



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 278 920**

51 Int. Cl.:  
**C07K 14/22** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **02730631 .5**

86 Fecha de presentación : **12.02.2002**

87 Número de publicación de la solicitud: **1385876**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **04.02.2004**

54 Título: **Proteínas gonocócicas y ácidos nucleicos.**

30 Prioridad: **12.02.2001 GB 0103424**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.08.2007**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.08.2007**

73 Titular/es:  
**Novartis Vaccines and Diagnostics S.R.L.**  
**Via Fiorentina 1**  
**53100 Siena SI, IT**

72 Inventor/es: **Fontana, Maria Rita;**  
**Pizza, Mariagrazia;**  
**Masignani, Vega y**  
**Monaci, Elisabetta**

74 Agente: **Carpintero López, Francisco**

**ES 2 278 920 T3**

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 gonocócicas y ácidos nucleicos.

5 **Campo técnico**

Esta invención se refiere a proteínas procedentes de la bacteria *Neisseria gonorrhoeae*, y de manera más particular a las proteínas que tienen los correspondientes homólogos u ortólogo en el serogrupo B de *N. meningitidis*.

10 **Técnica anterior**

*Neisseria gonorrhoeae* es un patógeno bacteriano. En la actualidad no existe cura efectiva para la infección por *N. gonorrhoeae*. Es un objeto de la invención proporcionar proteínas y ácidos nucleicos adecuado en estudios y/o fabricación de vacunas.

15 La *N. gonorrhoeae* está relacionada con la *N. meningitidis*. En la actualidad están disponibles los datos de secuencia para los meningococos del seprogrupo B [por ejemplo, en los documentos W099/24578; W099/36544; W099/57280; WO/22430; WO/66791; Tettelin y col., (2000) *Science* 287:1809-1815] y también para el serogrupo A [Parkhill y col., (2000) *Nature* e 404: 502-506]. Es un objeto adicional de la invención proporcionar proteínas y ácidos nucleicos útiles para distinguir entre gonococos y meningococos del serogrupo B.

**Descripción de la invención**

25 La invención proporciona proteínas que comprenden las secuencias de aminoácidos de *N. gonorrhoeae* descritas en los ejemplos (las numeradas como SEC. DE ID 2 y 4. Estas no tienen homólogos en los meningococos del serogrupo B y se les ha dado nombre en la forma "NGSn".

30 También proporciona proteínas que comprenden las secuencias de aminoácidos que tienen identidad de secuencia con las secuencias de aminoácidos de *N. gonorrhoeae* descritas en los ejemplos. Dependiendo de la secuencia concreta, el grado de identidad de la secuencia es mayor de 90% (por ejemplo, 95%, 99% o más). Estas proteínas incluyen homólogos, ortólogos, variantes alélicas y mutantes funcionales. La identidad entre proteínas se determina preferiblemente mediante el algoritmo de búsqueda de analogías de Smith-Waterman, tal como se implementa en el programa MPSRCH (Oxford Molecular), usando un intervalo de búsqueda con parámetros *penalización de intervalo abierto = 12* y *penalización de extensión de intervalo = 1*.

35 La invención además proporciona proteínas que comprenden fragmentos de secuencias de aminoácidos de *N. gonorrhoeae* descritas en los ejemplos. Los fragmentos deben comprender al menos n amino ácidos consecutivos procedentes de las secuencias y, dependiendo de la secuencia concreta, n es 20 o más (30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 o más), y uno o más epitopos de la secuencia. Otros de estos fragmentos son (a) los péptidos señal N-terminal de las proteínas descritas en los ejemplos, y (b) las proteínas descritas en los ejemplos, pero sin sus péptidos señal N-terminal.

45 Las proteínas de la invención pueden, por supuesto, prepararse de maneras diferentes, (por ejemplo, expresión recombinante, purificación a partir de *Neisseria*, (síntesis química, etc.) y en diferentes formas (por ejemplo, nativa, fusiones, etc.). Se preparan de manera preferible en forma sustancialmente pura (es decir, sustancialmente libres de otras *N. gonorrhoeae* o proteínas de célula huésped).

50 La invención proporciona anticuerpos que se enlazan con estas proteínas. Estas pueden ser policlonales o monoclonales, y se pueden producir mediante cualquier procedimiento convencional. Los anticuerpos pueden incluir una marca detectable.

55 La invención proporciona ácido nucleico que comprende las secuencias de nucleótidos descritas en los ejemplos. Además, la invención proporciona ácido nucleico que comprende las secuencias de nucleótidos que tienen identidad de secuencia respecto de las secuencias de nucleótidos de *N. gonorrhoeae* descritas en los ejemplos.

Además, se proporcionan también ácido nucleico que comprende fragmentos de estas secuencias. Estos deben comprender al menos n nucleótidos consecutivos procedentes de las secuencias de *N. gonorrhoeae* y, dependiendo de la secuencia particular, n es 25 ó más (por ejemplo, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200 o más).

60 La invención también proporciona ácido nucleico que codifica las proteínas y fragmentos de proteínas de la invención.

La invención incluye ácido nucleico que comprenden secuencias complementarias de las que se describen más arriba (por ejemplo, con objetivos de sentido opuesto o de fabricación de sondas).

65 Se puede preparar ácido nucleico de acuerdo con la invención en muchas formas ((por ejemplo, mediante síntesis químicas, procedentes de librerías genómicas o de ADNc, procedente del propio organismo, etc.) y puede tomar diferentes formas (por ejemplo, de cadena sencilla, cadena doble, vectores, sondas etc.).

## ES 2 278 920 T3

Además, el término “ácido nucleico” incluye ADN y ARN, y también sus análogos, tales como los que contienen esqueletos modificados, y también ácidos nucleicos péptidos (PNA) *etc.*

5 La invención proporciona vectores que comprenden las secuencias de nucleótidos de la invención (*por ejemplo*, vectores de clonación o de expresión), y las células huésped transformadas a partir de dichos vectores.

La invención proporciona composiciones que comprenden proteína, anticuerpo, y/o ácido nucleico de acuerdo con la invención.

10 Estas composiciones pueden ser adecuadas como composiciones inmunogénicas, *por ejemplo*, o como reactivos de diagnóstico, o como vacunas.

La invención también proporciona ácido nucleico, proteína, o anticuerpo de acuerdo con la invención para uso como medicamentos (*por ejemplo*, como vacunas, o como reactivos de diagnóstico. También proporciona el uso de ácido nucleico, proteína, o anticuerpo de acuerdo con la invención para la fabricación de: (i) un medicamento para tratar o prevenir la infección debido a *Neisseria*; (ii) un reactivo de diagnóstico para detectar la presencia de *Neisseria* o de anticuerpos contra *Neisseria*; y/o (iii) un reactivo que pueda estimular de anticuerpos contra *Neisseria*. Dicha *Neisseria* puede ser cualquier especie, pero es preferiblemente *N. gonorrhoeae*.

20 La invención también proporciona un procedimiento para tratar un paciente, que comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente efectiva de ácido nucleico, proteína, y/o anticuerpo de la invención.

De acuerdo con otros aspectos, la invención proporciona varios procedimientos.

25 Se proporciona un procedimiento para producir proteínas de la invención, que comprende la etapa de cultivar una célula huésped de la invención en condiciones en las que se induce la expresión de proteína.

Se proporciona un procedimiento para producir proteína o ácido nucleico de la invención, en el que se sintetiza la proteína o ácido nucleico en todo o en parte mediante procedimientos químicos.

30 Se proporciona un procedimiento para detectar polinucleótidos de la invención que comprende las etapas de: (a) poner en contacto una sonda nucleica con una muestra biológica en condiciones de hibridación para formar dúplex; y (b) detectar dichos dúplex.

35 Se proporciona un procedimiento para detectar proteínas de la invención que comprende las etapas de: (a) poner en contacto un anticuerpo de la invención con una muestra biológica en condiciones adecuadas para la formación de un complejo antígeno - anticuerpo; y (b) detectar dichos complejos.

40 Se proporciona un procedimiento para distinguir *N. gonorrhoeae* de *N. meningitidis*, que comprende las etapas de: (a) poner en contacto un anticuerpo de la invención con una muestra biológica en condiciones adecuadas para la hibridación del ácido nucleico; y (b) detectar cualquier hibridación. Alternativamente, las etapas pueden ser: (a) poner en contacto una proteína de la invención con una muestra biológica (*por ejemplo*, sangre o suero) en condiciones adecuadas para la formación de un complejo antígeno - anticuerpo; y (b) detectar dichos complejos.

45 Sigue a continuación un resumen de las técnicas y procedimientos convencionales que se pueden emplear con el fin de llevar a cabo la invención (*por ejemplo*, utilizar las secuencias descritas para vacunación o a efectos de diagnóstico). Este resumen no es una limitación de la invención, los ejemplos dados pueden usarse, pero no es necesario.

### General

50 La práctica de la presente invención empleará, a no ser que se indique otra cosa, las técnicas convencionales de biología molecular, microbiología, ADN recombinante e inmunología, que están dentro de las habilidades de la técnica. Dichas técnicas se explican completamente en la bibliografía, *por ejemplo*, Sambrook *Molecular Cloning; A Laboratory Manual*, Segunda Edición (1989) o Tercera Edición(2000); *DNA Cloning, Volúmenes I y II* (D. N Glover ed. 1985); *Oligonucleotide Synthesis* (M. J. Gait ed, 1984); *Acid Nucleic Hybridization* (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. 1984); *Transcription and Translation* (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. 1984); *Animal Cell Culture* (R. I. Freshney ed. 1986); *Immobilized Cells and Enzymes* (IRL Press, 1986); B. Perbal, *A Practical Guide to Molecular Cloning* (1984); la serie de *Methods in Enzymology* (Academic Press, nc.), especialmente los volúmenes 154 y 155; *Gene Transference Vector for the Mammalian Cells* (J.H. Miller y M. P. Calos eds. 1987, Cold Spring Harbor Laboratory); Mayer y Walker, eds. (1987), *Imunochemical Methods in Cell and Molecular Biology* (Academic Press, Londres); Scopes, (1987) *Protein Purification: Principles and Practice*, Segunda Edición (Springer-Verlag, N. Y.), y *Handbook of Experimental Immunology, Volúmenes I-IV* (D. M. Weir y C. C. Blackwell eds 1986).

65 Se usan en esta memoria las abreviaturas convencionales de los nucleótidos y aminoácidos.

## ES 2 278 920 T3

### Definiciones

Una composición que contiene X está “sustancialmente libre de Y” cuando al menos el 85% en peso del X+Y en la composición es X. Preferiblemente, X comprende al menos aproximadamente un 90% en peso del total de X+Y en la composición, más preferiblemente al menos aproximadamente un 95% o incluso un 99% en peso.

El término “que comprende” significa “incluyendo”, así como “consistiendo” una composición “que comprende” X puede consistir exclusivamente de X, o incluir algo adicional *por ejemplo*, X + Y.

El término “heterólogo” se refiere a dos componentes biológicos que no se encuentran juntos por Naturaleza: los componentes pueden ser células huésped, genes o regiones reguladoras, tales como promotores. Aunque los componentes heterólogos no se encuentran juntos por Naturaleza, pueden funcionar conjuntamente, como cuando un promotor heterólogo a un gen se enlaza de forma operativa al gen. Otro ejemplo es cuando una secuencia de *Neisseria* es heteróloga a una célula huésped de ratón. Ejemplo adicional sería el de dos epítomos de proteínas iguales o diferentes que se ensamblarían en una única proteína en una disposición que no aparece en la Naturaleza.

Un “origen de replicación” es una secuencia de polinucleótidos que inicia y regula la replicación de los polinucleótidos, tal como un vector de expresión. El origen de replicación se comporta como una unidad autónoma de replicación de polinucleótidos en el interior de una célula, capaz de replicación bajo su control. Se necesita un origen de replicación para que se replique un vector en una célula huésped concreta. Con algunos orígenes de replicación, se puede reproducir un vector de expresión con un número elevado de copias en presencia de las proteínas adecuadas en el interior celular. Son ejemplos de orígenes las secuencias de replicación autónoma, que son efectivas en levaduras, y el antígeno vírico T, efectivo en las células COS.

Se define “una secuencia mutante” como una secuencia de ADN, ARN o aminoácidos que se diferencia de, pero tiene identidad de secuencia, la secuencia nativa o descrita. Dependiendo de la secuencia concreta, el grado de identidad de secuencia entre la secuencia nativa o descrita y la secuencia mutante preferiblemente mayor que un 50% (*por ejemplo*, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% o más, calculada según el algoritmo de Smith-Waterman que se describe más arriba). Tal como se usa en el presente documento una “variante alélica” de una molécula o región de ácido nucleico, para la que dicha secuencia de ácido nucleico se proporciona en el presente documento es una molécula o región de ácido nucleico que se produce esencialmente en el mismo locus del genoma de otro o segundo aislado, y que, debido a la variación natural causada, por ejemplo, mutación o recombinación, tiene una secuencia de ácido nucleico similar pero no idéntica. Una región codificante alélica típica codifica una proteína que tiene una actividad similar a la de la proteína codificada por el gen con el que se compara. Una variante alélica puede comprender también una alteración en las regiones no traducidas 5' o 3' del gen, tales como en las regiones reguladoras de control (*por ejemplo*, ver la Patente de los Estados Unidos 5.753.235).

### Sistemas de expresión

Las secuencias de nucleótidos de *Neisseria* se pueden expresar en una variedad de diferentes sistemas de expresión; por ejemplo, los que se usan en células de mamífero, baculovirus, plantas, bacterias, y levadura.

#### i. Sistemas de mamífero

Los sistemas de expresión de mamífero son conocidos en la técnica. Un promotor de mamífero es cualquier secuencia de ADN capaz de enlazar con la ARN polimerasa de mamífero e iniciar la transcripción corriente abajo (3') de una secuencia de codificación (*por ejemplo*, de un gen estructural) en ARNm. Un promotor tendrá una región de inicio de transcripción, que normalmente se localiza cerca del extremo 5' de la secuencia de codificación, y una caja TATA, normalmente ubicada 25-30 pares de bases (PB) corriente arriba del emplazamiento de inicio de transcripción. Se piensa que la caja TATA dirige la ARN polimerasa II para que comience la síntesis del ARN en el punto adecuado. Un promotor de mamífero también contendrá un elemento promotor corriente arriba, normalmente ubicada de 100 a 200 pares de bases (PB) corriente arriba de la caja TATA. Un elemento promotor corriente arriba determina la velocidad a la que se inicia la transcripción, y puede actuar en cualquier orientación [Sambrook y col., (1989) “Expression of Cloned Genes in Mammalian Cells.” En *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª ed.].

Los genes víricos de mamífero a menudo se expresan de manera elevada y tienen un amplio intervalo de huésped. Entre los ejemplos se incluyen el promotor temprano SV40, el promotor LTR del virus del tumor de mama en ratones, el promotor tardío principal del adenovirus (Ad MLP), y el promotor del virus del herpes simplex. Además, las secuencias derivadas de otros genes no víricos, tales como el gen de la metaloteionina de murina, proporcionan también secuencias de promotor útiles. La expresión puede ser tanto constitutiva como regulada (inducible), dependiendo de si el promotor puede inducirse con glucocorticoides en las células que responden a hormonas.

La presencia de un elemento mejorador (mejorados), combinado como los elementos promotores descritos más arriba, incrementarán los niveles de expresión. Un mejorador es una secuencia de ADN que estimula la transcripción hasta 1000 veces cuando se enlaza con promotores homólogos o heterólogos, comenzando la síntesis en el punto de inicio normal del ARN. Los mejoradores son también activos cuando se colocan corriente arriba o abajo del emplazamiento de inicio de la transcripción, en cualquier orientación normal o girada, o a una distancia de más de nucleótidos desde el promotor [Maniatis y col., (1987) *Science* 236: 1237; Alberts y col., (1989) *Molecular Biology of the Cell*, 2ª

ed.]. Los elementos mejoradores derivados de virus pueden ser particularmente útiles, debido a que tienen un intervalo de huésped más amplio. Entre los ejemplos se incluyen el promotor temprano SV40, [Dijkema y col., (1985) *EMBO J.* 4: 761] y los mejoradores/promotores derivados de la repetición terminal larga del Virus Rous Sarcoma [Gorman y col., (1982b) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 79:6777] y del citomegalovirus humano [Boshart y col., (1985) *Cell* 41: 521].  
 5 Adicionalmente, algunos mejoradores se pueden regular, y sólo son activos en presencia de un inductor, tal como una hormona o ión metálico [Sassone-Corsi y Borelli (1986) *Trends Genet.* 2: 215; Maniatis y col., (1987) *Science* 236:1237].

Una molécula de ADN se puede expresar intracelularmente en las células de mamífero. Una secuencia de promotor  
 10 puede estar directamente enlazada con la molécula de ADN, en cuyo caso el primer aminoácido en el N-terminal de la molécula recombinantes será siempre una metionina, que se codifica mediante el codón de inicio ATG. Si se desea, se puede romper el N-terminal de la proteína mediante incubación con *in vitro* bromuro de cianógeno.

Alternativamente, se pueden también secretar proteínas extrañas a partir de la célula en el medio de crecimiento  
 15 creando moléculas de ADN quimérico que codifican una proteína de fusión, comprendida por un fragmento de secuencia líder que proporciona la secreción de las proteínas extrañas en las células de mamífero. Preferiblemente, hay emplazamientos de procesado codificados entre la secuencia líder y el gen extraño que se pueden romper tanto *in vivo* como *in vitro*. El fragmento de secuencia líder codifica normalmente un péptido señal comprendido de aminoácidos hidrófobos que dirigen la secreción de la proteína desde la célula. El líder tripartito del adenovirus es un ejemplo de  
 20 secuencia líder que proporciona la secreción de las proteínas extrañas en las células de mamífero.

Normalmente, la finalización de la transcripción y secuencias de poliadenilación que reconocen las células de mamífero son las regiones reguladoras localizada 3' respecto del codón de detención de la traducción y así, junto  
 25 con los elementos promotores, flanquean la secuencia de codificación. El extremo 3' del ARNm maduro se forma mediante rotura post-transcripcional dependiente del emplazamiento y poliadenilación [Birnstiel y col., (1985) *Cell* 41: 349; Proudfoot y Whitelaw (1988) "Termination and 3' end processing of eukaryotic ARN. En *Transcription and splicing* (ed. B. D. Hames y D. M. Glover); Proudfoot (1989) *Trends Biochem. Sci.* 14: 105]. Estas secuencias dirigen la transcripción de un ARNm que se puede traducir en el codificado mediante el ADN. Entre los ejemplos de terminador de la transcripción/señales de poliadenilación se incluyen los derivados de SV40 [Sambrook y col., (1989)  
 30 "Expression of cloned genes in cultured mammalian cells." En *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*.

Usualmente, los componentes anteriormente descritos, que comprenden un promotor, señal de poliadenilación, y secuencia de terminación de la transcripción, se ponen juntos en constructos de expresión. También se pueden incluir mejoradores, intrones con emplazamientos funcionales de donadores y aceptores agregados en el constructo de  
 35 expresión, si se desea. Los constructos de expresión se mantienen a menudo en un replicón, tal como un elemento extracromosómico (*por ejemplo*, plásmidos) capaces de mantenerse de forma estable en un huésped, tales como células de mamífero o bacterias. Los sistemas de replicación en mamífero incluyen los derivados de virus animales, que requieren factores de trans-actuación para replicarse. Por ejemplo, los plásmidos que contienen los sistemas de replicación del papovavirus tal como SV40 [Gluzman (1981) *Cell* 23: 175] o del poliomavirus, se replican con un número de copias extremadamente elevado en presencia del antígeno T vírico apropiado. Los ejemplos adicionales de replicones de mamífero incluyen los que se derivan del papilomavirus bovino y del virus Epstein-Barr. Adicionalmente, el replicón puede tener dos sistemas de replicación, lo que le permite mantenerse de esta forma, en células de mamífero para la expresión y en un huésped procarionota para clonación y amplificación. Entre los ejemplos de tales  
 40 vectores lanzadera mamífero-bacteria se incluyen pMT2 [Kaufman y col., (1989) *Mol. Cell. Biol.* 9: 946] y pHEBO [Shimizu y col., (1986) *Mol. Cell. Biol.* 6:1074].

El procedimiento de transformación usado depende del huésped a transformar. Los procedimientos para introducir polinucleótidos heterólogos en células de mamífero son conocidos en la técnica, e incluyen transfección mediada con dextrano, precipitación con fosfato de calcio, transfección mediada por polibreno, fusión de protoplastos, electroporación,  
 50 encapsulación de polinucleótido(s) en liposomas, y microinyección directa de ADN en los núcleos.

Las líneas celulares de mamífero disponibles como huéspedes para la expresión son conocidas en la técnica, e incluyen muchas líneas celulares inmortalizadas disponibles de la American Type Culture Collection (ATCC), incluyendo pero sin limitarse a, células de ovario de hámster chino (CHO), células HeLa, células de riñón de cría de hámster (BHK), células de riñón de mono (COS), células de carcinoma hepatocelular humano (*por ejemplo*, Hep G2), y otras numerosas líneas celulares

#### ii. Sistemas de Baculovirus

Los polinucleótidos que codifican las proteínas se insertan en un vector de expresión de insecto adecuado, y se enlaza de manera operativa con los sistemas de control dentro de dicho vector. La construcción de vectores emplea técnicas que son conocidas en la técnica. Generalmente, los componentes del sistema de incluyen un vector de transferencia, normalmente un plásmido bacteriano tanto un fragmento de genoma de baculovirus como un emplazamiento de restricción conveniente para la inserción de un gen o genes heterólogos a expresar; un baculovirus de tipo salvaje  
 65 con una secuencia homóloga a la del fragmento específico del baculovirus en el vector de transferencia (esto permite la recombinación homóloga del gen heterólogo en el genoma del baculovirus); y células huésped de insecto adecuadas y un medio de cultivo.

## ES 2 278 920 T3

Tras insertar la secuencia de ADN que codifica la proteína en el vector de transferencia, el vector y el genoma vírico de tipo salvaje se transfectan en la célula huésped de insecto donde se deja que el vector y el genoma vírico se recombinan. El virus recombinante empaquetado se expresa, y las placas recombinantes se identifican y purifican. Los materiales y procedimiento para la expresión de baculovirus/sistemas de expresión de células de insecto están disponibles comercialmente en forma de kit de, *inter alia*, Invitrogen, San Diego CA (“MaxBac” kit). Las personas expertas en la técnica conocen generalmente estas técnicas, que se describen completamente en Summers y Smith, *Texas Agricultural Experiment Station Bulletin N° 1555* (1987) (“Summers y Smith”).

Antes de insertar la secuencia de ADN que codifica la proteína en el genoma del baculovirus, los componentes anteriormente descritos comprende un promotor, un líder (si se desea), secuencia de codificación y secuencia de terminación de la transcripción, se ensamblan en un constructo intermedio de trans-colocación (vector de transferencia), Este puede contener un único gen, y el enlazado de forma operativa a elementos reguladores; o genes múltiples, cada uno de los cuales tiene su propio conjunto de elementos reguladores enlazados de forma operativa. Los constructos intermedios de trans-colocación se mantienen normalmente en un replican, tal como un elemento extracromosómico (*por ejemplo*, plásmidos), capaces de mantenerse de manera estable en un huésped, tal como una bacteria. El replicón tendrá un sistema de replicación, lo que le permite mantenerse en un huésped adecuado para clonación y amplificación.

Actualmente, el vector de transferencia más usado para introducir genes extraños en AcNPV es pAc373. Se han diseñado también muchos otros vectores, que conocen las personas expertas en la técnica. Entre estos se incluye, por ejemplo, pVL985) que altera el codón de inicio de la polihedrina desde ATG a ATT, y que introduce un emplazamiento de clonación BamHI 32 pares de base corriente abajo del ATT; véase Luckow y Summers, *Virology* (1989) 17: 31.

El plásmido contiene normalmente también la señal de poliadenilación de la polihedrina (Miller y col., (1988) *Ann. Rev. Microbiol.*, 42: 177) y un gen procariota de Resistencia a la ampicilina (*amp*) y un origen de replicación para la selección y propagación en *E. coli*.

Los vectores de transferencia de baculovirus contienen normalmente un promotor de baculovirus. Un promotor de baculovirus es cualquier secuencia de ADN capaz de enlazar una polimerasa de ARN de baculovirus e iniciar la transcripción corriente abajo (5' a 3') de la secuencia de codificación (*por ejemplo*, un gen estructural) en ARNm. Un promotor tendrá una región de inicio de transcripción que está normalmente localizada cerca del extremo 5' de la secuencia de codificación. Este inicio de transcripción incluye normalmente un emplazamiento de enlace de la polimerasa del ARN, y un emplazamiento de inicio de transcripción. Un vector de transferencia de baculovirus también puede tener una segunda región denominada un mejorador, que, si está presente, normalmente es distal al gen estructural. La expresión puede ser tanto regulada como constitutiva.

Los genes estructurales, que se transcriben abundantemente en los últimos momentos del ciclo de infección vírico, proporcionan secuencias de promotor particularmente útiles. Entre los ejemplos se incluyen secuencias derivadas del gen que codifica la proteína poliédrica vírica Friesen y col., (1986) “The Regulation of Baculovirus Gene Expression” en: *The Molecular Biology of Baculoviruses* (ed, Walter Doerfler); EPO Publ. N° 127 839 y 155 476; y el gen que codifica la proteína p10, Vlák y col., (1988), *J. Gen. Virol.*, 69: 765.

El ADN que codifica secuencias señal adecuadas se puede derivar de genes de proteínas de insecto o baculovirus secretadas, tales como el gen de la proteína poliédrica vírica (Carbonell y col., (1988) *Gene*, 73:409). Alternativamente, puesto que parece que las células de insecto reconocen las señales de las modificaciones post-traduccionales de las células de mamífero (tal como la señal de rotura peptídico, rotura proteolítica, y fosforilación), y que las señales necesarias para la secreción y acumulación nuclear también parecen conservarse entre las células de invertebrado y las células de vertebrado, líderes o de origen no insecto, se pueden usar también para conseguir la secreción en insectos las derivadas de genes que codifican el  $\alpha$ -interferón humano, Maeda y col., (1985), *Nature* e 315: 592; péptido liberador de gastrina humano, Lebacqz-Verheyden y col., (1988), *Molec. Cell. Biol.* 8: 3129; IL-2 humana, Smith y col., (1985) *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 82: 8404; IL-3 de ratón, (Miyajima y col., (1987) *Gene* 58: 273; y glucocerebrosidasa humana, Martin y col., (1988) *DNA*, 7: 99.

Un polipéptido o poliproteína recombinante se puede expresar intracelularmente o, si se expresa con las secuencias de regulación adecuadas, se puede secretar. La buena expresión intracelular de proteínas extrañas no fusionadas requiere normalmente genes heterólogos que tengan idealmente una secuencia líder corta que contenga las señales adecuadas de inicio de la traducción precedentes a una señal de inicio ATG. Si se desea, la metionina del N-terminal puede romperse en la proteína madura mediante incubación *in vitro* con bromuro de cianógeno.

Alternativamente, los polipéptidos o poliproteínas recombinantes que no se secretan de forma natural se pueden secretar a partir de una célula de insecto creando moléculas de ADN quimérico que codifican una proteína de fusión que comprende un fragmento de secuencia líder que proporciona la secreción de la proteína extraña en insectos. El fragmento de secuencia líder codifica normalmente un péptido señal que comprende aminoácidos hidrófobos que dirigen la translocación de la proteína en el retículo endoplásmico.

Tras la inserción de la secuencia de ADN y/o el gen que codifica el producto de expresión de la proteína, se transforma un huésped de célula de insecto con el ADN heterólogo del vector de transferencia y el ADN genómico del baculovirus de tipo salvaje -normalmente por co-transfección-. El promotor y la secuencia de terminación de la transcripción del constructo comprenderá normalmente una sección de 2-5 kb del genoma del baculovirus. Se conocen

en la técnica los procedimientos para introducir ADN heterólogo en el emplazamiento deseado del virus de baculovirus (ver Summers y Smith más arriba; Ju y col., (1987); Smith y col., *Mol. Cell. Biol.* (1983) 3: 2156; y Luckow y Summers (1989)). Por ejemplo, la inserción puede ser en el interior de un gen tal como el gen de la polihedrina, mediante recombinación homóloga por doble entrecruzamiento; la inserción puede ser también en un emplazamiento de restricción enzimática diseñado mediante ingeniería genética en el gen deseado de baculovirus. Miller y col., (1989), *Bioessays* 4; 91. La secuencia de ADN, cuando se clona en lugar del gen de la polihedrina en el vector de expresión, está flanqueada en 5' y 3' por secuencias específicas de la polihedrina, y se coloca corriente abajo del promotor de la polihedrina.

El vector de expresión de baculovirus nuevamente formado se empaqueta posteriormente en un baculovirus infeccioso recombinante. La recombinación homóloga se produce con baja frecuencia (entre aproximadamente un 1% y aproximadamente un 5%); así, la mayoría de los virus producidos tras la co-transfección sigue siendo virus de tipo salvaje. Por tanto, se necesita un procedimiento para identificar los virus recombinantes. Una ventaja del sistema de expresión es una selección visual que permite que se distingan los virus recombinantes. La proteína polihedrina, que se produce en el virus nativo, se produce a niveles muy elevados en los núcleos de las células infectadas en los últimos estadios tras la infección vírica. La proteína polihedrina acumulada forma cuerpos de oclusión que también contienen partículas embebidas. Estos cuerpos de oclusión, de hasta 15  $\mu\text{m}$  de tamaño, son muy refractarios, lo que les proporciona un aspecto lustroso brillante que se visualiza fácilmente bajo el microscopio óptico. Las células infectadas con virus recombinantes carecen de cuerpos de oclusión. Para distinguir el virus recombinante del virus de tipo salvaje, se plaquea el sobrenadante de la transfección sobre una monocapa de células de insecto mediante técnicas conocidas de las personas expertas en la técnica. Más en detalle, las placas se seleccionan bajo el microscopio óptico para la presencia (indicativa del virus de tipo salvaje) o ausencia (indicativa del virus recombinante) de los cuerpos de oclusión "Current Protocols in Microbiology" Vol. 2 (Ausubel y col., eds) en 16, 8 (Supl. 10, 1990); Summers & Smith, *más arriba*; Miller y col., (1989).

Se han desarrollado vectores de expresión de baculovirus recombinantes para infección en varias células de insecto. Por ejemplo, se han desarrollado baculovirus recombinantes para, *inter alia*: *Aedes aegypti*, *Autographa californica*, *Bombyx mori*, *Drosophila melanogaster*, *Spodoptera frugiperda*, y *Trichoplusia ni* (Documento WO 89/046699; Carbonell y col., (1985) *J. Virol.*, 56: 153; Wright (1986) *Nature* e 321: 718; Smith y col., (1983) *Mol. Cell. Biol.*, 3: 2156; y véase generalmente, Fraser, y col., (1989) *In vitro Cell. Dev. Biol.* 25: 225).

Las células y los medios de cultivo celulares están comercialmente disponibles para la expresión tanto directa como por fusión de polipéptidos heterólogos en un baculovirus/sistema de expresión; las personas expertas en la técnica conocen a tecnología del cultivo celular. Véase, *por ejemplo*, Summers & Smith *más arriba*.

Las células de insecto modificadas pueden hacerse crecer a continuación en un medio nutriente adecuado, que permite el mantenimiento estable de (de los) plásmido(s) presenten en el huésped de insecto modificado. Cuando el producto de expresión del gen está bajo control inducible, el huésped puede crecer hasta densidad elevada, y la expresión se induce. Alternativamente, cuando la expresión es constitutiva, el producto se expresará de forma continua en el medio, u el medio nutriente debe estar en circulación retirando el producto de interés y aumentando los nutrientes consumidos. El producto se puede purificar mediante técnicas cromatográficas, *por ejemplo*, HPLC, cromatografía por afinidad, cromatografía de intercambio iónico, *etc.* Cuando sea apropiado, el producto se puede purificar de forma adicional, según sea necesario, para eliminar sustancialmente cualesquiera proteínas de insecto que pudieran estar también presentes en el medio, de forma que se proporcione un producto que esté al menos sustancialmente libre de residuos del huésped, por ejemplo, proteínas, lípidos y polisacáridos.

Con el fin de obtener la expresión de la proteína, las células de huéspedes recombinantes derivadas de los transformantes se incuban en condiciones que permitan la expresión de la secuencia que codifica la proteína recombinante. Estas condiciones variarán, dependiendo de la célula huésped seleccionada. Sin embargo, una persona normalmente experta en la técnica puede deducir fácilmente las condiciones, basándose en los que se conoce en la técnica.

### iii. Sistemas de plantas

Existen muchos cultivos de células de plantas y sistemas de expresión genéticos de plantas conocidos en la técnica. Los sistemas de expresión genéticos de plantas de ejemplo incluyen los que se describen en las patentes, tales como la Patente de los Estados Unidos 5.693.506; la Patente de los Estados Unidos 5.659.122; y la Patente de los Estados Unidos 5.608.143. Se han descrito ejemplos adicionales de expresión genética en cultivos de células de plantas en Zenk, *Phytochemistry* 30: 3861-3863 (1991). Se pueden encontrar descripciones de péptidos señal de proteínas de plantas, además de las referencias descritas más arriba, en Vaulcombe y col., *Mol. Gen. Genet.* 209: 33-40 (1987); Chandler y col., *Plant Molecular Biology* 3: 407-418 (1984); Rogers, *J. Biol. Chem.* 260:3731-3738 (1985); Rothstein y col., *Gene* 55: 353-356 (1987); Whittier y col., *Nucleic Acid Research* 15: 2515-2535 (1987); Wirsal y col., *Molecular Microbiology* 3: 3-14 (1989); Yu y col., *Gene* 122: 247-253 (1992). Se puede encontrar una descripción de la regulación de la expresión de genes de planta mediante fitohormonas, ácido giberélico y enzimas secretados inducidos por el ácido giberélico en R. L. Jones y J. MacMillin, Gibberellins: en: *Advanced Plant Physiology*, Malcolm B. Wilkins, ed., 1984 Pitman Publishing Limited, Londres, pp. 21-52. Referencias que describen otros genes regulados por el metabolismo: Sheen, *Plant Cell*, 2: 1027-1038 (1990); Maas y col., *EMBO J.* 9: 3447-3452 (1990); Benkel y Hickey, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84: 1337-1339 (1987).

Típicamente, usando técnicas conocidas en la técnica, se inserta una secuencia de polinucleótidos deseada en un cassette de expresión que comprende elementos reguladores diseñados para funcionamiento en plantas. El cassette de expresión se inserta en un vector de expresión deseado que contiene secuencias corriente arriba y corriente abajo del cassette de expresión adecuado para expresión en una planta huésped. La secuencias de acompañamiento serán de origen plásmido o vírico, y proporcionan al vector las propiedades necesarias para que los vectores muevan ADN desde un huésped de clonación original, tal como una bacteria, hasta la planta huésped deseada. El constructo básico de vector bacteriano/de planta proporcionará preferiblemente un amplio intervalo de de orígenes de replicación de huéspedes procariotas; un marcador de procariota que se puede seleccionar; y, para transformaciones con *Agrobacterium*, la secuencia de ADN T para la transferencia mediada con *Agrobacterium* a los cromosomas de plantas. Aunque no es fácil conseguir la detección del gen heterólogo, el constructo preferiblemente tendrá también un gen marcador que se puede seleccionar para determinar si se ha transformado una célula de planta. Se encuentra una revisión general de los marcadores adecuados, por ejemplo para los miembros de la familia de las herbáceas, en Wilmink y Dons, 1993, *Plant Mol. Biol. Repr*, 11 (2): 165-185.

Se recomiendan también las secuencias adecuadas para permitir la integración de la secuencia heteróloga en el genoma de la planta. Estas pueden incluir las secuencias transposón y similares para recombinación homóloga, así como secuencias Ti que permiten la inserción aleatoria de un cassette de expresión heterólogo en el genoma de la planta. Entre los marcadores procariotas adecuados se incluyen resistencia frente a antibióticos como la ampicilina o tetraciclina. También pueden estar presentes en el vector otras secuencias de ADN que codifican funciones adicionales, tal como se conoce en la técnica.

Las moléculas de ácido nucleico de la presente invención se pueden incluir en un cassette de expresión para la expresión de la(s) proteína(s) de interés. Normalmente habrá un único cassette de expresión, aunque son factibles dos o más. El cassette de expresión recombinante contendrá, además de las secuencias de codificación de la proteína heteróloga, los siguientes elementos: una región de promotor, secuencias no traducidas 5' de planta, codón de inicio dependiendo de si el gen estructura esta equipado, o no, con uno, y una secuencia de finalización de la transcripción y traducción. Emplazamiento se restricción por enzima únicos en los extremos 3' y 5' del cassette permite la fácil inserción de un vector pre-existente.

Una secuencia de codificación heteróloga puede ser para cualquier proteína relacionada con la presente invención. La secuencia que codifica la proteína de interés codificará un péptido señal que permite el procesamiento y translocación de la proteína, según sea apropiado, y que normalmente carecerá de cualquier secuencia que de cómo resultado el enlace de la proteína deseada de la invención a una membrana. Puesto que, para la mayor parte, la región de inicio de la transcripción será para un gen que se exprese y trasloque durante la germinación, mediante el empleo del péptido señal que proporciona la translocación se puede proporcionar también la translocación de la proteína de interés. De esta forma, la(s) proteína(s) de interés se translocará desde las células en las que se expresan y pueden cosecharse de forma eficiente. La secreción normal en semillas se realiza a través de la aleurona o capa de epitelio escutelar en el endospermo de la semilla. Aunque no se necesita que la proteína se secrete desde las células en las que se produce la proteína, esto facilita el aislamiento y purificación de la proteína recombinante.

Puesto que la expresión definitiva del producto de gen deseado será en una célula eucariota, será deseable determinar qué parte del gen clonado contiene las secuencias que serán procesadas como intrones mediante la maquinaria del splicosoma del huésped. Si es así, se puede realizar la mutagénesis dirigida al emplazamiento de la región "intrón" para evitar la pérdida de una parte del mensaje genético en forma de un falso código de intrón. Reed y Maniatis, *Cell* 41: 95-105,1985.

El vector se puede microinyector directamente en las células de plantas mediante micropipetas para transferir mecánicamente el ADN recombinante. Crossway, *Mol. Gen. Genet*, 202: 179-185, 1985. El material genético se puede transferir también a la célula de planta usando polietilén glicol, Krens, y col., *Nature e*, 296, 72-74,1982. Otro procedimiento de introducción de los segmentos de ácido nucleico es la penetración balística de alta velocidad mediante partículas pequeñas en el ácido nucleico, ya sea en el interior de la materia de partículas o perlas pequeñas, o en su superficie Klein, y col., *Nature e*, 327, 70-73, 1987 y Knudsen y Muller, 1991, *Planta*, 185: 330-336 enseñan el bombardeo de partículas en el endospermo de cebada para crear cebada transgénica. Otro procedimiento más de introducción sería la fusión de protoplastos con otras entidades tanto minicélulas, como células, lisosomas u otros cuerpos de superficie lipídica que se pueden fusionar Fraley, y col., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 79, 1859-1863,1982.

El vector se puede introducir también en las células de plantas mediante electroporación (Fromm y col., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 82: 5824,1985). En esta técnica, los protoplastos de plantas se electroporan en presencia de plásmidos que contienen el constructo de gen. Los impulsos eléctricos de campo alto permeabilizan de manera reversible las biomembranas, permitiendo la introducción de los plásmidos. Los protoplastos de plantas electroporados reforman la pared celular, la dividen, y forman callus de plantas.

Se pueden transformar mediante la presente invención todas las plantas cuyos protoplastos se pueden aislar y cultivar para dar plantas enteras regeneradas, de forma que se recuperan las plantas completas que contienen el gen trasferido. Se sabe que prácticamente todas las plantas se pueden regenerar a partir de células o tejidos cultivados, incluyendo pero sin limitarse a las especies principales de caña de azúcar, remolacha azucarera, algodón, frutales y otros árboles, legumbres y vegetales. Algunas plantas adecuadas incluye, por ejemplo, especies de los géneros *Fragaria*, *Lotus*, *Medicago*, *Onobrychis*, *Trifolium*, *Trigottella*, *Vigna*, *Citrus*, *Linum*, *Geranium*, *Manihot*, *Daucus*, *Arabidop-*

*sis, Brassica, Raphallus, Sinapis, Atropa, Capsicum, Datura, Hyoscyamus, Lycopersion, Nicotiana, Solanum, Petunia, Digitalis, Majorana, Cichorium, Helianthus, Lactuca, Bromus, Asparagus, Antirrhinum, Hererocallis, Nemesia, Pelargonium, Panicum, Pennisetuni, Ranunculus, Senecio, Salpiglossis, Cucurnis, Browaalia, Glycine, Lolium, Zea, Triticum, Sorghum, y Datura.*

5 Los medios de regeneración varían de especie a especie de planta, pero generalmente se proporciona en primer lugar una suspensión de protoplastos transformados que contienen copias del gen heterólogo. El tejido del callus se forma, y se pueden inducir vástagos a partir del callo, y enraizarlos seguidamente. Alternativamente, se puede inducir la formación de embriones a partir de la suspensión de protoplastos. Estos embriones germinan como los embri-  
10 nes naturales para formar plantas. El medio de cultivo contendrá por lo general diferentes tipos de aminoácidos y hormonas, tales como auxina y citoquininas. Sería también ventajoso añadir al medio ácido glutámico y prolina, especialmente para especies como maíz y alfalfa. Los vástagos y las raíces se suelen desarrollar a la vez. La regeneración eficiente dependerá del medio, del genotipo, y del historial del cultivo. Si se controlan estas tres variables, entonces la regeneración es completamente reproducible y se puede repetir.

15 En algunos sistemas de células de plantas cultivadas, la proteína deseada de la invención puede extraerse de la planta completa. Cuando la proteína deseada de la invención se secreta al medio, puede recogerse. Alternativamente, los embriones y semillas semiembrionadas u otro tejido de la planta se puede romper mecánicamente para liberar cualquier proteína secretada entre células y tejidos. La mezcla se puede suspender en una solución tampón para localizar las  
20 proteínas solubles. Se usarán a continuación procedimientos convencionales de aislamiento y purificación de proteínas para purificar la proteína recombinante. Se ajustarán parámetros de tiempo, temperatura, pH, oxígeno y volumen, mediante procedimientos rutinarios para optimiza la expresión y la recuperación de la proteína heteróloga.

#### iv. Sistemas bacterianos

25 Se conocen en la técnica las técnicas de expresión bacteriana. Un promotor bacteriano es cualquier secuencia de ADN capaz de enlazarse con la polimerasa bacteriana de ARN e inicial la transcripción corriente abajo (3') de una secuencia de codificación (*por ejemplo*, gen estructural) en un ARNm. Un promotor tendrá una región de iniciación que incluye normalmente un emplazamiento de enlace de la ARN polimerasa y un emplazamiento de inicio de la trans-  
30 cripción. Un promotor bacteriano puede tener también una segunda región denominada operador, que puede solapar un emplazamiento de enlace de la ARN polimerasa adyacente al cual se inicia la síntesis de ARN. El operador permite la transcripción regulada negativa (inducible), como una proteína de gen represor que puede enlazar el operador y por tanto, inhibir la transcripción de un gen específico. Se puede producir la expresión constitutiva en ausencia de ele-  
35 mentos de regulación negativa, tal como el operador- Además, se puede conseguir la regulación positiva mediante una secuencia de proteína de enlace de un gen activador que, si está presente, está próxima (5') a la secuencia de enlace de la ARN polimerasa. Un ejemplo de proteína de un gen activador es la proteína activadora del catabolito (CAP), que ayuda a inicial la transcripción del operón lac en *Escherichia coli* (*E. coli*) [Raibaud y col., (1984) *Annu. Rev. Genet.* 18: 173]. La expresión regulada puede por tanto ser positiva o negativa, mejorando o reduciendo, de esta forma, la transcripción.

40 Las secuencias que codifican enzimas de rutas metabólicas proporcionan secuencias de promotor útiles. Entre los ejemplos se incluyen secuencias de promotor derivados de enzimas que metabolizan azúcares tales como galactosa, lactosa (*lac*) [Chang y col., (1977) *Nature e* 198:1056], y maltosa. Los ejemplos adicionales incluyen secuencias de promotor derivadas de enzimas biosintéticos tales como triptófano (*trp*) [Goeddel y col., (1980) *Nucl. Acids Res.* 8:  
45 4057; Yelverton y col., (1981) *Nucl. Acids Res.* 9: 731; Patente de los Estados Unidos 4.738.921; Documentos EP-A-0036776 y EP-A-0121775]. Los sistemas promotores de la g-laotamase (*bla*) [Weissmann (1981) "The cloning of interferon and other mistakes." En *interferón 3* (ed. I. Gresser)], bacteriófago lambda PL [Shimatake y col., (1981) *Nature e* 292: 128] y T5 [Patente de los Estados Unidos 4. 689.406] también proporcionan secuencias de promotor útiles.

50 Además, los sistemas de promotores sintéticos que no se producen en la Naturaleza actúan también como promotores bacterianos. Por ejemplo, las secuencias de activación de la transcripción de un promotor de bacteria o bacteriófago puede unirse con las secuencias de operón de otro promotor de bacteria o bacteriófago, creando un promotor híbrido sintético [Patente de los Estados Unidos 4.551.,433]. Por ejemplo, el promotor *tac* es un promotor híbrido *trp-lac*  
55 formado por las secuencias del promotor *trp* y del operón *lac* que se regulan mediante el represor *lac* [Amann y col., (1983) *Gene* 25: 167; de Boer y col., (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80: 21]. Además, un promotor bacteriano puede incluir promotores de aparición natural de origen no bacteriano que tienen la capacidad de enlazarse con la ARN polimerasa bacteriana e iniciar la transcripción. Un promotor de origen natural de origen no bacteriano puede acoplarse también con una ARN polimerasa compatible para producir elevados niveles de expresión de algunos genes en proca-  
60 riotas. El sistema bacteriófago T7 ARN polimerasa/promotor es un ejemplo de sistema promotor adecuado [Studier y col., (1986) *J. Mol. Biol.* 189: 113; Tabor y col., (1985) *Proc Natl. Acad. Sci.* 82: 1074]. Además un promotor híbrido puede también comprender un promotor de bacteriófago y una región operador de *E. coli* (EPO-A-0 267 851).

65 Además de una secuencia de promotor funcional, es también útil un emplazamiento de enlace efectivo en el ribosoma para la expresión de genes extraños en procariontas. En *E. coli*, el emplazamiento de enlace del ribosoma se denomina secuencia Shine-Dalgarno (SD), e incluye un codón de inicio (ATG) y una secuencia de 3-9 nucleótidos e longitud localizada 3-11 nucleótidos corriente arriba del codón de inicio [Shine y col., (1975) *Nature e* 254: 34]. Se piensa que la secuencia SD promueve el enlace del ARNm con el ribosoma mediante el emparejamiento de bases

entre la secuencia SD y el extremo 3' del ARNr 16S de *E. coli* [Steitz y col., (1979) "Genetic signals and nucleotide sequences in messenger RNA." En *Biological Regulation and Development: Gene Expression* (ed. R.F. Goldberger)]. Para expresar genes eucariotas y genes procariotas con emplazamiento de enlace débiles en el ribosoma [Sambrook y col., (1989) "Expression of cloned genes in *Escherichia coli*." En *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*].

Una molécula de ADN se puede expresar intracelularmente. Se puede enlazar directamente una secuencia de promotor con la molécula de ADN, en cuyo caso el primer aminoácido en el N-terminal será siempre una metionina, que se codifica mediante el codón de inicio ATG. Si se desea, la metionina del N-terminal se puede separar de la proteína mediante incubación *in vitro* con bromuro de cianógeno o en incubación tanto *in vivo* como *in vitro* con una peptidasa metionina N-terminal bacteriana (EPO-A-0 219 237).

Las proteínas de fusión proporcionan una alternativa a la expresión directa, normalmente, una secuencia de ADN que codifica la porción N-terminal de una proteína endógena de bacteria, y otra proteína estable, se fusiona con el extremo 5' de las secuencias de codificación heterólogas. Tras la expresión, este constructo proporcionará una fusión de las dos secuencias de aminoácidos. Por ejemplo, el gen celular del bacteriófago lambda se puede enlazar al extremo 5' de un gen extraño, y expresarlo en la bacteria. La proteína de fusión resultante retiene un emplazamiento para procesado de enzima (factor Xa) para romper la proteína del bacteriófago procedente del gen extraño [Nagai y col., (1984) *Nature* e 309:810]. Las proteínas de fusión se pueden también fabricar a partir de secuencias del procedentes de los genes *lacZ* [Jia y col., (1987) *Gene* 60: 197], *trpE* [Allen y col., (1987) *J. Biotechnol.* 5: 93; Makoff y col., (1989) *J. Gen. Microbiol.* 135: 11], y *Chey* [EP-A-0 324 647]. La secuencia de ADN en la unión de las dos secuencias de aminoácidos pueden codificar o no un emplazamiento de rotura. Otro ejemplo es la proteína de fusión ubiquitina. Dicha proteína de fusión se fabrica con la región ubiquitina que preferiblemente retiene un emplazamiento de procesado de enzima (por ejemplo, proteasa de procesado específica de la ubiquitina) para separar la ubiquitina de la proteína extraña. Mediante este procedimiento se pueden aislar proteínas nativas extrañas [Miller y col., (1989) *Biol Technology* 7: 698].

Alternativamente, las proteínas extrañas se pueden secretar también desde la célula creando moléculas de ADN quimérico que codifican una proteína de fusión que comprende un fragmento de secuencia de péptido señal que codifica la secreción de la proteína extraña en la célula [Patente de los Estados Unidos 4.336.336]. El fragmento de secuencia señal normalmente un de péptido señal comprendido de aminoácidos hidrófobos que dirigen la secreción de la proteína desde la célula. La proteína se puede tanto secretar en el medio de crecimiento (bacterias gram-positivas), o en el interior del espacio periplásmico, localizado entre las membrana interna y externa de la célula bacterias gram-negativas). Preferiblemente hay emplazamientos de procesado, que se pueden romper tanto *in vivo* como *in vitro*, codificados entre el fragmento de péptido señal y el gen extraño.

El ADN que codifica las secuencias señal adecuadas se pueden derivar de genes de proteínas bacterianas secretadas, tales como el gen de la proteína de la membrana externa de *E. coli* (*ompA*) [Masui y col., (1983), en: *Experimental Manipulation of Gene Expression*; Ghayeb y col., (1984) *EMBO J.* 3: 2437] y la secuencia señal de la fosfatasa alcalina de *E. coli* (*phoA*) [Oka y col., (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 82:7212]. Como ejemplo adicional, se puede usar la secuencia señal del gen de la alfa-amilasa procedente de diferentes cepas de *Bacillus* para secretar proteínas heterólogas a partir de *B. subtilis* [Palva y col., (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 79: 5582; Documento EP-A-0 244 042].

Normalmente, las secuencias de terminación de la transcripción reconocidas por las bacterias son las regiones reguladoras localizadas 3' respecto del codón de detención de la traducción, y así, junto con el promotor, flanquean la secuencia de codificación. Estas secuencias dirigen la transcripción de un ARNm que se puede traducir en el polipéptido codificado mediante el ADN. Las secuencias de terminación de la transcripción incluyen frecuentemente secuencias de ADN de aproximadamente 50 nucleótidos capaces de formar vástagos con estructura en bucle que ayudan a la terminación de la transcripción. Los ejemplos incluyen secuencias de terminación de la transcripción derivadas de genes con promotores fuertes, tales como el gen *trp* de *E. coli* así como otros genes biosintéticos.

Normalmente, los componentes anteriormente descritos, que comprenden un promotor, una secuencia señal (si se desea), una secuencia de codificación de interés, y una secuencia de terminación de la transcripción, se colocan juntos en constructos de expresión. Los constructos de expresión se mantienen a menudo en un replicón, tal como un electrocromosómico (*por ejemplo*, plásmidos) capaces de un mantenimiento estable en un huésped, tal como una bacteria. El replicón tendrá un sistema de replicación, que le permite permanecer en un huésped procariota tanto para la expresión como para la clonación y amplificación. Además, un replicón puede ser un plásmido con número de copias tanto alto como bajo. Un plásmido con número de copias alto generalmente tendrá un número de copias comprendido entre aproximadamente 5 y aproximadamente 200, y usualmente entre aproximadamente 10 y aproximadamente 150. Un huésped que contenga un plásmido con número de copias alto contendrá preferiblemente al menos aproximadamente 10, y más preferiblemente al menos aproximadamente 20 plásmidos. Se puede seleccionar un vector con número de copias tanto alto como bajo, dependiendo del efecto del vector y de la proteína extraña en el huésped.

Alternativamente, los constructos de expresión se pueden integrar en el genoma bacteriano con un vector de integración. Los vectores de integración contienen normalmente al menos una secuencia homóloga al cromosoma bacteriano que permite integrar el vector. Las integraciones parecen ser el resultado de recombinaciones entre ADN homólogo en el vector y el cromosoma bacteriano. Por ejemplo, los vectores de integración construidos con ADN procedente de varias cepas de *Bacillus* se integran en el cromosoma de *Bacillus* (EP-A-0 127 328). Los vectores de integración pueden también comprender secuencias de bacteriófago o transposón.

Normalmente los constructos de expresión extracromosómicos e integrantes pueden contener marcadores que se pueden seleccionar para permitir la selección de cepas bacterianas que se han transformado. Los marcadores que se pueden seleccionar se pueden expresar en el huésped bacteriano, y pueden incluir genes que hacen que la bacteria sea resistente a fármacos tales como ampicilina, cloramfenicol, eritromicina, kanamicina (neomicina), y tetraciclina [Davies y col., (1978) *Annu. Rev. Microbiol.* 32: 469]. Los marcadores que se pueden seleccionar pueden incluir también genes biosintéticos tales como los de las rutas biosintéticas de histidina, triptófano, y leucina.

Alternativamente, alguno de los componentes descritos más arriba se pueden juntar en vectores de transformación. Los vectores de transformación están comprendidos usualmente de un marcador que se pueden seleccionar que se mantiene bien en un replicón o se desarrolla en un vector de integración, tal como se ha descrito más arriba.

Los vectores de transformación y expresión, ya sean replicones extracromosómicos o vectores de integración, se han desarrollado para transformación en muchas bacterias. Por ejemplo, se han desarrollado vectores de expresión para, *inter alia*, las siguientes bacterias: *Bacillus subtilis* [Palva y col., (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 79: 5582; Documentos EP-A-0 036 259 y EP-A-0 063 953; Documento WO84/04541], *Escherichia coli* [Shimatake y col., (1981) *Nature* 292: 128; Amann y col., (1985) *Gene* 40: 183; Studier y col., (1986) *J. Mol. Biol.* 189: 113; Documentos EP-A-0 036776, EP-A-0 136 829 y EP-A-0 136 907], *Streptococcus cremoris* [Powell y col., (1988) *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 655]; *Streptococcus lividans* [Powell y col., (1988) *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 655], *Streptomyces lividans* [Patente de los Estados Unidos 4.745.056].

Los procedimientos para introducir ADN exógeno en huéspedes bacterianos son bien conocidos en la técnica, y normalmente incluye cualquiera de las transformaciones de las bacterias tratadas con  $\text{CaCl}_2$  u otros agentes, tales como cationes divalentes y DMSO. El ADN también se puede introducir en las células bacterianas mediante electroporación. Los procedimientos de transformación varían normalmente con la especie bacteriana a transformar. Véase, por ejemplo, [Masson y col., (1989) *FEMS Microbiol. Lett.* 60: 273; Palva y col., (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 79: 5582; Documentos EP-A-0 036 259 y EP-A-0 063 953; Documento WO 84/04541, Bacilos], [Miller y col., (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 85: 856; Wang y col., (1990) *J. Bacteriol.* 172: 949, *Campilobacter*], [Cohen y col., (1973) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 69: 2110; Dower y col., (1988) *Nucl. Acids Res.* 16: 6127; Kushner (1978) "An improved method for transformation of *Escherichia coli* with ColEI-derived plasmids. In *Genetic Engineering: Proceedings of the International Symposium on Genetic Engineering* (eds. H.W. Boyer y S. Nicosia); Mandel y col., (1970) *J. Mol. Biol.* 53: 159; Taketo (1988) *Biochim. Biophys. Acta* 949: 318; *Escherichia*], [Chassy y col., (1987) *FEMS Microbiol. Lett.* 44: 173 *Lactobacilo*]; [Fiedler y col., (1988) *Anal. Biochem* 170: 38, *Pseudomonas*]; [Augustin y col., (1990) *FEMS Microbiol. Lett.* 66: 203, estafilococos], [Barany y col., (1980) *J. Bacteriol.* 144: 698; Harlander (1987) "Transformation of *Streptococcus lactis* by electroporation, en: *Streptococcal Genetics* (ed. J. Ferretti y R. Curtiss III); Perry y col., (1981) *Infect. Immun.* 32: 1295; Powell y col., (1988) *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 655; Somkuti y col., (1987) *Proc. 4th Evr. Cong. Biotechnology* 1:412, estreptococos].

#### v. Expresión en levaduras

Los sistemas de expresión en levaduras son también conocidos de una persona normalmente experta en el técnica. Un promotor de levadura es cualquier secuencia de ADN capaz de enlazar una ARN polimerasa de levadura, e iniciar la transcripción corriente abajo (3') de una secuencia de codificación (*por ejemplo*, gen estructural) en ARNm. Un promotor tendrá una región de inicio de transcripción que normalmente se sitúa próxima al extremo 5' de la secuencia de codificación. Esta región de inicio de transcripción incluye normalmente un emplazamiento de enlace de la ARN polimerasa (la "caja TATA") y un emplazamiento de inicio de transcripción. Un promotor de levadura puede tener también una segunda región denominada un activador de secuencia corriente arriba de (UAS), que, si está presente, es normalmente distal al gen estructural El UAS permite la expresión regulada (inducible). La expresión constitutiva se produce en ausencia de UAS. La expresión regulada puede ser tanto positiva como negativa, mejorando o reduciendo la transcripción de esta forma.

La levadura es un organismo fermentador con una ruta metabólica activa, por tanto las secuencias que codifican enzimas de la ruta metabólica proporcionan secuencias de promotor particularmente útiles. Entre los ejemplos se incluyen alcohol deshidrogenasa (ADH) (EP-A-0 284 044), enolasa, glucoquinasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa (GAP o GAPDH), hexoquinasa, fosfofructoquinasa, 3-fosfoglicerato mutasa, y piruvato quinasa (PiK) (EPO A-0 329203). El gen de levadura *PH05*, que codifica la fosfatasa ácida, también proporciona una secuencia de promotor útil [Myanoharay col., (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 1].

Además, los sistemas de promotores sintéticos que no se producen en la Naturaleza actúan también como promotores bacterianos. Por ejemplo, las secuencias UAS de un promotor de levadura puede unirse con las secuencias de operón de otro promotor de bacteria o bacteriófago, creando un promotor híbrido sintético [Patentes de los Estados Unidos 4.876.197 y 4.880.734. Otros ejemplos de promotores híbridos incluyen promotores que contienen las secuencias de regulación de los genes *ADH2*, *GAL4*, *GAL10*, o *PH05*, combinados con la región de activación de la transcripción de un gen de enzima glicolítico tal como GAP o PiK (EP-A-0 164 556). Además, un promotor de levadura puede incluir promotores de aparición natural de origen no levadura que tienen la capacidad de enlazarse con la ARN polimerasa de la levadura e iniciar la transcripción. Entre los ejemplos de dichos promotores se incluyen, *inter alia*, [Cohen y col., (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 1078; Henikoff y col., (1981) *Nature* 283: 835; Hollenberg y col., (1981) *Curr. Topics Microbiol. Immunol.* 96: 119; Hollenberg y col., (1979) "The Expression of Bacterial Antibiotic Resistance Genes in the Levadura *Saccharomyces cerevisiae*," en: *Plasmids of Medical, Environmental and*

*Commercial Importance* (eds. K. N. Timmis y A. Puhler); Mercerau-Puigalon y col., (1980) *Gene* 11: 163; Panthier y col., (1980) *Curr. Genet.* 2: 109;].

Una molécula de ADN se puede expresar intracelularmente en una levadura. Se puede enlazar directamente una secuencia de promotor con la molécula de ADN, en cuyo caso el primer aminoácido en el N-terminal de la proteína recombinante será siempre una metionina, que se codifica mediante el codón de inicio ATG. Si se desea, la metionina del N-terminal se puede separar de la proteína mediante incubación *in vitro* con bromuro de cianógeno.

Las proteínas de fusión proporcionan una alternativa a los sistemas de expresión en levaduras, así como en sistemas de expresión en mamífero, baculovirus, y bacterianos. Normalmente, una secuencia de ADN que codifica la porción N-terminal de una proteína endógena de levadura, u otra proteína estable, se fusiona con el extremo 5' de las secuencias de codificación heterólogas. Tras la expresión, este constructo proporcionará una fusión de las dos secuencias de aminoácidos. Por ejemplo, el gen de la superóxido dismutasa (SOD) de levadura o humana se puede enlazar al extremo 5' de un gen extraño, y expresarlo en la levadura. La secuencia de ADN en la unión de las dos secuencias de aminoácidos pueden codificar o no un emplazamiento de rotura. *Ver por ejemplo*, el Documento EP-A-0196 056. Dicha proteína de fusión se fabrica con la región ubiquitina que preferiblemente retiene un emplazamiento de procesado de enzima (por ejemplo, proteasa de procesado específica de la ubiquitina) para separar la ubiquitina de la proteína extraña. Mediante este procedimiento se pueden aislar proteínas nativas extrañas (*por ejemplo*, Documento W088/024066).

Alternativamente, las proteínas extrañas se pueden secretar también desde la célula en el medio de crecimiento creando moléculas de ADN quimérico que codifican una proteína de fusión que comprende un fragmento de secuencia líder que proporciona la secreción de la proteína extraña en la levadura. Preferiblemente hay emplazamientos de procesado, codificados entre el fragmento de secuencia líder y el gen extraño que se pueden romper tanto *in vivo* como *in vitro*. El fragmento de secuencia líder codifica normalmente un péptido señal comprendido de aminoácidos hidrófobos que dirigen la secreción de la proteína desde la célula.

El ADN que codifica las secuencias señal adecuadas se puede derivar de genes de proteínas de levadura secretadas tales como el gen de la levadura invertasa (Documentos EP-A-0 012 873; JPO. 62.096.086) y el gen del factor A (Patente de los Estados Unidos 4.588.684). Alternativamente, hay líderes de origen no-levadura, tal como un líder de interferón, que también proporcionan la secreción en la levadura (Documento EP-A-0 060 057).

Una clase preferida de líderes de secreción son aquellos que emplean un fragmento del gen del factor alfa, que contiene tanto una secuencia "pre-sígnal" como una región "pro". Los tipos de fragmentos del gen del factor alfa que se pueden emplear incluye el líder factor alfa pre-pro de longitud completa (aproximadamente 83 residuos de aminoácidos) así como los líderes de factor alfa truncados (normalmente entre aproximadamente 25 y aproximadamente 50 residuos de aminoácidos) (Patente de los Estados Unidos 4.546.083 y 4.870.008; Documento EP-A-0 324 274). Otros líderes que emplean un fragmento líder del factor alfa que proporcionan secreción incluye los líderes del factor alfa híbridos que se fabrican con una presecuencia de una primera levadura, pero una pro-región procedente de un segundo factor alfa de levadura (*por ejemplo*, véase el Documento WO 89/02463.)

Normalmente, las secuencias de terminación de la transcripción reconocidas por las levaduras son las regiones reguladoras localizadas 3' respecto del codón de detención de la traducción, y así, junto con el promotor, flanquean la secuencia de codificación. Estas secuencias dirigen la transcripción de un ARNm que se puede traducir en el polipéptido codificado mediante el ADN. Los ejemplos de secuencias de terminación de la transcripción y otras secuencias de terminación reconocidas por las levaduras, tales como las que codifican los enzimas glicolíticos.

Normalmente, los componentes anteriormente descritos, que comprenden un promotor, una secuencia señal (si se desea), una secuencia de codificación de interés, y una secuencia de terminación de la transcripción, se colocan juntos en constructos de expresión. Los constructos de expresión se mantienen a menudo en un replicón, tal como un electo extracromosómico (*por ejemplo*, plásmidos) capaces de un mantenimiento estable en un huésped, tal como una levadura o bacteria. El replicón puede tener dos sistemas de replicación, lo que le permite permanecer, por ejemplo, en una levadura para la expresión y en un huésped de procarionota tanto para como para la clonación y amplificación. Entre los ejemplos de estos vectores lanzadera levadura-bacteria se incluyen YEp24 [Botstein y col., (1979) *Gene* 8: 17-24], pCII [Brake y col., (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 81: 4642-4646], y YRp17 [Stinchcomb y col., (1982) *J. Mol. Biol.* 158: 157]. Además, un replicón puede ser un plásmido con número de copias tanto alto como bajo. Un plásmido con número de copias alto generalmente tendrá un número de copias comprendido entre aproximadamente 5 y aproximadamente 200, y usualmente entre aproximadamente 10 y aproximadamente 150. Un huésped que contenga un plásmido con número de copias alto contendrá preferiblemente al menos aproximadamente 10, y más preferiblemente al menos aproximadamente 20 plásmidos. Se puede seleccionar un vector con número de copias tanto alto como bajo, dependiendo del efecto del vector y de la proteína extraña en el huésped. Véase *por ejemplo*, Brake y col., más arriba.

Alternativamente, los constructos de expresión extracromosómicos se pueden integrar en el genoma de la levadura con un vector integrante. Los vectores integrantes contienen normalmente al menos una secuencia homóloga respecto de un cromosoma de levadura que permite que el vector se integre, y de manera preferible contiene dos secuencias homólogas que flanquean el constructo de expresión. Las integraciones parecen ser el resultado de recombinaciones entre ADN homólogos en el vector y en el cromosoma de la levadura [Orr-Weaver y col., (1983) *Methods in Enzymol.* 101:228-245]. Se puede dirigir un vector integrante a un locus específico de la levadura seleccionando la secuencia

homóloga apropiada para su inclusión en el vector. Ver Orr-Weaver y col., *más arriba*. Uno o más constructor de expresión se pueden integrar, afectando posiblemente los niveles de proteína recombinante producida [Rine y col., (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:6750]. Las secuencias cromosómicas incluidas en el vector se pueden presentar como un único segmento en el vector, que da como resultado la integración del vector completo, o dos segmentos homólogos a segmentos adyacentes en el cromosoma y que flanquean el constructo de expresión en el vector, lo que puede dar como resultado la integración estable de únicamente el constructo de expresión.

Normalmente, los constructos de expresión extracromosómicos e integrantes pueden contener marcadores que se pueden seleccionar para permitir la selección de cepas de levadura que se han transformado. Los marcadores que se pueden seleccionar pueden incluir genes biosintéticos que se expresan en el huésped de levadura tales como *ADE2*, *HIS4*, *LEU2*, *TRP1*, y *ALG7*, así como el genes de resistencia *G418*, que confieren resistencia a las células de levadura a la tunicamicina y *G418*, respectivamente. Además, un marcador adecuado que se pueden seleccionar proporciona a la levadura la capacidad de crecer en presencia de compuestos tóxicos, tal como un metal. Por ejemplo, la presencia de *CUP1* permite que la levadura crezca en presencia de iones cobre [Butt y col., *Microbiol. Rev.*, 51:351]

Alternativamente, alguno de los componentes descritos más arriba se pueden juntar en vectores de transformación. Los vectores de transformación están comprendidos usualmente de un marcador que se puede seleccionar que se mantiene bien en un replicón o se desarrolla en un vector de integración, tal como se ha descrito más arriba.

Los vectores de transformación y expresión, ya sean replicones extracromosómicos o vectores de integración, se han desarrollado para transformación en muchas levaduras. Por ejemplo, se han desarrollado vectores de expresión para, *inter alia*, las siguientes levaduras: *Candida albicans* [Kurtz, y col., (1986) *Mol. Cell. Biol.* 6:142], *Candida maltosa* [Kunze, y col., (1985) *J. Basic Microbiol.*, 25:141]. *Hansenula polymorpha* [Gleeson, y col., (1986) *J. Gen. Microbiol.* 132:3459; Roggenkamp y col., (1986) *Mol. Gen. Genet.* 202:302], *Kluyveromyces fragilis* [Das, y col., (1984) *J. Bacteriol.* 158:1165], *Kluyveromyces lactis* [De Louvencourt y col., (1983) *J. Bacteriol.* 154:737; Van den Berg y col., (1990) *Bio/Technology* 8:135], *Pichia guilliermondii* [Kunze y col., (1985) *J. Basic Microbiol.* 25:141], *Pichia pastoris* [Cregg, y col., (1985) *Mol. Cell. Biol.* 5:3376; Patentes de los Estados Unidos con nros 4.837.148 y 4.929.555], *Saccharomyces cerevisiae* [Hinnen y col., (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:1929; Ito y col., (1983) *J. Bacteriol.* 153:163], *Schizosaccharomyces pombe* [Beach and Nurse (1981) *Nature* 300:706], y *Yarrowia lipolytica* [Davidow, y col., (1985) *Curr. Genet.* 10:380471 Gaillardin, y col., (1985) *Curr. Genet.* 10:49].

Los procedimientos para introducir ADN exógeno en huéspedes de levadura son bien conocidos en la técnica, e incluyen normalmente tanto la transformación de esferoplastos o células de levadura intactas tratadas con cationes alcalinos. Los procedimientos de transformación normalmente varían con la especie de levadura a transformar. Véase, *por ejemplo*, [Kurtz y col., (1986) *Mol. Cell. Biol.* 6:142; Kunze y col., (1985) *J. Basic Microbiol.* 25:141; *Candida*]; [Gleeson y col., (1986) *J. Gen. Microbiol.* 132:3459; Roggenkamp y col., (1986) *Mol. Gen. Genet.* 202:302; *Hansenula*]; [Das y col., (1984) *J. Bacteriol.* 158:1165; De Louvencourt y col., (1983) *J. Bacteriol.* 154:1165; Van den Berg y col., (1990) *Bio/Technology* 8:135; *Kluyveromyces*]; [Cregg y col., (1985) *Mol. Cell. Biol.* 5:3376; Kunze y col., (1985) *J. Basic Microbiol.* 25:141; Patentes de los Estados Unidos con nros 4.837.148 y 4.929.555; *Pichia*]; [Hinnen y col., (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 1929; Ito y col., (1983) *J. Bacteriol.* 153:163 *Saccharomyces*]; [Beach and Nurse (1981) *Nature* 300:706; *Schizosaccharomyces*]; [Davidow y col., (1985) *Curr. Genet.* 10:39; Gaillardin y col., (1985) *Curr. Genet.* 10:49; *Yarrowia*].

#### Anticuerpos

Tal como se usa en el presente documento, el término “anticuerpo” se refiere a polipéptido o grupo de polipéptidos compuesto al menos por un emplazamiento de combinación de anticuerpo. Un “emplazamiento de combinación de anticuerpo” es un espacio de enlace tridimensional con una forma de superficie interna y una distribución de carga complementaria a las características de un epítipo de un antígeno, que permite el enlace de un anticuerpo con el antígeno. “Anticuerpo” incluye, por ejemplo, anticuerpos de vertebrado, anticuerpos híbridos, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos alterados, anticuerpos univalentes, proteínas FAB, y anticuerpos de dominio único.

Los anticuerpos frente a las proteínas de la invención son útiles para cromatografía de afinidad, inmunoensayos, y distinguir/identificar proteínas de *Neisseria*.

Los anticuerpos frente a las proteínas de la invención, tanto policlonales como monoclonales, se preparan mediante procedimientos convencionales. En general, la proteína se usa en primer lugar para inmunizar un animal adecuado, preferiblemente un ratón, rata, conejo o cabra. Los conejos y cabras se prefieren para la preparación de sueros policlonales debido al volumen de suero que se puede obtener, y la disponibilidad de anticuerpos marcados anti-conejo y anti-cabra. La inmunización se lleva a cabo por lo general mezclando o emulsionando la proteína en suero salino, preferiblemente en un adyuvante tal como adyuvante completo de Freund, e inyectando la mezcla o emulsión por vía parenteral (generalmente subcutánea o intramuscular). Suele ser suficiente una dosis de 50-200  $\mu\text{g}$ /inyección. La inmunización se estimula 2-6 semanas después con una o más inyecciones de proteína en suero salino, preferiblemente en adyuvante incompleto de Freund. Se pueden generar anticuerpos alternativamente mediante inmunización *in vitro* usando procedimientos conocidos en la técnica, que a efectos de esta invención se considera equivalente a la inmunización *in vivo*. Se obtiene el antisuero policlonal extrayendo sangre del animal inmunizado a un recipiente de vidrio o plástico, incubando la sangre durante 25° durante una hora, seguido por incubación a 4°C durante 2-18 horas. El suero

se recuperó por centrifugación (*por ejemplo*, 1.000 g durante 10 minutos). Se puede obtener 20-50 ml por extracción de sangre en conejos.

Los anticuerpos monoclonales se preparan usando el procedimiento convencional de Kohler & Milstein [*Nature* (1975) 256:495-96], o una modificación del mismo. Normalmente, se inmuniza un ratón o rata como se ha descrito más arriba. Sin embargo, en lugar de sangrar el animal para extraer el suero, se retira el bazo (y algunas veces algunos ganglios linfáticos principales) y se disocia en células sencillas. Si se desea, las células del bazo se pueden separar (tras la separación de las células adherentes no específicas) aplicando la suspensión celular a una placa o pocillo recubierto con el antígeno de la proteína. Las células B que expresan la inmunoglobulina enlazada con la membrana específicas del antígeno se enlazan a la placa, y no se eliminan por aclarado con el resto de la suspensión. Las células B resultantes, o todas las células de bazo disociadas, son inducidas a continuación a fusionarse con células de mieloma para formar hibridomas, y se cultivan en un medio selectivo (*por ejemplo*, medio de hipoxantina, aminopterina, timidina "HAT"). Los hibridomas resultantes se plaquean con dilución limitada, y se ensayan respecto de la producción de anticuerpos que se enlazan específicamente con el agente inmunizante (y que no se enlazan con antígenos no relacionados). Los hibridomas que segregan MAb seleccionados se cultivan a continuación tanto *in vitro* (*por ejemplo*, en frascos para cultivos de tejido o reactores de fibra hueca), como *in vivo* (como ascites en ratones).

Si se desea, los anticuerpos (tanto policlonales como monoclonales) se pueden marcar usando técnicas convencionales. Los marcadores adecuados incluyen fluoróforos, cromóforos, átomos radioactivos (particularmente <sup>32</sup>P and <sup>125</sup>I), reactivos con densidad electrónica, enzimas, y ligandos que tengan compañeros de enlace específicos. Los enzimas se detectan típicamente por su actividad. Por ejemplo, se usa normalmente la peroxidasa de rábano picante para detectar su capacidad para convertir la 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) en un pigmento azul, que se puede cuantificar con un espectrofotómetro. El "compañero de enlace específico" se refiere a una proteína capaz de enlazar una molécula ligando con especificidad elevada, como por ejemplo en el caso de un antígeno y el anticuerpo monoclonal específico del mismo. Otros compañeros de enlace específicos incluyen biotina y avidina o estreptavidina, IgG y proteína A, y las numerosas parejas enlace - receptor conocidas en la técnica. Debe entenderse que la descripción anterior no intenta clasificar las diferentes marcas en diferentes clases, ya que la misma etiqueta puede actuar de diferentes modos. Por ejemplo, el <sup>125</sup>I puede usarse como una marca radioactiva o como un reactivo con densidad electrónica. HRP puede actuar como enzima o como antígeno de un MAb. Más aún, se pueden combinar varias etiquetas para el efecto deseado. Por ejemplo, MAb y avidina también requieren etiquetas para la práctica de esta invención: así, se puede etiquetar un MAb con biotina, y detectar su presencia con avidina marcada con <sup>25</sup>I, o con un MAb anti-biotina, y detectar su presencia con avidina marcada con <sup>25</sup>I, o con un MAb anti-biotina marcado con HRP. Otras posibilidades y permutaciones serán fácilmente evidentes para las personas normalmente expertas en la técnica, y se consideran como equivalentes en el alcance de la presente invención.

### Composiciones farmacéuticas

Las composiciones farmacéuticas pueden comprender cualesquiera polipéptidos, anticuerpos, o ácidos nucleicos de la invención. Las composiciones farmacéuticas comprenderán una cantidad terapéuticamente efectiva de cualesquiera polipéptidos, anticuerpos, o polinucleótidos de la invención reivindicada.

El término "cantidad terapéuticamente efectiva" tal como se usa en el presente documento se refiere a una cantidad de un agente terapéutico para tratar, mejorar o evitar una enfermedad o dolencia deseada, o para mostrar un efecto detectable terapéutico o de preservación. El efecto se puede detectar mediante, por ejemplo marcadores químicos o niveles de antígeno. Los efectos terapéuticos pueden incluir también la reducción en los síntomas físicos, tal como la disminución de la temperatura corporal. La cantidad efectiva precisa para un sujeto dependerá del tamaño del sujeto y su salud, la naturaleza y extensión de la dolencia, y la terapéutica o combinación de terapéutica seleccionada para la administración. Así, no es útil especificar una cantidad efectiva exacta por adelantado. Sin embargo, la cantidad efectiva para una situación dada se puede determinar mediante experimentación de rutina, y queda a juicio del médico a cargo del paciente.

Para los objetivos de la presente invención, una dosis efectiva estará comprendida entre aproximadamente 0,01 mg/kg y 50 mg/kg o entre 0,05 mg/kg y aproximadamente 10 mg/kg de los constructos de ADN en el individuo al cual se administran.

Una composición farmacéutica puede contener también un vehículo farmacéuticamente aceptable. El término "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a un vehículo para la administración de un agente terapéutico, tales como anticuerpos o un polipéptido, genes, y otros agentes terapéuticos. El término se refiere a cualquier vehículo farmacéutico que por sí mismo no induzca la producción de anticuerpos perjudiciales al individuo que recibe la composición, y que se pueden administrar sin toxicidad prevista. Los vehículos adecuados pueden ser macromoléculas grandes de metabolización lenta tales como proteínas, polisacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, aminoácidos copoliméricos y partículas víricas inactivas. Dichos vehículos son muy conocidos de las personas normalmente expertas en la técnica.

Se pueden usar en lo anterior sales farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, sales de ácidos minerales tales como clorhidratos, bromhidratos, fosfatos, sulfatos, y similares; y las sales de ácidos orgánicos tales como acetatos, propionatos, malonatos, benzoatos y similares. Una completa discusión acerca de los excipientes farmacéuticamente aceptables se encuentra en Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Pub. Co., N.J. 1991).

## ES 2 278 920 T3

Los vehículos farmacéuticamente aceptables en las composiciones terapéuticas pueden contener líquidos tales como agua, solución salina, glicerol y etanol. Pueden estar también presentes en dichos vehículos sustancias auxiliares, tales como agentes mojantes o emulsionantes, sustancias que tamponan el pH y similares. Normalmente, las composiciones terapéuticas se preparan en forma de inyectables, ya sea como soluciones líquidas o suspensiones. Los liposomas se incluyen en la definición de un vehículo farmacéuticamente aceptable.

### *Procedimientos de administración*

Una vez formuladas las composiciones de la invención se pueden administrar directamente al sujeto. Los sujetos a tratar pueden ser animales; en particular, se pueden tratar sujetos humanos.

La administración directa de las composiciones se realizará generalmente mediante inyección, ya sea por vía subcutánea, intraperitoneal, intravenosa o intramuscular en el espacio intersticial de un tejido. Las composiciones se pueden administrar también en una lesión. Otros modos de administración incluyen la administración oral y pulmonar, aplicaciones en supositorios, transdérmica o transcutánea (*por ejemplo, consultar WO98/20734*), agujas, pistolas génicas o hiporciadores.

### *Vacunas*

Las vacunas de acuerdo con la invención pueden ser tanto profilácticas (es decir, para evitar la infección) como terapéuticas (es decir, para tratar la enfermedad antes de la infección).

Dichas vacunas comprenden antígeno(s) inmunizantes, inmunógeno(s), proteína(s) o ácidos nucleicos, normalmente en combinación con "vehículos farmacéuticamente aceptables," que incluye cualquier vehículo que por sí mismo no induzca la producción de anticuerpos perjudiciales al individuo que recibe la composición. Los vehículos adecuados pueden ser macromoléculas grandes de metabolismo lento tales como proteínas, polisacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, aminoácidos copoliméricos, agregados lípidos (tales como gotitas de aceite o liposomas) y partículas víricas inactivas. Dichos vehículos son muy conocidos de las personas normalmente expertas en la técnica. Además, estos vehículos pueden actuar como agentes inmunoestimulantes (Adyuvantes). Más aún, el antígeno o inmunógeno se puede conjugar con un toxoide bacteriano, tal como un toxoide de los patógenos difteria, tétanos, cólera, *H. pylori*, etc.

Los adyuvantes preferidos para mejorar la eficacia de la composición incluyen, pero no se limitan a: (1) sales de aluminio (alum), tales como hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, sulfato de aluminio, etc; (2) formulaciones de emulsión de aceite en agua (con o sin otros agentes inmunoestimulantes específicos tales como péptidos de muramilo (ver más adelante) o componentes de la pared bacteriana, tales como por ejemplo (a) MF59<sup>TM</sup> (Documento WO 90/14837; capítulo 10, en *Vacuna design: the subunit and adjuvant approach*, eds. Powell & Newman, Plenum Press 1995), que contiene escualeno al 5%, Tween 80 al 0,5%, y Span 85 al 0,5%, (conteniendo opcionalmente diferentes cantidades de MTP-PE (ver más adelante), aunque no es necesario) formulado en partículas submicrométricas usando un micofluidizador tal como un micofluidizador Model 110Y (Microfluidics, Newton, MA); (b) SAF, que contiene escualeno al 10%, Tween 80 al 0,4%, y polímero de plurónico bloqueado L21al 5% y thr-MDP (ver más adelante) o tanto micofluidizada en una emulsión submicrométrica como sometida a vortización para generar una emulsión de tamaño de partícula más grande y (c) Ribí<sup>TM</sup> sistema adyuvante (RAS), (Ribi Immunochem, Hamilton, MT) que contiene escualeno al 2%, Tween 80 al 0,2%, y uno o más componentes de pared bacteriana procedentes del grupo constituido por monofosforolípido A (MPL), dimicolato de trehalosa (TDM), y esqueleto de pared celular (CWS), preferiblemente MPL+CWS (Detox<sup>TM</sup>); (3) se pueden usar adyuvantes de saponina tales como Stimulon<sup>TM</sup> (Cambridge Bioscience, Worcester, MA) o partículas generadas a partir del anterior tales como ISCOM (complejos inmunoestimulantes); (4) adyuvante completo de Freund (CFA) y adyuvante incompleto de Freund (IFA); (5) citoquinas, tales como interleuquinas (*por ejemplo, IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12, etc.*), (interferones (*por ejemplo, gamma interferón*), factor estimulante de colonias de macrófago (M-CSF), factor de necrosis tumoral (TNF), etc; y (6) otras sustancias que actúan para mejorar la eficacia de la composición. Se prefieren alum y MF59<sup>TM</sup>.

Tal como se ha mencionado más arriba, los péptidos de muramilo incluyen, pero no se limitan a, N-acetil-muramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetil-normuramil-L-alanil-D-isoglutamina (nor-MDP), N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-hidroxfosforiloxi)-etilamina (MTP-PE), etc.

Las composiciones inmunogénicas (*por ejemplo, de antígeno inmunizante/inmunógeno/polipéptido/proteína/ácidos nucleicos, vehículo farmacéuticamente aceptable, y adyuvante*) contendrán normalmente diluyentes, tales como agua, solución salina, glicerol, etanol, etc. Además, pueden estar presentes en dichos vehículos sustancias auxiliares tales como agentes emulsionantes o mojantes, sustancias tamponadoras del 'H, y similares.

Normalmente, las composiciones terapéuticas se preparan en forma de inyectables, ya sea como soluciones líquidas o suspensiones; Se pueden preparar también formas sólidas adecuadas para ponerlas en solución, o en suspensión, en vehículos líquidos antes de la inyección. La preparación puede estar también emulsionada o encapsulada en liposomas para un mejor efecto adyuvante, tal como se ha descrito más arriba en el apartado de vehículos farmacéuticamente aceptables.

Las composiciones inmunogénicas usadas como vacunas comprenden una cantidad inmunológicamente efectiva de los polipéptidos antigénicos o inmunogénicos, así como cualquier otro de los componentes anteriormente mencionados, según sea necesario. Por “cantidad inmunológicamente efectiva” se entiende que la administración de esa cantidad a un individuo, ya sea en una dosis única o como parte de una serie, es efectiva en el tratamiento o prevención. Esta cantidad varía dependiendo de la salud y estado físico del individuo a tratar, el grupo taxonómico del individuo a tratar (*por ejemplo*, primate no humano, primate, etc.), la capacidad del sistema inmune del individuo para sintetizar anticuerpos, el grado de protección deseado, la formulación de la vacuna, la evaluación de la situación médica por parte del médico a cargo del paciente, y otros factores relevantes. Se espera que la cantidad esté comprendida en un intervalo relativamente amplio, que se puede determinar mediante ensayos de rutina.

Las composiciones inmunogénicas se administran convenientemente de forma parenteral (*por ejemplo*, mediante inyección, ya sea por vía subcutánea, o intramuscular transdérmica/transcutánea (*por ejemplo*, consultar WO98/20734). Otras formulaciones adecuadas para otros modos de administración incluye formulaciones para la administración oral y pulmonar, aplicaciones en supositorios, y aplicaciones transdérmicas. La dosificación del tratamiento puede ser una aplicación de una dosis única o una temporalización de múltiples dosis. La vacuna se puede administrar junto con otros agentes inmunoreguladores.

Como alternativa a las vacunas basadas en proteína, se puede usar la vacunación con ADN [*por ejemplo*, Robinson & Torres (1997) *Seminars in Immunol* 9:271-283; Donnelly y col., (1997) *Annu Rev Immunol* 15:617-648; más adelante en el presente documento].

#### *Vehículos de dosificación de genes*

Los vehículos de terapia de genes para la dosificación de constructos que incluyen una secuencia de genes de un producto terapéutico de la invención, para dosificar a un mamífero para la expresión en el mamífero, se puede administrar tanto local como sistémicamente. Estos constructos pueden utilizar soluciones de vector vírico o no vírico en modalidad *in vivo* o *ex vivo*. La expresión de dicha secuencia de codificación se puede inducir usando promotores endógenos de mamífero o bien heterólogos. La expresión de dicha secuencia de codificación *in vivo* puede ser tanto constitutiva como regulada.

La invención incluye vehículos de dosificación de genes capaces de expresar las secuencias previstas de ácidos nucleicos. El vehículo de dosificación de genes es preferiblemente un vector vírico y, más preferiblemente, un vector retrovírico, adenovírico, adeno-asociado vírico (AAV), herpes vírico, o alfavirus. El vector vírico puede ser también un vector vírico de astrovirus, coronavirus, ortomixovirus, papovavirus, paramixovirus, parvovirus, picornavirus, poxvirus, o togavirus. Consultar generalmente, Jolly (1994) *Cancer Gene Therapy* 1:51-64; Kimura (1994) *Human Gene Therapy* 5:845-852; Connelly (1995) *Human Gene Therapy* 6:185-193; and Kaplitt (1994) *Nature Genetics* 6:148-153.

Los vectores retrovíricos son bien conocidos en la técnica, y se contempla que se puede emplear en la invención cualquier vector para terapia de gen retrovírico, incluyendo retrovirus de los tipos C y D, retrovirus xenotrópicos (*por ejemplo*, NZB-X1, NZB-X2 y NZB9-1 (*consultar* O’Neill (1985) *J. Virol.* 53:160) retrovirus politrópicos *por ejemplo*, MCF y MCF-MLV (*consultar* Kelly (1983) *J. Virol.* 45:291), spumavirus y lentivirus. Consultar RNA Tumor Viruses, Segunda Edición, Cold Spring Harbor Laboratory, 1985.

Se pueden derivar porciones del vector para terapia de gen retrovírico a partir de diferentes retrovirus. *Por ejemplo*, se puede derivar el retrovector LTRs de un Virus de Sarcoma de Murina, un ARNt que se enlaza con un Virus de Sarcoma de Rous, una señal de empaquetamiento de un Virus de Leucemia de Murina, y origen y síntesis de la segunda cadena precedente de un Virus de Leucosis en Aves.

Estos vectores recombinantes retrovíricos se pueden usar para generar partículas de vector retrovírico competente en la transducción introduciéndolas en líneas celulares de empaquetamiento adecuadas (*consultar* la Patente de los Estados Unidos N° 5.591.624). Los vectores de retrovirus se pueden construir para integración específica del emplazamiento en el ADN de la célula huésped incorporando un enzima integrasa quimérica en la partícula retrovírica (*consultar* WO96/37626). Es preferible que el vector vírico recombinante sea un virus recombinante con defectos en la replicación.

Las líneas celulares de empaquetamiento adecuadas para uso en los vectores retrovíricos descritos más arriba son bien conocidos en la técnica, se preparan con facilidad (*consultar* WO95/30763 y WO92/05266), y se pueden usar para producir líneas celulares (también denominadas líneas celulares vectoriales o “VCL”) para la producción de partículas vectoriales recombinantes. Preferiblemente, las líneas celulares de empaquetamiento se fabrican a partir de células parientes humanas (*por ejemplo*, células HT1080) o de líneas celulares parientes de visón, lo que elimina la inactivación en suero humano.

Los retrovirus preferidos para la construcción de vectores retrovíricos para terapia génica incluye el virus de la leucosis aviar, virus de la leucemia bovina, virus de la leucemia de murina, virus que induce focos celulares en el visón, virus del sarcoma de murina, virus de la reticuloenteliosis y virus del sarcoma de Rous- Los virus de la leucemia de murina particularmente preferidos incluye los 4070A y 1504A (Hartley y Rowe (1976) *J Virol* 19:19-25), Abelson (ATCC N° VR-999), Friend (ATCC N° VR-245), Graffi, Gross (ATCC N° VR-590), Kirsten, virus del sarcoma de

## ES 2 278 920 T3

Harvey y Rauscher (ATCC N° VR-998) y virus de la leucemia de murina de Moloney (ATCC N° VR-190). Dichos retrovirus se pueden obtener de depósitos o colecciones tales como la American Type Culture Collection ("ATCC") en Rockville, Maryland, o aislarse a partir de fuentes conocidas usando técnicas normalmente disponibles.

5 Los vectores retrovíricos para terapia génica conocidos de ejemplo que se pueden emplear en esta invención incluyen los que se describen en las solicitudes de Patente GB2200651, EP0415731, EP0345242, EP0334301, WO89/02468; WO89/05349, WO89/09271, WO90/02806, WO90/07936, WO94/03622, WO93/25698, WO93/25234, WO93/11230, WO93/10218, WO91/02805, WO91/02825, WO95/07994, Patentes de los Estados Unidos con nros 5.219.740, 4.405.712, 4.861.719, 4.980.289, 4.777.127, 5.591.624. Consultar también Vile (1993) *Cancer Res* 53:3860-3864; Vile (1993) *Cancer Res* 53:962-967; Ram (1993) *Cancer Res* 53 (1993) 83-88; Takamiya (1992) *J Neurosci Res* 33:493-503; Baba (1993) *J Neurosurg* 79:729-735; Mann (1983) *Cell* 33:153; Cane (1984) *Proc Natl Acad Sci* 81:6349; y Miller (1990) *Human Gene Therapy* 1.

15 Los vectores retrovíricos para terapia génica de origen humano se conocen también en la técnica, y se pueden emplear en esta invención. Consultar, por ejemplo, Berkner (1988) *Biotechniques* 6:616 y Rosenfeld (1991) *Science* 252:431, y los Documentos WO93/07283, WO93/06223, y WO93/07282. Los vectores adenovíricos para terapia génica que se pueden emplear en esta invención incluyen los que se describen en los documentos citados más arriba, y en los Documentos WO94/12649, WO93/03769, WO93/19191, WO94/28938, WO95/11984, WO95/00655, WO95/27071, WO95/29993, WO95/34671, WO96/05320, WO94/08026, WO94/11506, WO93/06223, WO94/24299, WO95/14102, WO95/24297, WO95/02697, WO94/28152, WO94/24299, WO95/09241, WO95/25807, WO95/05835, WO94/18922 y WO95/09654. Alternativamente, también se puede usar a administración de ADN enlazado a adeno-  
20 virus muertos tal como se describe en Curiel (1992) *Hum. Gene Ther.* 3:147-154. Los vehículos de dosificación de los genes de la invención incluyen también vectores de virus adenoasociados (AAV). Los ejemplos principales y preferidos de este tipo de vectores para uso en la invención son los virus basados en AAV-2 descritos en Srivastava, WO93/09239. Los vectores ASV más preferidos comprenden las dos repeticiones terminales invertidas AAV en los que las secuencias D nativas se modifican mediante la sustitución de nucleótidos, tales como al menos los nucleótidos nativos y hasta 18 nucleótidos nativos, preferiblemente al menos 10 nucleótidos nativos hasta 18 nucleótidos nativos, más preferiblemente se retienen 10 nucleótidos nativos y el resto de los nucleótidos de las secuencias D se borran o sustituyen con nucleótidos no nativos. Las secuencias D nativas de las repeticiones terminales invertidas AAV son  
25 secuencias de 20 nucleótidos consecutivos en cada repetición terminal invertida AAV (es decir, hay una secuencia en cada extremo) que no está implicada en la formación de HP. El nucleótido no nativo de sustitución puede ser cualquier nucleótido distinto del nucleótido que se encuentra en la secuencia D nativa en la misma posición. Otros vectores AAV de ejemplo que se pueden usar son pWP-19 y pWN-1, ambos se describen en Nahreini (1993) *Gene* 124:257-262. Otro ejemplo de este tipo de vector AAV es psub201 (consultar Samulski (1987) *J. Virol.* 61:3096). Otro vector  
35 AAV de ejemplo que se puede usar es el vector Doble-D ITR. La construcción del vector Doble-D ITR se describe en la Patente de los Estados Unidos N° 5.478.745. Otros vectores adicionales son los que Carter describe en la Patente de los Estados Unidos N° 4.797.368 y Muzyczka en la Patente de los Estados Unidos N° 5.139.941, Chartejee en la Patente de los Estados Unidos N° 5.474.935, y Kotin en la WO94/288157. Otro ejemplo adicional de vector AAV que se puede usar en esta invención es el SSV9AFABTKneo, que contiene el mejorador AFP y un promotor de albúmina  
40 y dirige la expresión predominantemente en el hígado. Su estructura y construcción se describe en Su (1996) *Human Gene Therapy* 7:463-470. Otros vectores AAV para terapia génica se describen en las Patentes de los Estados Unidos con nros 5.354.678, 5.173.414, 5.139.941, y 5.252.479.

Los vectores para terapia génica de la invención también incluyen los vectores del herpes. Los ejemplos principales  
45 y preferidos son los vectores del virus herpes simplex que contienen una secuencia que codifica un polipéptido de la timidina quinasa como el que se describe en las Patentes de los Estados Unidos N° 5.288.641 y EP0176170 (Roizman). Otros vectores del virus herpes simples adicionales incluyen HFEM/ICP6-LacZ descrito en WO95/04139 (Wistar Institute), pHSVlac descrito en Geller (1988) *Science* 241:1667-1669 y en WO90/09441 y WO92/07945, HSV Us3::pgC-lacZ descrito en Fink (1992) *Human Gene Therapy* 3:11-19 y HSV 7134, 2 RH 105 y GAL4 descritos en EP 0453242 (Breakefield), los depositados en el ATCC con los números de acceso VR-977 y VR-260.

También se contemplan los vectores del virus alfa para terapia génica que se pueden también emplear en esta invención. Los vectores del virus alfa preferidos son los vectores del virus Sindbis. Togavirus, virus del bosque Semliki (ATCC VR-67; ATCC VR-1247), virus Middleberg (ATCC VR-370), virus Ross River (ATCC VR-373; ATCC VR-1246), virus de la encefalitis equina venezolana (ATCC VR923; ATCC VR-1250; ATCC VR-1249; ATCC VR-532), y los que se describen en las Patentes de los Estados Unidos con nros 5.091.309, 5.217.879, y WO92/10578. De manera más particular, se pueden emplear aquellos vectores del virus alfa que se describen en la Patente con número de serie N° 08/405.627, presentada el 15 de marzo de 1995, y los documentos WO94/21792, WO92/10578, WO95/07994, Patentes de los Estados Unidos con nros 5.091.309 y 5.217.879. Dichos virus alfa se pueden obtener de depósitos o colecciones tales como la ATCC en Rockville, Maryland, o aislarse a partir de fuentes conocidas mediante técnicas comúnmente disponibles. Preferiblemente, se usan los aquellos vectores del virus alfa con citotoxicidad reducida (consultar el Documento U.S. N° Ser. 08/679640).

Los sistemas de vector de ADN tales como los sistemas de expresión basados en eucariotas son también útiles para  
65 expresar los ácidos nucleicos de la invención. Consultar WO 95/07994 para una descripción detallada de los sistemas de expresión basados en eucariotas. Preferiblemente, los sistemas de expresión basados en eucariotas de la invención se derivan de vectores del virus alfa y de más preferiblemente de vectores víricos Sindbis.

Otros vectores víricos adecuados para uso en la presente invención incluyen los derivados del poliovirus, por ejemplo ATCC VR-58 y los que se describen en Evans, *Nature* 339 (1989) 385 y Sabin (1973) *J. Biol. Standardization* 1:115; rinovirus, por ejemplo ATCC VR-11 10 y los que se describen en Arnold (1990) *J Cell Biochem* L401; virus de la viruela tales como virus de la viruela del canario o virus vaccinia, por ejemplo ATCC VR-111 y ATCC VR-2010 y los que se describen en Fisher-Hoch (1989) *Proc Natl Acad Sci* 86:317; Flexner (1989) *Ann NY Acad Sci* 569:86, Flexner (1990) *Vacuna* 8:17; en las Patentes de los Estados Unidos con nros 4.603.112 y 4.000.330 y WO89/01973; virus SV40, por ejemplo ATCC VR-305 y los que se describen en Mulligan (1979) *Nature* 277:108 y Madzak (1992) *J Gen Virol* 73:1533; virus de la gripe, por ejemplo ATCC VR-797 y los virus de la gripe recombinantes fabricados mediante técnicas de ingeniería genética inversa como se describen en la Patente de los Estados Unidos N° 5.166.057 y en Enami (1990) *Proc Natl Acad Sci* 87:3802-3805; Enami & Palese (1991) *J Virol* 65:2711-2713 y Luytjes (1989) *Cell* 59:110, (consultar también McMichael (1983) *NEJ Med* 309:13, y Yap (1978) *Nature* 273:238 y *Nature* (1979) 277:108); virus de la inmunodeficiencia humana como se describe en EP-0386882 y en Buchschacher (1992) *J. Virol.* 66:2731; virus del sarampión, por ejemplo ATCC VR-67 y VR-1247 y los que se describen en EP-0440219; virus Aura, por ejemplo ATCC VR-368; virus Bebaru, por ejemplo ATCC VR-600 y ATCC VR-1240; virus Cabassou, por ejemplo ATCC VR-922; virus Chikungunya, por ejemplo ATCC VR-64 y ATCC VR-1241; Virus Fort Morgan, por ejemplo ATCC VR-924; virus Getah, por ejemplo ATCC VR-369 y ATCC VR-1243; virus Kyzylagach, por ejemplo ATCC VR-927; virus Mayaro, por ejemplo ATCC VR-66; virus Mucambo, por ejemplo ATCC VR-580 y ATCC VR-1244; virus Ndumu, por ejemplo ATCC VR-371; virus Pixuna, por ejemplo ATCC VR-372 y ATCC VR-1245; virus Tonate, por ejemplo ATCC VR-925; virus Trinita, por ejemplo ATCC VR-469; virus Una, por ejemplo ATCC VR-374; virus Whataroa, por ejemplo ATCC VR-926; virus Y-62-33, por ejemplo ATCC VR-375; virus O'Nyong, virus de la encefalitis oriental, por ejemplo ATCC VR-65 y ATCC VR-1242; virus de la encefalitis occidental, por ejemplo ATCC VR-70, ATCC VR-1251, ATCC VR-622 and ATCC VR-1252; y coronavirus, por ejemplo ATCC VR-740 y los que se describen en Hamre (1966) *Proc Soc Exp Biol Med* 121:190.

La dosificación de las composiciones de la invención en células no está limitada a los vectores víricos anteriormente mencionados. Se pueden emplear otros procedimientos y medios de dosificación tales como, por ejemplo, vectores de expresión de ácidos nucleicos, ADN catiónico policondensado enlazado o no enlazado a adenovirus muertos, en solitario, por ejemplo consultar el Documento con número de serie N° 08/366.87, presentado el 30 de diciembre de 1994, y Curiel (1992) *Hum Gene Ther* 3:147-154 ligando enlazado con el ADN, por ejemplo consultar Wu (1989) *J Biol Chem* 264:16985-16987, vehículos celulares de dosificación de células eucariotas, por ejemplo consultar los Documentos con número de serie N° 08/240.030, presentado el 9 de mayo de 1994, Documento con número de serie N° 08/404.796, deposición sobre materiales de gel fotopolimerizados, pistola manual de partículas para transferencia de gen, tal como se describe en la Patente de los Estados Unidos N° 5.149.655, radiación ionizante tal como se describe en la Patente de los Estados Unidos N° 5.206.152 y en el Documento WO 92/11033, neutralización de carga de núcleo fusión con membranas celulares. Soluciones adicionales se describen en Philip (1994) *Mol Cell Biol* 14:2411-2418 y en Woffendin (1994) *Proc Natl Acad Sci* 91:1581-1585.

Se puede emplear transferencia de genes mediadas por partículas, por ejemplo consultar el Documento con número de serie N° 60/023.867. En breve, la secuencia se puede insertar en vectores convencionales que contienen secuencias convencionales de control para una expresión de alto nivel, e incubarse a continuación con moléculas de transferencia de gen sintético tales como cationes de enlace de ADN polimérico como polilisina, protamina, y albúmina, enlazado con ligandos de diana celular tales como asialoorosomucoide, que se describe en Wu & Wu (1987) *J. Biol. Chem.* 262:4429-4432, insulina, que se describe en Hucked (1990) *Biochem Pharmacol* 40:253-263, galactosa que se describe en Plank (1992) *Bioconjugate Chem* 3:533-539, lactosa o transferrina.

Se puede emplear también ADN desnudo. Los procedimientos de introducción de ADN desnudo de ejemplo se describen en el Documento WO 90/11092 y en la Patente de los Estados Unidos N° 5.580.859. Se puede mejorar la eficiencia de captación usando perlas de látex biodegradable. Las perlas de látex recubiertas de ADN se transportan de forma eficiente al interior de las células tras iniciación de la endocitosis mediante las perlas. El procedimiento se puede mejorar aún más mediante el tratamiento de las perlas para aumentar la hidrofobia y, de esta forma, facilitar la rotura del endosoma y la liberación del ADN en el citoplasma.

Los liposomas pueden actuar como vehículos de dosificación génica, tal como se describe en la Patente de los Estados Unidos N° 5.422.120, WO95/13796, WO94/23697, WO91/14445 y EP-524.968. Tal como se describe en el Documento con número de serie N° 60/023.867, sobre la dosificación no vírica, las secuencias de ácidos nucleicos que codifican un polipéptido se pueden insertar en vectores convencionales que contienen secuencias de control convencionales para una expresión elevada, y a continuación incubarse con moléculas de transferencia de genes sintéticos tales como cationes de enlace de ADN polimérico como polilisina, protamina, y albúmina, enlazado con ligandos de diana celular tales como asialoorosomucoide, insulina, galactosa, lactosa o transferrina. Otros sistemas de dosificación incluye el uso de liposomas para encapsular el ADN que comprende el gen bajo el control de una variedad de promotores específicos del tejido o activos en cualquier parte. Otra dosificación no vírica adecuada para uso incluye los sistemas de liberación mecánica tal como la hipótesis descrita en Woffendin y col, (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91(24):11581-11585. Más aún, la secuencia de codificación y el producto de expresión de esta se pueden liberar mediante deposición de materiales de hidrogel fotopolimerizados. Otros procedimientos convencionales para la dosificación de genes que se puede usar para la dosificación de la secuencia de codificación, incluyen, por ejemplo, el uso de una pistola manual para la transferencia de partículas de gen, tal como se describe en la Patente de los Estados Unidos N° 5.149.655; uso de radiación ionizante para activar el gen transferido, tal como se describe en la Patente de los Estados Unidos N° 5.206.152 y en el Documento WO92/11033.

## ES 2 278 920 T3

Los liposomas y vehículos de dosificación de genes de ejemplo son los descritos en las Patentes de los Estados Unidos con nros 5.422.120 y 4.762.915; en los Documentos WO 95/13796; WO94/23697; y WO91/14445; en EP-0524968; y en Stryer, *Biochemistry*, páginas 236-240 (1975) W.H. Freeman, San Francisco; Szoka (1980) *Biochem Biophys Acta* 600:1; Bayer (1979) *Biochem Biophys Acta* 550:464; Rivnay (1987) *Meth Enzymol* 149:119; Wang (1987) *Proc Natl Acad Sci* 84:7851; Plant (1989) *Anal Biochem* 176:420.

Una composición de polinucleótido puede comprender una cantidad terapéuticamente efectiva de un vehículo de terapia génica, según los términos definidos más arriba. A efectos de la presente invención, una dosis efectiva estará comprendida entre aproximadamente 0.01 mg/kg y 50 mg/kg o entre 0.05 mg/kg y aproximadamente 10 mg/kg de los constructos de ADN en el individuo al cual se suministran.

### *Procedimientos de dosificación*

Una vez formulados, las composiciones de polinucleótidos de la invención se pueden administrar (1) directamente al sujeto; (2) dosificarse *ex vivo*, a células derivadas del sujeto; o (3) *in vitro* para expresión de proteínas recombinantes. Los sujetos a tratar pueden ser mamíferos o pájaros. Igualmente, se pueden tratar sujetos humanos.

La dosificación directa de las composiciones se realizará habitualmente mediante inyección, por vía tanto subcutánea, intraperitoneal, intravenosa o intramuscular, o se dosificará en el espacio intersticial de un tejido. La composición se puede también administrar en el interior de una lesión. Otros procedimientos de administración incluye la administración oral y pulmonar, supositorios, y aplicaciones transdérmicas y transcutáneas (*por ejemplo, consultar WO98/20734*), agujas, y pistolas genéticas o hiporociadores. El tratamiento de dosificación puede ser una dosis única o un calendario de dosis múltiple.

Los procedimientos para dosificación *ex vivo* y reimplantación de las células transformadas son conocidos en la técnica, y están descritos en *por ejemplo*, WO 93/14778. Los ejemplos útiles para las aplicaciones *ex vivo* incluyen, por ejemplo, células madre, particularmente hematopoyéticas, células linfáticas, macrófagos, células dendríticas o células tumorales.

Por lo general, la dosificación de ácidos nucleicos en ambas aplicaciones *ex vivo e in vitro* se pueden llevar a cabo mediante los procedimientos siguientes, por ejemplo, transfección mediada por dextrano, precipitación con fosfato de calcio, transfección mediada por polibreno, fusión de protoplastos, electroporación, encapsulación de polinucleótido(s) en liposomas, y microinyección directa de ADN en los núcleos, todos ellos bien conocidos en la técnica.

### *Composiciones farmacéuticas de polinucleótido y polipéptido*

Además de los vehículos y sales farmacéuticamente aceptables descritos más arriba, se pueden usar los siguientes agentes con las composiciones de polinucleótido y/o polipéptido

#### *A. Polipéptidos*

Un ejemplo son polipéptidos que incluyen, sin limitación: asioloorosomucoide (ASOR); transferrina; asialoglicoproteínas; anticuerpos; fragmentos de anticuerpo; ferritina; interleuquinas; interferones, granulocitos, factor estimulante de las colonias de macrófagos (GM-CSF), factor estimulante de las colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulante de las colonias de macrófagos (M-CSF), factor de células madre y eritropoyetina. Se pueden usar también antígenos víricos, tales como proteínas de la cápsula. Igualmente, proteínas de otros organismos invasores, tales como el péptido de 17 aminoácidos procedente de la proteína del plasmodium falciparum conocido como RII.

#### *B. Hormonas, Vitaminas, etc*

Otros grupos que se pueden incluir son por ejemplo: hormonas, esteroides, andrógenos, estrógenos, hormona tiroidea, o vitaminas, ácido fólico.

#### *C. Polialquenos, polisacáridos, etc*

Igualmente, se puede incluir el polialquilén glicol entre los polinucleótidos/polipéptidos deseados. En una forma de realización preferida, el polialquilén glicol es polietilén glicol. Además, se pueden incluir mono-, di-, o polisacáridos. En una forma de realización preferida de este aspecto, el polisacárido es dextrano o DEAE-dextrano. Igualmente, quitosán y poli(láctido-co-glicólido).

#### *D. Lípidos, y liposomas*

El polinucleótido/polipéptido deseado se puede encapsular también en lípidos o empaquetarse en liposomas antes de dosificarlos al sujeto, o a las células derivadas de las anteriores.

La encapsulación en lípidos se lleva a cabo por lo general usando liposomas que enlazan o atrapan de forma estable y retienen el ácido nucleico. La relación de polinucleótido condensado a preparación lípida puede variar, pero por lo general estará comprendida en aproximadamente 1:1 (mg DNA: micromoles de lípido), o más lípido. Para una revisión

del uso de liposomas como vehículos para dosificación de ácidos nucleicos, *consultar*, Hug y Sleight (1991) *Biochim. Biophys. Acta.* 1097:1-17; Straubinger (1983) *Meth. Enzymol.* 101:512-527.

Las preparaciones liposomiales para uso en la presente invención incluyen preparaciones catiónicas (cargadas positivamente), aniónicas (cargadas negativamente), y neutras. Se ha demostrado que los liposomas catiónicos mediante la dosificación intracelular de ADN de plásmido (Feigner (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:7413-7416); ARNm (Malone (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:6077-6081); y factores de transcripción purificados (Debs (1990) *J. Biol. Chem.* 265:10189-10192), en forma funcional.

Los liposomas catiónicos están fácilmente disponibles. Por ejemplo, los liposomas de N[1-2,3-dioleiloxi]propil]-N,N,N-trietilamonio (DOTMA) están disponibles bajo la marca comercial Lipofectin, de GIBCO BRL, Grand Island, N.Y. (*Consultar*, también, Feigner *más arriba*). Otros liposomas comercialmente disponibles incluyen transfectace (DDAB/DOPE) y DOTAP/DOPE (Boerhinger). Otros liposomas catiónicos se pueden preparar a partir de materiales fácilmente disponibles usando técnicas bien conocidas en la técnica *Consultar*; por ejemplo, Szoka (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:4194-4198; WO90/11092 para una descripción de la síntesis de liposomas DOTAP (1,2-bis(oleoiloxi)-3-(trimetilamonio) propano).

De manera similar, los liposomas aniónicos o neutros están fácilmente disponibles, tales como los de Avanti Polar Lipids (Birmingham, AL), o e pueden preparar a partir de materiales fácilmente disponibles. Dichos materiales incluyen fosfatidil colina, colesterol, fosfatidil etanolamina, dioleoilfosfatidil colina (DOPC), dioleoilfosfatidil glicerol (DOPG), dioleoilfosfatidil etanolamina (DOPE), entre otros. Estos materiales se pueden mezclar también con los materiales de partida DOTMA y DOTAP en las relaciones adecuadas. Los procedimientos de producción de liposomas usando estos materiales son bien conocidos en la técnica.

Los liposomas pueden comprender vesículas multilamelares (MLV), vesículas unilamelares pequeñas (SUV), o vesículas unilamelares grandes (LUV). Los diferentes complejos liposoma-ácido nucleico se preparan usando procedimientos conocidos en la técnica. *Consultar por ejemplo*, Straubinger (1983) *Meth. Immunol.* 101:512-527; Szoka (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:4194-4198; Papahadjopoulos (1975) *Biochim. Biophys. Acta* 394:483; Wilson (1979) *Cell* 17:77; Deamer & Bangham (1976) *Biochim. Biophys. Acta* 443:629; Ostro (1977) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 76:836; Fraley (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:3348; Enoch & Strittmatter (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:145; Fraley (1980) *J. Biol. Chem.* (1980) 255:10431; Szoka & Papahadjopoulos (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:145; and Schaefer-Ridder (1982) *Science* 215:166.

#### E. Lipoproteínas

Además, se pueden incluir lipoproteínas en el polinucleótido/polipéptido a dosificar. Entre los ejemplos de lipoproteínas a utilizar se incluyen: quilomicrones, HDL, IDL, LDL, y VLDL. También se pueden usar mutantes, fragmentos o fusiones de estas proteínas. Igualmente, se pueden usar modificaciones de lipoproteínas de aparición natural, tales como LDL acetilado. Estas lipoproteínas pueden dirigir la liberación de polinucleótidos a las células que expresan receptores de lipoproteína. Preferiblemente, si las lipoproteínas se incluyen con el polinucleótido a dosificar, no se incluye ningún otro ligando diana en la composición.

Las lipoproteínas de aparición natural comprenden una porción lipídica y una porción proteica. La porción de proteína se denomina apoproteína. Hasta la fecha, se han aislado e identificado las apoproteínas A, B, C, D, y E. Al menos dos de estas contienen varias proteínas, denominadas con los numerales romanos AI, AII, AIV; CI, CII, CIII.

Una lipoproteína puede comprender más de una apoproteína. Por ejemplo, los quilomicrones de aparición natural comprenden A, B, C y E, con el tiempo, estas lipoproteínas pierden A y adquieren C y E. VLDL comprende la apoproteína B; y HDL las apoproteínas A, C, y E.

Los aminoácidos de estas apoproteínas son conocidos, y se describen en por ejemplo, Breslow (1985) *Annu Rev. Biochem* 54:699; Law (1986) *Adv. Exp. Med. Biol.* 151:162; Chen (1986) *J Biol Chem* 261:12918; Kane (1980) *Proc Natl Acad Sci USA* 77:2465; y Utermann (1984) *Hum Genet* 65:232.

Las lipoproteínas contienen una variedad de lípidos, incluyendo triglicéridos, colesterol (libre y ésteres), y fosfolípidos. La composición de los lípidos varía en las lipoproteínas de aparición natural. Por ejemplo, los quilomicrones de aparición natural comprenden principalmente triglicéridos. Se encuentra una descripción más detallada del contenido en lípidos de las lipoproteínas de aparición natural en por ejemplo, *Meth. Enzymol.* 128 (1986). Se escoge la composición de los lípidos para facilitar la conformación de la apoproteína para la actividad de enlace del receptor. La composición de los lípidos se puede escoger también para facilitar la interacción hidrófoba y la asociación con la molécula de enlace del polinucleótido.

Las lipoproteínas de aparición natural se pueden asilar del suero mediante ultracentrifugación, por ejemplo. Dichos procedimientos se describen en *Meth. Enzymol.* (más arriba); Pitas (1980) *J. Biochem.* 255:5454-5460 y Mahey (1979) *J Clin. Invest* 64:743-750. Las lipoproteínas se pueden producir también *in vitro* o mediante procedimientos de precombinación mediante la expresión de los genes de la apoproteína en la célula huésped deseada. *Consultar*, por ejemplo, Atkinson (1986) *Annu Rev Biophys Chem* 15:403 y Radding (1958) *Biochim Biophys Acta* 30: 443. Las lipoproteínas se pueden conseguir también de suministradores comerciales, tales como Biomedical Technologies,

## ES 2 278 920 T3

Inc., Stoughton, Massachusetts., USA. Se puede encontrar una descripción adicional de las en Zuckermann y col., PCT/US97/14465.

### F. Agentes policatiónicos

Se pueden incluir agentes policatiónicos, con o sin lipoproteína, en una composición con el polinucleótido/polipéptido deseado a dosificar.

Los agentes policatiónicos, normalmente, muestran una carga positiva neta a pH fisiológicamente relevante, y son capaces de neutralizar la carga eléctrica de los ácidos nucleicos para facilitar la dosificación en la localización recibida. Estos agentes tienen aplicaciones tanto *in vitro*, *ex vivo*, como *in vivo*. Los agentes policatiónicos se pueden usar para dosificar ácidos nucleicos a un sujeto vivo por vía intramuscular, subcutánea, etc.

Lo siguiente son ejemplos de polipéptidos útiles como agentes policatiónicos: polilisina, poliarginina, poliornitina, y protamina. Otros ejemplos incluyen histonas, protaminas, albúmina de suero humano, proteínas de enlace con el ADN, proteínas cromosómicas no histona, proteínas de recubrimiento procedentes de virus de ADN tales como (X174, los factores transcripcionales contienen también regiones que se enlazan con el ADN y por tanto pueden ser útiles como agentes de condensación de ácidos nucleicos. En breve, los factores transcripcionales tales como C/CEBP, cjun, c-fos, AP-1, AP-2, AP-3, CPF, Prot-1, Sp-1, Oct-1, Oct-2, CREP, y TFIID condenen regiones básicas que se enlazan con secuencias de ADN.

Los agentes policatiónicos orgánicos incluyen: espermina, espermidina, y putrescina.

Las dimensiones y propiedades físicas de un agente policatiónico se pueden extrapolar de la lista anterior para construir otros agentes policatiónicos de polipéptido o producir agentes policatiónicos sintéticos.

Los agentes policatiónicos sintéticos que son útiles incluyen por ejemplo, DEAE-dextrano, polibreno. Lipofectin™, y lipofectAMINA™ son monómeros que forman complejos policatiónicos cuando se combinan con los polinucleótidos/polipéptidos.

### Ensayos de inmunodiagnóstico

Los antígenos de Neisseria de la invención se pueden usar en inmunoensayos para detectar niveles de anticuerpo (o, inversamente, se pueden usar anticuerpos anti-Neisseria para detectar niveles de antígenos). Se pueden desarrollar inmunoensayos basados en antígenos recombinantes bien definidos para sustituir procedimientos invasivos de diagnóstico. Se pueden detectar anticuerpos frente a proteínas de Neisseria en muestras biológicas, incluyendo por ejemplo, muestras de sangre o suero. El diseño de los inmunoensayos está sometido a un elevado nivel de variación, y una variedad de estos son conocidos en la técnica. Se pueden usar protocolos de inmunoensayo en ensayos tipo competición, o reacción directa, o tipo emparejado. Los protocolos pueden usar, por ejemplo, soportes sólidos, o pueden ser mediante inmunoprecipitación. La mayor parte de ensayos implican el uso de anticuerpos o polipéptidos marcados, las etiquetas pueden ser, por ejemplo, moléculas fluorescentes, quimioluminescentes, radioactivas, o de tinción. Se conocen también los ensayos que amplifican las señales de la sonda; son ejemplos de dichos ensayos los que utilizan biotina y avidina, y enzimas marcados e inmunoensayos mediados, tales como ensayos ELISA.

Se construyen kits adecuados para inmunodiagnóstico y que contienen los reactivos marcados apropiados enviando los materiales adecuados, incluyendo las composiciones de la invención, en recipientes adecuados, junto con el resto de materiales y reactivos (por ejemplo, tampones adecuados, soluciones, de sales, etc.) necesarios para la realización del ensayo, así como un deseable conjunto de instrucciones de ensayo.

### Hibridación de ácidos nucleicos

“Hibridación” se refiere a la asociación de dos secuencias de ácidos nucleicos, una secuencia estar fija a un soporte sólido y la otra estará libre en solución. A continuación, las dos secuencias se ponen en contacto una con otra en condiciones que favorecen la formación de puentes de hidrógeno. Los factores que afectan este enlace incluyen; el tipo y volumen de solvente; temperatura de reacción, tiempo de hibridación, agitación, agentes que cloquean el enlace no específico de la fase líquida con el soporte sólido reactivo de Denhardt o BLOTTO); concentración de las secuencias; uso de compuestos para aumentar la velocidad de asociación de las secuencias (sulfato de dextrano o polietilén glicol); y la astringencia de las condiciones de lavado tras las hibridación *Consultar* Sambrook y col., [más arriba] Volumen 2, capítulo 9, páginas 9.47 a 9.57.

“Astringencia” se refiere a las condiciones de la reacción de hibridación que favorecen la asociación de secuencias muy similares sobre las secuencias que se diferencian. Por ejemplo, debe elegirse la combinación de temperatura y concentración de sales de manera que esté entre 120 y 200°C por debajo de la T<sub>m</sub> calculada del híbrido bajo estudio. Las condiciones de temperatura y sal se pueden determinar a menudo de manera empírica en experimentos preliminares en los que las muestras de ADN genómico inmovilizadas sobre filtros se hibridan con las secuencias de interés y se lavan en condiciones de astringencia diferentes. *Consultar* Sambrook y col., en la página 9.50.

## ES 2 278 920 T3

Las variables a considerar cuando se realiza por ejemplo, un Southern blot son (1) la complejidad del ADN que se emborrona y (2) la homología entre la sonda y las secuencias a detectar. La cantidad total del(de los) fragmento(s) a estudiar puede variar en una magnitud de 10, entre 0,1 a 1  $\mu\text{g}$  para una digestión de plásmido o fago, hasta  $10^{-9}$  a  $10^{-8}$  para gen de copia única en un genoma de eucariota muy complejo. Para polinucleótidos de baja complejidad, se pueden usar tiempos considerablemente más cortos de emborronado, hibridación y exposición, una cantidad menor de polinucleótidos de partida, y una menor actividad específica de las sondas. Por ejemplo, un gen de levadura de copia única puede detectarse con un tiempo de exposición de solo 1 hora a partir de 1  $\mu\text{g}$  de ADN, emborronado durante dos horas, e hibridación durante 4-8 horas con una sonda de  $10^8$  cpm/ $\mu\text{g}$ . Para un gen de mamífero copia única, una hipótesis conservativa se iniciaría con 10  $\mu\text{g}$  de ADN, emborronado durante toda la noche, e hibridación durante toda la noche con sulfato de dextrano usando una sonda de más de  $10^8$  cpm/ $\mu\text{g}$ , dando como resultado un tiempo de exposición de  $\approx 24$  horas.

Varios factores pueden afectar la temperatura de fusión (TM) de un híbrido ADN - ADN entre la sonda y el fragmento de interés, y por tanto, las condiciones apropiadas para la hibridación y lavado. En muchos casos, la sonda no es homóloga al 100% con el fragmento. Otras variables normalmente presentes incluye la longitud y contenido total de G+C en las secuencias hibridantes y la fuerza iónica y contenido en formamida del tampón de hibridación. Los efectos de todos estos factores se puede aproximar mediante una ecuación sencilla:

$$T_m = 81 + 16,6(\log_{10} C_i) + 0,4[(G+C) \%] 0,6 (\text{formamida} \%) - 600/n - 1,5 (\% \text{ de no emparejamiento})$$

En la que  $C_i$  es la concentración de sal (iones monovalentes) y  $n$  es la longitud del híbrido en pares de bases (ligeramente modificado a partir de Meinkoth & Wahl (1984) Anal. Biochem. 138: 267-284).

Para diseñar un experimento de hibridación, se deben alterar de manera conveniente varios factores que afectan la hibridación del ácido nucleico. La temperatura de la hibridación y lavado y la concentración de sal son los más sencillos de ajustar- A medida que aumenta la temperatura de hibridación (es decir, la astringencia), la hibridación se produce menos fácilmente entre cadenas que no son homólogas completamente con el fragmento inmovilizado (caso frecuente en los experimentos de hibridación en la familia génica e interespecie), y como resultado, disminuye el fondo. La temperatura de lavado afecta a la intensidad de la banda de hibridación y el grado de fondo de manera similar. La astringencia de los lavados aumenta también con la disminución de la concentración de sales.

En general, las temperaturas de hibridación convenientes en presencia de formamida al 50 son  $42^\circ\text{C}$  para una sonda con homología entre % y 100% respecto del fragmento diana,  $37^\circ\text{C}$  para homología entre 90% y 95% y  $32^\circ\text{C}$  homología entre 85% y 90%. Para homologías menores, debe disminuirse el contenido en formamida y debe ajustarse de acuerdo con ello usando la ecuación anterior. Si no se conoce la homología entre la sonda y el fragmento diana, la solución más simple es partir con condiciones tanto de hibridación como de lavado que no sean astringentes. Si se observan bandas no específicas, o un fondo elevado tras la autoradiografía, el filtro se puede lavar con astringencia elevada y volverse a exponer. Si el tiempo necesario para la exposición hace que esta solución no sea factible, deben ensayarse en paralelo diferentes astringencias de hibridación y/o lavado.

### *Ensayos con sondas de ácidos nucleicos*

Procedimientos tales como PCR, ensayos de sonda de ADN modificados o técnicas de emborronado de acuerdo con la invención pueden determinar la presencia de ADNc o ARNm. Se dice que una sonda se "hibrida" con una secuencia de la invención si puede formar un dúplex o un complejo de doble cadena, que sea lo suficientemente estable como para detectarse.

Las sondas de ácido nucleico hibridarán las secuencias de nucleótidos de Neisseria de la invención (incluyendo las cadenas tanto sentido como antisentido). Aunque muchas secuencias de nucleótidos diferentes pueden codificar la secuencia de aminoácidos, se prefiere la secuencia nativa de Neisseria puesto que la secuencia real presente en las células. El ARNm representa una secuencia de codificación, de forma que una sonda debe ser complementaria a la secuencia de codificación; el ADNc de cadena simple es complementario al ARNm, y por ello, una sonda de ADNc debería ser complementaria a la secuencia no codificante.

La secuencia de la sonda no necesita ser igual a la secuencia de Neisseria (o su complemento) -una pequeña variación en la secuencia y longitud puede llevar a una mayor sensibilidad del ensayo si la sonda de ácido nucleico puede formar un dúplex con los nucleótidos diana, que se pueden detectar. Igualmente, la sonda de ácido nucleico puede incluir nucleótidos adicionales que estabilicen el dúplex formado. Puede ser útil una secuencia adicional de Neisseria como etiqueta para detectar el dúplex formado. Por ejemplo, una secuencia no complementaria de nucleótidos puede enlazarse al extremo 5' de la sonda, siendo complementaria el resto de la secuencia de la sonda con la secuencia de Neisseria. Alternativamente, se pueden intercalar en la sonda bases no complementarias o secuencias más largas, siempre que la secuencia de la sonda sea lo suficientemente complementaria con la secuencia de Neisseria como para que se hibride con ella y por tanto, forme un dúplex que se pueda detectar.

La longitud exacta de la secuencia de la sonda dependerá de las condiciones de hibridación (*por ejemplo*, temperatura, condición salina etc.). Por ejemplo, para aplicaciones de diagnóstico, dependiendo de la complejidad de la secuencia del analito, la secuencia de la sonda contendrá normalmente al menos 10-20 nucleótidos, preferiblemente

15-25, y más preferiblemente al menos 30 nucleótidos, aunque puede ser más corta que esto. Los cebadores cortos requieren generalmente temperaturas más frías para formar complejos híbridos suficientemente estables con la plantilla.

Se pueden producir sondas mediante procedimientos sintéticos, tales como el procedimiento del triéster de Matteucci y col., [J. Am. Chem. Soc. (1981) 103:31853, o de acuerdo con Urdea y col., [Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1983) 80: 7461], o usando sintetizadores de oligonucleóticos automatizados comercialmente disponibles.

Se puede seleccionar la naturaleza química de la sonda de acuerdo con las preferencias. Para ciertas aplicaciones son adecuados ADN y ARN. Para otras aplicaciones, se pueden incorporar modificaciones *por ejemplo*, se pueden usar modificaciones en el esqueleto, tales como fosforotioatos o metilfosfonatos, para incrementar la semivida *in vivo*, alterar la afinidad del ARN, aumentar la resistencia de la nucleasa etc. [*por ejemplo, consultar* Agrawal & Jyer (1995) *Curr Opin Biotechnol* 6:12-19; Agrawal (1996) *TIBTECH* 14:376-387]; pueden usarse también análogos tales como péptidos de ácidos nucleicos [*por ejemplo, consultar* Corey (1997) *TIBTECH* 15:224-229; Buchardt y col., (1993) *TIBTECH* 11:384-386].

Alternativamente, la reacción en cadena de la polimerasa (OCR) es otro procedimiento bien conocido para detectar cantidades pequeñas de ácidos nucleicos diana. El ensayo se describe en Mullis y col., [*Meth. Enzymol.* (1987) 155:335-350] y en las Patentes de los Estados Unidos con nros 4.683.195 y 4.683.202. Dos “cebadores” de nucleótido se hibridan con los ácidos nucleicos diana y se usan para cebar la reacción. Los cebadores pueden comprender secuencias que no se hibridan con la secuencia de amplificación diana (o su complemento) para ayudar a la estabilidad del dúplex o, por ejemplo, para incorporar un emplazamiento de restricción adecuado. Típicamente, dicha secuencia flanqueará la secuencia deseada de *Neisseria*.

Una polimerasa termoestable crea copias de los ácidos nucleicos diana desde los cebadores usando los ácidos nucleicos originales como plantilla. Una vez que se ha generado una cantidad umbral de los ácidos nucleicos diana mediante la polimerasa, pueden detectarse por procedimientos más tradicionales, como los Southern blots. Cuando se usa el procedimiento Southern blot, la sonda marcada se hibrida con la secuencia de *Neisseria* (o su complemento).

También, se pueden detectar ARNm o ADNc mediante las técnicas tradicionales de emborronado descritas en Sambrook y col [más arriba]. El ARNm, o ADNc generado a partir de ARNm usando un enzima polimerasa, se puede separar o purificar usando electroforesis en gel. A continuación se emborronan los ácidos nucleicos sobre el gel sobre un soporte sólido, tal como nitrocelulosa. Se expone el soporte sólido a una sonda marcada y a continuación se lava para eliminar cualquier sonda no hibridada. A continuación se detectan los dúplex que contienen la sonda marcada. Normalmente, la sonda se marca con una fracción radioactiva.

### Breve descripción de los dibujos

No existen dibujos

### Modos de llevar a cabo la invención

Los siguientes ejemplos describen las secuencias de ácido nucleico que se han identificado en *N. gonorrhoeae* junto con sus productos de traducción inferidos.

Los ejemplos son generalmente en el siguiente formato:

- una secuencia de nucleótidos que se ha identificado en *N. gonorrhoeae*. La cepa usada es FA1090 [Dempsey y col. (1991) *J. Bacteriol.* 173:5476.5486]
- el producto de traducción inferido de esta secuencia
- un análisis de ordenador (por ejemplo, salida PSORT) del producto de traducción, que indique la antinegatividad
- secuencias homólogas (cuando sean relevantes)
- los resultados de la expresión y purificación (cuando sean relevantes)

Estos ejemplos incluyen normalmente detalles de la homología de la secuencia entre especies y cepas. Las proteínas que son similares en la secuencia son generalmente similares en la estructura y función, y la homología indica a menudo un origen evolutivo común. Se usa ampliamente la comparación con secuencias de proteínas de función conocida como guía para la asignación de la función supuesta de la proteína en una nueva secuencia y ha probado ser particularmente útil en el análisis del genoma completo.

Se predijeron los marcos de lectura abiertos (ORF) en el interior de las secuencias de nucleótidos usando el programa GLIMMER [Salzberg y col. (1998) *Nucleic Acids Res* 26:544-8]. Se seleccionaron todos los marcos de lectura abiertos más largos de 60 aa frente al ORF del meningococo serotipo B (“MenB”) (número de acceso NC002183) usando el algoritmo BLASTP [Altschul y col. (1990) *J. Mol Biol.* 215:403-410]. Se consideraron los ORF por ser

## ES 2 278 920 T3

gonococo-específicos si mostraron la identidad de la secuencia en un ORF de MenB inferior al 60% sobre la longitud de la proteína completa, o emparejando el ORF de MenB sobre menos del 30% de longitud.

5 Se muestran usualmente los marcos de lectura abiertos con una metionina N-terminal. Cuando no es este el caso, está presente un codón de inicio no ATG, pero el aminoácido N-terminal será la metionina cuando se traduzca usando este codón de inicio. Si se usa un codón de inicio corriente arriba, sin embargo, se traducirá el aminoácido "nativo" (*por ejemplo*, si se expresa la secuencia con las secuencias de fusión N-terminales). Incluso cuando no se muestra el primer aminoácido como metionina, la invención abarca las secuencias en las que el primer aminoácido es metionina.

10 Se pueden usar diversos ensayos para evaluar la inmunogenicidad *in vivo* de las proteínas identificadas en los ejemplos. Por ejemplo, se pueden expresar las proteínas de manera recombinante y usarse para seleccionar el suero del paciente mediante inmunoemborronado. Una reacción positiva entre la proteína y el suero del paciente indica que el paciente ha montado previamente una respuesta inmune en la proteína en cuestión, *es decir*, la proteína es un inmunógeno. Se puede usar también este procedimiento para identificar las proteínas inmunodominantes.

15 Se puede usar también de manera conveniente para preparar anticuerpos, *por ejemplo*, en un ratón. Se pueden usar estos para la confirmación directa de que una proteína se localiza sobre la superficie de la célula. Se puede incubar el anticuerpo marcado (*por ejemplo* marcado fluorescente mediante FACS) con las bacterias intactas y la presencia de la marca sobre la superficie bacteriana confirma la localización de la proteína.

20 Para la expresión de la proteína de los antígenos, se amplificaron las secuencias usando los siguientes cebadores:

		<b>Secuencias</b>	<b>Emplazamiento de restricción</b>
25	NGS13	Fwd CGCGGATCCGCTAGC-TGCGTTGCCGACCCCG	NheI
30		Rev CCCGCTCGAG-CATGTGCCGTGCGGCGT	XhoI

### Ejemplo 1

35 Se identificó una secuencia de ADN en *N. gonorrhoeae* <SEC DE ID25> que codifica la secuencia de aminoácidos de la <SEC DE ID 26; NGS 13>. El análisis de esta secuencia de proteína revela lo siguiente:

40 GvH: Secuencia señal examinada (von Heijne)

Puntuación de la Señal (-7,5): -3,64

Possible emplazamiento de rotura: 51

45 >>> Puede ser una lipoproteína

Composición del Aminoácido de la Forma Madura Predicha:

Calculado a partir de 21

50 ALOM: Encontrando regiones transmembrana (Klein y col.)

Conteo 1 Valor: -1,01 umbral. 0,0

55 INTEGRAL Semejanza = -1,01 Transmembrana 36 – 52 ( 36 – 52)

PERIFÉRICA Semejanza = 5,14

Puntuación ALOM modificada: 0,70

60 Regla: proteína de la membrana interna o externa

Regla: proteína de la membrana interna o externa

Regla: proteína de la membrana citoplásmica

65

# ES 2 278 920 T3

\*\*\* Etapa de razonamiento: 2

Lipoproteína?

Membrana interna?

---- Resultados Finales ----

Membrana externa bacteriana --- certeza = 0,790 (Afirmativo) < succ >

Membrana interna bacteriana --- certeza = 0,742 (Afirmativo) < succ >

Espacio periplásmico bacteriano --- certeza = 0,000 (No esta claro) < succ>

Citoplasma bacteriano --- certeza = 0,000 (No está claro) < succ >

La proteína tiene homología con las siguientes secuencias en las bases de datos:

>gb |AAC33455. 1| (AF067083) homóloga de la proteína de la membrana externa (Vitreoscilla sp.)

Puntuación = 236 bits (602), Esperado = 2e-61

Identities = 134/217 (61%), positivos = 166/217 (75%)

Petición: 1 MTFFRPSTVVLTAASALALSGCVA--DPVTGQQSPNKSAMYGLGGAAVCGIVGALTHSGKGR 60  
 M +K +++ T +A+ALS C DP+TGQ N + + LGGAA CGIVGALTH KGR  
 Asunto: 1 MRAWKRFSLMATVAAVALSACATDFMTGQVDRNNTVLGALGGAATCGIVGALTHSGKGR 60

Petición: 61 NSALACGAIGAGVGGYMDYQEQLRQNLQAGTQIEIQRQGNQIRLVMPESVTFATGSAALG 120  
 NSALACGAIGAGVG YMD+QE++LRQ+LA TQ+E+ R G++IRLVMPES+TFATGS L  
 Asunto: 61 NSALACGAIGAGVGAYMDHQRQLRQSLAMIQVEVNRVGDIEIRLVMPESITFATGSYQLN 120

Petición: 121 GSAQYALNTAAQTLVQYPTDTTLTINGHTDNTGSDAVNPLSQHRAQAVAYYLQTRGVAAS 180  
 SA +LN+ + L QY DTT+ I GHTD+TGSDA+N PLS++RA AVA YL +R VA++  
 Asunto: 121 SSASTSLNSVSSVLAQYTDTTINIVGHTDSTGSDAINEPLSRNRASAVANYLVSRNVASN 180

Petición: 181 RLTVYGYGSHMPVASNATVEGRAQNRVVEILINPDQR 217  
 R+T G G FVASN TV GRA+NRRVEI +NP QR  
 Asunto: 181 RITTVGAGCRQPVASNNTVAGRAENRRVEITVNPQR 217

>gb|AAD40344.1|U88088\_22 (U88088) OmpA [Pseudomonas alcaligenes]  
 Longitud = 220

Puntuación = 130 bits (328), esperado = 1e-29

Identities = 90/219 (41%), positivos = 127/219 (57%), trampa = 6/219 (2%)

Petición: 7 STVVLTAASALALSGCVA---DPVTGQQSPNKSAMYGLGGAAVCGIVGALTHSGKGRNSA 63  
 S + + L+GC + + T + + A L GA ++G + +GA A  
 Asunto: 3 SVIAASLVIFTLTGCASIQNEDGTTKNTALYGAGGALAGAVAGALIGK-ENRAQALIGA 61

Petición: 64 LACGAIGAGVGGYMDYQEQLRQNLQAGTQIEIQRQGNQIRLVMPESVTFATGSAALGSA 123  
 G++GAG G Y D QE LR+ + G+ ++++RQG++I +VMP ++TFATG A + +  
 Asunto: 62 AVAGSLGAGYGYADKQRAELREQMKSGVQVERQGDEIVVMPGAIITFATGKABIQPNP 121

Petición: 124 QYALNTAAQTLVQYPTDTTLTINGHTDNTGSDAVNPLSQHRAQAVAYYLQTRGVAASRLT 183  
 LN A + YPD+ L + GHTD+ GS N LSQ RAQ+VA +L+ GV R+  
 Asunto: 122 ANTLNQLAGSFRNYPDSRLIVTGHTDSVGSYEANELLSQRRRAQSVAQFLRGNGVQTDRIE 181

Petición: 184 VYGYGSHMPVASNATVEGRAQNRVVEILINPDQRAVNAA 222  
 V G G + FVASNAT EGRAQNRVBI + P RAV A  
 Asunto: 182 VIGAGPNQPVASNATAEGRAQNRVVEIKLAP--RAVQQA 218

# ES 2 278 920 T3

Se expresó la proteína en *E. coli* como un producto de His-fusión de 22,55 kDa y a continuación se purificó, se predijo que esta proteína de *N. gonorrhoeae*, y su epitopos, serían antígenos útiles para las vacunas o diagnósticos.

## Ejemplo 2

Se identificaron los marcos de lectura abiertos en gonococo <SEC DE ID 3 y 4>. Estas secuencias de polipéptidos y nucleótidos son útiles para estudiar el gonococo, para objetivos de diagnóstico, como dianas de antibióticos, y como antígenos de vacuna.

### SEC DE ID 1

```
TTGCTTATAGTTGTACGGTTTGACATATGCACGGAAAGGAAAGCCATGACTTTCTTCAAACCCCTCTACCGTGTGCTGACCGCAT
CCGCACTCGCGCTTTCGGGCTGCGTTGCCGACCCCGTAACCGGACAGCAGTCCCAAACAATCCGCCATGTACGGTTTGGGTGG
CGCGGCAGTGTGCGGCATCGTGGCGCACTGACCCACAGCGGCAAAGGGCCACGCAATTCGGCGCTTGCCCTGCGGCGCAAATCGGC
GCAGCGCTGGGCGGTATATGGACTACCAAGAGCAGCGTTTGGCGCAAACCTTGGCGGCACGCAAATCGAAATCCAACGCCAAG
GCAACCAAATCAGGCTGGTGTATGCCCGAAAGCGTTACCTTCGCCACCCGGCAGCGCGGCGTTGGGCGGCAGTGGCGAATACGCCCT
GAACACTGCCCGCACAGACCGTGGTGCAGTATCCCGACAGCAGCGTGAACATCAAACGGGCACACCGACAACACAGGTTCCGATGCA
GTCAACAATCCGCTTTCGCAACACCGCGCCCAAGCGGTTGCCCTACTATCTGCAGAGCGCGCGCGCTGGCGGCTTGGCGCTGACGG
TPTACGGCTACGGTTTCGCATATGCCGGTCCGCTCAAACGCTACGGTTGAAGGCCGCGCGCAAACCGCGCTCGAAATCCTCAT
CAACCCCGACC AACCGCGCGTCAACCGCGCACGGCACATG
```

### SEC DE ID 2

```
MTFPKPSTVVLTASALALSGCVADPVTGQSPNKSAMYGLGAAVCGIVGALTHSGKGRNSALACGAIGAGVGGYMDYQEQRLR
QNLAGTQIEIQRQGNQIRLVMPESVTPATGSAALGGSAQYALNTAAQTLVQYPTTLTINGHTDNTGSDAVNNPLSQHRAQAVAY
YLQTRGVAASRLTVYGYGSHMPVASNATVEGRAQNRVEILINPDQRAVNAARHM
```

### SEC DE ID 3

```
TTGCTTATAGTTGTACGGTTTGACATATGCACGGAAAGGAAAGCCATGACTTTCTTCAAACCCCTCTACCGTGTGCTGACCGCAT
TAAACGGACAGCAGTCCCAAACAATCCGCCATGTACGGTTTGGGTGGCGCGGCACTGCGGCAATCGCGGCACTGACCCACAGCGCAAAGCGCGCAACGCAATTCGGCGCTTGCCTG
CGCGCAATCGCGCAGGCTGGGCGCTATATGGACTACCAAGAGCAGCGTTTGGCGCAAACCTTGGCGGCACGCAATCGAAATPCAAACGCCAAGCCAAATCAGCGCTGCTGATG
CCCCAAGCGTTACCTTCGCCACCGCAGCGCGGCTTGGGCGCAAGTCCGCAATTCGCGCTGACACTCGCGCACAGCGCTGTCAGTATCCCGACAGCGCTGACCAATCAACGGC
ACACCGCACACAGGTTCCGATCGACTCAACATCCGCTTTCGCAACACCGCGCCCAAGCGGTTGCCCTACTACTGCAAGCGCGCGCGCTGGCGGCTTGGCGCTGACGGTTTACGGCTEA
CTTTCCGAPATGCCGGTCCGCTCCACCGCTACGGTTGAAGGCGCGCGCAAACCGCGCGCTGCAATCTCATCAACCGCACCAACCGCGCGCTCAACGGCGCCGCGCACATG
```

### SEC DE ID 4

```
LLIVVRFDICTEGNATFPFKPSTVVLTASALALSGCVADPVTGQSPNKSAMYGLGAAVCGIVGALTHSGKGRNSALACGAIGAGVGGYMDYQEQRLR
PESVTPATGSAALGGSAQYALNTAAQTLVQYPTTLTINGHTDNTGSDAVNNPLSQHRAQAVAYLQTRGVAASRLTVYGYGSHMPVASNATVEGRAQNRVEILINPDQRAVNAARHM
```

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo constituido por las SEC DE ID 2 y 4.
2. Una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene un 90% o más de identidad de la secuencia con una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo constituido por las SEC DE ID 2 y 4.
- 10 3. Una proteína que comprende un fragmento de al menos 20 aminoácidos consecutivos seleccionados entre el grupo constituido por las SEC DE ID 2 y 4, en las que el fragmento comprende un epitopo de la SEC DE ID N° 2 o la SEC DE ID N° 4.
- 15 4. Un anticuerpo que enlaza de manera específica con una proteína de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
5. Una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
- 20 6. Una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 5 que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada entre el grupo constituido por las SEC DE ID 1 y 3.
7. Una molécula de ácido nucleico que comprende un fragmento de al menos 25 nucleótido consecutivos seleccionados entre el grupo constituido por las SEC DE ID 1 y 3, en las que el fragmento comprende una secuencia que codifica un epitopo de la SEC DE ID N° 2 o la SEC DE ID N° 4.
- 25 8. Una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótido complementaria con una molécula de ácido nucleico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7.
- 30 9. Una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene un 90% o más de identidad de la secuencia con una molécula de ácido nucleico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8.
10. Una composición que comprende una proteína, una molécula de ácido nucleico, o un anticuerpo de acuerdo con cualquier reivindicación anterior.
- 35 11. Una composición de acuerdo con la reivindicación 10 que es una composición de vacuna o una composición de diagnóstico.
- 40 12. Una composición de acuerdo con la reivindicación 10 o reivindicación 11 para uso como producto farmacéutico.
13. El uso de una composición de acuerdo con la reivindicación 12 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o prevención de la infección debida a la bacteria neisseria, de manera particular *N. gonorrhoeae*.
- 45 14. Un procedimiento para distinguir *N. gonorrhoeae* de *N. meningitidis*, que comprende la etapas de: (a) poner en contacto una proteína, una molécula de ácido nucleico, o un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 con una muestra biológica bajo condiciones adecuadas para la formulación de los complejos anticuerpo-antígeno; y (b) detectar dichos complejos.
- 50
- 55
- 60
- 65