

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2014-12002

(P2014-12002A)

(43) 公開日 平成26年1月23日(2014.1.23)

| (51) Int.Cl.                         | F I                   | テーマコード (参考) |
|--------------------------------------|-----------------------|-------------|
| <b>C 1 2 N 15/09 (2006.01)</b>       | C 1 2 N 15/00 Z N A A | 4 B O 2 4   |
| <b>C O 7 K 16/12 (2006.01)</b>       | C O 7 K 16/12         | 4 B O 6 4   |
| <b>C 1 2 N 1/15 (2006.01)</b>        | C 1 2 N 1/15          | 4 B O 6 5   |
| <b>C 1 2 N 1/19 (2006.01)</b>        | C 1 2 N 1/19          | 4 C O 8 5   |
| <b>C 1 2 N 1/21 (2006.01)</b>        | C 1 2 N 1/21          | 4 H O 4 5   |
| 審査請求 有 請求項の数 22 O L (全 107 頁) 最終頁に続く |                       |             |

|              |                                 |          |  |
|--------------|---------------------------------|----------|--|
| (21) 出願番号    | 特願2013-158937 (P2013-158937)    | (71) 出願人 | 506198159                                      |
| (22) 出願日     | 平成25年7月31日 (2013.7.31)          |          | ワイス ホールディングス コーポレイション                          |
| (62) 分割の表示   | 特願2010-7996 (P2010-7996)<br>の分割 |          | アメリカ合衆国 ニュージャージー 07940, マディソン, ファイブ ジラルダ ファームズ |
| 原出願日         | 平成14年10月11日 (2002.10.11)        | (74) 代理人 | 100133927                                      |
| (31) 優先権主張番号 | 60/328, 101                     |          | 弁理士 四本 能尚                                      |
| (32) 優先日     | 平成13年10月11日 (2001.10.11)        | (74) 代理人 | 100137040                                      |
| (33) 優先権主張国  | 米国 (US)                         |          | 弁理士 宮澤 純子                                      |
| (31) 優先権主張番号 | 60/406, 934                     | (74) 代理人 | 100147186                                      |
| (32) 優先日     | 平成14年8月30日 (2002.8.30)          |          | 弁理士 佐藤 真紀                                      |
| (33) 優先権主張国  | 米国 (US)                         | (74) 代理人 | 100174447                                      |
|              |                                 |          | 弁理士 龍田 美幸                                      |
| 最終頁に続く       |                                 |          |  |

(54) 【発明の名称】 髄膜炎性疾患の予防および治療のための新規免疫原性組成物

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 ナイセリア属の菌株、例えば髄膜炎菌や淋菌による疾患の予防及び治療に有効な新規免疫原性組成物の提供。

【解決手段】 ナイセリア属 O R F 2 0 8 6 該タンパク質は、ナイセリア菌株から単離する、または組換えにより製造することのできる交差反応性の免疫原性タンパク質であり、その免疫原性部分、その生物学的均等物、前述の物質に免疫特異的に結合する抗体、および前述の各物質をコードする核酸配列を含む。同様に本発明は髄膜炎菌血清群 B による感染に対して有効な免疫原性組成物における、該物質の使用方法。

【選択図】 なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

以下を含む組成物：

(a) ナイセリア種 (*Neisseria species*) のオープンリーディングフレーム (ORF 2086) によりコードされる少なくとも 1 つのタンパク質であって、該オープンリーディングフレームが交差反応性の免疫原性抗原をコードし、該交差反応性免疫原性抗原が被験者における髄膜炎菌血清群 B (*Neisseria meningitidis* serogroup B) による感染に対して免疫原性を提供するタンパク質；または

(b) (a) に記載の少なくとも 1 つのタンパク質の少なくとも 1 つの免疫原性部分；または

(c) (a) に記載の少なくとも 1 つのタンパク質または (b) に記載の免疫原性フラグメントの、少なくとも 1 つの生物学的均等物。

## 【請求項 2】

少なくとも 1 つのタンパク質が配列番号：254 から 259 のアミノ酸配列のいずれかを含む、請求項 1 に記載の組成物。

## 【請求項 3】

少なくとも 1 つのタンパク質が、ナイセリア菌株 L3

6275, CDC2369, CDC1034, L4891, B16B6, W135 (ATCC35559), C11, Y (ATCC35561), M98

250732, M98 250771, CDC1135, M97 252153, CDC1610, CDC1492, L8 M978; M97 252988, M97 252697, 6557, 2996, M97

252976, M97 251854, CDC1521, M98 250622, 870446, M97 253248, M98 250809, L5 M981, NMBまたはM98

250572のいずれかのORF2086によりコードされる、請求項1に記載の組成物。

## 【請求項 4】

少なくとも 1 つのタンパク質が配列番号：260 から 278 または 279 から 299 のアミノ酸配列のいずれかを含む、請求項 1 に記載の組成物。

## 【請求項 5】

少なくとも 1 つのタンパク質が、ナイセリア菌株 880049, M982, CDC1573, M97

253524 または M98 250670 のいずれかの ORF 2086 によりコードされる、請求項 1 に記載の組成物。

## 【請求項 6】

少なくとも 1 つのタンパク質が配列番号：2 - 174 の偶数番号のいずれかのアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の組成物。

## 【請求項 7】

配列番号：176 - 252 の偶数番号のいずれかのアミノ酸配列を含む少なくとも 1 つのタンパク質を付加的に含む、請求項 6 に記載の組成物。

## 【請求項 8】

少なくとも 1 つのタンパク質が配列番号：224 - 252 の偶数番号のいずれかのアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の組成物。

## 【請求項 9】

前記の少なくとも 1 つのタンパク質、免疫原性部分または生物学的均等物が、非病原性であり実質的にいかなる感染性不純物も含まない、請求項 1 に記載の組成物。

## 【請求項 10】

少なくとも 1 つのタンパク質が、質量分析による測定で分子量

約 26,000 から約 30,000 ダルトンである、請求項 1 に記載の組成物。

10

20

30

40

50

## 【請求項 1 1】

少なくとも1つのタンパク質が、10% - 20% SDS ポリアクリルアミドゲルにおける測定で分子量

約28 - 35 kDaである、請求項10に記載の組成物。

## 【請求項 1 2】

該組成物が医薬的に受容可能なバッファー、希釈剤、アジュバントまたは担体を付加的に含む、請求項1に記載の組成物。

## 【請求項 1 3】

該組成物が付加的に担体を含む、請求項1に記載の組成物。

## 【請求項 1 4】

該組成物が付加的にアジュバントを含む、請求項1に記載の組成物。

## 【請求項 1 5】

該アジュバントが液体を含む、請求項14に記載の組成物。

## 【請求項 1 6】

タンパク質が組換えタンパク質である、請求項1に記載の組成物。

## 【請求項 1 7】

タンパク質が天然のナイセリア種から単離される、請求項1に記載の組成物。

## 【請求項 1 8】

タンパク質がリポタンパク質である、請求項1に記載の組成物。

## 【請求項 19】

タンパク質が脂質化されていない、請求項1に記載の組成物。

## 【請求項 20】

組成物が少なくとも1つのPorA、PorB、トランスフェリン結合タンパク質、またはopacityタンパク質(Opc)を付加的に含む、請求項1に記載の組成物。

## 【請求項 21】

組成物がナイセリア種の少なくとも1つの付加的な表面抗原を付加的に含み、前記の付加的な表面抗原がORF2086タンパク質ではない、請求項1に記載の組成物。

## 【請求項 22】

該組成物が付加的に多糖を含む、請求項1に記載の組成物。

## 【請求項 23】

該組成物が付加的なペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質を含み、該組成物が哺乳類において2つまたはそれより多くの細菌に対して免疫応答を惹起する複合体を形成する、請求項1に記載の組成物。

## 【請求項 24】

配列番号：254 - 259のいずれかを含む、少なくとも1つの免疫原性タンパク質またはポリペプチド、を含む組成物。

## 【請求項 25】

少なくとも1つのタンパク質が、質量分析による測定で分子量

約26,000 - 30,000ダルトンである、請求項24に記載の組成物。

## 【請求項 26】

少なくとも1つのタンパク質が、10% - 20% SDS ポリアクリルアミドゲルにおける測定で分子量

約28 - 35 kDaである、請求項25に記載の組成物。

## 【請求項 27】

該組成物が医薬的に受容可能なバッファー、希釈剤、アジュバントまたは担体を付加的に含む、請求項24に記載の組成物。

## 【請求項 28】

該組成物が付加的に担体を含む、請求項24に記載の組成物。

## 【請求項 29】

該組成物が付加的にアジュバントを含む、請求項24に記載の組成物。

10

20

30

40

50

## 【請求項 30】

該アジュバントが液体を含む、請求項 29 に記載の組成物。

## 【請求項 31】

タンパク質が脂質化されていない、請求項 24 に記載の組成物。

## 【請求項 32】

タンパク質が組換えタンパク質である、請求項 24 に記載の組成物。

## 【請求項 33】

タンパク質またはポリペプチドが天然のナイセリア種から単離される、請求項 24 に記載の組成物。

## 【請求項 34】

タンパク質がリポタンパク質である、請求項 24 に記載の組成物。

## 【請求項 35】

組成物が、少なくとも 1 つの P o r A、P o r B、トランスフェリン結合タンパク質、または opacity タンパク質 ( O p c ) を付加的に含む、請求項 24 に記載の組成物。

## 【請求項 36】

組成物がナイセリア種の少なくとも 1 つの付加的な表面抗原を付加的に含み、前記の付加的な表面抗原が O R F 2 0 8 6 タンパク質ではない、請求項 24 に記載の組成物。

## 【請求項 37】

該組成物が付加的に多糖を含む、請求項 24 に記載の組成物。

## 【請求項 38】

該組成物が付加的なペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質を含み、該組成物が哺乳類において 2 つまたはそれより多くの細菌に対して免疫応答を惹起する複合体を形成する、請求項 24 に記載の組成物。

## 【請求項 39】

配列番号：260 - 278 のいずれかを含む、少なくとも 1 つの免疫原性タンパク質またはポリペプチドを含む組成物。

## 【請求項 40】

該組成物が医薬的に受容可能なバッファー、希釈剤、アジュバントまたは担体を付加的に含む、請求項 39 に記載の組成物。

## 【請求項 41】

配列番号：279 - 299 のいずれかを含む、少なくとも 1 つの免疫原性タンパク質またはポリペプチドを含む組成物。

## 【請求項 42】

該組成物が医薬的に受容可能なバッファー、希釈剤、アジュバントまたは担体を付加的に含む、請求項 41 に記載の組成物。

## 【請求項 43】

配列番号：300 のアミノ酸配列を含む、少なくとも 1 つの単離されたタンパク質を含む組成物：ここで、

配列中 x はいずれかのアミノ酸であり；

配列中 5 番目のアミノ酸から 9 番目のアミノ酸までの領域は、0 から 5 個のいずれかのアミノ酸であり；

配列中 6 7 番目のアミノ酸から 6 9 番目のアミノ酸までの領域は、0 から 3 個のいずれかのアミノ酸であり；そして

配列中 1 5 6 番目のアミノ酸は、0 から 1 個のいずれかのアミノ酸である。

## 【請求項 44】

5 番目のアミノ酸から 9 番目のアミノ酸までの領域が 0、4 または 5 個のアミノ酸を含む、請求項 43 に記載の組成物。

## 【請求項 45】

6 7 番目のアミノ酸から 6 9 番目のアミノ酸までの領域が 0 または 3 個のアミノ酸を含む、請求項 43 に記載の組成物。

10

20

30

40

50

## 【請求項 46】

少なくとも1つのタンパク質が、質量分析による測定で分子量約26,000 - 30,000ダルトンである、請求項43に記載の組成物。

## 【請求項 47】

少なくとも1つのタンパク質が、10% - 20% SDS ポリアクリルアミドゲルにおける測定で分子量

約28 - 35 kDaである、請求項46に記載の組成物。

## 【請求項 48】

該組成物が医薬的に受容可能なバッファー、希釈剤、アジュバントまたは担体を付加的に含む、請求項43に記載の組成物。

10

## 【請求項 49】

該組成物が付加的に担体を含む、請求項43に記載の組成物。

## 【請求項 50】

該組成物が付加的にアジュバントを含む、請求項43に記載の組成物。

## 【請求項 51】

該アジュバントが液体を含む、請求項50に記載の組成物。

## 【請求項 52】

タンパク質が脂質化されていない、請求項43に記載の組成物。

## 【請求項 53】

タンパク質が組換えタンパク質である、請求項43に記載の組成物。

20

## 【請求項 54】

タンパク質が天然のナイセリア種から単離される、請求項43に記載の組成物。

## 【請求項 55】

タンパク質がリポタンパク質である、請求項43に記載の組成物。

## 【請求項 56】

組成物が、少なくとも1つのPorA、PorB、トランスフェリン結合タンパク質、またはopacityタンパク質(OpC)を付加的に含む、請求項43に記載の組成物。

## 【請求項 57】

組成物がナイセリア種の少なくとも1つの付加的な表面抗原を付加的に含み、前記の付加的な表面抗原がORF 2086タンパク質ではない、請求項43に記載の組成物。

30

## 【請求項 58】

該組成物が付加的に多糖を含む、請求項43に記載の組成物。

## 【請求項 59】

該組成物が付加的なペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質を含み、該組成物が哺乳類において2つまたはそれより多くの細菌に対して免疫応答を惹起する複合体を形成する、請求項43に記載の組成物。

## 【請求項 60】

以下を含む組成物：

(a) 配列番号：2 - 252の偶数番号のいずれかのアミノ酸配列を含む少なくとも1つのタンパク質；

(b) 配列番号：1 - 253の奇数番号のいずれかの核酸配列を含むポリヌクレオチドと、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドによりコードされる、少なくとも1つのタンパク質；

(c) (a)もしくは(b)に記載の少なくとも1つのタンパク質の少なくとも1つの免疫原性部分；または

(d) (a)もしくは(b)に記載の少なくとも1つのタンパク質もしくは(c)に記載の免疫原性フラグメントの、少なくとも1つの生物学的均等物。

40

## 【請求項 61】

少なくとも1つのタンパク質が配列番号：2 - 174の偶数番号のいずれかのアミノ酸配

50

列を含む、請求項 6 0 に記載の組成物。

【請求項 6 2】

配列番号：1 7 6 - 2 5 2 の偶数番号のいずれかのアミノ酸配列を含む少なくとも 1 つのタンパク質を付加的に含む、請求項 6 1 に記載の組成物。

【請求項 6 3】

少なくとも 1 つのタンパク質が配列番号：2 - 1 2 の偶数番号のいずれかのアミノ酸配列を含む、請求項 6 0 に記載の組成物。

【請求項 6 4】

少なくとも 1 つのタンパク質が配列番号：1 4 - 2 4 の偶数番号のいずれかのアミノ酸配列を含む、請求項 6 0 に記載の組成物。

10

【請求項 6 5】

少なくとも 1 つのタンパク質が配列番号：2 6 - 4 2 の偶数番号のいずれかのアミノ酸配列を含む、請求項 6 0 に記載の組成物。

【請求項 6 6】

少なくとも 1 つのタンパク質が配列番号：5 0 - 6 0 の偶数番号のいずれかのアミノ酸配列を含む、請求項 6 0 に記載の組成物。

【請求項 6 7】

少なくとも 1 つのタンパク質が配列番号：6 2 - 1 0 8 の偶数番号のいずれかのアミノ酸配列を含む、請求項 6 0 に記載の組成物。

【請求項 6 8】

少なくとも 1 つのタンパク質が配列番号：1 1 0 - 1 3 8 の偶数番号のいずれかのアミノ酸配列を含む、請求項 6 0 に記載の組成物。

20

【請求項 6 9】

少なくとも 1 つのタンパク質が配列番号：1 4 0 - 1 5 6 の偶数番号のいずれかのアミノ酸配列を含む、請求項 6 0 に記載の組成物。

【請求項 7 0】

少なくとも 1 つのタンパク質が配列番号：1 5 8 - 1 7 4 の偶数番号のいずれかのアミノ酸配列を含む、請求項 6 0 に記載の組成物。

【請求項 7 1】

少なくとも 1 つのタンパク質が配列番号：2 2 4 - 2 5 2 の偶数番号のいずれかのアミノ酸配列を含む、請求項 6 0 に記載の組成物。

30

【請求項 7 2】

組成物が少なくとも 1 つの P o r A、P o r B、トランスフェリン結合タンパク質、または opacity タンパク質 ( O p c ) を付加的に含む、請求項 6 0 に記載の組成物。

【請求項 7 3】

組成物がナイセリア種の少なくとも 1 つの付加的な表面抗原を付加的に含み、前記の付加的な表面抗原が O R F 2 0 8 6 タンパク質ではない、請求項 6 0 に記載の組成物。

【請求項 7 4】

少なくとも 1 つのタンパク質が、質量分析による測定で分子量約 2 6 , 0 0 0 から約 3 0 , 0 0 0 である、請求項 6 0 に記載の組成物。

40

【請求項 7 5】

少なくとも 1 つのタンパク質が、1 0 % - 2 0 % S D S ポリアクリルアミドゲルにおける測定で分子量

約 2 8 - 3 5 k D a である、請求項 7 4 に記載の組成物。

【請求項 7 6】

該組成物が医薬的に受容可能なバッファー、希釈剤、アジュバントまたは担体を付加的に含む、請求項 6 0 に記載の組成物。

【請求項 7 7】

該組成物が付加的に担体を含む、請求項 6 0 に記載の組成物。

【請求項 7 8】

50

該組成物が付加的にアジュバントを含む、請求項 60 に記載の組成物。

【請求項 79】

該アジュバントが液体を含む、請求項 78 に記載の組成物。

【請求項 80】

タンパク質が脂質化されていない、請求項 60 に記載の組成物。

【請求項 81】

タンパク質が組換えタンパク質である、請求項 60 に記載の組成物。

【請求項 82】

タンパク質が天然のナイセリア種から単離される、請求項 60 に記載の組成物。

【請求項 83】

タンパク質がリポタンパク質である、請求項 60 に記載の組成物。

【請求項 84】

該組成物が付加的に多糖を含む、請求項 60 に記載の組成物。

【請求項 85】

該組成物が付加的なペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質を含み、該組成物が哺乳類において 2 つまたはそれより多くの細菌に対して免疫応答を惹起する複合体を形成する、請求項 60 に記載の組成物。

【請求項 86】

ナイセリア種の第 1 の細菌株の少なくとも 1 つの抗原であって、ナイセリア種の第 2 の細菌株による被験者の感染に対して免疫原性を提供する該抗原を含む組成物。

【請求項 87】

第 1 の菌株がナイセリア種の菌株であり、前記の第 2 の菌株が髄膜炎菌血清群 B の菌株である、請求項 86 に記載の組成物。

【請求項 88】

第 1 の菌株が、菌株 L 3

6275, CDC 2369, CDC 1034, L4 891, B16B6, W135 (ATCC 3559), C11, Y (ATCC 35561), M98

250732, M98 250771, CDC 1135, M97 252153, CDC 1610, CDC 1492, L8 M978; M97 252988, M97 252697, 6557, 2996, M97

252976, M97 251854, CDC 1521, M98 250622, 870446, M97 253248, M98 250809, L5 M981, NMB または M98

250572 のいずれかである、請求項 86 に記載の組成物。

【請求項 89】

第 1 の菌株が、菌株 880049, M982, CDC 1573, M97

253524 または M98 250670 である、請求項 86 に記載の組成物。

【請求項 90】

タンパク質が組換えタンパク質である、請求項 86 に記載の組成物。

【請求項 91】

タンパク質が天然のナイセリア種から単離される、請求項 86 に記載の組成物。

【請求項 92】

タンパク質がリポタンパク質である、請求項 86 に記載の組成物。

【請求項 93】

該組成物が医薬的に受容可能なバッファー、希釈剤、アジュバントまたは担体を付加的に含む、請求項 86 に記載の組成物。

【請求項 94】

該組成物が付加的に担体を含む、請求項 86 に記載の組成物。

【請求項 95】

該組成物が付加的にアジュバントを含む、請求項 86 に記載の組成物。

10

20

30

40

50

## 【請求項 9 6】

該アジュバントが液体を含む、請求項 9 5 に記載の組成物。

## 【請求項 9 7】

タンパク質が脂質化されていない、請求項 8 6 に記載の組成物。

## 【請求項 9 8】

該組成物が付加的に多糖を含む、請求項 8 6 に記載の組成物。

## 【請求項 9 9】

該組成物が付加的なペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質を含み、該組成物が哺乳類において 2 つまたはそれより多くの病原菌に対して免疫応答を惹起する複合体を形成する、請求項 8 6 に記載の組成物。

10

## 【請求項 1 0 0】

配列番号：3 0 1 のアミノ酸配列を含む、少なくとも 1 つの単離されたタンパク質を含む組成物：ここで、

配列中 x はいずれかのアミノ酸であり；

配列中 5 番目のアミノ酸から 8 番目のアミノ酸までの領域は、0 から 4 個のいずれかのアミノ酸であり；

配列中 6 6 番目のアミノ酸から 6 8 番目のアミノ酸までの領域は、0 から 3 個のいずれかのアミノ酸である。

## 【請求項 1 0 1】

少なくとも 1 つのタンパク質が、質量分析による測定で分子量

20

約 2 6 , 0 0 0 から約 3 0 , 0 0 0 である、請求項 1 0 0 に記載の組成物。

## 【請求項 1 0 2】

少なくとも 1 つのタンパク質が、1 0 % - 2 0 % S D S ポリアクリルアミドゲルにおける測定で分子量

約 2 8 - 3 5 k D a である、請求項 1 0 1 に記載の組成物。

## 【請求項 1 0 3】

該組成物が医薬的に受容可能なバッファー、希釈剤、アジュバントまたは担体を付加的に含む、請求項 1 0 0 に記載の組成物。

## 【請求項 1 0 4】

該組成物が付加的に担体を含む、請求項 1 0 0 に記載の組成物。

30

## 【請求項 1 0 5】

該組成物が付加的にアジュバントを含む、請求項 1 0 0 に記載の組成物。

## 【請求項 1 0 6】

該アジュバントが液体を含む、請求項 1 0 5 に記載の組成物。

## 【請求項 1 0 7】

タンパク質が脂質化されていない、請求項 1 0 0 に記載の組成物。

## 【請求項 1 0 8】

タンパク質が組換えタンパク質である、請求項 1 0 0 に記載の組成物。

## 【請求項 1 0 9】

タンパク質が天然のナイセリア種から単離される、請求項 1 0 0 に記載の組成物。

40

## 【請求項 1 1 0】

タンパク質がリポタンパク質である、請求項 1 0 0 に記載の組成物。

## 【請求項 1 1 1】

該組成物が付加的に多糖を含む、請求項 1 0 0 に記載の組成物。

## 【請求項 1 1 2】

該組成物が付加的なペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質を含み、該組成物が哺乳類において 2 つまたはそれより多くの病原菌に対して免疫応答を惹起する複合体を形成する、請求項 1 0 0 に記載の組成物。

## 【請求項 1 1 3】

5 番目のアミノ酸から 8 番目のアミノ酸までの領域が 0 または 4 個のアミノ酸を含む、請

50



求項 1 0 0 に記載の組成物。

【請求項 1 1 4】

6 6 番目のアミノ酸から 6 8 番目のアミノ酸までの領域が 0 または 3 個のアミノ酸を含む、請求項 1 0 0 に記載の組成物。

【請求項 1 1 5】

配列番号：3 0 2 のアミノ酸配列を含む、少なくとも 1 つの単離されたタンパク質を含む組成物：ここで、

配列中 x はいずれかのアミノ酸であり；

配列中 8 番目のアミノ酸から 1 2 番目のアミノ酸までの領域は、0 から 5 個のいずれかのアミノ酸である。

10

【請求項 1 1 6】

8 番目のアミノ酸から 1 2 番目のアミノ酸までの領域が 0 または 5 個のアミノ酸を含む、請求項 1 1 5 に記載の組成物。

【請求項 1 1 7】

少なくとも 1 つのタンパク質が、質量分析による測定で分子量

約 2 6 , 0 0 0 から約 3 0 , 0 0 0 である、請求項 1 1 5 に記載の組成物。

【請求項 1 1 8】

少なくとも 1 つのタンパク質が、1 0 % - 2 0 % S D S ポリアクリルアミドゲルにおける測定で分子量

約 2 8 - 3 5 k D a である、請求項 1 1 7 に記載の組成物。

20

【請求項 1 1 9】

該組成物が医薬的に受容可能なバッファー、希釈剤、アジュバントまたは担体を付加的に含む、請求項 1 1 5 に記載の組成物。

【請求項 1 2 0】

該組成物が付加的に担体を含む、請求項 1 1 5 に記載の組成物。

【請求項 1 2 1】

該組成物が付加的にアジュバントを含む、請求項 1 1 5 に記載の組成物。

【請求項 1 2 2】

該アジュバントが液体を含む、請求項 1 2 1 に記載の組成物。

【請求項 1 2 3】

タンパク質が脂質化されていない、請求項 1 1 5 に記載の組成物。

30

【請求項 1 2 4】

タンパク質が組換えタンパク質である、請求項 1 1 5 に記載の組成物。

【請求項 1 2 5】

タンパク質が天然の材料から単離される、請求項 1 1 5 に記載の組成物。

【請求項 1 2 6】

該組成物が付加的に多糖を含む、請求項 1 1 5 に記載の組成物。

【請求項 1 2 7】

該組成物が付加的なペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質を含み、該組成物が哺乳類において 2 つまたはそれより多くの細菌に対して免疫応答を惹起する複合体を形成する、請求項 1 1 5 に記載の組成物。

40

【請求項 1 2 8】

以下のいずれかと免疫特異的に結合する少なくとも 1 つの抗体を含む組成物：

( a ) ナイセリア種のオープンリーディングフレーム ( O R F 2 0 8 6 ) によりコードされる少なくとも 1 つのタンパク質であって、該オープンリーディングフレームが交差反応性の免疫原性抗原をコードし、該交差反応性抗原が被験者における髄膜炎菌血清群 B による感染に対して免疫原性を提供するタンパク質；または

( b ) ( a ) に記載の少なくとも 1 つのタンパク質の少なくとも 1 つの免疫原性部分；または

( c ) ( a ) に記載の少なくとも 1 つのタンパク質または ( b ) に記載の 1 つの免疫原性

50

フラグメントの、少なくとも1つの生物学的均等物。

【請求項129】

抗体がモノクローナル抗体である、請求項128に記載の組成物。

【請求項130】

医薬的に受容可能な担体を付加的に含む、請求項128に記載の組成物。

【請求項131】

以下のいずれかと免疫特異的に結合する少なくとも1つの抗体を含む組成物：

(a) 配列番号：254から259のいずれかを含む少なくとも1つのタンパク質；または

(b) (a)に記載の少なくとも1つのタンパク質の少なくとも1つの免疫原性部分；または

(c) (a)に記載の少なくとも1つのタンパク質もしくは(b)に記載の1つの免疫原性フラグメントの、少なくとも1つの生物学的均等物。

【請求項132】

少なくとも1つのタンパク質、その免疫原性部分またはその生物学的均等物が、配列番号：260-299のいずれかを含む、請求項131に記載の組成物。

【請求項133】

少なくとも1つの抗体がモノクローナル抗体である、請求項131に記載の組成物。

【請求項134】

配列番号：300のアミノ酸配列を含む、少なくとも1つの単離されたタンパク質と免疫特異的に結合する、少なくとも1つの抗体を含む組成物：ここで、

配列中xはいずれかのアミノ酸であり；

配列中5番目のアミノ酸から9番目のアミノ酸までの領域は、0から5個のいずれかのアミノ酸であり；

配列中67番目のアミノ酸から69番目のアミノ酸までの領域は、0から3個のいずれかのアミノ酸であり；そして

配列中156番目のアミノ酸は0から1個のいずれかのアミノ酸である。

【請求項135】

少なくとも1つの抗体がモノクローナル抗体である、請求項134に記載の組成物。

【請求項136】

以下のいずれかと免疫特異的に結合する少なくとも1つの抗体を含む組成物：

(a) 配列番号：2-252の偶数番号のいずれかのアミノ酸配列を含む少なくとも1つのタンパク質；

(b) 配列番号：1-253の奇数番号のいずれかの核酸配列を含むポリヌクレオチドと、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドによりコードされる、少なくとも1つのタンパク質；

(c) (a)または(b)に記載の少なくとも1つのタンパク質の少なくとも1つの免疫原性部分；または

(d) (a)または(b)に記載の少なくとも1つのタンパク質または(c)に記載の免疫原性フラグメントの、少なくとも1つの生物学的均等物。

【請求項137】

以下の少なくとも1つのポリヌクレオチドを含む組成物：

(a) ナイセリア種のオープンリーディングフレーム(ORF2086)によりコードされる少なくとも1つのタンパク質、もしくは前記の少なくとも1つのタンパク質の少なくとも1つの免疫原性部分もしくは生物学的均等物をコードするポリヌクレオチドであって、該オープンリーディングフレームが交差反応性の免疫原性抗原をコードし、該交差反応性の免疫原性抗原が被験者における髄膜炎菌血清群Bによる感染に対して免疫原性を提供する、ポリヌクレオチド；または

(b) (a)に記載のポリヌクレオチドのいずれかとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド。

10

20

30

40

50

## 【請求項 138】

P4リーダー配列（配列番号：322）を付加的に含む、請求項137に記載の組成物。

## 【請求項 139】

該組成物がベクターを含む、請求項137に記載の組成物。

## 【請求項 140】

ベクターがプラスミドである、請求項139に記載の組成物。

## 【請求項 141】

ベクターがファージである、請求項139に記載の組成物。

## 【請求項 142】

ストリンジェントな条件が、高いストリンジェンシーのサザンハイブリダイゼーションの条件である、請求項137に記載の組成物。 10

## 【請求項 143】

さらにP4リーダー配列（配列番号：322）を含む、請求項137に記載の組成物。

## 【請求項 144】

ポリヌクレオチドが組換えポリヌクレオチドである、請求項137に記載の組成物。

## 【請求項 145】

ポリヌクレオチドが天然の材料から単離される、請求項137に記載の組成物。

## 【請求項 146】

該組成物が、付加的なペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質をコードする核酸配列を付加的に含む、請求項137に記載の組成物。 20

## 【請求項 147】

以下の少なくとも1つのポリヌクレオチドを含む組成物：

（a）配列番号：254 - 259、260 - 278もしくは279 - 299のいずれかを含む単離された少なくとも1つのタンパク質をコードするポリヌクレオチド、または（b）（a）に記載のポリヌクレオチドのいずれかとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド。

## 【請求項 148】

P4リーダー配列（配列番号：322）を付加的に含む、請求項147に記載の組成物。

## 【請求項 149】

該組成物がベクターを含む、請求項147に記載の組成物。 30

## 【請求項 150】

ストリンジェントな条件が、高いストリンジェンシーのサザンハイブリダイゼーションの条件である、請求項147に記載の組成物。

## 【請求項 151】

P4リーダー配列（配列番号：322）をさらに含む、請求項147に記載の組成物。

## 【請求項 152】

ポリヌクレオチドが組換えポリヌクレオチドである、請求項147に記載の組成物。

## 【請求項 153】

ポリヌクレオチドが天然の材料から単離される、請求項147に記載の組成物。

## 【請求項 154】

該組成物が、付加的なペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質をコードする核酸配列を付加的に含む、請求項147に記載の組成物。 40

## 【請求項 155】

以下の少なくとも1つのポリヌクレオチドを含む組成物：

（a）配列番号：300のアミノ酸配列を含む少なくとも1つのタンパク質をコードするポリヌクレオチドであって、xはいずれかのアミノ酸であり、5番目のアミノ酸から9番目のアミノ酸までの領域は、0から5個のいずれかのアミノ酸であり、67番目のアミノ酸から69番目のアミノ酸までの領域は、0から3個のいずれかのアミノ酸であり；そして156番目のアミノ酸は0から1個のいずれかのアミノ酸である、ポリヌクレオチド、または、 50

(b)(a)に記載のポリヌクレオチドのいずれかとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド。

【請求項156】

P4リーダー配列(配列番号:322)を付加的に含む、請求項155に記載の組成物。

【請求項157】

以下を含む組成物:

(a)以下の少なくとも1つをコードする少なくとも1つのポリヌクレオチド:(i)配列番号2-252の偶数番号のいずれかのアミノ酸配列を含む少なくとも1つのタンパク質;(ii)配列番号1-253の奇数番号のいずれかの核酸配列を含むポリヌクレオチドと、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドによりコードされる少なくとも1つのタンパク質、(iii)(i)または(ii)に記載の少なくとも1つのタンパク質の少なくとも1つの免疫原性部分;もしくは(iv)(i)もしくは(ii)に記載の少なくとも1つのタンパク質または(iii)に記載の免疫原性フラグメントの、少なくとも1つの生物学的均等物、または  
(b)(a)に記載のポリヌクレオチドのいずれかと、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする少なくとも1つのポリヌクレオチド。

10

【請求項158】

前記の少なくとも1つのポリヌクレオチドが、配列番号1-253の奇数番号のいずれかの核酸配列を含む、請求項157に記載の組成物。

【請求項159】

該組成物がベクターを含む、請求項157に記載の組成物。

20

【請求項160】

ストリンジェントな条件が、高いストリンジェンシーのサザンハイブリダイゼーションの条件である、請求項157に記載の組成物。

【請求項161】

該組成物が、付加的なペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質をコードする核酸配列を付加的に含む、請求項157に記載の組成物。

【請求項162】

以下を含む組成物:

(a)ナイセリア種の第1の細菌株の少なくとも1つの抗原であって、ナイセリア種の第2の細菌株による被験者の感染に対して免疫原性を提供する該抗原をコードする、少なくとも1つのポリヌクレオチド;または  
(b)(a)の少なくとも1つのポリヌクレオチドと、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする少なくとも1つのポリヌクレオチド。

30

【請求項163】

前記の少なくとも1つの単離されたポリヌクレオチドが、配列番号:1-253の奇数番号のいずれかの核酸配列を含む、請求項162に記載の組成物。

【請求項164】

P4リーダー配列(配列番号:322)を付加的に含む、請求項162に記載の組成物。

【請求項165】

該組成物がベクターを含む、請求項162に記載の組成物。

40

【請求項166】

ストリンジェントな条件が、高いストリンジェンシーのサザンハイブリダイゼーションの条件である、請求項162に記載の組成物。

【請求項167】

該組成物が、付加的なペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質をコードする核酸配列を付加的に含む、請求項162に記載の組成物。

【請求項168】

以下のいずれかを含むベクターを含む組成物:

(a)配列番号:254-259、260-278もしくは279-299のいずれかの

50

アミノ酸配列を含む、少なくとも1つのタンパク質；または

(b)(a)に記載の少なくとも1つのタンパク質の少なくとも1つの免疫原性部分；または

(c)(a)に記載の少なくとも1つのタンパク質もしくは(b)に記載の免疫原性フラグメントの、少なくとも1つの生物学的均等物。

【請求項169】

ベクターがプラスミドである、請求項168に記載の組成物。

【請求項170】

ベクターがファージである、請求項168に記載の組成物。

【請求項171】

ベクターがバクテリオファージである、請求項168に記載の組成物。

【請求項172】

ベクターが緩和ファージ(moderate phage)である、請求項168に記載の組成物。

【請求項173】

配列番号：300のアミノ酸配列を含むタンパク質をコードする少なくとも1つのポリヌクレオチドを含むベクターを含む組成物：ここで、

配列中xはいずれかのアミノ酸であり；

配列中5番目のアミノ酸から9番目のアミノ酸までの領域は、0から5個のいずれかのアミノ酸であり；

配列中67番目のアミノ酸から69番目のアミノ酸までの領域は、0から3個のいずれかのアミノ酸であり；そして

配列中156番目のアミノ酸は、0から1個のいずれかのアミノ酸である。

【請求項174】

ベクターがプラスミドである、請求項173に記載の組成物。

【請求項175】

ベクターがファージである、請求項173に記載の組成物。

【請求項176】

以下のいずれかを含むベクターを含む組成物：

(a)配列番号：2-252の偶数番号のポリペプチドの少なくとも1つをコードする少なくとも1つのポリヌクレオチド；または

(b)(a)に記載の少なくとも1つのポリヌクレオチドの少なくとも1つと、ストリンジентな条件下でハイブリダイズする少なくとも1つのポリヌクレオチド。

【請求項177】

ベクターが配列番号：1-153のいずれかの核酸配列を含む、請求項176に記載の組成物。

【請求項177】

ベクターがプラスミドである、請求項176に記載の組成物。

【請求項178】

ベクターがファージである、請求項176に記載の組成物。

【請求項179】

ベクターがバクテリオファージである、請求項176に記載の組成物。

【請求項180】

ベクターが緩和ファージ(moderate phage)である、請求項176に記載の組成物。

【請求項181】

ベクターで形質転換/トランスフェクトまたは感染させた宿主細胞を含む組成物であって、該ベクターが以下のいずれかを含む組成物：

(a)ナイセリア種のオープンリーディングフレーム(ORF2086)によりコードされる少なくとも1つのタンパク質であって、該オープンリーディングフレームが交差反応性の免疫原性抗原をコードし、該交差反応性免疫原性抗原が被験者における髄膜炎菌血清群Bによる感染に対して免疫原性を提供するタンパク質；または

10

20

30

40

50

(b)(a)に記載の少なくとも1つのタンパク質の少なくとも1つの免疫原性部分；または

(c)(a)に記載の少なくとも1つのタンパク質または(b)に記載の免疫原性フラグメントの、少なくとも1つの生物学的均等物。

【請求項182】

ベクターで形質転換/トランスフェクトまたは感染させた宿主細胞を含む組成物であって、該ベクターが以下のいずれかを含む該組成物：

(a)配列番号：254-259、260-278または279-299のいずれかを含む少なくとも1つのタンパク質；または

(b)(a)に記載の少なくとも1つのタンパク質の少なくとも1つの免疫原性部分；または

(c)(a)に記載の少なくとも1つのタンパク質もしくは(b)に記載の免疫原性フラグメントの、少なくとも1つの生物学的均等物。

【請求項183】

以下のいずれかをコードする核酸を宿主細胞で発現させることを含む過程により調製される組成物：

(a)ナイセリア種のオープンリーディングフレーム(ORF2086)によりコードされる少なくとも1つのタンパク質であって、該オープンリーディングフレームが交差反応性の免疫原性抗原をコードし、該交差反応性免疫原性抗原が被験者における髄膜炎菌血清群Bによる感染に対して免疫原性を提供する、タンパク質；または

(b)(a)に記載の少なくとも1つのタンパク質の少なくとも1つの免疫原性部分；または

(c)(a)に記載の少なくとも1つのタンパク質もしくは(b)に記載の免疫原性フラグメントの、少なくとも1つの生物学的均等物。

【請求項184】

核酸配列が配列番号：1-253の奇数番号のいずれかである、請求項183に記載の組成物。

【請求項185】

核酸配列が配列番号：2-252の偶数番号のいずれかを含むタンパク質をコードする、請求項183に記載の組成物。

【請求項186】

核酸配列が配列番号：2-174の偶数番号のいずれかを含むタンパク質をコードする、請求項183に記載の組成物。

【請求項187】

タンパク質が、質量分析による測定で分子量約26,000から約30,000である、請求項183に記載の組成物。

【請求項188】

タンパク質が、10%-20%SDSポリアクリルアミドゲルにおける測定で分子量約28-35kDaである、請求項187に記載の組成物。

【請求項189】

該組成物が医薬的に受容可能なバッファー、希釈剤、アジュバントまたは担体を付加的に含む、請求項183に記載の組成物。

【請求項190】

該組成物が付加的に担体を含む、請求項183に記載の組成物。

【請求項191】

該組成物が付加的にアジュバントを含む、請求項183に記載の組成物。

【請求項192】

該アジュバントが液体である、請求項191に記載の組成物。

【請求項193】

タンパク質が脂質化されたタンパク質である、請求項183に記載の組成物。

10

20

30

40

50

## 【請求項 194】

以下のいずれかをナイセリア種から単離、精製することを含む過程により調製される組成物：

(a) ナイセリア種のオープンリーディングフレーム (ORF 2086) によりコードされる少なくとも1つのタンパク質であって、該オープンリーディングフレームが交差反応性の免疫原性抗原をコードし、該交差反応性免疫原性抗原が被験者における髄膜炎菌血清群 B による感染に対して免疫原性を提供する、タンパク質；または

(b) (a) に記載の少なくとも1つのタンパク質の少なくとも1つの免疫原性部分；または

(c) (a) に記載の少なくとも1つのタンパク質もしくは (b) に記載の免疫原性フラグメントの、少なくとも1つの生物学的均等物。

10

## 【請求項 195】

少なくとも1つのポリヌクレオチドが、配列番号：1 - 253 の奇数番号のいずれかの核酸配列を含む、請求項 194 に記載の組成物。

## 【請求項 196】

過程が、少なくとも1つの単離されたポリヌクレオチドに天然ではないリーダー配列を導入することをさらに含む、請求項 194 に記載の組成物。

## 【請求項 197】

天然ではないリーダー配列が P4 リーダー配列 (配列番号：322) である、請求項 196 に記載の組成物。

20

## 【請求項 198】

以下のいずれかをナイセリア種から単離、精製することを含む過程により製造される組成物：

(a) 配列番号：254 - 259、260 - 278 または 279 - 299 のいずれかを含む、少なくとも1つのタンパク質；または

(b) (a) に記載の少なくとも1つのタンパク質の少なくとも1つの免疫原性部分；または

(c) (a) に記載の少なくとも1つのタンパク質もしくは (b) に記載の免疫原性フラグメントの、少なくとも1つの生物学的均等物。

## 【請求項 199】

ポリペプチドが、質量分析による測定で分子量約 26,000 から約 30,000 である、請求項 198 に記載の組成物。

30

## 【請求項 200】

ポリペプチドが、10% - 20% SDS ポリアクリルアミドゲルにおける測定で分子量約 28 - 35 kDa である、請求項 199 に記載の組成物。

## 【請求項 201】

該組成物が医薬的に受容可能なバッファー、希釈剤、アジュバントまたは担体を付加的に含む、請求項 198 に記載の組成物。

## 【請求項 202】

該組成物が付加的に担体を含む、請求項 198 に記載の組成物。

40

## 【請求項 203】

該組成物が付加的にアジュバントを含む、請求項 198 に記載の組成物。

## 【請求項 204】

該アジュバントが液体を含む、請求項 203 に記載の組成物。

## 【請求項 205】

タンパク質が脂質化されたタンパク質である、請求項 198 に記載の組成物。

## 【請求項 206】

配列番号：300 のアミノ酸配列を含む少なくとも1つの単離されたタンパク質をベクター中に挿入することを含む過程により製造される組成物：ここで、配列中 x はいずれかのアミノ酸であり；

50

配列中 5 番目のアミノ酸から 9 番目のアミノ酸までの領域は、0 から 5 個のいずれかのアミノ酸であり；

配列中 6 7 番目のアミノ酸から 6 9 番目のアミノ酸までの領域は、0 から 3 個のいずれかのアミノ酸であり；そして

配列中 1 5 6 番目のアミノ酸は、0 から 1 個のいずれかのアミノ酸である。

【請求項 2 0 7】

ベクターがプラスミドである、請求項 2 0 6 に記載の組成物。

【請求項 2 0 8】

ベクターがファージである、請求項 2 0 6 に記載の組成物。

【請求項 2 0 9】

ベクターがバクテリオファージである、請求項 2 0 6 に記載の組成物。

【請求項 2 1 0】

ベクターが緩和ファージ(moderate phage)である、請求項 2 0 6 に記載の組成物。

【請求項 2 1 1】

天然ではないリーダー配列をさらに含む、請求項 2 0 6 に記載の組成物。

【請求項 2 1 2】

天然ではないリーダー配列が P 4 リーダー配列（配列番号：3 2 2）である、請求項 2 1 1 に記載の組成物。

【請求項 2 1 3】

以下を宿主細胞で発現させること含む過程により製造される組成物：

( a ) ナイセリア種のオープンリーディングフレーム（ORF 2 0 8 6）によりコードされる少なくとも 1 つのタンパク質、または前記の少なくとも 1 つのタンパク質の少なくとも 1 つの免疫原性部分または生物学的均等物をコードする少なくとも 1 つの単離されたポリヌクレオチドであって、該オープンリーディングフレームが交差反応性の免疫原性抗原をコードし、該交差反応性免疫原性抗原が被験者における髄膜炎菌血清群 B による感染に対して免疫原性を提供する、ポリヌクレオチド、および ( b ) 前記の少なくとも 1 つの単離されたポリヌクレオチドに結合する、天然ではないリーダー配列。

【請求項 2 1 4】

天然ではないリーダー配列が P 4 リーダー配列（配列番号：3 2 2）である、請求項 2 1 3 に記載の組成物。

【請求項 2 1 5】

以下を含む過程により製造される組成物：

以下のいずれかをコードする核酸配列を宿主細胞で発現させること：

( a ) ナイセリア種のオープンリーディングフレーム（ORF 2 0 8 6）によりコードされる少なくとも 1 つのタンパク質であって、該オープンリーディングフレームが交差反応性の免疫原性抗原をコードし、該交差反応性免疫原性抗原が被験者における髄膜炎菌血清群 B による感染に対して免疫原性を提供する、タンパク質；もしくは

( b ) ( a ) に記載の少なくとも 1 つのタンパク質の少なくとも 1 つの免疫原性部分；もしくは

( c ) ( a ) に記載の少なくとも 1 つのタンパク質もしくは ( b ) に記載の免疫原性フラグメントの、少なくとも 1 つの生物学的均等物；または  
前述の核酸配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸配列を宿主細胞で発現させること。

【請求項 2 1 6】

核酸配列が配列番号：1 - 2 5 3 の奇数番号のいずれかである、請求項 2 1 5 に記載の組成物。

【請求項 2 1 7】

核酸配列が配列番号：2 - 2 5 2 の偶数番号のいずれかをコードする、請求項 2 1 5 に記載の組成物。

【請求項 2 1 8】

10

20

30

40

50



タンパク質が、質量分析による測定で分子量

約 26,000 から約 30,000 である、請求項 215 に記載の組成物。

【請求項 219】

タンパク質が、10% - 20% SDS ポリアクリルアミドゲルにおける測定で分子量

約 28 - 35 kDa である、請求項 218 に記載の組成物。

【請求項 220】

該組成物が医薬的に受容可能なバッファー、希釈剤、アジュバントまたは担体を付加的に含む、請求項 215 に記載の組成物。

【請求項 221】

該組成物が付加的に担体を含む、請求項 215 に記載の組成物。

10

【請求項 222】

該組成物が付加的にアジュバントを含む、請求項 215 に記載の組成物。

【請求項 223】

該アジュバントが液体を含む、請求項 222 に記載の組成物。

【請求項 224】

ストリンジェントな条件が、高いストリンジェンシーのサザンハイブリダイゼーションの条件である、請求項 215 に記載の組成物。

【請求項 225】

以下のいずれかをナイセリア種から単離、精製することを含む過程により製造される組成物：

20

(a) 配列番号：2 - 252 の偶数番号のいずれかのアミノ酸配列を含む少なくとも 1 つのポリペプチドをコードする少なくとも 1 つのポリヌクレオチド；または

(b) (a) の少なくとも 1 つのポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズする少なくとも 1 つのポリヌクレオチド。

【請求項 226】

少なくとも 1 つのポリヌクレオチドが、配列番号：1 - 253 の奇数番号のいずれかの核酸配列を含む、請求項 225 に記載の組成物。

【請求項 227】

過程が、少なくとも 1 つのポリヌクレオチドに天然ではないリーダー配列を導入することをさらに含む、請求項 225 に記載の組成物。

30

【請求項 228】

天然ではないリーダー配列が P4 リーダー配列（配列番号：322）である、請求項 227 に記載の組成物。

【請求項 229】

以下のいずれかをナイセリア種から単離、精製することを含む過程により調製される組成物：

(a) 配列番号：2 - 252 の偶数番号のいずれかのアミノ酸配列を含む、少なくとも 1 つのタンパク質；

(b) 配列番号：1 - 253 の奇数番号のいずれかの核酸配列を含むポリヌクレオチドと、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドによりコードされる、少なくとも 1 つのタンパク質；

40

(c) (a) もしくは (b) に記載の少なくとも 1 つのタンパク質の少なくとも 1 つの免疫原性部分；または

(d) (a) もしくは (b) に記載の少なくとも 1 つのタンパク質もしくは (c) に記載の免疫原性フラグメント、の少なくとも 1 つの生物学的均等物。

【請求項 230】

タンパク質が、質量分析による測定で分子量

約 26,000 から約 30,000 である、請求項 229 に記載の組成物。

【請求項 231】

50

タンパク質が、10% - 20% SDS ポリアクリルアミドゲルにおける測定で分子量約 28 - 35 kDa である、請求項 230 に記載の組成物。

【請求項 232】

該組成物が医薬的に受容可能なバッファー、希釈剤、アジュバントまたは担体を付加的に含む、請求項 229 に記載の組成物。

【請求項 233】

該組成物が付加的に担体を含む、請求項 229 に記載の組成物。

【請求項 234】

該組成物が付加的にアジュバントを含む、請求項 229 に記載の組成物。

【請求項 235】

該アジュバントが液体を含む、請求項 234 に記載の組成物。

【請求項 236】

ストリンジェントな条件が、高いストリンジェンシーのサザンハイブリダイゼーションの条件である、請求項 229 に記載の組成物。

【請求項 237】

以下のいずれかをベクターに挿入することを含む過程により調製される組成物：

(a) 配列番号：2 - 252 の偶数番号のいずれかを含む少なくとも 1 つのポリペプチドをコードする少なくとも 1 つの単離されたポリヌクレオチド；または

(b) (a) の少なくとも 1 つのポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズする少なくとも 1 つの単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 238】

ベクターがプラスミドである、請求項 237 に記載の組成物。

【請求項 239】

ベクターがファージである、請求項 237 に記載の組成物。

【請求項 240】

ベクターがバクテリオファージである、請求項 237 に記載の組成物。

【請求項 241】

ベクターが緩和ファージ (moderate phage) である、請求項 237 に記載の組成物。

【請求項 242】

天然ではないリーダー配列をさらに含む、請求項 237 に記載の組成物。

【請求項 243】

天然ではないリーダー配列が P4 リーダー配列 (配列番号：322) である、請求項 242 に記載の組成物。

【請求項 244】

以下のポリヌクレオチドの少なくとも 1 つを宿主細胞で発現させること含む過程により調製される組成物：

(a) ナイセリア種のオープンリーディングフレーム (ORF 2086) によりコードされる少なくとも 1 つのタンパク質、または前記の少なくとも 1 つのタンパク質の少なくとも 1 つの免疫原性部分または生物学的均等物をコードするポリヌクレオチドであって、該オープンリーディングフレームが交差反応性の免疫原性抗原をコードし、該交差反応性免疫原性抗原が被験者における髄膜炎菌血清群 B による感染に対して免疫原性を提供する、ポリヌクレオチド、および

(b) (a) に記載のポリヌクレオチドのいずれかとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド。

【請求項 246】

前記の少なくとも 1 つのポリヌクレオチドに結合する天然ではないリーダー配列を付加的に含む、請求項 244 に記載の組成物。

【請求項 246】

天然ではないリーダー配列が P4 リーダー配列 (配列番号：322) である、請求項 245 に記載の組成物。

10

20

30

40

50

## 【請求項 247】

少なくとも1つの免疫原性の菌株非特異的髄膜炎菌抗原であって、非病原性でいかなる感染性不純物も実質的に含まない該抗原を含む組成物。

## 【請求項 248】

抗原が、配列番号：2 - 6の偶数番号のいずれかと少なくとも約70%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項247に記載の抗原。

## 【請求項 249】

抗原が、配列番号：8 - 12の偶数番号のいずれかと少なくとも約70%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項247に記載の抗原。

## 【請求項 250】

抗原が、配列番号：14 - 18の偶数番号のいずれかと少なくとも約70%のアミノ酸配列が同一であるアミノ酸配列を含む、請求項247に記載の抗原。

## 【請求項 251】

抗原が、配列番号：20 - 24の偶数番号のいずれかと少なくとも約70%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項247に記載の抗原。

## 【請求項 252】

抗原が、配列番号：26 - 30の偶数番号のいずれかと少なくとも約70%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項247に記載の抗原。

## 【請求項 253】

抗原が、配列番号：32 - 36の偶数番号のいずれかと少なくとも約70%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項247に記載の抗原。

## 【請求項 254】

抗原が、配列番号：38 - 42の偶数番号のいずれかと少なくとも約70%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項247に記載の抗原。

## 【請求項 255】

抗原が、配列番号：44 - 48の偶数番号のいずれかと少なくとも約70%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項247に記載の抗原。

## 【請求項 256】

抗原が、配列番号：50 - 54の偶数番号のいずれかと少なくとも約70%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項247に記載の抗原。

## 【請求項 257】

抗原が、配列番号：56 - 60の偶数番号のいずれかと少なくとも約70%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項247に記載の抗原。

## 【請求項 258】

抗原が、配列番号：62 - 66の偶数番号のいずれかと少なくとも約70%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項247に記載の抗原。

## 【請求項 259】

抗原が、配列番号：68 - 72の偶数番号のいずれかと少なくとも約70%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項247に記載の抗原。

## 【請求項 260】

抗原が、配列番号：74 - 78の偶数番号のいずれかと少なくとも約70%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項247に記載の抗原。

## 【請求項 261】

抗原が、配列番号：80 - 84の偶数番号のいずれかと少なくとも約70%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項247に記載の抗原。

## 【請求項 262】

抗原が、配列番号：86 - 90の偶数番号のいずれかと少なくとも約70%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項247に記載の抗原。

## 【請求項 263】

抗原が、配列番号：92 - 96の偶数番号のいずれかと少なくとも約70%のアミノ酸配

10

20

30

40

50

列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 2 4 7 に記載の抗原。

【請求項 2 6 4】

抗原が、配列番号：9 8 - 1 0 2 の偶数番号のいずれかと少なくとも約 7 0 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 2 4 7 に記載の抗原。

【請求項 2 6 5】

抗原が、配列番号：1 0 4 - 1 0 8 の偶数番号のいずれかと少なくとも約 7 0 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 2 4 7 に記載の抗原。

【請求項 2 6 6】

抗原が、配列番号：1 1 0 - 1 1 4 の偶数番号のいずれかと少なくとも約 7 0 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 2 4 7 に記載の抗原。

10

【請求項 2 6 7】

抗原が、配列番号：1 1 6 - 1 2 0 の偶数番号のいずれかと少なくとも約 7 0 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 2 4 7 に記載の抗原。

【請求項 2 6 8】

抗原が、配列番号：1 2 2 - 1 2 6 の偶数番号のいずれかと少なくとも約 7 0 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 2 4 7 に記載の抗原。

【請求項 2 6 9】

抗原が、配列番号：1 2 8 - 1 3 2 の偶数番号のいずれかと少なくとも約 7 0 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 2 4 7 に記載の抗原。

【請求項 2 7 0】

抗原が、配列番号：1 3 4 - 1 3 8 の偶数番号のいずれかと少なくとも約 7 0 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 2 4 7 に記載の抗原。

20

【請求項 2 7 1】

抗原が、配列番号：1 4 0 - 1 4 4 の偶数番号のいずれかと少なくとも約 7 0 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 2 4 7 に記載の抗原。

【請求項 2 7 2】

抗原が、配列番号：1 4 6 - 1 5 0 の偶数番号のいずれかと少なくとも約 7 0 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 2 4 7 に記載の抗原。

【請求項 2 7 3】

抗原が、配列番号：1 5 2 - 1 5 6 の偶数番号のいずれかと少なくとも約 7 0 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 2 4 7 に記載の抗原。

30

【請求項 2 7 4】

抗原が、配列番号：1 5 8 - 1 6 2 の偶数番号のいずれかと少なくとも約 7 0 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 2 4 7 に記載の抗原。

【請求項 2 7 5】

抗原が、配列番号：1 6 4 - 1 6 8 の偶数番号のいずれかと少なくとも約 7 0 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 2 4 7 に記載の抗原。

【請求項 2 7 6】

抗原が、配列番号：1 7 0 - 1 7 4 の偶数番号のいずれかと少なくとも約 7 0 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 2 4 7 に記載の抗原。

40

【請求項 2 7 7】

抗原が、配列番号：1 7 6 - 1 8 0 の偶数番号のいずれかと少なくとも約 7 0 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 2 4 7 に記載の抗原。

【請求項 2 7 8】

抗原が、配列番号：1 8 2 - 1 8 6 の偶数番号のいずれかと少なくとも約 7 0 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 2 4 7 に記載の抗原。

【請求項 2 7 9】

抗原が、配列番号：1 8 8 - 1 9 2 の偶数番号のいずれかと少なくとも約 7 0 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 2 4 7 に記載の抗原。

【請求項 2 8 0】

50

抗原が、配列番号：194 - 198の偶数番号のいずれかと少なくとも約70%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項247に記載の抗原。

【請求項281】

抗原が、配列番号：200 - 204の偶数番号のいずれかと少なくとも約70%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項247に記載の抗原。

【請求項282】

抗原が、配列番号：206 - 210の偶数番号のいずれかと少なくとも約70%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項247に記載の抗原。

【請求項283】

抗原が、配列番号：212 - 216の偶数番号のいずれかと少なくとも約70%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項247に記載の抗原。

10

【請求項284】

抗原が、配列番号：218 - 222の偶数番号のいずれかと少なくとも約70%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項247に記載の抗原。

【請求項285】

抗原が、配列番号：224 - 228の偶数番号のいずれかと少なくとも約70%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項247に記載の抗原。

【請求項286】

抗原が、配列番号：230 - 234の偶数番号のいずれかと少なくとも約70%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項247に記載の抗原。

20

【請求項287】

抗原が、配列番号：236 - 240の偶数番号のいずれかと少なくとも約70%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項247に記載の抗原。

【請求項288】

抗原が、配列番号：242 - 246の偶数番号のいずれかと少なくとも約70%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項247に記載の抗原。

【請求項289】

抗原が、配列番号：248 - 252の偶数番号のいずれかと少なくとも約70%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項247に記載の抗原。

【請求項290】

哺乳類の免疫応答を惹起するための薬剤の製造における、請求項1 - 289のいずれかに記載の組成物の使用。

30

【請求項291】

該組成物を非経口的に投与する、請求項290の記載による使用。

【請求項292】

該組成物を粘膜から投与する、請求項290の記載による使用。

【請求項293】

哺乳類の細菌性髄膜炎に対して有効な薬剤における、請求項1 - 289のいずれかに記載の組成物の使用。

【請求項294】

該組成物を非経口的に投与する、請求項293の記載による組成物の使用。

40

【請求項295】

該組成物を粘膜から投与する、請求項293の記載による組成物の使用。

【請求項296】

該組成物を皮下注または筋注により投与する、請求項293の記載による組成物の使用。

【請求項297】

以下のいずれかをコードする核酸配列を宿主細胞で発現させることを含む組成物の調製法：

(a) ナイセリア種のオープンリーディングフレーム(ORF2086)によりコードされる少なくとも1つのタンパク質であって、該オープンリーディングフレームが交差反応

50

性の免疫原性抗原をコードし、該交差反応性免疫原性抗原が被験者における髄膜炎菌血清群 B による感染に対して免疫原性を提供するタンパク質；または

(b) (a) に記載の少なくとも 1 つのタンパク質の少なくとも 1 つの免疫原性部分；または

(c) (a) に記載の少なくとも 1 つのタンパク質もしくは (b) に記載の 1 つの免疫原性フラグメントの、少なくとも 1 つの生物学的均等物。

【請求項 298】

核酸配列を *in vivo* で発現させる、請求項 297 に記載の方法。

【請求項 299】

核酸配列を *in vitro* で発現させる、請求項 297 に記載の方法。

10

【請求項 300】

P4 リーダー配列 (配列番号：322) を結合することをさらに含む、請求項 297 に記載の方法。

【請求項 301】

少なくとも 1 つのタンパク質が配列番号：254 - 299 のいずれかを含む、請求項 297 に記載の方法。

【請求項 302】

以下のポリヌクレオチドの少なくとも 1 つを髄膜炎菌から単離、精製することを含む組成物の調製法：

(a) ナイセリア種のオープンリーディングフレーム (ORF 2086) によりコードされる少なくとも 1 つのタンパク質、または前記の少なくとも 1 つのタンパク質の少なくとも 1 つの免疫原性部分または生物学的均等物をコードするポリヌクレオチドであって、該オープンリーディングフレームが交差反応性の免疫原性抗原をコードし、該交差反応性免疫原性抗原が被験者における髄膜炎菌血清群 B による感染に対して免疫原性を提供する、ポリヌクレオチド；または

20

(b) (a) に記載のポリヌクレオチドのいずれかと、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド。

【請求項 303】

ストリンジェントな条件が、高いストリンジェンシーのサザンハイブリダイゼーションの条件である、請求項 302 に記載の組成物。

30

【請求項 304】

タンパク質、免疫原性部分または生物学的均等物のいずれかをナイセリア種から単離、精製することを含む、組成物の調製法。

【請求項 305】

本請求項に記載のタンパク質、免疫原性部分または生物学的均等物のいずれかを含む組成物を動物に導入した後、同動物から抗体を回収することを含む、抗体組成物の調製法。

【請求項 306】

請求項 1 - 289 の組成物の 1 つまたはそれより多くの有効量を哺乳類に投与することを含む、同哺乳類における免疫応答を惹起する方法。

【請求項 307】

該組成物を非経口的に投与する、請求項 306 の記載による使用。

40

【請求項 308】

該組成物を粘膜から投与する、請求項 306 の記載による使用。

【請求項 309】

請求項 1 - 298 の組成物の 1 つまたはそれ以上の有効量を哺乳類に投与することを含む、同哺乳類における細菌性髄膜炎を予防または治療する方法。

【請求項 310】

該組成物を非経口的に投与する、請求項 309 の記載による使用。

【請求項 311】

該組成物を粘膜から投与する、請求項 309 の記載による使用。

50

## 【請求項 3 1 2】

該組成物を皮下注または筋注により投与する、請求項 3 0 9 の記載による組成物の使用。

## 【請求項 3 1 3】

以下を含む哺乳類における細菌性髄膜炎を予防または治療する方法：

配列番号：2 - 2 5 2 の偶数番号のいずれかまたは配列番号：2 5 4 - 2 9 9 のいずれかのアミノ酸配列を含む、タンパク質、免疫原性部分または生物学的均等物と免疫特異的に結合する抗体を含む抗体組成物の有効量を同哺乳類に投与すること。

## 【請求項 3 1 3】

該組成物を非経口的に投与する、請求項 3 1 2 の記載による使用。

## 【請求項 3 1 4】

該組成物を粘膜から投与する、請求項 3 1 2 の記載による使用。

## 【請求項 3 1 5】

該組成物を皮下注または筋注により投与する、請求項 3 1 2 の記載による組成物の使用。

## 【請求項 3 1 6】

以下のいずれかをコードする核酸配列を宿主細胞で発現させること  
を含む組成物の調製法：

( a ) 配列番号：2 - 2 5 2 の偶数番号のいずれか、または配列番号：2 5 4 - 2 9 9 のいずれかのアミノ酸配列を含む、少なくとも 1 つのタンパク質；

( b ) 配列番号：1 - 2 5 3 の奇数番号のいずれかの核酸配列を含むポリヌクレオチドと、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドによりコードされる、少なくとも 1 つのタンパク質；

( c ) ( a ) もしくは ( b ) に記載の少なくとも 1 つのタンパク質の少なくとも 1 つの免疫原性部分；または

( d ) ( a ) もしくは ( b ) に記載の少なくとも 1 つのタンパク質もしくは ( c ) に記載の免疫原性フラグメントの、少なくとも 1 つの生物学的均等物。

## 【請求項 3 1 7】

核酸配列を *in vivo* で発現させる、請求項 3 1 6 に記載の方法。

## 【請求項 3 1 8】

核酸配列を *in vitro* で発現させる、請求項 3 1 6 に記載の方法。

## 【請求項 3 1 9】

ベクターがプラスミドである、請求項 3 1 6 に記載の方法。

## 【請求項 3 2 0】

ベクターがファージである、請求項 3 1 6 に記載の方法。

## 【請求項 3 2 1】

前記の少なくとも 1 つの単離されたポリヌクレオチドに、天然ではないリーダー配列を結合することをさらに含む、請求項 3 1 6 に記載の方法。

## 【請求項 3 2 2】

天然ではないリーダー配列が P 4 リーダー配列 ( 配列番号：2 6 7 ) である、請求項 3 1 6 に記載の方法。

## 【請求項 3 2 3】

配列番号：3 0 0 のアミノ酸配列を含む少なくとも 1 つの単離されたタンパク質をナイセリア種から単離、精製することを含む組成物の調製法：ここで

配列中 x はいずれかのアミノ酸であり；

配列中 5 番目のアミノ酸から 9 番目のアミノ酸までの領域は、0 から 5 個のいずれかのアミノ酸であり；

配列中 6 7 番目のアミノ酸から 6 9 番目のアミノ酸までの領域は、0 から 3 個のいずれかのアミノ酸であり；そして

配列中 1 5 6 番目のアミノ酸は、0 から 1 個のいずれかのアミノ酸である。

## 【請求項 3 2 4】

少なくとも 1 つの単離されたポリヌクレオチドに、天然ではないリーダー配列を導入する

10

20

30

40

50

ことをさらに含む、請求項 3 2 3 に記載の方法。

【請求項 3 2 5】

天然ではないリーダー配列が P 4 リーダー配列（配列番号：3 2 2）である、請求項 3 2 3 に記載の方法。

【請求項 3 2 6】

以下のいずれかをナイセリア種から単離、精製することを含む組成物の調製法：

（a）配列番号：2 - 2 5 2 の偶数番号のいずれかのアミノ酸配列、もしくは配列番号：2 5 4 - 2 5 9、2 6 0 - 2 7 8 もしくは 2 7 9 - 2 9 9 のいずれかのアミノ酸配列を含む、少なくとも 1 つのタンパク質；または

（b）配列番号：1 - 2 5 3 の奇数番号のいずれかの核酸配列を含むポリヌクレオチドと、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドによりコードされる、少なくとも 1 つのタンパク質。

10

【請求項 3 2 7】

ストリンジェントな条件が、高いストリンジェンシーのサザンハイブリダイゼーションの条件である、請求項 3 2 6 に記載の組成物。

【請求項 3 2 8】

以下を含む組成物を動物に導入した後、同動物から抗体を回収することを含む、抗体組成物の調製法：

（a）配列番号：2 - 2 5 2 の偶数番号のいずれかのアミノ酸配列、もしくは配列番号：2 5 4 - 2 5 9、2 6 0 - 2 7 8 もしくは 2 7 9 - 2 9 9 のいずれかのアミノ酸配列を含む、少なくとも 1 つのタンパク質；または

（b）配列番号：1 - 2 5 3 の奇数番号のいずれかのポリヌクレオチドと、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドによりコードされる、少なくとも 1 つのタンパク質。

20

【請求項 3 2 9】

ストリンジェントな条件が、高いストリンジェンシーのサザンハイブリダイゼーションの条件である、請求項 3 2 8 に記載の組成物。

【請求項 3 3 0】

以下の核酸配列を発現する組換え細胞を含む、形質転換/トランスフェクトまたは感染させた細胞株：

（a）配列番号：2 5 4 - 2 5 9、2 6 0 - 2 7 8 もしくは 2 7 9 - 2 9 9 のいずれかのアミノ酸配列を含む、少なくとも 1 つの単離されたタンパク質をコードする核酸配列；または

（b）（a）に記載のポリヌクレオチドのいずれかとストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸配列。

30

【請求項 3 3 1】

以下を含む、形質転換/トランスフェクトまたは感染させた細胞株：

以下の核酸配列を発現する組換え細胞、すなわち（a）ナイセリア種のオープンリーディングフレーム（ORF 2 0 8 6）によりコードされる少なくとも 1 つのタンパク質、もしくは前記の少なくとも 1 つのタンパク質の少なくとも 1 つの免疫原性部分もしくは生物学的均等物をコードする核酸配列であって、該オープンリーディングフレームが交差反応性の免疫原性抗原をコードし、該交差反応性免疫原性抗原が被験者における髄膜炎菌血清群 B による感染に対して免疫原性を提供する、核酸配列、または（b）（a）のポリヌクレオチドのいずれかとストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸配列；または以下をコードする核酸配列を発現する組換え細胞、すなわち（c）（a）もしくは（b）のいずれかによりコードされる少なくとも 1 つのポリペプチド；または（d）配列番号：2 - 2 5 2 の偶数番号のいずれかのアミノ酸配列を含む少なくとも 1 つのポリペプチド。

40

【請求項 3 3 2】

ポリペプチドがモノクローナル抗体である、請求項 3 3 1 に記載の形質転換/トランスフェクトまたは感染させた細胞株。

50



## 【請求項 3 3 3】

組換え細胞がハイブリドームである、請求項 3 3 1 に記載の形質転換/トランスフェクトまたは感染させた細胞株。

## 【請求項 3 3 4】

組換え細胞がトリオームである、請求項 3 3 1 に記載の形質転換/トランスフェクトまたは感染させた細胞株。

## 【請求項 3 3 5】

以下を含む、形質転換/トランスフェクトまたは感染させた細胞株：

以下を含む核酸配列を発現する組換え細胞：

( a ) 配列番号： 2 - 2 5 2 の偶数番号のいずれかを含むタンパク質をコードする少なくとも 1 つのポリヌクレオチド； 10

( b ) 配列番号： 1 - 2 5 3 の奇数番号のいずれかの核酸配列を含む少なくとも 1 つのポリヌクレオチド；

( c ) ( a ) もしくは ( b ) のいずれかとストリンジェントな条件下でハイブリダイズする少なくとも 1 つのポリヌクレオチド；または

以下をコードする核酸配列を発現する組換え細胞：

( d ) ( a )、( b ) もしくは ( c ) によりコードされる少なくとも 1 つのポリペプチド；または

( e ) 配列番号： 2 - 2 5 2 の偶数番号のいずれかのアミノ酸配列を含む少なくとも 1 つのポリペプチド。 20

## 【請求項 3 3 6】

ポリペプチドがモノクローナル抗体である、請求項 3 3 5 に記載の形質転換/トランスフェクトまたは感染させた細胞株。

## 【請求項 3 3 7】

組換え細胞がハイブリドームである、請求項 3 3 5 に記載の形質転換/トランスフェクトまたは感染させた細胞株。

## 【請求項 3 3 8】

組換え細胞がトリオームである、請求項 3 3 5 に記載の形質転換/トランスフェクトまたは感染させた細胞株。 30

## 【請求項 3 3 9】

検査サンプルの殺菌活性を O R F 2 0 8 6 抗血清に対して検出することを含む、免疫原性タンパク質を同定する方法。

## 【請求項 3 4 0】

O R F 2 0 8 6 核酸プローブに対して検査サンプルのポリヌクレオチド検出することを含む、免疫原性タンパク質を同定する方法。

## 【請求項 3 4 1】

実質的に当請求項で述べた組成物。

## 【請求項 3 4 2】

実質的に当請求項で述べた使用。 40

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0 0 0 1】

## 発明の属する技術分野

本発明は、菌株、例えば髄膜炎菌 (*Neisseria meningitidis*) (血清群 A、B、C、D、W - 1 3 5、X、Y、Z および 2 9 E)、淋菌 (*Neisseria gonorrhoeae*)、および *Neisseria lactamica* を含む *ナイセリア* 種の菌株から単離することのできる、*ナイセリア* 属 (*Neisseria*) O R F 2 0 8 6 タンパク質 (サブファミリー A およびサブファミリー B) ならびに該タンパク質の免疫原性部分および/または生物学的均等物に関する。本発明は 50

また、該タンパク質、免疫原性部分および/または生物学的均等物に免疫特異的に結合する抗体にも関する。さらに本発明は、前述のタンパク質、免疫原性部分、生物学的均等物、および/またはその抗体のいずれかをコードする核酸配列を含む、単離されたポリヌクレオチドに関する。加えて本発明は免疫原性組成物および、髄膜炎菌、そして特に髄膜炎菌血清群 B に起因する髄膜炎菌感染の予防、治療および/または診断におけるそれらの使用、ならびに該組成物の製造法に関する。本発明は組換えした型および天然材料から単離された型の双方、ならびに脂質化された型（脂質化型）および脂質化されていない型（非脂質化型）の双方に関する。

#### 【背景技術】

#### 【0002】

#### 発明の背景

髄膜炎菌性髄膜炎は、抗生物質を使用してもなお数時間以内で小児および若年成人を死亡させ得る破壊的な疾患である。Pizza et al., 2000, Science 287: 1816-1820。

髄膜炎は、激しい頭痛、発熱、食欲喪失、光や音に対する不耐、筋肉硬直（特に頸部）、および重篤な場合には痙攣、死に至る嘔吐および下痢をきたす、髄膜の炎症を特徴とする。髄膜炎菌性髄膜炎の症状は突然表れ、最終的には特徴的な出血性発疹を伴う髄膜炎菌性敗血症に至る。何らかの生存のチャンスがあるとすれば、即時の診断および抗生物質の大量投与を含む迅速な治療が重要である。2000, Batam Medical Dictionary, Third Edition 302。

#### 【0003】

髄膜炎菌性髄膜炎は、髄膜炎菌（*Neisseria meningitidis*, the meningococcus）すなわち A、B、C、D、W - 135、X、Y、Z および 29E を含むいくつかの病原性血清群に分類される、グラム陰性のきょう膜を有する細菌に起因する。髄膜炎菌うちの血清群 B 菌株が世界的な髄膜炎菌性疾患の主因である。例えば血清群 B は、米国および欧州在住の新生児および小児における細菌性髄膜炎の約 50% に関与することが、医学文献に報告されている。髄膜炎菌血清群 B に起因する髄膜炎菌性疾患を予防するためのワクチンは、現在はない。

#### 【0004】

血清群 B 髄膜炎菌性疾患を予防するための免疫原性組成物の開発は、Goldschneiderらの仕事以来 30 年以上にわたり研究者らにより試みられてきた。Goldschneider et al., 1969, J. Exp. Med. 129(6): 1307-26; Goldschneider et al., 1969, J. Exp. Med. 129(6): 1327-48; Gotschlich et al., 1969, J. Exp. Med. 129(6): 1385-95; および Gotschlich et al., 1969, J. Exp. Med. 129(6): 1367-84。第二次世界大戦以降、北米から事実上消失した血清群 A による疾患（Achtman, M., 1995, Trends in Microbiology 3(5): 186-92）とは異なり、血清群 B および C の有機体に起因する疾患は、先進国の多くにわたり風土的に残存する。疾患の発病率は、風土病としては少ない地域の 1/100, 000 未満から、流行性疾患として高リスクな母集団にあたる 200/100, 000 までと様々である。

#### 【0005】

多糖の複合体を基本とするワクチンが髄膜炎菌血清群 A および C に対して開発され、疾患の予防に有効なようである。現在、血清群 A、C、Y、& W - 135 由来のきょう膜多糖から作製された免疫原性組成物を入手することができる。Ambrosch et al., Immunogenicity and side-effects of a new tetravalent（新規 4 価物質の免疫原性および副作用）. Bulletin of the World Health Organization 61(2): 317-23。しかしこの免疫原性組成物は T 細胞非依存性の免疫応答を惹起し、年少の小児には有効ではなく、そして髄膜炎菌性疾患の 50% 以上の原因となる血清群 B 菌株への適用はできない。

#### 【0006】

他の研究者もまた、きょう膜多糖を用いての免疫原性組成物の開発を試みてきた。最近、

10

20

30

40

50

血清群Cのきょう膜物質をタンパク質に複合させることにより製造された、血清群C疾患用の免疫原性組成物について、欧州における使用に関するライセンスが取得された。しかし血清群Bのきょう膜は、そのきょう膜の多糖が、ヒトの神経組織の発達に関する糖質部分との類似性をもたらすポリシアル酸を含むため、ワクチンの候補としては不適切となり得る。この糖質部分は自己抗原として認識され、したがってヒトにおける免疫原性は低い。

#### 【0007】

血清群Bによる疾患のためのこれに代わるワクチン抗原として、外膜タンパク質(OMP)が開発されてきた。PorAの2つの変異性の領域に結合するモノクローナル抗体により髄膜炎菌の血清型サブタイプに分類されるスキームが定義される。したがってPorAタンパク質は髄膜炎菌株に関する血清型サブタイプに分類される抗原として提供され (Abdillahi et al., 1988, Microbial Pathogenesis 4(1): 27-32)、血清群Bの免疫原性組成物の成分として盛んに研究されている (Poolman, 1996, Adv. Exp. Med. Biol. 397: 73-7)、というのもこれらは殺菌性抗体を産生できるからである (Saukkonen, 1987, Microbial Pathogenesis 3(4): 261-7)。殺菌性抗体は防護の指標と考えることができ、新たな免疫原性組成物のいかなる候補物質もこれらの機能的な抗体を産生すべきであると考えられる。

10

#### 【0008】

動物と同様ヒトにおける研究も、血清型サブタイプに分類される抗原であるPorAが殺菌性抗体を産生することを示している。しかしPorAに対する免疫応答は一般に血清型サブタイプ特異的である。特に血清型サブタイプに分類されるデータは、PorAから作成される免疫原性組成物は、このような1つの免疫原性組成物の適用できる各血清型サブタイプに対して、1つのPorAが必要であり、おそらく6個から9個程度のPorAが必要となる可能性があることを示す。したがって血清群B菌株の70-80%に適用できるためには、6-9個のPorAが必要となる。このように臨床的に単離された十分な数の髄膜炎菌血清型サブタイプに対して防護するために、このタンパク質の変異性の特性が多価ワクチン組成物を必要とすることになる。

20

#### 【0009】

血清群B髄膜炎菌に関する免疫原性組成物の開発が非常に困難であったため、最近、いくつかの研究グループにより、新たな免疫原性組成物の候補物質を同定する一助とするため、血清群AおよびBの双方の代表的な複数の菌株のゲノムの配列決定が行われた。Tettlin, 2000, Science, 287(5459): 1809-15; Pizza et al., 2000, Science 287: 1816-1820。新たな免疫原性組成物の候補物質を同定することは、ナイセリア属のゲノムの知識があるとしても、適当な数学的アルゴリズムが今のところない挑戦的なプロセスである。事実最近の報告は、理論的に膜をスパンするドメインを含む何百ものオープンリーディングフレーム(“ORFs”)が同定されているにもかかわらず、発現、精製および表面の反応性の誘導、および機能的に活性な抗体を含む問題から、血清群B髄膜炎菌の免疫原性組成物に関して7つの候補物質を導くことしかできなかったことを示している。(Id)参照のこと。これらの1つは、既に知られているものであった。

30

#### 【0010】

したがって、(1)多数のナイセリア菌株に対して殺菌性抗体を産生する；(2)多数の菌株の表面と反応する；(3)実際の攻撃に対して受動的な防護を与える；および/または(4)コロニー化を防ぐ、免疫原性組成物の必要性は依然として残されている。

40

#### 【発明の開示】

##### 【課題を解決するための手段】

#### 【0011】

##### 発明の概要

これらおよびその他の必要性を満たすために、およびその目的を考慮して、本発明は2086サブファミリーAタンパク質および2086サブファミリーBタンパク質を含む、ナイセリアORF2086タンパク質(“2086タンパク質”)を提供する。各2086

50

タンパク質は、髄膜炎菌（血清群 A、B、C、D、W - 135、X、Y、Z および 29E）、淋菌および *Neisseria lactamica* の菌株を含む、天然のナイセリア菌株から単離することのできるタンパク質である。2086 タンパク質はまた組換え技術を用いて製造することもできる。

【0012】

特に本発明は 2086 タンパク質、その免疫原性部分、および/またはその生物学的均等物、前述のいずれかと免疫特異的に結合する抗体、および前述のいずれかをコードする核酸配列を含むポリヌクレオチドを提供する。本発明は組成物、免疫原性組成物、および髄膜炎菌感染、そして特に髄膜炎菌に起因する髄膜炎菌性疾患の予防、治療、および/または診断におけるそれらの使用、ならびに該組成物の製造法を含む。当明細書において 2086 タンパク質は組換えの型および天然材料から単離された型、ならびに脂質化型および非脂質化型の双方を含む。

【0013】

本発明は予想外にそして有益なことに以下の組成物、すなわち（1）多数のナイセリア菌株、例えば髄膜炎菌、淋菌、および/または *Neisseria lactamica* に対して殺菌性抗体を産生する；（2）多数の菌株の表面と反応する；（3）実際の攻撃に対して受動的な防護を与える；（4）コロニー化を防ぐ組成物、ならびに該組成物の使用法および該組成物の製造法を提供する。本発明の様々な態様を以下に述べる。

【0014】

配列の概要

配列番号 検討した配列について：

配列番号：1 天然のリーダー配列を結合させた場合に、L3 6275 菌株由来の成熟 2086 タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。

配列番号：2 天然のリーダー配列を用いて作製される L3 6275 菌株由来の成熟 2086 タンパク質のアミノ酸配列。

配列番号：3 P4リーダー配列を結合させた場合に、L3 6275 由来の成熟 2086 タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。

配列番号：4 P4リーダー配列を用いて作製される L3 6275 菌株由来の成熟 2086 タンパク質のアミノ酸配列。

配列番号：5 L3 6275 菌株由来の成熟 2086 タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。

配列番号：6 L3 6275 菌株由来の成熟 2086 タンパク質のアミノ酸配列。

配列番号：7 天然のリーダー配列を結合させた場合に、CDC 2369 菌株由来の成熟 2086 タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。

配列番号：8 天然のリーダー配列を用いて作製される CDC 2369 菌株由来の成熟 2086 タンパク質のアミノ酸配列。

配列番号：9 P4リーダー配列を結合させた場合に、CDC 2369 由来の成熟 2086 タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。

配列番号：10 P4リーダータンパク質を用いて作製される CDC 2369 菌株由来の成熟 2086 タンパク質のアミノ酸配列。

配列番号：11 CDC 2369 菌株由来の成熟 2086 タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。

配列番号：12 CDC 2369 菌株由来の成熟 2086 タンパク質のアミノ酸配列。

配列番号：13 天然のリーダー配列と結合させた場合に、CDC 1034 菌株由来の成熟 2086 タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。

配列番号：14 天然のリーダータンパク質を用いて作製される CDC 1034 菌株由来の成熟 2086 タンパク質のアミノ酸配列。

配列番号：15 P4リーダー配列を結合させた場合に、CDC 1034 由来の成熟 2086 タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。

配列番号：16 P4リーダータンパク質を用いて作製される CDC 1034 菌株由来の

成熟 2086 タンパク質のアミノ酸配列。

配列番号：17 CDC1034 菌株由来の成熟 2086 タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。

配列番号：18 CDC1034 菌株由来の成熟 2086 タンパク質のアミノ酸配列。

配列番号：19 天然のリーダー配列を結合させた場合に、L4 891 菌株由来の成熟 2086 タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。

配列番号：20 天然のリーダー配列を用いて作製される L4 891 菌株由来の成熟 2086 タンパク質のアミノ酸配列。

配列番号：21 P4 リーダー配列を結合させた場合に、L4 891 由来の成熟 2086 タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。

配列番号：22 P4 リーダー配列を用いて作製される L4 891 菌株由来の成熟 2086 タンパク質のアミノ酸配列。

配列番号：23 L4 891 菌株由来の成熟 2086 タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。

配列番号：24 L4 891 菌株由来の成熟 2086 タンパク質のアミノ酸配列。

配列番号：25 天然のリーダー配列を結合させた場合に、B16B6 菌株由来の成熟 2086 タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。

配列番号：26 天然のリーダー配列を用いて作製される B16B6 菌株由来の成熟 2086 タンパク質のアミノ酸配列。

配列番号：27 P4 リーダー配列を結合させた場合に、B16B6 由来の成熟 2086 タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。

配列番号：28 P4 リーダー配列を用いて作製される B16B6 菌株由来の成熟 2086 タンパク質のアミノ酸配列。

配列番号：29 B16B6 菌株由来の成熟 2086 タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。

配列番号：30 B16B6 菌株由来の成熟 2086 タンパク質のアミノ酸配列。

配列番号：31 天然のリーダー配列を結合させた場合に、W135 (ATCC35559) 菌株由来の成熟 2086 タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。

配列番号：32 天然のリーダー配列を用いて作製される W135 (ATCC35559) 菌株由来の成熟 2086 タンパク質のアミノ酸配列。

配列番号：33 P4 リーダー配列を結合させた場合に、W135 (ATCC35559) 由来の成熟 2086 タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。

配列番号：34 P4 リーダー配列を用いて作製される W135 (ATCC35559) 菌株由来の成熟 2086 タンパク質のアミノ酸配列。

配列番号：35 W135 (ATCC35559) 菌株由来の成熟 2086 タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。

配列番号：36 W135 (ATCC35559) 菌株由来の成熟 2086 タンパク質のアミノ酸配列。

配列番号：37 天然のリーダー配列を結合させた場合に、C11 菌株由来の成熟 2086 タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。

配列番号：38 天然のリーダー配列を用いて作製される C11 菌株由来の成熟 2086 タンパク質のアミノ酸配列。

配列番号：39 P4 リーダー配列を結合させた場合に、C11 由来の成熟 2086 タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。

配列番号：40 P4 リーダー配列を用いて作製される C11 菌株由来の成熟 2086 タンパク質のアミノ酸配列。

配列番号：41 C11 菌株由来の成熟 2086 タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。

配列番号：42 C11 菌株由来の成熟 2086 タンパク質のアミノ酸配列。

配列番号：43 天然のリーダー配列を結合させた場合に、Y (ATCC35561) 菌

10

20

30

40

50

株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。

配列番号：44 天然のリーダー配列を用いて作製されるY(ATCC35561)菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列。

配列番号：45 P4リーダー配列を結合させた場合に、Y(ATCC35561)由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。

配列番号：46 P4リーダー配列を用いて作製されるY(ATCC35561)菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列。

配列番号：47 Y(ATCC35561)菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。

配列番号：48 Y(ATCC35561)菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列。

配列番号：49 天然のリーダー配列を結合させた場合に、M98 250732菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。

配列番号：50 天然のリーダー配列を用いて作製されるM98 250732菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列。

配列番号：51 P4リーダー配列を結合させた場合に、M98 250732由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。

配列番号：52 P4リーダー配列を用いて作製されるM98 250732菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列。

配列番号：53 M98 250732菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。

配列番号：54 M98 250732菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列。

配列番号：55 天然のリーダー配列を結合させた場合に、M98 250771菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。

配列番号：56 天然のリーダー配列を用いて作製されるM98 250771菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列。

配列番号：57 P4リーダー配列を結合させた場合に、M98 250771由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。

配列番号：58 P4リーダー配列を用いて作製されるM98 250771菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列。

配列番号：59 M98 250771菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。

配列番号：60 M98 250771菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列。

配列番号：61 天然のリーダー配列を結合させた場合に、CDC1135菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。

配列番号：62 天然のリーダー配列を用いて作製されるCDC1135菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列。

配列番号：63 P4リーダー配列を結合させた場合に、CDC1135由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。

配列番号：64 P4リーダー配列を用いて作製されるCDC1135菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列。

配列番号：65 CDC1135菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。

配列番号：66 CDC1135菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列。

配列番号：67 天然のリーダー配列を結合させた場合に、M97 252153菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。

配列番号：68 天然のリーダー配列を用いて作製されるM97 252153菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列。

10

20

30

40

50

配列番号：69 P4リーダー配列を結合させた場合に、M97 252153由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。

配列番号：70 P4リーダー配列を用いて作製されるM97 252153菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列。

配列番号：71 M97 252153菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。

配列番号：72 M97 252153菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列。

配列番号：73 天然のリーダー配列を結合させた場合に、CDC1610菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。

10

配列番号：74 天然のリーダー配列を用いて作製されるCDC1610菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列。

配列番号：75 P4リーダー配列を結合させた場合に、CDC1610由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。

配列番号：76 P4リーダー配列を用いて作製されるCDC1610菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列。

配列番号：77 CDC1610菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。

配列番号：78 CDC1610菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列。

配列番号：79 天然のリーダー配列を結合させた場合に、CDC1492菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。

20

配列番号：80 天然のリーダー配列を用いて作製されるCDC1492菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列。

配列番号：81 P4リーダー配列を結合させた場合に、CDC1492由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。

配列番号：82 P4リーダー配列を用いて作製されるCDC1492菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列。

配列番号：83 CDC1492菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。

配列番号：84 CDC1492菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列。

30

配列番号：85 天然のリーダー配列を結合させた場合に、L8 M978菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。

配列番号：86 天然のリーダー配列を用いて作製されるL8 M978菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列。

配列番号：87 P4リーダー配列を結合させた場合に、L8 M978由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。

配列番号：88 P4リーダー配列を用いて作製されるL8 M978菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列。

配列番号：89 L8 M978菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。

40

配列番号：90 L8 M978菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列。

配列番号：91 天然のリーダー配列を結合させた場合に、M97 252988菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。

配列番号：92 天然のリーダー配列を用いて作製されるM97 252988菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列。

配列番号：93 P4リーダー配列を結合させた場合に、M97 252988由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。

配列番号：94 P4リーダー配列を用いて作製されるM97 252988菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列。

配列番号：95 M97 252988菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列

50

をコードする核酸配列。

配列番号：96 M97 252988 菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列。

配列番号：97 天然のリーダー配列を結合させた場合に、M97 252697 菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。

配列番号：98 天然のリーダー配列を用いて作製されるM97 252697 菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列。

配列番号：99 P4リーダー配列を結合させた場合に、M97 252697 由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。

配列番号：100 P4リーダー配列を用いて作製されるM97 252697 菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列。

配列番号：101 M97 252697 菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。

配列番号：102 M97 252697 菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列。

配列番号：103 天然のリーダー配列を結合させた場合に、6577 菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。

配列番号：104 天然のリーダー配列を用いて作製される6577 菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列。

配列番号：105 P4リーダー配列を結合させた場合に、6577 由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。

配列番号：106 P4リーダー配列を用いて作製される6577 菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列。

配列番号：107 6577 菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。

配列番号：108 6577 菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列。

配列番号：109 天然のリーダー配列を結合させた場合に、2996 菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。

配列番号：110 天然のリーダー配列を用いて作製される2996 菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列。

配列番号：111 P4リーダー配列を結合させた場合に、2996 由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。

配列番号：112 P4リーダー配列を用いて作製される2996 菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列。

配列番号：113 2996 菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。

配列番号：114 2996 菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列。

配列番号：115 天然のリーダー配列を結合させた場合に、M97 252976 菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。

配列番号：116 天然のリーダー配列を用いて作製されるM97 252976 菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列。

配列番号：117 P4リーダー配列を結合させた場合に、M97 252976 由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。

配列番号：118 P4リーダー配列を用いて作製されるM97 252976 菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列。

配列番号：119 M97 252976 菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。

配列番号：120 M97 252976 菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列。

配列番号：121 天然のリーダー配列を結合させた場合に、M97 251854 菌株由

10

20

30

40

50



来の成熟 2086 タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。

配列番号：122 天然のリーダー配列を用いて作製される M97 251854 菌株由来の成熟 2086 タンパク質のアミノ酸配列。

配列番号：123 P4リーダー配列を結合させた場合に、M97 251854 由来の成熟 2086 タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。

配列番号：124 P4リーダー配列を用いて作製される M97 251854 菌株由来の成熟 2086 タンパク質のアミノ酸配列。

配列番号：125 M97 251854 菌株由来の成熟 2086 タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。

配列番号：126 M97 251854 菌株由来の成熟 2086 タンパク質のアミノ酸配列。

配列番号：127 天然のリーダー配列を結合させた場合に、CDC1521 菌株由来の成熟 2086 タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。

配列番号：128 天然のリーダー配列を用いて作製される CDC1521 菌株由来の成熟 2086 タンパク質のアミノ酸配列。

配列番号：129 P4リーダー配列を結合させた場合に、CDC1521 由来の成熟 2086 タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。

配列番号：130 P4リーダー配列を用いて作製される CDC1521 菌株由来の成熟 2086 タンパク質のアミノ酸配列。

配列番号：131 CDC1521 菌株由来の成熟 2086 タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。

配列番号：132 CDC1521 菌株由来の成熟 2086 タンパク質のアミノ酸配列。

配列番号：133

天然のリーダー配列を結合させた場合に、M98 250622 菌株由来の成熟 2086 タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。

配列番号：134 天然のリーダー配列を用いて作製される M98 250622 菌株由来の成熟 2086 タンパク質のアミノ酸配列。

配列番号：135 P4リーダー配列を結合させた場合に、M98 250622 由来の成熟 2086 タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。

配列番号：136 P4リーダー配列を用いて作製される M98 250622 菌株由来の成熟 2086 タンパク質のアミノ酸配列。

配列番号：137 M98 250622 菌株由来の成熟 2086 タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。

配列番号：138 M98 250622 菌株由来の成熟 2086 タンパク質のアミノ酸配列。

配列番号：139 天然のリーダー配列を結合させた場合に、870446 菌株由来の成熟 2086 タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。

配列番号：140 天然のリーダー配列を用いて作製される 870446 菌株由来の成熟 2086 タンパク質のアミノ酸配列。

配列番号：141 P4リーダー配列を結合させた場合に、870446 由来の成熟 2086 タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。

配列番号：142 P4リーダー配列を用いて作製される 870446 菌株由来の成熟 2086 タンパク質のアミノ酸配列。

配列番号：143 870446 菌株由来の成熟 2086 タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。

配列番号：144 870446 菌株由来の成熟 2086 タンパク質のアミノ酸配列。

配列番号：145 天然のリーダー配列を結合させた場合に、M97 253248 菌株由来の成熟 2086 タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。

配列番号：146 天然のリーダー配列を用いて作製される M97 253248 菌株由来の成熟 2086 タンパク質のアミノ酸配列。

10

20

30

40

50

配列番号：147 P4リーダー配列を結合させた場合に、M97 253248由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。

配列番号：148 P4リーダー配列を用いて作製されるM97 253248菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列。

配列番号：149 M97 253248菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。

配列番号：150 M97 253248菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列。

配列番号：151 天然のリーダー配列を結合させた場合に、M98 250809菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。

配列番号：152 天然のリーダー配列を用いて作製されるM98 250809菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列。

配列番号：153 P4リーダー配列を結合させた場合に、M98 250809由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。

配列番号：154 P4リーダー配列を用いて作製されるM98 250809菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列。

配列番号：155 M98 250809菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。

配列番号：156 M98 250809菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列。

配列番号：157 天然のリーダー配列を結合させた場合に、L5 M981菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。

配列番号：158 天然のリーダー配列を用いて作製されるL5 M981菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列。

配列番号：159 P4リーダー配列を結合させた場合に、L5 M981由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。

配列番号：160 P4リーダー配列を用いて作製されるL5 M981菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列。

配列番号：161 L5 M981菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。

配列番号：162 L5 M981菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列。配列番号：163

天然のリーダー配列を結合させた場合に、NMB菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。

配列番号：164 天然のリーダー配列を用いて作製されるNMB菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列。

配列番号：165 P4リーダー配列を結合させた場合に、NMB由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。

配列番号：166 P4リーダー配列を用いて作製されるNMB菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列。

配列番号：167 NMB菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。

配列番号：168 NMB菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列。

配列番号：169 天然のリーダー配列を結合させた場合に、M98 250572菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。

配列番号：170 天然のリーダー配列を用いて作製されるM98 250572菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列。

配列番号：171 P4リーダー配列を結合させた場合に、M98 250572由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。

配列番号：172 P4リーダー配列を用いて作製されるM98 250572菌株由来の

10

20

30

40

50

成熟 2086 タンパク質のアミノ酸配列。

配列番号：173 M98 250572 菌株由来の成熟 2086 タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。

配列番号：174 M98 250572 菌株由来の成熟 2086 タンパク質のアミノ酸配列。

配列番号：175 天然のリーダー配列を結合させた場合に、A4 Sanford ; M97 251836 PART ; M97

251957 ; M97 251985 ; M97

252060 ; M97 251870 ; M97 251994 ; M98 250024 ; M97

251905 ; M97 251876 ; M97 251898 ; または M97

251830 菌株由来の成熟 2086 タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。

配列番号：176 天然のリーダー配列を用いて作製される A4 Sanford ; M97 251836 PART ; M97

251957 ; M97 251985 ; M97 252060 ; M97 251870 ; M97

251994 ; M98 250024 ; M97 251905 ; M97 251876 ; M97

251898 ; または M97 251830 菌株由来の成熟 2086 タンパク質のアミノ酸配列。

配列番号：177 P4リーダー配列を結合させた場合に、A4 Sanford ; M97 251836 PART ; M97

251957 ; M97 251985 ; M97 252060 ; M97 251870 ; M97

251994 ; M98 250024 ; M97 251905 ; M97 251876 ; M97

251898 ; または M97 251830 由来の成熟 2086 タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。

配列番号：178 P4リーダー配列を用いて作製される A4 Sanford ; M97

251836 PART ; M97 251957 ; M97 251985 ; M97

252060 ; M97 251870 ; M97 251994 ; M98 250024 ; M97

251905 ; M97 251876 ; M97 251898 ; または M97 251830 菌株由来の成熟 2086 タンパク質のアミノ酸配列。

配列番号：179 A4 Sanford ; M97

251836 PART ; M97 251957 ; M97

251985 ; M97 252060 ; M97 251870 ; M97 251994 ; M98

250024 ; M97 251905 ; M97 251876 ; M97 251898 ; または M97

251830 菌株由来の成熟 2086 タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。

配列番号：180 A4 Sanford ; M97

251836 PART ; M97 251957 ; M97

251985 ; M97 252060 ; M97 251870 ; M97 251994 ; M98

250024 ; M97 251905 ; M97 251876 ; M97 251898 ; または M97

251830 菌株由来の成熟 2086 タンパク質のアミノ酸配列。

配列番号：181 天然のリーダー配列を結合させた場合に、CDC937 菌株由来の成熟 2086 タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。

10

20

30

40

50

- 配列番号：182 天然のリーダー配列を用いて作製されるCDC937菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列。
- 配列番号：183 P4リーダー配列を結合させた場合に、CDC937由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。
- 配列番号：184 P4リーダー配列を用いて作製されるCDC937菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列。
- 配列番号：185 CDC937菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。
- 配列番号：186 CDC937菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列。
- 配列番号：187 天然のリーダー配列を結合させた場合に、M97 252097菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。 10
- 配列番号：188 天然のリーダー配列を用いて作製されるM97 252097菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列。
- 配列番号：189 P4リーダー配列を結合させた場合に、M97 252097由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。
- 配列番号：190 P4リーダー配列を用いて作製されるM97 252097菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列。
- 配列番号：191 M97 252097菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。
- 配列番号：192 M97 252097菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列。 20
- 配列番号：193 天然のリーダー配列を結合させた場合に、870227菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。
- 配列番号：194 天然のリーダー配列を用いて作製される870227菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列。
- 配列番号：195 P4リーダー配列を結合させた場合に、870227由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。
- 配列番号：196 P4リーダー配列を用いて作製される870227菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列。
- 配列番号：197 870227菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。 30
- 配列番号：198 870227菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列。
- 配列番号：199 天然のリーダー配列を結合させた場合に、H355菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。
- 配列番号：200 天然のリーダー配列を用いて作製されるH355菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列。
- 配列番号：201 P4リーダー配列を結合させた場合に、H355由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。
- 配列番号：202 P4リーダー配列を用いて作製されるH355菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列。 40
- 配列番号：203 H355菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。
- 配列番号：204 H355菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列。
- 配列番号：205 天然のリーダー配列を結合させた場合に、H44\_76菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。
- 配列番号：206 天然のリーダー配列を用いて作製されるH44\_76菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列。
- 配列番号：207 P4リーダー配列を用いて作製される、H44\_76由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列。
- 配列番号：208 H44\_76菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列をコー 50

ドする核酸配列。

配列番号：209 P4リーダー配列を結合させた場合に、H44\_76菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。

配列番号：210 H44\_76菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列。

配列番号：211 天然のリーダー配列を結合させた場合に、8529菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。

配列番号：212 天然のリーダー配列を用いて作製される8529菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列。

配列番号：213 P4リーダー配列を結合させた場合に、8529由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。

配列番号：214 P4リーダー配列を用いて作製される8529菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列。

配列番号：215 8529菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。

配列番号：216 8529菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列。

配列番号：217 天然のリーダー配列を結合させた場合に、6940菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。

配列番号：218 天然のリーダー配列を用いて作製される6940菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列。

配列番号：219 P4リーダー配列を結合させた場合に、6940由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。

配列番号：220 P4リーダー配列を用いて作製される6940菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列。

配列番号：221 6940菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。

配列番号：222 6940菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列。

配列番号：223 天然のリーダー配列を結合させた場合に、M982菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。

配列番号：224 天然のリーダー配列を用いて作製されるM982菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列。

配列番号：225 P4リーダー配列を結合させた場合に、M982由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。

配列番号：226 P4リーダー配列を用いて作製されるM982菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列。

配列番号：227 M982菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。

配列番号：228 M982菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列。

配列番号：229 天然のリーダー配列を結合させた場合に、880049菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。

配列番号：230 天然のリーダー配列を用いて作製される880049菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列。

配列番号：231 P4リーダー配列を結合させた場合に、880049由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。

配列番号：232 P4リーダー配列を用いて作製される880049菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列。

配列番号：233 880049菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。

配列番号：234 880049菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列。

配列番号：235 天然のリーダー配列を結合させた場合に、M97\_253524、M97\_251885、およびM97\_251926菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。

10

20

30

40

50

ノ酸配列をコードする核酸配列。

配列番号：236 天然のリーダー配列を用いて作製されるM97 253524、M97 251885、およびM97 251926 菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列。

配列番号：237 P4リーダー配列を結合させた場合に、M97 253524、M97 251885、およびM97 251926 由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。

配列番号：238 P4リーダー配列を用いて作製されるM97 253524、M97 251885、およびM97 251926 菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列。

配列番号：239 M97 253524、M97 251885、およびM97 251926 菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。

配列番号：240 M97 253524、M97 251885、およびM97 251926 菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列。

配列番号：241 天然のリーダー配列を結合させた場合に、M98 250670 菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。

配列番号：242 天然のリーダー配列を用いて作製されるM98 250670 菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列。

配列番号：243 P4リーダー配列を結合させた場合に、M98 250670 由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。

配列番号：244 P4リーダー配列を用いて作製されるM98 250670 菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列。

配列番号：245 M98 250670 菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。

配列番号：246 M98 250670 菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列。

配列番号：247 天然のリーダー配列を結合させた場合に、CDC1573 菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。

配列番号：248 天然のリーダー配列を用いて作製されるCDC1573 菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列。

配列番号：249 P4リーダー配列を結合させた場合に、CDC1573 由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。

配列番号：250 P4リーダー配列を用いて作製されるCDC1573 菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列。

配列番号：251 CDC1573 菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。

配列番号：252 CDC1573 菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列。

配列番号：253 *Neisseria lactamica*の菌株由来の2086タンパク質のアミノ酸配列をコードする部分的な核酸配列。

配列番号：254 から259

タンパク質の2086ファミリーのタンパク質に関するアミノ酸配列。

配列番号：260 から278

2086サブファミリーAのタンパク質に関するアミノ酸配列。

配列番号：279 から299

2086サブファミリーBのタンパク質に関するアミノ酸配列。

配列番号：300 は本発明の1つの態様による2086タンパク質ファミリー(“2086タンパク質”)に対応するアミノ酸コンセンサス配列である。

配列番号：301 は本発明の1つの態様による2086タンパク質サブファミリーAに

10

20

30

40

50

対応するアミノ酸コンセンサス配列である。

配列番号：302 は本発明の1つの態様による2086タンパク質サブファミリーBに対応するアミノ酸コンセンサス配列である。

配列番号：303 BamHI制限部位を含むreverseプライマーの核酸配列（化合物番号4623）。

配列番号：304 NdeI制限部位を含むforwardプライマーの核酸配列（化合物番号4624）。

配列番号：305 forwardプライマーの核酸配列（化合物番号4625）。

配列番号：306 forwardプライマーの核酸配列（化合物番号5005）。

配列番号：307 reverseプライマーの核酸配列（化合物番号5007）。

配列番号：308 BglII制限部位を含むreverseプライマーの核酸配列（化合物番号5135）。

配列番号：309 BamHI制限部位を含むforwardプライマーの核酸配列（化合物番号5658）。

配列番号：310 SphI制限部位を含むreverseプライマーの核酸配列（化合物番号5660）。

配列番号：311 BamHI制限部位を含むforwardプライマーの核酸配列（化合物番号6385）。

配列番号：312 BglIIおよびNdeI制限部位を含むforwardプライマーの核酸配列（化合物番号6406）。

配列番号：313 forwardプライマーの核酸配列（化合物番号6470）。

配列番号：314 reverseプライマーの核酸配列（化合物番号6472）。

配列番号：315 BamHI制限部位を含むforwardプライマーの核酸配列（化合物6473）。

配列番号：316 BglIIおよびNdeI制限部位を含むforwardプライマーの核酸配列（化合物番号6474）。

配列番号：317 forwardプライマーの核酸配列（化合物番号6495）。

配列番号：318 reverseプライマーの核酸配列（化合物番号6496）。

配列番号：319 SphI制限部位を含むreverseプライマーの核酸配列（化合物番号6453）。

配列番号：320 BglII制限部位を含むreverseプライマーの核酸配列（化合物番号6605）。

配列番号：321 BglIIおよびNdeI制限部位を含むforwardプライマーの核酸配列（化合物番号6721）。

配列番号：322 P4リーダー配列の核酸配列。

配列番号：323 天然の2086リーダーバリエーション1の核酸配列。

配列番号：324 天然の2086リーダーバリエーション2の核酸配列。

配列番号：325 天然の2086リーダーバリエーション3の核酸配列。

配列番号：326 天然の2086リーダーバリエーション4の核酸配列。

配列番号：327 はP4431のアミノ酸配列である。

配列番号：328 はP5163のアミノ酸配列である。

配列番号：329 は本発明の1つの態様によるアミノ酸配列である。

【0015】

#### 発明の詳細な説明

髄膜炎菌血清群Bに対して交差機能性の殺菌活性を有する抗原の新たなクラスは、感染に対する免疫感作のために多価PorAのアプローチを必要としない。このような抗原を期せずして同定することができ、当明細書にこれを記載し主張する。1つのこのような抗原の存在は、髄膜炎菌株由来の可溶性外膜タンパク質（sOMP）の複合体混合物中で最初に認められた。この抗原の殺菌活性を、目的のタンパク質混合物が数種のタンパク質しか含まなくなるまで、一連の分画化およびタンパク質の精製ステップを通して追跡した。こ

10

20

30

40

50

の混合物中の主要なタンパク質は、N末端アミノ酸配列決定およびペプチドマッピングにより同定した。殺菌活性を示す目的のタンパク質を、ORF 2086タンパク質、すなわち脂質化タンパク質（より限定的にLP 2086とも表す）として同定した。“ORF 2086タンパク質”は、ナイセリア種のオープンリーディングフレーム2086（ORF 2086）によりコードされるタンパク質を表す。

#### 【0016】

当明細書に記述したように、髄膜炎菌より単離されたナイセリア種ORF 2086タンパク質（“2086タンパク質”または“ORF 2086”タンパク質とも表し、当明細書では互変性を持って使用する、または非脂質化タンパク質としてP 2086および当該タンパク質の脂質化バージョンとしてLP 2086とも表した）を基本とする新規免疫原性組成物の候補物質は、細胞の分画化、異なる界面活性剤による抽出、タンパク質の精製、抗血清の製造を含み、そして多数の菌株を用いての殺菌活性のアッセイを組み合わせ同定した。上に引用した参考文献に開示されている免疫原性の可能性のある組成物および診断法に代わるものとして、本発明は組成物に関し、そしてタンパク質、その免疫原性部分およびその生物学的均等物、ならびに該ポリペプチド、その一部および均等物をコードする遺伝子、および該物質に免疫特異的に結合する抗体の使用を通しての髄膜炎菌感染の治療法および/または予防法に関する。

10

#### 【0017】

本発明の態様に従って、単離されたポリペプチド、その免疫原性部分、および/またはその生物学的均等物を含む、2086を基本とする免疫原性物質は、交差反応性または菌株非特異性を示す該物質の能力を基本とする免疫原性候補物質として、期せずして同定された。特に候補物質は以下の能力、すなわち（1）多数のナイセリア菌株、および/または淋菌株に対して殺菌性抗体を産生する；（2）多数の菌株の表面と反応する；（3）実際の攻撃に対して受動的な防護を与える；および/または（4）コロニー化を防ぐ、能力を期せずして示すことが同定された。したがって本発明は、単離されたポリペプチド、その免疫原性部分、および/またはその物生物学的均等物を含む、該免疫原性物質を含む免疫原性組成物、ならびに髄膜炎菌による感染に対して該物質を使用する方法を提供する。（2086タンパク質の同定に用いる方法に関しては、当明細書の実施例1を参照のこと。）

20

当明細書で使用する場合、“菌株非特異的”という用語は、髄膜炎菌の1つ以上の菌株（例えば異種の髄膜炎菌株）に対して有効な免疫応答を惹起する抗原の特徴をいう。“交差反応性”という用語は本明細書で使用する場合、“菌株非特異的”という用語と互変性をもって使用する。“免疫原性の菌株非特異的な髄膜炎菌の抗原”という用語は当明細書で使用する場合、同抗原は別の細菌（例えば他のナイセリア菌株、例えば淋菌株）から単離することも、または組換え技術を用いて製造することもできるが、髄膜炎菌から単離することのできる抗原をいう。

30

#### 【0018】

本発明の2086タンパク質は脂質化タンパク質および非脂質化タンパク質を含む。さらに本発明はまた、中間体化合物/組成物として各タンパク質に対応する、未成熟なタンパク質または前タンパク質の使用もまた含む。

40

#### 【0019】

本発明はまた、本発明の実施により前述の免疫原性作用物質に免疫特異的に結合する抗体も提供する。さらに本発明は前述のいずれかをコードする核酸配列を含む単離されたポリヌクレオチドに関する。したがって本発明は組成物および/または免疫原性組成物、および髄膜炎菌性髄膜炎、特に血清群B髄膜炎菌性疾患の予防、治療、および/または診断におけるそれらの使用、ならびに該組成物の製造法を提供する。

#### 【0020】

本発明の組成物は高い免疫原性があり、殺菌性抗体を産生できることが示された。これらの抗体は血清群、血清型および血清型サブタイプの異なる髄膜炎菌株に対する交差反応性がある。したがって本発明の組成物は、異種のナイセリア菌株に対して殺菌性抗体を生成

50



する能力を示すことにより、従来の髄膜炎菌のワクチンの試みの欠点を克服するものである。したがって特に有利な点として、本発明はより少ない成分で構成されて、従来から使用されている薬剤に匹敵する防護機能を惹起することができる免疫原性組成物を提供する。その際、同組成物または免疫原性物質（例えば限定するものではないが、ポリペプチド、免疫原性部分またはフラグメント、および生物学的均等物等）を、単独でまたは他の抗原または（免疫原性）物質と組み合わせて使用して、髄膜炎菌性感染および疾患からの免疫学的防護を惹起し、同様に他の病原菌に起因する感染および/または疾患から免疫学的防護を惹起することができる。このことから、多数の菌株に対しての防護に必要な抗原の数を減らすことにより、髄膜炎菌性感染に対して使用するための免疫原性組成物のデザインを簡素化することができる。事実、精製2086タンパク質は、髄膜炎菌性疾患に關与する複数の菌株に対して十分な免疫原性を適用するために必要なタンパク質の数を、劇的にそして期せずして減らすことになる。2086タンパク質は、同タンパク質の野生型であるリポタンパク質として、天然の髄膜炎菌におけるよりずっと高レベルで大腸菌内で組み換え発現させることができる。

10

20

30

40

50

#### 【0021】

1つの菌株由来の2086タンパク質に対して作用する抗体が、無関係の（すなわち異種の）菌株を死滅させることが発見されたため、“2086相同部分”の存在について多数の異種の菌株の特徴付けを行い、配列の保存レベルを決定する試みを行った。PCRで調べた菌株の約70%は、菌株8529由来のオリジナルの2086遺伝子を増幅するプライマーを用いて増幅することのできる、2086相同部分を有していたが、残りのおよそ30%はこの試験ではネガティブであった。これら残りのおよそ30%は、8529由来のオリジナルの2086遺伝子と約60%のアミノ酸配列しか相同ではない2086相同体を含むことが見出された。他のプライマーにより、これらのおよそ30%の菌株から2086相同部分を増幅できることが同定された。検査を行った髄膜炎菌株を、プライマーセットで2086相同部分を増幅できるかどうかにより、サブファミリーAまたはサブファミリーBに属するものと命名した。これらの実験の詳細は以下の実施例5に概説した。

#### 【0022】

##### （多数の血清型サブタイプにおける2086タンパク質の存在）

髄膜炎菌株間における2086遺伝子の配列の保存レベルを決定するため、サブファミリーAおよびBから幾つかの代表例について全長の遺伝子としてクローニングし、DNA配列分析を行った。当明細書で開示したようにプライマーを用いて（例えば表5を参照のこと）、異なる血清型サブタイプの抗原を発現し、かつまた共通のタンパク質、P2086を発現する24の血清群B髄膜炎菌株を同定した。これらの配列の例を当明細書に提供し、成熟DNA配列（すなわちすべてのリポタンパク質のシグナル配列はシステイン残基で切断された）として示す。例えば限定はしないが、配列番号：2-252の偶数番号のアミノ酸配列を参照のこと。

#### 【0023】

2086タンパク質は野生型菌株中には多量に存在しないが、殺菌性抗体の標的である。これらの抗体はPorAに应答して産生される抗体とは異なり、異種の血清型サブタイプを発現する菌株を死滅させることができる。

#### 【0024】

2086タンパク質に対する抗体はまた、髄膜炎菌による攻撃から新生仔ラットを受動的に防護する。（表8参照のこと）2086タンパク質の組換え発現は、髄膜炎菌性疾患の予防のための免疫原性組成物として2086タンパク質を使用することを可能にする。臨床的試みにおける最近の髄膜炎菌の免疫原性組成物の候補物質はすべて、多くの異なるタンパク質を含む複合体混合物または外膜タンパク質調製物であった。血清型サブタイプ特異性を提供するPorAタンパク質は、血清型サブタイプに関連する疾患の約70-80%に適用できるために、免疫原性組成物中に6から9のバリエーションを含むことが必要になる。対照的に、1つの2086タンパク質のみに対する抗血清が、西欧および米国で単離されるこの疾患の約65%に關与する6つの血清型サブタイプの代表的なものを死滅でき

ることが、当明細書において明確に示されている。したがって精製 2086 タンパク質は、髄膜炎菌性疾患に關与する複数の血清型サブタイプに適用できる十分な免疫原性組成物を提供するために必要なタンパク質の数を減らせる可能性がある。

【0025】

(タンパク質、免疫原性部分および生物学的均等物)

本発明により提供される 2086 タンパク質は、単離されたタンパク質である。“単離された”という用語は、天然の状態から人の手により変化したことを意味する。“単離された”組成物または物質が自然界で生じる場合、それはそのオリジナルの環境から変化しまたは除外された、またはその双方の状態である。例えば生きている動物に本来存在するポリペプチドまたはポリヌクレオチドは“単離され”ていないが、その本来の状態で共存する物質から分離された同ポリペプチドまたはポリヌクレオチドは、当明細書で使用する用語によれば“単離されて”いる。したがって当明細書で使用する場合、“単離されたタンパク質”という用語は、本来の素材から単離されたタンパク質および組換え技術を用いて作製されるタンパク質、ならびに他の抗原および/または賦形剤、例えば医薬的に受容可能な担体、バッファー、アジュバント等と組み合わせた場合のこのようなタンパク質を包含する。

10

【0026】

2086 タンパク質、その免疫原性部分および/またはその生物学的均等物は、本発明の態様にしたがって、以下のアミノ酸配列のいずれかを含む：

ADIGxGLADA (配列番号：254)、配列中xはいずれかのアミノ酸である；

20

IGxGLADALT (配列番号：255)、配列中xはいずれかのアミノ酸である；

SLNTGKLNKND (配列番号：256)；

SLNTGKLNKNDKxSRDFD (配列番号：257、配列中xはいずれかのアミノ酸である)；

SGEFQxYKQ (配列番号：258)、配列中xはいずれかのアミノ酸である；または

IEHLKxPE (配列番号：259)、配列中xはいずれかのアミノ酸である。

【0027】

2086 サブファミリー A タンパク質、その免疫原性部分および/またはその生物学的均等物は、本発明の態様にしたがって、以下のアミノ酸配列のいずれかを含む：

30

GGGVAADIGx (配列番号：260)、配列中xはいずれかのアミノ酸である；

SGEFQIYKQ (配列番号：261)；

HSVVVALQIE (配列番号：262)；

EKINNPKID (配列番号：263)；

SLINQRSFLV (配列番号：264)；

SGLGGEHTAF (配列番号：265)；

GEHTAFNQLP (配列番号：266)；

SFLVSGLGGEH (配列番号：267)；

EKINNPKIDSLINQRSFLVSGLGGEHTAFNQLP (配列番号：268)；

40

GKAEYHGKAF (配列番号：269)；

YHGKAFSSDD (配列番号：270)；

GKAEYHGKAFSSDD (配列番号：271)；

IEHLKTPEQN (配列番号：272)；

KTPEQNVELA (配列番号：273)；

IEHLKTPEQNVELA (配列番号：274)；

AELKADEKSH (配列番号：275)；

AVILGDTRYG (配列番号：276)；

AELKADEKSHAVILGDTRYG (配列番号：277)；または

EELKGTYHLAL (配列番号：278)。

50

## 【0028】

2086サブファミリーBタンパク質、その免疫原性部分および/またはその生物学的均等物は、本発明の態様にしたがって、以下のアミノ酸配列のいずれかを含む：

L I T L E S G E F Q (配列番号：279)；  
 S A L T A L Q T E Q (配列番号：280)；  
 F Q V Y K Q S H S A (配列番号：281)；  
 L I T L E S G E F Q V Y K Q S H S A L T A L Q T E Q (配列番号：282)；  
 I G D I A G E H T S (配列番号：283)；  
 E H T S F D K L P K (配列番号：284)；  
 I G D I A G E H T S F D K L P K (配列番号：285)；  
 A T Y R G T A F G S (配列番号：286)；  
 D D A G G K L T Y T (配列番号：287)；  
 I D F A A K Q G H G (配列番号：288)；  
 K I E H L K S P E L (配列番号：289)；  
 A T Y R G T A F G S D D A G G K L T Y T I D F A A K Q G H G K I E H L K S P E L  
 N V (配列番号：290)；  
 H A V I S G S V L Y (配列番号：291)；  
 K G S Y S L G I F G (配列番号：292)；  
 V L Y N Q D E K G S (配列番号：293)；  
 H A V I S G S V L Y N Q D E K G S Y S L G I F G (配列番号：294)；  
 A Q E V A G S A E V (配列番号：295)；  
 I H H I G L A A K Q (配列番号：296)；  
 V E T A N G I H H I (配列番号：297)；  
 A Q E V A G S A E V E T A N G I H H I G L A A K Q (配列番号：298)；または  
 V A G S A E V E T A N G I H H I G L A A K Q (配列番号：299)。

2086タンパク質は本発明の態様にしたがって、以下のコンセンサス配列および/またはその免疫原性部分を含む。

## 【0029】

2086タンパク質のコンセンサス配列(配列番号：300)

C S S G ---- G G G V x A D I G x G L A D A L T x P x D x K D K x L x S L T L  
 x x S x x x N x x L x L x A Q G A E K T x x x G D --- S L N T G K L K N D K x S  
 R F D F x x x I x V D G x x I T L x S G E F Q x Y K Q x H S A x x A L Q x E x x  
 x x x x x x x x x x x R x F x x x x x G E H T x F x x L P x x - x A x Y x G  
 x A F x S D D x x G x L x Y x I D F x x K Q G x G x I E H L K x P E x N V x L A  
 x x x x K x D E K x H A V I x G x x x Y x x x E K G x Y x L x x x G x x A Q E x  
 A G x A x V x x x x x H x I x x A x K Q

前述のコンセンサス配列において、“x”はいずれかのアミノ酸を表し、5番目のアミノ酸から9番目のアミノ酸までの領域は、0から5個のいずれかのアミノ酸であり、67番目のアミノ酸から69番目のアミノ酸までの領域は、0から3個のいずれかのアミノ酸であり、156番目のアミノ酸は、0から1個のいずれかのアミノ酸である。5番目のアミノ酸から9番目のアミノ酸までの領域は、好ましくは0、4または5個のアミノ酸を含む。67番目のアミノ酸から69番目のアミノ酸までの領域は、好ましくは0または3個のアミノ酸を含む。このコンセンサス配列が2086タンパク質の高い可変性を説明することは、特に注目すべきであろう。理論的には、それに固執する意図はないが、この高い可変性が有益なそして予想外の交差反応性を提供すると考えられる。

## 【0030】

本発明の実施により、2086タンパク質は免疫原性、非病原性および菌株非特異的であると特徴付けられる。さらに、本発明のさらなる実施によりこれらのタンパク質は予想外の免疫原性を示すが、約2%から約40%は保存されていない。

## 【0031】

10

20

30

40

50

当明細書で使用する場合“保存されていない”という用語は、挿入、置換および/または欠失が起こり得るアミノ酸の数を、タンパク質中のアミノ酸総数のパーセントで表す。例えばタンパク質の40%が保存されておらず、例えば263個のアミノ酸を有する場合、アミノ酸の置換の起こり得るタンパク質中のアミノ酸の位置は105箇所ある。同様に例えばタンパク質の10%が保存されておらず、例えば約280個のアミノ酸を有する場合、アミノ酸の置換の起こり得るアミノ酸の位置は28箇所ある。2086タンパク質もまた、タンパク質の免疫原性を損なわずにアミノ酸残基の欠失させることができる。

【0032】

さらに2086タンパク質は可変領域での相同性に基づいてサブファミリーに分割することができる。例えば限定する意図はないが、2つのこのようなサブファミリー、すなわちサブファミリーAおよびサブファミリーBのコンセンサス配列を以下に提供する。

10

【0033】

2086サブファミリーA配列(SEQ ID 301)

C S S G --- G G G V A A D I G x G L A D A L T x P x D x K D K x L x S L T L x x  
S x x x N x x L x L x A Q G A E K T x x x G D --- S L N T G K L K N D K x S R  
F D F x x x I x V D G Q x I T L x S G E F Q I Y K Q x H S A V V A L Q I E K I N  
N P D K I D S L I N Q R S F L V S G L G G E H T A F N Q L P x G K A E Y H G K A  
F S S D D x x G x L x Y x I D F x x K Q G x G x I E H L K T P E Q N V E L A x A  
E L K A D E K S H A V I L G D T R Y G x E E K G T Y H L A L x G D R A Q E I A G  
x A T V K I x E K V H E I x I A x K Q

20

記号“x”はいずれかのアミノ酸である。

【0034】

5番目のアミノ酸から8番目のアミノ酸までの領域は、0から4個のいずれかのアミノ酸である。

66番目のアミノ酸から68番目のアミノ酸までの領域は、0から3個のいずれかのアミノ酸である。

【0035】

5番目のアミノ酸から8番目のアミノ酸までの領域は、好ましくは0または4個のアミノ酸を含む。66番目のアミノ酸から68番目のアミノ酸までの領域は、好ましくは0または3個のアミノ酸を含む。

30

【0036】

2086サブファミリーB(配列番号302)

C S S G G G G --- V x A D I G x G L A D A L T A P L D H K D K x L x S L T L  
x x S x x x N x x L x L x A Q G A E K T Y G N G D S L N T G K L K N D K V S R F  
D F I R Q I E V D G x L I T L E S G E F Q V Y K Q S H S A L T A L Q T E Q x Q D  
x E x S x K M V A K R x F x I G D I A G E H T S F D K L P K x x x A T Y R G T A  
F G S D D A G G K L T Y T I D F A A K Q G H G K I E H L K S P E L N V x L A x x  
Y I K P D E K x H A V I S G S V L Y N Q D E K G S Y S L G I F G x x A Q E V A G  
S A E V E T A N G I H H I G L A A K Q

40

記号“x”はいずれかのアミノ酸である。

【0037】

8番目のアミノ酸から12番目のアミノ酸までの領域は、0から5個のいずれかのアミノ酸である。

8番目のアミノ酸から12番目のアミノ酸までの領域は、好ましくは0または5個のアミノ酸を含む。

【0038】

本発明の実施により、2086タンパク質サブファミリーをさらにクラスターに分割することができる。例えば本発明の1つの実施により以下のクラスターを提供する：配列番号

50

: 2 - 1 2 の偶数番号 ; 配列番号 : 1 4 - 2 4 の偶数番号 ; 配列番号 : 2 6 - 4 2 の偶数番号 ; 配列番号 : 5 0 - 6 0 の偶数番号 ; 配列番号 : 6 2 - 1 0 8 の偶数番号 ; 配列番号 : 1 1 0 - 1 3 8 の偶数番号 ; 配列番号 : 1 4 0 - 1 5 6 の偶数番号 ; 配列番号 : 1 5 8 - 1 7 4 の偶数番号 ; および配列番号 : 2 2 4 - 2 5 2 の偶数番号。

【 0 0 3 9 】

本発明のポリペプチド配列は配列番号 : 2 - 2 5 2 の偶数番号の基準配列 (reference sequence) と同一とすることができる、すなわち 1 0 0 % 同一である、または同一性の % が 1 0 0 % 未満であるような、基準配列と比較して多数のアミノ酸の変換を含むこともできる。このような変換は、保存されるおよび保存されない置換または挿入を含む、少なくとも 1 つのアミノ酸の欠失、置換を含む。変換は、基準ポリペプチド配列のアミノ末端またはカルボキシル末端の位置で、またはこれらの末端の位置の間のあらゆる位置で、すなわち基準アミノ酸配列中のアミノ酸の間に個々に点在して、もしくは基準アミノ酸配列内の 1 つまたはそれより多くの隣接するグループとして起こり得る。

10

【 0 0 4 0 】

したがって本発明はまた、配列表に含まれるアミノ酸配列 (すなわち配列番号 : 2 - 2 5 2 の偶数番号) と同一の配列を有するタンパク質もまた提供する。特定の配列に依存して、配列の同一性の程度は好ましくは 6 0 % 以上 (例えば 6 0 %、7 0 %、8 0 %、9 0 %、9 5 %、9 7 %、9 9 %、9 9 . 9 %、またはそれより多く) である。これらの相同タンパク質は突然変異および対立遺伝子のバリエーションを含む。

【 0 0 4 1 】

本発明の好ましい態様において、2 0 8 6 タンパク質または他の 2 0 8 6 ポリペプチド (例えば免疫学的部分および生物学的均等物) は、髄膜炎菌の相同菌株および少なくとも 1 つの異種菌株に対する殺菌性抗体を産生する。具体的には、2 0 8 6 ポリペプチドに対する抗体は新生仔ラットへの髄膜炎菌による例えば経鼻的な攻撃から受動的に防護する。さらなる好ましい態様において、2 0 8 6 ポリペプチドは新生仔ラットに関するこのような防護を、相同菌株および少なくとも 1 つの異種菌株に対して示す。ポリペプチドは、配列番号 : 2 - 2 5 2 の偶数番号で述べたような、上記の “配列のまとめ” から選択することができ、またはポリペプチドは、列記したポリペプチドのあらゆる免疫学的フラグメントまたは生物学的均等物とすることができる。好ましくはポリペプチドは上記の配列のまとめにおける配列番号 : 2 - 2 5 2 の偶数番号のいずれかから選択する。

20

30

【 0 0 4 2 】

本発明はまた、生物学的に均等な 2 0 8 6 ポリペプチドの対立遺伝子のバリエーションまたはその他のバリエーションにも関する。適切な生物学的均等物は以下の能力、すなわち ( 1 ) 相同菌株ならびに少なくとも 1 つの異種ナイセリア菌株および/または淋菌株に対して殺菌性抗体を産生する ; ( 2 ) 相同菌株ならびに少なくとも 1 つの異種ナイセリア菌株および/または淋菌株の表面と反応する ; ( 3 ) 実際の攻撃に対して受動的な防護を与える ; および/または ( 4 ) コロニー化を防ぐ、能力を示すものとする。

【 0 0 4 3 】

適切な生物学的均等物は、当明細書で特定した 2 0 8 6 タンパク質 (すなわち配列番号 : 2 - 2 5 2 の偶数番号) の 1 つと、少なくとも約 6 0 %、好ましくは少なくとも約 7 0 %、より好ましくは少なくとも約 7 5 %、さらにより好ましくは約 8 0 %、さらにより好ましくは約 8 5 %、さらにより好ましくは約 9 0 %、さらにより好ましくは約 9 5 % またはさらにより好ましくは約 9 8 %、またはさらにより好ましくは約 9 9 % の類似性を有するが、ただし均等物は、本発明の 2 0 8 6 タンパク質の 1 つと等しい免疫原性特性を実質的に惹起することができるものとする。

40

【 0 0 4 4 】

あるいは生物学的均等物は、配列番号 : 2 - 2 5 2 の偶数番号の 2 0 8 6 タンパク質の 1 つと等しい免疫原性特性を実質的に有する。本発明の態様により、生物学的均等物は、配列番号 : 2 - 2 5 2 の偶数番号と等しい免疫原性特性を実質的に有する。

【 0 0 4 5 】

50

生物学的均等物は、本発明のタンパク質のバリエーションおよび修飾物を作成することにより得られる。同タンパク質のこれらのバリエーションおよび修飾物は、1つまたはそれより多くのアミノ酸の挿入、欠失または置換によりアミノ酸配列を変えることにより得ることができる。実質的に等しいまたは改善された性質を有するポリペプチドを作成するために、アミノ酸配列を、例えば置換により修飾する。変化を導入する好ましい方法として、部位特異的突然変異誘発によりポリペプチドの核酸配列の予め決定された変化を行うことを含む。

#### 【0046】

本発明のポリペプチドの構造について修飾および変化があっても、なお髄膜炎菌の免疫原性を有する分子を得ることができる。例えば限定はしないが、免疫原性の喪失が認められない配列において、保存されない置換および保存される置換を含めての、あるアミノ酸から他のアミノ酸への置換は可能である。ポリペプチドの生物学的機能活性を規定するのは、そのポリペプチドの相互作用の能力および本質であるため、多数のアミノ酸配列の置換をポリペプチド配列（またはもちろんその元になるDNAコード配列）中で行い、それでもなお類似の性質を持つポリペプチドを得ることは可能である。本発明は、本明細書のポリペプチドの構造、ならびに該ポリペプチドをコードする核酸配列のあらゆる変化を意図するが、この場合同ポリペプチドは免疫原性を保持するものとする。当業者は開示されたポリペプチドおよびしたがってポリヌクレオチドを、当明細書で提供した指示に基づいて容易に修飾することができるだろう。

10

#### 【0047】

例えば、置換または欠失の許されるある種の可変領域が同定された。先に述べたように2086コンセンサス配列は本発明の実施により、タンパク質の2086ファミリーの保存領域および保存されない領域を示している。

20

#### 【0048】

このような変化を作成するには、当業者の公知のあらゆる技術を利用することができる。例えば限定する意図はないが、アミノ酸のハイドロパシク・インデックスを考慮することができる。ポリペプチドにおける相互作用の生物学的機能を与えるハイドロパシクアミノ酸インデックスの重要性は、当該技術分野では一般に理解されている。Kyte et al. 1982. *J. Mol. Bio.* 157: 105-132.

特に、作成される生物学的に均等なポリペプチドまたはペプチドを、免疫学的態様において使用することを意図する場合には、類似するアミノ酸の置換はまた、親水性に基づいて行うこともできる。米国特許第4,554,101号（当明細書において参照として援用する）は、ポリペプチドの最大の局所的な親水性の平均値は、近接するアミノ酸の親水性により決定される場合、その免疫原性、すなわちポリペプチドの生物学的特性に相関すると記載している。

30

#### 【0049】

ポリペプチドの生物学的均等物はまた、部位特異的突然変異誘発を用いて製造することもできる。部位特異的突然変異誘発は、元になるDNAの特異的突然変異を通してポリペプチドの配列から誘導される第2世代のポリペプチド、または生物学的機能の均等なポリペプチドまたはペプチドの製造に有用な技術である。このような変化は、アミノ酸の置換が望ましい場合には望ましい。同技術はさらに、例えば前述の1つまたはそれより多くの考察を組み入れた配列のバリエーションを、1つまたはそれより多くのヌクレオチドの配列の変化をDNAに導入することにより、作製し検査する能力をいつでも提供することができる。部位特異的突然変異誘発は、所望の変異のDNA配列ならびに十分な数の隣接するヌクレオチドをコードする特異的なオリゴヌクレオチドの使用を通して変異体の作製を可能にし、交差させた欠失の接合部の両側方向に安定な二本鎖を形成するための、十分なサイズのプライマー配列および配列複雑度を提供することができる。典型的には、変化させる配列の接合部の両側の約5から10残基を含む、約17から25ヌクレオチドの長さのプライマーが好ましい。

40

#### 【0050】

50

一般に部位特異的突然変異誘発の技術は当該技術分野でよく知られている。理解されていることと思うが、同技術は典型的には1本鎖および2本鎖の双方の形で存在することのできるファージベクターを利用する。典型的には当明細書にしたがっての部位特異的突然変異誘発は、選択された髄膜炎菌のポリペプチド配列のすべてまたは一部をコードするDNA配列をベクターの配列中に含む、1本鎖ベクターを得ることから始める。所望の変異の配列をもっているオリゴヌクレオチドプライマーを（例えば合成により）作製する。次に変異をもっているDNA鎖の合成を完成させるため、このプライマーを1本鎖ベクターとアニーリングさせ、酵素、例えば大腸菌ポリメラーゼI Klenowフラグメントを用いて伸長させる。このように1方の鎖がオリジナルの変異していない配列をコードし、第2の鎖が所望の変異をもつヘテロの二本鎖が形成される。次にこのヘテロ二本鎖のベクターを用いて、適当な細胞、例えば大腸菌細胞を形質転換させ、変異をもっている組換えベクターを含むクローンを選択する。市販の入手可能なキットは、オリゴヌクレオチドプライマーを除くすべての試薬が添付されている。

10

20

30

40

50

**【0051】**

2086ポリペプチドは、配列番号2-252の偶数番号の1つからのアミノ酸配列を有する2086タンパク質に対して、実質的に配列の類似するものおよび/または生物学的均等物を含む、あらゆるタンパク質またはポリペプチドを含む。さらに、本発明の2086ポリペプチドは特定の材料に限定されない。したがって本発明は、様々な材料からのポリペプチドの一般的な検出および単離を提供する。また2086ポリペプチドは、当該分野の技術に十分に含まれるような、当明細書に提供されたガイダンスに基づいて、組換えにより、または当該技術分野で公知のその他の合成法において、作製することができる。

**【0052】**

2086ポリペプチドは、さらなる構造分析または機能分析において、または試薬、例えば2086に関連するポリペプチドおよび2086の特異的抗体の作成において使用するためのフラグメントに、好都合なことに切断できることを、本発明において意図する。この切断は、精製または未精製の髄膜炎菌ポリペプチドをペプチダーゼ、例えばエンドプロテイナーゼgluc(Boehringer, Indianapolis, IN)で処理することにより達成することができる。CNBrによる処理は、ペプチドフラグメントを天然の髄膜炎菌2086ポリペプチドから生成するもうひとつの方法である。組換え技術もまた、2086タンパク質の特定のフラグメントを作成するために使用することができる。

**【0053】**

“バリエーション”はこの用語を当明細書で使用する場合、基準のポリヌクレオチドまたはポリペプチドとは各々異なるが、本質的な特性は保持しているポリヌクレオチドまたはポリペプチドである。ポリヌクレオチドの典型的なバリエーションは、もうひとつの、基準のポリヌクレオチドともヌクレオチド配列が異なる。バリエーションのヌクレオチド配列の変化が、基準のポリヌクレオチドにコードされるポリペプチドのアミノ酸配列を変化させてもいいし、変化させなくてもいい。ヌクレオチドの変化は、以下に述べるように基準配列にコードされるポリペプチド中のアミノ酸の置換、付加、欠失、融合および切り詰め(truncation)に帰着し得る。ポリペプチドの典型的なバリエーションは、もう一つの、基準のポリペプチドとはアミノ酸配列が異なる。一般に差異は限定されるため、基準のポリペプチドの配列とバリエーションの配列とは全体に非常に類似しており、多くの領域で同一である(すなわち生物学的に均等である)。バリエーションおよび基準のポリペプチドは、1つまたはそれより多くの置換、付加、欠失のあらゆる組み合わせによりアミノ酸配列が異なっている。置換されたまたは挿入されたアミノ酸残基は、遺伝子コードにコードされているものであってもよく、されていないものでもよい。ポリヌクレオチドまたはポリペプチドのバリエーションは対立遺伝子バリエーションのように自然界で起こり得るし、あるいは自然界で起こっていることが知られていないバリエーションもあり得る。ポリヌクレオチドおよびポリペプチドの自然界では起こらないバリエーションは、突然変異誘発技術によりまたは直複合成することにより作成することができる。

## 【 0 0 5 4 】

“同一性”は当該技術分野で知られているように、2つもしくはそれより多くのポリペプチド配列、または2つもしくはそれより多くのポリヌクレオチド配列を比較することにより決定される、これらの配列間の関係である。当該技術分野において、“同一性”はまた、場合によってはポリペプチド配列鎖またはポリヌクレオチド配列鎖間でマッチさせることにより決定される、このような配列間の配列関連性の程度を意味する。“同一性”および“類似性”は公知の方法により容易に算出することができ、その方法として非限定的に以下を含む。すなわちComputational Molecular Biology (コンピューターによる分子生物学), Lesk, A. M. 編、Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing : Informatics and Genome Projects (バイオコンピューター計算; インフォマティクスおよびゲノムプロジェクト), Smith, D. W. 編 Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part I (配列データのコンピューター分析、パートI), Griffin, A. M., and Griffin, H. G. 編、Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology (分子生物学における配列分析), von Heinje, G., Academic Press, 1987; および Sequence Analysis Primer (配列分析 プライマー), Gribskov, M. およびDevereux, J. 編、M Stockton Press, New York, 1991; およびCarillo, H. およびLipman, D., SIAM J. Applied Math., 48: 1073 (1988)。同一性を決定する好ましい方法は、検査する配列間の最大のマッチングが得られるようにデザインされている。同一性および類似性を決定する方法は、公開されている入手可能なコンピュータープログラムに体系的にまとめられている。2つの配列間の同一性および類似性を決定する、好ましいコンピュータープログラムの方法として、G C Gプログラムパッケージ(Devereux, J., et al 1984)、B L A S T P、B L A S T N、およびF A S T A(Altschul, S. F., et al., 1990)を含むがこれに限定されない。B L A S T Xプログラムは、N C B I および他の情報源より公開されており、入手可能である(BLAST Manual, Altschul, S., et al., NCBI NLM NIH Bethesda, Md. 20894; Altschul, S., et al., 1990)。周知のSmith Waterman アルゴリズムもまた同一性の決定に利用することができる。

## 【 0 0 5 5 】

これに限定する意図はないが例として、本発明のアミノ酸配列は基準配列である配列番号：2 - 2 5 2の偶数番号と同一とすることができる；すなわち100%同一である、または同一性の%が100%未満であるような、基準配列と比較して多数のアミノ酸の変換を含むことができる。このような変換は、保存されるおよび保存されない置換または挿入を含む、少なくとも1つのアミノ酸の欠失、置換からなる群から選択され、この場合該変換は、基準のポリペプチド配列のアミノ末端もしくはカルボキシル末端の位置で、またはこれらの末端の位置の間のあらゆるところで、すなわち基準配列中のアミノ酸の間で個々に、もしくは基準配列内で1つもしくはそれ以上の隣接する群としてのいずれかで起こり得る。得られた同一性の%のアミノ酸の変換の数は、配列番号：2 - 2 5 2のアミノ酸総数に各同一性パーセントの数値百分率(100で割る)を掛けて、配列番号：2 - 2 5 2のいずれかのアミノ酸の該総数からその積を引くことにより決定される、または：

$$n_a = x_a - (x_a \cdot y)$$

式中  $n_a$  はアミノ酸の変換数であり、 $x_a$  は配列番号：2 - 2 5 2のアミノ酸の総数、および  $y$  は例えば70%に対しては0.70、80%に対しては0.80、85%に対しては0.85等であり、 $x_a$  および  $y$  の積が整数でない場合は小数点以下を切り捨てて、 $x_a$  から引く。

## 【 0 0 5 6 】

10

20

30

40

50



好ましい態様において、上記のポリペプチドは配列番号：2 - 252の偶数番号で示したタンパク質、例えば2086タンパク質の成熟プロセスを経た型から選択する。2086タンパク質または均等物等は、脂質化されていても脂質化されていなくてもよい。

【0057】

QRF2086は、天然の2086シグナル配列を用いて大腸菌内で発現させることができる。しかしタンパク質の発現を改善する方法を発見することは望ましい。本発明の態様により、リーダー配列でタンパク質の脂質化型を生成する。例えば以下に、発現を促進するための分類不可能なインフルエンザ菌 (nontypable *Haemophilus influenzae*) P4タンパク質のシグナル配列の使用について記載する。

【0058】

細菌のリポタンパク質のプロセッシングは、1つのシグナル配列を含む前駆体またはプロリポタンパク質の合成から始まるが、このことは言い換えればリポタンパク質のプロセッシング/修飾部位のコンセンサスを含むことになる。このプロリポタンパク質は最初に、グラム陰性菌の内膜上またはグラム陽性菌の膜上の共通のSecシステムを通して透過する。Secシステムにより一度膜内に入ると、プロリポタンパク質はコンセンサス部位でシグナルペプチダーゼIIにより切断され、暴露されたN末端システイン残基はグリセル化およびアシル化される。Hayashi et al. 1990. Lipoproteins in bacteria (細菌におけるリポタンパク質)、J. Bioenerg. Biomembr. Jun; 22(3): 451-71; Oudega et al. 1993. *Escherichia coli* SecB, SecA, and SecY proteins are required for expression and

membrane insertion of the bacteriocin

release protein, a small lipoprotein (大

腸菌のSecB、SecA、およびSecYタンパク質は、バクテリオシンリリースタンパク質である小さなリポタンパク質の発現および膜への挿入に必要である) J. Bacteriol. Mar; 175(5): 1543-7; Sankaran et al. 1995.

Modification of bacterial lipoproteins (細菌のリポタンパク質の修飾) Methods Enzymol. 250: 683-97.

【0059】

グラム陰性菌において、脂質化されたタンパク質の外膜への移送は、リポタンパク質のポジション2での分別シグナルに依存する膜特異性を伴って、固有のABCトランスポーターシステムにより仲介される。Yakushi et al. 2000. A new ABC transporter mediating the detachment

of lipid modified proteins from membranes (脂質で修飾されたタ

ンパク質の膜からの剥離を仲介する新たなABCトランスポーター) Nat Cell Biol. Apr; 2(4): 212-8.

【0060】

細菌のリポタンパク質との融合およびそれらのシグナル配列の融合体を用いて、細菌の表面上に組換えタンパク質を提示させた。米国特許第5,583,038号および6,130,085号。リポタンパク質のシグナル配列を交換すると、リポタンパク質の産生を増加できる。De et al. 2000. Purification and characterization of *Streptococcus pneumoniae* palmitoylated pneumococcal surface adhesin A expressed in *Escherichia coli*. (大腸菌で発現させた、肺炎球菌のパルミトイル酸化した肺炎球菌表面の接着因子Aの精製および特徴づけ) Vaccine. Mar 6; 18(17): 1811-21.

【0061】

細菌のタンパク質の脂質化は、タンパク質の免疫学的反応を増加または修飾することが知られている。Erdil et al. 1993. Role of attached lipid in immunogenicity of *Borrelia burgdorferi* OspA (*Borrelia burgdorferi* OspAの免疫原性における結合した脂

質の役割) Infect. Immun. Jan; 61(1): 81-90; Snapper et al. 1995. Bacterial lipoproteins may substitute for cytokines in the humoral immune response to T

10

20

30

40

50

cell-independent type II antigens (細菌のリポタンパク質は、T細胞非依存性タイプ II 抗原への体液性免疫応答における、サイトカインと置き換わることができる) J. Immunol. Dec 15; 155(12): 5582-9。しかし細菌のリポタンパク質の発現は、プロセシングの緊縮に

より複雑化し得る。Pollitt et al. 1986. Effect of amino acid substitutions at the signal peptide cleavage site of the

*Escherichia coli* major outer membrane lipoprotein (大腸菌の主要な外膜リポタンパク質のシグナルペプチド切断部位でのアミノ酸の置換の影響)、J. Biol. Chem. Feb 5; 261(4): 1835-7; Lunn et al. 1987. Effects of

prolipoprotein signal peptide mutations on

secretion of hybrid prolipo-beta-lactamase in *Escherichia coli* (大腸菌のハイブリッド ポリリポ・ベータ・ラクタマーゼ

の分泌におけるポリリポタンパク質のシグナルペプチドの変異の影響)、J. Biol. Chem. Jun 15; 262(17): 8318-24; Klein et al. 1988.

Distinctive properties of signal sequences from bacterial lipoproteins (細菌のリポタンパク質のシグナル配列の顕著な特性)、Protein Eng. Apr; 2(1): 15-20。細菌のリポタンパク質の発現はまた、他の問

題、例えば毒性および低発現レベルにより複雑になる。Gomez et al. 1994. Nucleotide The *Bacillus subtilis* lipoprotein LpIA

causes cell lysis when expressed in *Escherichia coli*. (枯草菌リポタンパク質 Lp 1 A は大腸菌で発現させた場合に溶菌の原

因になる)、Microbiology. Aug; 140(Pt8): 1839-45; Hannsson et al. 1995.

Expression of truncated and full-length forms of the Lyme disease *Borrelia* outer surface

protein A in *Escherichia coli*. (Lyme病のボレリア属の外表面タンパク質 A の、長い領域の欠落した型および全長の型の大腸菌内での発現)、Protein Expr. Purif. Feb; 6(1): 15-24; Yakushi et al. 1997. Lethality

of the covalent linkage between mislocalized major outer membrane lipoprotein and the peptidoglycan of *Escherichia coli*. (大腸菌の誤って局在化した主要な外膜リポタンパク質およびペプチドグリカンとの共有結合の致死性、J. Bacteriol. May; 179(9): 2857-62。

#### 【0062】

分類不可能なインフルエンザ菌は P 4 と命名されたりポタンパク質 (タンパク質 “e” としても知られている) を発現する。P 4 タンパク質の組換え型は天然の P 4 シグナル配列を用いて大腸菌内で高レベルで発現させることができる。米国特許第 5, 955, 580 号。天然の P 4 シグナル配列を、大腸菌内の発現ベクター中の天然の ORF 2086 シグナル配列と置き換えると、ORF 2086 の発現レベルが増加する。

#### 【0063】

発現を増加させるために異種の P 4 シグナル配列を用いるこのコンセプトは、他の細菌のリポタンパク質に拡大することができる。特に細菌のゲノム分析により、目的のものである可能性のある多くの ORF を同定することができる。異種の宿主細胞、例えば大腸菌内で、その天然のシグナル配列を含む各 ORF を発現させるという試みは、安定性、適合性などを含む、様々なシグナル配列を使用することに付随する様々な問題を引き起こす。これらの問題を最小にするため、P 4 シグナル配列を利用して目的の各 ORF を発現させる。上述のように、P 4 シグナル配列は異種の 2086 ORF の発現を向上させる。発現ベクターは、目的の ORF の本来のシグナル配列を欠失させ、その ORF に P 4 シグナル配列を結合することにより作成する。次に適切な宿主細胞をその発現ベクターを用いて形質転換、トランスフェクションまたは感染させ、ORF の天然のシグナル配列を用いての発現と比較して ORF の発現を増加させる。

#### 【0064】

非脂質化型は、オリジナルのリーダー配列を欠損するタンパク質により、または宿主細胞において脂肪酸のアシル化の部位を特定しない配列部分に置き換えたリーダー配列により産生させる。

【0065】

他に特に言及していなければ、本発明の2086タンパク質の様々な型を当明細書では“2086”タンパク質という。他に言及していなければ上述のように“2086ポリペプチド”もまた、2086タンパク質ならびにその免疫原性部分または生物学的均等物を意味する。

【0066】

完全長の単離、精製された髄膜炎菌2086タンパク質は、10%から20%の勾配SDSポリアクリルアミドゲル(SDS-PAGE)の測定で、約28から35kDaの明確な分子量を有する。より限定的には、このタンパク質は質量分析による測定で、約26,000から30,000ダルトンの分子量を有する。

10

【0067】

好ましくは2086ポリペプチドおよび該ポリペプチドをコードするヌクレオチドを、髄膜炎菌および/または他の菌種に起因する感染の予防または改善に使用する。

(抗体)

配列番号：2-252のアミノ酸配列、それらのフラグメント、およびそれらの類似体、またはそれらを発現する細胞を含む本発明のタンパク質はまた、免疫原として使用して本発明のポリペプチドに免疫特異的な抗体を産生させることができる。本発明は、免疫特異的なポリペプチドに対する抗体、およびこのような抗体を使用しての髄膜炎菌の存在の検出、受動的防護の提供、または細胞、細胞もしくは組織の抽出物、もしくは生物学的液体中のポリペプチドの量もしくは濃度の測定を含む。

20

【0068】

本発明の抗体は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、および抗イデオタイプ抗体を含む。ポリクローナル抗体は、1つの抗原で感作した複数の動物の血清に由来する抗体分子の異質な(heterogeneous)母集団である。モノクローナル抗体は、特異的な抗原に対する実質的に同質の抗体の集団である。モノクローナル抗体は、当業者に公知の方法、例えばKohler and Milstein, 1975, Nature 256: 495-497 および米国特許第4,376,110号の方法により得ることができる。このような抗体はIgG、IgM、IgE、IgA、GILDおよびそれらのあらゆるサブクラスを含むあらゆる免疫グロブリンのクラスとすることができる。

30

【0069】

キメラ抗体は、分子の異なる部分が異なる動物種に由来する分子で、例えばネズミのモノクローナル抗体由来の可変領域およびヒトの免疫グロブリンの定常部領域を有する分子である。キメラ抗体およびそれらの製造法は当該技術分野で知られている(Cabilly et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 3273-3277;

Morrison et al., 1984, Proc.

Natl. Acad. Sci. USA 81: 6851-6855;

Boulianne et al., 1984, Nature 312: 643-646; Cabilly et al., 欧州特許出願125023(1984年11月14日公開); Taniguchi et al., 欧州特許出願171496(1985年2月19日公開); Morrison et al.,

40

欧州特許出願173494(1986年3月5日公開); Neuberger et al., PCT出願WO86/01533(1986年3月13日公開); Kudo et al., 欧州特許出願184187(1986年6月11日公開); Morrison et al., 欧州特許出願173494(1986年3月5日公開); Sahagan et al., 1986, J. Immunol. 137: 1066-1074; Robinson et al., PCT/US86/02269(1987年5月7日公開); Liu et al., 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 3439-3443; Sun et al., 1987, Proc.

Natl. Acad.

Sci. USA 84: 214-218; Better et al., 1988,

50

Science 240: 1041-1043)。これらの参照文献を当明細書によりその全内容において参照として援用する。

【0070】

抗イディオタイプ（抗 I d）抗体は、抗体の抗原結合部位に一般に結合する固有の決定基を認識する抗体である。抗 I d 抗体は、モノクローナル抗体を作成した動物と等しい種および遺伝子型の動物（例えば同系のマウス）を、それに対して抗 I d 抗体が産生されるモノクローナル抗体で免疫感作することにより作製する。免疫感作された動物は、これらのイソタイプ決定基に対する抗体（抗 I d 抗体）を産生することにより、免疫感作する抗体のイディオタイプ決定基を認識して応答することになる。

【0071】

したがって本発明のポリペプチドに対して産生されたモノクローナル抗体を用いて、適切な動物で抗 I d 抗体を誘発することができる。このように免疫感作されたマウス由来の脾臓細胞を用いて、抗 I d モノクローナル抗体を分泌する抗 I d ハイブリドーマを作成することができる。さらにこの抗 I d 抗体をキャリアー、例えばキーホール・リンペット・ヘモシアニン（K L H）にカップルさせて、さらに B A L B / c マウスの免疫感作に使用することができる。これらのマウス由来の血清は、R - P T P アーゼエピトープに対して特異的な最終的な m A b の結合特性を有する、抗・抗 I d 抗体を含むことになる。したがってこの抗 I d 抗体は、それらのイディオタイプのエピトープ、または評価するエピトープと構造的に類似する“イディオトープ”、例えば化膿連鎖球菌のポリペプチドを有する。

【0072】

“抗体”という用語はまた、完全な分子、ならびにフラグメント、例えば抗原に結合することのできる F a b の双方を含むことを意味する。F a b フラグメントは完全な抗体の F c フラグメントを欠損しており、血中からより急速に排泄され、本来の抗体より非特異的な組織への結合を低くすることができる（Wahl et al., 1983, J.Nucl. Med. 24: 316-325）。本発明に有用な抗体の F a b および他のフラグメントを、完全な抗体分子に関する方法により、髄膜炎菌ポリペプチドの検出および定量に使用できることは理解されるだろう。

【0073】

本発明の抗体、例えば抗イディオタイプ（“抗 I d”）抗体を、上述のポリペプチドに特異的な免疫学的有効量の抗体の投与を含む、哺乳類のホストにおけるナイセリア属の感染の治療法または予防法に利用することができる。抗 I d 抗体はまた、さら別の動物において免疫応答を導入するための“免疫原”として使用して、いわゆる抗・抗 I d 抗体を作成することもできる。この抗・抗 I d は、抗 I d を誘導したオリジナルの m A b とエピトープ的には同一となり得る。したがって m A b のイディオタイプの決定基に対する抗体を使用することにより、同一の特異性をもつ抗体を発現する他のクローンを同定することができる。

【0074】

この抗体は様々な方法、例えばタンパク質が発現されていることの確認、またはタンパク質が発現されている場所を確認するために使用できる。標識された抗体（例えば F A C S の蛍光標識）を無傷の細菌と共にインキュベーションできるので、例えば細菌表面上の標識の存在によりタンパク質の位置を確認することができる。

【0075】

本発明のポリペプチドに対して産生される抗体は、ポリペプチドもしくはエピトープをもっているフラグメント、類似体、または細胞を、規定のプロトコルを用いて動物に投与することにより得ることができる。モノクローナル抗体を作製するためには、継続的な細胞株の培養により産生される抗体を提供する、あらゆる技術を使用する。

【0076】

（ポリヌクレオチド）

本発明のタンパク質と同様に、本発明のポリヌクレオチドは、配列番号：1 - 253：の

10

20

30

40

50

奇数番号の基準配列のいずれかと同一である、すなわち100%同一であるヌクレオチド配列を含むことができる、または基準配列と比較して多数のヌクレオチドの変換までを含むことができる。このような変換は、トランジションおよびトランスバージョン、または挿入を含む、少なくとも1つのヌクレオチドの欠失、置換からなる群から選択され、この場合該変換は、基準ヌクレオチド配列の5'末端または3'末端の位置で、またはこれらの末端の位置の間のあらゆるところで、すなわち基準配列中のヌクレオチドの間で個々に点在して、もしくは基準配列中の1つまたはそれ以上の隣接する群としてのいずれかで起こり得る。ヌクレオチドの変換された数は、配列番号：1-253の奇数番号のいずれかのヌクレオチドの総数に、各同一性パーセントの数値百分率(100で割った値)を掛けて、該配列のヌクレオチドの該総数からその積を引くことにより決定する。

10

## 【0077】

限定する意図はないが例として、髄膜炎菌の単離されたポリヌクレオチドは、配列番号：1-253のいずれかの核酸配列と少なくとも70%の同一性を有するポリヌクレオチド配列；その縮重バリエーションまたはそのフラグメントを含み、この場合該ポリヌクレオチド配列は配列番号：1-253の核酸配列の全ポリヌクレオチド領域に渡り、 $n_n$ 個までの核酸の変換を含むことができる。式中 $n_n$ は変換の最大数であり、以下の式により算出される：

$$n_n = x_n - (x_n \cdot y)$$

式中 $x_n$ は配列番号：1-253のいずれかのヌクレオチドの総数であり、 $y$ は0.70の値であり、 $x_n$ および $y$ の積が整数でないかなる値も小数点以下を切り捨てて、 $x_n$ から引く。もちろん $y$ はまた、80%に対しては0.80、85%に対しては0.85、90%に対しては0.90、95%に対しては0.95、等の値をとることができる。配列番号：2-252のいずれかのアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列の変化は、このコードする配列におけるナンセンス変異、ミスセンス変異またはフレームシフト変異を生成し、それによりこのような変化後、ポリヌクレオチドにコードされるポリペプチドを変化させ得る。

20

## 【0078】

本発明のある態様は、2086タンパク質および2086タンパク質に対して作成された抗体をコードするポリヌクレオチド(当明細書では“2086ポリヌクレオチド”または“ORF2086ポリヌクレオチド”という)に関する。好ましい態様において、本発明の単離されたポリヌクレオチドは、配列番号：1および配列番号：253の間の奇数番号の1つから選択されたヌクレオチド配列、その縮重バリエーション、またはそのフラグメントと、少なくとも約95%の同一性を有するヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドである。当明細書で定義する場合“縮重バリエーション”は、遺伝子コードの縮重により配列番号：1および配列番号：253の間の奇数番号で示されるヌクレオチド配列とは異なるが、なお配列番号：1-253の奇数番号で示されるヌクレオチド配列によりコードされるものと等しい2086タンパク質(すなわち配列番号：2-252の偶数番号)をコードする、ポリヌクレオチド(およびそのフラグメント)と定義する。

30

## 【0079】

他の態様においてポリヌクレオチドは、配列番号：1-253の奇数番号の1つから選択されるヌクレオチド配列、その縮重バリエーションまたはそのフラグメントの相補鎖である。なお他の態様において、ポリヌクレオチドはDNA、染色体DNA、cDNAおよびRNAからなる群から選択され、さらに異種のヌクレオチドを含むことができる。もう一つの態様において単離されたポリヌクレオチドは、高いストリンジェンシーのハイブリダイズ条件下で、配列番号：1-253の1つから選択されるヌクレオチド配列、その相補鎖、その縮重バリエーション、またはそのフラグメントとハイブリダイズする。なお他の態様において、ポリヌクレオチドは中程度のストリンジェンシーのハイブリダイズ条件下でハイブリダイズする。

40

## 【0080】

2086ポリヌクレオチドは天然、合成または半合成の材料から得ることができる；さら

50

にヌクレオチド配列は、自然界で生成される配列とすることができる、または1つまたは複数の塩基の置換、欠失、挿入および逆位を含む変異により、このような自然界で生成される配列と関連付けることができるが、ただしこのような配列を含む核酸分子は、常に上述の2086免疫原性ポリペプチドとして発現させることができることは理解されるだろう。核酸分子はRNA、DNA、1本鎖もしくは2本鎖、直鎖もしくは共有結合で閉じた環状型とすることができる。ヌクレオチド配列は、それに隣接して位置する発現コントロール配列を有することができる、このようなコントロール配列は通常異種の材料に由来する。一般に本発明の核酸配列の組換え発現は、核酸配列の末端部において終止コドン配列、例えばTAAを使用することになる。

#### 【0081】

本発明はまた、低レベルのストリンジェンシーの条件下で、より好ましくはストリンジェントな条件下で、そして最も好ましくは高度にストリンジェントな条件下で、当明細書で述べたポリヌクレオチドとハイブリダイズすることのできるポリヌクレオチドを含む。ストリンジェンシーの条件の例を以下の“ストリンジェンシーの条件の表”に示す：高度にストリンジェントな条件は少なくとも、例えばA-Fの条件と同程度にストリンジェントであり；ストリンジェントな条件は少なくとも例えばG-Lの条件と同程度にストリンジェントであり；そして低レベルのストリンジェンシーの条件は少なくともM-Rの条件と同程度にストリンジェントである。

#### 【0082】

##### 【表1】

ストリンジェンシーの条件 - 表I

| ストリンジェンシーの条件 | ポリヌクレオチドハイブリッド | ハイブリッドの長さ (bp) <sup>I</sup> | ハイブリダイゼーション温度およびバッファー <sup>H</sup>      | 洗浄温度およびバッファー <sup>H</sup> |
|--------------|----------------|-----------------------------|---|---------------------------|
| A            | DNA:DNA        | > 50                        | 65EC; 1xSSC -or- 42EC; 1xSSC, 50%ホルムアミド | 65EC; 0.3xSSC             |
| B            | DNA:DNA        | < 50                        | T <sub>B</sub> ; 1xSSC                  | T <sub>B</sub> ; 1xSSC    |
| C            | DNA:RNA        | > 50                        | 67EC; 1xSSC -or- 45EC; 1xSSC, 50%ホルムアミド | 67EC; 0.3xSSC             |
| D            | DNA:RNA        | < 50                        | T <sub>D</sub> ; 1xSSC                  | T <sub>D</sub> ; 1xSSC    |
| E            | RNA:RNA        | > 50                        | 70EC; 1xSSC -or- 50EC; 1xSSC, 50%ホルムアミド | 70EC; 0.3xSSC             |
| F            | RNA:RNA        | < 50                        | T <sub>F</sub> ; 1xSSC                  | T <sub>F</sub> ; 1xSSC    |
| G            | DNA:DNA        | > 50                        | 65EC; 4xSSC -or- 42EC; 4xSSC, 50%ホルムアミド | 65EC; 1xSSC               |
| H            | DNA:DNA        | < 50                        | T <sub>H</sub> ; 4xSSC                  | T <sub>H</sub> ; 4xSSC    |
| I            | DNA:RNA        | > 50                        | 67EC; 4xSSC -or- 45EC; 4xSSC, 50%ホルムアミド | 67EC; 1xSSC               |
| J            | DNA:RNA        | < 50                        | T <sub>J</sub> ; 4xSSC                  | T <sub>J</sub> ; 4xSSC    |
| K            | RNA:RNA        | > 50                        | 70EC; 4xSSC -or- 50EC; 4xSSC, 50%ホルムアミド | 67EC; 1xSSC               |
| L            | RNA:RNA        | < 50                        | T <sub>L</sub> ; 2xSSC                  | T <sub>L</sub> ; 2xSSC    |
| M            | DNA:DNA        | > 50                        | 50EC; 4xSSC -or- 40EC; 6xSSC, 50%ホルムアミド | 50EC; 2xSSC               |
| N            | DNA:DNA        | < 50                        | T <sub>N</sub> ; 6xSSC                  | T <sub>N</sub> ; 6xSSC    |
| O            | DNA:RNA        | > 50                        | 55EC; 4xSSC -or- 42EC; 6xSSC, 50%ホルムアミド | 55EC; 2xSSC               |
| P            | DNA:RNA        | < 50                        | T <sub>P</sub> ; 6xSSC                  | T <sub>P</sub> ; 6xSSC    |
| Q            | RNA:RNA        | > 50                        | 60EC; 4xSSC -or- 45EC; 6xSSC, 50%ホルムアミド | 60EC; 2xSSC               |
| R            | RNA:RNA        | < 50                        | T <sub>R</sub> ; 4xSSC                  | T <sub>R</sub> ; 4xSSC    |

#### 【0083】

b p<sup>I</sup> : ハイブリッドの長さは、ハイブリダイズしているポリヌクレオチドのハイブリダイズした領域を構成する長さである。ポリヌクレオチドを未知の配列の標的ポリヌクレオチドとハイブリダイズさせる場合は、ハイブリッドの長さはハイブリダイズしているポリヌクレオチドの長さとして仮定する。配列の分かっているポリヌクレオチドをハイブリダイズさせる場合、ハイブリッドの長さはポリヌクレオチド配列を整列(align)し、最適な配列相補性のある1つまたは複数の領域を同定することにより、決定することができる。

## 【 0 0 8 4 】

バッファー<sup>H</sup> : S S P E ( 1 x S S P E は 0 . 1 5 M  
 N a C l、1 0 m M N a H<sub>2</sub>  
 P O<sub>4</sub>、および 1 . 2 5 m M  
 E D T A、p H 7 . 4 である ) は、ハイブリダイゼーションおよび洗浄バッファーにおいて S S C ( 1 x S S C は 0 . 1 5 M  
 N a C l および 1 5 m M クエン酸ナトリウム ) に換えることができる ; 洗浄はハイブリッド形成完了後 1 5 分間に行う。

## 【 0 0 8 5 】

T<sub>B</sub> から T<sub>R</sub> まで : 長さ 5 0 塩基対未満であることが予想されるハイブリッドのためのハイブリダイゼーション温度は、ハイブリッドの融解温度 ( T<sub>m</sub> ) より 5 - 1 0 E C 低くすべきであり、この場合 T<sub>m</sub> は以下の式より決定される。長さ 1 8 塩基対未満のハイブリッドに関しては、T<sub>m</sub> ( E C ) = 2 ( A + T 塩基数 ) + 4 ( G + C 塩基数 ) とする。長さ 1 8 および 4 9 塩基対の間のハイブリッドに関しては、T<sub>m</sub> ( E C ) = 8 1 . 5 + 1 6 . 6 ( l o g<sub>10</sub> [ N a<sup>+</sup> ] ) + 0 . 4 1 ( % G + C ) - ( 6 0 0 / N ) とするが、式中 N はハイブリッドの塩基数であり、[ N a<sup>+</sup> ] はハイブリダイゼーションバッファー中のナトリウムイオン濃度である ( 1 x S S C の [ N a<sup>+</sup> ] = 0 . 1 6 5 M ) 。

10

## 【 0 0 8 6 】

ポリヌクレオチドのハイブリダイゼーションに関するストリンジェントの条件のさらなる例は、Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis, 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual ( 分子のクローニング : 実験室マニュアル ), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 9 章 および 11 章、および Current Protocols in Molecular Biology ( 分子生物学における最新のプロトコル ), 1995, F.M. Ausubel et al. 編、John Wiley & Sons, Inc., セクション 2.10 および 6.3-6.4、に提供されており、これらを当明細書において参照として援用する。

20

## 【 0 0 8 7 】

本発明はまた、これらのポリヌクレオチドに完全に相補的なポリヌクレオチドを提供し、またアンチセンス配列をも提供する。本発明のアンチセンス配列 ( アンチセンスオリゴヌクレオチドともいう ) は、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの発現を遮断する、内部で産生される配列および外部から投与される配列の双方を含む。本発明のアンチセンス配列は、例えば約 1 5 - 2 0 塩基対を含む。アンチセンス配列は、例えば上流の翻訳されない配列に結合するプロモーターを妨害することにより転写を阻害するように、またはリボソームの結合を妨げることで本発明のポリペプチドをコードする転写物の翻訳を妨げるように、デザインすることができる。

30

## 【 0 0 8 8 】

本発明のポリヌクレオチドは多くの方法で ( 例えば化学的合成、DNAライブラリーから、生物体自体から ) 製造し、多様な形 ( 例えば 1 本鎖、2 本鎖、ベクター、プローブ、プライマー ) とすることができる。" ポリヌクレオチド " という用語は DNA および RNA、およびまたそれらの類似体、例えば主鎖の修飾を含む類似体を含む。

40

## 【 0 0 8 9 】

本発明のさらなる実施により、本発明のポリヌクレオチドは DNAライブラリー、例えば c DNAライブラリーを含む。

## ( 融合タンパク質 )

本発明はまた融合タンパク質に関する。" 融合タンパク質 " は、2 つのしばしば無関係の融合した遺伝子またはそのフラグメントにコードされるタンパク質をいう。例えば融合タンパク質は、免疫グロブリン分子の定常部領域の様々な部分を、もう一つの免疫原性タンパク質またはその一部と共に含む。多くの場合免疫グロブリン F c 領域を融合タンパク質の一部として利用することは、例えば治療および診断に使用すると薬物動態学的特性の改善をもたらすという利点がある ( 例えば E P

50

0 2 3 2 2 6 2

A 1を参照のこと)。他方使用によっては、融合タンパク質を発現、検出および精製した後にFc部分を除くことができることが望ましい。本発明の2086ポリヌクレオチドを本発明のポリペプチドの組換え生成に使用し、このヌクレオチドに成熟ポリペプチドそのものをコードする配列、またはリーディングフレーム中に他のコード配列、例えばリーダー配列もしくは分泌配列、前タンパク質もしくはプロタンパク質もしくはプレプロタンパク質の配列、ま

たは他の融合ペプチド部分をコードする配列と共に、成熟ポリペプチドをコードする配列を含ませることができる。例えば2086ポリペプチドまたは融合ポリペプチドの精製を促進するマーカー配列をコードさせることができる(Gentz et al., 1989を参照のこと、  
10  
当明細書中にこの全内容を参照として援用する)。このように本発明の実施において、Hisタグによる発現産物の精製を可能とする融合ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの製造を意図する。ポリヌクレオチドはまた、コードしない5'および3'配列、例えば転写されるが翻訳されない配列、すなわちスプライシングおよびポリアデニル化のシグナルも含むことができる。このような融合ポリペプチドは、以下に記述するように組換えDNAをクローニングする媒体で宿主細胞を形質転換/トランスフェクションまたは感染させることにより、作成することができ、その後宿主細胞から単離して、他の宿主細胞タンパク質を実質的に含まない融合ポリペプチドを提供することができる。

【0090】

(免疫原性組成物)

本発明の1つの側面は、少なくとも1つの2086タンパク質または該タンパク質をコードする核酸を含む、免疫原性組成物を提供する。上述の組成物は以下の能力、すなわち(1)複数の菌株に対して殺菌性抗体を産生する；(2)複数の菌株の表面と反応する；(3)実際の攻撃に対して受動的な防護を与える；(4)コロニー化を防ぐ能力を有する。  
20

【0091】

このような免疫原性組成物の処方物は当業者には周知である。本発明の免疫原性組成物は好ましくは、医薬的に受容可能な担体を含む。適切な医薬的に受容可能な担体および/または希釈剤は、従来のものである。適切な医薬的に受容可能な担体および/または希釈剤は、従来の溶媒、分散媒体、充填剤、固体の担体、水溶液、コーティング剤、抗菌剤および抗カビ剤、等張液、吸収遅延剤、等のいずれかおよびすべてを含む。適切な医薬的に受容可能な担体として、例えば水、生理食塩水、リン酸緩衝化生理食塩水、デキストロース、グリセロール、エタノール等の1つまたはそれより多く、ならびにそれらを組み合わせたものを含む。医薬的に受容可能な担体はさらに少量の補助物質、例えば抗体の品質保障期間または有効性を高める、湿潤剤または乳化剤、保存剤またはバッファーを含むことができる。医薬的に受容可能な担体の製造および使用は当該技術分野で公知である。従来のいずれの媒体または薬剤も活性成分と共存できない場合を除いて、本発明の免疫原性組成物におけるその使用を意図する。  
30

【0092】

このような免疫原性組成物は非経口的に、例えば皮下注または筋注のいずれかの注射により、ならびに経口または経鼻により投与することができる。筋肉内への免疫感作の方法は、WolffらによりおよびSedegahらにより記載されている。他の投与形態として、例えば経口処方物、経肺処方物、座剤、および経皮投与を利用できるが、これらに限定されない。経口処方物は例えば、医薬的グレードのマニトール、ラクトース、スターチ、ステアリン酸マグネシウム、サッカリン酸ナトリウム、セルロース、炭酸マグネシウム等のような通常用いられる賦形剤を含むが、これらに限定されない。  
40

【0093】

本発明の免疫原性組成物は、1つまたはそれ以上のアジュバントを含み、これは水酸化アルミニウム；リン酸アルミニウム；STIMULON(登録商標)

QS-21(Aquila

Biopharmaceuticals, Inc., Framingham, MA)；MPL(登録商標)(3-O-脱ア

シル化モノホスホリル脂質A；Corixa, Hamilton, MT)、529(アミノアルキルグルコ  
50



サミンフォスフェート化合物、Corixa, Hamilton, MT)、I L - 1 2 (Genetics Institute, Cambridge, MA) ; G M - C S F (Immunex Corp., Seattle, Washington) ; N - ア

セチル - ムラミル - L - セロニル(theronl) - D - イソグルタミン ( t h r - M D P ) ;

N - アセチル - ノル - ムラミル - L - アラニル - D - イソグルタミン ( C G P

1 1 6 3 7、n o r - M D Pともいう) ; N - アセチルムラミル - L - アラニル - D - イ

ソグルタミニル - L - アラニン - 2 - ( 1 ' - 2 ' - ジバルミトイル - s n - グリセロ -

3 - ヒドロキシホスホリルオキシ - エチルアミン) ( C G P

1 9 8 3 5 A、M T P - P Eともい

う) ; およびコレラ毒素を含むが、これに限定されない。使用可能な他の例として、コレラ毒素の非毒性誘導体(そのAサブユニットを含む)、および/または髄膜炎菌ポリペプチドとコレラ菌毒素もしくはそのBサブユニット(“CTB”)との複合体もしくは遺伝子工学による融合体、プロコレラゲノイド(procholeraegenoid)、カビの多糖(シゾフィランを含む)、ムラミルジペプチド、ムラミルジペプチド(“MDP”)誘導体、ホルポールエステル、大腸菌の易熱性毒素、ブロックポリマー、またはサポニンが挙げられる。

【0094】

ある好ましい態様において本発明のタンパク質を、粘膜用アジュバントを含む経口投与用免疫原性組成物中に使用し、ヒト宿主における髄膜炎菌感染の治療または予防に使用する。粘膜用アジュバントはコレラ毒素とすることができる;しかし好ましくは、本発明に従って使用することができるコレラ毒素以外の粘膜アジュバントとして、コレラホロトキシンの非毒性誘導体を含み、この場合Aサブユニットが突然変異誘発されたもの、化学的に修飾されたコレラ毒素、またはコレラ毒素アミノ酸配列の修飾により生成される関連タンパク質である。本発明の免疫原性組成物の製造に特に有用となり得る特定のコレラ毒素として、国際特許出願公開第W O

0 0 / 1 8 4 3 4 号に開示されている、変異コレラホ

ロトキシンE 2 9 Hを参照のこと(この全内容を当明細書において参照として援用する)

。これらを本発明のポリペプチドに加える、または複合させることができる。粘膜アジュバント特性または送達特性を有する他の分子、例えば大腸菌易熱性毒素(LT)に、同じ技術を適用することができる。粘膜用アジュバント活性または送達活性を有する他の化合物として、例えば胆汁;ポリカチオン、例えばDEAE-デキストランおよびポリオルニチン;界面活性剤、例えばドデシルベンゼン硫酸ナトリウム;脂質を複合した物質;抗生物質、例えばストレプトマイシン;ビタミンA;および粘膜表面の構造的または機能的完全性を変えるその他の物質、を使用することができる。他の粘膜活性化化合物として、微生物の構造の誘導体、例えばMDP;アクリジンおよびシメチジンを含む。STIMULON(登録商標)QS-21、MPLおよびIL-12もまた上述のように使用することができる。

【0095】

本発明の免疫原性組成物は、吸収に適するサイズのマイクロスフェアを形成するように、ISCOMS(免疫を刺激する複合物質)、CTBを含有するISCOMS、リボソーム、または化合物、例えばアクリレートもしくはDL-ラクチド/グリコシド共重合体中にカプセル化した剤形で送達することができる。本発明のタンパク質はまた、油性エマルジョン中に混合することもできる。

【0096】

(複数の抗原)

本発明のタンパク質、ポリヌクレオチドおよび均等物を含む免疫原性物質は、免疫組成物中に単一の活性免疫原として投与することができるが、あるいは同組成物は、他のナイセリア属、免疫原性ポリペプチド、または1つまたはそれより多くの微生物病原体(例えば限定はしないがウイルス、プリオン、細菌、もしくはカビ)の免疫学的に活性なタンパク質、またはきょう膜の多糖を含む他の活性な免疫原を含むことができる。組成物は1つまたはそれより多くの所望のタンパク質、フラグメントまたは医薬的化合物を、選択された

10

20

30

40

50

適用に所望されるように含むことができる。同様に、免疫原性組成物中に1つまたはそれより多くの核酸を使用する本発明の組成物はまた、上述のようにタンパク質の同じ変異を示す群をコードする核酸を含むことができる。

【0097】

あらゆる複数の抗原または多価免疫原組成物を、本発明により意図するものとする。例えば本発明の組成物は、2つまたはそれより多くの2086タンパク質の組み合わせ、2086タンパク質と1つまたはそれより多くのPorAタンパク質との組み合わせ、2086タンパク質と髄膜炎菌血清群A、C、YおよびW135多糖および/または多糖複合体との組み合わせ、2086タンパク質と髄膜炎菌および肺炎球菌を組み合わせたものの組み合わせ、または粘膜への送達に適する形の前述の物質のいずれかの組み合わせを含むことができる。当業者はこのような複数の抗原または多価免疫原組成物を、容易に製剤化することができるだろう。

10

【0098】

本発明はまた、病原体に対して有用なあらゆる組成物を本発明の組成物中に、または本発明の組成物と共に組み合わせることのできる、多重免疫感作処方を意図する。例えば限定はしないが、本発明の免疫原性組成物と、肺炎球菌に対して免疫感作するためのもう1つの免疫学的組成物を、多重免疫感作処方の一部として患者に投与することができる。当業者は、多重免疫感作計画を開発、実行するために、本発明の免疫原性組成物と共に合わせて使用する免疫原性組成物を、容易に選択することができるだろう。

20

【0099】

本発明の特定の態様は、肺炎球菌感染の予防または改善のための組成物中に、または治療計画の一部として、本発明の1つもしくはそれより多くのポリペプチド、またはそれをコードする核酸を使用することに関する。2086ポリペプチドまたは2086ポリヌクレオチドを、肺炎球菌感染に対して使用するあらゆる免疫原性組成物と組み合わせることができる。また2086ポリペプチドまたは2086ポリヌクレオチドを、あらゆる他のタンパク質または多糖を基本とする髄膜炎菌ワクチンと組み合わせることもできる。

【0100】

2086ポリペプチド、フラグメントおよび均等物は、複合免疫原性組成物の一部として使用することができる；この場合、いくつかの血清型および/またはいくつかの疾患に対して免疫原性特性を有する組成物を作成するために、1つまたはそれより多くのタンパク質またはポリペプチドを担体と複合させる。あるいは2086ポリペプチドの1つを、他の免疫原性ポリペプチドの担体タンパク質として使用することができる。

30

【0101】

本発明はまた、哺乳類に本発明の免疫原性組成物を提供するステップを含む、該哺乳類における免疫応答を誘導する方法に関する。免疫原性組成物は、治療する動物またはヒトにおいて抗原性があり、このような組成物中に含まれる免疫学的有効量のポリペプチドが、髄膜炎菌感染に対して所望の免疫応答を惹起する。好ましい態様は、免疫学的有効量の組成物をヒトに投与することを含む、ヒトにおける髄膜炎菌感染の改善または予防を含む治療法に関する。

【0102】

“免疫学的有効量”という語句は本明細書で使用する場合、1回の投与にでまたは一連の投与の一部としてのいずれかにより、治療した個体の免疫系が細菌感染の臨床的衝撃を低減する応答を引き起こす少なくとも要因となるのに十分な、哺乳類のホスト（好ましくはヒト）へのその用量の投与をいう。この有効量は、細菌による負荷をわずかに軽減する程度から感染の予防までの範囲とすることができる。理想的には治療した個体が、細菌感染によるより重症な臨床症状を発現しなくなる。投与量は個体の特定の条件に依存して変えることができる。この量はルーチンの試みで、あるいは当業者に公知の方法により決定することができる。

40

【0103】

本発明のもう一つの特定の側面は、本発明のタンパク質または免疫原性部分そのものを発

50

現するベクターまたはプラスミドを、免疫原性組成物として使用することに関する。したがって本発明のさらなる側面として、哺乳類における免疫応答を誘導する方法を提供し、その方法は少なくとも1つの単離された2086ポリペプチドを発現するベクターまたはプラスミドを哺乳類に提供することを含む。本発明のタンパク質は、外来ポリペプチドとしてポリペプチドまたは免疫原性部分を発現するために必要な遺伝的材料を含む、生きているベクターを用いて、特に生きている組換え細菌、ウイルスまたはその他の生きている物質を用いて、哺乳類に送達することができる。

【0104】

本発明のさらなる実施により、哺乳類における細菌性髄膜炎を診断するための方法を提供する：その方法として、哺乳類、または該哺乳類由来の組織サンプル、配列番号2-252の偶数番号のいずれかのアミノ酸配列を含む少なくとも1つのポリペプチドと免疫特異的に結合する抗体を含む抗体組成物を接触させた該哺乳類または組織サンプル、における免疫複合体の存在を検出する；その場合哺乳類または組織サンプルは免疫複合体の形成に適する条件下で抗体組成物と接触させる。

10

【0105】

(ウイルスベクターおよび非ウイルスベクター)

好ましいベクターは、特にin vitro および in vivoの細胞アッセイに関してはウイルスベクター、例えばレンチウイルス、レトロウイルス、ヘルペスウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ワクシニアウイルス、バキュロウイルス、および望ましい細胞指向性を有するその他の組換えウイルスである。このように2086タンパク質またはその免疫原性フラグメントをコードする核酸を、ウイルスベクターを用いてまたはDNAを直接導入することにより、in vivo、ex vivo、またはin vitroで導入することができる。標的組織内での発現は、例えばウイルスベクターもしくは受容体リガンドを用いて、または組織特異的なプロモーターを使用することにより、またはそれら双方により、遺伝子組換えしたベクターを特定の細胞にターゲティングすることにより達成することができる。

20

標的への遺伝子の送達はPCT出願公開第WO

95/28494号に記載されており、

その全内容を当明細書において参照として援用する。

【0106】

in vivoまたはex vivoターゲティングにおいて、または治療法として使用する一般的なウイルスベクターは、DNAを基本とするベクターおよびレトロウイルスベクターである。ウイルスベクターの構築法および使用法は、当該技術分野で公知である(例えばMiller and Rosman, Biotechniques, 1992, 7: 980-990)。好ましくはウイルスベクターは複製欠陥とする、すなわちウイルスベクターは標的細胞内で自動的に複製することはできない。好ましくは複製欠陥ウイルスは最小のウイルスとする、すなわちゲノムを外膜で包みウイルス粒子を形成するために必要なウイルスのゲノム配列のみを保有するものとする。

30

【0107】

DNAウイルスベクターは弱毒または欠陥DNAウイルス、例えば限定はしないが単純ヘルペスウイルス(HSV)、パピローマウイルス、エプスタイン・バーウイルス(EBV)、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス(AAV)等を含む。ウイルス遺伝子を完全にまたはほぼ完全に欠損する欠陥ウイルスが好ましい。欠陥ウイルスは細胞内への導入後の感染性はない。欠陥ウイルスベクターを使用することで、ベクターが他の細胞に感染する可能性を憂慮することなく、特定の、局所的領域の細胞への投与が可能となる。このように特定の組織を特異的に標的とすることができる。特定のベクターの例として以下を含むがこれに限定されない、すなわち欠陥ヘルペスウイルス1(HSV1)ベクター(Kaplit et al., Molec. Cell. Neurosci., 1991, 2: 320-330)、糖タンパク質L遺伝子を欠損する欠陥ヘルペスウイルスベクター、または他の欠陥ヘルペスウイルスベクター(PCT

40

出願公開第WO

94/21807号およびWO 92/05263号)；弱毒アデノウイルスベクター、例

50

えばStratford-Perricaudet

et al.に記載されているベクター (J. Clin. Invest., 1992, 90: 626-630; またLa Sall e et al., Science, 1993, 259: 988-990も参照のこと); および欠陥アデノ随伴ウイルスベクター (Samulski et al., J. Virol., 1987, 61: 3096-3101; Samulski et al., J. Virol., 1989, 63: 3822-3828; Lebkowski et al., Mol. Cell. Biol., 1988, 8: 3988-3996) が挙げられ、これらの各文献を当明細書において参照として援用する。

【0108】

様々な会社からウイルスベクターが市販されており、以下を含むがこれに限定されない、すなわちAvigen, Inc. (Alameda, CA; AAVベクター)、Cell Genesys (Foster City, CA ;レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、AAVベクター、およびレンチウイルスベクター)、Clontech (レトロウイルスベクターおよびパキキュロウイルスベクター)、Genovo, Inc.(Sharon Hill, PA; アデノウイルスベクターおよびAAVベクター)、Genvec (アデノウイルスベクター)、IntroGene (Leiden, Netherlands: アデノウイルスベクター)、Molecular Medicine (レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、AAVベクターおよびヘルペスウイルスベクター)、Norgen (アデノウイルスベクター)、Oxford BioMedica (Oxford, United Kingdom; レンチウイルスベクター)、およびTransgene (Strasbourg, France; アデノウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、レトロウイルスベクター、およびレンチウイルスベクター)があり、その全内容を当明細書において参照として援用する。

【0109】

(アデノウイルスベクター)

アデノウイルスは、本発明の核酸を様々なタイプの細胞に効率的に送達するように修飾することのできる、真核DNAウイルスである。アデノウイルスには様々な血清型がある。これらの血清型のうち、本発明の範疇において好ましくは2型または5型ヒトアデノウイルス (Ad2もしくはAd5) または動物起源のアデノウイルスを使用する (PCT出願公開第WO

94/26914号を参照のこと)。本発明の範疇に使用することのできる

動物起源のこれらのアデノウイルスは、イヌ、ウシ、ネズミ (例: Mavl, Beard et al., Virology, 1990, 75-81)、ヒツジ、ブタ、トリ、およびサル (例: SAV) を起源とするアデノウイルスを含む。好ましくは動物起源のアデノウイルスは、イヌアデノウイルス、より好ましくはCAV2アデノウイルス (例えばManhattanまたはA26/61株、ATCC VR-800) である。様々な複製欠陥アデノウイルスおよび最小のアデノウイルスのベクターについて記載されてきた (PCT出願公開第WO

94/26914号、

WO 95/02697号、WO 94/28938号、WO 94/28152号、WO

94/12649号、WO 95/02697号、WO 96/22378号)。本発明

による複製欠陥組換えアデノウイルスは、当業者に公知のいずれの技術でも製造することができる (Levrero et al., Gene, 1991, 101: 195; 欧州特許出願公開第EP 185

573号; Graham,

EMBO J., 1984, 3: 2917; Graham et al., J. Gen. Virol., 1977, 36: 59)。組換えア

デノウイルスは一般の当業者に周知の標準的な分子生物学的技術を用

いて回収し精製される。

【0110】

(アデノ随伴ウイルス)

アデノ随伴ウイルス (AAV) は、それらの感染する細胞のゲノム中に安定して部位特異的に組み込むことのできる、比較的小さなサイズのDNAウイルスである。これらはまた、細胞の成長、形態または分化になんら影響を与えることなく広範囲の細胞に感染することができ、ヒトの病理への関与は認められていない。AAVゲノムはクローン化、配列決定および特徴付けが完了している。In vitroおよび in vivoで遺伝子を伝達するためのA

A V由来のベクターの使用について、記述されている ( P C T 出願公開第 W O 9 1 / 1 8 0 8 8 号および W O 9 3 / 0 9 2 3 9 号 ; 米国特許第 4 , 7 9 7 , 3 6 8 号および 5 , 1 3 9 , 9 4 1 号 ; 欧州特許出願公開第 E P 4 8 8 5 2 8 号を参照のこと ) 。 本発明による複製欠陥組換え A A V は、目的の核酸配列の両側を2つの A A V 逆位末端反復 ( I T R ) 領域ではさんで含むプラスミド、および A A V のキャプシド形成遺伝子 ( r e p および c a p 遺伝子 ) を保有するプラスミドを、ヒトヘルパーウイルス ( 例えばアデノウイルス ) で感染させた細胞株内に、合わせてトランスフェクト ( c o t r a n s f e c t ) することにより、製造することができる。次に作製した組換え A A V を標準的な技術により精製する。

10

#### 【 0 1 1 1 】

##### ( レトロウイルスベクター )

本発明のもう一つに実施において、核酸をレトロウイルスベクターに導入することができる、例えば以下の文献、米国特許第 5 , 3 9 9 , 3 4 6 号 ; Mann et al., Cell, 1983, 33: 153; 米国特許第 4 , 6 5 0 , 7 6 4 号および 4 , 9 8 0 , 2 8 9 号 ; Markowitz et

20

al., J. Virol., 1988, 62: 1120; 米国特許第 5 , 1 2 4 , 2 6 3 号 ; 欧州特許出願公開第 E P 4 5 3 2 4 2 号および E P

1 7 8 2 2 0 号 ; Bernstein et al., Genet.

Eng., 1985, 7: 235; McCormick,

BioTechnology, 1985, 3: 689; P C T 出願公開第 W

O 9 5 / 0 7 3 5 8 号 ; および Kuo de

al., Blood, 1993, 82: 845に記載されており、

これらの各文献をその全内容において参照として援用する。レトロウイルスは分裂細胞に感染する組み込むタイプのウイルスである。レトロウイルスゲノムは2つの L T R、キャプシド形成配列および3つのコード領域 ( g a g、p o l および e n v ) を含む。組換えレトロウイルスにおいては、一般に g a g、p o l および e n v 遺伝子をすべてまたは部分的に欠失させ、目的の異種の核酸配列で置き換える。これらのベクターは異なるタイプのレトロウイルス、例えば H I V、M o M u L V ( “ ネズミ Moloney 白血病ウイルス ” )、M S V ( “ ネズミ Moloney 肉腫ウイルス ” )、H a S V ( “ Harvey 肉腫ウイルス ” ) ; S N V ( “ 脾臓壊死ウイルス ” ) ; R S V ( “ Rous 肉腫ウイルス ” ) および Friend ウイルス、から作成することができる。適切なパッケージング細胞株は先行技術に記載されており、特に P A 3 1 7 細胞株 ( 米国特許第 4 , 8 6 1 , 7 1 9 号 ) ; P s i C R I P 細胞株 ( P C T 出願公開第 W O

30

9 0 / 0 2 8 0 6 号 ) および G P + e n v A m - 1 2 細胞株 (

P C T 出願公開第 W O 8 9 / 0 7 1 5 0 号 ) が挙げられる。加えて組換えレトロウイルスベクターは、転写活性ならびに g a g 遺伝子の一部に含まれ得る、余分のキャプシド形成配列を抑制するため2つの L T R の間に修飾を含ませることができる ( Bender et al., J. Virol., 1987, 61: 1639 ) 。 組換えレトロウイルスベクターは一般の当業者に公知の標準的な技術により精製される。

40

#### 【 0 1 1 2 】

レトロウイルスベクターは感染性の粒子として機能するように、または1世代のトランスフェクションを行うように作成することができる。前者の場合ウイルスは、発癌性の形質転換特性に関与する遺伝子を除くすべてのウイルス遺伝子を保持し、かつ異種の遺伝子を発現するように修飾する。非感染性のウイルスベクターは、そのウイルスのパッケージングシグナルは破壊するが、異種の遺伝子およびパッケージングシグナルを含むように作製された、一緒に導入する ( c o - i n t r o d u c e e d ) ウイルスのパッケージングに必要な構造遺伝子は保持するように操作する。したがって作製されたウイルス粒子はさらなるウイルスを産

50

生する能力はない。

【0113】

レトロウイルスベクターはまたDNAウイルスにより導入することもでき、この場合1サイクルのレトロウイルスの複製が可能となり、トランスフェクション効率が増幅される（PCT出願公開第WO

95/22617号、WO 95/26411号、WO 96/

39036号、およびWO

97/19182号を参照のこと）。

【0114】

（レンチウイルスベクター）

本発明のもう一つの実施において、レンチウイルスベクターを直接送達のための媒体物質として使用して、脳、網膜、筋肉、肝臓および血液を含むいくつかの組織のタイプにおいて導入遺伝子の発現を持続することができる。このベクターをこれらの組織の分裂細胞および非分裂細胞に効率的に形質導入し、目的の遺伝子の長期間の発現を達成することができる。総説として、Naldini, Curr. Opin. Biotechnol., 1998, 9: 457-62を参照のこと；またZufferey, et al., J. Virol., 1998, 72: 9873-80も参照のこと。レンチウイルスのパッケージング細胞株は入手可能であり、当該技術分野で一般に知られている。これらは遺伝子治療用の高力価のレンチウイルスベクターの産生を促進する。一例として、ウイルス粒子を10<sup>6</sup>

IU/mL以上の力価で少なくとも3から4日間産生できる、テト

ラサイクリン誘発型VSV-G類型レンチウイルスパッケージング細胞株がある（Kafri, et al., J. Virol., 1999, 73: 576-584）。誘発型細胞株により産生されたベクターは、in vitroおよびin vivoで非分裂細胞に効率的に形質導入させるため必要に応じて濃縮することができる。

【0115】

（非ウイルスベクター）

本発明のもう一つの実施において、リポフェクションにより裸のDNAとしてまたは他のトランスフェクション促進物質（ペプチド、ポリマー等）と共に、ベクターをin vivoで導入することができる。合成陽イオン脂質を使用して、マーカーをコードする遺伝子をin vivoでトランスフェクションするためのリポソームを製造することができる。（Felgner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1987, 84: 7413-7417;

Felgner and Ringold, Science, 1989, 337: 387-388; Mackey, et al., Proc. Natl.

Acad. Sci. U.S.A., 1988, 85: 8027-8031; Ulmer et al., Science, 1993, 259:

1745-1748）。核酸の伝達に有用な脂質化合物および脂質組成物はPCT特許出願公開第WO

95/18863号お

よびWO 96/17823号、および米国特許第5,459,127号に記載されてい

る。脂質はターゲティングのために他の分子と化学的にカップルさせることができる（Mackey, et al., 上記参照のこと）。標的のペプチド、例えばホルモンもしくは神経伝達物質、および抗体のようなタンパク質、または非ペプチド分子をリポソームと化学的にカップルさせることができる。

【0116】

他の分子、例えばカチオン性オリゴペプチド（例えばPCT特許出願公開第WO

95/21931号）、DNA結合タンパク質由来のペプチド（例えばPCT特許出願公開第

WO 96/25508号）またはカチオン性ポリマー（例えばPCT特許出願公開第WO

95/21931号）もまた、in vivoでの核酸のトランスフェクションの促進に有用である。

【0117】

in vivoにおいて、裸のDNAプラスミドとしてのベクターを導入することもまた可能

10

20

30

40

50

である。ワクチンの目的、または遺伝子治療のための裸のDNAベクターを、当該技術分野の公知の方法、例えばエレクトロポレーション、マイクロインジェクション、細胞融合、DEAEデキストラン、リン酸カルシウム沈降法、遺伝子銃の使用、またはDNAベクター輸送体の使用により、所望の宿主細胞内に導入することができる(例えばWu et al., J. Biol. Chem., 1992, 267: 963-967; Wu and Wu, J. Biol. Chem., 1988, 263: 14621-14624; カナダ特許出願公開第2,012,311号; Williams et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1991, 88: 2726-2730)。受容体を介してDNAを送達する方法もまた利用できる(Curiel et al., Hum. Gene Ther., 1992, 3: 147-154; Wu and Wu, J. Biol. Chem., 1987, 262: 4429-4432)。米国特許第5,580,859号および5,589,466号は、哺乳類におけるトランスフェクション促進物質を使用せずに外来DNA配列を送達する方法を開示している。最近、electrotransferと命名された比較的低電圧で高効率のin vivo DNA伝達技術について記述があった(Mir et al., C. P. Acad. Sci., 1988, 321: 893; PCT出願公開第WO 99/01157号; WO 99/01158号; WO 99/01175号)。したがって本発明のさらなる態様は、本発明の2086ポリペプチドをコードするDNA分子の一定量を、所望によりトランスフェクション促進物質と共にヒトに投与することを含む、該ヒトにおける免疫応答の誘導法に関する。この場合該ポリペプチドは、発現する場合には免疫原性を保持するものとし、免疫原性組成物中に含ませてヒトに投与する場合には、ナイセリア属の病原体、例えば髄膜炎菌によるその後のヒトへの感染時に、疾患の増強を誘発しない防護を提供する。トランスフェクション促進剤は当該技術分野で知られており、ブピビカイン(bupivacaine)、およびその他の局所麻酔剤(例えば米国特許第5,739,118号を参照のこと)およびカチオン性ポリアミン(国際特許出願第WO 96/10038号に公開されている)を含む、これらの文献を当明細書において参照として援用する。

10

20

30

40

50

#### 【0118】

本発明はまた、上述のように2086ポリペプチドに特異的なモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体のいずれかとすることができる抗体に関する。このような抗体は当業者に周知の方法で作成することができる。

#### 【0119】

##### (細菌の発現系およびプラスミド)

本発明はまた、プロモーター配列およびイニシエーター配列を有する発現コントロール配列、および本発明のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、すなわちプロモーター配列およびイニシエーター配列の3'側に位置するヌクレオチド配列を含む組換えDNA分子、例えば、ベクターまたはプラスミドを提供する。なおもう一つの側面において本発明は、プロモーター配列およびイニシエーター配列を有する発現コントロール配列、および2086ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、すなわちプロモーター配列およびイニシエーター配列の3'側に位置するヌクレオチド配列を含む、2086ポリペプチドを発現することのできる、組換えDNAクローニング媒体を提供する。さらなる側面において、上述のように組換えDNAクローニング媒体および/または組換えDNA分子を含む宿主細胞を提供する。適切な発現コントロール配列および宿主細胞/クローニング媒体との組み合わせは、当該技術分野で良く知られており、例としてSambrook et al. (1989)に記載されている。

#### 【0120】

本発明の所望の1つのポリペプチドを発現する、組換えDNAクローニング媒体および/または宿主細胞を、対応する2086ポリヌクレオチドを含むプラスミドで、このようなクローニング媒体または宿主細胞を、形質転換、トランスフェクト、または感染させることによりいったん作製した後は、クローニング媒体または宿主細胞を、ポリペプチドを発現するような条件下で培養する。次にこのポリペプチドを、当業者に周知の技術により

宿主細胞の成分を実質的に含まないように単離する。

【 0 1 2 1 】

以下の実施例は本発明の好ましい態様を説明するためのものである。以下に示す実施例に開示された技術は、本発明を実践する上でうまく機能するように本発明者らにより今回開発された技術を説明するものであり、したがってその実践のための好ましい方法を構築するものと考えることができることを、当業者は理解すべきであろう。しかし当業者は本開示を考慮して、開示されている具体的な態様に多くの変更が可能であり、本発明の精神および範疇から離れずに同様のまたは類似の結果がなお得られることを、理解すべきであろう。

【実施例】

【 0 1 2 2 】

実施例

実施例 1

(異種の菌株に対して殺菌性抗体を産生することのできるナイセリア菌膜タンパク質抽出物の同定)

以下の表IIに示したように、LOS除去した(LOS-depleted)外膜タンパク質調製物が殺菌性抗体を産生することが示された。これらの抗体はしばしば各菌株のPorAへと方向付けられる。血清群B髄膜炎菌株8529(B:15:P1.7b,3)由来のLOSを除去した外膜調製物は、意外なことに幾つかの異種菌株に対して殺菌性抗体を産生することから、この点において通常とは異なっている。

【 0 1 2 3 】

【表2-1】

表I I 髄膜炎菌の異なる菌株に対する抗sOMPのBC活性

| 血清 第6週                          | H4476  | 5315 | H355  | M982 | 880649 | 8529*           | NMB   |
|---------------------------------|--------|------|-------|------|--------|-----------------|-------|
| 血清型サブタイプ                        | PL7,16 | P1.5 | P1.15 | P1.9 | P1.4   | P1.3            | PL5,2 |
| sOMPs H4476 25µg<br>QS-21 20µg  | 1,000  | <50  | <50   | <50  | <50    | 980             | <50   |
| sOMPs 5315 25µg<br>QS-21 20µg   | 50     | <50  | <50   | <50  | <50    | 2170            | <50   |
| sOMPs H355 25µg<br>QS-21 20µg   | <50    | <50  | 450   | <50  | <50    | 860             | <50   |
| sOMPs M982 25µg<br>QS-21 20µg   | 92     | <50  | <50   | 300  | <50    | 1100            | <50   |
| sOMPs 880649 25µg<br>QS-21 20µg | 50     | <50  | <50   | <50  | <50    | 1190            | <50   |
| sOMPs 8529 25µg<br>QS-21 20µg   | 1,000  | <50  | 450   | 50   | 215    | >4050<br>(81.7) | <50   |
| sOMPs 2596 25µg<br>QS-21 20µg   | <50    | <50  | <50   | <50  | <50    | 790             | 148   |
| 全細胞コントロール血清<br>25µg 30MPL 25µg  | 450    | 50   | 100   | 500  | 150    | >1350<br>(66.0) | 952   |

【 0 1 2 4 】

異種への殺菌性抗体の産生に関与する抗原(複数)の単離および特徴付けを促進するため、どの界面活性剤で最適ni 抗原(複数)抽出ができるかの同定を検討した。

【 0 1 2 5 】

(菌株および培養条件)

凍結バイアルからの髄膜炎菌株8529をGCプレート上で画線培養した。(髄膜炎菌株8529はThe RIYM, Bilthoven, The Netherlandsより供与を受けた)。プレートを36 / 5 % CO<sub>2</sub>で7.5時間インキュベーションした。いくつかのコロニーを使用して

、修飾したFrantz培地 + GC補足成分

50 mLを含むフラスコに接種した。フラスコを36 でエアシェーカー(air shaker)中でインキュベーションし、200 RPMで4.5時間撹拌した。5 mLを使用して、修飾したFrantz培地 + GC補足成分

450 mLを含

むFrenbachフラスコに接種した。このフラスコを36 でair shaker中でインキュベーションし、100 RPMで11時間撹拌した。450 mLすべてを使用して、10 Lのファ

10

20

30

40

50



ーメンター内の修飾したFrantz培地 + G C 補足成分

8 . 5 L 中に接種した。

【 0 1 2 6 】

【 表 2 - 2 】

修飾したFrantz 培地の成分：

|                      |         |
|----------------------|---------|
| グルタミン酸               | 1.3 g/L |
| システイン                | 0.02    |
| リン酸ナトリウム、 2塩基性、 7水和物 | 10      |
| 塩化カリウム               | 0.09    |
| 塩化ナトリウム              | 6       |
| 塩化アンモニウム             | 1.25    |
| 透析した酵母抽出物 (Y E)      | 40 ml   |

(2.5% Y E 溶液は5倍量の蒸留水に対してオーバーナイト透析した後オートクレーブした)

10

G C 補足成分 1 0 0 x、フィルター滅菌

|           |         |
|-----------|---------|
| デキストロース   | 400 g/L |
| グルタミン酸    | 10      |
| コカルボキシラーゼ | 0.02    |
| 硝酸化鉄      | 0.5     |

20

【 0 1 2 7 】

発酵中、以下のようにパラメータのコントロールを行った：温度 = 3 6 ; p H = 7 . 4 ; 溶解酸素濃度 = 2 0 % 。 泡の発生をコントロールするため P - 2 0 0 0 消泡剤を数滴加えた。増殖が定常期に達するまで培養を行った。O D 6 5 0 = 5 . 2 5 で細胞を遠心して集めた。典型的には湿った細胞ペレット総計 1 0 0 - 3 0 0 グラムを ~ 8 . 5 L の培地から得た。

【 0 1 2 8 】

(異種への殺菌性抗体を産生する髄膜炎菌由来の外膜タンパク質分画の部分的精製：)

細胞の湿重量 1 0 0 グラムを懸濁し、 1 0 m M

H E P E S - N a O H、p H 7 . 4、1 m M N a<sub>2</sub> E D T A にて湿重量の 5 倍量とし、~ 1 8 , 0 0 0 p s i で容器に取り付けた 1 1 0 Y マイクロフルイダイザー (microfluidizer) を通して溶菌させた。溶菌液を清澄にし、3 0 0 , 0 0 0 x g、1 時間、1 0 で遠心して細胞のエンベロープを単離した。細胞のエンベロープホモジナイザーで懸濁させて同じバッファーで 2 回洗浄し、上記のように遠心した。次に細胞のエンベロープを 1 0 m M

H E P E S - N a O H、p H 7 . 4、1 m M M g C l<sub>2</sub> 中の 1 % ( w / v ) TritonX-100 溶液 3 2 0 m L で抽出した。以下の表 III に示したように、続いての TritonX-100 および Zwittergent 3-14 を用いての異なる界面活性剤による抽出、およびその後のマウスの免疫感作の結果、Triton が目的の候補物質を最適に抽出することを決定することができた。この TritonX-100 抽出物は表 III に列記した 5 種の菌株のうち 4 種に対して殺菌性抗体反応を示したため、次に BioRad Rotophor

ユニットの分取用等電点電気泳動 ( I E F ) による分画を行った。両性電解質濃度は 1 % p H 4 - 6 を混合して 1 % p H 3 - 1 0 とした。表 III に示したように、いくつかの分画が異種への殺菌性反応を示すことが発見された。I E F から得られた、5 . 5 - 7 . 8 の p H 範囲に濃縮されている分画は、殺菌性のアッセイにより決定したところほとんどの菌株に対して異種への反応を示した。プールした I E F 分画を濃縮し、両性電解質をエタノール沈殿により除去した。陰イオン交換カラムで、約 5 . 5 - 7 . 8 の p H 範囲で得られたタンパク質の一部を吸着させ、吸着タンパク質と非吸着タンパク質によるマウスの免疫感作後に得られた殺菌活性を比較することによりさらに精製を行った。再び表 II に表した

30

40

50

ように、多くのタンパク質は陰イオン交換樹脂に吸着されたが、カラムに吸着されなかったタンパク質が異種へのより高い殺菌性抗体を産生した。

【 0 1 2 9 】

【 表 3 】

表 III

| 方法        | 分画                    | BC <sub>29</sub> 標的菌株 |        |      |      |      |
|-----------|-----------------------|-----------------------|--------|------|------|------|
|           |                       | H4476                 | 880649 | H355 | 539* | M982 |
| 除去        | LOS-                  |                       |        |      |      |      |
|           | sOMPs                 | 1,000                 | 215    | 450  | NC   | 50   |
| 界面活性剤抽出物  | 細胞質抽出                 | 200                   | NT     | NT   | NT   | NT   |
|           | TX-100                | >800                  | >800   | >800 | >800 | <25  |
|           | Zwittergent 3-12      | 400                   | >25    | 100  | 400  | <25  |
|           | Zwittergent 3-14      | <25                   | NT     | NT   | NT   | NT   |
|           | Zw 3-14 + NaCl        | <25                   | NT     | NT   | NT   | NT   |
|           | サルコシル                 | <25                   | NT     | NT   | NT   | NT   |
|           | Zw 3-14 + 加熱          | <25                   | NT     | NT   | NT   | NT   |
| 分離用 I E F | 分画 1-3 (pH 2.3-3.9)   | 50                    | NT     | NT   | NT   | NT   |
|           | 分画 4 (pH 4.1)         | >800                  | <25    | 100  | <25  | NT   |
|           | 分画 5 (pH 4.3)         | >800                  | <25    | 100  | 200  | NT   |
|           | 分画 6 (pH 4.5)         | 400                   | NT     | NT   | NT   | NT   |
|           | 分画 7 (pH 4.8)         | <25                   | NT     | NT   | NT   | NT   |
|           | 分画 8-9 (pH 5.0-5.3)   | <25                   | NT     | NT   | NT   | NT   |
|           | 分画 10-17 (pH 5.3-7.8) | >800                  | 200    | <300 | <300 | NT   |
| 陰イオン交換    | 吸着                    | 400                   | NT     | 100  | 100  | NT   |
|           | 非吸着                   | >6,400                | NT     | <300 | <300 | NT   |

10 NT: 未検査

\* 臨床的に単離された539は8529と同質の菌株であり、同じ流行から単離されている。

【 0 1 3 0 】

図 1 A に示したように、SDS - PAGE で決定したところ、非吸着分画に2つの主要タンパク質が存在していた。これらのタンパク質を同定するため、2種類の分析を行った。1つの分析として限定タンパク質分解 (図 1 A および図 1 B を参照のこと) の後、ペプチドの単離およびタンパク質の直接配列決定を行った。他の分析としてSDS - PAGE の後、ゲル切り出し、タンパク質分解酵素による消化、およびLC - MS / MS (液体クロマトグラフィータンデム質量分析) を行い、(図 3 参照) 目的の調製物の成分の質量分析の情報を得た。(本セクションで後述するペプチドマッピング法および配列決定法を参照のこと)

髄膜炎菌 A の Sanger ゲノム配列を、Zagursky and Russell, 2001, BioTechniques, 31: 636-659 に記載されている方法およびアルゴリズムを用いて分析した。この網羅的分析により、12,000 以上のオープンリーディングフレーム (ORF) の可能性が得られた。上述の直接配列決定データおよび質量分析データの双方は、非吸着分画の主要成分が、Sanger のデータベースの分析に存在するいくつかの ORF 産生物であることを示した。この方法論により同定された3つの顕著なタンパク質は、ORF 4431、5163 および 2086 に対応していた (図 1 B および 3 を参照のこと)。

【 0 1 3 1 】

ORF 4431 は、分画中で同定された最も顕著なタンパク質であったが、組換え脂質化 4431 に対するマウスの抗体は殺菌性ではなく、動物モデルにおける防護的応答は提供しなかった。ORF 5163 のさらなる分析は研究中である。

当実施例で述べた調製物の第 2 に顕著な成分は ORF 2086 の生成物に対応している。

【 0 1 3 2 】

(免疫原性の方法:)

(抗血清の調製:)

記載がない限り、タンパク質組成物/ワクチンは総タンパク質 25 μg を含むように処方し、20 μg QS - 21 をアジュバントとして加えた。6 - 8 週齢のメスの Swiss-Webster マウスに 0.2 mL の用量を皮下注 (臀部) により第 0 週および 4 週に投与した。血液を第 0 週および 4 週に採取し、最終的な全採血は第 6 週に行った。

【 0 1 3 3 】

(殺菌性のアッセイ:)

殺菌性のアッセイは本質的には記載されているように (Mountzouros and Howell, 2000,

10

20

30

40

50

J. Clin. Microbiol. 38(8): 2878-2884を参照のこと)行った。S B Aに関する補体を介しての抗体依存性の殺菌性力価は、アッセイに導入した標的細胞の50%以上を死滅させる検査血清の、最も高い希釈度の逆数として表した(BC<sub>50</sub>力価)。

【0134】

(2086タンパク質の同定に使用する方法：)

(臭化シアン分解およびフラグメントの直接配列決定：)

陰イオン交換カラム非吸着分画(Anion Exchange Unadsorbed Fraction、AEUF)の臭化シアン分解。AEUFは90%冷却エタノールで沈殿させ、70%ギ酸中の10mg/mL臭化シアン溶液にて、タンパク質濃度1mg/mLとなるように可溶化した。反応はオーバーナイト、室温、暗所で行った。切断した生成物を真空遠心で乾燥させ、ペレットをHE/0.1%に低下したTX-100で可溶化した。SDS-PAGEに続いてN末端アミノ酸配列決定を使用し、この分画の成分を同定した。

10

【0135】

(成分を同定するためのプロテアーゼ消化/逆相/N末端配列決定：)

AEUFはGluC(V8)、LysCまたはArgCのいずれかで消化した。酵素に対するタンパク質の比は、1μg酵素に対して30μgタンパク質とした。消化は37、オーバーナイトで行った。消化したタンパク質混合物(30μg)を7ミクロンAquapore RF-300カラムにかけ、0.1%トリフルオロ酢酸中の10-95%アセトニトリル溶液の濃度勾配で溶出し、ピークを手動で集めた。タンパク質を含まないブランクも流し、これから得られたピークをサンプルのクロマトグラムから差し引いた。サンプルのみから得られるピークを質量分析計で分析し、明確な質量の得られたサンプルをN末端アミノ酸配列決定で分析した。

20

【0136】

(N末端アミノ酸配列決定：)

プロットから切り出したバンドについては、そのタンパク質サンプルをSDSゲルからPVDF膜に移し、アミドブラック(脱イオン水中に10%酢酸、0.1%アミドブラック)で染色し、10%酢酸で脱色した。そして所望のタンパク質のバンドを10本のレーンすべてからメタノールで洗浄した外科用メスまたはミニExactoナイフで切り出し、Applied Biosystems 477A Protein Sequencer(タンパク質シーケンサ)の反応カートリッジに設置した。溶液中のサンプルを直接配列決定するため、Prosorb

30

カートリッジを組み立て、PVDFを60μLのメタノールで湿らせた。PVDFを脱イオン水50μLですすいで、サンプル(50μL)をPVDFにのせた。50μLの脱イオン水を用いてサンプルをすすいだ後、Prosorb PVDFをパンチで切り出し、乾燥させ、Applied Biosystems 477Aタンパク質シーケンサの反応カートリッジにセットした。双方の方法について、Applied Biosystems N末端シーケンサを、12またはそれ以上のサイクル(1サイクル

ブランク、1サイクルスタンダード、および10またはそれ以上のサイクル所望の残基の同定)の間、至適プロット条件下で作動させ、Applied Biosystems 120A PTH AnalyzerでPTH-アミノ酸検出を行った。サイクルのデータはアナログのチャートレコーダー

40

【0137】

(LC-MS/MS)

IEFで精製したタンパク質サンプルをさらにSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動で分析した。タンパク質はクーマシーブルー染色で視覚化し、目的のバンドを手で切り出し、還元、アルキル化し、in situで自動化インゲルトリプシン消化ロボットを用いてト

50

リブシン (Promaga, Madison, WI) による消化を行った (1)。消化後、ペプチド抽出物を最終容量 10 - 20  $\mu$ L まで、Savant Speed Vac Concentrator (ThermoQuest, Holesbrook, NY) を用いて濃縮した。

#### 【0138】

ペプチド抽出物を自動マイクロエレクトロスプレー逆相 HPLC で分析した。手短に言えば、マイクロエレクトロスプレー装置 (interface) は長さ 50 cm、直径 75  $\mu$ m、オリフィス直径 8  $\mu$ m の Picofrit ヒューズド (fused) シリカスプレーニードル (New Objective, Cambridge MA) に、10  $\mu$ m C18 逆相ビーズ (YMC, Wilmington, NC) を 10 c

m の長さまで詰めたものからなる。Picofrit ニードルは質量分析計の検出器の前に設置した手製のベースに固定したファイバーオプティックホルダー (fiber optic holder) (Melles Griot, Irvine, CA) に取り付けられた。カラムの後方はチタンユニオンに通してエレクトロスプレー装置への電氣的接触を提供するようにした。このユニオンは、HPLC 溶媒ポンプ (ABI 140C, Perkin-Elmer, Norwalk, CT) に接続させた FAMOS オートサンプラー (LC-Padkings, San Francisco, CA) への一定の長さのヒューズドシリカキャピラリー (FSC) のチューブに接続した。HPLC 溶媒ポンプは 50  $\mu$ L/分の流量を提供するが、マイクロタイトスプリッティングティー (microtight splitting tee) (Upchurch Scientific, Oak Harbor, WA) を用いて 250 nL/分にまで減量し、FSC トランスファーラインを用いてオートサンプラーまで送達させた。LC ポンプおよびオートサンプラーは各々インターナルユーザープログラムを用いてコントロールした。サンプルはプラスチック製のオートサンプラーバイアルに挿入し、シールし、5  $\mu$ L のサンプルループを用いて注入した。

#### 【0139】

(マイクロキャピラリー HPLC 質量分析計：)

インゲル消化から抽出されたペプチドを、マイクロエレクトロスプレー HPLC システムにて 50 分の 0 - 50% 溶媒 B (A : 0.1 M H<sub>2</sub>OAc, B : 90% MeCN / 0.1 M H<sub>2</sub>OAc) の濃度勾配により分離した。

ペプチドの分析は Finnigan LCQ イオントラップ質量分析計 (ThermoQuest, San Jose, CA) にてスプレー電圧 1.5 kV で作動し、キャピラリー温度を 150 °C に加熱して行った。データは本装置に提供されているデータ取得用ソフトウェアを用いて、自動 MS/MS モードで得た。取得法は 1 回の MS スキャン (375 - 1200 m/z) の後、MS スキャンで最も量の多い 3 イオンについての MS/MS スキャンを含んだ。dynamic exclusion 機能および isotope exclusion 機能を用いて、分析するペプチドイオン数を増加した (セッティング : 3 amu = exclusion width, 3 分 = exclusion duration, 30 秒 = pre-exclusion duration, 30 amu = isotope exclusion width)。MS/MS データの自動分析は、髄膜炎菌 (Sanger による) の完全なゲノムから導かれたタンパク質のデータベースを用いて、Finninggen Bioworks データ分析パッケージ (ThermoQuest, San Jose, CA) に組み込んだ SEQUEST コンピュータアルゴリズムを用いて行った。研究の結果を図 3 に示す。

#### 【0140】

(実施例 2)

(組換え脂質化 P2086 (rLP2086) のクローニング：)

A) 天然のリーダー配列：

(材料物質：)

8529 と命名されたサブグループ B 髄膜炎菌株の臨床的に単離されたものから、PCR により ORF2086 遺伝子を増幅した。この菌株の血清群、血清型および血清型サブタイプを括弧内に示す ; 8529 (B : 15, P1 : 7b, 3)。この髄膜炎菌株は The RIVM, Bilthoven, The Netherlands より供与を受けた。髄膜炎菌株 8529 由来の成熟 2086 タンパク質の遺伝子配列は当明細書において配列番号 212 として提供する。

#### 【0141】

(PCR増幅およびクローニング法：)

ORF 2086を目で見たところ、この遺伝子がリポタンパク質シグナル配列の可能性を有することを示していた。所有の隠れマルコフモデル

リポタンパク質 (Hidden

Markov

Model Lipoprotei) アルゴリズムを用いてのさらなる分析により、ORF 2086 がリポタンパク質のシグナル配列を含むことを確認した。より天然様のコンホメーションでP2086を組換え発現させるため、オリゴヌクレオチドプライマーはリポタンパク質シグナル配列をそのまま含む完全長の遺伝子を増幅するようにデザインし、髄膜炎菌A

ORF 2086のSanger配列の分析に基づいた、すなわち(5'プライマー - CTATCTCTG

CATATGACT

AGGAGCおよび3'プライマー - GCGCGGATCC

TTACTGCTT

GGCGGC AAG

ACC)とし、これらを各々配列番号304(化合物番号4624)および配列番号303(化合物番号4623)とする(当明細書の表IV参照のこと)。2086遺伝子は、髄膜炎菌株8529よりポリメラーゼ連鎖反応(PCR)[ABI 2400 thermal cycler, Applied Biosystems, Foster City, CA]により増幅した。正しいサイズの増幅産物を結合し、pCR2.1-TOPO(Invitrogen)中にクローニングした。プラスミドDNAをNdeIおよびBamHIにより制限消化し、ゲル精製し、pET-27b(+ )ベクター(Novagen)中に結合

させた。

【0142】

当明細書で述べたオリゴヌクレオチドプライマーは、PerSeptive Biosystems oligonucleotide synthesizer(オリゴヌクレオチド合成装置)、Applied Biosystems, Foster City CAで、-シアノエチルホスホロアミダイト化学、Applied Biosystems, Foster City

CAを用いて合成した。ORF 2086遺伝子ファミリーのPCR増幅に用いたプライマーを表IVに列記するが、これは本発明の非限定的なプライマーの例を示すものである。

【0143】

10

20

30

【表 4】

表IV: プライマー

| 配列番号<br>(化合物番号) | プライマー   | 配列   | 制限部位           |
|-----------------|---------|--|----------------|
| 303<br>(4623)   | Reverse | GCGCGGATCCTTACTGCTTGGCGGCAAGACC                                | BamHI          |
| 304<br>(4624)   | Forward | CTATTCTGCATATGACTAGGAGC  | NdeI           |
| 305<br>(4625)   | Forward | AGCAGCGGAGGCGGCGGTGTC  |                |
| 306<br>(5005)   | Forward | TGCCGATGCACTAACCGCACCC   |                |
| 307<br>(5007)   | Reverse | CGTTTCGCAACCACCTTCCCG  |                |
| 308<br>(5135)   | Reverse | GAGATCTCACTCACTTACTGCTTGGCGGCAAGACCGATATG                      | BglII          |
| 309<br>(5658)   | Forward | GCGGATCCAGCGGAGGGGCGGTGTCGCC                                   | BamHI          |
| 310<br>(5660)   | Reverse | GCGCATGCTTACTGCTTGGCGGCAAGACCGATATG                            | SphI           |
| 311<br>(6385)   | Forward | GCGGATCCAGCGGAGGCGGCGAAGC                                      | BamHI          |
| 312<br>(6406)   | Forward | GCGCAGATCTCATATGAGCAGCGGAGGGGGTGGTGGCGCCGAYATWGGTGGCGGGCTTGCCG | BglII and NdeI |
| 313<br>(6470)   | Forward | CTATTCTGCGTATGACTAG  |                |
| 314<br>(6472)   | Reverse | GTCCGAACGGTAAATTATCGTG   |                |
| 315<br>(6473)   | Forward | GCGGATCCAGCGGAGGCGGCGGTGTCGCC                                  | BamHI          |
| 316<br>(6474)   | Forward | GAGATCTCATATGAGCAGCGGAGGCGCGAAGC                               | BglII and NdeI |
| 317<br>(6495)   | Forward | GACAGCCTGATAAAC  |                |
| 318             | Reverse | GATGCCGATTCGTGAACC   |                |

10

| 配列番号<br>(化合物番号) | プライマー   | 配列   | 制限部位           |
|-----------------|---------|--|----------------|
| 319<br>(6496)   | Reverse | GCGCATGCTACTGTTTCCGCGATG                                       | SphI           |
| 320<br>(6605)   | Reverse | GAGATCTCACTCACTCACTGTTTGGCGGCGATGCTTTC                         | BglII          |
| 321<br>(6721)   | Forward | GCGCAGATCTCATATGAGCAGCGGAGGGCGCGAAGCGGCGGTGTCCCGCCGACATAGGCACG | BglII and NdeI |

20

## 【0144】

(天然のリーダー配列を用いての rLP2086 リポタンパク質の発現：)

図5に示すように、プラスミド pPX7340 を BLR (DE3) pLysS 宿主細胞 (Life Sciences) 中に形質転換/トランスフェクトまたは感染させた。1つの形質転換体を選択し、2%グルコース、カナマイシン (30 μg/mL)、クロラムフェニコール (30 μg/mL)、およびテトラサイクリン (12 μg/mL) を含む 50 mL Terrific Broth に接種した。オーバーナイトの培養で OD<sub>600</sub> は 6.0 であった。オーバーナイト培養液を 1% グリセロールおよび同じ抗生物質を含む Terrific Broth 1 リットル中に希釈した。スタート時の OD<sub>600</sub> は 0.4 であった。2 時間後 OD<sub>600</sub> は 1.6 になり、誘導前のサンプルを採取した。OD<sub>600</sub> = 1 に均等な細胞を遠心し、上清を除去した。全細胞のペレットを 150 μL Tris-EDTA バッファーおよび 150 μL 2x SDS-PAGE サンプルバッファーに再度懸濁した。IPTG を最終濃度 1 mM になるように加えた。3.5 時間後上述のように誘導後のサンプルを採取し、SDS-PAGE で分析した (図4)。

30

## 【0145】

(rLP2086 の精製：)

rLP2086 を異なる界面活性剤の抽出により、大腸菌から可溶化した。天然の環境下の P2086 とは異なり、rLP2086 は Triton X-100 および Zwittergen 3-12 では顕著には可溶化されなかった。rLP2086 の塊はサルコシルにより可溶化され、このことは髄膜炎菌の状態とは異なる大腸菌の外膜成分との相互作用があることを示している。いったん可溶化した rLP2086 は、混入する大腸菌タンパク質の多くを陰イオン交換樹脂に pH 8 で吸着させることにより除去する方法で、天然のタンパク質と同様に精製することができる。rLP2086 の理論上の pI より 1.5 以上高い pH であるにもかかわらず、rLP2086 は pH 8 では吸着されないままであった。さらなる精製は、陽イオン交換樹脂に pH 4.5 で rLP2086 を吸着させることにより達成した。

40

## 【0146】

SDS-PAGE 後の rLP2086 の均質性を図2に示す。rLP2086 の質量は、

50

MALDI-TOF質量分析により27,836と決定された。この質量は理論上の質量27,100とは736異なり、この値から細菌のリポタンパク質に共通するN末端を修飾する脂質の質量を概算できる。天然のものおよびrLP2086の双方とも外膜リポタンパク質であると考えられる。N末端配列決定の試みは阻害され、このことは末端の修飾と一致する。

【0147】

(精製法：)

P2086を発現するBLR

DE3 pLysS細胞の凍結ペレットを10mM HEPES-NaOH/1mM EDTA/1μg/mL Pefabloc SCプロテアーゼ阻害剤(Roche) pH7.4 (HEP)中に、20mL/g細胞湿重量で再懸濁し、マイクロフルイダイザー(Microfluidics Corporation Model 110Y)で溶菌した。細胞溶菌液を150,000x gで1時間遠心した。ペレットをHEPで2回洗浄して2回遠心し、得えられた膜

のペレットをオーバーナイト凍結した。ペレットを10mM

HEPES-NaOH/1

mM MgCl<sub>2</sub>/1%TX-100 pH7.4で30分間可溶化した後、150,0

00x gで3時間遠心した。これを3回繰り返した。膜のペレットを50mM Tris

-HCl/5mM EDTA/1% Zwittergent 3-12 pH8で上のように2回洗

浄した後、50mM Tris-HCl/5mM EDTA/1% Zwittergent 3-14

pH8および50mM Tris-HCl/5mM EDTA/1% Zwittergent 3-

14/0.5M NaCl pH8の各溶液で2回洗浄した。

【0148】

次にrLP2086を50mM

Tris-HCl/5mM EDTA/1%サルコシル

pH8で可溶化した。このサルコシル抽出物を1% Zwittergent 3-14 (Z3-1

4)となるように調整し、30倍量以上の50mM

Tris-HCl/5mM EDT

A/1% Z3-14で2回透析した。透析したrLP2086抽出物を90%エタノールで沈殿させ、残っているサルコシルを除去し、50mM

Tris-HCl/5mM E

DTA/1% Z3-14 pH8 (TEZ)で可溶化した。不溶性物質を遠心して除去し

、上清を陰イオン交換クロマトグラフィーカラムにかけ、結合しなかった分画中のrLP2086を集めた。次に結合しなかった物質を30倍量以上の25mM

NaAc/1%

Z3-14 pH4.5で2回透析し、陽イオン交換クロマトグラフィーカラムにかけた。0-0.3M

NaClの濃度勾配でrLP2086を溶出させ、SDS-PAGE(クーマシー染色)で分析した。rLP2086のプールはレーザーデンストメトリーにより84%の純度であることが決定された。

【0149】

(rLP2086サブファミリーBに対する抗血清の表面の反応性および殺菌活性)

表VIIに示したように、サブファミリーB菌株8529由来の精製rLP2086に対する抗血清は、全細胞のELISAにより、検査した10種の2086サブファミリーB菌株すべてに対して表面の反応性を示した。殺菌活性は、異種の血清型サブタイプ抗原のPorAを発現する2086サブファミリーB菌株の10種の内の9種に対して検出された。これらの菌株は、西欧、アメリカ大陸、オーストラリアおよびニュージーランドを通しての血清群B髄膜炎菌性疾患の起因菌の代表的なものである。殺菌性アッセイで死滅しなかった唯一の菌株である870227は、全細胞のELISAにより抗rLP2086(サブファミリーB)血清と強く反応し、この菌株がP2086に共通のエピトープを含むタンパク質を発現することを示した。

10

20

30

40

50

## 【0150】

表VIIに列記した2086サブファミリーA菌株についても、全細胞のELISAにより表面の反応性の検査を行った。これら3種の菌株のうち2種は、非常に低レベルの反応性を有しているようであるが、一部の2086サブファミリーA菌株はrLP2086サブファミリーBに対して作製した抗体との交差反応性ない可能性があることを示した。8529菌株由来の2086サブファミリーBの遺伝子を同定するために、使用したPCR増幅法を菌株870446、NMBおよび6557についても行った。2086サブファミリーBのPCR増幅産物は検出されなかった。

## 【0151】

(免疫原性の方法：)

(抗血清の製造：)

先に実施例1で述べたようにワクチンを処方した。しかし10 $\mu$ gの用量を使用した。

## 【0152】

(全細胞の酵素結合免疫吸着検定法(ELISA)：)

髄膜炎菌の全細胞の懸濁液を、滅菌した0.01Mリン酸塩、0.137M NaCl, 0.002M KCl (PBS)中に、620nmでの光学密度0.1まで希釈した。この懸濁液から0.1mLずつ、Nunc BacT 96ウェルプレート(カタログ番号2-69620)の各ウェルに加えた。細胞を、プレート上で室温で3日間乾燥させた後、カバーしてひっくり返し、4 $^{\circ}$ Cで保存した。プレートを洗浄バッファー(0.01M Tris-HCl, 0.139M NaCl/KCl, 0.1% ドデシルポリ(オキシエチレングリコールエーテル(oxyethlereneglycolether))<sub>n</sub>, n = 23 (Brij-35 (登録商標) ICI Americas, Inc., Wilmington, Delawareより入手可能)、pH 7.0 - 7.4)で3

回洗浄した。抗血清の希釈は、PBS、0.05% Tween-20/Azide中で調製し、0.1mLをコートしたプレートに移した。プレートは37 $^{\circ}$ Cで2時間インキュベーションした。プレートを洗浄バッファーで3回洗浄した。抗マウス-ヤギIgG AP (Southern

Biotech)をPBS/0.05% Tween-20で1:1500に希釈し、0.1mLを各ウェルに加え、プレートを37 $^{\circ}$ Cで2時間インキュベーションした。プレートを(上記のように)洗浄した。基質溶液は、1M

ジエタノールアミン/0.5mM MgCl<sub>2</sub>中に

p-ニトロフェニルホスフェート(Sigma)を希釈して1mg/mLに調製した。基質を1ウェル当たり0.1mLずつプレートに加え、室温で1時間インキュベーションした。反応は3N

NaOHを50 $\mu$ L/ウェル加えることにより停止し、690nmを参照として405nmで測定した。

## 【0153】

B.) P4リーダー配列：

(PCR増幅およびクローニング法：)

rLP2086の発現を最適化するため、分類不可能なインフルエンザ菌のP4シグナル配列の後部に2086遺伝子をクローニングした(Green et al., 1991)。リポタンパク質のクローニングに使用したプライマーを表IVに列記し、化合物番号：5658、5660、6473、6543および6385により識別する。ORF2086を髄膜炎菌B株8529より、以下の化合物番号5658および5660のプライマーを用いて増幅した。ORF2086を髄膜炎菌サブグループB株CDC1573より、以下の化合物番号6385および5660のプライマーを用いて増幅した。ORF2086を髄膜炎菌サブグループB株2996より、以下の化合物番号6473および6543のプライマーを用いて増幅した。N末端(5')プライマーは2086遺伝子の成熟領域と同一となるようにデザインした(システインのすぐ下流の3番目のアミノ酸がセリン残基で始まる)。制限部位BamHI (GGATTC)を各N末端のプライマーの5'末端に組み込み、2番

10

20

30

40

50



目のアミノ酸に成熟タンパク質のグリシン残基が挿入されるようにした。C末端(3')プライマーは、2086遺伝子のC末端と相同になるようにデザインし、終止コドンならびにクローニングの目的のためのSphI部位を含めた。各髄膜炎菌B株から増幅したフラグメントを中間体のベクターにクローニングし、配列分析でスクリーニングした。

#### 【0154】

正しいクローンからのプラスミドDNAをBamHIおよびSphI制限酵素(New England Biolabs, (NEB))で消化した。pLP339と命名されたベクター(出願人の譲受人により提供された)を発現ベクターとして選択した。このベクターは、pBAD18-Cm主鎖(Beckwith et al., 1995)を利用し、分類不可能なインフルエンザ菌のP4リポタンパク質シグナル配列およびP4遺伝子を含む(Green et al., 1991)。pLP339ベクターを部分的に制限酵素BamHIで消化し、次にSphIで消化した。増幅した2086フラグメント(BamHI/SphI)を各々別々にpLP339ベクター(部分的なBamHI/SphI)中に結合した。このクローニング法では、P4リポタンパク質シグナル配列の後ろに成熟2086遺伝子を設置する。BamHI部位は、P4シグナル配列および2086遺伝子の間のクローニング接合部に残る(図7に示したプラスミドコンストラクトを参照のこと)。以下にBamHIクローニング接合部の配列の一例を示す：

[P4シグナル配列] - TGT

GGATCC - [残りの2086成熟核酸配列]

[P4シグナル配列] - Cys

GlySer - [残りの2086成熟アミノ酸配列]

図7に示したように増幅した各フラグメントを、P4リーダー配列を含む修飾したpBAD18-Cmベクター内にクローニングした。rP4LP2086(組換えP4脂質化2086)を発現する組換え大腸菌BLRPX7343で発酵を行い、さらにグルコースを添加して細胞密度の増加を試みた。ファーメンターは、Sambrookによる1%グルコースを補った完全なM9Minimal培地10Lで満たした。

#### 【0155】

ファーメンター中の最初のグルコース濃度は45g/Lとした。ファーメンターに最初のODが~0.25となるように接種した。~OD

25でさらに20g/Lのグルコー

スを追加した。グルコースが枯渇したOD

63.4の時点で1%アラビノースで培養を誘導した。誘導後も3時間まで発酵を継続した。誘導後t=0、1、2、3でサンプルを採取し、BSAにてタンパク質を定量した。t=3で、タンパク質収量は~3.5g/L

そして総細胞タンパク質の7%であった。湿った細胞ペースト総計895グラムを~10Lの培養液から得た。

rP4LP2086の精製は先の実施例2、セクションAで述べたものと同じ方法で行った。

#### 【0156】

##### (実施例3)

(非脂質化成熟2086タンパク質の発展的遺伝子情報：)

2086タンパク質の免疫原性をさらに評価するため、P2086の非脂質化型のクローニングおよび発現を行った。

#### 【0157】

(ORF2086のPCRによる遺伝子増幅：)

非脂質化2086遺伝子のPCR増幅に使用したオリゴヌクレオチドを表IVのプライマー表に列記する。菌株8529由来の2086遺伝子は、表に示す化合物番号5135および6406(それぞれ、配列番号308および312)で識別されるプライマーで増幅することができる。菌株CDC1573由来の2086遺伝子は、化合物番号5135および6474(それぞれ、配列番号308および316)で識別されるプライマーで増幅

10

20

30

40

50

することができる。菌株 2996 由来の 2086 遺伝子は、化合物番号 6406 および 6605 (それぞれ、配列番号 312 および 320) で識別されるプライマーで増幅することができる。

【0158】

これらのプライマーの特徴として、各プライマー中に合成 BglII 制限部位、化合物番号 6406 および 6474 中の合成 NdeI 制限部位、および化合物番号 5135 および 6605 において 3 つのリーディングフレームすべてに終止コドンが存在する、を含む。プライマー番号 6406 および 6474 は、1 つの ATG (Met) が第 2 のアミノ終止コドン (ACG) に融合して成熟 2086 ポリペプチドの 1 つのアミノ酸の置換 (TGCCys に置き換わる) を表す配列を含む、2086 遺伝子を増幅する。

10

【0159】

PCR クローニングベクターは TOPO-PCR 2.1、Invitrogen, Valencia, CA とした。

非脂質化 2086 タンパク質の発現に使用するベクターは、Novagen, Madison, WI の pET9a とした。

【0160】

大腸菌クローニング株は Top10、Invitrogen, Carlsbad, CA とした。

大腸菌発現株は BLR (DE3) pLysS、Novagen, Madison, WI とした。

クローニングを目的とする培地は Sambrook らによるグリセロールを 1% 滅菌グルコースに置き換え、適当な抗生物質 (アンピシリンまたはカナマイシン) を加えた Terrific Broth 液または寒天培地とした。

20

プラスミドの精製は Qiagen Spin Miniprep Kit (Valencia, CA) で行った。

【0161】

(非脂質化 2086 発現のための産生用菌株または細胞株の調製：)

2086 遺伝子は髄膜炎菌株 8529 由来の染色体 DNA からポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) [AmpliTaQ and ABI 2400 thermal cycler, Applied Biosystems, Foster City,

CA] により増幅した。各反応において化合物番号 6474 および 5135 (それぞれ、配列番号 316 および 308) により識別される 2 つのオリゴヌクレオチドを、2086 遺伝子の PCR の増幅に用いた。増幅された 2086 PCR 産物を、直接 TOPO-PCR 2.1 クローニングベクター中にクローニングし、100 µg/ml アンピシリンおよび 20 µg/ml X-Gal を補った Terrific

30

Broth 寒天培地上で選択した。白色コロ

ニーを選択し、培養した。プラスミド DNA は Qiagen miniprep kit を用いて調製し、PCR のフラグメントが挿入されているかどうかプラスミドをスクリーニングした。PCR 産物が挿入されたプラスミドの DNA 配列決定を行った (ABI 377 シーケンサにて Big Dye 化学使用、Applied Biosystems, Foster City, CA)。

【0162】

正しい DNA 配列を示すプラスミドを BglII 制限酵素で消化し、BglII フラグメントを GeneClean II 精製キット (Bio101, Carlsbad, CA) を用いてゲル精製した。精製された BglII フラグメントを発現ベクター pET9a の BamHI 部位にクローニングした。pET9a/2086 クローンを、30 µg/ml カナマイシンを補った Terrific Broth プレート上で選択した。カナマイシン耐性クローンを培養し、ミニプレッ

40

プ ラスミド DNA を調製した。BamHI 部位での 2086 遺伝子の配向が適当かどうかについて、プラスミドをスクリーニングした。正しく配向されたプラスミドは 2086 遺伝子のアミノ末端への T7 抗原の融合を呈示する (rP2086T7)。これらの rP2086T7 遺伝子融合物を BLR (DE3) pLysS に形質転換し、Terrific Broth/Kan プレート上で選択し、Terrific Broth 中で培養し、1 mM

50

## I P T G ( イソプロピル

- D - チオガラクトピラノシド) で r P 2 0 8 6 T 7 融合タンパク質の発現を誘導した。  
r P 2 0 8 6 T 7 融合タンパク質は高レベルで発現された。

## 【 0 1 6 3 】

次にこれらの融合プラスミドを N d e I 制限酵素により消化した。この酵素は T 7 抗原を  
欠失させ、成熟 2 0 8 6 遺伝子をベクターにより提供される A T G 開始部位に直接結合す  
る。これらの N d e I による欠失プラスミドを T o p 1 0 細胞内に形質転換し、Terrific  
Broth/Kan プレート上で選択した。候補のクローンを培養し、ミニプレッ

プラスミド D N A を調製した。プラスミド D N A の D N A 配列決定を行い、欠失および 2  
0 8 6 遺伝子配列が組み込まれたことを確認した。これらのプラスミドを p P X 7 3 2 8  
と命名したプラスミドマップに表した ( 図 6 ) 。正しい D N A 配列を呈示するプラスミド  
を B L R ( D E 3 ) p L y s S 中に形質転換し、Terrific Broth/Kan プレート上で選択  
し、Terrific Broth 中で培養し、I P T G にて 2 0 8 6 タンパク質の発現を誘導した。

## p E T 9

a ベクターは、T 7 - タグを除去した場合に、菌株 B L R ( D E 3 ) p L y s S 内で成熟  
2 0 8 6 タンパク質を発現できなかった。

## 【 0 1 6 4 】

( 非脂質化 2 0 8 6 タンパク質の産生 : )

精製プラスミド D N A を用いて、発現株 B L R ( D E 3 ) p L y s S を形質転換した。プ  
ラスミドを保有する B L R ( D E 3 ) p L y s S 細胞はカナマイシン耐性であり、1 m M  
I P T G の添加により高レベルの P o r A タンパク質の高レベルの発現を誘導することが  
できる。r P 2 0 8 6 T 7 融合タンパク質は大腸菌細胞株 B L R ( D E 3 ) p L y s S 中  
で、総タンパク質の ~ 4 0 % で不溶性の封入体として発現させることができる。この精製  
融合タンパク質を用いてマウスを免疫感作し、異種の髄膜炎菌株に対して顕著なレベルの  
殺菌性抗体を産生した ( 表 V 参照のこと ) 。

## 【 0 1 6 5 】

( 2 0 8 6 非脂質化遺伝子突然変異誘発 : )

P C R プライマーの突然変異誘発を 2 0 8 6 遺伝子の 5 ' 末端で行った。成熟 r P 2 0 8  
6 T 7 の高発現レベルを示しながら T 7 タグを除去できるかどうかを決定するため、発現  
の研究を進めている。

## 【 0 1 6 6 】

( 非脂質化 r P 2 0 8 6 T 7 の精製 : )

非脂質化 r P 2 0 8 6 T 7 を発現する大腸菌 B L R ( D E 3 ) p L y s S 細胞を、1 0 m  
M

H e p e s - N a O H / 5 m M E D T A / 1 m M P e f a b l o c S C p H 7 . 4 中

でマイクロフルイダイザーにより溶菌した。次に溶菌液を 1 8 , 0 0 0 x

g で 3 0 分間遠

心した。封入体ペレットを 5 0 m M

T r i s - H C l / 5 m M E D T A / 1 % T r i t o n

X - 1 0 0 p H 8 で 3 回洗浄し、その度に 2 4 , 0 0 0 x g で 3 0 分間遠心した。次に

封入体ペレットを 5 0 m M T r i s - H C l / 5 m M E D T A / 1 % Z w i t t e r g e n t

3 - 1 4 p H 8 で 2 回洗浄し、その度に 2 4 , 0 0 0 x g で 1 5 分間遠心した。封入

体ペレットを次に 5 0 m M

T r i s - H C l / 5 m M E D T A / 4 M 尿素 p H 8 で 2 時間可溶化した後、遠心して

不溶物質を除去した。上清 ( 可溶化した r P 2 0 8 6 T 7 ) サンプルを 4 等分した。スト

ック溶液を用いて、1 つのサンプルは 5 0 m M

T r i s - H C l / 5 m M E D T A / 2 5 0 m M N a C l / 2 M 尿素

p H 8 ( 界面活性剤な

し) に調整し、1 つは 5 0 m M

T r i s - H C l / 5 m M E D T A / 2 5 0 m M N a C l / 2 M 尿素 / 1 % 水素化 Triton

50

10

20

30

40

50

X - 1 0 0 p H 8 ( T X - 1 0 0 ) に調整し、 1 つは 5 0 m M T r i s - H C l / 5 m M E D T A / 2 5 0 m M N a C l / 2 M 尿素 / 1 % Zwittergent 3 - 1 2 p H 8 ( Z 3 - 1 2 ) に調整し、そして 1 つは 5 0 m M T r i s - H C l / 5 m M E D T A / 2 5 0 m M N a C l / 2 M 尿素 / 1 % Zwittergent 3 - 1 4 p H 8 ( Z 3 - 1 4 ) に調整した。尿素を除去するため、サンプルを尿素を含まない各々のバッファーに対して、完全に平衡になるまで透析した。次にサンプルを尿素を含まない、 6 0 m M N a C l の各バッファーに対して完全に平衡になるまで透析し、 N a C l 濃度を下げた。 2 , 0 0 0 x

10

g で 1 5 分間遠心して不溶物質を除去し、得られた上清 ( リフォールディングした r P 2 0 8 6 T 7 ) をさらなる実験に用いた。 r P 2 0 8 6 T 7 の均一性は、クーマシー染色の S D S - P A G E およびレーザーデンスイトメトリーを用いて決定したところ、 9 1 - 9 5 % であった。

#### 【 0 1 6 7 】

免疫原性の方法 - 実施例 2 で述べたとおり

この精製融合タンパク質を用いてマウスを免疫感作し、異種の髄膜炎菌株に対して著明なレベルの殺菌性抗体を作製した ( 以下の表 V 参照のこと ) :

#### 【 0 1 6 8 】

##### 【 表 5 】

表 V : r P 2 0 8 6 T 7 に対して作製されたマウス抗体の殺菌性力価

| マウス血清     | 説明                             | 異種の菌株/H44/76 |
|-----------|--------------------------------|--------------|
| AF780 第6週 | r2086T7, 10ug                  | 3200         |
| 第0週 プール   | 免疫前血清                          | 10           |
| AE203 第6週 | rLP2086, 10 ug (ポジティブコントロール) * | 6400         |

(\* r L P 2 0 8 6 によるマウスの免疫感作により作製されたポジティブコントロール血清)

20

#### 【 0 1 6 9 】

##### ( 実施例 4 )

##### ( O R F 2 0 8 6 のキメラクローンの開発 )

菌株 C D C - 1 5 7 3 由来の 2 0 8 6 遺伝子の N 末端領域は、菌株 8 5 2 9 および 2 9 9 6 由来の 2 0 8 6 遺伝子には存在しない繰り返し部分を含む ( 図 8 参照のこと ) 。この繰り返し部分が大腸菌に基づいた 2 つの発現系 ( p E T および p B A D ) からの組換え 2 0 8 6 タンパク質の発現レベルの増加に関与していると思われる。 C D C - 1 5 7 3

2 0 8 6 遺伝子からの組換えタンパク質発現レベルは、 p E T および p B A D 発現系において、同じ発現系を用いた菌株 8 5 2 9 および 2 9 9 6 による 2 0 8 6 遺伝子からの組換え発現レベルに比して、顕著に高かった。 3 つすべての菌株由来の 2 0 8 6 遺伝子の N 末端領域は、この繰り返し部分を除いて比較的相同である。したがって、菌株 8 5 2 9 および 2 9 9 6 由来の 2 0 8 6 遺伝子に、菌株 C D C - 1 5 7 3 の N 末端を融合させることにより、これらの遺伝子から発現される組換え 2 0 8 6 タンパク質の発現レベルが、 p E T および p B A D 発現系を用いた場合に増加する、と仮定するのは妥当である。

40

#### 【 0 1 7 0 】

##### ( 材料および方法 : )

菌株 8 5 2 9 および 2 9 9 6 由来の染色体 D N A を精製し、キメラ 2 0 8 6 遺伝子の P C R 増幅の鋳型として使用した。化合物番号 6 7 2 1 および 5 1 3 5 ( それぞれ、配列番号 3 2 1 および 3 0 8 ) の P C R プライマーを用いて、菌株 8 5 2 9 由来のキメラ 2 0 8 6 遺伝子を増幅し、化合物番号 6 7 2 1 および 6 6 0 5 ( それぞれ、配列番号 3 2 1 および 3 2 0 ) の P C R プライマーを用いて、菌株 2 9 9 6 由来のキメラ 2 0 8 6 遺伝子を増幅した。 P C R 産物を Invitrogen の P C R 2 . 1

50

TOPOベクター内に直接クローニングし、DNA配列分析によりスクリーニングし、完全なキメラ2086遺伝子であることを同定した。この遺伝子を次にBglIIによりPCR2.1ベクターから切り出し、BglIIフラグメントをpET9aプラスミドのBamHI部位に挿入した。プラスミド挿入物を適当な配向かどうかスクリーニングした後、NdeIの消化を行った。直線状のNdeIフラグメントは自ら結合して、pET9aベクターから寄与されたT7タグ配列を含む小さなNdeIフラグメントの欠失を達成する。この欠失によりキメラ2086遺伝子の5'末端にT7プロモーターが直接結合することになる。NdeIにより欠失させたプラスミドを大腸菌株BL21(DE3)内に形質転換し、IPTGの誘導によりキメラ2086タンパク質を発現しているかどうか、カナマイシン耐性コロニーをスクリーニングした。

10

## 【0171】

最初の研究は、pET9a系で発現させた場合、菌株2996由来のキメラ2086遺伝子は、天然の2996/2086遺伝子に比して約2倍の組換えタンパク質を発現することを示している。pBAD系についてはまだ検査していない。

## 【0172】

わずか1回の実験を行ったに過ぎないが、キメラ2086遺伝子の有用性が高いことをデータは示している。CDC-1573N末端を、菌株8529および2996由来の2086遺伝子に融合することで、組換え2086タンパク質の発現の増大を提供することができる。

20

## 【0173】

## (実施例5)

## (髄膜炎菌株の2086PCRスクリーニング：)

臨床的に単離された菌株中での2086遺伝子の保存性を決定するため、88種の髄膜炎菌株についてPCR増幅を行った。

## 【0174】

ORF2086の最初のPCRの同定は、化合物番号：4623、4624および4625(それぞれ、配列番号303、304および305)で識別される表IVに列記したプライマーを利用した(上記の実施例2参照のこと)。これらのプライマーはSangerの髄膜炎菌血清群Aの配列に基づいてデザインされたものである。多数の菌株のスクリーニングを促進するため、2086遺伝子について内側のプライマーをデザインした。総計88種の髄膜炎菌株を、化合物番号5005および5007(配列番号306および307)で識別される新たにデザインした内側の2086プライマーを用いて、PCRによるスクリーニングを行った。これらのプライマーにより、88種の髄膜炎菌株のうちの63種(~70%)から2086遺伝子を同定することができた(表VI-A参照のこと)。

30

## 【0175】

Sangerの髄膜炎菌血清群Aの配列およびTIGRの髄膜炎菌血清群Bの配列について、2086遺伝子周囲の拡大領域を調べ、整列した。プライマーは、2086遺伝子の上流領域および下流領域に対応するようにデザインした。この目的は、これらのプライマーを使用して、配列比較のための様々な髄膜炎菌由来の2086遺伝子の完全長以上の長さを増幅することであった。化合物番号6470および6472(それぞれ、配列番号：313および314)を用いての1つの菌株(6557)のPCR増幅では、産物は低収量であった。菌株6557の増幅産物をクローニングし、プラスミドDNAの配列分析を行った。結果は、これまでに認められていたものより配列可変性の大きい新しいタイプの2086遺伝子であることを示した。菌株6557由来の2086遺伝子は、配列決定された他の菌株とアミノ酸レベルで~75%同一であった。興味深いことに菌株6557は、以前に上述の2086のPCRスクリーニングによりネガティブと評価された30%の菌株の1つであった。

40

## 【0176】

菌株6557中のC末端可変領域に特異的な内側のプライマーをデザインした。これらの

50

プライマーを用いて、以前に2086 PCRスクリーニングでネガティブと評価された～30%の菌株の、より可変性の高い2086遺伝子のスクリーニングを行った。入手可能なすべての髄膜炎菌株(n=88)について、これらの新たに同定された内側の2086プライマー(化合物番号6495および6496により識別される;それぞれ、配列番号159および160)を用いてPCRによりスクリーニングを行った。以前に2086のPCRでネガティブと評価された～30%の菌株のみが、今回のスクリーニングではPCRポジティブであった。以前にPCRネガティブ(～30%)であった菌株から増幅された遺伝子の一群は2086遺伝子の新しいタイプまたは2086遺伝子の第2ファミリーと表すべきであり、当明細書では2086サブファミリーAと命名した。8529由来のプライマーにより菌株の～70%から増幅された2086遺伝子の群を、当明細書ではサブファミリーBと命名した。

10

## 【0177】

2086遺伝子のサブファミリーAを、非限定的に配列番号1-173の奇数番号で例示する。2086遺伝子のサブファミリーBを、非限定的に配列番号175-251の奇数番号で例示する。

## 【0178】

PCR増幅の研究に使用した髄膜炎菌株は以下の表、表VI-Aおよび表VI-Bから選択した。表に列記した菌株を髄膜炎菌株の例として非限定的に提供する。表VI-Aに列記した菌株を2086タンパク質サブファミリーAと分類し、表VI-Bに列記した菌株を2086タンパク質サブファミリーBと分類する。各表に列記された菌株を血清型により分類する。表に示したように、菌株は以下の4箇所から入手できる:MPHL-Manchester Public Health Laboratory, Manchester, UK; RIVM, Bilthoven, the Netherlands; University of Iowa, College of Medicine, Department of Microbiology, Iowa City, IA; およびWalter Reed Army Institute of Research, Washington, D.C.。

20

## 【0179】

## 【表6-1】

表VI-A

| 菌株         | 血清型サブタイプ                   | 入手先         |
|------------|----------------------------|-------------|
| M97 251854 | B:4z, PI:4                 | MPHL        |
| M98 250622 | B:2b, PI:10                | MPHL        |
| M98 250572 | B:2b, PI:10                | MPHL        |
| M98 250771 | B:4z, PI:22,14             | MPHL        |
| M98 250732 | B:4z, PI:22,14a            | MPHL        |
| M98 250809 | B:15, PI:7,16              | MPHL        |
| M97 252697 | B:1, PI:6, P1.18,25        | MPHL        |
| M97 252988 | B:4, PI:6, P1.18,25,6      | MPHL        |
| M97 252976 | B:4, PI:6, P1.18,25        | MPHL        |
| M97 252153 | B:4, PI:6, P1.18,25        | MPHL        |
| M97 253248 | B:15, PI:7, NT, 16         | MPHL        |
| CDC1610    | P1:NT 4(15), P1.18-7,16-14 | CDC         |
| CDC1521    | P1.6,3 2b(4)               | CDC         |
| CDC1034    | P1.7 4(15)                 | CDC         |
| L8         | P1.7,1 15(4)               | Walter Reed |
| CDC1492    | P1.7,1 4(15)               | CDC         |
| 870446     | P1.12a,13                  | RIVM        |
| CDC2369    | P1.(9),14                  | CDC         |
| 6557       | P1.(9),14, P1.22a,14a      | RIVM        |
| 2996       | P1.5,2, P1.5a,2c           | RIVM        |
| NmB        | P1.5,2, P1.5a,2c           | UIOWA       |
| L3         | P1.5,2                     | Walter Reed |
| B16B6      | P1.5,2                     | RIVM        |
| CDC1135    |                            | CDC         |
| L5         | P1.NT, P1.21-6,1           | Walter Reed |
| L4         | P1.21,16                   | Walter Reed |
| W135       |                            | Walter Reed |
| C11        | C:16,P1.7,1                | CDC         |
| Y          |                            | Walter Reed |

30

40

## 【0180】

【表 6 - 2】

表VI-B

| 菌株         | 血清型サブタイプ              | 入手先  |
|------------|-----------------------|------|
| M98 250670 | B:1, PI:4             | MPHL |
| M98 250024 | B:1, PI:4             | MPHL |
| M97 253524 | B:1, PI:4             | MPHL |
| M97 252060 | B:1, PI:4             | MPHL |
| M97 251870 | B:4z, PI:4            | MPHL |
| M97 251836 | B:4z, PI:4            | MPHL |
| M97 251830 | B:4z, PI:4            | MPHL |
| M97 251905 | B:4z, PI:4            | MPHL |
| M97 251898 | B:4z, PI:4            | MPHL |
| M97 251885 | B:4z, PI:4            | MPHL |
| M97 251876 | B:4z, PI:4            | MPHL |
| M97 251994 | B:4z, PI:4            | MPHL |
| M97 251985 | B:4z, PI:4            | MPHL |
| M97 251957 | B:4z, PI:4            | MPHL |
| M97 251926 | B:4z, PI:4            | MPHL |
| M97 252045 | B:4z, PI:4            | MPHL |
| M97 252038 | B:4z, PI:4            | MPHL |
| M97 252026 | B:4z, PI:4            | MPHL |
| M97 252010 | B:4z, PI:4            | MPHL |
| M97 252098 | B:4z, PI:4            | MPHL |
| M97 252083 | B:4z, PI:4            | MPHL |
| M97 252078 | B:4z, PI:4            | MPHL |
| M98 250735 | B:4z, PI:15           | MPHL |
| M98 250797 | B:4z, PI:15           | MPHL |
| M98 250768 | B:4z, PI:15           | MPHL |
| M98 250716 | B:2b, PI:10           | MPHL |
| M98 250699 | B:4z, PI:10           | MPHL |
| M98 250393 | B:4z, PI:10           | MPHL |
| M98 250173 | B:4z, PI:10           | MPHL |
| M97 253462 | B:4z, PI:14           | MPHL |
| M98 250762 | B:15, PI:7,16         | MPHL |
| M98 250610 | B:15, PI:7,16         | MPHL |
| M98 250626 | B:15, PI:7,16         | MPHL |
| M97 250571 | B:15, PI:16           | MPHL |
| M97 252097 | B:15, PI:16, P1.7b,16 | MPHL |
| M97 253092 | B:1, PI:6             | MPHL |
| M97 252029 | B:15, PI:7, NT        | MPHL |
| M97 251875 | B:15, PI:7, NT        | MPHL |

10

20

【 0 1 8 1 】

【表 6 - 3】

| 菌株      | 血清型サブタイプ        | 入手先         |
|---------|-----------------|-------------|
| CDC1127 | PI.7,16 4(15)   | CDC         |
| CDC982  | PI.7,16 4(15)   | CDC         |
| CDC1359 | PI.7,16 4(15)   | CDC         |
| CDC798  | PI.7,16 15(4)   | CDC         |
| CDC1078 | PI.7,16 15(4)   | CDC         |
| CDC1614 | PI.7,16 15(4)   | CDC         |
| CDC1658 | PI.7,16 15(4)   | CDC         |
| H44/76  | PI.7,16 15(4)   | RIVM        |
| CDC1985 | P1.7,13 4(15)   | CDC         |
| L6      | P1.7,1 ?(4)     | Walter Reed |
| CDC1573 | P1.7,1 4(15)    | CDC         |
| L7      | P1.7,(9),1      | Walter Reed |
| CDC937  | P1.7.3, P1.7b,3 | CDC         |
| 8529    | P1.7.3, P1.7b,3 | RIVM        |
| 880049  | P1.7b,4         | RIVM        |
| CDC2367 | P1.15 4(15)     | CDC         |
| H355    | P1.19,15        | RIVM        |
| CDC1343 | P1.14 4(15)     | CDC         |
| M982    | P1.22,9         | RIVM        |
| 870227  | P1.5c,10        | RIVM        |
| B40     | P1.5c,10        | RIVM        |
| 5315    | P1.5c,10        | RIVM        |
| CDC983  | P1.5,2          | CDC         |
| CDC852  | P1.5,2          | CDC         |
| 6940    | P1.18,25 (6)    | RIVM        |
| A4      |                 |             |

30

40

【 0 1 8 2 】

他の菌株も感染した患者から単離して容易に入手することができる。

【 0 1 8 3 】

( 実施例 6 )

( 髄膜炎菌株に対する r L P 2 0 8 6 抗血清の反応性 )

以下の表、表VIIは、上述の r L P 2 0 8 6 の交差反応性および交差防護能(cross protec

50

tion capacity)を示す。表に示したように、rLP2086を全細胞ELISA(WCE)力価、殺菌性のアッセイ(BCA)および新生仔ラット(IR)アッセイを含む様々な技術を用いて、処理および分析を行い、2086タンパク質に対して作製されたポリクローナル抗体の細菌細胞表面の活性を決定した。

【0184】

【表7】

表VII

多数の髄膜炎菌に対するrLP2086-8529抗血清の反応性

| 菌株                   | 血清型サブタイプ    | WCE        | BC    | IR |
|----------------------|-------------|------------|-------|----|
| <b>2086 サブファミリーA</b> |             |            |       |    |
| 870446               | P1.12a,13   | 808,615    | >800  |    |
| NmB                  | P1.5a,2c    | 47,954     | <100  |    |
| 6557                 | P1.22a,14a  | 169,479    | <25   | -  |
| <b>2086 サブファミリーB</b> |             |            |       |    |
| 880049               | P1.7b,4     | 1,402,767  | 100   | +  |
| H44/76               | P1.7,16     | 8,009,507  | >6400 |    |
| H355                 | P1.19,15    | 10,258,475 | 3,200 | +  |
| 6940                 | P1.18,25(6) | 5,625,410  | 800   |    |
| 870227               | P1.5c,10    | 4,213,324  | <25   | +  |
| 252097               | P1.7b,16    | 10,354,512 | >800  |    |
| 539/8529             | P1.7b,3     | 11,635,737 | 3,200 |    |
| M982                 | P1.22,9     | 1,896,800  | 800   |    |
| CDC-1573             | P1.7a,1     | 208,259    | 25    |    |
| CDC-937              | P1.7b,(3)   | 9,151,863  | >800  |    |

+ 菌血において10より大きな低下

- 菌血において10倍未満の低下

10

20

【0185】

(実施例7)

ORF2086タンパク質を発現する様々なコンストラクトを調製した。以下の表、表VIIは本発明の実施例を示し、実施を説明する目的で非限定的に提供するr2086コンストラクトの表である。

【0186】

【表8】

表VIII

r2086コンストラクトのまとめ

| コンストラクト | プロモーター | リーダー       | 発現    | 抽出       | ベクター      | %総タンパク質            |
|---------|--------|------------|-------|----------|-----------|--------------------|
| pPX7340 | T7     | 天然         | クーマシー | サルコシル可溶性 | pET27b    | 2.5% 処理されたリポタンパク質  |
| pPX7341 | T7     | P4         | クーマシー | サルコシル可溶性 | pET27b    | 5% 処理されたリポタンパク質    |
| pPX7343 | アラビノース | P4         | クーマシー | サルコシル可溶性 | pBAD18 cm | 7-10% 処理されたリポタンパク質 |
| pPX7325 | T7     | T7-タグ融合/成熟 | クーマシー | 射入体      | pET9a     | 40-50% 成熟タンパク質     |
| pPX7328 | T7     | 成熟         | クーマシー | 可溶性      | pET9a     | 10% 成熟タンパク質        |

30

40

【0187】

(実施例8)

LOSを除去した外膜タンパク質を用いてのさらなる研究により、異種の血清型サブタイプを発現する菌株に対する殺菌性抗体を産生することのできる、PorA以外の外膜タンパク質(複数)を生成するさらなる菌株を同定した。以下に、髄膜炎菌の免疫原性組成物に必要なタンパク質の数を減らすことのできる、本発明の1つの態様による付加的なタンパク質、そして具体的には外膜のリポタンパク質を同定するためのさらなる研究について述べる。これらのさらなる研究は、先の実施例に記述した研究を補足するものである。

50



## 【0188】

細胞成分分画、異なる界面活性剤による抽出、等電点電気泳動およびイオン交換クロマトグラフィーを、複数の菌株に対する免疫感作および殺菌性のアッセイと共に使用して、目的のタンパク質の小さな群を同定した。主要成分の直接配列決定は、N末端がブロックされていることを示した。化学的分解およびタンパク質分解酵素による消化から得られたポリペプチドの直接配列決定により、内側のタンパク質の配列が得られた。A群髄膜炎菌株のゲノム配列は、Sangerセンターよりダウンロードし、探索可能なデータベースを作成するため当方のバイオインフォマティクスグループが現在あるおよび私有のアルゴリズムを用いて分析した。ペプチド配列データは、ORF 2086が目的のものであることを示した。このORFに基づいたプライマーを使用して、菌株8529からのP2086遺伝子のPCRを行った。遺伝子配列の分析、N末端がブロックされているという事実、およびその細胞下の位置から、P2086が脂質化された外膜タンパク質(LP2086)であることが示された。rLP2086-8529および他の髄膜炎菌株からのバリエーションを、インフルエンザ菌P4シグナル配列を用いて大腸菌内でリポタンパク質として組換え発現させた。これらの組換えタンパク質を、異なる界面活性剤の抽出により大腸菌膜から単離し、イオン交換クロマトグラフィーを用いて精製し、マウスの免疫感作に使用した。抗LP2086-マウス血清は、髄膜炎菌のいくつかの異なる血清型サブタイプの菌株に対して殺菌活性を促進することができた。多くの髄膜炎菌株からP2086遺伝子のさらなる分析は、これらの配列がサブファミリーAおよびサブファミリーBと命名した2つの群に分類されることを示した。(図12参照のこと)サブファミリーBタンパク質に対して作製された抗血清は、サブファミリーBタンパク質を発現する9つの菌株に対して、およびサブファミリーAタンパク質を発現する1つの菌株に対して殺菌性を示した。サブファミリーAの抗血清は複数のサブファミリーA菌株に対して殺菌性を示した。1つのrPorAおよび1つのrLP2086の混合物は、いずれかのタンパク質だけで誘導される範囲を超えてワクチンの適用範囲を拡大する、補足的な抗体を産生した。

10

20

## 【0189】

これらの観察より以下の結論が導かれる。rLP2086抗原は、異種のPorAおよび異種のP2086タンパク質を発現する髄膜炎菌株に対して殺菌性抗体を産生することができる。抗原のP2086ファミリーは、単独でまたは他のナイセリア属の抗原と組み合わせ、有用なワクチンとなるまたは免疫原性を有することができる。

30

## 【0190】

以下に前述の研究を詳細に述べる。可溶性外膜タンパク質(sOMP)の複合混合物が、異種のPorAタンパク質を発現する菌株に対して、PorA非依存性の殺菌性抗体を産生することが発見された。異なる界面活性剤による抽出処理、等電点電気泳動およびイオン交換クロマトグラフィー、その後のマウスの免疫感作を用いて、免疫学的活性成分を追跡した。

## 【0191】

各ステップで、髄膜炎菌性疾患の世界的な疫学の典型である血清型サブタイプの抗原を含むいくつかの菌株に対する、細胞表面の反応性および殺菌活性について、血清のアッセイを行った。

40

## 【0192】

分離および免疫感作のこの過程を用いて、B群髄膜炎菌に関する新たな交差反応性免疫原性候補物質を同定した。

PorA欠損株の作製 - porA染色体遺伝子座を菌株2996からプラスミドpPX7016中にクローニングした。プラスミド内でporAプロモーター、S/Dボックスおよび最初の38N末端コドンに欠失させ、それ自体が含有するKanR発現カセットで置き換えた。このプラスミドを制限酵素で直鎖化し、血清型サブタイプ菌株PI:5,2;PI:9;PI:7,16;PI:15;PI:4;PI:3およびPI:10中に自然に形質転換させた。カナマイシン耐性形質転換体を選択し、ELISAにおいて血清型サブタイプ特異的モノクローナルによりPorA欠損についてスクリーニングした。

50

## 【 0 1 9 3 】

殺菌活性のアッセイ : Mountzourous, K.T. and Howell, A.P. Detection of Complement-Mediated

Antibody-Dependent Bactericidal Activity in a Fluorescence-Based Serum

Bactericidal Assay for Group B Neisseria meningitides ( グループ B 髄膜炎菌に関

する蛍光標識を基本とする血清の殺菌性のアッセイにおける、補体を介した酵素依存的殺菌活性の検出 ). J Clin Microbiol. 2000; 38: 2878-2884を参照のこと。

## 【 0 1 9 4 】

全細胞の酵素結合免疫吸着検定法 ( E L I S A ) : 髄膜炎菌の全細胞の懸濁液を、滅菌 0 . 0 1 M リン酸塩、 0 . 1 3 7 M

N a C l , 0 . 0 0 2 M K C l ( P B S ) 中に、 6 2 0 n m における 0 . 1 の光学密度まで希釈した。この懸濁液から 0 . 1 m L ずつ、Nunc Bac T 9 6 ウェルプレート ( カタログ番号 2 - 6 9 6 2 0 ) の各ウェルに加えた。細

胞を、プレート上で 3 7 °C でオーバーナイト乾燥させた後、カバーしてひっくり返し、 4 °C で保存した。プレートを洗浄バッファー ( 0 . 0 1 M

T r i s - H C l , 0 . 1 3 9 M N a C l / K C l , 0 . 1 % B r i j i - 3 5 , p H 7 . 0 - 7 . 4 ) で 3 回洗浄した。抗血清の希釈は、P B S、 0 . 0 5 % Tween - 2 0 / Azide で調整し、 0 . 1 m L をコートしたプレートに移し、 3 7 °C で 2 時間インキュベーションした。プレートを洗浄バッファーで 3 回洗浄した。抗マウス - ヤギ I g G

A P ( Southern

Biotech) を P B S / 0 . 0

5 % Tween - 2 0 で 1 : 1 5 0 0 に希釈し、 0 . 1 m L を各ウェルに加え、プレートを 3 7 °C で 2 時間インキュベーションした。プレートを ( 上記のように ) 洗浄した。基質溶液は、ジエタノールアミン中の p - ニトロフェニルホスフェート ( Sigma ) で希釈して 1 m g / m L に調製した。基質を 1 ウェル当たり 0 . 1 m L ずつプレートに加え、室温で 1 時間インキュベーションした。反応は 3 N

N a O H を 5 0 μ L / ウェル加えることによ

り停止し、 6 9 0 n m を参照して 4 0 5 n m で測定した。

## 【 0 1 9 5 】

組換え P o r A の誘導 : B L R ( D E 3 ) / p E T 9 a 菌株を Kan - 3 0 および 2 % グルコースを補った HySoy Broth ( Sheffield Products ) 中で 3 7 °C でオーバーナイト培養した。

翌朝 O / N 培地を HySoy Broth Kan - 3 0 および 1 % グリセロール中で 1 / 2 0 に希釈し、 3 7 °C で 1 時間培養した。これらの培地に I P T G を最終濃度 1 m M となるように加えて誘導した。培地をさらに 2 - 3 時間培養した後、収穫した。

## 【 0 1 9 6 】

組換え P o r A の精製 : r P o r A は大腸菌封入体より 8 M

尿素にて可溶化し、尿素を含まないバッファーに透析することによりリフォールディングさせた。次にリフォールディングした r P o r A を次にダイアフィルトレーション ( diafiltration ) により濃縮し、 G 2 5 カラムにて N a P O 4

p H 6 にバッファーを交換した。次に透析した r P o r A を陽イオン交換カラム ( S Fractogel ) にかき 1 M

N a C l で溶出した。

## 【 0 1 9 7 】

菌株 8 5 2 9 ( P 1 . 7 - 2 , 3 ) 由来の s O M P は、異種の血清型サブタイプを発現する菌株に対して、マウスにおいて P o r A 非依存性の殺菌活性を惹起する。以下の表、表 IX は検討した菌株における殺菌活性を示す。

## 【 0 1 9 8 】

10

20

30

40

## 【表 9】

表IX

| 検査菌株         | 血清型サブタイプ         | BC <sub>50</sub> 力価 <sup>1</sup> |
|--------------|------------------|----------------------------------|
| 539          | P1.7-2,3         | 1280                             |
| 539 PorA-    | NST <sup>2</sup> | 1080                             |
| H44/76       | P1.7,16          | 3285                             |
| H44/76 PorA- | NST              | 2620                             |
| H355         | P1.19,15         | >1350                            |
| H355 PorA-   | NST              | >1350                            |
| 880049       | P1.7-2,4         | 290                              |
| 880049 PorA- | NST              | 85                               |
| M982         | P1.22,9          | 85                               |
| M982 PorA-   | NST              | <50                              |

10

## 【0199】

OMPの調製：髄膜炎菌の膜をTX-100、Zwittergent 3-14、およびZwittergent 3-14+0.5M

NaClで抽出した。上述のOMPはZwittergent 3-14/0.5M NaCl抽出で可溶化した。抽出は当業者周知の技術を用いて行い、例えば米国特許第6,355,253号を参照のこと（同文献を当明細書において参照として援用する）。

## 【0200】

免疫原性：メスSwiss-Websterマウスに、20μg QS-21をアジュバントした総タンパク質量25μgにて、第0週および第4週に免疫感作を行った。全採血およびデータ分析は第6週に行った。

20

## 【0201】

1. 殺菌性（BC<sub>50</sub>）力価は、生細胞のカウントを50%低減する抗血清の希釈度の逆数として表した。第0週の正常なマウスの血清のBC<sub>50</sub>力価は<25であった。

2. NST = 血清型サブタイプ分類外

以下の表、表XはサブファミリーAおよびサブファミリーBの双方に関する組換え脂質化P2086（rLP2086）の精製および特徴付けのまとめを示す。

## 【0202】

## 【表10】

サブファミリーA rLP2086精製

表X

| rLP2086バリエーション | アミノ酸の相同性 (%) <sup>1</sup> | 理論上のpI | 純度 (%) <sup>2</sup> |
|----------------|---------------------------|--------|---------------------|
| 870446         | 75                        | 6.1    | 80                  |
| 2996           | 71                        | 5.9    | 95                  |
| M97 252988     | 71                        | 6.3    | 96                  |
| C11            | 68                        | 6.4    | 82                  |
| M98 250771     | 62                        | 6.1    | 83                  |

30

## 【0203】

## 【表11】

サブファミリーB rLP2086精製

表XI

| rLP2086バリエーション | アミノ酸の相同性 (%) <sup>1</sup> | 理論上のpI | 純度 (%) <sup>2</sup> |
|----------------|---------------------------|--------|---------------------|
| 8529           | 100                       | 7.5    | 96                  |
| M982           | 94                        | 6.3    | 96                  |
| 88049          | 92                        | 6.2    | 90                  |
| CDC1573        | 87                        | 5.6    | 93                  |

40

## 【0204】

精製法：すべてのバリエーションは大腸菌膜よりTX-100にて可溶化した（サルコシルまたは尿素で可溶化したrLP2086-8529は除く）。さらなる精製は、Tris-HClバッファーまたはNaPO<sub>4</sub>バッファー中で、陰イオン交換クロマトグラフィー（TMAE）、サイズ排除クロマトグラフィーおよび/または陽イオン交換クロマトグラフィー（S Fractogel）を組み合わせて達成した。

50

## 【 0 2 0 5 】

・ 菌株 8 5 2 9 由来の P 2 0 8 6 と比較してのアミノ酸の相同性  
 ・ S D S - P A G E および、コロイド状のクーマシー染色バンド (Simply Blue 染色) のレーザーデンストメトリーによる純度の決定  
 同種および異種の菌株に対するサブファミリーのメンバーの r L P 2 0 8 6 - 8 5 2 9 の免疫原性を検査した。

## 【 0 2 0 6 】

以下の表XIIは、同種および異種の菌株に対して検査したサブファミリー B のメンバーの r L P 2 0 8 6 - 8 5 2 9 の免疫原性を示す。

## 【 0 2 0 7 】

10

## 【 表 1 2 】

表XII

| 標的菌株       | P2086<br>サブファミリー | 標的菌株<br>血清型サブタイプ | アミノ酸<br>均質性* | 全細胞<br>ELISA <sup>b</sup> 力価 | BC <sub>50</sub><br>力価 <sup>c</sup> |
|------------|------------------|------------------|--------------|------------------------------|-------------------------------------|
| 539        | B                | P1.7-2,3         | 100          | >1,458,000                   | 3,200                               |
| H44/76     | B                | P1.7,16          | 100          | >1,458,000                   | 3,200                               |
| H355       | B                | P1.19,15         | 100          | >1,458,000                   | 3,200                               |
| CDC937     | B                | P1.7-2,3-4       | 100          | >1,458,000                   | >800                                |
| M97 252097 | B                | P1.7-2,16        | 100          | >1,458,000                   | >800                                |
| 870227     | B                | P1.5-2,10        | 100          | >1,458,000                   | <25                                 |
| 6940       | B                | P1.18,25,6       | 97           | 900,162                      | >800                                |
| M982       | B                | P1.22,9          | 94           | 435,909                      | 200                                 |
| 880049     | B                | P1.7-2,4         | 92           | 349,912                      | 400                                 |
| CDC1573    | B                | P1.7-1,1         | 87           | 102,508                      | 25                                  |
| 870446     | A                | P1.12-1,13       | 71           | 389,829                      | 800                                 |
| M98 250771 | A                | P1.22,14         | 62           | 139,397                      | <25                                 |
| NmB        | A                | P1.5-1,2-2       | 71           | <2,000                       | <25                                 |

20

## 【 0 2 0 8 】

ワクチン接種手順：6 - 8 週齢メスSwiss-Websterマウスを、1 0 μ g r L P 2 0 8 6 - 8 5 2 9 + 2 0 μ g Q S - 2 1 で、第 0 週および第 4 週に免疫感作した。データ分析は第 6 週的全採血時に行った。

## 【 0 2 0 9 】

a . r L P 2 0 8 6 - 8 5 2 9 との比較における P 2 0 8 6 のアミノ酸の相同性  
 b . 吸収 = 0 . 1 での希釈度の逆数として表した終点力価  
 c . B C 5 0 力価は、生細胞のカウントを 5 0 % まで低減する抗血清の希釈度の逆数として表した。第 0 週の正常なマウスの血清の B C 5 0 力価は < 1 0 であった。

30

## 【 0 2 1 0 】

表XIIIは、同種および異種の菌株に対して検査したサブファミリー B のメンバーの r L P 2 0 8 6 - 2 9 9 6 の免疫原性を示す。

## 【 0 2 1 1 】

## 【 表 1 3 】

表XIII

| 標的菌株<br>Strain | P2086<br>サブファミリー | 標的菌株<br>血清型サブタイプ | アミノ酸<br>均質性* | 全細胞<br>ELISA <sup>b</sup> 力価 | BC <sub>50</sub><br>力価 <sup>c</sup> |
|----------------|------------------|------------------|--------------|------------------------------|-------------------------------------|
| NmB            | A                | P1.5-1,2-2       | 99.6         | 8,979                        | <25                                 |
| 870446         | A                | P1.12-1,13       | 99           | <1,458,000                   | >800                                |
| M97 252697     | A                | P1.18,25,6       | 98           | 320,732                      | >800                                |
| 6557           | A                | P1.22-1,14-1     | 98           | 17,319                       | <25                                 |
| M98 250732     | A                | P1.22,14-1       | 89           | 241,510                      | >800                                |
| M98 250771     | A                | P1.22,14         | 89           | 447,867                      | 800                                 |
| H44/76         | B                | P1.7,16          | 72           | 56,386                       | <25                                 |

40

## 【 0 2 1 2 】

ワクチン接種手順：6 - 8 週齢メスSwiss-Websterマウスを、1 0 μ g r L P 2 0 8 6 - 2 9 9 6 + 2 0 μ g Q S - 2 1 で、第 0 週および第 4 週に免疫感作した。データ分析は第 6 週的全採血時に行った。

## 【 0 2 1 3 】

a . r L P 2 0 8 6 - 2 9 9 6 との比較における P 2 0 8 6 のアミノ酸の相同性

50

b. 吸収 = 0.1 での希釈度の逆数として表した終点力価

c. 殺菌性 (BC50) 力価は、生細胞のカウントを 50% まで低減する抗血清の希釈度の逆数として表した。第 0 週の正常なマウスの血清の BC50 力価は < 10 であった。

【0214】

以下の表XIVは、rLP2086およびrPorAに対する抗血清が、両者を混合して殺菌活性をアッセイした場合に補足的であることを示す。

【0215】

【表14】

表XIV

| 抗血清                                   | H44/76<br>(P1.7,16) | NMB<br>(P1.5-1,2-2) | 880049<br>(P1.7-2,4) | H355<br>(P1.19,15) | 870227<br>(P1.5-2,10) | 6557<br>(P1.22-1,14-1) |
|---------------------------------------|---------------------|---------------------|----------------------|--------------------|-----------------------|------------------------|
| 抗-rLP2086<br>+ 3種のrPorA<br>抗血清        | >3,200              | >800                | 200                  | >800               | 200                   | 200                    |
| コントロール                                |                     |                     |                      |                    |                       |                        |
| 抗-rLP2086<br>対応する<br>1価の<br>rPorA 抗血清 | 6,400               | <25                 | 100                  | 3,200              | <25                   | <25                    |
|                                       | -                   | 1,600               | -                    | -                  | 200                   | 400                    |

10

【0216】

ワクチン接種手順：6 - 8 週齢メスSwiss-Websterマウスを、10 μg rLP2086 - 8529 + 20 μg QS - 21、または15 μg rPorA/100 μg MPLのいずれかで、第0週および第4週に免疫感作した。データ分析は第6週的全採血時に行った。

20

【0217】

a. 殺菌性 (BC50) 力価は、生細胞のカウントを 50% まで低減する抗血清の希釈度の逆数として表した。第 0 週の正常なマウスの血清の BC50 力価は < 10 であった。

【0218】

以下の表、表XVはrLP2086サブファミリーおよび2つのrPorAの混合物がマウスにおいて殺菌活性抗体を産生することを示す。

【0219】

【表15】

表XV

|  | H44/76           | 6940          | 880049       | M982        | M98<br>250771    | M98<br>250732  | M97<br>252697  | 870446         | Nmb            | 6557                 |
|--|------------------|---------------|--------------|-------------|------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------------|
|  | SfB <sup>a</sup> | SfB           | SfB          | SfB         | SfA <sup>a</sup> | SfA            | SfA            | SfA            | SfA            | SfA                  |
|  | P1.7,16          | P1.18<br>25,6 | P1.7-<br>2,4 | P1.22<br>,9 | P1.22,1<br>4     | P1.22,1<br>4-1 | P1.18,2<br>5,6 | P1.12-<br>1,13 | P1.5-<br>1,2-2 | P1.22<br>-1,14-<br>1 |
| 抗原   |                  |               |              |             |                  |                |                |                |                |                      |
| rLP2086-<br>8529 +<br>rLP2086-<br>2996   | >800             | >800          | 200          | 400         | 800              | >800           | >800           | >800           | -              | <25                  |
| rLP2086-<br>8529 +<br>rLP2086-<br>2996 +<br>rP1.5-1,2-2<br>+ rP1.22-<br>1,14-1 | >800             | 800           | 100          | 200         | 400              | 400            | >800           | >800           | >800           | 200                  |
| 1価の<br>コントロール  | >800             | >800          | 200          | 400         | 800              | >800           | >800           | >800           | >800           | 800                  |

30

40

【0220】

ワクチン接種手順：6 - 8 週齢メスSwiss-Websterマウスを、10 μg 各タンパク質 + 20 μg QS - 21 で、第0週および第4週に免疫感作した。データ分析は第6週的全採血時に行った。

【0221】

a. 殺菌性 (BC50) 力価は、生細胞のカウントを 50% まで低減する抗血清の希釈度の逆数として表した。第 0 週の正常なマウスの血清の BC50 力価は < 10 であった。

50

## 【0222】

b. S f A - サブファミリー A、S f B - サブファミリー B

c. 関連の一価コントロール: r L P 2 0 8 6 - 8 5 2 9、r L P 2 0 8 6 - 2 9 9 6、r P 1 . 5 - 1、2 - 2 または r P 1 . 2 2 - 1、1 4 - 1 抗血清

以下に上述の研究の結果をまとめる。抗 r L P 2 0 8 6 抗血清は、検査した菌株 1 6 種中 1 3 種に対して殺菌性がある。異なる血清型サブタイプを発現する 1 1 の菌株が、抗 P 2 0 8 6 血清により死滅させられる。抗 r L P 2 0 8 6 血清の殺菌活性は抗 r P o r A 血清に対して補足的である。P 2 0 8 6 および P o r A の混合物はマウスにおいて補足的な殺菌性抗体を産生する。異なる界面活性剤による抽出、精製、および多くの菌株に対する機能的な抗体のアッセイを組み合わせた免疫感作を用いて、新規ワクチン候補物質を同定することができる。P 2 0 8 6 は、P 2 0 8 6 および r P o r A の双方において異種の菌株に対して殺菌性抗体を産生するワクチン候補物質として同定された。したがって、タンパク質の 2 0 8 6 ファミリーは、単独でまたは他のナイセリア属抗原と組み合わせてのいずれかにおいて、有用なワクチンとなり得る。

10

## 【0223】

(実施例 9)

先の実施例に従って、様々な血清群のさらなる髄膜炎菌株について、O R F 2 0 8 6 遺伝子の存在に関する P C R によるスクリーニングを行った。最終的に 1 0 0 の髄膜炎菌株をスクリーニングした。以下に研究およびその全般的結果を述べる。これらの結果は先の実施例のデータを補足するものである。

20

## 【0224】

C 末端の変領域に特異的な 2 組の内側の P C R プライマーを利用してサブファミリー A および B の遺伝子配列の違いを明らかにした。約 3 5 0 b p の P C R 増幅産物の存在は、2 0 8 6 遺伝子配列が染色体上に存在することを示した。すべての菌株から予想されるサイズの 1 つの P C R 産物を得た。5 5 種の完全長 O R F 2 0 8 6 遺伝子のヌクレオチド配列を決定、整列し (DNAS tar MegAlign)、これらを用いて系統樹を作成した (図 1 2 参照のこと)。

## 【0225】

これら 2 0 8 6 遺伝子の 9 種を、p B A D アラビノース誘導型プロモーター系において r L P 2 0 8 6 リポタンパク質として組換え発現させ、これら遺伝子の 3 種を I P T G 誘導型 p E T 系において r P 2 0 8 6 非脂質化タンパク質として組換え発現させた。これらの組換えタンパク質は大腸菌 B 中で発現させた。精製した組換えタンパク質を用いてマウスを免疫感作し、マウスの抗血清を、その血清 I g G 力価および様々な異種の髄膜炎菌株に対するその殺菌活性についてアッセイした。

30

## 【0226】

O R F 2 0 8 6 を、以下の髄膜炎菌全細胞、精製染色体 D N A、またはプラスミド D N A の鋳型の 1 つから P C R により増幅した。

9 種の O R F 2 0 8 6 遺伝子を、インフルエンザ菌 P 4 リーダー配列を O R F 2 0 8 6 遺伝子の 5 ' 末端に融合するベクター p L P 3 3 9 中にクローニングした。p B A D / O R F 2 0 8 6 クローンから r P 2 0 8 6 の脂質化型を組換え発現させるための宿主菌株として、大腸菌株 B L R を使用した (図 1 0 A を参照のこと)。p B A D アラビノース誘導型プロモーターは、P 4 シグナル / O R F 2 0 8 6 融合タンパク質の発現に作用し、r P 2 0 8 6 の脂質化型を発現させる。シグナル配列を欠損する 3 種の P 2 0 8 6 遺伝子は、p E T 9 a ベクター中の高活性 T 7 フェージプロモーターの後ろにクローニングした。p E T 9 a / O R F 2 0 8 6 クローンから O R F 2 0 8 6 の非脂質化型を組換え発現させるための宿主細胞株として、大腸菌株 B L 2 1 ( D E 3 ) を使用した。(図 1 0 B 参照のこと) 大腸菌株 B L 2 1 中の D E 3 lysogen を、I P T G 添加により l a c U V 5 プロモーターのコントロール下で誘導して、T 7

40

R N A ポリメラーゼを発現させることができる。WCE; FEMS Micro. Lett., 48 (1987) 36 7-371 および BCA; J. Clin.

50

Microbiol., 38 (2000) 2878-2884を参照のこと。

【0227】

遺伝子ORF2086を、55種の異なる髄膜炎菌株からクローニングし、配列決定した。ヌクレオチド配列を整列し(DNAStar MegAlign)、系統樹を作成に用いた。(図12参照のこと)。この系統樹は、ORF2086遺伝子ヌクレオチド配列が2つのサブファミリーに区別されることを明らかにしている。遺伝子の2つのサブファミリーは、5'末端では類似しているが、3'末端付近はかなりの可変性を含む。重要な可変性であるとは思われるが、遺伝子のある種の鍵となる領域は異なる菌株間で非常に相同である。これらの保存領域がタンパク質としての機能的連続性を提供し、ワクチン標的として利用できる交差防護的エピトープを示している可能性がある。

10

【0228】

2086遺伝子をいくつかの血清群B髄膜炎菌株からクローニングし、脂質化シグナル配列を用いた場合および用いない場合で発現させた。図11Aおよび11Bに示したように、ゲルクロマトグラフは、大腸菌Bの全細胞溶菌液がr2086タンパク質を発現することを示す。T7タグを融合した非脂質化型は最も高レベルで発現された。T7タグ配列はmRNAを安定化し、翻訳されるポリペプチドのレベルを有意に高めることができる。この融合タンパク質は封入体中に沈着して表れるが、公知の方法により容易に精製、リフォールディングすることができる。P2086の脂質化型および非脂質化型は、T7タグを融合しない場合には総細胞タンパク質の約5から8%で発現され、T7タグを融合した場合には総タンパク質の約50%でrP2086を発現する。タンパク質の非脂質化型は可溶性で、細胞質中に局在するようである。タンパク質の脂質化型は膜分画に関与すると思われる、界面活性剤により可溶化される。

20

【0229】

髄膜炎菌B株8529由来の組換え脂質化2086は、非脂質化型に比して一貫してより高い血清IgG力価を示し(以下の表XVIを参照のこと)、このことは同種および異種の髄膜炎菌株双方に対する高レベルの殺菌活性にもよく相関する(以下の表XVII参照のこと)。天然の脂質化型のタンパク質は、抗原提示するための優れた3次元構造を有しており、および/または結合した脂質がより高い免疫原性応答を刺激するアジュバントとして作用する可能性がある。

30

【0230】

【表16】

表XVI

8529rP2086(非脂質化)対8529rLP2086(脂質化)を用いてのWCEにより第6週で誘発された免疫応答

| マウス血清   |         | 髄膜炎菌株     |           |           |           |         |  |
|---------|---------|-----------|-----------|-----------|-----------|---------|--|
| 抗原      | アジュバント  | H44/76    | H355      | 870227    | 880049    | 870446  |  |
| (10 ug) | (20 ug) |           |           |           |           |         |  |
| rP2086  | QS-21   | 273,238   | 212,947   | 102,694   | 69,124    | 21,466  |  |
| rLP2086 | QS-21   | 5,384,306 | 4,819,061 | 2,930,946 | 1,307,091 | 886,056 |  |

40

【0231】

【表17】

表XVII

8529rP2086は8529rLP2086より低い殺菌活性を誘発する

| マウス血清       |         | 髄膜炎菌株  |       |        |       |
|-------------|---------|--------|-------|--------|-------|
| 抗原          | アジュバント  | H44/76 | H355  | 880049 | NMB   |
| (10 ug)     | (20 ug) |        |       |        |       |
| rP2086      | QS-21   | 200    | 100   | <25    | <25   |
| rLP2086     | QS-21   | 6,400  | 3,200 | 100    | <25   |
| 免疫前         | -       | <10    | <10   | <10    | <10   |
| ポジティブコントロール | -       | 1,600  | 100   | 200    | 1,600 |

50

【 0 2 3 2 】

以下に本研究の結果をまとめる。検査を行ったすべての髄膜炎菌 B 株は、1 つの 2 0 8 6 様遺伝子を有しているようである。2 0 8 6 遺伝子には少なくとも 2 つのファミリーがある：サブファミリー A - 菌株の約 3 0 % およびサブファミリー B - 菌株の約 7 0 %。5 5 種の髄膜炎菌株から 2 0 8 6 遺伝子をクローニングし、配列決定した。サブファミリー A 中の配列は、DNA レベルで ~ 8 6 - 1 0 0 % 同一である。サブファミリー B 中の配列は、DNA レベルで ~ 8 9 . 5 - 1 0 0 % 同一である。サブファミリー A 中の配列はサブファミリー B に対して DNA レベルで ~ 6 0 . 9 % - 7 4 % 同一である。2 0 8 6 相同体を以下の菌株について PCR スクリーニングにより同定した：

髄膜炎菌 A、B、C、W 1 3 5、Y

N. lactamica

淋菌 (N. gonorrhoeae) F A 1 0 9 0

いくつかの O R F 2 0 8 6 遺伝子をクローニングし組換え発現させた。

P 2 0 8 6 の脂質化バージョンを 9 種の髄膜炎菌株から発現させた。

これらの組換えタンパク質を精製し、マウスのワクチン接種に使用した。

得られた抗血清は殺菌性である。

【 0 2 3 3 】

P 2 0 8 6 の非脂質化バージョンを上 9 種の菌株のうちの 3 種から発現させた。

r L P 2 0 8 6 では、r P 2 0 8 6 に比して一貫してより高い免疫応答を惹起する。

r L P 2 0 8 6 はまた、同種および異種の髄膜炎菌株の双方に対して高い殺菌活性を示した。

【 0 2 3 4 】

( 実施例 1 0 )

以下の表、表XVIIIおよび表XIXは、2つのサブファミリーのメンバーのバリエーションの特徴を示す。

【 0 2 3 5 】

【 表 1 8 】

表XVIII

サブファミリーArLP2086バリエーションの特徴づけ

|                               | rLP2086-252988       | rLP2086-250771  | rLP2086-870446 | rLP2086-2996    | rLP2086-C11      |                 |
|-------------------------------|----------------------|-----------------|----------------|-----------------|------------------|-----------------|
| 増殖用培地                         | HySoy                | HySoy           | HySoy          | HySoy           | HySoy            |                 |
| 可溶性                           | rTX-100 ⇒ Z3-12      | TX-100          | TX-100         | rTX-100 ⇒ Z3-12 | rTX-100 ⇒ Z3-12  |                 |
| 精製過程                          | TMAE S Fractogel SEC | HQ Poros SEC    | HQ Poros SEC   | TMAE SEC        | TMAE S Fractogel |                 |
| 純度 (%)                        | 96                   | 83              | 80             | 95              | 82               |                 |
| 収量 (mg/g 細胞ペレット)              | 0.2                  | 0.7             | 0.8            | 0.5 (発酵器)       | 0.1              |                 |
| サイズ                           | SEC (Z3-12)          | 134,000         | 155,000        | 132,000         | 163,000          | 126,000         |
|                               | MS                   | 27,897 (712 脂質) | -              | -               | 27,878 (750 脂質)  | 28,139 (682 脂質) |
| 熱変性転移中間点 (T <sub>m</sub> ) °C | 66 °C                | -               | NT             | 65 °C           | 63 °C            |                 |
| 利用可能なタンパク質                    | 2.7mg                | 1mg (Z3-12)     | 5.0mg          | 44mg            | 1.1mg            |                 |
| (mg)                          |                      |                 |                |                 |                  |                 |
| 8529 配列の相同性 (%)               | 71                   | 62              | 71             | 72              | 68               |                 |

【 0 2 3 6 】



【表 19】

表XIX

サブファミリーB rLP2086バリエーションの特徴づけ

|                               | rLP2086-8529              | rLP2086-M982                 | rLP2086-880049     | rLP2086-CDC1573                    |
|-------------------------------|---------------------------|------------------------------|--------------------|------------------------------------|
| 増殖用 培地                        | Apollon (Sanford)         | Apollon                      | HySoy              | HySoy                              |
| 可溶性                           | 4M Urea ⇨ Z3-12           | rTX-100 ⇨ Z3-12              | rTX-100 ⇨ Z3-12    | rTX-100                            |
| 精製過程                          | TMAE S Fractogel          | TMAE S Fractogel             | TMAE S Fractogel   | TMAE SEC                           |
| 純度 (%)                        | 96                        | 96                           | 90                 | 93                                 |
| 収量 (mg/g 細胞ペレット)              | 0.2 (発酵器)                 | 1.6 (発酵器)                    | 0.4                | 1.0                                |
| サイズ                           | SEC (Z3-12)               | 95,000                       | 110,000<br>150,000 | 120,000                            |
|                               | MS (822 脂質)               | 27,785                       | 27,719 (711 脂質)    | 28,044 (819 脂質)<br>28,385 (823 脂質) |
| 熱変性転移中間点 (T <sub>m</sub> ) °C | 70 °C                     | 75 °C                        | 62 °C              | NT                                 |
| 利用可能なタンパク質 (mg)               | 尿素 - 34mg<br>サルコシル - 36mg | ブール 1 - 47mg<br>ブール 2 - 17mg | 3.6mg              | 4.9mg                              |
| 8529 配列の 相同性 (%)              | 100                       | 94                           | 92                 | 87                                 |

10

【0237】

20

以下の表XXは、2086サブファミリーAに関する蛍光標識血清の殺菌性アッセイの結果を提供する。

【0238】

【表 20】

表XX

| 説明  | 250771      | 870446      | 6557 | NMB         | M98 250732  | M97 252697  |
|---|-------------|-------------|------|-------------|-------------|-------------|
| rLP2086-252988, 10µg  | >800 (99%)* | >800 (99%)* | <25  | -           | >800 (99%)* | >800 (93%)* |
| rLP2086-C11, 10µg   | 200         | >880 (91%)* | <25  | -           | 200         | 400         |
| rLP2086-250771, 10µg  | >800 (92%)* | >800 (99%)* | <25  | -           | >800 (96%)* | >800 (84%)* |
| rLP2086-870446, 10µg  | 400         | >800 (99%)* | <25  | -           | 400         | 400         |
| rLP2086-2996, 10µg  | 800         | >800 (99%)* | <25  | -           | >800 (93%)* | >800 (72%)* |
| rLP2086-8529 + rLP2086-2996, 10µg                           | 800         | >800 (99%)* | <25  | -           | >800 (80%)* | >800 (72%)* |
| rLP2086-8529 + rP1.22a,14a + rP1.5a,2c, 10µg                | -           | 800         | 200  | >800 (98%)* | -           | -           |
| rLP2086-8529 + rLP2086-2996 + rP1.22a,14a + rP1.5a,2c, 10µg | 400         | >800 (99%)* | 200  | >800 (99%)* | 400         | >800 (88%)* |
| NMB/rLP2086-8529 小胞 20µg                                    | -           | 100         | -    | 400         | -           | -           |
| rP1.22a,14a, 10µg   | 25          | -           | 800  | -           | 100         | -           |
| rP1.5a,2c, 10µg   | -           | -           | -    | >800 (99%)* | -           | -           |
| rLP2086-8529, 10µg  | -           | 800         | -    | -           | -           | -           |
| rP1.22a,14a, 25µg   | 200         | -           | -    | -           | 800         | -           |
| rP1.18,23,6, 5µg  | -           | -           | -    | -           | -           | -           |
| nP1.22,9 (M982), 25µg                                       | -           | -           | 100  | -           | -           | -           |
| 免疫前マウス血清 (ネガティブコントロール)                                      | <10         | <10         | <10  | <10         | <10         | <10         |
|   | 800         | 400         | 800  | 1600        | **          | **          |

30

\* パーセントは 1 : 800 希釈での%BC活性を示す。  
 \*\* ポジティブコントロール 入手不可  
 - 未検査の血清

【0239】

40

(実施例 11)

以下にさらに、P2086がナイセリア属菌株内で発現することを示し、いくつかの菌株

50

における P 2 0 8 6 の発現の更なる具体的な実施例を提供する。

【 0 2 4 0 】

プレート培養した細胞を SDS サンプルバッファーに再懸濁し、98 で4分間加熱して、細胞溶菌液を調製した。サンプルを、10 - 20 %のpre-castゲル ( I C N ) の各ウェルに総タンパク質 ~ 30 - 50  $\mu$ g で加え、175 V で流した。ゲルをニトロセルロース膜に移した後、T r i s 緩衝化生理食塩水 ( Blotto ) 中の5%粉末ミルクにて30分間ブロックした。使用する第1抗体は、マウスで各 r L P 2 0 8 6 バリエーションに対して作成したポリクローナル抗血清のプールとした。

【 0 2 4 1 】

図 1 7 および 1 8 に示したように、ウェスタンブロットは P 2 0 8 6 サブファミリー A および B の全細胞溶菌液に対する、r L P 2 0 8 6 マウス抗血清の反応性を示している。サブファミリー A 細胞溶菌液のブロットについては、使用する抗血清は r L P 2 0 8 6 - 2 9 9 6、- 8 7 0 4 4 6 および - 2 5 0 7 7 1 に対して作製し、r L P 2 0 8 6 - 2 5 0 7 7 1 は Blotto 中で 1 / 5 0 0 に希釈し、他のものは Blotto 中で 1 / 1 0 0 0 に希釈した。サブファミリー B 細胞溶菌液のブロットについては、使用する抗血清は、r L P 2 0 8 6 - 8 5 2 9 ( Blotto 中で 1 / 1 0 0 0 に希釈 )、- C D C 1 5 7 3、- M 9 8 2 および - 8 8 0 0 4 9 ( これら 3 種は Blotto 中で 1 / 5 0 0 に希釈 ) に対して作製した。第1抗血清およびブロットは 4 でオーバーナイト、インキュベーションした。ブロットを洗浄し、抗マウス - ヤギ A P 第2抗血清を Blotto 中で 1 / 5 0 0 として加え、ブロットを室温で30分間インキュベーションした。洗浄後、BCIP/NBT Membrane Phosphatase Substrate System ( 膜ホスファターゼ基質システム ) ( K P L ) を用いてブロットを現像した。

【 0 2 4 2 】

( 参考文献 )

当明細書において先に述べた参考文献を以下に記し、その全内容を当明細書において参照として援用する。

【 0 2 4 3 】

【 表 2 1 - 1 】

1. 1997. Case definitions for Infectious Conditions Under Public Health Surveillance. CDC.
2. 1995 Sambrook, J. and D. W. Russell. 1995. Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons, Inc., New York.
3. 1994. Griffin, A. M. and Griffin, H. G., ed., Computer Analysis of Sequence Data, Part I. Humana Press, New Jersey.
4. 1993. Smith, D. W., ed., Biocomputing: Informatics and Genome Projects. Academic Press, New York
5. 1991. Gribskov, M. and Devereux, J., ed. Sequence Analysis Primer. Stockton Press, New York.
6. 1988. Lesk, A. M., ed. Computational Molecular Biology. Oxford University Press, New York.
7. Abdillahi, H., and J. T. Poolman. 1988. *Neisseria meningitidis* group B serosubtyping using monoclonal antibodies in whole-cell ELISA. *Microbial Pathogenesis* 4(1):27-32.
8. Achtman, M. 1995. Epidemic spread and antigenic variability of *Neisseria meningitidis*. *Trends in Microbiology* 3(5):186-92.
9. Alm, R. A., L. S. Ling, D. T. Moir, B. L. King, E. D. Brown, P. C. Doig, D. R. Smith, B. Noonan, B. C. Guild, B. L. deJonge, G. Carmel, P. J. Tummino, A. Caruso, M. Uria-Nickelsen, D. M. Mills, C. Ives, R. Gibson, D. Merberg, S. D. Mills, Q. Jiang, D. E. Taylor, G. F. Vovis, and T. J. Trust. 1999. Genomic-sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori* [published erratum appears in Nature 1999 Feb 25;397(6721):719]. *Nature*. 397:176-80.

10

20

30

40

50

【 0 2 4 4 】

【 表 2 1 - 2 】

10. Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, and D. J. Lipman. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25:3389-402.
11. Anderson, T. F. 1951. Techniques for the preservation of three-dimensional structure in preparing specimens for the electron microscope. *Trans N Y Acad Sci.* 13:130-134.
12. Ambrosch, F., G. Wiedermann, P. Crooy, and A. M. George. 1983. Immunogenicity and side-effects of a new tetravalent meningococcal polysaccharide vaccine. *Bulletin of the World Health Organization* 61(2):317-23.
13. Benson, G. 1999. Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences. *Nucleic Acids Res.* 27:573-80.
14. Carillo, H., D. Lipman, and J. Siam. 1988. *Applied Math* 48:1073.
15. Chen, C. C., and P. P. Cleary. 1989. Cloning and expression of the streptococcal C5a peptidase gene in *Escherichia coli*: linkage to the type 12 M protein gene. *Infect. Immun.* 57:1740-1745.
16. Chmouryguina, L., A. Suvorov, P. Ferrieri, and P. P. Cleary. 1996. Conservation of the C5a peptidase genes in group A and B streptococci. *Infect. Immun.* 64:2387-2390.
17. Cockerill, F. R., 3rd, R. L. Thompson, J. M. Musser, P. M. Schlievert, J. Talbot, K. E. Holley, W. S. Harmsen, D. M. Ilstrup, P. C. Kohner, M. H. Kim, B. Frankfort, J. M. Manahan, J. M. Steckelberg, F. Roberson, and W. R. Wilson. 1998. Molecular, serological, and clinical features of 16 consecutive cases of invasive streptococcal disease. Southeastern Minnesota Streptococcal Working Group. *Clin Infect Dis.* 26:1448-58.
18. Courtney, H. S., Y. Li, J. B. Dale, and D. L. Hasty. 1994. Cloning, sequencing, and expression of a fibronectin/fibrinogen-binding protein from group A streptococci. *Infect Immun.* 62:3937-46.

10

20

【 0 2 4 5 】

## 【表 2 1 - 3】

19. Cserzo, M., E. Wallin, I. Simon, G. von Heijne, and A. Elofsson. 1997. Prediction of transmembrane alpha-helices in prokaryotic membrane proteins: the dense alignment surface method. *Protein Engineering*. 10:673-6.
20. Cunningham, M. W., and A. Quinn. 1997. Immunological crossreactivity between the class I epitope of streptococcal M protein and myosin. *Adv Exp Med Biol*. 418:887-92.
21. Dale, J. B., R. W. Baird, H. S. Courtney, D. L. Hasty, and M. S. Bronze. 1994. Passive protection of mice against group A streptococcal pharyngeal infection by lipoteichoic acid. *J Infect Dis*. 169:319-23.
22. Dale, J. B., M. Simmons, E. C. Chiang, and E. Y. Chiang. 1996. Recombinant, octavalent group A streptococcal M protein vaccine. *Vaccine*. 14:944-8.
23. Dale, J. B., R. G. Washburn, M. B. Marques, and M. R. Wessels. 1996. Hyaluronate capsule and surface M protein in resistance to opsonization of group A streptococci. *Infect Immun*. 64:1495-501.
24. Eddy, S. R. 1996. Hidden Markov models. *Cur Opin Struct Bio*. 6:361-5.
25. Ellen, R. P., and R. J. Gibbons. 1972. M protein-associated adherence of *Streptococcus pyogenes* to epithelial surfaces: prerequisite for virulence. *Infect Immun*. 5:826-830.
26. Eng, J. K., A. L. McCormack, and J. R. Yates, 3rd. 1994. An approach to correlate tandem mass-spectral data of peptides with amino-acid-sequences in a protein database. *Am Soc Mass Spectrometry*. 5:976-89.
27. Fischetti, V. A., V. Pancholi, and O. Schneewind. 1990. Conservation of a hexapeptide sequence in the anchor region of surface proteins from gram-positive cocci. *Mol Microbiol*. 4:1603-5.
28. Fogg, G. C., and M. G. Caparon. 1997. Constitutive expression of fibronectin binding in *Streptococcus pyogenes* as a result of anaerobic activation of *rofA*. *J Bacteriol*. 179:6172-80.

10

20

## 【 0 2 4 6 】

## 【表 2 1 - 4】

29. Foster, T. J., and M. Hook. 1998. Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol.* 6:484-8.
30. Fraser, C. M., S. Casjens, W. M. Huang, G. G. Sutton, R. Clayton, R. Lathigra, O. White, K. A. Ketchum, R. Dodson, E. K. Hickey, M. Gwinn, B. Dougherty, J. F. Tomb, R. D. Fleischmann, D. Richardson, J. Peterson, A. R. Kerlavage, J. Quackenbush, S. Salzberg, M. Hanson, R. van Vugt, N. Palmer, M. D. Adams, J. 31. Gocayne, J. C. Venter, and *et al.* 1997. Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete, *Borrelia burgdorferi* [see comments]. *Nature.* 390:580-6.
32. Goldschneider, I., E. C. Gotschlich, and M. S. Artenstein. 1969. Human immunity to the meningococcus. I. The role of humoral antibodies. *Journal of Experimental Medicine* 129(6):1307-26.
33. Goldschneider, I., E. C. Gotschlich, and M. S. Artenstein. 1969. Human immunity to the meningococcus. II. Development of natural immunity. *Journal of Experimental Medicine* 129(6):1327-48.
34. Gotschlich, E. C., I. Goldschneider, and M. S. Artenstein. 1969. Human immunity to the meningococcus. IV. Immunogenicity of group A and group C meningococcal polysaccharides in human volunteers. *Journal of Experimental Medicine* 129(6):1367-84.
35. Gotschlich, E. C., I. Goldschneider, and M. S. Artenstein. 1969. Human immunity to the meningococcus. V. The effect of immunization with meningococcal group C polysaccharide on the carrier state. *Journal of Experimental Medicine* 129(6):1385-95.
36. Hacker, J., G. Blum-Oehler, I. Muhldorfer, and H. Tschape. 1997. Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. *Mol Microbiol.* 23:1089-97.
37. Hanski, E., and M. Caparon. 1992. Protein F, a fibronectin-binding protein, is an adhesion of the group A streptococcus *Streptococcus pyogenes*. *Proc Natl Acad Sci., USA.* 89:6172-76.

10

20

## 【 0 2 4 7 】

## 【表 2 1 - 5】

38. Hanski, E., P. A. Horwitz, and M. G. Caparon. 1992. Expression of protein F, the fibronectin-binding protein of *Streptococcus pyogenes* JRS4, in heterologous streptococcal and enterococcal strains promotes their adherence to respiratory epithelial cells. *Infect Immun.* 60:5119-5125.
39. Hernandez-Sanchez, J., J. G. Valadez, J. V. Herrera, C. Ontiveros, and G. Guarneros. 1998. lambda bar minigene-mediated inhibition of protein synthesis involves accumulation of peptidyl-tRNA and starvation for tRNA. *EMBO Journal.* 17:3758-65.
40. Huang, T. T., H. Malke, and J. J. Ferretti. 1989. The streptokinase gene of group A streptococci: cloning, expression in *Escherichia coli*, and sequence analysis. *Mol Microbiol.* 3:197-205.
41. Hynes, W. L., A. R. Dixon, S. L. Walton, and L. J. Aridgides. 2000. The extracellular hyaluronidase gene (*hylA*) of *Streptococcus pyogenes*. *FEMS Microbiol Lett.* 184:109-12.
42. Hynes, W. L., L. Hancock, and J. J. Ferretti. 1995. Analysis of a second bacteriophage hyaluronidase gene from *Streptococcus pyogenes*: evidence for a third hyaluronidase involved in extracellular enzymatic activity. *Infect Immun.* 63:3015-20.
43. Isberg, R. R., and G. Tran Van Nhieu. 1994. Binding and internalization of microorganisms by integrin receptors. *Trends Microbio.* 2:10-4.
44. Jones, K. F., and V. A. Fischetti. 1988. The importance of the location of antibody binding on the M6 protein for opsonization and phagocytosis of group A M6 streptococci. *J Exp Med.* 167:1114-23.
45. Kihlberg, B. M., M. Collin, A. Olsen, and L. Bjorck. 1999. Protein H, an antiphagocytic surface protein in *Streptococcus pyogenes*. *Infect Immun.* 67:1708-14.
46. Koebnik, R. 1995. Proposal for a peptidoglycan-associating alpha-helical motif in the C-terminal regions of some bacterial cell-surface proteins [letter; comment]. *Molecular Microbiology.* 16:1269-70.

10

20

【 0 2 4 8 】

## 【表 2 1 - 6】

47. Kuipers, O. P., H. J. Boot, and W. M. de Vos. 1991. Improved site-directed mutagenesis method using PCR. *Nucleic Acids Res.* **19**:4558.
48. Kyte, J., and R. F. Doolittle. 1982. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *Journal of Molecular Biology* 157:105-132.
49. Landt, O., H. P. Grunert, and U. Hahn. 1990. A general method for rapid site-directed mutagenesis using the polymerase chain reaction. *Gene* **96**:125-128.
50. Loessner, M. J., S. Gaeng, and S. Scherer. 1999. Evidence for a holin-like protein gene fully embedded out of frame in the endolysin gene of *Staphylococcus aureus* bacteriophage 187. *J Bacteriol.* **181**:4452-60.
51. Lukashin, A. V., and M. Borodovsky. 1998. GeneMark.hmm: new solutions for gene finding. *Nucleic Acids Res.* **26**:1107-15.
52. Lukomski, S., C. A. Montgomery, J. Rurangirwa, R. S. Geske, J. P. Barrish, G. J. Adams, and J. M. Musser. 1999. Extracellular cysteine protease produced by *Streptococcus pyogenes* participates in the pathogenesis of invasive skin infection and dissemination in mice. *Infect Immun.* **67**:1779-88.
53. Madore, D. V. 1998. Characterization of immune response as an indicator of *Haemophilus influenzae* type b vaccine efficacy. *Pediatr Infect Dis J.* **17**:S207-10.
54. Matsuka, Y. V., S. Pillai, S. Gubba, J. M. Musser, and S. B. Olmsted. 1999. Fibrinogen cleavage by the *Streptococcus pyogenes* extracellular cysteine protease and generation of antibodies that inhibit enzyme proteolytic activity. *Infect Immun.* **67**:4326-33.
55. Mazmanian, S. K., G. Liu, H. Ton-That, and O. Schneewind. 1999. *Staphylococcus aureus* sortase, an enzyme that anchors surface proteins to the cell wall. *Science.* **285**:760-3.
56. McAtee, C. P., K. E. Fry, and D. E. Berg. 1998. Identification of potential diagnostic and vaccine candidates of *Helicobacter pylori* by "proteome" technologies. *Helicobacter.* **3**:163-9.

10

20

## 【 0 2 4 9 】

## 【表 2 1 - 7】

57. McAtee, C. P., M. Y. Lim, K. Fung, M. Velligan, K. Fry, T. Chow, and D. E. Berg. 1998. Identification of potential diagnostic and vaccine candidates of *Helicobacter pylori* by two-dimensional gel electrophoresis, sequence analysis, and serum profiling. *Clin Diagn Lab Immunol.* 5:537-42.
58. McAtee, C. P., M. Y. Lim, K. Fung, M. Velligan, K. Fry, T. P. Chow, and D. E. Berg. 1998. Characterization of a *Helicobacter pylori* vaccine candidate by proteome techniques. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 714:325-33.
59. Mejlhede, N., J. F. Atkins, and J. Neuhard. 1999. Ribosomal -1 frameshifting during decoding of *Bacillus subtilis* cdd occurs at the sequence CGA AAG. *J. Bacteriol.* 181:2930-7.
60. Molinari, G., S. R. Talay, P. Valentin-Weigand, M. Rohde, and G. S. Chhatwal. 1997. The fibronectin-binding protein of *Streptococcus pyogenes*, SfbI, is involved in the internalization of group A streptococci by epithelial cells. *Infect Immun.* 65:1357-63.
61. Mountzouros, K. T., and A. P. Howell. 2000. Detection of complement-mediated antibody-dependent bactericidal activity in a fluorescence-based serum bactericidal assay for group B *Neisseria meningitidis*. *J. Clin. Microbiol.* 38(8):2878-2884.
62. Nakai, K., and M. Kanehisa. 1991. Expert system for predicting protein localization sites in gram-negative bacteria. *Proteins.* 11:95-110.
63. Navarre, W. W., and O. Schneewind. 1999. Surface proteins of gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. *Microbiol Mol Biol Rev.* 63:174-229.
64. Nielsen, H., J. Engelbrecht, S. Brunak, and G. von Heijne. 1997. Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Engineering.* 10:1-6.
65. Nizet, V., B. Beall, D. J. Bast, V. Datta, L. Kilburn, D. E. Low, and J. C. De Azavedo. 2000. Genetic locus for streptolysin S production by group A streptococcus. *Infect Immun.* 68:4245-54.

10

20

## 【 0 2 5 0 】

## 【表 2 1 - 8】

66. Nordstrand, A., W. M. McShan, J. J. Ferretti, S. E. Holm, and M. Norgren. 2000. Allele substitution of the streptokinase gene reduces the nephritogenic capacity of group A streptococcal strain NZ131. *Infect Immun.* 68:1019-25.
67. Olmsted, S. B., S. L. Erlandsen, G. M. Dunny, and C. L. Wells. 1993. High-resolution visualization by field emission scanning electron microscopy of *Enterococcus faecalis* surface proteins encoded by the pheromone-inducible conjugative plasmid pCF10. *J Bacteriol.* 175:6229-37.
68. Park, J., and S. A. Teichmann. 1998. DIVCLUS: an automatic method in the GEANFAMMER package that finds homologous domains in single- and multi-domain proteins. *Bioinformatics.* 14:144-50.
69. Parkhill, J., M. Achtman, K. D. James, S. D. Bentley, C. Churcher, S. R. Klee, G. Morelli, D. Basham, D. Brown, T. Chillingworth, R. M. Davies, P. Davis, K. Devlin, T. Feltwell, N. Hamlin, S. Holroyd, K. Jagels, S. Leather, S. Moule, K. Mungall, M. A. Quail, M. A. Rajandream, K. M. Rutherford, M. Simmonds, J. Skelton, S. Whitehead, B. G. Spratt, and B. G. Barrell. 2000. Complete DNA sequence of a serogroup A strain of *Neisseria meningitidis* Z2491 [see comments]. *Nature.* 404:502-6.
70. Pierschbacher, M. D., and E. Ruoslahti. 1987. Influence of stereochemistry of the sequence Arg-Gly-Asp-Xaa on binding specificity in cell adhesion. *J Biol Chem.* 262:17294-8.
71. Pizza, M., V. Scarlato, V. Maignani, M. M. Giuliani, B. Arico, M. Comanducci, G. T. Jennings, L. Baldi, E. Bartolini, B. Capecci, C. L. Galeotti, E. Luzzi, R. Manetti, E. Marchetti, M. Mora, S. Nuti, G. Ratti, L. Santini, S. Savino, M. Scarselli, E. Storni, P. Zuo, M. Broecker, E. Hundt, B. Knapp, E. Blair, T. Mason, H. Tettelin, D. W. Hood, A. C. Jeffries, N. J. Saunders, D. M. Granoff, J. C. Venter, E. R. Moxon, G. Grandi, and R. Rappuoli. 2000. Identification of vaccine candidates against serogroup B meningococcus by whole-genome sequencing. *Science* 287(5459):1816-20.

30

40

50



【 0 2 5 1 】

【 表 2 1 - 9 】

72. Podbielski, A., A. Flosdorff, and J. Weber-Heymann. 1995. The group A streptococcal virR49 gene controls expression of four structural vir regulon genes. *Infect Immun.* 63:9-20.
73. Poolman, J. T. 1996. Bacterial outer membrane protein vaccines. The meningococcal example. *Advances in Experimental Medicine & Biology* 397:73-7.
74. Proft, T., S. Louise Moffatt, C. J. Berkahn, and J. D. Fraser. 1999. Identification and Characterization of Novel Superantigens from *Streptococcus pyogenes*. *J Exp Med.* 189:89-102.
75. Pugsley, A. P. 1993. The complete general secretory pathway in gram-negative bacteria. *Microbiol Rev.* 57:50-108.
76. Quinn, A., K. Ward, V. A. Fischetti, M. Hemric, and M. W. Cunningham. 1998. Immunological relationship between the class I epitope of streptococcal M protein and myosin. *Infect Immun.* 66:4418-24.
77. Reda, K. B., V. Kapur, D. Goela, J. G. Lamphear, J. M. Musser, and R. R. Rich. 1996. Phylogenetic distribution of streptococcal superantigen SSA allelic variants provides evidence for horizontal transfer of ssa within *Streptococcus pyogenes*. *Infect Immun.* 64:1161-5.
78. Sambrook, J., and D. W. Russell. 2001. *Molecular cloning a laboratory manual*, Third ed, vol. 3. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
79. Salzberg, S. L., A. L. Delcher, S. Kasif, and O. White. 1998. Microbial gene identification using interpolated Markov models. *Nucleic Acids Res.* 26:544-8.
80. Saukkonen, K., H. Abdillahi, J. T. Poolman, and M. Leinonen. 1987. Protective efficacy of monoclonal antibodies to class 1 and class 3 outer membrane proteins of *Neisseria meningitidis* B:15:P1.16 in infant rat infection model: new prospects for vaccine development. *Microbial Pathogenesis* 3(4):261-7.
81. Sedegah *et al.* 1994. *Immunology.* 91, 9866-9870.

10

20

【 0 2 5 2 】

## 【表 2 1 - 1 0】

82. Sonnenberg, M. G., and J. T. Belisle. 1997. Definition of *Mycobacterium tuberculosis* culture filtrate proteins by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis, N-terminal amino acid sequencing, and electrospray mass spectrometry. *Infect Immun.* 65:4515-24.
83. Sonnhammer, E. L., S. R. Eddy, and R. Durbin. 1997. Pfam: a comprehensive database of protein domain families based on seed alignments. *Proteins.* 28:405-20.
84. Stevens, D. L. 1995. Streptococcal toxic-shock syndrome: spectrum of disease, pathogenesis, and new concepts in treatment. *Emerg Infect Dis.* 1:69-78.
85. Stockbauer, K. E., L. Magoun, M. Liu, E. H. Burns, Jr., S. Gubba, S. Renish, X. Pan, S. C. Bodary, E. Baker, J. Coburn, J. M. Leong, and J. M. Musser. 1999. A natural variant of the cysteine protease virulence factor of group A streptococcus with an arginine-glycine-aspartic acid (RGD) motif preferentially binds human integrins  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 and  $\alpha$ IIb $\beta$ 3. *Proc Natl Acad Sci, USA.* 96:242-7.
86. Tettelin, H., N. J. Saunders, J. Heidelberg, A. C. Jeffries, K. E. Nelson, J. A. Eisen, K. A. Ketchum, D. W. Hood, J. F. Peden, R. J. Dodson, W. C. Nelson, M. L. Gwinn, R. DeBoy, J. D. Peterson, E. K. Hickey, D. H. Haft, S. L. Salzberg, O. White, R. D. Fleischmann, B. A. Dougherty, T. Mason, A. Ciecko, D. S. Parksey, E. Blair, H. Cittone, E. B. Clark, M. D. Cotton, T. R. Utterback, H. Khouri, H. Qin, J. Vamathevan, J. Gill, V. Scarlato, V. Masignani, M. Pizza, G. Grandi, L. Sun, H. O. Smith, C. M. Fraser, E. R. Moxon, R. Rappuoli, and J. C. Venter. 2000. Complete genome sequence of *Neisseria meningitidis* serogroup B strain MC58. *Science* 287(5459):1809-15.
87. Ton-That, H., G. Liu, S. K. Mazmanian, K. F. Faull, and O. Schneewind. 1999. Purification and characterization of sortase, the transpeptidase that cleaves surface proteins of *Staphylococcus aureus* at the LPXTG motif. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:12424-12429.

10

20

## 【 0 2 5 3】

## 【表 2 1 - 1 1】

88. von Heinje, G. 1987. Sequence Analysis in Molecular Biology. Academic Press, New York.
89. Weldingh, K., I. Rosenkrands, S. Jacobsen, P. B. Rasmussen, M. J. Elhay, and P. Andersen. 1998. Two-dimensional electrophoresis for analysis of *Mycobacterium tuberculosis* culture filtrate and purification and characterization of six novel proteins. *Infect Immun.* 66:3492-500.
90. Wolff et al. 1990. *Science.* 247, 1465-1468.
91. Yutsudo, T., K. Okumura, M. Iwasaki, A. Hara, S. Kamitani, W. Minamide, H. Igarashi, and Y. Hinuma. 1994. The gene encoding a new mitogenic factor in a *Streptococcus pyogenes* strain is distributed only in group A streptococci. *Infection and Immunity.* 62:4000-4004.
92. Zagursky, R.J. and D. Russell. 2001. Bioinformatics: Use in Bacterial Vaccine Discovery. *BioTechniques.* 31:636-659.

30

40

## 【 0 2 5 4】

本発明はここに十分に説明したので、当明細書に述べた本発明の精神または範疇から逸脱せず、本発明に対する変更および修飾が可能であることは一般の当業者には明らかであろう。これまでの記述は、多数の可能な変更にも則して本発明の好ましい態様を述べたものである。しかしこれらの態様は単なる例に過ぎず、本発明をそれに限定するものではない。

## 【図面の簡単な説明】

## 【 0 2 5 5】

【図 1 - A】図 1 A は、異種の菌株に対して殺菌性抗体を産生することのできるナイセリア属膜タンパク質抽出物を同定するための実験から得られた、タンパク質分画のうちの 2

50

つの主要なタンパク質を表している SDS - PAGE ゲルを表す。

【図 1 - B】図 1 B は、プロテアーゼの消化および逆相 N 末端配列決定による、TMAE 流出成分の分析による 2 つの主要なタンパク質を同定する実験の結果を表す。

【図 2】図 2 は、rLP2086 の SDS - PAGE で決定する場合の精製スキームおよび均質性を表す。

【図 3】図 3 は、LC - MS/MS および対応する SDS - PAGE による、TMAE 流出成分の分析による 2 つの主要なタンパク質および 1 つの少量のタンパク質を同定する実験の結果を表す。

【図 4】図 4 は、2086 タンパク質の組換え発現の SDS - PAGE ゲルである。

【図 5】図 5 は、当明細書で述べたプラスミド pPX7340 の模式図である。

【図 6】図 6 は、当明細書で述べたプラスミド pPX7328 の模式図である。

【図 7】図 7 は、当明細書で述べたプラスミド pPX7343 の模式図である。

【図 8】図 8 は、様々な菌株由来の 2086 遺伝子の N 末端領域を表す。

【図 9 - A】図 9 A は、ナイセリア菌株中の免疫原性成分の同定における予備段階を示すフローチャートである。

【図 9 - B】図 9 B は、ナイセリア菌株中の免疫原性成分の同定における最終段階を示すフローチャートである。

【図 10】図 10 A は、本明細書の実施例に述べたように、P4 シグナル/ORF2086 融合タンパク質の発現を誘導し、rP2086 の脂質化型を発現させる pBAD アラビノーズ誘導型プロモーターの模式図である。図 10 B は、ORF2086 の非脂質型の組換え発現のための pPET9a - T7 ベクターの模式図である。

【図 11】図 11 A は、rLP2086 タンパク質を発現する大腸菌 B の全細胞溶菌液を表す写真である。図 11 B は、rP2086 タンパク質を発現する大腸菌 B の全細胞溶菌液を表す写真である。

【図 12】図 12 は、ORF2086 タンパク質のサブファミリーおよび群の構成を示す系統樹である。

【図 13】図 13 は、rLP2086 サブファミリー A 抗血清に関する全細胞 FLISA データのグラフである。

【図 14】図 14 は、rLP2086 サブファミリー B 抗血清に関する全細胞 FLISA データのグラフである。

【図 15】図 15 は、rLP2086 の混合に関する研究 - WCE 力価の結果のグラフである。

【図 16】図 16 は、rLP2086 / rPorA の混合に関する研究 - WCE 力価の結果のグラフである。

【図 17】図 17 は、P2086 サブファミリー B 髄膜炎菌全細胞溶菌液に対する rLP2086 マウス抗血清の反応性を示すウェスタンブロットである。

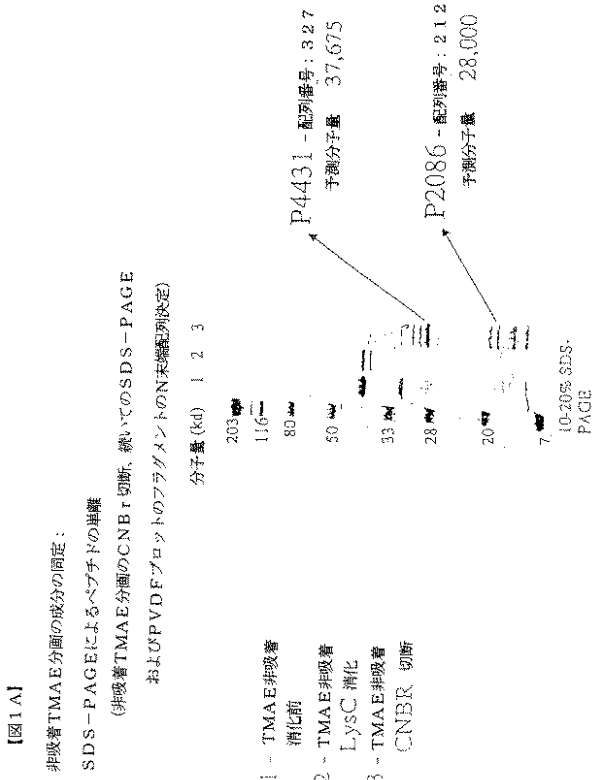
【図 18】図 18 は、P2086 サブファミリー A 髄膜炎菌および *N. lactamica* の全細胞溶菌液に対する rLP2086 マウス抗血清の反応性を示すウェスタンブロットである。

10

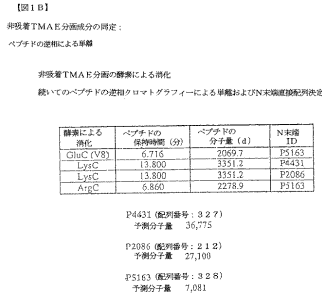
20

30

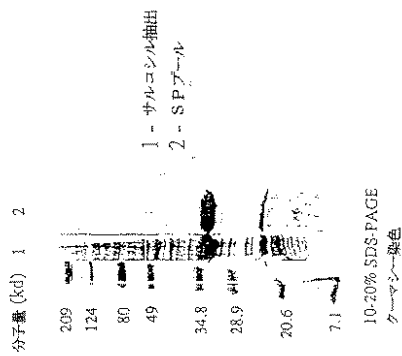
【図1-A】



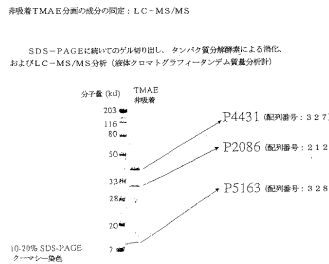
【図1-B】



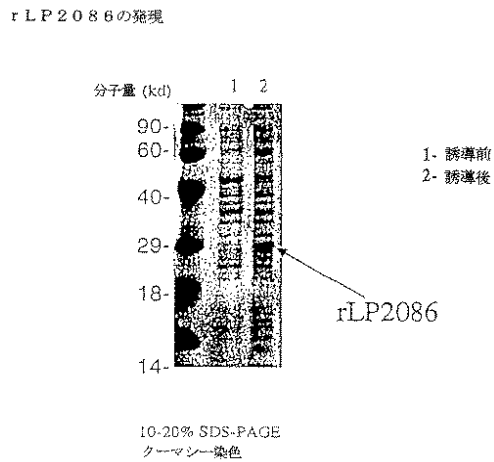
【図2】



【図3】

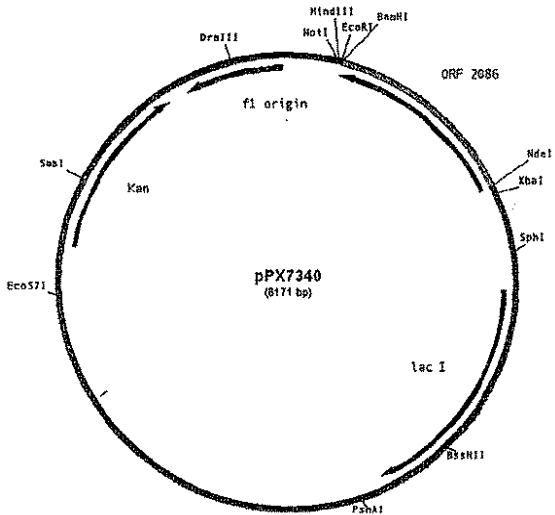


【図4】

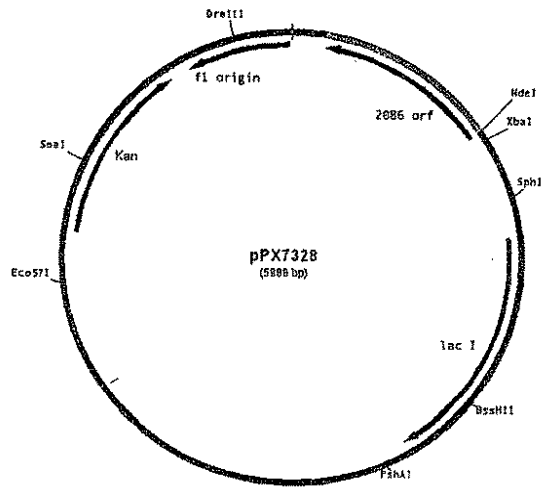


rLP2086の発現

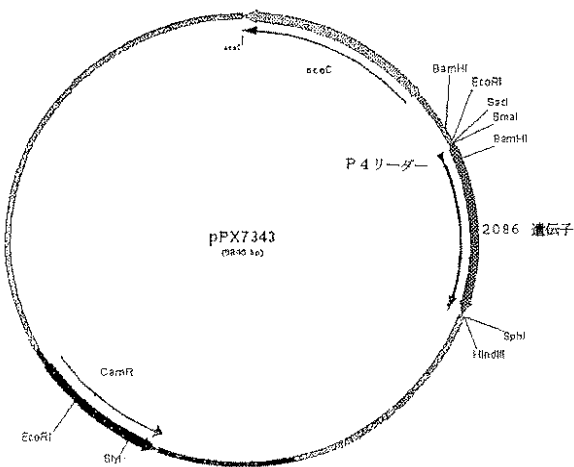
【 図 5 】



【 図 6 】



【 図 7 】



【 図 8 】

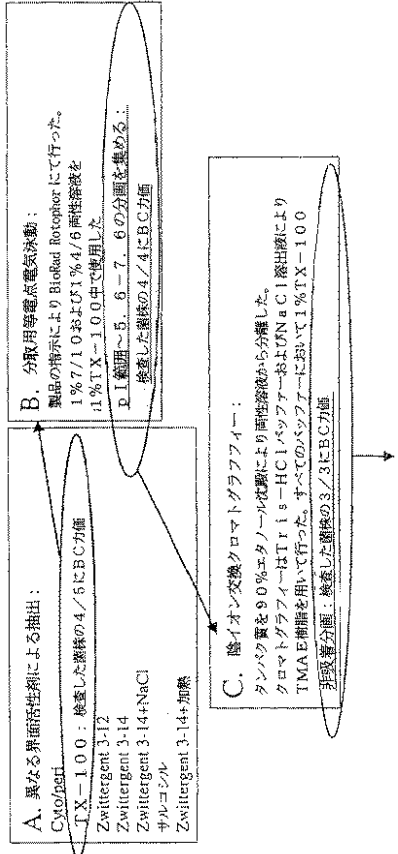
|   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |      |          |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|------|----------|
| 1 | C | S | S | G | G | G | G | - | - | - | - | Y | A | A | D | I | G | A | G | L | A | D | A | L | T | A | P | L | D | 8329 | 天然のタンパク質 |
| 1 | C | S | S | G | G | G | G | - | - | - | - | Y | A | A | D | I | G | A | G | L | A | D | A | L | T | A | P | L | D | 2996 | 天然のタンパク質 |
| 1 | C | S | S | G | G | G | G | S | G | G | G | V | A | A | D | I | G | A | G | L | A | D | A | L | T | A | P | L | D | 1573 | 天然のタンパク質 |

5 アミノ酸の繰り返し

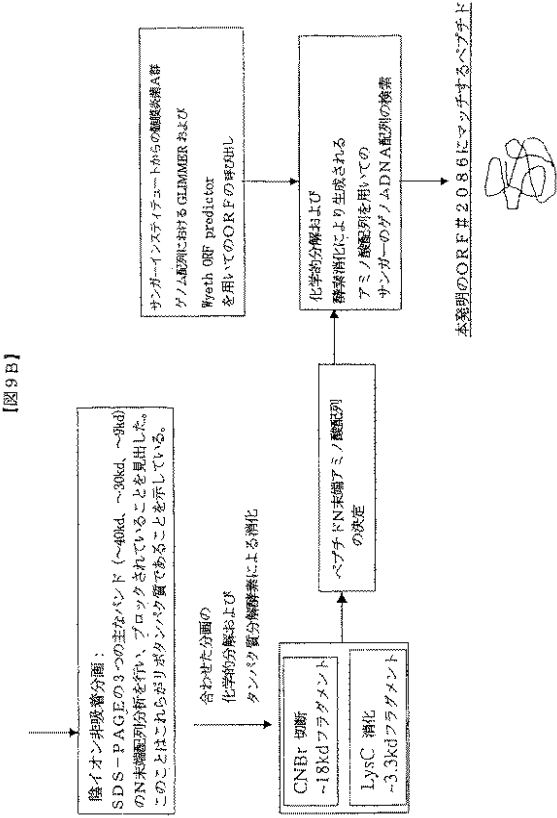
【 図 9 - A 】

【 図 9 A 】

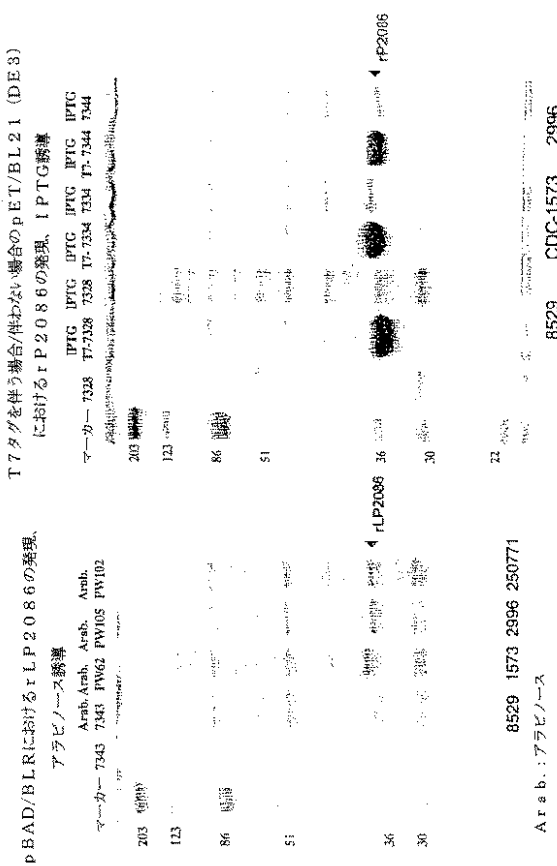
Nm 菌株 8528 の免疫原性成分の同定



【 図 9 - B 】

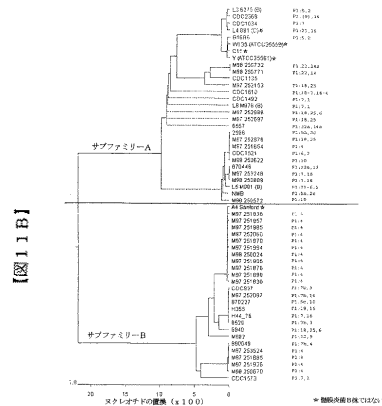


【 図 1 1 】



【 図 11A 】

【 図 1 2 】



【 図 11B 】

【 図 1 0 】

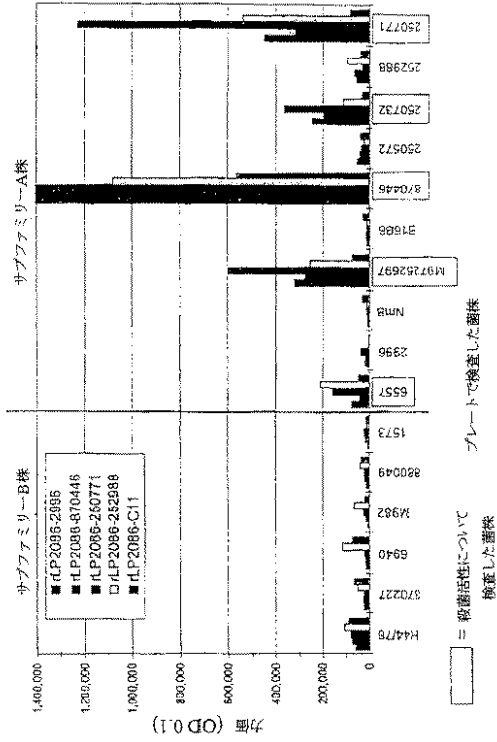


【 図 10A 】

【 図 10B 】

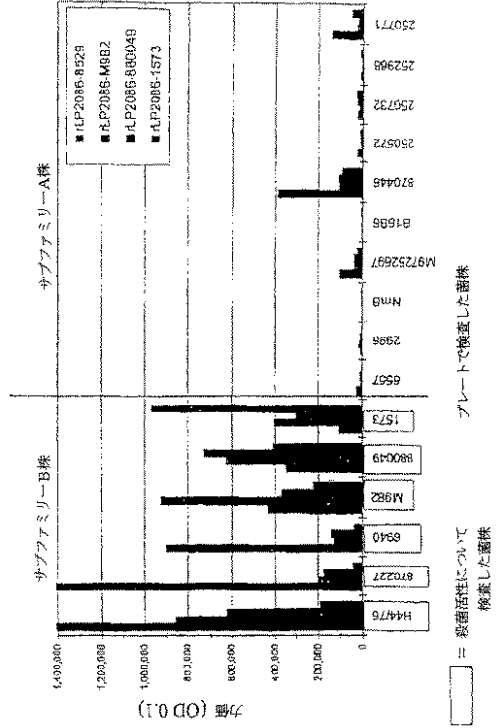
【 図 1 3 】

rLP2086サブファミリーA抗体血清に関する全細胞ELISAのデータ



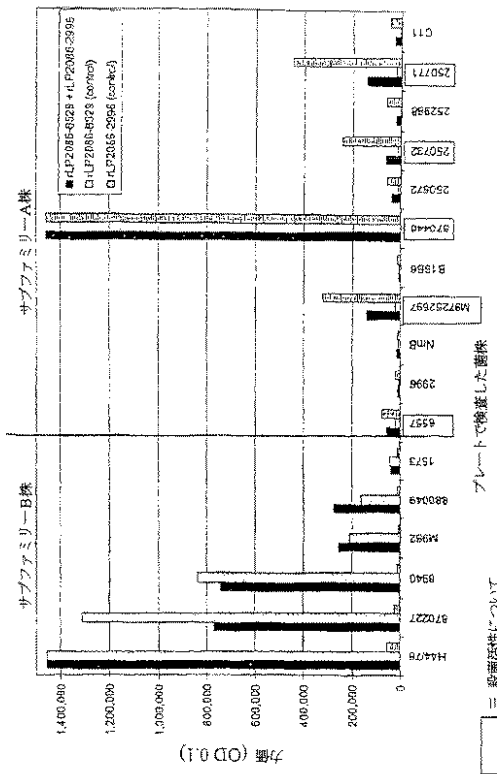
【 図 1 4 】

rLP2086サブファミリーB抗体血清に関する全細胞ELISAのデータ



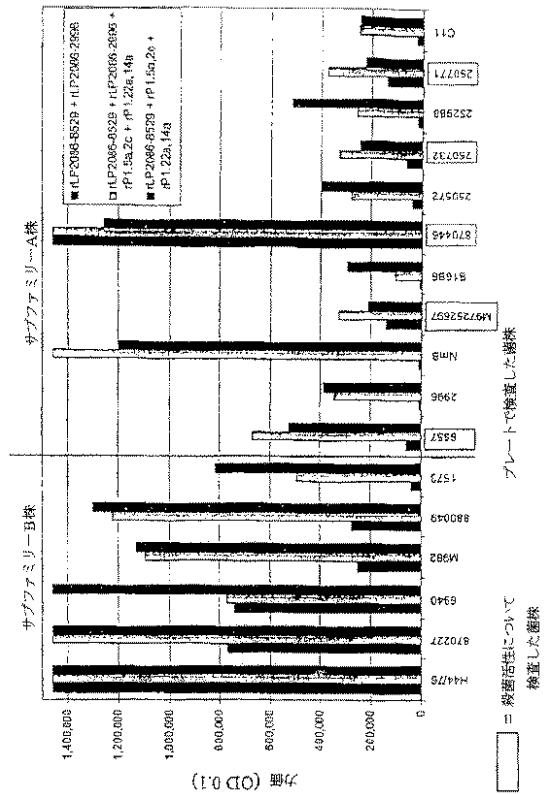
【 図 1 5 】

rLP2086を混合することに関する研究-WCE力価



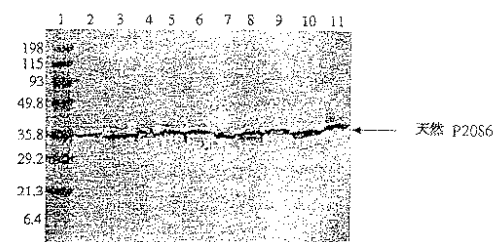
【 図 1 6 】

rLP2086/rPorAを混合することに関する研究-WCE力価



## 【 図 1 7 】

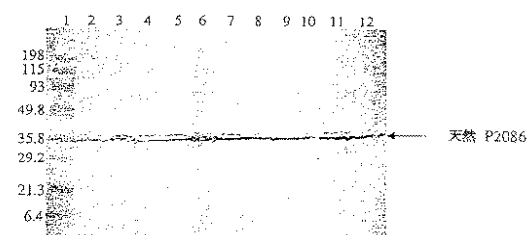
ウェスタンブロットにおける、P2086サブファミリーB髄膜炎菌の全細胞溶菌液に対するrLP2086マウス抗血清の反応性



1-分子量マーカー (kDa)                    7-CDC1359  
 2-M97 251985                            8-CDC1658  
 3-CDC937                                    9-M97 252026  
 4-6940                                      10-M97 252029  
 5-M97 251926                            11-M982  
 6-CDC1573  
 サブファミリーB P2086細胞溶菌液はすべてB群髄膜炎菌である

## 【 図 1 8 】

ウェスタンブロットにおける、P2086サブファミリーA髄膜炎菌および*N. lactamica*の全細胞溶菌液に対するrLP2086マウス抗血清の反応性



1-分子量マーカー (kDa)                    2-A群髄膜炎菌A4  
 3-C群髄膜炎菌-C11                    4-Y群髄膜炎菌-ATCC35561  
 5-W135群髄膜炎菌-ATCC35559  
 6-N. lactamica - UR5  
 B群髄膜炎菌  
 7-CDC1034  
 8-M98 250732  
 9-Nr3B  
 10-6557  
 11-CDC1521  
 12-M97 252153

## 【 配列表 】

2014012002000001.app

## 【 手続補正書 】

【 提出日 】平成25年8月29日 (2013.8.29)

## 【 手続補正 1 】

【 補正対象書類名 】特許請求の範囲

【 補正対象項目名 】全文

【 補正方法 】変更

【 補正の内容 】

【 特許請求の範囲 】

【 請求項 1 】

以下を含む、交差反応性免疫原性組成物：

(a) ナイセリア種 (*Neisseria species*) のオープンリーディングフレームORF2086によりコードされる少なくとも1つのタンパク質；または

(b) (a)に記載の少なくとも1つのタンパク質の少なくとも1つの免疫原性部分；または

(c) (a)に記載の少なくとも1つのタンパク質または(b)に記載の免疫原性部分の、少なくとも1つの生物学的均等物。

【 請求項 2 】

前記(a)に記載されるORF2086によりコードされるタンパク質が、2086タンパク質サブファミリーAに属する、請求項1に記載の交差反応性免疫原性組成物。

【 請求項 3 】

前記(a)に記載されるORF2086によりコードされるタンパク質が、2086タンパク質サブファミリーBに属する、請求項1に記載の交差反応性免疫原性組成物。

【 請求項 4 】



以下を追加的に含む、請求項 2 に記載の交差反応性免疫原性組成物：

(d) 少なくとも 1 つの ORF 2086 タンパク質によりコードされる 2086 タンパク質サブファミリー B に属するタンパク質；または

(e) (d) に記載の少なくとも 1 つのタンパク質の少なくとも 1 つの免疫原性部分；または

(f) (d) に記載の少なくとも 1 つのタンパク質または (e) に記載の免疫原性部分の、少なくとも 1 つの生物学的均等物。

【請求項 5】

配列番号 56、58 または 60 のアミノ酸配列に対して少なくとも 80% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む少なくとも一つのタンパク質を含む、交差反応性免疫原性組成物。

【請求項 6】

該少なくとも一つのタンパク質が、配列番号 56、58 または 60 のアミノ酸配列を含む、請求項 5 に記載の組成物。

【請求項 7】

配列番号 248、250、252、224、226 または 228 のアミノ酸配列に対して少なくとも 80% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む少なくとも一つのタンパク質を含む、交差反応性免疫原性組成物。

【請求項 8】

該少なくとも一つのタンパク質が、配列番号 248、250、252、224、226 または 228 のアミノ酸配列を含む、請求項 7 に記載の組成物。

【請求項 9】

配列番号 248、250、252、224、226 または 228 のアミノ酸配列に対して少なくとも 80% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む少なくとも一つのタンパク質を追加的に含む、請求項 5 に記載の交差反応性免疫原性組成物。

【請求項 10】

該追加的なタンパク質が、配列番号 248、250、252、224、226 または 228 のアミノ酸配列を含む、請求項 9 に記載の組成物。

【請求項 11】

該少なくとも一つのタンパク質、免疫原性部分および/または生物学的均等物が脂質化されている、請求項 1 から 10 のいずれか一項に記載の交差反応性免疫原性組成物。

【請求項 12】

医薬的に受容可能なバッファー、希釈剤、アジュバントまたは担体を付加的に含む、請求項 1 から 11 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 13】

アジュバントが水酸化アルミニウムまたはリン酸アルミニウムである、請求項 12 に記載の組成物。

【請求項 14】

他の活性化免疫原を付加的に含む、請求項 1 から 13 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 15】

他のナイセリア種の免疫原性ポリペプチドを付加的に含む、請求項 1 から 14 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 16】

他のナイセリア種の免疫原性ポリペプチドが、髄膜炎菌血清群 A、C、Y および W のいずれかに属する請求項 15 に記載の組成物。

【請求項 17】

少なくとも一つの PorA、PorB、トランスフェリン結合タンパク質、opacity タンパク質 (Opc)、または少なくとも一つの付加的な表面抗原を付加的に含み、ここで前記付加的な表面抗原が ORF 2086 タンパク質ではない、請求項 1 から 16 のいずれか一項に記載の組成物。

**【請求項 18】**

さらに多糖を含む、請求項 1 から 17 のいずれか 1 項に記載の組成物。

**【請求項 19】**

髄膜炎菌血清群A,C,YおよびW135多糖および/または多糖複合体をさらに含む、請求項 1 から 18 のいずれか 1 項に記載の組成物。

**【請求項 20】**

ワクチンとしての使用のための、請求項 1 から 19 のいずれか 1 項に記載の組成物。

**【請求項 21】**

哺乳類において免疫応答を惹起するための、またはヒトにおいて髄膜炎菌感染を改善または予防するための、請求項 1 から 19 のいずれか 1 項に記載の組成物。

**【請求項 22】**

前記少なくとも一つの ( a ) または ( b ) のタンパク質、免疫原性部分および/または生物学的均等物を、組み換え技術を用いて調製することを含む、請求項 1 から 19 のいずれか 1 項に記載の組成物を調製する方法。

## フロントページの続き

| (51)Int.Cl.              | F I                | テーマコード(参考) |
|--------------------------|--------------------|------------|
| C 1 2 N 5/10 (2006.01)   | C 1 2 N 5/00 1 0 1 |            |
| A 6 1 K 39/00 (2006.01)  | A 6 1 K 39/00 H    |            |
| A 6 1 K 39/095 (2006.01) | A 6 1 K 39/095     |            |
| A 6 1 K 39/39 (2006.01)  | A 6 1 K 39/39      |            |
| A 6 1 K 39/395 (2006.01) | A 6 1 K 39/395 D   |            |
| A 6 1 P 31/04 (2006.01)  | A 6 1 K 39/395 N   |            |
| C 1 2 P 21/02 (2006.01)  | A 6 1 P 31/04      |            |
|                          | C 1 2 P 21/02 C    |            |

- (72)発明者 ズロトニック, ゲーリー・ダブリュー  
アメリカ合衆国ニューヨーク州1 4 5 2 6, ペンフィールド, ウッドリン・ウェイ 2 1
- (72)発明者 フレッチャー, リー・ディー  
アメリカ合衆国ニューヨーク州1 4 4 5 4, ジェニシオ, セカンド・ストリート 3 7
- (72)発明者 ファーリー, ジョン  
アメリカ合衆国ニューヨーク州1 4 6 1 8, ロチェスター, エヴァンデール・ロード 4 9
- (72)発明者 バーンフィールド, リーセル・エイ  
アメリカ合衆国ニューヨーク州1 4 6 1 9, ロチェスター, サーストン・ロード 7 8 9
- (72)発明者 ザガースキー, ロバート・ジェイ  
アメリカ合衆国ニューヨーク州1 4 5 6 4, ヴィクター, フォックス・ハント・ドライブ 5 6 9
- (72)発明者 メットカーフ, ベンジャミン・ジェイ  
アメリカ合衆国ニューヨーク州1 4 6 1 8, ロチェスター, レンセラー・ドライブ 1 5

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA31 CA04 CA20 DA06 EA03 EA04 GA11  
4B064 AG31 CA02 CA19 CC24 CE11 DA01  
4B065 AA01Y AA26X AB01 AC14 BA02 CA24 CA44 CA45  
4C085 AA03 AA13 AA14 BA16 BB13 BB23 CC07 CC21 CC23 DD62  
EE06 GG03 GG04  
4H045 AA11 BA10 BA41 CA11 DA86 EA20 EA31 FA74 GA23 HA05