



NORGE

(12) **PATENT**

(19) NO

(11) **301844**

(13) B1

(51) Int Cl⁶ C 12 N 15/31, C 07 K 14/235

Patentstyret

(21) Søknadsnr	891842	(86) Int. inng. dag og	
(22) Inng. dag	03.05.89	søknadsnummer	26.08.88, PCT/US88/02983
(24) Løpedag	26.08.88	(85) Videreføringsdag	03.05.89
(41) Alm. tilgj.	21.06.89	(30) Prioritet	04.09.87, US, 94307
(45) Meddelt dato	15.12.97		17.08.88, US, 232482

(73) Patenthaver	Amgen Inc, 1900 Oak Terrace Lane, Thousand Oaks, CA 91320, US
(72) Oppfinner	Walter Neal Burnette III, Thousand Oaks, CA, US
(74) Fullmektig	Tandbergs Patentkontor AS, 0306 Oslo

(54) **Benevnelse** **DNA-molekyl som koder for en polypeptidanalogs til S1-underenheten i Bordetella-eksotoksin, og fremgangsmåte for fremstilling av en proteinanalogs til S1-underenheten i Bordetella-eksotoksin**

(56) **Anførte publikasjoner** EP 232229
Proc. Natl. Acad. Sci, US, 1986 (83), s. 4631-4635
Molecular Imm., 1984, vol. 21, nr. 9, s. 785-793
Journ. of Bact. 1985, vol 161 (2), s. 758-763
Science, 232 (4755), juni 1986, s. 1258-1264
Infection and Immunity, vol. 55 (5), 1987, s. 1321-1323
FEMS Microb. Letters, 36, 1986, s. 219-223
Infection & Immunity, 55 (4), april 1987, s. 963-967
Nucl. Acids. Res., 14, 1986, s. 3251-3261
Nucl. Acids. Res., 10, 1982, s. 6487-6499
Inf. & Immun, Jan 1987, vol. 55, s. 24-28
Annual Review of Genetics, 1981, vol. 15, s. 265-294

(57) **Sammendrag**

Utviklingen av underenheter og underenhetanaloger av Bordetella-eksotoksinet ved hjelp av rekombinante DNA-teknikker gir vaksineprodukter som bibeholder sin biologiske aktivitet, er svært immunogene og kan gi beskyttelse mot sykdomssmitte. Genetisk fremstilte modifikasjoner av underenhetene kan resultere i produkter som bibeholder immunogenisitet, men likevel er fri for enzymatisk aktivitet forbundet med toksinreaktogenisitet.

Oppfinnelsens bakgrunn

Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer høyeffektiv, direkte rekombinant ekspresjon av underenhetsanaloger av S1 i Bordetella-eksotoksin i E. coli uten

- 5 å bruke fusjoner med deler av heterologe proteiner. Nærmere bestemt gir gentekniske modifikasjoner av underenhetene en klasse av Bordetella toksinanaloger med evne til å bringe frem toksinnøytraliserende nivåer av antistoffer, og til å være i det vesentlige frie for reaktogene bestanddeler.
- 10 Genteknisk fremstilte underenheter kan brukes til å fremstille underenhetsvaksine(r) som har immunogen virkning og er i det vesentlige frie for reaktogene bestanddeler.

Uttrykket Bordetella eksotoksin betegner en gruppe toksiner som kodes for av genome til forskjellige arter av

15 Bordetella, slik som B. pertussis, B. parapertussis og B. bronchiseptica. Andre uttrykk som er vanlig brukt for å betegne Bordetella eksotoksin, er kikhostetoksin ("PTX"), lymfocytose-fremmende faktor ("LPF") og "islet"-aktiverende protein ("IAP").

- 20 Kikhoste vedvarer å være en hovedårsak til sykелighet og dødelighet hos småbarn i mange deler av verden. Helcelle Bordetella pertussis vaksiner har tilveiebragt en effektiv måte for å regulere denne sykdom. Bruken av slike vaksiner er imidlertid blitt direkte korrelert med svake bivirkninger og tidvis relatert til mer alvorlige, og en gang i blant fatale, neurologiske tilfeller.
- 25

Store anstrengelser er blitt ofret i et forsøk på å eliminere de skadelige bivirkningene som er kjent for å være forbundet med de nåværende vaksiner. Disse har resul-

30 tert i fremstillingen og testingen av acellulære vaksiner, og i grunnforskning i et forsøk på å utvikle sikre rekombinante produkter. Et kritisk første trinn mot kloning og utvikling av en rekombinant DNA-utvunnet vaksine, var sekvensering av kikhostetoksinoperonet og etterfølgende de-

35 duksjon av aminosyresekvensene til de individuelle underenheter. (Locht, C. og Keith, J.M., 1986, science 232: 1258-1264 ; Loch et al., 1986, Nucl. Acids Res. 14: 3251-3261 og Nicosia et al., 1986, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:

4631-4635).

Nicosia et al. (1987, Infect. Immun., 55: 963-967) demonstrerte at mRNA som koder for hver av underenhetene S1, S2, S3, S4 og S5 av Bordetella pertussis, kunne transkriberes effektivt fra de klonede genene i E. coli. Selv om de påstås å påvise høye nivåer av transkripsjon av det naturlig forekommende kikhostetoksin polycistroniske budskap, var mengden av proteiner produsert ved direkte ekspresjon svært lave eller upåvisbare. Videre var fusjonsproteiner som deretter ble syntetisert, ute av stand til å utvise noen nøytraliserende beskyttende immunresponser.

Barbieri et al. (1987, Infect. Immun., 55: 1321-1323) demonstrerte ekspresjonen av S1-underenheten som et fusjonsprotein i E. coli. Dette fusjonsprotein inneholder de første seks aminosyrene til beta-galaktosidase, fem aminosyrer som kodes for av pUC18-polylinkeren, etterfulgt av aminosyrene 2 - 235 i S1-underenheten. S1-fusjonsproteinet, produsert i små mengder, hadde bare ca. 25% av ADP-ribosyltransferaseaktivitet av autentisk eller naturlig forekommende kikhostetoksin.

Locht et al. (Abstract, Modern Approaches to New Vaccines, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, sept. 9-14, 1986) var i stand til å uttrykke et fusjonsprotein som inneholder aminosyrene 2 - 187 i S1-underenheten. De forutsa at konstruksjonen ikke ville ha toksisk aktivitet fordi de antok at den manglet NAD-bindingssetet forbundet med ADP-ribosyltransferase, den enzymatiske aktivitet ble antatt å være ansvarlig for reaktogenisiteten til toksinet. Etterfølgende forsøk med dette molekyl indikerer at denne avkortede art hadde i det vesentlige ikke-nedsatt enzymatisk aktivitet. Ingen av underenhetene eller underenhetanalogene fra teknikkens stand har evne til å frembringe toksinnøytraliserende n våer av antistoffer, og er i det vesentlige frie for enzymatisk aktivitet forbundet med reaktogenisitet.

Kort beskrivelse av figurene

Figur 1 er en skjematisk fremstilling av cistronordenen til PTX-operonet (teknikkens stand: Locht og Keith, supra). Områdene med S1, S2, S4, S5 og S3 angir de foreslåtte

åpne leserammene for hver av disse PTX-underenheter. Det
igjenfylte område like før hver cistron betegner den antatte
signalsekvens. Restriksjonsenzymsetet umiddelbart nedstrøms
for hvert cistronelement angir det nedstrøms restriksjons-
5 sete som brukes i subkloning av cistronet inn i ekspres-
sjonsvektoren. Restriksjonsenzymsetet som befinner seg like
innenfor hvert signalsekvensområde, ble benyttet som det
oppstrøms restriksjonssete for subkloning av cistronet i
full lengde inn i ekspresjonsvektoren med en passende oligo-
10 deoxynukleotidlinker for fremstilling av den ufullstendige
PTX-underenhet med dens signalsekvens intakt. Restriksjons-
enzymsetet like innenfor den åpne leseramme i den ufull-
stendige PTX-underenhet ble brukt med en passende oligo-
deoxynukleotidlinker som det oppstrøms restriksjonssete
15 for subkloning av cistronet uten dets innkodede signal-
sekvens for fremstilling av en PTX-underenhet som er gjort
fullstendig ved tilføyelse av methionyl.

Figur 2 er en SDS-polyacrylamidgel og "Western blot"
av rekombinante PTX-underenheter. Panel A til venstre
20 viser en "Coomassie Brilliant Blue"-farget gel med de re-
kombinante PTX-underenheter produsert i målbare mengder;
panel A til høyre er en "Western blot" av en parallell gel
hvor det benyttes et kanin polyklonalt anti-PTX-hyper-
immunserum. PTX angir feltene som inneholder kikhostetoksin
25 av kommersiell kvalitet. Disse resultatene viser at rekombi-
nant(r) S1, S2, S3 og S5 alle produserte betydelige mengder.
"Western blot" viser at rS1 prosesseres fullstendig fra
sine forløperproteinarter, rS2 og rS5 prosesseres delvis og
rS3 prosesseres ikke i vesentlig grad under fermenterings-
30 betingelsene; rS4 ble ikke produsert i tilstrekkelig mengde
til å være synlig. Panel B viser produktene av ekspresjon
som methionyl-fullførte rekombinante (rm) underenheter. Disse
underenheterne lages i betydelige mengder med unntak av
rmS1 (ikke vist).

35 Figur 3 er en "Western blot" som viser effekten av
oppstrøms ikke-kodende sekvenser på ekspresjonen av rS2.
Detaljene i figuren er gjengitt i teksten.

Figur 4 er et autoradiogram av en SDS-polyacrylamid-

gel som viser ADP-ribosyltransferaseaktivitet av rekombinant
Sl. Rekombinant Sl (500 ng), rensset naturlig forekommende
kikhostetoksin (1 µg) og reaksjonsbuffer ble hver for seg
omsatt med bovint transducin i nærvær av [³²P] NAD i det
5 vesentlige som beskrevet av Manning et al. 1984, J. Biol.
Chem. 259: 749-756; West et al. 1985, J. Biol. Chem. 260:
14428-14430). Prøvene ble utfelt med kald 10% trikloreddik-
syre, utfellingene underkastet SDS-PAGE og deretter auto-
radiografi. Det radioaktive bånd ved 39 Kd er transducin-
10 underenheten som er blitt ribosylert. Felt A, reaksjons-
bufferkontroll; felt B, naturlig forekommende PTX; felt C,
rSl.

Figur 5 er en grafisk fremstilling av radioimmuno-
prøver som viser immunogenisitet av rSl- og rS4-underen-
15 heter i mus. Mus ble hyperimmunisert med rekombinant Sl,
methionyl rS4, naturlig forekommende kikhostetoksin (PTX),
kommersiell kikhostevaksine eller eksipiens (NMS); noen
preparater inneholdt komplett Friends adjuvans (CFA). Sera
ble samlet inn og fortynninger undersøkt med hensyn på
20 anti-PTX-titer i en fastfase radioimmunologisk prøve.

Figur 6 er en grafisk fremstilling som viser det immu-
nologiske beskyttelsespotensiale til rSl og rS4 i mus mot
i.c. tilførsel av B. pertussis: Detaljer ved figuren er
gitt i teksten.

25 Figur 7 er den utledede aminosyresekvens til rSl-
mutant utvunnet ved ekspresjon av pPTXSl(6A-3/4-1).

Figur 8A og 8B er grafiske fremstillinger av ADP-ribo-
syltransferase- og NAD-glykohydrolase-aktivitet av rekombi-
nant analog Sl.

30 Figur 9 er et autoradiogram av en SDS-polyacrylamid-
gel med rensede Sl-underenhetproteiner.

Figur 10 er et autoradiogram av en ikke-reduserende,
ikke-denaturerende polyacrylamidgel med naturlig forekommende
holotoksiner fra kombinasjonen av den naturlig forekommende
35 oligomer enten med rekombinant Sl/1 eller rekombinant Sl/1-4.

Figur 11 er et fotografi av cellemonolag undersøkt
med hensyn på tilstedeværelse av cellegrupper ved lysmikro-
skopi.

Oppsummering av oppfinnelsen

Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer et DNA-molekyl som koder for en polypeptidanalogue til S1-underenheten i *Bordetella*-eksotoksin, og som også koder for en hovedepitop som er viktig for tilveiebringelse av immunologisk beskyttelse mot *Bordetella*-toksisitet, hvor polypeptidanalogen har en aminosyresekvens som atskiller seg fra den naturlige forekommende sekvens i S1-underenheten ved erstatning av argininresten i 9-stillingen med en lysinrest, kjennetegnet ved at polypeptidanalogen som et resultat av dette, kan utløse toksinnøytraliserende nivåer av antistoffer og er fri for enzymatiske virkninger forbundet med toksinreaktogenisitet.

Videre tilveiebringer oppfinnelsen en fremgangsmåte for fremstilling av en proteinanalogue til S1-underenheten i *Bordetella*-eksotoksin, hvor proteinanalogen kodes av DNA-molekylet ifølge krav 1, kan utløse toksinnøytraliserende nivåer av antistoffer og er fri for enzymatiske virkninger forbundet med toksinreaktogenisitet, kjennetegnet ved at en vertscelle som er transformert med det rekombinante DNA-molekyl ifølge krav 1, dyrkes under betingelser hvor den kodede proteinanalogue uttrykkes.

Polypeptid S1-underenheten eller underenhet derav, omfatter en hovedepitop som er kjent for å være viktig i tilveiebringelse av immunologisk beskyttelse mot kikhostetoksisitet. De toksinnøytraliserende nivåer av antistoffer gir immunologisk beskyttelse mot kikhostetoksisitet. Stedspesifikk mutagenese resulterer i en analogue av underenhet S1 som er i det vesentlige enzymatisk inaktiv.

S1-underenheten av *Bordetella* eksotoksin fremstilt ved genteknikk og analogene av denne underenheten gir rekombinante DNA-utvundne underenhetvaksinematerialer for bruk ved forebyggelsen av kikhostesykdom. S1-underenheten og dens analoger kan gi vaksineprodukter, enten alene eller i kombinasjon med underenhetene S2, S3, S4 og S5, og blandinger derav. Underenhetene S2, S3, S4 og S5 kan renses fra

B. pertussis eller utvinnes rekombinant som fusjons- eller ikke-fusjonsprodukter. Høye nivåer av rekombinant ekspresjon av underenheter S2, S3, S4 og S4 av Bordetella eksotoksin er også blitt oppnådd i E. coli ved direkte ikke-fusjonsmetoder. Alternative rekombinante verter, inkludert gjær, f.eks. S. cerevisiae, og bakterieorganismer, f.eks. Salmonella typhimurium eller typhi, Bacillus, sp., og virus, f.eks. vaccinia, kan brukes til ekspresjon av disse underenhetanaloger.

Nærmere beskrivelse

Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer høy-effektiv direkte rekombinant ekspresjon av alle PTX-underenheter som er nødvendige for vaksineproduksjon. Videre gir S1-underenhetanaloger biologisk aktivitet som er svært immunogen og i det vesentlige fri for reaktogene bestanddeler, idet slike bestanddeler er enzymatiske aktiviteter av toksinmolekylet som er relatert til dets toksisitet og reaktogenisitet og fremmedbestanddeler i B. pertussis (f.eks. endotoksin) som ville blitt funnet i vaksinematerialer ekstrahert fra celler av B. pertussis, og er kjent for å være reaktogene. S1-analogene som brukes alene, eller i kombinasjon med andre underenheter av PTX, kan gi vaksineprodukter som er effektive og i stor grad reduserer sannsynligheten for bivirkninger fra reaktogene bestanddeler som foreligger i ikke-modifiserte naturlig forekommende eller rekombinant utvundne underenheter.

De enkelte underenheter S1, S2, S3, S4 og S5 av Bordetella pertussis toksin ble hver subklonet og direkte uttrykt
5 hver for seg i E. coli. Signalsekvensen synes å spille en viktig rolle i ekspresjonen av rekombinant S1 (rS1). I fravær av et signalpeptid ble ubetydelige mengder av rS1 uttrykt i E. coli. Dersom enten den naturlig forekommende leder i S1-underenheten eller en syntetisk leder er til
10 stede på preproteinet, fås det høye ekspresjonsnivåer, i området 10 - 30% av totalt celleprotein. Fermenteringen av rS1-ekspressorceller ved produksjonsskalaen i en satsvis 10-liters fermentor (ved et ikke-optimalisert ekspresjonsnivå på 8 mg S1/OD-L) resulterer i nesten fullstendig proteo-
15 lytisk prosessering av rS1 til dens fullstendige arter, som vist i figur 2. Fermentering av ekspressorceller på en laboratorieskala ga opphav til ufullstendig prosessert S1; både preprotein og fullstendig protein ble funnet etter logaritmisk cellevekst. Svikten hos en syntetisk E. coli-
20 spaltbar ledersekvens når det gjelder å fremme signalprosessering, tydet på at ufullstendig spalting ikke er resultatet av ufullstendig gjenkjennelse av E. coli lederpeptidaser for B. pertussis proteolytiske spaltingssteder. Mangelen på å overvinne prosesseringsblokkeringen, enten ved å øke
25 signalpeptidsyntese under anvendelse av celler som er ko-transformert med et plasmid som uttrykker E.coli lederpeptidase i høye nivåer, eller ved å redusere S1-ekspresjonsnivåer med bruken av en vektor lavt kopiantall, indikerte at problemet ikke ligger i retning av spaltingssporet. Disse
30 resultatene viser at posttranslasjonell prosessering av

fremmede proteiner i E. coli kan reguleres ved dårlig forståtte mekanismer som står i forbindelse med den fysiologiske tilstand til den voksende celle.

PTX-underenheter S2, S3, S4 og S5 ble likeledes uttrykt i E. coli som vist i figur 2. På samme måte som rekombinant S1, syntetiseres rS2, rS3 og rS5 underenhetene å oppvise fullstendig prosessering ved fermentering i laboratorieskala. Ettersom rS1 kunne bli fullstendig prosessert ved produksjonsstørrelsen, kan lignende fermenteringsbetingelser benyttes til å få de øvrige underenhetene i fullstendig prosesserte former. I motsetning til rS1, kunne rS4-underenheten uttrykkes ved høye nivåer som et fullstendig methionylpolypeptid, men var ikke påvisbart når det ble uttrykt med sin naturlige lederpeptidsekvens. Underenhetene S2, S3, S4 og S5 er nå alle blitt uttrykt som methionyl-ferdige polypeptider. Aminosyreanalyse av disse molekylerne viser at den heterologe (ikke-native) methionylrest i det vesentlige fjernes fra hver art (med unntak av S4) ved cellulær methioninaminopeptidase, hvorved det fås fullt ferdige proteiner med naturlig forekommende sekvens. Methionylresten fjernes ikke i vesentlig grad fra rekombinant S4 på grunn av fullstendigheten til aminoende-gjenkjennelsessekvensen for det cellulære enzym. Alle de rekombinante proteinene ble utvunnet som inklusjonslegemer fra lyserte celler. Underenheten ble funnet å ha migreringsmønstre i SDS-PAGE som i det vesentlige er identiske med autentiske naturlig forekommende underenheter, eller å reagere i "Western blots" med monoklonale og polyklonale antitoksinsera. Som vist i figur 2, oppnås rekombinant ekspresjon av underenhetene S1, S2, S3, S4 og S5 i E. coli på høyt nivå ved direkte, ikke-fusjonsmidler.

Selv om alternative fremgangsmåter og materialer kunne brukes ved utøvelsen av foreliggende oppfinnelse, er de foretrukne fremgangsmåter og materialer beskrevet nedenunder.

Materialer og fremgangsmåter for rekombinant ekspresjon av underenhetene S1, S2, S3, S4 og S5

Materialer. DNA-modifiserende enzymer ble ervervet fra New England Biolabs (Beverly, Ma), Bethesda Research Labora-

tories, (Gaithersburg, Md), Boehringer Mannheim Biochemicals, (Indianapolis, IN, og International Biotechnologies, Inc., (New Haven, CT); enzymene ble brukt i henhold i produsentenes anbefalinger. Alle kjemikalier og biokjemikalier var av analytisk finhetsgrad. Renset kikhoste PTX ble ervervet fra List Biological Laboratories, Inc. (Campbell, CA). Syntetiske oligonukleotider ble syntetisert i henhold til Caruthers (1982, i H.G. Gussen og A. Lang (red.) "Chemical and Enzymatic Synthesis of Gene Fragments, Verlag Chemie Weinheim, FRG, s. 71-79). Kaninantiserer mot hel-PTX ble produsert av Antibodies, Inc. (Davis, CA) og NIAID Rocky Mountain Laboratory monoklonale antistoffer mot underenheter fra naturlig forekommende PTX ble produsert ved hjelp av standard metoder (Kohler og Milstein, 1975, Nature, 256: 495-497; Nowinski et al., 1979, Virology 93; 111-126). Radiojodert protein A og kanin-anti-mus-IgG ble ervervet fra New England Nuclear (Wilmington, DEL). Anti-S1 monoklonalt antistoff IB7 (som beskrevet i Sato et al., 1987, Infect. Immun. 55: 909-915,) var en gave fra H. Sato, NIH, til Keyo, Japan.

Plasmider og bakteriestammer. Plasmid pPTX42 som inneholder PTX-operonet, er blitt beskrevet (se Loch og Keith, supra og Loch et al., supra). Ekspresjonsplasmidene pCFM1036, pCFM1146, pCFM1152 og pCFM1156 ble avledet ved Amgen.

En nærmere beskrivelse av Amgens ekspresjonsvektorsystem er gitt i publisert europeisk patentsøknad nr. 136.490. Slike plasmider kan inneholde en induserbar promoter, et syntetisk ribosombindende sete, en "cloning cluster", plasmid-replikasjonsstart, en transkripsjonsterminator, gener som regulerer plasmidkopiantall, og et kanamycin-resistensgen. De avledede plasmider adskiller seg fra hverandre i en rekke henseender. Plasmidet pCFM1036 kan avledes fra pCFM836 (europeisk patentsøknad nr. 136.490) ved å substituere DNA-sekvensen mellom de unike AatII- og EcoRI-restriksjonssetene som inneholder den syntetiske P_L -promoter, med det følgende oligonukleotid:

AatII

EcoRI

```

5'          CATCGATTCTAG          3'
3'          TGCAGTAGCTAAGATCTTAA

```

5

Plasmidet inneholder ingen induserbar promoter foran restriksjons-"cluster". Plasmidet pCFM1146 kan avledes fra pCFM836 ved å bytte ut den lille DNA-sekvens mellom de unike ClaI- og XbaI-restriksjonssetene med det følgende oligonukleotid:

10

ClaI

XbaI

```

5'      CGATTTGATT      3'
3'      TAAACTAAGATC    5'

```

15

og ved å ødelegge de to endogene NdeI-restriksjonssetene ved å fylle ut enden med T4 polymeraseenzym etterfulgt av buttendeligering. Plasmidet inneholder ikke noe syntetisk ribosombindende sete umiddelbart foran restriksjons-"clusteret". Plasmidet pCFM1156 kan avledes fra pCFM1146 ved å bytte ut den lille DNA-sekvens mellom de unike XbaI- og KpnI-restriksjonssetene med følgende oligonukleotid:

20

25

XbaI

KpnI

```

5'  CTAGAAGGAAGGAATAACATATGGTTAACGCGTTGGAATTCGGTAC  3'
3'  TTCCTTCCTTATTGTATACCAATTGCGCAACCTTAAGC          5'

```

30

plasmidet pCFM1152 kan avledes fra pCFM1156 ved å bytte ut DNA-fragmentet fra BglIII til BglIII (248 basepar) som inneholder copB-promoteren, og som utkoder en del av copB-genet, med det tilsvarende DNA-fragment fra plasmid pCFM512 (europeisk patentsøknad nr. 136.490). Dette plasmidet har et lavere kopiantall enn pCFM1156.

35

Plasmidene pBR322, pUC18, pUC19 og fag-M13mpl8 og M13mpl9-DNA ble innkjøpt fra Bethesda Research Laboratories. Plasmidet pTD125 som inneholder genet for E. coli leder-

peptidase (Dale, T. 1983, J. Bacteriol. 143: 76-83) var en gave fra W. Wickner (UCLA). E. coli FM5-celler ble utvunnet ved Amgen Inc., Thousand Oaks, CA fra E. coli K-12-stamme fra C.F. Morris (Bachmann et al., 1976, Bacteriol. Rev. 40: 116-167) og inneholder det integrerte lambdafag-repressorgen; CI₈₅₇ (Sussmann et al., 1962, C.R. Acad. Sci. 254: 1517-1579). Konstruksjon av de individuelle underenhetspresjonsplasmider er beskrevet her. Vektorfremstilling, celletransformasjon og koloniutvelgelse ble utført ved hjelp av standard metoder (Maniatis et al., 1982, Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, NY).

Analytiske fremgangsmåter. DNA-sekvensering ble gjort ved hjelp av primer-forlengelse-, kjedetermineringsmetoden (Sanger et al., 1977, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5463-5467; Heidecker et al., 1980, Gene 10: 69-73). Proteinsekvensanalyse ble utført ved hjelp av automatisert Edman-nedbrytning i et ABI 470A gassfase-mikrosekvenseringsapparat (Hewick et al., 1981, J. Biol. Chem. 256: 7990-7997; Hunkapillar et al., 1983, Meth. Enzymol. 91: 399-413). SDS-polyacrylamidgelelektroforese (SDS-PAGE) ble utført som beskrevet av Laemmli (1970, Nature, 227: 680-685, eluering av polypeptider fra polyacrylamidgeler skjedde ved hjelp av metoden til Hunkapillar et al. (1983, Meth. Enzymol. 91: 227-236), og Western blotting ble utført som beskrevet av Burnette (1981, Analyt. Biochem. 112: 195-203. Forholdet mellom rekombinant protein og totalt cellulært protein eller totalt inklusjonslegemeprotein ble fastlagt ved hjelp av SDS-PAGE av helcellelysater eller inklusjonslegemepreparater, etterfulgt av farging med Coomassie Brilliant Blue R250 og etterfølgende gel-scanning ved hjelp av integrert densitometri. Analyser med hensyn på NAD-glykohydrolase og ADP-ribosyltransferase ble utført som beskrevet tidligere (Katada et al. 1982, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 3129-3133; Lim et al. 1985, J. Biol. Chem. 260: 2585-2588). Reduksjon i den morfologiske respons hos CHO-celler på PTX (Hewlett et al. 1983, Infect. Immun. 40: 1198-1203) med antisera mot forskjellige rekombinante underenhetspreparater

eller ved hjelp av fremgangsmåten til Gillenius et al.
(1985, J. Biol. Stand. 13: 61-66).

Konstruksjon av ekspresjonsplasmider. Alle plasmider ble konstruert fra en serie av E. coli generaliserte ekspresjonsvektorer som adskiller seg som tidligere beskrevet. De enkelte kikhlostetoksin-underenhetgensegmenter ble isolert under anvendelse av restriksjonssetene vist i figur 1 som tilhører teknikken stand; det oppstrøms restriksjonssete var like innenfor initieringskodonet for ekspresjon av den signalpeptidholdige form av underenheten, eller like innenfor kodonet foran aminoenderesten til den fullt ferdige, bearbejdede form av underenheten for ekspresjon av den methionyl-ferdige form av underenhetanalogen. Koekspresjon av hele B-oligomeren benyttet i ett tilfelle fragmentet som inneholder det oppstrøms ikke-kodende område av S2 til og med enden av S3, og utelot det syntetiske ribosombindende sete til E.coli ekspresjonsvektoren; i det andre tilfelle ble det oppstrøms ikke-kodende område til S2 fjernet og det syntetiske E. coli ribosombindende sete ble innføyet. Syntetiske oligonukleotidlinkere ble anvendt til å bevirke innføyelse av gensegmentene i ekspresjonsplasmidene ved en optimal avstand nedstrøms fra den syntetiske promoter og ribosombindingssetet. De oppstrøms linkere gjenopprettet leserammen til hvert gen, enten tilbake til det autentiske initieringskodon i tilfellet med pre-underenhetkonstruksjoner, eller til det første kodon i den fullt ferdige aminoende; de sistnevnte oligonukleotider omfattet et methionylinitieringskodon. I noen tilfeller ble kodonbruk endret for å redusere muligheten for sekundærstruktur nær 5'-enden til de resulterende mRNA-er. F.eks. ble cysteinkodonet i posisjon 3 i signalområdet S1-underenheten (Locht og Keith supra) byttet ut med kodonet for serin for å eliminere muligheten for skadelige disulfidinteraksjoner.

Etter transformasjon av E. coli FM5-celler med de forskjellige plasmidkonstruksjonene og utplating på Kanamycin-holdig agar, ble passende antall kolonier valgt ut, replika-utplatet, dyrket som små væskekulturer ("minipreps") og indusert ved 42°C i 4 timer. "Minipreps" ble så undersøkt ved hjelp av lysmikroskopi med hensyn til tilstedeværelsen

av inklusjonslegemer i bakteriecellene. Preparater som oppviste synlige inklusjoner ble identifisert og tilsvarende kolonier fra replikaplatene ble underkastet laboratoriefermentering ved induksjonstemperaturen i kolbeskala (1 liter); noen preparater ble senere underkastet fermentering med satsvis tilsetning i 10 liters industrielle fermentorer. Prøver ble fjernet fra fermentering ved forskjellige tidspunkter etter induksjon og undersøkt med hensyn på tilstedeværelsen av den korrekte PTX-underenhet ved hjelp av SDS-PAGE etterfulgt av både farging med "Coomassie Brilliant Blue" og Western-blotting; flekker ble først omsatt med et passende monoklonalt antistoff, undersøkt ved hjelp av autoradiografi og så omsatt med et polyklonalt anti-PTX-serum og fulgt ved hjelp av ytterligere radiografi. Strukturen til plasmidet fra hver ekspresjonsklon ble bekreftet ved restriksjonskartlegging av det isolerte plasmid og bekreftet ved hjelp av DNA-sekvensering av sammenknytningsområder.

Ekspresjon av rekombinant Sl. Når E. Coli celler inneholdende Sl-ekspresjonsplasmidet (pPTXSl/1) ble indusert ved 42°C i en 10-liters fermentor med satsvis tilsetning ved produksjonsskalaen, produserte de et intracellulært hovedprotein med omtrent 26.000 dalton (figur 2A til venstre, felt rSl) som komigrerte med autentisk PTX Sl i SDS-PAGE. Partiell aminosyresekvensanalyse (5 omganger) fastslo at dette polypeptidet hadde aminoendesequensen forutsagt for den fullt ferdige Sl-underenhet (Locht og Keith, supra). Proteinet ble immunokjemisk identifisert som Sl ved sin reaktivitet med et mus-anti-Sl monoklonalt antistoff i en Western-blot (figur 2A til høyre, felt rSl).

Det bør legges merke til at laboratoriefermentering av Sl-ekspresorcellene ved 1-liters kolbeskalaen resulterte i ufullstendig spalting av rSl-signalpeptidet, et fenomen som også iakttas for ekspresjonen av de øvrige PTX-underenheter i E. coli (se nedenunder). Forsøk ble gjort på å identifisere den molekulære blokk for signalprosessering som ses ved kolbeskalaen, ved hjelp av en serie forsøk utformet for å øke utstrekningen av preproteinspalting: innføring av Sl-genet i en ekspresjonsvektor med lavt kopi-

antall, substitusjon av en syntetisk E. coli spaltings-
signalsekvens (Picker et al., 1983, Infect. Immun. 42: 269-
275.) for det autentiske S1-signalpeptid, og kotransforma-
sjon av de underenhetuttrykkende celler med et ekspresjons-
5 plasmid som inneholder genet for E. coli lederpeptidase
(Date, supra.) for å øke grunnivået av dette enzym. Ingen
av disse forsøk førte til noen betydelig endring i signal-
spalting. Endring av fermenteringsbetingelsene til en
prosess med satsvis tilsetning førte imidlertid til prosess-
10 ering av pre-S1 til dens fullt ferdige form, som var i det
vesentlige komplett.

Suksessen med å uttrykke S1-underenheten som et fullt
ferdig methionylpolypeptid (nedenunder) tilskyndet bruken
av den samme strategi med rS1. I motsetning til rS4-ekspre-
15 sjon i E. coli var imidlertid ekspresjonen av fullt ferdig
methionyl-S1 så lav at en Western-blot var påkrevet for på-
visningen. I motsetning til dette ga ekspresjonen av rS1
under anvendelse av dens autentiske signalsekvens det full-
stendig prosesserte polypeptid ved nivåer på 10 - 30% av
20 det totale celleprotein. Som beskrevet senere kan avkutting
av den fullt ferdige aminoende til rS1 ved hjelp av rekombi-
nante midler resultere i svært høye ekspresjonsnivåer.
Således resulterer substitusjon av så lite som de første to
restene av den fullt ferdige S1-sekvens (AspAsp) med MetVal
25 i betydelig ekspresjon i forhold til den fullt ferdige methio-
nyl-form.

Ekspresjon av S2, S3, S4 og S5. Som en pålitelighets-
test ble PTX S4 underenhetene først uttrykt som et fullt
ferdig methionylprotein uten dets naturlig forekommende
30 lederpeptid, og ble, som beskrevet ovenfor, produsert ved
høye nivåer i E. coli (figur 2B til venstre, rmS4-felt).
Selv om dets migrering i SDS-PAGE ble noe retardert i for-
hold til migreringen til S4 fra hele toksinpreparater,
hadde proteinet den forutsagte S4-aminosyresekvens. S4 renses
35 fra B. pertussis ved hjelp av HPLC oppviser den samme re-
tardering i gelelektroforese (Locht et al. supra). Rekombi-
nant S4 reagerer godt med polyklonale antisera i Western-
blots (figur 2B til høyre, felt remS4), men har redusert
reaktivitet med et S4 monoklonalt antistoff.

I motsetning til resultatene som ble oppnådd med S1, resulterte ekspresjon av S4 med dens naturlig forekommende lederpeptidsekvens (Locht og Keith, supra) i upåvisbare proteinnivåer (ikke vist). Det bør imidlertid legges merke
5 til at Nicosia et al. (supra) forutsier et annet transla-
sjonsstartsted lengre oppstrøms; det er mulig at bruk av
denne tilleggssekvens i S4-lederpeptidet vil resultere i
mye høyere ekspresjonsnivåer. Rekombinant S2, S3 og S5 ble
hver uttrykt med sine naturlig forekommende ledersekvenser
10 (figur 2A, henholdsvis feltene rS2, rS3 og rS5); ingen av
disse underenhetene ble fullstendig uttrykt under labora-
torieskalafermentering, selv om preliminare forsøk med pro-
duksjonskalafermentering under anvendelse av fremgangsmåten
med satsvis tilsetning gir markert forbedring i prosess-
15 eringen av S2 og S5. S2, S3 og S5 ble også hver uttrykt i
E. coli i en fullt ferdig methionylform ved nivåer som er
sammenlignbare med de som ble oppnådd med deres naturlig
forekommende lederpeptider (figur 2B, henholdsvis feltene
rmS2, rmS3 og rmS5). Som anmerket ovenfor prosesseres de
20 heterologe methioninrestene S2, S3 og S5 ved hjelp av cellu-
lær methioninaminopeptidase, hvorved det fås fullt ferdige
polypeptider med naturlig forekommende sekvens.

Hele polycistronsegmentet som utgjør B-oligomerunder-
enhetene (S2-S4-S5-S3) ble uttrykt under kontroll av P_L -
25 promoteren. Figur 3 viser virkningene av det oppstrøms ikke-
kodende område på produksjon av S2-underenheten. I ett til-
felle beholdt ekspresjonsplasmidet hele intercistrondelen
mellom termineringskodonet til S1 og initieringskodonet til
S2 (Locht og Keith, supra), men uten det syntetiske ribosom-
30 bindingssete som ble brukt i alle de øvrige ekspresjons-
plasmidene. Dette resulterte i syntese av rekombinant S2
som syntes å være fullstendig prosessert når den ble under-
søkt i en Western-blot med et anti-S2 monoklonalt antistoff
(figur 3, feltene D og E); selv om det ikke er vist tyder
35 polyklonalantistoffanalyse på at de øvrige B-oligomerunder-
enhetene også ble fullstendig prosessert til sine fullt
ferdige former. Utbytting av det ikke-kodende intercistron-
segment med den syntetiske Shine-Delgarno-sekvens resulterte

i et mye høyere nivå for rS2 syntese (figur 3, feltene B og C); dette materiale prosesseres imidlertid ufullstendig.

Synteseeffektiviteten for hvert cistron synes å være direkte korrelert med dets nærhet til 5'-enden i budskapet, dvs.

5 S2>S4>S5>S3. Et preliminært forsøk hvor det gjenværende av operonet plasseres nedstrøms fra den høyeffektivt uttrykkende S1-konstruksjon (se ovenfor) resulterte i svært lave syntesenivåer og ufullstendig prosessering av hver av underenhetene, inkludert S1.

10 Egenskaper til rekombinant PTX-underenheter. Svært få, om noen, av de prosesserte PTX-underenheter synes å bli utskilt fra E. coli cellene, selv om det er en viss indikasjon på at fullstendig prosessert rS1 kan bli funnet i en begrenset utstrekning i det periplasmatiske rom. Massen av
15 hver underenhet ble funnet i form av inklusjonslegemer og utgjorde 10 - 30% av det totale celleprotein. Cellelyse ved hjelp av French-press og sentrifugering ved lav hastighet resulterte i pelletfraksjoner som inneholdt opp til 65% av sitt protein som de enkelte underenheter.

20 Alle PTX-underenhetene var påvisbare i Western-blots med et polyklonalt kanin-antitoksinserum (figur 2). Som angitt ovenfor reagerte underenhetene rS1 og rS2 godt med spesifikke monoklonale antistoffer i Western-blots. Rekombinant S4, laget som et methionylpolypeptid, hadde redusert
25 reaktivitet med et anti-S4 monoklonalt antistoff. Monoklonale antistoffer mot underenhetene S3 og S5 var ikke tilgjengelige, selv om rS3 kunne påvises på en Western-blot med anti-S2 monoklonalt antistoff i kraft av dets nære sekvenshomologi med S2 (Locht og Keith, supra).

30 Når urensset rekombinante rS1 preparater ble inkubert i nærvær av [³²P]NAD med membraner isolert fra CHO-celler, ble et protein med omtrent 41.000 dalton ADP-ribosylert, identisk med det som ble ribosylert av naturlig forekommende
35 hel PTX; dette molekyl antas å være en N_i-membranreagulatorproteinet til adenylatcyklasekomplekset (Bokoch et al. 1983, J. Biol. Chem. 258: 2072-2075; og Hsia et al. 1983, J. Biol. Chem. 259: 1086-1090). For rutineanalyseformål kan bovint transducin benyttes som et substrat for ribosylasen (figur

4), et molekyl som er påvist å være en akseptor for kikhoste-
toksin-katalysert ADP-riboseoverføring fra NAD. (Manning
et al. supra; West et al., supra). Dette resultatet be-
krefter lokaliseringen av ADP-ribosyltransferaseaktiviteten
5 på A-promoteren (Sl-underenhet) til toksinet og tyder på
at det rekombinante B. pertussis-protein er foldet i en
form som ligger nært opp til dets naturlig forekommende tre-
dimensjonale struktur i E. coli. Videre utviste den rekombi-
binante Sl NAD-glykohydrolaseaktivitet som også ble identi-
10 fisert med A-promoteren. Mus ble immunisert og forsterket
ved intraperitoneal injeksjon med et urensset inklusjons-
legemepreparat av rSl med renset rekombinant methionyl-S4.
rSl-underenhetmaterialet som ble brukt, inneholdt både
ferdig prosessert polypeptid og ikke-prosessert preprotein
15 i et omtrentlig forhold på 1:2; den relative immunogenisitet
til de to rSl-artene er ikke kjent. Serumprøver ble testet
i en fastfase-RIA med hensyn på tilstedeværelsen av anti-
toksinantistoffer (figur 5). Dyr som fikk rekombinant Sl
utviste en betydelig antitoksinrespons uansett om de immu-
20 niserende doser ble formulert med komplett Freund's adjuvans
eller ikke. Rekombinant S4, gitt bare i adjuvanstilsattform,
var også svært immunogen i forhold til heltoksin tilsatt
adjuvans og kommersiell kikhostevaksine.

Behandling av de dyrkede CHO-celler med hel-kikhoste-
25 toksin resulterer i en "clustered" morfologi (Hewlett et al., supra) som kan motvirkes med antitoksinsera (Gellenius et al., supra). I foreløpige forsøk var musesera mot rSl eller rS4
fremstilt som beskrevet ovenfor og som hadde forholdsvis
høye titere av antitoksinantistoffer, ikke rutinemessig i
30 stand til å nøytralisere CHO-cellers respons på naturlig
forekommende toksin.

Immunologisk beskyttelse av mus med rekombinant Sl.
Mus immunisert med urensset rekombinant Sl, renset rekombinant
S4 og passende kontrollmaterialer (se ovenfor) ble utsatt
35 for intracerebral smitte (i.c.) med B. pertussis mus-viru-
lent stamme 18323, og dødelighet registrert så lenge som
45 dager etter smitte (figur 6). Mus ble immunisert med
50 µg testartikkel (100 µl av 1:35 fortynning for kommer-

siell kikhostevaksine) ved intraperitoneal injeksjon; de ble på nytt immunisert med en identisk mengde 21 dager etter-inokulering og smittet 7 dager senere ved hjelp av i.c. smitte med levedyktig B. Pertussis stamme 18323 (3×10^4 organismer pr. dyr). Selv om beskyttelse ikke var forventet på grunn av mangel på aktiv holotoksin i de rekombinante preparater, var det overraskende å iaktta en økning i overlevelsestid for rS1 immuniserte dyr i forhold til ikke-immuniserte kontroller. Videre ble et antall mus som fikk adjuvanttilsatt rS1 fullstendig beskyttet mot smitte; mus immunisert med adjuvanttilsatt rS4 ble, selv om de utviste en god antistoffrespons (se figur 5), ikke beskyttet noe bedre enn ikke-immuniserte mus. I et annet preliminært forsøk viste adjuvanttilsatt rS1 seg å gi doseavhengig beskyttelse mot smitte. Ufullstendig beskyttelse i prøven med i.c. smitte kan ha sitt grunnlag i et fravær av aktivt holotoksin i det immuniserende materiale; ikke desto mindre viste beskyttelse oppnådd i denne preliminare undersøkelse at rekombinant S1-protein har potensiale som et underenhetsvaksinemateriale. Senere undersøkelser har ikke bekreftet immunologisk beskyttelse mot intracerebral smitte med B. pertussis musvirulent stamme 18323.

S1 ANALOGER

Ved å bruke teknikker for proteinkonstruksjon og sted-spesifikk mutagenese, ble det laget avkuttete S1-analoger. Området avgrenset av valin 7 og prolin 14 ble funnet å være et påkrevet område for ADP-ribosyltransferaseaktivitet i S1-molekylet. En antigen epitop som binder et monoklonalt antistoff som beskytter passivt mot toksinaktivitet i mus (dvs. en epitop som er involvert i frembringelse av en beskyttende respons), ligger i det minste delvis innenfor området avgrenset av og innbefattet valin 7 og prolin 14. Mutagenese av S1-molekylet i området avgrenset av og innbefattet valin 7 og prolin 14 ga analoge molekyler til S1 som mangler enzymatisk aktivitet mens den beskyttende epitop ble bibeholdt. Den beskyttende epitop er viktig for tilveiebringelse av immunologisk beskyttelse mot kikhostetoksinitet. Endring av området fra og med valin 7 t.o.m. prolin 14, inkludert

substituering og/eller delesjon av én eller flere aminosyrer, resulterer i S1 analogprodukter som kan frembringe toksinnøytraliserende nivåer av antistoffer og som er i det vesentlige fri for reaktogene bestanddeler.

5 Subkloning av PTX-S1-genet inn i pUC18

Plasmid pPTX42 som inneholder hele operonet for Bordetella pertussis toksin (PTX), ble erholdt fra J. Keith (NIAID, Rocky Mountain Laboratory) som transformerte JMI09-celler. Bakteriene ble dyrket i L-næringsvæske inneholdende ampicillin og plasmidet utvunnet og rensset ved hjelp av standard metoder (Maniatis et al., supra). Et 792 bp DNA-fragment inneholdende en del av PTX-S1-genet (cistronet) (Locht og Keith, supra) ble isolert fra pPTX42 ved oppløsning av plasmidet med restriksjonsenzymmer AvaI og XbaI, etterfulgt av
15 acrylamidelektroforese og etterfølgende eluering av DNA-fragmenter fra gelen. Dette DNA-fragment begynner ved AvaI-setet like innenfor den åpne leseramme for pre-S1-proteinet og slutter ved et XbaI-sete i termineringskodonet for S1. Standard kloningsvektoren pUC18 ble også oppløst med AvaI
20 og XbaI, og oppløsningsblandingen behandlet med fosfatase. En ligeringsreaksjon ble utført med den oppløste pUC18-vektor, det 792 bp store DNA-fragment (AvaI-XbaI) i pPTX42, og T4 DNA-ligase under anvendelse av standard betingelser. Nyfremstilte kompetente DH52α-celler ble transformert med
25 ligeringsblandingen og transformanten ble utvalgt på agarplater av L-næringsvæske inneholdende ampicillin og "Bluegal". Tolv hvite kolonier ble valgt ut, replika-utplatet og dyrket som 2-ml væskeskulturer. Cellene ble "minipreppet" ved hjelp av en standard alkalisk lyseringsfremgangsmåte, DNA
30 oppløst med AvaI og XbaI, og oppløsningsblandingen underkastet acrylamidgelelektroforese.

Konstruksjon av rPTXS1 ekspresjonsplasmid pPTXS1/1.

Et AvaI-XbaI-fragment med 792 bp ble isolert fra plasmid pPTX42 som tidligere beskrevet. Escherichia coli ekspresjonsplasmider pCFM1156 og pCFM1036 ble erholdt fra Charles F.
35 Morris, Amgen Inc., Thousand Oaks, CA. Plasmid pCFM1156 ble oppløst med restriksjonsenzymene SstI og NdeI, og et 1,8 kb stort DNA-fragment ble isolert fra en agarosegel ved hjelp

elektroeluering på Na45-papir. Plasmid pCFM1036 ble oppløst med SstI og XbaI, og et 2,8 kb stort DNA-fragment ble likeledes isolert. To komplementære tråder av oligodeoxynukleotidlinker, som rekonstituerte den delerte del av den S1 åpne leseramme, ble syntetisert ved hjelp av aminofosfinkjemien til Caruthers et al. (supra). Sekvensen til det syntetiske fragment ble, mens man opprettholdt den autentiske aminosyresekvens, modifisert i sin kodonbruk for å redusere potensiell sekundærstruktur i budbringer-RNA; et unntak fra dette var utbyttingen av cysteinkodonet med et serinkodon i aminosyreposisjon nr. 2 i preprotein-signalsekvensen for å eliminere eventuelle disulfidinteraksjoner mellom preproteinsignalet og de to proteinrestene i posisjonene 41 og 199 i det fullt ferdige protein. Denne oligodeoxynukleotidlinker hadde et NdeI-sete som er kohesivt for den ene i pCFM1156 og en AvaI kohesiv ende for ligering til AvaI-setet i det 792 bp store DNA-fragment i S1-genet. Sekvensen til dette oligodeoxynukleotid var:

5' TATGCGTTCTAC³
3' ACGCAAGATGAGCC₅,

En ligeringsreaksjon ble fremstilt med det 2,8 kb store DNA-fragment fra pCFM1036, det 1,8 kb store DNA-fragment fra pCFM1156, det 792 bp store DNA-fragment som inneholder S1-genfragmentet, oligodeoxynukleotidlinkeren og T4 DNA-ligase. Etter ligering ble FM6-celler (erholdt fra C.F. Morris, Amgen Inc., Thousand Oaks, CA) transformert med ligeringsblandingen og platet ut i L-næringsagar med kanamycin. Kolonier ble valgt ut både replika-utplatet og "mini-prepped" ved hjelp av den alkaliske metode (Maniatis et al., supra). "Mini-prepped" DNA-prøver ble underkastet restriksjonsenzymkartlegging og funnet å inneha de forventede DNA-restriksjonsfragmenter. Området fra begynnelsen av den syntetiske linker og inn i den åpne leseramme til det autentiske S1-gen ble fastlagt ved hjelp av DNA-sekvensanalyse. Etterfølgende induksjon av dette plasmid førte til høy-

effektiv ekspresjon av rekombinant Sl-protein.

Konstruksjon av rPTXSl ekspresjonsplasmid pPTXSl/2.

Et DNA-fragment på 181 bp ble isolert fra plasmid pPTXSl/1 ved oppløsning med AccI og SphI; etterfølgende
 5 rensing av DNA-fragmentet skjedde på en polyacrylamidgel. Dette DNA-fragment er en indre, venstresidig del av Sl-genet. Ved å bruke de samme fremgangsmåter ble et 564 bp stort DNA-fragment som utgjør den gjenværende høyresidige del av genet, isolert fra PTXSl som var klonet inn i pUC18. Dette ble ut-
 10 ført ved oppløsning av plasmidet med SphI og BamHI, idet det sistnevnte enzym kutter nedstrøms fra Sl-kloningssetet (XbaI), ved BamHI-setet innenfor den pUC18-klonende "cluster". DNA-fragmenter på 1,8 kb og 2,8 kb ble isolert fra ekspresjonsvektoren pCFM1156 ved oppløsning med restriksjons-
 15 enzymene NdeI, SstI og BamHI, etterfulgt av agarosegel-elektroforese og elektroeluering av DNA-fragmentene. En oligodeoxynukleotidlinker ble syntetisert; denne dobbeltrådede linker hadde NdeI og AccI kohesive ender og den følgende sekvens:

20

5' TATGGACGATCCACCTGCTACCGT^{3'}
 3' ACCTGCTAGGTGGACGATGGCATA_{5'}

En ligering ble utført ved hjelp av standard metoder
 25 (Maniatis et al., supra) ved benyttelse av de 181 bp (AccI-SphI) og 564 bp (SphI-BamHI) store DNA-fragmentene fra pPTXSl/1, de 1,8 kb (NdeI-SstI) og 2,8 kb (SstI-BamHI) store DNA-fragmentene fra pCFM1156, oligodeoxynukleotidlinkeren og T4 DNA-ligase. Etter ligering ble blandingen brukt til å
 30 transformere nyfremstilte, kompetente FM5-celler. Kanamycin-resistente transformanter ble beholdt, restriksjonsenzym-analysene utført på "mini-preps" av plasmid-DNA, og strukturen bekreftet ved hjelp av DNA-sekvensanalyse av forbindelsene.

35

Bal31-oppløsning av pPTXSl/2 og konstruksjon av vektorer med avkortede Sl-gener. For å bestemme viktige antigene epitoper og enzymatisk aktive seter nær aminoenden til det fullt ferdige Sl-molekyl, ble avkortede versjoner av dette protein laget. Ekspresjonsplasmidet pPTXSl/2 ble oppløst med

NdeI, behandlet med eksonukleasen Bal31 (IBI) under standard betingelser og aliquoter fjernet til forskjellige tidspunkter opp til 110 minutter. Etter inaktivering av Bal31 i 15 minutter ved 65°C ble prøver analysert med hensyn på økninger i elektroforetisk migrering ved elektroforese på agarosegeler. Prøver fra aliquotene ved 100 minutter og 110 minutter ble slått sammen (fraksjon A) og de gjenværende prøver slått sammen og oppløst med ytterligere Bal31; aliquoter ble fjernet til forskjellige tidspunkter opp til 180 minutter. Etter stansing av reaksjonen ble aliquoter på nytt undersøkt med hensyn på økninger i elektroforetisk migrering og fire ytterligere fraksjoner (B, C, D og E) ble beholdt. Hver av de fem fraksjonene ble hver for seg oppløst med SstI og DNA-fragmenter på 3 - 3,5 kb ble isolert fra agarosegeler ved elektroeluering.

Ekspresjonsvektor pCFM1156 ble oppløst med SstI og HpaI, og en 1,8 kb stort DNA-fragment likeledes isolert. De individuelle 3- 3,5 kb store DNA-fragmenter (Bal31 butt-SstI) fra pPTXS1/2 ble hver ligert med det 1,8 kb store DNA-fragment (SstI-HpaI) under anvendelse av T4-DNA-ligase under standard betingelser. Nyfremstilte, kompetente FM5-celler ble transformert med hver individuell ligeringsblanding og kanamycinresistente transformanter isolert. Transformanter av hver av fraksjonene A- og B-avkortinger ble plukket ut, "mini-preps" indusert ved 42°C og preparatene undersøkt ved lysmikroskopi med hensyn på tilstedeværelsen av inklusjonslegemer. Inklusjonspositive preparater ble "mini-prepped", oppløst med XbaI og DNA-innskuddene undersøkt med hensyn på størrelse ved agarosegelelektroforese. Prøver som varierte i størrelse fra 600 til 650 bp, ble valgt ut for DNA-sekvensering for å bekrefte strukturen til avkortningene. Etter følgende analyser av de uttrykte rekombinante proteiner indikerte at et påkrevet område for ADP-ribosyltransferaseaktivitet i S1-molekylet og en epitop som er involvert i frembringelse av en beskyttende respons (dvs. en antigen epitop som binder et monoklonalt antistoff som passiv beskytter mot toksinaktivitet i mus), ligger innenfor et område som er avgrenset fra og med valin 7 og til og med prolin 14 (for full aminosyresekvens, se Locht og Keith, supra) i det fullt

ferdige molekyler. Disse avkortede versjoner av S1-molekylet begynner alle, i kraft av vektorkonstruksjonen, i sine N-ender med methionylvalyl etterfulgt av den avkortede sekvens.

5 Mutagenese av S1. For å finkartlegge området avgrenset av valin 7 og prolin 14, og for å fremstille analogmolekyler av S1 som mangler enzymatisk aktivitet mens den beskyttende epitop er bibeholdt i dette område, ble det rekombinante S1-gen underkastet mutagenese. Bibeholdelse av den
10 beskyttende epitop bestemmes av reaktivitet med monoklonalt antistoff 1B7. Dette ble utført ved å bytte ut det autentiske område som koder for restene fra og med valin 7 til og med prolin 14, med syntetiske oligodeoxynukleotidsegmenter. Disse segmentene inneholdt enkle eller doble kodonsubstitusjoner
15 for å endre den autentiske aminosyresekvens. Modifikasjon kan oppnåes ved delesjon og/eller substitusjon. Det er innenfor omfanget av foreliggende oppfinnelse å endre en enkel base, hvorved de ønskede karakteristika til S1-analogene fås. En enkel base kan endres for å endre aminosyresekvensen. Det
20 er imidlertid anerkjent av fagfolk innen teknikken at den statistiske sannsynlighet for genotypisk reversjon til villtype er større når en enkel base endres sammenlignet med modifikasjon av minst to baser. Ved en foretrukket utførelsesform omfattet derfor hver av disse kodonendringer substitu-
25 sjon av minst to baser i hvert kodon for å redusere reversjonseffektiviteten. Oligodeoxynukleotidlinkerne ble syntetisert med AccI og BspMII kohesive ender og inneholdt den autentiske S1-sekvens, bortsett fra de kodonendringer som er anmerket i linkerbeskrivelsene i tabell I:

30

35

Tabell I

konstruksjon: pPTXS1(6A-3/5-1)
kodonendring: tyr8 til phe
5 oligodeoxynukleotidlinkersekvens:

5' ATTCCGCTATGACTCCCGCCCG³'
3' AGGCGATACTGAGGGCGGGCGGCC₅,

konstruksjon: pPTXS1(6A-3/4-1)
10 kodonendring: arg9 til lys
oligodeoxynukleotidlinkersekvens:

5' ATACAAGTATGACTCCCGCCCG³'
3' TGTTCATACTGAGGGCGGGCGGCC₅,

15 konstruksjon: pPTXS1(6A-3/3-1)
kodonendring: aspl1 til glu
oligodeoxynukleotidlinkersekvens:

5' ATACCGCTATGAATCCCGCCCG³'
3' TGGCGATACTTAGGGCGGGCGGCC₅,

20 konstruksjon: pPTXS1(6A-3/2-2)
kodonendring: ser12 til gly
oligodeoxynukleotidlinkersekvens:

25 5' ATACCGCTATGACGGCCCGCCCG³'
3' TGGCGATACTGCCGGCGGGCGGCC₅,

konstruksjon: pPTXS1(6A-3/1-1)
kodonendring: arg13 til lys
oligodeoxynukleotidlinkersekvens:

30 5' ATACCGCTATGACTCCAAGCCG³'
3' TGGCGATACTGAGGTTCGGCGGCC₅,

konstruksjon: pPTXS1(6A-3/8-1)
kodonendring: tyr8 til leu og arg9 til glu
35 oligodeoxynukleotidlinkersekvens:

5' ATTGGAATATGACTCCCGCCCG³'
3' ACCTTATACTGAGGGCGGGCGGCC₅,

Tabell 1. (forts.)

konstruksjon: pPTXS1(6A-3/7-2)

kodonendring: arg9 til asn og ser 12 til gly

5 oligodeoxynukleotidlinkersekvens:

5' ATACAACTATGACGGCGCCCG³'
3' TGTGATACTGCCGGCGGGCGGCC₅'

konstruksjon: pPTXS1(6A-3/6-1)

10 kodonendring: aspl1 til pro og prol4 til asp

oligodeoxynukleotidlinkersekvens:

5' ATACCGCTATCCGTCCCGCGAC³'
3' TGGCGATAGGCAGGGCGCTGGGCC₅'

15 For ekspresjonsplasmidkonstruksjon ble de følgende DNA-fragmenter isolert ved elektroeluering fra agarosegeler:

- 1) et 1824-bp DNA-fragment (AccI til SstI) fra pPTXS1(6A), et plasmid konstruert som tidligere beskrevet som uttrykte et rekombinant Sl-analogmolekyl hvor aspartat 1 og aspartat 2 er delert og erstattet med methionylvalyl;
- 2) et 3,56-Kb DNA-fragment (SstI til BspMII) fra pPTXS1(33B), et plasmid konstruert som tidligere beskrevet som uttrykte en rekombinant Sl-analog hvor de første fjorten aminosyrerestene var delert og erstattet med methionylvalyl. I denne spesielle genkonstruksjon skapte den butt-endede ligering som resulterte i dette forkortede molekyl, et nytt BspMII-sete. Dette restriksjonssete som ikke er til stede i det naturlig forekommende Sl cistronenelement, muliggjorde utnyttelsen av forholdsvis korte oligonukleotidlinkere med AccI og BspMII kohesive ender for å bevirke mutagenesen.

35 Disse to DNA-fragmentene ble ligert med de enkelte oligodeoxynukleotidfragmentene beskrevet ovenfor under standard ligeringsbetingelser. Disse ligeringene resulterte i nykonstruerte Sl-gener: en del av pPTXS1(6A) tilveiebragt ved de oppstrøms kodoner til punktet for AccI-restriksjonssetet,

de syntetiske fragmentene tilveiebragte de forskjellige mutasjoner til kodoner mellom AccI-setet og BspMII-setet, og en del av pPTXSl(33B) tilveiebragte det gjenværende av det Sl-kodende område nedstrøms fra det nye BspMII-restriksjonssete. Etter ligering ble hver blanding brukt til å transformere et separat preparat av de fremstilte, kompetente FM5-celler. Transformanter ble plukket ut, dyrket som "mini-preps", indusert til å produsere rekombinant protein og inklusjonslegeme-positive prøver ble identifisert ved hjelp av lysmikroskopi. Disse prøvene ble fermentert ved en større skala (1 - 6 liter) ved induksjonstemperaturene for å fremstille større mengder av hvert rekombinant analogprotein. Isolerte cellemasser ble indusert i en fransk presse etter resuspensjon i destillert H₂O med 1 mM DTT. Inklusjonslegemer ble isolert fra disse lysatene ved enkel sentrifugering ved lav hastighet. Disse inklusjonslegemeproteinpreparater inneholdt så lite som 30% og så mye som 80% av de rekombinante proteiner. Hvert preparat ble analysert med hensyn på evne til å binde i et Western-"blot-format" (Burnette, supra) til monoklonalt antistoff B2F8 rettet mot en dominant epitop identifisert i vår undersøkelse med avkortede Sl-analoger, og til å binde til monoklonalt antistoff 1B7 kjent for passivt å beskytte mus mot intracerebral smitte med virulent B. pertussis (Sato et al, supra). Prøvene ble også bestemt med hensyn på ADP-ribosyltransferaseaktivitet. De oppnådde resultater er vist i tabell 2.

30

35

Tabell 2

	<u>Prøve</u>	<u>Antistoffbinding</u>		<u>ADP-RTase-aktivitet</u>
		<u>B2F8</u>	<u>1B7</u>	
5	ingen	-	-	-
	PTX (kommersiell)	+	+	+
	rPTXS (pPTXS1/1)	+	+	+
	pPTXS1(6A-3/1-1)	+	+	+
	pPTXS1(6A-3/2-2)	+	+	+
	pPTXS1(6A-3/3-1)	+	+	+
	pPTXS1(6A-3/4-1)	+	+	-
	pPTXS1(6A-3/5-1)	+	+	+
10	pPTXS1(6A-3/6-1)	-	-	-
	pPTXS1(6A-3/7-2)	-	-	-
	pPTXS1(6A-3/8-1)	-	-	-

Sl-analogen 4-1 (Arg9→Lys) utviste liten eller ingen transferaseaktivitet, mens den beholdt reaktivitet med nøytraliserende mAb 1B7. Bare ekstremt små mengder enzymatisk aktivitet kunne avsløres ved å øke mengden av 4-1-protein i analysen (figur 8); gjentatte bestemmelser indikerte at den spesifikke ADP-ribosyltransferaseaktivitet til Sl-analogen ble redusert med en faktor på minst 5000. Måling av NAD-glycohydrolaseaktiviteten forbundet med mutantene med enkelrestsubstitusjon (figur 8B), avslørte et lignende mønster som det som ble oppnådd fra evaluering av ADP-ribosyltransferaseaktivitet. Sl-analog 4-1 utviste liten eller ingen påvisbar glykohydrolaseaktivitet, noe som indikerer en reduksjon i størrelsen på denne aktivitet ved en faktor på minst 50 - 100.

På grunn av dens evne til å bibeholde binding til et passivt beskyttende monoklonalt antistoff, (dvs. bibeholde en beskyttende hovedepitop) og mangel på en hovedmarkør for toksisk aktivitet (ADP-ribosyltransferase), har det rekombinante Sl-analogmolekyl fremstilt ved hjelp av klon pPTXS1(6A-3/4-1), som vist i figur 7, og modifikasjoner derav for anvendelse som sikre, økonomiske underenhetvaksiner, enten alene eller i kombinasjon med andre PTX-underenheter. Sl-analogene fremstilt ved hjelp av klon pPTXS1(6A-3/4-1), hvor arginin 9 er byttet ut med lysin, er illustrerende for rSl-analoger med de ønskede egenskaper som er nødvendige

for sikker underenhetvaksine. Andre analoger av 6A-3/4-1 kunne omfatte f.eks. aspartylaspartylrester i posisjonene 1 og 2, methionylaspartylaspartyl-rester i posisjonene 1, 0 og 2, og methionylvalylaspartyl-restene i posisjonene 0, 1 og 2.

Nåværende acellulære vaksiner inneholder S1-, S2-, S3-, S4- og S5-underenheter. Den morfologiske modifikasjon som frembringes i dyrkede pattedyrceller ved hjelp av kikhostetoksin, er nylig blitt påvist å være en egenskap hos S1-underenheten (Burns et al., 1987, Infect. Immun. 55: 24-28), selv om denne effekt bare er blitt demonstrert i nærvær av B-oligomeren. Preliminære undersøkelser som her er beskrevet, demonstrerer gjennomførbarheten av en enkel underenhetvaksine under benyttelse av rS1-analoger som beholder en viktig beskyttende epitop, men som mangler toksisk aktivitet. S1-analoger har også anvendelse i kombinasjon med underenheter S2, S3, S4 og S5. Disse underenhetene kan forøke immunresponsen til S1, og kan i seg selv ha beskyttende epitoper. Det er innenfor omfanget av oppfinnelsen at vaksiner omfattende S1-underenhetanaloger videre kan omfatte minst én av underenhetene S2, S3, S4, S5 og blandinger derav av Bordetella endotoksin. S2, S3, S4 og S5 kan være underenheter avledet fra B. pertussis, eller genetisk fremstilte underenheter og deres analoger. Genetisk fremstilte underenhetprodukter kan omfatte fusjonsproteiner og ikke-fusjonsproteiner.

For formålene ved forsøkene beskrevet i det følgende avsnitt, endret vi ekspresjonssystemet for å produsere en S1-underenhetanalog (S1/1-4) som har lysin-for-arginin 9 substitusjonen, men som også har de naturlig forekommende aspartylaspartatrester i sin aminoende.

Bestemmelse av biologisk aktivitet av S1/1-4-analogene og S1/1

Rekombinant S1-protein med naturlig forekommende sekvens (S1/1) og analog S1/1-4 (som beskrevet ovenfor, inneholder Arg 9→Lys-substitusjonen og aspartylaspartat-aminoenderestene til den naturlig forekommende sekvens) ble hver

for seg isolert fra E. coli fremstillingscellene ved hjelp av en fremgangsmåte som omfattet celleutbryning, sentrifugering, urea-oppløseliggjøring, ionebytterkromatografi og gelfiltreringskromatografi. Cellemassene ble oppslemmet i 25 mM Tris-buffer, pH 8,5, og lysert ved hjelp av høytrykksoppbrytning (fransk presse). Lysatene ble sentrifugert og de uoppløselige pellets, som inneholdt de rekombinante Sl-proteiner, ble oppløseliggjort i 8 M urea, 25 mM Tris, pH 8,5. Etter tilsetningen av CuSO_4 til en konsentrasjon på 50 μM ble blandingen omrørt over natten for å muliggjøre dannelsen av disulfidbindinger i de rekombinante Sl-proteiner. Blandingen ble fortynnet med et like stort volum 8 M urea, 25 mM natriumcitrat, pH 3,8, og tilført kolonner med S-Sepharose ("hurtigstrømming") ekvilibrert ved pH 3,8 i 8 M urea. Kolonnene ble eluert med lineære gradienter av NaCl (0-0,5M) i 8 M urea, 12 mM natriumcitrat, pH 3,8. Brede toppler ble tatt opp fra hver kolonne og titrert ved pH 7,5. Disse sammenblandinger av kromatografiske fraksjoner ble tilført separat til Sephacryl S-200-kolonner ekvilibrert i 2 M urea, 10 mM kaliumfosfat, pH 7,5, og det ble samlet opp blandinger av eluerende materiale som utgjorde oxyderte, monomere rekombinante Sl-proteiner av hver art (Sl/1 og Sl/1-4). Renset Sl-underenhetproteiner ble analysert ved hjelp av SDS-PAGE etterfulgt av sølvfarging av proteinene i gelene (figur 9). Geler (12,5% acrylamid) ble kjørt under reduserende betingelser. Felt 1, molekulvektstandarden. Felt 2, 2 μg B. pertussis holotoksin. Felt 3, 0,2 μg B. pertussis Sl-underenhetprotein. Felt 4, 0,2 μg rekombinant Sl/1. Felt 5, 0,2 μg rekombinant Sl/1-4. Felt 6, blindprøve. Felt 7, 0,4 μg Sl-underenhetprotein. Felt 8, 0,4 μg rekombinant Sl/1. Felt 9, 0,4 μg rekombinant Sl/2-4. På dette fremstillingsstadium var de rekombinante Sl-arter mer enn 90% rene.

For å bestemme den biologiske aktivitet til Sl-Arg $\rightarrow$ Lys-mutasjonen, var det nødvendig å oppnå forbindelsen mellom den mutante analog og det rekombinante Sl-protein med nativ sekvens i kikhoste-holotoksinarter. Høyrenset kikhostetoksin B-oligomer (en pentamer struktur av toksin-

underenhetene S2, S3, S4 og S5) ble tilveiebragt av D. Burns, Center for Biologics Evaluation and Research, Food and Drug Administration. De to forskjellige S1-underenhetartene fikk hver for seg bindes til B-oligomeren, hvorved det ble dannet
5 holotoksinmolekyler (inneholdende enten S1/1 eller S1/1-4) ved hjelp av den følgende fremgangsmåte. Like store molare mengder av rekombinante S1-arter og B-oligomer ble blandet sammen i oppløsninger av 2 M urea, 10 mM kaliumfosfat, pH 7,5, og ble inkubert i 30 minutter ved 37°C. Holotoksin-
10 dannelsen ble bestemt ved elektroforese i native acrylamidgeler (figur 10). Gel 1, rekombinant S1/1 og nativ oligomer. Gel 2, rekombinant S1/1-4 og nativ B-oligomer. Gel 3, nativ B-oligomer. Gel 4, nativ B. pertussis holotoksin. Gel 5, rekombinant S1/1. Gelene indikerer at holotoksinarter
15 ble samlet fra blandingen av nativ B-oligomer med enten rekombinant S1/1 eller rekombinant S1/1-4.

Semirekombinante holotoksiner (B-oligomer pluss enten S1/1 eller analog S1/1-4) ble så undersøkt med hensyn på evne til å frembringe en "clustering"-respons i ovarie-
20 celler fra kinesisk hamster (CHO) in vitro; denne respons er blitt vist å være et mål for cytopastisiteten til kikhostetoksin. Forsøksprøver og passende kontrollprøver ble fortynnet i CHO-cellekulturmedium (Dulbecco modifisert Eagle medium med 10% kalvefoster serum), sterilisert ved
25 ultrafiltrering og ytterligere fortynnet ved hjelp av serieoverføring i 96-brønners kulturskåler av plast. Omtrent $5-7 \times 10^3$ nytrypsiniserter CHO-celler (American Type Culture Collection CCL 61, CHO-K1-celler) ble tilsatt til hver brønn og skålene inkubert ved 37°C i 5% CO₂ i 48 - 72 timer. Celle-
30 monolagene ble vasket med fosfatbufret saltoppløsning, farget med krystallfiolett og undersøkt med hensyn på tilstedeværelse av celle-"clusters" ved hjelp av lysmikroskopi.

Figur 11 viser resultatene av slike analyser; av særlig interesse er resultatene av panelene G, H og J, som
35 vedrører S1/1-4-analogen. S1/1-4-analogen alene og 1/1600 fortynning av holotoksin dannet fra S1/1-4-analog og B-oligomer viser en mangel på celle-"clustering", idet 1/200-fortynningen utviser en neglisjerbar mengde "clustering".

Panel A er celler behandlet med en 1/200-fortynning av buffer alene. Panel B er behandlet med B-oligomer alene, ved en fortynning av 1/200; en liten mengde "clustering" er synlig ved denne fortynning og kan tilskrives forurensende
5 nativ Sl-underenhet som blir tilbake etter rensing. Panel B kan sammenlignes med et annet område av denne samme brønn (panel I), som klart viser "clustering"-aktivitet av B-oligomerpreparatet ved en fortynning på 1/200. Panel C er celler behandlet med nativ Sl-underenhet av kommersiell
10 finhetsgrad med 1/2000 fortynning. Panel D er nativ kikhosteholotoksin av kommersiell finhetsgrad ved 1/200 fortynning, noe som demonstrerer den dramatiske cytopatiske effekt av kikhostetoksin på CHO-celler i kultur. Panel E er rekombinant Sl-underenhet med nativ sekvens (Sl/1) ved
15 en fortynning på 1/2000. Panel F viser Sl/1 kombinert med B-oligomer og fortynnet til 1/2000; effekten av CHO-celle-"clustering" synes akkurat så dramatisk som med nativ holotoksin og understøtter de fysikalske gelresultater (se ovenfor) som oppviser holotoksinforbindelse med B-oligomer og
20 oppviser holotoksinforbindelse med B-oligomer og det rekombinante Sl-protein. Panel G illustrerer at Arg 9 → Lys-mutant Sl/1-4 i seg selv ikke har noen effekt på CHO-cellene. Panel H viser den manglende CHO-celle-"clustering" ved en 1/1600 fortynning av holotoksin dannet fra Sl/1-4-analogen og B-oligomeren. Ved en fortynning på 1/200 (Panel
25 J) kan en viss "clustering" av det Sl/1-4-holdige holotoksin ses; bidraget til "clustering"-effekten fra de analoge Sl-arter synes imidlertid neglisjerbar når man sammenligner med B-oligomer selv ved den samme fortynning (panel I).

30 Innledende forsøk er blitt gjort for å kvantifisere den effektive konsentrasjon av de forskjellige kikhostetoksinarter som er påkrevet for å frembringe CHO-celle-"clustering"-fenomenet. Preliminære resultater indikerer at både kommersielt kikhostetoksin og holotoksinet som inneholder rekombinant Sl/1 kan forårsake celle-"clustering"
35 ved så lave konsentrasjoner som 0,25 - 0,30 ng/ml; i motsetning til dette er holotoksin inneholdende Sl/1-4-analogen påkrevet ved konsentrasjoner på minst 10 - 25 ng/ml

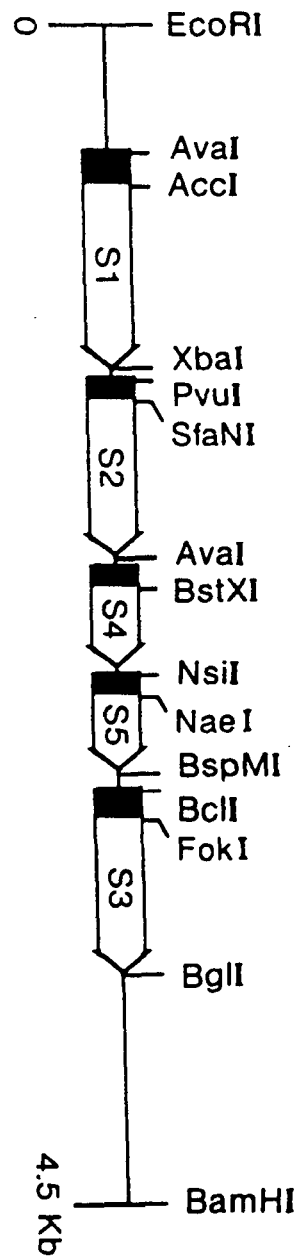


FIG.1

Teknikkens stand

FIG.2A

Direkte uttrykte PTX-underenheter

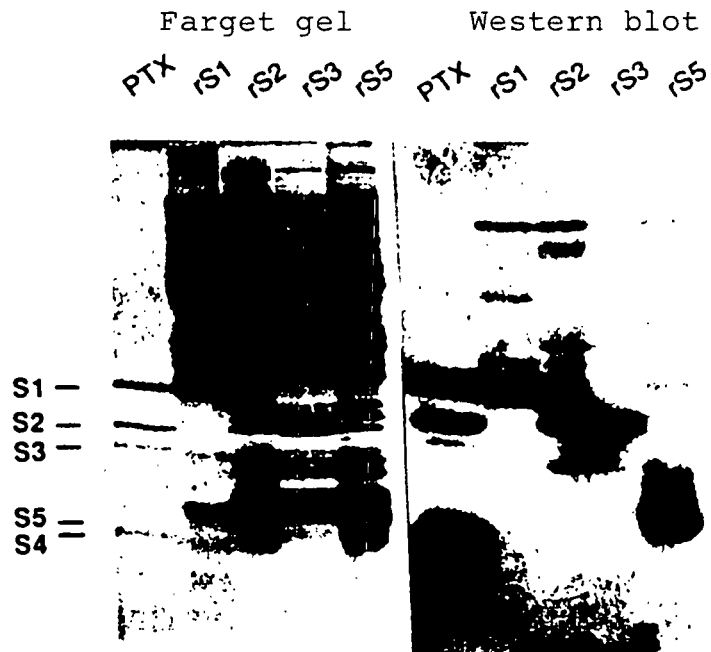
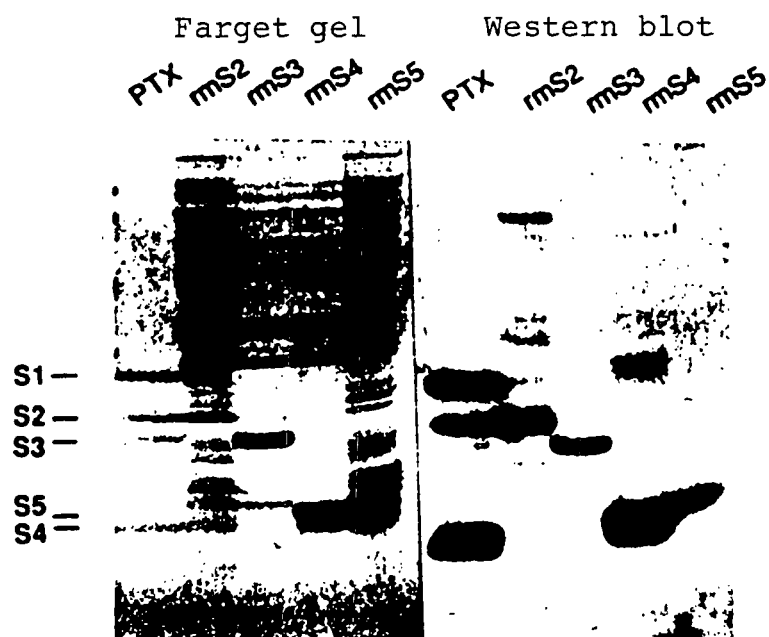


FIG.2B

Methionyl-PTX-underenheter



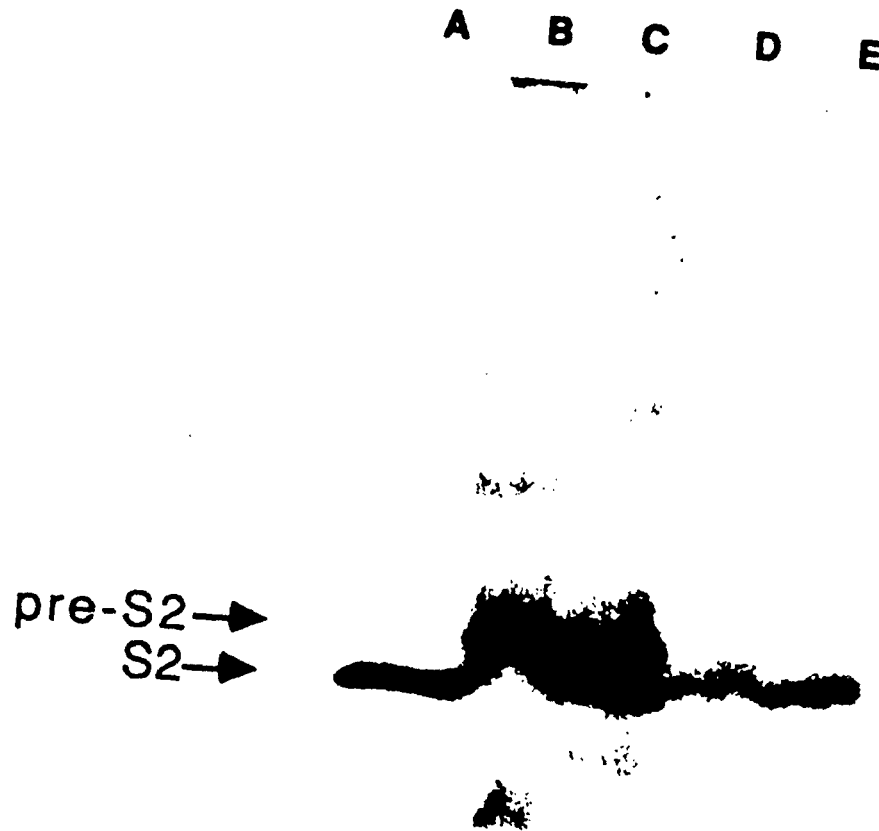


FIG.3



FIG. 4

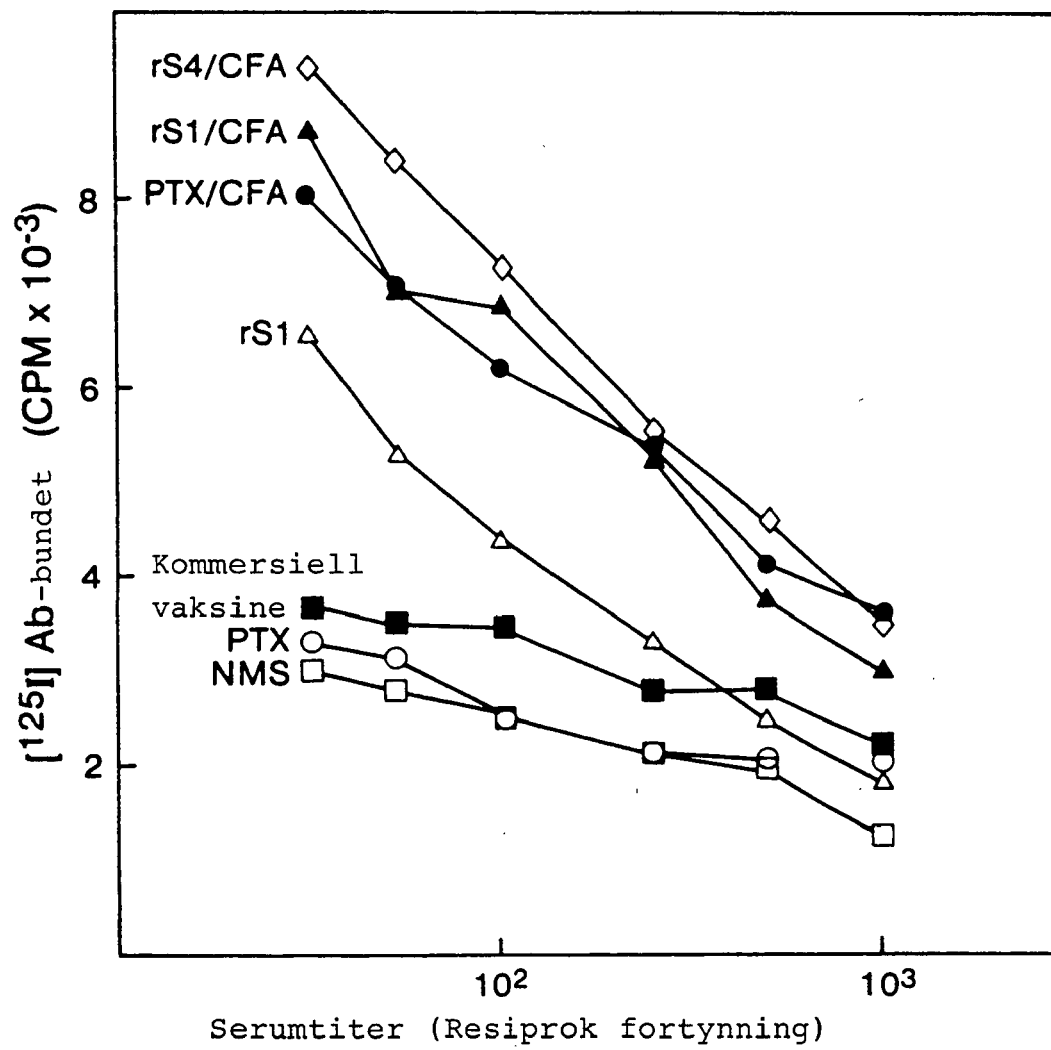


FIG.5

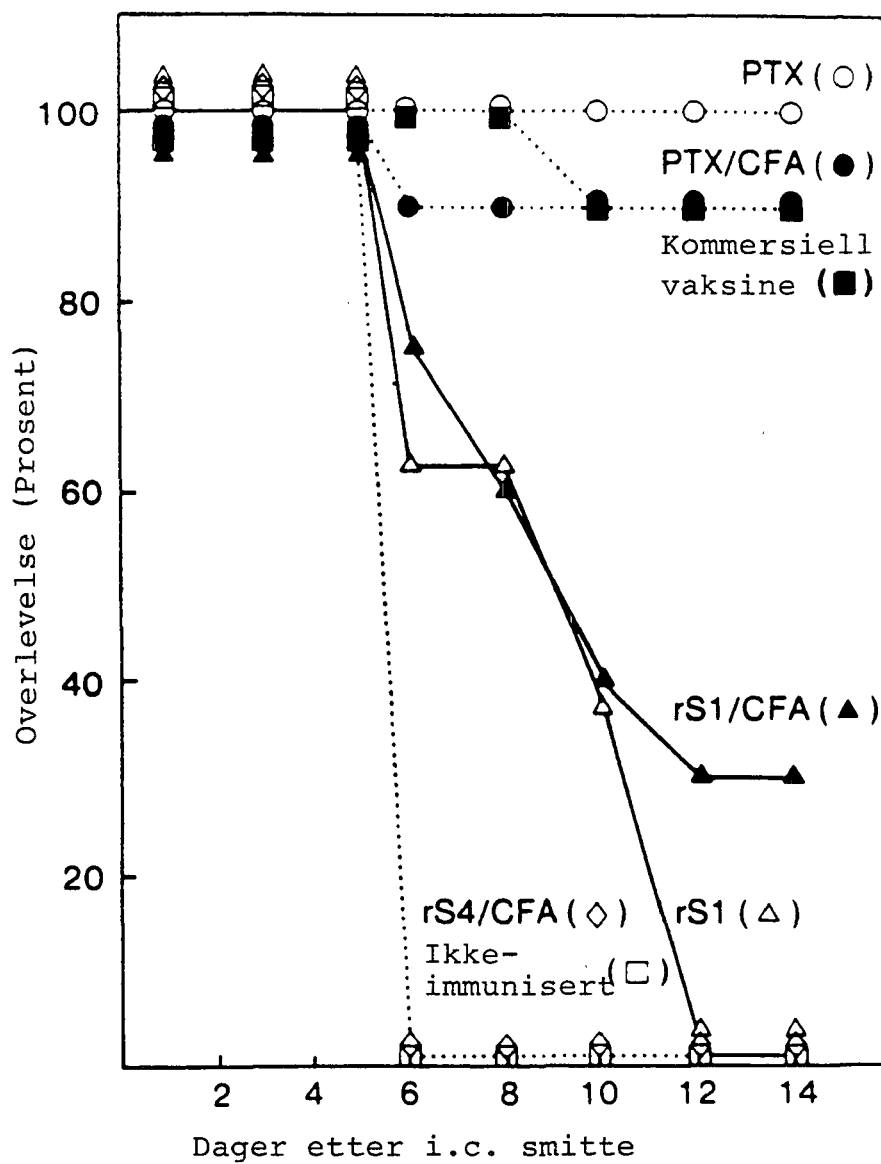


FIG.6

```

1               10               20
MetValProProAlaThrValTyrLysTyrAspSerArgProProGluAspValPheGln

21               30               40
AsnGlyPheThrAlaTrpGlyAsnAsnAspAsnValLeuAspHisLeuThrGlyArgSer

41               50               60
CysGlnValGlySerSerAsnSerAlaPheValSerThrSerSerSerArgArgTyrThr

61               70               80
GluValTyrLeuGluHisArgMetGlnGluAlaValGluAlaGluArgAlaGlyArgGly

81               90              100
ThrGlyHisPheIleGlyTyrIleTyrGluValArgAlaAspAsnAsnPheTyrGlyAla

101              110              120
AlaSerSerTyrPheGluTyrValAspThrTyrGlyAspAsnAlaGlyArgIleLeuAla

121              130              140
GlyAlaLeuAlaThrTyrGlnSerGluTyrLeuAlaHisArgArgIleProProGluAsn

141              150              160
IleArgArgValThrArgValTyrHisAsnGlyIleThrGlyGluThrThrThrThrGlu

161              170              180
TyrSerAsnAlaArgTyrValSerGlnGlnThrArgAlaAsnProAsnProTyrThrSer

181              190              200
ArgArgSerValAlaSerIleValGlyThrLeuValHisGlyAlaGlyAspSerAlaCys

201              210              220
MetAlaArgGlnAlaGluSerSerGluAlaMetAlaAlaTrpSerGluArgAlaGlyGlu

221              230              234
AlaMetValLeuValTyrTyrGluSerIleAlaTyrSerPhe

```

FIG.7

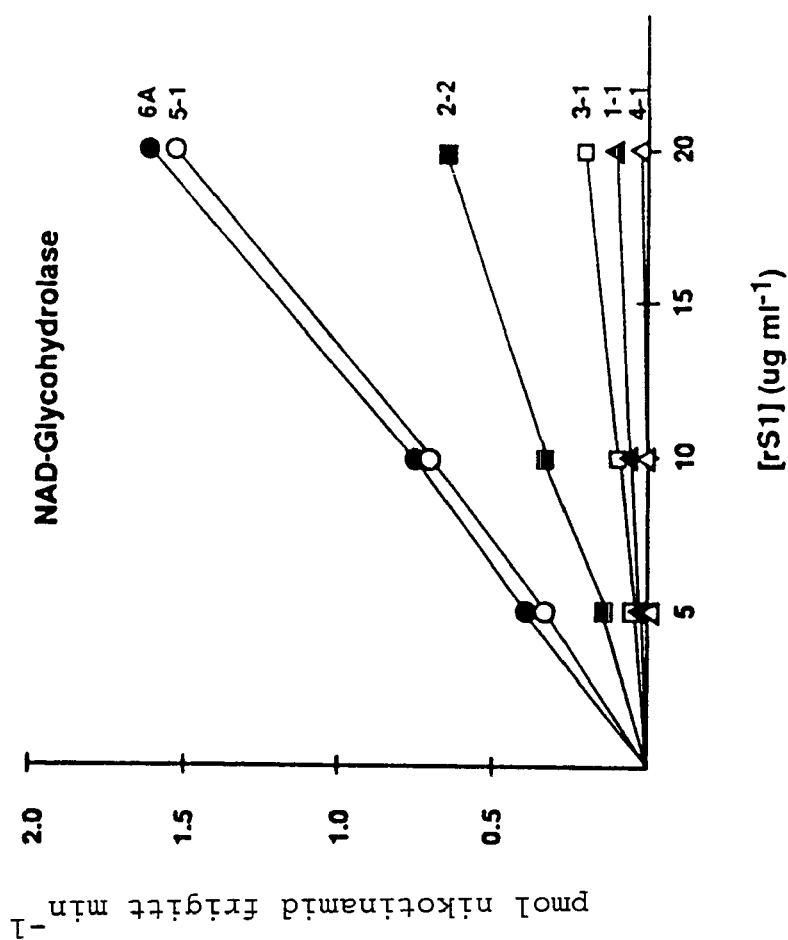


FIG.8B

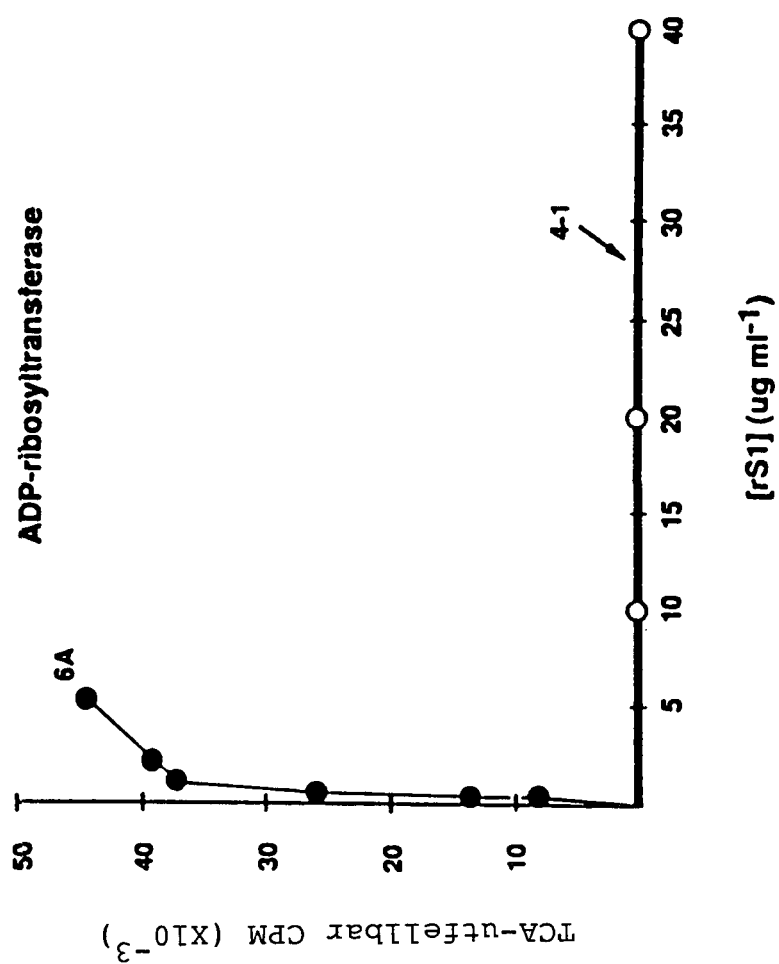


FIG.8A

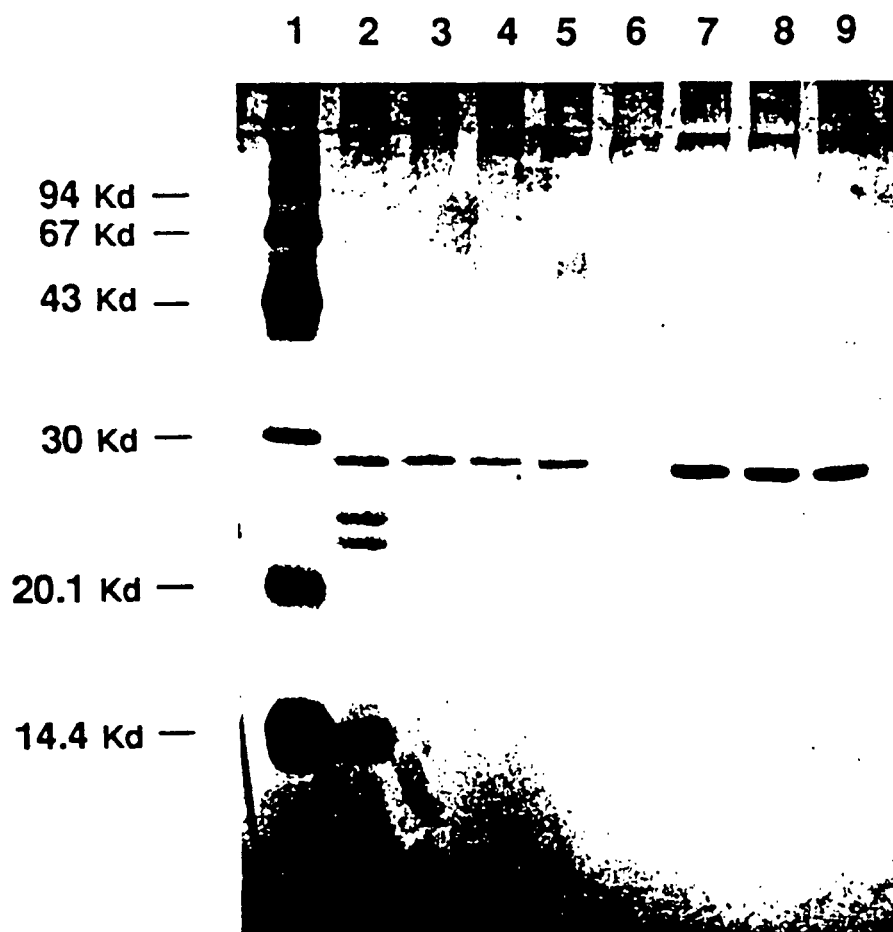


FIG.9

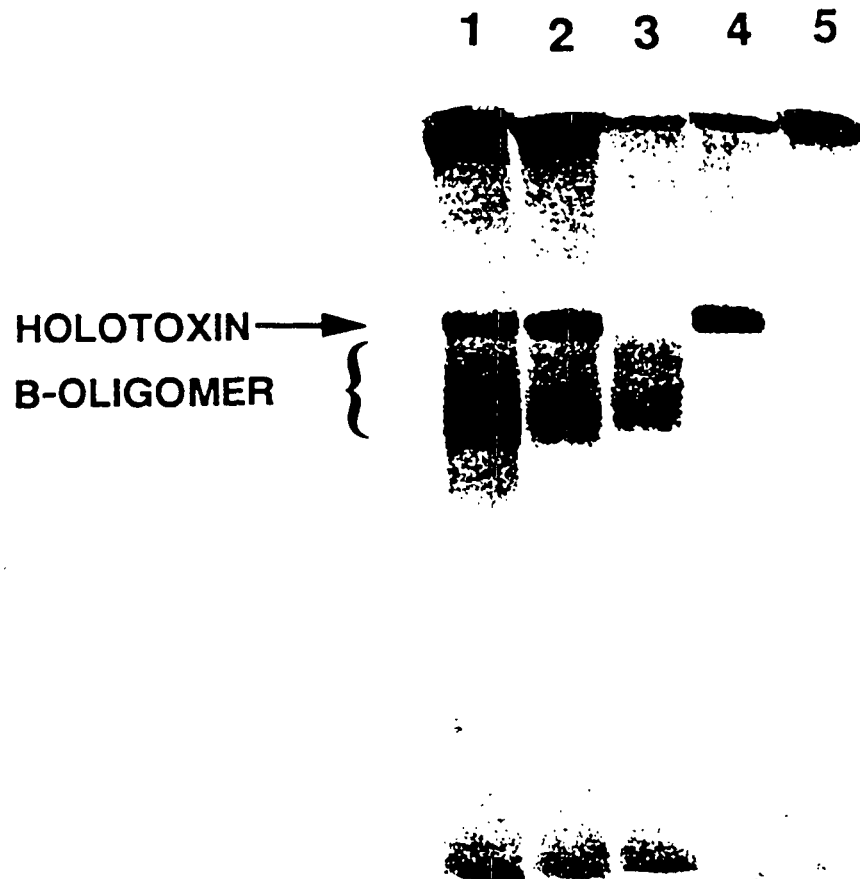


FIG.10

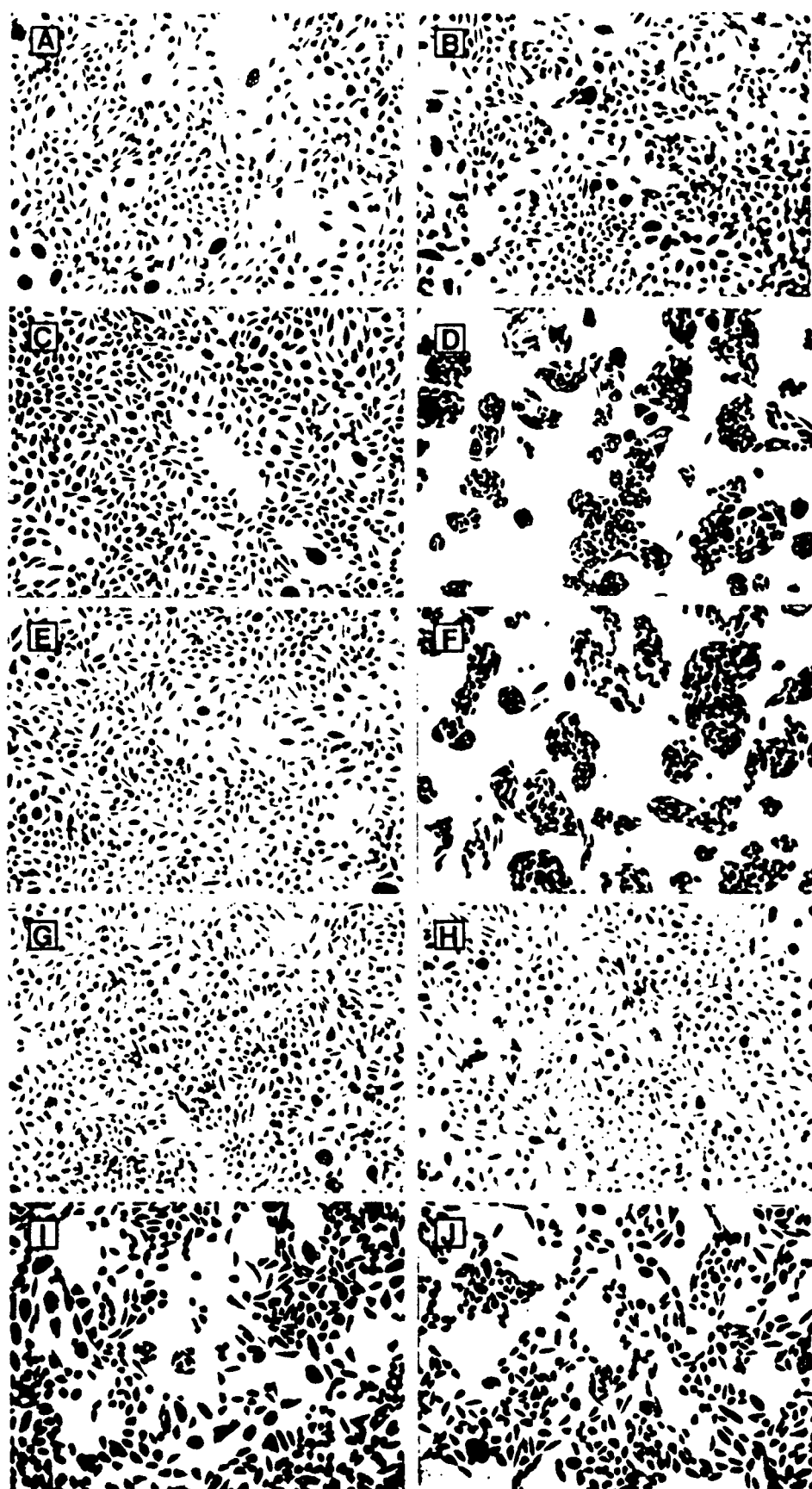


FIG.II

for å indusere "clustering"-effekten.

Disse resultatene bekrefter at den cytotoxiske effekt av kikhostetoksin ligger i dens S1-underenhetrest og at den er direkte relatert til dens enzymatiske aktiviteter. Mer viktig er det at disse forsøkene viser at et forholdsvis ikke-toksisk kikhostetoksinmolekyl kan dannes fra bestemte rekombinante toksinunderenheter avledet ved hjelp av stedrettet mutagenese.

P a t e n t k r a v

1. DNA-molekyl som koder for en polypeptidanalogue til S1-underenheten i *Bordetella*-eksotoksin, og som også koder for en hovedepitop som er viktig for tilveiebringelse av immunologisk beskyttelse mot *Bordetella*-toksisitet, hvor polypeptidanalogen har en aminosyresekvens som atskiller seg fra den naturlige forekommende sekvens i S1-underenheten ved erstatning av argininresten i 9-stillingen med en lysinrest, karakterisert ved at polypeptidanalogen som et resultat av dette, kan utløse toksinnøytraliserende nivåer av antistoffer og er fri for enzymatiske virkninger forbundet med toksinreaktogenisitet.

2. Fremgangsmåte for fremstilling av en proteinanalogue til S1-underenheten i *Bordetella*-eksotoksin, hvor proteinanalogen kodes av DNA-molekylet ifølge krav 1, kan utløse toksinnøytraliserende nivåer av antistoffer og er fri for enzymatiske virkninger forbundet med toksinreaktogenisitet, karakterisert ved at en vertscelle som er transformert med det rekombinante DNA-molekyl ifølge krav 1, dyrkes under betingelser hvor den kodede proteinanalogue uttrykkes.

3. Fremgangsmåte ifølge krav 2, karakterisert ved at proteinanalogen er i stand til å tilveiebringe immunologisk beskyttelse mot kikhostesykdom.