(12) **PATENT**

(19) NO (11) **321651** (13) **B1**

NORGE

(51) Int Cl.
C07K 9/00 (2006.01)
C08B 37/00 (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01)
C12P 19/04 (2006.01)
A61K 39/095 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	19951181	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	1993.07.30 PCT/NL93/00163
(22)	Inng.dag	1995.03.28	(85)	Videreføringsdag	1995.03.28
(24)	Løpedag	1993.07.30	(30)	Prioritet	1992.10.02, NL, 9201716
(41)	Alm.tilgj	1995.06.01			
(45)	Meddelt	2006.06.19			

(73) Innehaver De Staat der Nederlanden - Vertegenwoordigd door de Minister van Welzijn Volksgezondheid en Cultuur, Postbus 5406, NL-2280 HK Rijswijk, NL

(72) Oppfinner Jan Theunis Poolman, Broek in Waterland, NL
Peter André van der Ley, Utrecht, NL
Peter Hoogerhout, Bilthoven, NL

(74) Fullmektig Acapo AS , Postboks 1880 Nordnes, 5817 BERGEN, NO

(54) Benevnelse **Immunogent meningokokk-lipopoly-sakkarid, ytter-membranvesikler, samt vaksine fremstilt derav.**

(56) Anførte publikasjoner

A. F. M. Verheul et al., Infection and Immunity, vol. 59, 1991, s. 3566-3573
A. F. M. Verheul et al., Infection and Immunity, vol. 59, 1991, s. 843-851
E. J. Wiertz et al., The Journal of Immunology, vol. 147, 1991, s. 2012-2018
NL 9101359,WO 9006696

(57) Sammendrag

Oppfinnelsen vedrører et immunitetsbevirkende, B-celleaktiverende molekyl avledet fra et meningokokklipopolysakkarid (LPS) som har minst én epitop. Molekylet omfatter i det minste den felles del mellom oligosakkariddelen (kjerneregion) av lipopolysakkarider som er spesifikke for minst to meningokokk-immunitetstyper, fortrinnsvis immunitetstypene L2 og L3 og hvor galaktose er fraværende i den B-celleaktiverende del, samt derivater av molekylet med immunitetsreaksjonsbevirkende kapasitet. oppfinnelsen vedrører også en yttermembranvesikkel utstyrt med en gruppe polypeptider som har i det minste immunitetsaktiviteten til yttermembranproteiner (OMPer) som er bundet til en membran, et polypeptid fra gruppen av yttermembranvesiklene i form av et membranforankret yttermembranprotein eller et yttermembranproteinfragment med en mutasjon i én av overflateloopene, fortrinnsvis i en 2-, 3-, 5-, 6-, 7-, eller 8-loop av yttermembranproteiner av klasse I. Dessuten vedrører oppfinnelsen en vaksine som omfatter en yttermembranvesikkel og/eller et lipopolysakkarid, samt fremgangsmåter til fremstilling av et lipopolysakkarid og en yttermembranvesikkel som er omtalt ovenfor.

Den foreliggende oppfinnelsen vedrører et immunitetsbevirkende, B-celleaktiverende molekyl avledet fra et meningokokklipopolysakkarid (LPS) med minst én epitop, og en fremgangsmåte for fremstilling derav. Videre vedrører oppfinnelsen et sakkarid-peptidkonjugat (SPC) som omfatter i det minste et av nevnte molekyl som sakkaridel, og en yttermembranvesikkel som omfatter nevnte molekyl og/eller sakkarid-peptidkonjugat, samt en fremgangsmåte til fremstilling derav. Den foreliggende oppfinnelsen vedrører også en mutert meningokokkstamme som bærer en mutasjon i D eller E regionen til menigokokkale cps locus slik som i CBS 401.93, og en vaksine som inneholder nevnte molekyl, sakkarid-peptidkonjugat og/eller yttermembranvesikkel.

Således omfatter oppfinnelsen et immunitetsbevirkende B-celleaktiverende molekyl, som er avledet fra et meningokokk-lipopolysakkarid (LPS), som omfatter minst én epitop og som omfatter den felles del av oligosakkaridelen (kjerneregion) av lipopolysakkarider som er spesifikke for minst to meningokokk-immunitetstyper. Oppfinnelsen omfatter også fremgangsmåter til fremstilling derav, både syntetisk og via rekombinant DNA-teknikk. Dessuten omfatter oppfinnelsen en yttermembran-vesikkel utstyrt med en gruppe polypeptider som har i det minste immunitetsaktiviteten til yttermembran-proteiner (OMPer) som er bundet til en membran. Oppfinnelsen omfatter dess-

uten en vaksine som omfatter et slikt molekyl og/eller en slik yttermembran-vesikkel. Endelig omfatter oppfinnelsen en fremgangsmåte til fremstilling av en slik yttermembran-vesikkel.

Det er kjent at vaksiner av rensede, kapselformete polysakkarider (CPS) kan bevirke beskyttende immunitet. Denne immunitet avhenger av alderen til den vaksinerte person, og har bare kort varighet. De iboende ulemper med kapselformete polysakkarider som vaksiner omgås på den klassiske måte ved å kople kapselformete polysakkarider eller oligosakkarider avledet derav med proteiner (W.F. Goebel og Avery 1929 J. Exp. Med., Vol 50, p 533-550 og J.M. Cruse og R.E. Lewis, Contrib. Microbiol. Immunol. Basel, Krager, Vol 10:1, 1989, p 196). Bindingen av polysakkarider til proteiner resulterer i forandring av karakteren og type antigen fra tymus uavhengig av tymusavhengighet. Slike poly- eller oligosakkarid-proteinkonjugater er generelt meget immunogene i unge barn og kan bevirke hukommelse. Et antall eksempler på kjente sakkarid-peptidkonjugater er følgende: Konjugater av kapselformete polysakkarider (CPS) av H. influenza b med tetanustoksoid (TT) er kjent fra hollandsk patentsøknad 8602325.

Konjugater av kapselformete polysakkarider av meningokokk gruppe A og tetanustoksoid er blitt fremstilt. Disse konjugater har vist seg å være meget immunogene i mus og kaniner (E.C. Beuvery, A. Kaaden, V. Kanhai og A.B. Leussink, Physicochemical and immunological characterization of meningococcal group A og C polysaccharide-tetanus toxoid conjugates prepared by two methods, Vaccine, Vol 1, 1983, p 31-36, (E.C. Beuvery, F. Miedema, R. van Delft og K. Haverkamp, Preparation and immunochemical characterization of meningococcal group C polysaccharid tetanus toxoid conjugates as a new generation of vaccines, Infect. Immun., Vol 40, 1983, p 39-45) og (H.J. Jennings og H.C. Lugowski, Immunochemistry of groups A, B og C meningococcal polysaccharid-tetanus toxoid conju-

gates, J. Immunol., Vol 127, 1981, p 1011-1018).

Meningokokker av gruppe B, en bakteriegruppe som forårsaker mer enn 50% av tilfellene av meningokokksykdom i mange land, er en gruppe bakterier hvis kapselformete polysakkarider ikke bevirker immunreaksjon eller bevirker lite immunreaksjon (Poolman et al., The Lancet, september 1986, p 555-558).

Det er derfor blitt utført forskning blant meningokokker av gruppe B på sakkarid-peptidkonjugater som ville kunne være anvendelige i en vaksine idet kapselformete polysakkarider av denne gruppe gir ikke noen immunitetsreaksjon mot gramnegative bakterier i forsøksdyr og frivillige mennesker. Derfor ble det fremstilt sakkarid-peptidkonjugater med modifisert, kapselformet polysakkarid og bærerproteiner (H.J. Jennings, R. Roy og A. Gamian, Induction of meningococcal group B polysaccharide-specific IgG antibodies in mice using an N-proprionylated B polysaccharide tetanus toxoid conjugate vaccine, J. Immunol., Vol 137, 1986, p 1708-1713) og (H.J. Jennings, The capsular polysaccharide of group B Neisseria meningitidis as a vehicle for vaccine development, i I.M. Cruse og R.E. Lewis, Conjugate Vaccines, Contrib. Microbiol. Immunol. Basel, Krager, Vol 10, 1989, p 151-165).

Idet det er mistanke om at antigruppe B antistoffer (særlig IgG) oppviser in vivo kryssreaksjon med vertsantigener, og idet anvendelsen av et sakkarid-peptid-konjugat som inneholder modifisert, kapselformet polysakkarid av gruppe B meningokokker vil det derfor kunne ha ført til at det blir forårsaket autoimmun sykdom, er det meste av forskningen rettet mot en vaksine mot meningokokker av gruppe B rettet mot eventuell anvendelse av subkapselformete komponenter, såsom yttermembran-proteiner (OMP) og lipopolysakkarider (LPS).

Således beskriver Jennings et al. konjugater av tetanustoksoid (TT) med defosforylerte oligosakkarider (OS*) avledet fra meningokokk-LPS. Immuniteten til disse OPS*-TT-konjugater ble undersøkt i kaniner (Infect.

Immun., Vol 43, p 407-412). Fosforetanolamin ble fjernet fra meningokokk-oligosakkaridene (OS) ved behandling med hydrogenfluorid. De defosforylerte oligosakkarider ble deretter koplet til tetanustoksoid. Det derved oppnådde immunitetstype L_3 OS-proteinkonjugat var bare svakt immunogenisk i kaniner, noe som sannsynligvis kan forklares med resultatet av fjerning av PEA gruppe s.

I Infection and Immunity, mars 1991, p 843-851 beskriver Verheul et al fremstilling av meningokokk OS-proteinkonjugater med tetanustoksoid, hvor fosfoetanolamingrupper fra oligosakkarider er bibeholdt.

Oligosakkarid-peptidkonjugater hvor sakkariddelen og peptiddelen har sin opprinnelse i forskjellige organismer (for det meste et tetanus- eller difteripeptid) har den ulempe at det kan opptre overømfintlighet eller toleranse for peptiddelen (tetanus- eller difteribærer) og kan derfor føre til redusert respons overfor den B-celleaktiverende del. Derfor er det blitt forsket etter sakkarid-peptidkonjugater utstyrt med homologt bærerpeptid. Et slikt sakkarid-peptidkonjugat vil ikke bare aktivere B-cellehukommelse, men også reaktivere T-cellehukommelse ved kontakt med den aktuelle mikroorganisme.

Det er kjent sakkarid-peptidkonjugater som omfatter et homologt bærerpeptid. Paton et al. beskriver konjugering av pneumolysintoksoid til type 19F kapselformet polysakkarid av Streptococcus pneumoniae (Infection and Immunity, juli 1991, p 2297-2304).

Det er også kjent sakkarid-peptidkonjugater som omfatter et homologt bærerpeptid som omfatter en sakkaridel avledet fra et lipopolysakkarid (LPS) av gramnegative bakterier som immunitetsbevirkende P-celleaktiverende del. Et slikt sakkarid-peptidkonjugat gir som fordel muligheten av å fremstille en vaksine som gir immunitet mot gramnegative bakterier hvis kapselformete polysakkarider ikke bevirker noen eller utilstrekkelig immunitetsreaksjon. Et sakkarid-peptidkonjugat som omfatter lipopolysakkarid som immunitetsbevirkende B-celle-aktiverende del har imidler-

tid også ulemper. Lipopolysakkarid inneholder toksiske deler, og et sakkarid-peptidkonjugat som omfatter et lipopolysakkarid med toksiske deler vil også være toksisk.

I Contrib. Microbiol. Immunol. Basel, Karger, Vol 10, 1989, p 166-189 beskriver J.C. Cryz et al., vaksiner mot Pseudomonas aeruginosa, som omfatter et sakkarid-peptidkonjugat som inneholder detoksifisert lipopolysakkarid av Pseudomonas aeruginosa immunitetstype 5, hvor lipopolysakkaridet er koplet til forskjellige bærerproteiner. Bærerproteinene kan være både homologe og ikke-homologe. Bærerproteinene som er nevnt i denne publikasjon er tetanustoksoid, toksin A og hår av Pseudomonas aeruginosa.

Pseudomonas aeruginosas LPSer gjøres ifølge denne publikasjon harmløse ved fjerning av esterbundne fettsyrer av lipid A, slik at den serologisk aktive O-poysakkariddel kan inkorporeres i et sakkarid-peptidkonjugat. Et slikt detoksifisert LPS (D-LPS) ble omdannet til en aktiv ester ved kopling til N-hydroksysuccinimid, og deretter ble den aktive ester koplet til et protein som var blitt utstyrt med en spacer (1,4-diaminobutan) for å gjøre koplingen enklere. D-LPS-TA-konjugatet var ikke immunogenisk, men D-LPS-hår-konjugatet og D-LPS-TT-konjugatet var det.

I en artikkel av Boons et al., Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, Vol 1 nr. 6, 1991, p 303-308 er det beskrevet at et sakkarid-peptidkonjugat (SPC) med to essensielle, immunologiske domener (dvs. B- og T-epitopene som er ansvarlige for antistoffspesifisiteten og T-hjelperaktiviteten) som er kovalent bundet ved hjelp av en kunstig spacer er blitt gjort til del av utvikling av vaksine med en bred virkning mot N-meningitidis. I dette kjente konjugat bevirkes B-epitopfunksjonen av et fragment av IC-regionen av LPS immunitetstype 6 (IC=indre kjerne). En T-celleepitop som omfatter et peptid velges for å oppnå homolog T-hjelpercellerespons (hukommelse). T-celleepitopen som omfatter den kjente homologe SPC's peptiddel er 47-49 delen av en meningokokk-OMP som er beskrevet av

E.J.H.J. Wiertz et al. i "Proceedings of the 11th American Peptide symposium, utgiver J.E. River og G.R. Marshall, ESCOM, Leiden, 1990). Ulemper med dette kjente SPC er den nødvendige kompliserte og kostbare kjemiske syntese som på den ene side hindrer produksjon i stor skala av økonomiske årsaker, og på den annen side det faktum at bare en del av immunitetsvirkningen til OMP benyttes på grunn av at bare et lite fragment av OMP som omfatter en T-celleaktiverende del anvendes i forhold til både B- og T-celleaktiverende deler.

Inntil nå syntes det umulig å kople en sakkariddel til et fullstendig yttermembranprotein eller stort yttermembranfragment som omfatter mer enn en epitop, uten å forandre strukturen eller sammensetningen, noe som ville ha senket yttermembranproteinets immunitetsaktivitet.

Dessuten er det kjent at mikroorganismer som produserer yttermembranproteiner inkorporerer disse i sin membran i en viss konfigurasjon hvor deler av yttermembranproteinet er forankret i membranen og deler rager utad i form av looper. Den spesifikke konfigurasjon er nødvendig for immunitetsaktiviteten til de T-celle- og B-celleaktiverende deler som foreligger i yttermembranproteinet. I NIPH ANNALS, Vol 14 nr. 2, desember 1991, p 67-79, særlig p 69-71, er det beskrevet av J.H. Fredriksen et al. at mikroorganismer kan behandles på en slik måte at de "danner blærer" (bleb), dvs. danner yttermembranvesikler (OMVer). Slike yttermembranvesikler er utstyrt med et stort antall yttermembranproteiner på sin overflate og kan anvendes som kraftig vaksinekomponent på grunn av at en stor mengde yttermembranproteiner foreligger i den form som er nødvendig for immunitetsaktivitet. Men flere ulemper hos andre vaksiner som inneholder utelukkende yttermembranprotein som immunitetsaktivitets-aktiverende komponent er også gyldig for en slik vaksinekomponent. Kjente yttermembranvesikkelvaksiner synes å være i stand til å frembringe mellombeskyttelse hos mennesker, dvs. 50-80% beskyttelse.

Teknikkens stilling belyses ytterligere i de følgende publikasjoner: E. J. Wiertz et al (1991) The Journal of Immunology 147:2012-2018, A. F. M. Verheul et al (1991) Infection and Immunity 59:3566-3573, A. F. M. Verheul et al (1991) Infection and Immunity 59:843-851, samt patentsøknadene WO 9006696 og NL 9101359, men ingen av de nevnte publikasjonene omfatter de spesifikkke karakteristikkene tilmolekylet i følge den foreliggende oppfinnelsen.

Det immunitetsbevirkende, B-celleaktiverende molekyl i følge oppfinnelsen er således kjennetegnet ved at molekylet omfatter i det minste den felles del av oligosakkariddelen (kjerneregion) av lipopolysakkarider som er spesifikke for minst to meningokokk-immunitetstyper L2 og L3, og at galaktose er fraværende i den B-celleaktiverende del, samt derivater av molekylet som har immunitetsreaksjonsbevirkende kapasitet og mangler galactose i den B-celleaktiverende del.

Fremgangsmåten til fremstilling av nevnte molekyl i følge oppfinelsen er således kjennetegnet ved at det anvendes rekombinant DNA-teknikk.

Sakkarid-peptidkonjugatet (SPC) i følge oppfinnelsen er således kjennetegnet ved at sakkariddelen er konjugert til en peptiddel med minst én T-hjelpecelleaktiverende epitop, idet peptiddelen omfatter minst ett homologt protein eller et peptidfragment avledet fra et homologt protein, hvorved homologt betyr at både B-celle- og T-hjelpecelleaktiverende epitoper er avledet fra den samme mikroorganisme.

Yttermembranvesikkelen i følge oppfinnelsen er således kjennetegnet ved at den omfatter et molekyl ifølge et av kravene 1-3 og/eller et sakkarid-peptidkonjugat ifølge krav 9, hvor yttermembranvesikkelen omfatter klasse I yttermembranproteiner (OMPer) eller klasse I OMP fragmenter som T-hjelpecelleaktiverende epitop.

Fremgangsmåten til fremstilling av en

yttermembransvesikkel i følge oppfinnelsen er således kjennetegnet ved

i) at en nukleotidsekvens som koder for polypeptidet uttrykkes i en bakterie,

ii) at bakterien dyrkes og produserer yttermembranvesikler, og de derved dannede yttermembranvesikler isoleres med polypeptid, og

iii) at yttermembranvesikkelen som dannes i trinn ii) utstyres med sakkarid-peptidkonjugater ved kopling av polypeptidet til den ønskede sakkariddel som valgfritt er oppnådd via rekombinant DNA-teknikk eller på syntetisk vis.

Den muterte meningokokkstammen i følge oppfinnelsen er således kjennetegnet ved at den bærer en mutasjon i D eller E regiionen til menigokokkale cps locus slik som i CBS 401.93.

Vaksinen i følge oppfinnelsen er således kjennetegnet ved en effektiv mengde av én eller flere av følgende bestanddeler:

i) et molekyl ifølge et av kravene 1-3,

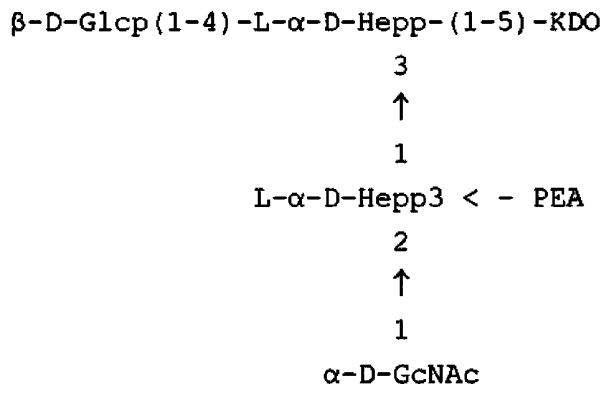
ii) et sakkarid-peptidkonjugat ifølge krav 9,

iii) en yttermembranvesikkel ifølge et av kravene 10-20.

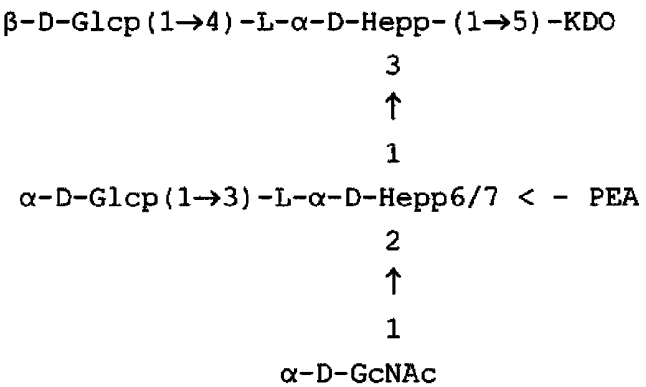
Med den foreliggende oppfinnelse gjøres det forsøk på å løse problemene som foreligger med kjente vaksine-komponenter. For det første har forskningen vært rettet mot å finne et B-celleaktiverende molekyl som er lite og enkelt å oppnå, som ikke er toksisk og som kan bevirke immunitet mot mer enn én LPS-immunitetstype. Oppfinnelsen vedrører også et immunitetsbevirkende, B-celleaktiverende molekyl avledet fra et meningokokk-lipopolysakkarid (LPS), hvor molekylet omfatter minst én epitop og omfatter i det minste den felles del av oligosakkariddelen (kjerneregion) i lipopolysakkarider som er spesifikke for minst to meningokokk-immunitetstyper, fortrinnsvis immunitetstypene L2 og L3, og hvor galaktose er fraværende i den B-celle-

aktiverende del, samt vedrører derivater av molekylet med immunitetsreaksjonsbevirkende kapasitet.

Et egnet eksempel på et slikt molekyl er et molekyl avledet fra L2-kjernen i et meningokokk-lipopolysakkarid og har følgende struktur:



Det kan frembringes antistoffer mot en slik struktur som er spesifikt baktericide for immunitetstyper L2 og L3, de mest utbredte immunitetstyper. Et annet passende eksempel på et slikt molekyl er et molekyl som er avledet fra L3-kjernen og som har følgende struktur:



Denne struktur er også anvendelig når det gjelder å bevirke immunitetsreaksjon mot begge immunitetstypene L2 og L3. Det har overraskende vist seg at et antistoff som var kjent for å oppvise kryssreaktivitet overfor forskjellige meningokokk-immunitetstyper, men om hvilket det var ukjent hvilken struktur det gjenkjente kan binde seg til de to molekylære strukturer som er vist ovenfor. De to molekylære strukturer som er vist ovenfor avviker fra epitopene som er postulert inntil nå for L2 og L3 ved fravær av galaktose. Epitopene som er postulert til dags dato er ikke helt nødvendige for å frembringe baktericide antistoffer med kryssreaktivitet overfor forskjellige meningokokk-immunitetstyper. Antistoffet som har vært benyttet for å illustrere dette er mN8D6A og er beskrevet av J.J. Kim, R.E. Mandrell, H. Zehn, M.A.J. Westerink, J.T. Poolman og J.M. Griffiss i Infection and Immunity, oktober 1988, p 2631-2638. I denne artikkel er det antydet at antistoffet vil kunne binde seg til lipopolysakkarider av 28 gruppe A N. meningiditis stammer i dot blots og til flere LOS-komponenter med forskjellige molekylvekter oppnådd fra de 28 stammer i immunoblottinger.

Molekyler ifølge den foreliggende oppfinnelse kan utgjøre en del av sakkarid-peptidkonjugater på en anvendelig måte, hvor de f.eks. er koplet til tetanustoksoid eller en annen kjent egnet bærer i vaksineteknologi. Med fordel omfatter et sakkarid-peptidkonjugat som omfatter et molekyl ifølge oppfinnelsen også en peptiddel med minst én T-hjelpecelleaktiverende epitop. Denne peptiddel omfatter fortrinnsvis minst ett homologt protein eller et peptidfragment avledet fra et homologt protein, hvor det med homologt menes at både P-celle- og T-hjelpecelleaktiverende epitoper er avledet fra den samme mikroorganisme. En yttermembranvesikkel som et sakkarid-peptidkonjugat som omfatter et molekyl ifølge oppfinnelsen er blitt tilført til eller blitt innleiret i som B-celleaktiverende del er en egnet utførelse som med fordel kan anvendes i en vaksine. Fortrinnsvis omfatter en yttermembranvesikkel som

et molekyl eller et sakkarid-peptidkonjugat som omfatter et slikt molekyl er blitt tilført til eller som et slikt molekyl er blitt innleiret i klasse I OMP eller klasse I OMP fragmenter som T-hjelpecelleaktiverende del.

Oppfinnelsen vedrører også fremgangsmåter til fremstilling av lipopolysakkaridderivatene ifølge oppfinnelsen. Hittil har det vært mulig å benytte mutagenese, rekombinante DNA-teknikker, enzymatisk spalting eller kjemisk syntese. Fremgangsmåten via rekombinante DNA-teknikker omfatter fremstilling av molekylet fra en mutert eller utvalgt produksjonsstamme som produserer i det minste LPS uten galaktose. For dette formål kan det med fordel anvendes en mutert meningokokkstamme som ikke produserer galaktose. Nærmere bestemt kan det anvendes en produksjonsstamme som produserer intet eller intet funksjonelt galE enzym. M. Frosch, C. Weisgerber og T.F. Meyer, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, Vol 86, 1989, p 1669-1673 bestemte for N. meningitidis hvilken del av N. meningitidis-genomet som omfatter genene for CPS-produksjon. Denne del ble klonet på plasmid pMF32.35, og det viste seg at dette plasmid også omfatter sekvenser som koder for LPS-biosyntese. En meningokokkstamme hvor dette plasmid er blitt integrert ble deponert den 29. juli 1993 hos CBS Baarn, Nederland, under nummeret CBS 401.93. For en ekspert er det uten tvil ved hjelp av vanlig DNA-teknikk mulig å anvende én eller flere mutasjoner eller delesjoner i denne del av meningokokk-DNA for å hindre galaktoseproduksjon. Nærmere bestemt er det mulig å anvende én eller flere mutasjoner eller delesjoner i cps-locusen som er tilstede på dette plasmid og derved hindre ekspresjon av noen som helst eller noen som helst funksjonell GalE. Med prober som omfatter en del av sekvensen som koder for en del av enzymet GalE kan lokaliseringen av GalE-genet bestemmes på enkel måte, og deretter kan det utføres mutagenese eller delesjon for å oppnå en sekvens som ikke uttrykker noen eller noen funksjonell GalE. Ekspresjonsproduktet av en slik mutert cps-locus vil

produsere lipopolysakkarid uten galaktose. På vanlig måte kan det deretter fremstilles en ekspresjonsvektor som omfatter en slik mutert cps-kassett eller den relevante del derav. Fremstilling av en slik produksjonsstamme ved hjelp av den muterte nukleotidsekvens eller ekspresjonsvektoren som omfatter en slik sekvens ligger innenfor kompetansen til en ekspert ved anvendelse av typiske protokoller innen rekombinant DNA-teknologi. Med fordel kan det på enkel måte fremstilles en mutert meningokokk-produksjonsstamme hvor det er blitt utført en delesjon i cps-kassetten av vill type og som er blitt utskiftet med en mutert cps-kassett.

Dessuten vedrører oppfinnelsen en løsning på problemet med kopling av yttermembranprotein med en andre komponent uten immunitetsaktivitet uten å skade yttermembranproteinets immunitetsaktivitet, slik at det kan oppnås en vaksinekomponent som omfatter mer enn én T-hjelpecelleaktiverende del. Oppfinnelsen vedrører derfor en yttermembranvesikkel utstyrt med polypeptider hvor i det minste yttermembranproteinenes (OMPenes) immunitetsaktivitet er bundet til en membran, hvorved yttermembranvesikkelen er kjennetegnet ved at polypeptidene er yttermembranproteiner eller yttermembranproteinfragmenter forankret i membranen med en mutasjon i én av overflateloopene hos yttermembranproteinet som polypeptidet er avledet av. Oppfinnelsen vedrører fortrinnsvis en slik yttermembranvesikkel hvor polypeptidene er yttermembranproteiner eller yttermembranproteinfragementer som er forankret i membranen med en mutasjon i én av overflateloopene til overflateproteiner av klasse I som polypeptider er avledet fra. Spesielt vedrører oppfinnelsen en slik yttermembranvesikkel hvor polypeptidet omfatter minst én mutasjon i en av loopene 2, 3, 5, 6, 7 eller 8.

Det har vist seg at anvendelse av mutasjoner i disse looper ikke minsker immunitetsaktiviteten til membranbundet yttermembranprotein av klasse I. Derved gjør muligheten til å frembringe mutasjoner i disse lokaliseringer

det mulig med spesifikk kopling av yttermembranproteinet til en annen ønsket komponent, fortrinnsvis en komponent med ytterligere immunitetsaktivitet i mutasjonens posisjon. En yttermembranvesikkel ifølge oppfinnelsen kan betraktes som en yttermembranvesikkel som er blitt aktivert for kopling.

Mutasjonen befinner seg fortrinnsvis i én av loopene 6 eller 7. Disse looper befinner seg i yttermembranproteinets tertiære struktur i de mest egnete posisjoner i forhold til loopene 1 og 4, hvorved disse looper omfatter et antall viktige yttermembranproteinepitoper.

Mutasjonen kan bestå av i det minste nærvær av en ytterligere aminosyre med en reaktiv sidekjede i én av loopene 2, 3, 5, 6, 7 eller 8. Denne kan være en insersjon, delesjon eller substitusjon i én av loopene. En substitusjon foretrekkes idet den naturlige situasjon derved etterlignes mest. Formen mutasjonen antar er ikke kritisk, noe imidlertid lokaliseringen er.

Idet ikke noen cystein foreligger i naturlig yttermembranprotein og sulfhydrylgruppen er en god, reaktiv gruppe blir fortrinnsvis denne aminosyre innleiret. Andre aminosyrer, såsom lysin, er mulige, men nærværet av slike aminosyrer i det native yttermembranprotein tilbyr et antall reaksjonsposisjoner i yttermembranproteinet for kopling, og derfor vil de resulterende SPVer måtte screenes for å bestemme hvilke som har gjennomgått konjugeringen i den ønskede lokalisering. Innleiring av beskyttende grupper vil i de fleste tilfeller føre til kompliserte kjemiske reaksjoner med stor risiko for denaturering av polypeptidet.

Som angitt kan polypeptidet omfatte det komplette yttermembranprotein, men også et yttermembranproteinfragment. Yttermembranproteinet bør ha tilstrekkelig lengde og en slik struktur at det kan forankres i membranen til en mikroorganisme og ha i det minste immunitetsaktiverende aktivitet, fortrinnsvis så mye som eller mer enn det tilsvarende native yttermembranprotein som det

er avledet av. En foretrukket yttermembranvesikkel ifølge oppfinnelsen omfatter et molekyl ifølge oppfinnelsen og/ eller et sakkarid-peptidkonjugat som omfatter et molekyl ifølge oppfinnelsen.

En anvendelse av en yttermembranvesikkel ifølge oppfinnelsen er til fremstilling av en vaksinekomponent som også omfatter en konjugert sakkariddel. Produktet fra kopling av en sakkariddel med en polypeptiddel fra yttermembranvesikkelen aktivert for kopling, en yttermembranvesikkel (OMV) som omfatter et sakkarid-peptidkonjugat (SPC), en såkalt sakkaridpeptidvesikkel (SPV), vil oppvise en bredere immunitetsaktivitet enn eksisterende yttermembranvesikler som omfatter yttermembranprotein. Sakkaridpeptidvesikkelen vil derfor ha en større og bredere immunitetsaktivitet enn de kjente sakkarid-peptidvesikler. En ytterligere fordel er at den naturlige mekanisme hvormed en mikroorganisme forankrer yttermembranproteiner i membranen kan anvendes på en økonomisk og enkel måte til å produsere en vaksinekomponent med bredere og sterkere immunitetsaktivitet. Oppfinnelsen vedrører også en sakkarid-peptidvesikkel som er beskrevet ovenfor.

Koplingen av en peptiddel fra en aktivert yttermembranvesikkel til en sakkariddel som omfatter minst én immunitetsbevirkende B-celleaktiverende del, med minst én epitop avledet fra et lipopolysakkarid (LPS) av en gram-negativ bakterie og en yttermembranvesikkel som omfatter et fragment av en B-celleaktiverende del med minst én epitop som er isolert fra en gram-negativ bakterie, foretrekkes. Oppfinnelsen vedrører også en sakkarid-peptidvesikkel utstyrt med polypeptider som har minst samme immunitetsaktivitet som yttermembranprotein, hvorved polypeptidene som utgjør en del av sakkarid-peptidkonjugater, hvor sakkariddelen og peptiddelen i et slikt konjugat er koplet i lokaliseringen for mutasjonen i én av loopene 2, 3, 4, 5, 6, 7 eller 8 av polypeptidet.

En sakkarid-peptidvesikkel som omfatter lipopolysakkaridets "kjerneregion" eller et fragment avledet derav

som B-celleaktiverende del av sakkariddelen vil være sikrere som komponent i en vaksine enn en sakkarid-peptid-vesikkel som omfatter et sakkarid-peptidkonjugat som omfatter nativt lipopolysakkarid, på grunn av fraværet av de toksiske deler. Videre har et slikt "kjerne"-holdig sakkarid-peptidkonjugat den fordel at det kan inneholde et større antall forskjellige LPS-"kjerne"-B-celleaktiverende deler enn en SPC med nativt LPS som blir toksisk når det innleires for mye av den toksiske komponent lipid A.

Meningokokk-lipopolysakkarid er toksisk og omfatter tre deler. Fig. 1 viser et meningokokk-lipopolysakkarid. Lipid A delen er toksisk, og lakto-N-neotetraoseenheten kan eventuelt føre til innføring av auto-antistoffer. Oligosakkariddelen imeningokokk-lipopolysakkarid, den såkalte "kjerneregion", er ikke toksisk. Den såkalte "indre kjerneregion" er den del av "kjerneregionen" i oligosakkariddelen av meningokokk-lipopolysakkarid hvor lakto-N-neotetraoseenheten er fraværende. Et sakkarid-peptid-konjugat som omfatter en B-celleaktiverende del, som omfatter "kjerne"-oligosakkaridet i Meningococcus eller et fragment avledet derav, er et passende eksempel på et SPC som kan være en del av en sakkarid-peptidvesikkel ifølge oppfinnelsen.

Faktisk er et sakkarid-peptidkonjugat som omfatter en sakkariddel avledet fra Meningococcus som mangler toksisk lipid A og også mangler den komplette lakto-N-neotetraoseenhet er beskrevet av Boons et al., men i denne kjente vaksinekomponent er sakkariddelen koplet til et fragment avledet fra yttermembranprotein som omfatter bare én T-celle-epitop, og nevnte SPC utgjør ikke en del av en yttermembranvesikkel.

For en sakkarid-peptidvesikkel ifølge oppfinnelsen kan et nativt lipopolysakkarid som skal anvendes isoleres, og deretter kan lipid A og en del av tetraoseenheten fjernes. Meningokokk-lipopolysakkarid (LPS) kan f.eks. isoleres ved ekstraksjonsmetoden med varmt vann og fenol ifølge Westphal (O. Westphal og J.K. Jann, Methods

Carbohydr. Chem., Vol 5, 1965, p 83-91). Kort sagt hydrolyseres lipopolysakkarid i 1 prosentig eddiksyre inntil det opptrer flokkulering. Lipid A fjernes ved sentrifugering, og oligosakkaridene renses over en biogel-søyle. Deretter kan hovedoligosakkaridet koples til peptiddelen.

"Kjerne"-oligosakkarid eller et aktivt derivat derav oppnådd ved en slik fremgangsmåte kan innleires i en sakkarid-peptidvesikkel ifølge oppfinnelsen.

Idet oppnåelse av en B-celleaktiverende del avledet fra nativt LPS er en langsom prosess og fullstendig rensing av "kjerne"-oligosakkaridet også er problematisk, kan den B-celleaktiverende del av sakkariddelen i sakkarid-peptidvesikkelen ifølge oppfinnelsen syntetiseres. En sakkarid-peptidvesikkel ifølge oppfinnelsen kan derfor omfatte en syntetisk B-celleaktiverende del i sakkariddelen.

Det er også mulig å oppnå en ikke-toksisk B-celleaktiverende del av sakkarid-peptidvesikkelen avledet fra et lipopolysakkarid via en biokjemisk rute, såsom mutagenese eller enzymatisk spalting. Denne rute er mulig dersom det via molekylærbiologiske metoder fremstilles en produksjonsstamme som er i stand til å produsere et forandret lipid A og/eller lakto-N-neotetraose. I ethvert tilfelle må terminal-galaktosen i lakto-N-tetraosen fjernes, og en mutant-produksjonsstamme som ikke produserer galaktose for innleiring i lipopolysakkaridet kan fremstilles på en enkel måte, slik det ovenfor er angitt for fremstillingen av et molekyl ifølge oppfinnelsen. Spesielt vedrører oppfinnelsen en sakkarid-peptidvesikkel i de forskjellige utførelser som allerede er blitt berømmet, hvor sakkaridelen omfatter et immunitetsbevirkende, B-celleaktiverende molekyl med minst én epitop avledet fra et meningokokk-lipopolysakkarid (LPS), hvor molekylet omfatter i det minste den felles del av oligosakkariddelen (kjerneregion) fra lipopolysakkarider som er spesifikke for i det minste to meningokokk-immunitetstyper, fortrinnsvis immunitetstypene L2 og L3, og hvor galaktose er fraværende i den B-

celleaktiverende del, samt derivater av molekylet som har immunitetsreaksjonsbevirkende kapasitet.

Sakkarid-peptidvesiklene ifølge oppfinnelsen kan være konjugeres ved hjelp av en spacer. Dette gir den fordel at det ikke forekommer noen intramolekylære reaksjoner mellom de reaktive grupper i sakkariddelen og i peptiddelen. Slike reaksjoner kan nemlig føre til en forandret, tertiær struktur av sakkariddelen og/eller peptiddelen, noe som resulterer i svekkelse av immunitetsaktiviteten.

Aktiviteten til et antall spesifikke epitoper av LPS-immunitetstype skyldes nærværet av minst én fosfoetanolamingruppe (PEA). Derfor foretrekkes en sakkarid-peptidvesikkel ifølge oppfinnelsen hvor PEA-gruppe s i den B-celleaktiverende del av sakkariddelen inneholder frie aminogrupper. Et eksempel på en slik sakkarid-peptidvesikkel ifølge oppfinnelsen som omfatter en immunitetsspesifikk B-celleaktiverende del i sakkariddelen er en sakkarid-peptidvesikkel som omfatter LPS av meningokokker sammen med immunitetstype L_3 i sakkariddelen. En slik sakkarid-peptidvesikkel som omfatter en immunitetsspesifikk epitop av immunitetstype L_3 vil fortrinnsvis inneholde en B-celleaktiverende del sammen med en PEA-gruppe s som inneholder frie aminogrupper.

Sakkarid-peptidvesikler ifølge oppfinnelsen omfatter med fordel en sakkariddel som inneholder en B-celleaktiverende del som kan frembringe kryssreaksjon med mer enn én immunitetstype. En vaksine som inneholder en sakkarid-peptidvesikkel ifølge oppfinnelsen vil gi beskyttelse mot mer enn én immunitetstype.

For tiden er det kjent 12 forskjellige lipopolysakkarider for meningokokk-stammer (som tilsvarer 12 immunitetstyper). Forskjellene i meningokokk-LPS-immunitetstypene er blitt lokalisert til oligosakkariddelen av lipopolysakkaridet ("kjerneregion"). Nylig ble de komplette primære strukturer for oligosakkaridene for immunitetstypene L_1, L_2, L_3, L_5 og L_6 postulert. Disse er vist i fig. 2 (J. L. Difabio et al., Structure of the L1 and L6

core oligosaccharide of Neisseria meningitidis, Can. J. Chem., Vol 86, 1990 p 1029-1034; H.J. Jennings et al., Structure and Immunochemistry of meningococcal lipopolysaccharides, i Anthonie van Leeuwenhoek, Vol 53, 1987, p 519-522; F. Michon et al., Structure of the L5 lipopolysaccharide core oligosaccharide of Nesseria meningitidis i J. Biol. Chem., Vol 256, 1990, p 7243-7247; A.F.M. Verheul et al., Infection and Immunity, Vol 51, 1991, p 3566-3573). Strukturene til de største L_1-, L_2- og L_3-molekyler er vist i fig. 3.

En sakkarid-peptidvesikkel ifølge oppfinnelsen som inneholder ett eller flere oligosakkarider med de strukturer som er vist i fig. 2 er anvendelige som komponent i en vaksine rettet mot minst én meningokokk-immunitetstype. En sakkarid-peptidvesikkel ifølge oppfinnelsen som omfatter i det minste den B-celleaktiverende del av minst ett av oligosakkaridene i fig. 2 i nevnte sakkariddel kan derfor med fordel anvendes som komponent i en vaksine rettet mot minst én meningokokk-immunitetstype.

Oligosakkaridene i immunitetstypene er forskjellige når det gjelder monosakkaridsammensetning, mengde og lokalisering av fosfoetanolamingrupper (PEA) og graden av acetylering av den $\alpha(1\rightarrow2)$ bundne GlcNAc-enhet eller andre enheter. For de fleste immunitetstyper er grunnstrukturen til oligosakkarid-"kjernen" den samme (fig. 1 og fig. 2).

Idet "kjerne"-oligosakkaridene i meningokokk-lipopolysakkarider oppviser overensstemmelse for forskjellige immunitetstyper inneholder "kjernen" mer enn én immunitetstypespesifikk epitop. En sakkarid-peptidvesikkel ifølge oppfinnelsen som inneholder en slik "kjerne" som B-celleaktiverende del av sakkariddelen vil bli foretrukket. En slik sakkarid-peptidvesikkel ifølge oppfinnelsen kan ha en samtidig B-celleaktiverende effekt på et antall forskjellige immunitetstyper. En sakkarid-peptidvesikkel ifølge oppfinnelsen som kan ha en samtidig B-celleaktiverende effekt på et antall immunitetstyper kan også inneholde et avledet fragment som omfatter mer enn én

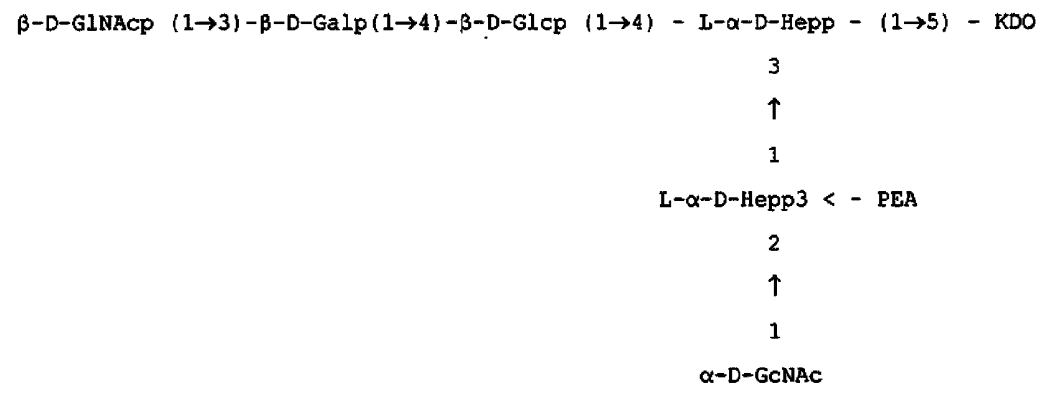
immunitetstypespesifikk epitop.

Det er også mulig å innleire bare en relevant del av "kjerne"-oligosakkaridet som fragment i en sakkarid-peptidvesikkel ifølge oppfinnelsen, som bevirker spesifikk immunitet for en spesifikk immunitetstype. Det er også mulig å innleire mer enn én B-celleaktiverende del i sakkariddelen av en sakkarid-peptidvesikkel ifølge oppfinnelsen, slik at en slik sakkarid-peptidvesikkel inneholder forskjellige spesifikke immunitetsbevirkende deler og derfor kan bevirke immunitet for forskjellige spesifikke immunitetstyper.

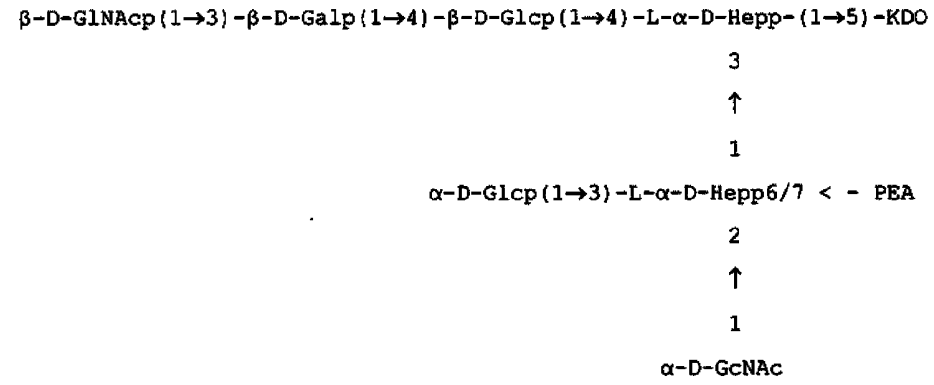
B-celleaktiverende deler av sakkariddelen med spesifikk immunitetsbevirkende virkning mot forskjellige immunitetstyper eller B-celleaktiverende deler av sakkariddelen, som har kryssreaktiv immunitetsfrembringende virkning kan med fordel innføres i sakkariddelen av sakkarid-peptidvesikkelen ifølge oppfinnelsen. Det er blitt mulig å syntetisere veldefinerte oligosakkarider med økende kompleksitet og molekylvekt, slik at det kan syntetiseres oligosakkarider som omfatter én eller flere B-celleaktiverende strukturer.

Det er kjent om Meningococcus at immunitetstyper L3 og L2 bevirker henholdsvis ca. 70% og 30% av meningokokkmeningitt av gruppe B. Derfor foretrekkes sakkarid-peptidvesikler ifølge oppfinnelsen som omfatter minst B-celleaktiverende deler av L3 og/eller L2 immunitetstyper i sakkariddelen av sakkarid-peptidvesikkelen.

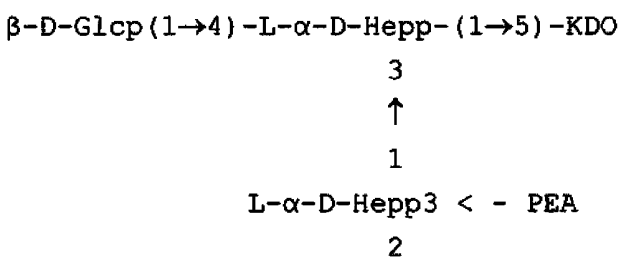
En sakkarid-peptidvesikkel ifølge oppfinnelsen som omfatter i det minste en B-celleaktiverende del av sakkariddelen som er et derivat av

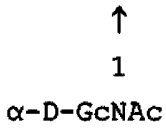


eller

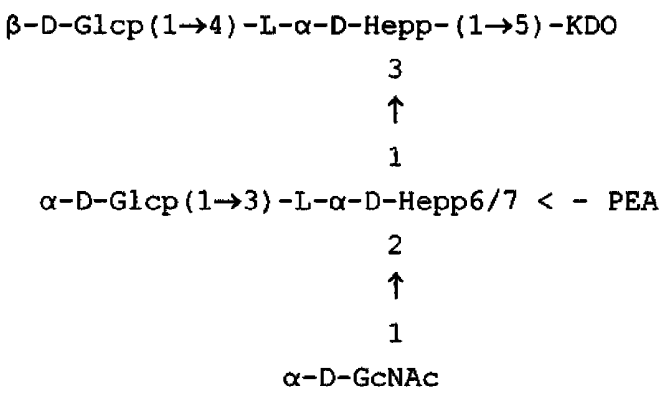


En sakkarid-peptidvesikkel som foretrekkes er en sakkarid-peptidvesikkel som omfatter en B-celleaktiverende del i sakkariddelen som utøver i det minste kryssreaksjon med to immunitetstyper av gram-negative bakterier. Et eksempel på en slik sakkarid-peptidvesikkel utøver i det minste kryssreaksjon med meningokokk-immunitetstypene L2 og L3. En slik sakkaridpeptidvesikkel omfatter derfor et molekyl med strukturen





og/eller



En sakkarid-peptidvesikkel som også er foretrukket er en sakkarid-peptidvesikkel som omfatter en B-celle-aktiverende del i sakkariddelen som utøver i det minste kryssreaksjon med meningokokk-immunitetstypene L1 og L3.

En sakkarid-peptidvesikkel som utøver kryssreaksjon med i det minste immunitetstypene L_1, L_2 og L_3 omfatter i det minste det forgrenete oligosakkarid β-D-Glcp(1→4)-[L-α-D-Hepp(1→3)]-L-α-D-Hepp) som B-celleaktiverende del i sakkariddelen. Et passende eksempel på en slik sakkarid-peptidvesikkel ifølge oppfinnelsen omfatter også en PEA-gruppe på 0-3 av heptosylenheten i det forgrenete oligo-sakkarid β-D-Glcp(1→4)-[L-α-D-Hepp(1→3)]-L-α-D-Hepp).

En sakkarid-peptidvesikkel ifølge oppfinnelsen som utøver kryssreaksjon med flere immunitetstyper enn L_1, L_2 og L_3 omfatter i det minste det forgrenete oligosakkarid β-D-Glcp(1-4)-[L-α-D-Hepp(1-3)]-L-α-Hepp) utstyrt med en spacer som gir et bindeledd til i det minste én annen immunitetstypespesifikk B-celleaktiverende del med minst én epitop som B-celleaktiverende del i sakkariddelen.

En sakkarid-peptidvesikkel ifølge oppfinnelsen kan omfatte en sakkariddel som er syntetisert og/eller modifi-

sert i forhold til en naturlig B-celleaktiverende del som B-celleaktiverende del for en viss immunitetstype. En slik syntetisert og/eller modifisert B-celleaktiverende del vil fortrinnsvis utøve kryssreaksjon med forskjellige immunitetstyper og/eller gi en forbedret immunitetsreaksjon i forhold til den tilsvarende del av det naturlige lipopolysakkarid. I ethvert tilfelle bør terminalgalaktosen fjernes, enten via enzymatisk rute eller via genetisk manipulasjon, gjennom mutasjon. Som det er antydet ovenfor er det fullstendige fravær av galaktose i slike strukturer en mulig utførelse som kan oppnås av en fagmann på området ved hjelp av rekombinant DNA-teknikk.

En slik syntetisert og/eller modifisert B-celleaktiverende del kan oppstå ved selektiv addisjon og/eller delesjon av visse grupper og/eller sukkerenheter.

En sakkarid-peptidvesikkel ifølge oppfinnelsen vil som peptiddel fortrinnsvis omfatte et yttermembranprotein (OMP) eller et fragment avledet fra et yttermembranprotein. Fortrinnsvis vil en sakkarid-peptidvesikkel ifølge oppfinnelsen omfatte et yttermembranprotein av Meningococcus klasse I idet dette yttermembranprotein kan indusere beskyttende antistoffer, ikke har en tendens til å blokkere antistoffer mot andre proteiner og ikke oppviser for stor antigenisk variasjon. Det har vært forsket på mange gjenkjenningsseter for humane T-celler av klasse I yttermembranprotein av Meningococcus H44/76, noe som gjør den til en egnet utgangsstamme for yttermembranproteinet som skal anvendes.

Den foreliggende oppfinnelsen vedrører også en fremgangsmåte til fremstilling av en yttermembranvesikkel ifølge oppfinnelsen. Denne fremgangsmåte omfatter følgende trinn:

1) En nukleotidsekvens som koder for polypeptidet uttrykkes i en bakterie,

2) bakterien dyrkes under kjente betingelser for fremstilling av yttermembranvesikler, slik som beskrevet av J.H. Fredriksen et al., i NIHP ANNALS, Vol 14 nr. 2,

desember 1991, p 67-79, særlig p 69-71, og de derved dannede membranstykker sammen med polypeptid kan eventuelt isoleres.

For fremstilling av en sakkarid-peptidvesikkel ifølge oppfinnelsen kan deretter

3) membranstykkene som er fremstilt i trinn 2 utstyres med sakkarid-peptidkonjugater ved kopling av polypeptidet til den ønskede sakkariddel.

For fremstilling av en yttermembranvesikkel eller en sakkarid-peptidvesikkel ifølge oppfinnelsen kan den nødvendige nukleotidsekvens for trinn 1) som skal anvendes være en rekombinant nukleotidsekvens som koder for et yttermembranprotein eller et fragment derav med i det minste immunitetsaktivitetene til yttermembranprotein av klasse I, hvori det sammenlignet med den korresponderende naturlige sekvens er blitt utført en mutasjon i én av overflateloopene. En mutasjon av én av loopene 2, 3, 4, 5, 6, 7 eller 8, særlig i loopene 6 og 7, foretrekkes. Mutasjonen resulterer i en kodon for minst én av aminosyrene som har en spesifikk, reaktiv sidekjede i én av overflateloopene. Spesielt resulterer mutasjonen i et kodon for cystein. En sakkariddel oppnådd ved rekombinant DNA-teknikk eller via en syntetisk rute kan anvendes i fremgangsmåten til fremstilling av en sakkarid-peptidvesikkel ifølge oppfinnelsen. Spesielt kan et molekyl ifølge oppfinnelsen, som kan oppnås slik som beskrevet andre steder her, anvendes som sakkariddel.

For kopling av en sakkariddel til en yttermembranvesikkel ifølge oppfinnelsen, spesielt til en OMV-SH utstyrt med en cysteingruppe, kan følgende reaksjonsskjema følges:

$$\text{Kjerne-KDO-COOH} + H_2N\text{-X-BR} \xrightarrow{\text{EDS}} \text{kjerne-KDO-CO-NH-X-Br}$$

(EDC= 1-etyl-3-dimetylaminopropylkarbodiimid)

$$\text{kjerne-KDO-CO-NH-X-Br} + \text{OMV-SH} \rightarrow \text{kjerne-KDO-CO-NH-X-S-OMV}$$

Mer spesifikt kan reaksjonen utføres som følger:
$BrCH_2$-CO-NH-$(CH_2)_4$-NH_2 (substans 1, overskudd) + OS-KDO +

EDC + sulfo-NHS- $\xrightarrow{pH8}$ OS- - $-CO-CH_2Br$ (substans 2). Substans 2 underkastes gelfiltrering, og deretter: Substans 2 + OMV-SH → konjugat.

En annen måte å utføre koplingen på er med $BrCH_2-CO-NH-(CH_2)_4-NH-CO-CH_2Br$ (substans 3, overskudd) + OS-SH (slik som beskrevet på side 34 og 35 i Andre Verheul's thesis, Meningococcal LPS derived oligosaccharide protein cunjugate vaccines, 29. oktober 1992, Utrecht). Dette resulterer i OS- - $-CO-CH_2Br$ (substans 2*). Denne underkastes gelfiltrering eller eventuelt en enkel ET_{20}-skylling. Substans 2* kan deretter omdannes til konjugatet med OMV-SH. Idet substans 3 er lipofil utføres modifiseringen av OS-SH i en blanding av en vandig buffer og et organisk løsningsmiddel, såsom dioksan. Av denne årsak er reaksjonen mellom OMV-SH og substans 3 etterfulgt av rensing ved inkubering med OS-SH mindre attraktiv.

For spesifikk kopling av karbohydrater er det nødvendig med nærvær av egnete grupper, såsom en aminogruppe ($-NH_2$), en karboksylgruppe (-COOH), en tiolgruppe (-SH) eller en aldehydgruppe (CHO), inne i karbohydratantigenet (W.E. Dick et al., Glycoconjugates of bacterial carbohydrate antigens, i J.M. Cruse og R.E. Lewis, Cunjugate vaccines, Contrib. Microbiol. Immunol., Basel, Krager, Vol 10, 1989, p 48-114). Disse grupper kan foreligge i antigenet, men må ofte innføres via kjemiske eller enzymatiske metoder. Det foretrekkes å benytte en koplingsmetode som resulterer i så liten modifikasjon av karbohydratet og proteinantigenet som mulig. Anvendelsen av en spesifikk spacer for innleiring bidrar til dette. Det foretrekkes å ødelegge epitopen eller epitopene som er tilstede eller å generere uønskede immunitetsdominante neoantigener så lite som mulig. Koplingsmetodens innvirkning på de immunologiske karakteristika for en oligosakkarid-peptidvesikkel er stor dersom det anvendes små oligosakkarider (W. Hoppner et al., Study on the carbohydrate specificity of antibodies formed in rabbits to synthetic glycoprotein with the carbohydrate structure of asialoglycophorin, A.

Mol. Immunol., Vol 12, 1985, p 1341-1348.

De fleste kjente vaksiner er basert på kapselformede polysakkarider eller O-antigener som består av repeterende enheter av fra 1 til 8 monosakkarider for å minimalisere innvirkningen av koplingen ved anvendelse av større oligosakkarider. Meningokokk-lipopolysakkarid inneholder ikke repeterende enheter, og derfor vil valget av koplingsmetoden hvor det anvendes meningokokk-lipopolysakkarid være særlig viktig for de immunologiske og immunokjemiske karakteristika hos det resulterende konjugat.

Fortrinnsvis koples sakkaridet til peptidet via en spacer som inneholder de terminale, reaktive grupper, såsom NH_2 og COOH. Anvendelsen av en spacer i sakkarid-peptidvesikkelen ifølge oppfinnelsen har den fordel at den tertiære struktur av sakkariddelen ikke forandres, noe som er viktig for sakkaridets immunitetsaktivitet.

I meningokokk-oligosakkaridene er to grupper tilgjengelige for anvendelse i kopling av et slikt oligosakkarid til et bærerpeptid; Den frie aminogruppe i fosfoetanolaminogruppen (PEA-gruppe) og karboksylsyregruppen i KDO-enheten (fig. 1). PEA-gruppen bør fortrinnsvis ikke anvendes til kopling idet denne gruppe sannsynligvis omfatter noen av et antall av de immunitetstype-spesifikke epitoper. Derfor foretrekkes det i en sakkarid-peptidvesikkel ifølge oppfinnelsen å bibeholde fosfoetanolaminogruppene med frie aminogrupper. Typisk kan sakkarid-peptidkonjugater fremstilles på basis av kopling av karboksylsyregruppen i oligosakkaridet til peptidets frie aminogrupper. Når denne metode benyttes sammen med meningokokk-oligosakkaridet kan dette resultere i kopling av oligosakkaridet til oligosakkaridet eller av oligosakkaridet til karboksylsyregrupper i peptidet ved hjelp av PEA-gruppen i oligosakkaridet. Jennings et al. (Infect. Immun., Vol 43, p 407-412) har løst dette problem ved å fjerne PEA-gruppene ved behandling med hydrogenfluorid. De defosforylerte oligosakkarider ble deretter koplet til tetanustoksoid ved inkorporering av β-(4-aminofenyl)etyl-

amin som spacer i den reduserende terminus via reduktiv aminering (noe som fører til at ringstrukturen i KDO går tapt), etterfulgt av aktivering av aminogruppen med tiofosgen etterfulgt av kopling til tetanustoksoid. Slike konjugater med immunotype L_2, L_5 og L_{10} var meget immunogeniske i kaniner, mens de med L_3 var lite immunogeniske. For denne sistnevnte gruppe synes tapet av PEA-gruppe s og/eller ringstrukturen i KDO-gruppen å være viktig for immuniteten, og det foretrekkes å fremstille en sakkarid-peptidvesikkel med L_3-oligosakkarid av Meningococcus hvor PEA-gruppen s og KDO-ringstrukturen i meningokokkoligosakkaridet er blitt modifisert så lite som mulig.

De ovennevnte metoder er ikke tilstrekkelige for fremstilling av en sakkarid-peptidvesikkel ifølge oppfinnelsen hvor sakkariddelens B-celleaktiverende aktivitet avhenger av nærværet av én eller flere fosfoetanol (PEA) grupper. Ytterligere trinn er nødvendige for fremstilling av slike sakkarid-peptidvesikler.

En mulighet for fremstilling av en sakkarid-peptidvesikkel ifølge oppfinnelsen som løser det ovennevnte problem er anvendelse av en sakkariddel som er fremstilt syntetisk.

Ved kjente metoder er det mulig å syntetisere oligosakkarider. Som beskrevet ovenfor kan det dessuten når det gjelder sakkarid-peptidvesikler som inneholder oligosakkarider avledet fra LPS være fordel å syntetisere den B-celleaktiverende del som foreligger i lipopolysakkaridets "indre kjerne". En annen fordel med en syntetisk fremstilt sakkariddel ligger i muligheten til å innføre det minste sakkarid som funksjonerer som B-celleaktiverende del i sakkarid-peptidvesikkelen ifølge oppfinnelsen. Videre er det også mulig å syntetisere en sakkariddel som omfatter et minste oligosakkarid med kryssreaktiv immunitetsfrembringende aktivitet. Det er også mulig å syntetisere B-celleaktiverende deler som gir bedre immunitetsaktivitet enn de naturlige oligosakkarider.

Det er enklere å anbringe spaceren i en spesifikk lokalisering med en syntetisk fremstilt sakkariddel. Det er også mulig å innleire én eller flere fosfoetanolgrupper i den B-celleaktiverende del av sakkariddelen for å oppnå forbedret immunitetsaktivitet.

For å anbringe spaceren i en spesifikk lokalisering i sakkaridet foretrekkes det å utstyre de reaktive grupper i sakkaridet med beskyttelsesgrupper før spaceren koples. Den reaktive gruppe hvor koplingen med spaceren foregår er ikke utstyrt med en beskyttelsesgruppe. Denne metode hindrer grupper som er vesentlige for den immunitetsfrembringende aktivitet å bli fjernet eller forandret under koplingen av spaceren.

Oppfinnelsen vedrører også en nukleotidsekvens som koder for rekombinant yttermembranprotein eller et rekombinant yttermembranproteinfragment som avviker fra ikke-rekombinant yttermembranprotein eller ikke-yttermembranproteinfragment ved i det minste en mutasjon i én av loopene 2, 3, 6, 7 eller 8 i yttermembranproteinet. Spesielt vedrører oppfinnelsen en slik nukleotidsekvens med en mutasjon i én av loopene 6 eller 7. En sekvens som også inneholder de mest viktige antigeniske determinanter lokalisert i loopene 1 og 4 foretrekkes. Nukleotidsekvensen kan inneholde en insersjon, delesjon eller alterasjon av minst ett kodon som mutasjon, med en preferanse for en mutasjon som fører til i det minste dannelse av et kodon som inneholder en ytterligere aminosyre med en reaktiv sidegruppe i én av loopene 2, 3, 6, 7 eller 8 sammenlignet med aminosyresekvensen i det korresponderende yttermembranprotein eller yttermembranproteinfragment. Nukleotidsekvensen ifølge oppfinnelsen omfatter dessuten fortrinnsvis et kodon som koder for cystein.

Oppfinnelsen vedrører også en ekspresjonsvektor som omfatter nukleotidsekvensen for yttermembranproteinet eller et yttermembranproteinfragment ifølge oppfinnelsen

samt en mikroorganisme som inneholder nevnte nukleotidsekvens og/eller nevnte ekspresjonsvektor ifølge oppfinnelsen.

Oppfinnelsen vedrører også et polypeptid som har i det minste immunitetsaktiviteten til yttermembranprotein, hvorved polypeptidet er kjennetegnet ved nærvær av en ytterligere aminosyre med en reaktiv sidekjede i én av overflateloopene, særlig loopene 2, 3, 5, 6, 7 eller 8, sammenlignet med det korresponderende native yttermembranprotein eller et korresponderende fragment i det native yttermembranprotein. Et polypeptid med en aminosyre med en spesifikk reaktiv sidekjede i loop 6 eller 7 foretrekkes på grunn av at disse looper vil være minst hindrende for den tertiære struktur av yttermembranprotein i loopene 1 og 4 når en sakkariddel koples. Fortrinnsvis omfatter et polypeptid ifølge oppfinnelsen cystein som aminosyre. Idet nativt yttermembranprotein ikke inneholder cystein er det i et polypeptid ifølge oppfinnelsen mulig å kople meget spesifikt til cystein. Innleiringen av en ytterligere lysin er også en av mulighetene, men denne foretrekkes ikke på grunn av nærværet av mer enn én lysin i nativt yttermembranprotein og derfor også i polypeptidet. Koplingen vil derfor frembringe mer enn ett konjugat og vil nødvendiggjøre screening etter det korrekte konjugat.

Et sakkarid-peptidkonjugat som omfatter minst én epitop av et yttermembranprotein kjennetegnet ved nærværet av et polypeptid ifølge oppfinnelsen faller også innenfor rammen av oppfinnelsen, noe en vaksine som inneholder en yttermembranvesikkel, en SPV, et polypeptid eller et sakkarid-peptidkonjugat ifølge oppfinnelsen i en effektiv mengde også gjør.

Dessuten vedrører oppfinnelsen en nukleotidsekvens som omfatter meningokokk-LPS-kodende materiale, hvorved denne nukleotidsekvens kan skjelnes fra nukleotidsekvensen av vill type ved minst én mutasjon eller delesjon, hvorved ekspresjonsproduktet av den muterte nukleotidsekvens ikke inneholder noen eller ikke inneholder noen funksjonell

GalE, i motsetning til nukleotidsekvensen av den ville type. En slik nukleotidsekvens kan omfatte en mutasjon i cps-locusen av meningokokk-DNA eller ekvivalent DNA avledet derav, f.eks. i DNA avledet fra N.meningiditis, såsom på plasmid pMF32.25, som er blitt integrert i meningokokkstamme CBS 401.93 og deponert hos CBS i Baarn den 29. juli 1993. Fortrinnsvis inneholder en slik sekvens en mutasjon i D- eller E-regionen. En ekspresjonsvektor som omfatter en nukleotidsekvens av LPS-meningokokkodende materiale ifølge oppfinnelsen, og en mikroorganisme som omfatter en slik nukleotidsekvens og som er i stand til å uttrykke en slik sekvens ligger innenfor rammen for oppfinnelsen. Spesielt ligger en mutagenisert meningokokkstamme som produserer LPS uten å inneholde galaktose innenfor rammen av oppfinnelsen, og det gjør også en vaksine som omfatter en slik mikroorganisme eller et slikt molekyl ifølge oppfinnelsen.

EKSEMPEL I

Oppsummering

Yttermembranproteiner av klasse I ble anvendt for utvikling av vaksine mot meningokokk B. Disse proteiner inneholder naturlig to variable områder (=epitoper) som binder baktericide antistoffer. Disse epitoper er lokalisert i to looper 1 og 2 som er eksponert på overflaten. 4 meningokokkstammer ble fremstilt med ekstra epitoper i loopene 5 og 6 av proteinet av klasse I (se tabell A). Av dette er det klart at insersjon i loopene 5 og 6 er mulig uten ulemper for epitoper i 1 og 4. Disse stammer har alle de naturlige epitoper til moderstamme A8-6' i loopene 1 og 4, nemlig epitopene P1.5 og P1.2. Dessuten har stamme J007 en ekstra epitop P1.7, og stamme J016 har en ekstra epitop P1.16, mens stamme J716 har to ekstra epitoper, P1.7 og P1.16 i loop 6. Endelig har stamme P016 en ekstra epitop P1.16 i loop 5. Alle disse stammer er i stand til å binde monoklonale antistoffer til celleoverflaten.

TABELL A

Meningokokk-streng	Loop 1	Loop 4	Loop 5	Loop 6
J007	P1.5	P1.2		P1.7
J016	P1.5	P1.2		P1.16
J716	P1.5	P1.2		P1.7+P1.16
P016	P1.5	P1.2	P1.16	

Ved hjelp av denne informasjon kan det fremstilles nye meningokokkstammer som inneholder mutasjoner i yttermembranproteinet. Disse stammer kan anvendes til fremstilling av yttermembranvesikler (OMVer) som består av stykker av yttermembran og som under visse betingelser utskilles av N.meningitidis. Disse stykker kan deretter koples til LPS. Yttermembranvesiklene kan funksjonere som vaksine mot B meningokokk.

1.1. Strukturen av yttermembranproteiner av klasse I

Yttermembranproteinene av klasse I er kationselektive poreproteiner [15]. Proteinet er ca. 374 aminosyrer langt og foregås av et signalpeptid med 19 aminosyrer [1]. En modell av topologien av proteinet i yttermembranen forutsier 8 looper eksponert på overflaten (se fig. 4).

Transmembransekvensene er blitt opprettholdt mellom de forskjellige Neisseria-poriner og danner en β-arkstruktur. De hydrofile, eksponerte looper på overflaten oppviser større variasjon i lengde og sekvens. Når det sammenlignes med andre yttermembranproteiner av klasse I oppviser sekvensene en homologi på 90%. Variasjonen i sekvensene synes å være lokalisert i den 1. og den 4. loop. Disse benevnes variable regioner eller epitoper. Bakterieantistoffer viste seg å binde epitopene i loopene 1 og 4, noe som svarer til det faktum at disse looper er

de lengste (se fig. 4). Disse to epitoper bestemmer subtypespesifisiteten til yttermembranproteiner av klasse I [6].

1.2. Innleiring av ekstra epitoper i meningokokk-yttermembranproteiner av klasse I

Når forskjellige epitoper av yttermembranproteiner av klasse I sammenlignes kan det skjelnes totalt 10 forskjellige subtypespesifikke epitoper. Oligonukleotider med klebrige ender syntetiseres for to epitoper, epitopene P1.7 og P1.16. Disse oligonukleotider ble deretter anbrakt i loop 5 og loop 6 i yttermembranproteingenet av klasse I.

Innleiringen av oligonukleotidene P1.7 og P1.16 i yttermembranproteingenet av klasse I frembrakte nye stammer med ekstra epitoper i yttermembranproteinet av klasse I. Disse stammer omfatter allerede P1.5 epitopen i loop 1 og P1.2 epitopen i loop 2. De nylig innleirete epitoper P1.7 og P1.16 er blitt anbrakt i loop 5 eller 6. Ekspresjonen av de innleirete epitoper i de nye stammer er deretter blitt iakttatt med helcelle ELISA og sammenlignet med ekspresjonen av morstammen. Deretter er yttermembrankomplekser (OMCer) blitt isolert fra både de nye stammer og morstammen, som anvendes for immunisering av mus.

1.3. Materialer

Anvendt DNA og plasmid:

Plasmidet pTZ19R er et plasmid levert av Pharmacia og koder for blant annet Amp-resistens (Ampr) og lac Z'-genet. Det anvendte plasmid 2-2ΔSE er et derivat av pTZ19R. Dette plasmid inneholder et 1.9 kB insert med en del av yttermembranproteingenet av klasse I fra meningokokkstamme 2996 (P1.5.2), fra aminosyre 100. Dette insert er lokalisert i EcoRI-setet av multippelkloningssetet (=MCS) av pTZ19R. Ved hjelp av en delesjon i multippelkloningssetet fra SalI-setet av EcoRI-setet (hvor insertet begynner) er genet av klasse I kommet inn i samme lese-

ramme som lac Z'-derivatet av pTZ19R. OMP-genet av klasse I i dette plasmid inneholder et KpnI-restriksjonssete i loop 5.

Et annet anvendt plasmid pPH204 er igjen et derivat av 2-2ΔSE.

Yttermembranproteingenet av klasse I i dette plasmid inneholder et nytt KpnI-restriksjonssete, nemlig i loop 6 istedenfor i loop 5. Det opprinnelige KpnI-sete i loop 5 er blitt erstattet med et BamHI-restriksjonssete, og deretter er et KpnI-sete blitt dannet i loop 6 ved PCR-mutagenese [17].

De anvendte enzymer:

De anvendte enzymer er alle levert av Boehringer Mannheim sammen med de leverte buffere.

KpnI (Vol, act.: 10 U/µl), sammen med inkubasjonsbuffer L
SpeI (Vol, act.: 10 U/ l), sammen med inkubasjonsbuffer H
Sna BI (Vol, act.: 8 U/µl), sammen med inkubasjonsbuffer M
T4 DNA ligase (Vol, act.: 1 U/µl), med T4 DNA ligasebuffer

Med korresponderende inkubasjonsbuffere:

- M buffer (1x): 10 mM Tris-HCl; 10 mM $MgCl_2$; 50 mM NaCl; 1 mM ditioerytritol (DTE), pH 7,5 (ved 37°C).
- L buffer (1x): 10 mM Tris-HCl; 10 mM $MgCl_2$; 1 mM ditioerytritol (DTE), pH 7,5 (ved 37°C)
- H buffer (1x): 50 mM Tris-HCl; 10 mM $MgCl_2$; 100 mM NaCl; 1 mM ditioerytritol (DTE) pH 7,5 (ved 37°C)
- T4 DNA ligasebuffer (10x): 660 mM Tris-HCl; 50 mM $MgCl_2$; 50 mM ditioerytritol; 10 mM ATP; pH 7,5 (ved 37°C).

De anvendte monoklonale antistoffer rettet mot epitop- og LPS-typene:

TABELL B

Monoklonal eller LPS-type	Type, subtype	
MN16C13F4	P1.2	P1-subtypespesifikk
MN22.19A9	P1.5	
MN14C11.6	P1.7	
MN5C11G	P1.16	LPS-immunitetstype-spesifikk
MN14F21.11	L1	
4A8B2	L3(7.9)	
4D1-B3	L3(7.9)	
MN3A8C	L5	
MN4C1B	L6(4.9)	
MNA11G	L11,12	
MN9C10D	L8,10,11,12	
3A12-E1	L3,7,8,9	
MN15A17F12	L9, 10	
MN15A8-1	Lipid A	

Alle monoklonale antistoffer levert av RIVM.
De øvrige materialer er nevnt under metoder (1.4).

De anvendte bakteriestammer:

E. coli K12 (NM522: Denne bakteriestamme er Hsd^- (dvs. inneholder ikke restriksjonmodifikasjonssystem).

Meningokokkstamme H44/76 B^- (P1.7,16): Denne bakteriestamme er en kapselmanglende klasse 3 manglende mutant av H44/76 (P1.7,16).

Meningokokkstamme A8-6' B^- (P1.5,2). Denne bak-

teriestamme er en kapselmanglende mutant H44/76 (P1.7,16) som er blitt transformert med klasse I proteinet av 2996 (P1.5,2) [17].

1.4. Metoder

1.4.1. Kontroll av pPH204 ved transformasjon til meningokokker

Det konstruerte plasmid pPH204 (P1.2) er blitt transformert til meningokokkstamme H44/76 B^- (P1.7.16). Her ble P1.16 epitopen i loop 4 i H44/76 B^- utskiftet med P1.2 epitopen i plasmid pPH204. Ved hjelp av koloni-blotting og immunoblotting (se nedenfor) ble $P1.2^+$-kolonier isolert, noe som frembrakte stamme J072 etter kontroll med SDS-PAGE, Western- og immunoblotting, se også tabell B under resultater (1.5).

1.4.2. Innleiring av ekstra epitoper i meningokokk-ytter-membranproteiner av klasse I

1.4.2.1. Innleiring av oligonukleotider i plasmidene pPH204 og 2-2ΔSE

Det anvendte yttermembranproteingen av klasse I i plasmid pPH204 inneholder et restriksjonssete for KpnI i delen som koder for loop 6. Et oligonukleotid med KpnI klebrige ender som koder for P1.7 epitopen slik som vist nedenfor og under fremstilling og insersjon av oligo-nukleotider (1.4.3) ble anbrakt her. Ved innleiring av oligonukleotidet forsvant KpnI-restriksjonssetet, og det ble dannet et unikt SpeI-restriksjonssete. Dette plasmid benevnes konstrukt pJB007.

2.1. Oligonukleotid av epitopen P1.7 med KpnI klebrige ender (sekvens id 1):

```
          N   G   G   A   S   G   Q   V   K   V   T
   5'-G|AAC GGC GGC GCC TCT GGC CAA GTT AAA GTT ACT|AGTAC-3'
3-CATGC|TTG CCG CCG CGG AGA CCG GTT CAA TTT CAA TGA|T-5'
          V   A   A   G   R   A   L   N   L   N   S
```

Restriksjonsenzym:	Restriksjonsenzym:
A/CTAGT	GGTAC/C
TGATC/A	C/CATGG
SpeI	KpnI

Ved insersjon av oligonukleotidet i plasmidet forsvinner KpnI-setet, og det fremkommer et unikt SpeI-sete:

Venstre (sekvens id 2):	Høyre (sekvens id 3):
5'-GGTACG|AAC GGC-3'	5'-GTT ACT|AGTACC-3'
3'-CCATGC|TTG CCG-5'	3'-CAA TGA|TCATGG-5'

På samme måte ble et oligonukleotid med KpnI klebrige ender anbrakt i loop 6, som koder for epitopen P1.16 slik som vist nedenfor og under fremstilling og insersjon av oligonukleotider (1.4.3.). Ved hjelp av innleiring av oligonukleotidet forsvant KpnI-restriksjonssetet også her, men det ble dannet et unikt SnaBI-restriksjonssete. Dette plasmid benevnes konstrukt pJB016.

2.2. Oligonukleotid av epitopen P1.16 med KpnI klebrige ender (sekvens id 4):

```
          Y   T   K   D   T   N   N   N   L   T   L
   5'-G|TAT ACC AAA GAC ACC AAC AAC AAC TTG ACC TTG|AGTAC-3'
3-CATGC|ATA TGO TTT CTG TTG TTG TTG TTG AAC TTG AAC|T-5'
          I   G   F   V   G   V   V   V   Q   G   Q
```

Restriksjonsenzym:	Restriksjonsenzym:
TAC/GTA	GGTAC/C
ATG/CAT	C/CATGG
SnaBI	KpnI

Ved insersjon av oligonukleotidet i plasmidet forsvinner KpnI-setet, og det fremkommer et unikt SnaBI-sete:

Venstre (sekvens id 5):	Høyre (sekvens id 6):
5'-GGTACG|TAT ACC-3'	5'-ACC TTG|AGTACC-3'
3'-CCATGC|ATA TGG-5'	3'-TGG AAC|TCATGG-5'

Deretter ble det anbrakt et oligonukleotid med SpeI klebrige ender bak oligonukleotidet P1.7 i loop 6 i konstrukten pJB007, hvorved oligoen som koder for epitopen P1.16 er vist nedenfor. Derved forsvinner SpeI-restriksjonssetet ved innleiring av oligonukleotidet. Dette plasmid benevnes konstrukt pJB716.

2.3 Oligonukleotid av P1.16 epitop med SpeI klebrige ender (sekvens id 7):

```
            Y   T   K   D   T   N   N   N   L   T   L
 5'-CTAGC|TAT ACC AAA GAC ACC AAC AAC AAC TTG ACC TTG|T-3'
     3'-G|ATA TGG TTT CTG TTG TTG TTG TTG AAC TGGAAC|AGATC-
5'
            I   G   F   V   G   V   V   V   Q   G   Q
```

Restriksjonsenzym:

A/CTAGT
TGATC/A
SpeI

Ved å kutte det innleirete oligonukleotid av epitopen P1.7 med SpeI etterfulgt av en insersjon med oligonukleotidet av epitopen P1.16 (med SpeI klebrige ender) forsvinner SpeI-setet:

Venstre (sekvens id 8):
5'-ACTAGC|TAT ACC-3'
3'-TGATCG|ATA TGG-5'

Høyre (sekvens id 9):
5'-ACC TTG|TCTAGT-3'
3'-TGG AAC|AGATCA-5'

Det anvendte yttermembranproteingen av klasse I i plasmid 2-2ΔSE inneholder et KpnI-restriksjonssete i delen som koder for loop 5. Et P1.16 oligonukleotid er blitt anbrakt der. Ved innleiringen forsvant KpnI-restriksjonssetet. Denne konstrukt benevnes pPH016.

TABELL C

Konstrukt	I loop 6	I loop 5
pJB007	p1.7	
pJB017	P1.16	
pJB716	P1.7.16	
pPH016		P1.16

1.4.2.2 Transformasjon av konstrukter til E. coli

Deretter ble det utført transformasjon av de fire konstrukter til E. coli K12 NN522 (se nedenfor). Transformantene ble dyrket under selektivt trykk på 100 µg/ml Ampicilline. Plasmid ble isolert fra de dannete kolonier (se nedenfor) og undersøkt på nærvær av de riktige konstrukter. Konstrukt PJB007 ble undersøkt angående det forsvundne KpnI-sete og det dannete SpeI-sete. Konstrukten PJB016 ble undersøkt angående det forsvundne KnpI-sete og det dannete SnaBI-sete, og konstrukten PJB716 ble undersøkt angående det forsvundne SpeI-sete. Ved hjelp av SDS-PAGE, Westernblotting og immunoblotting (se nedenfor) med passende monoklonale antistoffer ble det iakttatt om insersjonene av epitopene P1.7 og P.16 var suksessrike og derfor oppviste ekspresjonsantistoffer og bindingsantistoffer.

1.4.2.3 Transformasjon av konstrukter til meningokokker

Deretter ble konstruktene (pJB007, pJB016, pJB716) anvendt for å transformere meningokokkstammer A8-6'B$^-$ (P1.5,2), hvorved rekombinasjon av meningokokk-kromosomalt DNA og konstrukten fremkom. Ved hjelp av koloniblotting og immunitetsblotting (se nedenfor) ble koloniene P1.7$^+$ og P1.16$^+$ isolert, noe som resulterte i de ønskede stammer etter undersøkelse med SDS-PAGE samt Western- og immunoblotting, se også tabell C under resultater.

1.4.2.4 Undersøkelse av nye stammer med helcelle Elisa

Graden hvormed de innleirete epitoper ble uttrykt i stammene J007, J0167, J716, J072 samt P016 ble iakttatt, og denne ekspresjon ble sammenlignet med morstammenes ekspresjon.

1.4.3 Fremstilling og insersjon av oligonukleotider

De komplementære, ikke-fosforylerte oligonukleotider som er angitt ovenfor ble syntetisert i et DNA-syntetiseringsapparat nr. 3814 fra Applied Biosystems. Hybridisering opptrådte ved tilsetning av de komplementære oligonukleotider i like store konsentrasjoner, oppvarming til 95°C og deretter avkjøling til romtemperatur. Dette førte til oligoer med de riktige klebrige ender. Plasmidet ble fordøyet med det riktige enzym, hvoretter oligonukleotider ble ligert ved hjelp av T4-ligater i plasmidet natten over ved 15°C (i forholdet 200 ng oligo/I µg plasmid). Ligeringsblandingen ble deretter oppvarmet til 80°C og langsomt avkjølt til romtemperatur for å muliggjøre innleiring av oligonukleotid. Ved innleiringen av oligoene i plasmidet forsvant det anvendte restriksjonssete. Ligeringsblandingen ble konsekvent kuttet med dette enzym, hvorved de selvlukkende produkter under plasmidene ble linearisert. Ved transformasjon til E. coli K12 NM522 (se nedenfor) ble disse lineære stykker dekomponert, slik at alle transformanter må ha en insersjon. Ved hjelp av SDS PAGE,

Westernblotting og immunoblotting (se nedenfor) med monoklonale antistoffer mot de nye epitoper ble transformantene valgt for den riktige orientering av det innleirete oligonukleotid.

1.4.4. Transformasjon til E. coli K12 NM522

Transformasjon av plasmid DNA til E. coli ble utført ifølge [13]. For dette formål ble det anvendt en E. coli K12 NM522 som ble dyrket i Luriabuljongmedium (Trypton 10 g/l, gjærekstrakt 5 g/l, NaCl 10 g/l, pH 7,0) ved 37°C. Etter transformasjon ble E. coli platet ut på et fast næringsmedium som bestod av LB-medium med 1,5% (m/v) agar (Noble, Difco). For utvelgelse for ampicillinresistens ble 100 µg/ml ampicillin (Sigma) tilsatt til mediet, hvoretter vekst foregikk ved 30°C for å hindre satelittdannelse.

1.4.5. Plasmidisolering

Plasmidisolering fra E. coli ble utført ved den alkaliske lysismetode [13].

1.4.6. Agarosegel-elektroforese

Agarosegel-elektroforese ble utført ifølge [13]. For dette formål ble 1% (m/v) (Sigma nr. A-9539) for en normal gel og en 1,2% (m/v) lavtsmeltende agarose (Nusieve GTG, FMC Bioproducts) anvendt til en preperativ gel. TBE-buffer (RIVM) 1x konsentrert ble anvendt til buffer for disse geler: 0,089 M Tris, 0,089 M borsyre, 0,002 M EDTA (pH 8,3). Molekylvektmarkøren som ble anvendt her var lambda HindIII fordøyelsesprodukt (Boehringer Mannheim) med fragmentstørrelser på 125, 564, 2027, 2322, 4361, 6557, 9416 og 23130 bp. En 30 prosentig (m/v) sukroseløsning med 0,25% (m/v) bromfenolblått funksjonerte som buffer (5x).

Elektroforesen ble utført ved 10 V/cm. Etterpå ble disse farget med 0,5 µg/ml etidiumbromid og fotografert.

1.4.7. Transformasjon til meningokokker

En plate med meningokokker ble dyrket natten over med 5% CO_2 og fuktet vev ved 37°C. Cellene i den fullt dyrkete plate ble deretter resuspendert i 10 ml Müller-Hinton medium (RIVM) sammen med 10 mM $MgCl_2$ ved 37°C. Bakteriesuspensjonen ble deretter tynnet 1:5 i Muller-Hinton medium, hvoretter det ble tilsatt 1 µg/ml plasmid-DNA. Etter inkubering i 3 timer ved 37°C ble det utført 10^4 fortynning i steril PBS (med 0,01 M fosfatbufret fysiologisk salt, pH 7,2; RIVM), og utplating på en gonokokk-agarplate (* supplement 3) opptrådte. Etter dyrking natten over ble de riktige transformanter valgt ut ved hjelp av koloniblotting. Se nedenfor angående koloni-blotting.

1.4.8. Koloniblotting

Celler fra en fullstendig dekket meningokokkplate ble overført til en 0,45 µm mikrocellulosemembran (Schleicher & Schuell). Deretter ble bakteriecellene puttet i PBS (fosfatbufret, fysikalsk saltløsning, pH 7,2; RIVM) sammen med 0,1% "Tween" 80 (polyoksyetylen-sorbitan-monooleat, Merck) og inaktivert i 1 time ved 56°C. Deretter ble overskudd av celler tørket av, og avtrykket ble behandlet som under immunitetsblotting (se nedenfor).

1.4.9 SDS PAGE

SDS PAGE ble utført ifølge [8]. Gelen bestod av en 5 prosentig (m/vol.) akrylamidstablegel og en 11 prosentig (m/vol.) akrylamidoppløsningsgel. De anvendte referanse-proteiner (RIVM) hadde størrelser på 14, 20, 30, 43, 67 og 94 kD. Alle prøver for SDS PAGE besto av komplette celler.

Når det gjaldt E. coli celler ble disse dyrket natten over ved 37°C i LB-medium sammen med 100 µg/ml ampicillin, med og uten 1 mM IPTG (=isopropyl-B-D-tio-galaktopyranosid, Sigma). Deretter ble 1,5 ml av suspen-sjonen sentrifugert av. Pelleten ble suspendert i 70 µl H_2O hvortil det ble tilsatt 130 µl buffer (Tris/HCl, 0,625

M, pH 6,8; 10% SDS; 50% glyserol; 0,01% bromfenolblått; B-merkaptoetanol= 2:4:4:2:1) ble tilsatt. Blandingen ble deretter inkubert i 10 minutter ved 95°C.

Når det gjaldt meningokokkceller ble celler fra en fullstendig dyrket plate (o/n, med 5% CO_2 og fuktet vev ved 37°C) løst i 10 ml PBS (med 0,01 M fosfatbufret fysiologisk saltløsning, pH 7,2; RIVM), inaktivert i 30 minutter ved 56°C og avsentrifugert (10 min. ved 4000 omdr./min.). Pelleten ble suspendert i 500 µl H_2O. 170 µl buffer og 0-35 µl H_2O ble tilsatt til 35-70 µl bakteriesuspensjon, totalt volum 200 µl. Denne blanding ble varmet i 10 minutter ved 95°C og anbrakt på gel.

Den anvendte elektroforesebuffer bestod av 50 mM Tris/ HCl (pH 8,3), 380 mM glykokol og 0,1% SDS. Elektroforesen ble utført ved en konstant strømstyrke på 40 mA. Etter elektroforese ble gelene:

1. farget i 1 time ved 56°C med Coomassie brilliantblått (0,1% vekt/volum) i 10 volumprosentig eddiksyre og 30 volumprosentig metanol og avfarget i minst 1 time ved 56°C i en 10 volumprosentig eddiksyre-/5 volumprosentig metanolløsning,

2. eller blottet på en 0,2 µm nitrocellulosemembran (Schleicher & Schuell), se nedenfor under Westernblotting.

1.4.10 Westernblotting og immunoblotting

Proteinene som ble adskilt på SDS PAGE ble overført til en 0,2 µm nitrocellulosemembran (Schleicher & Schuell) ved hjelp av en Ancos Semi Dry Elektroblotter A i løpet av 1 time ved 0,8 mA/cm^2 gel, sammen 25 mM TRIS/HCl (pH 8,3), 192 mM glykokoll; 20% metanol og 0,0375% SDS som blottingsbuffer. Deretter ble avtrykket skylt i ett kvarter i PBS (fosfatbufret fysiologisk saltløsning, pH 7,2) sammen med 0,1% "Tween" 80 (Merck). Deretter ble avtrykkene skylt i en halv time i PBS, 0,1% "Tween" og 0,3% kasein (hydrolysat, N-Z-AmineA, ICN Biochemicals). Avtrykkene ble deretter inkubert i minst én time i PBS/ 0,1% "Tween"/0,3% kasein med det monoklonale antistoff mot

epitopen som skal påvises. Etter inkubering ble den skylt 3 x 10 minutter med PBS/0,1% "Tween" og deretter inkubert i en halv time med konjugat av protein A og peroksidase (tynnet 1:10.000) [9].

Etter skylling igjen i 3 x 10 minutter med PBS/0,1% "Tween" og én gang med H_2O ble følgende substrat/hydrogenperoksidblanding tilsatt: 30 ml substrat A (substrat A:fosfat/sitratbuffer, 0,02 M Na_2HPO_4 og 0,01 M sitronsyre 1:1, pH 5,0) sammen med 10 ml substrat B (substrat B: 24 mg tetrametylbenzidin og 80 mg DONS (dioktyl-sulfosuccinat) i 10 ml 96 prosentig etanol) og 20 µl 30 prosentig hydrogenperoksid (Merck). Etter noen få minutter ble grønne/blå bånd synlige på avtrykkene hvor antistoffer bindes til proteinene. Deretter ble avtrykkene skylt tre ganger med H_2O og fotografert.

1.4.11 Helcelle Elisa

En plate med meningokokker ble dyrket natten over med 5% CO_2 og fuktet vev ved 37°C. Cellene ble deretter resuspendert i 5 ml PBS (fosfatbufret fysikalsk saltløsning, pH 7,2; RIVM) og inaktivert i 30 minutter ved 56°C. Deretter ble suspensjonen tynnet til en OD_{620} på 0,1. Mikrotiterplater (Titertek PVC-mikroprøveplater, U-bunn) ble fylt med 100 µl suspensjon per brønn (belegg). Suspensjonen ble tørket natten over ved 27°C i 2 dager ved romtemperatur. Platene ble skylt tre ganger med PBS sammen med 0,1% "Tween" (Merck) kort tid før bruk. 100 µl løsning med den monoklonale antistoffortynning i PBS/0,1% "Tween"/0,5% "Protifar" (Nutricia) ble tilsatt per brønn og inkubert i 1 time ved 37°C. Platen ble skylt tre ganger med PBS/0,1% "Tween". Deretter ble brønnene fylt med 100 µl protein A peroksidasekonjugat (RIVM, 1:100.000 gangers fortynning) eller anti IgM* konjugat (RIVM, 1:2.000 ganger fortynnet i PBS/0,1% "Tween"/0,5% "Protifar") suspensjon per brønn og inkubert i 1 time ved 37°C. Etter skylling tre ganger med PBS/0,1% "Tween" ble det per brønn tilsatt 100 µl substrat C (substrat C: 1 ml tetrametylbenzidin (6

mg/ml 96 prosentig alkohol) og 22 µl 30 prosentig H_2O_2 (Merck) i 60 ml 0,11 M NaAc-buffer), hvoretter inkubering fant sted i 10 minutter. Reaksjonen ble stoppet ved blokkering med 100 µl 2M H_2SO_4 per brønn. Absorpsjonene ble avlest i en ELISA-leser (Biokinetics Reader EL312e fra Bio-Tek Instruments) ved 450 nm.

1.4.12 Isolering av yttermembranprotein

En plate med meningokokker ble dyrket natten over ved 37°C med 5% CO_2 og fuktig vev. Cellene ble deretter resuspendert i 5 ml flytende meningokokkmedium (RIVM) og fordelt i to kolber med 200 ml meningokokkmedium (RIVM). Disse kolber ble rystet nattenover ved 37°C. Cellene ble inaktivert i 30 minutter ved 56°C, hvoretter de ble sentrifugert ved 10.000 omdr./min. i 10 minutter (Beckman modell J-21B, rotor JA-14). Toppvæsken ble tømt ut, og 10 ml 0,01 M Tris/HCl, pH 8,0, ble tilsatt til hver pellet. Etter resuspendering av pelletene ble suspensjonene kombinert i ett 50 ml reagensrør. Reagensrøret ble anbrakt i is-vann og deretter underkastet 50 minutter ultralydvibrering (Branson Sonifier 250, stilling 4, 50%). Deretter ble det utført sentrifugering i 30 minutter ved 4.000 omdr./min (Heraeus Christ Minifuge GL med permanent rotor). Toppvæsken ble sentrifugert i 1 time ved 30.000 omdr./min. og 10°C (Sorvall ARC-1 ultrasentrifuge Oil Turbine Drive (OTD)-65, rotor 70 T_i). Deretter ble pelleten resuspendert i 4 ml 1% sarkosyl i Tris/HCl, pH 8,0, og sentrifugert i 15 minutter ved 5.000 omdr./min. (Heraeus minifuge). Toppvæsken ble sentrifugert i 1 time ved 30.000 omdr./min. og 10°C (Sorvall ultrasentrifuge, rotor T865.1). Etter at toppvæsken var helt av ble pelleten løst i 2 ml 0,01 M Tris/HCl, pH 8,0. Deretter ble utbyttet undersøkt ved bestemmelse av proteininnholdet (med BCA*-proteinprøvereagens fra Pierce, protokoll ifølge produsenten). Deretter ble yttermembranproteinene brakt på et proteininnhold av 1 mg/ml i Tris/buffer og 50 µl ble fylt i hvert reagensrør. Renheten ble bestemt ved hjelp av en 11

prosentig SDS-PAA-gel og en ELISA.

1.5 Resultater

1.5.1 Kontroll av pPH204 ved transformasjon til meningokokker

For å undersøke om plasmidet pPH204 ble værende intakt ble dette plasmid transformert til meningokokkstamme H44/76 B^-. Her ble P1.2 epitopen av plasmid pPH204 skiftet ut med P1.16 epitopen av stamme H44/76. Valg av de riktige transformanter foregikk ved hjelp av koloni- og immunoblotting, hvorved $P1.2^+$-kolonier ble isolert. Koloniene frembrakte stammen J072 etter kontroll ved hjelp av SDS-PAGE, Western immunoblotting (se fig. 5 og 6, 7, 8 og 9). Denne stamme har P1.7 epitopen i loop 1 og P1.2 i loop 4.

1.5.2 Insersjon av P1.7 oligonukleotid i KpnI-setet av pPH204

Oligonukleotidet for P1.7 epitopen ble anbrakt i KpnI-setet av pPH204, hvoretter den resulterende konstrukt pJP007 ble transformert til E. coli K12 NM522. Plasmid ble isolert fra de resulterende kolonier. Det isolerte plasmidmateriale ble undersøkt angående forsvinning av KpnI-restriksjonssetet og nærværet av det nye SpeI-restriksjonssetet, se fig. 10. I alle de undersøkte transformanter var KpnI-restriksjonssetet forsvunnet, og det nye SpeI-restriksjonssetet var tilstede. Transformantene ble anbrakt på SDS-PAGE. Etter Western immunoblotting med monoklonale antistoffer rettet mot P1.7 epitopen ble det valgt 3 transformanter som omfattet oligonukleotidet med den riktige orientering, se fig. 11 og 12, 13, 14 og 15.

1.5.3 Insersjon av P1.16 oligonukleotid i KpnI-setet av pPH204

Oligonukleotidet for P1.16 epitopen ble anbrakt i KpnI-setet av pPH204 (konstruksjon pJB016) og deretter transformert. Plasmider av transformanter ble undersøkt angående forsvinning av KpnI-sete og det nye SnaBI-sete, se fig. 10. 3 transformanter med P1.16 epitopen med den riktige orientering ble valgt ved Western immunoblotting, se fig. 11 og 12, 13, 14 og 15.

1.5.4 Insersjon av P1.16 oligonukleotid i SpeI-setet av pJB007

Oligonukleotidet for P1.16 epitopen ble anbrakt i SpeI-setet av PJB007 (konstrukt pJB716) og transformert. Plasmider av transformanter ble undersøkt angående forsvinning av SpeI-setet, se fig. 10. 1 transformant med oligonukleotidet med riktig orientering ble valgt ved Western immunoblotting, se fig. 11 og 12, 13, 14 og 15.

1.5.5 Insersjon av P1.16 oligonukleotid i KpnI-setet av 2-2ΔSE

Oligonukleotidet for P1.16 epitopen ble anbrakt i KpnI-setet av plasmid 2-2ΔSE (konstrukt pPH016) og transformert. Plasmider av transformanter ble undersøkt angående riktig innleiring i oligonukleotidet (data ikke inkludert) [17].

1.5.6 Transformasjon av konstruktene til meningokokker

Deretter ble de fire konstrukter pJB007, pJB016, pJB716 og pPH016 transformert til meningokokkstamme $A806^{t}$ B^{-} (P1.5.2). Utvelgelse av de riktige transformanter foregikk ved hjelp av koloni- og immunoblotting, hvorved $P1.7^{+}$- og $P1.16^{+}$-kolonier ble isolert. Dette resulterte etter sjekking i stammene i tabell D, se også fig. 5 og 6, 7, 8 og 9.

TABELL D: Konstruerte meningokokkstammer

Meningokokk-stamme	i loop 1	i loop 4	i loop 5	i loop 6
J007	P1.5	P1.2		P1.7
J016	P1.5	P1.2		P1.16
J716	P1.5	P1.2		P1.7.16
J072	P1.7	P1.2		
P016	P1.5	P1.2	P1.16	

1.5.7 Helcelle-ELISA

Ekspresjonen av de innleirete epitoper i de nye stammer ble iakttatt og sammenlignet med moderstammene A8-6^{t} (P1.5.2) og H44/76 (P1.7.16), se fig. 16 og tabell D.

1.6. Konklusjon og diskusjon

I denne serie av tester ble det fremstilt 4 nye meningokokkstammer med ekstra epitoper til loopene 5 og 6. Stammene J007 og J016 inneholder henholdsvis epitopene 1.7 og P1.16 i loop 6, mens J716 bærer både epitopene P1.7 og P1.16. Stamme P016 inneholder utelukkende epitopen P1.16 i loop 5. Utført helcelle-ELISA viser at de monoklonale antistoffer rettet mot de innleirete epitoper binder seg fra godt til noenlunde godt til helcellene sammenlignet med morstammene H44/76 og A8-6'. ELISA viser at de nye yttermembranproteiner av klasse I kan transporteres fullstendig intakt til yttermembranen, ellers ville det ikke ha funnet sted noen binding til de monoklonale antistoffer. Når stamme H44/76 sammenlignes med de fire stammer med ekstra epitoper i loopene 5 og 6, synes epitopen P1.7 å binde seg like godt i alle tilfeller. Det spiller ingen rolle om P1.7 epitopen er lokalisert i loop 1, 5 eller 6.

1.7. Litteratur til eksempel I

[1] A.K. Barlow, J.B. Heckels og I.N. Clarke, The class 1 outer membrane protein of Neisseria meningitidis: gene sequence and structural immunological similarities to gonococcal porins, Molecular Biology, Vol 3(2), 1989, p 131-139.

[2] E.F. Frasch, W.D. Zollinger og J.T. Poolman, Serotyping antigens of Neisseria meningitidis and a proposed scheme for designation of serotypes, Reviews of infectious diseases, Vol 7, nr. 4, juli-august 1985, p 504-510.

[3] E.C. Gotschlich, Meningococcal meningitis. In: Bacterial Vaccins (Ed. R. Germanier), Acedemice Press; Inc. 1984, kapittel 8, p 237-255.

[4] M.C.J. Maiden, J. Suker, A.J. McKenna, J.A. Bygraves og I.M. Feavers, Comparison of the class 1 outer membrane proteins of eight serological reference strains of Neisseria meningitis, Molecular Microbiology, Vol 5(3), 1991, p 727-736.

[5] K.P. Klugman, E.C. Gotschlich og M.S. Blake, Sequence of the structural gene (rpmM) for the class 4 outer membrane protein of Neisseria menigitidis, homology of the protein to gonococcal protein III and Escherichia coli Omp A and construction of meningococcal strains that lack class 4 protein. Infection and Immunity, juli 1989, p 2066-2071.

[6] P. van der Ley, J.E. Heckels, M. Virji, P. Hoogerhout og J.T. Poolman, Topology of outer membrane porins in pathogenic Neisseria, in press.

[7] M.R. Lifely, C. Moreno og J.C. Lindon, An integrated molecular and immunological approach toward a meningococcal group B vaccine. Vaccine, Vol 5, mars 1987, p 11-26.

[8] B. Lugtenberg, J. Meijers, R. Peters, P van de Hoek, L. van Alphen, Electrophoretic resolution of the major outer membrane protein of Escherichia coli K12 into four bounds, FEBS letters, Vol 58, nr. 1, 1975, p 254-258.

[9] P.K. Nakane, A. Kawaoi, Perosidase-labeled antibody. A new method of conjugation, J. Histochem. and Cytochem. nr. 22, 1974, p 1084-1091.

[10] E.W. Nester, C. Roberts Evans, N.N. Pearsall og B.J. McCarthy, Microbiology, 2. utgave, Eastbourne, Sussex, Holt Rinehart and Winston, 1978, p 433, 443, 474, 540-543 og 591.

[11] H. Peltola, A. Safary, H. Käythy, V. Karanko og F.E. André, Evaluation of two tetravalent (ACYW-135) meningococcal vaccins in infants and small children: a clinical study comparing immunogenity of O-acetyl-negative and O-acetyl-positive group C polysaccharides.

[12] J.T. Poolman, S. Marie og H.C. Zanen, Variability of low molecular weight, heat modifiable outer membrane proteins of Neisseria Meningitidis, Infection and Immunity, des. 1980, p 642-648.

[13] J. Sambrook, E.F. Fritsch og T. Maniatis, Molecular cloning: a laboratory manual, 2. utgave, 1989, Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour, N.Y., p 1.25-1.28, 1.82-1.84, 6.3-6.16 og 6.18-6,19.

[14] K. Saukonen, M. Lainonen, H. Abdillahi og J.T. Poolman, Comparative evaluation of potentional components for group B meningococcal vaccin by passive protection in the infant rat and in vitro bacterial assay, Vaccin, Vol 7, august 1989, p 325-328.

[15] J. Tomassen, P. Vermeij, M. Struyvé, R. Benz og J.T. Poolman, Isolation of Neisseria meningitidis mutants deficient in class 1 (PorA) and class 3 (PorB) outer membrane proteins, Infection and Immunity, mai 1990, p 1355-1359.

[16] C.M. Tsai, C.E. Frasch og L.F. Mocca, Five structural classes of major outer membrane proteins in Neisseria meningitidis, J. Bacteriol, 1981, nr. 146, p 69-78.

[17] P. van der Ley, personlig informasjon.

EKSEMPEL II

Oppsummering:

I dette eksempel beskrives dannelse av et mutert yttermembranprotein. Dette yttermembranprotein gir en mulighet til å kople yttermembranproteinet av klasse I til lipopolysakkaridets oligosakkariddel. Av denne årsak innleires det et oligonukleotid som koder for et cystein i et eksisterende restriksjonssete av genet med protein av klasse I. Dette oligo transformeres deretter til en kapselmanglende mutant av meningokokkstamme H44/76, H44/76-B$^-$. Etter transformasjonen synes ikke cysteininnleiring å ha noen innvirkning på epitopekspresjon eller på produksjon av yttermembranproteinet av klasse I.

Valget av loopene 5 og 6 ble bestemt av det faktum at de ikke inneholder noen viktige epitoper av klasse I, og av bibeholdet av immunitetsaktivitet belyst i eksempel

I etter frembringelse av mutasjoner i disse looper. Sjekking av resultatene av innleiring foregikk på basis av epitopekspresjon av de resulterende transformanter.

2.1 Materiale:

Det anvendte plasmid:

Det anvendte plasmid, pPH204 er avledet fra plasmidet pTZ19R fra Pharmacia.

Oversikt over dannelsen av de anvendte plasmider

pTZ19R

1,9 kb del av proteinet av klasse I anbrakt i Eco R1-setet. Basene mellom Eco R1 og Sal 1 var fjernet.

p2.2ΔS-E

Kpn 1 sete i loop 5 av klasse I omdannet til et Bam H1 sete. Ny Kpn I dannet i loop 5.

pPH204

Oligo som kodet for cysteinrest ligert i KpnI-setet i loop 6, nytt PstI sete dannet , gammelt KpnI sete forsvunnet.

pPH204-S

Anvendte enzymer:

- KpnI (vol. act.: 10 U/µl): med inkuberingsbuffer L
- PstI (vol. act.: 10 U/µl): med inkuberingsbuffer H
- T4 DNA ligase (Vol, act.: 1 U/µl), med T4 DNA ligasebuffer

Sammensetningen av den tilsvarende inkuberingsbuffer, se tabell E.

TABELL E: Sammensetning av anvendte buffere

Buffer-bestanddeler i mmol/l	H	L	T4 DNA ligase
Tris-HCl	50	10	66
$MgCl_2$	10	10	5
NaCl	100		
Ditioerytritol	1	1	5
ATP			1
pH ved 37°C	7,5	7,5	7,5

Både enzymene og bufferne er levert av Boehringer, Mannheim.

Anvendte bakterier:

Escherichia coli K12 NM522: denne stamme inneholder ikke et restriksjons-modifikasjonssystem.

Meningokokkstamme: H44/76-B^-. Denne er en mutant av H44/76 og mangler en kapsel.

Anvendte monoklonale antistoffer: Se tabell F

TABELL F: Anvendte monoklonale antistoffer.

Monoklonale antistoffer	Rettet mot
MN16C13F4	P1.2
MN14C11.6	P1.7
MN5C11G	P1.16

Alle anvendte monoklonale antistoffer er levert av RIVM.

Anvendt membran:

For Western-blotting:

BIO RAD Trans Blot transfermedium, ren nitrocellulosemembran.
Blottingfilterpapir 0,45 µm.
Lot.nr.: 4072/87020.
Katalognr. 162-0113.

For koloniblotting:

SCHLEICHER & SCHUELL BA 85/22, 0,45 µm.
Diameter: 82 mm.
Referansenr.: 406 216.

2.2 Metoder

2.2.1 Hybridisering av oligonukleotider

De komplementære, ikke-fosforylerte oligonukleotider (oligoer) (se nedenfor) ble tilsatt i en konsentrasjon på 1 µg/100 ml hver og oppvarmet til 95°C. Etter oppvarming fikk blandingen kjølne langsomt ned til romtemperatur. På grunn av at kjølingen foregår langsomt kan hybridisering av de komplementære oligonukleotider foregå [5]. På denne måte dannes det oligoer med de riktige klebrige ender, dvs. KpnI klebrige ender.

Informasjon om C1-C2-oligonukleotid

Oligonukleotid som koder for cystein med KpnI klebrige ender (sekvens id 10):

		Gly	Cys	Ser	Leu	Ser	
5'-	G	GGC	TGC	AGC	CTA	AGT	AC-3'
3'-CATG	C	CCG	ACG	TCG	GAT	T	-5'
		Ala	Ala	Ala	End		

Restriksjonssete for KpnI: 5'-GGTACC-3'
3'-CCATGG-5'

Restriksjonssete for PstI: 5'-CTGCAG-3'
3'-GACGTC-5'

Oligotidet består av to enkelttrådete oligonukleotider.

Oligo C1 (sekvens id 11): 5'-GGG CTG CAG CCT AAG TAC-3'
Oligo C2 (sekvens id 12): 5'-TTA GGC TGC AGC CCG TAC-3'

2.2.2 Ligering av hybridiserte oligonukleotider i plasmider:

Plasmidene ble spaltet ved hjelp av det korrekte enzym og deretter separert på en 1,2% lavtsmeltende gel fra plasmidene som ikke var kuttet. Deretter ble gelen farget med etidiumbromid, og de kuttede plasmider ble kuttet ut av gelen, hvoretter det kuttede plasmid-DNA ble isolert fra agarosegelen igjen ved fenolekstraksjon og utfelling med etanol [8].

Halvparten av de isolerte plasmider ble anvendt til ligering av oligoene. Ligeringsblandingen var sammensatt som følger: 50 µl kuttet plasmid-DNA, 20 µl hybridisert oligoblanding, 10 µl ligeringsbuffer, 4 µl T_4 ligase, 16 µl dH_2O. Etter inkubering av ligeringsblandingen natten over (o/n) ved 16°C ble blandingen konsentrert ved utfelling med etanol. Deretter ble ligeringsproduktene separert på en 1,2% lavtsmeltende gel, og ligeringsproduktene ble kuttet ut, hvoretter de ble isolert fra gelen ved fenolekstraksjon og utfelling med etanol.

2.2.3 Smelting av overskudd av oligo

Etter isolering av ligeringsproduktene fra gelen ble disse oppvarmet til 65°C slik at overskuddet av oligo ble

smeltet. Ved langsom avkjøling av blandingen igjen kunne det foregå hybridisering mellom de komplementære deler av oligoen ligert til plasmidet.

2.2.4 Fjerning av selvlukkende plasmider

Løsningene ble deretter kuttet med det originale restriksjonsenzym for at de selvlukkende plasmider skulle bli åpnet igjen. Denne etterkutting kunne foregå på grunn av at innleiringen av oligoen hadde forandret det opprinnelige restriksjonssete til et annet restriksjonssete.

Etter kutting ble det dannet lineære plasmider uten oligo og sirkulære plasmider med et innleiret oligonukleotid. Idet bare sirkulær plasmid-DNA kan tas inn av E. coli kan det i prinsippet bare oppstå transformanter som inneholder oligoen.

2.2.5 Transformasjon til E. coli

Transformasjonsprosess se [8].

Etter transformasjon ble transformantene platet ut på Luria Broth (L.B.) næringsmedium som var tilsatt 100 µg/ml ampicillin. Platene ble inkubert natten over ved 37°C, hvoretter transformantene fra eneste kolonier ble platet ut på L.B. næringsmedium med ampicillin og inkubert igjen natten over, hvoretter eneste kolonier ble overført til flytende L.B. medium sammen med ampicillin, og denne blanding ble inkubert natten over ved 37°C mens den ble rystet og ble anvendt til plasmidisolering (se nedenfor).

2.2.6 Plasmidisolering

Plasmidisolering fra transformantene ble utført ved den alkaliske lysismetode [8].

2.2.7 Kutting av de rekombinante plasmider

For å undersøke om oligonukleotidene var tilstede i plasmidene ble det utført en kutting med restriksjonsenzymet som koder for det nye restriksjonssete. En kutting ble også utført med restriksjonsenzymet som koder for

restriksjonssetet som skulle ha forsvunnet, slik at det kunne bestemmes på basis av restriksjonsmønsteret på en agarosegel om det gamle restriksjonssete hadde forsvunnet og at det nye sete faktisk var tilstede. Proteinsammensetningen til de positive tranformanter ble undersøkt med natriumdodecylsulfat-polyakrylamidgelelektroforese (SDS PAAGE).

2.2.8 SDS PAAGE

SDS PAAGE ble utført ifølge protokollen [8]. En 11 prosentig akrylamidgel ble anvendt som separeringsgel mens en 5 prosentig akrylamidgel ble anvendt som konsentreringsgel.

Prosess med E. coli

De positive transformanter ble dyrket for elektroforese natten over i flytende L.B. medium sammen med (100 µg/ml) ampicillin, både med og uten (1 mM) IPTG (isopropyl-8-D-tiogalaktopyranosid fra Sigma). 1,5 ml av kulturen etter natten over ble avsentrifugert, hvoretter pelletten ble resuspendert i 40 µl dH_2O hvortil det ble tilsatt 10 µl buffer (250 mM Tris-HCl, pH 6,8; 10% SDS, 10% ditiotreitol, 50% glyserol; 0,05% bromfenolblått), hvoretter suspensjonen ble varmet i 10 minutter ved 95°C og anbrakt på gel.

Prosess med meningokokker

For meningokokkene ble cellene, dyrket natten over i en fuktig atmosfære sammen med 5% CO_2 på en meningokokkplate anriket med isovitaleks, suspendert i 10 ml PBS (0,01M fosfatbufret fysiologisk saltløsning, pH 7,2, RIVM). Den oppnådde suspensjon ble deretter varmet i 30 minutter ved 56°C for at meningokokkene skulle inaktiveres, hvoretter suspensjonen ble avsentrifugert (10 minutter ved 4.000 omdr./min.). Pelletten ble suspendert i 40 µl dH_2O, og 10 µl buffer ble igjen tilsatt, hvoretter suspensjonen ble varmet i 10 minutter og anbrakt på gel.

Den anvendte elektroforesebuffer hadde følgende sammensetning: 50 mM Tris/HCl (pH 8,3), 380 mM glykokoll og 0,1% SDS. Elektroforesen ble utført ved 20mA per gel.

Etter elektroforesen ble gelen:

1) farget med Coomassie brilliantblått (1 time ved 56°C) og deretter farget med 10 vol% HAc/5 vol% metanol (3 ganger 30 minutter ved 56°C), og

2) blottet på en 0,45 µm nitrocellulosemembran (Biorad).

2.2.9 Western- eller immunoblotting

Ved hjelp av en Ancos Semi Dry Electroblotter A ble proteinene fra SDS-PAA-gelen blottet over på en 0,45 µm nitrocellulosemembran (Biorad). Proteintransporten fra gelen til membranen foregikk ved blotting i 1 time ved 0,8 mA/cm^2 gel, hvorved 25 mM Tris-HCl (pH 8,3), 192 mM glykokoll, 20% metanol og 0,0375% SDS ble anvendt som blottingsbuffer.

Etter blotting ble avtrykket skylt i ett kvarter i PBS sammen med 0,1% "Tween" 80 (polyoksyetylensorbitan-monooleat fra Merck). Deretter ble avtrykket skylt i en halv time med PBS tilsatt 0,1% "Tween" 80 og 0,3% kasein-hydrolysat (N-Z Amine A, ICN Biochemicals), hvoretter inkubering foregikk i 1 time med monoklonale antistoffer løst i PBS/0,1% "Tween" 80/0,3% kasein mot epitopen som skulle påvises. Deretter ble avtrykket skylt 3 ganger a 10 minutter med PBS/0,1% "Tween" 80, hvoretter det ble inkubert i en halv time med protein A peroksidasekonjugat tynnet 1:10.000 med PBS/0,1% "Tween" 80/0,3% kasein. Deretter ble det igjen foretatt skylling 3 ganger a 10 minutter med PBS/0,1% "Tween" 80 og 1 gang med dH_2O, hvoretter hydrogenperoksidsubstratblanding (20 µl 30 prosentig hydrogenperoksid fra Merck; 30 ml substrat A:fosfat/sitratbuffer; 0,02 M Na_2HPO_4 og 0,01M sitronsyre (1:1), pH=5,0; 10 ml substrat B:80 mg dioktyl-sulfosuccinat (DONS); 24 mg tetrametylbenzidin (TMB) i 10 ml 96 prosentig etanol) ble tilsatt.

Etter atskillige minutter ble blå bånd synlige i den posisjon hvor de monoklonale antistoffer hadde bundet seg til de korresponderende proteiner. Deretter ble avtrykkene skylt ytterligere 3 ganger med vann, hvoretter de ble fotografert eller holdt oppbevart i mørket inntil de ble fotografert.

2.2.10 Transformasjon til meningokokker

Meningokokker ble dyrket natten over på GC-agar (Difco) anriket med isovitaleks ved 37°C i en fuktig atmosfære med 5% CO_2 (3). Cellene i den fullstendig dekkete plate ble resuspendert i 10 ml Müller Hinton medium (RIVM) med 10 mM $MgCl_2$ ved 37°C. Deretter ble suspensjonen tynnet 1:5 i Müller Hinton medium med 10 mM $MgCl_2$, og 1 µg/ml plasmid-DNA ble tilsatt. Deretter foregikk inkubering i 3 timer ved 37°C, hvoretter bakteriesuspensjonen ble tynnet 10^4 ganger med steril PBS og platet ut på en GC-plate. Etter dyrking natten over ble de riktige transformanter valgt ved hjelp av koloniblotting.

2.2.11 Koloniblotting

Koloniene på en plate som var dekket natten over ved 37°C i en fuktig atmosfære med 5% CO_2 ble blottet over på en 0,45 µm nitrocellulosemembran (Schleicher & Schuell). Deretter ble avtrykket varmet i 30 minutter i PBS/0,1% "Tween" 80 ved 56°C for at meningokokkene skulle bli inaktivert. Etter varming ble overskuddet av bakterier tørket av. For videre prosess se under Western- eller immunoblotting.

2.2.12 Isolering av yttermembranprotein

En plate med meningokokker ble dyrket natten over ved 37°C i en fuktig atmosfære med 5% CO_2, hvoretter cellene ble resuspendert i 5 ml meningokokkmedium. 200 ml meningokokkmedium ble ympet med 2,5 ml av blandingen. Disse 200 ml ble aktivert natten over ved 37°C, hvoretter meningokokkene ble inaktivert ved inkubering i en halv

time ved 56°C. Deretter ble meningokokkene pellettert ved sentrifugering av mediet i 10 minutter ved 10.000 omdr./min. (sentrifuge: centrikon T-324, rotor A6.9). Supernatanten ble helt av, og pelletten ble resuspendert i 10 ml 0,1M Tris/HCl, pH 8,0. Deretter ble denne løsning ultralydvibrert i 15 minutter (Branson Sonifier 250, stilling 4, 50%), hvorved løsningen var anbrakt i et isbad. Deretter ble den ultralydbehandlete løsning sentrifugert 10 minutter ved 5.000 omdr./min. (sentrifuge: centrikon T-324, rotor A8.20). Supernatanten ble deretter sentrifugert i 1 time ved 20.000 omdr./min. og 10°C (sentrifuge: centrikon T-324, rotor A8.20). Pelletten som derved ble dannet ble resuspendert i 4 ml sarkosyl i 0,01M Tris/HCl, pH 8,0, hvoretter sentrifugering foregikk i 5 minutter ved 5.000 omdr./min. Supernatanten ble deretter sentrifugert i 1 time ved 20.000 omdr./min. ved 10°C (sentrifuge: centrikon T-324, rotor A8.20). Pelletten som derved ble dannet ble resuspendert i 1 ml 0,1M Tris/HCl, pH 8,0. Utbyttet ble bestemt ved hjelp av Microassay Procedure (BIORAD). Yttermembranproteinets renhet ble undersøkt ved hjelp av SDS PAAGE.

2.2.13 Undersøkelse av transformant ved hjelp av polymerasekjedereaksjon

Dag 1:

Meningokokkene som det skulle utføres PCR med ble ympet fra en GC-plate anriket med isovitaleks og dyrket natten over i en fuktig atmosfære med 5% CO_2 ved 37°C.

Dag 2:

Det ble fremstilt en cellesuspensjon av hver av stammene som skulle underkastes PCR ved å resuspendere en liten flokk bakterier i 1 ml sterilt, destillert vann og deretter varming av denne suspensjon i 10 minutter ved

95°C. Den resulterende løsning ble deretter sentrifugert i kort tid og oppbevart på is. Reaksjonsblandingen hadde følgende sammensetning:

- 10 µl buffer (500 mM KCl, 100 mM Tris/HCl, pH 8,3, 15 mM $MgCl_2$, 0,1% (vekt/vol) gelatin),
- 200 µM av hver av dNPTene
- 100 mg av hver av primerne
- 25 µl cellesuspensjon
- oppfylt til 100 µl med sterilt, destillert vann
- 100 µl mineralolje.

PCR-betingelsene var følgende: Se tabell G.

TABELL G: PCR-betingelser

Antall sykluser	min. 95°C	min. 55°C	min. 72°C
1	5	1	2
2-30 inkl.	1	1	2

Etter den 30. syklus ble prøvene oppbevart i ytterligere 8 minutter ved 72°C for å gjøre all DNA som forelå i prøvene dobbelt-trådet.

Etter PCR ble prøvene underkastet en fenolekstraksjon og en etanolutfelling for å oppnå den fremstilte DNA i ren form.

Dag 3:

10% av den rensede DNA ble elektroforesebehandlet på en 1% agarosegel for å iaktta resultatet. Av dette skulle det fremgå om det innleirete nukleotid var tilstede i DNA.

2.2. Resultater

2.2.1 Transformasjon av de rekombinante plasmider til E. coli

Det hybridiserte oligonukleotid ble ligert i pPH204 kuttet med KpnI, hvoretter det hele ble transformert til E. coli K12 NM522. Plasmidene ble isolert fra de resulterende transformanter. De isolerte plasmider ble kuttet med KpnI og PstI og deretter elektroforesebehandlet på en 0,8% agarosegel, se fig. 16.

TABELL H: Ytterligere belysning av fig. 16

Bane nummer	Prøvebeskrivelse	Anmerkning
1,6,11,21,26	Rekombinant plasmid DNA	Ukuttet
2,4,7,9,12,14,17, 19,22,24,27	Spaltingsprodukt fra rekombinant plasmid DNA KpnI	KpnI-sete skulle ha forsvunnet
3,5,8,10,13,15, 18,20,23,25,28	Spaltingsprodukt fra rekombinant plasmid DNA PstI	Innleiring av oligoen resulterte i et andre PstI-sete, nå skjæres et fragment ut av plasmidet
16	Lambda-markør	HindII-spaltingsprodukt

Av dannelsen av et fragment med ca. 6.000 basepar fra PstI-spaltingsproduktet og forsvinningen av KpnI-setet er det klart at oligoen er blitt innleiret i pPH204.

Transformantene ble deretter dyrket natten over ved 37°C i et væskeformet L.B. medium med 1 mM IPTG og 100 µg/ml ampicillin. Bakterieproteinene ble deretter adskilt ved hjelp av SDS PAAGE, hvoretter immunoblotting ble benyttet for å se om oligoen var blitt innleiret med den

riktige orientering. Ved å anvende blotting ble størrelsen på proteinet av klasse I iakttatt ved å vise epitopen P1.2 med det monoklonale antistoff MN16C13F4, se fig. 18 og 19.

Transformantene i banene 1, 3, 5, 7, 9 og 11 viser et proteinbånd som hadde beveget seg mindre enn båndene for transformantene i de øvrig baner. Dette indikerer at det dannete protein er større enn i transformantene i banene 2, 4, 6, 8 og 10. Transformantene i oddetalsbanene omfatter oligonukleotidet med den riktige orientering, og de med liketallsbanene med ukorrekt orientering, hvorved det dannes et stoppkodon som resulterer i et mindre protein.

2.3. Transformasjon til H44/76 B$^-$

Plasmidene til de positive transformanter ble deretter transformert til H44/76 B$^-$, en mutant av H44/76 uten kapsel. Transformantene ble valgt ved koloniblotting for P1.2 epitopen med det monoklonale antistoff MN16C13F4. De rene transformanters yttermembranproteiner ble isolert. Renheten ble undersøkt ved hjelp av SDS PAAGE og immunoblotting, se fig. 20 og 21. Det ble også undersøkt om forholdet mellom proteinet av klasse I og de øvrige proteiner hadde forandret seg med transformantene. Dette syntes ikke å være tilfelle (resultater ikke angitt).

Deretter ble det undersøkt om epitopen P1.16 hadde forsvunnet fra transformantene. Som en test ble de monoklonale antistoffer mot epitopene P1.2 og P1.7 inkludert samt stamme H44/76 B$^-$ som teststamme, fig. 22.

Av figuren fremgår det at det monoklonale antistoff MN5C11G rettet mot epitopen P1.16 bare reagerer med morstammen. Det monoklonale antisoff MN14C11.6 rettet mot epitopen P1.7 reagerer både med morstammen og transformantene. MN16C13F4 rettet mot epitopen P1.2 reagerer bare med transformantene.

2.4. Konklusjon

Den suksessrike innføring av en cysteinrest i klasse I protein av H44/76-B$^-$ fremgår av følgende resultater:

1) ved innleiring av oligonukleotidet er KpnI-setet forsvunnet, og det er dannet et nytt PstI-sete,

2) etter transformasjon til H44/76-B$^-$ har dette forandret seg fra P1.7.16 til P1.7.2, som er en indikasjon på det faktum at genet som koder for klasse I protein som foreligger i plasmid pPH204 i hvilket gen oligoen var innleiret er blitt innført i meningokokken. Cysteininnleiring synes ikke å ha noen innvirkning på dannelsen av proteinet av klasse I utfra mengden som dannes av meningokokken. Epitopekspresjonen av bakterien synes også å bli værende normal.

2.5 Litteraturliste for eksempel 2

1 C.E. Frasch, Role of protein serotype antigens in protection against disease due to Neisseria meningitidis, J. Infect.Dis., 136 (suppl.), 1977, p 84-90.

2 C.E. Frasch, W.D. Zollinger og J.T. Poolman, Serotype antigens of Neisseria meningitidis and a proposed scheme for designation of serotypes, Rev. Infect.Dis., Vol 7, 1985, p 504-510.

3 J.M. Griffiss, B.L. Brandt, D.D. Broud, D.K. Goroff og C.J. Baker, Immune response in infant children to disseminated infections with Neisseria meningitidis, J. Infect. Dis., Vol 150, 1984, p 71-79.

4 J.J. Kim, R.E. Mandrell, H. Zhen, M.A.J. Westernik, J.T. Poolman og J.M. Griffiss, Electromorphic characterization and description of conserved

epitopes of the lipooligosaccharides of group A Neisseria meningitidis. Infect.Immun., Vol 56, 1988, p 2631-2638.

4A K.P. Klugman, E.C. Gotschlich og M.S. Blake, Sequence of the structural Gene (rmpM) for the class 4 outer Membrane Protein of Neisseria meningitidis, Homology of the protein to Gonococcal Protein III and Escherichia coli OmpA and Construction of meningococcal strains that lack Class 4 protein, Infect. and Immun., juli 1989, p 2066-2071.

5 P. van der Ley, personlig informasjon.

5A M.C.J. Maiden, J. Suker, A.J. McKenna, J.A. Bygraves og I.M. Feavers, Comparison of the Class 1 outer membrane proteins of eight serological reference strains of Neisseria meningitidis, Molec. Microbiol., Vol 5:3, 1991, p 727-736.

6 J.T. Poolman, Polysaccharides and Membrane vaccines, Bacterial Vaccines, 1990, p 57-86 (70).

7 J.T. Poolman, C.T.P. Hopman og H.C. Zahnen, Problems in the definition of meningococcal serotypes, FEMS Microbiol. Lett, Vol 13, 1982, p 339-348.

8 Sambrook, Fritsch, Maniatis, Molecular Cloning, a laboratorium manual, andre utgave, Cold Spring Harbour Laboratory, N.Y. P1.25-1.28, P1.82-P1.85, P.6.3-6.16, P.6.18-6.19, P18.47-18.55.

9 K. Saukonen, M. Leinonen. H. Abdillahi og J.T. Poolman, 1989, Comparative evaluation of components for group B meningococcal vaccine by passive protection in the infant rat and in vitro bactericidal assay, Vaccine, Vol 7, 1989, p 325-328.

10 C.M. Tsai, C.E. Frasch og L.F. Mocca, Five structural classes of major outer membrane proteins in Neisseria meningitidis, J. Bacteriol, Vol 146, 1981, p 69-78.

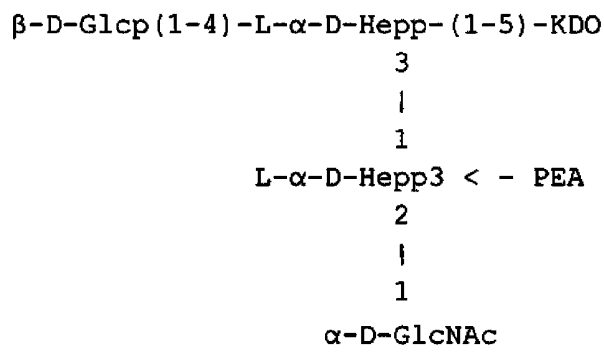
11 N.A. Vedros, Development of meningococcal serogroeps. p 33-38, N.A. Vedros (ed.), Evolution of meningococcal disease, Vol 2, 1987, p 33-38, CrC Press Inc., Boca Raton, FL.

12 W.D. Zollinger og R.E. Mandrell, Outer membrane protein and lipopolysaccharide serotyping of Neisseria meningitidis by inhibition of a solid phase radio-immunoassay, Infect. Immun., Vol 18, 1977, p 424-433.

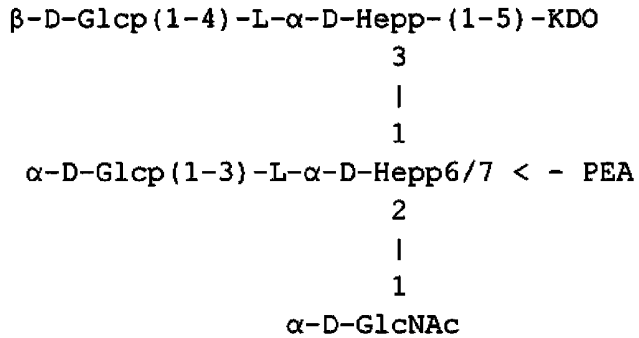
P A T E N T K R A V.

1. Immunitetsbevirkende, B-celleaktiverende molekyl avledet fra et meningokokklipopolysakkarid (LPS) med minst én epitop, k a r a k t e r i s e r t v e d at molekylet omfatter i det minste den felles del av oligosakkariddelen (kjerneregion) av lipopolysakkarider som er spesifikke for minst to meningokokk-immunitetstyper L2 og L3, og at galaktose er fraværende i den B-celleaktiverende del, samt derivater av molekylet som har immunitetsreaksjonsbevirkende kapasitet og mangler galactose i den B-celleaktiverende del.

2. Molekyl i samsvar med krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at det er avledet fra L3-kjernen og har følgende struktur:



3. Molekyl i samsvar med krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at det er avledet fra L2-kjernen og har følgende struktur:



4. Fremgangsmåte til fremstilling av et molekyl ifølge et av de foregående krav, k a r a k t e r i s e r t v e d at det anvendes rekombinant DNA-teknikk.

5. Fremgangsmåte til fremstilling av et molekyl ifølge et av kravene 1-3, k a r a k t e r i s e r t v e d at molekylet oppnås fra en mutagenisert eller utvalgt produksjonsstamme som produserer i det minste LPS uten galaktose.

6. Fremgangsmåte i samsvar med krav 5, k a r a k - t e r i s e r t v e d at det som produksjonsstamme anvendes en meningokokkstamme som ikke produserer galaktose.

7. Fremgangsmåte i samsvar med krav 5 eller 6, k a r a k t e r i s e r t v e d at det som produksjonsstamme anvendes en meningokokkstamme som har en mutasjon eller delesjon i D eller E regionen av det menigokokkale cps locus slik som i CBS 401.93.

8. Fremgangsmåte til fremstilling av et molekyl ifølge et av kravene 1-3, k a r a k t e r i s e r t v e d at molekylet fremstilles på en syntetisk måte.

9. Sakkarid-peptidkonjugat (SPC) som omfatter i det sminste et molekyl ifølge et av kravene 1-3 som sakkarid-

del, k a r a k t e r i s e r t v e d at sakkaridelen er konjugert til en peptiddel med minst én T-hjelpecelleaktiverende epitop, idet peptiddelen omfatter minst ett homologt protein eller et peptidfragment avledet fra et homologt protein, hvorved homologt betyr at både B-celle- og T-hjelpecelleaktiverende epitoper er avledet fra den samme mikroorganisme.

10. Yttermembranvesikkel, k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter et molekyl ifølge et av kravene 1-3 og/eller et sakkarid-peptidkonjugat ifølge krav 9, hvor yttermembranvesikkelen omfatter klasse I yttermembranproteiner (OMPer) eller klasse I OMP fragmenter som T-hjelpecelleaktiverende epitop.

11. Yttermembranvesikkel i samsvar med krav 10, k a r a k t e r i s e r t v e d at den inneholder en gruppe polypeptider som har i det minste immunitetsaktiviteten til OMPer bundet til en membran, og at i det minste ett polypeptid fra gruppen er et membranforankret OMP som har en mutasjon i én av overflateloopene, eller et OMP fragment som har en mutasjon i én av overflateloopene, hvor polypeptidet er fra gruppen membranforankret OMP klasse I eller et OMP fragment av membranforankret OMP klasse I, og valgfritt kan være et rekombinant OMP eller OMP fragment.

12. Yttermembranvesikkel i samsvar med krav 11, k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter et molekyl ifølge et av kravene 1-3 og/eller et sakkarid-peptidkonjugat ifølge krav 9 som B-celleaktiverende del med minst én epitop.

13. Yttermembranvesikkel i samsvar med krav 11 eller 12, k a r a k t e r i s e r t v e d at i det minste ett polypeptid fra gruppen er et membranforankret OMP eller et OMP fragment som har en mutasjon i én av overflateloopene

2, 3, 5, 6, 7 eller 8.

14. Yttermembranvesikkel i samsvar med et av kravene 11-13, k a r a k t e r i s e r t v e d at mutasjonen omfatter tilstedeværelse av minst én aminosyre med en spesifikk, reaktiv sidekjede, hvor aminosyren er cystein.

15. Yttermembranvesikkel i samsvar med et av kravene 11-14, k a r a k t e r i s e r t v e d at polypeptidet er gjenkjennbart for minst to HLA-fenotyper.

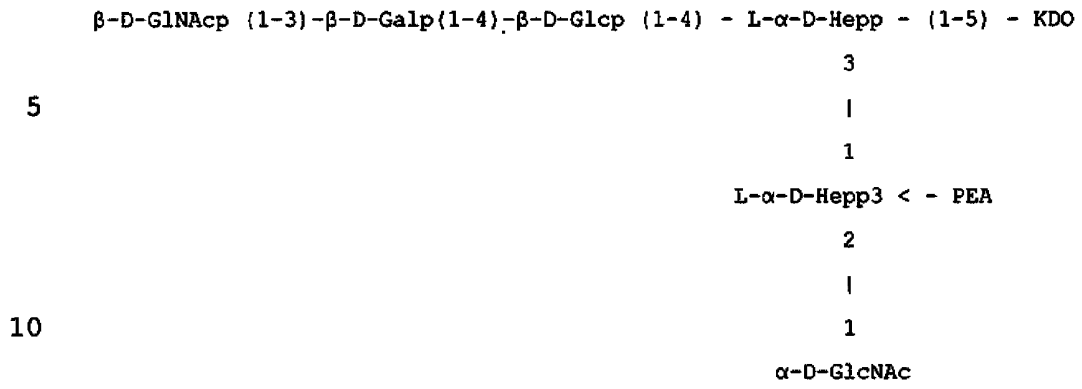
16. Yttermembranvesikkel i samsvar med et av kravene 11-15, k a r a k t e r i s e r t v e d at det er utstyrt med sakkarid-peptidkonjugater som omfatter et polypeptid som peptiddel, og at polypeptidet er konjugert med sakkariddelen på mutasjonstedet, hvor sakkariddelen omfatter en B-celleaktiverende del med minst én epitop avledet fra en gram-negativ bakterie, hvor den B-celleaktiverende del er avledet fra oligosakkariddelen (indre kjerne) i et meningokokk-LPS.

17. Yttermembranvesikkel (OMV) i samsvar med et av kravene 11-16, k a r a k t e r i s e r t v e d at sakkariddelen er koplet via en spacer til peptiddelen.

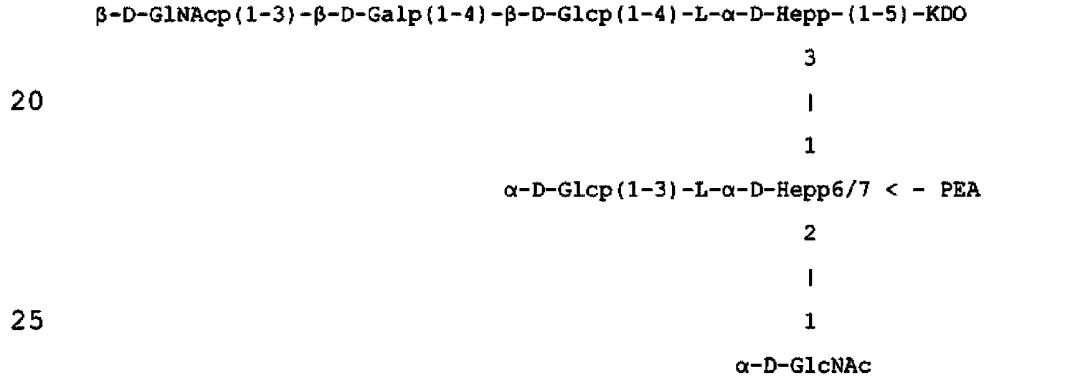
18. Yttermembranvesikkel (OMV) i samsvar med et av kravene 11-16, k a r a k t e r i s e r t v e d at sakkariddelen er konjugert med peptiddelen som opprettholder de frie aminogrupper i den B-celleaktiverende del av de fosfoetanolamin (PEA)grupper som foreligger i sakkariddelen, idet minst én PEA-gruppe er innført i sakkariddelen av den B-celleaktiverende del med minst én epitop før konjugeringen.

19. Yttermembranvesikkel (OMV) i samsvar med et av kravene 11-18, k a r a k t e r i s e r t v e d at sakkariddelen omfatter en B-celleaktiverende del avledet

fra



20. Yttermembranvesikkel (OMV) i samsvar med et av kravene 11-18, k a r a k t e r i s e r t v e d at den B-celleaktiverende del av sakkariddelen er et derivat av det forgrenete oligosakkarid



21. Fremgangsmåte til fremstilling av en yttermembranvesikkel ifølge et av kravene 11-20, k a r a k t e r i s e r t v e d

i) at en nukleotidsekvens som koder for polypeptidet uttrykkes i en bakterie,

ii) at bakterien dyrkes og produserer yttermembranvesikler, og de derved dannede yttermembranvesikler isoleres med polypeptid, og

iii) at yttermembranvesikkelen som dannes i trinn ii) utstyres med sakkarid-peptidkonjugater ved kopling av

polypeptidet til den ønskede sakkariddel som valgfritt er oppnådd via rekombinant DNA-teknikk eller på syntetisk vis.

22. Fremgangsmåte i samsvar med krav 21, k a r a k - t e r i s e r t v e d at sakkariddelen er oppnådd fra en mutagenisert eller utvalgt produksjonsstamme som produserer i det minste sakkariddelen uten galaktose, hvor en slik stamme er en meningokokkstamme som ikke produserer galaktose og bærer en mutasjon eller delesjon i D eller E regionen av det menigokokkale cps locus slik som i CBS 401.93.

23. Mutert meningokokkstamme som bærer en mutasjon i D eller E regiionen til menigokokkale cps locus slik som i CBS 401.93.

24. Mutert meningokokkstamme i samsvar med krav 23 som ikke produserer funksjonell galE.

25. Mutert meningokokkstamme i samsvar med krav 24 som produserer LPS som ikke inneholder galactose.

26. Vaksine, k a r a k t e r i s e r t v e d en effektiv mengde av én eller flere av følgende bestanddeler:

i) et molekyl ifølge et av kravene 1-3,

ii) et sakkarid-peptidkonjugat ifølge krav 9,

iii) en yttermembranvesikkel ifølge et av kravene 10-20.