

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2015-193652

(P2015-193652A)

(43) 公開日 平成27年11月5日(2015.11.5)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 39/095 (2006.01)	A 6 1 K 39/095	4 C 0 8 5
A 6 1 K 39/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/00	H 4 H 0 4 5
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 2 1
A 6 1 K 39/102 (2006.01)	A 6 1 K 39/102	
A 6 1 K 39/09 (2006.01)	A 6 1 K 39/09	

審査請求 有 請求項の数 1 O L 外国語出願 (全 80 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2015-145631 (P2015-145631)	(71) 出願人	592243793
(22) 出願日	平成27年7月23日 (2015. 7. 23)		ノバルティス ヴァクシンズ アンド ダ
(62) 分割の表示	特願2013-124554 (P2013-124554)		イアグノスティクス エスアールエル
	の分割		イタリア国 イー53100 シエナ, ビ
原出願日	平成13年1月17日 (2001. 1. 17)		ア フィオレンティーナ 1
(31) 優先権主張番号	0001067.8	(74) 代理人	100078282
(32) 優先日	平成12年1月17日 (2000. 1. 17)		弁理士 山本 秀策
(33) 優先権主張国	英国 (GB)	(74) 代理人	100113413
(31) 優先権主張番号	0005699.4		弁理士 森下 夏樹
(32) 優先日	平成12年3月9日 (2000. 3. 9)	(72) 発明者	マリアーグラツィア ピッツァ
(33) 優先権主張国	英国 (GB)		イタリア国 イー53100 シエナ,
			ピア フィオレンティーナ 1, カイ
			ロン エセ. ピー. アー.

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 N. MENINGITIDIS血清型B外膜タンパク質を含む外膜小胞 (OMV) ワクチン

(57) 【要約】

【課題】 (a) Nm B 外膜調製物、および (b) 免疫原性成分を含む組成物を提供すること。

【解決手段】 (a) *Neisseria meningitidis* 血清型 B 外膜小胞 (OMV)、および (b) 他の *Neisseria* タンパク質、またはそれらの免疫原性フラグメントから選択される免疫原性成分を含む組成物を提供する。好ましくは成分 (b) は、成分 (a) の OMV が由来する Nm B 株とは異なる株由来のタンパク質を含む。好ましくは OMV は、デオキシコレート抽出によって獲得される。必要に応じて、この組成物はまた、他の病原体に対する防御抗原を含み得る。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

明細書に記載された発明。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本明細書中に引用する全ての文書は、本明細書中にその全体が参考として援用される。

【0002】

(技術分野)

本発明は、*Neisseria meningitidis* 血清型 B (NmB) に対するワクチンに関する。 10

【背景技術】

【0003】

(背景技術)

Neisseria meningitidis は、非運動性のグラム陰性双球菌ヒト病原体である。これは、咽頭にコロニー形成をし、髄膜炎（および、時折、髄膜炎のない敗血症）を引き起こす。米国において、発病率は 1 年間に 100、000 人あたり 0.6 ~ 1 人の割合であり、そして大流行によりずっと大きくなり得る (Liebermanら (1996) JAMA 275 (19): 1499 - 1503; Schuchatら (1997) N Engl J Med 377 (14): 970 - 976)。発展途上国では、風土病の割合はずっと大きく、そして流行の間、発生率は 1 年間あたり 100、000 人あたり 500 症例に達し得る。死亡率は極めて高く、米国では 10 ~ 20%、そして発展途上国においてはよりずっと高い。*Haemophilus influenzae* に対する結合ワクチンの導入後、*N. meningitidis* は、米国において全ての年齢における細菌性髄膜炎の主な原因である (Schuchatら (1997) 前出)。 20

【0004】

生物の莢膜多糖類に基づいて、*N. meningitidis* の 12 血清型が同定されている。現在使用される髄膜炎ワクチンは、血清型 A、C、Y、および W135 によって構成される 4 価の多糖類ワクチンである。しかし、*H. influenza* に対するワクチン接種の成功の後、血清型 A および血清型 C に対する結合体ワクチンが開発されている。 30

【0005】

しかし、血清型 B は問題を残したままである。この血清型は現在、米国、欧州および南アメリカにおける全髄膜炎のおおよそ 50% の原因である。この多糖類アプローチは使用できない。なぜなら、menB 莢膜多糖類は、哺乳動物組織にもまた存在する α (2 - 8) 結合 N - アセチルノイラミン酸のポリマーであるからである。これは抗原に対する寛容を生ずる；実際、応答が惹起された場合、それは抗自己であり、それ故、所望されない。自己免疫の誘導を回避しそして防御免疫応答を誘導するために、この莢膜多糖類は、特異的抗原性は不変のまま、例えば、N - アセチル基を N - プロピオニル基と置換して化学的に改変される (Romero および Outschoorn (1994) Clin Microbiol Rev 7 (4): 559 - 575)。 40

【0006】

血清型 B に対する効果的な外膜小胞 (OMV) ワクチンは、ノルウェー国立公衆衛生機関によって生成された [例えば、Bjuneら (1991) Lancet 338 (8775): 1093 - 96]。このワクチンは安全であり、そして NmB 疾患を防止するが、その効果は、ワクチンを作製するために用いた株に限られる。他の外膜調製物などに基づく他のワクチンもまた報告されている。これらのワクチンの効果を他の株に広げることが本発明の目的である。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【 0 0 0 7 】

(発 明 の 開 示)

驚くべきことに、O M V ワクチンへの規定された成分のさらなる添加が、それらの効果を有意に拡大することが見出された。

【 0 0 0 8 】

従って本発明は、(a) N m B 外膜調製物、および (b) 以下の 1 つ以上から選択される免疫原性成分を含む組成物を提供する：

- ・ W O 9 9 / 5 7 2 8 0 に開示されるタンパク質またはその免疫原性フラグメント；
- ・ W O 9 9 / 3 6 5 4 4 に開示されるタンパク質またはその免疫原性フラグメント；
- ・ W O 9 9 / 2 4 5 7 8 に開示されるタンパク質またはその免疫原性フラグメント；
- ・ W O 0 0 / 6 6 7 9 1 に開示されるタンパク質またはその免疫原性フラグメント；
- ・ T e t t e l i n ら [S c i e n c e (2 0 0 0) 2 8 7 : 1 8 0 9 - 1 8 1 5] に開示されるタンパク質またはその免疫原性フラグメント；
- ・ P a r k h i l l ら [N a t u r e (2 0 0 0) 4 0 4 : 5 0 2 - 5 0 6] に開示されるタンパク質またはその免疫原性フラグメント；
- ・ W O 9 7 / 2 8 2 7 3 に開示されるタンパク質またはその免疫原性フラグメント；
- ・ W O 9 6 / 2 9 4 1 2 に開示されるタンパク質またはその免疫原性フラグメント；
- ・ W O 9 5 / 0 3 4 1 3 に開示されるタンパク質またはその免疫原性フラグメント；
- ・ W O 9 9 / 3 1 1 3 2 に開示されるタンパク質またはその免疫原性フラグメント；
- ・ W O 9 9 / 5 8 6 8 3 に開示されるタンパク質またはその免疫原性フラグメント；
- ・ W O 9 9 / 5 5 8 7 3 に開示されるタンパク質またはその免疫原性フラグメント；
- ・ N e i s s e r i a m e n i n g i t i d i s タンパク質 P o r A、T b p A、T b p B、P i l C、O p A、または O m p 8 5。

【 0 0 0 9 】

この組成物が、W O 9 9 / 2 4 5 7 8 に開示されるタンパク質を含む場合、好ましくはこのタンパク質は、W O 9 9 / 2 4 5 7 8 に開示される以下の配列番号 (S E Q I D) からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む (または以下の配列番号の 1 つ以上の免疫原性フラグメントを含むタンパク質、または以下の配列番号のいずれか 1 つに対する配列同一性 (好ましくは、50%を超える (例えば、60%、70%、80%、90%、95%、99%以上)) を有する配列を含むタンパク質)：

【 0 0 1 0 】

【化 1】

2, 4, 6, 8, 10,
 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66,
 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 104, 106, 108, 110, 112, 114, 116,
 118, 120, 122, 124, 126, 128, 130, 132, 134, 136, 138, 140, 142, 144, 146, 148, 150, 152, 154, 156, 158,
 160, 162, 164, 166, 168, 170, 172, 174, 176, 178, 180, 182, 184, 186, 188, 190, 192, 194, 196, 198, 200,
 202, 204, 206, 208, 210, 212, 214, 216, 218, 220, 222, 224, 226, 228, 230, 232, 234, 236, 238, 240, 242,
 244, 246, 248, 250, 252, 254, 256, 258, 260, 262, 264, 266, 268, 270, 272, 274, 276, 278, 280, 282, 284,
 286, 288, 290, 292, 294, 296, 298, 300, 302, 304, 306, 308, 310, 312, 314, 316, 318, 320, 322, 324, 326,
 328, 330, 332, 334, 336, 338, 340, 342, 344, 346, 348, 350, 352, 354, 356, 358, 360, 362, 364, 366, 368,
 370, 372, 374, 376, 378, 380, 382, 384, 386, 388, 390, 392, 394, 396, 398, 400, 402, 404, 406, 408, 410,
 412, 414, 416, 418, 420, 422, 424, 426, 428, 430, 432, 434, 436, 438, 440, 442, 444, 446, 448, 450, 452,
 454, 456, 458, 460, 462, 464, 466, 468, 470, 472, 474, 476, 478, 480, 482, 484, 486, 488, 490, 492, 494,
 496, 498, 500, 502, 504, 506, 508, 510, 512, 514, 516, 518, 520, 522, 524, 526, 528, 530, 532, 534, 536,
 538, 540, 542, 544, 546, 548, 550, 552, 554, 556, 558, 560, 562, 564, 566, 568, 570, 572, 574, 576, 578,
 580, 582, 584, 586, 588, 590, 592, 594, 596, 598, 600, 602, 604, 606, 608, 610, 612, 614, 616, 618, 620,
 622, 624, 626, 628, 630, 632, 634, 636, 638, 640, 642, 644, 646, 648, 650, 652, 654, 656, 658, 660, 662,
 664, 666, 668, 670, 672, 674, 676, 678, 680, 682, 684, 686, 688, 690, 692, 694, 696, 698, 700, 702, 704,
 706, 708, 710, 712, 714, 716, 718, 720, 722, 724, 726, 728, 730, 732, 734, 736, 738, 740, 742, 744, 746,
 748, 750, 752, 754, 756, 758, 760, 762, 764, 766, 768, 770, 772, 774, 776, 778, 780, 782, 784, 786, 788,
 790, 792, 794, 796, 798, 800, 802, 804, 806, 808, 810, 812, 814, 816, 818, 820, 822, 824, 826, 828, 830,
 832, 834, 836, 838, 840, 842, 844, 846, 848, 850, 852, 854, 856, 858, 860, 862, 864, 866, 868, 870, 872,
 874, 876, 878, 880, 882, 884, 886, 888, 890, および 892

10

20

30

40

。

【0011】

この組成物が、WO99/36544に開示されるタンパク質を含む場合、好ましくはこのタンパク質は、WO99/36544に開示される以下の配列番号 (SEQ ID) からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む (または以下の配列番号の1つ以上の免疫原性フラグメントを含むタンパク質、または以下の配列番号のいずれか1つに対する配列同一性 (好ましくは、50%を超える (例えば、60%、70%、80%、90%、95%、99%以上)) を有する配列を含むタンパク質) :

【0012】

50

【化 2】

2, 4, 6, 8, 10,

12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66,

68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88, および 90

。

【0013】

この組成物が、Tettelinら、に開示されるタンパク質（すなわち、その文献で開示される遺伝子の1つによってコードされるタンパク質）を含む場合、好ましくはこのタンパク質は、NMB0001～NMB2160からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む（またはこれらの2160個の遺伝子の1つ以上の免疫原性フラグメントを含むタンパク質、またはこれらの2160個の遺伝子の1つに対する配列同一性（好ましくは、50%を超える（例えば、60%、70%、80%、90%、95%、99%以上））を有する配列を含むタンパク質）。

10

【0014】

この組成物が、Parkhillら、に開示されるタンパク質を含む場合、好ましくはこのタンパク質は、その文献で開示される2121個のコード配列からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む（またはこれらの2121個の配列の1つ以上の免疫原性フラグメントを含むタンパク質、またはこれらの2121個の配列の1つに対する配列同一性（好ましくは、50%を超える（例えば、60%、70%、80%、90%、95%、99%以上））を有する配列を含むタンパク質）。

20

【0015】

この組成物が、WO99/57280に開示されるタンパク質を含む場合、好ましくはこのタンパク質は、WO99/57280に開示される以下の配列番号（SEQ ID）からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む（または以下の配列番号の1つ以上の免疫原性フラグメントを含むタンパク質、または以下の配列番号のいずれか1つに対する配列同一性（好ましくは、50%を超える（例えば、60%、70%、80%、90%、95%、99%以上））を有する配列を含むタンパク質）：

30

【0016】

【化 3】

2, 4, 6, 8, 10,
12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66,
68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 104, 106, 108, 110, 112, 114, 116,
118, 120, 122, 124, 126, 128, 130, 132, 134, 136, 138, 140, 142, 144, 146, 148, 150, 152, 154, 156, 158,
160, 162, 164, 166, 168, 170, 172, 174, 176, 178, 180, 182, 184, 186, 188, 190, 192, 194, 196, 198, 200,
202, 204, 206, 208, 210, 212, 214, 216, 218, 220, 222, 224, 226, 228, 230, 232, 234, 236, 238, 240, 242,
244, 246, 248, 250, 252, 254, 256, 258, 260, 262, 264, 266, 268, 270, 272, 274, 276, 278, 280, 282, 284,
286, 288, 290, 292, 294, 296, 298, 300, 302, 304, 306, 308, 310, 312, 314, 316, 318, 320, 322, 324, 326,
328, 330, 332, 334, 336, 338, 340, 342, 344, 346, 348, 350, 352, 354, 356, 358, 360, 362, 364, 366, 368,
370, 372, 374, 376, 378, 380, 382, 384, 386, 388, 390, 392, 394, 396, 398, 400, 402, 404, 406, 408, 410,
412, 414, 416, 418, 420, 422, 424, 426, 428, 430, 432, 434, 436, 438, 440, 442, 444, 446, 448, 450, 452,
454, 456, 458, 460, 462, 464, 466, 468, 470, 472, 474, 476, 478, 480, 482, 484, 486, 488, 490, 492, 494,
496, 498, 500, 502, 504, 506, 508, 510, 512, 514, 516, 518, 520, 522, 524, 526, 528, 530, 532, 534, 536,
538, 540, 542, 544, 546, 548, 550, 552, 554, 556, 558, 560, 562, 564, 566, 568, 570, 572, 574, 576, 578,
580, 582, 584, 586, 588, 590, 592, 594, 596, 598, 600, 602, 604, 606, 608, 610, 612, 614, 616, 618, 620,
622, 624, 626, 628, 630, 632, 634, 636, 638, 640, 642, 644, 646, 648, 650, 652, 654, 656, 658, 660, 662,
664, 666, 668, 670, 672, 674, 676, 678, 680, 682, 684, 686, 688, 690, 692, 694, 696, 698, 700, 702, 704,
706, 708, 710, 712, 714, 716, 718, 720, 722, 724, 726, 728, 730, 732, 734, 736, 738, 740, 742, 744, 746,
748, 750, 752, 754, 756, 758, 760, 762, 764, 766, 768, 770, 772, 774, 776, 778, 780, 782, 784, 786, 788,
790, 792, 794, 796, 798, 800, 802, 804, 806, 808, 810, 812, 814, 816, 818, 820, 822, 824, 826, 828, 830,
832, 834, 836, 838, 840, 842, 844, 846, 848, 850, 852, 854, 856, 858, 860, 862, 864, 866, 868, 870, 872,
874, 876, 878, 880, 882, 884, 886, 888, 890, 892, 894, 896, 898, 900, 902, 904, 906, 908, 910, 912, 914,
916, 918, 920, 922, 924, 926, 928, 930, 932, 934, 936, 938, 940, 942, 944, 946, 948, 950, 952, 954, 956,

10

20

30

40

(続き)

958, 960, 962, 964, 966, 968, 970, 972, 974, 976, 978, 980, 982, 984, 986, 988, 990, 992, 994, 996, 998,
 1000, 1002, 1004, 1006, 1008, 1010, 1012, 1014, 1016, 1018, 1020, 1022, 1024, 1026, 1028, 1030, 1032,
 1034, 1036, 1038, 1040, 1042, 1044, 1046, 1048, 1050, 1052, 1054, 1056, 1058, 1060, 1062, 1064, 1066,
 1068, 1070, 1072, 1074, 1076, 1078, 1080, 1082, 1084, 1086, 1088, 1090, 1092, 1094, 1096, 1098, 1100,
 1102, 1104, 1106, 1108, 1110, 1112, 1114, 1116, 1118, 1120, 1122, 1124, 1126, 1128, 1130, 1132, 1134,
 1136, 1138, 1140, 1142, 1144, 1146, 1148, 1150, 1152, 1154, 1156, 1158, 1160, 1162, 1164, 1166, 1168,
 1170, 1172, 1174, 1176, 1178, 1180, 1182, 1184, 1186, 1188, 1190, 1192, 1194, 1196, 1198, 1200, 1202,
 1204, 1206, 1208, 1210, 1212, 1214, 1216, 1218, 1220, 1222, 1224, 1226, 1228, 1230, 1232, 1234, 1236,
 1238, 1240, 1242, 1244, 1246, 1248, 1250, 1252, 1254, 1256, 1258, 1260, 1262, 1264, 1266, 1268, 1270,
 1272, 1274, 1276, 1278, 1280, 1282, 1284, 1286, 1288, 1290, 1292, 1294, 1296, 1298, 1300, 1302, 1304,
 1306, 1308, 1310, 1312, 1314, 1316, 1318, 1320, 1322, 1324, 1326, 1328, 1330, 1332, 1334, 1336, 1338,
 1340, 1342, 1344, 1346, 1348, 1350, 1352, 1354, 1356, 1358, 1360, 1362, 1364, 1366, 1368, 1370, 1372,
 1374, 1376, 1378, 1380, 1382, 1384, 1386, 1388, 1390, 1392, 1394, 1396, 1398, 1400, 1402, 1404, 1406,
 1408, 1410, 1412, 1414, 1416, 1418, 1420, 1422, 1424, 1426, 1428, 1430, 1432, 1434, 1436, 1438, 1440,
 1442, 1444, 1446, 1448, 1450, 1452, 1454, 1456, 1458, 1460, 1462, 1464, 1466, 1468, 1470, 1472, 1474,
 1476, 1478, 1480, 1482, 1484, 1486, 1488, 1490, 1492, 1494, 1496, 1498, 1500, 1502, 1504, 1506, 1508,
 1510, 1512, 1514, 1516, 1518, 1520, 1522, 1524, 1526, 1528, 1530, 1532, 1534, 1536, 1538, 1540, 1542,
 1544, 1546, 1548, 1550, 1552, 1554, 1556, 1558, 1560, 1562, 1564, 1566, 1568, 1570, 1572, 1574, 1576,
 1578, 1580, 1582, 1584, 1586, 1588, 1590, 1592, 1594, 1596, 1598, 1600, 1602, 1604, 1606, 1608, 1610,
 1612, 1614, 1616, 1618, 1620, 1622, 1624, 1626, 1628, 1630, 1632, 1634, 1636, 1638, 1640, 1642, 1644,
 1646, 1648, 1650, 1652, 1654, 1656, 1658, 1660, 1662, 1664, 1666, 1668, 1670, 1672, 1674, 1676, 1678,
 1680, 1682, 1684, 1686, 1688, 1690, 1692, 1694, 1696, 1698, 1700, 1702, 1704, 1706, 1708, 1710, 1712,
 1714, 1716, 1718, 1720, 1722, 1724, 1726, 1728, 1730, 1732, 1734, 1736, 1738, 1740, 1742, 1744, 1746,
 1748, 1750, 1752, 1754, 1756, 1758, 1760, 1762, 1764, 1766, 1768, 1770, 1772, 1774, 1776, 1778, 1780,
 1782, 1784, 1786, 1788, 1790, 1792, 1794, 1796, 1798, 1800, 1802, 1804, 1806, 1808, 1810, 1812, 1814,
 1816, 1818, 1820, 1822, 1824, 1826, 1828, 1830, 1832, 1834, 1836, 1838, 1840, 1842, 1844, 1846, 1848,
 1850, 1852, 1854, 1856, 1858, 1860, 1862, 1864, 1866, 1868, 1870, 1872, 1874, 1876, 1878, 1880, 1882,
 1884, 1886, 1888, 1890, 1892, 1894, 1896, 1898, 1900, 1902, 1904, 1906, 1908, 1910, 1912, 1914, 1916,
 1918, 1920, 1922, 1924, 1926, 1928, 1930, 1932, 1934, 1936, 1938, 1940, 1942, 1944, 1946, 1948, 1950,
 1952, 1954, 1956, 1958, 1960, 1962, 1964, 1966, 1968, 1970, 1972, 1974, 1976, 1978, 1980, 1982, 1984,
 1986, 1988, 1990, 1992, 1994, 1996, 1998, 2000, 2002, 2004, 2006, 2008, 2010, 2012, 2014, 2016, 2018,
 2020, 2022, 2024, 2026, 2028, 2030, 2032, 2034, 2036, 2038, 2040, 2042, 2044, 2046, 2048, 2050, 2052,
 2054, 2056, 2058, 2060, 2062, 2064, 2066, 2068, 2070, 2072, 2074, 2076, 2078, 2080, 2082, 2084, 2086,

10

20

30

40

(販売)

2088, 2090, 2092, 2094, 2096, 2098, 2100, 2102, 2104, 2106, 2108, 2110, 2112, 2114, 2116, 2118, 2120,
 2122, 2124, 2126, 2128, 2130, 2132, 2134, 2136, 2138, 2140, 2142, 2144, 2146, 2148, 2150, 2152, 2154,
 2156, 2158, 2160, 2162, 2164, 2166, 2168, 2170, 2172, 2174, 2176, 2178, 2180, 2182, 2184, 2186, 2188,
 2190, 2192, 2194, 2196, 2198, 2200, 2202, 2204, 2206, 2208, 2210, 2212, 2214, 2216, 2218, 2220, 2222,
 2224, 2226, 2228, 2230, 2232, 2234, 2236, 2238, 2240, 2242, 2244, 2246, 2248, 2250, 2252, 2254, 2256,
 2258, 2260, 2262, 2264, 2266, 2268, 2270, 2272, 2274, 2276, 2278, 2280, 2282, 2284, 2286, 2288, 2290,
 2292, 2294, 2296, 2298, 2300, 2302, 2304, 2306, 2308, 2310, 2312, 2314, 2316, 2318, 2320, 2322, 2324,
 2326, 2328, 2330, 2332, 2334, 2336, 2338, 2340, 2342, 2344, 2346, 2348, 2350, 2352, 2354, 2356, 2358,
 2360, 2362, 2364, 2366, 2368, 2370, 2372, 2374, 2376, 2378, 2380, 2382, 2384, 2386, 2388, 2390, 2392,
 2394, 2396, 2398, 2400, 2402, 2404, 2406, 2408, 2410, 2412, 2414, 2416, 2418, 2420, 2422, 2424, 2426,
 2428, 2430, 2432, 2434, 2436, 2438, 2440, 2442, 2444, 2446, 2448, 2450, 2452, 2454, 2456, 2458, 2460,
 2462, 2464, 2466, 2468, 2470, 2472, 2474, 2476, 2478, 2480, 2482, 2484, 2486, 2488, 2490, 2492, 2494,
 2496, 2498, 2500, 2502, 2504, 2506, 2508, 2510, 2512, 2514, 2516, 2518, 2520, 2522, 2524, 2526, 2528,
 2530, 2532, 2534, 2536, 2538, 2540, 2542, 2544, 2546, 2548, 2550, 2552, 2554, 2556, 2558, 2560, 2562,
 2564, 2566, 2568, 2570, 2572, 2574, 2576, 2578, 2580, 2582, 2584, 2586, 2588, 2590, 2592, 2594, 2596,
 2598, 2600, 2602, 2604, 2606, 2608, 2610, 2612, 2614, 2616, 2618, 2620, 2622, 2624, 2626, 2628, 2630,
 2632, 2634, 2636, 2638, 2640, 2642, 2644, 2646, 2648, 2650, 2652, 2654, 2656, 2658, 2660, 2662, 2664,
 2666, 2668, 2670, 2672, 2674, 2676, 2678, 2680, 2682, 2684, 2686, 2688, 2690, 2692, 2694, 2696, 2698,
 2700, 2702, 2704, 2706, 2708, 2710, 2712, 2714, 2716, 2718, 2720, 2722, 2724, 2726, 2728, 2730, 2732,
 2734, 2736, 2738, 2740, 2742, 2744, 2746, 2748, 2750, 2752, 2754, 2756, 2758, 2760, 2762, 2764, 2766,
 2768, 2770, 2772, 2774, 2776, 2778, 2780, 2782, 2784, 2786, 2788, 2790, 2792, 2794, 2796, 2798, 2800,
 2802, 2804, 2806, 2808, 2810, 2812, 2814, 2816, 2818, 2820, 2822, 2824, 2826, 2828, 2830, 2832, 2834,
 2836, 2838, 2840, 2842, 2844, 2846, 2848, 2850, 2852, 2854, 2856, 2858, 2860, 2862, 2864, 2866, 2868,
 2870, 2872, 2874, 2876, 2878, 2880, 2882, 2884, 2886, 2888, 2890, 2892, 2894, 2896, 2898, 2900, 2902,
 2904, 2906, 2908, 2910, 2912, 2914, 2916, 2918, 2920, 2922, 2924, 2926, 2928, 2930, 2932, 2934, 2936,
 2938, 2940, 2942, 2944, 2946, 2948, 2950, 2952, 2954, 2956, 2958, 2960, 2962, 2964, 2966, 2968, 2970,
 2972, 2974, 2976, 2978, 2980, 2982, 2984, 2986, 2988, 2990, 2992, 2994, 2996, 2998, 3000, 3002, 3004,
 3006, 3008, 3010, 3012, 3014, 3016, 3018 および 3020

10

20

30

40

50

【 0 0 1 7 】

この組成物が、WO 99 / 2 8 2 7 3 に開示されるタンパク質を含む場合、好ましくはこのタンパク質は、WO 97 / 2 8 2 7 3 の図 4 または図 1 3 に開示されるタンパク質である。

【 0 0 1 8 】

この組成物が、WO 99 / 2 9 4 1 2 に開示されるタンパク質を含む場合、好ましくはこのタンパク質は、WO 96 / 2 9 4 1 2 に開示される配列番号 1 ~ 8 からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む（またはこれらの配列番号の 1 つ以上の免疫原性フラグメントを含むタンパク質、またはこれらの配列番号のいずれか 1 つに対する配列同一性（好ま

しくは、50%を超える（例えば、60%、70%、80%、90%、95%、99%以上））を有する配列を含むタンパク質）。

【0019】

この組成物が、WO99/03413に開示されるタンパク質を含む場合、好ましくはこのタンパク質は、WO95/03413に開示される配列番号1～23からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む（またはこれらの配列番号の1つ以上の免疫原性フラグメントを含むタンパク質、またはこれらの配列番号のいずれか1つに対する配列同一性（好ましくは、50%を超える（例えば、60%、70%、80%、90%、95%、99%以上））を有する配列を含むタンパク質）。

【0020】

この組成物が、WO99/31132に開示されるタンパク質を含む場合、好ましくはこのタンパク質は、WO99/31132に開示される配列番号2からなるアミノ酸配列を含む（または配列番号2の免疫原性フラグメントを含むタンパク質、または配列番号2に対する配列同一性（好ましくは、50%を超える（例えば、60%、70%、80%、90%、95%、99%以上））を有する配列を含むタンパク質）。

【0021】

この組成物が、WO99/58683に開示されるタンパク質を含む場合、好ましくはこのタンパク質は、WO99/58683に開示される配列番号2または配列番号4からなるアミノ酸配列を含む（もしくは配列番号2または配列番号4の免疫原性フラグメントを含むタンパク質、もしくは配列番号2または配列番号4に対する配列同一性（好ましくは、50%を超える（例えば、60%、70%、80%、90%、95%、99%以上））を有する配列を含むタンパク質）。

【0022】

この組成物が、WO99/55873に開示されるタンパク質を含む場合、好ましくはこのタンパク質は、WO99/55873に開示される配列番号2または配列番号4からなるアミノ酸配列を含む（もしくは配列番号2または配列番号4の免疫原性フラグメントを含むタンパク質、もしくは配列番号2配列番号4に対する配列同一性（好ましくは、50%を超える（例えば、60%、70%、80%、90%、95%、99%以上））を有する配列を含むタンパク質）。

【0023】

OpaおよびPorAの詳細は、Wierertzら[Infect. Immun. (1996) 61:298-304]に見出され得る。PilCは、Nassifら[PNAS USA (1994) 91:3769-73]に開示されている。Omp85は、Manningら[Microb. Pathog (1998) 25:11-21]に開示されている。TbpAおよびTbpBは、Ala'Aldeen & Borriello[Vaccine (1996) 14:49-53]に開示されており、Legrainら[Protein Expr Purif (1995) 6:570-578]にもまた開示されている。

【0024】

成分(b)にとって好ましいタンパク質は以下のようなものである：

- ・WO99/57280の配列番号3069～3074および3207～3241に代表されるタンパク質「919」（その中の図23および実施例15もまた参照のこと）；
- ・WO99/57280の配列番号869～874および3149～3178に代表されるタンパク質「235」（その中の図20および実施例12もまた参照のこと）；
- ・WO99/57280の配列番号3045～3056および3185～3206に代表されるタンパク質「519」（その中の図22および実施例14もまた参照のこと）；
- ・WO99/57280の配列番号793～804および3115～3148に代表されるタンパク質「225」（その中の図19および実施例11もまた参照のこと）；
- ・WO99/36544の実施例1（配列番号1～6）に代表されるタンパク質「ORF 40」（WO00/66741の図1もまた参照のこと；WO99/31132およびW

10

20

30

40

50

０９９／５８６８３もまた参照のこと）；

・ＷＯ９９／５７２８０の実施例９に代表されるタンパク質「２８７」（その中の配列番号１１９９～１２０４、３１０３～３１０８、および３１７９～３１８４を参照のこと）；

・ＷＯ９９／２４５７８の実施例７７（配列番号６４７～６５４）に代表されるタンパク質「ＯＲＦ１」（ＷＯ９９／５５８７３および登録番号ＡＪ２４２５３５もまた参照のこと）；

・ＷＯ９９／２４５７８の実施例２６（配列番号２１５～２２６）に代表されるタンパク質「ＯＲＦ４」（ＷＯ００／６６７４１の図２もまた参照のこと）；

・ＷＯ９９／２４５７８の実施例５５（配列番号４５７～４６６）に代表されるタンパク質「ＯＲＦ４６」（ＷＯ００／６６７４１の図１２もまた参照のこと）。

10

【００２５】

この組成物の成分（ｂ）は、好ましくはNmBタンパク質である。成分（ｂ）が、成分（ａ）のOMVが由来するNmB株とは異なる株由来のタンパク質を含むことが好ましい（すなわち、成分（ａ）におけるOMVが、好ましくは異なるNmB株由来の免疫原性成分（ｂ）により補充される）。

【００２６】

この成分の１つ以上（またはそれらの全て）が、 $Al(OH)_3$ に吸着され得る。

例えば、本発明は以下を提供する。

（項目１） （ａ）N. meningitidis 血清型B外膜調製物、および（ｂ）以下の１つ以上から選択される免疫原性成分を含む、組成物；

20

・ＷＯ９９／５７２８０に開示されるタンパク質、またはその免疫原性フラグメント；

・ＷＯ９９／３６５４４に開示されるタンパク質、またはその免疫原性フラグメント；

・ＷＯ９９／２４５７８に開示されるタンパク質、またはその免疫原性フラグメント；

・ＷＯ００／６６７９１に開示されるタンパク質、またはその免疫原性フラグメント；

・Tettelinら[Science(2000)287:1809-1815]に開示されるタンパク質、またはその免疫原性フラグメント；

・ＷＯ９７／２８２７３に開示されるタンパク質、またはその免疫原性フラグメント；

・ＷＯ９６／２９４１２に開示されるタンパク質、またはその免疫原性フラグメント；

・ＷＯ９５／０３４１３に開示されるタンパク質、またはその免疫原性フラグメント；

30

・ＷＯ９９／３１１３２に開示されるタンパク質、またはその免疫原性フラグメント；

・ＷＯ９９／５８６８３に開示されるタンパク質、またはその免疫原性フラグメント；

・ＷＯ９９／５５８７３に開示されるタンパク質、またはその免疫原性フラグメント；

・Neisseria meningitidis タンパク質PorA、TbpA、TbpB、PilC、OpA、Omp85。

（項目２） 項目１に記載の組成物であって、前記成分（ｂ）がNmBタンパク質である、組成物。

（項目３） 項目２に記載の組成物であって、前記NmBタンパク質が、タンパク質９１９、タンパク質２３５、タンパク質５１９、タンパク質２２５、タンパク質ORF40、タンパク質２８７、ORF1、ORF4、またはORF46である、組成物。

40

（項目４） 項目１～３のいずれかに記載の組成物であって、前記成分（ｂ）が、前記成分（ａ）が由来するNmB株とは異なる株に由来するタンパク質を含む、組成物。

（項目５） 項目１～４のいずれかに記載の組成物であって、前記成分の１つ以上が $Al(OH)_3$ に吸着される、組成物。

（項目６） 項目１～５のいずれかに記載の組成物であって、前記成分（ａ）がOMVを含む、組成物。

（項目７） 項目６に記載の組成物であって、前記OMVが、NmB由来のデオキシコレート抽出物である、組成物。

（項目８） 項目１～７のいずれかに記載の組成物であって、前記成分（ａ）が $Al(OH)_3$ に吸着される、組成物。

50

(項目9) 項目1～8のいずれかに記載の組成物であって、該組成物が、以下の成分の1つ以上をさらに含む、組成物：

- ・ *Neisseria meningitidis* 血清型Aに対する防御抗原；
- ・ *Neisseria meningitidis* 血清型Cに対する防御抗原；
- ・ *Neisseria meningitidis* 血清型Yに対する防御抗原；
- ・ *Neisseria meningitidis* 血清型Wに対する防御抗原；
- ・ *Haemophilus influenzae* に対する防御抗原；
- ・ *pneumococcus* に対する防御抗原；
- ・ ジフテリアに対する防御抗原；
- ・ 破傷風に対する防御抗原；
- ・ 百日咳に対する防御抗原；
- ・ *Helicobacter pylori* に対する防御抗原；
- ・ ポリオに対する防御抗原；および/または
- ・ B型肝炎ウイルスに対する防御抗原。

10

(項目10) 前記組成物がワクチンである、項目1～9のいずれかに記載の組成物。

(項目11) 医薬品として使用されるための、項目1～10のいずれかに記載の組成物。

(項目12) 以下の(i)、(ii)および/または(iii)の製造における項目1～11のいずれかに記載の組成物の使用。(i) *Neisseria* 細菌に起因する感染を処置または防止するための医薬品；(ii) *Neisseria* 細菌の存在または *Neisseria* 細菌に対して惹起された抗体の存在を検出するための診断試薬；(iii) *Neisseria* 細菌に対する抗体を惹起し得る試薬。

20

(項目13) 患者の処置方法であって、項目1～10のいずれか1項に記載の組成物の治療有効量を患者に投与する工程を包含する、方法。

(項目14) 以下の1つ以上から選択される免疫原性成分を含む、細菌外膜調製物：

- ・ WO99/57280に開示されるタンパク質、またはその免疫原性フラグメント；
- ・ WO99/36544に開示されるタンパク質、またはその免疫原性フラグメント；
- ・ WO99/24578に開示されるタンパク質、またはその免疫原性フラグメント；
- ・ WO00/66791に開示されるタンパク質、またはその免疫原性フラグメント；
- ・ Tettelinら[*Science*(2000)287:1809-1815]に開示されるタンパク質、またはその免疫原性フラグメント；
- ・ WO97/28273に開示されるタンパク質、またはその免疫原性フラグメント；
- ・ WO96/29412に開示されるタンパク質、またはその免疫原性フラグメント；
- ・ WO95/03413に開示されるタンパク質、またはその免疫原性フラグメント；
- ・ WO99/31132に開示されるタンパク質、またはその免疫原性フラグメント；
- ・ WO99/58683に開示されるタンパク質、またはその免疫原性フラグメント；
- ・ WO99/55873に開示されるタンパク質、またはその免疫原性フラグメント；ならびに/あるいは
- ・ *Neisseria meningitidis* タンパク質PorA、TbpA、TbpB、PilC、OpA、Omp85。

30

40

【発明を実施するための形態】

【0027】

(外膜調製物の成分)

本発明の組成物は、NmB外膜調製物(成分(a))を含む。これは、膜小胞(OMV)の形態が好ましい。

【0028】

NmB由来のOMVの調製物は、当該分野で周知である。適切な調製物を獲得するための方法は、例えば以下に開示されている：Claassenら[*Vaccine*(199

50

6) 14: 1001 - 1008]; Cartwrightら [Vaccine (1999) 17: 2612 - 2619]; Peetersら [Vaccine (1996) 14: 1009 - 1015]; Fuら [Biotechnology NY (1995) 12: 170 - 74]; Davisら [J. Immunol. Meth. (1990) 134: 215 - 225]; Saundersら [Infect. Immun. (1999) 67: 113 - 119]; Draabickら [Vaccine (2000) 18: 160 - 172]; Morenoら [Infect. Immun. (1985) 47: 527 - 533]; Milagresら [Infect. Immun. (1994) 62: 4419 - 4424]; Naessら [Infect. Immun. (1998) 66: 959 - 965]; Rosenqvistら [Dev. Biol. Stand. (1998) 92: 323 - 333]; Hanebergら [Infect. Immun. (1998) 66: 1334 - 41]; Andersenら [Vaccine (1997) 15: 1225 - 34]; Bjuneら [Lancet (1991) 338: 1093 - 96] など。

10

【0029】

OMVは、好ましくはNmBからのデオキシコレート抽出物である（すなわち、NmBからデオキシコレート抽出によって獲得される）。好ましい抽出プロトコルは、Fredriksenら [Production, characterization and control of MenB - vaccine "Folkehelsa": an outer membrane vesicle vaccine against group B meningococcal disease (1991) NIPH Ann. 14 (2): 67 - 80] に記載されるプロトコルである。

20

【0030】

OMVを抽出するための好ましい株は、N. meningitidisの44/76株 (B: 15: P1.7, 16: P5.5: L3, 7, 9) である。

【0031】

OMV成分のさらなる詳細は、例えば、Bjuneら [Lancet (1991) 338 (8775): 1093 - 96]、またはFredriksenら [Characterization of high molecular weight component in MenB - vaccine 'Folkehelsa', an outer membrane vesicle vaccine against group B meningococcal disease. Pathobiology and immunobiology of Neisseriaceaeの818 - 824頁 (Conde - Glezら編) ISBN 968 - 6502 - 13 - 0]に見出される。

30

【0032】

OMV成分は、水酸化アルミニウムアジュバントに吸着され得る。好ましいタンパク質：アジュバントの比は、1: 67 (wt/wt) である。

【0033】

ヒトに対するワクチンの代表的な用量は、25 µgのタンパク質、2 µgのLPS、および1.67 mgのAl(OH)₃を含み、そして0.5 mlの容量で三角筋に注射され得る。

40

【0034】

OMV成分（例えば、デオキシコレート抽出によって獲得される成分）は、特定の成分を除去するために処理され得る。例えば、発熱物質または毒素成分が除去され得る（例えば、LPS）。

【0035】

OMV成分は、Fredriksenら [Pathobiology and immunobiology of Neisseriaceaeの818 - 824頁]に記載される80 kDaの抗原性成分を保持することが好ましい。

【0036】

より好ましくは、OMV成分は、以下のアミノ酸配列の1つ以上を含むタンパク質：配

50

列番号 3、配列番号 5、配列番号 7、配列番号 9、配列番号 11、配列番号 13 [もしくは (i) 配列番号 3、配列番号 5、配列番号 7、配列番号 9、配列番号 11、または配列番号 13 と同一性の配列を有するタンパク質 - 特定の配列番号に基づき、配列同一性の程度は、好ましくは 50% を超える (例えば、60%、70%、80%、90%、95%、99% 以上) (変異体および対立遺伝子改変体が挙げられる)、もしくは (ii) 配列番号 1、配列番号 3、配列番号 5、配列番号 7、配列番号 9、配列番号 11、または配列番号 13 の免疫原性フラグメントを含むタンパク質 - このフラグメントは、この配列由来の少なくとも n 個の保存性アミノ酸を含み、そして特定の配列に基づき、 n は 7 以上 (例えば、8、10、12、14、16、18、20 以上) を保持することが好ましい。

【0037】

10

(成分 (a) と (b) の配合)

成分 (a) と (b) は、単純に成分 (a) と外膜調製物を混合することにより (例えば、ORF 4 とノルウェー OMV を混合することにより) 配合され得る。

【0038】

あるいは、それらは、外膜中で成分 (a) を生成 (好ましくは、過剰生成) するよう細菌を操作することにより配合され得る - このような組み換え細菌由来の外膜調製物は、成分 (a) と (b) の両方を含む。

【0039】

この方法における操作のために適切な細菌として、*Neisseria meningitidis* (任意の血清型または株)、*Neisseria lactamica*、*Neisseria cinerea* または任意の他の非典型的な *Neisseria* が挙げられる。他のグラム陰性細菌 (例えば、*E. coli*、*Salmonella*、*Shigella*、*Bordetella*、*Yersinia*、*Helicobacter* など) もまた、用いられ得る。形質転換方法は、当該分野で周知である。

20

【0040】

(多価ワクチン)

必要に応じて、本発明の組成物はまた、以下の成分の 1 つ以上を含み得る：

- ・ *Neisseria meningitidis* 血清型 A に対する防御抗原；
- ・ *Neisseria meningitidis* 血清型 C に対する防御抗原；
- ・ *Neisseria meningitidis* 血清型 Y に対する防御抗原；
- ・ *Neisseria meningitidis* 血清型 W に対する防御抗原；
- ・ *Haemophilus influenzae* に対する防御抗原；
- ・ *pneumococcus* に対する防御抗原；
- ・ ジフテリアに対する防御抗原；
- ・ 破傷風に対する防御抗原；
- ・ 百日咳に対する防御抗原；
- ・ *Helicobacter pylori* に対する防御抗原；
- ・ ポリオに対する防御抗原；および / または
- ・ B 型肝炎ウイルスに対する防御抗原。

30

【0041】

40

これらの任意の成分の好ましい例は、以下のようなものである：

- ・ *Neisseria meningitidis* 血清型 A に対する多糖類抗原；
- ・ *Neisseria meningitidis* 血清型 C に対する多糖類抗原 (例えば、Constantino ら (1992) *Vaccine* 10: 691-698)；
- ・ *Neisseria meningitidis* 血清型 Y に対する多糖類抗原；
- ・ *Neisseria meningitidis* 血清型 W に対する多糖類抗原；
- ・ *Haemophilus influenzae* に対する多糖類抗原；
- ・ *pneumococcus* に対する多糖類抗原；
- ・ ジフテリアトキソイド (例えば、CRM 197 変異体 [例えば、Del Guidice ら (1998) *Molecular Aspects of Medicine* 19

50

： 1 - 7 0]) からなる、ジフテリアに対する防御抗原；

・破傷風トキソイド [例えば、W a s s i l a k および O r e n s t e i n、V a c c i n e s の第 4 章 (P l o t k i n および M o r t i m e r 編)、1 9 8 8] からなる、破傷風に対する防御抗原；

・百日咳ホロトキシン (p e r t u s s i s h o l o t o x i n) (P T) および糸状血球凝集素 (f i l a m e n t o u s h a e m a g g l u t i n i n) (F H A) を含む；必要に応じてパータクチン (p e r t a c t i n) および / または凝集原 2 および 3 [例えば、G u s t a f s s o n ら (1 9 9 6) N . E n g l . J . M e d . 3 3 4 : 3 4 9 - 3 5 5 ; R a p p u o l i ら (1 9 9 1) T I B T E C H 9 : 2 3 2 - 2 3 8] をさらに含む、百日咳に対する防御抗原；

・C a g A (例えば、W O 9 3 / 1 8 1 5 0)、V a c A (例えば、W O 9 3 / 1 9 1 5 0)、N A P (例えば、W O 9 9 / 5 3 3 1 0)、H o p X (例えば、W O 9 8 / 0 4 7 0 2)、H o p Y (例えば、W O 9 8 / 0 4 7 0 2)、ウレアーゼの 1 つ以上を含む、H . p y l o r i に対する防御抗原；

・H B V 表面抗原および / または H B V コア抗原からなる、B 型肝炎ウイルスに対する防御抗原。

【 0 0 4 2 】

組成物が、ジフテリアに対する抗原を含む場合、破傷風およびポリオに対する抗原を含むこともまた好ましい。組成物が、破傷風に対する抗原を含む場合、ジフテリアおよびポリオに対する抗原を含むこともまた好ましい。組成物が、ポリオに対する抗原を含む場合、ジフテリアおよび破傷風に対する抗原を含むこともまた好ましい。

【 0 0 4 3 】

百日咳トキシンは、毒性タンパク質であり、そして組成物中に存在する場合、好ましくは、解毒される。解毒は、化学的手段および / または遺伝子的手段によるものであり得る。好ましい解毒化変異体は、9 K / 1 2 9 G 二重変異体 (d o u b l e m u t a n t) [例えば、R a p p u o l i (1 9 9 7) N a t u r e M e d i c i n e 3 : 3 7 4 - 3 7 6] である。

【 0 0 4 4 】

組成物が、異なる新生形態および成熟形態で存在するタンパク質を含む場合、このタンパク質の成熟形態が、好ましくは、用いられる。例えば、N s p A [W O 9 6 / 2 9 4 1 2 ; M a r t i n ら (1 9 9 7) J . E x p . M e d 1 8 5 1 1 7 3 - 1 1 8 3 もまた参照のこと] が含まれる場合、シグナルペプチドを欠くこのタンパク質の成熟形態が、好ましくは、用いられる。

【 0 0 4 5 】

組成物が、多糖類抗原を含む場合、この多糖類は、好ましくは、キャリアタンパク質に結合体化される。

【 0 0 4 6 】

(治療、予防、診断)

本発明の組成物は、好ましくはワクチンである。本発明に基づくワクチンは、予防的 (すなわち感染を防止する) であるか、または治療的 (すなわち、感染後の疾患を処置する) であるかのいずれかであり得る。

【 0 0 4 7 】

本発明はまた、医薬として (好ましくはワクチンとして) または診断試薬として使用するための、本発明の組成物を提供する。本発明はまた、以下の製造における、本発明の組成物の使用を提供する： (i) ナイセリア細菌に起因する感染の処置または予防のための医薬； (i i) ナイセリア細菌またはナイセリア細菌に対して惹起された抗体の存在を検出するための診断試薬；および / または (i i i) ナイセリア細菌に対する抗体を惹起し得る試薬。上記のナイセリア細菌は任意の種または菌株であり得る (例えば、N . g o n o r r h o e a e) が、好ましくは N . m e n i n g i t i d i s (特に、血清型 B (N m B)) であり得る。

10

20

30

40

50

【0048】

本発明はまた、治療的有効量の、本発明に従う組成物を患者に投与する工程を含む、患者の処置の方法を提供する。この方法は好ましくは免疫である。

【0049】

(プロセス)

さらなる局面によれば、本発明は、種々のプロセスを提供する。

【0050】

N.meningitidis由来のOMVの抽出工程(例えば、デオキシコレート抽出)を含む、本発明の組成物を生成するためのプロセスが提供される。

【0051】

(配列表)

この配列表における配列は以下のようなものである。

【0052】

【表1】

配列番号	詳細
1	N.meningitidis血清型Bタンパク質、80~85kDaのN末端配列
2	N.meningitidis血清型B由来の完全な遺伝子
3	配列番号2由来のコードされたタンパク質
4	配列番号3由来のシグナルペプチドタンパク質
5	配列番号3由来の成熟タンパク質
6	配列番号2と相同なN.gonorrhoeae由来の完全な遺伝子
7	配列番号6由来のコードされたタンパク質
8	配列番号7由来のシグナルペプチドタンパク質
9	配列番号7由来の成熟タンパク質
10	配列番号2と相同なN.meningitidis血清型A由来の完全な遺伝子
11	配列番号10由来のコードされたタンパク質
12	配列番号11由来のシグナルペプチドタンパク質
13	配列番号11由来の成熟タンパク質
14	nmb2996株由来のタンパク質*919

(発明を実施するための形態)

本発明を実行するために用いられ得る標準的な技術および手順(例えば、ワクチン接種目的または診断目的のために、開示された配列を利用するための)の要旨は以下の通りである。この要旨は、本発明に対する限定ではなく、むしろ使用され得るが必ずしもそうではない例を与えるものである。

【0053】

(総論)

本発明の実施は、他に示されなければ、分子生物学、微生物学、組換えDNA、および免疫学の従来技術を使用し、これらは当該分野の技術の範囲内である。このような技術は以下の文献で十分説明されている(例えば、Sambrook Molecular Cloning; A Laboratory Manual、第2版(1989); DNA Cloning、Volumes I and ii(D.N Glover編 1985); Oligonucleotide Synthesis(M.J. Gait編 1984); Nucleic Acid Hybridization(B.D. HamesおよびS.J. Higgins編 1984); Transcription and Translation(B.D. HamesおよびS.J. Higgins編 1984); Animal Cell Culture(R.I. Freshney編 1986); Immobilized Cells and Enzymes(IRL Press、1986); B. Perbal、A Practical Guide to Molecular Cloning(1984); the Methods in E

nzymology series (Academic Press, Inc.), 特に 154 巻および 155 巻; Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J. H. Miller および M. P. Calos 編 1987, Cold Spring Harbor Laboratory); Mayer および Walker, 編 (1987), Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology (Academic Press, London); Scopes, (1987) Protein Purification: Principles and Practice, 第 2 版 (Springer-Verlag, N. Y.), および Handbook of Experimental Immunology, Volumes I - IV (D. M. Weir および C. C. Blackwell 編 1986)。

10

【0054】

ヌクレオチドおよびアミノ酸についての標準的な略号が、本明細書において使用される。

【0055】

本発明に用いられるタンパク質は、種々の手段（例えば、組み換え発現、細胞培養物からの精製、化学合成など）によって、そして種々の形態（例えば、ネイティブ、融合など）で調製され得る。それらは好ましくは、実質的な純粋形態（すなわち、実質的に他の Neisseria タンパク質または宿主細胞タンパク質を含まない）で調製される。

【0056】

本発明に用いられる核酸は、種々の方法（例えば、化学合成によって、ゲノムまたは cDNA ライブラリーから、生物自体から、など）で調製され得、そして種々の形態（例えば、一本鎖、二本鎖、ベクター、プローブなど）をとり得る。用語「核酸」は、DNA および RNA、ならびにそれらのアナログ（例えば、改変された骨格を含むアナログ）、ならびにペプチド核酸 (PNA) などを含む。

20

【0057】

（定義）

X を含む組成物は、組成物中の X + Y の合計のうちの少なくとも 85 重量 % が X であるとき、Y を「実質的に含まない」。好ましくは、X は、組成物中の X + Y の合計のうちの少なくとも約 90 重量 % を、さらに好ましくは少なくとも約 95 重量 % を、または 99 重量 % さえも構成する。

30

【0058】

用語「含む (comprising)」は「含む (including)」および「からなる」を意味する。例えば、X を「含む」組成物は、もっぱら X からなり得るか、または X + Y のような X に何かを付加したものも含み得る。

【0059】

用語「異種」とは、天然では一緒には見られない 2 つの生物学的成分をいう。この成分は、宿主細胞、遺伝子または調節領域（例えば、プロモーター）であり得る。異種成分は天然では一緒には見られないが、例えば、遺伝子に対して異種のプロモーターがその遺伝子に作動可能に連結されるときは、それらは一緒に機能し得る。別の例は、ナイセリア配列がマウス宿主細胞に対して異種である場合である。さらなる例は、天然においてみられない配置で単一タンパク質に組み立てられた、同じタンパク質または異なるタンパク質由来の 2 つのエピトープである。

40

【0060】

「複製起点」とは、発現ベクターのような、ポリヌクレオチドの複製を開始および調節するポリヌクレオチド配列である。複製起点は、細胞内でのポリヌクレオチド複製の自律性ユニットとして振る舞い、それ自体の制御下で複製し得る。複製起点は、ベクターが特定の宿主細胞において複製するために必要とされ得る。特定の複製起点を有せば、発現ベクターは、細胞内の適切なタンパク質の存在下で高いコピー数で再生され得る。起点の例は、酵母において有効な自律性複製配列；および COS - 7 細胞で有効であるウイルス T

50

抗原である。

【0061】

タンパク質間の同一性は、好ましくはMPSRCHプログラム(Oxford Molecular)において、ギャップオープンペナルティー=12およびギャップエクステンションペナルティー=1のパラメータでのアフラインギャップサーチを用いて実行されるSmith-Watermanホモロジーサーチアルゴリズムによって決定される。代表的に2つのタンパク質間の50%以上の同一性が、機能的等価の指標と考えられる。

【0062】

本明細書中で使用される場合、本明細書で核酸配列が提供される核酸分子(または領域)の「対立遺伝子改変体」は、別のもしくは第2の単離体のゲノム中の本質的に同じ遺伝子座で生じ、かつ、例えば、変異または組換えにより生ずる天然のバリエーションに起因して、類似するが、しかし同一でない核酸配列を有する核酸分子(または領域)である。コード領域の対立遺伝子改変体は、代表的には、比較される遺伝子によってコードされるタンパク質の活性と類似した活性を有するタンパク質をコードする。対立遺伝子改変体はまた、遺伝子の5'または3'非翻訳領域(例えば、調節制御領域)での変化を含み得る(例えば、米国特許第5,753,235号を参照のこと)。

【0063】

(発現系)

ナイセリアヌクレオチド配列は、種々の異なる発現系;例えば、哺乳動物細胞、バキュロウイルス、植物、細菌、および酵母について使用される発現系において発現され得る。

【0064】

(i. 哺乳動物系)

哺乳動物発現系は当該分野において公知である。哺乳動物プロモーターは、哺乳動物RNAポリメラーゼを結合し得、コード配列(例えば、構造遺伝子)のmRNAへの下流(3')転写を開始し得る任意のDNA配列である。プロモーターは、転写開始領域(これはコード配列の5'末端の近位に通常位置する)およびTATAボックス(転写開始部位の25~30塩基対(bp)上流に通常位置する)を有する。TATAボックスは、RNAポリメラーゼIIにその正しい部位においてRNA合成を開始させるよう指示すると考えられている。哺乳動物プロモーターはまた、TATAボックスの100~200bp上流以内に通常位置する上流プロモーターエレメントを含む。上流プロモーターエレメントは、転写が開始される速度を決定し、そしていずれの方向にも作用し得る(Sambrookら(1989)「Expression of Cloned Genes in Mammalian Cells」、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、第2版)。

【0065】

哺乳動物ウイルス遺伝子は、しばしば高度に発現され、そして広い宿主域を有する;従って、哺乳動物ウイルス遺伝子をコードする配列は、特に有用なプロモーター配列を提供する。例として、SV40初期プロモーター、マウス乳癌ウイルスLTRプロモーター、アデノウイルス主要後期プロモーター(Ad MLP)、および単純疱疹ウイルスプロモーターが挙げられる。さらに、マウスのメタロチオネイン遺伝子のような非ウイルス性遺伝子に由来する配列もまた、有用なプロモーター配列を提供する。発現は、構成性であるかまたは調節される(誘導可能)かのいずれかであり得、プロモーターに依存して、ホルモン応答性細胞においてグルココルチコイドで誘導され得る。

【0066】

上記のプロモーターエレメントと組み合わされたエンハンサーエレメント(エンハンサー)の存在は、通常発現レベルを増大させる。エンハンサーは、同種プロモーターまたは異種プロモーターに連結されたとき、転写を100倍まで刺激し得る調節DNA配列であり、合成は、通常のRNA開始部位で始まる。エンハンサーはまた、それらが、通常方向もしくは反転(flippe d)方向のいずれかで転写開始部位より上流もしくは下流に、またはプロモーターから1000ヌクレオチドを超える距離で位置するとき、活性であ

る (Maniatis ら (1987) Science 236:1237; Alberts ら (1989) Molecular Biology of the Cell、第2版)。ウイルス由来のエンハンサーエレメントは、それらは通常、より広い宿主域を有するため、特に有用であり得る。例としては、SV40 初期遺伝子エンハンサー (Dijkema ら (1985) EMBO J. 4:761) およびラウス肉腫ウイルスの長末端反復 (LTR) に由来するエンハンサー/プロモーター (Gorman ら (1982b) Proc. Natl. Acad. Sci. 79:6777) およびヒトサイトメガロウイルスに由来するエンハンサー/プロモーター (Boshart ら (1985) Cell 41:521) が挙げられる。さらに、いくつかのエンハンサーは調節可能であり、そしてホルモンまたは金属イオンのような誘導因子の存在下のみで活性になる (Sassone-Corsi および Borelli (1986) Trends Genet. 2:215; Maniatis ら (1987) Science 236:1237)。

【0067】

DNA 分子は、哺乳動物細胞において細胞内で発現され得る。プロモーター配列は、DNA 分子と直接連結され得、この場合、組換えタンパク質の N 末端における最初のアミノ酸は常に、ATG 開始コドンによりコードされるメチオニンである。所望される場合、N 末端は、臭化シアンとのインビトロでのインキュベーションによりタンパク質から切断され得る。

【0068】

あるいは、外来タンパク質もまた、哺乳動物細胞において外来タンパク質の分泌を提供するリーダー配列フラグメントを含む融合タンパク質をコードするキメラ DNA 分子を複製することにより、細胞から増殖培地中へ分泌され得る。好ましくは、リーダーフラグメントと外来遺伝子との間にコードされる、インビボまたはインビトロのいずれかにおいて切断され得るプロセッシング部位が存在する。リーダー配列フラグメントは通常、細胞からのタンパク質の分泌を指示する、疎水性アミノ酸を含むシグナルペプチドをコードする。アデノウイルス 3 部構成リーダーは、哺乳動物細胞における外来タンパク質の分泌を提供するリーダー配列の例である。

【0069】

通常、哺乳動物細胞によって認識される転写終結配列およびポリアデニル化配列は、翻訳終止コドンの 3' 側に存在する調節領域であり、従って、プロモーターエレメントと共に、コード配列に隣接する。成熟 mRNA の 3' 末端は、部位特異的転写後切断およびポリアデニル化により形成される (Birnstiel ら、(1985) Cell 41:349; Proudfoot および Whitelaw (1988) 「Termination and 3' end processing of eukaryotic RNA」 Transcription and splicing (B. D. Hames および D. M. Glover 編); Proudfoot (1989) Trends Biochem. Sci. 14:105)。これらの配列は、mRNA の転写を導き、その mRNA は、その DNA にコードされるポリペプチドに翻訳され得る。転写ターミネーター/ポリアデニル化シグナルの例としては、SV40 由来のものが挙げられる (Sambrook ら (1989) 「Expression of cloned genes in cultured mammalian cells」 Molecular Cloning: A Laboratory Manual)。

【0070】

通常、プロモーター、ポリアデニル化シグナル、および転写終結配列を含む上記の構成要素は、発現構築物内に共に導入される。エンハンサー、機能的なスプライス供与部位およびスプライス受容部位を有するイントロン、ならびにリーダー配列もまた、所望される場合、発現構築物内に含まれ得る。発現構築物はしばしば、哺乳動物細胞または細菌のような宿主内で安定的に維持され得る染色体外エレメント (例えば、プラスミド) のような、レプリコン内で維持される。哺乳動物の複製系としては、複製にトランス作用性の因子を必要とする、動物ウイルス由来の複製系が挙げられる。例えば、SV40 (Gluzm

10

20

30

40

50

am (1 9 8 1) C e l l 2 3 : 1 7 5)、あるいはポリオーマウイルスのようなパポウイルスの複製系を含むプラスミドは、適切なウイルスのT抗原の存在下で極めて高いコピー数で複製する。哺乳動物レプリコンの別の例としては、ウシバビローマウイルスおよびエプスタイン - バーウイルス由来のレプリコンが挙げられる。さらに、このレプリコンは、二つの複製系を有し得、従って、例えば、発現用に哺乳動物細胞内で、ならびにクローニングおよび増幅用に原核生物の宿主内で、そのレプリコンが維持されることが可能である。このような哺乳動物 - 細菌シャトルベクターの例としては、pMT2 (K a u f m a n ら (1 9 8 9) M o l . C e l l . B i o l . 9 : 9 4 6) および p H E B O (S h i m i z u ら (1 9 8 6) M o l . C e l l . B i o l . 6 : 1 0 7 4) が挙げられる。

10

【 0 0 7 1 】

使用される形質転換の手順は、形質転換される宿主に依存する。異種のポリヌクレオチドの哺乳動物細胞への導入方法は、当該分野で公知であり、その方法としては、デキストラン媒介トランスフェクション、リン酸カルシウム沈殿、ポリブレン媒介トランスフェクション、プロトプラスト融合、エレクトロポレーション、リボソーム内へのポリヌクレオチドの封入、およびDNAの核内への直接微量注入が挙げられる。

【 0 0 7 2 】

発現用宿主として利用可能な哺乳動物細胞株は、当該分野で公知であり、そのような細胞株としては、チャイニーズハムスター卵巣 (C H O) 細胞、HeLa細胞、新生仔ハムスター腎臓 (B H K) 細胞、サル腎臓細胞 (C O S)、ヒト肝細胞癌細胞 (例えば、Hep G 2) および多くの他の細胞株を含むが、これらに限定されない、American Type Culture Collection (A T C C) から入手可能な多くの不死化細胞株が挙げられる。

20

【 0 0 7 3 】

(i i バキュロウイルス系)

タンパク質をコードするポリヌクレオチドはまた、適切な昆虫発現ベクター内に挿入され得、そしてそのベクター内で、制御エレメントに作動可能に連結される。ベクターの構築には、当該分野で公知の技術を使用する。一般に、その発現系の構成要素として、以下のものが挙げられる：バキュロウイルスゲノムのフラグメント、および発現させる異種遺伝子の挿入用の簡便な制限部位の両方を含む転移ベクター (通常は細菌プラスミド) ; 転移ベクター内のバキュロウイルスに特異的なフラグメントに相溶性のある配列を有する野生型バキュロウイルス (これは、バキュロウイルスゲノム内への異種遺伝子の相同組換えを可能にする) ; ならびに適切な昆虫宿主細胞および増殖培地。

30

【 0 0 7 4 】

転移ベクターにタンパク質をコードするDNA配列を挿入した後、そのベクターおよび野生型ウイルスゲノムを、昆虫宿主細胞にトランスフェクトし、そこでこのベクターとウイルスゲノムとを組換えさせる。パッケージングされた組換えウイルスは発現され、そして組換えプラークが同定されそして精製される。バキュロウイルス / 昆虫細胞発現系の材料および方法は、特に、Invitrogen、San Diego CAからキット形態 (「MaxBac」キット) で市販される。これらの技術は、一般に当業者に公知であり、そしてSummersおよびSmith、Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No. 1555 (1987) (以下、 「SummersおよびSmith」) に十分に記載されている。

40

【 0 0 7 5 】

タンパク質をコードするDNA配列をバキュロウイルスゲノムに挿入するのに先立って、プロモーター、リーダー (所望される場合は)、目的のコード配列、および転写終結配列を含む上記の構成要素を、通常、中間置換 (i n t e r m e d i a t e t r a n s p l a c e m e n t) 構築物 (転移ベクター) に構築する。この構築物は、単一の遺伝子および作動可能に連結された調節エレメント ; 作動可能に連結された調節エレメントのセットを各々が所有する複数の遺伝子 ; あるいは調節エレメントの同じセットにより調節され

50

る複数の遺伝子を含み得る。中間置換構築物は、しばしば、細菌のような宿主内で安定的に維持し得る染色体外エレメント（例えば、プラスミド）のような、レプリコン内で維持される。レプリコンは、複製系を有しており、従って、それはクローニングおよび増幅用の適切な宿主内で維持され得る。

【0076】

現在、外来遺伝子のAcNPVへの導入のために最も一般に使用される転移ベクターは、pAc373である。当業者に公知の多くの他のベクターもまた設計されている。これらのものとして、例えば、pVL985（これは、ポリヘドリンの開始コドン（ATG）からATTに変化させ、そしてそのATTから32塩基対下流に、BamHIクローニング部位を導入する；LuckowおよびSummers、Virology（1989）17：31を参照のこと）が挙げられる。

10

【0077】

そのプラスミドはまた通常、ポリヘドリンポリアデニル化シグナル（Millerら（1988）Ann. Rev. Microbiol.、42：177）、および原核生物のアンピシリン耐性（amp）遺伝子、ならびに大腸菌においての選択および増殖のための複製起点を含む。

【0078】

バキュロウイルス転移ベクターは通常、バキュロウイルスプロモーターを含む。バキュロウイルスプロモーターは、バキュロウイルスRNAポリメラーゼに結合し得、そしてコード配列（例えば、構造遺伝子）のmRNAへの下流（5'から3'）方向の転写を開始し得る、任意のDNA配列である。プロモーターは、通常、コード配列の5'末端に近接して存在する転写開始領域を有している。この転写開始領域は通常、RNAポリメラーゼ結合部位および転写開始部位を含む。バキュロウイルス転移ベクターは、またエンハンサーと呼ばれる第二のドメインを有し得、これは存在する場合は、通常、構造遺伝子に対して遠位にある。発現は調節されるか、または構成的であるかのいずれかであり得る。

20

【0079】

ウイルスの感染周期の後期で大量に転写される構造遺伝子は、特に有用なプロモーター配列を提供する。例としては、ウイルス多角体タンパク質をコードする遺伝子（Friesenら、（1986）「The Regulation of Baculovirus Gene Expression」、The Molecular Biology of Baculoviruses（Walter Doerfler編）；EPO公開番号127839および155476；ならびにp10タンパク質をコードする遺伝子（Vlaskら、（1988）、J. Gen. Virol. 69：765）由来の配列が挙げられる。

30

【0080】

適切なシグナル配列をコードするDNAは、分泌昆虫タンパク質または分泌バキュロウイルスタンパク質の遺伝子（例えば、バキュロウイルスポリヘドリン遺伝子（Carbonellら（1988）Gene、73：409））から誘導され得る。あるいは、哺乳動物細胞の翻訳後修飾（例えば、シグナルペプチド切断、タンパク質分解性切断、およびリン酸化）のシグナルは、昆虫細胞に認識されると思われ、そして分泌および核蓄積に必要なシグナルもまた、無脊椎動物細胞と脊椎動物細胞との間で保存されると思われるために、ヒト α -インターフェロン（Maedaら、（1985）、Nature 315：592）；ヒトガストリン放出ペプチド（Lebacqz-Verheydenら、（1988）、Molec. Cell. Biol. 8：3129）；ヒトIL-2（Smithら、（1985）Proc. Nat'l Acad. Sci. USA、82：8404）；マウスIL-3（Miyajimaら（1987）Gene 58：273）；およびヒトグルコセレブロシダーゼ（Martinら、（1988）DNA、7：99）をコードする遺伝子由来のリーダーのような、非昆虫起源のリーダーも、昆虫での分泌を与えるために使用され得る。

40

【0081】

50

組換えポリペプチドまたは組換えポリタンパク質は、細胞内に発現され得、または適切な調節配列と共に発現される場合、分泌され得る。非融合外来タンパク質の優れた細胞内発現には通常、ATG開始シグナルに先行する適切な翻訳開始シグナルを含む短いリーダー配列を理想的には有する異種遺伝子が必要である。所望であれば、N末端のメチオニンは、臭化シアンとのインビトロインキュベーションにより、成熟タンパク質から切断され得る。

【0082】

あるいは、天然では分泌されない組換えポリタンパク質あるいは組換えタンパク質は、昆虫において外来タンパク質の分泌を与えるリーダー配列フラグメントを含む、融合タンパク質をコードするキメラDNA分子を作製することにより、昆虫細胞から分泌され得る。リーダー配列フラグメントは通常、タンパク質の小胞体内へのトランスロケーションを指示する疎水性アミノ酸を含むシグナルペプチドをコードしている。

10

【0083】

タンパク質の発現産物前駆体をコードするDNA配列および/または遺伝子の挿入後、昆虫細胞宿主に、転移ベクターの異種DNAおよび野生型バキュロウイルスのゲノムDNAを同時形質転換（通常は、同時トランスフェクションによって）する。構築物のプロモーターおよび転写終結配列は、通常バキュロウイルスゲノムの2～5kbの区域を含む。バキュロウイルスウイルスの望ましい部位に異種DNAを導入する方法は、当該分野で公知である（SummersおよびSmith、上記；Jurá（1987）；Smithら、Mol. Cell. Biol.（1983）3：2156；ならびにLuckowおよびSummers（1989）を参照のこと）。例えば、その挿入は、相同二重交差組換え（homologous double crossover recombination）により、ポリヘドリン遺伝子のような遺伝子内へであり得る；挿入はまた、所望のバキュロウイルス遺伝子内に設計された制限酵素部位内へであり得る。Millerら、（1989）、Bioessays 4：91。発現ベクター内のポリヘドリン遺伝子の代わりにクローン化した場合、このDNA配列は、ポリヘドリン特異的配列が5'および3'の両側に隣接しており、そしてポリヘドリンプロモーターの下流に位置される。

20

【0084】

新規に形成されたバキュロウイルス発現ベクターは続いて、感染性の組換えバキュロウイルス内にパッケージされる。相同組換えは、低い頻度で起こる（約1%と約5%との間）；それゆえ、同時トランスフェクション後に産生されたウイルスの大半は、依然野生型ウイルスである。従って、組換えウイルスを同定する方法が必要となる。その発現系の利点は、組換えウイルスを区別し得る視覚的スクリーニングである。天然のウイルスにより産生されるポリヘドリンタンパク質は、ウイルス感染後の後の時期に、その感染された細胞の核内で非常に高いレベルで産生される。蓄積されたポリヘドリンタンパク質は、閉塞体を形成し、またそれは包埋された粒子を含む。これらの閉塞体は、最大15μmの大きさで、高度に屈折し、明るく輝く外見を与え、容易に光学顕微鏡下で可視化される。組換えウイルスに感染した細胞は、閉塞体を欠く。組換えウイルスと野生型ウイルスとを区別するために、トランスフェクションの上清を、当業者に公知の技術により昆虫細胞の単層にプラーク形成させる。すなわち、プラークを、光学顕微鏡下で閉塞体の存在（野生型ウイルスを示す）または非存在（組換えウイルスを示す）によりスクリーニングする。「Current Protocols in Microbiology」2巻（Ausubelら編）16.8（増補10、1990）；SummersおよびSmith、上記；Millerら（1989）。

30

40

【0085】

組換えバキュロウイルス発現ベクターは、いくつかの昆虫細胞への感染用に開発された。例えば、組換えバキュロウイルスは、特に以下に示すもののために開発された：Aedes aegypti、Autographa californica、Bombyx mori、Drosophila melanogaster、Spodoptera frugiperda、およびTrichoplusia ni（WO89/0466

50

99; Carbonellら、(1985) J. Virol. 56:153; Wright (1986) Nature 321:718; Smithら、(1983) Mol. Cell. Biol. 3:2156; および Fraserら、(1989) In Vitro Cell. Dev. Biol. 25:225を一般に参照のこと。

【0086】

細胞および細胞培養培地は、バキュロウイルスノ発現系における異種ポリペプチドの直接発現および融合発現の両方のために市販される；細胞培養技術は、一般に当業者に公知である。例えば、上記 Summers および Smith を参照のこと。

【0087】

改変した昆虫細胞をさらに、適切な栄養培地で増殖させる。この培地は、その改変した昆虫宿主内で存在するプラスミドの安定的維持を可能にする。発現産物の遺伝子が、誘導性の制御下にある場合、宿主は高密度まで増殖され得、そして発現は誘導され得る。あるいは、発現が構成的である場合、その産物は培地中に連続的に発現され、そして目的産物を取り出し、そして枯渇した栄養を補給しながら、栄養培地を連続的に循環させる必要がある。その産物は、クロマトグラフィー（例えば、HPLC、アフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーなど）；電気泳動；密度勾配遠心；溶媒抽出などのような技術により精製され得る。適切な場合、その産物をさらに精製し、必要ならば、培地中にまた分泌された、または昆虫細胞の溶解から生じたあらゆる昆虫タンパク質を実質的に除去し、宿主細胞（例えば、タンパク質、脂質および多糖類）を少なくとも実質的に含まない産物を供給する。

【0088】

タンパク質の発現を得るために、形質転換体に由来する組換え宿主細胞は、組換えタンパク質をコードする配列の発現を可能にする条件下でインキュベートされる。これらの条件は、選択された宿主細胞に依存して変動する。しかし、その条件は、当該分野で公知の条件に基づいて、当業者に容易に確かめられる。

【0089】

(iii 植物系)

当該分野で公知の多くの植物細胞培養および全植物遺伝子発現系が存在する。例示的な植物細胞遺伝子発現系としては、米国特許第5、693、506号；米国特許第5、659、122号；および米国特許第5、608、143号のような特許に記載されるものが挙げられる。植物細胞培養における遺伝子発現のさらなる例は、Zenk、Phytochemistry 30:3861-3863 (1991) に記載された。植物タンパク質のシグナルペプチドの記載は、上記の参考文献に加え、以下に示すものの中においても見出され得る；Vaulcombeら、Mol. Gen. Genet. 209:33-40 (1987)；Chandlerら、Plant Molecular Biology 3:407-418 (1984)；Rogers、J. Biol. Chem. 260:3731-3738 (1985)；Rothsteinら、Gene 55:353-356 (1987)；Whittierら、Nucleic Acids Research 15:2515-2535 (1987)；Wirsellら、Molecular Microbiology 3:3-14 (1989)；Yuら、Gene 122:247-253 (1992)。植物ホルモンジベレリン酸およびジベレリン酸により誘導される分泌酵素による植物遺伝子発現の調節の記載は、R. L. Jones および J. MacMillin、Gibberellins: Advanced Plant Physiology、Malcolm B. Wilkins 編 1984 Pitman Publishing Limited、London、21-52頁の中に見出され得る。他の代謝調節性遺伝子が記載される参考文献：Sheen、Plant Cell、2:1027-1038 (1990)；Maasら、EMBO J. 9:3447-3452 (1990)；Benkel および Hickey、Proc. Natl. Acad. Sci. 84:1337-1339 (1987)。

【0090】

代表的に、当該分野で公知の技術を使用して、所望のポリヌクレオチド配列は、植物内で作動するように設計された遺伝子調節エレメントを含む発現カセットの中に挿入される。その発現カセットは、植物宿主内での発現に適切な発現カセットの上流および下流にコンパニオン配列を有する望ましい発現ベクターの中に挿入される。そのコンパニオン配列は、プラスミドまたはウイルス起源のものであり、そしてそのベクターが、細菌のような本来のクローニング宿主から、所望の植物宿主へDNAを移動させるために必要とされる特徴をベクターに提供する。基本的な細菌/植物ベクター構築物は、好ましくは、広い宿主域の原核生物の複製起点；原核生物の選択マーカー；および、アグロバクテリウムの形質転換については、アグロバクテリウム媒介移入のためのT-DNA配列を植物染色体に提供する。異種遺伝子が容易に検出できない場合は、好ましくは、その構築物はまた、植物細胞が形質転換されたかどうかを決定するために適した選択マーカー遺伝子を有する。適切なマーカーの一般的な総説は、例えば、イネ科のメンバーについては、Wilmin kおよびDons、1993、Plant Mol. Biol. Rept r、11(2) : 165 - 185に見られる。

【0091】

植物ゲノムへの異種配列の組み込みを可能にするために適した配列もまた、推奨される。これらは、相同組換え用のためのトランスポゾン配列など、および植物ゲノム内へ異種発現カセットのランダム挿入を可能にするTi配列を含み得る。適切な原核生物選択マーカーとしては、アンピシリンまたはテトラサイクリンのような抗生物質に対する耐性が挙げられる。さらなる機能をコードしている他のDNA配列はまた、当該分野で公知であるように、そのベクターの中に存在し得る。

【0092】

本発明の核酸分子はまた、目的のタンパク質の発現用の発現カセットに含まれ得る。2つ以上も可能であるが、通常はただ一つの発現カセットが存在する。組換え発現カセットは、異種タンパク質のコード配列に加え、以下のエレメントを含む；プロモーター領域、植物の5'非翻訳配列、構造遺伝子がそれを備えているかどうか依存して、開始コドン、ならびに転写および翻訳終結配列。そのカセットの5'末端および3'末端の独特な制限酵素部位は、既存のベクター内への容易な挿入を可能にする。

【0093】

異種のコード配列は、本発明に関係する任意のタンパク質についての配列であり得る。目的のタンパク質をコードする配列は、適切な場合、そのタンパク質のプロセッシングおよびトランスロケーションを可能にするシグナルペプチドをコードし、そして通常、本発明の所望のタンパク質の膜への結合を生じ得るあらゆる配列を欠いている。たいてい、転写開始領域は、発芽中に発現およびトランスロケーションされる遺伝子についてのものであるから、トランスロケーションを与えるシグナルペプチドを使用することにより、また、目的のタンパク質のトランスロケーションを提供し得る。このようにして、目的のタンパク質は、それらが発現される細胞からトランスロケーションされ、そして効率的に回収され得る。代表的には、種子における分泌は、アリュエロン層あるいは胚盤上皮層を通過して、種子の胚乳内へと至る。タンパク質がそれが産生された細胞から分泌されることは必要とされないが、このことは組換えタンパク質の単離および精製を容易にする。

【0094】

所望の遺伝子産物の最終的な発現が、真核生物におけるものであるので、クローン化した遺伝子の任意の部分が、イントロンのような、宿主のスプライセオソーム(spl i c o s o m e)機構よりプロセッシングされて除去される配列を含むかどうかを決定することが望ましい。そのような場合、「イントロン」領域の部位特異的変異誘発は、偽イントロンコードとして遺伝的メッセージの一部を欠失することを防ぐために実施され得る。ReedおよびManiatis、Cell 41:95-105(1985)。

【0095】

ベクターは、組換えDNAを機械的に転移するためにマイクロピペットを用いて植物細胞内に直接的に微量注入され得る(Crossway、Mol. Gen. Genet、2

10

20

30

40

50

02:179-185、1985)。遺伝物質はまた、ポリエチレングリコールを用いて植物細胞内に転移され得る(Krensら、Nature、296、72-74、1982)。核酸セグメントの導入の別の方法は、小さいビーズまたは微粒子のいずれかのマトリックスの内部に、あるいは表面に核酸を有する小さな微粒子による高速バリスティック(ballistic)穿通法である(Kleinら、Nature、327、70-73、1987ならびにKnudsenおよびMuller、1991、Planta、185:330-336は、大麦胚乳の粒子の照射(bombardment)によりトランスジェニック大麦を作製することを示している)。さらに別の導入方法は、他の物体(ミニ細胞、細胞、リソソームまたは他の易融な脂肪表面体のいずれか)とのプロトプラストの融合である(Fraleyら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、79、1859-1863、1982)。

10

【0096】

ベクターはまた、エレクトロポレーションにより植物細胞内に導入され得る(Frommら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:5824、1985)。この技術において、植物プロトプラストは、遺伝子構築物を含むプラスミドの存在下でエレクトロポレートされる。高電界強度での電気衝撃により、生体膜を可逆的に透過性にし、プラスミドの導入を可能にする。エレクトロポレートされた植物プロトプラストは細胞壁を再形成し、分裂し、植物カルスを形成する。

【0097】

プロトプラストが単離され得、そして培養されて完全な再生植物を与え得る全ての植物は、本発明により形質転換され得、その結果、移入した遺伝子を含む完全な植物が回収される。実際に、全ての植物が、サトウキビ、テンサイ、ワタ、果樹および他の樹木、マメ科植物および野菜という全ての主要な種を含むがそれらに限定されない培養細胞または組織から再生され得ることが公知である。いくつかの適切な植物としては、例えば、以下の属由来の種が挙げられる: *Fragaria*、*Lotus*、*Medicago*、*Onobrychis*、*Trifolium*、*Trigonella*、*Vigna*、*Citrus*、*Linum*、*Geranium*、*Manihot*、*Daucus*、*Arabidopsis*、*Brassica*、*Raphanus*、*Sinapis*、*Atropa*、*Capsicum*、*Datura*、*Hyoscyamus*、*Lycopersion*、*Nicotiana*、*Solanum*、*Petunia*、*Digitalis*、*Majorana*、*Cichorium*、*Helianthus*、*Lactuca*、*Bromus*、*Asparagus*、*Antirrhinum*、*Hererocallis*、*Nemesia*、*Pelargonium*、*Panicum*、*Pennisetum*、*Ranunculus*、*Senecio*、*Salpiglossis*、*Cucumis*、*Browaalia*、*Glycine*、*Lolium*、*Zea*、*Triticum*、*Sorghum*、および*Datura*。

20

30

【0098】

再生のための手法は、植物の種によって変化するが、しかし一般に異種遺伝子のコピーを含む形質転換されたプロトプラストの懸濁液が最初に提供される。カルス組織は形成され、そしてシュートがカルスから誘導され得、続いて発根させ得る。あるいは、胚形成がプロトプラスト懸濁液から誘導され得る。これらの胚は、天然の胚として発芽し、植物を形成する。培養培地は、一般に種々のアミノ酸、ならびにオーキシンおよびサイトカイニンのようなホルモンを含有する。グルタミン酸およびプロリンを培地に添加することまた、特にコーンおよびアルファルファのような種にとって有用である。シュートおよび根は通常、同時に発達する。効率的な再生は培地、遺伝子型、および培養歴に依存する。これらの3つの変動要因が制御される場合は、再生は十分に再現性がありそして繰り返し可能である。

40

【0099】

いくつかの植物細胞培養系において、本発明の所望のタンパク質は排出され得、あるいはこのタンパク質は植物全体から抽出され得る。本発明の所望のタンパク質が培地内に分

50

泌される場合、これは回収され得る。あるいは、胚および胚のない半分の種子または他の植物組織は、機械的に破壊されて細胞間および組織間のあらゆる分泌タンパク質を放出し得る。その混合物は緩衝液に懸濁されて、可溶タンパク質が回収され得る。次いで、従来のタンパク質単離および精製方法は組換えタンパク質を精製するために使用される。時間、温度、pH、酸素、および容量というパラメーターは、異種タンパク質の発現および回収を最適化するために慣用的な方法により調整される。

【0100】

(i v . 細菌系)

細菌の発現技術は、当該分野で公知である。細菌のプロモーターは、細菌のRNAポリメラーゼに結合し得るコード配列（例えば、構造遺伝子）の下流方向（3'方向）へのmRNAへの転写を開始し得る、任意のDNA配列である。プロモーターは、通常、コード配列の5'末端に近接して配置される、転写開始領域を有する。この転写開始領域は、通常、RNAポリメラーゼ結合部位および転写開始部位を含む。細菌のプロモーターはまた、オペレーターと呼ばれる第二のドメインを有し、これは、RNA合成が開始する、隣接するRNAポリメラーゼ結合部位と重複し得る。オペレーターは、遺伝子リプレッサータンパク質がこのオペレーターに結合し、それによって、特定の遺伝子の転写を阻害し得るような、負の調節された（誘導性の）転写を可能にする。構成的発現は、オペレーターのような負の調節エレメントの非存在下で起こり得る。さらに、正の調節は、遺伝子アクチベータータンパク質結合配列により達成され得、この配列は、通常、存在する場合には、RNAポリメラーゼ結合配列の（5'）側に近接している。遺伝子アクチベータータンパク質の例としては、カタボライト活性化タンパク質（CAP）があり、これは、*Escherichia coli*（*E. coli*）におけるlacオペロンの転写の開始を補助する（Raibaudら（1984）*Annu. Rev. Genet.* 18:173）。従って、調節される発現は、正または負のいずれかであり、それによって、転写を増強するかまたは低下し得る。

【0101】

代謝経路の酵素をコードする配列は、特に有用なプロモーター配列を提供する。例としては、ガラクトース、ラクトース（lac）（Changら、（1997）*Nature* 198:1056）およびマルトースのような糖代謝の酵素由来のプロモーター配列が挙げられる。さらなる例としては、トリプトファン（trp）（Goeddelら（1980）*Nuc. Acids Res.* 8:4057；Yelvertonら（1981）*Nuc. Acids Res.* 9:731；米国特許第4、738、921号；EPO公開番号036 776および121 775）のような生合成酵素由来のプロモーター配列が挙げられる。 β -ラクタマーゼ（bla）プロモーター系（Weissmann（1981）「The cloning of interferon and other mistakes」*Interferon 3*（I. Gresser編））、バクテリオファージ λ PL（Shimatakeら（1981）*Nature* 292:128）およびT5（米国特許第4、689、406号）プロモーター系もまた、有用なプロモーター配列を提供する。

【0102】

さらに、天然に存在しない合成プロモーターもまた、細菌プロモーターとして機能する。例えば、ある細菌またはバクテリオファージプロモーターの転写活性化配列を、別の細菌またはバクテリオファージプロモーターのオペロン配列と結合し得、合成ハイブリッドプロモーターを作製する（米国特許第4、551、433号）。例えば、tacプロモーターは、trpプロモーター配列、およびlacリプレッサーにより調節されるlacオペロン配列の両方から構成される、ハイブリッドtrp-lacプロモーターである（Amannら（1983）*Gene* 25:167；de Boerら（1983）*Proc. Natl. Acad. Sci.* 80:21）。さらに、細菌プロモーターには、細菌のRNAポリメラーゼに結合し得る転写を開始させる能力を有する、非細菌起源の天然に存在するプロモーターが含まれ得る。非細菌起源の天然に存在するプロモーターはまた

、適合性のあるRNAポリメラーゼが結合され、原核生物においていくつかの遺伝子の高レベルの発現をもたらし得る。バクテリオファージT7 RNAポリメラーゼ/プロモーター系は、連結したプロモーター系の例である(Studierら(1986) J. Mol. Biol. 189:113; Taborら(1985) Proc Natl. Acad. Sci. 82:1074)。さらに、ハイブリッドプロモーターはまた、バクテリオファージプロモーターおよびE. coliオペレーター領域から構成され得る(EPO公開番号267 851)。

【0103】

機能性プロモーター配列に加え、有効なリボソーム結合部位もまた、原核生物における外来遺伝子の発現に有用である。E. coliにおいて、リボソーム結合部位は、シャイン-ダルガルノ(SD)配列と呼ばれ、そしてこれは、開始コドン(ATG)および開始コドンの3~11ヌクレオチド上流に位置する長さ3~9ヌクレオチドの配列を含む(Shineら(1975) Nature 254:34)。SD配列は、SD配列とE. coliの16S rRNAの3'末端との間の塩基対形成により、リボソームへのmRNAの結合を促進すると考えられている(Steitzら(1979)「Genetic signals and nucleotide sequences in messenger RNA」Biological Regulation and Development: Gene Expression(R.F. Goldberger編))。弱いリボソーム結合部位を有する真核生物遺伝子および原核生物遺伝子の発現のためには、SD配列と真核生物遺伝子のATGとの間の距離を最適化することが、しばしば必要とされる(Sambrookら(1989)「Expression of cloned genes in Escherichia coli」Molecular Cloning: A Laboratory Manual)。

【0104】

DNA分子は、細胞内で発現され得る。プロモーター配列は、そのDNA分子と直接的に連結され得、この場合、N末端の最初のアミノ酸は、常に、メチオニンであり、これは、ATG開始コドンによりコードされる。所望される場合、N末端のメチオニンは、臭化シアンとのインビトロインキュベーションによって、あるいは細菌性メチオニンN末端ペプチダーゼとのインビボインキュベーションまたはインビトロインキュベーションのいずれかによって、タンパク質から切断され得る(EPO公開番号219 237)。

【0105】

融合タンパク質は、直接的発現に対する代替物を提供する。通常、内在性の細菌タンパク質あるいは他の安定なタンパク質のN末端部分をコードするDNA配列を、異種コード配列の5'末端に融合する。発現の際に、この構築物は、その2つのアミノ酸配列の融合体を提供する。例えば、バクテリオファージλ細胞遺伝子は、外来遺伝子の5'末端に連結され得、そして細菌において発現され得る。この生じた融合タンパク質は、好ましくは、このバクテリオファージタンパク質をこの外来遺伝子から切断するためのプロセシング酵素(Xa因子)用の部位を保持する(Nagaiら(1984) Nature 309:810)。融合タンパク質はまた、lacZ(Jiaら(1987) Gene 60:197)、trpE(Allenら(1987) J. Biotechnol. 5:93; Makoffら(1989) J. Gen. Microbiol. 135:11)、およびChey(EPO公開番号324 647)遺伝子由来の配列を用いて作製され得る。この2つのアミノ酸配列の接合部でのDNA配列は、切断部位をコードしてもよいし、コードしなくてもよい。別の例は、ユビキチン融合タンパク質である。このような融合タンパク質は、外来タンパク質からユビキチンを切断するためのプロセシング酵素(例えば、ユビキチン特異的プロセシングプロテアーゼ)部位を好ましくは保持する、ユビキチン領域と共に作製され得る。この方法を通して、ネイティブの外來タンパク質は単離され得る(Millerら(1989) Bio/Technology 7:698)。

【0106】

あるいは、外来タンパク質はまた、細菌において外来タンパク質の分泌を提供するシグ

ナルペプチド配列フラグメントから構成された融合タンパク質をコードする、キメラDNA分子を作製することによって、細胞から分泌され得る(米国特許第4、336、336号)。このシグナル配列フラグメントは、通常、細胞からのタンパク質の分泌を指向する、疎水性アミノ酸から構成されるシグナルペプチドをコードする。このタンパク質は、増殖培地(グラム陽性細菌)またはペリプラズム空間(細胞の内膜と外膜との間に位置する)(グラム陰性細菌)のいずれかに分泌される。好ましくは、インビボまたはインビトロのいずれかで切断され得る、このシグナルペプチドフラグメントと外来遺伝子との間にコードされる、プロセッシング部位が存在する。

【0107】

適切なシグナル配列をコードするDNAは、E. coli 外膜タンパク質遺伝子(ompA)(Masuiら(1983)、Experimental Manipulation of Gene Expression; Grayeら、(1984)EMBOJ. 3:2437)およびE. coli アルカリホスファターゼシグナル配列(phoA)(Okara(1985)Proc. Natl. Acad. Sci. 82:7212)のような、分泌性細菌タンパク質の遺伝子に由来し得る。さらなる例として、種々のBacillus株由来の α -アミラーゼ遺伝子のシグナル配列が、B. subtilis由来の異種タンパク質を分泌するために使用され得る(Palvaら(1982)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:5582; EPO公開番号244 042)。

10

【0108】

通常、細菌によって認識される転写終結配列は、翻訳終止コドンの3'側に位置する調節領域であり、そして従って、プロモーターとともに、コード配列に隣接する。これらの配列は、mRNAの転写を指向し、このmRNAが、そのDNAによってコードされるポリペプチドへと翻訳され得る。転写終結配列は、頻繁には、ステムループ構造を形成し得る、約50ヌクレオチドのDNA配列を含み、この構造が、転写の終結を補助する。例としては、強力なプロモーターを有する遺伝子(例えば、E. coli のtrp遺伝子および他の生合成遺伝子)由来の転写終結配列が挙げられる。

20

【0109】

通常、上記の構成要素(プロモーター、シグナル配列(もし所望ならば)、目的のコード配列、および転写終結配列を含む)が、発現構築物へと組み立てられる。発現構築物は、しばしば、宿主(例えば、細菌)において安定に維持し得る染色体外エレメント(例えばプラスミド)のような、レプリコンに維持される。このレプリコンは、複製系を有し、従って、これが、このレプリコンを、発現またはクローニングおよび増幅のいずれかのために、原核生物宿主において保持されることを可能にする。さらに、レプリコンは、高コピー数プラスミドまたは低コピー数プラスミドのいずれかであり得る。高コピー数プラスミドは、一般に、約5~約200、そして通常、約10~約150の範囲のコピー数を有する。高コピー数プラスミドを含む宿主は、好ましくは、少なくとも約10個、そしてより好ましくは、少なくとも約20個のプラスミドを含む。宿主に対するベクターおよび外来タンパク質の効果に依存して、高コピー数ベクターまたは低コピー数ベクターのいずれかが選択され得る。

30

40

【0110】

あるいは、発現構築物は、組み込みベクターを用いて、細菌ゲノム内に組み込まれ得る。組み込みベクターは、通常、ベクターが組み込むのを可能にする、細菌染色体と相同な少なくとも1つの配列を含む。組み込みは、このベクターにおける相同なDNAと細菌染色体との間の組換えから生じるようである。例えば、種々のBacillus株からのDNAで構築した組み込みベクターは、Bacillus染色体に組み込まれる(欧州特許公開番号127 328)。組み込みベクターはまた、バクテリオファージまたはトランスポゾン配列から構成され得る。

【0111】

通常、染色体外発現構築物および組み込み発現構築物は、選択マーカーを含み、形質転

50

換された細菌株の選択を可能にし得る。選択マーカーは、この細菌宿主において発現され得、そしてこれらには、薬物（例えば、アンピシリン、クロラムフェニコール、エリスロマイシン、カナマイシン（ネオマイシン）およびテトラサイクリン）に対する耐性を細菌に付与する遺伝子が含まれ得る（Daviesら（1978）*Annu. Rev. Microbiol.* 32:469）。選択マーカーはまた、ヒスチジン、トリプトファンおよびロイシンの生合成経路における生合成遺伝子のような、生合成遺伝子を含み得る。

【0112】

あるいは、上記の成分のいくつかは、形質転換ベクターに組み立てられ得る。形質転換ベクターは、通常、上記のように、レプリコンにおいて維持されるかまたは組み込みベクターへと展開されるかのいずれかの、選択マーカー（market）から構成される。

10

【0113】

発現ベクターまたは形質転換ベクター（染色体外レプリコンまたは組み込みベクターのいずれも）は、多くの細菌への形質転換のために開発されてきた。例えば、発現ベクターは、とりわけ、以下の細菌のために開発されてきた：*Bacillus subtilis*（Palvaら（1982）*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:5582；欧州特許公開番号036 259および欧州特許公開番号063 953；PCT公開番号WO 84/04541）、*Escherichia coli*（Shimatakeら（1981）*Nature* 292:128；Amannら（1985）*Gene* 40:183；Studierら（1986）*J. Mol. Biol.* 189:113；欧州特許公開番号036 776、欧州特許公開番号136 829および欧州特許公開番号136 907）、*Streptococcus cremoris*（Powellら（1988）*Appl. Environ. Microbiol.* 54:655）；*Streptococcus lividans*（Powellら（1988）*Appl. Environ. Microbiol.* 54:655）、*Streptomyces lividans*（米国特許4、745、056）。

20

【0114】

外因性DNAを細菌宿主へ導入する方法は、当該分野において周知であり、そして通常、CaCl₂または他の薬剤（例えば、2価の陽イオンおよびDMSO）のいずれかで処理された細菌の形質転換を含む。DNAはまた、エレクトロポレーションによって、細菌細胞へ導入され得る。形質転換の手順は、通常、形質転換される細菌の種によって変化する。例えば、以下を参照のこと：[Massonら（1989）*FEMS Microbiol. Lett.* 60:273；Palvaら（1982）*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:5582；欧州特許公開番号036 259および欧州特許公開番号063 953；WO84/04541、*Bacillus*]、[Millerら（1988）*Proc. Natl. Acad. Sci.* 85:856；Wangら（1990）*J. Bacteriol.* 172:949、*Campylobacter*]、[Cohenら（1973）*Proc. Natl. Acad. Sci.* 69:2110；Dowerら（1988）*Nucleic Acids Res.* 16:6127；Kushner（1978）「An improved method for transformation of *Escherichia coli* with ColE1-derived plasmids」*Genetic Engineering: Proceedings of the International Symposium on Genetic Engineering*（H.W. BoyerおよびS. Nicosia編）；Mandelら（1970）*J. Mol. Biol.* 53:159；Takeito（1988）*Biochim. Biophys. Acta* 949:318、*Escherichia coli*]、[Chassyら（1987）*FEMS Microbiol. Lett.* 44:173、*Lactobacillus*]、[Fiedlerら（1988）*Anal. Biochem.* 170:38、*Pseudomonas*の使用]、[Augustinら（1990）*FEMS Microbiol. Lett.* 66:203、*Staphylococcus*]、[Baranyら（1980）*J. B*

30

40

50

acteriol. 144:698; Harlander (1987) 「Transformation of Streptococcus lactis by electroporation」 Streptococcal Genetics (J. Ferretti および R. Curtiss III 編); Perryら (1981) Infect. Immun. 32:1295; Powellら (1988) Appl. Environ. Microbiol. 54:655; Somkutira (1987) Proc. 4th Evr. Cong. Biotechnology 1:412、Streptococcus】。

【0115】

(v. 酵母発現)

酵母発現系もまた、当業者に公知である。酵母プロモーターは、酵母RNAポリメラーゼに結合し得るコード配列（例えば、構造遺伝子）からmRNAへの下流の（3'側の）転写を開始し得る、任意のDNA配列である。プロモーターは、通常、コード配列の5'末端の近位に位置する、転写開始領域を有する。この転写開始領域は、通常、RNAポリメラーゼ結合部位（「TATAボックス」）および転写開始部位を含む。酵母プロモーターはまた、上流アクチベーター配列（UAS）と呼ばれる第2のドメインを有し得、これは、存在する場合、通常、構造遺伝子に対して遠位にある。このUASは、調節された（誘導性）発現を可能にする。構成的発現は、UASの非存在下で生じる。調節された発現は、正または負のいずれかであり得、それによって、転写を増強または減少させ得る。

【0116】

酵母は、活性な代謝経路を有する発酵性生物であり、従って、代謝経路における酵素をコードする配列は、特に有用なプロモーター配列を提供する。例としては、以下が挙げられる：アルコールデヒドロゲナーゼ（ADH）（欧州特許公開番号284 044）、エノラーゼ、グルコキナーゼ、グルコース-6-リン酸イソメラーゼ、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ（GAPまたはGAPDH）、ヘキソキナーゼ、ホスホフルクトキナーゼ、3-ホスホグリセリン酸ムターゼ、およびピルビン酸キナーゼ（PyK）（欧州特許公開番号329 203）。酸性ホスファターゼをコードする酵母PHO5遺伝子もまた、有用なプロモーター配列を提供する（Myanoharaら (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:1）。

【0117】

さらに、天然には生じない合成プロモーターもまた、酵母のプロモーターとして機能する。例えば、ある1つの酵母プロモーターのUAS配列を、別の酵母プロモーターの転写活性化領域と連結し得、合成ハイブリッドプロモーターを生成し得る。このようなハイブリッドプロモーターの例としては、GAP転写活性化領域に連結されたADH調節配列（米国特許第4、876、197号および同第4、880、734号）が挙げられる。ハイブリッドプロモーターの他の例としては、GAPまたはPyKのような解糖系酵素遺伝子の転写活性化領域に結合された、ADH2、GAL4、GAL10またはPHO5遺伝子のいずれかの調節配列からなるプロモーターが挙げられる（欧州特許公開番号164 556）。さらに、酵母プロモーターには、酵母RNAポリメラーゼと結合し得る転写を開始する能力を有する、非酵母起源の天然に存在するプロモーターが含まれ得る。このようなプロモーターの例としては、とりわけ、以下が挙げられる：（Cohenら、(1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:1078; Henikoffら (1981) Nature 283:835; Hollenbergerら (1981) Curr. Topics Microbiol. Immunol. 96:119; Hollenbergerら (1979) 「The Expression of Bacterial Antibiotic Resistance Genes in the Yeast Saccharomyces cerevisiae」、Plasmids of Medical, Environmental and Commercial Importance (K. N. Timmis および A. Puhler 編); Merce

rau - Puigalonら (1980) Gene 11:163; Panthierら (1980) Curr. Genet. 2:109;)。

【0118】

DNA分子は、酵母において、細胞内で発現され得る。プロモーター配列は、DNA分子と直接連結され得、その場合、この組換えタンパク質のN末端にある最初のアミノ酸は、常に、メチオニンであり、これが、ATG開始コドンによってコードされている。所望の場合、N末端のメチオニンは、臭化シアンとのインビトロインキュベーションによって、このタンパク質から切断され得る。

【0119】

融合タンパク質は、酵母発現系について、ならびに哺乳動物、植物、バキュロウイルスおよび細菌の発現系においての、代替物を提供する。通常、内因性酵母タンパク質または他の安定なタンパク質のN末端部分をコードするDNA配列を、異種コード配列の5'末端に融合する。発現に際して、この構築物は、この2つのアミノ酸配列の融合体を提供する。例えば、酵母またはヒトのスーパーオキシドジスムターゼ(SOD)遺伝子を、外来遺伝子の5'末端に連結し、そして酵母において発現させ得る。この2つのアミノ酸配列の連結部にあるDNA配列は、切断部位をコードしてもよいし、コードしなくてもよい。例えば、欧州特許公開番号196 056を参照のこと。別の例はユビキチン融合タンパク質である。このような融合タンパク質は、外来タンパク質からユビキチンを切断するプロセシング酵素(例えば、ユビキチン特異的プロセシングプロテアーゼ)部位を好ましくは保持する、ユビキチン領域と共に作製される。従って、この方法を通じて、ネイティブな外来タンパク質は、単離され得る(例えば、WO88/024066)。

【0120】

あるいは、外来タンパク質はまた、酵母における外来タンパク質の分泌を提供するリーダー配列フラグメントから構成された融合タンパク質をコードする、キメラDNA分子を作製することによって、細胞から増殖培地へ分泌され得る。好ましくは、インビボまたはインビトロのいずれかで切断され得る、リーダーフラグメントと外来遺伝子との間にコードされるプロセシング部位が存在する。リーダー配列フラグメントは、通常、細胞からのタンパク質の分泌を指向する、疎水性アミノ酸から構成されるシグナルペプチドをコードする。

【0121】

適切なシグナル配列をコードするDNAは、分泌性酵母タンパク質の遺伝子(例えば、酵母インベルターゼ遺伝子(欧州特許公開番号012 873; 日本国公開公報62、096、086)およびA因子遺伝子(米国特許4、588、684))由来であり得る。あるいは、インターフェロンリーダーのような、酵母における分泌もまた提供する、非酵母起源のリーダーが存在する(欧州特許公開番号060 057)。

【0122】

好ましいクラスの分泌リーダーは、酵母α因子遺伝子のフラグメントを使用するリーダーであり、これは「プレ」シグナル配列、および「プロ」領域の両方を含む。使用され得るこの型のα因子フラグメントは、完全長のプレ-プロα因子リーダー(約83アミノ酸残基)および短縮されたα因子リーダー(通常約25~約50アミノ酸残基)を含む(米国特許4、546、083および4、870、008; 欧州特許公開番号324 274)。分泌を提供するα因子リーダーフラグメントを使用するさらなるリーダーとしては、第1の酵母のプレ配列および第2の酵母α因子からのプロ領域を用いて作製される、ハイブリッドα因子リーダーが挙げられる(例えば、PCT公開番号WO89/02463を参照のこと)。

【0123】

通常、酵母に認識される転写終結配列は、翻訳終止コドンの3'側に位置する調節領域であり、そして従って、プロモーターと共にコード配列に隣接する。これらの配列は、mRNAの転写を指向し、このmRNAが、そのDNAにコードされるポリペプチドへと翻訳され得る。転写終結配列および他の酵母に認識される終結配列の例は、例えば、解糖酵

素をコードする配列である。

【0124】

通常、上記の成分（プロモーター、リーダー（所望の場合）、目的のコード配列および転写終結配列を含む）を、発現構築物に組み立てる。発現構築物は、しばしば、宿主（例えば、酵母または細菌）において安定に保持され得る染色体外エレメント（例えば、プラスミド）のような、レプリコンにおいて維持される。このレプリコンは、2つの複製系を有し得、従って、これが、例えば、発現のために酵母中で維持され、そしてクローニングおよび増幅のために原核生物宿主中で維持されることを可能にする。このような酵母-細菌シャトルベクターの例としては、以下が挙げられる：YEp24（Botssteinら（1979）Gene 8:17~24）、pCl/1（Brakeら（1984）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:4642~4646）、およびYRp17（Stinchcombら（1982）J. Mol. Biol. 158:157）。さらに、レプリコンは、高コピー数プラスミドまたは低コピー数プラスミドのいずれかであり得る。高コピー数プラスミドは、一般に、約5~約200、そして通常、約10~約150の範囲のコピー数を有する。高コピー数プラスミドを含む宿主は、好ましくは、少なくとも約10個、そしてより好ましくは、少なくとも約20個を有する。宿主に対するベクターおよび外来タンパク質の効果に依存して、高コピー数ベクターまたは低コピー数ベクターのいずれかが選択され得る。例えば、Brakeら、前出を参照のこと。

10

【0125】

あるいは、発現構築物は、組み込みベクターを用いて、酵母のゲノムへ組み込まれ得る。組み込みベクターは、通常、ベクターが組み込むのを可能にする、酵母の染色体と相同な少なくとも1つの配列を含み、そして好ましくは、この発現構築物に隣接する2つの相同配列を含む。組み込みは、ベクターにおける相同なDNAと酵母の染色体との間の組換えから生じるようである（Orr-Weaverら（1983）Methods in Enzymol. 101:228~245）。組み込みベクターは、そのベクター中に含有するための適切な相同配列を選択することによって、酵母における特定の遺伝子座に指向され得る。Orr-Weaverら、前出を参照のこと。1つ以上の発現構築物が組み込まれ得、これが、おそらく、産生される組換えタンパク質のレベルに影響を与える（Rineら（1983）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:6750）。ベクターに含まれる染色体配列は、ベクターにおける単一セグメントとして存在し得るか（これは、ベクター全体の組み込みを生じる）、または染色体における隣接セグメントに相同でかつベクターにおける発現構築物に隣接する2つのセグメントとして存在し得る（これは、発現構築物のみの安定した組み込みを生じ得る）。

20

30

【0126】

通常、染色体外発現構築物および組み込み発現構築物は、その形質転換された酵母株の選択を可能にする、選択マーカーを含み得る。選択マーカーとしては、酵母宿主において発現され得る生合成遺伝子（例えば、ADE2、HIS4、LEU2、TRP1およびALG7）ならびにG418耐性遺伝子が含まれ得、それぞれ、酵母細胞にツニカマイシンおよびG418に対する耐性を付与する。さらに、適切な選択マーカーはまた、金属のような毒性化合物の存在下において増殖する能力を、酵母に提供し得る。例えば、CUP1の存在は、酵母が、銅イオンの存在下において増殖することを可能にする（Buttら（1987）Microbiol. Rev. 51:351）。

40

【0127】

あるいは、上記成分のうちのいくつかは、形質転換ベクターに組み立てられ得る。形質転換ベクターは、通常、上記のように、レプリコンにおいて保持されるかまたは組み込みベクターに展開される、選択マーカーから構成される。

【0128】

発現ベクターおよび形質転換ベクターは、染色体外レプリコンまたは組み込みベクターのいずれかであり、多くの酵母への形質転換のために開発されてきた。例えば、外因性DNAを酵母宿主に導入する発現ベクターおよび方法は、とりわけ、以下の酵母のために開

50

発されてきた：*Candida albicans* (Kurtzら (1986) *Mol. Cell. Biol.* 6:142)、*Candida maltosa* (Kunzeら (1985) *J. Basic Microbiol.* 25:141)、*Hansenula polymorpha* (Gleesonら (1986) *J. Gen. Microbiol.* 132:3459; Roggenkampら (1986) *Mol. Gen. Genet.* 202:302)、*Kluyveromyces fragilis* (Dasら (1984) *J. Bacteriol.* 158:1165)、*Kluyveromyces lactis* (De Louvencourtら (1983) *J. Bacteriol.* 154:737; Van den Bergら (1990) *Bio/Technology* 8:135)、*Pichia guillierimondii* (Kunzeら (1985) *J. Basic Microbiol.* 25:141)、*Pichia pastoris* (Creggら (1985) *Mol. Cell. Biol.* 5:3376; 米国特許第4、837、148号および同第4、929、555号)、*Saccharomyces cerevisiae* (Hinnenら (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:1929; Itoら (1983) *J. Bacteriol.* 153:163)、*Schizosaccharomyces pombe* (BeachおよびNurse (1981) *Nature* 300:706)、および*Yarrowia lipolytica* (Davidowら (1985) *Curr. Genet.* 10:380471; Gaillardinら (1985) *Curr. Genet.* 10:49)。

10

20

【0129】

外因性DNAを酵母宿主へ導入する方法は、当該分野において周知であり、そして通常、スフェロプラストの形質転換またはアルカリ陽イオンで処理したインタクトな酵母細胞の形質転換が含まれる。形質転換の手順は、通常、形質転換される酵母の種によって変化する。例えば、以下を参照のこと：(Kurtzら (1986) *Mol. Cell. Biol.* 6:142; Kunzeら (1985) *J. Basic Microbiol.* 25:141; *Candida*); (Gleesonら (1986) *J. Gen. Microbiol.* 132:3459; Roggenkampら (1986) *Mol. Gen. Genet.* 202:302; *Hansenula*); (Dasら (1984) *J. Bacteriol.* 158:1165; De Louvencourtら (1983) *J. Bacteriol.* 154:1165; Van den Bergら (1990) *Bio/Technology* 8:135; *Kluyveromyces*); (Creggら (1985) *Mol. Cell. Biol.* 5:3376; Kunzeら (1985) *J. Basic Microbiol.* 25:141; 米国特許第4、837、148号および同第4、929、555号; *Pichia*); (Hinnenら (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:1929; Itoら (1983) *J. Bacteriol.* 153:163 *Saccharomyces*); (BeachおよびNurse (1981) *Nature* 300:706; *Schizosaccharomyces*); (Davidowら (1985) *Curr. Genet.* 10:39; Gaillardinら (1985) *Curr. Genet.* 10:49; *Yarrowia*)。

30

40

【0130】

(抗体)

本明細書中で使用される場合、用語「抗体」とは、少なくとも1つの抗体結合部位から構成されるポリペプチドまたはポリペプチド群をいう。「抗体結合部位」は、内部表面形状および抗原のエピトープの特徴に相補的な電荷分布を有する、3次元結合空間であり、これが、抗体と抗原の結合を可能にする。「抗体」は、例えば、脊椎動物抗体、ハイブリッド抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、改変された抗体、単価抗体、Fabタンパク質、および単ドメイン抗体を含む。

【0131】

50

本発明のタンパク質に対する抗体は、親和性クロマトグラフィー、免疫アッセイ、および *Neisseria* のタンパク質の識別 / 同定に有用である。

【0132】

本発明のタンパク質に対する抗体（ポリクローナルおよびモノクローナルの両方）は、従来の方法によって調製され得る。一般に、このタンパク質は、最初に、適切な動物、好ましくはマウス、ラット、ウサギ、またはヤギを免疫するために使用される。ウサギおよびヤギは、得られ得る血清の容量、および標識された抗ウサギ抗体および抗ヤギ抗体の入手可能性に起因して、ポリクローナル血清の調製のために好ましい。免疫は、一般的に、タンパク質を生理的食塩水（好ましくはフロイント完全アジュバントのようなアジュバント）に混合または乳化し、そして混合物または乳化物を非経口的に（一般的に皮下、または筋肉内に）注射することによって、行われる。50 ~ 200 μ g / 注射の用量が、代表的に十分である。免疫は、一般的に、2 ~ 6 週後に生理的食塩水（好ましくはフロイント不完全アジュバントを用いて）中のタンパク質の1回以上の注射でブーストされる。あるいは、当該分野において公知の方法を使用するインビトロ免疫によって抗体を産生し得、これは、本発明の目的にとっては、インビボ免疫に等しいと考えられる。ポリクローナル抗血清は、免疫された動物からガラスまたはプラスチック製の容器へ採血し、その血液を25 で1時間インキュベートし、その後4 で2 ~ 18時間インキュベートすることによって得られる。この血清は、遠心分離（例えば1,000 g、10分間）によって回収される。ウサギから、採血1回につき約20 ~ 50 ml が得られ得る。

10

【0133】

モノクローナル抗体は、Kohler および Milstein (Nature (1975) 256: 495 ~ 96) の標準的方法、またはその改変版を使用して調製される。代表的には、マウスまたはラットが、上記のように免疫される。しかし、血清を抽出するために動物から採血するよりも、脾臓（および必要に応じていくつかの大きなリンパ節）が取り出され、そして単一の細胞へ解離される。所望の場合、脾臓細胞は、（非特異的付着細胞の回収後）タンパク質抗原でコーティングされたプレートまたはウェルへ細胞懸濁液を適用することによって、スクリーニングされ得る。この抗原に特異的な膜結合免疫グロブリンを発現するB細胞は、このプレートに結合し、そして残りの懸濁液によって、洗い落とされない。得られるB細胞、または全ての解離された脾臓細胞は、次に骨髓腫細胞と融合するように誘導されてハイブリドーマを形成し、そして選択培地（例えばヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン培地、「HAT」）において培養される。得られるハイブリドーマは、限界希釈によってプレーティングされ、そして免疫する抗原に対して特異的に結合する（かつ関連しない抗原に結合しない）抗体の産生についてアッセイされる。選択されたMAb分泌ハイブリドーマは、次にインビトロ（例えば、組織培養瓶または中空線維リアクター中で）、またはインビボ（マウスにおける腹水として）のいずれかで培養される。

20

30

【0134】

所望の場合、抗体は（ポリクローナルまたはモノクローナルいずれであっても）、従来技術を使用して標識され得る。適切な標識としては、以下が挙げられる：発蛍光団、発色団、放射性原子（特に³²Pおよび¹²⁵I）、電子密度試薬、酵素、および特異的結合パートナーを有するリガンド。酵素は、代表的に、その活性によって検出される。例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼは、通常、3, 3', 5, 5' - テトラメチルベンジジン (TMB) を青い色素へ変換するその能力（分光光度計を用いて定量可能）によって、検出される。「特異的結合パートナー」とは、高い特異性でリガンド分子に結合し得るタンパク質をいい、例えば、抗原およびそれに特異的なモノクローナル抗体の場合である。他の特異的結合パートナーは、ビオチンおよびアビジンまたはストレプトアビジン、IgG およびプロテインA、ならびに当該分野において公知の多くのレセプター - リガンド結合体を含む。同じ標識がいくつかの異なる様式で働き得るので、上記が、種々の標識を別個のクラスへ分類することを意味しないことは、理解されるべきである。例えば、¹²⁵I は、放射性標識として、または電子密度試薬として働き得る。HRPは、酵素として、ま

40

50

たはM A bについての抗原として働き得る。さらに、所望の効果のために、種々の標識を組合せ得る。例えば、M A bおよびアビジンはまた、本発明の実施において、標識を必要とする。従って、M A bをビオチンで標識して、そして^{1 2 5} Iで標識したアビジン、またはH R Pで標識した抗ビオチンM A bで、その存在を検出し得る。他の並べ替えおよび可能性は、当業者に容易に明らかであり、そして本発明の範囲内で等価であると考えられる。

【0135】

(薬学的組成物)

薬学的組成物は、本発明のポリペプチド、抗体または核酸のいずれかを含み得る。この薬学的組成物は、治療上有効な量の、本願発明のポリペプチド、抗体、またはポリヌクレオチドのいずれかを含む。

10

【0136】

本明細書において使用される場合、用語「治療上有効な量」とは、所望の疾患または状態を処置、改善、または予防するための治療薬剤の量、または、検出可能な治療効果または予防効果を示すための治療薬剤の量をいう。この効果は、例えば、キメラマーカまたは抗原レベルによって検出され得る。治療効果はまた、体温低下のような、身体の状態における減少を含む。被験体に関する正確な有効量は、被験体の大きさおよび健康、状態の性質および程度、および投与のために選択される治療剤または治療剤の組合せに依存する。従って、あらかじめ正確な有効量を特定することは有用ではない。しかし、所定状況のための有効量は、慣用的な実験によって決定され得、そして臨床医の判断内である。

20

【0137】

本発明の目的のために、有効な用量は、DNA構築物が投与される個体において、約0.01mg/kg~50mg/kgまたは0.05mg/kg~約10mg/kgのDNA構築物である。

【0138】

薬学的組成物はまた、薬学的に受容可能なキャリアを含み得る。用語「薬学的に受容可能なキャリア」とは、抗体またはポリペプチド、遺伝子、および他の治療薬剤のような、治療薬剤の投与のためのキャリアをいう。この用語は、この組成物を受け取る個体に有害な抗体の産生をそれ自体は誘導しない、任意の薬学的キャリアをいい、そして、過度の毒性を伴わずに投与され得る。適切なキャリアは、タンパク質、多糖、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、重合アミノ酸、アミノ酸コポリマー、および不活性ウイルス粒子のような、大きく、ゆっくり代謝される高分子であり得る。このようなキャリアは、当業者に周知である。

30

【0139】

薬学的に受容可能な塩が、その中で使用され得る。例えば、塩酸塩、臭化水素塩、リン酸塩、硫酸塩などのような鉱酸塩；および酢酸塩、プロピオン酸塩、マロン酸塩、安息香酸塩などのような有機酸の塩である。薬学的に受容可能な賦形剤の徹底的な議論は、Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Pub. Co., N. J., 1991) にて入手可能である。

【0140】

治療組成物における薬学的に受容可能なキャリアは、水、生理的食塩水、グリセロールおよびエタノールのような液体を含み得る。さらに、湿潤剤または乳化剤、pH緩衝物質などのような補助物質が、このようなビヒクルに存在し得る。代表的には、治療組成物は、液体溶液または懸濁液のいずれかとして、注射可能物質として調製される；注射前に液体ビヒクルに溶解または懸濁するのに適切な固体形態もまた、調製され得る。リボソームは、薬学的に受容可能なキャリアの定義中に含まれる。

40

【0141】

(送達方法)

一旦処方されると、本発明の組成物は、その被験体へ直接投与され得る。処置される被験体は、動物であり得；特に、ヒト被験体が処置され得る。

50

【0142】

その組成物の直接送達は、一般的に、皮下、腹腔、静脈内、または筋肉内のいずれかでの注入によって達成されるか、あるいは、組織の間隙空間へ送達される。この組成物はまた、病巣へ投与され得る。他の投与様式には、経口投与、および肺投与、坐剤、および経皮 (transdermal) 適用または経皮 (transcutaneous) 適用 (例えば、WO98/20734 を参照のこと)、針、および遺伝子銃またはハイボスプレー (hypospray) が含まれる。投薬処置は、単回用量スケジュール、または多数回用量スケジュールであり得る。

【0143】

(ワクチン)

ワクチンは、免疫抗原、免疫原、ポリペプチド、タンパク質または核酸を、通常「薬学的に受容可能なキャリア」とともに含み、このキャリアは、その組成物を受ける個体に有害である抗体の産生をそれ自体は誘発しない任意のキャリアを含む。適切なキャリアは、代表的に、大きく、ゆっくり代謝される高分子 (例えば、タンパク質、多糖、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、重合アミノ酸、アミノ酸コポリマー、脂質凝集物 (例えば、油小滴またはリポソーム)、および不活性ウイルス粒子である。このようなキャリアは、当業者に周知である。さらに、これらのキャリアは免疫刺激薬剤 (「アジュバント」) として機能し得る。さらに、この抗原または免疫原は、細菌毒素 (例えば、ジフテリア、破傷風、コレラ、H. pylori などの病原体由来の毒素) と結合体化され得る。

【0144】

この組成物の効力を増強するために好ましいアジュバントは、(1) アルミニウム塩 (「ミョウバン」) (例えば、水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウム、硫酸アルミニウムなど)、(2) 水中油懸濁処方物 (他の特定の免疫刺激薬剤 (例えば、ムラミルペプチド (以下を参照のこと) または細菌細胞壁成分) を含むか含まない) を含むが、それらに限定されず、例えば、以下: (a) 5% スクアレン、0.5% Tween 80、および 0.5% Span 85 (必要に応じて、種々の量の MTP-PE (以下を参照のこと) を含有するが、必要ではない) を含み、モデル 110 Y マイクロフルイダイザー (Microfluidics, Newton, MA) のようなマイクロフルイダイザーを用いて μ 未満の粒子へと処方された、MF59TM (WO90/14837; Vaccine design: the subunit and adjuvant approach, Powell および Newman 編, Plenum Press 1995 の第 10 章); (b) μ 未満のエマルジョンへと微小流体化されたか、またはボルテックスして、より大きな粒子径エマルジョンを生成したかのいずれかである、10% スクアレン、0.4% Tween 80、5% プルロニックブロックポリマー L121、および thr-MDP (以下を参照のこと) を含有する、SAF、ならびに (c) 2% スクアレン、0.2% Tween 80、およびモノホスホリピド A (MPL)、トレハロースジミコレート (TDM)、および細胞壁骨格 (CWS)、好ましくは MPL および CWS (DetoxTM) からなる群由来の 1 つ以上の細菌細胞壁成分を含む、RibiTM アジュバント系 (RAS)、(Ribi Immunochem, Hamilton, MT); (3) サポニンアジュバント (例えば、StimulonTM) (Cambridge Bioscience, Worcester, MA) を使用し得るか、またはそれから粒子 (例えば、ISCOM (免疫刺激性複合体) を生成し得る; (4) 完全フロイントアジュバント (CFA) および不完全フロイントアジュバント (IFA); (5) サイトカイン (例えば、インターロイキン (例えば、IL-1、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-12 など)、インターフェロン (例えば、 γ 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) など; および (6) その組成物の効力を強化するための免疫刺激剤として作用する他の物質を含むが、それらに限定されない。ミョウバンおよび MF59TM が好ましい。

【0145】

上記で言及したように、ムラミルペプチドは、N-アセチル-ムラミル-L-スレオニ

10

20

30

40

50

ル - D - イソグルタミン (t h r - M D P)、N - アセチル - ノルムラミル - L - アラニル - D - イソグルタミン (ノル - M D P)、N - アセチルムラミル - L - アラニル - D - イソグルタミニル - L - アラニン - 2 - (1 ' - 2 ' - ジパルミトイル - s n - グリセロ - 3 - ヒドロキシホスホリルオキシ) - エチルアミン (M T P - P E) などを含むが、それらに限定されない。

【 0 1 4 6 】

免疫原性組成物 (例えば、免疫抗原 / 免疫原 / ポリペプチド / タンパク質 / 核酸、薬学的に受容可能なキャリア、およびアジュバント) は、代表的に、希釈剤 (例えば、水、生理食塩水、グリセロール、エタノールなど) を含有する。さらに、補助物質 (例えば、湿潤剤または乳化剤、pH緩衝物質など) が、このようなビヒクルにおいて存在し得る。

10

【 0 1 4 7 】

代表的に、免疫原性組成物は、液体溶液または懸濁物のいずれかとして、注射剤として調製され；注射前に液体ビヒクルにおける溶液または懸濁物として適切な固体形態もまた調製され得る。この調製物はまた、薬学的に受容可能なキャリアの下で、上記に記載のように、アジュバント効果の強化のために乳化され得るかまたはリボソーム中にカプセル化され得る。

【 0 1 4 8 】

ワクチンとして使用される免疫原性組成物は、免疫学的有効量の抗原性ポリペプチドまたは免疫原性ポリペプチド、および任意の他の上記の成分を必要に応じて含む。「免疫学的有効量」とは、個体へのその量の投与が、単回用量であれ、一連の (用量の) 一部としてであれ、処置または予防に有効であることを意味する。この量は、処置される個体の健康および身体状態、処置される個体の分類学上の群 (例えば、非ヒト霊長類、霊長類など)、個体の免疫系が抗体を合成する能力、所望される防御の程度、そのワクチンの処方、医療的状況の処置する医師の評価、および他の関連する因子に依存して変動する。その量は、比較的広い範囲にあり、この量が慣用的な試行を通して決定され得ることが予想される。

20

【 0 1 4 9 】

免疫学的組成物は、従来のように、非経口的 (例えば、皮下、筋肉内または経皮 (t r a n s u d e r m a l l y) / 経皮 (t r a n s u c u t a n e o u s l y) のいずれかでの注射による) に投与される (例えば、W O 9 8 / 2 0 7 3 4)。他の投与様式に適切なさらなる処方物は、経口処方物および肺処方物、坐剤、ならびに経皮適用を含む。投薬処置は、単回用量スケジュールまたは多数回用量スケジュールであり得る。ワクチンは、他の免疫調節剤と組み合わせて投与され得る。

30

【 0 1 5 0 】

タンパク質ベースのワクチンの代替として、DNAワクチンが使用され得る (例えば、RobinsonおよびTorres (1 9 9 7) Seminars in Immunology 9 : 2 7 1 - 2 8 3 ; Donnellyら (1 9 9 7) Annu Rev Immunol 1 5 : 6 1 7 - 6 4 8 ; 本明細書以下を参照のこと)。

【 0 1 5 1 】

(遺伝子送達ビヒクル)

40

本発明の治療剤のコード配列を含む、哺乳動物における発現のためにその哺乳動物へ送達される構築物の送達のための遺伝子治療ビヒクルは、局所または全身的のいずれかで投与され得る。これらの構築物は、ウイルスベクターアプローチまたは非ウイルスベクターアプローチを、インビボまたはエキソビボの様式で利用し得る。このようなコード配列の発現は、内因性哺乳動物プロモーターまたは外因性プロモーターを用いて誘導され得る。このコード配列のインビボでの発現は、構成性または調節性のいずれかであり得る。

【 0 1 5 2 】

本発明は、意図された核酸配列を発現し得る遺伝子送達ビヒクルを含む。この遺伝子送達ビヒクルは、好ましくは、ウイルスベクター、およびより好ましくはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルス (A A V) ベクター、ヘルペスウ

50

イルスベクターまたは α ウイルスベクターである。このウイルスベクターはまた、アストロウイルスベクター、コロナウイルスベクター、オルトミクソウイルスベクター、パポウイルスベクター、パラミクソウイルスベクター、パルボウイルスベクター、ピコルナウイルスベクター、ポックスウイルスベクター、またはトガウイルスベクターであり得る。一般的には、Jolly (1994) Cancer Gene Therapy 1: 51 - 64; Kimura (1994) Human Gene Therapy 5: 845 - 852; Connelly (1995) Human Gene Therapy 6: 185 - 193; および Kaplitt (1994) Nature Genetics 6: 148 - 153を参照のこと。

【0153】

レトロウイルスベクターは、当該分野で周知であり、これには、B型、C型およびD型のレトロウイルス、異種栄養性ウイルス（例えば、NZB-X1、NZB-X2およびNZB9-1 (O'Neill (1985) J. Virol. 53: 160を参照のこと) 多栄養性レトロウイルス（例えば、MCFおよびMCF-MLV (Kelly (1983) J. Virol. 45: 291を参照のこと)、スプマウイルスおよびレンチウイルスが含まれる。RNA Tumor Viruses、第2版、Cold Spring Harbor Laboratory、1985を参照のこと。

【0154】

レトロウイルス遺伝子治療ベクターの部分は、異なるレトロウイルスに由来し得る。例えば、レトロウイルスLTRは、マウス肉腫ウイルスに由来し得、tRNA結合部位はラウス肉腫ウイルスに由来し得、パッケージングシグナルはマウス白血病ウイルスに由来し得、そして第二の鎖合成の起源はトリ白血病ウイルスに由来し得る。

【0155】

これらの組換えレトロウイルスベクターを使用して、適切なパッケージング細胞株へそれらを導入することによって形質導入適合性レトロウイルスベクター粒子を生成し得る（米国特許第5,591,624号を参照のこと）。レトロウイルスベクターは、レトロウイルス粒子へのキメラインテグラーゼ酵素の組込みによる、宿主細胞DNAへの部位特異的組込みのために構築され得る（WO96/37626号を参照のこと）。この組換えウイルスベクターは複製欠損組換えウイルスであることが好ましい。

【0156】

上記に記載のレトロウイルスベクターを伴う使用について適切なパッケージング細胞株は、当該分野で周知であり、容易に調製され（WO95/30763号およびWO92/05266号を参照のこと）、そしてこれを使用して、組換えベクター粒子の生産のためのプロデューサー細胞株（これは、ベクター細胞株または「VCL」とも称される）を作製し得る。好ましくは、このパッケージング細胞株は、ヒトの親細胞（例えば、HT1080細胞）またはミンク親細胞株から作製され、これは、ヒト血清における不活化を除去する。

【0157】

レトロウイルス遺伝子治療ベクターの構築のために好ましいレトロウイルスは、トリ白血病ウイルス、ウシ白血病ウイルス、マウス白血病ウイルス、ミンク細胞フォーカス形成ウイルス、マウス肉腫ウイルス、細網内皮症ウイルス、およびラウス肉腫ウイルスを含む。特に好ましいマウス白血病ウイルスは、4070Aおよび1504A (Hartley および Rowe (1976) J. Virol. 19: 19 - 25)、エーベルソン (ATCC 番号VR-999)、フレンド (ATCC 番号VR-245)、グラフィー、グロス (ATCC 番号VR-590)、カーステン (Kirsten)、ハーベイ (Harvey) 肉腫ウイルス、ならびにラッシャー (ATCC 番号VR-998) およびモロニーマウス白血病ウイルス (ATCC 番号VR-190)を含む。このようなレトロウイルスベクターは、寄託機関または収集機関（例えば、アメリカンタイプカルチャーコレクション（「ATCC」）、Rockville、Maryland）から入手し得るか、または一般に利用可能な技術を用いて公知の供給源から単離され得る。

10

20

30

40

50

【0158】

本発明において使用可能な例示的な公知のレトロウイルス遺伝子治療ベクターとしては、特許出願GB2200651、EP0415731、EP0345242、EP0334301、WO89/02468；WO89/05349、WO89/09271、WO90/02806、WO90/07936、WO94/03622、WO93/25698、WO93/25234、WO93/11230、WO93/10218、WO91/02805、WO91/02825、WO95/07994、米国特許第5,219,740号、同第4,405,712号、同第4,861,719号、同第4,980,289号、同第4,777,127号、同第5,591,624号に記載されるものが挙げられる。Vile(1993)Cancer Res 53:3860-3864；Vile(1993)Cancer Res. 53:962-967；Ram(1993)Cancer Res 53(1993)83-88；Takamiya(1992)J Neurosci Res 33:493-503；Baba(1993)J Neurosurg 79:729-735；Mann(1983)Cell 33:153；Cane(1984)Proc Natl Acad Sci 81:6349；およびMiller(1990)Human Gene Therapy 1もまた参照のこと。

【0159】

ヒトアデノウイルス遺伝子治療ベクターもまた当該分野で公知であり、そして本発明において使用可能である。例えば、Berkner(1988)Biotechniques 6:616およびRosenfeld(1991)Science 252:431；ならびにWO93/07283、WO93/06223、およびWO93/07282を参照のこと。本発明において使用可能な例示的な公知のアデノウイルス遺伝子治療ベクターとしては、上記に参照される文書およびWO94/12649、WO93/03769、WO93/19191、WO94/28938、WO95/11984、WO95/00655、WO95/27071、WO95/29993、WO95/34671、WO96/05320、WO94/08026、WO94/11506、WO93/06223、WO94/24299、WO95/14102、WO95/24297、WO95/02697、WO94/28152、WO94/24299、WO95/09241、WO95/25807、WO95/05835、WO94/18922およびWO95/09654において記載されるものが挙げられる。あるいは、Curie(1992)Hum. Gene Ther. 3:147-154に記載されるような殺傷したアデノウイルスに連結したDNAの投与が使用され得る。本発明の遺伝子送達ビヒクルはまた、アデノウイルス随伴ウイルス(AAV)ベクターを含む。本発明における使用のためのこのようなベクターの主要なおよび好ましい例は、Srivastava WO93/09239に開示されるAAV-2ベースのベクターである。最も好ましいAAVベクターは、2つのAAV逆方向末端反復を含む。ここで、ネイティブD配列は、ヌクレオチドの置換によって改変され、その結果、少なくとも5つのネイティブなヌクレオチドおよび18までのネイティブヌクレオチド、好ましくは少なくとも10のネイティブヌクレオチドから18までのネイティブヌクレオチド、最も好ましくは10のネイティブヌクレオチドが維持され、そしてD配列の残りのヌクレオチドが欠失またはネイティブでないヌクレオチドで置換されている。AAV逆方向末端反復のネイティブなD配列は、各AAV逆方向末端反復において(すなわち、各末端に1つの配列が存在する)20の連続するヌクレオチドの配列であって、これは、HP形成に関与しない。ネイティブでない置換ヌクレオチドは、同じ位置でのネイティブなD配列に見出されるヌクレオチド以外の任意のヌクレオチドであり得る。他の使用可能な例示的なAAVベクターは、pWP-19、pWN-1であり、これらは両方ともNahreini(1993)Gene 124:257-262に開示される。このようなAAVベクターの別の例は、psub201(Samulski(1987)J. Virol. 61:3096を参照のこと)である。別の例示的なAAVベクターは、Double-D ITRベクターである。Double-D ITRベクターの構築は、米国特許第5,478,745号に開示される。なお他のベクターは

、C a r t e r の米国特許第 4 , 7 9 7 , 3 6 8 号および M u z y c z k a の米国特許第 5 , 1 3 9 , 9 4 1 号、C h a r t e j e e の米国特許第 5 , 4 7 4 , 9 3 5 号ならびに K o t i n の W O 9 4 / 2 8 8 1 5 7 に開示されるものである。本発明において使用可能な A A V ベクターのなおさらなる例は、S S V 9 A F A B T K n e o であり、これは、A F P エンハンサーおよびアルブミンプロモーターを含み、そして肝臓において優性に発現を指向する。その構造および構築は、S u (1 9 9 6) H u m a n G e n e T h e r a p y 7 : 4 6 3 - 4 7 0 に開示される。さらなる A A V 遺伝子治療ベクターは、米国特許第 5 , 3 5 4 , 6 7 8 号、同第 5 , 1 7 3 , 4 1 4 号、同第 5 , 1 3 9 , 9 4 1 号、および同第 5 , 2 5 2 , 4 7 9 号に記載される。

【 0 1 6 0 】

本発明の配列を含む遺伝子治療ベクターはまた、ヘルペスウイルスベクターを含む。主要なおよび好ましい例は、チミジンキナーゼポリペプチドをコードする配列を含む単純ヘルペスウイルスベクター（例えば、米国特許第 5 , 2 8 8 , 6 4 1 号、および E P 0 1 7 6 1 7 0 (R o i z m a n) に開示されるもの）である。さらなる例示的な単純ヘルペスウイルスベクターとしては、W O 9 5 / 0 4 1 3 9 (W i s t a r I n s t i t u t e) に開示される H F E M / I C P 6 - L a c Z 、G e l l e r (1 9 8 8) S c i e n c e 2 4 1 : 1 6 6 7 - 1 6 6 9 ならびに W O 9 0 / 0 9 4 4 1 および W O 9 2 / 0 7 9 4 5 に記載される p H S V l a c 、F i n k (1 9 9 2) H u m a n G e n e T h e r a p y 3 : 1 1 - 1 9 に記載される H S V U s 3 : : p g C - l a c Z 、ならびに E P 0 4 5 3 2 4 2 (B r e a k e f i e l d) に記載される H S V 7 1 3 4 、2 R H 1 0 5 および G A L 4 、ならびに A T C C に受託番号 A T C C V R - 9 7 7 および A T C C V R - 2 6 0 として寄託されたものが挙げられる。

【 0 1 6 1 】

本発明において使用され得る α ウイルス遺伝子治療ベクターもまた意図される。好ましい α ウイルスベクターは、シンドビスウイルスベクターである。トガウイルス、セムリキ森林ウイルス (A T C C V R - 6 7 ; A T C C V R - 1 2 4 7) 、M i d d l e b e r g ウイルス (A T C C V R - 3 7 0) 、ロスリバーウイルス (A T C C V R - 3 7 3 ; A T C C V R - 1 2 4 6) 、ベネズエラウマ脳脊髄炎ウイルス (A T C C V R 9 2 3 ; A T C C V R - 1 2 5 0 ; A T C C V R - 1 2 4 9 ; A T C C V R - 5 3 2) および米国特許第 5 , 0 9 1 , 3 0 9 号、同第 5 , 2 1 7 , 8 7 9 号、および W O 9 2 / 1 0 5 7 8 に記載されるもの。より詳細には、米国特許出願第 0 8 / 4 0 5 , 6 2 7 号 (1 9 9 5 年 3 月 1 5 日出願) 、W O 9 4 / 2 1 7 9 2 号、W O 9 2 / 1 0 5 7 8 号、W O 9 5 / 0 7 9 9 4 号、米国特許第 5 , 0 9 1 , 3 0 9 号、および米国特許第 5 , 2 1 7 , 8 7 9 号に記載される α ウイルスベクターが使用可能である。このような α ウイルスは、A T C C (R o c k v i l l e , M a r y l a n d) のような寄託機関または収集機関から入手し得るか、または一般的に利用可能な技術を用いて公知の供給源から単離され得る。好ましくは、細胞傷害性を減少させた α ウイルスベクターを使用する (米国特許出願番号 0 8 / 6 7 9 6 4 0 号を参照のこと) 。

【 0 1 6 2 】

D N A ベクター系 (例えば、真核生物層状発現系) もまた、本発明の核酸の発現に有用である。真核生物層状発現系の詳細な説明については W O 9 5 / 0 7 9 9 4 を参照のこと。好ましくは、本発明の真核生物層状発現系は α ウイルスベクターに由来し、そして最も好ましくはシンドビスウイルスベクターに由来する。

【 0 1 6 3 】

本発明における使用に適切な他のウイルスベクターとしては、以下に由来するものが挙げられる：ポリオウイルス (例えば、A T C C V R - 5 8 および E v a n s , N a t u r e 3 3 9 (1 9 8 9) 3 8 5 および S a b i n (1 9 7 3) J . B i o l . S t a n d a r d i z a t i o n 1 : 1 1 5 に記載されるもの) ; リノウイルス (例えば、A T C C V R - 1 1 1 0 および A r n o l d (1 9 9 0) J C e l l B i o c h e m L 4 0 1 に記載されるもの) ; ボックスウイルス (例えば、カナリアボックスウイルス

10

20

30

40

50

またはワクシニアウイルス（例えば、ATCC VR - 111およびATCC VR - 2010ならびにFisher - Hoch (1989) Proc Natl Acad Sci 86:317; Flexner (1989) Ann NY Acad Sci 569:86、Flexner (1990) Vaccine 8:17; 米国特許第4,603,112号および同第4,769,330号ならびにWO89/01973号に記載されるもの）; SV40ウイルス（例えば、ATCC VR - 305およびMulligan (1979) Nature 277:108およびMadzak (1992) J Gen Virol 73:1533に記載されるもの）; インフルエンザウイルス（例えば、ATCC VR - 797および米国特許第5,166,057号およびEnami (1990) Proc Natl Acad Sci 87:3802-3805; Enami およびPalese (1991) J Virol 65:2711-2713およびLuytjes (1989) Cell 59:110 (McMichael (1983) NEJ Med 309:13ならびにYap (1978) Nature 273:238およびNature (1979) 277:108もまた参照のこと）に記載されるような逆遺伝子技術を使用して作製した組換えインフルエンザウイルス）; EP - 0386882およびBuchschacher (1992) J. Virol. 66:2731に記載されるようなヒト免疫不全ウイルス; 麻疹ウイルス（例えば、ATCC VR - 67およびVR - 1247ならびにEP - 0440219に記載されるもの）; アウラ (Aura) ウイルス（例えば、ATCC VR - 368）; ベバル (Bebaru) ウイルス（例えば、ATCC VR - 600およびATCC VR - 1240）; カバス (Cassou) ウイルス（例えば、ATCC VR - 922）; チクングニヤウイルス（例えば、ATCC VR - 64およびATCC VR - 1241）; フォートモーガン (Fort Morgan) ウイルス（例えば、ATCC VR - 924）; ゲタウイルス（例えば、ATCC VR - 369およびATCC VR - 1243）; キジラガハ (Kyzylagach) ウイルス（例えば、ATCC VR - 927）; マヤロウイルス（例えば、ATCC VR - 66）; ムカン (Mucambo) ウイルス（例えば、ATCC VR - 580およびATCC VR - 1244）; ヌヅム (Ndumu) ウイルス（例えば、ATCC VR - 371）; ピクスナ (Pixuna) ウイルス（例えば、ATCC VR - 372およびATCC VR - 1245）; トナテ (Tonate) ウイルス（例えば、ATCC VR - 925）; トリニティ (Trinity) ウイルス（例えば、ATCC VR - 469）; ユナ (Una) ウイルス（例えば、ATCC VR - 374）; ワタロア (Whataroa) ウイルス（例えば、ATCC VR - 926）; Y - 62 - 33 ウイルス（例えば、ATCC VR - 375）; オニオンニオンウイルス、東部脳脊髄炎ウイルス（例えば、ATCC VR - 65およびATCC VR - 1242）; 西部脳脊髄炎ウイルス（例えば、ATCC VR - 70、ATCC VR - 1251、ATCC VR - 622およびATCC VR - 1252）; ならびにコロナウイルス（例えば、ATCC VR - 740）およびHamre (1966) Proc Soc Exp Biol Med 121:190に記載のもの。

【0164】

本発明の組成物の細胞への送達は、上記に言及したウイルスベクターに限定されない。他の送達方法および媒体が使用され得る（例えば、核酸発現ベクター、殺傷したアデノウイルスに連結したポリカチオン性縮合DNAかまたは連結していないポリカチオン性縮合DNA単独（例えば、米国特許出願番号08/366,787（1994年12月30日出願）およびCurriel (1992) Hum Gene Ther 3:147-154を参照のこと）、リガンド連結DNA（例えば、Wu (1989) J Biol Chem 264:16985-16987を参照のこと）、真核生物細胞送達ビヒクル細胞（例えば、米国特許出願番号08/240,030（1994年5月9日出願）および米国特許出願番号08/404,796を参照のこと）、光重合化ヒドロゲル物質の沈着、手動の遺伝子送達粒子銃（米国特許第5,149,655号に記載されるような）、米国特許第5,206,152号およびWO92/11033に記載されるような電離放射線、

核電荷中和または細胞膜との融合)。さらなるアプローチは、Philip (1994) Mol Cell Biol 14:2411-2418 および Woffendin (1994) Proc Natl Acad Sci 91:1581-1585 に記載される。

【0165】

粒子媒介遺伝子移入が使用され得る(例えば、米国特許出願60/023,867号を参照のこと)。手短には、配列を、高レベル発現のための従来の制御配列を含む従来のベクターに挿入し得、次いで細胞標的化リガンド(例えば、アシアロオロソムコイド(Wu および Wu (1987) J. Biol. Chem. 262:4429-4432 に記載されるような)、Hucked (1990) Biochem Pharmacol 40:253-263 に記載されるようなインスリン、Plank (1992) Bioconjugate Chem 3:533-539 に記載されるようなガラクトース、ラクトースまたはトランスフェリン)に連結された合成遺伝子移入分子(例えば、ポリリジン、プロタミンおよびアルブミン、のような重合DNA結合カチオン)とともにインキュベートされ得る。

10

【0166】

裸のDNAもまた、宿主細胞を形質転換するために使用され得る。例示的な裸のDNA導入方法は、WO90/11092 および米国特許第5,580,859号に記載される。取り込み効率は、生分解性のラテックスビーズを用いて改良され得る。DNAコートラテックスビーズは、ビーズによるエンドサイトーシス開始の後に効率よく細胞へと輸送される。この方法は、ビーズを処理して疎水性を高め、それによってエンドソームの破壊および細胞質へのDNAの放出を容易にすることによってさらに改良され得る。

20

【0167】

遺伝子送達ビヒクルとして作用し得るリボソームは、米国特許第5,422,120号、WO95/13796、WO94/23697、WO91/14445、およびEP-524,968に記載される。米国特許出願60/023,867に記載されるように、非ウイルス性送達において、ポリペプチドをコードする核酸配列は、高レベル発現のための従来の制御配列を含む従来のベクターへと挿入され得、次いで細胞標的化リガンド(例えば、アシアロオロソムコイド、インスリン、ガラクトース、ラクトースまたはトランスフェリン)に連結された、重合性DNA結合カチオン(例えば、ポリリジン、プロタミン、およびアルブミン)のような合成遺伝子移入分子とともにインキュベートされ得る。他の送達系は、種々の組織特異的または普遍的な作用性のプロモーターの制御下に遺伝子を含むDNAをカプセル化するためのリボソームの使用を含む。さらに、使用に適切な非ウイルス送達は、機械的送達系(例えば、Woffendinら(1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91(24):11581-11585に記載されるアプローチを含む。さらに、コード配列およびそのようなものの発現産物は、光重合化ヒドロゲル物質の沈着を介して送達され得る。コード配列の送達について使用され得る、遺伝子送達のための他の従来の方法としては、例えば、手動の遺伝子移入粒子銃(米国特許第5,149,655号に記載されるような)；移入された遺伝子を活性化するための電離放射線の使用(米国特許第5,206,152号およびWO92/11033に記載されるような)が挙げられる。

30

40

【0168】

例示的なリボソームおよびポリカチオン性遺伝子送達ビヒクルは、米国特許第5,422,120号および同第4,762,915号；WO95/13796；WO94/23697；およびWO91/14445；EP-0524968；およびStryer、Biochemistry、236-240頁(1975)、W.H. Freeman、San Francisco；Szoka(1980) Biochem Biophys Acta 600:1；Bayer(1979) Biochem Biophys Acta 550:464；Rivnay(1987) Meth Enzymol 149:119；Wang(1987) Proc Natl Acad Sci 84:785

50

1 ; P l a n t (1 9 8 9) A n a l B i o c h e m 1 7 6 : 4 2 0 に記載されるものである。

【 0 1 6 9 】

ポリヌクレオチド組成物は、治療有効量の遺伝子治療ビヒクル（この用語は上記に定義されるとおりである）を含み得る。本発明の目的のために、有効用量は、投与される個体において、約 0 . 0 1 m g / k g ~ 5 0 m g / k g または 0 . 0 5 m g / k g ~ 約 1 0 m g / k g の DNA 構築物である。

【 0 1 7 0 】

（送達方法）

一旦処方されると、本発明のポリヌクレオチド組成物は、（ 1 ）被験体に直接）；（ 2 ）エキソビボで被験体由来の細胞に送達されて；または（ 3 ）組換えタンパク質の発現のためにインビトロで、投与され得る。処置される被験体は、哺乳動物または鳥類であり得る。ヒト被験体もまた処置され得る。

10

【 0 1 7 1 】

この組成物の直接送達は、皮下、腹腔内、経皮的（ t r a n s d e r m a l l y ）もしくは経皮的（ t r a n s c u t a n e o u s l y ）、静脈内、または筋肉内の注射によって、あるいは組織の間質空間への送達のいずれかによって一般的に達成される。この組成物はまた、腫瘍または病巣へ投与され得る。他の投与様式は、経口投与および肺投与、坐剤、ならびに経皮適用、針、および遺伝子銃またはハイボスプレーを含む。投薬治療は、単回用量スケジュールまたは多数回用量スケジュールであり得る。W O 9 8 / 2 0 7 3 4

20

【 0 1 7 2 】

エキソビボ送達および被験体への形質転換細胞の再移植のための方法は、当該分野で公知であり、そして例えば W O 9 3 / 1 4 7 7 8 に記載されている。エキソビボ適用に有用である細胞の例としては、例えば、幹細胞、特に、造血細胞、リンパ細胞、マクロファージ、樹状細胞または腫瘍細胞が挙げられる。

【 0 1 7 3 】

一般的に、エキソビボ適用およびインビトロ適用の両方のための核酸の送達は、以下の手順：例えば、デキストラン媒介トランスフェクション、リン酸カルシウム沈降、ポリブレン媒介トランスフェクション、原形質融合、エレクトロポレーション、ポリヌクレオチドのリボソーム内へのカプセル化、および DNA の核への直接の微量注入（これらはすべて当該分野で周知である）で達成され得る。

30

【 0 1 7 4 】

（ポリヌクレオチドおよびポリペプチドの薬学的組成物）

上記に記載の薬学的に受容可能なキャリアおよび塩に加えて、以下のさらなる薬剤がポリヌクレオチド組成物および / またはポリペプチド組成物とともに使用され得る。

【 0 1 7 5 】

（ A . ポリペプチド）

1 つの例は、限定することなく以下を包含するポリペプチドである：アシアロオロソムコイド（ A S O R ）；トランスフェリン；アシアロ糖タンパク質；抗体；抗体フラグメント；フェリチン；インターロイキン；インターフェロン；顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（ G M - C S F ）；顆粒球コロニー刺激因子（ G - C S F ）；マクロファージコロニー刺激因子（ M - C S F ）；幹細胞因子およびエリスロポエチン。ウイルス抗原（例えば、エンベロープタンパク質）もまた、使用され得る。また、他の侵襲性生物由来のタンパク質（例えば、 R I I として知られる熱帯熱マラリア原虫（ p l a s m o d i u m f a l c i p a r u m ）のサーカムスポロゾイト（ c i r c u m s p o r o z o i t e ）タンパク質由来の 1 7 アミノ酸ペプチド）。

40

【 0 1 7 6 】

（ B . ホルモン、ビタミンなど）

包含され得る他の群は、例えば、ホルモン、ステロイド、アンドロゲン、エストロゲン

50

、甲状腺ホルモン、またはビタミン、葉酸である。

【0177】

(C. ポリアルキレン、ポリサッカリドなど)

また、ポリアルキレングリコールが、所望のポリヌクレオチド/ポリペプチドとともに含まれ得る。好ましい実施態様において、ポリアルキレングリコールは、ポリエチレングリコールである。さらに、モノサッカリド、ジサッカリド、またはポリサッカリドが含まれ得る。この局面の好ましい実施態様において、このポリサッカリドは、デキストランまたはDEAE-デキストランである。また、キトサンおよびポリ(乳酸-コ-グリコリド)

(D. 脂質およびリボソーム)

所望のポリヌクレオチド/ポリペプチドはまた、被験体またはそれに由来する細胞への送達の前に、脂質中にカプセル化され得るか、またはリボソーム中にパッケージングされ得る。

【0178】

脂質カプセル化は、一般的に核酸に安定に結合し得るかまたは核酸を捕捉および維持し得る、リボソームを用いて達成される。縮合ポリヌクレオチドの脂質調製物に対する比は、変動し得るが、一般的に約1:1(mgDNA:マイクロモル脂質)であるか、またはより多くの脂質である。核酸の送達のためのキャリアとしてリボソーム使用の概説については、HugおよびSleight(1991)Biochim.Biophys.Acta.1097:1-17;Straubinger(1983)Meth.Enzymol.101:512-527を参照のこと。

【0179】

本発明における使用のためのリボソーム調製物は、カチオン性(正に荷電した)調製物、アニオン性(負に荷電した)調製物および中性調製物を包含する。カチオン性リボソームは、機能的な形態で、プラスミドDNA(Felgner(1987)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 84:7413-7416);mRNA(Malone(1989)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86:6077-6081;および精製した転写因子(Debs(1990)J.Biol.Chem.265:10189-10192)の細胞内送達を媒介することが示されている。

【0180】

カチオン性リボソームは容易に入手可能である。例えば、N[1-2,3-ジオレイルオキシ)プロピル]-N,N,N-トリエチルアンモニウム(DOTMA)リボソームは、GIBCO BRL、Grand Island、NYからの商標リポフェクチン(Lipofectin)の下で入手可能である(Fegner前出もまた参照のこと)。他の市販されているリボソームとしては、トランスフェクテース(transfectace)(DDAB/DOPE)およびDOTAP/DOPE(Boehringer)が挙げられる。他のカチオン性リボソームは、当該分野で周知の技法を使用して、容易に利用可能な物質から調製され得る。例えば、DOTAP(1,2-ビス(オレイルオキシ)-3-(トリメチルアンモニオ)プロパン)リボソームの合成の記載について、Szoka(1978)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 75:4194-4198;WO90/11092を参照のこと。

【0181】

同様に、アニオン性リボソームおよび中性リボソームは、例えば、Avanti Polar Lipids(Birmingham,AL)から容易に入手可能であるか、または容易に入手可能な物質を使用してたやすく調製され得る。このような物質としては、とりわけ、ホスファチジルコリン、コレステロール、ホスファチジルエタノールアミン、ジオレオイルホスファチジルコリン(DOPC)、ジオレオイルホスファチジルグリセロール(DOPG)、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン(DOPE)などが挙げられる。これらの物質はまた、適切な比率のDOTMA出発物質およびDOTAP出発物質と混合され得る。これらの物質を使用してリボソームを作製する方法は、当該分野で

10

20

30

40

50

周知である。

【0182】

このリボソームとしては、多重膜リボソーム (MLV)、小さな単膜リボソーム (SUV)、または大きな単膜リボソーム (LUV) が挙げられ得る。種々のリボソーム - 核酸複合体は当該分野で公知の方法を使用して調製され得る。例えば、Straubinger (1983) Meth. Immunol. 101: 512 - 527; Szoka (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 4194 - 4198; Papahadjopoulos (1975) Biochim. Biophys. Acta 392: 483; Wilson (1979) Cell 17: 77; Deamer および Bangham (1976) Biochim. Biophys. Acta 443: 629; Ostro (1977) Biochem. Biophys. Res. Commun. 76: 836; Fraley (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 3348; Enoch および Strittmatter (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 145; Fraley (1980) J. Biol. Chem. (1980) 255: 10431; Szoka および Papahadjopoulos (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 145; ならびに Schaefer - Ridder (1982) Science 215: 166 を参照のこと。

10

【0183】

(E. リポタンパク質)

20

さらに、リポタンパク質が、送達されるポリヌクレオチド / ポリペプチドと共に含まれ得る。利用されるリポタンパク質の例としては、カイロミクロン、HDL、IDL、LDL、および VLDL が挙げられる。これらのタンパク質の変異体、フラグメント、または融合物もまた、使用され得る。また、天然に存在するリポタンパク質の改変体 (例えば、アセチル化された LDL) が使用され得る。これらのリポタンパク質は、リポタンパク質レセプターを発現する細胞へのポリヌクレオチドの送達を標的化し得る。好ましくは、リポタンパク質が、送達されるポリヌクレオチドと共に含まれる場合、他の標的化リガンドはその組成物中には含まれない。

【0184】

天然に存在するリポタンパク質は、脂質部分およびタンパク質部分を含む。このタンパク質部分は、アポタンパク質として知られる。現在では、アポタンパク質 A、B、C、D、および E が単離および同定されている。少なくともこれらの 2 つはいくつかのタンパク質を含み、ローマ数字、AI、AII、AIV; CI、CII、CIII によって命名されている。

30

【0185】

1 つのリポタンパク質は、1 つより多くのアポタンパク質を含み得る。例えば、天然に存在するカイロミクロンは A、B、C、および E から構成され、時間が経てばこれらのリポタンパク質は A を欠失し、そして C および E アポタンパク質を獲得する。VLDL は、A、B、C、および E アポタンパク質を含み、LDL はアポタンパク質 B を含み; そして HDL はアポタンパク質 A、C、および E を含む。

40

【0186】

これらのアポタンパク質のアミノ酸は公知であり、そして例えば、Breslow (1985) Annu Rev. Biochem. 54: 699; Law (1986) Adv. Exp. Med. Biol. 151: 162; Chen (1986) J. Biol. Chem. 261: 12918; Kane (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 2465; および Utermann (1984) Hum. Gene. 65: 232 に記載されている。

【0187】

リポタンパク質は、トリグリセリド、コレステロール (遊離およびエステル)、およびリン脂質を含む、種々の脂質を含む。この脂質の組成は、天然に存在するリポタンパク質

50

において変化する。例えば、カイロミクロンは主としてトリグリセリドを含む。天然に存在するリポタンパク質の脂質含有物のより詳細な記載は、例えば、Meth. Enzymol. 128 (1986) に見いだされ得る。この脂質の組成は、レセプター結合活性についてアポタンパク質の立体構造を補助するように選択される。脂質組成はまた、ポリヌクレオチド結合分子との疎水性相互作用および会合を容易にするように選択され得る。

【0188】

天然に存在するリポタンパク質は、例えば、血清から超遠心分離によって単離され得る。そのような方法は、Meth. Enzymol. (前出); Pitas (1980) J. Biochem. 255: 5454 - 5460 および Mahay (1979) J. Clin. Invest. 64: 743 - 750 に記載される。リポタンパク質はまた、インビトロ方法によってかまたは所望の宿主細胞中のアポタンパク質遺伝子の発現により組換え方法によって産生され得る。例えば、Atkinson (1986) Annu Rev Biophys Chem 15: 403 および Radding (1958) Biochim Biophys Acta 30: 443 を参照のこと。リポタンパク質はまた、Biomedical Technologies, Inc., Stoughton, Massachusetts, USA のような商業的な供給者から購入され得る。さらなるリポタンパク質の記載は、Zuckermannら、PCT/US97/14465 にて見い出され得る。

10

【0189】

(F. ポリカチオン性薬剤)

20

ポリカチオン性薬剤は、送達される所望のポリヌクレオチド/ポリペプチドを含む組成中に、リポタンパク質を伴ってかまたはリポタンパク質を伴わずに含まれ得る。

【0190】

ポリカチオン性薬剤は、代表的には、生理的に適切なpHにおいて正味の正電荷を示し、そして所望の位置への送達を容易にするために核酸の電荷を中和し得る。これらの薬剤は、インビトロ適用、エキソビボ適用、およびインビボ適用のいずれも有する。ポリカチオン性薬剤は、生きている被験体に、筋肉内、皮下などのいずれかで核酸を送達するために使用され得る。

【0191】

以下は、ポリカチオン性薬剤として有用なポリペプチドの例である：ポリリジン、ポリアルギニン、ポリオルニチン、およびプロタミン。他の例としては、ヒストン、プロタミン、ヒト血清アルブミン、DNA結合タンパク質、非ヒストン染色体タンパク質、DNAウイルス由来のコートタンパク質（例えば、X174）が挙げられる。転写因子もまた、DNAに結合するドメインを含み、従って核酸縮合薬剤として有用であり得る。手短に言えば、転写因子（例えば、C/CEBP、c-jun、c-fos、AP-1、AP-2、AP-3、CPF、Prot-1、Sp-1、Oct-1、Oct-2、CREP、およびTFIID）は、DNA配列に結合する塩基性ドメインを含む。

30

【0192】

有機ポリカチオン性薬剤としては、スペルミン、スペルミジン、およびプトレシン (purtrescine) が挙げられる。

40

【0193】

ポリカチオン性薬剤の大きさおよびその物理的特性は、上記の表から推定されて、他のポリペプチドポリカチオン性薬剤が構築され得るか、または合成ポリカチオン性薬剤が産生され得る。

【0194】

有用な合成ポリカチオン性薬剤としては、例えば、DEAE-デキストラン、ポリブレンが挙げられる。LipofectinTM、およびlipofectAMINETMは、ポリヌクレオチド/ポリペプチドと組み合わせた場合にポリカチオン性複合体を形成するモノマーである。

【0195】

50

(免疫診断アッセイ)

本発明の *Neisseria Men B* 抗原またはその抗原性フラグメントは、抗体レベルを検出するためのイムノアッセイにおいて使用され得る（または、逆に抗 *Neisseria* 抗体は抗原レベルを検出するために使用され得る）。十分に規定された組換え抗原に基づくイムノアッセイは、侵襲性の診断方法と置き換えるために開発され得る。生物学的サンプル（例えば、血液サンプルまたは血清サンプルを含む）内の *Neisseria Men B* タンパク質またはそのフラグメントに対する抗体が検出され得る。このイムノアッセイの設計は、多くのバリエーションの対象であり、そして種々のこれらは当該分野で公知である。イムノアッセイのプロトコルは、例えば、競合アッセイ、または直接反応アッセイ、またはサンドイッチ型アッセイに基づき得る。プロトコルはまた、例えば、固体支持体を使用し得、または免疫沈降によってなされ得る。ほとんどのアッセイは、標識された抗体またはポリペプチドの使用を含み、その標識は、例えば、蛍光分子、化学発光分子、放射性分子、または色素分子であり得る。プローブからのシグナルを増幅するアッセイは公知である；これらの例は、ビオチンおよびアビジンを利用するアッセイ、ならびに酵素標識および酵素媒介イムノアッセイ（例えば、ELISA アッセイ）である。

10

20

30

40

50

【0196】

免疫診断に適切であり、かつ適切な標識試薬を備えるキットは、適切な容器中に、アッセイの実行に必要とされる残りの試薬および物質（例えば、適切な緩衝液、塩溶液など）ならびにアッセイの説明書の適切なセットと共に本発明の組成物を含む適切な物質を詰めることによって構築される。

【0197】

(核酸ハイブリダイゼーション)

「ハイブリダイゼーション」とは、水素結合による2つの核酸配列の互いに対する会合をいう。代表的には、1つの配列は、固体支持体に固定され、そして他方は溶液中で遊離している。次いで、2つの配列は水素結合に好ましい条件下で互いに接触される。この結合に影響を与える因子としては以下が挙げられる：溶媒のタイプおよび容量；反応温度；ハイブリダイゼーションの時間；攪拌；液体相の配列の固体支持体への非特異的な付着をブロックする薬剤（Denhardt's 試薬またはBLOTTO）；配列の濃度；配列の会合の速度を増大させる化合物（硫酸デキストランまたはポリエチレングリコール）の使用；およびハイブリダイゼーション後の洗浄条件のストリンジェンシー。Sambrookら（前出）第2巻、第9章、9.47～9.57頁を参照のこと。

【0198】

「ストリンジェンシー」とは、異なる配列よりも非常に類似する配列の会合に好ましいハイブリダイゼーション反応における条件をいう。例えば、研究中のハイブリッドの計算された T_m より約120～200 低い温度および塩濃度の組み合わせが選択されるべきである。温度および塩条件はしばしば、フィルターに固定したゲノムDNAのサンプルが目的の配列にハイブリダイズし、次いで異なるストリンジェンシーの条件下で洗浄される、予備的な実験において経験的に決定され得る。Sambrookら、9.50頁を参照のこと。

【0199】

例えば、サザンブロットを行う場合、考慮する変数は、(1)プロットされるDNAの複雑さ、および(2)プローブおよび検出される配列の間の相同性である。研究されるフラグメントの全量は、プラスミドまたはファージ消化物については0.1～1 μg 、高度に複雑な真核生物ゲノム中の単一コピー遺伝子については 10^{-9} ～ 10^{-8} gまで、10倍変化し得る。より低い複雑さのポリヌクレオチドについては、実質的により短いプロットティング、ハイブリダイゼーション、および曝露時間、より少量の出発ポリヌクレオチド、およびより低い非活性のプローブが使用され得る。例えば、単一コピーの酵母遺伝子は、1 μg の酵母DNAで開始し、2時間プロットし、そして4～8時間 10^8 cpm/ μg を用いてハイブリダイズして、わずか1時間の曝露時間を用いて検出され得る。単一コピーの哺乳動物遺伝子について、保存性のアプローチは、10 μg のDNAで開始し、

一晚ブロットし、そして 10^8 c p m / μ g より多いプローブを用いて 10 % 硫酸デキストランの存在下で一晚ハイブリダイズし、約 24 時間露光時間を生じる。

【0200】

いくつかの因子が、プローブと目的のフラグメントとの間の DNA - DNA ハイブリッドの融解温度 (T_m)、ならびに、結果として、ハイブリダイゼーションおよび洗浄についての適切な条件に影響を与え得る。多くの場合において、そのプローブはフラグメントに対して 100 % 相同なわけではない。他の共通して直面する変化には、ハイブリダイズする配列の長さおよび全 G + C 含量、ならびにイオン強度およびハイブリダイゼーション緩衝液のホルムアミド含量が含まれる。これらのすべての因子の効果は、一つの式によって近似され得る：

$$T_m = 81 + 16.6 (\log_{10} C_i) + 0.4 [\% (G + C)] - 0.6 (\% \text{ホルムアミド}) - 600 / (n - 1) - 1.5 (\% \text{ミスマッチ})。$$

ここで C_i は塩濃度 (一価イオン) であり、そして塩基対内のハイブリッドの長さである (Meinkoth および Wahl (1984) Anal. Biochem. 138: 267 / 284 からわずかに改変した)。

【0201】

ハイブリダイゼーション実験の設計において、核酸ハイブリダイゼーションに影響を与えるいくつかの因子が簡便に変更され得る。ハイブリダイゼーションおよび洗浄の温度ならびに洗浄時の塩濃度を調整するのが最も単純である。ハイブリダイゼーション温度 (すなわち、ストリンジェンシー) が上昇するにつれて、非相同的な鎖の間で起こるハイブリダイゼーションは起こりにくくなるようであり、結果として、バックグラウンドが減少する。放射標識したプローブが固定化されたフラグメントと完全に相同ではない場合 (遺伝子ファミリーおよび種間のハイブリダイゼーション実験における場合で頻繁であるように)、ハイブリダイゼーション温度は低下されなければならない、そしてバックグラウンドが増大する。洗浄の温度は、類似の様式で、ハイブリダイゼーションバンドの強度、およびバックグラウンドの程度に影響を与える。洗浄のストリンジェンシーはまた、塩濃度の減少とともに増大する。

【0202】

一般的に、50 % ホルムアミドの存在下で都合よいハイブリダイゼーション温度は、標的フラグメントに 95 % ~ 100 % 相同であるプローブについて 42 °C、90 % ~ 95 % 相同性では 37 °C、85 % ~ 90 % 相同性については 32 °C である。より低い相同性については、上記の式を用いて、適切にホルムアミド含量が低くされ、そして温度が調整されるべきである。プローブと標的フラグメントとの間の相同性が未知である場合、最も単純なアプローチは、ともにストリンジェントではないハイブリダイゼーション条件および洗浄条件で開始することである。オートラジオグラフィ後に非特異的バンドまたは高いバックグラウンドが観察される場合、フィルターは高ストリンジェンシーで洗浄され得、そして再び露光され得る。露光のために必要な時間がこのアプローチを非実用的にする場合、いくつかのハイブリダイゼーションおよび / または洗浄ストリンジェンシーが並行して試験されるべきである。

【0203】

(髄膜炎菌の (meningococcal) 80 ~ 85 kDa のタンパク質の同定)
N. meningitidis 血清型 B 由来の種々の外膜の小胞調製物は、約 80 ~ 85 kDa の成分を含んでいたことが観察された。このタンパク質を、SDS - PAGE ゲルから精製し、そして N 末端を配列決定した (配列番号 1)。

【0204】

抗体は、SDS - PAGE で精製した 50 より多くの様々な血清型および血清型の N. meningitidis 株における等価のタンパク質と交差反応したタンパク質に対して惹起させた。N. gonorrhoeae、N. polysaccharia、および N. lactamica との交差反応もまた、観察した。ワクチン接種された患者由来の免疫後血清もまた、このタンパク質と反応した。

【0205】

完全な遺伝子を、血清型Bの*N. meningitidis*（配列番号2）からクローン化し、そしてコードされたタンパク質を、推定した（配列番号3）。上記のN末端の配列決定との比較により、シグナルペプチド（配列番号4）および成熟配列（配列番号5）を推定する。

【0206】

（*N. meningitidis* 血清型Aおよび*N. gonorrhoeae*における対応する遺伝子の同定）

血清型Bの*N. meningitidis* 配列に基づいて、*N. meningitidis* 血清型Aおよび*N. gonorrhoeae* 由来の対応する遺伝子をクローン化し、そして配列決定した（「ORF」と称される）。 10

【0207】

血清型Aの*N. meningitidis* 由来の完全な遺伝子を、配列番号6に示し、このコードされたタンパク質を配列番号7に示す。このシグナルペプチドおよび成熟配列は、配列番号8および配列番号9である。

【0208】

N. gonorrhoeae 由来の完全な遺伝子を、配列番号10に示し、このコードされたタンパク質を配列番号11に示す。このシグナルペプチドおよび成熟配列は、配列番号12および配列番号13である。

【0209】 20

（配列比較）

これらのタンパク質の配列を比較した。これらの配列は、高度に相同である。

【0210】

N. meningitidis 血清型Bの配列および*N. gonorrhoeae* の配列は、797aaの重複において、95.4%の同一性を示す：

【0211】

【化 4】

	10	20	30	40	50	60
orf21.pep	MKLKQIASALMMLGISPLALADFTIQDIRVEGLQRTPESTVFNYLPVKVGDTYNDTHGSA					
orf21ng.pep	MKLKQIASALMMLGISPLAFADFTIQDIRVEGLQRTPESTVFNYLPVKVGDTYNDTHGSA					
	10	20	30	40	50	60
	70	80	90	100	110	120
orf21.pep	IIKSLYATGFFDDVRVETADGQLLLTVIERPTIGSLNITGAKMLQNDAIKQLESFGLAQ					
orf21ng.pep	IIKSLYATGFFDDVRVETADGQLLLTVIERPTIGSLNITGAKMLQNDAIKQLESFGLAQ					
	70	80	90	100	110	120
	130	140	150	160	170	180
orf21.pep	SQYFNQATLNQAVAGLKEEYLGRGKLNITPKVTKLARNRVDIDITIDEGKSAKITDIE					
orf21ng.pep	SQYFNQATLNQAVAGLKEEYLGRGKLNITPKVTKLARNRVDIDITIDEGKSAKITDIE					
	130	140	150	160	170	180
	190	200	210	220	230	240
orf21.pep	FEGNQVYSRDKLMRQMSLTEGGIWTWLTNRNQFNEQKFAQDMEKVTDFYQNNGYDFRIL					
orf21ng.pep	FEGNQVYSRDKLMRQMSLTEGGIWTWLTNRSDRFDRQKFAQDMEKVTDFYQNNGYDFRIL					
	190	200	210	220	230	240
	250	260	270	280	290	300
orf21.pep	DTDIQTNEDEKTRQTIKTVHEGGRFRWGKVSIEGDTNEVPKAELEKLLTMKPGKMYERQQ					
orf21ng.pep	DTDIQTNEDEKTRQTIKTVHEGGRFRWGKVSIEGDTNEVPKAELEKLLTMKPGKMYERQQ					
	250	260	270	280	290	300
	310	320	330	340	350	360
orf21.pep	MTAVLGEIQNRMGSAFYAYSEISVQPLPNAETKTVDVFLHIEPGRKIYVNEIHTGNKNT					
orf21ng.pep	MTAVLGEIQNRMGSAFYAYSEISVQPLPNAETKTVDVFLHIEPGRKIYVNEIHTGNKNT					
	310	320	330	340	350	360
	370	380	390	400	410	420
orf21.pep	RDEVVRRELRLQMESAPYDTSKLQSKERVVELLGYFDNVQFQDAVPLAGTPDKVDLNMSLTE					
orf21ng.pep	RDEVVRRELRLQMESAPYDTSKLQSKERVVELLGYFDNVQFQDAVPLAGTPDKVDLNMSLTE					
	370	380	390	400	410	420
	430	440	450	460	470	480
orf21.pep	RSTGSLDLSAGWVQDTGLVMSAGVSQDNLFQGTGKSAALRASRSKTTLNGLSFTDPYFTA					
orf21ng.pep	RSTGSLDLSAGWVQDTGLVMSAGVSQDNLFQGTGKSAALRASRSKTTLNGLSFTDPYFTA					
	430	440	450	460	470	480
	490	500	510	520	530	540
orf21.pep	DGVSGLGYDVYGGKAFDPRKASTSIKQYKTTTAGAGIRMSVPVTEYDRVNFGLVAEHLTVNT					
orf21ng.pep	DGVSGLGYDIYGGKAFDPRKASTSVKQYKTTTAGGGVRMGIPVTEYDRVNFGLAAEHLTVNT					
	490	500	510	520	530	540
	550	560	570	580	590	600
orf21.pep	YNKAPKHYADFIKKYKGTGTDGSGFKGWLKGTGVGWRNKTDASALWPTRGYLTGVNAEIA					
orf21ng.pep	YNKAPKRYADFIKKYKGTGADGSGFKGLLYKGTGVGWRNKTDASASWPTRGYLTGVNAEIA					
	550	560	570	580	590	600
	610	620	630	640	650	660
orf21.pep	LPQSKLQYYSATHNQWFFPLSKTFTLMLGGEVGIAGGYGRTKEIPFFENFYGGGLGSVR					

10

20

30

40

(系売き)

```

orf21ng.pep  LPGSKLQYYSATHNQTWFFPLSKTFTLMLGGEVGIAGGYGRTKEIPFFENFYGGGLGSVR
               610      620      630      640      650      660
               670      680      690      700      710      720
orf21.pep     GYESGTLGPKVYDEYGEKISYGGNKKANVSAELLFPMPGAKDARTVRLSLFADAGSVWDG
               |||||
orf21ng.pep   GYESGTLGPKVYDEYGEKISYGGNKKANVSAELLFPMPGAKDARTVRLSLFADAGSVWDG
               670      680      690      700      710      720
               730      740      750      760      770      780
orf21.pep     KTYDDNSSSATGGRVQNIYGAGNTHKSTFTNELRYSAGGAVTWLSPLGPMKFSYAYPLKK
               :||  ::| :|  ::::| :| :|||
orf21ng.pep   RTY----TAAENGNNKSVYSE-NAHKSTFTNELRYSAGGAVTWLSPLGPMKFSYAYPLKK
               730      740      750      760      770
               790
orf21.pep     KPEDEIQRFFQFLGTTTF
               |||||
orf21ng.pep   KPEDEIQRFFQFLGTTTFX
               780      790

```

10

20

N . m e n i n g i t i d i s 血清型 A の配列および B の配列は、7 9 7 a a の重複に
 おいて、9 9 . 9 % の同一性を示す：

【 0 2 1 2 】

【化 5】

	10	20	30	40	50	60
orf21.pep	MKLKQIASALMMLGISPLALADFTIQDIRVEGLQRTPESTVFNYLPVKVGDYNDTHGSA					
orf21a.pep	MKLKQIASALMMLGISPLALADFTIQDIRVEGLQRTPESTVFNYLPVKVGDYNDTHGSA					
	10	20	30	40	50	60
	70	80	90	100	110	120
orf21.pep	IIKSLYATGFFDDVRVETADGQLLLTVIERPTIGSLNITGAKMLQNDAIKKNLESFGLAQ					
orf21a.pep	IIKSLYATGFFDDVRVETADGQLLLTVIERPTIGSLNITGAKMLQNDAIKKNLESFGLAQ					
	70	80	90	100	110	120
	130	140	150	160	170	180
orf21.pep	SQYFNQATLNQAVAGLKEEYLGKGLNIQITPKVTKLARNRVDIDITIDEGKSAKITDIE					
orf21a.pep	SQYFNQATLNQAVAGLKEEYLGKGLNIQITPKVTKLARNRVDIDITIDEGKSAKITDIE					
	130	140	150	160	170	180
	190	200	210	220	230	240
orf21.pep	FEGNQVYSRDKLMRQMSLTEGGIWTWLTSSNQFNEQKFAQDMEKVTDIFYQNNGYDFRIL					
orf21a.pep	FEGNQVYSRDKLMRQMSLTEGGIWTWLTSSNQFNEQKFAQDMEKVTDIFYQNNGYDFRIL					
	190	200	210	220	230	240
	250	260	270	280	290	300
orf21.pep	DTDIQTNEDEKTKQTIKITVHEGGRFRWGKVSIEGDTNEVPKAELEKLLTMKPGKMYERQQ					
orf21a.pep	DTDIQTNEDEKTKQTIKITVHEGGRFRWGKVSIEGDTNEVPKAELEKLLTMKPGKMYERQQ					
	250	260	270	280	290	300
	310	320	330	340	350	360
orf21.pep	MTAVLGEIQNRMGSAAYSEISVQPLPNAETKTVDVFLHIEPGRKIYVNEIHITGNNKT					
orf21a.pep	MTAVLGEIQNRMGSAAYSEISVQPLPNAETKTVDVFLHIEPGRKIYVNEIHITGNNKT					
	310	320	330	340	350	360
	370	380	390	400	410	420
orf21.pep	RDEVVRRELQMESAPYDTSKLQSKERVLLGYFDNVQFQDAVPLAGTPDKVDLNMSTL					
orf21a.pep	RDEVVRRELQMESAPYDTSKLQSKERVLLGYFDNVQFQDAVPLAGTPDKVDLNMSTL					
	370	380	390	400	410	420

10

20

30

40

(続き)

```

              430      440      450      460      470      480
orf21.pep    RSTGSLDLSAGWVQDTGLVMSAGVSQDNLFGTGKSAALRASRSKTTLNGSLSFDPYFTA
              |||||
orf21a.pep   RSTGSLDLSAGWVQDTGLVMSAGVSQDNLFGTGKSAALRASRSKTTLNGSLSFDPYFTA
              430      440      450      460      470      480

              490      500      510      520      530      540
orf21.pep    DGVSLGYDVYGKAFDPRKASTSIKQYKTTTAGAGIRMSVPVTEYDRVNFGLVAEHLTVNT
              |||||
orf21a.pep   DGVSLGYDVYGKAFDPRKASTSIKQYKTTTAGAGIRMSVPVTEYDRVNFGLVAEHLTVNT
              490      500      510      520      530      540

              550      560      570      580      590      600
orf21.pep    YNKAPKHYADFIKKYKTDGTDGSFKGWLYKGTVGWGRNKTDLSALWPTRGYLTGVNAEIA
              |||||
orf21a.pep   YNKAPKHYADFIKKYKTDGTDGSFKGWLYKGTVGWGRNKTDLSALWPTRGYLTGVNAEIA
              550      560      570      580      590      600

              610      620      630      640      650      660
orf21.pep    LPGSKLQYYSATHNQTWFFPLSKTFTLMLGGEVGIAGGYGRTKEIPFFENFYGGGLGSRV
              |||||
orf21a.pep   LPGSKLQYYSATHNQTWFFPLSKTFTLMLGGEVGIAGGYGRTKEIPFFENFYGGGLGSRV
              610      620      630      640      650      660

              670      680      690      700      710      720
orf21.pep    GYESGTLGPKVYDEYGEKISYGGNKKANVSAELLFPMPGAKDARTVRLSLFADAGSVWDG
              |||||
orf21a.pep   GYESGTLGPKVYDEYGEKISYGGNKKANVSAELLFPMPGAKDARTVRLSLFADAGSVWDG
              670      680      690      700      710      720

              730      740      750      760      770      780
orf21.pep    KTYDDNSSSATGGRVQNIYGAGNTHKSTFTNELRYSAGGAVTWLSPLGPMKFSYAYPLKK
              |||||
orf21a.pep   KTYDDNSSSATGGRVQNIYGAGNTHKSTFTNELRYSAGGAVTWLSPLGPMKFSYAYPLKK
              730      740      750      760      770      780

              790
orf21.pep    KPEDIQRFQFQLGTTF
              |||
orf21a.pep   KPEDIQRFQFQLGTTFX
              790

```

10

20

30

40

50

【0213】

この高度な保存は、単一のタンパク質が、種々の *Nesseriae* 種に対する免疫応答を誘導し得ることを、示唆する。

【0214】

(ワクチン)

上記のように同定されたこれらのタンパク質を発現させ、そして免疫化のために使用する。良好な免疫応答が、このタンパク質に対して観察される。

【0215】

(配合ワクチン)

さらに、このタンパク質を、他の病原性生物に対する抗原とそれぞれ配合し(例えば、

血清型 C の m e n i n g i t i s に対してカイロンポリサッカリドワクチン)、そして免疫化のために使用した。良好な免疫応答が観察された。

【0216】

(さらなるNmB成分)

ノルウェーOMVワクチン(Norwegian OMV vaccine)によって誘導される防御は、効果的であるが、そのワクチンを作製するために用いられた株に限定される。このワクチンについての臨床試験は、10代のヒトにおいて29月後では57.2%の有効性を獲得したのみであったが、IgG応答は、ほぼ100%の患者で観察された[例えば、Rosenqvistら(1995) Infect. Immun. 63: 4642 - 4652]。

10

【0217】

驚くべきことに、ノルウェーOMVワクチンへの、さらなる規定された成分の添加が、その効果を有意に拡大することが見出された。

【0218】

ノルウェーワクチンは、NmB株2996に対する防御を誘導しない。2996株由来の規定されたタンパク質をノルウェーワクチンに添加し、そしてそのワクチンの効果が、驚くべき程度まで増大されたことを示した。さらに、NmC多糖類結合抗原[例えば、Constantinoら(1992) Vaccine 10: 691 - 698]の添加は、非常に有意な結果を与えた。

20

【0219】

この配合物の殺菌活性を、以下の表に示す:

【0220】

【表 2】

グループ	ノルウェー OMV	NmB 抗原	NmC 抗原	NmB 2996株に 対する殺菌活性
1	+	-	-	<4
2	+	#1	-	512
3	+	#2	-	>2048
4	+	#3	-	1024
5	+	#3	+	256
6	-	#3	-	2048
7	-	#3	+	2048

10

* 3つの異なる NmB 抗原が用いられた:

#1: ORF1 - 例えは, W099/24578 の実施例 77
(W099/55873 もまた参照のこと)

#2: タンパク質「287」 - 例えは, W099/57280
の図 21 (配列番号 3103-3108
もまた参照のこと)

#3: #1, #2, および タンパク質「919」の A1(OH)₃
中における混合物 (本明細書中の配列番
号 14; W099/57280 の図 23 および その中の
配列番号 3069-3074 もまた参照のこと)

20

30

2996 株 (グループ 1) に対する ノルウェー OMV ワクチンの無効性が、2996 株由来の規定された抗原を添加することによって克服され得ることは、容易に判断され得る。NmB タンパク質「287」を用いた結果は、特に有効であった。従って、ノルウェーワクチンは、多数の異なる株由来の OMV を調製することを必要とせずに改善され得る。

【0221】

このワクチンはまた、異種 MenB 株に対する防御もまた提供し得る。2996 株タンパク質を用いて調製された同じワクチンを、5 つの他の株に対して試験した。力価は、以下の通りであった。

【0222】

40

【表 3】

グループ	2996	BZ133	BZ232	1000	MC58	NGH38
1	<4	1024	<4	>2048	>2048	32
2	512	512	<4	>2048	>2048	256
3	4096	4096	256	1024	>2048	1024
4	1024	2048	<4	2048	>2048	64
5	256	>32000	<4	>2048	>2048	128
6	2048	2048	4	<4	64	4
7	2048	>32000	4	128	1024	128
コントロール	32768	4096	8192	16384	16384	8192

* コントロール: 2996株、BZ133株、および1000株
 = 同族株から調製されたOMV;
 BZ232株 = 2996から調製されたOMV;
 MC58 および NGH38 = SEAM3

10

20

第2の研究は、「ノルウェー」OMVに、以下のNmB株2996由来のタンパク質を補充した:

- 任意の融合パートナーなしにE. coliにおいて発現させた、タンパク質919
- Hisタグ融合体としてE. coliにおいて発現させた、ORF1
- GST融合体としてE. coliにおいて発現させた、タンパク質287
- これら3つのタンパク質の混合物(必要に応じてNmC結合体を有する)。

【0223】

調製物を、 $Al(OH)_3$ をと共にアジュバント化し、そして殺菌アッセイを用いて、同種株に対して試験した。結果は、以下の通りであった。

【0224】

30

【表 4】

抗原	NmB			NmC	
	2996	NGH38	394/98	C11	BZ133
OMVs	<4	32	1024 *	<4	1024
+919	<4	<4	4	<4	512
+ORF1	512	256	2048	4096	512
+287	4096	1024	1024	512	4096
+mix	1024	64	4	64	2048
+mix +NmC	256	128	2048	64000	>32000

*抗体は、静菌性であり、殺菌性ではない。

10

20

(抗原 287 を用いたさらなる研究)

ノルウェー OMV と抗原 287 との配合物を、さらに調査した。20 μ g の抗原 287 をノルウェー OMP ワクチン (15 μ g OMP + Al(OH)₃) と配合し、そしてマウスを免疫するために用いた。抗体を殺菌アッセイにおいて試験した。そして、この抗体は、試験された全ての株に対して有効であった。この結果は、以下の通りであった。

【0225】

【表 5】

30

抗原	NmB							NmA	NmC
	2996	BZ133	BZ232	1000	MCS8	NGH38	NZ	F6124	C11
OMVs	<4	1024	<4	>2048	32768	32	<4	-	-
287	8000	4096	256	<4	512	2048	1024	1024	2048
OMV+287	4096	4096	256	1024	4096	1024	1024	-	-

40

従って、ほぼ全ての場合において、OMV + タンパク質 287 の配合物は、驚くべきことに OMV 単独の結果よりも良好な結果を与えた。

【0226】

(組み換え OMV)

E. coli を形質転換し、ORF1、ORF40、および ORF46 を発現させた。組み換え E. coli から調製された OMV は、N. meningitidis に対する殺菌性抗体を誘導し得た。

【0227】

50

ORF1、ORF40、およびORF46(2996株)を、E.coliにおいてHisタグ融合体として発現させ、そして純粋なタンパク質、またはOMVの形態のいずれかで調製した。両方の調製物に対する殺菌性力価を、2996株をチャレンジに用いて試験した。

【0228】

【表6】

抗原:	ORF1	ORF40	ORF46
精製	64	2048	16000
OMV	1024	256	128000

10

異種チャレンジ株を用いる殺菌性力価もまた測定した。ORF46は、純粋形態で4096のMC58株に対する力価を与えるが、OMV形態の場合、この力価は、32000に上昇する。ORF1は、純粋形態で128のNmA株F6124に対する力価を与えるが、OMV形態の場合、この力価は、512に上昇する。ORF40は、純粋形態で512のMC58株に対する力価を与えるが、OMV形態の場合、2倍になる。

【0229】

これらのデータは、NmB抗原が、E.coliにおいてOMVとして調製される場合、免疫原性を保持することを示し、そしてさらに、この免疫原性は、実際に増強され得る。

20

【0230】

本出願は、例示のみの目的によって本発明を記載し、そして本発明の範囲および精神の中に維持される限り、改変がなされ得ることが理解される。

【数 1】

-1-

SEQUENCE LISTING

<110> CHIRON SpA

<120> SUPPLEMENTED OMV VACCINE AGAINST MENINGOCOCCUS

<130> P023785WO

<140>

<141> 2001-01-17

<150> GB-0001067.8

<151> 2000-01-17

<150> GB-0005699.4

<151> 2000-03-09

<160> 14

<170> SeqWin99, version 1.02

<210> 1

<211> 15

<212> PRT

<213> Neisseria meningitidis

<400> 1

Asp Phe Thr Ile Gln Asp Ile Arg Val Glu Gly Leu Gln Arg Thr
1 5 10 15

<210> 2

<211> 2394

<212> DNA

<213> Neisseria meningitidis

<400> 2

```

atgaaactga aacagattgc ttccgcactg atgatgttgg gcatatcgcc tttggcactt 60
gccgacttca ccatccaaga catccgcgtc gaaggcttgc agcgtaccga gccgagtacc 120
gtattcaact acctgccgtg caaagtcggc gacacctaca acgacacaca cggcagtgcc 180
atcatcaaaa gcctgtacgc caccggttcc tttgacgacg tacgcgtcga aactgcggac 240
gggcagctcc tgctgaccgt tatcgaacgc cccaccatcg gctcgtcaa catcacgggc 300
gcaaaaatgc tgcaaaacga cgccattaag aaaaacctcg aatcgttcgg gctggcgcag 360
tcgcaatact ttaatcaggg gacactcaat caggcagtcg ccggcctgaa agaagaatac 420
ctcggggcgc gcaaaactca tatccaaatc acgcccacaa taaccaaaact cgcccgaac 480
cgcgctcgaca tcgacatcac gattgacgag ggcaaatccg ccaaaatcac cgacatcgaa 540
tttgaaggca accaagtcta ttccgaccgc aaactgatgc ggcaaatgtc cctgaccgaa 600
ggcggcattt ggacatggct gacacgaagc aaccaattca acgagcagaa atttgcccaa 660
gatattggaaa aagtaaccga cttctaccaa aataacggct acttcgattt ccgtatcctc 720
gataccgaca tccaaaccaa cgaagacaaa accaagcaga ccatcaaaat caccgtccac 780
gaaggcggac gtttccgctg gggcaaaagc tccatcgaag gcgacaccaa cgaagtcccc 840
aaagccgaac tggaaaaact gctgaccatg aagcccggca aatggtacga acgcccagcag 900
atgaccgcgc ttttgggtga gattcagaac cgcatgggct cggcaggcta cgcatacagc 960
gaaatcagcg tacagccgct gccgaacgct gaaacaaaaa ccgtcgattt cgtcctgcac 1020
atcgaaccgg gccggaaaaa ctacgtcaac gaaatacaca tcaccggcaa caacaaaacc 1080
cgcgacgaag tcgtccgccc tgaattacgc caaatggaat ccgcacctta cgacacctcc 1140
aagctgcaac gttccaaaaga gcgcgtcgag cttttgggct acttcgacaa tgtccagttt 1200
gatgctgtcc cgcttgccgg cagcccgcac aaagtcgatt tgaacatgag tctgaccgaa 1260
cgttccaccg gttccctgga tttgagcgcg ggttgggttc aagataccgg gttggtcatg 1320
tccgcaggcg tttcccaaga caacctgttc ggtacgggca agtcggccgc actgcgcgcc 1380
tccaggagca aaaccacgct taacggctcg ctgtcgttta ctgaccgcga cttcacggca 1440

```

10

20

30

40

【数 2】

-2-

```

gacgggggtca gcctgggcta cgaatgtttac ggaaaagcct tgcacccgcg caaagcatcg 1500
accagcatca aacaatataa aaccaccacg gcaggcgcag gcacccgcag gagcgtgcct 1560
gttacccaat acgaccgcgt gaatttcggt ttggtggcag aacacctgac cgtcaacacc 1620
tacaacaaag cgcccaaaac ctatgccgac tttatcaaga aatacggcaa aaccgacggc 1680
acagacggca gcttcaaagg ctggctgtac aaaggtagcg tcggctgggg gcgcaacaaa 1740
accgacagcg cgttatggcc gacgcgcggc tacctgacgg gcgtgaacgc cgaaatcgcc 1800
ctgcctggca gcaaaactga atactactcc gccaccaca accaaacctg gttcttcccc 1860
ctgagcaaaa ccttcacgct gatgctcggc gccgaagtcg gcattgcggg cggctacggc 1920
agaaccaaag aaatccccct ctttgaaaac ttctacggcg gcggcctggg ttcggtgcgc 1980
ggatacgaag gcggcacgct cgggtccgaa gtctatgacg aatacggcga aaaaatcagc 2040
tacggcgcca acaaaaaagc caacgtctcc gccgagctgc tcttcccgat gcccggcgcg 2100
aaagacgcgc gcaccgtccg cctgagcctg ttgcccgaag caggcagcgt gtgggacggc 2160
aaaacctacg acgacaacag cagttccgcg accggcggca gggttcaaaa catttacggc 2220
gccggcaata ccataaatc cacccttacc aacgaattgc gctattccgc cggcggcgcg 2280
gttacctggc tctgccttt aggcccgatg aaattcagct acgcctaccc gctgaagaaa 2340
aaaccggaag acgaaatcca acgcttccaa ttccaactcg gcacgacgtt ctaa 2394

```

```

<210> 3
<211> 797
<212> PRT
<213> Neisseria meningitidis

```

```

<400> 3
Met Lys Leu Lys Gln Ile Ala Ser Ala Leu Met Met Leu Gly Ile Ser
1 5 10 15

Pro Leu Ala Leu Ala Asp Phe Thr Ile Gln Asp Ile Arg Val Glu Gly
20 25 30

Leu Gln Arg Thr Glu Pro Ser Thr Val Phe Asn Tyr Leu Pro Val Lys
35 40 45

Val Gly Asp Thr Tyr Asn Asp Thr His Gly Ser Ala Ile Ile Lys Ser
50 55 60

Leu Tyr Ala Thr Gly Phe Phe Asp Asp Val Arg Val Glu Thr Ala Asp
65 70 75 80

Gly Gln Leu Leu Leu Thr Val Ile Glu Arg Pro Thr Ile Gly Ser Leu
85 90 95

Asn Ile Thr Gly Ala Lys Met Leu Gln Asn Asp Ala Ile Lys Lys Asn
100 105 110

Leu Glu Ser Phe Gly Leu Ala Gln Ser Gln Tyr Phe Asn Gln Ala Thr
115 120 125

Leu Asn Gln Ala Val Ala Gly Leu Lys Glu Glu Tyr Leu Gly Arg Gly
130 135 140

Lys Leu Asn Ile Gln Ile Thr Pro Lys Val Thr Lys Leu Ala Arg Asn
145 150 155 160

Arg Val Asp Ile Asp Ile Thr Ile Asp Glu Gly Lys Ser Ala Lys Ile
165 170 175

Thr Asp Ile Glu Phe Glu Gly Asn Gln Val Tyr Ser Asp Arg Lys Leu
180 185 190

Met Arg Gln Met Ser Leu Thr Glu Gly Gly Ile Trp Thr Trp Leu Thr

```

10

20

30

40

【数 3】

-3-

195	200	205
Arg Ser Asn Gln Phe Asn Glu Gln Lys Phe Ala Gln Asp Met Glu Lys 210 215 220		
Val Thr Asp Phe Tyr Gln Asn Asn Gly Tyr Phe Asp Phe Arg Ile Leu 225 230 235 240		
Asp Thr Asp Ile Gln Thr Asn Glu Asp Lys Thr Lys Gln Thr Ile Lys 245 250 255		
Ile Thr Val His Glu Gly Gly Arg Phe Arg Trp Gly Lys Val Ser Ile 260 265 270		
Glu Gly Asp Thr Asn Glu Val Pro Lys Ala Glu Leu Glu Lys Leu Leu 275 280 285		
Thr Met Lys Pro Gly Lys Trp Tyr Glu Arg Gln Gln Met Thr Ala Val 290 295 300		
Leu Gly Glu Ile Gln Asn Arg Met Gly Ser Ala Gly Tyr Ala Tyr Ser 305 310 315 320		
Glu Ile Ser Val Gln Pro Leu Pro Asn Ala Glu Thr Lys Thr Val Asp 325 330 335		
Phe Val Leu His Ile Glu Pro Gly Arg Lys Ile Tyr Val Asn Glu Ile 340 345 350		
His Ile Thr Gly Asn Asn Lys Thr Arg Asp Glu Val Val Arg Arg Glu 355 360 365		
Leu Arg Gln Met Glu Ser Ala Pro Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Gln Arg 370 375 380		
Ser Lys Glu Arg Val Glu Leu Leu Gly Tyr Phe Asp Asn Val Gln Phe 385 390 395 400		
Asp Ala Val Pro Leu Ala Gly Thr Pro Asp Lys Val Asp Leu Asn Met 405 410 415		
Ser Leu Thr Glu Arg Ser Thr Gly Ser Leu Asp Leu Ser Ala Gly Trp 420 425 430		
Val Gln Asp Thr Gly Leu Val Met Ser Ala Gly Val Ser Gln Asp Asn 435 440 445		
Leu Phe Gly Thr Gly Lys Ser Ala Ala Leu Arg Ala Ser Arg Ser Lys 450 455 460		
Thr Thr Leu Asn Gly Ser Leu Ser Phe Thr Asp Pro Tyr Phe Thr Ala 465 470 475 480		
Asp Gly Val Ser Leu Gly Tyr Asp Val Tyr Gly Lys Ala Phe Asp Pro 485 490 495		
Arg Lys Ala Ser Thr Ser Ile Lys Gln Tyr Lys Thr Thr Thr Ala Gly 500 505 510		
Ala Gly Ile Arg Met Ser Val Pro Val Thr Glu Tyr Asp Arg Val Asn		

10

20

30

40

【数 4】

-4-

515	520	525
Phe Gly Leu Val Ala Glu His Leu Thr Val Asn Thr Tyr Asn Lys Ala		
530	535	540
Pro Lys His Tyr Ala Asp Phe Ile Lys Lys Tyr Gly Lys Thr Asp Gly		
545	550	555
Thr Asp Gly Ser Phe Lys Gly Trp Leu Tyr Lys Gly Thr Val Gly Trp		
565	570	575
Gly Arg Asn Lys Thr Asp Ser Ala Leu Trp Pro Thr Arg Gly Tyr Leu		
580	585	590
Thr Gly Val Asn Ala Glu Ile Ala Leu Pro Gly Ser Lys Leu Gln Tyr		
595	600	605
Tyr Ser Ala Thr His Asn Gln Thr Trp Phe Phe Pro Leu Ser Lys Thr		
610	615	620
Phe Thr Leu Met Leu Gly Gly Glu Val Gly Ile Ala Gly Gly Tyr Gly		
625	630	635
Arg Thr Lys Glu Ile Pro Phe Phe Glu Asn Phe Tyr Gly Gly Gly Leu		
645	650	655
Gly Ser Val Arg Gly Tyr Glu Ser Gly Thr Leu Gly Pro Lys Val Tyr		
660	665	670
Asp Glu Tyr Gly Glu Lys Ile Ser Tyr Gly Gly Asn Lys Lys Ala Asn		
675	680	685
Val Ser Ala Glu Leu Leu Phe Pro Met Pro Gly Ala Lys Asp Ala Arg		
690	695	700
Thr Val Arg Leu Ser Leu Phe Ala Asp Ala Gly Ser Val Trp Asp Gly		
705	710	715
Lys Thr Tyr Asp Asp Asn Ser Ser Ser Ala Thr Gly Gly Arg Val Gln		
725	730	735
Asn Ile Tyr Gly Ala Gly Asn Thr His Lys Ser Thr Phe Thr Asn Glu		
740	745	750
Leu Arg Tyr Ser Ala Gly Gly Ala Val Thr Trp Leu Ser Pro Leu Gly		
755	760	765
Pro Met Lys Phe Ser Tyr Ala Tyr Pro Leu Lys Lys Lys Pro Glu Asp		
770	775	780
Glu Ile Gln Arg Phe Gln Phe Gln Leu Gly Thr Thr Phe		
785	790	795
<210> 4		
<211> 21		
<212> PRT		
<213> Neisseria meningitidis		
<400> 4		
Met Lys Leu Lys Gln Ile Ala Ser Ala Leu Met Met Leu Gly Ile Ser		

10

20

30

40

【数 5】

-5-

1	5	10	15	
Pro Leu Ala Leu Ala				
	20			
<210> 5				
<211> 776				
<212> PRT				
<213> Neisseria meningitidis				
<400> 5				
Asp Phe Thr Ile Gln Asp Ile Arg Val Glu Gly Leu Gln Arg Thr Glu				10
1	5	10	15	
Pro Ser Thr Val Phe Asn Tyr Leu Pro Val Lys Val Gly Asp Thr Tyr				
	20	25	30	
Asn Asp Thr His Gly Ser Ala Ile Ile Lys Ser Leu Tyr Ala Thr Gly				
	35	40	45	
Phe Phe Asp Asp Val Arg Val Glu Thr Ala Asp Gly Gln Leu Leu Leu				
	50	55	60	
Thr Val Ile Glu Arg Pro Thr Ile Gly Ser Leu Asn Ile Thr Gly Ala				
	65	70	75	80
Lys Met Leu Gln Asn Asp Ala Ile Lys Lys Asn Leu Glu Ser Phe Gly				
	85	90	95	20
Leu Ala Gln Ser Gln Tyr Phe Asn Gln Ala Thr Leu Asn Gln Ala Val				
	100	105	110	
Ala Gly Leu Lys Glu Glu Tyr Leu Gly Arg Gly Lys Leu Asn Ile Gln				
	115	120	125	
Ile Thr Pro Lys Val Thr Lys Leu Ala Arg Asn Arg Val Asp Ile Asp				
	130	135	140	
Ile Thr Ile Asp Glu Gly Lys Ser Ala Lys Ile Thr Asp Ile Glu Phe				
	145	150	155	160
Glu Gly Asn Gln Val Tyr Ser Asp Arg Lys Leu Met Arg Gln Met Ser				
	165	170	175	
Leu Thr Glu Gly Gly Ile Trp Thr Trp Leu Thr Arg Ser Asn Gln Phe				
	180	185	190	30
Asn Glu Gln Lys Phe Ala Gln Asp Met Glu Lys Val Thr Asp Phe Tyr				
	195	200	205	
Gln Asn Asn Gly Tyr Phe Asp Phe Arg Ile Leu Asp Thr Asp Ile Gln				
	210	215	220	
Thr Asn Glu Asp Lys Thr Lys Gln Thr Ile Lys Ile Thr Val His Glu				
	225	230	235	240
Gly Gly Arg Phe Arg Trp Gly Lys Val Ser Ile Glu Gly Asp Thr Asn				
	245	250	255	
Glu Val Pro Lys Ala Glu Leu Glu Lys Leu Leu Thr Met Lys Pro Gly				

【数 6】

-6-

260					265					270					
Lys	Trp	Tyr	Glu	Arg	Gln	Gln	Met	Thr	Ala	Val	Leu	Gly	Glu	Ile	Gln
		275					280					285			
Asn	Arg	Met	Gly	Ser	Ala	Gly	Tyr	Ala	Tyr	Ser	Glu	Ile	Ser	Val	Gln
		290				295					300				
Pro	Leu	Pro	Asn	Ala	Glu	Thr	Lys	Thr	Val	Asp	Phe	Val	Leu	His	Ile
		305				310					315				320
Glu	Pro	Gly	Arg	Lys	Ile	Tyr	Val	Asn	Glu	Ile	His	Ile	Thr	Gly	Asn
				325					330					335	
Asn	Lys	Thr	Arg	Asp	Glu	Val	Val	Arg	Arg	Glu	Leu	Arg	Gln	Met	Glu
				340					345					350	
Ser	Ala	Pro	Tyr	Asp	Thr	Ser	Lys	Leu	Gln	Arg	Ser	Lys	Glu	Arg	Val
				355				360					365		
Glu	Leu	Leu	Gly	Tyr	Phe	Asp	Asn	Val	Gln	Phe	Asp	Ala	Val	Pro	Leu
				370			375					380			
Ala	Gly	Thr	Pro	Asp	Lys	Val	Asp	Leu	Asn	Met	Ser	Leu	Thr	Glu	Arg
				385			390					395			400
Ser	Thr	Gly	Ser	Leu	Asp	Leu	Ser	Ala	Gly	Trp	Val	Gln	Asp	Thr	Gly
				405					410					415	
Leu	Val	Met	Ser	Ala	Gly	Val	Ser	Gln	Asp	Asn	Leu	Phe	Gly	Thr	Gly
				420					425					430	
Lys	Ser	Ala	Ala	Leu	Arg	Ala	Ser	Arg	Ser	Lys	Thr	Thr	Leu	Asn	Gly
				435				440					445		
Ser	Leu	Ser	Phe	Thr	Asp	Pro	Tyr	Phe	Thr	Ala	Asp	Gly	Val	Ser	Leu
				450				455				460			
Gly	Tyr	Asp	Val	Tyr	Gly	Lys	Ala	Phe	Asp	Pro	Arg	Lys	Ala	Ser	Thr
				465					470			475			480
Ser	Ile	Lys	Gln	Tyr	Lys	Thr	Thr	Thr	Ala	Gly	Ala	Gly	Ile	Arg	Met
				485					490					495	
Ser	Val	Pro	Val	Thr	Glu	Tyr	Asp	Arg	Val	Asn	Phe	Gly	Leu	Val	Ala
				500				505					510		
Glu	His	Leu	Thr	Val	Asn	Thr	Tyr	Asn	Lys	Ala	Pro	Lys	His	Tyr	Ala
				515				520				525			
Asp	Phe	Ile	Lys	Lys	Tyr	Gly	Lys	Thr	Asp	Gly	Thr	Asp	Gly	Ser	Phe
				530			535					540			
Lys	Gly	Trp	Leu	Tyr	Lys	Gly	Thr	Val	Gly	Trp	Gly	Arg	Asn	Lys	Thr
				545			550					555			560
Asp	Ser	Ala	Leu	Trp	Pro	Thr	Arg	Gly	Tyr	Leu	Thr	Gly	Val	Asn	Ala
				565					570					575	
Glu	Ile	Ala	Leu	Pro	Gly	Ser	Lys	Leu	Gln	Tyr	Tyr	Ser	Ala	Thr	His

10

20

30

40

【数 7】

-7-

580 585 590

Asn Gln Thr Trp Phe Phe Pro Leu Ser Lys Thr Phe Thr Leu Met Leu
595 600 605

Gly Gly Glu Val Gly Ile Ala Gly Gly Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Ile
610 615 620

Pro Phe Phe Glu Asn Phe Tyr Gly Gly Gly Leu Gly Ser Val Arg Gly
625 630 635 640

Tyr Glu Ser Gly Thr Leu Gly Pro Lys Val Tyr Asp Glu Tyr Gly Glu
645 650 655

Lys Ile Ser Tyr Gly Gly Asn Lys Lys Ala Asn Val Ser Ala Glu Leu
660 665 670

Leu Phe Pro Met Pro Gly Ala Lys Asp Ala Arg Thr Val Arg Leu Ser
675 680 685

Leu Phe Ala Asp Ala Gly Ser Val Trp Asp Gly Lys Thr Tyr Asp Asp
690 695 700

Asn Ser Ser Ser Ala Thr Gly Gly Arg Val Gln Asn Ile Tyr Gly Ala
705 710 715 720

Gly Asn Thr His Lys Ser Thr Phe Thr Asn Glu Leu Arg Tyr Ser Ala
725 730 735

Gly Gly Ala Val Thr Trp Leu Ser Pro Leu Gly Pro Met Lys Phe Ser
740 745 750

Tyr Ala Tyr Pro Leu Lys Lys Lys Pro Glu Asp Glu Ile Gln Arg Phe
755 760 765

Gln Phe Gln Leu Gly Thr Thr Phe
770 775

<210> 6
<211> 2379
<212> DNA
<213> *Neisseria gonorrhoeae*

<400> 6

atgaaactga aacagattgc ctccgcactg atgatgttgg gcataatgcc tttagcattt 60
gccgacttca ccatccaaga catccgtgtc gaaggcttgc agcgtaccga gccgagcacc 120
gtattcaact acctgccgt caaagtgggc gacacctaca acgacacaca cggcagtgcc 180
atcatcaaaa gcctgtacgc caccggtttc tttagcagcg tacgagtcga aactgcggac 240
gggcagcttc tgctgaccgt tatcgaacgc cccaccatcg gctcgtctaa catcaccggc 300
gccaaaatgc tgcaaaacga cgccatcaag aaaaacctcg aatcgttcgg gctggcgcag 360
tcgcaatact ttaatcaggc gacactcaac caggcagtcg ccggcctgaa agaagaatac 420
ctcgggcgtg gcaaaactca tatccaaatc acgcccacaa taaccaaact cgcgcccaac 480
cgcgctcgaca tcgacatcac gattgacgag ggcaaatccg ccaaaatcac cgacatcgaa 540
tttgaaggca accaagtcta ttccgaccgc aaactgatgc ggcagatgtc gctgaccgaa 600
ggcggcattt ggacatggct gacacgaagc gaccggttcg accgccagaa attcgcccaa 660
gacatggaaa aagtaaccga cttctaccag aacaacggct acttcgattt ccgtatcctc 720
gataccgaca tccaaaccaa cgaagacaaa accaggcaga ccatcaaaat caccgtccac 780
gaaggcggac gtttccgctg gggcaaatg tcgattgaag gcgacaccaa cgaagtcccc 840
aaggccgaac tggaaaaact gctgaccatg aagcccgga aatggtacga acgcccagcag 900
atgaccgccg ttttgggtga gattcagaac cgcattgggt cggcaggcta cgcatacagc 960

10

20

30

40

【数 8】

-8-

```

gaaatcagcg tacagccgct gccgaacgcc ggaacaaaa ccgtcgattt cgtcctgcac 1020
atcgaaacgg gccggaaaaat ctacgtcaac gaaatccaca tcaccggcaa caacaaaacc 1080
cgcgacgaag tcgtgcgcgc cgaattgcgc caaatggaat ccgcgcctta cgacacctcc 1140
aagctgcaac gctccaaaaga gcgcgtcgag cttttgggct acttcgacaa cgtacagttt 1200
gatgccgtcc cgcttgccgg tacgcccgc aaagtcgatt tgaacatgag cctgaccgaa 1260
cgctccacgg gctcgtctga cttgagcgc ggctgggttc aggataccgg cttggtcatt 1320
tcgcgcggcg tatcgaggga caacctgttc ggtacgggca agtcggccgc cctgcgcgcc 1380
tcgcaagaac aaaccacgct caacggctcg ctgtcgttta ccgaccgta cttcacggca 1440
gacgggggtca gcctgggcta cgatatctac ggaaaagcct tcgaccgcgc caaagcatcg 1500
accagcgta aacaatataa aaccaccacc gccggcgcg gcgtaaggat gggatatccc 1560
gttacggaat acgaccgct caatttcggg ctggcgccgg aacacctgac cgtcaacacc 1620
tacaacaaag caccacaaag ctatgcgcgc ttatcagga aatacggcaa aaccgacggc 1680
gcagacggca gcttcaaaag cctgctgtac aaaggcaccg tcggctgggg gcgcaacaa 1740
accgacggcg cgtcatggcc gacgcgcggc tacctgaccg gcgtaaatgc cgaatatgcc 1800
ctgcccggca gcaaaactga atactactcc gccaccaca accaaacctg gttcttccc 1860
ttaagcaaaa ccttcacgct gatgctcggc ggcaagtcg gcattgcggg cggctacggc 1920
agaacaaaag aaatccccct ctttgaaaac ttctacggcg gcggcctggg ttcggtgccg 1980
ggctacgaaa gcggcacgct cggcccgaaa gtgtatgacg aatacggcga aaaaatcagc 2040
tacggcggca acaaaaaagc caacgtctcc gccgagctgc tcttcccgat gcccggtgcg 2100
aaagacgcac gcacgctccg cctgagcctg tttgccgacg caggcagcgt gtgggacggc 2160
agaacctata ccgcccgcga aaacggtaac acaaatcgg tttactcgga aaacgcgc 2220
aaatccacct ttaccaacga attgcgtat tccgcgcggc gcgcggttac ctggctctcg 2280
cctttgggtc cgatgaaatt cagctacgcc taccgctga agaaaaaac ggaagacgaa 2340
atccaacgct tccaattcca gctcggcacg acgttctaa 2379

```

```

<210> 7
<211> 792
<212> PRT
<213> Neisseria gonorrhoeae

```

```

<400> 7
Met Lys Leu Lys Gln Ile Ala Ser Ala Leu Met Met Leu Gly Ile Ser
1 5 10 15

Pro Leu Ala Phe Ala Asp Phe Thr Ile Gln Asp Ile Arg Val Glu Gly
20 25 30

Leu Gln Arg Thr Glu Pro Ser Thr Val Phe Asn Tyr Leu Pro Val Lys
35 40 45

Val Gly Asp Thr Tyr Asn Asp Thr His Gly Ser Ala Ile Ile Lys Ser
50 55 60

Leu Tyr Ala Thr Gly Phe Phe Asp Asp Val Arg Val Glu Thr Ala Asp
65 70 75 80

Gly Gln Leu Leu Leu Thr Val Ile Glu Arg Pro Thr Ile Gly Ser Leu
85 90 95

Asn Ile Thr Gly Ala Lys Met Leu Gln Asn Asp Ala Ile Lys Lys Asn
100 105 110

Leu Glu Ser Phe Gly Leu Ala Gln Ser Gln Tyr Phe Asn Gln Ala Thr
115 120 125

Leu Asn Gln Ala Val Ala Gly Leu Lys Glu Glu Tyr Leu Gly Arg Gly
130 135 140

Lys Leu Asn Ile Gln Ile Thr Pro Lys Val Thr Lys Leu Ala Arg Asn
145 150 155 160

```

10

20

30

40

【数 9】

-9-

Arg Val Asp Ile Asp Ile Thr Ile Asp Glu Gly Lys Ser Ala Lys Ile
 165 170 175
 Thr Asp Ile Glu Phe Glu Gly Asn Gln Val Tyr Ser Asp Arg Lys Leu
 180 185 190
 Met Arg Gln Met Ser Leu Thr Glu Gly Gly Ile Trp Thr Trp Leu Thr
 195 200 205
 Arg Ser Asp Arg Phe Asp Arg Gln Lys Phe Ala Gln Asp Met Glu Lys
 210 215 220
 Val Thr Asp Phe Tyr Gln Asn Asn Gly Tyr Phe Asp Phe Arg Ile Leu
 225 230 235 240
 Asp Thr Asp Ile Gln Thr Asn Glu Asp Lys Thr Arg Gln Thr Ile Lys
 245 250 255
 Ile Thr Val His Glu Gly Gly Arg Phe Arg Trp Gly Lys Val Ser Ile
 260 265 270
 Glu Gly Asp Thr Asn Glu Val Pro Lys Ala Glu Leu Glu Lys Leu Leu
 275 280 285
 Thr Met Lys Pro Gly Lys Trp Tyr Glu Arg Gln Gln Met Thr Ala Val
 290 295 300
 Leu Gly Glu Ile Gln Asn Arg Met Gly Ser Ala Gly Tyr Ala Tyr Ser
 305 310 315 320
 Glu Ile Ser Val Gln Pro Leu Pro Asn Ala Gly Thr Lys Thr Val Asp
 325 330 335
 Phe Val Leu His Ile Glu Pro Gly Arg Lys Ile Tyr Val Asn Glu Ile
 340 345 350
 His Ile Thr Gly Asn Asn Lys Thr Arg Asp Glu Val Val Arg Arg Glu
 355 360 365
 Leu Arg Gln Met Glu Ser Ala Pro Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Gln Arg
 370 375 380
 Ser Lys Glu Arg Val Glu Leu Leu Gly Tyr Phe Asp Asn Val Gln Phe
 385 390 395 400
 Asp Ala Val Pro Leu Ala Gly Thr Pro Asp Lys Val Asp Leu Asn Met
 405 410 415
 Ser Leu Thr Glu Arg Ser Thr Gly Ser Leu Asp Leu Ser Ala Gly Trp
 420 425 430
 Val Gln Asp Thr Gly Leu Val Met Ser Ala Gly Val Ser Gln Asp Asn
 435 440 445
 Leu Phe Gly Thr Gly Lys Ser Ala Ala Leu Arg Ala Ser Arg Ser Lys
 450 455 460
 Thr Thr Leu Asn Gly Ser Leu Ser Phe Thr Asp Pro Tyr Phe Thr Ala
 465 470 475 480

10

20

30

40

【数 1 0】

-10-

Asp Gly Val Ser Leu Gly Tyr Asp Ile Tyr Gly Lys Ala Phe Asp Pro
 485 490 495
 Arg Lys Ala Ser Thr Ser Val Lys Gln Tyr Lys Thr Thr Thr Ala Gly
 500 505 510
 Gly Gly Val Arg Met Gly Ile Pro Val Thr Glu Tyr Asp Arg Val Asn
 515 520 525
 Phe Gly Leu Ala Ala Glu His Leu Thr Val Asn Thr Tyr Asn Lys Ala
 530 535 540
 Pro Lys Arg Tyr Ala Asp Phe Ile Arg Lys Tyr Gly Lys Thr Asp Gly
 545 550 555 560
 Ala Asp Gly Ser Phe Lys Gly Leu Leu Tyr Lys Gly Thr Val Gly Trp
 565 570 575
 Gly Arg Asn Lys Thr Asp Ser Ala Ser Trp Pro Thr Arg Gly Tyr Leu
 580 585 590
 Thr Gly Val Asn Ala Glu Ile Ala Leu Pro Gly Ser Lys Leu Gln Tyr
 595 600 605
 Tyr Ser Ala Thr His Asn Gln Thr Trp Phe Phe Pro Leu Ser Lys Thr
 610 615 620
 Phe Thr Leu Met Leu Gly Gly Glu Val Gly Ile Ala Gly Gly Tyr Gly
 625 630 635 640
 Arg Thr Lys Glu Ile Pro Phe Phe Glu Asn Phe Tyr Gly Gly Gly Leu
 645 650 655
 Gly Ser Val Arg Gly Tyr Glu Ser Gly Thr Leu Gly Pro Lys Val Tyr
 660 665 670
 Asp Glu Tyr Gly Glu Lys Ile Ser Tyr Gly Gly Asn Lys Lys Ala Asn
 675 680 685
 Val Ser Ala Glu Leu Leu Phe Pro Met Pro Gly Ala Lys Asp Ala Arg
 690 695 700
 Thr Val Arg Leu Ser Leu Phe Ala Asp Ala Gly Ser Val Trp Asp Gly
 705 710 715 720
 Arg Thr Tyr Thr Ala Ala Glu Asn Gly Asn Asn Lys Ser Val Tyr Ser
 725 730 735
 Glu Asn Ala His Lys Ser Thr Phe Thr Asn Glu Leu Arg Tyr Ser Ala
 740 745 750
 Gly Gly Ala Val Thr Trp Leu Ser Pro Leu Gly Pro Met Lys Phe Ser
 755 760 765
 Tyr Ala Tyr Pro Leu Lys Lys Lys Pro Glu Asp Glu Ile Gln Arg Phe
 770 775 780
 Gln Phe Gln Leu Gly Thr Thr Phe
 785 790

10

20

30

40

【数 1 1】

-11-

```

<210>      8
<211>      21
<212>      PRT
<213>      Neisseria gonorrhoeae

<400>      8
Met Lys Leu Lys Gln Ile Ala Ser Ala Leu Met Met Leu Gly Ile Ser
1          5          10          15

Pro Leu Ala Phe Ala
                20

<210>      9
<211>      771
<212>      PRT
<213>      Neisseria gonorrhoeae

<400>      9
Asp Phe Thr Ile Gln Asp Ile Arg Val Glu Gly Leu Gln Arg Thr Glu
1          5          10          15

Pro Ser Thr Val Phe Asn Tyr Leu Pro Val Lys Val Gly Asp Thr Tyr
                20          25          30

Asn Asp Thr His Gly Ser Ala Ile Ile Lys Ser Leu Tyr Ala Thr Gly
35          40          45

Phe Phe Asp Asp Val Arg Val Glu Thr Ala Asp Gly Gln Leu Leu Leu
50          55          60

Thr Val Ile Glu Arg Pro Thr Ile Gly Ser Leu Asn Ile Thr Gly Ala
65          70          75          80

Lys Met Leu Gln Asn Asp Ala Ile Lys Lys Asn Leu Glu Ser Phe Gly
85          90          95

Leu Ala Gln Ser Gln Tyr Phe Asn Gln Ala Thr Leu Asn Gln Ala Val
100         105         110

Ala Gly Leu Lys Glu Glu Tyr Leu Gly Arg Gly Lys Leu Asn Ile Gln
115         120         125

Ile Thr Pro Lys Val Thr Lys Leu Ala Arg Asn Arg Val Asp Ile Asp
130         135         140

Ile Thr Ile Asp Glu Gly Lys Ser Ala Lys Ile Thr Asp Ile Glu Phe
145         150         155         160

Glu Gly Asn Gln Val Tyr Ser Asp Arg Lys Leu Met Arg Gln Met Ser
165         170         175

Leu Thr Glu Gly Gly Ile Trp Thr Trp Leu Thr Arg Ser Asp Arg Phe
180         185         190

Asp Arg Gln Lys Phe Ala Gln Asp Met Glu Lys Val Thr Asp Phe Tyr
195         200         205

Gln Asn Asn Gly Tyr Phe Asp Phe Arg Ile Leu Asp Thr Asp Ile Gln
210         215         220

```

10

20

30

40

【数 1 2】

-12-

Thr Asn Glu Asp Lys Thr Arg Gln Thr Ile Lys Ile Thr Val His Glu
 225 230 235 240
 Gly Gly Arg Phe Arg Trp Gly Lys Val Ser Ile Glu Gly Asp Thr Asn
 245 250 255
 Glu Val Pro Lys Ala Glu Leu Glu Lys Leu Leu Thr Met Lys Pro Gly
 260 265 270
 Lys Trp Tyr Glu Arg Gln Gln Met Thr Ala Val Leu Gly Glu Ile Gln
 275 280 285
 Asn Arg Met Gly Ser Ala Gly Tyr Ala Tyr Ser Glu Ile Ser Val Gln
 290 295 300
 Pro Leu Pro Asn Ala Gly Thr Lys Thr Val Asp Phe Val Leu His Ile
 305 310 315 320
 Glu Pro Gly Arg Lys Ile Tyr Val Asn Glu Ile His Ile Thr Gly Asn
 325 330 335
 Asn Lys Thr Arg Asp Glu Val Val Arg Arg Glu Leu Arg Gln Met Glu
 340 345 350
 Ser Ala Pro Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Gln Arg Ser Lys Glu Arg Val
 355 360 365
 Glu Leu Leu Gly Tyr Phe Asp Asn Val Gln Phe Asp Ala Val Pro Leu
 370 375 380
 Ala Gly Thr Pro Asp Lys Val Asp Leu Asn Met Ser Leu Thr Glu Arg
 385 390 395 400
 Ser Thr Gly Ser Leu Asp Leu Ser Ala Gly Trp Val Gln Asp Thr Gly
 405 410 415
 Leu Val Met Ser Ala Gly Val Ser Gln Asp Asn Leu Phe Gly Thr Gly
 420 425 430
 Lys Ser Ala Ala Leu Arg Ala Ser Arg Ser Lys Thr Thr Leu Asn Gly
 435 440 445
 Ser Leu Ser Phe Thr Asp Pro Tyr Phe Thr Ala Asp Gly Val Ser Leu
 450 455 460
 Gly Tyr Asp Ile Tyr Gly Lys Ala Phe Asp Pro Arg Lys Ala Ser Thr
 465 470 475 480
 Ser Val Lys Gln Tyr Lys Thr Thr Thr Ala Gly Gly Gly Val Arg Met
 485 490 495
 Gly Ile Pro Val Thr Glu Tyr Asp Arg Val Asn Phe Gly Leu Ala Ala
 500 505 510
 Glu His Leu Thr Val Asn Thr Tyr Asn Lys Ala Pro Lys Arg Tyr Ala
 515 520 525
 Asp Phe Ile Arg Lys Tyr Gly Lys Thr Asp Gly Ala Asp Gly Ser Phe
 530 535 540

10

20

30

40

【数 1 3】

-13-

Lys Gly Leu Leu Tyr Lys Gly Thr Val Gly Trp Gly Arg Asn Lys Thr
 545 550 555 560
 Asp Ser Ala Ser Trp Pro Thr Arg Gly Tyr Leu Thr Gly Val Asn Ala
 565 570 575
 Glu Ile Ala Leu Pro Gly Ser Lys Leu Gln Tyr Tyr Ser Ala Thr His
 580 585 590
 Asn Gln Thr Trp Phe Phe Pro Leu Ser Lys Thr Phe Thr Leu Met Leu
 595 600 605
 Gly Gly Glu Val Gly Ile Ala Gly Gly Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Ile
 610 615 620
 Pro Phe Phe Glu Asn Phe Tyr Gly Gly Gly Leu Gly Ser Val Arg Gly
 625 630 635 640
 Tyr Glu Ser Gly Thr Leu Gly Pro Lys Val Tyr Asp Glu Tyr Gly Glu
 645 650 655
 Lys Ile Ser Tyr Gly Gly Asn Lys Lys Ala Asn Val Ser Ala Glu Leu
 660 665 670
 Leu Phe Pro Met Pro Gly Ala Lys Asp Ala Arg Thr Val Arg Leu Ser
 675 680 685
 Leu Phe Ala Asp Ala Gly Ser Val Trp Asp Gly Arg Thr Tyr Thr Ala
 690 695 700
 Ala Glu Asn Gly Asn Asn Lys Ser Val Tyr Ser Glu Asn Ala His Lys
 705 710 715 720
 Ser Thr Phe Thr Asn Glu Leu Arg Tyr Ser Ala Gly Gly Ala Val Thr
 725 730 735
 Trp Leu Ser Pro Leu Gly Pro Met Lys Phe Ser Tyr Ala Tyr Pro Leu
 740 745 750
 Lys Lys Lys Pro Glu Asp Glu Ile Gln Arg Phe Gln Phe Gln Leu Gly
 755 760 765
 Thr Thr Phe
 770

10

20

30

<210> 10
 <211> 2394
 <212> DNA
 <213> Neisseria meningitidis

<400> 10
 atgaaactga aacagattgc ttccgcactg atgggtcttg gcatatcgcc tttggcactt 60
 gccgacttca ccatccaaga catccgcgtc gaaggcttgc agcgtaccga gccgagtacc 120
 gtattcaact acctgccogt caaagtcggc gacacctaca acgacacaca cggcagtgcc 180
 atcatcaaaa gcctgtacgc caccggttcc tttgacgacg tacgcgtcga aactgcggac 240
 gggcagctcc tgcgtgaccgt tatcgaaacgc cccaccatcg gctcgctcaa catcaccggc 300
 gcaaaaatgc tgcaaaacga cgccattaag aaaaacctcg aatcggtcgg gctggcgag 360
 tcgcaatact ttaatcaggc gacactcaat caggcagtcg ccggcctgaa agaagaatac 420
 ctggggcgcg gcaaaactca tatccaaatc acgcccacaa taaccaaact cgcccgaac 480

40

【数 1 4】

-14-

```

cgcgctcgaca tgcacatcac gattgacgag ggcaaatccg ccaaaatcac cgacatcgaa 540
tttgaaggca accaagtcta ttccgaccgc aaactgatgc ggcagatgtc gctgaccgaa 600
ggcggcattt ggacatggct gacacgaagc aaccaattca acgagcagaa atttgcccaa 660
gacatggaaa aagtaaccga cttctaccag aacaacggct acttcgattt ccgcattcctc 720
gataccgaca tccaaaccaa cgaagacaaa accaagcaga ccatcaaaat caccgtccac 780
gaaggcggac gtttccgttg gggcaaagtc tccatcgaag gcgacaccaa cgaagtcccc 840
aaagccgaac tggaaaaact gctgaccatg aagcccggca aatggtacga acgccagcag 900
atgaccggcg ttttgggtga gattcagaac cgcattgggt cggcaggcta cgcatacagc 960
gaaatcagcg tacagccgct gccaaacgcc gaaacccaaa ccgtcgattt cgctctgcac 1020
atcgaaacgg gccggaaaaa ctacgtcaac gaaatccaca tcaccggcaa caacaaaacc 1080
cgcgacgaag tcgtgcggcg cgaattggcg caaatggaat ccgcgcctta cgacacctcc 1140
aagctgcaac gctccaaaaga gcgcgtcgag cttttggggt acttcgacaa cgtacagttt 1200
gatgcgctcc cgcttgcggg cacaccggac aaagtcgatt tgaacatgag cctgaccgaa 1260
cgttccaccg gctcgctcga cttgagcgcg gcttgggtac aggataccgg cctggtcatg 1320
tcgcgaggcg tttcccaaga caacctgttc ggtacgggca agtcggccgc cctgcgcgac 1380
tcacgaagca aaaccacgct caacggctcg ctgtcgttta ccgaccgcta cttcacggca 1440
gacgggggtca gcttgggtga cgtatgttac ggaagagcct tcgaccggcg caaagcatcg 1500
accagcatca aacaataata aaccaccacg gcaggcgagc gcattccgat gaggctgcct 1560
gttacggaat acgaccggct gaatttcggt ttggtggcag aacacctgac cgtcaacacc 1620
tacaacaaag cgcccaaaac ctatgccgac tttatcaaga aatacggcaa aaccgacggc 1680
acagacggca gcttcaaagg ctggctgtac aaaggtaccg tcggctgggg gcgcaacaaa 1740
accgacagcg cgttatggcc gacgcgcggc tacctgacgg gcgtgaacgc cgaaatcgcc 1800
ctgcccggca gcaaaactga atactactcc gccaccacaa accaaacctg gttcttcccc 1860
ttaagcaaaa ccttcacgct gatgctcgcc gccgaagtcg gcattgcggg cggtcacggc 1920
agaaccaaag aaatccccct tttgaaaac ttctacggcg gcggcctggg ttcggtgcgc 1980
ggatacgaaa gcggcacgct cggtcgaaa gtgtatgacg aatacggcga aaaaatcagc 2040
tacggcggca acaaaaaagc caacgtctcc gccgagctgc tcttcccgat gcccgcgcg 2100
aaagacggcg gcaccgtccg cctgagcctg tttgcgcagc caggcagcgt gtgggacggc 2160
aaaacctacg acgacaacag cagttccgcg accggcggca gggttcaaaa catttacggc 2220
gccggcaata cccataaatc cactttacc aacgaattgc gctattccgc cggcgcgcg 2280
gttacctggc tctgccttt aggcctgatg aaattcagct acgcctaccc gctgaagaaa 2340
aaaccggaag acgaaatcca acgcttccaa ttccaactcg gcacgacgtt ctaa 2394

```

```

<210> 11
<211> 797
<212> PRT
<213> Neisseria meningitidis

```

```

<400> 11
Met Lys Leu Lys Gln Ile Ala Ser Ala Leu Met Val Leu Gly Ile Ser
1 5 10 15

Pro Leu Ala Leu Ala Asp Phe Thr Ile Gln Asp Ile Arg Val Glu Gly
20 25 30

Leu Gln Arg Thr Glu Pro Ser Thr Val Phe Asn Tyr Leu Pro Val Lys
35 40 45

Val Gly Asp Thr Tyr Asn Asp Thr His Gly Ser Ala Ile Ile Lys Ser
50 55 60

Leu Tyr Ala Thr Gly Phe Phe Asp Asp Val Arg Val Glu Thr Ala Asp
65 70 75 80

Gly Gln Leu Leu Leu Thr Val Ile Glu Arg Pro Thr Ile Gly Ser Leu
85 90 95

Asn Ile Thr Gly Ala Lys Met Leu Gln Asn Asp Ala Ile Lys Lys Asn
100 105 110

```

10

20

30

40

【数 1 5】

-15-

Leu Glu Ser Phe Gly Leu Ala Gln Ser Gln Tyr Phe Asn Gln Ala Thr
 115 120 125
 Leu Asn Gln Ala Val Ala Gly Leu Lys Glu Glu Tyr Leu Gly Arg Gly
 130 135 140
 Lys Leu Asn Ile Gln Ile Thr Pro Lys Val Thr Lys Leu Ala Arg Asn
 145 150 155 160
 Arg Val Asp Ile Asp Ile Thr Ile Asp Glu Gly Lys Ser Ala Lys Ile
 165 170 175
 Thr Asp Ile Glu Phe Glu Gly Asn Gln Val Tyr Ser Asp Arg Lys Leu
 180 185 190
 Met Arg Gln Met Ser Leu Thr Glu Gly Gly Ile Trp Thr Trp Leu Thr
 195 200 205
 Arg Ser Asn Gln Phe Asn Glu Gln Lys Phe Ala Gln Asp Met Glu Lys
 210 215 220
 Val Thr Asp Phe Tyr Gln Asn Asn Gly Tyr Phe Asp Phe Arg Ile Leu
 225 230 235 240
 Asp Thr Asp Ile Gln Thr Asn Glu Asp Lys Thr Lys Gln Thr Ile Lys
 245 250 255
 Ile Thr Val His Glu Gly Gly Arg Phe Arg Trp Gly Lys Val Ser Ile
 260 265 270
 Glu Gly Asp Thr Asn Glu Val Pro Lys Ala Glu Leu Glu Lys Leu Leu
 275 280 285
 Thr Met Lys Pro Gly Lys Trp Tyr Glu Arg Gln Gln Met Thr Ala Val
 290 295 300
 Leu Gly Glu Ile Gln Asn Arg Met Gly Ser Ala Gly Tyr Ala Tyr Ser
 305 310 315 320
 Glu Ile Ser Val Gln Pro Leu Pro Asn Ala Glu Thr Lys Thr Val Asp
 325 330 335
 Phe Val Leu His Ile Glu Pro Gly Arg Lys Ile Tyr Val Asn Glu Ile
 340 345 350
 His Ile Thr Gly Asn Asn Lys Thr Arg Asp Glu Val Val Arg Arg Glu
 355 360 365
 Leu Arg Gln Met Glu Ser Ala Pro Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Gln Arg
 370 375 380
 Ser Lys Glu Arg Val Glu Leu Leu Gly Tyr Phe Asp Asn Val Gln Phe
 385 390 395 400
 Asp Ala Val Pro Leu Ala Gly Thr Pro Asp Lys Val Asp Leu Asn Met
 405 410 415
 Ser Leu Thr Glu Arg Ser Thr Gly Ser Leu Asp Leu Ser Ala Gly Trp
 420 425 430

10

20

30

40

【数 1 6】

-16-

Val Gln Asp Thr Gly Leu Val Met Ser Ala Gly Val Ser Gln Asp Asn
 435 440 445
 Leu Phe Gly Thr Gly Lys Ser Ala Ala Leu Arg Ala Ser Arg Ser Lys
 450 455 460
 Thr Thr Leu Asn Gly Ser Leu Ser Phe Thr Asp Pro Tyr Phe Thr Ala
 465 470 475 480
 Asp Gly Val Ser Leu Gly Tyr Asp Val Tyr Gly Lys Ala Phe Asp Pro
 485 490 495
 Arg Lys Ala Ser Thr Ser Ile Lys Gln Tyr Lys Thr Thr Thr Ala Gly
 500 505 510
 Ala Gly Ile Arg Met Ser Val Pro Val Thr Glu Tyr Asp Arg Val Asn
 515 520 525
 Phe Gly Leu Val Ala Glu His Leu Thr Val Asn Thr Tyr Asn Lys Ala
 530 535 540
 Pro Lys His Tyr Ala Asp Phe Ile Lys Lys Tyr Gly Lys Thr Asp Gly
 545 550 555 560
 Thr Asp Gly Ser Phe Lys Gly Trp Leu Tyr Lys Gly Thr Val Gly Trp
 565 570 575
 Gly Arg Asn Lys Thr Asp Ser Ala Leu Trp Pro Thr Arg Gly Tyr Leu
 580 585 590
 Thr Gly Val Asn Ala Glu Ile Ala Leu Pro Gly Ser Lys Leu Gln Tyr
 595 600 605
 Tyr Ser Ala Thr His Asn Gln Thr Trp Phe Phe Pro Leu Ser Lys Thr
 610 615 620
 Phe Thr Leu Met Leu Gly Gly Glu Val Gly Ile Ala Gly Gly Tyr Gly
 625 630 635 640
 Arg Thr Lys Glu Ile Pro Phe Phe Glu Asn Phe Tyr Gly Gly Gly Leu
 645 650 655
 Gly Ser Val Arg Gly Tyr Glu Ser Gly Thr Leu Gly Pro Lys Val Tyr
 660 665 670
 Asp Glu Tyr Gly Glu Lys Ile Ser Tyr Gly Gly Asn Lys Lys Ala Asn
 675 680 685
 Val Ser Ala Glu Leu Leu Phe Pro Met Pro Gly Ala Lys Asp Ala Arg
 690 695 700
 Thr Val Arg Leu Ser Leu Phe Ala Asp Ala Gly Ser Val Trp Asp Gly
 705 710 715 720
 Lys Thr Tyr Asp Asp Asn Ser Ser Ser Ala Thr Gly Gly Arg Val Gln
 725 730 735
 Asn Ile Tyr Gly Ala Gly Asn Thr His Lys Ser Thr Phe Thr Asn Glu
 740 745 750

10

20

30

40

【数 1 7】

-17-

Leu Arg Tyr Ser Ala Gly Gly Ala Val Thr Trp Leu Ser Pro Leu Gly
755 760 765

Pro Met Lys Phe Ser Tyr Ala Tyr Pro Leu Lys Lys Lys Pro Glu Asp
770 775 780

Glu Ile Gln Arg Phe Gln Phe Gln Leu Gly Thr Thr Phe
785 790 795

<210> 12

<211> 21

<212> PRT

<213> Neisseria meningitidis

<400> 12

Met Lys Leu Lys Gln Ile Ala Ser Ala Leu Met Val Leu Gly Ile Ser
1 5 10 15

Pro Leu Ala Leu Ala
20

<210> 13

<211> 776

<212> PRT

<213> Neisseria meningitidis

<400> 13

Asp Phe Thr Ile Gln Asp Ile Arg Val Glu Gly Leu Gln Arg Thr Glu
1 5 10 15

Pro Ser Thr Val Phe Asn Tyr Leu Pro Val Lys Val Gly Asp Thr Tyr
20 25 30

Asn Asp Thr His Gly Ser Ala Ile Ile Lys Ser Leu Tyr Ala Thr Gly
35 40 45

Phe Phe Asp Asp Val Arg Val Glu Thr Ala Asp Gly Gln Leu Leu Leu
50 55 60

Thr Val Ile Glu Arg Pro Thr Ile Gly Ser Leu Asn Ile Thr Gly Ala
65 70 75 80

Lys Met Leu Gln Asn Asp Ala Ile Lys Lys Asn Leu Glu Ser Phe Gly
85 90 95

Leu Ala Gln Ser Gln Tyr Phe Asn Gln Ala Thr Leu Asn Gln Ala Val
100 105 110

Ala Gly Leu Lys Glu Glu Tyr Leu Gly Arg Gly Lys Leu Asn Ile Gln
115 120 125

Ile Thr Pro Lys Val Thr Lys Leu Ala Arg Asn Arg Val Asp Ile Asp
130 135 140

Ile Thr Ile Asp Glu Gly Lys Ser Ala Lys Ile Thr Asp Ile Glu Phe
145 150 155 160

Glu Gly Asn Gln Val Tyr Ser Asp Arg Lys Leu Met Arg Gln Met Ser
165 170 175

10

20

30

40

【数 1 8】

-18-

Leu Thr Glu Gly Gly Ile Trp Thr Trp Leu Thr Arg Ser Asn Gln Phe
 180 185 190
 Asn Glu Gln Lys Phe Ala Gln Asp Met Glu Lys Val Thr Asp Phe Tyr
 195 200 205
 Gln Asn Asn Gly Tyr Phe Asp Phe Arg Ile Leu Asp Thr Asp Ile Gln
 210 215 220
 Thr Asn Glu Asp Lys Thr Lys Gln Thr Ile Lys Ile Thr Val His Glu
 225 230 235 240
 Gly Gly Arg Phe Arg Trp Gly Lys Val Ser Ile Glu Gly Asp Thr Asn
 245 250 255
 Glu Val Pro Lys Ala Glu Leu Glu Lys Leu Leu Thr Met Lys Pro Gly
 260 265 270
 Lys Trp Tyr Glu Arg Gln Gln Met Thr Ala Val Leu Gly Glu Ile Gln
 275 280 285
 Asn Arg Met Gly Ser Ala Gly Tyr Ala Tyr Ser Glu Ile Ser Val Gln
 290 295 300
 Pro Leu Pro Asn Ala Glu Thr Lys Thr Val Asp Phe Val Leu His Ile
 305 310 315 320
 Glu Pro Gly Arg Lys Ile Tyr Val Asn Glu Ile His Ile Thr Gly Asn
 325 330 335
 Asn Lys Thr Arg Asp Glu Val Val Arg Arg Glu Leu Arg Gln Met Glu
 340 345 350
 Ser Ala Pro Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Gln Arg Ser Lys Glu Arg Val
 355 360 365
 Glu Leu Leu Gly Tyr Phe Asp Asn Val Gln Phe Asp Ala Val Pro Leu
 370 375 380
 Ala Gly Thr Pro Asp Lys Val Asp Leu Asn Met Ser Leu Thr Glu Arg
 385 390 395 400
 Ser Thr Gly Ser Leu Asp Leu Ser Ala Gly Trp Val Gln Asp Thr Gly
 405 410 415
 Leu Val Met Ser Ala Gly Val Ser Gln Asp Asn Leu Phe Gly Thr Gly
 420 425 430
 Lys Ser Ala Ala Leu Arg Ala Ser Arg Ser Lys Thr Thr Leu Asn Gly
 435 440 445
 Ser Leu Ser Phe Thr Asp Pro Tyr Phe Thr Ala Asp Gly Val Ser Leu
 450 455 460
 Gly Tyr Asp Val Tyr Gly Lys Ala Phe Asp Pro Arg Lys Ala Ser Thr
 465 470 475 480
 Ser Ile Lys Gln Tyr Lys Thr Thr Thr Ala Gly Ala Gly Ile Arg Met
 485 490 495

10

20

30

40

【数 1 9】

-19-

Ser Val Pro Val Thr Glu Tyr Asp Arg Val Asn Phe Gly Leu Val Ala
 500 505 510
 Glu His Leu Thr Val Asn Thr Tyr Asn Lys Ala Pro Lys His Tyr Ala
 515 520 525
 Asp Phe Ile Lys Lys Tyr Gly Lys Thr Asp Gly Thr Asp Gly Ser Phe
 530 535 540
 Lys Gly Trp Leu Tyr Lys Gly Thr Val Gly Trp Gly Arg Asn Lys Thr
 545 550 555 560
 Asp Ser Ala Leu Trp Pro Thr Arg Gly Tyr Leu Thr Gly Val Asn Ala
 565 570 575
 Glu Ile Ala Leu Pro Gly Ser Lys Leu Gln Tyr Tyr Ser Ala Thr His
 580 585 590
 Asn Gln Thr Trp Phe Phe Pro Leu Ser Lys Thr Phe Thr Leu Met Leu
 595 600 605
 Gly Gly Glu Val Gly Ile Ala Gly Gly Tyr Gly Arg Thr Lys Glu Ile
 610 615 620
 Pro Phe Phe Glu Asn Phe Tyr Gly Gly Gly Leu Gly Ser Val Arg Gly
 625 630 635 640
 Tyr Glu Ser Gly Thr Leu Gly Pro Lys Val Tyr Asp Glu Tyr Gly Glu
 645 650 655
 Lys Ile Ser Tyr Gly Gly Asn Lys Lys Ala Asn Val Ser Ala Glu Leu
 660 665 670
 Leu Phe Pro Met Pro Gly Ala Lys Asp Ala Arg Thr Val Arg Leu Ser
 675 680 685
 Leu Phe Ala Asp Ala Gly Ser Val Trp Asp Gly Lys Thr Tyr Asp Asp
 690 695 700
 Asn Ser Ser Ser Ala Thr Gly Gly Arg Val Gln Asn Ile Tyr Gly Ala
 705 710 715 720
 Gly Asn Thr His Lys Ser Thr Phe Thr Asn Glu Leu Arg Tyr Ser Ala
 725 730 735
 Gly Gly Ala Val Thr Trp Leu Ser Pro Leu Gly Pro Met Lys Phe Ser
 740 745 750
 Tyr Ala Tyr Pro Leu Lys Lys Lys Pro Glu Asp Glu Ile Gln Arg Phe
 755 760 765
 Gln Phe Gln Leu Gly Thr Thr Phe
 770 775
 <210> 14
 <211> 441
 <212> PRT
 <213> Neisseria meningitidis
 <400> 14

10

20

30

40

【数 2 0】

-20-

Met Lys Lys Tyr Leu Phe Arg Ala Ala Leu Tyr Gly Ile Ala Ala Ala
 1 5 10 15
 Ile Leu Ala Ala Cys Gln Ser Lys Ser Ile Gln Thr Phe Pro Gln Pro
 20 25 30
 Asp Thr Ser Val Ile Asn Gly Pro Asp Arg Pro Val Gly Ile Pro Asp
 35 40 45
 Pro Ala Gly Thr Thr Val Gly Gly Gly Gly Ala Val Tyr Thr Val Val
 50 55 60
 Pro His Leu Ser Leu Pro His Trp Ala Ala Gln Asp Phe Ala Lys Ser
 65 70 75 80
 Leu Gln Ser Phe Arg Leu Gly Cys Ala Asn Leu Lys Asn Arg Gln Gly
 85 90 95
 Trp Gln Asp Val Cys Ala Gln Ala Phe Gln Thr Pro Val His Ser Phe
 100 105 110
 Gln Ala Lys Gln Phe Phe Glu Arg Tyr Phe Thr Pro Trp Gln Val Ala
 115 120 125
 Gly Asn Gly Ser Leu Ala Gly Thr Val Thr Gly Tyr Tyr Glu Pro Val
 130 135 140
 Leu Lys Gly Asp Asp Arg Arg Thr Ala Gln Ala Arg Phe Pro Ile Tyr
 145 150 155 160
 Gly Ile Pro Asp Asp Phe Ile Ser Val Pro Leu Pro Ala Gly Leu Arg
 165 170 175
 Ser Gly Lys Ala Leu Val Arg Ile Arg Gln Thr Gly Lys Asn Ser Gly
 180 185 190
 Thr Ile Asp Asn Thr Gly Gly Thr His Thr Ala Asp Leu Ser Arg Phe
 195 200 205
 Pro Ile Thr Ala Arg Thr Thr Ala Ile Lys Gly Arg Phe Glu Gly Ser
 210 215 220
 Arg Phe Leu Pro Tyr His Thr Arg Asn Gln Ile Asn Gly Gly Ala Leu
 225 230 235 240
 Asp Gly Lys Ala Pro Ile Leu Gly Tyr Ala Glu Asp Pro Val Glu Leu
 245 250 255
 Phe Phe Met His Ile Gln Gly Ser Gly Arg Leu Lys Thr Pro Ser Gly
 260 265 270
 Lys Tyr Ile Arg Ile Gly Tyr Ala Asp Lys Asn Glu His Pro Tyr Val
 275 280 285
 Ser Ile Gly Arg Tyr Met Ala Asp Lys Gly Tyr Leu Lys Leu Gly Gln
 290 295 300
 Thr Ser Met Gln Gly Ile Lys Ala Tyr Met Arg Gln Asn Pro Gln Arg
 305 310 315 320

10

20

30

40

【数 2 1】

-21-

Leu Ala Glu Val Leu Gly Gln Asn Pro Ser Tyr Ile Phe Phe Arg Glu
 325 330 335
 Leu Ala Gly Ser Ser Asn Asp Gly Pro Val Gly Ala Leu Gly Thr Pro
 340 345 350
 Leu Met Gly Glu Tyr Ala Gly Ala Val Asp Arg His Tyr Ile Thr Leu
 355 360 365
 Gly Ala Pro Leu Phe Val Ala Thr Ala His Pro Val Thr Arg Lys Ala
 370 375 380
 Leu Asn Arg Leu Ile Met Ala Gln Asp Thr Gly Ser Ala Ile Lys Gly
 385 390 395 400
 Ala Val Arg Val Asp Tyr Phe Trp Gly Tyr Gly Asp Glu Ala Gly Glu
 405 410 415
 Leu Ala Gly Lys Gln Lys Thr Thr Gly Tyr Val Trp Gln Leu Leu Pro
 420 425 430
 Asn Gly Met Lys Pro Glu Tyr Arg Pro
 435 440

10

20

30

40

【配列表】

2015193652000001.app

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	39/05	(2006.01)	A 6 1 K	39/05		
A 6 1 K	39/08	(2006.01)	A 6 1 K	39/08		
A 6 1 K	39/10	(2006.01)	A 6 1 K	39/10		
A 6 1 K	39/106	(2006.01)	A 6 1 K	39/106		
A 6 1 K	39/13	(2006.01)	A 6 1 K	39/13		
A 6 1 K	39/29	(2006.01)	A 6 1 K	39/29		
A 6 1 P	31/04	(2006.01)	A 6 1 P	31/04		
G 0 1 N	33/53	(2006.01)	G 0 1 N	33/53	N	
C 0 7 K	14/22	(2006.01)	C 0 7 K	14/22	Z N A	

(72)発明者 リーノ ラップオーリ
 イタリア国 イー - 5 3 1 0 0 シエナ, ピア フィオレンティーナ 1, カイロン エセ.
 ピー.アー.

(72)発明者 マルツィア ジュリアーニ
 イタリア国 イー - 5 3 1 0 0 シエナ, ピア フィオレンティーナ 1, カイロン エセ.
 ピー.アー.

F ターム(参考) 4C085 AA04 BA10 BA12 BA14 BA16 BA17 BA18 BA20 BA53 BA89
 CC08 CC21 EE03 GG02 GG04 GG06 GG08 GG10
 4H045 AA11 AA30 BA10 BA41 CA11 DA86 EA31 FA74

【外国語明細書】

2015193652000001.pdf

专利名称(译)	外膜囊泡 (OMV) 疫苗 , 包含n。 脑膜炎血清群b外膜蛋白		
公开(公告)号	JP2015193652A	公开(公告)日	2015-11-05
申请号	JP2015145631	申请日	2015-07-23
[标]申请(专利权)人(译)	诺华科尔多瓦点击罪和诊断SRL		
申请(专利权)人(译)	诺华Vakushinzu和诊断SRL		
[标]发明人	マリアーグラツィアピッツァ リーノラップオーリ マルツィアジュリアーニ		
发明人	マリアーグラツィア ピッツァ リーノ ラップオーリ マルツィア ジュリアーニ		
IPC分类号	A61K39/095 A61K39/00 A61P43/00 A61K39/102 A61K39/09 A61K39/05 A61K39/08 A61K39/10 A61K39/106 A61K39/13 A61K39/29 A61P31/04 G01N33/53 C07K14/22 A61K39/02 A61K39/116 A61K39/295 A61K39/39 A61P25/00 A61P29/00		
CPC分类号	A61K39/095 A61K2039/55505 A61K2039/6068 A61P25/00 A61P29/00 A61P31/00 A61P31/04 A61P31/ /12 A61P31/14 A61P31/20 A61P37/04 A61P43/00 Y02A50/466 A61K2039/54 A61K2039/70		
FI分类号	A61K39/095 A61K39/00.H A61P43/00.121 A61K39/102 A61K39/09 A61K39/05 A61K39/08 A61K39/10 A61K39/106 A61K39/13 A61K39/29 A61P31/04 G01N33/53.N C07K14/22.ZNA		
F-TERM分类号	4C085/AA04 4C085/BA10 4C085/BA12 4C085/BA14 4C085/BA16 4C085/BA17 4C085/BA18 4C085/ /BA20 4C085/BA53 4C085/BA89 4C085/CC08 4C085/CC21 4C085/EE03 4C085/GG02 4C085/GG04 4C085/GG06 4C085/GG08 4C085/GG10 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/ /CA11 4H045/DA86 4H045/EA31 4H045/FA74		
代理人(译)	夏木森下		
优先权	2000001067 2000-01-17 GB 2000005699 2000-03-09 GB		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)	包含 (a) 脑膜炎奈瑟氏球菌血清组B外膜囊泡 (OMV) 和 (b) 选自其他奈瑟氏球菌蛋白或其免疫原性片段的免疫原性组分的组合物。组分 (b) 优选包括来自组分 (a) 的OMV来源的不同NmB菌株的蛋白质。OMV优选通过脱氧胆酸盐提取获得。任选地, 组合物还可以包含针对其他病原体的保护性抗原。	(21) 出願番号 特願2015-145631 (P2015-145631) (22) 出願日 平成27年7月23日 (2015. 7. 23) (62) 分割の表示 特願2013-124554 (P2013-124554) の分割 原出願日 平成13年1月17日 (2001. 1. 17) (31) 優先権主張番号 0001067.8 (32) 優先日 平成12年1月17日 (2000. 1. 17) (33) 優先権主張国 英国 (GB) (31) 優先権主張番号 0005699.4 (32) 優先日 平成12年3月9日 (2000. 3. 9) (33) 優先権主張国 英国 (GB)	(71) 出願人 592243793 ノバルティス ヴァクシンス アンド ダイアグノスティクス エスアールエル イタリア国 イー-53100 シェナ, ピア フィオレンティーナ 1 (74) 代理人 100078282 弁理士 山本 秀策 (74) 代理人 100113413 弁理士 森下 夏樹 (72) 発明者 マリアーグラツィア ピッツァ イタリア国 イー-53100 シェナ, ピア フィオレンティーナ 1, カイロン エセ. ピー. アー.
-------	---	---	--