

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5404441号
(P5404441)

(45) 発行日 平成26年1月29日 (2014. 1. 29)

(24) 登録日 平成25年11月8日 (2013. 11. 8)

(51) Int. Cl.

F 1

C 1 2 N 15/09 (2006. 01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 0 7 K 14/22 (2006. 01)

C 0 7 K 14/22

A 6 1 K 39/095 (2006. 01)

A 6 1 K 39/095

A 6 1 P 31/04 (2006. 01)

A 6 1 P 31/04

A 6 1 K 39/39 (2006. 01)

A 6 1 K 39/39

請求項の数 19 (全 90 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2010-7996 (P2010-7996)
 (22) 出願日 平成22年1月18日 (2010. 1. 18)
 (62) 分割の表示 特願2003-563462 (P2003-563462)
 の分割
 原出願日 平成14年10月11日 (2002. 10. 11)
 (65) 公開番号 特開2010-162023 (P2010-162023A)
 (43) 公開日 平成22年7月29日 (2010. 7. 29)
 審査請求日 平成22年2月17日 (2010. 2. 17)
 (31) 優先権主張番号 60/328, 101
 (32) 優先日 平成13年10月11日 (2001. 10. 11)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 60/406, 934
 (32) 優先日 平成14年8月30日 (2002. 8. 30)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 506198159
 ワイス ホールディングス コーポレイシ
 ョン
 アメリカ合衆国 ニュージャージー 07
 940, マディソン, ファイブ ジラ
 ルダ ファームズ
 (74) 代理人 100133927
 弁理士 四本 能尚
 (72) 発明者 ズロトニック, ゲーリー・ダブリュー
 アメリカ合衆国ニューヨーク州14526
 , ペンフィールド, ウッドリン・ウェイ
 21

前置審査

最終頁に続く

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

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 56、58 または 60 のアミノ酸配列に対して少なくとも 95% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む少なくとも一つのタンパク質を含む、交差反応性免疫原性組成物。

【請求項 2】

前記タンパク質が、2086 タンパク質サブファミリー A に属する、請求項 1 に記載の交差反応性免疫原性組成物。

【請求項 3】

前記タンパク質が、2086 タンパク質サブファミリー B に属する、請求項 1 に記載の交差反応性免疫原性組成物。

【請求項 4】

配列番号 56、58 または 60 のアミノ酸配列に対して少なくとも 97% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む少なくとも一つのタンパク質を含む、請求項 1 に記載の交差反応性免疫原性組成物。

【請求項 5】

該少なくとも一つのタンパク質が、配列番号 56、58 または 60 のアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の 交差反応性免疫原性組成物。

【請求項 6】

配列番号 248、250、または 252 のアミノ酸配列に対して少なくとも 95% の配

10

20

列同一性を有するアミノ酸配列を含む少なくとも一つのタンパク質を追加的に含む、請求項 1 に記載の交差反応性免疫原性組成物。

【請求項 7】

該追加的なタンパク質が、配列番号 2 4 8、2 5 0、または 2 5 2 のアミノ酸配列を含む、請求項 6 に記載の組成物。

【請求項 8】

該少なくとも一つのタンパク質が脂質化されている、請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載の交差反応性免疫原性組成物。

【請求項 9】

医薬的に受容可能なバッファー、希釈剤、アジュバントまたは担体を付加的に含む、請求項 1 から 8 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 1 0】

アジュバントが水酸化アルミニウムまたはリン酸アルミニウムである、請求項 9 に記載の組成物。

【請求項 1 1】

他の活性な免疫原を付加的に含む、請求項 1 から 1 0 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 1 2】

他のナイセリア種の免疫原性ポリペプチドを付加的に含む、請求項 1 から 1 1 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 1 3】

他のナイセリア種の免疫原性ポリペプチドが、髄膜炎菌血清群 A、C、Y および W のいずれかに属する請求項 1 2 に記載の組成物。

【請求項 1 4】

少なくとも一つの PorA、PorB、トランスフェリン結合タンパク質、opacity タンパク質 (Opc)、または少なくとも一つの付加的な表面抗原を付加的に含み、ここで前記付加的な表面抗原が ORF 2 0 8 6 タンパク質ではない、請求項 1 から 1 3 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 1 5】

さらに多糖を含む、請求項 1 から 1 4 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 1 6】

髄膜炎菌血清群 A、C、Y および W135 多糖および／または多糖複合体をさらに含む、請求項 1 から 1 5 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 1 7】

ワクチンとしての使用のための、請求項 1 から 1 6 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 1 8】

哺乳類において免疫応答を惹起するための、またはヒトにおいて髄膜炎菌感染を改善または予防するための、請求項 1 から 1 6 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 1 9】

前記少なくとも一つのタンパク質を、組み換え技術を用いて調製することを含む、請求項 1 から 1 6 のいずれか 1 項に記載の組成物を調製する方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

発明の属する技術分野

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

10

20

30

40

50

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

【背景技術】

【0002】

発明の背景

10

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

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

【0003】

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

20

【0004】

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

30

【0005】

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

40

【0006】

他の研究者もまた、きょう膜多糖を用いての免疫原性組成物の開発を試みてきた。最近、血清群Cのきょう膜物質をタンパク質に複合させることにより製造された、血清群C疾患用の免疫原性組成物について、欧州における使用に関するライセンスが取得された。しかし血清群Bのきょう膜は、そのきょう膜の多糖が、ヒトの神経組織の発達に関する糖質

50

部分との類似性をもたらすポリシアル酸を含むため、ワクチンの候補としては不適切となり得る。この糖質部分は自己抗原として認識され、したがってヒトにおける免疫原性は低い。

【0007】

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

10

【0008】

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

20

【0009】

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

30

【0010】

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

40

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0011】

発明の概要

これらおよびその他の必要性を満たすために、およびその目的を考慮して、本発明は2086サブファミリーAタンパク質および2086サブファミリーBタンパク質を含む、ナイセリアORF2086タンパク質（“2086タンパク質”）を提供する。各2086タンパク質は、髄膜炎菌（血清群A、B、C、D、W-135、X、Y、Zおよび29E）、淋菌およびNeisseria lactamicaの菌株を含む、天然のナイセリア菌株から単離することのできるタンパク質である。2086タンパク質はまた組換え技術を用いて製造す

50

ることもできる。

【0012】

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

【0013】

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

【0014】

配列の概要

配列番号 検討した配列について：

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

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

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

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

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

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

配列番号：7 天然のリーダー配列を結合させた場合に、CDC2369菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。

配列番号：8 天然のリーダー配列を用いて作製されるCDC2369菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列。

配列番号：9 P4リーダー配列を結合させた場合に、CDC2369由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。

配列番号：10 P4リーダータンパク質を用いて作製されるCDC2369菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列。

配列番号：11 CDC2369菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。

配列番号：12 CDC2369菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列。

配列番号：13 天然のリーダー配列と結合させた場合に、CDC1034菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。

配列番号：14 天然のリーダータンパク質を用いて作製されるCDC1034菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列。

配列番号：15 P4リーダー配列を結合させた場合に、CDC1034由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。

配列番号：16 P4リーダータンパク質を用いて作製されるCDC1034菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列。

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

10

20

30

40

50

- 配列番号：18 CDC1034 菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列。
- 配列番号：19 天然のリーダー配列を結合させた場合に、L4 891 菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。
- 配列番号：20 天然のリーダー配列を用いて作製されるL4 891 菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列。
- 配列番号：21 P4リーダー配列を結合させた場合に、L4 891 由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。
- 配列番号：22 P4リーダー配列を用いて作製されるL4 891 菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列。
- 配列番号：23 L4 891 菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。 10
- 配列番号：24 L4 891 菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列。
- 配列番号：25 天然のリーダー配列を結合させた場合に、B16B6 菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。
- 配列番号：26 天然のリーダー配列を用いて作製されるB16B6 菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列。
- 配列番号：27 P4リーダー配列を結合させた場合に、B16B6 由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。
- 配列番号：28 P4リーダー配列を用いて作製されるB16B6 菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列。 20
- 配列番号：29 B16B6 菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。
- 配列番号：30 B16B6 菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列。
- 配列番号：31 天然のリーダー配列を結合させた場合に、W135 (ATCC35559) 菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。
- 配列番号：32 天然のリーダー配列を用いて作製されるW135 (ATCC35559) 菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列。
- 配列番号：33 P4リーダー配列を結合させた場合に、W135 (ATCC35559) 由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。
- 配列番号：34 P4リーダー配列を用いて作製されるW135 (ATCC35559) 菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列。 30
- 配列番号：35 W135 (ATCC35559) 菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。
- 配列番号：36 W135 (ATCC35559) 菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列。
- 配列番号：37 天然のリーダー配列を結合させた場合に、C11 菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。
- 配列番号：38 天然のリーダー配列を用いて作製されるC11 菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列。
- 配列番号：39 P4リーダー配列を結合させた場合に、C11 由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。 40
- 配列番号：40 P4リーダー配列を用いて作製されるC11 菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列。
- 配列番号：41 C11 菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。
- 配列番号：42 C11 菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列。
- 配列番号：43 天然のリーダー配列を結合させた場合に、Y (ATCC35561) 菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。
- 配列番号：44 天然のリーダー配列を用いて作製されるY (ATCC35561) 菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列。 50

配列番号：45 P4リーダー配列を結合させた場合に、Y (A T C C 3 5 5 6 1) 由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。

配列番号：46 P4リーダー配列を用いて作製されるY (A T C C 3 5 5 6 1) 菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列。

配列番号：47 Y (A T C C 3 5 5 6 1) 菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。

配列番号：48 Y (A T C C 3 5 5 6 1) 菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列。

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

10

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

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

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

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

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

20

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

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

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

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

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

30

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

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

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

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

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

40

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

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

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

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

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

配列番号：70 P4リーダー配列を用いて作製されるM97 252153菌株由来の

50

成熟 2086 タンパク質のアミノ酸配列。

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

配列番号：95 M97 252988 菌株由来の成熟 2086 タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。

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

10

20

30

40

50

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

配列番号：１０８ ６５７７菌株由来の成熟２０８６タンパク質のアミノ酸配列。

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

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

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

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

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

配列番号：１１４ ２９９６菌株由来の成熟２０８６タンパク質のアミノ酸配列。

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

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

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

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

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

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

配列番号：１２１ 天然のリーダー配列を結合させた場合に、Ｍ９７ ２５１８５４菌株由来の成熟２０８６タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。

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

10

20

30

40

50

配列番号：1 2 3 P 4 リーダー配列を結合させた場合に、M 9 7 2 5 1 8 5 4 由来の成熟 2 0 8 6 タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。

配列番号：1 2 4 P 4 リーダー配列を用いて作製される M 9 7 2 5 1 8 5 4 菌株由来の成熟 2 0 8 6 タンパク質のアミノ酸配列。

配列番号：1 2 5 M 9 7 2 5 1 8 5 4 菌株由来の成熟 2 0 8 6 タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。

配列番号：1 2 6 M 9 7 2 5 1 8 5 4 菌株由来の成熟 2 0 8 6 タンパク質のアミノ酸配列。

配列番号：1 2 7 天然のリーダー配列を結合させた場合に、C D C 1 5 2 1 菌株由来の成熟 2 0 8 6 タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。

10

配列番号：1 2 8 天然のリーダー配列を用いて作製される C D C 1 5 2 1 菌株由来の成熟 2 0 8 6 タンパク質のアミノ酸配列。

配列番号：1 2 9 P 4 リーダー配列を結合させた場合に、C D C 1 5 2 1 由来の成熟 2 0 8 6 タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。

配列番号：1 3 0 P 4 リーダー配列を用いて作製される C D C 1 5 2 1 菌株由来の成熟 2 0 8 6 タンパク質のアミノ酸配列。

配列番号：1 3 1 C D C 1 5 2 1 菌株由来の成熟 2 0 8 6 タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。

配列番号：1 3 2 C D C 1 5 2 1 菌株由来の成熟 2 0 8 6 タンパク質のアミノ酸配列。

配列番号：1 3 3 天然のリーダー配列を結合させた場合に、M 9 8 2 5 0 6 2 2 菌株由来の成熟 2 0 8 6 タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。

20

配列番号：1 3 4 天然のリーダー配列を用いて作製される M 9 8 2 5 0 6 2 2 菌株由来の成熟 2 0 8 6 タンパク質のアミノ酸配列。

配列番号：1 3 5 P 4 リーダー配列を結合させた場合に、M 9 8 2 5 0 6 2 2 由来の成熟 2 0 8 6 タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。

配列番号：1 3 6 P 4 リーダー配列を用いて作製される M 9 8 2 5 0 6 2 2 菌株由来の成熟 2 0 8 6 タンパク質のアミノ酸配列。

配列番号：1 3 7 M 9 8 2 5 0 6 2 2 菌株由来の成熟 2 0 8 6 タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。

配列番号：1 3 8 M 9 8 2 5 0 6 2 2 菌株由来の成熟 2 0 8 6 タンパク質のアミノ酸配列。

30

配列番号：1 3 9 天然のリーダー配列を結合させた場合に、8 7 0 4 4 6 菌株由来の成熟 2 0 8 6 タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。

配列番号：1 4 0 天然のリーダー配列を用いて作製される 8 7 0 4 4 6 菌株由来の成熟 2 0 8 6 タンパク質のアミノ酸配列。

配列番号：1 4 1 P 4 リーダー配列を結合させた場合に、8 7 0 4 4 6 由来の成熟 2 0 8 6 タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。

配列番号：1 4 2 P 4 リーダー配列を用いて作製される 8 7 0 4 4 6 菌株由来の成熟 2 0 8 6 タンパク質のアミノ酸配列。

配列番号：1 4 3 8 7 0 4 4 6 菌株由来の成熟 2 0 8 6 タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。

40

配列番号：1 4 4 8 7 0 4 4 6 菌株由来の成熟 2 0 8 6 タンパク質のアミノ酸配列。

配列番号：1 4 5 天然のリーダー配列を結合させた場合に、M 9 7 2 5 3 2 4 8 菌株由来の成熟 2 0 8 6 タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。

配列番号：1 4 6 天然のリーダー配列を用いて作製される M 9 7 2 5 3 2 4 8 菌株由来の成熟 2 0 8 6 タンパク質のアミノ酸配列。

配列番号：1 4 7 P 4 リーダー配列を結合させた場合に、M 9 7 2 5 3 2 4 8 由来の成熟 2 0 8 6 タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。

配列番号：1 4 8 P 4 リーダー配列を用いて作製される M 9 7 2 5 3 2 4 8 菌株由来の成熟 2 0 8 6 タンパク質のアミノ酸配列。

50

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

配列番号：163 天然のリーダー配列を結合させた場合に、NMB 菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。

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

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

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

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

配列番号：168 NMB 菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列。

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

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

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

配列番号：172 P4リーダー配列を用いて作製されるM98 250572 菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列。

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

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

10

20

30

40

50

配列番号：175 天然のリーダー配列を結合させた場合に、A4 Sanford; M97 251836 PART; M97 251957; M97 251985; M97 252060; M97 251870; M97 251994; M98 250024; M97 251905; M97 251876; M97 251898; またはM97 251830 菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。

配列番号：176 天然のリーダー配列を用いて作製されるA4 Sanford; M97 251836 PART; M97 251957; M97 251985; M97 252060; M97 251870; M97 251994; M98 250024; M97 251905; M97 251876; M97 251898; またはM97 251830 菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列。

10

配列番号：177 P4リーダー配列を結合させた場合に、A4 Sanford; M97 251836 PART; M97 251957; M97 251985; M97 252060; M97 251870; M97 251994; M98 250024; M97 251905; M97 251876; M97 251898; またはM97 251830 由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。

配列番号：178 P4リーダー配列を用いて作製されるA4 Sanford; M97 251836 PART; M97 251957; M97 251985; M97 252060; M97 251870; M97 251994; M98 250024; M97 251905; M97 251876; M97 251898; またはM97 251830 菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列。

20

配列番号：179 A4 Sanford; M97 251836 PART; M97 251957; M97 251985; M97 252060; M97 251870; M97 251994; M98 250024; M97 251905; M97 251876; M97 251898; またはM97 251830 菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。

配列番号：180 A4 Sanford; M97 251836 PART; M97 251957; M97 251985; M97 252060; M97 251870; M97 251994; M98 250024; M97 251905; M97 251876; M97 251898; またはM97 251830 菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列。

30

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

配列番号：182 天然のリーダー配列を用いて作製されるCDC937 菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列。

配列番号：183 P4リーダー配列を結合させた場合に、CDC937 由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。

配列番号：184 P4リーダー配列を用いて作製されるCDC937 菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列。

配列番号：185 CDC937 菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。

40

配列番号：186 CDC937 菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列。

配列番号：187 天然のリーダー配列を結合させた場合に、M97 252097 菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。

配列番号：188 天然のリーダー配列を用いて作製されるM97 252097 菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列。

配列番号：189 P4リーダー配列を結合させた場合に、M97 252097 由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。

配列番号：190 P4リーダー配列を用いて作製されるM97 252097 菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列。

50

配列番号：１９１ Ｍ９７ ２５２０９７菌株由来の成熟２０８６タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。

配列番号：１９２ Ｍ９７ ２５２０９７菌株由来の成熟２０８６タンパク質のアミノ酸配列。

配列番号：１９３ 天然のリーダー配列を結合させた場合に、８７０２２７菌株由来の成熟２０８６タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。

配列番号：１９４ 天然のリーダー配列を用いて作製される８７０２２７菌株由来の成熟２０８６タンパク質のアミノ酸配列。

配列番号：１９５ Ｐ４リーダー配列を結合させた場合に、８７０２２７由来の成熟２０８６タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。

配列番号：１９６ Ｐ４リーダー配列を用いて作製される８７０２２７菌株由来の成熟２０８６タンパク質のアミノ酸配列。

配列番号：１９７ ８７０２２７菌株由来の成熟２０８６タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。

配列番号：１９８ ８７０２２７菌株由来の成熟２０８６タンパク質のアミノ酸配列。

配列番号：１９９ 天然のリーダー配列を結合させた場合に、Ｈ３５５菌株由来の成熟２０８６タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。

配列番号：２００ 天然のリーダー配列を用いて作製されるＨ３５５菌株由来の成熟２０８６タンパク質のアミノ酸配列。

配列番号：２０１ Ｐ４リーダー配列を結合させた場合に、Ｈ３５５由来の成熟２０８６タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。

配列番号：２０２ Ｐ４リーダー配列を用いて作製されるＨ３５５菌株由来の成熟２０８６タンパク質のアミノ酸配列。

配列番号：２０３ Ｈ３５５菌株由来の成熟２０８６タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。

配列番号：２０４ Ｈ３５５菌株由来の成熟２０８６タンパク質のアミノ酸配列。

配列番号：２０５ 天然のリーダー配列を結合させた場合に、Ｈ４４__７６菌株由来の成熟２０８６タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。

配列番号：２０６ 天然のリーダー配列を用いて作製されるＨ４４__７６菌株由来の成熟２０８６タンパク質のアミノ酸配列。

配列番号：２０７ Ｐ４リーダー配列を用いて作製される、Ｈ４４__７６由来の成熟２０８６タンパク質のアミノ酸配列。

配列番号：２０８ Ｈ４４__７６菌株由来の成熟２０８６タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。

配列番号：２０９ Ｐ４リーダー配列を結合させた場合に、Ｈ４４__７６菌株由来の成熟２０８６タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。

配列番号：２１０ Ｈ４４__７６菌株由来の成熟２０８６タンパク質のアミノ酸配列。

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

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

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

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

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

配列番号：２１６ ８５２９菌株由来の成熟２０８６タンパク質のアミノ酸配列。

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

10

20

30

40

50

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

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

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

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

配列番号：222 6940菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列。

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

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

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

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

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

配列番号：228 M982菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列。

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

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

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

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

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

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

配列番号：235 天然のリーダー配列を結合させた場合に、M97 253524、M97 251885、およびM97 251926菌株由来の成熟2086タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。

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

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

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

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

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

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

配列番号：242 天然のリーダー配列を用いて作製されるM98 250670菌株由

10

20

30

40

50

来の成熟 2086 タンパク質のアミノ酸配列。

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

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

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

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

配列番号：247 天然のリーダー配列を結合させた場合に、CDC1573菌株由来の成熟 2086 タンパク質のアミノ酸配列をコードする核酸配列。 10

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

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

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

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

配列番号：252 CDC1573菌株由来の成熟 2086 タンパク質のアミノ酸配列。 20

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

配列番号：254から259 タンパク質の2086ファミリーのタンパク質に関するアミノ酸配列。

配列番号：260から278 2086サブファミリーAのタンパク質に関するアミノ酸配列。

配列番号：279から299 2086サブファミリーBのタンパク質に関するアミノ酸配列。

配列番号：300 は本発明の1つの態様による2086タンパク質ファミリー（“2086タンパク質”）に対応するアミノ酸コンセンサス配列である。 30

配列番号：301 は本発明の1つの態様による2086タンパク質サブファミリーAに対応するアミノ酸コンセンサス配列である。

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

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

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

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

配列番号：306 forwardプライマーの核酸配列（化合物番号5005）。 40

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

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

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

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

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

配列番号：312 BglIIおよびNdeI制限部位を含むforwardプライマーの核酸 50

配列（化合物番号 6 4 0 6）。

配列番号：3 1 3 forwardプライマーの核酸配列（化合物番号 6 4 7 0）。

配列番号：3 1 4 reverseプライマーの核酸配列（化合物番号 6 4 7 2）。

配列番号：3 1 5 B a m H I 制限部位を含むforwardプライマーの核酸配列（化合物 6 4 7 3）。

配列番号：3 1 6 B g l I I および N d e I 制限部位を含むforwardプライマーの核酸配列（化合物番号 6 4 7 4）。

配列番号：3 1 7 forwardプライマーの核酸配列（化合物番号 6 4 9 5）。

配列番号：3 1 8 reverseプライマーの核酸配列（化合物番号 6 4 9 6）。

配列番号：3 1 9 S p h I 制限部位を含むreverseプライマーの核酸配列（化合物番号 6 4 5 3）。

10

配列番号：3 2 0 B g l I I 制限部位を含むreverseプライマーの核酸配列（化合物番号 6 6 0 5）。

配列番号：3 2 1 B g l I I および N d e I 制限部位を含むforwardプライマーの核酸配列（化合物番号 6 7 2 1）。

配列番号：3 2 2 P 4 リーダー配列の核酸配列。

配列番号：3 2 3 天然の 2 0 8 6 リーダーバリエーション 1 の核酸配列。

配列番号：3 2 4 天然の 2 0 8 6 リーダーバリエーション 2 の核酸配列。

配列番号：3 2 5 天然の 2 0 8 6 リーダーバリエーション 3 の核酸配列。

配列番号：3 2 6 天然の 2 0 8 6 リーダーバリエーション 4 の核酸配列。

20

配列番号：3 2 7 は P 4 4 3 1 のアミノ酸配列である。

配列番号：3 2 8 は P 5 1 6 3 のアミノ酸配列である。

配列番号：3 2 9 は本発明の 1 つの態様によるアミノ酸配列である。

【0015】

発明の詳細な説明

髄膜炎菌血清群 B に対して交差機能性の殺菌活性を有する抗原の新たなクラスは、感染に対する免疫感作のために多価 P o r A のアプローチを必要としない。このような抗原を期せずして同定することができ、当明細書にこれを記載し主張する。1 つのこのような抗原の存在は、髄膜炎菌株由来の可溶性外膜タンパク質（s O M P）の複合体混合物中で最初に認められた。この抗原の殺菌活性を、目的のタンパク質混合物が数種のタンパク質しか含まなくなるまで、一連の分画化およびタンパク質の精製ステップを通して追跡した。この混合物中の主要なタンパク質は、N 末端アミノ酸配列決定およびペプチドマッピングにより同定した。殺菌活性を示す目的のタンパク質を、O R F 2 0 8 6 タンパク質、すなわち脂質化タンパク質（より限定的に L P 2 0 8 6 と表す）として同定した。“O R F 2 0 8 6 タンパク質”は、ナイセリア種のオープンリーディングフレーム 2 0 8 6（O R F 2 0 8 6）によりコードされるタンパク質を表す。

30

【0016】

当明細書に記述したように、髄膜炎菌より単離されたナイセリア種 O R F 2 0 8 6 タンパク質（“2 0 8 6 タンパク質”または“O R F 2 0 8 6 ”タンパク質とも表し、当明細書では互変性を持って使用する、または非脂質化タンパク質として P 2 0 8 6 および当該タンパク質の脂質化バージョンとして L P 2 0 8 6 と表した）を基本とする新規免疫原性組成物の候補物質は、細胞の分画化、異なる界面活性剤による抽出、タンパク質の精製、抗血清の製造を含み、そして多数の菌株を用いての殺菌活性のアッセイを組み合わせで同定した。上に引用した参考文献に開示されている免疫原性の可能性のある組成物および診断法に代わるものとして、本発明は組成物に関し、そしてタンパク質、その免疫原性部分およびその生物学的均等物、ならびに該ポリペプチド、その一部および均等物をコードする遺伝子、および該物質に免疫特異的に結合する抗体の使用を通しての髄膜炎菌感染の治療法および/または予防法に関する。

40

【0017】

本発明の態様に従って、単離されたポリペプチド、その免疫原性部分、および/または

50

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

10

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

【0018】

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

20

【0019】

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

【0020】

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

30

40

【0021】

1つの菌株由来の2086タンパク質に対して作用する抗体が、無関係の（すなわち異種の）菌株を死滅させることが発見されたため、“2086相同部分”の存在について多数の異種の菌株の特徴付けを行い、配列の保存レベルを決定する試みを行った。PCRで調べた菌株の約70%は、菌株8529由来のオリジナルの2086遺伝子を増幅するプ

50

ライマーを用いて増幅することのできる、2086相同部分を有していたが、残りのおよそ30%はこの試験ではネガティブであった。これら残りのおよそ30%は、8529由来のオリジナルの2086遺伝子と約60%のアミノ酸配列しか相同ではない2086相同体を含むことが見出された。他のプライマーにより、これらのおよそ30%の菌株から2086相同部分を増幅できることが同定された。検査を行った髄膜炎菌株を、プライマーセットで2086相同部分を増幅できるかどうかにより、サブファミリーAまたはサブファミリーBに属するものと命名した。これらの実験の詳細は以下の実施例5に概説した。

【0022】

(多数の血清型サブタイプにおける2086タンパク質の存在)

10

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

【0023】

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

20

【0024】

2086タンパク質に対する抗体はまた、髄膜炎菌による攻撃から新生仔ラットを受動的に防護する。（表8参照のこと）2086タンパク質の組換え発現は、髄膜炎菌性疾患の予防のための免疫原性組成物として2086タンパク質を使用することを可能にする。臨床的試みにおける最近の髄膜炎菌の免疫原性組成物の候補物質はすべて、多くの異なるタンパク質を含む複合体混合物または外膜タンパク質調製物であった。血清型サブタイプ特異性を提供するPorAタンパク質は、血清型サブタイプに関連する疾患の約70-80%に適用できるために、免疫原性組成物中に6から9のバリエーションを含むことが必要になる。対照的に、1つの2086タンパク質のみに対する抗血清が、西欧および米国で単離されるこの疾患の約65%に参与する6つの血清型サブタイプの代表的なものを死滅できることが、当明細書において明確に示されている。したがって精製2086タンパク質は、髄膜炎菌性疾患に参与する複数の血清型サブタイプに適用できる十分な免疫原性組成物を提供するために必要なタンパク質の数を減らせる可能性がある。

30

【0025】

(タンパク質、免疫原性部分および生物学的均等物)

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

40

【0026】

2086タンパク質、その免疫原性部分および/またはその生物学的均等物は、本発明

50

の態様にしたがって、以下のアミノ酸配列のいずれかを含む：

A D I G x G L A D A（配列番号：254）、配列中 x はいずれかのアミノ酸である；

I G x G L A D A L T（配列番号：255）、配列中 x はいずれかのアミノ酸である；

S L N T G K L K N D（配列番号：256）；

S L N T G K L K N D K x S R F D F（配列番号：257、配列中 x はいずれかのアミノ酸である）；

S G E F Q x Y K Q（配列番号：258）、配列中 x はいずれかのアミノ酸である；または

I E H L K x P E（配列番号：259）、配列中 x はいずれかのアミノ酸である。

【0027】

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

G G G V A A D I G x（配列番号：260）、配列中 x はいずれかのアミノ酸である；

S G E F Q I Y K Q（配列番号：261）；

H S A V V A L Q I E（配列番号：262）；

E K I N N P D K I D（配列番号：263）；

S L I N Q R S F L V（配列番号：264）；

S G L G G E H T A F（配列番号：265）；

G E H T A F N Q L P（配列番号：266）；

S F L V S G L G G E H（配列番号：267）；

E K I N N P D K I D S L I N Q R S F L V S G L G G E H T A F N Q L P（配列番号：268）；

G K A E Y H G K A F（配列番号：269）；

Y H G K A F S S D D（配列番号：270）；

G K A E Y H G K A F S S D D（配列番号：271）；

I E H L K T P E Q N（配列番号：272）；

K T P E Q N V E L A（配列番号：273）；

I E H L K T P E Q N V E L A（配列番号：274）；

A E L K A D E K S H（配列番号：275）；

A V I L G D T R Y G（配列番号：276）；

A E L K A D E K S H A V I L G D T R Y G（配列番号：277）；または

E E K G T Y H L A L（配列番号：278）。

【0028】

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

L I T L E S G E F Q（配列番号：279）；

S A L T A L Q T E Q（配列番号：280）；

F Q V Y K Q S H S A（配列番号：281）；

L I T L E S G E F Q V Y K Q S H S A L T A L Q T E Q（配列番号：282）；

I G D I A G E H T S（配列番号：283）；

E H T S F D K L P K（配列番号：284）；

I G D I A G E H T S F D K L P K（配列番号：285）；

A T Y R G T A F G S（配列番号：286）；

D D A G G K L T Y T（配列番号：287）；

I D F A A K Q G H G（配列番号：288）；

K I E H L K S P E L（配列番号：289）；

A T Y R G T A F G S D D A G G K L T Y T I D F A A K Q G H G K I E H L K S P E L N V（配列番号：290）；

H A V I S G S V L Y（配列番号：291）；

K G S Y S L G I F G（配列番号：292）；

V L Y N Q D E K G S (配列番号: 293);
H A V I S G S V L Y N Q D E K G S Y S L G I F G (配列番号: 294);
A Q E V A G S A E V (配列番号: 295);
I H H I G L A A K Q (配列番号: 296);
V E T A N G I H H I (配列番号: 297);
A Q E V A G S A E V E T A N G I H H I G L A A K Q (配列番号: 298); または
V A G S A E V E T A N G I H H I G L A A K Q (配列番号: 299)。

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

【0029】

2086タンパク質のコンセンサス配列 (配列番号: 300)

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

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

【0030】

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

【0031】

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

【0032】

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

【0033】

2086サブファミリーA配列 (SEQ ID 301)

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

ELKADEKSHAVILGDTRYGXEEKGTYHLALXGDRAQEIAG
xATVKIxEKVHEIxIAxKQ

記号“x”はいずれかのアミノ酸である。

【0034】

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

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

【0035】

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

10

【0036】

2086サブファミリーB（配列番号 302）

CSSGGGG-----VxADIGxGLADALTAPLDHKDKxLxSLTL
xxSxxNxxLxLxAQGA EKTYGNGDSLNTGK LKNDKVS RF
DFIRQIEVDGxLITLESGEFQVYKQSHSALTALQTEQxQD
xExSxKMVAKRxFxIGDIA GEHTSF DKLPKxxxATYRGTA
FGSDDAGGKLT YTIDFAAKQGHGKI EHLKSP ELNVxLAXx
YIKPDEKxHAVISGSVLYNQDEKGSYSLGIFGxxAQEVAG
SAEVETANGIHHIGLAAKQ

20

記号“x”はいずれかのアミノ酸である。

【0037】

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

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

【0038】

本発明の実施により、2086タンパク質サブファミリーをさらにクラスターに分割することができる。例えば本発明の1つの実施により以下のクラスターを提供する：配列番号：2-12の偶数番号；配列番号：14-24の偶数番号；配列番号：26-42の偶数番号；配列番号：50-60の偶数番号；配列番号：62-108の偶数番号；配列番号：110-138の偶数番号；配列番号：140-156の偶数番号；配列番号：158-174の偶数番号；および配列番号：224-252の偶数番号。

30

【0039】

本発明のポリペプチド配列は配列番号：2-252の偶数番号の基準配列(reference sequence)と同一とすることができる、すなわち100%同一である、または同一性の%が100%未満であるような、基準配列と比較して多数のアミノ酸の変換を含むこともできる。このような変換は、保存されるおよび保存されない置換または挿入を含む、少なくとも1つのアミノ酸の欠失、置換を含む。変換は、基準ポリペプチド配列のアミノ末端またはカルボキシル末端の位置で、またはこれらの末端の位置の間のあらゆる位置で、すなわち基準アミノ酸配列中のアミノ酸の間に個々に点在して、もしくは基準アミノ酸配列内の1つまたはそれより多くの隣接するグループとして起こり得る。

40

【0040】

したがって本発明はまた、配列表に含まれるアミノ酸配列（すなわち配列番号：2-252の偶数番号）と同一の配列を有するタンパク質もまた提供する。特定の配列に依存して、配列の同一性の程度は好ましくは60%以上（例えば60%、70%、80%、90%、95%、97%、99%、99.9%、またはそれより多く）である。これらの相同タンパク質は突然変異および対立遺伝子のバリエーションを含む。

【0041】

50

本発明の好ましい態様において、2086タンパク質または他の2086ポリペプチド（例えば免疫学的部分および生物学的均等物）は、髄膜炎菌の相同菌株および少なくとも1つの異種菌株に対する殺菌性抗体を産生する。具体的には、2086ポリペプチドに対する抗体は新生仔ラットへの髄膜炎菌による例えば経鼻的な攻撃から受動的に防護する。さらなる好ましい態様において、2086ポリペプチドは新生仔ラットに関するこのような防護を、相同菌株および少なくとも1つの異種菌株に対して示す。ポリペプチドは、配列番号：2-252の偶数番号で述べたような、上記の“配列のまとめ”から選択することができ、またはポリペプチドは、列記したポリペプチドのあらゆる免疫学的フラグメントまたは生物学的均等物とすることができる。好ましくはポリペプチドは上記の配列のまとめにおける配列番号：2-252の偶数番号のいずれかから選択する。

10

【0042】

本発明はまた、生物学的に均等な2086ポリペプチドの対立遺伝子のバリエーションまたはその他のバリエーションにも関する。適切な生物学的均等物は以下の能力、すなわち（1）相同菌株ならびに少なくとも1つの異種ナイセリア菌株および/または淋菌株に対して殺菌性抗体を産生する；（2）相同菌株ならびに少なくとも1つの異種ナイセリア菌株および/または淋菌株の表面と反応する；（3）実際の攻撃に対して受動的な防護を与える；および/または（4）コロニー化を防ぐ、能力を示すものとする。

【0043】

適切な生物学的均等物は、当明細書で特定した2086タンパク質（すなわち配列番号：2-252の偶数番号）の1つと、少なくとも約60%、好ましくは少なくとも約70%、より好ましくは少なくとも約75%、さらにより好ましくは約80%、さらにより好ましくは約85%、さらにより好ましくは約90%、さらにより好ましくは約95%またはさらにより好ましくは約98%、またはさらにより好ましくは約99%の類似性を有するが、ただし均等物は、本発明の2086タンパク質の1つと等しい免疫原生特性を実質的に惹起することができるものとする。

20

【0044】

あるいは生物学的均等物は、配列番号：2-252の偶数番号の2086タンパク質の1つと等しい免疫原性特性を実質的に有する。本発明の態様により、生物学的均等物は、配列番号：2-252の偶数番号と等しい免疫原性特性を実質的に有する。

【0045】

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

30

【0046】

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

40

【0047】

50

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

【0048】

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

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

【0049】

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

【0050】

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

【0051】

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

えにより、または当該技術分野で公知のその他の合成法において、作製することができる。

【0052】

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

10

【0053】

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

20

30

【0054】

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

40

50

、好ましいコンピュータープログラムの方法として、G C Gプログラムパッケージ(Devereux, J., et al 1984)、B L A S T P、B L A S T N、およびF A S T A(Altschul, S. F., et al., 1990)を含むがこれに限定されない。B L A S T Xプログラムは、N C B I および他の情報源より公開されており、入手可能である(BLAST Manual, Altschul, S., et al., NCBI NLM NIH Bethesda, Md. 20894; Altschul, S., et al., 1990)。周知のSmith Waterman アルゴリズムもまた同一性の決定に利用することができる。

【0055】

これに限定する意図はないが例として、本発明のアミノ酸配列は基準配列である配列番号：2-252の偶数番号と同一とすることができる；すなわち100%同一である、または同一性の%が100%未満であるような、基準配列と比較して多数のアミノ酸の変換を含むことができる。このような変換は、保存されるおよび保存されない置換または挿入を含む、少なくとも1つのアミノ酸の欠失、置換からなる群から選択され、この場合該変換は、基準のポリペプチド配列のアミノ末端もしくはカルボキシル末端の位置で、またはこれらの末端の位置の間のあらゆるところで、すなわち基準配列中のアミノ酸の間で個々に、もしくは基準配列内で1つもしくはそれ以上の隣接する群としてのいずれかで起こり得る。得られた同一性の%のアミノ酸の変換の数は、配列番号：2-252のアミノ酸総数に各同一性パーセントの数値百分率(100で割る)を掛けて、配列番号：2-252のいずれかのアミノ酸の該総数からその積を引くことにより決定される、または：

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

式中 n_a はアミノ酸の変換数であり、 x_a は配列番号：2-252のアミノ酸の総数、および y は例えば70%に対しては0.70、80%に対しては0.80、85%に対しては0.85等であり、 x_a および y の積が整数でない場合は小数点以下を切り捨てて、 x_a から引く。

【0056】

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

【0057】

Q R F 2 0 8 6 は、天然の2086シグナル配列を用いて大腸菌内で発現させることができる。しかしタンパク質の発現を改善する方法を発見することは望ましい。本発明の態様により、リーダー配列でタンパク質の脂質化型を生成する。例えば以下に、発現を促進するための分類不可能なインフルエンザ菌(nontypable Haemophilus influenzae) P 4 タンパク質のシグナル配列の使用について記載する。

【0058】

細菌のリポタンパク質のプロセッシングは、1つのシグナル配列を含む前駆体またはプロリポタンパク質の合成から始まるが、このことは言い換えればリポタンパク質のプロセッシング/修飾部位のコンセンサスを含むことになる。このプロリポタンパク質は最初に、グラム陰性菌の内膜上またはグラム陽性菌の膜上の共通のS e c システムを通して透過する。S e c システムにより一度膜内に入ると、プロリポタンパク質はコンセンサス部位でシグナルペプチダーゼI Iにより切断され、暴露されたN末端システイン残基はグリセル化およびアシル化される。Hayashi et al. 1990. Lipoproteins in bacteria (細菌におけるリポタンパク質)、J. Bioenerg. Biomembr. Jun; 22(3): 451-71; Oudega et al. 1993. Escherichia coli SecB, SecA, and SecY proteins are required for expression and membrane insertion of the bacteriocin release protein, a small lipoprotein (大腸菌のS e c B、S e c A、およびS e c Yタンパク質は、バクテリオシンリリースタンパク質である小さなリポタンパク質の発現および膜への挿入に必要である) J. Bacteriol. Mar; 175(5): 1543-7; Sankaran et al. 1995. Modification of bacterial lipoproteins (細菌のリポタンパク質の修飾) Methods Enzymol. 250: 683-97。

【0059】

グラム陰性菌において、脂質化されたタンパク質の外膜への移送は、リポタンパク質の

ポジション2での分別シグナルに依存する膜特異性を伴って、固有のABCトランスポーターシステムにより仲介される。Yakushi et al. 2000. A new ABC transporter mediating the detachment of lipid modified proteins from membranes (脂質で修飾されたタンパク質の膜からの剥離を仲介する新たなABCトランスポーター) Nat Cell Biol. Apr; 2(4): 212-8.

【0060】

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

【0061】

細菌のタンパク質の脂質化は、タンパク質の免疫学的反応を増加または修飾することが知られている。Erdil et al. 1993. Role of attached lipid in immunogenicity of *Borrelia burgdorferi* OspA (*Borrelia burgdorferi* OspA の免疫原性における結合した脂質の役割) Infect. Immun. Jan; 61(1): 81-90; Snapper et al. 1995. Bacterial lipoproteins may substitute for cytokines in the humoral immune response to T cell-independent type II antigens (細菌のリポタンパク質は、T細胞非依存性タイプII抗原への体液性免疫応答における、サイトカインと置き換えることができる) J. Immunol. Dec 15; 155(12): 5582-9. しかし細菌のリポタンパク質の発現は、プロセッシングの緊縮により複雑化し得る。Pollitt et al. 1986. Effect of amino acid substitutions at the signal peptide cleavage site of the *Escherichia coli* major outer membrane lipoprotein (大腸菌の主要な外膜リポタンパク質のシグナルペプチド切断部位でのアミノ酸の置換の影響)、J. Biol. Chem. Feb 5; 261(4): 1835-7; Lunn et al. 1987. Effects of prolipoprotein signal peptide mutations on secretion of hybrid prolipo-beta-lactamase in *Escherichia coli* (大腸菌のハイブリッド ポリリポ・ベータ・ラクタマーゼの分泌におけるポリリポタンパク質のシグナルペプチドの変異の影響)、J. Biol. Chem. Jun 15; 262(17): 8318-24; Klein et al. 1988. Distinctive properties of signal sequences from bacterial lipoproteins (細菌のリポタンパク質のシグナル配列の顕著な特性)、Protein Eng. Apr; 2(1): 15-20. 細菌のリポタンパク質の発現はまた、他の問題、例えば毒性および低発現レベルにより複雑になる。Gomez et al. 1994. Nucleotide

The *Bacillus subtilis* lipoprotein LplA causes cell lysis when expressed in *Escherichia coli*. (枯草菌リポタンパク質LplAは大腸菌で発現させた場合に溶菌の原因になる)、Microbiology. Aug; 140(Pt8): 1839-45; Hannsson et al. 1995. Expression of truncated and full-length forms of the Lyme disease *Borrelia* outer surface protein A in *Escherichia coli*. (Lyme病のボレリア属の外表面タンパク質Aの、長い領域の欠落した型および全長の型の大腸菌内での発現)、Protein Expr. Purif. Feb; 6(1): 15-24; Yakushi et al. 1997. Lethality of the covalent linkage between mislocalized major outer membrane lipoprotein and the peptidoglycan of *Escherichia coli*. (大腸菌の誤って局在化した主要な外膜リポタンパク質およびペプチドグリカンとの共有結合の致死性、J. Bacteriol. May; 179(9): 2857-62.

【0062】

分類不可能なインフルエンザ菌はP4と命名されたリポタンパク質(タンパク質“e”としても知られている)を発現する。P4タンパク質の組換え型は天然のP4シグナル配列を用いて大腸菌内で高レベルで発現させることができる。米国特許第5, 955, 580号。天然のP4シグナル配列を、大腸菌内の発現ベクター中の天然のORF2086シグナル配列と置き換えると、ORF2086の発現レベルが増加する。

【0063】

発現を増加させるために異種の P 4 シグナル配列を用いるこのコンセプトは、他の細菌のリポタンパク質に拡大することができる。特に細菌のゲノム分析により、目的のものである可能性のある多くの O R F を同定することができる。異種の宿主細胞、例えば大腸菌内で、その天然のシグナル配列を含む各 O R F を発現させるという試みは、安定性、適合性などを含む、様々なシグナル配列を使用することに付随する様々な問題を引き起こす。これらの問題を最小にするため、P 4 シグナル配列を利用して目的の各 O R F を発現させる。上述のように、P 4 シグナル配列は異種の 2 0 8 6 O R F の発現を向上させる。発現ベクターは、目的の O R F の本来のシグナル配列を欠失させ、その O R F に P 4 シグナル配列を結合することにより作成する。次に適切な宿主細胞をその発現ベクターを用いて形質転換、トランスフェクションまたは感染させ、O R F の天然のシグナル配列を用いての発現と比較して O R F の発現を増加させる。

10

【0064】

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

【0065】

他に特に言及していなければ、本発明の 2 0 8 6 タンパク質の様々な型を当明細書では“2 0 8 6”タンパク質という。他に言及していなければ上述のように“2 0 8 6 ポリペプチド”もまた、2 0 8 6 タンパク質ならびにその免疫原性部分または生物学的均等物を意味する。

20

【0066】

完全長の単離、精製された髄膜炎菌 2 0 8 6 タンパク質は、1 0 % から 2 0 % の勾配 S D S ポリアクリルアミドゲル (S D S - P A G E) の測定で、約 2 8 から 3 5 k D a の明確な分子量を有する。より限定的には、このタンパク質は質量分析による測定で、約 2 6 , 0 0 0 から 3 0 , 0 0 0 ダルトンの分子量を有する。

【0067】

好ましくは 2 0 8 6 ポリペプチドおよび該ポリペプチドをコードするヌクレオチドを、髄膜炎菌および/または他の菌種に起因する感染の予防または改善に使用する。

(抗体)

配列番号：2 - 2 5 2 のアミノ酸配列、それらのフラグメント、およびそれらの類似体、またはそれらを発現する細胞を含む本発明のタンパク質はまた、免疫原として使用して本発明のポリペプチドに免疫特異的な抗体を産生させることができる。本発明は、免疫特異的なポリペプチドに対する抗体、およびこのような抗体を使用しての髄膜炎菌の存在の検出、受動的防護の提供、または細胞、細胞もしくは組織の抽出物、もしくは生物学的液体中のポリペプチドの量もしくは濃度の測定を含む。

30

【0068】

本発明の抗体は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、および抗イディオタイプ抗体を含む。ポリクローナル抗体は、1 つの抗原で感作した複数の動物の血清に由来する抗体分子の異質な (heterogeneous) 母集団である。モノクローナル抗体は、特異的な抗原に対する実質的に同質の抗体の集団である。モノクローナル抗体は、当業者に公知の方法、例えば Kohler and Milstein, 1975, Nature 256: 495-497 および米国特許第 4 , 3 7 6 , 1 1 0 号の方法により得ることができる。このような抗体は I g G、I g M、I g E、I g A、G I L D およびそれらのあらゆるサブクラスを含むあらゆる免疫グロブリンのクラスとすることができる。

40

【0069】

キメラ抗体は、分子の異なる部分が異なる動物種に由来する分子で、例えばネズミのモノクローナル抗体由来の可変領域およびヒトの免疫グロブリンの定常部領域を有する分子である。キメラ抗体およびそれらの製造法は当該技術分野で知られている (Cabilly et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 3273-3277; Morrison et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 6851-6855; Boulianne et al., 1984, Nature 312: 643-646

50

; Cabilly et al., 欧州特許出願 1 2 5 0 2 3 (1 9 8 4 年 1 1 月 1 4 日公開); Taniguchi et al., 欧州特許出願 1 7 1 4 9 6 (1 9 8 5 年 2 月 1 9 日公開); Morrison et al., 欧州特許出願 1 7 3 4 9 4 (1 9 8 6 年 3 月 5 日公開); Neuberger et al., P C T 出願 W O 8 6 / 0 1 5 3 3 (1 9 8 6 年 3 月 1 3 日公開); Kudo et al., 欧州特許出願 1 8 4 1 8 7 (1 9 8 6 年 6 月 1 1 日公開); Morrison et al., 欧州特許出願 1 7 3 4 9 4 (1 9 8 6 年 3 月 5 日公開); Sahagan et al., 1986, J. Immunol. 137: 1066-1074; Robinson et al., P C T / U S 8 6 / 0 2 2 6 9 (1 9 8 7 年 5 月 7 日公開); Liu et al., 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 3439-3443; Sun et al., 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 214-218; Better et al., 1988, Science 240: 1041-1043)。これらの参照文献を当明細書によりその全内容において参照として援用する。

10

【0070】

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

【0071】

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

20

【0072】

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

30

【0073】

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

40

【0074】

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

50

【0075】

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

【0076】

(ポリヌクレオチド)

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

【0077】

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

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

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

【0078】

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

【0079】

他の態様においてポリヌクレオチドは、配列番号：1-253の奇数番号の1つから選択されるヌクレオチド配列、その縮重バリエーションまたはそのフラグメントの相補鎖である。なお他の態様において、ポリヌクレオチドはDNA、染色体DNA、cDNAおよびR

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

【0080】

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

10

【0081】

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

20

【0082】

【表 1】

ストリンジェンシーの条件 - 表 I

ストリン ジェンシー の条件	ポリヌクレオチド ハイブリッド	ハイブリッドの 長さ (b p) ¹	ハイブリダイゼーション 温度および バッファー ^H	洗浄 温度および バッファー ^H
A	DNA:DNA	> 50	65EC; 1xSSC -or- 42EC; 1xSSC, 50% ホルムアミド	65EC; 0.3xSSC
B	DNA:DNA	< 50	T _B ; 1xSSC	T _B ; 1xSSC
C	DNA:RNA	> 50	67EC; 1xSSC -or- 45EC; 1xSSC, 50% ホルムアミド	67EC; 0.3xSSC
D	DNA:RNA	< 50	T _D ; 1xSSC	T _D ; 1xSSC
E	RNA:RNA	> 50	70EC; 1xSSC -or- 50EC; 1xSSC, 50% ホルムアミド	70EC; 0.3xSSC
F	RNA:RNA	< 50	T _F ; 1xSSC	T _F ; 1xSSC
G	DNA:DNA	> 50	65EC; 4xSSC -or- 42EC; 4xSSC, 50% ホルムアミド	65EC; 1xSSC
H	DNA:DNA	< 50	T _H ; 4xSSC	T _H ; 4xSSC
I	DNA:RNA	> 50	67EC; 4xSSC -or- 45EC; 4xSSC, 50% ホルムアミド	67EC; 1xSSC
J	DNA:RNA	< 50	T _J ; 4xSSC	T _J ; 4xSSC
K	RNA:RNA	> 50	70EC; 4xSSC -or- 50EC; 4xSSC, 50% ホルムアミド	67EC; 1xSSC
L	RNA:RNA	< 50	T _L ; 2xSSC	T _L ; 2xSSC
M	DNA:DNA	> 50	50EC; 4xSSC -or- 40EC; 6xSSC, 50% ホルムアミド	50EC; 2xSSC
N	DNA:DNA	< 50	T _N ; 6xSSC	T _N ; 6xSSC
O	DNA:RNA	> 50	55EC; 4xSSC -or- 42EC; 6xSSC, 50% ホルムアミド	55EC; 2xSSC
P	DNA:RNA	< 50	T _P ; 6xSSC	T _P ; 6xSSC
Q	RNA:RNA	> 50	60EC; 4xSSC -or- 45EC; 6xSSC, 50% ホルムアミド	60EC; 2xSSC
R	RNA:RNA	< 50	T _R ; 4xSSC	T _R ; 4xSSC

【0083】

b p¹ : ハイブリッドの長さは、ハイブリダイズしているポリヌクレオチドのハイブリダイズした領域を構成する長さである。ポリヌクレオチドを未知の配列の標的ポリヌクレオチドとハイブリダイズさせる場合は、ハイブリッドの長さはハイブリダイズしているポリヌクレオチドの長さとして仮定する。配列の分かっているポリヌクレオチドをハイブリダイズさせる場合、ハイブリッドの長さはポリヌクレオチド配列を整列(align)し、最適な配列相補性のある1つまたは複数の領域を同定することにより、決定することができる。

【0084】

10

20

30

40

50

バッファー^H：SSPE（1xSSPEは0.15M NaCl、10mM NaH₂PO₄、および1.25mM EDTA、pH7.4である）は、ハイブリダイゼーションおよび洗浄バッファーにおいてはSSC（1xSSCは0.15M NaClおよび15mMクエン酸ナトリウム）に換えることができる；洗浄はハイブリッド形成完了後15分間に行う。

【0085】

T_BからT_Rまで：長さ50塩基対未満であることが予想されるハイブリッドのためのハイブリダイゼーション温度は、ハイブリッドの融解温度（T_m）より5-10℃低くすべきであり、この場合T_mは以下の式より決定される。長さ18塩基対未満のハイブリッドに関しては、T_m（℃）=2（A+T塩基数の数）+4（G+C塩基数の数）とする。長さ18および49塩基対の間のハイブリッドに関しては、T_m（℃）=81.5+16.6（log₁₀ [Na⁺]）+0.41（%G+C）-（600/N）とするが、式中Nはハイブリッドの塩基数であり、[Na⁺]はハイブリダイゼーションバッファー中のナトリウムイオン濃度である（1xSSCの[Na⁺]=0.165M）。

10

【0086】

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

20

【0087】

本発明はまた、これらのポリヌクレオチドに完全に相補的なポリヌクレオチドを提供し、またアンチセンス配列をも提供する。本発明のアンチセンス配列（アンチセンスオリゴヌクレオチドともいう）は、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの発現を遮断する、内部で産生される配列および外部から投与される配列の双方を含む。本発明のアンチセンス配列は、例えば約15-20塩基対を含む。アンチセンス配列は、例えば上流の翻訳されない配列に結合するプロモーターを妨害することにより転写を阻害するように、またはリボソームの結合を妨げることで本発明のポリペプチドをコードする転写物の翻訳を妨げるように、デザインすることができる。

30

【0088】

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

【0089】

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

（融合タンパク質）

40

本発明はまた融合タンパク質に関する。“融合タンパク質”は、2つのしばしば無関係の融合した遺伝子またはそのフラグメントにコードされるタンパク質をいう。例えば融合タンパク質は、免疫グロブリン分子の定常部領域の様々な部分を、もう一つの免疫原性タンパク質またはその一部と共に含む。多くの場合免疫グロブリンFc領域を融合タンパク質の一部分として利用することは、例えば治療および診断に使用すると薬物動態学的特性の改善をもたらすという利点がある（例えばEP 0 232 262 A1を参照のこと）。他方使用によっては、融合タンパク質を発現、検出および精製した後にFc部分を除くことができることが望ましい。本発明の2086ポリヌクレオチドを本発明のポリペプチドの組換え生成に使用し、このヌクレオチドに成熟ポリペプチドそのものをコードする配列、またはリーディングフレーム中に他のコード配列、例えばリーダー配列もしくはは

50

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

10

【0090】

（免疫原性組成物）

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

【0091】

20

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

30

【0092】

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

【0093】

40

本発明の免疫原性組成物は、1つまたはそれ以上のアジュバントを含み、これは水酸化アルミニウム；リン酸アルミニウム；STIMULON（登録商標）QS-21（Aquila Biopharmaceuticals, Inc., Framingham, MA）；MPL（登録商標）（3-O-脱アシル化モノホスホリル脂質A；Corixa, Hamilton, MT）、529（アミノアルキルグルコサミンフォスフェート化合物、Corixa, Hamilton, MT）、IL-12（Genetics Institute, Cambridge, MA）；GM-CSF（Immunex Corp., Seattle, Washington）；N-アセチル-L-セロニン（thronl）-D-イソグルタミン（thr-MDP）；N-アセチル-L-アラニン-L-アラニン-D-イソグルタミン（CGP 11637, nor-MDPともいう）；N-アセチル-L-アラニン-L-アラニン-D-イソグルタミン-L-アラニン-2-（1'-2'-ジバルミトイル-sn-グリセロール-3-ヒド

50

ロキシホスホリルオキシエチルアミン) (CGP 19835A、MTP-PEともいう) ; およびコレラ毒素を含むが、これに限定されない。使用可能な他の例として、コレラ毒素の非毒性誘導体 (そのAサブユニットを含む) 、 および/または髄膜炎菌ポリペプチドとコレラ菌毒素もしくはそのBサブユニット (“CTB”) との複合体もしくは遺伝子工学による融合体、プロコレラゲノイド (procholeragenoid) 、カビの多糖 (シゾフィランを含む) 、ムラミルジペプチド、ムラミルジペプチド (“MDP”) 誘導体、ホルボーエステル、大腸菌の易熱性毒素、ブロックポリマー、またはサポニンが挙げられる。

【0094】

ある好ましい態様において本発明のタンパク質を、粘膜用アジュバントを含む経口投与用免疫原性組成物中に使用し、ヒト宿主における髄膜炎菌感染の治療または予防に使用する。粘膜用アジュバントはコレラ毒素とすることができる ; しかし好ましくは、本発明に従って使用することのできるコレラ毒素以外の粘膜アジュバントとして、コレラホロトキシンの非毒性誘導体を含み、この場合Aサブユニットが突然変異誘発されたもの、化学的に修飾されたコレラ毒素、またはコレラ毒素アミノ酸配列の修飾により生成される関連タンパク質である。本発明の免疫原性組成物の製造に特に有用となり得る特定のコレラ毒素として、国際特許出願公開第WO 00/18434号に開示されている、変異コレラホロトキシンE29Hを参照のこと (この全内容を当明細書において参照として援用する) 。これらを本発明のポリペプチドに加える、または複合させることができる。粘膜アジュバント特性または送達特性を有する他の分子、例えば大腸菌易熱性毒素 (LT) に、同じ技術を適用することができる。粘膜用アジュバント活性または送達活性を有する他の化合物として、例えば胆汁 ; ポリカチオン、例えばDEAE-デキストランおよびポリオルニチン ; 界面活性剤、例えばドデシルベンゼン硫酸ナトリウム ; 脂質を複合した物質 ; 抗生物質、例えばストレプトマイシン ; ビタミンA ; および粘膜表面の構造的または機能的完全性を変えるその他の物質、を使用することができる。他の粘膜活性化合物として、微生物の構造の誘導体、例えばMDP ; アクリジンおよびシメチジンを含む。STIMULON (登録商標) QS-21、MPLおよびIL-12もまた上述のように使用することができる。

【0095】

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

【0096】

(複数の抗原)

本発明のタンパク質、ポリヌクレオチドおよび均等物を含む免疫原性物質は、免疫組成物中に単一の活性免疫原として投与することができるが、あるいは同組成物は、他のナイセリア属、免疫原性ポリペプチド、または1つまたはそれより多くの微生物病原体 (例えば限定はしないがウイルス、プリオン、細菌、もしくはカビ) の免疫学的に活性なタンパク質、またはきょう膜の多糖を含む他の活性な免疫原を含むことができる。組成物は1つまたはそれより多くの所望のタンパク質、フラグメントまたは医薬的化合物を、選択された適用に所望されるように含むことができる。同様に、免疫原性組成物中に1つまたはそれより多くの核酸を使用する本発明の組成物はまた、上述のようにタンパク質の同じ変異を示す群をコードする核酸を含むことができる。

【0097】

あらゆる複数の抗原または多価免疫原組成物を、本発明により意図するものとする。例えば本発明の組成物は、2つまたはそれより多くの2086タンパク質の組み合わせ、2086タンパク質と1つまたはそれより多くのPorAタンパク質との組み合わせ、2086タンパク質と髄膜炎菌血清群A、C、YおよびW135多糖および/または多糖複合体との組み合わせ、2086タンパク質と髄膜炎菌および肺炎球菌を組み合わせたものと

の組み合わせ、または粘膜への送達に適する形の前述の物質のいずれかの組み合わせを含むことができる。当業者はこのような複数の抗原または多価免疫原組成物を、容易に製剤化することができるだろう。

【0098】

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

10

【0099】

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

【0100】

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

20

【0101】

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

30

【0102】

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

【0103】

本発明のもう一つの特定の側面は、本発明のタンパク質または免疫原性部分そのものを発現するベクターまたはプラスミドを、免疫原性組成物として使用することに関する。したがって本発明のさらなる側面として、哺乳類における免疫応答を誘導する方法を提供し、その方法は少なくとも1つの単離された2086ポリペプチドを発現するベクターまたはプラスミドを哺乳類に提供することを含む。本発明のタンパク質は、外来ポリペプチドとしてポリペプチドまたは免疫原性部分を発現するために必要な遺伝的材料を含む、生きているベクターを用いて、特に生きている組換え細菌、ウイルスまたはその他の生きている物質を用いて、哺乳類に送達することができる。

40

【0104】

本発明のさらなる実施により、哺乳類における細菌性髄膜炎を診断するための方法を提

50

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

【0105】

(ウイルスベクターおよび非ウイルスベクター)

好ましいベクターは、特にin vitro および in vivoの細胞アッセイに関してはウイルスベクター、例えばレンチウイルス、レトロウイルス、ヘルペスウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ワクシニアウイルス、バキュロウイルス、および望ましい細胞指向性を有するその他の組換えウイルスである。このように2086タンパク質またはその免疫原性フラグメントをコードする核酸を、ウイルスベクターを用いてまたはDNAを直接導入することにより、in vivo、ex vivo、またはin vitroで導入することができる。標的組織内での発現は、例えばウイルスベクターもしくは受容体リガンドを用いて、または組織特異的なプロモーターを使用することにより、またはそれら双方により、遺伝子組換えしたベクターを特定の細胞にターゲティングすることにより達成することができる。標的への遺伝子の送達はPCT出願公開第WO 95/28494号に記載されており、その全内容を当明細書において参照として援用する。

【0106】

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

【0107】

DNAウイルスベクターは弱毒または欠陥DNAウイルス、例えば限定はしないが単純ヘルペスウイルス（HSV）、パピローマウイルス、エプスタイン・バーウイルス（EBV）、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス（AAV）等を含む。ウイルス遺伝子を完全にまたはほぼ完全に欠損する欠陥ウイルスが好ましい。欠陥ウイルスは細胞内への導入後の感染性はない。欠陥ウイルスベクターを使用することで、ベクターが他の細胞に感染する可能性を憂慮することなく、特定の、局所的領域の細胞への投与が可能となる。このように特定の組織を特異的に標的とすることができる。特定のベクターの例として以下を含むがこれに限定されない、すなわち欠陥ヘルペスウイルス1（HSV1）ベクター（Kap litt et al., Molec. Cell. Neurosci., 1991, 2: 320-330）、糖タンパク質L遺伝子を欠損する欠陥ヘルペスウイルスベクター、または他の欠陥ヘルペスウイルスベクター（PCT出願公開第WO 94/21807号およびWO 92/05263号）；弱毒アデノウイルスベクター、例えばStratford-Perricaudet et al.に記載されているベクター（J. Clin. Invest., 1992, 90: 626-630；またLa Salle et al., Science, 1993, 259: 988-990も参照のこと）；および欠陥アデノ随伴ウイルスベクター（Samulski et al., J. Virol., 1987, 61: 3096-3101；Samulski et al., J. Virol., 1989, 63: 3822-3828；Lebkowski et al., Mol. Cell. Biol., 1988, 8: 3988-3996）が挙げられ、これらの各文献を当明細書において参照として援用する。

【0108】

様々な会社からウイルスベクターが市販されており、以下を含むがこれに限定されない、すなわちAvigen, Inc. (Alameda, CA; AAVベクター)、Cell Genesys (Foster City, CA; レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、AAVベクター、およびレンチウイルスベクター)、Clontech (レトロウイルスベクターおよびバキュロウイルスベクター)、Genovo, Inc. (Sharon Hill, PA; アデノウイルスベクターおよびAAVベクター)、

Genvec (アデノウイルスベクター)、IntroGene (Leiden, Netherlands: アデノウイルスベクター)、Molecular Medicine (レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、AAVベクターおよびヘルペスウイルスベクター)、Norgen (アデノウイルスベクター)、Oxford BioMedica (Oxford, United Kingdom; レンチウイルスベクター)、およびTransgene (Strasbourg, France; アデノウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、レトロウイルスベクター、およびレンチウイルスベクター)があり、その全内容を当明細書において参照として援用する。

【0109】

(アデノウイルスベクター)

アデノウイルスは、本発明の核酸を様々なタイプの細胞に効率的に送達するように修飾することのできる、真核DNAウイルスである。アデノウイルスには様々な血清型がある。これらの血清型のうち、本発明の範疇において好ましくは2型または5型ヒトアデノウイルス (Ad2もしくはAd5) または動物起源のアデノウイルスを使用する (PCT出願公開第WO 94/26914号を参照のこと)。本発明の範疇に使用することのできる動物起源のこれらのアデノウイルスは、イヌ、ウシ、ネズミ (例: Mavl, Beard et al., Virology, 1990, 75-81)、ヒツジ、ブタ、トリ、およびサル (例: SAV) を起源とするアデノウイルスを含む。好ましくは動物起源のアデノウイルスは、イヌアデノウイルス、より好ましくはCAV2アデノウイルス (例えばManhattanまたはA26/61株、ATCC VR-800) である。様々な複製欠陥アデノウイルスおよび最小のアデノウイルスのベクターについて記載されてきた (PCT出願公開第WO 94/26914号、WO 95/02697号、WO 94/28938号、WO 94/28152号、WO 94/12649号、WO 95/02697号、WO 96/22378号)。本発明による複製欠陥組換えアデノウイルスは、当業者に公知のいずれの技術でも製造することができる (Levrero et al., Gene, 1991, 101: 195; 欧州特許出願公開第EP 185 573号; Graham, EMBO J., 1984, 3: 2917; Graham et al., J. Gen. Virol., 1977, 36: 59)。組換えアデノウイルスは一般の当業者に周知の標準的な分子生物学的技術を用いて回収し精製される。

【0110】

(アデノ随伴ウイルス)

アデノ随伴ウイルス (AAV) は、それらの感染する細胞のゲノム中に安定して部位特異的に組み込むことのできる、比較的小さなサイズのDNAウイルスである。これらはまた、細胞の成長、形態または分化になんら影響を与えることなく広範囲の細胞に感染することができ、ヒトの病理への関与は認められていない。AAVゲノムはクローン化、配列決定および特徴付けが完了している。In vitroおよび in vivoで遺伝子を伝達するためのAAV由来のベクターの使用について、記述されている (PCT出願公開第WO 91/18088号およびWO 93/09239号; 米国特許第4, 797, 368号および5, 139, 941号; 欧州特許出願公開第EP 488 528号を参照のこと)。本発明による複製欠陥組換えAAVは、目的の核酸配列の両側を2つのAAV逆位末端反復 (ITR) 領域ではさんで含むプラスミド、およびAAVのキャプシド形成遺伝子 (repおよびcap遺伝子) を保有するプラスミドを、ヒトヘルパーウイルス (例えばアデノウイルス) で感染させた細胞株内に、合わせてトランスフェクト(cotransfect)することにより、製造することができる。次に作製した組換えAAVを標準的な技術により精製する。

【0111】

(レトロウイルスベクター)

本発明のもう一つに実施において、核酸をレトロウイルスベクターに導入することができる、例えば以下の文献、米国特許第5, 399, 346号; Mann et al., Cell, 1983, 33: 153; 米国特許第4, 650, 764号および4, 980, 289号; Markowitz et al., J. Virol., 1988, 62: 1120; 米国特許第5, 124, 263号; 欧州特許出願公開第EP 453 242号およびEP 178 220号; Bernstein et al., Genet.

Eng., 1985, 7: 235; McCormick, BioTechnology, 1985, 3: 689; P C T 出願公開第 W O 9 5 / 0 7 3 5 8 号; および Kuo de al., Blood, 1993, 82: 845 に記載されており、これらの各文献をその全内容において参照として援用する。レトロウイルスは分裂細胞に感染する組み込むタイプのウイルスである。レトロウイルスゲノムは 2 つの L T R、キャプシド形成配列および 3 つのコード領域 (g a g、p o l および e n v) を含む。組換えレトロウイルスにおいては、一般に g a g、p o l および e n v 遺伝子をすべてまたは部分的に欠失させ、目的の異種の核酸配列で置き換える。これらのベクターは異なるタイプのレトロウイルス、例えば H I V、M o M u L V (“ネズミ Moloney 白血病ウイルス”)、M S V (“ネズミ Moloney 肉腫ウイルス”)、H a S V (“Harvey 肉腫ウイルス”)、S N V (“脾臓壊死ウイルス”)、R S V (“Rous 肉腫ウイルス”) および Friend ウイルス、から作成することができる。適切なパッケージング細胞株は先行技術に記載されており、特に P A 3 1 7 細胞株 (米国特許第 4, 8 6 1, 7 1 9 号); P s i C R I P 細胞株 (P C T 出願公開第 W O 9 0 / 0 2 8 0 6 号) および G P + e n v A m - 1 2 細胞株 (P C T 出願公開第 W O 8 9 / 0 7 1 5 0 号) が挙げられる。加えて組換えレトロウイルスベクターは、転写活性ならびに g a g 遺伝子の一部に含まれ得る、余分のキャプシド形成配列を抑制するため 2 つの L T R の間に修飾を含ませることができる (Bender et al., J. Virol., 1987, 61: 1639)。組換えレトロウイルスベクターは一般の当業者に公知の標準的な技術により精製される。

10

【0112】

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

20

【0113】

レトロウイルスベクターはまた DNA ウイルスにより導入することもでき、この場合 1 サイクルのレトロウイルスの複製が可能となり、トランスフェクション効率が増幅される (P C T 出願公開第 W O 9 5 / 2 2 6 1 7 号、W O 9 5 / 2 6 4 1 1 号、W O 9 6 / 3 9 0 3 6 号、および W O 9 7 / 1 9 1 8 2 号を参照のこと)。

30

【0114】

(レンチウイルスベクター)

本発明のもう一つの実施において、レンチウイルスベクターを直接送達のための媒体物質として使用して、脳、網膜、筋肉、肝臓および血液を含むいくつかの組織のタイプにおいて導入遺伝子の発現を持続することができる。このベクターをこれらの組織の分裂細胞および非分裂細胞に効率的に形質導入し、目的の遺伝子の長期間の発現を達成することができる。総説として、Naldini, Curr. Opin. Biotechnol., 1998, 9: 457-62 を参照のこと; また Zufferey, et al., J. Virol., 1998, 72: 9873-80 も参照のこと。レンチウイルスのパッケージング細胞株は入手可能であり、当該技術分野で一般に知られている。これらは遺伝子治療用の高力価のレンチウイルスベクターの産生を促進する。一例として、ウイルス粒子を 1 0 6 I U / m L 以上の力価で少なくとも 3 から 4 日間産生できる、テトラサイクリン誘発型 V S V - G 類型レンチウイルスパッケージング細胞株がある (Kafri, et al., J. Virol., 1999, 73: 576-584)。誘発型細胞株により産生されたベクターは、in vitro および in vivo で非分裂細胞に効率的に形質導入させるため必要に応じて濃縮することができる。

40

【0115】

(非ウイルスベクター)

本発明のもう一つの実施において、リポフェクションにより裸の DNA としてまたは他

50

のトランスフェクション促進物質（ペプチド、ポリマー等）と共に、ベクターをin vivoで導入することができる。合成陽イオン脂質を使用して、マーカーをコードする遺伝子をin vivoでトランスフェクションするためのリポソームを製造することができる。（Felgner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1987, 84: 7413-7417; Felgner and Ringold, Science, 1989, 337: 387-388; Mackey, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1988, 85: 8027-8031; Ulmer et al., Science, 1993, 259: 1745-1748）。核酸の伝達に有用な脂質化合物および脂質組成物はPCT特許出願公開第WO 95/18863号およびWO 96/17823号、および米国特許第5,459,127号に記載されている。脂質はターゲティングのために他の分子と化学的にカップルさせることができる（Mackey, et al., 上記参照のこと）。標的のペプチド、例えばホルモンもしくは神経伝達物質、および抗体のようなタンパク質、または非ペプチド分子をリポソームと化学的にカップルさせることができる。

10

【0116】

他の分子、例えばカチオン性オリゴペプチド（例えばPCT特許出願公開第WO 95/21931号）、DNA結合タンパク質由来のペプチド（例えばPCT特許出願公開第WO 96/25508号）またはカチオン性ポリマー（例えばPCT特許出願公開第WO 95/21931号）もまた、in vivoでの核酸のトランスフェクションの促進に有用である。

【0117】

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

20

30

40

【0118】

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

【0119】

（細菌の発現系およびプラスミド）

本発明はまた、プロモーター配列およびイニシエーター配列を有する発現コントロール

50

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

10

【0120】

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

【0121】

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

20

【実施例】

【0122】

実施例

実施例 1

30

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

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

【0123】

【表 2 - 1】

表 I I 髄膜炎菌の異なる菌株に対する抗 s OMP の B C 活性

抗血清 第6週	H44/76	5315	H355	M982	880049	8529*	NMB
血清型サブタイプ	P1.7,16	P1.5	P1.15	P1.9	P1.4	P1.3	P1.5,2
sOMPs H44/76 25μg QS-21 20μg	1,000	< 50	< 50	< 50	< 50	980	< 50
sOMPs 5315 25μg QS-21 20μg	50	< 50	< 50	< 50	< 50	2170	< 50
sOMPs H355 25μg QS-21 20μg	< 50	< 50	450	< 50	< 50	860	< 50
sOMPs M982 25μg QS-21 20μg	92	< 50	< 50	300	< 50	1100	< 50
sOMPs 880049 25μg QS-21 20μg	50	< 50	< 50	< 50	< 50	1190	< 50
sOMPs 8529 25μg QS-21 20μg	1,000	< 50	450	50	215	>4050 (81.7)	< 50
sOMPs 2996 25μg QS-21 20μg	< 50	< 50	< 50	< 50	< 50	790	148
全細胞コントロール血清 25μg 3DMPL 25μg	450	50	100	500	150	>1350 (66.0)	952

【 0 1 2 4】

異種への殺菌性抗体の産生に關与する抗原（複數）の単離および特徴付けを促進するため、どの界面活性剤で最適

抗原（複數）抽出ができるかの同定を檢討した。

【 0 1 2 5】

（菌株および培養条件）

凍結バイアルからの髄膜炎菌株 8 5 2 9 を G C プレート上で画線培養した。（髄膜炎菌株 8 5 2 9 は The RIYM, Bilthoven, The Netherlands より供与を受けた）。プレートを 3 6 ° C / 5 % C O ₂ で 7 . 5 時間インキュベーションした。いくつかのコロニーを使用して、修飾した Frantz 培地 + G C 補足成分 5 0 m L を含むフラスコに接種した。フラスコを 3 6 ° C でエアシェーカー (air shaker) 中でインキュベーションし、2 0 0 R P M で 4 . 5 時間攪拌した。5 m L を使用して、修飾した Frantz 培地 + G C 補足成分 4 5 0 m L を含む Frenbach フラスコに接種した。このフラスコを 3 6 ° C で air shaker 中でインキュベーションし、1 0 0 R P M で 1 1 時間攪拌した。4 5 0 m L すべてを使用して、1 0 L のファーマンター内の修飾した Frantz 培地 + G C 補足成分 8 . 5 L 中に接種した。

【 0 1 2 6】

【表 2 - 2】

修飾した Frantz 培地の成分：

グルタミン酸	1.3 g/L	
システイン	0.02	
リン酸ナトリウム、 2 塩基性、 7 水和物	10	
塩化カリウム	0.09	
塩化ナトリウム	6	10
塩化アンモニウム	1.25	
透析した酵母抽出物 (YE)	40 ml	

(25% YE 溶液は 5 倍量の蒸留水に対してオーバーナイト透析した後オートクレーブした)

20

GC 補足成分 100x、フィルター滅菌

デキストロース	400 g/L	
グルタミン酸	10	
コカルボキシラーゼ	0.02	
硝酸化鉄	0.5	30

【0127】

発酵中、以下のようにパラメータのコントロールを行った：温度 = 36 °C；pH = 7.4；溶解酸素濃度 = 20%。泡の発生をコントロールするため P-2000 消泡剤を数滴加えた。増殖が定常期に達するまで培養を行った。OD₆₅₀ = 5.25 で細胞を遠心して集めた。典型的には湿った細胞ペレット総計 100 - 300 グラムを ~8.5 L の培地から得た。

【0128】

(異種への殺菌性抗体を産生する髄膜炎菌由来の外膜タンパク質分画の部分的精製：)

細胞の湿重量 100 グラムを懸濁し、10 mM HEPES-NaOH、pH 7.4、1 mM Na₂EDTA にて湿重量の 5 倍量とし、~18,000 psi で容器に取り付けた 110 Y マイクロフルイダイザー (microfluidizer) を通して溶菌させた。溶菌液を清澄にし、300,000 × g、1 時間、10 °C で遠心して細胞のエンベロープを単離した。細胞のエンベロープホモジナイザーで懸濁させて同じバッファーで 2 回洗浄し、上記のように遠心した。次に細胞のエンベロープを 10 mM HEPES-NaOH、pH 7.4、1 mM MgCl₂ 中の 1% (w/v) TritonX-100 溶液 320 mL で抽出した。以下の表 III に示したように、続いての TritonX-100 および Zwittergent 3-14 を用いての異なる界面活性剤による抽出、およびその後のマウスの免疫感作の結果、Triton が目的の候補物質を最適に抽出することを決定することができた。この TritonX-100 抽出物は表 III に列記した 5 種の菌株のうち 4 種に対して殺菌性抗体反応を示したため、次に BioRad Rotaphor

40

50

ユニットの分取用等電点電気泳動（I E F）による分画を行った。両性電解質濃度は1 % p H 4－6を混合して1 % p H 3－10とした。表IIIに示したように、いくつかの分画が異種への殺菌性反応を示すことが発見された。I E Fから得られた、5．5－7．8のp H範囲に濃縮されている分画は、殺菌性のアッセイにより決定したところほとんどの菌株に対して異種への反応を示した。プールしたI E F分画を濃縮し、両性電解質をエタノール沈殿により除去した。陰イオン交換カラムで、約5．5－7．8のp H範囲で得られたタンパク質の一部を吸着させ、吸着タンパク質と非吸着タンパク質によるマウスの免疫感作後に得られた殺菌活性を比較することによりさらに精製を行った。再び表IIに表したように、多くのタンパク質は陰イオン交換樹脂に吸着されたが、カラムに吸着されなかったタンパク質が異種へのより高い殺菌性抗体を産生した。

【0129】

【表3】

表III

		BC _{su} 標的菌株				
方法	分画	H44/76	880049	H355	539*	M982
除去	LOS- sOMPs	1,000	215	450	NC	50
界面活性剤 抽出物	細胞質抽出	200	NT	NT	NT	NT
	TX-100	>800	>800	>800	>800	<25
	Zwittergent 3-12	400	>25	100	400	<25
	Zwittergent 3-14	<25	NT	NT	NT	NT
	Zw.3-14 + NaCl	<25	NT	NT	NT	NT
	サルコシル	<25	NT	NT	NT	NT
	Zw.3-14 + 加熱	<25	NT	NT	NT	NT
分離用 I E F	分画 1-3 (pH 2.3-3.9)	50	NT	NT	NT	NT
	分画 4 (pH 4.1)	>800	<25	100	<25	NT
	分画 5 (pH 4.3)	>800	<25	100	200	NT
	分画 6 (pH 4.5)	400	NT	NT	NT	NT
	分画 7 (pH 4.8)	<25	NT	NT	NT	NT
	分画 8-9 (pH 5.0-5.3)	<25	NT	NT	NT	NT
	分画 10-17 (pH 5.5-7.8)	>800	200	<800	<800	NT
陰イオン交換	吸着	400	NT	100	100	NT
	非吸着	>6,400	NT	<800	<800	NT

10 NT: 未検査

* 臨床的に単離された539は8529と同質の菌株であり、同じ流行から単離されている。

【0130】

図1Aに示したように、SDS-PAGEで決定したところ、非吸着分画に2つの主なタンパク質が存在していた。これらのタンパク質を同定するため、2種類の分析を行った。1つの分析として限定タンパク質分解（図1Aおよび図1Bを参照のこと）の後、ペプチドの単離およびタンパク質の直接配列決定を行った。他の分析としてSDS-PAGEの後、ゲル切り出し、タンパク質分解酵素による消化、およびLC-MS/MS（液体クロマトグラフィータンデム質量分析）を行い、（図3参照）目的の調製物の成分の質量分析の情報を得た。（本セクションで後述するペプチドマッピング法および配列決定法を参照のこと）

髄膜炎菌AのSangerゲノム配列を、Zagursky and Russell, 2001, BioTechniques, 31: 636-659に記載されている方法およびアルゴリズムを用いて分析した。この網羅的分析により、12, 000以上のオープンリーディングフレーム（ORF）の可能性が得られた。上述の直接配列決定データおよび質量分析データの双方は、非吸着分画の主要成分が、Sangerのデータベースの分析に存在するいくつかのORF産生物であることを示した。この方法論により同定された3つの顕著なタンパク質は、ORF 4431、5163および

10

20

30

40

50

2086に対応していた（図1Bおよび3を参照のこと）。

【0131】

ORF4431は、分画中で同定された最も顕著なタンパク質であったが、組換え脂質化4431に対するマウスの抗体は殺菌性ではなく、動物モデルにおける防護的応答は提供しなかった。ORF5163のさらなる分析は研究中である。

当実施例で述べた調製物の第2に顕著な成分はORF2086の生成物に対応している。

【0132】

（免疫原性の方法：）

（抗血清の調製：）

記載がない限り、タンパク質組成物/ワクチンは総タンパク質25μgを含むように処方し、20μg QS-21をアジュバントとして加えた。6-8週齢のメスのSwiss-Websterマウスに0.2mLの用量を皮下注（臀部）により第0週および4週に投与した。血液を第0週および4週に採取し、最終的な全採血は第6週に行った。

【0133】

（殺菌性のアッセイ：）

殺菌性のアッセイは本質的には記載されているように（Mountzouros and Howell, 2000, J. Clin. Microbiol. 38(8): 2878-2884を参照のこと）行った。SBAに関する補体を介しての抗体依存性の殺菌性力価は、アッセイに導入した標的細胞の50%以上を死滅させる検査血清の、最も高い希釈度の逆数として表した（BC₅₀力価）。

【0134】

（2086タンパク質の同定に使用する方法：）

（臭化シアン分解およびフラグメントの直接配列決定：）

陰イオン交換カラム非吸着分画（Anion Exchange Unadsorbed Fraction、AEUF）の臭化シアン分解。AEUFは90%冷却エタノールで沈殿させ、70%ギ酸中の10mg/mL臭化シアン溶液にて、タンパク質濃度1mg/mLとなるように可溶化した。反応はオーバーナイト、室温、暗所で行った。切断した生成物を真空遠心で乾燥させ、ペレットをHE/0.1%に低下したTX-100で可溶化した。SDS-PAGEに続いてN末端アミノ酸配列決定を使用し、この分画の成分を同定した。

【0135】

（成分を同定するためのプロテアーゼ消化/逆相/N末端配列決定：）

AEUFはGluC（V8）、LysCまたはArgCのいずれかで消化した。酵素に対するタンパク質の比は、1μg酵素に対して30μgタンパク質とした。消化は37℃、オーバーナイトで行った。消化したタンパク質混合物（30μg）を7ミクロンAquapore RF-300カラムにかけ、0.1%トリフルオロ酢酸中の10-95%アセトニトリル溶液の濃度勾配で溶出し、ピークを手動で集めた。タンパク質を含まないブランクも流し、これから得られたピークをサンプルのクロマトグラムから差し引いた。サンプルのみから得られるピークを質量分析計で分析し、明確な質量の得られたサンプルをN末端アミノ酸配列決定で分析した。

【0136】

（N末端アミノ酸配列決定：）

プロットから切り出したバンドについては、そのタンパク質サンプルをSDSゲルからPVDF膜に移し、アミドブラック（脱イオン水中に10%酢酸、0.1%アミドブラック）で染色し、10%酢酸で脱色した。そして所望のタンパク質のバンドを10本のレーンすべてからメタノールで洗浄した外科用メスまたはミニExactoナイフで切り出し、Applied Biosystems 477A Protein Sequencer（タンパク質シーケンサ）の反応カートリッジに設置した。溶液中のサンプルを直接配列決定するため、Prosorb カートリッジを組み立て、PVDFを60μLのメタノールで湿らせた。PVDFを脱イオン水50μLですすいで、サンプル（50μL）をPVDFにのせた。50μLの脱イオン水を用いてサンプルをすすいだ後、Prosorb PVDFをパンチで切り出し、乾燥させ、Applied Biosystems

10

20

30

40

50

477Aタンパク質シーケンサの反応カートリッジにセットした。双方の方法について、Applied Biosystems N末端シーケンサを、12またはそれ以上のサイクル（1サイクル ブランク、1サイクル スタンダード、および10またはそれ以上のサイクル 所望の残基の同定）の間、至適プロット条件下で作動させ、Applied Biosystems 120A PTH AnalyzerでPTH-アミノ酸検出を行った。サイクルのデータはアナログのチャートレコーダーおよび装置のソフトウェアによりデジタルに、の双方で集めた。アミノ酸の割り当ては、分析計のPTH-アミノ酸のスタンダードのセットおよびそれらの各保持時間との比較により、アナログデータおよびデジタルデータを用いて行った（システイン残基は変換中に破壊されるため検出されない）。1つの残基から複数の配列情報が得られるため、割り当ての第1、第2の決定はシグナルの強度に基づいて行う。

10

【0137】

(LC-MS/MS)

IEFで精製したタンパク質サンプルをさらにSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動で分析した。タンパク質はクーマシーブルー染色で視覚化し、目的のバンドを手で切り出し、還元、アルキル化し、in situで自動化インゲルトリプシン消化ロボットを用いてトリプシン (Promega, Madison, WI) による消化を行った(1)。消化後、ペプチド抽出物を最終容量10-20 μ Lまで、Savant Speed Vac Concentrator (ThermoQuest, Hologic, NY)を用いて濃縮した。

【0138】

ペプチド抽出物を自動マイクロエレクトロスプレー逆相HPLCで分析した。手短に言えば、マイクロエレクトロスプレー装置(interface)は長さ50 cm、直径75 μ m、オリフィス直径8 μ mのPico fritヒューズド(fused)シリカスプレーニードル (New Objective, Cambridge MA) に、10 μ m C18逆相ビーズ (YMC, Wilmington, NC) を10 cmの長さまで詰めたものからなる。Pico fritニードルは質量分析計の検出器の前に設置した手製のベースに固定したファイバーオプティックホルダー(fiber optic holder) (Melles Griot, Irvine, CA)に取り付けた。カラムの後方はチタンユニオンに通してエレクトロスプレー装置への電氣的接触を提供するようにした。このユニオンは、HPLC溶媒ポンプ (ABI 140C, Perkin-Elmer, Norwalk, CT) に接続させたFAMOSオートサンプラー (LC-Padkings, San Francisco, CA) への一定の長さのヒューズドシリカキャピラリー (FSC) のチューブに接続した。HPLC溶媒ポンプは50 μ L/分の流量を提供するが、マイクロタイトスプリッティングティー(microtight splitting tee) (Upchurch Scientific, Oak Harbor, WA) を用いて250 nL/分にまで減量し、FSCトランスファーラインを用いてオートサンプラーまで送達させた。LCポンプおよびオートサンプラーは各々インターナルユーザープログラムを用いてコントロールした。サンプルはプラスチック製のオートサンプラーバイアルに挿入し、シールし、5 μ Lのサンプルループを用いて注入した。

20

30

【0139】

(マイクロキャピラリーHPLC質量分析計：)

インゲル消化から抽出されたペプチドを、マイクロエレクトロスプレーHPLCシステムにて50分の0-50%溶媒B (A: 0.1 M HOAc, B: 90% MeCN/0.1 M HOAc) の濃度勾配により分離した。ペプチドの分析はFinnigan LCQ イオントラップ質量分析計 (ThermoQuest, San Jose, CA) にてスプレー電圧1.5 kVで作動し、キャピラリー温度を150 $^{\circ}$ Cに加熱して行った。データは本装置に提供されているデータ取得用ソフトウェアを用いて、自動MS/MSモードで得た。取得法は1回のMSスキャン (375-1200 m/z) の後、MSスキャンで最も量の多い3イオンについてのMS/MSスキャンを含んだ。dynamic exclusion機能およびisotope exclusion機能を用いて、分析するペプチドイオン数を増加した (セッティング: 3 amu = exclusion width, 3分 = exclusion duration, 30秒 = pre-exclusion duration, 30 amu = isotope exclusion width)。MS/MSデータの自動分析は、髄膜炎菌 (Sangerによる) の完全なゲノムから導かれたタンパク質のデータベースを用いて、Finning Bioworks データ

40

50

分析パッケージ (ThermoQuest, San Jose, CA) に組み込んだ S E Q U E S T コンピューターアルゴリズムを用いて行った。研究の結果を図 3 に示す。

【0140】

(実施例 2)

(組換え脂質化 P 2 0 8 6 (r L P 2 0 8 6) のクローニング:)

A) 天然のリーダー配列:

(材料物質:)

8 5 2 9 と命名されたサブグループ B 髄膜炎菌株の臨床的に単離されたものから、P C R により O R F 2 0 8 6 遺伝子を増幅した。この菌株の血清群、血清型および血清型サブタイプを括弧内に示す; 8 5 2 9 (B : 1 5 , P 1 : 7 b , 3)。この髄膜炎菌株はThe RIVM, Bilthoven, The Netherlands より供与を受けた。髄膜炎菌株 8 5 2 9 由来の成熟 2 0 8 6 タンパク質の遺伝子配列は当明細書において配列番号 2 1 2 として提供する。

【0141】

(P C R 増幅およびクローニング法:)

O R F 2 0 8 6 を目で見たと、この遺伝子がリポタンパク質シグナル配列の可能性を有することを示していた。所有の隠れマルコフモデル リポタンパク質 (Hidden Markov Model Lipoprotei) アルゴリズムを用いてのさらなる分析により、O R F 2 0 8 6 がリポタンパク質のシグナル配列を含むことを確認した。より天然様のコンホメーションで P 2 0 8 6 を組換え発現させるため、オリゴヌクレオチドプライマーはリポタンパク質シグナル配列をそのまま含む完全長の遺伝子を増幅するようにデザインし、髄膜炎菌 A O R F 2 0 8 6 の Sanger 配列の分析に基づいた、すなわち (5 ' プライマー - C T A T T C T G C A T A T G A C T A G G A G C および 3 ' プライマー - G C G C G G A T C C T T A C T G C T T G G C G G C A A G A C C) とし、これらを各々配列番号 3 0 4 (化合物番号 4 6 2 4) および配列番号 3 0 3 (化合物番号 4 6 2 3) とする (当明細書の表 IV 参照のこと)。2 0 8 6 遺伝子は、髄膜炎菌株 8 5 2 9 よりポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) [ABI 2400 thermal cycler, Applied Biosystems, Foster City, CA] により増幅した。正しいサイズの増幅産物を結合し、p C R 2 . 1 - T O P O (Invitrogen) 中にクローニングした。プラスミド D N A を N d e I および B a m H I により制限消化し、ゲル精製し、p E T - 2 7 b (+) ベクター (Novagen) 中に結合させた。

【0142】

当明細書で述べたオリゴヌクレオチドプライマーは、PerSeptive Biosystems oligonucleotide synthesizer (オリゴヌクレオチド合成装置)、Applied Biosystems, Foster City CA で、β - シアノエチルホスホロアミダイト化学、Applied Biosystems, Foster City CA を用いて合成した。O R F 2 0 8 6 遺伝子ファミリーの P C R 増幅に用いたプライマーを表 IV に列記するが、これは本発明の非限定的なプライマーの例を示すものである。

【0143】

【表 4】

表IV： プライマー

配列番号 (化合物番号)	プライマー	配列	制限部位
303 (4623)	Reverse	GCGCGGATCCTTACTGCTTGGCGGCAAGACC	BamHI
304 (4624)	Forward	CTATTCTGCATATGACTAGGAGC	NdeI
305 (4625)	Forward	AGCAGCGGAGGCGGCGGTGTC	
306 (5005)	Forward	TGCCGATGCACTAACC GCACC	
307 (5007)	Reverse	CGTTTCGCAACCATCTTCCCG	
308 (5135)	Reverse	GAGATCTCACTCACTCATTACTGCTTGGC GGCAAGACCGATATG	BglII
309 (5658)	Forward	GCGGATCCAGCGGAGGGGGTGGTGTGCGCC	BamHI
310 (5660)	Reverse	GCGCATGCTTACTGCTTGGCGGCAAGACC GATATG	SphI
311 (6385)	Forward	GCGGATCCAGCGGAGGCGGCGGAAGC	BamHI
312 (6406)	Forward	GCGCAGATCTCATATGAGCAGCGGAGGGG GTGGTGTGCGCGCCGAYATWGGTGC GGGG CTTGCCG	BglII and NdeI
313 (6470)	Forward	CTATTCTGCGTATGACTAG	
314 (6472)	Reverse	GTCCGAACGGTAAATTATCGTG	
315 (6473)	Forward	GCGGATCCAGCGGAGGCGGCGGTGTGCGCC	BamHI
316 (6474)	Forward	GAGATCTCATATGAGCAGCGGAGGCGGCG GAAGC	BglII and NdeI
317 (6495)	Forward	GACAGCCTGATAAACC	
318	Reverse	GATGCCGATTTCGTGAACC	

配列番号 (化合物番号)	プライマー	配列	制限部位
(6496)			
319 (6543)	Reverse	GCGCATGCCTACTGTTTGCCGGCGATG	SphI
320 (6605)	Reverse	GAGATCTCACTCACTCACTACTGTTTGCC GGCGATGCCGATTTC	BglII
321 (6721)	Forward	GCGCAGATCTCATATGAGCAGCGGAGGCG GCGGAAGCGGAGGCGGCGGTGTCAACGCC GACATAGGCACG	BglII and NdeI

【0144】

(天然のリーダー配列を用いての rLP2086 リポタンパク質の発現：)

図5に示すように、プラスミド pPX7340 を BLR (DE3) pLysS 宿主細胞 (Life Sciences) 中に形質転換/トランスフェクトまたは感染させた。1つの形質転換体を選択し、2%グルコース、カナマイシン (30 μg/mL)、クロラムフェニコール (30 μg/mL)、およびテトラサイクリン (12 μg/mL) を含む 50 mL Terrific Broth に接種した。オーバーナイトの培養で OD600 は 6.0 であった。オーバーナイト培養液を 1%グリセロールおよび同じ抗生物質を含む Terrific Broth 1 リットル中に希釈した。スタート時の OD600 は 0.4 であった。2時間後 OD600 は 1.6 にな

10

20

30

40

50

り、誘導前のサンプルを採取した。OD 600 = 1 に均等な細胞を遠心し、上清を除去した。全細胞のペレットを 150 μ L Tris-EDTA バッファーおよび 150 μ L 2x SDS-PAGE サンプルバッファーに再度懸濁した。IPTG を最終濃度 1 mM になるように加えた。3.5 時間後上述のように誘導後のサンプルを採取し、SDS-PAGE で分析した (図 4)。

【0145】

(rLP2086 の精製：)

rLP2086 を異なる界面活性剤の抽出により、大腸菌から可溶化した。天然の環境下の P2086 とは異なり、rLP2086 は Triton X-100 および Zwittergen 3-12 では顕著には可溶化されなかった。rLP2086 の塊はサルコシルにより可溶化され、このことは髄膜炎菌の状態とは異なる大腸菌の外膜成分との相互作用があることを示している。いったん可溶化した rLP2086 は、混入する大腸菌タンパク質の多くを陰イオン交換樹脂に pH 8 で吸着させることにより除去する方法で、天然のタンパク質と同様に精製することができる。rLP2086 の理論上の pI より 1.5 以上高い pH であるにもかかわらず、rLP2086 は pH 8 では吸着されないままであった。さらなる精製は、陽イオン交換樹脂に pH 4.5 で rLP2086 を吸着させることにより達成した。

【0146】

SDS-PAGE 後の rLP2086 の均質性を図 2 に示す。rLP2086 の質量は、MALDI-TOF 質量分析により 27,836 と決定された。この質量は理論上の質量 27,100 とは 736 異なり、この値から細菌のリポタンパク質に共通する N 末端を修飾する脂質の質量を概算できる。天然のものおよび rLP2086 の双方とも外膜リポタンパク質であると考えられる。N 末端配列決定の試みは阻害され、このことは末端の修飾と一致する。

【0147】

(精製法：)

P2086 を発現する BLR DE3 pLysS 細胞の凍結ペレットを 10 mM HEPES-NaOH/1 mM EDTA/1 μ g/mL Pefabloc SC プロテアーゼ阻害剤(Roche) pH 7.4 (HEP) 中に、20 mL/g 細胞湿重量で再懸濁し、マイクロフルイダイザー(Microfluidics Corporation Model 110Y)で溶菌した。細胞溶菌液を 150,000 x g で 1 時間遠心した。ペレットを HEP で 2 回洗浄して 2 回遠心し、得えられた膜のペレットをオーバーナイト凍結した。ペレットを 10 mM HEPES-NaOH/1 mM MgCl₂/1% TX-100 pH 7.4 で 30 分間可溶化した後、150,000 x g で 3 時間遠心した。これを 3 回繰り返した。膜のペレットを 50 mM Tris-HCl/5 mM EDTA/1% Zwittergent 3-12 pH 8 で上のように 2 回洗浄した後、50 mM Tris-HCl/5 mM EDTA/1% Zwittergent 3-14 pH 8 および 50 mM Tris-HCl/5 mM EDTA/1% Zwittergent 3-14/0.5 M NaCl pH 8 の各溶液で 2 回洗浄した。

【0148】

次に rLP2086 を 50 mM Tris-HCl/5 mM EDTA/1% サルコシル pH 8 で可溶化した。このサルコシル抽出物を 1% Zwittergent 3-14 (Z3-14) となるように調整し、30 倍量以上の 50 mM Tris-HCl/5 mM EDTA/1% Z3-14 で 2 回透析した。透析した rLP2086 抽出物を 90% エタノールで沈殿させ、残っているサルコシルを除去し、50 mM Tris-HCl/5 mM EDTA/1% Z3-14 pH 8 (TEZ) で可溶化した。不溶性物質を遠心して除去し、上清を陰イオン交換クロマトグラフィーカラムにかけ、結合しなかった分画中の rLP2086 を集めた。次に結合しなかった物質を 30 倍量以上の 25 mM NaAc/1% Z3-14 pH 4.5 で 2 回透析し、陽イオン交換クロマトグラフィーカラムにかけた。0-0.3 M NaCl の濃度勾配で rLP2086 を溶出させ、SDS-PAGE (クーマシー染色) で分析した。rLP2086 のプールはレーザーデンストメトリーにより 84% の純度であることが決定された。

【0149】

(r L P 2 0 8 6 サブファミリー B に対する抗血清の表面の反応性および殺菌活性)

表VIIに示したように、サブファミリー B 菌株 8 5 2 9 由来の精製 r L P 2 0 8 6 に対する抗血清は、全細胞の E L I S A により、検査した 1 0 種の 2 0 8 6 サブファミリー B 菌株すべてに対して表面の反応性を示した。殺菌活性は、異種の血清型サブタイプ抗原の P o r A を発現する 2 0 8 6 サブファミリー B 菌株の 1 0 種の内の 9 種に対して検出された。これらの菌株は、西欧、アメリカ大陸、オーストラリアおよびニュージーランドを通しての血清群 B 髄膜炎菌性疾患の起因菌の代表的なものである。殺菌性アッセイで死滅しなかった唯一の菌株である 8 7 0 2 2 7 は、全細胞の E L I S A により抗 r L P 2 0 8 6 (サブファミリー B) 血清と強く反応し、この菌株が P 2 0 8 6 に共通のエピトープを含むタンパク質を発現することを示した。

10

【0150】

表VIIに列記した 2 0 8 6 サブファミリー A 菌株についても、全細胞の E L I S A により表面の反応性の検査を行った。これら 3 種の菌株のうち 2 種は、非常に低レベルの反応性を有しているようであるが、一部の 2 0 8 6 サブファミリー A 菌株は r L P 2 0 8 6 サブファミリー B に対して作製した抗体との交差反応性ない可能性があることを示した。8 5 2 9 菌株由来の 2 0 8 6 サブファミリー B の遺伝子を同定するために、使用した P C R 増幅法を菌株 8 7 0 4 4 6、N M B および 6 5 5 7 についても行った。2 0 8 6 サブファミリー B の P C R 増幅産物は検出されなかった。

20

【0151】

(免疫原性の方法:)

(抗血清の製造:)

先に実施例 1 で述べたようにワクチンを処方した。しかし 1 0 μ g の用量を使用した。

【0152】

(全細胞の酵素結合免疫吸着検定法 (E L I S A) :)

髄膜炎菌の全細胞の懸濁液を、滅菌した 0. 0 1 M リン酸塩、0. 1 3 7 M N a C l , 0. 0 0 2 M K C l (P B S) 中に、6 2 0 n m の光学密度 0. 1 まで希釈した。この懸濁液から 0. 1 m L ずつ、Nunc Bac T 9 6 ウェルプレート (カタログ番号 2 - 6 9 6 2 0) の各ウェルに加えた。細胞を、プレート上で室温で 3 日間乾燥させた後、カバーしてひっくり返し、4 $^{\circ}$ C で保存した。プレートを洗浄バッファー (0. 0 1 M T r i s - H C l , 0. 1 3 9 M N a C l / K C l , 0. 1 % ドデシルポリ (オキシエチレングリコールエーテル (oxyethlereneglycolether))_n n = 2 3 (Brij-35 (登録商標) I C I Americas, Inc., Wilmington, Delaware より入手可能)、p H 7. 0 - 7. 4) で 3 回洗浄した。抗血清の希釈は、P B S、0. 0 5 % Tween-2 0 / Azide 中で調製し、0. 1 m L をコートしたプレートに移した。プレートは 3 7 $^{\circ}$ C で 2 時間インキュベーションした。プレートを洗浄バッファーで 3 回洗浄した。抗マウス-ヤギ I g G A P (Southern Biotech) を P B S / 0. 0 5 % Tween-2 0 で 1 : 1 5 0 0 に希釈し、0. 1 m L を各ウェルに加え、プレートを 3 7 $^{\circ}$ C で 2 時間インキュベーションした。プレートを (上記のように) 洗浄した。基質溶液は、1 M ジエタノールアミン / 0. 5 m M M g C l ₂ 中に p - ニトロフェニルホスフェート (Sigma) を希釈して 1 m g / m L に調製した。基質を 1 ウェル当たり 0. 1 m L ずつプレートに加え、室温で 1 時間インキュベーションした。反応は 3 N N a O H を 5 0 μ L / ウェル加えることにより停止し、6 9 0 n m を参照として 4 0 5 n m で測定した。

30

40

【0153】

B.) P 4 リーダー配列:

(P C R 増幅およびクローニング法:)

r L P 2 0 8 6 の発現を最適化するため、分類不可能なインフルエンザ菌の P 4 シグナル配列の後部に 2 0 8 6 遺伝子をクローニングした (Green et al., 1991)。リポタンパク質のクローニングに使用したプライマーを表IVに列記し、化合物番号: 5 6 5 8、5 6 6 0、6 4 7 3、6 5 4 3 および 6 3 8 5 により識別する。O R F 2 0 8 6 を髄膜炎菌 B

50

株8529より、以下の化合物番号5658および5660のプライマーを用いて増幅した。ORF2086を髄膜炎菌サブグループB株CDC1573より、以下の化合物番号6385および5660のプライマーを用いて増幅した。ORF2086を髄膜炎菌サブグループB株2996より、以下の化合物番号6473および6543のプライマーを用いて増幅した。N末端(5')プライマーは2086遺伝子の成熟領域と同一となるようにデザインした(システインのすぐ下流の3番目のアミノ酸がセリン残基で始まる)。制限部位BamHI(GGATTC)を各N末端のプライマーの5'末端に組み込み、2番目のアミノ酸に成熟タンパク質のグリシン残基が挿入されるようにした。C末端(3')プライマーは、2086遺伝子のC末端と相同になるようにデザインし、終止コドンならびにクローニングの目的のためのSphI部位を含めた。各髄膜炎菌B株から増幅したフラグメントを中間体のベクターにクローニングし、配列分析でスクリーニングした。

10

【0154】

正しいクローンからのプラスミドDNAをBamHIおよびSphI制限酵素(New England Biolabs, (NEB))で消化した。pLP339と命名されたベクター(出願人の譲受人により提供された)を発現ベクターとして選択した。このベクターは、pBAD18-Cm主鎖(Beckwith et al., 1995)を利用し、分類不可能なインフルエンザ菌のP4リポタンパク質シグナル配列およびP4遺伝子を含む(Green et al., 1991)。pLP339ベクターを部分的に制限酵素BamHIで消化し、次にSphIで消化した。増幅した2086フラグメント(BamHI/SphI)を各々別々にpLP339ベクター(部分的なBamHI/SphI)中に結合した。このクローニング法では、P4リポタンパク質シグナル配列の後ろに成熟2086遺伝子を設置する。BamHI部位は、P4シグナル配列および2086遺伝子の間のクローニング接合部に残る(図7に示したプラスミドコンストラクトを参照のこと)。以下にBamHIクローニング接合部の配列の一例を示す:

20

[P4シグナル配列]-TGT GGA TCC-[残りの2086成熟核酸配列]

[P4シグナル配列]-Cys Gly Ser-[残りの2086成熟アミノ酸配列]

図7に示したように増幅した各フラグメントを、P4リーダー配列を含む修飾したpBAD18-Cmベクター内にクローニングした。rP4LP2086(組換えP4脂質化2086)を発現する組換え大腸菌BLRPX7343で発酵を行い、さらにグルコースを添加して細胞密度の増加を試みた。ファーメンターは、Sambrookによる1%グルコースを補った完全なM9Minimal培地 10Lで満たした。

30

【0155】

ファーメンター中の最初のグルコース濃度は45g/Lとした。ファーメンターに最初のODが~0.25となるように接種した。~OD 25でさらに20g/Lのグルコースを追加した。グルコースが枯渇したOD 63.4の時点で1%アラビノースで培養を誘導した。誘導後も3時間まで発酵を継続した。誘導後t=0、1、2、3でサンプルを採取し、BSAにてタンパク質を定量した。t=3で、タンパク質収量は~3.5g/Lそして総細胞タンパク質の7%であった。湿った細胞ペースト総計895グラムを~10Lの培養液から得た。

40

rP4LP2086の精製は先の実施例2、セクションAで述べたものと同じ方法で行った。

【0156】

(実施例3)

(非脂質化成熟2086タンパク質の発展的遺伝子情報:)

2086タンパク質の免疫原性をさらに評価するため、P2086の非脂質化型のクローニングおよび発現を行った。

【0157】

(ORF2086のPCRによる遺伝子増幅:)

非脂質化2086遺伝子のPCR増幅に使用したオリゴヌクレオチドを表IVのプライマ

50

一表に列記する。菌株 8 5 2 9 由来の 2 0 8 6 遺伝子は、表に示す化合物番号 5 1 3 5 および 6 4 0 6（それぞれ、配列番号 3 0 8 および 3 1 2）で識別されるプライマーで増幅することができる。菌株 C D C 1 5 7 3 由来の 2 0 8 6 遺伝子は、化合物番号 5 1 3 5 および 6 4 7 4（それぞれ、配列番号 3 0 8 および 3 1 6）で識別されるプライマーで増幅することができる。菌株 2 9 9 6 由来の 2 0 8 6 遺伝子は、化合物番号 6 4 0 6 および 6 6 0 5（それぞれ、配列番号 3 1 2 および 3 2 0）で識別されるプライマーで増幅することができる。

【0158】

これらのプライマーの特徴として、各プライマー中に合成 B g l I I 制限部位、化合物番号 6 4 0 6 および 6 4 7 4 中の合成 N d e I 制限部位、および化合物番号 5 1 3 5 および 6 6 0 5 において 3 つのリーディングフレームすべてに終止コドンが存在する、を含む。プライマー番号 6 4 0 6 および 6 4 7 4 は、1 つの A T G (M e t) が第 2 のアミノ終止コドン (A C G) に融合して成熟 2 0 8 6 ポリペプチドの 1 つのアミノ酸の置換 (T G C C y s に置き換わる) を表す配列を含む、2 0 8 6 遺伝子を増幅する。

【0159】

P C R クローニングベクターは T O P O - P C R 2. 1、Invitrogen, Valencia, CA とした。

非脂質化 2 0 8 6 タンパク質の発現に使用するベクターは、Novagen, Madison, WI の p E T 9 a とした。

【0160】

大腸菌クローニング株は T o p 1 0、Invitrogen, Carlsbad, CA とした。

大腸菌発現株は B L R (D E 3) p L y s S、Novagen, Madison, WI とした。

クローニングを目的とする培地は Sambrook らによるグリセロールを 1 % 滅菌グルコースに置き換え、適当な抗生物質（アンピシリンまたはカナマイシン）を加えた Terrific Broth 液または寒天培地とした。

プラスミドの精製は Qiagen Spin Miniprep Kit (Valencia, CA) で行った。

【0161】

(非脂質化 2 0 8 6 発現のための産生用菌株または細胞株の調製：)

2 0 8 6 遺伝子は髄膜炎菌株 8 5 2 9 由来の染色体 D N A からポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) [AmpliTaq and ABI 2400 thermal cycler, Applied Biosystems, Foster City, CA] により増幅した。各反応において化合物番号 6 4 7 4 および 5 1 3 5（それぞれ、配列番号 3 1 6 および 3 0 8）により識別される 2 つのオリゴヌクレオチドを、2 0 8 6 遺伝子の P C R の増幅に用いた。増幅された 2 0 8 6 P C R 産物を、直接 T O P O - P C R 2. 1 クローニングベクター中にクローニングし、1 0 0 μ g / m l アンピシリンおよび 2 0 μ g / m l X - G a l を補った Terrific Broth 寒天培地上で選択した。白色コロニーを選択し、培養した。プラスミド D N A は Qiagen miniprep kit を用いて調製し、P C R のフラグメントが挿入されているかどうかプラスミドをスクリーニングした。P C R 産物が挿入されたプラスミドの D N A 配列決定を行った (A B I 3 7 7 シーケンサにて Big Dye 化学使用、Applied Biosystems, Foster City, CA)。

【0162】

正しい D N A 配列を示すプラスミドを B g l I I 制限酵素で消化し、B g l I I フラグメントを GeneClean II 精製キット (Bio101, Carlsbad, CA) を用いてゲル精製した。精製された B g l I I フラグメントを発現ベクター p E T 9 a の B a m H I 部位にクローニングした。p E T 9 a / 2 0 8 6 クローンを、3 0 μ g / m l カナマイシンを補った Terrific Broth プレート上で選択した。カナマイシン耐性クローンを培養し、ミニプレップ プラスミド D N A を調製した。B a m H I 部位での 2 0 8 6 遺伝子の配向が適当かどうかについて、プラスミドをスクリーニングした。正しく配向されたプラスミドは 2 0 8 6 遺伝子のアミノ末端への T 7 抗原の融合を呈示する (r P 2 0 8 6 T 7)。これらの r P 2 0 8 6 T 7 遺伝子融合物を B L R (D E 3) p L y s S に形質転換し、Terrific Broth/Kan プレート上で選択し、Terrific Broth 中で培養し、1 m M I P T G (イソプロピル β

10

20

30

40

50

ーDーチオガラクトピラノシド)でrP2086T7融合タンパク質の発現を誘導した。rP2086T7融合タンパク質は高レベルで発現された。

【0163】

次にこれらの融合プラスミドをNdeI制限酵素により消化した。この酵素はT7抗原を欠失させ、成熟2086遺伝子をベクターにより提供されるATG開始部位に直接結合する。これらのNdeIによる欠失プラスミドをTop10細胞内に形質転換し、Terrific Broth/Kan プレート上で選択した。候補のクローンを培養し、ミニブレップ プラスミドDNAを調製した。プラスミドDNAのDNA配列決定を行い、欠失および2086遺伝子配列が組み込まれたことを確認した。これらのプラスミドをpPX7328と命名したプラスミドマップに表した(図6)。正しいDNA配列を呈示するプラスミドをBLR (DE3) pLys S中に形質転換し、Terrific Broth/Kan プレート上で選択し、Terrific Broth中で培養し、IPTGにて2086タンパク質の発現を誘導した。pET9aベクターは、T7ータグを除去した場合に、菌株BLR (DE3) pLys S内で成熟2086タンパク質を発現できなかった。

【0164】

(非脂質化2086タンパク質の産生：)

精製プラスミドDNAを用いて、発現株BLR (DE3) pLys Sを形質転換した。プラスミドを保有するBLR (DE3) pLys S細胞はカナマイシン耐性であり、1mM IPTGの添加により高レベルのPorAタンパク質の高レベルの発現を誘導することができる。rP2086T7融合タンパク質は大腸菌細胞株BLR (DE3) pLys S中で、総タンパク質の~40%で不溶性の封入体として発現させることができる。この精製融合タンパク質を用いてマウスを免疫感作し、異種の髄膜炎菌株に対して顕著なレベルの殺菌性抗体を産生した(表V参照のこと)。

【0165】

(2086非脂質化遺伝子突然変異誘発：)

PCRプライマーの突然変異誘発を2086遺伝子の5'末端で行った。成熟rP2086T7の高発現レベルを示しながらT7タグを除去できるかどうかを決定するため、発現の研究を進めている。

【0166】

(非脂質化rP2086T7の精製：)

非脂質化rP2086T7を発現する大腸菌BLR (DE3) pLys S細胞を、10mM Hepes-NaOH/5mM EDTA/1mM Pefabloc SC pH7.4中でマイクロフルイダイザーにより溶菌した。次に溶菌液を18,000x gで30分間遠心した。封入体ペレットを50mM Tris-HCl/5mM EDTA/1% Triton X-100 pH8で3回洗浄し、その度に24,000x gで30分間遠心した。次に封入体ペレットを50mM Tris-HCl/5mM EDTA/1% Zwittergent 3-14 pH8で2回洗浄し、その度に24,000x gで15分間遠心した。封入体ペレットを次に50mM Tris-HCl/5mM EDTA/4M 尿素 pH8で2時間可溶化した後、遠心して不溶物質を除去した。上清(可溶化したrP2086T7)サンプルを4等分した。ストック溶液を用いて、1つのサンプルは50mM Tris-HCl/5mM EDTA/250mM NaCl/2M 尿素 pH8(界面活性剤なし)に調整し、1つは50mM Tris-HCl/5mM EDTA/250mM NaCl/2M 尿素/1% 水素化Triton X-100 pH8(TX-100)に調整し、1つは50mM Tris-HCl/5mM EDTA/250mM NaCl/2M 尿素/1% Zwittergent 3-12 pH8(Z3-12)に調整し、そして1つは50mM Tris-HCl/5mM EDTA/250mM NaCl/2M 尿素/1% Zwittergent 3-14 pH8(Z3-14)に調整した。尿素を除去するため、サンプルを尿素を含まない各々のバッファーに対して、完全に平衡になるまで透析した。次にサンプルを尿素を含まない、60mM NaClの各バッファーに対して完全に平衡になるまで透析し、NaCl濃度を下げた。2,000x gで15分間遠心して不溶物質を除去し、得

られた上清（リフォールディングした r P 2 0 8 6 T 7）をさらなる実験に用いた。r P 2 0 8 6 T 7 の均一性は、クーマシー染色の S D S - P A G E およびレーザーデンストメトリーを用いて決定したところ、91-95%であった。

【0167】

免疫原性の方法—実施例2で述べたとおり

この精製融合タンパク質を用いてマウスを免疫感作し、異種の髄膜炎菌株に対して著明なレベルの殺菌性抗体を作製した（以下の表V参照のこと）：

【0168】

【表5】

表V：r P 2 0 8 6 T 7 に対して作製されたマウス抗体の殺菌性力価

マウス血清	説明	異種の 菌株/H44/76
AF780 第6週	r2086T7, 10ug	3200
第0週 プール	免疫前血清	10
AE203 第6週	rLP2086, 10 ug (ポジティブ コントロール) *	6400

(* r L P 2 0 8 6 によるマウスの免疫感作により作製されたポジティブコントロール血清)

【0169】

(実施例4)

(O R F 2 0 8 6 のキメラクロンの開発)

菌株 C D C - 1 5 7 3 由来の 2 0 8 6 遺伝子の N 末端領域は、菌株 8 5 2 9 および 2 9 9 6 由来の 2 0 8 6 遺伝子には存在しない繰り返し部分を含む（図 8 参照のこと）。この繰り返し部分が大腸菌に基づいた 2 つの発現系（p E T および p B A D）からの組換え 2 0 8 6 タンパク質の発現レベルの増加に関与していると思われる。C D C - 1 5 7 3 2 0 8 6 遺伝子からの組換えタンパク質発現レベルは、p E T および p B A D 発現系において、同じ発現系を用いた菌株 8 5 2 9 および 2 9 9 6 による 2 0 8 6 遺伝子からの組換え発現レベルに比して、顕著に高かった。3 つすべての菌株由来の 2 0 8 6 遺伝子の N 末端領域は、この繰り返し部分を除いて比較的相同である。したがって、菌株 8 5 2 9 および 2 9 9 6 由来の 2 0 8 6 遺伝子に、菌株 C D C - 1 5 7 3 の N 末端を融合させることにより、これらの遺伝子から発現される組換え 2 0 8 6 タンパク質の発現レベルが、p E T および p B A D 発現系を用いた場合に増加する、と仮定するのは妥当である。

【0170】

(材料および方法：)

菌株 8 5 2 9 および 2 9 9 6 由来の染色体 D N A を精製し、キメラ 2 0 8 6 遺伝子の P C R 増幅の鋳型として使用した。化合物番号 6 7 2 1 および 5 1 3 5（それぞれ、配列番号 3 2 1 および 3 0 8）の P C R プライマーを用いて、菌株 8 5 2 9 由来のキメラ 2 0 8 6 遺伝子を増幅し、化合物番号 6 7 2 1 および 6 6 0 5（それぞれ、配列番号 3 2 1 および 3 2 0）の P C R プライマーを用いて、菌株 2 9 9 6 由来のキメラ 2 0 8 6 遺伝子を増幅した。P C R 産物を Invitrogen の P C R 2. 1 T O P O ベクター内に直接クローニングし、D N A 配列分析によりスクリーニングし、完全なキメラ 2 0 8 6 遺伝子であることを同定した。この遺伝子を次に B g l I I により P C R 2. 1 ベクターから切り出し、B g l I I フラグメントを p E T 9 a プラスミドの B a m H I 部位に挿入した。プラスミド挿入物を適当な配向かどうかスクリーニングした後、N d e I の消化を行った。直線状の N d e I フラグメントは自ら結合して、p E T 9 a ベクターから寄与された T 7 タグ配列を含む小さな N d e I フラグメントの欠失を達成する。この欠失によりキメラ 2 0 8 6 遺伝子の 5' 末端に T 7 プロモーターが直接結合することになる。N d e I により欠失させ

たプラスミドを大腸菌株BL21 (DE3)内に形質転換し、IPTGの誘導によりキメラ2086タンパク質を発現しているかどうか、カナマイシン耐性コロニーをスクリーニングした。

【0171】

最初の研究は、pET9a系で発現させた場合、菌株2996由来のキメラ2086遺伝子は、天然の2996/2086遺伝子に比して約2倍の組換えタンパク質を発現することを示している。pBAD系についてはまだ検査していない。

【0172】

わずか1回の実験を行ったに過ぎないが、キメラ2086遺伝子の有用性が高いことをデータは示している。CDC-1573N末端を、菌株8529および2996由来の2086遺伝子に融合することで、組換え2086タンパク質の発現の増大を提供することができる。

【0173】

(実施例5)

(髄膜炎菌株の2086PCRスクリーニング：)

臨床的に単離された菌株中での2086遺伝子の保存性を決定するため、88種の髄膜炎菌株についてPCR増幅を行った。

【0174】

ORF2086の最初のPCRの同定は、化合物番号：4623、4624および4625（それぞれ、配列番号303、304および305）で識別される表IVに列記したプライマーを利用した（上記の実施例2参照のこと）。これらのプライマーはSangerの髄膜炎菌血清群Aの配列に基づいてデザインされたものである。多数の菌株のスクリーニングを促進するため、2086遺伝子について内側のプライマーをデザインした。総計88種の髄膜炎菌株を、化合物番号5005および5007（配列番号306および307）で識別される新たにデザインした内側の2086プライマーを用いて、PCRによるスクリーニングを行った。これらのプライマーにより、88種の髄膜炎菌株のうちの63種（〜70%）から2086遺伝子を同定することができた（表VI-A参照のこと）。

【0175】

Sangerの髄膜炎菌血清群Aの配列およびTIGRの髄膜炎菌血清群Bの配列について、2086遺伝子周囲の拡大領域を調べ、整列した。プライマーは、2086遺伝子の上流領域および下流領域に対応するようにデザインした。この目的は、これらのプライマーを使用して、配列比較のための様々な髄膜炎菌由来の2086遺伝子の完全長以上の長さを増幅することであった。化合物番号6470および6472（それぞれ、配列番号：313および314）を用いての1つの菌株（6557）のPCR増幅では、産物は低収量であった。菌株6557の増幅産物をクローニングし、プラスミドDNAの配列分析を行った。結果は、これまでに認められていたものより配列可変性の大きい新しいタイプの2086遺伝子であることを示した。菌株6557由来の2086遺伝子は、配列決定された他の菌株とアミノ酸レベルで〜75%同一であった。興味深いことに菌株6557は、以前に上述の2086のPCRスクリーニングによりネガティブと評価された30%の菌株の1つであった。

【0176】

菌株6557中のC末端可変領域に特異的な内側のプライマーをデザインした。これらのプライマーを用いて、以前に2086PCRスクリーニングでネガティブと評価された〜30%の菌株の、より可変性の高い2086遺伝子のスクリーニングを行った。入手可能なすべての髄膜炎菌株（n=88）について、これらの新たに同定された内側の2086プライマー（化合物番号6495および6496により識別される；それぞれ、配列番号159および160）を用いてPCRによりスクリーニングを行った。以前に2086のPCRでネガティブと評価された〜30%の菌株のみが、今回のスクリーニングではPCRポジティブであった。以前にPCRネガティブ（〜30%）であった菌株から増幅された遺伝子の一群は2086遺伝子の新しいタイプまたは2086遺伝子の第2ファミリ

10

20

30

40

50

ーと表すべきであり、当明細書では2086サブファミリーAと命名した。8529由来のプライマーにより菌株の～70%から増幅された2086遺伝子の群を、当明細書ではサブファミリーBと命名した。

【0177】

2086遺伝子のサブファミリーAを、非限定的に配列番号1-173の奇数番号で例示する。2086遺伝子のサブファミリーBを、非限定的に配列番号175-251の奇数番号で例示する。

【0178】

PCR増幅の研究に使用した髄膜炎菌株は以下の表、表VI-Aおよび表VI-Bから選択した。表に列記した菌株を髄膜炎菌株の例として非限定的に提供する。表VI-Aに列記した菌株を2086タンパク質サブファミリーAと分類し、表VI-Bに列記した菌株を2086タンパク質サブファミリーBと分類する。各表に列記された菌株を血清型により分類する。表に示したように、菌株は以下の4箇所から入手できる：MPHL-Manchester Public Health Laboratory, Manchester, UK; RIVM, Bilthoven, the Netherlands; University of Iowa, College of Medicine, Department of Microbiology, Iowa City, IA; および Walter Reed Army Institute of Research, Washington, D.C.。

【0179】

【表 6 - 1】

表VI-A

菌株	血清型サブタイプ	入手先
M97 251854	B:4z, PI:4	MPHL
M98 250622	B:2b, PI:10	MPHL
M98 250572	B:2b, PI:10	MPHL
M98 250771	B:4z, PI:22,14	MPHL
M98 250732	B:4z, PI:22,14a	MPHL
M98 250809	B:15, PI:7,16	MPHL
M97 252697	B:1, PI:6, P1.18,25	MPHL
M97 252988	B:4, PI:6, P1.18,25,6	MPHL
M97 252976	B:4, PI:6, P1.18,25	MPHL
M97 252153	B:4, PI:6, P1.18,25	MPHL
M97 253248	B:15,PI:7, NT, 16	MPHL
CDC1610	P1:NT 4(15), P1.18-7,16-14	CDC
CDC1521	P1.6,3 2b(4)	CDC
CDC1034	P1.7 4(15)	CDC
L8	P1.7,1 15(4)	Walter Reed
CDC1492	P1.7,1 4(15)	CDC
870446	P1.12a,13	RIVM
CDC2369	P1.(9),14	CDC
6557	P1.(9),14, P1.22a,14a	RIVM
2996	P1.5,2, P1.5a,2c	RIVM
NmB	P1.5,2, P1.5a,2c	UIOWA
L3	P1.5,2	Walter Reed
B16B6	P1.5,2	RIVM
CDC1135		CDC
L5	P1.NT, P1.21-6,1	Walter Reed
L4	P1.21,16	Walter Reed
W135		Walter Reed
C11	C:16,P1.7,1	CDC
Y		Walter Reed

10

20

30

【 0 1 8 0】

【表 6 - 2】

表VI-B

菌株	血清型サブタイプ	入手先
M98 250670	B:1, PI:4	MPHL
M98 250024	B:1, PI:4	MPHL
M97 253524	B:1, PI:4	MPHL
M97 252060	B:1, PI:4	MPHL
M97 251870	B:4z, PI:4	MPHL
M97 251836	B:4z, PI:4	MPHL
M97 251830	B:4z, PI:4	MPHL
M97 251905	B:4z, PI:4	MPHL
M97 251898	B:4z, PI:4	MPHL
M97 251885	B:4z, PI:4	MPHL
M97 251876	B:4z, PI:4	MPHL
M97 251994	B:4z, PI:4	MPHL
M97 251985	B:4z, PI:4	MPHL
M97 251957	B:4z, PI:4	MPHL
M97 251926	B:4z, PI:4	MPHL
M97 252045	B:4z, PI:4	MPHL
M97 252038	B:4z, PI:4	MPHL
M97 252026	B:4z, PI:4	MPHL
M97 252010	B:4z, PI:4	MPHL
M97 252098	B:4z, PI:4	MPHL
M97 252083	B:4z, PI:4	MPHL
M97 252078	B:4z, PI:4	MPHL
M98 250735	B:4z, PI:15	MPHL
M98 250797	B:4z, PI:15	MPHL
M98 250768	B:4z, PI:15	MPHL
M98 250716	B:2b, PI:10	MPHL
M98 250699	B:4z, PI:10	MPHL
M98 250393	B:4z, PI:10	MPHL
M98 250173	B:4z, PI:10	MPHL
M97 253462	B:4z, PI:14	MPHL
M98 250762	B:15, PI:7,16	MPHL
M98 250610	B:15, PI:7,16	MPHL
M98 250626	B:15, PI:7,16	MPHL
M97 250571	B:15, PI:16	MPHL
M97 252097	B:15, PI:16, P1.7b,16	MPHL
M97 253092	B:1, PI:6	MPHL
M97 252029	B:15, PI:7, NT	MPHL
M97 251875	B:15, PI:7, NT	MPHL

【0181】

10

20

30

40

【表 6 - 3】

菌株	血清型サブタイプ	入手先
CDC1127	PI.7,16 4(15)	CDC
CDC982	PI.7,16 4(15)	CDC
CDC1359	PI.7,16 4(15)	CDC
CDC798	PI.7,16 15(4)	CDC
CDC1078	PI.7,16 15(4)	CDC
CDC1614	PI.7,16 15(4)	CDC
CDC1658	PI.7,16 15(4)	CDC
H44/76	PI.7,16 15(4)	RIVM
CDC1985	P1.7,13 4(15)	CDC
L6	P1.7,1 ?(4)	Walter Reed
CDC1573	P1.7,1 4(15)	CDC
L7	P1.7,(9),1	Walter Reed
CDC937	P1.7,3, P1.7b,3	CDC
8529	P1.7,3, P1.7b,3	RIVM
880049	P1.7b,4	RIVM
CDC2367	P1.15 4(15)	CDC
H355	P1.19,15	RIVM
CDC1343	P1.14 4(15)	CDC
M982	P1.22,9	RIVM
870227	P1.5c,10	RIVM
B40	P1.5c,10	RIVM
5315	P1.5c,10	RIVM
CDC983	P1.5,2	CDC
CDC852	P1.5,2	CDC
6940	P1.18,25 (6)	RIVM
A4		

10

20

30

【0182】

他の菌株も感染した患者から単離して容易に入手することができる。

【0183】

(実施例 6)

(髄膜炎菌株に対する r L P 2 0 8 6 抗血清の反応性)

以下の表、表VIIは、上述の r L P 2 0 8 6 の交差反応性および交差防護能(cross protection capacity)を示す。表に示したように、r L P 2 0 8 6 を全細胞 E L I S A (W C E) 力価、殺菌性のアッセイ (B C A) および新生仔ラット (I R) アッセイを含む様々な技術を用いて、処理および分析を行い、2086タンパク質に対して作製されたポリク

40

【0184】

【表 7】

表VII

多数の髄膜炎菌に対する rLP2086-8529 抗血清の反応性

菌株	血清型サブタイプ	WCE	BC	IR
2086 サブファミリーA				
870446	P1.12a,13	808,615	>800	
NmB	P1.5a,2c	47,954	<100	
6557	P1.22a,14a	169,479	<25	-
2086 サブファミリーB				
880049	P1.7b,4	1,402,767	100	+
H44/76	P1.7,16	8,009,507	>6400	
H355	P1.19,15	10,258,475	3,200	+
6940	P1.18,25(6)	5,625,410	800	
870227	P1.5c,10	4,213,324	<25	+
252097	P1.7b,16	10,354,512	>800	
539/8529	P1.7b,3	11,635,737	3,200	
M982	P1.22,9	1,896,800	800	
CDC-1573	P1.7a,1	208,259	25	
CDC-937	P1.7b,(3)	9,151,863	>800	

+菌血において10より大きな低下

-菌血において10倍未満の低下

【0185】

(実施例7)

ORF2086タンパク質を発現する様々なコンストラクトを調製した。以下の表、表VIIIは本発明の実施例を示し、実施を説明する目的で非限定的に提供するr2086コンストラクトの表である。

【0186】

【表 8】

表VIII

r 2086 コンストラクトのまとめ

コンストラクト	プロモーター	リーダー	発現	抽出	ベクター	%総タンパク質
pPX7340	T7	天然	クーマシー	サルコシル可溶性	pET27b	2.5% 処理されたリポタンパク質
pPX7341	T7	P4	クーマシー	サルコシル可溶性	pET27b	5% 処理されたリポタンパク質
pPX7343	アラビノース	P4	クーマシー	サルコシル可溶性	pBAD18 cm	7-10% 処理されたリポタンパク質
pPX7325	T7	T7-タグ融合/成熟	クーマシー	封入体	pET9a	40-50% 成熟タンパク質
pPX7328	T7	成熟	クーマシー	可溶性	pET9a	10% 成熟タンパク質

【0187】

(実施例 8)

LOS を除去した外膜タンパク質を用いてのさらなる研究により、異種の血清型サブタイプを発現する菌株に対する殺菌性抗体を産生することのできる、PorA 以外の外膜タンパク質（複数）を生成するさらなる菌株を同定した。以下に、髄膜炎菌の免疫原性組成物に必要なタンパク質の数を減らすことのできる、本発明の 1 つの態様による付加的なタンパク質、そして具体的には外膜のリポタンパク質を同定するためのさらなる研究について述べる。これらのさらなる研究は、先の実施例に記述した研究を補足するものである。

【0188】

細胞成分分画、異なる界面活性剤による抽出、等電点電気泳動およびイオン交換クロマトグラフィーを、複数の菌株に対する免疫感作および殺菌性のアッセイと共に使用して、目的のタンパク質の小さな群を同定した。主要成分の直接配列決定は、N 末端がブロックされていることを示した。化学的分解およびタンパク質分解酵素による消化から得られたポリペプチドの直接配列決定により、内側のタンパク質の配列が得られた。A 群髄膜炎菌株のゲノム配列は、Sanger センターよりダウンロードし、探索可能なデータベースを作成するため当方のバイオインフォマティクスグループが現在あるおよび私有のアルゴリズムを用いて分析した。ペプチド配列データは、ORF 2086 が目的のものであることを示した。この ORF に基づいたプライマーを使用して、菌株 8529 からの P2086 遺伝子の PCR を行った。遺伝子配列の分析、N 末端がブロックされているという事実、およびその細胞下の位置から、P2086 が脂質化された外膜タンパク質（LP2086）であることが示された。rLP2086-8529 および他の髄膜炎菌株からのバリエーションを、インフルエンザ菌 P4 シグナル配列を用いて大腸菌内でリポタンパク質として組換え発現させた。これらの組換えタンパク質を、異なる界面活性剤の抽出により大腸菌膜から単離し、イオン交換クロマトグラフィーを用いて精製し、マウスの免疫感作に使用した。抗 LP2086-マウス血清は、髄膜炎菌のいくつかの異なる血清型サブタイプの菌株に対して殺菌活性を促進することができた。多くの髄膜炎菌株から P2086 遺伝子のさらなる分析は、これらの配列がサブファミリー A およびサブファミリー B と命名した 2 つの群に分類されることを示した。（図 12 参照のこと）サブファミリー B タンパク質に対して作製された抗血清は、サブファミリー B タンパク質を発現する 9 つの菌株に対して、およびサブファミリー A タンパク質を発現する 1 つの菌株に対して殺菌性を示した。サブファミリー A の抗血清は複数のサブファミリー A 菌株に対して殺菌性を示した。1 つの rP

o r Aおよび1つのr L P 2 0 8 6の混合物は、いずれかのタンパク質だけで誘導される範囲を超えてワクチンの適用範囲を拡大する、補足的な抗体を産生した。

【0189】

これらの観察より以下の結論が導かれる。r L P 2 0 8 6抗原は、異種のP o r Aおよび異種のP 2 0 8 6タンパク質を発現する髄膜炎菌株に対して殺菌性抗体を産生することができる。抗原のP 2 0 8 6ファミリーは、単独でまたは他のナイセリア属の抗原と組み合わせて、有用なワクチンとなるまたは免疫原性を有することができる。

【0190】

以下に前述の研究を詳細に述べる。可溶性外膜タンパク質(s O M P)の複合混合物が、異種のP o r Aタンパク質を発現する菌株に対して、P o r A非依存性の殺菌性抗体を産生することが発見された。異なる界面活性剤による抽出処理、等電点電気泳動およびイオン交換クロマトグラフィー、その後のマウスの免疫感作を用いて、免疫学的活性成分を追跡した。

【0191】

各ステップで、髄膜炎菌性疾患の世界的な疫学の典型である血清型サブタイプの抗原を含むいくつかの菌株に対する、細胞表面の反応性および殺菌活性について、血清のアッセイを行った。

【0192】

分離および免疫感作のこの過程を用いて、B群髄膜炎菌に関する新たな交差反応性免疫原性候補物質を同定した。

P o r A欠損株の作製—p o r A染色体遺伝子座を菌株2 9 9 6からプラスミドp P X 7 0 1 6中にクローニングした。プラスミド内でp o r Aプロモーター、S / Dボックスおよび最初の3 8 N末端コドンに欠失させ、それ自体が含有するK a n R発現カセットで置き換えた。このプラスミドを制限酵素で直鎖化し、血清型サブタイプ菌株P I : 5, 2 ; P I : 9 ; P I : 7, 1 6 ; P I : 1 5 ; P I : 4 ; P I : 3およびP I : 1 0中に自然に形質転換させた。カナマイシン耐性形質転換体を選択し、E L I S Aにおいて血清型サブタイプ特異的モノクローナルによりP o r A欠損についてスクリーニングした。

【0193】

殺菌活性のアッセイ: Mountzourous, K.T. and Howell, A.P. Detection of Complement-Mediated Antibody-Dependent Bactericidal Activity in a Fluorescence-Based Serum Bactericidal Assay for Group B *Neisseria meningitidis* (グループB髄膜炎菌に関する蛍光標識を基本とする血清の殺菌性のアッセイにおける、補体を介した酵素依存的殺菌活性の検出). *J Clin Microbiol.* 2000; 38: 2878-2884を参照のこと。

【0194】

全細胞の酵素結合免疫吸着検定法(E L I S A): 髄膜炎菌の全細胞の懸濁液を、滅菌0. 0 1 Mリン酸塩、0. 1 3 7 M N a C l, 0. 0 0 2 M K C l (P B S)中に、6 2 0 n mにおける0. 1の光学密度まで希釈した。この懸濁液から0. 1 m Lずつ、Nunc Bac T 9 6 ウェルプレート(カタログ番号2-6 9 6 2 0)の各ウェルに加えた。細胞を、プレート上で3 7 °Cでオーバーナイト乾燥させた後、カバーしてひっくり返し、4 °Cで保存した。プレートを洗浄バッファー(0. 0 1 M T r i s-H C l, 0. 1 3 9 M N a C l / K C l, 0. 1 % Brij-3 5, p H 7. 0-7. 4)で3回洗浄した。抗血清の希釈は、P B S、0. 0 5 % Tween-2 0 / Azideで調整し、0. 1 m Lをコートしたプレートに移し、3 7 °Cで2時間インキュベーションした。プレートを洗浄バッファーで3回洗浄した。抗マウスヤギI g G A P (Southern Biotech)をP B S / 0. 0 5 % Tween-2 0で1 : 1 5 0 0に希釈し、0. 1 m Lを各ウェルに加え、プレートを3 7 °Cで2時間インキュベーションした。プレートを(上記のように)洗浄した。基質溶液は、ジエタノールアミン中のp-ニトロフェニルホスフェート(Sigma)で希釈して1 m g / m Lに調製した。基質を1ウェル当たり0. 1 m Lずつプレートに加え、室温で1時間インキュベーションした。反応は3 N N a O Hを5 0 μ L / ウェル加えることにより停止し、6 9 0 n mを参照して4 0 5 n mで測定した。

【0195】

組換え P o r A の誘導：B L R (D E 3) / p E T 9 a 菌株を Kan-30 および 2 % グルコースを補った HySoy Broth (Sheffield Products) 中で 37℃ でオーバーナイト培養した。翌朝 O / N 培地を HySoy Broth Kan-30 および 1 % グリセロール中で 1 / 20 に希釈し、37℃ で 1 時間培養した。これらの培地に I P T G を最終濃度 1 mM となるように加えて誘導した。培地をさらに 2-3 時間培養した後、収穫した。

【0196】

組換え P o r A の精製：r P o r A は大腸菌封入体より 8 M 尿素にて可溶化し、尿素を含まないバッファーに透析することによりリフォールディングさせた。次にリフォールディングした r P o r A を次にダイアフィルトレーション (diafiltration) により濃縮し、G 25 カラムにて N a P O ₄ pH 6 にバッファーを交換した。次に透析した r P o r A を陽イオン交換カラム (S Fractogel) につけ 1 M N a C l で溶出した。

【0197】

菌株 8529 (P1.7-2, 3) 由来の s O M P は、異種の血清型サブタイプを発現する菌株に対して、マウスにおいて P o r A 非依存性の殺菌活性を惹起する。以下の表、表 IX は検討した菌株における殺菌活性を示す。

【0198】

【表9】

表IX

検査菌株	血清型サブタイプ	BC ₅₀ 力価 ¹
539	P1.7-2,3	1280
539 PorA-	NST ²	1080
H44/76	P1.7,16	3285
H44/76 PorA-	NST	2620
H355	P1.19,15	>1350
H355 PorA-	NST	>1350
880049	P1.7-2,4	290
880049 PorA-	NST	85
M982	P1.22,9	85
M982 PorA-	NST	<50

【0199】

O M P の調製：髄膜炎菌の膜を T X-100、Zwittergent 3-14、および Zwittergent 3-14+0.5 M N a C l で抽出した。上述の O M P は Zwittergent 3-14/0.5 M N a C l 抽出で可溶化した。抽出は当業者周知の技術を用いて行い、例えば米国特許第 6,355,253 号を参照のこと（同文献を当明細書において参照として援用する）。

【0200】

免疫原性：メス Swiss-Webster マウスに、20 μg Q S-21 をアジュバントした総タンパク質量 25 μg にて、第 0 週および第 4 週に免疫感作を行った。全採血およびデータ分析は第 6 週に行った。

【0201】

1. 殺菌性 (B C ₅₀) 力価は、生細胞のカウントを 50 % 低減する抗血清の希釈度の逆数として表した。第 0 週の正常なマウスの血清の B C ₅₀ 力価は < 25 であった。

2. N S T = 血清型サブタイプ分類外

以下の表、表 X はサブファミリー A およびサブファミリー B の双方に関する組換え脂質化 P 2086 (r L P 2086) の精製および特徴付けのまとめを示す。

【0202】

【表10】

サブファミリーA rLP2086精製

表X

rLP2086 バリエント	アミノ酸の相同性 (%) ¹	理論上の p I	純度 (%) ²
870446	75	6.1	80
2996	71	5.9	95
M97 252988	71	6.3	96
C11	68	6.4	82
M98 250771	62	6.1	83

10

【0203】

【表11】

サブファミリーB rLP2086精製

表XI

rLP2086 バリエント	アミノ酸の相同性 (%) ¹	理論上の p I	純度 (%) ²
8529	100	7.5	96
M982	94	6.3	96
88049	92	6.2	90
CDC1573	87	5.6	93

20

【0204】

精製法：すべてのバリエントは大腸菌膜よりTX-100にて可溶化した（サルコシルまたは尿素で可溶化したrLP2086-8529は除く）。さらなる精製は、Tris-HClバッファーまたはNaPO₄バッファー中で、陰イオン交換クロマトグラフィー（TMAE）、サイズ排除クロマトグラフィーおよび/または陽イオン交換クロマトグラフィー（S Fractogel）を組み合わせで達成した。

【0205】

- ・ 菌株8529由来のP2086と比較してのアミノ酸の相同性
- ・ SDS-PAGEおよび、コロイド状のクーマシー染色バンド（Simply Blue 染色）のレーザーデンストメトリーによる純度の決定

30

同種および異種の菌株に対するサブファミリーのメンバーのrLP2086-8529の免疫原性を検査した。

【0206】

以下の表XIIは、同種および異種の菌株に対して検査したサブファミリーBのメンバーのrLP2086-8529の免疫原性を示す。

【0207】

【表 1 2】

表X I I

標的菌株	P2086 サブファミリー	標的菌株 血清型サブタイプ	アミノ酸 均質性 ^a	全細胞 ELISA ^b 力価	BC ₅₀ 力価 ^c
539	B	P1.7-2,3	100	>1,458,000	3,200
H44/76	B	P1.7,16	100	>1,458,000	3,200
H355	B	P1.19,15	100	>1,458,000	3,200
CDC937	B	P1.7-2,3-4	100	>1,458,000	>800
M97 252097	B	P1.7-2,16	100	>1,458,000	>800
870227	B	P1.5-2,10	100	>1,458,000	<25
6940	B	P1.18,25,6	97	900,162	>800
M982	B	P1.22,9	94	435,909	200
880049	B	P1.7-2,4	92	349,912	400
CDC1573	B	P1.7-1,1	87	102,508	25
870446	A	P1.12-1,13	71	389,829	800
M98 250771	A	P1.22,14	62	139,397	<25
NmB	A	P1.5-1,2-2	71	<2,000	<25

10

【0 2 0 8】

ワクチン接種手順：6－8週齢メスSwiss-Websterマウスを、10 μg r L P 2 0 8 6－8 5 2 9＋20 μg Q S－2 1で、第0週および第4週に免疫感作した。データ分析は第6週的全採血時に行った。

20

【0 2 0 9】

- a. r L P 2 0 8 6－8 5 2 9との比較におけるP 2 0 8 6のアミノ酸の相同性
- b. 吸収＝0. 1での希釈度の逆数として表した終点力価
- c. B C 5 0力価は、生細胞のカウントを50%まで低減する抗血清の希釈度の逆数として表した。第0週の正常なマウスの血清のB C 5 0力価は<10であった。

【0 2 1 0】

表XIIIは、同種および異種の菌株に対して検査したサブファミリーBのメンバーのr L P 2 0 8 6－2 9 9 6の免疫原性を示す。

30

【0 2 1 1】

【表 1 3】

表X I I I

標的菌株 Strain	P2086 サブファミリー	標的菌株 血清型サブタイプ	アミノ酸 均質性 ^a	全細胞 ELISA ^b 力価	BC ₅₀ 力価 ^c
NmB	A	P1.5-1,2-2	99.6	8,979	<25
870446	A	P1.12-1,13	99	<1,458,000	>800
M97 252697	A	P1.18,25,6	98	320,732	>800
6557	A	P1.22-1,14-1	98	17,319	<25
M98 250732	A	P1.22,14-1	89	241,510	>800
M98 250771	A	P1.22,14	89	447,867	800
H44/76	B	P1.7,16	72	56,386	<25

40

【0 2 1 2】

ワクチン接種手順：6－8週齢メスSwiss-Websterマウスを、10 μg r L P 2 0 8 6－2 9 9 6＋20 μg Q S－2 1で、第0週および第4週に免疫感作した。データ分析は第6週的全採血時に行った。

【0 2 1 3】

- a. r L P 2 0 8 6－2 9 9 6との比較におけるP 2 0 8 6のアミノ酸の相同性
- b. 吸収＝0. 1での希釈度の逆数として表した終点力価

50

c. 殺菌性 (BC50) 力価は、生細胞のカウントを50%まで低減する抗血清の希釈度の逆数として表した。第0週の正常なマウスの血清のBC50力価は<10であった。

【0214】

以下の表XIVは、rLP2086およびrPorAに対する抗血清が、両者を混合して殺菌活性をアッセイした場合に補足的であることを示す。

【0215】

【表14】

表XIV

抗血清	H44/76 (P1.7,16)	NMB (P1.5-1,2-2)	880049 (P1.7-2,4)	H355 (P1.19,15)	870227 (P1.5-2,10)	6557 (P1.22-1,14-1)
抗-rLP2086 + 3種のrPorA 抗血清	>3,200	>800	200	>800	200	200
コントロール						
抗-rLP2086 対応する 1価の rPorA 抗血清	6,400	<25	100	3,200	<25	<25
	-	1,600	-	-	200	400

【0216】

ワクチン接種手順：6-8週齢メスSwiss-Websterマウスを、10μg rLP2086-8529+20μg QS-21、または15μg rPorA/100μg MPLのいずれかで、第0週および第4週に免疫感作した。データ分析は第6週の全採血時に行った。

【0217】

a. 殺菌性 (BC50) 力価は、生細胞のカウントを50%まで低減する抗血清の希釈度の逆数として表した。第0週の正常なマウスの血清のBC50力価は<10であった。

【0218】

以下の表、表XVはrLP2086サブファミリーおよび2つのrPorAの混合物がマウスにおいて殺菌活性抗体を産生することを示す。

【0219】

【表15】

表XV

	H44/76	6940	880049	M982	M98 250771	M98 250732	M97 252697	870446	NmB	6557
	SfB ^b	SfB	SfB	SfB	SfA ^b	SfA	SfA	SfA	SfA	SfA
	P1.7,16	P1.18 25,6	P1.7- 2,4	P1.22 ,9	P1.22,1 4	P1.22,1 4-1	P1.18,2 5,6	P1.12- 1,13	P1.5- 1,2-2	P1.22 -1,14- 1
抗原										
rLP2086- 8529 + rLP2086- 2996	>800	>800	200	400	800	>800	>800	>800	-	<25
rLP2086- 8529 + rLP2086- 2996 + rP1.5-1,2-2 + rP1.22- 1,14-1	>800	800	100	200	400	400	>800	>800	>800	200
1価の コントロール ^c	>800	>800	200	400	800	>800	>800	>800	>800	800

【0220】

ワクチン接種手順：6－8週齢メスSwiss-Websterマウスを、10 µg 各タンパク質＋20 µg QS－21で、第0週および第4週に免疫感作した。データ分析は第6週的全採血時に行った。

【0221】

a. 殺菌性（BC50）力価は、生細胞のカウントを50%まで低減する抗血清の希釈度の逆数として表した。第0週の正常なマウスの血清のBC50力価は<10であった。

【0222】

b. SfA－サブファミリーA、SfB－サブファミリーB

10

c. 関連の一価コントロール：rLP2086－8529、rLP2086－2996、rP1.5－1, 2－2またはrP1.22－1, 14－1抗血清

以下に上述の研究の結果をまとめる。抗rLP2086抗血清は、検査した菌株16種中13種に対して殺菌性がある。異なる血清型サブタイプを発現する11の菌株が、抗P2086血清により死滅させられる。抗rLP2086血清の殺菌活性は抗rPorA血清に対して補足的である。P2086およびPorAの混合物はマウスにおいて補足的な殺菌性抗体を産生する。異なる界面活性剤による抽出、精製、および多くの菌株に対する機能的な抗体のアッセイを組み合わせた免疫感作を用いて、新規ワクチン候補物質を同定することができる。P2086は、P2086およびrPorAの双方において異種の菌株に対して殺菌性抗体を産生するワクチン候補物質として同定された。したがって、タンパク質の2086ファミリーは、単独でまたは他のナイセリア属抗原と組み合わせてのいずれかにおいて、有用なワクチンとなり得る。

20

【0223】

(実施例9)

先の実施例に従って、様々な血清群のさらなる髄膜炎菌株について、ORF2086遺伝子の存在に関するPCRによるスクリーニングを行った。最終的に100の髄膜炎菌株をスクリーニングした。以下に研究およびその全般的結果を述べる。これらの結果は先の実施例のデータを補足するものである。

【0224】

C末端の可変領域に特異的な2組の内側のPCRプライマーを利用してサブファミリーAおよびBの遺伝子配列の違いを明らかにした。約350bpのPCR増幅産物の存在は、2086遺伝子配列が染色体上に存在することを示した。すべての菌株から予想されるサイズの1つのPCR産物を得た。55種の完全長ORF2086遺伝子のヌクレオチド配列を決定、整列し(DNASTar MegAlign)、これらを用いて系統樹を作成した(図12参照のこと)。

30

【0225】

これら2086遺伝子の9種を、pBADアラビノース誘導型プロモーター系においてrLP2086リポタンパク質として組換え発現させ、これら遺伝子の3種をIPTG誘導型pET系においてrP2086非脂質化タンパク質として組換え発現させた。これらの組換えタンパク質は大腸菌B中で発現させた。精製した組換えタンパク質を用いてマウスを免疫感作し、マウスの抗血清を、その血清IgG力価および様々な異種の髄膜炎菌株に対するその殺菌活性についてアッセイした。

40

【0226】

ORF2086を、以下の髄膜炎菌全細胞、精製染色体DNA、またはプラスミドDNAの鋳型の1つからPCRにより増幅した。

9種のORF2086遺伝子を、インフルエンザ菌P4リーダー配列をORF2086遺伝子の5'末端に融合するベクターpLP339中にクローニングした。pBAD/ORF2086クローンからrP2086の脂質化型を組換え発現させるための宿主菌株として、大腸菌株BLRを使用した(図10Aを参照のこと)。pBADアラビノース誘導型プロモーターは、P4シグナル/ORF2086融合タンパク質の発現に作用し、rP

50

2086の脂質化型を発現させる。シグナル配列を欠損する3種のP2086遺伝子は、pET9aベクター中の高活性T7ファージプロモーターの後ろにクローニングした。pET9a/ORF2086クローンからORF2086の非脂質化型を組換え発現させるための宿主細胞株として、大腸菌株BL21(DE3)を使用した。(図10B参照のこと)大腸菌株BL21中のDE3 lysogenを、IPTG添加によりlacUV5プロモーターのコントロール下で誘導して、T7 RNAポリメラーゼを発現させることができる。WCE; FEMS Micro. Lett., 48 (1987) 367-371およびBCA; J. Clin. Microbiol., 38 (2000) 2878-2884を参照のこと。

【0227】

遺伝子ORF2086を、55種の異なる髄膜炎菌株からクローニングし、配列決定した。ヌクレオチド配列を整列し(DNAStar MegAlign)、系統樹を作成に用いた。(図12参照のこと)。この系統樹は、ORF2086遺伝子ヌクレオチド配列が2つのサブファミリーに区別されることを明らかにしている。遺伝子の2つのサブファミリーは、5'末端では類似しているが、3'末端付近はかなりの可変性を含む。重要な可変性であると思われるが、遺伝子のある種の鍵となる領域は異なる菌株間で非常に相同である。これらの保存領域がタンパク質としての機能的連続性を提供し、ワクチン標的として利用できる交差防護的エピトープを示している可能性がある。

【0228】

2086遺伝子をいくつかの血清群B髄膜炎菌株からクローニングし、脂質化シグナル配列を用いた場合および用いない場合で発現させた。図11Aおよび11Bに示したように、ゲルクロマトグラフは、大腸菌Bの全細胞溶菌液がr2086タンパク質を発現することを示す。T7タグを融合した非脂質化型は最も高レベルで発現された。T7タグ配列はmRNAを安定化し、翻訳されるポリペプチドのレベルを有意に高めることができる。この融合タンパク質は封入体中に沈着して表れるが、公知の方法により容易に精製、リフォールディングすることができる。P2086の脂質化型および非脂質化型は、T7タグを融合しない場合には総細胞タンパク質の約5から8%で発現され、T7タグを融合した場合には総タンパク質の約50%でrP2086を発現する。タンパク質の非脂質化型は可溶性で、細胞質中に局在するようである。タンパク質の脂質化型は膜分画に関与すると思われ、界面活性剤により可溶化される。

【0229】

髄膜炎菌B株8529由来の組換え脂質化2086は、非脂質化型に比して一貫してより高い血清IgG力価を示し(以下の表XVIを参照のこと)、このことは同種および異種の髄膜炎菌株双方に対する高レベルの殺菌活性にもよく相関する(以下の表XVII参照のこと)。天然の脂質化型のタンパク質は、抗原提示するための優れた3次元構造を有しており、および/または結合した脂質がより高い免疫原性応答を刺激するアジュバントとして作用する可能性がある。

【0230】

【表16】

表XVI

8529 rP2086(非脂質化)対8529 rLP2086(脂質化)を用いてのWCEにより第6週で誘発された免疫応答

マウス血清		髄膜炎菌株				
抗原	アジュバント	H44/76	H355	870227	880049	870446
(10 ug)	(20 ug)					
rP2088	QS-21	273,238	212,947	102,694	69,124	21,466
rLP2086	QS-21	5,384,306	4,819,061	2,930,946	1,307,091	886,056

【0231】

【表 17】

表XVII

8529rP2086は8529rLP2086より低い殺菌活性を誘発する

マウス血清		髄膜炎菌株			
抗原 (10 ug)	アジュバント (20 ug)	H44/76	H355	880049	NMB
rP2086	QS-21	200	100	<25	<25
rLP2086	QS-21	6,400	3,200	100	<25
免疫前	-	<10	<10	<10	<10
ポジティブ コントロール	-	1,600	100	200	1,600

10

【0232】

以下に本研究の結果をまとめる。検査を行ったすべての髄膜炎菌B株は、1つの2086様遺伝子を有しているようである。2086遺伝子には少なくとも2つのファミリーがある：サブファミリーA-菌株の約30%およびサブファミリーB-菌株の約70%。55種の髄膜炎菌株から2086遺伝子をクローニングし、配列決定した。サブファミリーA中の配列は、DNAレベルで~86-100%同一である。サブファミリーB中の配列は、DNAレベルで~89.5-100%同一である。サブファミリーA中の配列はサブファミリーBに対してDNAレベルで~60.9%-74%同一である。2086相同体を以下の菌株についてPCRスクリーニングにより同定した：

20

髄膜炎菌A、B、C、W135、Y

N. lactamica

淋菌 (N. gonorrhoeae) FA1090

いくつかのORF2086遺伝子をクローニングし組換え発現させた。

P2086の脂質化バージョンを9種の髄膜炎菌株から発現させた。

これらの組換えタンパク質を精製し、マウスのワクチン接種に使用した。

得られた抗血清は殺菌性である。

30

【0233】

P2086の非脂質化バージョンを上記の9種の菌株のうちの3種から発現させた。

rLP2086では、rP2086に比して一貫してより高い免疫応答を惹起する。

rLP2086はまた、同種および異種の髄膜炎菌株の双方に対して高い殺菌活性を示した。

【0234】

(実施例10)

以下の表、表XVIIIおよび表XIXは、2つのサブファミリーのメンバーのバリエーションの特徴を示す。

【0235】

40

【表 18】

表XVIII

サブファミリーArLP2086バリエーションの特徴づけ

		rLP2086- 252988	rLP2086- 250771	rLP2086- 870446	rLP2086- 2996	rLP2086- C11
増殖用 培地		HySoy	HySoy	HySoy	HySoy	HySoy
可溶性		rTX-100 ⇒ Z3-12	TX-100	TX-100	rTX-100 ⇒ Z3-12	rTX-100 ⇒ Z3-12
精製過程		TMAE S Fractogel SEC	HQ Poros SEC	HQ Poros SEC	TMAE SEC	TMAE S Fractogel
純度 (%)		96	83	80	95	82
収量 (mg/g 細胞ペレット)		0.2	0.7	0.8	0.5 (発酵器)	0.1
サイズ	SEC (Z3- 12)	134,000	155,000	132,000	163,000	126,000
	MS	27,897 (712 脂質)	-	-	27,878 (750 脂質)	28,139 (682 脂質)
熱変性 転移 中間点 (T _M) °C		66 °C	-	NT	65 °C	63 °C
利用可能な タンパク質		2.7mg	1mg (Z3-12)	5.0mg	44mg	1.1mg

(mg)					
8529 配列の 相同性 (%)	71	62	71	72	68

【0236】

【表 19】

表XIX

サブファミリーB rLP2086バリエーションの特徴づけ

		rLP2086-8529	rLP2086-M982	rLP2086-880049	rLP2086-CDC1573
増殖用 培地		Apollon (Sanford)	Apollon	HySoy	HySoy
可溶性		4M Urea ⇒ Z3-12	rTX-100 ⇒ Z3-12	rTX-100 ⇒ Z3-12	rTX-100
精製過程		TMAE S Fractogel	TMAE S Fractogel	TMAE S Fractogel	TMAE SEC
純度 (%)		96	96	90	93
収量 (mg/g 細胞ペレット)		0.2 (発酵器)	1.6 (発酵器)	0.4	1.0
サイズ	SEC (Z3-12)	95,000	110,000 150,000	100,000	120,000
	MS	27,785 (822 脂質)	27,719 (711 脂質)	28,044 (819 脂質)	28,385 (823 脂質)
熱変性 転移 中間点 (T _M) °C		70 °C	75 °C	62 °C	NT
利用可能な タンパク質 (mg)		尿素 - 34mg サルコシル - 36mg	プール 1 - 47mg プール 2 - 17mg	3.6mg	4.9mg
8529 配列の 相同性 (%)		100	94	92	87

【0237】

以下の表XXは、2086サブファミリーAに関する蛍光標識血清の殺菌性アッセイの結果を提供する。

【0238】

【表 20】

表XX

説明	250771	870446	6557	NMB	M98 250732	M97 252697
rLP2086-252988, 10μg	>800 (99%)*	>800 (99%)*	<25	-	>800 (99%)*	>800 (93%)*
rLP2086-C11, 10μg	200	>880 (91%)*	<25	-	200	400
rLP2086-250771, 10μg	>800 (92%)*	>800 (99%)*	<25	-	>800 (96%)*	>800 (84%)*
rLP2086-870446, 10μg	400	>800 (99%)*	<25	-	400	400
rLP2086-2996, 10μg	800	>800 (99%)*	<25	-	>800 (93%)*	>800 (72%)*
rLP2086-8529 + rLP2086-2996, 10μg	800	>800 (99%)*	<25	-	>800 (80%)*	>800 (72%)*
rLP2086-8529 + rP1.22a,14a + rP1.5a,2c, 10μg	-	800	200	>800 (98%)*	-	-
rLP2086-8529 + rLP2086-2996 + rP1.22a,14a + rP1.5a,2c, 10μg	400	>800 (99%)*	200	>800 (99%)*	400	>800 (88%)*
NMB/rLP2086- 8529 小胞 20μg	-	100	-	400	-	-
rP1.22a,14a, 10μg	25	-	800	-	100	-
rP1.5a,2c, 10μg	-	-	-	>800 (99%)*	-	-
rLP2086-8529, 10μg	-	800	-	-	-	-
rP1.22a,14a, 25μg	200	-	-	-	800	-
rP1.18,25.6, 5μg	-	-	-	-	-	-
nP1.22.9 (M982), 25μg	-	-	100	-	-	-
免疫前マウス 血清 (ネガティブコントロール)	<10	<10	<10	<10	<10	<10
	800	400	800	1600	**	**

* パーセントは1 : 800希釈での%BC活性を示す。

** ポジティブコントロール 入手不可

— 未検査の血清

【0239】

(実施例11)

以下にさらに、P2086がナイセリア属菌株内で発現することを示し、いくつかの菌株におけるP2086の発現の更なる具体的な実施例を提供する。

【0240】

プレート培養した細胞をSDSサンプルバッファーに再懸濁し、98℃で4分間加熱して、細胞溶菌液を調製した。サンプルを、10-20%のpre-castゲル(ICN)の各ウェルに総タンパク質~30-50μgで加え、175Vで流した。ゲルをニトロセルロー

10

20

30

40

50

ス膜に移した後、T r i s 緩衝化生理食塩水 (Blotto) 中の 5 % 粉末ミルクにて 3 0 分間ブロックした。使用する第 1 抗体は、マウスで各 r L P 2 0 8 6 バリエーションに対して作成したポリクローナル抗血清のプールとした。

【 0 2 4 1 】

図 1 7 および 1 8 に示したように、ウェスタンブロットは P 2 0 8 6 サブファミリー A および B の全細胞溶菌液に対する、r L P 2 0 8 6 マウス抗血清の反応性を示している。サブファミリー A 細胞溶菌液のブロットについては、使用する抗血清は r L P 2 0 8 6 - 2 9 9 6、- 8 7 0 4 4 6 および - 2 5 0 7 7 1 に対して作製し、r L P 2 0 8 6 - 2 5 0 7 7 1 は Blotto 中で 1 / 5 0 0 に希釈し、他のものは Blotto 中で 1 / 1 0 0 0 に希釈した。サブファミリー B 細胞溶菌液のブロットについては、使用する抗血清は、r L P 2 0 8 6 - 8 5 2 9 (Blotto 中で 1 / 1 0 0 0 に希釈)、- C D C 1 5 7 3、- M 9 8 2 および - 8 8 0 0 4 9 (これら 3 種は Blotto 中で 1 / 5 0 0 に希釈) に対して作製した。第 1 抗血清およびブロットは 4 °C でオーバーナイト、インキュベーションした。ブロットを洗浄し、抗マウス-ヤギ A P 第 2 抗血清を Blotto 中で 1 / 5 0 0 として加え、ブロットを室温で 3 0 分間インキュベーションした。洗浄後、BCIP/NBT Membrane Phosphatase Substrate System (膜ホスファターゼ基質システム) (K P L) を用いてブロットを現像した。

10

【 0 2 4 2 】

(参考文献)

当明細書において先に述べた参考文献を以下に記し、その全内容を当明細書において参照として援用する。

20

【 0 2 4 3 】

【表 2 1 - 1】

1. 1997. Case definitions for Infectious Conditions Under Public Health Surveillance. CDC.
2. 1995 Sambrook, J. and D. W. Russell. 1995. Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons, Inc., New York.
3. 1994. Griffin, A. M. and Griffin, H. G., ed., Computer Analysis of Sequence Data, Part I. Humana Press, New Jersey. 10
4. 1993. Smith, D. W.. ed., Biocomputing: Informatics and Genome Projects. Academic Press, New York
5. 1991. Gribskov, M. and Devereux, J., ed. Sequence Analysis Primer. Stockton Press, New York.
6. 1988. Lesk, A. M., ed. Computational Molecular Biology. Oxford University Press, New York. 20
7. Abdillahi, H., and J. T. Poolman. 1988. *Neisseria meningitidis* group B serosubtyping using monoclonal antibodies in whole-cell ELISA. *Microbial Pathogenesis* 4(1):27-32.
8. Achtman, M. 1995. Epidemic spread and antigenic variability of *Neisseria meningitidis*. *Trends in Microbiology* 3(5):186-92. 30
9. Alm, R. A., L. S. Ling, D. T. Moir, B. L. King, E. D. Brown, P. C. Doig, D. R. Smith, B. Noonan, B. C. Guild, B. L. deJonge, G. Carmel, P. J. Tummino, A. Caruso, M. Uria-Nickelsen, D. M. Mills, C. Ives, R. Gibson, D. Merberg, S. D. Mills, Q. Jiang, D. E. Taylor, G. F. Vovis, and T. J. Trust. 1999. Genomic-sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori* [published erratum appears in Nature 1999 Feb 25;397(6721):719]. *Nature*. 397:176-80. 40

【表 2 1 - 2】

10. Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, and D. J. Lipman. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25:3389-402.

11. Anderson, T. F. 1951. Techniques for the preservation of three-dimensional structure in preparing specimens for the electron microscope. *Trans N Y Acad Sci.* 13:130-134.

10

12. Ambrosch, F., G. Wiedermann, P. Crooy, and A. M. George. 1983. Immunogenicity and side-effects of a new tetravalent meningococcal polysaccharide vaccine. *Bulletin of the World Health Organization* 61(2):317-23.

13. Benson, G. 1999. Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences. *Nucleic Acids Res.* 27:573-80.

14. Carillo, H., D. Lipman, and J. Siam. 1988. *Applied Math* 48:1073.

20

15. Chen, C. C., and P. P. Cleary. 1989. Cloning and expression of the streptococcal C5a peptidase gene in *Escherichia coli*: linkage to the type 12 M protein gene. *Infect. Immun.* 57:1740-1745.

16. Chmouryguina, I., A. Suvorov, P. Ferrieri, and P. P. Cleary. 1996. Conservation of the C5a peptidase genes in group A and B streptococci. *Infect. Immun.* 64:2387-2390.

30

17. Cockerill, F. R., 3rd, R. L. Thompson, J. M. Musser, P. M. Schlievert, J. Talbot, K. E. Holley, W. S. Harmsen, D. M. Ilstrup, P. C. Kohner, M. H. Kim, B. Frankfort, J. M. Manahan, J. M. Steckelberg, F. Roberson, and W. R. Wilson. 1998. Molecular, serological, and clinical features of 16 consecutive cases of invasive streptococcal disease. Southeastern Minnesota Streptococcal Working Group. *Clin Infect Dis.* 26:1448-58.

18. Courtney, H. S., Y. Li, J. B. Dale, and D. L. Hasty. 1994. Cloning, sequencing, and expression of a fibronectin/fibrinogen-binding protein from group A streptococci. *Infect Immun.* 62:3937-46.

40

【 0 2 4 5】

【表 2 1 - 3】

19. Cserzo, M., E. Wallin, I. Simon, G. von Heijne, and A. Elofsson. 1997. Prediction of transmembrane alpha-helices in prokaryotic membrane proteins: the dense alignment surface method. *Protein Engineering*. 10:673-6.

20. Cunningham, M. W., and A. Quinn. 1997. Immunological crossreactivity between the class I epitope of streptococcal M protein and myosin. *Adv Exp Med Biol*. 418:887-92. 10

21. Dale, J. B., R. W. Baird, H. S. Courtney, D. L. Hasty, and M. S. Bronze. 1994. Passive protection of mice against group A streptococcal pharyngeal infection by lipoteichoic acid. *J Infect Dis*. 169:319-23.

22. Dale, J. B., M. Simmons, E. C. Chiang, and E. Y. Chiang. 1996. Recombinant, octavalent group A streptococcal M protein vaccine. *Vaccine*. 14:944-8. 20

23. Dale, J. B., R. G. Washburn, M. B. Marques, and M. R. Wessels. 1996. Hyaluronate capsule and surface M protein in resistance to opsonization of group A streptococci. *Infect Immun*. 64:1495-501.

24. Eddy, S. R. 1996. Hidden Markov models. *Cur Opin Struct Bio*. 6:361-5.

25. Ellen, R. P., and R. J. Gibbons. 1972. M protein-associated adherence of *Streptococcus pyogenes* to epithelial surfaces: prerequisite for virulence. *Infect Immun*. 5:826-830. 30

26. Eng, J. K., A. L. McCormack, and J. R. Yates, 3rd. 1994. An approach to correlate tandem mass-spectral data of peptides with amino-acid-sequences in a protein database. *Am Soc Mass Spectrometry*. 5:976-89.

27. Fischetti, V. A., V. Pancholi, and O. Schneewind. 1990. Conservation of a hexapeptide sequence in the anchor region of surface proteins from gram-positive cocci. *Mol Microbiol*. 4:1603-5. 40

28. Fogg, G. C., and M. G. Caparon. 1997. Constitutive expression of fibronectin binding in *Streptococcus pyogenes* as a result of anaerobic activation of *rofA*. *J Bacteriol*. 179:6172-80.

【 0 2 4 6】

【表 2 1 - 4】

29. Foster, T. J., and M. Hook. 1998. Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol.* 6:484-8.
30. Fraser, C. M., S. Casjens, W. M. Huang, G. G. Sutton, R. Clayton, R. Lathigra, O. White, K. A. Ketchum, R. Dodson, E. K. Hickey, M. Gwinn, B. Dougherty, J. F. Tomb, R. D. Fleischmann, D. Richardson, J. Peterson, A. R. Kerlavage, J. Quackenbush, S. Salzberg, M. Hanson, R. van Vugt, N. Palmer, M. D. Adams, J. 31. Gocayne, J. C. Venter, and *et al.* 1997. Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete, *Borrelia burgdorferi* [see comments]. *Nature.* 390:580-6. 10
32. Goldschneider, I., E. C. Gotschlich, and M. S. Artenstein. 1969. Human immunity to the meningococcus. I. The role of humoral antibodies. *Journal of Experimental Medicine* 129(6):1307-26.
33. Goldschneider, I., E. C. Gotschlich, and M. S. Artenstein. 1969. Human immunity to the meningococcus. II. Development of natural immunity. *Journal of Experimental Medicine* 129(6):1327-48. 20
34. Gotschlich, E. C., I. Goldschneider, and M. S. Artenstein. 1969. Human immunity to the meningococcus. IV. Immunogenicity of group A and group C meningococcal polysaccharides in human volunteers. *Journal of Experimental Medicine* 129(6):1367-84. 30
35. Gotschlich, E. C., I. Goldschneider, and M. S. Artenstein. 1969. Human immunity to the meningococcus. V. The effect of immunization with meningococcal group C polysaccharide on the carrier state. *Journal of Experimental Medicine* 129(6):1385-95.
36. Hacker, J., G. Blum-Oehler, I. Muhldorfer, and H. Tschape. 1997. Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. *Mol Microbiol.* 23:1089-97. 40
37. Hanski, E., and M. Caparon. 1992. Protein F, a fibronectin-binding protein, is an adhesion of the group A streptococcus *Streptococcus pyogenes*. *Proc Natl Acad Sci., USA.* 89:6172-76.

【 0 2 4 7】

【表 2 1 - 5】

38. Hanski, E., P. A. Horwitz, and M. G. Caparon. 1992. Expression of protein F, the fibronectin-binding protein of *Streptococcus pyogenes* JRS4, in heterologous streptococcal and enterococcal strains promotes their adherence to respiratory epithelial cells. *Infect Immun.* 60:5119-5125.
39. Hernandez-Sanchez, J., J. G. Valadez, J. V. Herrera, C. Ontiveros, and G. Guarneros. 1998. lambda bar minigene-mediated inhibition of protein synthesis involves accumulation of peptidyl-tRNA and starvation for tRNA. *EMBO Journal.* 17:3758-65. 10
40. Huang, T. T., H. Malke, and J. J. Ferretti. 1989. The streptokinase gene of group A streptococci: cloning, expression in *Escherichia coli*, and sequence analysis. *Mol Microbiol.* 3:197-205.
41. Hynes, W. L., A. R. Dixon, S. L. Walton, and L. J. Aridgides. 2000. The extracellular hyaluronidase gene (*hylA*) of *Streptococcus pyogenes*. *FEMS Microbiol Lett.* 184:109-12. 20
42. Hynes, W. L., L. Hancock, and J. J. Ferretti. 1995. Analysis of a second bacteriophage hyaluronidase gene from *Streptococcus pyogenes*: evidence for a third hyaluronidase involved in extracellular enzymatic activity. *Infect Immun.* 63:3015-20.
43. Isberg, R. R., and G. Tran Van Nhieu. 1994. Binding and internalization of microorganisms by integrin receptors. *Trends Microbio.* 2:10-4. 30
44. Jones, K. F., and V. A. Fischetti. 1988. The importance of the location of antibody binding on the M6 protein for opsonization and phagocytosis of group A M6 streptococci. *J Exp Med.* 167:1114-23.
45. Kihlberg, B. M., M. Collin, A. Olsen, and L. Bjorck. 1999. Protein H, an antiphagocytic surface protein in *Streptococcus pyogenes*. *Infect Immun.* 67:1708-14. 40
46. Koebnik, R. 1995. Proposal for a peptidoglycan-associating alpha-helical motif in the C-terminal regions of some bacterial cell-surface proteins [letter; comment]. *Molecular Microbiology.* 16:1269-70.

【 0 2 4 8】

【表 2 1 - 6】

47. Kuipers, O. P., H. J. Boot, and W. M. de Vos. 1991. Improved site-directed mutagenesis method using PCR. *Nucleic Acids Res.* **19**:4558.
48. Kyte, J., and R. F. Doolittle. 1982. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *Journal of Molecular Biology* **157**:105-132.
49. Landt, O., H. P. Grunert, and U. Hahn. 1990. A general method for rapid site-directed mutagenesis using the polymerase chain reaction. *Gene* **96**:125-128. 10
50. Loessner, M. J., S. Gaeng, and S. Scherer. 1999. Evidence for a holin-like protein gene fully embedded out of frame in the endolysin gene of *Staphylococcus aureus* bacteriophage 187. *J Bacteriol.* **181**:4452-60.
51. Lukashin, A. V., and M. Borodovsky. 1998. GeneMark.hmm: new solutions for gene finding. *Nucleic Acids Res.* **26**:1107-15. 20
52. Lukomski, S., C. A. Montgomery, J. Rurangirwa, R. S. Geske, J. P. Barrish, G. J. Adams, and J. M. Musser. 1999. Extracellular cysteine protease produced by *Streptococcus pyogenes* participates in the pathogenesis of invasive skin infection and dissemination in mice. *Infect Immun.* **67**:1779-88.
53. Madore, D. V. 1998. Characterization of immune response as an indicator of *Haemophilus influenzae* type b vaccine efficacy. *Pediatr Infect Dis J.* **17**:S207-10. 30
54. Matsuka, Y. V., S. Pillai, S. Gubba, J. M. Musser, and S. B. Olmsted. 1999. Fibrinogen cleavage by the *Streptococcus pyogenes* extracellular cysteine protease and generation of antibodies that inhibit enzyme proteolytic activity. *Infect Immun.* **67**:4326-33.
55. Mazmanian, S. K., G. Liu, H. Ton-That, and O. Schneewind. 1999. *Staphylococcus aureus* sortase, an enzyme that anchors surface proteins to the cell wall. *Science.* **285**:760-3. 40
56. McAtee, C. P., K. E. Fry, and D. E. Berg. 1998. Identification of potential diagnostic and vaccine candidates of *Helicobacter pylori* by "proteome" technologies. *Helicobacter.* **3**:163-9.

【 0 2 4 9】

【表 2 1 - 7】

57. McAtee, C. P., M. Y. Lim, K. Fung, M. Velligan, K. Fry, T. Chow, and D. E. Berg. 1998. Identification of potential diagnostic and vaccine candidates of *Helicobacter pylori* by two-dimensional gel electrophoresis, sequence analysis, and serum profiling. *Clin Diagn Lab Immunol.* 5:537-42.

58. McAtee, C. P., M. Y. Lim, K. Fung, M. Velligan, K. Fry, T. P. Chow, and D. E. Berg. 1998. Characterization of a *Helicobacter pylori* vaccine candidate by proteome techniques. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 714:325-33.

10

59. Mejlhede, N., J. F. Atkins, and J. Neuhard. 1999. Ribosomal -1 frameshifting during decoding of *Bacillus subtilis* cdd occurs at the sequence CGA AAG. *J. Bacteriol.* 181:2930-7.

60. Molinari, G., S. R. Talay, P. Valentin-Weigand, M. Rohde, and G. S. Chhatwal. 1997. The fibronectin-binding protein of *Streptococcus pyogenes*, SfbI, is involved in the internalization of group A streptococci by epithelial cells. *Infect Immun.* 65:1357-63.

20

61. Mountzouros, K. T., and A. P. Howell. 2000. Detection of complement-mediated antibody-dependent bactericidal activity in a fluorescence-based serum bactericidal assay for group B *Neisseria meningitidis*. *J. Clin. Microbiol.* 38(8):2878-2884.

62. Nakai, K., and M. Kanehisa. 1991. Expert system for predicting protein localization sites in gram-negative bacteria. *Proteins.* 11:95-110.

30

63. Navarre, W. W., and O. Schneewind. 1999. Surface proteins of gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. *Microbiol Mol Biol Rev.* 63:174-229.

64. Nielsen, H., J. Engelbrecht, S. Brunak, and G. von Heijne. 1997. Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Engineering.* 10:1-6.

40

65. Nizet, V., B. Beall, D. J. Bast, V. Datta, L. Kilburn, D. E. Low, and J. C. De Azavedo. 2000. Genetic locus for streptolysin S production by group A streptococcus. *Infect Immun.* 68:4245-54.

【 0 2 5 0】

【表 2 1 - 8】

66. Nordstrand, A., W. M. McShan, J. J. Ferretti, S. E. Holm, and M. Norgren. 2000. Allele substitution of the streptokinase gene reduces the nephritogenic capacity of group A streptococcal strain NZ131. *Infect Immun.* 68:1019-25.

67. Olmsted, S. B., S. L. Erlandsen, G. M. Dunny, and C. L. Wells. 1993. High-resolution visualization by field emission scanning electron microscopy of *Enterococcus faecalis* surface proteins encoded by the pheromone-inducible conjugative plasmid pCF10. *J Bacteriol.* 175:6229-37.

10

68. Park, J., and S. A. Teichmann. 1998. DIVCLUS: an automatic method in the GEANFAMMER package that finds homologous domains in single- and multi-domain proteins. *Bioinformatics.* 14:144-50.

69. Parkhill, J., M. Achtman, K. D. James, S. D. Bentley, C. Churcher, S. R. Klee, G. Morelli, D. Basham, D. Brown, T. Chillingworth, R. M. Davies, P. Davis, K. Devlin, T. Feltwell, N. Hamlin, S. Holroyd, K. Jagels, S. Leather, S. Moule, K. Mungall, M. A. Quail, M. A. Rajandream, K. M. Rutherford, M. Simmonds, J. Skelton, S. Whitehead, B. G. Spratt, and B. G. Barrell. 2000. Complete DNA sequence of a serogroup A strain of *Neisseria meningitidis* Z2491 [see comments]. *Nature.* 404:502-6.

20

70. Pierschbacher, M. D., and E. Ruoslahti. 1987. Influence of stereochemistry of the sequence Arg-Gly-Asp-Xaa on binding specificity in cell adhesion. *J Biol Chem.* 262:17294-8.

30

71. Pizza, M., V. Scarlato, V. Maignani, M. M. Giuliani, B. Arico, M. Comanducci, G. T. Jennings, L. Baldi, E. Bartolini, B. Capecchi, C. L. Galeotti, E. Luzzi, R. Manetti, E. Marchetti, M. Mora, S. Nuti, G. Ratti, L. Santini, S. Savino, M. Scarselli, E. Storni, P. Zuo, M. Broecker, E. Hundt, B. Knapp, E. Blair, T. Mason, H. Tettelin, D. W. Hood, A. C. Jeffries, N. J. Saunders, D. M. Granoff, J. C. Venter, E. R. Moxon, G. Grandi, and R. Rappuoli. 2000. Identification of vaccine candidates against serogroup B meningococcus by whole-genome sequencing. *Science* 287(5459):1816-20.

40

【 0 2 5 1】

【表 2 1 - 9】

72. Podbielski, A., A. Flosdorff, and J. Weber-Heynemann. 1995. The group A streptococcal virR49 gene controls expression of four structural vir regulon genes. *Infect Immun.* 63:9-20.

73. Poolman, J. T. 1996. Bacterial outer membrane protein vaccines. The meningococcal example. *Advances in Experimental Medicine & Biology* 397:73-7.

74. Proft, T., S. Louise Moffatt, C. J. Berkahn, and J. D. Fraser. 1999. Identification and Characterization of Novel Superantigens from *Streptococcus pyogenes*. *J Exp Med.* 189:89-102. 10

75. Pugsley, A. P. 1993. The complete general secretory pathway in gram-negative bacteria. *Microbiol Rev.* 57:50-108.

76. Quinn, A., K. Ward, V. A. Fischetti, M. Hemric, and M. W. Cunningham. 1998. Immunological relationship between the class I epitope of streptococcal M protein and myosin. *Infect Immun.* 66:4418-24. 20

77. Reda, K. B., V. Kapur, D. Goela, J. G. Lamphear, J. M. Musser, and R. R. Rich. 1996. Phylogenetic distribution of streptococcal superantigen SSA allelic variants provides evidence for horizontal transfer of ssa within *Streptococcus pyogenes*. *Infect Immun.* 64:1161-5.

78. Sambrook, J., and D. W. Russell. 2001. *Molecular cloning a laboratory manual*, Third ed, vol. 3. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. 30

79. Salzberg, S. L., A. L. Delcher, S. Kasif, and O. White. 1998. Microbial gene identification using interpolated Markov models. *Nucleic Acids Res.* 26:544-8.

80. Saukkonen, K., H. Abdillahi, J. T. Poolman, and M. Leinonen. 1987. Protective efficacy of monoclonal antibodies to class 1 and class 3 outer membrane proteins of *Neisseria meningitidis* B:15:P1.16 in infant rat infection model: new prospects for vaccine development. *Microbial Pathogenesis* 3(4):261-7. 40

81. Sedegah *et al.* 1994. *Immunology.* 91, 9866-9870.

【 0 2 5 2】

【表 2 1 - 1 0】

82. Sonnenberg, M. G., and J. T. Belisle. 1997. Definition of *Mycobacterium tuberculosis* culture filtrate proteins by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis, N-terminal amino acid sequencing, and electrospray mass spectrometry. *Infect Immun.* 65:4515-24.
83. Sonnhammer, E. L., S. R. Eddy, and R. Durbin. 1997. Pfam: a comprehensive database of protein domain families based on seed alignments. *Proteins.* 28:405-20. 10
84. Stevens, D. L. 1995. Streptococcal toxic-shock syndrome: spectrum of disease, pathogenesis, and new concepts in treatment. *Emerg Infect Dis.* 1:69-78.
85. Stockbauer, K. E., L. Magoun, M. Liu, E. H. Burns, Jr., S. Gubba, S. Renish, X. Pan, S. C. Bodary, E. Baker, J. Coburn, J. M. Leong, and J. M. Musser. 1999. A natural variant of the cysteine protease virulence factor of group A streptococcus with an arginine-glycine-aspartic acid (RGD) motif preferentially binds human integrins α 5 β 3 and α IIb β 3 *Proc Natl Acad Sci., USA.* 96:242-7. 20
86. Tettelin, H., N. J. Saunders, J. Heidelberg, A. C. Jeffries, K. E. Nelson, J. A. Eisen, K. A. Ketchum, D. W. Hood, J. F. Peden, R. J. Dodson, W. C. Nelson, M. L. Gwinn, R. DeBoy, J. D. Peterson, E. K. Hickey, D. H. Haft, S. L. Salzberg, O. White, R. D. Fleischmann, B. A. Dougherty, T. Mason, A. Ciecko, D. S. Parksey, E. Blair, H. Cittone, E. B. Clark, M. D. Cotton, T. R. Utterback, H. Khouri, H. Qin, J. Vamathevan, J. Gill, V. Scarlato, V. Masignani, M. Pizza, G. Grandi, L. Sun, H. O. Smith, C. M. Fraser, E. R. Moxon, R. Rappuoli, and J. C. Venter. 2000. Complete genome sequence of *Neisseria meningitidis* serogroup B strain MC58. *Science* 287(5459):1809-15. 30
87. Ton-That, H., G. Liu, S. K. Mazmanian, K. F. Faull, and O. Schneewind. 1999. Purification and characterization of sortase, the transpeptidase that cleaves surface proteins of *Staphylococcus aureus* at the LPXTG motif. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:12424-12429. 40

【 0 2 5 3】

【表 2 1 - 1 1】

88. von Heinje, G. 1987. Sequence Analysis in Molecular Biology. Academic Press, New York.
89. Welding, K., I. Rosenkrands, S. Jacobsen, P. B. Rasmussen, M. J. Elhay, and P. Andersen. 1998. Two-dimensional electrophoresis for analysis of *Mycobacterium tuberculosis* culture filtrate and purification and characterization of six novel proteins. *Infect Immun.* 66:3492-500. 10
90. Wolff *et al.* 1990. *Science.* 247, 1465-1468.
91. Yutsudo, T., K. Okumura, M. Iwasaki, A. Hara, S. Kamitani, W. Minamide, H. Igarashi, and Y. Hinuma. 1994. The gene encoding a new mitogenic factor in a *Streptococcus pyogenes* strain is distributed only in group A streptococci. *Infection and Immunity.* 62:4000-4004.
92. Zagursky, R.J. and D. Russell. 2001. Bioinformatics: Use in Bacterial Vaccine Discovery. *BioTechniques.* 31:636-659. 20

【 0 2 5 4】

本発明はここに十分に説明したので、当明細書に述べた本発明の精神または範疇から逸脱せずに、本発明に対する変更および修飾が可能であることは一般の当業者には明らかであろう。これまでの記述は、多数の可能な変更 に 則して本発明の好ましい態様を述べたものである。しかしこれらの態様は単なる例に過ぎず、本発明をそれに限定するものではない。

【図面の簡単な説明】

【 0 2 5 5】

【図 1 - A】図 1 A は、異種の菌株に対して殺菌性抗体を産生することのできるナイセリア属膜タンパク質抽出物を同定するための実験から得られた、タンパク質分画のうちの 2 つの主要なタンパク質を表している SDS - PAGE ゲルを表す。

【図 1 - B】図 1 B は、プロテアーゼの消化および逆相 N 末端配列決定による、TMAE 流出成分の分析による 2 つの主要なタンパク質を同定する実験の結果を表す。

【図 2】図 2 は、rLP2086 の SDS - PAGE で決定する場合の精製スキームおよび均質性を表す。

【図 3】図 3 は、LC - MS / MS および対応する SDS - PAGE による、TMAE 流出成分の分析による 2 つの主要なタンパク質および 1 つの少量のタンパク質を同定する実験の結果を表す。 40

【図 4】図 4 は、2086 タンパク質の組換え発現の SDS - PAGE ゲルである。

【図 5】図 5 は、当明細書で述べたプラスミド pPX7340 の模式図である。

【図 6】図 6 は、当明細書で述べたプラスミド pPX7328 の模式図である。

【図 7】図 7 は、当明細書で述べたプラスミド pPX7343 の模式図である。

【図 8】図 8 は、様々な菌株由来の 2086 遺伝子の N 末端領域を表す。

【図 9 - A】図 9 A は、ナイセリア菌株中の免疫原性成分の同定における予備段階を示すフローチャートである。

【図 9 - B】図 9 B は、ナイセリア菌株中の免疫原性成分の同定における最終段階を示すフローチャートである。

【図 10】図 10 A は、本明細書の実施例に述べたように、P4 シグナル / ORF 208 50

6 融合タンパク質の発現を誘導し、r P 2 0 8 6 の脂質化型を発現させる p B A D アラビノース誘導型プロモーターの模式図である。図 1 0 B は、O R F 2 0 8 6 の非脂質型の組換え発現のための p P E T 9 a - T 7 ベクターの模式図である。

【図 1 1】図 1 1 A は、r L P 2 0 8 6 タンパク質を発現する大腸菌 B の全細胞溶菌液を表す写真である。図 1 1 B は、r P 2 0 8 6 タンパク質を発現する大腸菌 B の全細胞溶菌液を表す写真である。

【図 1 2】図 1 2 は、O R F 2 0 8 6 タンパク質のサブファミリーおよび群の構成を示す系統樹である。

【図 1 3】図 1 3 は、r L P 2 0 8 6 サブファミリー A 抗血清に関する全細胞 F L I S A データのグラフである。

10

【図 1 4】図 1 4 は、r L P 2 0 8 6 サブファミリー B 抗血清に関する全細胞 F L I S A データのグラフである。

【図 1 5】図 1 5 は、r L P 2 0 8 6 の混合に関する研究 - W C E 力価の結果のグラフである。

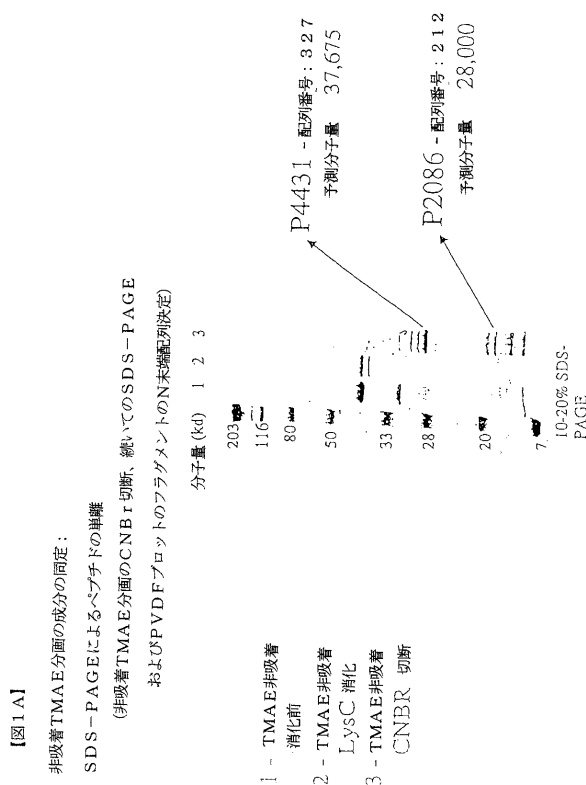
【図 1 6】図 1 6 は、r L P 2 0 8 6 / r P o r A の混合に関する研究 - W C E 力価の結果のグラフである。

【図 1 7】図 1 7 は、P 2 0 8 6 サブファミリー B 髄膜炎菌全細胞溶菌液に対する r L P 2 0 8 6 マウス抗血清の反応性を示すウェスタンブロットである。

【図 1 8】図 1 8 は、P 2 0 8 6 サブファミリー A 髄膜炎菌および N. lactamica の全細胞溶菌液に対する r L P 2 0 8 6 マウス抗血清の反応性を示すウェスタンブロットである。

20

【図 1 - A】



【図 1 - B】

【図 1 B】

非吸着 TMAE 分画成分の同定：

ペプチドの逆相による単離

非吸着 TMAE 分画の酵素による消化

続いてのペプチドの逆相クロマトグラフィーによる単離および N 末端直接配列決定

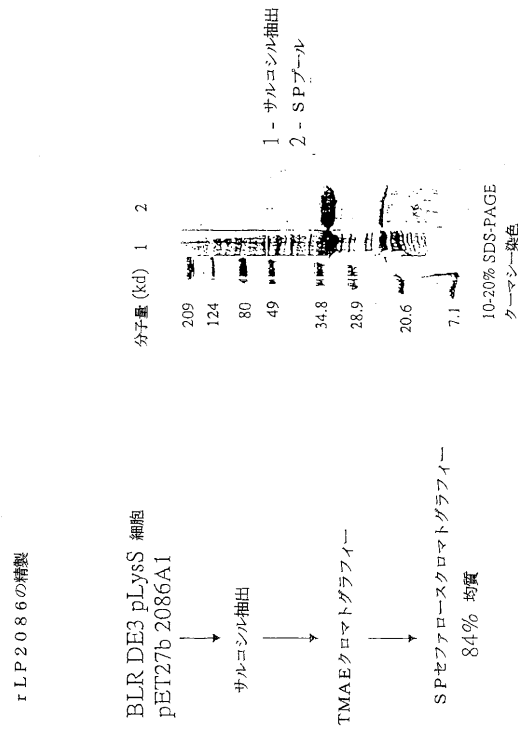
酵素による消化	ペプチドの保持時間 (分)	ペプチドの分子量 (d)	N 末端 ID
GluC (V8)	6.716	2069.7	P5163
LysC	13.800	3351.2	P4431
LysC	13.800	3351.2	P2086
ArgC	6.860	2278.9	P5163

P4431 (配列番号: 327)
予測分子量: 36,775

P2086 (配列番号: 212)
予測分子量: 27,100

P5163 (配列番号: 328)
予測分子量: 7,081

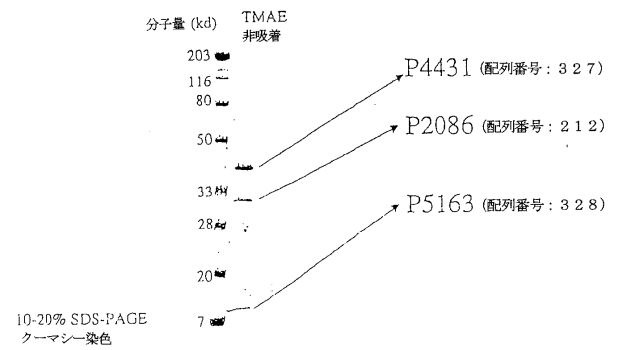
【図 2】



【図 3】

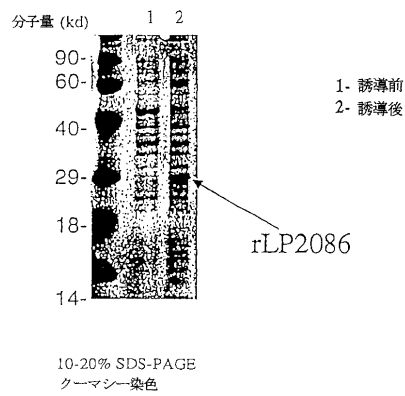
非吸着TMAE分画の成分の同定: LC-MS/MS

SDS-PAGEに続いてのゲル切り出し、タンパク質分解酵素による消化、およびLC-MS/MS分析 (液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析計)

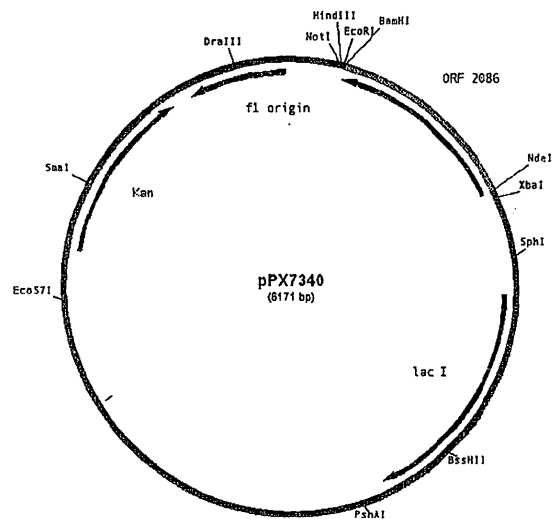


【図 4】

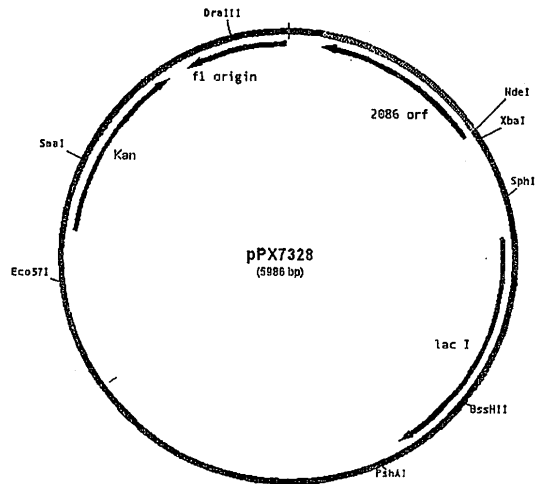
rLP2086の発現



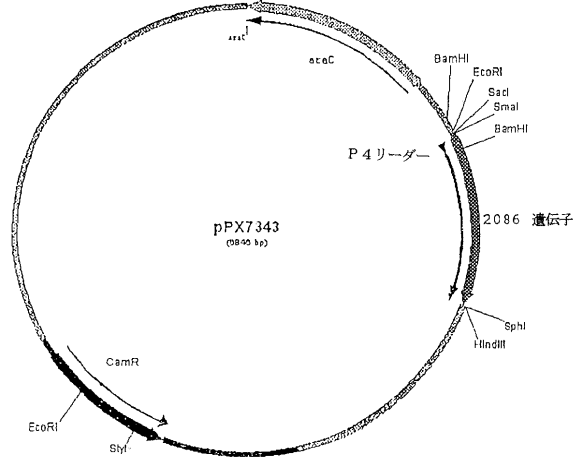
【図 5】



【図 6】



【図 7】



【図 8】

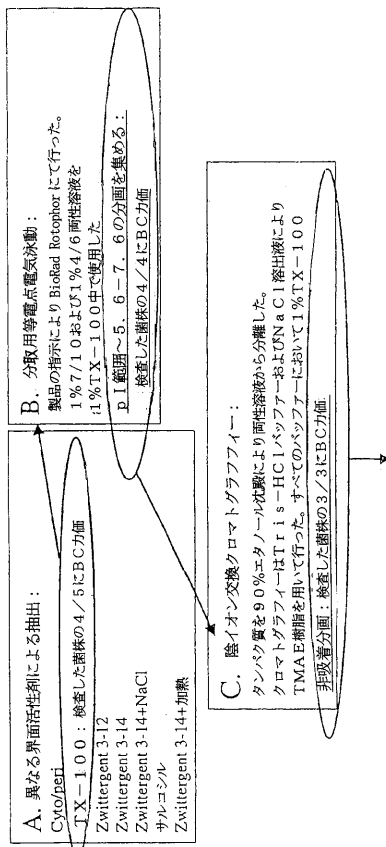
	10	20	30	
1	C S S G G G G	Y A A D I G A G L A D A L T A P L D	6529	天然のタンパク質
1	C S S G G G G	Y A A D I G A G L A D A L T A P L D	2996	天然のタンパク質
1	C S S G G G G	S G G G G T A D I G T G L A D A L T A P L D	1573	天然のタンパク質

5 アミノ酸の繰り返し

【図 9 - A】

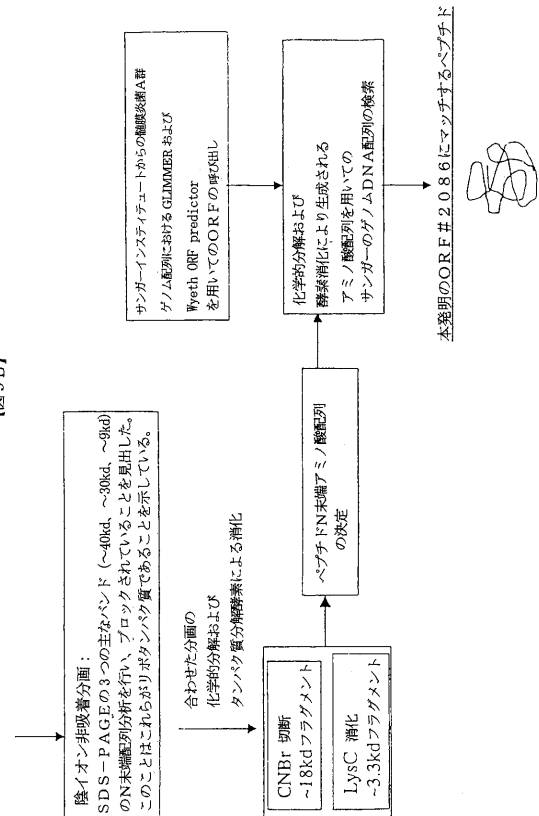
【図 9 A】

Nm 菌株 8529 の免疫原性成分の同定



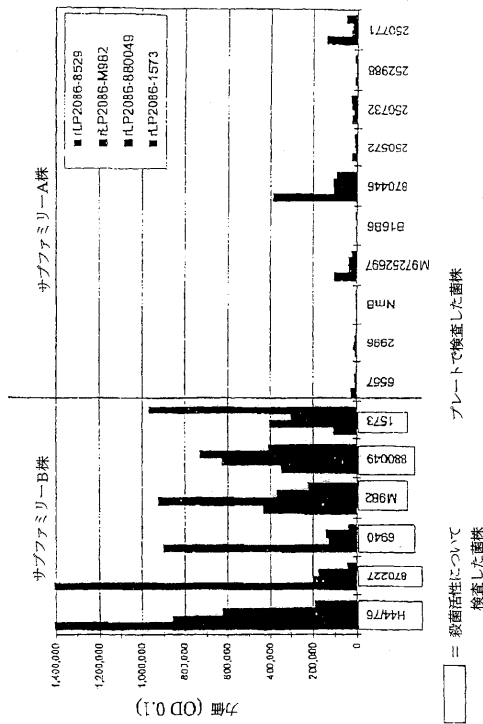
【図 9 - B】

【図 9 B】



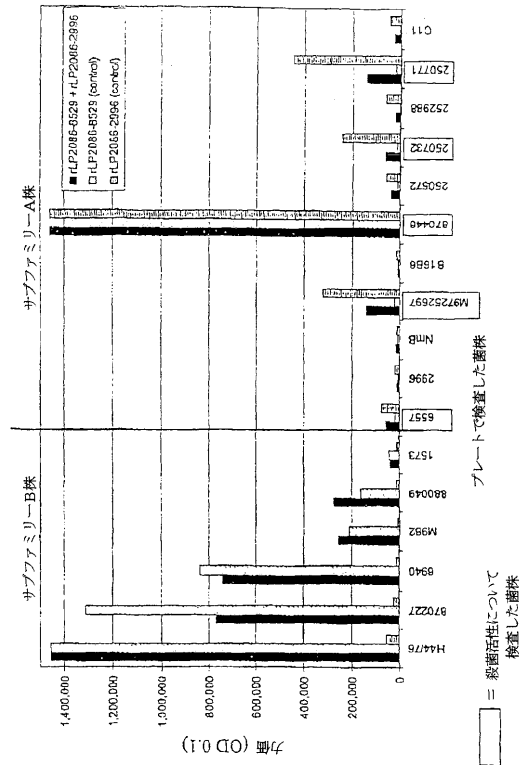
【図 14】

rLP2086サブファミリーB抗血清に関する全細胞ELISAのデータ



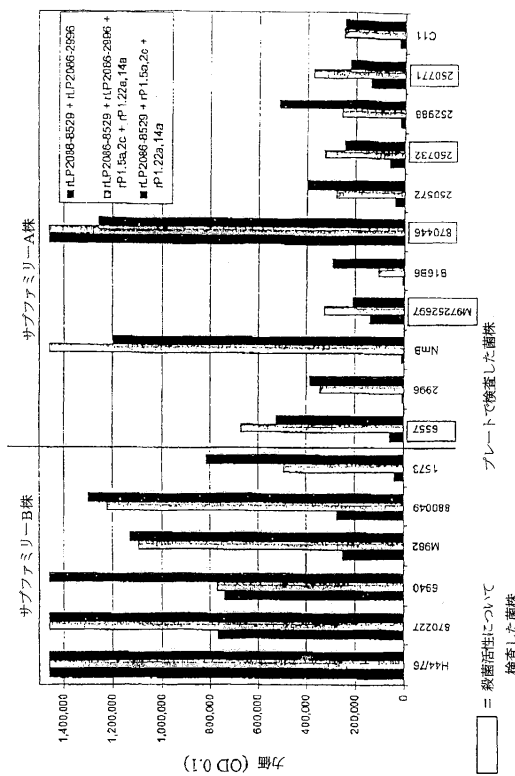
【図 15】

rLP2086を混合することに関する研究-WCE力価



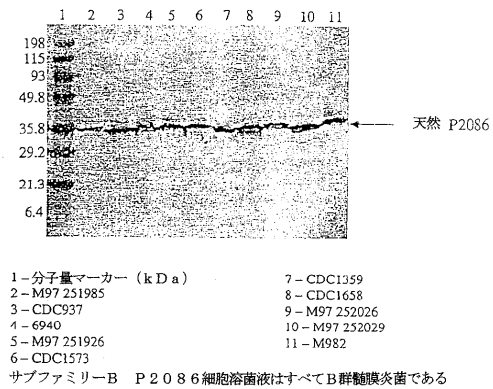
【図 16】

rLP2086/rPorAを混合することに関する研究-WCE力価



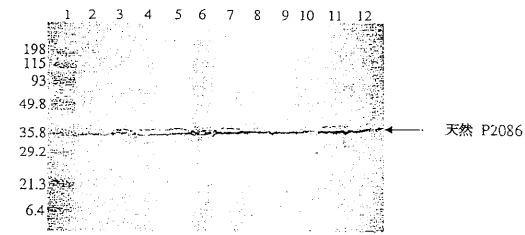
【図 17】

ウェスタンブロットにおける、P2086サブファミリーB髄膜炎菌の全細胞溶解液に対するrLP2086マウス抗血清の反応性



【図 18】

ウェスタンブロットにおける、P2086サブファミリーA髄膜炎菌
および*N. lactamica*の全細胞溶菌液に対する
rLP2086マウス抗血清の反応性



1 - 分子量マーカー (kDa)	
2 - A群髄膜炎菌A4	B群髄膜炎菌
Sut (P2086サブファミリーB)	7 - CDC1034
3 - C群髄膜炎菌-C11	8 - M98 250732
4 - Y群髄膜炎菌-	9 - NmB
ATCC 35561	10 - 6557
5 - W135群髄膜炎菌-	11 - CDC1521
ATCC 35559	12 - M97 252153
6 - <i>N. lactamica</i> - UR5	

【配列表】

0005404441000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I		
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/00	1 0 2
C 1 2 Q	1/68	(2006.01)	C 1 2 Q	1/68	A
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	D
G 0 1 N	33/53	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	N
			G 0 1 N	33/53	D
			G 0 1 N	33/53	M

- (72)発明者 フレッチャー, リー・ディー
アメリカ合衆国ニューヨーク州1 4 4 5 4, ジェニシオ, セカンド・ストリート 3 7
- (72)発明者 ファーリー, ジョン
アメリカ合衆国ニューヨーク州1 4 6 1 8, ロチェスター, エヴァンデル・ロード 4 9
- (72)発明者 バーンフィールド, リーセル・エイ
アメリカ合衆国ニューヨーク州1 4 6 1 9, ロチェスター, サーストン・ロード 7 8 9
- (72)発明者 ザガースキー, ロバート・ジェイ
アメリカ合衆国ニューヨーク州1 4 5 6 4, ヴィクター, フォックス・ハント・ドライブ 5 6 9
- (72)発明者 メットカーフ, ベンジャミン・ジェイ
アメリカ合衆国ニューヨーク州1 4 6 1 8, ロチェスター, レンセラー・ドライブ 1 5

審査官 高山 敏充

- (56)参考文献 国際公開第9 9 / 0 5 7 2 8 0 (WO, A1)
Science, 2 0 0 0年, Vol. 287, pp.1816-1820

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
UniProt/GeneSeq
PubMed
JSTPlus/JMEDPlus (JDreamIII)
Caplus/REGISTRY/MEDLINE/WPIDS/BIOSIS (STN)

专利名称(译)	用于预防和治疗脑膜炎球菌疾病的新型免疫原性组合物		
公开(公告)号	JP5404441B2	公开(公告)日	2014-01-29
申请号	JP2010007996	申请日	2010-01-18
[标]申请(专利权)人(译)	惠氏公司 惠氏控股		
申请(专利权)人(译)	惠氏控股公司		
当前申请(专利权)人(译)	惠氏控股公司		
[标]发明人	ズロトニックゲーリーダブリュー フレッチャーリーディー ファーリージョン バーンフィールドリーセルエイ ザガースキーロバートジェイ メットカーフベンジャミンジェイ		
发明人	ズロトニック,ゲーリー,ダブリュー フレッチャー,リー,ディー ファーリー,ジョン バーンフィールド,リーセル,エイ ザガースキー,ロバート,ジェイ メットカーフ,ベンジャミン,ジェイ		
IPC分类号	C12N15/09 C07K14/22 A61K39/095 A61P31/04 A61K39/39 C12N5/10 C12Q1/68 A61K39/395 G01N33/53 A61K39/00 A61P25/00 A61P37/04 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21		
CPC分类号	A61K39/095 A61K2039/523 A61K2039/55505 A61K39/00 A61K2039/505 A61K2039/53 A61K2039/55572 A61K2039/55577 A61K2039/58 A61P25/00 A61P31/04 A61P37/04 A61K47/543 A61K47/646 C07K14/22 C07K16/1217 C12N9/2417 C12N9/2465 C12N9/2471 G01N33/56911 G01N2333/22 Y10S530/825 A61K39/39 A61K2039/54 A61K2039/6087		
FI分类号	C12N15/00.ZNAA C07K14/22 A61K39/095 A61P31/04 A61K39/39 C12N5/00.102 C12Q1/68.A A61K39/395.D A61K39/395.N G01N33/53.D G01N33/53.M A61K39/00.H C07K16/12 C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12N15/13 C12N15/31 C12N15/63.Z C12N5/10		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA13 4B024/BA31 4B024/BA50 4B024/CA03 4B024/CA04 4B024/DA02 4B024/DA05 4B024/DA06 4B024/EA02 4B024/EA03 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA12 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ42 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS34 4B065/AA01Y 4B065/AA26X 4B065/AA90X 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C085/AA03 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BA16 4C085/BB13 4C085/BB23 4C085/CC07 4C085/CC21 4C085/CC23 4C085/DD62 4C085/EE06 4C085/GG03 4C085/GG04 4H045/AA11 4H045/BA10 4H045/CA11 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA52 4H045/FA72 4H045/FA74		
代理人(译)	四本 能尚		
审查员(译)	高山俊光		
优先权	60/328101 2001-10-11 US 60/406934 2002-08-30 US		
其他公开文献	JP2010162023A5 JP2010162023A		

摘要(译)

(经修改) 要解决的问题：提供Neisseria属ORF 2086蛋白的分离及其使用方法。 通过交叉反应性免疫原性抗原从奈瑟氏球菌菌株中分离出一种对受试者中的脑膜炎奈瑟氏球菌血清群B的感染提供免疫原性的蛋白质。可以重组产生的其他免疫原性部分，它们的生物学等价物，免疫特异性结合上述物质的抗体，以及编码上述物质的核酸序列，以及脑膜炎奈瑟氏球菌。该物质可用于有效抵抗血清群B感染的免疫原性组合物中。 【选择图】无

ストリン ジェンシー の条件	ポリヌクレオチド ハイブリッド	ハイブリッドの 長さ (b p) ¹	ハイブリダイゼーション 温度および バッファ ^H	洗浄 温度および バッファ ^H
A	DNA:DNA	> 50	65EC; 1xSSC -or- 42EC; 1xSSC, 50% ホルムアミド	65EC; 0.3xSSC
B	DNA:DNA	< 50	T _B ; 1xSSC	T _B ; 1xSSC
C	DNA:RNA	> 50	67EC; 1xSSC -or- 45EC; 1xSSC, 50% ホルムアミド	67EC; 0.3xSSC
D	DNA:RNA	< 50	T _D ; 1xSSC	T _D ; 1xSSC
E	RNA:RNA	> 50	70EC; 1xSSC -or- 50EC; 1xSSC, 50% ホルムアミド	70EC; 0.3xSSC
F	RNA:RNA	< 50	T _F ; 1xSSC	T _F ; 1xSSC
G	DNA:DNA	> 50	65EC; 4xSSC -or- 42EC; 4xSSC, 50% ホルムアミド	65EC; 1xSSC
H	DNA:DNA	< 50	T _H ; 4xSSC	T _H ; 4xSSC
I	DNA:RNA	> 50	67EC; 4xSSC -or- 45EC; 4xSSC, 50% ホルムアミド	67EC; 1xSSC
J	DNA:RNA	< 50	T _J ; 4xSSC	T _J ; 4xSSC
K	RNA:RNA	> 50	70EC; 4xSSC -or- 50EC; 4xSSC, 50% ホルムアミド	67EC; 1xSSC
L	RNA:RNA	< 50	T _L ; 2xSSC	T _L ; 2xSSC
M	DNA:DNA	> 50	50EC; 4xSSC -or- 40EC; 6xSSC, 50% ホルムアミド	50EC; 2xSSC
N	DNA:DNA	< 50	T _N ; 6xSSC	T _N ; 6xSSC
O	DNA:RNA	> 50	55EC; 4xSSC -or- 42EC; 6xSSC, 50% ホルムアミド	55EC; 2xSSC
P	DNA:RNA	< 50	T _P ; 6xSSC	T _P ; 6xSSC
Q	RNA:RNA	> 50	60EC; 4xSSC -or- 45EC; 6xSSC, 50% ホルムアミド	60EC; 2xSSC
R	RNA:RNA	< 50	T _R ; 4xSSC	T _R ; 4xSSC