

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN
FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 960309 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE
PUBLIC**

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application 960309

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification

C12N 15/31

C12N 15/62

C12P 21/02

C07K 14/22

C07K 19/00

A61K 39/095

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date 22.07.1994

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date 23.01.1996

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public 22.03.1996

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date 13.06.2019

(86) Kansainvälinen hakemus - 22.07.1994 PCT/US1994/008327
Internationell ansökan - International
application

(32) (33) (31) Etuokeus - Prioritet - Priority

23.07.1993 US 096182

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • **Baxter Healthcare S.A.**, Hertistrasse 2, Wallisellen, Kanton, 8306 Zürich, SVEITSI, (CH)

2 • **The Rockefeller University**, 1230 York Avenue, New York, NY 10021-6399, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • **Blake, Milan S.**, New York, N.Y. 10021, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

2 • **Tai, Joseph Y.**, Fort Washington, PA 19034, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

3 • **Qi, Huilin L.**, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

4 • **Liang, Shu-Mei**, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

5 • **Hronowski, Lucjan J. J.**, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

6 • **Pullen, Jeffrey K.**, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Seppo Laine Oy, PL 339, 00181 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

Neisseria meningitidis, B-ryhmän ulkomembraanin poriniiproteiinien kor kean tason ilmentäminen, puhdistaminen ja uudelleenlaskostaminen

Högnivå-expression, rening och återveckling av porinproteiner i yttermembranen av Neisseria meningitidis, grupp B

B-ryhmän Neisseria meningitidisin ulkomembraanin poriiniproteiinien ekspressio korkeina tasoina, puhdistus ja uudelleenlaskostus

Tämä keksintö kuuluu rekombinanttigenetiikan, proteiinien ekspression ja rokotteiden aihepiiriin. Tämä keksintö koskee erityisesti menetelmää B-ryhmän Neisseria meningitidisista peräisin olevan ulkomembraanin poriini-proteiinin ekspressoimiseksi rekombinantti-isännässä. Keksintö koskee myös menetelmää rekombinanttiproteiinin puhdistamiseksi ja uudelleenlaskostamiseksi.

10 Neisseria-lajien ulkomembraanit, paljolti samoin kuin muiden gram-negatiivisten bakteerien, ovat puoliläpäiseviä membraaneja, jotka sallivat pienen molekyylipainon omaavien aineiden vapaan sisään- ja ulosvirtauksen näiden bakteerien periplasmisesta tilasta, mutta pidättävät suurempikokoisia molekyylejä

15 (Heasley, F. A. et al., "Reconstitution and characterization of the N. gonorrhoeae outer membrane permeability barrier", kirjassa Genetics and Immunobiology of Neisseria gonorrhoeae, Danielsson ja Normark, toim., Uumajan yliopisto, Uumaja, s. 12 - 15 (1980); Douglas, J. T. et al., FEMS Microbiol. Lett. 12: 305 - 309 (1981)). Yksi mekanismeista, joilla tämä tapahtuu, on sisällyttää näiden membraanien sisään proteiineja, jotka on nimetty yhteisesti poriineiksi. Nämä proteiinit koostuvat kolmesta samanlaisesta polypeptidiketjusta (Jones, R. B. et al., Infect. Immun. 30: 773 - 780 (1980); McDade, Jr ja Johnston, J. Bacteriol. 141: 1183 - 1191 (1980)) ja muodostavat natiivissa trimeerikonformaatioissaan vedellä täytettyjä, jännitteestä riippuvaisia kanavia bakteerien ulkomembraanin sisään, tai muiden membraanien sisään, joihin ne on viety

25 (Lynch, E. C. et al., Biophys. J. 41: 62 (1983); Lynch, E. C. et al., Biophys J. 45: 104 - 107 (1984); Young, J. D. E. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 3831 - 3835 (1983); Mauro, A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 1071 - 1075 (1988), Young, J. D. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 150 - 154 (1986)). Koska näitä proteiineja on ulkomembraanissa suhteellisen runsaasti, näiden proteiinien antigeeneja on käytetty myös alaryhmittämään sekä Neisseria gonorrhoeae että Neisseria meningitidis useaan serotyyppiin epidemiologisia tarkoituksia

30

35

varten (Frasch, C. E. et al., Rev. Infect. Dis. 7: 504 - 510 (1985); Knapp, J. S. et al., "Overview of epidemiological and clinical applications of auxotype/serovar classification of Neisseria gonorrhoeae", The Pathogenic Neisseriae, Schoolnik, G. K. toim., American Society for Microbiology, Washington, s. 6 - 12 (1985)). Tähän mennessä moni näistä proteiineista sekä gonokokeista että meningokokeista on puhdistettu (Heckels, J. E., J. Gen. Microbiol. 99: 333 - 341 (1977); James ja Heckels. J. Immunol. Meth. 42: 223 - 228 (1981); Judd, R. C., Anal. Biochem. 173: 307 - 316 (1988); Blake ja Gotschlich, Infect. Immun. 36: 277 - 283 (1982); Wetzler, L. M., et al., J. Exp. Med. 168: 1883 - 1897 (1988)) ja kloonattu ja sekvensoitu (Gotschlich, E. C. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 8135 - 8139 (1987); McGuinness, B. et al., J. Exp. Med. 171: 1871 - 1882 (1990); Carbonetti ja Sparling, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 9084 - 9088 (1987); Feavers, I. M. et al., Infect. Immun. 60: 3620 - 3629 (1992); Murakami, K. et al., Infect. Immun. 57: 2318 - 2323 (1989); Wolff ja Stern, FEMS Microbiol. Lett. 83: 179 - 186 (1991); Ward, M. J. et al., FEMS Microbiol. Lett. 73: 283 - 289 (1992)).

Poriiniproteiinit eristettiin alkujaan yhdessä lipopolysakkaridien kanssa. Poriiniproteiineja on siis kutsuttu "endotoksiineihin liittyviksi proteiineiksi" (Bjornson et al., Infect. Immun. 56: 1602 - 1607 (1988)). Tutkimukset villityyppisillä poriiineilla ovat kertoneet, ettei täyttä kokoonpanoa ja oligomerisaatiota saavuteta jollei LPS vastaavasta bakteerikannasta ole proteiinin ympäristössä (Holzenburg et al., Biochemistry 28: 4187 - 4193 (1989); Sen ja Nikaido, J. Biol. Chem. 266: 11295 - 11300 (1991)).

Meningokokkiporiinit on jaettu kolmeen pääluokkaan, jotka aikaisemmassa nomenklatuurissa tunnettiin luokkina 1, 2 ja 3 (Frasch, C. E. et al., Rev. Infect. Dis. 7: 504 - 510 (1985)). Kukin tutkittu meningokokki on sisältänyt yhden alleeleista joko luokan 2 poriinigeenille tai luokan 3 poriinigeenille, mutta ei kumpaakin (Feavers, I. M. et al., Infect. Immun. 60: 3620 - 3629 (1992)); Murakami, K. et al., Infect. Immun. 57:

2318 - 2323 (1989)). Luokan 1 geenin läsnäolo tai puute näyttää olevan vaihtoehtoista. Samoin kaikki testatut gonokokit sisältävät ainoastaan yhden poriinigeenin, jolla on yhtene-
 5 yyksiä joko luokan 2 tai luokan 3 alleelin kanssa (Gotschlich, E. C. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 8135 - 8139 (1987); Carbonetti ja Sparling, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 9084 - 9088 (1987)). N. gonorrhoeaelta näyttää puuttuvan luokan 1 alleeli täysin. Tulokset geeneistä, jotka on tähän men-
 10 nessä sekvensoitu antavat olettaa, että kaikilla neisserian poriiniproteiineilla on vähintään 70 prosentin homologia tois-
 tensa kanssa niin, että perusteemassa on jonkin verran variaa-
 tiota (Feavers, I. M. et al., Infect. Immun. 60: 3620 - 3629 (1992)). On esitetty, että suuri osa variaatiosta, joka on
 havaittu näiden neisserian poriiniproteiinien välillä, johtuu
 15 immunologisista paineista, jotka seuraavat näiden patogeenis-
 ten organismien invaasiosta niiden luonnolliseen isäntään, ihmiseen. Hyvin vähän kuitenkin tiedetään siitä, kuinka muut-
 tokset poriiniproteiinisekvenssissä vaikuttavat näiden prote-
 iinien toiminnalliseen aktiivisuuteen.

20 Aikaisemmin on raportoitu, että luokan 2 alleelityypin eriste-
 tyt gonokokkiporiinit käyttäytyvät elektrofysikaalisesti jon-
 kin verran eri lailla kuin luokan 3 tyyppin eristetyt gonokok-
 kiporiinit lipidikaksoiskerrostojen tutkimuksissa, sekä mitä
 25 tulee niiden ioniselektiivisyyteen että jänniteriippuvuuteen
 (Lynch, E. C. et al., Biophys. J. 41: 62 (1983); Lynch, E. C.
 et al., Biophys. J. 45: 104 - 107 (1984)). Lisäksi eri porii-
 nien kyky tunkeutua sisään näihin kokonaisten elävien baktee-
 rien lipidikaksoiskerroksiin näyttää korreloivan, ei ainoas-
 30 taan poriinityypin kanssa, vaan myös neisseria-lajin kanssa,
 josta ne on saatu (Lynch, E. C. et al., Biophys. J. 45: 104 -
 107 (1984)). Näyttäisi siltä, että vähintään jotkin näistä
 toiminnallisista määritteistä voisivat liittyä eri alueisiin
 35 poriinin proteiinisekvenssissä. Yksi tällainen toiminnallinen
 alue, joka oli aikaisemmin tunnistettu kaikissa gonokokin luo-
 kan 2 kaltaisissa proteiineissa, on kymo-trypsiinin pilkkoutu-
 miskohta. Kymotrypsiinin pilkkomisen jälkeen tältä poriinien
 luokalta puuttuu kyky reagoida jännitepotentiaaliin ja sulkeu-

tua. Gonokokin luokan 3 kaltaisilta porineilta, samoin kuin meningokokkiporineilta puuttuu tämä sekvenssi, ja ne eivät siten ole kymotrypsiinipilkkomisen kohteita, mutta siitä huolimatta reagoivat sulkeutumalla annetun jännitepotentiaalin seurauksena (Greco, F., "The formation of channels in lipid bilayers by gonococcal major outer membrane protein", väitöskirja, The Rockefeller University, New York (1981); Greco, F. et al., Fed. Proc. 39: 1813 (1980)).

Näiden tutkimuksien suurin puute on ollut kyvyssä manipuloida helposti porinigeenejä nykyaikaisilla molekyyllitekniikoilla ja saada riittävästi puhdistettua proteiinia, jotta toteutettaisiin näiden muunnettujen poriini-proteiinien biofysikaaliset karakterisoinnit. Havaittiin varhain, että kloonatut neis-
 serian porinigeenit ekspressoituna Escherichia colissa olivat letaaleja isäntä- E. colille (Carbonetti ja Sparling, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 9084 - 9088 (1987); Carbonetti, N. H. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 6841 - 6845 (1988); Barlow, A. K. et al., Infect. Immun. 55: 2734 - 2740 (1987)).
 Näin ollen monet näistä geeneistä kloonattiin ja sekvensoitiin palasina kokonaisesta geenistä tai laitettiin pienen kopiomäärän plasmideihin tiukan ekspressionsäätelyn alaiseksi (Carbonetti, N. H. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 6841 - 6845 (1988)). Näissä olosuhteissa, vaikka koko porinigeeni ekspressoitui, kertyi hyvin vähän proteiinia, joka voitiin puhdistaa edelleen ja prosessoida karakterisointia varten.

Toinen tämän ongelman ratkaisemiskeino, jolla on saatu aikaan vähäistä menestystä, on ollut kloonata porinigeenit pienen kopiomäärän tiukasti kontrolloituun ekspressioplasmidiin, saattaa muuntelua porinigeeniin, ja sitten liittää muunnettu sekvenssi uudelleen Neisseriaan (Carbonetti, N. H. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 6841 - 6845 (1988)). Tämä on kuitenkin myös ollut täynnä ongelmia, johtuen Neisseriassa, erityisesti gonokokeissa olevasta monimutkaisesta restriktioendonukleaasijärjestelmästä (Davies, J. K., Clin. Microbiol. Rev. 2: S78 - S82 (1989)).

Tämä keksintö suuntautuu sovellutukseen, jolla voitetaan nämä vaikeudet. Kypsien poriiniproteiinien, esim. luokan 2 ja luokan 3, samoin kuin niiden fuusioiden DNA-sekvenssi voidaan monistaa käyttämällä meningokokkibakteerin kromosomia templaattina PCR-reaktiolle. Monistetut poriini-sekvenssit liigatoitiin ja kloonattiin ekspressiovektoriin, joka sisälsi T7-promoottorin. E. coli -kanta BL21, joka on lysogeeninen DE3-lambdafaagille (Studier ja Moffatt, J. Mol. Biol. 189: 113 - 130 (1986)), ja joka on muunnettu ompA-geenin eliminoimiseksi, selektoitiin yhdeksi ekspressioisännäksi pET-17b-plasmidille, joka sisälsi poriinigeenin. Induktion jälkeen suuria määriä meningokokin poriini-proteiineja kertyi E. coliin ilman mitään havaittavia letaaleja vaikutuksia isäntäbakteerille. Ekspressoitujen meningokokin poriiniproteiinit uutettiin ja prosessoitiin tavanomaisilla menetelmillä, ja lopuksi puhdistettiin molekyyliseulakromatografialla ja ioninvaihtokromatografialla. Päättelynä molekyyliseulakromatografian proteiiniprofiilista rekombinantit meningokokkiporiinit eluoituivat pylväistä trimeereinä. Jotta oltaisiin varmoja, ettei mitään PCR-artefakteja ollut liittynyt meningokokin poriini-geeneihin saamaan aikaan tällaisen korkean ekspression, määritettiin insertoitu PorB-geenisekvenssi. Käytettiin inhibitio-ELISA-analyysijä antamaan lisätodisteita siitä, että ekspressoitujen rekombinanttiporiniproteiinit olivat renaturoituneet luonnolliseen anti-geeniseen ja trimeeriseen konformaatioonsa.

Eri neisseria-kannoista ja lajeista peräisin olevilla porineilla on osoitettu olevan eroja sekä primaarisessa aminohapposekvenssissä että biofysikaalisissa ominaisuuksissa havaittuna toiminnallisilla analyyseillä. Lähempää tarkastelua, kuinka muutokset Neisserian poriinimolekyylien primaarisessa aminohapposekvenssissä korreloivat näiden havaittujen biofysikaalisten muutosten kanssa, on haitannut puute kyetä manipuloimaan helposti kloonattuja poriinigeenejä moderneilla molekyylitekniikoilla ja sen jälkeen saada tarpeeksi ekspressoitua muunnettua poriiniproteiinia puhdistettavaksi ja käytettäväksi näissä biofysikaalisissa toiminnan analyyseissä. Tässä keksinnössä geeni, joka kooditti kypsää PorB-proteiinia, josta

puuttui neisserian promoottori- ja signaalsekvenssi, kloonattiin ekspressioplasmidiin pET-17b ja transformoitiin E. coliin. Induktion jälkeen valmistui suuria määriä PorB-proteiinia.

5

Ekspressoitua poriiniproteiinia manipuloitiin sen jälkeen, jotta regeneroitiin sen natiivi trimeerirakenne, ja se puhdistettiin. Saatiin riittävästi puhdistettua rekombinantti-poriiniproteiinia seuraavia antigeenisistä, samoin kuin biofysikaalisia karakterisointeja varten. Näin ollen tällä saavutetaan vaihe, jolloin näiden neisserian poriiniproteiinien biofysikaalista karakterisointia voidaan tutkia yksityiskohtaisemmin.

10

15 Tämän keksinnön yleinen tavoite on tarjota käyttöön menetelmä B-ryhmän meningokokin poriiniproteiinin ekspressoimiseksi, erityisesti luokan 2 ja luokan 3 poriini-proteiinien ekspressoimiseksi.

20 Tämän keksinnön erityinen tavoite on saada aikaan menetelmä meningokokin ryhmän B luokan 2 tai 3 poriiniproteiinin ekspressoimiseksi E. colissa, jolloin menetelmän mukaan:

(a) transformoidaan E. coli vektorilla, joka käsittää selektiivisen merkin ja geenin, joka koodittaa proteiinia, joka on valittu joukosta, johon kuuluvat

25

(i) kypsä poriiniproteiini ja

(ii) fuusioproteiini, joka käsittää kypsän poriiniproteiinin fuusioituna T7-geenin Ø10 kapsidiproteiinin aminohappoihin 1 -

30

20, jolloin mainittu geeni on liitettyä toimivasti T7-promoottoriin;

(b) kasvatetaan transformoitua E. colia kasvatusalustassa, joka sisältää valinta-aineen ja

35

(c) indusoidaan mainitun proteiinin ekspressio;

jolloin proteiini muodostaa enemmän kuin 2 % kokonaisprotei-

iinista, joka ekspressoituu E. colissa.

Keksinnön toinen spesifinen kohde on saada aikaan menetelmä meningokokin ryhmän B poriiniproteiinin puhdistamiseksi ja uudelleenlaskostamiseksi, ja fuusioproteiini, joka on tuotettu edellä kuvattujen menetelmien mukaisesti.

Keksinnön lisäkohde on saada aikaan rokote, joka käsittää meningokokin ryhmän B poriiniproteiinin ja fuusioproteiinin, jotka on tuotettu edellä esitetyillä menetelmillä määränä, joka on tehokas saamaan aikaan suojaavia vasta-aineita eläimessä Neisseria meningitidistä vastaan, ja farmaseuttisesti hyväksyttävä laimennusaine, kantaja tai täyteaine.

Vielä yksi keksinnön kohde on saada aikaan kuvattu rokote, jolloin mainittu meningokokin ryhmän B poriiniproteiini tai fuusioproteiini konjugoidaan Neisseria meningitidisin kapselipolysakkaridiin.

Keksinnön kohteena on lisäksi saada aikaan menetelmä bakteerimeningiitin estämiseksi eläimessä, jolloin eläimelle annetaan meningokokin ryhmän B poriini-proteiinia tai fuusioproteiinirokotetta, joka on valmistettu edellä kuvattujen menetelmien mukaisesti.

Vielä yksi keksinnön kohde on tarjota käyttöön menetelmä polysakkaridikonjugaatin valmistamiseksi, jolloin saadaan edellä kuvattu meningokokin ryhmän B poriiniproteiini tai fuusioproteiini, saadaan polysakkaridi Neisseria meningitidis -organismista ja konjugoidaan meningokokin ryhmän B poriiniproteiini tai fuusioproteiini polysakkaridiin.

Vielä yksi keksinnön kohde on saada aikaan menetelmä edellä kuvattujen meningokokin ryhmän B poriiniproteiinin tai fuusioproteiinin puhdistamiseksi, jolloin menetelmässä lyysataan transformoitu E. coli, jotta vapautetaan meningokokin ryhmän B poriiniproteiini tai fuusioproteiini osana liukenemattomia inkluusiokappaleita, pestään inkluusiokappaleet puskurilla, jot-

ta poistetaan kontaminoivat E. colin soluproteiinit, suspendoidaan uudelleen ja liuotetaan inkluusiokappaleet denaturoimisaineen vesiliuokseen, laimennetaan saatu liuos detergentillä ja puhdistetaan liuotettu meningokokin ryhmän B poriiniproteiini tai fuusioproteiini geelisuodatuksella ja ioninvaihtokromatografialla.

Vielä yksi keksinnön kohde on saada aikaan menetelmä edellä kuvatun meningokokin ryhmän B poriiniproteiinin tai fuusioproteiinin uudelleenlaskostamiseksi, jolloin menetelmässä lyysataan transformoitu E. coli, jotta vapautetaan meningokokin ryhmän B poriiniproteiini tai fuusioproteiini osana liukenemattomia inkluusiokappaleita, pestään inkluusiokappaleet puskurilla, jotta poistetaan kontaminoivat E. colin soluproteiinit, suspendoidaan uudelleen ja liuotetaan inkluusiokappaleet denaturoimisaineen vesiliuokseen, laimennetaan saatu liuos detergentillä ja puhdistetaan liuotettu meningokokin ryhmän B poriiniproteiini tai fuusioproteiini geelisuodatuksella, jotta saadaan uudelleenlaskostettu proteiini eluointiaineeseen.

Vielä yksi keksinnön kohde on saada aikaan E. coli -kanta BL21 (DE3) $\Delta ompA$ -isäntäsolu, joka sisältää vektorin, joka käsittää DNA-molekyylin, joka koodittaa meningokokin ryhmän B poriiniproteiinia tai fuusioproteiinia, jolloin DNA-molekyyli on liitetty toiminnallisesti vektorin T7-promoottoriin.

Vielä yksi keksinnön kohde on saada aikaan E. coli -kanta BL21 (DE3) $\Delta ompA$.

Muut tämän keksinnön kohteet selviävät seuraavasta kuvauksesta.

Kuvioiden sisältö lyhyesti

Kuvio 1: kaavio, joka osoittaa PorB-geenin sekvensointistrategian. Esimerkissä 1 kuvattu PCR-tuote (Materiaalit ja menetelmät -osassa) ligatoitiin BamHI-XhoI-kohtaan ekspressioplasmidissa pET-17b. Alkuperäinen kaksijuosteisen alukkeen pidennys-

sekvensointi tehtiin käyttämällä oligonukleotidisekvenssejä suoraan ylävirtaan BamHI-kohdasta ja juuri alavirtaan XhoI-kohdasta pET-17b-plasmidissa. Toiset sekvenssitulokset saatiin tekemällä useita deleetioita geenin 3'-päähen käyttämällä en-

5

donukleaasi III/mungpavun nukleaasi -reaktioita. Uudelleenli-gatoinnin ja transformoinnin jälkeen E. colin valittiin useita insertin kokoisia klooneja ja sekvensointiin sen jälkeen. Tämä sekven-

10

Kuvio 2: Geelielektroforeesi, joka kuvaa PCR-reaktion tuotteita (ajettu elektroforeesilla 1 prosenttisessa agaroo-

15

Kuvio 3 (kuviot (a) ja (b)). Kuvio (a): kontrolliplasmidin pET-17b ilman inserttejä sisältävän E. colin ja insertin saa-
dusta PCR-tuotteesta, joka on kuvattu osassa materiaalit ja menetelmät, sisältävän plasmidin pET-17b käsittävän E. colin
kokonaisten solujen lyaattien SDS-PAGE-analyysi. Kumpaakin
viljelmää kasvatettiin O.D.:iin 0,6 600 nm:ssa, lisättiin IPTG
ja inkuboitiin 37 °C:ssa 2 tuntia. 1,5 ml kutakin viljelmää
otettiin talteen, sentrifugoitiin ja bakteeripelletti liuotet-
tiin 100 µl:aan SDS-PAGE-valmistuspuskuria. Kaistassa A näkyy
proteiiniprofiili, joka saatiin 10 µl:sta kontrollinäytettä ja
kaistat B (5 µl) ja C (10 µl) esittävät proteiiniprofiilin E. coli
-isännästä, joka ekspressoii PorB-proteiinia. Kaista (b):
western-blot-analyysi kokosolulysaateista E. colista, joka
sisältää kontrolliplasmidin pET-17b ilman inserttiä 2 tunnin
induktion jälkeen IPTG:llä, kaista A, 20 µl ja vastaava E. coli
-klooni, joka sisältää porB-pET-17b-plasmidin, kaista B,
5 µl; kaista C, 10 µl ja kaista D, 20 µl. Primaarisena vasta-
aineena käytettiin monoklonaalista vasta-ainetta 4D11 ja wes-
tern blot kehitettiin, kuten on kuvattu. Kussakin tapauksessa
käytettiin esivärjättyjä alhaisen molekyylipainon standardeja
BRL:stä.

20

25

30

35

Kuvio 4: kypsän PorB-geenin, joka on kloonattu ekspres-

sioplasmidiin pET-17b nukleotidisekvenssi (SEK ID NRO 1) ja translatoitu aminohapposekvenssi (SEK ID NRO 2). Kaksi nukleotidia, jotka eroavat aikaisemmin julkaistusta serotyypistä 15 PorB on alleviivattu.

5

Kuvio 5: kaavio, joka kuvaa Sephacryl S-300-pylvään eluutio-profiilia sekä villityyppiselle luokan 3 proteiinille, joka eristettiin meningokokkikannasta 8765 ja rekombinanttiselle luokan 3 proteiinille, joka tuotettiin E. coli -kannassa BL2-1(DE3)-AompA, joka sisälsi r3pET-17b-plasmidin, mitattuna absorptiolla 280 nm:ssa ja SDS-PAGE-analyysillä. Pylvään välisijatilavuus on osoitettu nuolella. Fraktiot, jotka sisältävät meningokokkiporiinin ja rekombinanttiporiinin määritettynä SDS-PAGE:lla, on merkitty viivalla.

15

Kuvio 6: kaavio, joka kuvaa tuloksia inhibitio-ELISA-analyysistä, osoittaen homologisen villityyppisen (wt) PorB:n kyvyn kilpailla reaktiivisista vasta-aineista kuudessa ihmisen immuuniseerumissa. Aritmeettinen keskimääräinen inhibitio on osoitettu lihavoidulla viivalla.

20

Kuvio 7: kaavio, joka kuvaa tuloksia inhibitio-ELISA-analyysistä, osoittaen puhdistetun rekombinanttisen PorB-proteiinin kyvyn kilpailla reaktiivisista vasta-aineista kuudessa ihmisen immuuniseerumissa. Aritmeettinen keskimääräinen inhibitio on osoitettu lihavoidulla viivalla.

25

Kuvio 8: kaavio, jossa verrataan näitä kahta keskimääräistä inhibitiota, jotka saatiin wt- ja rekombinantti-PorB-proteiinilla.

30

Kuvio 9A ja 9B: kypsän luokan II poriinigeenin, joka on kloonattu ekspressioplasmidiin pET-17b, nukleotidisekvenssi (SEK ID NRO 3) ja translatoitu aminohapposekvenssi (SEK ID NRO 4).

35

Kuviot 10A ja 10B: Fuusioidun luokan II poriinigeenin, joka on kloonattu ekspressioplasmidiin pET-17b, nukleotidisekvenssi (SEK ID NRO 5) ja translatoitu aminohapposekvenssi (SEK ID NRO

6).

Kuvio 11 (kuviot A ja B): kuvio A esittää pET-17b-plasmidin restriktiokartan. Kuvio B esittää nukleotidisekvenssin (SEK ID NRO 7 ja SEK ID NRO 9) pET-17b:n BglII- ja XhoI-kohtien välillä. Plasmidin tuottama sekvenssi on merkitty normaalilla viivalla kun taas PCR-tuotteesta insertoitu sekvenssi on merkitty lihavoidulla viivalla. Aminohapot (SEK ID NRO 8 ja SEK ID NRO 10), jotka on saatu plasmidista, on esitetty normaalilla tekstillä, kun taas aminohapot insertistä on merkitty lihavoidulla. Nuolet määrittelevät, milloin alkaa sekvenssi, joka on yhtenevä kuvion 4 sekvenssin kanssa, ja milloin se päättyy.

Keksinnön yksityiskohtainen kuvaus

Toisin kuin E. colin ja eräiden muiden gram-negatiivisten bakteerien poriiniproteiineista, suhteellisen vähän tiedetään siitä, kuinka muutokset Neisserian poriinien primaarisekvenssissä vaikuttavat niiden ioniselektiivisyyteen, riippuvuuteen jännitteestä ja muihin biofysikaalisiin toimintoihin. Vähän aikaa sitten ratkaistiin kahden E. coli -poriinin, OmpF ja PhoE, kiderakenne 2,4 Å:ksi ja vastaavasti 3,0 Å:ksi (Cowan, S. W. et al., Nature 358: 727 - 733 (1992)). Kumpaakin näistä E. colin poriineista on tutkittu intensiivisesti niiden epätavallisen stabiilisuuden vuoksi ja helppouden vuoksi, jolla molekyyligeneettiset manipuloinnit voitiin toteuttaa. Näistä kahdesta poriinista saadut tiedot korreloivat hyvin kiderakenteen kanssa. Vaikka useissa tutkimuksissa on osoitettu käyttäen monoklonaalisia vasta-aineita neisseriaporiinien selektomiseksi, että Neisserian pintatopologia muistuttaa läheisesti näiden kahden E. coli -poriinin pintatopologiaa (van der Ley, P. et al., Infect. Immun. 59: 2963 - 2971 (1991)), lähes mitään tietoa ei ole saatavissa siitä, kuinka aminohappojäännösekvenssin muutokset neisseriaporiinien tietyillä alueilla vaikuttavat niiden biofysikaalisiin ominaisuuksiin, toisin kuin E. colin poriinien suhteen on tehty (Cowan, S. W. et al., Nature 358: 727 - 733 (1992)).

Kaksi pääongelmaa, jotka haittaavat tätä tutkimusta ovat: (1) kyvyttömyys manipuloida helposti Neisseria geneettisesti moderneilla molekyyllitekniikoilla ja (2) kyvyttömyys ekspressoida riittäviä määriä neisseriaporiineja E. colissa lisäpuhdistusta varten, jotta saataisiin biofysikaaliset ja biokemialliset karakterisointitiedot. Itse asiassa suurin osa DNA-sekvenssitiedoista gonokokin ja meningokokin poriineista on saatu kloonaamalla poriinigeenin päällekkäisiä osia ja rekonstruoida informaatio tuottamaan koko geenisekvenssi (Gotschlich, E. C. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 8135 - 8139 (1987); Murakami, K. et al., Infect. Immun. 57: 2318 - 2323 (1989)). Carbonetti et al. olivat ensimmäiset, jotka kloonasivat gonokokin koko poriinigeenin E. coliin käyttäen tiukasti kontrolloitua pT7-5-ekspressioplasmidia. Näiden tutkimusten tulokset osoittivat, että kun poriinigeeni indusoitiin, hyvin vähän poriiniproteiinia kertyi, ja tämän proteiinin ekspressio oli letaali E. colille (Carbonetti ja Sparling, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 9084 - 9088 (1987)). Lisätutkimuksissa Carbonetti et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 6841 - 6845 (1988)) osoittivat, että muutokset gonokokin poriinigeenissä voitiin tehdä tässä järjestelmässä E. colissa ja viedä sitten uudelleen gonokokkeihin. Helppous, jolla nämä manipulaatiot voidaan tehdä ja saada kylliksi poriiniproteiinia seuraavia biokemiallisia ja biofysikaalisia karakterisointeja varten, näyttää rajalliselta.

Feavers et al. ovat kuvanneet menetelmän monistaa PCR:llä neisserian poriinigeenejä suuresta joukosta eri lähteitä käyttämällä kahta syntetoitua oligonukleotidia yhteisille domeeneille poriinigeenien 5'- ja vastaavasti 3'-päissä (Feavers, I. M. et al., Infect. Immun. 60: 3620 - 3629 (1992)). Oligonukleotidit rakennettiin niin, että monistettu DNA voitiin kloonata pakolla plasmideihin käyttäen restriktioendonukleaaaseja BglII ja XhoI.

Käyttäen Feaversin et al. PCR-järjestelmää monistettiin kypsän PorB proteiinin DNA-sekvenssi meningokokkikannasta 8765, serotyyppi 15, ja ligatoitiin se BamHI-XhoI-kohtaan T7-ekspressio-

plasmidissa pET-17b. Tämä asetti kypsän PorB-proteiinisekvenssin kehykseen suoraan T7-promoottorin ja 20 Ø10-proteiinin aminohapon jälkeen, mukaanluettuna johtosekvenssi. Kun IPTG oli lisätty tämän plasmidin sisältävän E. colin viljelmään, bakteerin sisään kertyi suuria määriä PorB-proteiinia. Täydellinen selitys sille, miksi tämä rakenne ei ollut letaali E. colille, ja miksi se ekspressoisi suuria määriä poriiniproteiinia, odottaa lisätutkimuksia. Eräs mahdollinen hypoteesi on kuitenkin se, että korvaamalla neisserian promoottori- ja signaalisekvenssi T7:n ja Ø10:n vastaavilla, poriinituote ohjattiin sytoplasmaan ennemmin kuin kohti ulkomembraania. Henning ja hänen työtoverinsa ovat esittäneet, että kun E. colin OmpA-proteiini ja sen fragmentit ekspressoituaan, ne tuotteet, jotka havaitaan sytoplasmassa, ovat vähemmän toksisia kuin ne, jotka on suunnattu kohti periplasmista tilaa (Klose, M. et al., J. Biol. Chem. 263: 13291 - 13296 (1988), Klose, M. et al., J. Biol. Chem. 263: 13297 - 13302 (1988); Freundl, R. et al., J. Mol. Biol. 205: 771 - 775 (1989)). Mikä selitys sitten onkaan, kun PorB-proteiini oli ekspressoitu, se oli helppo eristää, puhdistaa ja se näytti muotoutuvan trimeereiksi paljolti kuten natiivi poriini. Tulokset inhibitio-ELISA-aineistosta, joissa käytettiin ihmisen immuuniseerumia, antavat olettaa, että tällä tavalla saatu PorB-proteiini säilyttää useimmat, jos eivät kaikki meningokokista puhdistetun villityyppisen PorB-proteiinin antigeeniset ominaisuudet. Tämä ekspressiojärjestelmä soveltuu neisserian poriinigeenin helppoon manipulaatioon moderneilla molekyylietekniikoilla. Lisäksi tämä järjestelmä tekee mahdolliseksi saada suuria määriä puhdasta poriiniproteiinia karakterisointia varten. Lisäksi tämä ekspressiojärjestelmä tekee mahdolliseksi geenien useista Neisseria-kannoista, sekä gonokokeista että meningokokeista, tutkimisen ja karakterisoinnin samalla tavalla.

Näin ollen tämä keksintö koskee menetelmää B-ryhmän meningokokin ulkomembraanin poriiniproteiinin ekspressoimiseksi, erityisesti luokan 2 ja luokan 3 poriiniproteiinien ekspressoimiseksi.

Eräässä suoritusmuodossa tämä keksintö koskee menetelmää meningokokin ulkomembraanin ryhmän B poriiniproteiinin ekspressoimiseksi E. colissa, jolloin menetelmässä:

5

(a) transformoidaan E. coli vektorilla, joka käsittää selektoitavan merkin ja geenin, joka koodittaa proteiinia, joka on valittu joukosta, johon kuuluvat:

- (i) kypsä poriiniproteiini ja
 10 (ii) fuusioproteiini, joka käsittää kypsän poriiniproteiinin fuusioituna T7-geenin Ø10 kapsidiproteiinin aminohappoihin 1 - 20 tai 22,

jolloin mainittu geeni on liitettynä toimivasti T7-promoottoriin;

- 15 (b) kasvatetaan transformoitua E. colia kasvatusalustassa, joka sisältää valinta-aineen ja

(c) indusoidaan mainitun proteiinin ekspressio;

jolloin proteiini muodostaa enemmän kuin 2 % kokonaisproteiinista, joka ekspressoituu E. colissa.

20

Edullisessa suoritusmuodossa ekspressoitu meningokokin ryhmän B poriiniproteiini tai fuusioproteiini kattaa enemmän kuin 5 % E. colissa ekspressoituvasta kokonaisproteiinimäärästä. Toisessa edullisessa suoritusmuodossa ekspressoitu meningokokin
 25 ryhmän B poriiniproteiini tai fuusioproteiini kattaa enemmän kuin 10 % E. colissa ekspressoituvasta kokonaisproteiinimäärästä. Vielä eräässä edullisessa suoritusmuodossa ekspressoitu meningokokin ryhmän B poriiniproteiini tai fuusioproteiini kattaa enemmän kuin 30 % E. colissa ekspressoituvasta kokonaisproteiinimäärästä.
 30

Esimerkkeihin plasmideista, jotka sisältävät T7:n indusoituvan promoottorin, kuuluvat ekspressioplasmidit pET-17b, pET-11a, pET-24a-d(+) ja pET-9a, jotka kaikki ovat saatavilla kaupallisesti Novagenistä (565 Science Drive, Madison, WI, 53711).
 35 Nämä plasmidit käsittävät sekvenssinä T7-promoottorin, haluttaessa lac-operaattorin, ribosomin sitoutumiskohdan, restriktiokohdat, jotka tekevät mahdolliseksi rakennegeenin insertion

ja T7-lopetussekvenssin. Katso Novagenin luettelo, sivut 36 - 43 (1993).

5 Edullisessa suoritusmuodossa käytetään E. coli -kanta BL21 (DE3) Δ ompA. Edellä mainitut plasmidit voidaan transformoida tähän kantaan tai villityyppiseen kantaan BL21(DE3). E. coli -kanta BL21 (DE3) Δ ompA on edullinen, koska tämä kanta ei tuota OmpA-proteiinia, joka voisi kontaminoida puhdistetun poriiniproteiinin ja luoda ei-toivottavia immunogeenisiä sivuvaikutuk-

10 sia.

Transformoitua E. colia kasvatetaan ravintoalustalla, joka käsittää selektioaineen, esim. minkä tahansa β -laktaamin, jolle E. coli on herkkä, kuten ampisilliini. pET-ekspressiovektorit tarjoavat selektiivisiä merkkejä, jotka antavat antibio-

15 oottiresistenssin transformoidulle organismille.

B-ryhmän meningokokin poriiniproteiinin suuren tason ekspressio voi olla myrkyllinen E. colille. Yllättävästi tämä

20 keksintö sallii E. colin ekspressoida proteiinia tasoon, joka on vähintään 30 % ja jopa > 50 % solun kokonaisproteiineista.

Toisessa edullisessa suoritusmuodossa tämä keksintö koskee rokotetta, joka käsittää B-ryhmän meningokokin ulkomembraanin

25 poriiniproteiinin tai sen fuusioproteiinin, joka on valmistettu edellä kuvattujen menetelmien mukaisesti, yhdessä farmaceuttisesti hyväksyttävän laimennusaineen, kantajan tai täyteaineen kanssa, jolloin rokote voidaan antaa määränä, joka on tehokas nostamaan esiin eläimessä suojaavia vasta-aineita

30 Neisseria meningitidistä vastaan. Edullisessa suoritusmuodossa eläin valitaan joukosta, johon kuuluvat ihmiset, karja, siat, lampaat ja kananpojat. Toisessa edullisessa suoritusmuodossa eläin on ihminen.

35 Toisessa edullisessa suoritusmuodossa tämä keksintö koskee edellä kuvattua rokotetta, jossa mainittu B-ryhmän meningokokin ulkomembraanin poriiniproteiini tai sen fuusioproteiini on konjugoitu B-ryhmän meningokokin kapselipolysakkaridiin (CP).

Tällaiset kapselipolysakkaridit voidaan valmistaa, kuten ovat kuvanneet Ashton, F. E. et al., Microbial Pathog. 6: 455 - 458 (1989), Jennings, H. J. et al., J. Immunol. 134: 2651 (1985), Jennings, H. J. et al., J. Immunol. 137: 1708 - 1713 (1986),
 5 Jennings, H. J. et al., J. Immunol. 142: 3585 - 3591 (1989), Jennings, H. J., "Capsular Polysaccharides as Vaccine Candidates", in Current Topics in Microbiology and Immunology, 150: 105 - 107 (1990); näiden kaikkien julkaisujen sisältö liitetään tähän viitteiksi kokonaisuudessaan.

10

Edullisesti CP eristetään Frasch, C. E.:n menetelmän mukaisesti, "Production and Control of Neisseria meningitidis Vaccines", kirjassa Bacterial Vaccines, Alan R. Liss, Inc., S. 123 - 145 (1990), jonka sisältö liitetään tähän kirjallisuus-
 15 viitteeksi kokonaisuudessaan, seuraavasti:

- kasvatetaan organismeja muunnetussa Franzin alustassa 10 - 20 tuntia
- tapetaan lämmöllä 55 °C:ssa, 10 min
- poistetaan inaktivoidut solut sentrifugoimalla
- 20 - lisätään Cetavlonia 0,1 prosenttiseksi
- saostetaan CP kasvatusliemestä
- lisätään kalsiumkloridia 1 M:ksi
- liuotetaan CP, sitten sentrifugoidaan solujätteen poistamiseksi
- 25 - lisätään etyylialkoholia 25 prosenttiseksi
- poistetaan saostuneet nukleiinihapot sentrifugoimalla
- lisätään etyylialkoholia 80 prosenttiseksi
- saostetaan raaka-CP ja poistetaan alkoholi.

30

Raaka-CP puhdistetaan sitten vielä geelisuodatuskromatografialla osittaisen depolymerisaation jälkeen laimealla hapolla, esim. etikkahapolla, muurahaishapolla ja trifluorietikkahapolla (0,01 - 0,5 N), jotta saadaan polysakkaridiseos, jonka keskimääräinen molekyylipaino on 12,000 - 16,000. CP N-deasetyloidaan sitten boorihydridillä ja N-propionyloidaan, jotta saadaan N-Pr GBMP. Näin ollen CP, jota voidaan käyttää tämän keksinnön mukaisissa konjugaattirokotteissa, voi olla CP-fragmentteja, N-deasetyloitua CP:tä ja sen

35

fragmentteja, samoin kuin N-Pr CP:tä ja sen fragmentteja, kunhan ne indusoivat aktiivisen immunitetin käytettynä osana CP-poriiniproteiinikonjugaattia (katso esimerkeistä).

5 Vielä eräässä edullisessa suoritusmuodossa tämä keksintö koskee menetelmää polysakkaridikonjugaatin valmistamiseksi, jolloin saadaan edellä kuvattu B-ryhmän meningokokin ulkomembraanin poriiniproteiini tai sen fuusio-proteiini- saadaan CP Neisseria meningitidis-organismista ja konjuoidaan proteiini
10 CP:hen.

Keksinnön mukaiset konjugaatit voidaan muodostaa antamalla CP:n pelkistävien pääteryhmien reagoida poriinin primaaristen aminoryhmien kanssa pelkistävällä aminaatiolla. Pelkistävät
15 ryhmät voidaan muodostaa selektiivisellä hydrolyysillä tai spesifisellä hapettavalla pilkomisella tai kummankin yhdistelmänä. Edullisesti CP konjugoidaan poriiniproteiiniin Jenningsin et al. menetelmällä, US-patentti 4,356,170, jonka sisältö liitetään tähän kirjallisuusviitteeksi kokonaisuudessaan, jolloin menetelmä sisältää CP:n kontrolloidun hapettamisen pe-
20 riodaattilla, mitä euraa pelkistävä aminaatio poriiniproteiinin kanssa.

Tämän keksinnön mukainen rokote käsittää B-ryhmän meningokokin poriiniproteiinin, fuusioproteiinin tai konjugaattirokotteen
25 määränä, joka on tehokas riippuen antotavasta. Vaikka subkutaaniset tai intramuskulaariset antoreitit ovat edullisia, tämän keksinnön mukainen B-ryhmän meningokokin proteiini, fuusioproteiini tai rokote voidaan antaa myös intraperitoneaalista tai intravenaalista reittiä. Alan ammattilainen voi havai-
30 ta, että annettavat määrät mitä tahansa erityistä hoitokäytäntöä varten voidaan määrittää helposti ilman kohtuutonta tutkimusta. Sopivien määrien voisi odottaa olevan alueella 2 mikrogrammasta proteiinia kiloa ruumiinpainoa kohti 100 mikrogram-
35 maan kiloa ruumiinpainoa kohti.

Tämän keksinnön mukaista rokotetta voidaan käyttää sellaisina muotoina, kuten kapseleina, nesteliuksina, suspensioina tai

eliksiireinä oraalista antoa varten, tai steriileinä nestemuotoina, kuten liuoksina tai suspensioina. Edullisesti käytetään mitä tahansa inerttiä kantajaa, kuten suolaliuosta, fosfaattila puskuroitua suolaliuosta tai mitä tahansa sellaista kantajaa, jossa B-ryhmän meningokokin poriiniproteiinilla, fuusioproteiinilla tai konjugaattirokotteella on sopivia liukoisuusominaisuuksia. Rokotteet voivat olla yksittäisten annosvalmisteiden muodossa tai moniannospulloissa, joita voidaan käyttää massakokotusohjelmissa. Rokotteiden valmistus- ja käyttömenetelmien suhteen viitataan kirjoihin Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, PA, Osol (toim.) (1980) ja New Trends and Developments in Vaccines, Voller et al. (toim.) University Park Press, Baltimore, MD (1978).

Tämän keksinnön mukaiset B-ryhmän meningokokin poriiniproteiini, fuusioproteiini tai konjugaattirokotteet voivat käsittää lisäksi adjuvantteja, jotka edistävät poriinille spesifisten vasta-aineiden tuotantoa. Tällaisiin adjuvantteihin kuuluvat, mutta eivät rajoitu näihin, erilaiset öljyformulaatiot, kuten Freundin täydellinen adjuvantti (CFA), stearyylityrosiini (ST, katso US-patentti 4,258,029), dipeptidi, joka tunnetaan MDP:nä, saponiini, alumiinihydroksidi ja lymfaattinen sytokiini.

Freundin adjuvantti on mineraaliöljyn ja veden emulsio, joka sekoitetaan immunogeenisen aineen kanssa. Vaikka Freundin adjuvantti on voimakas, sitä ei yleensä anneta ihmisille. Sen sijaan adjuvanttia aluna (alumiinihydroksidi) tai ST:tä voidaan käyttää annettavaksi ihmisille. B-ryhmän meningokokin poriiniproteiini tai sen konjugaattirokote voidaan absorboida alumiinihydroksidiin, josta se vapautuu hitaasti injektion jälkeen. B-ryhmän meningokokin poriiniproteiini tai konjugaattirokote voidaan myös kapseloida liposomien sisään Fullertonin mukaisesti, US-patentti 4,235,877.

Toisessa edullisessa suoritusmuodossa tämä keksintö koskee menetelmää bakteerimeningiitin estämiseksi eläimessä, jolloin

menetelmässä annetaan eläimelle B-ryhmän meningokokin poriiniproteiinia, fuusioproteiinia tai konjugaattirokotetta, joka on valmistettu kuvattujen menetelmien mukaisesti määränä, joka on tehokas estämään bakteerimeningiittiä.

5

Vielä eräässä suoritussuodossa keksintö koskee menetelmää edellä kuvattua B-ryhmän meningokokin ulkomembraanin poriiniproteiinin tai fuusioproteiinin puhdistamiseksi, jolloin menetelmässä lyysataan transformoitu E. coli vapauttamaan B-ryhmän meningokokin poriiniproteiini tai fuusioproteiini osana liu-

10 kenemattomia inkluusiokappaleita, pestään inkluusiokappaleet puskurilla, jotta poistetaan kontaminoivat E. coli soluproteiinit, suspendoidaan ja liuotetaan inkluusiokappaleet denaturointiaineen vesiliuokseen, laimennetaan saatu liuos detergent-

15 tillä ja puhdistetaan liuotettu B-ryhmän meningokokin poriiniproteiini geelisuodatuksella.

Lyysausvaihe voidaan toteuttaa minkä tahansa menetelmän mukaisesti, jonka alan tavanomaiset taidot omaavat tuntevat, esim.

20 sonikoinnilla, entsyymipilkkomisella, osmoottisella sokilla, tai viemällä harsokangaspuristimen läpi.

Inkluusiokappaleet voidaan pestä millä tahansa puskurilla, joka kykenee liuottamaan E. coli soluproteiinit liuottamatta

25 inkluusiokappaleita, jotka sisältävät B-ryhmän meningokokin poriiniproteiinin. Tällaisiin puskureihin kuuluvat, mutta eivät rajoitu näihin, TEN-puskuri (50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, pH 8,0), Trisiini, Bisiini ja HEPES.

Denaturointiaineisiin, joita voidaan käyttää tämän keksinnön käytännön suorituksessa, kuuluvat 2 - 8 M urea tai noin 2 - 6 M guanidiini-HCl, edullisemmin 4 - 8 M urea tai noin 4 - 6 M guanidiini-HCl ja edullisimmin noin 8 M urea tai noin 6 M guanidiini-HCl.

35

Esimerkkeihin detergenteistä, joita voidaan käyttää laimentamaan liuotettu B-ryhmän meningokokin poriiniproteiini kuuluvat, mutta eivät rajoitu näihin, ioniset detergentit, kuten

SDS ja cetavlon (Calbiochem), ei-ioniset detergentit, kuten Tween, Triton X, Brij 35 ja oktyyloglukosidi ja amfoteeri-ioniset detergentit, kuten 3,14-Zwittergent, empigen BB ja Champs.

5

Lopuksi liukoiseksi tehty B-ryhmän meningokokin ulkomembraanin poriiniproteiini voidaan puhdistaa geelisuodatuksella erottaman suuri- ja pienimolekyyllipainoiset materiaalit. Suodatusgeelityyppeihin kuuluvat, mutta eivät rajoitu näihin, Sephacryl-300, Sepharose CL-6B ja Bio-Gel A-1.5m. Pylväs eluoidaan puskurilla, jota käytetään laimentamaan liuotettua proteiinia. Poriinin tai sen fuusion sisältävät fraktiot voidaan sitten tunnistaa geelielektroforeesilla, fraktiot yhdistää, dialysoida ja konsentroida.

15

Lopuksi olennaisesti puhdas (> 95 %) poriiniproteiini ja fuusioproteiini voidaan saada viemällä konsentroidut fraktiot Q-sepharose korkean erotuskyvyn pylvään läpi.

20

Toisessa suoritusmuodossa tämä keksintö koskee B-ryhmän meningokokin poriiniproteiinigeenin ekspressiota, jolloin geeni on osana vektoria, joka käsittää T7-promoottorin, joka on indusoitava. Jos promoottori on indusoitava promoottori, transkription taso lisääntyy reaktiona indusoivaan aineeseen. T7-promoottori in induoitavissa lisäämällä isopropyyli β -D-tiogalaktopyranosidia (IPTG) viljelyalustaan. Vaihtoehtoisesti voidaan käyttää Tac-promoottoria tai lämpösokkipromoottoria.

25

Edullisesti B-ryhmän meningokokin poriiniproteiinigeeni ekspressoidaan pET-17-ekspressiovektorista tai pET-11a-ekspressiovektorista, jotka kumpikin sisältävät T7-promoottorin.

30

B-ryhmän meningokokin poriiniproteiinigeenin tai fuusiogeenin kloonaus ekspressiovektoriin voidaan toteuttaa tavanomaisten tekniikoiden mukaisesti, joihin kuuluvat tylpät tai porraspäät ligaatiolle, pilkkominen restriktioentsyymillä tarjoamaan sopivat päädyt, kohesiivisten päiden täyttö sopivalla tavalla, käsittely alkalisella fosfataasilla, jotta vältetään ei-toi-

35

vottavaa liittymistä, ja ligaatio sopivilla ligaaseilla.

Yleisten kloonausmenetelmien viitteeksi esitetään kirja Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2 painos, Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989).

B-ryhmän meningokokin poriiniproteiini ja fuusio-proteiini, jotka on ekspressoitu tämän keksinnön mukaisesti, täytyy laskostaa uudelleen oikein, jotta saadaan aikaan rakenne, joka on immunologisesti luonteenomainen natiiville proteiinille. Vielä eräässä suoritussuodossa tämä keksintö koskee menetelmää edellä kuvatun ulkomembraani-proteiinin ja fuusioproteiinin uudelleenlaskostamiseksi, jolloin menetelmässä lyysataan transformoitu E. coli vapauttamaan B-ryhmän meningokokin poriiniproteiini tai fuusioproteiini osana liukenemattomia inkluusiokappaleita, inkluusiokappaleiden pesu puskurilla, jotta poistetaan kontaminoivat E. coli soluproteiinit, suspendoidaan uudelleen ja liuotetaan inkluusiokappaleet denaturointiaineeseen vesiliuokseen, laimennetaan saatu liuos detergentillä ja puhdistetaan liuotettu B-ryhmän meningokokin poriini-proteiini tai fuusioproteiini geelisuodatuksella, jotta saatetaan uudelleen laskostettu proteiini eluenttiin. Yllättävästi on havaittu, että laskostetut trimeeriset B-ryhmän meningokokin luokan 2 ja luokan 3 poriiniproteiinit saadaan suoraan eluentista geelisuodatuspylvästä.

Toisessa edullisessa suoritussuodossa tämä keksintö koskee olennaisesti puhdasta uudelleen laskostettua B-ryhmän meningokokin poriiniproteiinia ja fuusioproteiinia, jotka on valmistettu edellä kuvattujen menetelmien mukaisesti. Olennaisesti puhdas proteiini on proteiini, josta puuttuu yleisesti muut Neisseria meningitidis solukomponentit todistettuna esimerkiksi elektroforeesilla. Tällaisten olennaisesti puhtaiden proteiinien puhtaus on > 95 % määritettynä densitometrillä tai elektroforeesigeelillä värjäyksen jälkeen Coomassie-sinisellä tai hopeavärjäyksillä.

Seuraavat esimerkit ovat tämän keksinnön menetelmää ja koostu-

muksia kuvaavia, mutta eivät rajoittavia. Muut sopivat alalla tavallisesti tavatut eri olosuhteiden ja parametrien muunnellut ja sovellutukset, jotka ovat alan ammattilaisille ilmeisiä, kuuluvat tämän keksinnön henkeen ja piiriin.

5

Esimerkit

Esimerkki 1. Ryhmän B Neisseria meningitidisin luokan 3 poriiniproteiinin kloonaus

10

Materiaalit ja menetelmät

Organismit: Ryhmän B Neisseria meningitidis -kanta 8765

(B:15:P1,3) saatiin Dr. Wendell Zollingerilta (Walter Reed Army Institute for Research) ja sitä kasvatettiin agaralustalla, joka on kuvattu aikaisemmin (Swanson, J. L., Infect. Immun. 21: 292 - 302 (1978)) kynttilänsammutustölkissä inkubaattorissa, joka pidettiin 30 °C:ssa. Escherichia coli -kannat DME558 (S. Bensonin kokoelmasta, Silhavy, T. J. et al., "Experiments with Gene Fusions", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y., 1984), BRE51 (Bremer, E. et al., FEMS Microbiol. Lett. 33: 173 - 178 (1986)) ja BL21(DE3) kasvatettiin LB-agarmaljoilla 37 °C:ssa.

P1-transduktio: P1_{vir}-lysaattia E. coli -kannasta DME558 käytettiin transduktoimaan tetrasykliiniresistenssimerkki kantaan BRE51 (Bremer, E., et al., FEMS Microbiol. Lett. 33: 173 - 178 (1986)), josta oli deletoitettu koko ompA-geeni (Silhavy, T. J. et al., Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984)). Kantaa DME558, joka sisältää tetrasykliiniresistenssimerkin aivan ompA-geenin läheisyydessä, kasvatettiin LB-alustalla, kunnes se saavutti tiheyden noin 0,6 ID 600 nm:ssa. Yksi millilitran kymmennys 0,5 M CaCl₂:ta lisättiin 10 ml:aan viljelmää ja 0,1 ml liuosta, joka sisälsi 1 x 10⁹ PFU:ta P1 vir:iä. Viljelmää inkuboitiin 3 tuntia 37 °C:ssa. Tämän ajan jälkeen bakteerien solutiheys oli silmin nähden vähentynyt. Lisättiin 0,5 ml kloroformia ja faagiviljelelmä varastoitiin 4 °C:seen. Koska kuhunkin faagiin voi

pakkautua tyypillisesti 1 - 2 % E. colin kromosomista, luotujen faagien lukumäärä kattaa koko bakteeri-isännän kromosomin, mukaanluettuna tetrasykliiniresistenssimerkki lähellä ompA-geeniä.

5

Seuraavaksi kantaa BRE51, josta puuttuu ompA-geeni, kavatettiin LB-alustalla yli yön 37 °C:ssa. Yli yön kasvatettu viljelmä laimennettiin 1:50 tuoreeseen LB:hen ja kasvatettiin 2 tuntia. Solut poistettiin sentrifugoimalla ja suspendoitiin uudelleen MC-suoloihin. 0,1 ml bakteerisoluja sekoitettiin 0,05 kanssa faagilysaattia ja inkuboitiin 20 min huoneenlämmössä. Sen jälkeen lisättiin sama määrä 1 M natriumsitraattia ja bakteerisolut maljattiin LB-maljoille, jotka sisälsivät 12,5 µg/ml tetrasykliiniä. Maljoja inkuboitiin yli yön 37 °C:ssa. Tetrasykliiniresistenteistä (12 µg/ml) transduktanteista seulottiin OmpA-proteiinin ekspression puute SDS-PAGE:lla ja Western-Blot-analyysillä, kuten jäljempänä on kuvattu. Antibiootille resistenteillä bakteereilla on tetrasykliiniresistenssigeeni integroituna kromosomiinsa hyvin lähelle paikkaa, josta ompA-geeni on deletoitunut tästä kannasta. Yksi erityinen kanta nimettiin BRE-T^R:ksi.

20

Toinen faagin tuotantokierros tehtiin kannalla BRE-T^R käyttäen samaa menetelmää kuin edellä on kuvattu. Tämän faagipopulaation edustajat sisältävät sekä tetrasykliiniresistenssigeenin että OmpA-deleetion. Nämä faagit kerättiin sitten talteen ja varastoitiin. Näitä faageja käytettiin sitten E. coliBL21 (DE3):n infektoimiseen. Infektion jälkeen bakteerit sisältävät tetrasykliiniresistenssimerkin. Lisäksi on suuri todennäköisyys, että OmpA-deleetio selektoitui LB-maljoilla, jotka sisälsivät tetrasykliiniä.

30

Bakteeripesäkkeet, jotka kasvoivat maljoilla, kasvatettiin erikseen LB-alustalla ja niistä testattiin OmpA-proteiinin läsnäolo. Kaikista niistä pesäkkeistä, jotka valittiin tutkitavaksi, puuttui OmpA-proteiini, määritettynä vasta-ainereaktiivisuuden mukaan SDS-PAGE-western-bloteilla.

35

SDS-PAGE ja western blot: SDS-PAGE oli muunnelma Laemmliin menetelmästä (Laemmli, U. K., Nature 227: 680 - 685 (1970)), kuten aikaisemmin on kuvattu (Blake ja Gotschlich, J. Exp. Med. 159: 452 - 462 (1984)). Elektroforeettinen siirto Immobilon P:lle (Millipore Corp. Bedford, MA) suoritettiin Towbinin et al. menetelmien mukaisesti (Towbin, H. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 4350 - 4354 (1979)) sillä poikkeuksella, että paperi kostutettiin ensin metanolilla. Western blotit koetinnettiin fosfataasiin konjugoiduilla reagensseilla (Blake, M. S. et al., Analyt. Biochem. 136: 175 - 179 (1984)).

Polymeraasiketjureaktio: Feaversin et al. kuvaamaa menetelmää (Feavers, I. M. et al., Infect. Immun. 60: 3620 - 3629 (1992)) käytettiin monistamaan PorB:tä koodittava geeni. Valitut alukkeet olivat alukkeet 33 (SEK ID NRO 11) (GGG GTA GAT CTG CAG GTT ACC TTG TAC GGT ACA ATT AAA GCA GGC GT) ja 34 (SEK. ID. NRO 12) (GGG GGG GTG ACC CTC GAG TTA GAA TTT GTG ACG CAG ACC AAC), kuten aikaisemmin on kuvattu (Feavers, I. M. et al., Infect. Immun. 60: 3620 - 3629 (1992)). Lyhyesti sanottuna reaktiokomponentit olivat seuraavat: meningokokkikannan 8765 kromosomaalinen DNA (100 ng/ μ l), 1 μ l; 5'- ja 3'-alukkeita (1 μ M) 2 μ l kumpaakin; dNTP:tä (10 mM kantaliuokset), 4 μ l kuttakin, 10 x PCR reaktiopuskuria (100 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, pH 8,3), 10 μ l 25 mM MgCl₂:ta, 6 Ml; kaksi kertaa tislattua H₂O:ta, 62 μ l ja Taq-polymeraasia (Cetus Corp., 5 u/ μ l), 1 μ l. Reaktio toteutettiin GTC-2 Genetic Thermocyclerissä (Precision Inst. Inc., Chicago, IL), joka oli kytketty Lauda 4/K metanolivesi-jäähdytysjärjestelmään (Brinkman Instruments, Inc., Westbury, NY), joka oli asetettu 0 °C:seen. Lämpöjaksolaite ohjelmoitiin kiertämään 30 kertaa seuraavasti: 94 °C, 2 min; 40 °C, 2 min ja 72 °C, 3 min. Näiden 30 kierroksen jälkeen reaktiota pidennettiin 72 °C:ssa 3 min ja lopuksi pidettiin 4 °C:ssa, kunnes se oli valmisteltu analyysiä varten 1-prosenttisessa agarosigeelissä TAE-puskurissa, kuten Maniatis on kuvannut (Maniatis, T. et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1982)).

PCR-tuotteen alakloonauus: pET-17b-plasmidia (Novagen, Inc.) käytettiin alakloonaukseen, ja se valmisteltiin pilkkomalla kahdesti plasmidi restriktioendonukleaaseilla BamHI ja XhoI (New England Biolabs, Inc., Beverly, MA). Pilkotut päät defosforyloitiin sitten vasikan suoliston alkalisella fosfataasilla (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN). Pilkottu plasmidi analysoitiin sitten 1 prosenttisessa agarosigeelissä, pilkotu plasmidi poistettiin ja puhdistettiin käyttämällä GeneClean kitiä (Bio101, La Jolla, CA). PCR-tuote valmisteltiin uuttamalla fenoli-kloroformilla, kloroformilla ja puhdistettiin lopulta käyttämällä GeneClean-pakkausta (Bio101). PCR-tuote pilkottiin resntriktioendonukleaaseilla BglII ja XhoI (New England Biolabs, Inc.). DNA uutettiin sitten fenoli-kloroformilla, saostettiin lisäämällä 0,1 tilavuutta 3 M natriumasetaattia, 5 μ l glykokeeniä (20 μ g/ μ l) ja 2,5 tilavuutta etanolia. Kun DNA oli pesty 70 prosenttisella etanolilla (v/v) se liuotettiin uudelleen TE-puskuriin. Pilkottu PCR-tuote ligatoitiin kaksi kertaa pilkottuun pET-17b-plasmidisiin, joka on kuvattu edellä, käyttäen tavanomaista T4-ligaasimenettelyä 16 °C:ssa yli yön (Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York (1993)). Ligaatiotuote transformoitiin sitten BL21(DE3)- Δ ompA:hin, jotka on kuvattu edellä, ja jotka oli tehty kompetenteiksi Chungin et al. menetelmällä (Chung, C. T. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 2172 - 2175 (1989)). Transformantit valittiin LB-maljoilla, jotka sisälsivät 50 μ g/ml karbenisilliiniä ja 12 μ g/ml tetrasykliiniä. Valittiin useita transformantteja, kasvatettiin niitä LB-liemessä, joka sisälsi karbenisilliiniä ja tetrasykliiniä, 6 tuntia 30 °C:ssa, ja plasmidin geeniekspressio indusoitiin lisäämällä IPTG:tä. Lämpötila nostettiin 37 °C:seen ja viljelyä jatkettiin vielä 2 tuntia. Kunkin viljelmän solut kerättiin sentrifugoimalla, valmistettiin kokosolulysaatit ja analysoitiin SDS-PAGE:lla ja Western-blotilla käyttäen monoklonaalista vasta-ainetta (4D11), joka reagoi kaikkien neisserian poriinien kanssa.

Nukleotidisekvenssianalyysi: luokan 3 poriinigeenin kloonatun DNA:n nukleotidisekvenssi määritettiin dideoksimenetelmällä

käyttäen denaturoitua kaksijuosteista plasmidi-DNA:ta temp-
laattina, kuten on kuvattu (Current Protocols in Molecular
Biology, John Wiley & Sons, New York (1993)). Sekvenaasi II -
pakkaukset (United States Biochemical Corp., Cleveland, OH)
5 käytettiin valmistajan ohjeiden mukaisesti. Näissä reaktioissa
käytettiin kolmea syntetoitua oligonukleotidialuketta (Operon
Technologies, Inc., Alameda, CA). Yhtä 5'-päälle (SEK ID NRO
13), joka koostui sekvenssistä 5'TCAAGCTTGGTACCGAGCTC ja kahta
3'-päälle (SEK ID NRO 14) 5'TTTGTTAGCAGCCGGATCTG (SEK ID NRO
10 15) ja 5'CTCAAGACCCGTTTAGAGGCC. Limittäiset sarjassa olevat
deleetiot tehtiin linearisoimalla plasmidi-DNA restriktioen-
donukleaasilla Bpu11021 ja päät tehtiin tylpiksi lisäämällä
Thio-dNTP:tä ja Klenowin polymeraasia (Current Protocols in
Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York (1993)). Li-
15 nearisoitu plasmidi pilkottiin sitten restriktioendonukleaa-
silla XhoI ja exoII/Mung-pavun nukleasideleetiopakkauksella,
jota käytettiin tekemään plasmidin 3'-deleetiot (Stratagene,
Inc., La Jolla, CA), myyjän ohjeiden mukaisesti. Kartta tästä
strategiasta on esitetty kuviossa 1.

20 **PorB-geenituotteen ekspressio ja puhdistus:** Käyttämällä ste-
riiliä mikropipetin kärkeä valittiin yksi BL21-pesäke (DE3)-
ΔompA, joka sisälsi PorB-pET-17b-plasmidin, ja siirrostettiin
se 10 ml:aan LB-lientä, joka sisälsi 50 μg/ml karbenisil-
25 liiniä. Viljelmää inkuboitiin yli yön 30 °C:ssa ravistaen. 10
ml yli yön pidettyä viljelmää lisättiin sitten steriilisti 1
litraan LB-lientä, jossa oli sama konsentraatio karbenisil-
liiniä ja viljelyä jatkettiin ravistelevassa inkubaattorissa
37 °C:ssa kunnes OD₆₀₀ saavutti 0,6 - 1,0:n. Kolme ml IPTG:n
30 kantaliuosta (100 mM) lisättiin viljelmään ja viljelmää inku-
boitiin vielä 30 min. Sitten lisättiin rifampisiiniä (5,88 ml
kantaliuosta; 34 mg/ml metanolissa) ja viljelyä jatkettiin
vielä 2 tuntia. Solut kerättiin sentrifugoimalla 10 000 rpm
GS3-roottorissa 10 min ja punnittiin. Solut suspendoitiin uu-
35 delleen 3 ml:aan TEN-puskuria (50 mM Tris-HCl, 1 mM Tris-HCl,
1 mM EDTA, 100 mM NaCl, pH 8,0) grammaa solujen märkäpainoa
kohti. Tähän lisättiin 8 μl PMFS-kantaliuosta (50 mM vedettö-
mässä etanolissa) ja 80 μl lysotsyymikantaliuosta (10 mg/ml

vedessä) grammaa solujen märkäpainoa kohti. Seosta sekoitettiin huoneenlämmössä 20 min. Samalla kun sekoitettiin, lisättiin deoksikolaattia 4 mg grammaa solujen märkäpainoa kohti. Seos laitettiin 37 °C:seen vesihauteeseen ja sekoitettiin la-

5 sisauvalla. Kun seos tuli viskoosiksi, lisättiin 20 µl DNAasi I kantaliuosta (1 mg/ml) grammaa solujen märkäpainoa kohti. Seos otettiin sitten pois vesihauteesta ja jätettiin huoneenlämpöön kunnes liuos ei ollut enää viskoosi. Seosta sentrifugoitiin sitten 15 000 rpm SS-34-roottorissa 20 min 4 °C:ssa.

10 Pelletti säilytettiin ja pestiin huolellisesti kahdesti TEN-puskurilla. Pelletti suspendoitiin sitten uudelleen juuri valmistettuun TEN-puskuriin, joka sisälsi 0,1 mM PMSF:ää ja 8 M ureaa ja sonikoitiin haudesonikaattorissa (Heat Systems, Inc., Plainview, NY). Proteiinikonsentraatio määritettiin käyttämäl-

15 lä BCA-pakkausta (Pierce, Rockville, IL) ja proteiinikonsentraatio säädettiin vähempään kuin 10 mg/ml käyttäen TEN-urea-puskuria. Näyte laimennettiin sitten 1:1 10 prosenttisella (w/v) Zwittergentillä 3,14 (CalBiochem, La Jolla, CA), sonikoitiin ja ladattiin Sephacryl S-300 molekyyliseulapylvääseen.

20 Sephacryl S-300 -pylväs (2,5 cm x 200 cm) oli aiemmin tasapainotettu seuraavalla: 100 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, 10 mM EDTA, 0,05 % Zwittergent 3,14 ja 0,02 % atsidia, pH 8,0. pylvään virtausnopeus säädettiin 8 ml:aan tunnissa ja kerättiin 10 ml:n fraktiot. Kunkin fraktion OD₂₈₀ määritettiin ja SDS-PAGE

25 analyysi tehtiin proteiinia sisältäville fraktioille.

Inhibitio-ELISA-analyysit: mikrotiitterilevyt (Nunc-Immuno Plate IIF, Nunc, Inc., Naperville, IL) herkistettiin lisäämäl-

30 lä 0,1 ml kaivoa kohti porB:tä (2 µg/ml), joka oli puhdistettu villityypin kannasta 8765, 0,1 M karbonaattipuskurissa, pH 9,6 0,02 prosenttisen atsidin kanssa. Maljoja inkuboitiin yli yön huoneenlämmössä. Maljat pestiin viisi kertaa 0,9 prosenttisella NaCl:lla, 0,05 % Brij 35:ttä, 10 mM natriumasetaattia pH 7,0, 0,02 % atsidia. Ihmisen immuuniseerumi, joka oli nost-

35 tettu tyyppin 15 luokan 3 PorB-proteiinia vastaan, saatiin Dr. Phillip O. Livingstonilta, Memorial-Sloan Kettering Cancer Center, New York, N. Y. Ihmisen immuuniseerumi laimennettiin PBS:ään, jossa oli 0,5 % Brij 35:ttä ja lisättiin maljalle ja

inkuboitiin 2 tuntia huoneenlämmössä. Maljat pestiin jälleen kuten ennemmin ja toinen vasta-aine, alkalinen fosfataasi, joka oli konjugoitu vuohen anti-ihmis IgG:hen (Tago Inc., Burlingame, CA), laimennettiin PBS-Brij:hen, lisättiin maljoille ja inkuboitiin 1 tunti huoneenlämmössä. Maljat pestiin kuten aiemmin ja lisättiin p-nitrofenyylifosfaattia (Sigma phosphatase Substrate 104) (1 mg/ml) 0,1 dietanoliamiinia, 1 mM MgCl₂, 0,1 mM ZnCl₂, 0,02 % atsidia, pH 9,8. Maljoja inkuboitiin 37 °C:ssa 1 tuntia ja määritettiin absorbanssi 405 nm:ssä käyttäen Elida-5-mikrotiitterimaljanlukijaa (Physica, New York, NY). Kontrollikaivoista puuttui joko primaarinen ja/tai sekundääri-

nen vasta-aine. Tämä tehtiin, jotta saatiin tiitteri kullekin ihmisen seerumille, joka antaisi puoliksi suurimman mahdollisen lukeman ELISA-analyysille. Tätä kunkin ihmisseerumin tiitteriä käytettäisiin inhibitio-ELISA:ssa. ELISA mikrotiitterilevy herkistettäisiin puhdistetulla villityypin PorB-proteiinilla ja pestäisiin kuten aiemmin. Erilliselle polypropeenille mikrotiitterilevylle V-96 (Nunc, Inc.) lisättiin eri määrät joko puhdistettua villityyppistä PorB-proteiinia tai puhdistettua rekombinanttista PorB-proteiinia kokonaistilavuutena 75 µl. Ihmisen seerumit laimennettiin PBS-Brij-liuokseen kaksi kertaa niiden puoleen suurimmasta mahdollisesta tiitteristä ja kuhunkin kaivoon lisättiin 75 µl, joka sisälsi PorB- tai rekombinantti-PorB-proteiineja. Tätä maljaa inkuboitiin 2 t huoneenlämmössä ja sentrifugoitiin jäähdytettävässä Sorvall RT6000 -sentrifugissa, joka oli varustettu mikrotiitterilevyjen pitimillä (Wilmington, DE), 3,000 rpm 10 min. Välttää V-pohjaa otettiin 100 µl kustakin kaivosta ja siirrostettiin herkistetyille ja pestylle ELISA mikrotiitterilevylle. ELISA-

levyjä inkuboidaan vielä 2 tuntia, pestään ja lisätään konjugoitu toinen vasta-aine kuten aiemmin. Malja käsitellään ja luetaan, kuten on kuvattu. Inhibitioprosentti lasketaan ja luetaan kuten on kuvattu. Inhibitioprosentti lasketaan seuraavalla tavalla:

35

1- (ELISA-arvo joko PorB- tai rPorB-proteiinilisällä)
x100
 (ELISA-arvo ilman lisättyä porB:tä)

Tulokset

Polymeraasiketjureaktio ja alakloonaus: On kehitetty menetelmä kloonata helposti, manipuloida geneettisesti ja lopulta saada 5 kylliksi puhdasta poriiniproteiinia mistä tahansa määrästä neisserian eri poriinigeenejä jatkossa tehtäviä antigeenisia ja biofysikaalisia karakterisointeja varten. Ensimmäinen askel tätä päämäärää kohti oli kloonata poriinigeeni Neisseriasta. Käyttämällä tekniikkaa, jonka alunperin kuvasivat Feavers et 10 al. (Feavers, I. M. et al., Infect. Immun. 60: 3620 - 3629 (1992)) luokan 3 serotyypin 15 poriinin kypsän poriiniproteiinin DNA-sekvenssi monistettiin käyttämällä meningokokin kannan 8765 kromosomia templaattina PCR-reaktiolle. Sopivia endonukleaasin restriktiokohtia on syntetoitu oligonukleotidialukkeiden 15 päihin niin, että kun ne pilkottiin, monistettu kypsä poriinisekvenssi voitiin ligatoida ja kloonata suoraan valittuun ekspressioplasmidiin. 30 kierroksen jälkeen saatiin PCR-tuotteet, jotka on esitetty kuviossa 2. Päätuote liikkui välillä 900 ep:a ja 1,000 ep:a, mikä oli yhtenevää aikaisempien tutkimusten kanssa (Feavers, I. M. et al., Infect. Immun. 60: 20 3620 - 3629 (1992)). Suurimolekyyllipainoista tuotetta ei kuitenkaan nähty, vaikka PCR tehtiin ankaruudeltaan lievissä pariutumisolosuhteissa (40 °C, 50 mM KCl).

25 Jotta kyettäisiin valmistamaan suuria määriä kloonattua poriiniproteiinia, käytettiin Studierin et al. tiukasti kontrolloitua ekspressiojärjestelmää (Studier ja Moffatt, J. Mol. Biol. 189: 113 - 130 (1986)), joka on saatavissa kaupallisesti Novagen Inc.:sta. Monistettu PCR-tuote kloonattiin plasmidin 30 pET-17b BamHI-XhoI-kohtaan. Tämä strategia asettaa kypsän poriiniproteiinin DNA-sekvenssin kehykseen suoraan T7-promoottorin jälkeen; DNA-sekvenssi koodittaa 9 aminohapon johtosekvenssiä ja kypsän Ø10-proteiinin 11 aminohappoa. Studierin E. coli -kanta BL21, joka oli lysogeeninen DE3-lambdajohdannaiselle 35 (Studier ja Moffatt, J. Mol. Biol. 189: 113 - 130 (1986)) valittiin ekspressioisännäksi pET-17b-plasmidille, joka sisältää poriinigeenin. Mutta koska uskottiin, että OmpA-proteiinilla, joka on peräisin E. coli -ekspressioisännästä,

saattaisi olla taipumusta puhdistua yhdessä ekspressoidun poriiniproteiinin kanssa, tälle kannalle tehtiin muunnos P1-transduktiolla, joka eliminoi ompA-geenin tästä kannasta. Näin ollen kun sekä PCR-tuote että pET-17b-vektori oli pilkottu restriktioendonukleaasilla ja ligatoitu, tuote transformoitiin BL21(DE3)- Δ ompA:han ja transformantit valikoitiin ampisillini- ja tetrasykliiniresistenssin suhteen. Useista pesäkkeistä, jotka havaittiin selektiomaljalla poimittiin 10 lisäkarakterisointia varten. Kaikki kymmenen ekspressoivat suuria määriä proteiinia, joka liikkui suunnilleen PorB-proteiinin molekyylipainon kohdalla, kun se oli kasvatettu log-faasiin ja induoitu IPTG:llä. Erään tällaisen viljelmän kokosolulysaatti on esitetty kuviossa 3a. Westrern-blot-analyysi monoklonaalisella vasta-aineella 4D11 antoi olettaa vielä, että ekspressoitu proteiini oli PorB-proteiini (kuva 3b). Päin vastoi kuin muissa tutkimuksissa, kun neisserian poriineja on kloonattu ja ekspressoitu E. colissa, isäntäbakteerisolut eivät osoittaneet minkäänlaisia merkkejä mistään toksisista tai letaaleista vaikutuksista, ei myöskään IPTG:n lisäämisen jälkeen. E. coli -solut näyttivät eläviltä, ja niitä voitiin viljellä uudelleen milloin tahansa koko ekspressiovaiheen aikana.

Nukleotidisekvenssianalyysi: Ekspressoidun PorB-proteiinin määrä näissä kokeissa oli merkitsevästi suurempi kuin aikaisemmin havaittu, eikä tällä ekspressiolla näyttänyt olevan mitään haitallisia vaikutuksia isäntä-E. coliin. Jotta oltaisiin varmoja, ettei mitään PCR:n artefakteja oltu liitetty meningokokin poriinigeeniin mahdollistamaan tällainen korkean tason ekspressio, koko Ø10-poriinifuusio sekvensoitiin kaksijuosteisen alukkeen pidennyksellä plasmidista. Tulokset on esitetty kuviossa 4. Nukleotidisekvenssi oli identtinen toisen meningokokin serotyypin 15 PorB-geenisekvenssin kanssa, josta olivat raportoineet aikaisemmin Heckels et al. (Ward, M. J. et al., FEMS Microbiol. Lett. 73: 283 - 289 (1992)), kahta poikkeusta lukuunottamatta, jotka on esitetty. Nämä kaksi eroavuutta nukleotideissa esiintyvät kumpikin kodonin kolmannessa asemassa, eivätkä muuta ekspressoituvan proteiinin aminohapposekvenssiä. Näin ollen nukleotidisekvenssin perusteella ei

näyttänyt olevan mitään PCR-artefaktia tai mutaatiota, joka saattaisi olla vastuussa suuresta proteiiniekspressiosta ja toksisuuden puuttumisesta E. colissa. Lisäksi nämä tiedot antaisivat olettaa, että tuotettiin todellista PorB-proteiinia.

5

Ekspressoidun porB-geenituotteen puhdistus: E. colissa ekspres-soitu PorB-proteiini oli liukenematon TEN-puskuriin, mikä an-toi olettaa, että kun PorB-proteiini ekspressoitui, se muodos-tui inkluusiokappaleiksi. Liukenemattoman PorB-proteiinin pesu
10 TEN-puskurilla poisti suurimman osan kontaminoivista E. coli -proteiineista. PorB-proteiini voitiin sitten liuottaa juuri valmistettuun 8 M ureaan ja laimentaa Zwittergent 3,14 -deter-gentillä. Lopullinen puhdistus tehtiin käyttämällä Sephacryl S-300 molekyyliseulapylvästä, joka ei ainoastaan poistanut
15 ureaa, vaan myös jäljelle jääneet kontaminoivat proteiinit. Pääosan PorB-proteiinista, joka eluoitui pylvästä, trimeerien ilmeinen molekyylipaino oli paljolti kuten villityyppisellä PorB:llä. Sekä villityyppisen että E. colissa ekspressoidun PorB:n eluutiomallien vertailu on esitetty kuviossa 5. On tär-keää huomata, että kun PorB-proteiinikonsentraatio 8 M ureassa
20 oli yli 10 mg/ml ennen laimennusta Zwittergent-detergentillä, trimeereinä havaittavan PorB-proteiinin suhteelliset määrät laskivat ja ilmenivät aggregaatteina, jotka eluoituivat vä-lisijatilavuudessa. Kuitenkin proteiinikonsentraatioissa alle
25 10 mg/ml ureapuskurissa pääosa PorB:sta eluoitui juuri samassa fraktiossa kuin villityyppinen PorB. Myös käyttämällä mono-klonaalista vasta-ainetta T7-Tag ja western-blot-analyysillä määritettiin, että kypsän T7-kapsidiproteiinin 11 aminohappoa pysyivät aminopäässä. Meningokokin poriiniproteiinin kokonais-
30 saanto litrasta E. colia oli noin 50 mg.

Inhibitio-ELISA-analyysit

Sen määrittämiseksi, oliko puhdistetulla trimeerisellä rekombinantti-PorB:llä samanlainen antigeeninen konformaatio kuin
35 PorB:llä, jota villityyppinen meningokokkikanta 8765 tuotti, kuuden villityyppisellä meningokokki-tyypin 15 PorB-proteiinilla rokotetun potilaan seerumia käytettiin inhibitio-

ELISA-analyysissä. Inhibitiomäärityksessä natiivin PorB:n kanssa reaktiiviset vasta-aineet inhiboituivat kompetitiivisesti eri määrillä joko puhdistettua rekombinantti-PorB:tä tai homologista puhdistettua villityyppistä PorB:tä. Tulokset inhibitiosta homologisen puhdistetun PorB:n kanssa kullekin kuudesta ihmisen seerumista ja näiden seerumien keskimääräinen inhibitio on esitetty kuviossa 6. Näiden seerumien vastaava inhibitio puhdistetun rekombinantti-PorB:n kanssa on nähtävissä kuviossa 6b. Keskimääräisen inhibition vertailusta kuvioista 6 ja 7 on esitetty yhteenveto kuviossa 8. Nämä tiedot antaisivat olettaa, että näiden kuuden potilaan seerumin sisältävät vasta-aineet löysivät samanlaiset epitoopit sekä homologisesta puhdistetusta villityyppisestä PorB:stä että puhdistetusta rekombinantti-PorB:stä. Tämä antoi lisätodisteita siitä, että rekombinantti-PorB oli säilyttänyt suurimman osan, jollei kaikkea villityyppisestä PorB:stä havaitusta natiivista konformaatiosta.

Esimerkki 2.

B-ryhmän Neisseria meningitidis -kannan BNCV M986 luokan 2 poriinin kloonauk

Genominen DNA eristettiin noin 0,5 g:sta B-ryhmän Neisseria meningitidis -kantaa BNCV M986 (serotyyppi 2a) käyttäen aikaisemmin kuvattuja menetelmiä (Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2. painos, Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)). Tämä DNA toimi sitten templaattina kahdelle luokan 2 poriinille spesifiselle oligonukleotidille tavanomaisessa PCR-reaktiossa. Nämä oligonukleotidit suunniteltiin olemaan komplementaarisia luokan 2 poriinin 5'- ja 3'-reunustaville alueille ja sisältämään EcoRI-restriktiokohdat edistämään fragmentin kloonaukseen. Oligonukleotidien sekvenssit olivat seuraavat: (SEK ID NRO 16) 5' AGC GGC TTG GAA TTC CCG GCT GGC TTA AAT TTC 3' (SEK ID NRO 17) ja 5' CAA ACG AAT GAA TTC AAA TAA AAA AGC CTG 3'. Luokan 2 poriinin saamiseksi käytettiin sitten polymeraasiketjureaktiota. Reaktio-olosuhteet olivat seuraavat: BNCV M986:n genomista DNA:ta 200 ng, kahta edellä esitettyä oligonukleoti-

dialuketta 1 μ M kumpaakin, 200 μ M kutakin dNTP:tä, PCR-reaktiopuskuria (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, pH 8,3) 1,5 mM MgCl₂ ja 2,5 yksikköä Tag-polymeraasia, saatettiin 100 μ l:ksi tislattulla H₂O:lla. Tämä reaktioseos saatettiin sitten 25 kierrokseen seuraavasti: 95 °C 1 min, 50 °C 2 min ja 72 °C 1,5 min. Kierrosperiodin lopuksi reaktioseos ladattiin 1 prosenttiseen agarosegeeliin ma materiaalia ajettiin elektroforeesilla 2 t, minkä jälkeen juova 1,3 ke:ssä poistettiin ja DNA otettiin talteen käyttämällä Gene Clean -pakkausta (Bio 101). Tämä DNA pilkottiin sitten EcoRI:llä, puhdistettiin uudelleen ja ligoitiin EcoRI:llä pilkottuun pUC19:ään käyttäen T₄-DNA-ligaaasia. Ligaatioseosta käytettiin transformoimaan kompetentti E. coli DH5 α . Rekombinanttiplasmidit selektoitiin ja sekvensoitiin. Insertissä havaittiin olevan DNA-sekvenssi, joka vastasi luokan 2 poriinin sekvenssiä. Katso Murakami, K. et al., Infect. Immun. 57: 2318 - 2323 (1989).

Luokan 2 poriinin ekspressiossa käytettiin plasmidia pET-17b (Novagen). Kuten jäljempänä on kuvattu, rakennettiin kaksi plasmidia, jotka tuottivat kahta eri proteiinia. Yksi plasmidi suunniteltiin tuottamaan kypsää luokan 2 poriinia, kun taas toinen suunniteltiin tuottamaan luokan 2 poriinia fuusioituna 20 aminohappoon T7-geenin Ø10-kapsidiproteiinista.

25 Kypsän luokan 2 poriinin rakentaminen

Luokan 2 poriini rakennettiin monistamalla pUC19-luokan 2 poriinirakenne käyttämällä oligonukleotideja (SEK ID NRO 18) 5' CCT GTT GCA GCA CAT ATG GAC GTT ACC TTG TAC GGT ACA ATT AAA GC 3' ja (SEK ID NRO 19) 5' CGA CAG GCT TTT TCT CGA GAC CAA TCT TTT CAG 3'. Tämä strategia mahdollisti monistetun luokan 2 poriinin kloonauksen plasmidin pET-17b NdeI- ja XhoI-kohtiin, tuottaen siten kypsän luokan 2 poriinin. Tehtiin tavanomainen PCR käyttäen pUC19-luokka 2:ta templaattina ja kahta edellä esitettyä oligonukleotidia. Tämä PCR-reaktio tuotti 1,1 ke:n tuotteen analysoituna 1,0 prosenttisessa agarosegeelissä. PCR-reaktiosta saatu DNA geelipuhdistettiin ja pilkottiin restriktio-

entsyymeillä Nde1 ja Xho1. Tuotettu 1,1 ke:n DNA tuote geeli-
 puhdistettiin jälleen ja ligatoitiin Nde1:llä ja Xho1:llä pil-
 kottuun pET-17b:hen käyttäen T₄-DNA-ligaasia. Tätä ligaa-
 tioseosta käytettiin sitten transformoimaan kompetentit E.
 5 coli DH5 α :t. Pesäkkeet, jotka sisälsivät 1,1 ke:n insertin,
 valittiin lisäanalyysiin. DNA DH5 α -klooneista analysoitiin
 restriktiokartoituksella ja valittujen plasmidien kloonauslii-
 tokset sekvensoitiin. Tämän analyysin DH α -klooneista saatua
 DNA:ta käytettiin transformoimaan E. coli BL21(DE3)- Δ ompA.
 10 Transformantit selektoitiin LB-agarilla, joka sisälsi 100
 μ g/ml karbenisilliiniä. Seulottiin useiden transformanttien
 kyky tehdä luokan 2 poriiniproteiinia. Tämä tehtiin kasvatta-
 malla klooneja nestelmäisellä LB-alustalla, joka sisälsi 100
 μ g/ml karbenisilliiniä ja 0,4 % glukosia 30 °C:ssa OD₆₀₀:n =
 15 0,6, ja indusoimalla sitten viljelmät IPTG:llä (0,4 mM). Solut
 hajotettiin sen jälkeen ja solu-uute analysoitiin SDS-PAGE:-
 lla.

Luokan 2 poriinin fuusion rakentaminen

20 Luokan 2 poriinin fuusio rakennettiin monistamalla pUC19-luo-
 kan 2 poriinirakenne käyttäen oligonukleotideja (SEK ID NRO
 20) 5' CCT GTT GCA GCG GAT CCA GAC GTT ACC TTG TAC GGT ACA ATT
 AAA GC 3' ja (SEK ID NRO 21) 5' CGA CAG GCT TTT TCT CGA GAC
 25 CAA TCT TTT CAG 3'. Tämä strategia mahdollisti monistetun luo-
 kan 2 poriinin kloonauksen plasmidin pET17b BamHI- ja XhoI-
 kohtiin, tuottaen siten luokan 2 poriinin fuusion, joka sisäl-
 si ylimääräiset 22 aminohappoa N-päässä saatuna T7 Ø10-kapsi-
 diproteiinista, joka sisältyi plasmidiin. Toteutettiin ta-
 30 vanomainen PCR käyttäen pUC19-luokan 2 poriinirakennetta temp-
 laattina ja kahta edellä esitettyä oligonukleotidia. PCR-reak-
 tio tuotti 1,1 ke:n tuotteen analysoituna 1,0 prosenttisella
 agaroosigeelillä. PCR-reaktiosta saatu DNA puhdistettiin gee-
 lissä ja pilkottiin reaktioentsyymeillä BamHI ja XhoI. Tuotet-
 35 tu 1,1 ke:n tuote puhdistettiin jälleen geelissä ja ligatoi-
 tiin BamHI:llä ja XhoI:llä pilkottuun pET-17b:hen käyttäen T₄-
 DNA-ligaasia. Tätä ligaatioseosta käytettiin sitten transfor-
 moimaan kompetentit E. coli DH5 α :t. Pesäkkeet, jotka sisälsi-

vät 1,1 ke:n insertin, valittiin lisäanalyysiä varten. DNA DH5 α -pesäkkeistä analysoitiin restriktioentsyymikartoituksella ja valittujen plasmidien kloonausliitokset sekvensoitiin. Tämän analyysin jälkeen DH5 α -klooneista saatua DNA:ta käytettiin transformoimaan E. coli BL21(DE3)- Δ ompA. Transformantit selektoitiin LB-agarilla, joka sisälsi 100 μ g/ml karbenisilliiniä. Useiden transformanttien kyky tehdä luokan 2 poriiniproteiinia seulottiin. Tämä tehtiin kasvattamalla klooneja nestemäisellä LB-alustalla, joka sisälsi 100 μ g/ml karbenisilliiniä ja 0,4 % glukosia 30 °C:ssa OD₆₀₀:n, ja indusoimalla sitten viljelmät IPTG:llä (0,4 mM). Solut hajotettiin ja solu-uute analysoitiin SDS-PAGE:lla.

Esimerkki 3.

B-ryhmän Neisseria meningitidis -kannan 8765 kypsän luokan 3 poriinin kloonaus ja ekspressio E. colissa

Genominen DNA eristettiin noin 0,5 g:sta B-ryhmän Neisseria meningitidis -kantaa 8765 käyttäen edellä kuvattua menetelmää (Sambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2. painos, Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)). Tämä DNA toimi sitten templaattina kahdelle luokan 3 poriinille spesifiselle oligonukleotidille tavanomaisessa PCR-reaktiossa.

Kypsä luokan 3 poriini rakennettiin monistamalla genominen DNA 8765:stä käyttämällä oligonukleotideja: (SEK ID NRO 22) 5' GTT GCA GCA CAT ATG GAC GTT ACC CTG TAC GGC ACC 3' (SEK ID NRO 23) ja 5' GGG GGG ATG GAT CCA GAT TAG AAT TTG TGG CGC AGA CCG ACA CC 3'. Tämä strategia mahdollisti monistetun luokan 3 poriinin kloonauksen plasmidin pET24a(+) NdeI- ja BamHI-kohtiin, tuottaen siten kypsän luokan 3 poriinin. Tavanomainen PCR tehtiin käyttäen templaattina genomista DNA:ta, joka oli eristetty 8765:stä ja kahta edellä kuvattua oligonukleotidia.

35

Reaktio-olosuhteet olivat seuraavat: 8765:n genomista DNA:ta 200 ng, kahta edellä kuvattua oligonukleotidialuketta 1 μ M kumpaakin, 200 μ M kutakin dNTP:tä, PCR-reaktiopuskuria (10

mM Tris-HCl:ää, 50 mM KCl:ää, pH 8,3), 1,5 mM MgCl₂:ta ja 2,5 yksikköä Tag-polymeraasia, ja saatettiin 100 µl:ksi tislattulla vedellä. Tämä reaktioseos saatettiin sitten 25 kierrokseen 95 °C:ssa 1 min, 50 °C:ssa 2 min ja 72 °C:ssa 1,5 min.

5

PCR-reaktio tuotti noin 930 ep:tä tuotetta, analysoituna 1 prosenttisella agarosigeelillä. PCR-reaktiosta saatu DNA puhdistettiin geelissä ja pilkottiin restriktioentsyymeillä NdeI ja BamHI. 930 ep:n tuote puhdistettiin jälleen geelissä ja
 10 ligatoitiin NdeI:llä ja BamHI:llä pilkottuun pET-24a(+):aan käyttäen T4-ligaasia. Tätä ligaatioseosta käytettiin sitten transformoimaan kompetentit E. coli DH5α:t. Pesäkkeet, jotka sisälsivät 930 ep:n insertin, valittiin lisäanalyysiin. DNA E. coli DH5α-klooneista analysoitiin restriktioentsyymikartoituksella ja valittujen plasmidien kloonausliitokset sekvensoitiin. Tämän analyysin jälkeen DNA:ta, joka saatiin E. coli DH5α -klooneista, käytettiin transformoimaan E. coli BL21-(DE3)-ΔompA- Transformantit selektoitiin LB-alustalla, joka sisälsi 50 µg/ml kanamysiiniä. Useiden transformanttien kyky
 15 tehdä luokan 3 poriiniproteiinia seulottiin. Tämä tehtiin kasvattamalla klooneja nestemäisellä LB-alustalla, joka sisälsi 50 µg/ml kanamysiiniä ja 0,4 % glukosia 30 °C:ssa OD₆₀₀:n = 0,6, ja indusoimalla sitten viljelmät IPTG:llä (1 mM). Solut pilkottiin sitten ja solu-uute analysoitiin SDS-PAGE:lla.

25

Esimerkki 4

Luokan 2 rekombinanttiporiinin puhdistus ja laskostus uudelleen

30 E. coli -kantaa BL21(DE3)ΔompA[pNV-5] kasvatetaan keski-log-vaiheeseen (OD = 0,6 600 nm:ssa) Luria-liemessä 30 °C:ssa. Sitten lisätään IPTG:tä (0,4 mM lopullisessa) ja soluja kasvatetaan vielä kaksi tuntia 37 °C:ssa. Solut kerättiin sitten talteen ja pestiin usealla tilavuudella TEN-puskuria (50 mM
 35 Tris-HCl, 0,2 M NaCl, 10 mM EDTA, pH = 8,0) ja solutahna säilöttiin jäätyneenä -74 °C:seen.

Puhdistusta varten ennalta punnitut solut sulatetaan ja sus-

pendoidaan TEN-puskuriin suhteessa 1:15 (g/v). Suspensio vie-
dään Stansted-solunhajottajan läpi (Stansted fluid power Ltd.)
kahdesti 8 000 psi:tä. Saatu liuos sentrifugoidaan sitten 13
000 rpm 20 min ja supernatantti heitetään pois. Pelletti sus-
5 pendoidaan sitten kahdesti TEN-puskuriin, joka sisältää 0,5 %
deoksikolaattia ja supernatantit heitetään pois. Pelletti sus-
pendoidaan sitten TEN-puskuriin, joka sisältää 8 M deionisoi-
tua ureaa (elektroforeesitason puhtaus) ja 0,1 mM PMSF:ää (3
g/10 ml). Suspensiota sonikoidaan 10 min tai kunnen saadaan
10 tasainen suspensio. Lisätään 10 ml 10 prosenttista vedellistä
3,14-zwittergen-liuosta (Calbiochem) ja liuos sekoitetaan hu-
lellisesti. Liuosta sonikoidaan taas 10 min. kaikki jäljelle
jäänyt liukenematon materiaali poistetaan sentrifugoimalla.
Proteiinikonsentraatio määritetään ja proteiinikonsentraatio
15 säädetään 2 mg/ml:ssä 8 M urea-10 % zwittergen-puskurilla
(suhde 1:1).

Tämä seos lisätään sitten 2,6 x 100 cm Sephacryl S-300 -pyl-
vääseen, joka on tasapainotettu seuraavaan: 100 mM Tris-HCl, 1
20 M NaCl, 10 mM EDTA, 20 mM CaCl₂, 0,05 % 3,14-zwittergen, 0,02
% natriumatsidia, pH = 8,0. Virtausnopeus pidetään 1 ml:ssä/
min. Kerätään 10 ml:n fraktioita. Poriini laskostuu trimee-
reiksi geelisuodatuksen aikana. OD = 280 nm mitataan kullekin
fraktiolle ja ne fraktiot, jotka sisältävät proteiinia, saate-
25 taan SDS-geelielektroforeesianalyysiin poriinille. Ne frakti-
ot, jotka sisältävät poriinia, yhdistetään. Yhdistetyt frakti-
ot joko dialysoidaan tai laimennetaan 1:10 seuraavaan: 50 mM
Tris HCl, pH = 8,0, 0,05 % 3,14-zwittergen, 5 mM EDTA, 0,1 M
NaCl. Saatu liuos lisätään sitten 2,6 x 10 cm Q-sepharose kor-
30 kean erotuskyvyn pylvääseen (Pharmacia), joka on tasapainotet-
tu samalla puskurilla. Poriini eluoidaan lineaarisella gra-
dientilla 0,1 - 1 M NaCl:ia.

Esimerkki 5

35 **Luokan 3 rekombinanttiporiinin puhdistus ja laskostus uudel-
leen**

E. coli -kantaa BL21 (DE3) Δ ompA, joka sisältää porB-pET-17b-

plasmidin, kasvatetaan keski-log-vaiheeseen ($OD = 0,6$ 600 nm:ssa) Luria-liemessä $30\text{ }^{\circ}\text{C}$:ssa. Sitten lisätään IPTG:tä ($0,4\text{ mM}$ lopullisessa) ja soluja kasvatetaan vielä kaksi tuntia $37\text{ }^{\circ}\text{C}$:ssa. Solut kerättiin sitten talteen ja pestiin usealla tilavuudella TEN-puskuria (50 mM Tris-HCl, $0,2\text{ M}$ NaCl, 10 mM EDTA, $\text{pH} = 8,0$) ja solutahna säilöttiin jäätyneenä $-74\text{ }^{\circ}\text{C}$ seen.

Puhdistusta varten noin 3 grammaa soluja sulatetaan ja suspendoidaan 9 ml:aan TEN-puskuria. Lisätään lysotsyymiä (Sigma, $0,25\text{ mg/ml}$), deoksikolaattia (Sigma, $1,3\text{ mg/ml}$) ja PMSF:ää (Sigma, $\mu\text{g/ml}$) ja seosta ravistellaan hellävaraisesti yksi tunti huoneenlämmössä. Tänä aikana solut lyysaavat ja vapautunut DNA saa aikaan, että liuos tulee hyvin viskoosiksi. Sen jälkeen lisätään DNAasia (Sigma, $1\text{ }\mu\text{g/ml}$) ja liuosta sekoitetaan jälleen yksi tunti huoneenlämmössä. Seos sentrifugoidaan 15K rpm S-600-roottorissa 30 min ja supernatantti heitetään pois. Pelletti suspendoidaan sitten kahdesti 10 ml:aan TEN-puskuria ja supernatantit heitetään pois. Pelletti suspendoidaan 10 ml:aan 8 M ureaa (Pierce) TEN-puskurissa. Seosta sekoitetaan hellävaraisesti kaikkien möykkyjen hajottamiseksi. Suspensiota sonikoidaan 20 minuuttia tai kunnes saadaan tasainen suspensio. 10 ml:aa 10 prosenttista 3,14-zwittergenin (Calbiochem) vesiliuosta lisätään ja liuosta sekoitetaan huolella. Liuosta sonikoidaan taas 10 min. Kaikki jäljelle jäänyt liukenematon materiaali poistetaan sentrifugoimalla. Proteiinikonsentraatio määritetään ja proteiinikonsentraatio säädetään 2 mg:aan/ml 8 M urea-10 % zwittergen-puskurilla (suhde 1:1).

Tätä seosta lisätään sitten $180 \times 2,5\text{ cm:n}$ Sephacryl S-300 -pylvääseen (Pharmacia), joka on tasapainotettu seuraavalla: 100 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, 10 mM EDTA, 20 mM CaCl_2 , $0,05\text{ }\%$ 3,14-zwittergen, $\text{pH} = 8,0$. Virtausnopeus pidetään 1 ml:ssä/min . Kerätään 10 ml:n fraktioita. Poriini laskostuu trimeereiksi geelisuodatuksen aikana. $OD = 280\text{ nm}$ mitataan kullekin fraktiolle ja ne fraktiot, jotka sisältävät proteiinia, saateetaan SDS-geelielektroforeesianalyysiin poriinille. Ne frakti-

ot, jotka sisältävät poriinia, yhdistetään.

Yhdistetyt fraktiot dialysoidaan ja konsentroidaan 4 - 6 kertaiseksi käyttäen Amicon-konsentraattoria PM 10 membraanilla puskuria vastaa, joka sisältää 100 mM Tris-HCl, 0,1 M NaCl, 10 mM EDTA, 0,05 % 3,14-zwittergen, pH = 8,0. Vaihtoehtoisesti yhdistetyt fraktiot saostetaan 80 prosenttisella etanolilla ja suspendoidaan uudelleen edellä mainitulla puskurilla. 6 - 10 mg materiaalia lisätään sitten monoQ 10/10 -pylvääseen (Pharmacia), joka on tasapainotettu samalla puskurilla. Poriini eluoidaan matalalla 0,1 - 0,6 M NaCl-gradientilla 1,2 prosentin lisäyksellä minuutissa 50 minuutin aikana. Virtausnopeus on 1 ml/min. Poriinin sisältävä huippu kerätään talteen ja dialysoidaan TEN-puskuria ja 0,05 prosenttista 3,14-zwittergeniä vastaan. Poriini voidaan puhdistaa vielä toisella S-300-kromatografiolla.

Esimerkki 6

Polysakkaridien puhdistus ja muuntaminen kemiallisesti

Kapselipolysakkaridi sekä B-ryhmän Neisseria meningitidisista että E. coli K1:stä käsittää $\alpha(2\rightarrow8)$ polysiaali happoa (jota kutsutaan yleisesti GBMP:ksi tai K1-polysakkaridiksi). Suurimolekyyllipainoinen polysakkaridi, joka eristettiin kasvatusalustasta saostamalla (katso Frasch, C. E., "Production and Control of Neisseria meningitidis Vaccines" kirjassa Bacterial Vaccines, Alan R. Liss, Inc., s. 123 - 145 (1990)) puhdistettiin ja muunnettiin kemiallisesti ennen kuin se kytkettiin poriiniproteiiniin. Suurimolekyyllipainoinen polysakkaridi depolymerisoitiin osittain 0,1 M etikkahapolla (7 mg polysakkaridia/ml), pH = 6,0 - 6,5 (70 °C, 3 tuntia), jotta tuotettiin polysakkaridi, jonka keskimääräinen molekyyllipaino oli 12.000 - 16.000. Puhdistuksen jälkeen geelisuodatuspylväskromatografiolla (Superdex 200 prep. tasoa, Pharmacia), polysakkaridi N-deasetyloitiin NaBH₄:n läsnäollessa ja N-propionyloitiin sitten, kuten Jennings et al. ovat kuvanneet (J. Immunol. 137: 1808 (1986)), jotta tuotettiin N-Pr GBMP. Käsittely NaIO₄:llä, mitä seurasi geelisuodatuspylväspuhdistus, an-

toi hapettuneen N-Pr GBMP:n, jonka keskimääräinen molekyyli-
paino oli 12.000 daltonia.

Esimerkki 7

5 Hapettuneen N-Pr GBMP:n kytkeminen B-ryhmän meningokokin luokan 3 poriiniproteiiniin (PP)

Hapetettu N-Pr GBMp (9,5 mg) lisättiin puhdistettuun luokan 3
poriiniproteiiniin (3,4 mg), joka oli liuotettu 0,21 ml:aan
10 0,2 M fosfaattipuskuria, pH 7,5, joka sisälsi myös 10 % oktyy-
liglukosidia. Kun polysakkaridi oli liuotettu, lisättiin nat-
riumsyanoborohydridiä (7 mg) ja reaktioliuosta inkuboitiin
37 °C:ssa 4 päivää. Reaktioseos laimennettiin 0,15 M natrium-
kloridiliuoksella, joka sisälsi 0,01 % thimerosalia ja erotet-
15 tiin geelisuodatuspylväskromatografialla käyttäen Superdex 200
PG:tä. Konjugaatti (N-Pr GBMp-PP) saatiin yhtenä huippuna,
joka eluoitui lähellä välisijatilavuutta. Konjugaattiliuoksen
analyysi siaalihapon ja proteiinin suhteen näytti, että konju-
gaatti käsittää 43 % painostaan polysakkaridia. Poriiniprotei-
20 iini otettiin talteen konjugaatissa 44 % saantona ja polysak-
karidi 12 % saantona. Proteiinin talteenotot eri kokeissa ovat
yleisesti 50 - 80 % alueella ja polysakkaridin 9 - 13 % alu-
eella.

25 Esimerkki 8

Immunogeenisyystutkimukset

N-Pr GBMP-PP-konjugaatin ja N-Pr GBMP-tetanustoksoidi (N-Pr
GBMP-TT) -konjugaatin, joka oli valmistettu sananlaisella kyt-
30 kentämenetelmällä, immunogeenisyydet analysoitiin 4 - 6 viik-
koa vanhoista ulkosiittoisista Swiss Webster CFW naarashiiris-
tä. Polysakkaridi (2 µg)-konjugaatti annettiin päivinä 1, 14
ja 28 ja seerumi kerättiin päivänä 38. Konjugaatit annettiin
suolaliuoksina, adsorboitiin alumiinihydroksidiin tai sekoi-
35 tettiin stearyylityrosiiniin. Seerumin ELISA-tiittereistä po-
lysakkaridiantigeeniä vastaan ja bakteerisididisistä tiittereis-
tä N. meningitidisin B-ryhmää vastaan on esitetty yhteenveto
taulukossa 1.

Nyt kun tämä keksintö on kuvattu täysin, ymmärtävät alan ta-
vanomaiset taidot omaavat, että se voidaan toteuttaa laajalla
ja samanarvoisella olosuhteiden, koostumusten ja muiden para-
metrien kirjolla vaikuttamatta keksinnön tai sen minkään so-
vellutuksen piiriin. Kaikki patentit ja julkaisut, joihin täs-
sä esitetään viittauksia, sisällytetään tähän kirjallisuus-
viitteiksi kokonaisuudessaan.

Taulukko 1

10 B-ryhmän meningokokin konjugaattirokotteiden (N-Pr GBMP-prote-
iini) ELISA- ja bakterisidiset tiitterit

Rokote	Adjuvantti	ELISA- tiitteri	Bakteeri- tiitteri
N-Pr GBMP-TT	Saline	5.400	0
	Al(OH) ₃	13.000	0
	ST1	17.000	0
	CFA ²	40.000	800
N-Pr GBMP-PP	Saline	20.000	500
	Saline	22.000	150
	Saline	39.000	960
	Al(OH) ₃	93.000	200
	Al(OH) ₃	166.000	>3.200
	Al(OH) ₃	130.000	1.200
	ST	53.000	1.000
	ST	29.000	1.700
	ST	72.000	1.500
N-Pr GBMP	Saline	>100	0
	Al(OH) ₃	>100	0
	ST	>100	0
PP	Saline	>100	0
	Al(OH) ₃	>100	0
	ST	660	0

¹ST = stearyylityrosiini

²CFA = Freundin täydellinen adjuvantti

SEKVENSSILISTAUS

(1) YLEISET TIEDOT:

- (i) HAKIJA: The Rockefeller University
1230 York Avenue
New York, New York 10021
United States of America
- North American Vaccine, Inc.
12103 Indian Creek Court
Beltsville, Maryland 20705
United States of America

KEKSIJÄT: Blake, Milan B. Tai, Joseph Y. Qi, Huilin L. Liang, Shu-Mei
Hronowski, Lucjan J.J. Pullen, Jeffrey K.

- (ii) KEKSINNÖN NIMITYS: B-ryhmän Neisseria meningitidisin ulkomembraanin
poriiniproteiinien ekspressio korkeina tasoina, puhdistus ja
uudelleenlaskostus

(iii) SEKVENSSIEN LUKUMÄÄRÄ: 23

(vi) TIEDOT NYKYISESTÄ HAKEMUKSESTA:

(vii) ETUOIKEUSTIEDOT:

- (A) Hakemuksen nro: US 08/096,182
(B) Hakemispäivä: 23. heinäkuuta 1993

(2) SEKVENSSIN ID NO:1 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:

- (A) PITUUS: 930 emäsparia
(B) TYYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: kaksinkertainen juoste
(D) TOPOLOGIA: molemmat

(ix) OMINAISPIIRRE:

- (A) NIMI/SELITYS: CDS
(B) SIJAINTI: 1..930

(xi) SEKVENS SIN KUVAUS: SEKVENS SI ID NRO 1:

TTG TAC GGT ACA ATT AAA GCA GGC GTA GAA ACT TCC CGC TCT GTA TTT	48
Leu Tyr Gly Thr Ile Lys Ala Gly Val Glu Thr Ser Arg Ser Val Phe	
1 5 10 15	
CAC CAG AAC GGC CAA GTT ACT GAA GTT ACA ACC GCT ACC GGC ATC GTT	96
His Gln Asn Gly Gln Val Thr Glu Val Thr Thr Ala Thr Gly Ile Val	
20 25 30	
GAT TTG GGT TCG AAA ATC GGC TTC AAA GGC CAA GAA GAC CTC GGT AAC	144
Asp Leu Gly Ser Lys Ile Gly Phe Lys Gly Gln Glu Asp Leu Gly Asn	
35 40 45	
GGC CTG AAA GCC ATT TGG CAG GTT GAG CAA AAA GCA TCT ATC GCC GGT	192
Gly Leu Lys Ala Ile Trp Gln Val Glu Gln Lys Ala Ser Ile Ala Gly	
50 55 60	
ACT GAC TCC GGT TGG GGC AAC CGC CAA TCC TTC ATC GGC TTG AAA GGC	240
Thr Asp Ser Gly Trp Gly Asn Arg Gln Ser Phe Ile Gly Leu Lys Gly	
65 70 75 80	
GGC TTC GGT AAA TTG CGC GTC GGT CGT TTG AAC AGC GTC CTG AAA GAC	288
Gly Phe Gly Lys Leu Arg Val Gly Arg Leu Asn Ser Val Leu Lys Asp	
85 90 95	
ACC GGC GAC ATC AAT CCT TGG GAT AGC AAA AGC GAC TAT TTG GGT GTA	336
Thr Gly Asp Ile Asn Pro Trp Asp Ser Lys Ser Asp Tyr Leu Gly Val	
100 105 110	
AAC AAA ATT GCC GAA CCC GAG GCA CGC CTC ATT TCC GTA CGC TAC GAT	384
Asn Lys Ile Ala Glu Pro Glu Ala Arg Leu Ile Ser Val Arg Tyr Asp	
115 120 125	
TCT CCC GAA TTT GCC GGC CTC AGC GGC AGC GTA CAA TAC GCG CTT AAC	432
Ser Pro Glu Phe Ala Gly Leu Ser Gly Ser Val Gln Tyr Ala Leu Asn	
130 135 140	
GAC AAT GCA GGC AGA CAT AAC AGC GAA TCT TAC CAC GCC GGC TTC AAC	480
Asp Asn Ala Gly Arg His Asn Ser Glu Ser Tyr His Ala Gly Phe Asn	
145 150 155 160	
TAC AAA AAC GGT GGC TTC TTC GTG CAA TAT GGC GGT GCC TAT AAA AGA	528
Tyr Lys Asn Gly Gly Phe Phe Val Gln Tyr Gly Gly Ala Tyr Lys Arg	
165 170 175	
CAT CAT CAA GTG CAA GAG GGC TTG AAT ATT GAG AAA TAC CAG ATT CAC	576
His His Gln Val Gln Glu Gly Leu Asn Ile Glu Lys Tyr Gln Ile His	
180 185 190	
CGT TTG GTC AGC GGT TAC GAC AAT GAT GCC CTG TAC GCT TCC GTA GCC	624
Arg Leu Val Ser Gly Tyr Asp Asn Asp Ala Leu Tyr Ala Ser Val Ala	
195 200 205	
GTA CAG CAA CAA GAC GCG AAA CTG ACT GAT GCT TCC AAT TCG CAC AAC	672
Val Gln Gln Gln Asp Ala Lys Leu Thr Asp Ala Ser Asn Ser His Asn	
210 215 220	
TCT CAA ACC GAA GTT GCC GCT ACC TTG GCA TAC CGC TTC GGC AAC GTA	720
Ser Gln Thr Glu Val Ala Ala Thr Leu Ala Tyr Arg Phe Gly Asn Val	
225 230 235 240	
ACG CCC CGA GTT TCT TAC GCC CAC GGC TTC AAA GGT TTG GTT GAT GAT	768
Thr Pro Arg Val Ser Tyr Ala His Gly Phe Lys Gly Leu Val Asp Asp	
245 250 255	
GCA GAC ATA GGC AAC GAA TAC GAC CAA GTG GTT GTC GGT GCG GAA TAC	816
Ala Asp Ile Gly Asn Glu Tyr Asp Gln Val Val Val Gly Ala Glu Tyr	
260 265 270	

GAC TTC TCC AAA CGC ACT TCT GCC TTG GTT TCT GCC GGT TGG TTG CAA	864
Asp Phe Ser Lys Arg Thr Ser Ala Leu Val Ser Ala Gly Trp Leu Gln	
275 280 285	
GAA GGC AAA GGC GAA AAC AAA TTC GTA GCG ACT GCC GGC GGT GTT GGT	912
Glu Gly Lys Gly Glu Asn Lys Phe Val Ala Thr Ala Gly Gly Val Gly	
290 295 300	
CTG CGT CAC AAA TTC TAA	930
Leu Arg His Lys Phe	
305 310	

(2) SEKVENSSIN ID NO:2 TIEDOT:

- (i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
 (A) PITUUS: 309 aminohappoa
 (B) TYYPPI: aminohappo
 (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: protein

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEKVENSSI ID NO:2:

Leu Tyr Gly Thr Ile Lys Ala Gly Val Glu Thr Ser Arg Ser Val Phe	
1 5 10 15	
His Gln Asn Gly Gln Val Thr Glu Val Thr Thr Ala Thr Gly Ile Val	
20 25 30	
Asp Leu Gly Ser Lys Ile Gly Phe Lys Gly Gln Glu Asp Leu Gly Asn	
35 40 45	
Gly Leu Lys Ala Ile Trp Gln Val Glu Gln Lys Ala Ser Ile Ala Gly	
50 55 60	
Thr Asp Ser Gly Trp Gly Asn Arg Gln Ser Phe Ile Gly Leu Lys Gly	
65 70 75 80	
Gly Phe Gly Lys Leu Arg Val Gly Arg Leu Asn Ser Val Leu Lys Asp	
85 90 95	
Thr Gly Asp Ile Asn Pro Trp Asp Ser Lys Ser Asp Tyr Leu Gly Val	
100 105 110	
Asn Lys Ile Ala Glu Pro Glu Ala Arg Leu Ile Ser Val Arg Tyr Asp	
115 120 125	
Ser Pro Glu Phe Ala Gly Leu Ser Gly Ser Val Gln Tyr Ala Leu Asn	
130 135 140	
Asp Asn Ala Gly Arg His Asn Ser Glu Ser Tyr His Ala Gly Phe Asn	
145 150 155 160	
Tyr Lys Asn Gly Gly Phe Phe Val Gln Tyr Gly Gly Ala Tyr Lys Arg	
165 170 175	
His His Gln Val Gln Glu Gly Leu Asn Ile Glu Lys Tyr Gln Ile His	
180 185 190	
Arg Leu Val Ser Gly Tyr Asp Asn Asp Ala Leu Tyr Ala Ser Val Ala	
195 200 205	
Val Gln Gln Gln Asp Ala Lys Leu Thr Asp Ala Ser Asn Ser His Asn	
210 215 220	

Ser Gln Thr Glu Val Ala Ala Thr Leu Ala Tyr Arg Phe Gly Asn Val
 225 230 235 240
 Thr Pro Arg Val Ser Tyr Ala His Gly Phe Lys Gly Leu Val Asp Asp
 245 250 255
 Ala Asp Ile Gly Asn Glu Tyr Asp Gln Val Val Val Gly Ala Glu Tyr
 260 265 270
 Asp Phe Ser Lys Arg Thr Ser Ala Leu Val Ser Ala Gly Trp Leu Gln
 275 280 285
 Glu Gly Lys Gly Glu Asn Lys Phe Val Ala Thr Ala Gly Gly Val Gly
 290 295 300
 Leu Arg His Lys Phe
 305

(2) SEKVENSSIN ID NO:3 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:

- (A) PITUUS: 1029 emäsparia
- (B) TYYPPI: nukleiinihappo
- (C) JUOSTEISUUS: kaksinkertainen juoste
- (D) TOPOLOGIA: both

(ix) OMINAISPIIRRE:

- (A) NIMI/SELITYS: CDS
- (B) SIJAINTI: 1..1029

(xi) SEKVENSSIKUVAUS: SEKVENSSI ID NO:3:

ATG GAC GTT ACC TTG TAC GGT ACA ATT AAA GCA GGC GTA GAA GTT TCT	48
Met Asp Val Thr Leu Tyr Gly Thr Ile Lys Ala Gly Val Glu Val Ser	
1 5 10 15	
CGC GTA AAA GAT GCT GGT ACA TAT AAA GCT CAA GGC GGA AAA TCT AAA	96
Arg Val Lys Asp Ala Gly Thr Tyr Lys Ala Gln Gly Gly Lys Ser Lys	
20 25 30	
ACT GCA ACC CAA ATT GCC GAC TTC GGT TCT AAA ATC GGT TTC AAA GGT	144
Thr Ala Thr Gln Ile Ala Asp Phe Gly Ser Lys Ile Gly Phe Lys Gly	
35 40 45	
CAA GAA GAC CTC GGC AAC GGC ATG AAA GCC ATT TGG CAG TTG GAA CAA	192
Gln Glu Asp Leu Gly Asn Gly Met Lys Ala Ile Trp Gln Leu Glu Gln	
50 55 60	
AAA GCC TCC ATC GCC GGC ACT AAC AGC GGC TGG GGT AAC CGC CAG TCC	240
Lys Ala Ser Ile Ala Gly Thr Asn Ser Gly Trp Gly Asn Arg Gln Ser	
65 70 75 80	
TTC ATC GGC TTG AAA GGC GGC TTC GGT ACC GTC CGC GCC GGT AAT CTG	288
Phe Ile Gly Leu Lys Gly Gly Phe Gly Thr Val Arg Ala Gly Asn Leu	
85 90 95	
AAC ACC GTA TTG AAA GAC AGC GGC GAC AAC GTC AAT GCA TGG GAA TCT	336
Asn Thr Val Leu Lys Asp Ser Gly Asp Asn Val Asn Ala Trp Glu Ser	
100 105 110	
GGT TCT AAC ACC GAA GAT GTA CTG GGA CTG GGT ACT ATC GGT CGT GTA	384
Gly Ser Asn Thr Glu Asp Val Leu Gly Leu Gly Thr Ile Gly Arg Val	
115 120 125	

GAA AGC CGT GAA ATC TCC GTA CGC TAC GAC TCT CCC GTA TTT GCA GGC Glu Ser Arg Glu Ile Ser Val Arg Tyr Asp Ser Pro Val Phe Ala Gly 130 135 140	432
TTC AGC GGC AGC GTA CAA TAC GTT CCG CGC GAT AAT GCG AAT GAT GTG Phe Ser Gly Ser Val Gln Tyr Val Pro Arg Asp Asn Ala Asn Asp Val 145 150 155 160	480
GAT AAA TAC AAA CAT ACG AAG TCC AGC CGT GAG TCT TAC CAC GCC GGT Asp Lys Tyr Lys His Thr Lys Ser Ser Arg Glu Ser Tyr His Ala Gly 165 170 175	528
CTG AAA TAC GAA AAT GCC GGT TTC TTC GGT CAA TAC GCA GGT TCT TTT Leu Lys Tyr Glu Asn Ala Gly Phe Phe Gly Gln Tyr Ala Gly Ser Phe 180 185 190	576
GCC AAA TAT GCT GAT TTG AAC ACT GAT GCA GAA CGT GTT GCA GTA AAT Ala Lys Tyr Ala Asp Leu Asn Thr Asp Ala Glu Arg Val Ala Val Asn 195 200 205	624
ACT GCA AAT GCC CAT CCT GTT AAG GAT TAC CAA GTA CAC CGC GTA GTT Thr Ala Asn Ala His Pro Val Lys Asp Tyr Gln Val His Arg Val Val 210 215 220	672
GCC GGT TAC GAT GCC AAT GAC CTG TAC GTT TCT GTT GCC GGT CAG TAT Ala Gly Tyr Asp Ala Asn Asp Leu Tyr Val Ser Val Ala Gly Gln Tyr 225 230 235 240	720
GAA GCT GCT AAA AAC AAC GAG GTT GGT TCT ACC AAG GGT AAA AAA CAC Glu Ala Ala Lys Asn Asn Glu Val Gly Ser Thr Lys Gly Lys Lys His 245 250 255	768
GAG CAA ACT CAA GTT GCC GCT ACT GCC GCT TAC CGT TTT GGC AAC GTA Glu Gln Thr Gln Val Ala Ala Thr Ala Ala Tyr Arg Phe Gly Asn Val 260 265 270	816
ACG CCT CGC GTT TCT TAC GCC CAC GGC TTC AAA GCT AAA GTG AAT GGC Thr Pro Arg Val Ser Tyr Ala His Gly Phe Lys Ala Lys Val Asn Gly 275 280 285	864
GTG AAA GAC GCA AAT TAC CAA TAC GAC CAA GTT ATC GTT GGT GCC GAC Val Lys Asp Ala Asn Tyr Gln Tyr Asp Gln Val Ile Val Gly Ala Asp 290 295 300	912
TAC GAC TTC TCC AAA CGC ACT TCC GCT CTG GTT TCT GCC GGT TGG TTG Tyr Asp Phe Ser Lys Arg Thr Ser Ala Leu Val Ser Ala Gly Trp Leu 305 310 315 320	960
AAA CAA GGT AAA GGC GCG GGA AAA GTC GAA CAA ACT GCC AGC ATG GTT Lys Gln Gly Lys Gly Ala Gly Lys Val Glu Gln Thr Ala Ser Met Val 325 330 335	1008
GGT CTG CGT CAC AAA TTC TAA Gly Leu Arg His Lys Phe 340	1029

(2) SEKVENSSIN ID NO:4 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:

- (A) PITUUS: 342 aminohappoa
- (B) TYYPPI: aminohappo
- (D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: proteiini

(xi) SEKVENS SIN KUVAUS: SEKVENS SI ID NO:4:

Met Asp Val Thr Leu Tyr Gly Thr Ile Lys Ala Gly Val Glu Val Ser
 1 5 10 15
 Arg Val Lys Asp Ala Gly Thr Tyr Lys Ala Gln Gly Gly Lys Ser Lys
 20 25 30
 Thr Ala Thr Gln Ile Ala Asp Phe Gly Ser Lys Ile Gly Phe Lys Gly
 35 40 45
 Gln Glu Asp Leu Gly Asn Gly Met Lys Ala Ile Trp Gln Leu Glu Gln
 50 55 60
 Lys Ala Ser Ile Ala Gly Thr Asn Ser Gly Trp Gly Asn Arg Gln Ser
 65 70 75 80
 Phe Ile Gly Leu Lys Gly Gly Phe Gly Thr Val Arg Ala Gly Asn Leu
 85 90 95
 Asn Thr Val Leu Lys Asp Ser Gly Asp Asn Val Asn Ala Trp Glu Ser
 100 105 110
 Gly Ser Asn Thr Glu Asp Val Leu Gly Leu Gly Thr Ile Gly Arg Val
 115 120 125
 Glu Ser Arg Glu Ile Ser Val Arg Tyr Asp Ser Pro Val Phe Ala Gly
 130 135 140
 Phe Ser Gly Ser Val Gln Tyr Val Pro Arg Asp Asn Ala Asn Asp Val
 145 150 155 160
 Asp Lys Tyr Lys His Thr Lys Ser Ser Arg Glu Ser Tyr His Ala Gly
 165 170 175
 Leu Lys Tyr Glu Asn Ala Gly Phe Phe Gly Gln Tyr Ala Gly Ser Phe
 180 185 190
 Ala Lys Tyr Ala Asp Leu Asn Thr Asp Ala Glu Arg Val Ala Val Asn
 195 200 205
 Thr Ala Asn Ala His Pro Val Lys Asp Tyr Gln Val His Arg Val Val
 210 215 220
 Ala Gly Tyr Asp Ala Asn Asp Leu Tyr Val Ser Val Ala Gly Gln Tyr
 225 230 235 240
 Glu Ala Ala Lys Asn Asn Glu Val Gly Ser Thr Lys Gly Lys Lys His
 245 250 255
 Glu Gln Thr Gln Val Ala Ala Thr Ala Ala Tyr Arg Phe Gly Asn Val
 260 265 270
 Thr Pro Arg Val Ser Tyr Ala His Gly Phe Lys Ala Lys Val Asn Gly
 275 280 285
 Val Lys Asp Ala Asn Tyr Gln Tyr Asp Gln Val Ile Val Gly Ala Asp
 290 295 300
 Tyr Asp Phe Ser Lys Arg Thr Ser Ala Leu Val Ser Ala Gly Trp Leu
 305 310 315 320
 Lys Gln Gly Lys Gly Ala Gly Lys Val Glu Gln Thr Ala Ser Met Val
 325 330 335
 Gly Leu Arg His Lys Phe
 340

(2) SEKVENSSIN ID NO:5 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:

- (A) PITUUS: 1092 emäsparia
- (B) TYYPPI: nukleiinihappo
- (C) JUOSTEISUUS: kaksinkertainen juoste
- (D) TOPOLOGIA: molemmat

(ix) OMINAISPIIRRE:

- (A) NIMI/SELITYS: CDS
- (B) SIJAINTI: 1..1092

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:5:

ATG GCT AGC ATG ACT GGT GGA CAG CAA ATG GGT CGG GAT TCA AGC TTG	48
Met Ala Ser Met Thr Gly Gly Gln Gln Met Gly Arg Asp Ser Ser Leu	
1 5 10 15	
GTA CCG AGC TCG GAT CCA GAC GTT ACC TTG TAC GGT ACA ATT AAA GCA	96
Val Pro Ser Ser Asp Pro Asp Val Thr Leu Tyr Gly Thr Ile Lys Ala	
20 25 30	
GGC GTA GAA GTT TCT CGC GTA AAA GAT GCT GGT ACA TAT AAA GCT CAA	144
Gly Val Glu Val Ser Arg Val Lys Asp Ala Gly Thr Tyr Lys Ala Gln	
35 40 45	
GGC GGA AAA TCT AAA ACT GCA ACC CAA ATT GCC GAC TTC GGT TCT AAA	192
Gly Gly Lys Ser Lys Thr Ala Thr Gln Ile Ala Asp Phe Gly Ser Lys	
50 55 60	
ATC GGT TTC AAA GGT CAA GAA GAC CTC GGC AAC GGC ATG AAA GCC ATT	240
Ile Gly Phe Lys Gly Gln Glu Asp Leu Gly Asn Gly Met Lys Ala Ile	
65 70 75 80	
TGG CAG TTG GAA CAA AAA GCC TCC ATC GCC GGC ACT AAC AGC GGC TGG	288
Trp Gln Leu Glu Gln Lys Ala Ser Ile Ala Gly Thr Asn Ser Gly Trp	
85 90 95	
GGT AAC CGC CAG TCC TTC ATC GGC TTG AAA GGC GGC TTC GGT ACC GTC	336
Gly Asn Arg Gln Ser Phe Ile Gly Leu Lys Gly Gly Phe Gly Thr Val	
100 105 110	
CGC GCC GGT AAT CTG AAC ACC GTA TTG AAA GAC AGC GGC GAC AAC GTC	384
Arg Ala Gly Asn Leu Asn Thr Val Leu Lys Asp Ser Gly Asp Asn Val	
115 120 125	
AAT GCA TGG GAA TCT GGT TCT AAC ACC GAA GAT GTA CTG GGA CTG GGT	432
Asn Ala Trp Glu Ser Gly Ser Asn Thr Glu Asp Val Leu Gly Leu Gly	
130 135 140	
ACT ATC GGT CGT GTA GAA AGC CGT GAA ATC TCC GTA CGC TAC GAC TCT	480
Thr Ile Gly Arg Val Glu Ser Arg Glu Ile Ser Val Arg Tyr Asp Ser	
145 150 155 160	
CCC GTA TTT GCA GGC TTC AGC GGC AGC GTA CAA TAC GTT CCG CGC GAT	528
Pro Val Phe Ala Gly Phe Ser Gly Ser Val Gln Tyr Val Pro Arg Asp	
165 170 175	
AAT GCG AAT GAT GTG GAT AAA TAC AAA CAT ACG AAG TCC AGC CGT GAG	576
Asn Ala Asn Asp Val Asp Lys Tyr Lys His Thr Lys Ser Ser Arg Glu	
180 185 190	
TCT TAC CAC GCC GGT CTG AAA TAC GAA AAT GCC GGT TTC TTC GGT CAA	624
Ser Tyr His Ala Gly Leu Lys Tyr Glu Asn Ala Gly Phe Phe Gly Gln	
195 200 205	

TAC GCA GGT TCT TTT GCC AAA TAT GCT GAT TTG AAC ACT GAT GCA GAA Tyr Ala Gly Ser Phe Ala Lys Tyr Ala Asp Leu Asn Thr Asp Ala Glu 210 215 220	672
CGT GTT GCA GTA AAT ACT GCA AAT GCC CAT CCT GTT AAG GAT TAC CAA Arg Val Ala Val Asn Thr Ala Asn Ala His Pro Val Lys Asp Tyr Gln 225 230 235 240	720
GTA CAC CGC GTA GTT GCC GGT TAC GAT GCC AAT GAC CTG TAC GTT TCT Val His Arg Val Val Ala Gly Tyr Asp Ala Asn Asp Leu Tyr Val Ser 245 250 255	768
GTT GCC GGT CAG TAT GAA GCT GCT AAA AAC AAC GAG GTT GGT TCT ACC Val Ala Gly Gln Tyr Glu Ala Ala Lys Asn Asn Glu Val Gly Ser Thr 260 265 270	816
AAG GGT AAA AAA CAC GAG CAA ACT CAA GTT GCC GCT ACT GCC GCT TAC Lys Gly Lys Lys His Glu Gln Thr Gln Val Ala Ala Thr Ala Ala Tyr 275 280 285	864
CGT TTT GGC AAC GTA ACG CCT CGC GTT TCT TAC GCC CAC GGC TTC AAA Arg Phe Gly Asn Val Thr Pro Arg Val Ser Tyr Ala His Gly Phe Lys 290 295 300	912
GCT AAA GTG AAT GGC GTG AAA GAC GCA AAT TAC CAA TAC GAC CAA GTT Ala Lys Val Asn Gly Val Lys Asp Ala Asn Tyr Gln Tyr Asp Gln Val 305 310 315 320	960
ATC GTT GGT GCC GAC TAC GAC TTC TCC AAA CGC ACT TCC GCT CTG GTT Ile Val Gly Ala Asp Tyr Asp Phe Ser Lys Arg Thr Ser Ala Leu Val 325 330 335	1008
TCT GCC GGT TGG TTG AAA CAA GGT AAA GGC GCG GGA AAA GTC GAA CAA Ser Ala Gly Trp Leu Lys Gln Gly Lys Gly Ala Gly Lys Val Glu Gln 340 345 350	1056
ACT GCC AGC ATG GTT GGT CTG CGT CAC AAA TTC TAA Thr Ala Ser Met Val Gly Leu Arg His Lys Phe 355 360	1092

(2) SEKVENSIN ID NO:6 TIEDOT:

(i) SEKVENSIN OMINAISPIIRTEET:

- (A) PITUUS: 363 aminohappoa
- (B) TYYPPI: aminohappo
- (D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: proteiini

(xi) SEKVENSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:6:

Met Ala Ser Met Thr Gly Gly Gln Gln Met Gly Arg Asp Ser Ser Leu 1 5 10 15	
Val Pro Ser Ser Asp Pro Asp Val Thr Leu Tyr Gly Thr Ile Lys Ala 20 25 30	
Gly Val Glu Val Ser Arg Val Lys Asp Ala Gly Thr Tyr Lys Ala Gln 35 40 45	
Gly Gly Lys Ser Lys Thr Ala Thr Gln Ile Ala Asp Phe Gly Ser Lys 50 55 60	
Ile Gly Phe Lys Gly Gln Glu Asp Leu Gly Asn Gly Met Lys Ala Ile 65 70 75 80	

Trp Gln Leu Glu Gln Lys Ala Ser Ile Ala Gly Thr Asn Ser Gly Trp
 85 90 95
 Gly Asn Arg Gln Ser Phe Ile Gly Leu Lys Gly Gly Phe Gly Thr Val
 100 105 110
 Arg Ala Gly Asn Leu Asn Thr Val Leu Lys Asp Ser Gly Asp Asn Val
 115 120 125
 Asn Ala Trp Glu Ser Gly Ser Asn Thr Glu Asp Val Leu Gly Leu Gly
 130 135 140
 Thr Ile Gly Arg Val Glu Ser Arg Glu Ile Ser Val Arg Tyr Asp Ser
 145 150 155 160
 Pro Val Phe Ala Gly Phe Ser Gly Ser Val Gln Tyr Val Pro Arg Asp
 165 170 175
 Asn Ala Asn Asp Val Asp Lys Tyr Lys His Thr Lys Ser Ser Arg Glu
 180 185 190
 Ser Tyr His Ala Gly Leu Lys Tyr Glu Asn Ala Gly Phe Phe Gly Gln
 195 200 205
 Tyr Ala Gly Ser Phe Ala Lys Tyr Ala Asp Leu Asn Thr Asp Ala Glu
 210 215 220
 Arg Val Ala Val Asn Thr Ala Asn Ala His Pro Val Lys Asp Tyr Gln
 225 230 235 240
 Val His Arg Val Val Ala Gly Tyr Asp Ala Asn Asp Leu Tyr Val Ser
 245 250 255
 Val Ala Gly Gln Tyr Glu Ala Ala Lys Asn Asn Glu Val Gly Ser Thr
 260 265 270
 Lys Gly Lys Lys His Glu Gln Thr Gln Val Ala Ala Thr Ala Ala Tyr
 275 280 285
 Arg Phe Gly Asn Val Thr Pro Arg Val Ser Tyr Ala His Gly Phe Lys
 290 295 300
 Ala Lys Val Asn Gly Val Lys Asp Ala Asn Tyr Gln Tyr Asp Gln Val
 305 310 315 320
 Ile Val Gly Ala Asp Tyr Asp Phe Ser Lys Arg Thr Ser Ala Leu Val
 325 330 335
 Ser Ala Gly Trp Leu Lys Gln Gly Lys Gly Ala Gly Lys Val Glu Gln
 340 345 350
 Thr Ala Ser Met Val Gly Leu Arg His Lys Phe
 355 360

(2) SEKVENSIN ID NRO TIEDOT7:

- (i) SEKVENSIN OMINAISPIIRTEET:
- (A) PITUUS: 187 emäsparia
 - (B) TYYPPI: nukleiinihappo
 - (C) JUOSTEISUUS: molemmat
 - (D) TOPOLOGIA: molemmat

- (ix) OMINAISPIIRTEET:
- (A) NIMI/SELITYS: CDS
 - (B) SIJAINTI: 101..187

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:7:

```

AGATCTCGAT CCCGCGAAAT TAATACGACT CACTATAGGG AGACCACAAC GGTTTCCCTC      60
TAGAAATAAT TTTGTTTAAC TTAAAGAAGG AGATATACAT ATG GCT AGC ATG ACT      115
                                         Met Ala Ser Met Thr
                                         1           5

GGT GGA CAG CAA ATG GGT CGG GAT TCA AGC TTG GTA CCG AGC TCG GAT      163
Gly Gly Gln Gln Met Gly Arg Asp Ser Ser Leu Val Pro Ser Ser Asp
                      10           15           20

CTG CAG GTT ACC TTG TAC GGT ACA      187
Leu Gln Val Thr Leu Tyr Gly Thr
                      25

```

(2) SEKVENSSIN ID NO:8 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:

- (A) PITUUS: 29 aminohappoa
- (B) TYYPPI: aminohappo
- (D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLEKYYLITYYPPI: proteiini

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:8:

```

Met Ala Ser Met Thr Gly Gly Gln Gln Met Gly Arg Asp Ser Ser Leu
 1           5           10           15
Val Pro Ser Ser Asp Leu Gln Val Thr Leu Tyr Gly Thr
          20           25

```

(2) SEKVENSSIN ID NO:9 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:

- (A) PITUUS: 54 emäsparia
- (B) TYYPPI: nukleiinihappo
- (C) JUOSTEISUUS: molemmat
- (D) TOPOLOGIA: molemmat

(ix) OMINAISPIIRRE:

- (A) NIMI/SELITYS: CDS
- (B) SIJAINTI: 1..24

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:9:

```

GTT GGT CTG CGT CAC AAA TTC TAACTCGAGC AGATCCGGCT GCTAACAAAG      51
Val Gly Leu Arg His Lys Phe
 1           5

CCC      54

```

(2) SEKVENSSIN ID NO:10 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:

- (A) PITUUS: 7 aminohappoa
- (B) TYYPPI: aminohappo
- (D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(ii) MOLECULE TYYPPI: proteiini

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:10:

```

Val Gly Leu Arg His Lys PHe
 1           5

```

(2) SEKVENSSIN ID NO:11 TIEDOT:

- (i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
 - (A) PITUUS: 47 emäsparia
 - (B) TYYPPI: nukleiinihappo
 - (C) JUOSTEISUUS: yksinkertainen juoste
 - (D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:11:

GGGGTAGATC TGCAGGTTAC CTTGTACGGT ACAATTAAAG CAGGCGT

47

(2) SEKVENSSIN ID NO:12 TIEDOT:

- (i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
 - (A) PITUUS: 42 emäsparia
 - (B) TYYPPI: nukleiinihappo
 - (C) JUOSTEISUUS: single
 - (D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:12:

GGGGGGGTGA CCCTCGAGTT AGAATTTGTG ACGCAGACCA AC

42

(2) SEKVENSSIN ID NO:13 TIEDOT:

- (i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
 - (A) PITUUS: 20 emäsparia
 - (B) TYYPPI: nukleiinihappo
 - (C) JUOSTEISUUS: yksinkertainen juoste
 - (D) TOPOLOGIA: 1 lineaarinen

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:13:

TCAAGCTTGG TACCGAGCTC

20

(2) SEKVENSSIN ID NO:14 TIEDOT:

- (i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
 - (A) PITUUS: 20 emäsparia
 - (B) TYYPPI: nukleiinihappo
 - (C) JUOSTEISUUS: single
 - (D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:14:

TTTGTTAGCA GCCGGATCTG

20

(2) SEKVENSSIN ID NO:15 TIEDOT:

- (i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
 - (A) PITUUS: 21 emäsparia
 - (B) TYYPPI: nukleiinihappo
 - (C) JUOSTEISUUS: yksinkertainen juoste
 - (D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:15:

CTCAAGACCC GTTTAGAGGC C

21

(2) SEKVENSSIN ID NO:16 TIEDOT:

- (i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
 - (A) PITUUS: 33 emäsparia
 - (B) TYYPPI: nukleiinihappo
 - (C) JUOSTEISUUS: yksinkertainen juoste
 - (D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:16:

AGCGGCTTGG AATTCCCGGC TGGCTTAAAT TTC

33

(2) SEKVENSSIN ID NO:17 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:

- (A) PITUUS: 30 emäsparia
- (B) TYYPPI: nukleiinihappo
- (C) JUOSTEISUUS: yksinkertainen juoste
- (D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:17:

CAAACGAATG AATTCAAATA AAAAAGCCTG

30

(2) SEKVENSSIN ID NO:18 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:

- (A) PITUUS: 47 emäsparia
- (B) TYYPPI: nukleiinihappo
- (C) JUOSTEISUUS: yksinkertainen juoste
- (D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:18:

CCTGTTGCAG CACATATGGA CGTTACCTTG TACGGTACAA TTAAAGC

47

(2) SEKVENSSIN ID NO:19 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:

- (A) PITUUS: 33 emäsparia
- (B) TYYPPI: nukleiinihappo
- (C) JUOSTEISUUS: yksinkertainen juoste
- (D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:19:

CGACAGGCTT TTTCTCGAGA CCAATCTTTT CAG

33

(2) SEKVENSSIN ID NO:20 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:

- (A) PITUUS: 47 emäsparia
- (B) TYYPPI: nukleiinihappo
- (C) JUOSTEISUUS: yksinkertainen juoste
- (D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:20:

CCTGTTGCAG CGGATCCAGA CGTTACCTTG TACGGTACAA TTAAAGC

47

(2) SEKVENSSIN ID NO:21 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:

- (A) PITUUS: 33 emäsparia
- (B) TYYPPI: nukleiinihappo
- (C) JUOSTEISUUS: yksinkertainen juoste
- (D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:21:

CGACAGGCTT TTTCTCGAGA CCAATCTTTT CAG

33

(2) SEKVENSSIN ID NO:22 TIEDOT:

- (i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 36 emäsparia
(B) TYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksinkertainen juoste
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:22:

GTTGCAGCAC ATATGGACGT TACCCTGTAC GGCACC

36

(2) SEKVENSSIN ID NO:23 TIEDOT:

- (i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
(A) PITUUS: 44 emäsparia
(B) TYPPI: nukleiinihappo
(C) JUOSTEISUUS: yksinkertainen juoste
(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI ID NO:23:

GGGGGGATGG ATCCAGATTA GAATTTGTGG CGCAGACCGA CACC

44

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä B-ryhmän meningokokin ulkomembraanin poriini-proteiinin tai sen fuusioproteiinin ekspressoimiseksi korkeina
5 tasoina E. colissa, t u n n e t t u siitä, että

(a) transformoidaan E. coli -kantaan vektori, joka käsittää selektiivisen merkin ja geenin, joka koodittaa proteiinia, joka on valittu ryhmästä, johon kuuluvat:

- 10 (i) kypsä poriiniproteiini ja
(ii) fuusioproteiini, joka on kypsä poriiniproteiini fuusioituna T7-geenin Ø10 kapsidiproteiinin aminohappoihin 1 - 22,

jolloin mainittu geeni on liitettynä toimivasti T7-promoottoriin;
15

(b) kasvatetaan transformoitua E. colia kasvatusalustassa, joka sisältää valinta-aineen ja

20 (c) indusoidaan mainitun proteiinin ekspressio, jotta saadaan mainittua proteiinia sisältävä E. coli;
jolloin näin ekspressoitu proteiini muodostaa enemmän kuin 2 % E. colissa ekspressoituvien proteiinien kokonaismäärästä.

25 2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mainittu proteiini on kypsä B-ryhmän luokan 2 poriiniproteiini.

30 3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mainittu proteiini on kypsä B-ryhmän luokan 3 poriiniproteiini.

4. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mainittu proteiini käsittää enemmän kuin noin 30 % mainitussa E. colissa ekspressoituvasta proteiinien kokonaismäärästä.
35

5. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u

siitä, että mainittu vektori valitaan joukosta, johon kuuluvat pET-17b, pET-11a, pET-24a-d(+) ja pET-9a.

5 6. Menetelmä patenttivaatimuksen 1 mukaisella menetelmällä saadun B-ryhmän meningokokin ulkomembraanin poriiniproteiinin tai sen fuusioproteiinin puhdistamiseksi t u n n e t t u siitä, että menetelmässä

10 (d) lyysataan mainittu vaiheessa (c) saatu E. coli mainitun proteiinin vapauttamiseksi liukenemattomina inkluusiokappaleina,

15 (e) pestään mainitut vaiheessa (c) saadut liukenemattomat inkluusiokappaleet puskurilla, jotta poistetaan kontaminoivat E. coliin soluproteiinit,

(f) suspendoidaan ja liuotetaan mainitut vaiheessa (e) saadut inkluusiokappaleet denaturointiaineen vesiliuokseen,

20 (g) laimennetaan vaiheessa (f) saatu liuos detergentillä ja

(h) puhdistetaan mainittu proteiini geelisuodatuksella ja ioninvaihtokromatografialla.

25 7. Patenttivaatimuksen 6 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että vaiheessa (g) saadun laimennetun liuoksen konsentraatio on vähemmän kuin 10 mg proteiinia/ml.

30 8. Menetelmä patenttivaatimuksen 1 mukaisella menetelmällä saadun B-ryhmän meningokokin ulkomembraanin poriiniproteiinin tai sen fuusioproteiinin laskostamiseksi uudelleen, t u n n e t t u siitä, että menetelmässä

35 (d) lyysataan mainittu vaiheessa (c) saatu E. coli mainitun proteiinin vapauttamiseksi liukenemattomina inkluusiokappaleina,

(e) pestään mainitut vaiheessa (c) saadut liukenemattomat in-

kluusiokappaleet puskurilla, jotta poistetaan kontaminoivat E. colin soluproteiinit,

5 (f) suspendoidaan ja liuotetaan mainittu vaiheessa (e) saadut inkluusiokappaleet denaturointiaineen vesiliuokseen,

(g) laimennetaan vaiheessa (f) saatu liuos detergentillä ja

10 (h) viedään mainittu vaiheessa (g) saatu laimennettu liuos geelisuodatuspylvään läpi, jolloin saadaan laskostunut, trimeerinen proteiini.

9. Patenttivaatimuksen 8 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että vaiheessa (g) saadun laimennetun liuoksen konsentraatio on vähemmän kuin 10 mg proteiinia/ml.

20 10. Olennaisesti puhdas B-ryhmän meningokokin ulkomembraanin poriiniproteiini tai sen fuusioproteiini, t u n n e t t u siitä, että se on valmistettu patenttivaatimuksen 6 mukaisella menetelmällä.

25 11. Patenttivaatimuksen 10 mukainen olennaisesti puhdas proteiini, t u n n e t t u siitä, että se on kypsä B-ryhmän luokan 2 poriiniproteiini.

12. Patenttivaatimuksen 10 mukainen olennaisesti puhdas proteiini, t u n n e t t u siitä, että se on kypsä B-ryhmän luokan 3 poriiniproteiini.

30 13. Olennaisesti puhdas, laskostettu B-ryhmän meningokokin ulkomembraanin poriiniproteiini tai sen fuusioproteiini, t u n n e t t u siitä, että se on valmistettu patenttivaatimuksen 8 mukaisella menetelmällä.

35 14. Rokote, joka käsittää patenttivaatimuksen 10 tai 13 mukaisen B-ryhmän meningokokin ulkomembraanin poriiniproteiinin tai sen fuusioproteiinin yhdessä farmaseuttisesti hyväksyttävän laimennusaineen, kantoaineen tai täyteaineen kanssa, t u n -

n e t t u siitä, että mainittu proteiini on läsnä määränä, joka on tehokas nostamaan esiin eläimessä suojaavia vasta-aineita Neisseria meningitidista kohtaan.

5 15. Patenttivaatimuksen 14 mukainen rokote, t u n n e t t u siitä, että mainittu proteiini on konjugoitu Neisseria meningitidisin kapselipolysakkaridiin.

10 16. Menetelmä B-ryhmän meningokokin poriiniproteiinin tai sen fuusioproteiini-polysakkaridikonjugaatin saamiseksi, t u n n e t t u siitä, että menetelmässä

(c) saadaan uudelleenlaskostunut proteiini patenttivaatimuksen 8 mukaisella menetelmällä,

15

(d) saadaan Neisseria meningitidisin kapselipolysakkaridi ja

(e) konjugoidaan proteiini (a) polysakkaridiin (b).

20 17. Patenttivaatimuksen 16 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mainitun proteiinin aminohapposekvenssi on kuviossa 4 esitetty.

25 18. Menetelmä bakteerimeningiitin estämiseksi eläimessä, t u n n e t t u siitä, että mainitulle eläimelle annetaan patenttivaatimuksen 8 mukaisesti tuotettua B-ryhmän meningokokin poriiniproteiinia tai sen fuusioproteiinia määränä, joka on tehokas estämään bakteerimeningiittiä.

30 19. E. coli -kannan BL21 (DE3) Δ ompA isäntäsolu, t u n n e t t u siitä, että se sisältää vektorin, joka käsittää B-ryhmän meningokokin poriiniproteiinia tai sen fuusioproteiinia koodittavan DNA-molekyylin liitettyinä toimivasti mainitun vektorin T7-promoottoriin.

35

20. Patenttivaatimuksen 19 mukainen E. coli -kanta, t u n n e t t u siitä, että mainittu DNA-molekyyli koodittaa kypsää B-ryhmän meningokokin luokan 2 poriiniproteiinia.

21. Patenttivaatimuksen 19 mukainen E. coli -kanta, t u n -
n e t t u siitä, että mainittu DNA-molekyyli koodittaa kypsää
B-ryhmän meningokokin luokan 3 poriiniproteiinia.
- 5 22. Patenttivaatimuksen 19 mukainen E. coli -kanta, t u n -
n e t t u siitä, että mainittu DNA-molekyyli koodittaa fuu-
sioproteiinia, jolla on kuviossa 4 esitetty
aminohapposekvenssi.
- 10 23. Patenttivaatimuksen 19 mukainen E. coli -kanta, t u n -
n e t t u siitä, että mainittu vektori on pET-17b.
24. E. coli -kanta BL21(DE3) Δ ompA.

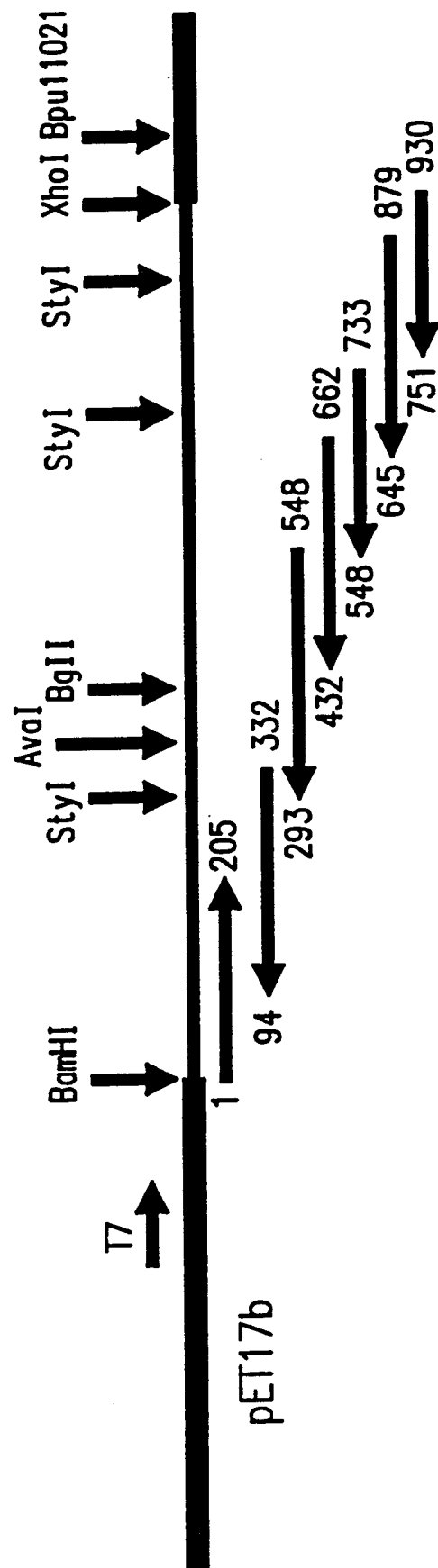


FIG.1

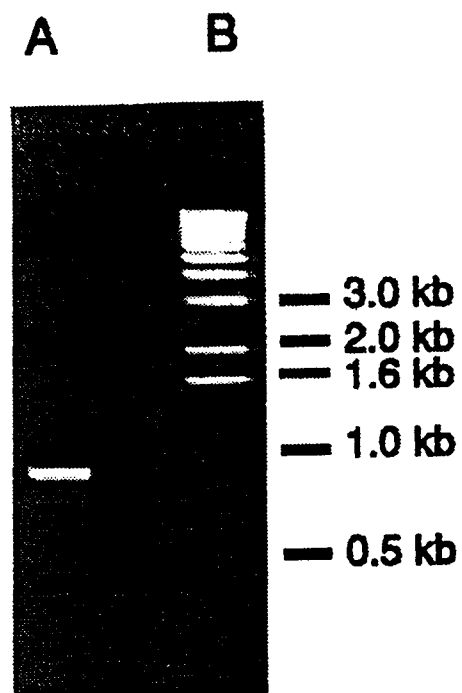


FIG. 2

3 / 17

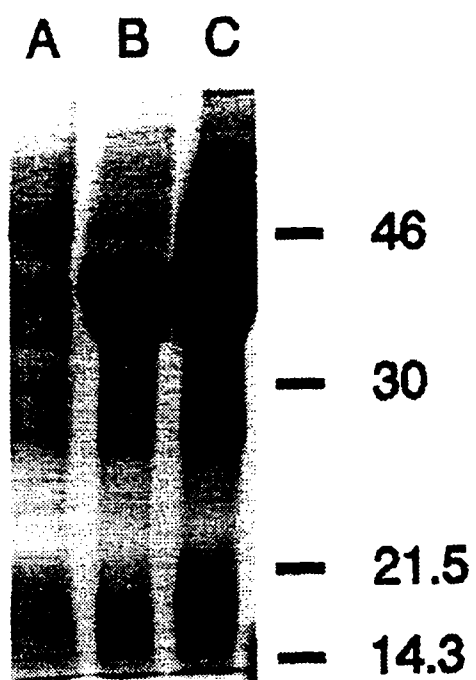


FIG. 3A

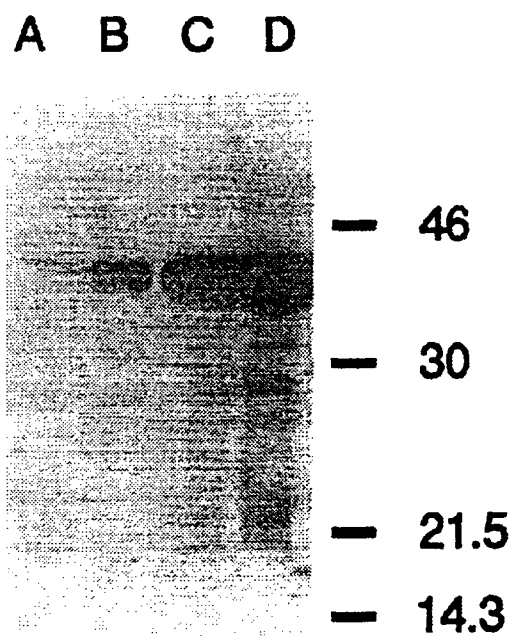


FIG. 3B

4/17

TTG TAC GGT ^C ACA ^C ATT AAA GCA GGC GTA GAA ACT TCC CGC TCT GTA TTT	48
Leu Tyr Gly Thr Ile Lys Ala Gly Val Glu Thr Ser Arg Ser Val Phe	
1 5 10 15	
CAC CAG AAC GGC CAA GTT ACT GAA GTT ACA ACC GCT ACC GGC ATC GTT	96
His Gln Asn Gly Gln Val Thr Glu Val Thr Thr Ala Thr Gly Ile Val	
20 25 30	
GAT TTG GGT TCG AAA ATC GGC TTC AAA GGC CAA GAA GAC CTC GGT AAC	144
Asp Leu Gly Ser Lys Ile Gly Phe Lys Gly Gln Glu Asp Leu Gly Asn	
35 40 45	
GGC CTG AAA GCC ATT TGG CAG GTT GAG CAA AAA GCA TCT ATC GCC GGT	192
Gly Leu Lys Ala Ile Trp Gln Val Glu Gln Lys Ala Ser Ile Ala Gly	
50 55 60	
ACT GAC TCC GGT TGG GGC AAC CGC CAA TCC TTC ATC GGC TTG AAA GGC	240
Thr Asp Ser Gly Trp Gly Asn Arg Gln Ser Phe Ile Gly Leu Lys Gly	
65 70 75 80	
GGC TTC GGT AAA TTG CGC GTC GGT CGT TTG AAC AGC GTC CTG AAA GAC	288
Gly Phe Gly Lys Leu Arg Val Gly Arg Leu Asn Ser Val Leu Lys Asp	
85 90 95	
ACC GGC GAC ATC AAT CCT TCG GAT AGC AAA AGC GAC TAT TTG GGT GTA	336
Thr Gly Asp Ile Asn Pro Trp Asp Ser Lys Ser Asp Tyr Leu Gly Val	
100 105 110	
AAC AAA ATT GCC GAA CCC GAG GCA CGC CTC ATT TCC GTA CGC TAC GAT	384
Asn Lys Ile Ala Glu Pro Glu Ala Arg Leu Ile Ser Val Arg Tyr Asp	
115 120 125	
TCT CCC GAA TTT GCC GGC CTC AGC GGC AGC GTA CAA TAC GCG CTT AAC	432
Ser Pro Glu Phe Ala Gly Leu Ser Gly Ser Val Gln Tyr Ala Leu Asn	
130 135 140	
GAC AAT GCA GGC AGA CAT AAC AGC GAA TCT TAC CAC GCC GGC TTC AAC	480
Asp Asn Ala Gly Arg His Asn Ser Glu Ser Tyr His Ala Gly Phe Asn	
145 150 155 160	

FIG.4A

5/17

TAC AAA AAC GGT GGC TTC TTC GTG CAA TAT GGC GGT GCC TAT AAA AGA Tyr Lys Asn Gly Gly Phe Phe Val Gln Tyr Gly Gly Ala Tyr Lys Arg 165 170 175	528
CAT CAT CAA GTG CAA GAG GGC TTG AAT ATT GAG AAA TAC CAG ATT CAC His His Gln Val Gln Glu Gly Leu Asn Ile Glu Lys Tyr Gln Ile His 180 185 190	576
CGT TTG GTC AGC GGT TAC GAC AAT GAT GCC CTG TAC GCT TCC GTA GCC Arg Leu Val Ser Gly Tyr Asp Asn Asp Ala Leu Tyr Ala Ser Val Ala 195 200 205	624
GTA CAG CAA CAA GAC GCG AAA CTG ACT GAT GCT TCC AAT TCG CAC AAC Val Gln Gln Gln Asp Ala Lys Leu Thr Asp Ala Ser Asn Ser His Asn 210 215 220	672
TCT CAA ACC GAA GTT GCC GCT ACC TTG GCA TAC CGC TTC GGC AAC GTA Ser Gln Thr Glu Val Ala Ala Thr Leu Ala Tyr Arg Phe Gly Asn Val 225 230 235 240	720
ACG CCC CGA GTT TCT TAC GCC CAC GGC TTC AAA GGT TTG GTT GAT GAT Thr Pro Arg Val Ser Tyr Ala His Gly Phe Lys Gly Leu Val Asp Asp 245 250 255	768
GCA GAC ATA GGC AAC GAA TAC GAC CAA GTG GTT GTC GGT GCG GAA TAC Ala Asp Ile Gly Asn Glu Tyr Asp Gln Val Val Val Gly Ala Glu Tyr 260 265 270	816
GAC TTC TCC AAA CGC ACT TCT GCC TTG GTT TCT GCC GGT TGG TTG CAA Asp Phe Ser Lys Arg Thr Ser Ala Leu Val Ser Ala Gly Trp Leu Gln 275 280 285	864
GAA GGC AAA GGC GAA AAC AAA TTC GTA GCG ACT GCC GGC GGT GTT GGT Glu Gly Lys Gly Glu Asn Lys Phe Val Ala Thr Ala Gly Gly Val Gly 290 295 300	912
CTG CGT CAC AAA TTC TAA Leu Arg His Lys Phe 305 310	930

FIG.4B

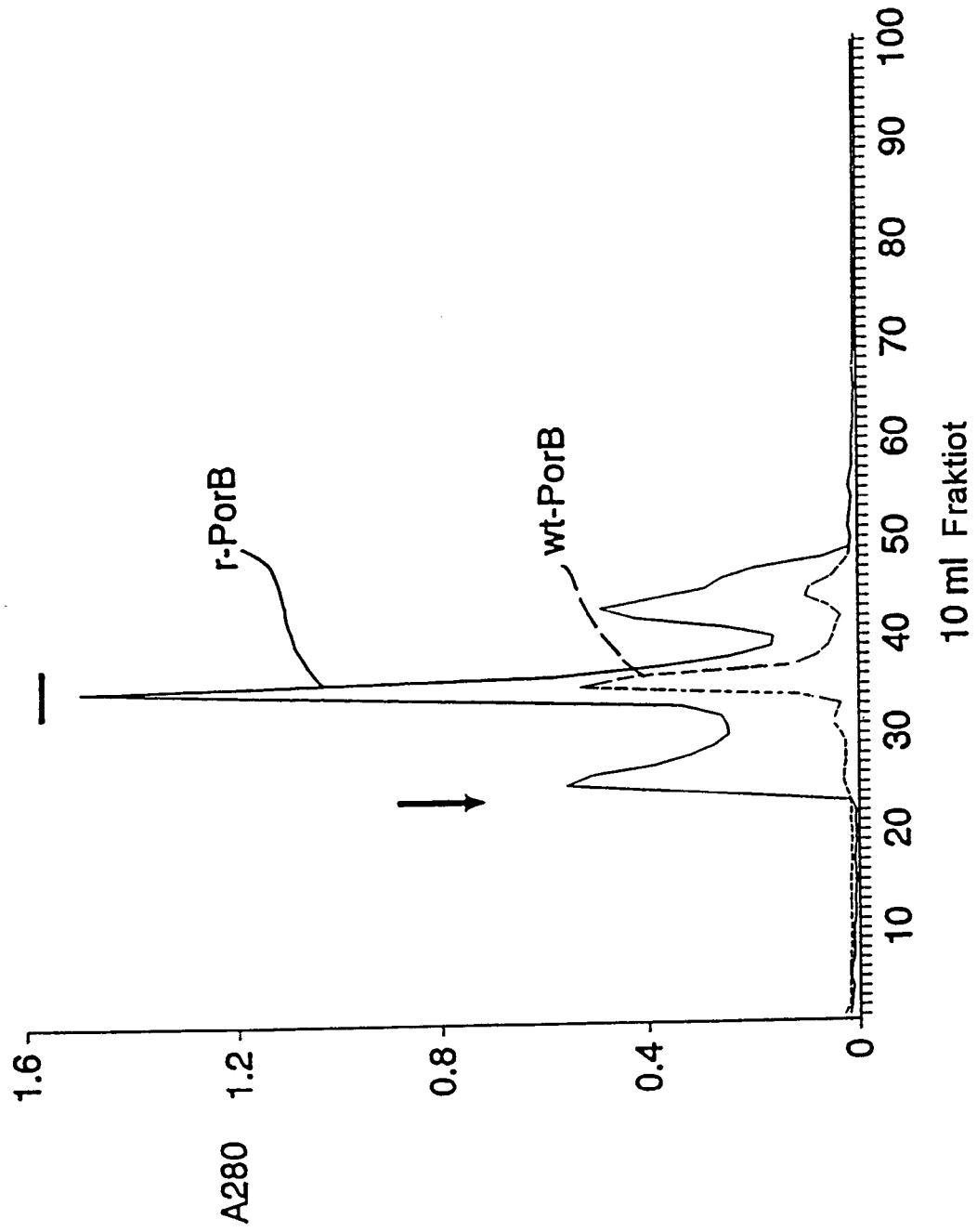


FIG.5

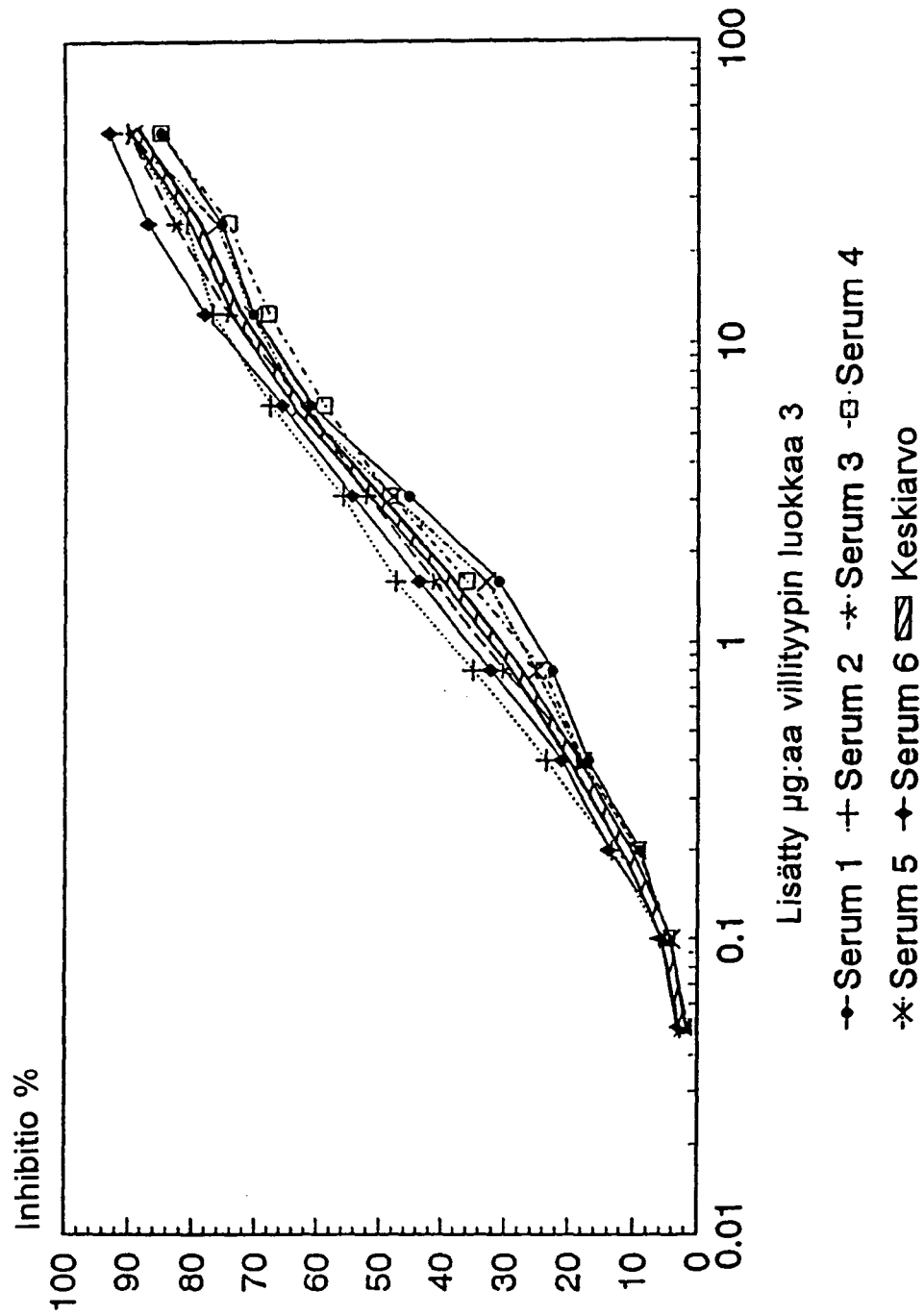


FIG. 6

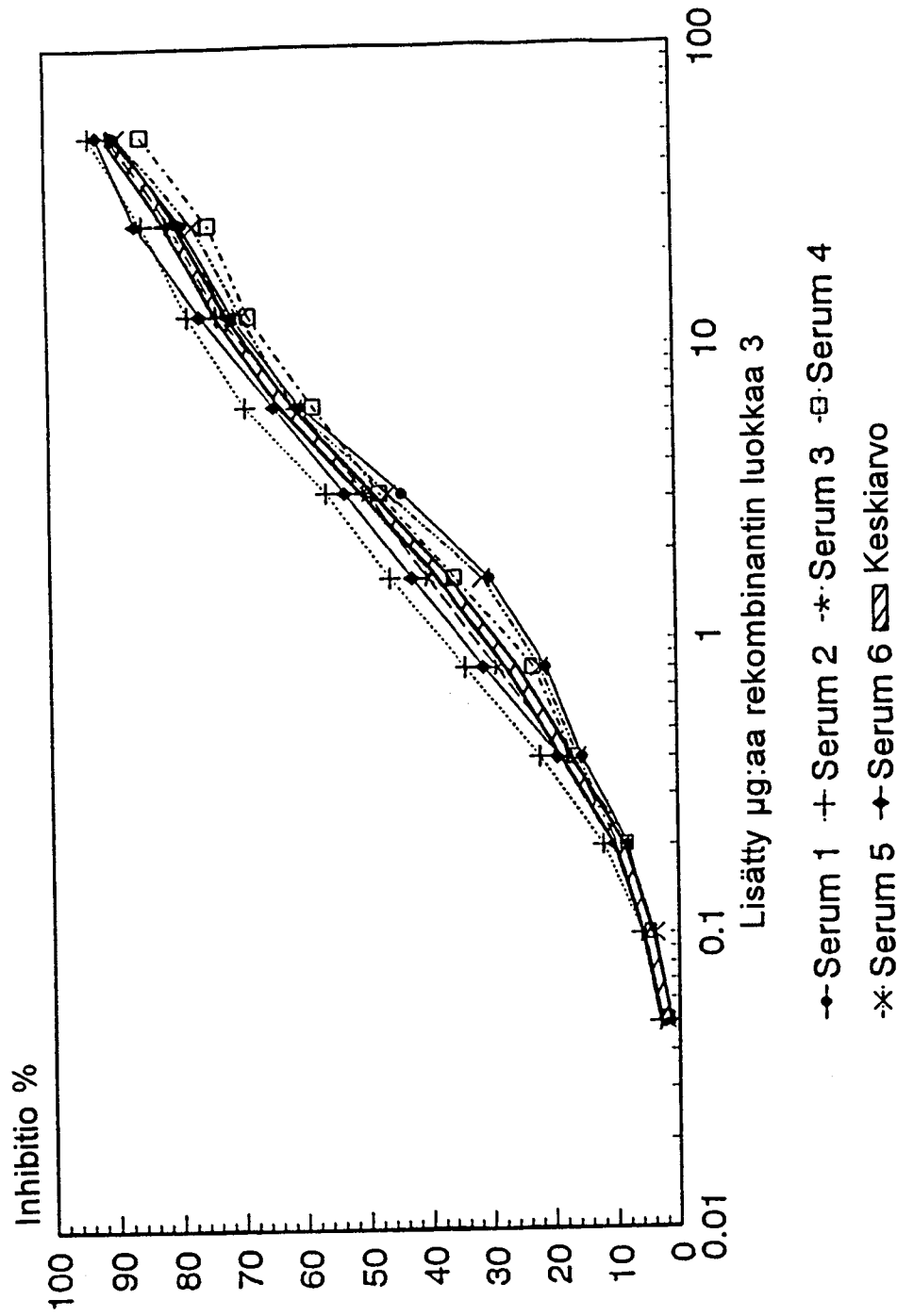


FIG. 7

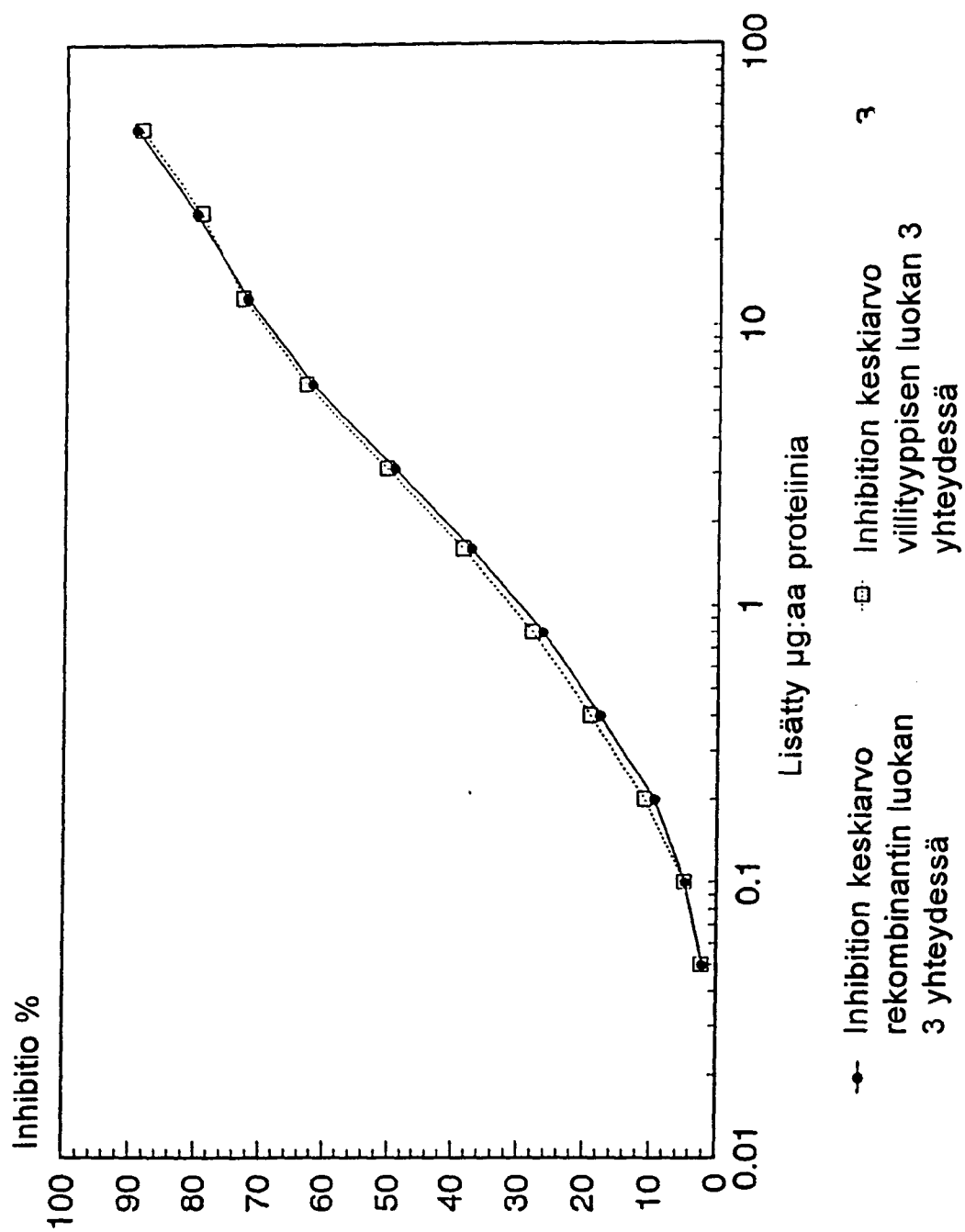


FIG. 8

10/17

ATG GAC GTT ACC TTG TAC GGT ACA ATT AAA GCA GGC GTA GAA GTT TCT	48
Met Asp Val Thr Leu Tyr Gly Thr Ile Lys Ala Gly Val Glu Val Ser	
1 5 10 15	
CGC GTA AAA GAT GCT GGT ACA TAT AAA GCT CAA GGC GGA AAA TCT AAA	96
Arg Val Lys Asp Ala Gly Thr Tyr Lys Ala Gln Gly Gly Lys Ser Lys	
20 25 30	
ACT GCA ACC CAA ATT GCC GAC TTC GGT TCT AAA ATC GGT TTC AAA GGT	144
Thr Ala Thr Gln Ile Ala Asp Phe Gly Ser Lys Ile Gly Phe Lys Gly	
35 40 45	
CAA GAA GAC CTC GGC AAC GGC ATG AAA GCC ATT TGG CAG TTG GAA CAA	192
Gln Glu Asp Leu Gly Asn Gly Met Lys Ala Ile Trp Gln Leu Glu Gln	
50 55 60	
AAA GCC TCC ATC GCC GGC ACT AAC AGC GGC TGG GGT AAC CGC CAG TCC	240
Lys Ala Ser Ile Ala Gly Thr Asn Ser Gly Trp Gly Asn Arg Gln Ser	
65 70 75 80	
TTC ATC GGC TTG AAA GGC GGC TTC GGT ACC GTC CGC GCC GGT AAT CTG	288
Phe Ile Gly Leu Lys Gly Gly Phe Gly Thr Val Arg Ala Gly Asn Leu	
85 90 95	
AAC ACC GTA TTG AAA GAC AGC GGC GAC AAC GTC AAT GCA TGG GAA TCT	336
Asn Thr Val Leu Lys Asp Ser Gly Asp Asn Val Asn Ala Trp Glu Ser	
100 105 110	
GGT TCT AAC ACC GAA GAT GTA CTG GGA CTG GGT ACT ATC GGT CGT GTA	384
Gly Ser Asn Thr Glu Asp Val Leu Gly Leu Gly Thr Ile Gly Arg Val	
115 120 125	
GAA AGC CGT GAA ATC TCC GTA CGC TAC GAC TCT CCC GTA TTT GCA GGC	432
Glu Ser Arg Glu Ile Ser Val Arg Tyr Asp Ser Pro Val Phe Ala Gly	
130 135 140	
TTC AGC GGC AGC GTA CAA TAC GTT CCG CGC GAT AAT GCG AAT GAT GTG	480
Phe Ser Gly Ser Val Gln Tyr Val Pro Arg Asp Asn Ala Asn Asp Val	
145 150 155 160	

FIG.9A

11/17

GAT AAA TAC AAA CAT ACG AAG TCC AGC CGT GAG TCT TAC CAC GCC GGT Asp Lys Tyr Lys His Thr Lys Ser Ser Arg Glu Ser Tyr His Ala Gly 165 170 175	528
CTG AAA TAC GAA AAT GCC GGT TTC TTC GGT CAA TAC GCA GGT TCT TTT Leu Lys Tyr Glu Asn Ala Gly Phe Phe Gly Gln Tyr Ala Gly Ser Phe 180 185 190	576
GCC AAA TAT GCT GAT TTG AAC ACT GAT GCA GAA CGT GTT GCA GTA AAT Ala Lys Tyr Ala Asp Leu Asn Thr Asp Ala Glu Arg Val Ala Val Asn 195 200 205	624
ACT GCA AAT GCC CAT CCT GTT AAG GAT TAC CAA GTA CAC CGC GTA GTT Thr Ala Asn Ala His Pro Val Lys Asp Tyr Gln Val His Arg Val Val 210 215 220	672
GCC GGT TAC GAT GCC AAT GAC CTG TAC GTT TCT GTT GCC GGT CAG TAT Ala Gly Tyr Asp Ala Asn Asp Leu Tyr Val Ser Val Ala Gly Gln Tyr 225 230 235 240	720
GAA GCT GCT AAA AAC AAC GAG GTT GGT TCT ACC AAG GGT AAA AAA CAC Glu Ala Ala Lys Asn Asn Glu Val Gly Ser Thr Lys Gly Lys Lys His 245 250 255	768
GAG CAA ACT CAA GTT GCC GCT ACT GCC GCT TAC CGT TTT GGC AAC GTA Glu Gln Thr Gln Val Ala Ala Thr Ala Ala Tyr Arg Phe Gly Asn Val 260 265 270	816
ACG CCT CGC GTT TCT TAC GCC CAC GGC TTC AAA GCT AAA GTG AAT GGC Thr Pro Arg Val Ser Tyr Ala His Gly Phe Lys Ala Lys Val Asn Gly 275 280 285	864
GTG AAA GAC GCA AAT TAC CAA TAC GAC CAA GTT ATC GTT GGT GCC GAC Val Lys Asp Ala Asn Tyr Gln Tyr Asp Gln Val Ile Val Gly Ala Asp 290 295 300	912
TAC GAC TTC TCC AAA CGC ACT TCC GCT CTG GTT TCT GCC GGT TGG TTG Tyr Asp Phe Ser Lys Arg Thr Ser Ala Leu Val Ser Ala Gly Trp Leu 305 310 315 320	960

FIG.9B

12/17

AAA CAA GGT AAA GCC GCG GGA AAA GTC GAA CAA ACT GCC AGC ATG GTT	1008
Lys Gln Gly Lys Gly Ala Gly Lys Val Glu Gln Thr Ala Ser Met Val	
325 330 335	
GGT CTG CGT CAC AAA TTC TAA	1029
Gly Leu Arg His Lys Phe	
340	

FIG.9C

13/17

ATG GCT AGC ATG ACT GGT GGA CAG CAA ATG GGT CGG GAT TCA AGC TTG	48
Met Ala Ser Met Thr Gly Gly Gln Gln Met Gly Arg Asp Ser Ser Leu	
1 5 10 15	
GTA CCG AGC TCG GAT CCA GAC GTT ACC TTG TAC GGT ACA ATT AAA GCA	96
Val Pro Ser Ser Asp Pro Asp Val Thr Leu Tyr Gly Thr Ile Lys Ala	
20 25 30	
GGC GTA GAA GTT TCT CGC GTA AAA GAT GCT GGT ACA TAT AAA GCT CAA	144
Gly Val Glu Val Ser Arg Val Lys Asp Ala Gly Thr Tyr Lys Ala Gln	
35 40 45	
GGC GGA AAA TCT AAA ACT GCA ACC CAA ATT GCC GAC TTC GGT TCT AAA	192
Gly Gly Lys Ser Lys Thr Ala Thr Gln Ile Ala Asp Phe Gly Ser Lys	
50 55 60	
ATC GGT TTC AAA GGT CAA GAA GAC CTC GGC AAC GGC ATG AAA GCC ATT	240
Ile Gly Phe Lys Gly Gln Glu Asp Leu Gly Asn Gly Met Lys Ala Ile	
65 70 75 80	
TGG CAG TTG GAA CAA AAA GCC TCC ATC GCC GGC ACT AAC AGC GGC TGG	288
Trp Gln Leu Glu Gln Lys Ala Ser Ile Ala Gly Thr Asn Ser Gly Trp	
85 90 95	
GGT AAC CGC CAG TCC TTC ATC GGC TTG AAA GGC GGC TTC GGT ACC GTC	336
Gly Asn Arg Gln Ser Phe Ile Gly Leu Lys Gly Gly Phe Gly Thr Val	
100 105 110	
CGC GCC GGT AAT CTG AAC ACC GTA TTG AAA GAC AGC GGC GAC AAC GTC	384
Arg Ala Gly Asn Leu Asn Thr Val Leu Lys Asp Ser Gly Asp Asn Val	
115 120 125	
AAT GCA TGG GAA TCT GGT TCT AAC ACC GAA GAT GTA CTG GGA CTG GGT	432
Asn Ala Trp Glu Ser Gly Ser Asn Thr Glu Asp Val Leu Gly Leu Gly	
130 135 140	
ACT ATC GGT CGT GTA GAA AGC CGT GAA ATC TCC GTA CGC TAC GAC TCT	480
Thr Ile Gly Arg Val Glu Ser Arg Glu Ile Ser Val Arg Tyr Asp Ser	
145 150 155 160	

FIG.10A

14/17

CCC GTA TTT GCA GGC TTC AGC GGC AGC GTA CAA TAC GTT CCG CGC GAT Pro Val Phe Ala Gly Phe Ser Gly Ser Val Gln Tyr Val Pro Arg Asp 165 170 175	528
AAT GCG AAT GAT GTG GAT AAA TAC AAA CAT ACG AAG TCC AGC CGT GAG Asn Ala Asn Asp Val Asp Lys Tyr Lys His Thr Lys Ser Ser Arg Glu 180 185 190	576
TCT TAC CAC GCC GGT CTG AAA TAC GAA AAT GCC GGT TTC TTC GGT CAA Ser Tyr His Ala Gly Leu Lys Tyr Glu Asn Ala Gly Phe Phe Gly Gln 195 200 205	624
TAC GCA GGT TCT TTT GCC AAA TAT GCT GAT TTG AAC ACT GAT GCA GAA Tyr Ala Gly Ser Phe Ala Lys Tyr Ala Asp Leu Asn Thr Asp Ala Glu 210 215 220	672
CGT GTT GCA GTA AAT ACT GCA AAT GCC CAT CCT GTT AAG GAT TAC CAA Arg Val Ala Val Asn Thr Ala Asn Ala His Pro Val Lys Asp Tyr Gln 225 230 235 240	720
GTA CAC CGC GTA GTT GCC GGT TAC GAT GCC AAT GAC CTG TAC GTT TCT Val His Arg Val Val Ala Gly Tyr Asp Ala Asn Asp Leu Tyr Val Ser 245 250 255	768
GTT GCC GGT CAG TAT GAA GCT GCT AAA AAC AAC GAG GTT GGT TCT ACC Val Ala Gly Gln Tyr Glu Ala Ala Lys Asn Asn Glu Val Gly Ser Thr 260 265 270	816
AAG GGT AAA AAA CAC GAG CAA ACT CAA GTT GCC GCT ACT GCC GCT TAC Lys Gly Lys Lys His Glu Gln Thr Gln Val Ala Ala Thr Ala Ala Tyr 275 280 285	864
CGT TTT GGC AAC GTA ACG CCT CGC GTT TCT TAC GCC CAC GCC TTC AAA Arg Phe Gly Asn Val Thr Pro Arg Val Ser Tyr Ala His Gly Phe Lys 290 295 300	912
GCT AAA GTG AAT GGC GTG AAA GAC GCA AAT TAC CAA TAC GAC CAA GTT Ala Lys Val Asn Gly Val Lys Asp Ala Asn Tyr Gln Tyr Asp Gln Val 305 310 315 320	960

FIG.10B

ATC GTT GGT GCC GAC TAC GAC TTC TCC AAA CGC ACT TCC GCT CTG GTT	1008
Ile Val Gly Ala Asp Tyr Asp Phe Ser Lys Arg Thr Ser Ala Leu Val	
325 330 335	
TCT GCC GGT TGG TTG AAA CAA GGT AAA GGC GCG GGA AAA GTC GAA CAA	1056
Ser Ala Gly Trp Leu Lys Gln Gly Lys Gly Ala Gly Lys Val Glu Gln	
340 345 350	
ACT GCC AGC ATG GTT GGT CTG CGT CAC AAA TTC TAA	1092
Thr Ala Ser Met Val Gly Leu Arg His Lys Phe	
355 360	

FIG.10C

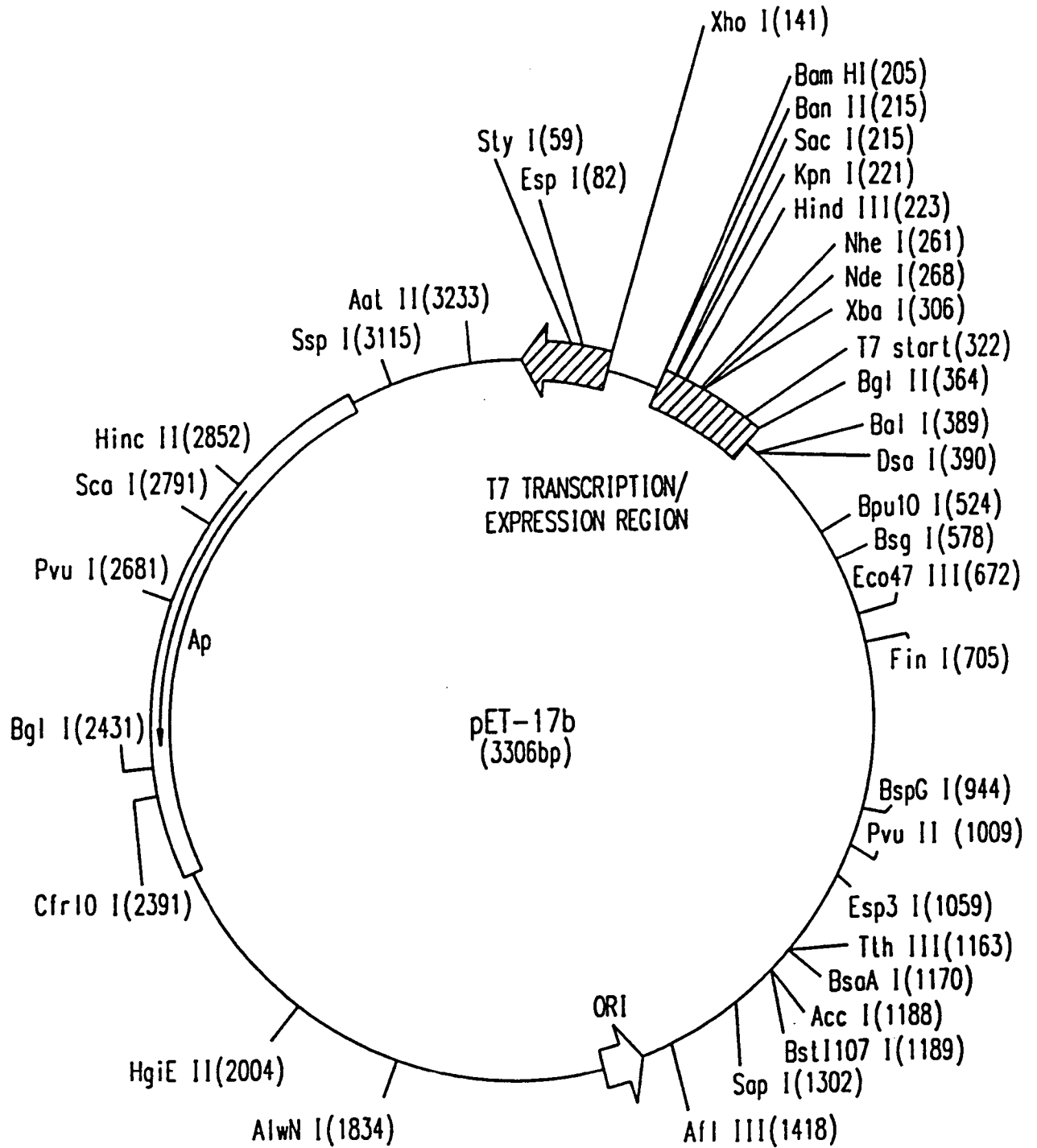


FIG.11A

<u>SgfII</u>		<u>XbaI</u>	
AGATCTCGAT CCCGCGAAAT TAATACGACT CACTATAGGG AGACCACAAC GGTTCCTC			60
	<u>NbaI</u>	<u>NbeI</u>	
TAGAAATAAT TTTGTTTAAC TTAAAGAAGG AGATATACAT ATG GCT AGC ATG ACT			115
	Met	Ala Ser Met Thr	
	1	5	
	<u>HindIII</u>	<u>KpnI</u>	<u>SacI</u> (<u>BamHI</u>)
GGT GGA CAG CAA ATG GGT CGG GAT TCA AGC TTG GTA CCG AGC TCG GAT			163
Gly Gly Gln Gln Met Gly Arg Asp Ser Ser Leu Val Pro Ser Ser Asp			
	10	15	20
CTG CAG GTT ACC TTG TAC GGT ACA			187
Leu Gln Val Thr Leu Tyr Gly Thr			
	25		
	<u>XbaI</u>		
GTT GGT CTG CGT CAC AAA TTC TAACTCGAGC AGATCCGGCT GCTAACAAAG			51
Val Gly Leu Arg His Lys Phe			
	1	5	
CCC			54