



(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 디트릭 스콧 스
트리트 504 인스티튜트 오브 리서치

(72) 발명자

줄링어 웬델 데이비드

미국 20906 매릴랜드주 실버 스프링 몰톤 홀 로드
14400

도네츠 미카일

미국 20878 매릴랜드주 노쓰 포토맥 오번스 클렌
테라스 15514

(뒷면에 계속)

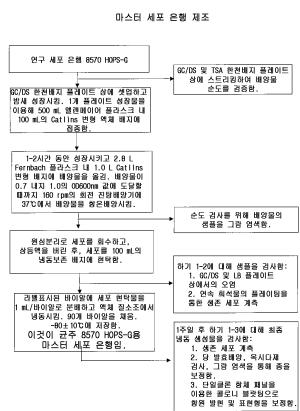
(74) 대리인

김성기, 강승옥

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 원딩 로즈 드라이브
520

모란 엘리자베스 엘렌

미국 20902-4382 매릴랜드주 위튼 10821-D- 암허스트
애버뉴

특허청구의 범위

청구항 1

광범위한 보호성을 제공하도록 유전자 변형된 2 이상의 수막구균성(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 *IpxL1*, *synX*, 및 *IgtA* 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 메닌지티디스(*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*, *IpxL1* 및 *IgtA*의 불활성화;

opaD 대신 제2 *porA* 유전자의(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*, *IpxL1* 및 *IgtA*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*, *IpxL1* 및 *IgtA*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 혼탁되는 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) *synX* 유전자의 불활성화,
- ii) *IpxL1* 유전자의 불활성화,
- iii) 락토-N-네오테트라오스 테트라사카라이드가 결여된 단축형 또는 절단형 리포올리고사카라이드(LOS)가 발현되게하는 각 균주에서의 *IgtA* 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 군에서 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) *synX* 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) *synX* 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 85 70(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) *IpxL1* 유전자의 불활성화,
- iii) *IgtA* 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, *IpxL1* 유전자 또는 *IgtA* 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 혼탁되는 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 시알릴화가 실질적으로 없고, 웬타아실 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,

- a) 유전자 변형될 수 있는 수막구균 B형의 균주를 선택하는 단계;
 - b) synY 유전자를 불활성화시켜 균주를 유전자 변형시키는 단계;
 - c) *IpxL1* 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 단계
- 를 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.메닌지티디스의 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.메닌지티디스의 배양 세포를 회수하고 세포 페이스트를 수집하는 단계;
- e) 세포 페이스트로부터 NOMV를 단리하는 단계; 및
- f) 백신 투여에 적절한 완충액 또는 담체에 NOMV를 재현탁시키는 단계;

를 포함하는 제조 방법.

명세서

기술 분야

[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.

배경 기술

[0005]

네이세리아 메닌지티디스(*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 속주 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 메닌지티디스의 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, 예전대 외막 단백질 및 리포울리고사카라이드(내독소)가 항원적으로 가변적이고/하거나 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 *IpxL1*, *synX* 및 *IgtA*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 겸증된 능력을 가지며, 각각의 균주에서 과발현되고, FHBP(GNA1870) 변이체 1, FHBP 변이체 2, 및 FHBP 변이체 3; NadA; App; NspA; TbpA 및 TbpB로 이루어진 균에서 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*, *IpxL1* 및 *IgtA*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*, *IpxL1* 및 *IgtA*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*, *IpxL1* 및 *IgtA*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, *IpxL1* 유전자의 불활성화, 각 균주에서 락토-N-네오텐트라오스 테트라사카라이드가 결여된 단축형 또는 절단형 리포울리고사카리아드(LOS)가 생성되는 *IgtA* 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 단리물을 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) *IpxL1* 유전자의 불활성화, iii) *IgtA* 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) *IpxL1* 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) *IpxL1* 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, *IpxL1* 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 시알릴화가 실질적으로 없고, 펜타-아실 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-네오텐트라오스(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) *IpxL1* 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, *IpxL1* 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 접종을 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 단리하는 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 익행을 제조하는 과정을 도시한 흐름도이다.

도 2는 백신 생산을 위해 네이세리아의 유전자 변형된 균주를 제조하는데 사용되는 세포 익행 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 $\mu\text{g/mL}$ 백신의 1:2 희석물 중 15 μl 를 겔 상에서 러닝시켰다(대조군의 1:2 희석물 100 $\mu\text{g/mL}$ 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-G NOMV 백신에 대한 살균성 격감 분석 결과를 도시한 그래프이다.

도 17은 8570 HOPS-G1 PorA 네아웃 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* 네아웃을 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 네아웃을 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 메닌지티디스(*Neisseria meningitidis*) 서브그룹 B형에 대한 면역화에 사용하기 위한 광범위한 보호성 백신 조성물을 제공한다. 본 발명의 기술의 일 구체 예에는 1 이상, 바람직하게는 2 이상, 보다 바람직하게는 3 이상의 네이세리아 메닌지티디스의 유전자 변형된 균주에서 유래된 천연 외막 소포체(NOMV)를 포함하는 백신을 제공한다. 수포(bleb)라고도 알려진, 천연 외막 소포체는 성장 동안 천연적으로 발생되는 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 리포울리고사카라이드를 포함하는 리포풀리사카라이드(LPS)를 포함한다. 그람 음성 박테리아, 특히 엔. 메닌지티디스 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 변형 균주에서 생성된다.

[0025]

본 발명의 일 구체예에는 엔. 메닌지티디스의 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 구체예에는 엔. 메닌지티디스의 항원적으로 다양한 균주, 바람직하게는 박테리아의 계놈 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, 리포울리고사카라이드(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 *IpxL1* 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 결여된 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 계놈에 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 *IpxL1* 유전자의 결실, 및/또는 절단형 LOS 구조를 안정화시키는 리포울리고사카라이드(LOS)에 대해 락토-N-네오테트라오스 생합성이 차단되게 하는 *IgtA* 유전자의 결실; 보다 바람직하게 유전자 변형된 균주는 이를 돌연변이 중 2가지를 제공하고, 가장 바람직하게는 유전자 변형된 균주는 이를 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 문현은 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 형질전환 가능한 엔. 메닌지티디스 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, ACCGTCTGAA가, synXB 67 내지 691 염기 서열을 증폭시키기 위해 사용된 PCR 프라이머의 말단에 포함되어 부가되었다. 완전한 구성체는 PCR을 통해 증폭, 정제되어 pUC19에 블런트 결찰되었다. 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 카페를 다수 클로닝 영역 부위에 결찰시키고 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 *IpxL1* 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 활성에 중요하다. 유전자 조작된 균주는 van der Ley 및 이의 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* *IpxL* mutants: influence on lipopolysaccharide structure, toxicity, and adjuvant activity. Infection and Immunity 69(10), 5981-5990, 2001.)가 기술한 바와 같이 *IpxL1* 돌연변이체를 포함한다. *IpxL1* 유전자의 결실은 전혈 유래의 인간 단핵구를 이용한 사이토카인 방출 분석 및 토키 발열원 검사 둘 모두로 확인시 상당히 내독성이 감소된 정상 수준의 펜타-아실 LOS가 발현되게 하였다. *IpxL1* 유전자를 과파하는 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 대핸 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 게놈 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 당백질을 안정화/과발현시키는데 이용할 수 있었다.

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

[0034] 수막구균 LOS의 중요한 특징은 상변이로서, 이는 *IgtA* 및 다른 네이세리아 유전자에서 뉴클레오티드 잔기의 동종중합 영역 내 고빈도 돌연변이로 인해 발생된다. 이러한 돌연변이는 LOS a 사슬의 어셈블리를 매개하는 *LgtA* 트랜스퍼라제의 발현을 개시 또는 종료시킨다(헵토스 2 상의 치환기의 입체구조 변경). 이러한 *IgtA* 유전자의 상변이 활성화는 LOS a 사슬의 원치않는 연장을 초래하여 인간 혈액 세포 항원과 구조적 유사성을 갖는 락토-N-네오텐트라오스가 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 *IgtA* 유전자가 넉아웃된다. *IgtA* 유전자를 넉아웃시키는 방법은 당분야의 숙련가에게 공지되어 있고, 이에 제한되는 것은 아니나 구성체 플라스미드 및 상동성 재조합 또는 형질전환을 포함한다. 돌연변이된 Δ *IgtA* 유전자는 관찰한 22 이상의 계대 동안 모든 변형 균주에서 불활성이었고 이는 LOS 코어 구조의 안정된 절단형이었다. *IgtA* 유전자의 결실은 절단형 a-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 *IgtA* 균주는 인간 혈액 세포 상에서 발견되는 락토-N-네오텐트라오스 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. 이를 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, 이를 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 퀄리티 예컨대 테스페롤의 특정 부가물을 포함하지 않는다. 적절한 배지 중 하나는 1% 카사미노산(certified, Difco Laboratories)으로 몇몇 개별 아미노산을 교체하여, BW Catlin(Catlin BW, 1973) *J. Infec. Dis.* 128: 178-194에 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 중류수를 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 과

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 이를 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 발생되는 수막구균성 질환에 대해 광범위한 보호성을 제공하는 백신을 제공한다. 본 발명의 백신 조성물은 엔.메닌지티디스의 대부분의 병원체 혈청군에 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 혈청군에 걸쳐 공유되므로 수막구균의 소수 혈청군을 비롯하여 다른 병원체 혈청군에 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 오페론을 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, 에리쓰로마이신, 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 이를 또는 관련 병원성 유기체에 의한 감염에 대해 동물을 보호하게 된다.

[0041] 정제된 NOMV는 용액을 멸균하기 위한 여과, 용액 희석, 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 젤(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 혼탁액일 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-데-0-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 투버클로시스 (*Mycobacterium tuberculosis*), 보르데텔라 페르투시스(*Bordetella pertussis*), 박테리아 리포폴리사카라이드, 아미노알킬 글루코사민 포스페이트 화합물(AGP) 또는 이의 유도체 또는 유사체, Corixa(Hamilton, Mont.)에서 입수 가능한 것, 미국 특허 제6,113,918호에 기술된 것; 예를 들어, 2-[(R)-3-테트라데카노일옥시테트라데카노일 아미노]에틸, 2-데옥시-4-O-포스포노-3-O-[(R)-3-테트라데카노이옥시테트라데카노일]-2-[(R)-3-테트라데카노이옥시테트라데카노일아미노]-b-D-글루코파라노시드, 미국 특허 제4,912,094호에 기술된 MPL™(3-O-데아실레이티드 모노포스포릴 지질 A)(Corixa에서 입수 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.), 백일해독소(PT), 또는 이.콜라이 열 불안정성 독소(LT), 특히 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, 사포틴, 콜레라 독소 B 서브유닛(CTB), 이.콜라이 유래의 열 불안정성 장독소(LT)(유전자 변성독소 돌연변이체 LT가 개발됨), 및 에멜솜(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, 혼탁제 또는 엘릭시르 형태로 투여될 수 있다. 백신이 건조형인 경우, 백신은 투여 전에 멸균 증류수에 용해 또는 혼탁된다. 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 혼탁제로 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 혼탁 매질로 사용되며, 이에 제한되는 것은 아니고, 예를 들어 합성 모노- 또는 디-글리세리드를 포함한다. 또한, 지방산 예컨대 울레산은 주사 가능한 조제물에 사용된다.

[0050]

주사 가능한 조제물, 예를 들어 멸균된 주사용 수성 또는 유성 혼탁제는 적절한 분산제 또는 습윤제 및 혼탁제를 이용해 당분야에 따라 제제화된다. 멸균된 주사용 조제물은 또한 비독성 비경구 허용되는 희석제 또는 용매 중 멸균 주사용 용액 또는 혼탁액, 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] 실시예

[0053] 실시예 1: 엔.메닌지티디스의 유전자 변형된 백신 균주의 유도 및 이 유전자 변형된 백신 균주의 외막 단백질을 함유하는 NDMV의 생성.

[0054] 유전자 변형된 균주 8570 HOPS-G1은 균주를 입수한 실험실에서 복수유전자좌 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 면역형을 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* 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 뉴클레오티드 둘 모두를 함유하는 동일 길이의 새로운 서열로 교체시켜 안정화시켰다. 원래 프로모터 서열(서열번호 1)(폴리-G 서열은 두꺼운 이탤릭체로 표시)

5'..CATAGTTAACCTCTAAATTGGATTGTAGTCGGATATGGTAACATAACGTAATAATCGTTACGCTTACAATTATTCCTAAGCTTTC **GGGGGG** **GGGGGG**TTT..3'은 Not I 부위(밑줄)를 갖는 G 및 C 뉴클레오티드를 포함하는 변형된 프로모터 서열(서열번호 2) 5'..CATAGTTAACCTCTAAATTGGATTGTAGTCGGATATGGTAACATAACGTAATAATCGTTACGCTTACAATTATTCCTAAGCTTTC **GC****GC****GG****GC**CATT..3'로 교체하였다. 교체된 서열은 교체 서열의 존재를 확인할 수 있도록 Not I에 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(Not I) 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 트랜스파라제인, 유전자 *IpxL1*는 *IpxL1* 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). *IpxL1* 유전자를 불능화시키는데 사용된 플라스미드는 pMn5(서열번호 5)였다. *IpxL1* 유전자 내 삽입부의 존재는 *IpxL1* 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 넉아웃된 *nspA* 유전자좌에 GNA 1870 변이체 1 유전자의 제2 카페를 삽입시켜 증가시켰다. 새롭게 삽입된 유전자는 젠타마이신 항생제 내성 유전자, IPTG-유도성 Ptac 프로모터를 갖는 이.콜라이 lac 오폐론, 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

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 ^a 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 웹티드	3764-3823	<i>N. mening.</i> , 44-76, PCR 구성체
종결 코돈을 갖는fHBP(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-EcoRI으로 분해하고 213 b.p. 단편을 제거하였다. 스티키 말단을 채우고 결합하여 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 넉아웃이 검증되었다.

[0061] 6) 단계 4에서 얻은 균주는 *lgtA* 유전자가 넉아웃된 제오마이신 유전자를 함유하는 플라스미드 pBE-501(서열번호 9)로 형질전환시켰다. 플라스미드 pBE-501가 포함하는 특징은 표 2에서 확인할 수 있다. *lgtA* 유전자의 넉아웃으로 락토-N-네오테트라오스(LNnT) 테트라사카라이드가 결여된 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. 클로닝부위 및 EM7 프로모터 제오신 Δ <i>lgtA</i> pEM7/Zeo으로 제공된 Zeocin ^R 유전자 pEM7/Zeo 클로닝부위 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.

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 특징규명

[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] 리포울리고사카라이드 36 tg/mL

[0070] 혼산 2.5 µg/mL

[0071] 염화나트륨 0.9%

[0072] Tris-HCl 완충액 0.01 M pH 7.6

[0073] 백신 조성물은 나트륨 도데실 세라이트 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 성분에 대해 백신의 정체성을 검사한 결과를 도시한 도면이다.

표 3

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

검사 물품	검사 결과	견해
8570 HOPS-G NOMV 백신 Lot # 1289	통과	모든 동물을 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°C)이고, 그 결과는 하기 표 5에서 확인할 수 있다.

표 5

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 비발열원성이라는 것을 시사한다.

실시예 6: 인간 전혈로부터 사이토카인 방출

[0084] 백신을, 신선한 인간 전혈로부터, 프로염증성 사이토카인 TNF-알파 및 IL-6을 유도하는 그 능력을 측정하여 내독소 함량에 대해 검사하였다. 결과는 도 9 및 10에 도시하였다. 데이터는 3회(이.콜라이 LPS 표준물 및 *IpxL2* LOS를 갖는 NOMV 백신 Lot#1119) 또는 5회(아생형 LOS를 갖는 Lot 0832 NOMV 및 *IpxL1* LOS를 갖는 Lot#1289 NOMV 백신) 검사의 평균이다. 여러 바는 평균의 표준 오차이다. NOMV의 농도는 단백질을 기준으로 한 것이지만 이.콜라이 표준 LPS는 중량 기준의 LPS이다. 임의의 특정 이론에 한정되지 않고, 이를 결과는 현행 백신이 *IpxL2* 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.

실시예 7: 마우스에서의 면역원성 및 살균성 항체 반응

[0087] 수산화알루미늄 보조제(Rehydragel LV)에 흡착하거나 흡착시키지 않고 4주 간격으로 유전자 변형된 백신 균주 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 µg을 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 균주, 백신 균주의 모균주 및 몇몇 관련 균주에 대한 살균성 항체에 대해 검사하였다. 전-백신접종 혈청은 한결같이 살균성 활성이 없었다.

표 6

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 균주에 대한 상이한 백신 그룹의 살균성 역가를 나타내었다. 검사 균주 중 2 균주는 백신 균주의 모균주와 동질유전자였다. 이들

은 상이한 혈청아형 특이성을 갖는 대안적인 *porA*로 *porA* 유전자를 교체하여 모균주로부터 유도시킨 것이었다. 이를 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] 이종성 균주 44/76에 대한 살균성 항체 반응의 특이성 분석은 상이한 단리 항원을 이용한 살균성 활성의 격감을 통해 측정하였다. 백신접종 후 마우스 혈청을 살균성 종료점(-50% 사멸)까지 흐석하고 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, 재조합 단백질)은 살균성 활성의 대략 20%를 제거할 수 있었으며, 임의의 특징 이론에 한정되지 않고, 이는 도 14에 도시한 바와 같이 항-LOS 항체 및 항-GNA1870 항체를 포함하는 일부 협력 사멸을 시사할 수 있다.

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 L3,7 v LOS를 발현하는 8570의 3종 동질유전자 변이체 및 상이한 코어 구조를 갖는 LOS 및 이종성 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.

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

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 오페론	2237-3641	pMAL-p2X(New England Biolabs)
P tac 프로모터	3642-3673	pMAL-p2X, PCR 구성체
Lac 오피레이터	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 웹티드	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 결찰시켜 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 lpxL^I는 삽입 돌연변이유발법으로 불능화시켰고, 제2의 porA 유전자(아형 P1.7-1, 1)는 이의 프로모터와 함께 opaD 유전자 대신 삽입시켰으며, nadA의 제2 카페 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

[0100]

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 웹티드	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. *IgtA* 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 스톡을 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°C의 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 접종전 및 마지막 백신접종 이후 2주경(10주경)에 채취하였다.

[0106] 개별 마우스에서 채취한 혈청은 상동성 균주에 대한 살균성 항체에 대해 검사하였고, 10 마우스의 각 그룹에서 모든 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

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 동질유전자 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 네아웃 돌연변이체로서 PorA 단백질을 발현하지 않았다. 몇몇 상이한 검사 균주에 대한 4 균주 각각에서 유도된 살균성 역가를 하기 표 10에 나타내었다.

표 10

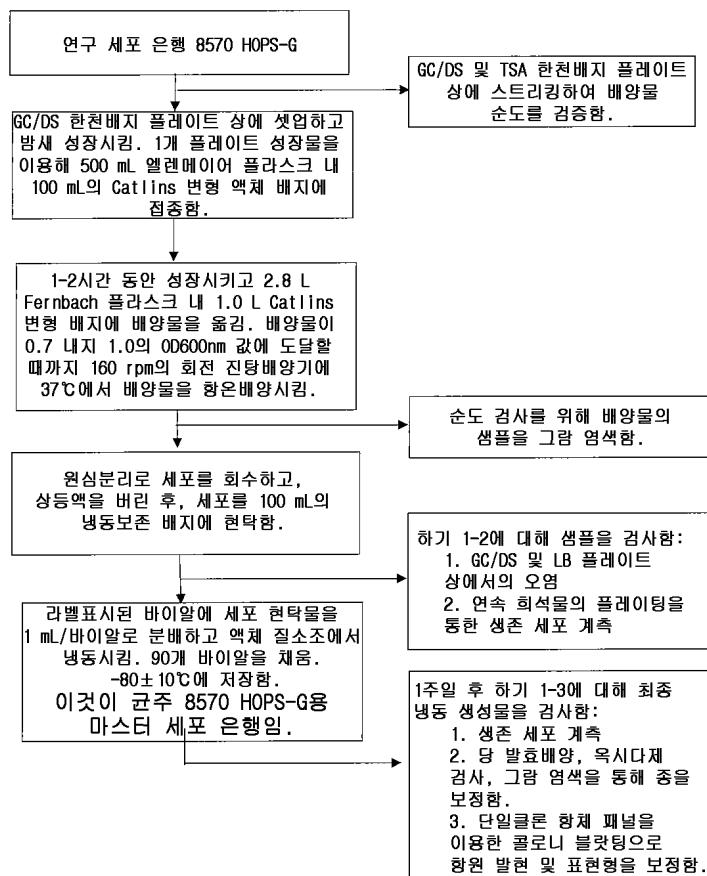
검사 균주	NOMV 백신을 제조한 8570 HOPS-G1의 돌연변이체			
	8570 (P1.19, 15 및 P1.22, 141)	8570 (P1.19, 15)	8570 (P1.22, 14)	8570 APorA
8570	256	256	256	256
44/76	256	256	256	256
B16B6	1	1	1	1
3576	2	8	8	8
9547	2	4	4	2
2981	64	1	16	1
6557	32	1	128	1

[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 살균 활성을 원인이었다. 이 결과는 살균성 격감 분석을 이용한 분석법으로 검증하였다. 이러한 분석 결과 중 하나를 도 16에 도시하였다. 도 17에 도시한 결과는 LOS 및 FHB(GNA1870)에 대한 항체가, 8570 HOPS-G1의 PorA 네아웃 돌연변이체에 대한 항혈청에 의한 균주 8570의 사멸에 관여한다는 것을 보여준다.

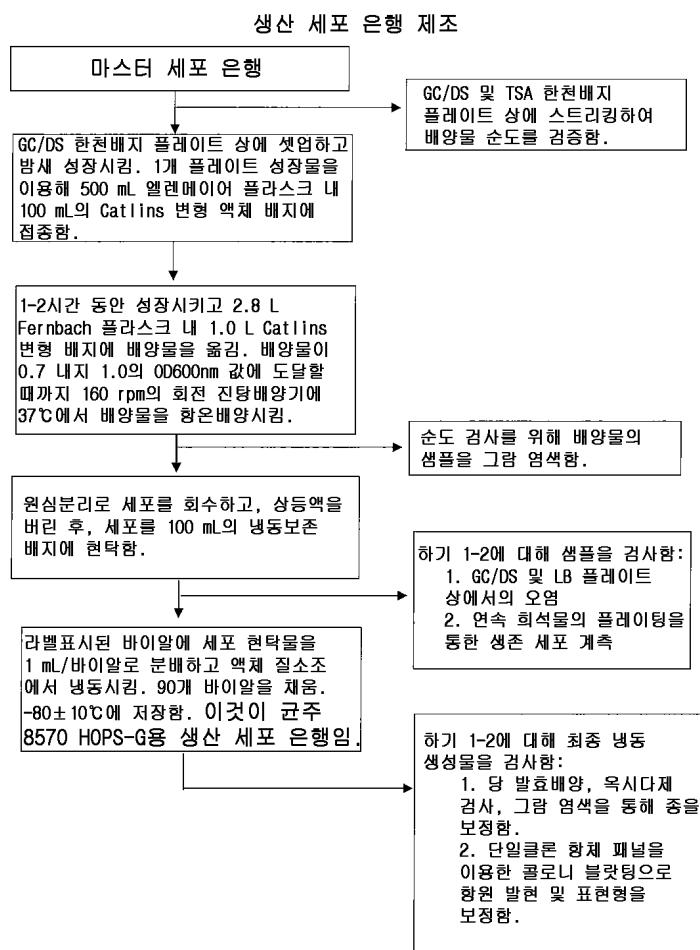
도면

도면1

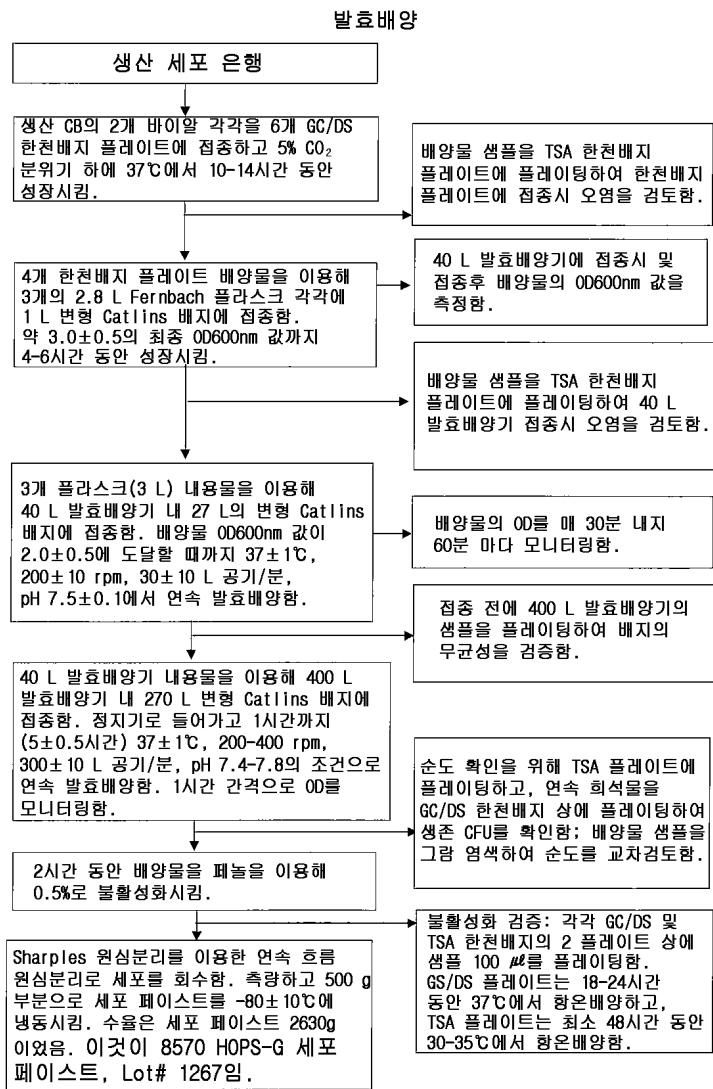
마스터 세포 응행 제조



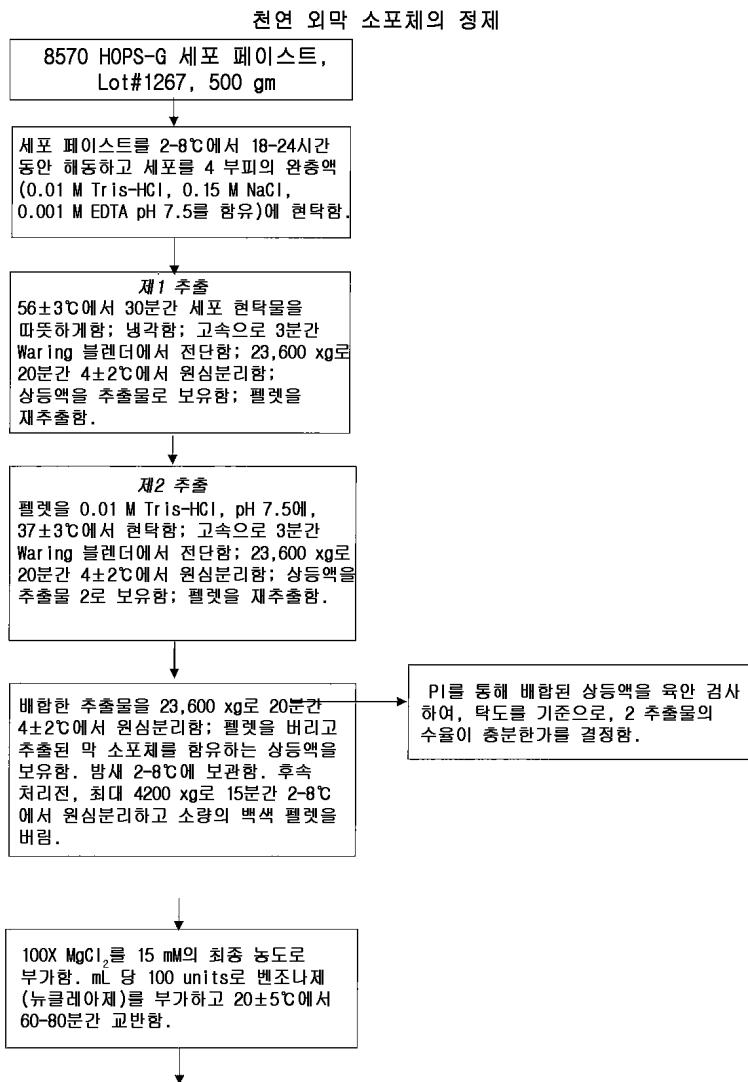
도면2



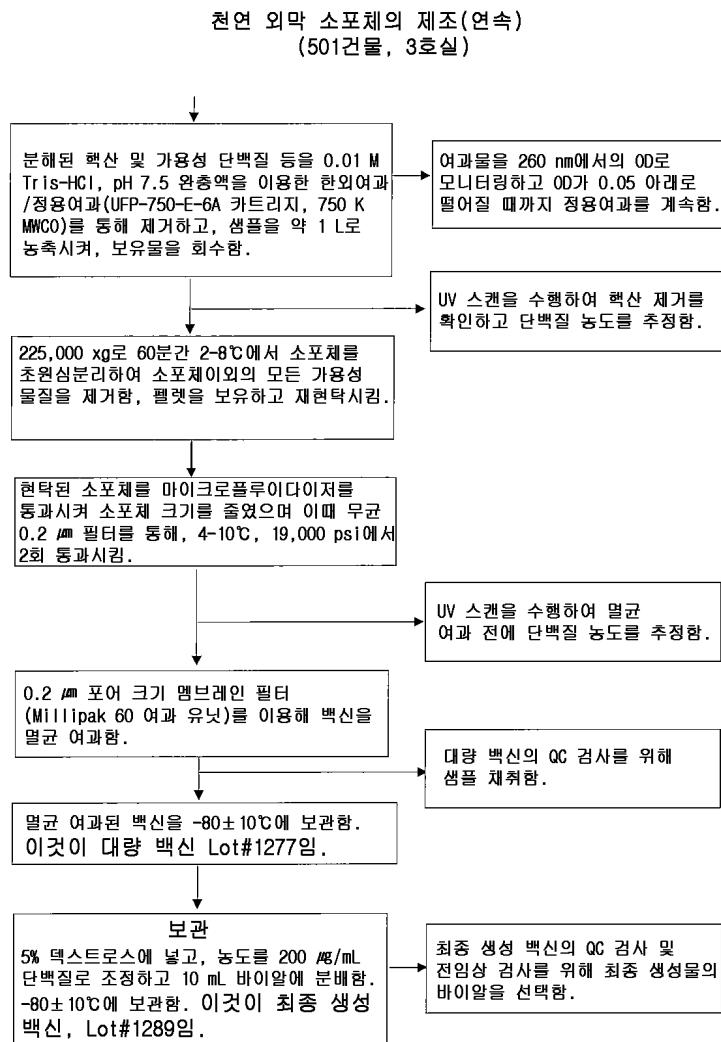
도면3



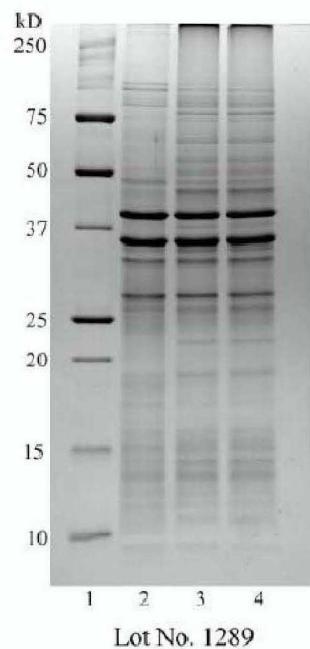
도면4



도면5

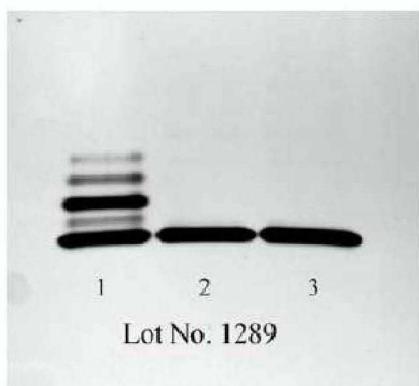


도면6



Lot No. 1289

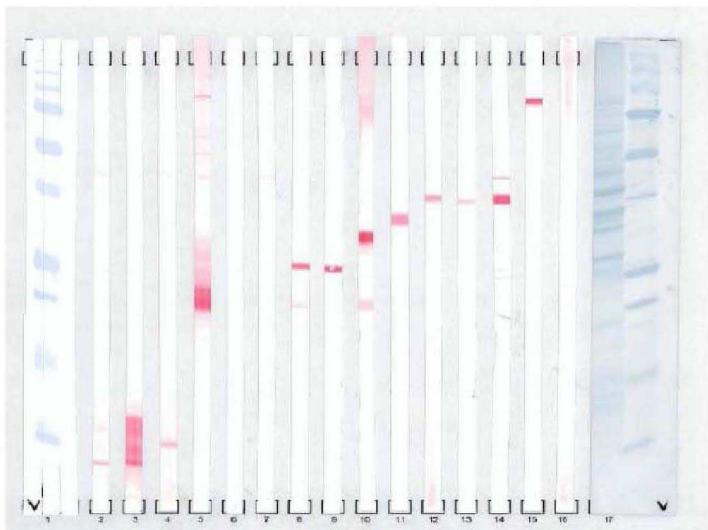
도면7



Lot No. 1289

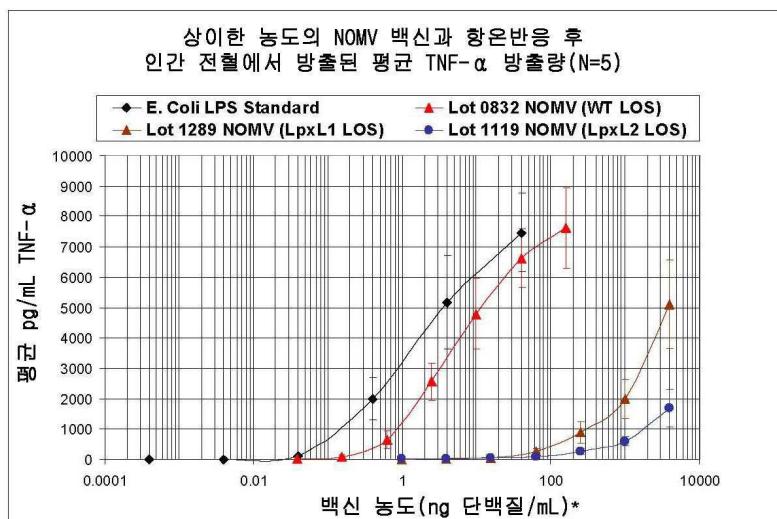
도면8

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



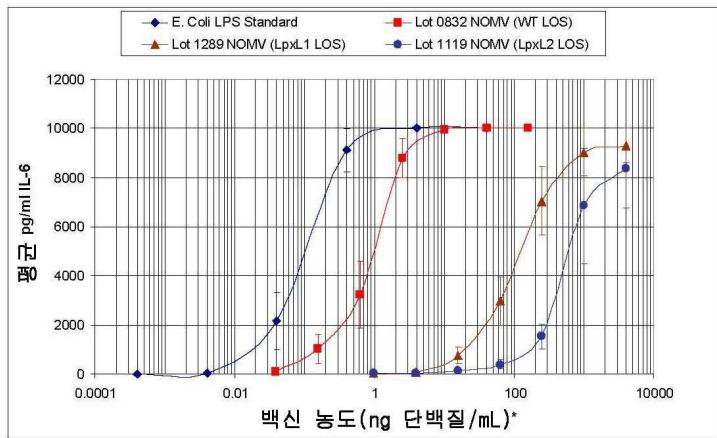
레인	항체 특이성	단일클론 항체	예상 반응	검사 결과
1	사전염색 표준물	NA		
2	L8 LOS	2-1-L8	미량	미량
3	L8v LOS	25-1-LC1	양성	양성
4	L3,7 LOS	9-2-L379	미량	미량
5	Lip (H8)	2-1-CA2	양성	양성
6	Opa P5.10	23-1-P5.10	음성	음성
7	Opa P5.11	MF7-1-P5.11	음성	음성
8	Opc (P5.C)	B306-P5C	양성	양성
9	FHBP 1 (GNA1870)	JAR 4	양성	양성
10	Rmp	9F5	양성	양성
11	PorB P4	15-1-P4	양성	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



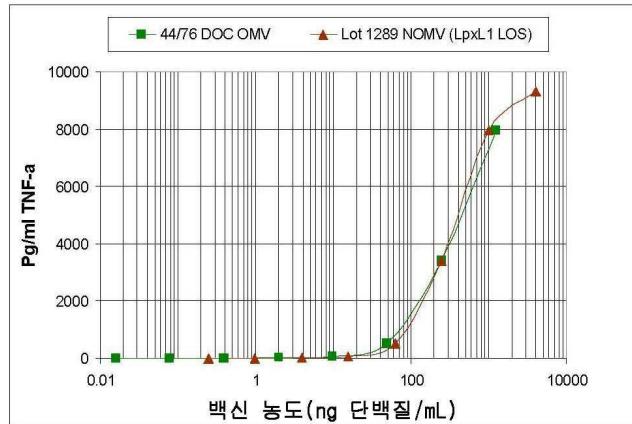
도면10

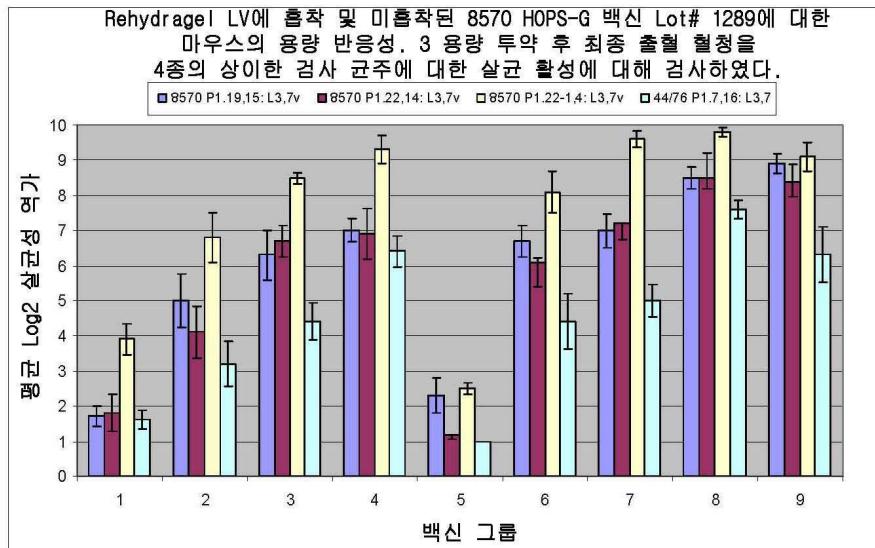
상이한 농도의 NOMV 백신과 항온반응 후
인간 전혈로부터 방출된 IL-6



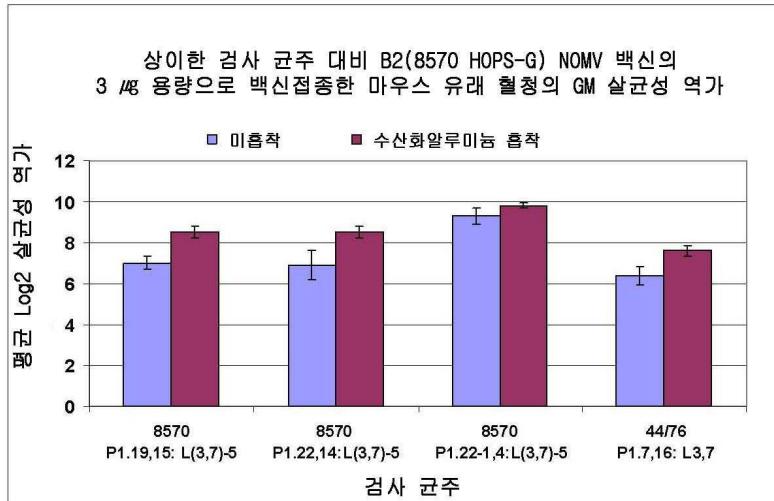
도면11

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

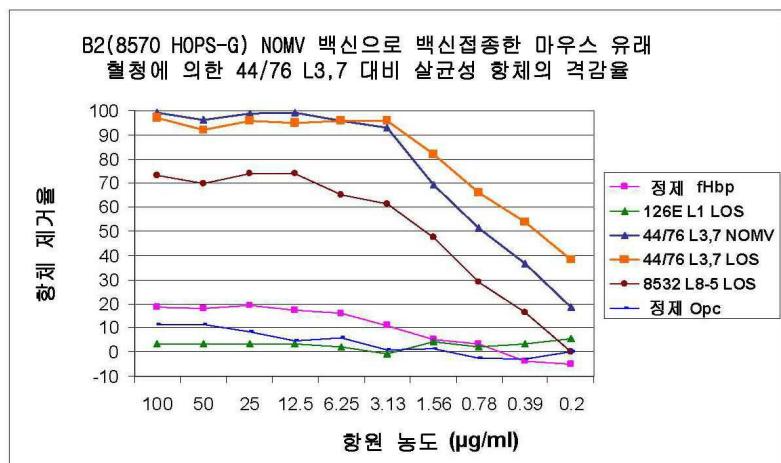


도면12백신 그룹 :

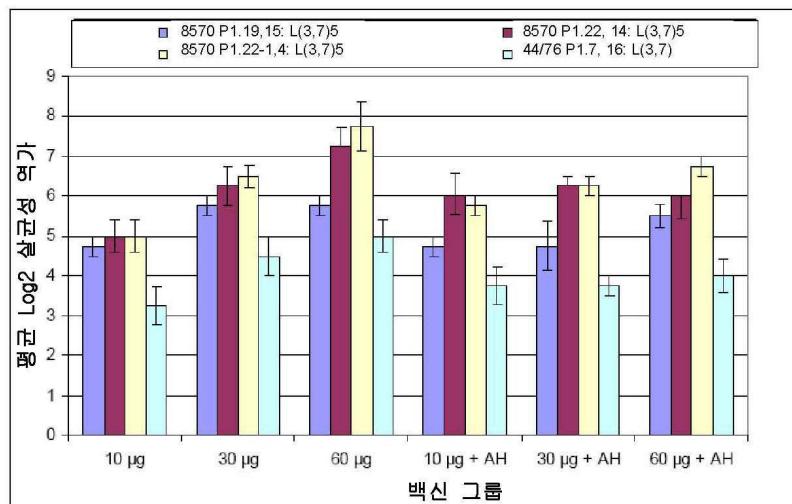
- | | |
|-----------|----------------------------|
| 1) 0.1 µg | 5) 0.1 µg + Rehydragel LV |
| 2) 0.3 µg | 6) 0.3 µg + Rehydragel LV |
| 3) 1.0 µg | 7) 1.0 µg + Rehydragel LV |
| 4) 3.0 µg | 8) 3.0 µg + Rehydragel LV |
| | 9) 1.0 µg + Rehydragel HPA |

도면13

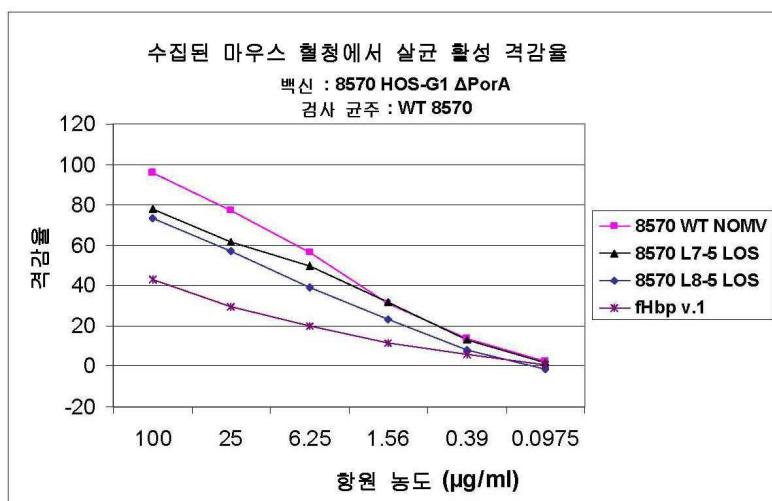
도면14

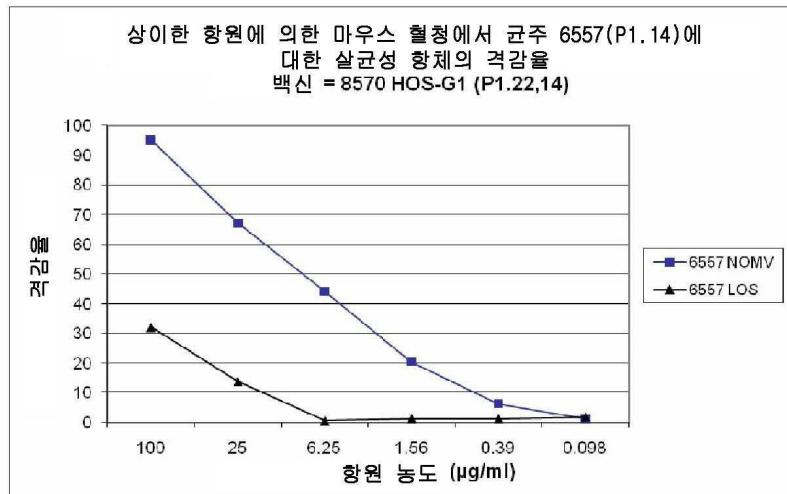


도면15



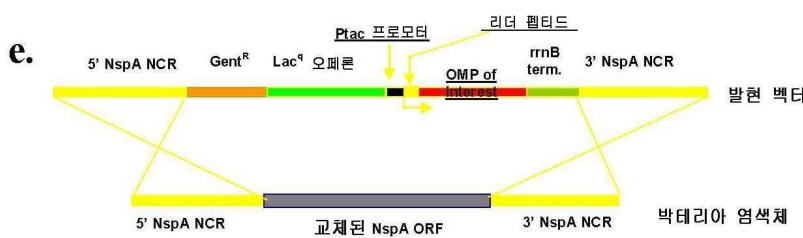
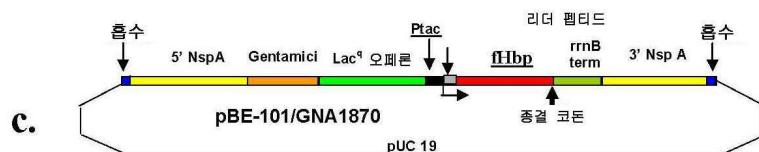
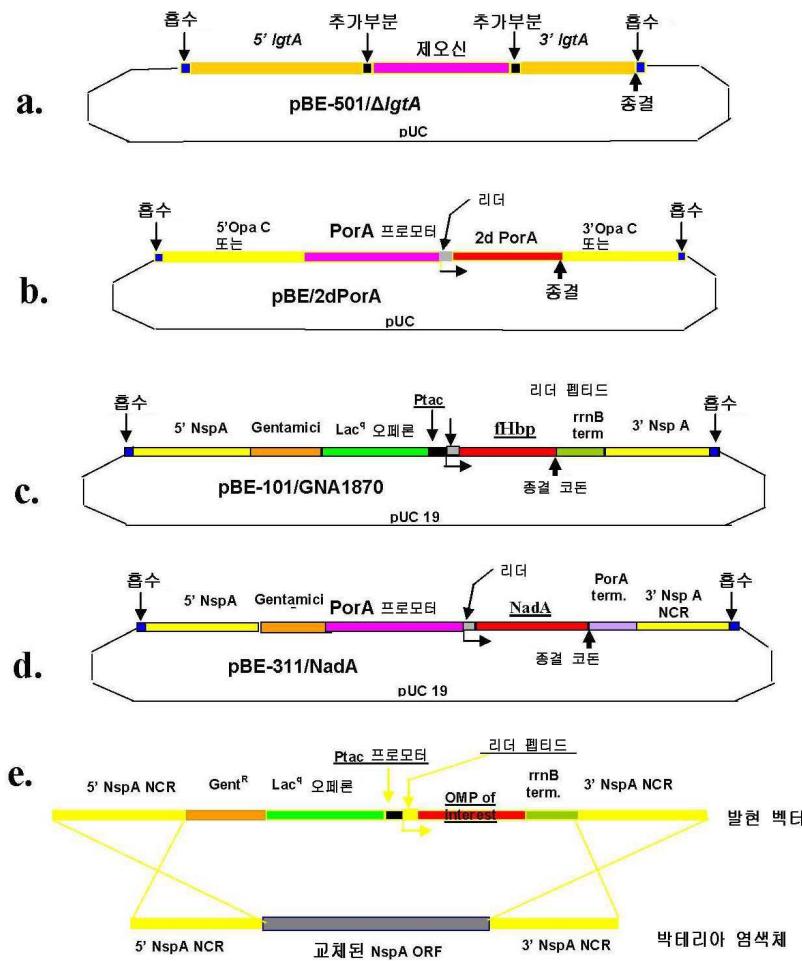
도면16



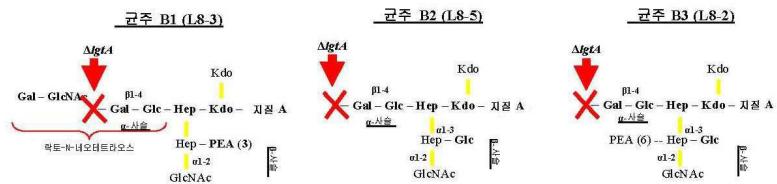
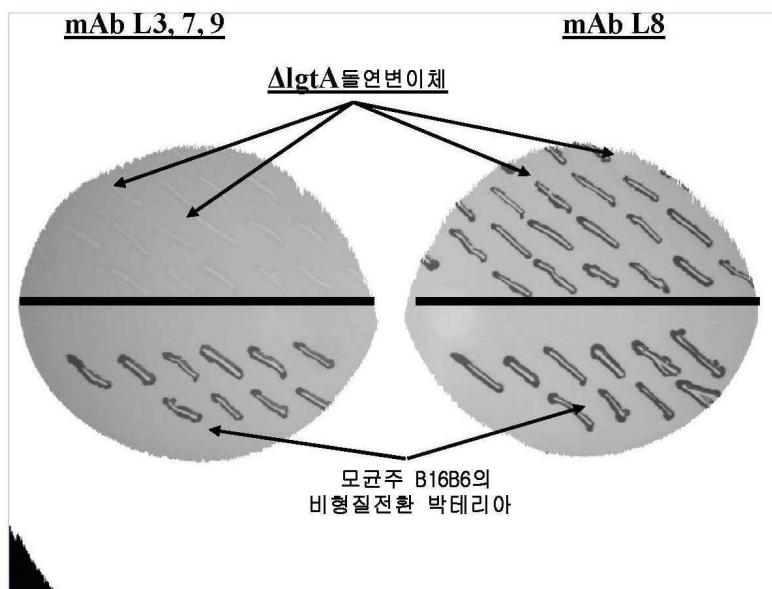
도면17**도면18**

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 fHbp (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 fHbp(v.2) L8-2의 안정된 발현

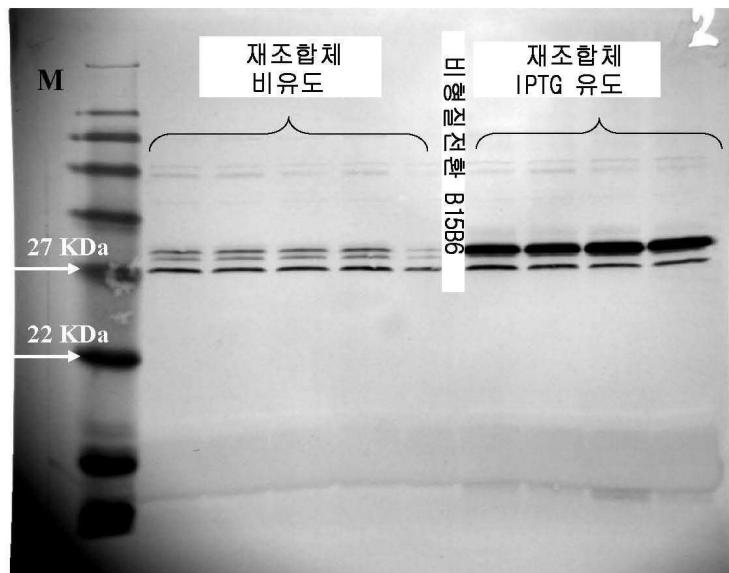
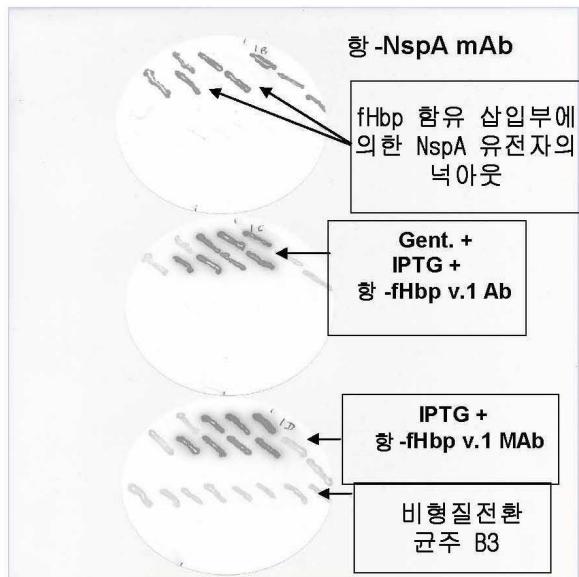
도면19



도면20

A.**B.**

도면21



서 열 목록

SEQUENCE LISTING

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

Zollinger, Wendell D.

Donets, Mikhail

Schmiedl, 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 cgtaataat	60
---	----

cgttacgctt acaatttatat 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 cgtaataat	60
---	----

cgttacgctt acaatttatat tcttaagctt tcgcgcggcc ggcgcatttt	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
gttttttg cggggggggg ggggtataa ttgaagac 38
<210> 4
<211> 2940
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> plasmid p0pc-79 for insertion of sequence into promoter of opc of
Neisseria meningitidis
<400> 4
ctgcagattt tttttacga cgggaagtt ggcaaagaaa tagccgcgt aagaaaacag 60
gataaccac aacaagccac cgatgtatgtt gttagcgata aatttggcat agtgcatttt 120
ccccataccg gcgacgaagg gggcgaaggt gcggacgatg ggcataaaac gggcaatgat 180

gatggtttg ccgcgtgtt ttcgtaaaa acgggtgggtt ttatcgagat attcacgtcg 240
gaagatttta gaatcggggt tggcgaacag cctgcccg aaatatttgc cgacgtaaa 300
attgagcgcg tcgcccagta tggcggcaag gcttaataat gcaaccatca aatgaatatc 360
cataccgccc agcgcggcaa tccgcggcgc ggcaaacagc agcgaatcgc cggcagtaa 420
gggcgttaaca atcaggccgg tttcgaaaa aacaatcaa aacagaatcg cataaatcca 480
cacaccgtat tgcccgaca gcgcgagcag gtgttggctg atatggagga tgaagtgcgt 540
ggcggaggca agcacggcgc gttcctaaaa aaacaaacccg cgtatTTAA ccgattggaa 600

aaatgccgtc tgaaaagttt cagacggcat cggctattca aattcatttc acgtaaaaac 660
cgcaaaccaa aatagttgc ggtttggcat ttaaagtgc aatgtatgatt tcaaatcatc 720
agaatTTAT gccgacgcgc aagccgtatt cacgaataact ggTTTcggg atggtgagcg 780
atacgtcgcc actcttggtt gttacactaa actcgccgga ttctttgtaa gtgcgttgtt 840
tgtagaacgg cccgcctcg atgctggcgg attcgccag tttttacca atattgcac 900

ccaatccaaa gccccagccg ttggttttt gattgatgtc tttttgaga ttggtaacgc	960
cgggtttaa ttatagcgg gaattgaggta caaattcac ttcagaccaa gggttgat	1020
accagccgtt acccagttgg gaaagcaaat ccgcgtgaac ttggctaac cacgactgac	1080
ggctgctgtg aagcgatgc ttgggttt taatgctgtc tttgaagat tcaaaaccca	1140
agccggcacc cacacggaaa tttaaagaat cacttaacgt ttgggtgtag gtgtacgt	1200
tgtaaagatc gatacggtt tcaggaacgc cggtggcag tttacattt ttagtctac	1260
ccagcttgtt ctcatctgtt tccaaattaa taatatttt ttgctgcgc ccgaaaccgg	1320
cttccaagcg gatgccttgg ttggcatcaa aaggaatatc agcacgcacg ctgatgtgtt	1380
tggcagctt gtgtttctt ttcaggaaag cacgagtga agaaatggaa gagaggtcg	1440
tgtggacggt aaactcatta gcggtttcaa gctctgtgc agcggcggca gtaccggta	1500
gggcaatcat ggcacatgtt aaaactgttt tttcatagt taaaaccttctt aaaaatttggaa	1560
ttgttagtcgg atatggtaac ataacgtaaa taatcggttac gcttacaattt atattctaa	1620
gcttcgcgc gcccgcgtt tttacatata ttaataaaaaa ttaacaaata gtttttgg	1680
tacaacgaat ttttatttctt acttggttt ctgtttttt tggtttttt gaaatttttag	1740
tttgcgtgtt tttatcgaa aaacagaaac ccggccgcgtt cattccgcgc caggcggaa	1800
tctagaaccc aacgcgacaa aaatttatcc gaagcgacaa caatctttt atcgtcatc	1860
ccgcgcagggc gggaaatctag aacgtaaaat ctaaagaaac cgtttaccc gataagttt	1920
cgtggcaca aaccttagatt cccgcctgcg cggtttttttt gtttctgtt	1980
tcggttttctt gtttaaggg aatgacgaga cttgagatgg cgccattttt cgggagcaac	2040
tggaaaccacc ctgcgtcat tccgcgaaa gcggaaatctt agttcggttcc gtttgcgtt	2100
atttccgata gattctgcc gcgttgggg tctggattcc cgcctgcgc ggaatgacgg	2160
gacttttaggt ttctgtttt gttttagacc ttgtttttt ccctttccctt cccgacagcc	2220
gaaacccaaa cacaggtttt cggctgtttt cggccaaat accgcctaatttttacccaaa	2280
tacccctta atctccccg gatacccgat aatcaggcat cgggtgtcc tttagggcg	2340
cagcggcgc acttaacctg ttggccgtt tcaacaggtt caaacatc gcctttaggt	2400
ggcttgcgc actcacttta atcagtccga aataggctgc cgcgcatacg cggattttac	2460
gggtgcagcgtt accgaagctc tggatcgatca catatagttt attaaatcc aaccgtacg	2520
gcgttgcctc gcgttgcgtt actatgttta ctgttgcgg cttgtgcgc ttgttgcgtt	2580
ttaatccatccactataa cgggtttcg ataaatatcg gttacgtttt gtttgcgtt	2640

ccgtcagccg acggttcgcc caggcttgc gcataatgcc gtccaaacaac tgatgttctt 2700
 ccagatgtg ccggtttcc gcactgtcat agccttgcc ggcataagacg gtcgtacctt 2760
 tgggcagtcc ttccaacaaa ggcggcaggt gttgcactc atggcattt gccccggtaa 2820
 tgtgcagtt ctgcataatag cttccgcat cggtacgggt atgttggtt taaccgagg 2880
 tgttagaggcc gttttcttgc atccaacggg catcgctgtc cttactcggt gtggttggc 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 gcctcgccga cgggaatggc gggtatcaact tttgcattt 60
 caagcgcggc aatgcggctc aatccggtaa tcgttgcgt ctgaataccg aaaaaatcca 120
 caaaaaccga atcgttgcgt ccgaaatcct gatcgggcag atacagaac ggcgcgtc 180
 tttgcggaa ctgttgcgtc agggcgcga gcccttcgtt gcccggata aggaagacgt 240
 tgtgatagcg gttgcggct ttcaaatct gttcgccaa tatcttgttt ttttgatgg 300
 aatacatact gatcagcggg atatcctgat taagcgcgt aaccgcctac tcgaacgcgg 360
 tgaagtgcgg atacaggatg atgacacgcg tttgtaatca tgtactctt ttgataaaaa 420
 attggagatt cctttacaaa tatgtctta cgtgcttata tttaagtgc tattttaaag 480
 gagttataa atatgcggca aggtattctt aaataaaactg tcaatttgat agcgggaaca 540
 aataattaga tgtcctttt tagggggct tagtttttg tacccagttt aagaataacct 600
 ttatcatgtg attctaaagt atccagagaa tatctgtatg ctttgcatac ctatggttat 660
 gcataaaaaat cccagtgata aaagtattta tcactggat ttttatgcc ttttgggtt 720
 ttgaatggag gaaaatcaca tgaaaattat taatattgga gtttgcgtc atgttgcgtc 780
 agggaaaaact accttaacag aaagtttattt atataacagt ggagcgttta cagaattagg 840
 aagcgtggac aaaggtacaa cgaggacgga taatacgctt ttagaacgtc agagaggaat 900
 tacaatttcg acaggaataa cctctttca gtggaaaat acgaagggtga acatcataga 960
 cacggccagga catatggatt tcttagcaga agtatacgat tcattatcg ttttagatgg 1020
 ggcaattcta ctgatttctg caaaagatgg cgtacaagca caaactcgta tatttttca 1080
 tgcacttagg aaaatggggta ttcccaaat ctttttatac aataagattt accaaaaatgg 1140

aattgattta tcaacggttt atcaggatat taaagagaaa cttctgccg aaatgtaat	1200
caaacagaag gtagaactgt atcctaataat gtgtgtgacg aactttaccg aatctgaaca	1260
atgggatacg gtaatagagg gaaatgatga ccttttagag aaatataatgt ccggtaaatc	1320
attagaagca ttggaactcg aacaagagga aagcataaga tttcataatt gttccctgtt	1380
ccctgttat cacggaaatgc caaaaaacaa tatagggatt gataaccctt tagaagtgtat	1440
tacgaataaa ttttattcat caacacatcg aggtccgtct gaactttgct gaaatgttt	1500
caaattgaa tatacaaaaa aaagacaacg tcttgcatat atacgcctt atagtggagt	1560
actacattta cgagattcgg ttagagtatc agaaaaagaa aaaataaaag ttacagaaat	1620
gtatacttca ataaatggtg aattatgtaa gatgtataga gcttattctg gagaaattgt	1680
tattttgcaa aatgagtttt tgaagttaaa tagtgttctt ggagataca aactattgcc	1740
acagagaaaa agaattgaaa atccgcatcc tctactaca ataactgtt aaccgagtaa	1800
acctgaacag agagaaatgt tgcttgatgc cctttggaa atctcagata gtgatccgct	1860
tctacgatat tacgtggatt ctacgacaca tgaattata cttctttct tagggaaagt	1920
acaatggaa gtgatttagt cactgttca agaaaagtat catgtggaga tagaactaaa	1980
agagcctaca gtcatttata tggagagacc gttaaaaat gcagaatata ccattcacat	2040
cgaagtgcgg ccaaattcctt tctggcttc cattggtttac tctgtatcac cgctccgtt	2100
gggaagtggaa atgcgtatg agagctcggt ttctttggaa tacttaatc aatcattca	2160
aatgcgtt atgaaaggga tacgtatgg ttgcacaa ggattatgt gttgaatgt	2220
gacgaaatgt aaaatctgtt ttaagtatgg cttataactat agccctgtt gtaccccagc	2280
agatttcgg atgcttgctc ctattgtatt ggaacaagtc ttaaaaaaag ctggAACAGA	2340
attgttagag ccatactta gttttaaaat ttatgcgcca caggaatata tttcacgagc	2400
atacaacgt gctcctaaat attgtgcgaa catcgtagac actcaattga aaaataatga	2460
ggtcattctt agggagaaa tccctgctcg gtgtattcaa gaatatcgta gtgatttaac	2520
tttcttaca aatggacgta gtgtttgtt aacagagttt aaagggtacc atgttactac	2580
cggtaacct gtttgcgcgc cccgtcgatcc aaatagtcgg atagataaag tacgatataat	2640
gttcaataaa ataacttagt gtatTTATG ttgttatata aatatggttt cttgttaat	2700
aagatgaaat atttttat aaagatttga attaaagtgt aaaggaggag atagttatta	2760
taaaactacaa gtggatattt gtcctgtat gtggaaataa aacacgattt aagataaggg	2820
aagatactga attaaaaatt ccccccttat tgtccgaaat gcagacaaga aaatttaatt	2880

gaaataaagc agttcaaagt aactgtgatt acagagccag acgcaaagac gcagagccga	2940
---	------

taaaatgaga ttaataacaat ctcatatcca tcggctctt ccgttatgta tggattctt	3000
taacgcgtca gaaaactgcaa aacatacagt aaaaaaaaata taaatttcacat ctcgatacac	3060
atttctttt cagacggcaa aatacaaatg ccgtctgaaa ctattgaaac ctgccgcgt	3120
tgacctgcat ccccgaaagg ttgagttgg cggcaagccc gtgggtgcgt aaggcgtggg	3180
tcagcgcac ggcagaagaccg tccgcccgc tccgctgggg cggtcccgaa agtcccaaca	3240
tctgcaccac catatgctgc acctgttctt ttgcgcctt gcccttgccg actaccgcct	3300
gtttgacctg cttaagacg 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 meningitidis	
---	--

<400> 6

tcgcgcgtt cgggtatgac ggtgaaaacc tctgacacat gcagctcccg gagacggta	60
cagcttgtct gtaagcgat gcccggagca gacaagcccg tcagggcgcg tcagcgggtg	120
ttggcgggtg tcggggctgg ctttaactatg cggcatcaga gcagatgta ctgagagtgc	180
accataaatt cgagctcgac cgtctgaaac ggccggaaag ccgttaaccc ggcgttgcc	240
tttaaatggt ggccggggca tcacgcggcg gatgggtgaa acttgcaaac gggttggaaa	300

aaacagcggt atctgtcgga ttgtgcagg tgcaggcata cggtttgcgt tgctgtgt	360
ccttaagcgt cggacatttc cggccggcgcc tgcgtgtct gaaacgcccgc gccccggatg	420
cggctgcgtt ttccatcgat aagcatatcc tccggacgcg ttccggcg gtttcccg	480
ggccggcccg attgtttgc gcttatatacg tggattaaca aaaatcagga caaggcgacg	540
aagccgcaga cagtacaaat agtacggaaac cgattcactt ggtgcttcg caccttagag	600
aatcggttc tttgagctaa ggccggggca cggcgactg gttttgtta atccactata	660
aaaaacactg cagcaaatcg tttaaaaaca agcgccctt ttccggcg gggatcgg	720

cagggtcggt ttccagcagg ctttttgcc ttgcgttgc gatttgcgc atgattttgg	780
cactcggtac gcccgtgcgc tcctgcaaca tcgcggcggt tacggcgat gtcaggcgca	840
gggcgttcat catgaattcg aacggcaaattt cttccggcagc gacggttttgcgttcgacgg	900
cttcactcggtt ttggcttcgat attaaggcgaa ggtagtcgtt ggggtggcg gggccggacgg	960

tgcgctcgat gcggcggga tagaaattt tgccgtgcgc gcccgcgc atgcctaatt	1020
aatcgccgaa ctgccagtag ttcaaattgt ggcggactg catggctgg ttcgcaaaag	1080
ccgatgtttc gtatggaca aaacccgcgc cttccagcgc gccgtgtacc gcgtttcga	1140
tgtcgagggc ggctcgctc tgccgaaac cttccgggg cgtatgaccg aacggcgtgt	1200
tcggttccat cgtcaggta tacgcgtga tgtgggtgc gcccgttaggg atcccgactt	1260
cgcgtgtgcc caagggtgcc gggtgacgca caccgtggaa acggatgaag gcacgaaccc	1320
agttgacata accctgttcg gttcgtaaac tgcataatgcaaa gtacgtatg cgctcacgca	1380
actggtccag aaccttgacc gaacgcagcg gtggtaacgg cgacgtggcg gtttcatgg	1440
cttgcgtatga ctgtttttt gtacagtcta tgccctggc atccaagcag caagcgcgtt	1500
acgcgtggg tcgatgtttg atgttatgga gcagcaacga tgtaacgcag cagcaacgat	1560
gttacgcgc agggcagtcg ccctaaaaca aagtttagtg gctcaagttt gggcatcatt	1620
cgcacatgtt ggcctggccc tgaccaagtc aaatccatgc gggctgtct tgatctttc	1680
ggtcgtgagt tcggagacgt agccacactac tcccaacatc agccggactc cgattacctc	1740
gggaacttgc tccgtatcaa gacattcatc ggcgttgctg cttcgacca agaagcggtt	1800
gttggcgctc tcgcccccta cgttctgccc aggtttgagc agccgcgttag tgagatctat	1860
atctatgatc tcgcagtctc cggcgagcac cggaggcagg gcattgccac cgcgttcattc	1920
aatctcctca agcatgagggc caacgcgtt ggtgttatg tgatctacgt gcaagcagat	1980
taacgtgacg atccgcagt ggctcttat acaaagtgg gcatacgga agaagtgtat	2040
cactttgata tcgacccaaag taccgccacc taacaattcg ttcaagccga gatcggttc	2100
ccggccgcgg aatgcgcatt ttttttcca gcaatttgat ttgtttggag atgcgggtt	2160
gcgaagtaaa caaggcttcg gccgttcgg aaacgttcag gttgtgtgg taaacttcta	2220
aggcgtatcc caattgccga caccatgaa tggcgtaaaa ctttcgcgg tatggcatga	2280
tagccccgg aagagagtca attcagggttg gtgtatgtaa aaccagtaac gttatacgt	2340
gtcgcagagt atgcgggtt ctcttatcga accgttccc gcgtggtaaa ccagccagc	2400
cacgtttctg cgaaaacgcg gaaaaaagtg gaagcggcga tggcggagct gaattacatt	2460
cccaaccgcg tggcacaaca actggcgggc aaacagtctg tgctgattgg cggtgccacc	2520
tccagtcgg ccctgcacgc gccgtcgaa attgtcgccg cgattaaatc tcgcggat	2580
caactgggtt ccacgtgtttt ggtgtcgatg gtgtacggaa gcccgtcga agcgtttaaa	2640
gcggcgggtgc acaatcttct cgcgcacgc gtcagtggc tgatcattaa ctatccgt	2700
gatgaccagg atgcatttc tggaaatgtt gcctgcacta atgtccggc gttatttctt	2760

gatgtctctg accagacacc catcaacagt attatttct cccatgaaga cggtacgcga	2820
ctggcgctgg agcatctggc cgcatgggt caccagcaaa tcgcgtgtt agcggccca	2880
ttaagttctg tctcgccgcg tctcgctcg gctggctggc ataaatatct cactcgaaat	2940
caaattcagc cgatagcggc acgggaaggc gactggagtg ccatgtccgg tttcaacaa	3000
accatgcaaa tgctgaatga gggcatcggtt cccactgcga tgctgggttc caacgatcag	3060
atggcgctgg ggcgaatgcg cgccattacc gagtccggc tgccgttgc tgccgatatc	3120
tcggtagtgg gatacgacga taccgaagac agctcatgtt atatccgcc gttaccacc	3180
atcaaacagg atttcgctt gctggggcaa accagcggtt accgctgtct gcaactctt	3240
cagggccagg cggtgaaggg caatcagctg ttgcccgtt cactggtgaa aagaaaaacc	3300
accctggcgc ccaatacgca aaccgcctt ccccgccgt tgccgattt attaatgcag	3360
ctggcacgac aggttcccg actggaaagc gggcagttag cgcaacgcaaa ttaatgtaa	3420
ttagctact cattaggcac aattctcatg ttgacagct tatcatcgac tgacgggtgc	3480
accaatgctt ctggcgtag gcagccatcg gaagctgtgg tatggctgtc caggtcgaa	3540
atcaactgcat aattcgtgtc gctcaaggcg cactccgtt ctggataatg tttttgcgc	3600
cgacatcata acggttctgg caaatattct gaaatgagct gttgacaatt aatcatcgcc	3660
tcgtataatg tgtggaattt tgagcgata acaatttac acagggaaaca gccagtcgtt	3720
ttagtgttt tcacgagcac ttacccaaca aggaccatag catatgaatc gaactgcctt	3780
ctgctgcctt tctctgacca ctgccccgt tctgaccgc tgccgcgcg gaggggggtgg	3840
tgtcgccgc gacatcggtt cggggcttgc cgatgcacta accgcaccgc tcgaccataa	3900
agacaaagggt ttgcagtctt tgacgctggc tcagtcgtc agggaaaaacg agaaactgaa	3960
gctggcgccca caaggtgcgg aaaaaactta tggaaacggt gacagcctca atacggccaa	4020
attgaagaac gacaaggctca gccgtttcga ctttatccgc caaatcgaag tggacggca	4080
gctcattacc ttggagagtg gagagttcca agtataaaaa caaagccatt ccgccttaac	4140
cgccttcag accgagcaaa tacaagatcc ggagcattcc gggaaagatgg ttgcgaaacg	4200
ccagttcaga atcggcgaca tagcgggcga acatacatct tttgacaagc ttcccgaaagg	4260
cgccaggcg acatatcgcc ggacggcggtt cggttcagac gatgccggcg gaaaactgac	4320
ctacaccata gatttcggc ccaagcaggaa acacggcaaa atcgaacatt tggaaatcgcc	4380
agaactcaat gtcgacactgg ccggccgcga tatcaagccg gatggaaaac gccatgcgtt	4440
catcagcggtt tccgtcctt acaaccaagc cgagaaaggc agttactccc tcggtatctt	4500

tggcgaaaaa gcccaggaag ttgccgcag cgcgaaagt aaaaccgtaa acggcatacg	4560
ccatatcgcc cttgccgcca agcaataacg ccgggtgtcg cgtcaaattc tgatatgcgc	4620
cttattctgc aaaccgccag cttggctgtt ttggcgatg agagaagatt ttcagcctga	4680
tacagattaa atcagaacgc agaagcggtc tgataaaaaca gaatttgccct ggcggcagta	4740
gcgcgggttgtt cccacctgac cccatgccga actcagaagt gaaacgccgt agcggcgatg	4800
gtagtgtggg gtcctccat gcgagagtag ggaactgcca ggcataaaat aaaacgaaag	4860
gctcagtcga aagactgggc ctttcgcccc atctgttgc tgtcggtgaa cgctctcctg	4920
agtaggacaa atccggccgc cgggcgagcc ttggcggtt ttgtttctg ccaccgcaac	4980
tacacaagcc ggcggttttg tacgataatc ccgaatgctg cggcttctgc cgccttattt	5040
tttggagaat ccgaaatgtc caaaaccatc atccacacccg acaaagcccc cgccgcac	5100
ggcgcgtaca gccaaggccgt ccgagcaggg gacaccgtt acatgagcgg tcaaatcccc	5160
ctcgatcccg ccacgatgac cgtcgctggc aacggcgatt tccgcggcga agcgcgc	5220
gtgttccaaa acctgcaagc cgtcgccgaa gcccggcggc gcacgctggc cgacatgtc	5280
aaactcaacg cctacctgac cgacttgggc aatttgcgg tcttcaacga agtcatggcg	5340
gaatttatcg ccgagccctt cccggccgc gccgcgcgtcg gcgttgccctc gctgccc	5400
ggcgtgcagg tcaagccga agccgtcctc gtgaccgtct gaaacggaag cttggcgtaa	5460
tcatggtcat agctgtttcc tgtgtgaaat tttatccgc tcacaattcc acacaacata	5520
cgagccggaa gcataaagttaaaggctgg ggtgcctaatt gagtgagcta actcacatta	5580
attgcgttgc gtcactgccc cgcttccag tcggaaacc tgcgtgcca gctgcattaa	5640
tgaatcgccc aacgcgcggg gagaggcggt ttgcgtattt ggcgccttc cgcttcctcg	5700
ctcaactgact cgctgcgtc ggtcgttcgg ctgcggcggc cggatcagc tcactcaag	5760
gcggtaatac gtttatccac agaatcaggg gataacgcag gaaagaacat gtgagcaaaa	5820
ggccagcaaa aggccaggaa ccgtaaaaag gccgcgttgc tggcgccccccataggctc	5880
cgcggccctg acgagcatca caaaaatcgca cgctcaagtc agaggtggcg aaaccgaca	5940
ggactataaa gataccaggc gttcccccgtt ggaagctccc tcgtgcgtc tcctgttccg	6000
accctgcgc ttaccggata cctgtccgcc tttctccctt cggaaagcgt ggcgc	6060
catagctcac gctgttaggtatctcagttcg gtgttaggtcg ttcgctccaa gctggcgtgt	6120
gtgcacgaac ccccggttca gcccggaccgc tgccgccttat ccggtaacta tcgttttag	6180
tccaaccgg taagacacga ctatcgcca ctggcagcag ccactggtaa caggattagc	6240
agagcggaggatgttggcgg tgctacagag ttcttgcgtt ggtggcctaa ctacggctac	6300
actagaagga cagtatttgg tatctgcgtc ctgctgaagc cagttaccc ttccggaaaaga	6360

gttggtagct ctgtatccgg caaacaaacc accgctggta gcgggtgttt ttttgttgc	6420
aagcagcaga ttacgcgcag aaaaaaagga tctcaagaag atccttgat ctttctacg	6480
gggtctgacg ctcatggaa cgaaaactca cgtaaggta tttggtcat gagattatca	6540
aaaaggatct tcacctagat cttttaaat taaaaatgaa gtttaataatc aatctaaagt	6600

atatatgagt aaacttggtc tgacagttac caatgtttaa tcagtggagc acctatctca	6660
gcgatctgtc tattcggttc atccatagtt gcctgactcc ccgtcggtta gataactacg	6720
atacgggagg gcttaccatc tggccccagt gctgcaatga taccggagaa cccacgtca	6780
ccggctccag atttatcagc aataaaccag ccagccggaa gggccgagcg cagaagtgg	6840
cctgcaactt tatccgcctc catccagttt attaattttt gccggaaagc tagagtaagt	6900
agttcgccag ttaatagttt ggcacacgtt gttgccattt ctacaggcat cgtgggtca	6960
cgctcgctgt ttgttatggc ttcattcage tccgggtccc aacgatcaag gcgagttaca	7020

tgatccccca ttttgtgcaa aaaagcggtt agctccttcg gtccctcgat cgttgtcaga	7080
agtaagtgg ccgcagtgtt atcactcatg gttatggcag cactgcataa ttctcttact	7140
gtcatgccat ccgtaaatgt ctgttctgtg actgggtgactt actcaaccaa gtcattctga	7200
gaatagtgtt tgcggcgacc gagttgcctt tgccggcgtaaataccggtaaatacccg	7260
ccacatagca gaactttaaa agtgcgtatc attggaaaac gttttcgccgaaactc	7320
tcaaggatct taccgctgtt gagatccagt tcgatgtaac ccactcggtc acccaactga	7380
tcttcagcat ctttacttt caccagcggtt tctgggtgag caaaaacagg aaggcaaat	7440

gccgcaaaaa aggaaataag ggcgacacgg aaatgttcaa tactcataact cttccctttt	7500
caatattattt gaagcatttta tcagggttat tgtctcatga gcggatacat atttgaatgt	7560
attttagaaaa ataaacaaat aggggttccg cgcacatttc cccgaaaatgttccacgtac	7620
gtctaagaaaa ccattattat catgacatta acctataaaa ataggcgat 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

tcgcgcgtt cgggtatgac ggtgaaaacc tctgacacat gcagctcccg gagacggta

60

cagcttgtct gtaagcggat gccgggagca gacaagcccg tcagggcgcg tcagcgggtg	120
ttggcgggtg tcgggctgg cttactatg cgccatcaga gcagattgtt ctgagagtgc	180
accataaatt cgagctcgac cgtctgaaac ggccgcaaag ccgttaaccc gcgcgttgcc	240
ttaaatggt ggccggca tcacgcggcg gatgggtgaa acttgcaaac gtttggaaa	300
aaacagcgt atctgtcgga ttgttcagg tgcaggcata cggtttgtg tgcgtctgt	360
ccttaagcgt cgacatttc cggccggcgc tgtgcgtct gaaacccccg gcggggatg	420
cggtgcgtt ttccatcgat aagcatattt tccggacgcg ttcggggcgg gtttcccg	480
gcggccgcg attgtttgc gcttatatacg tggattaaca aaaatcagga caaggcgcac	540
aagccgcaga cagtacaaat agtacggAAC cgattcaccc ggtgcgttcag caccttagag	600
aatcggttc tttgagctaa ggccaggca cgccgtactg gttttgtta atccactata	660
aaaaacactg cagcaatcg tttaaaaaca agcgtcctt ttccggcggg cgaaatacgg	720
cagggtcgtt ttccagcagg ctttttgc ttgcgtttc gatttgcgc atgattttgg	780
cactcgttac gccgtgcgc tcctgcaaca tcgcggcggg tacgcgtcg gtcaggcga	840
ggcggttcat catgaattcg aacggcaat cttcggcagc gacggtttg cggtcgacgg	900
cttcactcggttgcg attaaggcga ggtagtcgtt ggggtggcgg cggccgcgg	960
tgcgtcgat ggggtggcgg taggaaattt tgccgtgcgc gcccgcgcct atgcctaatt	1020
aatcgccaa ctgccatcg ttcaattgtt ggcggactg catggcttgtt ttcgcaaaag	1080
ccgatgtttc gtatggaca aaacccgcgc cttccagcgc ggcgttacc gcgttccgat	1140
tgtcgagggc ggcttcgtct tgccgcaaac cttccggcg cgtatgaccg aacggcgtgt	1200
tcgggttcat cgtcaggatga tacgcgtga tgtgggttc gcccgttaggg atcccgactt	1260
cgctgctgcc caagggttgc ggggtgacgca caccgtggaa acggatgaag gcacgaaccc	1320
agttgacata agcctgttgc gttcgtaaac tgtaatgca gtagcgtatg cgctcacgca	1380
actgggtccag aaccttgacc gaacgcggcgtt gttcgtaacgg cgccgtggcg gtttcatgg	1440
cttggatgttgc ctgtttttt gtacagtcta tgccgtggc atccaagcag caagcgcgtt	1500
acggccgtggc tcgatgtttt atgttatggc gcagcaacga tggtacgcag cagcaacgt	1560
gttacgcagc agggcagtcg ccctaaaaca aagtttaggtt gctcaagttt gggcatcatt	1620
cgcacatgtt ggcgtggccc tgaccaagtc aaatccatgc gggctgcgtt tgatctttc	1680
ggtcgtgagt tcggagacgt agccacatc tcccaacatc agccggactc cgattaccc	1740
gggaacttgc tccgttagtaa gacattcatc ggcgttgctg cttcgacca agaagcgggtt	1800
gttggcgcgtc tcggcgttta cgttctgccc aggttgcgc agccgcgtt tgatgttat	1860
atctatgatc tcgcgttc cggcgagcac cggaggcagg gcattgccac cgccgtcatc	1920

aatccctca agcatgaggc caacgcgtt ggtgttatg tgatctacgt gcaagcagat	1980
tacggtgacg atccccagt ggctcttat acaaagtgg gcatacgga agaagtgtat	2040
cacttgata tcgacccaag taccgccacc taacaattcg ttcaagccga gatcggttc	2100
ccggccgcgg aatgccgatt ttttttcca gcaatttgat ttgtttggag atgcccggtt	2160
gcgaagtaaa caaggcttcg gccgttcgg aaacgttcag gttgtgtgg taaacttcta	2220
aggcgtattt caattgccga caccatcgaa tggtgcaaaa ctttcgcgg tatggcatga	2280
tagccccgg aagagagtca attcagggtg gtgaatgtga aaccagtaac gttatacgt	2340
gtcgcagagt atgcccgtgt ctcttatcg accgtttccc gcgtggtaa ccagggcagc	2400
cacgttctg cggaaaacgcg gaaaaaaatg gaagcggcga tggcggagct gaattacatt	2460
cccaaccgcg tggcacaaca actggcgggc aaacagtctg tgctgattgg cggtgccacc	2520
tccagttctgg ccctgcacgc gccgtcgcaa attgtcgccg cgattaaatc tcgcgccat	2580
caactgggtg ccagcgttgt ggtgtcgatg gtagaacgaa gcggcgtcga agcctgtaaa	2640
gcggcgtgc acaatcttct cgcgcacgc gtcagttggc tgatcattaa ctatccgtg	2700
gatgaccagg atgcatttcg tgtggaaatgt gcctgacta atgttccggc gttatttctt	2760
gatgtctctg accagacacc catcaacagt attatttct cccatgaaga cggtacgcga	2820
ctggcgtgg agcatcttgtt cgcattgggt caccagcaaa tcgcgtgtt agcggccca	2880
ttaagttctg tctcggcgcg tctcgctctg gctggctggc ataaatatct cactcgaaat	2940
caaattcagc cgatagcggc acggaaaggc gactggagtg ccatgtccgg ttttcaacaa	3000
accatgcaaa tgctgaatga gggcatcggtt cccactgcga tgctgggtgc caacgatcg	3060
atggcgtgg gcgcaatgcg cgcattacc gagtccggc tgccgttgg tgccgatatc	3120
tcggtagtgg gatacgacga taccgaagac agctcatgtt atatccgcg gttaccacc	3180
atcaaacagg atttcgctt gctggggcaa accagcgtgg accgctgtct gcaactctt	3240
caggccagg cggtaaggg caatcagctg ttggccgtct cactggtaaa aagaaaaacc	3300
accctggcgc ccaatacgca aaccgcctt ccccgccgt tggccgattc attaatcgat	3360
ctggcacgac aggttcccg actggaaagc gggcagttag cgcaacgc当地 ttaatgtaa	3420
ttagctact cattaggcac aattctcatg tttgacagct tatcatcgac tgacgtgc	3480
accaatgctt ctggcgtcag gcagccatcg gaagctgtgg tatggctgtg caggtcgtaa	3540
atcaactcat aattcgtgtc gctcaaggcg cactccgtt ctggataatg tttttgcgc	3600
cgacatcata acggttctgg caaatattct gaaatgagct gttgacaatt aatcatcgat	3660
tctgtataatg tggtggaaatgg tgagcggata acaatttcac acaggaaaca gccagtcgt	3720

ttaggtttt tcacgagcac ttccaccaaca aggaccatag catatgaatc gaactgcctt	3780
ctgctgcctt tctctgacca ctgccccyat tctgaccgcc tgcagcagcg gaggcggcgg	3840
tgtcgccgcc gacatcgccg cggggcttgc cgatgeacta accgcaccgc tcgaccataa	3900
agacaaaagt ttgcagtctt tgacgcttgc tcagtcgctc agaaaaaaacg agaaactgaa	3960
gctggcggca caagggtgcgg agaaaaactta tggAACCGC gacagcctca atacggcaa	4020
attgaagaac gacaaggtaa gcccgttcga ctttatccgt caaatcgaag tggacggca	4080
gctcattacc ttggagagcg gagagttcca aataataaaa caggaccact ccgcgcgtcg	4140
tgcctacag attaaaaaaa tcaacaaccc cgacaaaatc gacagcctga taaaccaacg	4200
ctccttcctt gtcaagggtt tggcggaga acataccgcc ttcaaccaac tgcctgacgg	4260
caaagccgag tatcacggca aagcatttcg ctccgacat gctggcggaa aactgaccta	4320
taccatagat ttgcggcca aacagggaca cggcaaaatc gaacacctga aaacacccga	4380
gcaaaatgtc gagcttgccg ccggcgaact caaagcagat gaaaaatcac acgcgcgtcat	4440
tttggcgcac acgcgcctacg gcagcgaaga aaaaggcact taccacctcg ccctttcg	4500
cgaccgcgcc caagaaatcg ccggctcgcc aaccgtgaag atagggaaa agttcacga	4560
aatcggcatc gccggcaaacc agtagtaacg ccgggtgtcg cgtcaaattc tgatatgcgc	4620
cttattctgc aaaccgccag ctggctgtt ttggcggatg agagaagatt ttcaagcctga	4680
tacagattaa atcagaacgc agaagcggtc tgataaaaaca gaatttgcct ggcggcagta	4740
gcgcggtgtt cccacctgac cccatgccga actcagaagt gaaacgcgt agcgcgcgt	4800
gtagtgtgg gtctccccat gcgagagttag ggaactgcca ggcataaaat aaaacgaaag	4860
gctcagtcga aagactgggc cttcggttt atctgttgc tgctggtaa cgctctcctg	4920
agtaggacaa atccggccgc cggcgagcc ttggcggtt ttgtttctg ccacgcac	4980
tacacaagcc ggcggtttg tacgataatc ccgaatgctg ccgcctctgc cgccctattt	5040
tttggaaat ccgaaatgtc caaaaccatc atccacaccg acaaagcccc cgccgcattc	5100
ggcgcgtaca gccaaggcgt ccgagcaggc gacaccgtt acatgagcgg tcaaateccc	5160
ctcgatcccg ccacgatgac cgtcgctggc aacggcgatt tccgcggcga agcgcgccaa	5220
gtgttccaaa acctgcaagc cgtcgccgaa gcccggcggc gcacgctggc cgacatgtc	5280
aaactcaacg cctacctgac cgacttgggc aatttgcgc tttcaacga agtcatggcg	5340
gaatttatcg ccgagccctt cccggccgc gcccgcgtcg gctggccaa	5400
ggcgtgcagg tcgaagccga agccgtcctc gtgaccgtct gaaacggaag cttggcgtaa	5460

tcatggtcat agctgtttcc tgtgtgaaat tgttatccgc tcacaattcc acacaacata	5520
cgagccggaa gcataaaagt taaaggctgg ggtgcctaact gagtgagcta actcacatta	5580
attgcgttgc gctcaactgcc cgctttccag tcggaaacc tgctgtgcca gctgcattaa	5640
tgaatcgccc aacgcgcggg gagaggcggg ttgcgtatig ggctcttc cgttccicg	5700
ctcaactgact cgctgcgctc ggctgttcgg ctgcggcgg cgttatcagc tcactcaaag	5760
gccccgttaatac gtttatccac agaatcaggg gataacgcag gaaagaacat gtgagcaaaa	5820
ggccagcaaa aggccaggaa ccgtaaaaag gccgcgttgc tggcgaaaa ccataggctc	5880
cgcggccctg acgagcatca caaaaatcga cgctcaagtc agaggtggcg aaacccgaca	5940
ggactataaa gataccaggc gttccccctt ggaagtcggc tcgtgcgctc tcctgttccg	6000
accctgcgc ttacggata cctgtccggc tttctccctt cggaaagcgt ggcgtttct	6060
catagtcac gctgttaggt tctcagttcg gtgttaggtcg ttgcgtccaa gctgggtgt	6120
gtgcacgaac ccccggttca gcccggaccgc tgccgccttat ccggtaacta tcgttttag	6180
tccaaaccgg taagacacga cttatcgcca ctggcagcag ccactgttaa caggattagc	6240
agagcgaggt atgttagcgg tgctacagag ttcttgaagt ggtggctaa ctacggctac	6300
actagaagga cagtatttgg tatctgcgt ctgctgaagc cagttacctt cgaaaaaaga	6360
gttgttagct ctgtatccgg caaacaaacc accgctggta gcggtggttt ttttgttgc	6420
aagcagcaga ttacgcgcag aaaaaaagga tctcaagaag atccttgat ctttctacg	6480
gggtctgacg ctcaatggaa cggaaactca cgttaaggaa ttttgtcat gagattatca	6540
aaaaggatct tcacccatgt ctttttaat taaaaatgaa gttttaaatc aatctaaagt	6600
atatatgagt aaacttggtc tgacagttac caatgttaa tcagtggc acctatctca	6660
gcgtatgtc tatttcgttc atccatagtt gcctgactcc ccgtcggtta gataactacg	6720
atacgggagg gcttaccatc tggccccagt gctgcaatga taccgcgaga cccacgctca	6780
ccggctccag attatcagc aataaaccag ccagccggaa gggccgagcg cagaagtgg	6840
cctgcactt tateccgcctc catccagtct attaattgtt gccggaaagc tagagtaagt	6900
agttcgccag ttaatagttt ggcacgtt gttgcattt ctacaggcat cgtgggtca	6960
cgctcgctgt ttgttatggc ttcattcagc tccgggtccc aacgatcaag gcgagttaca	7020
tgtatccccca tgggtgtcaa aaaagcggtt agctccttcg gtctccgtat cggtgtcaga	7080
agtaagtgg ccgcgtgtt atcaactcatg gttatggcag cactgcataa ttcttact	7140
gtcatgccat ccgtaaagatg ctttctgtg actggtgagt actcaaccaa gtcattctga	7200
gaatagtgtt tgcggcgacc gagttgcgtc tgccggcgtt caatacgga taataccgc	7260
ccacatagca gaactttaaa agtgctcatc attggaaaac gttttcggg gcgaaaactc	7320

tcaaggatct taccgctgtt gagatccagt tcgatgtaac ccactcgtgc acccaactga	7380
tcttcagcat ctttacttt caccagcgtt tctgggttag caaaaacagg aaggcaaaat	7440
gccgcaaaaa aggaaataag ggcgacacgg aaatgttcaa tactcatact cttcctttt	7500
caatattatt gaagcattta tcagggttat tgtctcatga gcggatacat atttgaatgt	7560
atttagaaaa ataaacaaat aggggttccg cgcacatttc cccgaaaaagt gccacctgac	7620
gtctaagaaa ccattattat catgacatta acctataaaa ataggcgat 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 meningitidis	
<400> 8	
tcgcgcgtt cggtgatgac ggtgaaaacc tctgacacat gcagctcccg gagacggta	60
cagcttgtct gtaagcggat gccgggagca gacaagcccg tcagggcgcg tcagcgggtg	120
ttggcgggtg tcgggctgg ctaactatg cggcatcaga gcagattgtat ctgagagtgc	180
accataaatt cgagctcgac cgtctgaaac ggccgcaag ccgttaaccc ggcgcgttgc	240
tttaaatgtt ggcggcggca tcacgcggcg gatgggtgaa acttgaaac gtttggaaa	300
aaacagcggt atctgtcgga ttgtgcagg tgcaggcata cggtttgtg tgctctgt	360
ccttaagcgt cggacatttc cggccggcgc tgcgttgcgat gaaacgcccgcggatg	420
cggctgcgtt ttccatcgat aagcatat tccggacgcg ttccggcgg gtttccgg	480
gcggccgcgcg atttgttgc gcttatatacg tggattaaca aaaatcagga caaggcgacg	540
aagccgcaga cagtacaaat agtacggAAC cgattcactt ggtgcttcag caccttagag	600
aatcgttctc tttagactaa ggccgaggca cggcgactg gttttgtta atccactata	660
aaaaacactg cagcaaatcg ttaaaaaca agcgtcctt ttccggatgg cgaaatacgg	720
cagggtcggt ttccagcagg ctttttgc ttccgttgc gatttgcgcg atgattttgg	780
cactcgttac gcccgtgcgc ttccgttgc tccgttgcgat gtcaggcgacg	840
ggccgttcat caigaattcg aacggcaat cttccgttgc gacggtttg cggtcgacgg	900
tttactcgg ttggcttgc attaaggcga ggtagtcgtt ggggtggcgg cggccgcgg	960
tgccgtcgat gccgtcggtt taggaaattt tgccgtcgat gcccgcgcct atgcctaaat	1020

aatcgccgaa ctgccagtag ttcaaattgt ggcggcactg catggcttgt ttcgcaaaag	1080
ccgatgttc gtatggaca aaacccgcgc cttccagcgc gccgtgtacc gcgttgcga	1140
tgtcgagggc gggttcgtct tgcggcaaac ctttggcgg cgtatgaccg aacggcgtgt	1200
tcggttccat cgtcaggta tacgcgtga tgtggttgc gccgttaggg atcccgactt	1260
cgctgctgcc caaggttgcc gggtgacgca caccgtggaa acggatgaag gcacgaaccc	1320
agttgacata agcctgttcg gttcgtaaac tgtaatgca gtacgtatg cgctcacgca	1380
actggtccag aaccttgacc gaacgcagcg gtggtaacgg cgcaatggcg gtttcatgg	1440
cttggtatga ctgtttttt gtacagtcta tgcctcggc atccaagcag caagcgcgtt	1500
acgcccgtgg tcgatgttg atgttatgaa gcagcaacga tgtacgcag cagcaacgat	1560
gttacgcagc agggcagtcg ccctaaaaca aagtttagtg gctcaagtat gggcatcatt	1620
cgcacatgta ggctcgcccc tgaccaagtc aaatccatgc gggctgtct tgatctttc	1680
ggtcgtgagt tcggagacgt agccacctac tcccaacatc agccggactc cgattacctc	1740
gggaacttgc tccgtagtaa gacattcattc gcgcttgctg cttcgacca agaagcggtt	1800
gttggcgtc tcgcccgtta cggtctgccc aggttgagc agccgcgtag tgagatctat	1860
atctatgatc tcgcagtctc cggcgagcac cggaggcagg gcattgccac cgcgctcatc	1920
aatctctca agcatgaggc caacgcgtt ggtgtttatg tgatctacgt gcaagcagat	1980
tacggtgacg atcccgact ggctctctat acaaagttgg gcatacggga agaagtgtat	2040
cacttigata tcgacccaag taccgccacc taacaattcg ttcaagccga gatcggttc	2100
ccggccgcgg tcggacttcc agataatctt tgaatattgc tgggttctat aggtctagat	2160
tccgcctgc gggaaatga cgaatccatc cgacggaaa cctgcaccac gtcattccca	2220
cgaacccaca tccgcgttacc accacgaaag tggaaatcta ggacgcaggg ttaagaaaac	2280
ctacatcccg tcattcctca aaaacagaaaa accaaaatca gaaacctaaa atcccgatc	2340
tccgcgtcag gggaaatcc agtccgtca gttcggtcg tttccgatata attccgtcg	2400
ctttcattt cttagttccc acttcgtgg gaatgacggc ggaagggttt tggtttttc	2460
cgataaattc ttgaggcatt gaaattctag attccgcct ggcggaaat gacgaaatcca	2520
tccgtacgga aacctgcacc acgtcattcc taagaaccta catccgtca ttccctcaaa	2580
aacagaaaac caaaatcaga aacctaaaat cccgtcatc cgcgcaggc gggaaatccag	2640
tccgttcagt ttccgttccatt tccgataat tccgtgtct tttcatttct agattccac	2700
tttcgtggaa atgacggcgg aagggtttt gttttccg ataaattctt gaggcattga	2760
aattctatgt tccgcctgc gggaaatga cggctgtaga tggccgtatgg tctttatagc	2820
ggattaacaa aaatcaggac aaggcgcacgac agccgcagac agtacagata gtacgaaacc	2880

gattcacttg gtgttcagc accttagaga atcggtctt ttgagctaag gcggaggcaac	2940
gccgtacttg ttttgttaa tccactataa agtgccgcgt gtgtttttt atggcgaaaa	3000
aaaaagccga gactgcattcc gggcagcagc gcattggctc gcacgaggc tgccgttggaa	3060
ttgtgttggta gaaacacaac gttttgaaa aaataagcta ttgtttata tcaaatata	3120
atcatttta aaataaagggt tgccgcattt atcagatatt ttgttctgaaa aatggtttt	3180
tgcggggggg ggggtataat tgaagacgta tcgggtttt gcccgtt ttttaggttt	3240
tatcaaattt acaaaggaa gccgatcata tgaaacactt tccatccaa gtactgacca	3300
cagccatcct tgccacttcc ttagcggcg cactggcagc cacaacgac gacgttta	3360
aaaaagctgc cactgtggcc attgtgtcg cctacaacaa tggccaagaa atcaacgtt	3420
tcaagctgg agagaccatc tacgacattt atgaagacgg cacaattacc aaaaaagacg	3480
caactgcagc cgatgttggaa gccgacgact ttaaaggctt gggcttggaaa aaagtctgtga	3540
ctaacctgac caaaaccgtc aatgaaaaca aacaaaacgt cgatgcctaa gtaaaagctg	3600
cagaatctga aatagaaaag ttaacaacca agtttagcaga cactgtatgcc gctttagcag	3660
atactgtatgc cgctctggat gcaaccacca acgccttggaa taaattggaa gaaaatataa	3720
cgacatttgc tgaagagact aagacaaata tcgtaaaaat ttagtggaaa tttagaagccg	3780
tggctgatac cgtcgacaag catgccgaag cattcaacga tatgcgcgt tcatggatg	3840
aaaccaacac taaggcagac gaagccgtca aaaccgcacaa tgaagccaa cagacggccg	3900
aaaaaacccaa acaaaccgtc gatgccaaag taaaagctgc agaaactgca gcaggcaag	3960
ccgaagctgc cgctggcaca gctaatactg cagccgacaa ggccgaagct gtcgtgc当地	4020
aagtaccga catcaaagct gatatcgcta cgaacaaaga taatattgtct aaaaaagcaa	4080
acagtgcgcg cgtgtacacc agagaagagt ctgacagcaa attgtcaga attgtatggtc	4140
tgaacgctac taccgaaaaa ttggacacac gcttggcttc tgctggaaaaa tccattggccg	4200
atcacgatac tcgcctgaaac gggttggata aaacagtgtc agacctgcgc aaagaaaccc	4260
gccaggcct tgcagaacaa gccgcgtct ccggctgtt ccaacccatc aacgtgggtc	4320
gggtcaatgt aacggctgca gtcggcggtt acaaatccga atcggcagtc gccatcggtta	4380
ccggcttccg cttaccgaa aactttggccg ccaaaggcagg cgtggcagtc ggcacttcgt	4440
ccgggttccg cgcagcctac catgtcgccg tcaattacga gtggtaacgc cggtgtat	4500
cggggcggtt aacggatag ctttggaaaaa gacggctgc cttcatttt tgattgtcaat	4560
ctgactgcac atctgcttca gccccaaaca aaaatccgga tacgaaagaa aaacggcaat	4620
aaagacagca aataccgtct gaaagatggat cagacggat ttcgcatttt tggcttgggtt	4680

tgcacatata gtgagacctt tgcaaaaata gtctgttaac gaaatttgac gcataaaaat	4740
gccccaaaaa atttcaatt gcctaaaacc ttccataat tgagaaaaa gtagaaaaa	4800
tcagaaaagt ttgcattt gaaaatgaga ttgagcataa aattttagta acctatgtta	4860
ttgcaaaggc ctcgaattgt cattcccacg caggcggaa tctagctgg aatgctcg	4920
cttctgecgc cctatTTT gaggaatcg aaatgtccaa accatcatc cacaccgaca	4980
aagccccgc cccatcgcc gcgtacagcc aagccgtcg agcaggcgac accgttaca	5040
tgagcgtca aatccccctc gatcccggca cgatgaccgt cgtcgcaac ggcgattcc	5100
gcgccgaagc gcgccaagtg ttccaaaacc tgcaagccgt cgccgaagcg gcaggcggca	5160
cgctggccga catcgtaaa ctcaacgcct acctgaccga ctggcaat ttggcgct	5220
tcaacgaagt catggggaa ttatcgcc agccctccc cggccgcgc ggcgtcg	5280
ttgcctcgct gccaaaggc gtgcaggtcg aagccgaagc cgtcctcgta accgtctgaa	5340
acggaagctt ggcgtaatca tggcatagc tgttcgtgt gtgaaattgt tatccgtca	5400
caattccaca caacatacga gccggaagca taaagttaa agcctgggt gcctaattgag	5460
tgagctaact cacattaatt gcgttgcgt cactgcccgc ttccagtcg ggaaacctgt	5520
cgtgccagct gcattaatga atcgccaaac gcgcggggag aggccgttg cgtattggc	5580
gctttccgc ttctcgctc actgactcgc tgcgctcggt cggtcgctg cggcgagcgg	5640
tatcagctca ctcaaaggcg gtaatacggt tatccacaga atcagggat aacgcagaa	5700
agaacatgtg agcaaaaggc cagcaaaagg ccaggaaccg taaaaggcc gcgtgtcg	5760
cgttttcca taggtccgc cccctgacg agcatcacaa aaatcgacgc tcaagtca	5820
ggtggcgaaa cccgacagga ctataaagat accaggcggtt tccctgga agctccctcg	5880
tgcgtctcc tttccgacc ctgcccgtt ccggataacct gtccgcctt ctccctcg	5940
gaagcgtggc gcttctcat agtcacgct gtaggtatct cagttcggtg taggtcg	6000
gctccaagct gggctgtgtg cacgaacccc cggtcagcc cgaccgctgc gccttatccg	6060
gtaactatcg ttttagtcc aaccggtaa gacacgactt atgcgcactg gcagcagcca	6120
ctggtaacag gattagcaga gcgaggtatg taggcggtgc tacagagttc ttgaagtgg	6180
ggcttaacta cggtacact agaaggacag tattttgtat ctgcgtctg ctgaagccag	6240
ttacccctgg aaaaagagtt gtagctttt gatccggcaa acaaaccacc gctggtagcg	6300
gtggttttt ttgttgcag cagcagatta cgccgacaaa aaaaggatct caagaagatc	6360
ctttgatctt ttctacgggg tctgacgctc agtggaaacga aaactcacgt taaggattt	6420

tggcatgag attatcaaaa agatatctca cctagatcct tttaaattaa aaatgaagtt	6480
ttaaatcaat ctaaaagtata tatgagtaaa ctggctctga cagttaccaa tgctaatca	6540
gtgaggcacc tatctcagcg atctgtctat ttgcgttcatc catagtgcc tgactcccc	6600
tcgttagat aactacgata cgggaggcgt taccatctgg ccccagtgt gcaatgatac	6660
cgcgagaccc acgctcaccc gctccagatt tatcagcaat aaaccagcca gccggaaggg	6720
ccgagcgcag aagtggcct gcaactttat ccgcctccat ccagtcattt aatttgtgcc	6780
gggaagctag agtaagtagt tcgcccgtta atagttgcg caacgtgtt gccattgtca	6840

caggcatcgt ggtgtcacgc tcgtcggttgc gtatggcttc attcagctcc ggttccaaac	6900
gatcaaggcg agttacatga tccccatgt tggcaaaaa agcggttagc tccttcggtc	6960
ctccgatcgt tgtcagaagt aagttggccg cagtgttatac actcatggtt atggcagcac	7020
tgcataattc tcttactgtc atgccatccg taagatgctt ttctgtgact ggtgagtact	7080
caaccaagtc attctgagaa tagtgtatgc ggccgaccgag ttgctttgc ccggcgtcaa	7140
tacggataa taccgcgcca catagcagaa cttaaaagt gctcatcatt ggaaaacgtt	7200
cttcggggcg aaaactctca aggatcttac cgctgtttag atccagttcg atgtAACCCA	7260

ctcgtgcacc caactgatct tcagcatctt ttacttac cagcgtttct gggtagccaa	7320
aaacaggaag gcaaaatgcc gcaaaaaagg gaataaggc gacacggaaa tggtaatac	7380
tcatactctt ccttttcaa tattattgaa gcatttatca gggttattgt ctcatgagcg	7440
gatacatatt tgaatgtatt tagaaaaata aacaaatagg ggtccgcgc acatcccc	7500
gaaaagtgcc acctgacgctc taagaaacca ttattatcat gacattaacc tataaaaata	7560
ggcgatcac gaggccctt 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 ctgcgtcact gactcgctgc gctcggtcg tggctgcgg cgagcggtat	60
cagctcactc aaaggcgta atacggttat ccacagaatc agggataac gcagggaaaga	120
acatgtgagc aaaaggccag caaaaggcca ggaaccgtaa aaaggccgcg ttgctggcgt	180
ttttccatag gtcggcccc cctgacgagc atcacaaaaa tcgacgctca agtcagaggt	240

ggcgaaccc gacaggacta taaagatacc aggcgttcc ccctggaagc tccctcgtc	300
gctccctgt tccgaccctg ccgcttaccg gataacctgc cgccttctc cttcggaa	360
gcgtggcgct ttctcatagc tcacgctgtat ggtatctcag ttccgtgttag gtcgttcgct	420
ccaagctggg ctgtgtgcac gaaccccccgttccagccga ccgtgcgc ttatccgta	480
actatcgct tgagtccaaac ccgtaagac acgacttac gccactggca gcagccactg	540
gtaacaggat tagcagagcg aggtatgttag gcggtgctac agagttttttagtggc	600
ctaactacgg ctacactaga agaacagtagt ttggtatctgcgt aagccagtt	660
ccttcggaaa aagagtttgtt agctttgtat ccggcaaaca aaccaccgtt gtagcggtg	720
gttttttgtt tgcaagcag cagattacgc gcagaaaaaa aggtatctaa gaagatcctt	780
tgatcttttacgggtct gacgctcagt ggaacgaaaaa ctacgtttaa gggatttgg	840
tcatgagaca ataaccctga taaatgctt aataatatttggaaaaggaaatgtatgagta	900
ttcaacattt ccgtgtcgcc ctattccct ttttgcgc atttgcctt cctgttttgg	960
ctcacccaga aacgctggtaaagtaaaatgtgaaga tcaagttgggt gcacgatgg	1020
gttacatcga actggatctc aacagcgta agatccttga gagtttcgc cccgaagaac	1080
gtttccaat gatgagcaactttaaagttc tgctatgtgg cgccgttatttccgtatttgc	1140
acgccggca agagcaactc ggtcgccgca tacactatttccgtatgac ttgggttagt	1200
actcaccagt cacagaaaaat catcttacgg atggcatgac agtaagagaa ttatgcgt	1260
ctgccataac catgagtgtat aacactgcgg ccaacttact tctgacaacg atcggaggac	1320
cgaaggagct aaccgctttt ttgcacaaca tggggatca tgtaactcgc ttgtatcgtt	1380
gggaaccgga gctgaatgaa gccataccaa acgacgagcg tgacaccacg atgcctgttag	1440
caatggcaac aacgttgcgc aaactattaa ctggcgaact acttactcta gcttccggc	1500
aacaattaat agactggatg gaggcggata aagttgcagg accacttctgcgtccggccc	1560
ttccggctgg ctggtttatt gctgataat ctggagccgg tgagcgtgg tctcgccgtat	1620
tcatgcage actggggcca gatggtaagc cctccgtat cgtatgttac tacacgacgg	1680
ggagtccggc aactatggat gaacgaaata gacagatcgc tgagataggt gcctcactga	1740
ttaagcattt gtaactgtca gaccaagtttt actcatatat acttttagatt gattaaac	1800
ttcattttta attaaaagg atcttaggtga agatcctttt tgataatctc atgagcggat	1860
acatatttga atgtattttag aaaaataaaac aaatagggttccgcgcaca tttccccgaa	1920
aagtgccacc ttagtgcgggttg tggaaataccg cacagatcgc taaggagaaa ataccgcatttgc	1980

aggaaattgt aagcgtaat aattcagaag aactcgtaa gaaggcgata gaaggcgatg	2040
cgctgcgaat cgggagcggc gataccgtaa agcacgagga agcggtcagc ccattcgccg	2100
ccaagcttt cagcaatatac acggtagcc aacgctatgt cctgatagcg gtccgccaca	2160
cccagccgc cacagtcat gaatccagaa aagcgccat ttccaccat gataticggc	2220
aagcaggcat cgccatgggt cacgacgaga tcctcgccgt cggcatgct cgccttgagc	2280
ctggcgaaca gttcggttgg cgcgagcccc tgatgttctt cgtccagatc atcctgtatcg	2340
acaagaccgg ctccatccg agtacgtgtc cgctcgatgc gatgttcgc ttggtgtcg	2400
aatggcagg tagccggatc aagcgatgc agccgcccga ttgcatcagc catgtggat	2460
actttctcg caggagcaag gtgagatgac aggagatcct gccccggcac ttccggccaaat	2520
agcagccagt ccctccgc ttcagtgaca acgtcgagca cagctgcgca aggaacgccc	2580
gtcgtggcca gccacgatag cgcgcgtgcc tcgtttgca gttcattcag ggcacccggac	2640
aggtcggctt tgacaaaaag aaccgggcgc ccctgcgcgt acagccggaa cacggcggca	2700
tcagagcagc cgattgtctg ttgtgcccag tcatagccga atagcctctc caccgaagcg	2760
gccggagaac ctgcgtgcaa tccatcttgt tcaatcatgc gaaacgatcc tcattctgtc	2820
tcttgcgtcag agttgtatcc cctgcgcatt cagatccttgc gggcaagaa agccatccag	2880
tttactttgc agggcttccc aactttacca gaggggcccc cagctggcaa ttccggttcg	2940
cttgcgttcc ataaaaccgc ccagtcttagc tatgcgcattg taagccact gcaagctacc	3000
tgctttctt ttgcgttgc gttttccctt gtccagatag cccagtagt gacattcatc	3060
cggggtcagc accgttctg cggactggct ttctacgtga aaaggatcta ggtgaagatc	3120
ctttttgata atctcatgcc tgacatttat attccccaga acatcaggaa atatggcgaaa	3180
ttgatgtcat ttgcgggtg gctgagatca gccacttctt cccgataac ggagaccggc	3240
acactggcca tatcggttgtt catcatgcgc cagtttcat cccgatatg caccaccggg	3300
taaagttcac gggagacttt atctgacagc agacgtgcac tggccaggg gatcaccatc	3360
cgtcgccccc gcggtcaat aatatcactc tgtacatcca caaacagacg ataacggctc	3420
tctttttat aggtgtaaac cttaaactgc cgtacgtata ggctgcgc当地 ctgttggaa	3480
gggcgatcgg tgcggccctc ttgcgttata cgccagctgg cgaaaggggg atgtgctgca	3540
aggcgattaa gttggtaac gccagggtt tcccaactc gacgttgtaa aacgacggcc	3600
agtgaattgt aatacgactc actataggc gaattgaatt tagccgcgc gaattcgccc	3660
ttgcgtcgac cgtctgaaac gggggcgagt aaccgttgc cagtc当地 ggcgtctgaa	3720
gccttcagac ggcacgtgc ctatcggttgg aataaattgc agcctttagt cagcgttattg	3780
atttgcgcctt acaacgtaga aaaatatttgc gccaatcat tagccgc当地 cgtgaatcaa	3840

acttggcgca acttggatat ttgattgtc gatgacggct cgacggacgg tacgcttgcc	3900
attgcccagc gttccaaga acaggacggc cgcatccgca tcctcgcgca gccgcgaat	3960
tccggctctga ttccctttt aaacatcggt ctggatgaat tggcaaagt c gggggggggg	4020
ggggaaataa ttgcgcatac gctagctcgac gcacgtgtg acaattaatc atcggcatag	4080
tatatcgca tagtataata cgacaagggtg aggaactaaa ccatggccaa gttgaccagt	4140
gccgttcgg tgctcaccgc ggcgcacgtc gcccggacgg tcgagttctg gaccgaccgg	4200
ctcggttct cccggactt cgtggaggac gacttcgccc gtgtggtccg ggacgacgtg	4260
accctgttca tcagcgcgtt ccaggaccag gtggtgccgg acaacaccct ggcctgggtg	4320
tgggtgcgcg gctggacga gctgtacgcc gagttgtcg aggtcggtc cacgaacttc	4380
cgggacgcct ccggccggc catgaccgag atcggcgcagc agccgtgggg gcccggatcc	4440
gcccgtgcgcg accccggccgg caactgcgtg cacttgcgtt ccgaggagca ggactgagaa	4500
ttcccgaaaa tcctcttagag tcgacactgca ggcacatgcaag ctggactg gcccgtctt	4560
tacaacgtcg tgactggaa aaccctggcg ttacccaact taatcgccct gcagcacatc	4620
cccctttcgc cagcgcgcac cgtgcacac gatattgcgg ccccgactg gattgagaaa	4680
atcggtggtg agatggaaaa agaccgcagc atcatcgca tgggtgcgtg gctgaaagt	4740
ttgtcggaaag aaaaggacgg caaccggctg ggcggcacc acgaacacgg caaaaattgg	4800
aaaaaaaaaccga cccgacacga agacattgcc gacttttcc ctgcggcaa ccccatacac	4860
aacaacacga tgattatgag ggcgcacgc attgacggcg gtttgcgtt caacaccgag	4920
cgggattggg cgaaagatccaatttgg tacgtgtca gcaaatggg caggctggct	4980
tattatcccg aagccttggt caaataccgc cttcacgcca atcaggtttc atccaaatac	5040
agcatccgcc aacacgaaat cgcgcacggc atccaaaaaa cggccagaaa cgatttttg	5100
cagtctatgg gtttaaaac cgggttcgac agccttgaat accgcacaaat aaaagcagta	5160
gcgtatgaat tgctggagaa acatggccg gaagaagatt ttgaacgcgc cggccggtt	5220
ttgtaccaat gcttcaaaccg gacggacacg ctggccggc ggcgtggct ggattttcg	5280
gcagacggca ggtatggcg gctgtttacc ttgaggcaat acttcggcat ttgcaccga	5340
ttgctgaaaa accgttgaaa aacgcccgtt tatccaacag acaaaaaaca ggataaattt	5400
tgcaaaacca cgttatcagc ttagcttccg ccgcagaacg cagggcgccc gtttcagacg	5460
gtcgaaaggc cgaattcggt taaacctgca ggactagttcc cttagtgat ggttaattct	5520
gagcttggcg taatcatggt catagctgtt tcctgtgtga aatttgttac cgctcacaat	5580
tccacacaac atacgagccg gaagcataaa gtgtaaagcc tgggtgcct aatgagtgag	5640
ctaactcaca ttaattgcgt tgctcact gcccgtttc cagtcggaa acctgtcg	5700

ccagctgcat taatgaatcg gccaacgcgc ggggagaggc ggtttgcgt a ttggcgct 5759