

(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2015-505309

(P2015-505309A)

(43) 公表日 平成27年2月19日(2015.2.19)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 39/095 (2006.01)	A 6 1 K 39/095	4 C 0 8 5
A 6 1 K 39/39 (2006.01)	A 6 1 K 39/39	4 H 0 4 5
C 0 7 K 14/22 (2006.01)	C 0 7 K 14/22 Z N A	
C 0 7 K 19/00 (2006.01)	C 0 7 K 19/00	

審査請求 有 予備審査請求 有 (全 36 頁)

(21) 出願番号	特願2014-549542 (P2014-549542)	(71) 出願人	504389991
(86) (22) 出願日	平成23年12月29日 (2011.12.29)		ノバルティス アーゲー
(85) 翻訳文提出日	平成26年6月30日 (2014.6.30)		スイス国 バーゼル リヒトシュトラッセル
(86) 国際出願番号	PCT/IB2011/056006		3 5
(87) 国際公開番号	W02013/098589	(74) 代理人	100078282
(87) 国際公開日	平成25年7月4日 (2013.7.4)		弁理士 山本 秀策
		(74) 代理人	100113413
			弁理士 森下 夏樹
		(72) 発明者	アリコ, ベアトリーチェ マリア
			イタリア国 イー53100 シエナ,
			ヴィア フィオレンティーナ 1, ノバル
			ティス ヴァクシンズ

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 髄膜炎菌H因子結合タンパク質のアジュバントされた組み合わせ

(57) 【要約】

髄膜炎菌 fHbp の M01573 配列は、ワクチンにおいて乏しい適用範囲を提供する。本発明は、2つの方法においてこの乏しい適用範囲に対処する。第1の側面において、fHbp に基づいたワクチンは、2つのファミリー I fHbp 配列を含み、1つは M01573 より密接に MC58 に関連があり、および逆もまた同じである。第2の側面において、複数のファミリーの fHbp に基づいたワクチンは、M01573 より密接に MC58 に関連があるファミリー I fHbp 配列を、ファミリー III fHbp 配列と組み合わせて使用する。組成物は、アルミニウムホスフェートアジュバントでアジュバントされる。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

第1のfHbp抗原および第2のfHbp抗原、並びにアルミニウムホスフェートアジュバントを含む免疫原性組成物であって、前記第1のfHbp抗原は、配列番号：23より密接に配列番号：26に関連があるアミノ酸配列を含み；および前記第2のfHbp抗原は、配列番号：26より密接に配列番号：23に関連があるアミノ酸配列を含む、免疫原性組成物。

【請求項 2】

第1のfHbp抗原および第2のfHbp抗原、並びにアルミニウムホスフェートアジュバントを含む免疫原性組成物であって、前記第1のfHbp抗原は、配列番号：23より密接に配列番号：26に関連があるアミノ酸配列を含み；および前記第2のfHbp抗原は、(i) 配列番号：25に対し少なくとも94%の配列同一性を有する、および/または(ii) 配列番号：25から少なくとも50個の連続したアミノ酸の断片からなるアミノ酸配列を含む、免疫原性組成物。 10

【請求項 3】

請求項1の組成物であって、前記第1のfHbp抗原は、(a) 血清殺菌アッセイにおいて株MC58に対して殺菌性である抗体をマウスにおいて誘発することができる、および/または(b) 配列番号：26および配列番号：23の両方に対し少なくとも75%の配列同一性を有するが、同じアルゴリズムおよびパラメーターを使用して整列させたとき配列番号：23よりも配列番号：26に対しより高い配列同一性を有する、組成物。

【請求項 4】

請求項2の組成物であって、前記第1のfHbp抗原は、(a) 血清殺菌アッセイにおいて株MC58に対して殺菌性である抗体をマウスにおいて誘発することができる、および/または(b) 配列番号：26および配列番号：23の両方に対し少なくとも75%の配列同一性を有するが、同じアルゴリズムおよびパラメーターを使用して整列させたとき配列番号：23よりも配列番号：26に対しより高い配列同一性を有する、組成物。 20

【請求項 5】

請求項2または請求項4の組成物であって、前記第2のfHbp抗原が血清殺菌アッセイにおいて株961-5945に対して殺菌性である抗体をマウスにおいて誘発することができる、組成物。

【請求項 6】

請求項1または請求項3の組成物であって、前記第2のfHbp抗原が、(a) 血清殺菌アッセイにおいて株MC58に対して殺菌性でない抗体をマウスにおいて誘発する、および/または(b) 配列番号：26および配列番号：23の両方に対し少なくとも75%の配列同一性を有するが、同じアルゴリズムおよびパラメーターを使用して整列させたとき配列番号：26よりも配列番号：23に対しより高い配列同一性を有する、組成物。 30

【請求項 7】

(i) 配列番号：25に対し少なくとも94%の配列同一性を有する、および/または(ii) 配列番号：25から少なくとも50個の連続したアミノ酸の断片からなるアミノ酸配列を含む第3のfHbp抗原を含む、請求項1、請求項3または請求項6の組成物。

【請求項 8】

請求項7の組成物であって、前記第3のfHbp抗原が、血清殺菌アッセイにおいて株961-5945に対して殺菌性である抗体をマウスにおいて誘発することができる、組成物。 40

【請求項 9】

前記組成物が(i) 配列番号：23に対し>95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む抗原、または(ii) 配列番号：24に対し>95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む抗原を含まない、請求項2、請求項4または請求項5の組成物。

【請求項 10】

請求項1～9のいずれか1項の組成物であって、前記fHbp抗原の少なくとも1つがN末端システインにて脂質付加された、組成物。

【請求項 11】

ポリペプチドおよびアルミニウムホスフェートアジュバントを含む免疫原性組成物であ 50

って、

前記ポリペプチドは、式 $\text{NH}_2\text{-A-}\{-\text{X-L-}\}_n\text{-B-COOH}$ を有し、式中：

・nは2である；第1のXは、配列番号：23より密接に配列番号：26に関連があるアミノ酸配列である；第2のXは、配列番号：26より密接に配列番号：23に関連があるアミノ酸配列である；各Lは、随意のリンカーアミノ酸配列である；Aは、随意のN末端アミノ酸配列である；およびBは、随意のC末端アミノ酸配列である；または

・nは3である；第1のXは、配列番号：23より密接に配列番号：26に関連があるアミノ酸配列である；第2のXは、配列番号：26より密接に配列番号：23に関連があるアミノ酸配列である；第3のXは、(i) 配列番号：25に対し少なくとも94%の配列同一性を有する、および/または(ii) 配列番号：25から少なくとも50個の連続したアミノ酸の断片からなる、アミノ酸配列である；各Lは、随意のリンカーアミノ酸配列である；Aは、随意のN末端アミノ酸配列である；およびBは、随意のC末端アミノ酸配列である；または

・nは2である；第1のXは、配列番号：23より密接に配列番号：26に関連があるアミノ酸配列である；第2のXは、(i) 配列番号：25に対し少なくとも94%の配列同一性を有する、および/または(ii) 配列番号：25から少なくとも50個の連続したアミノ酸の断片からなる、アミノ酸配列である；各Lは、随意のリンカーアミノ酸配列である；Aは、随意のN末端アミノ酸配列である；およびBは、随意のC末端アミノ酸配列である、免疫原性組成物。

【請求項12】

請求項1～11のいずれか1項の組成物であって、担体タンパク質に結合体化された、髄膜炎菌血清群(類)A、C、W135および/またはYからの荚膜サッカライドをさらに含む、組成物。

【請求項13】

請求項1～12のいずれか1項の組成物であって、担体タンパク質に結合体化された肺炎球菌荚膜サッカライドをさらに含む、組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、髄膜炎菌ワクチンの分野、特にfHbpを含有するものに関する。

【背景技術】

【0002】

ナイセリア・メニンジティディス(*Neisseria meningitidis*) (髄膜炎菌)は、グラム陰性球状細菌である。現在の髄膜炎菌ワクチンはまた、荚膜サッカライドに基づいている。これらは、一価の血清群C結合体ワクチンおよび血清群A、C、W135およびYについての4価の結合体混合物を含む。血清群B(「MenB」)に対する一般的な使用のために許可された有用なワクチンは、現在はない。

【0003】

MenBに対して免疫化することに使用するために提唱された1つの抗原は、H因子結合タンパク質(「fHbp」)である。この抗原はまた、タンパク質「741」(参照文献34における配列番号2535および2536)、「NMB1870」、「GNA1870」[参照文献1-2、3]、「P2086」、「LP2086」または「ORF2086」[4-5、6]と呼ばれている。このタンパク質は、十分に研究されてきた。それは、天然ではリポタンパク質であり、全ての髄膜炎菌血清群にわたって発現される。fHbpのC末端免疫優性ドメイン(「fHbpC」)の構造は、NMRによって決定されている[7]。タンパク質のこの部分は、8鎖の α -バレルを形成し、それらの鎖が可変性の長さのループによって接続される。バレルは、短い α -ヘリックスによって、および柔軟なN末端テールによって先行される。

【0004】

fHbp抗原は、3つの異なる変異体またはファミリーに入り[8]、所定のファミリーに対して生じた血清が同じファミリーの中では殺菌性であるが、その他の2つのファミリーの1つを発現する株に対しては活性でないこと、すなわちファミリー内の交差防御はあるが、ファミリー間の交差防御はないことを見いだした。したがって、参照文献8は、fHbpの異

10

20

30

40

50

なる変異体を単一のワクチンの組成物において組み合わせ、それによって、別々のタンパク質の混合物として、または異なる変異体の融合タンパク質として（後者は「タンデムタンパク質」）、株の適用範囲を増やすことを提唱する。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

【特許文献1】国際公開第03/063766号

【特許文献2】国際公開第2004/048404号

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献1】Maignaniら、J Exp Med (2003) 197:789~799

【非特許文献2】Welschら、J Immunol (2004) 172:5606~15

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0007】

fHbpのファミリーIは、株MC58を含み、それは最初のゲノム配列公開[9]のために使用された株であり、および「BAA-335」としてATCCから入手できる。fHbpについてのMC58配列は、本明細書において配列番号：1であり、成熟した髄膜炎菌タンパク質のN末端のシステインにて始まる配列番号：26に示してある。ファミリーIはまた、株M01573を含み[5]、その配列は本明細書において配列番号：23である（「B01」または「CDC1573」配列ともいわれる；データベース登録GI：40353481を参照されたい）。配列番号：23および26は、下で整列してある。

【0008】

M01573 fHbp配列は、ヒトワクチンにおける使用のために提唱されるが[10]、株MC58からのfHbpとのその緊密な配列関係にもかかわらず、本発明者らは、M01573配列に対して生じた血清が、MC58株に対して不十分な防御を提供することを見いだした。MC58は、広まっているファミリーI株の少なくとも30%を代表するため、したがって、M01573配列はファミリーIの不十分な適用範囲を提供する。本発明の目的は、この不十分な適用範囲に対処し、かつ複数のファミリーからのfHbp抗原を含む、さらなるおよび改善されたワクチン組成物を提供することである。幅広い点において、この目的は、2つの方法で達成される：

【0009】

第1の側面において、fHbpに基づいたワクチンは、2つのファミリーI fHbp配列を含み、一方はM01573（配列番号：23）より密接にMC58（配列番号：1）に関連があり、および他方はその逆である。したがって、本発明は、第1のfHbp抗原および第2のfHbp抗原を含む免疫原性組成物を提供し、第1のfHbp抗原は、配列番号：23より密接に配列番号：1に関連があるアミノ酸配列を含み；および第2のfHbp抗原は、配列番号：1より密接に配列番号：23に関連があるアミノ酸配列を含む。以下により詳しく述べるように、この免疫原性組成物は、これらの2つのfHbp抗原に加えてさらなる抗原成分を含むことができる。

【0010】

第2の側面において、複数のファミリーのfHbpに基づいたワクチンは、M01573より密接にMC58に関連があるファミリーI配列を、ファミリーIII配列（たとえば株M01240320からの配列番号：25）と組み合わせ使用する。したがって、本発明は、第1のfHbp抗原および第2のfHbp抗原を含む免疫原性組成物を提供し、第1のfHbp抗原は、配列番号：23より密接に配列番号：1に関連があるアミノ酸配列を含み；および第2のfHbp抗原は、以下のアミノ酸配列を含む：（i）配列番号：25に対し少なくともw%の配列同一性を有する、および/または（ii）配列番号：25から少なくともx個の連続したアミノ酸の断片からなる。wの値は、少なくとも94（たとえば95、96、97、98、99またはそれ以上）である。xの値は、（a）少なくとも50、たとえば55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、110、120、130、140、150、160、180、200または（b）少なくとも7（たとえば8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、

10

20

30

40

50

50、60、70、80、90、100、120、140、160、180、200)のいずれかであり、ただし、上記断片はまた、配列番号：2および/または配列番号：3の断片でない。第1および第2のfHbp抗原は、異なるアミノ酸配列を有する。以下により詳しく述べるように、この免疫原性組成物はこれらの2つのfHbp抗原に加えてさらなる抗原成分を含むことができるが、好ましくは、配列番号：23に対して 95%の同一性のアミノ酸配列を含むfHbp抗原を含まない。

【0011】

本発明の免疫原性組成物は、アジュバントされる。アジュバントは、アルミニウムホスフェート塩を含む(下記を参照されたい)。

【0012】

H因子結合タンパク質(群)

10

本発明の組成物は、少なくとも2つの異なる髄膜炎菌H因子結合タンパク質(fHbp)を含み、異なった免疫応答を生じ、それは完全には交差反応性でなく、およびそれは髄膜炎菌に対して単一のfHbp単独よりも広い範囲の株適用範囲を提供する。

【0013】

本発明の第1の側面において、組成物は、2つのファミリーI fHbp抗原配列を含む。これらの第1のものは、M01573より密接にMC58に関連がある；第2は、MC58より密接にM01573に関連がある。本発明の側面において、組成物は、M01573より密接にMC58に関連があるfHbpを含む。fHbp抗原配列は、以下の基準の1つまたは複数を満たす場合、M01573より密接にMC58に関連があると定義してもよい：

【0014】

20

(a) 配列番号：1を含む野生型髄膜炎菌fHbpを認識するが、同じ結合条件下で、配列番号：4を含む野生型髄膜炎菌fHbpを認識しない抗体をマウスにおいて誘発することができる[NB：それは、両方の配列番号：1および4を認識するいくつかの抗体を誘発してもよい]。

【0015】

(b) 血清殺菌アッセイにおいて株MC58に対して殺菌性である抗体をマウスにおいて誘発することができる；たとえば、ヒト補体でゴールドシュナイダー(Goldschneider)アッセイを使用して 1：4の血清殺菌力価を提供する[11-12、13]、および/または仔ウサギの補体を使用して 1：128の血清殺菌力価を提供する。

【0016】

30

(c) 配列番号：1および配列番号：23の両方に、少なくとも75%の配列同一性を有するが、同じアルゴリズムおよびパラメーターを使用して整列させたとき配列番号：23よりも配列番号：1に対しより高い配列同一性を有する。

【0017】

(d) 配列番号：27~37としてリストされた6-merの1つまたは複数を含む。NB：配列番号：27~34の6-merは、配列において重複してもよい；および配列番号：36および37の6-merは、配列において重複してもよい。

【0018】

(e) 配列番号：1と整列させたときに、配列番号：1のAla-2と整列されるアミノ酸残基にスレオニン残基を有しない(および好ましくは、アラニン残基を有する)。

40

【0019】

(f) 配列番号：1と整列させたときに、配列番号：1のGly-141と整列されるアミノ酸残基にバリン残基を有しない(および好ましくは、グリシン残基を有する)。

【0020】

これらの6つの基準の中で、配列は、好ましくは少なくとも基準(b)または(c)、より好ましくは少なくとも(b)および(c)、さらにより好ましくは少なくとも(a)、(b)および(c)、並びに最も好ましくは6つ全てを満たす。

【0021】

第1の側面については、fHbp抗原配列は、以下の基準の1つまたは複数を満たす場合、MC58より密接にM01573に関連があると定義してもよい：

50

【0022】

(a) 配列番号：4を含む野生型髄膜炎菌fHbpを認識するが、同じ結合条件下で、配列番号：1を含む野生型髄膜炎菌fHbpを認識しない抗体をマウスにおいて誘発することができる[NB：それは、両方の配列番号：1および4を認識するいくつかの抗体を誘発してもよい]。

【0023】

(b) 血清殺菌アッセイにおいて株MC58に対して殺菌性でない抗体をマウスにおいて誘発する；たとえば、ヒト補体でゴールドシュナイダーアッセイを使用して 1：4の血清殺菌力価を提供する[11-13]、および/または仔ウサギの補体を使用して 1：128の血清殺菌力価を提供する。

【0024】

(c) 配列番号：1および配列番号：23の両方に、少なくとも75%の配列同一性を有するが、同じアルゴリズムおよびパラメーターを使用して整列させたとき配列番号：1よりも配列番号：23に対しより高い配列同一性を有する。

【0025】

(d) 配列番号：38～48としてリストされた6-merの1つまたは複数を含む。NB：配列番号：38～45の6-merは、配列において重複してもよい；および配列番号：47および48の6-merは、配列において重複してもよい。

【0026】

(e) 配列番号：1と整列させたときに、配列番号：1のAla-2と整列されるアミノ酸残基にスレオニン残基を有する。

【0027】

(f) 配列番号：1と整列させたときに、配列番号：1のGly-141と整列されるアミノ酸残基にバリン残基を有する。

【0028】

これらの6つの基準の中で、配列は、好ましくは少なくとも基準(a)または(c)、より好ましくは少なくとも(a)および(c)、さらにより好ましくは少なくとも(a)、(b)および(c)、並びに最も好ましくは6つ全てを満たす。

【0029】

本発明の第2の側面については、第2のfHbp抗原は、以下のアミノ酸配列を含む：(i) 配列番号：25に対し少なくともw%の配列同一性を有する、および/または(ii) 配列番号：25から少なくともx個の連続したアミノ酸の断片からなる。wの値は、少なくとも94(たとえば95、96、97、98、99またはそれ以上)である。xの値は、(a) 少なくとも50、たとえば55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、110、120、130、140、150、160、180、200または(b) 少なくとも7(たとえば8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50、60、70、80、90、100、120、140、160、180、200)のいずれかであり、ただし、上記断片はまた、配列番号：2および/または配列番号：3の断片でない。好ましい断片は、配列番号：25からのエピートープを含む。

【0030】

M01573より密接にMC58に関連がある、もしくはその逆である、または配列番号：25に対し94%の同一性を持つ配列および/または配列番号：25の断片を含む、fHbp配列は、これらの公知の配列に基づいて設計することができ、または当該技術分野において報告されていた多数の野生型fHbp配列から選択することができ、たとえば参考文献1-8および14-15、16、17、18、19を参照されたい。

【0031】

本発明で使用される適したアミノ酸配列は、配列番号：1および23と比較して、1つまたは複数(たとえば1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、その他)の保存的アミノ酸置換、すなわち1つのアミノ酸における、関連する側鎖を有する別のものへの交換を含んでもよい。遺伝的にコードされたアミノ酸は、一般に4つのファミリーに分けられる：(1) 酸性、

10

20

30

40

50

すなわちアスパルテート、グルタマート；(2)塩基性、すなわちリジン、アルギニン、ヒスチジン；(3)非極性、すなわちアラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン；および(4)極性無電荷、すなわちグリシン、アスパラギン、グルタミン、システイン、セリン、スレオニン、チロシン。フェニルアラニン、トリプトファンおよびチロシンは、合わせて芳香族アミノ酸として時には分類される。一般には、これらのファミリーの中での単一のアミノ酸の置換は、生物学的活性に対して大きな影響を与えない。抗原は、参照配列に対して1つまたは複数(たとえば1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、その他)の単一のアミノ酸欠失を有してもよい。抗原はまた、参照配列に対して1つまたは複数(たとえば1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、その他)の挿入(たとえばそれぞれ1、2、3、4または5アミノ酸)を含んでもよい。

10

【0032】

本発明の組成物は、2つの異なるfHbp配列のみを含むことができ、または2つを超える異なるfHbp配列を含むことができる。たとえば、第1の側面の組成物は、上述した2つのfHbp配列を超えてさらなるfHbp配列を含んでもよいし、または含まなくてもよく、たとえばファミリーIIから、および/またはファミリーIIIからのfHbp配列、たとえば本明細書において配列番号：2および/または配列番号：3を含んでもよい。したがって、組成物は、二価のfHbp組成物でもよく、またはたとえば、三価または四価のfHbp組成物での2つを超える異なるfHbp配列を含んでもよい。

20

【0033】

第1の側面の組成物は、2つのファミリーI fHbp配列を含み、および理想的にはファミリーIIおよび/またはファミリーIIIからもまたfHbp配列を含む。有用には、それは、以下のアミノ酸配列を含むfHbp抗原を含有する：(i)配列番号：25に対し少なくともw%の配列同一性を有する、および/または(ii)配列番号：25から少なくともx個の連続したアミノ酸の断片からなる。wおよびxの値は上で示してあり、および好ましい断片は配列番号：25からのエピトープを含む。このようなfHbp抗原(第2の側面の組成物においてもまた存在する)は、血清殺菌アッセイにおいて株961-5945に対して殺菌性である抗体をマウスにおいて誘発してもよい；たとえば、ヒト補体でゴールドシュナイダーアッセイを使用して1:4の血清殺菌力価を提供する[11-13]、および/または仔ウサギの補体を使用して1:128の血清殺菌力価を提供する。株961-5945は、文献において広く報告されており(たとえば、参照文献1、2および20-21、22、23、24、25、26を参照されたい。)、およびナイセリア(*Neisseria*) PubMLSTコレクションから、分離株MDU9615945、id 1002として入手できる。それは、電気泳動型A4およびMLST型153のB:2b:P1.21,16株である。そのfHbp配列は、参照文献23、GI:106073476において与えられる。

30

【0034】

したがって、第1の側面の組成物は、以下を含んでもよい：(i)上記記載の通り第1および第2のfHbp抗原、および(ii)以下のアミノ酸配列を含む第3のfHbp抗原：(i)配列番号：25に対し少なくともw%の配列同一性を有する、および/または(ii)配列番号：25から少なくともx個の連続したアミノ酸の断片からなる。

40

【0035】

第2の側面の組成物は、上で開示したように、2つの異なるfHbp抗原を含む。組成物は、第3のfHbp抗原を含んでもよいが、いずれにしる組成物が以下を含まないことが好ましい：(i)配列番号：23に対し>95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む抗原、または(ii)配列番号：24に対し>95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む抗原。

【0036】

本発明の組成物におけるfHbp抗原は、たとえばN末端システインにて、脂質付加されてもよい。しかし、その他の態様において、fHbp抗原(群)は、脂質付加されない。脂質付加されたfHbpについて、システインに付着される脂質は、通常、たとえばトリパルミトイル-S-グリセリル-システイン(Pam3Cys)、ジパルミトイル-S-グリセリルシステイン(Pam2Cys)、N-アセチル(ジパルミトイル-S-グリセリルシステイン)、その他のように、パ

50

ルミトイル残基を含むだろう。脂質付加された成熟fHbp配列の例は、配列番号：23（配列番号：4を含む）、配列番号：24（配列番号：5を含む）および配列番号：25（配列番号：6を含む）である。

【0037】

組成物が異なる髄膜炎菌fHbp抗原を含む場合、これらは別々のポリペプチド（たとえば第1および第2のポリペプチド）として存在してもよく、またはこれらは単一の「ハイブリッド」ポリペプチドの一部として存在してもよく、すなわちその場合には、参照文献27において髄膜炎菌抗原について開示されるように、少なくとも2つ（たとえば2、3、4、5またはそれ以上）のfHbp抗原が単一のポリペプチド鎖（融合タンパク質）として発現される。

10

【0038】

ハイブリッドポリペプチドは、式 $\text{NH}_2\text{-A-}\{-\text{X-L-}\}_n\text{-B-COOH}$ によって表すことができ、式中、各Xは、上に定義したとおり、異なるfHbp抗原のアミノ酸配列である；Lは、随意的リンカーアミノ酸配列である；Aは、随意的N末端アミノ酸配列である；Bは、随意的C末端アミノ酸配列である；nは、2つ以上（たとえば2、3、4、5、6、その他）の整数である。通常、nは、2または3である。

【0039】

-X-部分がその野生型形態におけるリーダーペプチド配列を有する場合、これはハイブリッドタンパク質において含まれてもよいし、または省略されてもよい。いくつかの態様において、リーダーペプチドは、ハイブリッドタンパク質のN末端に位置する-X-部分のもの以外は欠失されるだろう、すなわち、 X_1 のリーダーペプチドは保持されるが、 $X_2\ldots X_n$ のリーダーペプチドは省略されるだろう。これは、全てのリーダーペプチドを欠失させて、部分-A-として X_1 のリーダーペプチドを使用することに等しい。

20

【0040】

$\{-\text{X-L-}\}$ の各nの例について、リンカーアミノ酸配列-L-は、存在するか、または存在しなくてもよい。例として、 $n=2$ のとき、ハイブリッドは、 $\text{NH}_2\text{-X}_1\text{-L}_1\text{-X}_2\text{-L}_2\text{-COOH}$ 、 $\text{NH}_2\text{-X}_1\text{-X}_2\text{-COOH}$ 、 $\text{NH}_2\text{-X}_1\text{-L}_1\text{-X}_2\text{-COOH}$ 、 $\text{NH}_2\text{-X}_1\text{-X}_2\text{-L}_2\text{-COOH}$ 、その他であってもよい。リンカーアミノ酸配列（群）-L-は、典型的には短いだろう（たとえば20以下のアミノ酸、すなわち20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、1）。例には、クローニングを容易にする短いペプチド配列、ポリ-グリシンリンカー（すなわち Gly_n であって、 $n=2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10$ またはそれ以上を含む）およびヒスチジンタグ（すなわち His_n であって、 $n=3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10$ またはそれ以上を含む）。その他の適したリンカーアミノ酸配列は、当業者にとって明らかだろう。有用なリンカーは、GSGGGG（配列番号：15）またはGSGSGGGG（配列番号：16）であり、BamHI制限酵素切断部位から形成される Gly-Ser ジペプチドを持ち、したがってクローニングおよび操作を補助し、および $(\text{Gly})_4$ テトラペプチドは典型的なポリ-グリシンリンカーである。別の適したリンカーは、特に最終的な L_n としての使用のために、 Leu-Glu ジペプチドである。

30

【0041】

-A-は、随意的N末端アミノ酸配列である。これは、典型的には短いだろう（たとえば40以下のアミノ酸、すなわち40、39、38、37、36、35、34、33、32、31、30、29、28、27、26、25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、1）。例には、タンパク質輸送に向かわせるためのリーダー配列、またはクローニングもしくは精製を容易にする短いペプチド配列（たとえばヒスチジンタグ、すなわち His_n であって、 $n=3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10$ またはそれ以上を含む）。その他の適したN末端アミノ酸配列は、当業者にとって明らかだろう。 X_1 がそれ自体のN末端メチオニンを欠いている場合、-A-は好ましくは、N末端メチオニンを提供するオリゴペプチド（たとえば1、2、3、4、5、6、7または8アミノ酸）、たとえば Met-Ala-Ser または単一のMet残基である。

40

【0042】

50

-B-は、随意のC末端アミノ酸配列である。これは、典型的には短いだろう（たとえば40以下のアミノ酸、すなわち39、38、37、36、35、34、33、32、31、30、29、28、27、26、25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、1）。例には、タンパク質輸送に向かわせるための配列、クローニングもしくは精製を容易にする短いペプチド配列（たとえばヒスチジントグ、すなわちHis_nであって、n = 3、4、5、6、7、8、9、10またはそれ以上、配列番号：17など）またはタンパク質安定性を増強する配列を含む。その他の適したC末端アミノ酸配列は、当業者にとって明らかだろう。

【0043】

第1および第2の側面の好ましい組成物は、配列番号：25に対し少なくとも99%の配列同一性（たとえば100%の同一性）を有するアミノ酸配列を含むfHbp抗原を含む。これは、第1の側面における第3の抗原および第2の側面における第2の抗原であることができる。この抗原は、N末端システインを持つリポタンパク質であることができる。

10

【0044】

アジュバント

上述したように、本発明の組成物は、アジュバントされている。組成物は、アルミニウムホスフェートとして公知のアジュバントを含む。この名前は、慣習的であるが、便宜のためにだけ使用され、実際には存在する実際の化学的化合物の正確な記述でない（たとえば、参考文献28の第9章を参照されたい）。本発明は、一般的な使用における「ホスフェート」アジュバントのいずれかを使用することができる。

20

【0045】

「アルミニウムホスフェート」として公知のアジュバントは、典型的にはアルミニウムヒドロキシホスフェートであり、たいてい少量のサルフェートをもまた含有する（すなわちアルミニウムヒドロキシホスフェートサルフェート）。これらは沈澱によって得られてもよく、および沈澱の間の反応条件および濃度は、塩におけるヒドロキシルに対するホスフェートの置換度に影響する。アルミニウムホスフェートは、一般に0.3~1.2のPO₄/Alモル比を有する。アルミニウムホスフェートは、ヒドロキシル基の存在によって、厳密なAlPO₄から区別することができる。たとえば、3164cm⁻¹でのIRスペクトルバンド（たとえば2000まで加熱されるとき）は、構造的なヒドロキシルの存在を示す。アルミニウムホスフェートアジュバントは、少量のサルフェートを含んでもよく（すなわちアルミニウムヒドロキシホスフェートサルフェート）、並びにナトリウムおよび/または塩化物イオンをもまた含有してもよい[29]。アジュバントは、沈澱によって得られてもよい。

30

【0046】

アルミニウムヒドロキシホスフェートは、化学量論的な化合物ではなく、並びにそのヒドロキシルおよびホスフェート組成は、沈澱反応物および条件に依存する。このヒドロキシル/ホスフェート組成は、アジュバントのゼロ電荷点（PZC；表面がゼロの正味電荷を有するpH）に影響を及ぼす。PZCは、ヒドロキシルに対するホスフェートの置換度（P/Alモル比）に反比例する。ヒドロキシルアニオンに対するホスフェートアニオンの置換は、PZCを低下させる。したがって、PZCは、溶液における遊離型リン酸イオンの濃度を変えることによって（より多くのホスフェート=より酸性のPZC）、またはヒスチジン緩衝液などの緩衝液を添加することによって（PZCをより塩基性にする）、変化させることができる。本発明で使用するアルミニウムホスフェートは、一般に5.0~6.6、たとえば5.4~6.2のPZCを有する。

40

【0047】

アルミニウムホスフェートアジュバントのP/Alモル比は、一般に0.3~1.2、好ましくは0.8~1.2、または0.85~1.0、およびより好ましくは、約0.9であるだろう。少なくとも0.5のP/Alモル比は、熟成特性がより優れたアジュバントを提供することができる。

【0048】

アルミニウムホスフェートは、一般に非晶質だろう（すなわちX線に対し非晶質）。それは一般に粒子だろう（たとえば透過型電子顕微鏡写真に示されるように板状形態）。プ

50

レートの典型的な直径は10-100nmであり、およびこれらは0.5-20 μm (たとえば約1-10 μm) の大きさの凝集体を形成する。pH 7.4にてmg Al^{+++} 当たり0.7-1.5mgタンパク質の吸着能力は、アルミニウムホスフェートアジュバントについて報告されている。

【0049】

典型的なアジュバントは、0.84~0.92のP/Alモル比を持つ非晶質のアルミニウムヒドロキシホスフェートであり、およびこのアジュバントは0.6mg Al^{3+} /mlにて含有されてもよい。

【0050】

患者に対する投与のための組成物における Al^{+++} の濃度は、好ましくは5mg/ml未満であり、たとえば 4mg/ml、 3mg/ml、 2mg/ml、 1mg/ml、その他である。好ましい範囲は、0.2~1mg/mlである。最大 Al^{+++} 濃度0.85mg/用量が好ましい。

10

【0051】

単一のワクチンにおいて異なるアルミニウム塩の混合物を使用することが公知であり、たとえば参照文献30を参照されたい。アルミニウムホスフェートおよび水酸化アルミニウムの両方を含有するアジュバントをfHbpと使用することができるが、組成物が任意の水酸化アルミニウムアジュバントを含むべきでないことが好ましく、なぜなら上記の通り、それがfHbpと混合してもよい一定の抗原を分解することができるからである(特に、結合体化された細菌莢膜サッカライド)。その代わりに、アルミニウムホスフェートアジュバントのみを使用することが好ましい。

【0052】

20

アルミニウム塩(群)がアジュバントとして使用されるとき、本発明の組成物において少なくとも75%(重量で)のfHbpが、アルミニウム塩に、たとえば 80%、 75%、 90%、 95%またはさらに100%吸着されるべきである。吸着されるfHbpの比率は、製剤の間の塩濃度および/またはpHを変化させることによって制御することができ、たとえば一般に、NaCl濃度が高いほどfHbpの吸着を減少させることができる。任意の製剤のための吸着量は、アジュバントのPZC、製剤の間の塩濃度およびpH、アジュバント濃度、抗原濃度、並びに抗原のpIを含むパラメーターの組み合わせに依存するだろう。吸着に対する各々のこれらのパラメーターの影響は、容易に評価することができる。吸着の程度は、組成物におけるfHbp抗原の総量(たとえば吸着が生じる前に測定される、または吸着された抗原を脱着することによって測定される)を遠心分離後の上清に残る量と比較することによって、決定することができる(たとえば参照文献31の第4章を参照されたい)。遠心分離後の上清における検出可能な抗原の非存在は、完全な吸着が生じたこと、すなわちfHbpの全てがペレットにあり、ペレットは不溶性アジュバントおよびその吸着された内容物を含有することを示す。fHbp抗原の効率的な吸着は、参照文献32に開示された技術を使用することができる。

30

【0053】

さらなる抗原(群)

fHbp抗原(群)に加えて、本発明の組成物は、髄膜炎菌からの、またはその他の病原体からの、たとえば肺炎球菌などのその他の細菌からの、さらなる抗原を含むことができる。

40

【0054】

さらなる髄膜炎菌ポリペプチド抗原

髄膜炎菌fHbp抗原を含むことに加えて、組成物は、1つまたは複数のさらなる髄膜炎菌ポリペプチド抗原(群)を含んでもよい。したがって、組成物は、以下からなる群より選択されるポリペプチド抗原を含んでもよい: 287、NadA、NspA、HmbR、NhhA、Appおよび/またはOmp85。これらの抗原は、精製したポリペプチド、たとえば組換えポリペプチドとして、有用に存在するだろう。抗原は、好ましくは被験体に投与した後に殺菌抗髄膜炎菌抗体を誘発するだろう。組成物がPorA抗原を含む場合、いくつかの態様において、1つの髄膜炎菌PorA血清サブタイプのみが含まれる。いくつかの態様において、髄膜炎菌PorA外膜タンパク質は、組成物に含まれない。

50

【0055】

本発明の組成物は、287抗原を含んでもよい。287抗原は、遺伝子NMB2132 (GenBankアクセッション番号GI: 7227388; 本明細書において配列番号: 9) として、髄膜炎菌血清群B株MC58 [9] について公開されたゲノム配列に含まれていた。多くの株からの287抗原の配列が、それ以来公開されてきた。たとえば、287の対立遺伝子の形態は、参考文献33の図5および15において、並びに参考文献34 (その中において配列番号3179~3184) の実施例13および図21において参照することができる。287抗原の種々の免疫原性の断片もまた報告されてきた。本発明で使用するための好ましい287抗原は、以下のアミノ酸配列を含む: (a) 配列番号: 9に対し50%またはそれ以上の同一性を有する (たとえば60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%またはそれ以上); および/または (b) 配列番号: 9の少なくとも「n」個の連続したアミノ酸の断片を含み、「n」は7またはそれ以上である (たとえば8、10、12、14、16、18、20、25、30、35、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250またはそれ以上)。 (b) の好ましい断片は、配列番号: 9からのエピトープを含む。本発明で最も有用な287抗原は、被験体に投与した後に配列番号: 9のアミノ酸配列からなる髄膜炎菌ポリペプチドに結合することができる抗体を誘発することができる。本発明で使用するための有利な287抗原は、被験体に投与した後に殺菌抗髄膜炎菌抗体を誘発することができる。

【0056】

本発明の組成物は、NadA抗原を含んでもよい。NadA抗原は、遺伝子NMB1994 (GenBankアクセッション番号GI: 7227256; 本明細書において配列番号: 10) として、髄膜炎菌血清群B株MC58 [9] について公開されたゲノム配列に含まれていた。多くの株からのNadA抗原の配列が、それ以来公開されており、ナイセリアの (Neisserial) 付着因子としてのタンパク質の活性がよく考証されてきた。NadAの種々の免疫原性の断片もまた報告されてきた。本発明で使用するための好ましいNadA抗原は、以下のアミノ酸配列を含む: (a) 配列番号: 10に対し50%またはそれ以上の同一性を有する (たとえば60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%またはそれ以上); および/または (b) 配列番号: 10の少なくとも「n」個の連続したアミノ酸の断片を含み、「n」は7またはそれ以上である (たとえば8、10、12、14、16、18、20、25、30、35、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250またはそれ以上)。 (b) の好ましい断片は、配列番号: 10からのエピトープを含む。本発明で最も有用なNadA抗原は、被験体に投与した後に配列番号: 10のアミノ酸配列からなる髄膜炎菌ポリペプチドに結合することができる抗体を誘発することができる。本発明で使用するための有利なNadA抗原は、被験体に投与した後に殺菌抗髄膜炎菌抗体を誘発することができる。本発明で使用するための有用なNadA抗原は、配列番号: 49のアミノ酸配列を有する。

【0057】

本発明の組成物は、NspA抗原を含んでもよい。NspA抗原は、遺伝子NMB0663 (GenBankアクセッション番号GI: 7225888; 本明細書において配列番号: 11) として、髄膜炎菌血清群B株MC58 [9] について公開されたゲノム配列に含まれていた。抗原は、参考文献35および36により以前に公知であった。多くの株からのNspA抗原の配列がそれ以来公開されてきた。NspAの種々の免疫原性の断片もまた報告されてきた。本発明で使用するための好ましいNspA抗原は、以下のアミノ酸配列を含む: (a) 配列番号: 11に対し50%またはそれ以上の同一性を有する (たとえば60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%またはそれ以上); および/または (b) 配列番号: 11の少なくとも「n」個の連続したアミノ酸の断片を含み、「n」は7またはそれ以上である (たとえば8、10、12、14、16、18、20、25、30、35、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250またはそれ以上)。 (b) の好ましい断片は、配列番号: 11からのエピトープを含む。本発明で最も有用なNspA抗原は、被験体に投与した後に配列番号: 11のアミノ酸配列からなる髄膜炎菌ポリペプチドに結合することができる抗体を誘発することができる。本発明で使用するための有利なNspA抗原は、被験体に投与した後に殺菌抗髄膜炎菌抗体を誘発することができる。

【0058】

本発明の組成物は、髄膜炎菌HmbR抗原を含んでもよい。全長HmbR配列は、遺伝子NMB1668（本明細書において配列番号：7）として、髄膜炎菌血清群B株MC58〔9〕について公開されたゲノム配列に含まれていた。参照文献37は、異なる株からのHmbR配列を報告する（本明細書において配列番号：8）。配列番号：7および8は、1つのアミノ酸だけ長さが異なり、および94.2%の同一性を有する。本発明は、全長HmbR配列を含むポリペプチドを使用することができるが、たいてい部分的なHmbR配列を含むポリペプチドを使用するだろう。したがって、いくつかの態様において、本発明に従って使用されるHmbR配列は、配列番号：7に対し少なくともi%の配列同一性を有するアミノ酸配列であって、iの値は、50、60、70、80、90、95、99またはそれ以上であるアミノ酸配列を含んでもよい。その他の態様において、本発明に従って使用されるHmbR配列は、配列番号：7の少なくともj個の連続したアミノ酸の断片であって、jの値は、7、8、10、12、14、16、18、20、25、30、35、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250またはそれ以上である、断片を含んでもよい。その他の態様において、本発明に従って使用されるHmbR配列は、以下のアミノ酸配列を含んでもよい（i）配列番号：7に対し少なくともi%の配列同一性を有する、および/または（ii）配列番号：7の少なくともj個の連続したアミノ酸の断片を含む。j個のアミノ酸の好ましい断片は、配列番号：7からのエピトープを含む。このようなエピトープは、HmbRの表面に位置されるアミノ酸を通常含むだろう。有用なエピトープは、ヘモグロビンに対するHmbRの結合に関与するアミノ酸を有するものを含む。なぜなら、これらのエピトープに結合する抗体が宿主ヘモグロビンに結合するための細菌の能力を遮断することができるためである。HmbRのトポロジーおよびその重要な官能残基は、参照文献38において調査された。本発明で最も有用なHmbR抗原は、被験体に投与した後に配列番号：7のアミノ酸配列からなる髄膜炎菌ポリペプチドに結合することができる抗体を誘発することができる。本発明で使用するための有利なHmbR抗原は、被験体に投与した後に殺菌抗髄膜炎菌抗体を誘発することができる。

【0059】

本発明の組成物は、NhhA抗原を含んでもよい。NhhA抗原は、遺伝子NMB0992（GenBankアクセッション番号GI：7226232；本明細書において配列番号：12）として、髄膜炎菌血清群B株MC58〔9〕について公開されたゲノム配列に含まれていた。多くの株からのNhhA抗原の配列は、たとえば参照文献33および39から公開されており、およびNhhAの種々の免疫原性の断片が報告されてきた。それは、Hsfとしても知られる。本発明で使用するための好ましいNhhA抗原は、以下のアミノ酸配列を含む：（a）配列番号：12に対し50%またはそれ以上の同一性を有する（たとえば60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%またはそれ以上）；および/または（b）配列番号：12の少なくとも「n」個の連続したアミノ酸の断片を含み、「n」は7またはそれ以上である（たとえば8、10、12、14、16、18、20、25、30、35、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250またはそれ以上）。（b）の好ましい断片は、配列番号：12からのエピトープを含む。本発明で最も有用なNhhA抗原は、被験体に投与した後に配列番号：12のアミノ酸配列からなる髄膜炎菌ポリペプチドに結合することができる抗体を誘発することができる。本発明で使用するための有利なNhhA抗原は、被験体に投与した後に殺菌抗髄膜炎菌抗体を誘発することができる。

【0060】

本発明の組成物は、App抗原を含んでもよい。App抗原は、遺伝子NMB1985（GenBankアクセッション番号GI：7227246；本明細書において配列番号：13）として、髄膜炎菌血清群B株MC58〔9〕について公開されたゲノム配列に含まれていた。多くの株からのApp抗原の配列がそれ以来公開されてきた。Appの種々の免疫原性の断片もまた報告されてきた。本発明で使用するための好ましいApp抗原は、以下のアミノ酸配列を含む：（a）配列番号：13に対し50%またはそれ以上の同一性を有する（たとえば60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%またはそれ以上）；および/または（b）配列番号：13の少なくとも「n」個の連続したアミノ酸の断片を含み、

「n」は7またはそれ以上である（たとえば8、10、12、14、16、18、20、25、30、35、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250またはそれ以上）。（b）の好ましい断片は、配列番号：13からのエピトープを含む。本発明で最も有用なApp抗原は、被験体に投与した後に配列番号：13のアミノ酸配列からなる髄膜炎菌ポリペプチドに結合することができる抗体を誘発することができる。本発明で使用するための有利なApp抗原は、被験体に投与した後に殺菌抗髄膜炎菌抗体を誘発することができる。

【0061】

本発明の組成物は、Omp85抗原を含んでもよい。Omp85抗原は、遺伝子NMB0182（GenBankアクセッション番号GI：7225401；本明細書において配列番号：14）として、髄膜炎菌血清群B株MC58[9]について公開されたゲノム配列に含まれていた。多くの株からのOmp85抗原の配列が、それ以来公開されてきた。Omp85のさらなる情報は、参考文献40および41において見いだすことができる。Omp85の種々の免疫原性の断片もまた報告されてきた。本発明で使用するための好ましいOmp85抗原は、以下のアミノ酸配列を含む：（a）配列番号：14に対し50%またはそれ以上の同一性を有する（たとえば60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%またはそれ以上）；および/または（b）配列番号：14の少なくとも「n」個の連続したアミノ酸の断片を含み、「n」は7またはそれ以上である（たとえば8、10、12、14、16、18、20、25、30、35、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250またはそれ以上）。（b）の好ましい断片は、配列番号：14からのエピトープを含む。本発明で最も有用なOmp85抗原は、被験体に投与した後に配列番号：14のアミノ酸配列からなる髄膜炎菌ポリペプチドに結合することができる抗体を誘発することができる。本発明で使用するための有利なOmp85抗原は、被験体に投与した後に殺菌抗髄膜炎菌抗体を誘発することができる。

【0062】

髄膜炎菌リポオリゴ糖

髄膜炎菌fHbpポリペプチド抗原を含むことに加えて、組成物は、1つまたは複数の髄膜炎菌リポオリゴ糖（LOS）抗原（群）を含んでもよい。髄膜炎菌LOSは、細菌の外膜の外側の単層において見いだされるグルコサミンに基づいたリン脂質である。それは、リピドA部分およびコアオリゴ糖領域を含み、リピドA部分が膜における疎水性アンカーとして作用する。オリゴ糖コアの中の不均質性は、異なる髄膜炎菌株の中の構造的および抗原性の多様性を生じ、それは12の免疫型（L1からL12）に株を細分化するために使用されてきた。本発明は、任意の免疫型からの、たとえばL1、L2、L3、L4、L5、L6、L7および/またはL8からのLOSを使用してもよい。

【0063】

L2およびL3の -鎖は、ラクト-N-ネオテトラオース（LNnT）を天然に含む。本発明がL2またはL3免疫型からのLOSを使用する場合、このLNnTは存在しなくてもよい。この不存在は、 -鎖の中でLNnT四糖を合成するためのこれらの能力を破壊するように操作された変異株を使用することによって、都合よく達成することができる。関連する生合成付加を担う酵素のロックアウトによってこの目標を達成することが公知である[42、43]。例として、LgtB酵素のロックアウトは、LNnTの末端ガラクトースの付加を妨げ、同様に下流の -鎖の末端シアル酸の付加を妨げる。LgtA酵素のロックアウトは、LNnTのN-アセチルグルコサミンの付加およびまた下流の付加を妨げる。LgtAロックアウトは、LgtCロックアウトが付随し得る。同様に、LgtEおよび/またはGalE酵素のロックアウトは、内部ガラクトースの付加を妨げ、およびLgtFのロックアウトはHep^I残基へのグルコースの付加を妨げる。これらのロックアウトのいずれかを、単独でまたは組み合わせで、L2、L3、L4、L7またはL9免疫型株におけるLNnT四糖を破壊するために使用することができる。LNnTエピトープを取り除くと共に有用な免疫原性を保持するLOSを提供するため、少なくともLgtBのロックアウトが好ましい。

【0064】

LNnTエピトープを破壊する変異に加えて、またはこれに代えて、galE遺伝子のロックアウトもまた有用な修飾されたLOSを提供し、およびリピドA脂肪トランスフェラーゼ遺伝子

は同様にロックアウトしてもよい[44]。少なくとも1つの一次O結合型の脂肪酸をLOSから除去してもよい[45]。LOS分子当たりの二次アシル鎖の数が減少したLOSもまた使用することができる[46]。LOSは、典型的には少なくともGlcNAc-Hep₂ホスホエタノールアミン-KDO₂-リピドA構造を含むだろう[47]。LOSは、LNnT四糖を欠くと共にGlcNAc 1-3Gal 1-4Glc三糖を含んでもよい。

【0065】

LOSは、種々の形態において本発明の組成物に含まれてもよい。それは、精製した形態でそれ自体に対して使用してもよい。それは、担体タンパク質に結合体化されてもよい。LOSが結合体化されるとき、結合体化は、LOSにおけるリピドA部分を介して、または任意のその他の適した部分、たとえばそのKDO残基によってされてもよい。LOSのリピドA部分が不在である場合、このような代替りの架橋が必要とされる。LOSのための結合体化技術は、たとえば参照文献45、47、48、49、その他により公知である。これらの結合体のための有用な担体タンパク質、たとえばジフテリアもしくは破傷風毒素などの細菌毒素、またはそれらのトキソイドもしくは変異体を以下で考察してある。

10

【0066】

LOSは、参照文献50に記載されるように、固定された（すなわち可変性の相でない）LOS免疫型を有する株（たとえば遺伝的に操作された髄膜炎菌株）由来であってもよい。たとえば、L2およびL3 LOS免疫型は、固定されてもよい。このような株は、本来の野生型菌株に対して2倍を超えて（>50倍さえ）減少した、免疫型間で切り替わる割合を有してもよい。参照文献50は、IgtAおよび/またはIgtG遺伝子産物の修飾によって、この結果がどのように達成することができるかについて開示する。

20

【0067】

LOSは、たとえばL3について、そのHeptoseII残基に付着されたGlcNAc残基においてO-アセチル化されてもよい[51]。

【0068】

免疫原性組成物は、LOS、たとえば髄膜炎菌免疫型L2およびL3由来のLOSの複数のタイプを含むことができる。たとえば、参照文献52において開示されるLOSの組み合わせを使用してもよい。

【0069】

LOS抗原は、好ましくは被験体に投与した後に殺菌抗髄膜炎菌抗体を誘発することができる。

30

【0070】

しかし、本発明の好ましい組成物は、髄膜炎菌リポオリゴ糖がない。

【0071】

髄膜炎菌莢膜サッカライド抗原

髄膜炎菌fHbp抗原を含むことに加えて、組成物は、1つまたは複数の髄膜炎菌莢膜サッカライド結合体を含んでもよい。本発明の組成物は、髄膜炎菌血清群A、C、W135およびYの1、2、3、または4つ、たとえばA+C、A+W135、A+Y、C+W135、C+Y、W135+Y、A+C+W135、A+C+Y、A+W135+Y、A+C+W135+Y、その他からの莢膜サッカライドの1つまたは複数の結合体を含んでもよい。結合体化された血清群C莢膜サッカライドを含む組成物は有用であり、および血清群A、C、W135およびYの全てからのサッカライドを含む組成物は理想的である。

40

【0072】

血清群A髄膜炎菌の莢膜サッカライドは、C3およびC4位置における部分的なO-アセチル化を持つ、（16）結合N-アセチル-D-マンノサミン-1-ホスフェートのホモポリマーである。C-3位置におけるアセチル化は、70-95%であることができる。サッカライドを精製するために使用する条件は脱-O-アセチル化を生じ得るが（たとえば塩基性条件下）、このC-3位置にてOAcを保持することは有用である。いくつかの態様において、血清群Aサッカライドにおけるマンノサミン残基の少なくとも50%（たとえば少なくとも60%、70%、80%、90%、95%またはそれ以上）が、C-3位置にてO-アセチル化される。アセチル基は加水

50

分解を妨げるためにブロック基で置換することができ[53]、このような修飾されたサッカライドは、まだ本発明の意味の範囲内で血清群Aサッカライドである。

【0073】

血清群C莢膜サッカライドは、(29)結合シアル酸(N-アセチルノイラミン酸、すなわち「NeuNAc」)のホモポリマーである。サッカライド構造は、以下のように書かれる：
 $9)-\text{Neu p NA} \text{c } 7/8 \text{ OAc}-(2$ 。大部分の血清群C株は、シアル酸残基のC-7および/またはC-8にてO-アセチル基を有するが、臨床分離株の約15%はこれらのO-アセチル基を欠いている[54、55]。OAc基の有無は独特のエピトープを生じ、およびサッカライドに対する抗体結合の特異性は、O-アセチル化(OAc+)および脱-O-アセチル化(OAc-)株に対するその殺菌活性に影響を及ぼし得る[56、57、58]。本発明で使用される血清群Cサッカライドは、OAc+またはOAc-株のいずれかから調製してもよい。認可を受けたMenC結合体ワクチンは、OAc-(NEISVAC-C(商標))およびOAc+(MENJUGATE(商標)およびMENINGIT EC(商標))サッカライドの両方を含む。いくつかの態様において、血清群C結合体の産生のための株は、OAc+株、たとえば血清型16、血清サブタイプP1.7a,1、その他である。したがって、C:16:P1.7a,1 OAc+株を使用してもよい。血清サブタイプP1.1におけるOAc+株もまた有用であり、C11株などである。

10

【0074】

血清群W135サッカライドは、シアル酸-ガラクトース二糖ユニットのポリマーである。血清群Cサッカライドの様に、それは可変性のO-アセチル化を有するが、シアル酸7および9位置においてである[59]。構造は、以下のように書かれる：
 $4)-\text{D-Neup5Ac}(7/9\text{OAc})-(26)-\text{D-Gal}-(1$ 。

20

【0075】

血清群Yサッカライドは、二糖反復単位がガラクトースの代わりにグルコースを含むことを除き、血清群W135サッカライドに類似する。血清群W135の様に、それはシアル酸7および9位置にて可変性のO-アセチル化を有する[59]。血清群Y構造は、以下のように書かれる：
 $4)-\text{D-Neup5Ac}(7/9\text{OAc})-(26)-\text{D-Glc}-(1$ 。

【0076】

本発明に従って使用されるサッカライドは、上記の通りにO-アセチル化されてもよく(たとえば天然の莢膜サッカライドに見られるものと同じO-アセチル化パターンを持つ)、またはこれらはサッカライド環の1つまたは複数の位置にて部分的にまたは完全に脱-O-アセチル化されてもよく、またはこれらは天然の莢膜サッカライドに対して過剰にO-アセチル化されてもよい。

30

【0077】

結合体におけるサッカライド部分は、髄膜炎菌から調製される全長サッカライドを含んでもよく、および/または全長サッカライドの断片を含んでもよく、すなわちサッカライドは細菌において見られる天然の莢膜サッカライドより短くてもよい。したがって、サッカライドは、解重合してもよく、解重合はサッカライド精製の間か後だが結合体化の前に生じる。解重合は、サッカライドの鎖長を減少させる。1つの解重合方法は、過酸化水素の使用を包含する。過酸化水素をサッカライドに添加し(たとえば1%の H_2O_2 終濃度を与える)、および所望の鎖長の減少が達成されるまで、次いで混合物をインキュベートする(たとえば約55にて)。別の解重合方法は、酸加水分解を包含する。その他の解重合方法は、当該技術分野において公知である。本発明に従って使用するための結合体を調製するために使用されるサッカライドは、これらの解重合方法のいずれかによって得られてもよい。解重合は、免疫原性に最適の鎖長を提供するために、および/またはサッカライドの物理的な扱いやすさのために鎖長を減少させるために、使用することができる。いくつかの態様において、サッカライドは、以下の平均重合度(Dp)の範囲を有する： $A=10-20$ ； $C=12-22$ ； $W135=15-25$ ； $Y=15-25$ 。Dpよりもむしろ、分子量の点で、全ての血清群のために有用な範囲は、以下である： $<100\text{kDa}$ ； $5\text{kDa}-75\text{kDa}$ ； $7\text{kDa}-50\text{kDa}$ ； $8\text{kDa}-35\text{kDa}$ ； $12\text{kDa}-25\text{kDa}$ ； $15\text{kDa}-22\text{kDa}$ 。

40

【0078】

50

いくつかの態様において、それぞれの髄膜炎菌血清群A、C、W135およびYからのサッカライドの平均分子量は、50kDaを超えてもよく、たとえば 75kDa、100kDa、110kDa、120kDa、130kDa、その他であり [60]、および特にMALLSによって決定されるように、最高1500kDaでさえもよい。例として：MenAサッカライドは、範囲50-500kDa、たとえば60-80kDaであってもよい；MenCサッカライドは、範囲100-210kDaであってもよい；MenW135サッカライドは、範囲60-190kDa、たとえば120-140kDaであってもよい；および/またはMenYサッカライドは、範囲60-190kDa、たとえば150-160kDaであってもよい。

【 0 0 7 9 】

組成物における血清群当たりの髄膜炎菌サッカライドの質量は、通常1 μ g ~ 20 μ g、たとえば血清群当たり2 ~ 10 μ gまたは約4 μ gまたは約5 μ gまたは約10 μ gであるだろう。複数の血清群からの結合体が含まれる場合、これらは実質的に同等の質量にて存在してもよく、たとえば各血清群のサッカライドの質量は互いの+10%以内にある。同等の比率に代わるものとして、血清群Aサッカライドの倍の質量を使用してもよい。したがって、ワクチンは、10 μ gにてMenAサッカライドを、およびそれぞれ5 μ gにてMenC、W135およびYサッカライドを含んでもよい。

【 0 0 8 0 】

髄膜炎菌結合体のための有用な担体タンパク質は、ジフテリアもしくは破傷風毒素などの細菌毒素またはそれらのトキシドもしくは変異体を含む。これらは、結合体ワクチンにおいて一般に使用される。たとえば、CRM197ジフテリア毒素変異体は、有用である [61]。その他の適した担体タンパク質は、合成のペプチド [62、63]、熱ショックタンパク質 [64、65]、百日咳タンパク質 [66、67]、サイトカイン [68]、リンホカイン [68]、ホルモン [68]、成長因子 [68]、種々の病原体由来抗原からの複数のヒトCD4⁺ T細胞エピトープを含む人工のタンパク質 [69]、例えば、N19 [70]、インフルエンザ菌 (*H. influenzae*) からのタンパク質D [71-72、73]、肺炎球菌産生毒素 [74] またはその無毒の誘導体 [75]、肺炎球菌表面タンパク質PspA [76]、鉄取り込みタンパク質 [77]、クロストリジウム・ディフィシレ (*C. difficile*) からの毒素AまたはB [78]、組換え緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) のエキソタンパク質A (rEPA) [79]、その他を含む。CRM 197が好ましい。

【 0 0 8 1 】

組成物が複数の髄膜炎菌血清群からの結合体を含む場合、それぞれ別々の結合体に同じ担体タンパク質を使用すること、または異なる担体タンパク質を使用することが可能である。しかし、両方の場合において、異なる結合体の混合物は、通常、以下によって形成されるだろう：別々に各血清型結合体を調製すること、および次いでこれらを混合して別々の結合体の混合物を形成すること。

【 0 0 8 2 】

サッカライド：タンパク質比率 (w/w) が1 : 5 (すなわちタンパク質過剰) ~ 5 : 1 (すなわちサッカライド過剰) である結合体を使用してもよく、たとえば比率1 : 2 ~ 5 : 1および比率1 : 1.25 ~ 1 : 2.5である。参照文献80に記載されるように、混合物における異なる髄膜炎菌血清群結合体は、異なるサッカライド：タンパク質比率を有することができ、たとえば1つが1 : 2 ~ 1 : 5の比率を有してもよいのに対して、もう一方が5 : 1 ~ 1 : 1.99の比率を有する。

【 0 0 8 3 】

担体タンパク質は、直接またはリンカーを介して髄膜炎菌サッカライドに共有結合で結合体化されてもよい。種々のリンカーが公知である。たとえば、付着はカルボニルを介してもよく、それは、CDIとの修飾されたサッカライドの遊離ヒドロキシル基の反応によって形成してもよく [81、82]、続いてタンパク質との反応によってカルバメート結合を形成する。カルボジイミド縮合を使用することができる [83]。アジピン酸リンカーを使用することができ、それは遊離-NH₂基 (たとえばアミノ化によってサッカライドに導入される) をアジピン酸とカップリングすること (たとえば、ジイミド活性化を使用する)、および次いで生じるサッカライド-アジピン酸中間体にタンパク質をカップリングすること

によって形成してもよい[84、85]。その他のリンカーは、 α -プロピオンアミド[86]、ニトロフェニル-エチルアミン[87]、ハロアシルハライド[88]、グリコシド結合[89]、6-アミノカプロン酸[90]、N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)-プロピオナート(SPDP)[91]、アジピン酸ジヒドラジドADH[92]、C4~C12部分[93]、その他を含む。

【0084】

還元的アミノ化を介した結合体化を使用することができる。サッカライドは、まず過ヨウ素酸塩で酸化してアルデヒド基を導入してもよく、これは次いで還元的アミノ化を介して担体タンパク質への、たとえばリジンの α -アミノ基への、直接の共有結合を形成することができる。サッカライドが分子当たり複数のアルデヒド基を含む場合、この結合技術は架橋された生成物を生成することができ、複数のアルデヒドが複数の担体アミンと反応する。

10

【0085】

参照文献94に記載されるように、混合物は、直接のサッカライド/タンパク質結合を持つ1つの結合体およびリンカーを介した結合を持つもう一つの結合体を含むことができる。この配置は、特に異なる髄膜炎菌血清群からのサッカライド結合体を使用するときに適用し、たとえばMenAおよびMenCサッカライドはリンカーを介して結合体化してもよく、一方でMenW135およびMenYサッカライドは担体タンパク質に直接結合体化してもよい。

【0086】

髄膜炎菌サッカライドは、髄膜炎菌から調製されるような全長の無傷のサッカライドを含んでもよく、および/または全長サッカライドの断片を含んでもよく、すなわちサッカライドは細菌において見られる天然の莢膜サッカライドより短くてもよい。したがって、サッカライドは、解重合してもよく、解重合はサッカライド精製の間か後だが結合体化の前に生じる。解重合は、サッカライドの鎖長を減少させる。解重合は、免疫原性に最適の鎖長を提供するために、および/またはサッカライドの物理的な扱いやすさのために鎖長を減少させるために使用することができる。

20

【0087】

結合体化された肺炎球菌莢膜サッカライド

本発明の組成物は、担体タンパク質に結合体化された肺炎球菌莢膜サッカライドを含んでもよい。

30

【0088】

本発明は、1つまたは複数の異なる肺炎球菌血清型からの莢膜サッカライドを含むことができる。組成物が複数の血清型からのサッカライド抗原を含む場合、好ましくはこれらは別々に調製し、別々に結合体化し、および次いで組み合わせる。肺炎球菌莢膜サッカライドを精製するための方法は当該技術分野において公知であり(たとえば、参照文献95を参照されたい)、および23個の異なる血清型からの精製したサッカライドに基づいたワクチンは長年公知であった。これらの方法に対する改善はまた、たとえば、参照文献96に記載されるような血清型3について、または参照文献97に記載されるような血清型1、4、5、6A、6B、7Fおよび19Aについて、記述されてきた。

【0089】

肺炎球菌莢膜サッカライド(群)は、典型的には以下の血清型から選択されるだろう: 1、2、3、4、5、6A、6B、7F、8、9N、9V、10A、11A、12F、14、15B、17F、18C、19A、19F、20、22F、23Fおよび/または33F。したがって、全体で、組成物は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23またはそれ以上の異なる血清型からの莢膜サッカライドを含んでもよい。

40

【0090】

血清型の有用な組み合わせは、7価の組み合わせであり、たとえば血清型4、6B、9V、14、18C、19Fおよび23Fのそれぞれからの莢膜サッカライドを含む。別の有用な組み合わせは、9価の組み合わせであり、たとえば血清型1、4、5、6B、9V、14、18C、19Fおよび23Fのそれぞれからの莢膜サッカライドを含む。別の有用な組み合わせは、10価の組み合わせ

50

であり、たとえば血清型1、4、5、6B、7F、9V、14、18C、19Fおよび23Fのそれぞれからの莢膜サッカライドを含む。11価の組み合わせは、血清型3からのサッカライドをさらに含んでもよい。12価の組み合わせは、10価の混合物に以下を添加してもよい：血清型6Aおよび19A；6Aおよび22F；19Aおよび22F；6Aおよび15B；19Aおよび15B；または22Fおよび15B。13価の組み合わせは、11価の混合物に以下を添加してもよい：血清型19Aおよび22F；8および12F；8および15B；8および19A；8および22F；12Fおよび15B；12Fおよび19A；12Fおよび22F；15Bおよび19A；15Bおよび22F；6Aおよび19A、その他。

【0091】

したがって、有用な13価の組み合わせは、血清型1、3、4、5、6A、6B、7F、9V、14、18C、19、19Fおよび23Fからの莢膜サッカライドを含み、たとえば参照文献98-99、100、101において開示されるように調製される。1つのこのような組み合わせは、約8 $\mu\text{g/ml}$ にて血清型6Bサッカライド、およびそれぞれ約4 $\mu\text{g/ml}$ の濃度にてその他の12のサッカライドを含む。別のこのような組み合わせは、それぞれ約8 $\mu\text{g/ml}$ にて血清型6Aおよび6Bサッカライド、並びにそれぞれ約4 $\mu\text{g/ml}$ にてその他の11のサッカライドを含む。

【0092】

結合体のための適した担体タンパク質は、髄膜炎菌結合体に関して上で考察してある。特に肺炎球菌結合体ワクチンのための有用な担体タンパク質はCRM197、破傷風トキソイド、ジフテリアトキソイドおよびインフルエンザ菌タンパク質Dである。CRM197はPREVNAR（商標）において使用される。13価の混合物は、13個の結合体のそれぞれのための担体タンパク質としてCRM197を使用してもよく、およびCRM197は約55-60 $\mu\text{g/ml}$ にて存在してもよい。

【0093】

組成物が複数の肺炎球菌血清型からの結合体を含む場合、それぞれ別々の結合体に同じ担体タンパク質を使用すること、または異なる担体タンパク質を使用することが可能である。しかし、両方の場合において、異なる結合体の混合物は、通常、別々に各血清型結合体を調製すること、および次いでこれらを混合して別々の結合体の混合物を形成することによって形成されるだろう。参照文献102は、多価の肺炎球菌結合体ワクチンに異なる担体タンパク質を使用するときの潜在的な利点を記述するが、PREVNAR（商標）製品は、7個の異なる血清型のそれぞれに同じ担体を首尾よく使用する。

【0094】

担体タンパク質は、上で考察したように髄膜炎菌結合体に対して、直接またはリンカーを介して肺炎球菌サッカライドに共有結合的に結合体化されてもよい。架橋結合体化技術は、少なくとも肺炎球菌血清型4、6B、9V、14、18C、19Fおよび23Fのために特に有用である。

【0095】

髄膜炎菌サッカライドについて上で考察したように、肺炎球菌サッカライドは、肺炎球菌から調製されるような全長の無傷のサッカライドを含んでもよく、および/または全長サッカライドの断片を含んでもよい。複数の肺炎球菌血清型を使用する場合、各血清型についての無傷のサッカライドを使用すること、各血清型についての断片またはいくつかの血清型についての無傷のサッカライドおよびその他の血清型についての断片を使用することが可能である。組成物が血清型4、6B、9V、14、19Fおよび23Fのいずれかからのサッカライドを含む場合、これらのサッカライドは好ましくは無傷である。これに対し、組成物が血清型18Cサッカライドを含む場合、それは好ましくは解重合される。

【0096】

血清型3サッカライドを、また解重合してもよく、例として、血清型3サッカライドは、たとえば酢酸を使用して、解重合のために酸加水分解に供することができる[98]。次いで、生じる断片を活性化のために酸化し（たとえば過ヨウ素酸塩酸化、おそらく二価カチオンの存在下、たとえば MgCl_2 とともに）、還元条件下（たとえばナトリウムシアノボロハイドライドを使用して）で担体（たとえばCRM197）に結合体化させてもよく、および次いで（随意に）サッカライドにおける任意の未反応のアルデヒドをキャップすることがで

きる（たとえば水素化ホウ素ナトリウムを使用して）[98]。結合体化は、たとえば活性化されたサッカライドおよび担体を共に凍結乾燥した後に、凍結乾燥された材料に対し行ってもよい。

【 0 0 9 7 】

血清型1サッカライドは、少なくとも部分的に脱-O-アセチル化されてもよく、たとえばピカルボナート/カルボナート緩衝液を使用することによるなどのアルカリ性pH緩衝液処理[99]によって達成される。このような（部分的に）脱-O-アセチル化サッカライドは、活性化のために酸化し（たとえば過ヨウ素酸塩酸化）、還元条件下（たとえばナトリウムシアノボロハイドライドを使用して）で担体（たとえばCRM197）に結合体化させることができ、および次いで（随意に）サッカライドにおける任意の未反応のアルデヒドをキャップすることができる（たとえば水素化ホウ素ナトリウムを使用して）[99]。結合体化は、たとえば活性化されたサッカライドおよび担体を共に凍結乾燥した後に、凍結乾燥された材料に対し行ってもよい。

10

【 0 0 9 8 】

血清型19Aサッカライドは、活性化のために酸化し（たとえば過ヨウ素酸塩酸化）、還元条件下でDMSOにおいて担体（たとえばCRM197）に結合体化させてもよく、および次いで（随意に）サッカライドにおける任意の未反応のアルデヒドをキャップすることができる（たとえば水素化ホウ素ナトリウムを使用して）[103]。結合体化は、たとえば活性化されたサッカライドおよび担体を共に凍結乾燥した後に、凍結乾燥された材料に対し行ってもよい。

20

【 0 0 9 9 】

肺炎球菌結合体は、理想的には関連するサッカライドに結合する抗莢膜抗体を誘発することができ、たとえば抗サッカライド抗体レベル 0.20 $\mu\text{g/mL}$ を誘発する[104]。抗体は、エンザイムイムノアッセイ（EIA）および/またはオブソニン化貪食活性（OPA）の測定によって評価してもよい。EIA方法は、広範囲に確証されており、抗体濃度とワクチンの有効性との間に関連がある。

【 0 1 0 0 】

その他の病原体（群）からのさらなる抗原

本発明の組成物は、さらなる病原体（群）からの抗原（群）を含むことができる。たとえば、組成物は、以下のさらなる抗原（群）の1つまたは複数を含んでもよい：

30

- B型肝炎ウイルスからの抗原、表面抗原HBsAgなど。
- 百日咳菌（*Bordetella pertussis*）からの抗原、百日咳菌からの百日咳全毒素（PT）および線状の血球凝集素（FHA）など、随意にまたパータクチン（pertactin）および/または凝集原2および3と組み合わせる。
- ジフテリア抗原、ジフテリアトキソイドなど。
- 破傷風抗原、破傷風トキソイドなど。
- インフルエンザ菌（*Haemophilus influenzae*）B（Hib）からのサッカライド抗原、典型的には結合体化される。
- 不活化ポリオウイルス抗原（群）。

【 0 1 0 1 】

40

ジフテリア抗原が組成物に含まれる場合、破傷風抗原および百日咳抗原を含むこともまた好ましい。同様に、破傷風抗原が含まれる場合、ジフテリアおよび百日咳抗原を含むこともまた好ましい。同様に、百日咳抗原が含まれる場合、ジフテリアおよび破傷風抗原を含むこともまた好ましい。したがって、DTPの組み合わせは好ましい。

【 0 1 0 2 】

即時調製

本発明は、また：（i）上で記述したとおりのfHbp抗原を含む第1の構成要素；および（ii）非髄膜炎菌免疫原を含む第2の構成要素を含むキットを提供する。キットの構成要素は、混合して、患者に投与して複数の病原体から防御するための免疫原性組成物を与えることができる。

50

【0103】

本発明はまた、混合ワクチンを調製するための方法を提供し、以下を混合する工程を含む：(i)上で記述したとおりのfHbp抗原を含む第1の構成要素；および(ii)非髄膜炎菌免疫原を含む第2の構成要素。次いで、混合材料を患者に投与してもよい。第2の構成要素は凍結乾燥し、水性の第1の構成要素でそれを再構成するようにしてもよい。

【0104】

医薬組成物

本発明は、患者に投与するための免疫原性組成物に関する。これらの組成物は、薬学的に許容可能であり、および典型的には好適な担体を含むだろう。薬学的に許容可能な担体の完全な考察は、参照文献105において利用できる。

10

【0105】

有効な投薬量容積は、ルーチンの確立することができるが、組成物の典型的なヒト単位用量は約0.5mlの容積を有する。

【0106】

単位用量におけるfHbpポリペプチドの総量は、通常1~500 µg/用量、たとえば60~200 µg/用量または120~500 µg/mlであるだろう。各fHbp抗原について20、40、50、60、80、100または200 µgの量がヒトワクチン用量において典型的である。したがって、ワクチンは、この量の各fHbpを含むように製剤化してもよい。

【0107】

本発明の組成物のpHは、通常、6~8、およびより好ましくは、6.5~7.5(たとえば約7)である。すでに上で考察したように、組成物は緩衝液、たとえばトリス緩衝液、シトレート緩衝液、スクシナート緩衝液(コハク酸ナトリウム緩衝液など)またはヒスチジン緩衝液を含んでもよい。

20

【0108】

組成物は、無菌でもよく、および/または発熱物質がなくてもよい。本発明の組成物は、ヒトに関して等張性でもよい。

【0109】

本発明の組成物は、張度を与えるためにナトリウム塩(たとえば塩化ナトリウム)を含んでもよい。10±2mg/ml NaClの濃度が典型的であり、たとえば約9mg/mlである。

【0110】

患者に対する投与のための本発明の組成物は、免疫原性であり、およびより好ましくは、ワクチン組成物である。本発明に従ったワクチンは、予防的(すなわち感染を予防する)または治療的(すなわち感染を治療する)のいずれでもよいが、典型的には予防的であるだろう。ワクチンとして使用される免疫原性組成物は、抗原(群)の免疫学的に有効な量、並びに必要に応じて任意のその他の構成要素を含む。「免疫学的に有効な量」によって、個体に対するその量の投与が、単一用量においてまたは一連の一部として、治療または予防のために有効であることが意味される。この量は、治療される個体の健康および身体条件、年齢、治療される個体の分類群(たとえば非ヒト霊長類、霊長類、その他)、抗体を合成する個体の免疫系の能力、所望の防御度、ワクチンの製剤、医学的な状況における治療医師の評価、およびその他の関連因子に応じて、変化する。この量は、日常的な試行を通して決定することができる比較的広い範囲にはいることが予想される。本発明の組成物の抗原含量は、一般に、用量当たりのタンパク質の量の点から表されるだろう。

30

40

【0111】

髄膜炎菌は体の種々の領域に影響を及ぼすため、本発明の組成物は種々の液体の形態に調製してもよい。たとえば、組成物は、溶液または懸濁液のいずれかのような、注射剤として調製してもよい。組成物は、肺投与、たとえば吸入器による、微細スプレーを使用する肺投与のために調製してもよい。組成物は、経鼻、経耳または経眼投与、たとえばスプレーまたは滴下のような投与のために調製してもよい。筋肉内投与のための注射剤は、最も典型的である。

【0112】

50

本発明の組成物は、特に複数の用量形式にパッケージされるときに、抗菌物質を含んでもよい。チオメルサルおよび2-フェノキシエタノールなどの抗菌物質は、ワクチンにおいて一般に見いだされるが、水銀フリーの保存剤を使用することまたは全く保存剤を使用しないことが好ましい。

【0113】

本発明の組成物は、洗浄剤、たとえばポリソルベート (Tween)、ポリソルベート80など、を含んでもよい。洗浄剤は、一般に低レベル、たとえば<0.01%にて存在するが、抗原製剤を安定させるために、高レベル、たとえば最高10%が示唆されてきた[106]。実施例の組成物は、0.01~0.05%のポリソルベートを含んでもよく、およびこれは脂質付加されたfHbp抗原(群)を使用するとき特に有用である。

10

【0114】

治療方法

本発明はまた、哺乳動物における免疫応答を上げるための方法を提供し、哺乳動物に本発明の組成物を投与することを含む。免疫応答は、好ましくは髄膜炎菌から防御し、および好ましくは抗体を包含する。本方法は、すでに初回刺激された患者における二次免疫応答を上げ得る。

【0115】

哺乳動物は、好ましくはヒトである。ワクチンが予防的使用のためにある場合、ヒトは好ましくは小児(たとえば幼児または乳児)または10代である;ワクチンが治療的使用のためにある場合、ヒトは好ましくは成人である。子供のために意図されるワクチンはまた、成人に投与され、たとえば安全性、投薬量、免疫原性、その他を評価し得る。

20

【0116】

本発明はまた、本発明の組成物を医薬としての使用のために提供する。医薬は、好ましくは上記のように哺乳動物における免疫応答を上げるために使用され(すなわち、それは免疫原性組成物である)、およびより好ましくは、ワクチンである。

【0117】

本発明はまた、上記のような哺乳動物における免疫応答を上げるための医薬の製造における、上記記載のような少なくとも2つのfHbp抗原の使用を提供する。

【0118】

これらの使用および方法は、好ましくは髄膜炎菌(*N. meningitidis*)によって生じる疾患、たとえば細菌の(またはより特異的に、髄膜炎菌の)髄膜炎または敗血症の予防および/または治療のためのものである。

30

【0119】

治療的処置の有効性をチェックする1つの方法は、本発明の組成物の投与後の髄膜炎菌感染をモニターすることを包含する。予防的処置の有効性をチェックする1つの方法は、組成物の投与後の抗原に対する免疫応答をモニターすることを包含する。本発明の組成物の免疫原性は、被験体(たとえば子供12-16月齢または動物モデル)を試験するためにこれらを投与すること、並びに次いで髄膜炎菌のための血清殺菌性抗体(SBA)およびELISA力価(GMT)を含む標準的なパラメーターを決定することによって、決定することができる。これらの免疫応答は、一般に、組成物の投与後のおよそ4週間に決定され、および組成物の投与前に決定される値と比較されるだろう。少なくとも4倍または8倍のSBA増大が好ましい。組成物の複数の用量が投与される場合、複数の投与後決定がなされてもよい。

40

【0120】

本発明の組成物は、一般に患者に直接投与されるだろう。直接の送達は、非経口注射(たとえば皮下に、腹膜内に、静脈内に、筋肉内に、または組織の間隙に対して)によって、または任意のその他の適した経路によって達成してもよい。本発明は、全身性のおよび/または粘膜の免疫を誘発するために使用してもよい。大腿または上腕に対する筋肉内投与が好ましい。注射は針(たとえば皮下針)を介してでもよいが、針を用いない注射を代わりに使用してもよい。典型的な筋肉内用量は、0.5mlである。

【0121】

50

投薬処置は、単一用量計画または複数用量計画であることができる。複数の用量は、一次免疫化計画において、および/または追加免疫化計画において使用してもよい。一次用量計画のあとに、追加用量計画を続けてもよい。一次用量の間(たとえば4-16週間)および一次と追加との間の適したタイミングは、ルーチンの決定することができる。

【0122】

全般

本発明の実施は、特に明記しない限り、当該技術分野の技術の範囲内で、化学、生化学、分子生物学、免疫学および薬学における従来の方法を使用するだろう。このような技術は、文献において完全に説明される。たとえば参照文献107-108、109、110、111、112、113その他を参照されたい。

10

【0123】

用語「含む」は、「含む」、並びに「なる」を包含し、たとえば、Xを「含む」組成物は、Xのみからなってもよいし、またはさらなる何かを含んでもよく、たとえばX + Y。

【0124】

数値xに関して用語「約」は、随意的であり、およびたとえば、 $x \pm 10\%$ を意味する。

【0125】

本発明が「エピトープ」に関する場合、このエピトープはB細胞エピトープおよび/またはT細胞エピトープでもよいが、通常B細胞エピトープであるだろう。このようなエピトープは、経験的に同定することができ(たとえばPEPSCAN [114、115] または類似の方法を使用して)、またはこれらは予測することができる(たとえば、Jameson-Wolf抗原性インデックス [116]、マトリックスに基づいたアプローチ [117]、MAPITOPE [118]、TEPITOPE [119、120]、ニューラルネットワーク [121]、OptiMerおよびEpiMer [122、123]、ADEPT [124]、Tsites [125]、親水性 [126]、抗原性インデックス [127] または参照文献128-129、130、131、132その他において開示される方法を使用して)。エピトープは、抗体またはT細胞受容体の抗原結合部位によって認識され、およびこれに結合する抗原の部分であり、およびこれらはまた「抗原決定基」として称し得る。

20

【0126】

本発明が「精製した」抗原を使用する場合、この抗原はその天然に存在する環境から分離される。たとえば、抗原は、存在する任意のその他の精製した抗原から以外の、その他の髄膜炎菌成分が実質的にないだろう。精製した抗原の混合物は、2つの抗原が混合した状態で天然に存在する場合であっても、別々に各抗原を精製すること、および次いでこれらを再び組み合わせることによって典型的には調製されるだろう。

30

【0127】

2つのアミノ酸配列間の配列同一性の割合への言及は、整列させたときに、2つの配列を比較して同じであるアミノ酸の割合を意味する。この整列および相同性の割合または配列同一性の割合は、当該技術分野において公知のソフトウェアプログラム、たとえば参照文献133の項7.7.18において記述されたものを使用することにより決定することができる。好ましい整列は、ギャップ開始ペナルティ12およびギャップ伸長ペナルティ2、BLOSUMマトリックス62でアフィンギャップ検索を使用するSmith-Waterman相同性検索アルゴリズムによって、決定される。Smith-Waterman相同性検索アルゴリズムは、参照文献134において開示される。

40

【0128】

用語「実質的に」は「完全に」を除外せず、たとえばYが「実質的にない」組成物は、Yが完全になくてもよい。必要な場合、用語「実質的に」は、本発明の定義から省略してもよい。

【0129】

「GI」番号付与を上で使用してある。GI番号、または「GenInfo Identifier」は、NCBIによって配列がそのデータベースに加えられるときに処理される、各配列記録に対して連続的に割り当てられる一連の数字である。GI番号は、配列記録のアクセッション番号と類似しない。配列が更新されるとき(たとえば、修正のために、またはさらに注釈もしくはは

50

情報を加えるために)、それは、新たなGI番号を受ける。したがって、与えられたGI番号と関連する配列は、決して更新されない。

【図面の簡単な説明】

【0130】

【図1】図1は、水酸化アルミニウム(AH)またはアルミニウムホスフェート(AP)アジュバントへのfHbp抗原の吸着を示す。「D」とマークしたレーンは脱着処理後の抗原であり、一方「T」レーンは吸着後の溶液相の抗原である。したがって、「D」にあるが「T」には無いバンドは、抗原がアジュバントに完全に吸着されるが、脱着することができることを示す。「D」の左の3本のレーンは、ワクチン用量の10%、5%または2.5%での抗原標準である。

10

【図2】図2は、図1同様であるが、fHbp混合物の吸着を示す。

【発明を実施するための形態】

【0131】

3つのfHbpタンパク質を使用し、以下の株およびfHbpファミリーを表した：

【0132】

【表1】

株	MC58	M01573	M01240320
<i>fHbp</i> ファミリー	I	I	III
配列番号	1 / 26	4 / 23	6 / 25

20

【0133】

これらは、単価ワクチンまたは二価ワクチン(MC58+M01573またはMC58+ M01240320のどちらか)として試験した。

【0134】

抗原は、水酸化アルミニウムアジュバント(AH)またはアルミニウムホスフェートアジュバント(AP)に吸着した。図1は、個々のfHbp抗原が、両方のアジュバントによく吸着し、および無傷で脱着することができることを確認した。図2は、この結果が二価の混合物でも見られたことを示す。

30

【0135】

これらの一価および二価ワクチンはまた、マウスを免疫化するために使用し、および生じた血清は種々の髄膜炎菌株に対する殺菌活性について試験した。以下の表は、それぞれのfHbpファミリーI、IIおよびIIIからの2つの株に対する結果を示し、「+」は、128またはそれ以上の殺菌力価を示す：

【0136】

【表 2】

株名 (fHbp ファミリー)	MC58		M01573		M01240320		MC58 + M01573		MC58 + M01240320	
	AH	AP	AH	AP	AH	AP	AH	AP	AH	AP
MC58 (I)	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+
NZ98/254 (I)	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
961-5945 (II)	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+
M12566 (II)	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+
M01240355(III)	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+
M01240320(III)	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+

10

【0137】

したがって、MC58抗原は、両方のアジュバントで同種の株から防御することができたが、その他の株に対してはできなかった。M01240320抗原は、両方のアジュバントで同種の株から、および別のファミリーIII株からも防御することができたが、ファミリーI株からは防御しなかった、そしてAHアジュバントを使用したときにファミリーII株から防御することができた。M01573抗原単独は、いずれのアジュバントでも、これらの6株のいずれからも防御しなかった。したがって、結果は、単価ワクチンと混合させた。

20

【0138】

MC58およびM01573の組み合わせに基づいた二価ワクチンは、上記抗原単独のいずれもNZ98/254から防御しなかったにもかかわらず、両方のファミリーI株から防御した。この結果は、両方のアジュバントで見られた。しかし、予想通り、2つのファミリーI抗原の混合物は、ファミリーIIまたはファミリーIII株からの防御をもたらさなかった。

【0139】

MC58およびM01240320の組み合わせに基づいた二価ワクチンは、ファミリーII株を含む6つ全ての株（但し、APアジュバントを使用したとき1つの株は除く）から防御した。

【0140】

多くの広まっている髄膜炎菌株は、fHbpファミリーIであり、およびこれらの大きな割合はサブファミリーI.1（MC58によって表される）である。したがって、この大きなサブファミリーの適用範囲を保証するために、M01573配列単独は不適當である。したがって、M01573にのみ依存する代わりに、ワクチンは、それを置換するか、または第2のファミリーI配列をそれに補充するか、たとえばM01573+MC58、のいずれかをすべきである。サブファミリーI.1配列とファミリーIII配列との組み合わせは、AHまたはAPアジュバントを使用して、広い防御を与えることができる。

30

【0141】

配列番号：23および26の整列

配列番号：23および26は、それぞれ、株MC58およびM01573からの成熟アミノ酸配列（N末端システイン）である。これらは、以下のように整列される：

40

【0142】

【表 3】

SEQID_26	CSSGGGG-----VAADIGAGLADALTAPLDHKDKGLQSLTLDQSVRKNEKLKLAQAQAEK	55
SEQID_23	CSSGGGGSGGGGVTADIGTGLADALTAPLDHKDKGLKSLTLEDSSISQNGTTLTSAQGAQAEK	60
	***** *:****:*****:*****:*****:****:****:****:****:****:****	
SEQID_26	TYGNGLSLNTGKLKNDKVSFRDFIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTAFQTEQIQ	115
SEQID_23	TYGNGLSLNTGKLKNDKVSFRDFIRQIEVDGQLITLESGEFQVYKQSHSALTALQTEQEQ	120
	*****:**** *	
SEQID_26	DSEHSGKMKVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPKGGRATYRGTAFGSDDAGGKLTYTIDFAAK	175
SEQID_23	DPEHSEKMKVAKRRFRIGDIAGEHTSFDKLPKDVMTYRGTAFGSDDAGGKLTYTIDFAAK	180
	*.*** *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****	
SEQID_26	QGNKGIEHLKSPELNVDLAAADIKPDGKRHAVISGSVLYNQAEKGSYSLGIFGGKAQEV	235
SEQID_23	QGHGKIEHLKSPELNVDLAVAYIKPDEKHHAVISGSVLYNQDEKGSYSLGIFGEKAQEV	240
	:*:***:**** * ***** *:***** ***** ***** *****	
SEQID_26	GSAEVKTVNGIRHIGLAQK	255
SEQID_23	GSAEVETANGIHHIGLAQK	260
	*****:*.***:*****	

10

【0 1 4 3】

配列番号：26のVal-8および配列番号：23のVal-13から開始すると（すなわちN末端リピート領域を除外する）、これらは、87.5%同一である（217/248の同一の残基）。

【0 1 4 4】

MC58、961-5945およびM1239からの配列と整列させるとき、2つの残基が配列番号：23に独特であり、すなわちThr-14およびVal-153、それらは配列番号：1の残基2および残基141と整列される。

20

【0 1 4 5】

本発明が例示する目的のみによって記述されたこと、並びに本発明の範囲および趣旨の中にとどまるならば変更がなされてもよいことが理解されよう。

【0 1 4 6】

参照文献

- [1] Masignaniら. (2003) J Exp Med 197:789-799.
- [2] Welschら. (2004) J Immunol 172:5606-15.
- [3] Houら. (2005) J Infect Dis 192 (4):580-90.
- [4] 国際公開第03/063766号
- [5] Fletcherら. (2004) Infect Immun 72:2088-2100.
- [6] Zhuら. (2005) Infect Immun 73 (10):6838-45.
- [7] Cantiniら. (2006) J. Biol.Chem. 281:7220-7227
- [8] 国際公開第2004/048404号
- [9] Tettelinら. (2000) Science 287:1809-1815.
- [10] Mascioniら. (2009) J Biol Chem 284:8738-46.
- [11] Goldschneiderら. (1969) J. Exp. Med. 129:1307-26.
- [12] Santosら. (2001) Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology 8:616-23.
- [13] Fraschら. (2009) Vaccine 27S:B112-6.
- [14] 国際公開第2004/094596号
- [15] 国際公開第2008/079372号
- [16] 国際公開第03/020756号
- [17] 国際公開第2006/024954号
- [18] 国際公開第2007/060548号
- [19] 国際公開第2009/104097号
- [20] Comanducciら. (2002) J Exp Med 195:1445-54.
- [21] Dunning Hotoppら. (2006) Microbiol 152:3733-49.
- [22] Giulianiら. (2005) Infect Immun 73:1151-60.
- [23] Beerninkら. (2006) Clin Vaccine Immunol 13:758-63.

30

40

50

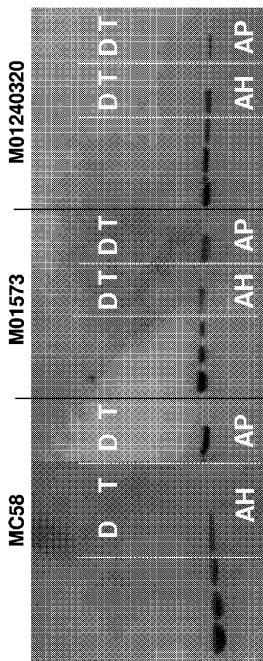
- [24]Pajon R. (2010) Vaccine28:2122-9.
- [25]Oriente R. (2009) J. Bacteriol.doi:10.1128/JB.01308-09
- [26]Metruccio R. (2009) PLoS Pathog.5 (12) : e1000710.
- [27]Giuliani R. (2006) PNAS USA103:10834-9.
- [28]Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach (Powell & Newman) 1995 (IS BN 0-306-44867-X) .
- [29]Burrell R. (2001) Vaccine19:275-81.
- [30]国際公開第01/22992号
- [31]Methods in Molecular Medicine, Vol. 42 (ed. O ' Hagan) Vaccine Adjuvants ...
- [32]国際出願番号PCT/IB2010/000733. 10
- [33]国際公開第00/66741号
- [34]国際公開第99/57280号
- [35]Martin R. (1997) J Exp Med 185 (7) :1173-83.
- [36]国際公開第96/29412号
- [37]米国特許第5,698,438号明細書
- [38]Perkins-Balding R. (2003) Microbiology149:3423-35.
- [39]国際公開第01/55182号
- [40]国際公開第01/38350号
- [41]国際公開第00/23595号
- [42]Ram R. (2003) J Biol Chem278:50853-62. 20
- [43]国際公開第2004/014417号
- [44]国際公開第98/53851号
- [45]米国特許第6531131号明細書
- [46]国際公開第00/26384号
- [47]米国特許第6645503号明細書
- [48]国際公開第03/070282号
- [49]国際公開第94/08021号
- [50]国際公開第2004/015099号
- [51]国際公開第2007/144316号
- [52]国際公開第2007/144317号 30
- [53]国際公開第03/080678号
- [54]Glode R. (1979) J Infect Dis139:52-56
- [55]国際公開第94/05325号;米国特許第5,425,946号明細書
- [56]Arakere & Frasch (1991) Infect. Immun. 59:4349 - 4356.
- [57]Michon R. (2000) Dev. Biol.103:151 - 160.
- [58]Rubinstein & Stein (1998) J. Immunol. 141:4357 - 4362.
- [59]国際公開第2005/033148号
- [60]国際公開第2007/000314号
- [61]Research Disclosure, 453077 (Jan 2002)
- [62]欧州特許出願公開第0378881号明細書 40
- [63]欧州特許出願公開第0427347号明細書
- [64]国際公開第93/17712号
- [65]国際公開第94/03208号
- [66]国際公開第98/58668号
- [67]欧州特許出願公開第0471177号明細書
- [68]国際公開第91/01146号
- [69]Falugi R. (2001) Eur J Immunol31:3816-3824.
- [70]Baraldo R. (2004) Infect Immun72 (8) :4884-7.
- [71]欧州特許出願公開第0594610号明細書
- [72]Ruan R. (1990) J Immunol145:3379-3384. 50

- [73] 国際公開第00/56360号
- [74] Kuo R. (1995) Infect Immun 63:2706-13.
- [75] Michon R. (1998) Vaccine 16:1732-41.
- [76] 国際公開第02/091998号
- [77] 国際公開第01/72337号
- [78] 国際公開第00/61761号
- [79] 国際公開第00/33882号
- [80] 国際公開第2007/000341号
- [81] Bethell G.S. R., J. Biol. Chem., 1979, 254, 2572-4
- [82] Hearn M.T.W., J. Chromatogr., 1981, 218, 509-18 10
- [83] 国際公開第2007/000343号
- [84] Mol. Immunol., 1985, 22, 907-919
- [85] 欧州特許出願公開第0208375号明細書
- [86] 国際公開第00/10599号
- [87] Gever R., Med. Microbiol. Immunol, 165 : 171-288 (1979) .
- [88] 米国特許第4,057,685号明細書
- [89] 米国特許第4,673,574;4,761,283; 4,808,700号明細書
- [90] 米国特許第4,459,286号明細書
- [91] 米国特許第5,204,098号明細書
- [92] 米国特許第4,965,338号明細書 20
- [93] 米国特許第4,663,160号明細書
- [94] 国際公開第2007/000342号
- [95] WHO Technical Report Series No. 927, 2005. Pages 64-98.
- [96] 米国特許出願公開第2008/0102498号
- [97] 米国特許出願公開第2006/0228381号
- [98] 米国特許出願公開第2007/0231340号
- [99] 米国特許出願公開第2007/0184072号
- [100] 米国特許出願公開第2006/0228380号
- [101] 国際公開第2008/143709号
- [102] 国際公開第2007/071707号 30
- [103] 米国特許出願公開第2007/0184071号
- [104] Jodar R. (2003) Vaccine 21:3265-72.
- [105] Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy. 20th edition, ISBN: 0683306472.
- [106] 国際公開第2007/127665号
- [107] Methods In Enzymology (S. Colowick and N. Kaplan, eds., Academic Press, Inc .)
- [108] Handbook of Experimental Immunology, Vols. I IV (D.M. Weir and C.C. Blackwell, eds, 1986, Blackwell Scientific Publications)
- [109] Sambrook R. (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd edition (Cold Spring Harbor Laboratory Press) . 40
- [110] Handbook of Surface and Colloidal Chemistry (Birdi, K.S. ed., CRC Press, 1997)
- [111] Ausubel R. (eds) (2002) Short protocols in molecular biology, 5th edition (Current Protocols) .
- [112] Molecular Biology Techniques: An Intensive Laboratory Course, (Ream R., eds ., 1998, Academic Press)
- [113] PCR (Introduction to Biotechniques Series), 2nd ed. (Newton & Graham eds., 1997, Springer Verlag)
- [114] Geysen R. (1984) PNAS USA 81:3998-4002. 50

- [115]Carter (1994) Methods Mol Biol 36:207-23.
 [116]Jameson, BA. 1988, CABIOS 4 (1) :181-186.
 [117]Raddrizzani & Hammer (2000) Brief Bioinform 1 (2) :179-89.
 [118]Bublil. (2007) Proteins 68 (1) :294-304.
 [119]De Lalla. (1999) J. Immunol.163:1725-29.
 [120]Kwok. (2001) TrendsImmunol 22:583-88.
 [121]Brusic. (1998) Bioinformatics14 (2) :121-30
 [122]Meister. (1995) Vaccine 13 (6) :581-91.
 [123]Roberts. (1996) AIDS Res HumRetroviruses 12 (7) :593-610.
 [124]Maksyutov & Zagrebelnaya (1993) Comput Appl Biosci 9 (3) :291-7. 10
 [125]Feller & de la Cruz (1991) Nature 349 (6311) :720-1.
 [126]Hopp (1993) Peptide Research 6:183-190.
 [127]Welling. (1985) FEBS Lett.188:215-218.
 [128]Davenport. (1995) Immunogenetics42:392-297.
 [129]Tsurui & Takahashi (2007) J Pharmacol Sci. 105 (4) :299-316.
 [130]Tong. (2007) BriefBioinform. 8 (2) :96-108.
 [131]Schirle. (2001) J ImmunolMethods. 257 (1-2) :1-16.
 [132]Chen. (2007) Amino Acids33 (3) :423-8.
 [133]Current Protocols in Molecular Biology (F.M. Ausubel. , eds.,1987) Supplem 20
 ent 30
 [134]Smith & Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2: 482-489.

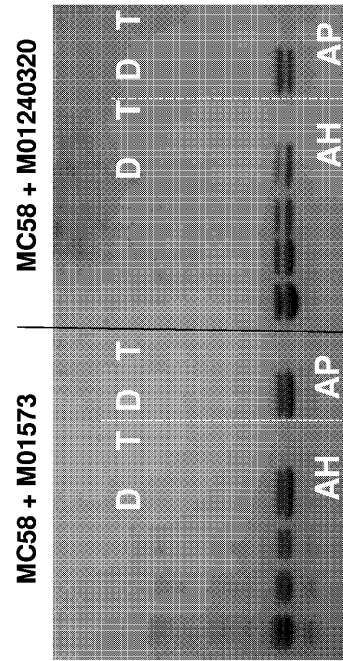
【 図 1 】

FIGURE 1



【 図 2 】

FIGURE 2



【配列表】

2015505309000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2011/056006

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. A61K39/095 A61P31/04 ADD.		
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) 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 practicable, search terms used) EP0-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KOEBERLING OLIVER ET AL: "Meningococcal outer membrane vesicle vaccines derived from mutant strains engineered to express factor H binding proteins from antigenic variant groups 1 and 2", CLINICAL AND VACCINE IMMUNOLOGY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, WASHINGTON, DC, US, vol. 16, no. 2, 1 February 2009 (2009-02-01), pages 156-162, XP009137318, ISSN: 1556-6811, DOI: 10.1128/CVI.00403-08	1,3,6,10
Y	the whole document -----	1-13
X	W0 2009/038889 A1 (CHILDREN S HOSPITAL AND RES CT [US]; GRANOFF DAN [US]; HOU VICTOR [US]) 26 March 2009 (2009-03-26)	1,3,6,10
Y	the whole document -----	1-13
-/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent 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 "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
25 October 2012		13/11/2012
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 6818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer
		Merlos, Ana Maria

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/IB2011/056006

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>JIANG H Q ET AL: "Broad vaccine coverage predicted for a bivalent recombinant factor H binding protein based vaccine to prevent serogroup B meningococcal disease", VACCINE, ELSEVIER LTD, GB, vol. 28, no. 37, 23 August 2010 (2010-08-23), pages 6086-6093, XP027204839, ISSN: 0264-410X [retrieved on 2010-07-07] the whole document</p>	1-13
Y	<p>ANDERSON A S ET AL: "Functional cross-reactive antibodies are elicited by a Group B Neisseriameningitidis bivalent recombinant lipidated LP2086 vaccine in Cynomolgusmacaques", 16TH INTERNATIONAL PATHOGENIC NEISSERIA CONFERENCE, 7 July 2008 (2008-07-07), pages 170-171, XP002595681, Retrieved from the Internet: URL:http://neisseria.org/ipnc/2008/Abstracts_poster_presentations_IPNC_2008.pdf [retrieved on 2010-08-06] the whole document</p>	1-13
Y	<p>MASIGNANI V ET AL: "Vaccination against Neisseria meningitidis using three variants of the lipoprotein GNA1870", THE JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, ROCKEFELLER UNIVERSITY PRESS, US, vol. 197, no. 6, 17 March 2003 (2003-03-17), pages 789-799, XP002286107, ISSN: 0022-1007, DOI: 10.1084/JEM.20021911 the whole document</p>	1-13
Y	<p>WO 2004/048404 A2 (CHIRON SRL [IT]; COMANDUCCI MAURIZIO [IT]; PIZZA MARIAGRAZIA [IT]) 10 June 2004 (2004-06-10) cited in the application the whole document</p>	1-13
Y	<p>WO 2007/060548 A2 (NOVARTIS VACCINES & DIAGNOSTIC [IT]; MASIGNANI VEGA [IT]; SCARSELLI MA) 31 May 2007 (2007-05-31) cited in the application the whole document</p>	1-13

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/IB2011/056006

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	FLETCHER L D ET AL: "Vaccine potential of the <i>Neisseria meningitidis</i> 2086 lipoprotein", INFECTION AND IMMUNITY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, USA, vol. 72, no. 4, 1 April 2004 (2004-04-01), pages 2088-2100, XP002308110, ISSN: 0019-9567, DOI: 10.1128/IAI.72.4.2088-2100.2004 the whole document	1-13
Y	----- WO 2010/109323 A1 (NOVARTIS AG [CH]; CONTORNI MARIO [IT]; TARLI LORENZO [IT]) 30 September 2010 (2010-09-30) the whole document	1-13
E	----- WO 2011/161653 A1 (NOVARTIS AG [CH]; ARICO BEATRICE MARIA [IT]; BRUNELLI BRUNELLA [IT]; C) 29 December 2011 (2011-12-29) the whole document	1-13
E	----- WO 2012/025873 A2 (WYETH LLC [US]; KHANDKE LAKSHMI [US]; ARUMUGHAM RASAPPA [US]; LOUN BOU) 1 March 2012 (2012-03-01) the whole document	1-13
E	----- WO 2012/032489 A1 (WYETH LLC [US]; ANDERSON ANNALIESA SYBIL [US]; HOISETH SUSAN KAY [US];) 15 March 2012 (2012-03-15) the whole document	1-13
A	----- PANATTO DONATELLA ET AL: "Neisseria meningitidis B vaccines.", EXPERT REVIEW OF VACCINES SEP 2011 LNKD-PUBMED:21919622, vol. 10, no. 9, September 2011 (2011-09), pages 1337-1351, XP002685925, ISSN: 1744-8395 the whole document	1-13
A	----- GRANOFF DAN M: "Review of meningococcal group B vaccines", CLINICAL INFECTIOUS DISEASES, THE UNIVERSITY OF CHICAGO PRESS, CHICAGO, IL, US, vol. 50, no. Suppl. 2, 1 March 2010 (2010-03-01), pages S54-S65, XP009137322, ISSN: 1058-4838, DOI: 10.1086/648966 the whole document	1-13
	----- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/IB2011/056006

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	BRUNELLI BRUNELLA ET AL: "Influence of sequence variability on bactericidal activity sera induced by Factor H binding protein variant 1.1", VACCINE, ELSEVIER LTD, GB, vol. 29, no. 5, 1 January 2011 (2011-01-01), pages 1072-1081, XP009148740, ISSN: 0264-410X, DOI: 10.1016/J.VACCINE.2010.11.064 the whole document	1-13
A	SCARSELLI MARIA ET AL: "Rational design of a meningococcal antigen inducing broad protective immunity", SCIENCE / SCIENCE TRANSLATIONAL MEDICINE, WASHINGTON, DC : AAAS, US, vol. 3, no. 91, 13 July 2011 (2011-07-13), XP009163768, ISSN: 1946-6242 the whole document	1-13
Y	RICHMOND P ET AL: "A randomized, observer-blinded, active control, phase 1 trial of meningococcal serogroup B rLP2086 vaccine in healthy children and adolescents aged 8 to 14 years; P212", INTERNET CITATION, 2008, pages 270-271, XP002662405, Retrieved from the Internet: URL:http://neisseria.org/ipnc/2008/Abstracts_poster_presentations_IPNC_2008.pdf [retrieved on 2011-10-28] the whole document	1-13
Y	MARSHALL H ET AL: "A randomized, placebo-controlled, double-blinded, phase 1 trial of ascending doses of meningococcal serogroup B rLP2086 vaccine in healthy adults; P213", INTERNET CITATION, 2008, pages 271-272, XP002662406, Retrieved from the Internet: URL:http://neisseria.org/ipnc/2008/Abstracts_poster_presentations_IPNC_2008.pdf [retrieved on 2011-10-28] the whole document	1-13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/IB2011/056006

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2009038889 A1	26-03-2009	CA 2695467 A1 EP 2185576 A1 US 2009035328 A1 WO 2009038889 A1	26-03-2009 19-05-2010 05-02-2009 26-03-2009
WO 2004048404 A2	10-06-2004	AU 2003288681 A1 BR 0316501 A CA 2507009 A1 CN 1732183 A EP 1562983 A2 EP 2258716 A2 EP 2258717 A2 EP 2261239 A2 HK 1088342 A1 JP 4767540 B2 JP 2006521782 A JP 2010162038 A MX PA05005442 A NZ 540206 A RU 2336091 C2 US 2006251670 A1 US 2012148617 A1 US 2012148618 A1 WO 2004048404 A2	18-06-2004 04-10-2005 10-06-2004 08-02-2006 17-08-2005 08-12-2010 08-12-2010 15-12-2010 27-03-2009 07-09-2011 28-09-2006 29-07-2010 26-08-2005 22-12-2006 20-10-2008 09-11-2006 14-06-2012 14-06-2012 10-06-2004
WO 2007060548 A2	31-05-2007	AT 521708 T AU 2006318155 A1 BR PI0619024 A2 CA 2630929 A1 CN 101356274 A DK 1976990 T3 EP 1976990 A2 EP 2385126 A1 EP 2385127 A1 ES 2369937 T3 JP 2009517377 A NZ 568577 A PT 1976990 E SI 1976990 T1 US 2011166323 A1 WO 2007060548 A2	15-09-2011 31-05-2007 20-09-2011 31-05-2007 28-01-2009 12-12-2011 08-10-2008 09-11-2011 09-11-2011 09-12-2011 30-04-2009 22-12-2011 24-10-2011 30-12-2011 07-07-2011 31-05-2007
WO 2010109323 A1	30-09-2010	AU 2010227219 A1 CA 2756522 A1 CN 102427826 A EP 2411048 A1 JP 2012521402 A US 2012070458 A1 US 2012148619 A1 WO 2010109323 A1	13-10-2011 30-09-2010 25-04-2012 01-02-2012 13-09-2012 22-03-2012 14-06-2012 30-09-2010
WO 2011161653 A1	29-12-2011	NONE	
WO 2012025873 A2	01-03-2012	TW 201221138 A WO 2012025873 A2	01-06-2012 01-03-2012
WO 2012032489 A1	15-03-2012	TW 201223542 A US 2012093852 A1	16-06-2012 19-04-2012

Information on patent family members

International application No

PCT/IB2011/056006

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		WO 2012032489 A1	15-03-2012

フロントページの続き

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

(72)発明者 ブルネルリ, ブルネルラ

イタリア国 イ - 5 3 1 0 0 シエナ, ヴィア フィオレンティーナ 1, ノバルティス ヴァクシンズ

(72)発明者 コマンドウッチ, マウリツィオ

イタリア国 イ - 5 3 1 0 0 シエナ, ヴィア フィオレンティーナ 1, ノバルティス ヴァクシンズ

(72)発明者 ビッツァ, マリアグラツィア

イタリア国 イ - 5 3 1 0 0 シエナ, ヴィア フィオレンティーナ 1, ノバルティス ヴァクシンズ

(72)発明者 サヴィーノ, スィルヴァーナ

イタリア国 イ - 5 3 1 0 0 シエナ, ヴィア フィオレンティーナ 1, ノバルティス ヴァクシンズ

(72)発明者 スカーセッリ, マリア

イタリア国 イ - 5 3 1 0 0 シエナ, ヴィア フィオレンティーナ 1, ノバルティス ヴァクシンズ

F ターム(参考) 4C085 AA02 BA16 BA38 CC07 EE03 EE06

4H045 AA10 AA20 AA30 BA41 BA42 BA55 CA11 DA86 EA31 FA74