(19) **Bundesrepublik Deutschland**
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 693 34 147 T2** 2008.02.14

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 680 512 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **693 34 147.5**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/NL93/00163**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **93 921 120.7**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1994/008021**
(86) PCT-Anmeldetag: **30.07.1993**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **14.04.1994**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **08.11.1995**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **13.06.2007**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **14.02.2008**

(51) Int Cl.[8]: ***C12N 15/61*** (2006.01)
A61K 39/095 (2006.01)
C08B 37/00 (2006.01)
C12P 19/04 (2006.01)
C07K 9/00 (2006.01)
C12N 15/31 (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01)

(30) Unionspriorität:
9201716 02.10.1992 NL

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE

(73) Patentinhaber:
De Staat der Nederlanden Vertegenwoordigd Door de Minister van Welzijn, Volksgezondheid en Cultuur, Rijsswijk, NL

(74) Vertreter:
Kutzenberger & Wolff, 50668 Köln

(72) Erfinder:
VAN DER LEY, Peter Andre, NL-3583 AM Utrecht, NL; POOLMAN, Jan Theunis, NL-1151 AK Broek in Waterland, NL; HOOGERHOUT, Peter, NL-3721 CN Bilthoven, NL

(54) Bezeichnung: **IMMUNOGENE MENINGOCOCCALE LPS UND AUSSENMEMBRANVESIKEL UND IMPSTOFF DARAUS**

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

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

Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft ein Immunität verleihendes, wenigstens ein Epitop enthaltendes B-Zellen aktivierendes Molekül, das von einem Meningokokken-Polysaccharid (LPS) abgeleitet ist und das wenigstens den gemeinsamen, für wenigstens zwei Meningokokken-Immuntypen spezifischen Bereich des Oligosaccharidteils (Kernbereich) von Lipopolysacchariden enthält. Des Weiteren betrifft die Erfindung Verfahren zu dessen Herstellung sowohl durch Synthese als auch durch rekombinante DNS-Technologien. Die vorliegende Erfindung betrifft außerdem ein äußeres Membranvesikel enthaltend ein Molekül nach den Ansprüchen 1 bis 3. Die Erfindung betrifft ebenfalls einen Impfstoff, der ein solches Molekül und/oder ein solches äußeres Membranvesikel enthält. Ein Verfahren zur Herstellung eines solchen äußeren Membranvesikels gehört ebenfalls zum Rahmen der vorliegenden Erfindung.

[0002] Es ist bekannt, dass Impfstoffe von Kapselpolysacchariden (CPD) Immunschutz verleihen können. Dieser Immunschutz hängt vom Alter einer vaccinierten Person ab und ist kurzzeitig. Die Nachteile der Verwendung von Kapselpolysacchariden als Impfstoffe werden durch die klassische Vorgehensweise umgangen, die Kapselpolysaccharide oder die davon abzuleitenden Oligosaccharide an Proteine zu koppeln (Goebel, W. F., and O. T. Avery 1929 J. Exp. Med. 50: 533–550 and Cruse, J. Avery 1929 J. Exp. Med. 50: 533–550 und Cruse. J. M. and R. E. Lewis (Ed.) 1989 Contrib. Microbiol. Immunol. Basel, Krager. 10: 1–196). Das Koppeln von Polysacchariden an Proteine führt zum Übergang dieses Antigentyps vom thymusunabhängigen zum thymusabhängigen Charakter. Solche Poly- oder Oligosaccharid-Proteinkonjugate wirken allgemein bei Kleinkindern sehr immunogen und können ein Immungedächtnis induzieren.

[0003] Es folgt eine Reihe von Beispielen bekannter Saccharid-Peptid-Konjugate:

[0004] Konjugate von Kapselpolysacchariden (CPS) von H. influenza b mit Tetanustoxoid (TT) sind aus der holländischen Patentanmeldung 8602325 bekannt.

[0005] Es sind Konjugate von Kapselpolysacchariden der Meningokokkengruppen A und C mit Tetanustoxoid hergestellt worden, die bei Mäusen und Kanninchen sehr immunogen gewirkt haben sollen ([Beuvery, E. C., A. Kaaden. V. Kanhai und A. B. Leussink, 1983. Physicochemical and immunological characterization of meningococcal group A and C polysaccharide-tetanus toxoid conjugates prepared by two methods. Vaccine 1: 31–36], [Beuvery. E. G., F. Miedema, R. van Delft and K. Haverkamp. 1983. Preparation and immunochemical characterization of meningococcal group C polysaccharide tetanus toxoid conjugates as a new generation of vaccines. Infect. Immun. 40: 39–45] und [Jennings, H. J. and H. C. Lugowski. 1981. Immunochemistry of groups A, B and C meningococcal polysaccharide-tetanus toxoid conjugates. J. Immunol. 127: 1011–1018]).

[0006] Der für mehr als 50% der Meningitiserkrankungen in zahlreichen Ländern verantwortliche Gruppe-B-Meningokokkus stellt eine Gruppe von Bakterien dar, deren Kapselpolysaccharide keine oder eine nur schwache Immunreaktion induzieren. (Poolman et al., The Lancet, September 1986, Seiten 555–558).

[0007] Daher wurde für den Gruppe-B-Meningokokkus nach den Saccharid-Peptid-Konjugaten gesucht, die für den Einsatz in einem Impfstoff in Frage kämen, da Kapselpolysaccharide aus dieser Gruppe bei Versuchstieren und freiwilligen Testpersonen keine gegen gramnegative Bakterien gerichtete Immunantwort hervorrufen. Folglich wurden Saccharid-Peptid-Konjugate mit verändertem Kapselpolysaccharid und Trägerproteinen hergestellt ([Jennings, H. J., R. Roy, und A. Gamian. 1986. Induction of meningococcal group B polysaccharide-specific IgG antibodies in mice using an N-proprionylated B polysaccharide tetanus toxoid conjugate vaccine. J. Immunol. 13: 1708–1713] und [Jennings. H. J. 1989. The capsular polysaccharide of group B Neisseria meningitidis as a vehicle for vaccine development. In Cruse, J. M., und R. E. Lewis, Conjugate Vaccines. Contrib. Microbiol. Immunol. Basel, Krager. 10: 151–165]).

[0008] Da der Verdacht besteht, dass die anti-Gruppe-B-Antikörper (insbesondere das IgG) in vivo eine Kreuzimmunreaktion gegenüber den Wirtsantigenen auslösen könnten, und da die Verwendung eines ein verändertes Kapselpolysaccharid des Gruppe-B-Meningokokkus enthaltenden Saccharid-Peptid-Konjugats deshalb zur Auslösung einer Autoimmunerkrankung (ihren könnte, ist die Forschung zum größten Teil bei der Bereitstellung eines Impfstoffs gegen den Gruppe-B-Meningokokkus auf den möglichen Einsatz von Kapselbestandteilen, wie z.B. Außenmembranproteinen (OMP) und Lipopolysacchariden (LPS) ausgerichtet.

[0009] Daher beschreiben Jennings et al. Konjugate von Tetanustoxoid (TT) mit dephosphorylierten, vom Meningokokken-LPS abgeleiteten Oligosacchariden (OS*). Die Immunogenität dieser OS*-TT-Konjugate wurde bei Kanninchen überprüft (Infect. Immun. 43: 407–412). Dabei wurde Phosphoethanolamin von den Meningo-

kokken-Oligosacchariden (OS) durch Behandlung mit Fluorwasserstoff abgespalten. Die dephosporylierten Oligosaccharide wurden anschließend an Tetanustoxoid gekoppelt. Die so erhaltenen OS-Proptein-Konjugate des Immuntyps L_3 wirkten bei Kanninchen nur leicht immunogen, was wahrscheinlich als Folge der Abspaltung der PEA-Gruppen zu erklären ist.

[0010] In Infection and Immunity, März 1991, Seiten 843–851, beschreiben Verheul et al. die Herstellung von Meningokokken-OS-Protein-Konjugaten mit Tetanustoxoid, wobei die Phosphoetanolamingruppen der Oligosaccharide beibehalten wurden.

[0011] Oligosaccharid-Peptid-Konjugate, bei welchen der Saccharid- und der Peptidteil von verschiedenen Organismen stammen (meistens von einem Tetanus- oder Diphteriepeptid) haben den Nachteil, dass Überempfindlichkeit oder Toleranz gegenüber dem Peptidteil (bei Tetanus- oder Diphterieträgem) eintreten und dadurch eine abgeschwächte Antwort auf den B-Zellen aktivierenden Teil bewirken kann. Deshalb wurde nach Saccharid-Peptid-Konjugaten mit einem homologen Trägerpeptid gesucht. Ein solches Saccharid-Peptid-Konjugat würde nicht nur das Gedächtnis der B-Zellen aktivieren, sondern durch den Kontakt mit dem Mikroorganismus auch das Gedächtnis der T-Zellen reaktivieren.

[0012] Saccharid-Peptid-Konjugate, die ein homologes Trägerpeptid enthalten, sind bekannt. Paton et al. beschreiben die Konjugation von Pneumolysintoxoid mit dem 19F Kapselpolysaccharid von Streptococcus pneumoniae (Infection and Immunity, July 1991, Seiten 2297–2304).

[0013] Es sind auch Saccharid-Peptid-Konjugate bekannt, die ein homologes Trägerpeptid enthalten, das einen als Immunität verleihenden, die B-Zellen aktivierenden Teil wirkenden, von einem Lipopolysaccharid (LPS) einer gramnegativen Bakterie abgeleiteten Saccharidteil enthält. Ein solches Saccharid-Peptid-Konjugat bietet vorteilhaft die Möglichkeit an, einen Impfstoff bereitzustellen, der Immunität gegenüber gramnegativen Bakterien verleiht, deren Kapselpolysaccharide keine oder eine nur ungenügende Immunantwort bewirken. Ein Saccharid-Peptid-Konjugat, das einen als Immunität verleihenden, die B-Zellen aktivierenden Teil enthält, hat aber auch Nachteile. Lipopolysaccharide enthalten toxische Bereiche, weshalb ein Saccharid-Peptid-Konjugat, das ein Lipopolysaccharid mit toxischen Bereichen enthält, ebenfalls toxisch sein muss.

[0014] In Contrib. Microbiol. Immunol. Basel, Karger. 1989, Bd. 10, Seiten 166–189 beschreiben Cryz, J. C. et al. Impfstoffe gegen Pseudomonas aeruginosa, die ein Saccharid-Peptid-Konjugat enthalten, das detoxifiziertes Lipopolysaccharid von Pseudomonas aeruginosa Immuntyp-5 enthält, das an verschiedene Trägerproteine gekoppelt ist. Die Trägerproteine können sowohl homolog als auch nicht homolog sein. Die in diesem Artikel erwähnten Trägerproteine sind Tetanustoxoid, Toxin A und Pili von Pseudomonas aeruginosa.

[0015] Das LPS von Pseudomonas aeruginosa. wird gemäß dem angegebenen Artikel durch Abspaltung von estergebundenen Fettsäuren des Lipids A harmlos gemacht, sodass der serologisch aktive O-Polysaccharidteil in ein Saccharid-Peptid-Konjugat eingearbeitet werden kann. Ein solches detoxifiziertes LPS (D-LPS) wurde durch Veresterung mit N-Hydroxysuccinimid in einen aktiven Ester überführt und dieser anschließend an ein zur Vereinfachung des Kopplungsvorgangs mit einem Abstandshalter (1,4-Diaminobutan) versehenes Protein gekoppelt. Während das D-LPS-TA-Konjugat nicht immunogen war, waren es jedoch das D-LPS-Pili-Konjugat sowie das D-LPS-TT-Konjugat.

[0016] In einer Arbeit von Boons et al. (Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, Bd. 1, No. 6, Seiten 303–308. 1991) wird angegeben, dass ein Saccharid-Peptid-Konjugat (SPC) mit zwei essentiellen Immunbereichen (d.h. mit den für die Antikörperspezifizität und die T-Helfer-Aktivität verantwortlichen B- und T-Epitopen), die mit Hilfe eines künstlichen Abstandshalters kovalent gebunden sind, als Teilleistung bei der Entwicklung eines Breitbandimpfstoffs gegen N. meningitidis erhalten wurde. In diesem bekannten Konjugat erfüllt ein Fragment der IC-Region des LPS-Immuntyps-6 die Funktion des B-Epitops (IC = Innenkern). Zur Induktion einer Antwort homologer T-Helfer-Zellen (Gedächtnis), wurde ein das T-Zellenepitop enthaltendes Peptid ausgewählt. Der das T-Zellenepitop enthaltende Peptidteil des bekannten homologen SPC ist der 47.–59. Teil eines von Wiertz E. J. H. J. et al (in Proceedings of the Eleventh American Peptide symposium, Hrg. River, J. E.; Marshall, G. R.; ESCOM, Leiden, 1990) beschriebenen Meningokokken-OMP. Die Nachteile des bekannten SPC bestehen einerseits in der notwendigen komplizierten und kostspieligen chemischen Synthese, welche der Massenproduktion aus wirtschaftlichen Gründen entgegensteht, andererseits darin, dass nur ein Teil der Immunwirkung der OMP zur Geltung kommt, da nur ein Bruchteil des einen die T-Zellen aktivierenden Bereich enthaltenden OMP ausgenutzt wird in Vergleich mit sowohl B- als auch T-Zellen aktivierenden Bereichen.

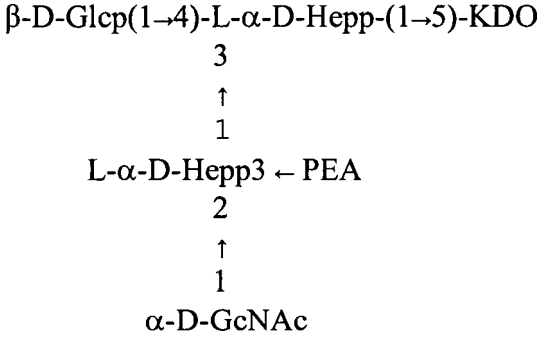
[0017] Es schien bisher unmöglich, einen Saccharidteil an ein vollständiges OMP oder an ein großes, mehr

als ein Epitop enthaltendes Fragment zu koppeln, ohne die Struktur oder die Zusammensetzung zu ändern, was seinerseits die Immunaktivität des OMP verringern würde.

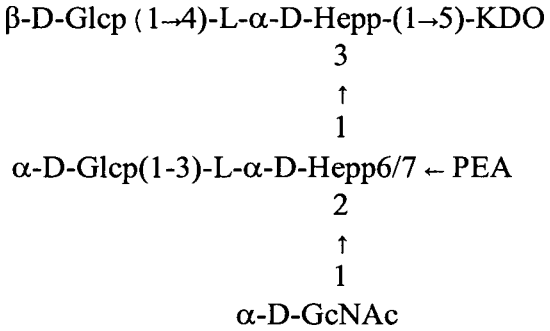
[0018] Des Weiteren ist bekannt, dass OMP erzeugende Mikroorganismen dieses in ihre Membran in einer bestimmten Konfiguration einlagern, bei der einige Abschnitte des OMP in der Membran verankert sind, während andere schleifenformig aus dieser herausragen. Diese spezifische Konfiguration ist für die Immunaktivität der im OMP vorhandenen T-Zellen und B-Zellen aktivierenden Teile erforderlich. In NIPH ANNALS, Bd. 14, Nummer 2, Dezember 1991 wird von Frederiksen J. H. et al auf den Seiten 67–79 und insbesondere 69–71 angegeben, dass Mikroorganismen so behandelt werden können, dass sie „Bläschen bilden", d.h. äußere Membranvesikel (OMV) bilden. Solche äußeren membranvesikel besitzen an der Oberfläche eine sehr große Anzahl von OMP und ermöglichen deren Einsatz als stark wirksame Impfstoffbestandteile, da ein großer Anteil der OMP in der für die Immunaktivität erforderlichen Konformation vorhanden ist. Allerdings bleibt ein Teil der Nachteile anderer Impfstoffe, die nur OMP als die Immunaktivität bewirkenden Bestandteil enthalten, auch für diese Impfstoffkomponenten bestehen. Bekannte OMV-Impfstoffe sollen bei Menschen einen Teilschutz bis zu 50–80% Schutz verleihen.

[0019] Mit der vorliegenden Erfindung sollen die in Verbindung mit den verschiedenen bekannten Impfstoffkomponenten bestehenden Probleme gelöst werden. Die Suche wurde vor allem auf das Auffinden eines B-Zellen aktivierenden Moleküls gerichtet, das klein und leicht herstellbar sowie ungiftig ist und auch eine Immunität gegenüber mehr als einem LPS-Immuntyp induzieren kann. Die vorliegende Erfindung betrifft ebenfalls ein Immunität verleihendes, B-Zellen aktivierendes Molekül mit wenigstens einem Epitop, das von einem Meningokokken-Polysaccharid (LPS) abgeleitet ist und das wenigstens den gemeinsamen, für wenigstens zwei Meningokokken-Immuntypen spezifischen Bereich des Oligosaccharidteils (Kernbereich) von Lipopolysacchariden, bevorzugt für die Immuntypen L2 und L3, enthält, wobei der die B-Zellen aktivierende Teil galactosefrei ist, sowie zur Immunantwort fähige Derivate dieses Moleküls.

[0020] Ein geeignetes Beispiel für ein solches Molekül ist ein vom L2-Kern des Meningokokken-LPS abgeleitetes Molekül mit folgender Struktur:



[0021] Gegen eine solche Struktur können Antikörper induziert werden, die für die am meisten verbreiteten Immuntypen L2 und L3 spezifisch bakterizid sind. Ein anderes geeignetes Beispiel für ein solches Molekül ist ein vom L3-Kern abgeleitetes Molekül mit folgender Struktur:



[0022] Diese Struktur ist auch für die Induktion von Immunantworten gegen beide Immuntypen L2 und L3 verwendbar. Es wurde überraschenderweise gefunden, dass ein Antikörper, für den das Aufweisen von Kreuzreaktivität gegenüber verschiedenen Meningokokken-Immuntypen bekannt aber die von ihm erkennbare Struktur nicht bekannt war, an die beiden Molekularstrukturen binden kann, wie oben dargestellt wird. Die beiden oben angegebenen Molekularstrukturen unterscheiden sich von den bisher für L2 und L3 postulierten Epitopen

durch das Fehlen der Galactose. Die bisher postulierten Epitope sind zur Induktion bakterizider Antikörper mit Kreuzreaktivität für zahlreiche Meningokokken-Immuntypen nicht unbedingt notwendig. Illustriert wurde das anhand des Antikörpers mN8D6A, der in Infection and Immunity, October 1988, Seiten 2631–2638 (von Kim. J. J., Mandrell. R. E., Zhen, H., Westerink, M. A. J., Poolman. J. T. und Griffiss. J. M.) beschrieben ist. In dieser Arbeit wird gezeigt, dass der Antikörper an das LPS von 28 Stämmen der Gruppe A N. meningitidis in Dot-Blotts sowie an zahlreiche der von den 28 Stämmen durch Immunoblotts erhaltenen LOS-Komponenten verschiedener Molekularmassen binden kann.

[0023] Erfindungsgemäße Moleküle können einen Teil der Saccharid-Peptid-Konjugate auf übliche Weise bilden, wobei sie z.B. an Tetanustoxoid oder an andere in der Impfstofftechnik bekannte geeignete Träger gekoppelt werden. Zweckmäßigerweise umfasst ein Saccharid-Peptid-Konjugat, das ein erfindungsgemäßes Molekül enthält, ebenfalls einen Peptidteil mit wenigstens einem T-Helferzellen aktivierenden Epitop, wobei der Peptidteil bevorzugt wenigstens ein homologes Protein oder ein von einem homologen Protein abgeleitetes Peptidfragment enthält, wobei homolog bedeutet, dass sowohl die die B-Zellen aktivierenden als auch jene die T-Helferzellen aktivierenden Epitope von demselben Mikroorganismus abgeleitet sind. Ein äußeres Membranvesikel, dem ein ein erfindungsgemäßes Molekül enthaltendes Saccharid-Peptid-Konjugat zugeführt oder darin als die B-Zellen aktivierender Teil eingearbeitet wurde, stellt eine geeignete Ausführungsform dar, die vorteilhaft in einem Impfstoff eingesetzt werden kann. Vorzugsweise enthält ein äußeres Membranvesikel, dem ein solches Molekül oder ein ein solches Molekül enthaltendes Saccharid-Peptid-Konjugat zugeführt oder darin eingearbeitet wurde, Klasse-1-OMP- oder Klasse-2-OMP-Fragmente als den die T-Helferzellen aktivierenden Teil.

[0024] Die vorliegende Erfindung betrifft ebenfalls Verfahren zur Herstellung solcher erfindungsgemäßer Lipopolysaccharidderivate. Hierzu können eine Mutagenese, rekombinante DNS-Techniken, eine enzymatische Spaltung oder eine chemische Synthese eingesetzt werden. Das auf rekombinante DNS-Techniken basierte Verfahren umfasst die Erhaltung des Moleküls von einem mutierten oder ausgewählten Produktionsstamm, der wenigstens galactosefreies LPS erzeugt. Dazu kann vorteilhaft ein mutierter Meningokokkenstamm verwendet werden, der keine Galactose erzeugt. Insbesondere kann ein Produktionsstamm verwendet werden, der kein oder kein funktionsfähiges galE Enzym produziert. In Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 (1989) Seiten 1669–1673 haben Frosch, M., Weisgerber, C. und Meyer, T. F. für N. meningitidis bestimmt, welcher Teil dessen Genoms die für die CPS-Produktion verantwortlichen Gene enthält. Dieser Teil wurde auf das Plasmid pMF32.35 kloniert, und wir haben herausgefunden, dass dieses Plasmid auch Sequenzen enthält, die die Biosynthese von LPS kodieren. Ein Meningokokkenstamm, in den dieses Plasmid integriert wurde, ist am 29. Juli 1993 bei CBS Baarn, die Niederlande, mit der Nummer CBS 401.93 hinterlegt worden. Für einen Fachkundigen ist es zweifellos möglich, über übliche DNS-Techniken eine oder mehrere Mutationen oder Deletionen in diesem Teil der Meningokokken-DNA zu tätigen, um die Galactoseproduktion zu verhindern. Insbesondere ist es möglich, eine oder mehrere Mutationen oder Deletionen in dem auf diesem Plasmid vorhandenen cps-Locus vorzunehmen, wodurch die Expression von GalE überhaupt oder von funktionsfähigem GalE verhindert wird. Mit Hilfe von Teststoffen, die einen Teil der Sequenz enthalten, die einen Teil des Enzyms GalE kodieren, kann die Lage des GalE-Gens ohne weiteres bestimmt und anschließend die zur Erhaltung einer kein oder kein funktionsfähiges GalE exprimierenden Sequenz erforderliche Mutagenese sowie Deletion vorgenommen werden. Das Expressionsprodukt eines derart mutierten cps-Locus ergibt galactosefreies Lipopolysaccharid. Es kann auf übliche Weise ein Expressionsvektor erzeugt werden, der eine solche mutierte cps-Kasette oder deren relevanten Abschnitt enthält. Die Erstellung eines Produktionsstammes mit Hilfe der mutierten Nukleotidsequenz oder des eine solche Sequenz enthaltenden Expressionsvektors liegt nun im Rahmen des Könnens eines Fachmanns, indem er für die rekombinante DNS Technik einschlägigen Arbeitsprotokolle anwendet. Zweckmäßigerweise kann ein mutierter Meningokokkenproduktionsstamm einfach erstellt werden, bei dem eine Deletion in der Wildtyp-cps-Kasette und anschließend das Austauschen mit einer mutierten cps-Kasette auf einfache Weise vorgenommen wird.

[0025] Des weiteren betrifft die Erfindung die Lösung des Problems hinsichtlich der Kopplung eines OMP mit einem Immunaktivität aufweisenden Molekül nach den Ansprüchen 1 bis 3, ohne die Immunaktivität des OMP zu beeinträchtigen, sodass eine Impfstoffkomponente erhalten werden kann, der mehr als einen T-Helferzellen aktivierenden Teil enthält. Die vorliegende Erfindung betrifft daher ein äußeres Membranvesikel, das mit wenigstens die Immunaktivität von Außenmembranproteinen (OMP) besitzenden, an eine Membran gebundenen Polypeptiden versehen ist, wobei das äußere Membranvesikel dadurch gekennzeichnet ist, dass die Polypeptide in der Membran verankerte OMP oder OMP-Fragmente mit einer Mutation in einem der Oberflächen-Loops des OMP, von dem das Polypeptid abgeleitet ist, darstellen. Die vorliegende Erfindung betrifft daher ein solches äußeres Membranvesikel, in welchem die Polypeptide in der Membran verankerte OMP oder OMP-Fragmente mit einer Mutation in einem der Oberflächen-Loops des Klasse 1-OMP darstellen, von dem

das Polypeptid abgeleitet ist. Insbesondere betrifft die vorliegende Erfindung ein solches äußere Membranvesikel, in welchem das Polypeptid wenigstens eine Mutation in einem der Oberflächen-Loops 2, 3, 5, 6, 7 oder 8 enthält.

[0026] Es wurde herausgefunden, dass die Tätigung von Mutationen in diesen Loops die Immunaktivität der membrangebundenen Klasse-1-OMP nicht herabsetzt. Dadurch bietet sich die Möglichkeit an, an diesen Stellen Mutationen durchzuführen, die die spezifische Kopplung von OMP an eine andere erwünschte Komponente, vorzugsweise eine Komponente mit zusätzlicher Immunaktivität an der Stelle der Mutation, ermöglichen. Ein erfindungsgemäßes äußeres Membranvesikel kann als ein für die Kopplung aktiviertes äußeres Membranvesikel angesehen werden.

[0027] Die Mutation wird bevorzugt in einem der Loops 6 oder 7 angeordnet. Diese Loops befinden sich innerhalb der tertiären Struktur des OMP an den gegenüber den mehrere wichtige OMP-Epitope enthaltenden Loops 1 und 4 am besten geeigneten Stellen.

[0028] Die Mutation kann darin bestehen, dass mindestens eine zusätzliche Aminosäure mit einer reaktiven Seitenkette in einem der Loops 2, 3, 5, 6, 7 oder 8 vorhanden ist. Das kann eine Insertion, Deletion oder Substitution in einem der Loops sein. Eine Substitution ist bevorzugt, da die natürliche Situation dadurch am besten nachgeahmt wird. Die Form der Mutation ist nicht kritisch, dagegen ist die Position der Mutation kritisch.

[0029] Da in natürlichen OMP kein Cystein vorhanden ist, und die Sulfhydrylgruppe eine vorteilhafte Reaktivgruppe darstellt, wird bevorzugt diese Aminosäure eingearbeitet. Andere Aminosäuren, wie z.B. Lysin, kommen auch in Frage, allerdings bietet das Vorhandensein solcher Aminosäuren in den nativen OMP eine Anzahl von Reaktionsstellen im OMP zur Kopplung an, weshalb die SPV (Saccharid-Peptid-Vesikel) einem Screening zu unterziehen sind, um festzustellen, bei welchen die Konjugation an den erwünschten Stellen stattgefunden hat. Das Einarbeiten von Schutzgruppen führt in den meisten Fällen zu komplizierten chemischen Reaktionen mit hoher Denaturierungsgefahr für das Polypeptid.

[0030] Wie erwähnt, kann das Polypeptid vollständige OMP aber auch ein OMP-Fragment enthalten. Das OMP-Fragment sollte ausreichende Länge und eine Struktur aufweisen, die dessen Verankerung in der Membran eines Mikroorganismus ermöglicht und wenigstens eine immunaktivierende Wirkung, bevorzugt eine mindestens genauso hohe wie das entsprechende native OMP, von dem es abgeleitet wurde, besitzt. Ein bevorzugtes erfindungsgemäßes OMV enthält ein erfindungsgemäßes Molekül und/oder ein Saccharid-Peptid-Konjugat, das ein erfindungsgemäßes Molekül enthält.

[0031] Eine Verwendungsmöglichkeit eines erfindungsgemäßen OMV besteht in der Produktion einer Impfstoffkomponente, die auch einen Saccharidteil enthält. Das Produkt der Kopplung eines Saccharidteils an einen Polypeptidteil des zur Kopplung aktivierten äußeren Membranvesikels, also ein äußeres Membranvesikel (OMV), das ein Saccharid-Peptid-Konjugat (SPC) enthält, ein so genanntes Saccharid-Peptid-Vesikel (SPV), weist eine weiter gehende Immunaktivität als die bisher bekannten, OMP enthaltenden äußeren Membranvesikel auf. Das SPV besitzt daher eine stärkere und weiter gehende Immunaktivität als die bekannten SPC. Ein weiterer Vorteil besteht darin, dass der natürliche Mechanismus, durch den sich ein Mikroorganismus OMP in der Membran verankern kann, auf wirtschaftliche und einfache Weise zur Herstellung einer Impfstoffkomponente mit stärkerer und weiter gehender Immunaktivität eingesetzt wird. Die vorliegende Erfindung betrifft ein SPV der oben beschriebenen Art.

[0032] Vorzuziehen ist die Kopplung eines Peptidteils eines aktivierten äußeren Membranvesikels an einen Saccharidteil, der wenigstens einen Immunität verleihenden, die B-Zellen aktivierenden Teil mit wenigstens einem von einem Lipopolysaccharid (LPS) einer gramnegativen Bakterie abgeleiteten Epitop sowie ein äußeres Membranvesikel mit einem Fragment eines B-Zellen aktivierenden Teils mit wenigstens einem von einer gramnegativen Bakterie isolierten Epitop enthält. Die Erfindung betrifft auch ein SPV, das mit Polypeptiden versehen ist, die wenigstens die Immunaktivität von OMP aufweisen und einen Teil der Saccharid-Peptid-Konjugate bilden, wobei der Polysaccharidteil und der Peptidteil eines solchen Konjugats am Ort der Mutation in einem der Loops 2, 3, 4, 5, 6, 7, oder 8 aneinander gekoppelt sind. Ein die „Kernregion" des LPS oder ein davon abgeleitetes Fragment als den die B-Zellen aktivierenden Teil des Saccharidteils enthaltendes SPV wird wegen des Fehlens der toxischen Teile als Impfstoffkomponente sicherer sein als ein SPV, das ein natives LPS enthaltendes Saccharid-Peptid-Konjugat umfasst. Darüber hinaus hat ein solches einen „Kernbereich" enthaltendes Saccharid-Peptid-Konjugat den Vorteil, dass es eine größere Anzahl verschiedener die B-Zellen aktivierende LPS-„Kernbereich"-Teile enthält als ein SPC mit nativem LPS, das toxisch wird, wenn zu viel von der toxischen Komponente Lipid A eingearbeitet wird.

[0033] Das Meningokokken-Lipopolysaccharid ist toxisch und umfasst drei Teile. In **Fig.** 1 wird ein Meningokokken-LPS dargestellt. Der Lipidteil ist toxisch und die Lacto-N-neotetraose-Einheit kann vielleicht zur Induktion von Autoantikörpern führen. Der Oligosaccharidteil des Meningokokken-LPS, der so genannte „Kernbereich" ist nicht toxisch. Der so genannte „innere Kernbereich" ist jener Teil des „Kernbereichs" des Oligosaccharidteils des Meningokokken-LPS, in dem die Lacto-N-neotetraose-Einheit fehlt. Ein Saccharid-Peptid-Konjugat mit einem B-Zellen aktivierenden Teil, welches das „Kern"-Oligosaccharid des Meningokokkus oder ein davon abgeleitetes Fragment enthält, ist ein geeignetes Beispiel für ein SPC, das einen Teil des erfindungsgemäßen SPV darstellen kann.

[0034] Tatsächlich wurde ein Saccharid-Peptid-Konjugat, das einen vom Meningokokkus abgeleiteten Saccharidteil enthält, in dem kein toxisches Lipid A und auch keine vollständige Lacto-N-neotetraose-Einheit vorhanden ist, von Boons et al. beschrieben, allerdings ist in dieser bekannten Impfstoffkomponente der Saccharidteil an ein vom OMP abgeleitetes Fragment gekoppelt, das nur ein T-Zellenepitop enthält, und das SPC ist nicht als Teil eines äußeren Membranvesikels ausgebildet.

[0035] Das zur Erhaltung eines erfindungsgemäßen SPV einzusetzende LPS kann isoliert und anschließend das Lipid A und ein Teil der Tetraose-Einheit entfernt werden. Das Meningokokken-Lipopolysaccharid (LPS) kann z.B. durch das Extraktionsverfahren von Westphal mit heißem Wasser und Phenol isoliert werden (Westphal, O. und Jann. J. K., 1965. Methods Carbohydr. Chem. 5. 83–91). Kurz gefasst, wird LPS in 1%-iger Essigsäure hydrolysiert bis es zur Flockung kommt. Das Lipid A wird durch Zentrifugieren entfernt, und die Oligosaccharide werden über einer Biogelsäule gereinigt. Anschließend kann das überwiegende Oligosaccharid an den Peptidteil gekoppelt werden.

[0036] Ein „Kern"-Oligosaccharid oder ein durch ein solches Verfahren erhaltenes funktionsfähiges Derivat davon kann in ein erfindungsgemäßes Saccharid-Peptid-Vesikel eingearbeitet werden.

[0037] Da die Erhaltung eines von nativem LPS abgeleiteten B-Zellen aktivierenden Teils ein langwieriger Prozess ist, und da die Reinigung des „Kern"-Oligopolysaccharids auch problematisch ist, kann es zweckmäßig sein, den die B-Zellen aktivierenden Teil des Saccharidteils eines erfindungsgemäßen Saccharid-Peptid-Vesikels zu synthetisieren. Ein erfindungsgemäßes Saccharid-Peptid-Vesikel kann daher einen synthetischen die B-Zellen aktivierenden Teil im Saccharidteil enthalten.

[0038] Es ist auch möglich, einen nicht toxischen, von einem LPS abgeleiteten, die B-Zellen aktivierenden Teil des SPV auf biochemischem Weg, wie z.B. durch Mutagenese oder enzymatische Spaltung zu erhalten. Dieser Weg ist möglich, wenn mit Hilfe biologischer Verfahren ein Produktionsstamm bereitgestellt wird, der fähig ist, ein verändertes Lipid A und/oder eine veränderte Lacto-N-neotetraose zu produzieren. Auf jeden Fall, wird die terminale Galactose der Lacto-N-tetraose entfernt werden müssen, und es kann auf einfache Weise ein mutanter Produktionsstamm bereitgestellt werden, der keine Galactose zur Integrierung in das LPS erzeugt, wie weiter oben für den Fall der Herstellung eines erfindungsgemäßen Moleküls angegeben wurde. Insbesondere betrifft die vorliegende Erfindung ebenfalls ein SPV in den bereits hervorgehobenen Ausführungsformen, wobei der Saccharidteil ein Immunität verleihendes, die B-Zellen aktivierendes Molekül mit wenigstens einem von einem Meniningokokken-Polysaccharid abgeleiteten Epitop enthält, wobei das Molekül wenigstens einen gemeinsamen, für wenigstens zwei Meningokokkenimmuntypen – bevorzugt für die Immuntypen L2 und L3 – spezifischen Teil des Oligosaccharidteils (Kernbereich) von Lipopolysacchariden umfasst, und wobei der die B-Zellen aktivierende Teil galactosefrei ist, sowie Derivate des Moleküls, die fähig sind, Immunantworten zu induzieren.

[0039] Die erfindungsgemäße Saccharid-Peptid-Vesikel können über einen Abstandshalter konjugiert werden. Das bietet den Vorteil, dass keine intramolekularen Reaktionen zwischen den reaktiven Gruppen des Saccharid- und des Peptidteils stattfinden. Solche Reaktionen können nämlich zu einer veränderten Tertiärstruktur des Saccharidteils und/oder Peptidteils führen, was die Verschlechterung der Immunaktivität bewirkt.

[0040] Einige der für den LPS-Immuntyp spezifischen Epitope verdanken ihre Aktivität dem Vorhandensein von wenigstens einer Phosphoethanolamingruppe (PEA). Daher wird ein erfindungsgemäßes Saccharid-Peptid-Vesikel bevorzugt, in welchem die PEA-Gruppen des die B-Zellen aktivierenden Teils des Sacharidteils freie Aminogruppen enthalten. Ein Beispiel für ein solches erfindungsgemäße Saccharid-Peptid-Vesikel, das einen immunspezifischen, die B-Zellen aktivierenden Teil im Saccharidteil enthält, ist ein Saccharid-Peptid-Vesikel, das LPS vom Meningokokkus des Immuntyps L_3 im Saccharidteil enthält. Ein solches ein immunspezifisches Epitop des Immuntyps L_3 enthaltendes Saccharid-Peptid-Vesikel enthält bevorzugt einen die B-Zellen aktivierenden Teil mit freie Aminogruppen tragenden PEA-Gruppen.

[0041] Erfindungsgemäße Saccharid-Peptid-Vesikel enthalten vorteilhafterweise einen Saccharidteil, der einen die B-Zellen aktivierenden Teil enthält, der eine Kreuzreaktion mit mehr als einem Immuntyp hervorrufen kann. Ein Impfstoff, der ein solches erfindungsgemäßes Saccharid-Peptid-Vesikel enthält, verleiht Schutz gegen mehr als einen Immuntyp.

[0042] Zur Zeit sind für Meningokokkenstämme zwölf verschiedene Lipopolysaccharide (entsprechend 12 Immuntypen) bekannt. Die Unterschiede hinsichtlich der LPS-Immuntypen wurden im Oligosaccharidteil des LPS („Kernbereich") geortet. Unlängst wurden die kompletten Primärstrukturen der Oligosaccharide für die Immuntypen L1, L2, L3, L4, L5 und L6 postuliert; sie werden in **Fig.** 2 dargestellt (Difabio J. L. et al. 1990, Structure of the L1 and L6 core oligosaccharide of Neisseria meningitidis. Can. J. Chem. 86: 1029–1034; Jennings, H. J. et al, 1987, Structure and Immunochemistry of meningococcal lipopolysaccharides, Anthonie van Leeuwenhoek 53: 519–522; Michon, F. et al, 1990, Structure of the L5 lipopolysaccharide core oligosaccharide of Neisseria meningitidis. J. Biol. Chem. 256: 7243–7247; Verheul, A. F. M. et al Infection and Immunity (1991). 51: p 3566–3573). Die Struktur der größten Moleküle – L_1, L_2, L_3 – sind der **Fig.** 3 zu entnehmen.

[0043] Ein erfindungsgemäßes Saccharid-Peptid-Vesikel, das ein oder mehrere Oligosaccharide mit der in **Fig.** 2 angegebenen Struktur enthält, ist als Komponente eines Impfstoffs gegen wenigstens einen Meningokokkenimmuntypen einsetzbar. Ein wenigstens einen die B-Zellen aktivierenden Teil von wenigstens einem der Oligosaccharide in **Fig.** 2 im Saccharidteil enthaltendes erfindungsgemäßes Saccharid-Peptid-Vesikel kann daher vorteilhaft als Komponente eines gegen wenigstens einen Meningokokkenimmuntyp gerichteten Impfstoffs eingesetzt werden.

[0044] Die Oligosaccharide der Immuntypen unterscheiden sich in Bezug auf die Monosaccharidzusammensetzung, die Menge und Stellung der Phosphoethanolamingruppen (PEA) und den Acetylierungsgrad der α(1-2)-gebundenen GlcNAc-Einheit oder anderer Einheiten. Für die meisten Immuntypen ist die Grundstruktur des Oligosaccharid-„Kerns" dieselbe (s. **Fig.** 1 und **Fig.** 2).

[0045] Da die „Kern"-Oligosaccharide des Meningiokokken-LPS für verschiedene Immuntypen Konformität aufweisen, enthält der „Kern" mehr als ein immuntypspezifisches Epitop. Ein erfindungsgemäßes SPV, das einen solchen „Kern" als die B-Zellen aktivierenden Teil des Saccharidteils enthält, wird bevorzugt. Ein solches erfindungsgemäßes SPV kann eine gleichzeitige B-Zellen-aktivierende Wirkung auf mehrere verschiedene Immuntypen haben. Ein erfindungsgemäßes Saccharid-Peptid-Vesikel, das eine gleichzeitige B-Zellen-aktivierende Wirkung auf mehrere verschiedene Immuntypen haben kann, kann auch ein abgeleitetes Fragment mit mehr als einem immuntypspezifischen Epitop enthalten.

[0046] Es ist ebenfalls möglich, nur einen relevanten Abschnitt des „Kern"-Oligsaccharids als Fragment in ein erfindungsgemäßes SPV einzuarbeiten, das spezifische Immunität gegen einem bestimmten Immuntyp verleiht. Es ist auch möglich, mehr als einen die B-Zellen aktivierenden Teil in den Saccharidteil eines erfindungsgemäßen SPV einzuarbeiten, sodass ein solches SPV verschiedene eine spezifische Immunität verleihende Teile umfasst und demzufolge eine Immunität gegenüber verschiedenen spezifischen Immuntypen verleihen kann.

[0047] Die B-Zellen aktivierende Teile des Saccharidteils mit einer eine spezifische Immunität gegenüber verschiedenen Immuntypen verleihenden Wirkung oder die B-Zellen aktivierende Teile des Saccharidteils mit einer die Kreuzimmunität verleihenden Wirkung können vorteilhaft in den Saccharidteil eines erfindungsgemäßen Saccharid-Peptid-Vesikels eingearbeitet werden. Es ist nun möglich geworden, Oligosaccharide mit definierter Struktur, zunehmender Komplexität und Molekularmasse zu synthetisieren, sodass Oligosaccharide synthetisiert werden können, die eine oder mehrere B-Zellen-aktivierende Strukturen umfassen.

[0048] Vom Meningokokkus ist bekannt, dass die Immuntypen L3 und L2 für ungefähr 70% bzw. 30% der von Gruppe B Meningokokken hervorgerufenen Hirnhautentzündungen verantwortlich sind. Daher werden erfindungsgemäße Saccharid-Peptid-Vesikel bevorzugt, die wenigstens B-Zellen-aktivierende Teile des Immuntyps L3 und/oder L2 im Saccharidteil des Saccharid-Peptid-Vesikels enthalten.

[0049] Ein erfindungsgemäßes Saccharid-Peptid-Vesikel enthält wenigstens einen B-Zellen aktivierenden Teil des Saccharidteils, der ein Derivat von

β-D-GlNAcp (1→3)-β-D-Galp(1→4)-p-Glcp (1→4) - L-α-D-Hepp - (1→5) – KDO
3
↑
1
L-α-D-Hepp3 ← PEA
2
↑
1
α-D-GcNAc

oder von

β-D-GlNAcp(1→3)-β-D-Galp(1→4)-β-D-Glcp(1→4)-L-α-D-Hepp-(1→5)-KDO
3
↑
1
α-D-Glcp(1-3)-L-α-D-Hepp6/7 ← PEA
2
↑
1
α-D-GcNAc

darstellt.

[0050] Ein bevorzugtes erfindungsgemäßes Saccharid-Peptid-Vesikel ist ein SPV, das wenigstens einen B-Zellen aktivierenden Teil im Saccharidteil enthält, der wenigstens eine Kreuzimmunantwort gegenüber zwei Immuntypen einer gramnegativen Bakterie ergibt. Ein Beispiel für ein solches Saccharid-Peptid-Vesikel ruft eine Kreuzimmunantwort gegenüber mindestens den Meningokokken-Immuntypen L2 und L3 hervor. Ein solches Saccharid-Peptid-Vesikel enthält daher ein Molekül mit der Struktur

β-D-Glcp(1→4)-L-α-D-Hepp-(1→5)-KDO
3
↑
1
L-α-D-Hepp3 ← PEA
2
↑
1
α-D-GcNAc

und/oder

β-D-Glcp(1→4)-L-α-D-Hepp-(1→5)-KDO
3
↑
1
α-D-Glcp(1-3)-L-α-D-Hepp6/7 ← PEA
2
↑
1
α-D-GcNAc

[0051] Ein ebenfalls bevorzugtes Saccharid-Peptid-Vesikel ist ein SPV, das eine Kreuzimmunantwort gegenüber mindestens den Meningokokken-Immuntypen L1 und L2 hervorruft.

[0052] Ein Saccharid-Peptid-Vesikel, das eine Kreuzimmunantwort gegenüber mindestens den Meningokokken-Immuntypen L_1, L2 und L3 aufweist, enthält wenigstens das verzweigte Oligosaccharid β-D-Glcp(1-4)-[L-α-D-Hepp(1-3)]-L-α-D-Hepp) als die B-Zellen aktivierenden Teil im Saccharidteil. Ein geeignetes Beispiel für ein solches erfindungsgemäßes Saccharid-Peptid-Vesikel enthält auch eine an das O-3 der Heptosyleinheit des verzweigten Oligosaccharids β-D-Glcp(1-4)-[L-α-D-Hepp(1-3)]-L-α-D-Hepp) gebundene PEA-Gruppe.

[0053] Ein erfindungsgemäßes Saccharid-Peptid-Vesikel, das eine Kreuzimmunantwort gegenüber mehreren Immuntypen als L_1, L_2 und L_3 hervorruft, enthält wenigstens das verzweigte Oligosaccharid β-D-Glcp(1-4)-[L-α-D-Hepp(1-3)]-L-α-Hepp), das mit einem Abstandshalter versehen ist, der eine Verbindung zu wenigstens einem für einen anderen Immuntyp spezifischen, die B-Zellen aktivierenden Teil mit wenigstens einem Epitop als die B-Zellen aktivierenden Teil im Saccharidteil herstellt.

[0054] Ein erfindungsgemäßes SPV kann einen Saccharidteil umfassen, der als die B-Zellen aktivierender Teil für einen bestimmten Immuntyp synthetisiert und/oder gegenüber einem natürlichen die B-Zellen aktivierenden Teil verändert ist. Ein solcher synthetisierter und/oder veränderter die B-Zellen aktivierender Teil ruft vorzugsweise eine Kreuzimmunantwort gegenüber verschiedenen Immuntypen hervor und/oder eine verbesserte Immunantwort gegenüber dem entsprechenden Teil des natürlichen LPS bewriken. Auf jeden Fall sollte die terminale Galactoseeinheit (**Fig.** 2) entweder auf enzymatischem Weg oder durch genetische Manipulierung durch Mutation, entfernt werden. Wie weiter oben erwähnt, ist die absolute Galactosefreiheit solcher Strukturen eine mögliche Ausführungsform, die von einem Fachkundigen durch rekombinante DNS-Technologie erzielt werden kann.

[0055] Ein solcher synthetisierter und/oder veränderter die B-Zellen aktivierender Teil kann durch selektive Addition und/oder Deletion bestimmter Gruppen und/oder Saccharideinheiten entstehen.

[0056] Ein erfindungsgemäßes Saccharid-Peptid-Vesikel enthält vorzugsweise ein Außenmembranprotein (OMP) oder ein von einem OMP abgeleitetes Fragment als Peptidteil. Bevorzugt umfasst ein erfindungsgemäßes SPV ein OMP vom Klasse-1-Meningokokkus, da dieses OMP schutzverleihende Antikörper induzieren kann, keine Neigung zur Blockierung der Antikörper gegenüber anderen Proteinen besitzt und keine zu große Antigenvariation aufweist. Auf dem Klasse-1-Außenmembranprotein des Meningokokkus H44/76 sind zahlreiche Erkennungsstrukturen für humane T-Zellen erforscht worden, weshalb dieser einen geeigneten Ausgangsstamm für das zu verwendende OMP darstellt.

[0057] Die vorliegende Patentanmeldung betrifft ebenfalls ein Verfahren zur Herstellung eines erfindungsgemäßen äußeren Membranvesikels. Das Verfahren umfasst folgende Schritte:

1) Eine das Polypeptid kodierende Sequenz wird in einer Bakterie exprimiert;

2) Die Bakterie wird unter bekannten Bedingungen für die Produktion von äußeren Membranvesikeln kultiviert, wie in NIPH ANNALS, Band 14, Nummer 2, Dezember 1991 von Fredriksen J. H. et al auf S. 67–79 beschrieben, wobei die so erstellten, Polypeptid enthaltenden Membranfragmente gegebenenfalls isoliert werden können. Zur Herstellung eines erfindungsgemäßen SPV können anschließend

3) die in Schritt 2 gebildeten Membranteile durch Kopplung der Polypeptide an die erwünschten Saccharidteile mit Saccharid-Peptid-Konjugaten versehen werden.

[0058] Zur Herstellung eines erfindungsgemäßen OMV oder SPV kann die erforderliche in Schritt 1) einzusetzende Nukleotidsequenz eine rekombinante Nukleotidsequenz sein, die das Klasse-1 OMP oder eines dessen Fragmente kodiert, das wenigstens die Immunaktivität des Klasse-1-OMP besitzt, worin gegenüber der entsprechenden natürlichen Sequenz eine Mutation in einer der Oberflächen-Loops vorgenommen wurde. Eine Mutation in einer der Oberflächen-Loops 2, 3, 4, 5, 6, 7 oder 8, insbesondere in den Loops 6 und 7 ist vorzuziehen. Die Mutation führt dazu, dass ein Kodon für wenigstens eine Aminosäure eine spezifische reaktive Seitenkette in einer der Oberflächen-Loops besitzt. Die Mutation führt insbesondere zu einem Kodon für Cystein. Beim Verfahren zur Herstellung eines erfindungsgemäßen SPV kann ein durch die rekombinante DNS-Technologie oder über einen Syntheseweg erhaltener Saccharidteil verwendet werden. Insbesondere kann ein erfindungsgemäßes, wie hierin an anderer Stelle beschrieben herstellbares Molekül als Saccharidteil eingesetzt werden.

[0059] Um einen Saccharidteil an ein erfindungsgemäßes OMV, insbesondere an ein mit einer Cysteingruppe versehenes OMV-SH zu koppeln, kann folgendes Reaktionsschema angewendet werden:

$$\text{Kern-KDO-COOH} + \text{H}_2\text{N-X-Br} \xrightarrow{EDC} \text{Kern-KDO-CO-NH-X-Br}$$

(EDC = 1-Ethyl-3-dimethylaminopropylcarbodiimid)
Kern-KDO-CO-NH-X-Br + OMV-SH → Kern-KDO-CO-NH-X-S-OMV.

[0060] Insbesondere kann die Reaktion wie folgt durchgeführt werden:

$BrCH_2$-CO-NH-$(CH_2)_4$-NH_2 (Substanz 1, Überschuss) + OS-KDO + EDC + sulfo-NHS-

$\xrightarrow{pH\,8}$ OS- - -CO-CH_2Br (Substanz 2).

[0061] Substanz 2 wird der Gelfiltrierung unterzogen und anschließend
Substanz 2 + OMV-SH → Konjugat.

[0062] Nach einer anderen Möglichkeit kann die Kopplung folgendermaßen durchgeführt werden: $BrCH_2$-CO-NH-$(CH_2)_4$-NH-CO-CH_2Br (Substanz 3, Überschuss) + OS-SH (wie auf den Seiten 34 und 35 von Andre Verheuls Dissertation „Meningococcal LPS derived oligosaccharide Protein conjugate vaccines" (Aus Meningokokken-LPS abgeleitete Oligosaccharid-Protein-Konjugat Impfstoffe) October 29, 1991. Utrecht).

[0063] Das führt zu OS- - -CO-CH_2Br (Substanz 2*). Diese wird der Gelfiltrierung oder ggf. einem einfachen Waschen mit ET_{20} unterzogen. Substanz 2* kann anschließend in das Konjugat mit OMV-SH überführt werden. Da Substanz 3 lipophil ist, erfolgt die Veränderung von OS-SH in einer Mischung aus einem wässrigen Puffer und einem organischen Lösungsmittel, wie z.B. Dioxan. Deshalb ist die Reaktion des OMV-SH mit Substanz 3, mit einer auf die Reinigung folgenden Inkubation mit OS-SH von geringerem Interesse.

[0064] Zur spezifischen Kopplung der Kohlenhydrate ist das Vorhandensein geeigneter Gruppen wie z.B. einer Amino-(-NH_2), Carboxyl-(-COOH), Thiol-(-SH) oder Aldehydgruppe (CHO) im Kohlenhydrat-Antigen notwendig (Dick, W. E. et al., 1989, Glycoconjugates of bacterial carbohydrate antigens (Glykokonjugate bakterieller Kohlenhydrat-Antigene. In Cruse J. M. und R. E. Lewis, Conjugate vaccines, Contrib. Microbiol. Immunol., Basel, Kreger, 10: 48–114). Diese Gruppen können in dem Antigen vorhanden sein, müssen aber oft durch chemische oder enzymatische Verfahren eingearbeitet werden. Vorzugsweise wird ein Kopplungsverfahren verwendet, das zu einer möglichst kleinen Veränderung des Kohlenhydrats und eines Proteinantigens führt. Die Verwendung eines spezifischen Abstandshalters ist dazu förderlich. Es wird bevorzugt, so wenig wie möglich das/die vorhandene(n) Epitop(e) zu zerstören bzw. unerwünschte immundominante Neuantigene zu generieren. Der Einfluss des Kopplungsverfahrens auf die immunologischen Kenndaten eines Oligosaccharid-Peptid-Vesikels ist beträchtlich, wenn kleine Oligosaccharide eingesetzt werden (Hoppner, W. et al., 1985. Study an the carbohydrate specificity of antibodies formed in rabbits to synthetic glycoprotein with the carbohydrate structure of asialoglycophorin A (Studium betreffend die Kohlenhydratspezifizität von bei Kanninchen gegenüber einem synthetischen Glykoprotein mit der Kohlenhydratstruktur von Asialoglykophorin gebildeten Antikörpern). Mol. Immunol. 12: 1341–1346)

[0065] Um den Einfluss der Kopplung durch den Einsatz größerer Oligosaccharide herabzusetzen, basieren die meisten bekannten Impfstoffe auf Kapselpolysacchariden oder O-Antigenen, die aus sich wiederholenden Einheiten von 1 bis 8 Monosacchariden bestehen. Das Menigokokken-LPS enthält keine sich wiederholenden Einheiten, und deshalb wird die Auswahl der Kopplungsverfahren unter Einsatz von Meningokokken-LPS insbesondere für die immunologischen und immunchemischen Kenndaten der gebildeten Konjugate von Bedeutung sein.

[0066] Das Saccharid wird bevorzugt über einen die reaktiven Endgruppen wie z.B. NH_2 oder COOH enthaltenden Abstandshalter an das Peptid gekoppelt. Der Einsatz eines Abstandshalters bei den erfindungsgemäßen Saccharid-Peptid-Vesikeln hat den Vorteil, dass die Tertiärstruktur des Saccharidteils nicht verändert wird, was für die Immunaktivität des Saccharids von Bedeutung ist.

[0067] Bei den Meningokokken-Oligosacchariden sind zwei Gruppen für den Einsatz zur Kopplung eines Oligosaccharids an ein Trägerpeptid verfügbar: die freie Aminogruppe der Phosphoethanolamingruppe (PEA-Gruppe) sowie die Carboxylgruppe der KDO-Einheit (**Fig.** 1). Die PEA-Gruppe sollte bevorzugt nicht verwendet werden, da diese Gruppe wahrscheinlich einen Teil von mehreren immuntypspezifischen Epitopen umfasst. Daher wird bevorzugt, in einem erfindungsgemäßen Saccharid-Peptid-Vesikel Phosphoethanolamingruppen mit freien Aminogruppen beizubehalten. Typischerweise können Saccharid-Peptid-Konjugate durch Kopplung der Carboxylgruppe des Oligosaccharids an die freien Aminogruppen des Peptids erzeugt werden. Wird dieses Verfahren im Falle des Meningokokken-Oligosaccharids verwendet, kann das zur Kopplung des Oligosaccharids an das Oligosaccharid bzw. zur Kopplung des Oligosaccharids an die Carboxylgruppen des

Peptids über die PEA-Gruppe des Oligosaccharids führen. Jennings et al. (Infect. Immun. 43: 407–412) lösten dieses Problem durch das Abspalten der PEA-Gruppen durch Behandlung mit Fluorwassestoff. Die dephosphorylierten Oligosaccharide wurden anschließend an Tetanustoxoid gekoppelt, wobei B-(4-Aminophenyl)ethylamin als Abstandshalter am reduzierenden Kettenende durch reduktive Aminierung eingearbeitet wurde (wodurch die Ringstruktur des KDO verloren ging), worauf die Aktivierung der Aminogruppe mit Thiophosgen und schließlich die Kopplung an das Tetanustoxoid erfolgten. Solche Konjugate von den Immuntypen L_2, L_5 und L_{10} wirkten bei Kanninchen sehr immunogen, während jene vom Immuntyp L_3 schwach immunogen waren. Für diese letztgenannte Gruppe scheint der Verlust der PEA-Gruppen und/oder der Ringstruktur der KDO-Gruppe für die Immunität von Bedeutung zu sein, weshalb bevorzugt wird, ein Saccharid-Peptid-Vesikel mit L_3-Meningokokken-Oligosaccharid zu erzeugen, worin die PEA-Gruppen und die Ringstruktur des KDO des Meningokokken-Oligosaccharids so wenig wie möglich verändert sind.

[0068] Die oben erwähnten Verfahren genügen nicht zur Herstellung eines erfindungsgemäßen Saccharid-Peptid-Vesikels, bei welchem die B-Zellen aktivierende Aktivität des Saccharidteils vom Vorhandensein einer oder mehrerer Phosphoetanolamingruppen (PEA) abhängig ist. Für die Herstellung solcher Saccharid-Peptid-Vesikel sind zusätzliche Maßnahmen erforderlich.

[0069] Eine Herstellungsmöglichkeit für ein erfindungsgemäßes Saccharid-Peptid-Vesikel, welche die oben erwähnten Probleme löst, besteht in der Verwendung eines synthetisch hergestellten Saccharidteils.

[0070] Die Synthese von Oligosacchariden ist mit den aktuellen Techniken möglich. Wie bereits in der vorliegenden Patentanmeldung beschrieben, kann es im Falle von Saccharid-Peptid-Vesikeln, die von LPS abgeleitete Oligosaccharide umfassen, vorteilhaft sein, den im „Innenkern" des LPS vorhandenen, die B-Zellen aktivierenden Teil zu synthetisieren. Ein weiterer Vorteil eines synthetisch erhaltenen Saccharidteils besteht in der Möglichkeit, ein Minimum an Saccharid einzuarbeiten, das als die B-Zellen aktivierender Teil im erfindungsgemäßen SPC funktioniert. Des Weiteren ist es ebenfalls möglich, einen Saccharidteil zu synthetisieren, der ein Minimum an Oligosaccharid mit einer kreuzreaktiven Immunität verleihenden Aktivität umfasst. Es ist auch möglich, die B-Zellen aktivierende Teile zu synthetisieren, die bessere Immunität verleihen als die natürlichen Oligosaccharide.

[0071] Im Falle eines synthetisch erzeugten Saccharidteils ist es einfacher, den Abstandshalter an eine bestimmte Stelle zu bringen. Es ist ebenfalls möglich, eine oder mehrere Phosphoethanolgruppen in den die B-Zellen aktivierenden Teil einzuarbeiten, um eine verbesserte Immunaktivität zu erzielen.

[0072] Um einen Abstandshalter an eine bestimmte Stelle im Saccharid zu bringen, wird bevorzugt, die reaktiven Gruppen des Saccharids mit Schutzgruppen zu versehen, bevor der Abstandshalter angekoppelt wird. Die reaktive Gruppe, an der die Kopplung mit dem Abstandshalter erfolgt, wird mit keiner Schutzgruppe versehen. Das Verfahren verhindert, dass die Gruppen, die für die Immunität verleihende Aktivität wesentlich sind, während der Kopplung mit dem Abstandshalter abgespalten oder verändert werden.

[0073] Die Offenbarung betrifft ebenfalls eine Nukleotidsequenz, die ein rekombinantes OMP oder ein rekombinantes OMP-Fragent kodiert, das gegenüber dem nicht rekombinanten OMP oder dem nicht rekombinanten OMP-Fragment durch wenigstens eine Mutation in den Loops 2, 3, 6, 7 oder 8 des OMP erkannt werden kann. Insbesondere betrifft die Erfindung eine solche Nukleotidsequenz, mit einer Mutation in einem der Loops 6 oder 7. Bevorzugt wird eine Sequenz, die ebenfalls die wesentlichsten in den Loops 1 und 4 befindlichen Antigendeterminanten umfasst. Die Nukleotidsequenz kann eine Insertion, eine Deletion oder eine Änderung wenigstens eines Kodons als Mutation umfassen, wobei eine Mutation bevorzugt wird, die wenigstens zur Bildung eines Kodons führt, das eine zusätzliche Aminosäure mit einer reaktiven Seitenkette in einer der Loops 2, 3, 6, 7 oder 8 gegenüber der Aminosäuresequenz des entsprechenden OMP oder OMP-Fragments enthält. Des Weiteren umfasst die erfindungsgemäße Sequenz vorzugsweise ein Cystein kodierendes Kodon.

[0074] Die Offenbarung betrifft ebenfalls einen Expressionsvektor, der die Nukleotidsequenz für ein erfindungsgemäßes OMP oder OMP-Fragent umfasst, sowie einen die erfindungsgemäße Nukleotidsequenz und/oder den erfindungsgemäßen Expressionsvektor enthaltenden Mikroorganismus.

[0075] Die Offenbarung betrifft ebenfalls ein wenigstens die Immunaktivität von OMP besitzendes Polypeptid, das durch das Vorhandensein einer zusätzlichen Aminosäure mit einer reaktiven Seitenkette in einem der Oberflächen-Loops, insbesondere in den Loops 2, 3, 5, 6, 7 oder 8 gegenüber dem nativen OMP oder einem entsprechenden Fragment des nativen OMP gekennzeichnet ist. Ein Polypeptid mit einer Aminosäure mit einer spezifisch reaktiven Seitenkette im Loop 6 oder 7 wird bevorzugt, da diese Loops die Tertiärstruktur des OMP

in den Loops 1 und 4 am wenigsten behindern, wenn ein Saccharidteil angekoppelt wird. Das erfindungsgemäße Polypeptid umfasst ein Cysteinmolekül als Aminosäure. Da natives OMP kein Cystein umfasst, besteht im Falle eines erfindungsgemäßen Polypeptids die Möglichkeit einer sehr gezielten Kopplung an Cystein. Das Einarbeiten eines zusätzlichen Lysinmoleküls stellt eine weitere Möglichkeiten dar, allerdings wird dies wegen des Vorhandenseins von mehr als einem Lysinmolekül im nativen OMP und daher auch im Polypeptid nicht bevorzugt. Hier führt der Kopplungsvorgang also zu mehr als einem Konjugat, wodurch ein Screening zur Bestimmung des richtigen Konjugats notwendig wird.

[0076] Ein Saccharid-Peptid-Konjugat, das wenigstens ein durch das Vorhandensein eines erfindungsgemäßen Polypeptids gekennzeichnetes Epitop eines OMP umfasst, fällt auch in den Rahmen der Erfindung, sowie ein Impfstoff, der ein äußeres Membranvesikel, ein SPV, ein Polypeptid oder ein erfindungsgemäßes Saccharid-Peptid-Konjugat in einer wirksamen Menge umfasst.

[0077] Die Offenbarung betrifft weiter eine Meningokokken-LPS kodierendes Material enthaltende Nukleotidsequenz, die sich von der Wildtyp-Nukleotidsequenz durch wenigstens eine Mutation oder Deletion unterscheidet, wobei das Expressionsprodukt der mutierten Nukleotidsequenz zum Unterschied von der Nukleotidsequenz des Wildtyps kein oder kein funktionsfähiges GalE enthält. Eine solche Nukleotidsequenz kann eine Mutation im cps-Locus der Meningokokken-DNA oder einer davon abgeleiteten äquivalenten DNA enthalten. Ein Beispiel hierfür ist die von N. meningitidis abgeleitete DNA, wie z.B. auf dem Plasmid pMF32.25, das in den Meningokokkenstamm CBS 401.93 integriert und bei CBS in Baarn am 29. Juli, 1993 hinterlegt wurde. Eine solche Sequenz umfasst vorzugsweise eine Mutation in der D- oder E-Region. Ein Expressionsvektor, der eine Nukleotidsequenz des LPS-kodierenden erfindungsgemäßen Meningokokkenmaterials sowie einen eine solche Nukleotidsequenz umfassenden und zur Expression einer solchen Sequenz fähigen Mikroorganismus enthält, ist auch Gegenstand der Erfindung. Insbesondere gehört ein mutagenisierter Meningokokkenstamm, der galactosefreies LPS erzeugt, zum Gegenstand der Erfindung, wie auch ein Impfstoff, der einen solchen erfindungsgemäßen Mikroorganismus oder ein solches erfindungsgemäßes Molekül umfasst.

BEISPIEL I

Zusammenfassung

[0078] Klasse-1-Außenmembranproteine werden zur Entwicklung von Impfstoffen gegen B-Meningokokken eingesetzt. Diese Proteine enthalten natürlicherweise zwei variable Bereiche (= Epitope), die bakterizide Antikörper binden. Diese Epitope befinden sich in zwei Loops, 1 und 4, die an der Oberfläche freiliegen. Es wurden vier Meningokokkenstämme mit zusätzlichen Epitopen in den Loops 5 und 6 des Klasse-1-Proteins (s. Tabelle A) hergestellt, woraus ersichtlich ist, dass die Insertion bei den Loops 5 und 6 ohne Nachteile für die Epitope im Loop 1 und im Loop 4 möglich ist. Die Stämme besitzen alle die natürlichen Epitope des Elternstamms A8-6^{t} in den Loops 1 und 4, nämlich die Epitope P1.5 und P1.2. Des Weiteren besitzt der Stamm J007 ein zusätzliches P1.7- und Stamm J016 ein zusätzliches P1.16-Epitop, während der Stamm J716 zwei zusätzliche Epitope, das P1.7 und das P1.16, im Loop 6 besitzt. Schließlich besitzt der Stamm P016 ein zusätzliches Epitop P1.16 im Loop 5. All diese Stämme sind fähig, monoklonale Antikörper an die Zelloberfläche zu binden.

TABELLE A

Meningokokkenstamm	Im Loop 1	Im Loop 4	Im Loop 5	Im 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	

[0079] Mit Hilfe dieser Information können neue Meningokokkenstämme hergestellt werden, die Mutationen im OMP enthalten, die zur Herstellung von äußeren Membranvesikeln (=OMV) eingesetzt werden können, die aus Außenmembranfragmenten bestehen, und die unter bestimmten Bedingungen von N. meningitidis abgesondert werden. Diese Stücke können anschließend an LPS gekoppelt werden. Die OMV können als Impfstoff gegen B-Meningokokken dienen.

1.1 Die Struktur der Klasse-1-OMP

[0080] Die Klasse-1-OMP sind kationenselektive Porenproteine [15]. Das Protein ist ungefähr 374 Aminosäuren lang, denen ein Signalpeptid aus 19 Aminosäuren vorangeht [1]. Ein Modell der Topologie des Proteins in der Außenmembran sieht acht an der Oberflache freiliegende Loops voraus (s. **Fig.** 4).

[0081] Die Transmembransequenzen sind unter den verschiedenen Neisseria Porinen erhalten geblieben und bilden eine β-Schichtstruktur. Die hydrophilen an der Oberfläche freiliegenden Loops weisen eine große Streuung in Länge und Sequenz auf. Werden verschiedene Klasse-1-OMP verglichen, so weisen die Sequenzen eine Homologie von 90% auf. Die Streuung innerhalb der Sequenzen scheint im ersten und vierten Loop lokalisiert zu sein. Diese werden variable Regionen oder Epitope genannt. Scheinbar fand eine Bindung der bakteriellen Antikörper an die Epitope in den Loops 1 und 4 statt, was der Tatsache entspricht, dass diese Loops die längsten sind (s. **Fig.** 4). Diese beiden Epitope bestimmen die Subtypspezifizität der Klasse-1-OMP [6].

1.2 Einarbeiten zusätzlicher Epitope in das Klasse-1-Meningokokken-OMP.

[0082] Werden verschiedene Epitope der Klasse-1-OMP verglichen, sind insgesamt 10 verschiedene subtypenspezifische Epitope zu unterscheiden. Oligonukleotide mit „klebrigen Enden" sind für zwei Epitope synthetisiert worden, das P1.7 und das P1.16. Diese Oligonukleotide wurden anschließend im Loop 5 und im Loop 6 des Klasse-1-OMP-Gens eingebaut.

[0083] Der Einbau der Olionukleotide P1.7 und P1.16 in das Klasse-1-OMP-Gen hat neue Stämme mit zusätzlichen Epitopen im Klasse-1-OMP bereitgestellt. Die Stämme umfassen bereits das P1.5-Epitop im Loop 1 und das P1.2-Epitop im Loop 4. Die neu eingearbeiteten Epitope, P1.7 und P1.16, sind im Loop 5 oder Loop 6 eingebaut worden. Die Expression der in die neuen Stämme eingebrachten Epitope ist anschließend mit Ganzzellen-ELISA festgestellt und mit der Expression des Elternstamms verglichen worden. Anschließend wurden die Außenmembrankomplexe (OMC) sowohl von den neuen Stämmen als auch von den Elternstämmen isoliert, die für die Immunisierung von Mäusen eingesetzt werden.

1.3 Materialien

[0084] Die verwendete DNA und das verwendete Plasmid:

– Das Plasmid pTZ19R ist ein von der Fa. Pharmacia geliefertes Plasmid, das u.a. die Amp-Resistenz (Amp^r) und das lacZ-Gen kodiert. Das eingesetzte Plasmid 2-2ΔSE ist ein Derivat von pTZ19R. Dieses Plasmid enthält ein 1,9 kB starkes Insert mit einem Teil des Klasse-1-OMP-Gens vom Meningokokkenstamm 2996 (P1.5.2), ab Aminosäure 100. Das Insert befindet sich an der EcoR1-Stelle der multiplen Klonierungsstelle (= MCS) des pTZ19R. Das Klasse-1-Gen ist durch eine Deletion an der multiplen Klonierungsstelle von der SalI-Stelle der EcoR1-Stelle (wo das Insert beginnt) in denselben Leserahmen wie das lac-Z'-Derivat des pTZ19R gelangt. Das Klasse 1-OMP-Gen in diesem Plasmid enthält eine Kpn-1-Restriktionsschnittstelle im Loop 5.

– Ein anderes verwendetes Plasmid, pPH204, ist ein Derivat von 2-2ΔSE. Das Klasse-1-OMP-Gen in diesem Plasmid enthält eine Kpn1-Restriktionsschnittstelle, nämlich im Loop 6 statt im Loop 5. Die ursprüngliche Kpn-1-Stelle im Loop 5 ist durch eine BamHI-Restriktionsschnittstelle ersetzt und anschließend eine Kpn-1-Stelle im Loop 6 durch PCR-Mutagenese erzeugt worden [17].

[0085] Die eingesetzten Enzyme:

Alle eingesetzten Enzyme wurden zusammen mit den Puffer von der Fa. Boehringer, Mannheim geliefert.

– Kpn-1 (Vol.-akt.: 10 U/μl), mit Inkubationspuffer L.
– SpeI (Vol.-akt.: 10 U/μl), mit Inkubationspuffer H
– SnaI (Vol.-akt.: 8 U/μl), mit Inkubationspuffer M
– T4-DNA-Ligase (Vol.-akt.: 1 U/μl), mit-T4-DNA Ligase Puffer.

[0086] Mit entsprechenden Inkubationspuffern:

– M-Puffer (1×):10 mM Tris-HCl; 10 mM $MgCl_2$; 50 mM NaCl; 1 mM Dithioerythritol (DTE), pH 7.5 (bei 37°C)
– L-Puffer (1×): 10 mM Tris-HCl; 10 mM $MgCl_2$; 1 mM Dithioerythritol (DTE), pH 7.5 (bei 37°C)
– H-Puffer (1×); 50 mM Tris-HCl; 10 mM $MgCl_2$; 100 mM NaCl; 1 mM Dithioerythritol (DTE) pH 7.5 (bei 37°C)
– T4-DNA-Ligase Puffer (10×): 660 mM Tris-HCl; 50 mM $MgCl_2$; 50 mM Dithioerythritol; 10 mM ATP; pH 7.5 (bei 37°C).

[0087] Die auf die Epitope und die LPS-Typen ausgerichteten eingesetzten monoklonalen Antikörper

TABELLE B

Monoklonale- oder LPS-typen	Typ, Subtyp	
MN16C13F4	P1.2	P1 subtypspezifisch
MN22.19A9	P1.5	
MN14C11.6	P1.7	
MN5C11G	P1.16	LPS-Immuntyp
MN14F21.1	L1	spezifisch
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 monoklonalen Antikörper stammten von RIVM.

[0088] Die anderen Materialien werden weiter unten unter der Rubrik „Methoden" (1.4) aufgeführt.

[0089] Die eingesetzten Bakterienstämme:
– E. coli K12 (NM522: Dieser Bakterienstamm ist Hsd (= enthält kein Restriktionsmodifikationssystem)
– Meningokokkenstamm H44/76 B^- (P1.7.16): Dieser Bakterienstamm ist ein kapseldefizienter Klasse 3 defizienter Mutant von H44/76 (P1.7.16).
– Der Meningokokkenstamm A8-6^t B^- (P1.5.2): Dieser Bakterienstamm ist ein kapseldefizienter Mutant von H44/76 (P1.7.16), der mit dem Klasse-1-Protein von 2996 (P1.5,2) transformiert wurde. [17]

1.4 Methoden

1.4.1 Kontrolle des pPH204 durch Transformation in Meningokokken.

[0090] Das Plasmidkonstrukt pPH204 (P1.2) wurde in einem Meningokokkenstamm H44/76 B^- (P1.7.16) transformiert. Dabei wurde das P1.16-Epitop im Loop 3 von H44/76 B^- durch das P1.2-Epitop des Plasmids pPH204 ersetzt. Durch Kolonieblotten und Immunoblotten (s. weiter unten) wurden $P1.2^+$-Kolonien isoliert, die den Stamm J072 nach Kontrolle mit SDS-PAGE, Western- und Immunoblotten lieferten, s. auch Tabelle B unter der Rubrik „Ergebnisse" (1.5).

1.4.2 Einarbeiten von zusätzlichen Epitopen in das Klasse-1-Meningokokken-OMP.

1.4.2.1 Einarbeiten von Oligonukleotiden in die Plasmide pPH204 und 2-2ΔSE

[0091] Das für das Plasmid verwendete Klasse-1-OMP-Gen enthält eine Restriktionsschnittstelle für Kpn-1 in

dem den Loop 6 kodierenden Teil. Ein Oligonukleotid mit Kpn-1-klebrigen Enden, das das P1.7-Epitop wie unten angegeben und unter der Rubrik „Herstellung & Insertion" aufgeführt kodiert, wurde hier eingebaut. Durch Einarbeiten des Oligonukleotids verschwindet die Kpn-1-Restriktionsschnittstelle und es entsteht eine einzigartige SpeI-Restriktionsschnittstelle. Dieses Plasmid wird Konstrukt pJB007 genannt.

2.1 Oligonukleotid des P1.7-Epitops mit Kpn-1 klebrigen Enden (Sequenz-Id 1.):

N G G A S G G 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

[0092]

Restriktionsenzym:	Restriktionsenzym:
A/CTAGT	GGTAC/C
TGATC/A	C/CATGG
SpeI	Kpn-1

[0093] Durch die Insertion des Oligonukleotids in das Plasmid, verschwindet die Kpn-1-Schnitttelle, und es bildet sich eine einzigartige SpeI-Schnitttelle:

links (Sequenz-Id 2):	rechts (Sequenz-Id 3):
5'-GGTACG|AAC GGC-3'	5'-GTT ACT|AGTACC-3'
3'-CCATGC|TTG CCG-5'	3'-CAA TGA|TCATGG-5'

[0094] Auf dieselbe Art wurde ein Oligonukleotid mit Kpn-1-klebrigen Enden, die das Epitop P1.16 kodiert, in den Loop 6 eingebaut, wie weiter unten und unter der Rubrik „Herstellung & Insertion" des Nukleotids (1.4.3) angegeben. Durch Einarbeiten des Oligonukleotids ist die Kpn-1-Restriktionsschnittstelle auch in diesem Fall verschwunden, allerdings entstand eine einzigartige SnaBI-Restriktionsschnittstelle. Dieses Plasmid wird Konstrukt pJB016 genannt.

2.2 Oligonukleotid des P1.16-Epitops mit Kpn-1-klebrigen Enden (Sequenz-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 TGG TTT CTG TTG TTG TTG TTG AAC TTG AAC|T-5'
I G F V G V V V Q G Q

[0095]

Restriktionsenzym:	Restriktionsenzym:
TAC/CTA	GGTAC/C
ATG/CAT	C/CATGG
SnaBI	Kpn-1

[0096] Durch die Insertion des Oligonukleotids in das Plasmid, verschwindet die Kpn-1-Stelle und es bildet sich eine einzigartige SnaBI-Stelle:

links (Sequenz-Id 5):	rechts (Sequenz-Id 6):
5'-GGTACG|TAT ACC-3'	5'-ACC TTG|AGTACC-3'
3'-CCATGC|ATA TGG-5'	3'-TGG AAC|TCATGG-5'

[0097] Anschließend wurde eine Oligonukleotide mit SpeI-klebrigen Enden nach dem Oligonukleotid P1.7 in den Loop 6 des Konstrukts pJB007 eingebaut, wodurch das Oligonukleotid das P1.16-Epitop kodiert, wie weiter unten beschrieben. Hiermit ist die SpeI-Restriktionsschnittstelle durch Einarbeiten der Nukleotide verschwunden. Dieses Plasmid wird Konstrukt pJB716 genannt.

2.3 Oligonukleotide des P1.16-Epitops mit SpeI-klebrigen Enden (Sequenz-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 TGG TTG TTG TTG AAC TGG AAC|AGATC-5'
I G F V G V V V Q G Q

Restriktionsenzym:

A/CTAGT
TGATC/A
SpeI

[0098] Durch Schneiden des eingebauten Oligonukleotids des P1.7 Epitops mit SpeI und anschließender Insertion mit einem Oligonukleotid des P1.16-Epitops (mit SpeI-klebrigen Enden) verschwindet die SpeI-Stelle:

links (Sequenz-Id 8):
5'-ACTAGC|TAT ACC-3'
3'-TGATCG|ATA TGG-5'

rechts (Sequenz-Id 9):
5'-ACC TTG|TCTAGT-3'
3'-TGG AAC|AGATCA-5'

[0099] Das verwendete Klasse-1-OMP-Gen im Plasmid 2-2ΔSE enthält eine Restriktionsschnittstelle für Kpn-1 in dem den Loop 5 kodierenden Teil. Darin wurde ein P1.16 Oligonukleotid eingebaut. Durch das Einarbeiten ist die Kpn-1-Restriktionsschnittstelle verschwunden. Das Konstrukt wird pJB016 genannt.

TABELLE C

Konstrukt	Im Loop 6	Im Loop 5
pJB007	P1.7	
pJB016	P1.16	
pJB716	P1.7.16	
pPH016		P1.16

1.4.2.2 Transformation der Konstrukte in E. coli.

[0100] Anschließend wurde die Tansformation der vier Konstrukte in E. coli K12 NN522 (s. weiter) vorgenommen. Die Transformanten wurden unter Selektionsdruck von 10 µg/ml Ampicillin kultiviert. Das Plasmid wurde aus den gebildeten Kolonien isoliert (s. weiter unten) und auf das Vorhandensein der richtigen Konstrukte geprüft. Das Konstrukt PJB007 wurde auf die verschwundene Kpn-1- und die gebildete SpeI-Stelle geprüft. Das Konstrukt pJB016 wurde auf die verschwundene Kpn-1- und die gebildete SnaBI-Stelle und das Konstrukt pJB716 auf die verschwundene SpeI-Stelle geprüft. Durch SDS-PAGE, Western- und Immunoblotten (s. weiter unten) mit den geeigneten monoklonalen Antikörpern wurde beobachtet, ob die Insertionen des P1.7- bzw. P1.16-Epitops gelungen sind, wobei die Expression und die bindenden Antikörper sichtbar gemacht wurden.

1.4.2.3 Transformation der Konstrukte in Meningokokken.

[0101] Anschließend wurden die Konstrukte (pJB007, pJB016, pJB716) zur Transformation des Meningokokkenstamms A8-6^{t} B^{-} (P1.5.2) verwendet, wobei die Rekombination der chromosomalen Meningokokken-DNA mit dem Konstrukt erfolgte. Mit Hilfe von Kolonieblotten und Immunoblotten (s. weiter unten) wurden die P1.7'- und die P1.16'-Kolonien isoliert und ergaben, nach dem Prüfen mit SDS-PAGE, Western- und Immunoblotten die erwünschten Stämme, s. a. Tabelle C unter der Rubrik „Ergebnisse".

1.4.2.4 Prüfen der neuen Stämme mit Ganz-Zellen-ELISA

[0102] Das Maß, in dem die eingearbeiteten Epitope in den Stämmen J007, J016, J716, J072 und P016 exprimiert waren, wurde festgestellt und diese Expression mit der Expression der Elternstämme verglichen.

1.4.3 Herstellung & Insertion des Oligonukleotids.

[0103] Die komplementären, nicht phosphorylierten Oligonukleotide gemäß den obenstehenden Angaben wurden mit Hilfe des 3814 DNA Synthesizers von Fa. Applied Biosystems synthetisiert. Die Hybridisierung erfolgte durch Zugabe der komplementären Oligonukleotiden in gleichen Konzentrationen, Erwärmung auf 95°C

und anschließendes Abkühlen auf Raumtemperatur. Das führte zu Oligonukleotiden mit den richtigen klebrigen Enden. Das Plasmid wurde mit den richtigen Enzymen verdaut, wonach die Oligonukleotide mit Hilfe von T4-Ligaten im Plasmid über Nacht bei 15°C (im Verhältnis von 200 ng Oligonukleotid : 1 µg Plasmid ligiert wurden. Die Ligationsmischung wurde anschließend auf 80°C erwärmt und langsam auf Raumtemperatur abgekühlt, um das Einarbeiten des Oligonukleotids zu ermöglichen. Durch Einarbeiten des Oligonukleotids in das Plasmid verschwindet die verwendete Restriktionsschnittstelle. Die Ligationsmischung wurde somit mit diesem Enzym geschnitten, wodurch die sich zu Ringen selbstschließenden Produkte unter den Plasmiden linerisiert wurden. Nach der Transformation in E. coli K12 NM522 (siehe weiter unten) wurden die linearen Bruchstücke degradiert, sodass in allen Transformanten eine Insertion enthalten sein muss. Die Transformanten mit der richtigen Orientierung des eingearbeiteten Oligonukleotids wurden durch SDS-PAGE, Westernblotten und Immunoblotten (s. weiter unten) mit monoklonalen, gegen die neuen Epitope gerichteten Antikörpern ausgewählt.

1.4.4 Transformation in E. coli K12 NM522

[0104] Die Transformation des Plasmids DNA in E. coli wurde nach [13] durchgeführt. Dazu wurde ein E. coli K12 NM522 Stamm verwendet, der in Luria-Broth-Medium (Trypton 10 g/l; Hefeextrakt 5 g/l; NaCl 10 g/l, pH 7,0) bei 37°C kultiviert wurde. Nach der Transformation wurde E. coli auf ein festes Nährmedium bestehend aus LB-Medium mit 1,5%igem (Gew/Vol) Agar (Fa. Noble, Fa. Difco) gestrichen. Zur Selektion betreffend die Ampicillinresistenz wurden dem Medium 100 µg/ml Ammpicillin (Fa. Sigma) zugegeben, wonach das Wachstum bei 30°C erfolgte, um die Bildung von Satelliten zu verhindern.

1.4.5 Isolierung des Plasmids

[0105] Die Isolierung des Plasmids von E. coli wurde nach der Methode der alkalischen Lyse durchgeführt. [13]

1.4.6 Agarose-Gel-Elektrophorese

[0106] Die Agarose-Gel-Elektrophorese wurde gemäß [13] durchgeführt. Dazu wurde eine 1 gew/vol%-ige Agarose (Sigma Nr A-9539) für ein normales Gel und eine 1,2 gew/vol%-ige bei niedriger Temperatur schmelzende Agarose (Nusieve GTG der Fa. FMC Bioproducts) für ein präparatives Gel verwendet. Als Puffer für diese Gele wurde 1× konzentrierter TBE-Puffer (RIVM) verwendet: 0,089 M Tris, 0.089 M Borsäure, 0,002 M EDTA (pH 8.3). Der hier für die Molekularmasse verwendete Marker war lambda-Hind-III-digest (Fa. Boehringer, Mannheim) mit Fragmentgrößen von 125, 564, 2027, 2322, 4361, 6557, 9416, 23130 bp. Eine 30 gew/vol%-ige Sucroselösung mit 0,25 Gew/Vol% Bromphenol Blau diente als Beladungspuffer (5×).

[0107] Die Elektrophorese wurde bei 10 V/cm durchgeführt. Danach wurde mit 0,5 µg/ml Ethidiumiodid gefärbt und photographiert.

1.4.7 Transformation in Meningokokken

[0108] Eine Platte mit Meningokokken wurde über Nacht mit 5% CO_2 und auf einem feuchten Tuch liegend bei 37°C kultiviert. Die Zellen der vollkommen kultivierten Platte wurden anschließend in 10 ml Muller Hinton Medium (RIVM) mit 10 mM $MgCl_2$ bei 37°C resuspendiert. Die Bakteriensuspension wurde anschließend mit Müller Hinton Medium 1: 5 verdünnt, wonach 1 µg/ml Plasmid-DNA zugegeben wurde. Nach dreistündiger Inkubation bei 37°C wurde eine 10^4-fache Verdünnung mit keimfreiem PBS (mit 0,01 M phosphat-gepuffertem physiologischem Salz pH = 7,2; RIVM) vorgenommen und auf eine Gonokokken-Agarplatte (*Supplement 3) gestrichen. Nach Kultivierung über Nacht, wurden die richtigen Transformanten durch Kolonieblotten ausgewählt. Siehe die Rubrik „Kolonieblotten".

1.4.8 Kolonieblotten.

[0109] Die Zellen einer voll bedeckten Meningokokken-Platte wurden auf eine 0,45 µm starke Nitrozellulosemembran (Schleicher & Schuell) übertragen. Anschließend wurden die Bakterienzellen in PBS (phosphat-gepuffertes physiologisches Salz, pH 7,2, RIVM) mit Tween 80 (Polyoxyethylen-sorbitanmonooleat, Fa. Merck) eingebracht und eine Stunde lang bei 56°C inaktiviert. Danach wurden die überschüssigen Zellen abgestrichen und der Blott wie unten unter „Immunoblotten" beschrieben behandelt.

1.4.9 SDS PAGE

[0110] SDS PAGE wurde gemäß [8] durchgeführt. Das Gel bestand aus einem 5%igen (Gew/Vol) Acrylamid-Stacking-Gel und einem 11%igen (Gew/Vol) Acrylamid-Trenngel. Die eingesetzten Standardproteine (RIVM) hatten Größen (Molekularmassen) von 14, 20, 30, 43, 67 und 94 kD. Alle Proben für die SDS PAGE-Bestimmung bestanden aus ganzen Zellen. Im Falle der E. Coli Zellen, wurden diese über Nacht bei 37°C in LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin, mit oder ohne 1 mM IPTG (= Isopropyl-thio-β-D-galactopyranosid, Sigma) kultiviert. Anschließend wurden 1.5 ml der Suspension abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 70 µl H_2O suspendiert, dem 130 µl Ladepuffer (Tris/HCl 0.625 M, pH 6,8; 10% SDS; 50% Glycerol; 0,01% Bromphenolblau; B-Mercapto-ethanol im Verhältnis 2: 4: 4: 2: 1) zugegeben wurden. Die Mischung wurde anschließend 10 Minuten bei 95°C inkubiert.

[0111] Im Fall der Meningokokkenzellen wurden Zellen von einer vollkultivierten Platte (über Nacht mit 5% CO_2 auf einem feuchtem Tuch liegend bei 37°C) in 10 ml PBS (enthaltend 0,01 M phosphat-gepuffertes physiologisches Salz, pH 7,2, RIVM) aufgelöst, 30 Minuten bei 56°C inaktiviert und abzentrifugiert (10 min bei 4000 U/min). Das Pellet wurde in 500 µl H_2O suspendiert. 170 µl Ladepuffer und 0 bis 35 µl H_2O wurden zu 35 bis 70 µl Bakteriensuspension bis zu einem Gesamtvolumen von 200 µl hinzugegeben. Die Mischung wurde 10 min auf 95°C erwärmt und auf das Gel aufgetragen.

[0112] Der verwendete Elektrophoresepuffer bestand aus 50 mM Tris/HCl (pH 8,3); 380 mM Glycin; 0,1% SDS. Die Elektrophorese wurde bei einer konstanten Stromstärke von 40 mA durchgeführt. Nach der Elektrophorese wurden die Gele:

1. entweder in einer Stunde bei 56°C mit Coomassie Brillantblau (0,1 gew/vol.%-ig in 10%-iger (Vol/Vol) Essigsäure und 30%-igem (Vol/Vol) Methanol) gefärbt und wenigstens eine Stunde lang bei 56°C in einer Lösung enthaltend 10% (Vol/Vol) Essigsäure und 5% (Vol/Vol) Methanol.
2. oder auf eine 0,2 µm Nitrocellulosemembran (Fa. Schleicher & Schuell) geblottet (siehe weiter unter der Rubrik „Westernblotten").

1.4.10 Western- und Immunoblotten

[0113] Die durch SDS PAGE getrennten Proteine wurden mit Hilfe des Semi Dry-Elektroblotters A, eine Stunde lang bei 8 mA/cm^2 Gel mit 25 mM Tris/HCl (pH 8.3); 192 mM Glycerin; 20% Methanol; 0.0375% SDS als Blottpuffer auf eine 0.2 µm starke Nitrocellulosemembran (Fa. Schleicher & Schuell) übertragen. Anschließend wurde der Blott eine Viertelstunde in PBS (phosphat-gepuffertem physiologischem Salz, pH 7,2) mit 0,1% Tween 80 (Fa. Merck) gewaschen. Danach wurden die Blotts eine halbe Stunde in PNS 0,1 Tween und 0,3% Casein (Hydrolysat, N-Z-AminA, Fa. ICN Biochemicals) gewaschen. Die Blotts wurden anschließend wenigstens 1 Stunde in PBS/0.1% Tween/0.3% Casein mit dem monoklonalen, gegen das nachzuweisende Epitop gerichteten Antikörper inkubiert. Nach der Inkubation wurde 3× 10 min mit PBS/0.1% Tween gewaschen und anschließend eine halbe Stunde mit Protein A Peroxidase-Konjugat (verdünnt 1: 10.000) inkubiert [9].

[0114] Nach erneutem Waschen 3× 10 Min mit PBS/0.1% Tween und 1× mit H_2O, wurde die Substrat/Wasserstoffperoxidmischung: 30 ml Substrat A (Substr. A: Phosphate/Citrate Puffer, 0.02M Na_2HPO_4 und 0.01M Zitronensäure 1: 1, pH 5.0) mit 10 ml Substrat B (Substr. B: 24 mg Tetramethylbenzidine und 80 mg DONS (Dioctyl-sulfosuccinat) in 10 ml 96%-igem Ethanol) und 20 µl Wasserstoffperoxid 30%-ig (Fa. Merck) hinzugegeben. Nach einigen Minuten wurden grün-blaue Bänder auf den Blotts dort sichtbar, wo die Antikörper an die Proteine gebunden hatten. Danach wurden die Blotts 3× mit H_2O gewaschen und photographiert.

1.4.11 Ganzzellen-ELISA

[0115] Eine platte mit Meningokokken wurde über Nacht mit 5% CO_2 auf einem feuchtem Tuch liegend bei 37°C kultiviert. Anschließend wurden die Bakterienzellen wieder in 5 ml PBS (phosphat-gepuffertem physiologischem Salz, pH 7,2, RIVM) suspendiert und 30 min lang bei 56°C inaktiviert. Danach wurde die Suspension auf eine OD_{620} von 0.1 verdünnt. Mikrotiterplatten (Titertek-PVC-Mikroprobenplatten mit U-förmigem Boden) wurden mit 100 µl Suspension proWell gefüllt (durch Bestreichen). Die Suspension wurde über Nacht bei 37°C und zwei Tage bei Raumtemperatur getrocknet. Die Platten wurden kurz vor dem Gebrauch 3× mit PBS mit 0,1% Tween (Fa. Merck) gewaschen. Es wurden 100 µl Lösung mit der Verdünnung monoklonaler Antikörper in PBS/0,1% Tween/0.5% Protifar (Fa. Nutricia) pro Well zugegeben und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die Platten wurden 3× mit PBS/0,1% Tween gewaschen. Anschließend wurden die Wells mit 100 µl/Well einer Suspension von Protein A-Peroxidase Konjugat (RIVM, 1: 100000× Verdünnung) oder anti-IgM-Konjugat (RIVM, 1: 2000× Verdünnung in PBS/0.1% Tween/0.5% Protifar) gefüllt und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Nach

3-maligem Waschen mit PBS/0.1% Tween wurden 100 µl Substrat C (Substr. C: 1 ml Tetramethylbenzidine (6 mg/ml Alcohol 96%-ig) und 22 µl H_2O_2 30%-ig (Fa. Merck) in 60 ml 0.11M NaAc-Puffer) pro Well zugegeben, wonach die Inkubation über 10 Minuten erfolgte. Die Reaktion wurde durch Blocken mit 100 µl 2 M H_2SO_4/Well abgebrochen. Die Absorptionswerte wurden mit einer ELISA-Lesevorrichtung (Biokinetics Reader EL312e der Fa. Bio-Tek Instruments) bei 450 nm gelesen.

1.4.12 Isolierung von OMP

[0116] Eine Platte mit Meningokokken wurde über Nacht mit 5% CO_2 auf einem feuchtem Tuch liegend bei 37°C kultiviert. Die Zellen wurden anschließend in 5 ml flüssigem Meningokokkenmedium (RIVM) resuspendiert und auf zwei Kolben mit je 200 ml Meningokokkenmedium (RIVM) verteilt. Die Kolben wurden über Nacht bei 37°C geschüttelt. Die Zellen wurden 30 min bei 56°C inaktiviert, wonach sie bei 10.000 U/min 10 min zentrifugiert wurden (Beckman Modell J-21B, Rotor JA-14). Die Überstehende Flüssigkeit wurde verworfen, und 10 ml 0.01M Tris/HCl pH 8.0 wurden zu jedem Pellet hinzugegeben. Nach Resuspendieren des Pellets wurden die Suspensionen in einem 50 ml Röhrchen vereinigt. Das Röhrchen wurde in Eiswasser gestellt und anschließend 15 Minuten beschallt (Branson Sonifier 250, Position 4, 50%). Danach wurde die Zentrifugierung 30 min bei 4000 U/min (Heraeus Christ Minifuge GL mit Permanentrotor) vorgenommen. Die überstehende Flüssigkeit wurde eine Stunde bei 30.000 U/min bei 10°C zentrifugiert. (Sorvall ARC-1 Ultrazentrifuge Ölturbinenantrieb (OTD)-65, Rotor 70 T_i). Anschließend wurde das Pellet in 4 ml 1% Sarcosyl in Tris/HCl pH 8.0 resuspendiert und 15 min bei 5000 U/min (Minifuge der Fa. Heraeus) zentrifugiert. Die überstehende Flüssigkeit wurde eine Stunde mit 30.000 U/min bei 10°C zentrifugiert. (Sorvall Ultrazentrifuge, Rotor T865.1). Nach Abgießen des Überstandes, wurde das Pellet in 2 ml 0.01 M Tris/HCl pH 8.0 aufgelöst. Anschließend wurde die Ausbeute durch Bestimmung des Proteingehalts überprüft (mit dem BCA* Protein Assay Reagent der Fa. Pierce, Arbeitsprotokoll laut Hersteller). Danach wurden die OMP auf einen Proteingehalt von 1 mg/ml in Tris-Puffer gebracht und auf 50 µl pro Röhrchen aufgefüllt. Die Reinheit wird mit Hilfe eines 11%-igen SDS-PAA-Gels und der ELISA-Technik bestimmt.

1.5 Ergebnisse

1.5.1 Kontrolle des pPH204 durch Transformation in Meningokokken

[0117] Um zu überprüfen, ob das Plasmid pPH204 intakt bleibt, wurde das Plasmid in den Meningokokkenstamm H44/76 B^- transformiert. Hier wurde das P1.2-Epitop des Plasmids pPH204 mit dem P1.16-Epitop des Stammes H44/76 ausgetauscht. Die Selektion der richtigen Tranformanten erfolgte durch Kolonie- und Immunoblotten, wobei $P1.2^+$-Kolonien isoliert wurden. Die Kolonien lieferten nach Kontrolle mit SDS-PAGE, Western-Immunoblotten den Stamm J072 (s. **Fig.** 5 und 6, 7, 8 sowie 9). Dieser Stamm besitzt das P1.7-Epitop im Loop 1 und das P1.2-Epitop im Loop 4.

1.5.2 Insertion des P1.7-Oligonukleotids an die Kpn-1-Stelle von pPH204

[0118] Das Oligonukleotid für das P1.7-Epitop wurde an die Kpn-1-Stelle von pPH204 eingebaut, wonach das erhaltene Konstrukt pJB007 in E. coli K12 NM522 transformiert wurde. Das Plasmid wurde aus den gebildeten Kolonien isoliert. Das isolierte Plasmidmaterial wurde auf das Verschwinden der Kpn-1-Restriktionsschnittstelle und das Vorhandensein der neuen SpeI-Restriktionsschnittstelle geprüft (s. **Fig.** 10). In allen geprüften Transformanten war die Kpn-1-Restriktionsschnittstelle verschwunden und die neue SpEI-Restriktionsschnittstelle vorhanden. Die Transformanten wurden auf SDS PAGE übertragen. Nach Western-Immunoblotten mit monoklonalen, gegen das P1.7-Epitop gerichteten Antikörpern wurden 3 Transformanten ausgewählt, die das Oligonukleotid in der richtigen Orientierung enthielten. Siehe **Fig.** 12, 13, 14 und 15.

1.5.3 Insertion des P1.6-Oligonukleotids an die Kpn-1-Stelle von pPH204

[0119] Das Oligonukleotid für das P1.16-Epitop wurde in die Kpn-1-Stelle von pPH204 eingebaut (Konstrukt pJB016) und anschließend transformiert. Die Plasmide der Transformanten wurden auf das Verschwinden der Kpn-1-Stelle und auf die neue SnaBI-Stelle geprüft, s. **Fig.** 10. Es wurden drei das Epitop P1.16 in der richtigen Orientierung enthaltende Transformanten durch Western-Immunoblotten ausgewählt. (Siehe **Fig.** 11 und 12, 13, 14, und 15.)

1.5.4 Isolieren des P1.6-Oligonukleotids an der SpeI-Stelle von pJB007

[0120] Die Oligonukleotide für das P1.16-Epitop wurde in die SpeI-Stelle von pJB007 eingebaut (Konstrukt

pJB716) und transformiert. Die Plasmide der Transformanten wurden auf das Verschwinden der SpeI-Stelle geprüft. Siehe **Fig.** 10. Ein die Oligonukleotide in der richtigen Orientierung enthaltender Transformant wurden durch Western-Immunoblotten ausgewählt. Siehe **Fig.** 11 und 12, 13, 14 und 15.

1.5.5 Insertion der P1.16-Oligonukleotide an die Kpn-1-Stelle von 2-2ΔSE

[0121] Die Oligonukleotide für das P1.16-Epitop wurde in die Kpn-1-Stelle von 2-2ΔSE eingebaut (Konstrukt pPH016) und anschließend transformiert. Die Plasmide der Transformanten wurden auf das richtige Einarbeiten der Oligonukleotide geprüft (nicht aufgeführte Daten) [17].

1.5.6 Transformation der Konstrukte in Meningokokken

[0122] Anschließend wurden die vier Konstrukte (pJB007, pJB016, pJB716 und pPH016) in den Meningokokkenstamm A806^{t} B^{-} (P1.5.2) transformiert. Die Selektion der korrekten Transfromanten erfolgte durch Kolonie- und Immunoblotten, wobei P1.7^{+} und P1.16^{+} Kolonien isoliert wurden. Infolge der Überprüfung der Stämme wurden die in Tabelle D angegebenen Ergebnisse erhalten. Siehe auch **Fig.** 5 und 6, 7, 8 und 9.

TABELLE D

Meningokokken-stamm	Im Loop 1	Im Loop 4	Im Loop 5	Im Loop 6
J007	P1.5	P12		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 Ganzzellen-ELISA

[0123] Die Expression der in die neuen Stämme eingearbeiteten Epitope wurde beobachtet und mit den Elternstämmen A8-6^{t} (P1.5.2) und H44/76 (P1.7.16) verglichen. Siehe. **Fig.** 16 und Table D.

1.6 Schlussfolgerung und Diskussion

[0124] In dieser Testserie wurden vier neue Meningokokkenstämme mit zusätzlichen Epitopen in den Loops 5 und 6 erstellt. Die Stämme J007 und J016 enthalten das 1.7- bzw. das 1.16-Epitop im Loop 6, während J716 sowohl das P1.7- als auch das P1.16-Epitop besitzt. Der Stamm P016 enthält das P 1.16-Epitop ausschließlich im Loop 5. Das vorgenommene Ganzzellen-ELISA zeigt, dass die monoklonalen, gegen die eingearbeiteten Epitope gerichteten Antikörper relativ zu den Elternstämmen H44/76 and A8-6^{t} gut bis ziemlich gut an die ganzen Zellen binden. Der ELISA-Test beweist, dass die neuen Klasse-1-OMP vollkommen intakt auf die Außenmembran transportiert werden können, andernfalls würde keine Bindung an die monoklonalen Antikörper stattfinden. Wenn der Stamm H44/76 mit den vier Stämmen mit zusätzlichen Epitopen in den Loops 5 und 6 verglichen wird, scheint das P1.7-Epitop in allen Fällen gleich gut zu binden. Es ist unwesentlich, ob sich das P1.7-Epitop im Loop 1, 5 oder 6 befindet.

1.7 Literatur für Beispiel 1

[1] Barlow A. K., Heckels J. E. und Clarke I. N., The class 1 outer membrane protein or Neisseria meningitidis: gene sequence und structural immunological similarities to gonococcal porins. Molecular Biology 1989. 3(2). S. 131–139.
[2] Frasch E. F.. Zollinger W. D. und Poolman J. T., Serotyping antigens or Neisseria meningitidis und a proposed scheme for designation of serotypes. Reviews of infectious diseases, Band 7. Nr. 4, Juli–August 1985. S. 504–510.
[3] Gotschlich E. C., Meningococcal meningitis. In: Bacterial Vaccins (Hrg. Geroanier, R.), Acedemice Press; Inc. 1984, Kap. 8. S. 237–255
[4] Maiden M. C. J., Suker J., HcKenna A. J.. Bygraves J. A. und Feavers I. M.. Comparison of the class 1 outer membrane proteins or eight serological reference strains of Neisseria meningitis, Molecular Microbiology (1991). 5(3). S. 727–736

[5] Klugman K. P.. Gotschlich E. C. und Blake M. S.. Sequence of the structural gene (rpmM) for the class 4 outer membrane protein of Neisseria meningitidis, homology of the protein to gonococcal protein III and Escherlchia coli Omp A and construction of meningococcal strains that lack class 4 protein. Infection und Immunity, Juli 1989, S. 2066–2071.
[6] Ley P. van der, Heckels J. E., Virji M., Hoogerhout P. und Poolman J. T., Topology of outer membrane porins in pathogenic Neisseria, in Druck.
[7] Lifely H. R.. Moreno C. und Lindon J. C., An intergrated molecular und immunological approach toward a meningococcal group B vaccine. Vaccine, Band 5, März 1987. S. 11–26
[8] Lugtenberg B., Meijers J., Peters R., Hoek P. van de. Alphen L. van Electrophoretic resolution of the major outer membrane protein of Escherichia coli into four bands, FEBS letters, 1975, Band 58, Nr. 1. S. 251–258.
[9] Nakane P. K., Kawaoi A., Perosidase-labeled antibody. A new method of conjugation. J. Histochem. end Cytochem., 1974. Nr. 22, S. 1084–1091.
[10] Nester E. W.. Evans Roberts C. Pearsall N. N. und McCarthy B. J., Microbiology, 2. Ausgabe, Eastbourne, Sussex, Holt Rinehart and Winston. 1978, S. 433. 443, 474, 540–543, 591.
[11] Peltola H.. Safary A.. Käythy H., Karanko V. und André F. E., Evaluation of two tetravalent (ACYW-135) menigococcal vaccins in infants und small children: a clinical study comparing immunogenity of O-acetyl-negative und O-acetyl-positive group C polysaccharides.
[12] Poolman J. T., Marie S. und Zanen H. C, Variability or low molecular weight, heat modifiable outer membrane proteins of Neisseria Menin-gitidis. Infection end Immunity, Dezember 1980, S. 642–648
[13] Sambrook J., Fritsch E. F. und Maniatis T., Molecular cloning: a laboratory manual. 2. Ausgabe, 1989. Cold Spring Harbour Laboratory. Cold Spring Harbour, N.Y. S. 1.25–1.28, 1.82–1.84. 6.3–6.16. 6.18–6.19.
[14] Soukonen K., Leinonen H., Abdillahi H. und Poolman J. T., Comparative evaluation of potentional components for group B meningococcal vaccin by passive protection in the infant rat and in vitro bacterial assay, Vaccin. Band 7. August 1989. S. 325–328.
[15] Tomassen J., Vermeij P., Struyvé M., Benz R. und Poolman J. T., Isolation of Neisseria meningitidis mutants deficient in class 1 (PorA) und class 3 (PorB) outer membrane proteins, Infection und Immunity, Mai 1990. S. 1355–1359.
[16] Tsai CM., Frasch C. E., und Mocca L. F., Five structural classes of major outer membrane proteins in Neisseria meningitidis, J. Bacteri-ol. 1981 Nr. 146, S. 69–78.
[17] P. van der Ley persönliche Information.

BEISPIEL 2

ZUSAMMENFASSUNG

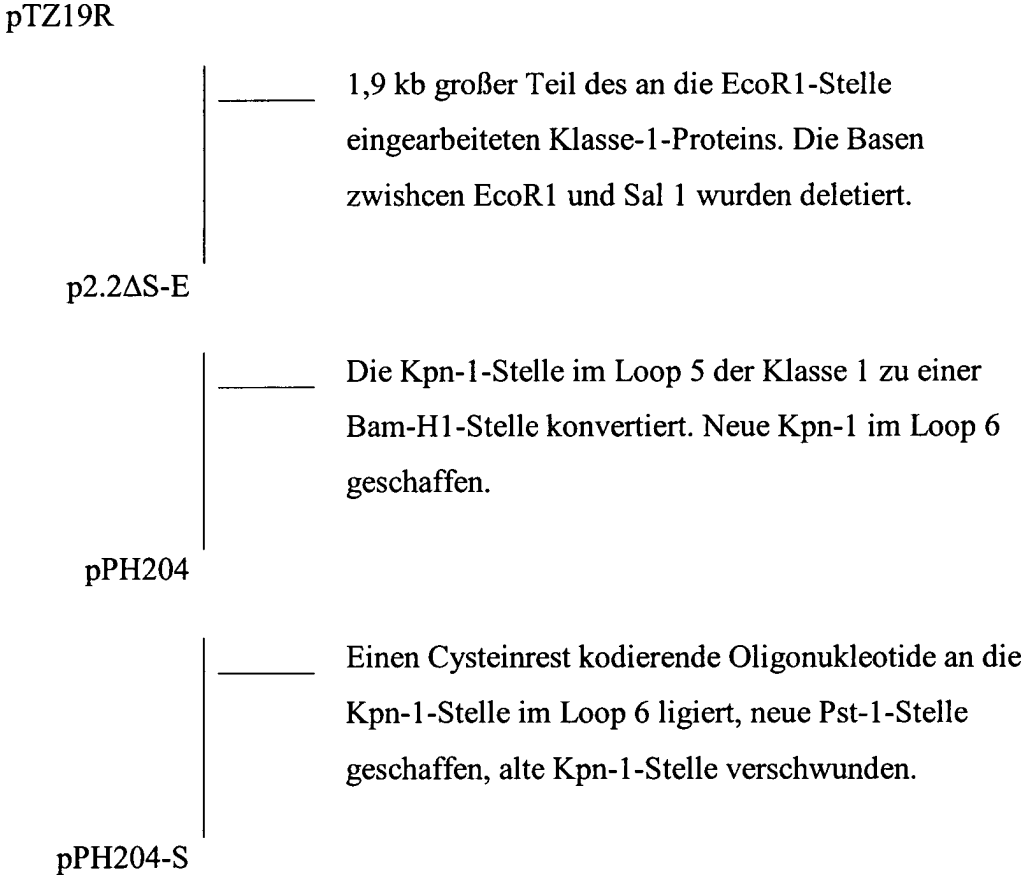
[0125] In diesem Beispiel wird die Erzeugung einer mutierten Außenmembranproteins beschrieben, wobei das OMP eine Kopplungsmöglichkeit zur Kopplung der Klasse-1-OMP an den Oligosaccharidteil des Lipopolysaccharids bietet. Aus diesem Grund wird eine ein Cystein kodierende Oligonukleotide in eine vorhandene Restriktionsschnittstelle des Klasse-1-Proteingens eingearbeitet, wobei das Oligonukleotid anschließend in einem kapseldefizienten Mutanten des Meningokokkenstamms H44/76, H44/76-B^- transformiert wird. Nach der Transformation schien die Einarbeitung von Cystein keinen Einfluss auf die Epitopexpression oder auf die Produktion des Klasse-1-OMP zu haben.

[0126] Die Selektion der Loops 5 und 6 war dadurch bestimmt, dass diese keine bedeutenden Klasse-1-Epitope enthalten, sowie durch die in Beispiel I beschriebene Beibehaltung der Immunaktivität nach Durchführung von Mutationen in diesen Loops. Die Überprüfung des Ergebnisses der Einarbeitung erfolgte auf Grund der Epitopexpression der erhaltenen Transformanten.

2.1 MATERIAL

[0127] Das eingesezte Plasmid:
Das eingesetzte Plasmid, pPH204, ist vom Plasmid pTZ19R der Fa. Pharmacia abgeleitet.

ÜBERBLICK ÜBER DIE ERZEUGUNG DER EINGESETZTEN PLASMIDE



Eingesetzte Enzyme:

– Kpn-1 (Vol.-akt.: 10 U/µl), mit Inkubationspuffer L
– PstI (Vol.-akt.: 10 U/µl), mit Inkubationspuffer H
– T4-DNA-Ligase (Vol.-akt.: 1 U/pl), mit T4-DNA-Ligase-Puffer.

[0128] Für die Zusammensetzung des jeweiligen Inkubationspuffers siehe Tabelle E.

TABELLE E: Zusammensetzung der eingesetzten Puffer

Pufferkomponenten in mMol/l	H	L	T4-DANN-Ligase
Tris-HCl	50	10	66
$MgCl_2$	10	10	5
NaCl	100		
Dithioerytheritol	1	1	5
ATP			1
pH bei 37°C	7,5	7,5	7,5

[0129] Sowohl die Enzyme als auch die Puffer wurden von der Fa. Boehringer Mannheim geliefert.

[0130] Verwendete Bakterien.

[0131] Escherichia coli K12 NM522: Dieser Bakterienstamm enthält kein Restriktion veränderndes System.

[0132] Meningokokkenstamm H44/76-B^-. Das ist der Mutant von H44/76, dem die Kapsel fehlt.

[0133] Für die verwendeten monoklonale Antikörper siehe Tabelle F.

TABELLE F: Verwendete monoklonale Antikörper

Monoklonaler Antikörper	gerichtet gegen
MN16C13F4	P1.2
MN14C11.6	P1.7
MN5C11G	P1.16

[0134] Alle monoklonalen Antikörper wurden von RIVM geliefert.

Verwendete Membran:

FÜR DEN WESTERNBLOTT
BIO RAD Trans Blott Transfermedium reine Nitrocellulosemembran
Blott-Filter-Papier, 0,45 µm.
Charge-Nr.: 4072/87020
Kat. Nr.: 162-0113
FÜR DEN KOLONIEBLOTT:
Fa. Schleicher & Schuell BA 85/22, 0,45 Mikron.
Durchmesser 82 mm
Ref. Nr.: 406 216

2.2 METHODEN

2.2.1 HYBRIDISIERUNG DER OLIGONUKLEOTIDE

[0135] Die komplementären nicht phosphorylierten Oligonukleotide (siehe unten) wurden in einer Konzentration von jeweils 1 µg/100 µl zugegeben und auf 95°C erwärmt. Nach dem Erwärmen konnte die Mischung langsam auf Raumtemperatur auskühlen. Da das Abkühlen langsam vor sich geht, kann die Hybridisierung der komplementären Oligonukleotide stattfinden [5]. So werden die Oligonukleotide mit den richtigen klebrigen Enden erzeugt, nämlich den Kpn-1-klebrigen Enden.

INFORMATION ZUM C1–C2 OLIGONUKLEOTID

Cystein mit Kpn-1-klebrigen Enden kodierendes Oligonukleotid (SEQ-ID-NR. 10)

Gly Cys Ser Leu Ser
5'-G GGC TGC AGC CTA AGT AC-3'
3'-CATG C CCG ACG TCG GATT-5'
Ala Ala Ala End

Restriktionsschnittstelle für Kpn-1:

5'-GGTACC-3'
3'-CCATGG-5'

Restriktionsschnittstelle für PstI:

5'-CTGCAG-3'
3'-GACGTC-5'

[0136] Das Nukleotid ist aus zwei einstrangigen Oligonukleotiden zusammengesetzt:
Oligonukleotid C1 (SEQ-ID-NR: 11) 5'-GGG CTG CAG CCT AAG TAC-3'
Oligonukleotid C2 (SEQ-ID-NR: 12) 5'-TTA GGC TGC AGC CCG TAC-3'

2.2.2 LIGIEREN VON HYBRIDISIERTEN OLIGONUKLEOTIDEN ZU PLASMIDEN

[0137] Die Plasmide wurden einer Verdauung mit den richtigen Enzymen unterzogen und anschließend auf einem 1,2%-igen leicht schmelzenden Gel von den nicht geschnittenen Plasmiden getrennt. Danach wurde das Gel mit Ethidiumbromid gefärbt und die geschnittenen Plasmide aus dem Gel herausgeschnitten. Nachher wurde die geschnittene Plasmid-DNA vom Agarosegel durch Phenolextraktion und Ethanolfällung wieder isoliert [8].

[0138] Die Hälfte der isolierten Plasmide wurden für die Ligierung der Oligonukleotide bestimmt. Die Ligierungsmischung hatte folgende Zusammensetzung: 50 µl geschnittene Plasmid-DNA, 20 µl hybridisierte Oligonukleotidenmischung, 10 µl Ligierungspuffer, 4 µl T_4-Ligase, 16 µl dH_2O. Nach der Inkubation der Ligierungsmischung über Nacht bei 16°C, wurde die Mischung durch Ethanolfällung konzentriert. Anschließend wurden die Produkte der Ligierung auf einem 1,2%-igen leicht schmelzenden Gel getrennt und aus dem Gel ausgeschnitten, wonach sie durch Phenolextraktion und Ethanolfällung vom Gel isoliert wurden [8].

2.2.3 SCHMELZEN DES OLIGONUKLEOTID-ÜBERSCHUSSES:

[0139] Nach Isolierung der Ligierungsprodukte vom Gel, wurden diese auf 65°C erwärmt, wodurch der Oligonukleotid-Überschuss zum Schmelzen gebracht wurde. Durch langsames Abkühlen der Mischung konnte die Hybridisierung zwischen den komplementären Teilen des an das Plasmid ligierten Ologonukleotids stattfinden.

2.2.4 ENTFERNUNG DER SELBSTSCHLIEßENDEN PLASMIDE:

[0140] Die Lösungen wurden anschließend mit dem ursprünglichen Restriktionsenzym nachgeschnitten, um die selbstschließenden Plasmide wieder zu öffnen. Dieses Nachschneiden konnte vorgenommen werden, da das Einarbeiten des Oligonukleotids die ursprüngliche Restriktionsschnittstelle in eine andere Restriktionsschnittstelle umgewandelt hatte. Nach dem Schneiden wurden lineare Plasmide ohne Oligonukleotid und ringförmige Plasmide mit einem eingearbeiteten Oligonukleotid geschaffen. Da nur ringförmige Plasmid-DNA von E. coli aufgenommen werden kann, können grundsätzlich nur Transformanten entstehen, die das Oligonukleotid enthalten.

2.2.5 TRANSFORMATION IN E. COLI:

[0141] Transformationsverfahren siehe: [8].

[0142] Nach der Transformation, wurden die Transformanten auf Luria Broth (L.B.) Nährmedium gestrichen, dem 100 µg/ml Ampicillin zugegeben wurden. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert, wonach die Transformanten von den einzelnen Kolonien auf L.B.-Nährmedium gestrichen wurden und erneut über Nacht inkubiert wurde, wonach die Einzelkolonien in flüssiges Ampicillin enthaltendes L.B.-Medium transportiert wurden, wobei die Mischung über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert und zur Plasmidisolierung (siehe unten) verwendet wurde.

2.2.6 DIE ISOLIERUNG DES PLASMIDS

[0143] Die Isolierung des Plasmids von den Transfomanten wurde nach der Methode der alkalischen Lyse durchgeführt [8].

2.2.7 VERDAUUNG DER REKOMBINANTEN PLASMIDE

[0144] Um zu überprüfen, ob das Nukleotid in den Plasmiden vorhanden war, wurde eine Verdauung mit dem die neue Restriktionsschnittstelle kodierenden Restriktionsenzym vorgenommen. Es wurde ebenfalls eine Verdauung mit dem die Restriktionsschnittstelle, die verschwunden sein sollte, kodierenden Restriktionsenzym vorgenommen, sodass auf Grund des Restriktionsmusters auf einem Agarosegel festgestellt werden konnte, ob die alte Restriktionsschnittstelle verschwunden war und die neue Stelle wirklich vorhanden war. Die Proteinzusammensetzung der positiven Transformanten wurde mit Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS, PAAGE) überprüft.

2.2.8 SDS PAAGE

[0145] SDS PAAGE wurde gemäß Protokoll [8] durchgeführt. Es wurde ein 11%-iges Acrylamidgel als Trenn-

gel und ein 5%-iges Acrylamidgel als Konzentrierungsgel eingesetzt.

Verfahren für E. coli

[0146] Die positiven Transformanten wurden für die Elektrophorese über Nacht in flüssigem LB-Medium mit (100 µg/ml) Ampicillin, sowohl mit als auch ohne (1 mM) IPTG (= Isopropyl-8-D-thiogalactopyranosid (Fa. Sigma)) kultiviert. 1.5 ml der über Nacht erhaltenen Kultur wurden abzentrifugiert, wonach das Pellet in 40 µl dH_2O resuspendiert wurde, dem 10 µl Ladepuffer (250 mM Tris-HCl pH 6.8, 10% SDS, 10% Dithiothritol, 10% Glycerol; 0,05% Bromphenolblau) hinzugegeben wurden, wonach die Suspension 10 Minuten auf 95°C erwärmt und auf das Gel aufgetragen wurde.

Verfahren für Meningokokken

[0147] Die in einer feuchten Atmosphäre mit 5% CO_2 über Nacht auf einer mit Isovitalex angereicherten Meningokokkenplatte kultivierten Meningokokken wurden in 10 ml PBS (mit 0,01 M phosphat-gepuffertem physiologischem Salz, pH 7,2 : RIVM) suspendiert. Die erhaltene Suspension wurde anschließend 30 min auf 56°C erwärmt, damit die Meningokokken inaktiviert wurden, wonach die Suspension abzentrifugiert wurde (10 Minuten bei 4000 U/min). Das Pellet wurde in 40 µl dH_2O, dem wieder 10 µl Ladepuffer zugegeben wurden, suspendiert, wonach die Suspension 10 Minuten auf 95°C erwärmt und auf das Gel aufgetragen wurde.

[0148] Der eingesetzte Elektrophoresepuffer hatte folgende Zusammensetzung: 50 mM Tris/HCl (pH 8,3), 380 mM Glycin, 0,1% SDS. Die Elektrophorese wurde bei 20 mA pro Gel durchgeführt.

[0149] Nach der Elektrophorese wurde das Gel
1) mit Coomassie Brillantblau (1 Stunde bei 56°C) und danach mit 10% HAc/5% (Vol./Vol.) Methanol (3 mal 30 min bei 56°C.) gefärbt, und
2) auf eine 0,45 Mikron starke Nitrocellulosemembran (Fa. Biorad) geblottet.

2.2.9 Western- oder Immunoblotten

[0150] Mit Hilfe eines Ancos Semi Dry Electroblotters A wurden die Proteine des SDS PAAGels durch Blotten auf eine 0,45 Mikron starke Nitrocellulosemembran (Fa. Biorad) übertragen. Der Proteintransport vom Gel auf die Membran erfolgte durch einstündiges Blotten bei 0,8 mA/cm^2 Gel, wobei 25 mM Tris-HCl (pH 8,3), 192 mM Glycin, 20% Methanol, 0,0375% SDS als Blottpuffer verwendet wurde.

[0151] Nach dem Blotten wurde der Blott eine Viertelstunde in PBS mit 0,1% Tween 80 (Polyoxyethylensorbitanmonooleat der Fa. Merck) gewaschen. Anschließend wurde der Blott eine halbe Stunde mit PBS gewaschen, dem 0,1% Tween 80 und 0.3% Casein-Hydrolysat (N-Z Amine A der Fa. ICN Biochemicals) hinzugegeben wurden, wonach eine Stunde mit in PBS/0,1% Tween 80/0,3% Casein gelösten monoklonalen, gegen das nachzuweisende Epitop gerichteten Antikörpern inkubiert wurde. Danach wurde der Blott 3× 10 min mit PBS/0,1% Tween 80 gespült, wonach er eine halbe Stunde mit 1: 10.000 mit PBS/0.1% Tween 80/0.3% Casein verdünntem Protein-A-Peroxidase-Konjugat inkubiert wurde. Anschließend wurde erneut dreimal 10 min mit PBS/0.1% Tween 80 und einmal mit dH_2O gewaschen, wonach die Wasserstoffperoxidsubstratmischung (20 µl 30% Wasserstoffperoxid, Fa. Merck; 30 ml Substrat A: Phosphat/Citrat-Puffer, 0.02 M Na_2HPO_4 und 0.01M Zitronensäure (1: 1) pH = 5.0; 10 ml Substrat B: 80 mg Dioctylsulphosuccinat (DONS), 24 mg Tetramethylbenzidin (TMB) in 10 ml 96%-igem Ethanol) hinzugefügt wurde.

[0152] Nach einigen Minuten wurden blaue Bänder an der Stelle sichtbar, wo die monoklonalen Antikörper an die entsprechenden Proteine gebunden hatten. Danach wurden die Blotts weitere drei Mal mit Wasser gewaschen, wonach sie photographiert wurden oder im Dunkeln bis zum Photographieren aufbewahrt wurden.

2.2.10 TRANSFORMATION IN MENINGOKOKKEN

[0153] Meningokokken wurden über Nacht auf mit Isovitalex angereichertem Agar (Fa. Difco) bei 37°C in einer feuchten Atmosphäre mit 5% CO_2 (3) kultiviert. Die Zellen der vollbedeckten Platte wurden in 10 ml Muller Hinton Medium (RIVM), mit 10 mM $MgCl_2$ bei 37°C resuspendiert. Anschließend wurde die Suspension 1: 5 mit 10 mM $MgCl_2$ enthaltendem Muller Hinton Medium verdünnt und mit 1 µg/ml Plasmid-DNA versetzt. Anschließend wurde 3 Stunden bei 37°C inkubiert, wonach die Bakteriensuspension auf das 10^4-fache mit keimfreiem PBS verdünnt und auf eine GC-Platte gestrichen wurde. Nach der Kultivierung über Nacht wurden die richtigen Transformanten mit Hilfe eines Kolonieblotts ausgewählt.

2.2.11 KOLONIEBLOTT

[0154] Die Kolonien von einer über Nacht bei 37°C in einer feuchten, 5% CO_2 enthaltenden Atmosphäre kulturbedeckten Platte wurden auf eine 0,45 µm starke Nitrocellulosemembran (Fa. Schleicher & Schuell) geblottet. Anschließend wurde der Blott 30 Minuten in PBS/0,1% Tween 80 auf 56°C erwärmt, damit die Meningokokken inaktiviert werden. Nach dem Erwärmen wurden die überschüssigen Bakterien abgestrichen. Für weitere Angaben zum Verfahren siehe die Rubrik „Western- oder Immunoblott-Technik".

2.2.12 ISOLIERUNG DES OMP

[0155] Eine Platte mit Meningokokken wurde über Nacht bei 37°C in einer feuchten, 5% CO2 enthaltenden Atmosphäre kultiviert, wonach die Zellen in 5 ml Meningokokkenmedium resuspendiert wurden. 200 ml Meningokokkenmedium wurde mit 2,5 ml der Mischung besät. Diese 200 ml Meningokokkenmedium wurden über Nacht bei 37°C aktiviert, wonach die Meningokokken durch eine halbstündige Inkubation bei 56°C inaktiviert wurden. Anschließend wurden die Meningokokken durch 10-minütiges Abzentrifugieren des Mediums (Zentrifuge: Centrikon T-324, Rotor A6.9) bei 10.000 U/min zu einem Pellet verdichtet. Der Überstand wurde abgegossen und das Pellet in 10 ml 0,01 M Tris/HCl, pH 8.0, resuspendiert. Anschließend wurde die Lösung 15 min in einem Eisbad ultrabeschallt (Branson Sonifier 250, Stellung 4, 50%). Dann wurde die beschallte Lösung 10 min bei 5000 U/min zentrifugiert. (Zentrifuge: Centrikon T-324, Rotor A8.20). Der Überstand wurde anschließend eine Stunde bei 20.000 U/min und 10°C zentrifugeirt. (Zentrifuge: Centrikon T-324, Rotor A8.20). Das so gebildete Pellet wurde in 4 ml 1%-igem Sarcosyl in 0.01 M Tris/HCl pH 8.0 resuspendiert, wonach 5 min bei 5000 U/min zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde anschließend eine Stunde bei 20.000 U/min und 10°C zentrifugiert. (Zentrifuge Centrikon T-324, Rotor A8.20). Das so gebildete Pellet wurde in 1 ml 0.01 M Tris/HCl pH 8.0 resuspendiert. Die Ausbeute wurde durch das Mikroassayverfahren (Fa. Biorad) bestimmt. Die Reinheit der OMP wurde durch SDS PAAGE überprüft.

2.2.13 PRÜFEN DER TRANSFORMANTEN MIT HILFE DER POLYMERASEKETTENREAKTION (PCR)

1. Tag:

[0156] Die für die PCR bestimmten Meningokokken wurden auf eine mit Isovitalex angereicherte GC-Platte gesät und über Nacht in einer feuchten Atmosphäre mit 5% CO_2 bei 37°C kultiviert.

2. Tag:

[0157] Von jedem der für die PCR bestimmten Stämme wurde jeweils durch Resuspendieren eines kleinen Bakterienhaufens in 1 ml keimfreiem destillierten Wasser und durch anschließendes 10-minütiges Erwärmen auf 95°C eine Zellsuspension bereitet. Die erhaltene Lösung wurde kurz zentrifugiert und auf Eis gelegt. Die Reaktionsmischung hatte folgende Zusammensetzung:

- 10 µl Puffer (500 mM KCl, 100 mM Tris/HCl pH 8,3, 15 mM $MgCl_2$, 0,1 gew/vol%-iges Gelatin)
- 200 µM des jeweiligen dNTP
- 100 mg des jeweiligen Primers
- 25 µl Zellsuspension
- mit keimfreiem destillierten Wasser auf 100 µl aufgefüllt.
- 100 µl Mineralöl.

[0158] Die Bedingungen für die PCR waren wie folgt: siehe Tabelle G

TABELLE G: PCR Bedingungen

Zyklus Nr.	min. 95°C	min. 55°C	min. 72°C
1	5	1	5
2 bis inkl. 30	1	1	2

[0159] Nach dem 30. Zyklus, wurden die Proben noch weitere 8 Minuten bei 72°C gehalten, damit die gesamte in den Proben vorhandene DNA doppelstrangig wurde.

[0160] Nach der PCR wurden die Proben einer Phenolextraktion und einer Ethanolfällung unterzogen, um die erzeugte DNA in reiner Form zu erhalten.

3. Tag:

[0161] 10% der gereinigten DNA wurde der Elektrophorese auf einem 0,1%igen Agarosegel unterzogen, um das Ergebnis auszuwerten. Daraus dürfte ersichtlich sein, ob das eingearbeitete Nukleotid in der DNA vorhanden war.

2.2. ERGEBNIS

2.2.1 Transformation des rekombinanten Plasmids in E.coli

[0162] Die hybridisierte Oligonukleotide wurde in das mit Kpn-1 geschnittene pPH204 ligiert, wonach das Ganze in E.coli K12 NM522 transformiert wurde. Die Plasmide wurden von den gebildeten Transformanten isoliert. Die isolierten Plasmide wurden mit Kpn-1 und Pst-1 geschnitten und anschließend auf einem 0,8%-igen Agarosegel der Elektrophorese unterzogen.

TABELLE H: Weitere Information zu FIG. 16

Blottstreifen-Nr.	Probenbeschreibung	Bemerkung
1,6,11,21,26	rekombinantes Plasmid-DNA	ungeschnitten
2,4,7,9,12,14,		Kpn-1-Stelle sollte
17,19,22,24,27	rekombinantes Plasmid-DNA Kpn-1-Verdauung	verschwunden sein
3,5,8,10,13,15,		durch Einarbeiten
18,20,23,25,28	rekombinantes Plasmid DNA	des Oligomers bildete sich eine zweite
	Pst-1-Verdauung	Pst-1-Stelle, nun wird ein Fragment
16		aus dem Plasmid geschnitten
	Lambda Marker	HindIII-Verdauung

[0163] Aus der Bildung eines Fragments von etwa 600 Basenpaaren infolge der Pst-1-Verdauung und aus dem Verschwinden der Kpn-1-Stelle ist ersichtlich, dass das Oligomer in das pPH204 eingearbeitet worden ist.

[0164] Die Transformanten wurden anschließend über Nacht bei 37°C in flüssigem L.B.-Medium mit 1 mM IPTG und 100 µg/ml Ampicillin kultiviert. Die Bakterienproteine wurden dann mit Hilfe von SDS PAGE getrennt, wonach Immunoblotten verwendet wurde, um herauszufinden, ob das Oligonukleotid in der richtigen Orientierung eingearbeitet worden war. Anhand des Blotts wurde die Größe des Klasse-1-Proteins durch den Nachweis des P1.2-Epitops mit dem monoklonalen Antikörper MN16C13F4 festgestellt. Siehe **Fig.** 18 und 19.

[0165] Die Transformanten in den Blottstreifen Nr. 1, 3, 5, 7, 9, 11 weisen ein Proteinband auf, das über eine kürzere Streck gelaufen ist als die Proteinbände der Transformanten in den anderen Streifen.

[0166] Das weist darauf hin, dass das erzeugte Protein größer ist als das in den jeweiligen Transformanten der Streifen Nr. 2, 4, 6, 8, 10. Die Transformanten in den ungeraden Streifen umfassen das Nukleotid in der richtigen Orientierung und jene in den geraden Streifen in der falschen, wodurch ein Stoppkodon geschaffen wird, das zu einem kleineren Protein führt.

2.3. Transformation in H44/76 B^-

[0167] Die Plasmide der positiven Transformanten wurden anschließend in H44/76 B^- transformiert, einem kapseldefizienten Mutanten von H44/76. Die Selektion der Transformanten erfolgte durch Kolonieblotten des Epitops P1.2 mit dem monoklonalen Antikörper MN16C13F4. Die Reinheit wurde durch SDS PAAGE und Immunoblotten geprüft. Siehe **Fig.** 20 und 21. Es wurde ebenfalls geprüft, ob das Verhältnis zwischen dem Klasse-1-Protein und den anderen Proteinen sich transformantenabhängig verändert hatte. Wie sich herausstellte, war das nicht der Fall (Ergebnisse nicht angegeben).

[0168] Anschließend wurde überprüft, ob das P1.16-Epitop aus den Transformanten verschwunden war, wo-

bei zum Test die monoklonalen, gegen das P1.2- und P1.7-Epitop gerichteten Antikörper sowie der Stamm H44/76 B^- als Teststamm mit einbezogen wurden (**Fig.** 22).

[0169] Aus der Figur ist ersichtlich, dass der gegen das P1.16-Epitop gerichtete monoklonale Antikörper MN5C11G nur mit dem Elternstamm reagiert. Der gegen das P1.7-Epitop gerichtete monoklonale Antikörper MN14C11.6 reagiert sowohl mit dem Elternstamm als auch mit den Transformanten. Der gegen das P1.2-Epitop gerichtete MN16C13F4 reagiert nur mit den Transformanten.

2.4 SCHLUSSFOLGERUNG

[0170] Der Erfolg des Einbauens eines Cysteinrests in das Klasse-1-Protein von H44/76-B^- ist aus folgenden Ergebnissen ersichtlich:

1) Nach dem Einarbeiten des Nukleotids ist die Kpn-1-Stelle verschwunden und es hat sich eine neue Pst-1-Stelle gebildet.

2) Nach der Transformation in H44/76-B^- hat sich diese von P1.7.16 in P1.7.2 umgewandelt, was darauf hinweist, dass das im Plasmid pPH204 vorhandene, das Klasse-1-Protein kodierende Gen, in das das Oligonukleotid eingearbeitet worden war, in den Meningokokkus eingebracht worden ist.

Das Einarbeiten von Cystein scheint, wenn man die vom Meningokokken erzeugte Menge in Betracht zieht, keinen Einfluss auf die Produktion des Klasse-1-Proteins zu haben. Die Epitopexpression der Bakterie scheint auch normal zu bleiben.

2.5 LITERATURLISTE FÜR BEISPIEL 2:

1 FRASCH, C. E. 1977: Role of protein serotype antigens in protection against disease due to Neisseria meningitidis. J. Infect. Dis. 136 (Erg.) S81J–S9O.

2 FRASCH, C. E., W. D. ZOLLINGER und J. T. POOLMAN. 1985. Serotype antigens or Neisseria meningitidis und a proposed scheme for designation of serotypes. Rev. Infect. Dis. 7: 504–510

3 GRIFFISS. J. M.. B. L. BRANDT, D. D. BROUD, D. K. GOROFF UND C. J. BAKER. 1984. Immune response in infant children to disseminated infections with Neisseria meningitidis. J. Infect. Dis. 150: 71–79.

4 KIM. J. J., R. E. MANDRELL, H. ZHEN, M. A. J. WESTERINK. J. T. POOLMAN und J. M. GRIFFISS. 1988. Electromorphic characterization und description of conserved epitopes of the lipooligosaccharides of group A Neisseria meningitidis. Infect. Immun. 56: 2631–2638.

4A KLUGMAN. K. P.. GOTSCHLICH. E. C. und BLAKE. M. S. I989. Sequence of the structural Gene (rmpM) for the class 4 outer Mem-brane Protein of Neisseria meningitidis. Homology of the protein to Gonococcal Protein III und Esscherichia coli OmpA und Construction of meningococcal strains that lack Class 4 protein. Infect. and Immun., Juli 1989. S. 2066–2071.

5 LEY. P. van der, persönliche Information.

5A MAIDEN, M. C. J., J. SUKER, A. J. McKENNA, J. A. BYGRAVES und I. M. FEAVERS. 1991. Comparison of the Class I outer membrane proteins of eight serological reference strains of Neisseria meningitidis. Molec. Microbiol. 1991. 5:3: S. 727–736.

6 POOLMAN, J. T. 1990. Polysaccharides und Membrane vaccines Bacterial Vaccines, S. 57–86 (70).

7 POOLMAN, J. T., C. T. P. HOPMAN. und H. C. ZANEN. 1982. Problems in the defenition of meningococcal serotypes. FEMS Microbiol. Lett. 13: 339–348

8 SAMBROOK, FRITSCH, MANIATIS. Molecular Cloning, a laboratorium manual, zweite Ausgabe, Cold Spring Harbour Laboratory, N.Y. S. 1.25–1.28, S. 1.82–1.85, S. 6.3–6.16, S. 6.18–6.19. S. 18.47–18.55.

9 SAUKONEN, K., M. LEINONEN. H. ABDILLAHI und J. T. POOLMAN. 1989. Comparative evaluation or components for group B neningococcal vaccine by passive protection in the infant rat und in vitro bactericidal assay. Vaccine 7: 325–328.

10 TSAI. CM., C. E. FRASCH UND L. F. MOCCA. 1981. Five structural classes of major outer membrane proteins in Neisseria meningitidis. J. Bacteriol. 146: 69–78.

11 VEDROS. N. A. 1987. Development of meningococcal serogroups. S. 33–38 N. A. Vedros (Hrg.), Evolution of meningococcal disease, Band. 2. CrC Press Inc., Boca Raton, FL.

12 ZOLLINGER, W. D. und R. E. MANDRELL. 1977- Outer membrane protein and lipopolysaccharide serotyping of Neisseria meningitidis by inhibition of a solid phase radio-immunoassay. Infect. Immun. 18: 424–433.

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER:
(A) NAME: De Staat der Nederlanden
(B) STRASSE: Antonie van Leeuwenhoeklaan 9
(C) ORT: Bilthoven
(D) STAAT: Utrecht
(E) LAND: The Netherlands
(F) POSTLEITZAHL: 3333 BN

(ii) ANMELDETITEL: Die B-Zellen aktivierendes, Immunität verleihendes von einem Meningokokken-Lipopolysaccharid abgeleitetes Molekül, Verfahren zu dessen Herstellung, ein Membranvesikel, versehen mit einer Gruppe von Polypeptiden, die

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 12

(iv) COMPUTER-LESBARE FORM:
(A) DATENTRÄGER: Floppy-Disk
(B) COMPUTER: IBM PC kompatibel
(C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
(D) SOFTWARE: Patent In Release Nr. 1.0, Version Nr. 1.25 (EPA)

(2) ANGABEN ZU SEQ-ID-NR: 1:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 39 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: einstrangig
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

(iii) ANTI-SENSE: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT
(A) ORGANISMUS: Meningokokken Klasse-1-OMP P1.7 Epitop mit Kpn-1-klebrigen Enden

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ-ID-NR: 1: GAACGGCGGC GCCTCTGGCC

AAGTTAAAGT TACTAGTAC

(2) ANGABEN ZU SEQ-ID-NR: 2:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 12 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: einstrangig
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA
(iii) ANTI-SENSE: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:
(A) ORGANISMUS: 5'-Terminus des p1.7-Epitops wie in PJB007 vorhanden

(vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:
(B) KLON: pJB007

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ-ID-NR: 2:

GGTACGAACG GC 12

(2) ANGABEN ZU SEQ-ID-NR: 3:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 12 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: einstrangig
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

(iii) ANTI-SENSE: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT
(A) ORGANISMUS: 3'-Terminus des p1.7-Epitops wie in PJB007 vorhanden

(vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:
(B) KLON: pJB007

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID 3:

GTTACTAGTA CC 12

(2) ANGABEN ZU SEQ-ID-NR: 4:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 39 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: einstrangig
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

(iii) ANTI-SENSE: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT
(A) ORGANISMUS: Meningokokken Klasse-1-OMP P1.7 Epitop mit Kpn-1 klebrigen Enden

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID 4:

GTATACCAAA GACACCAACA ACAACTTGAC CTTGAGTAC 39

(2) ANGABEN ZU SEQ-ID-NR: 5:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 12 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: einstrangig
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

(iii) ANTI-SENSE: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT
(A) ORGANISMUS: 5'-Terminus des p1.16-Epitops wie in PJB016 vorhanden

(vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:

(B) KLON: pJB0l6

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID 5:

GGTACGTATA CC 12

(2) ANGABEN ZU SEQ-ID-NR: 6:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 12 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: einstrangig
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

(iii) ANTI-SENSE: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT
(A) ORGANISMUS: 3'-Terminus des pl.l6-Epitops wie in PJB016 vorhanden

(vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:
(B) KLON: pJB0l6

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID 6:

ACCTTGAGTA CC 12

(2) ANGABEN ZU SEQ-ID-NR: 7:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 39 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: einstrangig

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

(iii) ANTI-SENSE: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT
(A) ORGANISMUS: Meningokokken Klasse-1-OMP-P1.7 Epitop mit SpeI klebrigen Enden (sticky ends)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID 7:

CTAGCTATAC CAAAGACACC AACAACAACT TGACCTTGT 39

(2) ANGABEN ZU SEQ-ID-NR: 8:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 12 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: einstrangig

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

(iii) ANTI-SENSE: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT
(A) ORGANISMUS: 5'-Terminus des p1.16-Epitops wie in PJB716 vorhanden

(vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:
(B) KLON: pJB7l6

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID 8:

ACTAGCTATA CC 12

(2) ANGABEN ZU SEQ-ID-NR: 9:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 12 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: einstrangig
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

(iii) ANTI-SENSE: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT
(A) ORGANISMUS: 3'-Terminus des p1.16-Epitops wie in PJB716 vorhanden

(vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:
(B) KLON: pJB7l6

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID 9:

ACCTTGTCTA GT 12

(2) ANGABEN ZU SEQ-ID-NR: 10:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 18 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: doppelt
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN(iii) ANTI-SENSE: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT

(A) ORGANISMUS: c1-c2 komplementäre Cystein kodierende Oligonukleotid mit Kpn-1-klebrigen Enden, die dem Klasse-1-OMP gegenüber komplementär sind

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID 10:

GGGCTGCAGC CTAAGTAC 18

(2) ANGABEN ZU SEQ-ID-NR: 11:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 18 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: einstrangig
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

(iii) ANTI-SENSE: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT
(A) ORGANISMUS: Cystein kodierendes Oligonukeotid mit Kpn-1-klebrigem Ende

(vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:
(B) KLON: c1-Oligonukleotid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID 11:

GGGCTGCAGC CTAAGTAC 18

(2) ANGABEN ZU SEQ-ID-NR: 12:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 18 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: einstrangig
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

(iii) ANTI-SENSE: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT
(A) ORGANISMUS: Cystein kodierendes Oligonukeotid mit Kpn-1-klebrigem Ende

(vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:
(B) KLON: c2-Oligonukleotid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID 12:

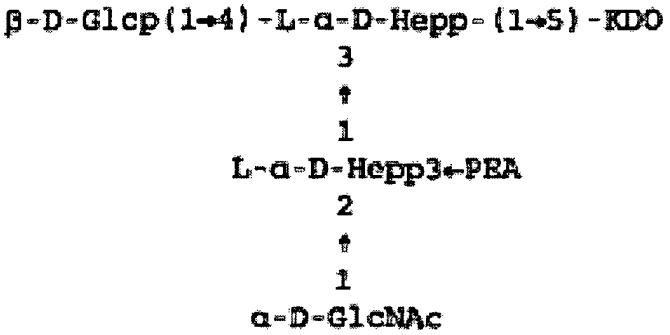
TTAGGCTGCA GCCCGTAC 18

Patentansprüche

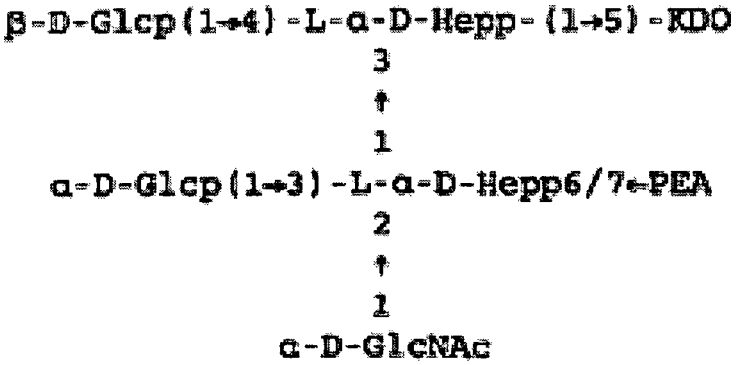
1. Ein Immunität verleihendes, B-Zellen aktivierendes Molekül, das von einem Meningokokken-Polysaccharid (LPS) mit wenigstens einem Epitop abgeleitet ist, und das wenigstens den gemeinsamen, für wenigstens zwei Meningokokken-Immuntypen, bevorzugt für die Immuntypen L2 und L3 spezifischen Bereich des Oligosaccharidteils (Kernbereich) von Lipopolysacchariden enthält, und worin der die B-Zellen aktivierende Teil keine Galaktose enthält, sowie zur Induktion einer Immunantwort fähige Derivate des Moleküls mit galaktose-

freiem B-Zellen aktivierenden Teil.

2. Molekül gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet dass das Molekül vom L3-Kernbereich abgeleitet ist und folgende Struktur besitzt:



3. Molekül gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet dass das Molekül vom L2-Kernbereich abgeleitet ist und folgende Struktur besitzt:



4. Verfahren zur Herstellung eines Moleküls gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass darin rekombinante DNS-Technologien verwendet wurden.

5. Verfahren zur Herstellung eines Moleküls gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass das Molekül von einem mutagenisierten oder ausgewählten Produktionsstamm erhalten wird, der wenigstens galaktosefreies LPS erzeugt.

6. Verfahren gemäß Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass als Produktionsstamm ein Meningokokkenstamm, der keine Galaktose erzeugt, verwendet wird.

7. Verfahren gemäß Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass als Produktionsstamm ein Meningokokkenstamm verwendet wird, der in einer D- oder E-Region eine Mutation oder eine Deletion eines cps-Locus eines Wildtyp-Meningokokken enthält, wie dieser auf einem DNS-Fragment im Plasmid pMF32.35 im hinterlegten Stamm mit der Zugangsnummer CBS 401.93 vorhanden ist.

8. Verfahren zur Herstellung eines Moleküls gemäß den Ansprüchen 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass das Molekül durch Synthese erhalten wird.

9. Konjugat eines Zuckerpeptids (SPC), das wenigstes ein Molekül gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3 als Saccharidteil enthält, dadurch gekennzeichnet, dass der Saccharidteil mit einem Peptidteil mit wenigstens einem T-Helferzellen aktivierenden Epitop konjugiert ist, wobei der Peptidanteil bevorzugt mindestens ein homologes Protein oder ein von einem homologen Protein abgeleitetes Peptidfragment enthält, wobei homolog die Bedeutung hat, dass sowohl das/die die B-Zellen aktivierende, als auch das/die die T-Helfer-Zellen aktivierende Epitop(e) von demselben Mikroorganismus abgeleitet ist/sind.

10. Äußeres Membranvesikel enthaltend ein Molekül gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3 und/oder ein Zuckerpeptidkonjugat gemäß Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass das äußere Membranvesikel bevorzugt Klasse-I-OMP oder Klasse-I-OMP-Fragmente als T-Helferzellen aktivierendes Epitop enthält.

11. Äußeres Membranvesikel gemäß Anspruch 10, das mit einer Gruppe von Polypeptiden versehen ist,

die mindestens die Immunaktivität von Membran-gebundenen Außenmembranproteinen (OMP) besitzen, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens eines der Polypeptide der Gruppe ein jeweils Membran-verankertes OMP oder OMP-Fragment mit jeweils einer Mutation in einem der Oberflächen-Loops ist, das beispielsweise ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus jeweils Membran-verankerten Klasse I-OMP und Klasse-I-OMP-Fragmenten und beispielsweise ein jeweils rekombinantes OMP oder OMP-Fragment darstellt.

12. Äußeres Membranvesikel gemäß Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass es ein Molekül gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3 und/oder ein Zuckerpeptidkonjugat gemäß Anspruch 9 als B-Zellen aktivierenden Teil mit mindestens einem Epitop enthält.

13. Äußeres Membranvesikel gemäß Anspruch 11 oder 12, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens ein Polypeptid der Gruppe ein jeweils Membran-verankertes OMP oder OMP-Fragment ist, das eine Mutation in einem der Oberflächen-Loops 2, 3, 5, 6, 7 oder 8, bevorzugt 6 oder 7 aufweist.

14. Äußeres Membranvesikel gemäß einem der Ansprüche 11 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass die Mutation die Anwesenheit wenigstens einer mit einer eine spezifisch reaktiven Seitenkette aufweisenden Aminosäure umfasst, die zum Beispiel Cystein ist.

15. Äußeres Membranvesikel gemäß einem der Ansprüche 11 bis 14, dadurch gekennzeichnet, dass das Polypeptid von mindestens zwei HLA-Phänotypen erkannt werden kann.

16. Äußeres Membranvesikel gemäß einem der Ansprüche 11 bis 15, dadurch gekennzeichnet, dass es mit Zuckerpeptidkonjugaten versehen ist, die jeweils ein Polypeptid als Peptidteil enthalten, wobei das Polypeptid mit dem Saccharidteil an der Stelle der Mutation konjugiert ist, wobei der Saccharidteil einen B-Zellen aktivierenden Teil mit mindestens einem von einer grammnegativen Bakterie abgeleiteten Epitop enthält, und wobei der B-Zellen aktivierende Teil zum Beispiel vom Oligosaccharidteil (Innenkern) eines Meningokokken-LPS abgeleitet ist.

17. Äußeres Membranvesikel (OMV) gemäß einem der Ansprüche 11 bis 16, dadurch gekennzeichnet, dass der Saccharidteil über einen Abstandshalter mit dem Peptidteil verbunden ist.

18. Äußeres Membranvesikel (OMV) gemäß einem der Ansprüche 11 bis 16, dadurch gekennzeichnet, dass der Saccharidteil mit dem Peptidteil konjugiert ist, wodurch die freien Aminogruppen in dem die B-Zellen aktivierenden Bereich der im Saccharidteil vorhandenen Phosphoetanolamingruppen (PEA) beibehalten werden, wobei zum Beispiel mindestens eine PEA-Gruppe vor der Konjugation in den Saccharidteil des wenigstens ein Epitop aufweisenden B-Zellen aktivierenden Teils eingeführt wurde.

19. Verfahren zur Herstellung eines äußeren Membranvesikels gemäß einem der Ansprüche 11 bis 20, dadurch gekennzeichnet, dass wenigstens
1) eine das Polypeptid kodierende Nukleotidsequenz in einer Bakterie exprimiert ist;
2) die Bakterie unter an sich bekannten Bedingungen kultiviert wird, wobei sie äußere Membranvesikel erzeugt und deren so gebildete Polypeptid enthaltende äußere Membranvesikel gegebenenfalls isoliert werden, und das Verfahren bevorzugt ferner
3) das Versehen der in Schritt 2 erhaltenen äußeren Membranvesikel mit Zuckerpeptidkonjugaten durch Bindung des Polypeptids an den gewünschten Saccharidteil umfasst, wobei der Saccharidteil bevorzugt über rekombinanten DNS-Technologien oder durch Synthese erhalten wird.

20. Verfahren gemäß Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, dass der Saccharidteil von einem mutagenisierten oder ausgewählten Produktionsstamm erhalten wird, der wenigstens den galaktosefreien Saccharidteil erzeugt, wobei ein derartiger Stamm zum Beispiel ein Meningokokkenstamm, der keine Galaktose erzeugt, bevorzugt ein Meningokokkenstamm, der eine Mutation oder eine Deletion in einer D- oder E-Region eines cps-Locus eines Wildtyp-Meningokokken enthält, darstellt, wie dieser auf einem DNS-Fragment im Plasmid pMF32.35 im hinterlegten Stamm mit der Zugangsnummer CBS 401.93 vorhanden ist.

21. Mutierter Meningokokkenstamm, dadurch gekennzeichnet, dass er in einer D- oder E-Region eine Mutation oder eine Deletion eines cps-Locus eines Wildtyp-Meningokokken enthält, wie dieser auf einem DNS-Fragment im Plasmid pMF32.35 im hinterlegten Stamm mit der Zugangsnummer CBS 401.93 vorhanden ist.

22. Impfstoff, dadurch gekennzeichnet, dass er eine wirksame Menge an einem oder mehreren der folgen-

den Komponenten enthält:
Ein Molekül gemäß den Ansprüchen 1 bis 3,
ein Zuckerpeptidkonjugat gemäß Anspruch 9,
ein äußeres Membranvesikel gemäß einem der Ansprüche 10 bis 18,
ein gemäß einem der Ansprüche 19 oder 20 erhaltenes äußeres Membranvesikel,
ein Mikoroorganismus gemäß Anspruch 21.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen