

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2006-516183

(P2006-516183A)

(43) 公表日 平成18年6月29日(2006.6.29)

(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 14/22 (2006.01)</b>	C O 7 K 14/22	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 未請求 予備審査請求 有	(全 71 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2004-532151 (P2004-532151)  
 (86) (22) 出願日 平成15年8月28日 (2003. 8. 28)  
 (85) 翻訳文提出日 平成17年4月20日 (2005. 4. 20)  
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2003/009634  
 (87) 国際公開番号 W02004/020463  
 (87) 国際公開日 平成16年3月11日 (2004. 3. 11)  
 (31) 優先権主張番号 0220199. 4  
 (32) 優先日 平成14年8月30日 (2002. 8. 30)  
 (33) 優先権主張国 英国 (GB)

(71) 出願人 397062700  
 グラクソスミスクライン バイオロジカル  
 ズ ソシエテ アノニム  
 ベルギー国 リキセンザール ビー 1 3  
 3 0 ルー デ ランスティテュート 8  
 9  
 (71) 出願人 505071664  
 ユトレヒト ユニバーシティー  
 オランダ国 エヌエル-3 5 8 4 シーエ  
 イチ ユトレヒト, パドゥアラーン 8

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 突然変異型タンパク質およびリフォールディング方法

(57) 【要約】

対応の野生型 FrpB タンパク質と比較して 1 個以上の非保存アミノ酸が欠失している FrpB タンパク質、および FrpB タンパク質のリフォールディング方法。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

対応する野生型FrpBタンパク質と比較して1個以上の非保存アミノ酸の欠失を有するFrpBタンパク質。

## 【請求項 2】

そのループの少なくとも1つの1個以上のアミノ酸が欠失しているFrpBタンパク質。

## 【請求項 3】

交差防御性である、請求項1または2に記載のタンパク質。

## 【請求項 4】

少なくとも2つのループの1個以上のアミノ酸が欠失している、請求項1～3のいずれか一項に記載のタンパク質。 10

## 【請求項 5】

ループ7および/または5の1個以上のアミノ酸が欠失している、請求項1～4のいずれか一項に記載のタンパク質。

## 【請求項 6】

ループ1、2、3、4、6、8、9、10、11、12および13のいずれか1つ以上の1個以上のアミノ酸が欠失している、請求項1～5のいずれか一項に記載のタンパク質。

## 【請求項 7】

ループ7から11～33個のアミノ酸が欠失している、請求項1～6のいずれか一項に記載のタンパク質。 20

## 【請求項 8】

ループ7から23～33個のアミノ酸が欠失している、請求項1～7のいずれか一項に記載のタンパク質。

## 【請求項 9】

ループ7から約28個のアミノ酸が欠失している、請求項1～8のいずれか一項に記載のタンパク質。

## 【請求項 10】

ループ5から18～29個のアミノ酸が欠失している、請求項1～9のいずれか一項に記載のタンパク質。

## 【請求項 11】

ループ5から19～29個のアミノ酸が欠失している、請求項1～10のいずれか一項に記載のタンパク質。 30

## 【請求項 12】

ループ5から24個のアミノ酸が欠失している、請求項1～11のいずれか一項に記載のタンパク質。

## 【請求項 13】

H44/76株FrpBについて、ループ7から、アミノ酸376～413の範囲でアミノ酸欠失が行われているか、あるいは対応する欠失が行われている、請求項1～12のいずれか一項に記載のタンパク質。

## 【請求項 14】

H44/76株FrpBについて、ループ7から、アミノ酸381～408の範囲でアミノ酸欠失が行われているか、あるいは対応する欠失が行われている、請求項1～13のいずれか一項に記載のタンパク質。 40

## 【請求項 15】

H44/76株FrpBについて、ループ7から、TTEEKNGQKVDKPMQQMKDRADEDTVHを含むアミノ酸配列が欠失しているか、あるいは対応する欠失が行われている、請求項1～14のいずれか一項に記載のタンパク質。

## 【請求項 16】

H44/76株FrpBについて、ループ5から、アミノ酸247～280の範囲でアミノ酸欠失が行われているか、あるいは対応する欠失が行われている、請求項1～15のいずれか一項に記載 50

のタンパク質。

【請求項 17】

H44/76株FrpBについて、アミノ酸欠失が、ループ5から、アミノ酸252～275の範囲で行われているか、あるいは対応する欠失が行われている、請求項1～16のいずれか一項に記載のタンパク質。

【請求項 18】

H44/76株FrpBについて、ループ5から、QHRGIRTVREEFTVGDKSSRINIDを含むアミノ酸配列が欠失しているか、あるいは対応する欠失が行われている、請求項1～17のいずれか一項に記載のタンパク質。

【請求項 19】

欠失している配列が別のアミノ酸配列で置き換えられている、請求項1～18のいずれか一項に記載のタンパク質。

10

【請求項 20】

配列が突然変異誘発により欠失している、請求項19に記載のタンパク質。

【請求項 21】

請求項1～20のいずれか一項に記載のタンパク質をコードするポリヌクレオチド。

【請求項 22】

請求項21に記載のポリヌクレオチドを含む発現ベクター。

【請求項 23】

請求項22に記載の発現ベクターを含む宿主細胞。

20

【請求項 24】

請求項23に記載の宿主細胞を培養し、発現されたタンパク質を回収することを含む、請求項1～20のいずれか一項に記載のタンパク質の生成方法。

【請求項 25】

FrpBタンパク質を、3-ジメチルドデシルアンモニオプロパンスルホネート（ツィタージェント（Zwittergent）3-12またはSB-12）を含むアルカリ性リフォールディング緩衝液と接触させることを含む、FrpBタンパク質のリフォールディング方法。

【請求項 26】

タンパク質が請求項1～20のいずれか一項に記載のタンパク質である、請求項25に記載の方法。

30

【請求項 27】

リフォールディング緩衝液がエタノールアミンおよびSB-12を含む、請求項25または26に記載の方法。

【請求項 28】

エタノールアミンが約20mMのエタノールアミンである、請求項27に記載の方法。

【請求項 29】

リフォールディング緩衝液がpH11である、請求項25～28のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 30】

SB-12が0.2% SB-12である、請求項25～29のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 31】

SB-12が0.5% SB-12である、請求項25～29のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 32】

リフォールディング緩衝液が塩化グアニジン、NaClおよび/または尿素をさらに含む、請求項25～31のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 33】

リフォールディング緩衝液が塩化グアニジンをさらに含む、請求項32に記載の方法。

【請求項 34】

リフォールディング緩衝液が0.4M塩化グアニジンをさらに含む、請求項33に記載の方法。

【請求項 35】

50

次のステップ：

(a) 場合により宿主細胞内でFrpBタンパク質を発現させ、場合によりその宿主細胞を破壊して、FrpBタンパク質を含む封入体を得、場合によりその封入体を洗浄するステップ；

(b) 場合により、その封入体およびFrpBタンパク質の少なくとも一部を（好ましくは塩酸グアニジンで）可溶化するステップ；

(c) 可溶化したFrpBタンパク質をリフォールディング緩衝液と接触させるステップ；

(d) 場合により、そのFrpBタンパク質からリフォールディング緩衝液を除去（または交換）するステップ

を含む、請求項25～34のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項36】

請求項25～35のいずれか一項に記載の方法において使用するための、エタノールアミン、SB-12、および場合により塩化グアニジンを含むリフォールディング緩衝液。

【請求項37】

請求項25～35のいずれか一項に記載の方法により得られる、または得ることができる、単離されたリフォールディングFrpBタンパク質。

【請求項38】

請求項1～20および37のいずれか一項に記載の少なくとも1種のFrpBタンパク質と、薬学的に許容される担体とを含む、医薬組成物。

【請求項39】

組成物中に存在するFrpBタンパク質の少なくとも30%、50%、70%または90%がリフォールディングされている、請求項38に記載の医薬組成物。

20

【請求項40】

ワクチンの形態である、請求項38または39に記載の医薬組成物。

【請求項41】

ナイセリア・メニンギチジスに由来するFrpBタンパク質を含む、請求項38～40のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項42】

ナイセリア・ゴノローエに由来するFrpBタンパク質を含む、請求項38～41のいずれか一項に記載の医薬組成物。

30

【請求項43】

少なくとも1種の他のナイセリア属抗原を含む、請求項38～42のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項44】

ナイセリア・ゴノローエに由来する少なくとも1種の他のナイセリア属抗原を含む、請求項43に記載の医薬組成物。

【請求項45】

ナイセリア・メニンギチジスに由来する少なくとも1種の他のナイセリア属抗原を含む、請求項43または44に記載の医薬組成物。

【請求項46】

サブユニット組成物の形態である、請求項38～45のいずれか一項に記載の医薬組成物。

40

【請求項47】

外膜小胞調製物の形態、またはサブユニットと他の外膜小胞の混合調製物の形態である、請求項38～45のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項48】

次のクラス：

(a) FhaB、NspA、Hsf、NadA、PilC、Hap、MafA、MafB、Omp26、NMB0315、NMB0995およびNMB1119からなる群から選択される少なくとも1種のナイセリア属附着因子；

(b) Hsf、Hap、IgAプロテアーゼ、AspAおよびNadAからなる群から選択される少なくとも1種のナイセリア属自己輸送因子；

50

(c) FrpA、FrpC、FrpA/C、VapD、NM-ADPRT、ならびにL2免疫タイプのLPSとL3免疫タイプのLPSの一方または両者からなる群から選択される少なくとも1種のナイセリア属毒素；

(d) 高分子量TbpA、低分子量TbpA、高分子量TbpB、低分子量TbpB、LbpA、LbpB、P2086、HpuA、HpuB、Lipo28、Sibp、FbpA、BfrA、BfrB、Bcp、NMB0964およびNMB0293からなる群から選択される少なくとも1種のナイセリア属Fe獲得タンパク質；ならびに

(e) PldA、NspA、TspA、FhaC、NspA、TbpA(高分子量)、TbpA(低分子量)、LbpA、HpuB、TdfH、PorB、HimD、HisD、GNA1870、OstA、HlpA、MltA、NMB 1124、NMB 1162、NMB 1220、NMB 1313、NMB 1953、HtrA、TspB、PilQおよびOMP85からなる群から選択される少なくとも1種のナイセリア属膜結合タンパク質、好ましくは外膜タンパク質、  
の1種以上から選択される少なくとも1種の他のナイセリア属抗原をさらに含む、請求項38~47のいずれか一項に記載の医薬組成物。

10

【請求項49】

1種以上の細菌莢膜多糖またはオリゴ糖をさらに含む、請求項38~48のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項50】

1種以上の莢膜多糖またはオリゴ糖が、ナイセリア・メニンギチジスの血清群A、C、Yおよび/もしくはW-135、ヘモフィリス・インフルエンザb型、ストレプトコッカス・ニューモニエ、A群連鎖球菌、B群連鎖球菌、スタフィロコッカス・アウレウス、およびスタフィロコッカス・エピデルミジスからなる群から選択される細菌に由来するものであり、好ましくはT-ヘルパーエпитープの供給源にコンジュゲートされている、請求項49に記載の医薬組成物。

20

【請求項51】

動物において免疫応答を引き起こすのに使用するための医薬の製造における請求項1~20および37のいずれか一項に記載のFrpBタンパク質(または請求項38~50のいずれか一項に記載の医薬組成物)の使用。

【請求項52】

ナイセリア属感染症を治療または予防するための医薬の製造における請求項1~20および37のいずれか一項に記載のFrpBタンパク質(または請求項38~50のいずれか一項に記載の医薬組成物)の使用。

30

【請求項53】

請求項1~20および37のいずれか一項に記載のFrpBタンパク質(または請求項38~50のいずれか一項に記載の医薬組成物)を、ナイセリア属感染の予防または治療が必要な患者に投与することを含む、ナイセリア属感染の予防方法または治療方法。

【請求項54】

ナイセリア・メニンギチジス感染を予防または治療する、請求項52または53に記載の使用または方法。

【請求項55】

ナイセリア・ゴノローエ感染を予防または治療する、請求項52~54のいずれか一項に記載の使用または方法。

40

【請求項56】

請求項1~20および37のいずれか一項に記載のFrpBタンパク質に対し免疫特異的な抗体。

【請求項57】

請求項56に記載の少なくとも1種の抗体と適切な製剤担体とを含む、ナイセリア属疾患に罹患しているヒトの治療に有用な医薬組成物。

【請求項58】

ナイセリア属疾患を治療または予防するための医薬の製造における請求項56に記載の抗体(または請求項57に記載の組成物)の使用。

【請求項59】

50

ナイセリア・メニンギチジス感染を予防または治療する、請求項58に記載の使用。

【請求項60】

ナイセリア・ゴノローエ感染を予防または治療する、請求項58または59に記載の使用。

【請求項61】

ナイセリア属感染の診断方法であって、請求項1～20および37のいずれか一項に記載のFrpBタンパク質または請求項56に記載の抗体を用いて、ナイセリア属感染に罹患していると疑われる動物からの生物学的サンプル中のFrpBタンパク質またはそれに対する抗体を同定するステップを含む、上記方法。

【請求項62】

ナイセリア・メニンギチジス感染を診断する、請求項61に記載の方法。

10

【請求項63】

ナイセリア・ゴノローエ感染を診断する、請求項61または62に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ナイセリア・メニンギチジス (*Neisseria meningitidis*) 生物のFrpB (外膜タンパク質) の変異体、FrpBタンパク質をリフォールディングする方法、かかるリフォールディングタンパク質、FrpBタンパク質を含む医薬組成物、ならびに細菌感染症 (例えばナイセリア属感染症、特に限定されるものではないが、ナイセリア・メニンギチジスおよび/またはナイセリア・ゴノローエ) の治療、予防および診断におけるそれらの使用に関する。

20

【背景技術】

【0002】

ナイセリア細菌株はヒトにおける多数の病理の原因因子であり、それに対する有効なワクチンの開発が必要とされている。特に、ナイセリア・ゴノローエ (淋菌) (*Neisseria gonorrhoeae*) およびナイセリア・メニンギチジス (*Neisseria meningitidis*) は、ワクチン接種により治療されうる病理を引き起こす。

【0003】

ナイセリア・ゴノローエは淋病の病原体である。淋病は、世界中で最も頻繁に報告されている性感染症の1つであり、その推定年間発生数は6200万件である (Gerbaceら 1998 *Lancet* 351; (Suppl 3) 2-4)。淋病の臨床症状には、尿路、咽喉または直腸の粘膜の炎症、および新生児の眼の感染症が含まれる。女性における上行性淋菌感染は不妊、子宮外妊娠、慢性骨盤炎症性疾患および卵管卵巣膿瘍形成を引き起こしうる。敗血症、関節炎、心内膜炎および髄膜炎は淋病の合併症に関連している。

30

【0004】

抗生物質耐性を有する多数の淋菌株が、罹患率の増加および淋病に伴う合併症の一因となっている。抗生物質での淋病の治療に代わる魅力的な方法はワクチン接種によるその予防であろう。現在のところ、ナイセリア・ゴノローエ感染に対するワクチンは存在しない。

【0005】

ナイセリア・メニンギチジス (髄膜炎菌) は、ヒトの上部気道から高頻度で単離されるグラム陽性細菌である。これはしばしば侵襲性の細菌感染症、例えば菌血症および髄膜炎などを引き起こす。疾患の大部分のケースは幼児または児童におけるものである。髄膜炎疾患の発生は、地理的、季節的および年度で差異を示す (Schwartz, B., Moore, P.S., Broome, C.V.; *Clin. Microbiol. Rev.* 2 (Supplement), S18-S24, 1989)。温暖気候の国における大部分の疾患は血清群Bの株によるものであり、これは発生頻度として1年当たり1～10/100,000総人口で変動し、それより高い値となる場合もある (Kaczmarek, E.B. (1997), *Commun. Dis. Rep. Rev.* 7: R55-9, 1995; Scholten, R.J.P.M., Bijlmer, H.A., Poolman, J.T. et al. *Clin. Infect. Dis.* 16: 237-246, 1993; Cruz, C., Pavez, G., Aguilar, E., et al. *Epidemiol. Infect.* 105: 119-126, 1990)。

40

50

## 【0006】

血清群Aの髄膜炎菌が大部分を示す流行病は、多くの場合中央アフリカで起こり、1年当たり1000/100,000のレベルにまで達することもある(Schwartz, B., Moore, P.S., Broome, C.V. Clin. Microbiol. Rev. 2 (Supplement), S18-S24, 1989)。髄膜炎疾患の全体としてほぼ全てのケースは血清群A、B、C、W-135およびY髄膜炎菌により引き起こされ、四価のA、C、W-135、Y多糖ワクチンが利用可能である(Armand, J., Arminjon, F., Mynard, M.C., Lafaix, C., J. Biol. Stand. 10: 335-339, 1982)。

## 【0007】

ナイセリア・メニンギチジス感染の頻度は、過去数十年において顕著に上昇している。これは、多剤抗生物質耐性株の出現と免疫系の弱い人口が増大していることに起因する。標準的な抗生物質の全てまたは一部に耐性を示すナイセリア・メニンギチジス株を単離することはもはや珍しいことではない。この現象は、まだ満たされていない医学的ニーズを生み出し、新規な抗菌薬、ワクチン、薬剤スクリーニング方法、およびこの生物の診断試験の要望がある。

10

## 【0008】

Van der Ley et al (1996) Microbiology 142:3269-3274は、現在のところ髄膜炎疾患の主要因であるB群生物に対して利用可能なワクチンはないと報告している。B群莢膜多糖のワクチンとしての使用は、ヒト宿主における神経細胞付着分子上に同一構造物が存在するために不可能であり、そのようなワクチンによって自己免疫病理を誘導する可能性がある。髄膜炎菌外膜タンパク質に基づくワクチンを使用することが提唱されている。しかしながら、防御性抗体の大部分は株特異的であることが見出されている。さらに、全ての外膜成分が殺菌性抗体の誘導に寄与するものではない。ナイセリア属由来のFrpBタンパク質は、TonB依存的外膜受容体の特徴を示す鉄調節型外膜タンパク質である。分子量は約77kDaであるが、種々の株において異なりうる。FrpBタンパク質は殺菌性抗体の製造のための良好な候補であると考えられている。しかしながら、Ala'Aldeen et al (1994) Vaccine 12:535は、野生型FrpBに対して単離されたモノクローナル抗体(mAb)は株特異的であることを見出している。

20

## 【0009】

細胞において発現される組換えFrpBは、そのような新規抗菌薬、ワクチン、薬剤スクリーニング方法および診断試験における用途のために製造されることが予測されている。しかしながら、タンパク質の発現についての主要な制限の1つは、多くの組換えタンパク質がその生物学的に活性な立体構造にフォールディングされないことである。組換えタンパク質はアンフォールディングされた種の凝集とミスフォールディングのためにわずかな低収率でしか得られないこともある。実際、タンパク質のリフォールディング、すなわちタンパク質が天然形態および活性構造を獲得することは、分子生物学において最も大きな課題の1つである。

30

## 【0010】

有効な免疫応答(好ましくは交差防御性応答)を誘発するのに好適なリフォールディングされた立体構造の精製防御性外膜タンパク質(突然変異タンパク質など)を含むナイセリア属疾患に対するワクチンを提供する必要性が残っていることは明らかである。

40

## 【発明の開示】

## 【0011】

発明の概要

本発明は、広範なスペクトルの殺菌性抗体を誘導しうる、突然変異型FrpBタンパク質、より具体的には、ループ欠失突然変異体を提供する。

## 【0012】

本発明はまた、FrpBタンパク質(突然変異体および野生型の両方を含む)のリフォールディング方法を提供する。

## 【0013】

また本発明は、かかるリフォールディングFrpBタンパク質に関する。

50

## 【0014】

本発明はまた、本発明のタンパク質の使用法、例えば、細菌疾患の予防および治療におけるそれらの使用、特に、例えばサブユニットおよび外膜小胞ワクチンにおける使用を提供する。さらなる態様において、本発明は、細菌感染症に関連する疾患およびかかる感染症に関連する症状を検出するための診断アッセイに関する。

## 【0015】

本発明の説明

本発明の一態様により、対応する野生型FrpBタンパク質と比較して1個以上の非保存アミノ酸の欠失を有するFrpBタンパク質が提供される。本発明のこれらのタンパク質は、「突然変異(型)」タンパク質という。本明細書において使用する「欠失」という用語には、1個以上の非保存アミノ酸の置換、置き換えまたは突然変異が含まれる。置換される配列は、それと置換する配列と同じ大きさであってもよいしまたはそうでなくてもよい。「非保存」アミノ酸には、第1株に由来する野生型FrpBタンパク質に存在するアミノ酸であるが、第2株に由来する野生型FrpBタンパク質には存在しないことのあるアミノ酸が含まれる。本発明のタンパク質は単離されたタンパク質である。「単離された」には、それらの天然状態から取り出されているまたはヒトの介入を経ているタンパク質が含まれる。好ましくは、タンパク質は40、50、60、70、80、90、95または99%より高いレベルで精製されていてもよい。

10

## 【0016】

従って本発明は、広範には、FrpBタンパク質の保存アミノ酸を有するタンパク質に関する。

20

## 【0017】

好ましくは、FrpBタンパク質はそのループの少なくとも1つの1個以上のアミノ酸が欠失しているものである。

## 【0018】

好ましくは、本発明に係る突然変異タンパク質は、株に非特異的であり、交差反応性であり、かつ/または交差防御性である。「株特異的」には、自系(相同)N.メニンギチジス株に対して誘起されたまたは少なくとも大部分がそれに対して誘起された免疫応答の発生が含まれる。「交差反応性」には、1種以上の異種ナイセリア属細菌株、好ましくはN.メニンギチジス株に対する免疫応答の発生が含まれる。「交差防御性」には、1種以上の異種ナイセリア属細菌株、好ましくはN.メニンギチジス株による感染に対する防御をもたらす免疫応答の発生が含まれる。好ましくは、本発明のタンパク質は立体構造上安定なものである。

30

## 【0019】

タンパク質は、少なくとも2つのループの1個以上のアミノ酸が欠失しているものであることが好ましい。ループは、配列比較により決定することができる。好ましくは、ループ7および/またはループ5の1個以上のアミノ酸が欠失しているものである。特定の好ましい実施形態において、ループ7からの欠失が好ましい。別の好ましい実施形態において、欠失はループ7およびループ5からである。ループ5および7は、FrpBタンパク質の比較的高頻度に非保存アミノ酸を有する領域であることが同定されている。FrpB表面ループの番号付けは、Pettersson et al (1995) *Infect. Immunology* 63:4181-4184 (図6)により使用されている番号体系にしたがっているが、対応する欠失は、利用可能となっているまたは利用可能となる他のモデルに従って行うこともできる(例えば、図9のものは「新モデル」であり、ループ3と5は、大体図6の旧モデルのループ5と7にそれぞれ対応している)。対応する欠失は、配列比較法を用いて決定することができることを理解されたい。

40

## 【0020】

また、タンパク質は、ループ1、2、3、4、6、8、9、10、11、12および13のいずれか1つ以上の1個以上のアミノ酸が欠失していてもよい(または、他の位相的モデル(例えば新モデル)のいずれかの対応するループ)。しかし、本発明は、FrpBタンパク質の

50

より定常な領域の1つ以上を含むことが好ましい。

【0021】

一実施形態において、タンパク質は、ループ7から11~33個のアミノ酸が欠失しているもの、より好ましくはループ7から23~33個、よりさらに好ましくは28個のアミノ酸が欠失しているものである。

【0022】

別の実施形態において、タンパク質は、ループ5から18~29個のアミノ酸が欠失しているもの、より好ましくはループ5から19~29個、よりさらに好ましくは24個のアミノ酸が欠失しているものである。

【0023】

一実施形態において、H44/76株FrpBについて、ループ7から、アミノ酸376~413、より好ましくは381~408の範囲のアミノ酸欠失が行われているか、あるいは対応する欠失が行われているタンパク質を提供する。

【0024】

好ましい実施形態において、H44/76株FrpBについて、ループ7から、TTEKNGQKVDKPMQEQ QMKDRAEDTVHを含むアミノ酸配列が欠失しているか、あるいは対応する欠失が行われているタンパク質を提供する。

【0025】

好ましい実施形態において、H44/76株FrpBについて、ループ5から、アミノ酸247~280、より好ましくは252~275の範囲のアミノ酸欠失が行われているか、あるいは対応する欠失が行われているタンパク質を提供する。

【0026】

さらに好ましい実施形態において、H44/76株FrpBについて、ループ5から、QHRGIRTVRE EFTVGDKSSRINIDを含むアミノ酸配列が欠失しているか、あるいは対応する欠失が行われているタンパク質を提供する。

【0027】

本発明はまた、本発明の突然変異タンパク質をコードするポリヌクレオチドを提供する。

【0028】

本発明の別の態様においては、本発明のポリヌクレオチドを含む発現ベクターを提供する。

【0029】

本発明の別の態様において、本発明のポリヌクレオチドを含む宿主細胞を提供する。

【0030】

本発明の別の態様において、本発明の宿主細胞を培養し、発現されたタンパク質を回収することを含む、本発明の突然変異タンパク質の生成方法を提供する。

【0031】

本発明の別の態様においては、FrpBタンパク質を、3-ジメチルドデシルアンモニオプロパンスルホネート(ツイタージェント(Zwittergent)3-12またはSB-12)を含むアルカリ性リフォールディング緩衝液と接触させることを含む、FrpBタンパク質(突然変異型および野生型の両方を含む)のリフォールディング方法を提供する。

【0032】

一実施形態において、リフォールディング緩衝液はエタノールアミンおよびSB-12を含む。

【0033】

好ましくは、エタノールアミンが、約15~30mM、好ましくは約20mMのエタノールアミンである。

【0034】

好ましくはリフォールディング緩衝液がpH11である。

【0035】

10

20

30

40

50

SB-12は、好ましくは0.1~0.2% SB-12、より好ましくは0.3~0.8% SB-12、よりさらに好ましくは0.5% SB-12である。

【0036】

好ましい実施形態において、リフォールディング緩衝液は、尿素、NaCl (0.4M NaClなど) および/または塩化グアニジン、より好ましくは塩化グアニジン、最も好ましくは0.4M塩化グアニジンをさらに含む。

【0037】

本発明の別の態様において、以下のステップ：

場合により宿主細胞内でFrpBタンパク質を発現させるステップ、

場合によりその宿主細胞を破壊して、FrpBタンパク質を含む封入体を得るステップ、

場合によりその封入体を洗浄するステップ、

場合により、その封入体およびFrpBタンパク質の少なくとも一部を(好ましくは塩酸グアニジンで)可溶化するステップ、

可溶化したFrpBタンパク質をリフォールディング緩衝液と接触させるステップ；ならびに

場合により、そのFrpBタンパク質からリフォールディング緩衝液を除去するステップ、を含む(好ましくはこれらのステップの全てを含む)方法を提供する。

【0038】

本発明の別の態様においては、本発明の方法において使用するための、エタノールアミン、SB-12、および場合により塩化グアニジン(上述した濃度のもの)を含むリフォールディング緩衝液を提供する。

【0039】

本発明の別の態様においては、本発明の方法により得られる、または得ることができる、単離されたリフォールディングFrpBタンパク質(突然変異タンパク質を含む)を提供する。

【0040】

本発明の別の態様において、本発明の少なくとも1種のFrpBタンパク質と、薬学的に許容される担体とを含む医薬組成物を提供する。

【0041】

組成物中に存在するFrpBタンパク質の少なくとも30%、50%、70%または90%がリフォールディングされていることが好ましい。

【0042】

また組成物は、ワクチンの形態であることが好ましい。

【0043】

一実施形態において、医薬組成物は、ナイセリア・メニンギチジスに由来するFrpBタンパク質を含む。

【0044】

別の態様において、医薬組成物は、ナイセリア・ゴノローエに由来するFrpBタンパク質を含む。

【0045】

医薬組成物は、好ましくは少なくとも1種の他のナイセリア属抗原を含む。

【0046】

一実施形態において、医薬組成物は、ナイセリア・ゴノローエに由来する少なくとも1種の他のナイセリア属抗原を含む。

【0047】

別の実施形態において、医薬組成物は、ナイセリア・メニンギチジスに由来する少なくとも1種の他のナイセリア属抗原を含む。

【0048】

一実施形態において、医薬組成物は、サブユニット組成物の形態であるが、外膜小胞調製物と混合してもよい。

10

20

30

40

50

## 【0049】

別の実施形態において、医薬組成物は、外膜小胞調製物の形態であるが、サブユニット組成物と混合してもよい。

## 【0050】

好ましくは、上記組成物は、少なくとも1種のナイセリア属付着因子、または少なくとも1種の他のナイセリア属外膜タンパク質、または少なくとも1種のナイセリア属自己輸送因子、または少なくとも1種のナイセリア属毒素、または少なくとも1種のナイセリア属Fe獲得タンパク質をさらに含む。最も好ましくは、本発明の単離されたFrpBに加えて、少なくとも1種のナイセリア属自己輸送因子および少なくとも1種のナイセリア属毒素が存在するか、または少なくとも1種のナイセリア属自己輸送因子および少なくとも1種のナイセリア属Fe獲得タンパク質が存在するか、または少なくとも1種のナイセリア属毒素および少なくとも1種のナイセリア属Fe獲得タンパク質が存在するか、または少なくとも1種のナイセリア属自己輸送因子および少なくとも1種のナイセリア属Fe獲得タンパク質および少なくとも1種のナイセリア属毒素が存在するか、あるいはそれらの免疫原性フラグメントを含む。

10

## 【0051】

より好ましくは、医薬組成物は、次のクラス：

FhaB、NspA、Hsf、NadA、PilC、Hap、MafA、MafB、Omp26、NMB0315、NMB0995およびNMB1119からなる群から選択される少なくとも1種のナイセリア属付着因子；

Hsf、Hap、IgAプロテアーゼ、AspAおよびNadAからなる群から選択される少なくとも1種のナイセリア属自己輸送因子；

20

FrpA、FrpC、FrpA/C、VapD、NM-ADPRT、ならびにL2免疫タイプのLPSとL3免疫タイプのLPSの一方または両者からなる群から選択される少なくとも1種のナイセリア属毒素；

高分子量TbpA、低分子量TbpA、高分子量TbpB、低分子量TbpB、LbpA、LbpB、P2086、HpuA、HpuB、Lipo28、Sibp、FbpA、BfrA、BfrB、Bcp、NMB0964およびNMB0293からなる群から選択される少なくとも1種のナイセリア属Fe獲得タンパク質；ならびに

PldA、NspA、TspA、FhaC、NspA、TbpA(高)、TbpA(低)、LbpA、HpuB、TdfH、PorB、HimD、HisD、GNA1870、OstA、HlpA、MltA、NMB1124、NMB1162、NMB1220、NMB1313、NMB1953、HtrA、TspB、PilQおよびOMP85からなる群から選択される少なくとも1種のナイセリア属膜結合タンパク質、好ましくは外膜タンパク質、の1種以上から選択される少なくとも1種の追加抗原(またはその断片)をさらに含む。

30

## 【0052】

より好ましくは、医薬組成物は、次のクラス：

(a) FhaB、HsfおよびNadAからなる群から選択される少なくとも1種のナイセリア属付着因子；

(b) HsfおよびHapからなる群から選択される少なくとも1種のナイセリア属自己輸送因子；

(c) FrpA、FrpC、ならびにL2免疫タイプのLPSとL3免疫タイプのLPSの一方または両者からなる群から選択される少なくとも1種のナイセリア属毒素；

(d) TbpA、TbpB、LbpAおよびLbpBからなる群から選択される少なくとも1種のナイセ

40

リア属Fe獲得タンパク質；ならびに  
(e) PldA、NspA、TspA、TspB、PilQおよびOMP85からなる群から選択される少なくとも1種のナイセリア属外膜タンパク質、の1種以上から選択される少なくとも1種の他のナイセリア属抗原(またはその断片)をさらに含む。

## 【0053】

ここで追加抗原は、例えばW001/09350号に記載のように、好ましくは(野生型の発現レベルと比較して)発現がアップレギュレートされてプレブ(OMV)上に存在する。

## 【0054】

好ましくは、医薬組成物は細菌莢膜多糖またはオリゴ糖をさらに含む。莢膜多糖または

50

オリゴ糖は、ナイセリア・メニンギチジスの血清群A、C、YおよびノもしくはW-135、ヘモフィリス・インフルエンザb型、ストレプトコッカス・ニューモニエ、A群連鎖球菌、B群連鎖球菌、スタフィロコッカス・アウレウス、およびスタフィロコッカス・エピデルミジスからなる群から選択される細菌に由来するものであり、好ましくはT-ヘルパーエプの供給源にコンジュゲートされている。

【0055】

本発明の別の態様によれば、動物において免疫応答を引き起こすのに使用するための医薬の製造における本発明のFrpBタンパク質（または本発明の医薬組成物）の使用が提供される。

【0056】

好ましくは、この使用は、ナイセリア属感染症を治療または予防するための医薬の製造におけるものである。1つの実施形態では、ナイセリア・メニンギチジス感染を予防または治療する。別の実施形態では、ナイセリア・ゴノローエ感染を予防または治療する。

【0057】

本発明の別の態様によれば、本発明のFrpBタンパク質に対して免疫特異的な抗体が提供される。

【0058】

本発明の別の態様によれば、少なくとも1種の本発明の抗体と適切な製薬担体とを含む、ナイセリア属疾患に罹患しているヒトの治療に有用な医薬組成物が提供される。

【0059】

本発明のさらに別の態様によれば、ナイセリア属疾患を治療または防御するための医薬の製造における本発明の抗体（またはそれを含む組成物）の使用が提供される。1つの実施形態では、ナイセリア・メニンギチジス感染を予防または治療する。別の実施形態では、ナイセリア・ゴノローエ感染を予防または治療する。

【0060】

本発明のさらなる態様によれば、ナイセリア属感染を有すると疑われる動物からの生物学的サンプル中に存在する本発明のFrpBタンパク質もしくは抗体を同定することを含むか、または、本発明のFrpBタンパク質もしくは抗体を用いて、動物からの生物学的サンプル中にFrpBもしくはFrpBに対する抗体が存在するか否かを検出することによる、ナイセリア属感染の診断方法が提供される。1つの実施形態では、ナイセリア・メニンギチジス感染を診断する。別の実施形態では、ナイセリア・ゴノローエ感染を診断する。

【発明を実施するための最良の形態】

【0061】

詳細な説明

ここで、本発明の種々の好ましい特徴および実施形態を、添付の図面を参照しながら、非限定的な実施例により説明する。

【0062】

一般に、本明細書中で述べる技法は当業界では周知であるが、特に、Sambrookら、Molecular Cloning, A Laboratory Manual (1989)およびAusubelら、Short Protocols in Molecular Biology (1999) 第4版、John Wiley & Sons, Inc（ならびに、完全バージョンであるCurrent Protocols in Molecular Biology）を参照することができる。

【0063】

本明細書中の「含む (comprising、)」、「含む (comprise)」および「含む (comprises)」という用語は、本発明者らによれば、あらゆる場合において、それぞれ、「からなる (consisting of)」、「からなる (consist of)」および「からなる (consists of)」という用語と場合により置き換え可能であるものとする。

【0064】

FrpBタンパク質

FrpBは、髄膜炎菌（ナイセリア・メニンギチジス）(Neisseria meningitidis)の最も多量に存在する鉄制限誘導型外膜タンパク質である。したがって、本明細書中で用いられ

10

20

30

40

50

る「FrpB」という用語は、Fe調節型タンパク質Bを含み、一般には、野生型（また天然に存在するとしても知られる）FrpBのアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を有する任意のタンパク質を包含する。FrpBに関するさらなる詳細は、米国特許第6,265,567号に見ることができる。また、本明細書中では、「FrpB」と「FrpBタンパク質」は、交換可能に用いられる。FrpBはまた、FetAとしても知られている。本明細書中で用いられる「タンパク質」という用語は、「ポリペプチド」という用語を含む。本発明は、FrpBタンパク質の突然変異形態、ならびにリフォールディングFrpBタンパク質に関するものであり、そのリフォールディングタンパク質は、突然変異形態であってもそうでなくてもよい。リフォールディングタンパク質が野生型タンパク質から誘導される場合、それは、好ましくは単離されたリフォールディングFrpBタンパク質である。「単離された（されている）」とは、FrpBタンパク質が、通常はそれが結合している他のタンパク質から遊離していることを意味する。リフォールディングFrpBタンパク質は、好ましくは組換えタンパク質である。「組換え」とは、そのタンパク質が分子生物学の適用を用いて得られたことを意味する。しかし、リフォールディング方法は、リフォールディングまたはアンフォールディングとリフォールディングによる精製を必要とする天然または合成のタンパク質にも適用可能である。好ましくは、本発明の単離されたFrpBは、それが40、50、60、70、80、90、95または99%を上回る純度である、という点で精製されているものである。最も好ましくは、本発明のFrpBは、それが他のナイセリア属タンパク質および/またはそれを生成した宿主細胞の他のタンパク質を40、50、60、70、80、90、95または99%を超えて含んでいない、という点で、生物学的に純粋なものである。

10

20

**【0065】**

本発明は、突然変異型FrpBタンパク質を提供する。本発明のアミノ酸配列に関連する「突然変異（型）」という用語は、FrpB配列の1個（またはそれ以上）のアミノ酸の任意の置換、改変、修飾、置換え、欠失、または付加を含み、但し、そうして得られるアミノ酸配列は、好ましくは、（必要であれば、担体に結合させた場合に）FrpBタンパク質を認識する抗体を生起させることができるものである。記載を簡単にするために、これは、1個（またはそれ以上）のアミノ酸の欠失と呼ぶ。このタンパク質は、対応する野生型FrpB配列から異なる、という意味で、突然変異しているものであり、好ましくは、免疫応答は非改変表面ループに対するものになっている。したがって、この配列はまた、それが非天然（別のナイセリア属タンパク質または全く別の種、好ましくはクラミジア属ペプチドに由来するペプチド）の配列で置き換えられており、好ましくは、免疫応答が非改変表面ループに対するものになっている、という意味で、欠失していてもよい。1つの実施形態では、この配列は、他の生物（例えばクラミジア・トリコマチス（*Chlamydia trachomatis*））に由来する保存配列で置き換えられている。

30

**【0066】**

本発明の1つの好ましい実施形態によれば、FrpBタンパク質の表面露出ループの1つの少なくとも一部が欠失している。1つの好ましい実施形態では、ループ7および/またはループ5が欠失しており、好ましくはループ7が欠失しており、さらに好ましくは二重突然変異体が作製される。ここで、これらの好ましい欠失は、記載を簡単にするために、ナイセリア・メニンギチジスH44/76株と呼ぶ。しかし、これに対応する欠失は、いずれのナイセリア属細菌株においても起こすことができ、事実、例えば淋菌（ナイセリア・ゴノローエ）（*Neisseria gonorrhoeae*）などのあらゆるナイセリア属生物または株でも起こすことができる。そのような対応する欠失は、図5および7に例示するような配列比較を用いて調べることができる。

40

**【0067】**

進め易くするために、本明細書では、Petterssonのトポロジーモデルを参照する。しかし、他のモデル（例えば、図9の新規モデル - これは、本明細書の文脈において用いようとする場合に特に参照される）も同様に十分に参照し得ることが理解されよう。

**【0068】**

上記で述べたように、1つの好ましい実施形態によれば、突然変異体は、ループ7に欠

50

失を含む。この実施形態（H44/76株FrpBに関する）によれば、10～35個の範囲のアミノ酸がループ7から欠失しており、好ましくは15～33個または20～33個、最も好ましくは24～33個のアミノ酸がループ7から欠失している。好ましくは、この欠失は、アミノ酸376～413の範囲内で起こっている。

## 【0069】

1つの特に好ましい実施形態では、約28個のアミノ酸がループ7から欠失している。このアミノ酸欠失は、好ましくは、アミノ酸381～408の範囲内で起こっている。したがって、好ましくは、配列TTEEKNGQKVDKPMEEQMKDRADEDTVHを含むアミノ酸配列がループ7から欠失している。

## 【0070】

ループ5に関する欠失については、（H44/76株FrpBに関して）7～30個の範囲のアミノ酸がループ5から欠失しており、好ましくは10～29個または15～29個、最も好ましくは19～29個のアミノ酸がループ5から欠失している。好ましくは、これらの欠失は、アミノ酸247～280の範囲内で起こっている。

## 【0071】

1つの特に好ましい実施形態では、約24個のアミノ酸がループ5から欠失している。好ましくは、このアミノ酸欠失は、アミノ酸252～275の範囲内で起こっている。したがって、好ましくは、配列QHRGIRTVREEFTVGDKSSRINIDを含むアミノ酸配列がループ5から欠失している。

## 【0072】

上記で述べたように、対応する欠失は、容易に調べることができる。ここで、例として、そのような対応する欠失を、ナイセリア・ゴノローエFA19株およびナイセリア・メニンギチジス892257株および2996株について述べる。しかし、本発明は、入手可能であるか入手可能となるあらゆるFrpBタンパク質に適用可能でありうる。

## 【0073】

FA19株FrpBについては、好ましくは、11～21個の範囲のアミノ酸がループ7から欠失している。このアミノ酸欠失は、アミノ酸381～406の範囲内で起こすことができる。

## 【0074】

好ましくは、FA19株FrpBについては、約16個のアミノ酸がループ7から欠失している。このアミノ酸欠失は、好ましくは、アミノ酸386～401の範囲内で起こっている。したがって、配列TNEEKKNRENEKIAKを含むアミノ酸配列をループ7から欠失させることができる。

## 【0075】

FA19株FrpBについては、好ましくは、19～29個のアミノ酸がループ5から欠失している。このアミノ酸欠失は、好ましくはアミノ酸247～280の範囲内で起こっている。

## 【0076】

好ましくは、FA19株FrpBについては、約24個のアミノ酸がループ5から欠失している。このアミノ酸欠失は、好ましくはアミノ酸252～275の範囲内で起こっている。したがって、配列QHRGIRTVREEFAVSEKNSRITIKを含むアミノ酸配列をループ5から欠失させることができる。

## 【0077】

好ましくは、2996株FrpBについては、18～28個の範囲のアミノ酸がループ7から欠失している。このアミノ酸欠失は、アミノ酸358～390の範囲内で起こすことができる。

## 【0078】

好ましくは、23個のアミノ酸がループ7から欠失している。このアミノ酸欠失は、アミノ酸363～385の範囲内で起こすことができる。したがって、配列NGQDVAKPADQQAQKDRKDEALVHを含むアミノ酸配列をループ7から欠失させることができる。

## 【0079】

2996株FrpBに関しては、好ましくは、18～28個の範囲のアミノ酸がループ5から欠失している。このアミノ酸欠失は、アミノ酸225～257の範囲内で起こすことができる。

## 【0080】

10

20

30

40

50

好ましくは、約23個のアミノ酸がループ5から欠失している。このアミノ酸欠失は、アミノ酸230~252の範囲内で起こすことができる。したがって、配列QHRGIRTVGEEFTVTNNSRLDLDを含むアミノ酸配列をループ5から欠失させることができる。

【0081】

892257株FrpBに関しては、好ましくは11~21個の範囲のアミノ酸をループ7から欠失させる。このアミノ酸欠失は、アミノ酸360~385の範囲内で起こっている。

【0082】

好ましくは、約16個のアミノ酸がループ7から欠失している。このアミノ酸欠失は、アミノ酸365~380の範囲内で起こすことができる。したがって、配列TDEEKNKNRENEKIAKを含むアミノ酸配列をループ7から欠失させることができる。

10

【0083】

892257株FrpBに関しては、好ましくは、19~29個の範囲のアミノ酸がループ5から欠失している。このアミノ酸欠失は、アミノ酸226~259の範囲内で起こすことができる。

【0084】

好ましくは、24個のアミノ酸がループ5から欠失している。このアミノ酸欠失は、アミノ酸231~259の範囲内で起こすことができる。したがって、配列QHRGIRTVREEFTVGAKDSRINKを含むアミノ酸配列をループ5から欠失させることができる。

【0085】

上記で示したように、FrpBタンパク質の表面ループの少なくとも1つ(好ましくは、ループ7および/またはループ5)からの少なくとも数個のアミノ酸が、非天然、すなわち異種の配列で置き換えることができる。また、異なるナイセリア属株のFrpBタンパク質間で領域のシャッフリングが可能であることも理解されよう。好ましくは、そのような置換配列は、別の細菌の外膜タンパク質に由来するものである。そのような置換配列は、保存されていること、すなわち、細菌生物の2種以上の株に対して免疫応答を生じることができることが好ましい。1つの実施形態では、置換配列はまた、ナイセリア・ゴノローエまたはナイセリア・メニンギチジスなどのナイセリア属外膜タンパク質に由来する。そのような適切な外膜タンパク質の一例は、米国特許第5,912,336号に示されており、そこでは、TbpAと命名された別のナイセリア属鉄調節型タンパク質が記載されている。置換配列は、好都合には、TbpAのループ2、3、4、5および8の中の任意の1つ以上から誘導することができた。これらのループは、一般には、それぞれ、TbpAのアミノ酸226~309; 348~395; 438~471; 512~576および707~723に相当する。好ましくは、ループ4、5および8のうちの1つ以上が取り込まれている。

20

30

【0086】

そのような適切な外膜タンパク質の別の例は、W001/55182に示されており、そこでは、ナイセリア・メニンギチジスに由来するNhhA(またはHsf)表面抗原が記載されている。置換配列は、好都合には、一般にC1、C2、C3、C4およびC5と命名されているNhhAタンパク質の1つ以上の定常領域から誘導することができた。本発明で使用可能な別の置換配列の一例は、欧州特許第0 586 266号に記載されている。

【0087】

FrpBのループ(特にループ5および/または7)と置換可能な別のナイセリア属OMPループは、PorAのループ4[または可変領域2](<http://neisseria.org/nm/typing/porA/>を参照); PorAのループ5("Topology of outer membrane porins in pathogenic Neisseria spp", van der Ley, Poolman, 等, Infect Immun 1991, 59, 2963-71に記載されている; PorA P1.7,16 (H44/76)ループ5中でのその配列はRHANVGRNAFELFLIGSGSDQAKGTDPLK NH); それぞれアミノ酸210~342、366~441、542~600、726~766および844~871に対応しているLbpA表面露出ループ4、5、7、10および12[但し、12が好ましい(配列KGKNPD ELAYLAGDQKRYSTKRASSWST)][LbpA表面ループについてのさらなる詳細は、参照により本明細書に組み込まれるPrinzら, 1999 J Bacter. 181:4417を参照されたい]; それぞれアミノ酸配列25~54、61~87、103~129および149~164に対応しているNspA表面露出ループ1、2、3または4[但し、好ましくはループ2(例えばFAVDYTRYKNYKAPSTDFKLYSIGAS

40

50

A) および / または ループ 3 (例えば ARLSLNRSVLDLGGSDSFSQTSIGLGLV) が挿入されているもの (これらのループは極めて小さいので、これらのループを導入するためには、FrpBのループ 5 および / または 7 の全てが理想的には除去されず、両者を導入しようとする場合には、それらが順にループ 5 または 7 に (またはその逆で) 導入されて、NspA のループ 2 と 3 との間に存在する立体構造型エピトープを保存しようとする試みが好ましい) ] [ NspA のループについてのさらなる詳細は、参照により本明細書に組み込まれる Vandeputte-Rutten ら, 2003 JBC 278:24825 を参照されたい ] ; Omp85 の表面露出ループのいずれか (参照により本明細書に組み込まれる Science 2003 299:262-5 およびそれを支持するオンライン資料の図 S4 を参照されたい) である。

【 0 0 8 8 】

あるいはまた、細菌性炭水化物抗原のペプチドミモトープは、上記のようにして FrpB に組み込むことができる。好ましくは、ナイセリア属 LOS のミモトープがループ 5 および / または 7 に組み込まれて、ワクチン中でその有害な作用を示すことなく、この重要な抗原に対する免疫応答を有利に刺激する。LOS ミモトープは、当業界で周知である (参照により本明細書に組み込まれる WO 02/28888 およびそこで引用されている文献を参照されたい)。

【 0 0 8 9 】

本発明の突然変異型タンパク質は、慣用のタンパク質工学技法を用いて調製可能であることが理解されよう。例えば、本発明のポリヌクレオチドまたは野生型 FrpB をコードするポリヌクレオチドは、ランダム突然変異誘発 (例えばトランスポゾン突然変異誘発) または部位指定突然変異誘発を用いて突然変異させることができる。

【 0 0 9 0 】

ナイセリア属による感染を予防するための FrpB タンパク質は、次の要素: ナイセリア属の補体媒介死滅を促進するため、かつ / または白血球 (例えば多形核白血球) による食作用および微生物殺傷を促進するため、かつ / または、宿主組織へのナイセリア属の結合を防止するための血清および / もしくは粘膜抗体の生成、のうち 2 つ以上を必要とする場合があり、細胞媒介免疫応答の誘導も防御に關与し得る。

【 0 0 9 1 】

他者により記載されているように (McChesney D ら, Infect. Immun. 36: 1006, 1982 ; Boslego J ら: Efficacy trial of a purified gonococcal pilus vaccine, in Program and Abstracts of the 24th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Washington, American Society for Microbiology, 1984 ; Siegel M ら, J. Infect. Dis 145: 300, 1982 ; de la Pas, Microbiology, 141 (Pt4): 913-20, 1995)、本発明の FrpB 突然変異体の効力の向上は、付着防止 (antiadherence) および / またはオプソニン化特性および / または殺菌活性を有する血清および / または粘膜抗体についての誘導された免疫応答を分析することにより評価することができる。

【 0 0 9 2 】

本発明の、または本発明において使用するためのタンパク質配列は、基準として提供されているものであり、本発明は本明細書中に示す特定の配列またはそれらの断片に限定されず、例えば関連する細菌性タンパク質などの任意の供給源から得られるそれらの相同配列、合成ペプチド、ならびに変形体 (特に天然の変形体) または誘導体も含むことが理解されよう。提示するループ配列は、基準としてであって、上記で記載したループ内に存在するエピトープを含むいずれのループ配列も利用できることが想定される。

【 0 0 9 3 】

したがって、本発明は、本発明のまたは本発明において使用するためのアミノ酸配列の変形体、相同体もしくは誘導体、ならびに、それらのアミノ酸配列の変形体、相同体もしくは誘導体を包含する。

【 0 0 9 4 】

本発明の文脈において、相同配列とは、アミノ酸レベルで少なくとも 60、70、80 または 90% 同一であり、好ましくは少なくとも 95 または 98% 同一であるアミノ酸配列を含むもの

10

20

30

40

50

とする。本発明の文脈では、相同性は類似性（すなわち、同様の化学的特性／機能を有するアミノ酸残基）という観点からも考えることができるが、相同性は配列同一性として表わすことが好ましい。

**【0095】**

相同性比較は、目視で行うことができるが、より一般的には、容易に利用可能な配列比較プログラムを用いて行うことができる。これらの市販のコンピュータプログラムは、2つ以上の配列間の%相同性を算出することができる。

**【0096】**

%相同性は、連続した配列全体にわたって算出することができる。すなわち、一方の配列を他方の配列とアライメントをとり、1回に1残基ずつ、一方の配列の各アミノ酸を、他方の配列の対応するアミノ酸と直接比較する。これは「ギャップなし」アライメントと呼ばれる。典型的には、そのようなギャップなしアライメントは、比較的少数の残基（例えば50個未満の連続アミノ酸）においてのみ行われる。

10

**【0097】**

これは非常に簡単でバラツキのない方法であるが、例えば他の点では同一である2つの配列において、1つの挿入または欠失が、それに続くアミノ酸残基をアライメントからはみ出させてしまい、したがって、広域アライメント（global alignment）を行った場合に、%相同性を大きく下げってしまう可能性があることを考慮に入れていない。したがって、多くの配列比較方法は、全体の相同性スコアに過度にペナルティーを課すことなく、可能性のある挿入および欠失を考慮した、最適なアライメントを得るように設計されている。これは、配列アライメントに「ギャップ」を挿入して、局所的相同性を最大限にしようと試みることにより達成される。

20

**【0098】**

しかし、これらのより煩雑な方法では、アライメント中に存在する各ギャップに「ギャップペナルティー」が割り当てられて、同数の同一のアミノ酸では、できるだけギャップが少ない配列アライメント（2つの比較配列間がより高度に関連していることを反映）が多数のギャップを含んだ場合よりも高いスコアを達成するようになっている。典型的には、1つのギャップの存在について比較的高いコストを課し、そのギャップ内の後続する各残基についてペナルティーが小さい、「アフィン（Affine）ギャップコスト」が用いられる。これは、最も一般的に用いられるギャップスコアリングシステムである。勿論、ギャップペナルティが高ければ、ギャップがより少ない最適化されたアライメントが得られる。多くのアライメントプログラムでは、ギャップペナルティを変えることができる。しかし、配列の比較にそのようなソフトウェアを使用する場合には、デフォルト値を用いることが好ましい。例えば、GCG Wisconsin Bestfitパッケージ（後記を参照）を用いる場合、アミノ酸配列についてのデフォルトギャップペナルティは1つのギャップについては-12であり、各伸張については-4である。

30

**【0099】**

したがって、最大%相同性を算出するには、まず、ギャップペナルティを考慮に入れて、最適なアライメントを得ることが必要である。そのようなアライメントを実行するための好適なコンピュータプログラムは、GCG Wisconsin Bestfitパッケージ（University of Wisconsin, U.S.A.; Devereuxら, 1984, Nucleic Acids Research 12:387）である。配列比較を実行できるその他のソフトウェアの例としては、BLASTパッケージ（Ausubelら, 1999 同上-Chapter 18を参照）、FASTA（Atschulら, 1990, J. Mol. Biol., 403-410）およびGENEWORKS比較ツールセットが挙げられるが、それらに限定されない。BLASTおよびFASTAは共に、オフライン検索およびオンライン検索の場合に利用できる（Ausubelら, 1999 同上, p.7-58~7-60を参照）。しかし、GCG Bestfitプログラムを使用することが好ましい。

40

**【0100】**

最終的な%相同性は同一性として測定できるが、アライメントプロセス自体は、典型的にはオールオアナッシングの対比較に基づくものではない。その代わりに、一般には、化学

50

的類似性または進化距離に基づいて各対比較にスコアを割り当てる換算相同性スコアマトリックスを用いる。一般に用いられるそのようなマトリックスの一例は、BLOSUM62マトリックス（BLASTプログラムセットのデフォルトマトリックス）である。GCG Wisconsinプログラムは、一般に、公のデフォルト値か（それが提供されている場合は）顧客向け特注のシンボル比較表を用いる（さらなる詳細はユーザーマニュアルを参照）。GCGパッケージでは、公のデフォルト値を用いるか、それ以外のソフトウェアでは、BLOSUM62などのデフォルトマトリックスを用いることが好ましい。

#### 【0101】

ソフトウェアにより最適なアライメントが得られたら、%相同性、好ましくは%配列同一性を算出することができる。ソフトウェアは、典型的には、これを、配列比較の一部として行い、結果を数値で出す。

10

#### 【0102】

本明細書中でタンパク質が具体的に述べられている場合、それは好ましくは全長タンパク質について言及するものであるが、（特にサブユニットワクチンの文脈においては）それらの抗原性断片も包含し得る。好ましい断片としては、エピトープを含むものが挙げられる。特に好ましい断片としては、少なくとも1つの表面ループを有するものが挙げられる。本発明の突然変異体に関しては、このループは、好ましくはループ7および/または5以外のものである。これらの断片は、このタンパク質のアミノ酸から連続して採られる少なくとも10個のアミノ酸、好ましくは20個のアミノ酸、さらに好ましくは30個のアミノ酸、さらに好ましくは40個のアミノ酸、最も好ましくは50個のアミノ酸を含むか、またはそれらから構成され得る。さらに、抗原性断片とは、ナイセリア属タンパク質に対して生じる抗体または哺乳動物宿主がナイセリア属に感染することにより生じる抗体と免疫学的に反応性である断片をいう。また、抗原性断片は、有効量を投与した場合に、ナイセリア属感染に対して防御性免疫応答を惹起させる断片を含み、さらに好ましくは、それはナイセリア・メニンギチジスおよび/またはナイセリア・ゴノローエの感染に対して防御性であり、最も好ましくは、それはナイセリア・メニンギチジスの血清群Bの感染に対して防御性である。

20

#### 【0103】

また、本発明は、本明細書中で述べるタンパク質の変形体も含むものであり、その変形体は、同族アミノ酸置換により、1つの残基が同様の特性を有する別のもので置換されて、基準物とは異なっているタンパク質である。典型的なそのような置換は、AlaとValとLeuとIleとの間；SerとThrとの間；酸性残基AspとGluとの間；AsnとGlnとの間；および塩基性残基LysとArgとの間；または芳香族性残基PheとTyrとの間である。特に好ましいものは、数個、5～10個、1～5個、1～3個、1～2個または1個のアミノ酸がいずれかの組合せで置換、欠失または付加されている変形体である。

30

#### 【0104】

FrpBタンパク質はまた、ナイセリア・ゴノローエにおいても同定されている（米国特許第6,265,567号）。したがって、本発明は、他のナイセリア属に由来するFrpBタンパク質にも適用可能である。

#### 【0105】

本発明により生成されるFrpBまたはその突然変異型FrpB、断片または変形体は、好ましくは、野生型FrpBタンパク質の免疫学的活性の少なくともある程度を示す生成物である。好ましくは、それは、次のうちの少なくとも1つを示す。

40

#### 【0106】

（必要であれば、本発明のFrpBタンパク質を担体に結合させた場合に）野生型FrpBを認識する抗体の産生を誘導する能力；

実験的感染に対して防御することができる抗体の産生を誘導する能力；および

動物に投与した場合に、ナイセリア・メニンギチジスやナイセリア・ゴノローエの感染などのナイセリア属感染に対して防御することができる免疫学的応答の発現を誘導する能力。

50

## 【0107】

好ましくは、本発明の突然変異型タンパク質は、交差反応性であり、さらに好ましくは、交差防御性 (cross-protective) である。

## 【0108】

本発明のFrpBタンパク質は、ナイセリア属、特にナイセリア・メニンギチジスにより引き起こされる疾患を予防、治療および診断するための予防用、治療用または診断用組成物において有用である。しかし、それは、例えばナイセリア・ゴノローエまたはナイセリア・ラクタミカ (*Neisseria lactamica*) などに関しても同様の用途があり得る。

## 【0109】

本発明のFrpBタンパク質では、それを免疫原およびワクチンとして使用するために、標準的な免疫学的技法を用いることができる。特に、任意の適切な宿主に、薬学上有効な量のFrpBタンパク質を注射して、モノクローナルまたはポリクローナル抗FrpB抗体を作製したり、あるいは、ナイセリア属疾患に対する防御性免疫応答の発現を誘導することができる。FrpBタンパク質は、投与の前に、適切なビヒクル中で製剤化することができ、したがって、薬学的に有効な量の本発明の1種以上のタンパク質を含む医薬組成物が提供される。本明細書中で用いられる「薬学的に有効な量」とは、十分な力価の抗体を生起させて、感染を治療または予防する、FrpBタンパク質 (または他の本発明のタンパク質) の量をいう。また、本発明の医薬組成物は、疾患の治療または予防に有用な他の抗原を含むことも可能である。

10

## 【0110】

本発明のFrpBタンパク質はまた、感染についての診断検査のベースを形成することもできる。例えば、本発明は、ナイセリア属抗原を含むまたは含んでいると疑われる生物学的サンプル中のナイセリア属抗原の検出方法であって、

20

本発明のタンパク質を用いて、抗FrpB抗体を作製するステップ；

患者から生物学的サンプルを単離するステップ；

抗FrpB抗体またはそのフラグメントをその生物学的サンプルと共にインキュベートするステップ；

結合している抗体または結合しているフラグメントを検出するステップ、を含む方法を提供する。

## 【0111】

本発明はまた、FrpBタンパク質に特異的な抗体を含むまたは含んでいると疑われる生物学的サンプル中のその抗体の検出方法であって、

30

患者から生物学的サンプルを単離するステップ；

本発明のFrpBタンパク質をその生物学的サンプルと共にインキュベートするステップ；

結合している抗原を検出するステップ、

を含む方法を提供する。

## 【0112】

この診断検査は、ELISAおよびラジオイムノアッセイを含む幾つかの形態を採ることができる。

## 【0113】

そのような適用についてのさらなる詳細を、以下に示す。

40

## 【0114】

本発明のSBA殺菌アッセイ

交差防御性および免疫応答は、髄膜炎菌ワクチンの効力を評価するための最も一般的に承認されている免疫学的指標である血清殺菌性アッセイ (SBA) を用いて測定することができる (Perkins et al. *J Infect Dis.* 1998, 177:683-691)。例えば、野生型タンパク質に対する突然変異FrpBタンパク質の改善された応答は、突然変異FrpBにより惹起されるSBAが、対応する野生型タンパク質により惹起されるSBAより少なくとも50%、2倍、3倍、好ましくは4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、最も好ましくは10倍高いことを特徴としうる。好ましくは、SBAは、該抗原が由来する同種株に対して、好ましくはまた、一群の異種

50

株に対して測定される。従って、交差防御性は、十分な異種SBAが一群の非関連株（例えば3つの非関連株）に対して得られるかどうかを測定することができる。任意の公知方法により、十分なSBAを確認することが可能である。SBAは、動物モデルからまたはヒト被験者から得た血清を使用して行うことができる。

#### 【0115】

ヒト血清を使用してSBAを行うための好ましい方法は以下のとおりである。初回ワクチン接種の前、2回目のワクチン接種の2ヵ月後および3回目のワクチン接種の1ヵ月後に血液サンプルを採取する（1年に3回のワクチン接種が典型的なヒト初回ワクチン接種計画であり、例えば、0、2および4ヶ月、または0、1および6ヶ月の時点で投与を行う）。そのようなヒト初回ワクチン接種計画は、1歳未満または2～4歳の小児に実施することが可能であり（例えば、Hibワクチン接種と同時に実施する）、あるいは、そのような初回ワクチン接種計画によるSBAを試験するために、青年にもワクチン接種することが可能である。初回ワクチン接種の6～12ヶ月後、および追加接種が適用可能な場合には追加接種の1ヵ月後に、更なる血液サンプルを採取することが可能である。

10

#### 【0116】

3回目のワクチン接種（初回ワクチン接種計画の3回目のワクチン接種）（2～4歳の小児または青年、好ましくは1歳以下の小児におけるもの）の1ヶ月後、本発明の抗原が由来する髄膜炎菌株に対するSBA（抗体希釈）力価において（ワクチン接種前の力価と比較して）4倍の増加を示す被験者の割合が該被験者の30%以上、好ましくは40%以上、より好ましくは50%以上、最も好ましくは60%以上である場合には、SBAは、同種殺菌活性を有する抗原またはブレブ調製物に関して満足しうるものであろう。

20

#### 【0117】

もちろん、異種殺菌活性を有する抗原またはブレブ調製物は、それが由来する髄膜炎菌株に対してそれが十分なSBAを惹起しうる場合には、同種殺菌活性を有するブレブ調製物を構成することもできる。

#### 【0118】

3回目のワクチン接種（初回ワクチン接種計画の3回目のワクチン接種）（2～4歳の小児または青年、好ましくは1歳以下の小児におけるもの）の1ヶ月後、3つの異種髄膜炎菌株に対するSBA（抗体希釈）力価において（ワクチン接種前の力価と比較して）4倍の増加を示す被験者の割合が該被験者の20%以上、好ましくは30%以上、より好ましくは35%以上、最も好ましくは40%以上である場合には、SBAは、異種殺菌活性を有する抗原またはブレブ調製物に関して満足しうるものであろう。そのような試験は、異種殺菌活性を有する抗原またはブレブ調製物が種々の髄膜炎菌株に対する交差殺菌性抗体を誘導しうるかどうかの良好な指標である。好ましくは、そのような3つの異種株は、互いに異なる、および好ましくは、異種殺菌活性を有する抗原またはブレブ調製物の原料となったまたはそれが由来する株とは異なる、電気泳動型（ET）複合体または多遺伝子座配列タイピング（multilocus sequence typing）（MLST）パターン（Maidenら PNAS USA 1998, 95:3140-5を参照されたい）を有するべきである。当業者は、髄膜炎菌、特に、重要な病難の原因であると認められておりおよび/または認識されているMenB超ビルレント系統に相当する髄膜炎菌B型株において認められる遺伝的多様性を表す異なるET複合体を有する3つの株を容易に決定しうるであろう（Maidenら、前掲を参照されたい）。例えば、使用しうる3つの株としては以下のものが挙げられる：A-4クラスターに属するBZ10（B:2b:P1.2）、ET-37複合体に属するB16B6（B:2a:P1.2）、およびET-5複合体に属するH44/76（B:15:P1.7,16）、または同じET/クラスターに属する他の任意の株。例えばET-5複合体に属する髄膜炎菌CU385（B:4:P1.15）から製造されたまたはそれに由来する、異種殺菌活性を有する抗原またはブレブ調製物を試験するために、そのような株を使用することが可能である。使用しうるもう1つのサンプル株は系統3流行性（epidemic）クローン（例えば、NZ124 [B:4:P1.7,4]）に由来する。もう1つのET-37株はNGP165（B:2a:P1.2）である。

30

40

#### 【0119】

SBA活性の測定方法は当技術分野において公知である。例えば、使用しうる方法はW0 99

50

/09176に記載されている。一般には、被験株の培養物を（好ましくは、EDDAのような鉄キレート剤の増殖培地への添加による鉄枯渇条件において）対数増殖期まで増殖させる。約20000 CFU/mlに調節された実施細胞懸濁液を得るために、これを、BSAを含有する培地（例えば、0.3% BSAを含有するハンクス培地）に懸濁させることが可能である。被験血清の2倍連続希釈液（好ましくは、56 で30分間熱不活性化されたもの）[例えば、50 $\mu$ l/ウェルの容量中]と20000 CFU/ml 被験髄膜炎菌株懸濁液[例えば、25 $\mu$ l/ウェルの容量中]とを混合することにより、一連の反応混合物を調製することができる。反応バイアルをインキュベート（例えば、37 で15分間）し、振とう（例えば、210rpm）すべきである。最終反応混合物[例えば、100 $\mu$ l容量]は更に、補体源[例えば、25%最終容量の予備試験された子ウサギ血清]を含有し、それを前記のとおり[例えば、37 で60分間]インキュベートする。このアッセイには無菌ポリスチレンU底96ウェルマイクロタイタープレートを使用することができる。アリコート[例えば、10 $\mu$ l]を、マルチチャンネルピペットを使用して各ウェルから採取し、ミュラー・ヒントン（Mueller-Hinton）寒天プレート（好ましくは、1% Isovitalexおよび1% 熱不活性化ウマ血清を含有する）上に滴下し、インキュベート（例えば、5% CO<sub>2</sub>中、37 で18時間）する。好ましくは、個々のコロニーは80 CFU/アリコートまで計数されうる。対照として、以下の3つの試験サンプルを使用することができる：バッファー + 細菌 + 補体；バッファー + 細菌 + 不活性化補体；血清 + 細菌 + 不活性化補体。SBA力価は、殺細胞の50%に対応する希釈度の測定値を回帰計算により与えるデータ処理プログラムを使用して、簡単に算出することができる。

10

20

30

40

50

#### 【0120】

#### 動物防御アッセイ

あるいは、相乗的応答は、動物防御アッセイにおいて、抗原の組合せの有効性を特徴としうる。例えば、実施例12または13に記載のアッセイを用いることが可能である。好ましくは、抗原の組合せにより防御される動物の数は、抗原（特に、最適以下の量（suboptimal）の抗原）を単独で使用した場合と比較して有意に改善される。

#### 【0121】

#### 接着阻止アッセイ

あるいは、免疫応答は、接着阻止アッセイにおいて、抗原の組合せの有効性を特徴としうる。好ましくは、突然変異型FrpBに対して産生された抗血清により誘導される阻止の度合は、野生型FrpBに対して産生された抗血清（特に、最適以下の量の抗体）を使用した場合と比較して有意に改善される。

#### 【0122】

#### ポリヌクレオチド

本発明はまた、本発明の突然変異型タンパク質をコードするポリヌクレオチド、併せて、それらの変形体、誘導體および相同体も提供する。本発明のポリヌクレオチドは、DNAまたはRNAを含むことができる。それらは、一本鎖であっても二本鎖であってもよい。また、それらは、内部に合成または修飾ヌクレオチドを含むポリヌクレオチドとすることもできる。オリゴヌクレオチドの多くの異なるタイプの修飾は、当業界では公知である。これらには、メチルホスホネートおよびホスホロチオエート骨格、分子の3'および/または5'末端でのアクリジンまたはポリリシン鎖の付加を含む。本発明の目的のためには、本明細書中で記載されるポリヌクレオチドは、当業界で利用可能なあらゆる方法で修飾可能であると理解されたい。そのような修飾は、本発明のポリヌクレオチドのin vivo活性または寿命を増大させる目的で行うことができる。

#### 【0123】

1つの実施形態では、本発明の突然変異型タンパク質は、次の技法のいずれかを用いて作製される：カセット突然変異誘発、単一プライマー伸長、部位指定突然変異誘発のPCR法、例えば、Higuchiら(1988) Nucleic Acids Res. 16:7351-67の4プライマー法、二方向欠失を含む部位指定突然変異誘発；ランダム突然変異誘発；ならびにファージ提示による突然変異型タンパク質の選定。

#### 【0124】

本発明のヌクレオチド配列に関連する「変形体」、「相同体」または「誘導体」という用語は、その配列からの、またはその配列への1個（またはそれ以上の）核酸の任意の置換、変形、修飾、置き換え、欠失または付加を含み、但し、その結果として得られたヌクレオチド配列は、突然変異型FrpBポリペプチドをコードするものとする。

【0125】

上記で示したように、配列相同性に関しては、好ましくは、本明細書中の配列表に示す配列に対して少なくとも75%、さらに好ましくは少なくとも85%、さらに好ましくは少なくとも90%の相同性（好ましくは同一性）がある。さらに好ましくは、少なくとも95%、さらに好ましくは少なくとも98%の相同性（好ましくは同一性）がある。ヌクレオチドの相同性比較は、上記で記載したようにして行うことができる。好ましい配列比較プログラムは、上記で記載したGCG Wisconsin Bestfitプログラムである。デフォルトスコアリングマトリックスは、各同一ヌクレオチドに対しては10の適合値を、そして各ミスマッチに対しては-9を有する。各ヌクレオチドに対して、デフォルトギャップ作成ペナルティは-50であり、デフォルトギャップ伸長ペナルティは-3である。

10

【0126】

本発明はまた、本明細書中に示す配列に選択的にハイブリダイズすることができるヌクレオチド配列、またはそれらの任意の変形体、断片もしくは誘導体、または上記のいずれかの相補体も包含する。ヌクレオチド配列は、好ましくは少なくとも15ヌクレオチド長であり、さらに好ましくは少なくとも20、30、40または50ヌクレオチド長である。

【0127】

本明細書中で用いられる「ハイブリダイゼーション」という用語は、「核酸の鎖が塩基対合により相補鎖と結合するプロセス」、ならびにポリメラーゼ連鎖反応法において行われるような増幅プロセスを含むものとする。

20

【0128】

本明細書中で示すヌクレオチド配列、またはそれらの相補体に選択的にハイブリダイズすることができる本発明のポリヌクレオチドは、一般に、本明細書中で示す対応するヌクレオチド配列の、少なくとも20個、好ましくは少なくとも25または30個、例えば少なくとも40、60または100以上の連続ヌクレオチドの領域にわたって、少なくとも70%、好ましくは少なくとも80または90%、さらに好ましくは少なくとも95%または98%の相同である。好ましい本発明のポリヌクレオチドは、保存された領域をコードするヌクレオチドに対して相同な領域を含み、好ましくは、これらの領域に対して少なくとも80または90%、さらに好ましくは少なくとも95%相同（好ましくは同一）である。

30

【0129】

「選択的にハイブリダイズ可能な」という用語は、プローブとして用いるポリヌクレオチドが、本発明の標的ポリヌクレオチドがバックグラウンドを有意に上回るレベルでそのプローブにハイブリダイズすると思われる条件下で用いられることを意味する。バックグラウンドハイブリダイゼーションは、例えばcDNAまたはゲノムDNAライブラリーをスクリーニングする際に存在する他のポリヌクレオチドによって起こり得る。この事象において、バックグラウンドとは、プローブとライブラリーの非特異的DNAメンバーとの相互作用により生じるシグナルのレベルを意味し、標的DNAで見られる特異的相互作用と比較して1/10未満、好ましくは1/100未満の強度である。相互作用の強度は、例えば、プローブを<sup>32</sup>Pなどで放射標識することにより測定できる。

40

【0130】

ハイブリダイゼーション条件は、BergerおよびKimmel (1987, Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology, Vol 152, Academic Press, San Diego CA) において教示されているように、核酸結合複合体の融解温度(T<sub>m</sub>)に基づくものであり、下記で説明するような所定の「ストリンジェンシー」をもたらす。

【0131】

最大のストリンジェンシーは、典型的には、T<sub>m</sub>-5（プローブのT<sub>m</sub>よりも5低いもの）付近で起こり、高ストリンジェンシーは、T<sub>m</sub>よりも約5~10低いところで起こり

50

、中程度ストリンジェンシーは $T_m$ よりも約10 ~ 20 低いところで起こり、低ストリンジェンシーは $T_m$ よりも約20 ~ 25 低いところで起こる。当業者であれば理解されるように、最大ストリンジェンシーハイブリダイゼーションは、同一のポリヌクレオチド配列の同定または検出に用いることができ、中程度（または低）ストリンジェンシーハイブリダイゼーションは、ほぼ同様のまたは関連するポリヌクレオチド配列の同定または検出に用いることができる。

【0132】

1つの好ましい態様において、本発明は、ストリンジェント条件下(例えば、65 °C、0.1 × SSC{1 × SSC = 0.15M NaCl, 0.015Mクエン酸 $Na_3$ 、pH7.0})で、本発明のヌクレオチド配列にハイブリダイズできるヌクレオチド配列を包含する。

10

【0133】

本発明のポリヌクレオチドが二本鎖である場合、その二本鎖の両方の鎖が、個々に、または組み合わせとして、本発明に包含される。そのポリヌクレオチドが一本鎖である場合、そのポリヌクレオチドの相補配列もまた、本発明の範囲に含まれることが理解されよう。

【0134】

本発明の配列に対して100%相同ではないが、本発明の範囲に含まれるポリヌクレオチドは、幾つかの方法で得ることができる。本明細書に記載されている配列の他の変形体は、例えば、ある範囲の個体(例えば異なる集団からの個体)から作製したDNAライブラリーを調べることにより得ることができる。さらに、他の細菌性相同体を得ることも可能であり、そのような相同体およびそれらの断片は、一般に、本明細書の配列表に示す配列に選択的にハイブリダイズすることができる。

20

【0135】

変形体および株/種相同体はまた、縮重PCRを用いて得ることができる。この縮重PCRは、本発明の配列内の保存されているアミノ酸配列をコードする変形体および相同体に含まれる配列を標的とするように設計されたプライマーを使用するものである。保存されている配列は、例えば、幾つかの変形体/相同体からのアミノ酸配列のアライメントをとることにより推定できる。配列アライメントは、当業界で知られているコンピューターソフトウェアを用いて実行できる。例えば、GCG Wisconsin PileUpプログラムが広く用いられている。

30

【0136】

縮重PCRにおいて用いられるプライマーは、1つ以上の縮重位置を含み、既知の配列に対する単一配列プライマーを用いて配列をクローニングするのに用いられるものよりも低いストリンジェンシー条件で用いられる。

【0137】

本発明のポリヌクレオチドは、プライマー(例えばPCRプライマー、別の増幅反応用のプライマー)、プローブ(例えば放射性または非放射性標識を用いて慣用の手段による露出した標識で標識したものを)を作製するのに使用してもよいし、あるいは、このポリヌクレオチドはベクターにクローニングしてもよい。そのようなプライマー、プローブおよび他の断片は、長さが少なくとも15、好ましくは少なくとも20、例えば少なくとも25、30または40ヌクレオチドであり、本明細書中で用いられる本発明のポリヌクレオチドという用語に包含される。好ましい断片は、長さが5000、2000、1000、500または200ヌクレオチド未満である。

40

【0138】

本発明に係るDNAポリヌクレオチドおよびプローブなどのポリヌクレオチドは、組換え、合成、または当業者に利用可能な任意の手段により作製できる。それらはまた、標準的な技法によりクローニングすることも可能である。

【0139】

一般に、プライマーは、一回に1個のヌクレオチドずつ作製する、目的核酸配列の段階的作製を含む合成手段により作製される。自動化方法を用いてこれを達成するための技法

50

は、当業界では容易に利用できる。

【0140】

より長いポリヌクレオチドは、一般に、組換え手段を用いて、例えばPCR（ポリメラーゼ連鎖反応）クローニング法を用いて作製される。これには、クローニングしようとする配列の領域を挟む一対のプライマー（例えば、約15～30ヌクレオチドのもの）を作製し、それらのプライマーを、動物またはヒトの細胞から得たmRNAまたはcDNAと接触させ、目的領域の増幅を起こす条件下でポリメラーゼ連鎖反応を行い、増幅された断片を（例えば反応混合物をアガロースゲル上で精製することにより）単離し、増幅されたDNAを回収することが含まれる。これらのプライマーは、適切な制限酵素認識部位を含むように設計して、増幅されたDNAが適切なクローニングベクターにクローニングできるようにしてもよい。

10

【0141】

リフォールディング方法

本発明は、本発明に係るFrpBタンパク質またはそれらの突然変異体の正しいフォールディング/リフォールディングを促進する方法を提供し、この方法は、アルカリ性リフォールディング緩衝液中で界面活性剤SB-12を使用することを含む。

【0142】

典型的には、本発明の方法は、組換えにより作製したFrpB（アンフォールディング形態またはミスフォールディング形態で得られる）のリフォールディングを補助するのに用いられる。したがって、組換えにより作製されたタンパク質は、リフォールディング緩衝液と接触させて、それらを発現する宿主細胞からの抽出によりミスフォールディングされているかアンフォールディングされている組換えタンパク質をアンフォールディング、リフォールディングおよび/または再活性化することができる。そのようなプロセスは「再調整（reconditioning）」と呼ぶこともできる。

20

【0143】

本発明の方法は、FrpBのフォールディングされた立体構造を、例えば保存の間に維持するために用いて、貯蔵寿命を長くすることができる。保存条件下では、多くのタンパク質は、正しいフォールディングが破壊されるため、自身の活性を喪失する。本発明のリフォールディング緩衝液が存在すると、タンパク質がアンフォールディングされる傾向を低減または逆転させ、したがって、その貯蔵寿命を多大に増大させる。

【0144】

本発明の方法は、貯蔵、変性条件への暴露などによりミスフォールディングされているFrpBの正しいフォールディングを促進するのに使用できる。したがって、本発明は、FrpBを再調整するのに使用できる。例えば、再調整が必要なFrpBを、本発明によるリフォールディング緩衝液と接触させることができる。

30

【0145】

また、本発明は、FrpBタンパク質の構造の改変方法を提供する。構造改変には、フォールディング、アンフォールディングおよびリフォールディングが含まれる。この改変の効果は、好ましくは、収率、特定の活性および/または分子の質を向上させることである。これは、典型的には、合成後の正しくフォールディングされていない分子を再可溶化、再調整および/または再活性化することにより達成できる。

40

【0146】

したがって、「再調整」および「再活性化」という用語は、in vitroでの手順を包含する。in vitro手順の具体的な例としては、尿素または塩化グアニジンなどの強変性剤を用いて細胞抽出物（封入体など）から可溶化されたタンパク質の処理を挙げることができる。

【0147】

「リフォールディングする」、「再活性化する」および「再調整する」という用語は、互いに相反するものを意味するものではない。例えば、おそらく尿素を用いて変性された不活性型タンパク質は、アンフォールディングされた構造を有する可能性がある。この不活性型タンパク質は、次いで、本発明のリフォールディング緩衝液でリフォールディング

50

されて、それを再活性化させることができる。ある状況下では、リフォールディング/再活性化されたタンパク質の特定の活性は、不活性/変性される前のタンパク質と比較して増大することがある。これが、「再調整する」という用語である。

【0148】

分子は、典型的には、リフォールディングが必要なアンフォールディングまたはミスフォールディングタンパク質である。しかし、あるいはまた、フォールディングされている状態で維持することを目的としたフォールディングタンパク質であってもよい。

【0149】

本発明は、少なくとも2つの状況を想定する。第1の状況は、フォールディングしようとするタンパク質がアンフォールディングされている状態、ミスフォールディングされている状態またはそれら両者の状態にある場合である。この場合、その正しいフォールディングは、本発明の方法により促進される。第2の状況は、タンパク質が既に実質的に正しくフォールディングされている状態にある場合、すなわち、その全部もしくは大部分が正しく、またはほぼ正しくフォールディングされている場合である。この場合、本発明の方法は、フォールディングされている状態を補助するようにフォールディング/アンフォールディング平衡に影響を及ぼすことによって、そのタンパク質のフォールディングされている状態を維持するのに役立つ。これによって、既に実質的に正しくフォールディングされているタンパク質が活性を喪失しないようになる。これらおよび他の結果は、タンパク質のリフォールディングを「促進する」ということに包含される。

10

【0150】

本明細書中で用いられるように、タンパク質の少なくとも一部が正しい、または目的とする二次もしくは三次構造をまだ獲得していない場合、そのタンパク質はアンフォールディングされている、とすることができる。タンパク質が少なくとも部分的に正しくない、または望ましくない二次または三次構造を獲得している場合、そのタンパク質はミスフォールディングされているとする。円二色性などのタンパク質構造を評価するための方法は、当業界では公知である。

20

【0151】

本発明のリフォールディング緩衝液は、3-ジメチルドデシルアンモニオプロパンスルホネート(N-ドデシル-N,N-ジメチル-3-アンモニオ-1-プロパンスルホネートとも呼ばれる)を含み本明細書中で「SB-12」と呼ぶ。SB-12はまた、ツィタージェント(Zwittergent) 3-12とも呼ばれる。SB-12は、Fluka AGなどの商業的供給元から入手可能である。SB-12が非常に好ましいが、SB12の他の塩、ならびにSB-12の誘導体またはSB-12に関連する分子の使用も用いることができる。いずれの理論にも拘束されるものではないが、SB-12の希釈ステップ(または一般にはSB-12の存在)により、このタンパク質にとって疎水性の環境(これはそのタンパク質の自然でのin vivo環境と類似している)が作られる、と考えられる。

30

【0152】

SB-12は界面活性剤であり、SB-12の濃度は、少なくとも約0.2%(w/v)とすべきである。この理由は、これが一般にミセル形成に必要とされる濃度であるからである。したがって、SB-12の濃度は、約0.2%~約5.0%、約0.3%~約4.0%、約0.4%~約3.0%、または約0.5%~約2.0%とすることができる。好ましくは、この濃度は、約0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.6%、0.7%、0.8%、0.9%または1.0%である。特に好ましい1つの実施形態では、0.5%のSB-12が使用される。「約」とは、好ましくは、引用される数値の+/-10%を意味するが、最も好ましくは、正確な数値を挙げる。

40

【0153】

1つの実施形態では、SB-12は精製される。通常、SB-12は、使用前に、例えばメタノール/クロロホルム(1:1)を用いてAl<sub>2</sub>O<sub>3</sub>クロマトグラフィークラム上で濃縮SB-12の溶液を通過させることにより精製できるが、いずれの適切な方法もが、SB-12の精製に使用可能である。

【0154】

50

本発明者らは、変性タンパク質の希釈は、リフォールディングの効率を最大限にするために、アルカリ性環境で行わなければならないことを見出した。好ましくは、リフォールディング緩衝液のpHは約11.0である。好ましくは、このアルカリ性環境は、エタノールアミンの使用により得られる。この好ましい実施形態では、リフォールディング緩衝液は、SB-12とエタノールアミンとを含む。通常、20mMのエタノールアミンが用いられるが、10、30、40または50mMなどの他の濃度も有用な場合もある。

【0155】

また、本発明者らは、好ましくは、このタンパク質の希釈は、塩酸グアニジン、NaCl (0.4 NaClなど) または尿素 (8 M尿素など) の存在下で行うことができ、塩酸グアニジンが好ましいことも見出した。通常、0.4M塩酸グアニジンが用いられるが、他の濃度が有用な場合もある。可溶化の際に上記の成分の1つが用いられる場合、リフォールディング段階においてその成分を再添加する必要がない場合もあることが理解されよう。しかし、最も好ましくは、本発明のタンパク質が封入体を介して作製される場合、その封入体を塩酸グアニジンで可溶化することが好ましい。そのような場合、リフォールディング緩衝液は変性剤を含む必要はなく、次にリフォールディングされた溶液の緩衝液を中性pHの0.3% SB-12 (例えばHepes、pH7.5) と交換して、フォールディングされたタンパク質を安定化させればよい。

10

【0156】

本発明者らは、FrpBがリフォールディング緩衝液中で1:10に希釈されていることが好ましいことを見出したが、1:20などの他の比率も使用可能である。リフォールディングを実施するための任意の適切な希釈度は、当業者であれば容易に採用できる。

20

【0157】

本発明の方法により処理しようとするFrpBは、典型的には、組換えFrpBを発現する宿主細胞の細胞抽出物から得られる。宿主細胞としては、大腸菌などの原核生物、酵母および昆虫細胞が挙げられる (バキュロウイルス系は非常に高レベルでタンパク質を発現できる)。宿主細胞内でのFrpBの発現は、収率をできるだけ高くするために、高レベルとする。組換えFrpBの発現についてのさらなる詳細を、以下で述べる。

【0158】

本発明者らは、本発明が、成熟FrpBタンパク質または突然変異型の成熟FrpBタンパク質をリフォールディングするのに使用された場合に最も有効であることを見出した。「成熟」とは、リーダー配列または分泌配列、プレ-もしくはプロ-もしくはプレプロ-タンパク質配列を含まないタンパク質を含むが、本方法は、そのような配列を含むタンパク質のリフォールディングにも使用可能である。慣用の精製法の際に、pQEベクター (Qiagen, Inc.) において提供され、かつGentzら, Proc. Natl. Acad. Sci., USA 86: 821-824 (1989) に記載されているようなヘキサヒスチジンペプチドまたはHAペプチドタグ (Wilsonら, Cell 37: 767 (1984)) など、精製を容易にするマーカー配列を利用することは一般的である。本発明のプロセスは、そのようなマーカー配列が存在しない場合にも使用できる。

30

【0159】

FrpBはその大部分が不溶性であり、したがって、細胞抽出物の通常は不溶性の成分 (例えば封入体) を可溶化させて、FrpBの抽出を最大限にする技法が典型的に用いられる。封入体からFrpBタンパク質を調製および抽出するため、ならびに続いてそれらを可溶化するための慣用の技法を用いることができる。そのような技法は、たとえば「Current Protocols in Protein Science」 (JA Wiley & Sons.発行) に記載されている。そうした技法は一般に、以下を含む。

40

【0160】

細胞溶解 - 封入体を遊離させるために、例えばフレンチプレスまたは超音波処理を用いる。典型的には、溶解させる前に、細胞を冷たい緩衝液 (例えばTE 緩衝液) に入れる。超音波処理は、Branson超音波処理装置を用いて行うことができる。超音波処理は、界面活性剤 (例えばBrijまたはTriton) の存在下で行うことができる。次に、細胞溶解物中の封入体を、低速遠心分離を用いてペレット化できる。細胞は、溶解させる前に、リソザイ

50

ムで前処理しうる。この前処理の目的は、洗浄ステップの際のペプチドグリカンや外膜タンパク質の混入物の除去を助けるためである。溶解させた細胞は、遠心分離により清澄化させ、上清は捨てることができる。

【0161】

封入体の洗浄 - 細胞溶解物から回収した封入体から、細胞壁や他の外膜成分の混入物を除去するため。典型的には、ペレットを、緩衝液（例えばTE緩衝液）および/または界面活性剤（例えばTriton）を含有する洗浄用緩衝液に再懸濁させる。次に、この懸濁液を再懸濁し、上清を捨てる。このプロセスは、上清が清澄になるまで繰り返すことができる。それが必要である場合、洗浄したペレットは保存のために凍結してもよい。

【0162】

洗浄したペレット中の組換えタンパク質の量は、次の基準を用いて評価することができる：(1) 1%の発現レベルは、湿潤細胞 1 g あたり約 1 mg の組換えタンパク質が存在することに相当する。(2) 洗浄したペレット中の高度に凝集した組換えタンパク質の回収率は、細胞中に最初に存在するものの約75%である。(3) 洗浄したペレットのタンパク質全体の約60%が組換えによるものである。組換えタンパク質の全量は、総タンパク質濃度を測定することにより、または洗浄したペレットをSDS-PAGEで分析してタンパク質構成成分の割合を求めることにより、直接的に求めることができる。

【0163】

タンパク質の可溶化 - 次に、抽出したタンパク質を、洗浄したペレットから抽出し、タンパク質 - タンパク質相互作用を解離させ、タンパク質をアンフォールディングさせて、それがアンフォールディングされたモノマーから構成されるようにする変性剤を用いてデフォールディングする。変性剤としては、グアニジン:HCl(例えば6Mグアニジン:HCl)および/または尿素(例えば8M尿素)が挙げられる。本発明の1つの実施形態では、可溶化には8M尿素が通常用いられる。1つの好ましい実施形態では、6Mグアニジン:HClが用いられる。残存する不溶性の物質は、典型的には超遠心分離(例えば100,000g x 1時間)により除去できる。ペレット化の後で、抽出物は凍結により保存してもよい。

【0164】

可溶化した細胞抽出物は、場合により、本発明の方法によりリフォールディング緩衝液と接触させる前に、例えば各種のアフィニティークロマトグラフィー法により部分精製してもよい。

【0165】

次に、可溶化した細胞抽出物は、本発明に係るリフォールディング緩衝液中に希釈する。典型的には、室温で終夜攪拌するが、必ずしもそうしなくてもよい。

【0166】

したがって、本発明のリフォールディング/再調整方法のための出発物質は、典型的には、尿素/塩化グアニジンなどの物質の溶液中の変性タンパク質である。あるいはまた、またはさらに、可溶性タンパク質のサンプルは、リフォールディングの前に、適切な変性剤の添加により特に変性させてもよい。

【0167】

また、本発明の方法は、分子シャペロンの使用も用いることができる。

【0168】

シャペロニンを含むシャペロンは、非酵素的手段によりタンパク質のフォールディングを促進するタンパク質であり、その際、それらは、タンパク質のリフォールディングにおいてどのような構造の化学的修飾も触媒しないが、それらの正しい構造配置を促進することによってタンパク質の正しいフォールディングを促進する。分子シャペロンは当業界で周知であり、それらの幾つかのファミリーが特性決定されている。本発明は、どのような分子シャペロン分子も用いることができ、その用語は、例えば、次の非網羅的な群から選択される分子シャペロンを含む。

【0169】

p90カルネキシン、HSPファミリー、HSP70ファミリー、DNA K、DNAJ、HSP60ファミリー

10

20

30

40

50

(GroEL)、ER-結合シャペロン、HSP90、Hsc70、sHsps; SecA; SecB、トリガー因子、ゼブラフィッシュhsp47、70および90、HSP47、GRP94、Cpn10、BiP、GRP78、C1p、FtsH、Ig不変鎖、ミトコンドリアhsp70、EBP、ミトコンドリアm-AAA、酵母Ydj1、Hsp104、ApoE、Syc、Hip、TriCファミリー、CCT、PapDならびにカルモジュリン(概説についてはW099/05163号を参照されたい)。

#### 【0170】

本発明の方法はまた、フォールダーゼ(フォールディング酵素)を利用することも可能である。一般的には、フォールダーゼは、その酵素活性によりタンパク質のフォールディングの促進に参与して、フォールディングタンパク質における結合の再構成または異性化を触媒する酵素である。したがって、それらは、分子シャペロンとは異なり、不安定または非天然の構造状態のタンパク質と結合し、結合再構成の酵素的触媒がなくても正しいフォールディングを促進する。多くのクラスのフォールダーゼが知られており、それらは動物、植物および細菌でよく見られる。それらとしては、ペプチジルプロリルイソメラーゼおよびチオール/ジスルフィドオキシドレダクターゼが挙げられる。本発明は、共有結合再構成によりタンパク質のフォールディングを促進できるフォールダーゼのいずれかを使用できる。

10

#### 【0171】

リフォールディング/再調整プロセスの最後に、適切な保存用緩衝液への透析および/または適切な保存用緩衝液への脱塩カラムの使用により、リフォールディングされたFrpBを脱塩することができる。好適な緩衝液は、25mMリン酸ナトリウム、150mM NaClおよび0.1% PEG6000 (pH7.4)を含む。

20

#### 【0172】

本発明の1つの実施形態では、尿素および塩酸グアニジンを除去した後で、緩衝液を、エタノールアミン(pH11)からツィタージェント3-12を含有するTris-HCl(pH7.2)へと交換することができる。

#### 【0173】

##### ベクター、宿主細胞、発現系

本発明は、少なくともFrpBタンパク質をコードするポリヌクレオチドを含むベクターを用いることができ、本発明の突然変異型FrpBタンパク質をコードする本発明のポリヌクレオチド、本発明のベクターを用いて遺伝子工学的に作製された宿主細胞、ならびに組換え技法によるFrpBタンパク質の作製を含むことができる。また、DNA構築物から誘導されるRNAを用いてそのようなタンパク質を作製するのに、無細胞翻訳系を用いることも可能である。

30

#### 【0174】

本発明の組換えタンパク質は、当業者に周知の方法により、発現系を含む遺伝子工学的に作製された宿主細胞から調製できる。

#### 【0175】

本発明のタンパク質の組換え作製では、宿主細胞は、本発明の発現系もしくはその一部またはポリヌクレオチドを取り込むように遺伝子工学的に作製できる。宿主細胞へのポリヌクレオチドの導入は、Davisら、BASIC METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, (1986)およびSambrookら、MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)などの多くの標準的な実験マニュアルに記載されている方法、例えばリン酸カルシウムトランスフェクション、DEAE-デキストラン媒介トランスフェクション、トランスフェクション(transfection)、マイクロインジェクション、カチオン脂質媒介トランスフェクション、エレクトロポレーション、形質導入、スクレープローディング、弾丸導入(ballistic introduction)および感染により実施できる。

40

#### 【0176】

適切な宿主の代表的な例としては、ストレプトコッカス属(streptococci)、スタフィロコッカス属(staphylococci)、エンテロコッカス属(enterococci)、大腸菌(E. coli)

50

i)、ストレプトマイセス属(streptomyces)、シアノバクテリア(cyanobacteria)、バシルス・サブチリス(Bacillus subtilis)、モラクセラ・カタラーリス(Moraxella catarrhalis)、ヘモフィルス・インフルエンザおよびナイセリア・メニンギチジスの細胞などの細菌細胞；酵母、クレイベロミセス(Kluveromyces)、サッカロミセス(Saccharomyces)、バシジオミセト(basidiomycete)、カンジダ・アルビカンス(Candida albicans)およびアスペルギルス(Aspergillus)の細胞などの真菌細胞；ショウジョウバエ(Drosophila) S2およびハスモンヨトウ(Spodoptera) Sf9などの昆虫細胞；CHO、COS、HeLa、C127、3T3、BHK、293、CV-1およびBowesメラノーマ細胞などの動物細胞；ならびに、裸子植物または被子植物の細胞などの植物細胞が挙げられる。

#### 【0177】

本発明のタンパク質の作製には、非常に多種多様な発現系を用いることができる。そのようなベクターとしては、特に、染色体由来、エピソーム由来、およびウイルス由来のベクター〔例えば、細菌性プラスミド、バクテリオファージ、トランスポゾン、酵母エピソーム、挿入エレメント、酵母染色体エレメント、ウイルス(例えば、バキュロウイルス、パポウイルス(SV40など)、ワクシニアウイルス、アデノウイルス、トリポックスウイルス、仮性狂犬病ウイルス、ピコルナウイルス、レトロウイルスおよびアルファウイルス)に由来するベクター〕、ならびに、それらの組合せに由来するベクター〔例えば、プラスミドとコスミドやファジミドなどのバクテリオファージ遺伝子エレメントに由来するもの〕が挙げられる。発現系構築物は、発現を調節したり発現を起こさせる調節領域を含むことができる。一般に、ポリヌクレオチドの維持、増殖もしくは発現、ならびに/または宿主内でのタンパク質の発現に適するいずれの系またはベクターも、これに関する発現に使用できる。適切なDNA配列は、例えばSambrookら、MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL(前掲)で述べられているような種々の周知でルーチンな技法のいずれかにより、この発現系に挿入できる。

#### 【0178】

翻訳したタンパク質を小胞体の内腔、ペリプラズム腔または細胞外環境へと分泌させるための真核生物における組換え発現系では、適切な分泌シグナルをその発現タンパク質に取り込むことができる。これらのシグナルはタンパク質に対して内因性であってもよいし、あるいは、それらは異種シグナルであってもよい。本発明のタンパク質は、組換え細胞培養物から、本発明の方法により回収および精製することができる。

#### 【0179】

##### 抗体

本発明のタンパク質は、そのようなタンパク質に対して免疫特異的な抗体を産生させるための免疫原として使用できる。

#### 【0180】

本発明の特定の好ましい実施形態では、本発明のFrpBタンパク質に対する抗体が提供される。

#### 【0181】

本発明のタンパク質に対して作製される抗体は、本発明のタンパク質またはそれらのエピトープ保有断片、その一方または両者の類似体を、ルーチンな経路を用いて動物(好ましくはヒト以外)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の調製では、連続細胞系培養によって産生される抗体を提供する、当業界で公知の任意の技法を用いることができる。例としては、Kohler, G.およびMilstein, C., Nature 256: 495-497 (1975); Kozborら, Immunology Today 4: 72 (1983); Coleら, pg. 77-96 in MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, Alan R. Liss, Inc. (1985)におけるものなどの各種の技法が挙げられる。

#### 【0182】

一本鎖抗体を作製するための技法(米国特許第4,946,778号)を用いて、本発明のタンパク質に対する一本鎖抗体を作製することができる。また、トランスジェニックマウスまたは他の生物もしくは動物(例えば他の哺乳動物)を用いて、本発明のタンパク質に対し

10

20

30

40

50

て免疫特異的なヒト化抗体を発現させることも可能である。

【0183】

あるいはまた、ファージ提示法を用いて、抗FrpBを有することに関してスクリーニングされたヒトから得たリンパ球のPCR増幅したv遺伝子のレパートリーから、または天然のライブラリー (McCaffertyら, (1990), *Nature* 348, 552-554; Marksら, (1992) *Biotechnology* 10, 779-783) から、本発明のタンパク質に対する結合活性を有する抗体遺伝子を選定することができる。これらの抗体の親和性はまた、例えば鎖シャッフリング (Clacksonら, (1991) *Nature* 352: 628) により向上させることができる。

【0184】

上記で記載した抗体は、本発明のFrpBタンパク質を発現するクローンの単離または同定に用いて、例えばアフィニティークロマトグラフィーによりそれらのタンパク質またはポリヌクレオチドを精製することができる。 10

【0185】

したがって、特に、本発明のFrpBタンパク質に対する抗体は、感染、特に細菌感染の治療に用いることができる。

【0186】

好ましくは、この抗体またはそれらの変形体は、個体において免疫原性が低くなるように修飾される。例えば、個体がヒトである場合、その抗体は、最も好ましくは、「ヒト化」することができ、その場合、ハイブリドーマ由来抗体の相補性決定領域は、例えばJonesら (1986), *Nature* 321, 522-525またはTempestら, (1991) *Biotechnology* 9, 266-273 20  
に記載されているように、ヒトモノクローナル抗体に移植されている。

【0187】

本発明のタンパク質は、レシピエントに投与でき、そのレシピエントは、次いで、特定のワクチンからのチャレンジに应答して産生される免疫グロブリンの供給源となる。このように処置された被験体は、慣用の血漿分画法により高度免疫グロブリンが得られる血漿を提供する。この高度免疫グロブリンは、別の被験体に投与して、ナイセリア属感染に対する抵抗性を付与したり、ナイセリア属感染を治療する。本発明の高度免疫グロブリンは、乳児、免疫不全症の個体における、または治療が必要ではあるが個体がワクチンに应答して抗体を産生させる時間がない場合の、ナイセリア属疾患の治療または予防に特に有用である。 30

【0188】

本発明のもう1つの態様は、本発明の医薬組成物に対して反応性のモノクローナル抗体 (またはそのフラグメント; 好ましくはヒトまたはヒト化フラグメント) を含む医薬組成物であり、これは、グラム陰性細菌、好ましくはナイセリア属、さらに好ましくはナイセリア・メニンギチジスもしくはナイセリア・ゴノローエ、最も好ましくはナイセリア・メニンギチジスの血清群Bによる感染の治療または予防に使用可能である。

【0189】

そのような医薬組成物は、本発明の2種以上の抗体に対して特異性を有する任意のクラスの免疫グロブリン全体 (例えばIgG、IgM、IgA、IgDもしくはIgE)、キメラ抗体またはハイブリッド抗体とすることができるモノクローナル抗体を含む。それらはまた、ハイブリッドフラグメントを含む、F(ab')<sub>2</sub>、Fab'、Fab、Fvなどのフラグメントとしてもよい。 40

【0190】

モノクローナル抗体の作製方法は、当業界では周知であり、脾細胞とメラノーマ細胞との融合を含むことができる (KohlerおよびMilstein 1975 *Nature* 256; 495; *Antibodies - a laboratory manual* Harlow and Lane 1988)。あるいはまた、モノクローナルFvフラグメントは、適切なファージ提示ライブラリーをスクリーニングすることにより得ることができる (Vaughan TJら, 1998 *Nature Biotechnology* 16; 535)。モノクローナル抗体は、公知の方法によりヒト化または部分ヒト化することができる。

【0191】

### アンタゴニストおよびアゴニスト - アッセイおよび分子

本発明のリフォルディングタンパク質はまた、例えば無細胞調製物、化学的ライブラリーおよび天然生成物混合物中の小分子基質とリガンドとの結合を評価するのにも使用できる。これらの基質およびリガンドは、天然の基質およびリガンドであってもよいし、あるいは、構造的もしくは機能的ミメティックであってもよい。例えば、Coliganら, Current Protocols in Immunology 1(2): Chapter 5 (1991)を参照されたい。

#### 【0192】

スクリーニング方法は、候補化合物とタンパク質との結合を単に測定するだけでよい。あるいはまた、スクリーニング方法は、標識した競合物質との競合を含むものとしてもよい。スクリーニング方法は、単に、候補化合物を、本発明のタンパク質を含む溶液と混合して混合物を形成し、その混合物中のFrpBタンパク質の活性を測定し、混合物のFrpBタンパク質の活性を標準物質と比較するステップを含むものとして行うことができる。

10

#### 【0193】

本発明のタンパク質と結合および/または相互作用するポリヌクレオチド、タンパク質および抗体はまた、細胞内でのmRNAおよび/またはタンパク質の産生に対する添加化合物の影響を検出するためのスクリーニング方法を構成するのにも使用できる。例えば、ELISAアッセイは、モノクローナル抗体およびポリクローナル抗体を用いて、当業界で公知の標準的な方法により、タンパク質の分泌レベルまたは細胞結合レベルを測定する用に構成できる。これは、適切に操作された細胞または組織からタンパク質の産生を抑制または増大させる物質（それぞれ、アンタゴニストまたはアゴニストと呼ばれる）を見出すのに使用できる。

20

#### 【0194】

本発明はまた、FrpBタンパク質およびポリヌクレオチドの作用を増大させるか（アゴニスト）または阻止する（アンタゴニスト）化合物、特に静菌性かつ/または殺菌性である化合物を同定するための、化合物のスクリーニング方法を提供する。このスクリーニング方法は、ハイスループット技法を含むことができる。例えば、アゴニストまたはアンタゴニストをスクリーニングするために、FrpBタンパク質およびそのようなタンパク質の標識した基質もしくはリガンドを含む合成反応混合物を、FrpBのアゴニストまたはアンタゴニストである可能性がある候補化合物の不在下または存在下でインキュベートする。その候補化合物の、FrpBタンパク質を作動（アゴナイズ）するまたは中和（アンタゴナイズ）する能力は、標識したリガンドの結合の低下またはそのような基質からの生成物の生成の低下において反映される。無駄に、すなわち、FrpBタンパク質の作用を誘導することなく結合する分子は、良好なアンタゴニストである可能性が最も高い。これに関して有用となり得るリポーター系としては、生成物に変換される比色標識基質、FrpBタンパク質の活性の変化に応答性であるリポーター遺伝子、および当業界で公知の結合アッセイが挙げられるが、それらに限定されない。

30

#### 【0195】

FrpBアゴニストのアッセイの別の例は、競合阻害アッセイに適切な条件下で、FrpBと可能性のあるアゴニストをFrpB結合分子、組換えFrpB結合分子、天然の基質もしくはリガンド、または基質もしくはリガンドミメティックと組み合わせる競合アッセイである。FrpBは、例えば放射性または比色性化合物により標識して、結合分子へ結合した、または生成物へと変換されたFrpB分子の数を正確に測定して、その可能性のあるアンタゴニストの有効性を評価できるようにしてもよい。

40

#### 【0196】

可能性のあるアンタゴニストとしては、特に、本発明のポリヌクレオチドおよび/またはタンパク質に結合して、その活性または発現を抑制または喪失させる小有機分子、ペプチド、タンパク質、および抗体が挙げられる。また、可能性のあるアンタゴニストは、結合分子などの結合分子上の同一部位に結合する小有機分子、ペプチド、タンパク質（例えば密接に関連しているタンパク質）または抗体とすることも可能である。

#### 【0197】

50

可能性のあるアンタゴニストとしては、タンパク質の結合部位に結合し、その結合部位を占領して細胞性結合分子への結合を阻止して、正常な生物学的活性が阻害されるようにする小分子が挙げられる。小分子の例としては、小有機分子、ペプチドもしくはペプチド様分子が挙げられるが、それらに限定されない。他の可能性のあるアンタゴニストとしては、アンチセンス分子が挙げられる（これらの分子の説明については、Okano, J. Neurochem. 56: 560 (1991); OLIGODEOXYNUCLEOTIDES AS ANTISENSE INHIBITORS OF GENE EXPRESSION, CRC Press, Boca Raton, FL (1988)を参照されたい）。好ましい可能性のあるアンタゴニストとしては、FrpBに関連する化合物およびFrpBの変形体が挙げられる。

#### 【0198】

また、本発明は、本発明のタンパク質、ポリヌクレオチド、アゴニストまたはアンタゴニストの、感染の後遺症に關与し得る、病原体と真核生物（好ましくは哺乳動物）宿主との初期の物理的相互作用を干渉するための使用を提供する。特に、本発明の分子は、細菌（特にグラム陽性および/またはグラム陰性細菌）の、留置装置上の真核生物（好ましくは哺乳動物）の細胞外マトリックスタンパク質または創傷における細胞外マトリックスタンパク質への付着の抑制において、真核生物（好ましくは哺乳動物）の細胞外マトリックスタンパク質と、組織損傷を仲介する細菌性FrpBタンパク質との細菌付着を阻止するため、かつ/あるいは、留置装置の埋込みまたは他の外科的技法以外により開始される感染の正常な病原進行を阻止するために使用できる。

#### 【0199】

本発明のさらに別の態様によれば、FrpBのアゴニストおよびアンタゴニスト、好ましくは静菌性もしくは殺菌性のアゴニストおよびアンタゴニストが提供される。

#### 【0200】

本発明のアンタゴニストおよびアゴニストは、例えば、疾患の予防、阻止および/または治療に用いることができる。

#### 【0201】

### ワクチン

本発明の別の態様は、個体、特に哺乳動物、好ましくはヒトにおいて、免疫学的応答を誘導する方法であって、その個体に本発明のFrpBタンパク質またはその断片もしくは変形体を接種して、抗体および/またはT細胞の免疫応答を適切に引き起こして、その個体を感染、特に細菌感染、最も特にはナイセリア・メニンギチジス感染から防御（または治療）することを含む方法に関する。また、そのような免疫学的応答が細菌複製を示す方法も提供される。

#### 【0202】

本発明のさらなる態様は、その体内で免疫学的応答を誘導することができる個体、好ましくはヒトに導入されると、そのような個体内で本発明のFrpBタンパク質に対する免疫学的応答を誘導する免疫学的組成物に関するものであり、そこにおいて、この組成物は、本発明の組換えFrpBを含む。この免疫学的応答は、治療目的または予防目的で使用することができ、抗体免疫性および/または細胞免疫性（例えばCTLまたはCD4+ T細胞から惹起させた細胞免疫性）の形態を採ることができる。

#### 【0203】

FrpBタンパク質、その変形体または断片は、それ自体は抗体を産生させても産生させなくてよいが、抗原性および/または免疫原性特性（好ましくは防御特性）を有する融合型または修飾型タンパク質を産生することができ、場合によっては、FrpBを安定化するか、それを容易に精製されるようにすることができる補助タンパク質（co-protein）または化学的部分と融合させることができる。この補助タンパク質は、タンパク質を投与した生物の免疫系の全身刺激をもたらす、という意味で、アジュバントとして作用することができる。

#### 【0204】

また、本発明により、本発明のタンパク質と、Sato, Y.ら Science 273: 352 (1996)に記載されているような免疫活性化DNA配列とを含む組成物、特にワクチン組成物、および

10

20

30

40

50

方法が提供される。

【0205】

したがって、本発明はまた、本発明の免疫原性タンパク質またはその断片もしくは変形体を、適切な担体（たとえば薬学的に許容される担体）と共に含むワクチン製剤を含む。このタンパク質は、胃で分解される可能性があるため、それぞれは、例えば皮下、筋肉内、静脈内または皮内投与を含む非経口投与することが好ましい。非経口投与に適する製剤は、酸化防止剤、緩衝剤、静菌性化合物、および製剤を個体の体液（好ましくは血液）と等張にする溶質を含んでいてもよい水性および非水性の無菌注射用液；ならびに懸濁剤または増粘剤を含んでいてもよい水性および非水性の無菌懸濁液を含む。製剤は、単回投与容器または複数回投与容器（例えば密閉したアンプルおよびバイアル）に入れて提供することができ、使用直前に無菌の液体担体を添加するだけでよい凍結乾燥条件で保存できる。この製剤は、粘膜（例えば鼻腔内）投与してもよい。

10

【0206】

本発明のワクチン製剤はまた、製剤の免疫原性を増大させるためのアジュバント系を含むことができる。典型的には、リン酸アルミニウムまたは水酸化アルミニウムを用いることができる。好ましくは、そのアジュバント系は、主にTH1型の応答を引き起こす。

【0207】

免疫応答は、2つの極端なカテゴリー、つまり体液性免疫応答または細胞性免疫応答（伝統的に、防御のための抗体によるエフェクター機能および細胞によるエフェクター機構によりそれぞれ特徴付けられる）に大きく区別することができる。これらの応答のカテゴリーは、TH1型応答（細胞性応答）およびTH2型免疫応答（体液性応答）と名付けられている。

20

【0208】

極端なTH1型免疫応答は、抗原特異的なハプロタイプ拘束性細胞傷害性Tリンパ球の産生およびナチュラルキラー細胞応答によって特徴付けることができる。マウスにおいて、TH1型応答はしばしばIgG2aサブタイプの抗体の生成により特徴付けられるが、ヒトにおいては、これらはIgG1型抗体に相当する。TH2型免疫応答は、マウスにおけるIgG1、IgAおよびIgMを含む広範囲の免疫グロブリンアイソタイプの生成によって特徴付けられる。

【0209】

これら2つのタイプの免疫応答の生起の背後にある駆動力はサイトカインであると考えられる。高レベルのTH1型サイトカインは、所与の抗原に対する細胞性免疫応答の誘導を促進する傾向があるが、高レベルのTH2型サイトカインは、抗原に対する体液性免疫応答の誘導を促進する傾向がある。

30

【0210】

TH1型およびTH2型免疫応答の区別は絶対的なものではない。現実には、個人は、TH1型優位またはTH2型優位といわれる免疫応答を保持する。しかし、MosmannおよびCoffman (Mosmann, T.R. and Coffman, R.L. (1989) TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. Annual Review of Immunology, 7, p145-173)によりマウスCD4+ve T細胞クローンの場合に記載された観点で、サイトカインのファミリーを考慮することがしばしば便利である。伝統的に、TH1型応答は、Tリンパ球によるINF- $\gamma$  およびIL-2サイトカインの産生と関連付けられている。TH1型免疫応答の誘導としばしば直接関連付けられる他のサイトカインは、IL-12等のT細胞によって産生されない。これに対し、TH2型応答は、IL-4、IL-5、IL-6およびIL-13の分泌と関連付けられている。

40

【0211】

特定のワクチンアジュバントはTH1型もしくはTH2型のいずれかのサイトカイン応答の刺激に特に適していることが分かっている。伝統的に、ワクチン接種後または感染後の免疫応答のTH1:TH2バランスを最も良く示す指標としては、抗原で再刺激した後にin vitroでのTリンパ球によるTH1もしくはTH2サイトカインの産生を直接測定すること、および/または抗原特異的抗体反応のIgG1:IgG2a比を測定すること、が挙げられる。

50

## 【0212】

このように、TH1型アジュバントは、単離されたT細胞集団を、in vitroにて抗原で再刺激したときに高レベルのTH1型サイトカインを産生するよう選択的に刺激し、CD8+ 細胞傷害性Tリンパ球と、TH1型アイソタイプに関連付けられる抗原特異的免疫グロブリン反応の両方の発生を促進するものである。

## 【0213】

TH1細胞応答を優先的に刺激することができるアジュバントは、国際特許出願公開番号第W094/00153号および第W095/17209号に記載されている。

## 【0214】

3-0-脱アシル化モノホスホリルリピドA (3 De-0-acylated monophosphoryl lipid A; 3 D-MPL) は、このようなアジュバントの1つであり、好ましいものである。これは、GB2220211 (Ribi) により公知である。化学的にはこれは3-0-脱アシル化モノホスホリルリピドAと4-、5-もしくは6-アシル化鎖との混合物であり、Ribi Immunochem, Montanaにより製造されている。3-0-脱アシル化モノホスホリルリピドAの好適な形態は、欧州特許第0 689 454 B1 (SmithKline Beecham Biologicals SA) に開示されている。あるいは、MPL等の他の解毒化 (detoxified) 細菌LPS分子を使用することもできる。

## 【0215】

好ましくは、3D-MPLの粒子は、0.22ミクロンのメンブレンを通して滅菌濾過するのに十分な程度小さい (欧州特許第0 689 454号)。3D-MPLは、1用量あたり、10 µg ~ 100 µg、好ましくは25 ~ 50 µgの範囲で存在する (この場合、抗原は典型的には1用量あたり2 ~ 50 µgの範囲で存在する)。

## 【0216】

好適なアジュバントは、キラヤ (Quillaja Saponaria Molina) の樹皮から得られるHPLCで精製した非毒性画分であるQS21を含む。場合により、これを3-0-脱アシル化モノホスホリルリピドA (3D-MDL) または他の非毒性LPS誘導体と混合してもよく、場合により担体も一緒に混合してもよい。

## 【0217】

QS21の製造方法は米国特許第5,057,540号に記載されている。

## 【0218】

QS21を含む非反応原性 (non-reactogenic) アジュバント製剤は、過去に記載されている (国際公開第W096/33739号)。QS21およびコレステロールを含むこのような製剤は、抗原と一緒に製剤化したときに、優れたTH1刺激性アジュバントであることが分かっている。

## 【0219】

TH1細胞応答の優先的な刺激因子である更なるアジュバントとしては、免疫調節性オリゴヌクレオチド (例えば国際公開第W096/02555号に開示されたような非メチル化 (unmethylated) CpG配列) が挙げられる。

## 【0220】

上記に記載したもの等の異なるTH1刺激性アジュバントを組合せたものも、TH1細胞応答の優先的な刺激因子であるアジュバントを提供するものと考えられる。例えば、QS21は、3D-MPLと一緒に製剤化することができる。QS21 : 3D-MPLの比率は、典型的には1 : 10 ~ 10 : 1程度、好ましくは1 : 5 ~ 5 : 1程度、およびしばしば実質的に1 : 1である。最適な相乗効果のために好ましい範囲は、2.5 : 1 ~ 1 : 1 (3D-MPL : QS21) である。

## 【0221】

好ましくは、本発明のワクチン組成物中には担体も存在する。担体は水中油滴型エマルションであってもよいし、またはリン酸アルミニウムや水酸化アルミニウム等のアルミニウム塩であってもよい。

## 【0222】

好適な水中油滴型エマルションは、スクアレン、トコフェロールおよびTween 80等の代謝可能な油を含む。特に好適な態様において、本発明のワクチン組成物中の抗原は、こ

のようなエマルジョン中でQS21および3D-MPLと混合される。さらに、水中油滴型エマルジョンは、スパン85 (span 85) および/またはレシチンおよび/またはトリカプリリン (tricaprylin) を含み得る。

#### 【0223】

典型的には、ヒト投与の場合は、QS21および3D-MPLはワクチン中に1用量あたり1 $\mu$ g~200 $\mu$ gの範囲(例えば、10~100 $\mu$ g、好ましくは10 $\mu$ g~50 $\mu$ g)で存在する。典型的には、この油滴含有水は2~10%のスクアレン、2~10%のトコフェロール、および0.3~3%のTween 80を含む。好ましくは、スクアレン: トコフェロールの比率は、より安定なエマルジョンを提供するように、1以下である。スパン85 (span 85) も1%のレベルで存在し得る。幾つかのケースでは、本発明のワクチンは、安定化剤をさらに含むことが有利である。

10

#### 【0224】

非毒性水中油滴型エマルジョンは、好ましくは水性担体中に非毒性油(例えばスクワランやスクアレン等)、乳化剤(例えばTween80等)を含む。水性担体は例えばリン酸緩衝生理食塩水であってもよい。

#### 【0225】

水中油滴型エマルジョン中にQS21、3D-MPLおよびトコフェロールを含む特に効力の高いアジュバント製剤は、国際公開第W095/17210号に記載されている。

#### 【0226】

本発明はまた、本発明のワクチン製剤と他の抗原(特に癌、自己免疫疾患および関連する症状に有用な抗原)を組み合わせて含む多価ワクチン組成物を提供する。そのような多価ワクチン組成物は、前述したTH-1誘導型アジュバントを含みうる。

20

#### 【0227】

#### サブユニット組成物

本発明の組成物はサブユニット組成物の形態でありうる。本発明のFrpBタンパク質(突然変異型であってもなくてもよい)は、フォールディング立体配置のものであり、好ましくはサブユニットワクチンの形態である。サブユニット組成物は、抗原性組成物を生成するために成分を混合する前には、成分が単離され少なくとも50%、好ましくは少なくとも60%、70%、80%、90%の純度まで精製されている組成物である。

#### 【0228】

サブユニット組成物は水溶性タンパク質の水溶液を含みうる。それらは、該抗原の疎水性部分を可溶化するために界面活性剤、好ましくは非イオン性、両性イオン性またはイオン性界面活性剤を含みうる。脂質膜を横断する構造を有する抗原の提示を可能にするリポソーム構造が形成されよう、それらは脂質を含みうる。組成物についてのさらなる詳細を以下に示す。

30

#### 【0229】

#### 外膜小胞調製物

本発明の組成物はまた、外膜小胞調製物の形態(特に本発明の突然変異FrpBタンパク質を含む場合)であってもよい。ナイセリア・メニンギチジス血清群B (menB) は、外膜ブレブを、工業的規模でのその製造を可能にするのに十分な量で排出する。外膜小胞は、細菌細胞の界面活性剤抽出の方法により調製することが可能である(例えば、EP 11243号を参照されたい)。

40

#### 【0230】

本発明の免疫原性組成物は、組換えによりアップレギュレーションされた少なくとも2つの抗原を有する外膜小胞調製物を含みうる。そのような外膜小胞調製物においてアップレギュレーションされる抗原の具体例には、本発明のFrpBタンパク質に加えて、NspA、Hsf、Hap、OMP85、TbpA(高)、TbpA(低)、LbpA、TbpB、LbpB、PilQおよびPidAが含まれる。場合により、そのような調製物はLPS免疫型L2およびLPS免疫型L3のうち的一方または両方をも含むであろう。

#### 【0231】

50

ナイセリア細菌株からのブレブ調製物の製造は、当業者によく知られた方法のいずれかにより達成されうる。好ましくは、欧州特許301992号、米国特許第5,597,572号、欧州特許11243号または米国特許第4,271,147号、Frederiksonら (NIPH Annals [1991], 14:67-80)、Zollingerら (J. Clin. Invest. [1979], 63:836-848)、Saundersら (Infect. Immun. [1999], 67:113-119)、Drabickら (Vaccine [2000], 18:160-172) またはW0 01/09350号(実施例8)に開示されている方法を用いる。一般には、OMVを界面活性剤、好ましくはデオキシコラートにより抽出する。所望により、核酸を酵素的に除去することが可能である。精製は、超遠心および場合によってはそれに続くサイズ排除クロマトグラフィーにより達成される。本発明の、2以上の異なるブレブを含める場合には、それらを単一の容器内に一緒にして本発明の多価調製物を形成させることが可能である(但し、本発明の異なるブレブが、宿主に同時に[1回の通院で]投与される別々の容器内の別々の組成物である場合にも、その調製物は多価であるとみなされる)。OMV調製物は、通常、0.2 $\mu$ mフィルターで濾過滅菌し、好ましくは、該ブレブ調製物を安定化することが知られているショ糖溶液(例えば、3%)中で保存する。

10

20

30

40

50

#### 【0232】

外膜小胞調製物中のタンパク質のアップレギュレーションは、OMV調製物が由来するナイセリア株内への遺伝子の過剰コピーの挿入により達成されうる。あるいは、遺伝子のプロモーターを、OMV調製物が由来するナイセリア株における、より強力なプロモーターで置換することが可能である。そのような技術はW001/09350号に記載されている。遺伝子の追加コピーを導入する場合、過剰発現のために付加された非天然強力プロモーターを有し、タンパク質のアップレギュレーションは、OMV中に存在するタンパク質のレベルを、未改変ナイセリア・メニンギチジス(例えば、株H44/76)に由来するOMV中に存在するタンパク質のレベルよりも上昇させる。好ましくは、該レベルは1.5、2、3、4、5、7、10または20倍高くなる。

#### 【0233】

LPSがOMV中の追加的抗原であると意図される場合には、好ましくは、結合LPSを高レベルで維持するが、特に毒性であり不十分に結合したLPSは除去するようなOMC製造方法において、低濃度の抽出用界面活性剤(例えば、デオキシコラートまたはDOC)を使用するプロトコルを用いる。使用するDOCの濃度は、好ましくは0~0.3% DOC、より好ましくは0.05~0.2% DOC、最も好ましくはおよそ0.1% DOCである。

#### 【0234】

「強力なプロモーター配列」は、目的の抗原をコードする遺伝子の転写を増強する調節制御要素を意味する。

#### 【0235】

「発現のアップレギュレーション」は、未改変(すなわち、天然に存在する)ブレブの発現に比べて、目的の抗原の発現を増強するための任意の手段を意味する。「アップレギュレーション」の量は個々の関心抗原に応じて様々となるが、ブレブの膜の完全性を破壊する量を超えないと理解される。抗原のアップレギュレーションは、未改変ブレブの発現より少なくとも10%高い発現を意味する。好ましくは、それは少なくとも50%高い。より好ましくは、それは少なくとも100%(2倍)高い。その代わりにまたはそれに加えて、発現のアップレギュレーションは、特にFrpB、TbpA、TbpB、LbpAおよびLbpBの場合には、代謝性または栄養性変化に対して発現を非条件付(non-conditional)にすることを意味する。一般的に、FrpBがブレブにおいて過剰発現される場合には、これはプロモーター由来の調節配列を除去することにより、または強力な非調節プロモーター(PorAなど)とプロモーターを置き換えることにより行いうる。

#### 【0236】

再び明瞭化の目的において、「該抗原の産生量を減少させるために細菌株を操作する」またはダウンレギュレーションは、未改変(すなわち、天然に存在するブレブ)の発現と比べて、目的の抗原の発現(または機能的遺伝子産物の発現)を減少させるための任意の手段を意味し、好ましくは、発現が未改変ブレブより少なくとも10%低くなるよう、欠失

により行う。好ましくは、それは少なくとも50%低く、最も好ましくは全く生じない。ダウンレギュレーションされるタンパク質が酵素または機能的タンパク質である場合には、該ダウンレギュレーションは、酵素活性または機能活性において10%、20%、50%、80%または好ましくは100%の減少が得られるよう1以上の突然変異を導入することにより達成することができる。

#### 【0237】

ナイセリアタンパク質の発現をモジュレーションするのに必要な操作工程は、当業者に公知の種々の方法により行うことが可能である。例えば、配列（例えば、プロモーターまたはオープンリーディングフレーム）を挿入することが可能であり、トランスポゾン挿入の技術によりプロモーター/遺伝子を破壊することが可能である。例えば、遺伝子の発現をアップレギュレーションするために、トランスポゾンを介して、該遺伝子の開始コドンの上流2kbまで（より好ましくは200~600bp上流、最も好ましくは約400bp上流）に、強力なプロモーターを挿入することが可能であろう。点突然変異または欠失を（特に、遺伝子の発現をダウンレギュレーションするために）利用することも可能である。

10

#### 【0238】

しかし、そのような方法は非常に不安定であり不確実でありうるため、相同組換え事象を介して該操作工程を行うことが好ましい。好ましくは、該事象は、細菌染色体上の少なくとも30ヌクレオチドの配列（組換え発生領域）と、該株内で形質転換されるベクター上の少なくとも30ヌクレオチドの配列（もう1つの組換え発生領域）との間で生じる。好ましくは、該領域は40~1000ヌクレオチド、より好ましくは100~800ヌクレオチド、最も好ましくは500ヌクレオチドである。これらの組換え発生領域は、高度にストリンジェントな条件下で互いにハイブリダイズしうるのに十分な程度に類似しているべきである。

20

#### 【0239】

本明細書に記載の遺伝子改変事象（例えば、組換え事象およびナイセリアゲノム内への更なる遺伝子配列の導入による遺伝子のアップレギュレーションまたはダウンレギュレーション）を用いるための方法はW001/09350に記載されている。ナイセリア内に組込まれうる典型的な強力なプロモーターとしては、porA、porB、IgtF、Opa、p110、IstおよびhpuA Bが挙げられる。PorAおよびPorBは、強力な構成性プロモーターとして好ましい。PorBプロモーター活性は、porBの開始コドンの上流のヌクレオチド-1~-250に対応する断片中に含まれることが確認されている。

30

#### 【0240】

##### 可変性および非防御免疫優性抗原のダウンレギュレーション/除去

多数の表面抗原は細菌株間で可変性であり、その結果、密接に関連した株の、限られた組に対してのみ、防御性であるに過ぎない。本発明の1つの態様は、他のタンパク質の発現が減少した、あるいは好ましくは、可変性表面タンパク質をコードする遺伝子が欠失した、本発明の外膜小胞を含む。そのような欠失により生じる細菌株が産生するブレブは、ワクチンとして投与されると、保存タンパク質（外膜上に保持されている）によってもたらされるワクチン被接種者の免疫系への影響がより大きいため、種々の株に対する交差反応性をより強く示す。本発明のブレブ免疫原性組成物においてダウンレギュレーションされうるナイセリアにおけるそのような可変性抗原の具体例には、PorA、PorB、Opaが含まれる。

40

#### 【0241】

ダウンレギュレーションされうるまたはスイッチが切られうる他のタイプの遺伝子は、*in vivo*において、該細菌により容易にスイッチが入れられうる（発現されうる）または切られうる遺伝子である。そのような遺伝子にコードされる外膜タンパク質は該細菌上に必ずしも存在するわけではないため、該ブレブ調製物中のそのようなタンパク質の存在は、前記の理由により、ワクチンの有効性に悪影響を及ぼしうる。ダウンレギュレーションまたは欠失させるべき好ましい一例は、ナイセリアOpcタンパク質である。感染生物は容易にOpc<sup>-</sup>となりうるため、Opc含有ブレブワクチンにより誘導される抗Opc免疫は、限られた防御能しか有さないであろう。

50

## 【0242】

例えば、これらの可変性または非防御性遺伝子は発現においてダウンレギュレーションされたり、または該遺伝子のスイッチが一時的に切られうる。これは、プレブの外表面上に少量で存在するより良好な抗原に、免疫系を集中させるという利点を有する。ダウンレギュレーションはまた、前記外膜タンパク質の表面露出可変性免疫優性ループを改変または欠失させて、生じる外膜タンパク質の免疫優性の度を低下させうることも意味する。

## 【0243】

発現のダウンレギュレーションのための方法はW001/09350に開示されている。本発明のプレブ免疫原性組成物においてダウンレギュレーションされるべきタンパク質の好ましい組合せには、PorAおよびOpA; PorAおよびOpC; OpAおよびOpC; PorAおよびOpAおよびOpCが含まれる。

10

## 【0244】

LPSの解毒

本発明の免疫原性組成物中のプレブは、W001/09350に開示されているLPSの解毒方法により解毒されうる。特に、本発明のLPSの解毒方法は、W001/09350に開示されているhtrBおよび/またはmsbB酵素のダウンレギュレーションを含む。そのような方法は、好ましくは、低レベルのDOC、好ましくは0~0.3% DOC、より好ましくは0.05%~0.2% DOC、最も好ましくはおよそ0.1% DOCを使用するプレブ抽出の方法と組合せる。

## 【0245】

交差反応性多糖

被包性グラム陰性細菌からの細菌外膜プレブの単離は、しばしば、莢膜多糖の同時精製をもたらす。場合によっては、この「混入」物質が有用となる。なぜなら、多糖は、他のプレブ成分によりもたらされる免疫応答を増強しうるからである。しかし、場合によっては、細菌プレブ調製物中の混入多糖物質の存在は、ワクチンにおけるプレブの使用に有害となる。例えば、少なくともナイセリア・メニンギチジス血清群Bの場合には、莢膜多糖は防御免疫を付与せず、ヒトにおいては有害な自己免疫応答を誘導しやすいことが示されている。したがって、プレブの製造のために、莢膜多糖を含有しないように操作された細菌株から本発明の外膜小胞を単離することが可能である。したがって、該プレブはヒトにおける使用に適しているであろう。そのようなプレブ調製物の特に好ましい一例は、莢膜多糖を欠くナイセリア・メニンギチジス血清群Bからのものである。

20

30

## 【0246】

これは、莢膜の生合成および/または輸送に必要な遺伝子が損なわれた改変プレブ産生株を使用することにより達成されうる。莢膜多糖の生合成または輸送をコードする遺伝子の不活性化は、制御領域およびコード領域のうち的一方または両方の突然変異(点突然変異、欠失または挿入)により(好ましくは、前記の相同組換え技術を用いる)、あるいはそのような遺伝子の酵素機能を低下させる任意の他の方法により達成されうる。さらに、莢膜生合成遺伝子の不活性化は、アンチセンス過剰発現またはトランスポゾン突然変異誘発によっても達成されうる。好ましい方法は、多糖の生合成および輸送に必要なナイセリア・メニンギチジス(*Neisseria meningitidis*) cps遺伝子の一部または全部の欠失である。この目的には、cpsCAD (+ galE)遺伝子クラスターを欠失させる突然変異を挿入するために、置換プラスミドpMF121(Froshら 1990, Mol. Microbiol. 4:1215-1218に記載されている)を使用することが可能である。

40

## 【0247】

好ましくは、siaD遺伝子の発現が欠失しているまたはダウンレギュレートされているか、あるいは遺伝子産物が任意のほかの手段により酵素的に不活性化されている(髄膜炎菌siaD遺伝子は、莢膜多糖およびLOSの合成に必要な酵素である、-2,3-シアリルトランスフェラーゼをコードする)。この突然変異は、好ましくは本発明の調製物中に保存されているLPSエピトープへの分解が最小に生じるために好ましい。

## 【0248】

50

ブレブ調製物、特に、低濃度のDOCで抽出した調製物においては、本発明の免疫原性組成物中の抗原としてLPSを使用することが可能である。しかし、ヒト様ラクト-N-ネオテトラオース構造を除去するために、IgtEまたは好ましくはIgtB遺伝子/遺伝子産物の酵素機能をダウンレギュレーション/欠失/不活性化することが有利である。LPSオリゴ糖構造の生合成のためのIgt遺伝子を含むナイセリア遺伝子座(およびその配列)は当技術分野において公知である(Jenningsら Microbiology 1999 145; 3013-3021)。IgtB(または機能的遺伝子産物)のダウンレギュレーション/欠失が好ましい。なぜなら、それはLPS防御エピトープを無傷のまま残すからである。本発明のN. メニンギチジス血清群Bブレブ調製物において、siaDおよびIgtBの両方のダウンレギュレーション/欠失が好ましく、これは最適な安全性およびLPS防御性エピトープの保持を示すブレブ調製物をもたらす。

10

## 【0249】

本発明の免疫原性組成物は、少なくとも1、2、3、4または5個の異なる外膜小胞調製物を含みうる。2以上のOMV調製物が含まれている場合には、各OMVにおいて本発明の少なくとも1つの抗原をアップレギュレーションする。そのようなOMV調製物は、同じ種および血清群のナイセリア株、あるいは好ましくは、異なる綱、血清群、血清群、亜血清群または免疫型のナイセリア株に由来しうる。例えば、免疫原性組成物は、免疫型L2のLPSを含有する1以上の外膜小胞調製物と、免疫型L3のLPSを含有する1以上の外膜小胞調製物とを含みうる。L2またはL3 OMV調製物は、好ましくは、LPSオリゴ糖合成遺伝子座における最小の相可変性を有する安定株に由来する。

## 【0250】

20

組み合わせ

本発明の免疫原性組成物は、サブユニット形態または外膜小胞形態のいずれでも、以下の少なくとも1種以上を含んでもよい：

- (a) 1種以上のサブユニットワクチン；
- (b) 1種以上の抗原がアップレギュレートされている1種以上の外膜小胞；および
- (c) (a)と(b)との混合物。

## 【0251】

(a)~(c)のいずれか1種以上には、本発明のFrpBタンパク質が含まれ得る。

## 【0252】

従って、本発明の免疫原性組成物はまた、サブユニット組成物および外膜小胞の両方を含む。

30

## 【0253】

外膜小胞調製物は、外膜小胞において組換えによりアップレギュレートされている以下に示すものから選択される少なくとも1種の異なる抗原を有し得る：NspA、Hsf、Hap、OMP85、TbpA(高)、TbpA(低)、LbpA、TbpB、LbpB、NadA、TspA、TspB、PilQおよびPidA。そして場合により、免疫タイプL2のLPSおよび免疫タイプL3のLPSの一方または両方を含んでもよい。

## 【0254】

その可溶性のためにサブユニット組成物中に含有させるのに特に好適な抗原がいくつかある。そのようなタンパク質の例としては、FhaB、NspA、Hsfのパッセンジャードメイン、Hapのパッセンジャードメイン、OMP85、FrpA、FrpC、TbpB、LbpB、PilQ。

40

## 【0255】

ナイセリア感染は幾つかの異なる段階を経て進行する。例えば、髄膜炎菌の生活環は、鼻咽腔コロニー形成、粘膜付着、血流内への侵入、血液中での増殖、毒素ショックの誘発、血液/脳関門の通過、ならびに脳脊髄液および/または髄膜内での増殖を含む。該細菌の表面上の異なる分子が、異なる感染サイクル段階に参与している。異なるナイセリア感染過程に参与する特定の抗原の組合せの有効量に対して免疫応答を標的化することにより、驚くべき高い有効性を有するナイセリアワクチンが得られる。

## 【0256】

特に、異なるクラスの特定のナイセリア属抗原の組合せが、多段階の感染から防御する

50

免疫応答を惹起しうる。驚くべきことに、そのような抗原の組合せは、ナイセリア感染に対するワクチン有効性の相乗的改善をもたらすことが可能であり、この場合、該細菌の2以上の機能が該免疫応答により最適に標的化される。含有することができるさらなる抗原は、宿主細胞への付着に關与するものであってもよいし、鉄獲得 (iron acquisition) に關与するものであってもよいし、自己輸送体 (autotransporter) や毒素であってもよい。

【0257】

ワクチンの有効性は種々のアッセイにより評価することができる。動物モデルにおける防御アッセイは当技術分野でよく知られている。さらに、血清殺菌アッセイ (SBA) は、髄膜炎菌ワクチンの有効性を評価するための最も一般に認められている免疫学的指標である (Perkinsら J Infect Dis. 1998, 177:683-691)。

10

【0258】

抗原の組合せには、動物モデルアッセイにおける防御の改善、および/または、相乗的に、より高いSBA力価をもたらすものがある。理論に束縛されるものではないが、抗原のそのような相乗的組合せは、そのような抗原の組合せに対する免疫応答の多数の特性により可能となる。抗原自体は、通常、ナイセリア細胞の表面に露出しており保存されている傾向にあるが、同時に、それは、該抗原のみに対して惹起される抗体により最適な殺菌応答が生じるのに十分な量では表面細胞上に存在しない傾向にある。本発明の抗原の組合せは、臨界的閾値を超えてナイセリア細胞と相互作用する殺菌抗体の有利な組合せを惹起する製剤を与えうる。この臨界値において、十分な量の十分な抗体が該細菌の表面に結合して、補体による効率的な殺菌を可能にし、その結果、はるかに高い殺菌作用が認められる。血清殺菌アッセイ (SBA) はワクチン候補の有効性を厳密に表すため、抗原の組合せによる良好なSBA力価の達成は、抗原のその組合せを含有するワクチンの防御の有効性の良好な指標となる。

20

【0259】

本発明の更なる利点は、免疫原性組成物中の種々のタンパク質ファミリーからの本発明の抗原の組合せが、より広範囲の株に対する防御を可能にしうることである。

【0260】

本発明は、ナイセリアにおいて異なる機能を果たす少なくとも2つの異なるカテゴリーのタンパク質から選ばれる複数のタンパク質を含む免疫原性組成物に関する。そのようなカテゴリーのタンパク質の具体例としては、付着因子、自己輸送体タンパク質、毒素、およびFe獲得タンパク質が挙げられる。本発明のワクチン組合せ物は、同種ナイセリア株 (抗原が由来する株) に対する、そしてまた好ましくは異種ナイセリア株に対するワクチンの有効性における驚くべき改善を示す。

30

【0261】

特に、以下：

FhaB、NspA、Hsf、NadA、PilC、Hap、MafA、MafB、Omp26、NMB0315、NMB0995およびNMB1119からなる群から選択される少なくとも1種のナイセリア属付着因子；

Hsf、Hap、IgAプロテアーゼ、AspAおよびNadAからなる群から選択される少なくとも1種のナイセリア属自己輸送因子；

40

FrpA、FrpC、FrpA/C、VapD、NM-ADPRT、ならびにL2免疫タイプのLPSとL3免疫タイプのLPSの一方または両者からなる群から選択される少なくとも1種のナイセリア属毒素；

高分子量TbpA、低分子量TbpA、高分子量TbpB、低分子量TbpB、LbpA、LbpB、P2086、HpuA、HpuB、Lipo28、Sibp、FbpA、BfrA、BfrB、Bcp、NMB0964およびNMB0293からなる群から選択される少なくとも1種のナイセリア属Fe獲得タンパク質；ならびに

PlidA、TspA、FhaC、NspA、TbpA (高)、TbpA (低)、LbpA、HpuB、TdfH、PorB、HimD、HisD、GNA1870、OstA、HlpA、MltA、NMB 1124、NMB 1162、NMB 1220、NMB 1313、NMB 1953、HtrA、TspB、PilQおよびOMP85からなる群から選択される少なくとも1種のナイセリア属膜結合タンパク質、好ましくは外膜タンパク質、好ましくは、

50

(a) FhaB、HsfおよびNadAからなる群から選択される少なくとも1種のナイセリア属付着因子；

(b) HsfおよびHapからなる群から選択される少なくとも1種のナイセリア属自己輸送因子；

(c) FrpA、FrpC、ならびにL2免疫タイプのLPSとL3免疫タイプのLPSの一方または両者からなる群から選択される少なくとも1種のナイセリア属毒素；

(d) TbpA、TbpB、LbpAおよびLbpBからなる群から選択される少なくとも1種のナイセリア属Fe獲得タンパク質；ならびに

(e) TspA、TspB、NspA、PilQ、OMP85およびPidAからなる群から選択される少なくとも1種のナイセリア属外膜タンパク質、

から選ばれる少なくとも1つ、2つ、3つ、4つまたは5つのタンパク質群から選ばれる少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9または10個の異なる追加ナイセリア属抗原（FrpBに対して）を含む免疫原性組成物を提供する。

【0262】

好ましくは、最初の4つ（最も好ましくは5つ全て）の群の抗原を本発明の免疫原性組成物に導入する。

【0263】

前述したように、本明細書においてタンパク質が具体的に挙げられている場合には、それは、好ましくは、天然の完全長タンパク質を意味するが、それは（特にサブユニットワクチンの場合には）その抗原性断片を包含しうる。これらは、該タンパク質のアミノ酸配列から連続的に選ばれる少なくとも10アミノ酸、好ましくは20アミノ酸、より好ましくは30アミノ酸、より好ましくは40アミノ酸、最も好ましくは50アミノ酸を含有するまたは含む断片である。また、抗原性断片は、ナイセリアタンパク質に対して産生された抗体または哺乳類宿主へのナイセリア感染により産生された抗体と免疫学的に反応性である断片を意味する。抗原性断片はまた、有効量で投与されるとナイセリア感染に対して防御免疫応答を惹起する断片を含み、より好ましくは、それはナイセリア・メニンギチジスおよび/またはナイセリア・ゴノローエ感染に対して防御性であり、最も好ましくは、それはナイセリア・メニンギチジス血清群B感染に対して防御性である。

【0264】

また、本発明は、本発明のナイセリアタンパク質またはその断片の組換え融合タンパク質を含む。これらは、同一ポリペプチド中に、異なるナイセリアタンパク質またはそれらの断片を組み合わせて有する。あるいは、本発明はまた、T細胞エピートープの供与体のような異種配列、またはウイルス表面タンパク質、例えばインフルエンザウイルス赤血球凝集素、破傷風トキソイド、ジフテリアトキソイド、CRM197との融合タンパク質としての、ナイセリアタンパク質またはその断片の個々の融合タンパク質を含む。

【0265】

本発明の抗原

NMBに対する言及は、[www.neisseria.org](http://www.neisseria.org)からアクセス可能な配列の参照番号を示す。

【0266】

1. 付着因子

付着因子としては、例えばFhaB (W098/02547)、NadA (J. Exp. Med (2002) 195:1445; NMB 1994)、NhhAとしても公知のHsf (NMB 0992) (W099/31132)、Hap (NMB 1985) (W099/55873)、NspA (W096/29412)、MafA (NMB 0652)およびMafB (NMB 0643) (Annu Rev Cell Dev Biol. 16; 423-457 (2000); Nature Biotech 20; 914-921 (2002))、Omp26 (NMB 0181)、NMB 0315、NMB 0995、NMB 1119およびPilC (Mol. Microbiol. 1997, 23; 879-892)を包含する。これらは、宿主細胞の表面へのナイセリアの結合に関与するタンパク質である。Hsfは付着因子の一例であり、これは自己輸送体タンパク質でもある。したがって、本発明の免疫原性組成物はHsfと他の自己輸送体タンパク質との組合せを含むことが可能であり、この場合、Hsfが付着因子としてその能力を発揮する。これらの付着因子はナイセリア・メニンギチジスまたはナイセリア・ゴノローエまたは他のナイセリア株に由来しうる。

10

20

30

40

50

本発明はまた、ナイセリア由来の他の付着因子を包含する。

【0267】

#### FhaB

この抗原はW098/02547の配列番号38(ヌクレオチド3083-9025)に記載されている。NMB 0497も参照されたい。本発明者らは、FhaBが、単独および特に本発明の他の抗原と共に、抗接着抗体を特に有効に誘導することを見出した。完全長FhaBを使用することは可能であるが、驚くべきことに、本発明者らは、特定のC末端末端切断型が、交差株作用(cross-strain effect)の点で、それと少なくとも同等に有効である、好ましくは、それより有効であることを見出した。また、好都合にも、そのような末端切断型は、クローニングが遥かに容易であることが示されている。本発明のFhaB末端切断型は、典型的には、FhaB分子のN末端側の3分の2に相当し、好ましくは、新たなC末端は1200-1600位、より好ましくは1300-1500位、最も好ましくは1430-1440位に位置する。特定の実施形態は1433または1436位にC末端を有する。したがって、本発明のそのようなFhaB末端切断型、およびそのような末端切断型を含むワクチンは、本発明の組合せ免疫原性組成物の好ましい成分である。該N末端も、10、20、30、40または50個までのアミノ酸が末端切断されうる。

10

【0268】

#### 2. 自己輸送体タンパク質

自己輸送体タンパク質には、典型的には、シグナル配列、パッセンジャードメイン、および外膜への結合のためのアンカードメインから構成される。自己輸送体タンパク質の具体例には、Hsf (W099/31132) (NMB 0992)、HMW、Hia (van Ulsenら Immunol. Med. Microbiol. 2001 32; 53-64)、Hap (NMB 1985) (W099/55873; van Ulsenら Immunol. Med. Microbiol. 2001 32; 53-64)、UspA、UspA2、NadA (NMB 1994) (Comanducciら J. Exp. Med. 2002 195; 1445-1454)、AspA (Infection and Immunity 2002, 70(8); 4447-4461; NMB 1029)、Aida-1様タンパク質、SSh-2およびTshが含まれる。NadA (J. Exp. Med (2002) 195:1445)は、自己輸送体タンパク質のもう1つの例であり、かつ、付着因子でもある。本発明の免疫原性組成物は、NadAと付着因子との組合せを含むことが可能であり、この場合、NadAが自己輸送体タンパク質としてその能力を発揮する。これらのタンパク質はナイセリア・メニンギチジスまたはナイセリア・ゴノローエまたは他のナイセリア株に由来する。本発明はまた、ナイセリア由来の他の自己輸送体タンパク質を包含する。

20

【0269】

#### Hsf

Hsfは、自己輸送体タンパク質に共通の構造を有する。例えば、ナイセリア・メニンギチジス株H44/76由来のHsfは、アミノ酸1-51から構成されるシグナル配列、表面に露出しており可変領域(アミノ酸52-106、121-124、191-210および230-234)を含有する成熟タンパク質のアミノ末端の頭部領域(アミノ酸52-479)、ネック部領域(アミノ酸480-509)、疎水性ヘリックス領域(アミノ酸518-529)、および4個の膜貫通ストランドが外膜に伸長するアンカードメイン(アミノ酸539-591)からなる。

30

【0270】

本発明の免疫原性組成物中では完全長Hsfを使用することが可能であるが、種々のHsf末端切断型および欠失体も、ワクチンのタイプに応じて有利に使用されうる。

40

【0271】

Hsfをサブユニットワクチン中で使用する場合には、可溶性パッセンジャードメインの一部、例えばアミノ酸52-479の完全ドメイン、最も好ましくはその保存的部分、例えばアミノ酸134-479の特に好ましい配列を使用することが好ましい。Hsfの好ましい形態は、W001/55182に開示されているタンパク質の可変領域を欠失するよう末端切断されているものでありうる。好ましい変異体は、W001/55182に記載されている1、2、3、4または5個の可変領域の欠失を含むであろう。前記の配列および後記の配列は、N末端またはC末端の一方または両方において1、3、5、7、10または15個までのアミノ酸が伸長または末端切断していてもよい。

【0272】

50

したがって、Hsfの好ましい断片は、Hsfの頭部領域の全体、好ましくはアミノ酸52-473を含有する該領域を含む。Hsfの更なる好ましい断片は、アミノ酸配列52-62、76-93、116-134、147-157、157-175、199-211、230-252、252-270、284-306、328-338、362-391、408-418、430-440および469-479のうち1以上を含む該頭部の表面露出領域が挙げられる。

#### 【0273】

Hsfが外膜小胞調製物中に存在する場合には、それは完全長タンパク質として、好ましくは、アミノ酸1-51とアミノ酸134-591(アミノ酸配列134からC末端までの成熟外膜タンパク質をもたらす)との融合体から構成される好ましい変異体として発現されうる。Hsfの好ましい形態は、W001/55182に開示されているタンパク質の可変領域を欠失するよう末端切断されていることが可能である。好ましい変異体は、W001/55182に記載されている1、2、3、4または5個の可変領域の欠失を含むであろう。好ましくは、第1および第2の可変領域が欠失している。好ましい変異体は、アミノ酸配列52-237または54-237の間の残基、より好ましくはアミノ酸52-133または55-133の間の残基を欠失しているであろう。該成熟タンパク質はシグナルペプチドを欠いているであろう。

#### 【0274】

### Hap

ナイセリア・メニンギチジス由来のHap様タンパク質のコンピューター解析は少なくとも3つの構造ドメインを示している。株H44/76由来のHap様配列を基準配列とすると、アミノ酸1-42を含むドメイン1は、自己輸送体ファミリーに特徴的なsec依存性シグナルペプチドをコードしており、アミノ酸43-950を含むドメイン2は、表面に露出しており免疫系に接近しうると考えられるパッセンジャードメインをコードしており、残基951からC末端まで(1457)を含むドメイン3は、バレル様構造に組み立てられ外膜内に繋ぎ止められるらしいストランドをコードしていると推定される。ドメイン2は表面に露出していると考えられ、よく保存されており(試験した全ての株において80%を上回る)、大腸菌(*E. coli*)内でサブユニット抗原として産生されうるため、それは興味深いワクチン候補の1つである。ドメイン2および3は表面に露出していると考えられ、よく保存されているため(Pizzaら(2000), *Science* 287: 1816-1820)、それらは興味深いワクチン候補の1つである。ドメイン2はパッセンジャードメインとして公知である。

#### 【0275】

本発明の免疫原性組成物は、好ましくはOMV調製物中に組み入れられた完全長Hapタンパク質を含みうる。また、本発明の免疫原性組成物は、株H44/76においてはアミノ酸残基43-950から構成されるHapのパッセンジャードメインを含みうる。Hapのこの断片は本発明のサブユニット組成物中で特に有利に使用されるであろう。Hapのパッセンジャードメインの前記配列は、N末端またはC末端の一方または両方において1、3、5、7、10、15、20、25または30個までのアミノ酸が伸長または末端切断されたものでありうる。

#### 【0276】

### 3. 鉄獲得タンパク質

鉄獲得タンパク質には、TbpA (NMB 0461) (W092/03467, 米国特許第5912336号, W093/06861およびEP586266)、TbpB (NMB 0460) (W093/06861およびEP586266)、LbpA (NMB 1540) (*Med Microbiol* (1999) 32:1117)、LbpB (NMB 1541)(W0/99/09176)、HpuA (U73112.2) (*Mol Microbiol*. 1997, 23; 737-749)、HpuB (NC\_003116.1) (*Mol Microbiol*. 1997, 23; 737-749)、XthAとしても公知のP2086 (NMB 0399) (13<sup>th</sup> International Pathogenic Neisseria Conference 2002)、FbpA (NMB 0634)、FbpB、BfrA (NMB 1207)、BfrB (NMB 1206)、GNA2132としても公知のLipo28 (NMB 2132)、Sibp (NMB 1882)、HmbR、HemH、Bcp (NMB 0750)、鉄(III) ABC輸送体パーミアーズタンパク質 (Tettelinら *Science* 287; 1809-1815 2000)、鉄(III) ABC輸送体-ペリプラズム (Tettelinら *Science* 287; 1809-1815 2000)、TonB依存性受容体 (NMB 0964およびNMB 0293)(Tettelinら *Science* 287; 1809-1815 2000)およびトランスフェリン結合タンパク質関連タンパク質 (Tettelinら *Science* 287; 1809-1815 2000) が包含される。これらのタンパク質はナイセリア・メニンギチジス (*Neisseria meningitidis*) またはナイセリア・ゴノローエ (*Neisseria gonorrhoeae*) または

他のナイセリア株に由来しうる。本発明はまた、ナイセリア由来の他の鉄獲得タンパク質を包含する。

【0277】

TbpA

TbpAはTbpBと相互作用してナイセリアの外膜上にタンパク質複合体を形成し、これはトランスフェリンに結合する。構造上は、TbpAは、短い細胞内ループおよびより長い細胞外ループにより連結された複数の膜貫通 ストランド、TonBボックスおよびプラグ (plug) ドメインと共に、細胞内N末端ドメインを含有する。

【0278】

TbpBの2つのファミリー（それぞれ、高い分子量を有するものおよび低い分子量を有するもの）が特徴づけられている。TbpBの高分子量形態および低分子量形態は、相同性に基づいて区別されうる異なるファミリーのTbpAと会合する。それらは、類似した分子量であるにもかかわらず、高分子量ファミリーおよび低分子量ファミリーとして公知である。なぜなら、それらはTbpBの高分子量形態または低分子量形態に会合するからである（Rokbiら *FEMS Microbiol. Lett.* 100; 51, 1993）。これらの2つの形態のTbpAを表すためにTbpA(高)およびTbpA(低)なる語が用いられ、また、TbpBも同様に称される。本発明の免疫原性組成物は、ナイセリア・メニンギチジス血清群A、B、C、YおよびW-135由来のTbpAおよびTbpB、ならびにナイセリア・ゴノローエを含む他の細菌に由来する鉄獲得タンパク質を含みうる。トランスフェリン結合タンパク質TbpAおよびTbpBはそれぞれTbp1およびTbp2とも称される（Cornelissenら *Infection and Immunity* 65; 822, 1997）。

10

20

【0279】

TbpAは幾つかの異なる領域を含有する。例えば、ナイセリア・メニンギチジス株H44/76由来のTbpAの場合には、アミノ末端の186アミノ酸が内部球状ドメインを形成し、22個のストランドが該膜を横切って パレル構造を形成している。これらは、短い細胞内ループおよびより大きな細胞外ループにより連結されている。細胞外ループ2、3および5は最高度の配列可変性を有し、ループ5は表面に露出している。ループ5および4はリガンドの結合に参与する。

【0280】

TbpAの好ましい断片はTbpAの細胞外ループを含む。ナイセリア・メニンギチジス株H44/76由来のTbpAの配列を用いると、これらのループでは、ループ1はアミノ酸200-202に対応し、ループ2はアミノ酸226-303に対応し、ループ3はアミノ酸348-395に対応し、ループ4はアミノ酸438-471に対応し、ループ5はアミノ酸512-576に対応し、ループ6はアミノ酸609-625に対応し、ループ7はアミノ酸661-671に対応し、ループ8はアミノ酸707-723、ループ9はアミノ酸769-790に対応し、ループ10はアミノ酸814-844に対応し、ループ11はアミノ酸872-903に対応する。配列アライメントの後の他のTbpタンパク質における対応配列も、好ましい断片を構成するであろう。最も好ましい断片は、Tbpのループ2、ループ3、ループ4またはループ5を構成するアミノ酸配列を含むであろう。

30

【0281】

本発明の免疫原性組成物がTbpAを含む場合、TbpA(高)およびTbpA(低)の両方を含むのが好ましい。

40

【0282】

TbpAは、好ましくは、OMVワクチン中に存在するが、それはサブユニットワクチンの一部であることも可能である。例えば、本発明の免疫原性組成物中に導入されうる単離された鉄獲得タンパク質は当技術分野においてよく知られている（W000/25811）。それらを細菌宿主内で発現させ、界面活性剤（例えば、2% Elugent）を使用して抽出し、アフィニティークロマトグラフィーによりまたは当技術分野においてよく知られた標準的なカラムクロマトグラフィー技術（Oakhillら *Biochem J.* 2002 364; 613-6）を用いて精製することが可能である。

【0283】

TbpAがOMVワクチン中に存在する場合には、その発現を本明細書またはW001/09350号に

50

記載の遺伝子工学的技術によりアップレギュレーションすることが可能であり、あるいは好ましくは、鉄制限条件下の親株の増殖によりアップレギュレーションすることが可能である。この方法は、免疫優性となりうる可変性鉄調節タンパク質（特に野生型FrpB）のアップレギュレーションをも引き起こす。したがって、広範なナイセリア株において存在する抗原に対する免疫応答を本発明の免疫原性組成物が惹起するのが保証されるよう、W001/09350号に記載のとおりそのようなタンパク質（特に野生型FrpB）の発現をダウンレギュレーションする（そのようなタンパク質をコードする遺伝子を欠失させる）または上述したように免疫優性ループを除去するのが有利である。野生型FrpBを欠失する場合、非免疫優性FrpB遺伝子の追加コピーを細胞に導入しうる。TbpA（高）およびTbpA（低）の両方を該免疫原性組成物中に存在させるのが好ましく、これは、好ましくは、そのような別形態のTbpAを発現する2つの株に由来するOMVと一緒にすることにより達成される。

10

【0284】

#### 4. 毒素

毒素には、FrpA (NMB 0585; NMB 1405)、FrpA/C (定義については後記を参照されたい)、FrpC (NMB 1415; NMB 1405) (W092/01460)、NM-ADPRT (NMB 1343) (13<sup>th</sup> International Pathogenic Neisseria Conference 2002 Massignani et al p135)、VapD (NMB 1753)、リポ多糖 (LPS; リポオリゴ糖またはLOSとも称される) 免疫型L2およびLPS免疫型L3が包含される。FrpAおよびFrpCは、これらの2つのタンパク質間で保存された領域を含有し、これらのタンパク質の好ましい断片は、この保存断片を含有するポリペプチド、好ましくは、FrpA/Cの配列のアミノ酸227-1004を含むポリペプチドであろう。これらの抗原はナイセリア・メニンギチジスまたはナイセリア・ゴノローエまたは他のナイセリア株に由来しうる。本発明はまた、ナイセリア由来の他の毒素を包含する。

20

【0285】

もう1つの実施形態においては、毒素には、毒性の調節に関与する抗原、例えば、リポ多糖の合成において機能するOstAが含まれうる。

【0286】

#### FrpAおよびFrpC

ナイセリア・メニンギチジスは、鉄が制限された際に分泌される、FrpAおよびFrpCと称される2つのRTXタンパク質をコードしている (Thompsonら, (1993) J. Bacteriol. 175:811-818; Thompsonら, (1993) Infect. Immun. 61:2906-2911)。RTX (Repeat ToXin) タンパク質ファミリーは共通して、それらのC末端付近に、コンセンサス配列 Leu Xaa Gly Gly Xaa Gly (Asn/Asp) Asp Xaa (LXGGXGN<sub>7</sub>DX) を有する一連の9アミノ酸の反復配列を有する。大腸菌 (E. coli) HlyAにおける反復配列はCa<sup>2+</sup>の結合部位であると考えられる。図4に示すとおり、株FAM20において特徴づけられている髄膜炎菌FrpAおよびFrpCタンパク質は、それらの中央領域およびC末端領域においてはかなりのアミノ酸類似性を共有するが、N末端においては（有するとしても）非常に限られた類似性しか有さない。さらに、FrpAとFrpCとの間で保存された領域は、9アミノ酸モチーフの反復性（FrpAにおいては13回およびFrpCにおいては43回）により幾らかの多型を示す。

30

【0287】

本発明の免疫原性組成物は完全長FrpAおよび/またはFrpCを含むことが可能であり、好ましくは、FrpAとFrpCとの間で保存された配列を含む断片を含む。該保存配列は9アミノ酸の反復単位から構成される。本発明の免疫原性組成物は、好ましくは、3個を超える反復、10個を超える反復、13個を超える反復、20個を超える反復、または23個を超える反復を含む。

40

【0288】

そのような末端切断型は完全長分子より有利な特性を有し、そのような抗原を含むワクチンは、本発明の免疫原性組成物に含まれることが好ましい。

【0289】

FrpAとFrpCとの間で保存された配列はFrpA/Cと称され、FrpAまたはFrpCが本発明の免疫原性組成物の構成成分に相当する場合には、FrpA/Cが有利に使用されうるであろう。FrpA

50

配列のアミノ酸277-1004は好ましい保存領域である。前記配列はN末端またはC末端の一方または両方において1、3、5、7、10、15、20、25または30個までのアミノ酸が伸長または末端切断されていてもよい。

【0290】

#### LPS

LPS(リポ多糖; LOS-リポオリゴ糖としても公知である)はナイセリアの外膜上の内毒素である。LPSの多糖部分は殺菌抗体を誘導することが公知である。

【0291】

LPSのオリゴ糖部分における不均一性は種々のナイセリア株間で構造および抗原性の多様性をもたらす(Griffissら *Inf. Immun.* 1987; 55: 1792-1800)。これは、髄膜炎菌株を12個の免疫型に細分するのに利用されている(Scholtenら *J Med Microbiol* 1994, 41: 236-243)。免疫型L3、L7およびL9は免疫学的に同一であり、構造的に類似しており(あるいは更には同一であり)、したがってL3,7,9と称される(あるいは、本明細書の目的においては「L3」と総称される)。髄膜炎菌LPS L3,7,9(L3)、L2およびL5はシアル酸化によりまたはシチジン 5'-リン酸-N-アセチルノイラミン酸の付加により修飾されうる。L2、L4およびL6 LPSは免疫学的に区別されうるが、それらは構造的には類似しており、本明細書中でL2に言及する場合には、所望により、本発明の範囲内で、L2の代わりにL4またはL6のいずれかを用いることが可能である。LPSの構造および不均一性の更なる説明は、M. P. Jenningsら, *Microbiology* 1999, 145, 3013-3021および*Mol Microbiol* 2002, 43:931-43を参照されたい。

【0292】

LPS、好ましくは髄膜炎菌LPSが本発明のワクチン中に含まれている場合には、好ましくはおよび有利には、免疫型L2およびL3の一方または両方が存在する。LPSは、好ましくは、外膜小胞中に存在するが、(好ましくは、低パーセントの界面活性剤、より好ましくは0~0.5%、0.02~0.4%、0.04~0.3%、0.06~0.2%、0.08~0.15%または0.1%の界面活性剤、最も好ましくはデオキシコラート [DOC]で該小胞を抽出した場合)サブユニットワクチンの一部であってもよい。LPSは、熱水-フェノール法(WesphalおよびJann *Meth. Carbo. Chem.* 5; 83-91 1965)を含むよく知られた方法を用いて単離することが可能である。Galanosら 1969, *Eur J Biochem* 9:245-249およびWuら 1987, *Anal Bio Chem* 160:281-289も参照されたい。LPSは、無修飾(plain)形態で、あるいは破傷風トキシノイド、ジフテリアトキシノイド、CRM-197またはOMV外膜タンパク質のようなT細胞エピトープ源に結合させて使用することが可能である。単離されたLOSを結合させるための技術も公知である(例えば、参照により本明細書に組み入れるEP 941738を参照されたい)。

【0293】

LOS(特に、本発明のLOS)をブレブ(bleb)製剤中に存在させる場合には、好ましくは、同様に該ブレブ調製物上に存在する1以上の外膜タンパク質(例えば、髄膜炎菌におけるPorAまたはPorB)へのLOSの結合を可能にする方法により、LOSをin situで結合させる。

【0294】

この方法は、該ブレブ製剤中のLOS抗原の安定性および/または免疫原性(T細胞の補助をもたらす)および/または抗原性を有利に増強し、すなわち髄膜炎菌外膜の表面上の天然環境中のLOSと同様に、該T依存性オリゴ糖免疫原にT細胞の補助をその最も防御性のコンホメーションにおいて与えうる。また、該ブレブ中のLOSの結合はLOSの解毒をもたらさう(リポドA部分が外膜内に安定に埋もれることにより、毒性の生じる可能性が減少する)。したがって、htrB<sup>i</sup>またはmsbB<sup>i</sup>突然変異体からブレブを単離する、本明細書に記載の解毒法、あるいはポリミキシンB[リポドAに対して高いアフィニティを有する分子]の無毒性ペプチド機能等価体を該組成物に加えることは必ずしも必要ないかもしれない(しかし、念のために、それを併せて加えることは可能である)(ポリミキシンBの無毒性ペプチド機能等価体の更なる詳細、特に、ペプチドSEAP 2(これは配列KTKCKFLKKCを有し、ここで、2個のシステインがジスルフィド架橋を形成している)の使用に関しては、WO

10

20

30

40

50

93/14115、WO 95/03327、Velucchiら (1997) J Endotoxin Res 4: 1-12およびEP 976402を参照されたい)。したがって、本発明者らは、該ブレブ中に存在するLOSがブレブ内様式で外膜タンパク質に結合しているブレブ含有組成物が、該ブレブが由来する生物により引き起こされる疾患の治療または予防用のワクチンの基礎を形成するものであり、そのようなワクチンは実質的に無毒性であり、LOSに対してその天然環境中でT依存性殺菌応答を誘導しうることを見出した。

【0295】

そのようなブレブ調製物を、目的の細菌から単離し(WO 01/09350を参照されたい)、ついで公知の結合化学法に付して、LOSのオリゴ糖部分上の官能基(例えば、NH<sub>2</sub>またはCOOH)をブレブ外膜タンパク質上の官能基(例えば、NH<sub>2</sub>またはCOOH)に連結することが可能である。グルタルアルデヒド、ホルムアルデヒドまたはグルタルアルデヒド/ホルムアルデヒド混合物を使用する架橋技術を用いることが可能であるが、EDACまたはEDAC/NHS(J.V. Staros, R.W. WrightおよびD. M. Swingle. Enhancement by N-hydroxysuccinimide of water-soluble carbodiimide-mediated coupling reactions. Analytical chemistry 156: 220-222 (1986); ならびにBioconjugates Techniques. Greg T. Hermanson (1996) pp173-176)のような、より選択的な化学法を用いることが好ましい。使用しうるタンパク質分子とLOSとの間に共有結合を生成させることができる他の結合化学法または処理は欧州特許941738号に記載されている。

【0296】

好ましくは、莢膜多糖の非存在下で該ブレブ調製物を結合させる。該ブレブは、(天然でまたは後記の突然変異により)莢膜多糖を産生しない株から単離することが可能であり、あるいはほとんど、好ましくは全ての混入莢膜多糖から精製することが可能である。このように、ブレブ内LOS結合反応は遥かに効率的である。

【0297】

好ましくは、該ブレブ中に存在するLOSの10、20、30、40、50、60、70、80、90または95%以上が架橋/結合している。

【0298】

ブレブ内結合は、好ましくは、以下の処理工程の1、2または3つ全てを含む: 結合pHはpH 7.0より大きく、好ましくはpH 7.5以上(最も好ましくはpH 9未満)であるべきであり; 1~5%、好ましくは2~4%、最も好ましくは約3% スクロースの条件を該反応の間、維持すべきであり; NaClは該結合反応の間は最小限にすべきであり、好ましくは0.1M未満、0.05M未満、0.01M未満、0.005M未満、0.001M未満で存在すべきであり、最も好ましくは全く存在しないようにすべきである。これらの処理上の特徴の全ては、ブレブが該結合過程の全体にわたって安定に溶液中に維持されることを保証するものである。

【0299】

EDAC/NHS結合法は、ブレブ内結合のための好ましい方法である。EDAC/NHSは、過度に架橋して濾過性に悪影響を及ぼしうるホルムアルデヒドのために好ましい。EDACはカルボン酸(例えば、LOS中のKDO)と反応して活性エステル中間体を与える。アミン求核試薬(例えば、PorBのような外膜タンパク質中のリシンなど)の存在下、アミド結合が生成され、副産物としてイソ尿素が放出される。しかし、EDAC媒介反応の効率は、スルホ-NHSエステル中間体の生成を通じて増加しうる。該スルホ-NHSエステルは、EDACのみとカルボキシレートとの反応から生成した活性エステルより長く、水溶液中で存続する。したがって、この2段階法を用いることにより、より高い収率のアミド結合形成を達成することができる。EDAC/NHS結合はJ.V. Staros, R.W. WrightおよびD. M. Swingle, Enhancement by N-hydroxysuccinimide of water-soluble carbodiimide-mediated coupling reactions. Analytical chemistry 156: 220-222 (1986)ならびにBioconjugates Techniques. Greg T. Hermanson (1996) pp173-176に記載されている。該反応においては、好ましくは、ブレブ1mg当たり0.01~5mgのEDAC、より好ましくは、ブレブ1mg当たり0.05~1mgのEDACを使用する。EDACの使用量は、サンプル中に存在するLOSの量に左右され、そしてこれは、ブレブを抽出するために使用するデオキシコラート(DOC)のパーセンテージ(%)に左右され

10

20

30

40

50

る。低いパーセンテージ（例えば、0.1%）のDOCの場合は、大量（1mg/mg以上）のEDACを使用するが、より高いパーセンテージ（例えば、0.5%）のDOCでは、過度のプレブ内架橋を防ぐために、より少量（0.025～0.1mg/mg）のEDACを使用する。

#### 【0300】

したがって、本発明の好ましい方法は、EDAC/NHSの存在下、pH 7.0～pH 9.0（好ましくは、pH約7.5）のpHで、1～5%（好ましくは約3%）スクロース中、場合によってはNaClを実質的に含有しない条件中（前記のとおり）、プレブを結合させ、該反応混合物から該結合プレブを単離する工程を含む、（好ましくは髄膜炎菌の）プレブ内結合LOSの製造方法である。

#### 【0301】

反応時間が経過するにつれて、プレブ中のLOSの割合が増えてLOSの分子量が増加するのを示すために、抗LOS（例えば、抗L2または抗L3）mAbを使用して該反応混合物のウエスタン分離ゲル上で該反応を追跡することが可能である。

#### 【0302】

そのような技術を用いて、収率99%でプレブを回収することが可能である。

#### 【0303】

EDACは、LOSのT依存性免疫原性の改善に十分な程度にLOSをOMPに架橋するが、乏しい濾過性、凝集およびプレブ間架橋のような問題が生じるほど過度にはそれを架橋しなかったため、EDACは優れたプレブ内架橋剤であることが判明した。生成したプレブの形態学的特徴は（電子顕微鏡によれば）未結合プレブのものに類似している。また、前記プロトコールは、過度の架橋（これは、該プレブの表面上に天然で存在する防御性OMP、例えばTbpAまたはHsfの免疫原性を減少させうる）が生じるのを防いだ。

#### 【0304】

プレブが由来する髄膜炎菌株は、莢膜多糖を産生し得ない突然変異株（特にsialD<sup>-</sup>）であることが好ましい。また、髄膜炎菌疾患に対して有効な免疫原性組成物はL2およびL3の両方のプレブを含んでおり、ここで、L2およびL3 LOSは共に、プレブ外膜タンパク質に結合していることが好ましい。さらに、プレブ内結合プレブ内のLOS構造は、IgtB<sup>-</sup>または好ましくはIgtB<sup>-</sup>髄膜炎菌株に由来するそれと合致することが好ましい。最も好ましくは、免疫原性組成物は、莢膜多糖を産生し得ない、IgtB<sup>-</sup>である突然変異髄膜炎菌株に由来するプレブ内結合プレブを含むか、または莢膜多糖を産生し得ない突然変異髄膜炎菌株に由来するL2およびL3プレブを含むか、またはIgtB<sup>-</sup>である突然変異髄膜炎菌株に由来するL2およびL3プレブを含むか、または最も好ましくは、莢膜多糖を産生し得ない、IgtB<sup>-</sup>である突然変異髄膜炎菌株に由来するL2およびL3プレブを含む。

#### 【0305】

本発明に使用しうる典型的なL3髄膜炎菌株はH44/76 menB株である。典型的なL2株はB16 B6 menB株または39E髄膜炎菌C型株である。

#### 【0306】

前記のとおり、本発明のプレブは、結合の作用により或る程度解毒されており、それ以上解毒する必要はないが、安全性を高めるために更なる解毒法を用いてもよく、例えば、htrB<sup>-</sup>またはmsbB<sup>-</sup>である髄膜炎菌株に由来するプレブを使用したり、あるいはポリミキシンB [リピドAに対する高いアフィニティを有する分子] の無毒性ペプチド機能等価体（好ましくはSEAP2）を該プレブ組成物に加えること（前記のとおり）が可能である。

#### 【0307】

前記の方法により、実質的に無毒性であり自己免疫の問題を伴わずT依存性を有しその天然環境中に存在し（L2+L3組成物の場合には）髄膜炎菌株の90%以上に対する殺菌抗体応答を誘導しうるLOSを重要な抗原として有する髄膜炎菌プレブおよびプレブ含有免疫原性組成物が提供される。

#### 【0308】

### 5. 内在性外膜タンパク質

他のカテゴリーのナイセリアタンパク質も、本発明のナイセリアワクチン中に含有させ

10

20

30

40

50

る候補となる可能性があり、驚くべきほど有効に他の抗原と組み合わせることができる。膜結合タンパク質、特に内在性膜タンパク質、最も有利には外膜タンパク質、特に内在性外膜タンパク質を、本発明の組成物中で使用することが可能である。そのようなタンパク質の一例は、ナイセリアホスホリパーゼ外膜タンパク質である、Omp1A (NMB 0464) (W000/15801)としても公知のPldAである。更なる具体例としては、TspA (NMB 0341) (Infect. Immun. 1999, 67; 3533-3541) およびTspB (T細胞刺激性タンパク質) (WO 00/03003; NMB 1548, NMB 1628 またはNMB 1747)が挙げられる。更なる具体例には、PilQ (NMB 1812) (W099/61620)、D15としても公知のOMP85 (NMB 0182) (W000/23593)、NspA (U52066) (W096/29412)、FhaC (NMB 0496またはNMB 1780)、PorB (NMB 2039) (Mol. Biol. Evol. 12; 363-370, 1995)、HpuB (NC\_003116.1)、TdfH (NMB 1497) (Microbiology 2001, 147; 1277-1290)、OstA (NMB 0280)、GNA33およびLipo30としても公知のMltA (NMB0033)、HtrA (NMB 0532; WO 99/55872)、HimD (NMB 1302)、HisD (NMB 1581)、GNA 1870 (NMB 1870)、HlpA (NMB 1946)、NMB 1124、NMB 1162、NMB 1220、NMB 1313、NMB 1953、HtrA、TbpA (NMB 0461) (W092/03467) (前記の鉄獲得タンパク質の説明も参照されたい) ならびにLbpA (NMB 1541) が含まれる。

#### 【 0 3 0 9 】

##### OMP85

OMP85/D15は、シグナル配列、N末端表面露出ドメインおよび外膜に付着するための内在性膜ドメインを有する外膜タンパク質である。本発明の免疫原性組成物は完全長OMP85を、好ましくはOMV調製物の一部として含む。本発明の免疫原性組成物においては、OMP85の断片も使用することが可能であり、特に、アミノ酸残基1-475または50-475から構成されるOMP85のN末端表面露出ドメインを、好ましくは、本発明の免疫原性組成物のサブユニット成分中に含有させる。OMP85の表面露出ドメインの前記配列は、N末端またはC末端の一方または両方において1、3、5、7、10、15、20、25または30個までのアミノ酸が伸長または末端切断されうる。シグナル配列はOMP85断片から除去するのが好ましい。

#### 【 0 3 1 0 】

##### OstA

OstAはリポ多糖の合成において機能し、毒性の調節因子であるとみなされうる。あるいは、毒素のカテゴリーを、毒素だけでなく毒性の調節因子をも含有するように拡張すると、OstAは毒素のカテゴリーに含まれうる。

#### 【 0 3 1 1 】

好ましくは、サブユニット組成物は本発明のFrpBと以下と一緒に含むものである：

i) 以下のリストから選択される少なくとも1種の追加抗原：FhaB、Hsfのパスセンジャードメイン、Hapのパスセンジャードメイン、NadA、OMP85のN末端表面露出ドメイン、FrpA、FrpC、FrpA/C、TpbA、TpbB、LpbA、LpbB、PldA、PilQ、NspA、ならびにL2免疫タイプのLPSとL3免疫タイプのLPSの一方または両者；ならびに/あるいは

ii) 少なくとも1種のナイセリア属（好ましくは髄膜炎菌）外膜小胞（OMV）調製物。好ましくは、OMV調製物は、外膜小胞において組換えによりアップレギュレートされている以下のリストから選択される少なくとも1種の抗原（より好ましくは2、3、4または5種）を有する：NspA、Hsf、Hap、OMP85、TbpA（高）、TbpA（低）、LbpA、TpbB、LpbB、PilQおよびPldA。そして場合によりL2免疫タイプのLPSとL3免疫タイプのLPSの一方または両者を含んでもよい。

#### 【 0 3 1 2 】

i) が存在する場合には、追加の抗原は上述したタンパク質の1以上の群から選択されることが好ましい。

#### 【 0 3 1 3 】

別の実施形態において、本発明の外膜小胞は、外膜小胞において組換えによりアップレギュレートされ、かつ以下のリストから選択される少なくとも1種の追加抗原（より好ましくは2、3、4または5種）を有する：NspA、Hsf、Hap、OMP85、TbpA（高）、TbpA（低）、LbpA、TpbB、LpbB、PilQおよびPldA。そして場合によりL2免疫タイプのLPSとL3免

疫タイプのLPSの一方または両者を含んでもよい。この外膜小胞は、少なくとも1種の追加抗原（より好ましくは2、3、4または5種）が外膜小胞において組換えによりアップレギュレートされており、かつ以下のリストから選択される、1種以上の追加の外膜小胞と共に使用されてもよい：FrpB、NspA、Hsf、Hap、MP85、TbpA（高）、TbpA（低）、LbpA、TbpB、LbpB、PilQおよびPldA。そして場合によりL2免疫タイプのLPSとL3免疫タイプのLPSの一方または両者を含んでもよい。

【0314】

本発明の免疫原性組成物は、ナイセリア・メニンギチジス血清群A、B、C、Y、W-135またはナイセリア・ゴノローエに由来する抗原（タンパク質、LPSおよび多糖）を含みうる。

10

【0315】

他の組合せ

本発明の免疫原性組成物は更に、細菌莢膜多糖またはオリゴ糖を含みうる。該莢膜多糖またはオリゴ糖は、ナイセリア・メニンギチジス血清群A、C、Yおよび/またはW-135、ヘモフィルス・インフルエンザb、ストレプトコッカス・ニューモニエ、A群連鎖球菌、B群連鎖球菌、スタフィロコッカス・アウレウスおよびスタフィロコッカス・エピデルミジスのうち1以上に由来しうる。

【0316】

本発明のもう1つの態様は、本発明の抗原性組成物と、ウイルスまたはグラム陽性菌に関連した病態を含む或る病態に対して有利に使用される他の抗原とを含むワクチンの組合せである。

20

【0317】

1つの好ましい組合せにおいては、本発明の抗原性組成物は、無修飾であってもタンパク質担体に結合していてもよい髄膜炎菌莢膜多糖またはオリゴ糖A、C、YまたはW-135のうち1、2、3または好ましくは4個すべてとともに製剤化される。好ましくは、本発明の免疫原性組成物は、AおよびC；またはC；またはCおよびYを使用して製剤化される。ナイセリア・メニンギチジス、好ましくは血清群Bに由来するタンパク質を含有するそのようなワクチンは、包括的髄膜炎菌ワクチンとして有利に使用されうる。

【0318】

もう1つの好ましい実施形態においては、本発明の抗原性組成物、好ましくは、無修飾のまたは結合させた髄膜炎菌莢膜多糖またはオリゴ糖A、C、YまたはW-135の1、2、3または4個すべてとともに製剤化される抗原性組成物（前記のとおり）は、結合させたヘモフィルス・インフルエンザb莢膜多糖もしくはオリゴ糖、および/または1以上の無修飾のもしくは結合させた肺炎球菌多糖もしくはオリゴ糖（例えば以下に記載するもの）を使用して製剤化される。所望により、該ワクチンは、ストレプトコッカス・ニューモニエ感染に対して宿主を防御しうる1以上のタンパク質抗原をも含みうる。そのようなワクチンは包括的な髄膜炎ワクチンとして有利に使用されうる。

30

【0319】

さらにもう1つの好ましい実施形態においては、本発明の免疫原性組成物は、ナイセリア・メニンギチジス、ヘモフィルス・インフルエンザb、ストレプトコッカス・ニューモニエ、A群連鎖球菌、G群連鎖球菌、スタフィロコッカス・アウレウスまたはスタフィロコッカス・エピデルミジスのうち1以上に由来しうる莢膜多糖またはオリゴ糖を使用して製剤化される。肺炎球菌莢膜多糖またはオリゴ糖抗原は、好ましくは、血清群1、2、3、4、5、6B、7F、8、9N、9V、10A、11A、12F、14、15B、17F、18C、19A、19F、20、22F、23Fおよび33F（最も好ましくは、血清群1、3、4、5、6B、7F、9V、14、18C、19Fおよび23F）から選ばれる。もう1つの好ましい実施形態はヘモフィルス・インフルエンザのPRP莢膜多糖またはオリゴ糖を含有するであろう。もう1つの好ましい実施形態はスタフィロコッカス・アウレウスの5型、8型または336型莢膜多糖を含有するであろう。もう1つの好ましい実施形態はスタフィロコッカス・エピデルミジスのI型、II型またはIII型莢膜多糖を含有するであろう。もう1つの好ましい実施形態はB群連鎖球菌のIa型、Ic型、II型またはIII型

40

50

莢膜多糖を含有するであろう。もう1つの好ましい実施形態はA群連鎖球菌の莢膜多糖を含有し、好ましくは更に、少なくとも1つのMタンパク質を含み、より好ましくは、複数の型のMタンパク質を含む。

#### 【0320】

本発明のそのような莢膜多糖またはオリゴ糖は非結合形態であっても、あるいは破傷風トキソイド、破傷風トキソイド断片C、ジフテリアトキソイド、CRM197、ニューモリジン、プロテインD(米国特許第6342224号)のような担体タンパク質に結合していてもよい。該多糖またはオリゴ糖結合体は任意の公知カップリング技術により製造することができる。例えば、該多糖をチオエーテル結合によりカップリングすることができる。この結合方法は、1-シアノ-4-ジメチルアミノピリジミウムテトラフルオロボラート(CDAP)で多糖を活性化してシアン酸エステルを生成することに基づく。したがって、該活性化多糖を、直接的にまたはスペーサー基を介して、担体タンパク質上のアミノ基にカップリングすることが可能である。好ましくは、該シアン酸エステルをヘキサンジアミンにカップリングし、該アミノ誘導体化多糖を、チオエーテル結合の形成を含むヘテロ連結化学法を用いて担体タンパク質に結合させる。そのような結合体はUniformed Services UniversityのPCT公開出願W093/15760号に記載されている。

10

#### 【0321】

該結合体は、米国特許第4365170(Jennings)および米国特許第4673574号(Anderson)に記載の直接的な還元的アミノ化法によっても製造することが可能である。他の方法はEP-0-161-188、EP-208375およびEP-0-477508に記載されている。もう1つの方法は、アジピン酸ヒドラジド(ADH)で誘導体化された臭化シアン活性化多糖の、カルボジイミド縮合(C hu C.ら Infect. Immunity, 1983 245 256)によるタンパク質担体へのカップリングを含む。

20

#### 【0322】

好ましい肺炎球菌タンパク質抗原は、(肺炎球菌の生活環の少なくとも一部において宿主の免疫系により認識されうる)肺炎球菌の外表面上に露出した肺炎球菌タンパク質、あるいは肺炎球菌により分泌または放出されるタンパク質である。最も好ましくは、該タンパク質は、ストレプトコッカス・ニューモニエの毒素、付着因子、2成分シグナルトランスデューサーもしくはリポタンパク質またはそれらの断片である。特に好ましいタンパク質には、ニューモリジン(好ましくは、化学処理または突然変異により解毒されているもの)[Mitchellら Nucleic Acids Res. 1990 Jul 11; 18(13): 4010 "Comparison of pneumolysin genes and proteins from Streptococcus pneumoniae types 1 and 2.", Mitchellら Biochim Biophys Acta 1989 Jan 23; 1007(1): 67-72 "Expression of the pneumolysin gene in Escherichia coli: rapid purification and biological properties.", WO 96/05859 (A. Cyanamid), WO 90/06951 (Paton et al), WO 99/03884 (NAVA)]; PspAおよびその膜貫通欠失変異体(米国特許第5804193号-Brilesら); PspCおよびその膜貫通欠失変異体(WO 97/09994-Brilesら); PsaAおよびその膜貫通欠失変異体(Berry & Paton, Infect Immun 1996 Dec;64(12):5255-62 "Sequence heterogeneity of PsaA, a 37-kilodalton putative adhesin essential for virulence of Streptococcus pneumoniae"); 肺炎球菌コリン結合タンパク質およびその膜貫通欠失変異体; CbpAおよびその膜貫通欠失変異体(WO 97/41151; WO 99/51266); グリセルアルデヒド3-リン酸デヒドロゲナーゼ(Infect. Immun. 1996 64:3544); HSP70(WO 96/40928); PcpA(Sanchez-Beatoら FEMS Microbiol Lett 1998, 164:207-14); M様タンパク質(EP 0837130)および付着因子18627, (EP 0834568)が含まれるが、これらに限定されるものではない。更なる好ましい肺炎球菌タンパク質抗原としては、WO 98/18931に開示されているもの、特に、WO 98/18930およびPCT/US99/30390において選ばれているものが挙げられる。

30

40

#### 【0323】

本発明の免疫原性組成物/ワクチンは、所望により、他のグラム陰性菌、例えばモラクセラ・カタラーリスまたはヘモフィルス・インフルエンザから製造された外膜小胞調製物を含みうる。

50

## 【0324】

組成物、キットおよび投与

前述したように、本発明は、細胞または多細胞器官に投与するためのFrpBタンパク質を含む組成物を提供する。

## 【0325】

免疫原性組成物は、宿主に投与した場合に免疫応答を誘導することができる少なくとも1種の抗原を含む。好ましくは、そのような免疫原性組成物は、ナイセリア属、好ましくはナイセリア・メニンギチジスおよび/またはナイセリア・ゴノローエの感染に対する防御性の免疫応答を誘導可能である。

## 【0326】

本発明はまた、本明細書に記載するタンパク質、またはそれらのアゴニストもしくはアンタゴニストを含む組成物に関する。本発明のタンパク質は、細胞、組織または生物に使用するための非滅菌もしくは滅菌担体（1もしくは複数）、例えば個体への投与に適した医薬用担体などと組み合わせて用いることができる。そのような組成物は、例えば媒質添加剤または治療上有効な量の本発明のタンパク質、および薬学的に許容される担体もしくは賦形剤を含む。そのような担体としては、限定されるものではないが、生理食塩水、緩衝化生理食塩水、デキストロース、水、グリセロール、エタノールおよびこれらの組み合わせが挙げられる。製剤は、投与形式に適合させる必要がある。本発明はさらに、前述の本発明の組成物の1種以上の有効成分を入れた1以上の容器を含む診断用医薬パックおよびキットに関する。

10

20

## 【0327】

本発明のタンパク質および他の化合物は、単独で、または他の化合物（治療用化合物など）と組み合わせて用いることができる。

## 【0328】

医薬組成物は、任意の有効な簡便な様式で投与することができ、中でも例えば、局所、経口、肛門、膣、静脈内、腹腔内、筋肉内、皮下、鼻腔内または皮内経路により投与することができる。

## 【0329】

治療または予防として、注射可能な組成物、例えば滅菌水性分散液、好ましくは等張液として有効成分を個体に投与することができる。

30

## 【0330】

組成物は、例えば全身経路または経口経路による投与経路に適合させることができる。全身投与の好ましい形態には、注射、典型的には静脈注射が含まれる。他の注射経路、例えば皮下、筋肉内または腹腔内経路も用いることができる。全身投与のための別の手段としては、浸透液（胆汁塩もしくはフシジン酸または他の界面活性剤など）を用いた経粘膜および経皮投与が挙げられる。さらに、本発明のタンパク質または他の化合物が腸溶製剤または被胞製剤として製剤化されうる場合には、経口投与もまた可能である。これらの化合物の投与はまた、軟膏、ペースト、ゲル剤、溶剤、粉剤などの形態で局所および/または局所化して投与することも可能である。

40

## 【0331】

哺乳動物、特にヒトへの投与のために、有効成分の日用量は、0.01mg/kg~10mg/kg、典型的にはおよそ1mg/kgであると予想される。いずれの場合でも医師は、個体にとって最適な実際の投与量を決定することができ、またそれは特定の個体の年齢、体重および反応性に依りて異なりうる。上記の投与量は平均の場合の事例である。当然のことながら、個体の中にはより高用量または低用量の範囲が有効である場合もあり、それもまた本発明の範囲内である。

## 【0332】

必要な投与量は、ペプチドの選択、投与経路、製剤の性質、被験体の症状の性質、および実施する実施者の判断により異なる。しかしながら好適な投与量は、0.1~100µg/kg被験体の範囲である。

50

## 【0333】

ワクチン組成物は簡便には注射可能な形態である。慣用のアジュバントを用いて免疫応答を高めることができる。ワクチン接種の好適な単位用量は、0.5～5 μg/kg抗原であり、その用量は、好ましくは1～3週間間隔で1～3回投与する。示される容量範囲においては、好適な個体への投与を排除する必要のある本発明の化合物により有害な毒性作用は全く観察されないと考える。

## 【0334】

利用可能な多種多様の化合物の点から、また種々の投与経路の有効性の違いから必要とされる投与量には広範な変形が予想される。例えば、経口投与は、静脈内注射による投与よりも高用量を必要とすることが予想される。これらの投与量レベルの変形に関しては、最適化のための標準的な経験的作業を用いて調節することができ、また当技術分野で周知である。

## 【0335】

本発明の好ましい特徴および実施形態を、以下の実施例を参照してさらに説明する。

## 【実施例1】

## 【0336】

FrpBのリフォールディング

FrpBは、ナイセリア・メニンギチジスの最も多量に存在する鉄制限誘導型外膜タンパク質である。株間で配列が相当に保存され、かつ殺菌性抗体を誘導する能力を保持したままで、発現レベルが高ければ、髄膜炎菌疾患を予防するための興味深いワクチン候補となる。しかし、このタンパク質は、幾つかの多様性を含んでおり、その大部分は2つの大きな細胞外ループ（それぞれL5およびL7）に限られる（van der Leyら、1996）。

## 【0337】

このタンパク質のより保存された部分に対して免疫応答を生起させる試みにおいて、ループL7に28個のアミノ酸残基の欠失を作製した。ループL7でのこの28個のアミノ酸欠失以外に、ループL5に24個のアミノ酸のさらなる欠失を含む、第2の突然変異体を作製した。L7に加えてL5を除去することにより、広域スペクトルの殺菌性抗体を誘導する可能性がある、FrpBの非常に良く保存されたドメインだけからなるFrpBタンパク質の構築を目的とする。FrpBおよびFrpBループ欠失突然変異体は、大腸菌（*Escherichia coli*）の封入体内で作製し、続いて、*in vitro*でリフォールディングした。リフォールディングは成功し、これらのタンパク質に対する免疫応答を分析することが可能である。

## 【0338】

I：FrpBをコードする遺伝子およびFrpBループ欠失突然変異体をコードする遺伝子の構築

ナイセリア・メニンギチジスH44/76のFrpBをコードする遺伝子は、pET11a内でシグナル配列を用いずにクローニングして、プラスミドpET11a-FrpBを得た。FrpBループ欠失突然変異体は、4プライマーPCR法を用いて調製して、細胞外ループL7に28個のアミノ酸の欠失を作製した。これにより、コードされたタンパク質は、ループ7からアミノ酸tteeekngqkvdkpmeqqmkdradedtvdhが欠失していた。この遺伝子を、シグナル配列を含まないpET11aに導入して、プラスミドpET11a-FrpB 28を得た。この構築物を用いて、プラスミドpET11a-FrpB 7 5を作製した。このプラスミドは、ループL7での28個のアミノ酸欠失以外に、ループL5からのさらなるアミノ酸qhrigirtvreeftvgdkssrinidの欠失を含むタンパク質をコードする。上記は、図6の旧ループ命名モデルを用いている。

## 【0339】

II：FrpB、FrpB 28およびFrpB 7 5の過剰発現およびin vitroリフォールディング

FrpB、FrpB 28およびFrpB 7 5は、大腸菌BL21内で調製し、その後、封入体を単離した。続いて、これらの封入体を8M尿素に可溶化した。20mMエタノールアミン（pH11）、0.5%ツイタージェント3-12（SB-12）、0.4M塩酸グアニジン中の可溶化物質の1：10希釈物を用いて、リフォールディングを行った。リフォールディングは、室温で16時間行った。尿素および塩酸グアニジンを除去し、緩衝液をエタノールアミン（pH11）からTris-HCl（pH7.2）に交換した。リフォールディング形態は、半ネイティブポリアクリルアミドゲ

10

20

30

40

50

ル電気泳動により検出した。電気泳動は、SDSを含まないゲルを用いて行った。

【0340】

サンプル緩衝液では、0.02% SDS、および0.075% (冷サンプル) もしくは2% SDS (煮沸サンプル) を含む泳動用緩衝液を用いた。サンプルを5分間冷たいまま維持するか煮沸した後、電気泳動を、氷上で10mAの一定電流で行った。

【0341】

### III: 結果

尿素変性タンパク質を、エタノールアミン (pH11)、0.5% ツイタージェント12、0.4M 塩酸グアニジン中に1:10に希釈した。16時間後、サンプルを脱塩し、緩衝液をTris-HCl (pH7.2) と交換した。サンプル緩衝液では、0.02% SDSおよび0.075% (冷サンプル) もしくは2% SDS (煮沸サンプル) を含む泳動用緩衝液を用いた。サンプルを5分間冷たいまま維持するか煮沸した後、電気泳動を、氷上で10mAの一定電流で行った。

【0342】

半ネイティブゲル電気泳動から得られた結果から、FrpB、FrpB<sub>28</sub>およびFrpB<sub>75</sub>のフォールディングされたモノマーが示された。これらのフォールディング形態は、変性タンパク質と比較して高い電気泳動移動度を有するタンパク質として見ることができる。また、リフォールディングされたFrpBならびにFrpB<sub>28</sub>が*in vitro*でオリゴマー性複合体へとアセンブリされ得ることも明らかであり、このことは、天然のFrpBの重要な特性である。FrpB<sub>75</sub>のオリゴマー性複合体形成能は、明らかに損なわれているが、フォールディングされたモノマーの存在により、正しくフォールディングされていることが示される。

【0343】

これらの正しくフォールディングされたタンパク質を用いて、これらのタンパク質の、ナイセリア・メニンギチジスに対する防御性抗体の合成の誘導能を調べることができる。これらのタンパク質の正しいフォールディングは、防御性免疫応答を獲得する上で極めて重要であると考えられる。この理由は、生来の立体構造型エピトープが存在する可能性が高いからである。

【実施例2】

【0344】

### リフォールディングされたFrpBおよびその突然変異体の改善プロトコール

封入体を6M塩酸グアニジンに可溶化し、続いて、迅速に(ボルテックス処理により) 20~27mMのエタノールアミン (HClもNaOHも添加されていない) + 0.5% SB-12 (ツイタージェント3-12) 中で1:20に希釈した。翌日、緩衝液をHepes (pH7.5) + 0.3% SB-12と交換して、タンパク質を安定化した。

【0345】

この改善プロトコールにより、リフォールディングの間に凝集が起こらないようになる。図10Aには、この新しいプロトコールにより*in vitro*でフォールディングされたFrpBの図を示し、併せて、Jasco-810スペクトロポラリメーターで記録した、その対応するCDスペクトル [30回のスキンの平均] を共に示す (図10B)。

【実施例3】

【0346】

### *in vitro*フォールディングFrpB (突然変異体) に対する免疫応答の評価

*in vitro*でフォールディングされたFrpB、FrpB<sub>28</sub>およびFrpB<sub>5/3</sub>を用いて、免疫実験を行った (新ループ命名 - 図9を参照)。血清を、抗原として*in vitro*フォールディングFrpBを用いたELISAで分析した。

【0347】

これらの血清は、親株および16種の異種株について、ウエスタンブロットにより分析した (図10A)。全ての株においてFrpBが検出され、保存されたエピトープが認識されたことが示された。BNCV株および2996株 (\*) の検出の改善は、FrpB<sub>5/3</sub>に対して生起させた抗血清を用いた場合に見られた。

【0348】

10

20

30

40

50

結論：3つの免疫化の全てから、良好な応答が見られ、株間で交差反応性である血清が得られた。さらに、2996株およびBNCV株の認識が高まったことから、欠失突然変異体による免疫により、免疫応答をこのタンパク質の異なるドメインに対して再生起させることが可能であることが示唆される。

【実施例4】

【0349】

過剰発現FrpB(突然変異体)を保有するOMVまたはリフォールディング野生型FrpBによる免疫

FrpB(突然変異型)タンパク質を保有するOMVに対する免疫応答を分析するために、目的のタンパク質(FrpB、FrpB 28およびFrpB 5/3[図9の新ループ命名を用いる])を、髄膜炎菌内で過剰産生させた(CE2001におけるpFP10由来の発現(H44/76 PorA(-))。Fredriksenら(NIPH Ann. 1991 Dec;14(2):67-79; discussion 79-80)に従って、ワクチンを製造した。続いて、ブレブ(bleb)ワクチンならびに本発明のリフォールディング野生型FrpBを用いて免疫実験を行い、Nmen H44/76に対するSBA実験用の血清を得た。

【0350】

調製物をOF1マウスモデルで試験した。0日目、21日目および35日目に、1群あたり10匹に、3種の注射物を、IM経路で投与した。1回の注射当たり、マウスには、アジュバント(AI<sup>3+</sup>塩+3DMPL)中に配合した5μgの抗原を投与した。2回目および3回目の注射の7日後に、血液サンプルを採取した。

【0351】

プールしたPost II血清およびPost III血清ならびに個々のPost III血清を、SBAにおいて、同種(H44/76)および異種MenB株ならびにH44/76 FrpB K0株について試験した。

【表1】

プールしたマウス血清7PII および7PIII についての  
ELISAによる特定の抗FrpB抗体

群	抗原	中点力価	
		7PII	7PIII
1	Frbp WT DOC 抽出物	373	542
2	FrbpBD28 DOC 抽出物	304	532
3	FrbpBD5/D3 DOC ブレブ	212	423
4	Frbp WT リフォールディング物	3406	4837
5	(-)	25	25

【0352】

リフォールディングされたブレブ中のWT FrpBならびに突然変異体は、抗FrpB抗体の産生を誘導した(上記のELISAの表を参照)。

【0353】

ブレブ中の野生型FrpBおよび野生型リフォールディングFrpBは、H44/76に対して、高い殺菌性抗体力価を示した。H44/76 FrpB K0株の使用から、これらの殺菌性抗体がFrpBに対して生起されることが実証された。示された。FrpB 28およびFrpB 5/3を含むブレブは、低い殺菌性抗体力価を示した。FrpB、FrpB 28およびFrpB 5/3を含むブレブは、異種MenB M97250687株に対して低い殺菌性力価を誘導したが、FrpB 28のブレブは、他の2種よりも高いSBAを誘導した(1/100の希釈率を上回る力価)。

【実施例5】

【0354】

FrpBループ位置におけるエピトープ提示

先に述べたように、FrpBにおける配列の多様性は、ほとんどが、提唱した新モデル(図

10

20

30

40

50

9) のループL3およびループL5に対応するこのタンパク質の2つのドメインに限られる。これら2つのループのうち、ループL5は、高度に免疫原性であることが先に示され、このタンパク質のこの部分に対して殺菌性抗体が生起される。このループの多様性の許容および野生型立体構造の殺菌性抗体を誘導するその能力を利用するために、このタンパク質のこの部分を選んで、外来エピトープの挿入部位とした。

#### 【0355】

原理の証拠として、H44/76由来のPorAの非常に良く研究されているエピトープを選んで、外来エピトープとして機能させた。FrpBのループL5(新モデル)に対応する高可変領域(TTEEKNGQKVDKPMEEQQMKDRADEDTVH)を除去し、ループ4由来のPorA 1.7,16断片をコードする短鎖配列[QLKDTNNNASを含むFrpB-C1g(ループ4またはPorAに対応する配列には下線を付してある)、PorA配列に隣接するQLおよびASは担体タンパク質に取り込まれた制限部位によりコードされる]を用いて、2つの制限部位(MunIおよびNheI)からなる短鎖配列で置き換えた。

10

#### 【0356】

続いて、これらの隣接制限部位を用いて、ループ4の大部分をコードするオリゴヌクレオチド[FrpB-C2 - QLKSAYTPAYTKDTNNNLTLPVAVVAS]を挿入した。続いて、両者の遺伝子を、シグナル配列を用いずに、pET11a(Novagen)プラスミドに導入した。タンパク質の発現は、大腸菌BL21内で行った。これらの構築物を発現させることにより、封入体が得られ、これらを単離した。続いて、これらの封入体を可溶化し、先に記載したプロトコールに従ってin vitroでフォールディングを行った。P1.7,16の最短のエピトープKDTNNNを認識するモノクローナル抗体MN5C11G(1:100,000)(Toropainenら, 2001 Microb Pathog 30:139)を用いて、ウエスタンブロットならびにドットブロットアッセイ(図12)を行った。

20

#### 【0357】

両者のキメラタンパク質を順次、in vitroでリフォールディングし、PorA抗体を有するタンパク質を検出したところ、この外来断片が正しく挿入されていることが示された。重要なことに、このキメラタンパク質のフォールディング形態は、変性型タンパク質と比較した場合、より効率的に反応し、FrpB内でこの外来エピトープが正しくフォールディングされていることが示唆される。

30

#### 【実施例6】

#### 【0358】

#### FrpBのループ位置におけるミモトープ提示

FrpBループはまた、ペプチドミモトープ(例えば髄膜炎菌LOSのもの)を提示するのにも理想的である。ミモトープを正しくフォールディングされた状態で提示することにより、例えばワクチン中に存在するLOSの有害な作用を有することなく、LOSに対する免疫応答を起こすことができるようになる。

#### 【0359】

Mab216は、内部コアLOSのエピトープを認識するモノクローナル抗体である。当業界では、このMabを有する環化ヘプタマーペプチドのライブラリーについてバイオパンニングすることにより、ミメティックペプチドが同定された(Ian Feavers)。

40

#### 【0360】

このペプチドの6個のアミノ酸をFrpBのループ5(図5の新ループ命名)に挿入し、LOSネガティブの状態のH44/76ナイセリア(IpxAノックアウト突然変異体)内でキメラを過剰発現させた(pFP10プラスミド)。下記の得られたタンパク質の配列を参照されたい。OMVを精製し、マウスに注射した(6~8週齢の雌性OF1、IM経路での3回のD0-21-28の注射; ALOH/3DMPL中の5μgのプレブを投与し、41日目に血清を回収した)。ウエスタンブロットにより、Mab216がFrpB-ミモトープを認識することが判った。

#### 【0361】

#### 配列

以下に、FrpB 28およびFrpB 5/3[新ループ命名](1個のアミノ酸の変化を起こ

50

す点突然変異を含む)の配列を示す。ここで示す配列は、pFP10プラスミド内に存在する遺伝子に相当する。したがって、シグナル配列は存在したままである。大腸菌内で封入体中のタンパク質を発現させるために、それらのシグナル配列を含まない対応する遺伝子を用いた。シグナル配列を含まない構築物(pET11a)では、110位の「G」は、新たに作製したATGの最後のヌクレオチドに該当する。

## 【0362】

FrpB 28: 二重突然変異体において欠失しているアミノ酸を太字下線で示す

MNTPLFRLSLLSLTLAAGFAHAAENNAKVVLDTVTVKGDQRQGSKIRTNIVTLQKQKDE  
 STATDMRELLKKEEPSIDFGGGNGTSQFLTLRGMGQNSVDIKVDNAYSQSDQILYHQGR  
 FIVDPALVKVSVQKAGSASAGIGATNGAIIAKTVDAQDLLKGLDKNWGVRLNSGF  
 ASNEGVSYGASVFGKEGNFDGLFSYRNDEKDYEAGKGFNRVNGGKTPYPSALDKRS  
 YLAKIGTTFGDDHRIVLSHMKDQHRGIRTVREEFTVGDKSSRINIDRQAPAYRETT  
 QSNTNLAYTGKNLGFVEKLDANAYVLEKERYSAADSGTGYAGNVKGNHTRITTRGA  
 NFNFDRLAEQTLKYGINYRHQEKPKQAFLNKFSIPAYKLSNPTKTDGTVYVEA  
 HDIGDFTLTGGLRYDRFKVKTHTDGKTVSSSNLNPSTGVIWQPHEHWSFSASHNYASR  
 SPRLYDALQTHGKRGIIISIADGTKAERARNTGIFNYNDGTFAANGSYFWQTIKDAL  
 ANPQNRHDSVAVREAVNAGYIKNHGYELGASYRTGGLTAKVGVSHSKPRFYDTHKDK  
 LLSANPEFGAQVGRWTASLAYRFQNPNIIGWRGRYVQKATGSILAAGQKDRKGNL  
 ENVVRKGFVNDVFANWKPLGKDTLNVNLSVNNVFNKFYYPHSQRWTNTLPGVGRDV  
 RLGVNKYF

10

20

## 【0363】

FrpB 5/ 3: 点突然変異により、ループ6でKからRへのアミノ酸の変化が起こる(太字下線)

MNTPLFRLSLLSLTLAAGFAHAAENNAKVVLDTVTVKGDQRQGSKIRTNIVTLQKQKDE  
 STATDMRELLKKEEPSIDFGGGNGTSQFLTLRGMGQNSVDIKVDNAYSQSDQILYHQGR  
 FIVDPALVKVSVQKAGSASAGIGATNGAIIAKTVDAQDLLKGLDKNWGVRLNSGF  
 ASNEGVSYGASVFGKEGNFDGLFSYRNDEKDYEAGKGFNRVNGGKTPYPSALDKRS  
 YLAKIGTTFGDDHRIVLSHMKDRQAPAYRETTQSNTNLAYTGKNLGFVEKLDANAY  
 VLEKERYSAADSGTGYAGNVKGNHTRITTRGANFNFDRLAEQTLKYGINYRHQEK  
 IKPQAFLNKFSIPAYKLSNPTKTDGTVYVEAHDIGDFTLTGGLRYDRFKVKTHTDG  
RTVSSSNLNPSTGVIWQPHEHWSFSASHNYASRSPRLYDALQTHGKRGIIISIADG  
TKAERARNTGIFNYNDGTFAANGSYFWQTIKDALANPQNRHDSVAVREAVNAGYIKN  
GYELGASYRTGGLTAKVGVSHSKPRFYDTHKDKLLSANPEFGAQVGRWTASLAYRF  
QNPNIIGWRGRYVQKATGSILAAGQKDRKGNLENVVRKGFVNDVFANWKPLGKDT  
LNVNLSVNNVFNKFYYPHSQRWTNTLPGVGRDVRRLGVNKYF

30

## 【0364】

FrpB 28: 起点を太字および下線で示す

GGCGCTTGGATTTACTTCCCTCATACTCAAGAGGACGATTGAATGAATACCCCAT  
 TGTTCCTCTCAGCCTGCTCTCGCTCACACTTGCAGGTTTTGCCACGCGGCAG  
 AAAATAATGCCAAGGTCGTAAGTACTGATACCGTACTGTAAAAGGCGACCGCCAAGGCA  
 GCAAAATCCGTACCAACATCGTTACGCTGCAACAAAAGACGAAAGCACCGCAACCG  
 ATATGCGCGAACTCTTAAAAGAAGAGCCGTCCATCGATTTCCGCGGCGGCAACGGCA  
 CGTCCCAATTCCTGA  
 CGCTGCGCGGCATGGGTCAGAACTCTGTGACATCAAGGTGGACAACGCCTATTCCG  
 ACAGCCAAATCCTTTACCACCAAGGCAGATTTATTGTGATCCCGCTTTGGTTAAAG  
 TCGTTTCCGTACAAAAAGGCGCGGGTTCCGCTCTGCCGGTATCGGCGCGACCAACG  
 GCGGATCATGCCAAAACCGTCGATGCCAAGACCTGCTCAAAGGCTTGATAAAA  
 ACTGGGGCGTGCCTCAACAGCGGCTTTGCCAGCAACGAAGGCGTAAGCTACGGCG  
 CAAGCGTATTTCGGAA  
 AAGAGGGCAACTTCGACGGCTTGTCTCTTACAACCGCAACGATGAAAAAGATTACG

40

50

AAGCCGGCAAAGGTTTCCGCAATGTCAACGGCGGCAAACCGTACCGTACAGCGCGC  
 TGGACAAACGCAGCTACCTCGCCAAAATCGGAACAACCTTCGGCGACGACGACCACC  
 GCATCGTGTGAGCCACATGAAAGACCAACACCGGGGCATCCGCACTGTGCGTGAAG  
 AATTTACCGTCGGCGACAAAAGTTCACGGATAAATATTGACCGCCAAGCCCCTGCTT  
 ACCGCGAAAACCTACCAATCCAACACCAACTTGGCGTACACGGGTAAAAACCTGGGCT  
 TTGTGCAAAAACTGGATGCCAACGCCTATGTGTTGAAAAAGAACGCTATTCCGCCG  
 ATGACAGCGGCACCGGCTACGCAGGCAATGTAAAAGGCCCAACCATAACCGAATCA  
 CCACTCGTGGTGCGAACCTCAACTTCGACAGCCGCCTTGCCGAACAAACCCTGTTGA  
 AATACGGTATCAACTACCGCCATCAGGAAATCAAACCGCAAGCATTTTTGAACTCGA  
 AATTCTCCATCCCCGCCTACAAACTTTCCAACCCGACAAAACCGATACCGGCGTAT  
 ATGTTGAAGCCATTACAGACATCGGCGATTTACGCTGACCGGCGGGCTGCGTTACG  
 ACCGCTTCAAGGTGAAAACCCATGACGGCAAACCGTTTCAAGCAGCAACCTTAACC  
 CGAGTTTCGGTGTGATTTGGCAGCCGCACGAACACTGGAGCTTCAGCGCGAGCCACA  
 ACTACGCCAGCCGACGCCCGCCTGTATGACGCGCTGCAAACCCACGGTAAACGCG  
 GCATCATCTCGATTGCCGACGGCACAAAAGCCGAACGCGCGCAATACCGAAATCG  
 GCTTCAACTACAACGACGGCAGTTTGGCGAAACGGCAGCTACTTCTGGCAGACCA  
 TCAAAGACGCGCTTGCCAATCCGCAAACCGCCACGACTCTGTGCGCGTCCGTGAAG  
 CCGTCAATGCCGGTTACATCAAAAACCACGGTTACGAATTGGGCGCGTCTACCGCA  
 CCGGCGGCCTGACTGCCAAAGTCGGCGTCAGCCACAGCAAACCGCGCTTTTACGATA  
 CGCACAAAGACAAGCTGTTGAGCGCAATCCTGAATTTGGCGCACAAAGTCGGCCGCA  
 CTTGGACGGCCTCCCTTGCTACCGCTTCCAAAATCCGAATCTGGAATCGGCTGGC  
 GCGGCCGTTATGTTCAAAAAGCTACGGGTTTCGATATTGGCGGCAGGTCAAAAAGACC  
 GCAAAGGCAACTTGGAACGTTGTACGCAAAGGTTTCGGTGTGAACGATGTCTTCG  
 CCAACTGGAACCGCTGGGCAAAGACAGCTCAATGTCAATCTTTCGGTTAACAACG  
 TGTTCACAAGTTCTACTATCCGCACAGCCAACGCTGGACCAATACCCTGCCGGGCG  
 TGGGACGTGATGTACGCT  
 TGGGCGTGAAC TACAAGTTCTAAAACGCACGACGT

10

20

【 0 3 6 5 】

FrpB 5/ 3 : 起点および点突然変異を太字 + 下線で示す

GGCCGCTTGGATTTACTTCCCTTCACTCAAGAGGACGATTGAATGAATACCCCAT  
 TGTTCCGTCTCAGCCTGCTCTCGCTCACACTTGGCGCAGGTTTTGCCACGCGGCAG  
 AAAATAATGCCAAGGTCTACTGGATACCGTACTGTAAAAGGCGACCGCCAAGGCA  
 GCAAAATCCGTACCAACATCGTTACGCTGCAACAAAAGACGAAAGCACCGCAACCG  
 ATATGCGCGAACTCTTAAAAGAAGAGCCGTCCATCGATTTCCGGCGCGGCAACGGCA  
 CGTCCCAATTCCTGA  
 CGCTGCGCGGCATGGGTCAGAACTCTGTGACATCAAGGTGGACAACGCCTATTCCG  
 ACAGCCAAAATCCTTTACCACCAAGGCAGATTTATTGTGATCCCGCTTTGGTTAAAG  
 TCGTTTCCGTACAAAAGGCGCGGGTTCCGCTCTGCCGATCGGGCGGACCAACG  
 GCGCGATCATCGCCAAAACCGTCGATGCCAAGACCTGCTCAAAGGCTTGGATAAAA  
 ACTGGGGCGTGGCCTCAACAGCGGCTTTGCCAGCAACGAAGGCGTAAGCTACGGCG  
 CAAGCGTATTTCGGAA  
 AAGAGGGCAACTTCGACGGCTTGTCTCTTACAACCGCAACGATGAAAAAGATTACG  
 AAGCCGGCAAAGGTTTCCGCAATGTCAACGGCGGCAAACCGTACCGTACAGCGCGC  
 TGGACAAACGCAGCTACCTCGCCAAAATCGGAACAACCTTCGGCGACGACGACCACC  
 GCATCGTGTGAGCCACATGAAAGACCGCAAGCCCCTGCTTACCGCGAAACTACCC  
 AATCCAACACCAACTTGGCGTACACGGGTAAAAACCTGGGCTTTGTGAAAAACTGG  
 ATGCCAACGCCTATGTGTTGAAAAAGAACGCTATTCCGCCGATGACAGCGGCACCG  
 GCTACGCAGGCAATGTAAAAGGCCCAACCATAACCGAATCACCCTCGTGGTGCGA  
 ACTTCAACTTCGACAGCCGCCTTGCCGAACAAACCCTGTTGAAATACGGTATCAACT  
 ACCGCCATCAGGAAATCAAACCGCAAGCATTTTTGAACTCGAAATTCTCCATCCCCG

30

40

50

CCTACAAACTTTCCAACCCGACCAAAACCGATACCGGCGTATATGTTGAAGCCATTC  
 ACGACATCGGCGATTTACGCTGACCGGGCGGGCTGCGTTACGACCGCTTCAAGGTGA  
 AAACCCATGACGGCAGAACCGTTTTCAAGCAGCAACCTTAACCCGAGTTTCGGTGTGA  
 TTTGGCAGCCGCAGAACACTGGAGCTTCAGCGCGAGCCACAACACTACGCCAGCCGCA  
 GCCCGCGCTGTATGACGCGCTGCAAACCCACGGTAAACGCGGCATCATCTCGATTG  
 CCGACGGCACAAAAGCCGAACGCGCGCAATACCGAAATCGGCTTCAACTACAACG  
 ACGGCACGTTTGCCGCAAACGGCAGCTACTTCTGGCAGACCATCAAAGACGCGCTTG  
 CCAATCCGCAAAAACCGCCACGACTCTGTGCGCGTCCGTGAAGCCGTCAATGCCGGTT  
 ACATCAAAAACACGGTTACGAATTGGGCGCGTCTACCGCACCGGGCGCCTGACTG  
 CCAAAGTCGGCGTCAGCCACAGCAAACCGCGCTTTTACGATACGCACAAAGACAAGC  
 TGGTTGAGCGGAATCCTGAATTTGGCGCACAAAGTCGGCCGCACTTGGACGGCCTCCC  
 TTGCCTACCGCTTCCAAAATCCGAATCTGAAAATCGGCTGGCGCGGCCGTTATGTTT  
 AAAAAAGTACGGGTTTCGATATTGGCGGCAGGTCAAAAAGACCGCAAAGGCAACTTGG  
 AAAACGTTGTACGCAAAGTTTTCGGTGTGAACGATGTCTTCGCCAACTGGAACCCG  
 TGGGCAAAGACACGCTCAATGTCAATCTTTTCGGTTAACAACGTGTTCAACAAGTTCT  
 ACTATCCGCACAGCCAACGCTGGACCAATACCCTGCCGGGCGTGGGACGTGATGTAC  
 GCTTGGGCGTGAACACTACAAGTTCTAAAACGCACGACGT

10

## 【 0 3 6 6 】

FrpB-ミモ ( 起点およびミモトープを太字下線を引いた )

TGTTAATATAAAATAAAAAATAATTATTAATTATTTTTCTTATCCTGCCAAATCTTAACGGTTTTGGATTTA  
 CTTCCCTTCACTCAAGAGGACGATTGAATGAATACCCATTGTTCCGTCTCAGCCTGCTCTCGCTCA  
 CACTTGGCGCAGGTTTTGCCACGCGGCAGAAAATAATGCCAAGGTCGTACTGGATACCGTTACTGTAA  
 AAGGCGACCGCAAGGCAGCAAAATCCGTACCAACATCGTTACGCTGCAACAAAAGACGAAAGCACCG  
 CAACCGATATGCGGCAACTCTTAAAAGAAGAGCCGTCCATCGATTTTCGGCGGGCAACGGCACGTCCC  
 AATTCTGACGCTGCGCGGCATGGGTGAGAACTCTGTGACATCAAGGTGGACAACGCCTATTCCGACA  
 GCCAAATCCTTTACCACCAAGGCAGATTTATTGTCGATCCCGCTTTGGTTAAAGTCGTTTCCGTACAAA  
 AAGGCGCGGGTTCCGCCCTCTGCCGGTATCGGCGCGACCAACGGCGCGATCATCGCCAAAACCGTCGATG  
 CCCAAGACCTGCTCAAAGGCTTGGATAAAAACCTGGGGCGTGGCCTCAACAGCGGCTTTGCCAGCAACG  
 AAGGCGTAAGCTACGGCGAAGCGTATTCGGAAAAGAGGGCAACTTCGACGGCTTGTCTCTTACAACC  
 GCAACGATGAAAAAGATTACGAAGCCGGCAAAGGTTTCCGCAATGTCAACGGCGGCAAAACCGTACCGT  
 ACAGCGCGCTGGACAAACGCAGCTACCTCGCCAAAATCGGAACAACCTTCGGCGACGACGACCACCGCA  
 TCGTGTGAGCCACATGAAAGACCAACACGGGGCATCCGCACTGTGCGTGAAGAATTTACCGTCGGCG  
 AAAAAAGTTCACGGATAAATATTGACCGCAAGCCCCTGCTTACCGCGAAACTACCCAATCCAACACCA  
 ACTTGGCGTACACGGGTAAAAACCTGGGCTTTGTGAAAAACTGGATGCCAACGCCTATGTGTTGGAAA  
 AAGAACGCTATTCCGCGGATGACAGCGGCACCGGCTACGCAGGCAATGTAAGGCCCCAACCATACCC  
 GAATCACCACTCGTGGTGCGAACCTCAACTTCGACAGCCGCTTGCCGAACAAACCCTGTTGAAATACG  
 GTATCAACTACCGCCATCAGGAAATCAAACCGCAAGCATTTTTGAACTCGAAATCTCCATCCCGACGA  
 CAGAAGAGAAAAACGGTCAAAAAGTCGATGAAGTCTTATTTTCGTGGCAGCAAACCGATGGAACAACAAA  
 TGAAGACCGTGCAGATGAAGACACTGTTACGCCTACAAACTTTCCAACCCGACCAAAACCGATACCG  
 GCGTATATGTTGAAGCCATTCACGACATCGGCGATTTACGCTGACCGGGCGGCTGCGTTACGACCGCT  
 TCAAGGTGAAAACCCATGACGGCAAACCGTTTTCAAGCAGCAACCTTAACCCGAGTTTCGGTGTGATTT  
 GGCAGCCGCACGAACACTGGAGCTTCAGCGCGAGCCACAACACTACGCCAGCCGACGCCCGCGCCTGTATG  
 ACGCGCTGCAAACCCACGGTAAACGCGGCATCATCTCGATTGCCGACGGCACAAAAGCCGAACGCGCGC  
 GCAATACCGAAATCGGCTTCAACTACAACGACGGCACGTTTGGCGCAAACGGCAGCTACTTCTGGCAGA  
 CCATCAAAGACGCGCTTGCCAATCCGCAAACCGCCACGACTCTGTGCGCGTCCGTGAAGCCGTCAATG  
 CCGGTTACATCAAAAACACGGTTACGAATTGGGCGCGTCTACCGCACCGGGCGCCTGACTGCCAAAG  
 TCGGCGTCAGCCACAGCAAACCGCGCTTTTACGATACGCACAAAGACAAGCTGTTGAGCGCGAATCCTG  
 AATTTGGCGCACAAAGTCGGCCGCACTTGGACGGCCTCCCTTGCTACCGCTTCCAAAATCCGAATCTGG  
 AAATCGGCTGGCGCGGCCGTTATGTTCAAAAAGCTACGGGTTTCGATATTGGCGGCAGGTCAAAAAGACC  
 GCAAAGGCAACTTGAAAACGTTGTACGCAAAGGTTTTCGGTGTGAACGATGTCTTCGCCAACTGGAAC

20

30

40

50

CGCTGGGCAAAGACACGCTCAATGTCAATCTTTCCGGTTAACAACGTGTTCAACAAGTTCTACTATCCGC  
 ACAGCCAACGCTGGACCAATACCCTGCCGGGCGTGGGACGTGATGTACGCTTGGGCGTGAACACTACAAGT  
 TCTAAAAACGCACATCCCCGAAAAAATGCCGTCTGAAAGCCTTTCAGACGGCA

【 0 3 6 7 】

FrpB-ミモアミノ酸配列 ( 起点およびミモトープインサートは太字下線をひいた )

MNTPLFRLSLLSLTLAAGFAHAAENNAKVLDTVTVKGRQSGKIRTNIVTLQKDESTATDMRELLKE  
 EPSIDFGGGNGTSQFLTLRGMGQNSVDIKVDNAYSQILYHQGRFIVDPALVKVSVQKAGSASAGI  
 GATNGAIIAKTVDAQDLLKGLDKNWGVRLNSGFASNEGVSYGASVFGKEGNFDGLFSYNNRNDKDYEAG  
 KGFNRVNGGKTVPYALSALKRSYLAKIGTTFGDDHRIVLSHMKDQHRGIRTVREEFTVGDKSSRINIDR  
 QAPAYRETTQSNTNLAYTGKNLGFVEKLDANAYVLEKERYSSADDSGTGYAGNVKGNHTRITTRGANFN  
 FDSRLAEQTLKLYGI

10

NYRHQEIKPQAFNSKFSIPTTEEKNGQKVDEVLFRGTPMEQQMKDRAEDTVHAYKLSNPTKTDGTV  
 YVEAIIHDIGDFTLTGGLRYDRFKVKTHDGKTVSSSNLNPSTFGVIWQPHEHWSFSASHNYASRSPRLYDA  
 LQTHGKRGIIISIADGKAERARNTIEGFNYNDGTFANGSYFWQTIKDALANPQNRHDSVAVREAVNAG  
 YIKNHGYELGASYRTGGLTAKVGVSHSKPRFYDTHKDKLLSANPEFGAQVGRWTWASLAYRFQNPNI  
 GWRGRYVQKATGSILAAGQKDRKGNLENVVRKGFVNDVFANWKPLGKDTLNVNLSVNNVFNKFYYPHS  
 QRWTNTLPGVGRDVRVLGVNYKF

【 図面の簡単な説明 】

【 0 3 6 8 】

【 図 1 】 H44/76株 FrpBのアミノ酸配列およびヌクレオチド配列を示す図である。

20

【 図 2 】 FA19株 FrpBのアミノ酸配列およびヌクレオチド配列を示す図である。

【 図 3 】 2996株 FrpBのアミノ酸配列およびヌクレオチド配列を示す図である。

【 図 4 】 892257株 FrpBのアミノ酸配列およびヌクレオチド配列を示す図である。

【 図 5 】 ナイセリア・ゴノローエFA19株およびナイセリア・メニンギチジス菌 892257株、  
 2996株およびH44/76株に由来する成熟 FrpBタンパク質の配列比較を示す図である。

【 図 6 】 Petterssonら (1995) Infect. Immunology 63:4181-4184のモデルに従う、外膜に  
 おけるH44/76株 FrpBのトポロジーを示す図である。

【 図 7 】 8種の異なる髄膜炎菌株に由来する FrpBのループ7領域の配列比較を示す図であ  
 る (H44/76株が基準として使用されている)。

【 図 8 】 尿素変性 FrpB、FrpB 28および FrpB 7 5の in vitroでのフォールディングを実  
 証するゲルを示す図である。

30

【 図 9 】 外膜における FrpBの新しいトポロジーモデルを示す図であり、ループ3および5  
 (旧法では、それぞれループ5および7と同等)が示されている。

【 図 10 A 】 いかに FrpBが適切にリフォールディングされているかを示すアクリルアミド  
 ゲルを示す図である。

【 図 10 B 】 高度にフォールディングされた生成物が得られることを示す、Jasco-810ス  
 ペクトロポラリメーターで記録したCDスペクトル [30回のスキヤンの平均]を示す図であ  
 る。

【 図 11 】 in vitroでフォールディングされた FrpB (突然変異体) に対する免疫応答の評  
 価を示す図である。親株および16種の異種髄膜炎菌株を用いて行ったウエスタンブロット  
 (最初のレーンは親株)。

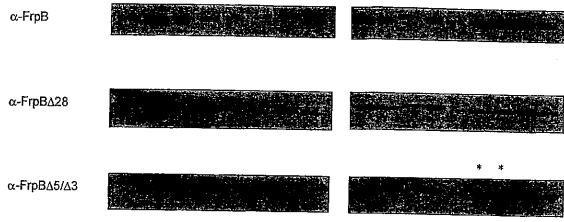
40

【 図 12 】 in vitroでフォールディングされた FrpB-C1および FrpB-C2のドットプロット分  
 析を示す図である。in vitroでフォールディングされたタンパク質は、冷たいままに保つ  
 か加熱して、タンパク質をアンフォールディングした。マウス・モノクローナル抗体 MN5C  
 11G 1:100,000 ( -PorA 1.7, 16 ) を用いて免疫検出を行った。

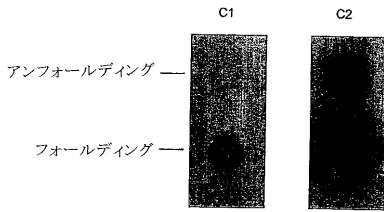




【 図 1 1 】



【 図 1 2 】



## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No PCT/E03/09634
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 A61K39/095 C07K14/22 C07K16/12 G01N33/48		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 A61K C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JANSEN C ET AL: "Biochemical and biophysical characterization of in vitro folded outer membrane porin PorA of Neisseria meningitidis" BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA. BIOMEMBRANES, AMSTERDAM, NL, vol. 1464, no. 2, 5 April 2000 (2000-04-05), pages 284-298, XP004273195 ISSN: 0005-2736	36
A	page 285, column 2, last paragraph - page 286, column 1 ----- -/--	25-35
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents :		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "C" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "&" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 30 March 2005		Date of mailing of the international search report 27.06.2005
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2200 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 346-2040, Tx. 31 851 epo.nl Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Noë, V

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.  
PCT/EP 03/09634

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	VAN DER LEY PETER ET AL: "Sequence variability of FrpB, a major iron-regulated outer-membrane protein in the pathogenic neisseriae" MICROBIOLOGY (READING), vol. 142, no. 11, 1996, pages 3269-3274, XP001182994 ISSN: 1350-0872 cited in the application the whole document -----	1-24, 37-63
A	US 6 265 567 B1 (SPARLING P. FREDERICK ET AL) 24 July 2001 (2001-07-24) abstract column 1, line 41 - column 2, line 3 column 5, line 10 - column 6, line 19 -----	
A	PETTERSSON A ET AL: "MOLECULAR CHARACTERIZATION OF FRPB, THE 70-KILODALTON REGULATED OUTER MEMBRANE PROTEIN OF NEISSERIA MENINGITIDIS" INFECTION AND IMMUNITY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, WASHINGTON, US, vol. 63, no. 10, October 1995 (1995-10), pages 4181-4184, XP002941952 ISSN: 0019-9567 abstract -----	
A	WO 01/55182 A (THE UNIVERSITY OF QUEENSLAND) 2 August 2001 (2001-08-02) abstract page 2, line 21 - page 3, line 3 -----	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/EP 03/09634**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Although claims 53 (completely) and 54-55 (insofar dependent on claim 53) are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:  
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:

see additional sheet

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:  
1-24, 26 (completely), 25, 27-63 (partially)

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/ EP 03/ 09634

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

## Continuation of Box I.1

Although claims 53 (completely) and 54-55 (insofar dependent on claim 53) are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

-----

## Continuation of Box I.2

Present claims 1-6,10-12,16-24 relate to a large number of possible compounds, namely a FrpB protein having one or more deletions of non-conserved amino acids compared to wild-type FrpB. Support within the meaning of Article 6 PCT and disclosure within the meaning of Article 5 PCT is to be found, however, for only a very small proportion of the compounds claimed. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Consequently, the search has been carried out for those parts of the claims which appear to be supported and disclosed, namely those parts relating to the compounds, namely those parts relating to the FrpB mutants having a deletion in loop 7 and FrpB mutants having a deletion in loop 7 AND loop 5 (and not the mutants having a deletion in only loop 5).

The applicant's attention is drawn to the fact that claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure. If the application proceeds into the regional phase before the EPO, the applicant is reminded that a search may be carried out during examination before the EPO (see EPO Guideline C-VI, 8.5), should the problems which led to the Article 17(2) declaration be overcome.

International Application No. PCT/ EP 03/09634

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-24,26(completely), 25,27-63 (partially)

Mutant FrpB protein having one or more deletions of non-conserved amino-acids compared to wild-type FrpB.  
Method for refolding above mutant FrpB protein.  
Pharmaceutical compositions comprising said refolded mutant FrpB, use thereof in the preparation of a medicament, antibodies against said protein and use of these antibodies in the preparation of a medicament. Use of said antibodies or said protein in a method of diagnosis.

---

2. claims: 25,27-63 (partially)

Method for refolding wild-type FrpB and refolded wild-type FrpB. Pharmaceutical composition comprising said FrpB and use thereof in the preparation of a medicament, antibodies against said protein and use of these antibodies in the preparation of a medicament. Use of said antibodies or said protein in a method of diagnosis.

---

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No  
PCT/EP 03/09634

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
US 6265567	B1	24-07-2001	US 2003096368 A1	22-05-2003
			AU 5537096 A	23-10-1996
			CA 2217522 A1	10-10-1996
			EP 0830456 A1	25-03-1998
			JP 11503322 T	26-03-1999
			WO 9631618 A1	10-10-1996
			-----	-----
WO 0155182	A	02-08-2001	WO 0155182 A1	02-08-2001
			AU 2818101 A	07-08-2001
			BR 0107857 A	29-10-2002
			CA 2398139 A1	02-08-2001
			CN 1419564 A	21-05-2003
			CZ 20022482 A3	15-01-2003
			EP 1252182 A1	30-10-2002
			HU 0300696 A2	28-07-2003
			JP 2003523208 T	05-08-2003
			MX PA02007184 A	26-02-2004
			NO 20023487 A	24-09-2002
			NZ 520445 A	27-02-2004
			PL 356819 A1	12-07-2004
			US 2002160016 A1	31-10-2002
			ZA 200206153 A	03-11-2003
			-----	-----

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
<b>C 1 2 N 5/10 (2006.01)</b>	C 1 2 N 5/00	A
<b>C 1 2 P 21/02 (2006.01)</b>	C 1 2 P 21/02	C
<b>C 0 7 K 16/12 (2006.01)</b>	C 0 7 K 16/12	
<b>A 6 1 K 39/00 (2006.01)</b>	A 6 1 K 39/00	H
<b>A 6 1 K 39/095 (2006.01)</b>	A 6 1 K 39/095	
<b>A 6 1 K 39/395 (2006.01)</b>	A 6 1 K 39/395	R
<b>G 0 1 N 33/53 (2006.01)</b>	G 0 1 N 33/53	D
	G 0 1 N 33/53	N

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

- (71) 出願人 505070173  
テクノロジー ファウンデーション (ステフティング フール デ テクニスケ ウェテンスハッペン)  
オランダ国 エヌエル - 3 5 2 7 ジェイピー コトレヒト, ファン フォーレンホーヴェンラーン 6 6 1
- (74) 代理人 100091096  
弁理士 平木 祐輔
- (74) 代理人 100096183  
弁理士 石井 貞次
- (74) 代理人 100118773  
弁理士 藤田 節
- (72) 発明者 ビーマンズ, ラルフ  
ベルギー国 ビー - 1 3 3 0 リキセンザール, リュ ド ランスティテュート 8 9, グラクソ  
スミスクライン バイオロジカルズ ソシエテ アノニム
- (72) 発明者 デノエル, フィリップ  
ベルギー国 ビー - 1 3 3 0 リキセンザール, リュ ド ランスティテュート 8 9, グラクソ  
スミスクライン バイオロジカルズ ソシエテ アノニム
- (72) 発明者 フェロン, クリスティアーヌ  
ベルギー国 ビー - 1 3 3 0 リキセンザール, リュ ド ランスティテュート 8 9, グラクソ  
スミスクライン バイオロジカルズ ソシエテ アノニム
- (72) 発明者 ゴラジ, カリーヌ  
ベルギー国 ビー - 1 3 3 0 リキセンザール, リュ ド ランスティテュート 8 9, グラクソ  
スミスクライン バイオロジカルズ ソシエテ アノニム
- (72) 発明者 コルテカーズ, ジェローン  
オランダ国 エヌエル - 3 5 8 4 シーエイチ コトレヒト, パドゥアラーン 8, コトレヒト  
ユニバーシティー
- (72) 発明者 プールマン, ジャン  
ベルギー国 ビー - 1 3 3 0 リキセンザール, リュ ド ランスティテュート 8 9, グラクソ  
スミスクライン バイオロジカルズ ソシエテ アノニム
- (72) 発明者 トマセン, ジャン  
オランダ国 エヌエル - 3 5 8 4 シーエイチ コトレヒト, パドゥアラーン 8, コトレヒト

ユニバーシティー

(72)発明者 ウェイナンツ, ヴィンセント

ベルギー国 ビー - 1 3 3 0 リキセンザール, リュ ド ランステイテュート 8 9, グラクソ  
スミスクライン バイオロジカルズ ソシエテ アノニム

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA50 BA80 CA01 GA11 HA01

4B064 AG01 AG27 CA19 CC24 DA01 DA15

4B065 AA01Y AB01 AC14 BA02 BD50 CA24 CA25 CA44 CA46

4C085 AA03 AA14 BA16 BA34 BA38 BA42 BB11 CC07 DD23 DD62

DD88 EE01

4H045 AA10 AA11 AA30 BA10 CA11 DA76 DA86 EA29 EA52 FA74

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	<a href="#">JP2006516183A5</a>	公开(公告)日	2006-11-30
申请号	JP2004532151	申请日	2003-08-28
[标]申请(专利权)人(译)	葛兰素史密丝克莱恩生物有限公司 乌得勒支大学 技术基金会斯蒂廷傻瓜去卡玛森网络规模紧张海切尔笔		
申请(专利权)人(译)	葛兰素史克生物制品兴业ANONYME 乌得勒支大学 技术基金会(斯蒂廷傻瓜去Tekunisuke博客紧张散笔)		
[标]发明人	ビーマンズラルフ デノエルフィリップ フェロンクリスティアーヌ ゴラジカリーヌ コルテカーズジェローン プールマンジャン トマセンジャン ウェイナンツヴィンセント		
发明人	ビーマンズ,ラルフ デノエル,フィリップ フェロン,クリスティアーヌ ゴラジ,カリーヌ コルテカーズ,ジェローン プールマン,ジャン トマセン,ジャン ウェイナンツ,ヴィンセント		
IPC分类号	C12N15/09 C07K14/22 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12P21/02 C07K16/12 A61K39/00 A61K39/095 A61K39/395 G01N33/53		
CPC分类号	A61K39/095 A61K39/102 A61K39/1045 A61K2039/505 A61K2039/55505 A61K2039/55516 A61K2039/55572 A61K2039/55577 A61P31/04 C07K14/22		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K14/22 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.A C12P21/02.C C07K16/12 A61K39/00.H A61K39/095 A61K39/395.R G01N33/53.D G01N33/53.N		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/BA50 4B024/BA80 4B024/CA01 4B024/GA11 4B024/HA01 4B064/AG01 4B064/AG27 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA15 4B065/AA01Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/BD50 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C085/AA03 4C085/AA14 4C085/BA16 4C085/BA34 4C085/BA38 4C085/BA42 4C085/BB11 4C085/CC07 4C085/DD23 4C085/DD62 4C085/DD88 4C085/EE01 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA11 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA29 4H045/EA52 4H045/FA74		
优先权	2002020199 2002-08-30 GB		
其他公开文献	JP2006516183A		

#### 摘要(译)

与相应的野生型FrpB蛋白相比,具有一个或多个非保守氨基酸缺失的FrpB蛋白,以及重折叠FrpB蛋白的方法。

