



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0053314
(43) 공개일자 2011년05월20일

(51) Int. Cl.

A61K 39/02 (2006.01) A61K 39/385 (2006.01)
C07K 14/22 (2006.01) A61P 31/04 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2010-7029750

(22) 출원일자(국제출원일자) 2009년06월01일

심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2010년12월30일

(86) 국제출원번호 PCT/US2009/045818

(87) 국제공개번호 WO 2009/158142

국제공개일자 2009년12월30일

(30) 우선권주장

61/057,462 2008년05월30일 미국(US)

(71) 출원인

더 유에스에이, 애즈 리프리젠티드 바이 더 세크
리터리 오브 더 아미, 온 비하프 오브 월터 리드
아미

미국 21702-5012 매릴랜드주 포트 다티릭 스콧 스트리트 504 인스티튜트 오브 리서치

(72) 발명자

줄리어 웬델 데이비드

미국 20906 매릴랜드주 실버 스프링 몰튼 홀 로드 14400

도네츠 미카일

미국 20878 매릴랜드주 노쓰 포토맥 오벤스 글렌 테라스 15514

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

김성기, 강승욱

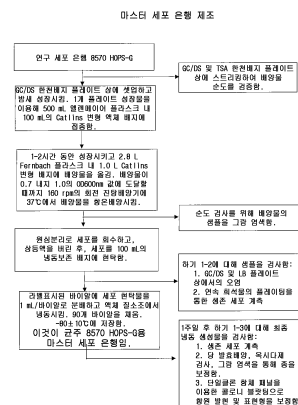
전체 청구항 수 : 총 48 항

(54) 수막구균성 다가 천연 외막 소포체 백신, 이의 제조 방법 및 사용 방법

(57) 요약

본 발명의 기술은 수막구균성 질환, 보다 바람직하게는 B 아형 수막구균성 질환에 대해 보호 면역성을 제공하는, 네이세리아의 1 이상의 유전자 변형된 균주에서 유래된 천연 외막 소포체(NOMV)를 포함하는 백신 조성물을 제공한다. 본 발명의 기술은 또한 본 발명의 백신 조성물을 투여하는 것을 포함하는 수막구균성 질환에 대해 동물 또는 인간을 면역화하는 방법을 제공한다.

대 표 도 - 도1



(72) 발명자

슈마이엘 데보라

미국 20851 매릴랜드주 록빌 아틀랜틱 애버뉴
13200

아이오닌 보리스

미국 20854 매릴랜드주 포토맥 데보라 드라이브
10737

마르크스 리안

미국 20850 매릴랜드주 록빌 윈딩 로즈 드라이브
520

모란 엘리자베스 엘렌

미국 20902-4382 매릴랜드주 위튼 10821-D- 암허스
트 애버뉴

특허청구의 범위

청구항 1

광범위한 보호성을 제공하도록 유전자 변형된 2 이상의 수막구균(meningococcal) 균주로부터 획득된 천연 외막 소포체를 포함하는 백신으로서, 여기서 천연 외막 소포체는 PorA, LOS 및 보존된 외막 단백질을 기반으로 하는 3종의 상이한 항원 세트를 포함하고, 유전자 변형된 균주는 *lpxL1*, *synX*, 및 *lgtA* 유전자의 불활성화에 기초하여 강화된 안전성을 제공하도록 변형된 것인 백신.

청구항 2

제1항에 있어서, 각각의 균주에 의해 발현되는 LOS는 상이한 LOS 코어 구조를 가지며, 글루코스 및 갈락토스로 이루어진 알파 사슬을 갖는 것인 백신.

청구항 3

제1항에 있어서, 각각의 균주는 그룹 B 사례 단리물 중에서 가장 우세한 PorA 아형을 기초로 선택된 2 이상의 상이한 PorA 아형 단백질 또는 아형 에피토프를 발현하는 것인 백신.

청구항 4

제1항에 있어서, 살균성 항체를 유도하는 검증된 능력을 갖는 상이한 보존성 표면 단백질은 각 균주에서 과발현되고, FHBP(GNA1870) 변이체 1, FHBP 변이체 2 및 FHBP 변이체 3; NadA; App; NspA; TbpA 및 TbpB로 이루어진 군에서 선택되는 것인 백신.

청구항 5

3종의 유전자 변형된, 항원적으로 다양한 네이세리아 메닝지티디스(*Neisseria meningitidis*) 균주에서 유래된 NOMV의 조합물로서, 여기서 균주 중 1 이상은 하기 (1), (2) 및 (3)에서 선택되는 것인 조합물:

(1) 다음의 유전자 변형 또는 특징을 갖는 H44/76 HOPS-DL:

유전자 *synX*, *lpxL1* 및 *lgtA*의 불활성화;

opaD 대신 제2 *porA* 유전자(아형 P1.7-1,1)의 삽입;

NadA의 증가된 발현; 및

Opc 및 PorA의 안정된 고발현;

(2) 다음의 유전자 변형 또는 특징을 갖는 8570 HOPS-G_AL:

유전자 *synX*, *lpxL1* 및 *lgtA*의 불활성화;

opaD 대신 제2 *porA* 유전자의 삽입;

인자 H 결합 단백질 변이체 1의 증가된 발현; 및

PorA 및 Opc의 안정된 고발현; 및

(3) 다음의 유전자 변형 또는 특징을 갖는 B16B6 HPS-G₂A:

유전자 *synX*, *lpxL1* 및 *lgtA*의 불활성화;

opaD 대신 제2 *porA* 유전자의 삽입;

인자 H 결합 단백질 변이체 2의 증가된 발현; 및

PorA 및 Opc의 안정된 고발현.

청구항 6

제5항에 있어서, 균주 H44/76 HOPS-DL은 ET-5 야생형 균주 H44/76(B:15: P1.7,16: L,3,7:P5.5,C)에서 유래된 것인 백신 균주의 조합물.

청구항 7

제5항에 있어서, 균주 8570 HOPS-G₁L은 ET-5 야생형 균주 8570(B:4:P 1.19,15: L3,7v: P5.5,11,C)에서 유래된 것인 백신 균주의 조합물.

청구항 8

제5항에 있어서, 균주 B16B6 HPS-G₂L은 ET-37 야생형 균주 B16B6(B:2a:P 1.5,2: L2:P5.1,2,5)에서 유래된 것인 백신 균주의 조합물.

청구항 9

제1항에 있어서, NOMV는 세제 또는 변성 용매에 대한 노출없이 포장된 세포 또는 사용된 배양 배지로부터 제조되는 것인 백신.

청구항 10

제1항에 있어서, 백신은 부형제로서 5% 글루코스에 현탁되는 것인 백신.

청구항 11

제1항에 있어서, NOMV는 수산화알루미늄 또는 인산알루미늄, MF59, CPG-ODN 또는 MPLA를 포함하는 1 이상의 보조제와 조합되는 것인 백신.

청구항 12

수막구균성 질환에 대한 면역화를 위해 근육내 및/또는 비내 투여되는 제1항에 따른 백신의 사용 방법.

청구항 13

그룹 B 수막구균성 질환에 대해 면역화를 위한 근육내 및/또는 비내 투여되는 제1항에 따른 백신의 사용 방법.

청구항 14

네이세리아 메닌지티디스의 1 이상의 유전자 변형된 균주에서 유래된 천연 외막 소포체(NOMV)를 포함하는 수막구균성 질환에 대한 백신 조성물로서, 여기서 1 이상의 유전자 변형된 균주는 하기 i), ii), iii) 및 iv)에 의해 변형된 것인 백신 조성물:

i) *synK* 유전자의 불활성화,

ii) *lpxL1* 유전자의 불활성화,

iii) 락토-N-네오테트라오스 테트라사카라이드가 결합된 단축형 또는 절단형 리포올리고사카라이드(LOS)가 발현되게하는 각 균주에서의 *lgtA* 유전자의 불활성화, 및

iv) *opa* 유전자 대신 1 이상의 제2의 항원적으로 상이한 *porA* 유전자의 삽입.

청구항 15

제14항에 있어서, 유전자 변형된 균주는 1 이상의 소수의 보존성 외막 단백질의 증가된 또는 안정된 발현을 더 포함하는 것인 백신 조성물.

청구항 16

제14항 또는 제15항에 있어서, 유전자 변형된 균주는 1 이상의 외막 단백질의 안정된 발현을 더 포함하고, 여기서 외막 단백질은 Opc 및 PorA를 포함하는 균에서 선택되는 것인 백신 조성물.

청구항 17

제14항 내지 제16항 중 어느 하나의 항에 있어서, 1 이상의 제2의 항원적으로 상이한 *porA* 유전자는 메닌지티디스 그룹 B 단리물 중 가장 우세한 PorA 아형에서 선택된 1 이상의 PorA 아형 단백질 또는 아형 에피토프를 발현하는 것인 백신 조성물.

청구항 18

제15항 내지 제17항 중 어느 하나의 항에 있어서, 1 이상의 소수의 보존성 외막 단백질은 FHBP(GNA1870) 변이체 1, FHBP 변이체 2, FHBP 변이체 3; NadA; App, NspA, TbpA 및 B로 이루어진 군에서 선택되는 것인 백신 조성물.

청구항 19

H44/76 HOPS-D 균주를 포함하는 네이세리아 메닌지티디스 아형 B 균주의 유전자 변형된 백신 균주.

청구항 20

하기 i) 내지 vi)의 유전자 변형을 포함하는 H44/76 균주에서 유래된 네이세리아 메닌지티디스 아형 B의 유전자 변형된 백신 균주:

- i) *synK* 유전자의 불활성화,
- ii) *lpxL1* 유전자의 불활성화,
- iii) *lgtA* 유전자의 불활성화,
- iv) *opaD* 유전자 대신 제2 *porA* 유전자의 삽입,
- v) 천연 균주와 비교하여 증가된 NadA의 발현, 및
- vi) Opc 및 PorA 단백질의 안정되고 증가된 발현.

청구항 21

제19항 또는 제20항에 있어서, 균주 H44/76 HOPS-DL은 ET-5 야생형 균주 H44/76(B:15: P1.7,16: L,3,7:P5.5, C)에서 유래된 것인 유전자 변형된 균주.

청구항 22

균주 8570 HOS-G1을 포함하는 네이세리아 메닌지티디스 아형 B의 유전자 변형된 백신 균주.

청구항 23

하기 i) 내지 vi)의 유전자 변형을 포함하는 8570에서 유래된 네이세리아 메닌지티디스 아형 B 균주의 유전자 변형된 백신 균주:

- i) *synK* 유전자의 불활성화,
- ii) *lpxL1* 유전자의 불활성화,
- iii) *lgtA* 유전자의 불활성화,
- iv) *opaD* 대신 제2 *porA* 유전자의 삽입;
- v) 인자 H 결합 단백질 변이체 1의 증가된 발현; 및
- vi) PorA 및 Opc 단백질의 안정되고 증가된 발현.

청구항 24

제22항 또는 제23항에 있어서, 유전자 변형된 균주는 ET-5 야생형 균주 8570(B:4: P1.19,15: L3,7v: P5.5,11,C)에서 유래된 것인 유전자 변형된 균주.

청구항 25

B16B6 HPS-G₂A 균주를 포함하는 네이세리아 메닌지티디스 아형 B의 유전자 변형된 백신 균주.

청구항 26

하기 i) 내지 vi)의 유전자 변형을 포함하는 B16B6에서 유래된 네이세리아 메닌지티디스 아형 B의 유전자 변형된 백신 균주:

- i) *synX* 유전자의 불활성화,
- ii) *lpxL1* 유전자의 불활성화,
- iii) *lgtA* 유전자의 불활성화,
- iv) *opaD* 대신 제2 *porA* 유전자(아형 P1.22-1,4)의 삽입;
- v) 인자 H 결합 단백질 변이체 2의 증가된 발현; 및
- vi) PorA 및 Opc 단백질의 안정되고 증가된 발현.

청구항 27

제25항 또는 제26항에 있어서, 유전자 변형된 균주는 ET-37 야생형 균주 B16B6(B:2a:P 1.5,2: L2:P5.1,2,5)에서 유래된 것인 유전자 변형된 균주.

청구항 28

제19항 내지 제27항 중 어느 하나의 항에 있어서, 균주는 철 결핍 배지에서 성장시킨 것인 유전자 변형된 균주.

청구항 29

제19항 내지 제28항 중 어느 하나의 항에 있어서, *synX* 유전자, *lpxL1* 유전자 또는 *lgtA* 유전자의 불활성화는 불활성화되는 유전자 서열 내에 약물 내성 유전자의 삽입에 의한 것인 유전자 변형된 균주.

청구항 30

제20항 내지 제29항 중 어느 하나의 항에 따른 1 이상의 유전자 변형된 균주에서 유래된 NOMV를 포함하는 백신 조성물.

청구항 31

제30항에 있어서, 백신 조성물은 2 이상의 유전자 변형된 균주에서 유래된 NOMV를 포함하는 것인 백신 조성물.

청구항 32

.

청구항 33

제30항에 있어서, 백신 조성물은 3 이상의 유전자 변형된 균주에서 유래된 NOMV를 포함하는 것인 백신 조성물.

청구항 34

제1항 내지 제18항, 또는 제30항 내지 제33항 중 어느 하나의 항에 있어서, NOMV는 포장된 세포 또는 사용된 배양 배지로부터 세제 또는 변성 용매에 대한 노출없이 제조되는 것인 백신 조성물.

청구항 35

제1항 내지 제18항, 또는 제30항 내지 제33항 중 어느 하나의 항에 있어서, 백신 조성물은 부형제로서 5% 글루코스에 현탁되는 것인 백신 조성물.

청구항 36

제1항 내지 제18항, 또는 제30항 내지 제33항 중 어느 하나의 항에 있어서, NOMV는 1 이상의 보조제와 조합되는

것인 백신 조성물.

청구항 37

제1항 내지 제18항, 또는 제30항 내지 제33항 중 어느 하나의 항에 있어서, 유전자 변형된 균주는 철 흡수 단백질을 발현하도록 변형되는 것인 백신 조성물.

청구항 38

다양한 천연 외막 소포체(NOMV)를 포함하는 수막구균성 질환에 대한 백신으로서, NOMV의 적어도 일부는 리포올리고사카라이드(LOS)의 발현 또는 시알틸화가 실질적으로 없고, 펜타아실 구조를 갖는 지질 A를 포함하는 LOS를 함유하며, 1 이상의 소수의 보존성 외막 단백질을 증가된 발현 수준으로 함유하고, 이때 소수의 보존성 외막 단백질은 살균성 항체를 유도하는 단백질에서 선택되는 것인 백신.

청구항 39

제38항에 있어서, 소수의 보존성 외막 단백질은 NadA, 인자 H 결합 단백질(FHBP) 변이체 1 및 FHBP 변이체 2로 이루어진 군에서 선택되는 것인 백신.

청구항 40

제38항에 있어서, NOMV의 적어도 일부는 락토-N-네오테트라오스(LNnT) 테트라사카라이드가 실질적으로 없는 단축형 또는 절단형 LOS를 포함하는 것인 백신.

청구항 41

제38항에 있어서, NOMV의 적어도 일부는 2 이상의 상이한 PorA 단백질을 포함하는 것인 백신.

청구항 42

제43항에 있어서, 적어도 2 이상의 상이한 PorA 단백질은 엔.메닌지티디스 서브그룹 B 균주 중 가장 우세한 균주에서 선택되는 것인 백신.

청구항 43

동물 또는 인간에서 수막구균성 질환에 대한 면역 반응을 유도하는 방법으로서, 수막구균성 질환에 대한 면역화를 위해 제1항 내지 제18항, 또는 제30항 내지 제33항 중 어느 하나의 항에 따른 조성물을 동물 또는 인간에게 투여하는 것을 포함하는 유도 방법.

청구항 44

제43항에 있어서, 백신은 그룹 B 수막구균성 질환에 대한 면역화를 위해 사용되는 것인 유도 방법.

청구항 45

수막구균성 질환에 대한 백신에서 사용하기 위한 엔.메닌지티디스의 유전자 변형된 균주를 제조하는 방법으로서,

- 유전자 변형될 수 있는 수막구균 B형의 균주를 선택하는 단계;
- synX* 유전자를 불활성화시켜 균주를 유전자 변형시키는 단계;
- lpxL1* 유전자를 불활성화시켜 균주를 유전자 변형시키는 단계;
- lgtA* 유전자를 불활성화시켜 균주를 유전자 변형시키는 단계; 및
- 1 이상의 소수의 보존성 외막 단백질의 발현을 증가시켜 균주를 유전자 변형시키는 단계를 포함하는 제조 방법.

청구항 46

제45항에 있어서, *opa* 유전자의 오픈 리딩 프레임에 1 이상의 제2의 항원적으로 상이한 *porA* 유전자를 삽입시켜

균주를 유전자 변형시키는 단계를 더 포함하는 것인 제조 방법.

청구항 47

제45항 또는 제46항에 있어서, 1 이상의 외막 단백질의 오픈 리딩 프레임 또는 프로모터 내 폴리-C 서열을 G 및 C 뉴클레오티드를 포함하는 서열로 교체하여 1 이상의 외막 단백질이 안정되게 발현되거나 또는 과발현되도록 균주를 유전자 변형시키는 단계를 더 포함하는 것인 제조 방법.

청구항 48

수막구균성 질환에 대한 백신을 제조하는 방법으로서,

a) 하기 i) 내지 vi)으로 이루어진 군에서 선택된 1 이상의 변형을 포함하는 엔.메닝지티디스의 유전자 변형된 균주를 배양하는 단계:

i) *synX* 유전자의 불활성화,

ii) *lpxL1* 유전자의 불활성화,

iii) *lgtA* 유전자의 불활성화,

iv) *opa* 유전자 대신 1 이상의 제2의 항원적으로 상이한 *porA* 유전자의 삽입,

v) 1 이상의 소수의 보존성 외막 단백질의 증가되거나 또는 안정된 발현,

vi) 1 이상의 외막 단백질의 안정된 발현;

b) 발효배양기 내 배지에 접종을 위해 a) 단계의 배양 균주를 이용하여 발효를 통해 배양물을 확장시키는 단계;

c) 발효된 배양물을 불활성화시키는 단계;

d) 연속 흐름 원심분리를 통해 엔.메닝지티디스의 배양 세포를 회수하고 세포 페이스트를 수집하는 단계;

e) 세포 페이스트로부터 NOMV를 분리하는 단계; 및

f) 백신 투여에 적절한 완충액 또는 담체에 NOMV를 재현탁시키는 단계;

를 포함하는 제조 방법.

명세서

기술분야

[0001] 관련 출원에 대한 교차 참조

[0002] 본 출원은 "수막구균성 다가 천연 외막 소포체 백신"의 명칭으로 2008년 5월 30일에 출원된 미국 가출원 제 61/057,462호를 우선권으로 주장한다. 상기 출원의 전체 개시 내용을 전체로 참조하여 본원에 포함시킨다.

[0003] 연방정부 지원 연구 또는 개발

[0004] 미국 정부는 본 발명의 권리를 갖는다.

배경기술

[0005] 네이세리아 메닝지티디스(*Neisseria meningitidis*)는 전세계적으로 수막염 및 패혈증의 주요 원인이다. 수막구균성 수막염은 뇌 및 척수 내막인 뇌척수막의 염증이다. 수막구균성 패혈증 및 수막구균성 수막염 둘 모두에서, 비제어적인 국소 또는 전신 숙주 염증 반응으로 인한 손상이 일어난다. 그룹 B 수막구균성 질환은 현재 북미 및 남미, 그리고 유럽을 포함한 많은 국가에서 모든 수막구균성 질환의 절반 이상을 차지한다. ET5로 알려진, 그룹 B 네이세리아 메닝지티디스의 신규한 병독성 클론이 70년대 후반 노르웨이에서 출현한 이래로 노르웨이, 쿠바, 브라질 및 칠레에서 지속적인 유행병의 원인이 되고 있다. 이러한 유행병은 심각한 공중 보건 문제를 야기하였고 몇몇 영향 국가들은 유효한 그룹 B 백신을 개발하고자 집중적인 노력을 기울여 왔다. 18개월 이하의 어린이에서 A 및 C 캡슐 폴리사카라이드 백신의 불충분한 효능이외에도 미국에서 승인된 그룹 B 백신의 부재는 수막구

균성 질환에 대한 정기적인 아동 백신접종의 진지한 고려를 막고 있다.

[0006] 네이세리아 메닌지티디스는 13종의 혈청형으로 나뉘며, 그중 9종은 침습성 질환을 일으킨다(A, B, C (C1, C1-), X, Y, W-135, Z 및 L). 많은 백신 연구의 표적이 되고 있는 혈청형 A, B, C, Y 및 W135를 포함한, 5 혈청형은 유행병을 일으키는 그 능력 때문에 백신 개발의 표적이 되고 있다.

[0007] 거의 모든 침습성 수막구균성 질환을 일으키는 네이세리아 메닌지티디스의 혈청형 A, C, Y 및 W135에 대한 백신이 이용가능하고, 탁월한 결과로서 통상 이용되고 있다. 네이세리아 메닌지티디스의 그룹 B 균주에 대해 적절한 백신은 다양한 이유로 인해 개발이 보다 어렵다. 예를 들어, 혈청형을 규정하는 캡슐 폴리사카라이드는 일정 인간 세포, 특히 혈액 세포 상에서 발견되는 폴리시알산과 동일한 구조를 갖기 때문에 백신으로 사용하기에는 비효율적이고 불안정할 가능성이 있다.

[0008] 적절한 백신 결여의 이유에는 표면 노출된 서브캡슐 항원, 예컨대 외막 단백질 및 리포올리고사카라이드(내독소)가 항원적으로 가변적이고/이거나 그룹 B 균주 내에서도 일관성없이 발현된다는 점이 또한 추가된다. 단독으로 효과적인 백신에 필수적인 모든 특징을 갖는 단일 항원이 동정된 적이 없다.

발명의 내용

[0009] 일 측면에서, 본 발명의 기술은 광범위한 보호성을 제공하도록 유전자 변형시킨 2 이상의 수막구균성 균주에서 획득된 천연 외막 소포체(NOMV)를 포함하는 백신을 제공한다. 천연 외막 소포체는 PorA, LOS 및 보존된 외막 단백질을 기반으로 3종의 다른 항원 세트를 포함하며; 유전자 변형된 균주는 *lpxL1*, *synX* 및 *lgtA*의 불활성화를 근간으로 강화된 안정성을 제공하도록 변형되었다. 2종의 수막구균성 균주는 상이한 LOS 코어 구조를 갖는 LOS를 발현할 수 있고 글루코스 및 갈락토스로 구성된 알파 사슬을 가질 수 있다. 각 균주는 B 그룹 사례 단리물 중에서 가장 우세한 PorA 아형을 기초로 선택된 2 종 이상의 상이한 PorA 아형 단백질 또는 아형 에피토프를 발현할 수 있다. 또한, 백신은 살균성 항체를 유도하는 검증된 능력을 가지며, 각각의 균주에서 과발현되고, FHBP(GNA1870) 변이체 1, FHBP 변이체 2, 및 FHBP 변이체 3; NadA; App; NspA; TbpA 및 TbpB로 이루어진 군에서 선택되는, 상이한 보존성 표면 단백질을 더 포함할 수 있다.

[0010] 추가 측면에서, 본 발명의 기술은 3종의 유전자 변형되고, 항원적으로 다양한 네이세리아 메닌지티디스 균주에서 유래된 NOMV의 조합물을 제공한다. 균주들 중 1 이상은 하기 (1), (2) 및/또는 (3)에서 선택된다: (1) 다음의 유전자 변형 또는 특징을 갖는 H44/76 HOPS-DL: 유전자 *synX*, *lpxL1* 및 *lgtA*의 불활성화; *opaD* 대신 제2 *porA* 유전자(아형 P1.7-1,1)의 삽입; NadA의 증가된 발현; 및 *Opc* 및 *PorA*의 안정된 고발현; (2) 다음의 유전자 변형 또는 특징을 갖는 8570 HOPS-G₂L: 유전자 *synX*, *lpxL1* 및 *lgtA*의 불활성화; *opaD* 대신 제2 *porA* 유전자의 삽입; 인자 H 결합 단백질 변이체 1의 증가된 발현; 및 *PorA* 및 *Opc*의 안정된 고발현; 및/또는 (3) 다음의 유전자 변형 또는 특징을 갖는 B16B6 HPS-G₂A: 유전자 *synX*, *lpxL1* 및 *lgtA*의 불활성화; *opaD* 대신 제2 *porA* 유전자의 삽입; 인자 H 결합 단백질 변이체 2의 증가된 발현; 및 *PorA* 및 *Opc*의 안정된 고발현. NOMV는 세제 또는 변성 용매에 노출없이 포장된 세포 또는 사용된 배양 배지로부터 제조된다. 백신은 1 이상의 보조제와 조합될 수 있고 근육 내 및/또는 비내 투여될 수 있다.

[0011] 다른 측면에서, 본 발명의 기술은 네이세리아 메닌지티디스의 1 이상의 유전자 변형된 균주에서 유래하는 천연 외막 소포체(NOMV)를 포함하는, 수막구균성 질환, 보다 바람직하게는 그룹 B 수막구균성 질환에 대한 백신 조성물을 제공한다. 1 이상의 유전자 변형된 균주는 *synX* 유전자의 불활성화, *lpxL1* 유전자의 불활성화, 각 균주에서 락토-N-네오테트라오스 테트라사카라이드가 결여된 단축형 또는 절단형 리포올리고사카라이드(LOS)가 생성되는 *lgtA* 유전자의 불활성화, 및/또는 *opa* 유전자 대신 1 이상의 제2의 항원적으로 상이한 *porA* 유전자의 삽입을 통해 변형된다. 다른 측면에서, 유전자 변형된 균주는 1 이상의 소수의 보존성 외막 단백질의 증가되거나 안정된 발현, 및/또는 1 이상의 외막 단백질의 안정된 발현을 더 포함한다. 1 이상의 제2의 항원적으로 상이한 제2 *porA* 유전자는 메닌지티디스 그룹 B 단리물 중 가장 우세한 PorA 아형에서 선택되는 1 이상의 PorA 아형 단백질 또는 아형 에피토프를 발현할 수 있다.

[0012] 또 다른 측면에서, 본 발명의 기술은 네이세리아 메닌지티디스 아형 B 균주의 유전자 변형된 백신 균주를 제공한다. 유전자 변형된 백신 균주는 H44/76 HOPS-D 균주(B1), 8570 HOS-G1 균주(B2) 및/또는 B16B6 HPS-G₂A 균주(B3)를 포함할 수 있다.

[0013] 또 다른 측면에서, 본 발명의 기술은 i) *synX* 유전자의 불활성화, ii) *lpxL1* 유전자의 불활성화, iii) *lgtA* 유전자의 불활성화, iv) *opaD* 유전자 대신 제2 *porA* 유전자의 삽입, v) 천연 균주와 비교하여 NadA의 증가된 발현,

및 vi) Opc 및 PorA 단백질의 안정되고 증가된 발현의 유전자 변형을 포함하는 H44/76 균주에서 유래된 네이세리아 메닌지티디스 아형 B의 유전자 변형된 백신 균주를 제공한다. 일부 측면에서, 상기 유전자 변형된 균주는 ET-5 야생형 균주 H44/76(B:15: P1.7,16: L,3,7:P5.5,C)에서 유래된 것이다.

[0014] 또 다른 측면에서, 본 발명의 기술은 i) *synX* 유전자의 불활성화, ii) *lpxL1* 유전자의 불활성화, iii) *IgtA* 유전자의 불활성화, iv) *opaD* 유전자 대신 제2 *porA* 유전자의 삽입, v) 인자 H 결합 단백질 변이체 1의 증가된 발현; 및 vi) PorA 및 Opc 단백질의 안정되고 증가된 발현의 유전자 변형을 포함하는 8570에서 유래된 네이세리아 메닌지티디스 아형 B 균주의 유전자 변형된 백신 균주를 제공한다. 일부 측면에서, 상기 유전자 변형된 균주는 ET-5 야생형 균주 8570(B:4:P1.19,15: L3,7v: P5.5,11,C)에서 유래된 것이다.

[0015] 또 다른 측면에서, 본 발명의 기술은 i) *synX* 유전자의 불활성화, ii) *lpxL1* 유전자의 불활성화, iii) *IgtA* 유전자의 불활성화, iv) *opaD* 유전자 대신 제2 *porA* 유전자(아형 P1.22-1,4)의 삽입, v) 인자 H 결합 단백질 변이체 2의 증가된 발현; 및 vi) PorA 및 Opc 단백질의 안정되고 증가된 발현의 유전자 변형을 포함하는 B16B6에서 유래된 네이세리아 메닌지티디스 아형 B의 유전자 변형된 백신 균주를 제공한다. 일부 측면에서, 상기 유전자 변형된 균주는 ET-5 야생형 균주 B16B6 (B:2a:P1.5,2:L2:P5.1,2,5)에서 유래된 것이다.

[0016] 일부 측면에서, 본 발명의 기술은 철 결핍 배지에서 성장시킨 유전자 변형된 균주를 제공한다.

[0017] 다른 측면에서, 본 발명의 기술은 유전자 변형된 균주를 제공하고, 여기서 *synX* 유전자, *lpxL1* 유전자, 또는 *IgtA* 유전자의 불활성화는 불활성화되는 유전자 서열 내에 약물 내성 유전자를 삽입시키는 것에 의한다.

[0018] 또 다른 측면은 본 발명의 기술의 유전자 변형된 균주에서 유래하는 NOMV를 포함하는 백신을 제공한다. NOMV는 포장된 세포 또는 사용된 배양 배지로부터 세제 또는 변성 용매에 노출없이 제조된다. 백신은 1 이상의 보조제를 더 포함할 수 있다. 추가 측면에서, 유전자 변형된 균주는 철 흡수 단백질을 발현하도록 변형된다.

[0019] 추가 측면에서, 본 발명의 기술은 다양한 외막 소포체(NOMV)를 포함하는 수막구균성 질환에 대한 백신을 제공하고, 여기서 NOMV의 적어도 일부는 리포올리고사카라이드(LOS)의 발현 또는 시알틸화가 실질적으로 없고, 펜타아실 구조를 갖는 지질 A를 포함하는 LOS를 함유하고, 1 이상의 소수의 보존성 외막 단백질의 발현 수준 증가를 포함하며, 이때 소수의 보존성 외막 단백질은 살균 항체를 유도하는 단백질에서 선택된다. 소수의 보존성 외막 단백질은 NadA, 인자 H 결합 단백질(FHBP) 변이체 1, 및 FHBP 변이체 2로 이루어진 군에서 선택될 수 있다. 다른 측면에서, NOMV의 적어도 일부는 락토-N-네오테트라오스(LNnT) 테트라사카라이드가 실질적으로 없는 단축형 또는 절단형 LOS를 포함하고/하거나 NOMV의 적어도 일부는 2 이상의 상이한 PorA 단백질을 포함한다.

[0020] 다른 측면에서, 본 발명의 기술은 동물 또는 인간에서 수막구균성 질환에 대한 면역 반응을 유도시키는 방법을 제공하고, 이 방법은 엔.메닌지티디스의 1 이상의 유전자 변형된 균주에서 유래된 NOMV를 함유하는 조성물을 수막구균성 질환에 대한 면역화를 위해 동물 또는 인간에게 투여하는 것을 포함한다. 상기 백신은 그룹 B 수막구균성 질환에 대한 면역화를 위해 사용된다.

[0021] 추가 측면에서, 본 발명의 기술은 수막구균성 질환에 대한 백신에 사용하기 위한 엔.메닌지티디스의 유전자 변형된 균주를 제조하는 방법을 제공하고, 이 방법은 a) 유전자 변형할 수 있는 수막구균 B형 균주를 선택하는 단계; b) *synX* 유전자를 불활성화시켜 균주를 유전자 변형시키는 단계; c) *lpxL1* 유전자를 불활성화시켜 균주를 유전자 변형시키는 단계, d) *IgtA* 유전자를 불활성화시켜 균주를 유전자 변형시키는 단계, 및 e) 1 이상의 소수의 보존성 외막 단백질의 발현을 증가시켜 균주를 유전자 변형시키는 단계를 포함한다. 추가 측면에서, 상기 방법은 *opa* 유전자의 오픈 리딩 프레임에 1 이상의 제2의 항원적으로 상이한 *portA* 유전자를 삽입시켜 균주를 유전자 변형시키는 단계를 더 포함한다. 다른 측면에서, 상기 방법은 G 및 C 뉴클레오티드를 함유하는 서열로 1 이상의 외막 단백질의 오픈 리딩 프레임 또는 프로모터 내 폴리-C 서열을 교체하여 1 이상의 외막 단백질을 안정하게 발현시키거나 또는 과발현시키도록 균주를 유전자 변형시키는 단계를 더 포함한다.

[0022] 또 다른 측면에서, 본 발명의 기술은 수막구균성 질환에 대한 백신을 제조하는 방법을 제공하고, 이 방법은 a) *synX* 유전자의 불활성화, *lpxL1* 유전자의 불활성화, *IgtA* 유전자의 불활성화, *opa* 유전자 대신 1 이상의 제2의 항원적으로 상이한 *porA* 유전자의 삽입, 1 이상의 소수의 보존성 외막 단백질의 증가되거나 또는 안정된 발현, 및/또는 1 이상의 외막 단백질의 안정된 발현에서 선택된 1 이상의 변형을 포함하는 엔.메닌지티디스의 유전자 변형 균주를 배양하는 단계; b) 발효배양기 내 배지 점종을 위해 a) 단계의 배양 균주를 이용해서 발효를 통해 배양물을 확장시키는 단계; c) 발효된 배양물을 불활성화시키는 단계; d) 연속 흐름 원심분리를 통해 엔.메닌지티디스 배양 세포를 회수하고 세포 페이스트를 수집하는 단계; e) 세포 페이스트로부터 NOMV를 분리하는 단계; 및 f) 백신 투여에 적절한 완충액 또는 담체에 NOMV를 재현탁하는 단계를 포함한다.

도면의 간단한 설명

[0023]

도 1은 백신 생산을 위해 유전자 변형된 네이세리아 균주에 대한 세포의 마스터 세포 은행을 제조하는 과정을 도시한 흐름도이다.

도 2는 백신 생산을 위해 네이세리아의 유전자 변형된 균주를 제조하는데 사용되는 세포 은행 조제물을 생산하는 과정을 도시한 흐름도이다.

도 3은 백신 생산을 위해 네이세리아의 유전자 변형된 균주를 제조하는데 사용되는 네이세리아의 발효 과정을 도시한 흐름도이다.

도 4는 백신 생산을 위해 유전자 변형시킨 네이세리아 균주로부터 NOMV를 정제하는 과정을 도시한 흐름도이다.

도 5는 도 4의 흐름도의 연속 부분이다.

도 6은 표준 마커(레인 1), 대조군 8570 HOPS-G NOMV 조제물(레인 2), 여과된 대량 백신(레인 3) 및 최종 생산 백신(레인 4)의 단백질 함량을 보여주는 쿠마시 블루 염색된 겔 도면이다.

도 7은 백신의 리포올리고사카라이드 함량을 보여주는 은 염색된 겔 도면이다. 레인 1은 대조군 ML5 LPS이고, 레인 2는 여과된 대량 백신이며 레인 3은 최종 백신 산물이다. 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 백신의 1:2 희석물 중 15 μl 를 겔 상에서 러닝시켰다(대조군의 1:2 희석물 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 중 20 μl).

도 8은 8570 HOPS-G NOMV 백신에서 발견된 단백질의 정체 및 조성을 보여주는 항체 염색된 웨스턴 블랏 도면이다.

도 9는 다양한 농도의 백신과 항온반응시킨 후 인간 혈액에서 방출된 TNF- α 의 방출량을 보여주는 그래프이다.

도 10은 상이한 농도의 유전자 변형된 NOMV 백신과 항온반응시킨 후 인간 혈액으로부터 IL-6 방출을 보여주는 그래프이다.

도 11은 균주 44/76에서 유래된 DOC-추출된 OMV와 비교한, 다양한 농도의 유전자 변형된 백신과 항온반응시킨 후 인간 혈액에서 방출되는 TNF- α 를 보여주는 그래프이다.

도 12는 보조제와 함께 또는 없이 상이한 농도의 8570 HOPS-G 백신으로 백신접종한 마우스의 살균성 역가를 보여주는 막대 그래프이다.

도 13은 상이한 시험 균주에 대해 8570 HOPS-G 백신으로 백신접종한 마우스의 살균성 역가를 보여주는 막대 그래프이다.

도 14는 LOS, GNA 1870, NOMV 및 Opc 항원에 대한 살균성 항체 격감 분석 결과를 도시한 그래프이다.

도 15는 보조제와 함께 및 보조제 없이 8570 HOPS-G NOMV 백신으로 백신접종된 토끼의 항체 반응을 도시한 도면이다.

도 16은 8570 HOPS-G1 NOMV 백신에 대한 살균성 격감 분석 결과를 도시한 그래프이다.

도 17은 8570 HOPS-G1 PorA 닉아웃 균주에 대한 FHBP 및 LOS 항원에 대한 살균성 격감 분석 결과를 도시한 그래프이다.

도 18은 본 발명에 따른 네이세리아의 3종의 유전자 변형된 균주(A=B1, B=B2, 및 C=B3)의 표현형을 나타낸 도면이다.

도 19는 네이세리아의 유전자 변형된 균주를 제작하기 위해 사용된 플라스미드를 나타낸 도면이다: a) *IgtA* 닉아웃을 위해 제작된 플라스미드, b) 제2 PorA 발현을 위한 플라스미드, c) 오르쏘고날(이.콜라이인 경우 Ptac) 프로모터에 의해 구동되는 fHbp 과발현을 위한 플라스미드, d) 상동성 프로모터(엔.메닌지티디스의 PorA 프로모터)에 의해 구동되는 NadA 과발현을 위한 프로모터, 및 e) *NspA* 유전자를 교체하는 상동성 재조합을 통해 fHbp (변이체 1 및 2) 및 NadA 과발현 플라스미드로 엔.메닌지티디스를 형질전환시키는 개략도.

도 20a는 3종의 유전자 변형된 균주의 *IgtA* 유전자의 닉아웃을 통해 NOMV 백신의 절단형 LOS 면역형을 안정화시키는 것을 도시한 도면이다. 도 20b는 L3, 7,9(좌) 및 L8(우)에 대한 단일클론 항체를 이용하여 유전자 변형된 균주 B2 및 모균주(B16B6)에 의한 LOS 알파 사슬의 발현을 면역블랏팅한 도면이다.

도 21은 유전자 변형된 균주 B3에서 fHbp 변이체 2의 발현을 보여주는 대표 도면이다. 도 21a)는 면역블랏팅을 통해 과발현된 fHbp를 함유하는 젠타마이신 내성 재조합체를 포함한 균주의 선별을 보여주는 도면이고 도 21b)는 fHVP의 증가된 발현을 보여주는 fHpb에 대한 JAR4 단일클론 항체를 이용한 웨스턴 블랏이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0024] 본 발명의 기술은 수막구균성 질환, 보다 바람직하게는 네이세리아 메닝지티디스(*Neisseria meningitidis*) 서브 그룹 B형에 대한 면역화에 사용하기 위한 광범위한 보호성 백신 조성물을 제공한다. 본 발명의 기술의 일 구체예는 1 이상, 바람직하게는 2 이상, 보다 바람직하게는 3 이상의 네이세리아 메닝지티디스의 유전자 변형된 균주에서 유래된 천연 외막 소포체(NOMV)를 포함하는 백신을 제공한다. 수포(bleb)라고도 알려진, 천연 외막 소포체는 성장 동안 천연적으로 발생하는 그람 음성 박테리아의 외막 단편으로 형성되거나 또는 이로부터 유래된 소포체이고 세제 또는 변성 용매를 사용하지 않는 가벼운 방법을 통해 세포 또는 배양 배지로부터 획득할 수 있다. 이러한 NOMV는 대체로, 외막 단백질(OMP), 지질, 인지질, 주변세포질 물질 및 리포올리고사카라이드를 포함하는 리포폴리사카라이드(LPS)를 포함한다. 그람 음성 박테리아, 특히 엔. 메닝지티디스 등과 같은 병원체는 흔히 수포화라고 알려진 과정으로 병독성 감염 동안 NOMV를 발산한다. 본 발명의 기술에서, NOMV는 화학 변성 과정을 사용하지 않고 박테리아의 외막으로부터 생성되는 소포체이고, 항원적으로 다양하며 안전성, 항원 안정성 및 보호 면역 반응의 범위가 향상되도록 각각 유전자 변형된 유전자 변형 균주에서 생성된다.
- [0025] 본 발명의 일 구체예는 엔.메닝지티디스의 적어도 2 이상의 유전자 변형된 균주, 바람직하게는 3 이상의 상이한 유전자 변형된 균주에서 유래된 천연 외막 소포체(NOMV)를 포함하는 백신 조성물을 제공한다.
- [0026] 본 발명의 일부 구체예는 엔.메닝지티디스의 항원적으로 다양한 균주, 바람직하게는 박테리아의 계통 내에 3 이상의 유전자 변형, 보다 바람직하게는 5 이상의 유전자 변형, 보다 적절하게는 6 이상의 유전자 변형을 포함하는 아형 B의 항원적으로 다양한 균주를 제공한다. 유전자 변형은 다음의 1), 2), 3), 4), 5) 및/또는 6) 중 1 이상을 포함할 수 있다: 1) 시알산 생합성에 필수적이고, 리포올리고사카라이드(LOS)의 발현 또는 시알릴화가 일어나지 않게 하는, *synX* 유전자의 불활성화; 2) 펜타-아실 구조를 갖는 지질 A를 갖는 유의하게 덜 독성인 LOS를 생성시키게 되는 *lpxL1* 유전자의 불활성화; 3) *opa* 유전자들 중 하나(*OpaC* 또는 *OpaD*) 대신 제2의, 항원적으로 상이한 *porA* 유전자의 삽입; 4) 살균성 항체를 유도하는 능력이 검증된, 1 이상의 소수의 보존성 외막 단백질의 증가된 발현(예를 들어, 이에 제한되는 것은 아니고, NadA, 인자 H 결합 단백질(FHBP) 변이체 1, 및 FHBP 변이체 2); 5) 락토-N-네오테트라오스(LNnT) 테트라사카라이드가 결합된 단축형 또는 절단형 LOS가 발현되게 하는 각 균주에서의 *IgtA* 유전자의 불활성화; 및/또는 6) 야생형 균주에서 상변이에 감수성인 예컨대 *Opc* 및 *PorA* 등의 일정 외막 단백질의 안정된 발현.
- [0027] 본 발명은 수막구균성 질환에 대한 증가된 보호 항체 반응 범위 및 증가된 사용 안전성을 제공하는 유전자 변형된 균주를 제공한다. 일 구체예에서, 유전자 변형된 균주는 박테리아 계통에 하기 돌연변이 중 1 이상을 도입하여 증가된 안전성을 제공한다: 캡시드의 시알산 합성을 차단하고 캡슐-음성 표현형 NOMV가 형성되게 하는 *synX* 유전자의 결실, 펜타-아실 지질 A 구조를 생성시켜 내독소 활성이 감소되게 하는 *lpxL1* 유전자의 결실, 및/또는 절단형 LOS 구조를 안정화시키는 리포올리고사카라이드(LOS)에 대해 락토-N-네오테트라오스 생합성이 차단되게 하는 *IgtA* 유전자의 결실; 보다 바람직하게 유전자 변형된 균주는 이들 돌연변이 중 2가지를 제공하고, 가장 바람직하게는 유전자 변형된 균주는 이들 돌연변이 중 3가지 모두를 제공한다. 본 발명의 다른 구체예에서, 유전자 변형된 균주는 NOMV 내에 포함된 가능한 보호성 항원의 3 세트 중 1 이상을 표적화하여 보호 항체 반응의 범위를 증가시킨다. 표적화되는 3종의 가능한 항원은 *PorA* 단백질, 1 이상의 보존성 소수 단백질, 및/또는 LOS 코어 구조 중 1 이상, 및 임의의 이의 조합을 포함한다. 보다 바람직한 구체예에서, 유전자 변형된 균주는 가능한 보호성 항원 중 2 이상을 표적으로 하고, 가장 바람직하게는 가능한 보호성 항원 중 3 모두를 표적으로 한다.
- [0028] 본 발명의 일부 구체예에서, *synX*-돌연변이(*synX* 유전자의 불활성화)는 미국 특허 6,558,677호에 기술된 방법에 따라 유전자 변형된 균주에 삽입되며, 상기 문헌은 전체로 참조하여 본원에 포함시킨다. 간략하게, 요약하면, 200 bp 서열을 카나마이신 내성 유전자로 교체한 *synX* 유전자를 포함하는 pUC19-기반 플라스미드를 사용하여 유전자 변형된 균주를 형질전환시켰다. Kan 내성 형질전환체를 선별하고 PCR을 통해 파괴된 *synX* 유전자의 존재 및 캡슐 음성 표현형을 조사하였다. 이러한 *synX*-돌연변이체는 *synX* 유전자에 트랜스포존 삽입이 캡슐 음성 표현형을 일으킨다는 것을 보여준 Swartley 및 Stephens(Swartley and Stephens (1994) *J. Bacteriol.* 176: 1530-1534)의 보고 결과 및 서열 정보를 기초로 제작하였다. 동일하거나 또는 균등한 돌연변이를 임의의 형질전환가능한 엔.메닝지티디스 균주에 도입시킬 수 있다. 수막구균을 형질전환시키는데 사용하기 적절한 플라스미드는 하기 과정을 이용해 제작하였다. 중첩 확장(SOE) 중합효소 연쇄 반응(PCR)을 통한 스플라이싱을 이용하여 3

종의 DNA 서열을 함께 관통시켰다(Horton et al. (1989) 유전자 77: 61-65). 3종의 DNA 서열은, 순서대로 5' 말단에서 시작하여, synXB 염기 67 내지 681; pUC4K(Pharmacia LKB Biotech Co.)에서 유래한 카나마이신 내성 유전자 671 내지 1623; 및 synXB 염기 886 내지 1589를 포함한다. 또한, 5' 말단에, 추정되는 흡수 서열, ACCGCTGAA가, synXB 67 내지 691 염기 서열을 증폭시키기 위해 사용된 PCR 프라이머의 말단에 포함되어 부가되었다. 완전한 구성체는 PCR을 통해 증폭, 정제되어 pUC19에 블린트 결합되었다. pUC19를 사용해서 에스케리치아 콜라이(*Escherichia coli*) DH5 α 를 형질전환시키고, 50 μ g 카나마이신이 포함된 LB 한천배지에서 선별하였다. 카나마이신 내성 콜로니를 선별하고, DNA를 추출, 정제한 후, XbaI로 절단하였다. 추정 흡수 서열의 다른 카피를 다수 클로닝 영역 부위에 결합시키고 얻어진 플라스미드를 다시 사용하여 이.콜라이 DH5 α 를 형질전환시키고, 카나마이신 내성 콜로니를 추가의 흡수 서열 존재에 대해 스크리닝하였다. 플라스미드 DNA를 선별된 콜로니로부터 단리하고 엔.메닌지티디스에 도입되서는 안되는 암피실린 내성 유전자를 제외한 플라스미드의 삽입부만을 증폭시키는 프라이머를 이용한 PCR의 주형으로 사용하였다. 다음으로 증폭된 DNA를 정제하고 유전자 변형된 엔.메닌지티디스 균주를 형질전환시키는데 사용하였다. 엔.메닌지티디스의 synX(-) 돌연변이체는 카나마이신 내성으로 선별하였고 변형된 영역의 PCR 증폭을 통해 확인하였다.

[0029] 본 발명의 일부 구체예에서, 백신 조성물 내 NOMV 상에서 내독소 LOS 발현이 감소되도록 유전자 변형된 균주에서 *lpxL1* 유전자를 불활성화시켰다. 엔.메닌지티디스 LOS의 지질 A는 정상적으로는 핵사-아실 구조이며 LOS의 내독소 특성을 책임진다. 지질 A에 존재하는 2 아실-옥시-아실 연결된 2차 지방산이 내독소 활성화에 중요하다. 유전자 조작된 균주는 van der Ley 및 그의 공동연구자(van der Ley, P., Steeghs, L., Hamstra, H.J., van Hove, J., Zomer, B., and van Alphen, L. Modification of lipid A biosynthesis in *Neisseria meningitidis* *lpxL* mutants: influence on lipopolysaccharide structure, toxicity, and adjuvant activity. *Infection and Immunity* 69(10), 5981-5990, 2001.)가 기술한 바와 같이 *lpxL1* 돌연변이체를 포함한다. *lpxL1* 유전자의 결실은 전혈 유래의 인간 단핵구를 이용한 사이토카인 방출 분석 및 토끼 발열원 검사 둘 모두로 확인시 상당히 내독성이 감소된 정상 수준의 펜타-아실 LOS가 발현되게 하였다. *lpxL1* 유전자를 파괴하는 다른 방법은 유전자 변형된 균주를 개발하는데서 사용하기 위한 본 발명의 추가 구체예에서 고려한다.

[0030] 일부 구체예에서, 유전자 변형된 균주는 *opa* 유전자 (*OpaC* 또는 *OpaD*) 중 하나 대신 제2의, 항원적으로 상이한 *porA* 유전자의 삽입을 포함한다. 네이세리아 메닌지티디스의 주요 외막 단백질, 포린 A 또는 PorA는 *porA* 유전자의 산물이다. PorA는 다양한 항원성 변이를 가지며 면역 선택적 압력을 피하도록 상변이를 겪는다; 따라서 다른 아형에 대해 항상 교차 보호적이지 않다. 상이한 PorA 아형에 대해 백신 조성물의 반응성을 증가시키기 위해, 1 이상의 추가적인 *porA* 유전자를 유전자 변형된 균주의 *opaC* 또는 *opaD* 유전자에 삽입시킨다. 삽입을 위해 선택된 PorA 혈청형은 아형 B 수막구균성 질환 사례에서 발견된 가장 우세한 PorA 형태를 기초로 선택된다. 적절한 PorA 혈청형은, 이에 제한되는 것은 아니고, P1.7-1(균주 M1080 유래); P1.22,14(균주 M4410 유래); P1.22,1,4; 또는 현행 문헌, 예를 들어 [Sacchi et al., Diversity and prevalence of PorA 유형s in *Neisseria meningitidis* serogroup B in the United States, 1992-1998, *J Infect Dis.* 2000 Oct;182(4):1169-76]에 기술되거나 또는 당분야의 숙련가가 이해하는 적절한 다른 PorA 혈청형을 포함한다. 제2 PorA 유전자는 PorA 단백질의 발현을 제공하는 임의의 적절한 강력한 프로모터, 예를 들어 적절한 균주, 예를 들어 H44/76 균주 유래의 PorA 프로모터 제어 하에 존재할 수 있다. 유전자 변형된 균주에 *porA* 유전자를 클로닝하는 방법은 당분야의 숙련가에게 공지되어 있으며, 이에 제한되는 것은 아니고, 상동성 재조합을 포함할 수 있다. 예를 들어, *porA* 유전자를 박테리아 염색체 DNA로부터 PCR 증폭시키고 클로닝 벡터에 클로닝하고, 중첩 확장 PCR 기술의 별법을 통한 유전자 스플라이싱을 이용해서, 적절하게 제작된 플라스미드 예를 들어 pUC19에 재클로닝한다. 이렇게 제작된 플라스미드를 예컨대 *opa* 유전자를 교체하기 위해 상동성 재조합을 통해 박테리아 계놈에 도입시킬 수 있다. 형질전환체는 포린에 대한 단일클론 항체를 이용한 콜로닝 블랏팅을 통해 선별할 수 있다. 이러한 방법은 당분야의 숙련가에게 공지되어 있다.

[0031] 본 발명의 추가 구체예에서, 변형 균주는 1 이상의 소수의 외막 단백질의 발현이 안정하고/하거나 증가된다. 적절한 소수의 외막 단백질은 살균성 항체를 유도하는 능력이 검증되었다(예를 들어, 이에 제한되는 것은 아니고, NadA, 인자 H 결합 단백질 (FHBp) 변이체 1, 및 FHBp 변이체 2). 임의의 이론에 제한되지 않으면서, 보호성 항체를 유도하는 가능성을 갖는 것으로 계놈 분석을 통해 확인된 고도의 보존성 표면 노출된 소수 외막 단백질의 안정화 및/또는 증가된 발현은 교차 보호성 면역 반응의 증가를 야기할 수 있다. 적절한 보존성 소수 단백질은, 이에 제한되는 것은 아니고 NadA, FHBp 변이체 1 및 2, 및 Opc를 포함한다. 소수의 외막 단백질 (OMOP)의 안정화 및/또는 고발현 방법은 발현 플라스미드 및 상동성 재조합의 사용, 또는 당분야의 숙련가에게 공지된 다른 적절한 방법의 사용을 포함한다. 소수의 OMP는 강력한 프로모터, 예를 들어 이에 제한되는 것은 아

니고, 엔.메닌지티디스 PorA 프로모터 또는 IPTG-유도성 이.콜라이 ptac 프로모터 제어하에 존재할 수 있다.

[0032] 이하 실시예에서 기술하는 바와 같이, 제작된 플라스미드를 사용하여 유전자 변형된 균주에서 fHbp 1 및 fHbp 2의 증가된 발현을 확립할 수 있는데, 여기서 과발현된 단백질은 적절하게 프로세싱, 지질화되어, 외막 표면으로 이동하는 것으로 나타났다. 예를 들어, 균주 8570 HOPS-G (B2)에 IPTG-유도성 이.콜라이 Ptac 프로모터 제어하의 v.1의 발현은 모균주 8570 보다 약 4배 높았고, 균주 B16B2 HPS-G₂A(B3)에서 v.2의 발현은 모균주 B16B6 보다 32-64배 높았다(도 20 참조). 다르게, PorA 프로모터를 활용하는 발현 시스템은 소수의 보존성 단백질을 안정화/과발현시키는데 이용할 수 있었다.

[0033] 본 발명의 추가 구체예에서, 유전자 변형된 균주는 락토-N-네오테트라오스(LNnT) 테트라사카라이드가 결여된 단축형 또는 절단형 LOS가 발현되도록 하는 *lgtA* 유전자의 불활성화를 포함한다.

[0034] 수막구균 LOS의 중요한 특징은 상변이로서, 이는 *lgtA* 및 다른 네이세리아 유전자에서 뉴클레오티드 잔기의 동종중합 영역 내 고빈도 돌연변이로 인해 발생된다. 이러한 돌연변이는 LOS α 사슬의 어셈블리를 매개하는 *LgtA* 트랜스퍼라제의 발현을 개시 또는 종료시킨다(헵토스 2 상의 치환기의 입체구조 변경). 이러한 *lgtA* 유전자의 상변이 활성화는 LOS α 사슬의 원치않는 연장을 초래하여 인간 혈액 세포 항원과 구조적 유사성을 갖는 락토-N-네오테트라오스가 생성되게 한다. 본 발명의 유전자 변형된 균주는 항생제 마커 또는 다른 적절한 마커(유전자 변형을 스크리닝하기 위해 사용함), 예를 들어 이에 제한되지 않으나, 제오마이신 내성 유전자를 이용해 천연 유전자를 파괴시켜서 *lgtA* 유전자가 녹아들었다. *lgtA* 유전자를 녹아들여주는 방법은 당분야의 숙련자에게 공지되어 있고, 이에 제한되는 것은 아니나 구성체 플라스미드 및 상동성 재조합 또는 형질전환을 포함한다. 돌연변이된 Δ*lgtA* 유전자는 관찰한 22 이상의 계대 동안 모든 변형 균주에서 불활성이었고 이는 LOS 코어 구조의 안정된 절단형이었다. *lgtA* 유전자의 결실은 절단형 α-코어 LOS 구조를 안정화시키는데, 예를 들어 도 19에 도시한 바와 같은 절단형 코어 구조를 제공하며, 도 19에는 3종의 예시적인 변형 균주를 도시하였고, 예를 들어 B3 균주는 L3 코어 구조를 갖는 L8 알파 사슬을 포함한다. 본 발명의 유전자 변형된 균주는 면역 반응을 증가시킬 수 있는 안정된 코어 구조를 제공하는 면역형 L3, L5 및 L2에 상응하는 특정 LOS 코어 구조를 포함하며, 이하 실시예에서는 전체 길이 LOS를 발현하는 야생형 균주를 사멸시킬 수 있는 절단형 L8-유사 LOS(L8-3, L8-5 및 L8-2)를 검증하였다. Δ*lgtA* 균주는 인간 혈액 세포 상에서 발견되는 락토-N-네오테트라오스 올리고사카라이드와 교차 반응하지 않고, 절단형 및 전체길이형의 LOS 구조 둘 모두를 인식하는 항체를 유도시킬 수 있다.

[0035] 본 발명의 추가 구체예에서, 엔.메닌지티디스의 유전자 변형된 균주는 야생형 균주에서 상변이에 정상적으로 감수성인 외막 단백질, 이에 제한되는 것은 아니고, 예를 들어 Opc 및 PorA를 안정되게 발현한다. 이들 단백질의 발현은 당분야의 공지 방법으로 안정화시킬 수 있으며, 안정화시키려는 유전자의 리딩 프레임 내 또는 프로모터의 중합성 반복 서열을, 최대 발현을 이루는 최적 길이의 비반복 서열로 교체하는 방법을 포함한다. 예를 들어, 이들 유전자의 프로모터 내 폴리-C 또는 폴리-G 서열의 일부를 C 및 G 뉴클레오티드 둘 모두를 포함하는 동일 길이의 서열로 교체할 수 있는데, 예를 들어, *opcA* 프로모터의 12 bp 폴리-G 서열(서열 번호 1 참조)을 C 및 G 뉴클레오티드 둘 모두 및 Not I 부위를 포함하는 동일 길이의 새로운 서열(서열번호 2 참조, Not I 부위는 밑줄 표시함)로 교체하였다. 다른 적절한 구체예에서, PorA 프로모터의 폴리-G 서열(예를 들어, 서열번호 3 참조)은 C 및 G 뉴클레오티드 둘 모두를 포함하는 새로운 서열로 교체할 수 있다.

[0036] 본 발명의 추가 구체예는 철 흡수에 관여하는 단백질, 예를 들어, 트랜스페린 결합 단백질 A 및 B의 단백질 발현을 유도하기 위해 철을 낮은 수준으로 함유하는 액체 배지에서 백신 균주의 성장을 제공한다. 일부 구체예에서, 사용되는 배지는 철 킬레이터 예컨대 데스페룰의 특정 부가물을 포함하지 않는다. 적절한 배지 중 하나는 1% 카사미노산(certified, Difco Laboratories)으로 몇몇 개별 아미노산을 교체하여, BW Catlin(Catlin BW. (1973) *J. Infect. Dis.* 128: 178-194)에 공개된 것을 변형시킨 것이다. 이 배지는 리터 당: 0.4 g NH₄Cl, 0.168 g KCl, 5.85 g NaCl, 1.065 g Na₂HPO₄, 0.17 g KH₂PO₄, 0.647 g 시트르산나트륨, 6.25 g 락트산나트륨(60% 시럽), 0.037 g CaCl₂·2H₂O, 0.0013 g MnSO₄·H₂O, 5 g 글리세롤, 0.02 g 시스테인, 10 g 카사미노산, 0.616 g MgSO₄, 및 1 리터가 되는 증류수를 함유한다. 동일한 철 결핍 배지를 출발 플라스커 및 최종 배양 플라스크 또는 발효배양기에 사용하였다.

[0037] 서브그룹 B의 3 이상의 상이한 유전자 변형된 균주에서 유래된 NOMV를 포함하는 본 발명의 백신 조성물은 각각 가능하게 보호성 항체 반응을 유도하는 3가지 유형의 항원 또는 3가지 가능한 수준의 보호성을 제공할 수 있다. 3가지 유형의 항원은 PorA 단백질(6가지 상이한 PorA 아형이 백신에 존재, 3종의 백신 균주 각각에 대해 2종); 리포올리고사카라이드(3종의 상이한 LOS 코어 구조가 백신에 존재, 각 균주에 대해 1종); 및 백신 균주에서 파

발현되는 보존성 소수 단백질 NadA, FHBP 변이체 1 및 2, 및 Opc이다. PorA는 수백개의 상이한 서열 변이가 동정되어 비교적 높은 수준의 항원성 변이를 갖지만, 일부 PorA 혈청아형이 다른 것들보다 빈번하게 마주치게되고, 많지 않은 수의 상이한 혈청아형이 그룹 B 질환의 절반 이상에 대해 가능하게 보호할 수 있다. 항원의 표면 밀도가 낮을 경우, 그에 대한 항체는 보체 매개 용해 이벤트를 개시할 수 없는 것으로 확인되었기 때문에, 백신에 살균성 항체를 유도할 수 있는 1 이상의 항원이 존재하는 것이 중요하다. 그러나, 이러한 2 이상의 항원에 대한 항체가 존재할 경우 이들 항체는 함께 보체 매개 용해를 개시할 수 있다. 본 발명의 유전자 변형된 균주는 이에 제한되는 것은 아니고, B1(44/76 HOPS-D), B2(8570 HOPS-G1) 및 B3(B16B6 HPS-G2) 균주를 포함하며, 도 18에 도시한 바와 같은 3종의 균주를 포함한다.

[0038] 본 발명은 수막구균성 질환, 특히 네이세리아 메닌지티디스 서브그룹 B에 의해 발생하는 수막구균성 질환에 대해 광범위한 보호성을 제공하는 백신을 제공한다. 본 발명의 백신 조성물은 엔.메닌지티디스의 대부분의 병원체 혈청균에 대한 보호성을 제공하기 위해 현존하는 4가 A, C, Y, 및 W-135 백신과 조합될 수 있다. 임의의 특정 이론에 제한되지 않고, 본 발명의 백신은 또한 기초가 되는 서브캡슐 항원이 수막구균의 모든 혈청균에 걸쳐 공유되므로 수막구균의 소수 혈청균을 비롯하여 다른 병원체 혈청균에 대해서 백업(back up) 보호성을 제공할 수 있다.

[0039] 본 발명의 바람직한 구체예에서, 목적 유전자 또는 목적 DNA는 전달되어 상동성 및/또는 부위 특이적 재조합을 통해 박테리아 염색체에 통합된다. 이러한 유전자 및/또는 오피론을 전달하는데 사용되는 통합 벡터는 조건적 복제 또는 자살 플라스미드, 박테리오파지, 트랜스포존, 또는 당분야의 숙련가에게 공지된 제한효소 가수분해 또는 PCR 증폭으로 획득되는 선형 DNA 단편일 수 있다. 일부 구체예에서, 통합은 시험관 내 성장을 위해 없어도 되는 염색체 영역을 표적으로 한다. 다른 구체예에서, 목적 유전자 또는 목적 DNA는 에피솜 벡터 예컨대 원형/선형 복제 플라스미드, 코스미드, 플라스미드, 용원성 박테리오파지 또는 박테리아 인공 염색체를 통해 박테리아에 전달될 수 있다. 재조합 사건의 선별은 선별 유전자 마커 예컨대 항생제 내성을 부여하는 유전자(예를 들어, 카나마이신, 제오마이신, 에리스로마이신, 클로람페니콜, 젠타마이신 등), 중금속 및/또는 독성 화합물에 대한 내성을 부여하는 유전자 또는 영양요구성 돌연변이를 보충한 유전자를 통해 선별할 수 있다. 다르게, 재조합은 PCR 증폭, 서열분석, 제한효소 분해 또는 당분야의 숙련가에게 공지된 다른 방법으로 스크리닝할 수 있다.

[0040] 본원에서 언급한 "백신"은 유기체, 바람직하게는 병원성 유기체에 의한 감염에 대해 동물을 면역화시키기 위해 동물을 접종하는데 사용되는 약학 또는 치료 조성물이다. 전형적으로 백신은 1 이상의 유기체에서 유래되는 1 이상의 항원을 포함하며 동물에 투여시 활성 면역성을 자극하고 이들 또는 관련 병원성 유기체에 의한 감염에 대해 동물을 보호하게 된다.

[0041] 정제된 NOMV는 용액을 멸균하기 위한 여과, 용액 회석, 보조제 부가 및 용액 안정화를 포함할 수 있는, 당분야의 공지 방법을 통해서, 포유동물, 적절하게 인간, 마우스, 래트 또는 토끼에 투여를 위해 제조된다.

[0042] 본 발명의 백신은 이에 제한되는 것은 아니고, 예를 들어 비경구(예를 들어, 면역내, 경피), 비내, 경구, 국소, 또는 당분야의 숙련가에게 공지된 다른 경로를 포함하는, 다수의 경로를 통해 인간 또는 동물에 투여될 수 있다. 이하에서 사용되는 용어 비경구는 정맥내, 피하, 피내, 근육내, 동맥내 주사 또는 주입법을 포함한다. 백신은 다량 백신접종 프로그램에 사용할 수 있는 다수 용량 플라스크 또는 단일 용량 조제물 형태일 수 있다. 백신을 제조하고 사용하는 적절한 방법은 문헌 [*Remington's Pharmaceutical Sciences*, Mack Publishing Co., Easton, Pa., Osol(ed.)(1980) 및 *New Trends in Developments in Vaccines*, Voller et al.(eds.), University Park Press, Baltimore, Md.(1978)]를 참조할 수 있으며, 이를 참조하여 포함시킨다.

[0043] 본 발명의 백신 조성물은 대체로 공지된, 표준, 비독성의 생리적으로 허용되는 담체, 보조제 및/또는 비히클을 함유하는 투약 단위 제형으로 비경구 투여된다.

[0044] 본 발명의 백신 조성물은 1 이상의 보조제를 더 포함할 수 있다. "보조제"는 특정 백신 항원과 조합하여 사용시 항원의 항원-특이적 면역 반응을 강화, 가속화 또는 지속시키는 기능을 하지만, 단독으로 사용시에는 면역 반응을 자극하지 않는 물질이다. 적절한 보조제는 무기 또는 유기 보조제를 포함한다. 적절한 무기 보조제는 이에 제한되는 것은 아니고, 예를 들어 알루미늄 염 예컨대 수산화알루미늄 겔(백산) 또는 인산알루미늄(바람직하게는, 수산화알루미늄)을 포함하지만, 또한 칼륨 염(특히 탄산칼륨), 철 또는 아연일 수 있거나, 또는 아실화된 티로신, 또는 아실화된 당, 양이온 또는 음이온 유도된 폴리사카라이드 또는 폴리포스파젠의 불용성 현탁액일 수 있다. 다른 적절한 보조제는 당분야의 숙련가에게 공지이다. 적절한 Th1 보조제 시스템을 또한 사용할 수 있고, 이에 제한되는 것은 아니며, 예를 들어, 모노포스포릴 지질 A, LPS의 다른 비독성 유도체, 및 모노포스포릴 지질 A, 예컨대 3-테-O-아실화된 모노포스포릴 지질 A(#D-MPL)와 알루미늄 염의 조합물을 포함할 수 있다.

- [0045] 보조제의 다른 적절한 예는 이에 제한되는 것은 아니고, MF59, MPLA, 마이코박테리움 튜버쿨로시스(*Mycobacterium tuberculosis*), 보르테텔라 페르투스시스(*Bordetella pertussis*), 박테리아 리포폴리사카라이드, 아미노알킬 글루코사민 포스페이트 화합물(AGP) 또는 이의 유도체 또는 유사체, Corixa(Hamilton, Mont.)에서 입수가 가능한 것, 미국 특허 제6,113,918호에 기술된 것; 예를 들어, 2-[(R)-3-테트라데카노일옥시테트라데카노일아미노]에틸, 2-데옥시-4-O-포스포노-3-O-[(R)-3-테트라데카노일옥시테트라데카노일]-2-[(R)-3-테트라데카노일옥시테트라데카노일아미노]-b-D-글루코피라노시드, 미국 특허 제4,912,094호에 기술된 MPL™(3-O-데아실레이티드 모노포스포릴 지질 A)(Corixa에서 입수가 가능함), 합성 폴리뉴클레오티드 예컨대 CpG 모티프를 포함하는 올리고뉴클레오티드(미국 특허 제6,207,646호), COG-ODN(CpG 올리고데옥시뉴클레오티드), 폴리펩티드, 사포닌 예컨대 Quil A 또는 미국 특허 제5,057,540호에 기술된 STIMULON™ QS-21(Antigenics, Framingham, Mass.), 백일해 독소(PT), 또는 이.콜라이 열 불안정성 독소(LT), 특허 LT-K63, LT-R72, CT-S109, PT-K9/G129; 예를 들어, 국제 공개 특허 출원 WO 93/13302 및 WO 92/19265에 기술된 것, 콜레라 독소(야생형 또는 돌연변이형) 등을 포함한다. 다르게, 다양한 오일 조제물 예컨대 스테아릴 티로신(ST, 예를 들어, 미국 특허 제4,258,029호), MDP로 알려진 디펩티드, 사포닌, 콜레라 독소 B 서브유닛(CTB), 이.콜라이 유래의 열 불안정성 장독소(LT)(유전자 변형독소 돌연변이체 LT가 개발됨), 및 에멀썬(Pharmos, LTD., Rehovot, Israel) 등이 포함된다. 다양한 사이토카인 및 림포카인이 보조제로 사용하기 적절하다. 이러한 보조제 중 하나는 과립구-마크로파지 콜로니 자극 인자(GM-CSF)로서, 예컨대 미국 특허 제5,078,996호에 기술된 뉴클레오티드 서열을 갖는다. 미국 특허 제5,723,127호에 기술된 사이토카인 인터루킨-12(IL-12)가 다른 보조제이다. 이에 제한되는 것은 아니고, 1- α , 1- β , 2, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 13, 14, 15, 16, 17 및 18, 인터페론- α , β 및 γ , 과립구 콜로니 자극 인자, 종양 괴사 인자 α 및 β 를 포함한 다른 사이토카인 또는 림포카인이 면역 조절 활성을 갖는 것으로 확인되었고, 보조제로 사용하기 적합하다.
- [0046] 백신 조성물은 동결건조시켜 운반 및 저장이 용이한 건조형으로 엔.메닌지티디스에 대한 백신을 생성시킬 수 있다. 또한, 백신은, 부가되는 항원이 백신의 효능을 방해하지 않고 부작용 및 역반응이 부가적으로 또는 상승적으로 증가되지 않는 한, 상기 기술된 유전자 변형된 균주 유래의 단백질을 함유하는 NOMV 및 1 이상의 다른 항원을 포함하는 혼합 백신 형태로 제조될 수 있다. 백신은 백신의 가용성, 흡수성, 생물학적 반감기 등을 개선시킬 수 있는 화학 부분과 연합될 수 있다. 상기 부분은 대안적으로, 백신의 독성을 감소시키거나, 백신의 임의의 원치않는 부작용을 제거 또는 약독화시킬 수 있다. 이러한 효과를 매개할 수 있는 부분은 문헌 [*Remington's Pharmaceutical Sciences* (1980)]을 참조한다. 이러한 부분을 분자에 커플링시키는 방법은 당분야에 공지이다.
- [0047] 백신은 밀봉된 바이알, 앰플 등에 저장할 수 있다. 본 발명의 백신은 대체로 비내 투여용 스프레이 형태로, 또는 비 액적, 흡입제, 편도선 상의 면봉으로, 또는 경구 투여용 캡슐, 액제, 현탁제 또는 엘릭시르 형태로 투여될 수 있다. 백신이 건조형인 경우, 백신은 투여 전에 멸균 증류수에 용해 또는 현탁된다. 임의의 불활성 담체, 바람직하게는 예컨대 염수, 인산 완충 염수, 또는 NOMV 백신이 적절한 가용성을 갖는 임의의 이러한 담체 등이 사용된다.
- [0048] 본 발명의 백신 조성물은 담체를 포함할 수 있다. 용액 또는 액체 에어로졸 현탁제로 존재할 경우, 적절한 담체는 이에 제한되는 것은 아니고, 염 용액, 수크로스 용액, 또는 다른 약학적으로 허용되는 완충액을 포함할 수 있다. 에어로졸 용액은 계면활성제를 더 포함할 수 있다.
- [0049] 사용할 수 있는 허용되는 비히클 및 용매 중에서, 링거액, 및 등장성 염화나트륨 용액, 예를 들어 인산 완충된 염수액, 락테이스, 트리스 등이 포함된다. 또한, 멸균된, 고정 오일이 통상적으로 용매 또는 현탁 매질로 사용되며, 이에 제한되는 것은 아니고, 예를 들어 합성 모노- 또는 디-글리세리드를 포함한다. 또한, 지방산 예컨대 올레산은 주사가 가능한 조제물에 사용된다.
- [0050] 주사가 가능한 조제물, 예를 들어 멸균된 주사용 수성 또는 유성 현탁제는 적절한 분산제 또는 습윤제 및 현탁제를 이용해 당분야에 따라 제제화된다. 멸균된 주사용 조제물은 또한 비독성 비경구 허용되는 희석제 또는 용매 중 멸균 주사용 용액 또는 현탁액, 예를 들어 1,3-부탄디올 중 용액이다.
- [0051] 본 발명에 설명한 기술 및 이의 장점은 이하의 실시예를 참조하여 더욱 이해할 수 있을 것이다. 이들 실시예는 이들 특정 실시예의 제공을 통해 본 발명의 특정 구체예를 설명하기 위해 제공하는 것이고, 출원인이 본 발명의 기술의 범주 및 정신을 제한하려는 의도가 아니다. 당분야의 당업자는 본원에 설명된 기술의 전체 범주가 명세서에 첨부한 청구항에서 한정하는 대상, 및 이러한 청구항의 임의의 변형물, 변경물 또는 균등물을 포함한다는 것을 이해할 것이다.

[0052]

실시에

[0053]

실시에 1: 엔.메닌지티디스의 유전자 변형된 백신 균주의 유도 및 이 유전자 변형된 백신 균주의 외막 단백질을 함유하는 NOMV의 생성.

[0054]

유전자 변형된 균주 8570 HOPS-G1은 균주를 입수한 실험실에서 복수유전자와 효소 전기영동을 통해 분석하고 ET-5 클론 복합체에 속하는 것으로 확인된 모균주 8570으로부터 5 유전자 변형을 통해 변형시켰다(Caugant, et al.). PorA 가변 영역을 서열분석하고 유형분류하였고 LOS 변역형을 확인한 후 유전자 변형을 수행하였다. 균주 8570는 ET-5 클론 4:P1.19, 15:L7v, ProB3(ST4) Tbp2 II형이었다. 일련의 5개의 순차적인 유전자 변형을 이하에 기술된 바와 같이 균주에 대해 수행하였다:

[0055]

1) 제2의, 상이한 *porA* 유전자를 *opaD* 유전자를 넣어맞춘 *opaD* 유전자좌에 삽입시켰다. 항생제 내성 마커가 삽입되지 않은 pUC 19-기반 플라스미드 pA 18.4를 사용하여, 삽입물로 유전자의 중간 100 bp 서열을 교체시켜 *opaD*를 불능화시킨, *opaD* 유전자좌에서 염색체에 제2 *porA* 유전자를 삽입시켰다. 삽입부는 균주 M4410(B:15:PI.22,14)에서 얻은 새로운 *porA* 유전자를 포함하고 균주 H44/76에서 얻은 *porA* 프로모터 뒤에 위치한다. 얻어진 *porA* 유형은 2 포린 A 유전자를 포함하는 P1.19,15: P1.22,14였다.

[0056]

2) 제2의 PorA를 발현하는, 1에서 얻은 균주에서 출발하여, 외막 단백질OpcA의 발현은 *opcA*의 프로모터 내 12 bp 폴리-C 서열을 C 및 G 뉴클레오타이드 둘 모두를 함유하는 동일 길이의 새로운 서열로 교체시켜 안정화시켰다. 원래 프로모터 서열(서열번호 1)(폴리-G 서열은 두꺼운 이탤릭체로 표시) 5'..CATAGTAAAACCTCTAAAATTTGGATTGTAGTCGGATATGGTAACATAACGTAAATAATCGTTACGCTTACAATTATATTCTTAAGCTTTCGGGGG GGGGGGATTT..3'은 Not I 부위(밑줄)를 갖는 G 및 C 뉴클레오타이드를 포함하는 변형된 프로모터 서열(서열번호 2) 5'..CATAGTAAAACCTCTAAAATTTGGATTGTAGTCGGATATGGTAACATAACGTAAATAATCGTTACGCTTACAATTATATTCTTAAGCTTTCGGCGCG CCGCGCATTTT..3'로 교체하였다. 교체된 서열은 교체 서열의 존재를 확인할 수 있도록 NotI에 대한 제한효소 부위를 포함하도록 선택하였다. 형질전환에 사용된 플라스미드는 pOpc79(서열번호 4)였다. 플라스미드 삽입부는 항생제 마커를 함유하지 않았다. 형질전환체의 선별은 OpcA에 대한 단일클론 항체를 이용한 콜로니 블랏팅을 기초로 하였다. 형질전환된 균주는 OpcA 음성 상변이인 것을 선택하였고, 강력한 OpcA 양성 클론은 콜로니 블랏팅으로 확인하였다. 정확한 형질전환체는 PCR 및 제한효소(NotI) 분석을 통해 OpcA 양성 상변이와 구별하였다.

[0057]

3) 2에서 얻은 균주로부터 출발하여, 2 아실-옥시-아실 연결된 지방산 중 하나를 LOS의 지질 A에 결합시키는데 관여하는 아실 트랜스퍼라제인, 유전자 *lpxL1*는 *lpxL1* 유전자의 중간에 260 bp 서열을 tetM 항생제 내성 유전자를 포함하는 삽입부로 교체하여 불능화시켰다. tetM 유전자는 트랜스포존 Tn916에서 유래된 플라스미드 pJS1934에서 획득하였다(Swartley, et al. 1993. Mol. Microbiol. 10:299-310). *lpxL1* 유전자를 불능화시키는데 사용된 플라스미드는 pMn5(서열번호 5)였다. *lpxL1* 유전자 내 삽입부의 존재는 *lpxL1* 유전자의 시작부 및 말단부에서 프라이머를 이용해 3.3 kbp 앰플리콘을 생성하는 PCR을 통해 검증하였다.

[0058]

4) 단계 3에서 얻은 균주로부터 출발하여, 보존성 외막 단백질 GNA 1870(변이체 1)(FHBP v.1)의 발현은 NspA의 발현이 넣어맞춘 *nspA* 유전자좌에 GNA 1870 변이체 1 유전자의 제2 카피를 삽입시켜 증가시켰다. 새롭게 삽입된 유전자는 젠타마이신 항생제 내성 유전자, IPTG-유도성 Ptac 프로모터를 갖는 이.콜라이 lac 오페론, GNA1870 변이체 1 유전자 및 *rrnB* 종결인자를 포함하는 삽입부의 일부이고, 사용된 플라스미드는 도 19c 및 서열번호 6에 도시하였다. PUC19 기반 플라스미드, pBE/GNA1870/101를 형질전환 및 상동성 재조합에 사용하여 GNA 1870 변이체 1 유전자를 변형 균주에 삽입시켰다. pBE/GNA1870/101 플라스미드(7687 b.p.)는 표 1에 기술된 특징을 갖게 제작하였다(서열은 서열번호 6에서 확인할 수 있음).

표 1

[0059]

특징	좌표(nt ##)	공급원
pUC19 [*]	1-191	New England Biolabs(NEB)
Sac I 부위(고유함)	192-197	pUC19 클로닝 부위
흡수 서열	198-212	PCR 구성체
5'NspA 비코딩 영역(NCR)	213-1248	<i>N. mening.</i> , 44-76, PCR 구성체
Bam H I 부위	1249-1254	Gent ^R 유전자 클로닝 부위
Gent ^R 유전자	1255-2104	Gent ^R 유전자의 PCR 구성체
Sac II(고유함)	2105-2110	PCR 구성체

Rmp 프로모터 5' 단편(rest)	2111-2230	NspA 발현을 위한 이전 플라스미드
Mfe I 부위(고유함)	2231-2236	PCR 구성체
Lac ^q 오페론	2237-3641	pMAL-p2X(New England Biolabs)
Ptac 프로모터	3642-3673	pMAL-p2X, PCR 구성체
Lac 오퍼레이터	3674-3702	pMAL-p2X, PCR 구성체
RBS	3750-3755	pMAL-p2X, PCR 구성체
Nde I 부위(고유함)	3761-3766	PCR 구성체
fHBP(변이체 1) 리더 펩티드	3764-3823	<i>N. mening.</i> , 44-76, PCR 구성체
종결 코돈을 갖는 fHBP(변이체 1) ORF	3824-4588	<i>N. mening.</i> , 44-76, PCR 구성체
SgrAI 부위(고유함)	4589-4596	<i>N. mening.</i> , 44-76, PCR 구성체
3'spA 및 3'spA NCR	4597-4638	NspA 발현을 위한 이전 플라스미드
rrnB 전사 종결인자	4639-4945	pBAD/Thio-E(Invitrogen), PCR
3'NspA NCR	4946-5432	<i>N. mening.</i> , PCR 구성체
흡수 서열	5433-5447	PCR 구성체
Hind III	5448-5453	pUC19 클로닝 부위
pUC 19	5454-7687말단	NEB (Amp. ^R)
*) pUC 19의 nt.1에서 출발함. 이 플라스미드는 다음과 같이 더욱 용이한 클로닝을 위해 NdeI 부위가 제거되도록 변형시켰다: 이 플라스미드를 NdeI-EcoRI로 분해하고 213 b.p. 단편을 제거하였다. 스티키 말단을 채우고 절찰하여 플라스미드를 복원하였다. 그 결과 NdeI(183) 및 EcoRI(395) 부위가 파괴되었다. 표적 단백질의 발현을 위한 구성체의 클로닝을 위해 pUC 19의 SacI 및 HindIII 클로닝 부위를 사용하였다.		

[0060] 5) 단계 4에서 얻은 균주는 카나마이신 내성 유전자로 200 bp 서열을 교체한 *synX* 유전자를 포함하는 pUC19-기반 플라스미드로 형질전환시켰다. Kan 내성 형질전환체를 선별하고 파괴된 *synX* 유전자의 존재 및 캡슐 음성 표현형에 대해 PCR을 통해 검토하였다. 결과로 *synX* 유전자의 녹아웃이 검증되었다.

[0061] 6) 단계 4에서 얻은 균주는 *lgtA* 유전자가 녹아웃된 제오마이신 유전자를 함유하는 플라스미드 pBE-501(서열번호 9)로 형질전환시켰다. 플라스미드 pBE-501가 포함하는 특징은 표 2에서 확인할 수 있다. *lgtA* 유전자의 녹아웃으로 락토-N-네오테트라오스(LNnT) 테트라사카라이드가 결합된 단축형 또는 절단형 LOS가 생성되었다(도 20 참조).

표 2

특징	좌표(nt#)	공급원
pCR 4-TOPO TA 클로닝 벡터	1-3667	Invitrogen. 유형: pUC ori
흡수 서열	3668-3682	PCR 구성체
LgtA 5' 절편	3683-4037	<i>N. mening.</i> , 2996, PCR 구성체
pEM7/Zeo	4038-4122 4123-4497 4498-4633 4634-5448	Invitrogen. 클로닝 부위 및 EM7 프로모터 제오신 Δ lgtA pEM7/Zeo으로 제공된 Zeocin ^R 유전자 pEM7/Zeo 클로닝 부위 LgtA 3' 절편의 단편 <i>N. mening.</i> , 2996, PCR 구성체
흡수 서열	5449-5463	흡수 서열
pCR 4-TOPO TA 클로닝 벡터	5464-5759말단	Invitrogen
*) LgtA cDNA는 BssHII로 효소분해하였다. 얻어진 3' 및 5' 스티키 말단은 재충전시키고 제오신 유전자를 이 블런트 말단 cDNA에 삽입시켰다. 박테리아 DNA의 보상 동안 발생할 수 있는 파괴된 제오신 유전자의 절개의 경우, 밀려난 LgtA 단편의 5' 및 3'은 보상불가한 서열을 보유하게 된다.		

[0063] 이 유전자 변형된 균주는 모든 5종의 돌연변이의 불확실한 보유성 및 모든 예상되는 항원의 발현에 대해 검토하였다.

[0064] 실시예 2: 유전자 변형 균주의 백신량 생산

[0065] 유전자 변형된 균주는, NOMV의 조성물을 생산하기 위해 도 1-5의 흐름도에 상세하게 설명한 바와 같이 백신 제조에 사용하기 위한 생산 세포 은행 및 마스터의 생성을 위해 사용되었다. NOMV 배양물은 외막 단백질 LOS의 발현에 대해 검사하였다.

[0066] **실시예 3: 백신의 특정규명**

[0067] 실시예 2에서 얻은 최종 생성물에 대해 마우스 및 토끼에서 품질 제어 검사 및 전임상 안정성 및 면역원성 검사를 실시하였다. 최종 생산 백신의 조성은 다음과 같다:

[0068] 단백질 2001ag/mL
 [0069] 리포올리고사카라이드 36 tg/mL
 [0070] 핵산 2.5 µg/mL
 [0071] 염화나트륨 0.9%
 [0072] Tris-HCl 완충액 0.01 M pH 7.6

[0073] 백신 조성물은 나트륨 도데실 설페이트 폴리아크릴아미드 겔 전기영동 및 웨스턴 블랏팅을 통해 더욱 분석하였다. 도 6은 대조군(레인 2) 및 여과된 대량 Lot(레인 3)와 비교하여 백신(레인 4)의 단백질 함량을 보여주는 쿠마시 블루 염색된 겔을 도시한 도면이다. 도 7은 대조군(ML5 LPS, 레인 1) 및 여과된 대량 백신 Lot(레인 2)와 비교하여 백신(레인 3)의 리포사카라이드 성분을 보여주는 은 염색된 겔을 도시한 도면이다. 도 8은 하기 표 3에 열거한 항체에 따른 NOMV 백신의 주요 성분들에 대해 백신의 정체성을 검사한 결과를 도시한 도면이다.

표 3

[0074]

레인	항체 특이성	단일클론 항체	예상 반응	검사 결과
1	사전염색 표준물	NA		
2	L8 LOS	2-1 L8	미량	미량
3	L8v LOS	25-1-LC1	양성	양성
4	L3,7 LOS	9-2-L379	미량	미량
5	Lip (H8)	2-1-CA2	양성	양성
6	Opa P5.10	23-1-P5.10	음성	음성
7	Opa P5.11	MF7-1-P5.11	음성	음성
8	Opc (P5.C)	B306-P5C	양성	양성
9	FHBP I (GNA1870)	JAR 4	양성	양성
10	Rmp	9F5	양성	양성
11	PorB P4	15-1-P4	양성	양성
12	PorA P1.14	MN21G3.17	양성	양성
13	PorA P1.15	MN3C5C	양성	양성
14	PorA P1.19	2-1-P1.19	양성	양성
15	TBP2	476C2G2	양성	양성
16	Gp B 폴리사카라이드	2-2-B	음성	음성
17	아미도 블랙 염료	NA		

[0075] 결과는 도 6, 7 및 8에서 확인할 수 있는데 여기서 유전자 변형된 균주 8570 HOPS-G NOMV 유래 백신의 NOMV에서 발견된 단백질은 기술된 바와 같은 LOS 및 단백질을 함유하고 있다는 것을 보여주었다.

[0076] **실시예 4: 백신의 일반 안전성 검사**

[0077] 백신은 21 CFR 610.11에 규정된 일반 안전성 검사에 따라 검사하였다. 백신에 대한 결과는 하기 표 4에 나타내었다.

표 4

[0078]

검사 물품	검사 결과	견해
8570 HOPS-G NOMV 백신 Lot # 1289	통과	모든 동물은 정상적이고 건강한 상태를 유지하였고 몸무게가 증가하였다

[0079] **실시예 5: 토끼 발열원성 검사***

[0080] 내독소 활성에 대한 토끼 발열원 검사 결과는 유전자 변형된 8570 HOPS-G NOMV 단독 및 수산화알루미늄 보조제

에 흡착된 백신에 대해 표 3에 나타내었다. 주어진 값은 토끼에서 발열을 유도하지 않은 검사된 최고 양(온도 상승 > 0.5℃)이고, 그 결과는 하기 표 5에서 확인할 수 있다.

표 5

[0081]

검사 물품	검사 농도	표시한 토끼에 대한 온도 상승		
		1	2	3
8570 HOPS-G NOMV 백신 Lot# 1289	0.4 pg/kg	0.1	0.2	0.2
알루미늄 리히드라겔 HPA lot# 1347에 흡착된 8570 HOPS-G NOMV 백신 Lot# 1289	0.5 µg/kg	0	0	0
* 이 검사는 CFR에서 명시한 프로토콜에 따라 GLP하에 BioReliance, Inc.가 수행하였다.				
** 모든 제형에 대해 인간 실험에서 사용하게 되는 수산화알루미늄/kg의 양(용량).				

[0082]

요약하면, 백신 단독은 0.4 pg/kg에서 통과하였고, 수산화알루미늄 보조제는 15 pg/kg(임상 실험에서 사용된 kg 당 최고량)에서 통과하였으며, 수산화알루미늄에 흡착된 백신은 0.5 lag/kg에서 통과하였지만 1.0 pg/kg에서는 실패하였다. pg/kg을 기초로 이들 결과의 외삽법은 흡착된 백신이 최대 25-50 µg 범위의 용량까지 인간에서 비 발열원성이라는 것을 시사한다.

[0083]

실시예 6: 인간 전혈로부터 사이토카인 방출

[0084]

백신을, 신선한 인간 전혈로부터, 프로염증성 사이토카인 TNF-알파 및 IL-6을 유도하는 그 능력을 측정하여 내 독소 함량에 대해 검사하였다. 결과는 도 9 및 10에 도시하였다. 데이타는 3회(이.콜라이 LPS 표준물 및 *lpxL2* LOS를 갖는 NOMV 백신 Lot#1119) 또는 5회(아생형 LOS를 갖는 Lot 0832 NOMV 및 *lpxL1* LOS를 갖는 Lot#1289 NOMV 백신) 검사의 평균이다. 에러 바는 평균의 표준 오차이다. NOMV의 농도는 단백질을 기준으로 한 것이지만 이.콜라이 표준 LPS는 중량 기준의 LPS이다. 임의의 특정 이론에 한정되지 않고, 이들 결과는 현행 백신이 *lpxL2* LOS 함유 백신(수막구균 44/76 MOS 5D NOMV 백신, Lot#1119, BB-IND 12687)에서 확인되었던 것과 유사한 안전성 프로파일을 인간 지원자에서 가질 것을 시사하였다.

[0085]

8570 HOPS-G NOMV 백신 Lot#1289의 활성을 데옥시콜레이트 추출된 외막 소포체(OMV)의 활성과 비교하였다. 이 소포체는 문헌 [Fredriksen JH, et al. NIPH Annals, 14:67-80, 1991]에 기술된 기본 방법을 이용하여 제조하였지만, 예외적으로, 초원심분리 펠렛을 재현탁하기 위해 1.2% 데옥시콜레이트(DOC)를 사용하는 대신 전체 과정에 걸쳐 0.5% DOC를 사용하였다. 비교 결과는 도 11에 도시하였다.

[0086]

실시예 7: 마우스에서의 면역원성 및 살균성 항체 반응

[0087]

수산화알루미늄 보조제(Rehydragel LV)에 흡착하거나 흡착시키지 않고 4주 간격으로 유전자 변형된 백신 군주 8570 HOPS-G의 3가지 용량을 마우스에 투여하였다. 10 마우스 그룹을 0, 4 및 8 주에 NOMV의 0.1, 0.3, 1.0 또는 3.0 µg를 복강내 백신접종하였고, 이 백신 그룹을 표 6에 나타내었다. 혈청을 0, 7 및 10 주에 채취하였다. 이 혈청은, 보체 공급원으로서 정상 인간 혈청을 이용하여 4종의 상이한 군주, 백신 군주의 모군주 및 몇몇 관련 군주에 대한 살균성 항체에 대해 검사하였다. 전-백신접종 혈청은 한결같이 살균성 활성이 없었다.

표 6

[0088]

백신 그룹	주사된 백신의 양
1	0.1 µg
2	0.3 µg
3	1.0 µg
4	3.0 µg
5	0.1 µg + Rehydragel LV
6	0.3 µg + Rehydragel LV
7	1.0 µg + Rehydragel LV
8	3.0 µg + Rehydragel LV
9	1.0 µg + Rehydragel HPA

[0089]

10주 혈청(3가지 백신 용량)으로 얻은 결과는 도 12에 도시하였는데, 여기서는 유전자 변형된 군주에 대한 상이한 백신 그룹의 살균성 역가를 나타내었다. 검사 군주 중 2 군주는 백신 군주의 모군주와 동질유전자였다. 이들

은 상이한 혈청아형 특이성을 갖는 대안적인 *porA*로 *porA* 유전자를 교체하여 모균주로부터 유도시킨 것이었다. 이들 검사 균주에서 발현된 PorA 단백질 중 2종(P1.19,15 및 P1.22,14)이 백신에 존재하였지만, 제3의 단백질(P1.22-1,4)은 존재하지 않았다. 제4 균주, 44/76는 상기 백신 균주와 비교하여 상이한 PorB, 및 상이한 LOS 코어 구조를 가진다. 데옥시콜레이트 추출된 소포체 백신이 전형적으로 우성 항원으로서 PorA를 나타낸다는 공개된 연구와 놀랄만큼 다르게, 본 발명의 백신의 결과는 대부분의 살균성 활성이 표적 균주의 혈청아형에 의존적이지 않았고 따라서 PorA에 대한 것이 아님을 증명하였다.

[0090] 8570 HOPS-G NOMV 백신에 의해 마우스에서 유도된 살균성 항체는 혈청아형 특이성을 보이지 않았지만, 대부분 혈청아형 및 혈청형에 비의존적인 것으로 나타났다(도 13). 균주 44/76를 사멸한 항체는 주로 LOS에 대한 것으로 확인되었다. 막대는 평균의 표준 오차이다. 백신은 Rehydragel LV 수산화알루미늄 보조제에 흡착시킨 경우 및 흡착시키지 않은 경우로 투여하였다.

[0091] 이중성 균주 44/76에 대한 살균성 항체 반응의 특이성 분석은 상이한 단리 항원을 이용한 살균성 활성의 격감을 통해 착수하였다. 백신접종 후 마우스 혈청을 살균성 종료점(-50% 사멸)까지 희석하고 상이한 농도의 몇몇 항원으로 코딩된 96-웰 마이크로플레이트 웰에서 항온반응시켰다. 4시간 항온반응 후, 혈청을 살균성 활성에 대해 검사하고 살균성 항체의 제거율을 측정하였다. 표적 균주(면역형 L3,7)으로부터 제조된 정제 LOS는 거의 모든 항체를 제거할 수 있었다. 백신 균주로부터 제조된 정제 LOS(면역형 L8v)는 항체의 대략 70%를 제거할 수 있었다. 보존성 단백질 GNA1870(정제된, 제조할 단백질)은 살균성 활성의 대략 20%를 제거할 수 있었으며, 임의의 특정 이론에 한정되지 않고, 이는 도 14에 도시한 바와 같이 항-LOS 항체 및 항-GNA1870 항체를 포함하는 일부 협력 사멸을 시사할 수 있다.

[0092] 실시예 8: 토끼에서의 면역원성

[0093] 백신을 또한 토끼에서 면역원성에 대해 검사하였다. 4 토끼 그룹을 수산화알루미늄 보조제에 흡착시키거나 흡착시키지 않고, 상이한 용량의 백신으로 근육내 백신접종하였다. 3가지 용량을 6주 간격으로 투여하였고 마지막 주사 이후 2주에 혈액을 채취하였다. 4가지 검사 균주에 대한 토끼의 살균성 항체 반응을 측정하였다. 검사 균주는 상이한 PorA 단백질 및 L3,7v LOS를 발현하는 8570의 3종 동질유전자 변이체 및 상이한 코어 구조를 갖는 LOS 및 이중성 PorA를 갖는 균주 44/76를 포함하였다. PorA 단백질 P1.19,15 및 P1.22,14가 백신에 존재하였지만, P1.22-1,4는 존재하지 않았다. 살균성 검사 결과는 도 15에 도시하였다. 균주 44/76에 대한 교차 반응성 살균 활성의 분석은 마우스 혈청에 대한 것과 동일한 방식으로 분석하였고 결과도 실질적으로 동일하였다. 대부분의 교차 반응성 살균 항체는 검사 균주에 상동성인 정제된 LOS에 의해 제거할 수 있었다.

[0094] 실시예 9: 완전한 다가 NOMV 백신의 실험실 Lot에 대한 제조 및 동물 실험

[0095] 상기 실시예들에서 기술한 균주 8570 HOPS-G1 이외에도, 2종의 추가 백신 균주를 선택하고 유전자 변형시켰다. 첫번째는 균주 B 16B6(B:2a:P1.5,2:L2)이었다. 이 균주는 유전자 군 ET-37에 속하고 클래스 2 PorB 단백질 및 I형 트랜스페린 결합 단백질 B를 갖는다. 두번째는 균주 44/76(B:15:P1.7,16:L3,7)이고, 이 균주는 유전자 군 ET-5에 속하고 1970년대 및 1980년대 노르웨이에서 유행한 그룹 B 수막구균성 유행병의 원인이 된 유행병 균주의 대표예이다. 이 균주는 클래스 3 PorB 단백질 및 II형 트랜스페린 결합 단백질 B를 발현한다.

[0096] 균주 B16B6은 균주 8570 HOPS-G1에 대해 기술된 바와 상당히 동일한 방식으로 유전자 변형시켰다. 2종의 유전자, *synX* 및 *lpxL1*를 불능화시켜 캡슐 합성 및 LOS의 시알릴화를 방지하고 LOS의 독성을 감소시켰다. 제2의 *porA* 유전자(아형 P1.22-4)를 *opaD* 유전자 대신 삽입시켰다. IPTG 유도성 이.콜라이 Ptac 프로모터를 갖는 GNA1870(FHBP)의 변이체 2는, 플라스미드 pBE-201(서열번호 7)을 이용하여 제2 카피로서 *nspA* 유전자 대신 삽입시켰다. 플라스미드 pBE-201(fHBP의 추가 발현용 7687 b.p.(변이체 2))은 하기 표 7에 기술된 바와 같은 특징을 갖게 제작하였다.

표 7

[0097]

특징	좌표(nt ##)	공급원
pUC 19 ^{*)}	1-191	New England Biolabs(NEB)
Sac I 부위(고유함)	192-197	pUC19
흡수 서열	198-212	PCR 구성체
5'NspA NCR	213-1248	<i>N. mening.</i> , 44-76, PCR 구성체
Bam H I 부위	1249-1254	Gent ^r 유전자 클로닝 부위

Gent ^r 유전자	1255-2104	Gent ^R 유전자의 PCR 구성체
Sac II(고유함)	2105-2110	PCR 구성체
Rmp 프로모터 5'단편(rest)	2111-2230	<i>N. mening.</i> , PCR 구성체
Mfe I 부위 (고유함)	2231-2236	PCR 구성체
Lac ^q 오퍼론	2237-3641	pMAL-p2X(New England Biolabs)
Ptac 프로모터	3642-3673	pMAL-p2X, PCR 구성체
Lac 오퍼레이터	3674-3702	pMAL-p2X, PCR 구성체
RBS	3750-3755	pMAL-p2X, PCR 구성체
Nde I 부위(고유함)	3761-3766	PCR 구성체
fHBP(변이체 2) 리더 펩티드	3764-3823	<i>N. mening.</i> , 2996, PCR 구성체
종결 코돈을 갖는 fHBP(변이체 2) ORF	3824-4588	<i>N. mening.</i> , 2996, PCR 구성체
SgrAI 부위(고유함)	4589-4596	<i>N. mening.</i> , 44-76, PCR 구성체
3'spA 및 3'spA NCR	4597-4638	NspA 발현을 위한 이전 플라스미드
rrnB 전사 종결인자	4639-4945	pBAD/Thio-E(Invitrogen), PCR
3'NspA NCR	4946-5432	<i>N. mening.</i> , PCR 구성체
흡수 서열	5433-5447	PCR 구성체
Hind III	5448-5453	pUC19 클로닝 부위
pUC 19	5454-7687말단	NEB, (Amp. ^R)
*) pUC 19의 nt. 1에서 출발함. 플라스미드는 다음과 같이 추가로 용이한 클로닝을 위해 Nde I 부위가 제거되도록 변형시켰다: Nde I-EcoR I으로 효소 분해하고 213 b.p. 단편을 제거하였다. 스티키 말단을 채우고 절찰시켜 플라스미드를 복원시켰다. 그 결과 부위 Nde I(183) 및 EcoRI(395)이 파괴되었다. 표적 단백질의 발현을 위한 구성체를 클로닝하기 위해 본 발명자들은 pUC 19의 Sac I 및 Hind III 클로닝 부위를 이용하였다.		

[0098] 획득된 균주의 상 변이체는 글루코스 및 갈락토스로 이루어진 절단형 알파 사슬을 발현한다. L2 LOS는 콜로니 블랏팅을 통해 선별하였다. 최종 유전자 변형된 균주를 B16B6 HPS-G2라고 명명하였다. 도 18을 참조한다.

[0099] 균주 44/76은 또한 균주 8570 HOPS-G1에 대해 기술한 바와 동일한 패턴으로 유전자 변형시켰다. 2 유전자, *synX* 및 *lpxL1*는 삽입 돌연변이유발법으로 불능화시켰고, 제2의 *porA* 유전자(아형 P1.7-1, 1)는 이의 프로모터와 함께 *opaD* 유전자 대신 삽입시켰으며, *nadA*의 제2 카피 *nspA* 유전자 대신 *porA* 프로모터 뒤에 삽입시켰다. 플라스미드 pBE-311은 NadA 유전자를 삽입시키기 위한 상동성 재조합에 사용하였고, 플라스미드 3-11는 하기 표 8에 기술한 특징을 갖도록 제작하였고 서열번호 8에서 그 서열을 확인할 수 있다.

표 8

특징	좌표(nt ##)	공급원
pUC19 ^{*)}	1-191	New England Biolabs(NEB)
Sac I 부위(고유함)	192-197	pUC19 클로닝 부위
흡수 서열	198-212	PCR 구성체
5'NspA NCR	213-1248	<i>N. mening.</i> , 44-76, PCR 구성체
Bam H I 부위	1249-1254	Gent ^r 유전자 클로닝부위
Gent ^r 유전자	1255-2104	Gent ^R 유전자의 PCR 구성체
Sac II(고유함)	2105-2110	PCR 구성체
PorA 프로모터(44-76)(변형됨)**	2111-3266	<i>N. mening.</i> , 44-76, PCR 구성체
Nde I 부위(고유함)	3267-3272	PCR 구성체
NadA(대립유전자 3) 리더 펩티드	3270-3338	<i>N. mening.</i> , 2996, PCR 구성체
종결 코돈을 갖는 NadA(대립유전자 3) ORF	3339-4487	<i>N. mening.</i> , 2996, PCR 구성체
SgrAI 부위(고유함)	4488-4495	<i>N. mening.</i> , 44-76, PCR 구성체
PorA 종결인자(44-76)	4496-4910	<i>N. mening.</i> , 44-76, PCR 구성체
Bsm I	4911-4916	PCR 구성체
3'NspA NCR	4917-5329	<i>N. mening.</i> , PCR 구성체
흡수 서열	5330-5344	PCR 구성체
Hind III	5345-5350	pUC19 클로닝부위
pUC 19	5351-7584말단	NEB, (Amp. ^R)

*) pUC 19의 nt. 1에서 출발함. 플라스미드는 다음과 같이 더욱 편리하도록 변형시켜 Nde I 부위를 제거하였다: Nde I-EcoR I으로 효소절단하고 213 b.p. 단편을 제거하였다. 스티키 말단을 채우고 결찰시켜 플라스미드를 복원하였다. 그 결과 부위 Nde I(183) 및 EcoRI(395)이 파괴되었다. 표적 단백질의 발현을 위한 구성체의 클로닝을 위해, 본 발명자들은 pUC 19의 Sac I 및 Hind III 클로닝 부위를 사용하였다.

**) 44-76 프로모터의 14Gs 폴리 G 영역은 11G 발현에 최적으로 교체시켜 변형시켰다.

[0101] 또한, OpcA의 발현은 그 유전자와 관련된 상 변이를 치유(cure)시켜 안정화시켰다. 이는 실시예 1에서 그 프로모터 내 폴리-G 가닥을 파괴시켜서 균주 8570 HOPS-G1에 대해 기술된 바와 같이 실시하였다. *lgtA* 유전자는 실시예 1에서 처럼 차단시켜 절단형 LOS를 생성시켰다. L8 면역형을 발현하는 최종 균주의 상 변이체는 L8 특이적 단일클론 항체를 이용한 콜로니 블랏팅을 통해 선별하였다. 이 유전자 변형된 균주를 도 18에 도시한 바와 같이 44/76 HOPS-D라고 명명하였다. 2종의 추가 균주는 모든 유전자 변형의 안정성을 검증하여 특징규명하였고 각 스톱을 냉동시켰다.

[0102] **실시예 10: 균주 B16B6 HPS-G2 및 44/76 HOPS-D로부터 NOMV 백신의 제조**

[0103] 3종의 유전자 변형된 균주를 사용하여 NOMV 백신 조성물의 실험실 Lot를 제조하였다. 이 균주를 회전 진탕 배양기 상에서 Fernbach 플라스크 내 1 리터 배양물로서 Catlin의 변형 배지 중에서 성장시켰다. 세포는 원심분리로 회수하고, 측량하였으며 세포 페이스트를 냉동시켰다. 세포 페이스트를 해동시키고 실시예 2에 기술된 바와 같이 균주 8570 HOPS-G1 유래 백신의 임상 Lot에 대해 기술한 바와 실질적으로 동일한 과정에 따라 NOMV를 제조하는데 사용하였다. 이러한 과정은 규모를 축소하였고 초원심분리를 2회 225,000 x g에서 60분간 2-8℃의 온도로 수행하여 핵산 및 모든 가용성, 비소포체 물질을 제거하였다.

[0104] **실시예 11: 완전한 다가 백신을 이용한 마우스의 면역화**

[0105] 10 CD-1 마우스의 그룹을 각각의 유전자 변형된 백신 균주에서 유래된 2 pg의 NOMV 백신으로 복강내 백신접종하였다(3종의 균주에서 유래된 NOMV와의 조합 백신에 대해 총 6 pg). 3가지 용량을 0, 4 및 8 주에 투여하였다. 혈액은 접종 전 및 마지막 백신접종 이후 2주경(10주경)에 채취하였다.

[0106] 개별 마우스에서 채취한 혈청은 상동성 균주에 대한 살균성 항체에 대해 검사하였고, 10 마우스의 각 그룹에서 모은 혈청은 광범위하게 상이한 서브캡슐 항원을 발현하는 1 그룹 C 균주 및 14 이종성 그룹 B 균주 패널에 대해 검사하였다.

[0107] 조합된 다가 백신은 3종의 백신 균주 각각에 대해 기하 평균 1:256 역가를 유도하였고 15종의 이종성 균주 중 13종에 대한 살균성 항체를 4배 또는 그 이상으로 증가시켰다. 검사 균주 중 2종은 백신 균주 중 하나와 공유하는 항원을 갖고 있음에도 사멸되지 않았다. 균주 패널에 대해 관찰된 살균성 역가를 하기 표 9에 나타내었다.

표 9

[0108]

다양한 검사 균주 패널에 대해 수집한 마우스 혈청의 살균성 역가						
살균성 검사 균주	발현된 항원	표시된 백신을 백신접종한 마우스로부터 모은 혈청의 역가				
		B1+B2+B3	B2+B3	B1	B2	B3
44/76	B:15:P1.7,16:P5.11,C:L3,7	256	256	256	256	1
8570	B:4:P1.19,15:P5.5:L3,7v	256	256	256	256	2
816136	B:2a:P1.5,2:P5.1a:L2	256	256	1	1	256
9162	B:15:P1.7-2,3:P5.10,11:L3,7*	16	16	8	2	1
M1080	B:1,19:P1.1:P5.3:L1,3,7	2	1	1	1	1
3576	B:NT:P1.22-1:L3,7	128	128	4	2	16
8047	B:2b:P1.5,2:L3,4,7	64	128	1	1	128
9547	B:4:P1.4:L1	256	256	128	2	64
531	B:2a:P1.5,2:P5.1a,1b,4,5:L3,7	256	256	256	1	256
7608	B:2b:P1.5,2:P5.2,c:L4	256	128	1	1	128
6940	B:8,19:P1.NT:L1	4	4	1	1	1
1901	B:8,19:P1.NT:P5.C:L1,3,7	256	32	128	1	8
99M	B:2a:P1.2:P5.1a,1b,5:L3,7	512	512	16	8	256
6275	B:2a:P1.2:P5.1a,4,5:L3,7	-	512	32	1	512
126E	C:8,19:P1.5,2:L1:P5.c	256	256	4	2	64

2981	B:8,19:P1.14:L1	32	8	4	64	2
M4720	B:19:P1.22,14:L2	1	1	1	1	1
6557	B:17:P1.14:L1(3,7)	32	16	1	32	16
백신 코드: B1 = 44/76 HOPS-D NOMV B2 = 8570 HOS-G1 NOMV B3 = B16B6 HPS-G2 NOMV						

[0109] 이들 결과는 광범위한 그룹 B 균주 및 가능하게는 다른 혈청군의 균주에 대해서도 살균성(보호성) 항체를 유도시키는 조합 백신의 능력을 확인시켜주었다.

[0110] 살균성 격감 검사를 이용한 살균성 항체의 분석은 모든 3 세트의 항원에 대한 항체가 검사 균주의 적어도 일부에서 사멸에 관여했다는 것을 증명해주었다. 일부 경우에서, 1 이상의 항원에 대한 항체가 주어진 균주에 대한 살균 활성을 생성시키기 위해 함께 관여하고 작용한 것으로 나타났다.

[0111] 마우스의 추가 그룹을 균주 8570 HOPS-G1의 돌연변이체로부터 제조된 NOMV 백신으로 백신접종하였다. 돌연변이체 균주는 그들의 PorA 발현이 다르다. 2종의 돌연변이체는 단일 PorA(다가 백신 균주의 2가지 중 하나 또는 그 나머지)를 발현하고 세번째는 PorA 닉아웃 돌연변이체로서 PorA 단백질을 발현하지 않았다. 몇몇 상이한 검사 균주에 대한 4 균주 각각에서 유도된 살균성 역가를 하기 표 10에 나타내었다.

표 10

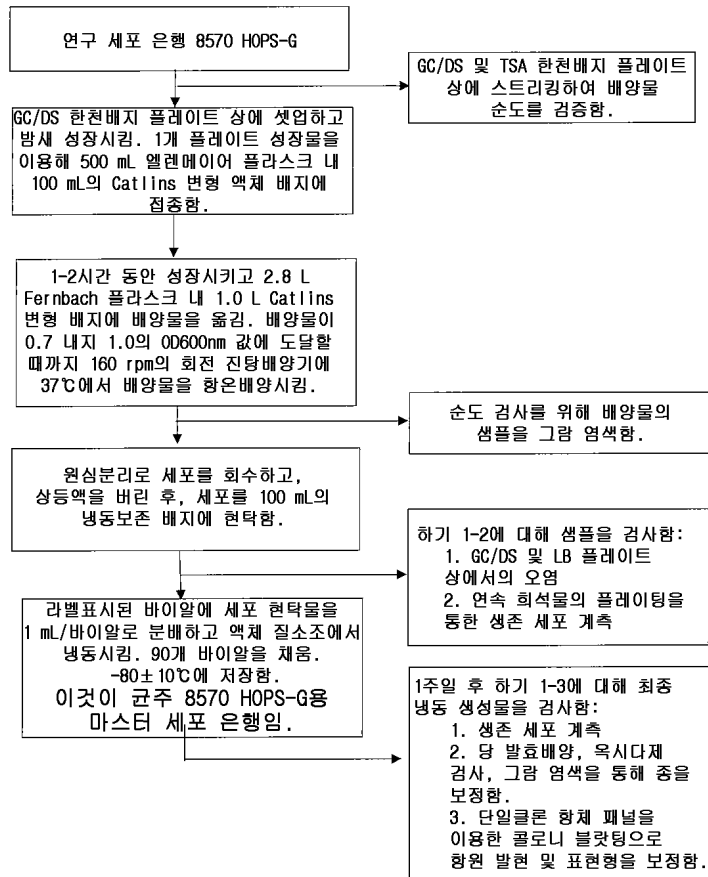
검사 균주	NOMV 백신을 제조한 8570 HOPS-G1의 돌연변이체			
	8570 (P1.19,15 및 P1.22,141)	8570 (P1.19,15)	8570 (P1.22,14)	8570 APorA
8570	256	256	256	256
44/76	256	256	256	256
B16B6	1	1	1	1
3576	2	8	8	8
9547	2	4	4	2
2981	64	1	16	1
6557	32	1	128	1

[0113] 표 10에서 처음 5 검사 균주의 경우, PorA 발현은 백신에 의해 유도된 살균성 항체의 역가에 어떠한 영향도 없었다. 마지막 2 균주의 경우, 이 둘은 P1.14를 발현하고, 백신 내 P1.14 에피토프의 존재는 균주를 사멸시키는 개별 혈청의 능력과 상관관계가 있었다. 이러한 결과는 PorA에 대한 항체가 일부 균주에 대해 관찰된 사멸에 관여한다는 것을 보여준다. 다른 균주 예컨대 상동성 균주 및 균주 44/76에 대해서는, 다른 항원이 대부분의 살균성 활성의 원인이었다. 이 결과는 살균성 격감 분석을 이용한 분석법으로 검증하였다. 이러한 분석 결과 중 하나를 도 16에 도시하였다. 도 17에 도시한 결과는 LOS 및 FHBP(GNA1870)에 대한 항체가, 8570 HOPS-G1의 PorA 닉아웃 돌연변이체에 대한 항혈청에 의한 균주 8570의 사멸에 관여한다는 것을 보여준다.

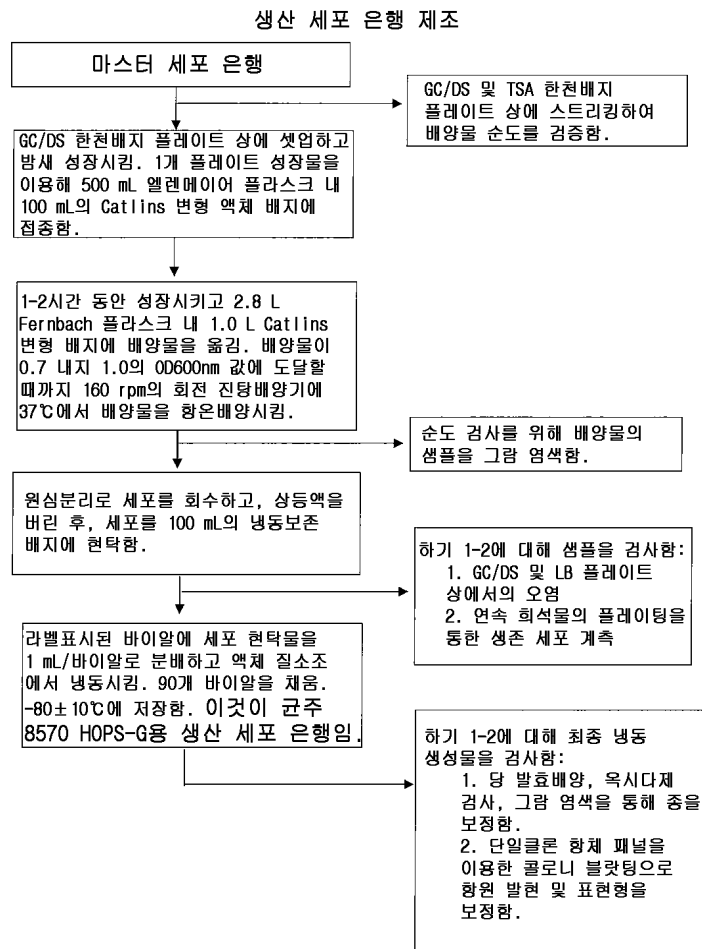
도면

도면1

마스터 세포 은행 제조

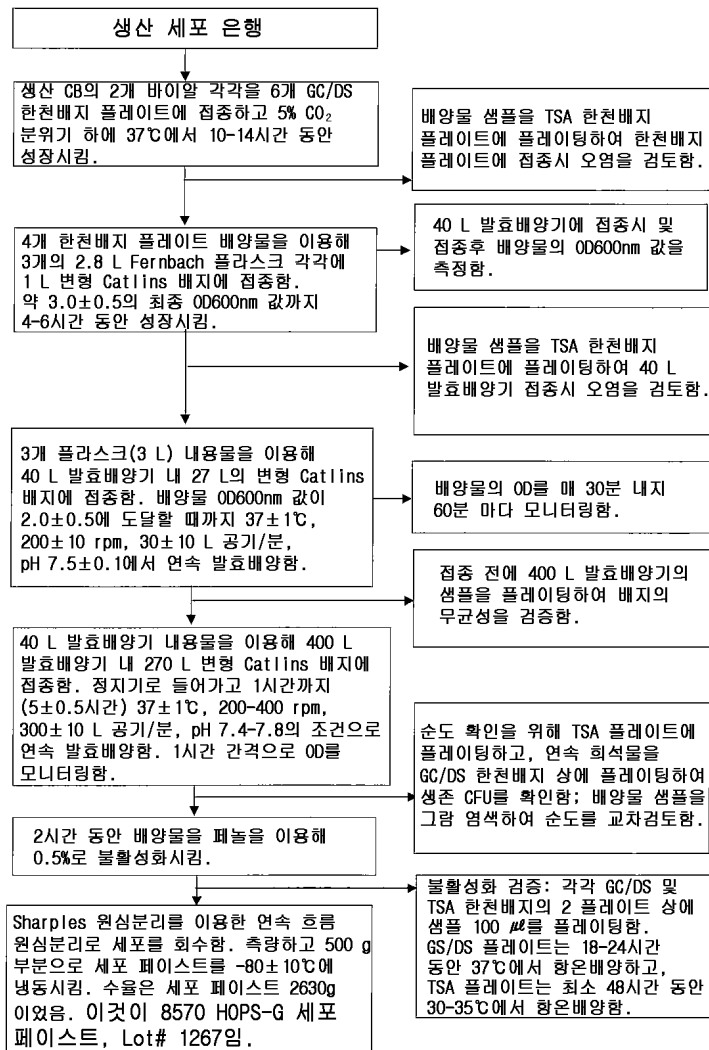


도면2



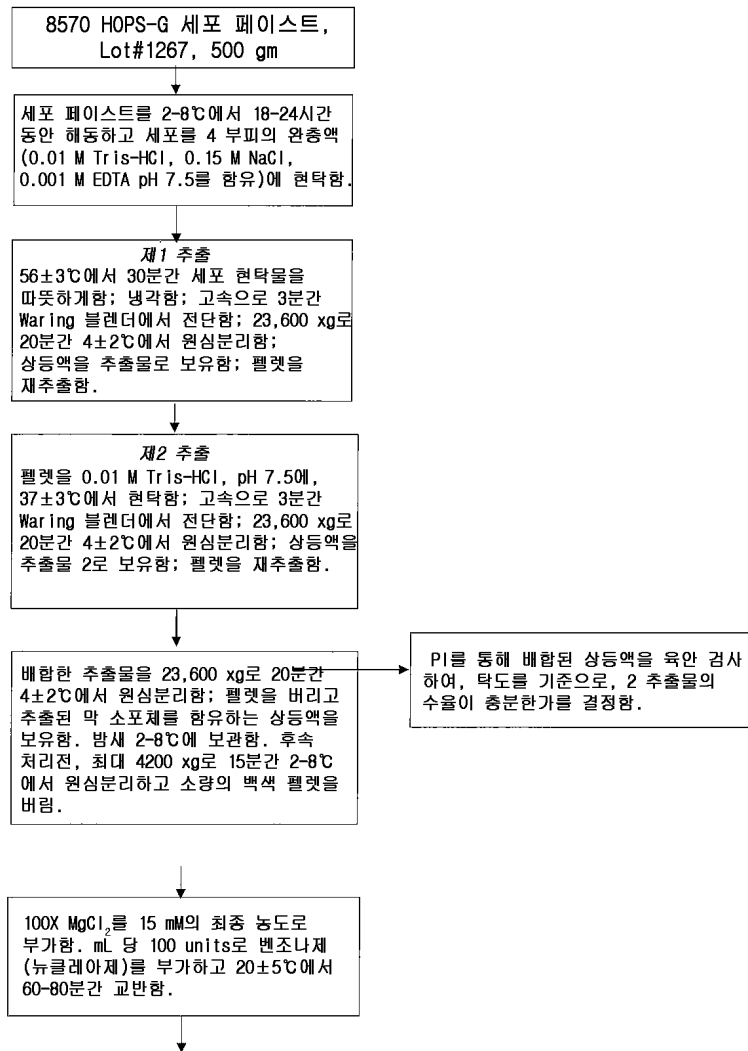
도면3

발효배양



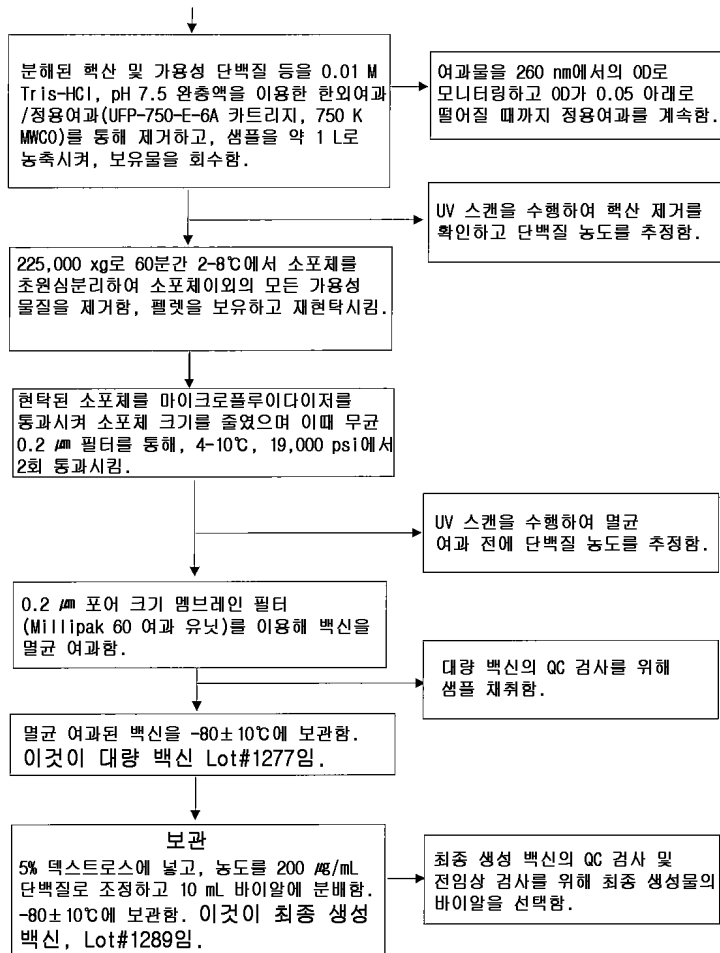
도면4

천연 외막 소포체의 정제

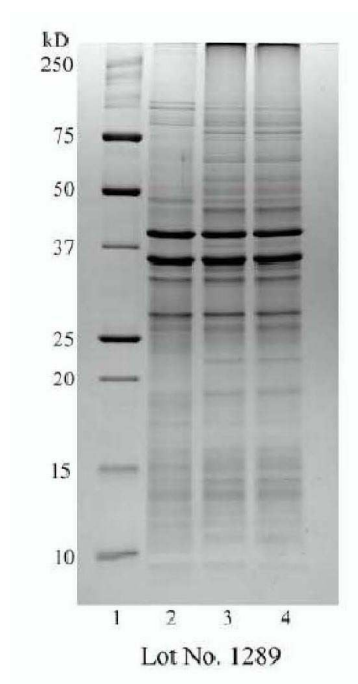


도면5

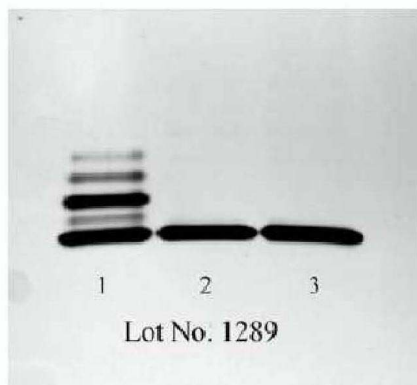
천연 외막 소포체의 제조(연속)
(501건물, 3호실)



도면6

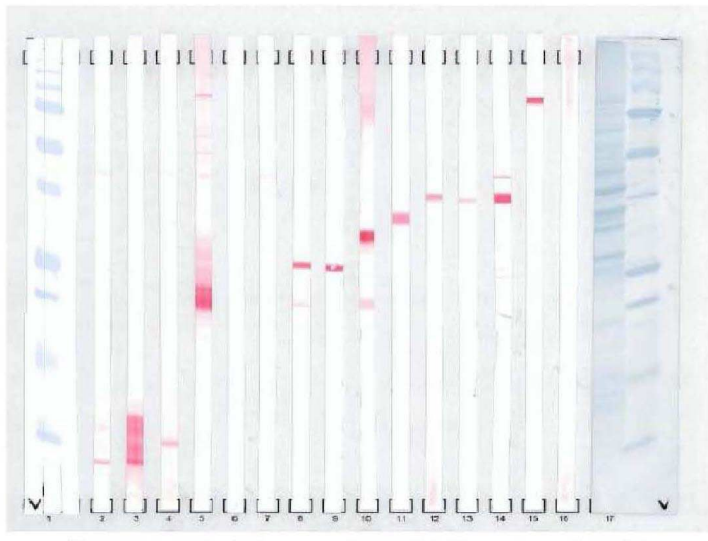


도면7



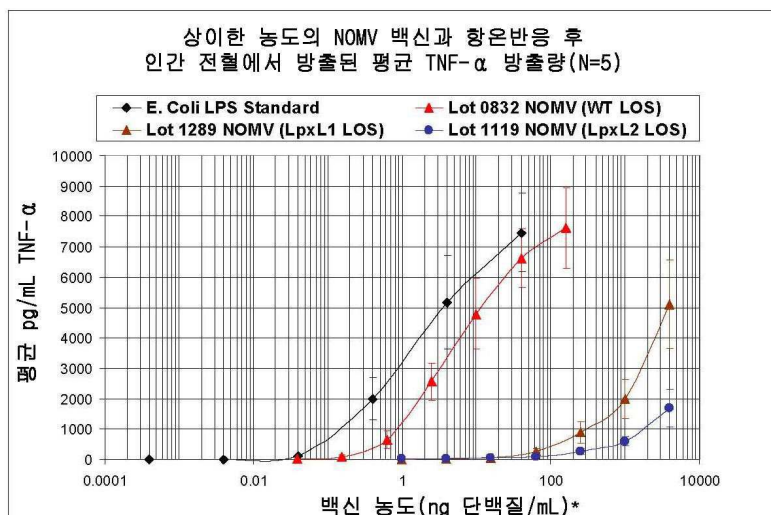
도면8

단일클론 항체를 이용한 정체성 검사
수막구균 8570 HOPS-G NOMV 백신, BPR-779-00, Lot No.1289



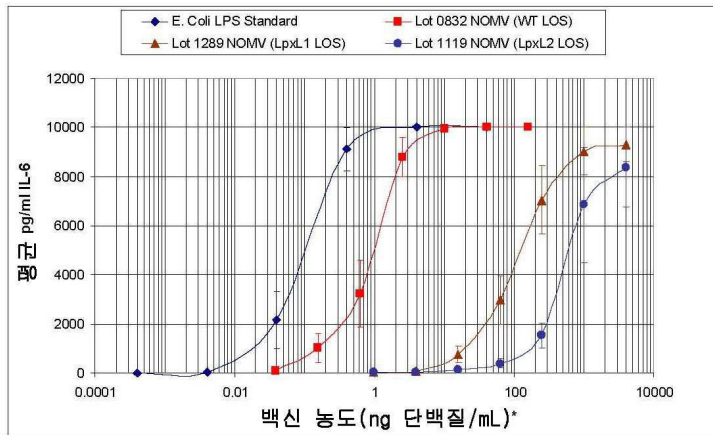
레인	항체 특이성	단일클론 항체	예상 반응	검사 결과
1	사전염색 표준물	NA		
2	L8 LOS	2-1 L8	미량	미량
3	L8v LOS	25-1-LC1	양성	양성
4	L3,7 LOS	9-2-L379	미량	미량
5	Lip (H8)	2-1-CA2	양성	양성
6	Opa P5.10	23-1-P5.10	음성	음성
7	Opa P5.11	MF7-1-P5.11	음성	음성
8	Opc (P5.C)	B306-P5C	양성	양성
9	FHBP 1 (GNA1870)	JAR 4	양성	양성
10	Rmp	9F5	양성	양성
11	PorB P4	15-1-P4	양성	양성
12	PorA P1.14	MN21G3.17	양성	양성
13	PorA P1.15	MN3C5C	양성	양성
14	PorA P1.19	2-1-P1.19	양성	양성
15	TBP2	476C2G2	양성	양성
16	Gp B 폴리사카라이드	2-2-B	음성	음성
17	아미도 블랙 염료	NA		

도면9



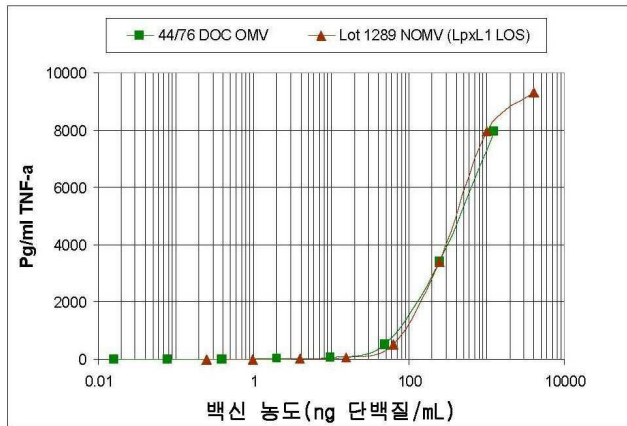
도면10

상이한 농도의 NOMV 백신과 항온반응 후
인간 전혈로부터 방출된 IL-6

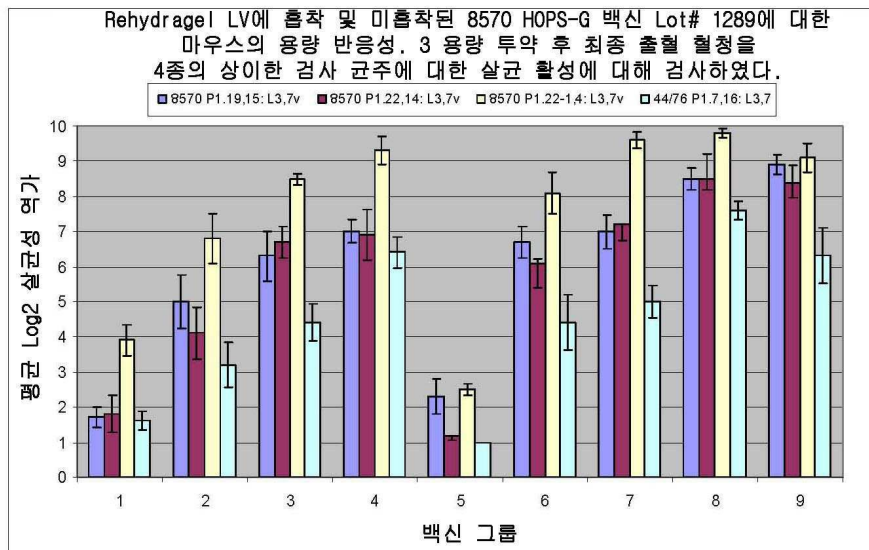


도면11

다양한 농도의 균주 44/76 유래 DOC-추출 OMV 또는 백신 Lot 1289와
항온반응 후 인간 전혈로부터 방출된 TNF- α 방출량



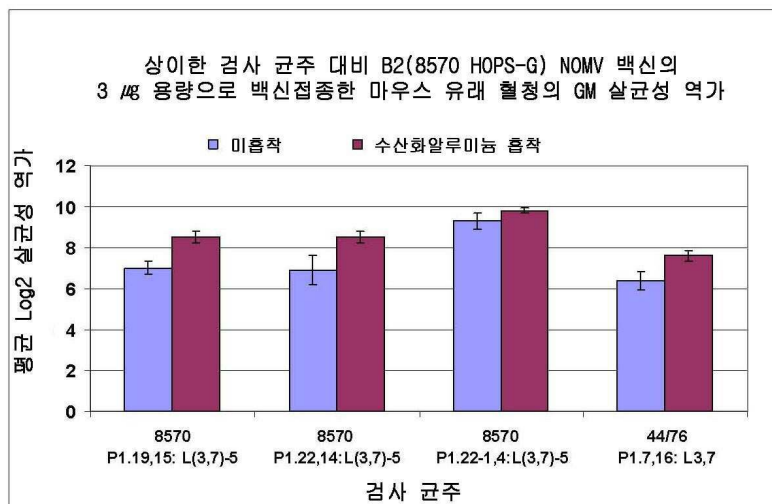
도면12



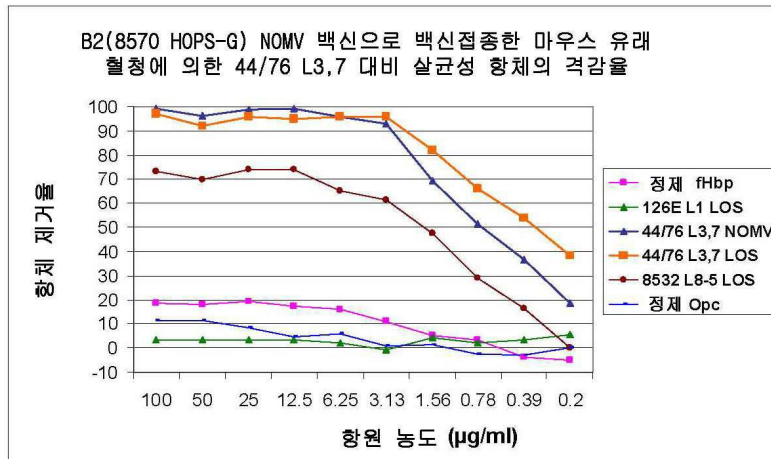
백신 그룹 :

- | | |
|----------------|---------------------------------|
| 1) 0.1 μ g | 5) 0.1 μ g + Rehydragel LV |
| 2) 0.3 μ g | 6) 0.3 μ g + Rehydragel LV |
| 3) 1.0 μ g | 7) 1.0 μ g + Rehydragel LV |
| 4) 3.0 μ g | 8) 3.0 μ g + Rehydragel LV |
| | 9) 1.0 μ g + Rehydragel HPA |

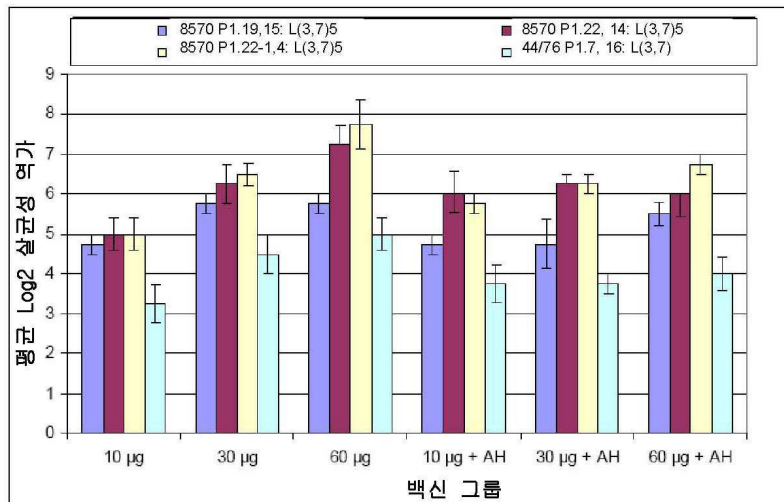
도면13



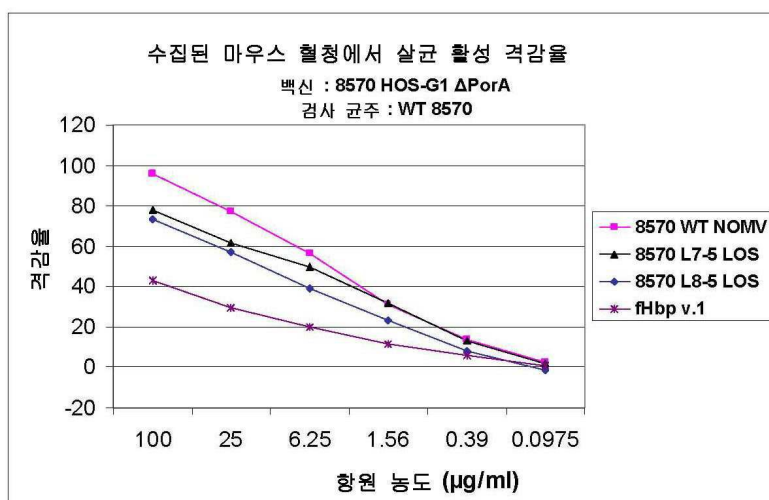
도면14



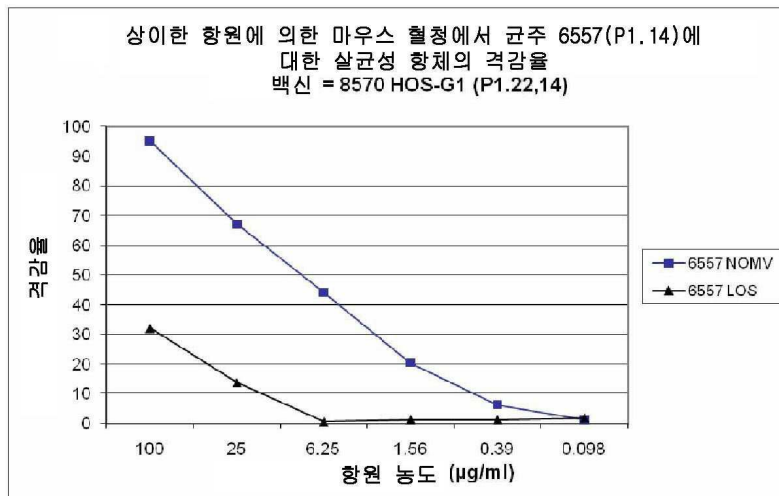
도면15



도면16



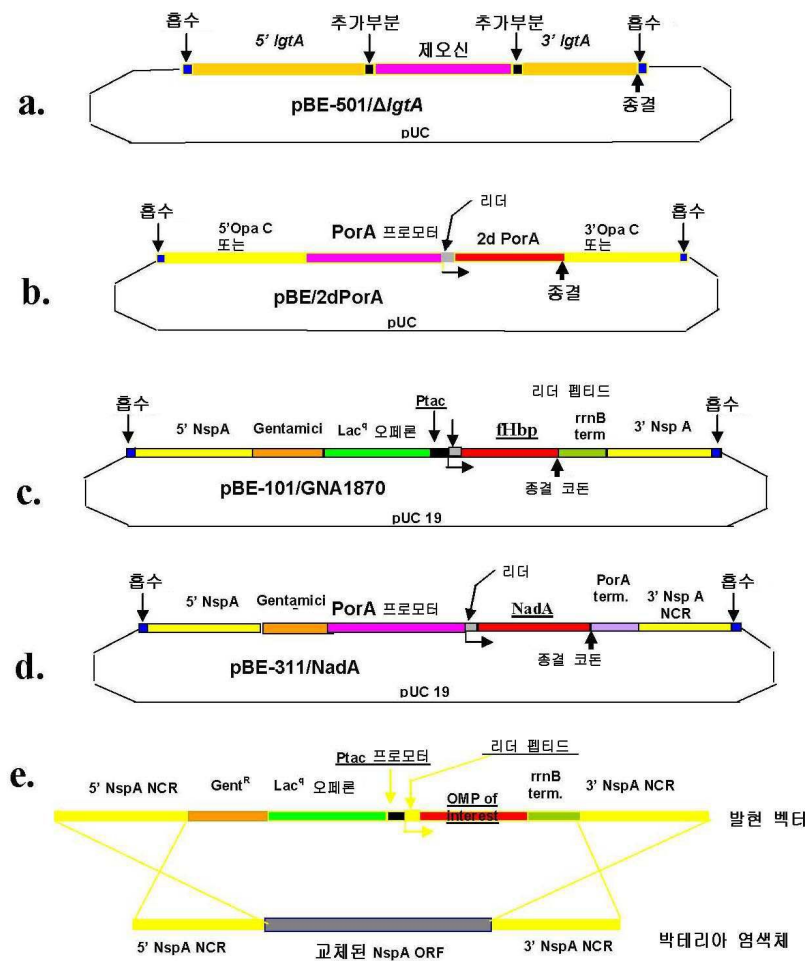
도면17



도면18

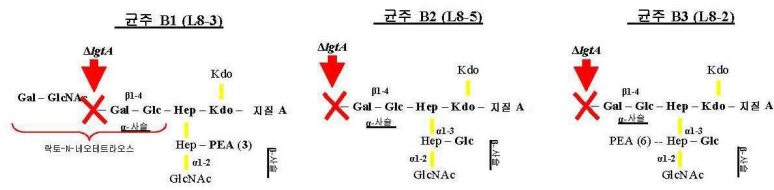
균주 B1	균주 B2	균주 B3
모균주 H44/76 B:15:P1.7,16:L3,7 ET-5 클론 PorB3 TbpB 이소타입 II	모균주 8570 B:4:P1.19,15:L(3,7)-5 ET-5 클론 PorB3 TbpB 이소타입 II	모균주 B16B6 B:2a:P1.5,2:L2 ET-37 클론 PorB2 TbpB 이소타입 I
돌연변이 <i>synX</i> 결실 <i>lpxL1</i> 결실 제2 PorA 부가 (P1.7-1.1) 과발현 NadA L8-3 LOS 및 Opc의 안정된 발현	돌연변이 <i>synX</i> 결실 <i>lpxL1</i> 결실 제2 PorA 부가 (P1.22,14) 과발현 rHbp (v.1) L8-5 LOS 및 Opc의 안정된 발현	돌연변이 <i>synX</i> 결실 <i>lpxL1</i> 결실 제2 PorA 부가 (P1.22-1.4) 과발현 rHbp(v.2) L8-2의 안정된 발현

도면19

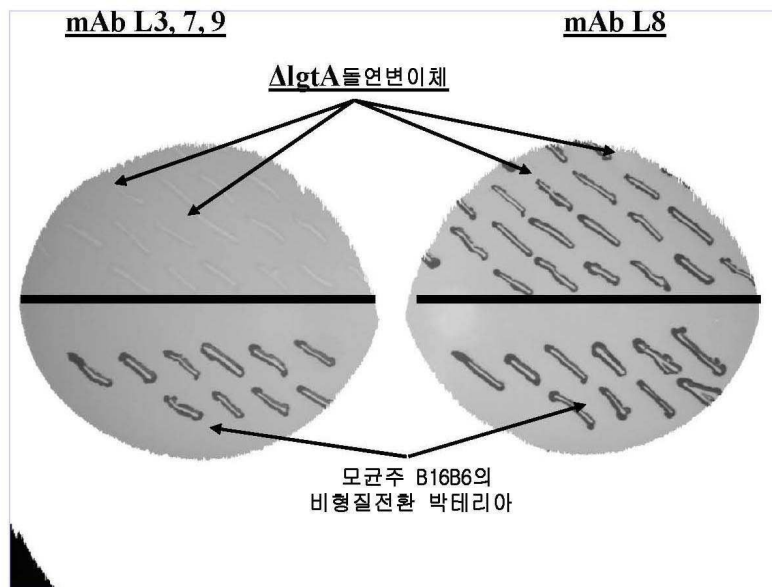


도면20

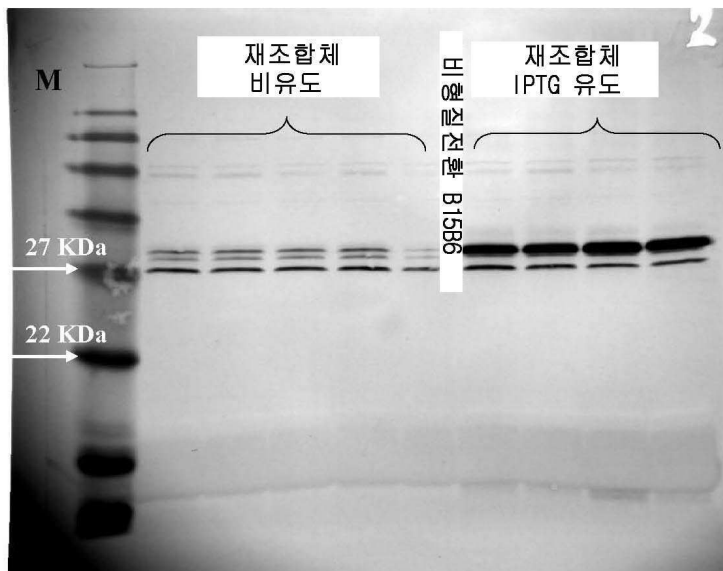
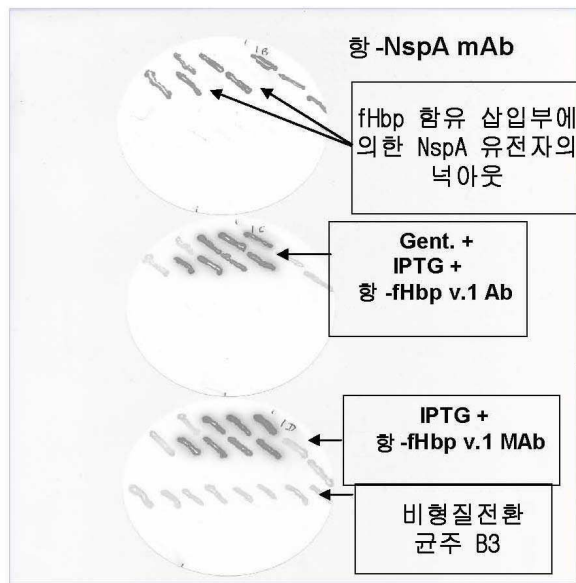
A.



B.



도면21



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> U.S. ARMY MEDICAL RESEARCH ACQUISITION ACTIVITY

Zollinger, Wendell D.

Donets, Mikhail

Schmiel, Deborah

Ionin, Boris

Marques, Ryan

Moran, Elizabeth E.

<120> MENINGOCOCCAL MULTIVALENT NATIVE OUTER MEMBRANE VESICLE

VACCINE,
METHODS OF MAKING AND USE THEREOF

<130> 20554W001

<150> 61/057,462

<151> 2008-05-30

<160> 9

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 108

<212

> DNA

<213> Neisseria meningitidis

<220><221> misc_feature

<223> promoter region of opcA gene of Neisseria meningitidis

<220><221> misc_feature

<222> (93)..(104)

<223> poly-G sequence

<400> 1

catagttaaa acctctaaaa ttggattgt agtcggatat ggtaacataa cgtaaataat 60

cgttacgctt acaattatat tcttaagctt tcgggggggg ggggattt 108

<210> 2

<211> 109

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> promoter region of opcA gene of Neisseria meningitidis

<220><221

> misc_feature

<222> (93)..(104)

<223> replacement sequence for poly-G sequence

<220><221> misc_feature

<222> (95)..(102)

<223> Not I restriction site

<400> 2

catagttaaa acctctaaaa ttggattgt agtcggatat ggtaacataa cgtaaataat 60

cgttacgctt acaattatat tcttaagctt tcgcgcggcc gcgcatttt 109

<210> 3

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> promoter region of PorA of Neisseria meningitidis

<220><221> misc_feature

<222> (12)..(25)

<223>

> poly-G sequence

<400> 3

ggtttttttg cggggggggg ggggggtataa ttgaagac 38

<210> 4

<211> 2940

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> plasmid pOp-79 for insertion of sequence into promoter of opc of
Neisseria meningitidis

<400> 4

ctgcagattg ttttttacga cggggaagtt ggcaaagaaa tagcccgct aagaaaacag 60

gataaccac aacaagccac cgatgatgtt gtagcggata aatttggcat agtgcatttt 120

ccccataccg gcgacgaagg gggcgaaggt gcggacgatg ggcatataaac gggcaatgat 180

gatggttttg ccgccgtgtt tttcgtaaaa acggtgggtt ttatcgagat attcacgtcg 240

gaagatttta gaatcgggtt tggcgaacag cctgccgccg aaatatttgc cgacggtaaa 300

attgagcgcg tcgccgagta tggcggcaag gcttaataat gcaaccatca aatgaatatc 360

cataccgcc agcgcggcaa tcccgccggc ggcaaacagc agcgaatcgc cgggcagtaa 420

gggcgtaaca atcaggccgg tttcgcaaaa aacaatcaaa aacagaatcg cataaatcca 480

cacaccgtat tgcgccgaca gcgcgagcag gtgttggtcg atatggagga tgaagtcgat 540

ggcggaggca agcacggcgc gttcctaaaa aaacaaaccg cgtattttta ccgattggaa 600

aaatgccgtc tgaagagttt cagacggcat cggctattca aattcatttc acgtaaaaac 660

cgcaaaccaa aatagtttgc ggtttggcat ttaaagtgac aatgatgatt tcaaatcatc 720

agaattttat gccgacgcgc aagccgtatt cacgaatact ggttttcggg atggtgagcg 780

atactgcgc actcttggtt gttacactaa actcgccgga ttccttgtaa gtgcgttgtt 840

tgtagaacgg cccgcctcgc atgctggcgg attcgcccag tttttacca atatttcac 900

ccaatccaaa gccccagccg ttgggttttt gattgatgtc ttttttgaga ttggtaacgc	960
cggtgtttta tttatagcgg gaattgaggt caaatctcac ttcagaccaa gggttgatat	1020
accagccgtt acccagttgg gaaagcaaat ccgctgaac tttggctaac cacgactgac	1080
ggctgctgtg aagcgtatgc ttgggtggtt taatgctgtc tttgaagat tcaaaacca	1140
agccgcgacc cacacggaaa tttaaagaat cacttaacgt ttgggtgtag gtgtagcctg	1200
tgtaaagatc gatacggttt tcaggaacgc cggtgggcag tttacattt ttagtcttac	1260
ccagcttgtt ctcatctgtt tccaaattaa taatatTTTT tttgctgcgc ccgaaaccgg	1320
cttcaagcg gatgccttgg ttggcatcaa aaggaatc agcacgcacg ctgatgtgtt	1380
tggcagcttt gtgtttttct ttcaggaaaag cacgagtga agaaatggaa gagaggtcgg	1440
tgtggacggt aaactcatta gcggtttgaa gctcttgtgc agcggcggca gtaccggtca	1500
gggcaatcat ggcacatgta aaaactgttt tttcatagt taaaacctct aaaatttga	1560
ttgtagtctg atatggtaac ataacgtaaa taatcgttac gcttacaatt atattcttaa	1620
gctttcgcgc ggccgcgcat tttacatata ttaataaaaa ttaacaaata gttatttgtt	1680
tacaacgaat tgttattctc acttggtttt ctgtttttta tgggaatgac gaaattttag	1740
tttgtgtgta tttatcgtaa aaacagaaac ccgccgccgt cattccccgc caggcgggaa	1800
tctagaacct aacgcgacaa aaatttatcc gaagcgacaa caatctttc atcgtcattc	1860
ccgcgcaggc gggaatctag aacgtaaaa ctaaagaaac cgttttacc gataagtctc	1920
cgtgccgaca aacctagatt cccgcctgcg cgggaatgac gggattttag gtttctgatt	1980
tcggttttct gttttaaggg aatgacgaga cttgagatgg cggcatttat cgggagcaac	2040
tgaaccacc ctgccgtcat tcccgcgaaa gcgggaatct aggttcgtcc ggtttcgggt	2100
atttcgata gattcctgcc gcgttggggg tctggattcc gcctgcgcg ggaatgacgg	2160
gactttaggt ttctgttttt gtttgagacc tttgcaaaat tcttttcct cccgacagcc	2220
gaaacccaaa cacaggtttt cggtctgttt cgcgccaaat accgcctaatt ttaccctaaa	2280
tacccctta atctccccg gataccgat aatcagcat ccgggctgcc ttttaggcgg	2340
cagcgggcgc acttaacctg ttggccgctt tcaacaggtt caaacacatc gccttcaggt	2400
ggctttgcgc actcacttta atcagtccga aataggtgc ccgcgcatag cggaatttac	2460
ggtgcagcgt accgaagctc tgttcgacca catatagtgg attaaattta aaccagtacg	2520
gcgttgccct gccttgccgt actatttgta ctgtctgcgg cttcgtgcc ttgtcctgat	2580
ttaaatttaa tccactataa cgggtcttcg ataaatatcg gttacgtttg gtttgcgttt	2640

ccgtcagcgg acggttgcgg caggctttgc gcataatgcc gtccaacaac tgatgttctt 2700

ccagatgttg ccggttttcc gcactgtcat agcctttgtc ggcatagacg gtcgtacctt 2760

tgggcagtcc ttccaacaaa ggccgcaggt gtttgcactc atgggcattg gcgggggtaa 2820

tgtgcagttt ctcgatatag ccttcgcgat cggtaggggt atgttgtttg taaccgagtt 2880

tgttagaggcc gtttttcttg atccaacggg catcgctgtc cttactcggg gtggtttggc 2940

<210> 5

<211> 3341

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Plasmid pMN5 for insertion sequence used for knockout of lpxL1
(also called htrB) gene of Neisseria meningitidis

<400

> 5

ctgcagaaac cgtattgtct gcctcgcgga cgggaatggc gggtatcact ttgcatattg 60

caagcgcggc aatgcggctc aatccggtaa tcgttgccgt ctgaatacgg aaaaaatcca 120

caaaaaccga atcgttgcgt ccgaaatcct gatcgggcag atacagaaac ggcgcgctgc 180

ttttgcggaa ctgtttgacg agggcgcgca gcccttcggg gcgcccata aggaagacgt 240

tgtgatagcg gttgcggcct ttcaaaatct gttcgtccaa tatcttgttt ttttgatggg 300

aatacact gatcagcggg atactctgat taagcgcgta caccgccatc tcgaacgcgg 360

tgaagtgcgg atacaggatg atgacacgcg tttgtaatca tgtactcttt ttgataaaaa 420

attggagatt cctttacaaa tatgctctta cgtgctatta tttaatgac tttttaaaag 480

gagttaataa atatgcggca aggtattctt aaataaactg tcaatttgat agcgggaaca 540

aataattaga tgccttttt taggagggt tagttttttg taccagttt aagaatacct 600

ttatcatgtg attctaaagt atccagagaa tatctgtatg ctttgtatac ctatggttat 660

gcataaaaat cccagtata aaagtattta tctactggat ttttatgcc ttttgggttt 720

ttgaatggag gaaaatcaca tgaaaattat taatattgga gtttagctc atgttgatgc 780

aggaaaaact accttaacag aaagcttatt atataacagt ggagcgatta cagaattagg 840

aagcgtggac aaaggtacaa cgaggacgga taatacgtt ttagaacgtc agagaggaat 900

tacaattcag acaggaataa cctcttttca gtgggaaaat acgaaggtga acatcataga 960

cacgccagga catatggatt tcttagcaga agtatacgt tcattatcag ttttagatgg 1020

ggcaattcta ctgatttctg caaaagatgg cgtacaagca caaactcgta tattgtttca 1080

tgcacttagg aaaatgggga ttcccacaa cttttttatc aataagattg accaaaatgg 1140

aattgattta tcaacggttt atcaggatat taaagagaaa ctttctgccg aaattgtaat	1200
caaacagaag gtagaactgt atcctaatat gtgtgtgacg aactttaccg aatctgaaca	1260
atgggatacg gtaatagagg gaaatgatga ccttttagag aaatatatgt ccggtaaatc	1320
attagaagca ttggaactcg aacaagagga aagcataaga tttcataatt gttccctgtt	1380
ccctgtttat cacggaagtg caaaaaacaa tatagggatt gataacctta tagaagtgat	1440
tacgaataaa ttttattcat caacacatcg aggtccgtct gaactttgcg gaaatgtttt	1500
caaaattgaa tatacaaaaa aaagacaacg tcttgcatat atacgccttt atagtggagt	1560
actacattta cgagattcgg ttagagtatc agaaaaagaa aaaataaaag ttacagaaat	1620
gtatacttca ataaatggtg aattatgtaa gattgataga gcttattctg gagaaattgt	1680
tattttgcaa aatgagtttt tgaagttaaa tagtgttctt ggagatacaa aactattgcc	1740
acagagaaaa agaattgaaa atccgcatcc tctactacaa ataactgttg aaccgagtaa	1800
acctgaacag agagaaatgt tgcttgatgc ccttttgga atctcagata gtgatccgct	1860
tctacgatat tacgtggatt ctacgacaca tgaaattata ctttctttct tagggaaagt	1920
acaaatggaa gtgatttagt cactgttgca agaaaagtat catgtggaga tagaactaaa	1980
agagcctaca gtcatattata tggagagacc gttaaaaaat gcagaatata ccattcacat	2040
cgaagtgccg ccaaatcctt tctgggcttc cattggttta tctgtatcac cgcttccgtt	2100
gggaagtgga atgcagiatg agagctcgg tttctttgga tacttaaatc aatcatttca	2160
aaatgcagtt ttggaaggga tacgctatgg ttgcgaacaa ggattatatg gttggaatgt	2220
gacggaatgt aaaatctgtt ttaagtatgg ctatactat agccctgtta gtaccccgagc	2280
agattttcgg atgcttgctc ctattgtatt ggaacaagtc ttaaaaaaag ctggaacaga	2340
attgttagag ccatatctta gttttaaaat ttatgcgcca caggaatatc tttcacgagc	2400
atacaacgat gtccttaaat attgtgcgaa catcgtagac actcaattga aaaataatga	2460
ggtcattctt agtggagaaa tccctgctcg gtgtattcaa gaatatcgta gtgatttaac	2520
tttctttaca aatggacgta gtgtttgttt aacagagtta aaagggtacc atgttactac	2580
cggatgaacct gtttgccagc cccgtcgtcc aaatagtcgg atagataaag tacgatatat	2640
gttcaataaa ataacttagt gtattttatg ttgttatata aatatggttt cttgttaaat	2700
aagatgaaat attttttaat aaagatttga attaaagtgt aaaggaggag atagtattta	2760
taaactacaa gtggatatgt tgtcctgtat gtggaaataa aacacgatta aagataaggg	2820
aagatactga attaaaaatt cccctctat tgtccgaaat gcagacaaga aaatttaatt	2880

gaaataaagc agttcaaagt aactgtgatt acagagccag acgcaaagac gcagagccga 2940

taaaatgaga ttaataacaat ctcatTTTTtA tcggctcttt ccgttatgta tggattcttt 3000

taacgcgtca gaaactgcaa aacatacagt acaaaaaata taaatttcat ctcgatacac 3060

atTTTctttt cagacggcaa aatacaaatg ccgtctgaaa ctattgaaac ctgccgcgt 3120

tgacctgcat ccccgaaagga ttgagtttgg cggcaagccc gtggttgcgt aaggcgtggg 3180

tcagcgcgac ggcaagaccg tccgccgcat ccggctgggg cgttcccgaa agtccaaca 3240

tctgcaccac catatgctgc acctgttctt ttgccgcctt gcccttgccg actaccgcct 3300

gtttgacctg ctttcagacg gtccatccat cacactgcag g 3341

<210> 6

<211> 7687

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> plasmid pBE-101 for expression of fHBP variant 1 of Neisseria meningiditis

<400> 6

tcgcgcgttt cggatgatgac ggtgaaaacc tctgacacat gcagctcccg gagacggtea 60

cagcttgtct gtaagcggat gccgggagca gacaagcccg tcagggcgcg tcagcgggtg 120

ttggcgggtg tcggggctgg cttaactatg cggcatcaga gcagattgta ctgagagtgc 180

accataaatt cgagctcgac cgtctgaaac ggcggaag cgtttaaccg gcgcgttgcc 240

tttaaatggt ggcgggcgga tcacggcgcg gatgggtgaa acttgcaaac ggtttggaag 300

aaacagcggg atctgtcgga ttgttcagg tgcaggcata cggttttgtg tgcgtctgtg 360

ccttaagcgt cggacatttc cggcgccggc tgtgccgtct gaaacgccg gcgggggatg 420

cggctgcgtt ttccatcgat aagcatattt tccggacgcg ttcggggcgg gttttcccg 480

gcggccgccg atttgtttgc gcttatatag tggattaaca aaaatcagga caaggcgacg 540

aagccgcaga cagtacaaat agtacggaac cgattcactt ggtgcttcag caccttagag 600

aatcgttctc tttagagctaa ggcgaggcaa cgccgtactg gttttgtta atccactata 660

aaaaaactg cagcaaatcg tttaaaaaca agcgtccttt ttcggtcggg cggaatacgg 720

cagggtcggg ttccagcagg cttttttgcc ttgccgttc gatttgccc atgattttgg 780

cactcggtag gcccggtgcg tcttgcaaca tcgcggcggg tacgccgtcg gtcaggcgca 840

gggcgttcat catgaattcg aacggcaaat cttcggcagc gacggttttg cgttcgacgg 900

cttactcgg ttggctttgc attaaggcga ggtagtcgtt ggggtggcgg cgcgacgg 960

tgcgctcgat gcggtcggga taggaaattt tgccgtgcgc gcccggcct atgcctaaat	1020
aatcgccgaa ctgccagtag ttcaaattgt ggcggcactg catggctggt ttcgcaaaag	1080
ccgatgtttc gtagtgaca aaaccgcgc cttccagcgc gccgtgtacc gcgtcttcga	1140
tgtcgagggc ggcttcgtct tgcggcaaac ctttcggcgg cgtatgaccg aacggcgtgt	1200
tcggttccat cgtcaggtag tacgcgtga tttgggttgc gcccgtaggg atccccactt	1260
cgctgctgcc caaggttgcc gggtagcga caccgtggaa acggatgaag gcacgaaccc	1320
agttgacata agcctgttcg gtctgtaaac tgtaatgaa gtagcgtatg cgctcacgca	1380
actgtccag aaccttgacc gaacgcagcg gtgtaacgg cgcagtggcg gttttcatgg	1440
cttgttatga ctgtttttt gtacagtcta tgccctgggc atccaagcag caagcgcgtt	1500
acgccgtggg tcgatgtttg atgttatgga gcagcaacga tgttacgcag cagcaacgat	1560
gttacgcagc agggcagtcg ccctaaaaca aagttagggt gctcaagtat gggcatcatt	1620
cgcacatgta ggctcggccc tgaccaagtc aaatccatgc gggtgctct tgatcttttc	1680
ggtcgtgagt tcggagacgt agccacctac tcccaacatc agccggactc cgattacctc	1740
gggaacttgc tccgtagtaa gacattcatc gcgcttgctg ctttcgacca agaagcgggt	1800
gttggcgctc tcgcggctta cgttttgcgc aggtttgagc agccgcgtag tgagatctat	1860
atctatgac tcgcagctc cggcgagcac cggaggcagg gcattgccac cgcgctcatc	1920
aatctctca agcatgagge caacgcgctt ggtgcttatg tgatctacgt gcaagcagat	1980
tacggtagc atccccaggt ggctctctat acaaagtgg gcatacggga agaagtgatg	2040
cactttgata tcgaccaag taccgccacc taacaattcg ttcaagccga gatcggttc	2100
ccggccgcgg aatgccgatt tcttttcca gcaatttgat ttgtttggag atgccgggtt	2160
gcgaagtaaa caaggttcg gccgcttcgg aaacgttcag gttgtgctgg taaacttcta	2220
aggcgatatt caattgccga caccatcgaa tggtagcaaaa ctttcgcgg tatggcatga	2280
tagcggcgg aagagagtca attcagggtg gtgaatgtga aaccagtaac gttatacgat	2340
gtcgagagat atgccggtgt ctcttatcag accgtttccc gcgtggtgaa ccaggccagc	2400
cacgtttctg cgaaaacgcg ggaaaaagtg gaagcggcga tggcggagct gaattacatt	2460
cccaaccgcg tggcacaaca actggcgggc aaacagtcgt tgctgattgg cgttgccacc	2520
tccagtctgg ccttcacgc gccgtcgaa attgtcgcgg cgattaaatc tcgcgccgat	2580
caactgggtg ccagcgtggt ggtgtcgatg gtagaacgaa gcggcgtcga agcctgtaaa	2640
gcggcgggtg acaatcttct cgcgcaacgc gtcagtgggc tgatcattaa ctatccgctg	2700
gatgaccagg atgccattgc tgtggaagct gctgcacta atgttcggc gttatttctt	2760

gatgtctctg accagacacc catcaacagt attatatttct cccatgaaga cggtagcgga 2820

ctgggcgtgg agcatctggt cgcatlgggt caccagcaaa tcgcgctgtt agcgggccc 2880

ttaagtcttg tctcggcgcg tctgcgtctg gctggctggc ataaatatct cactcgcaat 2940

caaattcagc cgatagcgga acgggaaggc gactggagtg ccatgtccgg ttttcaaca 3000

accatgcaaa tgctgaatga gggcatcggt cccactgcga tgctggttgc caacgatcag 3060

atggcgctgg gcgaatgcg cgccattacc gactccgggc tgcgcgttgg tgcggatctc 3120

tcggtagtgg gatagcaga taccgaagac agctcatgtt atatcccgcc gttaccacc 3180

atcaaacagg attttcgctt gctggggcaa accagcgtgg accgcttgct gcaactctct 3240

cagggccagg cggatgaagg caatcagctg ttccccgtct cactgggtgaa aagaaaaacc 3300

accctggcgc ccaatacgca aaccgcctct ccccgcgctg tggccgattc attaatgcag 3360

ctggcacgac aggtttcccg actgaaagc gggcagtgag cgcaacgcaa ttaatgtaag 3420

ttagctcact cattaggcac aattctcatg ttgacagct tatcatcgac tgcacggtgc 3480

accaatgctt ctggcgtcag gcagccatcg gaagctgtgg tatggctgtg caggtcgtaa 3540

atcactgcat aattcgtgtc gctcaaggcg cactccggtt ctggataatg ttttttcgac 3600

cgacatcata acggttcttg caaatattct gaaatgagct gttgacaatt aatcatcggc 3660

tcgtataatg tgtggaattg tgagcggata acaatttcac acaggaaaca gccagtccgt 3720

ttaggtgttt tcacgagcac ttaccaaca aggaccatag catatgaatc gaactgcctt 3780

ctgctgcctt tctctgacca ctgccccgat tctgaccgcc tgcagcagcg gaggggtgg 3840

tgctcgccgc gacatcggtg cggggcttgc cgtatgacta accgcaccgc tcgaccataa 3900

agacaaaggt ttgcagcttt tgacgttga tcatccgtc aggaacacg agaaactgaa 3960

gctggcgcca caaggtcgcc aaaaaactta tggaaacggt gacagcctca atacgggcaa 4020

attgaagaac gacaaggtca gccgtttcga ctttatccgc caaatcgaag tggacgggca 4080

gctcattacc ttggagagtg gagagttcca agtatacaaa caaagccatt ccgcctaac 4140

cgcttttcag accgagcaaa tacaagattc ggagcattcc gggaagatgg ttgcgaaacg 4200

ccagttcaga atcggcgaca tagcgggcga acatacatct tttgacaagc tccccgaagg 4260

cggcagggcg acatctcgcg ggacggcggtt cggttcagac gatgccggcg gaaaactgac 4320

ctacaccata gatttcgccc ccaagcaggg aaacggcaaa atcgaacatt tgaaatcgcc 4380

agaactcaat gtcgacctgg ccgccgccga tatcaagccg gatggaaaac gccatgccgt 4440

catcagcgggt tccgtccttt acaaccaagc cgagaaaggc agttactccc tcggtatctt 4500

tggcggaaaa gccaggaag ttgccggcag cgcggaagtg aaaaccgtaa acggcatacg	4560
ccataatcgcc cttagcccca agcaataacg ccggtgtgcg cgtcaaattc tgatatgcgc	4620
cttattctgc aaaccgccag cttggctgtt ttggcggatg agagaagatt ttcagcctga	4680
tacagattaa atcagaacgc agaagcggtc tgataaaaca gaatttgcct ggccggcagta	4740
gcgcggtggt cccacctgac cccatgccga actcagaagt gaaacgccgt agcgcgatg	4800
gtagtgtggg gtctcccat gcgagagtag ggaactgccca ggcatcaaat aaaacgaaag	4860
gctcagtcga aagactgggc ctttcgtttt atctgttgtt tgtcggtgaa cgctctcctg	4920
agtaggacaa atccgccgc cgggcgagcc ttggcgggtt ttgttttctg ccaccgcaac	4980
tacacaagcc ggccggtttt tacgataatc ccgaatgctg cggtttctgc cgccctattt	5040
tttgaggaat ccgaaatgtc caaaaccatc atccacaccg acaaagcccc cgccgccatc	5100
ggcgcgtaca gccaaagcgt ccgagcaggc gacaccgttt acatgagcgg tcaaattccc	5160
ctcgatcccc ccacgatgac cgtcgtcggc aacggcgatt tccgcgccga agcgcgcca	5220
gtgttccaaa acctgcaagc cgtcgcgaa gcggcaggcg gcacgtggc cgacatcgtc	5280
aaactcaacg cctacctgac cgacttgggc aattttgccg tcttcaacga agtcatggcg	5340
gaatttatcg ccgagccctt ccccgccgc gccgccgtcg gcgttgcctc gctgccc	5400
ggcgtgcagg tcgaagccga agccgtctc gtgaccgtct gaaacggaag cttagcgtaa	5460
tcattggtcat agctgtttcc tgtgtgaaat tgttatccgc tcacaattcc acacaacata	5520
cgagccggaa gcataaagt taaagcctgg ggtgcctaata gagtgagcta actcacatta	5580
attgcgttgc gctcactgcc cgctttccag tcgggaaacc tgcgtgcca gctgcattaa	5640
tgaatcgcc aacgcgcggg gagaggcgg ttgcgtattg ggcgctcttc cgcttcctcg	5700
ctcactgact cgctgcgctc ggtcgttcgg ctgcggcgag cggatcagc tcaactcaaag	5760
gcgtaatac ggttatccac agaatcagg gataacgcag gaaagaacat gtgagcaaaa	5820
ggccagcaaa aggccaggaa ccgtaaaaag gccgcgttgc tggcgttttt ccataggctc	5880
cgcctccctg acgagcatca caaaaatcga cgtcaagtc agaggtggcg aaaccgcaca	5940
ggactataaa gataccaggc gtttccctt ggaagctccc tcgtgcgctc tctgttccg	6000
acctgcccgc ttaccggata cctgtccgc tttctccctt cgggaagcgt ggcgctttct	6060
catagctcac gctgtaggt tctcagttcg gtgtaggtcg ttcgtccaa gctgggctgt	6120
gtgcacgaac ccccggttca gcccgaccgc tgcgccttat ccggtaaacta tcgtcttgag	6180
tccaacccgg taagacacga cttatgccca ctggcagcag ccactggtaa caggattagc	6240
agagcgaggt atgtaggcgg tgctacagag ttcttgaagt ggtggcctaa ctacggctac	6300
actagaagga cagtatattg tatctgcgct ctgctgaagc cagttacctt cggaaaaaga	6360

gttggtagct cttagatccgg caaacaacc accgctggta gcggtgggtt ttttgtttgc 6420
aagcagcaga ttacgcgcag aaaaaaagga tctcaagaag atcctttgat cttttctacg 6480
gggtctgacg cttagtgga cgaaaactca cgttaaggga ttttggcat gagattatca 6540
aaaaggatct tcacctagat ctttttaaat taaaaatgaa gttttaaatc aatctaaagt 6600

atatatgagt aaacttggtc tgacagttac caatgcttaa tcagtggagc acctatctca 6660
gcgatctgtc tatttcgttc atccatagtt gcctgactcc ccgtcgtgta gataactacg 6720
atacgggagg gcttaccatc tggccccagt gctgcaatga taccgcgaga cccacgctca 6780
ccggtccag atttatcagc aataaaccag ccagccgga gggccgagcg cagaagtgg 6840
cctgcaactt tatccgctc catccagtct attaatgtt gccgggaagc tagagtaagt 6900
agttcgccag ttaatatgtt gcgcaacgtt gttgccattg ctacaggcat cgtgggtgca 6960
cgctcgtcgt ttggtatggc ttcatcagc tccggttccc aacgatcaag gcgagttaca 7020

tgatcccca tgttgtgcaa aaaagcgggt agctccttcg gtcctccgat cgttgtcaga 7080
agtaagttgg ccgcagtgtt atcactcatg gttatggcag cactgcataa ttctcttact 7140
gtcatgcat ccgtaagatg cttttctgtg actggtgagt actcaacaa gtcattctga 7200
gaatagtgtg tgcggcgacc gagttgctct tgcccggcgt caatacggga taataccgcg 7260
ccacatagca gaactttaa agtgtctatc attggaaaac gttcttcggg gcgaaaactc 7320
tcaaggatct taccgctgtt gagatccagt tcgatgtaac cactcgtgc acccaactga 7380
tcttcagcat cttttacttt caccagcgtt tctgggtgag caaaaacagg aaggcaaat 7440

gccgcaaaaa agggaataag ggcgacacgg aaatgttgaa tactcatact ctctctttt 7500
caatattatt gaagcattta tcagggttat tgtctcatga gcggatacat atttgaatgt 7560
atttagaaaa ataaacaaat aggggttccg cgcacatttc cccgaaaagt gccacctgac 7620
gtctaagaaa ccattattat catgacatta acctataaaa ataggcgtat cacgaggccc 7680
tttcgtc 7687

<210> 7

<211> 7687

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> plasmid pBE-201 for additional expression of fHBP variant 2 of

Neisseria meningitidis

<400> 7

tcgcgcgttt cggatgatgac ggtgaaaacc tctgacacat gcagctccc gagacggtca 60

cagcttgtct gtaagcggat gccgggagca gacaagcccc tcagggcgcg tcagcgggtg 120

ttggcgggtg tcggggctgg cttaactatg cggcatcaga gcagattgta ctgagagtgc 180

accataaatt cgagctcgac cgtctgaaac ggcgggcaaag ccgttaaccc gcgcgttgcc 240

tttaaatggt ggcgggcgca tcacggcgcg gatgggtgaa acttgcaaac ggttttgaaa 300

aaacagcggg atctgtcgga ttgttcagg tgcaggcata cggttttgtg tgcgtctgtg 360

ccttaagcgt cggacatttc cggcgggcgc tgtgccgtct gaaacgccc gcgggggatg 420

cggctgcgtt ttccatcgat aagcatattt tccggacgcg ttcggggcgg gttttcccgg 480

gcggccgccg atttgtttgc gcttatatag tggattaaca aaaatcagga caaggcgacg 540

aagccgcaga cagtacaaat agtacggaac cgattcactt ggtgcttcag caccttagag 600

aatcgttctc ttgagctaa ggcgaggcaa cgccgtactg gttttgtta atccactata 660

aaaaacactg cagcaaatcg tttaaaaaca agcgtccttt ttcggtcggg cggaatacgg 720

cagggtcggt ttccagcagg cttttttgcc ttgccgtttc gatttgcgcc atgattttgg 780

cactcggtag gcccggtgcg tcctgcaaca tcgcggcggg tacgccgtcg gtcaggcgca 840

gggcgttcat catgaattcg aacggcaaat cttcggcagc gacggttttg cgttcgacgg 900

cttcactcgg ttggctttgc attaaggcga ggtagtcgtt ggggtggcgg cggcgacgg 960

tgcgtcgat gcggtcggga taggaaattt tgcctgctgc gcccgccct atgcctaaat 1020

aatcgccgaa ctgccagtag ttcaaattgt ggcggcactg catggctggt ttcgcaaaag 1080

ccgatgtttc gtagtgga aaaccgcgc cttccagcgc gccgtgtacc gcgtcttcga 1140

tgtcgagggc ggcttcgtct tgcggcaaac ctttcggcgg cgtatgaccg aacggcgtgt 1200

tcggttccat cgtcaggtag tacgcgtga tgtgggttgc gcccgtaggg atcccgactt 1260

cgctgtgcc caaggttgcc gggtagcga caccgtggaa acggatgaag gcacgaaccc 1320

agttgacata agcctgttcg gttcgtaaac tgtaatgcaa gtagcgtatg cgctcacga 1380

actggtccag aaccttgacc gaacgcagcg gtggtaacgg cgcagtggcg gttttcatgg 1440

cttgttatga ctgtttttt gtacagtcta tgcctcgggc atccaagcag caagcgcgtt 1500

acgccgtggg tcgatgtttg atgttatgga gcagcaacga tgttacgcag cagcaacgat 1560

gttacgcagc agggcagtcg ccctaaaaca aagttagggt gctcaagtat ggcatcatt 1620

cgcacatgta ggctcggccc tgaccaagtc aaatccatgc gggctgctct tgatcttttc 1680

ggctgtgagt tcggagacgt agccacctac tccaacatc agccggactc cgattacctc 1740

gggaacttgc tccgtagtaa gacattcatc gcgcttctg ccttcgacca agaagcgggt 1800

gttggcgctc tcgcggtta cgttctgccc aggtttgagc agccgcgtag tgagatctat 1860

atctatgac tcgcagctc cggcgagcac cggaggcagg gcattgccac cgcgctcatc 1920

aatctctca agcatgagc caacgcgctt ggtgcttatg tgatctacgt gcaagcagat	1980
tacggtagc atcccgagt ggctctctat acaaagtgg gcatacgga agaagtgatg	2040
cactttgata tcgaccaag taccgccacc taacaattcg ttcaagccga gatcggttc	2100
ccggccgagg aatgccgatt tcttcttcca gcaatttgat ttgtttggag atgccgggtt	2160
gcgaagtaaa caaggcttcg gccgttcgg aaacgttcag gttgtgctgg taaacttcta	2220
aggcgtatth caattgccga caccatcgaa tggtagcaaaa cctttcgagg tatggcatga	2280
tagcggcagg aagagagta attcagggtg gtgaatgtga aaccagtaac gttatacgat	2340
gtcgagagat atgccggtg ctcttatcag accgtttccc gcgtggtaga ccaggccagc	2400
cacgtttctg cgaaaacgg ggaaaaagt gaagcgcgga tggcgagct gaattacatt	2460
cccaaccggc tggcacaaca actggcgggc aaacagtcgt tgctgattgg cgttgccacc	2520
tccagtctgg cctgcacgc gccgtcgaa attgtcggc cgattaaatc tcgcccgat	2580
caactgggtg ccagcgtgtt ggtgtcgatg gtagaacgaa gcggcgtaga agcctgtaaa	2640
gcggcggtgc acaatcttct cgcgcaacgc gtcagtgggc tgatcattaa ctatccgtg	2700
gatgaccagg atgccattgc tgtggaagct gcctgcacta atgttcggc gttatttctt	2760
gatgtctctg accagacacc catcaacagt attatttctt cccatgaaga cggtagcgga	2820
ctggcggtgg agcatctgtt cgcattgggt caccagcaaa tcgcgtgtt agcgggcca	2880
ttaagtctg tctggcgcg tctgcgtctg gctggctggc ataatatct cactcgcaat	2940
caaattcagc cgatagcga acgggaaggc gactggagtg ccatgtccg tttcaacaa	3000
accatgcaaa tgctgaatga gggcatcgtt cccactgca tgctggttg caacgatcag	3060
atggcgctgg gcgcaatgc cgccattacc gactccggc tcgctgttg tcgggatatc	3120
tcggtagtgg gatacgaca taccgaagac agctcatgtt atatccgcc gttaccacc	3180
atcaaacagg attttcgct gctggggcaa accagcgtg accgttctt gcaactctct	3240
cagggccagg cgtgaaggc caatcagctg ttcccgtct cactggtgaa aagaaaaacc	3300
accctggcgc ccaatacgca aaccgcctct ccccgcgct tggccgattc attaatgcag	3360
ctggcacgac aggtttcccg actggaaagc gggcagttag cgcaacgcaa ttaatgtaag	3420
ttagctcact cattaggcac aattctcatg ttgacagct tatcatcgac tgcacgtgc	3480
accaatgctt ctggcgtcag gcagccatcg gaagctgtgg tatggctgtg caggctgtaa	3540
atcactgcat aattcgtgc gctcaaggcg cactccgtt ctggataatg tttttgcgc	3600
cgacatcata acggttctgg caaatattct gaaatgagct gttgacaatt aatcatcggc	3660
tcgtataatg tttggaattg tgagcgata acaatttcac acaggaaaca gccagtccgt	3720

ttaggtgttt tcacgagcac ttcaccaaca aggaccatag catatgaatc gaactgcctt	3780
ctgctgcctt tctctgacca ctgcccgat tctgaccgcc tgcagcagcg gaggcggcgg	3840
tgtcgccgcc gacatcggcg cggggcttgc cgatgcacta accgcaccgc tcgaccataa	3900
agacaaaagt ttgcagtctt tgacgctgga tcagtccgtc aggaaaaacg agaaactgaa	3960
gctggcgcca caaggtgcgg agaaaaactta tggaaacggc gacagcctca atacgggcaa	4020
attgaagaac gacaaggta gccgcttcca ctttatccgt caaatcgaag tggacgggca	4080
gctcattacc ttggagagcg gagagttcca aatatacaaa caggaccact ccgccgtcgt	4140
tgcctacag attgaaaaaa tcaacaaccc cgacaaaatc gacagcctga taaaccaacg	4200
ctccttctt gtcagcggtt tgggcggaga acataccgcc ttcaaccaac tgcctgacgg	4260
caaagccgag tatcacggca aagcattcag ctccgacgat gctggcgga aactgaccta	4320
taccatagat ttcgccgcca aacagggaca cggcaaaatc gaacacctga aaacaccga	4380
gcaaaatgtc gagcttgccg ccgccgaact caaagcagat gaaaaatcac acgccgtcat	4440
tttggcgac acgcgtacg gcagcgaaga aaaaggcact taccacctcg cccttttcgg	4500
cgaccgcc caagaaatcg ccggtcggc aaccgtgaag ataggggaaa aggttcacga	4560
aatcgcatc gccggcaaac agtagtaacg ccggtgtgcg cgtcaaattc tgatatgcgc	4620
cttattctgc aaaccgccag cttggctgtt ttggcggatg agagaagatt ttcagcctga	4680
tacagattaa atcagaacgc agaagcggtc tgataaaaca gaatttgctt ggcggcagta	4740
gcgcggtggt cccacctgac cccatgccga actcagaagt gaaacgccgt agcgccgatg	4800
gtagtgtggg gtctcccat gcgagagtag ggaactgcca ggcatcaaat aaacgaaag	4860
gtcagtcga aagactgggc ctttcgtttt atctgttgtt tgtcggtgaa cgctctcctg	4920
agtaggacaa atccgccgc cgggcgagcc ttggcggtt ttgtttctg ccaccgaac	4980
tacacaagcc ggcggttttg tacgataatc ccgaatgctg cggttctgc cgccctattt	5040
tttgaggaat ccgaaatgtc caaaaccatc atccacaccg acaaagccc cgccgccatc	5100
ggcgctaca gccaaagcgt ccgagcaggc gacaccgttt acatgagcgg tcaaattccc	5160
ctcgatcccg ccacgatgac cgtcgtcggc aacggcgatt tccgcgccga agcgcgccaa	5220
gigtccaaa acctgcaagc cgtcgccgaa gcggcaggcg gcacgtggc cgacatcgtc	5280
aaactcaac cctacctgac cgacttgggc aattttgccg tcttcaacga agtcatggcg	5340
gaatttatcg ccgagccctt cccgccccgc gccgccgtcg gcgttgctc gctgccaaa	5400
ggcgtgcagg tcgaagccga agccgtctc gtgaccgtct gaaacggaag cttggcgtaa	5460

tcattggtcat agctgtttcc tgtgtgaaat tgttatccgc tcacaattcc acacaacata	5520
cgagccggaa gcataaagt taaagcctgg ggtgcctaata gattgagcta actcacatta	5580
attgctgtgc gctcactgcc cgctttccag tcgggaaacc tgcgtgccca gctgcattaa	5640
tgaatcggcc aacgcgcggg gagagcggtt ttgcgtattg ggcgctcttc cgcttcctcg	5700
ctcactgact cgctgcgctc ggtcgttcgg ctgcggcgag cggtatcagc tcaactcaaag	5760
gcggtataac ggttatccac agaatacagg gataacgcag gaaagaacat gtgagcaaaa	5820
ggccagcaaa aggccaggaa ccgtaaaaag gccgcgttgc tggcgttttt ccataggctc	5880
cgccccctg acgagcatca caaaaatcga cgctcaagtc agagggtggcg aaacccgaca	5940
ggactataaa gataccaggc gtttccccct ggaagctccc tcgtgcgctc tcctgttccg	6000
accctgccgc ttaccggata cctgtccgcc ttctccctt cggaagcgtt ggcgctttct	6060
catagctcac gctgtaggtt tctcagttcg gtgtaggtcg ttcgtcccaa gctgggctgt	6120
gtgcacgaac cccccgttca gcccagaccg tcgccttat ccggtactaa tcgtcttgag	6180
tccaacccgg taagacacga cttatcgcca ctggcagcag ccactggtaa caggattagc	6240
agagcgaggt atgtaggcgg tgctacagag ttcttgaagt ggtggcctaa ctacggctac	6300
actagaagga cagtatttgg tatctgcgct ctgctgaagc cagttacctt cggaataaga	6360
gttggttagct cttgatccgg caaacaacc accgctggta gcggtggttt tttgtttgc	6420
aagcagcaga ttacgcgcag aaaaaagga tctcaagaag atcctttgat cttttctacg	6480
gggtctgacg ctcagtggaa cgaaaactca cgttaaggga ttttggtcat gagattatca	6540
aaaaggatct tcacctagat ctttttaaat taaaaatgaa gttttaaatc aatctaaagt	6600
atatatgagt aaacttggtc tgacagttac caatgcttaa tcagttaggc acctatctca	6660
gcgatctgtc tatttcgttc atccatagtt gcctgactcc ccgtcgtgta gataactacg	6720
atacgggagg gcttaccatc tggccccagt gctgcaatga taccgcgaga cccacgtca	6780
ccggtccag atttatcagc aataaaccag ccagccggaa gggccgagcg cagaagtgtt	6840
cctgcaactt tatccgctc catccagtct attaatgtt gccgggaagc tagagtaagt	6900
agttcgccag ttaatagttt gcgcaacgtt gttgccattg ctacaggcat cgtggtgtca	6960
cgctcgtcgt ttggtatggc ttcatcagc tccggttccc aacgatcaag gcgagttaca	7020
tgatcccca tgttgtgcaa aaaagcgtt agctccttcg gtcctccgat cgttgtcaga	7080
agtaagtgtg ccgcagtgtt atactcatg gttatggcag cactgcataa ttctcttact	7140
gtcatgcat ccgtaagatg cttttctgtg actggtgagt actcaacaa gtcattctga	7200
gaatagtgtg tgcggcgacc gatttgctct tgcggcggt caatacggga taataccgcg	7260
ccacatagca gaactttaaa agtgctcatc attggaaaac gttcttcggg gcgaaaactc	7320

tcaaggatct taccgctgtt gagatccagt tcgatgtaac ccaactcgtgc acccaactga 7380
tcttcagcat cttttacttt caccagcgtt tctgggtgag caaaaacagg aaggcaaaat 7440
gccgcaaaaa agggataaag ggcgacacgg aaatgttgaa tactcatact cttecttttt 7500
caatattatt gaagcattta tcagggttat tgtctcatga gcggatacat atttgaatgt 7560

atttagaaaa ataaacaaat aggggttccg cgcacatttc cccgaaaagt gccacctgac 7620
gtctaagaaa ccattattat catgacatta acctataaaa ataggcgtat cacgaggccc 7680
tttcgtc 7687

<210> 8
<211> 7584
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> plasmid pBE-311 for additional expression of NadA of Neisseria meningiditis
<400> 8

tcgcgcgttt cggtgatgac ggtgaaaacc tctgacacat gcagctccc gagacggtca 60
cagcttgtct gtaagcggat gccgggagca gacaagccc tcagggcgcg tcagcgggtg 120

ttggcgggtg tcgggctgg cttaactatg cggcatcaga gcagattgta ctgagagtgc 180
accataaatt cgagctcgac cgtctgaaac ggcggaag cgttaacc gcgcgttgcc 240
tttaaatggt ggcgcgga tcacgcgcg gatgggtgaa acttgcaaac gttttggaaa 300
aaacagcgtt atctgtcgga ttgttcagg tgcaggcata cggttttgtg tgcgtctgtg 360
ccttaagcgt cggacatttc cggcgcggc tgtgccgtct gaaacgccc gcgggggatg 420
cggtcgcgtt ttccatcgat aagcatattt tccggacgcg ttcggggcgg gttttcccg 480
gcggccgcgc atttgtttgc gcttatatag tggattaaca aaaatcagga caaggcgacg 540

aagccgcaga cagtacaaat agtacggaac cgattcactt ggtgcttcag caccttagag 600
aatcgttctc tttagctaa ggcgaggcaa cgccgtactg gttttgtta atccactata 660
aaaaaactg cagcaaatcg tttaaaaaca agcgtccttt ttcggtcggg cggaatcgg 720
cagggtcgtt ttccagcagg cttttttgcc ttgccgttc gatttgcgcc atgattttgg 780
cactcggtag gccgtgcgc tcctgcaaca tcgcggcggg tacgccgtcg gtcaggcgca 840
ggcggttcat catgaattcg aacggcaaat ctccggcagc gacggttttg cgttcgacgg 900
cttactcgg ttggctttgc attaaggcga gtagtcgtt ggggtggcgg cggcggacgg 960

tgcgctcgat gcggtcggga taggaaattt tgccgtgcgc gcccgccct atgcctaaat 1020

aatcgccgaa ctgccagtag ttcaaattgt ggccggcactg catggctggt ttcgcaaaag	1080
ccgatgtttc gtagtggaca aaaccgcgc cttccagcgc gccgtgtacc gcgtcttcga	1140
tgtcgagggc ggcttcgtct tgcggcaaac ctttcggcgg cgtatgaccg aacggcgtgt	1200
tcggttccat cgtcaggtag tacgcgtga tgtgggttgc gcccgtaggg atcccgactt	1260
cgctgtgcc caaggttgc gggtagcga caccgtggaa acggatgaag gcacgaacc	1320
agttgacata agcctgttcg gttcgtaaac tgtaatgcaa gtagcgtatg cgctcacga	1380
actgggccag aaccttgacc gaacgcagcg gtggtaacgg cgcagtggcg gttttcatgg	1440
cttgttatga ctgtttttt gtacagtcta tgcctcgggc atccaagcag caagcgcgtt	1500
acgccgtggg tcgatgtttg atgttatgga gcagcaacga tgttacgcag cagcaacgat	1560
gttacgcagc agggcagtcg ccctaaaaca aagttaggtg gctcaagtat ggcatcatt	1620
cgcacatgta ggctcggccc tgaccaagtc aaatccatgc gggctgtctt tgatcttttc	1680
ggctgtgagt tcggagacgt agccacctac tccaacatc agccggactc cgattacctc	1740
gggaacttgc tccgtagtaa gacattcatc gcgcttgctg ccttcgacca agaagcggtt	1800
gttggcgctc tcgcggtta cgtttcgccc aggtttgagc agccgcgtag tgagatctat	1860
atctatgac tcgcagtctc cggcgagcac cggaggcagg gcattgccac cgcgctcatc	1920
aatctcctca agcatgagc caacgcgtt ggtgcttatg tgatctacgt gcaagcagat	1980
tacggtgacg atcccgaggt ggctctctat acaaagtgg gcatacggga agaagtgatg	2040
cactttgata tcgaccaag taccgccacc taacaattcg ttcaagccga gatcggcttc	2100
ccggcccgcg tcggacttcc agataatctt tgaatatgc tgttgttcta aggtctagat	2160
tcccgcctgc gcgggaatga cgaatccatc cgcacggaaa cctgcaccac gtcattccca	2220
cgaaccacaca tcccgctatt accacgaaag tgggaatcta ggacgcaggg ttaagaaaac	2280
ctacatcccg tcatctctca aaaacagaaa accaaaatca gaaacctaaa atcccgctat	2340
tcccgcgtag gcgggaatcc agtccgttca gtttcggctg tttccgataa attcctgctg	2400
cttttcattt ctagattccc actttcgtgg gaatgacggc ggaagggttt tggttttttc	2460
cgataaatte ttgaggcatt gaaattctag attccgcct gcgcgggaat gacgaatcca	2520
tccgtacgga aacctgcacc acgtcattcc taagaaccta catcccgta ttcctcaaa	2580
aacagaaaac caaatcaga aacctaaaat cccgtcattc ccgcgcaggc gggaatccag	2640
tccgttcagt ttcggctatt tccgataaat tctgtctgct tttcatttct agattccac	2700
tttcgtggga atgacggcgg aagggttttg gttttttccg ataaattctt gaggcattga	2760
aattctagat tccgcctgc gcgggaatga cggctgtaga tgcccgatgg tctttatagc	2820
ggattaacaa aaatcaggac aaggcgacga agccgcagac agtacagata gtacggaacc	2880

gattcacttg gtgcttcagc accttagaga atcgcttctt ttgagctaag gcgaggcaac	2940
gccgtacttg tttttgttaa tccactataa agtgccgcgt gtgttttttt atggcgtttt	3000
aaaaagccga gactgcatcc gggcagcagc gcatcggtc gcacgaggtc tgcgcttgaa	3060
ttgtgttgta gaaacacaac gtttttgaaa aaataagcta ttgttttata tcaaaatata	3120
atcattttta aaataaagggt tgcggcattt atcagatatt tgttctgaaa aatggttttt	3180
tgcggggggg ggggtataat tgaagacgta tcgggtgttt gcccgatgtt tttaggtttt	3240
tatcaaattt acaaaaggaa gccgatcata tgaaacactt tccatccaaa gtactgacca	3300
cagccatcct tgccactttc tgtagcggcg cactggcagc cacaaacgac gacgatgtta	3360
aaaaagctgc cactgtggcc attgctgctg cctacaacaa tggccaagaa atcaacggtt	3420
tcaaagctgg agagaccatc tacgacattg atgaagacgg cacaattacc aaaaaagacg	3480
caactgcagc cgatgttgaa gccgacgact ttaaaggctt gggcttgaaa aaagtcgtga	3540
ctaactgac caaaaccgtc aatgaaaaca acaaaacgt cgatgccaaa gtaaaagctg	3600
cagaatctga aatagaaaag ttaacaacca agttagcaga cactgatgcc gcttttagcag	3660
atactgatgc cgtctggat gcaaccacca acgccttgaa taaattggga gaaaatataa	3720
cgacatttgc tgaagagact aagacaaata tcgtaaaaat tgatgaaaaa ttagaagccg	3780
tggtgatac cgtcgacaag catgccgaag cattcaacga tatcgccgat tcattggatg	3840
aaaccaacac taaggcagac gaagccgtca aaaccgcaa tgaagccaaa cagacggccg	3900
aagaaacca acaaaacgtc gatgccaaag taaaagctgc agaaactgca gcaggcaaag	3960
ccgaagctgc cgtggcaca gctaatactg cagccgacaa ggccgaagct gtcgctgcaa	4020
aagttaccga catcaaagct gatatcgct cgaacaaaga taatattgct aaaaaagcaa	4080
acagtgccga cgtgtacacc agagaagagt ctgacagcaa atttgcaga attgatggc	4140
tgaacgtac taccgaaaaa ttggacacac gcttggttc tgctgaaaaa tccattgccg	4200
atcacgatac tcgcctgaac ggtttggata aaacagtgtc agacctgcgc aaagaaccc	4260
gccaaaggcct tgcagaacaa gccgcgtct cgggtctgtt ccaaccttac aacgtgggtc	4320
ggttcaatgt aacggctgca gtcggcggct acaaatccga atcggcagtc gccatcggt	4380
ccggcttcg ctttaccgaa aactttgccg ccaaagcagg cgtggcagtc ggcacttcgt	4440
ccggttttc cgcagcctac catgtcggcg tcaattacga gtggtaacgc cgggttatat	4500
cggggcgggtg aagcggatag ctttgtttt gacggctcgc cttcattctt tgattgcaat	4560
ctgactgcca atctgttca gcccacaaaca aaaatccgga tacggaagaa aaacggcaat	4620
aaagacagca aatacgtct gaaagatttt cagacgttat ttcgattttt tggcttggtt	4680

tgacatatata gtgagacctt tgcaaaaata gtctgttaac gaaatttgac gcataaaaat	4740
gcgcaaaaaa attttcaatt gcctaaaacc ttcctaatat tgagcaaaaa gtaggaaaaa	4800
tcagaaaagt ttgcatTTTT gaaaatgaga ttgagcataa aatttttagta acctatgtta	4860
ttgcaaaggt ctgaattgt cattccccacg caggcgggaa tctagtctgg aatgctgcgg	4920
cttctgccgc cctatttttt gaggaatccg aaatgtccaa aaccatcatc cacaccgaca	4980
aagccccgc cgccatcggc gcgtacagcc aagccgtccg agcaggcgac accgtttaca	5040
tgagcggta aatccccctc gatcccgcca cgatgaccgt cgtcggcaac ggcgatttcc	5100
gcgccgaagc gcgccaagtg ttccaaaacc tgcaagccgt cgccgaagcg gcaggcggca	5160
cgctggccga catcgtcaaa ctcaacgcct acctgaccga cttgggcaat ttgccgtct	5220
tcaacgaagt catggcgga tttatcgccg agcccttccc cgcccgcgcc gccgtcggcg	5280
ttgcctcgct gcccaaaggc gtgcaggctc aagccgaagc cgtcctcgtg accgtctgaa	5340
acggaagctt ggcgtaatca tggcatagc tgtttcctgt gtgaaattgt tatccgtca	5400
caattccaca caacatacga gccggaagca taaagtgtaa agcctggggg gcctaataag	5460
tgagctaact cacattaatt gcgttgcgct cactgcccgc tttccagtgc ggaaacctgt	5520
cgtgccagct gcattaatga atcgccaac gcgcggggag aggcggtttg cgtattgggc	5580
gtcttccgc ttctcgtc actgactgc tgcgtcgggt cgttcggctg cggcgagcgg	5640
tatcagctca ctcaaaggcg gtaatacgggt tatccacaga atcaggggat aacgcaggaa	5700
agaacatgtg agcaaaaggc cagcaaaagg ccaggaaccg taaaaaggcc gcgttgctgg	5760
cgtttttcca taggtccgc cccctgacg agcatcaca aaatcgacgc tcaagtcaga	5820
ggtggcgaaa cccgacagga ctataaagat accaggcgtt tccccctgga agctccctcg	5880
tgcgtctcc tgttcgacc ctgccgtta ccgataacct gtccgccttt ctcccttcgg	5940
gaagcgtggc gctttctcat agctcacgt gtaggtatct cagttcggtg taggtcgttc	6000
gctccaagct gggctgtgtg cacgaacccc ccgttcagcc cgaccgtgc gccttatccg	6060
gtaactatcg tcttgagtc aaccggtaa gacacgactt atcgccactg gcagcagcca	6120
ctggtaacag gattagcaga gcgaggatg taggcgggtc tacagagttc ttgaagtgg	6180
ggcctaacta cggtacact agaaggacag tatttggtat ctgcgtctg ctgaagccag	6240
ttaccttcgg aaaaagagtt ggtagctctt gatccggcaa acaaaccacc gctggtagcg	6300
gtggtttttt tgtttgcaag cagcagattt cgcgcagaaa aaaaggatct caagaagatc	6360
ctttgatctt ttctacgggg tctgacgtc agtggaaacga aaactcacgt taagggattt	6420

tggatcatgag attatcaaaa aggatcttca cctagatcct tttaaattaa aaatgaagtt 6480
 ttaaatacaat ctaaagtata tatgagtaaa ctgggtctga cagttaccaa tgcttaataca 6540
 gtgaggcacc tatctcagcg atctgtctat ttctgttcac catagtgtgc tgactccccg 6600
 tcgtgtatag aactacgata cgggagggct taccatctgg cccagtgct gcaatgatac 6660
 cgcgagaccc acgtcaccg gctccagatt tatcagcaat aaaccagcca gccggaaggg 6720
 ccgagcgagc aagtggctct gcaactttat ccgcctccat ccagtcctatt aattgttgcc 6780
 gggaagctag agtaagtagt tcgccagtta atagtttgcg caacgttggt gccattgcta 6840

caggcatcgt ggtgtcacgc tcgtcgtttg gtatggcttc attcagctcc ggttcccaac 6900
 gatcaaggcg agttacatga tcccccatgt tgtgcaaaaa agcggtttagc tccttcggtc 6960
 ctccgatcgt tgcagaagt aagtggccg cagtgttacc actcatgggt atggcagcac 7020
 tgataattc tcttactgtc atgccatccg taagatgctt ttctgtgact ggtgagtact 7080
 caaccaagtc attctgagaa tagtgtatgc ggcgaccgag ttgctcttgc ccggcgtcaa 7140
 tacgggataa taccgcgcca catagcagaa ctttaaaagt gctcatcatt ggaaaacgtt 7200
 ctccggggcg aaaactctca aggatcttac cgtgttgag atccagttcg atgtaacca 7260

ctcgtgcacc caactgatct tcagcatctt ttactttcac cagcgtttct gggtgagcaa 7320
 aaacaggaag gcaaaatgcc gcaaaaaagg gaataagggc gacacggaaa tgttgaatac 7380
 tcatactctt ctttttcaa tattattgaa gcatttatca gggttattgt ctcagagcg 7440
 gatacatatt tgaatgtatt tagaaaaata aacaaatagg ggttccgcgc acatttcccc 7500
 gaaaagtgcc acctgacgtc taagaaacca ttattatcat gacattaacc tataaaaata 7560
 ggcgtatcac gaggcccttt cgtc 7584

<210> 9

<211> 5759

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> plasmid pBE-501 for knockout of lgtA gene of Neisseria meningitidis by replacement with zeomycin gene

<400> 9

cttccgcttc ctcgctcact gactcgctgc gctcggctgt tcggtgcgg cgagcggtat 60
 cagctcactc aaaggcggtg atacggttat ccacagaatc aggggataac gcaggaaaga 120
 acatgtgagc aaaaggccag caaaaggcca ggaaccgtaa aaaggccgcg ttgctggcgt 180
 ttttccatag gctccgcccc cctgacgagc atcacaaaaa tcgacgtca agtcagaggt 240

ggcgaaaccc gacaggacta taaagatacc aggcgtttcc ccctggaagc tccctcgtgc 300

gctctcctgt tccgacctg ccgcttacg gatacctgtc cgcctttctc ccttcgggaa 360

gcgtggcgct ttctcatagc tcacgctgta ggtatctcag ttcggtgtag gtcgttcgct 420

ccaagctggg ctgtgtgcac gaaccccccg ttcagcccgga ccgctgcgcc ttatccggta 480

actatcgtct tgagtccaac ccggttaagac acgacttate gccactggca gcagccactg 540

gtaacaggat tagcagagcg aggtatgtag gcggtgctac agagtctctg aagtggtagc 600

ctaactacgg ctacactaga agaacagtat ttggtatctg cgctctgctg aagccagtta 660

ccttcggaaa aagagttggg agctcttgat ccggcaaaca aaccaccgct ggtagcggtg 720

gtttttttgt ttgcaagcag cagattacgc gcagaaaaaa aggatctcaa gaagatcctt 780

tgatcttttc tacggggctc gacgctcagt ggaacgaaaa ctcacgttaa gggattttgg 840

tcatgagaca ataaccctga taaatgcttc aataatattg aaaaaggaag agtatgagta 900

ttcaacattt ccgtgtcgcc cttattccct tttttgcggc attttgcctt cctgtttttg 960

ctcaccaga aacgctgggt aaagtaaaag atgctgaaga tcagttgggt gcacgagtag 1020

gttacatcga actggatctc aacagcggta agatccttga gagttttcgc cccgaagaac 1080

gttttccaat gatgagcact tttaaagtgc tgctatgtgg cgcggtatta tcccgtattg 1140

acgccgggca agagcaactc ggtcgccgca tacactattc tcagaatgac ttggttgagt 1200

actcaccagt cacagaaaag catcttacgg atggcatgac agtaagagaa ttatgcagtg 1260

ctgccataac catgagtgat aacactgcgg ccaacttact tctgacaacg atcggaggac 1320

cgaaggagct aaccgctttt ttgcacaaca tgggggatca tgtaactcgc ctgatcggtt 1380

gggaaccgga gcigaatgaa gccataccaa acgacgagcg tgacaccacg atgcctgtag 1440

caatggcaac aacgttgccg aaactattaa ctggcgaact acttactcta gtttcccggc 1500

aacaattaat agactggatg gaggcggata aagttgcagg accacttctg cgctcggccc 1560

ttccggctgg ctggtttatt gctgataaat ctggagccgg tgagcgtggg tctcgcggtg 1620

tcattgcagc actggggcca gatggttaagc cctcccgtat cgtagttatc tacacgacgg 1680

ggagtccaggc aactatggat gaacgaaata gacagatcgc tgagataggt gcctcactga 1740

ttaagcattg gtaactgtca gaccaagttt actcatatat actttagatt gatttaaac 1800

ttcatTTTTA atttaaaagg atctaggtga agatcctttt tgataatctc atgagcggat 1860

acatatTTGA atgtatttag aaaaataaac aaataggggt tccgcgcaca tttccccgaa 1920

aagtgccacc tgatgcggtg tgaaataaccg cacagatgcg taaggagaaa ataccgcac 1980

aggaaattgt aagcgttaat aattcagaag aactcgtcaa gaaggcgata gaaggcgatg 2040
 cgctgcgaat cgggagcggc gataccgtaa agcacagga agcggtcagc ccattcgccg 2100
 ccaagctctt cagcaatatac acgggtagcc aacgctatgt cctgatagcg gtccgccaca 2160
 cccagccggc cacagtcgat gaatccagaa aagcggccat tttccacat gatattcggc 2220
 aagcaggcat cgccatgggt cagcagaga tcctcgccgt cgggcatgct cgccttgagc 2280
 ctggcgaaca gttcggctgg cgcgagcccc tgatgctctt cgtccagatc atcctgatcg 2340
 acaagaccgg cticcatccg agtacgtgct cgctcgatgc gatgtttcgc ttggtggtcg 2400

 aatgggcagg tagccggatc aagcgtatgc agccgccga ttgcatcagc catgatggat 2460
 actttctcgg caggagcaag gtgagatgac aggagatcct gcccggcac ttcgccaat 2520
 agcagccagt cccttccgc ttcagtaca acgtcagca cagctgcga aggaacgccc 2580
 gtctggcca gccagatag ccgcgtgcc tcgtcttgca gttcattcag ggcaccggac 2640
 aggtcggctt tgacaaaaag aaccgggcgc cctgcgctg acagccgaa cacggcggca 2700
 tcagagcagc cgattgtctg ttgtgccag tcatagccga atagcctctc cacccaagcg 2760
 gccggagaac ctgcgtgcaa tccatcttgt tcaatcatgc gaaacgatcc tcatcctgtc 2820

 tcttgatcag agcttgatcc cctgcgcat cagatccttg gcgcaagaa agccatccag 2880
 tttactttgc agggcttccc aacctacca gagggcgccc cagctggcaa ttcggttcg 2940
 ctgtgttcc ataaaaccgc ccagctagc tatcgccatg taagccact gcaagctacc 3000
 tgctttctct ttgcgttgc gttttccctt gtccagatag ccagtagct gacattcatc 3060
 cggggtcagc accgtttctg cggactggct ttctacgtga aaaggatcta ggtgaagatc 3120
 ctttttgata atctcatgcc tgacatttat attccccaga acatcaggtt aatggcgttt 3180
 ttgatgtcat tttcgggtg gctgagatca gccacttctt ccccgataac ggagaccggc 3240

 aactggcca tatcggtggt catcatgcgc cagctttcat cccgatatg caccaccggg 3300
 taaagttcac gggagacttt atctgacagc agacgtgcac tggccagggg gatcaccatc 3360
 cgtcgccccg gcgtgtcaat aatatcactc tgtacatcca caaacagacg ataacggctc 3420
 tctcttttat aggtgtaaac cttaaaactgc cgtacgtata ggctgcgcaa ctgttgggaa 3480
 gggcgatcgg tgcgggcctc ttcgtatta cgccagctgg cgaaaggggg atgtgctgca 3540
 aggcgattaa gttgggtaac gccagggttt tcccagtcac gacgttgtaa aacgacggcc 3600
 agtgaattgt aatcagactc actatagggc gaattgaatt tagcgccgc gaattcgccc 3660

 ttgcgtcagc cgtctgaaac gggggcgagt aaccgttgta cagtccaaat gccgtctgaa 3720
 gccttcagac ggcatcgtgc ctatcgggag aataaattgc agcctttagt cagcgtattg 3780
 atttgcgcct acaacgtaga aaaatatttc gccaatcat tagccgccgt cgtgaatcaa 3840

acttgcgca acttgatat ttgtattgtc gatgacggct cgacggacgg tacgcttgcc 3900
attgcccagc gtttccaaga acaggacggc cgcacccgca tcctcgcgca gccgcgcaat 3960
tccggtctga ttccctcttt aaacatcggg ctggatgaat tggcaaagtc gggggggggg 4020
ggggaatata ttgcgcgac gctagctcga gcacgtgttg acaattaatc atcggcatag 4080

tatatcgga tagtataata cgacaaggtg aggaactaaa ccatggccaa gttgaccagt 4140
gccgttccgg tgctcacgc gcgcgacgtc gccggagcgg tcgagttctg gaccgaccgg 4200
ctcgggttct cccgggactt cgtggaggac gacttcgccg gtgtggtccg ggacgacgtg 4260
accctgttca tcagcgcgtt ccaggaccag gtggtgccgg acaacaccct ggcctgggtg 4320
tgggtgcgcg gcctggacga gctgtacgcc gagtggtcgg aggtcgtgtc cacgaacttc 4380
cgggacgcct cggggccggc catgaccgag atcggcgagc agccgtgggg gcgggagttc 4440
gccctgcgcg acccgccgg caactgcgtg cacttcgtgg ccgaggagca ggactgagaa 4500

ttcccgggga tcctctagag tcgacctgca ggcatgcaag cttggcactg gccgtcgttt 4560
tacaacgtcg tgactgggaa aacctggcg ttaccaact taatcgctt gcagcacatc 4620
cccttttcg cagcgcgcac cgatgcagac gatattgccg ccccgactg gattgagaaa 4680
atcgtgggtg agatggaaaa agaccgcagc atcatcgca tgggtgcgtg gctggaagtt 4740
ttgtcggaag aaaaggacgg caaccggctg gcgcggcacc acgaacacgg caaaaattgg 4800
aaaaaacga cccgacaga agacattgcc gactttttcc ctttcggcaa cccatacac 4860
aacaacaga tgattatgag gcgcagcgtc attgacggcg gtttgcgtta caacaccgag 4920

cgggattggg cggaagatta ccaattttgg tacgatgtca gcaaattggg caggctggct 4980
tattatcccg aagccttggg caaataccgc cttcacgcca atcaggtttc atccaaatac 5040
agcatccgc aacacgaaat cgcgcaaggc atccaaaaaa ccgccagaaa cgattttttg 5100
cagtctatgg gttttaaaac ccggttcgac agccttgaat accgccaaat aaaagcagta 5160
gcgtatgaat tgctggagaa acatttgccg gaagaagatt ttgaacgcgc ccgccggttt 5220
ttgtaccaat gtttcaaacg gacggacacg ctgcccgcg gcgcgtggct ggattttgcg 5280
gcagacggca ggatgcggcg gctgtttacc ttgaggcaat acttcggcat tttgcaccga 5340

ttgtgaaaa accgttgaaa aacgccgtt tatccaacag aaaaaaaca ggataaatta 5400
tgaaaaacca cgttatcagc ttagcttcg ccgcagaacg caggcgcccc gtttcagacg 5460
gtcgaaggcg cgaattcgtt taaacctgca ggactagtcc ctttagtgag ggtaattct 5520
gagcttggcg taatcatggt catagctgtt tcctgtgtga aattgttatc cgctcacaat 5580
tccacacaac atacgagccg gaagcataaa gtgtaaagcc tggggtgcct aatgagttag 5640
ctaactcaca ttaattgcgt tgcgctcact gcccgcttcc cagtcgggaa acctgtcgtg 5700

ccagctgcat taatgaatcg gccaacgcgc ggggagaggc ggtttgcgta ttgggcgct 5759