

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2013-541322

(P2013-541322A)

(43) 公表日 平成25年11月14日 (2013. 11. 14)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	4 B O 6 3
C 1 2 P 21/02 (2006.01)	C 1 2 P 21/02 C	4 B O 6 4
C O 7 K 14/22 (2006.01)	C O 7 K 14/22	4 B O 6 5
C O 7 K 16/12 (2006.01)	C O 7 K 16/12	4 C O 8 4
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 50 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2013-520932 (P2013-520932)	(71) 出願人	509075181
(86) (22) 出願日	平成23年8月1日 (2011. 8. 1)		グリフィス・ユニバーシティ
(85) 翻訳文提出日	平成25年2月28日 (2013. 2. 28)		G R I F F I T H U N I V E R S I T Y
(86) 国際出願番号	PCT/AU2011/000971		オーストラリア4111クイーンズランド
(87) 国際公開番号	W02012/012851		州ネーサン、ケッセルズ・ロード170番
(87) 国際公開日	平成24年2月2日 (2012. 2. 2)	(74) 代理人	100068755
(31) 優先権主張番号	2010903418		弁理士 恩田 博宣
(32) 優先日	平成22年7月30日 (2010. 7. 30)	(74) 代理人	100105957
(33) 優先権主張国	オーストラリア (AU)		弁理士 恩田 誠
		(74) 代理人	100142907
			弁理士 本田 淳
		(72) 発明者	ジェニングズ、マイケル ポール
			オーストラリア国 4179 クイーンズ
			ランド州 マンリー ブリタニア ストリ
			ート 35
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 組換え髄膜炎菌 (ナイセリア・メニンギティディス) P o r A ポーリンタンパク質

(57) 【要約】

保存領域全体または保存領域アミノ酸の挿入により作出された1つ以上の中断された可変領域を有する髄膜炎菌 (ナイセリア・メニンギティディス) P o r A 構築物が提供される。P o r A の高免疫原性の可変領域は、広範囲の保護的でない株特異的免疫応答の誘発を担うので、可変領域の中断は、免疫応答を保存領域エピトープに対して指向させ、より広いスペクトルの髄膜炎菌 (N . メニンギティディス) 株に対して有効に免疫化する。コーディング核酸、遺伝子構築物、P o r A 構築物を発現する宿主細胞ならびに髄膜炎菌 (ナイセリア・メニンギティディス) 感染を検出および治療するための組成物、キットおよび方法も提供される。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

髄膜炎菌（ナイセリア・メニンギティディス）の P o r A タンパク質のアミノ酸配列を含む単離タンパク質であって、前記 P o r A タンパク質の 1 つ以上の可変領域が、1 つ以上の P o r A 保存領域、または 1 個以上の保存領域アミノ酸を含むことにより中断されている単離タンパク質。

【請求項 2】

前記 1 つ以上の可変領域が、V R 1 領域；V R 2 領域；S V R 1 領域；および S V R 2 領域からなる群から選択される、

請求項 1 に記載の単離タンパク質。

10

【請求項 3】

前記 1 つ以上の可変領域が、V R 1 領域；および V R 2 領域からなる群から選択される、

請求項 2 に記載の単離タンパク質。

【請求項 4】

前記 p o r A 保存領域が、ループ 2、ループ 3、ループ 7 またはループ 8 のアミノ酸配列であるか、またはループ 2、ループ 3、ループ 7 またはループ 8 のアミノ酸配列のうちの 1 つ以上を含む、

請求項 1 に記載の単離タンパク質。

【請求項 5】

前記 1 つ以上の可変領域、または前記 1 つ以上の可変領域の 1 個以上のアミノ酸が不存在である、

請求項 1 ～ 4 のいずれか一項に記載の単離タンパク質。

20

【請求項 6】

前記 1 つ以上の可変領域が、その領域に挿入された 1 つ以上の P o r A 保存領域、または 1 個以上の保存領域アミノ酸を含む、

請求項 1 ～ 4 のいずれか一項に記載の単離タンパク質。

【請求項 7】

配列番号 5 ～ 2 2 のいずれか 1 つに記載のアミノ酸配列を含む、

請求項 1 ～ 6 のいずれか一項に記載の単離タンパク質。

30

【請求項 8】

配列番号 1 1 ～ 2 2 のいずれか 1 つに記載のアミノ酸配列を含む、

請求項 1 ～ 7 のいずれか一項に記載の単離タンパク質。

【請求項 9】

請求項 1 ～ 8 のいずれか一項に記載の単離タンパク質と少なくとも 8 0 % の配列同一性を有する、その変異体である単離タンパク質であって、野生型 P o r A タンパク質でない単離タンパク質。

【請求項 1 0】

請求項 1 ～ 9 のいずれか一項に記載の単離タンパク質の誘導体である単離タンパク質。

【請求項 1 1】

請求項 1 ～ 1 0 のいずれか一項に記載の単離タンパク質の少なくとも 2 0 個の連続アミノ酸を含む断片であるか、またはその断片を含む単離タンパク質。

40

【請求項 1 2】

対応する野生型 P o r A タンパク質により誘発されるよりも株特異的でない免疫応答を誘発し得る、

請求項 1 ～ 1 1 のいずれか一項に記載の単離タンパク質。

【請求項 1 3】

前記免疫応答が、髄膜炎菌（N . メニンギティディス）の複数の株に対する保護を提供する、

請求項 1 2 に記載の単離タンパク質。

50

【請求項 14】

請求項 1 ~ 13 のいずれか一項に記載の単離タンパク質を含む外膜タンパク質小胞（OMV）。

【請求項 15】

請求項 1 ~ 13 のいずれか一項に記載の単離タンパク質をコードする単離核酸。

【請求項 16】

配列番号 26 ~ 43 のいずれか 1 つに記載のヌクレオチド配列を含む、
請求項 15 に記載の単離核酸。

【請求項 17】

配列番号 32 ~ 43 のいずれか 1 つに記載のヌクレオチド配列を含む、
請求項 15 に記載の単離核酸。

10

【請求項 18】

請求項 15 ~ 17 のいずれか一項に記載のヌクレオチド配列と少なくとも 80 % の同一性のヌクレオチド配列を含む単離核酸。

【請求項 19】

請求項 15 ~ 18 のいずれか一項に記載の単離核酸；および 1 つ以上の付加ヌクレオチド配列を含む遺伝子構築物。

【請求項 20】

請求項 19 に記載の遺伝子構築物を含む宿主細胞。

【請求項 21】

細菌である、
請求項 20 に記載の宿主細胞。

20

【請求項 22】

髄膜炎菌（N．メニンギティディス）である、
請求項 21 に記載の宿主細胞。

【請求項 23】

組換えタンパク質を産生する方法であって、
（i）請求項 20 ~ 22 のいずれか一項に記載の宿主細胞を、前記組換えタンパク質が前記宿主細胞中で発現されるように培養する工程；および
（ii）前記組換えタンパク質を単離する工程
を含む方法。

30

【請求項 24】

請求項 1 ~ 13 のいずれか一項に記載の単離タンパク質に結合し、またはその単離タンパク質に対して生成された抗体または抗体断片。

【請求項 25】

哺乳動物において髄膜炎菌（N．メニンギティディス）を検出する方法であって、
（i）請求項 24 に記載の抗体または抗体断片を、哺乳動物から得られた生体試料と合わせる工程；および
（ii）前記試料中における、前記抗体または抗体断片と髄膜炎菌（N．メニンギティディス）または PorA タンパク質とを含む複合体の存在または不存在を決定する工程
を含み、前記複合体の存在が前記髄膜炎菌（N．メニンギティディス）を示す方法。

40

【請求項 26】

髄膜炎菌（N．メニンギティディス）PorA タンパク質に対する抗体を検出する方法であって、
（i）哺乳動物から得られた生体試料を、請求項 1 ~ 13 のいずれか一項に記載の単離タンパク質と接触させる工程；および
（ii）前記試料中の前記単離タンパク質および髄膜炎菌（N．メニンギティディス）PorA 抗体を含む複合体の存在または不存在を決定する工程
を含む方法。

【請求項 27】

50

髄膜炎菌（*N. メニンギティディス*）に対する殺菌性抗体を検出する方法であって、
（*i*）請求項 1 ～ 13 のいずれか一項に記載の単離タンパク質により免疫化された哺乳動物から得られた生体試料を、髄膜炎菌（*N. メニンギティディス*）と接触させる工程；および

（*ii*）前記試料中の前記殺菌性抗体の存在または不存在を決定する工程を含む方法。

【請求項 28】

髄膜炎菌（*N. メニンギティディス*）を検出する方法であって、請求項 15 ～ 18 のいずれか一項に記載の単離核酸を使用して、哺乳動物から得られた生体試料中の前記髄膜炎菌（*N. メニンギティディス*）の存在を示す核酸配列を検出する工程を含む方法。

10

【請求項 29】

前記生体試料がヒトから得られる、
請求項 26 ～ 28 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 30】

髄膜炎菌（*N. メニンギティディス*）感染を検出するためのキットであって、請求項 1 ～ 13 のいずれか一項に記載の単離タンパク質；請求項 15 ～ 18 のいずれか一項に記載の単離核酸；および／または請求項 24 に記載の抗体もしくは抗体断片；ならびに場合により 1 つ以上の他の試薬を含むキット。

【請求項 31】

請求項 1 ～ 13 のいずれか一項に記載の単離タンパク質；請求項 14 に記載の外膜小胞（*OMV*）；請求項 15 ～ 18 のいずれか一項に記載の単離核酸；請求項 19 に記載の遺伝子構築物；請求項 20 ～ 22 のいずれか一項に記載の宿主細胞；請求項 24 に記載の抗体または抗体断片；および薬学的に許容可能な担体、希釈剤または賦形剤を含む医薬組成物。

20

【請求項 32】

ワクチンである、
請求項 31 に記載の医薬組成物。

【請求項 33】

外膜タンパク質小胞（*OMV*）中の単離タンパク質を含む、
請求項 31 または 32 に記載の医薬組成物。

30

【請求項 34】

染色体に組み込まれた遺伝子構築物を含む細菌を含む、
請求項 32 または 33 に記載の医薬組成物。

【請求項 35】

前記細菌が、髄膜炎菌（*ナイセリア・メニンギティディス*）である、
請求項 34 に記載の医薬組成物。

【請求項 36】

哺乳動物において髄膜炎菌（*N. メニンギティディス*）感染を予防または治療する方法であって、請求項 1 ～ 13 のいずれか一項に記載の単離タンパク質；請求項 14 に記載の外膜小胞；請求項 15 ～ 18 のいずれか一項に記載の単離核酸；請求項 19 に記載の遺伝子構築物；請求項 20 ～ 22 のいずれか一項に記載の宿主細胞；請求項 24 に記載の抗体もしくは抗体断片；および／または請求項 31 ～ 35 のいずれか一項に記載の医薬組成物を哺乳動物に投与し、それにより前記哺乳動物において前記髄膜炎菌（*N. メニンギティディス*）感染を予防または治療する工程を含む方法。

40

【請求項 37】

前記宿主細胞が、染色体に組み込まれた遺伝子構築物を含む細菌である、
請求項 36 に記載の方法。

【請求項 38】

前記細菌が、髄膜炎菌（*ナイセリア・メニンギティディス*）である、
請求項 37 に記載の方法。

50

【請求項 39】

前記単離タンパク質が、外膜タンパク質小胞 (OMV) 中に存在する、
請求項 36 に記載の方法。

【請求項 40】

前記哺乳動物が、ヒトである、
請求項 36 ~ 39 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 41】

哺乳動物における髄膜炎菌 (N. メニンギティディス) 感染の予防または治療において
使用される、請求項 1 ~ 13 のいずれか一項に記載の単離；請求項 14 に記載の外膜小胞
；請求項 15 ~ 18 のいずれか一項に記載の単離核酸；請求項 19 に記載の遺伝子構築物
；請求項 20 ~ 22 のいずれか一項に記載の宿主細胞；請求項 24 に記載の抗体または抗
体断片。

10

【請求項 42】

染色体に組み込まれた遺伝子構築物を含む細菌である、
請求項 41 に記載の使用される宿主細胞。

【請求項 43】

前記細菌が、髄膜炎菌 (ナイセリア・メニンギティディス) である、
請求項 42 に記載の使用される宿主細胞。

【請求項 44】

外膜タンパク質小胞 (OMV) 中に存在する、
請求項 31 に記載の使用される単離タンパク質。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、髄膜炎菌 (ナイセリア・メニンギティディス (Neisseria meningitidis)) の PorA タンパク質の改変形態を構成する新規タンパク質、そのようなタンパク質をコードする核酸、ならびに治療および予防方法、組成物、特にワクチンにおけるそれらの使用に関する。さらに特定すると、PorA の表面ループ中の非保存アミノ酸を中断することにより、本発明は、対応する野生型 PorA タンパク質から予期されるよりも広いスペクトルの髄膜炎菌 (N. メニンギティディス (N. meningitidis)) 株に対して有効に免疫化するワクチンにおいて有用であり得るタンパク質およびコーディング核酸を提供する。

30

【背景技術】

【0002】

髄膜炎菌 (ナイセリア・メニンギティディス (Neisseria meningitidis)) はグラム陰性細菌であり、髄膜炎菌性髄膜炎および敗血症の原因因子である。その唯一の公知の宿主はヒトであり、人口の約 10 % により無症状で保有され得る (非特許文献 1)。

【0003】

髄膜炎菌 (N. メニンギティディス (N. meningitidis)) は、多糖莢膜を発現し得、このことにより、発現される莢膜の性質による細菌の分類が可能となる。髄膜炎菌 (N. メニンギティディス) の少なくとも 12 の血清学的グループ：A、B、C、29-E、H、I、K、L、W135、X、Y および Z が存在し、そのうち血清学的グループ A、B、および C は、髄膜炎菌性疾患の 90 % を引き起こす (非特許文献 2)。血清学的グループ A および C に対して指向されたワクチンが利用可能であるが、血清学的グループ B 莢膜多糖は、免疫原性が不十分であり、ヒトにおける保護を誘導しない。

40

【0004】

したがって、他の膜および細胞外構成成分がワクチン中の包含についてのそれらの好適性について試験されている。例には、クラス 1、2 および 3 (ポーリン；por 遺伝子によりコードされる) ならびにクラス 4 (Rmp) および 5 (不透明 (Opacity) タ

50

ンパク質；opaおよびopc遺伝子によりコードされる）の外膜タンパク質が含まれる。しかしながら、髄膜炎菌（N．メニンギティディス）は、抗原性および相可変性により免疫応答を回避するのに極めて有効である。例えば、Opcタンパク質は、その発現が相可変性（非特許文献3）であるにもかかわらず、経路変更（高免疫原性移動標的、特にPorAに対する免疫応答の発生）により高度に免疫原性（非特許文献4）であるアドヘシン／インベysin（非特許文献5）である。

【0005】

PorAは株間で非常に多様性が高く、患者および無症状保有者の両方で免疫応答を、それが株同定のためのマーカーとして使用される程度に発生させ、そのことは血清型系を表す（非特許文献6）。PorAは重要な抗原であり、これまでの有効で登録されたワクチン配合物中で使用されており、有効な殺菌性抗体を誘発するための理想的な抗原とみなされる。しかしながら、表面ループの株間多様性は多様性標的をもたらし、ワクチンは、典型的にはPorA型特異的である。最大6つの異なるPorA型をカバーする多価PorAワクチンを発生させるための試みがなされている（非特許文献7）が、この標的は、過剰に多様性があると判断されており、近年のワクチン開発は主としてその理由のためにこの抗原から遠ざかっている。

【0006】

PorAモノマーポロジの現行モデルは、8つの細胞外ループを示す（非特許文献8）；（非特許文献9）。最長ループ（1および4）は最も多様性が高く、したがって可変領域1（VR1）および可変領域2（VR2）と称される。ループ5および6においては多様性が低く（それぞれ、半変異SVR1および2）、残りのループにおいては本質的には多様性が見られない。ループ3は、PorAトリマーのそれぞれのサブユニットにより形成される細孔中で「プラグ」を形成すると予測される。VR1およびVR2内でさえ、多様性のほとんどは、それぞれのループのチップを形成することが予測される残基に制限される。実際、マウスおよび免疫化ヒト被験者の両方で、エピトープマッピングは、抗体応答の大多数が、株間で多様性の高い領域ループ1および4の「頂部」に指向されることを示し（非特許文献10）、抗PorA応答の株特異性が推定的に説明される。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0007】

- 【非特許文献1】カウガント（Caugant）ら，1994，J．Clin．Microbiol．32 323
- 【非特許文献2】プールマン（Poolman）ら，1995，Infect．Agents and Dis．4 13
- 【非特許文献3】サルカリ（Sarkari）ら，1994，Mol Microbiol．13 207 - 17
- 【非特許文献4】ヴィエルス（Wieretz）ら，1996，Infect Immun．64 298 - 304
- 【非特許文献5】ヴァージ（Virji）ら，1995，Mol Microbiol．18 741 - 54
- 【非特許文献6】マクギネス（McGuinness）ら，1990，J Exp Med．171 1871 - 82
- 【非特許文献7】ヴァンデルフォールト（van der Voort）ら，1996，Infect Immun．64 2745 - 51
- 【非特許文献8】デリック（Derrick）ら，1999，Infect．Immun．67 2406 - 13
- 【非特許文献9】ヴァンデルレイ（van der Ley）ら，1991，Infect．Immun．59 2963
- 【非特許文献10】ヴァンデルフォールト（van der Voort）ら，1997，FEMS Immunol．Med．Microbiol．17 139 - 48

10

20

30

40

50

【図面の簡単な説明】

【0008】

【図1】本発明の単離タンパク質の実施形態と比較した野生型 PorA のアミノ酸配列の一覧を示す図。太字下線は、van der Ley モデルループ (van der Ley ら, 1991, Infect. Immun. 59:2963) を示す。イタリックは VR1 および VR2 を示す。- はアラインメントを達成するための空間の挿入を示す。野生型 MC58 株 PorA アミノ酸配列 (配列番号1); pPorDELL1 (配列番号2); pPorDELL4 (配列番号3); pPorDELL1-4 (配列番号4); pPorDELL1-4-5 (配列番号5); pDELVR1 (配列番号6); pDELVR2 (配列番号7); pDELVR1-2 (配列番号8); pDELVR1-2-5 (配列番号9); pDELVR1-2-5-6 (配列番号10); pVR2-7 (配列番号11); pVR2-8 (配列番号12); pΔVR1VR2-7 (配列番号13); pΔVR1VR2-8 (配列番号14); pVR1-7VR2-8 (配列番号15); pVR1-7VR2-8Δ5 (配列番号16); pPOR7in1; (配列番号17); pPor8in4 (配列番号18) および pPOR7in1、8in4 (配列番号19)。

10

【図2A-1】本発明の単離タンパク質の実施形態のアミノ酸配列 (配列番号2~18; 図1参照) および以下のコーディングヌクレオチド配列を示す図: pPorΔL1 (配列番号23); pPorΔL4 (配列番号24)。

【図2A-2】本発明の単離タンパク質の実施形態のアミノ酸配列 (配列番号2~18; 図1参照) および以下のコーディングヌクレオチド配列を示す図: pPorΔL1-4 (配列番号25); pPorDELL1-4-5 (配列番号26)。

20

【図2A-3】本発明の単離タンパク質の実施形態のアミノ酸配列 (配列番号2~18; 図1参照) および以下のコーディングヌクレオチド配列を示す図: pDELVR1 (配列番号27); pDELVR2 (配列番号28)。

【図2A-4】本発明の単離タンパク質の実施形態のアミノ酸配列 (配列番号2~18; 図1参照) および以下のコーディングヌクレオチド配列を示す図: pDELVR1-2 (配列番号29); pDELVR1-2-5 (配列番号30)。

【図2A-5】本発明の単離タンパク質の実施形態のアミノ酸配列 (配列番号2~18; 図1参照) および以下のコーディングヌクレオチド配列を示す図: pVR2-7 (配列番号32); pVR2-8 (配列番号33)。

30

【図2A-6】本発明の単離タンパク質の実施形態のアミノ酸配列 (配列番号2~18; 図1参照) および以下のコーディングヌクレオチド配列を示す図: pΔVR1VR2-7 (配列番号34); pΔVR1VR2-8 (配列番号35)。

【図2A-7】本発明の単離タンパク質の実施形態のアミノ酸配列 (配列番号2~18; 図1参照) および以下のコーディングヌクレオチド配列を示す図: pVR1-7VR2-8 (配列番号36); pVR1-7VR2-8Δ5 (配列番号37)。

【図2A-8】本発明の単離タンパク質の実施形態のアミノ酸配列 (配列番号2~18; 図1参照) および以下のコーディングヌクレオチド配列を示す図: pVR1-7VR2-8Δ5 (配列番号37); pDELVR1-2-5-6 (配列番号31); pPOR7in1 (配列番号38)。

40

【図2A-9】本発明の単離タンパク質の実施形態のアミノ酸配列 (配列番号2~18; 図1参照) および以下のコーディングヌクレオチド配列を示す図: pPOR7in1 (配列番号38); pPor8in4 (配列番号39)。

【図2A-10】本発明の単離タンパク質の実施形態のアミノ酸配列 (配列番号2~18; 図1参照) および以下のコーディングヌクレオチド配列を示す図: pPOR7in1-8in4 (配列番号40)。野生型 MC58 株 porA ヌクレオチド配列も提供される (配列番号44)。

【図2B-1】VR1 および / または VR2 領域が欠失され、保存ループ7またはループ8アミノ酸により置き換えられた本発明の単離タンパク質のさらなる実施形態のアミノ酸配列およびコーディング核酸を示す図。AA配列 pVR1-7VR2-7 (配列番号20)

50

); VR18VR28 (配列番号21); DNA配列pVR1-7VR2-7 (配列番号41); DNA配列pVR1-8VR2-8 (配列番号42)。

【図2B-2】VR1および/またはVR2領域が欠失され、保存ループ7またはループ8アミノ酸により置き換えられた本発明の単離タンパク質のさらなる実施形態のアミノ酸配列およびコーティング核酸を示す図。AA配列pVR1-8VR2-7 (配列番号22); およびDNA配列pVR1-8VR2-7 (配列番号43)。

【図3A】MC58ならびにVR1、VR2、SVR1およびSVR2の1つ以上における異なる配列を有する2つの他のPorA野生型の部分アミノ酸配列の一覧を示す図 (配列番号85~87)。太字下線は、MC58 PorAのvan der Leyモデル (非特許文献9) ループを示す。イタリックはMC58 PorAのVR1およびVR2を示す。- はアラインメントを達成するための空間の挿入を示す。アラインメント下部の* は3つ全ての配列における同一残基を示し、点は配列間の保存アミノ酸を示す。

【図3B】株MC58、BZ133、BZ232、および400からのPorA配列のアラインメントならびにコンセンサスを示す (配列番号1および88~90)。ループ1、4、5、6、7、および8を強調し、それらは非特許文献9、または非特許文献8のモデルにより記載されるものである。アラインメントにおいて、. はMC58 PorAと同一の配列を示し、- は配列アラインメントにおけるギャップを示す。コンセンサスにおいて、* はそれらの配列の全てにおいて保存されたアミノ酸を示す。: は保存残基を示す。.
. は半保存残基を示す。

【図4】PorAタンパク質構築物のウエスタンブロッティング検出を示す図。髄膜炎菌 (N. meningitidis) のデオキシコレートOMVをプレキャスト8~12% Novex (登録商標) ポリアクリルアミドゲル上で分離し、クーマシーブルーにより染色し (左写真)、またはウエスタンブロットした (右写真)。抗PorAポリクローナル抗体 (サンタクルーズ・バイオテクノロジー社 (Santa-Cruz Biotechnology Inc.)) を使用してPorAを検出した。レーン1: 分子量マーカ (見かけのサイズをkDaで左側に示した)。レーン2: ϕ 9 OMV、レーン3: 9-Fix OMV、レーン4: 9-1 OMV、レーン5: 1728-2 OMV、レーン6: 027-3、レーン7: 028-10 OMV、レーン8: 145-5 OMV。株を表5に記載する。

【図5】porAタンパク質構築物のウエスタンブロッティング検出を示す図。異なるPorA血清型型の4つの株およびそれらのアイソジェニックporA::tet変異体からのサルコシル (登録商標) 抽出により膜タンパク質を調製し、電気泳動により分離してクーマシー染色 (上部写真) またはウエスタン免疫ブロッティング (下部写真) を行った。ウエスタンブロットにおけるタンパク質を、株1728-2からのデオキシコレートOMVによりワクチン接種された10匹のマウスからのプール血清により検出した。

【図6】組換えPorA構築物を発現する株由来のOMVによりワクチン接種されたマウスの血清のELISA分析: ヘテロロガスなPorAの表面エピトープに対する交差反応性の検出を示す図。幾何平均力価データ (3重ウェルから) の逆数を実験1 (A) および実験2 (B) について示す。

【発明を実施するための形態】

【0009】

本発明者らは、PorAの高免疫原性の表面ループが、髄膜炎菌 (N. メニンギティディス) の特定株由来のPorAタンパク質を包含するワクチンがその特定株に対して優先的に免疫化する傾向があるといったように、広範囲の保護ではない株特異的免疫応答の誘発を担うことを発見した。結果として、本発明者らは、野生型PorAにより誘発されるほど株特異的でない免疫応答を誘発するPorAタンパク質を産生することを追求した。免疫応答を主として保存エピトープに対して指向することにより、単離タンパク質を含むワクチンは、野生型PorAによる免疫化後に予期されるよりも広いスペクトルの髄膜炎菌 (N. メニンギティディス) 株に対して有効に免疫化するはずである。

【0010】

第1の態様において、本発明は、髄膜炎菌 (*Neisseria meningitidis*) の PorA タンパク質のアミノ酸配列を含む単離タンパク質であって、前記 PorA タンパク質の可変領域の1個以上のアミノ酸が中断されている単離タンパク質を提供する。

【0011】

好適には、前記 PorA タンパク質の可変領域の1個以上のアミノ酸が、1つ以上の PorA 保存領域、または1個以上の保存領域アミノ酸を含むことにより中断されている (例えば、野生型 PorA タンパク質と比較して)。好ましくは、保存領域は、保存ループ2、保存ループ3、保存ループ7および/または保存ループ8のアミノ酸配列であり、またはそのアミノ酸配列を含む。

10

【0012】

好適には、可変領域は、VR1; VR2; SVR1; および SVR2 領域からなる群から選択される。

好ましくは、可変領域は、VR1; および VR2 領域からなる群から選択される。

【0013】

可変領域および保存領域は、同一または異なる PorA タンパク質のもの、そのタンパク質由来であり、またはそのタンパク質起源であり得る。

好適には、本発明の単離タンパク質は、免疫応答を誘発し得る。

【0014】

好ましくは、免疫応答は、対応する野生型 PorA タンパク質により誘発されるよりも株特異的でない。

20

より好ましくは、前記免疫応答は、髄膜炎菌 (*N. meningitidis*) の1つ以上の株、またはよりいっそう好ましくは、髄膜炎菌 (*N. meningitidis*) の複数の株に対する保護を提供する。

【0015】

この態様の単離タンパク質の特定の実施形態は、この態様の単離タンパク質の具体例に提供され、図1および2に提供される (配列番号11~22)。好ましくは、単離タンパク質は、配列番号11~22のいずれか1つに記載のアミノ酸配列を含む。

【0016】

好ましくは、単離タンパク質の中断された可変領域は、VR1および/またはVR2領域の欠失 (例えば配列番号2~4に記載のもの) からなることはない。

30

第1の態様による本発明は、本発明の単離タンパク質のホモログ、断片、変異体および誘導体を含む。

【0017】

この態様の1つの特定の実施形態において、単離タンパク質は、外膜タンパク質小胞 (OMV) 中に存在する。

第2の態様において、本発明は、第1の態様によるポリペプチドをコードする単離核酸を提供する。

【0018】

この態様の単離核酸の具体例は、図2に提供される (配列番号23~43)。好ましくは、単離核酸は、配列番号23~43のいずれか1つに記載のヌクレオチド配列を含む。

40

第2の態様による本発明は、本発明の単離核酸のホモログ、断片、変異体および誘導体を含む。

【0019】

第3の態様において、本発明は、第2の態様による単離核酸および1つ以上の付加ヌクレオチド配列を含む遺伝子構築物を提供する。

好ましい形態において、遺伝子構築物は、発現ベクターおよび第2の態様による単離核酸を含む発現構築物であって、前記単離核酸が前記発現ベクター中の1つ以上の調節核酸に作動的に連結された発現構築物である。

【0020】

50

第４の態様において、本発明は、第３の態様による遺伝子構築物を含む宿主細胞を提供する。

１つの好ましい実施形態において、宿主細胞は、染色体に組み込まれた発現構築物を含む細菌である。

【００２１】

好ましくは、細菌は髄膜炎菌（*Neisseria meningitidis*）である。

本発明の第５の態様において、第１の態様による組換え単離タンパク質を産生する方法であって、

（ｉ）第３の態様による発現ベクターを含有する宿主細胞を、前記ポリペプチドが前記宿主細胞中で発現されるように培養する工程；および

（ｉｉ）前記組換えポリペプチドを単離する工程を含む方法が提供される。

【００２２】

第６の態様において、本発明は、本発明の単離タンパク質、その断片、変異体または誘導体に結合し、またはそれらに対して生成された抗体または抗体断片を提供する。

第７の態様において、本発明は、髄膜炎菌（*N. meningitidis*）を検出する方法であって、

（ｉ）第６の態様の抗体または抗体断片を、哺乳動物から得られた生体試料と合わせる工程；および

（ｉｉ）前記試料中の前記抗体または抗体断片と髄膜炎菌（*N. meningitidis*）および／または髄膜炎菌（*N. meningitidis*）PorAタンパク質とを含む複合体の存在または不存在を決定する工程

を含み、前記複合体の存在が前記髄膜炎菌（*N. meningitidis*）を示す方法を提供する。

【００２３】

第８の態様において、本発明は、髄膜炎菌（*N. meningitidis*）PorAタンパク質に対する抗体を検出する方法であって、

（ｉ）哺乳動物から得られた生体試料を、第１の態様の単離タンパク質と接触させる工程；および

（ｉｉ）前記試料中の前記単離タンパク質および髄膜炎菌（*N. meningitidis*）PorA抗体を含む複合体の存在または不存在を決定する工程を含む方法を提供する。

【００２４】

第９の態様において、本発明は、髄膜炎菌（*N. meningitidis*）に対する殺菌性抗体を検出する方法であって、

（ｉ）第１の態様の単離タンパク質により免疫化された哺乳動物から得られた生体試料を、髄膜炎菌（*N. meningitidis*）と接触させる工程；および

（ｉｉ）前記試料中の前記殺菌性抗体の存在または不存在を決定する工程を含む方法を提供する。

【００２５】

第１０の態様において、髄膜炎菌（*N. meningitidis*）を検出する方法であって、前記細菌の存在を示す、哺乳動物から得られた生体試料中の第２の態様による核酸配列を検出する工程を含む方法が提供される。

【００２６】

好ましくは、哺乳動物はヒトである。

第１１の態様において、本発明は、髄膜炎菌（*N. meningitidis*）感染を検出するためのキットであって、第１の態様による単離タンパク質；第２の態様による単離核酸；および／または第６の態様の抗体もしくは抗体断片；ならびに場合により１つ以上の他の試薬を含むキットを提供する。

【 0 0 2 7 】

第 1 2 の態様において、本発明は、第 1 の態様による単離タンパク質；第 2 の態様による単離核酸；第 3 の態様による遺伝子構築物；第 4 の態様による宿主細胞；および / または第 6 の態様の抗体もしくは抗体断片；ならびに薬学的に許容可能な担体、希釈剤または賦形剤を含む医薬組成物を提供する。

【 0 0 2 8 】

一実施形態において、医薬組成物は、染色体に組み込まれた発現構築物を含む細菌を含む。

好ましくは、細菌は髄膜炎菌 (*Neisseria meningitidis*) である。

10

【 0 0 2 9 】

別の実施形態において、医薬組成物は、外膜タンパク質小胞 (OMV) 中の単離タンパク質を含む。

好適には、医薬組成物は免疫原性組成物である。

【 0 0 3 0 】

好ましくは、医薬組成物はワクチンである。

第 1 3 の態様において、本発明は、哺乳動物において髄膜炎菌 (*N. meningitidis*) 感染を予防または治療する方法であって、第 1 の態様による単離タンパク質；第 2 の態様による単離核酸；第 3 の態様による遺伝子構築物；第 4 の態様による宿主細胞；第 6 の態様の抗体もしくは抗体断片；および / または第 1 2 の態様による医薬組成物を哺乳動物に投与し、それにより前記哺乳動物において前記髄膜炎菌 (*N. meningitidis*) 感染を予防または治療する工程を含む方法を提供する。

20

【 0 0 3 1 】

一実施形態において、本方法は、染色体に組み込まれた発現構築物を含む細菌を投与する。

好ましくは、細菌は髄膜炎菌 (*Neisseria meningitidis*) である。

【 0 0 3 2 】

別の実施形態において、本方法は、外膜タンパク質小胞 (OMV) 中の単離タンパク質を投与する。

30

好ましくは、上記態様の哺乳動物はヒトである。

【 0 0 3 3 】

本明細書を通して、文脈が特に要求しない限り、「含む (*comprise*)」、「含む (*comprises*)」および「含む (*comprising*)」という語は、指定の整数または整数群を包含することを意味するが、任意の他の整数も整数群も除外しないと理解される。

【 0 0 3 4 】

本発明の中心は、野生型 PorA タンパク質における非保存アミノ酸を含む表面ループを中断することにより、免疫応答が保存エピトープ配列に対して指向され、それにより髄膜炎菌 (*N. meningitidis*) の複数のヘテロロガスな株に対する保護を提供する免疫応答を免疫化時に誘発することができることの発見であることが認識される。

40

【 0 0 3 5 】

一態様において、本発明は、髄膜炎菌 (*Neisseria meningitidis*) の PorA タンパク質のアミノ酸配列を含む単離タンパク質であって、単離 PorA タンパク質が髄膜炎菌 (*Neisseria meningitidis*) の複数の株に対して免疫応答を誘発するように前記 PorA タンパク質の 1 つ以上の可変領域が中断されている単離タンパク質を提供する。好適には、前記 PorA タンパク質の可変領域の 1 個以上のアミノ酸が、1 つ以上の PorA 保存領域、または 1 個以上の保存領域アミノ酸を含むことにより中断されている (例えば、野生型 PorA タンパク質と比較して)。

【 0 0 3 6 】

50

本発明の目的のため、「単離された」は、その天然状態から取り出され、またはそうでなければ人間による操作に供された材料を意味する。単離材料は、その天然状態で通常それに伴う構成成分を実質的にも本質的にも有さないことがあり、または、その天然状態で通常それに伴う構成成分と一緒に人工状態になるように操作されることができる。単離材料は、天然（ネイティブ）または組換え形態であり得る。

【0037】

「タンパク質」は、アミノ酸ポリマーを意味する。アミノ酸は、当該技術分野において十分理解されている天然または非天然アミノ酸であり得る。

「ペプチド」は、60個以下のアミノ酸を有するタンパク質である。

【0038】

ポリペプチドは、60個超のアミノ酸を有するタンパク質である。

これに関連して「中断された」は、本発明の単離タンパク質がPorAタンパク質（膜貫通および/または細胞内アミノ酸配列を含む）のアミノ酸配列を含む一方、1つ以上の可変領域もしくは1個以上の可変領域アミノ酸が少なくとも部分的に、もしくは完全に不存在であり、1個以上の保存領域アミノ酸により置き換えられていることおよび/または1つ以上の可変領域が、可変領域アミノ酸配列に存在し、もしくは挿入された1個以上の保存領域アミノ酸を有することを意味する。

【0039】

好適には、可変領域は、VR1；VR2；SVR1；およびSVR2領域からなる群から選択される。好ましくは、単離タンパク質の中断された可変領域は、VR1および/またはVR2領域の欠失（例えば配列番号2～4に記載のもの）からなることはない。

【0040】

表1は、PorA（例えば、髄膜炎菌（*N. meningitidis*）株MC58の野生型PorAタンパク質のアミノ酸配列により例示される；配列番号1）の表面または細胞外ループ1～8を有する、本明細書に記載の可変領域（すなわち、VR1、VR2、SVR1、SVR2）および本明細書に記載の保存領域のアミノ酸配列の比較を提供する。髄膜炎菌（*N. meningitidis*）の多数の株と血清型との間の可変領域アミノ酸配列の多様性を実証する図3Aおよび3Bも参照される。VR1およびVR2の多様性は、<http://pubmlst.org/neisseria/PorA/vr1.shtml>および<http://pubmlst.org/neisseria/PorA/vr2.shtml>を参照して、ならびにラッセル（Russell）ら、2004, *Emerg Infect Dis*, 10: 674-8に記載のとおり、より詳細に例示される。したがって、本発明は、髄膜炎菌（*N. meningitidis*）のいずれの株または血清型のPorAにも適用可能であることが認識される。

【0041】

本発明の単離タンパク質の具体例は、図1および2に提供される（配列番号5～22、または好ましくは、配列番号11～22）。

上記可変領域の最も多様性が高いものは、VR1およびVR2である。SVR1およびSVR2は半可変領域であり、SVR1はSVR2よりも多くの非保存アミノ酸を含む。したがって、好ましくは、中断された可変領域はVR1および/またはVR2領域である。しかしながら、特定の実施形態において、SVR1は、単独で、または1つ以上の他の可変領域、例えばVR1および/またはVR2に加えて中断されている。

【0042】

図3および表1から明らかであるとおり、特に、ループ1、4、5および6は、一般に、本明細書において参照される可変領域と相関する。しかしながら、VR1は、ループ1の非保存または可変部分配列（例えば、AQAANGGASGQVKVTKVTKA；配列番号45）であること、およびVR2は、ループ4の非保存または可変部分配列（例えばYYTKNTNNNLTLVP；配列番号46）であることが認識される。したがって、本発明の単離タンパク質は、VR1および/またはVR2の中断に加え、VR1およびVR2の一部でないループ1および/または4の1個以上のアミノ酸の中断を有し得る。

【0043】

同様に、本発明の単離タンパク質は、SVR1および/またはSVR2の中断に加え、SVR1およびSVR2の一部でないループ1および/または6の1個以上のアミノ酸の中断を有し得る。

【0044】

SVR1およびSVR2は、クラウドイオ(Claudio)ら, 1998, Clin Diagn. Lab Immunol. 5: 845-855において、アミノ酸247から261(SVR1)および299から302(SVR2)における株MC50(アクセッション番号X12899)のPorA遺伝子に関連して元々定義された。本明細書に参照されるvan der Leyモデルは、LENGDKAKTKNSTTE(配列番号52; 表1参照)を含むループ6を有する。典型的には、排他的ではないが、SVR2領域は、図3Bに示す一覧のそれらの他の残基の一部に見られる多様性に照らして大多数であるが全てではないループ6アミノ酸、例えばENGDKTKN(配列番号91)を含み得る。

10

【0045】

上記から理解されるとおり、1つの広範な実施形態において、1つ以上のPorA可変領域全体は、本発明の単離タンパク質中に不存在であり得、または1つ以上のPorA可変領域の1個または複数のアミノ酸が不存在であり得る。ここで、不存在の可変領域または可変領域アミノ酸は、保存PorAアミノ酸、例えばループ2、3、7および/または8のアミノ酸の1個もしくは複数、または保存ループ全体(例えばループ2、3、7および/または8)により有効に置き換えられる。

20

【0046】

特定の実施形態は、配列番号5~16および20~22に記載のアミノ酸配列を含む。好ましい実施形態は、配列番号11~16および20~22に記載のアミノ酸配列を含む。

【0047】

それぞれのVR1、VR2、SVR1および/またはSVR2領域は、欠失され(例えば配列番号5~10)、保存ループ7または8のアミノ酸により置き換えられる(配列番号11~16および20~22)操作が独立して行われ得ることが認識される。このような操作は、可変領域を欠失させることができる一方、別の可変領域を保存ループ7または8のアミノ酸により置き換えるように組み合わせられることができ(例えば配列番号13および14)、または異なる可変領域がループ7または8のアミノ酸配列により両方置き換えられることができる(例えば配列番号15、16および20~22)。

30

【0048】

例として、複数の可変領域アミノ酸は、VR1、VR2、SVR1およびSVR2を含む任意の可変領域の2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20または25個以上のアミノ酸であり得る。好適には、アミノ酸は連続している。具体例は表2および3ならびに図1に提供される。

【0049】

さらに例として、ループ2、3、7または8の複数の保存アミノ酸は、それらのループのいずれか1つの2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19または20個以上のアミノ酸であり得る。好適には、アミノ酸は連続している。具体例は表2および3ならびに図1に提供される。

40

【0050】

好ましくは、VR1およびVR2は完全に不存在であり、またはVR1もしくはVR2アミノ酸の1個もしくは複数が存在しない。具体的な実施形態において、ループ7アミノ酸はVR1領域全体を置き換え、および/またはループ8アミノ酸はVR2領域全体を置き換える(配列番号11~16)。他の実施形態において、VR1領域は不存在であり、保存ループ8またはループ7アミノ酸配列により置き換えられており、および/またはVR1領域は不存在であり、保存ループ7またはループ8アミノ酸配列により置き換えら

50

れている（配列番号 20 ~ 22）。

【0051】

別の広範な実施形態において、保存アミノ酸（例えばループ 2、3、7 および / または 8 アミノ酸）の 1 個または複数、または保存ループ全体（例えばループ 2、3、7 および / または 8）は、VR1、VR2、SVR1 および SVR2 を含む PorA 可変領域中（またはそうでなければ存在する）に挿入される。好適には、1 つまたは複数の可変領域のアミノ酸が存在し、保存ループアミノ酸が可変領域アミノ酸配列中に存在し、または挿入される。

【0052】

好ましくは、保存ループアミノ酸は、PorA の VR1 および / または VR2 領域中に存在し、または挿入される。特定の実施形態は、配列番号 17 ~ 19 に記載のアミノ酸配列を含む。

10

【0053】

代替的实施形態において、前記 PorA タンパク質の 1 つ以上の可変領域は、1 つ以上の PorA 保存領域も 1 個以上の保存領域アミノ酸も含むことなく中断される（例えば、野生型 PorA タンパク質と比較して）。1 つ以上の PorA 保存領域も 1 個以上の保存領域アミノ酸も挿入されずまたは存在せずに 1 つ以上の可変領域が存在しないこの代替的实施形態の好ましい例は、配列番号 5 ~ 10 に提供される。

【0054】

図 1（配列番号 1）および表 1 が髄膜炎菌（*N. meningitidis*）株 MC58 を指す一方、本発明は髄膜炎菌（*N. meningitidis*）の任意の株に関して実施することができることも理解される。より具体的には、本発明の単離タンパク質は、髄膜炎菌（*N. meningitidis*）の複数の異なる株のアミノ酸配列を含み得る。例にすぎないが、髄膜炎菌（*N. meningitidis*）の 2996（GenBank アクセッション番号 X60105.1）株の PorA の保存アミノ酸を、髄膜炎菌（*N. meningitidis*）の M1336 株（GenBank アクセッション番号 AF70297.1）の PorA に本質的に由来し、または対応するアミノ酸配列を含む PorA タンパク質中に含めることができる。

20

【0055】

PorA タンパク質構築物のまとめは、表 7 に提供される。

30

1 つ以上の可変領域の中断が、単離タンパク質の保存アミノ酸配列の免疫原性の変化、改変またはそうでなければ改善をもたらす（野生型または中断されていない PorA タンパク質と比べて）ことが認識される。好適には、本発明の単離タンパク質は、髄膜炎菌（*Neisseria meningitidis*）の複数の株に対する免疫応答を誘発する。

【0056】

本明細書において使用される「免疫応答を誘発する」は、本発明の単離タンパク質の、それが投与される哺乳動物における免疫応答を産生する能力を指し、応答は髄膜炎菌（*N. meningitidis*）および / または前記タンパク質に指向される。好ましくは、免疫応答は殺菌性抗体の産生を含む。より好ましくは、免疫応答は髄膜炎菌（*N. meningitidis*）感染に対して保護的である。

40

【0057】

好適には、誘発された免疫応答は、野生型 PorA タンパク質および / または 1 つ以上の中断された可変領域を有さない PorA タンパク質により誘発されるよりも株特異的でなく、または交差反応的である。

【0058】

「株特異的」は、オートロガスな髄膜炎菌（*N. meningitidis*）株に指向され、または少なくとも優勢的に指向される免疫応答に関連して本明細書において使用される。

【0059】

50

本明細書において使用される「交差反応的」は、本発明の単離タンパク質の、1つ以上のヘテロロガスな髄膜炎菌 (*N. meningitidis*) 株に指向される免疫応答を誘発する能力を意味する。

【0060】

本明細書において使用される「交差保護的」は、本発明の単離タンパク質の、免疫応答を誘発し、それにより1つ以上のヘテロロガスな髄膜炎菌 (*N. meningitidis*) 株による感染に対する保護を提供する能力を意味する。

【0061】

本発明はまた、例えば、配列番号2~22、または好ましくは配列番号11~22のいずれか1つに記載のアミノ酸配列を含む本発明の単離タンパク質の断片、ホモログおよび誘導体を提供する。

10

【0062】

一実施形態において、タンパク質「断片」は、前記単離タンパク質の100%未満であるが少なくとも20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%または90~99%を構成するアミノ酸配列を含む。

【0063】

別の実施形態において、「断片」は、例えば、少なくとも6個、好ましくは、少なくとも10、12、15個、より好ましくは、少なくとも20または30個のアミノ酸長のペプチドである。

【0064】

好ましい実施形態において、断片は、本明細書に開示の中断された可変領域のアミノ酸配列を含む。好ましくは、断片は、例えば配列番号2~4に記載のVR1および/またはVR2領域の欠失からなるものではない。

20

【0065】

ペプチド断片は、標準的な組換え核酸技術の適用を介して得ることができ、または慣用の液相もしくは固相合成技術を使用して合成することができる。例えば、ニコルソン (*Nicholson*) により編集され、ブラックウェル・サイエンティフィック・パブリケーションズ (*Blackwell Scientific Publications*) により刊行された標題「合成ワクチン (*Synthetic Vaccines*)」の刊行物に含まれるアサートン (*Atherton*) およびシェファード (*Shepherd*) による標題「ペプチド合成 (*Peptide Synthesis*)」の9章に記載の溶液合成または固相合成を例えば参照することができる。あるいは、ペプチドは、プロテアーゼ、例えば *endoLys-C*、*endoArg-C*、*endoGlu-C* およびブドウ球菌 V8 - プロテアーゼによる本発明のポリペプチドの消化により産生することができる。消化断片は、例えば、高速液体クロマトグラフィー (*HPLC*) 技術により精製することができる。

30

【0066】

複数の同一または異なる断片を含むより大きいペプチドおよびポリペプチドが企図されることも認識される。

好適には、本発明の単離タンパク質の断片は、1つ以上の抗原決定基またはエпитープを含む。好ましくは、抗原決定基またはエпитープは、複数の髄膜炎菌 (*N. meningitidis*) 株に対する免疫応答を誘発し得る。

40

【0067】

免疫原性断片は、断片を哺乳動物に投与し；哺乳動物において免疫応答を検出することにより同定することができる。このような応答には、髄膜炎菌 (*N. meningitidis*) および/または前記単離タンパク質、変異体または誘導体に特異的に結合する要素の産生、および/または髄膜炎菌 (*N. meningitidis*) 感染に対する保護効果が含まれる。

【0068】

場合により、上記方法において免疫原性について特定の断片を試験する前に、種々の予

50

測的方法を使用して特定の断片を使用してネイティブ抗原と交差反応する抗体を得ることができるかどうかを推定することができる。これらの予測的方法は、例えばオースベル (A u s u b e l) ら (前掲) の 11.14 章に記載のアミノ末端またはカルボキシ末端配列を基本とし得る。あるいは、これらの予測的方法は、例えば参照により本明細書に組み込まれるキート&ドーリトル (K y t e & D o o l i t t l e) 1982, J. Mol. Biol. 157 105 およびホップ&ウッズ (H o p p & W o o d s), 1983, Mol. Immunol. 20 483) により記載された親水性の予測、または例えば参照により本明細書に組み込まれるチョー&ファスマン (C h o o & F a s m a n), 1978, Ann. Rev. Biochem. 47 251) により記載された二次構造の予測をベースとし得る。

10

【0069】

さらに、「エピトープマッピング」は、本発明の抗体を使用して交差反応性エピトープを、最初にそれらの交差反応を提供する能力を試験し、次いで前記抗体により認識されるエピトープを同定することにより同定する。例示的方法は、コリガン (C o l i g a n) ら, C U R R E N T P R O T O C O L S I N I M M U N O L O G Y (前掲) に提供されている。

【0070】

本明細書において使用されるタンパク質「ホモログ」は、規定可能なヌクレオチドまたはアミノ酸配列関係を本発明の単離タンパク質と共有する。好適には、ホモログは、野生型 P o r A タンパク質と比較して中断された可変領域 (例えば V R 1、V R 2、S V R 1 および / または S V R 2) の 1 個以上のアミノ酸を含む。

20

【0071】

好適には、ホモログは、野生型 P o r A タンパク質ではない。好ましくは、変異体は、例えば配列番号 2 ~ 4 に記載の V R 1 および / または V R 2 領域の欠失からなるものではない。

【0072】

好ましくは、タンパク質ホモログは、本発明のアミノ酸配列、例として、限定されないが配列番号 5 ~ 22、または好ましくは配列番号 11 ~ 22 のいずれか 1 つに記載のアミノ酸配列と、70% または 75%、好ましくは少なくとも 80% または 85% またはより好ましくは少なくとも 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% または 99% の配列同一性を共有する。

30

【0073】

例えば、本明細書において例示されるものとは異なるが、免疫原性であり、好ましくは交差反応性免疫を提供するアミノ酸配列を有するようなホモログが企図される。

本明細書において使用される用語「ホモログ」は、変異体タンパク質を含む。本明細書において使用される本発明の「変異体」タンパク質は、1 個以上のアミノ酸が欠失され、または 1 個以上のアミノ酸が異なるアミノ酸により置換されている。一部のアミノ酸は、ポリペプチドの免疫原性活性を変化することなく置換または欠失され得ることが当該技術分野において十分理解されている (保存的置換)。

【0074】

免疫原性に対するより実質的な変更は、より保存的でない置換または欠失を導入することにより行うことができる (非保存的置換)。

40

用語「変異体」は、アレル変異体から産生され、またはその変異体のアミノ酸配列を含む本発明の単離タンパク質も含む。

【0075】

反応性タンパク質と核酸との配列関係を記載するために本明細書において一般に使用される用語は、「比較ウインドウ」、「配列同一性」、「配列同一性の百分率」および「実質的な同一性」を含む。それぞれの核酸 / タンパク質はそれぞれ、(1) 核酸 / タンパク質により共有される完全な核酸 / タンパク質配列の 1 つ以上の部分のみ、および (2) 核酸 / タンパク質間で相違する 1 つ以上の部分を含み得るので、配列比較は、典型的には、

50

「比較ウィンドウ」にわたり配列を比較して配列類似性の局所領域を同定および比較することにより実施される。「比較ウィンドウ」は、典型的には、参照配列と比較される6、9または12個の連続残基の概念的セグメントを指す。比較ウィンドウは、それぞれの配列の最適アラインメントのために参照配列と比較して約20%以下の付加または欠失（すなわち、ギャップ）を含み得る。比較ウィンドウをアラインメントするための配列の最適アラインメントは、アルゴリズムのコンピュータへの実装（インテリジェネティクス（Inteligenetics）によるGeneworksプログラム；参照により本明細書に組み込まれる Wisconsin・ジェネティクス・ソフトウェア・パッケージ・リリース7.0（Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0）におけるGAP、BESTFIT、FASTA、およびTFASTA、ジェネティクス・コンピュータ・グループ（Genetics Computer Group）、アメリカ合衆国 ウィスコンシン州 マディソン サイエンスドライブ575）、または調査および選択される種々の方法のいずれかにより作成された最良のアラインメント（すなわち、比較ウィンドウにわたり最大百分率のホモロジーをもたらす）により実施することができる。例えば参照により本明細書に組み込まれるアルトシュル（Altschul）ら、1997、Nucleic Acids Res. 25 3389により開示されたプログラムのBLASTファミリーを参照することもできる。配列分析の詳細な考察は、CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY Eds. オースベル（Ausubel）ら、（ジョン・ウィリー&サンズ社（John Wiley & Sons Inc）ニューヨーク州、1995 - 1999）のユニット1.3に見出すことができる。

10

20

【0076】

用語「配列同一性」は、本明細書において、配列が比較のウィンドウにわたり同一である程度を考慮して標準的なアルゴリズムを使用する適切なアラインメントを考慮する正確なヌクレオチドまたはアミノ酸一致の数を含むようにその最も広い意味で使用される。したがって、「配列同一性の百分率」は、比較のウィンドウにわたり2つの最適にアラインメントされた配列を比較し、同一核酸塩基（例えば、A、T、C、G、I）が両配列中に生じる位置の数を決定して一致位置の数を得、その一致位置の数を比較のウィンドウ中の位置の総数（すなわち、ウィンドウサイズ）により割り、その結果に100を乗じて配列同一性の百分率を得ることにより算出される。例えば、「配列同一性」は、DNASIS（登録商標）コンピュータプログラム（windows（登録商標）用バージョン2.5；日立ソフトウェアエンジニアリング社、南サンフランシスコ、カリフォルニア州、アメリカ合衆国から入手可能）により算出された「一致百分率」を意味すると理解することができる。

30

【0077】

したがって、本発明のタンパク質および核酸ホモログ、例えば上記定義の変異体を組換えDNA技術により調製することは十分に当業者の能力の範囲内である。例えば、本発明の核酸は、例えばトランスポゾン変異導入を使用するランダム変異導入、または部位特異的変異導入を使用して変異させることができる。次いで、得られたDNA断片を好適な発現宿主、例えば大腸菌（E. coli）中にクローニングする。

40

【0078】

本明細書において使用される「誘導体」タンパク質は、例えば、翻訳後修飾（例えばリン酸化、アセチル化など）、グリコシル化の改変（例えばグリコシル化の付加、除去または変化）および/または当該技術分野において理解される付加アミノ酸配列の包含により他の化学部分とのコンジュゲーションまたは複合体化により変化されている。

【0079】

付加アミノ酸配列は、融合タンパク質を作出する融合パートナーアミノ酸配列を含み得る。例として、融合パートナーアミノ酸配列は、単離融合タンパク質の検出および/または精製を支援し得る。非限定的な例には、金属結合（例えばポリヒスチジン）融合パートナー、マルトース結合タンパク質（MBP）、プロテインA、グルタチオンS-トランスフェラ

50

ーゼ (G S T)、蛍光タンパク質配列 (例えば G F P)、エピトープタグ、例えば m y c、F L A G およびヘマグルチニンタグが含まれる。

【 0 0 8 0 】

他の誘導体には、ポリペプチドを有する単離タンパク質が含まれ、そのポリペプチドを担体タンパク質として作用するオリゴ糖ベースワクチン構成成分に融合することができる。

【 0 0 8 1 】

本発明により企図される他の誘導体には、限定されないが、側鎖への修飾、ペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質合成の間の非天然アミノ酸および / またはそれらの誘導体の取り込み、ならびに本発明のポリペプチド、断片および変異体に立体配座制約を付与する架橋剤および他の方法の使用が含まれる。

10

【 0 0 8 2 】

本発明の別の態様は、本発明の単離タンパク質 (その単離タンパク質の断片 変異体および誘導体を含む) をコードする単離核酸を提供する。

本明細書において使用される用語「核酸」は、一本鎖または二本鎖 D N U および R N A を指定する。D N A には、ゲノム D N A および c D N A が含まれる。R N A には、m R N A、R N A、R N A i、s i R N A、c R N A および自己触媒 R N A が含まれる。核酸は、D N A - R N A ハイブリッドであってもよい。核酸は、典型的には A、G、C、T または U 塩基を含むヌクレオチドを含むヌクレオチド配列を含む。しかしながら、ヌクレオチド配列は、他の塩基、例えばイノシン、メチリシトシン、メチルイノシン、メチルアデノシンおよび / またはチオウリジンを含み得るが、それらに限定されない。

20

【 0 0 8 3 】

「ポリヌクレオチド」は、80 個以上の連続ヌクレオチドを有する核酸である一方、「オリゴヌクレオチド」は、80 個未満の連続ヌクレオチドを有する。

「プローブ」は、好適には、例えばサザンまたはノザンプロットングにおいて相補的配列を検出する目的のために標識された一本鎖または二本鎖オリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドであり得る。

【 0 0 8 4 】

「プライマー」は、通常、好ましくは 15 ~ 50 個の連続ヌクレオチドを有し、相補的核酸「テンプレート」にアニーリングし得、D N A ポリメラーゼ、例えば T a q ポリメラーゼ、R N A 依存性 D N A ポリメラーゼまたは S e q u e n a s e (商標) の作用によりテンプレート依存的に伸長され得る一本鎖オリゴヌクレオチドである。

30

【 0 0 8 5 】

本発明の単離核酸の特定の実施形態は、図 2 に記載のヌクレオチド配列 (配列番号 26 ~ 43) を含む。

好ましくは、単離核酸は、配列番号 32 ~ 43 のいずれか 1 つに記載のヌクレオチド配列を含む。

【 0 0 8 6 】

本発明の別の特定の態様は、本発明の単離タンパク質をコードする単離核酸のホモログを提供する。

40

一実施形態において、核酸ホモログは、本発明の単離タンパク質のホモログまたは変異体をコードする。

【 0 0 8 7 】

好適には、核酸ホモログは、髄膜炎菌 (N . m e n i n g i t i d i s) の野生型 P o r A タンパク質をコードしない。好ましくは、核酸ホモログは、本明細書に記載の P o r A の 1 つ以上の中断された可変領域をコードするヌクレオチド配列を含む。

【 0 0 8 8 】

別の実施形態において、核酸ホモログは、例えば図 2 および / または配列番号 26 ~ 43、または好ましくは、配列番号 32 ~ 43 に例示される本発明の単離核酸と、少なくとも 60 % または 65 %、好ましくは、少なくとも 70 % または 75 %、より好ましくは、

50

少なくとも 80% または 85%、よりいっそう好ましくは、少なくとも 90% または 95% のヌクレオチド配列同一性を共有する。

【0089】

さらに別の実施形態において、核酸ホモログは、本発明の単離核酸（例えば図 2 および / または配列番号 26 ~ 43、または好ましくは、配列番号 32 ~ 43 に例示されるもの）に、少なくとも低いストリンジェンシー条件下で、好ましくは、少なくとも中程度のストリンジェンシー条件下で、より好ましくは、高いストリンジェンシー条件下でハイブリダイズする。

【0090】

「ハイブリダイズするおよびハイブリダイゼーション」は、DNA - DNA、RNA - RNA または DNA - RNA ハイブリッドを産生するための少なくとも部分的に相補的なヌクレオチド配列の対形成を示すために本明細書において使用される。相補的なヌクレオチド配列を含むハイブリッド配列は、当該技術分野において周知の相補的なプリンとピリミジンとの間の塩基対形成を介して生じる。

10

【0091】

これに関して、修飾プリン（例えば、イノシン、メチルイノシンおよびメチルアデノシン）および修飾ピリミジン（チオウリジンおよびメチルシトシン）も塩基対形成に関与し得ることが認識される。

【0092】

本明細書において使用される「ストリンジェンシー」は、ハイブリダイゼーションの間の温度およびイオン強度条件、ならびにある種の有機溶媒および / または洗浄剤の存在または不存在を指す。ストリンジェンシーが高ければ、ハイブリダイズするヌクレオチド配列間の相補性の要求されるレベルが高くなる。

20

【0093】

「高いストリンジェンシー条件」は、高頻度の相補的な塩基を有する核酸のみがハイブリダイズする条件を指定する。

本明細書における高いストリンジェンシー条件への参照には、

(i) 42 における、ハイブリダイゼーションのための少なくとも約 31% v/v から少なくとも約 50% v/v のホルムアミドおよび少なくとも約 0.01 M から少なくとも約 0.15 M の塩、ならびに 42 における洗浄のための少なくとも約 0.01 M から少なくとも約 0.15 M の塩；

30

(ii) 65 における、ハイブリダイゼーションのための 1% BSA、1 mM の EDTA、0.5 M の NaH_2PO_4 (pH 7.2)、7% SDS、および 65 超の温度における、約 1 時間の洗浄のための (a) 0.1x SSC、0.1% SDS；または (b) 0.5% BSA、1 mM の EDTA、40 mM の NaH_2PO_4 (pH 7.2)、1% SDS；ならびに

(iii) 68 以上における、約 20 分間の洗浄のための 0.2x SSC、0.1% SDS

が含まれ、包含される。

40

【0094】

一般に、洗浄は、 $T_m = 69.3 + 0.41(G + C)\% - 12$ において実施される。一般に、二本鎖 DNA の T_m は、ミスマッチ塩基の数が 1% 増加すると約 1 だけ減少する。

【0095】

上記にかかわらず、ストリンジェントな条件は当該技術分野において周知であり、例えば Aulsebrook (前掲) の 2.9 および 2.10 章に記載されている。当業者は、種々の要因は、ハイブリダイゼーションの特異性を最適化するように操作することができることも認識する。最終洗浄のストリンジェンシーの最適化は、高程度のハイブリダイゼーションを確保するために機能し得る。

【0096】

50

典型的には、相補的ヌクレオチド配列は、ヌクレオチドをマトリックス（好ましくは、合成膜、例えばニトロセルロース）上で固定化する工程、ハイブリダイゼーション工程、および典型的には、標識プローブまたは他の相補的核酸を使用する検出工程を含むプロットティング技術により同定される。サザンプロットティングは相補的DNA配列を同定するために使用され；ノザンプロットティングは相補的RNA配列を同定するために使用される。ドットプロットティングおよびスロットプロットティングは、相補的DNA/DNA、DNA/RNAまたはRNA/RNAポリヌクレオチド配列を同定するために使用することができる。このような技術は当業者により周知であり、Ausubelら（前掲）の2.9.1から2.9.20ページに記載されている。このような方法によれば、サザンプロットティングは、DNA分子をゲル電気泳動によりサイズに従って分離し、サイズにより分離されたDNAを合成膜に転写し、膜に結合したDNAを相補的ヌクレオチド配列にハイブリダイズすることを含む。代替的なプロットティング工程は、cDNAまたはゲノムDNAライブラリー中の相補的核酸を同定する場合に、例えばブランクまたはコロニーハイブリダイゼーションのプロセスを介して使用される。この手順の他の典型例は、サムブルック（Sambrook）ら（前掲）の8～12章に記載されている。

10

【0097】

0にハイブリダイズした標識核酸を検出する方法は、当該技術分野における実務者に周知である。このような方法には、オートラジオグラフィ、化学発光、蛍光および比色検出が含まれる。

20

【0098】

核酸は、核酸配列増幅技術を使用して単離、検出および/または組換えDNA技術に供することもできる。

好適な核酸増幅技術は当業者に周知であり、その技術には、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）；相補鎖置換増幅（SDA）；ローリングサークル複製（RCR）；核酸配列ベース増幅（NASBA）、Q-βレプリカーゼ増幅およびヘリカーゼ依存性増幅が含まれるが、それらに限定されない。

【0099】

本明細書において使用される「増幅産物」は、核酸増幅により発生した核酸産物を指す。

30

核酸増幅技術には、特定の定量および半定量技術、例えば当該技術分野において周知のqPCR、リアルタイムPCRおよび競合的PCRが含まれ得る。

【0100】

本発明のさらに別の態様は、本発明の単離核酸および1つ以上の付加ヌクレオチド配列を含む遺伝子構築物を提供する。

好適には、遺伝子構築物は、当該技術分野において十分理解されているプラスミド、バクテリオファージ、コスミド、酵母または細菌性人工染色体の形態であり、またはその遺伝子構成成分を含む。

【0101】

遺伝子構築物は、細菌または他の宿主細胞中での単離核酸の維持および伝播、組換えDNA技術による操作ならびに/または本発明の核酸もしくはコードされるタンパク質の発現に好適であり得る。

40

【0102】

宿主細胞発現の目的のため、遺伝子構築物は発現構築物である。好適には、発現構築物は、発現ベクター中の1つ以上の付加配列に作動的に連結された本発明の核酸を含む。発現構築物の非限定的な例を表2および表3に提供する。

【0103】

「発現ベクター」は、自己複製染色体外ベクター、例えばプラスミド、または宿主ゲノム中に組み込まれるベクターであり得る。

「作動的に連結された」は、前記付加ヌクレオチド配列が、好ましくは、転写を初期化、調節またはそうでなければ制御するように本発明の核酸に対して位置していることを意

50

味する。

【0104】

一実施形態において、付加ヌクレオチド配列は調節配列である。調節ヌクレオチド配列は、一般に、発現に使用される宿主細胞に適切である。多数のタイプの適切な発現ベクターおよび好適な調節配列が、種々の宿主細胞について当該技術分野において公知である。

【0105】

典型的には、前記1つ以上の調節ヌクレオチド配列には、限定されないが、プロモータ配列、リーダまたはシグナル配列、リボソーム結合部位、転写開始および終結配列、翻訳開始および終結配列、ならびにエンハンサーまたはアクチベータ配列が含まれ得る。

【0106】

当該技術分野において公知の構成的または誘導的プロモータが本発明により企図される。プロモータは、天然プロモータ、または2つ以上のプロモータの要素を組み合わせるハイブリッドプロモータであり得る。

【0107】

別の実施形態において、付加ヌクレオチド配列は、形質転換された宿主細胞の選択を可能とする選択可能マーカ遺伝子である。選択可能マーカ遺伝子は当該技術分野において周知であり、使用される宿主細胞によって変動する。

【0108】

付加ヌクレオチド配列の1つの特定の実施形態は、改変ポリG配列を含む。野生型 porA 遺伝子は、そのプロモータ中に株内および株間で多様性の高いポリGトラクトを有し、それにより多様な発現レベルがもたらされる。本発明の単離タンパク質の一貫した発現を確保するため、多様性を低減させるようにポリGトラクトを改変することができる。それというのも、G₁₁が PorA の最適な発現に関連しているからである。ポリGトラクトの変化を低減させるため、それが G₅AG₅により置き換えられるようにそれを改変することができる。

【0109】

発現構築物は、本発明の組換えポリペプチドが上記の融合タンパク質として発現されるように融合パートナー（典型的には発現ベクターにより提供される）をコードする付加ヌクレオチド配列も含み得る。

【0110】

発現構築物は、発現構築物中に存在する単離核酸の細菌ゲノム中への相同組換えを促進する1つ以上の付加ヌクレオチド配列も含み得る。例にすぎないが、髄膜炎菌（N. meningitidis）の内因性 porA 遺伝子を、本発明の単離核酸および付加ヌクレオチド配列を含む発現構築物による形質転換体および相同組換えの選択を可能とする外因性ヌクレオチド配列（例えば pLK6 からの LacZ - Kan^r カセット；ザボ（Szabo）ら 1992, J. Bacteriol 174 7245 - 7252）または pJJ260 からの sacB - Kan^r - Tet^r カセット（ニール（Neil）ら, 2009, Infect Immun. 77 2285 - 2293.）（例えば pLK6 からの LacZ - Kan^r カセットまたは pJJ260 からの sacB - Kan^r - Tet^r カセット）により置き換えることができる。他の相同組換えアプローチは当業者に周知である。

【0111】

親和性クロマトグラフィーによる融合ポリペプチド精製の特定の目的のため、親和性クロマトグラフィーのための関連マトリックスは、それぞれグルタチオン - 、アミロース - 、およびニッケル - またはコバルト - コンジュゲート樹脂である。多くのこのようなマトリックスは、「キット」形態、例えば（HIS₆）融合パートナーについて有用な QIAexpress（登録商標）システム（キアゲン（Qiagen（登録商標）））およびファルマシア（Pharmacia（登録商標））GST 精製システムで入手可能である。

【0112】

好ましくは、融合パートナーは、例えば関連プロテアーゼが本発明の融合ポリペプチドを

10

20

30

40

50

部分的に消化し、それによりそれから本発明の組換えポリペプチドを遊離させることを可能とする第X_a因子またはトロンビンについてのプロテアーゼ開裂部位も有する。次いで、遊離されたポリペプチドを、後続のクロマトグラフィー分離により融合パートナーから単離することができる。

【0113】

本発明の単離タンパク質（断片、誘導体およびホモログを含む）は、当業者に公知の任意の好適な手順により調製することができる。好ましくは、単離タンパク質は組換えタンパク質である。

【0114】

例にすぎないが、本発明の組換え単離タンパク質は、

(i) 1つ以上の調節ヌクレオチド配列に作動的に連結された本発明の単離核酸を含む発現構築物を調製する工程；

(ii) 好適な宿主細胞を、発現構築物により形質移入または形質転換する工程；

(iii) 前記宿主細胞中で組換えタンパク質を発現させる工程；および

(iv) 組換えタンパク質を前記宿主細胞から単離する工程を含む方法により產生することができる。

【0115】

発現に好適な宿主細胞は、原核または真核細胞であり得る。例えば、好適な宿主細胞は、哺乳動物細胞、植物細胞、酵母細胞、昆虫細胞または細菌細胞である。本発明による単離タンパク質の発現に好ましい1つの宿主細胞は、細菌である。使用される細菌は、大腸菌 (*Escherichia coli*) または髄膜炎菌 (*N. meningitidis*) であり得る。

【0116】

好ましい実施形態において、宿主細胞は髄膜炎菌 (*N. meningitidis*) である。好ましくは、髄膜炎菌 (*N. meningitidis*) 宿主細胞は、内因性 PorA も Opa も Opc も莢膜多糖も発現せず、所望のリボ多糖表現型を発現するように改変されている。

【0117】

宿主細胞（原核と真核を問わず）中への遺伝子構築物の導入は、例えば CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY Eds. Ausubel ら, (John Wiley & Sons, Inc. 1995 - 2009)、特に9および16章に記載のとおり当該技術分野において周知である。髄膜炎菌 (*N. meningitidis*) の形質転換に関連して、このような方法は当該技術分野において周知である。髄膜炎菌 (*N. meningitidis*) は「天然に」形質転換可能であることも認識される。

【0118】

組換えタンパク質は、当業者が例えばサムブルック (Sambrook) ら, MOLECULAR CLONING. A Laboratory Manual (コールド・スプリング・ハーバー・プレス (Cold Spring Harbor Press), 1989)、特に16および17部；CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY Eds. Ausubel ら, (John Wiley & Sons, Inc. 1995 - 2009)、特に10および16章；ならびに CURRENT PROTOCOLS IN PROTEIN SCIENCE Eds. Coligan ら, (John Wiley & Sons, Inc. 1995 - 2009)、特に1、5および6章に記載の標準的なプロトコルを使用して都合良く調製することができる。

【0119】

本明細書に開示の単離タンパク質、断片、ホモログおよび誘導体に対して生成され、それらに結合する抗体および/または抗体断片も提供される。好適には、抗体および/または抗体断片は、野生型 PorA タンパク質に結合しない。好ましくは、抗体および/また

10

20

30

40

50

は抗体断片は、中断された P o r A 可変領域（例えば V R 1、V R 2、S V R 1 または S V R 2 領域）に特異的に結合し、野生型 P o r A 可変領域（例えば V R 1、V R 2、S V R 1 または S V R 2 領域）に結合しない。

【0120】

抗体は、ポリクローナルまたはモノクローナルであり得、ネイティブまたは組換えであり得る。抗体産生、精製および使用に適用可能な周知のプロトコルは、例えば、C o l i g a n ら, C U R R E N T P R O T O C O L S I N I M M U N O L O G Y (J o h n W i l e y & S o n s N Y , 1 9 9 1 - 1 9 9 4) の 2 章およびハーロー, E . & レーン, D (H a r l o w , E . & L a n e , D .) A n t i b o d i e s : A L a b o r a t o r y M a n u a l , コールド・スプリング・ハーバー (C o l d S p r i n g H a r b o r) , コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー (C o l d S p r i n g H a r b o r L a b o r a t o r y) , 1 9 8 8 に見出すことができ、それらは両方とも参照により本明細書に組み込まれる。

10

【0121】

一般に、本発明の抗体は、本発明の単離タンパク質、断片、ホモログまたは誘導体に結合し、またはそれらとコンジュゲートする。例えば、抗体はポリクローナル抗体であり得る。このような抗体は、例えば本発明の単離タンパク質、断片、変異体または誘導体を、産生種（マウスまたはウサギが含まれ得る）中に注射してポリクローナル抗血清を得ることにより調製することができる。ポリクローナル抗体を産生する方法は、当業者に周知である。使用することができる例示的なプロトコルは、例えば C o l i g a n ら, C U R R E N T P R O T O C O L S I N I M M U N O L O G Y (前掲) 、および H a r l o w & L a n e , 1 9 8 8 (前掲) に記載されている。

20

【0122】

モノクローナル抗体は、例えば参照により本明細書に組み込まれるケーラー & ミルステイン (K o e h l e r & M i l s t e i n) , 1 9 7 5 , N a t u r e 2 5 6 , 4 9 5 による論文に記載の標準的方法を使用して、または例えば C o l i g a n ら, C U R R E N T P R O T O C O L S I N I M M U N O L O G Y (前掲) に記載のより近年のその改変により、本発明の単離タンパク質、断片、変異体または誘導体の 1 つ以上により接種された産生種由来の脾臓または他の抗体産生細胞を不死化させることにより産生することができる。

30

【0123】

本発明はまた、その範囲内に抗体断片、例えば上記参照のポリクローナルまたはモノクローナル抗体の F c 、 F a b または F (a b) 2 断片を含む。あるいは、抗体または抗体断片は、本発明のペプチドに対する単鎖 F v 抗体 (s c F v) を含み得る。このような s c F v は、例えば米国特許第 5 , 0 9 1 , 5 1 3 号明細書、欧州特許第 2 3 9 , 4 0 0 号明細書またはウインター & ミルステイン (W i n t e r & M i l s t e i n) , 1 9 9 1 , N a t u r e 3 4 9 2 9 3 による論文にそれぞれ記載の方法に従って調製することができる。

【0124】

抗体および抗体断片は、髄膜炎菌 (N . m e n i n g i t i d i s) 感染に対する受動免疫化に使用することができる。好ましくは、このような抗体は殺菌性である。

40

抗体および抗体断片は、上記のエピトープマッピングに使用することができる。

【0125】

本発明の抗体および抗体断片は、親和性クロマトグラフィーに使用することができる。例えば、C o l i g a n ら, C U R R E N T P R O T O C O L S I N I M M U N O L O G Y (前掲) の 9 . 5 章に記載の免疫親和性クロマトグラフィー手順を参照することができる。

【0126】

抗体および抗体断片は、髄膜炎菌 (N . m e n i n g i t i d i s) および / または髄膜炎菌 (N . m e n i n g i t i d i s) P o r A タンパク質の検出に使用することがで

50

きる。

【0127】

一態様において、哺乳動物において髄膜炎菌 (*N. meningitidis*) を検出する方法は、

(i) 本発明の抗体または抗体断片を、哺乳動物から得られた生体試料と合わせる工程；および

(ii) 前記試料中で前記抗体または抗体断片と髄膜炎菌 (*N. meningitidis*) および/または髄膜炎菌 (*N. meningitidis*) PorAタンパク質とを含む複合体の存在または不存在を決定する工程を含み、前記複合体の存在は前記髄膜炎菌 (*N. meningitidis*) を示す。

10

【0128】

生体試料中の髄膜炎菌 (*N. meningitidis*) の存在または不存在は、哺乳動物から生体試料を得、上記抗体または抗体断片を生体試料と混合し、試料中の髄膜炎菌 (*N. meningitidis*) の存在を示す特異的に結合した抗体または抗体断片を検出することにより決定することができる。典型的には、特異的に結合した抗体または抗体断片は、生体試料中の髄膜炎菌 (*N. meningitidis*) PorAタンパク質との複合体を形成する。

【0129】

好適には、髄膜炎菌 (*N. meningitidis*) PorAタンパク質は、前記哺乳動物に感染する髄膜炎菌 (*N. meningitidis*) 由来であり、またはその細菌起源である。

20

【0130】

本明細書において使用される用語「生体試料」は、個体、例えば患者から抽出、未処理、処理、希釈または濃縮することができる試料を指す。好適には、生体試料は、全血、血清、血漿、唾液、尿、汗、腹水、腹腔液、滑液、羊水、脳脊髄液、皮膚生検物などからなる群から選択される。

【0131】

別の態様において、生体試料中の髄膜炎菌 (*N. meningitidis*) PorAタンパク質に対する抗体を検出する方法は、

(i) 哺乳動物から得られた生体試料を、本発明の単離タンパク質 (例えば配列番号 2 ~ 22 または好ましくは配列番号 11 ~ 22 によるもの) と接触させる工程；および

(ii) 前記試料中の前記単離タンパク質および抗髄膜炎菌 (*N. meningitidis*) PorA抗体を含む複合体の存在または不存在を決定する工程を含む。

30

【0132】

好適には、抗髄膜炎菌 (*N. meningitidis*) PorA抗体は、髄膜炎菌 (*N. meningitidis*) による哺乳動物の感染に应答して誘発される内因性抗体である。

【0133】

免疫アッセイ、タンパク質アッセイ (タンパク質インサイチュアレイ、DNA - タンパク質アレイおよび核酸プログラマブルアレイおよび二次元 (2D) 発現プロファイリングを含む) を含むタンパク質検出に好適な任意の技術を使用することができるが、それらに限定されない。免疫アッセイには、限定されないが、当業者に周知の免疫ブロッティング、ウエスタンブロッティングおよびドットブロッティング、ラジオ免疫アッセイ (RIA)、酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA) および免疫クロマトグラフィー技術 (ICT) が含まれ得る。例えば、本発明に従って使用することができる種々の免疫アッセイを開示する Coliganら, CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY (前掲) の 7 章を参照することができる。免疫アッセイには、当該技術分野において理解されている競合的アッセイが含まれ得る。

40

【0134】

50

好ましい実施形態において、検出は、前記単離タンパク質、断片、ホモログもしくは誘導体、または前記抗体もしくは抗体断片を標識により修飾することにより実施される。一実施形態は、標識タンパク質、断片、ホモログまたは誘導体を免疫アッセイにおいて使用して髄膜炎菌（*N. meningitidis*）特異的抗体を検出する。別の実施形態は、標識抗体または抗体断片を免疫アッセイにおいて使用してPorAタンパク質を検出する。

【0135】

抗体および抗体断片に関して、標識は以下のものを含み得る：

- (A) 抗体または抗体断片への標識の直接付着；
- (B) 抗体または抗体断片への標識の間接付着；すなわち、続いて抗体または抗体断片に結合する別の試薬（例えば二次抗体）への標識の付着；および
- (C) 抗体または抗体断片の後続の反応産物への付着。

10

【0136】

標識は、発色体、触媒、酵素、蛍光体、化学発光分子、ランタノイドイオン、例えばユーロピウム（ Eu^{3+} ）、放射性同位体および直接可視標識を含む群から選択することができる。直接可視標識の場合、コロイド状金属もしくは非金属粒子、色素粒子、酵素もしくは基質、有機ポリマー、ラテックス粒子、リボソーム、またはシグナル産生物質を含有する他の小胞などを使用することができる。

【0137】

本発明において有用な酵素標識の非限定的な例には、アルカリホスファターゼ、セイヨウサビバエルオキシダーゼ、ルシフェラーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、リゾチーム、マレートデヒドロゲナーゼなどが含まれる。酵素標識は、単独で、または第2の酵素と組み合わせて溶液中で使用することができる。

20

【0138】

蛍光体の非限定的な例には、フルオレセインイソチオシアネート（FITC）、アロフィコシアニン（APC）、フルオレセイン誘導体、例えばFAMおよびROX、Texas Red、テトラメチルローダミンイソチオシアネート（TRITL）、R-フィコエリスリン（RPE）、AlexaおよびBodipy蛍光体が含まれるが、それらに限定されない。

【0139】

生体試料中の抗髄膜炎菌（*N. meningitidis*）抗体（例えば殺菌性抗体）を検出する方法も提供される。

30

一態様において、

- (i) 本発明の単離タンパク質（例えば配列番号2～22または好ましくは配列番号11～22によるもの）により免疫化された哺乳動物から得られた生体試料を、髄膜炎菌（*N. meningitidis*）と接触させる工程；および
 - (ii) 前記試料中の前記殺菌性抗体の存在または不存在を決定する工程
- 含む、髄膜炎菌（*N. meningitidis*）に対する殺菌性抗体を検出する方法が提供される。

40

【0140】

典型的には、殺菌性抗体は、単離タンパク質による免疫化に応答して誘発される。殺菌性抗体を検出する殺菌アッセイの例は実施例に以下提供される。

別の広範な態様において、本発明は、核酸に基づく検出方法を提供する。

【0141】

一実施形態において、生体試料中の髄膜炎菌（*N. meningitidis*）を検出する方法は、生体試料を患者から単離する工程および本発明の単離核酸を使用して試料中のPorAタンパク質をコードする核酸配列を検出する工程を含む。核酸の検出は、任意の好適な技術を使用して実施することができる。例えば、当該技術分野において周知のとおり、本発明による標識核酸を患者から得られた核酸抽出物のサザンブロットにおけるプローブとして使用することができる。

50

【 0 1 4 2 】

あるいは、本発明による標識核酸は、患者からのRNAまたはcDNA抽出物のノザンプロットにおけるプローブとして利用することができる。好ましくは、患者からの核酸抽出物は、本発明の核酸配列のセンスおよびアンチセンス配列に対応するオリゴヌクレオチドプライマーと合わせて、核酸増幅技術、例えばPCRとともに利用されてそれにより増幅産物が産生される。増幅産物は、複数の技術のいずれかにより、例えば上記プローブハイブリダイゼーションにより検出することができる。

【 0 1 4 3 】

種々の自動化固相検出技術も核酸の検出に適切である。これらの技術には、当該技術分野において十分理解されている巨大スケール固定化プライマーアレイ（VLSIPS（商標））、PCR増幅産物の磁気ビーズベース捕捉および核酸アレイが含まれる。

10

【 0 1 4 4 】

本発明はまた、髄膜炎菌（*N. meningitidis*）感染を検出するためのキットを提供する。キットは、生体試料中の髄膜炎菌（*N. meningitidis*）、内因性髄膜炎菌（*N. meningitidis*）PorAタンパク質もしくはコーディング核酸、または抗体を検出するための1つ以上の検出試薬を含み得る。キットは、用いられる試験法の性質に応じて上記の1つ以上の特定の検出試薬を含有する。これに関連して、キットは、本発明による単離タンパク質、断片、ホモログ、誘導体、抗体、抗体断片または核酸（例えばプライマーまたはプローブ）の1つ以上を含み得る。これらの任意の1つ以上を上記のとおり標識することができる。キットは、場合により1つ以上の他の試薬、例えば検出試薬、例えば標識二次抗体、比色または生物発光検出のための酵素および/または基質、陽性および/または陰性対照、洗浄溶液、希釈緩衝液、タンパク質または核酸サイズマーカー、DNAポリメラーゼ、DNAリガーゼ、Taqポリメラーゼなども、用いられる検出法に応じて含み得る。

20

【 0 1 4 5 】

本発明のさらなる態様は、哺乳動物において髄膜炎菌（*N. meningitidis*）感染を治療するための予防および治療方法ならびに/または医薬組成物を提供する。

1つの特定の態様において、哺乳動物において髄膜炎菌（*N. meningitidis*）感染を予防または治療する方法は、哺乳動物に、

(i) 本発明の単離タンパク質（例えば配列番号2～22または好ましくは配列番号11～22によるもの（そのホモログ、誘導体および断片を含む））；

30

(ii) 本発明の単離核酸（例えば配列番号23～43または好ましくは配列番号32～43によるもの）（そのホモログ、誘導体および断片を含む）；

(iii) (ii) の単離核酸をコードする発現構築物；

(iv) (iii) の発現構築物を含む宿主細胞；

(v) 本発明の単離タンパク質に結合する抗体または抗体断片；および/または

(vi) (i)～(v) の1つ以上を含む医薬組成物

からなる群から選択される免疫原性因子（immunogenic agent）を投与して、それにより前記哺乳動物において前記髄膜炎菌（*N. meningitidis*）感染を予防または治療する工程を含む。

40

【 0 1 4 6 】

好適には、免疫原性因子は、野生型PorAタンパク質および/または1つ以上の中断された可変領域を有さないPorAタンパク質により誘発されるよりも株特異的でなく、または交差反応的である免疫応答を前記哺乳動物中で誘発する。好ましくは、誘発される免疫応答は保護的免疫応答である。

【 0 1 4 7 】

好ましくは、哺乳動物はヒトである。

1つの特定の好ましい実施形態において、本発明の単離タンパク質（そのホモログ、誘導体および断片を含む）は、OMV中に存在する。

【 0 1 4 8 】

50

例えば、フラッシュ, C. (Frascch, C.), L. ヴァン・アルフェン (L. van Alphen), ら (2001). 髄膜炎性疾患のための外膜タンパク質小胞ワクチン (Outer Membrane Protein Vesicle Vaccines for Meningococcal Disease.) Meningococcal Vaccines: Methods and Protocols. A. ポラード (A. Pollard) および M. メイデン (M. Maiden) 編, ヒューマナ・プレス (Humana Press). 66: 81 - 107 に記載のとおり OMV ワクチンを調製する多くの周知の方法が存在する。

【0149】

別の特定の好ましい実施形態において、本発明の単離タンパク質（そのホモログ、誘導体および断片を含む）は、染色体に組み込まれた発現構築物を含む細菌により発現される。好ましくは、細菌は髄膜炎菌 (N. meningitidis) である。

10

【0150】

好適には、医薬組成物は、薬学的に許容可能な担体、希釈剤または賦形剤を含む。

「薬学的に許容可能な担体、希釈剤または賦形剤」は、全身投与において安全に使用することができる固体または液体充填剤、希釈剤またはカプセル化物質を意味する。特定の投与経路に応じて、当該技術分野において周知の種々の担体を使用することができる。これらの担体は、糖、デンプン、セルロースまたはその誘導体、麦芽、ゼラチン、タルク、硫酸カルシウム、植物油、合成油、ポリオール、アルギン酸、リン酸緩衝溶液、乳化剤、等張生理食塩水および塩、例えば鉍酸塩、例として塩酸塩、臭化物および硫酸塩、有機酸、例えば酢酸塩、プロピオン酸塩およびマロン酸塩ならびにパイロジェンフリー水を含む群から選択することができる。

20

【0151】

薬学的に許容可能な担体、希釈剤および賦形剤を記載する有用な参考文献は、参照により本明細書に組み込まれる Remington's Pharmaceutical Sciences (マック出版社 (Mack Publishing Co.) ニュージャージー州, アメリカ合衆国, 1991) である。

【0152】

任意の安全な投与経路を本発明の免疫原性因子の投与に用いることができる。例えば、経口、経直腸、非経口、舌下、パッカル、静脈内、関節内、筋肉内、皮内、皮下、吸入、眼内、腹腔内、脳室内、経皮などを用いることができる。筋肉内および皮下注射は、例えば免疫原性組成物、ワクチンおよび DNA ワクチンの投与に適切である。

30

【0153】

剤形には、錠剤、分散剤、懸濁剤、注射剤、液剤、シロップ剤、トローチ剤、カプセル剤、坐剤、エアロゾル剤、経皮貼付剤などが含まれる。これらの剤形には、この目的のために特別に設計された注射または移植用制御放出デバイスまたはこの様式で付加的に作用するように改変された他の形態のインプラントも含まれ得る。治療剤の制御放出は、例えば、それを疎水性ポリマー、例としてアクリル樹脂、ワックス、高級脂肪族アルコール、ポリ乳酸およびポリグリコール酸およびある種のセルロース誘導体、例えばヒドロキシプロピルメチルセルロースによりコーティングすることにより実施することができる。さらに、制御放出は、他のポリマーマトリックス、リボソームおよび / またはマイクロスフェアを使用することにより実施することができる。

40

【0154】

経口または非経口投与に好適な本発明の医薬組成物は、別個単位、例えば、所定量の本発明の 1 つ以上の治療剤をそれぞれ含有するカプセル剤、サシェ剤または錠剤として、散剤または顆粒剤として、または水性液体、非水性液体、水中油型エマルションもしくは油中水型液体エマルション中の液剤もしくは懸濁剤として提供することができる。このような組成物は、製薬方法のいずれかにより調製することができるが、全ての方法は、上記の 1 つ以上の免疫原性因子を 1 つ以上の必須成分を構成する担体と会合させる工程を含む。一般に、組成物は、本発明の免疫原性因子を液体担体もしくは微細固体担体またはその両

50

方と均一に緊密に混合し、次いで必要であれば、産生物を所望の提供物に成形することにより調製される。

【0155】

上記組成物は、投薬配合物と適合するように、患者を髄膜炎菌 (*N. meningitidis*) 感染から保護、または既存の感染を治療するために免疫原的に有効であるような量で投与することができる。患者に投与される用量は、本発明に関連して、患者において経時的に利益応答、例えば髄膜炎菌 (*N. meningitidis*) のレベルの低減をもたらすために、または髄膜炎菌 (*N. meningitidis*) による感染を阻害するために十分でなければならない。投与すべき免疫原性因子の量は、治療すべき対象 (その年齢、性別、体重および全身健康状態を含む) に依存し得る。これに関連して、投与に要求される免疫原性因子の正確な量は、担当医の判断に依存する。

10

【0156】

髄膜炎菌 (*N. meningitidis*) に対する治療または予防において投与すべき免疫原性因子の有効量の決定において、医師は、循環血漿レベル、疾患の進行、および抗髄膜炎菌 (*N. meningitidis*) 抗体の産生を評価することができる。いずれのイベントにおいても、本発明の免疫原性因子の好適な投薬量は当業者が容易に決定することができる。このような投薬量は、ナノグラムからミリグラムのオーダーの本発明の免疫原性因子であり得る。

【0157】

特定の実施形態において、本発明の免疫原性因子は、治療または予防ワクチンとして投与することができる。したがって、本発明は、活性物質として本発明の免疫原性因子の1つ以上を含有するワクチンの産生に及ぶ。種々の適用可能な手順がこのようなワクチンの産生に企図される。例示的な手順には、例えば、参照により本明細書に組み込まれる NEW GENERATION VACCINES (1997, レヴァイン (Levine) ら, マーセル・デッカー社 (Marcel Dekker, Inc.) ニューヨーク, バーゼル・香港 (Basel Hong Kong)) に記載のものが含まれる。

20

【0158】

本発明による免疫原性因子は、他の抗原、例として他の抗原のBまたはT細胞エピトープと混合、コンジュゲートまたは融合させることができる。さらに、本発明による免疫原性因子は、下記担体にコンジュゲートさせることができる。

30

【0159】

本発明のハプテン性ペプチドが使用される場合 (すなわち、コグネート (同種の) 抗体と反応するが、それ自体で免疫応答を誘発し得ないペプチド)、そのペプチドを免疫原性担体とコンジュゲートさせることができる。有用な担体は当該技術分野において周知であり、その担体には、例えば：サイログロブリン；アルブミン、例えばヒト血清アルブミン；毒素、類毒素または破傷風、ジフテリア、百日咳、シュードモナス菌 (*Pseudomonas*)、大腸菌 (*E. coli*)、ブドウ球菌 (*Staphylococcus*)、および連鎖球菌 (*Streptococcus*) からの毒素の任意の変異体交差反応性材料 (CRM)；ポリアミノ酸、例えばポリ (リジン：グルタミン酸)；インフルエンザ；ロタウイルスVP6、パルボウイルスVP1およびVP2；B型肝炎ウイルスコアタンパク質；B型肝炎ウイルス組換えワクチンなどが含まれる。あるいは、担体タンパク質または他の免疫原性タンパク質の断片またはエピトープを使用することができる。例えば、本発明のハプテン性ペプチドを細菌性毒素、類毒素またはCRMのT細胞エピトープにカップリングさせることができる。これに関連して、米国特許第5,785,973号明細書を参照することができる。

40

【0160】

本発明の免疫原性因子は、髄膜炎菌 (*N. meningitidis*) の抗原、または他の生物 (病原性細菌インフルエンザ菌 (*H. influenzae*)、カタル球菌 (*M. catarrhalis*)、淋菌 (*N. gonorrhoeae*)、大腸菌 (*E. coli*)、肺炎連鎖球菌 (*S. pneumoniae*) などを含む) の抗原と組み合わせて

50

多価サブユニットワクチンとして投与することができる。あるいは、または付加的に、これらは髄膜炎菌 (*N. meningitidis*) のオリゴ糖または多糖構成成分に合わせて投与することができる。

【0161】

ワクチンおよび他の免疫原性組成物は、当該技術分野において周知のアジュバントを含み得る。本発明により企図されるアジュバントには、限定されないが、表面活性物質、例えばヘキサデシルアミン、オクタデシルアミン、オクタデシルアミノ酸エステル、リゾレシチン、ジメチルジオクタデシルアンモニウムブロミド、N, N - ジコクタデシル - N', N' - ビス (2 - ヒドロキシエチル - プロパンジアミン)、メトキシヘキサデシルグリセロール、およびプルロニック (登録商標) ポリオール; ポリアミン、例えばピラン、硫酸デキストラン、ポリICカーボポール (登録商標); ペプチド、例えばムラミルジペプチドおよび誘導体、ジメチルグリシン、タフトシン; 油エマルション; ならびにミネラルゲル、例えばリン酸アルミニウム、水酸化アルミニウムまたはミョウバン; リンホカイン、Quil A および免疫刺激複合体 (ISCOM) が含まれる。OMV 送達に関する実施形態において、これらの小胞はアジュバント、例えばアルミニウム塩を用いてまたは用いずに産生することができる。

10

【0162】

アジュバントの例に関連して、参照により本明細書に組み込まれる国際公開第 99 / 36544 号も参照される。

特定の実施形態において、髄膜炎菌 (*N. meningitidis*) 感染を治療するための組成物および方法 (ワクチンおよび免疫化の方法を含む) は、本発明の単離タンパク質をコードする DNA 発現構築物を含み得る。

20

【0163】

例えば、本発明の免疫原性因子は、弱毒化ウイルス宿主により発現させることができる。「弱毒化ウイルス宿主」は、天然に実質的に無毒性であり、または実質的に無毒性とされたウイルスベクターを意味する。ウイルスは、任意の好適な物理的 (例えば、熱処理) または化学的手段 (例えば、ホルムアルデヒド処理) により実質的に無毒性とすることができる。「実質的に無毒性」は、感染性が破壊されたウイルスを意味する。理想的には、ウイルスの感染性は、ウイルスの免疫原性を担持するタンパク質に影響することなく破壊される。前記のことから、弱毒化ウイルス宿主は生ウイルスまたは不活化ウイルスを含み得ることが認識される。

30

【0164】

本発明によるワクチンにおいて有用であり得る弱毒化ウイルス宿主は、ウイルスベクター (アデノウイルス、サイトメガロウイルスおよび好ましくは、ポックスウイルス、例えばワクシニア (例えば米国特許第 4, 603, 112 号明細書) および弱毒化サルモネラ菌 (*Salmonella*) 株 (例えば、米国特許第 4, 550, 081 号明細書に記載のもの) を含む) を含み得る。生ワクチンは、それらが実質的に長時間持続する免疫を付与し得る長期刺激をもたらすので特に有利である。ナイセリア属 (*Neisseria*) タンパク質を使用する免疫化に潜在的に好適な種々のウイルスベクター、および送達方法を記載する別の参考文献は、参照により本明細書に組み込まれる国際公開第 99 / 36544 号である。

40

【0165】

多価ワクチンは、髄膜炎菌 (*N. meningitidis*) の異なるエピトープ (例えば、髄膜炎菌 (*N. meningitidis*) の他の表面タンパク質またはエピトープ) を発現する 1 つ以上の微生物から調製することができる。さらに、他の病原性微生物のエピトープをワクチン中に取り込むことができる。例えば、このことは、本発明による核酸配列を発現させるための組換えワクシニアウイルスの構築を含み得る。組換えワクシニアウイルスは、宿主中に導入すると免疫原性因子を発現し、それにより宿主CTL応答を誘発する。例えば、参照により本明細書に組み込まれる、免疫化プロトコルにおいて有用なワクシニアベクターおよび方法を記載する米国特許第 4, 722, 848 号明細書を

50

参照することができる。

【0166】

本発明の免疫原性因子による治療的投与または免疫化に有用な広範な他のベクターは、本開示から当業者に明らかである。

本発明を容易に理解し、実施することができるように、特定の好ましい実施形態を以下の非限定的な実施例としてここで記載する。

【0167】

実施例

導入

Por Aは、髄膜炎菌 (*Neisseria meningitidis*) の主要なタンパク質である。Por Aは、株間で非常に多様性が高く、免疫応答を患者および無症状保有者の両方で、それが株同定のためのマーカとして使用される程度に発生させ、そのことは血清型系を表す (非特許文献6)。Por Aモノマーポロジの現行モデルは、8つの細胞外ループを示す。非特許文献8；非特許文献9)。表1にまとめるとおり、最長ループ (1および4) は最も多様性が高く、ループ5および6においては多様性が低く (それぞれ半変異SVR1および2)、残りのループにおいては本質的には多様性が見られない。ループ3は、Por Aトリマーのそれぞれのサブユニットにより形成される細孔中で「プラグ」を形成することが予測される。ループ1および4内でさえ、株間の多様性の大多数は、ループのチップを形成することが予測される残基に制限される。これらは可変領域 (VR) 1および2として公知である。多くの株のVR1およびVR2配列が同定されている (例えば図3ならびに表3および4；Russellら, 2004, *Emerg. Infect. Dis.* 10 674；<http://neisseria.org/nm/typing/pora/vr1.shtml>および<http://neisseria.org/nm/typing/pora/vr2.shtml>参照)。驚くべきことに、VR1/VR2の外側の領域も髄膜炎菌 (*N. meningitidis*) に対する免疫応答にいかに関与するかを記載する多くの科学文献が存在する (ジョーダン (Jordans) ら, 2004, *Infect. Immun.* 72 6503-10；非特許文献7；マーティン (Martin) ら, 2000, *Vaccine* 18 2476-81；ウェッジ (Wedge) ら, 2003, *Infect. Immun.* 71 3775-81；コテルニコヴァ (Kotelnikova) ら, 2005, *Bull. Exp. Biol.* 139 593-5；米国特許第7,238,345号明細書)。

【0168】

本発明は、本明細書に例示の2つの広い実施形態を提供する：(1) 髄膜炎菌 (*Neisseria meningitidis*) 株間で保存されているPor Aの領域に対して免疫応答を向けるための可変領域の欠失；および(2) 保存領域の新規提供が、髄膜炎菌 (*Neisseria meningitidis*) の保存領域に対する免疫応答を向上させる。

【0169】

実施例1

変異ループまたは領域が欠失されたPor Aアレル、および選択可能マーカを有するpor Aアレルの作製

por A遺伝子およびフランキング配列を髄膜炎菌 (*Neisseria meningitidis*) 株MC58のゲノムDNAからPCRにより増幅し、pGEMTeasy中にクローニングしてpPor Aを作製した。このプラスミドを、種々のインバースPCR反応のための、または制限消化を介する組換え構築のためのテンプレートとして使用した。プラスミドをシーケンシングした。このように作製されたプラスミドは、表2および表3に列記される1個以上の欠失および/または中断を有した。付加的なプラスミドを、標準的な分子生物学方法 (制限消化、ライゲーション、クローニング) により構築して選択可能マーカにより置き換えられたpor A遺伝子を有するプラスミドを作製した (表2参照)。欠失されたアミノ酸の数は、記載数よりも大きく、または小さいものであり得

ることは明らかである。

【0170】

実施例 2

可変領域を置き換える保存領域を有するプラスミド

プラスミド pDELVR1-2、および pPorA をテンプレートとして使用して PCR および他の標準的分子生物学技術により、porA の VR1 および VR2 コーディング領域が、表 3 および図 1 に記載のループ 7 および 8 の配列により置き換えられ、または改変されたいくつかの PorA アレルを作製した。PorA の他の保存アミノ酸配列、例えば「ループ 2」と定義される配列、VSVGGGATQWGNR (配列番号 48) または任意の他の保存 PorA ペプチド配列をコードする DNA 配列を、ヒトまたは動物免疫系

10

【0171】

記載された MC58 および組換え PorA 配列の一覧を図 1 に提供する。

実施例 3

組換え PorA を発現する遺伝子による野生型 PorA の置き換え

表 2、表 3 ならびに図 1 および図 2 に記載の PorA ヌクレオチド配列を有するプラスミドを、髄膜炎菌 (*N. meningitidis*) 中に、天然形質転換により形質転換することができ、相同組換えは、組換え配列による野生型 porA の置き換えをもたらす。あるいは、組換え porA アレルを上記組換え porA アレルを包含するプラスミドから増幅することができ、これらの増幅プライマーを使用して髄膜炎菌 (*Neisseria meningitidis*) を形質転換することができる。形質転換体の同定を促進するため、porA 遺伝子が欠失され、pLK6 遺伝子からの LacZ-Kan^r カセット、または pJJ260 からの sacB-Kan^r-Tet^r カセットにより置き換えられたレシピエント髄膜炎菌 (*Neisseria meningitidis*) 株を調製した (表 2 参照)。株 Φ3 はレシピエント株 (非特許文献 5) であった。株 Φ09 (非特許文献 5) も、pPorDel: LacZkan により形質転換し、X-gal を含有する培地上での増殖後にブルーコロニーを選択した。続いて、Φ02: delPorASacB の染色体 DNA を Φ09: delPorALacZ 中に形質転換し、X-Gal に基づき選択し、ホワイトコロニーを選択して Φ09delPorASacB を作製した。この後者の株を、変異体 porA アレルを含有するプラスミドによる形質転換のためのレシピエントとして使用した。10% スクロースを含有する培地上での増殖により、porA: sacB アレルを変異体 PorA 遺伝子により置き換えたクローンについての選択を可能とした。こうして、ループ 1、4、および 5 が欠失され、またはループ 7 および 8 によりそれぞれ置き換えられ、もしくは改変された VR1 および VR2 を有する PorA を発現する髄膜炎菌 (*N. meningitidis*) の株を作製した。組換え porA 遺伝子を他のプロモータに転写的に連結させ、相同組換えにより髄膜炎菌 (*N. meningitidis*) の染色体中に挿入することができることは明らかである。

20

30

【0172】

実施例 4

細菌発現を改善するためのポリ G トラクトの改変

野生型 porA 遺伝子は、そのプロモータ中に株内および株間で多様性の高いポリ G トラクトを有し、それにより多様な発現をもたらされる。PorA および変異体の一貫した発現を確保するため、多様性を低減させるようにポリ G トラクトを改変した。それというのも、11 個の G が PorA の最適な発現に関連しているからである。ポリ G トラクトの変化を低減させるため、それが G₅AG₅ により置き換えられるようにそれを改変することができる。この配列は G₁₁ と同一の長さであるが、G₁₁ ホモポリマートラクトよりも長さの変化が低頻度である。この目的のため、約 330 個のヌクレオチドを porA の上流に包含し、改変領域がネイティブポリ G トラクトに代えて G₅AG₅ を含む配列を合成した。この配列は、PorA の最初の 38 個のアミノ酸をコードするヌクレオチドを含

40

50

み、pJ J 2 6 0 のカナマイシン耐性遺伝子の部分も取り込む。この配列をDNA 2 . 0 により合成し、プラスミドベクター中にクローニングした。これをSph I 1 およびRsr I I により切断し、pPorDel : Sac B のSph I - Rsr I I 断片を置き換えるために使用した。得られたプラスミドpPorDel Sac Fix G を髄膜炎菌 (N . meningitidis) の株Φ 9 (非特許文献 5) 中に形質転換し、株Φ 3 - Fix をもたらした。このようなレシピエントは、por A プロモータの全部または一部を置き換え得る。Φ 3 - Fix (後続の形質転換に使用される) は、プロモータ中の 1 1 個の G を含有する。組換え por A を包含する DNA による後続の形質転換は、変異体 por A アレルによる Tet R Sac B Kan 領域の置き換えをもたらす。こうして、プラスミド DNA、または PCR 増幅プライマー (プライマー Por A F 1 : 5 ' GTTCGGTC GTTTC CGATAA - 3 ' (配列番号 5 4) および OMWF 5 ' - GGGGTATAA ATTGAA GACGTATCGG - 3 ' (配列番号 9 2) により増幅される、またはゲノム DNA は、1 0 % スクロースを含有する培地上で選択して、組換え por A の発現を有する株の同定を可能とした。配列分析は、プロモータ中の G 残基の数をさらに同定した (表 5) 。組換え por A 遺伝子を他のプロモータに転写的に連結させ、相同組換えにより髄膜炎菌 (N . meningitidis) の染色体中に挿入することができることは明らかである。例えば、髄膜炎菌 (N . meningitidis) からの por B 遺伝子のプロモータおよびナイセリア属 (Neisseria) の opa 遺伝子のプロモータを、髄膜炎菌 (N . meningitidis) または淋菌 (N . gonorrhoeae) のゲノム DNA から増幅し、髄膜炎菌 (N . meningitidis) 中への組換えアレルの形質転換前に増幅プライマーを使用して表 3 に記載のプラスミドのいずれかの por A プロモータを置き換える。例えば、アクセッション AE 0 0 2 0 9 8 . 2 のヌクレオチド 2 1 5 7 4 5 9 ~ 2 1 5 7 5 2 8 は、髄膜炎菌 (N . meningitidis) 株 MC 5 8 の por B 遺伝子のプロモータ (5 ' - TAAATGCAAGCTAAG CGGCTTGGAAGCCCGGCGCTTAATAATTTCTTAACCAAA AAGGAATACAGCA - 3 ' ; 配列番号 9 3) を包含する。同様に、淋菌 (N . gonorrhoeae) 株 MS 1 1 の opa A のプロモータを、ベランド (Belland) ら 1 9 9 7 , Mol Microbiol . 2 3 : 1 2 3 - 3 5 により記載されたプライマーを使用する PCR により増幅することができる。

10

20

30

【 0 1 7 3 】

実施例 5

組換え Por A はヘテロログスな Por A のエピトープに対する交差反応性を誘発する本発明の Por A タンパク質を含有する外膜小胞 (OMV) は、髄膜炎菌 (N . meningitidis) から調製し、ワクチンとして投与することができる。Fraser (2 0 0 1) , 髄膜炎性疾患のための外膜タンパク質小胞ワクチン, Meningococcal Vaccines : Methods and Protocols . A . Pollard および M . Maiden 編, Humana Press . 6 6 : 8 1 - 1 0 7 に記載のとおり、OMV ワクチンを調製する多くの周知の方法、およびアジュバント、例えばアルミニウム塩を用い、または用いないそれらの調製が存在する。

40

【 0 1 7 4 】

手短に述べると、OMV タンパク質をデオキシコレート法により単離し、タンパク質濃度を BCA アッセイにより評価してから水酸化アルミニウムゲル (シグマ (Sigma)) に吸着させた。1 0 匹の BALB / c マウスの群に 0 . 1 ~ 1 0 μ g の全タンパク質を 0 , 2 1 および 2 8 日目に注射し、次いでワクチンの最終投与 1 4 日後に最終的な全採血により血液を回収した。血清を周知の方法により血液から調製することができる。手短に述べると、血液を室温において 1 ~ 2 時間凝固させ、4 において一晚インキュベートした。血清を 4 における 5 分間の 1 0 , 0 0 0 × g における遠心分離 1 0 分後に上澄みとして回収した。血清を PBS 中で希釈し、4 つの株およびそれらのアイソジェニック Δ por A : : tet 変異体のサルコシル (登録商標) 不溶性タンパク質に対するウエスタン免疫プロットにおいて使用した。二次抗体はヤギ抗マウス Ig G アルカリホスファターゼ

50

コンジュゲート (Sigma) であり、結合を NBT / BCIP (Sigma) を使用して比色的に検出した。このことは、株 1728 - 2 (ループ 7 により置き換えられた VR 1 およびループ 8 により置き換えられた VR 2 を有する Por A ; 配列番号 15 を発現する) からの単離タンパク質を含む OMV によりワクチン接種されたマウスからの血清が、全ての株からの Por A を認識することを示した (表 5 および図 5 参照)。使用した株 (およびそれらの関連 Por A 血清型) は、MC 58 (P1. 7, 16 - 2)、BZ 133 (P1. 18 - 1, 3)、BZ 232 (P1. 5 - 2, 2 - 2) および 400 (P1. 19, 15) であった。

【0175】

実施例 6

組換え Por A タンパク質は、ELISA によるヘテロロガスな Por A の表面エピトープに対する交差反応性を誘発する

固体培地 (BHI 寒天) 上での一晚培養からの細菌を 4 時間継代培養してから $A_{600nm} = 0.1$ まで再懸濁し、加熱死 (56、30 分間) させてから平底 96 ウェルプレート (Nunc immunosorp) をコーティングした。血清を、実施例 5 に記載の OMV として調製された $0.1 \sim 0.5 \mu g$ のタンパク質によりワクチン接種されたマウスから回収した。ワクチン接種マウスからの血清を、それらの細菌細胞認識能についてこのアッセイにおいて試験した。二次抗体はヤギ抗マウス免疫グロブリン HRP コンジュゲート (DAKO P 0447、マウス免疫グロブリン、主として IgG に対して生成されたもの) であった。逆数幾何平均力価を図 6 A および 6 B に報告し、表 6 は、読みが陰性対照を超えた (陰性対照 OD の平均に 3 SD を加えたものとして定義) 最終希釈である。それぞれの場合、血清を親株 (400、BZ 133、および BZ 232) およびそれぞれのアイソジェニック Por A 変異株に対して試験した。驚くべきことに、株 1728 - 2 (ループ 7 により置き換えられた VR 1 およびループ 8 により置き換えられた VR 2 を有する Por A ; 配列番号 15 を発現する) および株 D 145 (ループ 1、4、および 5 が欠失された Por A ; 配列番号 5 を発現する) からの OMV は、3 つの試験 Por A 変異株よりも高い力価で 3 つの試験株を認識する抗体を誘発した。逆に、株 $\Phi 9$ (Por A P1. 7, 16 - 2 を発現する)、株 027 - 3 (配列番号 13 の Por A を発現する) および株 028 - 10 (配列番号 14 の Por A を発現する) からの OMV は、この実験において Por A 変異株よりも良好に野生株を認識するマウス抗体を一貫して誘発しなかった。

【0176】

実施例 7

変異体 Por A を有する OMV の、オートロガスまたはヘテロロガスな株を標的化する能力を評価するための殺菌アッセイ

このアッセイは、フーゲルハウト (Hoogerhout) ら 1995 Infection and Immunity 63: 3473 - 3478) により記載された方法の改変により実施する。手短に述べると、細菌を BHI プレート上で 37 において 5 % CO_2 中で一晚増殖させる。この一晚培養からの細菌を、同一条件下で 4 ~ 6 時間継代培養してから 1 mL の PBS 中で懸濁する。細菌懸濁液を PBS 中で約 10^5 cfu/mL に調整する。試験すべき血清を 56 において 45 分間熱不活化する。幼齢ウサギ補体を商業的供給業者 (例えばペルフリーズ (PelFreez)) から得る。アッセイは、無菌ポリスチレン平底 96 ウェルマイクロタイタープレート中で実施する。それぞれのウェルの全容量は $24 \mu L$ であり、 $12 \mu L$ の PBS 中 2 倍段階希釈血清および $6 \mu L$ の細菌懸濁液 (300 ~ 900 の細菌を含有する) を含む。血清および細菌を室温において 10 分間インキュベートしてから $6 \mu L$ の PBS 中 80 % 補体 (最終濃度 20 % (vol/vol)) を添加した。対照は、a) PBS、細菌および補体、b) PBS、細菌および血清である。全ての補体の添加および混合後、それぞれの対照ウェルからの $7 \mu L$ アリコート (アリコート) を BHI 寒天プレートに移す。マイクロタイタープレート中を 37 において 5 % CO_2 中で 60 分間インキュベートする。このインキュベーション後、それぞれのウェルから

10

20

30

40

50

の 7 μ L アリコート を BHI 寒天プレートに移す。全ての BHI プレート を 37 において 5 % CO₂ 中で 14 ~ 18 時間 インキュベートし、細菌コロニーを計数する。血清殺菌死滅を、細菌の少なくとも 90 % が死滅する最大逆数希釈として報告する。それぞれの場合、個々のまたはプールしたマウス血清を MC58、MC58 por::tet に対して、およびヘテロガスな PorA およびそれらの PorA 変異体を発現する株に対して試験する (MC58 PorA は P1.7, 16.2 である一方、株 2996 および M990 は、例えばそれぞれ P1.5.1, 2-2 および P1.18, 25 である; 図 3A 参照)。

【0177】

本明細書を通して、本発明をいずれか 1 つの実施形態または特徴の具体的な集合に限定することなく、本発明の好ましい実施形態を記載することを目的とした。したがって、当業者により、本開示に照らして、本発明の範囲を逸脱することなく種々の改変および変更を例示された特定の実施形態において行うことができることが認識される。

10

【0178】

本明細書に参照された全てのコンピュータプログラム、アルゴリズム、特許および科学文献は、参照により本明細書に組み込まれる。

【0179】

【表 1】

表 1. MC58 PorA (P1.7, 16、アクセッション番号 AF226344) のループ配列。太字は、血清亜型間で同一または保存された残基を示す。ループの程度は、非特許文献 9 または非特許文献 8 により提案された PorA モデルの前例に従う。

20

ループ	配列
1 (VR1)	VEGRNYQLQLTEAQAANGGASGQVKVTKVTKAKRKSRIRTKI (配列番号 47)
2	VSV-GGGATQWGNR (配列番号 48)
3	ASQAIDPWDSDNDVASQLGLIFKRHDD (配列番号 49)
4 (VR2)	PIQNSKSAYTPAYYTKNTNNNLTLVPAVVGKPGS (配列番号 50)
5 (SVR1)	RHANVGRDAFELFLGSGSDQAKGTDPLKNH (配列番号 51)
6 (SVR2)	LSENGDK-TKNSTTE (配列番号 52)
7	FDLIERGKKGENTS (配列番号 53)
8	KRNTGIGNYTQIN (配列番号 54)

30

【0180】

【表 2】

表2 配列番号1～10の細菌発現のための発現構築物

プラスミド名		使用プライマーまたは方法
pPorA	遺伝子座NMB1429のリーディングフレームと同一のporAアレルを含有するプラスミド	PorAF1: 5'-GTTCGGTGGTTTCGATAA-3' (配列番号55) PorARev1: 5'-TTTGAAACCCCTGACCCCTCTG-3' (配列番号56)
pPorDel	porA遺伝子欠失	porDELup 5'-TATACCCGGGTCG CAT ATC GGC TTC CTT TTG TAA ATT TGA-3' (配列番号57) porDELdown 5'-TCC GTC GGT TTG CGC CAC AAA TTC -3' (配列番号58)
pPorDel:LacZkan	pPorDelにLacZkanを挿入	LacZkanをlacZstuf:GTGAAAAGGCCTGATCCCGTGGTTTACAA (配列番号59) lacZstufkanR:GTGAAAAGGCCTCAATTCTGATTAGAAAAAATC (配列番号60) を使用して増幅し、Stulにより消化し、SmaI消化pPorDel中にライゲートした
pPorDel:SacB	pPorDelにTetR SacB KanRを挿入	TetR-SacB-KanをpuJ260からSmaIにより切り取り、SmaI消化pPorDel中にライゲートした
pPorDel:Tet	pPorDelにTetSを挿入	TetM遺伝子をpGEMTetM-BからHincIIにより切り取り、SmaI消化pPorDel中にライゲートした
pPorDelSacFixG		G5AG5を取り込む合成配列を、pPorDel:SacBのSphI-RsrII部位中にクローニングした
pPorΔL1	Δループ1 アミノ酸 38～63 欠失	DEL_Loop1_up_5'-CTG GTA GTT CCT GCC TTC CACGG-3' (配列番号61) DEL_Loop1_down 5'-AGC CAA GCC GCT AAC GGT GGA-3' (配列番号62) テンプレートとしてpPorA
pPorΔL4	Δループ4 アミノ酸 187～211 欠失	DEL_L4up 5'-GAT CGG AAC GAA TTG AAC GCT GC-3' (配列番号63) DEL_L4down 5'-GTT GTC GGC AAG CCC GGA TC-3' (配列番号64) テンプレートとしてpPorA
pPorΔL1-4	Δループ1 アミノ酸 38～63 欠失	テンプレートとしてpPorΔL1を使用するDEL_L4_up DEL_L4_down

10

20

30

pPorD145	Δルーブ1 アミノ酸 38~63 欠失	Δルーブ4 アミノ酸 187~211 欠失	Δルーブ5 アミノ酸 248~268 欠失	DEL_L5_up_5'-TCC GAC ATT GGC GTG TCT CGC-3' (配列番号65) DEL_L5-down 5'-TTG AAA AAC CAT CAG GTA CAC CGT CTG-3' (配列番号66) テンプレートとしてpPorΔL1-4
pDELVR1	ΔVR1 アミノ酸 43~63 欠失			delVR1 up 5' TTC AGT CAA TTG CAG CTG GTA GTT CCT-3' (配列番号67) DEL_Loop1_down 5'-AGC CAA GCC GCT AAC GGT GGA-3' (配列番号68) テンプレートとしてpPorA
pDELVR2		ΔVR2 アミノ酸 197~209 欠失		欠失を含む領域を合成し、pPorAのVR2領域を包含するBssHII-KpnI断片を 置き換えるために使用した
pDELVR1-2	ΔVR1 アミノ酸 43~63 欠失	ΔVR2 アミノ酸 197~209 欠失		欠失を含む領域を合成し、pDELVR1のVR2領域を包含するBssHII-KpnI断片を 置き換えるために使用した
pDELVR1-2-5	ΔVR1 アミノ酸 43~63 欠失	ΔVR2 アミノ酸 197~209 欠失	Δルーブ5 アミノ酸 248~268 欠失	DEL_L5_up_5'-TCC GAC ATT GGC GTG TCT CGC-3' (配列番号69) DEL_L5-down 5'-TTG AAA AAC CAT CAG GTA CAC CGT CTG-3' (配列番号70) テンプレートとしてpDELVR1-2
pDELVR1-2-5-6	ΔVR1 アミノ酸 43~63 欠失	ΔVR2 アミノ酸 197~209 欠失	Δルーブ5 アミノ酸 248~268 欠失	さらにルーブ6のアミノ酸298~306を欠失 DEL_L6_up 5' AGA CAA ATC CAA CTG AGC CGC CAA (配列番号71) DEL_L6_down 5' AGT ACG ACC GAA ATT GCC GCC ACT -3' (配列番号72) テンプレートとしてpDELVR1-2-5を使用

【 0 1 8 1 】

10

20

30

40

【表 3】

表3 配列番号11～19の細菌発現のための発現構築物

プラスミド名	VR1	VR2	使用プライマー
pVR2-7	WT	aa197～209を aa331～344に より置き換えた	Loop4-7up 5' ACC GCG TTC GAT AAA GTC GAA AGC CCG CGT ATA GGC GGA CTT -3' (配列番号73) Loop4-7down 5'- AAA AAA GGC GAA AAT ACC AGC CCG GCT GTT GTC GGC AAG C-3' (配列番号74) PCRテンプレートとしてpPorA
pVR2-8	WT	aa197～209を aa370～382に より置き換えた	Loop4-8up 5' GCC GGT ATT GCG TTT AGC CCG CGT ATA GGC GGA CTT (配列番号75) Loop4-8down 5'- ATC GGC AAC TAC ACT CAA ATT AAT CCG GCT GTT GTC GGC AAG C-3' (配列番号76) テンプレートとしてpPorA
pΔVR1VR2-7	ΔVR1 アミノ酸 43～63 欠失	aa197～209を aa331～344に より置き換えた	使用プライマー: delVR1_up, DEL_Loop1_down テンプレートとしてpVR2-7
pΔVR1VR2-8	ΔVR1 アミノ酸 43～63 欠失	aa197～209を aa370～382に より置き換えた	使用プライマー: delVR1_up, DEL_Loop1_down テンプレートとしてpVR2-8
pVR1-7VR2-8	aa43～63を aa331～344に より置き換えた	aa197～209を aa370～382に より置き換えた	Loop1-7up 5' ACC GCG TTC GAT AAA GTC GAA TTC AGT CAA TTG CAG CTG GTA GTT CCT-3' (配列番号77) Loop1-7down 5'-AAA AAA GGC GAA AAT ACC AGC AGC CAA GCC GCT AAC GGT GGA-3' (配列番号78) テンプレートとしてpVR2-8

10

20

30

40

pVR1-7VR2-8Del5	aa43～63を aa331～344に より置き換えた	aa197～209を aa370～382に より置き換えた	Δループ5 アミノ酸248～268を、プライマー DEL_L5_up_5'-TCC GAC ATT GGC GTG TCT CGC-3' (配列番号79) DEL_L5-down 5'-TTG AAA AAC CAT CAG GTA CAC CGT CTG-3' (配列番号80) を使用して欠失させた
pPor7in1	ループ7をVR1中に: aa331～344を VR1中に挿入		7into1up: 5' ACC GCG TTC GAT AAA GTC GAA CGC TCC ACC GTT AGC GCG TIG TGC-3' (配列番号81) 7into1down: 5'-5' -AAA AAA GGC GAA AAT ACC AGC AGC GGT CAG GTA AAA GTT ACT AAA GTT ACT AAG-3'-3' (配列番号82)
pPor8in4	ループ7をVR1中に: aa331～344を VR1中に挿入	ループ8を VR2中に挿入: aa370～382を VR2中に挿入	テンプレートとしてpPorA 8into4up: 5' GCC GGT ATT GCG TTT GTT TGT ATT CTT AGT ATA ATA AGC-3' (配列番号83) 8into4down: 5'-ATC GGC AAC TAC ACT CAA ATT AAT AAC AAT CTT ACT CTC GTT CCG GCT GTT-3' (配列番号84)
pPor7in1-8in4	ループ7をVR1中に: aa331～344を VR1中に挿入	ループ8を VR2中に挿入: aa370～382を VR2中に挿入	テンプレートとしてpPorA プライマー: 8into4up & 8into4down テンプレートとしてpPor7in1

10

20

30

40

【表 4】

表4 髄膜炎菌(N. meningitidis)組換え株の誘導

ドナーアレル/レシピエント株	プラスミド/PCR/ゲノム	得られた髄膜炎菌(N.meningitidis)クローン
PorDel:Tet	pPorDel:Tetを ϕ 9中に	9 Δ PorTa
PorDel:LacZkan	pPorDel:LacZkanを ϕ 9中に	ϕ 2 Δ PorlacZkan
PorDel:LacZkan	ϕ 2 Δ PorlacZkanのgDNAを切断 9 Δ PorTa中に	ϕ 9 Δ Porlac
PorDel: SacB	pPorSacBをMC58中に	58PorSac1
PorSacB	58PorSac1のgDNAを ϕ 9 Δ Porlac中に	ϕ 9delPorASacb
PorDelSacFixG	pPorDelSacFixGを ϕ 3中に	ϕ 3Fix3A
PorA:SacB Kan 11G	ϕ 3Fix3AからのgDNAを ϕ 9中に	9-Fix

10

【 0 1 8 3 】

【表 5】

表5 ワクチン試験に使用された髄膜炎菌(N. meningitidis)組換え株

アレル	プラスミド/PCR/ゲノムドナーDNAを レシピエント株中に:	得られた髄膜炎菌 (N.meningitidis)クローン(注釈)
PorDel:Tet	pPorDel:Tetを ϕ 9中に	9 Δ PorTa
WT porA	pPorAを9-Fix中に	9-5、(プロモーター中に11個のG)
WT porA	pPorAを9-Fix中に	9-1、(プロモーター中に10個のG)
1728	pVR1-7VR2-8を9-Fix中に	1728-2、(プロモーター中に 11個のG)
0-27	p Δ VR1VR2-7のPCR産物(プライマー-OMWF およびAR1)を9-Fix中に	027-3(プロモーター中に 11個のG)
0-28	p Δ VR1VR2-8のPCR産物(プライマー-OMWF およびAR1)を9-Fix中に	028-10(プロモーター中に 11個のG)
Δ L1 Δ L4 Δ L5	p Δ L1 Δ L4 Δ L5のPCR産物(プライマー-OMWF およびAR1)を9-Fix中に	145-5(プロモーター中に 11個のG)

20

30

【 0 1 8 4 】

【表 6】

表6 実施例6の実験2からの表集計データ。0.1~0.5 μ gデオキシコレートOMVによりワクチン接種された10匹のマウスからのプール血清を、列記株(「試験株」)の加熱死した細菌に対して段階2倍希釈で一次抗体としてELISAアッセイにおいて使用した。この表において、P-は、中断されたporA遺伝子を有する株を示す。

免疫原:						
	ϕ 9	ϕ 9 P-	1728-2	D145	027-3	028-10
試験株						
400	16000	32000	406375	256000	3177	15996
400P-	12699	64000	40317	64000	7998	31989
BZ133	8000	64000	203187	128000	5035	50816
BZ133P-	8000	64000	50797	64000	7998	15996
BZ232	6350	32000	161270	80635	12706	15996
BZ232P-	6350	40317	64000	40317	50816	40272

40

【 0 1 8 5 】

【表 7】

表7 タンパク質構築物のまとめ

構築物	配列番号
V領域の欠失のみ	2-10
保存ループにより置き換えられたV領域の欠失	11-16および20-22
保存ループのV領域中への挿入	17-19

【図 1 - 1】

```

PorA MC58      1 MRKKLTALVLSALPLAAVADVSLYEIKAGVEGRNVLQLTEAQAANGG- 49
pPORDEL1       1 MRKKLTALVLSALPLAAVADVSLYEIKAGVEGRNV----- 37
pPorDEL4       1 MRKKLTALVLSALPLAAVADVSLYEIKAGVEGRNVQLQLTEAQAANGG- 49
pPor1-4        1 MRKKLTALVLSALPLAAVADVSLYEIKAGVEGRNV----- 37
pPorDEL1-4-5   1 MRKKLTALVLSALPLAAVADVSLYEIKAGVEGRNV----- 37
pDELVR1        1 MRKKLTALVLSALPLAAVADVSLYEIKAGVEGRNVQLQLTE----- 42
pDELVR2        1 MRKKLTALVLSALPLAAVADVSLYEIKAGVEGRNVQLQLTEAQAANGG- 49
pDELVR1-2      1 MRKKLTALVLSALPLAAVADVSLYEIKAGVEGRNVQLQLTE----- 42
pDELVR1-2-5    1 MRKKLTALVLSALPLAAVADVSLYEIKAGVEGRNVQLQLTE----- 42
pDELVR1-2-5-6  1 MRKKLTALVLSALPLAAVADVSLYEIKAGVEGRNVQLQLTE----- 42
pVR2-7         1 MRKKLTALVLSALPLAAVADVSLYEIKAGVEGRNVQLQLTEAQAANGG- 49
pVR2-8         1 MRKKLTALVLSALPLAAVADVSLYEIKAGVEGRNVQLQLTEAQAANGG- 49
pDELVR1VR2-7   1 MRKKLTALVLSALPLAAVADVSLYEIKAGVEGRNVQLQLTE----- 42
pDELVR1VR2-8   1 MRKKLTALVLSALPLAAVADVSLYEIKAGVEGRNVQLQLTE----- 42
pVR1-7VR2-8    1 MRKKLTALVLSALPLAAVADVSLYEIKAGVEGRNVQLQLTE----- 42
pVR1-7VR2-8DEL5 1 MRKKLTALVLSALPLAAVADVSLYEIKAGVEGRNVQLQLTE----- 42
pPor7in1       1 MRKKLTALVLSALPLAAVADVSLYEIKAGVEGRNVQLQLTEAQAANGG- 50
pPor8in4       1 MRKKLTALVLSALPLAAVADVSLYEIKAGVEGRNVQLQLTEAQAANGG- 49
pPor7in1-8in4  1 MRKKLTALVLSALPLAAVADVSLYEIKAGVEGRNVQLQLTEAQAANGG- 50

```

【図 1 - 2】

```

PorA MC58      87 DGLKAVWQLEQDVSVAGGGATQWGNRESFIGLAGEFOTLRAGRANQFDD 136
pPORDEL1       61 DGLKAVWQLEQDVSVAGGGATQWGNRESFIGLAGEFOTLRAGRANQFDD 110
pPorDEL4       87 DGLKAVWQLEQDVSVAGGGATQWGNRESFIGLAGEFOTLRAGRANQFDD 136
pPor1-4        61 DGLKAVWQLEQDVSVAGGGATQWGNRESFIGLAGEFOTLRAGRANQFDD 110
pPorDEL1-4-5   61 DGLKAVWQLEQDVSVAGGGATQWGNRESFIGLAGEFOTLRAGRANQFDD 110
pDELVR1        66 DGLKAVWQLEQDVSVAGGGATQWGNRESFIGLAGEFOTLRAGRANQFDD 115
pDELVR2        87 DGLKAVWQLEQDVSVAGGGATQWGNRESFIGLAGEFOTLRAGRANQFDD 136
pDELVR1-2      66 DGLKAVWQLEQDVSVAGGGATQWGNRESFIGLAGEFOTLRAGRANQFDD 115
pDELVR1-2-5    66 DGLKAVWQLEQDVSVAGGGATQWGNRESFIGLAGEFOTLRAGRANQFDD 115
pDELVR1-2-5-6  66 DGLKAVWQLEQDVSVAGGGATQWGNRESFIGLAGEFOTLRAGRANQFDD 115
pVR2-7         87 DGLKAVWQLEQDVSVAGGGATQWGNRESFIGLAGEFOTLRAGRANQFDD 136
pVR2-8         87 DGLKAVWQLEQDVSVAGGGATQWGNRESFIGLAGEFOTLRAGRANQFDD 136
pDELVR1VR2-7   66 DGLKAVWQLEQDVSVAGGGATQWGNRESFIGLAGEFOTLRAGRANQFDD 115
pDELVR1VR2-8   66 DGLKAVWQLEQDVSVAGGGATQWGNRESFIGLAGEFOTLRAGRANQFDD 115
pVR1-7VR2-8    80 DGLKAVWQLEQDVSVAGGGATQWGNRESFIGLAGEFOTLRAGRANQFDD 129
pVR1-7VR2-8DEL5 80 DGLKAVWQLEQDVSVAGGGATQWGNRESFIGLAGEFOTLRAGRANQFDD 129
pPor7in1       101 DGLKAVWQLEQDVSVAGGGATQWGNRESFIGLAGEFOTLRAGRANQFDD 150
pPor8in4       87 DGLKAVWQLEQDVSVAGGGATQWGNRESFIGLAGEFOTLRAGRANQFDD 136
pPor7in1-8in4  101 DGLKAVWQLEQDVSVAGGGATQWGNRESFIGLAGEFOTLRAGRANQFDD 150

```

```

PorA MC58      50 -----ASGQVKVKVTKAKSRIRTKISDFGSGFIGFGKGSDDL 86
pPORDEL1       38 -----SRIIRTKISDFGSGFIGFGKGSDDL 60
pPorDEL4       50 -----ASGQVKVKVTKAKSRIRTKISDFGSGFIGFGKGSDDL 86
pPor1-4        38 -----SRIIRTKISDFGSGFIGFGKGSDDL 60
pPorDEL1-4-5   38 -----SRIIRTKISDFGSGFIGFGKGSDDL 60
pDELVR1        43 -----SRIIRTKISDFGSGFIGFGKGSDDL 65
pDELVR2        50 -----ASGQVKVKVTKAKSRIRTKISDFGSGFIGFGKGSDDL 86
pDELVR1-2      43 -----SRIIRTKISDFGSGFIGFGKGSDDL 65
pDELVR1-2-5    43 -----SRIIRTKISDFGSGFIGFGKGSDDL 65
pDELVR1-2-5-6  43 -----SRIIRTKISDFGSGFIGFGKGSDDL 65
pVR2-7         50 -----ASGQVKVKVTKAKSRIRTKISDFGSGFIGFGKGSDDL 86
pVR2-8         50 -----ASGQVKVKVTKAKSRIRTKISDFGSGFIGFGKGSDDL 86
pDELVR1VR2-7   43 -----SRIIRTKISDFGSGFIGFGKGSDDL 65
pDELVR1VR2-8   43 -----SRIIRTKISDFGSGFIGFGKGSDDL 65
pVR1-7VR2-8    43 FDFIERGKKGENTSSGQVKVKVTKAKSRIRTKISDFGSGFIGFGKGSDDL 79
pVR1-7VR2-8DEL5 43 FDFIERGKKGENTSSGQVKVKVTKAKSRIRTKISDFGSGFIGFGKGSDDL 79
pPor7in1       51 FDFIERGKKGENTSSGQVKVKVTKAKSRIRTKISDFGSGFIGFGKGSDDL 100
pPor8in4       50 -----ASGQVKVKVTKAKSRIRTKISDFGSGFIGFGKGSDDL 86
pPor7in1-8in4  51 FDFIERGKKGENTSSGQVKVKVTKAKSRIRTKISDFGSGFIGFGKGSDDL 100

```

FIGURE 1

```

PorA MC58      137 ASQAIDPWDSNNNDVASQLGIFKRHDDMPVSVRYDSFEFGSGSGVQFVP 186
pPORDEL1       111 ASQAIDPWDSNNNDVASQLGIFKRHDDMPVSVRYDSFEFGSGSGVQFVP 160
pPorDEL4       137 ASQAIDPWDSNNNDVASQLGIFKRHDDMPVSVRYDSFEFGSGSGVQFVP 186
pPor1-4        111 ASQAIDPWDSNNNDVASQLGIFKRHDDMPVSVRYDSFEFGSGSGVQFVP 160
pPorDEL1-4-5   111 ASQAIDPWDSNNNDVASQLGIFKRHDDMPVSVRYDSFEFGSGSGVQFVP 160
pDELVR1        116 ASQAIDPWDSNNNDVASQLGIFKRHDDMPVSVRYDSFEFGSGSGVQFVP 165
pDELVR2        137 ASQAIDPWDSNNNDVASQLGIFKRHDDMPVSVRYDSFEFGSGSGVQFVP 186
pDELVR1-2      116 ASQAIDPWDSNNNDVASQLGIFKRHDDMPVSVRYDSFEFGSGSGVQFVP 165
pDELVR1-2-5    116 ASQAIDPWDSNNNDVASQLGIFKRHDDMPVSVRYDSFEFGSGSGVQFVP 165
pDELVR1-2-5-6  116 ASQAIDPWDSNNNDVASQLGIFKRHDDMPVSVRYDSFEFGSGSGVQFVP 165
pVR2-7         137 ASQAIDPWDSNNNDVASQLGIFKRHDDMPVSVRYDSFEFGSGSGVQFVP 186
pVR2-8         137 ASQAIDPWDSNNNDVASQLGIFKRHDDMPVSVRYDSFEFGSGSGVQFVP 186
pDELVR1VR2-7   116 ASQAIDPWDSNNNDVASQLGIFKRHDDMPVSVRYDSFEFGSGSGVQFVP 165
pDELVR1VR2-8   116 ASQAIDPWDSNNNDVASQLGIFKRHDDMPVSVRYDSFEFGSGSGVQFVP 165
pVR1-7VR2-8    130 ASQAIDPWDSNNNDVASQLGIFKRHDDMPVSVRYDSFEFGSGSGVQFVP 179
pVR1-7VR2-8DEL5 130 ASQAIDPWDSNNNDVASQLGIFKRHDDMPVSVRYDSFEFGSGSGVQFVP 179
pPor7in1       151 ASQAIDPWDSNNNDVASQLGIFKRHDDMPVSVRYDSFEFGSGSGVQFVP 200
pPor8in4       137 ASQAIDPWDSNNNDVASQLGIFKRHDDMPVSVRYDSFEFGSGSGVQFVP 186
pPor7in1-8in4  151 ASQAIDPWDSNNNDVASQLGIFKRHDDMPVSVRYDSFEFGSGSGVQFVP 200

```

FIGURE 1 cont'd

【 図 1 - 4 】

PorE MC58	217	VHRLTGGYEGGGINLAAQAQLDSENGDKTNSTTETAAATSYRFGNVAV	323
pORDEL1	248	VHRLTGGYEGGGINLAAQAQLDSENGDKTNSTTETAAATSYRFGNVAV	323
pPorE-4	248	VHRLTGGYEGGGINLAAQAQLDSENGDKTNSTTETAAATSYRFGNVAV	323
pPorE-4	223	VHRLTGGYEGGGINLAAQAQLDSENGDKTNSTTETAAATSYRFGNVAV	278
pPorE-4+5	202	VHRLTGGYEGGGINLAAQAQLDSENGDKTNSTTETAAATSYRFGNVAV	278
pPorE-4	202	VHRLTGGYEGGGINLAAQAQLDSENGDKTNSTTETAAATSYRFGNVAV	102
pDELVR2	261	VHRLTGGYEGGGINLAAQAQLDSENGDKTNSTTETAAATSYRFGNVAV	310
pDELVR1-2	240	VHRLTGGYEGGGINLAAQAQLDSENGDKTNSTTETAAATSYRFGNVAV	289
pDELVR1-2-5	219	VHRLTGGYEGGGINLAAQAQLDSENGDKTNSTTETAAATSYRFGNVAV	268
pDELVR1-2-5-6	219	VHRLTGGYEGGGINLAAQAQLDSENGDKTNSTTETAAATSYRFGNVAV	268
pVR2-8	274	VHRLTGGYEGGGINLAAQAQLDSENGDKTNSTTETAAATSYRFGNVAV	323
pDELVR1VR2-7	254	VHRLTGGYEGGGINLAAQAQLDSENGDKTNSTTETAAATSYRFGNVAV	303
pDELVR1VR2-8	253	VHRLTGGYEGGGINLAAQAQLDSENGDKTNSTTETAAATSYRFGNVAV	302
pVR1-VR2-8	246	VHRLTGGYEGGGINLAAQAQLDSENGDKTNSTTETAAATSYRFGNVAV	316
pVR1-VR2-8DEL5	246	VHRLTGGYEGGGINLAAQAQLDSENGDKTNSTTETAAATSYRFGNVAV	316
pPorE-1	287	VHRLTGGYEGGGINLAAQAQLDSENGDKTNSTTETAAATSYRFGNVAV	336
pPorE-1	287	VHRLTGGYEGGGINLAAQAQLDSENGDKTNSTTETAAATSYRFGNVAV	336
pPorE-7in1-8in4	301	VHRLTGGYEGGGINLAAQAQLDSENGDKTNSTTETAAATSYRFGNVAV	350

PorA MC58	318	RIYAHGDFPIERGGKGGTSYDQIAGVDFDSKRTSAIVSGAWLK	373
pORDL1	298	RIYAHGDFPIERGGKGGTSYDQIAGVDFDSKRTSAIVSGAWLK	373
pPorDEL4	298	RIYAHGDFPIERGGKGGTSYDQIAGVDFDSKRTSAIVSGAWLK	373
pPor1	273	RIYAHGDFPIERGGKGGTSYDQIAGVDFDSKRTSAIVSGAWLK	348
pDEL1V1-4+5	252	RIYAHGDFPIERGGKGGTSYDQIAGVDFDSKRTSAIVSGAWLK	301
pDELV1	303	RIYAHGDFPIERGGKGGTSYDQIAGVDFDSKRTSAIVSGAWLK	360
pDEL1V2	304	RIYAHGDFPIERGGKGGTSYDQIAGVDFDSKRTSAIVSGAWLK	360
pDEL1V2-1	290	RIYAHGDFPIERGGKGGTSYDQIAGVDFDSKRTSAIVSGAWLK	339
pDEL1V2-2+5	269	RIYAHGDFPIERGGKGGTSYDQIAGVDFDSKRTSAIVSGAWLK	318
pDEL1V2-1+5-6	261	RIYAHGDFPIERGGKGGTSYDQIAGVDFDSKRTSAIVSGAWLK	310
pVR2-7	325	RIYAHGDFPIERGGKGGTSYDQIAGVDFDSKRTSAIVSGAWLK	373
pDEL1V1VR2-8	304	RIYAHGDFPIERGGKGGTSYDQIAGVDFDSKRTSAIVSGAWLK	360
pDEL1V1VR2-9	303	RIYAHGDFPIERGGKGGTSYDQIAGVDFDSKRTSAIVSGAWLK	359
pVR1-7VR2-8	317	RIYAHGDFPIERGGKGGTSYDQIAGVDFDSKRTSAIVSGAWLK	366
pVR1-7VR2-BDEL5	316	RIYAHGDFPIERGGKGGTSYDQIAGVDFDSKRTSAIVSGAWLK	365
pPorB1	332	RIYAHGDFPIERGGKGGTSYDQIAGVDFDSKRTSAIVSGAWLK	387
pPorB1a	332	RIYAHGDFPIERGGKGGTSYDQIAGVDFDSKRTSAIVSGAWLK	387
pPor1-8in1	351	RIYAHGDFPIERGGKGGTSYDQIAGVDFDSKRTSAIVSGAWLK	400

FIGURE 1 cont'd

【 図 2 A - 1 】

[illegible]

AA 序列 pPorAL1

ATGA CAAA AAAAT CTTACCGG CTGTAATGTGCGACCTGCGCGCTTGGCGGGTGGCGATGTGACGCTATACGGCGCA
 AATCAAGCGCGGCTGTGAAGAGCAGCAAGCTACACGCTGCAATGACTGAGGACAAAGCGGCTAGCGGTGACGACGGAG
 GTGACGTAAGAAGTGTAAAGTAATGTATACGCAAGCAATGCGGTAAGCAATCACTGAATTTGGCTGGTTTATTC
 GCGCTTAAAGGGAGCTGGAGATTTGGGCGGCGGCTGAGGCTGCTTGGCAAGTIGAGCAAGCAATATCGCTGCTGGG
 GCGGCTGGCGACCACTGGAGTGGCGGAGGATCTTATTCGCTTGGCGAGCAAGTACGCTAGCTGGCGCGGGT
 GCGTTCGATCACTGTTGAGATGCGACGACGAGCATATGCTCTTGGACGACATGATGCTGGTCTCGATCG
 CGTATATGAGGAGGAGGAGGAGGAGGCTGCGCTGCTGCTGACGATGACCTGACCTGACCTGACCTGACCTGACCT
 GAGGAGGAGTTCGCTGCTGCTGCGACGAGGCTGCGATGTTGATTCATGCTGCTGATTAACAAATAGGCG
 TTTGGCGGCGAGCTACTGCTTTAAATGTGGAGACGACCAAGCTGCGGAGTACTGCTTTGATGTTGTTTGTATC
 GCGACCGGAGGAGTCAACGACCAAGGATACGTCGCTTTGAAAACCACTCAGTACAGCTGTGACGGCGCGCTATC
 GAGGAGGCTGCTGATCTGCGCTTGGCGGCTCGCTTGATTGTTGCTGATTAATGAGGACCAAGCAAAACAGTACGA
 CGAATGTCGCGCGCATGCTTCTACGATCTCGGTAATCGGTTGACGATCAGCTACGCTATGCCGATGCTTTCGATCT
 ATGACGCGCGTAAAGAGCGCAAAATATCACTGATGCGTATGCGGATGCTGCGATGCTGCGATGCTGCGATGCTG
 GCGTGGCTGGCT
 CGCTGCTGGCT

AA 配列 pPorA_{L4}

MRKKLPAI₁VAL₂PLAAVADQVSLYEIKAGVEGRNYQLQLTEAQAANGSGASGVKVTKVTKAKSRIRTKISDFGSFI
 GFKSGSDIGDGLGKAAWQVLEQVSVAGGAGTQWNGRESFTGLAGEFGTLRAGRVAHQFDASQATDPWDNNDVASOL
 LKFRHDDMDPVSVRYDSPEESGSGSGSVQFVPFIVVKGPGSDVYYAGLNYKNGSGFAGNYAFKYARHANVGRNAFELFLI
 GSGSDQKSGTDPDKNHQVHYDTGGVEEGLNALQALDLSENKSTNTASTTAA₃SYA₄RGVAFVRI₅SYA₆GDPF
 TERGKKAGSYDOLIA₇GVDDYD₈GKRTA₉ISV₁₀GAWLKRENT₁₁IGNYTQ₁₂INAA₁₃SYE₁₄RI₁₅KE₁₆*

FIGURE 1 cont'd

【 図 2 A - 3 】

DNA 配列 pDELVR1

[illegible]

AA 配列 pDELVR1

AA 序列 pDELVR1
MRKKTLALVLSALPLAAVADVSLGYETKAGVEGRNYQLQLTESRTKISDFSGSFIGKSGEGLDGLKAVWQLEQV
VAVAGGATQWGNRESFIGLAGEFGLRAGRVAQFDDASQAIPDPWSDNNDVASQLGFKRHHDMPPVSVRYDSPEFS
GFGSGVSGYPIQNSKSAITYPATYITKNTNNLLVLEAVVWPKGSDVYYAGLNYKNGGFAGNYAFKYAHANHYGRNAFE
LFLTSGGSDQAKGDTPLKHHVHRLTCGYEBCGLNLAQAQLNLSGKNTKSTFAGNATYKSGFNAVPISYAH
GFDFIERGGKSDYSDQITACGVDDYDFSKRTALVSGAMKQWDSGQNTQYQINAAVGLRHKF*

DNA 配列 pDELVR2

DNA data file pDELv2E

```
ATGCGAAAAAACATCTACGCGCTGGTATTACGAGCTGGCGGTTCGCGCGATTGCGCATTCAGCATATACGCGCA
ATCTGAAAGAGGCTGTGGAAGAGAGGATCTACGCGTCTGCTGAGAGCAAGCGGCTAATATGCGACGGCGGAG
GATCTGATGAGGAGGATCTATACGCGCAAAAGCGGATCTAGGCGAGAAATCAGGATATTCGGCTGGTTTATC
CGCTTTATAGGGGATGAGSATTGGCGGACGGCTGAGAGCTGTCATGCGATCTGACGACAGCATATCGCTTCGCG
CGCGCGCGCGACCAAGTGGGCGACACGGAATGATCTATTCGGTTCGAGCGAGCAATTCGGTACGCTGGCGCGCGG
CGGTGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGG
CGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGG
CGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGG
CGCTCAATTCGTCGCGATCAAAACGAGCGCTCGCTATACGCGCTCGCGGCTGCTGCGGCTGCGGCGGCGGCGG
ATGTGATTATATGCGCGGCTCGAATTACGAAATTCGGGCTTTCGGCGGAGCATGCGCTTAAATATATGCGGAT
ATGTCGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGG
ATGTCGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGG
CTGTCGAAATACGCGCAAAACAAACAAATACATACGCGCAAAATTCGGCGCAAGTCTGCTCAAGCTCGGTTATG
ATCTCCGCGATCAGTATACGCGGATTCGATCTTCGATCTACGACCGGCGTATGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGG
CGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGG
CGCGCATCGGCATCATACGCAAAATTAATGGCGCTCGGTGGCTTTGGCGCAAAATCTCAA
```

AA 配列 pDELVR2

AA 序列 pDELVR2
MKKFLTALVLSALFLAAVVDVSLYGEIKAGVEGRNYQLQLTEAQAANGASGQVYKVKTKAKSRITRKISDFGSFIF
GFKSGEDGLGGLVQWQLEQDVSVAGGATQWGNRESIFLAGEFGTLAAGRVANQPDASQAIIPWDSNNVDVASQL
GIFKRKHDMFVSRYRDSPEFSFGSGSVQVFIPKNSKAYTAPAVVAGQSDSYAGLNKNGPAGNAYFKYARHN
NVGRNAGLFLIGSGDQAKQDPLNKHVRLTGGVEEGLNLALAQQLDSENGDKTKNSTTELAATSVYRFGNA
VPRISYAHFGDFTEARGKKGENTSVDYIACVDYDFGSKRSALISVGAWLKRNTGIGNYQTINRAASVGLRHKF*

【 図 2 A - 5 】

DNA 配列 pVR2-7

[illegible]

AA 配列 pVR2-7

AA 配列 pVR2-2
 MRKKLTALVLSDLAFLAAVAADVSLYGETKAGVEGRNYQLQLTEAQAANGGASGVQVKYKTKAKSRIRTKISDPGSPFI
 GFGSGEDLDGLLKVAQMLEQDVSVAGGAGTQWGNRESFGLGAEFTFLLRAGRVNQFDQASQAIIPWDSNNVASQL
 FIKRHHDDPMVSVRYDSPEFSGFSGSVFVFIQNSKSAITPADEFIETKGGSSNSPAVVGKPGGSDYIAGLYNIGK
 GFGAYNIFYKTYARAVNRYGNRAFLDILGSGSQQAQGTPLNNKHVHRLTGGYEGLGMLLAAQLQLSENGOKTKNST
 TEATAATSYRFGNAVPRISYAHGPDFIERGKKGENTSQDIAGVGYDPSKRTSAIVSGAWLKRNGTIGNYTIQINAA
 SVGLRHGAF

DNA 配列 pVR2-8

[illegible]

AA 配列 pVR2-8

AA 序列 pVR2-8
MRKKLTALVLSALAAVADVSLTGEIKAGVEGRNQLQLTEQAANGSGGVKTKTKAKSRIRTKLSDPSPGFI
FGKSGEDGKGLAKWDLQDLYVGVAGGGATVGNKRSFGLAGEFTGLRAGVAAQVQNFQADQDZWDSNDVAGLQ
GIFPRKDMDSPVYRSDVSGFGSGGVGVYINSEKATPKAKRNTGNTQIPPAWVGKPGSDVYAGLVNGLKSG
FAGNYAFKYAHANVGNRFAELGLGLSDSGQKQDTPLNKKNHLLTGGTBEGGLNALLAAQLDLSNGDKTKNST
ELATASVTFRFGNAVFLISYAHGDFDTGRGKKENTSVDQILAGVDYDFKRSFATVSGMLKRNKTGICNYQTNINAA
VLRHKKF

【図 2 A - 6】

DNA 配列 pΔVR1VR2-7

ATGCGAAAAAAACCTACCGCCCTCGTATTGTCCGCACTGCCGCTTGCGGCGGTTGCGGATGTCAAGCTATACGGCGGA
AATCAAAGCCGGCGTGGAAAGCGAGGAATCAACAGCTGCAATTGACTGAAGCGGCACTCAGACGAAATACAGTGAATT
TCGGCTCGTTTATCGGCTTTAAGGGAGACTGAGGAATTTGGCGAGCGGCTGAGAGCGTGTTTGGCACTTGGAGCAAGAC
GTATCCGCTTGCGGCGCGCGGACCACTCGCGGCAACAGCGAAATCCCTTATCGCTTTGGCAGCGGAATTCCGATAC
GCTCGCGCGCGGCTGCGGATCACTTTGACGATCGCGAGCGCAAGCAATTGATCCTTTGGACAGCAATAATGATG
TGGCTTGGCAATTGGGATTTTCAACGCCACAGAGGACATGCCGCTTTTCGATAGCTACATTTCCCGCAATTTTTCG
GCTTTGCGAGCGAGGCTTCAATTTCGTTCCGATCCAAACAGCAAGATTCGCGCTATACGCGGCTTTGCACTTTATGCA
AGCGCTGAAAAAAGGCAAAATCAAGCCCGGCTGTGTGCGAGACGCGGATGCGATGTGTATATCCGCGCTGTGCA
ATTCAAAATGGGCGCTTTTTCGCGGAGACTTGCTTTAAATATCGGACAGACGCGCAATTCGCGACGTAATGCTTCT
GAGTGTGTTTGTATCGGACGCGGAGTGATCAAGCGAAAGATACCGATCCCTTGAAGAACCATCAGGTACACGCTCT
GACGCGCGGCTATAGGAAGAGCGGCTTGAATCTCGCTTGGCGGCTCAGTTGGATTGTCTTAAAGAGCGACAAAA
CCAAAAACAGTACGACGAAATTTGCGCGCACTGCTTCTTACGCTTGGTATATCGAGTTCCAGCGCATCAGCTATGCG
CATGGTTTGGACTTATCGACGCGCTTAAAGAGCGGAAATTCAGCTACATCAATCATCGCGCGCTTGAATTT
TGATTTTCCAAAGCACTTCGCGCATGTGTCTGCGGCTTGGCTGAAGCGCAATACCGGATCGGCACTACACTC
AAATTAAGCGCGCTCCGTCGGTTTGGCGCAAAATCTCAA

AA 配列 pΔVR1VR2-7

MRKKLTALVLSALPLAAVADVSLYEIKAGVEGRNYQLQTESRIRTKISDFGSGFIGKSEDLGDGLKAVWQLEQD
VSVAGGATQWNRRESFIGLAGEFGTILRAGRNVQPDASQALDPWDSNNVVASQLGIFKRHDMPVSVRYSPFES
GFSGSGVFVPTQNSKSAYTFAPDFIERGKKGENTSPAVVQKPGSDVYIAGLNYKMGFGAGYAFKYARHNVGRNASE
ELFLIGSGDQAKGTFDLKNNQVHRLTGGYEEGGLNALAAQLDLENGDKTNKSTTEIAATASYRFGNAPVPRISYA
HGFDFIERGKKGENTSYDQIAGVDYDFSKRTSAIVSGAWLKRNTGNYTQINAASVGLRHKF*

DNA 配列 pΔVR1VR2-8

ATGCGAAAAAAACCTACCGCCCTCGTATTGTCCGCACTGCCGCTTGCGGCGGTTGCGGATGTCAAGCTATACGGCGGA
AATCAAAGCGGCGTGGAAAGCGAGGAATCAACAGCTGCAATTGACTGAAGCGGCACTCAGACGAAATACAGTGAATT
TCGGCTCGTTTATCGGCTTTAAGGGAGACTGAGGATTTGGGCGAGCGGCTGAGGCGTGTTTGGCAGCTTGAGCAAGAC
GTATCCGCTTGCGGCGCGCGGACCGACCGAATGGGSGCAACAGGAAATCCCTTATCGGCTTGGCAGCGGAATTCCGATAC
GCTCGCGCGCGGTCGGTTCGCAATCAAGTTTGACGATGCCACCAAGCAATTGATCCTTTGGACAGCAATAATGATG
TGGCTTGGCAATTGGGATATTTCAAAGCGCAGACAGACATGCCGCTTTTCGTAAGCTACGATTTCCCGGAATTTTCG
GCTTTCAAGCGAGCGCTCAATTCCTTCGATCCAAAGACAGTCCGCTATAGCGCGCTTAAAGCGAATTCGCG
CATCGGCACTGCACTCAAAATATATCGGCGCTGTGTGCGGCAAGCCCGGATCGGATGTGATTTATCGCGCTGGAATT
ACAAAAATGGCGGCTTTGCGCGGAGCAATGCTTTAAATATCGGAGACAGCGCAATTCGCGACGTAATGCTTTGAG
TGTGCTTGTATCGGACGCGGAGTGTACAGCAAGAGATCCGATCCCTTGAAGAACCATCAGGTACACGCTCTGAC
GGGCGGCTATGAGGAGAGCGGCTTGAATCGCTTTGCGGCGCTCAGTTGGATTTGCTTGAAGATGGCAACAAACCA
AAACAGTALGACCGGAAATTCGCGCACTGCTTCTTACGCTTGGATATGAGATTCACGGATCACTATGCGCAAT
GCTTTGCACTTTATCGACGCGCTTAAAGAGCGGAAATACCAAGCTACGATCAATCATCGCGCGGCTTGATGTATCA
TGTTTCCAAAGCACTTCGCGCATCGTGTCTGCGGCTTGGCTGAAGCGCAATACCGGCACTACACTCAAA
TAAATGCCGCTCCGTCGGTTTGGCGCAAAATCTCAA

AA 配列 pΔVR1VR2-8

MRKKLTALVLSALPLAAVADVSLYEIKAGVEGRNYQLQTESRIRTKISDFGSGFIGKSEDLGDGLKAVWQLEQD
VSVAGGATQWNRRESFIGLAGEFGTILRAGRNVQPDASQALDPWDSNNVVASQLGIFKRHDMPVSVRYSPFES
GFSGSGVFVPTQNSKSAYTFAPDFIERGKKGENTSPAVVQKPGSDVYIAGLNYKMGFGAGYAFKYARHNVGRNASE
ELFLIGSGDQAKGTFDLKNNQVHRLTGGYEEGGLNALAAQLDLENGDKTNKSTTEIAATASYRFGNAPVPRISYA
HGFDFIERGKKGENTSYDQIAGVDYDFSKRTSAIVSGAWLKRNTGNYTQINAASVGLRHKF*

【図 2 A - 8】

AA 配列 pVR1-7VR2-845

MRKKLTALVLSALPLAAVADVSLYEIKAGVEGRNYQLQTEFDFIERGKKGENTSSRIRTKISDFGSGFIGKSGED
LDGDLKAVWQLEQDVSVAGGATQWNRRESFIGLAGEFGTILRAGRNVQPDASQALDPWDSNNVVASQLGIFKRHD
MPVSVRYSPFESFIGLAGEFGTILRAGRNVQPDASQALDPWDSNNVVASQLGIFKRHDMPVSVRYSPFES
GFSGSGVFVPTQNSKSAYTFAPDFIERGKKGENTSPAVVQKPGSDVYIAGLNYKMGFGAGYAFKYARHNVGRNASE
ELFLIGSGDQAKGTFDLKNNQVHRLTGGYEEGGLNALAAQLDLENGDKTNKSTTEIAATASYRFGNAPVPRISYA
HGFDFIERGKKGENTSYDQIAGVDYDFSKRTSAIVSGAWLKRNTGNYTQINAASVGLRHKF*

DNA 配列 pDELVR1-2-5-6

ATGCGAAAAAAACCTACCGCCCTCGTATTGTCCGCACTGCCGCTTGCGGCGGTTGCGGATGTCAAGCTATACGGCGGA
AATCAAAGCCGGCGTGGAAAGCGAGGAATCAACAGCTGCAATTGACTGAAGCGGCACTCAGACGAAATACAGTGAATT
TCGGCTCGTTTATCGGCTTTAAGGGAGACTGAGGATTTGGGCGAGCGGCTGAGGCGTGTTTGGCAGCTTGAGCAAGAC
GTATCCGCTTGCGGCGCGCGGCGGACCGATGGGCGCAACAGGAAATCCCTTATCGCTTTGGCAGCGGAATTCCGATAC
GCTGGGCGCGGCTGCGTTCGCAATCAAGTTTGACGATGCGCAGGCAAGCTGATCCTTTGGACAGCAATAATGATG
TGGCTTGGCAATTGGGATTTTCAACGCCACAGAGGACATGCCGCTTTTCGATAGCTACATTTCCCGGAATTTTCG
GCTTTGCGAGCGGCGGCTTCAATTCGTTCCGATTCGCAAGCAAGCAAGTCCGCTATACGCGGCTCCGCGCTTGTGCG
CAAGCCGGGATCGGATGTGATTTATCGCGGCTCGAATTCAAAAATGGCGGCTTTGCGGGAAGCAATATGCTTTAAAT
ATGCGAGACAGCGCAATGTGCGATTTGAAGAACCATCAGGTACAGGCTGTGACGCGCGGCTATGAGGAAGCGGCGGCT
AATCTGCGCTTGGCGGCTCAGTTGGATTGTGTCTAGTACGCAAGCAATTTGGCGGCTCAGTCTCTTACGCTTCCGAT
TGGAGTTCCGCGATCATGCTATGCGCGCTTTCGCAATTTGCGAGCGGCTTAAAGAGCGGAAATACCAAGCTACG
ATCAAAATCATCGCGCGGCTTGATTAATGATTTTCCAAAGCACTTCGCGCATCGTGTCTGCGGCTTTGCGTGAAGCGC
AATACCGGATCGCGCAATACACTCAAAATTAATGCCGCTCCGTCGGTTTGGCGCAAAATCTCAA

AA 配列 pDELVR1-2-5-6

MRKKLTALVLSALPLAAVADVSLYEIKAGVEGRNYQLQTESRIRTKISDFGSGFIGKSEDLGDGLKAVWQLEQD
VSVAGGATQWNRRESFIGLAGEFGTILRAGRNVQPDASQALDPWDSNNVVASQLGIFKRHDMPVSVRYSPFES
GFSGSGVFVPTQNSKSAYTFAPAVVQKPGSDVYIAGLNYKMGFGAGYAFKYARHNVGLKNNQVHRLTGGYEEGGL
NALAAQLDLSSTTEIAATASYRFGNAPVPRISYAHGFDFIERGKKGENTSYDQIAGVDYDFSKRTSAIVSGAWLKR
NTGNYTQINAASVGLRHKF*

DNA 配列 pPOR7in1

ATGCGAAAAAAACCTACCGCCCTCGTATTGTCCGCACTGCCGCTTGCGGCGGTTGCGGATGTCAAGCTATACGGCGGA
AATCAAAGCCGGCGTGGAAAGCGAGGAATCAACAGCTGCAATTGACTGAAGCGGCACTCAGACGAAATACAGTGAATT
TCGGCTCGTTTATCGGCTTTAAGGGAGACTGAGGATTTGGGCGAGCGGCTGAGGCGTGTTTGGCAGCTTGAGCAAGAC
GTATCCGCTTGCGGCGCGCGGCGGACCGATGGGCGCAACAGGAAATCCCTTATCGCTTTGGCAGCGGAATTCCGATAC
GCTGGGCGCGGCTGCGTTCGCAATCAAGTTTGACGATGCGCAGGCAAGCTGATCCTTTGGACAGCAATAATGATG
TGGCTTGGCAATTGGGATTTTCAACGCCACAGAGGACATGCCGCTTTTCGATAGCTACATTTCCCGGAATTTTCG
GCTTTGCGAGCGGCGGCTTCAATTCGTTCCGATTCGCAAGCAAGCAAGTCCGCTATACGCGGCTCCGCGCTTGTGCG
CAAGCCGGGATCGGATGTGATTTATCGCGGCTCGAATTCAAAAATGGCGGCTTTGCGGGAAGCAATATGCTTTAAAT
ATGCGAGACAGCGCAATGTGCGATTTGAAGAACCATCAGGTACAGGCTGTGACGCGCGGCTATGAGGAAGCGGCGGCT
AATCTGCGCTTGGCGGCTCAGTTGGATTGTGTCTAGTACGCAAGCAATTTGGCGGCTCAGTCTCTTACGCTTCCGAT
TGGAGTTCCGCGATCATGCTATGCGCGCTTTCGCAATTTGCGAGCGGCTTAAAGAGCGGAAATACCAAGCTACG
ATCAAAATCATCGCGCGGCTTGATTAATGATTTTCCAAAGCACTTCGCGCATCGTGTCTGCGGCTTTGCGTGAAGCGC
AATACCGGATCGCGCAATACACTCAAAATTAATGCCGCTCCGTCGGTTTGGCGCAAAATCTCAA

【図 2 A - 7】

DNA 配列 pVR1-7VR2-8

ATGCGAAAAAAACCTACCGCCCTCGTATTGTCCGCACTGCCGCTTGCGGCGGTTGCGGATGTCAAGCTATACGGCGGA
AATCAAAGCCGGCGTGGAAAGCGAGGAATCAACAGCTGCAATTGACTGAAGCGGCACTCAGACGAAATACAGTGAATT
TCGGCTCGTTTATCGGCTTTAAGGGAGACTGAGGATTTGGGCGAGCGGCTGAGGCGTGTTTGGCAGCTTGAGCAAGAC
GTATCCGCTTGCGGCGCGCGGCGGACCGATGGGCGCAACAGGAAATCCCTTATCGCTTTGGCAGCGGAATTCCGATAC
GCTCGCGCGCGGCTGCGGATCACTTTGACGATCGCGAGCGCAAGCAATTGATCCTTTGGACAGCAATAATGATG
TGGCTTGGCAATTGGGATTTTCAACGCCACAGAGGACATGCCGCTTTTCGATAGCTACATTTCCCGCAATTTTTCG
GCTTTGCGAGCGAGGCTTCAATTTCGTTCCGATCCAAACAGCAAGATTCGCGCTATACGCGGCTTTGCACTTTATGCA
AGCGCTGAAAAAAGGCAAAATCAAGCCCGGCTGTGTGCGAGACGCGGATGCGATGTGTATATCCGCGCTGTGCA
ATTCAAAATGGGCGCTTTTTCGCGGAGACTTGCTTTAAATATCGGACAGACGCGCAATTCGCGACGTAATGCTTCT
GAGTGTGTTTGTATCGGACGCGGAGTGATCAAGCGAAAGATACCGATCCCTTGAAGAACCATCAGGTACACGCTCT
GACGCGCGGCTATAGGAAGAGCGGCTTGAATCTCGCTTGGCGGCTCAGTTGGATTGTCTTAAAGAGCGACAAAA
CCAAAAACAGTACGACGAAATTTGCGCGCACTGCTTCTTACGCTTGGTATATCGAGTTCCAGCGCATCAGCTATGCG
CATGGTTTGGACTTATCGACGCGCTTAAAGAGCGGAAATTCAGCTACATCAATCATCGCGCGCTTGAATTT
TGATTTTCCAAAGCACTTCGCGCATGTGTCTGCGGCTTGGCTGAAGCGCAATACCGGATCGGCACTACACTC
AAATTAAGCGCGCTCCGTCGGTTTGGCGCAAAATCTCAA

AA 配列 pVR1-7VR2-8

MRKKLTALVLSALPLAAVADVSLYEIKAGVEGRNYQLQTEFDFIERGKKGENTSSRIRTKISDFGSGFIGKSGED
LDGDLKAVWQLEQDVSVAGGATQWNRRESFIGLAGEFGTILRAGRNVQPDASQALDPWDSNNVVASQLGIFKRHD
MPVSVRYSPFESFIGLAGEFGTILRAGRNVQPDASQALDPWDSNNVVASQLGIFKRHDMPVSVRYSPFES
GFSGSGVFVPTQNSKSAYTFAPDFIERGKKGENTSPAVVQKPGSDVYIAGLNYKMGFGAGYAFKYARHNVGRNASE
ELFLIGSGDQAKGTFDLKNNQVHRLTGGYEEGGLNALAAQLDLENGDKTNKSTTEIAATASYRFGNAPVPRISYA
HGFDFIERGKKGENTSYDQIAGVDYDFSKRTSAIVSGAWLKRNTGNYTQINAASVGLRHKF*

DNA 配列 pVR1-7VR2-845

ATGCGAAAAAAACCTACCGCCCTCGTATTGTCCGCACTGCCGCTTGCGGCGGTTGCGGATGTCAAGCTATACGGCGGA
AATCAAAGCCGGCGTGGAAAGCGAGGAATCAACAGCTGCAATTGACTGAAGCGGCACTCAGACGAAATACAGTGAATT
TCGGCTCGTTTATCGGCTTTAAGGGAGACTGAGGATTTGGGCGAGCGGCTGAGGCGTGTTTGGCAGCTTGAGCAAGAC
GTATCCGCTTGCGGCGCGCGGACCGAATGGGSGCAACAGGAAATCCCTTATCGGCTTGGCAGCGGAATTCCGATAC
GCTCGCGCGCGGTCGGTTCGCAATCAAGTTTGACGATGCCACCAAGCAATTGATCCTTTGGACAGCAATAATGATG
TGGCTTGGCAATTGGGATATTTCAAAGCGCAGACAGATGCCGCTTTCGTAAGCTACGATTTCCCGGAATTTTCG
GCTTTCAAGCGAGCGCTCAATTCCTTCGATCCAAAGACAGTCCGCTATAGCGCGCTTAAAGCGAATTCGCG
CATCGGCACTGCACTCAAAATATATCGGCGCTGTGTGCGGCAAGCCCGGATCGGATGTGATTTATCGCGCTGGAATT
ACAAAAATGGCGGCTTTGCGCGGAGCAATGCTTTAAATATCGGAGACAGCGCAATTCGCGACGTAATGCTTTGAG
TGTGCTTGTATCGGACGCGGAGTGTACAGCAAGAGATCCGATCCCTTGAAGAACCATCAGGTACACGCTCTGAC
GGGCGGCTATGAGGAGAGCGGCTTGAATCGCTTTGCGGCGCTCAGTTGGATTTGCTTGAAGATGGCAACAAACCA
AAACAGTALGACCGGAAATTCGCGCACTGCTTCTTACGCTTGGATATGAGATTCACGGATCACTATGCGCAAT
GCTTTGCACTTTATCGACGCGCTTAAAGAGCGGAAATACCAAGCTACGATCAATCATCGCGCGGCTTGATGTATCA
TGTTTCCAAAGCACTTCGCGCATCGTGTCTGCGGCTTGGCTGAAGCGCAATACCGGCACTACACTCAAA
TAAATGCCGCTCCGTCGGTTTGGCGCAAAATCTCAA

【図 2 A - 9】

AA 配列 pPOR7in1

MRKKLTALVLSALPLAAVADVSLYEIKAGVEGRNYQLQTEAQAANGASQOVKTVKTKRIRTKISDFGSGFI
GKSGSELDGLKAVWQLEQDVSVAGGATQWNRRESFIGLAGEFGTILRAGRNVQPDASQALDPWDSNNVVASQL
GIFKRHDMPVSVRYSPFESGFSGSGVFVPTQNSKSAYTFAYTYKNNKRNTGNYTQINNLTINPAVVQKPGS
DVIYAGLNYKMGFGAGYAFKYARHNVGRNASELFLIGSGDQAKGTFDLKNNQVHRLTGGYEEGGLNALAAQL
DLENGDKTNKSTTEIAATASYRFGNAPVPRISYAHGFDFIERGKKGENTSYDQIAGVDYDFSKRTSAIVSGAWLKR
NTGNYTQINAASVGLRHKF*

DNA 配列 pPOR8in4

ATGCGAAAAAAACCTACCGCCCTCGTATTGTCCGCACTGCCGCTTGCGGCGGTTGCGGATGTCAAGCTATACGGCGGA
AATCAAAGCCGGCGTGGAAAGCGAGGAATCAACAGCTGCAATTGACTGAAGCGGCACTCAGACGAAATACAGTGAATT
TCGGCTCGTTTATCGGCTTTAAGGGAGACTGAGGATTTGGGCGAGCGGCTGAGGCGTGTTTGGCAGCTTGAGCAAGAC
GTATCCGCTTGCGGCGCGCGGCGGACCGATGGGCGCAACAGGAAATCCCTTATCGCTTTGGCAGCGGAATTCCGATAC
GCTGGGCGCGGCTGCGTTCGCAATCAAGTTTGACGATGCGCAGGCAAGCTGATCCTTTGGACAGCAATAATGATG
TGGCTTGGCAATTGGGATTTTCAACGCCACAGAGGACATGCCGCTTTTCGATAGCTACATTTCCCGGAATTTTCG
GCTTTGCGAGCGGCGGCTTCAATTCGTTCCGATTCGCAAGCAAGCAAGTCCGCTATACGCGGCTCCGCGCTTGTGCG
CAAGCCGGGATCGGATGTGATTTATCGCGGCTCGAATTCAAAAATGGCGGCTTTGCGGGAAGCAATATGCTTTAAAT
ATGCGAGACAGCGCAATGTGCGATTTGAAGAACCATCAGGTACAGGCTGTGACGCGCGGCTATGAGGAAGCGGCGGCT
AATCTGCGCTTGGCGGCTCAGTTGGATTGTGTCTAGTACGCAAGCAATTTGGCGGCTCAGTCTCTTACGCTTCCGAT
TGGAGTTCCGCGATCATGCTATGCGCGCTTTCGCAATTTGCGAGCGGCTTAAAGAGCGGAAATACCAAGCTACG
ATCAAAATCATCGCGCGGCTTGATTAATGATTTTCCAAAGCACTTCGCGCATCGTGTCTGCGGCTTTGCGTGAAGCGC
AATACCGGATCGCGCAATACACTCAAAATTAATGCCGCTCCGTCGGTTTGGCGCAAAATCTCAA

AA 配列 pPor8in4

MRKKLTALVLSALPLAAVADVSLYEIKAGVEGRNYQLQTEAQAANGASQOVKTVKTKRIRTKISDFGSGFI
GKSGSELDGLKAVWQLEQDVSVAGGATQWNRRESFIGLAGEFGTILRAGRNVQPDASQALDPWDSNNVVASQL
GIFKRHDMPVSVRYSPFESGFSGSGVFVPTQNSKSAYTFAYTYKNNKRNTGNYTQINNLTINPAVVQKPGS
DVIYAGLNYKMGFGAGYAFKYARHNVGRNASELFLIGSGDQAKGTFDLKNNQVHRLTGGYEEGGLNALAAQL
DLENGDKTNKSTTEIAATASYRFGNAPVPRISYAHGFDFIERGKKGENTSYDQIAGVDYDFSKRTSAIVSGAWLKR
NTGNYTQINAASVGLRHKF*

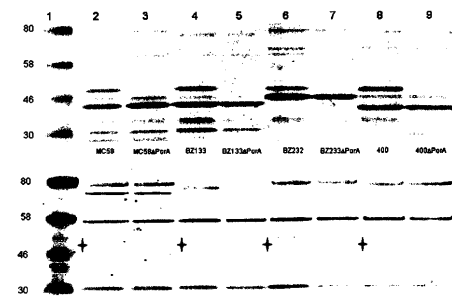
【 図 2 B - 1 】

【 叉 3 A 】

```
MC58 1_7 16-2   348 TQINAASVGLRHKF 361
M990 1_18 25    344 TQINAAS----- 35
2996 1_5-1 2-2  342 TQINAASVGLRHKF 355
```

FIGURE 3A

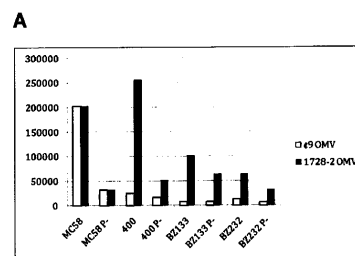
【 図 5 】



【 図 4 】

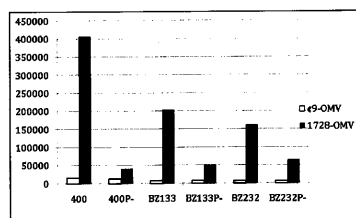


【 図 6 A 】



【 図 6 B 】

B



【配列表】

2013541322000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/AU2011/000971
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
Int. Cl.		
C07K 14/22 (2006.01) A61P 37/04 (2006.01) G01N 33/68 (2006.01) A61K 39/095 (2006.01) G01N 33/53		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPODOC, WPI, MEDLINE, GENOMEQUEST.; Keywords – Neisseria meningitides, por a, porin, major outer membrane protein p IA, surface loop, variable region, VR 1, VR 2, mutat+, disrupt+, alter+, modif+, sequence ID numbers cited in the claims.		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 7,118,757 B1 (SEID, Jr. et al) 10 October 2006 SEQ ID NO 7, column 5, line 63-column 6, line 21, example 1 and claims	11-15, 24, 30-33, 36, 39-41 and 44
A		1-10, 16-23, 25-29, 34-35, 37-38 and 42-43
X	WO 2004/065603 A2 (WYETH HOLDINGS CORP.) 5 August 2004 Whole Document especially SEQ ID NO 18 and claims	11-13, 15, 18-25, 28-32, 34-38 and 40-43.
A		1-10, 14, 16-17, 26-27, 33, 39 and 44
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C ☒ See patent family annex		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "&" document member of the same patent family "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 24/10/2011		Date of mailing of the international search report 1 NOVEMBER 2011
Name and mailing address of the ISA/AU AUSTRALIAN PATENT OFFICE PO BOX 200, WODEN ACT 2606, AUSTRALIA E-mail address: pct@ipaaustralia.gov.au Facsimile No. +61 2 6283 7999		Authorized officer JOHANNA LOWERY AUSTRALIAN PATENT OFFICE (ISO 9001 Quality Certified Service) Telephone No : +61 2 6283 2968

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/AU2011/000971

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2007/231342 A1 (GIULIANNI et al) 4 October 2007 Whole Document, especially SEQ ID NO 7645 [0015], [0028], [0040]-[0041] and claims	11-13, 15, 18-38 and 40-43
A	VICENTE, D. et al "Prevalence of genosubtypes (PorA types) of serogroup B invasive meningococcus in the north of Spain from 2000 to 2003." Journal of Medical Microbiology. Vol 54 (4), pages 381-384. April 2005. Whole document	1-10, 14, 16-17, 39 and 44
A	WO 2005/117956 A2 (ISIS INNOVATION LIMITED) 15 December 2005 Whole document, especially page 4, line 5-18 and page 13, line 2-8	1-44
A	VAN DER LEY, P. et al "Construction of porA Mutants." Methods in Molecular Medicine, Meningococcal Vaccines. Vol 66, page 145-154. 2001. Whole Document	1-44

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/AU2011/000971

This Annex lists the known "A" publication level patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent Document Cited in Search Report			Patent Family Member				
US	7118757	AU	48219/90	CA	2007248	DK	117491
		EP	0449958	JP	H06503465	NL	8803111
		NL	8900036	NL	8901612	NO	912369
		PT	92807	US	7238345	WO	9006696
WO	2004065603	CA	2512917	EP	1590459	US	2007148729
US	2007231342	AU	50977/00	AU	2006201153	AU	2009200865
		BR	0010721	CA	2373236	CN	1362992
		CN	101116744	EP	1179072	EP	1860191
		EP	2258851	EP	2270172	EP	2270173
		EP	2270174	JP	2003500420	JP	2007224047
		MX	PA01011867	NZ	515935	NZ	528254
		NZ	536676	NZ	545647	US	7862827
		US	2005244436	US	2011104193	WO	0071725
WO	2005117956	EP	1755663	GB	2414667	JP	2008501674
		US	2007224222				
Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001.							
END OF ANNEX							

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)		C 1 2 Q 1/68	Z	4 C 0 8 5
C 1 2 Q 1/04 (2006.01)		C 1 2 Q 1/04		4 C 0 8 6
A 6 1 K 48/00 (2006.01)		A 6 1 K 48/00		4 C 0 8 7
A 6 1 K 38/00 (2006.01)		A 6 1 K 37/02		4 H 0 4 5
A 6 1 K 35/74 (2006.01)		A 6 1 K 35/74		
A 6 1 K 31/713 (2006.01)		A 6 1 K 31/713		
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)		A 6 1 K 31/7088		
A 6 1 K 39/095 (2006.01)		A 6 1 K 39/095		
G 0 1 N 33/53 (2006.01)		G 0 1 N 33/53	D	
G 0 1 N 33/569 (2006.01)		G 0 1 N 33/53	N	
		G 0 1 N 33/569	F	

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

(72)発明者 ビーク、イアン リチャード アンセルム
オーストラリア国 4 2 0 9 クイーンズランド州 アッパー クーメラ ナイトジャー ドライ
ブ 1 4

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA31 BA50 CA04 CA20 DA05 EA04 FA02 GA11
HA03 HA11
4B063 QA01 QA18 QQ06 QQ42 QR08 QR42 QR62 QS25 QX01
4B064 AG27 AG31 CA19 CC24 DA01 DA13
4B065 AA01X AA01Y AB01 BA02 CA24 CA25 CA45 CA46
4C084 AA02 AA13 BA01 BA08 BA23 BA50 CA04 NA14 ZB351
4C085 AA03 BA16 CC07 EE01
4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 NA14 ZB35
4C087 AA01 AA02 BC50 NA14 ZB35
4H045 AA11 AA20 AA30 CA11 DA76 DA86 EA29 EA50 FA74

专利名称(译)	重组脑膜炎球菌 (Neisseria meningitidis) PorA多蛋白		
公开(公告)号	JP2013541322A	公开(公告)日	2013-11-14
申请号	JP2013520932	申请日	2011-08-01
[标]申请(专利权)人(译)	格里菲斯大学		
申请(专利权)人(译)	格里菲斯大学		
[标]发明人	ジェニングズマイケルポール ピークイアンリチャードアンセルム		
发明人	ジェニングズ、マイケル ポール ピーク、イアン リチャード アンセルム		
IPC分类号	C12N15/09 C12N1/21 C12P21/02 C07K14/22 C07K16/12 C12Q1/68 C12Q1/04 A61K48/00 A61K38/00 A61K35/74 A61K31/713 A61K31/7088 A61K39/095 G01N33/53 G01N33/569		
CPC分类号	C07K14/22 A61K39/095 C07K16/1217 C07K2317/33		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C12N1/21 C12P21/02.C C07K14/22 C07K16/12 C12Q1/68.Z C12Q1/04 A61K48/00 A61K37/02 A61K35/74 A61K31/713 A61K31/7088 A61K39/095 G01N33/53.D G01N33/53.N G01N33/569.F		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA31 4B024/BA50 4B024/CA04 4B024/CA20 4B024/DA05 4B024/EA04 4B024/FA02 4B024/GA11 4B024/HA03 4B024/HA11 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ06 4B063/QQ42 4B063/QR08 4B063/QR42 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QX01 4B064/AG27 4B064/AG31 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA01X 4B065/AA01Y 4B065/AB01 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA45 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA13 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA23 4C084/BA50 4C084/CA04 4C084/NA14 4C084/ZB351 4C085/AA03 4C085/BA16 4C085/CC07 4C085/EE01 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZB35 4C087/AA01 4C087/AA02 4C087/BC50 4C087/NA14 4C087/ZB35 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/CA11 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA29 4H045/EA50 4H045/FA74		
代理人(译)	昂达诚 本田 淳		
优先权	2010903418 2010-07-30 AU		
其他公开文献	JP2013541322A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

提供了脑膜炎奈瑟球菌PorA构建体，其具有通过插入完整的保守区域或保守区域氨基酸产生的一个或多个破坏的可变区。PorA的高免疫原性可变区负责引发不广泛保护的菌株特异性免疫应答，因此可变区的破坏指导针对保守区表位的免疫应答以有效地免疫更广谱的脑膜炎奈瑟球菌菌株。还提供了编码核酸，遗传构建体，表达PorA构建体和组合物的宿主细胞，用于检测和治疗脑膜炎奈瑟球菌感染的试剂盒和方法。

プライムシタ			使用プライムシタの方法
pPacA	遺伝子発現(MB)のオン/オフに同一-Operonのいずれかをオン/オフ		PerR1: 5'-GTTGGGCTTTTCGATTA-3' (配列番号55) PerAer1: 5'-TTTGAACCTTCACCTCTG-3' (配列番号56)
pPerDel	per遺伝子欠失		pPerDel up: 5'-TATACCGGGGTGG CAT ATC GGC TTC GTT TTG TAA ATT TGA-3' (配列番号57) pPerDel down: 5'-TCC GTC GGT TTG GCG CAC AAA TTC-3' (配列番号58)
pPerDel LacZam	pPerDelにLacZamを挿入		LacZamをkanamycin耐性遺伝子として挿入 kanamycin: GTTGAAGAAGGGCTGATCCCGCTGCTTTACAA (配列番号59) kanamycinR: GTGAAGAAGGGCTCATTTGATTAGAAAATC (配列番号60) 使用して複製し、SmallのpPerDel中にライク-1として
pPerDel SacB	pPerDelにTer SacB Kanamycinを挿入		Ter-SacB-KanamycinのpSmall-2のpSmall-2のpPerDel中にライク-1として
pPerDel Tet	pPerDelにTetRを挿入		TetR遺伝子とpDE1 TetR-6bのpSmall-2のpPerDel中にライク-1として
pPerDel SsrA			SSR3をコードする遺伝子を、pPerDel SacBのpPerDel中にライク-1として
pPerDel 1	Δ187-74 74-186 欠失		DEL_Loop_up: 5'-CTG GTA GTT GCT GGC TTC CACGG-3' (配列番号61) DEL_Loop_down: 5'-ATC CAA GCG GCT AAC GGT TGA-3' (配列番号62) pPerDel-1としてpPerA
pPerDel 4	Δ187-74 74-186 187-211 欠失		DEL_Loop up: 5'-CAT CGT AAC GAA TTG AAC GCT GC-3' (配列番号63) DEL_Loop down: 5'-GTT GTC GCG AAG GCG GGA TC-3' (配列番号64) pPerDel-4としてpPerA
pPerDel 1-4	Δ187-74 74-186 187-211 欠失		pPerDel-1とpPerDel-4を挿入するDEL1-4 up DEL1-4 down