



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 329 979**

51 Int. Cl.:
A61K 39/095 (2006.01)
C07K 14/22 (2006.01)
C12N 15/03 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02028655 .5**
96 Fecha de presentación : **23.08.1991**
97 Número de publicación de la solicitud: **1378245**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **07.01.2004**

54 Título: **Proteínas de unión de transferrina de *Neisseria gonorrhoeae* y *Neisseria meningitidis*. Su uso como vacuna.**

30 Prioridad: **23.08.1990 US 572187**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
03.12.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
03.12.2009

73 Titular/es:
**The University of North Carolina at Chapel Hill
300 Bynum Hall, Campus Box 4100
Chapel Hill, North Carolina 27599-4100, US**

72 Inventor/es: **Sparling, P. Frederick y
Cornelissen, Cynthia Nau**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Proteínas de unión de transferrina de *Neisseria gonorrhoeae* y *Neisseria meningitidis*. Su uso como vacuna.

5 La presente solicitud se dirige a las proteínas de unión de transferrina de *Neisseria gonorrhoeae* y *Neisseria meningitidis*, y a los fragmentos y análogos de reacción inmunológica cruzada de las mismas. La memoria se dirige además a anticuerpos dirigidos frente a tales proteínas, así como al uso de tales proteínas y anticuerpos en la detección de *N. gonorrhoeae* y *N. meningitidis*, y en el tratamiento de las enfermedades provocadas por *N. gonorrhoeae* y *N. meningitidis*. El ADN que codifica las proteínas de unión de transferrina recombinantes y las células que expresan tal
10 ADN también están englobados por la presente invención.

N. gonorrhoeae y *N. meningitidis* son dos patógenos del género *Neisseria* que son genéticamente similares, pero patológicamente diferentes. El hierro es un nutriente esencial para el crecimiento de *N. gonorrhoeae* y *N. meningitidis*, como lo es para muchas bacterias. A diferencia de la mayoría de las bacterias gram-negativas, *N. gonorrhoeae* y *N. meningitidis* no producen ni secretan los compuestos quelantes del hierro solubles de poco tamaño denominados sideróforos. Estas otras bacterias gram-negativas tienen receptores que son capaces de absorber el complejo de hierro-sideróforo.
15

En cambio, se cree que *N. gonorrhoeae* y *N. meningitidis* poseen proteínas de membrana que se unen con las glicoproteínas de unión con el hierro lactoferrina y transferrina, que están presentes en las secreciones exocrinas humanas y en el suero, respectivamente. Se cree que *N. gonorrhoeae* y *N. meningitidis* absorben el hierro en huéspedes humanos mediante la unión de la lactoferrina y la transferrina con estas proteínas de membrana de unión con la lactoferrina y la transferrina, i.e., receptores.
20

Se cree que la proteína de unión de lactoferrina de *N. meningitidis* es una proteína de la membrana celular exterior regulada por el hierro de 105 kD; véase Schryvers y Morris, *Infect. Immun.* 56, 1144-1149 (1988). Se ha publicado que la proteína de unión de transferrina de una cepa de *N. meningitidis* es una proteína de la membrana celular exterior regulada por el hierro de 71 kD, aunque se ha publicado que hay otras cepas que tienen proteínas de unión de transferrina con pesos moleculares de 75 kD-88 kD, 85 kD y 95 kD; véase Schryvers y Morris, *Mol. Microbiol.* 2, 281-288 (1988). Estos autores reconocen que los resultados de los diversos intentos por identificar la proteína de unión de transferrina de *N. meningitidis* no concuerdan entre sí. De hecho, se observó que las proteínas de 85 kD y 95 kD no eran necesarias para la función receptora de la transferrina en *N. meningitidis*; véase Dyer *et al.*, *Microbial Pathogenesis* 3, 351-363 (1987).
25
30

También ha sido de interés la capacidad de *N. gonorrhoeae* para asimilar el hierro. En una investigación, un ensayo de unión a puntos que implicaba el uso de membranas gonocócicas totales derivadas de células desarrolladas en condiciones deficientes en hierro sugirió la presencia de receptores separados para la lactoferrina y para la transferrina. No se determinaron el peso molecular ni otras propiedades de las proteínas de unión. Véase Lee y Schryvers, *Mol. Microbiol.* 2, 827-829 (1988). Por lo tanto, la identidad de las proteínas de unión en *N. gonorrhoeae* no ha sido establecida con anterioridad.
35
40

Las enfermedades provocadas por una infección gonocócica y meningocócica lo invaden todo y a menudo son graves. Se necesitan mejores procedimientos para prevenir, detectar y tratar enfermedades tales como la gonorrea, la meningitis y el choque séptico.
45

El crecimiento de *N. gonorrhoeae* y *N. meningitidis* en seres humanos se puede inhibir reduciendo la capacidad de estas células para absorber el hierro. Se podría realizar una reducción de la capacidad de las células gonocócicas y meningocócicas para asimilar el hierro en el torrente sanguíneo bloqueando la función receptora de la transferrina. Por ejemplo, podría bloquearse el receptor de la transferrina mediante anticuerpos frente al receptor. Para aumentar los anticuerpos frente al receptor, sin embargo, es necesario identificar al receptor para que pueda ser aislado.
50

Existe, por tanto, la necesidad de identificar, aislar y purificar las proteínas de unión de transferrina de *N. gonorrhoeae* y *N. meningitidis*. Se necesitan moléculas de ADN que codifiquen tales proteínas para producir proteínas de unión de transferrina recombinantes. Se necesitan anticuerpos frente a las proteínas de unión de transferrina para inhibir la función receptora de la transferrina. Se necesitan vacunas para prevenir y tratar las infecciones gonocócicas y meningocócicas. Se necesitan sondas de anticuerpo y ácido nucleico para detectar *N. gonorrhoeae* y *N. meningitidis*. El objeto de la presente invención es proporcionar tales proteínas, anticuerpos, moléculas de ADN y vacunas para detectar, prevenir y tratar las infecciones gonocócicas y meningocócicas.
55

Schryvers *et al.*, (1989) "Canadian Journal of Microbiology", vol. 35, n.º 5, 409-415 revelan un análisis comparativo de las proteínas de unión de transferrina y lactoferrina de la familia *Neisseriaceae*, incluyendo *Neisseria meningitidis* y *Neisseria gonorrhoeae*.
60

Griffiths *et al.*, (1990) *FEMS Microbiology Letters* vol. 57, n.º 1-2, 31-36 informan sobre la heterogeneidad antigénica y molecular de la proteína de unión de transferrina de *Neisseria meningitidis*. Informan que las cepas de *Neisseria meningitidis* estudiadas tienen una proteína de unión con un M_r de entre 78 kDa y 83 kDa o de aproximadamente 68 kDa.
65

Resumen de la invención

Un aspecto de la invención proporciona una composición de vacuna frente a la infección causada por *Neisseria* que comprende una cantidad eficaz de un polipéptido regulado por el hierro de *Neisseria gonorrhoeae* purificado que comprende un polipéptido de 100 kD de la cepa de *Neisseria gonorrhoeae* FA19, o fragmentos que producen anticuerpos neutralizantes, codificado por un ácido nucleico complementario al polinucleótido mostrado en la Fig 2a.

Otro aspecto más de la invención proporciona una composición de vacuna frente a la infección causada por *Neisseria* que comprende una cantidad eficaz de un polipéptido regulado por el hierro de *Neisseria meningitidis* purificado que comprende un polipéptido de 95 kD de la cepa de *Neisseria meningitidis* FAM20, o fragmentos que producen anticuerpos neutralizantes, codificado por un ácido nucleico complementario al polinucleótido mostrado en la Fig 5.

Otro aspecto más de la invención proporciona el uso de las composiciones de vacuna de la invención para la fabricación de un medicamento para inmunizar un mamífero frente a la infección por *Neisseria gonorrhoeae* o *Neisseria meningitidis*.

Otro aspecto más de la invención proporciona el uso de las composiciones de vacuna de la invención para la fabricación de un medicamento para inhibir el crecimiento de y/o matar a *Neisseria gonorrhoeae* o *Neisseria meningitidis*.

Éstos y otros objetivos, como será evidente para los expertos en la técnica, se han logrado proporcionando una proteína regulada por el hierro encontrada en las membranas exteriores de *Neisseria gonorrhoeae* o *Neisseria meningitidis*, proteína que está sustancialmente libre de:

(a) detergente;

(b) papel de nitrocelulosa/acetato de celulosa; y

(c) otras proteínas reguladas por el hierro de *Neisseria gonorrhoeae* y *Neisseria meningitidis*;

proteína que se puede aislar por medio de una columna de afinidad por la transferrina;

proteína que se une específicamente con los antiseros dirigidos frente a una proteína de la membrana celular exterior regulada por el hierro que tiene un peso molecular de aproximadamente 100 kD encontrada en *Neisseria gonorrhoeae*; y proteína que es importante en la función receptora de la transferrina de *Neisseria gonorrhoeae* o *Neisseria meningitidis*; y análogos de tales proteínas.

Se proporcionan además moléculas de ADN que expresan la proteína de unión de transferrina y sus análogos en una célula huésped. La proteína recombinante resultante también forma parte de la revelación.

También se proporcionan anticuerpos frente a las proteínas de unión de transferrina de la invención. Los anticuerpos inhiben el crecimiento de *N. gonorrhoeae* y/o *N. meningitidis*, y son útiles para controlar las infecciones de estos patógenos.

La invención incluye composiciones de vacuna que comprenden las proteínas de unión de transferrina y los análogos de tales proteínas, así como los procedimientos para inmunizar a un huésped frente a enfermedades gonocócicas y meningocócicas, tales como la gonorrea, la meningitis y el choque séptico, mediante la administración de tales vacunas. Se pueden usar los anticuerpos proporcionados en la inmunización pasiva para tratar enfermedades gonocócicas y meningocócicas.

Descripción de las figuras

La figura 1 muestra una secuencia de ADN parcial del gen de la proteína de 100 kD de la cepa gonocócica FA19 obtenida a partir de los insertos pUNCH401 y pUNCH402; véanse el ejemplo 6a y el ejemplo 7.

La figura 2A muestra la secuencia de un fragmento génico de la proteína de unión de transferrina de 100 kD en un inserto pUNCH403. Las letras mayúsculas indican la región de solapamiento entre los clones pUNCH401 y pUNCH402 (figura 1) y pUNCH403. El codón de inicio propuesto para la proteína de unión de transferrina gonocócica de 100 kD tiene lugar en el nucleótido 659. El sentido del marco de lectura abierto es opuesto al mostrado en la figura (i.e., del nucleótido 659 al nucleótido 1). Véase el ejemplo 8.

La figura 3 muestra las posiciones de las inserciones de transposones en el fragmento de la proteína de unión de transferrina gonocócica de 100 kD en pUNCH403 y los correspondientes fenotipos de sus respectivos mutantes. Los transposones (mTn3CAT) fueron insertados mediante mutagénesis lanzadera en *E. coli*. Se seleccionaron transformantes resistentes al cloranfenicol en FA19 para crear mutantes. Debajo de cada inserción de transposón (indicada mediante un triángulo invertido), el crecimiento sobre transferrina humana 2,5 uM (saturada al 25% con Fe) y la expresión de la proteína según lo analizado mediante transferencia Western se indican con + o -. El marco de lectura abierto, indicado con una flecha ondulada, se lee de derecha a izquierda (la misma orientación de la figura 2A) y co-

mienza con metionina, indicada con una M. Se encontró una secuencia de -10 típica (-10), pero no se pudo identificar la secuencia de -35 canónica. El crecimiento de tipo natural y la expresión de la proteína se muestran a la derecha bajo el encabezamiento de "No Tn".

La figura 4 muestra la estrategia para la clonación del gen de la proteína de unión de transferrina de 95 kD meningocócica. Se clonó el fragmento HincII/EcoRI de 1,3 kb de un banco de Zap Lambda II usando una sonda de anticuerpo. Se clonaron los fragmentos de 5,0 kb y 3,5 kb mostrados en la etapa 2 de un banco de ClaI parcial en pHSS6-GCU usando el fragmento de 1,3 kb como sonda. Se clonó el fragmento Hinc II de 3,5 kb de la etapa 3 de un banco de Zap Lambda II usando el fragmento EcoRI/ClaI de 3,5 kb de la etapa 2 como sonda. Los fragmentos de las etapas 1-3 se encajan según lo mostrado en el fragmento titulado "Cromosoma FAM20".

La figura 5 muestra la secuencia del fragmento Hinc II/EcoRI de 1,3 kb de la etapa 1 de la figura 4. El sitio de unión al ribosoma está subrayado. El codón de inicio ATC y la dirección de la transcripción se indican con la flecha. Véase el ejemplo 10.

La figura 6 muestra los resultados de los experimentos de mutagénesis de los transposones que implican al fragmento Hinc II/EcoRI de 1,3 kb de la etapa 1 de la figura 4. Véase el ejemplo 11.

Descripción detallada de la invención

Aislamiento de proteínas de bacterias

Se preparan proteínas de unión de transferrina a partir de las membranas de *N. gonorrhoeae* y *N. meningitidis*. Las membranas se pueden preparar mediante procedimientos conocidos en la técnica. El procedimiento descrito por Schryvers y Morris en *Infect. Immun.* 56, 1144-1149 (1988) es adecuado.

Las membranas se obtienen de células desarrolladas en un medio deficiente en hierro. El medio de crecimiento puede ser un medio de crecimiento estándar, tal como una base de medio GC (base de medio gonocócico) suministrada por Difco. Es posible convertir este medio en deficiente en hierro mediante la adición de agentes quelantes, tales como el ácido etilen-diamino-tetraacético (EDTA), ácido etilen-diamino-di-orto-hidroxifenil-acético (EDDA) o desferal (ciba Pharmaceuticals). Alternativamente, el medio de crecimiento puede ser un medio definido químicamente descrito por Mickelsen y Sparling (*Inf. Immun.* 33, 555-564 (1981)), que se haya vuelto deficiente en hierro mediante el tratamiento con el agente quelante Chelex-100 (Bio-Rad).

Cualquier cepa gonocócica y meningocócica que tenga una función receptora de la transferrina normal es útil en la presente invención. Tales cepas tienen generalmente un origen clínico o de otro tipo, tal como la Colección Americana de Cultivos Tipo, Bethesda, Maryland y el depósito de *Neisseria*, NAMRU, Universidad de California, Berkley.

Por ejemplo, la cepas gonocócica FA19, que se describe en McKenna *et al.*, *Infect. Immun.* 56, 785-791 (1988); FA248, que se describe en Biswas *et al.*, *J. Bacteriol.* 151, 77-82 (1979); y F62, que se describe en West y Sparling, *Infect. and Immun.* 47, 388-394 (1985) constituyen fuentes adecuadas de la proteína transferrina gonocócica. Las cepas meningocócicas FAM18 y FAM20 (Dyer *et al.*, *Microbial Pathogenesis* 3, 351-363 (1987)) y B16B6, grupo X y grupo W135 (Schryvers y Morris 56, 1144-1149 (1988)) son representativas de fuentes de proteína de unión de transferrina meningocócica.

Las proteínas que se unen con la transferrina se pueden aislar de otras proteínas de membrana de *N. gonorrhoeae* y *N. meningitidis* privadas de hierro con transferrina inmovilizada usando procedimientos de afinidad conocidos en la técnica; véase, Por ejemplo, Schryvers y Morris, *Infect. Immun.* 56, 1144-1149 (1988). Es preferible usar una variación de este procedimiento, que se describe en el ejemplo 2a, para resolver las proteínas de unión de transferrina de las proteínas de membrana gonocócicas y meningocócicas.

En síntesis, se aíslan membranas de células gonocócicas y meningocócicas privadas de hierro y se tratan con transferrina biotinilada. El complejo resultante es inmovilizado mediante, por ejemplo, el tratamiento del complejo con avidina- o estreptavidina-agarosa. Se lavan exhaustivamente los sedimentos de la resina de afinidad y se suspenden en tampón. Se separa el receptor de transferrina de la transferrina inmovilizada mediante, por ejemplo, calentamiento. Las proteínas se separan mediante, por ejemplo, electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS según el procedimiento de Laemmli, *Mature* 227, 680-685 (1970). Se resuelve una proteína que tiene un peso molecular de aproximadamente 100 kD, en lo sucesivo, proteína de 100 kD, de los gonococos. Se resuelve una proteína que tiene un peso molecular de aproximadamente 95 kD de los meningococos.

Identificación de proteínas

Se determinaron los pesos moleculares resolviendo bandas simples sobre electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS y comparando sus posiciones con las de los patrones conocidos. Los expertos en la técnica entienden que el procedimiento es exacto en un intervalo del 3-5%. Los pesos moleculares variaron ligeramente entre las determinaciones. El peso molecular de la proteína de los gonococos fue constante y repetidamente superior al de la de los meningococos, y varió de 97-100 kD.

La confirmación de que la proteína de unión de transferrina de 100 kD de *N. gonorrhoeae* es importante para la función receptora de la transferrina se obtuvo preparando cinco mutantes gonocócicos diferentes deficientes en actividad receptora de la transferrina. Se analizó cada mutante en cuanto a la presencia de la proteína de unión de transferrina de 100 kD mediante transferencia Western usando antisueros policlonales en conejos. En cada mutante, la cantidad de proteína de la membrana exterior de 100 kD fue mucho menor que la observada para las cepas gonocócicas de tipo natural. Otras cepas gonocócicas mutantes con una actividad receptora de la transferrina normal tenían niveles de tipo natural de la proteína de 100 kD en sus membranas.

Un experimento similar estableció que la proteína de 95 kD de los meningococos es importante para la función receptora de la transferrina. Se realizó un análisis de transferencia Western con antisueros dirigidos frente a la proteína de 100 kD de *N. gonorrhoeae*, que se descubrió que reaccionaba de forma cruzada con la proteína de 95 kD de *N. meningitidis*. De este modo, tanto en *N. gonorrhoeae* como en *N. meningitidis*, la falta de actividad receptora de la transferrina está correlacionada con la ausencia de las proteínas de 100 kD y de 95 kD, respectivamente.

Por lo tanto, en contra de las expectativas basadas en la técnica anterior, la proteína de la membrana exterior de 100 kD regulada por el hierro encontrada en *N. gonorrhoeae* es el receptor de la transferrina. La proteína de la membrana exterior de 95 kD regulada por el hierro encontrada en *N. meningitidis*, sorprendentemente, reacciona de forma cruzada con los antisueros dirigidos frente a la proteína de 100 kD encontrada en *N. gonorrhoeae*, y es el receptor de la transferrina de *N. meningitidis*. Los antisueros dirigidos en mamíferos, tales como conejos, ratones, cabras, monos y seres humanos, frente al receptor de la transferrina de *N. gonorrhoeae*, generalmente, reaccionan de forma cruzada con el receptor de la transferrina de *N. meningitidis*, y viceversa. Los anticuerpos monoclonales, generalmente, también reaccionan de forma cruzada con las proteínas de 95 kD y 100 kD.

Como se usa en la presente memoria, el receptor de la transferrina de *N. gonorrhoeae* y *N. meningitidis* incluye la proteína de la membrana exterior de 100 kD regulada por el hierro de *N. gonorrhoeae* y la proteína de la membrana exterior de 95 kD regulada por el hierro de *N. meningitidis*. Debería entenderse que estos receptores de la transferrina constituyen una clase de proteínas. La clase incluye, por ejemplo, las variaciones en la secuencia de aminoácidos que tienen lugar de manera natural en las diversas cepas de *N. gonorrhoeae* y *N. meningitidis*.

Las proteínas incluyen además análogos funcionales de los receptores de la transferrina de 100 kD o de 95 kD de *N. gonorrhoeae* o de *N. meningitidis*, respectivamente. Se considera que una proteína es un análogo funcional de otra proteína para una función específica, según lo descrito más adelante, cuando el análogo reacciona de forma inmunológicamente cruzada con y tiene la misma función que la otra proteína. El análogo puede ser, por ejemplo, un fragmento de la proteína, o un mutante por sustitución, adición o eliminación de la proteína.

Las proteínas y los análogos funcionales son esencialmente puros. A efectos de esta memoria, esencialmente puros significa que las proteínas y los análogos funcionales están libres del resto, excepto cantidades traza, de las proteínas reguladas por el hierro de *N. gonorrhoeae* y *N. meningitidis*, así como de los materiales usados durante el procedimiento de purificación. Las otras proteínas reguladas por el hierro de *N. gonorrhoeae* y *N. meningitidis* incluyen otras proteínas de unión de transferrina. Los materiales usados en el procedimiento de purificación incluyen detergentes, agentes de unión por afinidad y películas de separación. Los detergentes incluyen dodecil-sulfato de sodio y sarcosina. Los agentes de unión por afinidad incluyen agarosa, avidina-agarosa, estreptavidina-agarosa, biotina y proteínas biotiniladas, tales como transferrina biotinilada. Las películas de separación incluyen papel de nitrocelulosa y papel de nitrocelulosa/acetato de celulosa.

ADN recombinante

Se conocen procedimientos para aislar ADN una vez que la proteína ha sido aislada y purificada. Muchos de estos procedimientos se describen en Maniatis *et al.*, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press (1982). Se prefiere el procedimiento de inmuno-evaluación selectiva.

Por ejemplo, se aísla ADN cromosómico de una cepa gonocócica o meningocócica capaz de utilizar el hierro unido con la transferrina, tal como las descritas anteriormente, y se escinde en fragmentos de un tamaño adecuado mediante procedimientos estándar. Los procedimientos de escisión de ADN adecuados incluyen, por ejemplo, el tratamiento con ultrasonidos y el uso de endonucleasas de restricción. Un tamaño de fragmento medio adecuado es de aproximadamente 0,5-10 kpb.

Se añaden ligadores a los fragmentos y se unen los fragmentos resultantes en un vector adecuado. El ligador corresponde a un sitio de restricción dentro del vector. Los ligadores adecuados incluyen, por ejemplo, *EcoRI*, *PstI* y *BamHI*. Un vector adecuado es lambda-gt10. Se puede empaquetar el ADN unido con equipos comerciales, tales como un equipo fabricado por Promega.

Las proteínas del banco resultante se clonan y se expresan en un huésped adecuado, comúnmente, en *E. coli*. La clonación se realiza preferiblemente en un huésped de *E. coli* que porta las siguientes mutaciones: *mcrA*, *mcrB*, *mcrC*, *mrr*, *hsdS*, *hsdR* y *hsdM*. Algunas cepas de *E. coli* adecuadas incluyen DH5alphaMCR (BRL) y "SURE" (Stratagene).

Las placas que se obtienen son evaluadas selectivamente inmunológicamente mediante procedimientos conocidos en la técnica. Maniatis, Id. En el ejemplo 6 que se presenta más adelante, se describe un procedimiento adecuado. La

evaluación selectiva puede ser facilitada por el uso de un equipo de evaluación selectiva comercial, tal como el equipo de inmuno-evaluación selectiva Picoblue de Stratagene (La Jolla, CA) según el protocolo de Stratagene adjunto, que está disponible en Stratagene o en el historial de archivo de esta memoria.

Las placas que unen los antisueros específicos de la proteína de unión de transferrina se seleccionan de placas no reactivas y purificadas. Maniatis, Id. El ADN del fago purificado se aísla mediante procedimientos conocidos en la técnica. Los procedimientos adecuados incluyen, por ejemplo, precipitación en polietilenglicol, lisis de fagos y cromatografía de intercambio iónico, que pueden ser facilitados por el uso de un equipo fabricado por Qiagen (Studio City, CA).

El ADN obtenido se puede amplificar mediante procedimientos conocidos en la técnica. Un procedimiento adecuado es el procedimiento de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) descrito por Mullis *et al.* en la patente estadounidense n.º 4.683.195 y por Sambrook, Fritsch y Maniatis (eds) en "Molecular Cloning, A Laboratory Manual", Segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989). Es conveniente amplificar los clones de ADN en vectores lambda-gt11 usando oligómeros específicos de lambda-gt11 disponibles en New England Biolabs.

Los clones amplificados son insertados en vectores adecuados y secuenciados según los procedimientos conocidos en la técnica. Un procedimiento de secuenciación adecuado es el procedimiento de la terminación de cadenas didesoxi descrito por Sanger *et al.* en *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 74, 5463-5467 (1977).

Se conocen vectores y polimerasas adecuados para la secuenciación. Un vector adecuado es el vector Bluescript de Stratagene. Una polimerasa adecuada es la Sequenase (United States Biochemical Corp., Cleveland, OH).

En el procedimiento de inmuno-evaluación selectiva descrito anteriormente, habitualmente, es necesario evaluar selectivamente un gran número de placas para identificar los fragmentos con antisueros específicos de la proteína de unión de transferrina. Por ejemplo, en un experimento, se obtuvieron aproximadamente 500.000 placas de fragmentos de un cromosoma gonocócico (FA19). Se identificaron dos placas usando los antisueros frente a la proteína de unión de transferrina de 100 kD de *N. gonorrhoeae*. Se aisló un clon que tenía un tamaño de inserto de 323 pb (pUNCH401) de una placa, mientras que se aisló un clon con un tamaño de inserto de 483 pb (pUNCH402) de otra placa. Estas secuencias de ADN representan fragmentos de solapamiento del cromosoma FA19. La secuencia consenso de los dos fragmentos, incluyendo el solapamiento, se muestra como la figura 1. Los nucleótidos 75 a 323 representan las secuencias de solapamiento. Los nucleótidos 1 a 74 representan la secuencia de no solapamiento del fragmento de 323 pb. Los nucleótidos 324 a 558 representan la secuencia de no solapamiento del fragmento de 483 pb. El único marco de lectura abierto va en el sentido opuesto al mostrado en la figura 1 (i.e., del nucleótido 558 al nucleótido 1). Véase el ejemplo 6a.

Los fragmentos descritos anteriormente, o los sub-fragmentos de los mismos, se pueden usar como sondas para obtener más fragmentos del gen de la proteína de unión de transferrina. Mediante el uso de esta técnica, un fragmento *Clal* de 8 kb y un fragmento *HincII* de 3,2 kb del cromosoma FA19 se hibrida con los fragmentos de 323 y 483 pb. La figura 2B, se muestra un mapa de restricción del fragmento *HincII* de 3,2 kb. Los fragmentos obtenidos se pueden secuenciar. Véanse los ejemplos 7 y 8, y la figura 2A.

Mediante las prolongaciones adecuadas de los fragmentos, se secuencia todo el gen. Los límites de la secuencia codificante se determinan mediante procedimientos conocidos en la técnica, tales como mediante mutagénesis insercional. Véase el ejemplo 9. Se usan procedimientos similares para determinar la secuencia de la proteína de unión de transferrina meningocócica de 95 kD. Véanse los ejemplos 10 y 11, y las figuras 4-6.

Proteínas recombinantes

Las proteínas de la presente revelación se pueden producir por medio de tecnología de ADN recombinante. Los procedimientos adecuados para producir proteínas recombinantes a partir de ADN aislado se describen en Maniatis *et al.*, Id.

En síntesis, se puede expresar ADN que codifica las proteínas de unión de transferrina de la presente revelación, así como ADN que codifica sus análogos funcionales, usando una amplia variedad de células huésped y una amplia variedad de vectores. El huésped puede ser procariota o eucariota. El ADN se puede obtener de fuentes naturales y, opcionalmente, puede estar modificado. El ADN también puede ser sintetizado por completo o en parte.

El vector puede comprender segmentos de secuencias de ADN cromosómicas, no cromosómicas y sintéticas. Algunos vectores procariotas adecuados incluyen plásmidos de *E. coli*, tales como *colE1*, *pCR1*, *pHR322*, *cMB9* y *RP4*. Los vectores procariotas también incluyen derivados de ADN de fago, tales como del fago *M13* y de otros fagos de ADN monocatenarios filamentosos.

Hay disponibles vectores útiles en levadura. Un ejemplo adecuado es el plásmido 2u.

También se conocen vectores adecuados para su uso en células de mamífero. Tales vectores incluyen derivados conocidos del adenovirus SV-40, secuencias de ADN derivadas de retrovirus y vectores derivados de la combinación de plásmidos y ADN de fago.

Se conocen en la técnica otros vectores de expresión eucariotas (p. ej., P. J. Southern y P. Berg, *J. Mol. Appl. Genet.* 1, 327-341 (1982); S. Subramani *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* 1, 854-864 (1981); R. J. Kaufmann y P. A. Sharp, "Amplification And Expression Of Sequences Cotransfected with A Modular Dihydrofolate Reductase Complementary DNA Gene", *J. Mol. Biol.* 159, 601-621 (1982); R. J. Kaufmann y P. A. Sharp, *Mol. Cell. Biol.* 159, 601-664 (1982); S. I. Scahill *et al.*, "Expression And Characterization Of The Product Of A Human Immune Interferon DNA Gene In Chinese Hamster Ovary Cells", *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 80, 4654-4659 (1983); G. Urlaub y L. A. Chasin, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 77, 4216-4220, (1980).

Los huéspedes de expresión útiles incluyen huéspedes procariotas y eucariotas conocidos. Algunos huéspedes procariotas adecuados incluyen, por ejemplo, *E. coli*, tal como SG-936 de *E. coli*, HB 101 de *E. coli*, W3110 de *E. coli*, X1776 de *E. coli*, X2282 de *E. coli*, DHI de *E. coli* y MRCI de *E. coli*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, tales como *Bacillus subtilis* y *Streptomyces*. Las células eucariotas adecuadas incluyen levaduras y otros hongos, células de insecto y de animales, tales como las células COS y las células CHO, células humanas y células vegetales en cultivo tisular.

Los vectores de expresión útiles en la presente revelación contienen al menos una secuencia de control de la expresión que está unida operativamente con el gen de la proteína de unión de transferrina o un fragmento del mismo. Se inserta la secuencia control en el vector para controlar y regular la expresión de la secuencia de ADN clonada. Los ejemplos de secuencias de control de la expresión útiles son el sistema *lac*, el sistema *trp*, el sistema *tac*, el sistema *trc*, las regiones promotoras y operadoras principales del fago Lambda, la región control de la cubierta proteínica fd, los promotores glicolíticos de levadura, p. ej., el promotor de la 3-fosfoglicerato cinasa, los promotores de la fosfatasa ácida de levadura, p. ej., Pho5, los promotores de los factores de apareamiento alfa de la levadura y los promotores derivados de poliomias, adenovirus, retrovirus y virus de simio, p. ej., los promotores tempranos y tardíos de SV40 y otras secuencias conocidas por su control de la expresión de genes de células procariotas o eucariotas, y sus virus o combinaciones de los mismos.

Las proteínas de 100 kD o 95 kD se pueden purificar mediante procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, las proteínas de unión de transferrina o partes de las mismas pueden ser expresadas en forma de una proteína de fusión con una pareja de fusión apropiada. La pareja de fusión preferiblemente facilita la purificación y la identificación. Algunas parejas de fusión útiles incluyen la beta-galactosidasa (Gray, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 79, 6598 (1982)); *trpE* (Itakura *et al.*, *Science* 198, 1056 (1977)) y la proteína A (Uhlen *et al.*, *Gene* 23 369 (1983)). Por ejemplo, las proteínas de fusión que contienen beta-galactosidasa se pueden purificar mediante cromatografía de afinidad usando una columna de anticuerpos anti-beta-galactosidasa (Ullman, *Gene*. 29, 27-31 (1984)).

Opcionalmente, el ADN que codifica la proteína de fusión es diseñado genéticamente, tal que la proteína de fusión contiene un sitio escindible entre la proteína de unión de transferrina y la pareja de fusión. Ambos sitios escindibles química y enzimáticamente son conocidos en la técnica. Los ejemplos adecuados de sitios que son escindibles enzimáticamente incluyen sitios que son reconocidos específicamente y escindidos por la collagenasa (Keil *et al.*, *FEBS Letters* 56, 292-296 (1975)); la enterocinasa (Hopp *et al.*, *Biotechnology* 6, 1204-1210 (1988)); el factor Xa (Nagai *et al.*, *Methods Enzymol.* 153, 461-481 (1987)); la trombina (Eaton *et al.*, *Biochemistry* 25, 505 (1986)); y la glutatona S-transferasa (Johnson, *Nature* 338, 585 (1989); y Van Etten *et al.*, *Cell* 58, 669 (1989)). La collagenasa escinde entre la prolina y X en la secuencia Pro-X-Gly-Pro, en la que X es un aminoácido neutro. La enterocinasa escinde detrás de la lisina en la secuencia Asp-Asp-Asp-Asp-Lys. El factor Xa escinde detrás de la arginina en la secuencia Ile-Glu-Gly-Arg. La trombina escinde entre la arginina y la glicina en la secuencia Arg-Gly-Ser-Pro.

También se conocen agentes de escisión química específicos. Por ejemplo, el bromuro de cianógeno escinde en los residuos de metionina de las proteínas.

Alternativamente, las proteínas receptoras de la transferrina de 100 kD y 95 kD pueden ser sobre-expresadas detrás de un promotor inducible y purificadas mediante cromatografía de afinidad usando anticuerpos específicos de los receptores de la transferrina. Como otra alternativa, la proteína sobre-expresada se puede purificar usando una combinación de cromatografía de intercambio iónico, de exclusión por tamaños y de interacción hidrofoba usando procedimientos conocidos en la técnica. Estos y otros procedimientos adecuados están descritos por Marston, "The Purification of Eukaryotic Polypeptides Expressed in *E. coli* en DNA Cloning", D. M. Glover, Ed., Volumen III, IRL Press Ltd., Inglaterra, 1987.

Utilidad

Proteínas como sondas

La proteína de 100 kD de *N. gonorrhoeae*, la proteína de 95 kD de *N. meningitidis* y sus análogos funcionales son útiles en la detección y la prevención de enfermedades provocadas por la infección gonocócica y meningocócica.

Por ejemplo, se pueden marcar las proteínas y usarlas como sondas en inmunoanálisis estándar para detectar anticuerpos frente a las proteínas en muestras, tales como en los sueros u otros fluidos corporales de pacientes que estén siendo tratados de gonorrea, choque séptico o meningitis. En general, se incubaba una proteína según la reivindicación A, o un derivado funcional de tal proteína, con la muestra sospechosa de contener anticuerpos frente a la proteína. La proteína se marca bien antes, durante o después de la incubación. La detección de la proteína marcada unida con un anticuerpo en la muestra indica la presencia del anticuerpo. El anticuerpo está preferiblemente inmovilizado.

Los análisis adecuados para detectar anticuerpos con proteínas son conocidos en la técnica, tales como el protocolo de ELISA estándar descrito por R. H. Kenneth, "Enzyme-Linked Antibody Assay with Cells Attached to Polyvinyl Chloride Plates" en Kenneth *et al.*, Monoclonal Antibodies, Plenum Press, N.Y., página 376 (1981). En síntesis, se revisten las placas con una cantidad suficiente de una proteína antigénica para unir cantidades detectables del anticuerpo. Tras incubar las placas con el polipéptido, éstas se bloquean con un agente bloqueador adecuado, tal como, por ejemplo, suero de cabra normal al 10%. Se añade la muestra, tal como sueros de pacientes, y se valora para determinar el punto final. Se añaden simultáneamente controles positivos y negativos para cuantificar la cantidad de anticuerpo relevante presente en las muestras desconocidas. Tras la incubación, se sondan las muestras con Ig anti-humana de cabra conjugada con una enzima adecuada. La presencia de anticuerpos anti-proteína en la muestra se indica mediante la presencia de la enzima.

Para su uso en inmunoanálisis, la proteína se puede marcar con átomos y moléculas radiactivas o no radiactivas. Tales marcadores y procedimientos para conjugarlos con proteínas son conocidos en la técnica.

Algunos ejemplos de marcadores radiactivos útiles incluyen ^{32}P , ^{125}I , ^{131}I y ^3H . El uso de marcadores radiactivos se ha descrito en los documentos U.K. 2.034.323; U.S.4.358.535 y U.S.4.302.204.

Algunos ejemplos de marcadores no radiactivos incluyen enzimas, cromóforos, átomos y moléculas detectables mediante microscopía electrónica e iones metálicos detectables mediante sus propiedades magnéticas.

Algunos marcadores enzimáticos útiles incluyen enzimas que provocan un cambio detectable en un sustrato. Algunas enzimas útiles y sus sustratos incluyen, por ejemplo, peroxidasa de rábano picante (pirogalol y o-fenilendiamina), beta-galactosidasa (beta-D-galactopiranosido de fluoresceína) y fosfatasa alcalina (5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato/azul de nitro-tetrazolio). El uso de marcadores enzimáticos ha sido descrito en los documentos U.K. 2.019.404; EP 63.879 y mediante Rotman, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 47, 1981-1991 (1961).

Los cromóforos útiles incluyen, por ejemplo, moléculas fluorescentes, quimioluminiscentes y bioluminiscentes, así como colorantes. Algunos cromóforos específicos útiles en la presente invención incluyen, por ejemplo, fluoresceína, rodamina, rojo Texas, ficoeritrina, umbeliferona y luminol.

Tales marcadores pueden ser conjugados con la sonda mediante procedimientos que son conocidos en la técnica. Los marcadores pueden estar unidos directamente a través de un grupo funcional de la sonda. La sonda bien contiene o se puede hacer que contenga tal grupo funcional. Algunos ejemplos de grupos funcionales adecuados incluyen, por ejemplo, amino, carboxilo, sulfidrido, maleimida, isocianato e isotiocianato.

También es posible conjugar el marcador con la sonda por medio de un ligando unido con la sonda mediante un procedimiento descrito anteriormente y un receptor para ese ligando unido con el marcador. Cualquiera de las combinaciones de ligando-receptor conocidas es adecuada. Se prefiere la combinación de biotina-avidina.

Para su uso en inmunoanálisis, las proteínas pueden ser la proteína de 100 kD entera o la de 95 kD entera, o pueden ser análogos funcionales de las mismas. Los análogos funcionales de estas proteínas incluyen fragmentos y mutaciones por sustitución, adición y eliminación que no destruyen la capacidad de las proteínas para unirse con sus anticuerpos. Siempre y cuando las proteínas sean capaces de detectar anticuerpos específicos de las proteínas de unión de transferrina, éstas son útiles en la presente invención.

Proteínas en vacunas

Como las proteínas de unión de transferrina de la presente revelación son importantes para una función vital de *N. gonorrhoeae* y *N. meningitidis*, y se encuentran en las membranas exteriores, estas proteínas son útiles en vacunas para la prevención de enfermedades provocadas por infecciones por *Neisseria*, tales como la gonorrea, el choque séptico y la meningitis. A tal efecto, es necesario que la proteína produzca anticuerpos neutralizantes. Los anticuerpos neutralizantes son anticuerpos que inhiben significativamente el crecimiento de y/o matan a las células bacterianas *in vitro* o *in vivo*. El crecimiento de las bacterias es inhibido significativamente *in vivo* si la inhibición es suficiente para prevenir o reducir los síntomas de la enfermedad de un mamífero infectado con la enfermedad.

Las vacunas que comprenden la proteína de 100 kD o la de 95 kD, o análogos funcionales, como antígeno se pueden usar para inhibir el crecimiento de, o matar a, los gonococos o los meningococos según la invención. Los análogos funcionales de las proteínas de 100 kD y de 95 kD a tal efecto incluyen fragmentos y mutaciones por sustitución, adición o eliminación que producen anticuerpos neutralizantes en un huésped mamífero, tal como un huésped humano.

La presente invención incluye además composiciones de vacuna para inmunizar a mamíferos, incluyendo seres humanos, contra la infección por *N. gonorrhoeae* y *N. meningitidis*. Las vacunas comprenden el receptor de la transferrina de 100 kD de *N. gonorrhoeae* y/o el receptor de la transferrina de 95 kD de *N. meningitidis*, y adyuvantes farmacéuticamente aceptables. Las proteínas de 100 kD y de 95 kD se pueden ser sustituidas por análogos funcionales según lo descrito anteriormente.

La vacuna comprende el antígeno en un vehículo adecuado. La vacuna puede incluir adyuvantes, tales como péptidos de muramilo y linfocinas, tales como interferón, interleucina-1 e interleucina-6. El antígeno puede ser adsorbido sobre partículas adecuadas, tales como partículas de óxido de aluminio, o estar encapsulado en liposomas, según lo conocido en la técnica.

El antígeno también puede ser administrado en una cepa no virulenta de *Salmonella*, tal como *S. typhimurium*. Tales vacunas se pueden preparar mediante la clonación de ADN que comprende la parte activa de la proteína de unión de transferrina en la cepa de *Salmonella*, según lo conocido en la técnica; véase, por ejemplo, Curtiss *et al.*, *Vaccine* 6, 155-160 (1988) y Galan *et al.*, *Gene* 94, 29-35 (1990).

La invención incluye además procedimientos de inmunización de huéspedes mamíferos, incluyendo seres humanos, con las composiciones de vacuna descritas anteriormente. La vacuna se puede administrar a un mamífero mediante procedimientos conocidos en la técnica. Tales procedimientos incluyen, por ejemplo, la administración intravenosa, intraperitoneal, subcutánea o intramuscular.

La composición de vacuna puede contener la proteína de 100 kD entera o la proteína de 95 kD entera, pero contiene preferiblemente un fragmento no tóxico de la proteína de 100 kD o de la de 95 kD. Se sabe, por ejemplo, cómo producir fragmentos de proteínas antigénicas y cómo determinar aquellos fragmentos que contienen el sitio antigénico. La longitud del fragmento no es relevante, siempre y cuando el fragmento sea antigénico y no sea tóxico. Por lo tanto, el fragmento debería contener suficientes residuos de aminoácido como para definir el epítipo. Los procedimientos para aislar e identificar fragmentos antigénicos a partir de polipéptidos antigénicos conocidos están descritos por Salfeld *et al.* en *J. Virol.* 63, 798-808 (1989) y por Isola *et al.* en *J. Virol.* 63, 2325-2334 (1989).

Si el fragmento define el epítipo, pero es demasiado corto para ser antigénico, puede ser conjugado con una molécula transportadora. Algunas moléculas transportadoras adecuadas incluyen la hemocianina de lapa californiana y la albúmina de suero bovino. La conjugación se puede llevar a cabo mediante procedimientos conocidos en la técnica. Uno de tales procedimientos consiste en combinar un residuo de cisteína del fragmento con un residuo de cisteína de la molécula transportadora.

Anticuerpos para tratamiento

Además, la revelación incluye el aislamiento de anticuerpos neutralizantes que reconocen y se unen específicamente con las proteínas y los análogos funcionales de la invención. Los anticuerpos pueden ser policlonales o monoclonales. Las definiciones de los anticuerpos neutralizantes y los análogos funcionales usados en combinación con las vacunas (véase la descripción anterior) se aplican también a la producción de anticuerpos neutralizantes.

Los anticuerpos policlonales son aislados de mamíferos a los que se ha inoculado la proteína o el análogo funcional según los procedimientos conocidos en la técnica. Los anticuerpos monoclonales se pueden producir mediante procedimientos conocidos en la técnica. Estos procedimientos incluyen el procedimiento inmunológico de Kohler y Milstein, *Nature* 256, 495-497 (1975) y el procedimiento de ADN recombinante descrito por Huse *et al.* en *Science* 246, 1275-1281 (1989).

La revelación también incluye procedimientos para el tratamiento de mamíferos, incluyendo seres humanos, que padecen enfermedades provocadas por *N. gonorrhoeae* o *N. meningitidis* mediante la administración a tales mamíferos de una cantidad eficaz de los anticuerpos neutralizantes de la invención. La administración puede ser mediante los mismos procedimientos descritos anteriormente para la administración de vacunas.

Anticuerpos como sondas

Las proteínas de unión de transferrina y los análogos funcionales de la revelación también se pueden usar para producir anticuerpos para usarlos como sondas para detectar la presencia de *Neisseria gonorrhoeae* y *Neisseria meningitidis* en una muestra. Los anticuerpos pueden ser policlonales o monoclonales. A tal efecto, los análogos funcionales incluyen fragmentos y mutaciones por sustitución, adición y eliminación de la proteína de 100 kD o de la proteína de 95 kD, siempre y cuando los análogos también produzcan anticuerpos capaces de detectar la presencia de la proteína de 100 kD o de la de 95 kD. La muestra puede ser, por ejemplo, un fluido corporal de un mamífero, incluyendo un ser humano, sospechoso de estar infectado con *N. gonorrhoeae* o *N. meningitidis*.

Los análisis para detectar la presencia de proteínas con anticuerpos han sido descritos previamente, y siguen formatos conocidos, tales como los formatos de transferencia y de ELISA estándar. Estos formatos están basados normalmente en incubar un anticuerpo para una muestra sospechosa de contener la proteína de 100 kD o la de 95 kD, y detectar la presencia de un complejo entre el anticuerpo y la proteína. El anticuerpo se marca bien antes, durante o después de la etapa de incubación. La proteína se inmoviliza preferiblemente antes de la detección. La inmovilización se puede realizar uniando directamente la proteína con una superficie sólida, tal como un pocillo de microvaloración, o uniando la proteína con anticuerpos inmovilizados.

Cuando se usan como sondas, los anticuerpos son marcados normalmente mediante procedimientos conocidos en la técnica. Los mismo marcadores útiles para las proteínas (véase descripción anterior) también son útiles para los anticuerpos. Han sido descritos procedimientos para marcar anticuerpos, por ejemplo, por Hunter y Greenwood en

ES 2 329 979 T3

Nature 144, 945 (1962) y por David *et al.* en *Biochemistry* 13, 1014-1021 (1974). Se han descrito otros procedimientos para marcar anticuerpos en las patentes estadounidenses n.º 3.940.475 y 3.645.090.

Moléculas de ácido nucleico como sondas

Se pueden usar moléculas de ácido nucleico que codifican la proteína de 100 kD, la proteína de 95 kD o fragmentos de la proteína de 100 kD o de la de 95 kD que tengan secuencias únicas para detectar la presencia de *N. gonorrhoeae* o *N. meningitidis*. Las moléculas de ácido nucleico pueden ser ARN o ADN.

Los procedimientos para determinar si una sonda de molécula de ácido nucleico reconoce una molécula de ácido nucleico específica en una muestra son conocidos en la técnica. Generalmente, se prepara una sonda marcada que es complementaria a una secuencia de ácido nucleico sospechosa de estar en una muestra. Preferiblemente, la molécula de ácido nucleico diana es inmovilizada. La presencia de sonda hibridada con la molécula de ácido nucleico diana indica la presencia de la molécula de ácido nucleico en la muestra. Hay ejemplos de procedimientos adecuados descritos por Dallas *et al.* en "The Characterization of an *Escherichia Coli* Plasmid Determinant that Encodes for the Production of a Heat-labile Enterotoxin", en K. N. Timmis y A. Puehler, eds, *Plasmids of Medical, Environmental, and Commercial Importance*, Elsevier/North-Holland Publishing Co., Amsterdam, páginas 113-122 (1975); Grunstein y Hogness en *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 72, 3961-3965 (1975); Palva *et al.* en la patente estadounidense n.º 4.731.325, que está concedida a Orion-yhtymä, Espoo, Finlandia; Mullis *et al.* en la patente estadounidense n.º 4.683.195, que está concedida a Cetus Corporation, Emeryville, California; Schneider *et al.* en la patente estadounidense n.º 4.882.269, que está concedida a la Universidad de Princeton, y Segev en la solicitud vía PCT WO 90/01069. ImClone Systems Inc., New York City, tiene la licencia de tanto la patente de Schneider *et al.*, como de la solicitud de Segev.

Las sondas descritas anteriormente están marcadas según los procedimientos conocidos en la técnica. Los procedimientos para marcar sondas de oligonucleótido han sido descritos, por ejemplo, por Leary *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* (1983) 80:4045; Renz y Kurz, *Nucl. Acids Res.* (1984) 12:3435; Richardson y Gumpert, *Nucl. Acids Res.* (1983) 11:6167; Smith *et al.*, *Nucl. Acids Res.* (1985) 13:2399; y Meinkoth y Wahl, *Anal. Biochem.* (1984) 138:267.

Ejemplos

1. Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

Se pasa la cepa gonocócica FA19 de la solución madre una vez sobre base de agar de GC y luego se usa para inocular matraces que contienen 1 litro de caldo de GC hasta una densidad inicial de 20 UK (unidades de Klett). Se desarrolla el cultivo con CO₂ al 5% a 37°C, con una agitación vigorosa hasta alcanzar una densidad de 40 UK, momento en el que se añade el quelante desferal hasta una concentración final de 50 µM. Se recogen las células 4 horas después de la adición.

Se prepara la cepa meningocócica FAM20 del mismo modo que la cepa gonocócica FA19, a excepción del uso de CDM tratado con Chelex en lugar de la base de GC y desferal.

2a. Purificación por afinidad de la proteína de unión de transferrina gonocócica

Los procedimientos usados para la preparación de membranas, y el aislamiento y la purificación de la proteína de unión de transferrina gonocócica son similares al de Schryvers y Morris *Infect. and Immun.* 56, 1144-1149 (1988) para la preparación de la proteína de unión de lactoferrina meningocócica. Se introducen las siguientes modificaciones del procedimiento de Schryvers y Morris. Se mezclan 625 µg de la transferrina biotinilada (preparada mediante el procedimiento de Schryvers usando Biotina-S-S-NHS de Pierce como reactivo de biotinilación) con 25 mg de proteína de membrana total de la cepa gonocócica FA19 en 25 ml de NaCl 100 mM/Tris 50 mM, pH 8,0. Se incuba la mezcla a temperatura ambiente durante 1 hora con una agitación suave. Se nodulizan las membranas a 17.000 x g durante 10 minutos. Se vuelven a suspender los nódulos en 25 ml de NaCl 100 mM/Tris 50 mM, pH 8,0, siguiendo con la adición de Na₂EDTA hasta una concentración final de 10 mM y *N*-lauroil-sarcosina hasta una concentración final del 0,75%. Se disuelven las membranas durante 10 minutos a temperatura ambiente con agitación. Se añaden 2,5 ml de estreptavidina-agarosa (Sigma) y se permite la unión durante 1 hora a temperatura ambiente. Se centrifuga la resina a 3.000 x g durante 5 minutos, se retira el sobrenadante y se lava la resina dos veces en NaCl 1M/Tris 50 mM, pH 8,0 con EDTA 5 mM y *N*-lauroil-sarcosina al 0,5%, y luego dos veces en NaCl 1M/Tris 50 mM, pH 8,0 sin adiciones. Se eluye la proteína de la matriz con *N*-lauroil-sarcosina al 0,45% y beta-mercaptoetanol 125 mM en NaCl 1M/Tris 50 mM, pH 8,0.

2b. Purificación por afinidad de la proteína de unión de transferrina meningocócica

Se repite el procedimiento del ejemplo 2a, a excepción de que la cepa meningocócica FAM20 sustituye a la cepa gonocócica FA19.

3a. Aislamiento de la proteína de unión de transferrina gonocócica

Se concentra el eluato de la preparación por afinidad (ejemplo 2a) usando concentradores Amicon (corte a 30.000 MW). Se disuelve la preparación de proteína concentrada resultante en glicerol al 20%; SDS al 4%; Tris 130 mM,

ES 2 329 979 T3

pH 8,0; 10 ug/ml de azul de bromofenol, y se separa sobre un gel de poliacrilamida-SDS al 7,5% según el procedimiento de Laemmli, *Nature*, 227, 680-685 (1970). Se tiñe el gel con azul brillante de Coomassie para visualizar las proteínas. Se resuelven dos especies proteicas como bandas simples mediante este procedimiento. La transferrina tiene un peso molecular de aproximadamente 80 kD. La proteína de unión de transferrina tiene un peso molecular de aproximadamente 100 kD. Se separa, se liofiliza y se macera la banda de la proteína de 100 kD.

3b. Aislamiento de la proteína de unión de transferrina meningocócica

Se repite el procedimiento del ejemplo 3A, a excepción de que el eluato del ejemplo 2b sustituye al eluato del ejemplo 2a.

4. Antiseros frente a la proteína de unión de transferrina

Se vuelven a suspender por separado los polvos finos resultantes de los ejemplos 3a y 3b en solución salina, se mezclan con el mismo volumen de adyuvante de Freund (completo para la primera inyección; incompleto para las inyecciones posteriores) y se inyectan en conejos hembra blancos de Nueva Inglaterra. Las inyecciones se aplican cada dos semanas. Es posible detectar el anticuerpo frente a la proteína de 100 kD dos semanas después de la tercera inyección mediante transferencia Western frente a proteína de unión de transferrina purificada.

5a. Banco de expresión en Lambda-gt11 de ADN gonocócico

Se aísla ADN cromosómico de la cepa gonocócica FA19 según Seifert *et al.*, *J. Bacteriol.* 172, 40-46 (1990) y se somete a un tratamiento de ultrasonidos mediante procedimientos estándar (Maniatis *et al.*, 1982) para producir un fragmento con un tamaño medio de 500 pb. Se añaden ligadores *EcoRI* y se unen los fragmentos resultantes en ADN de Lambda-gt11 digerido por *EcoRI*. El ADN unido se empaqueta usando un equipo fabricado por Promega.

5b. Banco de expresión en Lambda-gt11 de ADN meningocócico

Se aísla ADN cromosómico de la cepa meningocócica FAM20 según Seifert *et al.*, *J. Bacteriol.*, 172, 40-46 (1990) y se digiere con la endonucleasa de restricción *HincII*. Se añaden ligadores *EcoRI*, y se digiere la molécula de ADN resultante con *EcoRI* y se une en Lambda-Zap digerido por *EcoRI* (Stratagene). El ADN unido se empaqueta usando un equipo fabricado por Promega.

6a. Inmuno-evaluación selectiva del banco de expresión

Se evalúan selectivamente aproximadamente 500.000 placas obtenidas del banco de los ejemplos 5a y 5b mediante el procedimiento de inmuno-evaluación selectiva descrito en el protocolo de Stratagene que acompaña al equipo de inmuno-evaluación selectiva Picoblue. En síntesis, se absorben los antiseros primarios con lisado de *E. coli*/fago disponible en Stratagene (La Jolla, CA) según su protocolo. Se emplazan aproximadamente 5×10^4 u.f.p. (unidades formadoras de placa) en la cepa huésped de *E. coli* Y1090. Se colocan sobre las placas filtros de nitrocelulosa empapados en isopropil-tiogalactosidasa (IPTG) 10 mM tras 3-4 horas de incubación a 42°C. Entonces se incuban las placas durante una noche tras lo que se retiran los filtros, se lavan en solución salina tamponada de Tris y Tween-20 al 0,05% (TBST) y se bloquean durante una hora en solución salina tamponada de Tris y albúmina de suero bovino al 5%. Entonces se incuban los filtros con una dilución 1:200 del anticuerpo primario absorbido durante una hora. Tras la incubación con el anticuerpo primario, se lavan los filtros exhaustivamente con TBST y luego se incuban con el anticuerpo secundario (dilución 1:3.000 de anticuerpo de cabra anti-conejo conjugado con fosfatasa alcalina, adquirido en Bio-Rad) durante una hora. Entonces se lavan los filtros exhaustivamente con TBST y finalmente se incuban en 0,3 mg/ml de azul de nitro-tetrazolio (NBT); 0,15 mg/ml de 5-bromo-4-cloro-3-indoilo-fosfato (BCIP); Tris 100 mM, pH 9,8; NaCl 100 mM, MgCl₂ 5 mM hasta que se desarrolla suficiente color.

Se recogen y se purifican del resto de placas no reactivas las placas que unen los antiseros específicos de la proteína de unión de transferrina. Se aísla el ADN de fago purificado y se purifica usando cromatografía de intercambio aniónico (columna adquirida en Qiagen, Studio City, CA).

6b. Evaluación selectiva del banco de expresión son sondas de ADN

Las placas obtenidas del banco de los ejemplos 5a y 5b también son evaluadas selectivamente usando sondas de ADN marcadas. Se marca no radiactivamente el oligómero TfBP1, 2, 3 ó 5 usando digoxigenin-11-dUTP y un equipo de terminación del ADN, ambos fabricados por Boehringer Mannheim Biochemicals (BMB). Las secuencias de los oligómeros son:

TfBP1: GAG CCC GCC AAT GCG CCG CT

TfBP2: AGC GGC GCA TTG GCG GGC TC

TfBP3: GGG GCG CAT CGG CGG TGC GG

TfBP5: AAA ACA GTT GGA TAC CAT AC

Los protocolos para el marcaje y la detección del ADN están disponibles en BMB con el equipo de marcaje y detección de ADN no radiactivo Genius. Alternativamente, se marcan radiactivamente los mismos oligómeros con alfa-³²P-dCTP y el equipo de terminación del ADN de BMB usando técnicas estándar (Maniatis *et al.*, 1982).

5 7. Amplificación y secuenciación de ADN

El ADN obtenido en el ejemplo 5 ó 6 es amplificado mediante la técnica de PCR (Sambrook *et al.*, (eds), "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", segunda edición. Cold Spring Harbor Press (1989)) usando oligómeros específicos de Lambda-gt11. Se clonan los insertos así amplificados en vectores Bluescript (Stratagene) usando técnicas estándar (Maniatis *et al.*, 1982) y se secuencian mediante el procedimiento de terminación de cadenas didesoxi de Sanger *et al.*,
10 *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 74, 5463-5467 (1977) usando Sequenase (United States Biochemical Corp., Cleveland, OH).

15 8. Otra secuencia del gen de la proteína de unión de transferrina de 100 kD de la cepa gonocócica FA19

Usando los procedimientos generales de los ejemplos 6 y 7, se identifica un fragmento *Sau3AI* cromosómico de aproximadamente 1,0 kpb. Este fragmento se clona en el sitio *BamHI* del vector pHSS6-GCU (Elkins *et al.*, v. *Bacteriol.* 173, 3911-3913 (1991). (La designación GCU indica que una secuencia de 10 pb, conocida como la secuencia de absorción gonocócica, está incluida en el vector). Se sabe que esta secuencia media la absorción específica de una especie del ADN en el gonococo (Elkins *et al.*, *Id.*). La cepa huésped para esta clonación fue HB101. El clon resultante se conoce como pUNCH 403.

Se secuencian el inserto de pUNCH 403 en su totalidad usando moldes bicatenarios preparados según el procedimiento descrito por Kraft *et al.* en *Biotechniques* 6, 554-556 (1988). La secuencia es determinada por medio del procedimiento didesoxi de Sanger usando SequenaseTM (United States Biochemicals). En la figura 2A, se muestra la secuencia del fragmento *Sau3AI* de pUNCH 403. La secuencia de la figura 2A de los nucleótidos 1-558 representa el solapamiento entre pUNCH 401 y pUNCH 402 (figura 1) y pUNCH 403 (figura 2A). El marco de lectura abierto está desde el nucleótido 659 al nucleótido 1. De este modo, el codón que comienza en el nucleótido 69 (de la cadena complementaria a la mostrada en la figura 2A), que codificaría un residuo de metionina, es el extremo 5' del gen.

30 9. Pruebas sobre la estructura y la función de la proteína de unión de transferrina de 100 kD

Para determinar el efecto de la desactivación del gen de la proteína de unión de transferrina de 100 kD, se aislaron inserciones de transposones a lo largo del inserto de pUNCH403 según el protocolo descrito en Seifert *et al.* en "Genetic Engineering, Principles and Methods", Setlow, J.K. y Holleander, A., eds., Plenum Press, N.Y., Vol. 8, páginas 123-134. Se insertan transposones mTn3CAT mediante mutagénesis lanzadera en *E. coli* y luego se seleccionan transformantes resistentes al cloranfenicol de FA19 para crear mutantes. Los transposones mTn3CAT son denominados por Seifert *et al.* como m-Tn3(Cm). Entonces se clasifican los mutantes en cuanto a su capacidad para crecer sobre transferrina como su única fuente de hierro y su capacidad para expresar la proteína de 100 kD según lo analizado mediante transferencia Western. Los resultados de ese experimento se muestran en la figura 3. Los transposones de las posiciones designadas con una "T", 44, 37 y 24 destruyen tanto la expresión de la proteína de 100 kD como su capacidad para crecer sobre transferrina. Sin embargo, el transposón de la posición "A" permitió algún crecimiento sobre transferrina y la expresión de alguna proteína de unión de transferrina de longitud nativa detectable. Estos resultados confirman la hipótesis de que el gen estructural que codifica la proteína de 100 kD comienza en la posición 659 (véase la figura 2A), pues la inserción secuencia arriba de este punto permite la expresión de la proteína de longitud de tipo natural. El hecho de que la expresión no se detecte a niveles de tipo natural en el mutante "A" indica que la región secuencia arriba del codón de inicio putativo es importante para la regulación del gen que codifica la proteína de 100 kD.

50 10. Construcción y evaluación selectiva del banco genómico meningocócico

Se clonó el gen de la proteína de unión de transferrina meningocócica de 95 kD en tres etapas. En la primera etapa, con el uso de antisuero gonocócico, se identificó un fragmento *HincII/EcoRI* de 1,3 kb de un banco de Lambda Zap II (véase la figura 4). En la figura 5, se proporciona la secuencia de este fragmento. El codón de inicio putativo está indicado por una flecha que también muestra el sentido de la transcripción. El sitio de unión al ribosoma anterior está subrayado. El fragmento de 1,3 kb contiene aproximadamente 500 bp del gen estructural de la proteína de 95 kD. Este clon se hibridó con un solo fragmento *Clal* de 5 kb en el cromosoma de la cepa meningocócica FAM20. Se construyó un banco de *Clal* de 5 kb parciales en el vector pHSS6-GCU (según lo descrito en el ejemplo 8), y se clonó un fragmento *Clal* de 5 kb usando el fragmento de 1,3 kb como sonda. El mapeado de la restricción parcial de este fragmento *Clal* sugirió que este fragmento no codifica el gen estructural completo. Por lo tanto, en la etapa 3, se usó un fragmento *clal/EcoRI* de 3,5 kb (generado a partir del fragmento *Clal* de 5 kb obtenido en la etapa 2) como sonda, dando como resultado la clonación del fragmento *HincII* adyacente del banco de Lambda Zap II (Stratagene). Este fragmento *HincII* es de un tamaño de aproximadamente 3,5 kb y, probablemente, codifica el resto del gen estructural de la proteína de 95 kD. Este fragmento *HincII* de 3,5 kb es secuenciado mediante la generación de eliminaciones unidireccionales usando exonucleasas III y VII según lo descrito por E. Ozkaynak y S.D. Putney en *Biotechniques* 5, 770 (1987).

11. *Pruebas sobre la estructura y la función de la proteína de unión de transferrina de 95 kD*

Se usó el fragmento *HincII/EcoRI* de 1,3 kb para mutagenizar el gen de la proteína de 95 kD meningocócica. Se empleó el mismo procedimiento de mutagénesis lanzadera descrito en el ejemplo 9, a excepción de que en lugar de los transposones mTn3CAT, se introdujeron transposones mTn3erm en el clon de 1,3 kb. Los transposones mTn3erm se crearon mediante la modificación de los transposones mTn3CAT descritos en el ejemplo 9 para conferirles resistencia a la eritromicina. Esta modificación permite la selección de transformantes meningocócicos resistentes a la eritromicina. Estos transformantes fueron evaluados selectivamente en cuanto a su capacidad para crecer sobre placas de transferrina según lo descrito en el ejemplo 9. Los resultados de estos experimentos de mutagénesis se muestran detalladamente en la figura 6. Mientras que las inserciones 1 y 2 de mTn3erm inhibieron completamente la expresión de la proteína de 95 kD y la capacidad de los clones para crecer sobre placas de transferrina, las inserciones 3 y 4 de mTn3erm presentaron algún crecimiento sobre transferrina y mostraron alguna cantidad de proteína de 95 kD en transferencias Western. Basándose en los datos de secuenciación y de mutagénesis, parece que las inserciones 1 y 2 de mTn3erm están en el gen estructural y en la región promotora, respectivamente, mientras que las inserciones 3 y 4 parecen estar en una región secuencia arriba que podría estar implicada en la regulación positiva de la expresión.

Referencias complementarias

La invención según lo reivindicado es posible según la memoria y las referencias y los materiales iniciales de fácil acceso. No obstante, las siguientes líneas celulares fueron depositadas en la Colección Americana de Cultivos Tipo Bethesda, Maryland, el 16 de julio de 1990 para facilitar la elaboración y el uso de la invención:

Línea celular meningocócica FAM18 (número de acceso de la ATCC: 55071)

Línea celular meningocócica FAM20 (número de acceso de la ATCC: 55072)

Línea celular gonocócica FA19 (número de acceso de la ATCC: 55073)

Además, los siguientes folletos que contienen los protocolos y la información útiles están disponibles en el historial de archivo de esta memoria: "Predigested Lambda Zap/Eco RI Cloning Kit Instruction Manual", Stratagene, La Jolla, California (20 de noviembre de 1987);

"Gigapack Plus" (para el empaquetamiento de fagos Lambda recombinantes), Stratagene, La Jolla, California (25 de abril de 1988);

"picoBlue Immunoscreening Kit Instruction Manual," Stratagene, La Jolla, California (19 de mayo de 1989); y

"Genius Nonradioactive DNA Labeling and Detection Kit," Boehringer Mannheim Biochemicals, Indianapolis, Indiana (enero, 1989).

REIVINDICACIONES

1. Una composición de vacuna frente a la infección causada por *Neisseria* que comprende una cantidad eficaz de un polipéptido regulado por el hierro de *Neisseria gonorrhoeae* purificado que comprende un polipéptido de 100 kD de la cepa de *Neisseria gonorrhoeae* FA19, o fragmentos que producen anticuerpos neutralizantes, codificado por un ácido nucleico complementario al polinucleótido mostrado en la Fig 2a.
2. Una composición de vacuna frente a la infección causada por *Neisseria* que comprende una cantidad eficaz de un polipéptido regulado por el hierro de *Neisseria meningitidis* purificado que comprende un polipéptido de 95 kD de la cepa de *Neisseria meningitidis* FAM20, o fragmentos que producen anticuerpos neutralizantes, codificado por el polinucleótido mostrado en la Fig 5.
3. La composición de vacuna de la reivindicación 2, composición que comprende además una cantidad eficaz de un polipéptido regulado por el hierro de *Neisseria gonorrhoeae* purificado que comprende un polipéptido regulado por el hierro de 100 kD de la cepa de *Neisseria gonorrhoeae* FA19, o fragmentos que producen anticuerpos neutralizantes, codificado por un ácido nucleico complementario al polinucleótido mostrado en la fig. 2a.
4. La composición de vacuna de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, composición que comprende además un adyuvante farmacéuticamente aceptable.
5. La composición de vacuna de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en la que el polipéptido purificado es un polipéptido recombinante purificado.
6. La composición de vacuna de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en la que el polipéptido purificado es capaz de producir anticuerpos neutralizantes en un huésped mamífero, anticuerpos que inhiben significativamente el crecimiento de y/o matan a *Neisseria gonorrhoeae* o *Neisseria meningitidis*.

FIGURA 1

```

1  AGCAAAGCCT CCGCACCGCC GATGCGCCCC GCCAGCGCGA TGGATTGGGT
51  AAGCCCCCGG TTTTGTCCGG AATAGGCGGT TTTACTCTGA ATGCCCCACT
101 GCGTGCCTTC CCCGATAACA TCGTCGGCGG TTTTGGTTTG AAATGCGACC
151 GAGCCCGCCA ATGCGCGCGT GCCTTGTTTCG ACCGAGTTTG AGCCTTTGCT
201 GATTTCGACA GCCTTGACGT TCTCATACTC GATTTCATTG ATTGCGCCGC
251 TGCTGCCCGC CGTCCTCGTC CCGCCCAATG CCGCCTGCGC GTGTAGGACT
301 GTATTTGCGC CAAGCCGTCC ACCGTCAAGG AGACGCGGTT TTTGTCCATA
351 CCGCGTATCG AGTAGCCCGA GCTTGCGCCG CGCCCCTGTT CGACGACGGC
401 GATGCCGGGG TCGTAACGCG TCAGGTCGCG GATGTCGAGT ACCTGTTTCT
451 TGCTGGAGGG TGTCGGCGGT TTTGACCAAT TTGCCCAAAC CGGTACTTTC
501 GTTATCGCGG CGGGTTTTCT GTTTTTTGGC TTTTACCTGT ATGGTATCCA
551 ACTGTTTT

```

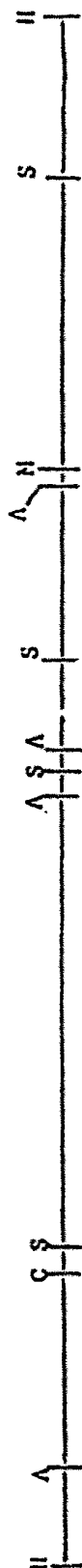
FIGURA 2A

```

1  AGCAAAGCCT CCGCACCGCC GATGCGCCCC GCCAGCGCGA TGGATTGGGT
51  AAGCCCCCGG TTTTGTCCGG AATAGGCGGT TTTACTCTGA ATGCCCCACT
101 GCCTGCCTTC CCCGATAACA TCGTCGGCGG TTTTGGTTTG AAATGCGACC
151 GAGCCCCGCA ATGCGCCGCT GCCTTGTTTCG ACCGAGTTTG AGCCTTTGCT
201 GATTTGACAA GCCTTGACGT TCTCATACTC GATTTTCATTG ATTGCGCCGC
251 TGCTGCCCCG CGTCCTCGTC CCGCCCAATG CCGCCTGCGC GTGTAGGACT
301 GTATTTGCGC CAAGCCGTCC ACCGTCAAGG AGACGCGGTT TTTGTCCATA
351 CCGCGTATCG AGTAGCCCGA GCTTGCGCCG CGCCCCTGTT CGACGACGGC
401 GATGCCGGGG TCGTAACGCG TCAGGTCGCG GATGTCGAGT ACCTGTTTCT
451 TGCTGGAGGG TGTCGGCGGT TTTGACCAAT TTGCCCAAAC CGGTTACTTC
501 GTTATCGCGG CGGGTTTTCT GTTTTTTGGC TTTTACCTGT ATGGTATCCA
551 ACTGTTTTTc ctgtgcttgt ccggcttgca ctttttctgc ataaagcgggc
601 agcgcagtc ttaaagacag gcataaaaata tttaatcgga acaaatgttg
651 ctgttgcata gtgtttccct aatcttcgct ttcagacgga atcggaaggc
701 acgatgccgt ctgaagcctt attctcgatt gttgttcggc agccgtgctt
751 atttcacaag cttttggcgt ttcgcaccga atacgacagt tgcactgctt
801 gctgaatttc cattgccgga ttcaactgtt gcatttttctg tttgttcatt
851 gcccggatag gcaaaccatc cgcccaactc ttcggcggtt gccccgtaaa
901 aaccgcccctg cacttcgg

```


FIGURA 2B



A=Aval, C=Clal, H=HincII, M=MluI, S=Snu3Al

200 h.p

FIGURA 3

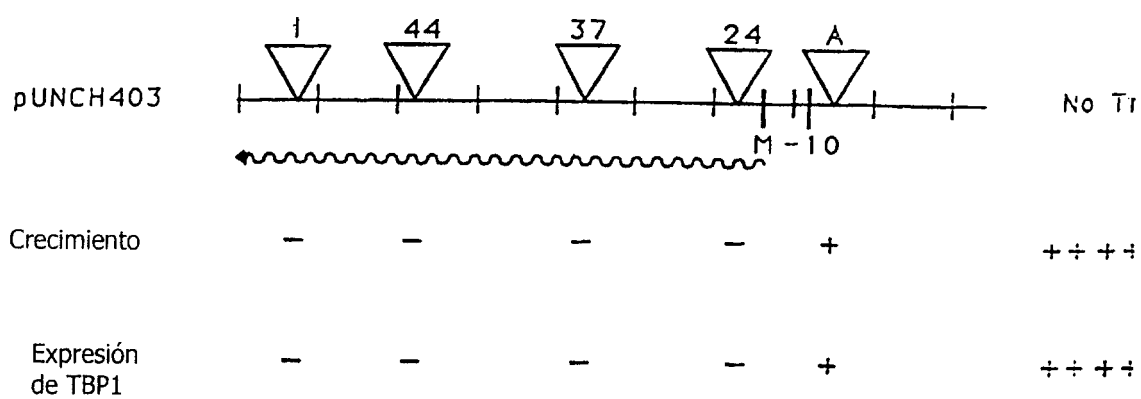


FIGURA 4: Estrategia para la clonación del gen de la proteína de unión con la transferrina meningoecítica

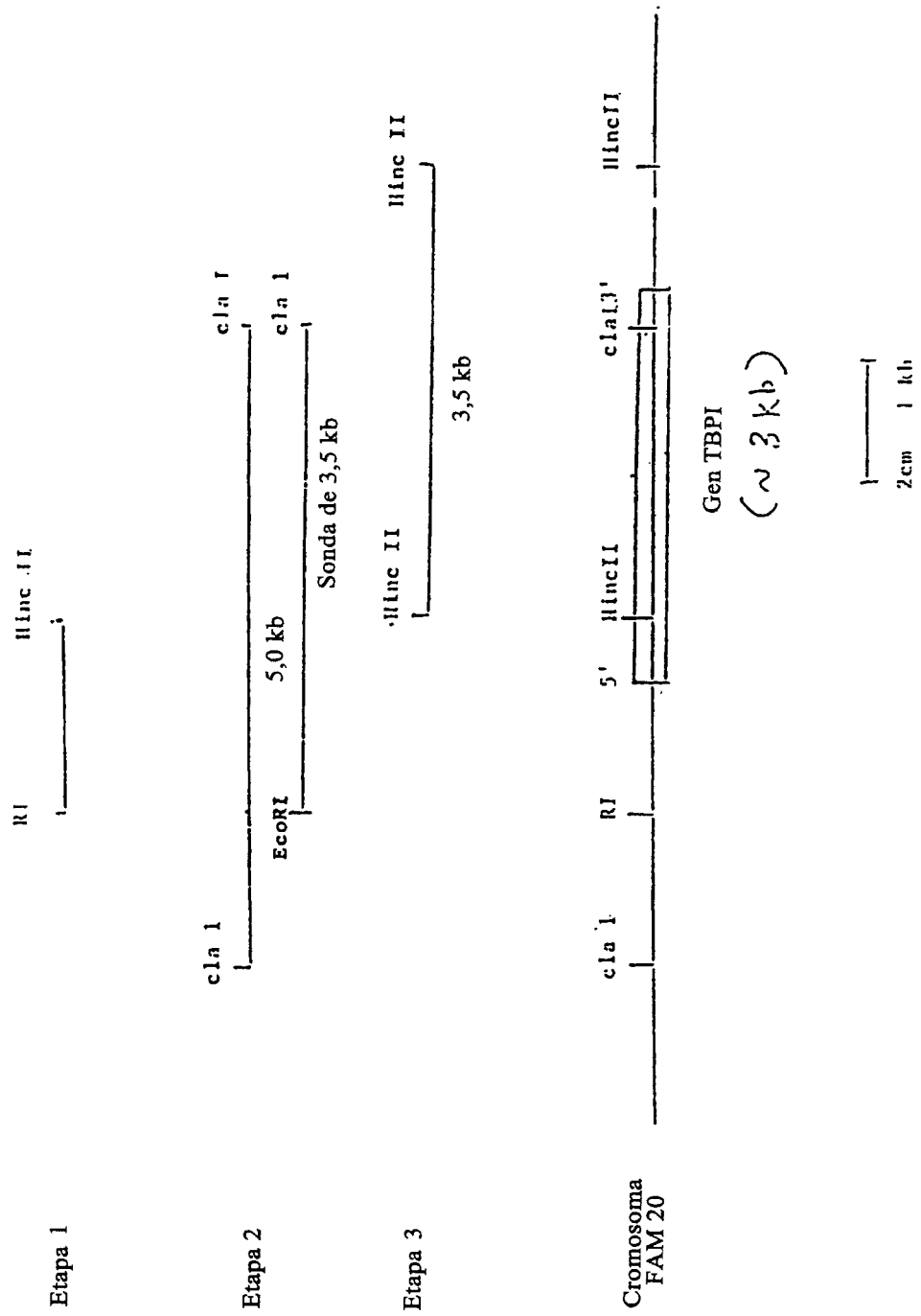
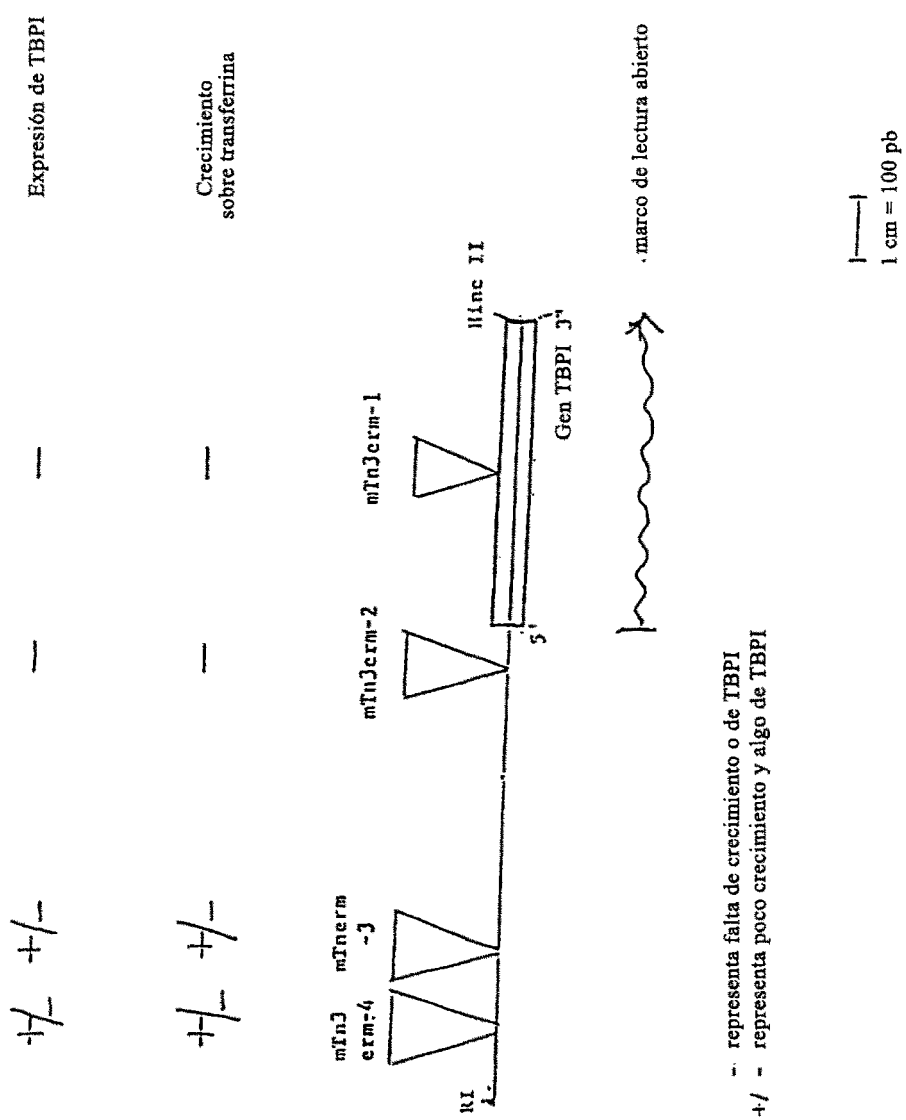


Figura 5: Secuencia del fragmento HincII/RI de 1,3 kb (1192 bases)

AATTCCGACGGAGTGAGCTTTTCACCTGCTGCCGTCTGAGGGCCAATAAGGGGGGCATTTTCAGCAGAGATTGAGCAAAACGG
 CGTGAAAGGCAACGGGTGTGTTCCTCAACTTGGATTACATGAGTTTTCGGGAAGCTGTCTCAAAAGAAATAAAGACGATATGT
 TCCTGCAAGGTGTCCGCACCTCCTGTATCCGATGTGGCGGCAAGGACGGAGCAACGCCCAATATTCGGGTACTTGGTACG
 GATATATTGCCAACGGCAACAGCTGGAGCGCGAAGCCCTCCATTCAGGAAGGTGGTAATAAGGGCAGAGTTTTCACGTGGATT
 TTTCCACTAAATAATCAGTGGCACTGACGGCAAAAGACCGTACGTCTCTCCGCTTCTAATACTATTAATGCCCATGATTAAAG
 GACAACGGTTTTCAGGTGTGGCGAATAACGGGTGAATAACGGCTTTTGGCTGGATCCGCCAATAATACCGGAATAATCCCACTA
 TACGCATATTGAAGCCACTGTATCCGGCTGTGTCTACGGCAATAACGCCATCGAGATGGCGGATTTCGTTCTCATTTCC
 GGGAAATGCACCAAGGGAAACAAGAAAGCAAGCAATCGGTGGTAATTCGGTGGCAACGCCCAACAGCTTGTGCAATAAGCAC
 GGCTGCCGAACAATCGAGATAAGGCTTCAGACGGCACGTTCTTCGGATGCGCTCTGAAAGCGAAGATTAGGGAAACAT
 CATTGCAACAGCAATTTGTTCGGATTAAATAATTTATGCTCTGTCTTAAATGACCGCGCGCTGCCCTTTATGCAAGAAA
 TGTGCAAGCCGAACAGCACAGGAATAACAGTTGGATACCATACAGGTAAAGCCCAATAACAGAAACCCGCCCGGATA
 ACGAAGTAACCGGGCTGGGCAAGTTGGTCAAGTCTTCCGATAACGCTAAGTAAGAACAGGTTTGTGATAATCCGAGACCTG
 ACCCGTTATGATCCGGTATTGCCGTGTGTCGAACAGGGTCCGGCGCAAGTTCCGCTATTCAATACCGGGCATGGATATAA
 ACCGGCTTTCCTAACGGTACAGCGCGTTTCGCCAATAACAGTCTACACCGCGCAAGCGGCTATTCGGTGGACGAGGACG
 CGGGGTACGAGCGGGCGCAATCAATGAATCGAGTATGAATAACGTCAAGGCCGCTTGAATAATACGAAGGGTTCCG

FIGURA 6: mutagénesis de transposones del fragmento de 1,3 kb



LISTA DE SECUENCIAS

(1) INFORMACIÓN GENERAL:

- (i) SOLICITANTE: Universidad de Carolina del Norte, Chapel Hill
- (ii) TÍTULO DE LA INVENCIÓN: Proteínas de unión de transferrina de *Neisseria gonorrhoeae* y *Neisseria meningitidis*
- (iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 3
- (iv) DIRECCIÓN DE CORRESPONDENCIA:
- (A) DIRECCIÓN: ImClone Systems Incorporated
 - (B) CALLE: 180 Varick Street
 - (C) CIUDAD: Nueva York
 - (D) ESTADO: Nueva York
 - (E) PAÍS: EE.UU.
 - (F) CÓDIGO POSTAL: 10014
- (v) FORMA DE LECTURA INFORMÁTICA:
- (A) TIPO DE MEDIO: Disco flexible
 - (B) ORDENADOR: PC IBM compatible
 - (C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS
 - (D) PROGRAMA: PatentIn Release #1.0, Versión #1.25
- (vi) DATOS DE LA SOLICITUD ACTUAL:
- (A) NÚMERO DE SOLICITUD: EP 91918802.9
 - (B) FECHA DE PRESENTACIÓN: 12 de febrero de 1993
 - (C) CLASIFICACIÓN:
- (viii) INFORMACIÓN DEL ABOGADO/AGENTE:
- (A) NOMBRE: Feit, Irving N.
 - (B) NÚMERO DE REGISTRO: 28.601
 - (C) NÚMERO DE REFERENCIA/CASO: SPA-1-PT: EUROPE
- (ix) INFORMACIÓN DE TELECOMUNICACIÓN:
- (A) TELÉFONO: 212 -645 -1405
 - (B) TELEFAX: 212 -645 -2054

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N.º 1:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 558 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - (C) ENCADENAMIENTO: doble
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc
- (iii) HIPOTÉTICA: NO
- (iv) ANTISENTIDO: NO
- (v) TIPO DE FRAGMENTO: N-terminal
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N.º: 1:

ES 2 329 979 T3

	AGCAAAGCCT CCGCACCGCC GATGCGCCCC GCCAGCGCGA TGGATTGGGT AAGCCCCCGG	60
5	TTTTTGCCGG AATAGGCGGT TTTACTCTGA ATGCCCCACT GCCTGCCCTC CCCGATAACA	120
	TCGTCGGCGG TTTTGGTTTG AAATGCGACC GAGCCCGCCA ATGCGCCGCT GCCTTGTTTCG	180
10	ACCGAGTTTG AGCCTTTGCT GATTTGACA GCCTTGACGT TCTCATACTC GATTTTCATTG	240
15	ATTGCGCCGC TGCTGCCCGC CGTCTCGTC CCGCCCAATG CCGCCTGCGC GTGTAGGACT	300
	GTTTTGCGC CAAGCCGTCC ACCGTCAAGG AGACGCGGTT TTTGTCCATA CCGCGTATCG	360
20	AGTAGCCCGA GCTTGCGCCG CGCCCCTGTT CGACGACGGC GATGCCGGGG TCGTAACGCG	420
	TCAGGTGCGG GATGTCGAGT ACCTGTTCTT TGCTGGAGGG TGTCGGCGGT TTTGACCAAT	480
25	TTGCCCAAAC CGGTTACTTC GTTATCGCGG CGGGTTTTCT GTTTTTTGGC TTTTACCTGT	540
30	ATGGTATCCA ACTGTTTT	558

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N.º: 2:

- 35
- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 918 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- 40 (C) ENCADENAMIENTO: doble
- (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc
- 45 (iii) HIPOTÉTICA: NO
- (iv) ANTISENTIDO: NO
- (v) TIPO DE FRAGMENTO: N-terminal
- 50 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N.º: 2:

55

60

65

ES 2 329 979 T3

	AGCAAAGCCT CCGCACC GCC GATGCGCCCC GCCAGCGCGA TGGATTGGGT AAGCCCCCGG	60
5	TTTTTGCCGG AATAGGCGGT TTTACTCTGA ATGCCCCACT GCCTGCCTTC CCCGATAACA	120
	TCGTCGGCGG TTTTGTTTTG AAATGCGACC GAGCCCGCCA ATGCGCCGCT GCCTTGTTTCG	180
10	ACCGAGTTTG AGCCTTTGCT GATTTCGACA GCCTTGACGT TCTCATACTC GATTTCATTG	240
15	ATTGCGCCGC TGCTGCCCCG CGTCCTCGTC CCGCCCAATG CCGCCTGCGC GTGTAGGACT	300
	GTTATTTGCGC CAAGCCGTCC ACCGTCAAGG AGACGCGGTT TTTGTCCATA CCGCGTATCG	360
20	AGTAGCCCGA GCTTGCGCCG CGCCCCGTGT CGACGACGGC GATGCCGGGG TCGTAACGCG	420
25	TCAGGTCGCG GATGTCGAGT ACCTGTTTCT TGCTGGAGGG TGTCGGCGGT TTTGACCAAT	480
	TTGCCCAAAC CGGTACTTTC GTTATCGCGG CGGGTTTTCT GTTTTTTGGC TTTTACCTGT	540
30	ATGGTATCCA ACTGTTTTTC CTGTGCTTGT CCGGCTTGCA CATTTTCTGC ATAAGCGGGC	600
35	AGCGCAGTCA TTAAAGACAG GCATAAAATA TTTAATCGGA ACAAATGTTG CTGTTGCATA	660
	GTGTTTCCCT AATCTTCGCT TTCAGACGGA ATCGGAAGGA ACGATGCCGT CTGAAGCCTT	720
40	ATTCTCGATT GTTGTTCCGC AGCCGTGCTT ATTTACACAAG CTTTGGCGT TTCGCACCGA	780
45		
	ATACGACAGT TGCACTGCTT GCTGAATTC CATTGCCGGA TTCAACTGTT GCATTTTTTCG	840
50	TTTGTTTCATT GCCCCGATAG GCAAACCATC CGCCCACTC TTCGGCGTTA GGCCCGTAAA	900
	AACCGCCCTG CACTTCGG	918

55 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N.º: 3:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 1192 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - (C) ENCADENAMIENTO: doble
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc
- (iii) HIPOTÉTICA: NO

ES 2 329 979 T3

(iv) ANTISENTIDO: NO

(v) TIPO DE FRAGMENTO: N-terminal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N.º: 3:

5

AATTCCGACG GAGTGGAGCT TTCACTGCTG CCGTCTGAGG GCAATAAGGC GGCATTTTCAG 60

10

CACGAGATTG AGCAAAACGG CGTGAAGGCA ACGGTGTGTT GTTCCAACCTT GGATTACATG 120

AGTTTTGGGA AGCTGTCAA AGAAAATAAA GACGATATGT TCCTGCAAGG TGTCCGCACT 180

15

CCTGTATCCG ATGTGGCGGC AAGGACGGAG CAAACGCCAA ATATCGCGGT ACTTGGTACG 240

20

GATATATTGC CAACGGCACA AGCTGGAGCG CGAAGCCTCC AATCAGGAAG GTGGTAATAG 300

GGCAGAGTTT GACGTGGATT TTTCCACTAA AAAAATCAGT GGCACACTGA CGGCAAAAGA 360

25

CCGTACGTCT CCTGCGTTTA CTATTACTGC CATGATTAAG GACAACGGTT TTTCAGGTGT 420

GGCGAAAACC GGTGAAAACG GCTTTGCGCT GGATCCGCAA AATACCGGAA ATTCCCACTA 480

30

TACGCATATT GAAGCCACTG TATCCGGCTG GTTTCTACGG CAAAACGCC ATCGAGATGG 540

35

GCGGATTCGT TCTCATTTCC GGGAAATGCA CCAGAGGGAA AACAAGAAAA AGCATCGGTG 600

GTATTCGGTG CGAAACGCCA ACAGCTTGTG CAATAAGCAC GGCTGCCGAA CAATCGAGAA 660

40

TAAGGCTTCA GACGGCACGT TCCTTCCGAT GCCGTCTGAA AGCGAAGATT AGGGAAACAT 720

45

CATGCAACAG CAACATTTGT TCCGATTAAA TATTTTATGC CTGTCTTTAA TGACCGCGCG 780

CTGCCCCGTTT ATGCAGAAAA TGTGCAAGCC GAACAAGCAC AGGAAAAACA GTTGGATACC 840

50

ATACAGGTAA AAGCCAAAAA ACAGAAAACC CGCCGCGATA ACGAAGTAAC CGGGCTGGGC 900

AAGTTGGTCA AGTCTTCCGA TACGCTAAGT AAAGAACAGG TTTTGAATAT CCGAGACCTG 960

55

ACCCGTTATG ATCCGGTATT GCCGTGGTCG AACAGGGTCG GGGCGCAAGT TCGGCTATTC 1020

60

AATACGCGGC ATGGATAAAA ACCGCGTTTC CTTAACGGTA GACGGCGTTT CGCAAATACA 1080

GTCCTACACC GCGCAGGCGG CATTGGGTGG GACGAGGACG GCGGGTACGA GCGGCGCAAT 1140

65

CAATGAAATC GAGTATGAAA ACGTCAAGGC CGTTGAAATC AGCAAGGGTT CG 1192

ES 2 329 979 T3

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> ImClone Systems Incorporated
- 5 <120> Proteínas de unión de transferrina de *Neisseria gonorrhoeae* y *Neisseria meningitidis*
- <130> EP088991I - 01938/GRI
- 10 <140>
<141>
- 15 <150> US 572.187
<151> 23-08-1991
- <160> 3
- 20 <170> PatenIN 3.0
- <210> 1
<211> 558
25 <212> ADN
<213> Gonococo
- 30 <220>
<223> Descripción de la secuencia:
Cepa parcial del gen de la proteína de 100 kD de la cepa gonocócica FA19 obtenida de los insertos pUNCH401 y pUNCH402
- 35 <400> 1
- | | | |
|----|---|-----|
| | AGCAAAGCCT CCGCACCGCC GATGCGCCCC GCCAGCGCGA TGGATTGGGT AAGCCCCCGG | 60 |
| 40 | TTTTTGCCGG AATAGGCGGT TTTACTCTGA ATGCCCCACT GCCTGCCTTC CCCGATAACA | 120 |
| | TCGTCGGCGG TTTTG GTTTG AAATGCGACC GAGCCCGCCA ATGCGCCGCT GCCTTGTTCTG | 180 |
| 45 | ACCGAGTTTG AGCCTTTGCT GATTTCGACA GCCTTGACGT TCTCATACTC GATTTCATTG | 240 |
| | ATTGCGCCGC TGCTGCCCGC CGTCCTCGTC CCGCCCAATG CCGCCTGCGC GTGTAGGACT | 300 |
| 50 | GTATTTGCGC CAAGCCGTCC ACCGTCAAGG AGACGCGGTT TTTGTCCATA CCGCGTATCG | 360 |
| | AGTAGCCCGA GCTTGCGCCG CGCCCCTGTT CGACGACGGC GATGCCGGGG TCGTAACGCG | 420 |
| 55 | TCAGGTCGCG GATGTCGAGT ACCTGTTTCT TGCTGGAGGG TGTCGGCGGT TTTGACCAAT | 480 |
| | TTGCCCAAAC CGGTTACTTC GTTATCGCGG CGGGTTTTCT GTTTTTTGGC TTTTACCTGT | 540 |
| 60 | ATGGTATCCA ACTGTTTT | 558 |
- <210> 2
65 <211> 918
<212> ADN
<213> Gonococo

ES 2 329 979 T3

<220>

<223> Descripción de la secuencia:

Secuencia del fragmento génico de la proteína de unión de transferrina de 100 kD de un inserto pUNCH403.

5

<400> 2

```

10      AGCAAAGCCT CCGCACC GCC GATGCGCCCC GCCAGCGCGA TGGATTGGGT AAGCCCCCGG      60
      TTTTGTGCCG AATAGGCGGT TTTACTCTGA ATGCCCCACT GCCTGCCTTC CCCGATAACA      120
      TCGTCGGCGG TTTTGGTTTG AAATGCGACC GAGCCCGCCA ATGCGCCGCT GCCTTGTTTCG      180
15      ACCGAGTTTG AGCCTTTGCT GATTTTCGACA GCCTTGACGT TCTCATACTC GATTTTCATTG      240
      ATTGCGCCGC TGCTGCCCCG CGTCCTCGTC CCGCCCAATG CCGCCTGCGC GTGTAGGACT      300
20      GTATTTGCGC CAAGCCGTCC ACCGTCAAGG AGACGCGGTT TTTGTCCATA CCGCGTATCG      360
      AGTAGCCCGA GCTTGCGCCG CGCCCCTGTT CGACGACGGC GATGCCGGGG TCGTAACGCG      420
25      TCAGGTCGCG GATGTCGAGT ACCTGTTCTT TGCTGGAGGG TGTCGGCGGT TTTGACCAAT      480
      TTGCCCAAAC CGGTTACTTC GTTATCGCGG CGGGTTTTCT GTTTTTTGGC TTTTACCTGT      540
30      ATGGTATCCA ACTGTTTTTC CTGTGCTTGT CCGGCTTGCA CATTTTCTGC ATAAGCGGGC      600
      AGCGCAGTCA TTAAAGACAG GCATAAAATA TTTAATCGGA ACAAATGTTG CTGTTGCATA      660
35      GTGTTTCCCT AATCTTCGCT TTCAGACGGA ATCGGAAGGA ACGATGCCGT CTGAAGCCTT      720
      ATTCTCGATT GTTGTTCGGC AGCCGTGCTT ATTTCAACAAG CTTTGGCGT TTCGCACCGA      780
      ATACGACAGT TGCACTGCTT GCTGAATTC CATTGCCGGA TTCAACTGTT GCATTTTTTCG      840
40      TTTGTTTCATT GCCCGGATAG GCAAACCATC CGCCCAACTC TTCGGCGTTA GGCCCGTAAA      900
      AACCGCCCTG CACTTCGG                                918

```

45

<210> 3

<211> 1192

50

<212> ADN

<213> Gonococo

<220>

55

<223> Descripción de la secuencia:

Secuencia del fragmento *HincII/EcoRI* de 1,3 kb.

60

65

ES 2 329 979 T3

<400> 3

5	AATTCCGACG GAGTGGAGCT TTCACTGCTG CCGTCTGAGG GCAATAAGGC GGCATTTTCAG	60
	CACGAGATTG AGCAAAACGG CGTGAAGGCA ACGGTGTGTT GTTCCAACCTT GGATTACATG	120
	AGTTTTGGGA AGCTGTCAAA AGAAAATAAA GACGATATGT TCCTGCAAGG TGTCCGCACT	180
10	CCTGTATCCG ATGTGGCGGC AAGGACGGAG CAAACGCCAA ATATCGCGGT ACTTGGTACG	240
	GATATATTGC CAACGGCACA AGCTGGAGCG CGAAGCCTCC AATCAGGAAG GTGGTAATAG	300
15	GGCAGAGTTT GACGTGGATT TTTCCTACTAA AAAAATCAGT GGCACACTGA CGGCAAAAGA	360
	CCGTACGTCT CCTGCGTTTA CTATTACTGC CATGATTAAG GACAACGGTT TTTCAGGTGT	420
20	GGCGAAAACC GGTGAAAACG GCTTTGCGCT GGATCCGCAA AATACCGGAA ATTCCCCTA	480
	TACGCATATT GAAGCCACTG TATCCGGCTG GTTTCTACGG CAAAACGCC ATCGAGATGG	540
25	GCGGATTCGT TCTCATTTCC GGGAAATGCA CCAGAGGGAA AACAAGAAAA AGCATCGGTG	600
	GTATTCGGTG CGAAACGCCA ACAGCTTGTG CAATAAGCAC GGCTGCCGAA CAATCGAGAA	660
30	TAAGGCTTCA GACGGCACGT TCCTTCCGAT GCCGTCTGAA AGCGAAGATT AGGGAAACAT	720
	CATGCAACAG CAACATTTGT TCCGATTAAA TATTTTATGC CTGTCTTTAA TGACCGCGCG	780
	CTGCCCGTTT ATGCAGAAAA TGTGCAAGCC GAACAAGCAC AGGAAAAACA GTTGGATACC	840
35	ATACAGGTAA AAGCCAAAAA ACAGAAAACC CGCCGCGATA ACGAAGTAAC CGGGCTGGGC	900
	AAGTTGGTCA AGTCTTCCGA TACGCTAAGT AAAGAACAGG TTTTGAATAT CCGAGACCTG	960
40	ACCCGTTATG ATCCGGTATT GCCGTGGTCG AACAGGGTCG GGGCGCAAGT TCGGCTATTC	1020
	AATACGCGGC ATGGATAAAA ACCGCGTTTC CTTAACGGTA GACGGCGTTT CGCAAATACA	1080
45	GTCTACACC GCGCAGGCGG CATTGGGTGG GACGAGGACG GCGGGTACGA GCGGCGCAAT	1140
	CAATGAAATC GAGTATGAAA ACGTCAAGGC CGTTGAAATC AGCAAGGGTT CG	1192