

(12) **PŘEKLAD EVROPSKÉHO
PATENTOVÉHO SPISU**

(10)
CZ/EP 2 341 063 T3

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

- (96) Datum podání evropské přihlášky: **11.10.2002**
- (96) Číslo evropské přihlášky: **EP 10182345.8**
- (97) Datum zveřejnění evropské přihlášky: **06.07.2011**
- (97) Číslo evropského patentu: **EP 2341063**
- (97) Datum oznámení o udělení evropského patentu: **26.08.2015**
- (30) Právo přednosti:
11.10.2001 US 328101 P
30.08.2002 US 406934 P
- (47) Datum zveřejnění překladu evropského patentového spisu: **25.11.2015**
(Věstník č. 47/2015)

(51) Int. Cl.:

A 61 K 39/00 (2006.01)
C 07 K 16/12 (2006.01)
C 07 K 14/22 (2006.01)
G 01 N 33/569 (2006.01)
C 12 N 9/28 (2006.01)
C 12 N 9/38 (2006.01)
C 12 N 9/40 (2006.01)

(73) Majitel patentu:
Wyeth Holdings LLC, New York, NY 10017-5755, US

(72) Původce:
Zlotnick, Gary, W., PENFIELD, NY 14526, US
Fletcher, Leah, D., GENESEO, NY 14454, US
Farley, John, ROCHESTER, NY 14618, US
Bernfield, Liesel, A., ROCHESTER, NY 14619, US
Zagursky, Robert, J, Victor, NY 14564, US
Metcalf, Benjamin, J., ROCHESTER, NY 14618, US

(74) Zástupce:
JUDr. Pavel Zelený, Hálkova 2, 120 00 Praha 2

(54) Název vynálezu:
Nové imunogenní prostředky k prevenci a léčbě meningokového onemocnění

NOVÉ IMUNOGENNÍ PROSTŘEDKY K PREVENCI A LÉČBĚ MENINGOKOVÉHO ONEMOCNĚNÍ

Popis

Oblast vynálezu

[0001] Předmětný vynález popisuje proteiny *Neisseria* ORF2086 (subrodina A a B), které se mohou izolovat z bakteriálních kmenů, jako jsou druh *Neisseria* zahrnující *Neisseria meningitidis* (seroskupiny A, B, C, D, W-135, X, Y, Z a 29E), *Neisseria gonorrhoeae* a *Neisseria lactamica*, stejně jako imunogenní části a/nebo biologické ekvivalenty uvedených proteinů. Předmětný vynález také popisuje protilátky, které se imunspecificky váží na uvedené proteiny, imunogenní části a/nebo biologické ekvivalenty. Dále předmětný vynález popisuje izolované polynukleotidy obsahující sekvence nukleové kyseliny kódující libovolné cizorodé proteiny, imunogenní části, biologické ekvivalenty a/nebo protilátky. Navíc, předmětný vynález popisuje imunogenní prostředky a jejich použití při prevenci, léčbě a/nebo diagnostice meningokokových infekcí způsobených *N. meningitidis* a zvláště meningokokové onemocnění způsobené *N. meningitidis* séroskupinou B stejně jako způsoby přípravy uvedených prostředků. Vynález popisuje jak rekombinantní formy, tak i formy izolované z přirozeného zdroje stejně jako lipidované tak i nelipidované formy.

Dosavadní stav techniky

[0002] Meningokoková meningitida je devastující onemocnění, které může usmrtit děti a dospívající během několika hodin navzdory dostupnosti antibiotik. Jak se popisuje v publikaci Piz-za et al., 2000, *Science* 287:1816-1820. Meningitida se charak-

terizuje jako zánět pleny mozkové zahrnující intenzivní bolest hlavy, horečku, ztrátu chuti k jídlu, intoleranci světla a zvuků, rigiditu svalů, zvláště krku a k vážným případům konvulze, zvracení a deliria vedoucí k smrti. Symptomy meningokokové meningitidy se objevují náhle a kulminují v meningokokovou septicémií s charakteristickou hemoragickou vyrážkou. Rychlá diagnóza a bezprostřední léčba vysokými dávkami antibiotik je kritická, pokud ještě existuje nějaká šance na přežití. Jak se popisuje v publikaci 2000. Bantam Medical Dictionary, Third Edition 302.

[0003] Meningokokovou meningitidu způsobuje *Neisseria meningitidis* (meningokokus), gram-negativní, kapsulizovaná bakterie, která se klasifikovala do několika patogenních skupin, které zahrnují A, B, C, D, W-135, X, Y, Z a 29E. Kmeny seroskupiny B *N. meningitidis* jsou hlavní příčinou meningokokového onemocnění ve světě. Například, v literatuře se uvádí, že seroskupina B odpovídá za přibližně 50 % bakteriální meningitidy u kojenců a dětí žijících v USA a v Evropě. V současné době neexistuje vakcína, která brání vzniku meningokokového onemocnění způsobené *N. meningitidis* seroskupina B.

[0004] Vývoj imunogenní prostředku k prevenci meningokokového onemocnění seroskupina B se datuje od dob práce Goldschneider et al. před 30 lety. Jak se popisuje v publikaci Goldschneider et al., 1969, J. Exp. Med 129(6):1307-26; Goldschneider et al., 1969, J. Exp. Med 129(6):1327-48; Gotschlich et al., 1969, J. Exp. Med. 129(6):1385-95; a Gotschlich et al., 1969, J. Exp. Med. 129(6):1367-84. Na rozdíl od onemocnění seroskupiny A, které fakticky na území Severní Ameriky zaniklo po II. Světové válce, jak se popisuje v publikaci Achtman, M., 1995, Trends in Microbiology 3(5):186-92, onemocnění způsobené organizmy seroskupiny B a C zůstává endemické ve většině ekonomicky vyspě-

lých zemích. Incidence onemocnění kolísá od <1/100 000 kde se endemické onemocnění během epidemie objevuje řídce 200/100 000 u populace s vysokým nebezpečím.

[0005] Vakcíny založené na polysacharidových konjugátech se vyvinuly proti *N. meningitidis* seroskupiny A a C a jeví se být účinné při prevenci onemocnění. V současné době je dostupný imunogenní prostředek připravený z kapsulárního polysacharidu ze seroskupin A, C, Y & W-135. Jak se popisuje v publikaci Ambrosch et al., 1983, Immunogenicity and side-effects of a new tetravalent. Bulletin of the World Health Organization 61(2): 317-23. Tento imunogenní prostředek však vyvolává imunitní odezvu závislou na T-lymfocytech není účinný u malých dětí a nepokrývá kmeny seroskupiny B, které způsobují až 50 % meningokokového onemocnění.

[0006] Další odborníci také věnovali velké úsilí vývoji imunogenních prostředků použitím kapsulárních polysacharidů. V současné době získaly licenci k použití v Evropě imunogenní prostředky pro onemocnění seroskupiny C připravené konjugací kapsulárního materiálu seroskupiny C s proteiny. Avšak kapsle seroskupiny B mohou být v hodné jako kandidáti vakcíny, protože kapsulární polysacharid je tvořen kyselinou polysialovou, která vykazuje podobnost k částem polysacharidů při vývoji lidské nervové tkáně. Tato cukerná část se rozeznává jako vlastní antigen a je tudíž u člověka velmi slabě imunogenní.

[0007] Vnější membránové proteiny (OMP) se vyvinuly jako alternativní vakcinační antigeny pro onemocnění seroskupiny B. Navázání monoklonální protilátky na dvě variabilní oblasti PorA definuje schéma serosubtypování meningokoků. Proteiny ParA tudíž slouží jako antigeny serosubtypování (jak se popisuje v publikaci Abdillahi et al., 1988, Microbial Pathogenesis 4(1):27-32) v případě meningokokových kmenů a proto se aktivně

zkoumají jako složky imunogenního prostředku seroskupiny B (Poolman, 1996, Adv. Exp. Med. Biol. 397:73-7), protože mohou vyvolat baktericidní protilátky (Saukkonen, 1987, Microbial Pathogenesis 3(4):261-7). Baktericidní protilátky jsou indikátory ochrany a libovolný nový kandidát imunogenního prostředku by mohl vyvolat tyto funkční protilátky.

[0008] Studie u lidí stejně jako u zvířat indikuje, že serotypovací antigen PorA vyvolává bakteriální protilátky. Imunitní odezva na PorA je v obecném případě serosubtypově specifická. Zvláště data serosubtypování indikují, že imunogenní prostředek připravený pro ParA může vyžadovat Por A každého serosubtypu, aby byl pokryt takovým imunogenním prostředkem, možná 6 až 9. Šest až devět PorA bude potřeba k pokrytí 70 až 80 % kmenů seroskupiny B. Tudíž variabilní podstata tohoto proteinu vyžaduje multivalentní vakcinační prostředek k ochraně proti dostatečnému počtu klinických izolátů meningokokových serosubtypů.

[0009] Vývoj imunogenního prostředku meningokoků seroskupiny B byl tak obtížný. V současné době se sekvenovalo několik skupin genomů kmenů reprezentujících obě seroskupiny A a B, aby se asistovalo při identifikaci nových kandidátů imunogenních prostředků. Jak se popisuje v publikaci Tettelin, 2000, Science, 287(5459):1809-15; Pizza et al., 2000, Science 287:1816-1820. Identifikace nových kandidátů imunogenního prostředku, dokonce i v případě znalosti genomu neisserie, je postup, pro který v současné době neexistuje adekvátní matematický algoritmus. Ve skutečnosti jisté informace indikují, že navzdory identifikaci stovek otevřených čtecích rámců (ORF) obsahujících spanning teoretických membránových domén, problémy s expresí, čištěním a vyvoláním povrchových reaktivních a funkčně aktivních protilátek odborníci získaly pouze sedm kandidátů meningokového imuno-

genního prostředku seroskupiny B. Jeden z nich byl znám už dříve.

[0010] Dokument W001/64922 popisuje heterologní expresi řady proteinů *Neisseria meningitidis* a *Neisseria gonorrhoeae*. Popisuje se sekvence proteinu 741 (také nazvaný NMB1870) z kmene MC58.

[0011] Dokument W001/64920 popisuje heterologní expresi hybridů proteinů *Neisseria meningitidis* a *Neisseria gonorrhoeae*. Popisuje se sekvence proteinu 741 (také nazvaný NMB1870) z kmene MC58 a hybridů.

[0012] Databáze UniProt přístupové č. Q9JXV4 popisuje sekvenci hypotetického proteinu NMB1870 z *N. meningitidis* seroskupina B kmen MC58.

[0013] V publikaci Martin D et al. (J Exp Med. 1997; 185(7):1173-83) se popisuje povrchový protein nazvaný NspA s přibližnou molekulovou hmotností 22 000 a hodnotí ochranný potenciál rekombinantního proteinu NspA u myší.

[0014] Existuje potřeba vytvoření imunogenního prostředku, který (1) vyvolává bakteriální protilátky pro více neisseriových kmenů; (2) reaguje s povrchem více kmenů; (3) udílí pasivní ochranu proti čelendži živými kmeny; a/nebo (4) brání kolonizaci.

Souhrn vynálezu

[0015] Vyhovět těmto a jiným potřebám a pro tyto účely předmětný vynález popisuje proteiny *Neisseria* ORF2086 („2086 proteiny“) zahrnující proteiny 2086 subrodiny A a 2086 proteiny subrodiny B. Každý z těchto proteinů je protein, který se může izolovat z přirozených neisseriových kmenů, které zahrnují kme-

ny *Neisseria meningitidis* (seroskupiny A, B, C, D, W-135, X, Y, Z a 29E), *Neisseria gonorrhoeae* a *Neisseria lactamica*. 2086 proteiny se mohou také připravit použitím technologie rekombinace.

[0016] Předmětný vynález zvláště poskytuje proteiny 2086, jak se definuje v připojených nárocích. Předmětný vynález zahrnuje prostředky, imunogenní prostředky a jejich použitím při prevenci, léčbě meningokokové infekce a zvláště meningokokového onemocnění způsobeného *N. meningitidis* stejně jako způsoby k přípravě uvedených prostředků. Proteiny 2086 zahrnují rekombinantní formy a formy izolované z přirozeného zdroje stejně jako lipidované a nelipidované formy.

[0017] Předmětný vynález neočekávaně a s výhodou poskytuje prostředky, které (1) vyvolávají protilátky k více kmenům neisserie, jako jsou kmeny *N. meningitidis*, *N. gonorrhoeae* a/nebo *N. lactamica*; (2) reagují s povrchem více kmenů; (3) udílejí pasivní ochranu proti čelendži živými kmeny; a/nebo (4) brání kolonizaci stejně jako způsoby použití prostředků a způsobů přípravy uvedených prostředků. Dále v textu se popisují se různá provedení předmětného vynálezu.

Stručný popis obrázků

[0018]

Obr. 1A znázorňuje SDS-PAGE gel, který znázorňuje dva hlavní proteiny proteinových frakcí získaných z experimentů identifikace proteinového extraktu neisseriové membrány, který je schopen vyvolat bakteriální protilátka proti heterologním kmenům.

Obr. 1B znázorňuje výsledky z experimentů identifikace dvou hlavních proteinů analýzou TMAE Flow Through složek štěpením proteázou a fázového N-terminálního sekvenování.

Obr. 2 znázorňuje schéma čištění a homogenitu, jak se stanovilo SDS-PAGE rLP2086.

Obr. 3 znázorňuje výsledky z experimentů identifikace dvou hlavních proteinů a jednoho minoritního proteinu analýzou TMAE Flow Through složek LC-MS/MS a odpovídající SDS-PAGE.

Obr. 4 je SDS-PAGE gel z rekombinantní exprese proteinu 2086.

Obr. 5 je schématický diagram plazmidu pPX7340, jak se popisuje ve zde uvedených příkladech.

Obr. 6 je schématický diagram plazmidu pPX7328, jak se popisuje ve zde uvedených příkladech.

Obr. 7 je schématický diagram plazmidu pPX7343, jak se popisuje ve zde uvedených příkladech.

Obr. 8 ilustruje N-terminální oblasti genu 2086 z různých kmenů.

Obr. 9A je blokové schéma ukazující předchozí kroky při identifikaci imunogenní složky v kmenu neisserie.

Obr. 9B je blokové schéma ukazující konečné kroky při identifikaci imunogenní složky v kmenu neisserie.

Obr. 10A je schématický diagram promotoru indukovatelného pBAD arabinózou, který řídí expresi fúzního proteinu P4 signál/ORF2086, aby se exprimovala lipidovaná forma rP2086, jak se popisuje ve zde uvedených příkladech.

Obr. 10A je schématický diagram promotoru indukovatelného arabinózou pBAD, který řídí expresi fúzního proteinu P4 signál/ORF2086, jak se popisuje ve zde uvedených příkladech.

Obr. 10B je schématický diagram vektoru pET9a-T7 pro rekombinantní expresi nelipidované formy ORF2086.

Obr. 11A je fotografie reprezentující celé buněčné lyzáty *E. coli* B exprimující protein rLP2086.

Obr. 11B je fotografie reprezentující celé buněčné lyzáty *E. coli* B exprimující protein rLP2086.

Obr. 12 je fylogenní strom vykazující organizaci subrodin a skupin proteinů ORF2086.

Obr. 13 je grafická ilustrace dat testu ELISA celých buněk v případě antiséra rLP2086 subrodiny A.

Obr. 14 je grafická ilustrace dat testu ELISA celých buněk v případě antiséra rLP2086 subrodiny B.

Obr. 15 je grafická ilustrace výsledků smíšené studie rLP2086 - WCE titrů.

Obr. 16 je grafická ilustrace výsledků smíšené studie rLP2086/rProA - WCE titrů.

Obr. 17 je Western Blot vykazující reaktivitu rLP2086 myšního antiséra k lyzátu celých buněk P2086 subrodina B *N. meningitidis*.

Obr. 18 je Western Blot vykazující reaktivitu rLP2086 myšního antiséra k lyzátu celých buněk P2086 subrodina A *N. meningitidis*.

Souhrn sekvencí

[0019]

SEQ ID NO: v případě studovaných sekvencí:

SEQ ID NO: 1 je sekvence nukleové kyseliny kódující aminokyselinovou sekvenci v případě zralého proteinu 2086 z kmene L3 6275, pokud se kombinovaly s přirozenou vedoucí sekvencí.

SEQ ID NO: 2 je aminokyselinová sekvence zralého proteinu 2086 z kmene L3 6275 připraveného použitím přirozené vedoucí sekvence.

SEQ ID NO: 3 je sekvence nukleové kyseliny kódující aminokyselinovou sekvenci zralého proteinu 2086 z L3 6275, pokud se kombinovala s vedoucí sekvencí P4.

SEQ ID NO: 4 je aminokyselinové sekvence pro zralý protein 2086 z kmene L3 6275 připraveného použitím P4 vedoucí sekvence.

SEQ ID NO: 5 je sekvence nukleové kyseliny kódující aminokyselinovou sekvenci zralého proteinu 2086 z kmene L3 6275.

SEQ ID NO: 6 je aminokyselinová sekvence zralého proteinu 2086 z kmene L3 6275.

SEQ ID NO: 7 je sekvence nukleové kyseliny kódující aminokyselinovou sekvenci zralého proteinu 2086 z kmene CDC2369, pokud se kombinoval s nativní vedoucí sekvencí.

SEQ ID NO: 8 je aminokyselinová sekvence pro zralý protein 2086 z kmene CDC2369 připraveného použitím přirozené vedoucí sekvence.

SEQ ID NO: 9 je sekvence nukleové kyseliny kódující aminokyselinovou sekvencí zralého proteinu 2086 z CDC2369, pokud se kombinoval s vedoucí sekvencí P4.

SEQ ID NO: 10 je aminokyselinová sekvence zralého proteinu 2086 z kmene CDC2369 připraveného použitím vedoucí sekvence P4.

SEQ ID NO: 11 je sekvence nukleové kyseliny kódující aminokyselinovou sekvencí zralého proteinu 2086 z kmene CDC2369.

SEQ ID NO: 12 je aminokyselinová sekvence zralého proteinu 2086 z kmene CDC2369.

SEQ ID NO: 13 je sekvence nukleové kyseliny kódující aminokyselinovou sekvencí zralého proteinu 2086 z kmene CDC1034, pokud se kombinoval s nativní vedoucí sekvencí.

SEQ ID NO: 14 je aminokyselinová sekvence zralého proteinu 2086 z kmene CDC1034 připraveného použitím přirozené vedoucí sekvence.

SEQ ID NO: 15 je sekvence nukleové kyseliny kódující aminokyselinovou sekvencí zralého proteinu 2086 z CDC1034, pokud se kombinoval s vedoucí sekvencí P4.

SEQ ID NO: 16 je aminokyselinová sekvence zralého proteinu 2086 z kmene CDC1034 připraveného použitím vedoucí sekvence P4.

SEQ ID NO: 17 je sekvence nukleové kyseliny kódující aminokyselinovou sekvencí zralého proteinu 2086 z kmene CDC1034.

SEQ ID NO: 18 je aminokyselinová sekvence zralého proteinu 2086 z kmene CDC1034.

SEQ ID NO: 19 je sekvence nukleové kyseliny kódující aminokyselinovou sekvenci zralého proteinu 2086 z kmene L4 891, pokud se kombinovala s přirozenou vedoucí sekvencí.

SEQ ID NO: 20 je aminokyselinová sekvence zralého proteinu 2086 z kmene L4 891 připravená použitím přirozené vedoucí sekvence.

SEQ ID NO: 21 je sekvence nukleové kyseliny kódující aminokyselinovou sekvenci zralého proteinu 2086 z L4 891, pokud se kombinovala s P4 vedoucí sekvencí.

SEQ ID NO: 22 je aminokyselinová sekvence zralého proteinu 2086 z kmene L4 891 připraveného použitím P4 vedoucí sekvence.

SEQ ID NO: 23 je sekvence nukleové kyseliny kódující aminokyselinovou sekvenci zralého proteinu 2086 z kmene L4 891.

SEQ ID NO: 24 je aminokyselinová sekvence zralého proteinu 2086 z kmene L4 891.

SEQ ID NO: 25 je sekvence nukleové kyseliny kódující aminokyselinovou sekvenci zralého proteinu 2086 z kmene B16B6, pokud se kombinoval s přirozenou vedoucí sekvencí.

SEQ ID NO: 26 je aminokyselinová sekvence zralého proteinu 2086 z kmene B16B6 připraveného použitím přirozené vedoucí sekvence.

SEQ ID NO: 27 je sekvence nukleové kyseliny kódující aminokyselinovou sekvenci zralého proteinu 2086 z B16B6, pokud se kombinovala s vedoucí sekvencí P4.

SEQ ID NO: 28 je aminokyselinová sekvence zralého proteinu 2086 z kmene B16B6 připraveného použitím vedoucí sekvence P4.

SEQ ID NO: 29 je sekvence nukleové kyseliny kódující aminokyselinovou sekvenci zralého proteinu 2086 z kmene B16B6.

SEQ ID NO: 30 je aminokyselinová sekvence pro zralý protein 2086 z kmene B16B6.

SEQ ID NO: 31 je sekvence nukleové kyseliny kódující aminokyselinovou sekvenci zralého proteinu 2086 z kmene W135 W135 (ATCC35559), pokud se kombinovala s přirozenou vedoucí sekvencí.

SEQ ID NO: 32 je aminokyselinová sekvence přirozeného proteinu 2086 z kmene W135 (ATCC35559) připraveného použitím přirozené vedoucí sekvence.

SEQ ID NO: 33 je sekvence nukleové kyseliny kódující zralý protein 2086 z kmene W135 (ATCC35559), pokud se kombinuje s vedoucí sekvencí P4.

SEQ ID NO: 34 je aminokyselinová sekvence zralého proteinu 2086 z kmene W135 (ATCC35559) připraveného použitím vedoucí sekvence P4.

SEQ ID NO: 35 je sekvence nukleové kyseliny kódující aminokyselinovou sekvenci zralého proteinu 2086 z kmene W135 (ATCC35559).

SEQ ID NO: 36 je aminokyselinová sekvence zralého proteinu 2086 z kmene W135 (ATCC35559).

SEQ ID NO: 37 je sekvence nukleové kyseliny kódující aminokyselinovou sekvenci zralého proteinu 2086 z kmene C11, pokud se kombinuje s vedoucí sekvencí.

SEQ ID NO: 38 je aminokyselinová sekvence zralého proteinu 2086 z kmene C11 připraveného použitím přirozené vedoucí sekvence.

SEQ ID NO: 39 je sekvence nukleové kyseliny kódující aminokyselinovou sekvenci zralého proteinu 2086 z kmene C11, pokud se kombinuje s vedoucí sekvencí P4.

SEQ ID NO: 40 je aminokyselinová sekvence zralého proteinu 2086 z kmene C11 připraveného použitím přirozené vedoucí sekvence P4.

SEQ ID NO: 41 je sekvence nukleové kyseliny kódující aminokyselinovou sekvenci zralého proteinu 2086 z kmene C11.

SEQ ID NO: 42 je aminokyselinová sekvence zralého proteinu 2086 z kmene C11.

SEQ ID NO: 43 je sekvence nukleové kyseliny kódující aminokyselinovou sekvenci zralého proteinu 2086 z kmene Y (ATCC35561), pokud se kombinuje s přirozenou vedoucí sekvencí.

SEQ ID NO: 44 je aminokyselinová sekvence zralého proteinu 2086 z kmene Y (ATCC35561) připravené použitím přirozené vedoucí sekvence.

SEQ ID NO: 45 je sekvence nukleové kyseliny kódující aminokyselinovou sekvenci zralého proteinu 2086 z kmene Y (ATCC35561), pokud se kombinuje s přirozenou vedoucí sekvencí P4.

SEQ ID NO: 46 je aminokyselinová sekvence ze zralého proteinu 2086 z kmene Y (ATCC35561) připraveného použitím vedoucí sekvence P4.

SEQ ID NO: 47 je sekvence nukleové kyseliny kódující aminokyselinovou sekvenci ze zralého proteinu 2086 z kmene Y (ATCC35561).

SEQ ID NO: 48 je aminokyselinová sekvence ze zralého proteinu 2086 z kmene Y (ATCC35561).

SEQ ID NO: 49 je sekvence nukleové kyseliny kódující aminokyselinovou sekvenci ze zralého proteinu 2086 z kmene M98 250732, pokud se kombinuje s přirozenou vedoucí sekvencí.

SEQ ID NO: 50 je aminokyselinová sekvence zralého proteinu 2086 z kmene M98 250732 připraveného použitím přirozené vedoucí sekvence.

SEQ ID NO: 51 je sekvence nukleové kyseliny kódující aminokyselinovou sekvenci ze zralého proteinu 2086 z kmene M98 250732, pokud se kombinuje s přirozenou vedoucí sekvencí P4.

SEQ ID NO: 52 je aminokyselinová sekvence zralého proteinu 2086 z kmene M98 250732 připraveného použitím přirozené vedoucí sekvence P4.

SEQ ID NO: 53 je sekvence nukleové kyseliny kódující aminokyselinovou sekvenci ze zralého proteinu 2086 z kmene M98 250732.

SEQ ID NO: 54 je aminokyselinová sekvence zralého proteinu 2086 z kmene M98 250732.

SEQ ID NO: 55 je sekvence nukleové kyseliny kódující aminokyselinovou sekvenci ze zralého proteinu 2086 z kmene M98 250771, pokud se kombinuje s přirozenou vedoucí sekvencí.

SEQ ID NO: 56 je aminokyselinová sekvence zralého proteinu 2086 z kmene M98 250771 připraveného použitím přirozené vedoucí sekvence.

SEQ ID NO: 57 je sekvence nukleové kyseliny kódující aminokyselinovou sekvenci ze zralého proteinu 2086 z kmene M98 250771, pokud se kombinuje s přirozenou vedoucí sekvencí P4.

SEQ ID NO: 58 je aminokyselinová sekvence zralého proteinu 2086 z kmene M98 250771 připraveného použitím přirozené vedoucí sekvence P4.

SEQ ID NO: 59 je sekvence nukleové kyseliny kódující aminokyselinovou sekvenci ze zralého proteinu 2086 z kmene M98 250771.

SEQ ID NO: 60 je aminokyselinová sekvence zralého proteinu 2086 z kmene M98 250771.

SEQ ID NO: 61 je sekvence nukleové kyseliny kódující aminokyselinovou sekvenci ze zralého proteinu 2086 z kmene CDC1135, pokud se kombinuje s přirozenou vedoucí sekvencí.

SEQ ID NO: 62 je aminokyselinová sekvence zralého proteinu 2086 z kmene CDC1135 připraveného použitím přirozené vedoucí sekvence.

SEQ ID NO: 63 je sekvence nukleové kyseliny kódující aminokyselinovou sekvenci ze zralého proteinu 2086 z kmene CDC1135, pokud se kombinuje s přirozenou vedoucí sekvencí P4.

SEQ ID NO: 64 je aminokyselinová sekvence přirozeného proteinu 2086 z kmene CDC1135 připraveného použitím vedoucí sekvence P4.

SEQ ID NO: 65 je sekvence nukleové kyseliny kódující aminokyselinovou sekvenci zralého proteinu 2086 z kmene CDC1135.

SEQ ID NO: 66 je aminokyselinová sekvence zralého proteinu 2086 z kmene CDC1135.

SEQ ID NO: 67 je sekvence nukleové kyseliny kódující aminokyselinovou sekvenci zralého proteinu 2086 z kmene M97 252153, pokud se kombinoval s přirozenou vedoucí sekvencí.

SEQ ID NO: 68 je aminokyselinová sekvence zralého proteinu 2086 z kmene M97 252153 připraveného použitím přirozené vedoucí sekvence.

SEQ ID NO: 69 je sekvence nukleové kyseliny kódující aminokyselinovou sekvenci zralého proteinu 2089 z M97 252153, pokud se kombinovala s vedoucí sekvencí P4.

SEQ ID NO: 70 je aminokyselinová sekvence z přirozeného proteinu 2086 z kmene M97 252153 připraveného použitím vedoucí sekvence P4.

SEQ ID NO: 71 je nukleová kyselina kódující aminokyselinovou sekvenci zralého proteinu 2086 z kmene M97 252153.

SEQ ID NO: 72 je aminokyselinová sekvence zralého proteinu 2086 z kmene M97 252153.

SEQ ID NO: 73 je nukleová kyselina kódující aminokyselinovou sekvenci z přirozeného proteinu 2086 z kmene CDC1610, pokud se kombinoval s přirozenou vedoucí sekvencí.

SEQ ID NO: 74 je aminokyselinová sekvence zralého proteinu 2086 z kmene CDC1610 připravené použitím přirozené vedoucí sekvence.

SEQ ID NO: 75 je sekvence nukleové kyseliny kódující aminokyselinovou sekvenci zralého proteinu 2086 z CDC1610, pokud se kombinovala s vedoucí sekvencí P4.

SEQ ID NO: 76 je aminokyselinová sekvence zralého proteinu 2086 z kmene CDC1610 připraveného použitím vedoucí sekvence P4.

SEQ ID NO: 77 je sekvence nukleové kyseliny kódující aminokyselinovou sekvenci zralého proteinu 2086 z kmene CDC1610.

SEQ ID NO: 78 je aminokyselinová sekvence zralého proteinu 2086 z kmene CDC1610.

SEQ ID NO: 79 je sekvence nukleové kyseliny kódující aminokyselinovou sekvenci zralého proteinu 2086 z kmene CDC1492, pokud se kombinovala s přirozenou vedoucí sekvencí.

SEQ ID NO: 80 je aminokyselinová sekvence zralého proteinu 2086 z kmene CDC1492 připraveného použitím přirozené vedoucí sekvence.

SEQ ID NO: 81 je sekvence nukleové kyseliny kódující aminokyselinovou sekvenci zralého proteinu 2086 z CDC1492, pokud se kombinovala s vedoucí sekvencí P4.

SEQ ID NO: 82 je aminokyselinová sekvence zralého proteinu 2086 z kmene CDC1492 připraveného použitím vedoucí sekvence P4.

SEQ ID NO: 83 je sekvence nukleové kyseliny kódující aminokyselinovou sekvenci zralého proteinu 2086 z kmene CDC1492.

SEQ ID NO: 84 je aminokyselinová sekvence zralého proteinu z kmene CDC1492.

SEQ ID NO: 85 je sekvence nukleové kyseliny kódující aminokyselinovou sekvenci zralého proteinu 2086 z kmene L8 M978, pokud se kombinoval s přirozenou vedoucí sekvencí.

SEQ ID NO: 86 je aminokyselinová sekvence zralého proteinu 2086 z kmene L8 M978 připraveného použitím přirozené vedoucí sekvence.

SEQ ID NO: 87 je sekvence nukleové kyseliny kódující aminokyselinovou sekvenci zralého proteinu 2086 z kmene L8 M978, pokud se kombinoval s vedoucí sekvencí P4.

SEQ ID NO: 88 je aminokyselinová sekvence zralého proteinu 2086 z kmene L8 M978 připraveného použitím vedoucí sekvence P4.

SEQ ID NO: 89 je sekvence nukleové kyseliny kódující aminokyselinovou sekvenci zralého proteinu 2086 z kmene L8 M978.

SEQ ID NO: 90 je aminokyselinová sekvence zralého proteinu 2086 z kmene L8 M978.

SEQ ID NO: 91 je sekvence nukleové kyseliny kódující aminokyselinovou sekvenci zralého proteinu 2086 z kmene M97 252988, pokud se kombinoval s přirozenou vedoucí sekvencí.

SEQ ID NO: 92 je aminokyselinová sekvence zralého proteinu 2086 z kmene M97 252988 připraveného použitím přirozené vedoucí sekvence.

SEQ ID NO: 93 je sekvence nukleové kyseliny kódující aminokyselinovou sekvenci zralého proteinu 2086 z kmene M97 252988, pokud se kombinoval s přirozenou vedoucí sekvencí P4.

SEQ ID NO: 94 je aminokyselinová sekvence zralého proteinu 2086 z kmene M97 252988 připravená použitím vedoucí sekvence P4.

SEQ ID NO: 95 je sekvence nukleové kyseliny kódující aminokyselinovou sekvenci zralého proteinu 2086 z kmene M97 252988.

SEQ ID NO: 96 je aminokyselinová sekvence zralého proteinu 2086 z kmene M97 252988.

SEQ ID NO: 97 je sekvence nukleové kyseliny kódující aminokyselinovou sekvenci zralého proteinu 2086 z kmene M97 252697, pokud se kombinovala s přirozenou vedoucí sekvencí.

SEQ ID NO: 98 je aminokyselinová sekvence zralého proteinu 2086 z kmene M97 252988 připravená použitím přirozené vedoucí sekvence P4.

SEQ ID NO: 99 je sekvence nukleové kyseliny kódující aminokyselinovou sekvenci zralého proteinu 2086 z kmene M97 252697, pokud se kombinovala s vedoucí sekvencí P4.

SEQ ID NO: 100 je aminokyselinová sekvence zralého proteinu 2086 z kmene M97 252697 připravená použitím přirozené vedoucí sekvence P4.

SEQ ID NO: 101 je sekvence nukleové kyseliny kódující aminokyselinovou sekvenci zralého proteinu 2086 z kmene M97 252697.

SEQ ID NO: 102 je aminokyselinová sekvence zralého proteinu 2086 z kmene M97 252697.

SEQ ID NO: 103 je sekvence nukleové kyseliny kódující aminokyselinovou sekvenci zralého proteinu 2086 z kmene 6557, pokud se kombinovala s přirozenou vedoucí sekvencí.

SEQ ID NO: 104 je aminokyselinová sekvence zralého proteinu 2086 z kmene 6557 připravená použitím přirozené vedoucí sekvence.

SEQ ID NO: 105 je sekvence nukleové kyseliny kódující aminokyselinovou sekvenci zralého proteinu 2086 z kmene 6557, pokud se kombinovala s přirozenou vedoucí sekvencí P4.

SEQ ID NO: 106 je aminokyselinová sekvence zralého proteinu 2086 z kmene 6557 připravená použitím přirozené vedoucí sekvence P4.

SEQ ID NO: 107 je sekvence nukleové kyseliny kódující aminokyselinovou sekvenci zralého proteinu 2086 z kmene 6557.

SEQ ID NO: 108 je aminokyselinová sekvence zralého proteinu 2086 z kmene 6557.

SEQ ID NO: 109 je sekvence nukleové kyseliny kódující aminokyselinovou sekvenci zralého proteinu 2086 z kmene 2996, pokud se kombinovala s přirozenou vedoucí sekvencí.

SEQ ID NO: 110 je aminokyselinová sekvence zralého proteinu 2086 z kmene 2996 připravená použitím přirozené vedoucí sekvence.

SEQ ID NO: 111 je sekvence nukleové kyseliny kódující aminokyselinovou sekvenci zralého proteinu 2086 z kmene 2996, pokud se kombinovala s přirozenou vedoucí sekvencí P4.

SEQ ID NO: 112 je aminokyselinová sekvence zralého proteinu 2086 z kmene 2996 připravená použitím přirozené vedoucí sekvence P4.

SEQ ID NO: 113 je sekvence nukleové kyseliny kódující aminokyselinovou sekvenci zralého proteinu 2086 z kmene 2996.

SEQ ID NO: 114 je aminokyselinová sekvence zralého proteinu 2086 z kmene 2996.

SEQ ID NO: 115 je sekvence nukleové kyseliny kódující aminokyselinovou sekvenci zralého proteinu 2086 z kmene M97 252976, pokud se kombinovala s přirozenou vedoucí sekvencí.

SEQ ID NO: 116 je aminokyselinová sekvence zralého proteinu 2086 z kmene M97 252976 připravená použitím přirozené vedoucí sekvence.

SEQ ID NO: 117 je sekvence nukleové kyseliny kódující aminokyselinovou sekvenci zralého proteinu 2086 z kmene M97 252976, pokud se kombinovala s přirozenou vedoucí sekvencí P4.

SEQ ID NO: 118 je aminokyselinová sekvence zralého proteinu 2086 z kmene M97 252976 připravená použitím přirozené vedoucí sekvence P4.

SEQ ID NO: 119 je sekvence nukleové kyseliny kódující aminokyselinovou sekvenci zralého proteinu 2086 z kmene M97 252976.

SEQ ID NO: 120 je aminokyselinová sekvence zralého proteinu 2086 z kmene M97 252976.

SEQ ID NO: 121 je sekvence nukleové kyseliny kódující aminokyselinovou sekvenci zralého proteinu 2086 z kmene M97 251854, pokud se kombinovala s přirozenou vedoucí sekvencí.

SEQ ID NO: 122 je aminokyselinová sekvence zralého proteinu 2086 z kmene M97 251854 připravená použitím přirozené vedoucí sekvence.

SEQ ID NO: 123 je sekvence nukleové kyseliny kódující aminokyselinovou sekvenci zralého proteinu 2086 z kmene M97 251854, pokud se kombinovala s přirozenou vedoucí sekvencí P4.

SEQ ID NO: 124 je aminokyselinová sekvence zralého proteinu 2086 z kmene M97 251854 připravená použitím přirozené vedoucí sekvence P4.

SEQ ID NO: 125 je sekvence nukleové kyseliny kódující aminokyselinovou sekvenci zralého proteinu 2086 z kmene M97 251854.

SEQ ID NO: 126 je aminokyselinová sekvence zralého proteinu 2086 z kmene M97 251854.

SEQ ID NO: 127 je sekvence nukleové kyseliny kódující aminokyselinovou sekvenci zralého proteinu 2086 z kmene CDC1521, pokud se kombinovala s přirozenou vedoucí sekvencí.

SEQ ID NO: 128 je aminokyselinová sekvence zralého proteinu 2086 z kmene CDC 1521 připravená použitím přirozené vedoucí sekvence.

SEQ ID NO: 129 je sekvence nukleové kyseliny kódující aminokyselinovou sekvenci zralého proteinu 2086 z kmene CDC 1521, pokud se kombinovala s přirozenou vedoucí sekvencí P4.

SEQ ID NO: 130 je aminokyselinová sekvence zralého proteinu 2086 z kmene CDC 1521 připravená použitím přirozené vedoucí sekvence P4.

SEQ ID NO: 131 je sekvence nukleové kyseliny kódující aminokyselinovou sekvenci zralého proteinu 2086 z kmene CDC 1521.

SEQ ID NO: 132 je aminokyselinová sekvence zralého proteinu 2086 z kmene CDC 1521.

SEQ ID NO: 133 je sekvence nukleové kyseliny kódující aminokyselinovou sekvenci zralého proteinu 2086 z kmene M98 250622, pokud se kombinovala s přirozenou vedoucí sekvencí.

SEQ ID NO: 134 je aminokyselinová sekvence zralého proteinu 2086 z kmene z kmene M98 250622 připravená použitím přirozené vedoucí sekvence.

SEQ ID NO: 135 je sekvence nukleové kyseliny kódující aminokyselinovou sekvenci zralého proteinu 2086 z kmene M98 250622, pokud se kombinovala s přirozenou vedoucí sekvencí P4.

SEQ ID NO: 136 je aminokyselinová sekvence zralého proteinu 2086 z kmene M98 250622 připravená použitím přirozené vedoucí sekvence P4.

SEQ ID NO: 137 je sekvence nukleové kyseliny kódující aminokyselinovou sekvenci zralého proteinu 2086 z kmene M98 250622.

SEQ ID NO: 138 je aminokyselinová sekvence zralého proteinu 2086 z kmene M98 250622.

SEQ ID NO: 139 je sekvence nukleové kyseliny kódující aminokyselinovou sekvenci zralého proteinu 2086 z kmene 870446, pokud se kombinovala s přirozenou vedoucí sekvencí.

SEQ ID NO: 140 je aminokyselinová sekvence zralého proteinu 2086 z kmene 870446 připravená použitím přirozené vedoucí sekvence.

SEQ ID NO: 141 je sekvence nukleové kyseliny kódující aminokyselinovou sekvenci zralého proteinu 2086 z kmene 870446, pokud se kombinovala s vedoucí sekvencí P4.

SEQ ID NO: 142 je aminokyselinová sekvence zralého proteinu 2086 z kmene 870446 připravená použitím vedoucí sekvence P4.

SEQ ID NO: 143 je sekvence nukleové kyseliny kódující aminokyselinovou sekvenci zralého proteinu 2086 z kmene 870446.

SEQ ID NO: 144 je aminokyselinová sekvence zralého proteinu 2086 z kmene 870446.

SEQ ID NO: 145 je sekvence nukleové kyseliny kódující aminokyselinovou sekvenci zralého proteinu 2086 z kmene M97 253248, pokud se kombinovala s přirozenou vedoucí sekvencí.

SEQ ID NO: 146 je aminokyselinová sekvence zralého proteinu 2086 z kmene M97 253248 připravená použitím přirozené vedoucí sekvence.

SEQ ID NO: 147 je sekvence nukleové kyseliny kódující aminokyselinovou sekvenci zralého proteinu 2086 z kmene M97 253248, pokud se kombinovala s vedoucí sekvencí P4.

SEQ ID NO: 148 je aminokyselinová sekvence zralého proteinu 2086 z kmene M97 253248 připravená použitím vedoucí sekvence P4.

SEQ ID NO: 149 je sekvence nukleové kyseliny kódující aminokyselinovou sekvenci zralého proteinu 2086 z kmene M97 253248.

SEQ ID NO: 150 je aminokyselinová sekvence zralého proteinu 2086 z kmene M97 253248.

SEQ ID NO: 151 je sekvence nukleové kyseliny kódující aminokyselinovou sekvenci zralého proteinu 2086 z kmene M98 250809, pokud se kombinovala s přirozenou vedoucí sekvencí.

SEQ ID NO: 152 je aminokyselinová sekvence zralého proteinu 2086 z kmene M98 250809 připravená použitím přirozené vedoucí sekvence.

SEQ ID NO: 153 je sekvence nukleové kyseliny kódující aminokyselinovou sekvenci zralého proteinu 2086 z kmene M98 250809, pokud se kombinovala s vedoucí sekvencí P4.

SEQ ID NO: 154 je aminokyselinová sekvence zralého proteinu 2086 z kmene M98 250809 připravená použitím vedoucí sekvence P4.

SEQ ID NO: 155 je sekvence nukleové kyseliny kódující aminokyselinovou sekvenci zralého proteinu 2086 z kmene M98 250809.

SEQ ID NO: 156 je aminokyselinová sekvence zralého proteinu 2086 z kmene M98 250809.

SEQ ID NO: 157 je sekvence nukleové kyseliny kódující aminokyselinovou sekvenci zralého proteinu 2086 z kmene L5 M981, pokud se kombinovala s přirozenou vedoucí sekvencí.

SEQ ID NO: 158 je aminokyselinová sekvence zralého proteinu 2086 z kmene L5 M981 připravená použitím přirozené vedoucí sekvence.

SEQ ID NO: 159 je sekvence nukleové kyseliny kódující aminokyselinovou sekvenci zralého proteinu 2086 z kmene L5 M981, pokud se kombinovala s vedoucí sekvencí P4.

SEQ ID NO: 160 je aminokyselinová sekvence zralého proteinu 2086 z kmene L5 M981 připravená použitím vedoucí sekvence P4.

SEQ ID NO: 161 je sekvence nukleové kyseliny kódující aminokyselinovou sekvenci zralého proteinu 2086 z kmene L5 M981.

SEQ ID NO: 162 je aminokyselinová sekvence zralého proteinu 2086 z kmene L5 M981.

SEQ ID NO: 163 je sekvence nukleové kyseliny kódující aminokyselinovou sekvenci zralého proteinu 2086 z kmene NMB, pokud se kombinovala s přirozenou vedoucí sekvencí.

SEQ ID NO: 164 je aminokyselinová sekvence zralého proteinu 2086 z kmene NMB připravená použitím přirozené vedoucí sekvence.

SEQ ID NO: 165 je sekvence nukleové kyseliny kódující aminokyselinovou sekvenci zralého proteinu 2086 z kmene NMB, pokud se kombinovala s vedoucí sekvencí P4.

SEQ ID NO: 166 je aminokyselinová sekvence zralého proteinu 2086 z kmene NMB připravená použitím vedoucí sekvence P4.

SEQ ID NO: 167 je sekvence nukleové kyseliny kódující aminokyselinovou sekvenci zralého proteinu 2086 z kmene NMB.

SEQ ID NO: 168 je aminokyselinová sekvence zralého proteinu 2086 z kmene NMB.

SEQ ID NO: 169 je sekvence nukleové kyseliny kódující aminokyselinovou sekvenci zralého proteinu 2086 z kmene M98 250572, pokud se kombinovala s vedoucí sekvencí.

SEQ ID NO: 170 je aminokyselinová sekvence zralého proteinu 2086 z kmene M98 250572 připravená použitím přirozené vedoucí sekvence.

SEQ ID NO: 171 je sekvence nukleové kyseliny kódující aminokyselinovou sekvenci zralého proteinu 2086 z kmene M98 250572, pokud se kombinovala s vedoucí sekvencí P4.

SEQ ID NO: 172 je aminokyselinová sekvence zralého proteinu 2086 z kmene M98 250572 připravená použitím vedoucí sekvence P4.

SEQ ID NO: 173 je sekvence nukleové kyseliny kódující aminokyselinovou sekvenci zralého proteinu 2086 z kmene M98 250572.

SEQ ID NO: 174 je aminokyselinová sekvence zralého proteinu 2086 z kmene M98 250572.

SEQ ID NO: 175 je sekvence nukleové kyseliny kódující aminokyselinovou sekvenci zralého proteinu 2086 z kmene A4 Sanford; M97 251836 PART; M97 251957; M97 251985; M97 252060; M97 251870; M97 251994; M98 250024; M97 251905; M97 251876; M97 251898; nebo M97 251830, pokud se kombinovala s přirozenou vedoucí sekvencí.

SEQ ID NO: 176 je aminokyselinová sekvence zralého proteinu 2086 z kmene A4 Sanford; M97 251836 PART; M97 251957; M97 251985; M97 252060; M97 251870; M97 251994; M98 250024; M97

251905; M97 251876; M97 251898; nebo M97 251830 připravená použitím přirozené vedoucí sekvence.

SEQ ID NO: 177 je sekvence nukleové kyseliny kódující aminokyselinovou sekvenci zralého proteinu 2086 z kmene A4 Sanford; M97 251836 PART; M97 251957; M97 251985; M97 252060; M97 251870; M97 251994; M98 250024; M97 251905; M97 251876; M97 251898; nebo M97 251830, pokud se kombinovala s vedoucí sekvencí P4.

SEQ ID NO: 178 je aminokyselinová sekvence zralého proteinu 2086 z kmene A4 Sanford; M97 251836 PART; M97 251957; M97 251985; M97 252060; M97 251870; M97 251994; M98 250024; M97 251905; M97 251876; M97 251898; nebo M97 251830 připravená použitím vedoucí sekvence P4.

SEQ ID NO: 179 je sekvence nukleové kyseliny kódující aminokyselinovou sekvenci zralého proteinu 2086 z kmene A4 Sanford; M97 251836 part; M97 251957; M97 251985; M97 252060; M97 251870; M97 251994; M98 250024; M97 251905; M97 251876; M97 251898; nebo M97 251830.

SEQ ID NO: 180 je aminokyselinová sekvence zralého proteinu 2086 z kmene A4 Sanford; M97 251836 PART; M97 251957; M97 251985; M97 252060; M97 251870; M97 251994; M98 250024; M97 251905; M97 251876; M97 251898; nebo M97 251830.

SEQ ID NO: 181 je sekvence nukleové kyseliny kódující částečnou aminokyselinovou sekvenci zralého proteinu 2086 z kmene CDC937, pokud se kombinovala s přirozenou vedoucí sekvencí.

SEQ ID NO: 182 je aminokyselinová sekvence zralého proteinu 2086 z kmene CDC937 připravená použitím přirozené vedoucí sekvence.

SEQ ID NO: 183 je sekvence nukleové kyseliny kódující částečnou aminokyselinovou sekvencí zralého proteinu 2086 z kmene CDC937, pokud se kombinovala s vedoucí sekvencí P4.

SEQ ID NO: 184 je aminokyselinová sekvence zralého proteinu 2086 z kmene CDC937 připravená použitím vedoucí sekvence P4.

SEQ ID NO: 185 je sekvence nukleové kyseliny kódující částečnou aminokyselinovou sekvencí zralého proteinu 2086 z kmene CDC937.

SEQ ID NO: 186 je aminokyselinová sekvence zralého proteinu 2086 z kmene CDC937.

SEQ ID NO: 187 je sekvence nukleové kyseliny kódující částečnou aminokyselinovou sekvencí zralého proteinu 2086 z kmene M97 252097, pokud se kombinovala s přirozenou vedoucí sekvencí.

SEQ ID NO: 188 je aminokyselinová sekvence zralého proteinu 2086 z kmene M97 252097 připravená použitím přirozené vedoucí sekvence.

SEQ ID NO: 189 je sekvence nukleové kyseliny kódující částečnou aminokyselinovou sekvencí zralého proteinu 2086 z kmene M97 252097, pokud se kombinovala s vedoucí sekvencí P4.

SEQ ID NO: 190 je aminokyselinová sekvence zralého proteinu 2086 z kmene M97 252097 připravená použitím vedoucí sekvence P4.

SEQ ID NO: 191 je sekvence nukleové kyseliny kódující částečnou aminokyselinovou sekvencí zralého proteinu 2086 z kmene M97 252097.

SEQ ID NO: 192 je aminokyselinová sekvence zralého proteinu 2086 z kmene M97 252097.

SEQ ID NO: 193 je sekvence nukleové kyseliny kódující aminokyselinovou sekvenci zralého proteinu 2086 z kmene 870227, pokud se kombinovala s přirozenou vedoucí sekvencí.

SEQ ID NO: 194 je aminokyselinová sekvence zralého proteinu 2086 z kmene 870227 připravená použitím přirozené vedoucí sekvence.

SEQ ID NO: 195 je sekvence nukleové kyseliny kódující aminokyselinovou sekvenci zralého proteinu 2086 z kmene 870227, pokud se kombinovala s vedoucí sekvencí P4.

SEQ ID NO: 196 je aminokyselinová sekvence zralého proteinu 2086 z kmene 870227 připravená použitím vedoucí sekvence P4.

SEQ ID NO: 197 je sekvence nukleové kyseliny kódující aminokyselinovou sekvenci zralého proteinu 2086 z kmene 870227.

SEQ ID NO: 198 je aminokyselinová sekvence zralého proteinu 2086 z kmene 870227.

SEQ ID NO: 199 je sekvence nukleové kyseliny kódující aminokyselinovou sekvenci zralého proteinu 2086 z kmene H355, pokud se kombinovala s přirozenou vedoucí sekvencí.

SEQ ID NO: 200 je aminokyselinová sekvence zralého proteinu 2086 z kmene H355 připravená použitím přirozené vedoucí sekvence.

SEQ ID NO: 201 je sekvence nukleové kyseliny kódující aminokyselinovou sekvenci zralého proteinu 2086 z kmene H355, pokud se kombinovala s vedoucí sekvencí P4.

SEQ ID NO: 202 je aminokyselinová sekvence zralého proteinu 2086 z kmene H355 připravená použitím vedoucí sekvence P4.

SEQ ID NO: 203 je sekvence nukleové kyseliny kódující aminokyselinovou sekvenci zralého proteinu 2086 z kmene H355.

SEQ ID NO: 204 je aminokyselinová sekvence zralého proteinu 2086 z kmene H355.

SEQ ID NO: 205 je sekvence nukleové kyseliny kódující aminokyselinovou sekvenci zralého proteinu 2086 z kmene H44_76, pokud se kombinovala s přirozenou vedoucí sekvencí.

SEQ ID NO: 206 je aminokyselinová sekvence zralého proteinu 2086 z kmene H44_76 připravená použitím přirozené vedoucí sekvence.

SEQ ID NO: 207 je aminokyselinová sekvence zralého proteinu 2086 z kmene H44_76 připravená použitím přirozené vedoucí sekvence P4.

SEQ ID NO: 208 je sekvence nukleové kyseliny kódující aminokyselinovou sekvenci zralého proteinu 2086 z kmene H44_76.

SEQ ID NO: 209 je sekvence nukleové kyseliny kódující aminokyselinovou sekvenci zralého proteinu 2086 z kmene H44_76, pokud se kombinovala s vedoucí sekvencí P4.

SEQ ID NO: 210 je aminokyselinová sekvence zralého proteinu 2086 z kmene H44_76.

SEQ ID NO: 211 je sekvence nukleové kyseliny kódující aminokyselinovou sekvenci zralého proteinu 2086 z kmene 8529, pokud se kombinovala s přirozenou vedoucí sekvencí.

SEQ ID NO: 212 je aminokyselinová sekvence zralého proteinu 2086 z kmene 8529 připravená použitím přirozené vedoucí sekvence.

SEQ ID NO: 213 je sekvence nukleové kyseliny kódující aminokyselínovou sekvenci zralého proteinu 2086 z kmene 8529, pokud se kombinovala s vedoucí sekvencí P4.

SEQ ID NO: 214 je aminokyselinová sekvence zralého proteinu 2086 z kmene 8529 připravená použitím vedoucí sekvence P4.

SEQ ID NO: 215 je sekvence nukleové kyseliny kódující aminokyselínovou sekvenci zralého proteinu 2086 z kmene 8529.

SEQ ID NO: 216 je aminokyselinová sekvence zralého proteinu 2086 z kmene 8529.

SEQ ID NO: 217 je sekvence nukleové kyseliny kódující aminokyselínovou sekvenci zralého proteinu 2086 z kmene 6940, pokud se kombinovala s přirozenou vedoucí sekvencí.

SEQ ID NO: 218 je aminokyselinová sekvence zralého proteinu 2086 z kmene 6940 připravená použitím přirozené vedoucí sekvence.

SEQ ID NO: 219 je sekvence nukleové kyseliny kódující aminokyselínovou sekvenci zralého proteinu 2086 z kmene 6940, pokud se kombinovala s vedoucí sekvencí P4.

SEQ ID NO: 220 je aminokyselinová sekvence zralého proteinu 2086 z kmene 6940 připravená použitím vedoucí sekvence P4.

SEQ ID NO: 221 je sekvence nukleové kyseliny kódující aminokyselínovou sekvenci zralého proteinu 2086 z kmene 6940.

SEQ ID NO: 222 je aminokyselinová sekvence zralého proteinu 2086 z kmene 6940.

SEQ ID NO: 223 je sekvence nukleové kyseliny kódující aminokyselinovou sekvenci zralého proteinu 2086 z kmene M982, pokud se kombinovala s přirozenou vedoucí sekvencí.

SEQ ID NO: 224 je aminokyselinová sekvence zralého proteinu 2086 z kmene M982 připravená použitím přirozené vedoucí sekvence.

SEQ ID NO: 225 je sekvence nukleové kyseliny kódující aminokyselinovou sekvenci zralého proteinu 2086 z kmene M982, pokud se kombinovala s vedoucí sekvencí P4.

SEQ ID NO: 226 je aminokyselinová sekvence zralého proteinu 2086 z kmene M982 připravená použitím vedoucí sekvence P4.

SEQ ID NO: 227 je sekvence nukleové kyseliny kódující aminokyselinovou sekvenci zralého proteinu 2086 z kmene M982.

SEQ ID NO: 228 je aminokyselinová sekvence zralého proteinu 2086 z kmene M982.

SEQ ID NO: 229 je sekvence nukleové kyseliny kódující aminokyselinovou sekvenci zralého proteinu 2086 z kmene 880049, pokud se kombinovala s přirozenou vedoucí sekvencí.

SEQ ID NO: 230 je aminokyselinová sekvence zralého proteinu 2086 z kmene 880049 připravená použitím přirozené vedoucí sekvence.

SEQ ID NO: 231 je sekvence nukleové kyseliny kódující aminokyselinovou sekvenci zralého proteinu 2086 z kmene 880049, pokud se kombinovala s vedoucí sekvencí P4.

SEQ ID NO: 232 je aminokyselinová sekvence zralého proteinu 2086 z kmene 880049 připravená použitím vedoucí sekvence P4.

SEQ ID NO: 233 je sekvence nukleové kyseliny kódující aminokyselinovou sekvenci zralého proteinu 2086 z kmene 880049.

SEQ ID NO: 234 je aminokyselinová sekvence zralého proteinu 2086 z kmene 880049.

SEQ ID NO: 235 je sekvence nukleové kyseliny kódující aminokyselinovou sekvenci zralého proteinu 2086 z kmene M97 253524, M97 251885 a M97 251926, pokud se kombinovala s přirozenou vedoucí sekvencí.

SEQ ID NO: 236 je aminokyselinová sekvence zralého proteinu 2086 z kmene M97 253524, M97 251885 a M97 251926 připravená použitím přirozené vedoucí sekvence.

SEQ ID NO: 237 je sekvence nukleové kyseliny kódující aminokyselinovou sekvenci zralého proteinu 2086 z kmene M97 253524, M97 251885 a M97 251926, pokud se kombinovala s vedoucí sekvencí P4.

SEQ ID NO: 238 je aminokyselinová sekvence zralého proteinu 2086 z kmene M97 253524, M97 251885 a M97 251926 připravená použitím vedoucí sekvence P4.

SEQ ID NO: 239 je sekvence nukleové kyseliny kódující aminokyselinovou sekvenci zralého proteinu 2086 z kmene M97 253524, M97 251885 a M97 251926.

SEQ ID NO: 240 je aminokyselinová sekvence zralého proteinu 2086 z kmene M97 253524, M97 251885 a M97 251926.

SEQ ID NO: 241 je sekvence nukleové kyseliny kódující aminokyselinovou sekvenci zralého proteinu 2086 z kmene M98 250670, pokud se kombinovala s přirozenou vedoucí sekvencí.

SEQ ID NO: 242 je aminokyselinová sekvence zralého proteinu 2086 z kmene M98 250670 připravená použitím přirozené vedoucí sekvence.

SEQ ID NO: 243 je sekvence nukleové kyseliny kódující aminokyselinovou sekvenci zralého proteinu 2086 z kmene M98 250670, pokud se kombinovala s vedoucí sekvencí P4.

SEQ ID NO: 244 je aminokyselinová sekvence zralého proteinu 2086 z kmene M98 250670 připravená použitím vedoucí sekvence P4.

SEQ ID NO: 245 je sekvence nukleové kyseliny kódující aminokyselinovou sekvenci zralého proteinu 2086 z kmene M98 250670.

SEQ ID NO: 246 je aminokyselinová sekvence zralého proteinu 2086 z kmene M98 250670.

SEQ ID NO: 247 je sekvence nukleové kyseliny kódující aminokyselinovou sekvenci zralého proteinu 2086 z kmene CDC 1573, pokud se kombinovala s přirozenou vedoucí sekvencí.

SEQ ID NO: 248 je aminokyselinová sekvence zralého proteinu 2086 z kmene CDC 1573 připravená použitím přirozené vedoucí sekvence.

SEQ ID NO: 249 je sekvence nukleové kyseliny kódující aminokyselinovou sekvenci zralého proteinu 2086 z kmene CDC 1573, pokud se kombinovala s vedoucí sekvencí P4.

SEQ ID NO: 250 je aminokyselinová sekvence zralého proteinu 2086 z kmene CDC 1573 připravená použitím vedoucí sekvence P4.

SEQ ID NO: 251 je sekvence nukleové kyseliny kódující aminokyselinovou sekvenci zralého proteinu 2086 z kmene CDC 1573.

SEQ ID NO: 252 je aminokyselinová sekvence zralého proteinu 2086 z kmene CDC 1573.

SEQ ID NO: 253 je částečná sekvence nukleové kyseliny kódující aminokyselinovou sekvenci zralého proteinu 2086 z kmene *Neisseria lactamica*.

SEQ ID NO: 254 až 259 jsou aminokyselinové sekvence asociované s proteiny rodiny proteinů 2086.

SEQ ID NO: 260 až 278 jsou aminokyselinové sekvence asociované s proteiny 2086 subrodiny A.

SEQ ID NO: 279 až 299 jsou aminokyselinové sekvence asociované s proteiny 2086 subrodiny B.

SEQ ID NO: 300 je aminokyselinová konvenční sekvence odpovídající rodině proteinů 2086 („proteiny 2086“) v souladu s provedením předmětného vynálezu.

SEQ ID NO: 301 je aminokyselinová konvenční sekvence odpovídající proteinům 2086 subrodiny A v souladu s provedením předmětného vynálezu.

SEQ ID NO: 302 je aminokyselinová konvenční sekvence odpovídající proteinům 2086 subrodiny B v souladu s provedením předmětného vynálezu.

SEQ ID NO: 303 je sekvence nukleové kyseliny pro reverzní primer s místem rozeznávaným restričním enzymem BamHI (sloučenina č. 4623).

SEQ ID NO: 304 je sekvence nukleové kyseliny pro forward primer s místem rozeznávaným restričním enzymem NdeI (sloučenina č. 4624).

SEQ ID NO: 305 je sekvence nukleové kyseliny pro forward primer (sloučenina č. 4625).

SEQ ID NO: 306 je sekvence nukleové kyseliny pro forward primer (sloučenina č. 5005).

SEQ ID NO: 307 je sekvence nukleové kyseliny pro reverzní primer (sloučenina č. 5007).

SEQ ID NO: 308 je sekvence nukleové kyseliny pro reverzní primer s místem rozeznávaným restriktivním enzymem BglII (sloučenina č. 5135).

SEQ ID NO: 309 je sekvence nukleové kyseliny pro forward primer s místem rozeznávaným restriktivním enzymem BamHI (sloučenina č. 5658).

SEQ ID NO: 310 je sekvence nukleové kyseliny pro reverzní primer s místem rozeznávaným restriktivním enzymem SphI (sloučenina č. 5660).

SEQ ID NO: 311 je sekvence nukleové kyseliny pro forward primer s místem rozeznávaným restriktivním enzymem BamHI (sloučenina č. 6385).

SEQ ID NO: 312 je sekvence nukleové kyseliny pro forward primer s místy rozeznávanými restriktivními enzymy BglII a NdeI (sloučenina č. 6406).

SEQ ID NO: 313 je sekvence nukleové kyseliny pro forward primer (sloučenina č. 6470).

SEQ ID NO: 314 je sekvence nukleové kyseliny pro reverzní primer (sloučenina č. 6472).

SEQ ID NO: 315 je sekvence nukleové kyseliny pro forward primer s místem rozeznávaným restričními enzymem BamHI (sloučenina č. 6473).

SEQ ID NO: 316 je sekvence nukleové kyseliny pro forward primer s místy rozeznávanými restričními enzymy BglII a NdeI (sloučenina č. 6474).

SEQ ID NO: 317 je sekvence nukleové kyseliny pro forward primer (sloučenina č. 6495).

SEQ ID NO: 318 je sekvence nukleové kyseliny pro reverzní primer (sloučenina č. 6496).

SEQ ID NO: 319 je sekvence nukleové kyseliny pro reverzní primer s místem rozeznávaným restričními enzymem SphI (sloučenina č. 6543).

SEQ ID NO: 320 je sekvence nukleové kyseliny pro reverzní primer s místem rozeznávaným restričními enzymem BglII (sloučenina č. 6605).

SEQ ID NO: 321 je sekvence nukleové kyseliny pro forward primer s místem rozeznávanými restričními enzymy BglII a NdeI (sloučenina č. 6721).

SEQ ID NO: 323 je sekvence nukleové kyseliny přirozené 2086 vedoucí varianty 1.

SEQ ID NO: 324 je sekvence nukleové kyseliny přirozené 2086 vedoucí varianty 2.

SEQ ID NO: 325 je sekvence nukleové kyseliny přirozené 2086 vedoucí varianty 3.

SEQ ID NO: 326 je sekvence nukleové kyseliny přirozené 2086 vedoucí varianty 4.

SEQ ID NO: 327 je aminokyselinová sekvence P4431.

SEQ ID NO: 328 je aminokyselinová sekvence P5163.

SEQ ID NO: 329 je aminokyselinová sekvence v souladu s provedením předmětného vynálezu.

Podrobný popis vynálezu

[0020] Je zřejmé, že pro multivalentní PorA přístup k imunizaci proti infekci je potřeba nová třída antigenů se skříženou funkční baktericidní aktivitou proti *Neisseria meningitidis* serogrupina B. Takový antigen se neočekávaně identifikoval a je zde popsán v patentových nárocích. Přítomnost jednoho takového antigenu se poprvé pozorovala v komplexní směsi rozpustných proteinů vnější membrány (sOMP) z meningokového kmene. Baktericidní aktivita tohoto antigenu se sledovala během série frakcionací a kroků čištění proteinů až proteinová směs, která je středem zájmu, obsahovala několik proteinů. Hlavní proteiny v této směsi se identifikovaly sekvenováním N-terminálních aminokyselin a mapováním peptidů. Protein, který je středem zájmu vykazující baktericidní aktivitu se identifikoval jako protein ORF2086, lipidovaný protein (také označovaný jako LP2086). „Protein ORF2086“ znamená protein kódovaný otevřeným čtecím rámcem 2086 (ORF2086) *Neisseria species*.

[0021] Jak se zde popisuje, noví kandidáti imunogenního prostředku založený na proteinu ORF22086 *Neisseria species* (také známy jako „protein 2086“ nebo protein „ORF2086“) se mohou změnit nebo P2086 v případě nelipidovaných proteinů a LP2086 v případě lipidované verze proteinů) izolované z *N. meningitidis* se identifikovaly kombinací frakcionace buněk, diferenciál-

ní detergentovou extrakcí, čištěním proteinů, přípravou antiséra a testem baktericidní aktivity použitím velkého množství kmenů. Jako alternativa potenciálních imunogenních prostředků a diagnostických prostředků popsaných ve shora v textu uvedených citacích se popisují prostředky a způsoby léčby a/nebo prevence meningokokové infekce použitím proteinů, jejich imunogenních částí a biologických ekvivalentů, stejně jako genů kódujících uvedené polypeptidy, části a ekvivalenty, které se imunospécificky stejně váží.

[0022] V souladu s provedením předmětného vynálezu imunogenní činidla založená na proteinu 2086, jak se definuje v připojených patentových nárocích, zahrnující izolované polypeptidy se neočekávaně identifikovaly jako imunogenní kandidáti založení na schopnosti uvedených činidel vykazovat zkříženou reaktivitu nebo ne-kmenovou specifitu. Zvláště se identifikovaly ti kandidáti, kteří neočekávaně demonstrovaly schopnost (1) vyvolat baktericidní protilátky proti více neisseriálním a/nebo gonokokovým kmenům; (2) reagovat s povrchem více kmenů; (3) udělit pasivní ochranu proti živé čelendži; a/nebo (4) zabránit kolonizaci. V souladu s tím předmětný vynález popisuje imunogenní prostředky obsahující uvedená imunogenní činidla zahrnující izolované polypeptidy a/nebo jejich biologické ekvivalenty, stejně jako způsoby jejich použití proti infekci *N. meningitidis*. (zde v Příkladu 1 se popisuje metodologie užívaná k identifikaci proteinu 2086).

[0023] Zde používaný termín „kmenově nespecifický“ znamená charakteristiku antigenu vyvolat imunitní odezvu účinnou proti více než jednomu kmenu *N. meningitidis* (např. heterologní meningokokové kmeny). Termín „zkříženě-reaktivní“ je možné zaměnit s termínem „kmenově nespecifický“. Zde používaný termín „imunogenní ne-kmenově specifický antigen *N. meningitidis*“ popisuje

antigen, který se izoloval z *N. meningitidis*, ačkoliv se může izolovat z jiné bakterie (např. jiných kmenů neisserie, jako jsou gonokokové kmeny, např.) nebo připravené použitím rekombinantní technologie.

[0024] Protein 2086 podle předmětného vynálezu zahrnuje lipidované nebo nelipidované proteiny. Dále, předmětný vynález také popisuje použití nezralých proteinů nebo přípravků, které odpovídají každému proteinu jako sloučenině/prostředku meziproductu.

[0025] Předmětný vynález popisuje protilátky, které se imunospécificky váží na následující imunogenní činidla v souladu s implementací vynálezu. Předmětný vynález dále popisuje prostředky a/nebo imunogenní prostředky a jejich použití při prevenci, léčbě meningokokové meningitidě, zvláště meningokokového onemocnění seroskupiny B stejně jako způsoby přípravy uvedených prostředků.

[0026] Prostředky podle předmětného vynálezu jsou vysoce imunogenní a jsou schopné vyvolat produkci baktericidních protilátek. Tyto protilátky zkříženě reagují se seroskupinou, sérotypem a serosubtypem heterologních meningokokových kmenů. Proto předmětné prostředky obcházejí deficienci předchozích vakcín *N. meningitidis* tím, že vykazují schopnost vyvolat baktericidní protilátky proti heterologním neisseriálním kmenům. Tudiž mezi jinými výhodami předmětný vynález popisuje imunogenní prostředky, které mohou fungovat společně s několika složkami a vyvolat ochranu srovnatelnou s dříve užívanými činidly. Prostředky nebo imunogenní činidla (např. polypeptidy, imunogenní části nebo fragmenty a biologické ekvivalenty) se mohou použít samostatně nebo v kombinaci s jinými antigeny nebo činidly k vyvolání imunologické ochrany před meningokokovou infekcí a onemocněním, stejně jako vyvolat imunologickou ochranu před infekcí a/nebo

onemocněním způsobeným jinými patogeny. To zjednodušuje návrh imunogenní prostředku k použití proti meningokokové infekci redukcí počtu antigenů nutných k ochraně proti více kmenům. Ve skutečnosti čištěný protein 2086 bude dramaticky a neočekávaně snižovat počet proteinů nutných k adekvátnímu imunogennímu pokrytí kmenů odpovědných za meningokokové onemocnění. Protein 2086 se může rekombinantně exprimovat v *E. coli* jako lipoprotein, který je formou divokého typu v množství daleko vyšším než u přirozených meningokoků.

[0027] Protože se zjistilo, že protilátky určené proti proteinu 2086 z jediného kmene usmrcují nepříbuzné (to znamená heterologní) kmeny. Provedl se pokus charakterizovat přítomnost „homologa 2086“ u velkého počtu heterologních kmenů a stanovit stupeň konverze sekvence. Zatímco přibližně 70 % kmenů testovaných PCR vykazovalo homologu 2086, které se mohou amplifikovat použitím primerů, které amplifikovaly původní gen 2086 z kmene 8529 zbývajících přibližně 30 % bylo v tomto testu negativních. Zjistilo se, že zbývajících přibližně 30 % obsahuje homolog 2086, které vykazují přibližně 60 % homologie aminokyselinové sekvence s původním 8529 získaným genem 2086. Identifikovaly se jiné primery, které se mohou použít k amplifikaci homologu 2086 z těchto přibližně 30 % kmenů. Určilo se, že testované kmeny *N. meningitidis* patří do subrodiny A nebo B v závislosti na sadě primerů, které mohou amplifikovat homolog 2086. Podrobnosti tohoto experimentu jsou uvedeny v příkladu 5 dále v textu.

Přítomnost proteinu 2086 v řadě serosubtypů

[0028] Ke stanovení stupně konverze sekvencí genu 2086 mezi kmeny *N. meningitidis* se několik reprezentantů ze subrodiny A a B klonovaly jako geny v plné délce a podrobily se analýze DNA sekvence. Použitím primerů, jak se zde popisuje např. v tabulce IV, se identifikovalo 24 meningokokových kmenů seroskupiny B,

které exprimují různé serosubtypy antigenů a také exprimují sdílený protein P2086. Uvádí se zde příklady těchto sekvencí a jsou zobrazeny jako zralé DNA sekvence (to znamená, všechny sekvence lipoproteinového signálu se štěpily v cysteinovém zbytku). Např. aminokyselinové sekvence označené bez omezení sudými čísly SEQ ID NO: 2 až 252.

[0029] Ačkoli protein 2086 není přítomen v kmenech divokého typu ve velkém množství, je cílem pro baktericidní protilátky. Tyto protilátky, na rozdíl od těch produkovaných při odezvě na PorA, jsou schopny usmrtit kmeny exprimující heterologní subtypy.

[0030] Protilátky k proteinu 2086 také pasivně chrání mláďata krys před čelendží meningokoky. (jak se uvádí v tabulce VII). Rekobinantní exprese proteinu 2086 umožňuje použití proteinu 2086 jako imunogenního prostředku k prevenci meningokokového onemocnění. Všichni z kandidátů současných meningokokových imunogenních prostředků v klinických studiích tvoří komplexní směsi nebo přípravky proteinů vnějších membrán, které obsahují řadu různých proteinů. Protein PorA, který také poskytuje serosubtypovou specifitu, bude nutný k inkluzi 6 až 9 variant v imunogenním prostředku, aby poskytl přibližně 70 až 80 % pokrytí serosubtypů souvisejících s onemocněním. Naopak je zřejmé, že antisérum k samotnému jedinému proteinu 2086 je schopné usmrtit reprezentativní šesti serosubtypů odpovědných za přibližně 65 % izolátů souvisejících s onemocněním v západní Evropě a USA. Čištěný protein 2086 vykazuje potenciál redukovat počet proteinů nutných k vytvoření adekvátního imunogenního prostředku pokrývajícího serosubtypy odpovědné za meningokokové onemocnění.

Proteiny, imunogenní části a biologické ekvivalenty

[0031] Proteiny 2086 získané podle předmětného vynálezu jsou izolované proteiny. Termín „izolovaný“ znamená změněný člověkem z přirozeného stádia. Pokud „izolovaný“ prostředek nebo látka se objeví v přírodě, změní se nebo se vyjme z původního prostředí nebo je možné oboje. Např., polypeptid nebo polynukleotid přirozeně se vyskytující v živém zvířeti se nepovažuje za izolovaný, ale stejný polypeptid nebo polynukleotid, který se separoval z ko-existujících materiálů svého přirozeného stádia, se považuje za „izolovaný“. Tudiž zde používaný termín „izolovaný protein“ znamená protein izolovaný z přirozeného zdroje a proteinů připravených použitím technologie rekombinace, stejně jako takové proteiny, pokud se kombinovaly s jinými antigeny a/nebo pomocnými látkami, jako je např. farmaceuticky přijatelný nosič, pufr, adjuvans atd..

[0032] Zde popsaný protein 2086, jeho imunogenní část a/nebo biologický ekvivalent obsahuje libovolnou z následujících sekvencí:

ADIGxGLADA (SEQ ID NO: 254), kde x je libovolná aminokyselina;

IGxGLADALT (SEQ ID NO: 255), kde x je libovolná aminokyselina;

SLNTGKLNKD (SEQ ID NO: 256);

SLNTGKLNKDKxSRFDF (SEQ ID NO: 257, kde x je libovolná aminokyselina);

SGEFQxYKQ (SEQ ID NO: 258), kde x je libovolná aminokyselina;
nebo

IEHLKxPE (SEQ ID NO: 259), kde x je libovolná aminokyselina.

[0033] Protein 2086 subrodiny A, jeho imunogenní část a/nebo biologický ekvivalent obsahuje libovolnou z následujících zde popsaných aminokyselinových sekvencí:

GGGVAADIGx (SEQ ID NO: 260), kde x je libovolná aminokyselina;

SGEFQIYKQ (SEQ ID NO: 261);

HSAVVALQIE (SEQ ID NO: 262);

EKINNPDKID (SEQ ID NO: 263);

SLINQRSFLV (SEQ ID NO: 264);

SGLGGEHTAF (SEQ ID NO: 265);

GEHTAFNQLP (SEQ ID NO: 266);

SFLVSGLGGEH (SEQ ID NO: 267);

EKINNPDKIDSLINQRSFLVSGLGGEHTAFNQLP (SEQ ID NO: 268);

GKAEYHGKAF (SEQ ID NO: 269);

YHGKAFSSDD (SEQ ID NO: 270);

GKAEYHGKAFSSDD (SEQ ID NO: 271);

IEHLKTPEQN (SEQ ID NO: 272);

KTPEQNVELA (SEQ ID NO: 273);

IEHLKTPEQNVELA (SEQ ID NO: 274);

AELKADEKSH (SEQ ID NO: 275);

AVILGDTRYG (SEQ ID NO: 276);

AELKADEKSHAVILGDTRYG (SEQ ID NO: 277); nebo

EELKGTYHLAL (SEQ ID NO: 278).

09.11.15

[0034] Protein 2086 subrodiny B, jeho imunogenní část a/nebo biologický ekvivalent obsahuje libovolnou z následujících zde popsaných aminokyselinových sekvencí:

LITLESGEFQ (SEQ ID NO: 279);

SALTALQTEQ (SEQ ID NO: 280);

FQVYKQSHSA (SEQ ID NO: 281);

LITLESGEFQVYKQSHSALTALQTEQ (SEQ ID NO: 282);

IGDIAGEHTS (SEQ ID NO: 283);

EHTSFDKLPK (SEQ ID NO: 284);

IGDIAGEHTSFDKLPK (SEQ ID NO: 285);

ATYRGTAFGS (SEQ ID NO: 286);

DDAGGKLYT (SEQ ID NO: 287);

IDFAAQGHG (SEQ ID NO: 288);

KIEHLKSP (SEQ ID NO: 289);

ATYRGTAFGSDDAGGKLYTIDFAAQGHGKIEHLKSP (SEQ ID NO: 290);

HAVISGSVLY (SEQ ID NO: 291);

KGSYSLGIFG (SEQ ID NO: 292);

VLYNQDEKGS (SEQ ID NO: 293);

HAVISGSVLYNQDEKGSYSLGIFG (SEQ ID NO: 294);

AQEVAGSAEV (SEQ ID NO: 295);

IHHIGLAAKQ (SEQ ID NO: 296);

VETANGIHHI (SEQ ID NO: 297);

AQEVAGSAEVETANGIHHIGLAAKQ (SEQ ID NO: 298); nebo

VAGSAEVETANGIHHIGLAAKQ (SEQ ID NO: 299).

[0035] Protein 2086 obsahuje následující konvenční sekvenci a/nebo její zde popsané imunogenní části.

Konvenční sekvence proteinu 2086 (SEQ ID NO: 300):

CSSG----GGGVxADIGxGLADALTxPx DxKDKxLxSLTLxxSxxxNxxLxLxAQGA
EKTxxxGD---SLNTGKLNKxSRFDFxxxIxVDGxxITLxSGEFQxYKQxHSAxx
ALQxExxxxxxxxxxxxxRxFxxxxxGEHTxFxxLPxx-xAxYxGxAFxSDDxxGxLxYx
IDFxxKQGxGxIEHLKxPExNVxLAXxxxKxDEKxHAVIxGxxxYxxxEKGxYxLxxx
GxxAQExAGxAxVxxxxxxHxLxxAxKQ

[0036] V předchozí konvenční sekvenci symbol „x” reprezentuje libovolnou aminokyselinu, oblast z polohy aminokyseliny 5 k poloze aminokyseliny 9 tvoří libovolná z 0 až 5 aminokyselin, oblast z polohy aminokyseliny 67 k poloze aminokyseliny 69 tvoří libovolná 0 až 3 aminokyseliny a v poloze aminokyseliny 156 je libovolná 0 až 1 aminokyselina. Oblast z polohy aminokyseliny 5 k poloze aminokyseliny 9 s výhodou obsahuje 0, 4 nebo 5 aminokyselin. Oblast z polohy aminokyseliny 67 k poloze aminokyseliny 69 s výhodou obsahuje 0 nebo 3 aminokyseliny. Je zvláště nutné poznamenat, že tato konvenční sekvence ilustruje vysokou variabilnost proteinů 2086. Věří se, že tato vysoká variabilnost poskytuje výhody a neočekávanou zkříženou reaktivitu.

[0037] V souladu s implementací předmětného vynálezu proteiny 2086 se charakterizují jako imunogenní, nepatogenní a kmenově

nespecifické. Tyto proteiny neočekávaně vykazují imunogennost, zatímco jsou přibližně z 2 % až 40 % nekonzervativní.

[0038] Zde používaný termín „nekonzervativní“ znamená počet aminokyselin, které se mohou začlenit, substituovat a/nebo deletovat jako procento celkového počtu aminokyselin v proteinu. Např. pokud protein je z 40 % nekonzervativní a vykazuje např. 263 aminokyselin, pak existuje 105 poloh aminokyselin v proteinu, kde se mohou aminokyseliny substituovat. Pokud je protein z 10 % nekonzervativní a vykazuje např. přibližně 280 aminokyselin, pak existuje 28 poloh aminokyselin, kde se mohou aminokyseliny substituovat. Proteiny 2086 vykazují delecí aminokyselinových zbytků, aniž se kompromituje imunogennost proteinů.

[0039] Dále proteiny 2086 se mohou rozdělit do podrodin na základě homologie v různých oblastech. Např. bez omezení konvenční sekvence určené pro dvě takové subrodiny, subrodinu A a B jsou uvedeny dále v textu:

Sekvence 2086 subrodiny A (SEQ ID NO: 301)

CSSG----GGGVAADIGxGLADALTxPxDxKDKxLxSLTLxxSxxxNxxLxLxAQGA
EKTxxxGD---SLNTGKLNKxSRFDFxxxIxVDGQxITLxSGEFQIYKQxHSAVV
ALQIEKINNPDKIDSLINQRSFLVSGLGGEHTAFNQLPxGKAEYHGKAFSSDDx
xGxLxYxIDFxxKQGxGxIEHLKTPEQNVELAxAELKADEKSHAVILGDTRYGxE
EKGTYHLALxGDRAQEIAGxATVKIxEKVHEIxIAxKQ

[0040] Symbol „x“ znamená libovolnou aminokyselinu.

[0041] Oblast od polohy aminokyseliny 5 do polohy aminokyseliny 8 tvoří libovolná z 0 až 4 aminokyselin.

[0042] Oblast od polohy aminokyseliny 66 do polohy aminokyseliny 68 tvoří libovolná z 0 až 3 aminokyselin.

[0043] Oblast od polohy aminokyseliny 5 do polohy aminokyseliny 8 tvoří libovolná z 0 až 4 aminokyselin. Oblast od polohy aminokyseliny 66 do polohy aminokyseliny 68 tvoří libovolná z 0 až 3 aminokyselin.

2086 subrodina B (SEQ ID NO: 302)

CSSGGGG-----VxADIGxGLADALTAPLDHKDKxLxSLTLxxSxxxNxxLxLxAQ
GAEKTYGNGDSLNTGKLKNDKVSRLFIRQIEVDGxLITLESGEFQVYKQSHS
ALTALQTEQxQDxExSxKMVAKRxFxIGDIAGEHTSFDKLPKxxxATYRGTAFGS
DDAGGKLTYTIDFAAKQGHGKIEHLKSPELNVxLAXxYIKPDEKxHAVISGSVL
YNQDEKGSYSLGIFGxxAQEVAGSAEVETANGIHHIGLAAKQ

[0044] Symbol „x“ znamená libovolnou aminokyselinu.

[0045] Oblast od polohy aminokyseliny 8 do polohy aminokyseliny 12 tvoří libovolná z 0 až 5 aminokyselin.

[0046] Oblast od polohy aminokyseliny 8 do polohy aminokyseliny 12 s výhodou obsahuje 0 nebo 5 aminokyselin.

[0047] V souladu s implementací předmětného vynálezu subrodiny proteinů 2086 se mohou dále dělit do klastrů. Například se zde popisují následující klastry: číslovány sudými čísly SEQ ID NO: 2 až 12; číslovány sudými čísly SEQ ID NO: 14 až 24; číslovány sudými čísly SEQ ID NO: 26 až 42; číslovány sudými čísly SEQ ID NO: 50 až 60; číslovány sudými čísly SEQ ID NO: 62 až 108; číslovány sudými čísly SEQ ID NO: 110 až 138; číslovány sudými čísly SEQ ID NO: 140 až 156; číslovány sudými čísly SEQ ID NO: 158 až 174; a dokonce číslovány sudými čísly SEQ ID NO: 224 až 252.

[0048] Polypeptidová sekvence podle předmětného vynálezu se může shodovat s referenční sekvencí číselovanou sudými čísly SEQ ID NO: 58, 56, 60, která je 100 % shodná nebo může zahrnovat počet změn aminokyselin, jak se porovnává s referenční sekvencí tak, že % shody je nižší než 100 %. Takové změny zahrnují alespoň jednu delecii, substituci aminokyseliny zahrnující konzervativní nebo nekonzervativní substituci nebo inzerci. Změny se mohou vyskytovat v N-terminálních nebo C-terminálních polohách referenční polypeptidové sekvence nebo kdekoli mezi těmito terminálními polohami roztroušenými buď jednotlivě mezi aminokyselinami v referenční aminokyselinové sekvenci nebo v jedné nebo ve více kontinuálních skupinách v referenční aminokyselinové sekvenci.

[0049] Předmětný vynález také popisuje proteiny vykazující shodu sekvence s aminokyselinovými sekvencemi obsaženými v seznamu sekvencí (to znamená označeno sudými čísly SEQ ID NO: 58, 56, 60). V závislosti na určité sekvenci stupeň shody sekvence je s výhodou vyšší než 97 % (např. 97 %, 99 %, 99,9 % nebo vyšší). Tyto homologní proteiny zahrnují mutanty a alelické varianty.

[0050] Ve výhodných provedeních předmětného vynálezu proteiny 2086 nebo jiné polypeptidy 2086 (např. imunologické části a biologické ekvivalenty, jak se definuje v připojených patentových nárocích) tvoří baktericidní protilátky k homolognímu a alespoň jednomu heterolognímu kmeni meningokoků. Přesněji, protilátky k polypeptidům 2086 pasivně chrání mláďata krys před čelendží meningokoky, jako je intranasální čelendž. V dalším výhodném provedení polypeptidy 2086 vykazují takovou ochranu mláďat krys v případě homologních kmenů a alespoň jednoho heterologního kmene. Polypeptid se může vybrat ze souhrnu sekvencí uvedeného shora v textu, jak je uveden pro sudě číselované SEQ ID NO: 58, 56, 60 nebo polypeptidem může být libovolný imunologický frag-

ment nebo biologický ekvivalent uvedených polypeptidů. Polypeptid se s výhodou vybral z libovolných sudě číslovaných sekvencí uvedených v seznamu sekvencí SEQ ID NO: 58, 56, 60 shora v textu.

[0051] Vynález také popisuje alelické nebo jiné varianty polypeptidů 2086, které jsou biologickými ekvivalenty. Zde popsané biologické ekvivalenty vykazují schopnost (1) vyvolat baktericidní protilátky k homologním kmenům a alespoň k jednomu heterolognímu neisseriálnímu kmenu a/nebo gonokokovému kmenu; (2) reagovat s povrchem homologních kmenů a s alespoň jedním heterogním neisseriálním a/nebo gonokokálním kmenem; (3) udělit pasivní ochranu proti živé čelendži; a/nebo (4) zabránit kolonizaci.

[0052] Zde popsané biologické ekvivalenty vykazují alespoň přibližně 60 %, s výhodou alespoň přibližně 70 %, výhodněji alespoň přibližně 75 %, dokonce výhodněji přibližně 80 %, dokonce výhodněji přibližně 85 %, dokonce výhodněji přibližně 90 %, dokonce výhodněji přibližně 95 % nebo dokonce výhodněji přibližně 98 % nebo dokonce výhodněji přibližně 99 % podobnost s jedním ze zde specifikovaných polypeptidů 2086 (to znamená sekvence označené sudými čísly SEQ ID NO: 2 až 252), poskytují ekvivalent, který je schopný vyvolat v podstatě stejné imunogenní vlastnosti jako jeden z proteinů 2086 podle vynálezu.

[0053] V jiném případě zde popsané biologické ekvivalenty vykazují v podstatě stejné imunogenní vlastnosti jednoho z proteinů 2086 v sudě číslované SEQ ID NO: 2 až 52. V souladu s provedením podle předmětného vynálezu biologické ekvivalenty vykazují stejné imunogenní vlastnosti jako sudě číslované SEQ ID NO: 58, 56, 60.

[0054] Zde popsané biologické ekvivalenty se získaly vytvořením variant a modifikací proteinů podle uvedeného vynálezu. Tyto varianty a modifikace proteinů se získaly změnou aminokyselinových sekvencí inzercí, delecí nebo substitucí jedné nebo více aminokyselin. Aminokyselinová sekvence se modifikovala např. substitucí za účelem vytvořit polypeptid vykazující v podstatě stejnou nebo zlepšenou kvalitu. Výhodné způsoby zavedení alterací obsahují přípravu předem určených mutací sekvence nukleové kyseliny polypeptidu místně řízenou mutagenezí.

[0055] Modifikace a změny se mohou provést ve struktuře polypeptidu podle předmětného vynálezu a stále je možné získat molekulu vykazující imunogennost *N. meningitidis*. Jisté aminokyseliny se bez omezení mohou substituovat jinými aminokyselinami, které zahrnují nekonzervovanou nebo konzervovanou substituci v sekvenci bez vhodné ztráty imunogenosti. Vzhledem k interaktivní kapacitě a podstatě polypeptid, které definují biologickou funkční aktivitu polypeptidu, v polypeptidové sekvenci se může provést řada substitucí aminokyselinové sekvence (nebo samozřejmě v její kódující sekvenci DNA) a přesto získat polypeptid s podobnými vlastnostmi. Předmětný vynález, jak se definuje v připojených patentových nárocích, popisuje libovolné změny struktury polypeptidů, stejně jako sekvence nukleové kyseliny kódující uvedené polypeptidy, přičemž polypeptid si ponechává imunogenost. Odborník je schopen snadno modifikovat popsané polypeptidy a polynukleotidy na základě zde uvedeného doporučení.

[0056] Například se identifikovaly jisté variabilní oblasti, kde substituce nebo delece jsou dovolené. Konvenční sekvence 2086, jak se popisuje dříve v textu, ukazuje konzervované nebo nekonzervované oblasti rodiny proteinů 2086 v souladu s implementací předmětného vynálezu.

[0057] Při provedení takových změn, odborník může použít libovolné postupy známé v oboru. Např. bez omezení se uvažuje hydrofatický index aminokyselin. V oboru je obecně známa důležitost hydrofatického aminokyselinového indexu při udělení interaktivní biologické funkci na polypeptid. Jak se popisuje v publikaci Kyte et al. 1982. J. Mol. Bio. 157:105-132.

[0058] Substituce podobných aminokyselin se může provést na základě hydrofóbnosti, zvláště v případě biologického funkčního ekvivalentního polypeptidu nebo peptidu takto vytvořeného určeného k použití v imunologických provedeních. Patent USA č. 4,554,101 popisuje, že nejvyšší lokální průměrná hydrofóbnost polypeptidu řízená hydrofóbností jeho přilehlými aminokyselinami koreluje s imunogeností, to znamená s biologickou vlastností polypeptidu.

[0059] Biologické ekvivalenty polypeptidu se mohou také připravit použitím místně specifické mutagenese. Místně specifická mutagenese je postup použitelný při přípravě druhé generace polypeptidů nebo biologicky funkčních ekvivalentních polypeptidů nebo peptidů získaných z jejich sekvencí prostřednictvím specifické mutagenese výchozí DNA. Takové změny mohou být nutné, pokud jsou nutné substituce aminokyselin. Postup dále poskytuje schopnost snadno připravit varianty sekvencí, např. začleněním jednoho nebo více následujících úvah, zavedením jedné nebo více změn nukleotidové sekvence do DNA. Místně specifická mutagenese dovoluje produkci mutantů použitím specifických oligonukleotidových sekvencí, které kódují sekvenci DNA požadované mutace stejně jako dostatečný počet přilehlých nukleotidů, aby poskytly sekvenci primeru dostatečné velikosti a sekvenční komplexnosti za vzniku stabilního duplexu na obou stranách překryvu delečního spojení. V typickém případě je výhodný primer při-

bližně 17 až 25 nukleotidů s přibližně 5 až 10 zbytky na obou stranách spojení sekvence, která se mění.

[0060] V obecném případě postup místně specifické mutagenese je dobře znám v oboru. Je výhodné, že postup v typickém případě používá fágový vektor, který může existovat jak v jednořetězcové tak i v dvouřetězcové formě. V typickém případě místně řízená mutagenese v souladu s provedením vynálezu se provedla tak, že se nejdříve získal jednořetězcový vektor, který zahrnuje ve své sekvenci DNA sekvenci, která kóduje celou nebo část vybraného sekvence polypeptidu *N. meningitidis*. Připravil se oligonukleotidový primer nesoucí požadovanou mutovanou sekvenci (např. synteticky). Tento primer se pak navázal na jednořetězcový vektor a prodloužil se použitím enzymů, jako je *E.coli* polymeráza I Klenow fragment za účelem zcela syntetizovat řetězec nesoucí mutaci. Tudiž se vytvořil heteroduplex, kde jeden řetězec kóduje původní nemutovanou sekvenci a druhý řetězec nese požadovanou mutaci. Tento heteroduplexní vektor se pak použil ke transformaci vhodných buněk, jako jsou buňky *E. coli*, a vybraly se klony, které zahrnují rekombinantní vektory nesoucí mutaci. Komerčně dostupné kity obsahují všechna činidla nezbytná s výjimkou oligonukleotidových primerů.

[0061] Zde popsané polypeptidy 2086 zahrnují libovolný protein nebo polypeptid vykazující podstatnou podobnost sekvence a/nebo biologickou ekvivalenci s proteinem 2086 vykazující aminokyselinovou sekvenci od jedné ze sudě číslovaných sekvencí SEQ ID NO: 2 až 252. Navíc, polypeptid 2086, jak se definuje v připojených patentových nárocích, není omezen na určitý zdroj. Tudiž, se zde popisuje obecná detekce a izolace polypeptidů z různých zdrojů. Polypeptidy 2086 se mohou připravit rekombinantně, jak je dobře známo v oboru na základě poskytnutého

návodu, nebo libovolným jiným syntetickým způsobem, jak je známo v oboru.

[0062] Polypeptid 2086 se může s výhodou štěpit na fragmenty k použití při další strukturní nebo funkční analýze nebo při vytvoření činidel, jako jsou polypeptidy příbuzné s 2086 a protilátky specifické pro 2086. To může být doprovázeno ošetřením čištěných nebo nečištěných polypeptidů *N. meningitidis* peptidázou, jako je endoproteináza glu-C (Boehringer, Indianapolis, IN). Ošetření CNBr je jiným způsobem, kterým je možné připravit peptidové fragmenty z přirozených polypeptidů 2086 *N. meningitidis*. Rekombinantní postupy se mohou také použít při produkci specifických fragmentů proteinu 2086.

[0063] Zde používaný termín „varianta“ je polynukleotid nebo polypeptid, který se liší od referenčního polynukleotidu respektive polypeptidu, ale ponechává si podstatné vlastnosti. Typická varianta polynukleotidu se liší nukleotidovou sekvencí od jiného referenčního polynukleotidu. Změny v nukleotidové sekvenci varianty mohou nebo nemusí měnit aminokyselinovou sekvenci polypeptidu kódovaného referenčním polynukleotidem. Změny nukleotidů mohou vést k substituci, deleci, fúzi a zkrácení aminokyselin v polypeptidu kódovaném referenční sekvencí, jak se diskutuje dále v textu. Typická varianta polypeptidu se liší v aminokyselinové sekvenci od jiného referenčního polypeptidu. V obecném případě jsou rozdíly omezeny tak, že sekvence referenčního polypeptidu a varianta jsou celkově podobné a v mnoha oblastech shodné (to je biologicky ekvivalentní). Varianta a referenční polypeptid se mohou lišit aminokyselinovou sekvencí jednou nebo více substitucemi, adicemi, delecemi v libovolné kombinaci. Substituovaný nebo začleněný aminokyselinový zbytek může nebo nemusí být kódován genetickým kódem. Varianta polynukleotidu nebo polypeptidu se může vyskytovat přirozeně stejně

jako alelická varianta nebo může být variantou, o které se neví, že se vyskytuje přirozeně. Varianty polynukleotidů a polypeptidů, které se nevyskytují přirozeně, se mohou vyrobit postupy mutagenese nebo přímou syntézou.

[0064] Termín „shoda“ vyjadřuje vztah mezi dvěma nebo více polypeptidovými sekvencemi nebo dvěma nebo více polynukleotidovými sekvencemi, jak se stanovilo porovnáním sekvencí. V oboru termín „shoda“ znamená stupeň vztahu mezi polypeptidovými nebo polynukleotidovými sekvencemi, jak se stanovilo párováním mezi řetězci takových sekvencí. „Shoda“ a „podobnost“ se snadno vypočítaly známým způsobem, který zahrnuje ten popsáný v publikaci *Computational Molecular Biology*, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; *Biocomputing: Informatics and Genome Projects*, Smith, D. W., ed., Academic Press, New York, 1993; *Computer Analysis of Sequence Data, Part I*, Griffin, A. M., and Griffin, H. G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; *Sequence Analysis in Molecular Biology*, von Heinje, G., Academic Press, 1987; a *Sequence Analysis Primer*, Grib-skov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991; a Carillo, H., and Lipman, D., *SIAM J. Applied Math.*, 48:1073 (1988). Výhodné způsoby ke stanovení shody se navrhly tak, aby se získalo co největší párování mezi testovanými sekvencemi. Způsoby ke stanovení shody a podobnosti se kodifikovaly ve veřejně dostupných počítačových programech. Výhodné způsoby počítačových programů ke stanovení shody a podobnosti mezi dvěma sekvencemi zahrnují bez omezení program GCG (Devereux, J., et al 1984), BLASTP, BLASTN a FASTA (Altschul, S. F., et al., 1990). Program BLASTX je veřejně dostupný u NCBI a z jiných zdrojů (BLAST Manual, Altschul, S., et al., NCBI NLM NIH Bethesda, Md. 20894; Altschul, S., et al., 1990). Ke stanovení shody se může také použít Smith Waterman algoritmus.

[0065] Aminokyselinová sekvence podle předmětného vynálezu může být shodná s referenčními sekvencemi se sudými čísly SEQ ID NO: 58, 56, 60, které vykazují 100 % shodu nebo mohou zahrnovat počet změn aminokyselin, jak se porovnává s referenční sekvencí tak, že % shody je nižší než 100 %. Takové alterace se vybraly ze skupiny obsahující delecii, substituci alespoň jedné aminokyseliny zahrnující konzervativní a nekonzervativní substituci nebo začlenění a kde uvedená změna se může objevit v poloze na N-konci nebo C-konci referenční polypeptidové sekvence nebo kdekoliv mezi uvedenými koncovými polohami roztroušenými buď jednotlivě mezi aminokyselinami v referenční sekvenci nebo v jedné nebo více kontinuálními skupinami v referenční sekvenci. Počet změn aminokyselin pro dané % shody se stanovilo násobením celkového počtu aminokyselin v sekvenci SEQ ID NO: 58, 56, 60 číselným vyjádřením procent odpovídajícího procenta shody (děleno 100) a pak se tento výsledek odečte od uvedeného celkového počtu aminokyselin v libovolné sekvenci SEQ ID NO: 58, 56, 60 nebo

$$n_a = x_a - (x_a \cdot y),$$

kde n_a je počet změn aminokyselin, x_a je celkový počet aminokyselin v SEQ ID NO: 58, 56, 60 a y je např. 0,70 v případě 70 %, 0,80 v případě 80 % a 0,85 v případě 85 % atd. a kde libovolný výsledek, kterým není celé číslo $x \cdot y$ a y se zaokrouhlí dolů na nejbližší celé číslo a pak se odečte od x_a .

[0066] Ve výhodných provedeních se shora v textu popsany polypeptid vybral z proteinů uvedených v sekvencích se sudými čísly SEQ ID NO: 58, 56, 60, jako zralá zpracovaná forma proteinu 2086. Proteiny 2086, jak se definuje v připojených nárocích, může být lipidovaný nebo nelipidovaný.

[0067] ORF 2086 je možné exprimovat v *E. coli* s přirozenou signální sekvencí ORF 2086. Je však nutné najít způsob zlepšení exprese proteinů. V souladu s provedením předmětného vynálezu vedoucí sekvence produkuje lipidovanou formu proteinu. Dále v textu se popisuje použití signální sekvence netypovatelného proteinu P4 *Haemophilus influenzae* k zesílení exprese.

[0068] Zpracování bakteriálních lipoproteinů začíná se syntézou perkurzoru nebo prolipoproteinu, který obsahuje signální sekvenci, která naopak obsahuje konvenční místo zpracování/modifikace lipoproteinu. Tento prolipoprotein zpočátku prochází běžným Sec systémem na vnitřní membráně Gram-negativních bakterií nebo na membráně Gram-positivních bakterií. Pokud se umístí na membráně Sec systémem prolipoprotein se štěpí signální peptidázou II v konvenčním místě a exponovaný N-terminální cysteinový zbytek se glyceroval a acyloval. Hayashi et al. 1990. Lipoproteins in bacteria. J. Bioenerg. Biomembr. Jun; 22(3):451-71; Oudega et al. 1993. Escherichia coli SecB, SecA a SecY proteiny jsou nutné k expresi a začlenění do membrány proteinu uvolňujícího bakteriocin, což je malý lipoprotein. Jak se popisuje v publikaci J. Bacteriol. Mar;175(5):1543-7; Sankaran et al. 1995. Modification of bacterial lipoproteins. Methods Enzymol. 250:683-97.

[0069] U gram-negativních bakterií transport lipidovaného proteinu přes vnější membránu se zprostředkoval jedinečným ABC transportním systémem s membránovou specifitou závislou na signálu v poloze 2 lipoproteinu. Jak se popisuje v publikaci Yakushi et al. 2000. Nový ABC transporter zprostředkovávající uvolnění lipidem modifikovaných proteinů z membrán. Jak se popisuje v publikaci Nat Cell Biol. Apr;2(4):212-8.

[0070] Fúze s bakteriálními lipoproteiny a jejich signální sekvence se použily k vystavení rekombinantních proteinů na po-

vrchu bakterie. Jak se popisuje v dokumentu patent USA č. 5,583,038 a 6,130,085. Výměnou lipoproteinových signálních sekvencí se může zesílit produkce lipoproteinu, jak se popisuje v publikaci De et al., 2000. Čištění a charakterizace palmitoylovaného pneumokokálního povrchového adhesinu A bakterie *Streptococcus pneumoniae* exprimovaného v *Escherichia coli*. Jak se popisuje v publikaci Vaccine. Mar 6;18(17):1811-21.

[0071] Je známo, že bakteriální lipidace proteinů zvyšuje nebo modifikuje imunologickou odezvu na proteiny. Jak se popisuje v publikaci Erdile et al. 1993. Role of attached lipid in immunogenicity of *Borrelia burgdorferi* OspA. Infect. Immun. Jan; 61(1):81-90; Snapper et al. 1995. Bakteriální lipoproteiny mohou substituovat cytokiny v humorální imunitní odezvě na T lymfocyty-nezávislé antigeny typ II. Jak se popisuje v publikaci J. Immunol. Dec 15;155(12):5582-9. Exprese bakteriálního lipoproteinu se může komplikovat přísností procesu. Pollitt et al. 1986. Effect of amino acid substitutions at the signal peptide cleavage site of the *Escherichia coli* major outer membrane lipoprotein. J. Biol. Chem. Feb 5; 261(4):1835-7; Lunn et al: 1987. Effects of prolipoprotein signal peptide mutations on secretion of hybrid prolipo-beta-lactamase in *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. Jun 15;262(17):8318-24; Klein et al. 1988. Distinctive properties of signal sequences from bacterial lipoproteins. Protein Eng. Apr; 2(1):15-20. Bacterial lipoprotein expression is also complicated by other problems such as toxicity and low expression levels. Gomez et al. 1994. Nucleotide The *Bacillus subtilis* lipoprotein LpIA causes cell lysis when expressed in *Escherichia coli*. Microbiology. Aug;140 (Pt 8):1839-45; Hansson et al. 1995. Expression of truncated and full-length forms of the Lyme disease *Borrelia* outer surface protein A in *Escherichia coli*. Protein Expr. Purif. Feb; 6(1):15-24; Yakushi et al. 1997. Lethality of the covalent linkage between

mislocalized major outer membrane lipoprotein and the peptidoglycan of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* May; 179(9):2857-62.

[0072] Netyповatelná bakterie *Haemophilus influenzae* exprimuje lipoprotein označený P4 (také známý jako protein „e“). Rekombinantní forma proteinu P4 se silně exprimuje v *E. coli* použitím přirozené signální sekvence P4. Jak se popisuje v dokumentu patent USA č. 5,955,580. Pokud přirozená signální sekvence P4 se substituovala signální sekvencí přirozeného ORF 2086 v expresivním vektoru v *E. coli*, síla exprese ORF2086 roste.

[0073] Tento koncept použití heterologní signální sekvence P4 k zesílení exprese je možné rozšířit i na jiné bakteriální lipoproteiny. Analýza bakteriálních genomů zvláště vede k identifikaci řady ORF, které jsou středem zájmu. Úkol exprimovat každý ORF s jeho přirozenou signální sekvencí v heterologní hostitelské buňce, jako je *E. coli* nese řadu problémů inherentních při použití různých signálních sekvencí, které zahrnují stabilitu, kompatibilitu atd.. K minimalizaci těchto problémů signální sekvence P4 se použila k expresi každého ORF, který je středem zájmu. Jak se popisuje shora v textu, signální sekvence P4 zlepšuje expresi heterologního ORF 2086. Expresivní vektor se zkonstruoval delecí přirozené signální sekvence ORF, který je středem zájmu a ligací signální sekvence P4 do ORF. Vhodná hostitelská buňka se pak transformovala, transfekovala nebo infikovala s expresivním vektorem a exprese ORF se zesílila v porovnání s expresí použitím přirozené signální sekvence ORF.

[0074] Nelipidovaná forma vznikla pomocí proteinu, který neobsahuje původní vedoucí sekvenci nebo vedoucí sekvenci, která se nahradila částí sekvence, která nespecifikuje místo pro acylaci maštné kyseliny v hostitelské buňce.

[0075] Různé formy proteinů 2086 se zde označují jako protein „2086“, pokud není uvedeno jinak. Tako polypeptidy „2086“ znamenají proteiny 2086 stejně jako imunogenní části nebo jejich biologické ekvivalenty, jak se uvádí shora v textu, pokud není uvedeno jinak.

[0076] Izolovaný a čištěný protein 2086 *N. meningitidis* v plné délce vykazuje zjevnou molekulovou hmotnost přibližně 28 až 35 kDa, jak se stanovilo na 10 % až 20 % gradientu SDS polyakrylamidového gelu (SDS-PAGE). Přesněji, tento protein vykazuje molekulovou hmotnost přibližně 26 000 až 30 000 daltonů, jak se stanovilo hmotnostní spektrometrií.

[0077] Polypeptidy 2086 a nukleové kyseliny kódující takové polypeptidy se s výhodou použily k prevenci nebo zmírnění infekce způsobené *N. meningitidis* a/nebo jiným species.

Protilátky

[0078] Proteiny podle předmětného vynálezu zahrnující aminokyselínové sekvence SEQ ID NO: 58, 56, 60, jejich fragmenty a analogy nebo buňky, které je exprimují, se mohou také použít jako imunogeny k produkci protilátek imunspecifických pro polypeptidy podle vynálezu. Předmětný vynález zahrnuje protilátky pro imunspecifické polypeptidy a použití takových protilátek k detekci přítomnosti *N. meningitidis*, poskytuje pasivní ochranu nebo měří množství nebo koncentraci polypeptidů v buňce, v buněčném nebo tkáňovém extraktu nebo v biologické tekutině.

[0079] Protilátky podle předmětného vynálezu zahrnují polyklonální protilátky, monoklonální protilátky, chimerické protilátky a anti-idiotypové protilátky. Polyklonální protilátky jsou heterogenní populací molekul protilátek získaných ze séra zvířat imunizovaných antigenem. Monoklonální protilátky jsou

v podstatě homogenní populací protilátek specifických pro antigeny. Monoklonální protilátky se mohou získat způsoby známými v oboru, jak se popisuje např. v publikaci Kohler and Milstein, 1975, Nature 256:495-497 a patent USA č. 4,376,110. Takové protilátky mohou zahrnovat libovolnou třídu imunoglobulinů obsahující IgG, IgM, IgE, IgA, GILD a libovolnou jejich podtřídu.

[0080] Chimerické protilátky jsou molekuly, jejichž různé části se získaly z různých zvířecích species, jako jsou ty vykazující variabilní oblast získanou z myší monoklonální protilátky a konstantní oblast lidského imunoglobulinu. Chimerické protilátky a způsoby jejich produkce jsou známy v oboru (jak se popisuje v Cabilly et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3273-3277; Morrison et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855; Boulianne et al., 1984, Nature 312:643-646; Cabilly et al., přihláška evropského patentu 125023 (uveřejněná 14.11.1984); Taniguchi et al., přihláška evropského patentu 171496 (uveřejněná 19.2.1985); Morrison et al., přihláška evropského patentu 173494 (uveřejněná 5.3.1986); Neuberger et al., PCT přihláška WO 86/01533 (uveřejněná 13.3.1986); Kudo et al., přihláška evropského patentu 184187 (uveřejněná 11.6.1986); Morrison et al., přihláška evropského patentu 173494 (uveřejněná 5.3.1986); Sahagan et al., 1986, J. Immunol. 137:1066-1074; Robinson et al., PCT/US86/02269 (uveřejněný 7.5.1987); Liu et al., 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:3439-3443; Sun et al., 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:214-218; Better et al., 1988, Science 240:1041-1043).

[0081] Anti-idiotypová protilátka (anti-Id) je protilátka, která rozeznává jedinečné determinanty obecně asociované s místem protilátky vázající antigen. Anti-Id protilátka se připravila imunizací zvířete stejného species a genetického typu (např. myší kmen), který slouží jako zdroj monoklonální protilátky,

monoklonální protilátkou vůči které se anti-Id připravila. Imunizované zvíře rozezná a odpoví na idiotypové determinanty imunizující protilátky produkcí protilátky k těmto izotypovým determinantám (anti-Id protilátka).

[0082] Monoklonální protilátky vytvořené proti polypeptidům podle předmětného vynálezu se mohou použít k vyvolání anti-Id protilátek ve vhodných zvířatech. Buňky sleziny z takových imunizovaných myší se mohou použít k produkci anti-Id hybridomů vylučujících anti-Id monoklonální protilátky. Dále, anti-Id protilátky se mohou spojit s nosičem, jako je „keyhole limpet hemocyanin“ (KLH) a použít k imunizaci dalších myší BALB/c. Sérum z takových myší bude obsahovat anti-anti-Id protilátky, které vykazují vazebné vlastnosti konečné mAb specifické pro epitop R-PTPázy. Anti-Id protilátky tudíž vykazují jejich idiotypové epitopy nebo „idiotopy“ strukturně podobné hodnocenému epitop, jako jsou polypeptidy *Streptococcus pyogenes*.

[0083] Termín „protilátka“ také zahrnuje intaktní molekuly stejně jako fragmenty, jako je Fab, které jsou schopné vázat antigen. Fragmenty Fab neobsahují Fc fragment intaktní protilátky, rychleji mizí z oběhu a vykazují nižší nespecifické navázání ve srovnání s intaktní protilátkou (jak se popisuje v publikaci Wahl et al., 1983, J. Nucl. Med. 24:316-325). Je vhodné, že Fab a jiné fragmenty protilátky použitelné podle předmětného vynálezu se mohou použít k detekci a kvantifikaci polypeptidů *N. meningitidis* v souladu se způsoby pro intaktní molekuly protilátky.

[0084] Protilátky podle předmětného vynálezu, jako anti-idiotypové („anti-Id“) protilátky se mohou použít ve způsobu léčby nebo k prevenci *Neisseria* infekce u savčích hostitelů, který zahrnuje aplikaci imunologicky účinného množství protilátky, specifické pro polypeptid, jak se zde popisuje. Anti-Id

protilátka se může také použít jako imunogen k vyvolání imunitní odezvy u ještě jiného zvířete, které produkuje tzv. anti-anti-Id protilátku. Anti-anti-Id protilátka může být epitopem shodná s původní mAb, která vyvolává anti-Id. Tudiž použitím protilátek k idiotypovým determinantám mAb je možné identifikovat jiné klony exprimující protilátky shodné specifity.

[0085] Protilátky se použily různými způsoby, např. pro potvrzení, že protein se exprimoval nebo ke zjištění, kde se protein exprimoval. Značená protilátka (např. fluorescenční značení pro FACS) se může inkubovat s intaktní bakterií a přítomnost značky na bakteriálním povrchu potvrdí lokaci proteinu.

[0086] Protilátky vytvořené proti polypeptidům podle vynálezu se mohou získat aplikací polypeptidů nebo fragmentů nesoucí epitop, analogů nebo buněk zvířeti použitím rutinních protokolů. Při přípravě monoklonálních protilátek se může použít libovolný způsob poskytující protilátky kontinuální kultivací buněčné linie.

Polynukleotidy

[0087] Jako s proteiny podle předmětného vynálezu polynukleotid podle předmětného vynálezu může obsahovat sekvenci nukleové kyseliny, která je shodná s libovolnou z referenčních sekvencí číslovanými lichými čísly SEQ ID NO: 57, 55, 59, které jsou 100% shodné nebo mohou zahrnovat až řadu změn nukleotidů ve srovnání s referenční sekvencí. Takové změny se vybraly ze skupiny zahrnující alespoň delecii, substituci jednoho nukleotidu zahrnující transici a transverzi nebo začlenění a kde uvedená změna se může objevit v poloze na 5' nebo 3' konci referenční nukleotidové sekvence nebo kdekoliv mezi těmito uvedenými polohami referenční nukleotidové sekvence nebo kdekoliv mezi těmito terminálními polohami, roztroušenými jednotlivě mezi nukleotidy

v referenční sekvenci nebo v jedné nebo více kontinuálních skupin v referenční sekvenci. Řada změn nukleotidů se stanovila násobením celkového počtu nukleotidů v libovolné sekvenci číselované lichými čísly SEQ ID NO: 57, 55, 59 číselným procentem příslušné procentuální shody (děleno 100) a odečtením uvedeného výsledku od uvedeného celkového počtu nukleotidů v uvedené sekvenci.

[0088] Izolovaný polynukleotid *N. meningitidis* obsahující polynukleotidovou sekvenci, která vykazuje alespoň 70 % shodu s libovolnou sekvencí nukleové kyseliny SEQ ID NO: I-253; jeho degenerovanou variantu nebo jeho fragment, kde polynukleotidová sekvence může zahrnovat až n_n změn nukleové kyseliny v celé oblasti polynukleotidu sekvence nukleové kyseliny SEQ ID NO: 1 až 253, n_n je maximální počet změn a vypočítal se podle vzorce:

$$n_n = x_n - (x_n * y),$$

kde x_n je celkový počet nukleových kyselin libovolné sekvence z SEQ ID NO: 1 až 253 a y vykazuje hodnotu 0,70, kde libovolný výsledek, kterým není celé číslo x_n a y , se zaokrouhlil na nejbližší nižší celé číslo a pak se odečetl od x_n . Samozřejmě y může také vykazovat hodnotu 0,80 v případě 80 %, 0,85 v případě 85 %, 0,90 v případě 90 %, 0,95 v případě 95 % atd.. Změna polynukleotidové sekvence kódující polypeptidy obsahující aminokyselinové sekvence libovolné z SEQ ID NO: 2 až 252 může tvořit nonsense, missense nebo frameshift mutace v této kódující sekvenci a tím se změní polypeptid kódovaný polynukleotidem po takové změně.

[0089] V jistých provedeních předmětného vynálezu se popisují polynukleotidy (zde označené jako „polynukleotidy 2086“ nebo „ORF2086 polynukleotidy“), které kódují proteiny 2086. Ve výhodných provedeních izolovaným polynukleotidem podle předmětné-

ho vynálezu je polynukleotid obsahující nukleotidovou sekvenci vykazující alespoň přibližně 95 % shodu s nukleotidovou sekvencí vybranou z jedné ze sekvencí číslovaných lichým číslem SEQ ID NO: 57, 55, 59, její degenerované varianty nebo fragmentu. „Degenerovaná varianta“ se definuje jako polynukleotid, který se liší od nukleotidové sekvence zobrazené v sekvenci číslované lichým číslem SEQ ID NO: 57, 55, 59 (a její fragmenty) způsobené degenerací genetického kódu, ale stále kóduje stejný protein 2086 (to znamená sekvence číslovaná lichým číslem SEQ ID NO: 58, 56, 60) jako ta kódovaná nukleotidovou sekvencí zobrazenou v sekvenci číslovanou lichým číslem SEQ ID NO: 57, 55, 59.

[0090] V jiných provedeních polynukleotid je komplementární s nukleotidovou sekvencí vybranou z jedné sekvence číslované lichým číslem SEQ ID NO: 57, 55, 59 a její degenerativní varianty nebo fragmentu. V ještě jiném provedení polynukleotid se vybral ze skupiny obsahující DNA, chromozomální DNA, cDNA a RNA a může dále obsahovat heterologní nukleotidy.

[0091] Je výhodné, že polynukleotidy 2086 se mohou získat z přirozeného, syntetického nebo semi-syntetického zdroje; dále nukleotidovou sekvencí může být přirozeně se vyskytující sekvence nebo může souviset mutací, zahrnující substituce, delece, inzerce a inverze jediné nebo více bazí s takovou přirozeně se vyskytující sekvencí, což umožňuje, že molekula nukleové kyseliny obsahující takovou sekvenci je schopna se exprimovat jako imunogenní polypeptid, jak se zde popisuje. Molekulou nukleové kyseliny může být RNA, DNA, jednořetězcová nebo dvouřetězcová, lineární nebo kovalentně uzavřená kruhová forma. Nukleotidová sekvence může obsahovat sekvence řídící expresi v sousedící poloze, takové řídící sekvence se obvykle získaly z heterologního zdroje. V obecném případě rekombinantní exprese sekvence nukle-

ové kyseliny podle tohoto vynálezu použije sekvenci stop kódu, jako je TAA na konci sekvence nukleové kyseliny.

[0092] Také se zde popisují polynukleotidy schopné hybridizovat za podmínek s redukovanou přísností, výhodněji za přísných podmínek a nejvýhodněji za velmi přísných podmínek se zde popsanými polynukleotidy. Příklady přísných podmínek jsou zobrazeny v tabulce dále v textu: velmi přísné podmínky odpovídají např. podmínkám A až F; přísné podmínky jsou odpovídající např. podmínkám G-L; a podmínky s redukovanou přísností odpovídají např. podmínkám M-R.

Tabulka I - přísnost podmínek hybridizace

Přísnost podmínek	Hybrid polynukleotidu	Délka hybridu (bp) ^I	Teplota hybridizace a pufrů	Teplota promývání a pufrů ^H
A	DNA:DNA	> 50	65EC; 1xSSC -nebo - 42EC; 1xSSC, 50 % formamid	65EC; 0,3xSSC
B	DNA:DNA	< 50	T _B ; 1xSSC	T _B ; 1xSSC
C	DNA:RNA	> 50	67EC; 1xSSC -or- 45EC; 1xSSC, 50 % formamid	67EC; 0,3xSSC
D	DNA:RNA	< 50	T _D ; 1xSSC	T _D ; 1xSSC
E	RNA:RNA	> 50	70EC; 1xSSC -nebo -50EC; 1xSSC, 50 % formamid	70EC; 0,3xSSC
F	RNA:RNA	< 50	T _F ; 1xSSC	T _F ; 1xSSC

Přísnost podmínek	Hybrid polynukleotidu	Délka hybridu (bp) ^I	Teplota hybridizace a pufry	Teplota promývání a pufry ^H
G	DNA:DNA	> 50	65EC; 4xSSC -nebo- 42EC; 4xSSC, 50 % formamid	65EC; 1xSSC
H	DNA:DNA	< 50	T _H ; 4xSSC	T _H ; 4xSSC
I	DNA:RNA	> 50	67EC; 4xSSC -nebo- 45EC; 4xSSC, 50 % formamid	67EC; 1xSSC
J	DNA:RNA	< 50	T _J ; 4xSSC	T _J ; 4xSSC
K	RNA:RNA	> 50	70EC; 4xSSC -nebo- 50EC; 4xSSC, 50 % formamid	67EC; 1xSSC
L	RNA:RNA	< 50	T _L ; 2xSSC	T _L ; 2xSSC
M	DNA:DNA	> 50	50EC; 4xSSC -nebo- 40EC; 6xSSC, 50 % formamid	50EC; 2xSSC
N	DNA:DNA	< 50	T _N ; 6xSSC	T _N ; 6xSSC
O	DNA:RNA	> 50	55EC; 4xSSC -nebo- 42EC; 6xSSC, 50 % formamid	55EC; 2xSSC
P	DNA:RNA	< 50	T _P ; 6xSSC	T _P ; 6xSSC
Q	RNA:RNA	> 50	60EC; 4xSSC -nebo- 45EC; 6xSSC, 50 % formamid	60EC; 2xSSC
R	RNA:RNA	< 50	T _R ; 4xSSC	T _R ; 4xSSC

Přísnost podmínek	Hybrid polynukleotidu	Délka hybridu (bp) ^I	Teplota hybridizace a pufry	Teplota promývání a pufry ^H
<p>bp^I: Délka hybridu je ta předpokládaná pro hybridizované oblasti hybridizujících polynukleotidů. Pokud hybridizuje polynukleotid s cílovým polynukleotidem s neznámou sekvencí, předpokládaná délka hybridu je délka hybridizujícího polynukleotidu. Pokud hybridizují polynukleotidy se známou sekvencí délka hybridu se může stanovit párováním sekvencí polynukleotidů a identifikací oblasti nebo oblastí optimální sekvencí komplementarity.</p> <p>pufry^H: SSPE (1xSSPE je 0,15 M NaCl, 10 mM NaH₂PO₄ a 1,25 mM EDTA, pH 7,4) se může substituovat SSC (1xSSC je 0,15 M NaCl a 15 mM citrát sodný) v hybridizačním a promývacím pufry; promytí se provedlo 15 minut po ukončení hybridizace.</p> <p>T_B až T_R: Teplota hybridizace v případě hybridů s délkou nižší než 50 párů bazí by měla být o 5-10°C nižší než teplota tání (T_m) hybridu, kde T_m se stanovila podle následující rovnice. V případě hybridů kratších než 18 párů bazí $T_m(°C) = 2(\# A + T \text{ bazí}) + 4(\# G + C \text{ bazí})$. V případě hybridů mezi 18 a 49 páry bazí $T_m(°C) = 81,5 + 16,6(\log_{10}[\text{Na}^+] + 0,41(\% G+C) - (600/N))$, kde N je počet bazí v hybridu a [Na⁺] je koncentrace sodných iontů v hybridizačním pufry ([Na⁺] pro 1xSSC = 0,165 M).</p>				

[0093] Další příklady přísných podmínek pro hybridizaci polynukleotidů jsou uvedeny v publikaci Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis, 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, chapters 9 and 11, and *Current Protocols in Molecular Biology*, 1995, F.M. Ausubel et al., eds., John Wiley & Sons, Inc., sections 2.10 and 6.3-6.4.

[0094] Také se zde popisují polynukleotidy, které jsou zcela komplementární s těmito polynukleotidy, také poskytují antisense sekvence.

[0095] Polynukleotid podle vynálezu se připravil řadou způsobů (např. chemickou syntézou, s knihoven DNA, ze samotného organismu) a může mít různé formy (např. jednořetězcové, dvouřetězcové, vektory, sondy, primery). Termín „polynukleotid“ zahrnuje DNA a RNA a také jejich analogy, jako jsou ty obsahující modifikované základní struktury.

Fúzní proteiny

[0096] Také se popisují fúzní proteiny. Termín „fúzní protein“ znamená protein kódovaný dvěma, často nepříbuznými fúzními geny nebo jejich fragmenty. Fúzní proteiny obsahující např. konstantní oblast molekul imunoglobulinu spolu s jiným imunogenním proteinem nebo s jeho částí. V mnoha případech použití Fc oblasti imunoglobulinu jako části fúzního proteinu je výhodné při použití v terapii a diagnostice vedoucí např. ke zlepšení farmakokinetických vlastností (jak se popisuje např. v dokumentu EP 0 232 262 A1). Na druhou stranu v případě některých použití bude nutné umožnit delecí Fc části po expresi, detekci a čištění fúzního proteinu. Polynukleotidy 2086 podle vynálezu se používaly k rekombinantní produkci polypeptidů podle předmětného vynálezu. Polynukleotid může zahrnovat samotnou kódující sekvenci zralého polypeptidu nebo kódující sekvenci zralého polypeptidu ve čtecím rámci s jinými kódujícími sekvencemi, jako jsou ty kódující zralého polypeptidu ve čtecím rámci s jinými kódujícími sekvencemi, jako jsou ty kódující vedoucí nebo sekreční sekvenci, pre-nebo pro-nebo prepro-proteinovou sekvenci nebo jiné části fúzního peptidu. Např. může být kódována markerová sekvence, která umožňuje čištění polypeptidu 2086 nebo fúzovaného polypeptidu (jak se popisuje v publikaci Gentz et al.,

1989). Předmětný vynález tudíž popisuje přípravu polynukleotidů kódující fúzní polypeptidy umožňující čištění produktů exprese na základě značky His-tag. Polynukleotid může také obsahovat nekódující 5' a 3' sekvence, jako jsou přepsané nepřekládané sekvence, signály sestřihu a polyadenylační signály. Takový fúzovaný polypeptid může vzniknout transformací/transfekcí nebo infekcí hostitelské buňky klonovacím vehikulem rekombinantní DNA, jak se popisuje dále v textu a může se následně izolovat z hostitelské buňky, aby se získal fúzovaný polypeptid, který v podstatě neobsahuje jiné proteiny hostitelské buňky.

Imunogenní prostředky

[0097] Jedno provedení předmětného vynálezu popisuje imunogenní prostředky, které obsahují alespoň jeden protein 2086, jak se definuje v připojených nárocích nebo uvedené proteiny kódující nukleovou kyselinu. Zmíněné prostředky vykazují schopnost (1) vyvolat baktericidní protilátky k více kmenům; (2) reagovat s povrchem více kmenů; (3) udělit pasivní ochranu proti živé čelendži; a/nebo (4) předcházet kolonizaci.

[0098] Formulace takových imunogenních prostředků jsou dobře známy v oboru. Imunogenní prostředky podle vynálezu s výhodou zahrnují farmaceuticky přijatelný nosič. Vhodné farmaceuticky přijatelní nosiči a/nebo ředidla zahrnují libovolné a všechna běžná rozpouštědla, disperzní média, plnidla, pevné nosiče, vodné roztoky, potahovací činidla, antibakteriální a antifungální činidla, izotonická činidla a činidla oddalující absorpci a podobně. Vhodní farmaceuticky přijatelní nosiči zahrnují např. jednu nebo víc elátek z voda, fyziologický roztok, fyziologický roztok pufrovaný fosforečnanem, dextróza, glycerol, ethanol a podobně, stejně jak jejich kombinace. Farmaceuticky přijatelný nosič může dále obsahovat minoritní množství pomocných látek, jako jsou smáčecí nebo emulgační činidla, konzer-

vační činidla nebo pufry, které prodlužují dobu uskladnění nebo účinnost protilátky. Příprava a použití farmaceuticky přijatelných nosičů jsou dobře známy v oboru. S výjimkou libovolného běžného média nebo činidla, které není kompatibilní s aktivní složkou, jejich použití v imunogenních prostředcích je obsahem předmětného vynálezu.

[0099] Takové imunogenní prostředky se mohou aplikovat parenterálně, např. injekcí buď subkutánně nebo intramuskulárně, stejně jako orálně nebo intranazálně. Způsoby intramuskulární imunizace se popisují v publikaci Wolff *et al.* a Sedegah *et al.*. Jiné módy aplikace např. používají bez omezení orální formulace, pulmonární formulace, čípky a transdermální aplikace. Orální formulace např. zahrnují bez omezení normálně používané excipienty, jako je např. mannitol, laktóza, škrob, stearát hořečnatý, natrium sacharin, celulóza, uhličitan hořečnatý a podobně. Všechny sloučeniny odpovídají čistotou farmaceutickému použití.

[0100] Imunogenní prostředky podle vynálezu zahrnují jedno nebo více adjuvans zahrnující bez omezení hydroxid hlinitý, fosforečnan hlinitý, STIMULON™ QS-21 (Aquila Biopharmaceuticals, Inc., Framingham, MA); MPL™ (3-0-deacylovaný monofosforyllipid A; Corixa, Hamilton, MT), 529 (aminoalkylglukosaminfosfát, Corixa, Hamilton, MT), IL-12 (Genetics Institute, Cambridge, MA); GM-CSF (Immunex Corp., Seattle, Washington); N-acetylmuramyl-L-theronyl-D-isoglutamin (thr-MDP); N-acetyl-nor-muramyl-L-alanyl-D-isoglutamin (CGP 11637, označený jako nor-MDP); N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutaminyl-L-alanin-2-(1'-2'-dipalmitoyl-sn-glycero-3-hydroxyfosforyloxyethylamin) (CGP 19835A, označený jako MTP-PE); a toxin cholery. Další sloučeniny, které se označují jako netoxické deriváty toxinu cholery zahrnují jeho podjednotku A a/nebo konjugáty nebo geneticky

upravené fúze polypeptidu *N. meningitidis* s toxinem cholery nebo jeho podjednotku B („CTB“), pro choleragenoid, fungální polysacharid zahrnující schizofyllan, muramyl-dipeptid, deriváty muramyl-dipeptidu („MDP“), forbolestery, teplem labilní toxin *E. coli*, blokové polymery nebo saponiny.

[0101] V jistých výhodných provedeních proteiny podle tohoto vynálezu se používaly v imunogenním prostředí k orální aplikaci, které zahrnují mukozální adjuvans a užívaly se k léčbě nebo prevenci infekce *N. meningitidis* v lidském hostiteli. Mukozální adjuvans může být toxin cholery; avšak s výhodou mukozálním adjuvans jiným než toxin cholery, které se používají v souladu s předmětným vynálezem, zahrnují netoxické deriváty holotoxinu cholery, kde podjednotka A se mutagenizovala, chemicky modifikovaný toxin cholery nebo příbuzné proteiny produkované modifikací aminokyselinové sekvence toxinu cholery. V případě toxinu cholery, který se může zvláště použít při přípravě imunogenního prostředí podle tohoto vynálezu, mutantní holotoxin cholery E29H, jak se popisuje v uveřejněné mezinárodní přihlášce WO 00/18434. Ty se mohou přidat nebo konjugovat s polypeptidy podle předmětného vynálezu. Stejně postupy se mohou aplikovat v případě jiných molekul s mukozálním adjuvans nebo s vlastnosmi zavedení, jako je teplem labilní toxin *Escherichia coli* (LT). Mohou se také použít jiné sloučeniny s mukozálním adjuvans nebo zaváděcí aktivitou, jako je žluč; polykationty, jako je DEAE-dextran a polyornithin; detergenty, jako je natrium dodecylbenzensulfát; lipid-konjugované materialy; antibiotika, jako je streptomycin; vitamin A; a jiné sloučeniny, které mění strukturální nebo funkční integritu mukozálních povrchů. Mohou se použít jiné mukozálně aktivní sloučeniny zahrnují deriváty mikrobiální struktury, jako je MDP; akridin a cimetidin. STIMULON™ QS-21, MPL a IL-12, jak se popisuje shora v textu.

[0102] Imunogenní prostředky podle tohoto vynálezu se mohou zavést ve formě ISCOMS (imunitní stimulační komplexy), ISCOMS obsahující CTB, lipozomy nebo kapsulizované ve sloučeninách, jako jsou akryláty nebo poly(DL-laktid-ko-glykosid) za vzniku mikrosfér velikosti vhodných k adsorpci. Proteiny podle vynálezu se mohou také začlenit do olejových emulzí.

Mnohonásobné antigeny

[0103] Imunogenní činidla zahrnující proteiny, polynukleotidy a ekvivalenty podle předmětného vynálezu se mohou aplikovat jako jediný aktivní imunogen v imunogenním prostředku nebo v jiném případě prostředek může zahrnovat jiné aktivní imunogeny zahrnující imunogenní polypeptidy *Neisseria sp.* nebo imunologicky aktivní proteiny jednoho nebo více mikrobiálních patogenů (např. bez omezení virus, prion, bakterie nebo fungi) nebokapsulární polysacharid. Prostředky mohou obsahovat jeden nebo více požadovaných proteinů, fragmentů nebo farmaceutických sloučenin, jak je nutné pro vybranou indikaci. Stejným způsobem prostředky podle tohoto vynálezu, které používají jednu nebo více nukleových kyselin v imunogenním prostředku mohou také zahrnovat nukleové kyseliny, které kódují stejnou diverzní skupinu proteinů, jak se uvádí shora v textu.

[0104] Předmětný vynález popisuje libovolný imunogenní prostředek s více antigeny nebo multivalentní imunogenní prostředek. Prostředky definované v připojených nárocích mohou obsahovat kombinace dvou nebo více proteinů 2086, kombinace proteinů 2086 s jedním nebo více proteiny PorA, kombinaci proteinu 2086 s meningokoky seroskupiny A, C, Y a W135 polysaccharidy a/nebo polysacharidové konjugáty, kombinaci proteinu 2086 s meningokoky a pneumokoky nebo kombinaci libovolných sloučenin uvedených shora v textu ve formě vhodné pro mukozální zavá-

dění. Pro odborníky je jednoduché formulovat takový multi-antigenní nebo multivalentní imunologické prostředky.

[0105] Předmětný vynález také zahrnuje multi-imunizační režimy, kde libovolný prostředek použitelný proti patogenu se může kombinovat s prostředky podle předmětného vynálezu. Například, pacientovi se může bez omezení aplikovat imunogenní prostředek podle předmětného vynálezu a jiný imunologický prostředek k imunizaci proti *S. Pneumoniae*, jako část multi-imunizačního režimu. Odborník je schopen snadno vybrat imunogenní prostředky k použití ve spojení s imunogenními prostředky podle předmětného vynálezu za účelem vyvinout a implementovat multi-imunizační režimy.

[0106] Specifická provedení tohoto vynálezu popisují použití jednoho nebo více polypeptidů podle uvedeného vynálezu nebo nukleové kyseliny je kódující, v prostředku nebo jako část léčebného režimu k prevenci nebo zmírnění infekce *S. Pneumoniae*. Odborník může kombinovat polypeptidy 2086 nebo polynukleotidy 2086 s libovolným imunogenním prostředkem k použití proti infekci *S. pneumonaie*. Odborník může také kombinovat polypeptidy 2086 nebo polynukleotidy 2086 s libovolnou jinou proteinovou nebo polysacharidovou meningokokální vakcínou.

[0107] Polypeptidy 2086, fragmenty a ekvivalenty se mohou použít jako část konjugovaného imunogenního prostředku; kde jeden nebo více proteinů nebo polypeptidů se konjugovalo s nosičem za účelem vytvořit prostředek, který vykazuje imunogenní vlastnosti proti několika serotypům a/nebo proti několika nemocem. V jiném případě jeden z polypeptidů 2086 se může použít jako nosič v případě jiných imunogenních polypeptidů.

[0108] Předmětný vynález popisuje způsob vyvolávající imunitní odezvy u savců, kteří obsahují krok aplikace imunogenního pro-

středku podle předmětného vynálezu savci. Imunogenní prostředek je prostředek, který je antigenní u ošetřených zvířat nebo lidí tak, že imunologicky účinné množství polypeptidu obsaženého v takovém prostředku nese sebou požadovanou imunitní odezvu proti infekci *N. meningitidis*. Výhodná provedení popisují způsob léčby, zahrnují zmírnění nebo prevenci infekce *N. meningitidis* u člověka, který zahrnuje imunologicky účinné množství prostředku.

[0109] Zde používaný termín „imunologicky účinné množství“ znamená aplikaci takového množství savci (s výhodou člověku) buď v jediné dávce, nebo jako část série dávek dostatečné k vytvoření imunitní odezvy ošetřeného jedince, která redukuje klinický vliv bakteriální infekce. Může se pohybovat v rozmezí od minimálního snížení bakterií až k prevenci infekce. V ideálním případě ošetřený jedinec už více nevykazuje vážné klinické znaky bakteriální infekce. Dávka může kolísat v závislosti na specifických podmínkách jedince. Toto množství se může stanovit v rutinních studiích nebo jiným způsobem známým v oboru.

[0110] Jiný specifický aspekt předmětného vynálezu popisuje použití jako imunogenního prostředku vektoru nebo plazmidu, který exprimuje protein podle vynálezu nebo jeho imunogenní část. V souladu s dalším provedením tento vynález popisuje způsob vyvolání imunitní odezvy u savce, která zahrnuje zavedení vektoru nebo plazmidu savci exprimující alespoň jeden izolovaný polypeptid 2086. Protein podle předmětného vynálezu se může zavést savci použitím živého vektoru zvláště použitím živých rekombinantních bakterií, virů nebo jiných živých agens, která obsahuje genetický materiál nezbytný k expresi polypeptidu nebo imunogenní části jako cizího polypeptidu.

Virové a neviróvé vektory

[0111] Výhodnými vektory, zvláště pro buněčné testy *in vitro* a *in vivo*, jsou virové vektory, jako je lentivirus, retrovirus, herpesvirus, adenovirus, adeno-asociovaný virus, virus vakcínie, bakulovirus a jiné rekombinantní viry s požadovaným buněčným tropismem. Tudiž nukleová kyselina kódující protein 2086 nebo jeho imunogenní fragment se může zavést *in vivo*, *ex vivo* nebo *in vitro* použitím virového vektoru nebo přímým zavedením DNA. Exprese do cílových tkání se může ovlivnit cílením transgenního vektoru do specifických buněk s virovým vektorem nebo receptorovým ligandem nebo použitím tkáňové specifického promotoru nebo obou. Zavedení cílového genu se popisuje v publikaci PCT č. WO 95/28494.

[0112] Virové vektory běžně užívané k *in vivo* nebo *ex vivo* cílení a terapii jsou vektory založené na DNA a retrovirové vektory. Způsoby pro konstrukci a použití virových vektorů jsou známy v oboru (jak se popisuje např. v publikaci Miller and Rosman, *BioTechniques*, 1992, 7:980-990). Virové vektory vykazují s výhodou defekt replikace, což znamená, že se nemohou autonomně replikovat v cílové buňce. Replikačně defektivní virus je s výhodou minimální virus, to znamená, že si ponechává pouze sekvence svého genomu, které jsou nezbytné ke enkapsulizaci genomu za vzniku virových částic.

[0113] DNA virové vektory zahrnují atenuovaný nebo defektní DNA virus, jako je bez omezení virus herpes simplex (HSV), papillomavirus, Epstein-Barrové virus (EBV), adenovirus, adeno-asociovaný virus (AAV) a podobně. Výhodné jsou defektní viry, které zcela nebo skoro zcela neobsahují virové geny. Defektní virus není infekční po zavedení do buňky. Použití defektního virového vektoru umožňuje aplikaci buňkám ve specifické, lokalizované oblasti, aniž se uvažuje, že vektor infikuje jiné buňky. Tudiž specifická tkáň se může specificky cílit. Příklady ur-

čitých vektorů zahrnují bez omezení defektní vektor herpes viru 1 (HSV-1) (jak se popisuje v publikaci Kaplitt et al., *Molec. Cell. Neurosci.*, 1991, 2:320-330), defektní vektor herpes virus, kterému chybí gen glykoproteinu L nebo jiné defektivní vektory herpes virus (PCT přihláška WO 94/21807 a WO 92/05263); atenuovaný adenovirový vektor, jako je vektor popsáný v publikaci Stratford-Perricaudet et al. (*J. Clin. Invest.*, 1992, 90:626-630; také se popisuje v publikaci La Salle et al., *Science*, 1993, 259:988-990); a defektní adeno-asociovaný virový vektor (jak se popisuje v publikaci Samulski et al., *J. Virol.*, 1987, 61:3096-3101; Samulski et al., *J. Virol.*, 1989, 63:3822-3828; Lebkowski et al., *Mol. Cell. Biol.*, 1988, 8:3988-3996).

[0114] Různé firmy komerčně produkují virové vektory zahrnující bez omezení Avigen, Inc. (Alameda, CA; AAV vektory), Cell Genesys (Foster City, CA; retrovirové, adenovirové, AAV vektory a lentivirové vektory), Clontech (retrovirové a bakulovirové vektory), Genovo, Inc. (Sharon Hill, PA; adenovirové a AAV vektory), Genvec (adenovirové vektory), IntroGene (Leiden, Nizozemsko; adenovirové vektory), Molecular Medicine (retrovirové, adenovirové, AAV vektory a herpes virus vektory), Norgen (adenovirové vektory), Oxford BioMedica (Oxford, UK; lentivirové vektory) a Transgene (Strasbourg, Francie; adenovirové, retrovirové a lentivirové vektory, vakcinie).

[0115] Adenovirové vektory. Adenoviry jsou eukaryontní DNA viry, které se mohou modifikovat pro účinné zavádění nukleové kyseliny podle uvedeného vynálezu do různých buněčných typů. Existují různé sérotypy adenovirů. Z těchto sérotypů se preferuje podle předmětného vynálezu použití lidského adenoviru typ 2 nebo 5 (Ad 2 nebo Ad 5) nebo adenovirů zvířecího původu (jak se popisuje v PCT publikaci č. WO 94/26914). Tyto adenoviry zvířecího původu, které se mohou použít v rozsahu vynálezu, za-

hrnují adenoviry psího, bovinního, myšího (např. Mav1, jak se popisuje v publikaci Beard et al., *Virology*, 1990, 75-81), ovčího, prasečího, ptačího a opičího původu (např. SAV).

S výhodou adenovirem zvířecího původu je psí adenovirus, s výhodou CAV2 adenovirus (např. Manhattan nebo kmen A26/61, ATCC VR-800). Různé replikačně defektní adenoviry a minimální adenovirové vektory se popisují (PCT přihlášky č. WO 94/26914, WO 95/02697, WO 94/28938, WO 94/28152, WO 94/12649, WO 95/02697, WO 96/22378). Replikačně defektní rekombinantní adenoviry v souladu s vynálezem se mohou připravit libovolným způsobem známým v oboru (jak se popisuje v publikaci Levrero et al., *Gene*, 1991, 101:195; European Publication No. EP 185 573; Graham, *EMBO J.*, 1984, 3:2917; Graham et al., *J. Gen. Virol.*, 1977, 36:59). Rekombinantní adenoviry se získaly a čistily použitím standardních molekulárních biologických postupů, které jsou známy v oboru.

[0116] Adeno-asociované viry. Adeno-asociované viry (AAV) jsou DNA viry relativně malé velikosti, které se mohou integrovat stabilně a místně specifickým způsobem do genomu buněk, které infikují. Jsou schopny infikovat široké spektrum buněk, aniž vyvolávají libovolný účinek na buněčný růst, morfologii nebo diferenciaci a nepodílejí se na patologii člověka. Genom AAV se klonoval, sekvenoval a charakterizoval. Popisuje se použití vektorů získaných z AAV pro transfer genů *in vitro* a *in vivo* jak se popisuje v PCT přihlášce č. WO 91/18088 a WO 93/09239; patent USA č. 4,797,368 a 5,139,941; přihláška Evropského patentu č. EP 488 528). Replikačně defektní rekombinantní AAV podle vynálezu se mohou připravit ko-transfekcí plazmidu, který obsahuje sekvenci nukleové kyseliny, která je středem zájmu, lemovanou dvěma oblastmi invertované terminální repetice (ITR) AAV a plazmidu nesoucího AAV enkapsidované geny (geny rep a can) do buněčné linie, která se infikovala lidským pomocným vi-

rem (např. adenovirem). Produkované AAV rekombinanty se pak čistily standardními postupy.

[0117] Retrovirové vektory. V jiné implementaci předmětného vynálezu nukleová kyselina se může zavést do retrovirového vektoru, jak se např. popisuje v patentu USA č. 5,399,346; Mann et al., *Cell*, 1983, 33:153; patent USA č. 4,650,764 a 4,980,289; Markowitz et al., *J. Virol.*, 1988, 62:1120; patent USA č. 5,124,263; přihláška Evropského patentu č. EP 453 242 a EP178 220; Bernstein et al., *Genet. Eng.*, 1985, 7:235; McCormick, *BioTechnology*, 1985, 3:689; přihláška PCT č. WO 95/07358; a Kuo et al., *Blood*, 1993, 82:845. Retroviry jsou integrační viry, které infikují dělicí se buňky. Retrovirový genom zahrnuje dvě LTR, enkapsidovanou sekvenci a tři kódující oblasti (*gag*, *pol* a *env*). V rekombinantních retrovirových vektorech geny *gag*, *pol* a *env* se v obecném případě celé nebo částečně deletovaly a nahradily se sekvencí heterologní nukleové kyseliny, které je středem zájmu. Tyto vektory se mohou zkonstruovat z různých typů retrovirů, jako je HIV, MoMuLV („virus myší Moloney leukémie“ MSV („virus myšího Moloney sarkomu“), HaSV („virus Harvey sarkomu“); SNV („virus nekrózy sleziny“); RSV („virus Rousova sarkomu“) a Friendův virus. V předchozím stavu techniky se popisují vhodné pakovací buněčné linie PA317 (patent USA č. 4,861,719); PsiCRIP buněčné linie (PCT přihláška č. WO 90/02806) a buněčná linie GP+envAm-12 (PCT přihláška č. WO 89/07150). Dále, rekombinantní retrovirové vektory mohou obsahovat modifikace v LTR k potlačení transkripční aktivity, stejně jako extenzivní enkapsidaci sekvencí, které mohou zahrnovat část *gag* genu (Bender et al., *J. Virol.*, 1987, 61:1639). Rekombinantní retrovirové vektory se čistily standardními postupy známými v oboru.

[0118] Retrovirové vektory se zkonstruovaly, aby fungovaly jako infekční částice nebo se podrobily transfekci v jednom cyklu. V prvním případě virus se modifikoval, aby si ponechal všechny své geny s výjimkou těch, které jsou odpovědné za onkogenní vlastnosti transformace a exprimují heterologní geny. Neinfekční virové vektory se upravily, aby se poškodil signál balení virů, ale viry si ponechaly strukturní geny, aby došlo ke sbalení společně zavedeného viru upraveného tak, aby obsahoval heterologní gen a balící signály. Takto produkované virové částice nejsou schopny produkovat další virus.

[0119] Do retrovirových vektorů se mohou také zavést DNA viry, které umožňují retrovirovou replikaci v jednom cyklu a amplifikují účinnost transfekce (jak se popisuje v PCT přihláškách č. WO 95/22617, WO 95/26411, WO 96/39036 a WO 97/19182).

[0120] Lentivirové vektory. V jiné implementaci předmětného vynálezu se mohou použít lentivirové vektory jako činidla pro přímé zavedení a stálou expresi transgenů v několika typech tkání, která zahrnují mozek, retinu, svaly, játra a krev. Vektory mohou účinně transdukovat dělicí se a nedělicí se buňky v uvedených tkáních a ovlivňují dlouhodobou expresi genu, který je středem zájmu. Souhrn se uvádí v publikaci Naldini, Curr. Opin. Biotechnol., 1998, 9:457-63; také se popisuje v publikaci Zufferey, et al., J. Virol., 1998, 72:9873-80). Lentivirové balící buněčné linie jsou dostupné a jsou známy v oboru. Umožňují produkci vysokého titru lentivirových vektorů pro genovou terapii. Příkladem je tetracyklinem indukovatelná VSV-G pseudotypovaná lentivirus balící buněčná linie, která může vytvořit virové částice s titry vyššími než 10⁶ IU/ml pro alespoň 3 až 4 dny (jak se popisuje v publikaci Kafri, et al., J. Virol., 1999, 73: 576-584). Vektor produkovaný indukovatelnou buněčnou linií

se může koncentrovat, jak je potřeba pro účinnou transdukcii nedělicích se buněk *in vitro* a *in vivo*.

[0121] Nevirové vektory. V jiné implementaci předmětného vynálezu vektor se může zavést *in vivo* lipofekcí, jako nahá DNA nebo s jiným činidlem umožňujícím transfekci (peptidy, polymery atd.). Syntetické kationtové lipidy se mohou použít k přípravě lipozomů *in vivo* transfekcí genu kódujícího merker (jak se popisuje v publikaci Felgner, et. al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1987, 84:7413-7417; Felgner and Ringold, Science, 1989, 337:387-388; Mackey, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1988, 85:8027-8031; Ulmer et al., Science, 1993, 259:1745-1748). Použitelné lipidové sloučeniny a prostředky pro transfer nukleových kyselin se popisují v přihlášce PCT č. WO 95/18863 a WO 96/17823 a v patentu USA č. 5,459,127. Lipidy se mohou chemicky spojovat s jinými molekulami pro účely cílení (jak se popisuje v publikaci Mackey, et. al., citace uvedená shora v textu). Cílové peptidy např. hormony nebo neurotransmitery a proteiny, jako jsou protilátky nebo ne-peptidové molekuly se mohou spojovat s lipozomy chemicky.

[0122] Jiné molekuly se mohou použít k transfekci nukleové kyseliny *in vivo*, jako je kationický oligopeptid (např. přihláška PCT č. WO 95/21931), peptidy získané z proteinů vázajících DNA (např. přihláška PCT č. WO 96/25508) nebo kationický polymer (např. přihláška PCT č. WO 95/21931).

[0123] Je také možné zavést vektor *in vivo* jako nahý DNA plazmid. Nahé DNA vektory pro účely vakcíny nebo genovou terapii se mohou zavést do požadovaných hostitelských buněk způsoby známými v oboru, např. elektroporací, mikroinjekcí, buněčnou fúzí, DEAE destanem, srážením fosforečnanem vápenatým, použitím genového děla nebo použitím transportéru DNA vektoru (např. jak se popisuje v publikaci Wu et al., J. Biol. Chem., 1992,

267:963-967; Wu and Wu, J. Biol. Chem., 1988, 263:14621-14624; přihláška patentu Kanady č. 2,012,311; Williams et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1991, 88:2726-2730). Mohou se také použít přístupy zavádění DNA zprostředkované receptorem (jak se popisuje v publikaci Curiel et al., Hum. Gene Ther., 1992, 3:147-154; Wu and Wu, J. Biol. Chem., 1987, 262:4429-4432). Patent USA č. 5,580,859 a 5,589,466 popisuje zavedení exogenních sekvencí DNA bez činidel umožňujících transfekci do savců.

V současné době se popisuje elektrotransfer DNA s relativně nízkým napětím, vysokou účinností *in vivo* postupu (Mir et al., C.P. Acad. Sci., 1988, 321:893; PCT přihláška č. WO 99/01157; WO 99/01158; WO 99/01175). Další provedení předmětného vynálezu popisuje způsob vyvolání imunitní odezvy u člověka, který zahrnuje aplikaci uvedenému člověku množství molekuly DNA kódující polypeptid 2086 v tomto vynálezu, eventuálně s činidlem umožňujícím transfekci, přičemž uvedený polypeptid, pokud se exprimuje, si ponechává imunogennost a pokud se začlení do imunogenního prostředí a aplikuje se člověku, poskytuje ochranu bez zhoršení onemocnění při následné infekci člověka patogenem *Neisseria sp.*, jako je *N. meningitidis*. Činidla umožňující transfekci jsou známá v oboru a zahrnují bupivikain a jiná lokální anestetika (např. se popisuje v patentu USA č. 5,739,118) a kationické polyaminy (jak se popisuje v mezinárodní patentové přihlášce WO 96/10038).

[0124] Předmětný vynález také popisuje protilátku, která může být buď monoklonální nebo polyklonální specifická pro proteiny 2086, jak se popisuje shora v textu. Takové protilátky mohou vznikat způsoby, které jsou dobře známy v oboru.

Bakteriální expresivní systémy a plazmidy

[0125] Tento vynález také popisuje rekombinantní molekulu DNA, jako je vektor nebo plazmid, která obsahuje sekvenci řídící ex-

presi vykazující promotorovou sekvenci a iniciátorové sekvence a nukleotidovou sekvenci, která kóduje polypeptid podle předmětného vynálezu, nukleotidovou sekvenci lokalizovanou na 3'konci promotorové a iniciátorové sekvence. V jiném provedení předmětného vynálezu se popisuje klonovací vehikulum rekombinantní DNA schopné exprimovat polypeptid 2086 obsahující sekvenci řídící expresi vykazující promotorové a iniciátorové sekvence a nukleotidovou sekvenci, která kóduje polypeptid 2086, nukleotidovou sekvenci lokalizovanou na 3'promotorové a iniciátorové sekvence. V dalším provedení se popisuje hostitelská buňka obsahující klonovací vehikulum rekombinantní DNA a/nebo rekombinantní molekulu DNA, jak se popisuje shora v textu. Vhodné sekvence řídící exprese a kombinace hostitelská buňka/klonovací vehikulum jsou známy v oboru a popisují se například v publikaci Sambrook et al. (1989).

[0126] Po konstrukci DNA klonovacího vehikula a/nebo hostitelských buněk exprimujících požadovaný polypeptid podle předmětného vynálezu transformací, transfekcí nebo infekcí takových klonovacích vehikul nebo hostitelských buněk plazmidy obsahujícími odpovídající polynukleotid 2086, klonovací vehikuly nebo hostitelské buňky se kultivovaly za podmínek, které umožňují expresi polypeptidu. Polypeptid se pak izoloval postupem známým v oboru a je prakticky bez kontaminujících složek hostitelských buněk.

[0127] Zahrnuty jsou následující příklady, aby demonstrovaly výhodná provedení předmětného vynálezu. Pro odborníka je vhodné, že postupy popsané v příkladech, které sledují reprezentativní postupy objevené odborníky, fungují v praxi podle předmětného vynálezu, a tudíž se mohou považovat za výhodné módy pro jeho praxi. Pro odborníka je také výhodné, že ve specific-

kém provedení je možné provést řadu změn a stále je možné dosáhnout podobného výsledku.

PŘÍKLADY

Příklad 1

Identifikace proteinového extraktu z membrány Neisserií schopného vyvolat baktericidní protilátky proti heterologním kmenům:

[0128] S odkazem na tabulku II dále v textu přípravy obsahující proteiny vnější membrány s deplecí LOS vyvolávají baktericidní protilátky. Tyto protilátky jsou často určeny proti PorA odpovídajícího kmene. Přípravky z vnější membrány s deplecí LOS ze séroskupiny B meningokových kmenů 8529 (B:15:P1.7b,3) jsou neobvyklé, protože neočekávaně vyvolávají baktericidní protilátky proti několika heterologním kmenům.

Tabulka II

BC aktivita Anti-sOMPS proti různým kmenům <i>N. meningitidis</i>							
Anti-serum týden	H44/76	5315	H355	M982	880049	8529*	NMB
6							
Serosubtyp	P1.7,16	P1.5	P1.15	P1.9	P1.4	P1.3	P1.5,2
sOMP H44/76 25 µg QS-21 20µg	1,000	< 50	< 50	< 50	< 50	980	< 50
sOMP 5315 25 µg QS-21 20 µg	50	< 50	<50	< 50	< 50	2 170	< 50
sOMP H355 25 µg QS-21 20 µg	< 50	< 50	450	< 50	< 50	860	< 50
sOMPs M982 25 µg QS-21 20 µg	92	< 50	< 50	300	< 50	1 100	< 50

BC aktivita Anti-sOMPS proti různým kmenům <i>N. meningitidis</i>							
Anti-serum týden	H44/76	5315	H355	M982	880049	8529*	NMB
6							
sOMP 880049 25 µg QS-21 20 µg	50	< 50	< 50	< 50	< 50	1 190	< 50
sOMP 8529 25 µg QS-21 20 µg	1,000	< 50	450	50	215	>4 050 (81,7)	< 50
sOMP 2996 25 µg QS-21 20 µg	< 50	< 50	< 50	< 50	< 50	790	148
Kontrolní sérum z celých buněk 25 µg 3DMPL 25 µg	450	50	100	500	150	>1 350 (66,0)	952

[0129] Aby se umožnila izolace a charakterizace antigenů odpovědných za vyvolání heterologních baktericidních protilátek, identifikovaly jsme, který detergent optimálně extrahoval antigen.

Kmeny a kultivační podmínky

[0130] *N. meningitidis* kmen 8529 ze zmrazené zkumavky se naněs na GC plotnu. (meningokokový kmen 8529 se získal z The RIVM, Bilthoven, Nizozemí). Plotna se inkubovala při 36 °C/5 % CO₂ po dobu 7,5 hod.. Několik kolonií se použilo k inokulaci nádoby, která obsahuje 50 ml modifikovaného Frantz media + GC doplněk. nádoba se inkubovala na míchačce na vzduchu při teplotě 36 °C a míchala se při 200 RPM po dobu 4,5 hod.. 5 ml se použilo k inokulaci Fernbachovy nádoby, která obsahuje 450 ml modifikovaného Frantzov média + GC doplněk. Nádoba se inkubovala na míchačce na vzduchu při teplotě 36 °C a míchala se při 100 RPM 11 hod.. Celý objem 450 ml se použilo k inokulaci 8,5 l modifiko-

vaného Frantzova media + GC doplnku ve fermentoru o objemu 10 l.

Složení modifikovaného Frantzova média:

Kyselina glutamová	1,3 g/l
Cystein	0,02
hydrogenfosforečnan sodný x 7 H ₂ O	10
Chlorid draselný	0,09
Chlorid sodný	6
Chlorid amonný	1,25
Dialyzovaný kvasinkový extrakt (YE)	40 ml

[0131] (25 % YE roztok dialyzovaný proti 5 objemům dH₂O přes noc a pak se autoklávoval)

GC doplněk 100X, sterilizace filtrací	
Dextróza	400 g/l
Glutamová kyselina	10
kokarboxyláza	0,02
dusičnan železitý	0,5

[0132] Během fermentace se řídily následující parametry: teplota 36 °C; pH=7,4; rozpuštěný kyslík 20 %. Ke kontrole tvorby pěny se přidalo několik kapek P-2000 činidla proti tvorbě pěny. Kultura se kultivovala do dosažení stacionární fáze. Buňky se shromáždily centrifugací při OD₆₅₀ = 5,25. Celkem 100 až 300 gramů mokré buněčné pasty se v typickém případě shromáždilo z kultury o objemu 8,5 l.

Parciální čištění proteinových frakcí s vnější membrány z meningokoků, které vyvolávají heterologní baktericidní protilátky:

[0133] 100 g mokré hmotnosti buněk se suspendovalo v objemu odpovídajícím pětinasobku hmotnosti s 10 mM HEPES-NaOH, pH7,4, 1 mM Na₂EDTA a lyzovaly se pasáží přes mikorfluidizer 110Y vybavený komorou při ~18 000 psi. Buněčný lyzát se čiřil a buněčný obal se izoloval centrifugací při 300 000x g po dobu 1 hodina při teplotě 10 °C. Buněčné obaly se promyly 2x stejným pufrem a suspendovaly se v homogenizeru a pak se centrifugovaly způsobem popsaným shora v textu. Buněčné obaly se pak extrahovaly 320 ml 1 % (hm./V) Triton X-100 v 10 mM HEPES-NaOH, pH 7,4, 1 mM MgCl₂. S odkazem na tabulku III dále v textu výsledky ze sekvenční diferenciální extrakce detergentem použitím Triton X-100 a Zwittergent 3-14 následované imunizací myši umožnily stanovit, že triton extrahuje optimálně kandidáta, který je středem zájmu. Tento extrakt s tritonem X-100 umožňující baktericidní protilátkovou odezvu proti 4 z pěti kmenů uvedených v tabulce III, se pak se rozdělil na frakce preparativní izoelektrofukuzací (IEF) v jednotce BioRad Rotophor. Koncentrace amfolytu byly 1 % pH 3 až 10 smíchané s 1 % pH 4-6. Jak je zobrazeno v tabulce III, zjistilo se, že několik frakcí vyvolává heterologní baktericidní odezvu. Frakce získané z IEF, které fokusovaly v pH v rozmezí 5,5 až 7,8 vyvolaly heterologní odezvu k většině kmenů v baktericidním testu. Spojené IEF frakce se koncentrovaly a amfolyty se odstranily srážením ethanolem. Dalšího čištění se dosáhlo adsorbci některého z proteinů získaného v rozmezí pH přibližně 5,5 až 7,8 na aniontovýmenné koloně a porovnáním baktericidní aktivity získané po imunizaci myši s adsorbovaným a neadsorbovaným proteinem. S odkazem na tabulku II, zatímco se řada proteinů adsorbovala na aniontovýmennou

pryskyřici, proteiny, které se neadsorbovaly na kolonu, vyvolávaly více heterologní baktericidní protilátky.

Tabulka III

způsob	frakce	BC ₅₀ cílový kmen				
		H44/76	880049	H355	539*	M982
LOS-deplece	sOMP	1 000	215	450	NC	50
Extrakce detergentem	Cytoplazmatický extrakt	200	NT	NT	NT	NT
	TX-100	>800	>800	>800	>800	<25
	Zwittergent 3-12	400	>25	100	400	<25
	Zwittergent 3-14	<25	NT	NT	NT	NT
	Zw.3-14 + NaCl	<25	NT	NT	NT	NT
	Sarkosyl	<25	NT	NT	NT	NT
	Zw.3-14 + teplo	<25	NT	NT	NT	NT
Preparativní IEF	Frakce 1-3 (pH 2,3-3,9)	50	NT	NT	NT	NT
	Frakce 4 (pH 4,1)	>800	<25	100	<25	NT
	Frakce 5 (pH 4,3)	>800	<25	100	200	NT
	Frakce 6 (pH 4,5)	400	NT	NT	NT	NT
	Frakce 7 (pH 4,8)	<25	NT	NT	NT	NT
	Frakce 8-9 (pH 5,0-5,3)	<25	NT	NT	NT	NT
	Frakce 10-17 (pH 5,5-7,8)	>800	200	<800	<800	NT
aniontovýměnná	adsorbovaná	400	NT	100	100	NT
	neadsorbovaná	>6 400	NT	<800	<800	NT

		BC ₅₀ cílový kmen				
způsob	frakce	H44/76	880049	H355	539*	M982
LOS-deplece	sOMP	1 000	215	450	NC	50
NT: nebylo testováno						
*klinický izolát 539 je kmen homologní s 8529 izolovaný ze stejné epidemie						

[0134] Jak je zobrazeno na Obr. 1A, dva hlavní proteiny byly přítomné v neadsorbované frakci, jak se stanovilo SDS-PAGE. K identifikaci těchto proteinů se provedly dva typy analýzy. Jedna analýza se provedla omezenou proteolytickou degradací (jak se popisuje na Obr. 1A a 1B) a pak následovala izolace peptidů a přímým sekvenováním proteinu. Další analýza se provedla SDS-PAGE následovala gelová excize, proteolytické štěpení a LC-MS/MS (kapalnou chromatografií v tandemu s hmotnostní spektrometrií (Obr. 3), aby se získaly hmotnostní spektrální informace v případě složek přípravků, který jsou středem zájmu (způsoby mapování a sekvenování peptidu se popisují později v této sekci).

[0135] Sangerova genomová sekvence *N. meningitidis* A se analyzovala použitím způsobů a algoritmů popsanych v publikaci Zagursky and Russell, 2001, BioTechniques, 31:636-659. Tato analýza poskytla přes více než 12 00 otevřených čtecích rámců (ORF). Jak přímá sekvenční data, tak i data získaná hmotnostní spektrometrií uvedená shora v textu indikovala, že hlavní složky neadsorbované frakce byly produkty několika ORF prezentovaných v analýze Sangerovy databáze. Tři převládající proteiny identifikované touto metodologií odpovídají ORF 4431, 5163 a 2086 (Obr. 1B a 3).

[0136] Ačkoliv ORF 4431 byl nejvíce převládající protein identifikovaný ve frakcích, myší protilátky k rekombinantnímu lipidovanému 4431 nebyl baktericidní a neposkytoval protektivní odezvu ve zvířecím modelu. Další analýza ORF 5163 probíhá.

[0137] Druhá nejvíce převládající zde popsaná složka přípravků odpovídá produktu ORF 2086.

Způsoby imunogennosti

Příprava séra:

[0138] Kde není uvedeno jinak, proteinový prostředek/vakcíny se formulovaly s 25 µg celkového proteinu a upravily se adjuvans 20 µg QS-21. Dávka 0,2 ml se aplikovala subkutánní injekcí (do hýždě) samicím myši Swiss-Webster 6 až 8 týdnů starých v týdnu 0 a 4. Krev se shromáždila v týdnu 0 a 4 a v týdnu 6 se provedlo konečné vykrvácení.

Baktericidní test:

[0139] Baktericidní testy se provedly potencionálně, jak se popisuje (Mountzouros and Howell, 2000, J. Clin. Microbiol. 38(8):2878-2884). Protilátka-dependentní baktericidní titry zprostředkované komplementem v případě SBA se vyjádřily jako převrácená hodnota nejvyššího ředění testovaného séra, která usmrtí 50 % cílových buněk zavedených do testů (BC₅₀ titr).

Způsoby používané k identifikaci proteinu 2086:

Štěpení kyanidem bromným a přímé sekvenování fragmentů:

[0140] Štěpení kyanidem bromným aniontovýměnné neadsorbované frakce (AEUF). AEUF se srážel s 90 % chlazeným ethanolem a pak se rozpustil v 10 mg/ml kyanidu bromného v 70 % kyselině mravenčí, aby koncentrace proteinu byla 1 mg/ml. Reakce se proved-

la přes noc při teplotě místnosti ve tmě. Štěpený produkt se sušil ve vakuu a pelety se rozpustily s HE/0,1 % redukovaném TX-100. SDS-PAGE následovaný sekvenováním N-terminálních aminokyselin se použila k identifikaci složek této frakce.

Štěpení proteázou/reverzní fáze/N-terminální sekvenování k identifikaci složek:

[0141] AEUF se štěpilo buď GluC (V8), LysC nebo ArgC. Poměr proteinu ku enzymu byl 30 µg ku 1 µg. Štěpení se provedlo při teplotě 37 °C přes noc. Směs štěpeného proteinu (30 µg) procházela kolonou Aquapore RF-300 s velikostí pórů 7 mikronů a píky se shromáždily manuálně. Provedlo se slepé stanovení bez proteinu a odpovídající píky se odečetly od hodnot z chromatogramu vzorku. Píky, které se vyskytují pouze ve vzorcích, se analyzovaly hmotnostním spektrometrem a ty vzorky vykazující čistou hmotu se analyzovaly sekvenováním N-terminálních aminokyselin.

Sekvenování N-terminálních aminokyselin:

[0142] V případě pruhů vyříznutých z blotu se vzorek proteinu přenesl z SDS gelu na membránu PVDF, barvil se amidovou černí (10 % kyselina octová, 0,1 % amidová čern v deionizované vodě) a odbarvil se 10 % kyselinou octovou. Pruh požadovaného proteinu se pak vyřízl ze všech deseti linií použitím methanolem ošetřeného skalpelu nebo mini-Exacto nožem a umístily se do reakční kartridže Applied Biosystems 477A Protein Sequencer. V případě přímého sekvenování v roztoku se uspořádala ProSorb kartridž a PVDF se smáčela 60 µl methanolu. PVDF se promyla 50 µl deionizované vody a vzorek (50 µl) se nanesl na PVDF. 50 µl deionizované vody se použilo k promytí vzorku ProSorb PVDF se vyňal, sušil se a umístil se do reakční kartridže Applied Biosystems 477A Protein Sequencer. V případě obou způsobů Applied Biosystems N-terminal Sequencer se provedl za optimálních blo-

tačních podmínek 12 a více cyklů (1 cyklus slepé stanovení, 1 cyklus standard a 10 nebo více cyklů identifikace požadovaného zbytku) a PTH-aminokyselinová detekce se provedla na přístroji Applied Biosystems 120A PTH Analyzer. Cykly se shromáždily na analogovém zaznamenávacím zařízení tak i digitálně pomocí softwaru zařízení. Uspořádání aminokyselin se provedlo použitím analogu a digitálních dat porovnáním standardní sady PTH-aminokyselin a jejich retenčních časů na analyzáru (cysteinové zbytky se během konverze porušily a nejsou detekovány). Z jediného zbytku je možné získat více sekvenčních informací a primárně verzus sekundární přiřazení provedené na základě intenzity signálu.

LC-MS/MS

[0143] Proteinové vzorky se čistily pomocí IEF se dále analyzovaly elektroforézou na SDS-polyakrylamidovém gelu. Proteiny se vizualizovaly barvením Coomaasievou modří a pruhy, které jsou středem zájmu, se manuálně vyřízly, pak se redukovaly, alkylovaly a štěpily se trypsinem (Promega, madison, WI) *in situ* použitím automatizovaného robota pro štěpení trypsinem v gelu (1). Po štěpení se peptidové extrakty koncentrovaly na konečný objem 10 až 20 μ l použitím Savant Speed Vac Concentrator (ThermoQuest, Holdbrook, NY).

[0144] Peptidové extrakty se analyzovaly na automatizované mikroelektrosprejové HPLC s reverzní fází. Stručně, mikroelektrosprejové rozmezí tvoří Picofrit fúzovaná jehla s oxidem křemičitým v délce 50 cm ID 75 μ m, 8 μ m průměr clony (New Objective, Cambridge MA) naplněná částicemi 10 μ m s reverzní fází C18 (YMC, Wilmington, NC) do délky 10 cm. Jehla Picofrit se umístila do nosiče optických vláken (Melles Griot, Irvine, CA) umístěném na bázi před detektorem hmotnostního spektrometru. Zadní část kolony se zaplombovala titanovým spojem, aby se umožnilo

elektrické připojení pro elektrosprejovací rozhraní. Spoj se spojil s délkou fúzované křemičité kapiláry (FCS) se zařízením pro automatický odběr vzorků FAMOS (LC-Packings, San Francisco, CA), který se spojil s čerpadlem rozpouštědlo pro HPLC ABI 140C, Perkin-Elmer, Norwalk, CT). Čerpadlo HPLC rozpouštědla dodávalo tok 50 μ l /min, který se redukoval na 250 nl/min. použitím PEEK nepropustného rozdělovače ve tvaru T (Upchurch Scientific, Oak Harbor, WA) a pak se zavedl do automatického zařízení pro odběr vzorků použitím FSC přenosového potrubí. LC čerpadlo a zařízení pro automatický odběr vzorků řídilo použitím jejich vnitřních uživatelských programů. Vzorky se umístily do plastových zkumavek automatického zařízení pro odběr vzorků a vstříkovaly se použitím vzorkové smyčky o objemu 5 μ l.

Mikrokapilární HPLC-hmotnostní spektrometrie:

[0145] Extrahované peptidy z gelu se separovaly mikrosprejovým HPLC systémem použitím 50 minutového gradientu 0 až 50 % rozpouštědla B (A: 0,1 M HoAc, B: 90 % MeCN/0,1 M HoAc). Analýza peptidu se provedla na hmotnostním spektrometru Finnigan LCQ se záchytem iontů (ThermoQuest, San Jose, CA) pracujícím při sprejovém napětí 1,5 kV a použitím teploty pro zahřátí kapilár 150 °C. Data se získala v automatizovaném MS/MS módu použitím softwaru pro získávání dat, který poskytuje přístroj. Způsob akvizice zahrnoval 1 MS sken (375-1200 m/z) následovaný MS/MS skenem 3 nejvíce zastoupených iontů v MS skenu. Ke zvýšení počtu peptidových iontů, které se analyzovaly, se použila dynamická exkluze a izotopová exkluze (3 amu = šířka exkluze, 3 min. = trvání exkluze, 30 sek. = trvání pre-exkluze, 3 amu = šířka izotopové exkluze). Automatizovaná analýze dat MS/MS se provedla použitím počítačového algoritmu SEQUEST, který je součástí balíčku analýzy dat Finnigan Bioworks (ThermoQuest, San Jose, CA) použitím databáze proteinů získaných z úplného genomu

N. meningitidis (od Sanger). Výsledky studie jsou uvedeny na Obr. 3.

Příklad 2

Klonování rekombinantního lipidovaného P2086 (rLP2086):

A) Přirozená vedoucí sekvence:

Zdrojový materiál:

[0146] Gen ORF 2086 se amplifikoval PCR z klinického izolátu kmene *Neisseria meningitidis* seroskupiny B kmene označeného 8529. Seroskupina, serotyp a serosubtyp tohoto kmene je zobrazen v závorce; 8529 (B:15, P1:7b,3). Tento meningokokový kmen se získal od The RIVM, Bilthoven, Nizozemí. Sekvence genu zra-
lého proteinu 2086 z meningokokového kmene 8529 je zde označen jako SEQ ID NO: 212.

PCR amplifikace a klonovací strategie:

[0147] Vizuální inspekce ORF 2086 indikovala, že tento gen vykazoval potencionální lipoproteinovou signální sekvenci. Další analýza použitím Hidden Markov Model Lipoprotein algoritmu potvrdila, že ORF 2086 obsahuje lipoproteinovou signální sekvenci. Za účelem rekombinantně exprimovat P2086 v přirozené konformaci, oligonukleotidové primery se navrhly k amplifikaci genu v celé délce s lipoproteinovou signální sekvencí a byly založené na analýze Sangerovy sekvence pro *N. meningitidis* A ORF 2086, (5' primer - CT ATT CTG CAT ATG ACT AGG AGC a 3' primer - GCGC GGATCC TTA CTG CTT GGC GGC AAG ACC), kterou je SEQ ID NO. 304 (sloučenina č. 4 624) a respektive SEQ ID NO. 303 (sloučenina č. 4 623) (jak se také popisuje v tabulce IV). Gen 2086 se amplifikoval polymerázovou řetězcovou reakcí (PCR) [ABI 2400 termální cycler, Applied Biosystems, Foster City, CA] z *N. meningitidis* kmen 8529. Správná velikost amplifikovaného produktu se ligovala a klonoval do pCR2.1-TOPO (Invitrogen). Plazmidová DNA se štěpila restrikcčním enzymem NdeI a BamHI a čistila se na gelu a ligovala do vektoru pET-27b(+)(Novagen).

[0148] Zde popsané oligonukleotidové primery se syntetizovaly na oligonukleotidovém syntetizéru PerSeptive Biosystems, Applied Biosystems, Foster City CA, použitím β -kyanoethylfosforamiditu, Applied Biosystems, Foster City CA. Primery používané při amplifikaci PCR rodiny genů ORF 2086 jsou uvedeny v tabulce IV, která ukazuje neomezuující příklady primerů podle předmětného vynálezu.

Tabulka IV: Primery

SEQ ID NO. (sloučenina č.)	Primer	<u>Sekvence</u>
303 (4 623)	reverzní	GCGCGGATCCTTACTGCTTGGCGGCAAGACC
304 (4 624)	Forward	CTATTCTGCATATGACTAGGAGC
305 (4 625)	Forward	AGCAGCGGAGGCGGCGGTGTC
306 (5 005)	Forward	TGCCGATGCACTAACCGCACC
307 (5 007)	reverzní	CGTTTCGCAACCATCTTCCCG
308 (5 135)	reverzní	GAGATCTCACTCACTCATTA CTGCTTGGC GGCAAGACCGATATG
309 (5 658)	Forward	GCGGATCCAGCGGAGGGGGTGGTGTGCGCC
310 (5 660)	reverzní	GCGCATGCTTACTGCTTGGCGGCAAGACCGATATG
311 (6 385)	Forward	GCGGATCCAGCGGAGGCGGCGGAAGC
312 (6 406)	Forward	GCGCAGATCTCATATGAGCAGCGGAGGGG GTGGTGTGCGCCCGAYATWGGTGGGGG CTTGCCG
313 (6 470)	Forward	CTATTCTGCGTATGACTAG
314 (6 472)	Reverzní	GTCCGAACGGTAAATTATCGTG
315 (6 473)	Forward	GCGGATCCAGCGGAGGCGGCGGTGTGCGCC
316 (6 474)	Forward	GAGATCTCATATGAGCAGCGGAGGCGGCGG GAAGC
317 (6 495)	Forward	GACAGCCTGATAAACC
318 (6 496)	Reverzní	GATGCCGATTTGCGTGAACC
319 (6 543)	Reverzní	GCGCATGCCTACTGTTTGCCGGCGATG
320 (6 605)	Reverzní	GAGATCTCACTCACTCACTACTGTTTGCC GGCGATGCCGATTTC
321 (6 721)	Forward	GCGCAGATCTCATATGAGCAGCGGAGGCGG GCGGAAGCGGAGGCGGCGGTGTCAACCGCC GACATAGGCACG

Expresse lipoproteinů rLP2086 využívající přirozenou vedoucí sekvenci:

[0149] Na Obr. 5 plazmid pPX7340 se transformoval/transfekoval nebo infikoval do BLR(DE3) pLysS hostitelských buněk (Life Sciences). Vybral se jeden transformant a inokuloval se do 50 ml Terrific Broth obsahující 2 % glukózu, kanamycin (30 µg/ml), chloramfenicol (30 µg/ml) a tetracyklin (12 µg/ml). OD600 v případě kultury přes noc byla 6,0. Kultura kultivovaná přes noc se ředila v 1 l Terrific Broth s 1 % glycerolem a se stejnými antibiotiky. Počáteční OD600 bylo 0,4. Po 2 hodinách hodnota OD600 byla 1,6 a odebral se pre-indukovaný vzorek. Ekvivalent buněk, kdy hodnota OD600 = 1, se centrifugoval a odstranil se supernatant. Pelet z celých buněk se resuspendoval ve 150 µg Tris-EDTA pufru a 150 µl 2x SDS-PAGE vzorkového pufru. Ke konečné koncentraci se přidal IPTG v koncentraci 1 mM. Po 3,5 hodinách se odebral vzorek po indukci a analyzoval se SDS-PAGE (Obr. 4).

Čištění rLP2086:

[0150] rLP2086 se získal z *E. coli* po diferenciální extrakci detergentem. Na rozdíl od P2086 rLP2086 nebyl ve svém přirozeném prostředí podstatně rozpustný v Triton X-100 nebo Zwittergent 3-12. Hmota rLP2086 se rozpustila se sarkosylem, což indikuje, že reaguje se složkami vnější membrány *E. coli* rozdílně než *N. meningitidis*. Po rozpuštění se rLP2086 čistil podobně jako přirozený protein. Tím se odstranila řada kontaminujících proteinů *E. coli* adsorbací na anionotvýmenné pryskyřici při pH 8. Navzdory tomu, že je vyšší než jedna polovina pH jednotky jeho teoretické pI rLP2086 zůstává neadsorbován při pH 8. Dále čištění se dosáhlo adsorbací rLP2086 na kationtovýmennou pryskyřici při pH 4,5.

[0151] Homogenita rLP2086 po SDS-PAGE je zobrazena na Obr. 2. Hodnota hmotnosti rLP2086 stanovená hmotnostní spektrální analýzou MALDI-TOF je 27 836. Tato hmotnost se liší od teoretické hmotnosti 27 100 o 736, které se přibližují hmotnosti N-terminální lipidové modifikace běžné pro bakteriální lipoproteiny. Jak přirozený tak rLP2086 se jeví jako lipoproteiny vnější membrány. Pokus s N-terminálním sekvenováním se blokoval a to odpovídá terminální modifikaci.

Způsoby čištění

[0152] Zmrazené pelety buněk BLR DE3 pLysS exprimující P2086 se resuspendovaly v 10 mM HEPES-NaOH/1mM EDTA/inhibitor proteázy 1 µg/ml Pefabloc SC (Roche) pH 7,4 (HEP) při 20 ml/g vlhké hmotnosti buněk a lyzovaly se v mikrofluidizeru (Microfluidics Corporation Model 110Y). Buněčný lyzát se centrifugoval při 150,000 x g jednu hodinu. Pelet se dvakrát promyl HEP a dvakrát se centrifugoval a výsledný membránový pelet se přes noc zamrazil. Pelet se rozpustil v 10 mM HEPES-NaOH/1 mM MgCl₂/1 % TX-100 pH 7,4 po dobu 30 minut, pak následuje centrifugace při 150 000 x g po dobu 30 minut. To se opakovalo třikrát. Membránový pelet se promyl, jak se uvádí shora v textu, jak se uvádí shora v textu dvakrát s 50 mM Tris-HCl/5 mM EDTA/1 % Zwittergent 3-12 pH 8, následují dvě promytí 50mM Tris-HCl/5 mM EDTA/1 % Zwittergent 3-14 pH 8 a 50 mM Tris-HCl/5 mM EDTA/1 % Zwittergent 3-14/0,5M NaCl pH 8.

[0153] rLP2086 se pak rozpustil s 50 mM Tris-HCl/5 mM EDTA/ 1 % sarkosyl pH 8. Tento sarkosylový extrakt se upravil 1 % Zwittergent 3-14 (Z3-14) a dialyzoval se dvakrát proti 30-tinásobnému nadbytku 50 mM Tris-HCl/5 mM EDTA/1 % Z3-14. Dialyzovaný extrakt rLP2086 se srážel 90 % ethanolem, aby se odstranil zbývající sarkosyl a rozpustil se v 50 mM Tris-HCl/5 mM EDTA/ 1 % Z3-14 pH 8 (TEZ). Nerozpustný materiál se odstranil

centrifugací a supernatant prošel aniontovýměnnou chromatografickou kolonou a rLP2086 se shromáždil v nevázané frakci. Nevázaný materiál se pak dialyzoval dvakrát proti 30-ti násobnému nadbytku 25 mM NaAc/1 % Z3-14 pH 4,5 prošel kationtovýměnnou chromatografickou kolonou. rLP2086 se eluoval s gradientem 0-0,3 M NaCl a analyzoval se SDS-PAGE (barvení podle Coomassie). Stanovilo se, že rLP2086 je z 84 % čistý laserovou densitometrií.

Povrchová reaktivita a baktericidní aktivita antiséra k rLP2086 subrodiny B

[0154] S odkazem na tabulku VII antiséra k čištěnému rLP2086 ze subrodiny B kmen 8529 demonstroval povrchovou reaktivitu ke všem deseti kmenům 2086 subrodiny B testované v testu ELISA z celých buněk. Baktericidní aktivita se detekovala proti devíti z desíti kmenům 2086 subrodiny B exprimující heterologní serosubtypové antigeny, PorA. Tyto kmene jsou reprezentativní kmene způsobující meningokokové onemocnění séroskupina B po celé západní Evropě, v Americe, Austrálii a na Novém Zélandu. Pouze kmen 870227, který nebyl usmrcen v baktericidním testu, reagoval silně s anti-rLP2086 sérem (subrodina B) v testu ELISA použitím celých buněk, což indikuje, že tento kmen exprimuje protein s epitopy běžnými pro P2086.

[0155] U kmenů 2086 subrodiny A uvedené v tabulce VII se také testovala povrchová reaktivita v testu ELISA použitím celých buněk. Dva ze tří těchto kmenů se jeví, že vykazují velmi nízkou reaktivitu, což indikuje, že některý kmen 2086 subrodiny A není zkříženě reaktivní s protilátkami vzniklými proti rLP2086 subrodiny B. Postup PCR amplifikace používaný k identifikaci genu 2086 subrodiny B z kmene 8529 se také provedl v případě kmenů 870446, NMB a 6557. Detekoval se produkt amplifikace č. 2086 subrodina B PCR.

Způsoby imunogennosti:

Příprava antiséra:

[0156] Vakcíny se formulovaly, jak se popisuje dříve např. v příkladu 1. Použila se však dávka 10 µg.

Test ELISA s celými buňkami:

[0157] Suspenze celých buněk *N. meningitidis* se ředila, aby hodnota optické hustoty byla 0,1 při 620 nm ve sterilním 0,01 M fosforečnanu, 0,137 M NaCl, 0,002 M KCl (PBS). Z těchto suspenzí 0,1 ml se přidalo do každé prohlubně na destičkách Nunc Bac T s 96 prohlubněmi (kat. # 2-69620). Buňky se sušily při teplotě místnosti po dobu tří dní a pak se překryly a překlopily a uchovávaly při teplotě 4 °C. Destičky se promyly třikrát promývacím pufrem (0,01 M Tris-HCl, 0,139 M NaCl/KCl, 0,1 % dodecylpoly(oxyethylenglykoether)_n n=23 (Brij-35®, dostupný od firmy ICI Americas, Inc., Wilmington, Delaware), pH 7,0-7,4). Ředění antiséra se připravilo v PBS, 0,05 % Tween-20/azid a 0,1 ml se přeneslo na potažené destičky. Destičky se inkubovaly dvě hodiny při teplotě 37 °C. Destičky se promyly třikrát v promývacím pufru. Kozí anti-myší IgG AP (Southern Biotech) se ředily 1:1 500 v PBS/0,05 % Tween-20, do každé prohlubně se přidalo 0,1 ml a destičky se inkubovaly při teplotě 37 °C 2 hodiny. Destičky se promyly (jak se uvádí shora v textu). Roztok substrátu se připravil ředěním para-nitrofenylfosfátu (Sigma) v 1 M diethanolamin/0,5 mM MgCl₂ až 1 mg/ml. Substrát se přidal na destičky do každé prohlubně 0,1 ml a destičky se inkubovaly při teplotě místnosti jednu hodinu. Reakce se zastavila přidáním 50 µl/prohlubeň 3N NaOH a destičky se odečítaly při 405 nm s referenční hodnotou při 690 nm.

B) Vedoucí sekvence P4:

PCR amplifikace a klonovací strategie:

[0158] Za účelem optimalizovat expresi rLP2086 gen 2086 se klonoval za signální sekvenci P4 netypovatelného *Haemophilus influenzae* (jak se popisuje v publikaci Green et al., 1991). Primery užívané ke klonování lipoproteinu jsou uvedeny v tabulce IV a identifikovaly se sloučeninou č. 5658, 5660, 6473, 6543 a 6385. ORF 2086 se amplifikoval z *N. meningitidis* B kmen 8529 použitím primerů s následující sloučeninou č. 5658 a 5660. ORF 2086 se amplifikoval z *N. meningitidis* seroskupina B kmen CDC 1573 použitím primerů s následující sloučeninou č. 6385 a 5660. ORF 2086 se amplifikoval z *N. meningitidis* seroskupina B kmen 2996 použitím primerů s následující sloučeninou č. 6473 a 6543. N-terminální (5') primery se navrhly, aby byly homologní s genem zralého proteinu 2086 (začíná v poloze serinového zbytku v poloze aminokyseliny č. 3 právě downstream cysteinu). Místo rozeznávané restriční enzymem BamHI (GGATTC) se začlenilo na 5' konec každého N-terminálního primeru a výsledkem je inserce glycinového zbytku ve zralém proteinu v poloze aminokyseliny 2. C-terminální (3') primery se navrhly, aby byly homologní s C-terminálním koncem genu 2086 a zahrnovaly stop kodon stejně jako místo rozeznávané restričním enzymem SphI pro účely klonování. Amplifikovaný fragment z kmene *N. meningitidis* B se klonoval do dočasného vektoru a provedl se skrínig sekvenční analýzou.

[0159] Plazmidová DNA ze správných klonů se štěpila restričními enzymy BamHI a SphI (New England Biolabs, (NEB)). Vektor označený pLP339 se vybral jako expresivní vektor. Tento vektor využívá základní strukturu pBAD18-Cm (jak se popisuje v publikaci Beckwith et al., 1995) a obsahuje P4 lipoproteinovou signální sekvenci a gen P4 netypovatelného *Haemophilus in-*

fluenzae (jak se popisuje v publikaci Green et al., 1991). Vektor pLP339 se částečně štěpil restričními enzymy BamHI a pak se štěpil restričním enzymem SphI. Amplifikované fragmenty 2086 (BamHI/SphI) se každý ligoval odděleně do vektoru pLP339 (částečně BamHI/SphI). Tato klonovací strategie umístila gen zralého 2086 za signální sekvenci lipoproteinu P4. Místo rozeznávané restričním enzymem BamHI zůstává v klonovacím spojení mezi signální sekvencí P4 a genem 2086 (konstrukce plazmidu zobrazená na Obr. 7). Následuje příklad sekvence v klonovacím spojení BamHI:

[P4 signální sekvence]- TGT GGA TCC -[zbývající 2086 zralá nukleokyselinová sekvence]

[P4 signální sekvence]- Cys Gly Ser -[zbývající 2086 zralá aminokyselinová sekvence]

[0160] S odkazem na Obr. 7 se každý amplifikovaný fragment klonoval do modifikovaného vektoru pBAD 18-Cm obsahujícího vedoucí sekvenci P4. Fermentace se provedla v rekombinantním *E. coli* BLR pPX7343, který exprimuje rP4LP2086 (rekombinantní P4 lipidovaný 2086), aby se zvýšila buněčná hustota přidáním další glukózy. Fermentor se naplnil 10 l úplného M9 minimálního média podle publikace Sambrook a doplnil se 1 % glukózou.

[0161] Počáteční koncentrace glukózy ve fermentoru byla 45 g/l. Fermentor se inokuloval, aby se dosáhlo počátečního OD -0,25. Při -OD 25 se přidalo 20 g/l glukózy. Kultura se indukovala 1 % arabinózou při depleci glukózy při OD 63,4. fermentace pokračovala 3 hodiny po indukci. Vzorky se odebraly v čase $t = 0, 1, 2, 3$ po indukci a protein se kvantifikoval použitím BSA. V čase $t = 3$ byl výtěžek -0,35 g/l a 7 % celkového buněčného proteinu. Z kultury o objemu 10 l se shromáždilo celkem 895 g vlhké buněčné pasty.

[0162] Čištění rP4LP2086 se provedlo použitím stejných způsobů, jak se popisuje shora v textu v příkladu 2 sekce A.

Příklad 3

Vývoj genetiky pro nelipidovaný zralý protein 2086:

[0163] K dalšímu hodnocení imunogennosti proteinu 2086 se provedlo klonování a exprese nelipidované formy P2086.

Amplifikace genu ORF 2086 PCR:

[0164] Oligonukleotidy užívané k PCR amplifikaci genu nelipidovaného 2086 jsou uvedeny v tabulce primerů tabulka IV. Gen 2086 z kmene 8529 se amplifikoval s primery identifikovanými sloučeninou č. 5135 a 6406 (SEQ ID NO. 308 respektive 312) jak se označilo v tabulce. Gen 2086 z kmene CDC 1573 se může amplifikovat primery identifikovanými sloučeninou č. 5135 a 6474 (SEQ ID NO. 308 respektive 316). Gen 2086 z kmene 2996 se může amplifikovat s primery identifikovanými sloučeninou č. 6406 a 6605 (SEQ ID NO. 312 a respektive 320).

[0165] Rysy těchto primerů zahrnují v každém primeru syntetické místo rozeznávané restrikčním enzymem BglII, syntetické místo rozeznávané restrikčním enzymem NdeI v sloučenině č. 5135 a 6605. Primer č. 6406 a 6474 amplifikuje gen 2086 s ATG (Met) fúzovaným s druhým aminoterminálním kodonem (ACG) reprezentujícím substituci jediné aminokyseliny (nahrazuje TGC Cys) zralého polypeptidu 2086.

[0166] PCR klonovací vektor byl TOPO-PCR2.1, Invitrogen, Valencia, CA.

[0167] Vektor užívaný k expresi nelipidovaného proteinu 2086 byl pEt9a z Novagen, Madison, WI.

[0168] *E.coli* klonovací kmen byl Top10, Invitrogen, Carlsbad, CA.

[0169] *E.coli* expresivní kmen byl BLR(DE3)pLysS, Novagen, Madison, WI. [0169]

[0170] Kultivačním médiem pro účely klonování bylo Terrific Broth tekuté médium nebo agar v souladu s Sambrook et al., s 1 % sterilní glukózou doplněnou glycerolem a vhodnými antibiotiky (ampicilin nebo kanamycin).

[0171] Čištění plazmidu proběhlo s Qiagen Spin Miniprep Kit (Valencia, CA).

Příprava produkčního kmene nebo buněčné linie pro expresi nelipidovaného 2086:

[0172] Gen 2086 se amplifikoval polymerázovou řetězcovou reakcí (PCR) [AmpliTag a ABI 2400 teplotní cycler, Applied Biosystems, Foster City, CA] z chromozomální DNA získané z meningokokového kmene 8529. PCR amplifikace genu 2086 využívala dvou oligonukleotidových primerů v každé reakci identifikované sloučeninou č. 6474 a 5135 (SEQ ID NO. 316 a 308). Amplifikovaný PCR produkt se klonoval přímo do TOPO-PCR2.1 klonovacího vektoru a selekce se provedla na Terrific Broth agaru doplněném 100 µg/ml ampicilinem a 20 µg/ml X-Gal. Vybraly se bílé kolonie a nechaly se kultivovat. Plazmidová DNA se připravila použitím Qiagen miniprep kit a provedl se skrining plazmidu za účelem stanovení inzerce PCR fragmentu. Plazmidy nesoucí PCR inzert se vystavily sekvenování DNA (Big Dye chemistry použitím sekvenátoru ABI377, Applied Biosystems, Foster City, CA).

[0173] Plazmidy vykazující správnou sekvenci DNA se štěpily restriktivními enzymy BglII a fragment BglII se čistil na gelu použitím čistícího kitu GeneClean II (Bio101, Carlsbad, CA). Čištění

těný fragment BgIII se klonoval do místa rozeznávaného restrikním enzymem BamHI expresivního vektoru pET9a. Selekcce klonů pET9a/2086 se provedla na plotnách Terrific Broth doplněných 30 µg/ml kanamycinem. Klony rezistentní ke kanamycinu se kultivovaly a provedla se miniprep plazmidové DNA. Provedl se skríníng plazmidů za účelem vhodné orientace genu 2086 v místě rozeznávaném restrikním enzymem BamHI. Správně orientované plazmidy reprezentují fúzi T7-antigenu vůči aminokonci genu 2086 (rP2086T7). Tyto genové fúze rP2086T7 se transformovaly do BLR(DE3)pLysS, provedla se selekcce na plotnách s Terrific Broth/Kan a kultury se nechaly růst na Terrific Broth a vyvolala se exprese fúzního proteinu rP2086T7 s 1 mM IPTG (isopropyl β-D-thiogalaktopyranosidem). Fúzní protein rP2086T7 se exprimuje ve vysokých hladinách.

[0174] Tyto fúzní plazmidy se pak štěpí restrikním enzymem NdeI, který deletuje T7-antigen a váže se na gen zralého 2086 přímo na startovací kodon ATG, který poskytuje vektor. Tyto NdeI deletované plazmidy se transformovaly do buněk Top10 a selekcce proběhla na plotnách Terrific Broth/Kan. Kandidáti klonů se nechaly růst a provedla se miniprep plazmidové DNA. Plazmidová DNA se sekvenovala, aby se potvrdila delece a integrity sekvence genu 2086. Tyto plazmidy reprezentují plazmidovou mapu navrženou pPX7328 (Obr. 6). Plazmidy reprezentující správnou sekvenci DNA se transformovaly do BLR(DE3)pLysS, provedla se jejich selekcce na plotnách Terrific Broth/Kan a nechaly se růst v Terrific Broth a indukovala se exprese proteinu 2086 IPTG. Vektor pET9a selhal při expresi zralého proteinu 2086 v kmenu BLR(DE3)pLysS, pokud se odstranil T7-Tag.

Produkce nelipidovaného proteinu 2086:

[0175] Čištěné plazmidová DNA se použila k transformaci expresivního kmene BLR(DE3)pLysS. Buňky BLR(DE3)pLysS nesoucí

plazmidy jsou rezistentní ke kanamycinu a může se u nich indukovat exprese proteinu ProA ve vysoké hladině přidáním 1 mM IPTG. Fúzní protein rP2086T7 se může exprimovat jako nerozpustná inkluzní tělíska v buněčné linii *E.coli* BLR(DE3)pLysS a po-

skytuje ~40 % celkového proteinu. Tento čištěný fúzní protein

se použil k imunizaci myši a generuje významné množství baktericidních protilátek proti heterolognímu meningokokovému kmenu (jak se uvádí v tabulce V).

Mutageneze 2086 nelipidovaného genu:

[0176] Mutageneze PCR primerů se provedla na 5'konci genu 2086. Studie exprese probíhají za účelem stanovení, zda T7-Tag se může odstranit, zatímco vykazuje silnou expresi zralého rP2086T7.

Čištěný nelipidovaný rP2086T7:

[0177] Buňky *E. coli* BLR(DE3)pLysS exprimující nelipidovaný rP2086T7 se lyzovaly v mikrofluidizéru v 10 mM HEPES-NaOH/5 mM EDTA/1 mM Pefabloc SC pH 7,4. Buněčný lyzát se pak centrifugoval při 18 000 xg po dobu 30 minut. Pelet inkluzních tělísek se promyl třikrát s 50 mM Tris-HCl/5 mM EDTA/1 % TritonX-100 pH 8 a pak následuje centrifugace při 24 000 xg 30 min.. Pelet inkluzních tělísek se pak dvakrát promyl 50 mM Tris-HCl/5 mM EDTA/1 % Zwittergent 3-14 pH 8 a pak následuje centrifugace při 24 000 xg 15 min.. Pelet inkluzních tělísek se pak rozpustil v 50 mM Tris-HCl/5 mM EDTA/4 M močovina pH 8 dvě hodiny a pak následuje centrifugace, aby se odstranil nerozpustný materiál. Supernatant (rozpuštěný rP2086T7) se rozdělil do čtyř stejných vzorků. Jeden vzorek se upravil 50 mM Tris-HCl/5 mM EDTA/250 mM

NaCl/2 M močovina pH8 (bez detergentu), jeden se upravil s 50 mM Tris-HCl/5 mM EDTA/250 mM NaCl/2 M močovina/1 % hydrogenovaný Triton X-100 pH8 (TX-100), jeden se upravil 50 mM Tris-HCl/5 mM EDTA/250mM NaCl/2 M močovina/1 % Zwittergent 3-12 pH8 (Z3-12) a jeden se upravil 50 mM Tris-HCl/5 mM EDTA/250 mM NaCl/2 M močovina/1 % Zwittergent 3-14 pH8 (Z3-14) použitím zásobních roztoků. K odstranění močoviny se vzorky dialyzovaly proti odpovídajícímu pufru, který neobsahuje močovinu a 60 mM NaCl k redukci koncentrace NaCl. Nerozpustný materiál se odstranil centrifugací při 2 000 xg po dobu 15 minut a výsledný supernatant (opětně balený rP2086T7) se použil k dalším experimentům. Homogenita rP2086T7 byla 91 až 95 %, jak se stanovilo použitím SDS-PAGE barveného podle Coomassie a laserovou densitometrií.

Postup imunogennosti - jak se popisuje v příkladu 2

[0178] Tento čištěný fúzní protein se použil k imunizaci myší a k vytvoření podstatné hladiny baktericidních protilátek proti heterolognímu meningokokovému kmeni (jak se uvádí v tabulce V dále v textu).

Tabulka V: Baktericidní titry myších protilátek pro rP2086T7

Myší sérum	popis	Heterologní kmen/ H44/76
AF780 týden 6	r2086T7, 10 ug	3 200
Týden 0 sou- bor	Pre-imunitní sérum	10
AE203 týden 6	rLP2086, 10 ug (pozitivní kon- trola)*	6 400
(* pozitivní kontrolní sérum se vytvořilo imunizací myší s rLP2086)		

Příklad 4**Vývoj chimérických klonů ORF 2086**

[0179] N-terminální oblast genu 2086 z kmene CDC-1573 obsahuje opakovaný segment, který není přítomný v genu 2086 z kmenů 8529 a 2996 (Obr. 8). Je zřejmé, že tento opakovaný segment je odpovědný za zesílenou expresi rekombinantního proteinu 2086 ze dvou expresivních systémů založených na *E.coli* (pET a pBAD). Síla exprese rekombinantního proteinu z CDC-1573 2086 byla podstatně vyšší v expresivních systémech pET a pBAD, jak se porovnává s rekombinantní expresí z genu 2086 s kmeny 8529 a 2996 použitím stejných systémů. N-terminální oblast genu 2086 ze všech tří řetězců je relativně homologní s výjimkou uvedeného opakovaného segmentu. Proto má význam se domnívat, že fúze N-konce CDC-1573 s geny 2086 z kmenů 8529 a 2996, které z těchto genů exprimovaly hladiny rekombinantního proteinu 2086 se zvýší použitím systému pET a pBAD.

Materiály a způsoby:

[0180] Chromozomální DNA z kmenů 8529 a 2996 se čistila a použila se jako templát pro PCR amplifikaci chimérického genu 2086. PCR primery se sloučeninou č. 6721 a 5135 (SEQ ID NO. 321 a respektive 308) se použily k amplifikaci chimérického genu 2086 z kmene 8529 a PCR primery se sloučeninami č. 6721 a 6605 (SEQ ID NO. 321 a respektive 320) se použily k amplifikaci chimérického genu 2086 z kmene 2996. PCR produkty se klonovaly přímo do vektoru PCR2.1 TOPO od firmy Invitrogen a pak se provedl skrínig aekvenční analýzou DNA za účelem idnetiifkovat intaktní chimerický gen 2086. Gen se pak štěpil z vektoru PCR2.1 restrikčním enzymem BgIII a BgIII fragment se začlenil do místa rozeznávaného restrikčním enzymem BamHI plazmidu pET9a. Provedl se skrínig inzertů v plazmidu, zda jsou umístěné ve vhodné orientaci a pak se štěpily restrikčním enzymem NdeI. Lineární NdeI fragment se samostatně ligoval, aby se dosáhlo delece malého NdeI fragmentu, který obsahuje T7-tag sekvenci, kterou přispívá vektor pET9a. Tato delece je přímo spojena s promotorem T7 s 5'koncem chimérického genu 2086. NdeI deletovaný plazmid se transformoval do *E.coli* kmen BL21(DE3) a provedl se skrínig kolonií rezistentních na kanamycin, aby se stanovila exprese chimérického proteinu 2086 indukované IPTG.

[0181] Počáteční studie indikují, že chimerický gen 2086 z kmene 2996 exprimuje přibližně dvakrát více rekombinantního proteinu ve srovnání s přirozeným genem 2996/2086, pokud se exprimuje v systému pET9a. Systém pBAD se ještě netestoval.

[0182] Ačkoliv se provedl pouze jediný experiment, data indikují, že v případě chimérického genu 2086 dochází k zesílení funkce. Vytvoření CDC-1573 N-terminálních fúzí s geny 2086 z kmenů 8529 a 2996 poskytuje zesílení exprese rekombinantního proteinu 2086.

Příklad 5

2086 PCR skrining kmenů *N. meningitidis*

[0183] Za účelem stanovit konzervaci genu 2086 mezi klinickými izoláty se provedla PCR amplifikace 88 kmenů *N. meningitidis*.

[0184] Počáteční PCR identifikace ORF 2086 využívala primery uvedené v tabulce IV (uvádí se v příkladu 2 shora v textu) identifikované sloučeninou č. 4623, 4624 a 4625 (SEQ ID NO. 303, 304 a respektive 305). Tyto primery se navrhly na základě Sangerovy sekvence *N. meningitidis* seroskupina A. Aby se umožnil skrining velkého množství kmenů, navrhly se pro gen 2086 vnitřní primery. Provedl se skrining celkem 88 kmenů *N. meningitidis* pomocí PCR s nově navrženými primery 2086 identifikovanými č. 5005 a 5007 (SEQ ID NO. 306 a 307). S těmito primery je

možné identifikovat gen 2086 ze 63 z 88 (~70 %) kmenů *N. meningitidis* (tabulka VI-A).

[0185] Expandované oblasti obklopující gen 2086 v Sangerově sekvenci *N. meningitidis* seroskupina A a TIGR sekvenci *N. meningitidis* seroskupina B se testovaly a provedl se jejich alignment. Primery se navrhly, aby korespondovaly s oblastmi upstream a downstream genu 2086. Účelem bylo použít tyto primery k amplifikaci více než celé délky proteinu 2086 z různých kmenů *N. meningitidis* k porovnání sekvencí. PCR amplifikace jednoho kmene (6557) použitím sloučeniny č. 6470 a 6472 (SEQ ID NO: 313 a respektive 314) vedly k produktu s nízkým výtěžkem. Produkt amplifikovaný z kmene 6557 se klonoval a v případě plazmidové DNA se provedla sekvenční analýza. Výsledky indikují

nový typ genu 2086 s větší sekvenční variabilitou, než bylo

možné dříve spatřit. Gen 2086 z kmene 6557 byl ~75 % shodný na

úrovni aminokyseliny s jinými sekvenovanými kmeny. Je zajímavé, že kmen 6557 je jeden z 30 % kmenů, které vycházejí z předchozího testování 2086 PCR skríníngem negativně, jak se popisuje shora v textu.

[0186] Navrhly se vnitřní primery specifické pro C-terminální variabilní oblast v kmeni 6557. Tyto primery se použily ke

skríníngu variabilního genu 2086 ve ~30 % kmenů, které se dříve

testovaly negativně v případě 2086 PCR skríníngem. Všechny dostupné kmeny *N. meningitidis* (n = 88), u kterých se provedl skríníng PCR těmito nově idnetifikovanými vnitřními primery 2086 (idnetifikované č. 6495 a 6496; SEQ ID NO. 159 a respekti-

ve 160). Pouze ~30 % kmenů *N. meningitidis*, které v dřívějším

testu PCR vychází jako negativní, 2086 se jeví v tomto skríníngu PCR pozitivní. Sada genů amplifikovaných z předchozích PCR

negativních kmenů (~30 %) by mohla reprezentovat nový typ genu

2086 nebo druhou rodinu genů 2086 a je označena jako 2086 sub-

rodina A. Sada genů 2086 amplifikovaných ze ~70 % kmenů 8529

získaných primerů jsou označeny jako subrodina B.

[0187] Příklady subrodiny A genů 2086 jsou bez omezení liše číslované sekvence SEQ ID NO: 1 až 173. Příklady subrodiny genů B 2086 jsou bez omezení liše číslované sekvence SEQ ID NO: 175 až 251.

[0188] Kmeny *N. meningitidis* užívané k PCR amplifikaci se vybraly s následující tabulky, tabulka VI-A a tabulka VI-B. Kmeny uvedené v tabulkách jsou neomezené příklady kmenů *N. meningitidis*. Kmeny uvedené v tabulce VI-A se klasifikovaly do 2086 protein subsrodina A a kmeny uvedené v tabulce VI-B se klasifikovaly do 2086 protein subsrodina B. Kmeny uvedené v každé tabulce jsou rozděleny do skupin podle serosubtypů. V tabulce jsou uvedeny kmeny dostupné z následujících 4 zdrojů: MPHL- Manchester Public Health Laboratory, Manchester, UK; RIVM, Bilthoven, The Netherlands; University of Iowa, College of Medicine, Department of Microbiology, Iowa City, IA; a Walter Reed Army Institute of Research, Washington, D.C..

Tabulka VI-A

Kmen	Serosubtyp	zdroj
M97 251854	B:4z, PI:4	MPHL
M98 250622	B:2b, PI:10	MPHL
M98 250572	B:2b, PI:10	MPHL

Kmen	Serosubtyp	zdroj
M98 250771	B:4z, PI.22,14	MPHL
M98 250732	B:4z, PI.22,14a	MPHL
M98 250809	8:15, PI:7,16	MPHL
M97 252697	B:1, PI:6, P1.18,25	MPHL
M97 252988	B:4, PI:6, P1.18,25,6	MPHL
M97 252976	B:4, PI:6, P1.18,25	MPHL
M97 252153	B:4, PI:6, P1.18,25	MPHL
M97 253248	B:15,PI:7, NT, 16	MPHL
CDC1610	P1:NT 4(15), P1.18-7,16-14	CDC
CDC1521	P1.6,3 2b(4)	CDC
CDC1034	P1.7 4(15)	CDC
L8	P1.7,1 15(4)	Walter Reed
CDC1492	P1.7,1 4(15)	CDC
870446	P1.12a,13	RIVM
CDC2369	P1.(9),14	CDC
6557	P1.(9),14, P1.22a,14a	RIVM
2996	P1.5,2, P1.5a,2c	RIVM
NmB	P1.5,2, P1.5a,2c	UIOWA
L3	P1.5,2	Walter Reed
B16B6	P1.5,2	RIVM
CDC1135		CDC
L5	P1.NT, P1.21-6,1	Walter Reed
L4	P1.21,16	Walter Reed
W135		Walter Reed

Kmen	Serosubtyp	zdroj
C11	C:16, P1.7, 1	CDC
Y		Walter Reed

Tabulka VI-B

kmen	Serosubtyp	zdroj
M98 250670	B:1, PI:4	MPHL
M98 250024	B:1, PI:4	MPHL
M97 253524	B:1, PI:4	MPHL
M97 252060	B:1, PI:4	MPHL
M97 251870	B:4z, PI:4	MPHL
M97 251836	B:4z, PI:4	MPHL
M97 251830	B:4z, PI:4	MPHL
M97 251905	B:4z, PI:4	MPHL
M97 251898	B:4z, PI:4	MPHL
M97 251885	B:4z, PI:4	MPHL
M97 251876	B:4z, PI:4	MPHL
M97 251994	B:4z, PI:4	MPHL
M97 251985	B:4z, PI:4	MPHL
M97 251957	B:4z, PI:4	MPHL
M97 251926	B:4z, PI:4	MPHL
M97 252045	B:4z, PI:4	MPHL
M97 252038	B:4z, PI:4	MPHL
M97 252026	B:4z, PI:4	MPHL
M97 252010	B:4z, PI:4	MPHL

kmen	Serosubtyp	zdroj
M97 252098	B:4z, PI:4	MPHL
M97 252083	B:4z, PI:4	MPHL
M97 252078	B:4z, PI:4	MPHL
M98 250735	B:4z, PI:15	MPHL
M98 250797	B:4z, PI:15	MPHL
M98 250768	B:4z, PI:15	MPHL
M98 250716	B:2b, PI:10	MPHL
M98 250699	B:4z, PI:10	MPHL
M98 250393	B:4z, PI:10	MPHL
M98 250173	B:4z, PI:10	MPHL
M97 253462	B:4z, PI:14	MPHL
M98 250762	B: 15, PI:7,16	MPHL
M98 250610	8:15, PI:7,16	MPHL
M98 250626	8:15, PI:7,16	MPHL
M97 250571	B:15, PI:16	MPHL
M97 252097	B:15, PI:16, P1.7b,16	MPHL
M97 253092	B:1, PI:6	MPHL
M97 252029	B:15,PI:7, NT	MPHL
M97 251875	B:15,PI:7, NT	MPHL
CDC1127	PI.7,16 4(15)	CDC
CDC982	PI.7,16 4(15)	CDC
CDC1359	PI.7,16 4(15)	CDC
CDC798	PI.7,16 15(4)	CDC
CDC1078	PI.7,16 15(4)	CDC

kmen	Serosubtyp	zdroj
CDC1614	P1.7,16 15(4)	CDC
CDC1658	P1.7,16 15(4)	CDC
H44/76	P1.7,16 15(4)	RIVM
CDC1985	P1.7,13 4(15)	CDC
L6	P1.7,1 ?(4)	Walter Reed
CDC1573	P1.7,1 4(15)	CDC
L7	P1.7, (9), 1	Walter Reed
CDC937	P1.7,3, P1.7b,3	CDC
8529	P1.7,3, P1.7b,3	RIVM
880049	P1.7b,4	RIVM
CDC2367	P1.15 4(15)	CDC
H355	P1.19,15	RIVM
CDC1343	P1.14 4(15)	CDC
M982	P1.22,9	RIVM
870227	P1.5c,10	RIVM
B40	P1.5c,10	RIVM
5315	P1.5c,10	RIVM
CDC983	P1.5,2	CDC
CDC852	P1.5,2	CDC
6940	P1.18,25 (6)	RIVM
A4		

[0189] Jiné kmeny jsou snadno dostupné jako izoláty z infikovaných jedinců.

Příklad 6

Reaktivita antiséra rLP2086 proti meningokovým kmenům:

[0190] Následující tabulka, tabulka VII, ukazuje zkříženou reaktivitu a zkříženou ochranu rLP2086, jak se popisuje shora v textu. Jak je uvedeno v tabulce rLP2086 se zpracoval a analyzoval použitím různých postupů zahrnujících titry testu ELISA (WCE) s celými buňkami, baktericidní test (BCA) a test mladých krys (IR) ke stanovení bakteriální buněčné povrchové reaktivity polyklonálních protilátek vytvořených použitím proteinu 2086.

Tabulka VII

Reaktivita rLP2086-8529 antiséra proti více meningokokovým kmenům				
kmen	Serosubtyp	WCE	BC	IR
2086 subrodina A				
870446	P1.12a,13	808 615	>800	
NmB	P1.5a,2c	47 954	<100	
6557	P1.22a,14a	169 479	<25	-
2086 subrodina B				
880049	P1.7b,4	1 402 767	100	+
H44/76	P1.7,16	8 009 507	>6400	
H355	P1.19,15	10 258 475	3 200	+
6940	P1.18,25 (6)	5 625 410	800	
870227	P1.5c,10	4 213 324	<25	+
252097	P1.7b,16	10 354 512	>800	
539/8529	P1.7b,3	11 635 737	3 200	
M982	P1.22,9	1 896 800	800	
CDC-1573	P1.7a,1	208 259	25	
CDC-937	P1.7b, (3)	9 151 863	>800	

Příklad 7

[0191] Připravily se různé konstrukce exprimující ORF2086. Následující tabulka VIII je tabulka konstrukce r2086, která se připravila pro účely vykazující příklady a ilustrující implementaci předmětného vynálezu bez omezení.

Tabulka VIII

Souhrn konstrukce r2086						
konstrukce	Promotor	Vedoucí sekvence	exprese	extrakce	vektor	% celkového proteinu
pPX7340	T7	přirozená	Coomassie	Rozpustný v sarkosylu	pET27b	2,5 % zpracovaný lipoprotein
pPX7341	T7	P4	Coomassie	Rozpustný v sarkosylu	pET27b	5 % zpracovaný lipoprotein
pPX7343	Arabinose	P4	Coomassie	Rozpustný v sarkosylu	pBAD18cm	7 až 10 % zpracovaný lipoprotein
pPX7325	T7	T7-tag fúzní/zralý	Coomassie	Inkluzní tělíska	pET9a	40 až 50 % zralý protein
pPX7328	T7	zralý	Coomassie	rozpustný	pET9a	10 % zralý protein

Příklad 8

[0192] V dalších studiích s proteiny vnější membrány s deplecí LOS se identifikovaly další kmeny produkující proteiny vnější membrány než je PorA, které jsou schopny vyvolat baktericidní protilátky ke kmenům exprimujícím heterologní subtypy. Dále se popisují studie k identifikaci dalších proteinů v souladu s jedním provedením předmětného vynálezu a přesněji lipoproteinu vnější membrány, které mohou redukovat počet proteinů požadovaných v meningokokovém imunologickém prostředí. Tyto další studie doplňují studie popsané v předchozích příkladech.

[0193] Subcelulární frakce, diferenciální detergentní extrakce, izoelektrická fokuzace a iontovýmenná chromatografie se použily s imunizací a baktericidními testy proti více kmenům k identifikaci malých skupin proteinů, které jsou středem zájmu. Přímé sekvenování hlavních složek indikovalo, že N-konce

se blokovaly. Vnitřní proteonové sekvence se získaly sekvenováním polypeptidů získaných z chemického a proteolytického štěpení. Genomová sekvence meningokokového kmene skupiny A se získala z Sangerova centra a analyzovala se skupinou Bioinformatic použitím existujících a vlastních algoritmů za vzniku zkoumané databáze. Data peptidové sekvence indikovala, že ORF2086 je středem zájmu. Primery založené na tomto ORF se použily v PCR genu P2086 z kmene 8529. Analýza sekvence genu, skutečnost, že N-konec je blokován a jeho subcelulární lokace indikovala, že P2096 je lipidovaný protein vnější membrány LP2086), rLP2086-8529 a varianta z jiných meningokokových kmenů se rekombinantně exprimovala jako lipoprotein v *E.coli* použitím *H. influenzae* P4 signální sekvence. Tyto rekombinantní proteiny se izolovaly z membrán *E. coli* diferenciální detergentovou extrakcí, se čistily použitím iontovýměnné chromatografie a použily se k imunizaci myši. Myši anti-LP2086 séra umožňovala baktericidní aktivitu proti několika různým typům kmenů *N.meningitidis*. Další analýza genů P2086 z řady kmenů *N. meningitidis* ukázala, že tyto sekvence spadají do dvou skupin označených subrodina A a B (Obr. 12). Antisérum proti proteinům subrodiny B byla baktericidní proti devíti kmenům proteinů subrodiny B a jednomu kmeni exprimujícímu protein subsrodiny A. Antiséra subrodiny A byla baktericidní proti kmenům subrodiny A. Směs jednoho rPorA a jednoho rLP2086 vyvolala komplementární protilátky umožňující rozsáhlejší pokrytí vakcíny, než jsou protilátky vyvolané libovolným samotným proteinem.

[0194] Tato pozorování vedou k následujícím závěrům. Antigeny rLP2086 jsou schopny vyvolat baktericidní protilátky proti meningokokovým kmenům, které exprimují heterologní PorA a heterologní proteiny P2086. Rodina antigenů P2086 je možné použít jako vakcínu nebo imunogenní buď samotnou nebo v kombinaci s jinými neisseriálními antigeny.

[0195] Další text popisuje podrobně následující studii. Zjistilo se, že komplexní směs rozpuštěných proteinů vnější membrány (sOMP) vyvolává PorA nezávislé baktericidní protilátky proti kmenům exprimujícím heterologní PorA proteiny. Postup diferenciální detergentové extrakce, izoelektrická fokuzace a iontovýměnná chromatografie následovaný imunizací myši se použil ke zjištění imunologicky aktivních složek.

[0196] V každém kroku se u sér testovala povrchová reaktivita a baktericidní aktivita proti několika kmenům, které obsahují serosubtypové antigeny, které jsou reprezentanty celosvětové epidemiologie meningokokového onemocnění.

[0197] Tento postup separace a imunizace se použil k identifikaci nového zkříženě reaktivního imunogenního kandidáta pro skupinu B *N. meningitidis*.

[0198] Vytvoření PorA deficientních kmenů - porA chromozomální lokus se klonoval do plazmidu pPX7016 z kmene 2996. V plazmidu promotor porA, S/D box a první 38 N-terminální kodony se deletovaly a nahradily se kazestou exprimující KanR. Plazmidy se linearizovaly restrikcími enzymy a přirozeně se transformovaly do kmenů serosubtypu PI:5,2; PI:9; PI:7,16; PI:15; PI:4; PI:3 & PI: 10. Vybraly se transformanti rezistentní ke kanamycinu a provedl se skrínig ztráty PorA monoklonálními protilátkami specifickými pro serosubtyp v testu ELISA.

[0199] Baktericidní test: Popisuje se v publikaci Mountzourous, K.T. and Howell, A.P. Detection of Complement-Mediated Antibody-Dependent Bactericidal Activity in a Fluorescence-Based Serum Bactericidal Assay for Group B Neisseria meningitidis. J Clin Microbiol. 2000;38:2878-2884.

[0200] Test ELISA s celými buňkami: Suspenze celých buněk *N. meningitidis* se ředila tak, aby optická hustota byla 0,1 při 620 nm ve sterilním 0,01 M fosforečnanu, 0,137 M NaCl, 0,002 M KCl (PBS). Z této suspenze se přidalo do každé prohlubně destiček Nunc Bac T (kat.# 2-69620) s 96 prohlubněmi 0,1 ml. Buňky se sušily na destičkách při teplotě 37 °C přes noc. Destičky se promyly třikrát promývacím pufrem (0,01 M Tris-HCl, 0,139M NaCl/KCl, 0,1 % Brij-35, pH 7,0-7,4). Ředění antisera se provedlo v PBS, 0,05 % Tween-20/Azid a 0,1 ml se přeneslo na potažené destičky a ty se inkubovaly při teplotě 37 °C. Destičky se pak třikrát promyly promývacím pufrem. Kozí-anti-myší IgG AP (Southern Biotech) se ředily 1:1 500 v PBS/0,05 % Tween-20, do každé prohlubně se přidalo 0,1 ml a destičky se inkubovaly při teplotě 37 °C 2 hodiny. Destičky se promyly (jak se uvádí shora v textu). Roztok substrátu se ředil paranitrofenylfosforečnanem (Sigma) v diethanolaminu v koncentraci 1mg/ml. Na destičky se přidalo 0,1 ml substrátu do jedné prohlubně a vše se inkubovalo při teplotě místnosti jednu hodinu. Reakce se zastavila 50 ul/prohlubeň 3 N NaOH a destičky se odečítaly při 405 nm s referenční hodnotou odečtenou při 690 nm.

[0201] Indukce rekombinantního PorA: Kmeny BLR(DE3)/pET9a se nechaly růst přes noc při teplotě 37 °C v HySoy půdě (Sheffield Products) doplněné Kan-30 a 2 % glukózou. Ráno se kultury kultivované přes noc ředily 1/20 v HySoy Broth Kan-30 a 1 % glycerol a nechaly se růst při 37 °C 1 hodinu. Tyto kultury se indukovaly přidáním IPTG v konečné koncentraci 1 mM. Kultury se nechaly růst po dobu 2 až 3 hodiny a pak se shromáždily.

[0202] Čištění rekombinantního PorA: rPorA se rozpustil z inkluzních tělísek *E. coli* 8 M močovinou a opětně se sbalil dialýzou proti pufru, který neobsahuje močovinu. Opětně sbalený rPorA se pak koncentroval diafiltrací a pufr se vyměnil na ko-

loně G25 za NaPO_4 pH6. Dialyzovaný rPorA se pak zavedl na kationtovýměnnou kolonu (S Fractogel) a eluoval se 1 M NaCl.

[0203] sOMP z kmene 8529 (P1.7-2,3) vyvolal PorA nezávisle na baktericidní aktivitě u myši proti kmenům exprimujícím heterologní serotypy. Následující tabulka IX ukazuje baktericidní aktivitu u studovaných kmenů.

Tabulka IX

Testovaný kmen	Serosubtyp	BC ₅₀ Titr ¹
539 539 PorA-	P1.7-2,3	1 280
	NST ²	1 080
H44/76 H44/76 PorA-	P1.7,16	3 285
	NST	2 620
H355 H355 PorA-	P1.19,15	>1 350
	NST	>1 350
880049 880049 PorA-	P1.7-2,4	290
	NST	85
M982 M982 PorA-	P1.22,9	85
	NST	<50

[0204] Příprava sOMP: Membrány *N. meningitidis* se extrahovaly s TX-100, Zwittergent 3-14 a Zwittergent 3-14/0,5 M NaCl. sOMP se rozpustily v extraktu Zwittergent 3-14/0,5 M NaCl. Extrakce se provedla použitím postupu dobře známého v oboru, jak se např. popisuje v dokumentu patent USA č. 6,355,253.

[0205] Imunogennost: Samice myši Swiss-Webster se imunizovaly 25 μg celkového proteinu upraveného adjuvans s 20 μg QS-21

v týdnu 0 a 4. Konečné vykrvácení a analýza dat se provedla v týdnu 6.

1 baktericidní titry (BC_{50}) prezentované jako reciproční ředění antiséra, které redukuje počet živých buněk na 50 %. Týden 0 normální myší sérum vykazovalo titry $BC_{50} < 25$.

2 NST = neserotypovatelné

[0206] V tabulce X se nachází souhrn čištění a charakterizace rekombinantního lipidovaného P2086 (rLP2086) jak pro subrodinu A tak i B.

Čištění subrodina A rLP2086

Tabulka X

Varianta rLP2086	A.A. homologie (%) ¹	teoretické pI	čistota (%) ²
870446	75	6,1	80
2996	71	5,9	95
M97 252988	71	6,3	96
C11	68	6,4	82
M98 250771	62	6,1	83

Čištění subrodina B rLP2086

Tabulka XI

Varianta rLP2086	A.A. homologie (%) ¹	teoretické pI	čistota (%) ²
8529	100	7,5	96
M982	94	6,3	96
88049	92	6,2	90

Varianta rLP2086	A.A. homologie (%) ¹	teoretické pI	čistota (%) ²
CDC1573	87	5,6	93

[0207] Způsob čištění: Všechny varianty se rozpustily z *E. coli* membrán s TX-100 (s výjimkou rLP2086-8529, které se rozpustily sarkosylem nebo v močovíně). Dalšího čištění se dosáhlo kombinací aniontovýměnné chromatografie (TMAE), chromatografie s exkluzí podle velikosti a/nebo kationtovýměnné chromatografie (S Fractogel) v Tris-HCl nebo NaPO₄ pufru.

1. aminokyselinová homologie ve srovnání s P2086 z kmene 8529

2. čistota, jak se stanovila SDS-PAGE a laserovou densitometrií pruhu barveného podle Coomassie (barvení Simply Blue).

[0208] Testovala se imunogennost člena subrodiny B rLP2086-8529 proti homologním a heterologním kmenům.

[0209] Tabulka XII dále v textu ukazuje imunogennost člena subrodiny B rLP2086-8529 testovanou proti homologním a heterologním kmenům.

Tabulka XII

Cílový kmen	Subrodina P2086	Serosubtyp cílového kmene	A.A. homologie ^a	Titry v testu ELISA ^b celé buňky	BC ₅₀ titr ^c
539	B	P1.7-2,3	100	>1 458 000	3 200
H44/76	B	P1.7,16	100	>1 458 000	3 200
H355	B	P1.19,15	100	>1 458 000	3 200
CDC937	B	P1.7-2,3-4	100	>1 458 000	>800
M97 252097	B	P1.7-2,16	100	>1 458 000	>800
870227	B	P1.5-2,10	100	>1 458 000	<25
6940	B	P1.18,25,6	97	900 162	>800
M982	B	P1.22,9	94	435 909	200
880049	B	P1.7-2,4	92	349 912	400
CDC 1573	B	P1.7-1,1	87	102 508	25
870446	A	P1.12-1,13	71	389 829	800
M98 250771	A	P1.22,14	62	139 397	<25
NmB	A	P1.5-1,2-2	71	<2 000	<25

[0210] Postup vakcinace: Myši Swiss-Webster 6 až 8 týdnů staré se imunizovaly 10 µg rLP2086-8529 + 20 µg QS-21 v týdnu 0 a 4. Provedla se analýza dat v týdnu 6 při konečném vykrvácení.

a) aminokyselinová homologie se porovnávala s rLP2086-8529

b) konečné titry se vyjádřily jako reciproční hodnota ředění při absorpci = 0,1

c) titry BC-50 reprezentované jako reciproční hodnota ředění anti-séra, které redukuje počet životaschopných buněk o 50 %. V týdnu 0 normální myší sérum vykazovalo BC50 titry <10.

[0211] Tabulka XIII vykazuje imunogenost člena subrodiny B rLP2086-2996, která se testovala proti homologním a heterologním kmenům.

Tabulka XIII

Cílový kmen	Subrodina P2086	Serosubtyp cílového kmene	A.A. Homologie ^a	Titř v testu ELISA ^b s celými buňkami	BC ₅₀ titr ^c
NmB	A	P1.5-1,2-2	99,6	8 979	<25
870446	A	P1.12-1,13	99	<1 458 000	>800
M97 252697	A	P1.18,25,6	98	320 732	>800
6557	A	P1.22-1,14-1	98	17 319	<25
M98 250732	A	P1.22,14-1	89	241 510	>800
M98 250771	A	P1.22,14	89	447 867	800
H44/76	B	P1.7,16	72	56 386	<25

[0212] Postup vakcinace: Samice myší Swiss-Webster se imunizovaly 10 µg rLP2086-2996 + 20 µg QS-21 v týdnu 0 a v týdnu 4. Analýza dat se provedla v týdnu 6 po konečném vykrvácení.

1. aminokyselinová homologie P2086 v porovnání s rLP2086-2996

2. koncové titry vyjádřené jako reciproční hodnota ředění při absorbanci = 0,1

3. baktericidní (BC50) titry prezentované jako reciproční hodnota ředění anti-séra, které redukuje počet životaschopných buněk o 50 %. V týdnu 0 normálnější sérum vykazovalo BC50 titry <10.

[0213] Tabulka XIV uvedená dále v textu ukazuje, že antisérum k rLP2086 a rPorA je komplementární se smíšenou a testovanou baktericidní aktivitou.

Tabulka XIV

Antisera	H44/76 (P1.7,16)	NMB (P1.5- 1,2-2)	880049 (P1.7- 2,4)	H355 (P1.19,15)	870227 (P1.5- 2,10)	6557 (P1.22- 1,14-1)
Anti-rLP2086 + tři rPorA antiséra	>3 200	>800	200	>800	200	200
kontroly						
anti-rLP2086	6 400	<25	100	3 200	<25	<25
Odpovídající monovalentní rPorA antisera	-	1 600	-		200	400

[0214] Postup vakcinace: 6 až 8 týdnů staré samice myši Swiss-Webster se imunizovaly buď 10 µg rLP2086-8529/20 µg QS-21 nebo 15 µg rPorA/100 µg MPL v týdnu 0 a 4. Analýza dat se provedla v týdnu 6 při konečném vykrvácení.

[0215] Baktericidní titry (BC500) vyjádřené jako reciproční hodnota ředění anti-séra redukují počet životaschopných buněk o 50 %. V týdnu 0 normální myši séra vykazovala BC50 titry <10.

[0216] Tabulka XV ukazuje, že směsi rLP2086 subrodin a dva rPo-rA vyvolávají u myši baktericidní protilátky.

Tabulka XV

	H44/76	6940	880049	M982	M98 250771	M98 250732	M97 252697	870446	NmB	6557
	SfB ^b	SfB	SfB	SfB	SfA ^b	SfA	SfA	SfA	SfA	SfA
	P1.7,16	P1.18 25,6	P1.7- 2,4	P1.22 ,9	P1.22,1 4	P1.22,1 4-1	P1.18,2 5,6	P1.12- 1,13	P1.5- 1,2-2	P1.22 - 1,14- 1
Antigen										
rLP2086- 8529 + rLP2086- 2996	>800	>800	200	400	800	>800	>800	>800	-	<25
rLP2086- 8529 + rLP2086- 2996 + rP1.5-1,2-2 + rP1.22- 1,14-1	>800	800	100	200	400	400	>800	>800	>800	200
Monovalent- ní kontro- ly ^c	>800	>800	200	400	800	>800	>800	>800	>800	800

[0217] Postup vakcinace: Samice myši Swiss-Webster 6 až 8 týdnů staré se imunizovaly 10 µg každého proteinu + 20 µg QS-21 v týdnu 0 a 4. Analýza dat se provedla v týdnu 6 po konečném vykrvácení.

1. Baktericidní (BC50) titry prezentované jako reciproční hodnota ředění anti-sera, které redukuje počet životaschopných buněk o 50 %. V týdnu 0 normální myší sérum vykazovalo hodnoty titrů BC50 <10.
2. SfA - subrodina A, SfB - subrodina B
3. Relevantní monovalentní kontrola: rLP2086-8529, rLP2086-2996, rP1.5-1,2-2 nebo rP1.22-1,14-1 antisera

[0218] Následuje souhrn výsledků shora v textu popsanych studií. Anti-rLP2086 antisérum je baktericidní proti kmenům 13/16. Dvanáct kmenů exprimujících různé subtypy se usmrtily anti-P2086 sérem. Baktericidní aktivita anti-rLP2086 séra je komplementární k anti-rPorA séru. Směsi P2086 a PorA vyvolávají komplementární baktericidní protilátky u myší. Diferenciální detergentová extrakce, čištění a imunizace ve spojení s funkčním protilátkovým testem proti řadě kmenů se může použít k identifikaci nových vakcinačních kandidátů. P2086 se identifikoval jako vakcinační kandidát, který vyvolává baktericidní protilátky proti kmenům heterologním jak u P2086 tak i rPorA. Tudíž rodina 2086 proteinů se může použít k vakcinaci buď samotná nebo v kombinaci s jinými neisseriálními kmeny.

Příklad 9

[0219] V souladu s předchozími příklady u další meningokokálních kmenů různých seroskupin se provedl skrining PCR v přítomnosti genu ORF2086. Nakonec se provedl skrining 100 meningokokových kmenů. Dále se popisuje studie a její výsledky. Tyto výsledky doplňují data z předchozích příkladů.

[0220] Dvě sady vnitřních PCR primerů specifických pro C-terminální variabilní oblasti se využívaly k diskriminaci mezi sekvencemi genů subsrodiny A a B. Přítomnost PCR amplifikované-

ho produktu přibližně 350 bp indikovala, že genové sekvence 2086 byly přítomné na chromozomu. Všechny kmeny vykazovaly jediný PCR produkt v očekávané velikosti. Provedl se alignment nukleotidových sekvencí 55 genů ORF2086 v plné délce (DNASTar MegAlign) a použily se k vytvoření fylogenetického stromu (Obr. 12).

[0221] Devět z těchto genů 2086 se rekombinantně exprimovaly jako rLP2086 lipoprotein v promotorovém systému indukovatelném pBAD arabinózou a tři z těchto genů se rekombinantně exprimovaly jako rP2086 nelipidovaný protein v IPTG indukovatelném pET systému. Tyto rekombinantní proteiny se exprimovaly v *E. coli* B. Čištěný rekombinantní protein se použil k imunizaci myši a myší antisérum se testovalo za účelem stanovení IgG titrů a jejich baktericidní aktivity proti různým heterologním meningokovým kmenům.

[0222] ORF 2086 se amplifikovaly PCR z jednoho následujícího templátu: celé meningokokové buňky, čištěné chromozomální DNA a plazmidová DNA.

[0223] Devět genů ORF 2086 se klonovalo do vektoru pLP339, který fúzuje *Haemophilus* P4 vedoucí sekvenci s 5' koncem ORF 2086 genů. *E. coli* kmen BLR se použil jako hostitelský kmen pro rekombinantní expresi lipidované formy rP2086 z pBAD/ORF 2086 klonů. (Obr. 10A). Promotor pBAD indukovatelný arabinózou řídí expresi P4 signal/ORF 2086 fúzní protein, aby se exprimovala lipidovaná forma rP2086. Tři geny P2086, kterým chybí signální sekvence, se klonovaly do vektoru pET9a za vysoce aktivní promotor fága T7. Kmen *E. coli* BL21(DE3) se použil jako hostitelský kmen pro rekombinantní expresi nelipidované formy ORF 2086 z klonů pET9a/ORF 2086 clones. (Obr. 10B) DE3 lysogen v *E. coli* kmenu BL21 se může indukovat k expresi T7 RNA polymerázy řízenou lacUV5 promotorem přidáním IPTG. Jak se popisuje v publika-

ci WCE; FEMS Micro. Lett., 48 (1987) 367-371 a BCA; J. Clin. Microbiol., 38 (2000) 2878-2884.

[0224] Gen ORF2086 se klonoval a sekvenoval z 55 různých kmenů *N. meningitidis*. Provedl se alignment nukleotidových sekvencí (DNASar MegAlign) a použily se k vytvoření fylogenního stromu (Obr. 12). Tento strom odhalil dvě různé subrodiny nukleotidové sekvence genu ORF 2086. Dvě rodiny genů jsou podobné buď svým 5'konci nebo obsahují podstatnou variaci blízko jejich 3'konců. Ačkoliv se jeví podstatně variabilní, jisté klíčové oblasti genu jsou u různých kmenů vysoce homologní. Tyto konzervované oblasti poskytují funkční kontinuitu v případě proteinu a mohou indikovat zkřížené ochranné epitopy, které se budou zkoumat jako vakcinační cíle.

[0225] Gen 2086 se klonoval s několika meningokokových kmenů seroskupina B a exprimoval se se signální sekvencí lipidace nebo bez ní. Na Obr. 11A a 11B fotografie gelů ukazuje lyzáty celých buněk *E. coli* B exprimující protein r2086. Nelipidovaná forma fúzaná s T7-Tag exprimovala nejvyšší hladinu. Sekvence T7-Tag může poskytovat stabilitu mRNA a podstatně zesiluje hladinu přeloženého polypeptidu. Tento fúzní protein je uložen v inkluzních tělískách a může se čistit a opětně sbalit podle známého protokolu. Lipidované a nelipidované formy P2086 se exprimovaly v přibližně 5 až 8 % celkového buněčného proteinu s výjimkou fúze T7-Tag, která exprimuje rP2086 jako přibližně 50 % celkového proteinu. Nelipidovaná forma proteinu je rozpustná a lokalizovaná v cytoplazmě. Lipidovaná forma proteinu se jeví být spojena s membránovou frakcí a je rozpustná v detergentu.

[0226] Rekombinantní lipidovaný protein 2086 z *N. meningitidis* B kmen 8529 důsledně vyvolává vyšší titry IgG v séru než nelipidovaná forma (tabulka CVI dále v textu), což koreluje dobře

se zesílenou hladinou baktericidní aktivity proti homologním tak i heterologním meningokokovým kmenům (tabulka XVII dále v textu). Protein ve své přirozené lipidované formě vykazuje terciární strukturu prezentace antigenu a/nebo zachycený lipid může působit jako adjuvans stimulující vyšší imunogenní odezvu.

Tabulka XVI

Imunitní odezva vyvolaná v týdnu 6 WCE použitím 8529 rP2086 (nelipidovaný) vs. 8529 rLP2086 (lipidovaný)						
Myší sérum		Meningokokové kmeny				
Antigen (10 ug)	Adjuvans (20 ug)	H44/76	H355	870227	880049	870446
rP2088	QS-21	273 238	212 947	102 947	69 124	21 466
rLP2086	QS-21	5 384 306	4 819 061	2 930 946	1 307 091	886 056

Tabulka XVII

8529 rP2086 vyvolává slabší baktericidní aktivitu než 8529 rLP2086					
Myší sérum		Meningokokové kmeny			
Antigen (10 ug)	Adjuvant (20 ug)	H44/76	H355	880049	NMB
rP2086	QS-21	200	100	<25	<25
rLP2086	QS-21	6 400	3 200	100	<25
Pre-imunitní	-	<10	<10	<10	<10
Pozitivní kontrola	-	1 600	100	200	1 600

Následuje souhrn výsledků studie. Všechny testované kmeny *N. meningitidis* B vykazují gen podobný genu 2086. Reprezentovány jsou alespoň dvě rodiny genu 2086: subsrodina A přibližně 30 % kmenů a subrodina B - přibližně 70 % kmenů. Gen 2086 se klonoval a sekvenoval z 55 kmenů *N. meningitidis*. Sekvence

v subrodině A jsou ~86-100 % shodné na úrovni DNA. Sekvence

v subrodině B jsou ~89,5-100 % shodné na úrovni DNA. Sekvence

v subrodině A jsou vs. subrodiny B ~60,9 %-74 % shodné na úrov-

ni DNA. Homology 2086 se identifikovaly skríníngem PCR následně:

N. meningitidis A, B, C, W135, Y

N. lactamica

N. gonorrhoeae FA1090

Několik genů ORF 2086 se klonovalo a rekombinantně exprimovalo lipidované verze P2086 se exprimovaly z devíti meningokokových kmenů.

[0227] Tyto rekombinantní proteiny se čistily a používaly k vakcinaci myší.

[0228] Výsledná antiséra jsou baktericidní.

[0229] Nelipidované verze P2086 se exprimovaly ze tří shora uvedených devíti kmenů. rLP2086 vyvolávají vyšší imunitní odezvu než rP2086. rLP2086 také vyvolává zesílenou baktericidní aktivitu proti homologním a heterologním meningokovým kmenům.

Příklad 10

[0230] Následující tabulky XVIII a XIX vykazují charakterizaci variant členů dvou subrodin.

Tabulka XVIII

Varianty subrodina A rLP2086 - charakterizace						
	rLP2086- 252988	rLP2086- 250771	rLP2086- 870446	rLP2086- 2996	rLP2086- C11	
Růstové médium	HySoy	HySoy	HySoy	HySoy	HySoy	
rozpustnost	rTX-100 => Z3-12	TX-100	TX-100	rTX-100 => Z3-12	rTX-100 => Z3-12	
Kroky čištění	TMAE S Fractogel SEC	HQ Poros SEC	HQ Poros SEC	TMAE SEC	TMAE S Fractogel	
Čistota (%)	96	83	80	95	82	

Varianty subrodina A rLP2086 - charakterizace						
		rLP2086- 252988	rLP2086- 250771	rLP2086- 870446	rLP2086- 2996	rLP2086- C11
výtěžek (mg/g buněčný pe- let)		0,2	0,7	0,8	0,5 (fer- mentor)	0,1
Veli- kost	SEC (Z3-12)	134 000	155 000	132 000	163 000	126 000
	MS	27 897 (712 li- pid)	-	-	27 878 (750 li- pid)	28 139 (682 li- pid)
Teplotní denaturace střední bod transice (T_M) °C		66 °C	-	NT	65 °C	63 °C
Dostupný pro- tein (mg)		2,7 mg	1 mg (Z3- 12)	5,0 mg	44 mg	1,1 mg
8529 homolo- gie sekvence (%)		71	62	71	72	68

Tabulka XIX

Varianty subrodiny B rLP2086 - charakterizace				
	rLP2086- 8529	rLP2086- M982	rLP2086- 880049	rLP2086- CDC1573
Růstové médium	Apollon (Sanford)	Apollon	HySoy	HySoy

Varianty subrodiny B rLP2086 - charakterizace					
		rLP2086- 8529	rLP2086- M982	rLP2086- 880049	rLP2086- CDC1573
rozpustnost		4 M močovi- na ⇒ Z3-12	rTX-100 ⇒ Z3-12	rTX-100 ⇒Z3-12	rTX-100
Kroky čištění		TMAE S Fractogel	TMAE S Fractogel	TMAE S Fractogel	TMAE SEC
Čistota (%)		96	96	90	93
Výtěžek (mg/g bu- něčný pelet)		0,2 (fer- mentor)	1,6 (fer- mentor)	0,4	1,0
veli- kost	SEC (Z3- 12)	95 000	110 000	100 000	120 000
			150 000		
	MS	27 785 (822 lipid)	27 719 (711 li- pid)	28 044 (819 li- pid)	28 385 (823 li- pid)
Teplotní denatura- ce střední bod transice (T_M) °C		70 °C	75 °C	62 °C	NT
Dostupný protein (mg)		močovina - 34 mg	sběr 1 - 47 mg	3,6 mg	4,9 mg
		Sarc - 36mg	sběr 2 - 17 mg		
8529 homologie sekvence (%)		100	94	92	87

[0231] Tabulka XX dále v textu poskytuje výsledky fluorescenčního sérového baktericidního testu pro 2986 subrodinu A.

Tabulka XX

popis	250771	870446	6557	NMB	M98 250732	M97 252697
rLP2086-252988, 10 µg	>800 (99 %)*	>800 (99 %)*	<25	-	>800 (99 %)*	>800 (93 %)*
rLP2086-C11, 10 µg	200	>880 (91 %)*	<25	-	200	400
rLP2086-250771, 10 µg	>800 (92 %)*	>800 (99 %)*	<25	-	>800 (96 %)*	>800 (84 %)*
rLP2086-870446, 10 µg	400	>800 (99 %)*	<25	-	400	400
rLP2086-2996, 10 µg	800	>800 (99 %)*	<25	-	>800 (93 %)*	>800 (72 %)*
rLP2086-8529 + rLP2086-2996, 10 µg	800	>800 (99 %)*	<25	-	>800 (80 %)*	>800 (72 %)*
rLP2086-8529 + rP1.22a,14a + rP1.5a,2c, 10 µg	-	800	200	>800 (98 %)*	-	-
rLP2086-8529 + rLP2086-2996 + rP1.22a,14a + rP1.5a,2c, 10 µg	400	>800 (99 %)*	200	>800 (99 %)*	400	>800 (88 %)*
NMB/rLP2086-8529 ve- sicles, 20 µg	-	100	-	400	-	-
rP1.22a,14a, 10 µg	25	-	800	-	100	-
rP1.5a,2c, 10 µg	-	-	-	>800 (99 %)*	-	-

popis	250771	870446	6557	NMB	M98 250732	M97 252697
rLP2086-8529, 10 µg	-	800	-	-	-	-
rP1.22a,14a, 25 µg	200	-	-	-	800	-
rP1.18,25.6, 5 µg		-	-	-	-	
nP1.22,9 (M982), 25 µg	-	-	100	-	-	-
Pre-imunní myší sérum (negativní kontrola)	<10	<10	<10	<10	<10	<10
	800	400	800	1 600	**	**

Poznámky:

* Procenta indikují % BC aktivity při ředění 1:800.

** Pozitivní kontrola není dostupná.

- netestované sérum

Příklad 11

[0232] Následující fakta dále demonstrují, že P2086 se exprimuje v neisseriálních kmenech a poskytuje další specifické příklady exprese P2086 v několika kmenech.

[0233] Buněčné lyzáty se připravily s buňkami z kultur na plotnách resuspendovaných v SDS vzorkovém pufru a zahřítém na 98 °C po dobu 4 minuty. Vzorky se nanasly v množství 30 až 50 µg celkového proteinu do každé prohlubně na 10 až 20 % gelech (ICN) a elektroforéza proběhla při 175 V. Gely se přenesly na nitrocelulózovou membránu, která se pak blokovala po dobu 30 minut 5 % práškovým mlékem ve fyziologickém roztoku pufovaném Trus (Blotto). Užívaná primární protilátka byla spojení polyklonál-

ního antiséra vzniklého proti jednotlivým variantám rLP2086 u myši.

[0234] Na Obr. 17 a 18 western bloty ukazují reaktivitu rLP2086 myšího antiséra k P2086 subsrodiny A a B lyzátů celých buněk. V případě blotu buněčného lyzátu subrodiny A používané antisérum vzniklo proti rLP2086-2996, -870446 a -250771 s rLP2086-250771 ředěním 1/500 v Blotto a další se ředily v poměru 1/1 000 v Blotto. V případě blotu buněčného lyzátu subrodiny B užívaná antisera vznikla proti rLP2086-8529 (ředěno 1/1 000 v Blotto), -CDC1573, -M982 a -880049 (tyto tři se ředily v poměru 1/500 v Blotto). Primární antiséra a blot se inkuboval při teplotě 4 °C přes noc. Blot se promyl, sekundárně se přidaly kozi-anti-myši AP v ředění 1/500 v Blotto a blot se inkuboval 30 minut při teplotě místnosti. Po promytí se vyvinul blot použitím BCIP/NBT Membrane Phosphatase Substrate System (KPL).

Seznam literatury

[0235] Reference zmiňované shora v textu jsou uvedené dále v textu

1. 1997. Case definitions for Infectious Conditions Under Public Health Surveillance. CDC.
2. 1995 Sambrook, J. and D. W. Russell. 1995. Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons, Inc., New York.
3. 1994. Griffin, A. M. and Griffin, H. G., ed., Computer Analysis of Sequence Data, Part I. Humana Press, New Jersey.
4. 1993. Smith, D. W.. ed., Biocomputing: Informatics and Genome Projects. Academic Press, New York
5. 1991. Gribskov, M. and Devereux, J., ed. Sequence Analysis Primer. Stockton Press, New York.

6. 1988. Lesk, A. M., ed. Computational Molecular Biology. Oxford University Press, New York.
7. Abdillahi, H., and J. T. Poolman. 1988. Neisseria meningitidis group B serosubtyping using monoclonal antibodies in whole-cell ELISA. Microbial Pathogenesis 4(1):27-32.
8. Achtman, M. 1995. Epidemic spread and antigenic variability of Neisseria meningitidis. Trends in Microbiology 3(5):186-92.
9. Alm, R. A., L. S. Ling, D. T. Moir, B. L. King, E. D. Brown, P. C. Doig, D. R. Smith, B. Noonan, B. C. Guild, B. L. deJonge, G. Carmel, P. J. Tummino, A. Caruso, M. Uria-Nickelsen, D. M. Mills, C. Ives, R. Gibson, D. Merberg, S. D. Mills, Q. Jiang, D. E. Taylor, G. F. Vovis, and T. J. Trust. 1999. Genomic-sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen Helicobacter pylori [published erratum appears in Nature 1999 Feb 25;397(6721):719]. Nature. 397:176-80.
10. Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, and D. J. Lipman. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res. 25:3389-402.
11. Anderson, T. F. 1951. Techniques for the preservation of three-dimensional structure in preparing specimens for the electron microscope. Trans N Y Acad Sci. 13:130-134.
12. Ambrosch, F., G. Wiedermann, P. Crooy, and A. M. George. 1983. Immunogenicity and side-effects of a new tetravalent meningococcal polysaccharide vaccine. Bulletin of the World Health Organization 61(2):317-23.

13. Benson, G. 1999. Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences. *Nucleic Acids Res.* 27:573-80.
14. Carillo, H., D. Lipman, and J. Siam. 1988. *Applied Math* 48:1073.
15. Chen, C. C., and P. P. Cleary. 1989. Cloning and expression of the streptococcal C5a peptidase gene in *Escherichia coli*: linkage to the type 12 M protein gene. *Infect. Immun.* 57:1740-1745.
16. Chmouryguina, I., A. Suvorov, P. Ferrieri, and P. P. Cleary. 1996. Conservation of the C5a peptidase genes in group A and B streptococci. *Infect. Immun.* 64:2387-2390.
17. Cockerill, F. R., 3rd, R. L. Thompson, J. M. Musser, P. M. Schlievert, J. Talbot, K. E. Holley, W. S. Harmsen, D. M. Ilstrup, P. C. Kohner, M. H. Kim, B. Frankfort, J. M. Manahan, J. M. Steckelberg, F. Roberson, and W. R. Wilson. 1998. Molecular, serological, and clinical features of 16 consecutive cases of invasive streptococcal disease. Southeastern Minnesota Streptococcal Working Group. *Clin Infect Dis.* 26:1448-58.
18. Courtney, H. S., Y. Li, J. B. Dale, and D. L. Hasty. 1994. Cloning, sequencing, and expression of a fibronectin/fibrinogen-binding protein from group A streptococci. *Infect Immun.* 62:3937-46.
19. Cserzo, M., E. Wallin, I. Simon, G. von Heijne, and A. Elofsson. 1997. Prediction of transmembrane alpha-helices in prokaryotic membrane proteins: the dense alignment surface method. *Protein Engineering.* 10:673-6.

20. Cunningham, M. W., and A. Quinn. 1997. Immunological cross-reactivity between the class I epitope of streptococcal M protein and myosin. *Adv Exp Med Biol.* 418:887-92.
21. Dale, J. B., R. W. Baird, H. S. Courtney, D. L. Hasty, and M. S. Bronze. 1994. Passive protection of mice against group A streptococcal pharyngeal infection by lipoteichoic acid. *J Infect Dis.* 169:319-23.
22. Dale, J. B., M. Simmons, E. C. Chiang, and E. Y. Chiang. 1996. Recombinant, octavalent group A streptococcal M protein vaccine. *Vaccine.* 14:944-8.
23. Dale, J. B., R. G. Washburn, M. B. Marques, and M. R. Wessels. 1996. Hyaluronate capsule and surface M protein in resistance to opsonization of group A streptococci. *Infect Immun.* 64:1495-501.
24. Eddy, S. R. 1996. Hidden Markov models. *Cur Opin Struct Bio.* 6:361-5.
25. Ellen, R. P., and R. J. Gibbons. 1972. M protein-associated adherence of *Streptococcus pyogenes* to epithelial surfaces: prerequisite for virulence. *Infect Immun.* 5:826-830.
26. Eng, J. K., A. L. McCormack, and J. R. Yates, 3rd. 1994. An approach to correlate tandem mass-spectral data of peptides with amino-acid-sequences in a protein database. *Am Soc Mass Spectrometry.* 5:976-89.
27. Fischetti, V. A., V. Pancholi, and O. Schneewind. 1990. Conservation of a hexapeptide sequence in the anchor region of surface proteins from gram-positive cocci. *Mol Microbiol.* 4:1603-5.

09.11.15

28. Fogg, G. C., and M. G. Caparon. 1997. Constitutive expression of fibronectin binding in *Streptococcus pyogenes* as a result of anaerobic activation of *rofA*. *J Bacteriol.* 179:6172-80.
29. Foster, T. J., and M. Hook. 1998. Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol.* 6:484-8.
30. Fraser, C. M., S. Casjens, W. M. Huang, G. G. Sutton, R. Clayton, R. Lathigra, O. White, K. A. Ketchum, R. Dodson, E. K. Hickey, M. Gwinn, B. Dougherty, J. F. Tomb, R. D. Fleischmann, D. Richardson, J. Peterson, A. R. Kerlavage, J. Quackenbush, S. Salzberg, M. Hanson, R. van Vugt, N. Palmer, M. D. Adams, J.
31. 31. Gocayne, J. C. Venter, and et al. 1997. Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete, *Borrelia burgdorferi* [see comments]. *Nature.* 390:580-6.
32. Goldschneider, I., E. C. Gotschlich, and M. S. Artenstein. 1969. Human immunity to the meningococcus. I. The role of humoral antibodies. *Journal of Experimental Medicine* 129(6):1307-26.
33. Goldschneider, I., E. C. Gotschlich, and M. S. Artenstein. 1969. Human immunity to the meningococcus. II. Development of natural immunity. *Journal of Experimental Medicine* 129(6):1327-48.
34. Gotschlich, E. C., I. Goldschneider, and M. S. Artenstein. 1969. Human immunity to the meningococcus. IV. Immunogenicity of group A and group C meningococcal polysaccharides in human volunteers. *Journal of Experimental Medicine* 129(6):1367-84.

35. Gotschlich, E. C., I. Goldschneider, and M. S. Artenstein. 1969. Human immunity to the meningococcus. V. The effect of immunization with meningococcal group C polysaccharide on the carrier state. *Journal of Experimental Medicine* 129(6):1385-95.
36. Hacker, J., G. Blum-Oehler, I. Muhldorfer, and H. Tschape. 1997. Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. *Mol Microbiol.* 23:1089-97.
37. Hanski, E., and M. Caparon. 1992. Protein F, a fibronectin-binding protein, is an adhesion of the group A streptococcus *Streptococcus pyogenes*. *Proc Natl Acad Sci., USA.* 89:6172-76.
38. Hanski, E., P. A. Horwitz, and M. G. Caparon. 1992. Expression of protein F, the fibronectin-binding protein of *Streptococcus pyogenes* JRS4, in heterologous streptococcal and enterococcal strains promotes their adherence to respiratory epithelial cells. *Infect Immun.* 60:5119-5125.
39. Hernandez-Sanchez, J., J. G. Valadez, J. V. Herrera, C. Ontiveros, and G. Guarneros. 1998. lambda bar minigene-mediated inhibition of protein synthesis involves accumulation of peptidyl-tRNA and starvation for tRNA. *EMBO Journal.* 17:3758-65.
40. Huang, T. T., H. Malke, and J. J. Ferretti. 1989. The streptokinase gene of group A streptococci: cloning, expression in *Escherichia coli*, and sequence analysis. *Mol Microbiol.* 3:197-205.

41. Hynes, W. L., A. R. Dixon, S. L. Walton, and L. J. Aridgides. 2000. The extracellular hyaluronidase gene (hyla) of *Streptococcus pyogenes*. *FEMS Microbiol Lett.* 184:109-12.
42. Hynes, W. L., L. Hancock, and J. J. Ferretti. 1995. Analysis of a second bacteriophage hyaluronidase gene from *Streptococcus pyogenes*: evidence for a third hyaluronidase involved in extracellular enzymatic activity. *Infect Immun.* 63:3015-20.
43. Isberg, R. R., and G. Tran Van Nhieu. 1994. Binding and internalization of microorganisms by integrin receptors. *Trends Microbio.* 2:10-4.
44. Jones, K. F., and V. A. Fischetti. 1988. The importance of the location of antibody binding on the M6 protein for opsonization and phagocytosis of group A M6 streptococci. *J Exp Med.* 167:1114-23.
45. Kihlberg, B. M., M. Collin, A. Olsen, and L. Bjorck. 1999. Protein H, an antiphagocytic surface protein in *Streptococcus pyogenes*. *Infect Immun.* 67:1708-14.
46. Koebnik, R. 1995. Proposal for a peptidoglycan-associating alpha-helical motif in the C-terminal regions of some bacterial cell-surface proteins [letter; comment]. *Molecular Microbiology.* 16:1269-70.
47. Kuipers, O. P., H. J. Boot, and W. M. de Vos. 1991. Improved site-directed mutagenesis method using PCR. *Nucleic Acids Res.* 19:4558.
48. Kyte, J., and R. F. Doolittle. 1982. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *Journal of Molecular Biology* 157:105-132.

49. Landt, O., H. P. Grunert, and U. Hahn. 1990. A general method for rapid site-directed mutagenesis using the polymerase chain reaction. *Gene* 96:125-128.
50. Loessner, M. J., S. Gaeng, and S. Scherer. 1999. Evidence for a holin-like protein gene fully embedded out of frame in the endolysin gene of *Staphylococcus aureus* bacteriophage 187. *J Bacteriol.* 181:4452-60.
51. Lukashin, A. V., and M. Borodovsky. 1998. GeneMark.hmm: new solutions for gene finding. *Nucleic Acids Res.* 26:1107-15.
52. Lukomski, S., C. A. Montgomery, J. Rurangirwa, R. S. Geske, J. P. Barrish, G. J. Adams, and J. M. Musser. 1999. Extracellular cysteine protease produced by *Streptococcus pyogenes* participates in the pathogenesis of invasive skin infection and dissemination in mice. *Infect Immun.* 67:1779-88.
53. Madore, D. V. 1998. Characterization of immune response as an indicator of *Haemophilus influenzae* type b vaccine efficacy. *Pediatr Infect Dis J.* 17:S207-10.
54. Matsuka, Y. V., S. Pillai, S. Gubba, J. M. Musser, and S. B. Olmsted. 1999. Fibrinogen cleavage by the *Streptococcus pyogenes* extracellular cysteine protease and generation of antibodies that inhibit enzyme proteolytic activity. *Infect Immun.* 67:4326-33.
55. Mazmanian, S. K., G. Liu, H. Ton-That, and O. Schneewind. 1999. *Staphylococcus aureus* sortase, an enzyme that anchors surface proteins to the cell wall. *Science.* 285:760-3.
56. McAtee, C. P., K. E. Fry, and D. E. Berg. 1998. Identification of potential diagnostic and vaccine candidates of He-

- licobacter pylori by "proteome" technologies. *Helicobacter*. 3:163-9.
57. McAtee, C. P., M. Y. Lim, K. Fung, M. Velligan, K. Fry, T. Chow, and D. E. Berg. 1998. Identification of potential diagnostic and vaccine candidates of *Helicobacter pylori* by two-dimensional gel electrophoresis, sequence analysis, and serum profiling. *Clin Diagn Lab Immunol*. 5:537-42.
58. McAtee, C. P., M. Y. Lim, K. Fung, M. Velligan, K. Fry, T. P. Chow, and D. E. Berg. 1998. Characterization of a *Helicobacter pylori* vaccine candidate by proteome techniques. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*. 714:325-33.
59. Mejlhede, N., J. F. Atkins, and J. Neuhard. 1999. Ribosomal -1 frameshifting during decoding of *Bacillus subtilis* *cdd* occurs at the sequence CGA AAG. *J. Bacteriol*. 181:2930-7.
60. Molinari, G., S. R. Talay, P. Valentin-Weigand, M. Rohde, and G. S. Chhatwal. 1997. The fibronectin-binding protein of *Streptococcus pyogenes*, SfbI, is involved in the internalization of group A streptococci by epithelial cells. *Infect Immun*. 65:1357-63.
61. Mountzouros, K. T., and A. P. Howell. 2000. Detection of complement-mediated antibody-dependent bactericidal activity in a fluorescence-based serum bactericidal assay for group B *Neisseria meningitidis*. *J. Clin. Microbiol*. 38(8):2878-2884.
62. Nakai, K., and M. Kanehisa. 1991. Expert system for predicting protein localization sites in gram-negative bacteria. *Proteins*. 11:95-110.

63. Navarre, W. W., and O. Schneewind. 1999. Surface proteins of gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. *Microbiol Mol Biol Rev.* 63:174-229.
64. Nielsen, H., J. Engelbrecht, S. Brunak, and G. von Heijne. 1997. Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Engineering.* 10:1-6.
65. Nizet, V., B. Beall, D. J. Bast, V. Datta, L. Kilburn, D. E. Low, and J. C. De Azavedo. 2000. Genetic locus for streptolysin S production by group A streptococcus. *Infect Immun.* 68:4245-54.
66. Nordstrand, A., W. M. McShan, J. J. Ferretti, S. E. Holm, and M. Norgren. 2000. Allele substitution of the streptokinase gene reduces the nephritogenic capacity of group A streptococcal strain NZ131. *Infect Immun.* 68:1019-25.
67. Olmsted, S. B., S. L. Erlandsen, G. M. Dunny, and C. L. Wells. 1993. High-resolution visualization by field emission scanning electron microscopy of *Enterococcus faecalis* surface proteins encoded by the pheromone-inducible conjugative plasmid pCF10. *J Bacteriol.* 175:6229-37.
68. Park, J., and S. A. Teichmann. 1998. DIVCLUS: an automatic method in the GEANFAMMER package that finds homologous domains in single- and multi-domain proteins. *Bioinformatics.* 14:144-50.
69. Parkhill, J., M. Achtman, K. D. James, S. D. Bentley, C. Churcher, S. R. Klee, G. Morelli, D. Basham, D. Brown, T. Chillingworth, R. M. Davies, P. Davis, K. Devlin, T. Feltham, N. Hamlin, S. Holroyd, K. Jagels, S. Leather, S. Mou-

- le, K. Mungall, M. A. Quail, M. A. Rajandream, K. M. Rutherford, M. Simmonds, J. Skelton, S. Whitehead, B. G. Spratt, and B. G. Barrell. 2000. Complete DNA sequence of a serogroup A strain of *Neisseria meningitidis* Z2491 [see comments]. *Nature*. 404:502-6.
70. Pierschbacher, M. D., and E. Ruoslahti. 1987. Influence of stereochemistry of the sequence Arg-Gly-Asp-Xaa on binding specificity in cell adhesion. *J Biol Chem*. 262:17294-8.
71. Pizza, M., V. Scarlato, V. Masignani, M. M. Giuliani, B. Arico, M. Comanducci, G. T. Jennings, L. Baldi, E. Bartolini, B. Capecchi, C. L. Galeotti, E. Luzzi, R. Manetti, E. Marchetti, M. Mora, S. Nuti, G. Ratti, L. Santini, S. Savino, M. Scarselli, E. Storni, P. Zuo, M. Broecker, E. Hundt, B. Knapp, E. Blair, T. Mason, H. Tettelin, D. W. Hood, A. C. Jeffries, N. J. Saunders, D. M. Granoff, J. C. Venter, E. R. Moxon, G. Grandi, and R. Rappuoli. 2000. Identification of vaccine candidates against serogroup B meningococcus by whole-genome sequencing. *Science* 287(5459):1816-20.
72. Podbielski, A., A. Flosdorff, and J. Weber-Heynemann. 1995. The group A streptococcal virR49 gene controls expression of four structural vir regulon genes. *Infect Immun*. 63:9-20.
73. Poolman, J. T. 1996. Bacterial outer membrane protein vaccines. The meningococcal example. *Advances in Experimental Medicine & Biology* 397:73-7.
74. Proft, T., S. Louise Moffatt, C. J. Berkahn, and J. D. Fraser. 1999. Identification and Characterization of Novel Superantigens from *Streptococcus pyogenes*. *J Exp Med*. 189:89-102.

75. Pugsley, A. P. 1993. The complete general secretory pathway in gram-negative bacteria. *Microbiol Rev.* 57:50-108.
76. Quinn, A., K. Ward, V. A. Fischetti, M. Hemric, and M. W. Cunningham. 1998. Immunological relationship between the class I epitope of streptococcal M protein and myosin. *Infect Immun.* 66:4418-24.
77. Reda, K. B., V. Kapur, D. Goela, J. G. Lamphear, J. M. Musser, and R. R. Rich. 1996. Phylogenetic distribution of streptococcal superantigen SSA allelic variants provides evidence for horizontal transfer of ssa within *Streptococcus pyogenes*. *Infect Immun.* 64:1161-5.
78. Sambrook, J., and D. W. Russell. 2001. *Molecular cloning a laboratory manual, Third ed, vol. 3.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
79. Salzberg, S. L., A. L. Delcher, S. Kasif, and O. White. 1998. Microbial gene identification using interpolated Markov models. *Nucleic Acids Res.* 26:544-8.
80. Saukkonen, K., H. Abdillahi, J. T. Poolman, and M. Leinonen. 1987. Protective efficacy of monoclonal antibodies to class 1 and class 3 outer membrane proteins of *Neisseria meningitidis* B:15:P1.16 in infant rat infection model: new prospects for vaccine development. *Microbial Pathogenesis* 3(4):261-7.
81. Sedegah et al. 1994. *Immunology.* 91, 9866-9870.
82. Sonnenberg, M. G., and J. T. Belisle. 1997. Definition of *Mycobacterium tuberculosis* culture filtrate proteins by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis, N-terminal

- amino acid sequencing, and electrospray mass spectrometry. *Infect Immun.* 65:4515-24.
83. Sonnhammer, E. L., S. R. Eddy, and R. Durbin. 1997. Pfam: a comprehensive database of protein domain families based on seed alignments. *Proteins.* 28:405-20.
84. Stevens, D. L. 1995. Streptococcal toxic-shock syndrome: spectrum of disease, pathogenesis, and new concepts in treatment. *Emerg Infect Dis.* 1:69-78.
85. Stockbauer, K. E., L. Magoun, M. Liu, E. H. Bums, Jr., S. Gubba, S. Renish, X. Pan, S. C. Bodary, E. Baker, J. Coburn, J. M. Leong, and J. M. Musser. 1999. A natural variant of the cysteine protease virulence factor of group A streptococcus with an arginine-glycine-aspartic acid (RGD) motif preferentially binds human integrins α v β 3 and α IIb β 3 *Proc Natl Acad Sci., USA.* 96:242-7.
86. Tettelin, H., N. J. Saunders, J. Heidelberg, A. C. Jeffries, K. E. Nelson, J. A. Eisen, K. A. Ketchum, D. W. Hood, J. F. Peden, R. J. Dodson, W. C. Nelson, M. L. Gwinn, R. DeBoy, J. D. Peterson, E. K. Hickey, D. H. Haft, S. L. Salzberg, O. White, R. D. Fleischmann, B. A. Dougherty, T. Mason, A. Ciecko, D. S. Parksey, E. Blair, H. Cittone, E. B. Clark, M. D. Cotton, T. R. Utterback, H. Khouri, H. Qin, J. Vamathevan, J. Gill, V. Scarlato, V. Maignani, M. Pizza, G. Grandi, L. Sun, H. O. Smith, C. M. Fraser, E. R. Moxon, R. Rappuoli, and J. C. Venter. 2000. Complete genome sequence of *Neisseria meningitidis* serogroup B strain MC58. *Science* 287(5459):1809-15.
87. Ton-That, H., G. Liu, S. K. Mazmanian, K. F. Faull, and O. Schneewind. 1999. Purification and characterization of sor-

tase, the transpeptidase that cleaves surface proteins of *Staphylococcus aureus* at the LPXTG motif. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:12424-12429.

88. von Heinje, G. 1987. *Sequence Analysis in Molecular Biology.* Academic Press, New York.
89. Weldingh, K., I. Rosenkrands, S. Jacobsen, P. B. Rasmussen, M. J. Elhay, and P. Andersen. 1998. Two-dimensional electrophoresis for analysis of *Mycobacterium tuberculosis* culture filtrate and purification and characterization of six novel proteins. *Infect Immun.* 66:3492-500.
90. Wolff et al. 1990. *Science.* 247, 1465-1468.
91. Yutsudo, T., K. Okumura, M. Iwasaki, A. Hara, S. Kamitani, W. Minamide, H. Igarashi, and Y. Hinuma. 1994. The gene encoding a new mitogenic factor in a *Streptococcus pyogenes* strain is distributed only in group A streptococci. *Infection and Immunity.* 62:4000-4004.
92. Zagursky, R.J. and D. Russell. 2001. *Bioinformatics: Use in Bacterial Vaccine Discovery.* *BioTechniques.* 31:636-659.

[0236] Z popisu vynálezu je patrné, že je možné provést řadu změn a modifikací, jak definují připojené nároky. V dalším textu se popisují výhodná provedení podle předmětného vynálezu spolu s řadou pozitivních alternativ. Tato provedení jsou pouze příklady a pro vynález nejsou omezující.

[0237] Zvláště vhodná provedení jsou uvedena v následujících odstavcích.

1. Prostředek obsahující:

- (a) alespoň jeden protein kódovaný otevřeným čtecím rámcem *Neisseria species* (ORF2086), uvedený otevřený čtecí rámec kódující zkříženě reaktivní imunogenní antigen a uvedený zkříženě reaktivní imunogenní antigen poskytující u jedince imunogenost proti infekci *Neisseria meningitidis* seroskupina B; nebo
- (b) alespoň jednu imunogenní část alespoň jednoho proteinu popsaného v (a); nebo
- (c) alespoň jeden biologický ekvivalent alespoň jednoho proteinu popsaného v (a) nebo imunogenní fragment popsaný (b).

2. Prostředek podle odstavce 1, kde alespoň jeden protein obsahuje libovolnou aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO: 254 až 259.

3. Prostředek podle odstavce 1, kde alespoň jeden protein kódovaný ORF2086 v libovolném z neisseriálních kmenů L3 6275, CDC2369, CDC1034, L4 891, B16B6, W135 (ATCC35559), C11, Y(ATCC35561), M98 250732, M98 250771, CDC1135, M97 252153, CDC1610, CDC1492, L8 M978; M97 252988, M97 252697, 6557, 2996, M97 252976, M97 251854, CDC1521, M98 250622, 870446, M97 253248, M98 250809, L5 M981, NMB nebo M98 250572.

4. Prostředek podle odstavce 1, kde alespoň jeden protein obsahuje libovolnou z aminokyselinových sekvencí SEQ ID NO: 260 až 278 nebo 279 až 299.

5. Prostředek podle odstavce 1, kde alespoň jeden protein je kódován ORF2086 v libovolném z neisseriálních kmenů 880049, M982, CDC1573, M97 253524 nebo M98 250670.
6. Prostředek podle odstavce 1, kde alespoň jeden protein obsahuje aminokyselinovou sekvenci označenou sudým číslem SEQ ID NO: 2 až 174.
7. Prostředek podle odstavce 6, který dále obsahuje alespoň jeden protein obsahující libovolnou aminokyselinovou sekvenci ze sekvencí označených sudým číslem SEQ ID NO: 176 až 252.
8. Prostředek podle odstavce 1, kde alespoň jeden protein obsahuje libovolnou aminokyselinovou sekvenci ze sekvencí označených sudým číslem SEQ ID NO: 224 až 252.
9. Prostředek podle odstavce 1, kde alespoň jeden protein, imunogenní část nebo biologický ekvivalent není patogenní a v podstatě neobsahuje infekční nečistoty.
10. Prostředek podle odstavce 1, kde alespoň jeden protein vykazuje molekulovou hmotnost přibližně 26 000 až 30 000 daltonů, jak se stanovilo hmotnostní spektroskopií.
11. Prostředek podle odstavce 10, kde alespoň jeden protein vykazuje molekulovou hmotnost přibližně 28 až 35 kDa, jak se stanovilo na 10 až 20 % SDS polyakrylovém gelu.
12. Prostředek podle odstavce 1, kde uvedený prostředek navíc obsahuje farmaceuticky přijatelný pufr, ředidlo, adjuvans nebo nosič.
13. Prostředek podle odstavce 1, kde uvedený prostředek navíc obsahuje nosič.

14. Prostředek podle odstavce 1, kde uvedený prostředek navíc obsahuje adjuvans.
15. Prostředek podle odstavce 14, kde uvedené adjuvans obsahuje kapalinu.
16. Prostředek podle odstavce 1, kde proteinem je rekombinantní protein.
17. Prostředek podle odstavce 1, kde se protein izoloval z přirozeného *Neisseria species*.
18. Prostředek podle odstavce 1, kde proteinem je lipoprotein.
19. Prostředek podle odstavce 1, kde protein není lipidován.
20. Prostředek podle odstavce 1, kde prostředek navíc obsahuje alespoň jeden PorA, PorB, protein vázající transferrin nebo opacitní protein (Opc).
21. Prostředek podle odstavce 1, kde prostředek navíc obsahuje alespoň jeden další povrchový antigen *Neisseria species*, přičemž uvedeným dalším povrchovým antigenem je non-ORF2086 protein.
22. Prostředek podle odstavce 1, který dále obsahuje polysacharid.
23. Prostředek podle odstavce 1, kde uvedený prostředek obsahuje další peptid, polypeptid nebo protein, přičemž uvedený prostředek tvoří konjugát, který vyvolává u savce imunitní odezvu k dvěma nebo více bakteriím.
24. Prostředek obsahující

alespoň jeden imunogenní protein nebo polypeptid obsahující libovolnou ze SEQ ID NO: 254 až 259.

25. Prostředek podle odstavce 24, kde alespoň jeden protein vykazuje molekulovou hmotnost přibližně 26 000 až 30 000 daltonů, jak se stanovilo hmotnostní spektroskopií.
26. Prostředek podle odstavce 25, kde alespoň jeden protein vykazuje molekulovou hmotnost přibližně 28 až 35 kDa, jak se stanovilo na 10 % až 20 % SDS polyakrylamidovém gelu.
27. Prostředek podle odstavce 24, který navíc obsahuje farmaceuticky přijatelný pufr, ředidlo, adjuvans nebo nosič.
28. Prostředek podle odstavce 24, kde uvedený prostředek dále obsahuje nosič.
29. Prostředek podle odstavce 24, kde uvedený prostředek navíc obsahuje adjuvans.
30. Prostředek podle odstavce 29, kde uvedené adjuvans obsahuje kapalinu.
31. Prostředek podle odstavce 24, kde protein není lipidován.
32. Prostředek podle odstavce 24, kde proteinem je rekombinantní protein.
33. Prostředek podle odstavce 24, kde protein nebo polypeptid se izoloval z přirozeného *Neisseria species*.
34. Prostředek podle odstavce 24, kde proteinem je lipoprotein.

35. Prostředek podle odstavce 24, kde prostředek dále obsahuje alespoň jeden PorA, PorB, protein vázající transferrin nebo opacitní protein (Opc).
36. Prostředek podle odstavce 24, kde prostředek dále obsahuje alespoň jeden další povrchový antigen *Neisseria species*, uvedeným dalším povrchovým antigenem je non-ORF2086 protein.
37. Prostředek podle odstavce 24, který dále obsahuje polysacharid.
38. Prostředek podle odstavce 24, kde uvedený prostředek obsahuje další peptid, polypeptid nebo protein, uvedený prostředek tvořící konjugát, který u savce vyvolává imunitní odezvu k dvěma nebo více bakteriím.
39. Prostředek obsahující: alespoň jeden imunogenní protein nebo polypeptid obsahující libovolný z SEQ ID NO: 260 až 278.
40. Prostředek podle odstavce 39, kde uvedený prostředek dále obsahuje farmaceuticky přijatelný pufr, ředidlo, adjuvans nebo nosič.

41. Prostředek obsahující:

alespoň jeden imunogenní protein nebo polypeptid obsahující libovolnou ze sekvencí SEQ ID NO: 279 až 299.

42. Prostředek podle odstavce 41, přičemž uvedený prostředek dále obsahuje farmaceuticky přijatelný pufr, ředidlo, adjuvans nebo nosič.

43. Prostředek obsahující:

alespoň jeden izolovaný protein obsahující aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO: 300;

kde x je libovolná aminokyselina;

přičemž oblast od aminokyseliny v poloze 5 k aminokyselině v poloze 9 je libovolná z 0 až 5 aminokyselin;

kde oblast z aminokyseliny v poloze 67 k aminokyselině v poloze 69 je libovolná z 0 až 3 aminokyselin;

a kde aminokyselina v poloze 156 je libovolná z 0 až 1 aminokyseliny.

44. Prostředek podle odstavce 43, kde oblast od aminokyseliny v poloze 5 do aminokyseliny v poloze 9 obsahuje 0, 4 nebo 5 aminokyselin.

45. Prostředek podle odstavce 43, kde oblast od aminokyseliny v poloze 67 do aminokyseliny v poloze 69 obsahuje 0 nebo 3 aminokyseliny.

46. Prostředek podle odstavce 43, kde alespoň jeden protein vykazuje molekulovou hmotnost přibližně 26 000 až 30 000 daltonů, jak se stanovilo hmotnostní spektroskopii.

47. Prostředek podle odstavce 46, kde alespoň jeden protein vykazuje molekulovou hmotnost přibližně 28 až 35 kDa, jak se stanovilo na 10 až 20 % SDS polyakrylovém gelu.
48. Prostředek podle odstavce 43, kde uvedený prostředek dále obsahuje farmaceuticky přijatelný pufr, ředidlo, adjuvans nebo nosič.
49. Prostředek podle odstavce 43, který navíc obsahuje nosič.
50. Prostředek podle odstavce 43, který obsahuje dále adjuvans.
51. Prostředek podle odstavce 50, který obsahuje kapalinu.
52. Prostředek podle odstavce 43, kde protein není lipidován.
53. Prostředek podle odstavce 43, kde proteinem je rekombinantní protein.
54. Prostředek podle odstavce 43, kde protein se izoloval z přirozeného *Neisseria species*.
55. Prostředek podle odstavce 43, kde proteinem je lipoprotein.
56. Prostředek podle odstavce 43, kde prostředek dále obsahuje alespoň jeden PorA, PorB, protein vázající transferrin nebo opacitní protein (Opc).
57. Prostředek podle odstavce 43, kde prostředek dále obsahuje alespoň jeden další povrchový antigen *Neisseria*

species, přičemž uvedeným dalším povrchovým antigenem je non-ORF2086 protein.

58. Prostředek podle odstavce 43, kde uvedený prostředek dále obsahuje polysacharid.
59. Prostředek podle odstavce 43, kde uvedený prostředek obsahuje další peptid, polypeptid nebo protein, uvedený prostředek tvořící konjugát, který vyvolává u savce imunitní odezvu k dvěma nebo více bakteriím.
60. Prostředek obsahující:
- (a) alespoň jeden protein obsahující aminokyselinovou sekvenci libovolné se sekvencí označených soudým číslem SEQ ID NO: 2 až 252;
 - (b) alespoň jeden protein kodovaný polynukleotidem, který hybridizuje za přísných podmínek s polynukleotidem, který obsahuje libovolnou sekvenci nukleové kyseliny z těch číslovaných lichým číslem SEQ ID NO: 1 až 253;
 - (c) alespoň jednu imunologickou část alespoň jednoho proteinu popsaného (a) nebo (b); nebo
 - (d) alespoň jeden biologický ekvivalent alespoň jednoho proteinu popsaný v (a) nebo (b) imunogenní fragment popsaný v (c).
61. Prostředek podle odstavce 60, kde alespoň jeden protein obsahuje libovolnou aminokyselinovou sekvenci z těch označených sudými čísly SEQ ID NO: 2 až 174.
62. Prostředek podle odstavce 61, který dále obsahuje alespoň jeden protein obsahující libovolnou aminokyselinovou sekvenci ze sudě číslovaných SEQ ID NO: 176 až 252.

63. Prostředek podle odstavce 60, kde alespoň jeden protein obsahuje libovolnou aminokyselinovou sekvenci ze sudě číselovaných SEQ ID NO: 2 až 12.
64. Prostředek podle odstavce 60, kde alespoň jeden protein obsahuje libovolnou aminokyselinovou sekvenci ze sudě číselovaných SEQ ID NO: 14 až 24.
65. Prostředek podle odstavce 60, kde alespoň jeden protein obsahuje libovolnou aminokyselinovou sekvenci ze sudě číselovaných SEQ ID NO: 26 až 42.
66. Prostředek podle odstavce 60, kde alespoň jeden protein obsahuje libovolnou aminokyselinovou sekvenci ze sudě číselovaných SEQ ID NO: 50 až 60.
67. Prostředek podle odstavce 60, kde alespoň jeden protein obsahuje libovolnou aminokyselinovou sekvenci ze sudě číselovaných SEQ ID NO: 62 až 108.
68. Prostředek podle odstavce 60, kde alespoň jeden protein obsahuje libovolnou aminokyselinovou sekvenci ze sudě číselovaných SEQ ID NO: 110 až 138.
69. Prostředek podle odstavce 60, kde alespoň jeden protein obsahuje libovolnou aminokyselinovou sekvenci ze sudě číselovaných SEQ ID NO: 140 až 156.
70. Prostředek podle odstavce 60, kde alespoň jeden protein obsahuje libovolnou aminokyselinovou sekvenci ze sudě číselovaných SEQ ID NO: 158 až 174.
71. Prostředek podle odstavce 60, kde alespoň jeden protein obsahuje libovolnou aminokyselinovou sekvenci ze sudě číselovaných SEQ ID NO: 223 až 252.

72. Prostředek podle odstavce 60, který dále obsahuje alespoň jeden PorA, PorB, protein vázající transferrin nebo opacitní protein (Opc).
73. Prostředek podle odstavce 60, který dále obsahuje alespoň jeden další povrchový antigen *Neisseria species*, přičemž dalším povrchovým antigenem je protein non-ORF2086.
74. Prostředek podle odstavce 60, kde alespoň jeden protein vykazuje molekulovou hmotnost přibližně 26 000 až 30 000, jak se stanovilo hmotnostní spektroskopií.
75. Prostředek podle odstavce 74, kde alespoň jeden protein vykazuje molekulovou hmotnost přibližně 28 až 35 kda, jak se stanovilo na 10 až 20 % SDS polyakrylamidovém gelu.
76. Prostředek podle odstavce 60, kde uvedený prostředek dále obsahuje farmaceuticky přijatelný pufr, ředidlo, adjuvans nebo nosič.
77. Prostředek podle odstavce 60, kde uvedený prostředek dále obsahuje nosič.
78. Prostředek podle odstavce 60, kde uvedený prostředek dále obsahuje adjuvans.
79. Prostředek podle odstavce 78, kde uvedené adjuvans obsahuje kapalinu.
80. Prostředek podle odstavce 60, kde protein není lipidovaný.
81. Prostředek podle odstavce 60, kde proteinem je rekombinantní protein.

82. Prostředek podle odstavce 60, kde protein se izoloval z přirozeného *Neisseria species*.
83. Prostředek podle odstavce 60, kde proteinem je lipoprotein.
84. Prostředek podle odstavce 60, kde uvedený prostředek dále obsahuje polysacharid.
85. Prostředek podle odstavce 60, kde uvedený prostředek obsahuje další peptid, polypeptid nebo protein, přičemž uvedený prostředek tvoří konjugát, který vyvolává u savce imunitní odezvu k dvěma nebo více bakteriím.
86. Prostředek obsahující:
- alespoň jeden antigen prvního bakteriálního kmene *Neisseria species*, který poskytuje imunogenost proti infekci jedince druhým bakteriálním kmenem *Neisseria species*.
87. Prostředek podle odstavce 86, kde prvním kmenem je kmen *Neisseria species* a uvedeným druhým kmenem je *Neisseria meningitidis* seroskupina B.
88. Prostředek podle odstavce 86, kde prvním kmenem je libovolný z kmenů L3 6275, CDC2369, CDC1034, L4 891, B16B6, W135 (ATCC35559), Cell, Y(ATCC35561), M98 250732, M98 250771, CDC1135, M97 252153, CDC1610, CDC1492, L8 M978; M97 252988, M97 252697, 6557, 2996, M97 252976, M97 251854, CDC1521, M98 250622, 870446, M97 253248, M98 250809, L5 M981, NMB nebo M98 250572.
89. Prostředek podle odstavce 86, kde prvním kmenem je libovolný z kmenů 880049, M982, CDC1573, M97 253524 nebo M98 250670.

90. Prostředek podle odstavce 86, kde proteinem je rekombinantní protein.
91. Prostředek podle odstavce 86, kde protein se izoloval z přirozeného *Neisseria species*.
92. Prostředek podle odstavce 86, kde proteinem je lipoprotein.
93. Prostředek podle odstavce 86, kde uvedený prostředek dále obsahuje farmaceuticky přijatelný pufr, ředidlo, adjuvans nebo nosič.
94. Prostředek podle odstavce 86, kde uvedený prostředek dále obsahuje nosič.
95. Prostředek podle odstavce 86, kde uvedený prostředek dále obsahuje adjuvans.
96. Prostředek podle odstavce 95, kde uvedené adjuvans obsahuje kapalinu.
97. Prostředek podle odstavce 86, kde protein není lipidován.
98. Prostředek podle odstavce 86, kde uvedený prostředek dále obsahuje polysacharid.
99. Prostředek podle odstavce 86, kde uvedený prostředek obsahuje další peptid, polypeptid nebo protein, uvedený prostředek tvoří konjugát, který vyvolává u savce imunitní odezvu k dvěma nebo více patogenům.
100. Prostředek obsahující:

alespoň jeden izolovaný protein obsahující aminokyselino-
vou sekvenci SEQ ID NO: 301;

kde x je libovolná aminokyselina;

kde oblast od polohy aminokyseliny 5 do polohy aminokyseliny 8 je libovolný z 0 až 8 aminokyselin;

kde oblast od polohy aminokyseliny 66 k poloze aminokyseliny 68 je libovolná z 0 až 3 aminokyselin.

101. Prostředek podle odstavce 100, kde alespoň jeden protein vykazuje molekulovou hmotnost přibližně 26 000 až 30 000, jak se stanovilo hmotnostní spektroskopii.
102. Prostředek podle odstavce 101, kde alespoň jeden protein vykazuje molekulovou hmotnost přibližně 28 až 35 kDa, jak se stanovilo na 10 až 20 % SDS polyakrylovém gelu.
103. Prostředek podle odstavce 100, kde uvedený prostředek dále obsahuje farmaceuticky přijatelný pufr, ředidlo, adjuvans nebo nosič.
104. Prostředek podle odstavce 100, kde uvedený prostředek dále obsahuje nosič.
105. Prostředek podle odstavce 100, kde uvedený prostředek dále obsahuje adjuvans.
106. Prostředek podle odstavce 105, kde uvedené adjuvans obsahuje kapalinu.
107. Prostředek podle odstavce 100, kde protein není lipidován.
108. Prostředek podle odstavce 100, kde proteinem je rekombinantní protein.
109. Prostředek podle odstavce 100, kde protein se izoloval z přirozeného *Neisseria species*.

110. Prostředek podle odstavce 100, kde proteinem je lipoprotein.
111. Prostředek podle odstavce 100, kde uvedený prostředek dále obsahuje polysacharid.
112. Prostředek podle odstavce 100, kde uvedený prostředek obsahuje další peptid, polypeptid nebo protein, uvedený prostředek tvořící konjugát, který vyvolává u savce imunitní odezvu k dvěma nebo více bakteriím.
113. Prostředek podle odstavce 100, kde oblast od polohy aminokyseliny 5 k poloze aminokyseliny 8 obsahuje 0 nebo 4 aminokyseliny.
114. Prostředek podle odstavce 100, kde oblast od aminokyseliny v poloze 66 k aminokyselině v poloze 68 obsahuje 0 nebo 3 aminokyseliny.
115. Prostředek obsahující:
- alespoň jeden izolovaný protein obsahující aminokyselino-
vou sekvenci SEQ ID NO: 302;
- kde x je libovolná aminokyselina;
- kde oblast od polohy aminokyseliny 8 k poloze aminokyseliny 12 je libovolný počet od 0 do 5 aminokyselin.
116. Prostředek podle odstavce 115, kde oblast od polohy aminokyseliny 8 k poloze aminokyseliny 12 obsahuje 0 nebo 5 aminokyselin.
117. Prostředek podle odstavce 115, kde alespoň jeden protein vykazuje molekulovou hmotnost přibližně 26 000 až 30 000, jak se stanovilo hmotnostní spektroskopii.

118. Prostředek podle odstavce 117, kde alespoň jeden protein vykazuje molekulovou hmotnost přibližně 28 až 35 kDa, jak se stanovilo na 10 až 20 % SDS polyakrylamidovým gelu.
119. Prostředek podle odstavce 115, kde uvedený prostředek dále obsahuje farmaceuticky přijatelný pufr, ředidlo, adjuvans nebo nosič.
120. Prostředek podle odstavce 115, kde uvedený prostředek dále obsahuje nosič.
121. Prostředek podle odstavce 115, kde uvedený prostředek dále obsahuje adjuvans.
122. Prostředek podle odstavce 121, kde uvedené adjuvans obsahuje kapalinu.
123. Prostředek podle odstavce 115, kde protein není lipidován.
124. Prostředek podle odstavce 115, kde proteinm je rekombinantní polypeptid.
125. Prostředek podle odstavce 115, kde protein se izoloval z přirozeného zdroje.
126. Prostředek podle odstavce 115, kde uvedený prostředek dále obsahuje polysacharid.
127. Prostředek podle odstavce 115, kde uvedený prostředek obsahuje další peptid, polypeptid nebo protein, přičemž uvedený prostředek tvoří konjugát, který vyvolává u savce imunitní odezvu k dvěma nebo více bakteriím.
128. Prostředek obsahující:

alespoň jednu protilátku, která se imunspecificky váže na libovolný z:

- (a) alespoň jeden protein kódovaný otevřeným čtecím rámcem *Neisseria species* (ORF2086), uvedený otevřený čtecí rámeček kódující zkříženě reaktivní imunogenní antigen a uvedený zkříženě reaktivní imunogenní antigen poskytující u jedince imunogennost proti infekci *Neisseria meningitidis* seroskupina B; nebo
- (b) alespoň jednu imunogenní část alespoň jednoho proteinu popsaného v (a); nebo
- (c) alespoň jeden biologický ekvivalent alespoň jednoho proteinu popsaného v (a) nebo imunogenní fragment popsaný (b).

129. Prostředek podle odstavce 128, kde protilátkou je monoklonální protilátka.

130. Prostředek podle odstavce 128, dále obsahující farmaceuticky přijatelný nosič.

131. Prostředek obsahující:

alespoň jednu protilátku, která se imunspecificky váže na libovolný z:

- (a) alespoň jeden protein obsahující libovolnou ze sekvencí SEQ ID NO: 254 až 259; nebo
- (b) alespoň jednu imunogenní část alespoň jednoho proteinu popsaného v (a); nebo

(c) alespoň jeden biologický ekvivalent alespoň jednoho proteinu popsaného v (a) nebo imunogenní fragment popsaný (b).

132. Prostředek podle odstavce 131, kde alespoň jeden protein, jeho imunogenní část nebo jeho biologický ekvivalent obsahuje SEQ ID NO: 260 až 299.

133. Prostředek podle odstavce 131, kde alespoň jednou protilátkou je monoklonální protilátka.

134. Prostředek obsahující:

alespoň jednu protilátku, která se imunspecificky váže na alespoň jeden izolovaný protein obsahující aminokyselino-
vou sekvenci SEQ ID NO: 300;

kde x je libovolná aminokyselina;

kde oblast z polohy aminokyseliny 5 do polohy aminokyseliny 9 obsahuje libovolných 0 až 5 aminokyselin;

kde oblast z polohy aminokyseliny 67 do polohy aminokyseliny 69 obsahuje libovolných 0 až 3 aminokyseliny; a

kde poloha aminokyseliny 156 obsahuje libovolnou z 0 až 1 aminokyselin.

135. Prostředek podle odstavce 134, kde alespoň jednou protilátkou je monoklonální protilátka.

136. Prostředek obsahující:

alespoň jednu protilátku, která se imunspecificky váže na libovolný z:

- (a) alespoň jeden protein obsahující libovolnou aminokyselínovou sekvenci ze sudě číselovaných SEQ ID NO: 2 až 252; nebo
- (b) alespoň jeden protein kodovaný polynukleotidem, který hybridizuje za přísných podmínek s polynukleotidem, který obsahuje sekvenci nukleové kyseliny z libovolných liše číselovaných SEQ ID NO: 1 až 253;
- (c) alespoň jednu imunogenní část alespoň jednoho proteinu popsaného v (a) nebo (b); nebo
- (d) alespoň jeden biologický ekvivalent alespoň jednoho proteinu popsaného (a) nebo (b) nebo imunogenní fragment popsaný v (c).

137. Prostředek obsahující:

alespoň jeden polynukleotid, který kóduje (a) alespoň jeden protein kodovaný otevřeným čtecím rámcem *Neisseria species* (ORF2086) nebo alespoň jednu imunogenní oblast nebo biologický ekvivalent uvedeného alespoň jednoho proteinu, uvedený otevřený čtecí rámec kódující zkříženě reaktivní imunogenní antigen a uvedený zkříženě reaktivní imunogenní antigen poskytující jedinci imunogennost proti infekci *Neisseria meningitidis* seroskupina B; nebo (b) hybridizuje za přísných podmínek s polynukleotidem popsaným v odstavci (a).

138. Prostředek podle odstavce 137 dále obsahující vedoucí sekvenci P4 (SEQ ID NO: 322).

139. Prostředek podle odstavce 137, kde uvedený prostředek obsahuje vektor.

140. Prostředek podle odstavce 139, kde vektorem je plazmid.
141. Prostředek podle odstavce 139, kde vektorem je fág.
142. Prostředek podle odstavce 137, kde přísné podmínky jsou vysoce přísné podmínky southern hybridizace.
143. Prostředek podle odstavce 137, který dále obsahuje P4 vedoucí sekvenci (SEQ ID NO: 322).
144. Prostředek podle odstavce 137, kde polynukleotidem je rekombinantní polynukleotid.
145. Prostředek podle odstavce 137, kde polynukleotid se izolova z přirozeného zdroje.
146. Prostředek podle odstavce 137, kde uvedený prostředek dále obsahuje sekvenci nukleové kyseliny kódující další peptid, polypeptid nebo protein.
147. Prostředek obsahující:

alespoň jeden polynukleotid, kde (a) kóduje alespoň jeden izolovaný protein obsahující libovolnou ze sekvencí SEQ ID NO: 254 až 259, 260 až 278 nebo 279 až 299 nebo (b) hybridizuje za přísných podmínek s libovolným z polynukleotidů popsaných v odstavci (a).
148. Prostředek podle odstavce 147, který dále obsahuje vedoucí sekvenci P4 (SEQ ID NO: 322).
149. Prostředek podle odstavce 147, který obsahuje vektor.
150. Prostředek podle odstavce 147, kde přísné podmínky jsou velmi přísné podmínky southern hybridizace.

151. Prostředek podle odstavce 147, který dále obsahuje vedoucí sekvenci P4 (SEQ ID NO: 322).
152. Prostředek podle odstavce 147, kde polynukleotidem je rekombinantní polynukleotid.
153. Prostředek podle odstavce 147, kde polynukleotid se izoloval z přirozeného zdroje.
154. Prostředek podle odstavce 147, který navíc obsahuje sekvenci nukleové kyseliny kódující další peptid, polypeptid nebo protein.
155. Prostředek obsahující:
- alespoň jeden polynukleotid, který (a) kóduje alespoň jeden protein obsahující aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO: 300, x je libovolná aminokyselina, oblast od aminokyseliny v poloze 5 do aminokyseliny v poloze 9 je libovolná 0 až 5 aminokyselin, oblast od aminokyseliny v poloze 67 do polohy aminokyseliny 69 je libovolná z 0 až 3 aminokyselin; a aminokyselina v poloze 156 je libovolná 0 až 1 aminokyselina neb (b) hybridizuje za přísných podmínek s libovolným ze zde popsanych polynukleotidů v odstavci (a).
156. Prostředek podle odstavce 155, dále obsahující vedoucí sekvenci P4 (SEQ ID NO: 322).
157. Prostředek obsahující:
- (a) alespoň jeden polynukleotid, který kóduje alespoň jeden z (i) alespoň jeden protein obsahující aminokyselinovou sekvenci libovolné ze sudě číselovaných sekvencí SEQ ID NO: 2 až 252; (ii) alespoň jeden protein kódovaný polynukleotidem, který hybridizuje za přísných

ných podmínek s polynukleotidem, který obsahuje sekvenci nukleové kyseliny libovolní z liše číslovaných SEQ ID NO: 1 až 243, (iii) alespoň jednu imunogenní část alespoň jednoho proteinu popsanou v (i) nebo (ii); nebo (iv) alespoň jeden biologický ekvivalent alespoň jednoho proteinu popsaného v (i) nebo (ii) nebo imunogenní fragment popsaný v (iii) nebo

(b) alespoň jeden polynukleotid, který hybridizuje za přísných podmínek s libovolným z polynukleotidů popsaných v odstavci (a).

158. Prostředek podle odstavce 157, kde uvedený alespoň jeden polynukleotid obsahuje libovolnou sekvenci nukleové kyseliny z liše číslovaných SEQ ID NO: 1 až 253.

159. Prostředek podle odstavce 157, kde uvedený prostředek obsahuje vektor.

160. Prostředek podle odstavce 157, kde přísné podmínky jsou velmi přísné podmínky southernovy hybridizace.

161. Prostředek podle odstavce 157, kde uvedený prostředek dále obsahuje sekvenci nukleové kyseliny kódující další peptid, polypeptid nebo protein.

162. Prostředek obsahující:

(a) alespoň jeden polynukleotid, který kóduje alespoň jeden antigen prvního bakteriálního kmene *Neisseria species*, který poskytuje imunogennost proti infekci jedince sekundárním bakteriálním kmenem *Neisseria species*; nebo

- (b) alespoň jeden polynukleotid, který hybridizuje za přísných podmínek s alespoň jedním polynukleotidem popsaným v odstavci (a).
163. Prostředek podle odstavce 162, kde uvedený alespoň jeden izolovaný polynukleotid obsahuje sekvenci nukleové kyseliny libovolné z liše číslovaných SEQ ID NO: 1 až 253.
164. Prostředek podle odstavce 162, který dále obsahuje vedoucí sekvenci P4 (SEQ ID NO: 322).
165. Prostředek podle odstavce 162, kde uvedený prostředek obsahuje vektor.
166. Prostředek podle odstavce 162, kde přísnými podmínkami jsou silně přísné podmínky southernovy hybridizace.
167. Prostředek podle odstavce 162, kde uvedený prostředek dále obsahuje sekvenci nukleové kyseliny kódující další peptid, polypeptid nebo protein.
168. Prostředek obsahující:
- vektor obsahující libovolný z:
- (a) alespoň jeden protein obsahující aminokyselinovou sekvenci libovolné z SEQ ID NOS: 254-259, 260-278 nebo 279-299; nebo
- (b) alespoň jedna imunogenní část alespoň jednoho proteinu popsaného v odstavci (a); nebo
- (c) alespoň jeden biologický ekvivalent alespoň jednoho proteinu v odstavci (a) nebo imunogenní fragment popsaný v odstavci (b).

169. Prostředek podle odstavce 168, kde vektorem je plazmid.
170. Prostředek podle odstavce 168, kde vektorem je fág.
171. Prostředek podle odstavce 168, kde vektorem je bakteriofág.
172. Prostředek podle odstavce 168, kde vektorem je mírný fág.
173. Prostředek obsahující:

vektor obsahující alespoň jeden polynukleotid, který kóduje protein obsahující aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO: 300;

kde x je libovolná aminokyselina;

kde oblast od aminokyseliny v poloze 5 k poloze aminokyseliny 9 je libovolná z 0 až 5 aminokyselin;

kde oblast od polohy aminokyseliny 67 k poloze aminokyseliny 69 je libovolná z 0 až 3 aminokyseliny; a

kde aminokyselinou v poloze 156 je libovolná z 0 až 1 aminokyseliny.

174. Prostředek podle odstavce 173, kde vektorem je plazmid.
175. Prostředek podle odstavce 173, kde vektorem je fág.
176. Prostředek obsahující:

vektor obsahující libovolný z:

(a) alespoň jeden polynukleotid, který kóduje alespoň jeden z polypeptidů označených lichými čísly SEQ ID NO: 2 až 252; nebo

(b) alespoň jeden polynukleotid, který hybridizuje za přísných podmínek s alespoň jedním polynukleotidem popsaným v odstavci (a).

177. Prostředek podle odstavce 176, kde vektor obsahuje sekvenci nukleové kyseliny podle libovolné z SEQ ID NO: 1 až 153.

177. Prostředek podle odstavce 176, kde vektorem je plazmid.

178. Prostředek podle odstavce 176, kde vektorem je fág.

179. Prostředek podle odstavce 176, kde vektorem je bakteriofág.

180. Prostředek podle odstavce 176, kde vektorem je mírný fág.

181. Prostředek obsahující:

hostitelskou buňku transformovanou/transfekovanou nebo infikovanou vektorem, uvedený vektor obsahuje libovolnou složku z:

(a) alespoň jeden protein kódovaný otevřeným čtecím rámcem *Neisseria species* (ORF2086), uvedený otevřený čtecí rámec kódující zkříženě reaktivní imunogenní antigen a uvedený zkříženě reagující imunogenní antigen poskytující u jedince imunogenost proti infekci *Neisseria meningitidis* seroskupina B; nebo

- (b) alespoň jednu imunogenní část alespoň jednoho proteinu popsaného v odstavci (a); nebo
- (c) alespoň jeden biologický ekvivalent alespoň jednoho proteinu popsaného v odstavci (a) nebo imunogenní fragment popsaný v odstavci (b).

182. Prostředek obsahující:

hostitelskou buňku transformovanou/transfekovanou nebo infikovanou vektorem, uvedený vektor obsahující libovolný z:

- (a) alespoň jeden protein obsahující libovolnou z SEQ ID NO: 254-259, 260-278 nebo 279-299; nebo
- (b) alespoň jeden imunogenní část z alespoň jednoho proteinu popsaného v (a); nebo
- (c) alespoň jeden biologický ekvivalent alespoň jednoho proteinu popsaného v (a) nebo imunogenní fragment popsaný v odstavci (b).

183. Prostředek připravený postupem zahrnujícím:

expresi sekvence nukleové kyseliny v hostitelské buňce kódující libovolný z:

- (a) alespoň jeden protein kodovaný otevřeným čtecím rámcem *Neisseria species* (ORF2086), uvedený otevřený čtecí rámec kódující zkříženě reaktivní imunogenní antigen a uvedený zkříženě reaktivní imunogenní antigen poskytující jedinci imunogenost proti infekci *Neisseria meningitidis* seroskupina B; nebo
- (b) alespoň jednu imunogenní část alespoň jednoho proteinu popsaného v odstavci (a); nebo

(c) alespoň jeden biologický ekvivalent alespoň jednoho proteinu popsaného v odstavci (a) nebo imunogenní fragment popsaný v odstavci (b).

184. Prostředek podle odstavce 183, kde sekvence nukleové kyseliny je libovolná z liše číselovaných SEQ ID NO: 1 až 253.

185. Prostředek podle odstavce 183, kde sekvence nukleové kyseliny kóduje protein obsahující libovolnou se sudě číselovaných SEQ ID NO: 2 až 252.

186. Prostředek podle odstavce 183, kde sekvence nukleové kyseliny kóduje protein obsahující libovolný ze sudě číselovaných SEQ ID NO: 2 až 174.

187. Prostředek podle odstavce 183, kde protein vykazuje molekulovou hmotnost přibližně 26 000 až 30 000, jak se stanovilo hmotnostní spektroskopií.

188. Prostředek podle odstavce 187, kde protein vykazuje molekulovou hmotnost přibližně 28 až 35 kDa, jak se stanovilo na 10 až 20 % SDS polyakrylamidovém gelu.

189. Prostředek podle odstavce 183, kde uvedený prostředek dále zahrnuje farmaceuticky přijatelný pufr, ředidlo, adjuvans nebo nosič.

190. Prostředek podle odstavce 183, kde uvedený prostředek dále zahrnuje nosič.

191. Prostředek podle odstavce 183, kde uvedený prostředek dále obsahuje adjuvans.

192. Prostředek podle odstavce 191, kde adjuvans je kapalina.

193. Prostředek podle odstavce 183, kde proteinem je lipidovaný protein.

194. Prostředek připravený postupem obsahujícím:

izolaci a čištění z *Neisseria species* libovolného z:

- (a) alespoň jeden protein kodovaný otevřeným čtecím rámcem *Neisseria species* (ORF2086), uvedený otevřený čtecí rámec kódující zkříženě reaktivní imunogenní antigen a uvedený zkříženě reaktivní imunogenní antigen poskytující jedinci imunogenost proti infekci *Neisseria meningitidis* seroskupina B; nebo
- (b) alespoň jednu imunogenní část alespoň jednoho proteinu popsaného v odstavci (a); nebo
- (c) alespoň jeden biologický ekvivalent alespoň jednoho proteinu popsaného v odstavci (a) nebo imunogenní fragment popsaný v odstavci (b).

195. Prostředek podle odstavce 194, kde alespoň jeden polynukleotid obsahuje sekvenci nukleové kyseliny podle libovolného z liše číselovaných SEQ ID NO: 1 až 253.

196. Prostředek podle odstavce 194, kde způsob dále zahrnuje zavedení nepřirozené vedoucí sekvence do alespoň jednoho izolovaného polynukleotidu.

197. Prostředek podle odstavce 196, kde nepřirozenou vedoucí sekvencí je vedoucí sekvence P4 (SEQ ID NO: 322).

198. Prostředek připravený postupem obsahujícím:

izolaci a čištění z *Neisseria species* libovolného z:

- (a) alespoň jeden protein obsahující libovolnou ze sekvencí SEQ ID NO: 254-259, 260-278 nebo 279-299; nebo
- (b) alespoň jednu imunogenní část alespoň jednoho proteinu popsaného v odstavci (a); nebo
- (c) alespoň jeden biologický ekvivalent alespoň jednoho proteinu popsaného v odstavci (a) nebo imunogenní fragment popsaný v odstavci (b).

199. Prostředek podle odstavce 198, kde polypeptid vykazuje molekulovou hmotnost přibližně 26 000 až 30 000, jak se stanovilo hmotnostní spektroskopii.

200. Prostředek podle odstavce 199. kde polypeptid vykazuje molekulovou hmotnost přibližně 28 až 35 kDa, jak se stanovilo na 10 až 20 % SDS polyakrylamidovém gelu.

201. Prostředek podle odstavce 198, kde uvedený prostředek navíc obsahuje farmaceuticky přijatelný pufr, ředidlo, adjuvans nebo nosič.

202. Prostředek podle odstavce 198, kde uvedený prostředek dále obsahuje nosič.

203. Prostředek podle odstavce 198, kde uvedený prostředek dále obsahuje adjuvans.

204. Prostředek podle odstavce 203, kde uvedené adjuvans obsahuje kapalinu.

205. Prostředek podle odstavce 198, kde proteinem je lipidovaný protein.

206. Prostředek připravený postupem zahrnujícím:

začlenění do vektoru alespoň jednoho izolovaného proteinu, který obsahuje aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO: 300;

kde x je libovolná aminokyselina;

kde oblast od polohy aminokyseliny 5 do polohy aminokyseliny 9 obsahuje libovolný z 0 až 5 aminokyselin;

kde oblast od polohy aminokyseliny 67 do polohy aminokyseliny 69 je libovolná z 0 až 3 aminokyselin; a

kde v poloze aminokyseliny 156 je libovolná z 0 až 1 aminokyselina.

207. Prostředek podle odstavce 206, kde vektorem je plazmid.

208. Prostředek podle odstavce 206, kde vektorem je fág.

209. Prostředek podle odstavce 206, kde vektorem je bakteriofág.

210. Prostředek podle odstavce 206, kde vektorem je mírný fág.

211. Prostředek podle odstavce 206, který dále obsahuje nepřírozenou vedoucí sekvenci.

212. Prostředek podle odstavce 211, kde nepřírozenou vedoucí sekvencí je vedoucí sekvence P4 (SEQ ID NO. 322).

213. Prostředek připravený postupem obsahujícím:

expresi v hostitelské buňce (a) alespoň jednoho izolovaného polynukleotidu, který kóduje alespoň jeden protein kódovaný otevřeným čtecím rámcem *Neisseria species* (ORF2086) nebo alespoň jednou imunogenní částí nebo biologickým ekvivalentem uvedeného alespoň jednoho proteinu, uvedený otevřený čtecí rámec kódující zkříženě reaktivní imunogenní antigen a uvedený zkříženě reak-

tivní imunogenní antigen poskytující jedinci imunogennost proti infekci *Neisseria meningitidis* seroskupina B a (b) nepřírozenou vedoucí sekvenci spojenou s uvedeným alespoň jedním izolovaným polynukleotidem.

214. Prostředek podle odstavce 213, kde nepřírozenou vedoucí sekvencí je vedoucí sekvence P4 (SEQ ID NO. 322).

215. Prostředek připravený postupem obsahujícím:

expresi sekvence nukleové kyseliny v hostitelské buňce, přičemž sekvence kóduje libovolný z:

- (a) alespoň jeden protein kodovaný otevřeným čtecím rámcem *Neisseria species* (ORF2086), uvedený otevřený čtecí rámec kódující zkříženě reaktivní imunogenní antigen a uvedený zkříženě reaktivní imunogenní antigen poskytující jedinci imunogennost proti infekci *Neisseria meningitidis* seroskupina B; nebo
- (b) alespoň jednu imunogenní část alespoň jednoho proteinu popsaného v odstavci (a); nebo
- (c) alespoň jeden biologický ekvivalent alespoň jednoho proteinu popsaného v odstavci (a) nebo imunogenní fragment popsaný v odstavci (b); nebo

expresi nukleové kyseliny v hostitelské buňce, přičemž sekvence nukleové kyseliny hybridizuje za přísných podmínek s následující sekvencí nukleové kyseliny.

216. Prostředek podle odstavce 215, kde sekvencí nukleové kyseliny je libovolná z liše číslovaných sekvencí SEQ ID NO: 1 až 253;

217. Prostředek podle odstavce 215, kde sekvencí nukleové kyseliny je libovolná z liše číslovaných sekvencí SEQ ID NO: 2 až 252.

218. Prostředek podle odstavce 215, kde protein vykazuje molekulovou hmotnost přibližně 26 000 až 30 000, jak se stanovilo hmotnostní spektroskopii.

219. Prostředek podle odstavce 218, kde protein vykazuje molekulovou hmotnost přibližně 28 až 35 kDa, jak se stanovilo na 10 až 20 % SDS akrylamidovém gelu.

220. Prostředek podle odstavce 215, kde uvedený prostředek dále obsahuje farmaceuticky přijatelný pufr, ředidlo, adjuvans nebo nosič.

221. Prostředek podle odstavce 215, kde uvedený prostředek dále zahrnuje nosič.

222. Prostředek podle odstavce 215, kde uvedený prostředek dále zahrnuje adjuvans.

223. Prostředek podle odstavce 222, kde uvedené adjuvans obsahuje kapalinu.

224. Prostředek podle odstavce 215, kde přísné podmínky jsou velmi přísné podmínky southernovy hybridizace.

225. Prostředek připravený postupem, který obsahuje:

izolaci a čištění *Neisseria species* libovolného z:

- (a) alespoň jednoho polynukleotidu, který kóduje alespoň jeden polypeptid obsahující libovolnou aminokyselinovou sekvenci ze sudě číslovaných SEQ ID NO: 2 až 252; nebo

- (b) alespoň jeden polynukleotid, který hybridizuje za přísných podmínek s alespoň jedním polynukleotidem popsáním v odstavci (a).

226. Prostředek podle odstavce 225, kde alespoň jeden polynukleotid obsahuje libovolnou sekvenci nukleové kyseliny z liše číselovaných SEQ ID NO: 1 až 253.

227. Prostředek podle odstavce 225, kde postup dále zahrnuje zavedení nepřírozené vedoucí sekvence s alespoň jedním polynukleotidem.

228. Prostředek podle odstavce 227, kde nepřírozenou vedoucí sekvencí je P4 vedoucí sekvence (SEQ ID NO: 322).

229. Prostředek připravený postupem zahrnujícím:

izolaci a čištění *Neisseria species* libovolného z:

- (a) alespoň jeden protein obsahující aminokyselinovou sekvenci libovolného z liše číselovaných SEQ ID NO: 2 až 252;
- (b) alespoň jeden protein kódovaný polynukleotidem, který hybridizuje za stringentních podmínek s polynukleotidem obsahujícím libovolnou sekvenci nukleové kyseliny z liše číselovaných SEQ ID NO: 1 až 253;
- (c) alespoň jedna imunologická část alespoň jednoho proteinu popsáného v (a) nebo (b); nebo
- (d) alespoň jeden biologický ekvivalent alespoň jednoho proteinu popsáného v (a) nebo (b) nebo imunogenní fragment popsáný v (c).

230. Prostředek podle odstavce 229, kde protein vykazuje molekulovou hmotnost 26 000 až 30 000, jak se stanovilo hmotnostní spektroskopií.

231. Prostředek podle odstavce 230, kde protein vykazuje molekulovou hmotnost přibližně 28 až 35 kDa, jak se stanovilo na 10 až 20 % SDS polyakrylamidovém gelu.

232. Prostředek podle odstavce 229, kde uvedený prostředek dále obsahuje farmaceuticky přijatelný pufr, ředidlo, adjuvans nebo nosič.

233. Prostředek podle odstavce 229, kde uvedený prostředek navíc obsahuje nosič.

234. Prostředek podle odstavce 229, kde uvedený prostředek dále obsahuje adjuvans.

235. Prostředek podle odstavce 234, kde uvedené adjuvans obsahuje kapalinu.

236. Prostředek podle odstavce 229, kde přísné podmínky jsou velmi přísné podmínky southernovy hybridizace.

237. Prostředek připravený postupem obsahujícím:

začlenění do vektoru libovolného z:

(a) alespoň jeden izolovaný polynukleotid, který kóduje alespoň jeden polypeptid obsahující libovolnou liše číslovaných SEQ ID NO: 2 až 252; nebo

(b) alespoň jeden izolovaný polynukleotid, který hybridizuje za přísných podmínek s alespoň jedním polynukleotidem podle odstavce (a).

238. Prostředek podle odstavce 237, kde vektorem je plazmid.

239. Prostředek podle odstavce 237, kde vektorem je fág.

240. Prostředek podle odstavce 237, kde vektorem je bakterio-fág.

241. Prostředek podle odstavce 237, kde vektorem je mírný fág.

242. Prostředek podle odstavce 237, který dále obsahuje nepřírozenou vedoucí sekvenci.

243. Prostředek podle odstavce 242, kde nepřírozenou vedoucí sekvencí je P4 vedoucí sekvence (SEQ ID NO: 322).

244. Prostředek připravený postupem obsahujícím:

expresi v hostitelské buňce jednoho polynukleotidu, který (a) kóduje alespoň jeden protein kodovaný otevřeným čtecím rámcem *Neisseria species* (ORF2086) nebo alespoň jednou imunogenní částí nebo biologickým ekvivalentem uvedeného alespoň jednoho proteinu, uvedený otevřený čtecí rámec kódující zkríženě reaktivní imunogenní antigen a uvedený zkríženě reaktivní imunogenní antigen poskytující jedinci imunogennost proti infekci *Neisseria meningitidis* seroskupina B; nebo (b) hybridizuje za přísných podmínek s libovolným z polynukleotidů popsanych v odstavci (a).

245. Prostředek podle odstavce 244, který navíc obsahuje nepřírozenou vedoucí sekvenci spojenou s uvedeným alespoň jedním polynukleotidem.

246. Prostředek podle odstavce 245, kde nepřírozenou vedoucí sekvencí je vedoucí sekvence P4 (SEQ ID NO: 322).

247. Prostředek obsahující:

alespoň jeden imunogenní antigen *Neisseria meningitidis*, který není specifický pro kmen, přičemž antigen není patologický a v podstatě neobsahuje žádné infekční nečistoty.

248. Antigen podle odstavce 247, kde antigen obsahuje aminokyselinovou sekvenci vykazující alespoň přibližně 70 % shodu aminokyselinové sekvence s libovolnou ze sudě číslovaných SEQ ID NO: 2 až 6.

249. Antigen podle odstavce 247, kde antigen obsahuje aminokyselinovou sekvenci vykazující alespoň přibližně 70 % shodu aminokyselinové sekvence s libovolnou sudě číslovanou SEQ ID NO: 8 až 12.

250. Antigen podle odstavce 247, kde antigen obsahuje aminokyselinovou sekvenci vykazující alespoň přibližně 70 % shody aminokyselinové sekvence s libovolnou sudě číslovanou SEQ ID NO: 14 až 18.

251. Antigen podle odstavce 247, kde antigen obsahuje aminokyselinovou sekvenci vykazující alespoň přibližně 70 % shody aminokyselinové sekvence s libovolnou sudě číslovanou SEQ ID NO: 20 až 24.

252. Antigen podle odstavce 247, kde antigen obsahuje aminokyselinovou sekvenci vykazující alespoň přibližně 70 % shody aminokyselinové sekvence s libovolnou sudě číslovanou SEQ ID NO: 26 až 30.

253. Antigen podle odstavce 247, kde antigen obsahuje aminokyselinovou sekvenci vykazující alespoň přibližně 70 % shody aminokyselinové sekvence s libovolnou sudě číslovanou SEQ ID NO: 32 až 36.

254. Antigen podle odstavce 247, kde antigen obsahuje aminokyselínovou sekvenci vykazující alespoň přibližně 70 % shodu aminokyselinové sekvence s libovolnou sudě číslovanou SEQ ID NO: 38 až 42.

255. Antigen podle odstavce 247, kde antigen obsahuje aminokyselínovou sekvenci vykazující alespoň přibližně 70 % shody s libovolnou sudě číslovanou SEQ ID NO: 44 až 48.

256. Antigen podle odstavce 247, kde antigen obsahuje aminokyselínovou sekvenci vykazující alespoň přibližně 70 % shodu s libovolnou sudě číslovanou SEQ ID NO: 50 až 54.

257. Antigen podle odstavce 247, kde antigen obsahuje aminokyselínovou sekvenci vykazující alespoň přibližně 70 % shodu s libovolnou sudě číslovanou SEQ ID NO: 56 až 60.

258. Antigen podle odstavce 247, kde antigen obsahuje aminokyselínovou sekvenci vykazující alespoň přibližně 70 % shodu aminokyselinové sekvence s libovolnou sudě číslovanou SEQ ID NO: 62 až 66.

259. Antigen podle odstavce 247, kde antigen obsahuje aminokyselínovou sekvenci vykazující alespoň přibližně 70 % shodu s libovolnou sudě číslovanou SEQ ID NO: 68 až 72.

260. Antigen podle odstavce 247, kde antigen obsahuje aminokyselínovou sekvenci vykazující alespoň přibližně 70 % shodu s libovolnou sudě číslovanou SEQ ID NO: 74 až 78.

261. Antigen podle odstavce 247, kde antigen obsahuje aminokyselínovou sekvenci vykazující alespoň přibližně 70 % shodu s libovolnou sudě číslovanou SEQ ID NO: 80 až 84.

262. Antigen podle odstavce 247, kde antigen obsahuje aminokyselínovou sekvenci vykazující alespoň přibližně 70 % shodu s libovolnou ze sudě číslovaných SEQ ID NO: 86 až 90.

263. Antigen podle odstavce 247, kde antigen obsahuje aminokyselínovou sekvenci vykazující alespoň přibližně 70 % shodu s libovolnou sudě číslovanou SEQ ID NO: 92 až 96.

264. Antigen podle odstavce 247, kde antigen obsahuje aminokyselínovou sekvenci vykazující alespoň přibližně 70 % shodu s libovolnou sudě číslovanou SEQ ID NO: 98 až 102.

265. Antigen podle odstavce 247, kde antigen obsahuje aminokyselínovou sekvenci vykazující alespoň přibližně 70 % shodu s libovolnou sudě číslovanou SEQ ID NO:104 až 108.

266. Antigen podle odstavce 247, kde antigen obsahuje aminokyselínovou sekvenci vykazující alespoň přibližně 70 % shodu s libovolnou sudě číslovanou SEQ ID NO: 110 až 114.

267. Antigen podle odstavce 247, kde antigen obsahuje aminokyselínovou sekvenci vykazující alespoň přibližně 70 % shodu s libovolnou sudě číslovanou SEQ ID NO: 116 až 120.

268. Antigen podle odstavce 247, kde antigen obsahuje aminokyselínovou sekvenci vykazující alespoň přibližně 70 % shodu s libovolnou sudě číslovanou SEQ ID NO: 122 až 126.

269. Antigen podle odstavce 247, kde antigen obsahuje aminokyselínovou sekvenci vykazující alespoň přibližně 70 % shodu s libovolnou sudě číslovanou SEQ ID NO: 128 až 132.

270. Antigen podle odstavce 247, kde antigen obsahuje aminokyselínovou sekvenci vykazující alespoň přibližně 70 % shodu s libovolnou sudě číslovanou SEQ ID NO: 134 až 138.

271. Antigen podle odstavce 247, kde antigen obsahuje aminokyselínovou sekvenci vykazující alespoň přibližně 70 % shodu s libovolnou sudě číslovanou SEQ ID NO: 140 až 144.

272. Antigen podle odstavce 247, kde antigen obsahuje aminokyselínovou sekvenci vykazující alespoň přibližně 70 % shodu s libovolnou sudě číslovanou SEQ ID NO: 146 až 150.

273. Antigen podle odstavce 247, kde antigen obsahuje aminokyselínovou sekvenci vykazující alespoň přibližně 70 % shodu s libovolnou sudě číslovanou SEQ ID NO: 152 až 156.

274. Antigen podle odstavce 247, kde antigen obsahuje aminokyselínovou sekvenci vykazující alespoň přibližně 70 % shodu s libovolnou sudě číslovanou SEQ ID NO: 158 až 162.

275. Antigen podle odstavce 247, kde antigen obsahuje aminokyselínovou sekvenci vykazující alespoň přibližně 70 % shodu s libovolnou sudě číslovanou SEQ ID NO: 164 až 168.

276. Antigen podle odstavce 247, kde antigen obsahuje aminokyselínovou sekvenci vykazující alespoň přibližně 70 % shodu s libovolnou sudě číslovanou SEQ ID NO: 170 až 174.

277. Antigen podle odstavce 247, kde antigen obsahuje aminokyselínovou sekvenci vykazující alespoň přibližně 70 % shodu s libovolnou sudě číslovanou SEQ ID NO: 176 až 180.

278. Antigen podle odstavce 247, kde antigen obsahuje aminokyselínovou sekvenci vykazující alespoň přibližně 70 % shodu s libovolnou sudě číslovanou SEQ ID NO: 182 až 186.

279. Antigen podle odstavce 247, kde antigen obsahuje aminokyselínovou sekvenci vykazující alespoň přibližně 70 % shodu s libovolnou sudě číslovanou SEQ ID NO: 188 až 192.

280. Antigen podle odstavce 247, kde antigen obsahuje aminokyselínovou sekvenci vykazující alespoň přibližně 70 % shodu s libovolnou sudě číslovanou SEQ ID NO: 194 až 198.

281. Antigen podle odstavce 247, kde antigen obsahuje aminokyselínovou sekvenci vykazující alespoň přibližně 70 % shodu s libovolnou sudě číslovanou SEQ ID NO: 200 až 204.

282. Antigen podle odstavce 247, kde antigen obsahuje aminokyselínovou sekvenci vykazující alespoň přibližně 70 % shodu s libovolnou sudě číslovanou SEQ ID NO: 206 až 210.

283. Antigen podle odstavce 247, kde antigen obsahuje aminokyselínovou sekvenci vykazující alespoň přibližně 70 % shodu s libovolnou sudě číslovanou SEQ ID NO: 212 až 216.

284. Antigen podle odstavce 247, kde antigen obsahuje aminokyselínovou sekvenci vykazující alespoň přibližně 70 % shodu s libovolnou sudě číslovanou SEQ ID NO: 218 až 222.

285. Antigen podle odstavce 247, kde antigen obsahuje aminokyselínovou sekvenci vykazující alespoň přibližně 70 % shodu s libovolnou sudě číslovanou SEQ ID NO: 224 až 228.

286. Antigen podle odstavce 247, kde antigen obsahuje aminokyselínovou sekvenci vykazující alespoň přibližně 70 % shodu s libovolnou sudě číslovanou SEQ ID NO: 230 až 234.

287. Antigen podle odstavce 247, kde antigen obsahuje aminokyselínovou sekvenci vykazující alespoň přibližně 70 % shodu s libovolnou sudě číslovanou SEQ ID NO: 236 až 240.

288. Antigen podle odstavce 247, kde antigen obsahuje aminokyselínovou sekvenci vykazující alespoň přibližně 70 % shodu s libovolnou sudě číslovanou SEQ ID NO: 242 až 246.

289. Antigen podle odstavce 247, kde antigen obsahuje aminokyselínovou sekvenci vykazující alespoň přibližně 70 % shodu s libovolnou sudě číslouvanou SEQ ID NO: 248 až 252.

290. Použití prostředku podle odstavce 1 až 289 k přípravě léčebného prostředku k vyvolání imunitní odezvy u savce.

291. Použití podle odstavce 290, kde uvedený prostředek se aplikuje parenterálně.

292. Použití podle odstavce 290, kde uvedený prostředek se aplikuje mukozálně.

293. Použití prostředku podle odstavce 1 až 289 k přípravě léčebného prostředku proti bakteriální meningitidě u savce.

294. Použití podle odstavce 293, kde uvedený prostředek se aplikuje parenterálně.

295. Použití podle odstavce 293, kde uvedený prostředek se aplikuje mukozálně.

296. Použití podle odstavce 293, kde uvedený prostředek se aplikuje subkutánní nebo intramuskulární injekcí.

297. Způsob přípravy prostředku obsahujícího:

expresi sekvence nukleové kyseliny v hostitelské buňce kódující libovolnou z:

alespoň jeden kódovaný otevřeným čtecím rámcem *Neisseria species* (ORF2086), uvedený otevřený čtecí rámec kódující zkříženě reagující imunogenní antigen a uvedený zkříženě reaktivní imunogenní antigen poskytující u jedince imunogenost proti infekci *Neisseria meningitidis* seroskupina B; nebo

- (a) alespoň jednu imunogenní část alespoň jednoho proteinu popsaného v odstavci (a); nebo
- (b) alespoň jeden biologický ekvivalent alespoň jednoho proteinu popsaného v (a) nebo imunogenní fragment popsaný v v odstavci (b).

298. Způsob podle odstavce 297, kde sekvence nukleové kyseliny se extrimuje *in vivo*.

299. Způsob podle odstavce 297, kde sekvence nukleové kyseliny se extrimuje *in vitro*.

300. Způsob podle odstavce 297, který dále osahuje asociaci vedoucí sekvence P4 (SEQ ID NO: 322).

301. Způsob podle odstavce 297, kde alespoň jeden protein obsahuje libovolnou z SEQ ID NO: 254 až 299.

302. Způsob přípravy prostředku zahrnujícího:

izolaci a čištění z *N. meningitidis* alespoň jednoho polynukleotidu, který (a) kóduje u jedince alespoň jeden protein kódovaný otevřeným čtecím rámcem z *Neisseria species* (ORF2086) seroskupina B; nebo (b) hybridizuje za přísných podmínek s libovolným ze zde popsaných polynukleotidů v (a).

303. Způsob podle odstavce 302, kde přísné podmínky jsou velmi přísné podmínky southernovy hybridizace.

304. Způsob přípravy prostředku obsahujícího:

izolaci a čištění z *Neisseria species* libovolného z proteinů, imunogenní části nebo zde popsaných biologických ekvivalentů.

305. Způsob přípravy protilátkového prostředku, který zahrnuje:

získání protilátek ze zvířete po zavedení do zvířete prostředku, který obsahuje libovolný z proteinů, imunogenních částí nebo zde popsaných biologických ekvivalentů.

306. Způsob vyvolání imunitní odezvy u savců zahrnující:

aplikaci účinného množství jednoho nebo více prostředků podle odstavce 1 až 289 savci.

307. Způsob podle odstavce 306, kde uvedený prostředek se aplikuje parenterálně.

308. Způsob podle odstavce 306, kde uvedený prostředek se aplikuje mukozálně.

309. Způsob prevence nebo léčby bakteriální meningitidy u savce, který zahrnuje:

aplikaci savci účinného množství jednoho nebo více prostředků podle odstavce 1 až 289.

310. Způsob podle odstavce 309, kde uvedený prostředek se aplikuje parenterálně.

311. Způsob podle odstavce 309, kde uvedený prostředek se aplikuje mukozálně.

312. Způsob podle odstavce 309, kde prostředek se aplikuje subkutánní nebo intramuskulární injekcí.

313. Způsob prevence nebo léčby bakteriální meningitidy u savce obsahující:

aplikaci savci účinného množství protilátkového prostředku obsahujícího protilátky, které se imunspecificky váží na protein, imunogenní část nebo biologický ekvivalent obsahující-

cí aminokyselinovou sekvenci libovolné sudě číslované SEQ ID NO: 2 až 252 nebo libovolné z SEQ ID NO: 254 až 299.

314. Způsob podle odstavce 313, kde protilátkový prostředek se aplikuje parenterálně.

315. Způsob podle odstavce 313, kde protilátkový prostředek se aplikuje mukozálně.

316. Způsob podle odstavce 313, kde protilátkový prostředek se aplikuje subkutánní nebo intramuskulární injekcí.

317. Způsob přípravy prostředku obsahujícího:

expresi sekvence nukleové kyseliny v hostitelské buňce kódující libovolný z:

- (a) alespoň jeden protein obsahující aminokyselinovou sekvenci libovolné ze sudě číslovaných SEQ ID NO: 2 až 252 nebo libovolné z SEQ ID NO: 254 až 299;
- (b) alespoň jeden protein kódovaný polynukleotidem, který hybridizuje za přísných podmínek s polynukleotidem obsahujícím sekvenci nukleové kyseliny podle libovolného ze sudě číslovaných SEQ ID NO: 1 až 253;
- (c) alespoň jedna imunologická část alespoň jednoho proteinu popsaného v odstavci (a) nebo (b); nebo
- (d) alespoň jeden biologický ekvivalent alespoň jednoho proteinu popsaného v odstavci (a) nebo (b) nebo imunogenní fragment popsaný v odstavci (c).

318. Způsob podle odstavce 317, kde sekvence nukleové kyseliny se exprimuje *in vivo*.

319. způsob podle odstavce 317, kde sekvence nukleové kyseliny se exprimuje *in vitro*.
320. Způsob podle odstavce 317, kde vektorem je plazmid.
321. Způsob podle odstavce 317, kde vektorem je fág.
322. Způsob podle odstavce 317, který dále obsahuje asociaci s nepřirozenou vedoucí sekvencí s uvedeným alespoň jedním izolovaným polynukleotidem.
323. Způsob podle odstavce 317, kde nepřirozenou vedoucí sekvencí je vedoucí sekvence P4 (SEQ ID NO: 267).
324. Způsob přípravy prostředku obsahujícího:
- izolaci a čištění z *Neisseria species* alespoň jednoho izolovaného proteinu, který obsahuje aminokyselinovou sekvenci SEQ ID NO: 300;
- kde x je libovolná aminokyselina;
- kde oblast od polohy aminokyseliny 5 do polohy aminokyseliny 9 je libovolná 0 až 5 aminokyselin;
- kde oblast z polohy aminokyseliny 67 do polohy aminokyseliny 69 je libovolná z 0 až 3 aminokyseliny; a
- kde aminokyselina v poloze 156 je libovolná z 0 až 1 aminokyseliny.
325. Způsob podle odstavce 324, který dále obsahuje zavedení nepřirozené vedoucí sekvence do alespoň jednoho izolovaného polynukleotidu.
326. Způsob podle odstavce 324, kde nepřirozenou vedoucí sekvencí je vedoucí sekvence P4 (SEQ ID NO: 322).

327. Způsob přípravy prostředku obsahujícího:

izolaci a čištění z *Neisseria species* libovolného z:

- (a) alespoň jednoho proteinu obsahujícího aminokyselinovou sekvenci libovolné ze sudě číslovaných SEQ ID NO: 2 až 252 nebo aminokyselinovou sekvenci libovolné z SEQ ID NO: 254-259, 260-278 nebo 279-299; nebo
- (b) alespoň jeden protein kódovaný polynukleotidem, který hybridizuje za přísných podmínek s polynukleotidem obsahujícím sekvenci nukleové kyseliny libovolné ze sudě číslovaných SEQ ID NO: 1 až 253.

328. Způsob podle odstavce 327, kde přísné podmínky jsou silně přísné podmínky southernovy hybridizace.

329. Způsob přípravy protilátkového prostředku, který obsahuje:

získání protilátek ze zvířete po zavedení do zvířete prostředku, který obsahuje:

- (a) alespoň jeden protein obsahující aminokyselinovou sekvenci libovolné ze sudě číslovaných SEQ ID NO: 2-252 nebo aminokyselinové sekvence libovolné z SEQ ID NOS: 254-259, 260-278 nebo 279-299; nebo
- (b) alespoň jeden protein kódovaný polynukleotidem, který hybridizuje za přísných podmínek s polynukleotidem podle libovolného z liše číslovaných SEQ ID NO: 1 až 253.

330. Způsob podle odstavce 329, kde přísné podmínky jsou velmi přísné podmínky southernovy hybridizace.

331. Transformovaná/transfekovaná nebo infikovaná buněčná linie obsahující:

rekombinantní buňku, která exprimuje sekvenci nukleové kyseliny, která (a) kóduje alespoň jeden izolovaný protein obsahující aminokyselinovou sekvenci libovolné z SEQ ID NO: 254-259, 260-278 nebo 279-299 nebo (b) hybridizuje za přísných podmínek s libovolným z polynukleotidů popsaného v (a).

332. Transformovaná/transfekovaná nebo infikovaná buněčná linie obsahující:

rekombinantní buňku, která exprimuje sekvenci nukleové kyseliny, která (a) kóduje alespoň jeden protein kodovaný otevřeným čtecím rámcem z *Neisseria species* (ORF2086) nebo alespoň jednu imunogenní část nebo biologický ekvivalent uvedeného alespoň jednoho proteinu, uvedený otevřený čtecí rámec kódující zkříženě reaktivní imunogenní antigen a uvedený zkříženě reaktivní imunogenní antigen poskytující jedinci imunogennost proti infekci *Neisseria meningitidis* seroskupina B nebo (b) hybridizuje s za přísných podmínek s libovolným z polynukleotidů popsaných v odstavci (a); nebo

rekombinantní buňku, která exprimuje sekvenci nukleové kyseliny kódující: (c) alespoň jeden polypeptid kódovaný libovolným z (a) nebo (b); nebo (d) alespoň jeden polypeptid obsahující aminokyselinovou sekvenci libovolné ze sudě číslovaných SEQ ID NO: 2 až 252.

333. Transformovaná/transfekovaná nebo infikovaná buněčná linie podle odstavce 332, kde polypeptidem je monoklonální protilátka.

334. Transformovaná/transfekovaná nebo infikovaná buněčná linie podle odstavce 332, kde rekombinantní buňkou je hybridom.

335. Transformovaná/transfekovaná nebo infikovaná buněčná linie podle odstavce 332, kde rekombinantní buňkou je triom.

336. Transformovaná/transfekovaná nebo infikovaná buněčná linie obsahující:

rekombinantní buňku, která exprimuje sekvenci nukleové kyseliny obsahující:

- (a) alespoň jeden polynukleotid, který kóduje protein obsahující libovolnou ze sudě kodovaných SEQ ID NO: 2 až 252;
- (b) alespoň jeden polynukleotid obsahující sekvenci nukleové kyseliny libovolné liše číslované SEQ ID NO: 1 až 253;
- (c) alespoň jeden polynukleotid, který hybridizuje za přísných podmínek s libovolným (a) nebo (b); nebo rekombinantní buňka, která exprimuje sekvenci nukleové kyseliny kódující:
- (d) alespoň jeden polypeptid kodovaný libovolnou (a), (b) nebo (c); nebo
- (e) alespoň jeden polypeptid obsahující aminokyselinovou sekvenci libovolné ze sudě číslovaných SEQ ID NO: 2 až 252.

337. Transformovaná/transfekovaná nebo infikovaná buněčná linie podle odstavce 336, kde polypeptidem je monoklonální protilátka.

338. Transformovaná/transfekovaná nebo infikovaná buněčná linie podle odstavce 336, kde rekombinantní buňkou je hybridom.

339. Transformovaná/transfekovaná nebo infikovaná buněčná linie podle odstavce 336, kde rekombinantní buňkou je trioma.

340. Způsob identifikace imunogenního proteinu zahrnující:

detekční baktericidní aktivitu ve vzorku testovaném proti antiséru ORF2086.

341. Způsob k identifikaci imunogenního proteinu, který obsahuje:

detekci polynukleotidu ve vzorku testovaném proti sondě nukleové kyseliny ORF2086.

342. Prostředek, jak se v podstatě popisuje shora v textu.

343. Použití v podstatě, jak se popisuje shora v textu.

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Prostředek obsahující alespoň jeden protein obsahující aminokyselinovou sekvenci vykazující shodu sekvence vyšší než 97 % s aminokyselinovou sekvencí libovolné z SEQ ID NO. 58, 56 a 60.
2. Prostředek podle nároku 1, kde uvedený alespoň jeden protein obsahuje aminokyselinovou sekvenci libovolné jedné z SEQ ID NO: 58, 56 a 60.
3. Prostředek podle nároku 1, kde uvedený alespoň jeden protein se skládá z aminokyselinové sekvence vykazující shodu sekvence vyšší než 97 % s aminokyselinou libovolné sekvence z SEQ ID NO: 58, 56 a 60.
4. Prostředek podle nároku 1 až 3, kde uvedený alespoň jeden protein je lipidován.
5. Prostředek podle nároku 1 až 3, kde uvedený alespoň jeden protein není lipidován.
6. Prostředek podle libovolného z nároků 1 až 5, kde uvedeným alespoň jedním proteinem je rekombinantní protein.
7. Prostředek podle libovolného z nároků 1 až 6, kde uvedený prostředek dále obsahuje farmaceuticky přijatelný pufr, ředidlo, adjuvans nebo nosič.
8. Prostředek podle nároku 7, kde adjuvans je hydroxid hlinitý nebo fosforečnan hlinitý.
9. Prostředek podle libovolného z nároků 1 až 8, kde prostředek dále obsahuje jiné aktivní imunogeny.

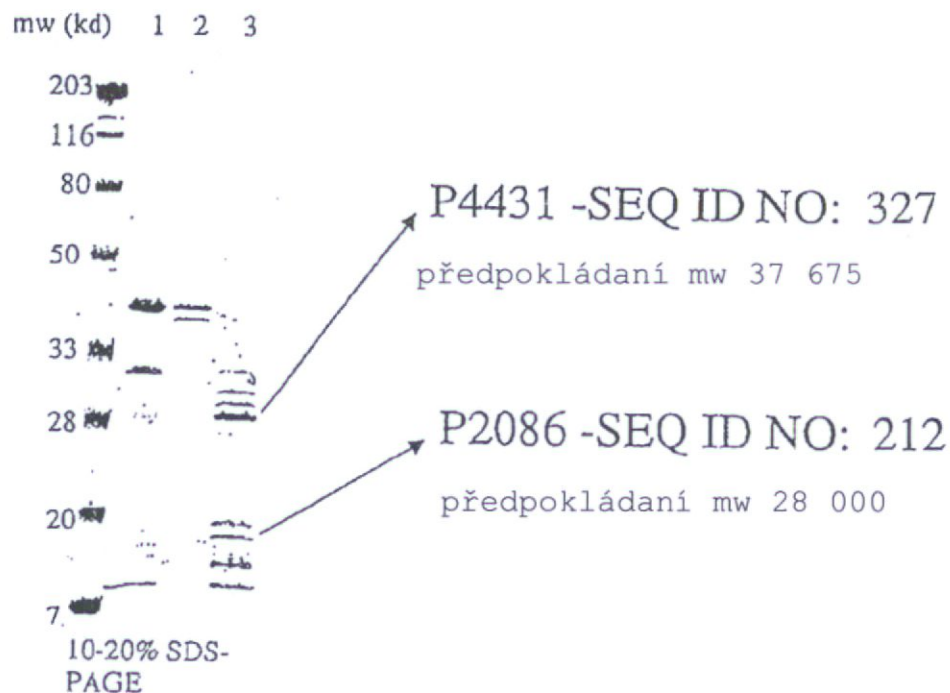
10. Prostředek podle libovolného z nároků 1 až 8, kde prostředek dále obsahuje jiné imunogenní polypeptidy *Neisseria species*.
11. Prostředek podle libovolného z nároků 1 až 10, kde prostředek dále obsahuje alespoň jeden PorA, PorB, protein vázající transferin, opacitní protein (Opc) nebo alespoň jeden další povrchový antigen *Neisseria species*, přičemž uvedeným dalším povrchovým antigenem je non-ORF2086 protein.
12. Prostředek podle libovolného z nároků 1 až 11, který dále obsahuje polysacharid.
13. Izolovaný polynukleotid vykazující alespoň 90 % shodu s libovolnou jednou nukleotidovou sekvencí SEQ ID NO: 57, 55 a 59.
14. Prostředek obsahující alespoň jeden polynukleotid, který kóduje alespoň jeden protein obsahující aminokyselinovou sekvenci libovolné z SEQ ID NO: 58, 56 a 60.
15. Prostředek podle nároku 14, kde uvedený alespoň jeden polynukleotid obsahuje sekvenci nukleové kyseliny libovolné z SEQ ID NO: 57, 55 a 59.
16. Prostředek obsahující alespoň jednu protilátku, která se imunspecificky váže na protein obsahující aminokyselinovou sekvenci libovolné z SEQ ID NO: 58, 56 a 60.
17. Vektor obsahující sekvenci řídící exprese vykazující promotorové sekvence a iniciační sekvence a nukleotidovou sekvenci, která kóduje polypeptid libovolné z SEQ ID NO: 58, 56 a 60, nukleotidovou sekvenci lokalizovanou na 3' ve vztahu s promotorovou a iniciační sekvencí.
18. Hostitelská buňka obsahující vektor podle nároku 17.

19. Způsob přípravy prostředku obsahujícího expresi sekvence nukleové kyseliny v hostitelské buňce kódující alespoň jeden protein obsahující aminokyselinovou sekvenci libovolné z SEQ ID NO: 58, 56 a 60.
20. Prostředek podle libovolného z nároků 1 až 12 nebo 14 až 16 k použití jako léčebného prostředku.
21. Prostředek podle libovolného z nároků 1 až 12 nebo 14 až 16 k použití ve způsobu zahrnujícím imunitní odezvu u savce.
22. Prostředek podle libovolného z nároků 1 až 12 nebo 14 až 16 k použití při způsobu zmírnění nebo prevenci infekce *N. meningitidis* u člověka.

Identifikace složek u neadsorbovaných TMAE frakcí: SDS-PAGE izolace peptidů

CNBr štěpení neadsorbované TMAE frakce následované SDS-PAGE a N-terminálním sekvenováním fragmentů z blotu PVDF

- 1 - TMAE neadsorbovaný neštěpený
- 2 - TMAE neadsorbovaný LysC štěpený
- 3 - TMAE neadsorbovaný CNBR štěpený



Identifikace složek v neadsorbované TMAE frakci: Izolace peptidů s reverzní fází
Enzymatické štěpení neadsorbované TMAE frakce následované chromatografickou separací s reverzní fází peptidů a přímým N-terminálním sekvenováním

enzymatické štěpení	retenční čas peptidu (min.)	molekulová hmotnost peptidu (d)	N-terminální ID
GluC (V8)	6.716	2069.7	P5163
LysC	13.800	3351.2	P4431
LysC	13.800	3351.2	P2086
ArgC	6.860	2278.9	P5163

P4431 (SEQ ID NO: 327)

předpokládaná mw 36 775

P2086 (SEQ ID NO: 212)

předpokládání mw 27 100

P5163 (SEQ ID NO: 328)

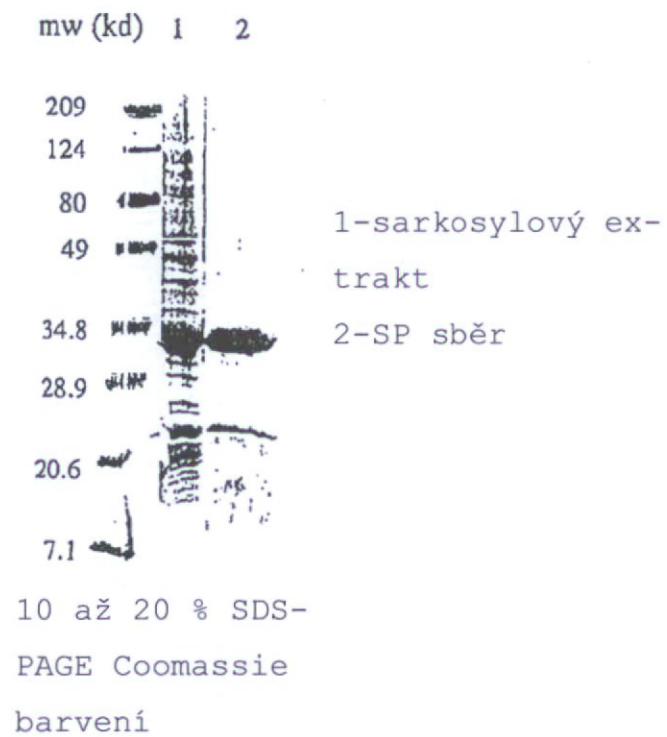
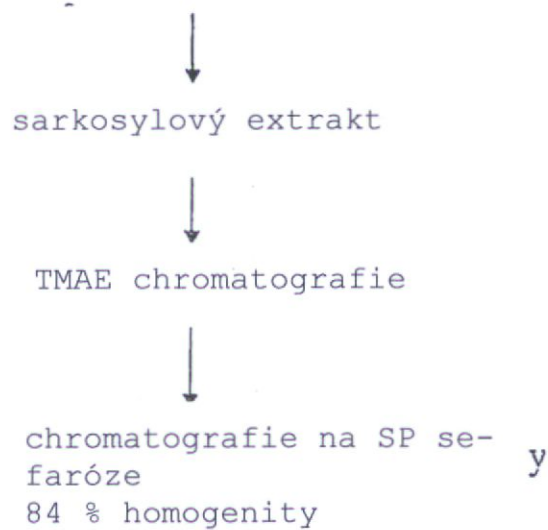
předpokládaná mw 7 081



Čištění rLP2086

Buňky BLR DE3 pLysS

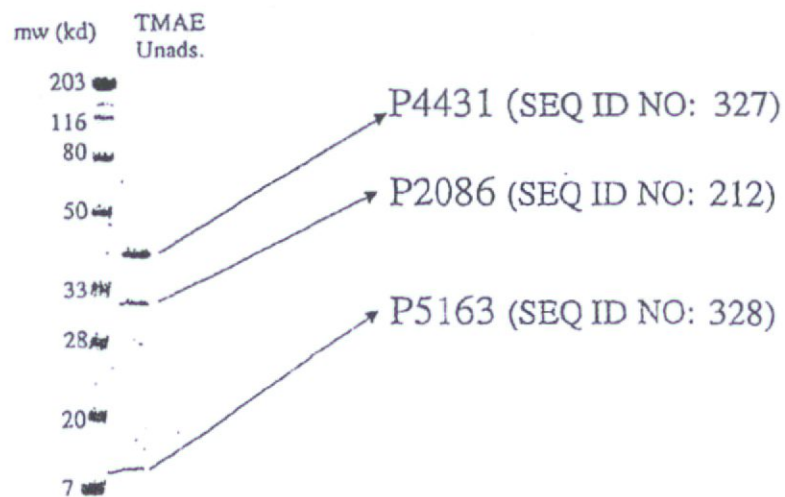
pET27b 2086A1



Identifikace složek v neadsorbované TMAE frakci:

LC-MS/MS

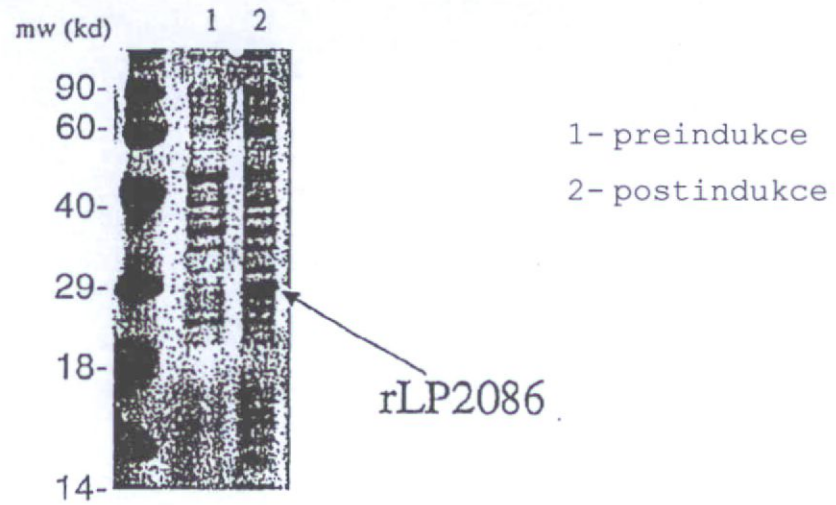
SDS-PAGE následované gelovou excizí, proteolytické štěpení a LC-MS/MS analýza (kapalná chromatografie tandem hmotnostní spektroskopie)



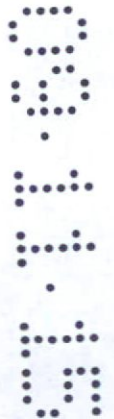
10 až 20 % SDS-
PAGE barvení
podle Coomassie

expresse rLP2086

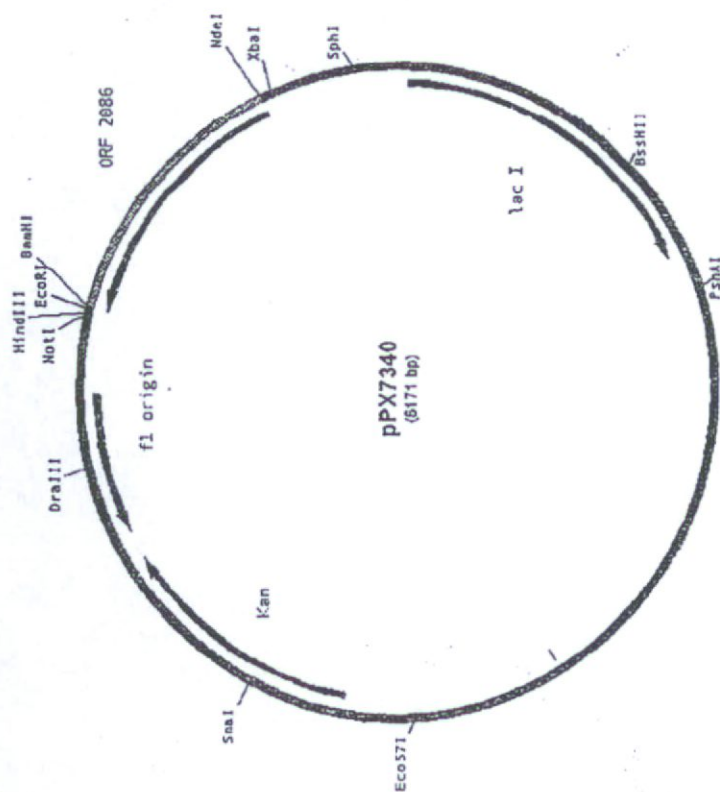
Obr. 4



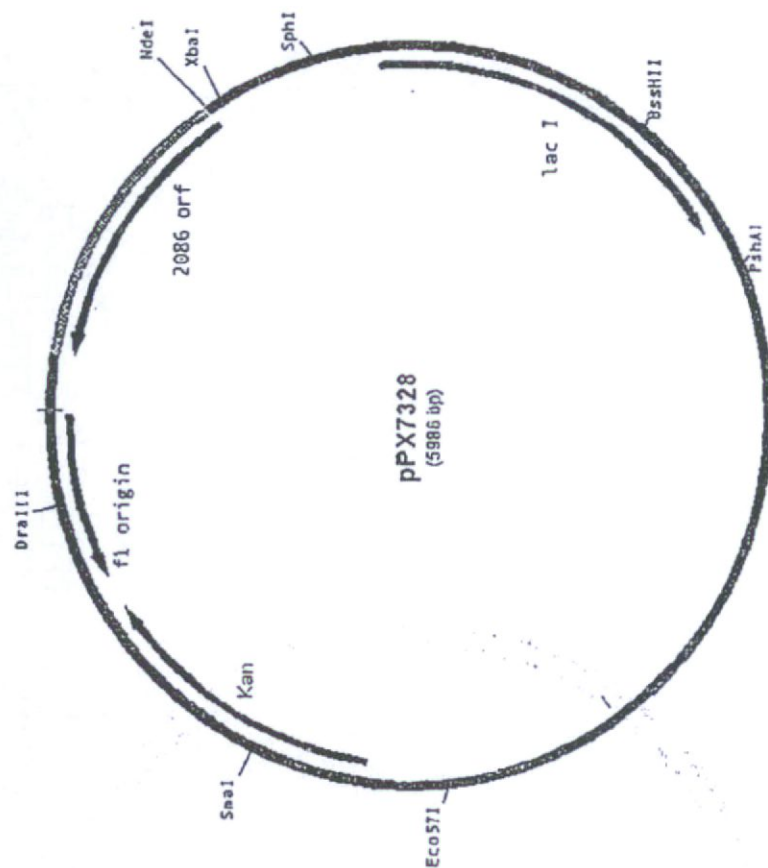
10 až 20 % SDS-
PAGE barvení
podle Coomassie



Obr. 5

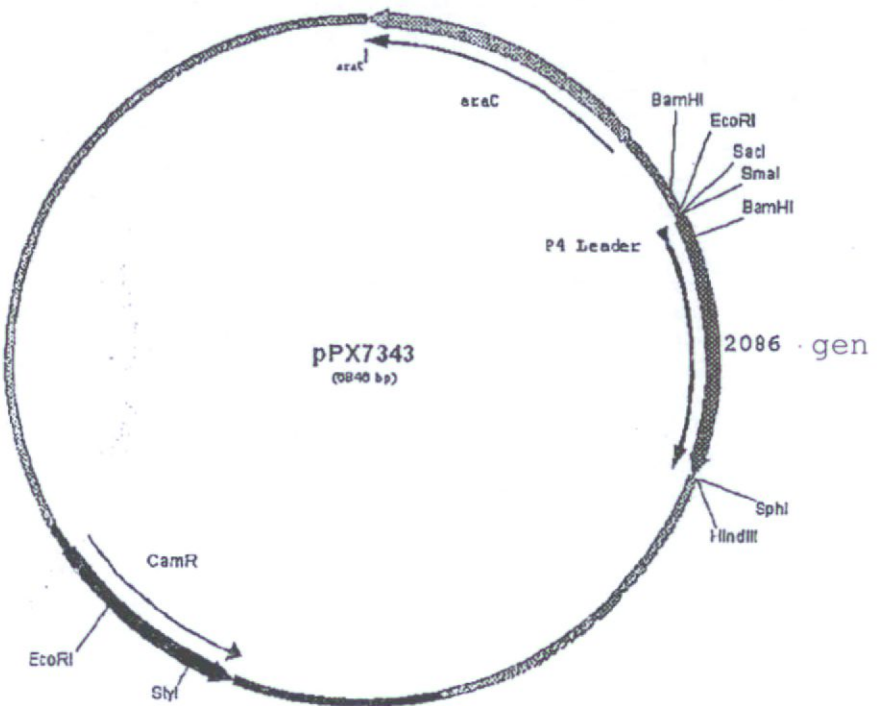


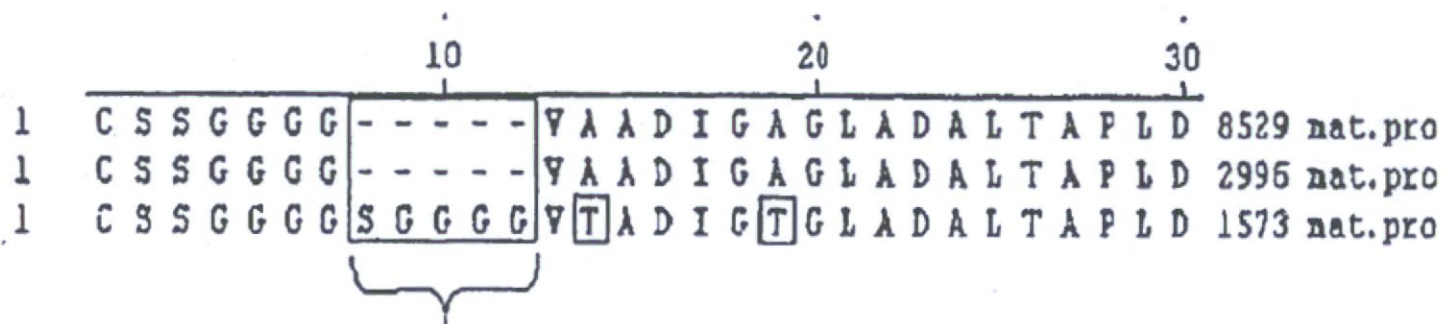
Obr. 6



09.11.15

Obt. 7





5 aminokyselinových repetit

Identifikace imunogenní složky v Nm kmenu 8529

A. diferenciální detergentní extrakce

Cit/neri

TX-100: BC titry pro 4/5 testovaných kmenů

Zwittergent 3-12
Zwittergent 3-14
Zwittergent 3-14+NaCl
Sarcosyl
Zwittergent 3-14+heat

B. preparativní izoelektrická fokuzace

provedeno v BioRad Roto v souladu s instrukcemi výrobce.

1% 7/10 a 1% 4/6 amfolytového roztoku užívaného v 1% TX-100

sběr frakcí v pI rozmezí přibližně 5,6 až 7,6

BC titry pro 4/4 tetsovaných kmenů

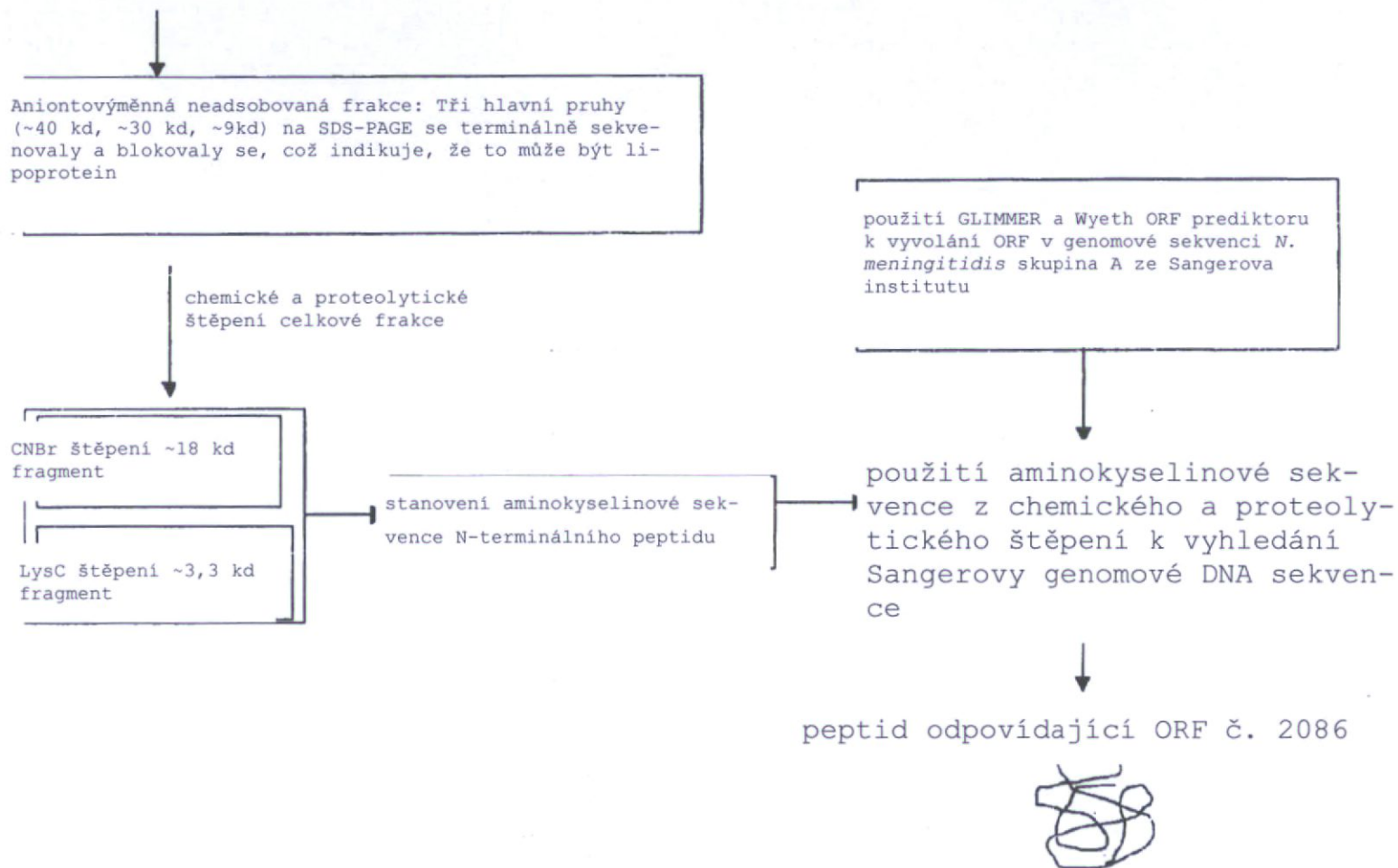
C. aninontovýmienná chromatografie

Protein se separoval z amfolytů použitím srážení s 90 % ethanolem

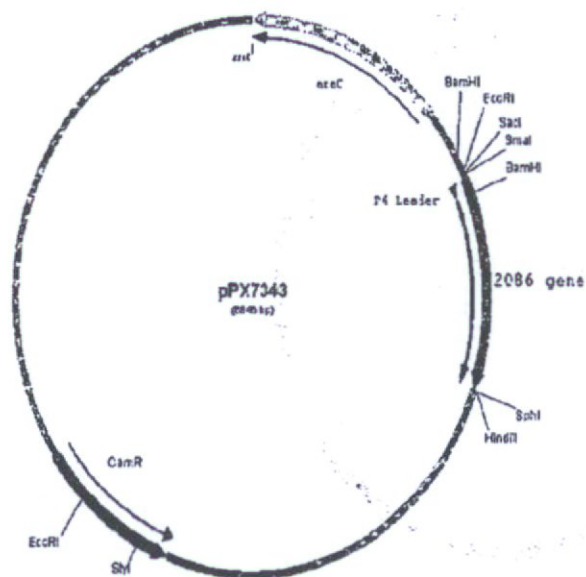
chromatografie se provedla použitím TMAE pryskyřice s Tris-HCl pH8 pufru a

NaCl eluce. 1% TX-100 ve všech pufrch

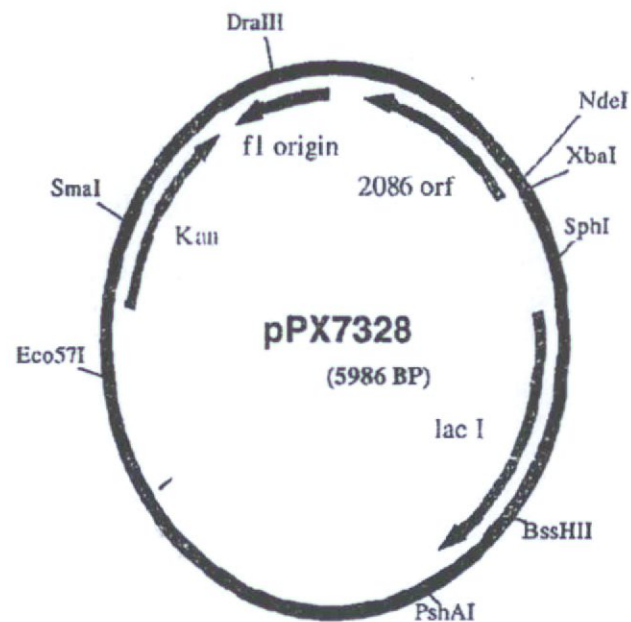
nadsorbovaná frakce: BC titry pro 3/3 testovaných kmenů



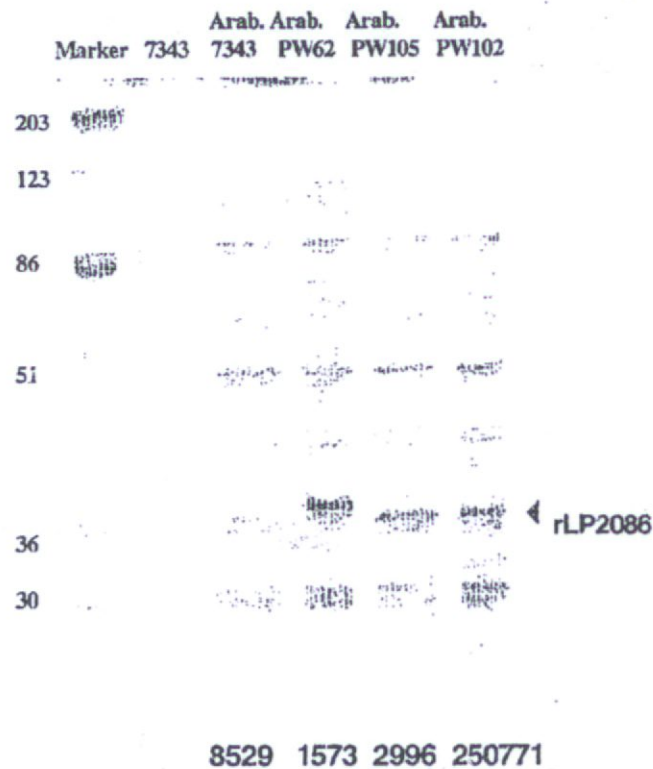
Obr. 10A
Lipidovaný rP2086
pBAD18-arabinóza promotor



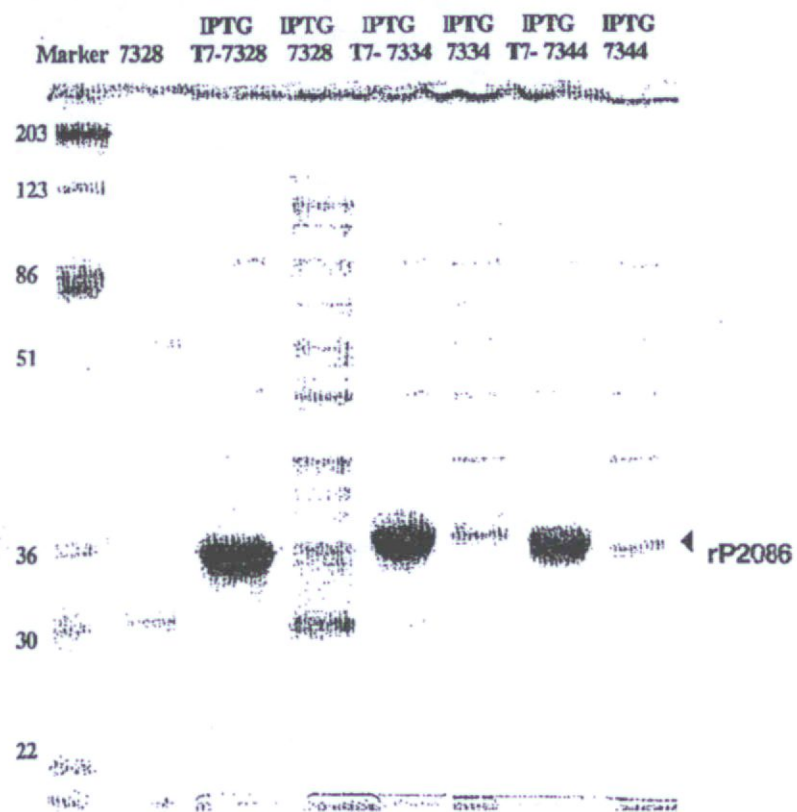
Obr. 10B
nelipidovaný rP2086
pET9a-T7 promotor
8529, CDC-1573 a 2996



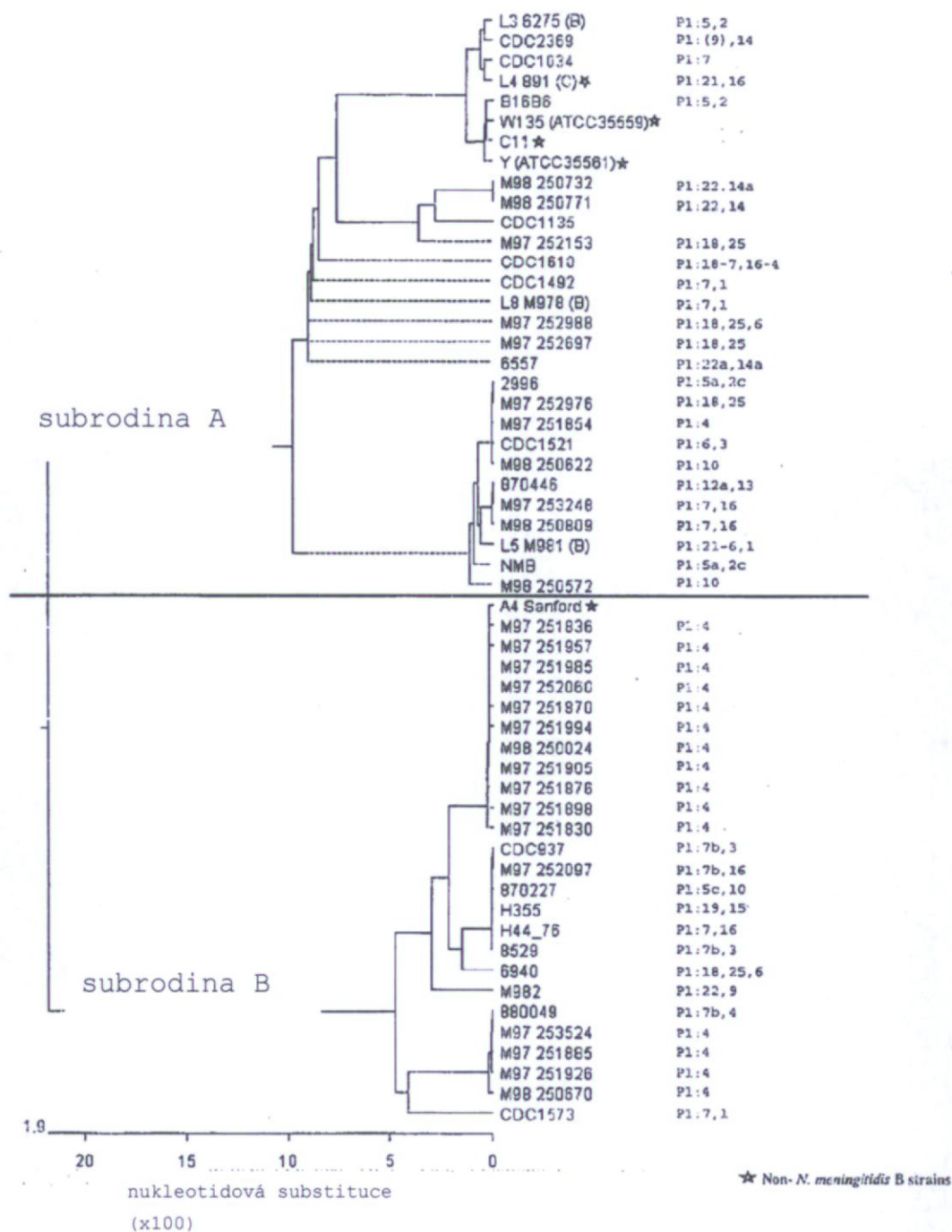
Obr. 11A
rLP2086 exprimovaný v pBAD/BLR
indukce arabinózy



Obr. 11B
rP2086 exprimovaný v pET/BL21 (DE3)
IPTG indukce s/bez T7-Tag

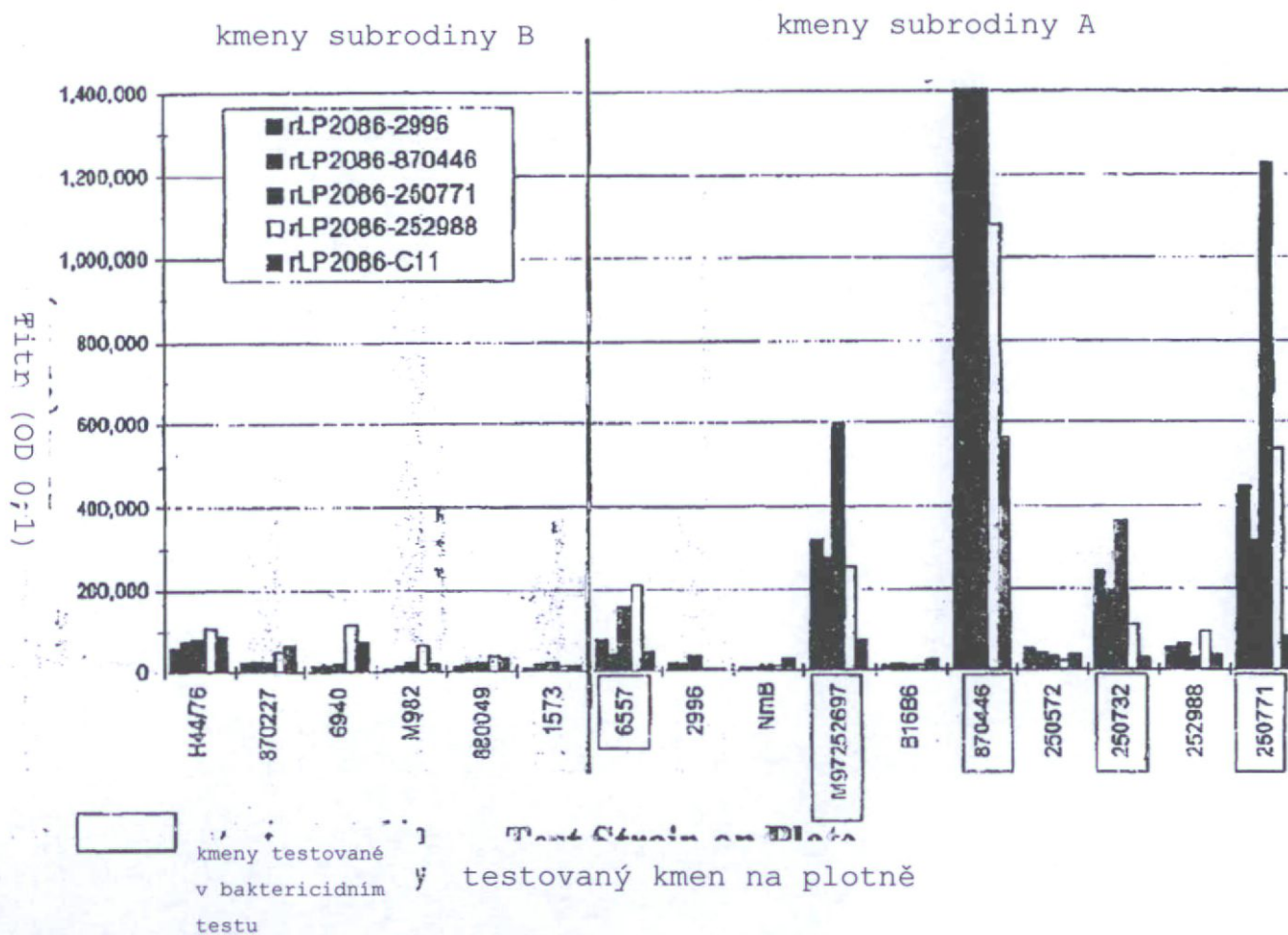


Obr. 12



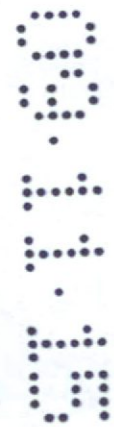
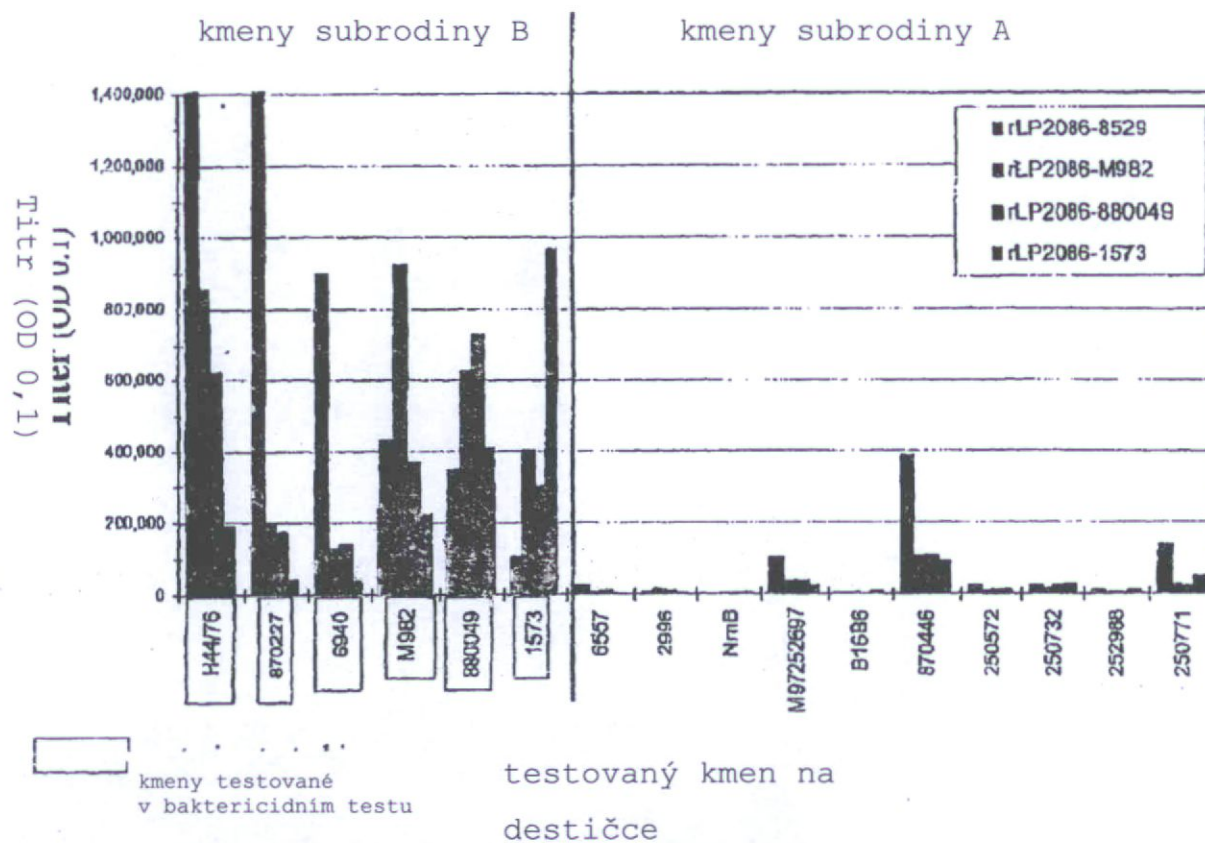
Data s testu ELISA s celými buňkami pro rLP2086 subrodina A

Antisera

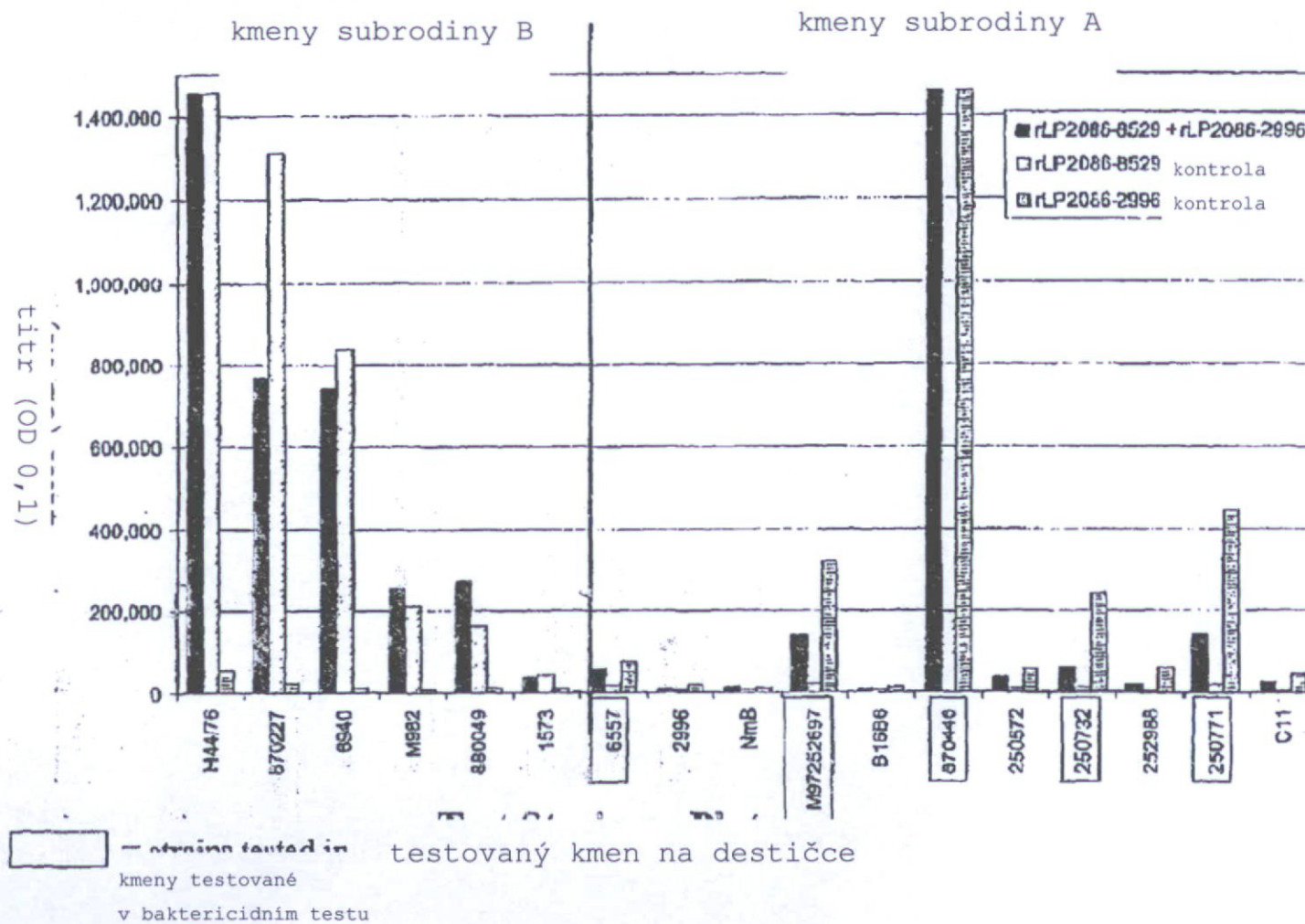


data z testu ELISA s celými buňkami pro rLP2086 subrodiny
B

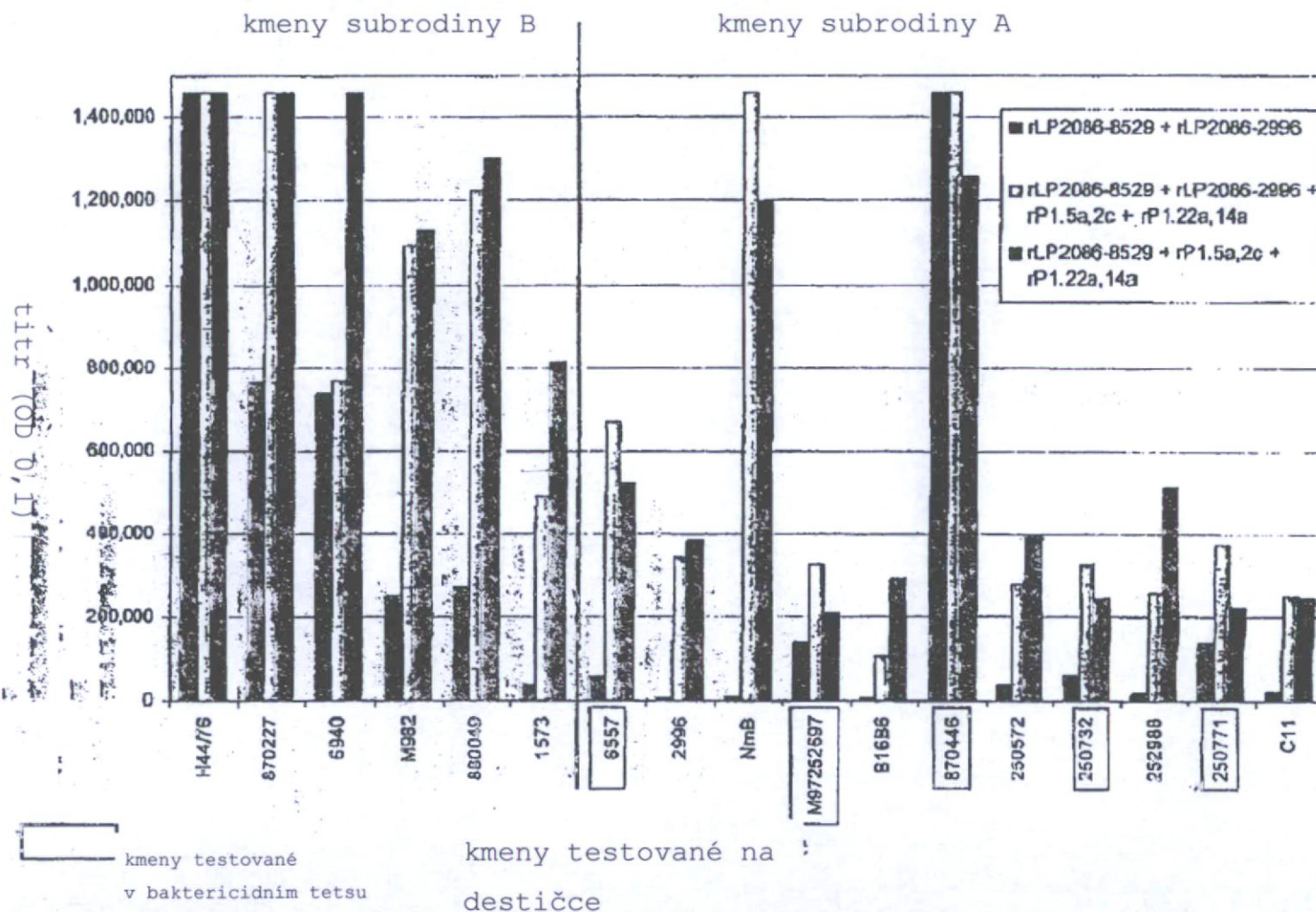
Antisera



rLP2086 smiřená studie - WCE titry

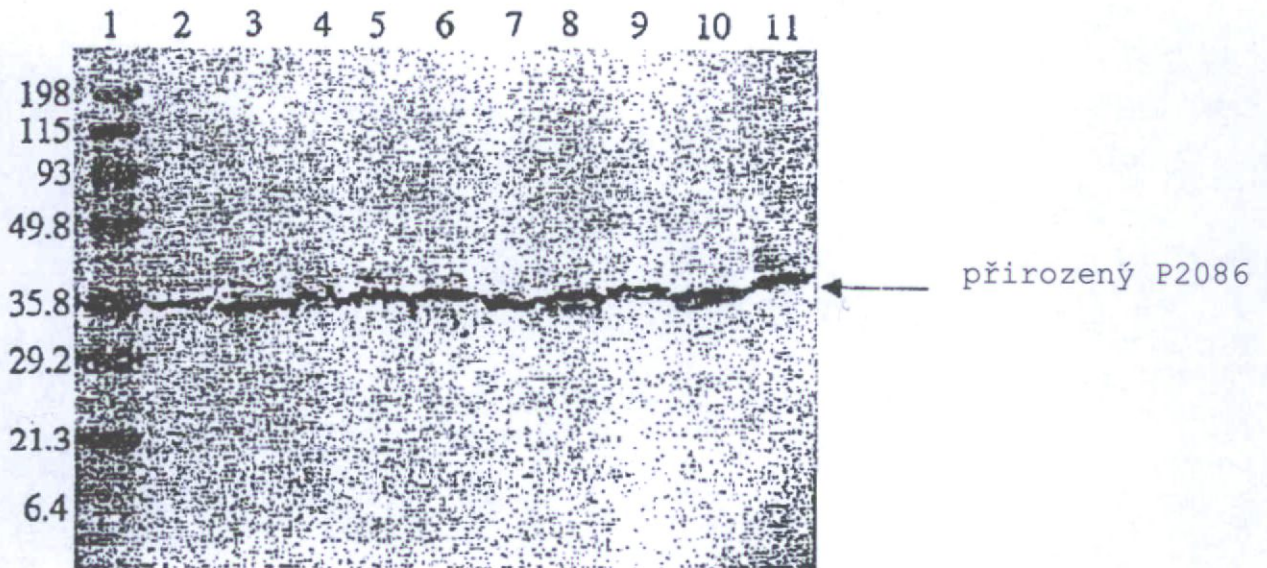


rLP2086/rPorA smíšená studie - WCE titry



Obr. 17

Reaktivita rLP2086 myšního antiséra s P2086 subrodina B s lyzátem celých buněk *N. meningitidis* v testu western blot



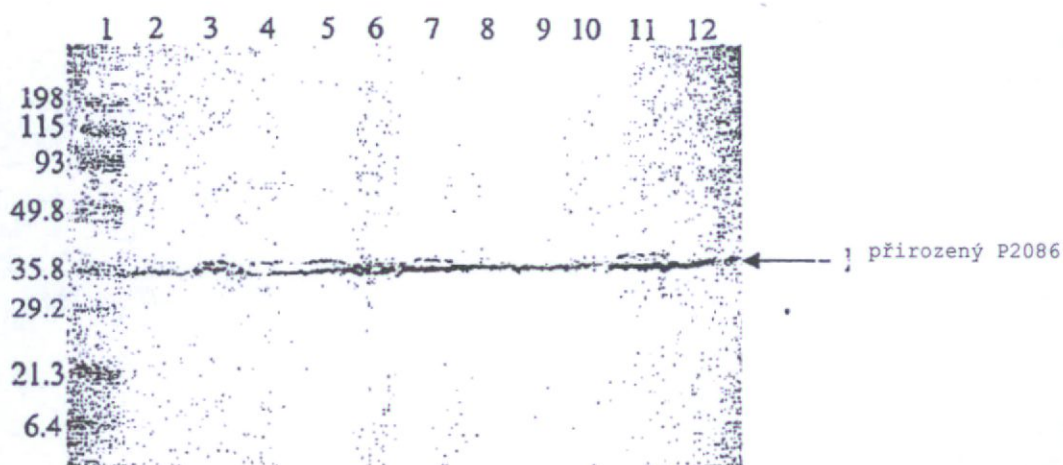
1 - marker molekulové hmotnosti kDa

- | | |
|----------------|-----------------|
| 2 - M97 251985 | 7 - CDC1359 |
| 3 - CDC937 | 8 - CDC1658 |
| 4 - 6940 | 9 - M97 252026 |
| 5 - M97 251926 | 10 - M97 252029 |
| 6 - CDC1573 | 11 - M982 |

buněčné lyzáty buněk P2086 subrodina B jsou všechny *N. meningitidis* skupina B

Obr. 18

Reaktivita rLP2086 myšního antiséra s P2086 subrodina B s lyzátem celých buněk *N. meningitidis* a *N. lactamica* v testu western blot



1- markery molekulové hmotnosti (kDa)

2- skupina A *N.meningitidis* A4
(P2086 subrodna A)

3- skupina C *N.meningitidis* - C11

4- skupina Y *N.meningitidis*
ATCC35561

5- skupina W135 *N.meningitidis*
ATCC35559

skupina *N.meningitidis*

7- CDC1034

8- M98 250732

9- NmB

10- 6557

11- CDC1521

12- M97 252153

REFERENCE CITOVANÉ V POPISU

Tento seznam referencí citovaných přihlašovatelem slouží jen pro pohodlí čtenáře. Tento seznam netvoří část evropského patentu. I když byla vytváření seznamu referencí věnována velká péče, nelze vyloučit chyby nebo opomenutí a EPÚ se v této souvislosti zříká jakékoli zodpovědnosti.

Patentové dokumenty citované v popisu

- WO0164922A [0010]
- WO0164920A [0011]
- US4554101A [0058]
- US5583038A [0070]
- US6130085A [0070]
- US5955580A [0072]
- US4376110A [0079]
- EP125023A [0080]
- EP171496A [0080]
- EP173494A [0080] [0080]
- WO8601533A [0080]
- EP184187A [0080]
- US8602269W [0080]
- EP0232262A1 [0096]
- WO0018434A [0101]

09.11.15

- WO9528494A [0111]
- WO9421807A [0113]
- WO9205263A [0113]
- WO9426914A [0115] [0115]
- WO9502697A [0115] [0115]
- WO9428938A [0115]
- WO9428152A [0115]
- WO9412649A [0115]
- WO9622378A [0115]
- EP185573A [0115]
- WO9118088A [0116]
- WO9309239A [0116]
- US4797368A [0116]
- US5139941A [0116]
- EP488528A [0116]
- US5399346A [0117]
- US4650764A [0117]
- US4980289A [0117]
- US5124263A [0117]
- EP453242A [0117]
- EP178220A [0117]

09.11.15

- WO9507358A [0117]
- US4861719A [0117]
- WO9002806A [0117]
- WO8907150A [0117]
- WO9522617A [0119]
- WO9526411A [0119]
- WO9639036A [0119]
- WO9719182A [0119]
- WO9518863A [0121]
- WO9617823A [0121]
- US5459127A [0121]
- WO9521931A [0122] [0122]
- WO9625508A [0122]
- CA2012311 [0123]
- US5580859A [0123]
- US5589466A [0123]
- WO9901157A [0123]
- WO9901158A [0123]
- WO9901175A [0123]
- US5739118A [0123]
- WO9610038A [0123]

- US6355253B [0204]

Ostatní literatura citovaná v popisu

- **PIZZA et al.** Science, 2000, vol. 287, 1816-1820 [0002] [0009]
- A rapid diagnosis and immediate treatment with large doses of antibiotics is critical if there is to be any chance of survival Bantam Medical Dictionary, 20000000302- [0002]
- **GOLDSCHNEIDER et al.** J. Exp. Med, 1969, vol. 129, 61307-26 [0004]
- **GOLDSCHNEIDER et al.** J. Exp. Med, 1969, vol. 129, 61327-48 [0004]
- **GOTSCHLICH et al.** J. Exp. Med., 1969, vol. 129, 61385-95 [0004]
- **GOTSCHLICH et al.** J. Exp. Med., 1969, vol. 129, 61367-84 [0004]
- **ACHTMAN, M.** Trends in Microbiology, 1995, vol. 3, 5186-92 [0004]
- **AMBROSCH et al.** Immunogenicity and side-effects of a new tetravalent, Bulletin of the World Health Organization, 1983, vol. 61, 2317-23 [0005]
- **ABDILLAHI et al.** Microbial Pathogenesis, 1988, vol. 4, 127-32 [0007]
- **POOLMAN** Adv. Exp. Med. Biol, 1996, vol. 397, 73-7 [0007]
- **SAUKKONEN** Microbial Pathogenesis, 1987, vol. 3, 4261-7 [0007]

- **TETTELIN** Science, 2000, vol. 287, 54591809-15 [0009]
- **MARTIN D et al.** J Exp Med., 1997, vol. 185, 71173-83 [0013]
- **KYTE et al.** J. Mol. Bio, 1982, vol. 157, 105-132 [0057]
- Computational Molecular Biology, Oxford University Press, 1988 [0064] [0235]
- Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Academic Press, 1993 [0064] [0235]
- Computer Analysis of Sequence Data, Part I Humana Press, 1994 [0064] [0235]
- **VON HEINJE, G.** Sequence Analysis in Molecular Biology, Academic Press, 1987 [0064] [0235]
- Sequence Analysis Primer, Stockton Press, 1991 [0064] [0235]
- **CARILLO, H.LIPMAN, D.** SIAM J. Applied Math., 1988, vol. 48, 1073- [0064]
- **HAYASHI et al.** Lipoproteins in bacteria, J. Bioenerg. Bio-membr., 1990, vol. 22, 3451-71 [0068]
- **OUDEGA et al.** Escherichia coli SecB, SecA, and SecY proteins are required for expression and membrane insertion of the bacteriocin release protein, a small lipoprotein, J. Bacteriol, 1993, vol. 175, 51543-7 [0068]
- **SANKARAN et al.** Modification of bacterial lipoproteins, Methods Enzymol., 1995, vol. 250, 683-97 [0068]

- **YAKUSHI et al.** A new ABC transporter mediating the detachment of lipid modified proteins from membranes, *Nat Cell Biol*, 2000, vol. 2, 4212-8 [0069]
- **DE et al.** Purification and characterization of *Streptococcus pneumoniae* palmitoylated pneumococcal surface adhesin A expressed in *Escherichia coli*, *Vaccine*, 2000, vol. 18, 171811-21 [0070]
- **ERDILE et al.** Role of attached lipid in immunogenicity of *Borrelia burgdorferi* OspA, *Infect. Immun.*, 1993, vol. 61, 181-90 [0071]
- **SNAPPER et al.** Bacterial lipoproteins may substitute for cytokines in the humoral immune response to T cell-independent type II antigens, *J. Immunol.*, 1995, vol. 155, 125582-9 [0071]
- **POLLITT et al.** Effect of amino acid substitutions at the signal peptide cleavage site of the *Escherichia coli* major outer membrane lipoprotein, *J. Biol. Chem.*, 1986, vol. 261, 41835-7 [0071]
- **LUNN et al.** Effects of prolipoprotein signal peptide mutations on secretion of hybrid prolipo-beta-lactamase in *Escherichia coli*, *J. Biol. Chem.*, 1987, vol. 262, 178318-24 [0071]
- **KLEIN et al** Distinctive properties of signal sequences from bacterial lipoproteins, *Protein Eng.*, 1988, vol. 2, 115-20 [0071]
- **GOMEZ et al.** Nucleotide The *Bacillus subtilis* lipoprotein LpIA causes cell lysis when expressed in *Escherichia coli*, *Microbiology*, 1994, vol. 140, 1839-45 [0071]

- **HANSSON et al.** Expression of truncated and full-length forms of the Lyme disease *Borrelia* outer surface protein A in *Escherichia coli*., *Protein Expr. Purif.*, 1995, vol. 6, 115-24 [0071]
- **YAKUSHI et al.** Lethality of the covalent linkage between mislocalized major outer membrane lipoprotein and the peptidoglycan of *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.*, 1997, vol. 179, 92857-62 [0071]
- **KOHLERMILSTEIN** *Nature*, 1975, vol. 256, 495-497 [0079]
- **CABILLY et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1984, vol. 81, 3273-3277 [0080]
- **MORRISON et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1984, vol. 81, 6851-6855 [0080]
- **BOULIANNE et al.** *Nature*, 1984, vol. 312, 643-646 [0080]
- **SAHAGAN et al.** *J. Immunol.*, 1986, vol. 137, 1066-1074 [0080]
- **LIU et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1987, vol. 84, 3439-3443 [0080]
- **SUN et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1987, vol. 84, 214-218 [0080]
- **BETTER et al.** *Science*, 1988, vol. 240, 1041-1043 [0080]
- **WAHL et al.** *J. Nucl. Med.*, 1983, vol. 24, 316-325 [0083]
- **SAMBROOK, J.E.F. FRITSCHT. MANIATIS** *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 [0093]

- Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., 1995 [0093]
- MILLERROSMAN BioTechniques, 1992, vol. 7, 980-990 [0112]
- KAPLITT et al. Molec. Cell. Neurosci., 1991, vol. 2, 320-330 [0113]
- STRATFORD-PERRICAUDET et al. J. Clin. Invest., 1992, vol. 90, 626-630 [0113]
- LA SALLE et al. Science, 1993, vol. 259, 988-990 [0113]
- SAMULSKI et al. J. Virol., 1987, vol. 61, 3096-3101 [0113]
- SAMULSKI et al. J. Virol., 1989, vol. 63, 3822-3828 [0113]
- LEBKOWSKI et al. Mol. Cell. Biol., 1988, vol. 8, 3988-3996 [0113]
- BEARD et al. Virology, 1990, 75-81 [0115]
- LEVRERO et al. Gene, 1991, vol. 101, 195- [0115]
- GRAHAM EMBO J., 1984, vol. 3, 2917- [0115]
- GRAHAM et al. J. Gen. Virol., 1977, [0115]
- MANN et al. Cell, 1983, vol. 33, 153- [0117]
- MARKOWITZ et al. J. Virol., 1988, vol. 62, 1120- [0117]
- BERNSTEIN et al. Genet. Eng., 1985, vol. 7, 235- [0117]
- MCCORMICK BioTechnology, 1985, vol. 3, 689- [0117]
- KUO et al. Blood, 1993, vol. 82, 845- [0117]
- BENDER et al. J. Virol., 1987, vol. 61, 1639- [0117]

- **NALDINI** Curr. Opin. Biotechnol., 1998, vol. 9, 457-63 [0120]
- **ZUFFEREY et al.** J. Virol., 1998, vol. 72, 9873-80 [0120]
- **KAFRI et al.** J. Virol., 1999, vol. 73, 576-584 [0120]
- **FELGNER** Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1987, vol. 84, 7413-7417 [0121]
- **FELGNERRINGOLD** Science, 1989, vol. 337, 387-388 [0121]
- **MACKEY et al.** Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1988, vol. 85, 8027-8031 [0121]
- **ULMER et al.** Science, 1993, vol. 259, 1745-1748 [0121]
- **WU et al.** J. Biol. Chem., 1992, vol. 267, 963-967 [0123]
- **WU; WU** J. Biol. Chem., 1988, vol. 263, 14621-14624 [0123]
- **WILLIAMS et al.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1991, vol. 88, 2726-2730 [0123]
- **CURIEL et al.** Hum. Gene Ther., 1992, vol. 3, 147-154 [0123]
- **WU; WU** J. Biol. Chem., 1987, vol. 262, 4429-4432 [0123]
- **MIR et al.** C.P. Acad. Sci., 1988, vol. 321, 893- [0123]
- **ZAGURSKY; RUSSELL** BioTechniques, 2001, vol. 31, 636-659 [0135]
- **MOUNTZOUROS; HOWELL** J. Clin. Microbiol, 2000, vol. 38, 82878-2884 [0139]

- **MOUNTZOUROUS, K.T.HOWELL, A.P.** Detection of Complement-Mediated Antibody-Dependent Bactericidal Activity in a Fluorescence-Based Serum Bactericidal Assay for Group B *Neisseria meningitidis* *J Clin Microbiol.*, 2000, vol. 38, 2878-2884 [0199]
- *FEMS Micro. Lett.*, 1987, vol. 48, 367-371 [0223]
- *J. Clin. Microbiol.*, 2000, vol. 38, 2878-2884 [0223]
- Case definitions for Infectious Conditions Under Public Health Surveillance *CDC19970000* [0235]
- **SAMBROOK, J.; D. W. RUSSELL.** *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc., 1995 [0235]
- **ABDILLAHI, H.; J. T. POOLMAN.** *Neisseria meningitidis* group B serosubtyping using monoclonal antibodies in whole-cell ELISA, *Microbial Pathogenesis*, 1988, vol. 4, 127-32 [0235]
- **ACHTMAN, M.** Epidemic spread and antigenic variability of *Neisseria meningitidis*, *Trends in Microbiology*, 1995, vol. 3, 5186-92 [0235]
- **ALM, R. A.L. S. LINGD. T. MOIRB. L. KINGE. D. BROWNP. C. DOIGD. R. SMITHB. NOONANB. C. GUILDB. L. DEJONGE** Genomic-sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori* [published erratum appears, *Nature*, 1999, vol. 397, 6721719- [0235]
- *Nature*, vol. 397, 176-80 [0235]
- **ALTSCHUL, S. F.T. L. MADDENA. A. SCHAFFERJ. ZHANGZ. ZHANGW. MILLERD. J. LIPMAN** Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs, *Nucleic Acids Res*, 1997, vol. 25, 3389-402 [0235]

- **ANDERSON, T. F.** Techniques for the preservation of three-dimensional structure in preparing specimens for the electron microscope *Trans N Y Acad Sci*, 1951, vol. 13, 130-134 [0235]
- **AMBROSCH, F.G. WIEDERMANNP. CROOYA. M. GEORGE** Immunogenicity and side-effects of a new tetravalent meningococcal polysaccharide vaccine, *Bulletin of the World Health Organization*, 1983, vol. 61, 2317-23 [0235]
- **BENSON, G.** Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences *Nucleic Acids Res.*, 1999, vol. 27, 573-80 [0235]
- **CARILLO, H.D. LIPMAN; J. SIAM** *Applied Math*, 1988, vol. 48, 1073- [0235]
- **CHEN, C. C.P. P. CLEARY** Cloning and expression of the streptococcal C5a peptidase gene in *Escherichia coli*: linkage to the type 12 M protein gene, *Infect. Immun*, 1989, vol. 57, 1740-1745 [0235]
- **CHMOURYGUINA, I.; A. SUVOROV; P. FERRIERI; P. P. CLEARY** Conservation of the C5a peptidase genes in group A and B streptococci., *Infect. Immun*, 1996, vol. 64, 2387-2390 [0235]
- **COCKERILL, F. R., 3RDR. L. THOMPSONJ. M. MUSSERP. M. SCHLIEVERTJ. TALBOTK. E. HOLLEYW. S. HARMSSEND. M. LLSTRUPP. C. KOHNERM. H. KIM** Molecular, serological, and clinical features of 16 consecutive cases of invasive streptococcal disease. Southeastern Minnesota Streptococcal Working Group, *Clin Infect Dis*, 1998, vol. 26, 1448-58 [0235]

- **COURTNEY, H. S.Y. LIJ. B. DALED. L. HASTY** Cloning, sequencing, and expression of a fibronectin/fibrinogen-binding protein from group A streptococci, *Infect Immun*, 1994, vol. 62, 3937-46 [0235]
- **CSERZO, M.E. WALLINI. SIMONG. VON HEIJNEA. ELOFSSON** Prediction of transmembrane alpha-helices in prokaryotic membrane proteins: the dense alignment surface method., *Protein Engineering*, 1997, vol. 10, 673-6 [0235]
- **CUNNINGHAM, M. W.A. QUINN** Immunological crossreactivity between the class I epitope of streptococcal M protein and myosin *Adv Exp Med Biol.*, 1997, vol. 418, 887-92 [0235]
- **DALE, J. B.R. W. BAIRDH. S. COURTNEYD. L. HASTYM. S. BRONZE** Passive protection of mice against group A streptococcal pharyngeal infection by lipoteichoic acid, *J Infect Dis*, 1994, vol. 169, 319-23 [0235]
- **DALE, J. B.M. SIMMONSE. C. CHIANGE. Y. CHIANG** Recombinant, octavalent group A streptococcal M protein vaccine, *Vaccine*, 1996, vol. 14, 944-8 [0235]
- **DALE, J. B.R. G. WASHBURNM. B. MARQUESM. R. WESSELS** Hyaluronate capsule and surface M protein in resistance to opsonization of group A streptococci., *Infect Immun*, 1996, vol. 64, 1495-501 [0235]
- **EDDY, S. R.** Hidden Markov models, *Cur Opin Struct Bio*, 1996, vol. 6, 361-5 [0235]
- **ELLEN, R. P.R. J. GIBBONS** M protein-associated adherence of *Streptococcus pyogenes* to epithelial surfaces: prerequisite for virulence, *Infect Immun*, 1972, vol. 5, 826-830 [0235]

- **ENG, J. K.A. L. MCCORMACKJ. R. YATES, 3RD** An approach to correlate tandem mass-spectral data of peptides with amino-acid-sequences in a protein database, *Am Soc Mass Spectrometry*, 1994, vol. 5, 976-89 [0235]
- **FISCHETTI, V. A.V. PANCHOLIO. SCHNEEWIND** Conservation of a hexapeptide sequence in the anchor region of surface proteins from gram-positive cocci, *Mol Microbiol*, 1990, vol. 4, 1603-5 [0235]
- **FOGG, G. C.M. G. CAPARON** Constitutive expression of fibronectin binding in *Streptococcus pyogenes* as a result of anaerobic activation of *rof*, *A.J. Bacteriol*, 1997, vol. 179, 6172-80 [0235]
- **FOSTER, T. J.M. HOOK** Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus.*, *Trends Microbiol*, 1998, vol. 6, 484-8 [0235]
- **GOCAYNE, J. C. VENTER et al.** Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete, *Borrelia burgdorferi* [see comments, *Nature*, vol. 390, 580-6 [0235]
- **GOLDSCHNEIDER, I.E. C. GOTSCHLICHM. S. ARTENSTEIN** Human immunity to the meningococcus. I. The role of humoral antibodies., *Journal of Experimental Medicine*, 1969, vol. 129, 61307-26 [0235]
- **GOLDSCHNEIDER, I.E. C. GOTSCHLICHM. S. ARTENSTEIN** Human immunity to the meningococcus. II. Development of natural immunity, *Journal of Experimental Medicine*, 1969, vol. 129, 61327-48 [0235]
- **GOTSCHLICH, E. C.I. GOLDSCHNEIDERM. S. ARTENSTEIN** Human immunity to the meningococcus. IV. Immunogenicity of group

A and group C meningococcal polysaccharides in human volunteers, *Journal of Experimental Medicine*, 1969, vol. 129, 61367-84 [0235]

- **GOTSCHLICH, E. C.I. GOLDSCHNEIDERM. S. ARTENSTEIN.** Human immunity to the meningococcus. V. The effect of immunization with meningococcal group C polysaccharide on the carrier state, *Journal of Experimental Medicine*, 1969, vol. 129, 61385-95 [0235]
- **HACKER, J.G. BLUM-OEHLERI. MUHLDOERFERH. TSCHAPE** Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution., *Mol Microbiol.*, 1997, vol. 23, 1089-97 [0235]
- **HANSKI, E.M. CAPARON** Protein F, a fibronectin-binding protein, is an adhesion of the group A streptococcus *Streptococcus pyogenes*, *Proc Natl Acad Sci., USA*, 1992, vol. 89, 6172-76 [0235]
- **HANSKI, E.P. A. HORWITZM. G. CAPARON** Expression of protein F, the fibronectin-binding protein of *Streptococcus pyogenes* JRS4, in heterologous streptococcal and enterococcal strains promotes their adherence to respiratory epithelial cells., *Infect Immun*, 1992, vol. 60, 5119-5125 [0235]
- **HERNANDEZ-SANCHEZ, J.J. G. VALADEZJ. V. HERRERAC. ONTIVEROSG. GUARNEROS** lambda bar minigene-mediated inhibition of protein synthesis involves accumulation of peptidyl-tRNA and starvation for tRNA, *EMBO Journal*, 1998, vol. 17, 3758-65 [0235]
- **HUANG, T. T.H. MALKEJ. J. FERRETTI** The streptokinase gene of group A streptococci: cloning, expression in *Escheri-*

chia coli, and sequence analysis., Mol Microbiol, 1989, vol. 3, 197-205 [0235]

- **HYNES, W. L.A. R. DIXONS. L. WALTONL. J. ARIDGIDES** The extracellular hyaluronidase gene (hylA) of Streptococcus pyogenes., FEMS Microbiol Lett, 2000, vol. 184, 109-12 [0235]
- **HYNES, W. L.L. HANCOCKJ. J. FERRETTI** Analysis of a second bacteriophage hyaluronidase gene from Streptococcus pyogenes: evidence for a third hyaluronidase involved in extracellular enzymatic activity, Infect Immun, 1995, vol. 63, 3015-20 [0235]
- **ISBERG, R. R.G. TRAN VAN NHIEU** Binding and internalization of microorganisms by integrin receptors, Trends Microbio., 1994, vol. 2, 10-4 [0235]
- **JONES, K. F.V. A. FISCHETTI** The importance of the location of antibody binding on the M6 protein for opsonization and phagocytosis of group A M6 streptococci, J Exp Med., 1988, vol. 167, 1114-23 [0235]
- **KIHLBERG, B. M.M. COLLINA. OLSENL. BJORCK** Protein H, an antiphagocytic surface protein in Streptococcus pyogenes, Infect Immun, 1999, vol. 67, 1708-14 [0235]
- **KOEBNIK, R.** Proposal for a peptidoglycan-associating alpha-helical motif in the C-terminal regions of some bacterial cell-surface proteins [letter; comment]. Molecular Microbiology, 1995, vol. 16, 1269-70 [0235]
- **KUIPERS, O. P.H. J. BOOTW. M. DE VOS.** Improved site-directed mutagenesis method using PCR, Nucleic Acids Res, 1991, vol. 19, 4558- [0235]

- **KYTE, J.R. F. DOOLITTLE** A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein, *Journal of Molecular Biology*, 1982, vol. 157, 105-132 [0235]
- **LANDT, O.H. P. GRUNERTU. HAHN** A general method for rapid site-directed mutagenesis using the polymerase chain reaction, *Gene*, 1990, vol. 96, 125-128 [0235]
- **LOESSNER, M. J.S. GAENGS. SCHERER** Evidence for a holin-like protein gene fully embedded out of frame in the endolysin gene of *Staphylococcus aureus* bacteriophage 187, *J Bacteriol*, 1999, vol. 181, 4452-60 [0235]
- **LUKASHIN, A. V.M. BORODOVSKY** GeneMark.hmm: new solutions for gene finding, *Nucleic Acids Res*, 1998, vol. 26, 1107-15 [0235]
- **LUKOMSKI, S.C. A. MONTGOMERYJ. RURANGIRWAR. S. GESKEJ. P. BARRISHG. J. ADAMSJ. M. MUSSER** Extracellular cysteine protease produced by *Streptococcus pyogenes* participates in the pathogenesis of invasive skin infection and dissemination in mice, *Infect Immun*, 1999, vol. 67, 1779-88 [0235]
- **MADORE, D. V.** Characterization of immune response as an indicator of *Haemophilus influenzae* type b vaccine efficacy. *Pediatr Infect Dis J.*, 1998, vol. 17, 207-10 [0235]
- **MATSUKA, Y. V.S. PILLAIS. GUBBAJ. M. MUSSERS. B. OLMSTED.** Fibrinogen cleavage by the *Streptococcus pyogenes* extracellular cysteine protease and generation of antibodies that inhibit enzyme proteolytic activity, *Infect Immun.*, 1999, vol. 67, 4326-33 [0235]

- **MAZMANIAN, S. K.G. LIUH. TON-THATO. SCHNEEWIND** Staphylococcus aureus sortase, an enzyme that anchors surface proteins to the cell wall, Science, 1999, vol. 285, 760-3 [0235]
- **MCATEE, C. P.K. E. FRYD. E. BERG** Identification of potential diagnostic and vaccine candidates of Helicobacter pylori by 'proteome' technologies, Helicobacter, 1998, vol. 3, 163-9 [0235]
- **MCATEE, C. P.M. Y. LIMK. FUNGM. VELLIGANK. FRYT. CHOWD. E. BERG** Identification of potential diagnostic and vaccine candidates of Helicobacter pylori by two-dimensional gel electrophoresis, sequence analysis, and serum profiling., Clin Diagn Lab Immunol, 1998, vol. 5, 537-42 [0235]
- **MCATEE, C. P.M. Y. LIMK. FUNGM. VELLIGANK. FRYT. P. CHOWD. E. BERG** Characterization of a Helicobacter pylori vaccine candidate by proteome techniques, J Chromatogr B Biomed Sci Appl., 1998, vol. 714, 325-33 [0235]
- **MEJLHEDE, N.J. F. ATKINSJ. NEUHARD.** Ribosomal -1 frame-shifting during decoding of Bacillus subtilis cdd occurs at the sequence CGA AAG, J. Bacteriol, 1999, vol. 181, 2930-7 [0235]
- **MOLINARI, G.S. R. TALAYP. VALENTIN-WEIGANDM. ROHDEG. S. CHHATWAL** The fibronectin-binding protein of Streptococcus pyogenes, SfbI, is involved in the internalization of group A streptococci by epithelial cells, Infect Immun, 1997, vol. 65, 1357-63 [0235]
- **MOUNTZOUROS, K. T.A. P. HOWELL** Detection of complement-mediated antibody-dependent bactericidal activity in a fluorescence-based serum bactericidal assay for group B

Neisseria meningitidis, J. Clin. Microbiol., 2000, vol. 38, 82878-2884 [0235]

- **NAKAI, K.M. KANEHISA** Expert system for predicting protein localization sites in gram-negative bacteria, *Proteins*, 1991, vol. 11, 95-110 [0235]
- **NAVARRE, W. W.O. SCHNEEWIND.** Surface proteins of gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope, *Microbiol Mol Biol Rev*, 1999, vol. 63, 174-229 [0235]
- **NIELSEN, H.J. ENGELBRECHTS. BRUNAKG. VON HEIJNE.** Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites, *Protein Engineering*, 1997, vol. 10, 1-6 [0235]
- **NIZET, V.B. BEALLD. J. BASTV. DATTAL. KILBURND. E. LOWJ. C. DE AZAVEDO** Genetic locus for streptolysin S production by group A streptococcus, *Infect Immun*, 2000, vol. 68, 4245-54 [0235]
- **NORDSTRAND, A.W. M. MCSHANJ. J. FERRETTIS. E. HOLMM. NORGREN.** Allele substitution of the streptokinase gene reduces the nephritogenic capacity of group A streptococcal strain NZ131, *Infect Immun*, 2000, vol. 68, 1019-25 [0235]
- **OLMSTED, S. B.S. L. ERLANSENG. M. DUNNYC. L. WELLS** High-resolution visualization by field emission scanning electron microscopy of *Enterococcus faecalis* surface proteins encoded by the pheromone-inducible conjugative plasmid pCF10, *J Bacteriol*, 1993, vol. 175, 6229-37 [0235]
- **PARK, J.S. A. TEICHMANN** DIVCLUS: an automatic method in the GEANFAMMER package that finds homologous domains in

single- and multi-domain proteins, *Bioinformatics*, 1998, vol. 14, 144-50 [0235]

- **PARKHILL, J.M. ACHTMANK. D. JAMESS. D. BENTLEYC. CHURCHERS. R. KLEEG. MORELLID. BASHAMD. BROWNT. CHILLINGWORTH** Complete DNA sequence of a serogroup A strain of *Neisseria meningitidis* Z2491 [see comments, *Nature*, 2000, vol. 404, 502-6 [0235]
- **PIERSCHBACHER, M. D.E. RUOSLAHTI** Influence of stereochemistry of the sequence Arg-Gly-Asp-Xaa on binding specificity in cell adhesion, *J Biol Chem*, 1987, vol. 262, 17294-8 [0235]
- **PIZZA, M.V. SCARLATOV. MASIGNANIM. M. GIULIANIB. ARICOM. COMANDUCCIG. T. JENNINGSI. BALDIE. BARTOLINIB. CAPECCHI** Identification of vaccine candidates against serogroup B meningococcus by whole-genome sequencing, *Science*, 2000, vol. 287, 54591816-20 [0235]
- **PODBIELSKI, A.A. FLOSDORFFJ. WEBER-HEYNEMANN** The group A streptococcal virR49 gene controls expression of four structural vir regulon genes, *Infect Immun*, 1995, vol. 63, 9-20 [0235]
- **POOLMAN, J. T.** Bacterial outer membrane protein vaccines. The meningococcal example, *Advances in Experimental Medicine & Biology*, 1996, vol. 397, 73-7 [0235]
- **PROFT, T.S. LOUISE MOFFATT. J. BERKAHNJ. D. FRASER** Identification and Characterization of Novel Superantigens from *Streptococcus pyogenes*, *J Exp Med*, 1999, vol. 189, 89-102 [0235]

- **PUGSLEY, A. P.** The complete general secretory pathway in gram-negative bacteria, *Microbiol Rev.*, 1993, vol. 57, 50-108 [0235]
- **QUINN, A.K. WARDV. A. FISCHETTIM. HEMRICM. W. CUNNINGHAM,** Immunological relationship between the class I epitope of streptococcal M protein and myosin, *Infect Immun*, 1998, vol. 66, 4418-24 [0235]
- **REDA, K. B.V. KAPURD. GOELAJ. G. LAMPHEARJ. M. MUSSERR. R. RICH** Phylogenetic distribution of streptococcal superantigen SSA allelic variants provides evidence for horizontal transfer of ssa within *Streptococcus pyogenes.*, *Infect Immun*, 1996, vol. 64, 1161-5 [0235]
- **SAMBROOK, J.D. W. RUSSELL.** Molecular cloning a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001, vol. 3, [0235]
- **SALZBERG, S. L.A. L. DELCHERS. KASIFO. WHITE** Microbial gene identification using interpolated Markov models, *Nucleic Acids Res.*, 1998, vol. 26, 544-8 [0235]
- **SAUKKONEN, K.H. ABDILLAHIJ. T. POOLMANM. LEINONEN** Protective efficacy of monoclonal antibodies to class 1 and class 3 outer membrane proteins of *Neisseria meningitidis* B:15:P1.16 in infant rat infection model: new prospects for vaccine development., *Microbial Pathogenesis*, 1987, vol. 3, 4261-7 [0235]
- **SEDEGAH et al.** *Immunology*, 1994, vol. 91, 9866-9870 [0235]
- **SONNENBERG, M. G.J. T. BELISLE** Definition of *Mycobacterium tuberculosis* culture filtrate proteins by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis, N-terminal amino acid

sequencing, and electrospray mass spectrometry., *Infect Immun*, 1997, vol. 65, 4515-24 [0235]

- **SONNHAMMER, E. L.S. R. EDDYR. DURBIN.** Pfam: a comprehensive database of protein domain families based on seed alignments, *Proteins*, 1997, vol. 28, 405-20 [0235]
- **STEVENS, D. L.** Streptococcal toxic-shock syndrome: spectrum of disease, pathogenesis, and new concepts in treatment., *Emerg Infect Dis.*, 1995, vol. 1, 69-78 [0235]
- **STOCKBAUER, K. E.L. MAGOUNM. LIUE. H. BUMS, JR.S. GUBBAS. RENISHX. PANS. C. BODARYE. BAKERJ. COBURN** A natural variant of the cysteine protease virulence factor of group A streptococcus with an arginine-glycine-aspartic acid (RGD) motif preferentially binds human integrins α v β 3 and α I β 3, *Proc Natl Acad Sci., USA*, 1999, vol. 96, 242-7 [0235]
- **TETTELIN, H.N. J. SAUNDERSJ. HEIDELBERGA. C. JEFFRIESK. E. NELSONJ. A. EISENK. A. KETCHUMD. W. HOODJ. F. PEDENR. J. DODSON** Complete genome sequence of *Neisseria meningitidis* serogroup B strain MC58, *Science*, 2000, vol. 287, 54591809-15 [0235]
- **TON-THAT, H.G. LIUS. K. MAZMANIANK. F. FAULLO. SCHNEEWIND** Purification and characterization of sortase, the transpeptidase that cleaves surface proteins of *Staphylococcus aureus* at the LPXTG motif, *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 1999, vol. 96, 12424-12429 [0235]
- **WELDINGH, K.I. ROSENKRANDSS. JACOBSEN P. B. RASMUSSEN M. J. ELHAYP. ANDERSEN** Two-dimensional electrophoresis for analysis of *Mycobacterium tuberculosis* culture filtrate and

purification and characterization of six novel proteins,
Infect Immun, 1998, vol. 66, 3492-500 [0235]

- **WOLFF et al.** Science, 1990, vol. 247, 1465-1468 [0235]
- **YUTSUDO, T.K. OKUMURAM. IWASAKIA. HARAS. KAMITANIW. MINAMIDEH. IGARASHIY. HINUMA** The gene encoding a new mitogenic factor in a Streptococcus pyogenes strain is distributed only in group A streptococcal infection and Immunity, 1994, vol. 62, 4000-4004 [0235]
- **ZAGURSKY, R.J.D. RUSSELL** Bioinformatics: Use in Bacterial Vaccine Discovery, BioTechniques, 2001, vol. 31, 636-659 [0235]