

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-526418
(P2004-526418A)

(43) 公表日 **平成16年9月2日(2004.9.2)**

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
A 6 1 K 39/095	A 6 1 K 39/095	4 B O 6 4
A 6 1 K 39/395	A 6 1 K 39/395 R	4 B O 6 5
A 6 1 P 31/04	A 6 1 P 31/04	4 C O 8 5
C O 7 K 7/06	C O 7 K 7/06	4 H O 4 5
	審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 108 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願2002-532470 (P2002-532470)	(71) 出願人	397062700 グラクソスミスクライン バイオロジカルズ ソシエテ アノニム ベルギー国 リキセンザール ビー 13 30 ルー デ ランスティテユート 8 9
(86) (22) 出願日	平成13年10月3日 (2001.10.3)	(74) 代理人	100091096 弁理士 平木 祐輔
(85) 翻訳文提出日	平成15年4月2日 (2003.4.2)	(74) 代理人	100118773 弁理士 藤田 節
(86) 国際出願番号	PCT/EP2001/011409	(74) 代理人	100096183 弁理士 石井 貞次
(87) 国際公開番号	W02002/028888		
(87) 国際公開日	平成14年4月11日 (2002.4.11)		
(31) 優先権主張番号	0024200.8		
(32) 優先日	平成12年10月3日 (2000.10.3)		
(33) 優先権主張国	英国 (GB)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ワクチンの成分

(57) 【要約】

本発明は髄膜炎菌に対するワクチンのための成分、特に髄膜炎菌のリポオリゴ糖のエピトープを模倣するペプチド、およびそのような成分を含有するワクチンに関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ナイセリア・メニンギチジス (*N. meningitidis*) の表面の L3, 7, 9 LOS のミモトープであって、4BE12C10、H44/24、H44/58、H44/70 および H44/78 からなる群から選択されるモノクローナル抗体を用いてペプチドライブラリーをスクリーニングして得られるペプチドエピトープを含んでなる前記ミモトープ。

【請求項 2】

ナイセリア・メニンギチジス (*N. meningitidis*) の表面の L3, 7, 9 LOS のミモトープであって、4BE12C10、H44/24、H44/58、H44/70 および H44/78 からなる群から選択されるモノクローナル抗体との抗原としての交叉反応性を有する前記ミモトープ。 10

【請求項 3】

配列番号 1 ~ 140 および 289 ~ 296 のペプチドのうちのいずれか 1 つまたはそのレトロ配列に含有されるペプチドエピトープを含んでなる、請求項 1 または 2 に記載のミモトープ。

【請求項 4】

ペプチドエピトープがノナペプチド中に存在する、請求項 3 に記載のミモトープ。

【請求項 5】

4BE12C10、H44/24、H44/58、H44/70 および H44/78 からなる群から選択されるモノクローナル抗体との交叉反応性を保持している、配列番号 1 ~ 140 および 289 ~ 296 のペプチドのうちのいずれか 1 つもしくはそのレトロ配列または該ペプチドもしくはレトロ配列の改変体のうちのいずれか 1 つ、を含んでなる、請求項 3 または 4 に記載のミモトープ。 20

【請求項 6】

ペプチドエピトープがアミノ酸配列 PP [Y または F または W] を含有する、請求項 3 ~ 5 のいずれか 1 項に記載のミモトープ。

【請求項 7】

ペプチドエピトープがアミノ酸配列 PP [Y または F または W] D を含有する、請求項 6 に記載のミモトープ。 30

【請求項 8】

ペプチドエピトープがアミノ酸配列 PP Y D を含有する、請求項 7 に記載のミモトープ。

【請求項 9】

ペプチドエピトープがアミノ酸配列 W Y を含有する、請求項 3 ~ 5 のいずれか 1 項に記載のミモトープ。

【請求項 10】

ペプチドエピトープがアミノ酸配列 W Y X X P を含有する、請求項 9 に記載のミモトープ。

【請求項 11】

ペプチドエピトープがアミノ酸配列 [Y または W] X Y を含有する、請求項 3 ~ 5 のいずれか 1 項に記載のミモトープ。 40

【請求項 12】

ミモトープが、前記ペプチドエピトープを含むオリゴペプチドであってそのオリゴペプチドの非置換の直鎖状形態よりも構造的に拘束されている前記オリゴペプチドを含んでなる、請求項 3 ~ 11 のいずれか 1 項に記載のミモトープ。

【請求項 13】

オリゴペプチドが、前記ペプチドエピトープを含む環状ペプチドを含んでなる、請求項 12 に記載のミモトープ。

【請求項 14】

環状ペプチドがアミノ酸配列からなる環状部分を含み、かつそのアミノ酸配列の両末端の 50

アミノ酸が共有結合によって連結されている、請求項 13 に記載のミモトープ。

【請求項 15】

環状ペプチドが配列番号 141 ~ 280 および 297 ~ 301 のペプチドのうちのいずれか 1 つ、またはそのレトロ配列である、請求項 14 に記載のミモトープ。

【請求項 16】

ミモトープの免疫原性を増強するために該ミモトープにキャリアーをコンジュゲートさせた、請求項 1 ~ 15 のいずれか 1 項に記載のミモトープ。

【請求項 17】

キャリアーが免疫原性タンパク質を含む、請求項 16 に記載のミモトープ。

【請求項 18】

請求項 1 ~ 17 のいずれか 1 項に記載のミモトープおよび適切な賦形剤または希釈剤を含むワクチン。

10

【請求項 19】

ナイセリア・メニンギチジス (*N. meningitidis*) の表面の L3, 7, 9 LOS のミモトープおよびナイセリア・メニンギチジス (*N. meningitidis*) の表面の L2 LOS のミモトープを含む、血清型 B、C、Y、または W-135 の髄膜炎菌に対するワクチン。

【請求項 20】

ミモトープが、それぞれの髄膜炎菌の表面 LOS に対して高い特異性を有するモノクローナル抗体との抗原としての交叉反応性を有するものである、請求項 19 に記載のワクチン。

20

【請求項 21】

ミモトープの各々がペプチドエピトープを含んでなる、請求項 19 または 20 に記載のワクチン。

【請求項 22】

ペプチドエピトープが、請求項 20 に規定されたそれぞれのモノクローナル抗体を用いてペプチドライブラリーをスクリーニングすることによって得られるものである、請求項 21 に記載のワクチン。

【請求項 23】

L3, 7, 9 および L2 ミモトープが同一の分子内に含まれる、請求項 21 または 22 に記載のワクチン。

30

【請求項 24】

表面の L3, 7, 9 LOS のミモトープが請求項 2 ~ 17 のいずれか 1 項に記載のミモトープである、請求項 21 ~ 23 のいずれか 1 項に記載のワクチン。

【請求項 25】

表面の L3, 7, 9 LOS のミモトープが、以下：

IHRQGIH、HIGQRHI、LPARTEG、GETRAPL、APARQLP、
PLQRAPA、KQAPVHH、HHVPAQK、
LQAPVHH、HHVPAQL、LPSIQLP、PLQISPL、NELPHKL、
LKHPLEN、KSPSMTL、LTMSPSK、
AGPLMLL、LLMLPGA、WSPILLD、DLLIPSW、LSMHPQN、
NQPHMSL、HSMHPQN、NQPHMSH、
SMYGSYN、NYSGYMS、TNHSLYH、HYLSHNT、HAIIYPRH、
HRPYIAH、TTYSRFP、PFRSYTT、
TDSLRLLL、LLRLSDT、SFATNIP、および PINTAFS

40

からなる群より選択されるペプチドを含んでなる、請求項 21 ~ 23 のいずれか 1 項に記載のワクチン。

【請求項 26】

表面の L2 LOS のミモトープが、F1-5H5 / ID9 モノクローナル抗体との抗原としての交叉反応性を有する、請求項 19 ~ 25 のいずれか 1 項に記載のワクチン。

50

【請求項 27】

ナイセリア・メニンギチジス (*N. meningitidis*) の表面の L3, 7, 9 LOS のミモトープ、およびナイセリア・メニンギチジス (*N. meningitidis*) の表面の L10 LOS のミモトープを含む、血清型 A の髄膜炎菌に対するワクチン。

【請求項 28】

表面の L10 LOS のミモトープが、L10 LOS に対して高い特異性を有するモノクローナル抗体との抗原としての交叉反応性を有する、請求項 27 に記載のワクチン。

【請求項 29】

モノクローナル抗体が 5B4-F9-B10 である、請求項 28 に記載のワクチン。

10

【請求項 30】

表面の L10 LOS のミモトープがペプチドエピトープを含んでなる、請求項 28 または 29 に記載のワクチン。

【請求項 31】

ナイセリア・メニンギチジス (*N. meningitidis*) の表面の L3, 7, 9 LOS のミモトープ、ナイセリア・メニンギチジス (*N. meningitidis*) の表面の L10 LOS のミモトープ、およびナイセリア・メニンギチジス (*N. meningitidis*) の表面の L2 LOS のミモトープを含む、髄膜炎菌ワクチン。

【請求項 32】

請求項 31 に記載のワクチンおよびコンジュゲート化インフルエンザ菌 (*H. influenzae*) b 型莢膜多糖を含む、髄膜炎ワクチン。

20

【請求項 33】

特許手続上の寄託に関するブダペスト条約に基づいて 2000 年 9 月 22 日付で仮受託番号 92209 により ECACC に寄託された、H44/24 ハイブリドーム。

【請求項 34】

特許手続上の寄託に関するブダペスト条約に基づいて 2000 年 9 月 22 日付で仮受託番号 92210 により ECACC に寄託された、H44/58 ハイブリドーム。

【請求項 35】

特許手続上の寄託に関するブダペスト条約に基づいて 2000 年 9 月 22 日付で仮受託番号 92211 により ECACC に寄託された、H44/70 ハイブリドーム。

30

【請求項 36】

特許手続上の寄託に関するブダペスト条約に基づいて 2000 年 9 月 22 日付で仮受託番号 92212 により ECACC に寄託された、H44/78 ハイブリドーム。

【請求項 37】

請求項 33 ~ 36 のいずれか 1 項に記載のハイブリドームから得られるモノクローナル抗体。

【請求項 38】

ナイセリア・メニンギチジス (*N. meningitidis*) の L3, 7, 9 LOS のミモトープを同定するための、請求項 37 に記載のモノクローナル抗体の使用。

【請求項 39】

請求項 37 に記載のモノクローナル抗体を含む医薬組成物。

40

【請求項 40】

医薬として使用するための、請求項 1 ~ 17 のいずれか 1 項に記載のミモトープ、または請求項 18 ~ 32 のいずれか 1 項に記載のワクチン、または請求項 37 に記載のモノクローナル抗体。

【請求項 41】

髄膜炎菌疾患の治療または予防のための医薬を製造するための、請求項 1 ~ 17 のいずれか 1 項に記載のミモトープ、または請求項 18 ~ 32 のいずれか 1 項に記載のワクチン、または請求項 37 に記載のモノクローナル抗体の使用。

【請求項 42】

50

請求項 1 ~ 17 のいずれか 1 項に記載のミモトープを製造すること、および該ミモトープをアジュバントとともに製剤化することを含む、ワクチンの製造方法。

【請求項 43】

請求項 1 ~ 17 のいずれか 1 項に記載のミモトープ、または請求項 18 ~ 32 のいずれか 1 項に記載のワクチン、または請求項 37 に記載のモノクローナル抗体を、髄膜炎菌疾患に罹患しているかまたは罹患しやすい患者へ投与することを含む、患者の治療方法。

【請求項 44】

請求項 1 ~ 16 のいずれか 1 項に記載のミモトープをコードする DNA 配列。

【請求項 45】

患者の血清中の L3, 7, 9 LOS に対する抗体を検出するために請求項 1 ~ 16 のいずれか 1 項に記載のミモトープを使用することを含む、髄膜炎菌感染に対する診断用アッセイ。 10

【請求項 46】

患者から得たサンプル中の L3, 7, 9 免疫型髄膜炎菌の存在を検出するために請求項 37 に記載のモノクローナル抗体を使用することを含む、髄膜炎菌感染に対する診断用アッセイ。

【請求項 47】

配列番号 281 ~ 288 の DNA 配列によってコードされる CDR 領域をコードする DNA 配列。

【発明の詳細な説明】 20

【0001】

発明の分野

本発明は髄膜炎菌に対するワクチンの成分、好ましくは髄膜炎菌のリポオリゴ糖のエピトープを模倣するペプチド、及びそのような成分を含むワクチンに関する。

【0002】

発明の背景

ナイセリア・メニンギチジス (*Neisseria meningitidis*) (髄膜炎菌) はヒト上気道から頻繁に単離されるグラム陰性細菌である。この細菌は、菌血症や髄膜炎等の重篤な侵入性細菌性疾患の原因である。髄膜炎菌疾患の発生数には、地理的、季節的および年次的な差異が見られる (Schwartz, B., Moore, P. S., Broome, C. V.; Clin. Microbiol. Rev. 2 (Supplement), S18 - S24, 1989)。この細菌は通常はその莢膜多糖の血清型に従って分類される。 30

【0003】

温暖な国々で最も多い疾患は血清型 B 株によるものであって、その発生数は 1 ~ 10 / 100,000 / 年・総人口の間で変動し、しばしばより高値に達する (Kaczmarek, E. B. (1997), Commun. Dis. Rep. Rev. 7: R55 - 9, 1995; Scholten, R. J. P. M., Bijlmer, H. A., Poolman, J. T. 5、Clin. Infect. Dis. 16: 237 - 246, 1993; Cruz, C., Pavez, G., Aguilar, E., 5、Epidemiol. Infect. 105: 119 - 126, 1990)。 40

【0004】

血清型 A の髄膜炎菌が優位を占める流行は、その大部分が中央アフリカで発生し、しばしば 1000 / 100,000 / 年のレベルにまで達する (Schwartz, B., Moore, P. S., Broome, C. V. Clin. Microbiol. Rev. 2 (Supplement), S18 - S24, 1989)。髄膜炎菌疾患全体からみて殆ど全ての症例が血清型 A、B、C、W - 135 および Y の髄膜炎菌により引き起こされ、4 価の A、C、W - 135、Y 型莢膜多糖ワクチンが利用可能である (Armand, J., Arminjon, F., Mynard, M. C., Lafaix, C., J. Biol. Stand. 10: 335 - 339, 1982)。 50

【0005】

ナイセリア・メニンギチジス (*Neisseria meningitidis*) の感染頻度は過去数十年の間に劇的に上昇している。これは、複数の抗生物質に耐性な株の出現および免疫系が弱められた人口数の増大を原因とする。幾つかのまたは全ての標準的な抗生物質に耐性であるナイセリア・メニンギチジス (*Neisseria meningitidis*) 株が単離されることは、もはや珍しいことではない。この現象は、新たな抗菌剤、ワクチン、薬剤のスクリーニング法、およびこれらの生物用の診断試験といった、現在のところ満たされていない医薬の必要性および需要を生み出した。

【0006】

利用可能な前記の多糖ワクチンについては、それらをキャリアタンパク質に化学的にコンジュゲートさせることによる改良が現在行われている (Lieberman, J. M., Chiu, S. S., Wong, V. K.ら、JAMA 275:1499-1503, 1996)。

【0007】

しかしながら、血清型Bのワクチンは利用できない。血清型Bの莢膜多糖は免疫原性を有しないことが見出されている - それはおそらくこの血清型Bの莢膜多糖が宿主成分との構造類似性を有しているためであろう (Wyle, F. A., Artenstein, M. S., Brandt, M. L.ら、J. Infect. Dis. 126:514-522, 1972; Finne, J. M., Leinonen, M., Makela, P. M. Lancet ii.:355-357, 1983)。従って外膜小胞からまたはそれから得た精製タンパク質成分から血清型Bのワクチンの開発を試みることに努力が集中されてきた。

【0008】

ワクチン開発のための別の髄膜炎菌抗原としては、髄膜炎菌のリポオリゴ糖 (LOS) がある。それらリポオリゴ糖は外膜に結合した糖脂質であり、腸内細菌科細菌のリポ多糖 (LPS) とはO側鎖が欠けている点で異なっており、従って、R型のLPSに似ている (Griffissら、Rev. Infect. Dis. 1988, 10:S287-295)。LOSのオリゴ糖部分における不均一性のために種々の髄膜炎菌の株間での構造的及び抗原性の多様性が作り出されている (Griffissら、Inf. Immun. 1987, 55:1792-1800)。このことは髄膜炎菌の株を12種類の免疫型にさらに分けるために用いられている。免疫型L3、L7、L9は同一の炭水化物構造を有し、従ってL3, 7, 9と名付けられている。髄膜炎菌のLOS3, 7, 9、L2、およびL5はシアリル化によって、またはシチジン5'-ウリジン酸-N-アセチルノイラミン酸の添加により修飾することができる。LOSに対する抗体は実験用ラットを感染から保護し、ナイセリア・メニンギチジス (*N. meningitidis*) に感染した小児での殺菌活性に寄与することが示されている (Griffissら、J. Infect. Dis. 1984, 150:71-79)。

【0009】

LOSの毒性成分は、他のグラム陰性細菌由来のエンドトキシンの場合と同様に、分子のリピドA部分にあり、免疫原性を有するオリゴ糖部分にはない。この分子の免疫原性を有する部分から毒性のある部分を分離することは可能かもしれないが、分離してしまえばその分子の天然のコンフォメーションは保持することができないであろう。

【0010】

このような困難性の解決法はLOSのオリゴ糖部分にあるエピトープを模倣することのできるミモトープを同定することである。このようなやり方で代理抗原を作製することができる。

【0011】

多糖を模倣するペプチドが報告されている。例えば、髄膜炎菌B群莢膜多糖のミモトープ (Moeら、1999, FEMS Immunology and Medical Microbiology, 26:209-226)、および髄膜炎菌C群莢膜多糖のミモ

トープ (Westerinkら、1995, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92:4021-4025) が同定されている。さらに、WO 00/25814 はいくつかの血清型 B の LOS L3, 7, 9 ヘプタペプチドミモトープを開示している。

【0012】

ミモトープをワクチン中に含有させる場合の適合性はかなり様々であり (すなわち、その炭水化物に対して防護液性免疫応答を誘導することのできる免疫原性ミモトープからなるものであるか否か)、髄膜炎菌 (特に血清型 B) の LOS のペプチドミモトープのさらに別のクラスを同定することの必要性は依然としてある。

【0013】

本発明の要旨

ナイセリア・メニンギチジス (N. meningitidis) LOS の表面に露出されるエピトープを模倣するペプチドミモトープをさらに同定するために、本発明者らは 2 ファージディスプレイランダムペプチドライブラリーを、ナイセリア・メニンギチジス (N. meningitidis) LOS に対する 5 種類のモノクローナル抗体を用いてスクリーニングした。

【0014】

本発明はナイセリア・メニンギチジス (N. meningitidis) の表面の L3, 7, 9 LOS のミモトープであって、4BE12C10、H44/24、H44/58、H44/70 および H44/78 からなる群から選択されるモノクローナル抗体との抗原としての交叉反応性を有する前記ミモトープを提供する。

【0015】

本発明はさらに、ナイセリア・メニンギチジス (N. meningitidis) の表面の L3, 7, 9 LOS のミモトープであって、4BE12C10、H44/24、H44/58、H44/70 および H44/78 からなる群から選択されるモノクローナル抗体を用いてペプチドライブラリーをスクリーニングすることによって得られるペプチドエピトープを含んでなる前記ミモトープを提供する。

【0016】

上記のミモトープを含むワクチン組成物も提供される。

【0017】

本発明の別の 1 態様は、血清型 B、C、Y、または W-135 の髄膜炎菌に対するワクチンであって、ナイセリア・メニンギチジス (N. meningitidis) の表面の L3, 7, 9 LOS のミモトープ、およびナイセリア・メニンギチジス (N. meningitidis) の表面の L2 LOS のミモトープを含む前記ワクチンに関する。

【0018】

本発明のさらに別の 1 態様は、血清型 A の髄膜炎菌に対するワクチンであって、ナイセリア・メニンギチジス (N. meningitidis) の表面の L3, 7, 9 LOS のミモトープ、およびナイセリア・メニンギチジス (N. meningitidis) の表面の L10 LOS のミモトープを含む前記ワクチンに関する。

【0019】

発明の詳細な説明

本発明は、髄膜炎菌ワクチンの成分として用いるためのナイセリア・メニンギチジス (N. meningitidis) LOS のミモトープのさらに別のクラスを提供することを目的としている。

【0020】

本発明はナイセリア・メニンギチジス (N. meningitidis) の表面の L3, 7, 9 LOS のミモトープであって、4BE12C10、H44/24、H44/58、H44/70 および H44/78 からなる群から選択されるモノクローナル抗体との抗原としての交叉反応性を有する前記ミモトープを提供する。これらのモノクローナル抗体の各々については後に説明するが、これらを「本発明の mAb (モノクローナル抗体)

10

20

30

40

50

」と呼ぶ。これらのmAbは、L3, 7, 9 LOSに対して高い特異性および/またはアフィニティーを有している。ミモトープの意味は、天然の髄膜炎菌LOSのエピトープを認識する抗体が結合しうるような、天然の髄膜炎菌LOSのエピトープと十分に類似した実体物、として定義される。「抗原としての交叉反応性を有する」とは、本発明の目的とするところからは、当該ミモトープを発現している組換えファージについてのELISA試験（好ましくは実施例3で行うような）またはイムノプロットで、そのミモトープが陽性であることが示されることを意味する。好ましくは、該ミモトープは天然のアミノ酸配列を持たない。

【0021】

好ましくは、LOSと特異的に交叉反応し、かつ好ましくはLOSを含んでいる細菌の細胞全体と交叉反応する抗体が産生されるように、本発明のミモトープを用いて宿主を免疫することができる。

10

【0022】

本発明はさらに、ナイセリア・メニンギチジス(*N. meningitidis*)の表面のL3, 7, 9 LOSのミモトープであって、4BE12C10、H44/24、H44/58、H44/70およびH44/78からなる群から選択されるモノクローナル抗体を用いてペプチドライブラリーをスクリーニングすることによって得られるペプチドエピトープを含んでなる前記ミモトープを提供する。好ましくは、該ミモトープは天然のアミノ酸配列を持たない。

【0023】

典型的には、該ペプチドエピトープは、LOSに対する高い特異性および/または高いアフィニティーを有するモノクローナル抗体を用いてペプチドライブラリー（好ましくはランダムで高度に多様なもの）をスクリーニングすることによって得られるものである。ファージディスプレイ法(EP 0 552 267 B1)などの一般的技法を用いてそのようなライブラリーを（好ましくは実施例2に記載のようにして）スクリーニングすることができる。この技法は多くのペプチドミモトープを同定できる可能性があるという利点を有することから、それによりL3, 7, 9 LOSのペプチドミモトープ内に含まれているエピトープの本質的な特徴（または化学的性質）を定義するための認識パターンを確立することができる。

20

【0024】

本発明では、ノナーペプチドライブラリー（直鎖状のもの、またはジスルフィド結合で拘束されたもののいずれかであり、例えばFelicia [1993 Gene 128: 21-27] およびLuzzagoら [1993 Gene 128: 51-57] によって報告されているようなもの）は、該ライブラリーから単離される配列番号1~140、289~296のペプチドミモトープ内に含まれているペプチドエピトープを同定する目的で、本発明のmAbをチャレンジさせるために好都合に用いることができると考えられた。従って、本発明のミモトープは、好ましくは、配列番号1~140および289~296のペプチドのうちいずれか1つ、またはそのレトロ配列に含有されるペプチドエピトープを含んでなる。

30

【0025】

本発明では、ペプチドエピトープは、配列番号1~140および289-296のうちいずれか1つの部分配列、またはそのレトロ配列を含んでなるものであってよく、あるいは、配列番号1~140および289~296のうちいずれか1つ（もしくはそのレトロ配列）またはそれに由来する部分配列を組み込んだより長いペプチド中に存在するものであってもよい。従って、本発明のミモトープは、配列番号1~140および289~296のペプチドの一方の末端または両端において、多数の他の天然の残基からなるN末端および/またはC末端の伸長部が付加されたものであってもよい。

40

【0026】

好ましくは、本発明のミモトープは、配列番号1~140および289~296のペプチド（本発明のペプチド）のいずれか1つ、もしくはそのレトロ配列、または該ペプチドも

50

しくはレトロ配列の改変体を含んでなる。最も好ましくは、本発明のペプチドのレトロ配列および改変体を含んでなるミモトープは、4BE12C10、H44/24、H44/58、H44/70およびH44/78からなる群から選択されるモノクローナル抗体との交叉反応性を保持するはずである。最も好ましくは、本発明のミモトープは、配列番号153、154、157、162、167、168、169、170、179、45、47、190、191、53、194、55、58、61、63、206、75、222、83、85、86、227、88、93、243、104、245、255、124、271、272、273、279、280、297、298、291、292、293、294、295、および296（これらは、実施例2の表2に示しているペプチドNo. 13、14、17、22、27、28、29、30、39、45、47、50、51、53、54、55、58、61、63、66、75、82、83、85、86、87、88、93、103、104、105、115、124、131、132、133、139、140、141、142、143、144、145、146、147、および148にそれぞれ対応する）のペプチドのいずれか1つ、または、実施例3のELISA試験において1種以上のmAbにより依然として認識されるそれらのペプチドのレトロ配列および改変体のいずれか1つを含んでなる。

10

20

30

40

【0027】

ペプチド配列についての「レトロ配列 (retro sequence)」とは、配列の方向性を逆転させたペプチド配列を意味する。すなわち、ペプチドAGDTのレトロ配列はTDGAである。ペプチドミモトープのレトロ配列はしばしばペプチドミモトープそれ自体であることが当業界では見出されている。本発明のミモトープ配列は、その全体または一部がD-立体異性体アミノ酸からなるもの（インベルソ配列； *inverso sequence*）であってもよい。またそのペプチド配列は、配列の方向性が逆転されておりアミノ酸がD-立体異性体であるという意味で、レトロ-インベルソの性質を持つものであってよい。そのようなレトロペプチド、インベルソペプチド、またはレトロ-インベルソペプチドは、免疫原として投与された場合、宿主中でより安定でありかつ/またはより免疫原性の強いものとなりうるという利点を有している。D-アミノ酸を作成しそれらをタンパク質中に組み入れる方法は当業界では周知である [例えば、Thorsonら、(1998) *Methods Mol. Biol.* 77: 43-73、およびChartrainら (2000) *Curr. Opin. Biotechnol.* 11: 209-14を参照せよ]。

【0028】

本発明のペプチドを含んでなるペプチドミモトープは、特定の目的のために、選択されたアミノ酸の付加、欠失、または置換によって改変することができる（本発明のペプチドの改変体）。

【0029】

例えば、配列番号1~140、289~296のペプチドの各々の1、2、3、4、5、6、7、8、または9個のアミノ酸を、そのアミノ酸に非常に類似しているアミノ酸で置換することができる。例えば、下記の表に示すとおり、AはV、L、またはIで置換することができる。

【0030】

元の残基	代表的な置換	好ましい置換
A	V, L, I	V
R	K, Q, N	K
N	Q, H, K, R	Q
D	E	E
C	S	S
Q	N	N
E	D	D
G	P, A	A
H	N, Q, K, R	R
I	L, V, M, A, F	L
L	I, V, M, A, F	I
K	R, Q, N	R
M	L, F, I	L
F	L, V, I, A, Y	L
P	A	A
S	T	T
T	S	S
W	Y, F	Y
Y	W, F, T, S	F
V	I, L, M, F, A	L

10

20

30

40

50

【0031】

さらに、本発明のペプチドはタンパク質キャリアーとのコンジュゲーションを容易にする目的で改変することができる。例えば、該ペプチドに末端システインを含有させることが、いくつかの化学的コンジュゲーション法のためには望ましいであろう。さらに、タンパク質キャリアーに結合されるペプチドについて、そのペプチドのコンジュゲートされる末端から遠位側に疎水性末端を含有させて、それによりそのペプチドの遊離の非コンジュゲーション末端がキャリアータンパク質の表面と会合した状態のままとなるようにすることが望ましい。このことは該ペプチドのコンフォメーションの自由度を減らし、それによって該ペプチドが分子全体としてのL3, 7, 9 LOSに非常によく類似したコンフォメーションを示すこととなる可能性が増大する。例えば、該ペプチドを改変して、N末端システインを有し、C末端に疎水性のアミド化テイルを有するようにしてもよい。あるいはまた、有益な誘導体を得るため、例えば、ペプチドの安定性を増大させるために、1個以上のアミノ酸のD-立体異性体を付加または置換してもよい。当業者であれば、そのような改変されたペプチドまたはミモトープは、全体としてまたは部分的に非ペプチド性のミモトープであってもよく、その場合にその構成残基は20種類の天然アミノ酸に必ずしも限定されない。さらに、本発明のモノクローナル抗体と交叉反応できるエピトープを保持する限りは、本発明のペプチドから1個以上のアミノ酸を欠失させてもよい。典型的には、そのようなエピトープは少なくとも4、5、6、7、または8個のアミノ酸を有する。さらに、本発明のペプチドは、そのペプチド配列がLOS分子全体と関連する場合にはその形状とよく類似するコンフォメーションとなるようそのペプチドを拘束するために、当業界では既知の技法によって環状化させてもよい。

【0032】

従って、さらなる好ましい実施形態においては、本発明のミモトープは、そのオリゴペプチドの直鎖状形態のものよりも構造的に強く拘束されているオリゴペプチドを含んでいて

もよい。より少数のコンフォメーションしか取りえないペプチド、またはロックされたコンフォメーションを有するペプチドは、免疫応答をより惹起しやすいと考えられるが、それは、そのようなペプチドが抗体の結合部分に対して構造的に拘束されたエピトープを提示するからである。

【0033】

別のペプチド鎖への共有結合による連結または分子内結合などの置換基は、そのオリゴペプチドを構造的に拘束する。例えば、本発明のオリゴペプチドは、該オリゴペプチドのアミノ酸配列を含んでいるより大きなポリペプチドの一次構造の一部を形成するものであってもよい。好ましくは、本発明のオリゴペプチドは、下記にさらに詳述するとおり、環状ペプチドを含む。

【0034】

その他の置換基としては、生物学および非生物学的结构物を含む巨大分子结构物などの他の要素との共有結合を包含する。生物学的结构物の例としては、ミモトープの免疫原性を増強するための、下記に記載したものなどのキャリアタンパク質が含まれる。非生物学的结构物の例としては、ミセルなどの脂質小胞が含まれる。

【0035】

好ましい実施形態においては、本発明のオリゴペプチドは環状ペプチドを含む。環状ペプチドの使用。典型的には、該環状ペプチドは、好ましくはアミノ酸配列からなる環状部分を含み、かつそのアミノ酸配列の両末端アミノ酸は共有結合によって互いに連結されている。その共有結合は、システイン残基間に見られるようなジスルフィド架橋であることが都合がよい。その環状部分は典型的にはノナペプチドを含み、かつこのノナペプチドは、共有結合によって連結されて環状部分を形成させるアミノ酸に隣接する前記アミノ酸配列の一部を形成するものであることが都合がよい。

【0036】

システイン残基のペアを含むことによりジスルフィド架橋を形成することができる好ましい環状ペプチドの例としては、配列番号141~280および297~301(ならびに上記で定義した、それらのレトロ配列、インベルソ配列、またはレトロ-インベルソ配列)が挙げられる。

【0037】

上述のとおり、ファージディスプレイ法で同定される多数のペプチドミモトープにより、L3, 7, 9 LOSのミモトープのエピトープ(またはエピトープの一部)を規定するパターンを同定することが可能となる。従って本発明の別の態様は、以下のアミノ酸配列(直鎖状または環状)を含むL3, 7, 9 LOSのペプチドミモトープである: WY、PP、AP、PY、PPY、PPF、PPW、APP、WYS、WYT、LWY、GGY、GPY、PPYD(好ましいモチーフ)、PPFD、FDPP、GGYL、PPWD、SLWY、PXWY、WYXXP、YXY、PWST、EKKXFまたはWXY [式中、それぞれのXは、同一であるかまたは異なるアミノ酸であり、好ましくは天然アミノ酸である]。

【0038】

好ましい実施形態においては、上記で同定した本発明のエピトープまたはペプチドミモトープを組み込んでいるペプチドは、サイズの小さなものである。従って、ペプチドミモトープはその長さが100アミノ酸未満であるのがよく、好ましくは75アミノ酸未満、より好ましくは50アミノ酸未満、最も好ましくは4~25アミノ酸長の範囲内であることを意図している。特定の実施形態においては、本発明のペプチドはその長さが9アミノ酸である。

【0039】

髄膜炎菌に対するワクチンにおける使用に適したミモトープとしてのある特定の構築物の状況を確認するために種々の技法を用いることは、当業者には明白なことであろう。そのような技法としては次の例が挙げられる。すなわち、推定上のミモトープについてアッセイして、その際その推定上のミモトープによって生成された抗血清が天然L3, 7, 9

10

20

30

40

50

LOS分子と交叉反応し、かつ、L3, 7, 9免疫型のナイセリア・メニンギチジス (*N. meningitidis*) に対する殺菌アッセイにおいて有効であることから、その構築物の免疫原性を確認することができる。典型的な殺菌アッセイは実施例1.4中に記載するとおり行われる。また、そのようなアッセイは、幼若ラットなどの動物モデルでの標準的なオプソニン食菌 (*opsonophagocytosis*) 実験で行うこともできる。

【0040】

本発明の実施形態においては、ペプチドエピトープまたはミモトープを組み込んでいる上述の少なくとも1種のペプチドをキャリアー分子と連結させて、ワクチン接種プロトコール用の免疫原を形成させる。該ペプチドは、化学的共有結合により連結してもよく、あるいは遺伝子工学的に作製された融合パートナーとの発現により、場合によりリンカー配列を介するものの発現により連結してもよい。

10

【0041】

本発明のペプチドの免疫原性を有するキャリアーへの共有結合カップリングは、当技術分野で周知の方法で行うことができる。従って、例えば、直接的な共有結合カップリングのためには、CDAPおよびSPDPなどの一般的な市販のヘテロ二官能性リンカーを(製造業者の使用説明書に従って)用いて、カルボジイミド、グルタルアルデヒド、または(N-[-マレイミドブチリルオキシ])スクシンイミドエステルを利用することができる。そのカップリング反応の後、免疫原は透析法、ゲルろ過法、分画法等の手段によって容易に単離精製することができる。

20

【0042】

本発明の免疫原中に用いるキャリアーの種類は当業者であれば容易に分かるであろう。そのようなキャリアーの役割は、本発明のペプチドに対する免疫応答の誘導を助けるためのサイトカインの助力を提供することである。全てを網羅したものではないが、本発明で用いることのできるキャリアーとしては以下のものが挙げられる：キーホールリンペットヘモシアニン(KLH)、ウシ血清アルブミン(BSA)などの血清アルブミン、破傷風毒素もしくはジフテリア毒素(TT、DT)などの不活化細菌性毒素、またはそれらの組換え断片(例えば、TTのフラグメントCのドメイン1、またはDTの転移ドメイン(Tドメイン))、CRM197、あるいはツベルクリンの精製タンパク質誘導體(PPD)。あるいはまた、本発明のミモトープまたはエピトープはリポソームキャリアーに直接的にコンジュゲートさせてもよく、それがさらにT細胞の助力をもたらすことのできる免疫原を含んでいてもよい。好ましくは、ペプチドとキャリアーとの比は1:1~20:1のレベルであり、好ましくはそれぞれのキャリアーが3~15個のペプチドを担持すべきである。

30

【0043】

本発明の実施形態においては、好ましいキャリアーは、インフルエンザ菌(*Haemophilus influenzae*)由来のプロテインD(IgD結合性タンパク質)である(WO 91/18926、EP 0 594 610 B1)。場合によっては、例えば組換え免疫原発現系においては、プロテインDの断片、例えばプロテインDの1番目の3分の1断片(プロテインDのN末端から100~110個のアミノ酸からなる(WO 99/10375))を使用することが望ましい。

40

【0044】

本発明のペプチドを提示させる方法として好ましい別の方法は、組換え融合分子を用いるものである。例えば、EP 0 421 635 Bは、ウイルス様粒子において外来ペプチド配列を提示させるためのキメラヘパドナウイルスのコア抗原粒子の使用について述べている。本発明の免疫原は、B型肝炎ウイルスコア抗原から構成されるキメラ粒子において提示されたペプチドを含んでもよい。さらに、本発明の組換え融合タンパク質は、本発明のミモトープと、インフルエンザウイルスのNS1などのキャリアータンパク質とを含んでなるものであってもよい。

【0045】

50

あるいは、本発明のペプチドを、外膜タンパク質（好ましくは髄膜炎菌起源のもの、例えば Por A、Por B、Pil C、Tbp A、Frp B、または Lbp A）の表面に露出されているループ内に、またはそれと置換する形で挿入することができる。これは、本発明のペプチドを LOS エピトープを模倣しうる形状に拘束しておける利点がある。さらにこれは、免疫原を、その免疫原を発現している髄膜炎菌株から得られる外膜小胞調製物（またはブレブ調製物）中に含有させて宿主に投与することに関して、有利であろう。そのような改良されたブレブ調製物は、本発明のさらなる態様である。

【0046】

本発明の一部を形成する任意の組換え発現タンパク質については、そのような免疫原をコードする核酸配列もまた本発明の1態様を形成する。さらに、上述の本発明のペプチドまたはミモトープのうちの任意のものをコードする DNA 配列も、さらなる態様である。

10

【0047】

本発明の DNA 配列を含む DNA 分子、例えばプラスミドは、Kieber - Emmonsら (Journal of Immunology 2000 165: 623 - 627) が述べている様式で免疫原として用いることができる。その方策は、宿主中の LOS に対する交叉反応性の Th 1 免疫応答の引き金を引くのに有益であろう。そのような DNA 分子を含むワクチン、およびそのようなワクチンの髄膜炎菌疾患の治療または予防のための使用は、本発明のさらなる態様である。

【0048】

本発明に用いられるペプチドは、当技術分野で周知の固相法によって容易に合成することができる。「T-boc法」または「F-moc法」を利用して適切な合成を行うことができる。環状ペプチドは、周知の「F-moc法」とポリアミド樹脂を用いて全自動装置での固相法によって合成することができる。あるいは、当業者であればこの手法を手動で行うために必要な実験操作は認識しているであろう。固相合成の技術および手順は、「固相ペプチド合成：実際的なアプローチ (Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach)」(E. Atherton および R. C. Sheppard による。Oxford University Press の IRL により刊行。(1989)) に記載されている。あるいは、本発明のペプチドは組換え法で製造することができ、その方法には、ミモトープをコードする核酸分子を細菌または哺乳類細胞系にて発現させた後、その発現したミモトープを精製することが含まれる。ペプチドおよびタンパク質を組換え法で発現させる技術は当業界において知られており、Maniatis, T., Fritsch, E. F. および Sambrook ら, 「分子クローニング、実験室マニュアル (Molecular cloning, a laboratory manual)」第2版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989) に記載されている。

20

30

【0049】

本発明のモノクローナル抗体、およびそれらを含む医薬組成物は、本発明の一部を形成する。これらの抗体 (H44/24、H44/58、H44/70、H44/78、および 4BE12C10) は、髄膜炎菌疾患の改善または予防のために該抗体を患者に投与することによって、受動的予防または治療に用いることができる。これらの抗体は好ましくはハイブリドーマから産生されるものである。本発明の H44/24、H44/58、H44/70、および H44/78 ハイブリドーマは、ブダペスト条約に基づく特許手続上の寄託として、ECACC (European Collection of Cell Cultures, Vaccine Research and Production Laboratory, Public Health Laboratory Service, Centre for Applied Microbiology Research, Porton Down, Salisbury, Wiltshire, SP4 0JG UK) に、2000年9月22日付で寄託されており、それらの仮受託番号はそれぞれ No. 92209、92210、92211、および92212である。これらの八

40

50

イブリドーマにより産生される抗体は、配列番号281~288で示されるそれら抗体の軽鎖および重鎖をコードするDNA配列によってさらに定義される。4BE12C10抗体は、国立生物学的製剤研究所(National Institute of Biological Standards and Control), Blanche Lane, South Mimms, Potters Bar, Herts, EN6 3QG, UKから入手することができる。これらの抗体は、配列番号281~288の配列および当技術分野で公知の技法を用いて、治療用途のためにヒト化またはCDR移植することができる[例えば、HolligerおよびBohlen、(1999) Cancer Metastasis Rev. 18:411-9、GavilondoおよびLarrick、(2000) Biotechniques 29:128-32, 134-6, 138、KipriyanovおよびLittle、(1999) Mol. Biotechnol. 12:173-201を参照せよ]。本明細書では「抗体」という用語は有用な抗原結合特異性を有する分子を意味する。当業者であれば、この用語が、本発明のモノクローナル抗体のフラグメントであり、かつそのモノクローナル抗体と同一または非常に類似した機能性を示しうるポリペプチドをも包含することは容易に理解されよう。そのような抗体フラグメントまたは誘導体は、本明細書で用いられている抗体という用語に包含されることが意図されている。

10

【0050】

本発明のモノクローナル抗体と結合できるL3, 7, 9 LOSのミモトープ、およびそれらのミモトープを含む免疫原は、本発明の重要な態様を形成する。これらの抗体と結合できるミモトープを含むワクチンは、髄膜炎菌疾患の治療または予防において有用である。

20

【0051】

本発明のモノクローナル抗体を髄膜炎菌のL3, 7, 9 LOSの新規のミモトープを同定するために使用すること、さらにそれを免疫原として使用することも、本発明の重要な態様を形成する。

【0052】

本発明は、本発明のエピトープまたはミモトープ(上記で定義したもの)を含む新規ペプチドの、髄膜炎菌疾患の予防または治療のための医薬組成物の製造における使用を提供する。また、本発明のミモトープまたはペプチドとキャリアー分子とを含む免疫原が、髄膜炎菌疾患の免疫学的予防または治療のためのワクチンにおける使用のために提供される。従って、本発明のミモトープ、ペプチド、または免疫原は、医薬における使用、および髄膜炎菌疾患の内科的治療または予防における使用のために提供される。従って、髄膜炎菌疾患に罹患しているかまたは罹患しやすい患者に本発明のワクチンまたは医薬を投与することを含む、髄膜炎菌疾患の治療法が提供される。

30

【0053】

本発明のワクチンには適切な賦形剤または希釈剤も含めることができる。アジュバントを含めることが有利である。本発明のワクチンのための適切なアジュバントとしては、本発明の免疫原に対する抗体応答を増強させることのできるアジュバントが含まれる。アジュバントは当技術分野では周知のものである(「ワクチンデザイン - サブユニットとアジュバントを用いるアプローチ(Vaccine Design - The Subunit and Adjuvant Approach)」1995, Pharmaceutical Biotechnology, 第6巻, Powell, M. F. およびNewman, M. J. 編, Plenum Press, New York and London, ISBN 0-306-44867-X)。本発明の免疫原と共に用いるための好ましいアジュバントとしてはアルミニウム塩またはカルシウム塩(例えば、水酸化物塩またはリン酸塩)が含まれる。他のアジュバントとしては、QS21(米国特許第5,057,540号)および3D-MPL(英国特許第2220211号)などのサポニンアジュバントが含まれる。

40

【0054】

50

本発明のワクチンは、通常は初回免疫投与と追加免疫投与の両方に用いられる。追加免疫投与は十分な間隔をおいて、または、好ましくは毎年もしくは循環血液中の抗体レベルが所望のレベル未満となった際に、行われることが期待される。追加免疫投与は、最初に用いたキャリアー分子を含まないペプチドから構成されるものであってよい。そのようなブースター（追加免疫）構築物は、別のキャリアーを含んでもよく、またはキャリアーを全く含まなくてもよい。

【0055】

本発明のワクチン調製物は、全身経路または粘膜経路によって該ワクチンを投与することにより、髄膜炎菌疾患に罹患しやすいかまたは罹患している哺乳類を保護または治療するために用いることができる。このような投与には、筋肉内、腹腔内、皮内、経皮、もしくは皮下経路による注射、または、口腔/消化管、呼吸器、泌尿生殖管への粘膜投与が含まれる。

10

【0056】

ワクチンの各用量に含めるタンパク質、ペプチド、またはコンジュゲート化ペプチドの量は、典型的な被ワクチン接種者において著しい有害な副作用を生じることなく免疫防御応答を惹起する量が選択される。そのような量は、どの特定の免疫原を用いるか、どのようにその免疫原を提示させるかに応じて変動する。一般的には、各用量は、1~1000 μ g、好ましくは1~500 μ g、好ましくは1~100 μ gのタンパク質/ペプチドを含むと考えられ、そのうち1~50 μ gが最も好ましい範囲である。ある特定のワクチンに対して最適な量は、被験体において適切な免疫応答が生ずることを観察することを含む標準的な研究によって、確かめることができる。初回ワクチン接種後、被験者は適切に間隔をあけて、1回または数回の追加免疫を受けるであろう。

20

【0057】

本発明の態様はまた、診断用アッセイにおいても用いることができる。例えば、本発明のペプチドまたはミモトープは、患者の血清中のL3, 7, 9 LOSに対する抗体を検出するために用いることができる。同様に、本発明のモノクローナル抗体は患者から得たサンプル中のL3, 7, 9免疫型髄膜炎菌の存在を検出するために用いることができる。

【0058】

ワクチン調製物については「ワクチンの新潮流と開発 (New Trends and Developments in Vaccines)」Vollerら編, University Park Press, Baltimore, Maryland, U.S.A. 1978中に総説として記述されている。タンパク質の巨大分子へのコンジュゲーションは、Likhite, 米国特許第4,372,945号およびArmorら、米国特許第4,474,757号によって開示されている。

30

【0059】

本発明の別個の態様は、ナイセリア・メニンギチジス (N. meningitidis) の表面のL3, 7, 9 LOSのミモトープおよびナイセリア・メニンギチジス (N. meningitidis) の表面のL2 LOSのミモトープを含む、血清型B、C、Y、またはW-135の髄膜炎菌に対するワクチンである。このワクチンは、場合により、C、Y、およびW-135からなる群から選択される、1種以上の、髄膜炎菌莢膜多糖そのものまたはコンジュゲート化髄膜炎菌莢膜多糖を、さらに含むことが有利である。

40

【0060】

さらに別の態様は、ナイセリア・メニンギチジス (N. meningitidis) の表面のL3, 7, 9 LOSのミモトープおよびナイセリア・メニンギチジス (N. meningitidis) の表面のL10 LOSのミモトープを含む、血清型Aの髄膜炎菌に対するワクチンである。このワクチンは、場合により、ナイセリア・メニンギチジス (N. meningitidis) の血清型Aの莢膜多糖そのものまたはそのコンジュゲート化形態をも含むことが有利である。

【0061】

さらなる態様は、ナイセリア・メニンギチジス (N. meningitidis) の表

50

面のL3, 7, 9 LOSのミモトープ、ナイセリア・メニンギチジス(N. meningitidis)の表面のL10 LOSのミモトープ、およびナイセリア・メニンギチジス(N. meningitidis)の表面のL2 LOSのミモトープを含む、血清型A、B、C、Y、またはW-135の髄膜炎菌に対するワクチンである。このワクチンは、A、C、Y、およびW-135からなる群から選択される、1種以上の、髄膜炎菌莢膜多糖そのものまたはコンジュゲート化髄膜炎菌莢膜多糖を、さらに含むことが有利である。

【0062】

本発明者らは、上記製剤が、上述の髄膜炎菌血清群内に包含される変異株の大多数に対する哺乳類宿主の免疫保護において非常に有効であることを見出した。好ましくは、本発明のミモトープを用いて宿主を免疫することにより、LOSと特異的に交叉反応する抗体、好ましくはLOSを含んでいる細菌の細胞全体と交叉反応する抗体を産生させることができる。

10

【0063】

各ミモトープはペプチド性または非ペプチド性のものであってよい。非ペプチド性のミモトープは、分子量の点ではペプチド性の対応物と同程度のサイズを有するものを意図している。好ましくは、そのようなミモトープは、それぞれの髄膜炎菌の表面LOSに対して高い特異性および/またはアフィニティーを有するモノクローナル抗体との抗原としての交叉反応性を有する。好ましくは、上述のワクチンの組み合わせに含まれる一方または両方のミモトープは、ペプチドエピトープを含んでなる。

20

【0064】

ペプチドエピトープは、髄膜炎菌のそれぞれの表面LOSに特異的な(および/または高いアフィニティーを有する)モノクローナル抗体を用いてペプチドライブラリーをスクリーニングすることによって得ることができる。本発明においては、「高いアフィニティー」とは、通常は少なくとも $10^5 M^{-1}$ 、好ましくは少なくとも $10^6 M^{-1}$ のアフィニティー定数を示すことを意味している。

【0065】

LOSに対して高い特異性および/またはアフィニティーを有するモノクローナル抗体は、免疫原として外膜複合体を用い、確立されているプロトコールに従って(例えば、Zollingerら、1983. I & I 40: 257-264; Abdillahiら、1988. Microbial Pathogenesis 4: 27-32)抗原を検出することにより、製造することができる。

30

【0066】

本発明のミモトープは、好ましくは、モノクローナル抗体を用いてペプチドライブラリーをスクリーニングすることによって同定することのできるペプチドエピトープを含んでなる。典型的には、ヘptaペプチドまたはノナペプチド(上記参照)ライブラリーなどのペプチドライブラリーであって好ましくは可能性のあるアミノ酸配列を全て含むライブラリーを用いることにより、該モノクローナル抗体との抗原としての交叉反応性が評価される潜在的エピトープについて、最大の多様性をもたらすようにすべきである。典型的には、このような性質を有するランダムペプチドライブラリーが用いられる。

40

【0067】

好ましくは本発明のミモトープは、選択手段として用いる以下のモノクローナル抗体との交叉反応性を利用して得られるものである: L3, 7, 9 LOSミモトープに対してはH44/24、H44/58、H44/70、H44/78、4BE12C10、4A8-B2、または9-2-L397; L2 LOSミモトープに対してはF1-5H5/ID9; そしてL10 LOSミモトープに対しては5B4-F9-B10。

【0068】

H44/24、H44/58、H44/70、H44/78、および4BE12C10抗体については上述のとおりである。4A8-B2、9-2-L397、F1-5H5/ID9、および5B4-F9-B10モノクローナル抗体は、国立生物学的製剤研究所(

50

National Institute of Biological Standards and Control), Blanche Lane, South Mimms, Pottery Bar, Herts, EN6 3QG, UKから入手することができ、また、E C A C Cからも入手することができる。

【0069】

上述の製剤のペプチドミモトープは、上述のとおりコンフォメーションが拘束されたものでもよい。それぞれの製剤についての各ミモトープは単一の分子内に含有されていてもよい。それらのミモトープは上述したような同一または異なるキャリアー分子と連結させることができる。例えば、それらのミモトープを、髄膜炎菌の同一の外膜タンパク質の、同一のまたは異なる露出ループ領域内に挿入するか、またはそれと置換することができる(上述)。

【0070】

本発明の製剤に用いられるL3, 7, 9ミモトープは、好ましくは上述の本発明のミモトープおよびペプチドである。あるいは、L3, 7, 9LOSのミモトープは、WO 00/25814に開示されているペプチド、好ましくは以下: IHRQGIH、HIGQRHI、LPARTEG、GETRAPL、APARQLP、PLQRAPA、KQAPVHH、HHVPAQK、LQAPVHH、HHVPAQL、LPSIQLP、PLQISPL、NELPHKL、LKHPLN、KSPSMTL、LTMSPSK、AGPLMLL、LLMLPGA、WSPILLD、DLLIPSW、LSMHPQN、NQPHMSL、HSMHPQN、NQPHMSH、SMYGSYN、NYSGYMS、TNHSLYH、HYLSHNT、HAIYPRH、HRPYIAH、TTYSRFP、PFRSYTT、TDSLRL、LLRLSDT、SFATNIPおよびPINTAFS、から選択されるペプチドを含んでなるものであってよい。

【0071】

本発明の好ましい実施形態は、ナイセリア・メニンギチジス(N. meningitidis)の表面のL3, 7, 9LOSのミモトープ、ナイセリア・メニンギチジス(N. meningitidis)の表面のL10LOSのミモトープ、およびナイセリア・メニンギチジス(N. meningitidis)の表面のL2LOSのミモトープを含み、場合により、A、C、Y、およびW-135からなる群から選択される1種以上の髄膜炎菌莢膜多糖そのものまたはコンジュゲート化髄膜炎菌莢膜多糖をさらに含む、髄膜炎菌疾患の治療または予防に特に有益な汎用性のあるワクチンである。

【0072】

本発明のさらに好ましい実施形態は、上述したワクチンの組み合わせ(好ましくはL3, 7, 9、L2およびL10ペプチドミモトープを含み、場合により1種以上の髄膜炎菌莢膜多糖をさらに含むもの)、および1種以上の肺炎球菌莢膜多糖そのものまたはコンジュゲート化肺炎球菌莢膜多糖を含む、髄膜炎の治療または予防に特に有益な汎用性のあるワクチンである。肺炎球菌莢膜多糖抗原は、好ましくは、血清型1、2、3、4、5、6B、7F、8、9N、9V、10A、11A、12F、14、15B、17F、18C、19A、19F、20、22F、23F、および33Fから(最も好ましくは血清型1、3、4、5、6B、7F、9V、14、18C、19F、および23Fから)選択されるものである。

【0073】

本発明におけるまた別の好ましい組み合わせは、L3, 7, 9、L2、およびL10からなるリストからの1種または2種以上(2または3種)のペプチドミモトープと、他のものと結合させたインフルエンザ菌(H. influenzae)b型の莢膜多糖とを含む、髄膜炎の治療または予防に特に有益な汎用性のあるワクチンである。

【0074】

上述のワクチンの組み合わせは医薬としての使用に適しており、髄膜炎菌疾患の治療または予防のための医薬品の製造に用いることができる。上述のワクチンの組み合わせを患者に投与することを含む、髄膜炎菌疾患に罹患しているかまたは罹患しやすい患者を治療す

10

20

30

40

50

る方法は、本発明のさらなる態様である。

【0075】

実施例

下記の実施例は標準的な技法を用いて行われたものであり、そのような技法は、特に詳細に説明しない限りは、当業者にはよく知られた日常的に行われているものである。これらの実施例は例示的なものであり、本発明を限定するものではない。

【0076】

実施例1：ナイセリア・メニンギチジス(N. meningitidis)のL3, 7, 9 LOSに対するモノクローナル抗体

1.1 モノクローナル抗体の単離と機能的特徴付け

免疫

ナイセリア・メニンギチジス(N. meningitidis) Bの細胞(H44/76単離体、B:15:P1.7、16、LOS 3, 7, 9、由来の熱不活化細胞)を、BALB/Cマウスに0日目、21日目、および42日目の3回注射した(5匹/群)。水中油型/3D-MPL/QS21アジュバント(WO 95/17210に記載のとおり)中に製剤化した細胞を皮下経路および腹腔内経路の両方で注射した。第3回目の注射の7日後に、全細胞ELISAで動物の抗体応答を評価した。

【0077】

特異的ハイブリドーマ細胞系を得るための融合法

融合の10日前および7日前に、Sp2/0 Ag 14ミエローマ細胞を解凍してそれをフラスコ中で培養し、培養物1mlあたり 10^5 細胞に達して融合を行う日(0日目)までそれが維持されるようにした。融合の1日前に骨髓腫細胞の濃度を 10^5 細胞/mlに調整した。同時に、腹腔マクロファージを使用するフィーダー細胞のプレートを用意した(10^5 マクロファージ/ml; 100 μ L/ウェル)。

【0078】

0日目に、選択したマウスの脾臓を(滅菌条件下で)摘出し、ペトリ皿中の10~20mLのDMEM培地中に分散させた。細胞を計数し(Sysmexカウンター、および赤血球を溶解させるための2滴の「Quicklyser」を用いて)、150~200gで10分間遠心分離した(1000rpm、Beckman GPR遠心機使用)。Sp2/0および脾臓細胞を洗浄、計数し、150~200gで10分間遠心分離した後、1:5(Sp2/0:脾臓細胞)の比で混合した。この1:5という混合比は25mLのDMEM中で達成され、それを400gで5分間遠心分離した(GPR遠心機、50mLのFalconチューブを用いて1500rpmで行った)。上清を棄て、チューブを軽くはじいてペレットを懸濁させた。細胞を水浴中にてできる限り37 $^{\circ}$ Cで維持した。37 $^{\circ}$ Cに維持した1mLのPEG溶液(5% DMSO, 40% v/vとしたPEG4000, pH 8.0~8.2)を、そのチューブを軽く揺らしながら1分間以内で少量ずつ(滴下して)添加した。細胞の温度はできる限り37 $^{\circ}$ Cに近くしなければならなかった。このPEGステップ以後は、細胞を穏和な操作で取り扱った。30秒~1分後に、1mLのDMEMを1分間以内で添加し、次いで2mLのDMEMを2分間以内で添加し、次いで4mLのDMEMを4分間以内で添加した。最後にそのチューブにDMEM+添加剤を満たして液量を約20mLとし、400gで10分間遠心分離した。

【0079】

その後、凝集物をほぐすために、25mLピペットを用いてペレットを15~25mLの完全培地(DMEM、FCS+HS(Volker)、HAT、およびNutridom)中に穏和に懸濁した。

【0080】

そのチューブを、CO₂インキュベーター中で37 $^{\circ}$ Cで2時間にわたりインキュベートした。次いで、細胞を適切な濃度(2.5×10^4 から 10^5 細胞/ウェル)まで希釈し、細胞100 μ Lをあらかじめフィーダー細胞を播種しておいた96ウェルのマイクロプレートにプレーティングした。

10

20

30

40

50

【0081】

1.2 全細胞ELISAによる細胞表面エピトープの認識

動物血清中、ならびに脾臓細胞を融合させた後のハイブリドーマ培養物の上清中の、特異的な抗ナイセリア・メニンギチジス (*N. meningitidis*) 抗体を検出するために、被覆される細菌としてH44/76 MenB類似株 (B:15:P1.7, 16) を用いた。簡潔に述べれば、6時間にわたる培養物から得たH44/76菌液 (含有される細菌は400 µg/mLのテトラサイクリンで殺滅した) の1/10希釈物 (PBS中) を100 µL用いて、マイクロタイタープレート (Maxisorp, Nunc) を被覆した。プレートを37 °Cで少なくとも16時間、プレートが完全に乾燥するまでインキュベートした。次いで、プレートを300 µLの150 mM NaCl - 0.05 % Tween 20で3回洗浄した。その後、プレートをさらに100 µLのPBS - 0.3 % カゼインにより上から被覆し、振盪しつつ室温で30分間インキュベートした。プレートを抗体とのインキュベーション前に行った方法と同じ方法を用いて再度洗浄した。動物血清をPBS - 0.3 % カゼイン、0.05 % Tween 20中へ2倍に連続希釈し、マイクロプレート中に入れた後、振盪しつつ室温で30分間インキュベートし、その後再度同じ洗浄ステップを実施した。モノクローナル抗体のスクリーニング用には、上清をそのまま (希釈せずに) マイクロプレート中に入れた。細胞表面の複数の抗原に対して特異的な抗体を検出するために、ビオチンとコンジュゲートさせた抗マウス免疫グロブリン (ウサギ Ig, Dakopatts E0413) をPBS - 0.3 % カゼイン - 0.05 % Tween 20中に1/2000に希釈して用いた。最後の洗浄ステップ (前述) の後、プレートを同じ溶液中に1/4000に希釈したストレプトアビジン - ペルオキシダーゼ複合体溶液を加えて、振盪しつつ室温で30分間インキュベートした。モノクローナル抗体を特徴付けるために、上述と同じ方法を用いて被覆される細菌として他の数種のナイセリア・メニンギチジス (*N. meningitidis*) B株も用いたが、それらは次のとおりである: 英国でヒトから単離されたM97250 687 (B:4:P1.15) 株およびM97252078株。莢膜多糖を欠いており変異型のLOSを有している形質転換H44/76D細胞も、これらのモノクローナル抗体を特徴付けるための全細胞ELISAに用いられる (次の節を参照せよ)。これらの抗体の全細胞ELISAでの反応性は、シグナル検出なし (-) から強い反応性 (+++) まで様々であった。

【0082】

1.3 株の形質転換

プラスミドpMF121 (Froschら, 1990) を、莢膜多糖を欠くナイセリア・メニンギチジス (*N. meningitidis*) 血清型B株を構築するために用いた。このプラスミドは、B型多糖 (BPS) 生合成経路をコードする遺伝子クラスターの末端に対応する組換え領域に隣接したエリスロマイシン耐性遺伝子を含んでいる。BPSを欠失させるとB型の莢膜多糖の発現の喪失ならびにgalEの活性コピーの欠失がもたらされ、それはガラクトース欠損リポオリゴ糖 (LOS) の合成をもたらす。

【0083】

ナイセリア・メニンギチジス (*N. meningitidis*) 血清型B株のH44/76 (B:15:P1.7, 16; LOS 3, 7, 9) を形質転換に用いた。Muller-Hinton (MH) プレート (エリスロマイシン不含) 上で一晩にわたるCO₂ インキュベーションを行った後、10 mM MgCl₂ を含有するMH液中に細胞を集め (一枚のMHプレートあたり2 mLを用いた)、OD (550 nm) が0.1となるまで希釈した。この液の2 mLに対して4 µLのプラスミドpMF121ストック溶液 (0.5 µg/mL) を添加し、37 °Cで (振盪しつつ) 6時間インキュベートした。対照群では、同量のナイセリア・メニンギチジス (*N. meningitidis*) 菌を用いて、プラスミドは添加せずに行った。インキュベーション後、エリスロマイシンを5、10、20、40、または80 µg/mL含有するMHプレート中に、培養物の原液、1/10希釈物、1/100希釈物、および1/1000希釈物を100 µL入れて、その後

37 で48時間インキュベートした。

【0084】

コロニープロットティング：

プレートをインキュベーションした後、形質転換体を選択し、エリスロマイシン/MHプレート(10~80 μ gエリスロマイシン/mL)上で増殖させた。翌日、目視し得るコロニーを全て、エリスロマイシン不含の新たなMHプレート上にて増殖させた。次いで、それらのコロニーをニトロセルロースシート上に転写し(コロニープロットティング)、B型多糖の存在をプローブ検出した。簡潔に述べれば、コロニーをニトロセルロースシート上にプロットし、PBS-0.05% Tween 20中で直接すすいだ後、細胞をPBS-0.05% Tween 20(希釈バッファー)中で56で1時間かけて細胞を不活化した。その後、ニトロセルロース膜に希釈バッファーを重層して室温(RT)で1時間置いた。次いで、膜を再度希釈バッファー中で5分間 \times 3回洗った後、希釈バッファー中に1/3000に希釈した抗BPS 735 Mab(Dr. FroschからBoehringerを通じて入手)と共に室温で2時間インキュベートした。新たな洗浄ステップ(3回、5分間)の後、モノクローナル抗体は、希釈バッファー中に500倍に希釈したビオチン化抗マウスIg(Amershamから入手)(RPN 1001)を用いて検出し、続いて次の洗浄ステップ(上述のステップと同じ)にかけた。その後、ニトロセルロースシートを、希釈バッファー中に1/1000に希釈したストレプトアビジン-ペルオキシダーゼ複合体の溶液と共に室温で1時間インキュベートした。最後の3回の洗浄を上述と同じ方法を用いて行った後、ニトロセルロースシートを顕色溶液(Merckから入手した、10mlエタノール+40mL PBS中に30mgの4-クロロ-1-ナフトールを含有する溶液、および30 μ LのH₂O₂ 37%)を用いて暗所で15分間インキュベートした。この反応は蒸留水での洗浄ステップで停止させた。抗BPS Mabとの反応性を示さないクローンをさらに全細胞ELISAで特徴付けした。

【0085】

全細胞ELISA：

全細胞ELISAは、被覆される細菌(20 μ g/mL)としての形質転換コロニーおよび野生型株(H44/76)、およびナイセリア・メニンギチジス(N. meningitidis)株を特徴付けるために用いる種々のモノクローナル抗体のセットを使用した。次のモノクローナル抗体を試験した。抗BPS(Dr. Froschからの735)、および国立生物学的製剤研究所(National Institute for Biological Standards and Control, London)から入手したその他のモノクローナル抗体：抗BPS(Ref 95/750)、抗P1.7(A-PorA, Ref 4025)、抗P1.16(A-PorA, Ref 95/720)、抗LOS 3, 7, 9(A-LPS, Ref 4047)、抗LOS 8(A-LPS, Ref 4048)、および抗P1.2(A-PorA, Ref 95/696)。

【0086】

マイクロタイタープレート(Maxisorp, Nunc)を、PBS中で約20 μ g/mLの濃度の組換え髄膜炎菌B株細胞溶液を約20 μ g/mLで含むPBSを100 μ L用いて、37で一晩かけて被覆した。その後、プレートを300 μ Lの150mM NaCl-0.05% Tween 20で3回洗浄し、100 μ LのPBS-0.3% カゼインを重層し、振盪しつつ室温で30分間インキュベートした。プレートを前述と同じ方法で再度洗った後、抗体と共にインキュベートした。モノクローナル抗体(100 μ L)をPBS-0.3% カゼイン-0.05% Tween 20中に種々の希釈度で希釈したものをマイクロプレートに入れた後、振盪しつつ室温で30分間インキュベーションし、次いで前述と同じ洗浄ステップを行った。ビオチンをコンジュゲートさせてPBS-0.3% カゼイン-0.05% Tween 20中に1/2000希釈した抗マウスIg(ウサギ由来、Dakopatts E0413)の100 μ Lをウェルに添加し、結合したモノクローナル抗体を検出した。洗浄ステップ(前述のとおり)の後、同じ使用

溶液中に1/4000に希釈したストレプトアビジン-ペルオキシダーゼ複合体溶液(100 μ LのAmersham RPN 1051)をプレートに加えて、振盪しつつ室温で30分間インキュベートした。このインキュベーションおよび最後の洗浄ステップの後、100 μ Lの発色溶液(4mgのオルトフェニレンジアミン(OPD)を含有する5 μ LのH₂O₂を10mlの0.1Mクエン酸バッファー(pH4.5)に添加したものを)をプレートに加えて、暗所で15分間インキュベートした。次いで、プレートを分光光度計を用いて490/620nmで読み取った。

【0087】

通常、形質転換体の約10%が二重乗り換えによって得られる。BPSおよびLOSに対する反応性を欠いているがP1.7とP1.16モノクローナル抗体に対しては依然として反応性を有する細菌クローンH44/76Dを、さらに研究するために選択した。

10

【0088】

1.4 殺菌アッセイ

これらのモノクローナル抗体の殺菌活性を測定した。簡潔に述べれば、ナイセリア・メニンギチジス(*N. meningitidis*)血清型B(第1の株としてH44/76株)を用いて抗体(動物もしくはヒトの血清、またはモノクローナル抗体)の殺菌活性を測定する。U底の96ウェルマイクロプレート(NUNC)中で、50 μ L/ウェルの2倍連続希釈血清を、 2.5×10^4 CFU/mLに調整した対数増殖期の髄膜炎菌懸濁液37.5 μ L/ウェルと共に、210rpmで振盪しつつ37 $^{\circ}$ Cで15分間インキュベートした(Oribital shaker, Forma Scientific)。次いで、12.5 μ Lの新生児ウサギ補体(Pel-freeze Biologicals, US)を添加した後、同一条件でさらに1時間インキュベートした。その後、各ウェルからのその混合液の10 μ Lのアリコートをし、1%のIsovitalexと1%の熱不活化ウマ血清とを含有するMueller-Hinton寒天プレート上にスポットし、5%CO₂下で37 $^{\circ}$ Cで一晩インキュベートした。翌日、試験した各希釈率についてコロニー数を数え、血清不含の補体対照と比較して50%殺滅する血清の希釈率として殺菌力価を決定する。この方法では、個々のコロニーを1スポットあたり100CFUまで計数することができる。力価は50%の殺滅をもたらす希釈率として表され、回帰分析によって計算される。

20

【0089】

1.5 結果

表1はナイセリア・メニンギチジス(*N. meningitidis*)のH44/76株で免疫したマウスから得られた脾臓細胞を用いた2つの融合実験で4種類の抗LOSモノクローナル抗体を用いて得た結果を示している。4種のモノクローナル抗体のLOS特異性は、これらの抗体が全細胞ELISAにおいてH44/76D(BPS、LOS変異型)と反応しないが野生型のH44/76株とは容易に反応することによって確かめられる。BPSには免疫原性がないことを考慮すると、これらのモノクローナル抗体が荚膜多糖と反応するとは全く考えられない。4種のモノクローナル抗体は全て野生型のH44/76株に対して殺菌活性を示した。モノクローナル抗体H44/24とH44/58は全細胞ELISAによりナイセリア・メニンギチジス(*N. meningitidis*)のM97240687株およびM94252078株と交叉反応することが示された。

40

【0090】

【表1】

表 1

抗体	アイソタイプ	H44/76 株に 対する殺菌活性 (力価)	全細胞 ELISA によるナイセリア・メニンギチジス株の認識			
			H44/76 (野生型)	H44/76D (突然変異体)	M97250687	M97252078
H44/24	IgG3	>2560	+++	-	+++	+++
H44/58	IgG1	973	+++	-	+++	++
H44/70	IgM	1884	+++	-	NT	NT
H44/78	IgM	>2560	+++	-	NT	NT

NT = 試験せず

【 0 0 9 1 】

1.6 4 種類を選択したモノクローナル抗体の構造的特徴付け

モノクローナル抗体の一次構造を、重鎖と軽鎖の可変領域をコードしている cDNA の配列決定によって決定した。これを行うためにこれら 4 種のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマから総 RNA を抽出した。配列決定は、重鎖または軽鎖に特異的なプライマーを用いた PCR を行った後に得られる RT-PCR 産物について行った。

【 0 0 9 2 】

ハイブリドーマからの RNA の抽出

細胞数をトーマ血球計算盤で計数して決定された 10^6 個の細胞から抽出を行う。細胞を 1200 RPM で 10 分間遠心分離し上清を除去する。細胞を 1200 RPM で再度遠心分離し、微量の上清を全て除去する。細胞を 200 μ L の RNase 不含の PBS 中に再懸濁する。RNA の抽出は「High Pure RNA Isolation Kit」(Roche Diagnostics) を用いて製造業者の使用説明書に従って行う。溶出は 100 μ L の溶出バッファーで行う。

【 0 0 9 3 】

逆転写

10 μ L の精製 RNA を 1.25 μ g の dT15 プライマーと混合し最終液量を 20 μ L とした。その RNA-プライマー混合物を 70 で 10 分間加熱し、次いで 4 に冷却した。逆転写は下記のプロトコールで行った：

0.2 mL チューブに次のものを添加した：

- ・ 上述のアニールしたプライマー-RNA 混合物 10 μ L
- ・ 0.1 M DTT 5 μ L
- ・ dNTPs (各 10 mM) 2.5 μ L
- ・ RNase インヒビター (10 u/ μ L, Gibco BRL) 0.5 μ L
- ・ M-MLV 逆転写酵素 (200 U/ μ L, Gibco BRL) 2.5 μ L
- ・ RT バッファー (5x) 10 μ L
- ・ H₂O 総量 50 μ L となるまで添加。

【 0 0 9 4 】

この溶液を 37 で 1 時間インキュベートし、95 で 5 分間かけて酵素を不活化し氷上で冷却した。M-MLV 逆転写酵素を含まないこと以外は同じ成分を含んでいるチューブを陰性対照として用いた。

【 0 0 9 5 】

cDNA に対する PCR

軽鎖および重鎖 cDNA の PCR 増幅のために用いたプライマーは、Kangra (Kangra, 1991, Methods. A companion to Methods in Enzymology, 2(2): 111-118) の報告に従って以下のとおりデザインした。

10

20

30

40

50

【 0 0 9 6 】

軽鎖	3'プライマー	L-Kappa3'	5' GCGCCGTCTAGAATTAACACTCATTCTGTGAA 3'
	5'プライマー	Lvar 5'-1	5' CCAGTCCGAGCTCGTTGTGACTCAGGAATCT 3'
		Lvar 5'-2	5' CCAGTCCGAGCTCGTGTGACGCAGCCGCC 3'
		Lvar 5'-3	5' CCAGTCCGAGCTCGTCTCACCAGTCTCCA 3'
		Lvar 5'-4&7	5' CCAGTCCGAGCTC(G/C)(A/T)GATGAC(A/C)CAGTCTCCA 3'
		Lvar 5'-5&6	5' CCAGATGTGAGCTCGT(G/C)ATGACCCAG(A/T)CTCCA 3'
重鎖	5'プライマー	Hvar 5' 1-8	5' AGGTCCA(A/G)CT(G/T)CTCGAGTC(A/T)GG 3'
		Hvar 5' 9	5' AGGTIIAICTICTCGAGTC(A/T)GG 3'
	3'プライマー	HCy 3' 3'	5' GGGGGTACTAGTCTTGGGTATTCTAGGCTC 3'
		HCp 3'	5' ATTGGGACTAGTTTCTGCGACAGCTGGAAT 3'

10

【 0 0 9 7 】

PCRは次のとおり行った：

0.2 mLの反応チューブ中に次のものを混合した：

- ・ 鋳型 (RT-PCR産物または陰性対照) 5 μ L
- ・ 反応バッファー (10 \times) 5 μ L
- ・ dNTPs (各10 mM) 1 μ L
- ・ 各プライマー (20 μ Mストック) 1.5 μ L
- ・ REDTaq ポリメラーゼ (1 U/ μ L, Sigma) 2.5 μ L
- ・ H₂O 総量50 μ Lとなるまで添加。

20

【 0 0 9 8 】

PCR反応は次の温度サイクルで行った：

94 で4分間

94 で30秒間、52 で30秒間、72 で1分間のサイクルを35回

72 で4分間

4。

【 0 0 9 9 】

これらの反応はRT反応 (M-MLV逆転写酵素は含まず) からの陰性対照についても行って、PCR産物がcDNAから得たものであってゲノムDNAからのものではないことを確認した。陰性対照からはPCR産物は全く得られなかった。得られたPCR産物を「High Pure PCR Product Purification Kit」(Roche Diagnostics)を用いて製造業者の使用説明書に従って精製した。

30

【 0 1 0 0 】

精製PCR産物の配列決定

配列決定をPCR産物について行ったため、配列のエラーが生じていないことを確認するために、配列決定すべき各cDNAから独立に2回行ったPCRで得た産物について配列決定した。

【 0 1 0 1 】

シーケンシング反応は、1 μ Lの精製PCR産物について、「ABI PRISM (登録商標) BigDyeTM Terminator Cycle Sequencing Kit」を製造者 (Perkin-Elmer) の使用説明書に従って使用して行い、さらにABI PRISM 377シーケンサーで分析した。4種のモノクローナル抗体の軽鎖および重鎖の配列は配列番号281~288に示している。

40

【 0 1 0 2 】

実施例2：ファージディスプレイペプチドライブラリーからのナイセリア・メニンギチジス (N. meningitidis) LOSのペプチドミモトープの単離

上述のナイセリア・メニンギチジス (N. meningitidis) LOSに対する抗体のような細菌性多糖のエピトープに対するモノクローナル抗体は、分子の大規模なレパートリーをスクリーニングするために用いることができる。そのような分子ライブラリーは化学的に様々なものであってよく、例えばペプチド、ペプチド、またはヌクレオチ

50

ドのライブラリーであってよい。ペプチドライブラリーは、合成によって（可溶性のペプチドとしてまたは支持体に結合したペプチドとして）、または生物学的に（例えば細胞質のタンパク質もしくは表面タンパク質との融合体として）得ることができる。最もよく使われている系の1つは、P I I IおよびP V I I Iタンパク質などの線状バクテリオファージのコートタンパク質と融合させたペプチドのディスプレイである。これらのライブラリーは、それら2種のタンパク質のうちの1つをコードするO R Fの5'領域に、縮重配列を含むオリゴヌクレオチドを挿入することによって得られる。線状ファージが構造タンパク質に囲まれたファージ環状一本鎖DNAからなるために、ファージの表面でP I I IまたはP V I I Iタンパク質と融合して発現されるペプチドは、それらのペプチドをコードするDNAと物理的に連結されている。この研究では、2種類のファージディスプレイされたペプチドライブラリーを、5種のモノクローナル抗体を用いたペプチドの選択のために用いた。これらの2つのライブラリーは既に報告されているノナマー直鎖状ペプチドライブラリーおよびノナマージスルフィド拘束ペプチドライブラリーである（F e l i c i ら、1993, Gene 128: 21-27; L u z z a g o ら、1993, Gene 128: 51-57）。これらのライブラリーはファージミド中に構築され、縮重オリゴヌクレオチドは主要莢膜タンパク質であるp V I I Iをコードする遺伝子に融合される。大腸菌での形質転換とファージヘルパーでの重感染の後、得られるファージ粒子は組換えp V I I Iと非組換えp V I I Iタンパク質の両方が含まれ、その組換えp V I I Iタンパク質の割合は正確には規定されない。ペプチドの選択に用いる5種のモノクローナル抗体は、上述の4種と、I a n F e a v e r s から入手したモノクローナル抗体4 B E 1 2 C 1 0 (N a t i o n a l I n s t i t u t e o f B i o l o g i c a l S t a n d a r d s a n d C o n t r o l , L o n d o n) である。

10

20

30

40

50

【0103】

4 B E 1 2 C 1 0 はまた、他の4つのライブラリーの混合物からのペプチドの選択にも用いた。これらのライブラリーは、f 8 8 - 4 線状ファージのp V I I Iタンパク質に融合させた14~16個のアミノ酸の長さのペプチドを発現する。このベクターはG e o r g e s S m i t h (D i v i s i o n o f B i o l o g i c a l S c i e n c e s , U n i v e r s i t y o f M i s s o u r i - C o l u m b i a) から入手したものであり、2個の遺伝子V I I I、すなわち野生型遺伝子と、t a c プロモーターの制御下にありf d - t e t ファージ由来の合成組換え遺伝子とを有する（S m i t h , V i r o l o g y , 1 6 7 , 1 5 6 - 1 6 5 , 1 9 8 8）。大腸菌に感染させた後、得られたファージ粒子は野生型および組換えp V I I Iタンパク質の両方を含んでおり、その組換えp V I I Iタンパク質はp V I I Iタンパク質全体の10%未満である。これらの4つのライブラリーは、3、4、5、または6個の残基で隔てられた2個の内部システインを有するペプチドを発現するものであり、それらライブラリーはそれぞれC y s 3、C y s 4、C y s 5、およびC y s 6と呼ばれる。

【0104】

2.1 パニング方法

3サイクルのパニングを行った。モノクローナル抗体H 4 4 / 2 4 とH 4 4 / 5 8 に対しては、ファージ-抗体複合体の固定に次の2つの方法を用いた。すなわち、プロテインAを被覆したイムノプレート上での捕捉（以下P A法と呼ぶ）、またはプロテインAを被覆した磁性ビーズ上での捕捉（以下D Y法と呼ぶ）である。モノクローナル抗体H 4 4 / 7 0、H 4 4 / 7 8、および4 B E 1 2 C 1 0 については、ファージ-抗体複合体をプロテインL Aを被覆したイムノプレート上での捕捉によって回収した。

【0105】

2.1.1 プロテインAを被覆したイムノプレート（P A）法（H 4 4 / 2 4 およびH 4 4 / 5 8 について）

第1サイクルとしては、M a x i s o r p イムノプレート（N u n c , R o s k i l d e , D e n m a r k）を、0.1M 炭酸ナトリウム中に10μg/mLの濃度で含まれるプロテインA（S i g m a , S t . L o u i s , U S A）を用いて4 で一晩かけ

て被覆した（用いるモノクローナル抗体のそれぞれについて100 μ LのプロテインA溶液を入れた4個のウェルを用いた）。同時に、ライブラリー混合物のサンプル（2つのライブラリーの各々につき 5×10^{10} pfu）を10 μ gのモノクローナル抗体を液量を最小限として（典型的には40 μ L未満）加えて、4で一晚インキュベートした。翌日、1時間飽和させ（5mg/mL BSA、0.1 μ g/mLのプロテインAを含有する0.1M 炭酸ナトリウム溶液）、次いでTween 20 0.5%（v/v）を含有するTris緩衝生理食塩水（TBS、50mM Tris、150mM NaCl、pH 7.5）で4回洗浄した後、抗体-ファージ混合物に洗浄溶液を加えて400 μ Lとし、4等分にした100 μ Lのアリコートのそれぞれを、プロテインAを被覆したディッシュ上で室温で3時間インキュベートした。TBS-Tween 20 0.5%で10回洗浄した後、結合したファージをグリシンバッファー（pH 2.2）で室温で20分間溶出させた。溶出液を直ちに中和し、感染性ファージ粒子の増幅と力価測定に用いた。増幅と力価測定に用いた大腸菌（E. coli）株はDH11S（Gibco BRL）であった。その後のバイオパニングのサイクルでは、モノクローナル抗体の量を1 μ gまで減らしたことを除いては、同じプロトコルを用いた。

10

【0106】

2.1.2 プロテインAを被覆した磁性ビーズ（DY）法（H44/24およびH44/58について）

第1サイクルとしては、ライブラリー混合物のサンプル（2つのライブラリーの各々について 5×10^{10} pfu）を10 μ gのモノクローナル抗体を液量を最小限として（典型的には40 μ L未満）加えて、4で一晚インキュベートした。翌日、40 μ LのDynabeads プロテインA（Dyna1, Oslo, Norway）を、TBS-Tweenで2回洗浄し、1時間飽和させ（5mg/mL BSA、0.1 μ g/mLのプロテインAを含有する0.1M 炭酸ナトリウム溶液）、次いでTBS-Tweenでさらに2回洗浄した。抗体-ファージ混合物に洗浄溶液を加えて40 μ Lとし、飽和させたDynabeads プロテインAと混合し、室温で3時間インキュベートした。TBS-Tween 20 0.5%で10回洗った後、結合したファージをグリシンバッファー（pH 2.2）を用いて室温で20分間溶出させた。溶出液を実施例2.1.1のとおり処理した。その後のバイオパニングのサイクルでは、モノクローナル抗体の量を1 μ gまで減らしたことを除いては同じプロトコルを用いた。

20

30

【0107】

2.1.3 プロテインLAを被覆したイムノプレート法（H44/70、J44/78、および4BE12C10について）

この方法で用いるプロトコルは、プロテインAをプロテインLA（Clontech, Palo Alto, USA）と置き換えたこと、および精製していない濃縮ハイブリドーマ上清を用いたことを除いては、プロテインAを被覆したイムノプレート法と同じである。

【0108】

2.1.4 Cys3からCys6までのライブラリー混合物からの、モノクローナル抗体4BE12C10を用いた選択

40

プロトコルは下記の事項を除き、上述の2.1.1で述べたPA法と同様であった：

- ・1回目のパニングには各ライブラリーについて 3×10^{10} TUを用いた。

【0109】

・3回のパニングサイクルについてモノクローナル抗体4BE12C10を3種類の異なる量で用いた。すなわち第1サイクルでは10 μ g、第2サイクルでは1 μ g、および第3サイクルでは0.1 μ gであった。

【0110】

・1回目と3回目のパニングのラウンドにおいてはファージ-抗体複合体を捕捉するためにプロテインG（10 μ g/mL）を用い、2回目のパニングのラウンドにおいてはファージ-抗体複合体を捕捉するためにプロテインA（10 μ g/mL）を用いた。

50

【0111】

2.2 ファージの増幅

ノナマライブラリーからのファージ溶出物を大腸菌 (*E. coli*) (DH11S) への感染によって増幅させ、ヘルパーファージ M13K07 により重感染させた。溶出物のサンプル (1 回目のパニングラウンドの総量 475 μ L 中の 450 μ L、または 2 回目もしくは 3 回目のパニングラウンドの総量 475 μ L 中の 100 μ L) を、1 mL の *terrific broth* 細胞 (*terrific broth* 中で、10 倍希釈で OD_{600nm} が 0.125 から 0.25 の間となるまで増殖させた DH11S) と混合した。細菌は感染の直前と直後に緩徐に攪拌しつつ 37 で 15 分間保持した。次いで感染した細菌を、強く攪拌しつつ 37 で 30 分間増殖させ、100 μ g/mL のアンピシリンを添加した大きな LB プレート (LB Amp) 上に播いた。翌日、そのプレートを掻き取り、そのサンプルを 100 mL の LB Amp に加えて、 OD_{600nm} が 0.05 となるまで増殖させた。この培養物を OD_{600nm} が 0.2 から 0.25 の間となるまで増殖させ、攪拌を遅くして 10 分間行い、さらに M13K07 を添加して MOI (感染の多重度) が 20 となるようにヘルパーウイルスによる重感染を行った。この時点で IPTG を最終濃度が 1 mM となるように添加した。この培養物を攪拌せずに 37 で 15 分間インキュベートし、強く攪拌しつつ 37 で 5 時間増殖させた。清澄化した上清を PEG-NaCl で沈殿させることによりファージを回収し、それを大腸菌 (DH11S) に感染させて LB Amp プレート上に播くことによって力価測定を行った。

10

【0112】

Cys3/4/5/6 ライブラリーからのファージ溶出物を、大腸菌 (*E. coli*) (K91kan) に感染させることによって増幅させた。溶出物のサンプル (1 回目のパニングラウンドの総量 475 μ L 中の 450 μ L、または 2 回目もしくは 3 回目のパニングラウンドの総量 475 μ L 中の 100 μ L) を 1 mL の *terrific broth* 細胞 (*terrific broth* 中で、10 倍希釈で OD_{600nm} が 0.125 から 0.25 の間となるまで増殖させた K91kan) と混合した。細菌は感染の直前と直後に緩徐に攪拌しつつ 37 で 15 分間保持した。次いで感染した細菌を 0.2 μ g/mL のテトラサイクリンを添加した LB 培地中で強く攪拌しつつ 37 で 30 分間増殖させた。次いでテトラサイクリンを 20 μ g/mL まで添加し、強く攪拌しつつ 37 で一晩増殖させた。清澄化した上清を PEG-NaCl で沈殿させることによりファージを回収し、それを大腸菌 (*E. coli*) (K91kan) に感染させて LB Amp プレート上に播くことによって力価測定を行った。

20

30

【0113】

2.3 イムノプロットングによるスクリーニング

2.3.1 コロニーイムノプロットングによるスクリーニング

コロニーイムノプロットングによるスクリーニングを、3 回のパニングサイクル後に得られたファージを感染させた大腸菌 (*E. coli*) (DH11S) を用いて行った。7 種類のファージサンプルを用いた：モノクローナル抗体 H44/70、H44/78、および 4BE12C10 の各々を用いて選択したファージの 1 種類ずつのサンプル、ならびにモノクローナル抗体 H44/24 および H44/58 の各々を用いて選択した 2 種類ずつのサンプルを用いた。後者では 2 種類のサンプルはパニングに用いた 2 つの方法 (上記の PA 法および DY 法と呼ばれる方法) に対応したものである。

40

【0114】

アンピシリン (100 μ g/mL) および 1 mM IPTG を含有するペトリ皿を使用して、ファージに感染している大腸菌 (*E. coli*) を播いた。新鮮なコロニーをナイロン両性膜 (Porablott NY amp, Macherey-Nagel, Duren, Germany) に 37 で 2 時間かけてプロットした。その膜を 5% スキムミルクを含有する TBS で飽和し (37 で 2 時間)、対応するモノクローナル抗体と共にインキュベートした。モノクローナル抗体の組換え pVIIITanパク質への結合は、飽和溶液中に 1000 倍に希釈した GAM-HRP (Dako, Denmark) を用いて

50

示した。次いで二次抗体の存在をHRP発色試薬(Bio-Rad, Hercules, USA)を用いて検出した。

【0115】

2.3.2 培養上清のイムプロットティングによるスクリーニング

2種のノナマーライブラリーのモノクローナル抗体4BE12C10を用いたスクリーニングの場合には、コロニーイムプロットティング技法では、2回目または3回目のラウンドのパニングからは、陽性クローンは示されなかった。個々の陽性クローンをいくつか単離することを試みるために、新たな実験を準備したが、それは各パニングラウンドから48クローンを単離し、それらの単離されたクローンから96ウェルフォーマットで重複してファージを産生させて、それにより培養上清のイムプロット実験で陽性クローンの単離が迅速に行えるようにしたものである。培養と、M13K07ヘルパーファージを用いた重感染によるファージ産生とは、96ウェルフォーマットに合わせて培養体積を500μLに減らしたことを除いては、2.2節に記載したとおりに行った。培養上清100μLを96ウェルフォーマットのドットプロットティング装置(BioRad)中でニトロセルロース膜上に直接的にプロットし、コロニーイムプロットティング実験の膜と同様にして処理した。

10

【0116】

モノクローナル抗体の結合は化学発光検出法によって示した。すなわち、膜をLumiLight Plus基質(Roche Diagnostics)と共に室温で10分間、暗所でインキュベートし、オートラジオグラフィカセット中でその膜をオートラジオグラフィフィルムと30秒~2、3分間接触させることにより、発光を検出した。同様のプロット膜を抗ファージ血清と共にインキュベートして、ファージを含有しているウェルの全てにおいてファージ粒子が同程度の量で存在することを確認した。

20

【0117】

2.4 選択されたペプチドの配列の決定

選択されたペプチドの配列は2段階の方法を用いて決定した。第1ステップでは提示されたペプチドをコードする領域の上流にアニーリングするオリゴヌクレオチド(ノナマーライブラリーについては5'-ATTCTAGAGATTACGCC-3'、またはCys3/4/5/6ライブラリーについては5'-CCCCATCCCCCTGTTGACAAAT-3')および下流にアニーリングするオリゴヌクレオチド(ノナマーライブラリーについては5'-TGCTGCAAGGCGATTAAAGTT-3'、またはCys3/4/5/6ライブラリーについては5'-ATTAGGCGGGCTGGGTATCT-3')を用いて、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)により組換え遺伝子8を増幅した。PCRは、Tth熱安定性DNAポリメラーゼ(BIOTOOLS, Madrid, Spain)を用いて、増幅時に起こりうるエラーのリスクを確認するために重複して行った。PCR産物は、M13-40フォワードプライマー(5'-GTTTTTCCCAAGTCAACGAC-3')(ノナマーライブラリー由来のペプチド用)、または5'-CATCGGCTCGTATAATGT-3'(Cys3/4/5/6ライブラリー由来のペプチド用)を使用し、「ABI PRISM(登録商標) BigDyeTM Terminator Cycle Sequencing Kit」を製造業者(Perkin-Elmer)の使用説明書に従って用いてシーケンシング反応させて、その後、ABI PRISM 377シーケンサーで分析した。

30

40

【0118】

148種類の異なる配列が得られ、それらは次のとおり分類された。

- ・モノクローナル抗体H44/24、H44/58、H44/70、およびH44/78により選択された1種類のペプチド(No. 1の配列)
- ・モノクローナル抗体H44/24によってのみ(DY法またはPA法のいずれかで)選択された11種類のペプチド(No. 2~12の配列)
- ・モノクローナル抗体H44/58によってのみ(DY法またはPA法のいずれかで)選択された30種類のペプチド(No. 13~43の配列、但しNo. 17の配列を除く)

50

- ・モノクローナル抗体 H 4 4 / 5 8 (D Y 法または P A 法のいずれかにより) およびモノクローナル抗体 H 4 4 / 7 0 によって選択された 1 種類のペプチド (N o . 1 7 の配列)
- ・モノクローナル抗体 H 4 4 / 7 0 と H 4 4 / 7 8 によって選択された 3 種類のペプチド (N o . 4 4 ~ 4 6 の配列)
- ・モノクローナル抗体 H 4 4 / 7 0 によってのみ選択された 2 8 種類のペプチド (N o . 4 7 ~ 7 4 の配列)
- ・モノクローナル抗体 H 4 4 / 7 8 によってのみ選択された 2 1 種類のペプチド (N o . 7 5 ~ 9 5 の配列)
- ・モノクローナル抗体 4 B E 1 2 C 1 0 によってのみ選択された 5 3 種類のペプチド (N o . 9 6 ~ 1 4 8 の配列) 。 N o . 1 4 1 および 1 4 2 の配列はシステイン架橋されたノナマーライブラリー由来のファージから得たもの。 N o . 1 4 3 ~ 1 4 5 の配列は直鎖状ノナマーライブラリー由来のファージから得たもの。 N o . 1 4 6 ~ 1 4 8 の配列は C y s 6 、 C y s 5 、 および C y s 3 ライブラリーのそれぞれに由来するファージから得たもの。

10

【 0 1 1 9 】

これらの配列を下記の表 2 に示す。

【 0 1 2 0 】

【 表 2 】

表 2: 選択された148種のファージディスプレイペプチドの配列

No.	配列	配列番号	No.	配列	配列番号	No.	配列	配列番号
1	CNTKWYPYAC	141	48	ESPYSAHRW	48	95	WYVGSVRSQ	95
2	CFVPSPVYEC	142	49	WYDERTILK	49	96	CALDIAGGYIC	236
3	CRSSLPGDC	143	50	CSSYSYVHDS	190	97	CPPPSRGGYIC	237
4	FYRELAGDL	4	51	CRFTYDPPFMC	191	98	CQAFDTSWTAC	238
5	MRRTASEIM	5	52	CRLYSFVFDKC	192	99	FLPCRRCGS	99
6	MRPLTWQTT	6	53	SQWRSAAPT	53	100	RPWQTAHFA	100
7	RMRIIPBGT	7	54	CRPAFDPPYHC	194	101	GQYSSSPFP	101
8	MRDVMQHW	8	55	HGRTLWYTP	55	102	CGRPGPYPADC	242
9	HKPTDHPWS	9	56	CSSVSATYPIC	196	103	CTPLPDGGILC	243
10	CSETYGRPGLC	150	57	CSLVQSPKRFC	197	104	LKWGDGSSA	104
11	ERPIGGDSG	11	58	SNWYENTPT	58	105	CYPQLSHANPC	245
12	RMRDIPGAP	12	59	PRPGWQQA	59	106	CSAYHRLGAC	246
13	CISEYAKGTT	153	60	CTDPRGCGMFA	60	107	CFPLPSREFAC	247
14	CSHAPPYDRVC	154	61	PRPHFGAPP	61	108	YRQSRSSWP	108
15	CVTIPYRGTQC	155	62	CVTRATYPSWC	202	109	SHRFDALRR	109
16	CFAPPYDPLPC	156	63	WYIAPRCTL	63	110	CVRFPDGSWSC	250
17	CAPYSIFIGEC	157	64	CYGYGALRDT	204	111	CSPAAFSDRLC	251
18	CTHLYHYGTSC	158	65	CIITGSGWYVC	205	112	CYTDQWGGYLC	252
19	CLCQAYKGRRC	159	66	CTHYSFYGDIC	206	113	CVPSGKSPNIC	253
20	CDPRLDLIC	160	67	HWYSTEAAW	67	114	PKWSDKRPQ	114
21	KTALPPYDR	21	68	HRIAQSLPQ	68	115	CAPPGIAVRTC	255
22	CFARPFQGTWC	162	69	CALYRFAADSC	209	116	MKWGPNSHS	116
23	CSLSLPPYDRC	163	70	CRPQFDPPNDC	210	117	CLQDRAGGYLC	257
24	CDRTLALALC	164	71	CHPALARWPLC	211	118	CGRIEGRCSHA	118
25	CRAPPYDTIMC	165	72	QPKSLWYSV	72	119	CYFIAKHGWAC	259
26	CPPYDEGCRVA	26	73	CRGYSHVSDAC	213	120	CPPRSSRGFLC	260
27	CFGLIAFHPDC	167	74	CDPVRTIYPIC	214	121	CTGISTGEYLC	261
28	CQPIGTPYDRC	168	75	WYTIPTRPV	75	122	GPVFIATGL	122
29	CTANYFPGTYC	169	76	QRQSLWYSS	76	123	CLSQYADWYTC	263
30	CANSRPGGYLC	170	77	NPDYSSPIE	77	124	ARWYPIST	124
31	CMSYGRGVR	171	78	PPWYPEHKT	78	125	CQGFPGAPQDC	265
32	CVSTPFRGTFC	172	79	CASLGLAKTTC	219	126	WHERTFPAT	126
33	CDPRITPDFGC	173	80	WYVDGPIAT	80	127	TRRPFDPFA	127
34	CGPPYDPPFAC	174	81	RGWYADPSA	81	128	CASPLGPCFW	128
35	CHTVRFRGTLC	175	82	CLWRPIDPFLC	222	129	CWTDTYGDLLC	269
36	CTAPPYDAYGC	176	83	AERSLWYYP	83	130	CISAGPESSHC	270
37	CRSPLLAPVC	177	84	PPWYNQSEL	84	131	CHSVQPATRAC	271
38	CTTYGTGTWC	178	85	DSAPAVKSS	85	132	CPKAPFSPFKC	272
39	CSSLYHGTAC	179	86	PGWYDAHPT	86	133	CIDAGSHGWLC	273
40	CLYEPLRGTLC	180	87	CRGLGGHIAYC	227	134	CRRGSPLSRYC	274
41	CAPPYDQSF	181	88	WYSAPENAL	88	135	SWDEIIDLG	135
42	CPPPWYSRSSC	182	89	WYTAPLSL	89	136	CRSPAGEWSSC	276
43	CSRALGVVSEC	183	90	WYTNPSIAA	90	137	CAYHVLRYC	277
44	PTWYKLSV	44	91	WYFSNENLG	91	138	CAKTVRGDYC	278
45	RGSEGSFAR	45	92	WYTLDIGPT	92	139	CLAASADTAAC	279
46	CKQTIGSFDGC	186	93	GPWHGPFSS	93	140	CPYTSWAREGC	280
47	PLWYDPAPP	47	94	GDWPFPSAP	94	141	CPPPWSTHDC	297

No.	配列	配列番号
142	CSEPWSTSN	298
143	AITGVRARW	291
144	EKKHFNYGT	292
145	EKKRFESNT	293
146	EQGYCTVNIQCAKYR	294
147	SPADCDYTTLCAKPT	295
148	NSPTSCKWLCKEKF	296

【 0 1 2 1 】

実施例 3 ファージ上ペプチドとモノクローナル抗体との相互作用に関する E L I S A 試験

多数のファージ上ペプチドに対するモノクローナル抗体の結合を調べるために、下記のプロトコルを用いて全てのクローンを独立に作製した。

【 0 1 2 2 】

ノナマーライブラリ由来のクローン(表 2、ペプチド No. 1 ~ 145)について

10

20

30

40

50

ファージを感染させた大腸菌 (*E. coli*) DH11Sの前培養を一晩行って増殖させた。この前培養のサンプルを用いて新たな50 mLの培養液に接種し、その開始時のOD_{600nm}を0.050とした。この培養物をOD_{600nm}が0.20~0.25となるまで強く振盪しつつ37℃で増殖させた。次いで線毛の再生を行わせるために培養を15分間減速させた。M13K07ヘルパーファージをMOIを20として添加し、緩徐に攪拌しつつ37℃で15分以上置くことによって重感染させた。次いでIPTG(最終濃度1 mM)を添加し、強く攪拌しつつ5時間増殖させた。

【0123】

Cys3/4/5/6ライブラリー由来のクローン(表2、ペプチドNo.146~148)について

対象のクローンを含んでいるK91kanのコロニー(LB Tettプレート上)を50 mLの20 µg/mLテトラサイクリン補充LB培地に添加し、強く攪拌しつつ37℃で一晩増殖させた。

【0124】

全てのクローンについて

培養物を4000 RPMで15分間遠心した。0.15倍量のPEG-NaCl溶液を上清に添加してファージを沈殿させ、4℃で一晩保持した。4000 RPMで45分間遠心してファージを回収した。TBS中に再懸濁した後、ファージを65℃で15分間加熱して、残存細菌を殺滅しサンプル中に存在する可溶性タンパク質を変性させた。次いでその溶液を遠心分離し、ペレットを棄てた。次いで上清中のファージを上述の方法で再度沈殿させた。最後にファージを200 µLのTBS中に再懸濁した。ファージ粒子の濃度は269 nm~320 nmにおけるODを測定して求めた。

【0125】

ELISA試験

ファージをMaxisorpマルチウェルプレート上で 5×10^{11} 粒子/mLにて被覆した。被覆は100 µL/ウェルを用いて4℃で一晩かけて行った。プレートを5%(w/v)スキムミルクを含有するTBSにより37℃で2時間かけて飽和させ、さらにTBS-Tween20 0.05%(v/v)で5回洗った。次いで、モノクローナル抗体を被覆したウェル中で37℃で1時間インキュベートし、5回洗い、GAM-HRPコンジュゲート(1500倍希釈、Dako, Denmark)を添加して37℃で1時間かけて該モノクローナル抗体のファージへの結合を検出した。5回洗った後、ペルオキシダーゼ活性を、K-Blue(登録商標)基質(Neogen, Lexington, USA)を添加して室温で20分間反応させることによりモニターした。反応は25 µLの2N H₂SO₄を添加して停止させた。読み取りは450~630 nmにて行った。各ファージの被覆は、それぞれのモノクローナル抗体を用いる試験用に、3回重複して行った。対照モノクローナル抗体は、選択するモノクローナル抗体と同じアイソタイプのものであるがナイセリア・メニンギチジス(*N. meningitidis*) Bとは反応しないものを用いた。

【0126】

結果

1つ以上のモノクローナル抗体を用いて陽性であることが示されたファージの全てについて、その結果を確認するために2回目の試験を行った。46種のペプチドが少なくとも1種のモノクローナル抗体を用いて陽性であることが示された。それらのペプチド番号(表2を参照)は次のとおりである: 13、14、17、22、27、28、29、30、39、45、47、50、51、53、54、55、58、61、63、66、75、82、83、85、86、87、88、93、103、104、105、115、124、131、132、133、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148。このことは、これらのペプチドが髄膜炎菌のL3, 7, 9 LOSのミモトープとして特に適するものであるという考えを支持する。

【0127】

148種の選択されたペプチドのうち102種はこの試験では陽性として検出されなかった。その理由は、それらのうちの少なくともいくつかについて、特に、この試験で陽性を示した他のペプチドとの間で保存モチーフを共有しているそれらのペプチドについては、そのペプチドは当該ファージの表面上での発現が良好ではないためと考えられる。そのような場合には、より高感度な試験で、それらのペプチドのうちのいくつかは実際には1種以上のモノクローナル抗体によって認識されることが示されるであろう。

【0128】

実施例4 S P O Tペプチド

免疫を試みるための最良のペプチド候補を決定する別の実験は、化学的に合成されたペプチドが少なくとも1種の抗MenB LOSモノクローナル抗体によって認識されるかどうか（および好ましくは無関係なモノクローナル抗体によって認識されないかどうか）を調べるものである。このことをS P O T合成ペプチド（セルロース膜上に直接的に合成されたペプチド）について調べることができる。この膜を種々のモノクローナル抗体を用いて反復的イムノプロットティングと化学発光による検出で試験すればよい。ペプチドは、そのペプチドの両末端の各々にp V I I Iタンパク質配列に由来する3個の残基を有する形で合成することができる。バクテリオファージの表面上でp V I I Iとの融合体として発現されるそのようなペプチドの一次構造は、次のとおりである（xはライブラリー中の何らかの残基を示す）：

・直鎖状ペプチド（9アミノ酸）： A A E G E F x x x x x x x x x D P A K A A F .

・環状ペプチド（C 9アミノ酸 C）： A A E G E F C x x x x x x x x x C G D P A K A A F . . .

直鎖状および環状ペプチドは別個の膜上に合成して環状ペプチドの特異的な再生が可能ないようにすることができる。

【0129】

例えば、表2のペプチドNo. 61（G E F P R P H F G A P P D P A）およびNo. 83（G E F A E R S L W Y Y P D P A）を含んでなる直鎖状ペプチドは1枚の膜上に合成し、表2のペプチドNo. 50（G E F C S S Y S Y V H D S C G D P）、No. 14（G E F C S H A P P Y D R V C G D P）、およびNo. 25（G E F C R A P P Y D T I M C G D P）は別の膜上に合成した。

【0130】

これらの膜をモノクローナル抗体でプローブするために用いたプロトコールはGenosysから提供されているものにいくつかの改変、特に環状ペプチドを有する膜の再生のための改変を加えたものである。簡潔に述べれば、膜を3回各10分間洗浄し（洗浄バッファはT T B S : T B S p H 8、T w e e n 2 0 0 . 0 5 %）、次いでブロッキングバッファ中で室温で1時間飽和させ（ブロッキングバッファ濃縮液Genosys SU-07-250を、T T B S、0.05g/mLシヨ糖中に10倍に希釈）、T T B Sで再度1分間洗浄し、室温で2時間かけて（穏やかに振盪しながら）ブロッキングバッファ中に希釈したモノクローナル抗体と共にインキュベートし、T T B Sを用いて2 x 1分間、および3 x 10分間洗浄し、さらにブロッキングバッファ中に1500倍に希釈した二次抗体（ヤギ抗マウスHRP, Dako）と共に室温で1時間30分（穏やかに振盪しながら）インキュベートし、T T B Sを用いて2 x 1分間、および3 x 10分間洗浄し、化学発光検出により測定した（すなわち、L u m i L i g h t P l u s (R o c h e D i a g n o s t i c s) と共に暗所で室温にて10分間インキュベートし、発光をF l u o r - S M u l t i I m a g e r S y s t e m (B i o R a d) で3~30秒間検出するか、またはX線フィルム上でのオートラジオグラフィで検出した）。

【0131】

結果は下記の表に示している。第1のカラムはペプチドの番号である。モノクローナル抗体（ボールド体または下線で示す）は、一連の実験で用いた順に示している。

【0132】

10

20

30

40

50

用いたモノクローナル抗体：モノクローナル抗体 24 (H44/24)、58 (H44/58)、47 (4BE12C10)、および2C8 (無関係のモノクローナル抗体)はIgG3である；モノクローナル抗体 70 (H44/70)、78 (H44/78)、M4 (連鎖球菌多糖に対する抗体)、M13 (同上)、およびF76 (ペプチドエピトープに対して産生された抗体)は、IgMである。GはGAM-HRP単独(一次モノクローナル抗体なし)を表す。

【0133】

膜1 (直鎖状ペプチド)

	70	Gam	78	47	M4	58	M13	24	G	2C8	F76
83	+++		+	(+)	++	(+)	++	++			++
61	+										+/-

10

膜2 (環状ペプチド)

	58	G	24	70	78	M13	47	70	2C8	F76
14	++			+		+				(+)
25	(+)					(+)				(+)
50				++	+	+		++		(+)

20

【0134】

検出後、プロットを下記のようにして再生した。TTBS中で3×10分間洗浄し、再生バッファー中で50で2×1分間および3×10分間洗浄し(再生バッファーは50 mM Tris-HCl, pH 6.7; 2% SDS; 2-メルカプトエタノール 100 mM)、PBS中で3×10分間洗浄し(環状ペプチドの場合のみ)、PBS-DM SO 10%中で2×1分間、次いで一晩かけて洗浄し(環状ペプチドの場合のみ)、TTBS中で3×10分間洗浄した。

30

【0135】

この実験から、ペプチド61はモノクローナル抗体H44/70によって特異的に認識され、一方、ペプチド50はモノクローナル抗体H44/70、H44/78、およびM13に認識されるがそのシグナルのレベルはモノクローナル抗体H44/70による場合が他のものによる場合よりも高い。ペプチド83は全てのIgMによって認識されるがそのシグナルはモノクローナル抗体H44/70による場合が他のものによる場合よりも高い。このペプチドもH44/24およびH44/58により認識されるが他のIgG3によっては認識されない。ペプチド14および25はファージELISAではモノクローナル抗体H44/58によってのみ陽性を示すが、これらのペプチドはSPOT合成の場合には同じモノクローナル抗体により陽性を示す一方で他のIgG3によっては陽性を示さなかった。

40

【0136】

実施例5 ペプチド構造の解析

本研究で単離したペプチドはWO 00/25814に開示されたL3, 7, 9 LOSペプチドミモトープのセットとは全く異なるように思われる。

【0137】

本研究では148個のペプチドが見出された(表2参照)。それらの大部分は、意図的に、1個ずつのCys残基を両末端に有し、それによりジスルフィド架橋を介して環状となるようにされている。アラインメント法およびパターン検索法においてこれらのCysによってバイアスがかかることを避けるために、それらのペプチドからは末端システインを

50

取り除いてある。それらのペプチド中に元々はシステインが存在していることは、それらのペプチドの名称の最後の2文字で判るようになっている(C Cは、1個ずつのC y sを両末端に有することを、C Nは、N末端に1個のC y sを有しC末端にはC y sを有しないことを、N Cはその逆を、N Nはどちらの末端にも末端C y sを有しないことを表す)。

【0138】

これらのペプチドの平均アミノ酸組成は2つの驚くべき特徴を示す。すなわち、これらのペプチドはプロリンに富んでいるようであり(148種中98種は少なくとも1個のプロリンを有する)、さらに芳香族アミノ酸残基(Tyr、Trp、およびPhe)についてはいっそう富んでいるようである(126種のペプチドが少なくとも1つの芳香族残基を有する)。

10

【0139】

特に、7種のペプチド(1、2、18、50、64、83、123)は[YW] x Yというモチーフを有しており、このモチーフは炭水化物サブユニットを模倣することができる」と報告されているものである(C. D. Partidos, Current Opinion in Mol. Therapeutics, Vol 2, pp74-79, 2000)。

【0140】

ジスルフィド架橋の存在によりペプチド中でプロリンが好まれるのであろうとも考えられるが、拘束されていないペプチドでもほぼ同程度にプロリンを含んでいる。

20

【0141】

それらに対して保存されたパターンを検索し、下記の結果を得た。

【0142】

一部のペプチドに共有されている高い類似性

一部のペプチドは、以下の表に示すように、いくつかの連続残基を共通に有する。

【0143】

ペプチドの個数	共通モチーフ	ペプチドNo.
2	L-P-P-Y-D-R	21, 23
4	P-P-Y-D-R	14, 21, 23, 28
4	A-P-P-Y-D	14, 16, 25, 36
2	P-P-Y-D-P	16, 34
2	G-P-P-Y-D	28, 34
2	A-G-G-Y-L	96, 117
2	S-L-W-Y-S	72, 76
2	S-R-S-S	42, 108
3	P-P-W-Y	42, 78, 84
10	P-P-Y-D	下記参照
2	R-G-T-L	35, 40
3	F-D-P-P	54, 70, 127
2	A-T-Y-P	56, 62
2	P-G-A-P	12, 125
2	G-R-P-G	10, 102
2	F-R-G-T	32, 35
4	G-G-Y-L	30, 96, 112, 117
2	S-L-S-L	23, 89
3	S-L-W-Y	72, 76, 83

30

40

【0144】

50

P P Y Dモチーフを共有している以下の多数(10種)のペプチドには特に注目すべきである:

LTpep_14_CC : shaPPYDrv
LTpep_16_CC : faPPYDplp
LTpep_21_NN : ktalPPYDr
LTpep_23_CC : slslPPYDr
LTpep_25_CC : raPPYDtim
LTpep_26_CN : PPYDegcrv
LTpep_28_CC : qpigPPYDr
LTpep_34_CC : gPPYDpfpa
LTpep_36_CC : taPPYDayg
LTpep_41_CC : apPPYDqsf

10

【0145】

P P [Y F W]モチーフを有するペプチドは17種ある。

W Yのペアはこのペプチドセットには特に高頻度に存在しており、26種のペプチドが数えられる。

【0146】

2番目に頻度の高いジペプチドはP P (24)であり、その次はA P (20)である。

【0147】

多数のペプチドに共有されているより弱い類似性

20

介在するミスマッチを許容すれば、以下のような関連ペプチドのセットが見出される。

【0148】

LTpep_54_CC :	RPaFDPPyh	
LTpep_70_CC :	RPqFDPPnd	
LTpep_96_CC :	a1DiAGGYL	
LTpep_117_CC :	lqDrAGGYL	
LTpep_89_NN :	WYTaPS1sl	
LTpep_90_NN :	WYtnPS1aa	
LTpep_78_NN :	PpWYpeHkT	
LTpep_86_NN :	PgWYdaHpT	10
LTpep_7_NN :	RMRiIPegt	
LTpep_12_NN :	RMRdIPgap	
LTpep_16_CC :	faPPYDP1P	
LTpep_34_CC :	gPPYDPfPa	
LTpep_52_CC :	R1YSfvfDk	
LTpep_73_CC :	RgYShVsDa	20
LTpep_47_NN :	P1WYdpapp	
LTpep_86_NN :	PgWYdahPt	
LTpep_78_NN :	PpWYpehkt	
LTpep_86_NN :	PgWYdahpt	
LTpep_42_CC :	pPpWYsrss	
LTpep_84_NN :	PpWYnqsel	
LTpep_75_NN :	WYtPttrpv	
LTpep_89_NN :	WYTaPslsl	30
LTpep_90_NN :	WYtnPslaa	
LTpep_63_NN :	WYiAPrktL	
LTpep_88_NN :	WYsaPenal	
LTpep_89_NN :	WYtAPslsL	

【 0 1 4 9 】

より弱いパターンを許容すれば、最後の2つのセットをパターンWY x x Pでグループ化することができ、さらに以下の別のペプチドを加えることができる。

【 0 1 5 0 】

LTpep_81_NN :	rgWYadPsa	40
LTpep_63_NN :	WYiaPrkal	
LTpep_88_NN :	WYsaPenal	
LTpep_75_NN :	WYttPttrpv	
LTpep_89_NN :	WYtaPslsl	
LTpep_90_NN :	WYtnPslaa	

【 0 1 5 1 】

アライメントにおいてギャップを許容することにより高い自由度をもちこめば、さらに多くのペプチドをグループ化でき、それは例えば以下のとおりである。

【 0 1 5 2 】

LTpep_54_CC : RPaFDPPyh
 LTpep_70_CC : RPqFDPPnd
 LTpep_127_NN: trRP-FDPPa

LTpep_21_NN : ktA1-PPYDr
 LTpep_41_CC : Ap-PPYDqsf
 LTpep_54_CC : rpAfdPPYH

LTpep_47_NN : plWYd-Papp
 LTpep_55_NN : hgrtlWYt-P
 LTpep_63_NN : WYiaPrktl
 LTpep_75_NN : WYttPtrpv
 LTpep_81_NN : rgWYadPsa
 LTpep_83_NN : aerslWYy-P
 LTpep_88_NN : WYsaPenal
 LTpep_89_NN : WYtaPsisl
 LTpep_90_NN : WYtnPsiaa

10

【 0 1 5 3 】

その他のコンセンサ配列は以下のとおりである。

【 0 1 5 4 】

ペプチド141 cppPWSThdc
 ペプチド142 csePWSTsnc
 コンセンサス PWST

20

ペプチド144 EKKhfnygT
 ペプチド145 EKKrFesnT
 コンセンサス EKKxFxxxT

【 0 1 5 5 】

実施例 3 で選択された選択ペプチドの比較

これらのペプチドの3分の2はジスルフィド架橋により拘束されており、このことはその 30
 特徴が必ずしも必須のものではないことを意味している。

【 0 1 5 6 】

配列番号 1 N T K W Y P Y A
 配列番号 2 F V P S P Y V Y E
 配列番号 3 R S S L P G D
 配列番号 4 F Y R E L A G D L
 配列番号 5 M R R T A S E I M
 配列番号 6 M R P L T W Q T T
 配列番号 7 R M R I I P E G T
 配列番号 8 M R D V M P Q H W
 配列番号 9 H K P T D H P S W
 配列番号 10 S E T Y G R P G L
 配列番号 11 E R P I G G D S G
 配列番号 12 R M R D I P G A P
 配列番号 13 I S E Y A K G T T
 配列番号 14 S H A P P Y D R V
 配列番号 15 V T I P Y R G T Q
 配列番号 16 F A P P Y D P L P
 配列番号 17 A P Y S I F I G E
 配列番号 18 T H L Y H Y G T S

40

50

配列番号 1 9	L C Q A Y K G R R	
配列番号 2 0	D P R L L D L	
配列番号 2 1	K T A L P P Y D R	
配列番号 2 2	F A R P F Q G T W	
配列番号 2 3	S L S L P P Y D R	
配列番号 2 4	D R T L S A L A L	
配列番号 2 5	R A P P Y D T I M	
配列番号 2 6	C P P Y D E G C R V A	
配列番号 2 7	F G L I A F H P D	
配列番号 2 8	Q P I G P P Y D R	10
配列番号 2 9	T A N Y Y F G T Y	
配列番号 3 0	A N S R P G G Y L	
配列番号 3 1	M S S Y G R G V R	
配列番号 3 2	V S T P F R G T F	
配列番号 3 3	D P R I T P D F G	
配列番号 3 4	G P P Y D P F P A	
配列番号 3 5	H T V R F R G T L	
配列番号 3 6	T A P P Y D A Y G	
配列番号 3 7	R S P L L G A P V	
配列番号 3 8	T T T Y G T G T W	20
配列番号 3 9	S S L Y Y H G T A	
配列番号 4 0	L Y E P L R G T L	
配列番号 4 1	A P P P Y D Q S F	
配列番号 4 2	P P P W Y S R S S	
配列番号 4 3	S R A L G Y V S E	
配列番号 4 4	P T W Y K L K S V	
配列番号 4 5	R G S E G S F A R	
配列番号 4 6	K Q T I G S F D G	
配列番号 4 7	P L W Y D P A P P	
配列番号 4 8	E S P Y S A H R W	30
配列番号 4 9	W Y D E R T I L K	
配列番号 5 0	S S Y S Y V H D S	
【 0 1 5 7 】		
配列番号 5 1	R F T Y D P P F M	
配列番号 5 2	R L Y S F V F D K	
配列番号 5 3	S Q W R S A A P T	
配列番号 5 4	R P A F D P P Y H	
配列番号 5 5	H G R T L W Y T P	
配列番号 5 6	S S V S A T Y P I	
配列番号 5 7	S L V Q S P K R F	40
配列番号 5 8	S N W Y E N T P T	
配列番号 5 9	P R P G W G Q S A	
配列番号 6 0	C T D P R G C G M F A	
配列番号 6 1	P R P H F G A P P	
配列番号 6 2	V T R A T Y P S W	
配列番号 6 3	W Y I A P R K T L	
配列番号 6 4	Y G Y S A L R D T	
配列番号 6 5	I I T G S G W Y V	
配列番号 6 6	T H Y S F Y G D I	
配列番号 6 7	H W Y S T E A A W	50

配列番号 6 8	H R I A Q S L P Q	
配列番号 6 9	A L Y R F A A D S	
配列番号 7 0	R P Q F D P P N D	
配列番号 7 1	H P A L A R W P L	
配列番号 7 2	Q P K S L W Y S V	
配列番号 7 3	R G Y S H V S D A	
配列番号 7 4	D P V R T I Y P I	
配列番号 7 5	W Y T T P T R P V	
配列番号 7 6	Q R Q S L W Y S S	
配列番号 7 7	N P D Y S S P H E	10
配列番号 7 8	P P W Y P E H K T	
配列番号 7 9	A S L G L A K T T	
配列番号 8 0	W Y V D G P L A T	
配列番号 8 1	R G W Y A D P S A	
配列番号 8 2	L W R P I D P F L	
配列番号 8 3	A E R S L W Y Y P	
配列番号 8 4	P P W Y N Q S E L	
配列番号 8 5	D S A P A V K S S	
配列番号 8 6	P G W Y D A H P T	
配列番号 8 7	R G L Q G H I A Y	20
配列番号 8 8	W Y S A P E N A L	
配列番号 8 9	W Y T A P S L S L	
配列番号 9 0	W Y T N P S I A A	
配列番号 9 1	W Y F S N E n L G	
配列番号 9 2	W Y T L D I G P T	
配列番号 9 3	G P W H G P S S S	
配列番号 9 4	G D W P P F S A P	
配列番号 9 5	W Y V G S V R S Q	
配列番号 9 6	A L D I A G G Y I	
配列番号 9 7	P P P S R G G Y I	30
配列番号 9 8	Q A F D T S W T A	
配列番号 9 9	F L P C R R C G S	
配列番号 1 0 0	R P W Q T A H F A	
【 0 1 5 8 】		
配列番号 1 0 1	G Q Y S S S P F P	
配列番号 1 0 2	G R P G P Y P A D	
配列番号 1 0 3	T P L P D G G I L	
配列番号 1 0 4	L K W G D G S S A	
配列番号 1 0 5	Y P Q L S H A N P	
配列番号 1 0 6	S A Y H R S L G A	40
配列番号 1 0 7	F P L P S R E F A	
配列番号 1 0 8	Y R Q S R S S W P	
配列番号 1 0 9	S H R F D A L R R	
配列番号 1 1 0	V R F P D G S H S	
配列番号 1 1 1	S P A A F S D R L	
配列番号 1 1 2	V T D Q W G G Y L	
配列番号 1 1 3	V P S G R S P N T	
配列番号 1 1 4	P K W S D K R P Q	
配列番号 1 1 5	A P P G I A V R T	
配列番号 1 1 6	M K W G P N S H S	50

配列番号 1 1 7	L Q D R A G G Y L	
配列番号 1 1 8	C G R L E G R C S H A	
配列番号 1 1 9	Y F I A K H G W A	
配列番号 1 2 0	P P R S S R G F L	
配列番号 1 2 1	T G I S T G E Y L	
配列番号 1 2 2	G P V F Y A T G L	
配列番号 1 2 3	L S Q Y A D W T Y	
配列番号 1 2 4	A R W Y P I S Q T	
配列番号 1 2 5	Q G F P G A P Q D	
配列番号 1 2 6	W H F R T F P A T	10
配列番号 1 2 7	T R R P F D P P A	
配列番号 1 2 8	C A S P L G P C F W	
配列番号 1 2 9	W T D T Y G D L L	
配列番号 1 3 0	I S A G P E S S H	
配列番号 1 3 1	H S V Q P A T R A	
配列番号 1 3 2	P K A P F S P F K	
配列番号 1 3 3	I D A G S H G W L	
配列番号 1 3 4	R R G S P L S R Y	
配列番号 1 3 5	S W D E I I D L G	
配列番号 1 3 6	R S P A G E W S S	20
配列番号 1 3 7	A Y H V L R Y S A	
配列番号 1 3 8	A K T V R G D Y Y	
配列番号 1 3 9	L A A S A D T A A	
配列番号 1 4 0	P Y T S W A R E G	
配列番号 1 4 1	C N T K W Y P Y A C	
配列番号 1 4 2	C F V P S P Y V Y E C	
配列番号 1 4 3	C R S S L P G D C	
配列番号 1 4 4	C F Y R E L A G D L C	
配列番号 1 4 5	C M R R T A S E I M C	
配列番号 1 4 6	C M R P L T W Q T T C	30
配列番号 1 4 7	C R M R I I P E G T C	
配列番号 1 4 8	C M R D V M P Q H W C	
配列番号 1 4 9	C H K P T D H P S W C	
配列番号 1 5 0	C S E T Y G R P G L C	
【 0 1 5 9 】		
配列番号 1 5 1	C E R P I G G D S G C	
配列番号 1 5 2	C R M R D I P G A P C	
配列番号 1 5 3	C I S E Y A K G T T C	
配列番号 1 5 4	C S H A P P Y D R V C	
配列番号 1 5 5	C V T I P Y R G T Q C	40
配列番号 1 5 6	C F A P P Y D P L P C	
配列番号 1 5 7	C A P Y S I F I G E C	
配列番号 1 5 8	C T H L Y H Y G T S C	
配列番号 1 5 9	C L C Q A Y K G R R C	
配列番号 1 6 0	C D P R L L D L C	
配列番号 1 6 1	C K T A L P P Y D R C	
配列番号 1 6 2	C F A R P F Q G T W C	
配列番号 1 6 3	C S L S L P P Y D R C	
配列番号 1 6 4	C D R T L S A L A L C	
配列番号 1 6 5	C R A P P Y D T I M C	50

配列番号 1 6 6	C P P Y D E G C R V A C	
配列番号 1 6 7	C F G L I A F H P D C	
配列番号 1 6 8	C Q P I G P P Y D R C	
配列番号 1 6 9	C T A N Y Y F G T Y C	
配列番号 1 7 0	C A N S R P G G Y L C	
配列番号 1 7 1	C M S S Y G R G V R C	
配列番号 1 7 2	C V S T P F R G T F C	
配列番号 1 7 3	C D P R I T P D F G C	
配列番号 1 7 4	C G P P Y D P F P A C	
配列番号 1 7 5	C H T V R F R G T L C	10
配列番号 1 7 6	C T A P P Y D A Y G C	
配列番号 1 7 7	C R S P L L G A P V C	
配列番号 1 7 8	C T T T Y G T G T W C	
配列番号 1 7 9	C S S L Y Y H G T A C	
配列番号 1 8 0	C L Y E P L R G T L C	
配列番号 1 8 1	C A P P P Y D Q S F C	
配列番号 1 8 2	C P P P W Y S R S S C	
配列番号 1 8 3	C S R A L G Y V S E C	
配列番号 1 8 4	C P T W Y K L K S V C	
配列番号 1 8 5	C R G S E G S F A R C	20
配列番号 1 8 6	C K Q T I G S F D G C	
配列番号 1 8 7	C P L W Y D P A P P C	
配列番号 1 8 8	C E S P Y S A H R W C	
配列番号 1 8 9	C W Y D E R T I L K C	
配列番号 1 9 0	C S S Y S Y V H D S C	
配列番号 1 9 1	C R F T Y D P P F M C	
配列番号 1 9 2	C R L Y S F V F D K C	
配列番号 1 9 3	C S Q W R S A A P T C	
配列番号 1 9 4	C R P A F D P P Y H C	
配列番号 1 9 5	C H G R T L W Y T P C	30
配列番号 1 9 6	C S S V S A T Y P I C	
配列番号 1 9 7	C S L V Q S P K R F C	
配列番号 1 9 8	C S N W Y E N T P T C	
配列番号 1 9 9	C P R P G W G Q S A C	
配列番号 2 0 0	C T D P R G C G M F A C	
【 0 1 6 0 】		
配列番号 2 0 1	C P R P H F G A P P C	
配列番号 2 0 2	C V T R A T Y P S W C	
配列番号 2 0 3	C W Y I A P R K T L C	
配列番号 2 0 4	C Y G Y S A L R D T C	40
配列番号 2 0 5	C I I T G S G W Y V C	
配列番号 2 0 6	C T H Y S F Y G D I C	
配列番号 2 0 7	C H W Y S T E A A W C	
配列番号 2 0 8	C H R I A Q S L P Q C	
配列番号 2 0 9	C A L Y R F A A D S C	
配列番号 2 1 0	C R P Q F D P P N D C	
配列番号 2 1 1	C H P A L A R W P L C	
配列番号 2 1 2	C Q P K S L W Y S V C	
配列番号 2 1 3	C R G Y S H V S D A C	
配列番号 2 1 4	C D P V R T I Y P I C	50

配列番号 2 1 5	C W Y T T P T R P V C	
配列番号 2 1 6	C Q R Q S L W Y S S C	
配列番号 2 1 7	C N P D Y S S P H E C	
配列番号 2 1 8	C P P W Y P E H K T C	
配列番号 2 1 9	C A S L G L A K T T C	
配列番号 2 2 0	C W Y V D G P L A T C	
配列番号 2 2 1	C R G W Y A D P S A C	
配列番号 2 2 2	C L W R P I D P F L C	
配列番号 2 2 3	C A E R S L W Y Y P C	
配列番号 2 2 4	C P P W Y N Q S E L C	10
配列番号 2 2 5	C D S A P A V K S S C	
配列番号 2 2 6	C P G W Y D A H P T C	
配列番号 2 2 7	C R G L Q G H I A Y C	
配列番号 2 2 8	C W Y S A P E N A L C	
配列番号 2 2 9	C W Y T A P S L S L C	
配列番号 2 3 0	C W Y T N P S I A A C	
配列番号 2 3 1	C W Y F S N E n L G C	
配列番号 2 3 2	C W Y T L D I G P T C	
配列番号 2 3 3	C G P W H G P S S S C	
配列番号 2 3 4	C G D W P P F S A P C	20
配列番号 2 3 5	C W Y V G S V R S Q C	
配列番号 2 3 6	C A L D I A G G Y I C	
配列番号 2 3 7	C P P P S R G G Y I C	
配列番号 2 3 8	C Q A F D T S W T A C	
配列番号 2 3 9	C F L P C R R C G S C	
配列番号 2 4 0	C R P W Q T A H F A C	
配列番号 2 4 1	C G Q Y S S S P F P C	
配列番号 2 4 2	C G R P G P Y P A D C	
配列番号 2 4 3	C T P L P D G G I L C	
配列番号 2 4 4	C L K W G D G S S A C	30
配列番号 2 4 5	C Y P Q L S H A N P C	
配列番号 2 4 6	C S A Y H R S L G A C	
配列番号 2 4 7	C F P L P S R E F A C	
配列番号 2 4 8	C Y R Q S R S S W P C	
配列番号 2 4 9	C S H R F D A L R R C	
配列番号 2 5 0	C V R F P D G S H S C	
【 0 1 6 1 】		
配列番号 2 5 1	C S P A A F S D R L C	
配列番号 2 5 2	C V T D Q W G G Y L C	
配列番号 2 5 3	C V P S G R S P N T C	40
配列番号 2 5 4	C P K W S D K R P Q C	
配列番号 2 5 5	C A P P G I A V R T C	
配列番号 2 5 6	C M K W G P N S H S C	
配列番号 2 5 7	C L Q D R A G G Y L C	
配列番号 2 5 8	C G R L E G R C S H A C	
配列番号 2 5 9	C Y F I A K H G W A C	
配列番号 2 6 0	C P P R S S R G F L C	
配列番号 2 6 1	C T G I S T G E Y L C	
配列番号 2 6 2	C G P V F Y A T G L C	
配列番号 2 6 3	C L S Q Y A D W T Y C	50

配列番号 264	C A R W Y P I S Q T C	
配列番号 265	C Q G F P G A P Q D C	
配列番号 266	C W H F R T F P A T C	
配列番号 267	C T R R P F D P P A C	
配列番号 268	C A S P L G P C F W C	
配列番号 269	C W T D T Y G D L L C	
配列番号 270	C I S A G P E S S H C	
配列番号 271	C H S V Q P A T R A C	
配列番号 272	C P K A P F S P F K C	
配列番号 273	C I D A G S H G W L C	10
配列番号 274	C R R G S P L S R Y C	
配列番号 275	C S W D E I I D L G C	
配列番号 276	C R S P A G E W S S C	
配列番号 277	C A Y H V L R Y S A C	
配列番号 278	C A K T V R G D Y Y C	
配列番号 279	C L A A S A D T A A C	
配列番号 280	C P Y T S W A R E G C	
配列番号 289	P P P W S T H D	
配列番号 290	S E P W S T S N	
配列番号 291	A I T G V R A R W	20
配列番号 292	E K K H F N Y G T	
配列番号 293	E K K R F E S N T	
配列番号 294	E Q G Y C T V N I E Q C A K Y R	
配列番号 295	S P A D C D Y T T L C A K P T	
配列番号 296	N S P T S C K W L C N E K F	
配列番号 297	C P P P W S T H D C	
配列番号 298	C S E P W S T S N C	
配列番号 299	C A I T G V R A R W C	
配列番号 300	C E K K H F N Y G T C	
配列番号 301	C E K K R F E S N T C	30

【 0 1 6 2 】

配列番号 281 H 4 4 / 2 4 モノクローナル抗体の軽鎖の配列
 5' GACCCAGTTTCCACTTTTCCCTGCCTGTGAGTCTGGAGATCAAACCTCCATCTCTTGCACATCTAGTCG
 GAGCCTTGTACACCGGTAAGGAAACACCTATTTACATTGGTACCTTCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCAAAGC
 TCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTTTCTGGGTCCCAGACAGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAG
 ATTTCACTCACGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGACTTTATTTCTGCTCTCAAAGTACACATG
 TTCCGTGGACGTTCCGTGGAGGCACCAACCTGGAAATCAAACGGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCT
 TCCCACCATCCAGTGAGCAGTTAACATCTGGAGGTGCCTCAGTCGTGTCTTCTGAACAATTCTACCCCA
 AAGACATCAATGTCAAGTGAAGATTGATGGCAGTGAACGACAAAATGGCGTCTGAACAGTTGGACTGATC
 AGGACAGCAAAGACAGCACCTACAGCATGAGCAGCACCCCTCACGTTGACCAAGGACGAGTATGAACGACATA
 ACAGCTATACCTGTGAGGCCACTCACAAGACATCAACTTCACCCATTGTCAAGAGCG 3'

40

【 0 1 6 3 】

配列番号 282 H 4 4 / 2 4 モノクローナル抗体の重鎖の配列

5' CCTGAGTCTGAAGGTGGCCTGGTGCAGCCTGAAGgATCCCTGAAACTcTCCTGTGCAGCCTCCGGATTGG
 ATTTTAGTAGATACTGGATGAGTTGGGTCCGGCAGGCTCCAGGGAAAGGGCTAGAATGGATTGGAGAAATTT
 ATCCAGATAGCAGAAGGATAAACTATACGCCTTCTCTAAAGGATAAAATTCATCATCTCCAGAGACAACGCCA
 AAAATACGCTATACCTGCAATGAGCAAAAGTGAGATCTGAGGACACAGGCTTTTACTGTGCAATCTACT
 TTACTTACGACGCCTGGGTTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCAGCTACAACAA
 CAGCCCCATCTGTCTATCCCTTGGTCCCTGGCTGCAGTGACACATCTGGATCCTCGGTGACACTGGGATGCC
 TTGTCAAAGGCTACTTCCCTGAGCCGGTAACTGTAAAATGGAACATGGAGCCCTGTCCAGCGGTGTGCGCA
 CAGTCTCATCTGTCTGCAGTCTGGGTTCTATTCCCTCAGCAGCTTGGTACTGTACCCTCCAGCACCTGGC
 CCAGCCAGACTGTCTGCAACGTAGCCACCCAGCCAGCAAGACTGAGTTgTCAAGA 3'

【 0 1 6 4 】

10

配列番号 2 8 3 H 4 4 / 5 8 モノクローナル抗体の軽鎖の配列
 5' CCCAGTTCCTACTtTCCTGCcTGTGAGTCTTgGAGATCAAGCcTCCATcTCTTGCAGATCTAGTCAGAGCC
 TTGTTACAATAAGGGAAACACCTATTTACATTTGGTaCCTGCAGAAGCCAGGCCAGTcTCCAAAGCTCCTGA
 TCTACAAAGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCTGACAGGTTCAAGTGGCAGTGATTACAGGGACAGATTTCA
 CACTCAGGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTTCTGCTCTCAAAGTACACATGTTCCGT
 GGACGTTCCGTGGAGGCCAACGCTGAAATCAAACGGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTCCAC
 CATCCAGTGAGCAGTTAACATCTGGAGGTGCTCAGTCGTGTGCTTCTTGAACAACTTCTACCCCAAAGACA
 TCAATGTCAAGTGAAGATTGATGGCAGTGAACGACAAAATGGCGTCTGAACAGTTGGACTGATCAGGACA
 GCAAAGACAGCACCTACAGCATGAGCAGCACCCCTCACGTTGACCAAGGACGAGTATGAACGACATAACAGCT
 ATACCTGTGAGGCCACTCACAAGACATCAACTTCACCCATTGTCAAGAGCG 3'

20

【 0 1 6 5 】

配列番号 2 8 4 H 4 4 / 5 8 モノクローナル抗体の重鎖の配列
 5' TCTGAAGTGGCTGGTGCAGCTGAAGGATCCCTGAAaCtTcTCTGTGTGCCACAGGATTCGATTTAGTA
 GATACTGGATGAGTTGGGTCCGGCAGGCTCCAGGGAAAGGGCTAGAGTGGATTGGAGAAATTTATCCAGATA
 GCAGGAAGATAAACTATACGCCATCTCTAAAGGATAAGTTTCATCATCTCCAGAGACAACGCCAAAAATACGC
 TGTACCTGCAATGAGCAAAAGTGAGATCTGAGGACACAGCCCTTTTACTGTGCACTACTATACTTACG
 ACGTCTGGGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCAGTACAACAACAGCCCAT
 CTGTCTATCCCTTGGTCCCTGGTGCAGTGACACATCTGGATCCTCGGTGACACTGGGATGCCTTGTCAAAG
 GCTACTTCCCTGAGCCGGTAACTGTAAAATGGAACATGGAGCCCTGTCCAGCGGTGTGCGCACAGTCTCAT
 CTGTCTGCAGTCTGGGTTCTATTCCCTCAGCAGCTTGGTACTGTACCCTCCAGCACCTGGCCAGCCAGA
 CTGTCTATCTGCAACGTAGCCACCCAGCCAGCAAGACTGAGTNATCAAGAG 3'

30

【 0 1 6 6 】

配列番号 2 8 5 H 4 4 / 7 0 モノクローナル抗体の軽鎖の配列
 5' TGACCCAGTCTCCACTCACTTTTGTGGTTACCATTGGaCAACCAGCcTCCATcTCTTGCAAGTCAAGTC
 AGAGCCTCTTAGATAATGATGAAAGACATATTTGAATTGGTTGTTACAGAGGCCAGGCCAGTcTCCAAAGC
 GCCTAATCTATCTGGTGTCTAAACTGGACTCTGGAGTCCCTGACAGGTTCACTGGCAGTGGATCAGGGACAG
 ATTTCACTGAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATTTGGGAGTTTATTATTGCTGGCAAGGTACACATT
 TTCTCTCACGTTCCGGTCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAACGGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCT
 TCCACCATCCAGTGAGCAGTTAACATCTGGAGGTGCTCAGTCGTGTGCTTCTTGAACAACTTCTACCCCA
 AAGACATCAATGTCAAGTGAAGATTGATGGCAGTGAACGACAAAATGGCGTCTGAACAGTTGGACTGATC
 AGGACAGCAAAGACAGCACCTACAGCATGAGCAGCACCCCTCACGTTGACCAAGGACGAGTATGAACGACATA
 ACAGCTATACCTGTGAGGCCACTCACAAGACATCAACTTCACCCATTGTCAAGAGCGG 3'

40

【 0 1 6 7 】

配列番号 2 8 6 H 4 4 / 7 0 モノクローナル抗体の重鎖の配列

5' ACAGGTAAGCTGGGGCTTCAGTGAGGATATCCTGTAAGGcTTCtGGcTACACCTTTCACAAGCTACTATA
 TACACTGGGTGAAGCAGAGGCCCTGGACAGGGACTTGAGTGGATTGGATGGATTTATCCTGGAATGTTAATA
 CTAAGTACAATGAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACACTGACTGCAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGC
 AGCTCAGCAGCCTGACCTCTGAGGACTCTGCGGTCTATTTCTGTGCAAGAGGGGGGTACGGTATGCTATGG
 ACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCAGAGAGTCAGTCCTTCCCAAATGTCTTCCCCTCG
 TCTCCTGCGAGAGCCCCCTGTCTGATAAGAATCTGGTGGCCATGGGCTGCCTGGCCCGGACTTCTTGCCCA
 GCACCATTTCTTCCACTGGAACCTACCAGAACAACTGAAGTCATCCAGGGTATCAGAACCTTCCCAACAC
 TGAGGACAGGGGGCAAGTACCTAGCCACCTCGCAGGTGTTGCTGTCTCCAAGAGCATCCTTGAAGGTTGAG
 ATGAATACCTGGTATGCAAAATCCACTACGGAGGCAAAAACAGAG 3'

【 0 1 6 8 】

10

配列番号 2 8 7 H 4 4 / 7 8 モノクローナル抗体の軽鎖の配列

5' CTGACCCAGTTCCTACTCACTTtGTcGGtTACCATTGGaCAACCAGCcTCCATcTCTTGCAAGTCAAGTCA
 GAGCcTCTTAGATAGTGATGGAAGACATATTTGAATTGGTTGTACAGAGGCCAGGCCAGTcTCCAAAGCG
 CcTAATCTATCTGGTGTCTAAACTGGACTCTGGAGTCCCTGACAGGTTCACTGGCAGTGGATCAGGGACAGA
 TTTCACTGAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATTTGGGAGTTTATTATTGCTGGCAAGGTACACATTT
 TCCGCTCAGGTTCCGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAACGGGCTGATGTCACCAACTGTATCCATCTT
 CCCACCATCCAGTGAGCAGTTAACATCTGGAGGTGCCTCAGTCGTGTGCTTCTTGAACAACTTACCCCAA
 AGACATCAATGTCAAGTGAAGATTGATGGCAGTGAACGACAAAATGGCGTCTGAACAGTTGGACTGATCA
 GGACAGCAAAGACAGCACCTACAGCATGAGCAGCACCCCTCACGTTGACCAAGGACGAGTATGAACGACATAA
 CAGTATACCTGTGAGGCCACTCACAAGACATCAACTTACCCATTGTCAAGAGCG 3'

20

【 0 1 6 9 】

配列番号 2 8 8 H 4 4 / 7 8 モノクローナル抗体の重鎖の配列

5' GTCTGGACCTAAGTGGTAAAGCCTGGGGCTTCAGTGAGGATATCCTGCAAGGCTTCTGGcTACAcTTCA
 CAAGCTACTATATACACTGGGTGAAGCAGAGGCCCTGGACAGGGACTTGAGTGGATTGGATGGATTTATCCTG
 GAAATGTTAATACTAAGTACAATGAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACACTGACTGCAGACAAATCCTCCAGCA
 CAGCCTACATGCAGCTCAGCAGCCTGACCTCTGAGGACTCTGCGGTCTATTTCTGTGCAAGATCTACTACGG
 CTAGGGGTACTTTGACTACTGGGGCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCAGAGAGTCAGTCCTTCCCAA
 ATGTCTTCCCCTCGTCTCCTGCGAGAGCCCCCTGTCTGATAAGAATCTGGTGGCCATGGGCTGCCTGGCCC
 GGGACTTCTGCCAGCACCATTTCCTTCCACTGGAACCTACCAGAACAACTGAAGTCATCCAGGGTATCA
 GAACCTTCCCAACTGAGGACAGGGGGCAAGTACCTAGCCACCTCGCAGGTGTTGCTGTCTCCAAGAGCA
 TCCTTGAAGGTTGAGATGAATACCTGGTATGCAAAATCCACTACGGAGGCAAAAACAGAG 3'

30

【 0 1 7 0 】

Applicant's or agent's file B45242 reference number	International application No.
--	-------------------------------

INDICATIONS RELATING TO A DEPOSITED MICROORGANISM

(PCT Rule 13bis)

A. The indications made below relate to the microorganism referred to in the description on page 11 lines 8-17 and page 15 lines 5-9.	
B. IDENTIFICATION OF DEPOSIT Further deposits are identified on an additional sheet <input type="checkbox"/>	
Name of depositary institution European Collection Of Cell Cultures	
Address of depositary institution (including postal code and country) Vaccine Research And Production Laboratory, Public Health Laboratory Service, Centre for Applied Microbiology Research, Porton Down, Salisbury, Wiltshire SP4 0JG, GB	
Date of deposit 22/09/00 (22 September 2000)	Accession Number 92209, 92210, 92211 and 92212
C. ADDITIONAL INDICATIONS (leave blank if not applicable) This information is continued on an additional sheet <input type="checkbox"/>	
In respect of those designations where a European Patent is sought, a sample of the deposited microorganisms will be made available until the publication of the mention of the grant of the European Patent or until the date on which the application has been refused or withdrawn, only by issue of such a sample to an expert nominated by the person requesting the sample	
D. DESIGNATED STATES FOR WHICH INDICATIONS ARE MADE (if the indications are not for all designated States)	
E. SEPARATE FURNISHING OF INDICATIONS (leave blank if not applicable)	
The indications listed below will be submitted to the International Bureau later (specify the general nature of the indications e.g., "Accession Number of Deposit")	

10

20

30

For receiving Office use only
<input type="checkbox"/> This sheet was received with the international application
Authorized officer

For International Bureau use only
<input type="checkbox"/> This sheet was received by the International Bureau on:
Authorized officer

40

【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
11 April 2002 (11.04.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/28888 A2(51) International Patent Classification: C07K 7/04,
A61K 39/095, G01N 33/68, C12N 15/11, 5/20[NL/BE]: GlaxoSmithKline Biologicals s.a., Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart (BE). **VOET, Pierre** [BE/BE]; GlaxoSmithKline Biologicals s.a., Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart (BE).

(21) International Application Number: PCT/EP01/11409

(22) International Filing Date: 3 October 2001 (03.10.2001)

(74) Agent: **LUBIENSKI, Michael, John**; Corporate Intellectual Property, GlaxoSmithKline, 980 Great West Road, Brentford, Middlesex TW8 9GS (GB).

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data: 0024200.8 3 October 2000 (03.10.2000) GB

(71) Applicant (for all designated States except US): **SMITHKLINE BEECHAM BIOLOGICAL S.A.** [BE/BE], Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart (BE).

(72) Inventors: and

(75) Inventors/Applicants (for US only): **DE BOLLE, Xavier, Thomas** [BE/BE]; Laboratoire d'Immunologie et Microbiologie URBM, Facultés Universitaires Notre Dame de la Paix, 61, rue de Bruxelles, B-5000 Namur (BE). **LETESSON, Jean-Jacques** [BE/BE]; Laboratoire d'Immunologie et Microbiologie URBM, Facultés Universitaires Notre Dame de la Paix, 61, rue de Bruxelles, B-5000 Namur (BE). **LOBET, Yves** [BE/BE]; GlaxoSmithKline Biologicals s.a., Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart (BE). **MERTENS, Pascal, Yvon** [BE/BE]; Laboratoire d'Immunologie et Microbiologie URBM, Facultés Universitaires Notre Dame de la Paix, 61, rue de Bruxelles, B-5000 Namur (BE). **POOLMAN, Jan**

(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BI, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— without international search report and to be republished upon receipt of that report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/28888 A2

(54) Title: COMPONENT FOR VACCINE

(57) Abstract: The present invention relates to a component for a vaccine against meningococci, in particular peptides which mimic epitopes of meningococcal lipooligosaccharide, and to a vaccine comprising such a component.

WO 02/28888

PCT/EP01/11409

I
COMPONENT FOR VACCINE

FIELD OF THE INVENTION

The present invention relates to a component for a vaccine against meningococci, preferably peptides which mimic epitopes of meningococcal lipooligosaccharide, and to a vaccine comprising such a component.

BACKGROUND TO THE INVENTION

Neisseria meningitidis (meningococcus) is a Gram negative bacterium frequently isolated from the human upper respiratory tract. It is a cause of serious invasive bacterial diseases such as bacteremia and meningitis. The incidence of meningococcal disease shows geographical, seasonal and annual differences (Schwartz, B., Moore, P.S., Broome, C.V.; Clin. Microbiol. Rev. 2 (Supplement), S18-S24, 1989). The bacterium is commonly classified according to the serogroup if its capsular polysaccharide.

Most disease in temperate countries is due to strains of serogroup B and varies in incidence from 1-10/100,000/year total population - sometimes reaching higher values (Kaczmarek, E.B. (1997), Commun. Dis. Rep. Rev. 7: R55-9, 1995; Scholten, R.J.P.M., Bijlmer, H.A., Poolman, J.T. et al. Clin. Infect. Dis. 16: 237-246, 1993; Cruz, C., Pavez, G., Aguilar, E., et al. Epidemiol. Infect. 105: 119-126, 1990).

Epidemics dominated by serogroup A meningococci, mostly in central Africa, sometimes reach incidence levels of up to 1000/100,000/year (Schwartz, B., Moore, P.S., Broome, C.V. Clin. Microbiol. Rev. 2 (Supplement), S18-S24, 1989). Nearly all cases as a whole of meningococcal disease are caused by serogroup A, B, C, W-135 and Y meningococci, and a tetravalent A, C, W-135, Y capsular polysaccharide vaccine is available (Armand, J., Arminjon, F., Mynard, M.C., Lafaix, C., J. Biol. Stand. 10: 335-339, 1982).

The frequency of *Neisseria meningitidis* infections has risen dramatically in the past few decades. This has been attributed to the emergence of multiple antibiotic resistant strains and an increasing population of people with weakened immune systems. It is no longer uncommon to isolate *Neisseria meningitidis* strains that are resistant to some or all of the standard antibiotics. This phenomenon has created an unmet medical need and demand for new anti-microbial agents, vaccines, drug screening methods, and diagnostic tests for this organism.

WO 02/28888

PCT/EP01/11409

2

The available polysaccharide vaccines are currently being improved by way of chemically conjugating them to carrier proteins (Lieberman, J.M., Chiu, S.S., Wong, V.K., et al. JAMA 275 : 1499-1503, 1996).

5 A serogroup B vaccine, however, is not available. The serogroup B capsular polysaccharide has been found to be nonimmunogenic - most likely because it shares structural similarity with host components (Wyle, F.A., Artenstein, M.S., Brandt, M.L. et al. J. Infect. Dis. 126: 514-522, 1972; Finne, J.M., Leinonen, M., Mäkelä, P.M. Lancet ii: 355-357, 1983). Effort has therefore been focused in trying to develop serotype B vaccines from outer membrane vesicles or purified protein components therefrom.

10 Alternative meningococcal antigens for vaccine development are meningococcal lipooligosaccharides (LOS). These are outer membrane bound glycolipids which differ from the lipopolysaccharides (LPS) of the Enterobacteriaceae by lacking the O side chains, and thus resemble the rough form of LPS (Griffiss et al. Rev Infect Dis 1988; 10: S287-295). Heterogeneity within the oligosaccharide moiety of the LOS generates structural and antigenic diversity among different meningococcal strains (Griffiss et al. 15 Inf. Immun. 1987; 55: 1792-1800). This has been used to subdivide the strains into 12 immunotypes. Immunotypes L3, L7, L9 have an identical carbohydrate structure and have therefore been designated L3,7,9. Meningococcal LOS L3,7,9, L2 and L5 can be modified by sialylation, or by the addition of cytidine 5'-monophosphate-N-acetylneuraminic acid. Antibodies to LOS have been shown to protect in experimental 20 rats against infection and to contribute to the bactericidal activity in children infected with *N. meningitidis* (Griffiss et al J Infect Dis 1984; 150: 71-79).

The toxic component of the LOS, as in the case of endotoxin from other Gram-negative bacteria, lies in the lipid A moiety of the molecule, and not in the immunogenic 25 oligosaccharide portion. Although it may be possible to separate the toxic part from the immunogenic portion of the molecule, once done the native conformation of the molecule may not be retained.

A solution to this difficulty is the identification of mimotopes which can mimic epitopes on the oligosaccharide moiety of the LOS. In this way surrogate antigens may 30 be generated.

Peptides mimicking polysaccharides have been reported. For instance, mimotopes of meningococcal group B capsular polysaccharide (Moe et al. 1999. FEMS Immunology and Medical Microbiology 26: 209-226) and meningococcal group C capsular polysaccharide (Westerink et al. 1995 Proc. Natl. Acad. Sci. USA

WO 02/28888

PCT/EP01/11409

3

92: 4021-4025) have been identified. Furthermore, WO 00/25814 discloses several serogroup B LOS L3,7,9 heptapeptide mimotopes.

As mimotopes can vary widely in their suitability for inclusion in a vaccine (that is whether they constitute an immunogenic mimotope which can induce a protective humoral immune response against the carbohydrate), there remains a need to identify further classes of peptide mimotopes of meningococcal (particularly serogroup B) LOS.

10 SUMMARY OF THE INVENTION

To achieve the identification of further peptide mimotopes mimicking surface-exposed epitopes of *N. meningitidis* LOS, the present inventors have screened two phage-displayed random peptide libraries with five monoclonal antibodies directed against *N. meningitidis* LOS.

15 The present invention provides a mimotope of a surface L3,7,9 LOS of *N. meningitidis*, said mimotope being antigenically cross-reactive with a monoclonal antibody selected from a group consisting of: 4BE12C10; H44/24; H44/58; H44/70; and H44/78.

The present invention further provides a mimotope of a surface L3,7,9 LOS of *N. meningitidis*, said mimotope comprising a peptide epitope obtainable by screening a peptide library with a monoclonal antibody selected from a group consisting of: 4BE12C10; H44/24; H44/58; H44/70; and H44/78.

Vaccine compositions comprising the above mimotopes are also provided.

A further aspect of the invention relates to a vaccine against serogroup B, C, Y, or W-135 meningococci, which comprises a mimotope of a surface L3,7,9 LOS of *N. meningitidis* and a mimotope of a surface L2 LOS of *N. meningitidis*.

A still further aspect relates to a vaccine against serogroup A meningococci, which comprises a mimotope of a surface L3,7,9 LOS of *N. meningitidis* and a mimotope of a surface L10 LOS of *N. meningitidis*.

30

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

The present invention aims to provide further classes of *N. meningitidis* LOS mimotopes for use as a component of a meningococcal vaccine.

WO 02/28888

PCT/EP01/11409

4

The present invention provides a mimotope of a surface L3,7,9 LOS of *N. meningitidis*, said mimotope being antigenically cross-reactive with a monoclonal antibody selected from a group consisting of: 4BE12C10; H44/24; H44/58; H44/70; and H44/78. These monoclonal antibodies are each described later and are termed the
5 'mAbs of the invention'. These mAbs have high specificity and/or affinity to the L3,7,9 LOS. The meaning of mimotope is defined as an entity which is sufficiently similar to a native meningococcal LOS epitope so as to be capable of being bound by antibodies which recognise the native meningococcal LOS epitope. 'Antigenically cross-reactive' for the purposes of this invention means that the mimotope tests
10 positive in an ELISA test (preferably as performed in Example 3) or immunoblot on recombinant phages expressing the mimotope. Preferably, the mimotope does not have a naturally-occurring amino-acid sequence.

Preferably, the mimotopes of the invention can be used to immunise a host such that antibodies are produced which specifically cross-react with LOS, and
15 preferably cross-react with whole cell bacteria containing the LOS.

The present invention further provides a mimotope of a surface L3,7,9 LOS of *N. meningitidis*, said mimotope comprising a peptide epitope obtainable by screening a peptide library with a monoclonal antibody selected from a group consisting of: 4BE12C10; H44/24; H44/58; H44/70; and H44/78. Preferably, the mimotope does not
20 have a naturally-occurring amino-acid sequence.

Typically, the peptide epitope is obtainable by screening a peptide library (preferably a random, highly diverse one) with a monoclonal antibody of high specificity and/or affinity to the LOS. Typically techniques such as phage display technology (EP 0 552 267 B1) can be used for screening such libraries (preferably as
25 described in Example 2). This technique has the advantageous potential of allowing the identification of many peptide mimotopes so that a recognition pattern can be established in order to define essential features (or chemical properties) of an epitope contained within a peptide mimotope of L3,7,9 LOS.

In the present invention, a nonamer peptide library (either linear or disulfide-constrained, for instance as previously described by Felici et al. [1993 *Gene* 128: 21-27] and Luzzago et al. [1993 *Gene* 128: 51-57]) was found to be conveniently used to challenge the mAbs of the invention in order to identify peptide epitopes contained within the peptide mimotopes of SEQ ID NO: 1-140, 289-296 that were isolated from the libraries. Thus the mimotope of the invention preferably comprises a peptide

WO 02/28888

5

PCT/EP01/11409

epitope contained within any one of the peptides of SEQ ID NO: 1-140, 289-296, or retro sequences thereof.

According to the present invention, the peptide epitope may comprise a sub-sequence of any one of SEQ ID NO:1-140, 289-296, or retro-sequences thereof, or may be present in a longer peptide incorporating any one of SEQ ID NO:1-140, 289-296 (or retro-sequences thereof) or sub-sequences therefrom. Accordingly, the mimotopes of the present invention may consist of addition of N and/or C terminal extensions of a number of other natural residues at one or both ends of the peptides of SEQ ID NO:1-140, 289-296.

Preferably the mimotope of the invention comprises any one of the peptides of SEQ ID NO: 1-140, 289-296 (the peptides of the invention), or retro sequences thereof, or modifications of the peptides or retro sequences. Most preferably, the mimotopes comprising the retro sequences and modifications of the peptides of the invention should retain cross-reactivity with a monoclonal antibody selected from a group consisting of: 4BE12C10; H44/24; H44/58; H44/70; and H44/78. Most preferably, the mimotope of the invention comprises any one of the peptides of SEQ ID NO:153, 154, 157, 162, 167, 168, 169, 170, 179, 45, 47, 190, 191, 53, 194, 55, 58, 61, 63, 206, 75, 222, 83, 85, 86, 227, 88, 93, 243, 104, 245, 255, 124, 271, 272, 273, 279, 280, 297, 298, 291, 292, 293, 294, 295, and 296 (corresponding, respectively, to peptide No. 13, 14, 17, 22, 27, 28, 29, 30, 39, 45, 47, 50, 51, 53, 54, 55, 58, 61, 63, 66, 75, 82, 83, 85, 86, 87, 88, 93, 103, 104, 105, 115, 124, 131, 132, 133, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, and 148 with reference to Table 2 in Example 2) or retro sequences and modifications of the peptides which are still recognised by one or more mAbs in the ELISA test of Example 3.

By 'retro sequences' with reference to a peptide sequence it is meant peptide sequences where the sequence orientation is reversed. Thus a retro sequence of the peptide AGDT is TDGA. It has been found in the art that retro sequences of peptide mimotopes are often peptide mimotopes themselves. Peptide mimotope sequences of the invention may be entirely or at least in part comprised of D-stereo isomer amino acids (inverso sequences). Also, the peptide sequences may be retro-inverso in character, in that the sequence orientation is reversed and the amino acids are of the D-stereoisomer form. Such retro, inverso or retro-inverso peptides have the advantage of potentially being more stable and/or immunogenic in a host when administered as an immunogen. Methods to make D amino acids and incorporate them into proteins

WO 02/28888

PCT/EP01/11409

6

are well known in the art [see, for example, Thorson *et al.* (1998) *Methods Mol. Biol.* 77:43-73, & Chartrain *et al.* (2000) *Curr. Opin. Biotechnol.* 11:209-14].

Peptide mimotopes comprising the peptides of the invention may be modified (modifications of the peptides of the invention) for a particular purpose by addition, deletion or substitution of elected amino acids.

For example, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 or 9 amino acids of each of the peptides of SEQ ID NO:1-140, 289-296 can be replaced by the amino acid that most closely resembles that amino acid. For example, A may be substituted by V, L or I, as described in the following table.

Original residue	Exemplary substitutions	Preferred substitution
A	V, L, I	V
R	K, Q, N	K
N	Q, H, K, R	Q
D	E	E
C	S	S
Q	N	N
E	D	D
G	P, A	A
H	N, Q, K, R	R
I	L, V, M, A, F	L
L	I, V, M, A, F	I
K	R, Q, N	R
M	L, F, I	L
F	L, V, I, A, Y	L
P	A	A
S	T	T
T	S	S
W	Y, F	Y
Y	W, F, T, S	F
V	I, L, M, F, A	L

10

Furthermore, the peptides of the present invention may be modified for the purposes of ease of conjugation to a protein carrier. For example, it may be desirable for some chemical conjugation methods to include a terminal cysteine to the peptide. In addition it may be desirable for peptides conjugated to a protein carrier to include a hydrophobic terminus distal from the conjugated terminus of the peptide, such that the free unconjugated end of the peptide remains associated with the surface of the carrier protein. This reduces the conformational degrees of freedom of the peptide, and thus increases the probability that the peptide is presented in a conformation which most

15

WO 02/28888

PCT/EP01/11409

7

5 closely resembles that of the L3,7,9 LOS epitope in the context of the whole molecule. For example, the peptides may be modified to have an N-terminal cysteine and a C-terminal hydrophobic amidated tail. Alternatively, the addition or substitution of a D-stereoisomer form of one or more of the amino acids may be performed to
10 create a beneficial derivative, for example to enhance stability of the peptide. Those skilled in the art will realise that such modified peptides, or mimotopes, could be a wholly or partly non-peptide mimotope wherein the constituent residues are not necessarily confined to the 20 naturally occurring amino acids. Furthermore, one or more amino acids may be deleted from the peptides of the invention, as long as an epitope is retained which is capable of cross-reacting with the monoclonal antibodies of the invention. Typically such an epitope would have at least 4, 5, 6, 7 or 8 amino acids. In addition, the peptides of the invention may be cyclised by techniques known in the art to constrain the peptide into a conformation that closely resembles its shape when the peptide sequence is in the context of the whole LOS molecule.

15 Thus in a preferred further embodiment, the mimotope may comprise an oligopeptide which is structurally more constrained than a linear form of the oligopeptide. It is thought that peptides which assume fewer conformations or which have their conformations locked are more likely to elicit an immune response because they present to the binding portion of antibodies a structurally constrained epitope.

20 Substituents such as covalent linkages to further peptide chains or intramolecular linkages will structurally constrain the oligopeptide. For example, the oligopeptide may form part of the primary structure of a larger polypeptide containing the amino acid sequence of the oligopeptide. Preferably, the oligopeptide comprises a cyclic peptide, as discussed in further detail below.

25 Other substituents include covalent linkages to other moieties such as macromolecular structures including biological and non-biological structures. Examples of biological structures include carrier proteins such as those described below for enhancing the immunogenicity of the mimotope. Examples of non-biological structures include lipid vesicles such as micelles and the like.

30 In a preferred embodiment, the oligopeptide comprises a cyclic peptide. Use of a cyclic peptide. Typically, the cyclic peptide comprises a cyclised portion, which cyclised portion preferably comprises an amino acid sequence, the terminal amino acids of which are linked together by a covalent bond. The covalent bond is conveniently a disulphide bridge, such as found between cysteine residues. The

WO 02/28888

PCT/EP01/11409

8

cyclised portion typically comprises a nonapeptide and this nonapeptide can conveniently form part of the amino acid sequence which is flanked by the amino acids which are linked by the covalent bond to form the cyclised portion.

5 Examples of preferred cyclised peptides which contain a pair of cysteine residues to allow the formation of a disulphide bridge are SEQ ID NO:141-280, 297-301 (and retro, inverso, or retroinverso variants thereof, as defined above).

As described above, the large number of peptide mimotopes identified by the phage display technique allows the identification of patterns which define an epitope (or part of an epitope) of a mimotope of L3,7,9 LOS. Accordingly a further aspect of
10 the invention is peptide mimotopes of L3,7,9 LOS comprising the amino acid sequence (either linear or cyclised): WY; PP; AP; PY; PPY; PPF; PPW; APP; WYS; WYT; LWY; GGY; GPY; PPYD (a preferred motif); PPF; FDPP; GGYL; PPWD; SLWY; PXWY; WYXXP; YXY; PWST; EKKXF or WXY (where each X is the same or different and is an amino acid, preferably a naturally-occurring amino acid).

15 In a preferred embodiment, the peptides incorporating the above identified epitopes or peptidic mimotopes of the present invention will be of a small size. It is envisaged that peptidic mimotopes, therefore, should be less than 100 amino acids in length, preferably shorter than 75 amino acids, more preferably less than 50 amino acids, and most preferable within the range of 4 to 25 amino acids long. In a specific
20 embodiment the peptide is 9 amino acids in length.

It will be apparent to the man skilled in the art that techniques may be used to confirm the status of a specific construct as a mimotope suitable for use in a vaccine against meningococcus. Such techniques include the following: the putative
25 mimotope can be assayed to ascertain the immunogenicity of the construct, in that antisera raised by the putative mimotope cross-react with the native L3,7,9 LOS molecule, and are also functional in bactericidal assays against *N. meningitidis* of the L3,7,9 immunotype. Typically bactericidal assays are performed as described in Example 1.4. They may also be done using standard opsonophagocytosis experiments in an animal model such as the infant rat.

30 In one embodiment of the present invention at least one peptide as hereinbefore described, incorporating a peptide epitope or mimotope, is linked to carrier molecules to form immunogens for vaccination protocols. The peptides may be linked via chemical covalent conjugation or by expression of genetically engineered fusion partners, optionally via a linker sequence.

WO 02/28888

PCT/EP01/11409

9

The covalent coupling of the peptide to the immunogenic carrier can be carried out in a manner well known in the art. Thus, for example, for direct covalent coupling it is possible to utilise a carbodiimide, glutaraldehyde or (N-[γ-maleimidobutyryloxy]) succinimide ester, utilising common commercially available heterobifunctional linkers such as CDAP and SPDP (using manufacturers instructions). After the coupling reaction, the immunogen can easily be isolated and purified by means of a dialysis method, a gel filtration method, a fractionation method etc.

The types of carriers used in the immunogens of the present invention will be readily known to the man skilled in the art. The function of the carrier is to provide cytokine help in order to help induce an immune response against the peptide of the invention. A non-exhaustive list of carriers which may be used in the present invention include: Keyhole limpet Haemocyanin (KLH), serum albumins such as bovine serum albumin (BSA), inactivated bacterial toxins such as tetanus or diphtheria toxins (TT and DT), or recombinant fragments thereof (for example, Domain 1 of Fragment C of TT, or the translocation domain of DT, CRM197, or the purified protein derivative of tuberculin (PPD). Alternatively the mimotopes or epitopes may be directly conjugated to liposome carriers, which may additionally comprise immunogens capable of providing T-cell help. Preferably the ratio of peptides to carrier is in the order of 1:1 to 20:1, and preferably each carrier should carry between 3-15 peptides.

In an embodiment of the invention a preferred carrier is Protein D (an IgD-binding protein) from *Haemophilus influenzae* (WO 91/18926, EP 0 594 610 B1). In some circumstances, for example in recombinant immunogen expression systems it may be desirable to use fragments of protein D, for example Protein D 1/3rd (comprising the N-terminal 100-110 amino acids of protein D (WO 99/10375)).

Another preferred method of presenting the peptides of the present invention is in the context of a recombinant fusion molecule. For example, EP 0 421 635 B describes the use of chimeric hepadnavirus core antigen particles to present foreign peptide sequences in a virus-like particle. As such, immunogens of the present invention may comprise peptides presented in chimeric particles consisting of hepatitis B core antigen. Additionally, the recombinant fusion proteins may comprise

WO 02/28888

10

PCT/EP01/11409

the mimotopes of the present invention and a carrier protein, such as NSI of the influenza virus.

Alternatively, the peptides of the present invention could be inserted within or substitute a surface-exposed loop of an outer membrane protein (preferably of meningococcal origin, for example PorA, PorB, PilC, TbpA, FrpB or LbpA). This has the advantage of constraining the peptide into a shape that can mimic the LOS epitope. Additionally, this may be advantageous in terms of administering the immunogen to a host in an outer membrane vesicle preparation (or bleb preparation) from a meningococcal strain expressing the immunogen. Such an improved bleb preparation is a further aspect of the invention.

For any recombinantly expressed protein which forms part of the present invention, a nucleic acid sequence which encodes said immunogen also forms an aspect of the present invention. Additionally, DNA sequences encoding any aforementioned peptide or mimotope of the present invention are further aspects.

DNA molecules, for instance plasmids, comprising the DNA sequences of the present invention may be used as an immunogen in the manner described by Kieber-Emmons et al. (Journal of Immunology 2000 165:623-627). Such a strategy may advantageously trigger a cross-reactive Th1 immune response against the LOS in the host. A vaccine comprising such DNA molecules, and the use of such a vaccine for the treatment or prevention of meningococcal disease are further aspects of the invention.

Peptides used in the present invention can be readily synthesised by solid phase procedures well known in the art. Suitable syntheses may be performed by utilising "T-boc" or "F-moc" procedures. Cyclic peptides can be synthesised by the solid phase procedure employing the well-known "F-moc" procedure and polyamide resin in the fully automated apparatus. Alternatively, those skilled in the art will know the necessary laboratory procedures to perform the process manually. Techniques and procedures for solid phase synthesis are described in 'Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach' by E. Atherton and R.C. Sheppard, published by IRL at Oxford University Press (1989). Alternatively, the peptides may be produced by recombinant methods, including expressing nucleic acid molecules encoding the mimotopes in a bacterial or mammalian cell line, followed by purification of the expressed mimotope. Techniques for recombinant expression of peptides and proteins are known in the art, and are described in Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook et al., *Molecular*

WO 02/28888

11

PCT/EP01/11409

cloning, a laboratory manual, 2nd Ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989).

The monoclonal antibodies of the invention, and pharmaceutical compositions comprising them, form part of the present invention. These antibodies (H44/24, H44/58, H44/70, H44/78 and 4BE12C10) are capable of being used in passive prophylaxis or therapy, by administration of the antibodies into a patient, for the amelioration or prevention of meningococcal disease. These antibodies are preferably made from a hybridoma. The H44/24, H44/58, H44/70 and H44/78 hybridomas of the invention have been deposited as Budapest Treaty patent deposit at ECACC (European Collection of Cell Cultures, Vaccine Research and Production Laboratory, Public Health Laboratory Service, Centre for Applied Microbiology Research, Porton Down, Salisbury, Wiltshire, SP4 OJG, UK) on 22/9/00 under Provisional Accession No. 92209, 92210, 92211, and 92212, respectively. The antibodies produced by these hybridomas are further defined by the DNA sequence which encodes their light and heavy chains as recited in SEQ ID NO:281-288. The 4BE12C10 antibody can be obtained from the National Institute of Biological Standards and Control, Blanche Lane, South Mimms, Potters Bar, Herts, EN6 3QG, UK. The antibodies may be humanised or CDR grafted for therapeutic use using the sequences of SEQ ID NO:281-288 and techniques known in the art [see, for example, Holliger and Bohlen (1999) *Cancer Metastasis Rev.* 18:411-9, Gavilondo and Larrick (2000) *Biotechniques* 29:128-32, 134-6, 138, and Kipriyanov and Little (1999) *Mol. Biotechnol.* 12:173-201]. The term "antibody" herein is used to refer to a molecule having a useful antigen binding specificity. Those skilled in the art will readily appreciate that this term may also cover polypeptides which are fragments of the monoclonal antibodies of the invention which can show the same or a closely similar functionality. Such antibody fragments or derivatives are intended to be encompassed by the term antibody as used herein.

Mimotopes of L3,7,9 LOS that are capable of binding to the monoclonal antibodies of the invention, and immunogens comprising these mimotopes, form an important aspect of the present invention. Vaccines comprising mimotopes that are capable of binding to these antibodies are useful in the treatment or prevention of meningococcal disease.

WO 02/28888

12

PCT/EP01/11409

Also forming an important aspect of the present invention is the use of the monoclonal antibodies of the invention in the identification of novel mimotopes of meningococcal L3,7,9 LOS, for subsequent use as an immunogen.

5 The present invention provides the use of novel peptides encompassing epitopes or mimotopes of the present invention (as defined above), in the manufacture of pharmaceutical compositions for the prophylaxis or therapy of meningococcal disease. Immunogens comprising the mimotope or peptide of the present invention and a carrier molecule are also provided for use in vaccines for the immunoprophylaxis or therapy of meningococcal disease. Accordingly, the
10 mimotopes, peptides or immunogens of the present invention are provided for use in a medicament, and in the medical treatment or prophylaxis of meningococcal disease. Accordingly, there is provided a method of treatment of meningococcal disease comprising the administration to a patient suffering from or susceptible to said disease, of a vaccine or medicament of the present invention.

15 Vaccines of the present invention may also include suitable excipients or diluents. Advantageously, an adjuvant is also included. Suitable adjuvants for vaccines of the present invention comprise those adjuvants that are capable of enhancing the antibody responses against the immunogen. Adjuvants are well known in the art (Vaccine Design - The Subunit and Adjuvant Approach, 1995,
20 Pharmaceutical Biotechnology, Volume 6, Eds. Powell, M.F., and Newman, M.J., Plenum Press, New York and London, ISBN 0-306-44867-X). Preferred adjuvants for use with immunogens of the present invention include aluminium or calcium salts (for example hydroxide or phosphate salts). Other adjuvants include saponin adjuvants such as QS21 (US 5,057,540) and 3D-MPL (GB 2220 211).

25 The vaccines of the present invention will be generally administered for both priming and boosting doses. It is expected that the boosting doses will be adequately spaced, or preferably given yearly or at such times where the levels of circulating antibody fall below a desired level. Boosting doses may consist of the peptide in the absence of the original carrier molecule. Such booster constructs may comprise an
30 alternative carrier or may be in the absence of any carrier.

The vaccine preparation of the present invention may be used to protect or treat a mammal susceptible to, or suffering from meningococcal disease, by means of administering said vaccine via systemic or mucosal route. These administrations may include injection *via* the intramuscular, intraperitoneal, intradermal, transdermal or

WO 02/28888

13

PCT/EP01/11409

subcutaneous routes; or *via* mucosal administration to the oral/alimentary, respiratory, genitourinary tracts.

The amount of protein, peptide(s) or conjugated peptide(s) in each vaccine dose is selected as an amount which induces an immunoprotective response without significant, adverse side effects in typical vaccinees. Such amount will vary depending upon which specific immunogen is employed and how it is presented. Generally, it is expected that each dose will comprise 1-1000 µg of protein/peptide, preferably 1-500 µg, preferably 1-100 µg, of which 1 to 50µg is the most preferable range. An optimal amount for a particular vaccine can be ascertained by standard studies involving observation of appropriate immune responses in subjects. Following an initial vaccination, subjects may receive one or several booster immunisations adequately spaced.

Aspects of the present invention may also be used in diagnostic assays. For example, the peptides or mimotopes of the present invention could be used to detect antibodies against L3,7,9 in the serum of a patient. Likewise the monoclonal antibodies of the invention could be used for detecting the presence of L3,7,9 immunotype meningococcus in a sample from a patient.

Vaccine preparation is generally described in *New Trends and Developments in Vaccines*, edited by Voller et al., University Park Press, Baltimore, Maryland, U.S.A. 1978. Conjugation of proteins to macromolecules is disclosed by Likhite, U.S. Patent 4,372,945 and by Armor et al., U.S. Patent 4, 474,757.

An independent aspect of the invention is a vaccine against serogroup B, C, Y, or W-135 meningococci, which comprises a mimotope of a surface L3,7,9 LOS of *N. meningitidis* and a mimotope of a surface L2 LOS of *N. meningitidis*. Optionally, this vaccine may advantageously also comprise one or more plain or conjugated meningococcal capsular polysaccharides selected from a group comprising: C, Y and W-135.

A further aspect is a vaccine against serogroup A meningococci, which comprises a mimotope of a surface L3,7,9 LOS of *N. meningitidis* and a mimotope of a surface L10 LOS of *N. meningitidis*. Optionally, this vaccine may advantageously also comprise plain or conjugated *N. meningitidis* serogroup A capsular polysaccharide.

WO 02/28888

14

PCT/EP01/11409

A further aspect still is a vaccine against serogroup A, B, C, Y, or W-135 meningococci, which comprises a mimotope of a surface L3,7,9 LOS of *N. meningitidis*, a mimotope of a surface L10 LOS of *N. meningitidis* and a mimotope of a surface L2 LOS of *N. meningitidis*. Optionally, this vaccine may advantageously also comprise one or more plain or conjugated meningococcal capsular polysaccharides selected from a group comprising: A, C, Y and W-135.

The inventors have found that the above formulations prove extremely effective in the immunoprotection of a mammalian host against the majority of strain variants encompassed within the above mentioned groups of meningococcal serotypes. Preferably, the mimotopes of the invention can be used to immunise a host such that antibodies are produced which specifically cross-react with LOS, and preferably cross-react with whole cell bacteria containing the LOS.

Each mimotope may be either peptidic or non-peptidic. Non-peptidic mimotopes are envisaged to be of a similar size, in terms of molecular volume, to their peptidic counterparts. Preferably, the mimotopes are antigenically cross-reactive with a monoclonal antibody of high specificity and/or affinity to the respective surface LOS. Preferably one or both mimotopes in the above vaccine combinations comprise a peptide epitope.

The peptide epitopes may be obtainable by screening a peptide library with a monoclonal antibody specific (and/or of high affinity) to the respective surface LOS. For the purposes of this invention, 'high affinity' typically means having an affinity constant of at least $10^5 M^{-1}$, preferably a least $10^6 M^{-1}$.

Monoclonal antibodies of high specificity and/or affinity to LOS may be prepared using outer membrane complexes as immunogens and detecting antigens according to established protocols (see for example Zollinger *et al.* 1983. I&L 40:257-264; Adbillahi *et al.* 1988. Microbial Pathogenesis 4:27-32).

The mimotope preferably comprises a peptide epitope which may be identified by screening a peptide library with the monoclonal antibody. Typically, a peptide library such as a heptapeptide or a nonapeptide (see above) library preferably containing all possible amino acid sequences should be used to give the greatest diversity of potential epitopes against which antigenic cross-reactivity with the monoclonal antibody can be assessed. Typically, a random peptide library of this nature is used.

WO 02/28888

15

PCT/EP01/11409

Preferably the mimotopes are obtainable using cross-reactivity with the following monoclonal antibodies as a selection means: H44/24, H44/58, H44/70, H44/78, 4BE12C10, 4A8-B2 or 9-2-L397 for L3,7,9 LOS mimotopes; F1-5H 5/ID9 for L2 LOS mimotopes; and 5B4-F9-B10 for L10 LOS mimotopes.

5 H44/24, H44/58, H44/70, H44/78, and 4BE12C10 antibodies are described above. 4A8-B2, 9-2-L397, F1-5H 5/ID9 and 5B4-F9-B10 monoclonal antibodies may be obtained from the National Institute of Biological Standards and Control, Blanche Lane, South Mimms, Potters Bar, Herts, EN6 3QG, UK and may also be obtained through ECACC.

10 The peptide mimotopes of the above formulations may be conformationally constrained as described above. The mimotopes of each respective formulation may be contained within a single molecule. They may be linked to the same or different carrier molecules as described above. For instance they may be inserted within or substitute the same or different exposed loop region(s) of the same outer membrane
15 protein of meningococcus (as described above).

The L3,7,9 mimotopes used in the formulations are preferably the mimotopes and peptides of the invention described above. Alternatively the mimotope of the L3,7,9 LOS can comprise a peptide disclosed in WO 00/25814, preferably selected from: IHRQGIH; HIGQRHI; LPARTEG; GETRAPL; APARQLP; PLQRAPA;
20 KQAPVHH; HHVPAQK; LQAPVHH; HHVPAQL; LPSIQLP; PLQISPL; NELPHKL; LKHPLEN; KSPSMTL; LTMSPSK; AGPLMLL; LLMLPGA; WSPILLD DLLIPSW; LSMHPQN; NQPMSL; HSMHPQN NQPMSH; SMYGSYN; NYSGYMS; TNHSLYH; HYLHNT; HAIYPRH; HRPYIAH; TTYSRFP; PFRSYTT; TDSLRL; LLRLSDT; SFATNIP; and PINTAFS.

25 A preferred embodiment of the invention is a global vaccine which is particularly beneficial in the treatment or prevention of meningococcal disease comprising a mimotope of a surface L3,7,9 LOS of *N. meningitidis*, a mimotope of a surface L10 LOS of *N. meningitidis*, and a mimotope of a surface L2 LOS of *N. meningitidis*; optionally also comprising one or more plain or conjugated
30 meningococcal capsular polysaccharides selected from a group comprising: A, C, Y and W-135.

A further preferred embodiment of the invention is a global vaccine which is particularly beneficial in the treatment or prevention of meningitis comprising the vaccine combinations described above (preferably that containing L3,7,9, L2 and L10

WO 02/28888

16

PCT/EP01/11409

peptide mimotopes, and optionally one or more meningococcal capsular polysaccharides), and one or more plain or conjugated pneumococcal capsular polysaccharide antigens. The pneumococcal capsular polysaccharide antigens are preferably selected from serotypes 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F and 33F (most preferably from serotypes 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F and 23F).

Yet another preferred combination of the invention is a global vaccine which is particularly beneficial in the treatment or prevention of meningitis comprising one or more (2 or 3) peptide mimotopes from the list consisting of L3,7,9, L2 and L10, and a conjugated *H. influenzae* b capsular polysaccharide.

The above vaccine combinations are suitable for use as a medicament, and may be used in the manufacture of a medicament for the treatment or prevention of meningococcal disease. A method for treating a patient suffering from or susceptible to meningococcal disease, comprising the administration of the above vaccine combinations to the patient is a further aspect of the invention.

WO 02/28888

17

PCT/EP01/11409

EXAMPLES

The examples below were carried out using standard techniques, which are well known and routine to those of skill in the art, except where otherwise described in detail. The examples are illustrative, but do not limit the invention.

Example 1: Monoclonal antibodies directed against *N. meningitidis* L3,7,9 LOS**1.1 Isolation and functional characterization of the monoclonal antibodies*****Immunization***

Neisseria meningitidis B cells (heat inactivated cells from the H44/76 isolate, B:15:P1.7, 16, Los 3,7,9) were injected three times in BALB/C mice on days 0, 21 and 42 (5 animals/group). Cells, formulated in an oil-in-water/3D-MPL/QS21 adjuvant (as described in WO 95/17210), were injected both by the subcutaneous and intraperitoneal routes. Animals were evaluated 7 days after the third injection for antibody response in a whole cell Elisa.

Fusion procedure to obtain specific hybridoma cell lines

On days -10 and -7 before fusion, Sp2/0 Ag 14 myeloma cells were thawed and cultivated in a flask in order to reach and maintain a 10^5 cells/ml culture up to the fusion day (day 0). On day -1, myeloma cell concentration was adjusted to 10^5 cells/ml. At the same time, plates of feeder cells using peritoneal macrophages were prepared (10^5 macrophages/ml; 100 μ l/well).

On day 0, the spleen of the selected mouse was taken (under sterile conditions) and perfused with 10 to 20 ml of DMEM medium inside a Petri dish. Cells were counted (using a Sysmex counter and 2 drops of "Quicklyser" to lyse red cells) and centrifuged for 10 min. at 150-200 g (1000 rpm using the Beckman GPR centrifuge). Sp2/0 and spleen cells were washed, counted and centrifuged for 10 min at 150-200 g before mixing in a 1:5 ratio (Sp2/0 : spleen cells). The 1:5 mixing ratio was done in 25 ml DMEM and centrifuges for 5 min at 400 g (1500 rpm using the GPR centrifuge, 50-ml Falcon tube). The supernatant was discarded and the tube slightly tapped to put the pellet in suspension. The cells were kept as much as possible at 37°C, in a water-

WO 02/28888

18

PCT/EP01/11409

bath. One ml of PEG solution (PEG 4000 at 40 % v/v with 5 % de DMSO at pH 8.0-8.2), kept at 37°C, was slightly added (drop by drop) within 1 minute, while the tube was slightly shaken. The temperature of the cells had to be as close as possible to 37°C. From this PEG step, cells were manipulated gently. After 30 sec to 1 min, 1 ml of DMEM was added within 1 min, then 2 ml of DMEM within 2 min., and 4 ml DMEM within 4 min.. Finally, the tube was filled with DMEM + additives in order to reach a volume of about 20 ml., and was centrifuged for 10 min. at 400 g.

Afterwards, the pellet was suspended gently in 15 to 25 ml of complete medium (DMEM, FCS + HS (Volker), HAT and Nutridoma) with a 25 ml pipet in order to break the aggregates.

Incubation of the tube was done for 2 h. at 37°C in a CO₂ incubator. The cells were then diluted to an adequate concentration (2.5 10⁴ to 10⁵ cells/well) and 100 µl of cells were plated in 96 wells microplates previously inoculated with feeder cells.

1.2 Recognition of cell surface epitopes by whole cell ELISA

The homologous H44/76 MenB strain (B:15:P1.7, 16) was used as coated bacteria to detect specific anti-*Neisseria meningitidis* antibodies in animal sera, as well as in supernatants of hybridoma cultures after splenocyte fusion. Briefly, microtiter plates (Maxisorp, Nunc) were coated with 100 µl of a 1/10 dilution (in PBS) with a H44/76 bacteria solution from a 6 hours culture, in which bacteria were killed by 400 µg/ml tetracycline. Plates were incubated at 37°C for at least 16 hours until plates were completely dried. Then, they were washed three times with 300 µl of 150 mM NaCl - 0.05 % Tween 20. Afterwards, plates were overcoated with 100 µl of PBS-0.3 % casein and incubated for 30 min at room temperature with shaking. Plates were washed again using the same procedure before incubation with antibodies. Animal sera were serially two-fold diluted in PBS-0.3 % Casein 0.05 % Tween 20 and put into the microplates (12 dilutions starting at the 1/100 dilution) before incubation at room temperature for 30 min with shaking, before the next identical washing step. For screening of the monoclonal antibodies, supernatants were put as such (non diluted) in the microplates. Anti-mouse immunoglobulins (rabbit Ig, Dakopatts E0413) conjugated to biotin is used at 1/2000 in PBS - 0.3 % casein - 0.05 % Tween 20 to detect specific antibodies

WO 02/28888

19

PCT/EP01/11409

against several antigens at the cell surface. After the last washing step (as before), plates were incubated with a streptavidin-peroxidase complex solution diluted at 1/4000 in the same solution for 30 min at room temperature under shaking conditions. For characterization of the mabs, a few other *Neisseria meningitidis* B strains were also used as coated bacteria using the same procedure as described above: strains M97250 687 (B:4:P1.15) and M97252078 isolated in UK from human beings. Transformed H44/76D cells lacking the capsular polysaccharide and having a mutated LOS were also used by whole cell Elisa to characterize these mabs (see the next paragraph). Reactivity of the antibodies in whole cell ELISA ranged from no detected signal (-) to strong reactivity (+++).

1.3 Strain transformation

The plasmid pMF121 (Frosch *et al.*, 1990) was used to construct a *Neisseria meningitidis* serogroup B strain lacking the capsular polysaccharide. This plasmid contains the erythromycin resistance gene flanked by recombination regions corresponding to the ends of gene cluster encoding the group B polysaccharide (B PS) biosynthetic pathway. Deletion of the B PS resulted in loss of expression of the group B capsular polysaccharide as well as a deletion in the active copy of *galE* leading to the synthesis of galactose-deficient lipo-oligosaccharide (LOS).

Neisseria meningitidis serogroup B strain H44/76 (B:15:P1.7, 16; LOS 3,7,9) was used for transformation. After an overnight CO₂ incubation on Muller-Hinton (MH) plate (without erythromycin), cells were collected in liquid MH containing 10 mM MgCl₂ (2 ml were used per MH plate) and diluted up to an OD of 0.1 (550 nm). To this 2 ml solution, 4 µl of the plasmid pMF121 stock solution (0.5 µg/ml) were added for a 6 hours incubation period at 37°C (with shaking). A control group was done with the same amount of *Neisseria meningitidis* bacteria, but without addition of plasmid. After the incubation period, 100 µl of culture, as such, at 1/10, 1/100 and 1/1000 dilutions, were put in MH plates containing 5, 10, 20, 40 or 80 µg erythromycin /ml before incubation for 48 hours at 37°C.

Colony blotting:

After plate incubation, transformants were selected and grown onto erythromycin/ MH plates (10 to 80 µg erythromycin/ml). The day after, all the visible

WO 02/28888

20

PCT/EP01/11409

colonies were placed on new MH plates without erythromycin in order to let them grow. Then, they were transferred onto nitrocellulose sheets (colony blotting) and probed for the presence of B polysaccharide. Briefly, colonies were plotted onto a nitrocellulose sheet and rinsed directly in PBS-0.05 % Tween 20 before cell
5 inactivation for 1 hour at 56°C in PBS-0.05% Tween 20 (diluant buffer). Afterwards, the membrane was overlaid for one hour in the diluant buffer at room temperature (RT). Then, membranes were washed again for three times 5 minutes in the diluant buffer before incubation with the anti-B PS 735 Mab (From Dr Frosch, via Boehringer) diluted at 1/3000 in the diluant buffer for 2 hours at RT. After a new
10 washing step (3 times 5 minutes), the monoclonal antibody was detected with a biotinylated anti-mouse Ig from Amersham (RPN 1001) diluted 500 times in the diluant buffer (one hour at RT) before the next washing step (as described above). Afterwards, sheets were incubated for one hour at RT with a solution of streptavidin-peroxidase complex diluted 1/1000 in the diluant buffer. After the last three washing
15 steps using the same method, nitrocellulose sheets were incubated for 15 min in the dark using the revelation solution (30 mg of 4-chloro-1-naphtol solution in 10 ml methanol plus 40 ml PBS and 30 mcl of H₂O₂ 37% from Merck). The reaction was stopped with a distilled water-washing step. Clones lacking reactivity with the anti-B PS Mab were further characterized by whole cell ELISA.

20

Whole cell ELISA:

Whole cell ELISAs were also done using the transformed colonies and the wild type strain (H44/76) as coated bacteria (20 µg protein/ml), and a set of different monoclonal antibodies used to characterize *Neisseria meningitidis* strains. The
25 following Mabs were tested: anti-B PS (735 from Dr Frosch), and the other Mabs from the National Institute for Biological Standards and Control, London: anti-B PS (Ref 95/750) anti-P1.7 (A-PorA, Ref 4025), anti-P1.16 (A-PorA, Ref 95/720), anti-Los 3,7,9 (A-LPS, Ref 4047), anti-Los 8 (A-LPS, Ref 4048), and anti-P1.2 (A-PorA Ref 95/696).

30 Microtiter plates (Maxisorp, Nunc) were coated with 100 µl of the recombinant meningococcal B cells solution overnight (ON) at 37°C at around 20 µg/ml in PBS. Afterwards, plates are washed three times with 300 µl of 150 mM NaCl - 0.05 % Tween 20, and were overlaid with 100 µl of PBS-0.3 % Casein and incubated for 30 min at room temperature with shaking. Plates were washed again

WO 02/28888

21

PCT/EP01/11409

- using the same procedure before incubation with antibodies. Monoclonal antibodies (100 μ l) were used at different dilutions in PBS-0.3 % Casein 0.05 % Tween 20 and put onto the microplates before incubation at room temperature for 30 min with shaking, before the next identical washing step. 100 μ l of the anti-mouse Ig (from rabbit, Dakopatts E0413) conjugated to biotin and diluted at 1/2000 in PBS-0.3 % Casein - 0.05 % Tween 20 were added to the wells to detect bound monoclonal antibodies. After the washing step (as before), plates were incubated with a streptavidin-peroxidase complex solution (100 μ l of the Amersham RPN 1051) diluted at 1/4000 in the same working solution for 30 min at room temperature under shaking conditions. After this incubation and the last washing step, plates are incubated with 100 μ l of the chromogenic solution (4 mg orthophenylenediamine (OPD) in 10 ml 0.1 M citrate buffer pH4.5 with 5 μ l H₂O₂) for 15 min in the dark. Plates are then read at 490/620 nm using a spectrophotometer.
- 15 Routinely, about 10% of the transformants resulted from double cross-over. Bacterial clone H44/76D lacking reactivity against BPS & LOS but still reactive against P1.7 & P1.16 mAbs was selected for further studies.

1.4 Bactericidal assay

- 20 The bactericidal activity of these monoclonal antibodies was measured. Briefly, the *Neisseria meningitidis* serogroup B (H44/76 strain as a first strain) is used to determine the bactericidal activity of the antibodies (animal or human sera or monoclonal antibodies). In U-bottom 96 well microplates (NUNC), 50 μ l/well of serial two-fold serum dilutions were incubated with 37.5 μ l/well of the log phase meningococcal suspension adjusted to 2.5 10^8 CFU/ml and incubated for 15 min at 25 37°C with shaking at 210 rpm (Orbital shaker, Forma Scientific). Then, 12.5 μ l of the baby rabbit complement (Pel-freeze Biologicals, US) is added before incubation for one more hour in the same conditions. Afterwards, 10 μ l aliquots of the mixture from each well were spot onto Mueller-Hinton agar plates containing 1% Isovitalex and 1% 30 of heat inactivated Horse serum before overnight incubation at 37°C with 5% CO₂. The day after, colonies are counted for each dilution tested and bactericidal titers determined as the dilution of the serum for 50 % killing, compared with the complement control without serum. By this method, individual colonies can be

WO 02/28888

22

PCT/EP01/11409

counted up to 100 CFU per spot. Titers are expressed as the dilution which induce 50 % killing, calculated by regression analysis.

1.5 Results

5 Table 1 illustrates results obtained with 4 anti-LOS monoclonal antibodies from two fusion experiments with splenocytes from mice immunized with *Neisseria meningitidis* strain H44/76. The LOS specificity of the 4 monoclonal antibodies is supported by their failure to react with the H44/76D (BPS and LOS mutated) strain in whole cell ELISA, whereas these readily reacted with the wild type H44/76 strain.

10 Considering the non-immunogenic nature of the BPS, it is extremely unlikely that these monoclonal antibodies react with the capsular polysaccharide. All 4 monoclonal antibodies exhibited bactericidal activity against the wild type strain H44/76. Monoclonal antibodies H44/24 and H44/58 were shown to cross-react with M97250687 and M97252078 *N. meningitidis* strains by whole cell ELISA.

15

Table 1:

Antibody	Isotype	Bactericidal activity against strain H44/76 (titer)	Recognition of <i>N. meningitidis</i> strains by whole cell ELISA			
			H44/76 (wild type)	H44/76D (mutant)	M97250687	M97252078
H44/24	IgG3	>2560	+++	-	+++	+++
H44/58	IgG1	973	+++	-	+++	++
H44/70	IgM	1884	+++	-	NT	NT
H44/78	IgM	>2560	+++	-	NT	NT

NT. = not tested

20 1.6 Structural characterization of the 4 selected monoclonal antibodies

The primary structure of the monoclonal antibodies was determined by sequencing the cDNA encoding the variable heavy and light chains. To achieve this, total RNA was extracted from the hybridomas producing those 4 monoclonal antibodies. Sequencing has been carried out on RT-PCR products obtained following

25 PCR using primers specific for heavy or light chains.

WO 02/28888

23

PCT/EP01/11409

Extraction of RNA from hybridomas

Extraction is performed on 10^6 cells as determined after counting in a Thoma cell. Cells are centrifuged 10 minutes at 1200RPM and supernatant is removed. Cells are centrifuged again 2 minutes at 1200RPM and all traces of supernatant are removed. Cells are resuspended in 200 μ l RNase-free PBS. RNA extraction is performed with the "High Pure RNA Isolation Kit" (Roche Diagnostics) according to the manufacturer's instructions. Elution is performed in 100 μ l elution buffer.

Reverse transcription

10 10 μ l of the purified RNA were mixed with 1.25 μ g dT15 primer in a 20 μ l final volume. The RNA-primer mix was heated for 10 minutes at 70°C and then cooled to 4°C. The reverse transcription was realized using the following protocol:

In a 0.2ml tube were added:

- 10 μ l of the above annealed primer-RNA mix
- 15 -5 μ l of 0.1M DTT
- 2.5 μ l of dNTPs (10mM each)
- 0.5 μ l RNase inhibitor (10u/ μ l, GibcoBRL)
- 2.5 μ l M-MLV Reverse Transcriptase (200U/ μ l, GibcoBRL)
- 10 μ l RT buffer (5x)
- 20 -H₂O to 50 μ l

This was incubated for 1 hour at 37°C, the enzyme was inactivated for 5 minutes at 95°C and cooled on ice. A tube containing the same components but no M-MLV Reverse Transcriptase was used as a negative control.

25

30 PCR on the cDNA

The primers used for the PCR amplification of the light and heavy chains cDNAs were designed according to Kang *et al.* (Kang, et al. 1991 Methods. A companion to Methods in Enzymology 2(2): 111-118):

WO 02/28888

24

PCT/EP01/11409

Light chain	3' primer	L-Kappa3'	5' GCGCCGCTAGAATTAACACTCATTCTGTTGAA 3'
	5' primers	Lvar 5'-1	5' CCAGTCCGAGCTCGTTGTGACTCAGGAATCT 3'
		Lvar 5'-2	5' CCAGTCCGAGCTCGTTGTGACTCAGCCAGCCGCC 3'
		Lvar 5'-3	5' CCAGTCCGAGCTCGTTGTGACTCAGCCAGTCTCCA 3'
		Lvar 5'-4&7	5' CCAGTCCGAGCTC(G/C)(A/T)GATGAC(A/C)CAGTCTCCA 3'
		Lvar 5'-5&6	5' CCAGATGTGAGCTCGT(G/C)ATGACCCAG(A/T)CTCCA 3'
Heavy chain	5' primers	Hvar 5' 1-8	5' AGGTCCA(A/G)CT(G/T)CTCGAGT(A/T)GG 3'
		Hvar 5' 9	5' AGGTIIAICTCTCGAGT(A/T)GG 3'
	3' primers	HCy 3' 3'	5' GGGGGTACTAGTCTTGGGTATTCTAGGCTC 3'
		HCl 3'	5' ATTGGACTAGTTTCTGCGACAGCTGGAAT 3'

PCR was accomplished as follows:

Mix in a 0.2ml reaction tube:

- 5µl template (RT-PCR product or negative control)
- 5 -5µl reaction buffer (10x)
- 1µl dNTPs (10mM each)
- 1.5µl each primer (20µM stocks)
- 2.5µl REDTaq polymerase (1U/µl, Sigma)
- H₂O to 50µl
- 10 The PCR reaction was performed with the following temperature cycling:
 - 4 min at 94°C
 - 35 times 30 seconds at 94°C
 - 30 seconds at 52°C
 - 1 min at 72°C
- 15 -4 min at 72°C
- 4°C

These reactions were also performed on the negative controls from RT reactions (without M-MLV Reverse Transcriptase) to be sure that the PCR products are obtained from cDNA and not genomic DNA. No PCR products were obtained from those negative controls. The obtained PCR products were purified with the "High Pure PCR Product Purification Kit" (Roche Diagnostics) according to the manufacturer's instructions.

Sequencing of the purified PCR products

- 25 To be sure that no sequence errors occurred because the sequencing was performed on a PCR product, sequencing was done on two independently-obtained PCR products for each cDNA to be sequenced.

Sequencing reactions were performed on 1 µl of the purified PCR products with the "ABI PRISM® BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Kit" according to the manufacturer's instructions (Perkin-Elmer) and analyzed on a ABI PRISM 377 sequencer. Sequences of the light and heavy chains for the 4 monoclonal antibodies are presented in SEQ ID NO:281-288.

Example 2: Isolation of *N. meningitidis* LOS peptidic mimotopes from phage-displayed peptidic libraries

Monoclonal antibodies directed against epitopes on bacterial polysaccharides, as are the above-mentioned antibodies directed against *N. meningitidis* LOS, can be used to screen large repertoires of molecules. Such molecular libraries can chemically different, for example, peptides, peptoids, or nucleotides. Peptidic libraries can be obtained either synthetically (as soluble or support-bound peptides) or biologically (for example as fusions to a cytoplasmic or surface protein). One of the most often used systems is the display of peptides fused to a coat protein of filamentous bacteriophages such as the pIII and pVIII proteins. These libraries are obtained by inserting an oligonucleotide containing a degenerate sequence in the 5' region of the ORF encoding one of these 2 proteins. The peptides expressed at the surface of the phage in fusion with the pIII or pVIII proteins are physically linked to their encoding DNA since the filamentous phages consist of the phage circular single-stranded DNA surrounded by the structural proteins. Two phage-displayed peptidic libraries were used in this work for selection of peptides with five monoclonal antibodies. These two libraries are the nonamer linear and nonamer disulfide-constrained peptide libraries previously described (Felici et al. 1993 Gene 128: 21-27; Luzzago et al. 1993 Gene 128: 51-57). These libraries are constructed in a phagemid, the degenerate oligonucleotides being fused to the gene encoding the major capsid protein, pVIII. After transformation in *E. coli* and superinfection with phage helper, the resulting phage particles contain both recombinant and non-recombinant pVIII proteins, the proportion of recombinant pVIII proteins not being precisely defined. The five monoclonal antibodies used for selection of peptides are the four described above, and the monoclonal antibody 4BE12C10 obtained from Ian Feavers (National Institute for Biological Standards and Control, London).

4BE12C10 was also used to select peptides from a mix of 4 other libraries. These libraries express peptides 14 to 16 amino acids in length fused to the pVIII

WO 02/28888

26

PCT/EP01/11409

protein of the f88-4 filamentous phage. This vector, received from Goerges Smith (Division of Biological Sciences, University Of Missouri-Columbia), has two gene VIII: the wild-type gene and a synthetic recombinant gene under the control of the tac promoter, and is derived from the fd-tet phage (Smith, Virology, 167, 156-165, 1988). After infection of *E. coli*, the resulting phage particles contain both wild-type and recombinant pVIII proteins, the recombinant pVIII protein being a few to 10% of all pVIII proteins. The 4 libraries express peptides that contain two internal cysteines separated by 3, 4, 5 or 6 residues and are called Cys3, Cys4, Cys5 and Cys6, respectively.

10

2.1 Panning procedures

Three cycles of panning were performed. For mAbs H44/24 and H44/58, two procedures were used for immobilisation of phage-antibodies complexes: capture on ProteinA-coated immunoplate (hereunder referred as procedure PA) or capture on ProteinA-coated magnetic beads (hereunder referred as procedure DY). For mAbs H44/70, H44/78 and 4BE12C10, phage-antibodies complexes were recovered by capture on ProteinLA-coated immunoplates.

2.1.1 ProteinA-coated immunoplates (PA) procedure (for H44/24 and H44/58)

During the first cycle, Maxisorp immunoplates (Nunc, Roskilde, Denmark) were coated overnight at 4°C with ProteinA (Sigma, St. Louis, USA) at 10 µg/ml of 0.1 M sodium carbonate (four wells with 100µl ProteinA solution for each mAb to be used). At the same time, a sample of the libraries mix ($5 \cdot 10^{10}$ pfu for each of the two libraries) was incubated overnight at 4°C with 10µg of mAb in the smallest possible volume (typically less than 40µl). The following day, after 1hr saturation (5mg/ml BSA, 0.1µg/ml ProteinA in 0.1M sodium carbonate) and 4 washes with Tris Buffered Saline (TBS, 50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.5) containing Tween20 0.5 % (v/v), the antibody-phages mixes were filled up to 400µl with the washing solution and four 100µl aliquotes were incubated for 3 hours at room temperature on the proteinA-coated dishes. After 10 washes with TBS-Tween20 0.5%, bound phages were eluted for 20 minutes at room temperature with a glycine buffer at pH 2.2. The eluate was immediately neutralized and used for amplification and titration of infectious phage

WO 02/28888

27

PCT/EP01/11409

particles. The *E. coli* strain used for amplification and titration was DH11S (GibcoBRL). For the following cycles of biopanning, the same protocol was used but the amount of mAb was reduced to 1 μ g.

5 **2.1.2 ProteinA-coated magnetic beads (DY) procedure (for H44/24 and H44/58)**

For the first cycle, a sample of the libraries mix ($5 \cdot 10^{10}$ pfu for each of the two libraries) was incubated overnight at 4°C with 10 μ g of mAb in the smallest possible volume (typically less than 40 μ l). The following day, 40 μ l Dynabeads ProteinA (Dyna, Oslo, Norway) were washed 2 times with TBS-Tween, saturated for 1hr (5mg/ml BSA, 0.1 μ g/ml ProteinA in 0,1M sodium carbonate) and washed 2 more times with TBS-Tween. The antibody-phage mixes were filled up to 40 μ l with the washing solution, mixed with the saturated Dynabeads ProteinA and incubated 3 hours at room temperature. After 10 washes with TBS-Tween20 0.5%, bound phages were eluted 20 minutes at room temperature with a glycine buffer at pH 2.2. The eluate was treated as in Example 2.1.1. For the following cycles of biopanning, the same protocol was used but the amount of mAb was reduced to 1 μ g.

15 **2.1.3 ProteinLA-coated immunoplates procedure (for H44/70, H44/78 and 4BE12C10)**

20 The protocol used for this procedure is the same that for the ProteinA-coated immunoplate procedure except that ProteinA was replaced by ProteinLA (Clontech, Palo Alto, USA) and that non-purified concentrated hybridoma supernatant was used.

25 **2.1.4 Selection from the Cys3 to Cys6 library mix with monoclonal antibody 4BE12C10.**

The protocol was similar to the PA procedure discussed above in 2.1.1, except the following:

- 3 $\cdot 10^{10}$ TU of each library were used in the first panning
- monoclonal antibody 4BE12C10 was used in three different amounts for the three panning cycles: 10 μ g for the first cycle, 1 μ g for the second cycle and 0.1 μ g for the third cycle.

- ProteinG (10µg/ml) was used to capture the phage-antibody complexes in the first and third panning rounds, and ProteinA (10µg/ml) was used to capture the phage-antibody complexes in the second panning round.

5 2.2 Amplification of phages

Phage eluates from the nonamer libraries were amplified by infection of *E. coli* (DH11S) and superinfection with helper phage M13KO7. A sample of the eluates (450µl out of the total 475µl of the first panning round or 100µl out of the total 475µl of the second or third panning rounds) was mixed with 1ml of terrific broth cells (DH11S grown in terrific broth at OD600nm between 0.125 and 0.25 at dilution 10). Bacteria were kept 15 minutes at 37°C with slow agitation just before and after infection. Infected bacteria were then grown 30 minutes at 37°C with strong agitation and then spread on large LB plates supplemented with 100µg/ml ampicillin (LB Amp). The next day, the plates were scraped and a sample was added to 100ml LB Amp to reach 0.05 OD600 nm. This culture was grown to a OD600nm between 0.2 and 0.25, the agitation was slowed down for 10 minutes and superinfection by helper phage was performed by adding M13KO7 at a MOI (multiplicity of infection) of 20. At this time, IPTG was added at a final concentration of 1mM. The culture was incubated 15 minutes at 37°C without agitation and grown 5 hours at 37°C with strong agitation. Phages were recovered by precipitation of cleared supernatant with PEG-NaCl and titrated by infection of *E. coli* (DH11S) and spreading on LB Amp plates.

Phage eluates from the Cys3/4/5/6 libraries were amplified by infection of *E. coli* (K91kan). A sample of the eluates (450µl out of the total 475µl of the first panning round or 100µl out of the total 475µl of the second or third panning rounds) was mixed with 1ml of terrific broth cells (K91kan grown in terrific broth at OD600nm between 0.125 and 0.25 at one tenth dilution). Bacteria were kept 15 minutes at 37°C with slow agitation just before and after infection. Infected bacteria were then grown 30 minutes at 37°C with strong agitation in LB medium supplemented with 0.2µg/ml tetracycline. Tetracycline was then added up to 20µg/ml and grow overnight at 37°C with strong agitation. Phages were recovered by precipitation of cleared supernatant with PEG-NaCl and titrated by infection of *E. coli* (K91kan) and spreading on LB Tet plates.

WO 02/28888

29

PCT/EP01/11409

2.3 Screening by immunoblottings

2.3.1 Screening by colony immunoblotting

Screening by colony immunoblotting was done using *E. coli* (DH11S) infected with phage obtained after 3 panning cycles. Seven phage samples were used: one sample of phage selected with each of the monoclonal antibodies H44/70, H44/78 and 4 BE12C10, and two samples for each of the monoclonal antibodies H44/24 and H44/58. In the latter case, the two samples correspond to the two methods used for the pannings (referred as procedures PA and DY above).

Petri dishes containing ampicillin (100µg/ml) and 1 mM IPTG were used for spreading the phage-infected *E. coli* onto. Fresh colonies were blotted with nylon amphoteric membranes (Porablot NY amp, Macherey-Nagel, Düren, Germany) for 2 hours at 37°C. The membranes were subsequently saturated with 5% skimmed milk in TBS (2 hours at 37°C) and incubated with the corresponding monoclonal antibody. The binding of the monoclonal antibody to the recombinant pVIII proteins was revealed using GAM-HRP (Dako, Denmark) diluted 1000 times in saturation solution. The presence of the secondary antibody was in turn detected using HRP color development reagent (Bio-Rad, Hercules, USA).

2.3.2 Screening by culture supernatant immunoblotting

In the case of the screening of the two nonamer libraries with monoclonal antibody 4BE12C10, no positive clone could be revealed by the colony immunoblotting technique from either the second or third round of panning. In order to try to isolate some individual positive clones, a new experiment was set up which consisted of isolating 48 clones from each panning round and producing phages from these isolated clones in duplicate in a 96-well format allowing a quick isolation of positive clones in a culture supernatant immunoblot experiment. Culture and phage production by superinfection with M13KO7 helper phage were carried out as described in point 2.2 except that culture volumes were reduced to 500 µl to afford the 96-well format. Hundred microlitre of the culture supernatants were directly blotted on a nitrocellulose membrane in a 96-well format dot blotting device (BioRad) and treated as membranes of the colony immunoblotting experiment.

Monoclonal antibody binding was revealed by a chemiluminescent detection technique: membrane was incubated 10 minutes with LumiLight Plus substrate (Roche Diagnostics) at room temp. in the dark, and light emission was detected by

WO 02/28888

30

PCT/EP01/11409

putting the membrane in contact with an autoradiography film for 30 seconds to a few minutes in an autoradiography cassette. A similar blot was incubated with an anti-phage serum to check for the presence of phage particles in similar amounts in all phage-containing wells.

5

2.4 Sequence determination of selected peptides

The sequence of the selected peptides was determined using a two-step procedure. In the first step, the recombinant gene 8 was amplified by polymerase chain reaction (PCR) using oligonucleotides annealing upstream (5'-ATTCTAGAGATTACGCC-3' for the nonamer libraries or 5'-CCCATCCCCCTGTTGACAAT-3' for the Cys3/4/5/6 libraries) and downstream (5'-TGCTGCAAGGCGATTAAGTT-3' for the nonamer libraries or 5'-ATTAGGCGGGCTGGGTATCT-3' for the Cys3/4/5/6 libraries) of the region coding for the presented peptide. The PCR were carried out with the *Tth* thermostable DNA polymerase (BIOTOOLS, Madrid, Spain) in duplicate in order to check for possible risks or errors during amplification. The PCR products were sequenced using with the M13-40 Forward primer (5'-GTTTCCAGTCACGAC-3') (for peptides derived from the nonamer libraries) or with 5'-CATCGCTCGTATAATGT-3' (for peptides derived from the Cys3/4/5/6 libraries) using the "ABI PRISM® BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Kit" according to the manufacturer's instructions (Perkin-Elmer) and analyzed on a ABI PRISM 377 sequencer.

- 148 different sequences were obtained distributed as follows:
- 1 peptide selected with monoclonal antibodies H44/24, H44/58, H44/70 and H44/78 (sequence N° 1)
 - 11 peptides selected only with monoclonal antibody H44/24 (either by procedure DY or procedure PA) (sequences N° 2 to 12)
 - 30 peptides selected only with monoclonal antibody H44/58 (either by procedure DY or procedure PA) (sequences N° 13 to 43, except 17)
 - 1 peptide selected with monoclonal antibody H44/58 (either by procedure DY or procedure PA) and monoclonal antibody H44/70 (sequence N° 17)
 - 3 peptides selected with monoclonal antibodies H44/70 and H44/78 (sequences N° 44 to 46)

- 28 peptides selected only with monoclonal antibody H44/70 (sequences N° 47 to 74)
 - 21 peptides selected only with monoclonal antibody H44/78 (sequences N° 75 to 95)
- 5 • 53 peptides selected only with monoclonal antibody 4 BE12C10 (sequences N° 96 to 148). Sequences 141 and 142 are from phage derived from the cysteine-bridged nonamer library. Sequences 143 to 145 are from phage derived from the linear nonamer library. Sequences 146 to 148 are from phage derived from the Cys6, Cys5 and Cys3 libraries, respectively.
- 10 These sequences are presented in Table 2 below.

Table 2. Sequences of the 148 selected phage-displayed peptides.

No.	Sequence	SEQ ID	No.	Sequence	SEQ ID	No.	Sequence	SEQ ID
1	CNTRMWPYAC	141	48	ESPYSARRW	48	95	WYVGSVRSQ	95
2	CFVPSPYVEEC	142	49	WYDERTLTK	49	96	CALDIAGGYIC	236
3	CRSSLPGDC	143	50	CSSYSYVHDSC	190	97	CFPSPRGYIC	237
4	FYRELAGDL	4	51	CRFTYDPPFMC	191	98	COAFDTSWTAC	238
5	MRRTASEIM	5	52	CRLYSFVFDKC	192	99	FLPCRRCGS	99
6	MRPLTWQTT	6	53	SQWRSAAPT	53	100	RPWQTAHFA	100
7	RMRIPEGT	7	54	CRPAFDPPYHC	194	101	GQYSSSPFP	101
8	MRDVMPPQHW	8	55	HGRTLWYTP	55	102	CGRPGPYADC	242
9	HKPTDHPSW	9	56	CSSVSATYPIC	196	103	CTPLPDGGILC	243
10	CSEYGRFGLC	150	57	CSLVQSPKRFC	197	104	LKWGDGSSA	104
11	ERPIGDSO	11	58	SNWYENTPT	58	105	CYQLSHANPC	245
12	RMRDIFGAP	12	59	PRFGWQSA	59	106	CSAYHRLGAC	246
13	CISEYAKGTTT	153	60	CTDPRGCGMFA	60	107	CFPLPSREFAC	247
14	CSHAPPYDRVC	154	61	PRPHFGAPP	61	108	YRQSRSSWP	108
15	CVTIPIRGATC	155	62	CVTRATYPSWC	202	109	SHRFDALRR	109
16	CFAPPYDPLPC	156	63	WYIAPRKT	63	110	CVRFPGDSSHSC	250
17	CAPYSIFIGEC	157	64	CYGYALSALDTC	204	111	CSPAAFSDRLC	251
18	CTHLYHYGTSC	158	65	CIITGSGWYVC	205	112	CVTDQWGGYLC	252
19	CLCQAYKQRRR	159	66	CTHYSFYGDIC	206	113	CVPSGRSPNTC	253
20	CDPRLLDLC	160	67	HWYSTEAAW	67	114	PKWSDKRPO	114
21	KTALPPYDR	21	68	HRIAQSLPQ	68	115	CAPPJAVRVC	255
22	CFARPFQGTWC	162	69	CALYRFAADSC	209	116	MKWGPNSHS	116
23	CSLSLPPYDRC	163	70	CRPQFDPPNDC	210	117	CLQDRAGGYLC	257
24	CDRTLALALC	164	71	CHPALARWPLC	211	118	CGRLEGRCSHA	118
25	CRAPPYDTIMC	165	72	QPKSLWYVS	72	119	CYFIAKHGWAC	258
26	CPPYDEGORVA	26	73	CRGYSHVSDAC	213	120	CPPRSSRGFLC	260
27	CFGLIAFHPDC	167	74	CDPVRTYPIIC	214	121	CTGISTIGEYLC	261
28	CQPIGPPYDRC	168	75	WYTFTRPV	75	122	GPVYATGL	122
29	CTANYFPGTYC	169	76	QRQSLWYSS	76	123	CLSQYADWYTC	263
30	CANSRPPGGYLC	170	77	NPDYSPHE	77	124	ARWYPISTQ	124
31	CMSSYGRGVRC	171	78	PPWYPEHKT	78	125	CQGFPGAPQDC	265
32	CVSTPFRGTFC	172	79	CASLGLAKTTC	219	126	WHFRFTPAT	126
33	CDPRITPFGC	173	80	WYVDGLAT	80	127	TRRPFDPFA	127
34	CGPPYDPPFAC	174	81	RGWYADPSA	81	128	CASPLGPCFW	128
35	CHTVRFRGTLC	175	82	CLWRPIDPFLC	222	129	CWTDYGDLLC	269
36	CTAPPYDAYGC	176	83	AERSLWYYP	83	130	CISAGPSSHHC	270
37	CRSRLGAPVC	177	84	PRWYDQSEL	84	131	CHSVQPATRAC	271
38	CTTTYGTGTWC	178	85	DSAPAVKSS	85	132	CPKAPFSPFKC	272
39	CSSLYYHGTC	179	86	PGWYDAHPT	86	133	CIDAGSHGWLC	273
40	CLYELRGTLC	180	87	CRGLQGHAYC	227	134	CRRGSPLSRYC	274
41	CAPPPYDQDFC	181	88	WYSAPENAL	88	135	SWDEIDLG	135
42	CPPPWYSRSSC	182	89	WYTAPSLSL	89	136	CRSPAGEWSSC	276
43	CSRALGVVSEC	183	90	WYTNPSIAA	90	137	CAYHVLRYAC	277
44	PTWYKLSV	44	91	WYFSNENLG	91	138	CAKTRGDYYC	278
45	RGSEGSFAR	45	92	WYTLDIGPT	92	139	CLAASADTAAC	279
46	CKQTIGSFDGC	186	93	GPWYSPSSS	93	140	CPYTSWAREGC	280
47	PLWYDPAPP	47	94	GDWPPFSAP	94	141	CPPPWSTHDC	297

No.	Sequence	SEQ ID
142	CSEPWSTSNIC	298
143	AITGVRRRW	291
144	EKKHFNYGT	292
145	EKKRFESNT	293
146	EQGYCTWIEQCAKYR	294
147	SPADCDYTLCAKPT	295
148	NSPTSCKWLCNEKF	296

Example 3 ELISA tests for the peptide-on-phage mAb interaction.

To assess the binding of the mAbs to the numerous peptides-on-phage, all clones have been produced independently using the following protocol.

5 *For clones from the nonamer libraries (Table 2, Peptide Nos 1 to 145).*

A preculture of *E. coli* DH11S infected with the phage was grown overnight. A sample of this preculture was used to inoculate a new 50 ml culture with a starting OD_{600nm} of 0.050. This culture was grown up to an OD_{600nm} of 0.20 to 0.25 with vigorous shaking at 37°C. The culture was then slowed down for 15 minutes in order
10 to allow the regeneration of pili. M13K07 helper phage was added at an MOI of 20, and superinfection was allowed for 15 more minutes at 37°C with slow agitation. IPTG (1mM final concentration) was then added and the culture was grown for 5 hours with vigorous agitation.

For clones from the Cys3/4/5/6 libraries (Table 2, peptide Nos. 146 to 148).

15 A colony of K91kan containing the clone of interest (on a LB Tet plate) was added to 50ml of LB supplemented with 20µg/ml tetracycline and grown overnight at 37°C with strong agitation.

For all clones.

Culture was centrifuged for 15 minutes at 4000RPM; 0.15 volume of PEG-
20 NaCl solution was added to the supernatant for precipitating the phage and kept overnight at 4°C. Phage were collected by centrifugation, 45 minutes at 4000RPM. After being resuspended in TBS, phage were heated 15 minutes at 65°C to kill remaining bacteria and to denature soluble proteins present in the sample. The solution was then centrifuged and the pellet was discarded. Phage in the supernatant
25 were then precipitated again as indicated above. Phage were finally resuspended in 200µl of TBS. Concentration of phage particules was determined by measuring the ΔOD at 269nm-320nm.

The ELISA test

30 Phages were coated at 5x10¹¹particules/ml on MaxiSorp multiwell plates. Coating was performed overnight at 4°C with 100µl/well. Plates were saturated with 5% (w/v) skimmed milk in TBS for 2 hours at 37°C and washed 5 times with TBS-Tween₂₀ 0.05 % (v/v). The mAbs were then incubated in the coated wells for 1 hour at 37°C, washed 5 times, and GAM-HRP conjugate (1500-fold dilution, Dako,

WO 02/28888

34

PCT/EP01/11409

Denmark) was added for 1 hour at 37°C to detect the binding of the mAb to the phages. After 5 washings, the peroxidase activity was monitored by addition of the K-Blue® substrate (Neogen, Lexington, USA) at room temperature for 20 minutes. Reaction was stopped by addition of 25µl of 2N H₂SO₄. Reading was performed at 5 450-630nm. Each phage was coated in triplicate for testing with each mAb. Control mAbs are of the same isotype as the selecting mAbs but do not react with *N. meningitidis* B.

Results

10 All phages that were positive with one or more than one mAb were tested a second time to confirm the result. Forty-six peptides were shown to be positive with at least one mAb. These are peptide number (with reference to Table 2): 13, 14, 17, 22, 27, 28, 29, 30, 39, 45, 47, 50, 51, 53, 54, 55, 58, 61, 63, 66, 75, 82, 83, 85, 86, 87, 88, 93, 103, 104, 105, 115, 124, 131, 132, 133, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 15 147, 148. This supports the view that they are particularly suitable as mimotopes of the meningococcal L3,7,9 LOS.

Hundred and two out of the 148 selected peptides were not detected as positive in this test. For at least some of these, this could be due to bad expression of the peptide at the surface of the phage, especially for those peptides which share a 20 conserved motif with other peptides that are positive in the test. In such case, a more sensitive test may show that some of these peptides are indeed recognized by one or more mAbs.

Example 4 SPOT Peptides

25 Another experiment for determining the best peptide candidates for immunisation trials is whether chemically synthesized peptides are recognized by at least one anti-MenB LOS mAb (and preferably not by irrelevant mAbs). This can be assessed on SPOT synthesized peptides (peptides synthesized directly on a cellulose membrane). This membrane can be tested with different mAbs by repetitive 30 immunoblottings and chemiluminescent detection. Peptides may be synthesised with 3 residues originating from the pVIII protein sequence on each end of the peptide. Indeed, the primary structure of the peptides expressed in fusion with pVIII on the surface of the bacteriophage is as follows (x for any residue in the library):

- linear peptides (9aa): AAEGEFxxxxxxxxDPAKAAF....

WO 02/28888

36

PCT/EP01/11409

Membrane 2 (cyclic peptides)

	58	G	24	70	78	M13	47	70	2C8	F76
14	++			+		+				(+)
25	(+)					(+)				(+)
50				++	+	+		++		(+)

After detection, blots were regenerated as follows: washed 3 x 10 minutes in TTBS; washed 2 x 1 minute and 3 x 10 minutes in regeneration buffer at 50°C (regeneration buffer is: 50mM Tris-HCl, pH 6.7; 2% SDS; 2-mercaptoethanol 100mM); washed 3 x 10 minutes in PBS (only for cyclic peptides); washed 2 x 1 minutes and then overnight in PBS-DMSO 10% (only for cyclic peptides); and washed 3 x 10 minutes in TTBS.

From the experiment it can be concluded that Peptide 61 is specifically recognized by mAb H44/70 and Peptide 50 is recognized by mAb H44/70, H44/78 and M13 but the signal level is higher with mAb H44/70 than with other mAbs. Peptide 83 is recognized by all IgMs but the signal is higher with mAb H44/70 than with other mAbs. This peptide is also recognized by mAbs H44/24 and H44/58 and not by other IgG3. Peptides 14 and 25, positive only with mAb H44/58 in phage-ELISA, were positive in SPOT synthesis with the same mAb and no other IgG3.

Example 5 Analysis of the Peptide Structure

The peptides isolated in this study appear to be quite dissimilar to the set of L3,7,9 LOS peptide mimotopes disclosed in WO 00/25814.

148 peptides were found in this study (see Table 2). Many of them have, by design, one Cys residue at both ends, to make them cyclic via a disulphide bridge. In order to avoid, in the alignment and pattern search procedures, any bias due to these Cys, the peptides have been trimmed of their terminal cysteines; the original presence of cysteines in the peptides can be recognized in the last two characters of their names (CC stands for one Cys at both ends, CN stands for one cys at N-ter, and no cys at C-ter, NC is the reverse, and NN when no terminal cys at any end).

The average amino acid composition of the peptides has two striking features : they seem to be enriched in Prolines (98/148 have at least one Proline) and even more so in aromatic residues (Tyr, Trp and Phe) (126 peptides have at least one aromatic residue).

WO 02/28888

37

PCT/EP01/11409

In particular, seven peptides (1, 2, 18, 50, 64, 83, 123) have the motif [YW]xY, reported to be able to mimic carbohydrate subunits (C.D.Partidos, Current Opinion in Mol. Therapeutics, Vol 2, pp74-79, 2000).

One might think that the presence of a disulfide bridge would favour prolines in the peptides, but the unconstrained peptides contain prolines almost as frequently.

Conserved patterns were searched for, with the following results.

Strong similarities shared by some peptides

Some peptides share a number of consecutive residues, as shown in the following table:

Number of peptides	Motif shared	Peptide numbers
2	L-P-P-Y-D-R	21, 23
4	P-P-Y-D-R	14, 21, 23, 28
4	A-P-P-Y-D	14, 16, 25, 36
2	P-P-Y-D-P	16, 34
2	G-P-P-Y-D	28, 34
2	A-G-G-Y-L	96, 117
2	S-L-W-Y-S	72, 76
2	S-R-S-S	42, 108
3	P-P-W-Y	42, 78, 84
10	P-P-Y-D	See below
2	R-G-T-L	35, 40
3	F-D-P-F	54, 70, 127
2	A-T-Y-P	56, 62
2	P-G-A-P	12, 125
2	G-R-P-G	10, 102
2	F-R-G-T	32, 33
4	G-G-Y-L	30, 96, 112, 117
2	S-L-S-L	23, 89
3	S-L-W-Y	72, 76, 83

One should particularly notice the large number (10) of peptides sharing the PPYD motif:

15

LTpep_14_CC : shaPPYDrv
 LTpep_16_CC : faPPYDplp
 LTpep_21_NN : ktalPPYDr
 LTpep_23_CC : sislPPYDr
 20 LTpep_25_CC : raPPYDtim
 LTpep_26_CN : PPYDegcrv
 LTpep_28_CC : qpigPPYDr
 LTpep_34_CC : gPPYDpfpa
 LTpep_36_CC : taPPYDayg
 25 LTpep_41_CC : apPPYDqsf

WO 02/28888

38

PCT/EP01/11409

There are 17 peptides having the motif PP[YFW].

The doublet WY is especially frequent in the set, with a count of 26 peptides.

The next most frequent dipeptide is PP (24) followed by AP (20).

5 Weaker similarities shared by many peptides

If intervening mismatches are accepted, the following sets of related peptides are found:

10	LTpep_54_CC :	RPaFDPPh
	LTpep_70_CC :	RqFDPFnd
	LTpep_96_CC :	aLDiAGGYL
	LTpep_117_CC :	lqDrAGGYL
15	LTpep_89_NN :	WYTaPSls1
	LTpep_90_NN :	WYtnPSiaa
	LTpep_78_NN :	PpWYpeHkT
20	LTpep_86_NN :	PgWYdahPt
	LTpep_7_NN :	RMRiIPegt
	LTpep_12_NN :	RMRdIPgap
25	LTpep_16_CC :	faPPYDPLP
	LTpep_34_CC :	gPPYDfPa
	LTpep_52_CC :	RlYSfvFDk
	LTpep_73_CC :	RgYShVsDa
30	LTpep_47_NN :	PlWYdpapp
	LTpep_86_NN :	PgWYdahPt
	LTpep_78_NN :	PpWYpehkt
	LTpep_86_NN :	PgWYdahpt
35	LTpep_42_CC :	pPpWYsrss
	LTpep_84_NN :	PpWYnqsel
	LTpep_75_NN :	WYtPtrpv
	LTpep_89_NN :	WYTaPSls1
	LTpep_90_NN :	WYtnPSiaa
40	LTpep_63_NN :	WYiAPrktL
	LTpep_88_NN :	WYsaPenal
	LTpep_89_NN :	WYtAPslsL

45 Allowing for weaker patterns, we can group the last two sets with the pattern WYxxP, and add another peptide:

	LTpep_81_NN :	rgWYadPsa
	LTpep_63_NN :	WYiAPrktL
50	LTpep_88_NN :	WYsaPenal

WO 02/28888

39

PCT/EP01/11409

LTpep_75_NN : WYttPtrpv
 LTpep_89_NN : WYtaPs1sl
 LTpep_90_NN : WYtnPsiaa

- 5 If some more flexibility is introduced by allowing for gaps in the alignments, even more peptides may be grouped; for example:

10 LTpep_54_CC : RPaFDPPyh
 LTpep_70_CC : RPqFDPFnd
 LTpep_127_NN: trRP-FDPFa

15 LTpep_21_NN : ktAl-PPYDr
 LTpep_41_CC : Ap-PPYDqsf
 LTpep_54_CC : rpAfdPPYH

20 LTpep_47_NN : plWYd-Papp
 LTpep_55_NN : hgrtlWYt-P
 LTpep_63_NN : WYiaPrkti
 LTpep_75_NN : WYttPtrpv
 LTpep_81_NN : rgWYadPsa
 LTpep_83_NN : aerslWYy-P
 LTpep_88_NN : WYsaPenal
 LTpep_89_NN : WYtaPs1sl
 LTpep_90_NN : WYtnPsiaa

25 Other consensus sequences:

Peptide 141 cppPWSThdc
 Peptide 142 csePWSTsnc
 Consensus PWST

30

Peptide 144 EKKhFnygT
 Peptide 145 EKKrFesnT
 Consensus EKKxFxxxT

- 35 A Comparison of the Selected Peptides selected in Example 3

Two thirds of the peptides are constrained by a disulphide bridge, which means that this feature is not necessarily essential.

WO 02/28888

40

PCT/EP01/11409

	SEQ ID NO:1	NTKWYPYA
	SEQ ID NO:2	FVPSPYVYE
	SEQ ID NO:3	RSSLPGD
5	SEQ ID NO:4	FYRELAGDL
	SEQ ID NO:5	MRRTASEIM
	SEQ ID NO:6	MRPLTWQTT
	SEQ ID NO:7	RMRIPEGT
	SEQ ID NO:8	MRDVMPQHW
10	SEQ ID NO:9	HKPTDHPSW
	SEQ ID NO:10	SETYGRPGL
	SEQ ID NO:11	ERPIGGDSG
	SEQ ID NO:12	RMRDIPGAP
	SEQ ID NO:13	ISEYAKGTT
15	SEQ ID NO:14	SHAPPYDRV
	SEQ ID NO:15	VTIPYRGTO
	SEQ ID NO:16	FAPPYDPLP
	SEQ ID NO:17	APYSIFIGE
	SEQ ID NO:18	THLYHYGTS
20	SEQ ID NO:19	LCQAYKGRR
	SEQ ID NO:20	DPRLDL
	SEQ ID NO:21	KTALPPYDR
	SEQ ID NO:22	FARPFQGTW
	SEQ ID NO:23	SLSLPPYDR
25	SEQ ID NO:24	DRTLALAL
	SEQ ID NO:25	RAPPYDTIM
	SEQ ID NO:26	CPPYDEGCRVA
	SEQ ID NO:27	FGLIAFHPD
	SEQ ID NO:28	QPIGPPYDR
30	SEQ ID NO:29	TANYYFGTY
	SEQ ID NO:30	ANSRPGGYL
	SEQ ID NO:31	MSSYGRGVR
	SEQ ID NO:32	VSTPFRGTF
	SEQ ID NO:33	DPRIPTDFG
35	SEQ ID NO:34	GPPYDPFPA
	SEQ ID NO:35	HTVRFRTGL
	SEQ ID NO:36	TAPPYDAYG
	SEQ ID NO:37	RSPLLGAPV
	SEQ ID NO:38	TTTTGTGTW
40	SEQ ID NO:39	SSLYYHGTA
	SEQ ID NO:40	LYEPLRGTL
	SEQ ID NO:41	APPPYDQSF
	SEQ ID NO:42	PPPWYSRSS
	SEQ ID NO:43	SRALGYVSE
45	SEQ ID NO:44	PTWYKLSV
	SEQ ID NO:45	RGSEGSFAR
	SEQ ID NO:46	KQTIGSFDG
	SEQ ID NO:47	PLWYDFAPP
	SEQ ID NO:48	ESPYSAHRW
50	SEQ ID NO:49	WYDERTILK

WO 02/28888

41

PCT/EP01/11409

	SEQ ID NO:50	SSYSYVHDS
	SEQ ID NO:51	RFTYDPPFM
	SEQ ID NO:52	RLYSFVFDK
	SEQ ID NO:53	SQWRSAAFT
5	SEQ ID NO:54	RPAFDPPYH
	SEQ ID NO:55	HGRTLWYTP
	SEQ ID NO:56	SSVSATYPI
	SEQ ID NO:57	SLVQSPKRF
	SEQ ID NO:58	SNWYENTFT
10	SEQ ID NO:59	PRPGWGQSA
	SEQ ID NO:60	CTDPRGCGMFA
	SEQ ID NO:61	PRPHFGAPP
	SEQ ID NO:62	VTRATYPSW
	SEQ ID NO:63	WYIAPRCTL
15	SEQ ID NO:64	YGYSALRDT
	SEQ ID NO:65	IITGSGWYV
	SEQ ID NO:66	THYSFYGDI
	SEQ ID NO:67	HWYSTEAAW
	SEQ ID NO:68	HRIAQSLPQ
20	SEQ ID NO:69	ALYRFAADS
	SEQ ID NO:70	RQFDPPND
	SEQ ID NO:71	HPALARWPL
	SEQ ID NO:72	QPKSLWYSV
	SEQ ID NO:73	RGYSHVSDA
25	SEQ ID NO:74	DPVRTIYPI
	SEQ ID NO:75	WYTTIYTRPV
	SEQ ID NO:76	QRQSLWYSS
	SEQ ID NO:77	NPDYSSPHE
	SEQ ID NO:78	PPWYPEHKT
30	SEQ ID NO:79	ASLGLAKTT
	SEQ ID NO:80	WYVDGPLAT
	SEQ ID NO:81	RGWYADPSA
	SEQ ID NO:82	LWRPIDPFL
	SEQ ID NO:83	AERSLWYYP
35	SEQ ID NO:84	PPWYNQSEL
	SEQ ID NO:85	DSAPAVKSS
	SEQ ID NO:86	PGWYDAHPT
	SEQ ID NO:87	RGLQGHIAIY
	SEQ ID NO:88	WYSAPENAL
40	SEQ ID NO:89	WYTAPSLSL
	SEQ ID NO:90	WYTNPSIAA
	SEQ ID NO:91	WYFSNerLG
	SEQ ID NO:92	WYTLDIGPT
	SEQ ID NO:93	GPWHGPSSS
45	SEQ ID NO:94	GDWPPFSAP
	SEQ ID NO:95	WYVGSVRSQ
	SEQ ID NO:96	ALDIAGGYI
	SEQ ID NO:97	PPSRGGYI
	SEQ ID NO:98	QAFDTSWTA
50	SEQ ID NO:99	FLPCRRCGS

WO 02/28888

42

PCT/EP01/11409

SEQ ID NO:100 RPWQTAHFA
SEQ ID NO:101 GQYSSSPFP
SEQ ID NO:102 GRPGYPAD
SEQ ID NO:103 TPLPDGGIL
5 SEQ ID NO:104 LKWGDGSSA
SEQ ID NO:105 YPQLSHANP
SEQ ID NO:106 SAYHRSLGA
SEQ ID NO:107 FPLPSREFA
SEQ ID NO:108 YRQSRSSWP
10 SEQ ID NO:109 SHRFDALRR
SEQ ID NO:110 VRFPDGSMS
SEQ ID NO:111 SPAAFSDRL
SEQ ID NO:112 VTDQWGGYL
SEQ ID NO:113 VPSGRSPNT
15 SEQ ID NO:114 PKWSDKRPQ
SEQ ID NO:115 APPGIAVRT
SEQ ID NO:116 MKWGPNSHS
SEQ ID NO:117 LQDRAGGYL
SEQ ID NO:118 CGRLEGRCSHA
20 SEQ ID NO:119 YFIAKHGWA
SEQ ID NO:120 PPRSSRGFL
SEQ ID NO:121 TGISTGEYL
SEQ ID NO:122 GPVYATGL
SEQ ID NO:123 LSQYADWTY
25 SEQ ID NO:124 ARWYPISTQ
SEQ ID NO:125 QGFFGAPQD
SEQ ID NO:126 WHFRITFPAT
SEQ ID NO:127 TRRPFDPAA
SEQ ID NO:128 CASPLGPCFW
30 SEQ ID NO:129 WTDTYGDLL
SEQ ID NO:130 ISAGPESSH
SEQ ID NO:131 HSVQPATRA
SEQ ID NO:132 PKAPFSPFK
SEQ ID NO:133 IDAGSHGWL
35 SEQ ID NO:134 RRGSPLSRY
SEQ ID NO:135 SWDEIDLG
SEQ ID NO:136 RSPAGEWSS
SEQ ID NO:137 AYHVLRYSY
SEQ ID NO:138 AKTVRGDYY
40 SEQ ID NO:139 LAASADTAA
SEQ ID NO:140 PYTSWAREG
SEQ ID NO:141 CNTKWYPYAC
SEQ ID NO:142 CFVPSPYVYEC
SEQ ID NO:143 CRSSLPDGC
45 SEQ ID NO:144 CFYRELAGDLC
SEQ ID NO:145 CMRRTASEIMC
SEQ ID NO:146 CMRPLTWQTTC
SEQ ID NO:147 CRMRIPEGTC
SEQ ID NO:148 CMRDVMPQHWC
50 SEQ ID NO:149 CHKPTDHPSWC

WO 02/28888

43

PCT/EP01/11409

SEQ ID NO:150 CSEYGRPGLC
SEQ ID NO:151 CERPIGGDSGC
SEQ ID NO:152 CRMRDIPGAPC
SEQ ID NO:153 CISEYAKGITC
5 SEQ ID NO:154 CSHAPPYDRVC
SEQ ID NO:155 CVTIPYRGTQC
SEQ ID NO:156 CFAPPYDPLPC
SEQ ID NO:157 CAPYSIFIGEC
SEQ ID NO:158 CTHLYHYGTSC
10 SEQ ID NO:159 CLCQAYKGRRRC
SEQ ID NO:160 CDPRLDLCLC
SEQ ID NO:161 CKTALPPYDRC
SEQ ID NO:162 CFARPPQGTWC
SEQ ID NO:163 CSLSLPPYDRC
15 SEQ ID NO:164 CDRTLSALALC
SEQ ID NO:165 CRAPPYDTIMC
SEQ ID NO:166 CPPYDEGCRVAC
SEQ ID NO:167 CFGLIAFHPDC
SEQ ID NO:168 CQPIGTYDRC
20 SEQ ID NO:169 CTANYYFGTYC
SEQ ID NO:170 CANSRPPGGYLC
SEQ ID NO:171 CMSSYGRGVRC
SEQ ID NO:172 CVSTPPRGTFC
SEQ ID NO:173 CDPRTPDFGC
25 SEQ ID NO:174 CGPPYDPPFAC
SEQ ID NO:175 CHTVFRGTLC
SEQ ID NO:176 CTAPPYDAYGC
SEQ ID NO:177 CRSPLLGPVPC
SEQ ID NO:178 CTTYGTGTWC
30 SEQ ID NO:179 CSSLYYHGATC
SEQ ID NO:180 CLYEPLRGTLCLC
SEQ ID NO:181 CAPPYDQSFCLC
SEQ ID NO:182 CPPPWYSRSSCLC
SEQ ID NO:183 CSRALGYVSECLC
35 SEQ ID NO:184 CPTWYKLSVCLC
SEQ ID NO:185 CRGSEGSFARCLC
SEQ ID NO:186 CKQTIGSFDGCLC
SEQ ID NO:187 CPLWYDPAPPCLC
SEQ ID NO:188 CESPYSahrwCLC
40 SEQ ID NO:189 CWYDERTILKCLC
SEQ ID NO:190 CSSYSYVHDSC
SEQ ID NO:191 CRFTYDPPFMC
SEQ ID NO:192 CRLYSFVFDKCLC
SEQ ID NO:193 CSQWRSAAPTCLC
45 SEQ ID NO:194 CRPAFDPPYHCLC
SEQ ID NO:195 CHGRTLWYTPCLC
SEQ ID NO:196 CSSVSATYPIC
SEQ ID NO:197 CSLVQSPKRFC
SEQ ID NO:198 CSNWYENTPTCLC
50 SEQ ID NO:199 CPRPGWQSQAC

WO 02/28888

44

PCT/EP01/11409

SEQ ID NO:200 CTDPRGCGMFAC
SEQ ID NO:201 CPRPHFGAPP
SEQ ID NO:202 CVTRATYPSWC
SEQ ID NO:203 CWYIAPRKTLC
5 SEQ ID NO:204 CYGYSALRDTC
SEQ ID NO:205 CIITGSGWYVC
SEQ ID NO:206 CTHYSFYGDIC
SEQ ID NO:207 CHWYSTEAAWC
SEQ ID NO:208 CHRJAQSLPQC
10 SEQ ID NO:209 CALYRFAADSC
SEQ ID NO:210 CRPQFDPPNDC
SEQ ID NO:211 CHPALARWPLC
SEQ ID NO:212 CQPKSLWYSVC
SEQ ID NO:213 CRGYSHVSDAC
15 SEQ ID NO:214 CDPVRTIYPIC
SEQ ID NO:215 CWYTTIPTRPVC
SEQ ID NO:216 CQRQSLWYSSC
SEQ ID NO:217 CNPDYSSPHEC
SEQ ID NO:218 CPPWYPEHKTC
20 SEQ ID NO:219 CASLGLAKTTC
SEQ ID NO:220 CWYVDGPLATC
SEQ ID NO:221 CRGWYADPSAC
SEQ ID NO:222 CLWRPIDPFLC
SEQ ID NO:223 CAERLWYYPC
25 SEQ ID NO:224 CPPWYNQSELC
SEQ ID NO:225 CDSAPAVKSSC
SEQ ID NO:226 CPGWYDAHPTC
SEQ ID NO:227 CRGLQGHAYC
SEQ ID NO:228 CWYSAPENALC
30 SEQ ID NO:229 CWYTAPSLSLC
SEQ ID NO:230 CWYTNPSIAAC
SEQ ID NO:231 CWYFSNEALGC
SEQ ID NO:232 CWYTLDIGPTC
SEQ ID NO:233 CGPWHGPFSSC
35 SEQ ID NO:234 CGDWPPFSAPC
SEQ ID NO:235 CWYVGVSRSQC
SEQ ID NO:236 CALDIAGGYIC
SEQ ID NO:237 CPPPSRGGYIC
SEQ ID NO:238 CQAEDTSWTAC
40 SEQ ID NO:239 CFLPCRRCGSC
SEQ ID NO:240 CRPWQTAHFAC
SEQ ID NO:241 CGQYSSSPFPC
SEQ ID NO:242 CGRPGYPADC
SEQ ID NO:243 CTPLPDGGILC
45 SEQ ID NO:244 CLKWGDGSSAC
SEQ ID NO:245 CYPQLSHANPC
SEQ ID NO:246 CSAYHRSLGAC
SEQ ID NO:247 CFPLPSREFAC
SEQ ID NO:248 CYRQSRSSWPC
50 SEQ ID NO:249 CSHRFDALRRC

WO 02/28888

45

PCT/EP01/11409

SEQ ID NO:250 CVRFPDGSWSC
SEQ ID NO:251 CSPAAFSDRLC
SEQ ID NO:252 CVTDQWGGYLC
SEQ ID NO:253 CVPSGRSPNTC
5 SEQ ID NO:254 CPKWSDKRPQC
SEQ ID NO:255 CAPPGIAVRTC
SEQ ID NO:256 CMKWGPNNSHSC
SEQ ID NO:257 CLQDRAGGYLC
SEQ ID NO:258 CGRLEGRCSHAC
10 SEQ ID NO:259 CYFIAKHGWAC
SEQ ID NO:260 CPPRSSRGFLC
SEQ ID NO:261 CTGISTGEYLC
SEQ ID NO:262 CGPVFYATGLC
SEQ ID NO:263 CLSQYADWTYC
15 SEQ ID NO:264 CARWYPISTQC
SEQ ID NO:265 CQGFPGAPQDC
SEQ ID NO:266 CWHFRTPATC
SEQ ID NO:267 CTRRPFDPAC
SEQ ID NO:268 CASPLGPCFWC
20 SEQ ID NO:269 CWTDTYGDLLC
SEQ ID NO:270 CISAGPSSHSC
SEQ ID NO:271 CHSVQPATRAC
SEQ ID NO:272 CPKAPSPFKC
SEQ ID NO:273 CIDAGSHGWLC
25 SEQ ID NO:274 CRRGSPLSRYC
SEQ ID NO:275 CSWDEIIDLGC
SEQ ID NO:276 CRSPAGEWSSC
SEQ ID NO:277 CAYHVLRYLAC
SEQ ID NO:278 CAKTVRGDYYC
30 SEQ ID NO:279 CLAASADTAAC
SEQ ID NO:280 CPYTSWAREGC
SEQ ID NO:289 PPPWSTHD
SEQ ID NO:290 SEPWSTSN
SEQ ID NO:291 AITGVRARW
35 SEQ ID NO:292 EKKHFNYGT
SEQ ID NO:293 EKKRFESNT
SEQ ID NO:294 EQGYCTVNIEQCAKYR
SEQ ID NO:295 SPADCDYTLCAKPT
SEQ ID NO:296 NSPTSCKWLCNEKF
40 SEQ ID NO:297 CPPPWSTHDC
SEQ ID NO:298 CSEPWSTSNL
SEQ ID NO:299 CAITGVRARWC
SEQ ID NO:300 CEKKHFNYGTC
45 SEQ ID NO:301 CEKKRFESNTC

WO 02/28888

46

PCT/EP01/11409

SEQ ID NO:281 Sequence of the light chain of the H44/24 monoclonal antibody

5' GACCCAGTTTCACACTTTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGATCAAACCTCCATCTCTTGCACATCTA
 5 GTCCGAGCCTTGTACACCGGTAAGGAAACACCTATTTACATTGGTACCTTCAGAAGCCAGGCCAGTC
 TCCAAAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCCAAACCGATTTCTGGGGTCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTG
 GATCAGGGACAGATTTACACTCACGATCACGACAGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGACTTTATTTCTGC
 TCTCAAAGTACACATGTTCCGTGGAGCTTCCGGTGGAGGCCAAACCTGGAATCAAACGGGCTGATGC
 TGCAACAACTGATCCATCTTCCACCCATCCAGTGGAGGATTAACATCTGGAGTGCCTCAGTCGTGT
 10 GCTTTTGAACACTTCTACCCAAAGACATCAATGTCAAGTGAAGATGATGGCMTGAACGACAA
 AATGGCTCCTGAAACAGTTGGACTGATCAGGACGCAAGACAGCACCTACAGCATGAGCAGCACCT
 CAGCTTACCAAGGACAGTATGAACGACATAACAGCTATACCTGTGAGGCCACTCACAAGACATCAA
 CTTACCCATTGTCAAGAGCG 3'

SEQ ID NO:282 Sequence of the heavy chain of the H44/24 monoclonal antibody

5' CCTGAGTCTGAAGGTGGCTGGTGCAGCCTGAAGATCCCTGAAACTCTCCTGTGCAGCCTCCGGA
 TCCGATTTTATGATAGTACTGGATGAGTTGGGTCCGGCAGGCTCCAGGGAAGGGCTAGAATGGATTGG
 20 AGAAATTTATCCAGATAGCAGAACGATAAATACTACGCCTCTCTAAAGGATAAATTCATCATCCCA
 GGCACACGCCAAATAATACGCTATATCCCTGCAATGAGCAAGTGAATCTGAGGACACAGGCCCTTAT
 TACTGTCAATCTACTTTACTTACGACGCTGGGTTATGACTACTGGGTCAGAGAACCTCAGTCTAC
 CCTCTCCTCAGCTACAAACAGCCCATCTGTCTATCCCTTGGTCCCTGGCTGCAGTGCACATCTG
 GATCTCCGTTGACACTGGGATGCCTTGTCAAAGGCTACTTCCCTGAGCCGGTAACTGTAATAATGGAAC
 25 TATGGAGCCCTGTCCAGCGGTGTGGCACAGTCTCATCTGTCTGCTGAGTCTGGGTTCTATTCCCTCAG
 CAGCTTGGTACTGTACCCTCCAGCACCTGGCCAGCCAGACTGTCTGCAACGTAGCCACCCAG
 CCAGCAAGACTGAGTTGTCAAGA 3'

SEQ ID NO:283 Sequence of the light chain of the H44/58 monoclonal antibody

5' CCCAGTTCACCTTCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGATCAAGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCAG
 AGCCTTGTTCACAAATAGGGAAACCTATTTACATTGGTACTTGCAGAGCCAGGCCAGTCTCCAAA
 GCTCTGATCTACAAAGTTTCCACCGATTTTCTGGGGTCCCTGACAGGTTTCAGTGGCAGTATTCAG
 35 GGCAGATTTACACTCAGGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGAGTTTATTTCTGTCTCAA
 AGTACACMGTTCCTGGAGCTTCCGTGGAGGCCACCACTGGAATCAAACCGGCTGATGCTGCACC
 AACTGTATCCATCTCCACCATCCAGTGAACAGTAAACATCTGGAGGTGCCTCAGTCGTGGCTTCT
 TGAACAACTTCTACCCAAAGACATCAATGTCAAGTGGAGATTGATGGCAGTGAACGACAAAATGGC
 GTCCTGAACAGTTGGACTGATCAGGACAGCAAGACAGCACTACAGCATGAGCAGCACCTCAGCTT
 40 GACCAAGGACGAGTATGAACACATACAGCTATACCTGTGAGGCCACTCACAAGACATCAACTTAC
 CCATTGTCAAGAGCG 3'

SEQ ID NO:284 Sequence of the heavy chain of the H44/58 monoclonal antibody

5' TCTGAAGTGGCTGGTGCAGCTGAAGGATCCCTGAAACTCTCCTGTGTCCACAGGATTCGATTTT
 AGTAGATPACTGGATGAGTTGGTCCGGCAGGCTCCAGGGAAGGGCTAGAGTGGATTGGAGAAATTTA
 TCCAGATAGCAGGAGATAAATACTATAGCCATCTCTAAAGGATAAGTTTCATCATCTCCAGAGACAACG
 CCAAAAATCCCTGTACTCTGCAAAATGAGCAAAGTGAATCTGAGGACACAGCCCTTATCTGTGCA
 GTCCTACTATACTTACGACGTTGGGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTACCCGCTCCTC
 50 AGCTACAAACACAGCCCATCTGTCTATCCCTTGGTCCCTGGCTGCAGTGCACATCTGGATCCCTGG
 TGACACTGGGATGCCTTGTCAAAGGCTACTTCCCTGAGCCGGTAACTGTAATAATGGAATATGGAGCC
 CTGTCCAGCGGTGTGGCACAGTCTCATCTGTCTGCACTGGGTTCTATTCCCTCAGCAGCTTGGT
 GACTGTACCCTCCAGCACCTGGCCAGCCAGACTGTCTGCAACGTAGCCACCCAGCCAGCAAGA
 CTGAGTATCAAGAG 3'

55

WO 02/28888

47

PCT/EP01/11409

SEQ ID NO:285 Sequence of the light chain of the H44/70 monoclonal antibody

5' TGACCCAGTCTCCACTCACTTTTGTGGTTACCAATGGaCAACCAGCcTCCATcTCTTGCAAGTCAA
 AGTCAGAGCCCTTAGATAATGATGGAAAGACATATTTGAATTGGTTGTACAGAGGCCAGGCCAGTc
 5 TCCAAAGCCCTAATCTATCTGGTGTCTAAACTGGACTCTGGAGTCCCTGACAGGTTCACTGGCAGTGG
 GATCAGGGACAGATTTCACACTGAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATTGGGAGTTTATTATTGC
 10 TGGCRAAGTACACATTTTCTCTCACGTTCGGTGTCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAACGGGCTGATGC
 TGCAACCACTGTATCCATCTCCACCACTCCAGTGGAGTTAAACATCTGGAGGTGCTCAGTCCGTGT
 15 GCTTCTTGAACAATCTTACCCCAAAGACATCAATGTCAAGTGGAAAGATGTATGGCAGTGAACGACAA
 AATGGGCTTCCTGAACAGTTGGACTGATCAGGACACCAAGACAGCACCTACAGCATGAGCAGCACCTC
 CAGCTTGACCAAGGACGAGTATGAACGACATAACAGCTATACCTGTGAGGCCACTCACAAGACATCAA
 CTCACCCATTGTCAAGAGCG 3'

SEQ ID NO:286 Sequence of the heavy chain of the H44/70 monoclonal antibody

5' ACAGGTAAGTGGGGCTTCAGTGAGGATATCCTGTAAGGcTCTGGcTACACCTTTCCACAAGCTAC
 TATATACACTGGGTGAAGCAGAGGCCCTGGACAGGGACTTGAGTGGATTGGATGGATTTTCTTGAAA
 20 TGTTAATACCTAAGTACAATGAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACACTGACTGCAGACAAATCTCCAGCA
 CAGCCTCATGCACTCAGCAGCCTGACCTCTGAGGACTCTGGGCTTATTCTGTGCRAGAGGGGGG
 GTACGGTATCTATGGACTACTGGGCTCAAGAACTCAGTCACTGCTCCTCAGAGAGTCACTCCTT
 25 CCAAATGCTTCCCTCTCTCTCCGAGAGCCCTGTCTGATAAAGATCTGGTGGCCATGGGCT
 GCCTGGCCCGGACTTCTGCCCAGCACATTTCTTCCACTGGAACTACAGAACAACTCAAGTCAAGT
 ATCCAGGATACAGAACTTCCCAACTGAGGACAGGGGGCAAGTACCTAGCCACTCGCAGGTTGT
 30 GCTGCTCCCAAGAGCATCTTGAAGTTTCAAGTGAATACCTGGTATGCAAAATCCACTACGAGGCGCA
 AAAACAGAG 3'

SEQ ID NO:287 Sequence of the light chain of the H44/78 monoclonal antibody

5' CTGACCCAGTCCACTCACTTGTGGTACCATTGGaCAACCAGCcTCCATcTCTTGCAAGTCAA
 GTCAGAGCCcTCTTAGATAGTATGGAAAGACATATTTGAATTGGTTGTACAGAGGCCAGGCCAGTcT
 30 CCAAAGCCcTAATCTATCTGGTGTCTAAACTGGACTCTGGAGTCCCTGACAGGTTCACTGGCAGTGG
 ATCAGGGACAGATTTCACACTGAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATTGGGAGTTTATTATTGCT
 35 GGCAGGTAACAATTTCCGCTCACGTTCTGGTCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAACGGGCTGATGCT
 GCACCACTGATCCATCTTCCCACTCCAGTGGAGTAAACATCTGGAGTGGCTCACTGCTGTG
 CTTCTTGAACAATCTTACCCCAAAGACATCAATGTCAAGTGGAAAGATTGATGGCAGTGAACGACAAA
 ATGGGCTCCTGAACAGTTGGACTGATCAGGACAGCAAGACAGCACCTACAGCATGAGCAGCACCTC
 40 ACSTTGCCAAAGGACGAGTATGAACGACATAACAGCTATACCTGTGAGGCCACTCACAAGACATCAAC
 TTCACCCATTGTCAAGAGCG 3'

SEQ ID NO:288 Sequence of the heavy chain of the H44/78 monoclonal antibody

5' GTCTGGACCTAAGTGGTAAAGCCTGGGGCTTCAGTGAGGATATCCTGCAAGGCTTCTGGcTACACc
 45 TTCAACAGCTACTATATACACTGGGTGAAGCAGAGGCCCTGGACAGGGACTTGAGTGGATTGGATGGAT
 TTRTCTGGAAATGTTAATACTAAGTACAATGAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACACTGACTGCAGACA
 AATCTCCAGCACAGCCTACATGCACTCAGCAGCCTGACCTCTGAGGACTCTGGGCTTATTCTGT
 50 GCAAGTCTACTACGGCTAGGGGTACTTTGACTCTGGGGCCAGGGCCCACTCTCACAGTCTCTC
 AGAGAGTCACTCTTCCCAAATGCTTCCCTCTGCTCTCTGGAGAGCCCTCTGATAAAGAAATC
 TGGTGGCCATGGGCTGCTGGCCGGGACTTCTGCCCAGCACATTTCTTCACTGGAACTACAG
 AACACACTGAAGTCAATCCAGGATACAGAACTTCCCAACTGAGGACAGGGGGCAAGTACCTAGC
 CACTGCGAGGTTGCTGTCTCCCAAGGACATCTTGAAGTTTCAAGTGAATACCTGGTATGCAAAA
 TCCACTACGAGGCAAAAACAGAG 3'

WO 02/28888

48

PCT/EP01/11409

Applicant's or agent's file B45242 reference number	International application No.
--	-------------------------------

INDICATIONS RELATING TO A DEPOSITED MICROORGANISM

(PCT Rule 13bis)

A. The indications made below relate to the microorganism referred to in the description on page 11 lines 8-17 and page 15 lines 5-9.	
B. IDENTIFICATION OF DEPOSIT	Further deposits are identified on an additional sheet <input type="checkbox"/>
Name of depositary institution European Collection Of Cell Cultures	
Address of depositary institution (including postal code and country) Vaccine Research And Production Laboratory, Public Health Laboratory Service, Centre for Applied Microbiology Research, Porton Down, Salisbury, Wiltshire SP4 0JG, GB	
Date of deposit 22/09/00 (22 September 2000)	Accession Number 92209, 92210, 92211 and 92212
C. ADDITIONAL INDICATIONS (leave blank if not applicable)	This information is continued on an additional sheet <input type="checkbox"/>
In respect of those designations where a European Patent is sought, a sample of the deposited microorganisms will be made available until the publication of the mention of the grant of the European Patent or until the date on which the application has been refused or withdrawn, only by issue of such a sample to an expert nominated by the person requesting the sample	
D. DESIGNATED STATES FOR WHICH INDICATIONS ARE MADE (if the indications are not for all designated States)	
E. SEPARATE FURNISHING OF INDICATIONS (leave blank if not applicable)	
The indications listed below will be submitted to the International Bureau later (specify the general nature of the indications e.g., "Accession Number of Deposit")	

For receiving Office use only	
<input type="checkbox"/>	This sheet was received with the international application
Authorized officer	

For International Bureau use only	
<input type="checkbox"/>	This sheet was received by the International Bureau on:
Authorized officer	

WO 02/28888

49

PCT/EP01/11409

We Claim:

1. A mimotope of a surface L3,7,9 LOS of *N. meningitidis*, said mimotope comprising a peptide epitope obtainable by screening a peptide library with a monoclonal antibody selected from a group consisting of: 4BE12C10; H44/24; H44/58; H44/70; and H44/78.
5
2. A mimotope of a surface L3,7,9 LOS of *N. meningitidis*, said mimotope being antigenically cross-reactive with a monoclonal antibody selected from a group consisting of: 4BE12C10; H44/24; H44/58; H44/70; and H44/78.
10
3. The mimotope according to claim 1 or claim 2, which comprises a peptide epitope contained within any one of the peptides of SEQ ID NO: 1-140, 289-296, or retro sequences thereof.
15
4. The mimotope according to claim 3, wherein the peptide epitope is present in a nonapeptide.
5. The mimotope according to claims 3-4, which comprises any one of the peptides of SEQ ID NO: 1-140, 289-296, or retro sequences thereof, or modifications of the peptides or retro sequences which retain cross-reactivity with a monoclonal antibody selected from a group consisting of: 4BE12C10; H44/24; H44/58; H44/70; and H44/78.
20
6. The mimotope of claims 3-5, wherein the peptide epitope comprises the amino acid sequence PP[Y or F or W].
25
7. The mimotope of claim 6, wherein the peptide epitope comprises the amino acid sequence PP[Y or F or W]D.
30
8. The mimotope of claim 7, wherein the peptide epitope comprises the amino acid sequence PPYD.

WO 02/28888

50

PCT/EP01/11409

9. The mimotope of claims 3-5, wherein the peptide epitope comprises the amino acid sequence WY.
10. The mimotope of claim 9, wherein the peptide epitope comprises the amino acid sequence WYXXP.
11. The mimotope of claims 3-5, wherein the peptide epitope comprises the amino acid sequence [Y or W]XY.
- 10 12. The mimotope of claims 3-11, wherein said mimotope comprises an oligopeptide, comprising said peptide epitope, which is structurally more constrained than an unsubstituted linear form of the oligopeptide.
13. The mimotope according to claim 12, wherein the oligopeptide comprises a cyclic peptide encompassing the peptide epitope.
- 15
14. The mimotope according to claim 13, wherein the cyclic peptide comprises a cyclised portion which comprises an amino acid sequence, the terminal amino acids of which are linked together by a covalent bond.
- 20
15. The mimotope according to claim 14, wherein the cyclic peptide is any one of the peptides of SEQ ID NO: 141-280, 297-301, or retro sequences thereof.
16. The mimotope according to any one of the preceding claims, wherein a carrier is conjugated to the mimotope to enhance the immunogenicity thereof.
- 25
17. The mimotope according to claim 16, wherein the carrier comprises an immunogenic protein.
- 30 18. A vaccine comprising a mimotope according to any one of the preceding claims and a suitable excipient or diluent.

WO 02/28888

51

PCT/EP01/11409

19. A vaccine against serogroup B, C, Y, or W-135 meningococci, which comprises a mimotope of a surface L3,7,9 LOS of *N. meningitidis* and a mimotope of a surface L2 LOS of *N. meningitidis*.
- 5 20. The vaccine according to claim 19, wherein the mimotopes are antigenically cross-reactive with a monoclonal antibody of high specificity to the respective surface LOS.
21. The vaccine according to claim 19 or claim 20, wherein the mimotopes each
10 comprise a peptide epitope.
22. The vaccine according to claim 21, wherein the peptide epitopes are obtainable by screening a peptide library with the respective monoclonal antibodies of claim 20.
- 15 23. The vaccine of claim 21 or 22, wherein the L3,7,9 and the L2 mimotopes are contained within the same molecule.
24. The vaccine according to claims 21-23, wherein the mimotope of a surface
20 L3,7,9 LOS is the mimotope of claims 2-17.
25. The vaccine according to claims 21-23, wherein the mimotope of a surface L3,7,9 LOS comprises a peptide selected from:
IHRQGIH; HIGQRHI; LPARTEG; GETRAPL; APARQLP; PLQRAPA;
25 KQAPVHH; HHVPAQK; LQAPVHH; HHVPAQL; LPSIQLP; PLQISPL;
NELPHKL; LKHPLEN; KSPSMTL; LTMSPSK; AGPLMLL; LLMLPGA;
WSPILLD DLLIPSW; LSMHPQN; NQPHMSL; HSMHPQN NQPHMSH;
SMYGSYN; NYSGYMS; TNHSLYH; HYLHNT; HAIYPRH; HRPYIAH;
TTYSRFP; PFRSYTT; TDSLRL; LLRLSDT; SFATNIP; and PINTAFS.
- 30 26. The vaccine according to claim 19-25, wherein the mimotope of a surface L2 LOS is antigenically cross-reactive with F1-5H 5/ID9 monoclonal antibody.

WO 02/28888

52

PCT/EP01/11409

27. A vaccine against serogroup A meningococci, which comprises a mimotope of a surface L3,7,9 LOS of *N. meningitidis* and a mimotope of a surface L10 LOS of *N. meningitidis*.
- 5 28. The vaccine according to claim 27, wherein the mimotope of a surface L10 LOS is antigenically cross-reactive with a monoclonal antibody of high specificity to the L10 LOS.
29. The vaccine according to claim 28, wherein the monoclonal antibody is 5B4-
10 F9-B10.
30. The vaccine of claim 28 or 29, wherein the mimotope of a surface L10 LOS comprises a peptide epitope.
- 15 31. A meningococcal vaccine comprising a mimotope of a surface L3,7,9 LOS of *N. meningitidis*, a mimotope of a surface L10 LOS of *N. meningitidis*, and a mimotope of a surface L2 LOS of *N. meningitidis*.
32. A meningitis vaccine comprising the vaccine of claim 31, and a conjugated *H. influenzae* b capsular polysaccharide.
20
33. A H44/24 hybridoma deposited under the Budapest Treaty patent deposit at ECACC on 22/9/00 with Provisional Accession Number 92209.
- 25 34. A H44/58 hybridoma deposited under the Budapest Treaty patent deposit at ECACC on 22/9/00 with Provisional Accession Number 92210.
35. A H44/70 hybridoma deposited under the Budapest Treaty patent deposit at ECACC on 22/9/00 with Provisional Accession Number 92211.
30
36. A H44/78 hybridoma deposited under the Budapest Treaty patent deposit at ECACC on 22/9/00 with Provisional Accession Number 92212.

WO 02/28888

53

PCT/EP01/11409

37. A monoclonal antibody obtainable from any of the hybridomas of claims 33-36.
38. Use of the monoclonal antibodies of claim 37 in the identification of mimotopes of *N. meningitidis* L3,7,9 LOS.
39. A pharmaceutical composition comprising the monoclonal antibody of claim 37.
- 10 40. A mimotope as described in claims 1-17, or a vaccine as described in claims 18-32, or a monoclonal antibody as described in claim 37 for use as a medicament.
41. Use of the mimotope of claims 1-17, or the vaccine of claims 18-32, or the monoclonal antibody of claim 37 in the manufacture of a medicament for the
15 treatment or prevention of meningococcal disease.
42. A method of manufacturing a vaccine comprising the manufacture of a mimotope as claimed in any one of claims 1 to 17, and formulating the mimotope with an adjuvant.
- 20 43. A method for treating a patient suffering from or susceptible to meningococcal disease, comprising the administration of the mimotope of claims 1-17, or the vaccine of claims 18-32, or the monoclonal antibody of claim 37, to the patient.
- 25 44. A DNA sequence encoding the mimotope of claims 1-16.
45. A diagnostic assay for meningococcal infection comprising the use of the mimotope of claims 1-16 to detect antibodies against L3,7,9 LOS in the serum of a patient.
- 30 46. A diagnostic assay for meningococcal infection comprising the use of the monoclonal antibody of claim 37 to detect the presence of L3,7,9 immunotype meningococcus in a sample from a patient.

WO 02/28888

54

PCT/EP01/11409

47. A DNA sequence encoding a CDR region encoded by the DNA sequences of SEQ ID NO:281-288.

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/EP 01/11409
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C07K/04 A61K39/095 G01N33/68 C12N15/11 C12N5/20		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C07K G01N A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) CHEM ABS Data, WPI Data, PAJ, EPO-Internal, BIOSIS, MEDLINE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 00 25814 A (CHARALAMBOUS BAMBOS MICHAEL ;FEAVERS IAN MICHAEL (GB); UNIV LONDON) 11 May 2000 (2000-05-11) cited in the application page 2 -page 7; examples 1,2	1-10, 12-32, 40-45
X	CHARALAMBOUS BAMBOS M ET AL: "Peptide mimics elicit antibody responses against the outer-membrane lipooligosaccharide of group B Neisseria meningitidis." FEMS MICROBIOLOGY LETTERS, vol. 191, no. 1, 1 October 2000 (2000-10-01), pages 45-50, XP002212284 ISSN: 0378-1097 the whole document	1-10, 12-32, 40-45
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents:		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 4 December 2002	Date of mailing of the international search report 10.01.03	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentkan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2940, Tx. 31 661 epo nl, Fac. (+31-70) 340-3016	Authorized officer Renggl1, J	

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 01/11409

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	PARTIDOS C D: "Peptide mimotopes as candidate vaccines." CURRENT OPINION IN MOLECULAR THERAPEUTICS. ENGLAND FEB 2000, vol. 2, no. 1, February 2000 (2000-02), pages 74-79, XP001097969 ISSN: 1464-8431 page 76, right-hand column, paragraph 2	1-10, 12-32, 40-45
X	US 5 994 083 A (FELICI FRANCO ET AL) 30 November 1999 (1999-11-30) the whole document	45

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/EP 01/11409
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)		
This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:		
1.	<input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos.:	because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: Although claim 43 is directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2.	<input type="checkbox"/> Claims Nos.:	because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3.	<input type="checkbox"/> Claims Nos.:	because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)		
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:		
see additional sheet		
As a result of the prior review under R. 40.2(e) PCT, no additional fees are to be refunded.		
1.	<input type="checkbox"/>	As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2.	<input type="checkbox"/>	As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.	<input checked="" type="checkbox"/>	As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.: 1-5(part), 6-10 (complete), 12-32 (part), 40-45 (part)
4.	<input type="checkbox"/>	No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
Remark on Protest		<input checked="" type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest. <input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/EP 01 /1409

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

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

Invention 1: claims 1-5 (part), 6-8 (complete),
12-32 (part), 40 (part), 41 (part), 42 (part),
43 (part), 44 (part) and 45 (part)

A mimotope of a surface L3,7,9 LOS of *N. meningitidis*, a vaccine comprising said mimotope, multivalent vaccines comprising said mimotopes, the use of said mimotope for preparing a medicament, a method for preparing a vaccine comprising said mimotope, a method of treating based on the use of said mimotope and a diagnostic assay comprising the use of said mimotope wherein said mimotope comprises at least the amino acid motif PP.

Invention 2: claims 1-5 (part), 9-10 (complete),
12-32 (part), 40 (part), 41 (part), 42 (part),
43 (part), 44 (part) and 45 (part)

A mimotope of a surface L3,7,9 LOS of *N. meningitidis*, a vaccine comprising said mimotope, multivalent vaccines comprising said mimotopes, the use of said mimotope for preparing a medicament, a method for preparing a vaccine comprising said mimotope, a method of treating based on the use of said mimotope and a diagnostic assay comprising the use of said mimotope wherein said mimotope comprises at least the amino acid motif WY.

Invention 3: claims 1-5 (part), 11-32 (part),
40 (part), 41 (part), 42 (part), 43 (part),
44 (part) and 45 (part)

A mimotope of a surface L3,7,9 LOS of *N. meningitidis*, a vaccine comprising said mimotope, multivalent vaccines comprising said mimotopes, the use of said mimotope for preparing a medicament, a method for preparing a vaccine comprising said mimotope, a method of treating based on the use of said mimotope and a diagnostic assay comprising the use of said mimotope wherein said mimotope comprises at least the amino acid motif YXY.

Invention 4: claims 1-5 (part), 11-32 (part),
40 (part), 41 (part), 42 (part), 43 (part),
44 (part) and 45 (part)

A mimotope of a surface L3,7,9 LOS of *N. meningitidis*, a vaccine comprising said mimotope, multivalent vaccines

International Application No. PCT/EP 01 11409

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

comprising said mimotopes, the use of said mimotope for preparing a medicament, a method for preparing a vaccine comprising said mimotope, a method of treating based on the use of said mimotope and a diagnostic assay comprising the use of said mimotope wherein said mimotope comprises at least the amino acid motif WXY.

Inventions 5-179: claims 1-5 (part), 12-32 (part), 40 (part), 41 (part), 42 (part), 43 (part), 44 (part) and 45 (part)

A mimotope of a surface L3,7,9 LOS of *N. meningitidis*, a vaccine comprising said mimotope, multivalent vaccines comprising said mimotopes, the use of said mimotope for preparing a medicament, a method for preparing a vaccine comprising said mimotope, a method of treating based on the use of said mimotope and a diagnostic assay comprising the use of said mimotope wherein said mimotope comprises, respectively, seq IDs 3-13 15 17 19 20 22 24 27 29-33 35 37-40 43 45 46 48 52 53 56 57 59 60 62 66 68 69 71 73 74 77 79 82 85 87 93 96 98-114 116-119 121 122 125-140 143-153 155 157 159 160 162 164 167 169-173 175 177-180 183 185 186 188 192 193 195 197 199 200 202 206 208-214 217 219 222 225 227 233 236 238-254 256-259 261 262 265 266 268-280 290-296 and 298-301.

Invention 180: claims 33, 37-39 (part), 40 (part), 41 (part), 43 (part), 46 (part) and 47 (part relating to seq IDs 281 and 282)

The hybridoma H44/24 deposited at ECACC under provisional accession number 92209, the antibody derived therefrom, the use of said antibodies in various screening/diagnostic methods, the use of said antibody for therapeutic purposes and DNA sequences encoding the heavy and light chains of said antibody.

Invention 181: claims 34, 37-39 (part), 40 (part), 41 (part), 43 (part), 46 (part) and 47 (part relating to seq IDs 283 and 284)

The hybridoma H44/58 deposited at ECACC under provisional accession number 92210, the antibody derived therefrom, the use of said antibodies in various screening/diagnostic methods, the use of said antibody for therapeutic purposes and DNA sequences encoding the heavy and light chains of said antibody.

International Application No. PCT/EP 01 /1409

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Invention 182: claims 35, 37-39 (part), 40 (part),
41 (part), 43 (part),
46 (part) and 47 (part relating to seq IDs 285
and 286)

The hybridoma H44/70 deposited at ECACC under provisional
accession number 92211, the antibody derived therefrom, the
use of said antibodies in various screening/diagnostic
methods, the use of said antibody for therapeutic purposes
and DNA sequences encoding the heavy and light chains of
said antibody.

Invention 183: claims 36, 37-39 (part), 40 (part),
41 (part), 43 (part),
46 (part) and 47 (part relating to seq IDs 287
and 288)

The hybridoma H44/78 deposited at ECACC under provisional
accession number 92212, the antibody derived therefrom, the
use of said antibodies in various screening/diagnostic
methods, the use of said antibody for therapeutic purposes
and DNA sequences encoding the heavy and light chains of
said antibody.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

on patent family members

International Application No.

PCT/EP 01/11409

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0025814	A	11-05-2000	EP 1124574 A2 22-08-2001
			WO 0025814 A2 11-05-2000
			JP 2002528517 T 03-09-2002
US 5994083	A	30-11-1999	IT 1270939 B 26-05-1997
			AT 170558 T 15-09-1998
			AU 685121 B2 15-01-1998
			AU 6806994 A 12-12-1994
			BR 9406595 A 02-01-1996
			CA 2160486 A1 24-11-1994
			CN 1122613 A ,B 15-05-1996
			DE 69413024 D1 08-10-1998
			DE 69413024 T2 04-02-1999
			DK 698091 T3 07-06-1999
			EP 0698091 A1 28-02-1996
			ES 2120046 T3 16-10-1998
			HK 1011710 A1 31-03-2000
			WO 9426886 A2 24-11-1994
			JP 2813468 B2 22-10-1998
			JP 8506493 T 16-07-1996
			RU 2136697 C1 10-09-1999

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
C 0 7 K 7/08	C 0 7 K 7/08	
C 0 7 K 7/64	C 0 7 K 7/64	
C 0 7 K 14/22	C 0 7 K 14/22	
C 0 7 K 16/12	C 0 7 K 16/12	
C 0 7 K 19/00	C 0 7 K 19/00	
C 1 2 N 5/10	G 0 1 N 33/53	N
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/569	F
G 0 1 N 33/569	G 0 1 N 33/577	B
G 0 1 N 33/577	C 1 2 N 5/00	B
// C 1 2 P 21/08	C 1 2 P 21/08	

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

(72) 発明者 ド ボル, サビエール, トマ

ベルギー国 ナムール ビ - 5 0 0 0 リュ デ ブリュッセル, 6 1, ファカルテ ユニバーシ
テール ノートル ダム デ ラ ペ, ラボラトワール デイミュノロジー エ マイクロバイオ
ロジー

(72) 発明者 レトスン, ジーン - ジャック

ベルギー国 ナムール ビ - 5 0 0 0 リュ デ ブリュッセル, 6 1, ファカルテ ユニバーシ
テール ノートル ダム デ ラ ペ, ラボラトワール デイミュノロジー エ マイクロバイオ
ロジー

(72) 発明者 ロベ, イブ

ベルギー国 リキセンザール ビ - 1 3 3 0 ル - デ ランスティテュート 8 9, グラクソスミ
スクライン バイオロジカルズ ソシエテ アノニム

(72) 発明者 マーテン, パスカル, イボン

ベルギー国 ナムール ビ - 5 0 0 0 リュ デ ブリュッセル, 6 1, ファカルテ ユニバーシ
テール ノートル ダム デ ラ ペ, ラボラトワール デイミュノロジー エ マイクロバイオ
ロジー

(72) 発明者 プールマン, ジャン

ベルギー国 リキセンザール ビ - 1 3 3 0 ル - デ ランスティテュート 8 9, グラクソスミ
スクライン バイオロジカルズ ソシエテ アノニム

(72) 発明者 ヴェト, ピエール

ベルギー国 リキセンザール ビ - 1 3 3 0 ル - デ ランスティテュート 8 9, グラクソスミ
スクライン バイオロジカルズ ソシエテ アノニム

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA31 BA50 CA01 GA03 HA15

4B064 AG27 CC24 DA01 DA15

4B065 AA91X AA92X AB05 BA08 CA25 CA45 CA46

4C085 AA03 AA14 BA16 BB11 BB15 BB17 CC02 CC32 DD32 DD35

DD41 DD56 DD62 EE06 FF01 FF02 GG02 GG03 GG04 GG05

GG06

4H045 AA11 AA30 BA09 BA14 BA15 BA16 BA17 BA30 BA40 DA76

DA86 EA31 EA52

专利名称(译)	疫苗的成份		
公开(公告)号	JP2004526418A	公开(公告)日	2004-09-02
申请号	JP2002532470	申请日	2001-10-03
[标]申请(专利权)人(译)	葛兰素史密丝克莱恩生物有限公司		
申请(专利权)人(译)	葛兰素史克生物制品兴业ANONYME		
[标]发明人	ドボルサビエールトマ レトスンジーンジャック ロベイブ マーテンパスカルイボン プールマンジャン ヴェトピエール		
发明人	ドボル,サビエール,トマ レトスン,ジーン-ジャック ロベ,イブ マーテン,パスカル,イボン プールマン,ジャン ヴェト,ピエール		
IPC分类号	G01N33/53 A61K39/095 A61K39/395 A61P31/04 C07K7/06 C07K7/08 C07K7/64 C07K14/22 C07K16/12 C07K19/00 C12N5/10 C12N5/20 C12N15/09 C12P21/08 G01N33/569 G01N33/577 G01N33/68		
CPC分类号	A61K39/095 C07K14/22 C07K16/1217 G01N33/6854 G01N33/6878 G01N2333/22 G01N2400/50		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K39/095 A61K39/395.R A61P31/04 C07K7/06 C07K7/08 C07K7/64 C07K14/22 C07K16/12 C07K19/00 G01N33/53.N G01N33/569.F G01N33/577.B C12N5/00.B C12P21/08		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA31 4B024/BA50 4B024/CA01 4B024/GA03 4B024/HA15 4B064/AG27 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA15 4B065/AA91X 4B065/AA92X 4B065/AB05 4B065/BA08 4B065/CA25 4B065/CA45 4B065/CA46 4C085/AA03 4C085/AA14 4C085/BA16 4C085/BB11 4C085/BB15 4C085/BB17 4C085/CC02 4C085/CC32 4C085/DD32 4C085/DD35 4C085/DD41 4C085/DD56 4C085/DD62 4C085/EE06 4C085/FF01 4C085/FF02 4C085/GG02 4C085/GG03 4C085/GG04 4C085/GG05 4C085/GG06 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA09 4H045/BA14 4H045/BA15 4H045/BA16 4H045/BA17 4H045/BA30 4H045/BA40 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA31 4H045/EA52		
优先权	2000024200 2000-10-03 GB		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及用于脑膜炎球菌疫苗的组分，特别是模拟脑膜炎奈瑟氏球菌脂寡糖表位的肽，以及含有这种组分的疫苗。

元の残基	代表的な置換	好ましい置換
A	V, L, I	V
R	K, Q, N	K
N	Q, H, K, R	Q
D	E	E
C	S	S
Q	N	N
E	D	D
G	P, A	A
H	N, Q, K, R	R
I	L, V, M, A, F	L
L	I, V, M, A, F	I
K	R, Q, N	R
M	L, F, I	L
F	L, V, I, A, Y	L
P	A	A
S	T	T
T	S	S
W	Y, F	Y
Y	W, F, T, S	F
V	I, L, M, F, A	L