

(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2008-533016

(P2008-533016A)

(43) 公表日 平成20年8月21日(2008.8.21)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	4 B 0 2 4
A 6 1 K 9/127 (2006.01)	A 6 1 K 9/127 Z N A	4 C 0 7 6
A 6 1 K 47/24 (2006.01)	A 6 1 K 47/24	4 C 0 8 4
A 6 1 K 47/28 (2006.01)	A 6 1 K 47/28	4 C 0 8 5
A 6 1 K 47/18 (2006.01)	A 6 1 K 47/18	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 55 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2008-500836 (P2008-500836)	(71) 出願人	507267311
(86) (22) 出願日	平成18年3月7日 (2006.3.7)		アイディー バイオメディカル コーポレイション オブ ケベック シー. オー. ビー. アズ グラクソスミスクライン
(85) 翻訳文提出日	平成19年9月6日 (2007.9.6)		バイオロジカルズ ノース アメリカ
(86) 国際出願番号	PCT/US2006/008052		カナダ国 エイチ7ブイ 3エス8 ケベック, ラバル, カルティエ プールバード ウエスト 525
(87) 国際公開番号	W02006/096701	(74) 代理人	100102978
(87) 国際公開日	平成18年9月14日 (2006.9.14)		弁理士 清水 初志
(31) 優先権主張番号	60/658, 815	(74) 代理人	100119507
(32) 優先日	平成17年3月7日 (2005.3.7)		弁理士 刑部 俊
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100128048
			弁理士 新見 浩一
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 薬学的リボソーム組成物

(57) 【要約】

N . m e n i n g i t i d i s ポリペプチド断片またはそのアナログまたは対応する DNA 断片に会合したリボソームを含む医薬組成物を用いて、ナイセリア感染を予防し、診断し、および/または治療することができる。1つの態様によると、本発明は、配列番号2を含むポリペプチドまたはその断片またはアナログと会合したリボソームを含む医薬組成物に関する。他の態様において、本発明の医薬組成物の製法、本発明の医薬組成物を宿主に送達する方法、本発明の医薬組成物の使用方法が提供される。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 2 を含む少なくとも 1 つのポリペプチド、またはその断片もしくはアナログと会合したりポソームを含む医薬組成物。

【請求項 2】

前記組成物が配列番号 2 を含む少なくとも 1 つのポリペプチドと会合したりポソームを含む請求項 1 記載の医薬組成物。

【請求項 3】

前記組成物が、配列番号 2 からなる少なくとも 1 つのポリペプチド、またはその断片もしくはアナログと会合したりポソームを含む請求項 1 記載の医薬組成物。

10

【請求項 4】

前記組成物が、配列番号 2 からなる少なくとも 1 つのポリペプチドと会合したりポソームを含む請求項 1 記載の医薬組成物。

【請求項 5】

配列番号 2 を含むポリペプチドの部分、またはその断片もしくはアナログの少なくとも 1 つのエピトープ保持部分と会合したりポソームを含む医薬組成物。

【請求項 6】

前記組成物が、配列番号 2 を含むポリペプチドの少なくとも 1 つのエピトープ保持部分と会合したりポソームを含む請求項 5 記載の医薬組成物。

【請求項 7】

少なくとも 1 つの単離されたポリペプチドと会合したりポソームを含む医薬組成物であって、該単離されたポリペプチドが：

20

(a) 配列番号 2 を含む第二のポリペプチドに対して少なくとも 70% 同一性を有するポリペプチド、またはその断片もしくはアナログ；

(b) 配列番号 2 を含む第二のポリペプチドに対して少なくとも 80% 同一性を有するポリペプチド、またはその断片もしくはアナログ；

(c) 配列番号 2 を含む第二のポリペプチドに対して少なくとも 95% 同一性を有するポリペプチド、またはその断片もしくはアナログ；

(d) 配列番号 2 を含むポリペプチド、または断片またはアナログ；

(e) 配列番号 2 を含むポリペプチドに対して結合特異性を有する抗体を惹起させることができるポリペプチド、またはその断片もしくはアナログ；

30

(f) 配列番号 2 を含むポリペプチド、またはその断片もしくはアナログのエピトープ保持部分；

(g) N - 末端 Met 残基が欠失した (a)、(b)、(c)、(d)、(e)、または (f) のポリペプチド；および

(h) 分泌アミノ酸配列が欠失した (a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、または (g) のポリペプチド；

から選択される医薬組成物。

【請求項 8】

前記単離されたポリペプチドが：

40

(a) 配列番号 2 を含む第二のポリペプチドに対して少なくとも 70% 同一性を有するポリペプチド；

(b) 配列番号 2 を含む第二のポリペプチドに対して少なくとも 80% 同一性を有するポリペプチド；

(c) 配列番号 2 を含む第二のポリペプチドに対して少なくとも 95% 同一性を有するポリペプチド；

(d) 配列番号 2 を含むポリペプチド；

(e) 配列番号 2 を含むポリペプチドに対する結合特異性を有する抗体を惹起させることができるポリペプチド；

(f) 配列番号 2 を含むポリペプチドのエピトープ保持部分；

50

(g) N - 末端 Met 残基が欠失した (a)、(b)、(c)、(d)、(e)、または (f) のポリペプチド；および

(h) 分泌アミノ酸配列が欠失した (a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f) または (g) のポリペプチド；

から選択される請求項 7 記載の医薬組成物。

【請求項 9】

少なくとも 1 つの単離されたポリヌクレオチドと会合したりボソームを含む医薬組成物であって、該単離されたポリヌクレオチドが：

(a) 配列番号 2 を含む第二のポリペプチドに対して少なくとも 70% 同一性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、またはその断片もしくはアナログ；

(b) 配列番号 2 を含む第二のポリペプチドに対して少なくとも 80% 同一性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、またはその断片もしくはアナログ；

(c) 配列番号 2 を含む第二のポリペプチドに対して少なくとも 95% 同一性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、またはその断片もしくはアナログ；

(d) 配列番号 2 を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、またはその断片もしくはアナログ；

(e) 配列番号 2 を含むポリペプチドに対する結合特異性を有する抗体を惹起させることができるポリヌクレオチドまたはその断片；

(f) 配列番号 2 を含むポリペプチドのエピトープ保持部分をコードするポリヌクレオチド、またはその断片もしくはアナログ；

(g) 配列番号 1 を含むポリヌクレオチド、またはその断片もしくはアナログ；

(h) (a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f) または (g) におけるポリヌクレオチドに対して相補的であるポリヌクレオチド；

から選択される医薬組成物。

【請求項 10】

前記単離されたポリヌクレオチドが：

(a) 配列番号 2 を含む第二のポリペプチドに対して少なくとも 70% 同一性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；

(b) 配列番号 2 を含む第二のポリペプチドに対して少なくとも 80% 同一性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；

(c) 配列番号 2 を含む第二のポリペプチドに対して少なくとも 95% 同一性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；

(d) 配列番号 2 を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；

(e) 配列番号 2 を含むポリペプチドに対して結合特異性を有する抗体を惹起させることができるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；

(f) 配列番号 2 を含むポリペプチドのエピトープ保持部分をコードするポリヌクレオチド；

(g) 配列番号 1 を含むポリヌクレオチド、またはその断片もしくはアナログ；および

(h) (a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f) または (g) に対して相補的であるポリヌクレオチド；

から選択される請求項 9 記載の医薬組成物。

【請求項 11】

配列番号 2 を含む 2 以上のポリペプチド、またはその断片もしくはアナログを含むキメラポリペプチドと会合したりボソームを含む医薬組成物であって、該ポリペプチドはキメラポリペプチドを形成するように連結されている医薬組成物。

【請求項 12】

前記組成物が、配列番号 2 を含む 2 以上のポリペプチドを含むキメラポリペプチドと会合したりボソームを含み、ここで、該ポリペプチドはキメラポリペプチドを形成するように連結されている請求項 10 記載の医薬組成物。

【請求項 13】

10

20

30

40

50

前記リポソームが合成リン脂質、細菌リン脂質および/またはコレステロールから選択される脂質を含む請求項 1 ないし 1 2 いずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 1 4】

前記リポソームが *E. coli*、*N. meningitidis* または *N. lactamica* から抽出された細菌脂質を含む請求項 1 3 記載の医薬組成物。

【請求項 1 5】

前記リポソームがホスファチジルエーテルおよびエステル、グリセリド、ガングリオシド、スフィンゴミエリン、およびステロイドから選択される脂質を含む請求項 1 ないし 1 2 いずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 1 6】

前記脂質が：

- 1, 2 - ジラウロイル - sn - グリセロ - 3 - ホスフェート (DLPA)、
 ジミリストイル - sn - グリセロ - 3 - ホスフェート (DMPA)、
 1, 2 - ジパルミトイル - sn - グリセロ - 3 - ホスフェート (DPPA)、
 1, 2 - ジステアロイル - sn - グリセロ - 3 - ホスフェート (DSPA)、
 1, 2 - ジオレオイル - sn - グリセロ - 3 - ホスフェート (DOPA)、
 1 - パルミトイル - 2 - オレオイル - sn - グリセロ - 3 - ホスフェート (POPA)、
 1, 2 - ジラウロイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン (DLPC)、
 1, 2 - ジトリデカノイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン、
 1, 2 - ジミリストイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン (DMPC)、
 1, 2 - ジペンタデカノイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン、
 1, 2 - ジパルミトイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン (DPPC)、
 1, 2 - ジヘプタデカノイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン、
 1, 2 - ジステアロイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン (DSPC)、
 1, 2 - ジミリストレオイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン、
 1, 2 - ジパルミトレオイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン、
 1, 2 - ジオレオイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン (DOPC)、
 1 - ミリストイル - 2 - パルミトイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン、
 1 - ミリストイル - 2 - ステアロイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン、
 1 - パルミトイル - 2 - ミリストイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン、
 1 - パルミトイル - 2 - ステアロイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン、
 1 - パルミトイル - 2 - オレオイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン (POPC)、
 1 - パルミトイル - 2 - リノレオイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン、
 1, 2 - ジラウロイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン (DLPE)、
 1, 2 - ジミリストイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン (DMPE)、
 1, 2 - ジパルミトイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン (DPPE)、
 1, 2 - ジパルミトレオイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン、
 1, 2 - ジステアロイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン (DSPE)、
 1, 2 - ジオレオイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン (DOPE)、
 1 - パルミトイル - 2 - オレオイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン (POPE)、
 1, 2 - ジラウロイル - sn - グリセロ - 3 - [ホスホ - RAC - (1 - グリセロール)] (DLPG)、
 1, 2 - ジミリストイル - sn - グリセロ - 3 - [ホスホ - RAC - (1 - グリセロール)] (DMPG)、
 1, 2 - ジパルミトイル - sn - グリセロ - 3 - [ホスホ - RAC - (1 - グリセロール)] (DPPG)、
 1, 2 - ジステアロイル - sn - グリセロ - 3 - [ホスホ - RAC - (1 - グリセロール)] (DSPG)、
 1, 2 - ジオレオイル - sn - グリセロ - 3 - [ホスホ - RAC - (1 - グリセロール)]

10

20

30

40

50

] (D O P G)、

1 - パルミトイル - 2 - オレオイル - s n - グリセロ - 3 - [ホスホ - R A C - (1 - グリセロール)] (P O P G)、

1 , 2 - ジラウロイル - s n - グリセロ - 3 - [ホスホ - L - セリン] (D L P S)、

1 , 2 - ジミリストイル - s n - グリセロ - 3 - [ホスホ - L - セリン] (D M P S)、

1 , 2 - ジパルミトイル - s n - グリセロ - 3 - [ホスホ - L - セリン] (D P P S)、

1 , 2 - ジステアロイル - s n - グリセロ - 3 - [ホスホ - L - セリン] (D S P S)、

1 , 2 - ジオレオイル - s n - グリセロ - 3 - [ホスホ - L - セリン] (D O P S) および

1 - パルミトイル - 2 - オレオイル - s n - グリセロ - 3 - [ホスホ - L - セリン] (P O P S)

10

から選択される請求項 1 3 記載の医薬組成物。

【請求項 1 7】

前記脂質が：

1 , 2 - ジミリストイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホコリン (D M P C)、

1 , 2 - ジミリストイル - s n - グリセロ - 3 - [ホスホ - L - セリン] (D M P S)、

および

1 , 2 - ジミリストイル - 3 - トリメチルアンモニウム - プロパン (D M T A P)

から選択される請求項 1 6 記載の医薬組成物。

【請求項 1 8】

前記リポソームが、さらに、リポド A、モノホスホリルリポド A (M P L A)、リポ多糖およびサイトカインから選択される少なくとも 1 つのアジュバントを含む請求項 1 3 記載の医薬組成物。

20

【請求項 1 9】

前記リポソームが 0 ないし 2 5 モル % のコレステロールを含む請求項 1 3 記載の医薬組成物。

【請求項 2 0】

前記組成物が、さらに、医薬上許容されるアジュバントを含む請求項 1 ないし 1 8 いずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 2 1】

免疫応答を誘導するのに免疫学的に有効量の請求項 1 ないし 1 9 いずれか 1 項に記載の医薬組成物を宿主に投与することを含む、該宿主において *N . meningitidis* に対する免疫応答を誘導する方法。

30

【請求項 2 2】

予防または治療量の請求項 1 ないし 1 9 いずれか 1 項に記載の医薬組成物をそれを必要とする宿主に投与することを含む、*N . meningitidis* 感染を予防および / または治療する方法。

【請求項 2 3】

予防または治療量の請求項 1 ないし 1 9 いずれか 1 項に記載の医薬組成物をそれを必要とする宿主に投与することを含む、*N . meningitidis*、*N . gonorrhoeae*、*N . lactamica* および *N . polysaccharaea* から選択されるナイセリア感染を予防および / または治療する方法。

40

【請求項 2 4】

有効量の請求項 1 ないし 1 9 いずれか 1 項に記載の医薬組成物を宿主に投与することを含む、宿主において髄膜炎および髄膜炎菌血症を治療または予防する方法。

【請求項 2 5】

前記宿主が哺乳動物である請求項 2 0 ないし 2 3 いずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 6】

前記宿主がヒトである請求項 2 4 記載の方法。

【請求項 2 7】

50

前記宿主が成人のヒトである請求項 25 記載の方法。

【請求項 28】

前記組成物が免疫化の間の約 1 ないし 6 週間隔の間隔で、約 0.001 ないし 100 μ g / kg の (抗原 / 体重) の単位投与形態で投与される請求項 20 ないし 26 いずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 29】

a) 宿主から生物学的試料を入手し；
 b) 請求項 1 ないし 19 いずれか 1 項に記載の医薬組成物に対して反応性である抗体またはその断片を生物学的試料と共にインキュベートして、混合物を形成させ；次いで、
 c) *N. meningitidis* の存在を示す混合物中の特異的に結合した抗体または結合した断片を検出する；
 ことを含む、生物学的試料中の *N. meningitidis* 生物を検出する診断方法。

10

【請求項 30】

a) 宿主から生物学的試料を入手し；
 b) 請求項 1 ないし 19 いずれか 1 項に記載の医薬組成物を生物学的試料と共にインキュベートして、混合物を形成し；次いで、
 c) *N. meningitidis* に対して特異的な抗体の存在を示す混合物中の特異的に結合した抗原または結合した断片を検出する；
 ことを含む、生物学的試料中の *N. meningitidis* 生物を検出する診断方法。

20

【請求項 31】

a) 宿主から生物学的試料を入手し；
 b) 配列番号 2 を含むポリペプチドまたはその断片をコードする DNA 配列を有する 1 以上の DNA プロブを該生物学的試料と共にインキュベートして、混合物を形成し；次いで、
 c) *N. meningitidis* 細菌の存在を示す混合物中の特異的に結合した DNA プロブを検出する；
 ことを含む、生物学的試料中の *N. meningitidis* 生物を検出する診断方法。

【請求項 32】

a) 請求項 1 ないし 19 いずれか 1 項に記載の医薬組成物に対して反応性である抗体を検出可能な標識で標識し；
 b) 標識された抗体を宿主に投与し；次いで、
 c) *N. meningitidis* の存在を示す宿主中の特異的に結合した標識抗体または標識断片を検出する；
 ことを含む、宿主において *N. meningitidis* を検出する診断方法。

30

【請求項 33】

治療または予防量の前記薬学的組成物を個体に投与することを、*N. meningitidis* 感染に対して罹患性の個体における *N. meningitidis* の予防または治療措置のための請求項 1 ないし 19 いずれか 1 項に記載の医薬方法の使用。

【請求項 34】

N. meningitidis 感染の診断の検出用の請求項 1 ないし 19 いずれか 1 項に記載の薬学的組成物を含むキット。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本願は、2005 年 3 月 7 日に出願された米国仮特許出願第 60 / 58, 815 号の出願日の利益を主張する。米国仮特許出願第 60 / 58, 815 号は、本明細書中に参考として援用される。

【0002】

(技術分野)

本発明は、ナイセリア感染を予防し、診断し、および / または治療するのに用いること

50

ができる、*N. meningitidis* ポリペプチドまたは対応するDNA断片に会合したリポソームを含む医薬組成物に関する。

【背景技術】

【0003】

(発明の背景)

N. meningitidis は世界中で死亡および病的状態の主な原因である。*N. meningitidis* は、風土病および流行病、特に髄膜炎および髄膜炎菌血症双方を引き起こす [Tzeng, Y-L and D.S. Stephens, *Microbes and Infection*, 2, p. 687 (2000); Pollard, A. J. and C. Frasch, *Vaccine*, 19, p. 1327 (2001); Morley, S. L, and A. J. Pollard, *Vaccine*, 20, p. 666 (2002)]。血清殺菌活性は*N. meningitidis* に対する主な防御メカニズムであり、細菌による侵入に対する保護は抗-髄膜炎菌抗体の血清中での存在に相関することはよく記載されている [Goldschneider et al. *J. Exp. Med.* 129, p. 1307 (1969); Goldschneider et al. *J. Exp. Med.* 129, p. 1327 (1969)]。

10

【0004】

N. meningitidis は、被膜抗原の存在に従って血清学的群に細分化される。現在、12の血清群が認められているが、血清群A、B、C、YおよびW135は最も普通に見出される。血清群の中で、異なる血清型、サブタイプおよび免疫型は外膜蛋白質およびリポ多糖に基づいて同定することができる [Frasch et al. *Rev. Infect. Dis.*, 7, p. 504 (1985)]。

20

【0005】

現在入手可能な被膜多糖ワクチンは全ての*N. meningitidis* 単離体に対して効果的ではなく、若い幼児において保護抗体の生産を効果的には誘導しない [Tzeng, Y-L and D.S. Stephens, *Microbes and Infection*, 2, p. 687 (2000); Pollard, A. J. and C. Frasch, *Vaccine*, 19, p. 1327 (2001); Morley, S. L. and A. J. Pollard, *Vaccine*, 20, p. 666 (2002)]。血清群A、C、YおよびW135の被膜多糖はこの生物に対するワクチンにおいて現在用いられている。これらの多糖ワクチンは短い期間では効果的であるが、ワクチン接種した対象は免疫学的記憶を発生せず、従って、彼らは3年以内に再度ワクチン接種をして、それらのレベルの抵抗性を維持しなければならない。

30

【0006】

さらに、これらのワクチンは十分なレベルの殺菌抗体を誘導して、この病気の犠牲となる非常に若い子供において所望の保護を与えない。血清群B単離体に対する効果的なワクチンは現在入手可能でないが、これらの生物は開発国における髄膜炎菌病の主な原因の1つである。さらに、新生ヒト脳組織の糖蛋白質におけるかなり類似の交差-反応性構造の存在は血清群B多糖の免疫原性を改良する試みを落胆させるかもしれない [Finne et al. *Lancet*, p. 355 (1983)]。

40

【0007】

より効果的なワクチンを得るためには、リポ多糖、ピリ線毛、蛋白質のような他の*N. meningitidis* 表面抗原が調査されている。免疫化されたボランティアおよび回復期患者の血清中のある種のこれらの蛋白質性表面抗原に対するヒト免疫応答および細菌抗体の存在が示された [Mandrell and Zollinger, *Infect. Immun.*, 57, p. 1590 (1989); Poolman et al. *Infect. Immun.*, 40, p. 398 (1983); Rosenquist et al. *J. Clin. Microbiol.*, 26, p. 1543 (1988); Wedege and Froholm *Infect. Immun.*, 51, p. 571 (1986); Wedege and Michaelson, *J. Clin. Micro*

50

biol., 25, p. 1349 (1987)]。

【0008】

既に記載された髄膜炎菌表面蛋白質のほとんどのに伴う主な問題の1つはそれらの抗原性の不均一性である。事実、主な外膜蛋白質の株間変動は、それらの保護的有効性を抗原的に関連する髄膜炎菌株の限定された数に制限する。主な表面蛋白質のほとんど、あるいは精製された外膜蛋白質を含有するいずれかの外膜小胞に基づくいくつかの戦略は、蛋白質ベースの髄膜炎菌ワクチンの保護能力を拡大するために現在開発されつつある [Tzeng, Y-L and D.S. Stephens, Microbes and Infection, 2, p. 687 (2000); Pollard, A.J. and C.F. Frasch, Vaccine, 19, p. 1327 (2001); Morley, S.L., and A.J. Pollard, Vaccine, 20, p. 666 (2002)]。抗原的に保存された表面-露出領域を持つ普遍的なあるいは少なくとも広く分布した蛋白質の同定は、主な髄膜炎菌外膜蛋白質の大きな不均一性に対して解決を与えるであろう。ナイセリア属表面蛋白質AについてのNspAと命名された1つのそのような抗原はPCT/WO/96/29412に開示されており、ここに引用して援用する。

10

【0009】

NspA蛋白質に対して向けられたモノクローナル抗体(MAb)はテストした髄膜炎菌株の99%を超えて反応し、これは、高度に保存された抗原性領域がこの蛋白質に存在することを明瞭に示す [Martin et al. J. Exp. Med., 185, p. 1173 (1997); Cadieux et al. Infect. Immun., 67, p. 4955, (1999)]。免疫電子顕微鏡観察およびフローサイトフルオメトリーデータは、NspA蛋白質が無傷髄膜炎菌細胞の表面に存在し、この蛋白質は細胞表面に均一に分布することを明瞭に示した [Cadieux et al. Infect. Immun., 67, p. 4955, (1999)]。この蛋白質をコードする遺伝子はクローン化され、配列決定された [Martin et al. J. Exp. Med., 185, p. 1173 (1997)]。この配列と入試可能なデータベースにコンパイルされた配列との比較は、nspA遺伝子が、やはり髄膜炎菌外膜に見出されるナイセリア属不透明性蛋白質ファミリー(Opa)のメンバーと相同性を共有することを示した。DNAハイブリダイゼーションは、nspA遺伝子がテストした全ての髄膜炎菌株のゲノムに存在することを明瞭に確立したが、それは、高度に保存されたホモログが密接に関連する種N. gonorrhoeae、N. lactamicaおよびN. polysaccharaにやはり存在したことも示した。淋菌NspA蛋白質の特徴付けは従前に示されている [Plante et al. Infect. Immun., 67, p. 2855 (1999)]。この蛋白質の高レベルの分子保存(>96%同一性)についての決定的な証拠は、発散した血清群A、BおよびC髄膜炎菌株からのさらなるnspA遺伝子のクローニングおよび配列決定に従って得られた [Martin et al. J. Exp. Med., 185, p. 1173 (1997); Cadieux et al. Infect. Immun., 67, p. 4955, (1999); Moe et al., Infect. Immun., 67, p. 2855 (1999)]。十分な量の精製された蛋白質を得て、感染のマウスモデルにおいてその保護能力を評価するために、nspA遺伝子は発現ベクターpWKS30にクローン化された [Martin et al. J. Exp. Med., 185, p. 1173 (1997)]。BALB/cマウスを20μgの免疫アフィニティ-精製組換えNspA蛋白質で3回免疫化し、次いで、致死用量の血清群B株で攻撃した。NspA-免疫化マウスの80%は、対照群における20%未満と比較して細菌攻撃で生き残った。致死髄膜炎菌攻撃で生き残ったマウスから収集した血清の分析により、テストした4つの血清群B株に付着され、該株を殺した交差-反応性抗体の存在が明らかとされた。加えて、NspA-特異的MAbでのマウスの受動免疫化により、蛋白質の保護能力が確認された。事実、攻撃18時間前のNspA-特異的MAb18の投与は、テストした11の髄膜炎菌株のうち10で攻撃したマウスについて記録された細菌血症のレベルを75%を超えて低下させた [非特許文献1]。これらの結果は、

20

30

40

50

この高度に保存された蛋白質が髄膜炎菌感染に対して保護免疫を誘導できることを示した。

【0010】

組換え髄膜炎菌表面 - 露出 Por A、Por B および Opc 蛋白質での実験は、殺菌抗体の効果的な生産は、しばしば、天然立体配座を生じさせるための組換え蛋白質の再折り畳みに依存することを示した [非特許文献 2 ; 非特許文献 3 ; 非特許文献 4 ; 非特許文献 5 ; 非特許文献 6 ; 非特許文献 7 ; 非特許文献 8]。組換え表面蛋白質の再折り畳みを好都合とするのに用いられる 1 つの方法は、リボソームへのその取り込みである。

【0011】

しかしながら、ナイセリア感染の予防、診断および / または治療で用いることができる医薬組成物に対する継続する要求が存在する。

【非特許文献 1】Cadieux et al. Infect. Immun., 67, p. 4955, (1999)

【非特許文献 2】Christodoulides et al. Microbiol., 144, p. 3027, (1998)

【非特許文献 3】Idanpaan-Heikkila et al. Vaccine, 13, p. 1501 (1995)

【非特許文献 4】Muttilainen et al., Microb. Pathog., 18, p. 365 (1995)

【非特許文献 5】Muttilainen et al., Microb. Pathog., 18, p. 423 (1995)

【非特許文献 6】Ward et al. Microb. Pathog., 21, p. 499, (1996)

【非特許文献 7】Wright et al. Infect. Immun., 70, p. 4028 (2002)

【非特許文献 8】Musacchio et al., Vaccine, 15, p. 751 (1996)

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0012】

1 つの態様によると、本発明は、配列番号 2 を含むポリペプチドまたはその断片またはアナログと会合したりボソームを含む医薬組成物に関する。

【0013】

他の態様において、本発明の医薬組成物の製法、本発明の医薬組成物を宿主に送達する方法、本発明の医薬組成物の使用方法が提供される。

【発明を実施するための最良の形態】

【0014】

本発明は、ナイセリア属感染を予防し、診断し、および / または治療するのに用いることができる、N. meningitidis ポリペプチドに会合したりボソームを含む医薬組成物を提供する。

【0015】

1 つの態様によると、本発明は、配列番号 2 またはその断片またはアナログを含むポリペプチドに会合したりボソームを含む医薬組成物に関する。

【0016】

もう 1 つの態様によると、本発明は、配列番号 2 を含むポリペプチドと会合したりボソームを含む医薬組成物に関する。

【0017】

1 つの態様によると、本発明は、配列番号 2 からなるポリペプチド、またはその断片もしくはアナログと会合したりボソームを含む医薬組成物に関する。

【0018】

10

20

30

40

50

1つの態様によると、本発明は、配列番号2からなるポリペプチドと会合したりボソームを含む医薬組成物に関する。

【0019】

1つの態様によると、本発明は、配列番号2を含むポリペプチドのエピトープ保持部分、またはその断片もしくはアナログに会合したりボソームを含む医薬組成物に関する。

【0020】

1つの態様によると、本発明は、配列番号2を含むポリペプチドのエピトープ保持部分に会合したりボソームを含む医薬組成物に関する。

【0021】

1つの態様によると、本発明は：

(a) 配列番号2を含む第二のポリペプチドに対して少なくとも70%同一性を有するポリペプチドまたはその断片またはアナログ；

(b) 配列番号2を含む第二のポリペプチドに対して少なくとも80%同一性を有するポリペプチドまたはその断片またはアナログ；

(c) 配列番号2を含む第二のポリペプチドに対して少なくとも95%同一性を有するポリペプチドまたはその断片またはアナログ；

(d) 配列番号2を含むポリペプチド、またはその断片もしくはアナログ；

(e) 配列番号2を含むポリペプチドに対する結合特異性を有する抗体を惹起させることができるポリペプチド、またはその断片もしくはアナログ；

(f) 配列番号2を含むポリペプチドのエピトープ保持部分、またはその断片もしくはアナログ；

(g) N-末端Met残基が欠失した(a)、(b)、(c)、(d)、(e)または(f)ポリペプチド；

(h) 分泌アミノ酸配列が欠失した(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)または(g)のポリペプチド；

から選択された単離されたポリペプチドと会合したりボソームを含む医薬組成物を提供する。

【0022】

1つの態様によると、本発明は：

(a) 配列番号2を含む第二のポリペプチドに対して少なくとも70%同一性を有するポリペプチド；

(b) 配列番号2を含む第二のポリペプチドに対して少なくとも80%同一性を有するポリペプチド；

(c) 配列番号2を含む第二のポリペプチドに対して少なくとも95%同一性を有するポリペプチド；

(d) 配列番号2を含むポリペプチド；

(e) 配列番号2を含むポリペプチドに対する結合特異性を有する抗体を惹起させることができるポリペプチド；

(f) 配列番号2を含むポリペプチドのエピトープ保持部分；

(g) N-末端Met残基が欠失した(a)、(b)、(c)、(d)、(e)または(f)ポリペプチド；

(h) 分泌アミノ酸配列が欠失した(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)または(g)のポリペプチド；

から選択された単離されたポリペプチドと会合したりボソームを含む医薬組成物を提供する。

【0023】

1つの態様によると、本発明は：

(a) 配列番号2を含む第二のポリペプチドに対して少なくとも70%同一性を有するポリペプチド、またはその断片もしくはアナログをコードするポリヌクレオチド；

(b) 配列番号2を含む第二のポリペプチドに対して少なくとも80%同一性を有するポ

10

20

30

40

50

リペプチド、またはその断片もしくはアナログをコードするポリヌクレオチド：

(c) 配列番号 2 を含む第二のポリペプチドに対して少なくとも 95% 相同性を有するポリペプチド、またはその断片もしくはアナログをコードするポリヌクレオチド：

(d) 配列番号 2 を含むポリペプチド、またはその断片もしくはアナログをコードするポリヌクレオチド；

(e) 配列番号 2 を含むポリペプチド、またはその断片もしくはアナログに対して結合特異性を有する抗体を惹起させることができるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；

(f) 配列番号 2 を含むポリペプチドのエピトープ保持部分、またはその断片もしくはアナログをコードするポリヌクレオチド；

(g) 配列番号 1 を含むポリヌクレオチド、またはその断片もしくはアナログ；

(h) (a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f) または (g) におけるポリヌクレオチドに対して相補的であるポリヌクレオチド；

から選択される単離されたポリヌクレオチドと会合したりボソームを含む医薬組成物を提供する。

【0024】

1つの態様において、本発明は：

(a) 配列番号 2 を含む第二のポリペプチドに対して少なくとも 70% 同一性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；

(b) 配列番号 2 を含む第二のポリペプチドに対して少なくとも 80% 同一性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；

(c) 配列番号 2 を含む第二のポリペプチドに対して少なくとも 95% 同一性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；

(d) 配列番号 2 を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；

(e) 配列番号 2 を含むポリペプチドに対する結合特異性を有する抗体を惹起させることができるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；

(f) 配列番号 2 を含むポリペプチドのエピトープ保持部分をコードするポリヌクレオチド；

(g) 配列番号 1 を含むポリヌクレオチド；

(h) (a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f) または (g) におけるポリヌクレオチドに対して相補的であるポリヌクレオチド；

から選択されるポリヌクレオチドを含む単離されたポリヌクレオチドと会合したりボソームを含む医薬組成物を提供する。

【0025】

当業者であれば、本発明は、リボソーム、および DNA 分子、すなわち、本特許出願においてここに記載した、そのようなポリペプチドの突然変異体、変種、ホモログおよび誘導体のようなアナログをコードするポリヌクレオチドおよびそれらの相補的配列を含む医薬組成物を含むことを認識するであろう。本発明は、本発明の DNA 分子に対応する RNA 分子も含む。DNA および RNA 分子に加えて、本発明は、対応するポリペプチド、およびそのようなポリペプチドに特異的に結合する一特異的抗体を含む。

【0026】

本明細書中で用いるように、「に会合した」は、本発明のポリペプチドはリボソーム膜に少なくとも部分的に包埋された、好ましくは脂質に非共有結合されたことを意味する。該ポリペプチドは、それ自体が膜に包埋された脂質の脂肪酸「テイル」にも結合することができる。

【0027】

さらなる実施形態において、本発明によるポリペプチドと会合したりボソームを含む医薬組成物は抗原性である。

【0028】

さらなる実施形態において、本発明によるポリペプチドと会合したりボソームを含む医

10

20

30

40

50

薬組成物は免疫原性である。

【0029】

さらなる実施形態において、本発明によるポリペプチドと会合したりボソームを含む医薬組成物は宿主において免疫応答を誘導することができる。

【0030】

さらなる実施形態において、本発明は、前記定義の本発明のポリペプチドに対して結合特異性を有する抗体を惹起させることができるポリペプチドと会合したりボソームを含む医薬組成物にも関する。

【0031】

「結合特異性を有する」抗体は、選択されたポリペプチドを認識し、それに結合するが、試料、例えば、選択されたペプチドを天然では含む生物学的試料中の他の分子を実質的に認識し、それに結合しない抗体である。特異的結合は、選択されたポリペプチドが抗原として用いられるE L I S Aアッセイを用いて測定することができる。

10

【0032】

本発明によると、生物学的実験における「保護」は、細菌抗体の生産における有意な増加、または殺菌活性の有意な増加によって定義される。

【0033】

本発明のさらなる態様において、本発明のポリペプチド、またはそのアナログの免疫原性および/または抗原性断片に会合したりボソームを含む医薬組成物が提供される。

【0034】

本発明の断片は1以上のそのようなエピトープ領域を含むべきであり、あるいはそれらの免疫原性および/または抗原性特性を保有するのに十分にそのような領域に対して同様であるべきである。かくして、本発明による断片では、同一性の程度はおそらくは無関係である。というのは、それらは本明細書中に記載されたポリペプチドまたはそのアナログの特定の部分に100%同一であり得るからである。本発明は、さらに、本発明のポリペプチドの免疫原性断片を提供し、該断片は本発明のポリペプチドの連続部分である。本発明は、さらに、本発明のポリペプチド配列からの少なくとも10の連続アミノ酸残基を有する断片を提供する。1つの実施形態において、少なくとも15連続アミノ酸残基。1つの実施形態において、少なくとも20連続アミノ酸残基。1つの実施形態において、少なくとも30連続アミノ酸残基。1つの実施形態において、少なくとも40連続アミノ酸残基。1つの実施形態において、少なくとも50連続アミノ酸残基。1つの実施形態において、少なくとも100連続アミノ酸残基。1つの実施形態において、少なくとも150連続アミノ酸残基。

20

30

【0035】

本発明は、さらに、配列番号2を含むポリペプチドと同一または実質的に同一の免疫原性活性を有する断片を提供する。該断片は、(もし必要であれば、担体にカップリングさせた場合)、N s p Aポリペプチドを認識する免疫応答を惹起させることができる。

【0036】

そのような免疫原性断片は、例えば、N-末端リーダーペプチド、および/または膜貫通ドメインおよび/または該部ループおよび/またはターンを欠如するN s p Aポリペプチドを含むことができる。本発明は、さらに、当該配列の全長にわたって、配列番号2を含む第二のポリペプチドに対して少なくとも70%同一性、好ましくは80%同一性、より好ましくは95%同一性を有するポリペプチドの過剰細胞ドメインの実質的に全てを含むN s p Aの断片を提供する。

40

【0037】

本発明は、さらに、B-細胞またはT-ヘルパーエピトープを含む断片に会合したりボソームを含む医薬組成物を提供する。

【0038】

本発明は、さらに、より長いポリペプチドの一部であってよい断片と会合したりボソームを含む医薬組成物を提供する。分泌またはリーダー配列、または多重ヒスチジン残基の

50

ような精製を助ける配列、または組換え生産の間に安定性を増大させるさらなる配列、または最終ポリペプチドの免疫原性を増大させるさらなるポリペプチドまたは脂質テイル配列を含有するさらなるアミノ酸配列を含むのが有利であり得る。

【0039】

当業者であれば、本発明のポリペプチドのアナログに会合したりボソームを含む医薬組成物もまた、本発明と関連した、すなわち、抗原性/免疫原性物質としての用途を見出すであろうことを認識するであろう。かくして、例えば、1以上の付加、欠失、置換等を含む蛋白質またはポリペプチドは本発明に含まれる。

【0040】

本明細書中で用いるように、本発明のポリペプチドの「断片」、「アナログ」または「誘導体」は、アミノ酸残基の1以上が保存されたまたは保存されていないアミノ酸残基（好ましくは保存された）で置き換えられ、かつ天然または非天然であってよいポリペプチドを含む。1つの実施形態において、本発明のポリペプチドの誘導体およびアナログは、図面に示される配列またはその断片に対して約80%の同一性を有するであろう。すなわち、残基の80%は同一である。さらなる実施形態において、ポリペプチドは80%を超える同一性を有するであろう。さらなる実施形態において、ポリペプチドは85%よりも大きな同一性を有するであろう。さらなる実施形態において、ポリペプチドは90%よりも大きな同一性を有するであろう。さらなる実施形態において、ポリペプチドは95%よりも大きな同一性を有するであろう。さらなる実施形態において、ポリペプチドは99%よりも大きな同一性を有するであろう。さらなる実施形態において、本発明のポリペプチドのアナログは約20アミノ酸残基未満、より好ましくは10未満の置換、修飾または欠失を有するであろう。

10

20

30

【0041】

これらの置換はポリペプチドの二次構造およびヒドロパシク性質に対して最小の影響を有するものである。好ましい置換は保存されたとして当該分野で知られたものであり、すなわち、置換された残基は疎水性、サイズ、電荷または官能基のような物理的または化学的特性を共有する。これらは、Atlas of Protein Sequence and Structure 5, 1978においてDayhoff, M.によって、およびEMBO J. 8, 779-785, 1989においてArgos, P.によって記載されたもののような置換を含む。例えば、以下の群の1つに属する天然または非天然いずれかのアミノ酸は保存された変化を表す：

ala, pro, gly, gln, asn, ser, thr, val;

cys, ser, tyr, thr;

val, ile, leu, met, ala, phe;

lys, arg, orn, his;

およびphe, tyr, trp, his。

好ましい置換は、対応するL-アミノ酸に代えてのD-エナンチオマーの置換も含む。

【0042】

相同性のパーセンテージは、同一性のパーセンテージ+アミノ酸タイプの同様性または保存のパーセンテージの和と定義される。

40

【0043】

1つの実施形態において、本発明のポリペプチドのアナログは、図面に示した配列またはその断片に対して約70%同一性を有するであろう。すなわち、残基の70%は同一である。さらなる実施形態において、ポリペプチドは80%よりも大きな同一性を有するであろう。さらなる実施形態において、ポリペプチドは85%よりも大きな同一性を有するであろう。さらなる実施形態において、ポリペプチドは90%よりも大きな同一性を有するであろう。さらなる実施形態において、ポリペプチドは95%よりも大きな同一性を有するであろう。さらなる実施形態において、ポリペプチドは99%よりも大きな同一性を有するであろう。さらなる実施形態において、本発明のポリペプチドのアナログは約20アミノ酸残基未満の、より好ましくは約10アミノ酸残基未満の置換、修飾または欠失を

50

有するであろう。

【0044】

1つの実施形態において、本発明のポリペプチドのアナログは図面に示した配列またはその断片に対して約70%相同性を有するであろう。さらなる実施形態において、ポリペプチドは80%よりも大きな相同性を有するであろう。さらなる実施形態において、ポリペプチドは85%よりも大きな相同性を有するであろう。さらなる実施形態において、ポリペプチドは90%よりも大きな相同性を有するであろう。さらなる実施形態において、ポリペプチドは95%よりも大きな相同性を有するであろう。さらなる実施形態において、ポリペプチドは99%よりも大きな相同性を有するであろう。さらなる実施形態において、本発明のポリペプチドのアナログは、約20アミノ酸残基未満、より好ましくは約10アミノ酸残基未満の置換、修飾または欠失を有するであろう。

10

【0045】

アミノ酸配列を比較するのにCLUSTALプログラムのようなプログラムを用いることができる。このプログラムはアミノ酸配列を比較し、適切であればスペースをいずれかの配列に挿入することによって最適な整列を見出す。最適な配列についてのアミノ酸同一性または相同性を計算するのが可能である。BLASTxのようなプログラムは、同様な配列の最も長いストレッチを整列させ、フィットに対して値を割り当てる。かくして、同様のいくつかの領域が見出され、各々が異なるスコアを有する比較を得ることが可能である。同一性分析の双方のタイプが本発明で考えられる。

20

【0046】

抗原性ポリペプチドをスクリーニングして、エピトープ領域、すなわち、ポリペプチドの抗原性または免疫原性を担う領域を同定するのが可能であることはよく知られている。そのようなスクリーニングを行うための方法は当該分野でよく知られている。かくして、本発明の断片は1以上のそのようなエピトープ領域を含み、あるいはそれらの抗原性/免疫原性特性を保有するのにそのような領域に対して十分に同様であるべきである。

【0047】

かくして、アナログ、誘導体および断片で重要なものは、それらは、それらが由来する蛋白質またはポリペプチドの少なくともある程度の抗原性/免疫原性を保有することである。

【0048】

さらに、アミノ酸領域が多形であることが見出される状況においては、異なるN meningitidis株の異なるエピトープをより有効に模倣するために1以上の特定のアミノ酸を変化させるのが望ましいであろう。

30

【0049】

さらなる実施形態において、本発明は、本発明の1以上のポリペプチド、またはその断片もしくはアナログを含むキメラポリペプチドと会合したりボソームを含む医薬組成物にも関する。

【0050】

さらなる実施形態において、本発明は、配列番号2を含む2以上のポリペプチド、またはその断片またはアナログを含むキメラポリペプチドに会合したりボソームを含む医薬組成物にも関し、ただし、該ポリペプチドはキメラポリペプチドを形成するように連結されているものとする。

40

【0051】

さらなる実施形態において、本発明は、配列番号2を含む2以上のポリペプチドを含むキメラポリペプチドに会合したりボソームを含む医薬組成物にも関し、但し、ポリペプチドがキメラポリペプチドを形成するように連結されているものとする。

【0052】

好ましくは、本発明の医薬組成物のポリペプチドの断片、アナログまたは誘導体は少なくとも1つの抗原性領域、すなわち、少なくとも1つのエピトープを含むであろう。

【0053】

50

特別な実施形態において、本発明の医薬組成物に含まれるポリペプチド断片およびアナログは、メチオニン (Met) またはバリン (Val) のような出発残基は含有しない。好ましくは、ポリペプチドはリーダーまたは分泌配列 (シグナル配列) を取り込まない。本発明のポリペプチドのシグナル部分は確立された分子生物学技術に従って決定することができる。一般に、注目するポリペプチドは *N. meningitidis* 培養から単離し、引き続いて、配列決定して、成熟蛋白質の初期残基、従って、天然ポリペプチドの配列を決定することができる。

【0054】

本発明の医薬組成物についてのポリペプチドは、それらの開始コドン (メチオニンまたはバリン) なくして、および/または組換えポリペプチドの生産および精製に好都合なようにするそれらのリーダーペプチドなくして、生産しおよび/または用いることができるのが理解される。リーダーペプチドをコードする配列を含まないクローニング遺伝子はポリペプチドを *E. coli* の細胞質に制限し、それらの回収を容易とするであろう (Glick, B. R. and Pasternak, J. J. (1998) *Manipulation of gene expression in prokaryotes. In. "Molecular biotechnology: Principles and applications of recombinant DNA"*, 2nd edition, ASM Press, Washington DC, p. 109-143)。

10

【0055】

NspA蛋白質は抗原性的に高度に保存されており、それが特異的抗体に接近可能な *N. meningitidis* の外膜に存在することが示されている。

20

【0056】

NspAのイン・ピトロ折り畳みは殺菌抗体の生産を完全することができる。この膜たんぱく質の折り畳みを改良するのに用いることができる方法の1つは、リポソームへのその取り込みである。

【0057】

リポソームは、閉じた同心二層膜を形成するリン脂質および他の極性両性体から形成される [Gregoriades, G., *Immunology Today*, 11, 3, 89 (1990); Lasic, D., *American Scientist*, 80, p. 20 (1992); Remington's on Pharmaceutical Sciences, 18th ed., 1990, Mack Publishing Co., Pennsylvania., p. 1691にまとめられている]。リポソームの主な成分は脂質であり、それは、長い非極性疎水性「テイル」に結合した極性親水性「ヘッド」を有する。該親水性ヘッドは、典型的には、リン酸基よりなり、他方、親水性テイルは2つの長い炭水化物鎖から形成される。脂質分子は水溶性である1つの部分およびそうではないもう1つの部分を有するため、それらは、疎水性テイルを水分子から隔離する秩序だった構造に凝集する傾向がある。該プロセスにおいて、リポソームは水および溶質をそれらの内部に捕獲することができ、あるいは疎水性領域を持つ分子もまたリポソーム膜に直接的に一体化させることもできる。多くのリン脂質は単独で、または他の脂質と組み合わせられて、リポソームを形成する。約束により、リポソームはサイズによってカテゴリー分けされ、3-文字頭字語を用いて、議論すべきリポソームのタイプを指定する。マルチメラ小胞は「MLV」と命名され、大きなユニメラ小胞は「LUV」と命名され、小さなユニメラ小胞は「SUV」と命名される。これらの命名には、時々、リポソームの化学的組成が続く。公知のリポソームの命名法およびまとめは Storm et al., 1998, *PSIT*, 1: 19-31に記載されている。リポソームは膜蛋白質再折り畳みを助けるのに有効であり、また、抗原に対する液性並びに細胞性免疫応答の効果的なアジュバントブースティングである。

30

40

【0058】

本発明は、約1ないし50、ないし約1ないし1500の間の脂質に対する蛋白質の比

50

率を有するリポソームを含む医薬組成物を提供する。

【0059】

本発明は、リン脂質から構成されたリポソームを含む医薬組成物を提供する。これらのリン脂質は合成し、または細菌細胞、大豆、卵から抽出することができる。

【0060】

本発明は、組換えNspAポリペプチドを異なるリポソーム処方に取り込む方法を提供する。

【0061】

リポソームは、異なる比率で合わせることができる、種々の合成リン脂質（リスト1）または細菌リン脂質および/またはコレステロールで調製することができる。

10

【0062】

本発明は、細菌起源からリポソーム処方を作成するために細菌細胞から脂質を抽出する方法を提供する。複合脂質混合物はいくつかの細菌種から抽出することができる。これらの種は限定されるものではないが、*Neisseria* spp、*Haemophilus* spp、*Pseudomonas* spp、*Bacteriodes* spp、*Legionella* spp、*Vibrio* spp、*Brucella* spp、*Bordetella* spp、*Campylobacter* spp、*Klebsiella* spp、*Salmonella* spp、*Shigella* spp、*Proteus* spp、および*Yersinia* sppを含む。他の種はBergey's Manual of Determinative Bacteriology (1974) (Baltimore)に見出すことができる。好ましい実施形態において、複合脂質混合物は*E. coli*、*N. meningitidis*、または*N. lactamica*から抽出される。

20

【0063】

本発明のリポソームは、ホスファチジルエタノールアミン（PE）、ホスファチジルセリン（PS）、ホスファチジルグリセロール（PG）およびホスファチジルコリン（PC）のようなホスファチジルエーテルおよびエステルを含めた種々の小胞形成脂質から、また、ジオレオイルグリセロスクシネートのようなグリセリド；セレプロシド；ガングリオシド、スフィンゴミエリン；コレステロールのようなステロイド；および他の脂質、ならびにビタミンEまたはビタミンCパルミテートのような賦形剤からの調製することができる。

30

【0064】

リスト1は、NspA-リポソーム調製物を調製するのに用いることができる合成脂質の部分的リストを評する。他の脂質を用いることができ、それはRemington's Pharmaceutical Sciences, 18th ed., 1990, Mack Publishing Co., Pennsylvania, p. 390に記載されている。

【0065】

リスト1 NspA-リポソーム調製物を調製するのに用いられる合成脂質のリスト
 1, 2 - ジラウロイル - sn - グリセロ - 3 - ホスフェート (DLPA)、
 ジミリストイル - sn - グリセロ - 3 - ホスフェート (DMPA)、
 1, 2 - ジパルミトイル - sn - グリセロ - 3 - ホスフェート (DPPA)、
 1, 2 - ジステアロイル - sn - グリセロ - 3 - ホスフェート (DSPA)、
 1, 2 - ジオレオイル - sn - グリセロ - 3 - ホスフェート (DOPA)、
 1 - パルミトイル - 2 - オレオイル - sn - グリセロ - 3 - ホスフェート (POPA)、
 1, 2 - ジラウロイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン (DLPC)、
 1, 2 - ジトリデカノイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン、
 1, 2 - ジミリストイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン (DMPC)、
 1, 2 - ジペンタデカノイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン、
 1, 2 - ジパルミトイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン (DPPC)、

40

50

- 1, 2 - ジヘプタデカノイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン、
 1, 2 - ジステアロイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン (D S P C)、
 1, 2 - ジミリストイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン、
 1, 2 - ジパルミトレオイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン、
 1, 2 - ジオレオイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン (D O P C)、
 1 - ミリストイル - 2 - パルミトイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン、
 1 - ミリストイル - 2 - ステアロイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン、
 1 - パルミトイル - 2 - ミリストイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン、
 1 - パルミトイル - 2 - ステアロイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン、
 1 - パルミトイル - 2 - オレオイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン (P O P C)、
 1 - パルミトイル - 2 - リノレオイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン、
 1, 2 - ジラウロイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン (D L P E)、
 1, 2 - ジミリストイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン (D M P E)、
 1, 2 - ジパルミトイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン (D P P E)、
 1, 2 - ジパルミトレオイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン、
 1, 2 - ジステアロイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン (D S P E)、
 1, 2 - ジオレオイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン (D O P E)、
 1 - パルミトイル - 2 - オレオイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン (P O P E)、
 1, 2 - ジラウロイル - sn - グリセロ - 3 - [ホスホ - R A C - (1 - グリセロール)] (D L P G)、
 1, 2 - ジミリストイル - sn - グリセロ - 3 - [ホスホ - R A C - (1 - グリセロール)] (D M P G)、
 1, 2 - ジパルミトイル - sn - グリセロ - 3 - [ホスホ - R A C - (1 - グリセロール)] (D P P G)、
 1, 2 - ジステアロイル - sn - グリセロ - 3 - [ホスホ - R A C - (1 - グリセロール)] (D S P G)、
 1, 2 - ジオレオイル - sn - グリセロ - 3 - [ホスホ - R A C - (1 - グリセロール)] (D O P G)、
 1 - パルミトイル - 2 - オレオイル - sn - グリセロ - 3 - [ホスホ - R A C - (1 - グリセロール)] (P O P G)、
 1, 2 - ジラウロイル - sn - グリセロ - 3 - [ホスホ - L - セリン] (D L P S)、
 1, 2 - ジミリストイル - sn - グリセロ - 3 - [ホスホ - L - セリン] (D M P S)、
 1, 2 - ジパルミトイル - sn - グリセロ - 3 - [ホスホ - L - セリン] (D P P S)、
 1, 2 - ジステアロイル - sn - グリセロ - 3 - [ホスホ - L - セリン] (D S P S)、
 1, 2 - ジオレオイル - sn - グリセロ - 3 - [ホスホ - L - セリン] (D O P S)、
 1 - パルミトイル - 2 - オレオイル - sn - グリセロ - 3 - [ホスホ - L - セリン] (P O P S)。
【 0 0 6 6 】
 好ましい実施形態において、脂質は：
 1, 2 - ジミリストイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン (D M P C)、
 1, 2 - ジミリストイル - sn - グリセロ - 3 - [ホスホ - L - セリン] (D M P S)、
 および
 1, 2 - ジミリストイル - 3 - トリメチルアンモニウム - プロパン (D M T A P)
 から選択させる。
【 0 0 6 7 】
 リポソーム膜の流動性および安定性はリン脂質の転移温度 (炭化水素領域が準結晶からより流体状態に変化する温度) に依存するであろう。
【 0 0 6 8 】
 膜流動性、ラメラの数、小胞サイズ、表面電荷、抗原に対する脂質の比率、および抗原

のリポソーム内への局所化の修飾は、リポソーム調製物のアジュバント性を変調することができる。

【0069】

リポソームの調製はエタノール注入；エーテル注入；洗剤除去；溶媒蒸発；水エマルジョン中のクロロホルムからの有機溶媒の蒸発；核ポアポリカルボネート膜を通じるマルチラメラ小胞の押出し；リン脂質混合物の凍結および解凍、ならびに音波処理およびホムリナイゼーションを含めた多数の異なる技術によって作成することができる。

【0070】

脂質は、丸底ガラスフラスコ中のクロロホルム：メタノール溶液のような適当な有機溶媒または有機溶媒混合物に溶解させ、ロータリーエバポレーターを用いて乾燥して、容器上の均一なフィルムを達することができる。

10

【0071】

次いで、NspA蛋白質およびSDSを含有する蛋白質-洗剤溶液を脂質フィルムに加え、フィルムが溶解するまで軽く混合することができる。次いで、溶液をPBS緩衝液に対して透析して、洗剤を除去し、リポソームの形成を誘導する。

【0072】

ゲル濾過を別法として用いて、NspA-OG-SPS-脂質混合ミセル溶液からのNspAリポソームの形成を誘導し、洗剤を除去することができる。

【0073】

いくつかのリポソーム処方は、リピドA、モノホフホリルリピドA(MPLA)のような親油性分子、QuilA、QS21、ミョウバン、MF59、p3CSS、MTP-PEのようなリポ多糖のようなアジュバント、ならびにインターフェロンのようなサイトカインを含めた水溶性分子で調製することもできる。好ましい実施形態において、リポソーム組成物は約1ないし10%アジュバントを含む。より好ましい実施形態において、アジュバントは約5%未満で存在させる。値はアジュバントに応じてvol/volまたはwt/wtであってよい。

20

【0074】

本発明によると、リポソームは抗原送達において臨界的な役割を演じる。というのは、ポリペプチド-リポソーム組成物は免疫系の細胞による循環からの除去に続いて免疫系に直接的に提示されるからである。加えて、免疫刺激経路の選択は、リポソームの脂質組成に変化を施すことによって改変することができる。例えば、リピドA、ムラミルジ-およびトリペプチド-PEおよびカチオン性脂質のような異なる刺激分子をリポソームに処方することができる。

30

【0075】

膜蛋白質の再折り畳みに加えて、リポソームもまた抗原に対する液性ならびに細胞性免疫応答をブースティングする有効なアジュバントである。膜流動性、ラメラの数、小胞サイズ、表面電荷、抗原に対する脂質比率、および抗原のリポソーム内の局所化の修飾は、リポソーム調製物のアジュバント性を変調することができる。

【0076】

好ましい実施形態において、脂質処方は0および25モル%の間のコレステロールを含有する。

40

【0077】

本発明のもう1つの態様によると、(i)リポソーム、担体、希釈剤またはアジュバントと共に本発明のポリペプチドを含有する組成物；(ii)本発明のポリペプチドおよびリポソーム、希釈剤またはアジュバントを含む医薬組成物；(iii)本発明のポリペプチドおよびリポソーム、単体、希釈剤またはアジュバントを含むワクチン；(iv)免疫応答、例えば、N meningitidisに対する保護免疫応答を誘導するのに免疫原性的に有効な量の本発明の医薬組成物を宿主に投与することによって宿主においてN meningitidisに対する免疫応答を誘導する方法；特に、(v)予防または治療有効量の本発明の医薬組成物をそれを必要とする宿主に投与することによって、N m

50

en meningitidis 感染を予防および/または治療する方法も提供される。

【0078】

本発明のもう1つの態様によると、(i)リボソーム、担体、希釈剤またはアジュバントと共に本発明のポリヌクレオチドを含有する組成物；(ii)本発明のポリヌクレオチド、およびリボソーム、担体、希釈剤またはアジュバントを含む医薬組成物；(iii)免疫応答、例えば、N. meningitidis に対する保護免疫応答を誘導するのに免疫原的に有効量の本発明の医薬組成物を宿主に投与することによって宿主において N. meningitidis に対する免疫応答を誘導する方法；特に、(iv)予防または治療量の本発明の医薬組成物をそれを必要とする宿主に投与することによって、N. meningitidis 感染を予防および/または治療する方法も提供される。

10

【0079】

もう1つの態様によると、医薬上許容されるアジュバントを含む混合物中のリボソーム、1以上の本発明の N. meningitidis ポリペプチドを含む医薬組成物が提供される。適当なアジュバントは(1)MF59TM、SAFTM、RibitTMのような水中油型エマルジョン処方；(2)フロイントの完全または不完全アジュバント；(3)塩、すなわち、AlK(SO₄)₂、AlNa(SO₄)₂、AlNH₄(SO₄)₂、Al(OH)₃、AlPO₄、シリカ、カオリン；(4)ISCOM(免疫刺激複合体)のようなそれから精製する StimulomTM または粒子のようなサポニン誘導體；(5)インターロイキン、インターフェロン、マクロファージコロニー刺激因子(M-CSF)、腫瘍壊死因子(TNF)のようなサイトカイン；(6)炭素ポリヌクレオチド、すなわち、粘膜免疫性の誘導のための、ポリICおよびポリAU、解毒されたコレラトキシン(CTB)および E. coli 熱不安定トキシンのような他の物質を含む。アジュバントのより詳細な記載は、Pharmaceutical Research, vol. 11, No. 1 (1994) pp 2-11において M. Z. I Khan et al. によるレビューにおいて、また、Vaccine, Vol. 13, No. 14, pp 1263-1276 (1995) および WO 99/24578 において Gupta et al. によるもう1つのレビューにおいて利用可能である。好ましいアジュバントは QuilATM、QS21TM、AlhydrogelTM および AdjuphosTM を含む。

20

【0080】

本発明の医薬組成物は注射、迅速注入、鼻咽頭吸収、皮膚吸収によって非経口的に、またはバツカル傾向または経口投与することができる。

30

【0081】

用語医薬組成物は抗体を含むことも意味する。本発明によると、N. meningitidis 感染および/または N. meningitidis 感染によって媒介される病気および兆候の治療または予防用の、本発明のポリペプチドに対する結合特異性を有する1以上の抗体の使用が提供される。

【0082】

本発明の医薬組成物は、Manual of Clinical Microbiology, P. R. Murray (Ed, in Chief), E. J. Baron, M. A. Pfaller, F. C. Tenover and R. H. Tenover. ASM Press, Washington, D. C. seventh edition, 1999, 1773 p に記載されたナイセリア感染および/またはナイセリア感染によって媒介される病気および兆候の予防で用いられる。

40

【0083】

1つの実施形態において、本発明の組成物は、髄膜炎および髄膜炎菌血症のような風土病および流行病の治療または予防で用いられる。1つの実施形態において、本発明のワクチン組成物は、ナイセリア感染および/またはナイセリア感染によって媒介される病気および兆候の治療または予防で用いられる。さらなる実施形態において、ナイセリア感染は N. meningitidis、N. gonorrhoeae、N. lactamica

50

または *N. polysaccharaea* である。

【0084】

さらなる実施形態において、本発明は、予防または治療量の本発明の組成物を宿主に投与することを含む、*N. meningitidis* 感染に罹患性の宿主において *N. meningitidis* 感染の予防または治療方法を提供する。

【0085】

本発明で用いるように、用語「宿主」は哺乳動物を含む。さらなる実施形態において、該哺乳動物はヒトである。

【0086】

特別な実施形態において、医薬組成物は、新生児、幼児、子供、老人および免疫寛容宿主のような *N. meningitidis* 感染の危険性がある宿主に投与される。

10

【0087】

特別な実施形態において、医薬組成物は、成人のような *N. meningitidis* 感染の危険性がある宿主に投与される。

【0088】

医薬組成物は、好ましくは、免疫化の間が約1ないし6週間間隔の間隔であり、1ないし3回の、約0.001ないし100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (抗原/体重)、より好ましくは0.01ないし10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、最も好ましくは0.1ないし1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の単位投与形態である。

【0089】

医薬組成物は、好ましくは、免疫化の間が約1ないし6週間間隔の間隔である、1ないし3回の、約0.1 μg ないし10 mg、より好ましくは1 μg ないし1 mg、最も好ましくは10ないし100 μg の単位投与形態である。

20

【0090】

もう一つの態様において、配列番号2を含むアミノ酸配列によって特徴付けられるポリペプチド、またはその断片もしくはアナログをコードするポリヌクレオチドに関連するリポソームを含む医薬組成物が提供される。

【0091】

図1に示したポリヌクレオチド配列は縮重コドンで改変することができるが、依然として、本発明のポリペプチドをコードすることは認識されよう。従って、本発明は、さらに90%の配列間同一性を有するここに前記したポリヌクレオチド配列(またはその相補体配列)にハイブリダイズするポリヌクレオチド、およびリポソームを含む医薬組成物を提供する。さらなる実施形態において、ポリヌクレオチドは、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズ可能であり、すなわち、少なくとも95%同一性を有する。さらなる実施形態において、97%を超える同一性。

30

【0092】

ハイブリダイゼーションに適したストリンジェントな条件は当業者によって容易に決定することができる(例えば、Sambrook et al., (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor, N.Y.; *Current Protocols in Molecular Biology*, (1999) edited by Ausubel F.M. et al., John Wiley & Sons Inc., N.Y. 参照)。

40

【0093】

さらなる実施形態において、配列番号1に示されたポリヌクレオチド、または本発明のポリペプチドをコードするその断片またはアナログと会合したりポソームを含む医薬組成物。

【0094】

もう一つの態様によると、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを宿主細胞において発現させ、発現させたポリペプチド産物を回収することにより、組換え技術によって

50

本発明のポリペプチドを生産する方法が提供される。

【0095】

別法として、ポリヌクレオチドは確立された合成化学技術、すなわち、十分なポリペプチドを生産するように連結された（ブロック連結）オリゴペプチドの液相または固相合成に従って生産することができる。

【0096】

ポリヌクレオチドおよびポリペプチドを得て、評価する一般的な方法は以下の文献に記載されている：Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989; Current Protocols in Molecular Biology, edited by Ausubel F.M. et al., John Wiley & Sons, Inc. New York; PCR Cloning Protocols, from Molecular Cloning to Genetic Engineering, edited by White B.A., Human Press, Totowa, New Jersey, 1997, 490 pages Protein Purification, Principles and Practices, Scopes R.K., Springer-Verlag, New York, 3rd Edition, 1993, 380 pages; Current Protocols in Immunology, edited by Coligan J.E. et al., John Wiley & Sons Inc., New York.

10

20

【0097】

本発明は、ポリペプチドの発現に適した条件下で、本発明の宿主細胞を培養することを含みポリペプチドの製法を提供する。

【0098】

組換え生産では、宿主細胞を、本発明のポリペプチドをコードするベクターでトランスフェクトし、次いで、適切には、プロモーターを活性化し、形質転換体を選択し、または遺伝子を増幅するための修飾された栄養培地中で培養する。適当なベクターは選択された宿主中で生きており、複製可能であるものであり、染色体、非-染色体および合成DNA配列、例えば、細菌プラスミド、ファージDNA、バキュロウイルス、酵母プラスミド、プラスミドおよびファージDNAの組合せから由来するベクターを含む。ポリペプチド配列は、それが、プロモーター、リボソーム結合部位（コンセンサス領域またはシャイン-ダルガルノ配列）および所望によりオペレーター（制御エレメント）を含む発現制御領域に操作可能に連結されるように、制限酵素を用いて適当な部位にてベクターに組み込むことができる。与えられた宿主およびベクターに適切である発現制御領域の個々の成分を、確立された分子生物学の原理に従って選択することができる（Sambrook et al., Molecular Cloning; A Laboratory Manual, 2nd ed, Cold Spring Harbor, N.Y. 1989; Current Protocols in Molecular Biology, Edited by Ausubel F.M. et al., John Wiley and Sons, Inc. New York）。適当なプロモーターは、限定されるものではないが、LTRまたはSV40プロモーター、E. coli lac、tacまたはtrpプロモーターおよびファージラムダP_Lプロモーターを含む。ベクターは、好ましくは、複製起点ならびに選択マーカー、すなわち、アンピシリン抵抗性遺伝子を取り込む。適当な細菌ベクターはpET、pQE70、pQE60、pQE-9、pD10 phage script、psiX174、pbluescript SK、pbsks、pNH8A、pNH16a、pNH18A、pNH46A、ptrc99a、pKK223-3、pKK233-3、pDR540、pRIT5および真核生物ベクターpBlueBacII、pWLNEO、pSV2CAT、pOG44、pXT1、pSG、pSVK3、pBPV、pMSGおよびpSVLを含む。宿主細胞は細菌、すなわち、E. coli、

30

40

50

Bacillus subtilis、*Streptomyces*；真菌、すなわち、*Aspergillus niger*、*Aspergillus nidulans*；酵母、すなわち、*Saccharomyces*または真核生物、すなわち、CHO、COSであってよい。

【0099】

培養におけるポリペプチドの発現に際して、細胞は典型的には遠心によって収穫し、次いで、（もし発現されたポリペプチドが培地に分泌されないならば）物理的・化学的手段によって破壊し、得られた粗製調節物を維持して、注目するポリペプチドを単離する。培養基または溶解物からのペプチドの精製は、ポリペプチドの特性に依存して、確立された技術によって、すなわち、硫酸アンモニウムまたはエタノール沈殿、酸抽出、アニオンまたはカチオン交換クロマトグラフィー、ホスホセルローストマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィーおよびベクチンクロマトグラフィーを用いて達成することができる。最終の精製はHPLCを用いて達成することができる。

10

【0100】

ポリペプチドはリーダーまたは分泌配列の有りまたは無しにて発現させることができる。前者の場合には、リーダーは、翻訳後プロセッシングを用いて除去することができる（米国特許第4,431,739号；米国特許第4,425,437号；および米国特許第4,338,397号参照）、あるいは発現されたポリペプチドの精製に従い化学的に除去することができる。

20

【0101】

さらなる態様によると、本発明の医薬組成物はナイセリア感染、特に、*N. meningitidis*感染についての診断テストで用いることができる。

【0102】

いくつかの診断方法、例えば、生物学的試料中の*N. meningitidis*生物の検出が可能である。以下の手法に従うことができる；

a) 宿主から生物学的試料を入手し、

b) 本発明の医薬組成物と反応性である抗体または抗体断片を、生物学的試料と共にインキュベートして、混合物を形成し；次いで、

c) *N. meningitidis*の存在を示す混合物中の特異的に結合した抗体または結合した断片を検出する。

30

【0103】

別法として、*N. meningitidis*抗原に特異的な抗体を含有する、または含有することが疑われる生物学的試料中の該抗体を検出する抗体は以下のように行うことができる。

【0104】

a) 宿主から生物学的試料を入手し、

b) 本発明の医薬組成物を生物学的試料と共にインキュベートして、混合物を形成し；ついで、

c) *N. meningitidis*に特異的な抗体の存在を示す混合物中の特異的に結合した抗原または結合した断片を検出する。

40

【0105】

当業者であれば、この診断テストは、本質的に、蛋白質の特異的な抗体が生物に存在するか否かを判断するための、酵素結合免疫吸着検定（ELISA）、ラジオイムノアッセイまたはラテックス凝集アッセイのような免疫学的テストを含めたいくつかの形態を採用することができるのを認識するであろう。

【0106】

本発明のポリペプチドをコードするDNA配列を用いて、そのような細菌を含有することが疑われる生物学的試料中の*N. meningitidis*の存在を検出するのに用いられるDNAプローブを設計することもできる。本発明の検出方法は；

50

- a) 宿主から生物学的試料を入手し、
- b) 本発明のポリペプチドまたはその断片をコードするDNA配列を有する1以上のDNAプローブを生物学的試料と共にインキュベートして、混合物を形成し；次いで、
- c) *N. meningitidis* 細菌の存在を示す混合物中の特異的に結合したDNAプローブを検出することを含む。

【0107】

本発明のDNAプローブは、例えば、*N. meningitidis* 感染を診断する方法として、例えば、ポリメラーゼ鎖反応を用いて試料中の循環*N. meningitidis*、すなわち、*N. meningitidis* 核酸を検出するのに用いることもできる。該プローブは慣用的技術を用いて合成することができ、固相に固定化し、あるいは検出可能な標識で標識することができる。この適用のための好ましいDNAプローブは、本発明の*N. meningitidis* ポリペプチドの少なくとも約6連続ヌクレオチドに対して相補的な配列を有するオリゴマーである。さらなる実施形態において、好ましいDNAプローブは、本発明の*N. meningitidis* ポリペプチドの少なくとも約15連続ヌクレオチドに対して相補的な配列を有するオリゴマーであろう。さらなる実施形態において、好ましいDNAプローブは、本発明の*N. meningitidis* ポリペプチドの少なくとも約30連続ヌクレオチドに対して相補的な配列を有するオリゴマーであろう。さらなる実施形態において、好ましいDNAプローブは、本発明の*N. meningitidis* ポリペプチドの少なくとも約50連続ヌクレオチドに対して相補的な配列を有するオリゴマーであろう。

10

20

【0108】

宿主において*N. meningitidis* の検出のためのもう1つの診断方法は；

- a) 本発明の医薬組成物に対して反応性である抗体を検出可能な標識で標識し；
- b) 標識された抗体を宿主に投与し、次いで、；
- c) *N. meningitidis* の存在を示す宿主における特異的に結合した標識抗体または標識断片を検出することを含む。

【0109】

本発明のさらなる態様は、*N. meningitidis* 感染の診断および、特に、治療用の特異的抗体の生産のための免疫原としての本発明の医薬組成物の使用である。適当な抗体は、例えば、テストモデルにおいて*N. meningitidis* 感染に対して受動的に保護する特定の抗体の能力を測定することによって、適当なスクリーニング方法を用いて測定することができる。抗体は全抗体またはその抗原-結合断片であってよく、いずれの免疫グロブリンクラスに属することもできる。抗体または断片は動物起源、特に哺乳動物起源、さらに詳しくはネズミ、ラットまたはヒト起源であってよい。それは天然抗体またはその断片、あるいは所望であれば、組換え抗体または抗体断片であってよい。擁護組み換え抗体または抗体断片は、分子生物学技術を用いて生産された抗体または抗体断片を意味する。抗体または抗体断片はポリクローナル、または好ましくはモノクローナルであってよい。それは、*N. meningitidis* ポリペプチドと会合した多数のエピトープに対して特異的であるが、好ましくは1つに対して特異的であろう。

30

40

【0110】

1つの態様において、本発明は、*N. meningitidis* 感染の予防および/または治療のための抗体の使用を提供する。

【0111】

本発明のさらなる態様は、受動免疫化のための、本発明の医薬組成物に向けられた抗体の使用である。本出願に記載された抗体を使用することができよう。

【0112】

本発明のさらなる態様は免疫化の方法であり、それにより、本発明の医薬組成物に惹起された抗体は、受動免疫化を供するのに十分な量で宿主に投与される。

【0113】

50

さらなる実施形態において、本発明は、*N. meningitidis* 感染の予防または治療処置用の医薬の製造における本発明の医薬組成物の使用を提供する。

【0114】

さらなる実施形態において、本発明は、*N. meningitidis* 感染の検出または診断用の本発明の医薬組成物を含むキットを提供する。

【0115】

他に定義されなければ、本明細書中で用いるすべての技術および科学用語は、本発明が属する分野における当業者によって通常理解されるのと同じの意味を有する。本明細書中で言及されるすべての刊行物、特許出願、特許および他の文献がここに引用してその全体を援用する。コンプリクトする場合、定義を含めた本出願が支配するであろう。加えて、材料、方法および例は説明のためであり、限定的であることを意図しない。

10

【実施例】

【0116】

実施例 1

本実施例は、*NspA* 蛋白質を表す 3 - D モデルを説明する。

【0117】

髄膜炎菌 *NspA* 蛋白質を 3 - D モデルは、*Swiss - Pdb Viewer* [Gue, N. and MC Peitsch, *Electrophoresis*, 18, p. 2714 (1997)] および図 1 に示された *NspA* アミノ酸配列を用い、再度折り畳まれた *E. coli OmpA* (PDB: 1QJP) の結晶構造 [Pautsch, A and GE Schulz, *J. Mol. Biol.* 298, p. 273 (2000)] に基づいて開発された。この配列ならびに他の *NspA* は、元来、PCT/WO/96/29412 で示された。3 - D *NspA* モデルは図 2 に示す。予測される標的 (*NspA* 配列) および鑄型 (1QJP, OMPA 配列) の間の整列は、二次構造を予測 (PSIPRED)、プロフィールライブラリーサーチ (FUGUE)、位置特異的反復 BLAST (PSI-BLAST) およびベータ - スtrand 両親媒性測定を用いて達成された [Shi J. et al. *J. Mol. Biol.*, 310, p. 243 (2001); McGuffin L. T. et al. *Bioinformatics*, 16, p. 404 (2000); Altschul S. F. et al. *Nucleic Acids Res*, 25, p. 3389 (1997)]。このモデルから、蛋白質の各領域を突き止め、それらを、ペリプラズムターン (T)、膜包埋領域 (M) および表面 - 露出ループ (L) として分類することができた。従前に報告されているように、最初の 18 アミノ酸残基は分泌シグナルを表し、これは切断されて成熟ポリペプチドとなる [Martin et al. *J. Exp. Med.* 185, p. 1173 (1997)]。細菌のペリプラズム領域に面する膜の外側まで延びる 3 つの鋭いターンは、残基 55 ないし 58 (T1)、92 ないし 96 (T2) および 137 ないし 140 (T3) の間に突き止められた。髄膜炎基膜に包埋された *NspA* 蛋白質の内部コアは、 α - バレルを形成する 8 つの反平行膜貫通 α - スtrand から構成される。これらの膜貫通 α - スtrand は、各々、アミノ酸残基 24 ないし 33 (M1)、45 ないし 54 (M2)、59 ないし 67 (M3)、81 ないし 91 (M4)、97 ないし 107 (M5)、126 ないし 136 (M6)、141 ないし 150 (M7)、および 164 ないし 173 (M8) の間に位置すると決定された。最後に、髄膜炎基細胞の表面に露出していると判断された 4 つの領域は、各々、アミノ酸残基 34 ないし 44 (L1)、68 ないし 80 (L2)、108 ないし 125 (L3)、および 151 ないし 163 (L4) の間に位置した。このモデルの免疫学的確認は実施例 5 に示す。

20

30

40

【0118】

実施例 2

本実施例は、*NspA N. meningitidis* 突然変異体株の創製を説明する。

【0119】

50

NspA蛋白質を発現しない髄膜炎菌突然変異体株を創製するために、ファージベクター 1105に挿入されたトランスポゾンミニ-Tn10 (Kan^r)を用いて遺伝子を不活化した [Way et al. Gene, 32, p. 369 (1984); Kleckner et al. Methods Enzymol., 204, p. 139 (1991)]。nspA遺伝子 [Martin et al. J. Exp. Med., 185, p. 1173 (1997)]を含有するプラスミドpN2202を用いて、E. coli株W3110 [F⁻、hsdR⁻、hsdM⁺、thy⁻、IN(rrnD-rrnE)1⁻、mcrA⁺、mcrB⁺、(r_k⁺、m_k⁺)、MRR⁺、su^o]を形質転換した。次いで、組換えE. coli株をファージベクター 1105で感染させ、培養を、25 μg/mlアンピシリンおよび25 μg/mlのカナマイシンを含有するLB寒天プレート上で平板培養し、37 °Cで一晩インキュベートした。染色体またはpN2202プラスミドいずれか上にミニ-Tn10トランスポゾン含有する細菌のみが選択培地で増殖するであろう。QIAGENプラスミド精製キットを用い、組換えpN2202プラスミドを選択されたコロニーから精製した。次いで、これらの精製されたプラスミドを用いて、E. coli株JM109 (e14⁻ (mcrA) recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 (r_k⁻ m_k⁺) supE44 relA1 (lac-proAB) (F' traD36 proAB lacI^q Z M15))を形質転換し、細菌懸濁液を再度選択培地で平板培養した。ミニ-Tn10トランスポゾンを持つ、pN2202 nspAとして同定された組換えpN2202プラスミド含有する細菌のみが、この第2ラウンドの選択後に増殖することができた。イムノプロットにより、これらの組換えE. coliはNspA蛋白質を生産しなかったことが確認された。プラスミドをE. coli組換え株の1つから精製し、nspA遺伝子中のミニ-Tn10トランスポゾンの存在は配列決定によって確認した。1.8 kbミニ-Tn10は、プラスミドpN2202 nspAに含有されたnspA遺伝子中のヌクレオチド221直後に挿入されたと判断された。次いで、プラスミドpN2202 nspAを用いて、以下のプロトコルに従って、髄膜炎菌株608Bを形質転換した。10 mM MgCl₂を含むハートヒュージョンブロス中で増殖した髄膜炎菌株608Bの細菌懸濁液の光学密度(λ = 620 nm)を~0.25に調整した。10 μlの一定容量の精製されたプラスミドpN2202 nspAを1 mlの調整された髄膜炎菌細胞懸濁液に加え、5% CO₂の存在下で37 °Cにて3時間インキュベートした。このインキュベーション時間の後、髄膜炎菌細胞を、25 μg/mlのカナマイシンを含有するチョコレート寒天プレート上で平板培養した。NspA蛋白質の発現の欠如は、イムノプロットおよびフローサイロフルオロメトリーアッセイによって確認された。予測されるように、NspA-特異的MAb Me-7ならびにウサギおよびマウス過剰免疫結成は608B nspA突然変異体株と反応せず、他方、それらは野生型髄膜炎菌608B株を認識した。

【0120】

実施例3

本実施例は、NspA-特異的モノクローナル抗体の創製を説明する。

【0121】

天然NspAに対して向けられたMAbを創製するために、血清型BのN. meningitidis株608B [B:2a:P1.2:L3]から抽出された外膜調製物で雌Balb/cマウスを免疫化した [Martin et al. J. Exp. Med., 185, p. 1173 (1997)]。この外膜調製物を得るのに用いた塩化リチウム抽出は、本発明者らによって従前に記載されたように行った [Brodeur et al. Infect. Immun., 50, p. 265 (1985)]。マウスに、Quil Aアジュバント (Cedarlane Laboratories, Hornby, Ont. Canada)の存在下で、3週間間隔で、20 μgの外膜調製物を3回筋肉内(IM)注射した。ハイブリドーマ細胞系を創製するのに用いた融合プロトコルは、発明者らによって従前に記載されている [Hamel et al. J. Med. Microbiol., 25, p. 2434 (1987)]。MAbのクラスおよびサブクラスは従前に

報告されているようにELISAによって決定した[Martin et al., J. Exp. Med., 185, p. 1173 (1997)]。

【0122】

MAbの特異性は、精製された組換えNspA蛋白質、N. meningitidis 野生型株608Bおよび608B nspA突然変異体株から抽出された外膜調製物を用い、ELISAによって測定し、データを表1に示す。ELISAは従前に記載されているように行った[Martin et al., J. Exp. Med., 185, p. 1173 (1997)]。PCT/WO/96/29412に従前に記載されたMAb Me-7を陽性対照として用い、Haemophilus influenzae P2外膜蛋白質からの特異的なMAb p2-4を陰性対照として用いた[Cadieux et al., Infect. Immun., 67, p. 4955, (1999)]。全てのMAbは精製された組換えNspAと、および髄膜炎菌野生型608B株から抽出された外膜調製物と強く反応したが、それらが髄膜炎菌608B nspA突然変異体株を認識しなかった。

10

【0123】

表1：NspA - 特異的MAbの反応性

【0124】

【表1-1】

Mab ID	アイソタイプ	以下のものとMAbとの反応性 ¹		
		組換え NspA	野生型外膜	ΔNspA 外膜
Me-7	IgG2a	+	+	-
Me-9	IgG3	+	+	-
Me-10	IgG2a	+	+	-

20

【0125】

【表1-2】

Me-11	IgG2b	+	+	-
Me-12	IgG2b	+	+	-
Me-13	IgG2a	+	+	-
Me-14	IgG2a	+	+	-
Me-15	IgG2a	+	+	-
Me-16	IgG1	+	-	-
Me-17	IgG2a	+	+	-
Me-18	IgG2a	+	+	-
Me-19	IgG2a	+	+	-
Me-20	IgG3	+	+	-
Me-21	IgG2a	+	+	-
Me-22	IgG2a	+	+	-
P2-4	IgG2a	-	-	-

30

40

¹ MAbの反応性は、0.5 μg/mlの精製された組換えNspA蛋白質、野生型608B髄膜炎菌株からの、またはコーディング抗原としての608B nspA株からのOMPの2.5 μg/mlを用い、ELISAによって評価した。

【0126】

50

無傷髄膜炎菌細胞の表面での N s p A の露出はサイトフルオロメトリーアッセイを用いて調べた。髄膜炎菌は、8 % C O₂ 雰囲気中、37 °C にて、0 . 2 5 % デキストロースを含有するブレインハートインフュージョン (B H I) プロス中で、0 . 5 0 0 (~ 1 0⁸ C F U / m l) の光学密度 (λ = 4 9 0 n m) まで増殖させた。次いで、N s p A - 特異的 M A b または対照 M A b を加え、細胞に結合させ、これを回転させつつ 4 °C にて 2 時間インキュベートした。試料を、ブロッキング緩衝液 [2 % ウシ血清アルブミン (B S A) を含有するリン酸 - 緩衝化生食塩水 (P S B)] 中で 2 回洗浄し、次いで、ブロッキング緩衝液中に希釈された 1 m l のヤギフルオレセイン (F I T C) - コンジュゲート抗体 - マウス特異的 I g G (H + L) を加えた。回転しつつの室温での 6 0 分間のさらなるインキュベーションの後、試料を P B S 緩衝液中で 2 回洗浄し、P D B 緩衝液中の 0 . 3 % ホルムアルデヒドで 4 °C にて 1 8 時間固定した。細胞を、フルオサイトメトリー (E p i c s (登録商標) X L ; B e c k m a n C o u l t e r , I n c .) によって分析するまで、4 °C にて暗所で維持した。

【 0 1 2 7 】

図 3 は、2 つの血清群 B (6 0 8 B) [M a r t i n e t a l . J . E x p . M e d . , 1 8 5 , p . 1 1 7 3 (1 9 9 7)] および C u 3 8 5 [M o e e t a l . I n f e c t . I m m u n . , 6 7 , p . 5 6 6 4 , (1 9 9 9)]、1 つの血清群 A (F 8 2 3 8) [M a s l a n k a e t a l . , C l i n . D i a g n . L a b . I m m u n o l . , 4 , p . 1 5 6 (1 9 9 7)] および 1 つの血清群 C (C 1 1) [M a s l a n k a e t a l . , C l i n . D i a g n . L a b . I m m u n o l . , 4 , p . 1 5 6 (1 9 9 7)] 髄膜炎菌株の表面における 9 つの代表的 N s p A - 特異的 M A b の結合を示す。各 M A b について、濃度は 1 μ g / m l に調製し、初期対数期髄膜炎菌細胞を用いて、サイトフルオロメトリーアッセイを行った。これらの M A b のいずれも、n s p A 遺伝子がトランスポゾンの挿入によって不活化された 6 0 8 B n s p A 突然変異体株と反応しなかった (突然変異体株の記載については実施例 2 参照) 。この結果は、これらの M A b のいずれも、生きた髄膜炎菌細胞の表面に非特異的に結合しなかったことを示す。

【 0 1 2 8 】

無傷髄膜炎菌細胞への付着のレベルに従い、N s p A - 特異的 M A b を 3 つの群に分類した (図 3) 。第一の群において、M e - 7、M e - 9、M e - 1 1、M e - 1 3 および M e - 1 5 のような M A b はテストした 4 つの株の細胞表面において効果的に付着し、これは、それらのエピトープが蛋白質の表面 - 露出領域に位置することを示す。第二の群に分類された M e - 1 0、M e - 1 2 および M e - 1 4 のような M A b の結合はより可変であった。というのは、それらは、テストされた 4 つのうち 1 または 2 の株の表面のその対応するエピトープを認識したからである。最後に、いずれの無傷髄膜炎菌細胞にも結合しなかった M e - 1 6 のような M A b は第三の群に分類された。イムノプロットは、後者の群における M A b は、それを髄膜炎菌外膜に挿入されなかった場合、精製された N s p A とよく反応したことを明瞭に示した (データは示さず) 。

【 0 1 2 9 】

全体として、これらの結合データは、N s p A に存在するいくつかのエピトープは露出されており、血清学的に区別される髄膜炎菌細胞の細胞表面の特異的抗体に接近可能であり、他方、他のエピトープは制限された数の株上の抗体に接近可能であることを示唆した。N s p A 蛋白質は高度に保存されており、今日までにテストされた全ての株によって生産されるため、群 I I の M A b のある種の髄膜炎菌株への結合の欠如は、恐らくは、アミノ酸変動、または蛋白質発現の欠如にほとんど関連しない。髄膜炎菌細胞表面に存在する他の抗原は第二の群における M A b によって認識されるエピトープをマスクするのではないか、あるいは蛋白質の三次構造はこれらの株において僅かに異なり、かくして、ある種のエピトープへの抗体への結合を妨げると仮定するであろう。多糖被膜は N s p A エピトープをシールドし、大量の多糖を生産する髄膜炎菌株への抗体の結合を妨げると報告されている [M o e e t a l . , I n f e c t . I m m u n . , 6 7 , p . 5 6 6 4、(

10

20

30

40

50

1999)]。しかしながら、多糖の生産、結合の欠如、および N s p A - 特異的抗体の殺菌活性の間の関係は明瞭には確立されなかった。事実、抗 - N s p A 抗体は表面に結合せず、高い多糖生産者であると決定された髄膜炎菌株を殺すことができず、他方、低 - 生産者株は表面結合について陰性であって、殺菌活性に対して抵抗性であった。この後者の観察を考慮し、立体配座変化のような他のメカニズムもまたある種の M A b について観察された結合の欠如および殺菌活性を説明できるであろうと仮定されるかもしれない。

【0130】

全ての4つの株の表面のそれらの特異的エピトープを認識した群 I に分類された M A b は、テストした4つの髄膜炎菌株に対して殺菌性であることが判明した(図3)。群 I の M A b では、データは、表面結合および殺菌活性の間の相関を示唆した。しかしながら、群 I I に分類された M A b についてのいずれかの関係を確立するのは困難である。その例として、髄膜炎菌株 C 1 1 は、それが表面結合については陽性であるにも拘わらず、M A b M e - 1 2 および M e - 1 4 の殺菌活性に対して抵抗性であった。

10

【0131】

実施例 4

本実施例は、ポリメラーゼ鎖反応 (P C R) による修飾された n s p A 遺伝子産物のクローニングおよび E . c o l i におけるこれらの遺伝子産物の発現を記載する。

【0132】

N s p A 表面 - 露出エピトープを特徴付けるために、7つの修飾された N s p A 蛋白質を設計した(表2)。標準的な方法に従い、制限酵素部位(表3および4)の付加のための塩基延長を含有したオリゴヌクレオチドプライマーの対を用い、Nm14、Nm16、Nm17およびNm20と命名された修飾された n s p A 遺伝子に含まれるべき遺伝子断片を、特許 P C T / W O / 9 6 / 2 9 4 1 2 に記載された p U R V ベクターにクローン化された n s p A または (N m 2 0 の 代 わ り の) N m 1 9 から P C R (D N A T h e r m a l C y c l e r G e n e A m p P C R システム 2 4 0 0 P e r k i n E l m e r) によって増幅した。P C R 産物は、製造業者の指示に従って、Q I A g e n からの Q I A q u i c k ゲル抽出キットを用いて、アガロースゲルから精製し、制限エンドヌクレアーゼで消化した。p U R V ベクターをエンドヌクレアーゼ N d e I および N o t I で消化し、Q I A g e n からの Q I A q u i c k ゲル抽出キットを用いてアガロースゲルから精製した。与えられた修飾された n s p A 遺伝子に対応する消化された P C R 産物を、修飾された n s p A 遺伝子の創製のために p U R V - N d e I - N o t I ベクターに連結した。連結された産物を、製造業者の推奨に従い、E . c o l i 株 D H 5 [F ⁻ 8 0 d l a c z M 1 5 (l a c Z Y A - a r g F) U 1 6 9 e n d A 1 r e c A 1 h s d R 1 7 (r _k⁻ m _k⁺) d e o R t h i - 1 p h o A s u p E 4 4 g y r A 9 6 r e l A 1] (G i b c o B R L , G a i t h e r s b u r g , M D) に形質転換した。修飾された n s p A 遺伝子断片を含有する組換えプラスミドを、Q I A g e n プラスミドキットを用いて精製し、それらの D N A インサートを配列決定した (T a q D y e D e o x y T e r m i n a t o r C y c l e S e q u e n c i n g k i t , A B I , F o s t e r C i t y , C A) 。

20

30

【0133】

修飾された蛋白質 Nm14、Nm16、Nm17、および Nm20 を完成し、蛋白質 Nm3 を創製するために、S t r a t a g e n e からの Q u i c k c h a n g e 部位 - 特異的突然変異誘発キットおよび表5に記載されたオリゴヌクレオチドを用いる突然変異誘発実験を製造業者の推奨に従って行った。表6は、部位 - 特異的突然変異誘発によって創製された修飾された n s p A 遺伝子に対する修飾を示す。

40

【0134】

蛋白質 Nm18 を創製するために、制限酵素部位(表4)の付加のための塩基延長を含有するオリゴヌクレオチドプライマー D M A R 8 3 9 および D M A R 1 1 5 9 を用い、N - 末端断片を P C R によって増幅し、前記したように消化した。標準的な方法に従い、オリゴヌクレオチドプライマー D M A R 1 1 5 7 および D M A R 1 1 5 8 をアダプターとし

50

て用い、これらのプライマーのアニーリングの後に、C - 末端断片を作製した。pURV - NdeI - NotIベクターへの連結、およびE. coli株DH5 への形質転換は前記したように行った。修飾されたnspA遺伝子断片を含有する組換えプラスミドは、QIAGENプラスミドキットを用いて精製し、そのDNAインサートを配列決定した(Taq Dye Deoxy Terminator Cycle Sequencing kit, ABI, Foster City, CA)。

【0135】

Nm19分子を創製するために、修飾された遺伝子Nm16およびNm18を、各々、エンドクレアーゼNdeI - SalIおよびSalI - NotIで消化した。QIAGENからのQIAquickゲル抽出キットを用い、断片をアガロースゲルから精製し、pURV - NdeI - NotIベクターに連結した。QIAGENプラスミドキットを用い、修飾された遺伝子Nm19を含有する組換えプラスミドを精製し、そのDNAインサートを配列決定した(Taq Dye Deoxy Terminator Cycle Sequencing kit, ABI, Foster City, CA)。

10

【0136】

得られたプラスミド構築体の各々を用いて、エレクトロポレーション(Gene Pulser II装置, BIO-RAD Labs, Mississauga, Ontario, Canada)によって、E. coli株BL21(F⁺ ompT hsdS_B(r_Bm_B) gal dcm)(Novagen)を形質転換した。この組換え株を、40 μg/mlのカナマイシンを含有するLBブロス(Gibco BRL)に接種し、まず、攪拌しつつ37 °Cにてほぼ1.5時間インキュベートし(OD_{600nm} = 0.6)、その時点の後、温度をさらに1.5時間で39 °Cまで上昇させて、組換え蛋白質の生産を誘導した。表面-露出エピトープを特徴付けるために、実施例5に記載したように、インキュベーション時間の後に得られたE. coli株に対して、サイトフルオロメトリーアッセイを用いてNspA - 特異的Mabをテストした。

20

【0137】

表2 修飾されたnspA遺伝子のリスト

【0138】

【表2】

30

遺伝子/蛋白質名	特徴
Nm3	Aに代えてのG(位置115) Nに代えてのD(位置118)
Nm14	Loop 2 欠失 (AA 67 ないし AA 79)
Nm16	Loop 1 欠失 (AA 36 ないし AA 43)
Nm17	Loop 3 欠失 (AA 111 ないし AA 122)
Nm18	Loop 4 欠失 (AA 152 ないし AA 163)
Nm19	ループ1(AA36ないしAA43)および4(AA152ないしAA163)欠失
Nm20	ループ1(AA36ないしAA43)、ループ2(AA67ないしAA79)、および4(AA152ないしAA163)欠失

40

表3 表2にリストされた修飾されたnspA遺伝子の創製のために設計されたPCRオリゴヌクレオチドプライマー対のリスト

【0139】

【表 3】

遺伝子/蛋白質名	PCRプライマー確認	修飾された蛋白質分子上の遺伝子断片の対応する位置
Nm3	DMAR837-DMAR838	完全
Nm14	DMAR839-DMAR937	N末端
	DMAR840-DMAR938	C末端
Nm16	DMAR839-DMAR1149	N末端
	DMAR840-DMAR1152	C末端
Nm17	DMAR839-DMAR1153	N末端
	DMAR840-DMAR1154	C末端
Nm18	DMAR839-DMAR1159	N末端
	DMAR1157-DMAR1158	C末端
Nm20	DMAR839-DMAR1160	N末端
	DMAR840-DMAR1161	C末端

10

20

表 4 表 2 にリストされた修飾された n s p A 遺伝子の創製のために設計された P C R
オリゴヌクレオチドプライマーのリスト

【 0 1 4 0 】

【表 4】

プライマー	配列 5' - 3'	制限酵素部位
DMAR839	ggaattccatatgaaaaaagcacttgccac	NdeI
DMAR840	ataagaatgcgccgctcagaatttgacgcgcac	NotI
DMAR937	tcgaggtaccctgtgtaatcgacggcgaagc	KpnI
DMAR938	tcgaggtaccctttacagcatcggcgcg	KpnI
DMAR1149	tcgaggtacctgtttttgctgtgcggcatcgg	KpnI
DMAR1152	tcgaggtaccaaaggcttcagcccgcgc	KpnI
DMAR1153	atatgggcccggcgcggttgaggctcaagc	ApaI
DMAR1154	atatgggcccctccaacacctccatcggcctcggcg	ApaI
DMAR1157	cgataatggcgaactgtccgtcggcgtgcgcgtcaaattctg agc	-
DMAR1158	ggccgctcagaatttgacgcgcacgccgacggacagttcgcc attatcgggcc	-
DMAR1159	atatgggcccgtagtgttagcggtagccggc	ApaI
DMAR1160	tcgaggtaccctgtgtaatcgacggcgaagcg	KpnI
DMAR1161	tcgaggtaccctttacagcatcggcgcgctcc	KpnI

10

20

表 5 修飾された n s p A 遺伝子に対する部位 - 特異的突然変異誘発で用いた P C R オリゴヌクレオチドプライマー組のリスト

【 0 1 4 1 】

30

【表 5】

遺伝子/蛋白質名	プライマー確認	プライマー配列 5' ---> 3'
Nm3	DMAR837 DMAR838	ccgcgcctcogtogaacttggccggcagcaacagcttcagccaaac gtttggctgaagctgtcgctgccgcccaagtgcacggaggcgcg
Nm14	DMAR941 DMAR942	cgcttcgocgtogattacacgggtaacctttacagcatcggcgcg cgcccgatgctgtaaaggttaccogtgaatcgacggcgaagcg
Nm16	DMAR1150 DMAR1151	gcgcgggctgaagcctttgttacctgtttttgctgtgcggc gccgcacacgcaaaaacaggtaacaaaggcttcagcccgcgc
Nm17	DMAR1155 DMAR1156	ttgagcctcaacogcgccggggctccaacacctccatcggcctc gaggccgatggagggtgttgagccccggcgcggttgaggctcaa
Nm20	DMAR1162 DMAR1163	ggacgcgccgatgctgtaaaggttaccogtgaatcgacggcga ttcgcogctcattacacgggtaacctttacagcatcggcgcgctcc

40

表 6 部位 - 特異的突然変異誘発によって創製された修飾された n s p A 遺伝子産物に対する修飾のリスト

【 0 1 4 2 】

50

【表 6】

遺伝子／蛋白質名	突然変異誘発で用いた分子	DNA修飾 ¹
Nm3	<u>nspA</u>	341-TGGCCGGGCAGCAACA-355
Nm14	<u>Nm14</u>	201-GGGTAACCTT-210
Nm16	<u>Nm16</u>	111-TAACAAAGGC-120
Nm17	<u>Nm17</u>	331-GGGGGCTCCA-340
Nm20	<u>Nm20</u>	181-ACGGGTAACC-190

10

¹ 下線を施したアミノ酸残基はDNA配列中の修飾を表す。

【0143】

実施例 5

本実施例はNspA蛋白質上のMAbによって認識されたエピトープの位置決定を説明する。

【0144】

NspA - 特異的MAbによって認識されたエピトープを位置決定し、および実施例1で示されたNspAモデルを確認するために、実施例4に記載された修飾されたNspA蛋白質を生産していた組換えE.coli株を用いるフローサイトメトリーによって、およびNspA蛋白質をカバーする重複合成ペプチドでのELISAによって、これらのMAbの表面結合を評価した。

20

【0145】

Me-16のような群III MA bによって認識されるエピトープは、NspA蛋白質の全長をカバーする重複する15 - ないし20 - アミノ酸残基合成ペプチドを用いて容易に位置決定された。これらのペプチドは特許PCT/WO/96/29412に示されている。その例として、MAb Me-16は、ELISAによって、残基41ないし55

【0146】

30

【数1】

(GSAKGFSPRISAGYR)

および141ないし150

【0147】

【数2】

(VDLDAGYRYNYIGKV)

の間に位置する2つの別々のペプチドと反応することが判明した。より綿密な分析は、これらの2つのペプチドは、ペプチド配列中で下線を施したAGYR残基を共有したことを明らかにした。NspAモデル(図2)に従うと、これらの2つの領域は髄膜炎菌外膜の内部に包埋され、予測されるように、これらの領域に対して向けられた抗体は無傷髄膜炎菌細胞に付着しなかった(図3)。

40

【0148】

群IおよびIIに分類されたMAbはこれらのペプチドのいずれとも反応しなかった。これらの結果は、これらのMAbが立体配座的に制限されたエピトープに対して向けられていることを示唆する。これらのエピトープは、PorA [Jansen et al. FEMS Immunol. Med. Microbiol., 27, p. 227 (2000); Peeters et al. Vaccine, 17, p. 2702 (1999); Niebla et al. Vaccine, 19, p. 3568 (2001)] および

50

Opc蛋白質 [Carminate et al. Biotechnol. Appl. Biochem., 34, p. 63, (2001)] で観察された髄膜炎菌外膜蛋白質の生産、精製および処方間に容易に修飾され、または喪失できた。これらの誤って折り畳まれた蛋白質に対して惹起した抗体は制限された用途のものである。というのは、それらは、しばしば、生物学的に活性が低いからである。これらの立体配座エピトープを位置決定するために、表面 - 露出のループの異なる組合せが欠失または突然変異した一連の修飾された NspA 蛋白質を構築した (実施例 4)。これらの修飾された NspA 蛋白質の立体配座を維持するために、それらを E. coli 膜中で生産した。これらの修飾された NspA 蛋白質と選択された MA b との反応性をサイトフルオロメトリーアッセイによって評価した。細胞に対する MA b の付着は、細胞を NspA - 特異的 MA b で標識した後に得られたメジアン蛍光値を対照 MA b について得られた蛍光値で割って計算された結合指標として表 7 に示す。1 の蛍光値は、無傷細胞の表面に抗体の結合がなかったことを示した。組換え E. coli 細胞の外膜中でのこれらの修飾された NspA 蛋白質の存在は、MA b Me - 16 を用いるイムノプロットによって確認した。前記したように MA b Me - 16 は、立体配座変化に対して感受性でない直線状エピトープを認識した。このエピトープは表面露出ループ上ではなく、蛋白質の膜貫通部分に位置決定される。イムノプロットは、MA b Me - 16 が全ての修飾された NspA 蛋白質と反応することを明らかとし、組換え E. coli 細胞がそれらの外膜においてこれらの蛋白質を生産していたことが確認された。

10

20

30

40

50

【0149】

群 I I に分類される MA b は、4 つの表面 - 露出ループに対する欠失または突然変異いづれかによって誘導された立体配座変化に対して高度に感受性であった NspA 蛋白質上のエピトープを認識した。それらの膜において修飾された NspA を生産する組換え E. coli 細胞への MA b Me - 10 の結合は、4 つの表面 - 露出ループのいずれかにおけるいづれかの修飾に対して高度に感受性であった。この結果は、この MA b によって認識されるエピトープが表面 - 露出された立体配座であり、この MA b の結合は NspA 蛋白質に対する些細な構造的修飾によって妨げることができることを示唆する。MA b Me - 10 について観察される結合特性とは対照的に、ループ 4 (Nm18) の欠失は、組換え E. coli 細胞への MA b Me - 12 および Me - 14 の結合を妨げなかった。

【0150】

MA b Me - 7 を例外として、群 I に分類された MA b は、細胞表面に正しく提示されるのにループ 2 および 3 双方を必要とした立体配座エピトープに対して向けられる。(Nm3) に対する突然変異、またはこれらの 2 つのループのうちの 1 つの欠失 (Nm14、Nm17) は有意に低下し、あるいは組換え E. coli 細胞への MA b Me - 11、Me - 17 および Me - 19 の結合を完全に妨げた。対照的に、ループ 1 (Nm16)、ループ 4 (Nm18) およびループ 1 および 4 (Nm19) の欠失は、組換え E. coli 細胞へのこれらの MA b の結合を有意に低下させなかった。これらの結果は、これらの MA b によって認識されるエピトープは、無傷細胞の表面で正しく提示されるのにループ 2 および 3 の双方を必要とすることを示唆する。

【0151】

これらの修飾された NspA 蛋白質と MA b Me - 7 との反応性は、その対応するエピトープがループ 3 のみに位置することを明瞭に示した。事実、突然変異した NspA 蛋白質 (Nm3)、または欠失されたループ 3 (Nm17) が無い蛋白質いづれかを生産する組換え E. coli 細胞への MA b Me - 7 の結合は妨げられなかった。Nm3 NspA 蛋白質では、115 および 118 の位置におけるグリシン (G) およびアスパラギン酸 (D) は、各々、アラニン (A) およびアスパラギン (N) によって置き換えられた。Nm3 を生産した組換え E. coli 細胞と MA b Me - 7 との反応性の欠如は、特異的エピトープがループ 3 の先端に位置することを示した。

【0152】

本実施例で示された結果は少なくともループ 2、3 および 4 が細菌の表面に露出してい

ることを示し、かくして、実施例1で示された3-D N s p Aモデルは適切であることが確認される。ループ1の表面-露出は確認されなかった。というのは、蛋白質のその部分に対して特異的であるM A bが利用できなかったからである。より重要なことにはこれらのデータは、ほとんどの殺菌性N s p A - 特異的M A bがループ2および/またはループ3に位置する立体配座エピトープに対して向けられていることを明瞭に示す。誤って折り畳まれたN s p A蛋白質でのワクチン接種は、これらの立体配座エピトープに対して向けられた抗体の誘導を妨げ、かくして、この蛋白質の保護能力を低下させ得ると推定することができる。

【0153】

表7 それらの外膜において異なる修飾されたN s p A蛋白質を発現する組換えE . c o l i細胞へのN s p A - 特異的M A bの結合の評価

10

【0154】

【表7】

Mab	組換えE. coli細胞へのMAbの表面結合: 結合指標(標識された細胞の%) ¹							
	WT ²	Nm16 ³ (-L1)	Nm18 (-L4)	Nm19 (- L1/4)	Nm14 (-L2)	Nm20 (- L1/2/4)	Nm3 (DM ⁴)	Nm17 (-L3)
Me-7	50(98)	24(95)	49(98)	46(98)	46(82)	19(88)	1(1)	1(1)
Me-11	55(96)	19(95)	38(96)	37(98)	1(1)	1(1)	2(19)	1(1)
Me-17	47 (98)	33 (99)	55 (99)	48 (99)	1(1)	1(1)	2 (24)	1(1)
Me-19	52 (98)	21 (85)	55 (98)	18 (83)	1(1)	1(1)	5 (37)	1(1)
Me-12	33(68)	18(78)	41(94)	5(42)	1(1)	1(1)	1(3)	1(1)
Me-14	46(99)	18(75)	47(94)	2(19)	1(1)	1(1)	5(38)	1(1)
Me-10	48(93)	12(52)	2(20)	1(2)	nd*	1(1)	1(1)	1(1)
Me-16	1(1)	2(8)	2(21)	2(20)	2(15)	2(19)	2(13)	2(6)

20

¹ 結合指標は、N s p A - 特異的M A bで細胞を標識した後に得られたメジアン蛍光値を対照M A bについて得られた蛍光値で割ったものとして計算した。1の蛍光値は、無傷細胞の表面において抗体の結合がなかったことを示した。低い指標を持つボックスは陰影を付けた。

30

² それらの外膜において野生型N s p A蛋白質を発現する組換えE . c o l i細胞

³ 修飾されたN s p A蛋白質(欠失)の免疫

⁴ D M ; ループ3での二重突然変異

* n d : 測定せず。

【0155】

実施例6

本実施例は、細菌細胞から脂質を抽出するのに用いた方法を説明する。

【0156】

複合脂質混合物をE . c o l i、N . m e n i n g i t i d i s、およびN . l a c t a m i c aから抽出して、細菌起源からのリボソーム処方を作製した。

40

【0157】

以下の方法を用いて、実施例7に示したりボソーム処方を作製するのに用いた複合脂質混合物を作製した。

【0158】

8% C O ₂ の存在下で、細菌を37 °CのB H Iプロス中で一晩増殖させた(175 r p m)。細胞を遠心によって収集し、ペレットを細胞1グラム当たり6 . 7 m lのメタノールに懸濁させた(湿潤重量)。この細菌懸濁液を、8に調整されたマイクロチッププローブを備えたS o n i c d i s m e m b r a t o r 500 (F i s h e r S c i e n t i f i c)を用いて氷浴中で2回音波処理した。次いで、この懸濁液を65 °Cにて30

50

分間加熱した。このインキュベーション時間の後、2容量のクロロホルムを懸濁液に加え、室温にて1時間攪拌した。懸濁液をWhatman No. 4フィルターを通して濾過した。濾液をテフロン（登録商標）チューブに移し、0.2容量の生理食塩水（NaCl 0.6%（W/V））を次いで加えた。遠心の後、上相および界面の沈殿を捨てた。下相下を1容量のクロロホルム：メタノール：生理食塩水（3：48：47）で少なくとも4回、あるいは界面にもはや沈殿がなくなるまで抽出した。最終抽出の後、有機下相下のロータリーエバポレーター（Rotavapor, Buchi, Switzerland）中で乾燥した。乾燥したリン脂質を-80で貯蔵するか、あるいはクロロホルム：メタノール（2：1）の溶液に再懸濁させた。

【0159】

実施例7

本実施例は、組換えNspAの異なるリポソーム処方への取り込みを説明する。

【0160】

リポソームは透析方法を用いて調製した。リポソームは、異なる比率で合わせた、コレステロールを含むまたは含まない、異なる合成（本実施例におけるリスト1参照）または細菌リン脂質で調製した。また、いくつかのリポソーム処方は、600 μ g/mlのアジバンモノホスホリルリピドA（MPLA, Avanti極性脂質, Alabaster, AL）で調製した。NspA蛋白質をまず99%エタノール（vol/vol）中で沈殿させ、1%（wt/vol）のSDS（Sigma Chemical）を含有する1mlのPBS緩衝液中で変性し、100にて10分間加熱した。溶液を、15%（wt/vol）のN-オクチル-D-グルコピラノシド（OG, Sigma）を含有する1mlのPBS緩衝液で希釈し、室温にて3時間インキュベートした。脂質を丸底ガラスフラスコ中のクロロホルム：メタノール溶液（2：1）に溶解させ、ロータリーエバポレーター（Rotavapor, Buchi, Switzerland）を用いて乾燥して、容器上の均一なフィルムを達成した。次いで、前記蛋白質-洗剤溶液を脂質フィルムに加え、フィルムが溶解するまで温和に混合した。溶液は、混合後に、外観が僅かに不透明とであった。次いで、溶液をPBS緩衝液（pH7.4）に対して徹底的に透析して、洗剤を除去し、リポソーム形成を誘導した。透析の後、ステンレス鋼押しデバイス（Lipex Biomembranes, Vancouver, Canada）を用い、得られたミルク状溶液を1000、400、200、および100nmポリカルボネートフィルターを通して順次押し出した。リポソームに取り込まれなかった組換えNspAは、45における15分間の20000gでの遠心によって除去した。リポソーム溶液を4にて1時間250000gで遠心し、ペレット、0.3Mスクロースを含有するPBSで懸濁させた。小胞サイズおよび均一性は、サブミクロン粒子アナライザー（モデルN4 Plus, Beckman Coulter）での準弾性光散乱によって評価した。この装置を用い、異なる調製物におけるリポソームのサイズはほぼ100nmであると見積もられた。リポソーム調製物を0.22 μ m膜を通す濾過によって滅菌し、用いるまで-80で貯蔵した。リポソームに取り込まれた組換え蛋白質の量は、Wessel and Flugge（Anal. Biochem. 1984, 138:141-143）によって記載されているように、クロロホルム：メタノール溶液（2：1）でのNspA-リポソーム調製物の蛋白質抽出後にMicroBCA（Pierce, Rockford, Ill.）によって見積もった。

【0161】

ゲル濾過および迅速な希釈を、NspAリポソームの形成を誘導するための代替法として用いた。ゲル濾過方法では、NspA-OG-SDS-脂質溶液をSephadex G-50（カラムサイズ：2 \times 20cm, Pharmacia）の頂部に直接的に、またはP-6（カラムサイズ；2 \times 20cm, Bio Rad）サイズ排除クロマトグラフィー/脱塩カラムに適用し、2.5ml/分の流速にてPBS緩衝液にて溶出させた。蛋白質および脂質双方を含有する画分をプールし、押し出し、遠心し、小胞のサイズを前記したように見積もった。全ての調製物を0.22 μ m膜を通して滅菌し、用いるまで-80

10

20

30

40

50

で貯蔵した。

【0162】

迅速希釈方法では、脂質フィルムを前記したように丸底ガラスフラスコ中で調製した。この脂質フィルムを、1%トリトンX-100および750 μg/mlのNspA蛋白質を含有するリン酸緩衝化溶液(10 mM, 70 mM NaCl, pH 7.2)で溶解させた。次いで、脂質-洗剤-蛋白質溶液を、11容量のリン酸緩衝液の添加によって、一定攪拌しつつ、滴下(1滴/秒)希釈した。希釈の後、攪拌しつつ、溶液を室温にて30分間維持した。リポソームに取り込まれなかった組換えNspAは遠心によって除去し、リポソーム溶液を前記したように超遠心した。最後に、リポソームペレットを、0.3 Mスクロースを含有するPBS緩衝液で懸濁させた。小胞サイズおよび均一性は前記したように見積もった。全ての調製物を0.22 μm膜を通して滅菌し、用いるまで-80 で貯蔵した。

10

【0163】

リスト1 NspA-リポソーム調製物を調製するのに用いた合成脂質の部分的リスト1, 2-ジラウロイル-sn-グリセロ-3-ホスフェート(DLPA)、ジミリストイル-sn-グリセロ-3-ホスフェート(DMPA)、1, 2-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスフェート(DPPA)、1, 2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスフェート(DSPA)、1, 2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスフェート(DOPA)、1-パルミトイル-2-オレオイル-sn-グリセロ-3-ホスフェート(POPA)、1, 2-ジラウロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(DLPC)、1, 2-ジトリデカノイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン、1, 2-ジミリストイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(DMPC)、1, 2-ジペンタデカノイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン、1, 2-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(DPPC)、1, 2-ジヘプタデカノイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン、1, 2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(DSPC)、1, 2-ジミリストレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン、1, 2-ジパルミトレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン、1, 2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(DOPC)、1-ミリストイル-2-パルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン、1-ミリストイル-2-ステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン、1-パルミトイル-2-ミリストイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン、1-パルミトイル-2-オレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(POPC)、1-パルミトイル-2-リノレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン、1, 2-ジラウロイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン(DLPE)、1, 2-ジミリストイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン(DMPE)、1, 2-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン(DPPE)、1, 2-ジパルミトレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン、1, 2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン(DSPE)、1, 2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン(DOPE)、1-パルミトイル-2-オレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン(POPE)、1, 2-ジラウロイル-sn-グリセロ-3-[ホスホ-RAC-(1-グリセロール)](DLPG)、1, 2-ジミリストイル-sn-グリセロ-3-[ホスホ-RAC-(1-グリセロール)](DMPG)、1, 2-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-[ホスホ-RAC-(1-グリセロール)](DPPG)、1, 2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-[ホスホ-RAC-(1-グリセロール)](DSPG)、1, 2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-[ホスホ-RAC-(1-グリセロール)](DOPG)、1-パルミトイル-2-オレオイル-sn-グリセロ-3-[ホスホ-RAC-(1-グリセロール)](POPG)、1, 2-ジラウロイル-sn-グリセロ-3-[ホスホ-L-セリン](DLPS)、1, 2-ジミリストイル-sn-グリセロ-3-[ホスホ-L-セリン](DMPS)、1, 2-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-[ホスホ-L-セリン](

20

30

40

50

DPPS)、1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-[ホスホ-L-セリン](DSPS)、1,2-ジオレオイル-sn-グリセロ-3-[ホスホ-L-セリン](DOPS)、1-パルミトイル-2-オレオイル-sn-グリセロ-3-[ホスホ-L-セリン](POPS)。

【0164】

実施例 8

本実施例は、マウスおよびウサギのNspA-リポソーム処方での免疫化を説明する。

【0165】

雌BALB/cマウス(Charles River Laboratories, St-Constant, Quebec, Canada)の群を、異なるリポソーム調製物に取り込まれた20 μ gの組換えNspAまたは、対照としての、蛋白質-フリーリポソーム調製物と共に、10%水酸化アルミニウムアジュバント(AlhydrogelTM 2%: Brenntag Biosector, Denmark)に吸着された20 μ gの組換えNspA蛋白質で2週間間隔で3ないし4回筋肉内(IM)免疫化した。各免疫化に先立って、および最後の注射から2週間後に血液試料を眼窩洞から収集した。血清試料を-20 $^{\circ}$ Cで貯蔵した。

10

【0166】

New Zealand White雌ウサギ(2.5Kg, Charles River)を、異なるリポソーム処方に取り込まれた100 μ gの組換えNspA蛋白質または、対照としての、蛋白質-フリーリポソーム処方と共に、10%水酸化アルミニウムアジュバント(AlhydrogelTM 2%: Brenntag Biosector, Denmark)に吸着された100 μ gの組換えNspA蛋白質で数個の部位にて3週間間隔で3ないし4回IM免疫化した。血清試料を各免疫化の前および最後の注射から3週間後に収集した。血清試料を-20 $^{\circ}$ Cで貯蔵した。

20

【0167】

実施例 9

本実施例は、マウスおよびウサギ血清のELISAによる分析を説明する。

【0168】

免疫化動物の抗体応答を酵素結合免疫吸着検定(ELISA)によって測定した。マイクロタイプレートを、リン酸緩衝液(50mM NaH₂PO₄, pH4.3)中の0.5 μ g/mlの濃度の精製された組換えNspA、または炭酸緩衝液(15mM Na₂CO₃; 35mM NaHCO₃, pH9.6)中のml中のml当たり0.25 μ gの蛋白質の濃度の髄膜炎菌株608Bから抽出されたOM調製物いずれかの0.1ml/ウエルで室温にて一晚コートした。プレートを、0.5%(wt/vol)ウシ血清アルブミン(BSA)を含有するリン酸-緩衝化生理食塩水(PBS)で37 $^{\circ}$ Cにて1時間ブロックし、次いで、ウサギおよびマウス血清の系列希釈と共に1時間インキュベートした。インキュベーション時間後に、プレートを洗浄緩衝液(0.02% tween-20を含有するPBS)で3回洗浄した。アルカリ性ホスファターゼ-コンジュゲートドAffiniPureヤギ抗-マウスIgG+IgM(H+L)または抗-ウサギIgGを3%(wt/vol)BSAを含有するPBS中に希釈し、この溶液の0.1mlを各ウエルに加えた。37 $^{\circ}$ Cでの60分間のさらなるインキュベーションの後、プレートを洗浄緩衝液で3回洗浄した。10%ジエタノールアミン(pH9.6)中のp-ニトロフェニルホスフェートナトリウム溶液の100 μ lを各ウエルに加えた。室温での1時間のインキュベーションに続き、OD405nmをSpectra Maxマイクロプレートリーダー(Molecular Devices)で読んだ。0.1の読み(=410/630nm)がバックグラウンドを差し引いた後に記録された血清希釈は、この血清の力価であると考えられる。組換えNspA蛋白質を含有する処方での免疫化によって惹起された抗血清の全ては、組換えNspAに対して強く反応した。加えて、表8に示されるように、全ての免疫化後血清は株608Bから抽出された髄膜炎菌OMPに対して反応した。これらの結果は、免疫化によって誘導された抗体の有意な割合が、髄膜炎菌膜に挿入さ

30

40

50

れた場合に、天然 N s p A 蛋白質と反応することを示唆する。200 未満の力価を、蛋白質 - フリーリポソーム調製物で免疫化したマウスおよびウサギから収集された血清から記録した (データは示さず)。

【0169】

表 8 異なる N s p A - リポソーム処方での免疫化後に収集したマウスおよびウサギ抗血清の分析

【0170】

【表 8】

処方 ¹	方法	リポソームを調製したのに用いた脂質濃度	(標準偏差)からの抗血清の抗-OMP 力価の逆数 ²	
			マウス	ウサギ (s) ³
組換え NspA ⁴	-	-	5800 ± 3414	409600 (1)
<u>N.meningitidis</u> 100% + MPLA	透析	75 mM	64000 ± 25600	Nd
<u>N.lactamica</u> 100% + MPLA			54400 ± 36765	102400 (2)
<u>E.coli</u> : Chol (7:2)			nd	409600 (3)
<u>E.coli</u> : Chol (7:2) + MPLA			70400 ± 38400	> 409600 (4)
<u>E.coli</u> 100%			208000 ± 175471	409600 (5)
				> 409600 (6)
	> 409600 (7)			
	> 409600 (8)			
<u>E.coli</u> 100%	6 mM	nd	204800 (9)	
			> 409600 (10)	
<u>E.coli</u> : Chol (7:2)	迅速希釈	nd	204800 (11)	
			204800 (12)	

¹ マウスおよびウサギを、組換え N s p A 蛋白質、あるいは実施例 8 に記載したように、異なるリポソーム処方に取り込んだ組換え N s p A 蛋白質で免疫化した。

² 血清は組換え N s p A に対し、および N . m e n i n g i t i d i s 株 6 0 8 B からの O M P に対して、E L I S A によってテストした。プレ免疫血清は、E L I S A において、組換え N s p A に対して、および N . m e n i n g i t i d i s 株 6 0 8 B からの O M P に対して反応性を示さなかった。nd、測定せず。

³ 括弧の間の数字はウサギ識別番号を示す。

⁴ 10% 水酸化アルミニウムアジュバントに吸着された組換え N s p A 蛋白質。

【0171】

実施例 10

本実施例は、N . m e n i n g i t i d i s 株の表面の N s p A - リポソーム調製物に対して惹起された抗体の接近性を説明する。

【0172】

N . m e n i n g i t i d i s 株を、8% C O ₂ 雰囲気中で 37 °C にて、0 . 2 5 % デキストロースを含有するミュラー - ヒントン (M H) プロス中で増殖させて、0 . 5 0 0 (~ 1 0 ⁸ C F U / m l) の O D _{4 9 0 n m} を得た。次いで、抗 - N s p A または対照血清の希釈を調整された細菌培養に加え、攪拌しつつ、4 °C にて 2 時間インキュベートした。試料をブロッキング緩衝液 [2 % ウシ血清アルブミン (B S A) を含有するリン酸 -

10

20

30

40

50

緩衝化生理食塩水 (PBS)] 中で2回洗浄し、次いで、ブロッキング緩衝液中に希釈された1mlのヤギフルオレセイン (FITC) - コンジュゲート抗 - マウスIgG + IgM (H + L) 特異的または抗 - ウサギIgG (H + L) を加えた。攪拌しつつの室温での60分間のさらなるインキュベーション時間の後、試料をPBS緩衝液で2回洗浄し、PBS緩衝液中の0.3%ホルムアルデヒドで4℃にて18時間固定した。フローサイトメトリー (Epics (登録商標) XL; Beckman Coulter, Inc.) によって分析するまで、細胞を4℃にて暗所で維持した。フローサイトメトリー分析は、Ns p A - リポソーム処方で免疫化したマウスおよびウサギからのNs p A - 特異的血清に存在する抗体が、10%水酸化アルミニウムに吸着された組換えNs p A蛋白質で免疫化したウサギからの血清に存在するものよりも効率的に髄膜炎菌株608B上のそれらの対応する表面露出エピトープを認識したことを明らかとした (表9)。事実、25よりも高い結合指標を、10%水酸化アルミニウムに吸着された組換えNs p Aで免疫化したウサギで記録された16の結合指標と比較して組換えNs p A - リポソーム処方で免疫化したウサギについて記録した。分析した10,000髄膜炎菌細胞の80%を超えたものが、異なるNs p A - リポソーム処方で免疫化したマウスからのNs p A - 特異的血清に存在する抗体で標識されたと判断された。加えて、分析した髄膜炎菌細胞の90%を超えるものが、異なるリポソーム処方で免疫化したウサギからのNs p A - 特異的血清に存在する抗体で標識されたと判断された。図4は、2つの異なるNs p A - リポソーム処方 (E. coli : Chol (7 : 2) + MPLA ; E. coli 100%) での免疫化後に惹起されたNs p A - 特異的ウサギ抗体が、異なる血清群B髄膜炎菌株の表面におけるそれらの特異的エピトープを認識できることを示す。これらの観察は、Ns p A - リポソーム処方で免疫化したマウスおよびウサギからの血清に存在するNs p A - 特異的抗体が、無傷髄膜炎菌細胞の表面における接近可能エピトープを認識することを明らかに示す。蛋白質 - フリーリポソーム調製物で免疫化したマウスおよびウサギから収集された血清に存在する抗体は髄膜炎菌細胞に付着しなかった (データは示さず)。

10

20

【0173】

表9 無傷N. meningitidis株608B細胞の表面におけるNs p A - 特異的抗体の付着の評価

【0174】

【表 9】

処方 ¹	方法	リポソームを調製するのに用いた脂質濃度	以下のものからの抗血清 ² :				
			マウス		ウサギ		
			標識された細胞の% ³	BI ⁴	ウサギの数	標識された細胞の%	BI
組換え NspA ⁵	-	-	nd	nd	1	78	16
<i>N.meningitidis</i> 100% + MPLA	透析	75 mM	80.3	30	-	nd	nd
<i>N.lactamica</i> 100% + MPLA			90.6	41	2	92	36.1
<i>E.coli</i> : Chol (7:2)			nd	nd	3	96	38.7
<i>E.coli</i> : Chol (7:2) + MPLA			87.6	20.6	4	98	62.6
<i>E.coli</i> 100%			nd	nd	5	91	33.4
					6	92	41.1
			7	98	98.6		
			8	90	25.6		
<i>E.coli</i> 100%	迅速な希釈	6 mM	nd	nd	9	98	64
					10	99	88
<i>E.coli</i> : Chol (7:2)			nd	nd	11	98	40
					12	96	26

10

20

¹ マウスおよびウサギは実施例 8 に記載されたように組換え N s p A - リポソーム処方で免疫化した。

² プールされた血清を 1 / 20 希釈して、サイトフルオロメトリーアッセイを行った。

30

³ 分析した 10,000 細胞のうち標識された細胞の%

⁴ 結合指標 (BI) は、免疫血清で細胞を標識した後に得られたメジアン蛍光値を、血清なしの対照で得られた蛍光値で割ったものとして計算した。1 の蛍光値は、無傷髄膜炎菌細胞の表面において抗体の結合がなかったことを示した。nd、測定せず。

⁵ 10% 水酸化アルミニウムアジュバントに吸着された組換え N s p 蛋白質。

【0175】

実施例 11

本実施例は、マウスおよびウサギ血清に存在する抗 - N s p A 抗体の殺菌活性を説明する。

【0176】

細菌をチョコレート寒天プレート上で平板培養し、8% CO₂ 雰囲気中で 37 にて 16 時間インキュベートし、あるいは 8% CO₂ 雰囲気中で 37 にて、0.25% デキストロースを含有するミュラー - ヒントン (MH) プロス中で増殖させて、0.600 の OD_{620nm} を得た。インキュベーション時間の後、細菌を溶菌緩衝液 [ハンクスの平衡塩溶液 (HBSS) および 1% 加水分解カゼイン、pH 7.3] に 0.300 の OD_{490nm} まで懸濁させ、8 × 10⁴ CFU/ml まで希釈した。殺菌アッセイは、25 μl の細菌懸濁液を 50 μl の希釈した加熱 - 不活化テスト血清と混合することによって行った。この懸濁液を攪拌しつつ (225 rpm) 37、8% CO₂ にて 15 分間インキュベートした。次いで、補体の源としてのウサギまたはヒト血清を 25% の最終濃度まで加え、混合物を攪拌しつつ (225 rpm) 37、8% CO₂ にてさらに 60 分間イン

40

50

キュベートした。インキュベーション時間の最後に、10 µl のアッセイ混合物をチョコレート寒天プレート上で平板培養することによって、生きた細菌の数を測定した。プレートを8% CO₂ 雰囲気中で37 °Cにて18ないし24時間インキュベートした。対照は、免疫化前のマウスから収集した加熱 - 不活化血清およびウサギ補体と共にインキュベートした細菌からなるものであった。溶解の%は、以下の数学式を用いて決定した：

【0177】

【数3】

$$100 - \left[\frac{\text{免疫血清で細菌をインキュベートした場合に得られたCFU}}{\text{予め採血した血清で得られたCFU}} \times 100 \right]$$

10

殺菌抗体は、リポソームに取り込まれた精製された組換えNs p A蛋白質で免疫化されたマウスおよびウサギから収集された血清に存在することが判明した(表10)。重要なことには、殺菌抗体は、10%水酸化アルミニウムに吸着された組換えNs p A蛋白質で免疫化したウサギから収集された血清には存在しなかった。加えて、2つの異なるリポソーム処方(E. coli : Chol (7:2) + MPLA、E. coli 100%)で免疫化したウサギから収集した血清もまた、3つの異なる血清群B株に対して殺菌性であることが判明した(表11)。後者の結果は、Ns p A - リポソーム処方での免疫化が交差 - 殺菌抗体の生産を誘導できることを示す。これらのデータは、リポソームへの精製された組換えNs p A蛋白質の取り込みが、天然蛋白質に対する免疫応答をかなり増強したことを示す。

20

【0178】

表10 髄膜炎菌株608Bに対するNs p A - リポソーム処方に対して惹起した抗血清の殺菌活性

【0179】

【表 10】

処方 ¹	方法	リポソームを調製するのに用いた脂質濃度	溶解の%	
			以下のものからの抗血清 ² :	
			マウス	ウサギ ³
組換え NspA ⁴	-	-	nd	19 (1)
<u>N.meningitidis</u> 100% + MPLA	透析	75 mM	79	nd
<u>N.lactamica</u> 100% + MPLA			84	94 (2)
<u>E.coli</u> : Chol (7:2)			nd	93 (3)
<u>E.coli</u> : Chol (7:2) + MPLA			79	95.7 (4)
<u>E.coli</u> 100%			85	86.4 (5)
				89 (6)
		100 (7)		
		75 (8)		
<u>E.coli</u> 100%	6 mM	nd	77 (9)	
			99 (10)	
<u>E.coli</u> : Chol (7:2)	迅速希釈	nd	75 (11)	
			80 (12)	

10

20

30

¹ マウスおよびウサギは実施例 8 に記載されているように組換え N s p A - リポソーム処方で免疫化した。

² 組換え N s p A 調製物に対して惹起した抗血清を、髄膜炎菌株 6 0 8 B の補体 - 媒介殺傷を誘導するそれらの能力につきテストした。血清を 1 / 1 0 希釈した。nd、測定せず。

³ 括弧の間の数字はウサギの数を示す。

⁵ 1 0 % 水酸化アルミニウムアジュバントに吸着された組換え N s p A 蛋白質

表 1 1 異なる N s p A - リポソーム処方での免疫化の後に収集したウサギ抗血清の殺菌活性

【 0 1 8 0 】

40

【表 1 1】

処方 (ウサギの数)	株に対する溶解の% ¹ :			
	608B (B:2a:P1.2)	BZ198 (B:NT:P-)	S3446 (B:14:P1.23,14)	H355 (B:15:P1.15)
<i>E.coli</i> : Chol (7:2) + MPLA (4)	95.7	100	97.2	91.6
<i>E.coli</i> 100% (5)	86.4	99.8	65.0	62.2

10

¹ 組換え N s p A 調製物に対して惹起させたウサギ血清を、4つの髄膜炎菌株の補体 - 媒介殺傷を誘導するそれらの能力についてテストした。血清は 1 / 10 希釈した。

【0181】

実施例 1 2

本実施例は、異なるリポソーム処方への組換え N s p A の取り込みを説明する。

【0182】

精製された組換え N s p A 蛋白質 (r N s p A) を無水エタノール (v o l / v o l) の添加によってまず沈殿させた。沈殿した r N s p A を、1% (w t / v o l) のドデシル硫酸ナトリウム (S D S ; S i g m a c h e m i c a l) を含有する 1 m l の P B S 緩衝液に可溶化させ、100 にて10分間加熱した。r N s p A 溶液を、15% (w t / v o l) の n - オクチル - D - グルコピラノシド (O G , S i g m a) を含有する 1 m l の P B S 緩衝液で希釈し、室温にて3時間インキュベートした。

20

【0183】

1, 2 - ジミリストイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホコリン (D M P C ; A v a n t i 極性脂質, A l a b a s t e r , A L)、1, 2 - ジミリストリル - s n - グリセロ - 3 - [ホスホ - L - セリン] (D M P S , A v a n t i)、およびコレステロール (C h o l ; A v a n t i) から形成されたリポソーム、および D M P C、1, 2 - ジミリストイル - 3 - トリメチルアンモニウム - プロパン (D M T A P , A v a n t i)、およびコレステロールから作成されたリポソームは、透析方法 (M u t t i l a i n e n e t a l . 1 9 9 5 , M i c r o b P a t h o g . , 1 8 : 4 2 3 - 3 6) を用いて調製した。簡単に述べれば、脂質を丸底ガラスフラスコ中のクロロホルム : メタノール溶液 (2 : 1) に溶解させ、ロータリーエバポレーター (R o t a v a p o r , B u c h i , S w i t z e r l a n d) を用いて乾燥して、容器上の均一なフィルムを達成した。r N s p A 蛋白質 - 洗剤溶液を脂質フィルムに加え、フィルムが懸濁するまで軽く混合した。混合物は外観がわずかに不透明になった。次いで、混合物を P B S 緩衝液 (p H 7 . 4) に対して徹底的に透析して、洗剤を除去し、リポソーム形成を誘導した。透析の後、ステンレス鋼押しデバイス (L i p e x B i o m e m b r a n e s , V a n c o u v e r , C a n a d a) を用いて、得られたミルク状懸濁液を 1000、400、200 および 100 n m ポリカルボネートフィルターを通して順次押し出した。リポソームに取り込まれなかった r N s p A は 4 にて 20000 x g における 15 分間の遠心によって除去した。リポソーム溶液を 4 にて 25000 x g において 1 時間遠心し、ペレットを 0 . 3 M のスクロースを含有する P B S 緩衝液に懸濁させた。小胞サイズおよび均一性は、サブミクロン粒子アナライザー (モデル N 4 P l u s , B e c k m a n C o u l t e r) での準弾性光散乱によって評価した。この装置を用い、異なる調製物におけるリポソームサイズはほぼ 150 n m であると見積もられた。全てのリポソーム調製物は 0 . 22 μ m 膜を通す濾過によって滅菌し、用いるまで + 4 または - 80 で貯蔵した。リポソームに取り込まれた組換え蛋白質の量は、W e s s e l a n d F l u g g e (A n a l . B i o c h e m . 1 9 8 4 , 1 3 8 : 1 4 1 - 1 4 3) によって記載されているように、クロロホルム : メタノール溶液 (2 : 1) での r N s p A - リポソーム調製物の蛋白質抽出後に M i c r o B C A (P i e r c e , R o c k f o r d , I 1 1 .) によって見積もった

30

40

50

。

【0184】

透析濾過に基づく方法は、rNspA-リポソーム処方を作成するための代替方法として用いた。この方法では、脂質を50にて8%OGに懸濁させた。前記したように調製した1容量のrNspA蛋白質を異なる容量の脂質懸濁液と合わせ、37にて15分間インキュベートした。脂質/蛋白質混合物をHEPES緩衝液セーライン(HBS)に希釈して、リポソーム小胞の形成を誘導した。ステンレス鋼押しデバイス(Lipex Biomembranes, Vancouver, Canada)を用い、得られた懸濁液を2つの重ねた100nmポリカルボネートフィルターを通した。リポソーム処方は所望の最終容量まで超濾過し、次いで、10容量のHBSに対して透析濾過して、A/G/Technology Corp.からの500,000公証分子量カットオフカートリッジを用い、遊離蛋白質および洗剤を除去した。最後に、調製物を0.22μm膜を通して滅菌し、小胞サイズおよび均一性は前記したように評価した。全ての調製物は用いるまで+4で貯蔵した。

10

【0185】

実施例13

本実施例は、rNspA-リポソーム処方でのマウスの免疫化を説明する。

【0186】

雌BALB/cマウス(4ないし6週齢; Charles River Laboratories, St-Constant, Quebec, Canada)の群を、10%水酸化アルミニウムアジュバント(AlhydrogelTM 2%: Brenntag Biosector, Denmark)に吸着された20μgのrNspA蛋白質で、あるいは異なるリポソーム調製物に取り込まれた20μgのrNspAで、3週間間隔で4回筋肉内(IM)免疫化した。血液試料を各免疫化に先立って、および最後の注射から3週間後に、眼窩洞から収集した。血液試料を-20で貯蔵した。

20

【0187】

実施例14

本実施例は、ウサギのrNspA-リポソーム処方での免疫化を説明する。

【0188】

New Zealand White雌ウサギ(2.5Kg, Charles River)を、10%水酸化アルミニウムアジュバント(AlhydrogelTM 2%: Brenntag Biosector, Denmark)に吸着させた100μgのrNspA蛋白質で、または異なるリポソーム処方に取り込ませた100μgのrNspA蛋白質で数箇所部位にて3週間間隔で4回IM免疫化した。血清試料は、各免疫化の前に、および最後の注射から3週間後に収集した。血清試料は-20で貯蔵した。

30

【0189】

実施例15

本実施例は、rNspA-リポソーム処方で免疫化したウサギからの血清のELISAによる分析を説明する。

【0190】

免疫化した動物の抗体応答を酵素結合免疫吸着検定(ELISA)によって測定した。マイクロタイタープレートを、リン酸緩衝液(50mM NaH₂PO₄, pH4.2)中の0.5μg/mlの濃度のrNspA、あるいは炭酸緩衝液(15mM Na₂CO₃; 35mM NaHCO₃, pH9.6)中のml当たり2.5μgの蛋白質の濃度の髄膜炎菌株608Bから抽出したOM調製物いずれかの0.1ml/ウエルで室温にて一晚コートした。プレートを、0.5%(wt/vol)ウシ血清アルブミン(BSA)を含有するリン酸-緩衝化生理食塩水(PBS)緩衝液で37にて30分間ブロックし、次いで、ウサギ血清の系列希釈と共に1時間インキュベートした。インキュベーション時間の後に、プレートを洗浄緩衝液(0.02% tween-20を含有するPBS)で3回洗浄した。アルカリ性ホスファターゼ-コンジュゲートドAffiniPureヤギ

40

50

抗 - ウサギ I g G を、3 % (w t / v o l) B S A を含有する P B S 中で希釈し、0 . 1 m l のこの溶液を各ウエルに加えた。37 °C における 60 分間のさらなるインキュベーションの後、プレートを洗浄緩衝液で 3 回洗浄した。10 % ジエタノールアミン (p H 9 . 6) 中の 100 μ l の p - ニトロフェニルホスフェート二ナトリウム溶液を各ウエルに加えた。室温での 1 時間のインキュベーションに続き、S p e c t r a M a x マイクロプレートリーダー (M o l e c u l a r D e v i c e s) を用いて O D _{405nm} を評価した。O D 値の 2 倍に対応する吸光度読みがプレ免疫血清につき得られた ($\lambda = 405 / 630$ nm) 血清希釈は、この血清の力価であると考えた。r N s p A 蛋白質を含有する処方で免疫化したウサギから収集した全ての血清は、E L I S A によって評価して、r N s p A と強く反応した (データは示さず) 。表 1 に示すように、髄膜炎菌 O M P に対するより強い力価が、ミョウバンアジュバントに吸着された r N s p A で免疫化したウサギで得られた力価 (21333 \pm 7390) と比較して r N s p A - リボソームで免疫化したウサギから収集した血清で測定された (317979 \pm 133703 ; 平均 \pm 標準偏差) 。これらの結果は、免疫化によって誘導された抗体の有意な割合が、髄膜炎菌膜に挿入された場合に、天然 N s p A 蛋白質と反応することを示唆する。

10

【 0 1 9 1 】

表 1 2 E L I S A 、 サイトフルオロメトリーおよび殺菌アッセイ (S B A) による異なる r N s p A - リボソーム処方で免疫化したウサギからの血清の分析

【 0 1 9 2 】

【表 1 2 - 1】

処方 ¹	リポソームを調製するのに用いた脂質濃度	ウサギの数	抗-Omp力価の逆数 ²	表面結合アッセイ ³			SBA ⁶		
				BI ⁴	標識された細胞の% ⁵	溶解の%			
rNspA ⁷	-	1	25600	29	97	16			
		2	25600	25	97	23			
		3	12800	8	79	13			
DMPC:DMPS:Chol (4:1:1)	75 mM	4	> 409600	53	99	54			
		5	409600	169	100	100			
		6	> 409600	154	100	100			
		7	102400	39	97	38			
		8	409600	81	100	72			
		9	409600	94	100	70			
		10	409600	23	93	17			
		11	> 409600	91	99	81			
		12	> 409600	81	100	77			
		13	409600	27	95	20			
		14	> 409600	47	98	41			
		DMPC:DMTAP:Chol (4:1:1)	75 mM	15	> 409600	230	100	100	
				16	204800	33	98	39	
				17	> 409600	121	100	79	
18	204800			132	100	55			
19	409600			97	99	55			
20	409600			153	100	87			
21	409600			127	100	89			
22	> 409600			269	100	100			
23	409600			132	100	71			
24	204800			145	100	79			
25	> 409600			213	100	94			
DMPC:DMPS:Chol (4:1:1)	30 mM	26	102400	36	97	42			
		27	409600	59	99	80			
		28	102400	11	79	19			
		29	102400	40	98	42			
		30	204800	22	88	18			
		31	409600	70	100	68			
		32	102400	71	100	61			
		33	> 409600	49	99	54			
		DMPC:DMTAP:Chol (4:1:1)	30 mM	34	51200	31	96	22	
				35	> 409600	121	100	52	
36	> 409600			169	100	83			
37	409600			147	100	78			
38	204800			131	100	56			
39	> 409600			216	100	96			
40	51200			112	100	61			

【 0 1 9 3 】

【表 1 2 - 2】

	41	204800	110	99	52
--	----	--------	-----	----	----

¹ ウサギを、10%水酸化アルミニウムアジュバントに吸着された100μgのrNspA蛋白質で、あるいは実施例12に記載したように異なるリポソーム調製物に取り込まれた100μgのrNspAで4回筋肉内免疫化した。

² 血清は、N.meningitidis株608Bから抽出されたOMPに対してELISAによってテストした。プレ免疫血清は、ELISAによって評価して、髄膜炎菌OMP調製物に対して反応性を示さなかった。

10

20

30

40

50

³ 血清を 1 / 20 希釈して、実施例 16 によって記載したようにサイトフルオロメトリーアッセイを行った。

⁴ 結合指標 (BI) は、免疫血清で細胞を標識した後に得られたメジアン蛍光値を、血清無しの対照で得られた蛍光値で割ったものとして計算した。1 の蛍光値は、無傷髄膜炎菌細胞の表面で抗体の結合はなかったことを示した。

⁵ 分析した 10,000 細胞のうちの標識された細胞の %

⁶ rNspA 調製物に対して惹起された抗血清を、実施例 17 に記載したように、髄膜炎菌株 608b の補体 - 媒介殺傷を誘導するそれらの能力についてテストした。血清は 1 / 40 希釈した。

⁷ rNspA 蛋白質を 10 % 水酸化アルミニウムアジュバントに吸着させた。

10

【0194】

実施例 16

本実施例は、N. meningitidis 細胞の表面の NspA - リポソーム処方に対して惹起された抗体の接近性を説明する。

【0195】

N. meningitidis 株は、8 % CO₂ 雰囲気中、攪拌しつつ (225 rpm) にて、0.25 % デキストロースを含有するミューラー - ヒントン (MH) プロス中で増殖させて、0.500 (~ 10⁸ CFU / ml) の CD_{490nm} を得た。次いで、抗 - NspA または対照血清の希釈物を調整された細菌培養に加え、攪拌しつつ 4 にて 2 時間インキュベートした。試料をブロッキング緩衝液 [2 % ウシ血清アルブミン (BSA) を含有するリン酸 - 緩衝化生理食塩水 (PBS)] で 2 回洗浄し、次いで、ブロッキング緩衝液中に希釈した 1 ml のヤギフルオレセイン (FITC) - コンジュゲート抗 - ウサギ IgG (H + L) を加えた。攪拌しつつの室温での 60 分間のさらなるインキュベーション期間の後、試料を PBS 緩衝液中で 2 回洗浄し、PBS 緩衝液中の 0.3 % ホルムアルデヒドで 4 にて 18 時間固定した。フローサイトメトリー (Epics (登録商標) XL; Beckman Coulter, Inc.) によるそれらの分析まで、細胞を 4 にて暗所に保持した。結合指標 (BI) は、免疫血清で細胞を標識した後に得られたメジアン蛍光値を、血清無しの対照で得られた蛍光値で割ったものとして計算した。1 の蛍光値は、無傷髄膜炎菌細胞の表面に抗体の結合がなかったのを示した。フローサイトメトリー分析は、rNspA - リポソーム処方で免疫化されたウサギからの血清に存在する抗体は、10 % 水酸化アルミニウムに吸着された rNspA 蛋白質で免疫化されたウサギからの血清に存在するものよりも効果的に髄膜炎菌細胞上のそれらの対応する表面露出エピトープを認識したことを明らかにした (表 12)。事実、rNspA - リポソーム処方で免疫化したウサギについて記録された結合指標は、10 % 水酸化アルミニウムに吸着された rNspA で免疫化したウサギについて記録された結合指標 (BI 29) よりも一般的に高かった (11 BI 269)。これらの観察は、rNspA - リポソーム処方で免疫化されたウサギからの血清に存在する NspA - 特異的抗体が、無傷髄膜炎菌細胞の表面の接近可能のエピトープを認識することを明瞭に示す。

20

30

【0196】

実施例 17

本実施例は、ウサギ血清に存在する抗 - NspA 抗体の殺菌活性を説明する。

40

【0197】

細菌を、1 % ウマ血清 (Gibco BRL) を含有する BHI 寒天プレート上で平板培養し、8 % CO₂ 雰囲気中で 37 にて 16 時間インキュベートした。0.25 % デキストロースを含有するミューラー - ヒントン (MH) プロスを、BHI 寒天プレートからの細菌で接種し、0.600 の OD_{620nm} が得られるまで、8 % CO₂ 雰囲気中で 37 にて攪拌しつつ (225 rpm) インキュベートした。インキュベーション期間の後、細菌を溶菌緩衝液 [ハンクスの平衡塩溶液 (HBSS) および 0.1 % ゼラチン、pH 7.2] に 0.300 の OD_{490nm} まで懸濁させ、8 × 10⁴ CFU / ml まで希釈した。殺菌アッセイは、25 μl の調整された細菌懸濁液を 50 μl の希釈された加熱 -

50

不活化ウサギ血清と混合することによって行った。補体の源として、髄膜炎菌細胞についてのその弱い特異的な殺傷活性につき選択された一定容量の $25 \mu\text{l}$ ($25\% \text{ v/v}$) の正常なヒト血清を加え、混合物を、 37°C 、 $8\% \text{ CO}_2$ にて、攪拌しつつ (225 rpm) 60 分間インキュベートした。インキュベーション期間の最後に、 $10 \mu\text{l}$ のアッセイ混合物をチョコレート寒天プレート上で平板培養することによって、生きた細菌の数を測定した。プレートを $8\% \text{ CO}_2$ 雰囲気中で 37°C にて 18 ないし 24 時間インキュベートした。対照は、免疫化前にウサギから収集した加熱 - 不活化血清およびヒト補体と共にインキュベートした細菌からなるものであった。溶解の%は以下の数式を用いて決定した：

【0198】

【数4】

$$100 - \left[\frac{\text{細菌を免疫血清と共にインキュベートした場合に得られるCFU}}{\text{プレー採血血清で得られたCFU}} \times 100 \right]$$

殺菌抗体は、リポソームに取り込んだ *rNspA* 蛋白質で免疫化されたウサギから収集されたほとんどの血清に存在することが判明した (表12)。重要なことには、殺菌抗体は、 10% 水酸化アルミニウムに吸着させた *rNspA* 蛋白質で免疫化したウサギから収集した血清には存在しなかった。加えて、2つの異なるリポソーム処方 (DMPC : DMPS : Chol, DMPC : DMTAP : Chol ; 75 mM) で免疫化したウサギから収集した血清もまた、3つの区別される血清群 B 株および1つの血清群 A 株 (Z4063) に対して殺菌性であることが判明した (表13)。この後者の結果は、*rNspA* - リポソーム処方での免疫化が、交差 - 殺菌性抗体の生産を誘導できることを示す。これらのデータは、*rNspA* 蛋白質のリポソームへの取り込みが、天然蛋白質に対する機能的免疫応答をかなり増強したことを示す。

【0199】

表13 異なる *rNspA* - リポソーム処方での免疫化の後に収集されたウサギ抗血清の殺菌性活性

【0200】

【表13】

処方	ウサギの数	株に対する溶解の% ¹ :			
		608B (B:2a:P1.2)	SWZ107 (B:4:P1.2)	H355 (B:15:P1.15)	Z4063 (A:4:P1.7)
DMPC:DMPS:Chol (4:1:1) 75 mM	4	85	73	75	98
	5	100	100	100	100
	6	100	100	99	100
DMPC:DMTAP:Chol (4:1:1) 75 mM	15	100	100	100	100
	17	96	98	90	100

¹ *rNspA* 調製物に対して惹起されたウサギ血清を、4つの髄膜炎菌株の補体 - 媒介殺傷を誘導するそれらの能力についてテストした。血清を $1/20$ まで希釈した。

【0201】

さらに技巧を凝らすことなく、当業者であれば、これまでの記載を用い、本発明を最高限に利用できると考えられる。以下の好ましい特異的な実施形態は、従って、単に説明するものであり、開示の残りを断じて限定するものではないと解釈されるべきである。

【0202】

前記および以下の例において、全ての温度は摂氏度で修正されることなく記載され、全ての部および%は特に断りの無い限り重量によるものである。本明細書中で引用された全ての刊行物、特許および出願の、および 2005 年 3 月 7 日に出版された対応する米国仮出願第 $60/658,815$ 号の全開示はここに引用して援用する。

【0203】

10

20

30

40

50

これまでの実施例は、これまでの実施例で用いたものに代えて本発明の一般的にまたは具体的に記載された反応体および/または操作条件を置き換えることによって同様な成功をもって反復することができる。

【0204】

これまでの記載から、当業者であれば、本発明の必須の特徴を容易に確認することができ、かつその精神および範囲を逸脱することなく、本発明の種々の変形および修飾をなして、それを種々の用法および条件に適合させることができる。

【図面の簡単な説明】

【0205】

【図1】図1は、*N. meningitidis* 株608B NspA蛋白質をコードする遺伝子のヌクレオチド(配列番号1)およびアミノ酸(配列番号2)配列を表す。

【図2】図2は、髄膜炎菌NspA蛋白質の3-Dモデルを表す。このモデルは、Swiss-Pdb Viewer [Guex, N. and MC Peitsch, Electrophoresis, 18, p. 2714 (1997)]を用い、再度折り畳まれた*E. coli* OmpA (PDB: 1QJP)の結晶構造から開発された [Pautsch, A. and GE Schulz, J. Mol. Biol., 298, p. 273 (2000)]。8つの膜貫通-ストランドは、ペリプラズム側では3つの密なターン(T)、および細菌の外側表面では4つの表面-露出ループ(L1、L2、L3、L4)に連結されている。膜相間と相互作用するアミノ酸残基はボールおよびスティックとして表される。この図は、ベクターNTISUIT7.0 (Informax, Inc.)からの3D-Mol Viewerを用いて作成された。

【図3】図3は、2つの血清群B髄膜炎菌株608B (B: 2a: P1.2: L3)、CU385 (B: 4: P1.15: L3、7、9)、1つの血清群A株F8238 (A: 4、21)および1つの血清群C株C11 (NT: P1.1: L3、7、9)の表面におけるNspA-特異的MAbの接近性のフローサイトメトリーによる評価を表す。指数関数的に増殖する髄膜炎菌細胞を、順次、NspA-特異的または対照MAb、続いて、FITC-コンジュゲート抗-マウス免疫グロブリン二次抗体と共にインキュベートした。各MAbの殺菌活性は、対照CFUと比較した、60分のインキュベーションの後にmL当たりCFUの50%減少をもたらす抗体の濃度として表される: ++、0.5ないし49 μgの間の抗体/mL; +、50ないし99 μgの間の抗体/mL; - > 100 μgの抗体/mLにおいて殺菌活性なし。

【図4】図4は、間接蛍光フローサイトメトリーによって測定した、*Neisseria meningitidis* 株608B (B: 2a: P1.2)、BS198 (B: NT: P-)、S3446 (B. 14: P1.23、14)およびH355 (B: 15: P1.15)に対するポリクローナル抗-NspAウサギ抗血清の結合の評価を示す。ウサギを、異なるリポソーム処方に取り込まれた100 μgのrNspAで免疫化した。指数関数的に増殖する髄膜炎菌細胞を、順次、予め採血したまたは過剰免疫血清、続いて、フルオレセインイソチオシアネート(FITC)-コンジュゲート抗-ウサギ免疫グロブリン二次抗体と共にインキュベートした。全ての血清は1:20の希釈でテストした。各グラフにおいて、左側ピークは予め採血したウサギ血清の結合を表し、他方、右側ピークは無傷髄膜炎菌細胞に対する対応する過剰免疫血清の結合を表す。

10

20

30

40

【 図 1 】

Figure 1. *N. meningitidis*株608B NspA蛋白質をコードする遺伝子のヌクレオチド(配列番号1)およびアミノ酸(配列番号2)配列

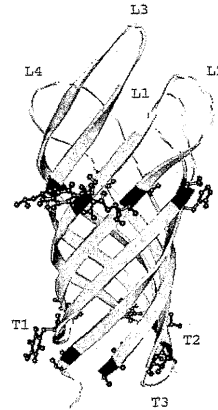
```

1   M K K A L A T L I A L A L P A A A L A E
1   ATGAAAAGCACTTGCAGACTGATTCGCTCGCTCTCCGGCCGCGCACTGGGGAA
21  G A S G F Y V Q A D A R H A K A S S L
61  GGCCATCCGGCTTTACGTCACAGCCGATGCCGACAGCCAAAGCCTCAAGCTCTTTA
41  G S A K G F S P R I S A G Y R I N D L R
121 GGTTCTGCCAARGCTTCAGCCGGGATCTCCGAGGCTACCGCATCAGCAGCTCCGCG
61  F A V D Y T R Y K N Y K A P S T D F K L
181 TFCGGCGGATTACACGGCTACAAAACATAAAGCCCATCCACCGATTCAAACTT
81  Y S I G A S A I Y D F D T Q S P V K P Y
241 TACAGCATGGCGGCTCCGCGCATTTACGACTTCAGACCCCAATCGCCCTCAACCGTAT
101  L G A R L S L N R A S V D L G G S D S F
301  CTGGCGCGGCTTGAGCTCACCAGCCGCTCCGCTGACTTGGCGCGAGGAGGCTTC
121  S Q T S I G L G V L T G V S Y A V T P N
361  AGCCAAACCTCCATCGGCTCGGCTATTCAGCGGCGTAAGCTATGCCCTTACCCGAAAT
141  V D L D A G Y R Y N Y I G K V N T V K N
421  GTCGATTTGATGCGGCTACCGCTACATACATCGCAAGTCAACACTGTCAAAAC
161  V R S G E L S V G V R V K F * (配列番号2)
481  GTCGCTCCGCGCACTCTCCGCTCGGCTCCGCTCAATTCTGA (配列番号1)

```

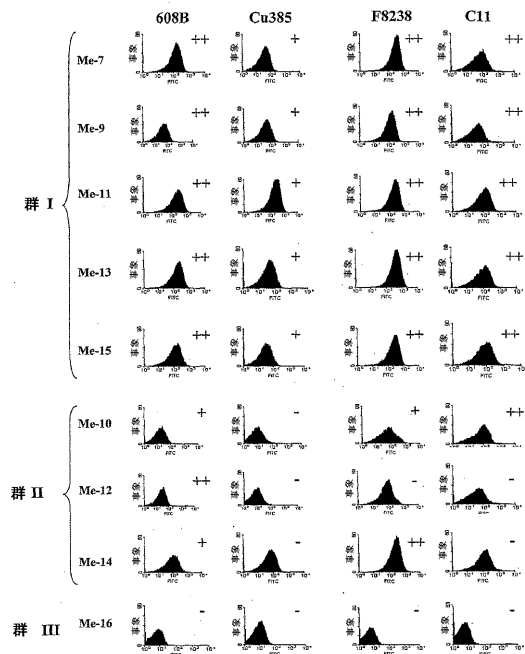
【 図 2 】

Figure 2. 髄膜炎菌NspA蛋白質の3Dモデル。このモデルは、Swiss-Pdb Viewer(Guex, N. and MC Pautsch, Electrophoresis, 18, P. 2714(1997))を用い、再度折曲された*E. coli* OmpA(PDB: 1QJP)[Pautsch, A. and GE Schulz, J. Mol. Biol., 298, p. 273(2000)]の結晶構造から開発した。8つの膜貫通β-ストランドは、ペリプラズム側の3つの密なターン(T)および細菌の外側表面の4つの表面-露出ループ(L1, L2, L3, L4)に連結している。膜相間と相互作用するアミノ酸残基はボールおよびスティックとして表される。この図は、ベクターNTLスライト7.0からの3D-Mol Viewer(InfoMax, Inc.)を用いて作成した。



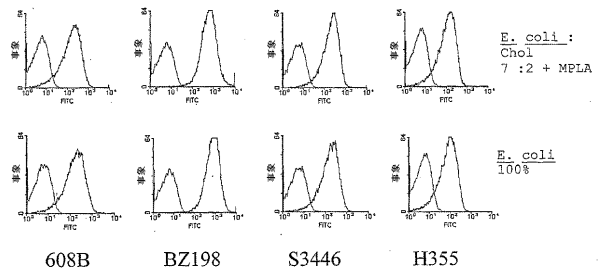
【 図 3 】

Figure 3 2つの血清群B髄膜炎菌株608B(B:2a:P1, 2:L3)、CU385(B:4:P1, 15:L3, 7, 9)、1つの血清群A株F8238(A:4, 21)および1つの血清群C株C11(NT:P1, 1:L3, 7, 9)の表面におけるNspA-特異的MAbの接近性のフローサイトメトリーによる評価。指数関数的に増殖する髄膜炎菌細胞を、NspA-特異的または対照MAb、続いて、FITC-コンジュゲートド抗マウス免疫グロブリン二次抗体と共に順次にインキュベートした。各MAbの殺菌活性は、対照CFUと比較した。60分のインキュベーション後におけるmL当たりCFUの50%減少をもたらす抗体の濃度として表される: ++, 0.5ないし49 μg/mlの間の抗体/mL; +, 50ないし99 μg/mlの間の抗体/mL; - > 100 μg/mlの抗体/mLにおいて殺菌活性なし



【 図 4 】

Figure 4. 間接的蛍光フローサイトメトリーによって測定した、*Neisseria meningitidis*株608B(B:2a:P1, 2)、BZ198(B:NT:P-), S3446(B:14:P1, 23, 14)およびB355(B:15:P1, 15)へのポリクローナル抗-NspAウサギ血清の結合の評価。ウサギを、異なるリボソーム処方に取り込まれた100 μgのrNspAで免疫化した。指数関数的に増殖する髄膜炎菌細胞を、順次、プレー採血したまたは過剰免疫血清、続いて、フルオレセインイソシアシアネート(FITC)-コンジュゲートド抗ウサギ免疫グロブリン二次抗体と共にインキュベートした。全ての血清は1:20の希釈でテストした。各グラフにおいて、左側ピークはプレー採血ウサギ血清の結合を表し、他方、右側ピークは無傷髄膜炎菌細胞に対する対応する過剰免疫血清の結合を表す。



【配列表】

2008533016000001.xml

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PC/US06/08052
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC: A61K 8/00(2006.01); A61K 39/02(2006.01); 39/116(2006.01); 39/095(2006.01); 38/00(2006.01); C07K 21/04(2006.01); C07K 1/00(2006.01); G01N 33/53(2006.01); 33/554(2006.01); C12Q 1/68(2006.01)		
USPC: 424/9.51, 190.1, 203.1, 250.1, 249.1, 234.1; 314/2; 536/23.7; 530/350, 300, 825/435/7.1, 975, 7.32, 6 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) U.S. : 424/9.51, 190.1, 203.1, 250.1, 249.1, 234.1; 314/2; 536/23.7; 530/350, 300, 825/435/7.1, 975, 7.32, 6		
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)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2004/0132652 A1 (MARTIN et al) 08 July 2004 (08.07.2004), claims.	1-13, 15, 19-32 and 34
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input type="checkbox"/> See patent family annex.
<i>Special categories of cited documents</i>		
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X"
"E"	earlier application or patent published on or after the international filing date	"Y"
"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)	"Z"
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"A"
"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 11 September 2006 (11.09.2006)		Date of mailing of the international search report 22 NOV 2006
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (571) 273-3201		Authorized officer S. Devi, Ph.D. Telephone No. (571) 272-1600

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US06/08052

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. Claims Nos.: 33
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
Please See Continuation Sheet
3. Claims Nos.: 14 and 16-18
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

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

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of any additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

- Remark on Protest**
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US06/08052

Continuation of Box II Reason 2:

Claim 33 is unsearchable because of the incorrect limitation: 'a pharmaceutical method according to any one of claims 1 to 19'. Claims 1 to 19 are drawn to a pharmaceutical composition, but not to a 'pharmaceutical method'.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 39/39	(2006.01)	A 6 1 K 39/39	
A 6 1 K 39/00	(2006.01)	A 6 1 K 39/00	H
A 6 1 K 39/095	(2006.01)	A 6 1 K 39/095	
A 6 1 P 31/04	(2006.01)	A 6 1 P 31/04	
A 6 1 P 29/00	(2006.01)	A 6 1 P 29/00	
G 0 1 N 33/53	(2006.01)	G 0 1 N 33/53	D
C 1 2 N 15/09	(2006.01)	C 1 2 N 15/00	A

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

(74)代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100130845

弁理士 渡邊 伸一

(74)代理人 100142929

弁理士 井上 隆一

(72)発明者 マーティン, デニス

カナダ国 ジー3エー 1イー9 ケベック, セント-オーギュスティン-ド デズモール,
ガボリー 4728-ジー

(72)発明者 リュー, ステファン

カナダ国 ジー1イー 1ジェイ3 ケベック, ボーポール, アベニュー デ パンソン 8
69

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 CA01 CA09 CA11 CA20 HA11

4C076 AA19 CC31 DD15 DD19 DD49 DD63 DD70 EE52 FF16 FF36
FF43 FF63 FF68

4C084 AA01 AA02 AA03 BA01 BA22 CA04 MA05 MA24 NA03 NA10
NA14 ZB111 ZB321 ZB351 ZC511

4C085 AA03 AA38 BA16 BB11 CC07 CC21 DD62 EE01 EE06 FF13
FF14 FF24

专利名称(译)	药用脂质体组合物		
公开(公告)号	JP2008533016A	公开(公告)日	2008-08-21
申请号	JP2008500836	申请日	2006-03-07
[标]申请(专利权)人(译)	船上魁北克芯片为葛兰素史克生物制品北美的生物医学IDC公司		
申请(专利权)人(译)	艾迪生物医药公司魁北克海哦.蜂.AS葛兰素史克生物制品北美		
[标]发明人	マーティンデニス リューステファン		
发明人	マーティン, デニス リュウ, ステファン		
IPC分类号	A61K38/00 A61K9/127 A61K47/24 A61K47/28 A61K47/18 A61K39/39 A61K39/00 A61K39/095 A61P31/04 A61P29/00 G01N33/53 C12N15/09		
CPC分类号	A61K9/127 A61K38/00 A61K39/095 A61K39/39 A61P29/00 C07K14/22 C07K16/1217 C07K2317/34 C12Q1/689 G01N33/56911 G01N2333/22		
FI分类号	A61K37/02 A61K9/127.ZNA A61K47/24 A61K47/28 A61K47/18 A61K39/39 A61K39/00.H A61K39/095 A61P31/04 A61P29/00 G01N33/53.D C12N15/00.A		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/CA01 4B024/CA09 4B024/CA11 4B024/CA20 4B024/HA11 4C076/AA19 4C076/CC31 4C076/DD15 4C076/DD19 4C076/DD49 4C076/DD63 4C076/DD70 4C076/EE52 4C076/FF16 4C076/FF36 4C076/FF43 4C076/FF63 4C076/FF68 4C084/AA01 4C084/AA02 4C084/AA03 4C084/BA01 4C084/BA22 4C084/CA04 4C084/MA05 4C084/MA24 4C084/NA03 4C084/NA10 4C084/NA14 4C084/ZB111 4C084/ZB321 4C084/ZB351 4C084/ZC511 4C085/AA03 4C085/AA38 4C085/BA16 4C085/BB11 4C085/CC07 4C085/CC21 4C085/DD62 4C085/EE01 4C085/EE06 4C085/FF13 4C085/FF14 4C085/FF24		
代理人(译)	清水初衷 小林智彦 渡边真一 井上隆一		
优先权	60/658815 2005-03-07 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

包含与脑膜炎奈瑟氏球菌多肽片段或其类似物或相应的DNA片段相关的脂质体的药物组合物可用于预防，诊断和/或治疗奈瑟菌感染。

表 1

Mab ID	アイソタイプ	以下のものとMabとの反応性 ¹		
		組換え NspA	野生型外膜	ΔNspA 外膜
Me-7	IgG2a	+	+	-
Me-9	IgG3	+	+	-
Me-10	IgG2a	+	+	-

【0125】