



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 601 32 978 T2** 2009.02.26

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 261 723 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **601 32 978.3**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/IB01/00420**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **01 914 098.7**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2001/064920**

(86) PCT-Anmeldetag: **28.02.2001**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **07.09.2001**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **04.12.2002**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **27.02.2008**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **26.02.2009**

(51) Int Cl.⁸: **C12N 15/62** (2006.01)

C07K 14/22 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

0004695 **28.02.2000** **GB**

0027675 **13.11.2000** **GB**

(73) Patentinhaber:

Novartis Vaccines and Diagnostics S.r.l., Siena, IT

(74) Vertreter:

Vossius & Partner, 81675 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LI, LU, MC, NL, PT, SE, TR**

(72) Erfinder:

**ARICO, Maria Beatrice, 53100 Siena, IT;
COMANDUCCI, Maurizio, 53100 Siena, IT;
GALEOTTI, Cesira, 53100 Siena, IT; MASIGNANI,
Vega, 53100 Siena, IT; GIULIANI, Marzia Monica,
53100 Siena, IT; PIZZA, Mariagrazia, 53100 Siena,
IT**

(54) Bezeichnung: **HYBRIDE EXPRESSION VON NEISSERIA PROTEINEN**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

TECHNISCHES GEBIET

[0001] Diese Erfindung ist aus dem Gebiet der Proteinexpression. Insbesondere betrifft sie die heterologe Expression von Proteinen aus *Neisseria* (z. B. *N. gonorrhoeae* oder bevorzugt *N. meningitidis*).

HINTERGRUND DES FACHGEBIETS

[0002] Die internationalen Patentanmeldungen WO 99/24578, WO 99/36544, WO 99/57280 und WO 00/22430 offenbaren Proteine aus *Neisseria meningitidis* und *Neisseria gonorrhoeae*. Diese Proteine werden typischerweise so beschrieben, dass sie in *E. coli* exprimiert werden (d. h. heterologe Expression) und zwar entweder als N-terminale GST-Fusionen oder als C-terminale His-Markierungssequenz-Fusionen, obwohl andere Expressionssysteme einschließlich der Expression in nativer *Neisseria* ebenfalls offenbart wurden.

[0003] Guilles et al., *Biotechnologia aplicada*, 1996, Band 13, Nr. 4, Seite 271–275 beschreiben ein Fusionsprotein aus dem P.1.15-Protein aus *Neisseria* mit dem P64K-Protein und dessen Expression in *E. coli*.

[0004] Eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, alternative und verbesserte Ansätze für die heterologe Expression dieser Proteine bereitzustellen. Diese Ansätze werden typischerweise den Expressionsspiegel, die Einfachheit der Reinigung, die zelluläre Lokalisation der Expression und/oder die immunologischen Eigenschaften des exprimierten Proteins beeinflussen.

OFFENBARUNG DER ERFINDUNG

[0005] Gemäß der Erfindung werden zwei Proteine aus *Neisseria* als ein einzelnes Hybridprotein exprimiert. Es wird bevorzugt, dass kein Fusionspartner (z. B. GST oder Poly-His) verwendet wird, der nicht aus *Neisseria* stammt.

[0006] Dadurch ergeben sich zwei Vorteile. Erstens kann ein Protein, das alleine instabil sein kann oder schwach exprimiert wird, durch die Anfügung eines geeigneten Hybridpartners, der diese Probleme überwindet, unterstützt werden. Zweitens wird die kommerzielle Herstellung vereinfacht – es müssen nur eine Expression und eine Reinigung durchgeführt werden, um zwei getrennt nützliche Proteine herzustellen.

[0007] Daher stellt die Erfindung ein Hybridprotein der Formel $\text{NH}_2\text{-A-B-COOH}$ bereit, wobei A das Protein ΔG287 aus *Neisseria* umfasst und B das Protein 953 aus *Neisseria* umfasst, und wobei die Aminosäuresequenz des Hybridproteins wie in SEQ ID NO: 6 dargestellt ist oder eine Sequenz ist, die dazu eine Sequenzidentität von mehr als 70% aufweist.

[0008] Die Proteine stammen bevorzugt aus dem Stamm 2996 oder aus dem Stamm 394/98.

[0009] Die Proteinbestandteile (A und B) in einem Hybridprotein gemäß der Erfindung stammen bevorzugt aus dem gleichen Stamm.

[0010] Die fusionierten Proteine in dem Hybrid können direkt verbunden werden oder sie können über einen Linker-Peptid aneinander gefügt werden, wie z. B. über einen Poly-Glycin-Linker (d. h. G_n , wobei $n = 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10$ oder mehr) oder über eine kurze Peptidsequenz, welche die Clonierung erleichtert. Es ist offensichtlich, dass bevorzugt wird, ein ΔG -Protein nicht mit dem C-Terminus eines Poly-Glycin-Linkers zu verbinden.

[0011] Den fusionierten Proteinen können die nativen Leader-Peptide fehlen oder sie können die Leader-Peptidsequenz des N-terminalen Fusionspartners enthalten.

Wirte

[0012] Es wird bevorzugt ein heterologer Wirt verwendet. Der heterologe Wirt kann prokaryontisch oder eukaryontisch sein. Bevorzugt handelt es sich um *E. coli*, aber andere geeignete Wirte umfassen *Bacillus subtilis*, *Vibrio cholerae*, *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium*, *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria lactamica*, *Neisseria cinerea*, *Mycobacteria* (z. B. *M. tuberculosis*), Hefe usw.

Sequenzen

[0013] Die Erfindung stellt auch ein Protein bereit, das eine Sequenzidentität zu dem Protein der SEQ ID NO: 6 aufweist. Wie vorstehend beschrieben, ist der Grad der „Sequenzidentität“ bevorzugt größer als 70% (z. B. 80%, 90%, 95%, 99% oder mehr).

[0014] Der Grad der „Sequenzidentität“ wird bevorzugt nach dem Smith-Waterman-Homologie-Suchalgorithmus bestimmt, wie er in dem MPSRCH-Programm (Oxford Molecular) ausgeführt wird, und zwar unter Verwendung einer affinen Lückensuche mit den Parametern gap open penalty (Strafe für offene Lücke) = 12 und gap extension penalty (Strafe für Erweiterung der Lücke) = 1. Ein Wert von 50% Identität zwischen zwei Proteinen wird typischerweise als Anzeichen für eine funktionelle Äquivalenz angesehen.

[0015] Die Proteine der Erfindung liegen in N. meningitidis Serogruppe B vor.

[0016] Die bevorzugten Proteine der Erfindung sind solche aus der Serogruppe B des N. meningitidis-Stammes 2996 (Petterson et al., Infect. Immun. 1993, 61(11): 4724–4733) oder des Stammes 394/98 (ein Stamm aus Neuseeland; Martin et al., JID, 1998, 177: 447–500). Sofern nicht anders ausgeführt, stammen die hierin erwähnten Proteine aus dem N. meningitidis-Stamm 2996. Es wird jedoch bevorzugt, dass die Erfindung im Allgemeinen nicht auf bestimmte Stämme beschränkt ist.

KURZE BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

[0017] Die [Fig. 1](#) bis [Fig. 6](#) zeigen die hierin beschriebenen Hybridproteine.

VERFAHREN ZUR DURCHFÜHRUNG DER ERFINDUNG

Beispiel 1 – Hybride von Δ G287

[0018] Es wurde herausgefunden, dass die Deletion der (Gly)₆-Sequenz des Proteins 287 eine dramatische Auswirkung auf die Proteinexpression hat. Das Protein, dem die N-terminalen Aminosäuren bis zu GGGGGG fehlen, wird als „ Δ G287“ bezeichnet. Im Stamm MC58 ist die Grundsequenz (das Leader-Peptid ist unterstrichen):

```

SPDVKS ADTLSPKPAAP VVSEKETEAQ EDAPQAGSQ QGAPSAQGSQ DMAAVSEENT
GNGGAVTADN PKNEDEVAQN DMPQNAAGTD SSTPNHTPDP NMLAGNMENQ ATDAGESSQP
ANQPDMANAA DGMQGGDDPSA GGQNAAGTAA QGANQAGNNQ AAGSSDPIPA SNPAPANGGS
NFGRVDLANG VLIDGPSQNI TLTHCKGDSC SGNNFLDEEV QLKSEFEKLS DADKISNYKK
DGKNDKFVGL VADSVQMKGI NQYII FYKPK PTSFARFRS ARSRRSLPAE MPLIPVNQAD
TLIVDGEAVS LTGHSNIFA PEGNYRYLTY GAEKLPGGSY ALRVQGEPAK GEMLAGAAVY
NGEVLHFHTE NGRPYPTRGR FAAKVDFGSK SVDGIIIDSGD DLHMGTOKEK AAIDGNGFKG
TWTENGSGDV SGKFYGPAGE EVAGKYSYRP TDAEKGFGV FAGKKEQD*

```

[0019] Δ G287, mit oder ohne His-Markierungssequenz („ Δ G287-His“ beziehungsweise „ Δ G287K“), wird im Vergleich zu „287-His“ oder „287-^{unmarkiert}“ in sehr guten Spiegeln exprimiert.

[0020] Auf Grundlage von Daten über die Variabilität der Gene wurden Varianten von Δ G287-His aus einer Reihe von MenB-Stämmen, insbesondere den Stämmen 2996, MC58, 1000 und BZ232, in E. coli exprimiert. Die Ergebnisse waren ebenfalls gut – jedes Protein ergab hohe ELISA-Titer und auch bakterizide Serum-Titer von > 8192. Δ G287K, das mit Hilfe des Vektors pET-24b exprimiert wurde, ergab ausgezeichnete Titer bei dem ELISA und dem Serum-Bakterizidie-Testansatz.

[0021] Die Deletion der Poly-Gly-Sequenz kann auch auf Tbp2 (NMB0460), 741 (NMB1870) und 983 (NMB1969) angewendet werden. Wenn diese ohne die Sequenzen, die ihre Leader-Peptide codieren, und ohne Poly-Gly (d. h. als „ Δ G-Formen“) in einem pET-Vector cloniert und in E. coli exprimiert wurden, wurde der gleiche Effekt beobachtet – die Expression bei den Clonen, die die Deletion des Poly-Gly-Bereiches enthielten, war gut, aber schwach oder nicht vorhanden, wenn die Glycin-Reste in dem exprimierten Protein vorhanden waren.

[0022] Δ G287 wurde direkt stomaufwärts von 919, 953, 961 (die Sequenzen werden nachstehend gezeigt) und dem ORF46.1 im Leseraster fusioniert:

AG287-919

ATGGCTAGCCCCGATGTTAAATCGGCGGACAGCTGTCAAACCGGCCGCTCCTGTTGTTGCTGAAAAAGAGACAGAG
 GTAAAAGAAGATGCGCCACAGGCAGGTTCTCAAGGACAGGGCGGCCATCCACACAAGGCAGCCAAGATATGGCGGCA
 GTTTCGGCAGAAAATACAGGCAATGGCGGTGCGGCAACAACGGACAAACCCAAAAATGAAGACGAGGGGACCGCAAAAT
 GATATGCCGCAAAATTCGCGGAATCCGCAAAATCAAACAGGGAACAACCAACCCGCGGATTCTTCAGATTCCGCCCCC
 CCGTCAAACCCCTGCACCTGCGAATGGCGGTAGCAATTTTGGAAAGGTTGATTTGGCTAATGGCGTATTGATTGATGGG
 CGTCAAACCCCTGCACCTGCGAATGGCGGTAGCAATTTTGGAAAGGTTGATTTGGCTAATGGCGTATTGATTGATGGG
 TCAAATCAGAATTTGAAAATTTAAATGAGTCTGAACGAATTGAGAAATATAAGAAAGATGGGAAAAGCGATAAATTT
 ACTAATTTGGTTGCGACAGCAGTTCAGCTAATGGAACATAACAATATGTCATCATTTATAAAGACAAGTCCGCTTCA
 TCTTCATCTGCGGATTCAGGCGTTCGACGGTTCGAGGAGGTGCTTCCCTGCCGAGATGCCGCTAATCCCCGTCAT
 CAGGCGGATACGCTGATTGTCGATGGGGAAGCGGTGAGCCTGACGGGGCATTCGCGCAATATCTTCGCGCCCCGAAGGG
 AATTACCGGTATCTGACTTACGGGGCGGAAAAATTCGCGGGCGGATCGTATGCCCTCCGTGTGCAAGGCGAACCGGCA
 AAGGCGAAATGCTTGTGTCGACGGCCGTGTACAACGGCGAAGTGTGCTGATTTTCATACGGAAAACGGCCCGTAC
 CCGACTAGAGGACAGGTTTCCGCAAAAAGTTCGATTTTCGGCAGCAAATCTGTGGACGGCATTATCGACAGCGGCGATGAT
 TTGCATATGGGTACGCAAAAATTCAAAGCCGCCATCGATGGAACGGCTTTAAGGGGACTTGGACGGAAAATGGCGGC
 GGGGATGTTTCCGGAAGTTTTACGGCCCCGGCCGGCAGGAAGTGGCGGAAAATACAGCTATCGCCCCACAGATGCG
 GAAAAGGGCGGATTCGGCGTGTTCGCGGCAAAAAGAGCAGGATGGATCCGGAGGAGGAGGATGCCAAAGCAAGAGC
 ATCCAAACCTTTCCGCAACCCGACACATCCGTCATCAACGGCCCGGACCGGCCGGTCCGCATCCCCGACCCCGCCGGA
 ACGACGTCGGCGGGCGGGCCCGTCTATACCGTGTACCGCACCTGTCCCTGCCCCACTGGGCGGGCAGGATTTTC
 GCCAAAAGCCTGCAATCCCTCCGCTCGGCTGCGCAATTTGAAAACCGCCAAGGCTGGCAGGATGTGTGCGCCCAA
 GCCTTTCAAAACCCCGTCCATTCCTTTCAGGCAAAAACAGTTTTTTGAACGCTATTTTCACGCCGTGGCAGGTTGCAGGC
 AACGGAAGCCTTGCCTGACGGTTACCGGCTATTACGAGCCGGTGTGTAAGGGCGACGACAGGCGGACGGCACAAGCC
 CGCTTCCCGATTTACGGTATTCGCGACGATTTTATCTCCGTCGCCCTCCCTGCGGTTTTCGCGGAGCGGAAAAGCCCTT
 GTCCGCATCAGGCAGACGGGAAAAAACAGCGGCACAATCGACAATACCGGCGGCACACATACCGCCGACCTCTCCCGA
 TTCCCATCACCGCGCGCACAAACGGCAATCAAAGGCAGGTTTGAAGGAAGCCGCTTCCCTCCCTACCACACGCGCAAC
 CAAATCAAACGGCGCGCGCTTGACGGCAAAGCCCCGATACTCGGTTACGCCGAAGACCCCGTGAACCTTTTTTTTATG
 CACATCCAGGCTCGGGCCGTCGAAAACCCCGTCCGGCAAATACATCCGCATCGGCTATGCGGACAAAACGAACAT
 CCCTACGTTTCCATCGGACGCTATATGGCGGACAAAGGCTACCTCAAGCTCGGGCAGACCTCGATGCAGGGCATCAA
 GCCTATATGCGGCAAAATCCGCAACGCCTCGCCGAAGTTTTGGGTCAAACCCAGCTATATCTTTTTCCGCGAGCCT
 GCGGGAAGCAGCAATGACGTTCCCGTCCGCGCACACTGGGCACGCCGTTGATGGGGGAATATGCGCGCGCAGTGCAGCCG
 CACTACATACCTTGGGCGCGCCCTTATTTGTCCGCCACCGCCATCCGCTTACCCGCAAAGCCCTCAACCGCCTGATT
 ATGGCGCAGGATACCGGCAGCGGATTAAGGCGCGGTGCGCGTGGATTATTTTTGGGGATACGGCGACGAAGCCGGC
 GAACCTGCCGCAACAGAAAACCGGTTACGTCGCGAGCTCCTACCCAACGGTATGAAGCCCGAATACCGCCCCG
 TAACTCGAG

1	MASPDVKSAD	TLSKPAAPVV	AEKETEVED	APQAGSQGQ	APSTQGSQDM
51	AAVSAENTGN	GGAAATDKPK	NEDEGPQNDM	PQNSAESANQ	TGNNQPADSS
101	DSAPASNAP	ANGGSNFRV	DLANGVLIDG	PSQNTLTHC	KGDSNGDNL
151	LDEEAPSKSE	FENLNESERI	EKYKDKGSD	KPTNLVAV	QANGTNKYVI
201	IYKDKSASS	SARFRSARS	RRSLPAEMPL	IPVNQADTLI	VDGEAVSLTG
251	HSGNIFAPEG	NYRYLTYGAE	KLPGGSYALR	VQGEPAKEM	LAGTAVYNGE
301	VLHFHTENGR	PYPTRGRFAA	KVDFGSKSVD	GIIDSGDDLH	MGTQKFKAAI
351	DGNFGKGTWT	ENGGDVSGR	FYGPAGEEVA	GKYSYRPTDA	EKGGFVVFAG
401	KKBQDSSGG	GCQSKIQTF	PQPDTSVING	PDRPVGIPDP	AGTTVGGGGA
451	VYTVVPHLSL	PHWAAQDFAK	SLQSFRLGCA	NLKNRQGWQD	VCAQAFQTPV
501	HSPQAKQFFE	RYFTPWQVAG	NGSLAGTVTG	YYEPVLKGD	RRTAQARFPI
551	YGIPTDFISV	PLPAGLRSGK	ALVRIQTKG	NSGTIDNTGG	THTADLSRFP
601	ITARTTAIKG	RFEGSRFLPY	HTRNQINGGA	LDGKAPILGY	AEDPVELFFM
651	HIQSSGRLKT	PSGKYIRIGY	ADKNEHPYVS	IGRYMADKGY	LKLGQTSMQG
701	IKAYMRQNPQ	RLAEVLGQNP	SYIFFRELAG	SSNDGPV GAL	GTPLMGEYAG
751	AVDRHYITLG	APLFVATAHP	VTRKALNRLI	MAQDTGSAIK	GAVRVDYFWG
801	YGDEAGELAG	KQKTTGYVWQ	LLPNGMKPEY	RP*	

AG287-953

ATGGCTAGCCCCGATGTTAAATCGGCCGACACGCTGTCAAAACCGGCCGCTCCTGTTGTTGCTGAAAAAGAGACAGAG
 GTAAAAGAAGATGCGCCACAGGCAGGTTCTCAAGGACAGGGCGGCCATCCACACAAGGCAGCCAAGATATGGCGGCA
 GTTTCGGCAGAAAAATACAGGCAATGGCGGTGCGGCAACACCGACAAACCCAAAAATGAAGACGAGGGACCGAAAAAT
 GATATGCCGCAAAATTCGCCGAATCCGCAAAATCAACAGGGAACAACCAACCGCCGATTCCTTCAGATTCGCCCCCC
 GCGTCAAACCCCTGCACCTGCGAATGGCGGTAGCAATTTTGAAGGGTGTATTTGGCTAATGGCGTTTTGATTGATGGG
 CCGTCGCAAAATATAACGTTGACCCACTGTAAAGGCGATTCTTGTAAATGGTGATAATTTATTGGATGAAGAAGCACCG
 TCAAAATCAGAAATTTGAAAATTTAAATGAGTCTGAACGAATGAGAAATATAAGAAAGATGGGAAAAGCGATAAATTT
 ACTAATTTGGTTGCGACAGCAGTTCAGCTAATGGAACATAACAAATATGTTCATCATTATAAAGACAAGTCCGCTTCA
 TCTTCATCTGCGCGATTTCAGGCGTTTCGACGGTTCGAGGAGTTCGCTTCCTGCGGAGATGCCGCTAATCCCCGTCAAT
 CAGCCGGATACGCTGATTGTTCGATGGGGAAGCGGTACGCTGACGGGGCATTCGCGCAATATCTTCGCGCCCGAAGGG
 AATTACCGGTATCTGACTTACGGGGCGGAAAAATTCGCCGCGGATCGTATGCCCTCCGTGTGCAAGGCGAACCGGCA
 AAAGGCGAAATGCTTGCTGGCACGGCCGTGTACAACGGCGAAGTGTGTCATTTTCATACGGAAAACGGCCGTCCGTAC
 CCGACTAGAGGCAGGTTTCCCGCAAAAGTCGATTTCCGGCAGCAAATCTGTGGACGGCATTATCGACAGCGCGGATGAT
 TTGCATATGGGTACGCAAAAATTCAAAGCCGCCATCGATGGAACCGGCTTTAAGGGGACTTGGACGGAAAATGGCGGC
 GGGGATGTTTCCGGAAGGTTTTACGGCCCGGCCGGCGAGGAAGTGGCGGAAAAATACAGCTATCGCCCGACAGATGCG
 GAAAAGGGCGGATTCGGCGTGTTCGCCGGCAAAAAGAGCAGGATGGATCCGGAGGAGGAGGCCACCTACAAAGTG
 GACGAATATCAGCCCAACGCCCGTTTCGCCATCGACCATTTCAACACCAGCACCAACGCTCGCGGTTTTTACGGTCTG
 ACCGGTTCGTCGAGTTCGACCAAGCAAAACGGCAGGTAATAATCGACATCACCATCCCGTTCGCAACCTGCAAAAGC
 GGTTCGCAACACTTTACCGACCACCTGAAATCAGCCGACATCTTCGATGCCGCCAATATCCGGACATCCGCTTTGTT
 TCCACCAATTCAACTTCAACGGCAAAAAACTGGTTTTCCGTGACGGCAACCTGACCATGCACGGCAAAACCGCCCCC
 GTCAAACTCAAAGCCGAAAAATTCAACTGCTACCAAAGCCCGATGGCGAAAACCGAAGTTTTCGGCGGCGACTTCAGC
 ACCACCATCGACCGCACCAATGGGGCGTGGACTACCTCGTTAACGTTGGTATGACCAAAAAGCGTCCGCATCGACATC
 CAAATCGAGGCAGCCAACAATAACTCGAG

1	MASPDVKSAD	TLSKPAAPVV	AEKETEVEKED	APQAGSQGQG	APSTQGSQDM
51	AAVSAENTGN	GGAAATTDKPK	NEDEGPQNDM	PQNSAESANQ	TGNNQPADSS
101	DSAPASNAP	ANGGSNFGRV	DLANGVLIDG	PSQNTLTHC	KGDSNCGDNL
151	LDEEAPSKSE	FENLNERI	EKYKDKGSD	KFTNLVATAV	QANGTNKYVI
201	IYKDKSASS	SARFRRSARS	RRSLPAEMPL	IFVNQADTLI	VDGEAVSLTG
251	HSGNIFAPEG	NYRYLTYGAE	KLPGGSYALR	VQGEPAKGEM	LAGTAVYNGE
301	VLHFHTENGR	PYPTRGRFAA	KVDFGSKSVD	GIIDSGDDLH	MGTQKFKAAI
351	DGNFGKGTWT	ENGGGDVSGR	FYGPAGEEVA	GKYSYRPTDA	ERGGFQVFAG
401	KKEQDGSQGG	GATYKVDEYH	ANARFAIDHF	NTSTNVGGFY	GLTGSVEFDQ
451	AKRDGKIDIT	IPVANLQSGS	QHFTDHLKSA	DIFDAAQYPD	IRFVSTKFNF
501	NGKKLVSVDG	NLTMHGKTAP	VKLKAEKFNK	YQSPMAKTEV	CGGDFSTTID
551	RTKWGVLDLV	NVGMTKSVRI	DIQIEAAKQ*		

ΔG287-961

ATGGCTAGCCCCGATGTTAAATCGGGCGGACAGCTGTCAAACCGGGCCGCTCCTGTGTGTGCTGAAAAAGAGACAGAG
 GTAAAAGAAGATGCGCCACAGGCAGGTTCTCAAGGACAGGGCGCCATCCACACAAGCCAGCCAAAGATATGGCGGCA
 GTTTCGGCAGAAAATACAGGCAATGGCGGTGCGGCAACAACCGGACAAAACCCAAAATGAAGACGAGGGACCAGAAAAT
 GATATGCCGCAAAAATCCGCCGAATCCGCAAATCAAACAGGGAACAACCAACCCGCGGATTTCTTCAGATTCCGCCCCC
 GCGTCAAACCCCTGCACCTGCGAATGGCGGTAGCAATTTTGAAGGGTGTATTGGCTAATGGCGTTTGTATGATGGG
 CCGTGCAGAAAATATAACGTTGACCCACTGTAAAGGCGATTCTTGTAAATGGTGATAATTTATGGATGAAGAAGCACC
 TCAAATCAGAATTTGAAAATTTAAATGAGTCTGAACGAATGAGAAAATAAAGAAAGATGGGAAAAGCGATAAATTT
 ACTAATTTGGTTGCGACAGCAGTTCAAGCTAATGGAACAAACAATATGTCATCATTTATAAAGACAAGTCCGCTTCA
 TCTTCATCTGCGGATTCAGGCGTTCTGCACGGTTCGAGGAGTTCGCTTCCTGCGGAGATGCGCGTAATCCCGCTCAAT
 CAGGCGGATACGCTGATGTGATGGGGAAAGCGGTGACCTGACCGGGCATTCGGCAATATCTTCGCGCCCGAAGGG
 AATTACCGGTATCTGACTTACGGGGCGGAAAATTGCCCGCGGATCGTATGCCCTCCGCTGTGCAAGGCGAACCGGCA
 AAAGGCGAATGCTTGTGCGCACGGCCGTGTACAACGGCGAAGTGTGCAATTTTCATACGAAAACGGCCGTCCGTAC
 CCGACTAGAGGCAGGTTTGGCCGAAAAGTCGATTTCCGGCAGCAAATCTGTGGACGGCATTATCGACAGCGCGGATGAT
 TTGCAATATGGGTACGCAAAAATTCAAAGCCGCGCATCGATGAAAACGGCTTTAAGGGGACTTGGACGGAAAATGGCGGC
 GGGGATGTTTCCGGAAGGTTTACGGCCCGGGCGGCGAGGAGTGGCGGGAAAATACAGCTATCGCCCGACAGATGCG
 GAAAAGGGCGGATTCGGCGTGTTCGCCGCAAAAAGAGCAGGATGGATCCGGAGGAGGAGGCCACAAACGACGAC
 GATGTTAAAAAAGCTGCCAATGCGCAATGCTGTGCTTACAACAATGGCCAAGAAATCAACGGTTTCAAAGCTGGA
 GAGACCATCTACGACATTTGATGAAGACGCGACAATTACCAAAAAGACGCAACTGCAGCCGATTTGAAGCCGACGAC
 TTTAAAGGTCTGGGTCTGAAAAAAGTCTGACTAACCTGACCAAAACCGTCAATGAAAACAAAACAAACCGTTCGATGCC
 AAAGTAAAGCTGCAGAAATCTGAAATAGAAAAGTTAACAACCAAGTTAGCAGACACTGATGCCGCTTTAGCAGATACT
 GATGCCGCTCTGGATGCAACCACCAACGCCCTTGAATAAAATGGGAGAAAATAAAGCAGACTTTGCTGAAGAGACTAAG
 ACAAATATCGTAAAAATTGATGAAAAATTAGAAGCCGTGGCTGATACCGCTCGACAAGCATGCCGAAGCATTCAACGAT
 ATCGCCGATTCATGGATGAAACCAACTAAGGCAGCAGCAAGCCGTCAAAACCGCCAATGAAGCCAAACAGACGGCC
 GAAGAAACCAAAACAAACGTCGATGCCAAGTAAAGCTGACAGAACTGCAGCAGGCAAAGCCGAAGCTGCCGCTGGC
 ACAGCTAATACTGCAGCCGACAAGGCCGAAGCTGTGCGCTGCAAAAAGTTACCGACATCAAAGCTGATATCGCTACGAA
 AAGATAATATTGCTAAAAAAGCAAACAGTGCAGCAGCTGTACACCAGAGAAGAGTCTGACAGCAAATTTGTGAGAATT
 GATGGTCTGAACGCTACTACCGAAAATTTGGACACACGCTTGGCTTCTGCTGAAAAATCCATTGCCGATCAGGATACT
 CGCCTGAACGGTTTGGATAAAACAGTGTGACACCTGCGCAAGAAACCCGCAAGGCCTTGCAGAACAAAGCCGCGCTC
 TCCGGTCTGTTCCAACCTTACAACGTGGGTGCGGTTCAATGTAACGGCTGCAGTCCGGCGGCTACAAATCCGAATCGGCA
 GTCGCCATCGGTACCGGCTTCCGCTTTACCGAAAACCTTTCGCCCAAAGCAGGCGTGGCAGTCCGGCACTTCGTCCGGT
 TCTTCGCGACCTACCATGTCCGGCTCAATACGAGTGGTAACTCGAG

- 1 MASPDVKSAD TLSKPAAPVV AEKETE VKED APQAGSQGQ APSTQGSQDM
- 51 AAVSAENTGN GGAATTDKPK NEDEGPQNDM PQNSAESANQ TGNNO PADSS
- 101 DSAPASNPAF ANGGSNFGRV DLANGVLIDG PSQNI TLTHC KGDSCNGDNL
- 151 LDEEAPSKSE FENL NESERI EKYK KDGKSD KFTNLVATAV QANGTNKYVI
- 201 IYKDKSASS SARFRRSARS RRS LPAEMPL IPVNQADTLI VDGEAVSLTG
- 251 HSGNIFAPEG NYRYLTYGAE KLPGGSYALR VQGEPAKGEM LAGTAVYNGE
- 301 VLHFHTENGR PYPTRGRFAA KVD FGSKSD GIIDSGDDLH MGTQKFKAAI
- 351 DGNFGKGTWT ENGGDVSGR FYGPAGEEVA GKYSYRPTDA EKGFGVVFAG
- 401 KKEQDSSGGG GATNDDDVKK AATVAIAAAY NNGQEINGFK AGETIYDIDE
- 451 DGTITKDAT AADVEADDFK GLGLKVVVN LTKTVNENKQ NVDKVKRAE
- 501 SEIEKLTTKL ADTDAALADT DAALDATTNA LNKLGENTTT FAEETKTINIV
- 551 KIDEKLEAVA DTVDKHAEAF NDLADSLDET NTKADEAVKT ANEAKQTAEB
- 601 TKQNVDAKVK AAETAAGKAE AAAGTANTAA DKAEVAARKV TDIKADIATN
- 651 KDNI AKKANS ADVY TREESD SKFVRIDGLN ATTEKLDTRL ASA EKSIADH
- 701 DTRLNGLDKT VSDLRKETRQ GLAEQAALSG LFQPYNVGRF NVTAAVGGYK
- 751 SESAVAIGTG FRFTENFAAK AGVAVGTSSG SSAAYHGVN YEW*

	ELISA	Bakterizidie
ΔG287-953-His	3834	65536
ΔG287-961-His	108627	65536

[0023] Die bakterizide Wirksamkeit (homologer Stamm) der Antikörper, die gegen die Hybridproteine erzeugt wurden, wurde mit der von Antikörpern verglichen, die gegen einfache Gemische der Antigen-Bestandteile (unter Verwendung von 287-GST) erzeugt worden waren, und zwar für 919 und ORF46.1:

	Gemisch mit 287	Hybrid mit Δ G287
919	32000	128000
ORF46.1	128	16000

[0024] Daten über die bakterizide Aktivität gegen heterologe MenB-Stämme und gegen die Serotypen A und C wurden ebenfalls erhalten:

Stamm	919		ORF46.1	
	Gemisch	Hybrid	Gemisch	Hybrid
NGH38	1024	32000	-	16384
MC58	512	8192	-	512
BZ232	512	512	-	-
MenA (F6124)	512	32000	-	8192
MenC (C11)	> 2048	> 2048	-	-
MenC (BZ133)	> 4096	64000	-	8192

[0025] Die Hybridproteine mit Δ G287 am N-Terminus sind daher den einfachen Gemischen in immunologischer Hinsicht überlegen, wobei Δ G287-ORF46.1 besonders wirksam ist, sogar gegen heterologe Stämme. Δ G287-ORF46.1 K kann in pET-24b exprimiert werden.

[0026] Die gleichen Hybridproteine wurden unter Verwendung des Stammes 394/98 aus Neuseeland anstelle des Stammes 2996 hergestellt:

AG287NZ-919

ATGGCTAGCCCCGATGTCAAGTCGGCGGACACGCTGTCAAACCTGCCGCCCTGTGTTCTGAAAAAGAGACAGAG
 GCAAAGGAAGATGCGCCACAGGCAGGTTCTCAAGGACAGGGCGGCCATCCGCACAAGGGGTCAGAGATATGGCGGCG
 GTTTCGGAAGAAAATACAGGCAATGGCGGTGCGGCAGCAACGGACAAAACCCAAAAATGAAGACGAGGGGCGCAAAAT
 GATATGCCGCAAAATGCCGCCGATACAGATAGTTTGACACCGAATCACACCCCGGCTTCGAATATGCCGGCCGAAAT
 ATGAAAACCAAGCACCGGATGCCGGGAATCGGAGCAGCCGGCAAACCAACCGGATATGGCAAATACGGCGGACCGGA
 ATGCAGGGTACAGATCCGTCGGCAGCGGGGAAAATGCCGCAATACGGCTGCCCAAGGTACAAATCAAGCCGAAAAC
 AATCAAACCGCCGTTCTCAAATCCTGCCTCTTCAACCAATCCTAGCGCCACGAATAGCGGTGGTGTATTTGGAAGG
 ACGAACGTGGGCAATCTGTTGTGATTGACGGGCGCTCGCAAAATATAACGTTGACCCACTGTAAAGGCGATTCCTGT
 AGTGGCAATAATTTCTTGGATGAAGAAGTACAGCTAAAATCAGAAATTTGAAAAATTAAGTGATGCAGACAAAATAAGT
 AATTACAAGAAGATGGGAAGAATGACGGGAAGAATGATAAATTTGCGGTTTGGTTGCCGATAGTGTGCAGATGAAG
 GGAATCAATCAATATATTATCTTTTATAAACCTAAACCCACTTCATTTGCGCGATTAGGCGTTCTGCACGGTCGAGG
 CGGTCCGTTCCGGCCGAGATGCCGCTGATTCCCCTCAATCAGGCGGATACGCTGATTGTGCGATGGGGAAGCGGTACGC
 CTGACGGGGCATCCCGCAATATCTTCGCGCCCGAAGGGAATTACCGGTATCTGACTTACGGGGCGGAAAAATTGCC
 GCGGATCGTATGCCCTCCGTGTTCAAGCGAACCTTCAAAGGCGAAATGCTCGCGGGCACGGCAGTGTACAACGGC
 GAAGTGTGCATTTTCATACGGAACCGCCGTCGCTCCCGTCCAGAGGCAGGTTTTCGCGCAAAGTTCGATTTTCGGC
 AGCAAATCTGTGGACGGCATTATCGACAGCGCGATGGTTTCATATGGGTACGCAAAAATTCAAAGCCGCCATCGAT
 GGAAACGGCTTTAAGGGGACTTGGACGGAAAAATGGCGGGGGATGTTTCCGGAAAGTTTACGGCCCGCGCGGCGAG
 GAAGTGGCGGGAAAAATACAGCTATCGCCCAACAGATGCGGAAAAGGGCGGATTCGGCGTGTTCGCGCAAAAAGAG
 CAGGATGGATCCGGAGGAGGAGGATGCCAAAGCAAGAGCATCCAAACCTTTCGCAACCCGACACATCCGTCATCAAC
 GGGCCGGACCGCGGCTCCGCAATCCCGAACCCCGGAAACGACCGTCCGCGGGCGGGCGGCTCTATACCGTTGTA
 CCGCACCTGTCCCTGCCACTGGGCGCGCAGGATTTCCGCCAAAAGCCTGCAATCCTTCCGCTCGGCTCGGCAAT
 TTGAAAACCGCCAAGGCTGGCAGGATGTGTGCGCCAAAGCCTTCAAACCCCGTCCATTCTTTTCAGGCAAAAACAG
 TTTTTTGAACGCTATTTTACGCGCTGGCAGGTTGACAGGCAACGGAAGCCTTTCGCGTACGGTTACCGGCTATTACGAG
 CCGGTGCTGAAGGGGACGACAGGCGGACGGCACAAGCCGCTTCCGATTTACGGTATTCCCGACGATTTTATCTCC
 GTCCCCCTGCCGCGGTTTTCGCGAGCGGAAAAGCCCTTGTCCGCATCAGGCAGACGGGAAAAAACAGCGGCACAATC
 GACAATACCGCGCGCACACATACCGCCGACCTCTCCCGATTCGCCCATCACCGCGGCACAACGGCAATCAAAGGCAGG
 TTTGAAGGAAGCCGCTTCTCCCTACACACGCGCAACCAAATCAACGGCGCGCGCTTACGCGCAAAGCCCGGATA
 CTCGGTTACGCCGAAGACCCCGTCGAACCTTTTTTTTATGCACATCCAAGGCTCGGGCCGCTGAAAACCCCGTCCGGC
 AAATACATCCGCTCGGCTATGCCGACAAAACGAACATCCCTACGTTTCCATCGGACGCTATATGGCGGACAAAAGGC
 TACCTCAAGCTCGGGCAGACCTCGATGCAGGGCATAAAGCCTATATGCGGCAAAAATCCGCAACCGCTCGCCGAAGTT
 TTGGGTCAAACCCAGCTATATCTTTTTCGCGAGCTTGCAGGAAAGCAGCAATGACGGTCCCGTCCGGCGCACTGGGC
 ACGCCGTTGATGGGGGAATATGCCGGCGCAGTCGACCGGCACTACATTACCTTGGGCGCGCCCTTATTTGTGCCACC
 GCCCATCCGGTTACCCGCAAAGCCCTCAACCGCCTGATTATGGCGCAGGATACCGGCAGCGGATTAAGGGCGCGGTG
 CGCGTGGATTAATTTTGGGGATACGGCGACGAAGCCGGCGAACTTTCGCGCAACAGAAAACACCGGTTACGTCTGG
 CAGCTCCTACCCAACGGTATGAAGCCCGAATACCGCCCGTAAAAGCTT

1	MASPDVKSAD	TLSKPAAPVW	SEKETEAKED	APQAGSQGQ	APSAQGGQDM
51	AAVSEENTGN	GGAAATDKPK	NEDEGAQNDM	PQNAADTDSL	TPNHTPASNM
101	PAGNMENQAP	DAGESEQPAN	QPDMAANTADG	MQGDDPSAGG	ENAGNTAAQG
151	TNQAENNQTA	GSQNPASSTN	PSATNSGGDF	GRTNVGNSVW	IDGPSQNTL
201	THCKGDSG	NNFLDEEVQL	KSEFEKLSDA	DKLSNYKKDG	KNDGKNDKFW
251	GLVADSVQMK	GINQYIIFYK	PKPTSFARFR	RSARSRLSLP	AEMPLIPVWQ
301	ADTLIVDGEA	VSLTGHSGNI	FAPEGNYRYL	TYGAEKLPGG	SYALRVQGEF
351	SKGEMLAGTA	VYNGEVLHFH	TENGRPSPSR	GRFAAKVDFG	SKSVDGIIDS
401	GDGLHMGTK	FKAAIDGNF	KGTWTENGGG	DVSGKFGYPA	GEEVAGKYSY
451	RPTDAEKGGF	GVFAGKKEQD	GSGGGGQSK	SIQTFPQPD	SVINGPDRPV
501	GIPDPAGTIV	GGGGAVYTVV	PHLSLPHWAA	QDFAKSLQSF	RLGCANLKNR
551	QGWQDVCAQA	FQTFVHSPQA	KQFFERYFTP	WQVAGNGSLA	GTVTGYEYEV
601	LKGDVDRRTAQ	ARFPIYGIPT	DFISVPLPAG	LRSGKALVRI	RQTKNSGTI
651	DNTGGTHTAD	LSRFPITART	TAIKGRFEGS	RFLPYHTRNQ	INGGALDGA
701	PILGYAEDPV	ELFFMHIQGS	GRLKTPSGKY	IRIGYADKNE	HPYVSIGRYM
751	ADKGYLKLQ	TSMQGIKAYM	RQNPQRLAEV	LGQNPYIFF	RELAGSSNDG
801	PVGALGTPLM	GEYAGAVDRH	YITLGAPLFW	ATAHPVTRKA	LNRLIMAQDT
851	GSAIKGAVRV	DYFWGYGDEA	GELAGKQKTT	GYVWQLLPNG	MKPEYRP*

AG287NZ-953

ATGGCTAGCCCCGATGTCAAGTCGGCGGACACGCTGTCAAAACCTGCCGCCCTGTTGTTTCTGAAAAAGAGACAGAG
 GCAAAGGAAGATGCGCCACAGGCAGGTTCTCAAGGACAGGGCGCCATCCGCACAAGGCGGTCAAGATATGGCGGCG
 GTTTCGGAAAGAAAATACAGGCAATGGCGGTGCGGCAGCAACGGACAAACCCAAAAATGAAGACGAGGGGGCGCAAAAT
 GATATGCCGCAAAATGCCCGGATACAGATAGTTTGACACCGAATCACACCCCGGCTTCGAATATGCCGGCCGAAAT
 ATGGAAAACCAAGCACCGGATGCCGGGGAATCGGAGCAGCCGGCAAACCAACCGGATATGGCAAATACGGCGGACGGA
 ATGCAGGGGTGACGATCCGTGCGGCAGGCGGGAAAATGCCGGCAATACGGCTGCCCAAGGTACAAATCAAGCCGAAAAC
 AATCAAACCGCCGGTTCCTCAAAATCCTGCCTCTTCAACCAATCCTAGCGCCACGAATAGCGGTGGTGAATTTGGAAGG
 ACGAACGTGGGCAATCTGTTGTGATTGACGGCCCGTTCGCAAAATATAACGTTGACCCACTGTAAAGGCGATTCTTGT
 AGTGGCAATAATTTCTTGGATGAAGAAGTACAGCTAAAATCAGAAATTTGAAAAATTAAGTGTATGCAGACAAAATAAGT
 AATTACAAGAAAGATGGGAAGAATGACGGGAAGAAATGATAAAATTTGTCGGTTTGGTTGCCGATAGTGTGCAGATGAAG
 GGAATCAATCAATATATATCTTTTATAAACCTAAACCCACTTCATTTGCGCGATTTAGCGTTCGACGGTTCGAGG
 CGTGCCTTCCGGCCGAGATGCCGCTGATTCGGTCAATCAGGCGGATACGCTGATTTGTCGATGGGGAAGCGGTCAGC
 CTGACGGGGCATTCGGCAATATCTTTCGCGCCCGAAGGGAATTACCGGTATCTGACTTACGGGGCGGAAAATTTGCC
 GCGGATCGTATGCCCTCCGTGTTCAAGGCGAACCTTCAAAGGCGAAAATGCTCGCGGGCACGGCAGTGTACAACGGC
 GAAGTGTGATTTTCATACGGAACCGCCGTCCTCCCGTCCAGAGGCAGGTTTGGCCGAAAAGTTCGATTTCCGGC
 AGCAAATCTGTGGACGGCATPTATCGACAGCGGGCGATGGTTTGCATATGGGTACGCAAAATTCAAAGCCGCCATCGAT
 GGAACCGGCTTTAAGGGCACTTGGACGGAAAATGGCGCGGGGATGTTTCCGGAAGTTTACGGCCCGCCGGCGAG
 GAAGTGGCGGGAAAATACAGCTATCGCCCAACAGATGCGGAAAAGGGCGGATTCGGCGTGTTCGCGGCAAAAAGAG
 CAGGATGGATCCGGAGGAGGAGGAGCCACCTACAAAGTGGACGAATATCACGCCAACGCCGTTTCGCCATCGACCAT
 TTCAACACCAGCACCAACGTCCGGCGTTTTTACGGTCTGACCGGTTCCGTCGAGTTCGACCAAGCAAAACCGGACGGT
 AAAATCGACATCACCATCCCGTTGCCAACCTGCAAAGCGGTTCCGCAACACTTTACCGACCACCTGAAATCAGCCGAC
 ATCTTCGATGCCGCCAATATCCGGACATCCGCTTTGTTTCCACCAATTCAACTTCAACGGCAAAAACCTGGTTTCC
 GTTGACGGCAACCTGACCATGCACGGCAAAACCGCCCGTCAAACCTCAAAGCCGAAAATTCAACTGCTACCAAGC
 CCGATGGCGAAAACCGAAGTTTGGCGCGGACTTCAGCACCACCATCGACCCACCAATGGGGCGTGGACTACCTC
 GTTAACTTGGTATGACCAAAAGCGTCCGCATCGACATCCAAATCGAGGCAGCCAAACAATAAAAGCTT

- 1 MASEPDKSAD TLSKPAAPVV SEKETEAKED APQAGSQGQ APSAQQGQDM
- 51 AAVSEENTGN GGAAATDKPK NEDEGAQNDM PQNAADTDSL TPNHTPASNM
- 101 PAGNMENQAP DAGESEQPAN QPDMANTADG MQGDDPSAGG ENAGNTAAQG
- 151 TNQAEINQTA GSQNPASTN PSATNSGGDF GRTNVGNSV IDGPSQNTL
- 201 THCKGDCSG NNFLDEEVQL KSEFEKLSA DKISNYKKDG KNDGKNDKFV
- 251 GLVADSVQMK GINQYIIFYK PKPTSFARFR RSARSRRSLP AEMPLIPVNO
- 301 ADTLIVDGEA VSLTGHSGNI FAPEGNYRYL TYGAEKLP GG SYALRVQGE
- 351 SKGEMLAGTA VYNGEVLHFN TENGRPSPSR GRFAAKVDFG SKSVDGIIDS
- 401 GDGLHMGTOK FKAALDGNF KGTWTENGGG DVSGKFYGPA GEEVAGKYSY
- 451 RPTDAEKGGF GVFAKKEQD GSGGGGATYK VDEYHANARF AIDHFNSTN
- 501 VGGFYGLTGS VEFDAQRDG KIDITIPVAN LQSGSQHFTD HLKSADIFDA
- 551 AQYPDIRFVS TKFNFNKKL VSVDGNLTMH GRTAPVKLKA EKFNQYQSPM
- 601 AKTEVCGGDF STTIDRTKWG VDYLNVN GMT KSVRIDIQLE AAKQ*

ΔG287NZ-961

ATGGCTAGCCCGATGTCAAGTCGGCGGACACCGCTGTCAAAACCTGCCGCCCTGTTGTTTCTGAAAAAGAGACAGAG
 GCAAAGGAAGATGCGCCACAGGCAGGTTCTCAAGGACAGGGCGGCCATCCGCACAAGGCGGTCAAGATATGGCGGCG
 GTTTCGGAAGAAAATACAGGCAATGGCGGTGCGGCAGCAACGGACAACCCAAAAATGAAGACGAGGGGGCGCAAAAT
 GATATGCCGCAAAATGCCGCCGATACAGATAGTTTGACACCGAATCACACCCGGCTTCGAATATGCCGGCCGAAAT
 ATGGAAAACCAAGCACCGGATGCCGGGAATCGGAGCAGCCGGCAACCAACCGGATATGGCAAATACGGCCGACGGA
 ATGCAGGGTACGATCCGTCCGCAGGCGGGGAAAAATGCCGGCAATACGGCTGCCCAAGGTACAAATCAAGCCGAAAAC
 AATCAAACCGCGGTTCTCAAAATCCTGCCTCTTCAACCAATCCTAGCGCCACGAATAGCGGTGGTGAATTTGGAAGG
 ACGAACCTGGGCAATCTGTGTGATTGACGGGGCCGTCGCAAAATATAACGTTGACCCACTGTAAAGCCGATTCCTGT
 AGTGGCAATAATTTCTTGGATGAAGAAGTACAGCTAAAATCAGAATTTGAAAAATTAAGTGATGCAGACAAAATAAGT
 AATTACAAGAAAGATGGGAAGAATGACGGGAAGAATGATAAAATTTGTTCGGTTTGGTTGCCGATAGTGTGCAGATGAAG
 GGAATCAATCAATATATATCTTTTATAAACTAAACCCACTTCAATTTGCGCGATTTAGGCGTTCTGCACGGTCGAGG
 CGGTCGCTCCGGCCGAGATGCCGCTGATTCCCGTCAATCAGGCGGATACGCTGATTGTGATGGGAAGCGGTCAGC
 CTGACGGGGCATTCCGGCAATATCTTCGCGCCCGAAGGAATTACCGSTATCTGACTTACGGGGCGGAAAAATTGCC
 GCGGATCGTATGCCCTCCGTGTTCAAGGCGAACCCTTCAAAGGCGAAATGCTCGCGGGCACGGCAGTGTACAACGGC
 GAAGTGTGCTGCAATTTTCATACGGAAAACGGCCGTCGCTCCCGTCCAGAGGCGAGGTTGCCGCAAAAGTTCGATTTCCGGC
 AGCAAATCTGTGGACGGCATTATCGACAGCGGCGATGGTTTGCATATGGGTACGCAAAAATTCAAAGCCGCCATCGAT
 GGAACCGCTTTAAGGGGACTTGGACGAAAATGGCGGGCGGGATGTTTCCGGAAGTTTTCAGGCCCGCCGCGAG
 GAAGTGGCGGAAAATACAGCTATCGCCCAACAGATGCGGAAAAGGGCGGATTCGGCGTGTGTTGCCGGCAAAAAGAG
 CAGGATGGATCCGGAGGAGGAGGCCAACAACGACGACGATGTTAAAAAGCTGCCACTGTGGCCATTGCTGCTGCC
 TACAACAATGGCCAAAGAAATCAACGGTTTCAAAGCTGGAGAGACCATCTACGACATTGATGAAGACGGCACAATTACC
 AAAAAAGACGCAACTGCAGCCGATGTTGAAGCCGACGACTTAAAGGCTCGGGTCTGAAAAAGTCTGTGACTAACCTG
 ACCAAAACCGTCAATGAAAAACAACAAAACGTCGATGCCAAAGTAAAAGCTGCAGAATCTGAAATAGAAAAGTTAACA
 ACCAAGTTAGCAGACTGATGCCGCTTTAGCAGATACTGATGCCGCTCTGGATGCAACCACCAACGCCTTGAATAAA
 TTGGGAGAAATATAACGACATTTGCTGAAGAGACTAAGACAAATATCGTAAAAATTGATGAAAATTAGAAGCCGCTG
 GCTGATACCGTCCGACAGCATGCCGAAGCATTCACAGATATCGCCGATTCATGATGAAACCAACACTAAGGCAGAC
 GAAGCCGTCAAAACCGCAATGAAGCCAAACAGACGGCCGAAGAAACCAACAAAACGTCGATGCCAAAGTAAAAGCT
 GCAGAACTGCAGCAGGCAAAGCCGAAGCTGCCGCTGGCACAGCTAATACTGCAGCCGACAAGCCGAAGCTGTGCGT
 GCAAAAGTTACCGACATCAAAGCTGATATCGCTACGAACAAGATAATATGCTAAAAAAGCAAACAGTGCCGACGTC
 TACACCAGAGAAGAGTCTGACAGCAAAATTTGTCAGAATTGATGGTCTGAACGCTACTACCGAAAAATTTGGACACCGC
 TTGGCTTCTGTGAAAAATCCATTGCCGATCAGCATACTCGCTGAACGGTTTGGATAAAAACAGTGTGCAGACTGCCG
 AAAGAACCCTGCCAAAGCCTTGCAGAACAAAGCCGCTCTCCGGTCTGTTTCAACCTTACAACGTTGGGTTTCAAT
 GTAACGGCTGCAGTCCGGCTACAAATCCGAATCGGCAGTCCGCATCGGTACCGGCTTCCGCTTTACCGAAAACCTT
 GCCGCCAAAGCAGGCGTGGCAGTCCGCCTTCGTCGGTTCCTCCGCAGCCTACCATGTGGCGTCAATTACGAGTGG
 TAAAAGCTT

1	MASPDVKSAD	TLSKPAAPVV	SEKETEAKED	APQAGSQGQ	APSAQGGQDM
51	AAVSEENTGN	GGAAATDKPK	NEDEGAQNDM	PQNAADTDSL	TPNHTPASNM
101	PAGNMENQAP	DAGESEQPAN	QPDMAANTADG	MQGDDPSAGG	ENAGNTAAQG
151	TNQAENNQTA	GSONPASSTN	PSATNSGGDF	GRTNVGNVSV	IDGPPQNITL
201	THCKGDCSG	NNFLDEEVQL	KSEFEKLSDA	DKISNYKKG	KNDGKNDKQV
251	GLVADSVQMK	GINQYIIFYK	PKPTSFARFR	RSARSRRLP	AEMPLIPVNO
301	ADTLIVDGEA	VSLTGHSGNI	FAPEGNYRYL	TYGAEKLPGG	SYALRVQGEF
351	SKGEMLAGTA	VYNGEVLHFN	TENGRPSPSR	GRFAAKVDFG	SKSVDGLIDS
401	GDGLHMGTOK	FKAAIDGNF	KGTWTENGGG	DVSGKFYGPA	GEEVAGKYSY
451	RPTDAEKGGF	YVFAGKKEQD	GSGGGATND	DDVKAATVA	IAAAYNNGQE
501	INGFKAGETI	YDIDEDGTIT	KKDATAADVE	ADDFKGLGLK	KVVTNLTKTV
551	NENQNVDKAK	VKAESEIEK	LTTKLADTDA	ALADTDAALD	ATTNALNKLK
601	ENITTFAEET	KTNIVRIDEK	LEAVADTVDK	HARAFNDIAD	SLDETNTKAD
651	EAVKTANEAK	QTAEETKQNV	DAKVKAETA	AGKAEAAAGT	ANTAADKAEA
701	VAAKVTDIKA	DIATNKDNIA	KKANSADVYT	REESDSKFVR	IDGLNATTEK
751	LDTRLASAEK	SIADHDTRLN	GLDKTVSDLR	KETROGLAEQ	AALSGLFPQY
801	NVGRFNVTAA	VGGYKSESVA	AIGTGFRFTE	NFAAKAGVAV	GTSSGSSAAY
851	HVGVNYEW*				

Beispiel 2 – Hybride von 287

[0027] Die Expression von 287 in Volllänge mit einer C-terminalen His-Markierungssequenz oder ohne sein Leader-Peptid, aber mit einer C-terminalen His-Markierungssequenz führt zu relativ niedrigen Expressionspegeln. Eine bessere Expression wird bei der Verwendung einer N-terminalen GST-Fusion erreicht. Als Alternative zur Verwendung von GST als N-terminalen Fusionspartner wurde 287 an den C-Terminus von Protein 919 („919-287“), von Protein 953 („953-287“) und der Proteine des ORF46.1 („ORF46.1-287“) platziert. In beiden Fällen wurden die Leader-Peptide deletiert und die Hybride waren direkte Fusionen im Leseraster.

[0028] Um das 953-287-Hybrid zu erzeugen, wurden die Leader-Peptide der beiden Proteine weggelassen, indem der Vorwärts-Primer stromabwärts des Leaders jeder Sequenz konstruiert wurde; die Sequenz des Stopp-Codons wurde in dem reversen Primer für 953 ausgelassen, aber in den reversen Primer für 287 mit

eingeschlossen. Bei dem 953-Gen umfassten der 5'- und der 3'-Primer, die für die Amplifikation verwendet wurden, eine NdeI- beziehungsweise eine BamHI-Restriktions-Schnittstelle, wohingegen für die Amplifikation des 287-Gens der 5'- und der 3'-Primer eine BamHI- beziehungsweise eine XhoI-Restriktions-Schnittstelle enthielten. Auf diese Weise konnte eine schrittweise und orientierte Clonierung der beiden Gene in pET-21b+ unter Verwendung von NdeI-BamHI (für die Clonierung des ersten Gens) und anschließend von BamHI-XhoI (für die Clonierung des zweiten Gens) erreicht werden.

[0029] Das 919-287-Hybrid wurde durch Clonierung der Sequenz, die den reifen Anteil von 287 codiert, in die XhoI-Schnittstelle am 3'-Ende des 919-His-Clons in pET21b+ erhalten. Die für die Amplifikation des 287-Gens verwendeten Primer wurden so konstruiert, dass sie eine Sall-Restriktions-Schnittstelle am 5'- und eine XhoI-Restriktions-Schnittstelle am 3'-Ende des PCR-Fragments enthielten. Da die kohäsiven Enden, die durch die Restriktionsenzyme Sall und XhoI erzeugt werden, kompatibel sind, konnte das mit Sall und XhoI verdaute 287-PCR-Produkt in den mit XhoI geschnittenen Clon pET21b-919 inseriert werden.

[0030] Das Hybrid ORF46.1-287 wurde auf ähnliche Weise erhalten.

[0031] Die bakterizide Wirksamkeit (homologer Stamm) der Antikörper, die gegen die Hybridproteine erzeugt wurden, wurde mit der von Antikörpern verglichen, die gegen einfache Gemische der Antigen-Bestandteile erzeugt worden waren:

	Gemisch mit 287	Hybrid mit 287
919	32000	16000
953	8192	8192
ORF46.1	128	8192

[0032] Daten über die bakterizide Aktivität gegen heterologe MenB-Stämme und gegen die Serotypen A und C wurden für 919-287 und 953-287 ebenfalls erhalten:

	919		953		ORF46.1	
	Gemisch	Hybrid	Gemisch	Hybrid	Gemisch	Hybrid
MC58	512	1024	512	1024	-	1024
NGH38	1024	2048	2048	4096	-	4096
BZ232	512	128	1024	16	-	-
MenA (F6124)	512	2048	2048	32	-	1024
MenC (C11)	> 2048	n. d.	> 2048	n. d.	-	n. d.
MenC (BZ133)	> 4096	> 8192	> 4096	< 16	-	2048

[0033] Hybride von ORF46.1 und 919 wurden ebenfalls konstruiert. Die besten Ergebnisse (vierfach höherer Titer) wurden mit 919 am N-Terminus erhalten.

[0034] Die Hybride 919-519His, ORF97-225His und 225-ORF97His wurden ebenfalls untersucht. Sie ergaben mittlere ELISA-Titer und bakterizide Antikörper-Antwortreaktionen.

[0035] Da Hybride aus zwei Proteinen A und B entweder in Form von NH₂-A-B-COOH oder in Form von NH₂-B-A-COOH vorliegen können, wurden die „reversen“ Hybride mit 287 am N-Terminus ebenfalls hergestellt, aber unter Verwendung von ΔG287. Es wurde eine Reihe von Stämmen verwendet, einschließlich des homologen Stammes 2996. Als Adjuvanz wurde FCA verwendet:

	287 & 919		287 & 953		287 & ORF46.1	
Stamm	Δ G287-919	919-287	Δ G287-953	953-287	Δ G287-46.1	46.1-287
2996	128000	16000	65536	8192	16384	8192
BZ232	256	128	128	< 4	< 4	< 4
1000	2048	< 4	< 4	< 4	< 4	< 4
MC58	8192	1024	16384	1024	512	128
NGH38	32000	2048	> 2048	4096	16384	4096
394/98	4096	32	256	128	128	16
MenA (F6124)	32000	2048	> 2048	32	8192	1024
MenC (BZ133)	64000	> 8192	> 8192	< 16	8192	2048

[0036] Wenn 287 am N-Terminus verwendet wird, werden im Allgemeinen bessere bakterizide Titer beobachtet.

[0037] Wenn Δ G287 mit dem Protein 961 fusioniert wird [NH_2 - Δ G287-961-COOH – die Sequenz wurde vorstehend gezeigt], ist das so erhaltene Fusionsprotein unlöslich und muss vor der Reinigung denaturiert und renaturiert werden. Im Anschluss an die Renaturierung verblieben etwa 50% des Proteins in unlöslicher Form. Das lösliche und das unlösliche Protein wurden miteinander verglichen, und mit dem löslichen Protein wurden deutlich bessere Titer erhalten (FCA als Adjuvanz):

	2996	BZ232	MC58	NGH38	F6124	BZ133
Löslich	65536	128	4096	> 2048	> 2048	4096
Unlöslich	8192	< 4	< 4	16	n. b.	n. b.

[0038] Andererseits konnten die Titer mit der unlöslichen Form jedoch verbessert werden, wenn Alaun als Adjuvanz verwendet wurde:

Unlöslich	32768	128	4096	> 2048	> 2048	2048
-----------	-------	-----	------	--------	--------	------

[0039] Bei den Hybridproteinen wurde ebenfalls 961c verwendet (vergleiche mit dem Vorstehenden). Da 961 und seine Domänen-Varianten eine effiziente Expression steuern, sind sie als N-terminaler Anteil eines Hybridproteins ideal geeignet.

[0040] Es ist verständlich, dass die Erfindung nur durch Beispiele beschrieben wird und dass Modifikationen vorgenommen werden können, während man im Rahmen der Erfindung bleibt. So wird zum Beispiel die Verwendung von Proteinen aus anderen Stämmen in Betracht gezogen [vergleiche z. B. mit WO 00/66741 hinsichtlich polymorpher Sequenzen für 287 und 953].

EXPERIMENTELLE EINZELHEITEN

Clonierungsstrategie und Konstruktion von Oligonucleotiden

[0041] Die Gene, welche die Antigene von Interesse codierten, wurden durch PCR unter Verwendung von Oligonucleotiden amplifiziert, die auf der genomischen Sequenz von *N. meningitidis* B MC58 basierend konstruiert wurden. Sofern nicht anders spezifiziert, wurde immer die genomische DNA des Stammes 2996 als Matrize bei den PCR-Reaktionen verwendet, und die amplifizierten Fragmente wurden in dem Expressionsvektor pET21b+ (Novagen) cloniert, um das Protein als Produkt mit C-terminaler His-Markierungssequenz zu exprimieren, oder in pET-24b+ (Novagen) cloniert, um das Protein in „unmarkierter“ Form zu exprimieren (z. B. Δ G287K).

[0042] Wenn ein Protein ohne einen Fusionspartner und mit seinem eigenen Leader-Peptid (sofern vorhanden) exprimiert wurde, wurde eine Amplifikation des offenen Leserasters (vom ATG- bis zum STOPP-Codon) durchgeführt.

[0043] Wenn ein Protein in „unmarkierter“ Form exprimiert wurde, wurde das Leader-Peptid ausgelassen, indem der Amplifikations-Primer am 5'-Ende stromabwärts der vorhergesagten Leader-Sequenz konstruiert wurde.

[0044] Die Schmelztemperatur der Primer, die bei der PCR verwendet wurden, hängt von der Anzahl und der Art der hybridisierenden Nucleotide in dem vollständigen Primer ab, und wurde unter Verwendung der folgenden Formel bestimmt:

$$T_{m1} = 4(G + C) + 2(A + T) \text{ (ohne zusätzliche Schwanz-Nucleotide)}$$

$$T_{m2} = 64,9 + 0,41(\% \text{ GC}) - 600/N \text{ (vollständiger Primer)}$$

[0045] Die Schmelztemperaturen der ausgewählten Oligonucleotide lagen in der Regel zwischen 65–70°C für ein vollständiges Oligo und zwischen 50–60°C für die hybridisierende Region alleine.

[0046] Die Oligonucleotide wurden unter Verwendung des DNA/RNA-Synthesegeräts 394 von Perkin Elmer synthetisiert, mit 2,0 ml NH₄OH von der Säule eluiert und durch 5 Stunden Inkubation bei 56°C von Schutzgruppen befreit. Die Oligos wurden durch Zugabe von 0,3 M Na-Acetat und 2 Volumina Ethanol präzipitiert. Die Proben wurden zentrifugiert und die Sedimente wurden in Wasser resuspendiert.

Sequenzen

(Fwd = Vorwärts-Primer, Rev = reverser Primer)

Restriktions-

Schnittstelle

fu-(ΔG287)-919-His	Fwd	CGCGGATCCGGTGGTGGTGGT- CAAAGCAAGAGCATCCAAACC	BamHI
	Rev	CCCAAGCTT-TTCGGGCGGTATTCGGGCTTC	HindIII
fu-(ΔG287)-953-His	Fwd	CGCGGATCCGGTGGTGGTGGT- GCCACCTACAAAGTGGAC	BamHI
	Rev	GCCCAAGCTT-TTGTTTGGCTGCCTCGAT	HindIII
fu-(ΔG287)-961-His	Fwd	CGCGGATCCGGTGGTGGTGGT- ACAAGCGACGACG	BamHI
	Rev	GCCCAAGCTT-CCACTCGTAATTGACGCC	HindIII
fu-(ΔG287)-Orf46.1-His	Fwd	CGCGGATCCGGTGGTGGTGGT- TCAGATTTGGCAAACGATTC	BamHI
	Rev	CCCAAGCTT-CGTATCATATTTACGTGC	HindIII
fu-(ΔG287-919)-Orf46.1-His	Fwd	CCCAAGCTTGGTGGTGGTGGTGGT- TCAGATTTGGCAAACGATTC	HindIII
	Rev	CCCGCTCGAG-CGTATCATATTTACGTGC	XhoI
fu-(ΔG287-Orf46.1)-919-His	Fwd	CCCAAGCTTGGTGGTGGTGGTGGT- CAAAGCAAGAGCATCCAAACC	HindIII
	Rev	CCCGCTCGAG-CGGGCGGTATTCGGGCTT	XhoI
fu ΔG287(394.98)- ...	Fwd	CGCGGATCCGCTAGC-CCCGATGTTAAATCGGC	NheI
	Rev	CGGGGATCC-ATCCTGCTCTTTTTTGCCGG	BamHI

NB – Bei allen PCR-Reaktionen wurde der Stamm 2996 verwendet, sofern nicht anders spezifiziert (z. B. Stamm MC58)

[0047] In allen Konstrukten, die mit einem ATG begannen, dem keine singuläre NheI-Schnittstelle folgte, ist das ATG-Codon Teil der NdeI-Schnittstelle, die für die Clonierung verwendet wurde. Konstrukte, die unter Verwendung von NheI als Clonierungsstelle am 5'-Ende hergestellt wurden (z. B. alle diejenigen, die 287 am N-Terminus enthalten), besitzen zwei zusätzliche Codons (GCT AGC), die mit der codierenden Sequenz des Antigens fusioniert waren.

Herstellung der chromosomalen DNA-Matrizen

[0048] Die N. meningitidis-Stämme 2996, MC58, 394.98, 1000 und BZ232 (und andere) wurden bis zur exponentiellen Wachstumsphase in 100 ml GC-Medium angezogen, durch Zentrifugation geerntet und in 5 ml

Puffer (20% (Gew./Vol.) Saccharose, 50 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA, pH-Wert 8) resuspendiert. Nach 10 Minuten Inkubation auf Eis wurden die Bakterien durch Zugabe von 10 ml Lyse-Lösung (50 mM NaCl, 1% Na-Sarkosyl, 50 µg/ml Proteinase K) lysiert und die Suspension wurde 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Dann wurden zwei Extraktionen mit Phenol (auf pH-Wert 8 äquilibriert) und eine Extraktion mit CHCl₃/Isoamylalkohol (24:1) durchgeführt. Die DNA wurde durch Zugabe von 0,3 M Natriumacetat und 2 Volumina Ethanol präzipitiert und durch Zentrifugation gesammelt. Das Sediment wurde einmal mit 70% (Vol./Vol.) Ethanol gewaschen und in 4,0 ml TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH-Wert 8,0) rückgelöst. Die DNA-Konzentration wurde durch Ablesung der OD₂₆₀ bestimmt.

PCR-Amplifikation

[0049] Das Standard-PCR-Protokoll war wie folgt: 200 ng genomischer DNA aus den Stämmen 2996, MC58, 1000 oder BZ232 oder 10 ng eines Plasmid-DNA-Präparats eines rekombinanten Clons wurden als Matrize in Gegenwart von 40 µM jedes Oligonucleotid-Primers, 400–800 µM dNTP-Lösung, 1 × PCR-Puffer (der 1,5 mM MgCl₂ enthielt), 2,5 Einheiten TaqI-DNA-Polymerase verwendet (unter Verwendung von Perkin-Elmer AmpliTaq oder Boehringer Mannheim Expand™ Long Template).

[0050] Nach einer ersten 3-minütigen Inkubation des gesamten Gemisches bei 95°C wurde jede Probe einer zweistufigen Amplifikation unterworfen: die ersten 5 Zyklen wurden unter Verwendung der Hybridisierungstemperatur durchgeführt, bei der der Restriktionsenzym-Schwanz des Primers ausgeschlossen war (T_{m1}). Daraufhin folgten 30 Zyklen bei der Hybridisierungstemperatur, die für die Vollängen-Oligos berechnet worden war (T_{m2}). Die Zeiten für die Verlängerung, die bei 68°C oder bei 72°C durchgeführt wurde, variierten entsprechend der Länge des ORFs, das amplifiziert werden sollte. Im Falle von ORF1 wurde mit einer Verlängerungszeit von 3 Minuten begonnen und diese jeden Zyklus um 15 Sekunden verlängert. Die Zyklen wurden mit einem Verlängerungsschritt von 10 Minuten bei 72°C abgeschlossen.

[0051] Die amplifizierte DNA wurde direkt auf ein 1%-iges Agarosegel geladen. Das DNA-Fragment, welches der Bande mit der korrekten Größe entsprach, wurde aus dem Gel unter Verwendung des Gel-Extraktions-Kits von Qiagen nach den Angaben des Herstellers gereinigt.

Verdau der PCR-Fragmente und der Clonierungs-Vektoren

[0052] Die gereinigte DNA, die dem amplifizierten Fragment entsprach, wurde mit den geeigneten Restriktionsenzymen für die Clonierung in pET21b+, pET22b+ oder pET24b+ verdaut. Die verdauten Fragmente wurden unter Verwendung des QIAquick-PCR-Reinigungs-Kits (entsprechend den Angaben des Herstellers) gereinigt und entweder mit H₂O oder mit 10 mM Tris, pH-Wert 8,5 eluiert. Die Plasmid-Vektoren wurden mit den geeigneten Restriktionsenzymen verdaut, auf ein 1,0%-iges Agarosegel geladen und die dem verdauten Vektor entsprechende Bande wurde unter Verwendung des QIAquick-Gel-Extraktions-Kits von Qiagen gereinigt.

Clonierung

[0053] Die jeweils einem Gen entsprechenden Fragmente, die zuvor verdaut und gereinigt worden waren, wurden in pET21b+, pET22b+ oder pET24b+ ligiert. Es wurde ein molares Verhältnis von 3:1 zwischen Fragment und Vektor verwendet sowie die T4-DNA-Ligase und der Ligierungs-Puffer, der durch den Hersteller mitgeliefert wurde.

[0054] Das rekombinante Plasmid wurde in die kompetenten E. coli-Stämme DH5 oder HB101 transformiert, dies erfolgte durch 40 Minuten Inkubation der Ligase-Reaktionslösung und der Bakterien auf Eis und anschließend für 3 Minuten bei 37°C. Dann wurden 800 µl LB-Nährmedium zugegeben und 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden bei maximaler Geschwindigkeit in einer Eppendorf-Microfuge zentrifugiert, in etwa 200 µl des Überstandes resuspendiert und auf LB-Agar mit Ampicillin (100 µg/ml) ausplattiert.

[0055] Die Durchmusterung auf rekombinante Clone wurde durch die Anzucht zufällig ausgewählter Kolonien über Nacht bei 37°C in 4,0 ml LB-Nährmedium + 100 µg/ml Ampicillin durchgeführt. Die Zeilen wurden sedimentiert und die Plasmid-DNA wurde unter Verwendung des QIAprep-Spin-Miniprep-Kits von Qiagen nach den Angaben des Herstellers extrahiert. Etwa 1 µg jeder individuellen Minipräparation wurde mit den geeigneten Restriktionsenzymen verdaut und das verdaute Material wurde auf ein 1–1,5%-iges Agarosegel (in Abhängigkeit von der erwarteten Größe der Insertion) parallel zu einem Molekulargewichtsmarker (1 kB-DNA-Leiter, GIBCO) aufgetragen. Die positiven Clone wurden anhand der Größe der Insertion ausgewählt.

Expression

[0056] Nachdem jedes Gen in einen Expressionsvektor cloniert worden war, wurden die rekombinanten Plasmide in *E. coli*-Stämme transformiert, die für die Expression des rekombinanten Proteins geeignet waren. Es wurde 1 µg jedes Konstrukts verwendet, um, wie vorstehend beschrieben, *E. coli*-BL21-DE3 zu transformieren. Einzelne rekombinante Kolonien wurden in 2 ml LB + Amp (100 µg/ml) angeimpft, bei 37°C über Nacht inkubiert und dann 1:30 in 20 ml LB + Amp (100 µg/ml) in 100 ml-Flaschen verdünnt, um eine OD₆₀₀ zwischen 0,1 und 0,2 zu erhalten. Die Flaschen wurden bei 30°C oder bei 37°C in einem Kreisel-Wasserbad-Schüttler inkubiert, bis die OD₆₀₀ die exponentielle Wachstumsphase anzeigte, die für die Induktion der Expression geeignet war (OD: 0,4–0,8). Die Expression des Proteins wurde durch Zugabe von 1,0 mM IPTG induziert. Nach 3 Stunden Inkubation bei 30°C oder bei 37°C wurde die OD₆₀₀ gemessen und die Expression untersucht. Es wurde 1,0 ml aus jeder Probe in einer Microfuge zentrifugiert und das Sediment wurde in PBS resuspendiert und durch SDS-PAGE und Färbung mit Coomassie-Blau analysiert.

Reinigung der His-markierten Proteine

[0057] Es wurden verschiedene Formen von 287 aus den Stämmen 2996 und MC58 cloniert. Diese wurden mit einer His-Markierungs-Fusion am C-Terminus konstruiert und umfassten die reife Form (As 18-427), Konstrukte mit Deletionen (Δ1, Δ2, Δ3 und Δ4) und Clone, die entweder die B- oder die C-Domäne umfassten. Für jeden Clon, der als His-Fusion gereinigt wurde, wurde eine Einzelkolonie ausgestrichen und über Nacht bei 37°C auf einer LB/Amp-(100 µg/ml)Agarplatte angezogen. Eine von dieser Platte isolierte Kolonie wurde in 20 ml LB/Amp-(100 µg/ml)Flüssigmedium angeimpft und über Nacht bei 37°C unter Schütteln angezogen. Diese Übernacht-Kultur wurde 1:30 in 1,0 l LB/Amp-(100 µg/ml)Flüssigmedium verdünnt und bei der optimalen Temperatur (30 oder 37°C) angezogen, bis die OD₅₅₀ Werte zwischen 0,6–0,8 erreicht hatte. Die Expression des rekombinierten Proteins wurde durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration 1,0 mM) induziert und die Kultur wurde weitere 3 Stunden inkubiert. Die Bakterien wurden durch 15 Min. Zentrifugation bei 8.000 × g und 4°C geerntet. Das Bakteriensediment wurde in 7,5 ml entweder (i) kaltem Puffer A (300 mM NaCl, 50 mM Phosphat-Puffer, 10 mM Imidazol, pH-Wert 8,0) für lösliche Proteine oder (ii) Puffer B (10 mM Tris-HCl, 100 mM Phosphat-Puffer, pH-Wert 8,8 und wahlweise 8 M Harnstoff) für unlösliche Proteine resuspendiert. Proteine, die in löslicher Form gereinigt wurden, umfassen 287-His, Δ1, Δ2, Δ3 und Δ4287-His, Δ4287MC58-His, 287c-His und 287cMC58-His. Das Protein 287bMC58-His war unlöslich und wurde entsprechend anders gereinigt. Die Zellen wurden durch viermalige Behandlung über 30 sec. bei 40 W mit Ultraschall auf Eis unter Verwendung des Branson-Ultraschallgeräts 450 aufgebrochen und 30 min bei 4°C mit 13.000 × g zentrifugiert. Bei unlöslichen Proteinen wurden die Sedimente in 2,0 ml Puffer C (6 M Guanidin-Hydrochlorid, 100 mM Phosphat-Puffer, 10 mM Tris-HCl, pH-Wert 7,5) resuspendiert und 10 Durchgänge mit einem Dounce-Homogenisator behandelt. Das Homogenat wurde 30 min bei 13.000 × g zentrifugiert und der Überstand wurde aufbewahrt. Die Überstände sowohl der löslichen als auch der unlöslichen Präparate wurden mit 150 µl Ni²⁺-Harz (das zuvor entweder mit Puffer A oder mit Puffer B je nach Bedarf äquilibriert worden war) gemischt und 30 min bei Zimmertemperatur unter sanftem Schütteln inkubiert. Bei dem Harz handelte es sich um Chelating Sepharose Fast Flow (Pharmacia), das entsprechend dem Protokoll des Herstellers behandelt worden war. Das Batch-Präparat wurde 5 min bei 700 × g und 4°C zentrifugiert und der Überstand wurde verworfen. Das Harz wurde 10 min zweimal (chargenweise) mit 10 ml Puffer A oder B gewaschen, dann in 1,0 ml Puffer A oder B resuspendiert und auf eine Einweg-Säule aufgetragen. Das Harz wurde mit entweder (i) Puffer A bei 4°C oder (ii) Puffer B bei Zimmertemperatur weiterhin gewaschen, bis die OD₂₈₀ des Durchlaufs Werte von 0,02–0,01 erreicht hatte. Anschließend wurde das Harz entweder mit (i) kaltem Puffer C (300 mM NaCl, 50 mM Phosphat-Puffer, 20 mM Imidazol, pH-Wert 8,0) oder (ii) Puffer D (10 mM Tris-HCl, 100 mM Phosphat-Puffer, pH-Wert 6,3 und wahlweise 8 M Harnstoff) weiter gewaschen, bis die OD₂₈₀ des Durchlaufs Werte von 0,02–0,01 erreicht hatte. Das His-Fusionsprotein wurde durch Zugabe von 700 µl entweder (i) kaltem Elutions-Puffer A (300 mM NaCl, 50 mM Phosphat-Puffer, 250 mM Imidazol, pH-Wert 8,0) oder (ii) Elutions-Puffer B (10 mM Tris-HCl, 100 mM Phosphat-Puffer, pH-Wert 4,5 und wahlweise 8 M Harnstoff) eluiert, und es wurden Fraktionen gesammelt, bis die OD₂₈₀ anzeigte, dass das rekombinante Protein vollständig erhalten worden war. Ein Aliquot von 20 µl aus jeder eluierten Fraktion wurde mittels SDS-PAGE analysiert. Die Protein-Konzentrationen wurden unter Verwendung des Bradford-Testansatzes abgeschätzt.

Renaturierung der denaturierten His-Fusionsproteine

[0058] Da für die Solubilisierung von 287bMC8 eine Denaturierung erforderlich war, wurde vor der Immunisierung ein Renaturierungsschritt durchgeführt. Den vorstehend erhaltenen denaturierten Fraktionen wurde Glycerin zugefügt, um eine Endkonzentration von 10% (Vol./Vol.) einzustellen. Die Proteine wurden unter Verwendung von Dialyse-Puffer I (10% (Vol./Vol.) Glycerin, 0,5 M Arginin, 50 mM Phosphat-Puffer, 5 mM reduzier-

tes Glutathion, 0,5 mM oxidiertes Glutathion, 2,0 M Harnstoff, pH-Wert 8,8) auf 200 µg/ml verdünnt und gegen den gleichen Puffer 12–14 Stunden bei 4°C dialysiert. Dann wurde 12–14 Stunden bei 4°C eine weitere Dialyse mit Puffer II (10% (Vol./Vol.) Glycerin, 0,5 M Arginin, 50 mM Phosphat-Puffer, 50 mM reduziertes Glutathion, 0,5 mM oxidiertes Glutathion, pH-Wert 8,8) durchgeführt. Die Konzentration des Proteins wurde unter Verwendung der folgenden Formel abgeschätzt:

$$\text{Protein (mg/ml)} = (1,55 \times \text{OD}_{280}) - (0,76 \times \text{OD}_{260})$$

Immunisierung

[0059] Balb/C-Mäuse wurden mit den Antigenen an den Tagen 0, 21 und 35 immunisiert und die Seren wurden am Tag 49 analysiert.

Analyse der Seren – ELISA

[0060] Der keine Kapseln bildende Stamm MenB M7 und die Kapseln-bildenden Stämme wurden auf Schokolade-Agarplatten plattiert und über Nacht bei 37°C unter 5% CO₂ inkubiert. Die Bakterienkolonien wurden von den Agarplatten unter Verwendung von sterilen Dracon-Tupfern gesammelt und in Mueller-Hinton-Nährmedium (Difco), das 0,25% Glucose enthielt, angeimpft. Das Wachstum der Bakterien wurde alle 30 Minuten durch Ablesen der OD₆₂₀ überwacht. Die Bakterien wurden wachsen gelassen, bis die OD Werte zwischen 0,4–0,5 erreichte. Dann wurde die Kultur 10 Minuten bei 4.000 UpM zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Bakterien wurden zweimal mit PBS gewaschen, dann in PBS, das 0,025% Formaldehyd enthielt, resuspendiert und 1 Stunde bei 37°C und anschließend über Nacht bei 4°C unter Rühren inkubiert. Jeweils 100 µl der Bakterienzellen wurden den Vertiefungen einer Greiner-Platte mit 96 Vertiefungen zugegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Dann wurden die Vertiefungen dreimal mit PBT-Waschpuffer (0,1% Tween-20 in PBS) gewaschen. Es wurden 200 µl eines Sättigungspuffers (2,7% Polyvinylpyrrolidon 10 in Wasser) jeder Vertiefung zugegeben und die Platten wurden 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Dann wurden die Vertiefungen dreimal mit PBT gewaschen. Anschließend wurden 200 µl eines verdünnten Serums (Verdünnungs-Puffer: 1% BSA, 0,1% Tween-20, 0,1% NaN₃ in PBS) jeder Vertiefung zugegeben und die Platten wurden 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Vertiefungen wurden dreimal mit PBT gewaschen. Dann wurden 100 µl eines mit HRP konjugierten anti-Maus-Serums aus Kaninchen (Dako), das 1:2000 mit Verdünnungspuffer verdünnt worden war, jeder Vertiefung zugegeben und die Platten wurden 90 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Vertiefungen wurden dreimal mit PBT-Puffer gewaschen. Es wurden 100 µl Substratpuffer für die HRP (25 ml Citratpuffer, pH-Wert 5, 10 mg O-Phenyldiamin und 10 µl H₂O₂) jeder Vertiefung zugegeben und die Platten wurden 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden jeder Vertiefung 100 µl 12,5%-ige H₂SO₄ zugegeben und die OD₄₉₀ wurde aufgezeichnet. Die ELISA-Titer wurden willkürlich als die Verdünnung eines Serums berechnet, die einen OD₄₉₀-Wert von 0,4 über dem Spiegel des Präimmun-Serums ergab. Ein ELISA wurde als positiv bewertet, wenn die Verdünnung des Serums mit einem OD₄₉₀-Wert von 0,4 höher als 1:400 lag.

Analyse der Seren – FACS-Scan-Bakterien-Bindungs-Testansatz

[0061] Der keine Kapseln bildende Stamm MenB M7 wurde auf Schokolade-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C unter 5% CO₂ inkubiert. Die Bakterienkolonien wurden von den Agarplatten unter Verwendung von sterilen Dracon-Tupfern gesammelt und in 4 Röhrchen angeimpft, die jeweils 8 ml Mueller-Hinton-Nährmedium (Difco) enthielten, das 0,25% Glucose enthielt. Das Bakterienwachstum wurde alle 30 Minuten durch Ablesen der OD₆₂₀ überwacht. Die Bakterien wurden wachsen gelassen, bis die OD Werte zwischen 0,35–0,5 erreichte. Die Kultur wurde 10 Minuten bei 4.000 UpM zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment wurde in Blockierungspuffer (1% BSA in PBS, 0,4% NaN₃) resuspendiert und 5 Minuten bei 4.000 UpM zentrifugiert. Die Zellen wurden in Blockierungspuffer in einer OD₆₂₀ von 0,05 resuspendiert. Es wurden 100 µl Bakterienzellen jeder Vertiefung einer Costar-Platte mit 96 Vertiefungen zugegeben. Dann wurden 100 µl verdünntes (1:100, 1:200, 1:400) Serum (in Blockierungspuffer) jeder Vertiefung zugegeben und die Platten wurden 2 Stunden bei 4°C inkubiert. Die Zellen wurden 5 Minuten bei 4.000 UpM zentrifugiert, der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen wurden durch Zugabe von 200 µl Blockierungspuffer pro Vertiefung in jeder Vertiefung gewaschen. Es wurden 100 µl R-Phycoerythrin, das mit dem F(ab)₂-Fragment eines Ziegen-anti-Maus-Antikörpers konjugiert und 1:100 verdünnt worden war, jeder Vertiefung zugegeben und die Platten wurden 1 Stunde bei 4°C inkubiert. Die Zellen wurden durch 5 Minuten Zentrifugation bei 4.000 UpM sedimentiert und durch Zugabe von 200 µl Blockierungspuffer pro Vertiefung gewaschen. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen wurden in 200 µl PBS, 0,25% Formaldehyd pro Vertiefung resuspendiert. Die Proben wurden in FACS-Scan-Röhrchen überführt und abgelesen. Die eingestellten Bedingungen für die FACS-Scan (Laser-Stärke 15 mW) waren: FL2 an; FSC-H-Schwellenwert: 92; FCS-PMT-Spannung: E 01; SSC-PMT: 474;

Verstärkungsfaktor 6,1; FL-2-PMT: 586; Kompensations-Werte: 0.

Analyse der Seren – Testansatz auf Bakterizidie

[0062] Der *N. meningitidis*-Stamm 2996 wurde über Nacht bei 37°C auf Schokolade-Agarplatten unter 5% CO₂ angezogen (ausgehend von einer eingefrorenen Stammkultur). Die Kolonien wurden gesammelt und verwendet, um 7 ml Mueller-Hinton-Nährmedium (Difco), das 0,25% Glucose enthielt, in einer OD₆₂₀ von 0,05–0,08 anzupflanzen. Die Kultur wurde etwa 1,5 Stunden bei 37°C unter Schütteln inkubiert, bis die OD₆₂₀ Werte zwischen 0,23–0,24 erreichte. Die Bakterien wurden mit 50 mM Phosphat-Puffer, pH-Wert 7,2, der 10 mM MgCl₂, 10 mM CaCl₂ und 0,5% (Gew./Vol.) BSA enthielt (Testansatz-Puffer), zu einer Arbeitskonzentration von 10⁵ KBE/ml verdünnt. Das Gesamtvolumen des abschließenden Reaktionsgemisches betrug 50 µl, wobei 25 µl eine serielle zweifache Verdünnung des Testserums, 12,5 µl Bakterien mit der Arbeitskonzentration und 12,5 µl Komplement aus Kaninchen-Jungtieren (Endkonzentration 25%) waren.

[0063] Die Kontrollen umfassten Bakterien, die mit Komplement-Serum inkubiert wurden, sowie Immunsereen, die mit Bakterien und mit Komplement, das durch 30 Sek. Erhitzen auf 56°C inaktiviert worden war, inkubiert wurden. Sofort nach der Zugabe des Komplements aus Kaninchen-Jungtieren wurden 10 µl der Kontrollen auf Mueller-Hinton-Agarplatten unter Verwendung des Neigungs („tilt“)-Verfahrens ausplattiert (Zeitpunkt 0). Die Platte mit 96 Vertiefungen wurde 1 Stunde bei 37°C unter Rotieren inkubiert. Es wurden 7 µl jeder Probe auf Mueller-Hinton-Agarplatten in einem Tupfen ausplattiert, wohingegen 10 µl der Kontrollen auf Mueller-Hinton-Agarplatten unter Verwendung des Neigungs-Verfahrens ausplattiert wurden (Zeitpunkt 1). Die Agarplatten wurden 18 Stunden bei 37°C inkubiert und die Kolonien, die den Zeitpunkten 0 und 1 entsprachen, wurden ausgezählt.

Analyse der Seren – Western Blot-Analyse

[0064] Gereinigte Proteine (500 ng/Bahn), Vesikel der äußeren Membran (5 µg) und Gesamt-Zellextrakt (25 µg), die aus dem MenB-Stamm 2996 stammten, wurden auf ein 12%-iges Polyacrylamid-Gel aufgetragen und auf eine Nitracellulose-Membran übertragen. Der Transfer wurde über 2 Stunden mit 150 mA bei 4°C unter Verwendung von Transfer-Puffer (0,3% Tris-Base, 1,44% Glycin, 20% (Vol./Vol.) Methanol) durchgeführt. Die Membran wurde über Nacht bei 4°C durch Inkubation in Absättigungs-Puffer (10% entrahmte Milch, 0,1% Triton X100 in PBS) abgesättigt. Dann wurde die Membran zweimal mit Waschpuffer (3% entrahmte Milch, 0,1% Triton X100 in PBS) gewaschen und 2 Stunden bei 37°C mit Maus-Serum inkubiert, das 1:200 mit Waschpuffer verdünnt worden war. Die Membran wurde zweimal gewaschen und 90 Minuten mit einer 1:2000-Verdünnung von ante-Maus-Ig inkubiert, das mit Meerrettich-Peroxidase konjugiert worden war. Die Membran wurde zweimal mit 0,1% Triton X100 in PBS gewaschen und mit dem Opti-4CN-Substrat-Kit (Bio-Rad) entwickelt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Wasser beendet.

[0065] Die OMVs („outer membrane vesicle“, äußere Membranvesikel) wurden wie folgt hergestellt: der *N. meningitidis*-Stamm 2996 wurde über Nacht bei 37°C unter 5% CO₂ auf 5 GC-Platten angezogen, mit einer Öse geerntet und in 10 ml 20 mM Tris-HCl, pH-Wert 7,5, 2 mM EDTA resuspendiert. Es wurde eine Hitzeinaktivierung bei 56°C über 45 Minuten durchgeführt und die Bakterien wurden durch 5 Minuten Behandlung mit Ultraschall (50% Arbeitszyklus, 50% Leistung, 3 mm-Mikrospitze, Branson-Ultraschall-Gerät) auf Eis aufgebrochen. Die nicht aufgebrochenen Zellen wurden durch 10 Minuten Zentrifugation bei 5.000 × g entfernt, der Überstand, der die Gesamt-Zellhüll-Fraktion enthielt, wurde gewonnen und bei 50.000 × g und einer Temperatur von 4°C über Nacht erneut zentrifugiert. Das Sediment, welches die Membranen enthielt, wurde in 2% Sarkosyl, 20 mM Tris-HCl, pH-Wert 7,5, 2 mM EDTA resuspendiert und 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, um die inneren Membranen zu solubilisieren. Die Suspension wurde 10 Minuten bei 10.000 × g zentrifugiert, um Aggregate zu entfernen, und der Überstand wurde 3 Stunden bei 50.000 × g erneut zentrifugiert. Das Sediment, das die äußeren Membranen enthielt, wurde in PBS gewaschen und in dem gleichen Puffer resuspendiert. Die Proteinkonzentration wurde mittels des D.C.-Protein-Tests von BioRad (modifiziertes Lowry-Verfahren) unter Verwendung von BSA als Standard gemessen.

[0066] Die Gesamt-Zell-Extrakte wurden wie folgt hergestellt: der *N. meningitidis*-Stamm 2996 wurde über Nacht auf einer GC-Platte angezogen, mit einer Öse geerntet und in 1 ml 20 mM Tris-HCl resuspendiert. Es wurde 30 Minuten eine Hitzeinaktivierung bei 56°C durchgeführt.

SEQUENZPROTOKOLL

<110> CHIRON SpA

<120> Hybride Expression von Neisseria-Proteinen

<130> P026783WO

<140> PCT/IB01/00420

<141> 28.02.2001

<150> GB 0004695.3

<151> 28.02.2000

<150> GB 0027675.8

<151> 13.11.2000

<160> 121

<170> SeqWin99, Version 1.02

<210> 1

<211> 608

<212> PRT

<213> Neisseria meningitidis

<400> 1

Leu Gly Ile Ser Arg Lys Ile Ser Leu Ile Leu Ser Ile Leu Ala Val
 1 5 10 15

Cys Leu Pro Met His Ala His Ala Ser Asp Leu Ala Asn Asp Ser Phe
 20 25 30

Ile Arg Gln Val Leu Asp Arg Gln His Phe Glu Pro Asp Gly Lys Tyr
 35 40 45

His Leu Phe Gly Ser Arg Gly Glu Leu Ala Glu Arg Ser Gly His Ile
 50 55 60

Gly Leu Gly Lys Ile Gln Ser His Gln Leu Gly Asn Leu Met Ile Gln
 65 70 75 80

Gln Ala Ala Ile Lys Gly Asn Ile Gly Tyr Ile Val Arg Phe Ser Asp
 85 90 95

His Gly His Glu Val His Ser Pro Phe Asp Asn His Ala Ser His Ser
 100 105 110

Asp Ser Asp Glu Ala Gly Ser Pro Val Asp Gly Phe Ser Leu Tyr Arg
 115 120 125

Ile His Trp Asp Gly Tyr Glu His His Pro Ala Asp Gly Tyr Asp Gly
 130 135 140

Pro Gln Gly Gly Gly Tyr Pro Ala Pro Lys Gly Ala Arg Asp Ile Tyr
 145 150 155 160

Ser Tyr Asp Ile Lys Gly Val Ala Gln Asn Ile Arg Leu Asn Leu Thr
 165 170 175
 Asp Asn Arg Ser Thr Gly Gln Arg Leu Ala Asp Arg Phe His Asn Ala
 180 185 190
 Gly Ser Met Leu Thr Gln Gly Val Gly Asp Gly Phe Lys Arg Ala Thr
 195 200 205
 Arg Tyr Ser Pro Glu Leu Asp Arg Ser Gly Asn Ala Ala Glu Ala Phe
 210 215 220
 Asn Gly Thr Ala Asp Ile Val Lys Asn Ile Ile Gly Ala Ala Gly Glu
 225 230 235 240
 Ile Val Gly Ala Gly Asp Ala Val Gln Gly Ile Ser Glu Gly Ser Asn
 245 250 255
 Ile Ala Val Met His Gly Leu Gly Leu Leu Ser Thr Glu Asn Lys Met
 260 265 270
 Ala Arg Ile Asn Asp Leu Ala Asp Met Ala Gln Leu Lys Asp Tyr Ala
 275 280 285
 Ala Ala Ala Ile Arg Asp Trp Ala Val Gln Asn Pro Asn Ala Ala Gln
 290 295 300
 Gly Ile Glu Ala Val Ser Asn Ile Phe Met Ala Ala Ile Pro Ile Lys
 305 310 315 320
 Gly Ile Gly Ala Val Arg Gly Lys Tyr Gly Leu Gly Gly Ile Thr Ala
 325 330 335
 His Pro Ile Lys Arg Ser Gln Met Gly Ala Ile Ala Leu Pro Lys Gly
 340 345 350
 Lys Ser Ala Val Ser Asp Asn Phe Ala Asp Ala Ala Tyr Ala Lys Tyr
 355 360 365
 Pro Ser Pro Tyr His Ser Arg Asn Ile Arg Ser Asn Leu Glu Gln Arg
 370 375 380
 Tyr Gly Lys Glu Asn Ile Thr Ser Ser Thr Val Pro Pro Ser Asn Gly
 385 390 395 400
 Lys Asn Val Lys Leu Ala Asp Gln Arg His Pro Lys Thr Gly Val Pro
 405 410 415
 Phe Asp Gly Lys Gly Phe Pro Asn Phe Glu Lys His Val Lys Tyr Asp
 420 425 430
 Thr Lys Leu Asp Ile Gln Glu Leu Ser Gly Gly Gly Ile Pro Lys Ala
 435 440 445
 Lys Pro Val Ser Asp Ala Lys Pro Arg Trp Glu Val Asp Arg Lys Leu
 450 455 460

Asn Lys Leu Thr Thr Arg Glu Gln Val Glu Lys Asn Val Gln Glu Ile
465 470 475 480

Arg Asn Gly Asn Lys Asn Ser Asn Phe Ser Gln His Ala Gln Leu Glu
485 490 495

Arg Glu Ile Asn Lys Leu Lys Ser Ala Asp Glu Ile Asn Phe Ala Asp
500 505 510

Gly Met Gly Lys Phe Thr Asp Ser Met Asn Asp Lys Ala Phe Ser Arg
515 520 525

Leu Val Lys Ser Val Lys Glu Asn Gly Phe Thr Asn Pro Val Val Glu
530 535 540

Tyr Val Glu Ile Asn Gly Lys Ala Tyr Ile Val Arg Gly Asn Asn Arg
545 550 555 560

Val Phe Ala Ala Glu Tyr Leu Gly Arg Ile His Glu Leu Lys Phe Lys
565 570 575

Lys Val Asp Phe Pro Val Pro Asn Thr Ser Trp Lys Asn Pro Thr Asp
580 585 590

Val Leu Asn Glu Ser Gly Asn Val Lys Arg Pro Arg Tyr Arg Ser Lys
595 600 605

<210> 2

<211> 464

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> deltaG287

<400> 2

Ser Pro Asp Val Lys Ser Ala Asp Thr Leu Ser Lys Pro Ala Ala Pro
1 5 10 15

Val Val Ser Glu Lys Glu Thr Glu Ala Lys Glu Asp Ala Pro Gln Ala
20 25 30

Gly Ser Gln Gly Gln Gly Ala Pro Ser Ala Gln Gly Ser Gln Asp Met
35 40 45

Ala Ala Val Ser Glu Glu Asn Thr Gly Asn Gly Gly Ala Val Thr Ala
50 55 60

Asp Asn Pro Lys Asn Glu Asp Glu Val Ala Gln Asn Asp Met Pro Gln
65 70 75 80

Asn Ala Ala Gly Thr Asp Ser Ser Thr Pro Asn His Thr Pro Asp Pro
85 90 95

Asn Met Leu Ala Gly Asn Met Glu Asn Gln Ala Thr Asp Ala Gly Glu
100 105 110

Ser Ser Gln Pro Ala Asn Gln Pro Asp Met Ala Asn Ala Ala Asp Gly
 115 120 125

Met Gln Gly Asp Asp Pro Ser Ala Gly Gly Gln Asn Ala Gly Asn Thr
 130 135 140

Ala Ala Gln Gly Ala Asn Gln Ala Gly Asn Asn Gln Ala Ala Gly Ser
 145 150 155 160

Ser Asp Pro Ile Pro Ala Ser Asn Pro Ala Pro Ala Asn Gly Gly Ser
 165 170 175

Asn Phe Gly Arg Val Asp Leu Ala Asn Gly Val Leu Ile Asp Gly Pro
 180 185 190

Ser Gln Asn Ile Thr Leu Thr His Cys Lys Gly Asp Ser Cys Ser Gly
 195 200 205

Asn Asn Phe Leu Asp Glu Glu Val Gln Leu Lys Ser Glu Phe Glu Lys
 210 215 220

Leu Ser Asp Ala Asp Lys Ile Ser Asn Tyr Lys Lys Asp Gly Lys Asn
 225 230 235 240

Asp Lys Phe Val Gly Leu Val Ala Asp Ser Val Gln Met Lys Gly Ile
 245 250 255

Asn Gln Tyr Ile Ile Phe Tyr Lys Pro Lys Pro Thr Ser Phe Ala Arg
 260 265 270

Phe Arg Arg Ser Ala Arg Ser Arg Arg Ser Leu Pro Ala Glu Met Pro
 275 280 285

Leu Ile Pro Val Asn Gln Ala Asp Thr Leu Ile Val Asp Gly Glu Ala
 290 295 300

Val Ser Leu Thr Gly His Ser Gly Asn Ile Phe Ala Pro Glu Gly Asn
 305 310 315 320

Tyr Arg Tyr Leu Thr Tyr Gly Ala Glu Lys Leu Pro Gly Gly Ser Tyr
 325 330 335

Ala Leu Arg Val Gln Gly Glu Pro Ala Lys Gly Glu Met Leu Ala Gly
 340 345 350

Ala Ala Val Tyr Asn Gly Glu Val Leu His Phe His Thr Glu Asn Gly
 355 360 365

Arg Pro Tyr Pro Thr Arg Gly Arg Phe Ala Ala Lys Val Asp Phe Gly
 370 375 380

Ser Lys Ser Val Asp Gly Ile Ile Asp Ser Gly Asp Asp Leu His Met
 385 390 395 400

Gly Thr Gln Lys Phe Lys Ala Ala Ile Asp Gly Asn Gly Phe Lys Gly
 405 410 415

Thr Trp Thr Glu Asn Gly Ser Gly Asp Val Ser Gly Lys Phe Tyr Gly
 420 425 430

Pro Ala Gly Glu Glu Val Ala Gly Lys Tyr Ser Tyr Arg Pro Thr Asp
 435 440 445

Ala Glu Lys Gly Gly Phe Gly Val Phe Ala Gly Lys Lys Glu Gln Asp
 450 455 460

<210> 3
 <211> 2505
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> deltaG287-919

<400> 3

```

atggctagcc cccgatgtaa atcggcggac acgctgtcaa aaccggccgc tccgtgtgtt 60
gctgaaaaag agacagaggt aaaagaagat gcgccacagg caggttctca aggacagggc 120
gcgccatcca cacaaggcag ccaagatatg gcggcagttt cggcagaaaa tacaggcaat 180
ggcgggtgccc caacaacgga caaacccaaa aatgaagacg agggaccgca aatgatatg 240
ccgcaaaaatt ccgcccgaat cgcaaatcaa acagggaaca accaacccgc cgattcttca 300
gattccgccc ccgcgtaaaa cccctgcacct gcgaatggcg gtagcaattt tggagggtt 360
gatttgctta atggcgtttt gattgatggg ccgctcgaaa atataacgtt gaccactgt 420
aaaggcgatt cttgtaatgg tgataattta ttggatgaag aagcacccgc aaaatcagaa 480
tttgaaaatt taaatgagtc tgaacgaatt gagaaatata agaaagatgg gaaaagcgat 540
aaatttacta atttggttgc gacagcagtt caagctaata gaaactaaca atatgtcatc 600
atztataaag acaagtcgac ttcattctca tctgcgcgat tcaggcgttc tgcacggtcg 660
aggaggtcgc ttccctgccg gatgccgcta atccccgtca atcaggcggg tacgctgatt 720
gtcgatgggg aagcggtcag cctgacgggg cattccggca atatcttcgc gcccgaggg 780
aattaccggt atctgactta cggggcggaa aaattgcccg gcggatcgta tgcctccgt 840
gtgcaaggcg aaccggcaaa aggcgaaatg cttgctggca cggccgtgta caacggcgaa 900
gtgctgcatt ttcatacggg aaacggccgt ccgtaccgca ctagaggcag gtttgccgca 960
aaagtgcatt tcggcagcaa atctgtggac ggcattatcg acagcggcga tgatttgcac 1020
atgggtacgc aaaaattcaa agccgccatc gatggaaacg gctttaaggg gacttggacg 1080
gaaaatggcg gcggggatgt ttccggaagg ttttacggcc cggccggcga ggaagtggcg 1140
ggaaaataca gctatcgcgc gacagatgcg gaaaaggggcg gattcggcgt gtttgccggc 1200
aaaaaagagc aggatggatc cggaggagga ggatgccaaa gcaagagcat ccaaaccctt 1260
ccgcaacccc acacatccgt catcaacggc ccggaccggc cggtcggcat ccccgacccc 1320
gccggaacga cggtcggcgg cggcggggcc gtctataccg ttgtaccgca cctgtccctg 1380
cccactggg cggcgcagga tttcgccaaa agcctgcaat ccttccgct cggctgcgcc 1440
aatttgaaaa accgccaagg ctggcaggat gtgtgcgccc aagccttca aaccccgc 1500
cattccttcc aggcaaaaaca gttttttgaa cgctatttca cgcctgggca ggttgcaggc 1560
aacggaagcc ttgccggtac ggttaccggc tattacgagc cggtgctgaa gggcgacgac 1620
aggcggacgg cacaagccc cttcccgatc tacggtatc ccgacgatt tatctccgctc 1680
cccctgcctg ccggttttgc gagcggaaaa gccctgtcc gcatcaggca gacgggaaaa 1740
aacagcggca caatcgaaa taccggcggc acacataccg ccgacctctc ccgattcccc 1800
atcaccgccc gcacaacggc aatcaaaggc aggtttgaag gaagccgctt cctcccctac 1860
cacacggcga accaaatcaa cggcggcggc cttgacggca aagccccgat actcggttac 1920
gccgaagacc ccgtcgaaact tttttttatg cacatccaag gctcggggcg tctgaaaacc 1980
ccgtccggca aatacatccg catcggctat gccgacaaaa acgaacatcc ctacgtttcc 2040
atcggacgct atatggcgga caaaggctac ctcaagctcg ggcagacctc gatgcagggc 2100
atcaaagcct atatgcccga aaatccgcaa cgcctcgcgc aagttttggg tcaaaaacccc 2160
agctatatct ttttccgca gcttgccgga agcagcaatg accgtcccgt cggcgcactg 2220
    
```

```

ggcacgccgt tgatggggga atatgccggc gcagtcgacc ggcactacat taccttgggc 2280
gcgcccttat ttgtcgccac cgcccatccg gttaccegca aagccctcaa ccgcctgatt 2340
atggcgagc ataccggcag cgcgattaaa ggcgcggtgc gcgtggatta tttttgggga 2400
tacggcgacg aagccggcga acttgccggc aaacagaaaa ccacgggtta cgtctggcag 2460
ctcctacca acggtatgaa gcccgaatac cgcccgtaac tcgag 2505

```

<210> 4

<211> 832

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> deltaG287-919

<400> 4

```

Met Ala Ser Pro Asp Val Lys Ser Ala Asp Thr Leu Ser Lys Pro Ala
1          5          10          15

Ala Pro Val Val Ala Glu Lys Glu Thr Glu Val Lys Glu Asp Ala Pro
          20          25          30

Gln Ala Gly Ser Gln Gly Gln Gly Ala Pro Ser Thr Gln Gly Ser Gln
          35          40          45

Asp Met Ala Ala Val Ser Ala Glu Asn Thr Gly Asn Gly Gly Ala Ala
50          55          60

Thr Thr Asp Lys Pro Lys Asn Glu Asp Glu Gly Pro Gln Asn Asp Met
65          70          75          80

Pro Gln Asn Ser Ala Glu Ser Ala Asn Gln Thr Gly Asn Asn Gln Pro
          85          90          95

Ala Asp Ser Ser Asp Ser Ala Pro Ala Ser Asn Pro Ala Pro Ala Asn
          100          105          110

Gly Gly Ser Asn Phe Gly Arg Val Asp Leu Ala Asn Gly Val Leu Ile
          115          120          125

Asp Gly Pro Ser Gln Asn Ile Thr Leu Thr His Cys Lys Gly Asp Ser
130          135          140

Cys Asn Gly Asp Asn Leu Leu Asp Glu Glu Ala Pro Ser Lys Ser Glu
145          150          155          160

Phe Glu Asn Leu Asn Glu Ser Glu Arg Ile Glu Lys Tyr Lys Lys Asp
          165          170          175

Gly Lys Ser Asp Lys Phe Thr Asn Leu Val Ala Thr Ala Val Gln Ala
          180          185          190

Asn Gly Thr Asn Lys Tyr Val Ile Ile Tyr Lys Asp Lys Ser Ala Ser
          195          200          205

Ser Ser Ser Ala Arg Phe Arg Arg Ser Ala Arg Ser Arg Arg Ser Leu
210          215          220

```

Pro Ala Glu Met Pro Leu Ile Pro Val Asn Gln Ala Asp Thr Leu Ile
 225 230 235 240
 Val Asp Gly Glu Ala Val Ser Leu Thr Gly His Ser Gly Asn Ile Phe
 245 250 255
 Ala Pro Glu Gly Asn Tyr Arg Tyr Leu Thr Tyr Gly Ala Glu Lys Leu
 260 265 270
 Pro Gly Gly Ser Tyr Ala Leu Arg Val Gln Gly Glu Pro Ala Lys Gly
 275 280 285
 Glu Met Leu Ala Gly Thr Ala Val Tyr Asn Gly Glu Val Leu His Phe
 290 295 300
 His Thr Glu Asn Gly Arg Pro Tyr Pro Thr Arg Gly Arg Phe Ala Ala
 305 310 315 320
 Lys Val Asp Phe Gly Ser Lys Ser Val Asp Gly Ile Ile Asp Ser Gly
 325 330 335
 Asp Asp Leu His Met Gly Thr Gln Lys Phe Lys Ala Ala Ile Asp Gly
 340 345 350
 Asn Gly Phe Lys Gly Thr Trp Thr Glu Asn Gly Gly Gly Asp Val Ser
 355 360 365
 Gly Arg Phe Tyr Gly Pro Ala Gly Glu Glu Val Ala Gly Lys Tyr Ser
 370 375 380
 Tyr Arg Pro Thr Asp Ala Glu Lys Gly Gly Phe Gly Val Phe Ala Gly
 385 390 395 400
 Lys Lys Glu Gln Asp Gly Ser Gly Gly Gly Gly Cys Gln Ser Lys Ser
 405 410 415
 Ile Gln Thr Phe Pro Gln Pro Asp Thr Ser Val Ile Asn Gly Pro Asp
 420 425 430
 Arg Pro Val Gly Ile Pro Asp Pro Ala Gly Thr Thr Val Gly Gly Gly
 435 440 445
 Gly Ala Val Tyr Thr Val Val Pro His Leu Ser Leu Pro His Trp Ala
 450 455 460
 Ala Gln Asp Phe Ala Lys Ser Leu Gln Ser Phe Arg Leu Gly Cys Ala
 465 470 475 480
 Asn Leu Lys Asn Arg Gln Gly Trp Gln Asp Val Cys Ala Gln Ala Phe
 485 490 495
 Gln Thr Pro Val His Ser Phe Gln Ala Lys Gln Phe Phe Glu Arg Tyr
 500 505 510
 Phe Thr Pro Trp Gln Val Ala Gly Asn Gly Ser Leu Ala Gly Thr Val
 515 520 525

Thr Gly Tyr Tyr Glu Pro Val Leu Lys Gly Asp Asp Arg Arg Thr Ala
 530 535 540

Gln Ala Arg Phe Pro Ile Tyr Gly Ile Pro Asp Asp Phe Ile Ser Val
 545 550 555 560

Pro Leu Pro Ala Gly Leu Arg Ser Gly Lys Ala Leu Val Arg Ile Arg
 565 570 575

Gln Thr Gly Lys Asn Ser Gly Thr Ile Asp Asn Thr Gly Gly Thr His
 580 585 590

Thr Ala Asp Leu Ser Arg Phe Pro Ile Thr Ala Arg Thr Thr Ala Ile
 595 600 605

Lys Gly Arg Phe Glu Gly Ser Arg Phe Leu Pro Tyr His Thr Arg Asn
 610 615 620

Gln Ile Asn Gly Gly Ala Leu Asp Gly Lys Ala Pro Ile Leu Gly Tyr
 625 630 635 640

Ala Glu Asp Pro Val Glu Leu Phe Phe Met His Ile Gln Gly Ser Gly
 645 650 655

Arg Leu Lys Thr Pro Ser Gly Lys Tyr Ile Arg Ile Gly Tyr Ala Asp
 660 665 670

Lys Asn Glu His Pro Tyr Val Ser Ile Gly Arg Tyr Met Ala Asp Lys
 675 680 685

Gly Tyr Leu Lys Leu Gly Gln Thr Ser Met Gln Gly Ile Lys Ala Tyr
 690 695 700

Met Arg Gln Asn Pro Gln Arg Leu Ala Glu Val Leu Gly Gln Asn Pro
 705 710 715 720

Ser Tyr Ile Phe Phe Arg Glu Leu Ala Gly Ser Ser Asn Asp Gly Pro
 725 730 735

Val Gly Ala Leu Gly Thr Pro Leu Met Gly Glu Tyr Ala Gly Ala Val
 740 745 750

Asp Arg His Tyr Ile Thr Leu Gly Ala Pro Leu Phe Val Ala Thr Ala
 755 760 765

His Pro Val Thr Arg Lys Ala Leu Asn Arg Leu Ile Met Ala Gln Asp
 770 775 780

Thr Gly Ser Ala Ile Lys Gly Ala Val Arg Val Asp Tyr Phe Trp Gly
 785 790 795 800

Tyr Gly Asp Glu Ala Gly Glu Leu Ala Gly Lys Gln Lys Thr Thr Gly
 805 810 815

Tyr Val Trp Gln Leu Leu Pro Asn Gly Met Lys Pro Glu Tyr Arg Pro
 820 825 830

<210> 5
 <211> 1746
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> deltaG287-953

<400> 5

```

atggctagcc cccgatgttaa atcggcggac acgctgtcaa aaccggccgc tcctgttgtt 60
gctgaaaaag agacagagggt aaaagaagat gcgccacagg caggttctca aggacagggc 120
gcgccatcca cacaaggcag ccaagatag gcggcagttt cggcagaaaa tacaggcaat 180
ggcgggtgagg caacaacgga caaacccaaa aatgaagacg agggaccgca aaatgatatg 240
ccgcaaaaatt ccgccgaatc cgcaaatcaa acagggaaca accaaccggc cgattcttca 300
gattccgccc ccgcgtcaaa ccctgcacct gcgaatggcg gtagcaattt tggagggtt 360
gatttgggta atggcgtttt gattgatggg ccgtcgcaaa atataacgtt gaccactgt 420
aaaggcgatt cttgtaatgg tgataattta ttggatgaag aagcaccgtc aaaatcagaa 480
tttgaaaaatt taaatgagtc tgaacgaatt gagaaatata agaaagatgg gaaaagcgat 540
aaatttacta atttggttgc gacagcagtt caagctaatt gaaactaaca atatgtcatc 600
atttataaag acaagtccgc ttcattctca tctgcgcgat tcaggcggtc tgcacggtcg 660
aggaggctgc ttccctgccg gatgccgcta atccccgtca atcaggcgga tacgtgatt 720
gtcagatgggg aagcggctag cctgacgggg cattccggca atatcttcgc gcccgaggg 780
aattaccggt atctgactta cggggcggaa aaattgcccg gcggatcgtg tgcctccgt 840
gtgcaaggcg aaccggcaaa aggcgaaatg cttgctggca cggccgtgta caacggcgaa 900
tgactgcatt ttcatacggg aaacggccgt ccgtaccgca ctagaggcag gtttgccgca 960
aaagtcgatt tcggcagcaa atctgtggac ggcattatcg acagcggcga tgatttgcg 1020
atgggtacgc aaaaattcaa agccgccatc gatggaaacg gctttaaggg gacttggacg 1080
gaaaatggcg gcggggatgt ttccggaagg ttttacggcc cggccggcga ggaagtggcg 1140
ggaaaataca gctatcgccc gacagatgcg gaaaaggcg gattcggcgt gtttgccggc 1200
aaaaaagagc aggatggatc cggaggagga ggagccacct acaaagtgga cgaatatcac 1260
gccaacgccc gtttcgccat cgaccatttc aacaccagca ccaacgtcgg cggtttttac 1320
ggtctgaccg gttccgtcga gttcgaccaa gcaaaacgcg acggtaaaat cgacatcacc 1380
atccccgttg ccaacctgca aagcggttcg caaaccttta ccgaccacct gaaatcagcc 1440
gacatcttcg atgccgcca atatccggac atccgctttg tttccaccaa attcaacttc 1500
aacggcaaaa aactggtttc cgttgacggc aaactgacca tgcacggcaa aaccgcccc 1560
gtcaaaactca aagccgaaaa attcaactgc taccaaagcc cgatggcgaa aaccgaagtt 1620
tgccggcgcg acttcagcac caccatcgac cgcaccaaat gggcggtgga ctacctcgtt 1680
aacgttggta tgaccaaaag cgtccgcacg gacatccaaa tcgaggcagc caaacaataa 1740
ctcgag 1746
    
```

<210> 6
 <211> 579
 <212> PRT
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> deltaG287-953

<400> 6

```

Met Ala Ser Pro Asp Val Lys Ser Ala Asp Thr Leu Ser Lys Pro Ala
1           5           10           15
Ala Pro Val Val Ala Glu Lys Glu Thr Glu Val Lys Glu Asp Ala Pro
                20           25           30
Gln Ala Gly Ser Gln Gly Gln Gly Ala Pro Ser Thr Gln Gly Ser Gln
    
```



```

gctgaaaaag agacagaggt aaaagaagat gcgccacagg caggttctca aggacagggc 120
gcgccatcca cacaaggcag ccaagatag gcggcagttt cggcagaaaa tacaggcaat 180
ggcgggtgcg caacaacgga caaacccaaa aatgaagacg agggaccgca aaatgatatg 240
ccgcaaaatt ccgccgaatc cgcaaatcaa acaggggaaca accaaccgcg cgattcttca 300
gattccgccc ccgcgtaaaa ccctgcacct gcgaatggcg gtagcaattt tgggaagggtt 360
gatttgggcta atggcgtttt gattgatggg ccgtcgcaaa atataacgtt gaccactgt 420
aaaggcgatt cttgtaaatg tgataattta ttggatgaag aagcaccgtc aaaatcagaa 480
tttgaaaatt taaatgagtc tgaacgaatt gagaaatata agaaagatgg gaaaagcgat 540
aaatttacta atttggttgc gacagcagtt caagctaata gaactaacia atatgtcatc 600
atttataaag acaagtccgc ttcatcttca tctgcgcgat tcaggcgttc tgcacggtcg 660
aggagggtcgc ttccctgccga gatgccgcta atccccgtca atcaggcgga tacgctgatt 720
gtcgatgggg aagcggtcag cctgacgggg cattccggca atatcttcgc gcccgagggg 780
aattaccggt atctgactta cggggcgga aaattgcccg gcggatcgta tgccctccgt 840
gtgcaaggcg aaccggcaaaa aggcgaaatg cttgctggca cggccgtgta caacggcgaa 900
gtgctgcatt ttcatacggg aaacggccgt ccgtaccoga ctagaggcag gtttgccgca 960
aaagtcgatt tcggcagcaa atctgtggac ggcattatcg acagcggcga tgatttgcac 1020
atgggtacgc aaaaattcaa agccgccatc gatggaaacg gctttaaggg gacttggacg 1080
gaaaatggcg gcggggatgt ttccggaagg ttttacggcc cggccggcga ggaagtggcg 1140
ggaaaataca gctatcgccc gacagatgcg gaaaagggcg gattcggcgt gtttgccggc 1200
aaaaaagagc aggatggatc cggaggagga ggagccacaa acgacgacga tgttaaaaaa 1260
gctgccactg tggccattgc tgctgcctac aacaatggcc aagaaatcaa cggtttcaaa 1320
gctggagaga ccatctacga cattgatgaa gacggcacia ttaccaaaaa agacgcaact 1380
gcagccgatg ttgaagccga cgactttaaa ggtctgggtc tgaaaaaagt cgtgactaac 1440
ctgaccaaaa ccgtcaatga aaacaaacia aacgtcgatg ccaaagttaa agctgcagaa 1500
tctgaaatag aaaagttaac aaccaagtta gcagacactg atgccgcttt agcagatact 1560
gatgccgctc tggatgcaac caccaacgcc ttgaataaat tgggagaaaa tataacgaca 1620
tttgctgaag agactaagac aaatatcgta aaaattgatg aaaaattaga agccgtggct 1680
gataccgctc acaagcatgc cgaagcattc aacgatatcg ccgattcatt ggatgaaacc 1740
aacactaagg cagacgaagc cgtcaaaaacc gccaatgaag ccaaacagac ggccgaagaa 1800
accaaaciaa acgtcgatgc caaagtaaaa gctgcagaaa ctgcagcagg caaagccgaa 1860
gctgccgctg gcacagctaa tactgcagcc gacaagggcg aagctgtcgc tgcaaaagtt 1920
accgacatca aagctgatat cgctacgaac aaagataata ttgctaaaaa agcaaacagt 1980
gcccgctgtg acaccagaga agagtctgac agcaaatgtg tcagaattga tggcttgaac 2040
gctactaccg aaaaattgga cacacgcttg gcttctgctg aaaaatccat tgccgatcac 2100
gatactgcc tgaacggttt ggataaaaCa gtgtcagacc tgcgcaaaga aaccgcgcaa 2160
ggccttgag aacaagccgc gctctccggt ctgtccaac ctacaacgt gggtcggttc 2220
aatgtaacgg ctgcagtcgg cggctacaaa tccgaatcg cagtcgccat cggtagccgc 2280
ttccgcttta ccgaaaactt tgccgcaaaa gcaggcgtgg cagtcggcac ttcgtccggt 2340
tcttccgag cctaccatgt cggcgtcaat tacgagtggg aactcgag 2388

```

<210> 8
 <211> 793
 <212> PRT
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> deltaG287-961

<400> 8
 Met Ala Ser Pro Asp Val Lys Ser Ala Asp Thr Leu Ser Lys Pro Ala
 1 5 10 15
 Ala Pro Val Val Ala Glu Lys Glu Thr Glu Val Lys Glu Asp Ala Pro
 20 25 30
 Gln Ala Gly Ser Gln Gly Gln Gly Ala Pro Ser Thr Gln Gly Ser Gln
 35 40 45

Asp Met Ala Ala Val Ser Ala Glu Asn Thr Gly Asn Gly Gly Ala Ala
 50 55 60

Thr Thr Asp Lys Pro Lys Asn Glu Asp Glu Gly Pro Gln Asn Asp Met
 65 70 75 80

Pro Gln Asn Ser Ala Glu Ser Ala Asn Gln Thr Gly Asn Asn Gln Pro
 85 90 95

Ala Asp Ser Ser Asp Ser Ala Pro Ala Ser Asn Pro Ala Pro Ala Asn
 100 105 110

Gly Gly Ser Asn Phe Gly Arg Val Asp Leu Ala Asn Gly Val Leu Ile
 115 120 125

Asp Gly Pro Ser Gln Asn Ile Thr Leu Thr His Cys Lys Gly Asp Ser
 130 135 140

Cys Asn Gly Asp Asn Leu Leu Asp Glu Glu Ala Pro Ser Lys Ser Glu
 145 150 155 160

Phe Glu Asn Leu Asn Glu Ser Glu Arg Ile Glu Lys Tyr Lys Lys Asp
 165 170 175

Gly Lys Ser Asp Lys Phe Thr Asn Leu Val Ala Thr Ala Val Gln Ala
 180 185 190

Asn Gly Thr Asn Lys Tyr Val Ile Ile Tyr Lys Asp Lys Ser Ala Ser
 195 200 205

Ser Ser Ser Ala Arg Phe Arg Arg Ser Ala Arg Ser Arg Arg Ser Leu
 210 215 220

Pro Ala Glu Met Pro Leu Ile Pro Val Asn Gln Ala Asp Thr Leu Ile
 225 230 235 240

Val Asp Gly Glu Ala Val Ser Leu Thr Gly His Ser Gly Asn Ile Phe
 245 250 255

Ala Pro Glu Gly Asn Tyr Arg Tyr Leu Thr Tyr Gly Ala Glu Lys Leu
 260 265 270

Pro Gly Gly Ser Tyr Ala Leu Arg Val Gln Gly Glu Pro Ala Lys Gly
 275 280 285

Glu Met Leu Ala Gly Thr Ala Val Tyr Asn Gly Glu Val Leu His Phe
 290 295 300

His Thr Glu Asn Gly Arg Pro Tyr Pro Thr Arg Gly Arg Phe Ala Ala
 305 310 315 320

Lys Val Asp Phe Gly Ser Lys Ser Val Asp Gly Ile Ile Asp Ser Gly
 325 330 335

Asp Asp Leu His Met Gly Thr Gln Lys Phe Lys Ala Ala Ile Asp Gly
 340 345 350

Asn Gly Phe Lys Gly Thr Trp Thr Glu Asn Gly Gly Gly Asp Val Ser
 355 360 365

Gly Arg Phe Tyr Gly Pro Ala Gly Glu Glu Val Ala Gly Lys Tyr Ser
 370 375 380

Tyr Arg Pro Thr Asp Ala Glu Lys Gly Gly Phe Gly Val Phe Ala Gly
 385 390 395 400

Lys Lys Glu Gln Asp Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ala Thr Asn Asp Asp
 405 410 415

Asp Val Lys Lys Ala Ala Thr Val Ala Ile Ala Ala Ala Tyr Asn Asn
 420 425 430

Gly Gln Glu Ile Asn Gly Phe Lys Ala Gly Glu Thr Ile Tyr Asp Ile
 435 440 445

Asp Glu Asp Gly Thr Ile Thr Lys Lys Asp Ala Thr Ala Ala Asp Val
 450 455 460

Glu Ala Asp Asp Phe Lys Gly Leu Gly Leu Lys Lys Val Val Thr Asn
 465 470 475 480

Leu Thr Lys Thr Val Asn Glu Asn Lys Gln Asn Val Asp Ala Lys Val
 485 490 495

Lys Ala Ala Glu Ser Glu Ile Glu Lys Leu Thr Thr Lys Leu Ala Asp
 500 505 510

Thr Asp Ala Ala Leu Ala Asp Thr Asp Ala Ala Leu Asp Ala Thr Thr
 515 520 525

Asn Ala Leu Asn Lys Leu Gly Glu Asn Ile Thr Thr Phe Ala Glu Glu
 530 535 540

Thr Lys Thr Asn Ile Val Lys Ile Asp Glu Lys Leu Glu Ala Val Ala
 545 550 555 560

Asp Thr Val Asp Lys His Ala Glu Ala Phe Asn Asp Ile Ala Asp Ser
 565 570 575

Leu Asp Glu Thr Asn Thr Lys Ala Asp Glu Ala Val Lys Thr Ala Asn
 580 585 590

Glu Ala Lys Gln Thr Ala Glu Glu Thr Lys Gln Asn Val Asp Ala Lys
 595 600 605

Val Lys Ala Ala Glu Thr Ala Ala Gly Lys Ala Glu Ala Ala Ala Gly
 610 615 620

Thr Ala Asn Thr Ala Ala Asp Lys Ala Glu Ala Val Ala Ala Lys Val
 625 630 635 640

Thr Asp Ile Lys Ala Asp Ile Ala Thr Asn Lys Asp Asn Ile Ala Lys
 645 650 655

Lys Ala Asn Ser Ala Asp Val Tyr Thr Arg Glu Glu Ser Asp Ser Lys
 660 665 670

Phe Val Arg Ile Asp Gly Leu Asn Ala Thr Thr Glu Lys Leu Asp Thr
 675 680 685

Arg Leu Ala Ser Ala Glu Lys Ser Ile Ala Asp His Asp Thr Arg Leu
 690 695 700

Asn Gly Leu Asp Lys Thr Val Ser Asp Leu Arg Lys Glu Thr Arg Gln
 705 710 715 720

Gly Leu Ala Glu Gln Ala Ala Leu Ser Gly Leu Phe Gln Pro Tyr Asn
 725 730 735

Val Gly Arg Phe Asn Val Thr Ala Ala Val Gly Gly Tyr Lys Ser Glu
 740 745 750

Ser Ala Val Ala Ile Gly Thr Gly Phe Arg Phe Thr Glu Asn Phe Ala
 755 760 765

Ala Lys Ala Gly Val Ala Val Gly Thr Ser Ser Gly Ser Ser Ala Ala
 770 775 780

Tyr His Val Gly Val Asn Tyr Glu Trp
 785 790

<210> 9
 <211> 2700
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> deltaG287NZ-919

<400> 9
 atggctagcc ccgatgtcaa gtcggcggac acgctgtcaa aacctgccgc ccctgttgtt 60
 tctgaaaaag agacagaggc aaaggaagat ggcgccacagg caggttctca aggacagggc 120
 ggcgccatccg cacaaggcgg tcaagatatg ggcggcggttt cggagaaaaa tacaggcaat 180
 ggcgggtgctg cagcaacgga caaacccaaa aatgaagacg agggggcgca aatgatatg 240
 ccgcaaaatg ccgccgatac agatagtttg acaccgaatc acaccccggc ttcgaatatg 300
 ccggccggaa atatggaaaa ccaagcaccg gatgccgggg aatcggagca gccggcaaac 360
 caaccggata tggcaaacac ggcggacgga atgcagggtg acgatccgtc ggcaggcggg 420
 gaaaatgccg gcaatacggc tgcccaaggt acaaatcaag ccgaaaacaa tcaaacgcc 480
 ggttctcaaa atcctgcctc ttcaaccaat cctagcggca cgaatagcgg tggtgatttt 540
 ggaaggacga acgtgggcaa ttctgttgtg attgacgggc cgtcgcaaaa tataacgttg 600
 acccactgta aaggcgattc ttgtagtggc aataatttct tggatgaaga agtacagcta 660
 aatcagaat ttgaaaaatt aagtgatgca gacaaaataa gtaattacaa gaaagatggg 720
 aagaatgacg ggaagaatga taaatttgtc ggtttggttg ccgatagtgt gcagatgaag 780
 ggaatcaatc aatatattat cttttataaa cctaaacca cttcatttgc gcgatttagg 840
 cgttctgcac ggtcggaggc gtcgcttccg gccgagatgc cgtgattcc cgtaaatcag 900
 gcgatacgc tgattgtcga tggggaagcg gtcagcctga cggggcattc cggcaatc 960
 ttcgcgcccg aaggaatta ccggtatctg acttacgggg cggaaaaatt gcccgcgga 1020
 tcgtatgcc tccgtgttca aggcgaacct tcaaaaggcg aatgctcgc gggcacggca 1080
 gtgtacaacg gcgaagtgct gcattttcat acggaaaacg gccgtccgtc cccgtccaga 1140
 ggcaggtttg ccgcaaaagt cgatttcggc agcaaatctg tggacggcat tatcgacagc 1200

```

ggc gat ggtt tgc at at ggg tac gca aaaa ttcaa agccg ccatc gatgg aaacggcttt 1260
aaggggactt ggacggaaaa tggcggcggg gatgtttccg gaaagtttta cggcccggcc 1320
ggcgaggaag tggcgggaaa atacagctat cgcccaacag atgcggaaaa gggcggatcc 1380
ggcgtgtttg ccggcaaaaa agagcaggat ggatccggag gaggaggatg ccaaagcaag 1440
agcatccaaa cttttccgca acccgacaca tccgtcatca acggcccggg cggcccggtc 1500
ggcatccccg accccgcccg aacgacggtc ggcggcggcg gggccgtcta taccgttgta 1560
ccgcacctgt ccctgccccca ctgggcggcg caggatttcg ccaaaaagcct gcaatccttc 1620
cgcctcgggt gcgccaattt gaaaaaccgc caaggctggc aggatgtgtg cgcccaagcc 1680
tttcaaacc cctgcccattc ctttcaggca aaacagtttt ttgaacgcta ttccacgccg 1740
tggcagggtt caggcaaccg aagccttgcc ggtacggtta ccggctatta cgagccgggtg 1800
ctgaagggcg acgacaggcg gacggcacia gcccgcttcc cgatttacgg tattcccgcac 1860
gattttatct ccgtccccct gcctgccggt ttgcccggcg gaaaagccct tgtccgcac 1920
aggcagacgg gaaaaaacag cggcacaatc gacaataccg gcggcacaca taccgccgcac 1980
ctctcccgat tccccatcac cgcgcgcaca acggcaatca aaggcagggt tgaaggaagc 2040
cgcttccctc cctaccacac gcgcaaccia atcaacggcg gcgcgcttga cggcaaagcc 2100
ccgatactcg gttacgccga agaccccgtc gaactttttt ttatgcacat ccaaggctcg 2160
ggcgtcttga aaaccccgtc cggcaaatc atccgcacg gctatgccga caaaaacgaa 2220
caccctacg tttccatcgg acgctatatg gcggacaaaag gctacctcaa gctcgggcag 2280
acctcgatgc agggcatcaa agcctatatg cggcaaaatc cgcaacgcct cgccgaagtt 2340
ttgggtcaaa accccagcta tatctttttc cgcgagcttg ccggaagcag caatgacggt 2400
cccgtcggcg cactggggcac gccgttgatg ggggaatatg ccggcgcagt cgaccggcac 2460
tacattacct tgggcgcgcc cttatttgte gccaccgccc atccggttac ccgcaaagcc 2520
ctcaaccgcc tgattatggc gcaggatacc ggcagcgcga ttaaaggcgc ggtgcgcgtg 2580
gattattttt ggggatacgg cgacgaagcc ggcgaacttg ccggcaaaaa gaaaaccacg 2640
ggttacgtct ggcagctcct acccaacggt atgaagcccc aataaccgcc gtaaaagctt 2700

```

<210> 10
 <211> 897
 <212> PRT
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> deltaG287NZ-919

<400> 10
 Met Ala Ser Pro Asp Val Lys Ser Ala Asp Thr Leu Ser Lys Pro Ala
 1 5 10 15
 Ala Pro Val Val Ser Glu Lys Glu Thr Glu Ala Lys Glu Asp Ala Pro
 20 25 30
 Gln Ala Gly Ser Gln Gly Gln Gly Ala Pro Ser Ala Gln Gly Gly Gln
 35 40 45
 Asp Met Ala Ala Val Ser Glu Glu Asn Thr Gly Asn Gly Gly Ala Ala
 50 55 60
 Ala Thr Asp Lys Pro Lys Asn Glu Asp Glu Gly Ala Gln Asn Asp Met
 65 70 75 80
 Pro Gln Asn Ala Ala Asp Thr Asp Ser Leu Thr Pro Asn His Thr Pro
 85 90 95
 Ala Ser Asn Met Pro Ala Gly Asn Met Glu Asn Gln Ala Pro Asp Ala
 100 105 110
 Gly Glu Ser Glu Gln Pro Ala Asn Gln Pro Asp Met Ala Asn Thr Ala

420

425

430

Ser Gly Lys Phe Tyr Gly Pro Ala Gly Glu Glu Val Ala Gly Lys Tyr
 435 440 445

Ser Tyr Arg Pro Thr Asp Ala Glu Lys Gly Gly Phe Gly Val Phe Ala
 450 455 460

Gly Lys Lys Glu Gln Asp Gly Ser Gly Gly Gly Gly Cys Gln Ser Lys
 465 470 475 480

Ser Ile Gln Thr Phe Pro Gln Pro Asp Thr Ser Val Ile Asn Gly Pro
 485 490 495

Asp Arg Pro Val Gly Ile Pro Asp Pro Ala Gly Thr Thr Val Gly Gly
 500 505 510

Gly Gly Ala Val Tyr Thr Val Val Pro His Leu Ser Leu Pro His Trp
 515 520 525

Ala Ala Gln Asp Phe Ala Lys Ser Leu Gln Ser Phe Arg Leu Gly Cys
 530 535 540

Ala Asn Leu Lys Asn Arg Gln Gly Trp Gln Asp Val Cys Ala Gln Ala
 545 550 555 560

Phe Gln Thr Pro Val His Ser Phe Gln Ala Lys Gln Phe Phe Glu Arg
 565 570 575

Tyr Phe Thr Pro Trp Gln Val Ala Gly Asn Gly Ser Leu Ala Gly Thr
 580 585 590

Val Thr Gly Tyr Tyr Glu Pro Val Leu Lys Gly Asp Asp Arg Arg Thr
 595 600 605

Ala Gln Ala Arg Phe Pro Ile Tyr Gly Ile Pro Asp Asp Phe Ile Ser
 610 615 620

Val Pro Leu Pro Ala Gly Leu Arg Ser Gly Lys Ala Leu Val Arg Ile
 625 630 635 640

Arg Gln Thr Gly Lys Asn Ser Gly Thr Ile Asp Asn Thr Gly Gly Thr
 645 650 655

His Thr Ala Asp Leu Ser Arg Phe Pro Ile Thr Ala Arg Thr Thr Ala
 660 665 670

Ile Lys Gly Arg Phe Glu Gly Ser Arg Phe Leu Pro Tyr His Thr Arg
 675 680 685

Asn Gln Ile Asn Gly Gly Ala Leu Asp Gly Lys Ala Pro Ile Leu Gly
 690 695 700

Tyr Ala Glu Asp Pro Val Glu Leu Phe Phe Met His Ile Gln Gly Ser
 705 710 715 720

Gly Arg Leu Lys Thr Pro Ser Gly Lys Tyr Ile Arg Ile Gly Tyr Ala

725 730 735

Asp Lys Asn Glu His Pro Tyr Val Ser Ile Gly Arg Tyr Met Ala Asp
740 745 750

Lys Gly Tyr Leu Lys Leu Gly Gln Thr Ser Met Gln Gly Ile Lys Ala
755 760 765

Tyr Met Arg Gln Asn Pro Gln Arg Leu Ala Glu Val Leu Gly Gln Asn
770 775 780

Pro Ser Tyr Ile Phe Phe Arg Glu Leu Ala Gly Ser Ser Asn Asp Gly
785 790 795 800

Pro Val Gly Ala Leu Gly Thr Pro Leu Met Gly Glu Tyr Ala Gly Ala
805 810 815

Val Asp Arg His Tyr Ile Thr Leu Gly Ala Pro Leu Phe Val Ala Thr
820 825 830

Ala His Pro Val Thr Arg Lys Ala Leu Asn Arg Leu Ile Met Ala Gln
835 840 845

Asp Thr Gly Ser Ala Ile Lys Gly Ala Val Arg Val Asp Tyr Phe Trp
850 855 860

Gly Tyr Gly Asp Glu Ala Gly Glu Leu Ala Gly Lys Gln Lys Thr Thr
865 870 875 880

Gly Tyr Val Trp Gln Leu Leu Pro Asn Gly Met Lys Pro Glu Tyr Arg
885 890 895

Pro

<210> 11
 <211> 1941
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> deltaG287NZ-953

<400> 11

atggctagcc	ccgatgtcaa	gtcggcggac	acgctgtcaa	aacctgccgc	ccctgttgtt	60
tctgaaaaag	agacagaggc	aaaggaagat	gcgccacagg	caggttctca	aggacagggc	120
gcgccatccg	cacaaggcgg	tcaagatatg	gcggcggttt	cggaagaaaa	tacaggcaat	180
ggcggtgccg	cagcaacgga	caaaccctaaa	aatgaagacg	agggggcgca	aaatgatatg	240
ccgcaaaatg	ccgccgatac	agatagtttg	acaccgaatc	acaccgccgc	ttcgaatatg	300
ccggccggaa	atatggaaaa	ccaagcaccg	gatgccgggg	aatcggagca	gccggcgaac	360
caaccggata	tggcaaatat	ggcggacgga	atgcagggtg	acgatccgtc	ggcaggcggg	420
gaaaatgccg	gcaatacggc	tgcccaaggt	acaaatcaag	ccgaaaacaa	tcaaaccgcc	480
ggttctcaaa	atcctgcctc	ttcaaccaat	cctagcgcca	cgaatagcgg	tggtgatttt	540
ggaaggacga	acgtgggcaa	ttctgtttgt	attgacgggc	cgtcgcaaaa	tataacgttg	600
accactgta	aaggcgattc	ttgtagtggc	aataatttct	tgatgaaga	agtacagcta	660
aatcagaat	ttgaaaaatt	aagtgatgca	gacaaaataa	gtaattacaa	gaaagatggg	720
aagaatgacg	ggaagaatga	taaatttgtc	ggtttggttg	ccgatagtgt	gcagatgaag	780

```

ggaatcaatc aatatattat cttttataaa cctaaaccca cttcatttgc gcgatttagg 840
cgttctgcac ggtcggaggc gtcgcttccg gccgagatgc cgctgattcc cgtcaatcag 900
gcggtacacg tgattgtcga tggggaagcg gtcagcctga cggggcattc cggcaatc 960
ttcgcgcccc aaggggaatta ccggtatctg acttacgggg cggaaaaatt gcccgggcga 1020
tcgtatgccc tccgtgttca aggcgaacct tcaaaaggcg aaatgctcgc gggcacggca 1080
gtgtacaacg gcgaagtgtc gcattttcat acggaaaacg gccgtccgtc cccgtccaga 1140
ggcaggtttg ccgcaaaagt cgattttcggc agcaaatctg tggacggcat tatcgacagc 1200
ggcgatgggt tgcataatggg tacgcaaaaa ttcaaagccg ccatcgatgg aaacggcttt 1260
aaggggactt ggacggaaaa tggcggcggg gatgtttccg gaaagtttta cggcccggcc 1320
ggcgaggaag tggcgggaaa atacagctat cgcccaacag atgcggaaaa gggcggattc 1380
ggcgtgtttg ccggcaaaaa agagcaggat ggatccggag gaggaggagc cacctacaaa 1440
gtggacgaat atcacgcaa cgcccgttcc gccatcgacc atttcaacac cagcaccaac 1500
gtcggcgggt tttacgggtc gaccggttcc gtcgagttcg accaagcaaa acgcgacggg 1560
aaaatcgaca tcaccatccc cgttgccaac ctgcaaagcg gttcgcaaca ctttaccgac 1620
cacctgaaat cagccgacat cttcgatgcc gcccaatc cggacatccg ctttgtttcc 1680
accaaattca acttcaacgg caaaaaactg gtttccgttg acggcaacct gaccatgcac 1740
ggcaaaaccg cccccgtcaa actcaaagcc gaaaaattca actgctacca aagcccgatg 1800
gcaaaaaccg aagtttgagg cggcgacttc agcaccacca tcgaccgcac caaatggggc 1860
gtggactacc tcgttaacgt tggatgacc aaaagcgtcc gcatcgacat ccaaatcgag 1920
gcagccaaac aataaaagct t 1941

```

<210> 12
 <211> 644
 <212> PRT
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> deltaG287NZ-953

<400> 12
 Met Ala Ser Pro Asp Val Lys Ser Ala Asp Thr Leu Ser Lys Pro Ala
 1 5 10 15
 Ala Pro Val Val Ser Glu Lys Glu Thr Glu Ala Lys Glu Asp Ala Pro
 20 25 30
 Gln Ala Gly Ser Gln Gly Gln Gly Ala Pro Ser Ala Gln Gly Gly Gln
 35 40 45
 Asp Met Ala Ala Val Ser Glu Glu Asn Thr Gly Asn Gly Gly Ala Ala
 50 55 60
 Ala Thr Asp Lys Pro Lys Asn Glu Asp Glu Gly Ala Gln Asn Asp Met
 65 70 75 80
 Pro Gln Asn Ala Ala Asp Thr Asp Ser Leu Thr Pro Asn His Thr Pro
 85 90 95
 Ala Ser Asn Met Pro Ala Gly Asn Met Glu Asn Gln Ala Pro Asp Ala
 100 105 110
 Gly Glu Ser Glu Gln Pro Ala Asn Gln Pro Asp Met Ala Asn Thr Ala
 115 120 125
 Asp Gly Met Gln Gly Asp Asp Pro Ser Ala Gly Gly Glu Asn Ala Gly
 130 135 140

Asn Thr Ala Ala Gln Gly Thr Asn Gln Ala Glu Asn Asn Gln Thr Ala
 145 150 155 160

Gly Ser Gln Asn Pro Ala Ser Ser Thr Asn Pro Ser Ala Thr Asn Ser
 165 170 175

Gly Gly Asp Phe Gly Arg Thr Asn Val Gly Asn Ser Val Val Ile Asp
 180 185 190

Gly Pro Ser Gln Asn Ile Thr Leu Thr His Cys Lys Gly Asp Ser Cys
 195 200 205

Ser Gly Asn Asn Phe Leu Asp Glu Glu Val Gln Leu Lys Ser Glu Phe
 210 215 220

Glu Lys Leu Ser Asp Ala Asp Lys Ile Ser Asn Tyr Lys Lys Asp Gly
 225 230 235 240

Lys Asn Asp Gly Lys Asn Asp Lys Phe Val Gly Leu Val Ala Asp Ser
 245 250 255

Val Gln Met Lys Gly Ile Asn Gln Tyr Ile Ile Phe Tyr Lys Pro Lys
 260 265 270

Pro Thr Ser Phe Ala Arg Phe Arg Arg Ser Ala Arg Ser Arg Arg Ser
 275 280 285

Leu Pro Ala Glu Met Pro Leu Ile Pro Val Asn Gln Ala Asp Thr Leu
 290 295 300

Ile Val Asp Gly Glu Ala Val Ser Leu Thr Gly His Ser Gly Asn Ile
 305 310 315 320

Phe Ala Pro Glu Gly Asn Tyr Arg Tyr Leu Thr Tyr Gly Ala Glu Lys
 325 330 335

Leu Pro Gly Gly Ser Tyr Ala Leu Arg Val Gln Gly Glu Pro Ser Lys
 340 345 350

Gly Glu Met Leu Ala Gly Thr Ala Val Tyr Asn Gly Glu Val Leu His
 355 360 365

Phe His Thr Glu Asn Gly Arg Pro Ser Pro Ser Arg Gly Arg Phe Ala
 370 375 380

Ala Lys Val Asp Phe Gly Ser Lys Ser Val Asp Gly Ile Ile Asp Ser
 385 390 395 400

Gly Asp Gly Leu His Met Gly Thr Gln Lys Phe Lys Ala Ala Ile Asp
 405 410 415

Gly Asn Gly Phe Lys Gly Thr Trp Thr Glu Asn Gly Gly Gly Asp Val
 420 425 430

Ser Gly Lys Phe Tyr Gly Pro Ala Gly Glu Glu Val Ala Gly Lys Tyr
 435 440 445

Ser Tyr Arg Pro Thr Asp Ala Glu Lys Gly Gly Phe Gly Val Phe Ala
 450 455 460

Gly Lys Lys Glu Gln Asp Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ala Thr Tyr Lys
 465 470 475 480

Val Asp Glu Tyr His Ala Asn Ala Arg Phe Ala Ile Asp His Phe Asn
 485 490 495

Thr Ser Thr Asn Val Gly Gly Phe Tyr Gly Leu Thr Gly Ser Val Glu
 500 505 510

Phe Asp Gln Ala Lys Arg Asp Gly Lys Ile Asp Ile Thr Ile Pro Val
 515 520 525

Ala Asn Leu Gln Ser Gly Ser Gln His Phe Thr Asp His Leu Lys Ser
 530 535 540

Ala Asp Ile Phe Asp Ala Ala Gln Tyr Pro Asp Ile Arg Phe Val Ser
 545 550 555 560

Thr Lys Phe Asn Phe Asn Gly Lys Lys Leu Val Ser Val Asp Gly Asn
 565 570 575

Leu Thr Met His Gly Lys Thr Ala Pro Val Lys Leu Lys Ala Glu Lys
 580 585 590

Phe Asn Cys Tyr Gln Ser Pro Met Ala Lys Thr Glu Val Cys Gly Gly
 595 600 605

Asp Phe Ser Thr Thr Ile Asp Arg Thr Lys Trp Gly Val Asp Tyr Leu
 610 615 620

Val Asn Val Gly Met Thr Lys Ser Val Arg Ile Asp Ile Gln Ile Glu
 625 630 635 640

Ala Ala Lys Gln

<210> 13
 <211> 2583
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> deltaG287NZ-961

<400> 13
 atggctagcc cccgatgtcaa gtcggcggac acgctgtcaa aacctgccgc cctgttggt 60
 tctgaaaaag agacagaggc aaaggaagat gcgccacagg caggttctca aggacagggc 120
 gcgccatccg cacaaggcgg tcaagatatg gcggcggttt cccaagaaaa tacaggcaat 180
 ggcggtgcgg cagcaacgga caaacccaaa aatgaagacg agggggcgca aatgatgatg 240
 ccgcaaaatg ccgccgatac agatagtttg acaccgaatc acaccgggc ttcgaatatg 300
 ccggccggaa atatggaaaa ccaagcaccg gatgccgggg aatcggagca gccggcaaac 360
 caaccggata tggcaaatac ggccggacgga atgcagggtg acgatccgtc gccagggcgg 420
 gaaaatgccg gcaatacggc tgcccaaggt acaaatcaag ccgaaaacaa tcaaaccgcc 480
 ggttctcaaa atcctgcctc ttcaaccaat cctagcgcca cgaatagcgg tgggtgatttt 540

```

ggaaggacga acgtgggcaa ttctgttgtg attgacgggc cgtcgcaaaa tataacgttg 600
accactgta aaggcgattc ttgtagtggc aataatttct tggatgaaga agtacagcta 660
aaatcagaat ttgaaaaatt aagtgatgca gacaaaataa gtaattacaa gaaagatggg 720
aagaatgacg ggaagaatga taaatttgtc ggtttggttg ccgatagtgt gcagatgaag 780
ggaatcaatc aatatattat cttttataaa cctaaacca cttcatttgc gcgatttagg 840
cgttctgcac ggtcgaggcg gtcgcttccg gccgagatgc cgtcgattcc cgtcaateag 900
goggatagc t gattgtcga tggggaagcg gtcagcctga cggggcattc cggcaatate 960
ttcgcgcccg aagggaatta cgggtatctg acttacgggg cggaaaaatt gcccgggcga 1020
tcgtatgccc tccgtgttca aggcgaacct tcaaaaggcg aaatgctcgc gggcacggca 1080
gtgtacaacg gcgaagtgtc gcattttcat acggaaaacg gccgtccgtc cccgtccaga 1140
ggcaggtttg ccgcaaaagt cgatttcggc agcaaatctg tggacggcat tatecagacg 1200
ggcgatggtt tgcataatggg tacgcaaaaa ttcaaagccg ccatcgatgg aaacggcttt 1260
aaggggactt ggacggaaaa tggcggcggg gatgtttccg gaaagtttta cggccccggc 1320
ggcgagggaag tggcgggaaa atacagctat cgcccaacag atgcggaaaa gggcggattc 1380
ggcgtgtttg ccggcaaaaa agagcaggat ggatccggag gaggaggagc cacaaacgac 1440
gacgatgtta aaaaagctgc cactgtggcc attgctgctg cctacaacaa tggccaagaa 1500
atcaacggtt tcaaagctgg agagaccatc tacgacattg atgaagacgg cacaattacc 1560
aaaaaagacg caactgcagc cgatgttgaa gccgacgact ttaaaggctc gggctctgaaa 1620
aaagtctgta ctaacctgac caaaaccgtc aatgaaaaca acaaaaacgt cgatgccaaa 1680
gtaaaagctg cagaatctga aatagaaaag ttaacaacca agttagcaga cactgatgcc 1740
gcttttagcag atactgatgc cgctctggat gcaaccacca acgccttgaa taaattggga 1800
gaaaaataaa cgacatttgc tgaagagact aagacaaata tcgtaaaaaat tgatgaaaaa 1860
ttagaagccg tggctgatac cgtcgacaag catgccgaag cattcaacga tatecggat 1920
tcattggatg aaaccaacac taaggcagac gaagccgtca aaaccgcaa tgaagccaaa 1980
cagacggccg aagaaaacca acaaaacgtc gatgccaaag taaaagctgc agaaactgca 2040
gcaggcaaaag ccgaagctgc cgctggcaca gctaatactg cagccgacaa ggcggaagct 2100
gtcgtgcaa aagttaccga catcaaagct gatategcta cgaacaaaga taatattgct 2160
aaaaaagcaa acagtgcga cgtgtacacc agagaagagt ctgacagcaa atttgtcaga 2220
attgatggtc tgaacgctac taccgaaaaa ttggacacac gcttggcttc tgctgaaaaa 2280
tccattgccc atcacgatac tcgctgaac ggtttggata aaacagtgtc agacctgccc 2340
aaagaaaccc gccaaaggcct tgcagaacaa gccgcgctct cccgtctgtt ccaaccttac 2400
aacgtgggtc ggttcaatgt aacggctgca gtcggcggct acaaatccga atcggcagtc 2460
gccatcggtg ccggcttccg ctttaccgaa aactttgccg ccaaagcagg cgtggcagtc 2520
ggcaacttct cccgtttctc cgcagcctac catgtcggcg tcaattacga gtggtaaaaag 2580
ctt 2583

```

<210> 14

<211> 858

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> deltaG287NZ-961

<400> 14

Met Ala Ser Pro Asp Val Lys Ser Ala Asp Thr Leu Ser Lys Pro Ala
1 5 10 15

Ala Pro Val Val Ser Glu Lys Glu Thr Glu Ala Lys Glu Asp Ala Pro
20 25 30

Gln Ala Gly Ser Gln Gly Gln Gly Ala Pro Ser Ala Gln Gly Gly Gln
35 40 45

Asp Met Ala Ala Val Ser Glu Glu Asn Thr Gly Asn Gly Gly Ala Ala
50 55 60

Ala Thr Asp Lys Pro Lys Asn Glu Asp Glu Gly Ala Gln Asn Asp Met
65 70 75 80

Pro Gln Asn Ala Ala Asp Thr Asp Ser Leu Thr Pro Asn His Thr Pro
85 90 95

Ala Ser Asn Met Pro Ala Gly Asn Met Glu Asn Gln Ala Pro Asp Ala
100 105 110

Gly Glu Ser Glu Gln Pro Ala Asn Gln Pro Asp Met Ala Asn Thr Ala
115 120 125

Asp Gly Met Gln Gly Asp Asp Pro Ser Ala Gly Gly Glu Asn Ala Gly
130 135 140

Asn Thr Ala Ala Gln Gly Thr Asn Gln Ala Glu Asn Asn Gln Thr Ala
145 150 155 160

Gly Ser Gln Asn Pro Ala Ser Ser Thr Asn Pro Ser Ala Thr Asn Ser
165 170 175

Gly Gly Asp Phe Gly Arg Thr Asn Val Gly Asn Ser Val Val Ile Asp
180 185 190

Gly Pro Ser Gln Asn Ile Thr Leu Thr His Cys Lys Gly Asp Ser Cys
195 200 205

Ser Gly Asn Asn Phe Leu Asp Glu Glu Val Gln Leu Lys Ser Glu Phe
210 215 220

Glu Lys Leu Ser Asp Ala Asp Lys Ile Ser Asn Tyr Lys Lys Asp Gly
225 230 235 240

Lys Asn Asp Gly Lys Asn Asp Lys Phe Val Gly Leu Val Ala Asp Ser
245 250 255

Val Gln Met Lys Gly Ile Asn Gln Tyr Ile Ile Phe Tyr Lys Pro Lys
260 265 270

Pro Thr Ser Phe Ala Arg Phe Arg Arg Ser Ala Arg Ser Arg Arg Ser
275 280 285

Leu Pro Ala Glu Met Pro Leu Ile Pro Val Asn Gln Ala Asp Thr Leu
290 295 300

Ile Val Asp Gly Glu Ala Val Ser Leu Thr Gly His Ser Gly Asn Ile
305 310 315 320

Phe Ala Pro Glu Gly Asn Tyr Arg Tyr Leu Thr Tyr Gly Ala Glu Lys
325 330 335

Leu Pro Gly Gly Ser Tyr Ala Leu Arg Val Gln Gly Glu Pro Ser Lys
340 345 350

Gly Glu Met Leu Ala Gly Thr Ala Val Tyr Asn Gly Glu Val Leu His
355 360 365

Phe His Thr Glu Asn Gly Arg Pro Ser Pro Ser Arg Gly Arg Phe Ala
 370 375 380

Ala Lys Val Asp Phe Gly Ser Lys Ser Val Asp Gly Ile Ile Asp Ser
 385 390 395 400

Gly Asp Gly Leu His Met Gly Thr Gln Lys Phe Lys Ala Ala Ile Asp
 405 410 415

Gly Asn Gly Phe Lys Gly Thr Trp Thr Glu Asn Gly Gly Gly Asp Val
 420 425 430

Ser Gly Lys Phe Tyr Gly Pro Ala Gly Glu Glu Val Ala Gly Lys Tyr
 435 440 445

Ser Tyr Arg Pro Thr Asp Ala Glu Lys Gly Gly Phe Gly Val Phe Ala
 450 455 460

Gly Lys Lys Glu Gln Asp Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ala Thr Asn Asp
 465 470 475 480

Asp Asp Val Lys Lys Ala Ala Thr Val Ala Ile Ala Ala Ala Tyr Asn
 485 490 495

Asn Gly Gln Glu Ile Asn Gly Phe Lys Ala Gly Glu Thr Ile Tyr Asp
 500 505 510

Ile Asp Glu Asp Gly Thr Ile Thr Lys Lys Asp Ala Thr Ala Ala Asp
 515 520 525

Val Glu Ala Asp Asp Phe Lys Gly Leu Gly Leu Lys Lys Val Val Thr
 530 535 540

Asn Leu Thr Lys Thr Val Asn Glu Asn Lys Gln Asn Val Asp Ala Lys
 545 550 555 560

Val Lys Ala Ala Glu Ser Glu Ile Glu Lys Leu Thr Thr Lys Leu Ala
 565 570 575

Asp Thr Asp Ala Ala Leu Ala Asp Thr Asp Ala Ala Leu Asp Ala Thr
 580 585 590

Thr Asn Ala Leu Asn Lys Leu Gly Glu Asn Ile Thr Thr Phe Ala Glu
 595 600 605

Glu Thr Lys Thr Asn Ile Val Lys Ile Asp Glu Lys Leu Glu Ala Val
 610 615 620

Ala Asp Thr Val Asp Lys His Ala Glu Ala Phe Asn Asp Ile Ala Asp
 625 630 635 640

Ser Leu Asp Glu Thr Asn Thr Lys Ala Asp Glu Ala Val Lys Thr Ala
 645 650 655

Asn Glu Ala Lys Gln Thr Ala Glu Glu Thr Lys Gln Asn Val Asp Ala
 660 665 670

Lys Val Lys Ala Ala Glu Thr Ala Ala Gly Lys Ala Glu Ala Ala Ala
 675 680 685
 Gly Thr Ala Asn Thr Ala Ala Asp Lys Ala Glu Ala Val Ala Ala Lys
 690 695 700
 Val Thr Asp Ile Lys Ala Asp Ile Ala Thr Asn Lys Asp Asn Ile Ala
 705 710 715 720
 Lys Lys Ala Asn Ser Ala Asp Val Tyr Thr Arg Glu Glu Ser Asp Ser
 725 730 735
 Lys Phe Val Arg Ile Asp Gly Leu Asn Ala Thr Thr Glu Lys Leu Asp
 740 745 750
 Thr Arg Leu Ala Ser Ala Glu Lys Ser Ile Ala Asp His Asp Thr Arg
 755 760 765
 Leu Asn Gly Leu Asp Lys Thr Val Ser Asp Leu Arg Lys Glu Thr Arg
 770 775 780
 Gln Gly Leu Ala Glu Gln Ala Ala Leu Ser Gly Leu Phe Gln Pro Tyr
 785 790 795 800
 Asn Val Gly Arg Phe Asn Val Thr Ala Ala Val Gly Gly Tyr Lys Ser
 805 810 815
 Glu Ser Ala Val Ala Ile Gly Thr Gly Phe Arg Phe Thr Glu Asn Phe
 820 825 830
 Ala Ala Lys Ala Gly Val Ala Val Gly Thr Ser Ser Gly Ser Ser Ala
 835 840 845
 Ala Tyr His Val Gly Val Asn Tyr Glu Trp
 850 855

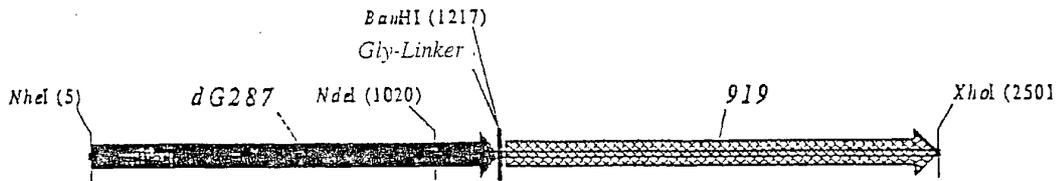
Patentansprüche

1. Hybrid-Protein der Formel $\text{NH}_2\text{-A-B-COOH}$, wobei A das Protein ΔG287 aus *Neisseria* umfasst und B das Protein 953 aus *Neisseria* umfasst, und wobei die Aminosäuresequenz des Hybrid-Proteins wie in SEQ ID NO: 6 dargestellt ist oder eine Sequenz ist, die dazu eine Sequenzidentität von mehr 70% aufweist.
2. Protein nach Anspruch 1, wobei ΔG287 aus dem *N.meningitidis*-Stamm 2996 oder dem *N.meningitidis*-Stamm 394/98 ist.
3. Protein nach Anspruch 1, wobei 953 aus dem *N.meningitidis*-Stamm 2996 oder dem *N.meningitidis*-Stamm 394/98 ist.
4. Protein nach Anspruch 1, wobei A und B aus dem gleichen Stamm von *N.meningitidis* sind.
5. Protein nach Anspruch 1, umfassend die in SEQ ID NO: 6 genannte Aminosäuresequenz.

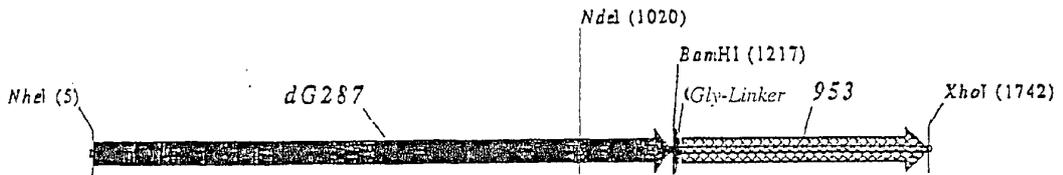
Es folgt ein Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

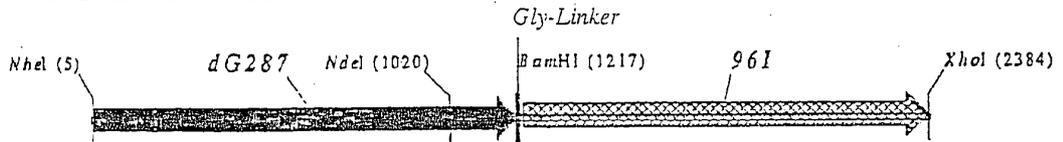
FIGUR 1 — ΔG287—919



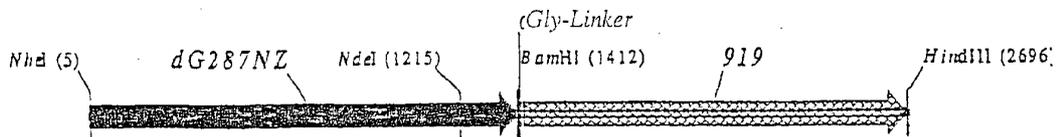
FIGUR 2 — ΔG287—953



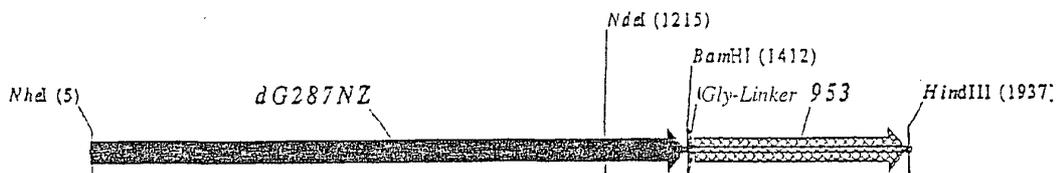
FIGUR 3 — ΔG287—961



FIGUR 4 — ΔG287NZ—919



FIGUR 5 — ΔG287NZ—953



FIGUR 6 — ΔG287NZ—961

