

(19)日本国特許庁(JP)

## (12)特許公報(B2)

(11)特許番号  
特許第7525093号  
(P7525093)

(45)発行日 令和6年7月30日(2024.7.30)

(24)登録日 令和6年7月22日(2024.7.22)

(51)国際特許分類	F I			
C 1 2 N	15/31 (2006.01)	C 1 2 N	15/31	Z N A
A 6 1 K	35/76 (2015.01)	A 6 1 K	35/76	
A 6 1 K	39/095 (2006.01)	A 6 1 K	39/095	
A 6 1 K	39/39 (2006.01)	A 6 1 K	39/39	
A 6 1 K	47/62 (2017.01)	A 6 1 K	47/62	

請求項の数 11 (全44頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2019-511993(P2019-511993)	(73)特許権者	516245900 オックスフォード ユニバーシティ イノ ベーション リミテッド OXFORD UNIVERSITY I NNOVATION LIMITED イギリス国 オックスフォード オックス フォードシャー オーエックス2 0ジエ イビー, ウエスト ウェイ 3, バックス トン コート
(86)(22)出願日	平成29年8月31日(2017.8.31)	(74)代理人	100114775 弁理士 高岡 亮一
(65)公表番号	特表2019-526261(P2019-526261 A)	(74)代理人	100121511 弁理士 小田 直
(43)公表日	令和1年9月19日(2019.9.19)	(74)代理人	100202751 弁理士 岩堀 明代
(86)国際出願番号	PCT/GB2017/052535		
(87)国際公開番号	WO2018/042178		
(87)国際公開日	平成30年3月8日(2018.3.8)		
審査請求日	令和2年8月28日(2020.8.28)		
審判番号	不服2022-11759(P2022-11759/J 1)		
審判請求日	令和4年7月29日(2022.7.29)		
(31)優先権主張番号	1614687.0		
(32)優先日	平成28年8月31日(2016.8.31)		
(33)優先権主張国・地域又は機関			
	最終頁に続く		最終頁に続く

(54)【発明の名称】 改変H因子結合タンパク質

## (57)【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

配列番号45～79のいずれかによる配列を含むPorAループ、または1、2、3、4もしくは5つ以下のアミノ酸付加、欠失もしくは置換を有するその変異体から選択される外来ペプチドループの付加でさらに改変された、野生型fHbp、fHbpの野生型淋菌オルソログ(Ghfp)、または配列番号1～13の配列のいずれか1つと少なくとも75%の同一性を有するその変異体を含む、改変H因子結合タンパク質(fHbp)であつて、

前記外来ペプチドループが8～20アミノ酸長であり、前記外来ペプチドループが、配列番号1のアミノ酸残基番号49～54、83～88、114～124、199～206、227～233および240～246、またはそれらと同等の残基のいずれか1つに対応するアミノ酸位置に挿入される、免疫原性を有する改変H因子結合タンパク質。

## 【請求項2】

前記改変fHbpが、H因子を結合できないように、または少なくともH因子結合活性を低下させるように改変される、請求項1に記載の改変H因子結合タンパク質。

## 【請求項3】

前記改変fHbpが2つ以上の外来ペプチドループを含むか、または前記改変fHbpが1～7個の外来ペプチドループを含む、請求項1～2のいずれか一項に記載の改変H因子結合タンパク質。

## 【請求項4】

前記改変 f H b p またはその変異体が、少なくとも 2 つの位置において外来ペプチドグループで改変される、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の改変 H 因子結合タンパク質。

**【請求項 5】**

前記改変 f H b p が、配列番号 1 ~ 13 のいずれか 1 つの配列またはその変異体を含み、少なくとも 1 つの外来ペプチドグループが、配列番号 1 ~ 13 のいずれかの 1 つの配列内の追加の挿入物である、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の改変 H 因子結合タンパク質。

**【請求項 6】**

請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の改変 f H b p をコードする核酸であって、任意で前記核酸がベクターであり、さらに任意でウイルスベクターである、核酸。

**【請求項 7】**

請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の改変 f H b p 、または請求項 6 に記載の核酸を含む、組成物であって、

任意で、前記組成物が 2 つ以上の異なる改変 f H b p 分子を含む、および / または前記組成物が、薬学的に許容される担体ならびに / もしくはアジュバントを含む、組成物。

**【請求項 8】**

前記組成物が、少なくとも 1 つの他の予防または治療活性分子をさらに含み、任意で前記少なくとも 1 つの他の予防または治療活性分子が、

一価タンパク質：莢膜多糖ワクチン；または

結合型ワクチンであって、外来ペプチドグループを保持する f H b p 足場を含む抗原が、タンパク質担体分子として前記結合型ワクチンに組み込まれた、前記ワクチンを含む、請求項 7 に記載の組成物。

**【請求項 9】**

薬剤としての使用のための、請求項 7 または 8 に記載の組成物。

**【請求項 10】**

対象の病原性感染またはコロニー形成の治療または予防での使用のための、請求項 7 または 8 に記載の組成物。

**【請求項 11】**

請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の改変 f H b p 、請求項 6 に記載の核酸、または請求項 7 または 8 に記載の組成物と、少なくとも 1 つの他の予防または治療活性分子との組み合わせであって、

任意で少なくとも 1 つの他の予防または治療活性分子が、タンパク質：莢膜多糖ワクチンを含む、組み合わせ。

**【発明の詳細な説明】**

**【技術分野】**

**【0001】**

本発明は、改変 H 因子結合タンパク質 ( f H b p ) 、および病原性感染またはコロニー形成に対する、例えば、髄膜炎菌または淋菌に対する免疫応答を誘発するその使用に関する。

**【背景技術】**

**【0002】**

髄膜炎菌 ( N m ) は、依然として小児および若年層における敗血症および細菌性髄膜炎の主因である。疾患の発症が極めて早い場合があり、敗血症疾患の致死率は約 10 % であり<sup>1</sup>、生存者は、四肢喪失および神経学的欠損を含む重大な身体障害を患う恐れがある<sup>1</sup>。したがって、予防的免疫付与は、髄膜炎菌感染から個人を保護する最善の方法である。細菌莢膜に基づくワクチンを利用できる<sup>2</sup>が、現在 U K で症例の 80 % 超で生じる、地域特有の血清型 B 感染に利用できる部分的に有効なワクチンしか存在しない<sup>3</sup>；血清型 B 莢膜 N m の多糖は、神経組織のヒト糖タンパク質との構造的同一性を有するため、免疫原性が低く、ワクチンとして使用した場合に自己免疫を誘導する可能性があった<sup>4</sup>。したがって、新規なワクチンを生成することが急務であり、この重要な目標を達成するために産学両方で懸命な努力がなされている。

10

20

30

40

50

## 【0003】

髓膜炎菌外膜小胞 (OMV) に対して誘発される免疫応答の主な標的は Por A<sup>16</sup>、<sup>17</sup>、<sup>18</sup>、髓膜炎菌の内在性外膜タンパク質 (OMP)<sup>19</sup>である。しかし、このタンパク質の配列は多様であり、特定の変異体の優勢は、地理的領域によって異なり、OMVワクチンは主としてPor A特異的である。Por Aの変異体は、タンパク質の可変領域 (VR) の配列により同定され、これはタンパク質の表面露出ループに位置しており、免疫応答の標的である<sup>17</sup>。Por Aは、7つの細胞外ループ有する。第4ループは、可変領域2 (VR2) であり、自然感染後およびOMVでの免疫付与後Por Aにより生じるほとんどの血清殺菌活性 (SBA) の標的である<sup>16</sup>、<sup>18</sup>。SBAは、髓膜炎菌疾患に対する防御と相關していることが知られている。配列多様性にかかわらず、6つのPor Aタンパク質を含有するワクチンが、UK分離株の約70%を占める (http://pubmlst.org/nesseria/PorA/)。

## 【0004】

細菌ワクチンの開発の主な障害は、Por Aなどの内在性OMPをその天然立体配座で大量に産生することが困難であることである。これは、OMPが膜を貫通する疎水性ドメインを含有し、可溶性組換えタンパク質として発現させると正しく折り畳まれないためである。SBAが、タンパク質の直鎖ではなく立体配座エピトープにより誘発されるため、正しい折り畳みは、Por Aにとって必須である<sup>20</sup>。Por Aペプチドをワクチンとして使用する以前の試みは、それらが、十分に免疫原性でなく、Por Aの免疫原性部分をその正確な立体配座で提示しないため成功しなかった。結果的に、開発中のPor Aに基づくワクチンはOMVのみであり、これは、幼児における有効性が限られており<sup>2</sup>、反応原生であり<sup>21</sup>、規制問題をもたらすことが十分に定義されていない。免疫原性としてのOMVは、整合性および毒性が製造過程で問題となり得るため、好ましくない。例えば、OMVは、毒性リポ多糖 (LPS) を含有し得る。

## 【0005】

髓膜炎菌H因子結合タンパク質 (fHbp) は、2つのバレルからなる表面露出行リポタンパク質である<sup>5</sup> (図1A)。fHbpのN末端 バレルは、比較的開放的な構造を有し、C末端 バレルは、このバレルを形成する7つの鎖間の広範な水素結合により安定化される<sup>5</sup>。

## 【0006】

重要なことに、fHbpは、Pfizer、GSKなどの製薬会社が開発中の血清型BNmに対するワクチンにおいて重要な抗原であり、次世代OMVワクチンに含まれる<sup>6</sup>、<sup>7</sup>、<sup>8</sup>。Pfizerワクチンは、2つのfHbpからなり、GSKワクチンは、OMVを含む他の抗原のカクテルに単一fHbpを有する。fHbpは、マウスではなくヒトH因子 (fH)<sup>9</sup>、<sup>10</sup>を結合し、補体系をダウンレギュレートする豊富な血漿タンパク質であり<sup>11</sup>、Nmに対する免疫の重大な側面である<sup>12</sup>。fHbpでの青年および成人の免疫付与によりSBAが誘発される<sup>13</sup>。

## 【0007】

fHbpは、その予想アミノ酸配列に基づき様々なスキームに分類されている。本願において、3つの変異体群 (v1、v2およびv3<sup>7</sup>) およびペプチド数 (www.mlst.org) が認識される。重要なことに、v1-fHbpに対して提起された血清は、v2およびv3タンパク質を発現するNmに対してSBAを媒介せず、逆もまた同様である。GSKワクチンは、単一v1タンパク質 (v1.1) を含有し、Pfizer製剤は、v1およびv3-fHbpを含む<sup>13</sup>、<sup>14</sup>。したがって、現在のワクチンは、v2-fHbpを含んでいないが、UKにおける疾患の大部分は、現在この変異体群からのfHbpを発現する株により引き起こされている<sup>3</sup>、<sup>15</sup>。

## 【0008】

国際公開第2011024072号は、宿主動物への投与後、広域殺菌性抗髓膜炎菌抗体を誘発できる配列を有するように選択または遺伝子操作されたfHbpの使用について記載する特許出願である。この文書は、さらなる髓膜炎菌抗原が、NまたはC末端融合タ

10

20

30

40

50

ンパク質の形態の改変 f H b p で提供され得ること教示している。しかし、このような提案により、多くの髄膜炎菌抗原の免疫原性部分を提示するタンパク質、例えば、P o r A が、正確な立体配座で產生される可能性は低く、これらは十分に免疫原性ではないであろう。

【 0 0 0 9 】

本発明の目的は、特に髄膜炎菌または淋菌の感染またはコロニー形成を予防または低減するための、病原性微生物に対するワクチン接種のための代替のおよび改善された免疫原性分子を提供することである。

【 0 0 1 0 】

本発明の第 1 の態様によれば、異なる抗原からの少なくとも 1 つの外来ペプチドループの付加での改変により、分子足場として作用する、f H b p またはその変異体を含む改変 H 因子結合タンパク質 ( f H b p ) が提供される。

【 0 0 1 1 】

免疫原性ペプチド、例えば、P o r A からの免疫原性ペプチドは、分子足場として作用する、H 因子結合タンパク質 ( f H b p ) に導入できることが、本明細書で示された。f H b p に導入されるペプチドは、免疫系に提示され、S B A などの防御応答を誘発できる。有利には、f H b p 分子は、エピトープの表示のため、特に、その天然立体配座での安定化および表示が困難なエピトープのためのペプチドループ、例えば、P o r A などの内在性 O M P からのループを安定的に含むのに理想的な分子足場を提供する。これは、f H b p および追加の抗原の単純な N - または C 末端融合では、いくつかの抗原の固有の安定性および溶解性の問題が解決されないであろうという、国際公開第 2 0 1 1 0 2 4 0 7 2 号などの教示と対照をなす。特に、P o r A などの多くの O M P は、その膜貫通ドメインが不溶性であるため発現が困難である。P o r A は、鎖 1 と 2 ( ループ 1 ) 、鎖 7 と 8 ( ループ 4 ) 、鎖 9 と 1 0 ( ループ 5 ) および鎖 1 1 と 1 2 ( ループ 7 ) の間に表面露出ループを有する、1 6 鎖バレル構造を有し、最も有効な抗原であることが実証された。f H b p は、2 つの バレルを含有し、したがって、O M P からのペプチドループ配列を、f H b p の 鎖間のループの先端に挿入して、内在性 O M P からの細胞外ループフラグメントをその天然立体配座で提示し、免疫付与することができる。したがって、本発明の改変 f H b p 足場分子は、單一タンパク質が、2 つの異なる抗原からの重要なエピトープを提示する、N m または淋菌を対象とした予防および治療ワクチンとして使用できる。

【 0 0 1 2 】

一実施形態において、f H b p は、髄膜炎菌 f H b p である。別の実施形態において、f H b p は、淋菌 f H b p である。f H b p は、変異体 v 1 、v 2 および v 3 のいずれか 1 つを含み得る。一実施形態において、f H b p は、f H b p v 1 を含み得る。別の実施形態において、f H b p は、f H b p v 2 を含み得る。別の実施形態において、f H b p は、f H b p v 3 を含み得る。

【 0 0 1 3 】

一実施形態において、f H b p 変異体 v 1 は、変異体 v 1 . 1 、v 1 . 1 3 、v 1 . 1 4 、v 1 . 1 5 、v 1 . 4 または v 1 . 5 5 であり得る。一実施形態において、f H b p 変異体 v 1 は、v 1 . 1 でない場合がある。一実施形態において、f H b p 変異体 v 1 は、v 1 . 1 または v 1 . 5 5 でない場合がある。一実施形態において、f H b p 変異体 v 2 は、変異体 v 2 . 1 6 、v 2 . 1 9 、v 2 . 2 2 または v 2 . 2 5 であり得る。一実施形態において、f H b p 変異体 v 3 は、変異体 v 3 . 4 5 であり得る。一実施形態において、f H b p は f H b p 変異体 v 1 . 4 、v 2 . 2 5 または v 3 . 4 5 のいずれか 1 つを含む。

【 0 0 1 4 】

f H b p の変異体は、f H b p のオルソログを含み得る。例えば、f H b p の変異体は、G h f p 、f H b p の淋菌ホモログを含み得る。G h f p は非機能性であり、V 3 f H b p に密に関連している (> 9 5 % の a a 同一性、H 因子との解離定数 K D > 1 0 0 μ M ) 。

10

20

30

40

50

## 【0015】

一実施形態において、少なくとも1つの外来ペプチドループでさらに改変されるべきfHbpは、CSSGGGGVAA DIGAGLADAL TAPLDHKDKG LQS LTLDQSV RKNEKLKLAQ GAEKTYGNG DSLNTGKLKN DKVSRDFIR QIEVDGQLIT LESGEFQVYK QSHSALTA FQ TEQIQDSEHS GKMVAKRQFR IGDIAGEHTS FDKLPEGGRA TYRGTAFGSD DAGGKLTYTI DFAAKQGNGK IE HLKSPELN VDLAAADIKP DGKRHAVISG SVLYNQAEKG SYSLGIFGGK AQEVAGSAEV KTVNGIRHIG LAAKQ(配列番号1、fHbpV1.1 GI:316985482)の配列を含み得るか、またはこれからなり得る。 10

## 【0016】

別の実施形態において、少なくとも1つの外来ペプチドループでさらに改変されるべきfHbpは、CSSGGGGVAA DIGAGLADAL TAPLDHKDKS LQS LTLDQSV RKNEKLKLAQ GAEKTYGNG DSLNTGKLKN DKVSRDFIR QIEVDGQLIT LESGEFQVYK QSHSALTA LQ TEQVQDSEHS GKMVAKRQFR IGDIAGEHTS FDKLPEGGRA TYRGTAFGSD DASGKLTYTI DFAAKQGHGK IE HLKSPELN VDLAASDIKP DKKRHAVISG SVLYNQAEKG SYSLGIFGGQ AQEVAGSAEV ETANGIRHIG LAAKQ(配列番号2、fHbpV1.4 GI:989557230)の配列を含み得るか、またはこれからなり得る。 20

## 【0017】

別の実施形態において、少なくとも1つの外来ペプチドループでさらに改変されるべきfHbpは、CSSGGGGVAA DIGAGLADAL TAPLDHKDKG LQS LTLDQSV RKNEKLKLAQ GAEKTYGNG DSLNTGKLKN DKVSRDFIR QIEVDGKLIT LESGEFQVYK QSHSALTA LQ TEQVQDSEDS GKMVAKRQFR IGDIAGEHTS FDKLPKGGSA TYRGTAFGSD DAGGKLTYTI DFAAKQGHGK IE HLKSPELN VELATAYIKP DEKRHAVISG SVLYNQDEKG SYSLGIFGGQ AQEVAGSAEV ETANGIHHIG LAAKQ(配列番号3、fHbpV1.13 GI:752774533)の配列を含み得るか、またはこれからなり得る。 30

## 【0018】

別の実施形態において、少なくとも1つの外来ペプチドループでさらに改変されるべきfHbpは、CSSGGGGVAA DIGAGLADAL TAPLDHKDKS LQS LTLDQSV RKNEKLKLAQ GAEKTYGNG DSLNTGKLKN DKVSRDFIR QIEVDGQLIT LESGEFQVYK QSHSALTA LQ TEQEQQDPEHS GKMVAKRRFK IGDIAGEHTS FDKLPKDVMA TYRGTAFGSD DAGGKLTYTI DFAAKQGHGK IE HLKSPELN VELATAYIKP DEKHHHAVISG SVLYNQDEKG SYSLGIFGGQ AQEVAGSAEV ETANGIHHIG LAAKQ(配列番号4、fHbpV1.14 GI:630057376)の配列を含み得るか、またはこれからなり得る。 40

## 【0019】

別の実施形態において、少なくとも1つの外来ペプチドループでさらに改変されるべきfHbpは、CSSGGGSGGG GGVAADIGAG LADALTAPLD HKDKGLKSLT LEDSISQNGT LTLSAQGAER TFKAGDKDNS LNTGKLKN DK ISRFDFIRQI EVDGQLITLE SGEFQVYK QS HSALTALQTE QVQDSEHSGK MVAKRQFRIG DIVGE 50

HTSFG KLPKDVMATY RGTAFGSDDA GGKLTYTIDF AA  
 KQGHGKIE HLKSPELNVD LAAADIKPDE KHHAVISGSV  
 LYNQAEKGSY SLGIFGGQAQ EVAGSAEVET ANGIRHIG  
 LA AKQ (配列番号5、fHbp V1.15 GI: 504394462)の配列を  
 含み得るか、またはこれからなり得る。

## 【0020】

別の実施形態において、少なくとも1つの外来ペプチドループでさらに改変されるべき  
 fHbpは、CSSGGGGSGG GGVTA DIGTG LADALTAPLD HK  
 DKGLKSLT LEDSISQNGT LTLSAQGAEK TYGNGDSLNT  
 GKLNNDKVSF FDFIRQIEVD GQLITLESGE FQVYKQSH  
 SA LTALQTEQEQ DPEHSEKMVA KRRFRIGDIA GEHTS  
 FDKLK DVMMATYRGT AFGSDDAGGK LTYTIDFAAK QG  
 HGKIEHLK SPELNVDLAV AYIKPDEKHH AVISGSVLYN  
 QDEKGSYSLG IFGEKAQEVA GSAEVETANG IHHIGLAA  
 KQ (配列番号6、fHbp V1.55 GI: 40353481)の配列を含み得るか、またはこれからなり得る。

10

## 【0021】

別の実施形態において、少なくとも1つの外来ペプチドループでさらに改変されるべき  
 fHbpは、CSSGGGGVAA DIGAGLADAL TAPLDHKDKS LQ  
 SLTLDQSV RKNEKLKLAQ QGAEKTYGNG DSLNTGKLKN  
 DKVSRFD FIR QIEVDGQLIT LESGEFQIYK QDHSAVVA  
 LQ IEKINNPDKI DSLINQRSL VSGLGGEHTA FNQLP  
 DGKAE YHGKAFSSDD AGGKLTYTID FAAKQGHGKI EH  
 LKTPEQNV ELAAAELKAD EKSHAVILGD TRYGSEEKGT  
 YHLALFGDRA QEIAAGSATVK IGEKVHEIGI AGKQ (配列番  
 号7、fHbp V2.16 GI: 488155511)の配列を含み得るか、またはこれからなり得る。

20

## 【0022】

別の実施形態において、少なくとも1つの外来ペプチドループでさらに改変されるべき  
 fHbpは、CSSGGGGVAA DIGAGLADAL TAPLDHKDKS LQ  
 SLTLDQSV RKNEKLKLAQ QGAEKTYGNG DSLNTGKLKN  
 DKVSRFD FIR QIEVDGQLIT LESGEFQIYK QDHSAVVA  
 LQ IEKINNPDKI DSLINQRSL VSGLGGEHTA FNQLP  
 SGKAE YHGKAFSSDD AGGKLTYTID FAAKQGHGKI EH  
 LKTPEQNV ELASAAELKAD EKSHAVILGD TRYGGEEKGT  
 YHLALFGDRA QEIAAGSATVK IREKVHEIGI AGKQ (配列番  
 号8、fHbp V2.19 GI: 488148626)の配列を含み得るか、またはこれからなり得る。

30

## 【0023】

別の実施形態において、少なくとも1つの外来ペプチドループでさらに改変されるべき  
 fHbpは、CSSGGGGVAA DIGAGLADAL TAPLDHKDKS LQ  
 SLTLDQSV RKNEKLKLAQ QGAEKTYGNG DSLNTGKLKN  
 DKVSRFD FIR QIEVDGQLIT LESGEFQIYK QDHSAVVA  
 LQ IEKINNPDKI DSLINQRSL VSGLGGEHTA FNQLP  
 SGKAE YHGKAFSSDD PNGLRLHYSID FTKKQGYGRI EH  
 LKTPEQNV ELASAAELKAD EKSHAVILGD TRYGGEEKGT  
 YHLALFGDRA QEIAAGSATVK IREKVHEIGI AGKQ (配列番  
 号9、fHbp V2.22 GI: 120865922)の配列を含み得るか、またはこれからなり得る。

40

## 【0024】

50

別の実施形態において、少なくとも1つの外来ペプチドループでさらに改変されるべきf H b pは、C S S G G G G V A A D I G A G L A D A L T T P L D H K D K S L Q S L T L D Q S V R K N E K L K L A A Q G A E K T Y G N G D S L N T G K L K N D K V S R F D F I R Q I E V D G Q T I T L A S G E F Q I Y K Q N H S A V V A L Q I E K I N N P D K I D S L I N Q R S F L V S G L G G E H T A F N Q L P D G K A E Y H G K A F S S D D P N G R L H Y S I D F T K K Q G Y G R I E H L K T P E Q N V E L A S A E L K A D E K S H A V I L G D T R Y G G E E K G T Y H L A L F G D R A Q E I A G S A T V K I R E K V H E I G I A G K Q (配列番号10、f H b p 2.25 GI: 488158712)の配列を含み得るか、またはこれからなり得る。

10

## 【0025】

別の実施形態において、少なくとも1つの外来ペプチドループでさらに改変されるべきf H b pは、C S S G S G S G G G G V A A D I G T G L A D A L T A P L D H K D K G K G L K S L T L E D S I S Q N G T L T L S A Q G A E K T F K V G D K D N S L N T G K L K N D K I S R F D F V Q K I E V D G Q T I T L A S G E F Q I Y K Q N H S A D H S A V V A L Q I E K I N N P D K I D S L I N Q R S F L V S G L G G E H T A F N Q L P S G K A E Y H G K A F S S D D A G G K L T Y T I D F A A K Q G H G H G K I E H L K T P E Q N V E L A A A E L K A D E K S H A V I L G D T R Y G S E E G S E E K G T Y H L A L F G D R A Q E I A G S A T V K I R E K V H E I G I A G K Q (配列番号11、f H b p V3.45 GI: 284466869)の配列を含み得るか、またはこれからなり得る。

20

## 【0026】

別の実施形態において、少なくとも1つの外来ペプチドループでさらに改変されるべきf H b pは、C S S G G G G V A A D I G A G L A D A L T A P L D H K D K G L K S L T L E D S I S Q N G T L T L S A Q G A E K T F K V G D K D N S L N T G K L K N D K I S R F D F V Q K I E V D G Q T I T L A S G E F Q I Y K Q N H S A V V A L Q I E K I N N P D K I D S L I N Q R S F L V S G L G G E H T A F N Q L P G G K A E Y H G K A F S S D D A G G K L T Y T I D F A A K Q G H G K I E H L K T P E Q N V E L A A A E L K A D E K S H A V I L G D T R Y G S E E K G T Y H L A L F G D R A Q E I A G S A T V K I G E K V H E I S I A G K Q (配列番号12、f H b p V3.47 GI: 284466897)の配列を含み得るか、またはこれからなり得る。

30

## 【0027】

別の実施形態において、少なくとも1つの外来ペプチドループでさらに改変されるべきG h f pは、M T R S K P V N R T T F C C L S L T A G P D S D R L Q Q R R G G G G G V A A D I G T G L A D A L T A P L D H K D K G L K S L T L E A S I P Q N G T L T L S A Q G A E K T F K A G G K D N S L N T G K L K N D K I S R F D F V Q K I E V D G Q T I T L A S G E F Q I Y K Q D H S A V V A L R I E K I N N P D K I D S L I N Q R S F L V S D L G G E H T A F N Q L P D G K A E Y H G K A F S S D D A D G K L T Y T I D F A A K Q G H G K I E H L K T P E Q N V E L A S A E L K A D E K S H A V I L G D T R Y G G E E K G T Y R L A L F G D R A Q E I A G S A T V K I G E K V H E I G I A D K Q (配列番号13、G H F P)の配列を含み得るか、またはこれからなり得る。

40

## 【0028】

f H b pの変異体は、改変f H b pに提供される外来ペプチドループに加えて、野生型f H b pに対して、付加、欠失または置換を含む、1つ以上のアミノ酸残基の突然変異を含み得る。例えば、f H b pは、外来ペプチドループが提供される足場として作用し得、野生型に対する変異体は、外来ペプチドループの付着点の外側の領域の足場フレームワークにおけるアミノ酸突然変異を含み得る。野生型f H b pについての言及は、本明細書で考察されるf H b pの変異体のいずれか1つ、例えば、配列番号1~13のいずれか1つ

50

を指し得る。

【0029】

*f H b p* の変異体は、野生型タンパク質のアミノ酸と比較して、少なくとも 1 つのアミノ酸変化を含み得る。*f H b p* の変異体は、野生型タンパク質と比較して 1 つ以下のアミノ酸変化を含み得る。*f H b p* の変異体は、野生型タンパク質と比較して 3 つ以下のアミノ酸変化を含み得る。*f H b p* の変異体は、野生型タンパク質と比較して 4 つ以下のアミノ酸変化を含み得る。*f H b p* の変異体は、野生型タンパク質と比較して 5 つ以下のアミノ酸変化を含み得る。*f H b p* の変異体は、野生型タンパク質と比較して 6 つ以下のアミノ酸変化を含み得る。一実施形態において、野生型タンパク質と比較して 6 つのアミノ酸突然変異を含む、*f H b p* の変異体が提供される。

10

【0030】

アミノ酸置換は、保存的置換であり得る。例えば、突然変異残基は、野生型置換残基と実質的に同様の特性を含み得る。例えば、置換残基は、野生型置換残基と実質的に同様または同等の電荷または疎水性を含み得る。例えば、置換残基は、野生型置換残基と実質的に同様の分子量または立体的嵩を含み得る。

【0031】

一実施形態において、変異体 *f H b p* は、野生型と少なくとも 75 % の同一性を有し得る。別の実施形態において、変異体 *f H b p* は、野生型と少なくとも 80 % の同一性を有し得る。別の実施形態において、変異体 *f H b p* は、野生型と少なくとも 85 % の同一性を有し得る。別の実施形態において、変異体 *f H b p* は、野生型と少なくとも 90 % の同一性を有し得る。別の実施形態において、変異体 *f H b p* は、野生型と少なくとも 95 % の同一性を有し得る。別の実施形態において、変異体 *f H b p* は、野生型と少なくとも 98 % の同一性を有し得る。別の実施形態において、変異体 *f H b p* は、野生型と少なくとも 99 % の同一性を有し得る。別の実施形態において、変異体 *f H b p* は、野生型と少なくとも 99.5 % の同一性を有し得る。上記のパーセンテージの変化は、外来ペプチドループの付加に伴うパーセンテージ同一性の変化を含むことを意図するものではなく（すなわち、それが、野生型に対する *f H b p* の構成要素単独でのパーセンテージ同一性である）、他のタンパク質からのループが挿入されるサイトでの *f H b p* 配列の欠失を含まない。

20

【0032】

改変 *f H b p* は、H 因子を結合できないように、または少なくとも H 因子結合活性を低下させるように改変され得る。改変 *f H b p* は、野生型 *f H b p* の機能と比較して非機能性であり得る。一実施形態において、改変 *f H b p* は、野生型タンパク質と比較して  $K_D > 2$  枠で C F H を結合する能力が低下している。非機能性 *f H b p* は、*f H b p* 配列の突然変異により提供され得る。一実施形態において、非機能性 *f H b p* は、H 因子の結合サイトを妨害する外来ペプチドループの 1 つ以上により提供され得る。

30

【0033】

アミノ酸残基の突然変異は、改変 *f H b p* の補体 H 因子との結合を妨害または低減し得る。別の実施形態において、アミノ酸残基の突然変異は、*f H b p* の機能に実質的に影響を及ぼさないであろう。一実施形態において、*f H b p* またはその変異体におけるアミノ酸残基の突然変異は、v 1 . 1 *f H b p* の 85 位、133 位、134 位、135 位、136 位、204 位、206 位、211 位、212 位、213 位、222 位、225 位、227 位、231 位、および 252 位、または他の *f H b p* の対応する位置のアミノ酸からなる群から選択され得る。

40

【0034】

一実施形態において、アミノ酸残基の突然変異は、野生型残基の代わりにアラニンへの置換を含み得るか、またはこれからなり得る。一実施形態において、アミノ酸残基の変化は、野生型残基の代わりに任意の他のアミノ酸への置換を含み得るか、またはこれからなり得る。

【0035】

有利には、非機能性（すなわち、H 因子をまったくまたはほぼ結合しない）*f H b p* を

50

提供することにより、H因子の動員のワクチンの成功に対する何らかの悪影響を排除または低減できる。

【0036】

一実施形態において、アミノ酸残基の突然変異は、特に、改変 f H b p の安定性を高め得、f H b p V 2 が提供される一実施形態において、f H b p V 2 は、f H b p V 2 配列の突然変異により安定化され得る。V 2 の安定のための突然変異の詳細は、参照により本明細書に援用される、国際公開第2014030003号に見出され得る。例えば、安定化のためのアミノ酸置換は、f H b p V 2 の 35 位、36 位、42 位、46 位、107 位、112 位、114 位、137 位および 138 位のアミノ酸の 1 つ以上でのアミノ酸置換であり得る。安定化のための置換は、Ser 35、Leu 36、Asp 42、Glu 43、Arg 46、Asp 107、Val 112、Leu 114、Ser 137 および Gly 138 の 1 つ以上での置換であり得る。

10

【0037】

一実施形態において、外来ペプチドグループは免疫原性である。外来ペプチドグループは、外膜 / 表面露出タンパク質に由来し得る。

【0038】

外来ペプチドグループは、原核生物起源であり得る。外来ペプチドグループは、病原体の外膜タンパク質 (OMP) などの細菌のタンパク質に由来し得る。OMP は、内在性 OMP またはリポタンパク質であり得る。外来ペプチドグループは、髄膜炎菌外膜タンパク質などの髄膜炎菌タンパク質に由来し得る。外来ペプチドグループは、淋菌などの別の病原体の外膜タンパク質に由来し得る。

20

【0039】

外来ペプチドグループは、膜透過 バレルタンパク質のフラグメントを含み得る。外来ペプチドグループは、 バレルポリンタンパク質のフラグメントを含み得る。外来ペプチドグループは、Por A のフラグメントを含み得る。別の実施形態において、外来ペプチドグループは、Fet A のフラグメントを含み得る。

【0040】

Por A フラグメントなどの外来ペプチドグループは、16 アミノ酸長であり得る。一実施形態において、Por A フラグメントなどの外来ペプチドグループは、8 ~ 20 アミノ酸長であり得る。別の実施形態において、Por A フラグメントなどの外来ペプチドグループは、8 ~ 16 アミノ酸長であり得る。別の実施形態において、Por A フラグメントなどの外来ペプチドグループは、10 ~ 16 アミノ酸長であり得る。別の実施形態において、Por A フラグメントなどの外来ペプチドグループは、12 ~ 16 アミノ酸長であり得る。別の実施形態において、Por A フラグメントなどの外来ペプチドグループは、14 ~ 18 アミノ酸長であり得る。別の実施形態において、Por A フラグメントなどの外来ペプチドグループは、免疫原性エピトープを提供するのに十分な任意の長さであり得る。別の実施形態において、Por A フラグメントなどの外来ペプチドグループは、野生型のフラグメントに対して、免疫原性エピトープを提供し、天然立体配座を維持するのに十分な任意の長さであり得る。

30

【0041】

外来ペプチドグループは、Por A ループ 1 ~ 7 のいずれか 1 つまたはこれらのフラグメント；および / またはこれらの組み合わせから選択され得る。外来ペプチドグループは、ループ 1 ( 鎖 1 と 2 の間 ) 、ループ 4 ( 鎖 7 と 8 の間 ) 、ループ 5 ( 鎖 9 と 10 の間 ) およびループ 7 ( 鎖 11 と 12 の間 ) の Por A ループのいずれか 1 つ；またはこれらのフラグメント；および / またはこれらの組み合わせから選択され得る。

40

【0042】

外来ペプチドグループは、Por A ループ 1 ( 鎖 1 と 2 の間 ) ；ループ 4 ( バレル 7 と 8 の間 ) ；およびループ 5 ( 鎖 9 と 10 の間 ) ；またはこれらのフラグメント；および / またはこれらの組み合わせから選択される任意の 1 つのペプチドを含み得る。

【0043】

50

外来ペプチドループは、P o r A ループ1（バレル1と2の間）またはそのフラグメントを含み得る。外来ペプチドループはP o r A ループ4（鎖7と8の間）またはそのフラグメントを含み得る。外来ペプチドループはP o r A ループ5（鎖9と10の間）またはそのフラグメントを含み得る。

#### 【0044】

当業者は、P o r A ループの変異体配列が、野生型に対するわずかな突然変異で提供され得、エピトープとして依然として機能し得ることを理解するであろう。したがって、外来ペプチドループは、P o r A ループ変異体を含み得る。変異体は、野生型配列に対して1つ以上のアミノ酸付加、欠失または置換を含み得る。別の実施形態において、変異体は、野生型配列に対して1つ以下のアミノ酸付加、欠失または置換を含み得る。別の実施形態において、変異体は、野生型配列に対して2、3、4または5つ以下のアミノ酸付加、欠失または置換を含み得る。置換は保存的置換であり得る。例えば、実質的に同様の特性、例えば、電荷、疎水性、立体的嵩または分子量を有する代替のアミノ酸残基を提供する。変異体は、野生型P o r A ループ配列と少なくとも85%の配列同一性を有する配列を含み得る。別の実施形態において、変異体は、野生型P o r A ループ配列と少なくとも90%、95%、98%、99%または99.5%の配列同一性を有する配列を含み得る。

#### 【0045】

一実施形態において、改变f H b pは、2個以上の外来ペプチドループを含み得る。一実施形態において、改变f H b pは、3個以上の外来ペプチドループを含み得る。一実施形態において、改变f H b pは、1～7個の外来ペプチドループを含み得る。一実施形態において、改变f H b pは、1～5個の外来ペプチドループを含み得る。一実施形態において、改变f H b pは、1～3個の外来ペプチドループを含み得る。一実施形態において、改变f H b pは、2～7個の外来ペプチドループを含み得る。一実施形態において、改变f H b pは、2～5個の外来ペプチドループを含み得る。一実施形態において、改变f H b pは、3～5個の外来ペプチドループを含み得る。改变f H b pまたはその変異体は、少なくとも1つの位置において外来ペプチドループで改变され得る。改变f H b pまたはその変異体は、少なくとも2つの位置において外来ペプチドループで改变され得る。改变f H b pまたはその変異体は、少なくとも3つの位置において外来ペプチドループで改变され得る。改变f H b pまたはその変異体は、少なくとも4つの位置において外来ペプチドループで改变され得る。改变f H b pまたはその変異体は、少なくとも5つの位置において外来ペプチドループで改变され得る。改变f H b pまたはその変異体は、少なくとも6つの位置において外来ペプチドループで改变され得る。改变f H b pまたはその変異体は、少なくとも7つの位置において外来ペプチドループで改变され得る。

#### 【0046】

ペプチドループは、H因子結合タンパク質の2つのシート間に（例えば、f H b pを足場として使用して）提供され得る。ペプチドループは、P o r A ループなどの外来ペプチドループがv 1 . 1 f H b pのアミノ酸49～54、83～88、114～124、199～206、227～233および240～246の間（範囲は、ループのすべての残基を含む）に挿入され得る位置または他のf H b pの対応する位置から選択されるアミノ酸位置の1つ以上で、f H b pまたはその変異体に挿入され得る。

#### 【0047】

少なくとも1つの外来ペプチドループは、NまたはC末端融合として提供されない場合がある。

#### 【0048】

外来ペプチドループが挿入され得るf H b pの配列は、以下のf H b p V 1 . 1の一次アミノ酸配列に関連して下線が引かれたこれらの位置のいずれかであり得る。代替の変異体f H B Pを使用する一実施形態において、挿入サイトは、等価な位置であり得る。

#### 【0049】

f H b pの1位(p 1)、残基83～88

10

20

30

40

50

P 2、残基 1 9 9 ~ 2 0 6  
 P 3、残基 2 2 7 ~ 2 3 3  
 P 4、残基 4 9 ~ 5 4  
 P 5、残基 1 1 4 ~ 1 2 4  
 P 7、残基 2 4 0 ~ 2 4 6

## 【化 1】

1     CSSGGGGVAA DIGAGLADAL TAPLDHKDKG LQSLTLDQSV RKNEKLKLA  
P4  
 51   QGAEKTYGNG DSLNTGKLKN DKVSRDFDFIR QIEVDGQLIT LESGEFQVYK  
10  
P4  
 P1  
 101   QSHSALTAFQ TEQIQDSEHS GKMVAKRQFR IGDIAGEHTS FDKLPEGGRA  
P5  
 151   TYRGTAFGSD DAGGKLTYTI DFAAKQGNNGK IEHLKSPELN VDLAAADIKP  
P2  
 201   DGKRHAVISG SVLYNQAEKG SYSLGIFGGK AQEVAGSAEV KTVNGIRHIG  
P3  
P7  
 P2  
 251   LAAKQ (配列番号 1 4 )

## 【0 0 5 0】

一実施形態において、外来ペプチドループの挿入サイトは、f H b p の 1 位 ( P 1 )、残基 8 3 ~ 8 8 ( 配列 E V D G Q L ( 配列番号 1 5 ) ) であり得る。別の実施形態において、外来ペプチドループの挿入サイトは、P 2 位、残基 1 9 9 ~ 2 0 6 ( 配列 K P D G K R H A ( 配列番号 1 6 ) ) であり得る。別の実施形態において、外来ペプチドループの挿入サイトは、P 3 位、残基 2 2 7 ~ 2 3 3 ( 配列 F G G K A Q E ( 配列番号 1 7 ) ) であり得る。別の実施形態において、外来ペプチドループの挿入サイトは、P 4 位、残基 4 9 ~ 5 4 ( 配列 A A Q G A E ( 配列番号 1 8 ) ) であり得る。別の実施形態において、外来ペプチドループの挿入サイトは、P 5 位、残基 1 1 4 ~ 1 2 4 ( 配列 I Q D S E H S G K M ( 配列番号 1 9 ) ) であり得る。別の実施形態において、外来ペプチドループの挿入サイトは、P 7 位、残基 2 4 0 ~ 2 4 6 ( 配列 K T V N G I ( 配列番号 2 0 ) ) であり得る。

## 【0 0 5 1】

任意の所与の 1 位 ~ 7 位の外来ペプチドループの挿入サイトは、f H b p の 1 位 ~ 7 位で同定された残基のいずれかの間であり得る。あるいは、任意の所与の 1 位 ~ 7 位の外来ペプチドループの挿入サイトは、f H b p の 1 位 ~ 7 位で同定された最初の残基の前または最後の残基の後であり得る。例えば、外来ペプチドループが、4 位で挿入される場合、挿入は、\* A A Q G A E ( 配列番号 2 1 )、A \* A Q G A E ( 配列番号 2 2 )、A A \* Q G A E ( 配列番号 2 3 )、A A Q \* G A E ( 配列番号 2 4 )、A A Q G \* A E ( 配列番号 2 5 )、A A Q G A \* E ( 配列番号 2 6 ) または A A Q G A E \* ( 配列番号 2 7 ) であり得、\* は挿入サイトを示す。

## 【0 0 5 2】

別の実施形態において、当業者は、挿入サイトの領域の 1 ~ 5 個の残基が、f H b p 構造に顕著な影響を与えずに f H b p から除去され得る ( 例えば、ループで置き換えられ得る ) ように、外来ペプチドループの挿入サイトは可変的であり得ることを理解するであろう。一実施形態において、同定された位置のアミノ酸残基の 1 個以上は、外来ペプチドループで置き換えられる / 置換される。代替実施形態において、同定された位置のアミノ酸残基の 2 、 3 、 4 、 5 個以上は、外来ペプチドループで置き換えられる / 置換される。別の実施形態において、挿入サイトの領域の 1 ~ 3 個の残基が、f H b p 構造に顕著な影響を与えずに f H b p から除去され得る ( 例えば、ループに置き換えられ得る ) ように、外来ペプチドループの挿入サイトは可変的であり得る。別の実施形態において、挿入サイトの領域の 1 または 2 個の残基が、f H b p 構造に顕著な影響を与えずに f H b p から除去

20

30

40

50

され得る（例えば、ループで置き換えられ得る）ように、外来ペプチドループの挿入サイトは可変的であり得る。別の実施形態において、挿入サイトの領域の1個の残基が、f H b p構造に顕著な影響を与えずにf H b pから除去され得る（例えば、ループで置き換えられ得る）ように、外来ペプチドループの挿入サイトは可変的であり得る。例えば、挿入サイトが、ループの一方の端部でアミノ酸残基86であり、ループの他方の端部で残基87である場合、変異体は、言及された挿入サイトの領域での5、4、3、2、または1個の残基とループとの置き換えを含み得る。代替実施形態において、同定された位置のアミノ酸残基の6個以上は、外来ペプチドループで置き換えられる／置換される。代替実施形態において、同定された位置のアミノ酸残基の7個以上は（該当する場合）外来ペプチドループで置き換えられる／置換される。代替実施形態において、同定された位置のアミノ酸残基の8個以上は（該当する場合）外来ペプチドループで置き換えられる／置換される。代替実施形態において、同定された位置のアミノ酸残基の9個以上は（該当する場合）外来ペプチドループで置き換えられる／置換される。挿入位置1～7のいずれかの全アミノ酸残基は、外来ペプチドループで置換され得る。

#### 【0053】

例えば、外来ペプチドループが、4位で挿入され、1個以上の残基を置換する場合、挿入は、A \* Q G A E（配列番号28）、A A \* G A E（配列番号29）、A A \* A E（配列番号：30）、A A \* E（配列番号31）、A A \*、A \* G A E（配列番号32）、A \* A E（配列番号33）、A A \* E（配列番号34）、A \* E、A \*、\* A Q G A E（配列番号35）、\* Q G A E（配列番号36）、\* G A E（配列番号37）、\* A E、\* E、A A Q \* A E（配列番号38）、A A Q \* E（配列番号39）、A A Q \*（配列番号40）、A A Q G \* E（配列番号41）、A A Q G \*（配列番号42）、A A Q G A \*（配列番号43）であり得、\*は、挿入サイトを示し、1個以上の残基が、元の配列から除去される。

#### 【0054】

当業者は、挿入サイトおよび／または外来ペプチドループでの置換の等価な組み合わせが、別の配列の他の同定された挿入位置1～7でなされ得ることを理解するであろう。

#### 【0055】

一実施形態において、挿入サイトの領域は、任意の1位～7位の上流または下流に±5残基移動し得る。あるいは、挿入サイトの領域は、任意の1位～7位の上流または下流に±4残基移動し得る。あるいは、挿入サイトの領域は、任意の1位～7位の上流または下流に±3残基移動し得る。あるいは、挿入サイトの領域は、任意の1位～7位の上流または下流に±2残基移動し得る。あるいは、挿入サイトの領域は、任意の1位～7位の上流または下流に±1残基移動し得る。

#### 【0056】

さらにまたはあるいは、ペプチドループは、f H b p : C F Hの相互作用を立体的に妨害する位置に提供され得る。これらは、以下のV1の一次配列に下線が引かれた、残基114～124、199～206または240～246（例えば、2位、5位および7位）の間の任意の1つ以上のサイトに挿入される外来ペプチドループを含む：

#### 【化2】

```

1  CSSGGGGVAA DIGAGLADAL TAPLDHKDKG LQSLTLDQSV RKNEKLKLA
51  QGAEKTYGNG DSLNTGKLKN DKVSRDFDFIR QIEVDGQLIT LESGEFQVYK
101 QSHSALTAFQ TEQIQDSEHS GKMVAKRQFR IGDIAGEHTS FDKLPEGGRA
151 TYRGTAFGSD DAGGKLTYTI DFAAKQGNKG IEHLKSPLEN VDLAAADIKP
201 DGKRHAVISG SVLYNQAEKG SYSLGIFGGK AQEVAGSAEV KTVNGIRHIG
251 LAAKQ (配列番号44)

```

#### 【0057】

本発明の一実施形態において、改变f H b pは免疫原性である。改变f H b pは組換えタンパク質であり得る。改变f H b pは、組換え融合タンパク質などの融合タンパク質で

あり得る。改変 f H b p は、単離された改変 f H b p 分子であり得る。本発明の改変 f H b p 分子は、単一タンパク質多価ワクチンとして示され得る。改変 f H b p は O M V ワクチンに含まれ得る。

#### 【 0 0 5 8 】

1 超の外来ペプチドループが f H b p またはその変異体に挿入される実施形態において、外来ペプチドループが同じ、例えば、同じ配列、または実質的に同様であってよい。例えば、P o r A エピトープなどのいくつかのエピトープは、f H b p 上に個々に表示された場合、十分な機能応答を誘発できない。この場合、本発明を使用して、同じ改変 f H b p 分子上の複数のサイトに同じエピトープを提供することができ、それにより、エピトープの免疫原性認識が向上する。

10

#### 【 0 0 5 9 】

あるいは、外来ペプチドループは互いに対して異なり得る。例えば、外来ペプチドループは、P o r A などの単一タンパク質に由来する場合、各外来ペプチドループは、P o r A などのタンパク質の別個の領域に由来し得る。一実施形態において、各外来ペプチドループは、P o r A などのタンパク質の重複する領域および別個の領域に由来し得る。

#### 【 0 0 6 0 】

1 超の外来ペプチドループが、f H b p またはその変異体に挿入される実施形態において、外来ペプチドループは様々な種または株に由来し得る。例えば、多価ワクチンが様々な生物を含む複数の異なる抗原に所望される場合である。

20

#### 【 0 0 6 1 】

P o r A ペプチドループ配列は、表 1 に示される配列のいずれか（例えば、配列番号 4 5 ~ 7 9 のいずれか）から選択され得る。表 1 の各 P o r A 配列の組み合わせは、本明細書に記載の挿入サイト P 1 ~ P 7 のいずれかに提供され得る（1 サイトあたり 1 ループ）。さらにまたはあるいは、表 1 の同じ P o r A 配列の 2 つ以上は、本明細書に記載の挿入サイト P 1 ~ P 7 のいずれかに提供され得る（1 サイトあたり 1 ループ）。

#### 【 0 0 6 2 】

30

40

50

【表 1】

表 1 : P o r A VR2 ループの配列、このいずれかを f H b p の任意の変異体に挿入して、キメラ f H b p - P o r A タンパク質を作製することができる。

PorA VR2 ループ	一次配列	
P1. 1	YVAVENGVAKKVA (配列番号 45)	
P1. 2	HFVQQTPKSQPTLVP (配列番号 46)	10
P1. 2_2	HFVQQTPQSQPTLVP (配列番号 47)	
P1. 3	TLANGANNTIIRVP (配列番号 48)	
P1. 3_5	TLAKGANNTIIRVP (配列番号 49)	
P1. 4	HVVVNNKVATHVP (配列番号 50)	
P1. 9	YVDEQSKYHA (配列番号 51)	20
P1. 10	HFVQNKQNQRPTLVP (配列番号 52)	
P1. 10_1	HFVQNKQNQPPTLVP (配列番号 53)	
P1. 10_2	HFVQDKKGQPPTLVP (配列番号 54)	
P1. 10_8	HFVQNKQNQQNQPPTLVP (配列番号 55)	30
P1. 10_4	HFVQNKQNQNPPTLVP (配列番号 56)	
P1. 10_7	HFVQNKQNKPPTLVP (配列番号 57)	
P1. 13	YWTTVNTGSATTTTFVP (配列番号 58)	
P1. 13_1	YWTTVNTGSATTTFVP	40

	(配列番号 59)	
P1. 13_2	YWTTVNTGSATTFVP (配列番号 60)	10
P1. 13_4	YYTTVTQGSATTTFVP (配列番号 61)	
P1. 14	YVDEKKMVHA (配列番号 62)	
P1. 14_6	YVDEKQVSHA (配列番号 63)	
P1. 14_26	YVDEKKVVHA (配列番号 64)	
P1. 15	HYTRQNNADVFVP (配列番号 65)	
P1. 15_1	HYTRQNNNTDVFVP (配列番号 66)	20
P1. 15_11	HYTRQNNIDVFVP (配列番号 67)	
P1. 16	YYTKDTNNNLTLP (配列番号 68)	
P1. 16_3	YYTKDKNDNLTLP (配列番号 69)	
P1. 16_4	YYTKDKNDKLTLP (配列番号 70)	
P1. 16_26	YYTNNTNNLTLP (配列番号 71)	30
P1. 23	HWNTVYNTNGTTTFVP (配列番号 72)	
P1. 23_2	HWNTVYNTNGTTTFVP (配列番号 73)	
P1. 25	TYTVDSSGVVTPVP (配列番号 74)	
P1. 26	HFVADSQGKITRVP	40

	(配列番号 75)
P1.28	YYTTATNSSTSTTFVP (配列番号 76)
P1.30	HYTTVYNATTTTTFVP (配列番号 77)
P1.30_2	HYTTVYNATTTTTTFVP (配列番号 78)
P1.34	YVDDQGKVKG (配列番号 79)

10

## 【0063】

当業者は、1つまたは2つまたはそれ以上のアミノ酸置換、付加または欠失を伴う変異体が、免疫原性機能を実質的に除去せずに表1のPor A配列のために提供され得ることを理解するであろう。置換は、例えば、同様のMW、電荷、疎水性もしくは部分を有する同様のアミノ酸残基、または合成類似体に対する置換であり得る。当業者は、変異体が表1のPor A配列のトランケーションであり得、トランケートされた変異体は、認識可能なエピトープを形成するのに十分なアミノ酸残基を提供することをさらに理解するであろう。一実施形態において、Por A配列は、表1の配列のいずれか1つと少なくとも80%の同一性を有する。別の実施形態において、Por A配列は、表1の配列のいずれか1つと少なくとも85%の同一性を有する。別の実施形態において、Por A配列は、表1の配列のいずれか1つと少なくとも90%の同一性を有する。別の実施形態において、Por A配列は、表1の配列のいずれか1つと少なくとも95%の同一性を有する。別の実施形態において、Por A配列は、表1の配列のいずれか1つと少なくとも98%の同一性を有する。

20

## 【0064】

30

一実施形態において、外来ペプチドループでさらに改変されるべきfHbpは、

## 【化3】

CSSGGGGVAA DIGAGLADAL TAPLDHKDKG LQSLTLDQSV RKNEKLKLAA QGAEKTYGNG DSLNTGKLKN  
 DKVSRFDFIR QI[EVDGQL]IT LESGEFQVYK QSHSALTAFQ TEQ[QDSEHS GKMV]AKRQFR IGDIAGEHTS  
 FDKLPEGGRA TYRGTAFGSD DAGGKLTYTI DFAAKQGNGK IEHLKSPLEN VDLAAADI[KP DGKRHA]VISG  
 SVLYNQAEKG SYSLGI[FGGK AQE]VAGSAEV KTVNGI[RHIG LAAKQ (配列番号 80、 fHbp V1. 40  
 1 G I : 3 1 6 9 8 5 4 8 2)

の配列を含み得るか、またはこれからなり得、表1の任意のPor A VR2ループの配列は、枠で強調された任意のアミノ酸またはアミノ酸の群に置き換わり得る。

## 【0065】

一実施形態において、外来ペプチドループでさらに改変されるべきfHbpは、

40

50

## 【化4】

CSSGGGVAA DIGAGLADAL TAPLDHKDKS LQSLTLDQSV RKNEKLKLAA QGAEKTYGNG DSLNTGKLKN  
 DKVSRFDFIR QI [EVDGQL] IT LESGEFQVYK QSHSALTALQ TEQ [VQDSEHS GKMV] AKRQFR IGDIAEHTS  
 FDKLPEGGRA TYRGTAFGSD DASGKLTYTI DFAAKQGHGK IEHLKSPLEN VDLAASDI [KP DKKRHA] VISG  
 SVLYNQAEKG SYSLGI [FGGQ AQE] VAGSAEV [ETANGI] RHIG LAAKQ (配列番号 8 1, f H b p V 1.  
 4 G I : 9 8 9 5 5 7 2 3 0)

10

の配列を含み得るか、またはこれからなり得、表1の任意のP o r A V R 2ループの配列は、枠で強調された任意のアミノ酸またはアミノ酸の群に置き換わり得る。

## 【0066】

—実施形態において、外来ペプチドループでさらに改変されるべきf H b pは、

## 【化5】

CSSGGGVAA DIGAGLADAL TAPLDHKDKG LQSLTLDQSV RKNEKLKLAA QGAEKTYGNG DSLNTGKLKN  
 DKVSRFDFIR QI [EVDGKL] IT LESGEFQVYK QSHSALTALQ TEQ [VQDSEDS GKMV] AKRQFR IGDIAEHTS  
 FDKLPKGGSAA TYRGTAFGSD DAGGKLTYTI DFAAKQGHGK IEHLKSPLEN VELATAYI [KP DEKRHA] VISG  
 SVLYNQDEKG SYSLGI [FGGQ AQE] VAGSAEV [ETANGI] HHIG LAAKQ (配列番号 8 2, f H b p V 1.  
 13 G I : 7 5 2 7 7 4 5 3 3)

20

の配列を含み得るか、またはこれからなり得、表1の任意のP o r A V R 2ループの配列は、枠で強調された任意のアミノ酸またはアミノ酸の群に置き換わり得る。

## 【0067】

—実施形態において、外来ペプチドループでさらに改変されるべきf H b pは、

## 【化6】

CSSGGGVAA DIGAGLADAL TAPLDHKDKS LQSLTLDQSV RKNEKLKLAA QGAEKTYGNG DSLNTGKLKN  
 DKVSRFDFIR QI [EVDGQL] IT LESGEFQVYK QSHSALTALQ TEQ [EQDPEHS GKMV] AKRRFK IGDIAEHTS  
 FDKLPKDVMAA TYRGTAFGSD DAGGKLTYTI DFAAKQGHGK IEHLKSPLEN VELATAYI [KP DEKHHA] VISG  
 SVLYNQDEKG SYSLGI [FGGQ AQE] VAGSAEV [ETANGI] HHIG LAAKQ (配列番号 8 3, f H b p V 1.)

30

14 G I : 6 3 0 0 5 7 3 7 6)

40

の配列を含み得るか、またはこれからなり得、表1の任意のP o r A V R 2ループの配列は、枠で強調された任意のアミノ酸またはアミノ酸の群に置き換わり得る。

## 【0068】

—実施形態において、外来ペプチドループでさらに改変されるべきf H b pは、

50

## 【化 7】

CSSGGGGSGG GGVAADIGAG LADALTAPLD HKDKGLKSLT LEDSISQNGT LTL[SAQGAER] TFKAGDKDNS  
 LNTGKLKNDK ISRFDFIRQI [EVDGQLITLE SGEFQVYKQS HSALTALQTE Q[VQDSEHSGK MVAKRQFRIG  
 DIVGEHTSFG KLPKDVMATY RGTAFGSDDA GGKLTYTIDF AAKQGHGKIE HLKSPELNVD LAAADI[KPDE  
 [KHHAVISGSV LYNQAEKGSY SLGI[FGGQAQ EVAGSAEV[ET ANG]RHIGLA AKQ (配列番号 8 4 、 f H b  
 p V 1. 1 5 G I : 5 0 4 3 9 4 4 6 2)

10

の配列を含み得るか、またはこれからなり得、表 1 の任意の P o r A V R 2 ループの配列は、枠で強調された任意のアミノ酸またはアミノ酸の群に置き換わり得る。

## 【0 0 6 9】

一実施形態において、外来ペプチドループでさらに改変されるべき f H b p は、

## 【化 8】

CSSGGGGSGG GGBTADIGTG LADALTAPLD HKDKGLKSLT LEDSISQNGT LTL[SAQGAEK] TYGNGDSLNT  
 GKLKNDKVSR FDFIRQI[EVD GQLITLESGE FQVYKQSHSA LTALQTEEQ DPEHSEKMV]A KRRFRIGDIA  
 GEHTSFDKLP KDVMATYRGT AFGSDDAGGK LTYTIDFAAK QGHGKIEHLK SPELNVDLAV AYIKP[DEKHH]  
 [AVISGSVLYN QDEKGSYSLG I[FGGEKAQE]VA GSAAEV[ETANG I]HHIGLAAKQ (配列番号 8 5 、 f H b p V  
 1. 5 5 G I : 4 0 3 5 3 4 8 1)

20

の配列を含み得るか、またはこれからなり得、表 1 の任意の P o r A V R 2 ループの配列は、枠で強調された任意のアミノ酸またはアミノ酸の群に置き換わり得る。

## 【0 0 7 0】

一実施形態において、外来ペプチドループでさらに改変されるべき f H b p は、

## 【化 9】

CSSGGGVAA DIGAGLADAL TAPLDHKDKS LQSLTLDQSV RKNEKLKL[AA QGAEK]TYGNG DSLNTGKLKN  
 DKVSRFDFIR QI[EVDGQL]IT LESGEFQIYK QDHSAVVALQ IEK[INNPDKI DSLI]NQRSFL VSGLGGEHTA  
 FNQLPDGKAE YHGKAFSSDD AGGKLTYTID FAAKQGHGKI EHLKTPEQNV ELAAAELKAD EKSHAVILGD  
 TRYGSEEKGT YHLAL[FGDRA QEIAGSATV]K IGEKVHEIGI AGKQ (配列番号 8 6 、 f H b p V 2 .  
 1 6 G I : 4 8 8 1 5 5 5 1 1)

30

40

の配列を含み得るか、またはこれからなり得、表 1 の任意の P o r A V R 2 ループの配列は、枠で強調された任意のアミノ酸またはアミノ酸の群に置き換わり得る。

## 【0 0 7 1】

一実施形態において、外来ペプチドループでさらに改変されるべき f H b p は、

50

## 【化 1 0】

CSSGGGGVAA DIGAGLADAL TAPLDHKDKS LQSLTLDQSV RKNEKLKLAA QGAEKTYGNG DSLNTGKLKN  
 DKVSRFDFIR QI [EVDGQL] IT LESGEFQIYK QDHSAVVALQ IEK [INNPDKI] DSLI [NQRSL] VSGLGGEHTA  
 FNQLPSGKAE YHGKAFSSDD AGGKLTYTID FAAKQGHGKI EHLKTPEQNV ELASAEKLAD EKSHAVILGD  
 TRYGGEEKGT YHLAL [FGDRA] QEIAGSATV [K] IREKV HEIGI AGKQ (配列番号 8 7, f H b p V 2.)  
 19 G I : 4 8 8 1 4 8 6 2 6)

10

の配列を含み得るか、またはこれからなり得、表 1 の任意の P o r A V R 2 ループの配列は、枠で強調された任意のアミノ酸またはアミノ酸の群に置き換わり得る。

## 【0 0 7 2】

—実施形態において、外来ペプチドループでさらに改変されるべき f H b p は、

## 【化 1 1】

CSSGGGGVAA DIGAGLADAL TAPLDHKDKS LQSLTLDQSV RKNEKLKLAA QGAEKTYGNG DSLNTGKLKN  
 DKVSRFDFIR QI [EVDGQL] IT LESGEFQIYK QDHSAVVALQ IEK [INNPDKI] DSLI [NQRSL] VSGLGGEHTA  
 FNQLPSGKAE YHGKAFSSDD PNGRLHYSID FTKKQGYGRI EHLKTPEQNV ELASAEKLAD EKSHAVILGD  
 TRYGGEEKGT YHLAL [FGDRA] QEIAGSATV [K] IREKV HEIGI AGKQ (配列番号 8 8, f H b p V 2.)  
 22 G I : 1 2 0 8 6 5 9 2 2)

20

の配列を含み得るか、またはこれからなり得、表 1 の任意の P o r A V R 2 ループの配列は、枠で強調された任意のアミノ酸またはアミノ酸の群に置き換わり得る。

## 【0 0 7 3】

—実施形態において、外来ペプチドループでさらに改変されるべき f H b p は、

## 【化 1 2】

CSSGGGGVAA DIGAGLADAL TTPLDHDKKS LQSLTLDQSV RKNEKLKLAA QGAEKTYGNG DSLNTGKLKN  
 DKVSRFDFIR QI [EVDGQT] IT LASGEFQIYK QNHSAVVALQ IEK [INNPDKI] DSLI [NQRSL] VSGLGGEHTA  
 FNQLPDGKAE YHGKAFSSDD PNGRLHYSID FTKKQGYGRI EHLKTPEQNV ELASAEKLAD EKSHAVILGD  
 TRYGGEEKGT YHLAL [FGDRA] QEIAGSATV [K] IREKV HEIGI AGKQ (配列番号 8 9, f H b p 2. 2  
 5 G I : 4 8 8 1 5 8 7 1 2)

30

40

の配列を含み得るか、またはこれからなり得、表 1 の任意の P o r A V R 2 ループの配列は、枠で強調された任意のアミノ酸またはアミノ酸の群に置き換わり得る。

## 【0 0 7 4】

—実施形態において、外来ペプチドループでさらに改変されるべき f H b p は、

50

## 【化13】

CSSGSGSGGG GVAADIGTGL ADALTA PLDH KDKGLKSLTL EDSISQNGTL TL SAQGAEK T FKVGDKD NSL  
 NTGKLNDKI SRFDFVQKIE VDGQT ITLAS GEFQIYKQDH SAVVALQIEK INNPDKIDS L INQRSFLVSG  
 LGGEHTAFNQ LPSGKA EYHG KAFSSDDAGG KLTYTIDFAA KQGHGKIEHL KTPEQNVELA SAELKA DEKS  
 HA VILGDTRY GSEEKG TYHL AL FGDRAQEI AGSATV KIRE KV HEIGIAGK Q (配列番号 90、f H b p  
 V 3. 45 G I : 284466869)

10

の配列を含み得るか、またはこれからなり得、表1の任意のP o r A VR2ループの配列は、枠で強調された任意のアミノ酸またはアミノ酸の群に置き換わり得る。

## 【0075】

一実施形態において、外来ペプチドループでさらに改変されるべきf H b pは、

## 【化14】

CSSGGGGVAA DIGAGLADAL TAPLDHKDKG LKSLTLEDSI SQNGTLTL SA QGAEK TFKVG DKDSLNTGK  
 LKNDKISRF D FVQKIE VDGQ T ITLASGEFQ IYKQNHS AVV ALQIEK INNP DKIDS INQR SFLVSLGGE  
 HTAFNQLPGG KAEYHGKA FS SDDAGGKL TY TIDFAAKQGH GKIEHLKTPE QNVELAAAEL KA DEKSHAVI  
 LGDTRYGSEE KG TYHL AL FG DRAQ EIAGSA TV KIGEV HE ISIAGKQ (配列番号 91、f H b p V  
 3. 47 G I : 284466897)

20

の配列を含み得るか、またはこれからなり得、表1の任意のP o r A VR2ループの配列は、枠で強調された任意のアミノ酸またはアミノ酸の群に置き換わり得る。

## 【0076】

改変f H b pは、配列番号92～109のいずれか1つの配列を含み得る。

30

## 【0077】

改変f H b pは、配列番号92～109の配列を含み得、そこで配列YYTKDTNN  
 NLTLVP (配列番号68)は、任意のP o r A VR2ループ配列、例えば、表1に示される任意のVR2ループ配列で置き換えられる。

## 【0078】

一実施形態において、改変f H b pは、配列CSSGGGGVAA DIGAGLAD  
 AL TAPLDHKDKG LQSLTL DQSV RKNEKLKLA QGAEK  
 TYGNG DSLNTGKLKN DKVSRFD FIR QIEVDYYTKDT  
 NNLTLVPQL ITLESGEFQV YKQSHS ALTA FQTEQIQDS  
 E HSGK MVA KRQ FRIGDIAGEH TSFDKLPEGG RATYRG  
 TAFG SDDAGGKL TY TIDFAAKQGN GKIEHLKSPE LNV  
 DLAAADI KPDGKRH AVI SG S VL YNQAE KGSYSLGIFG  
 GKAQEVAGSA EVKTVNGIRH IGLAAKQ (配列番号92、f H b p  
 V 1. 1、G I : 316985482、P 1のP o r A VR2 P 1. 16) または同じ配列を含み得るか、またはこれからなり得、配列YYTKDTNNNLTLVP (配列番号68)は、任意のP o r A VR2ループ配列、例えば、表1に示される任意のP o r Aループ配列で置き換えられる。

40

## 【0079】

一実施形態において、改変f H b pは、配列CSSGSGSGGG GVAADIGT  
 GL ADALTA PLDH KDKGLKSLTL EDSISQNGTL TL SAQ

50

G A E K T F K V G D K D N S L N T G K L K N D K I S R F D F V Q K I E V D  
 Y Y T K D T N N N L T L V P Q T I T L A S G E F Q I Y K Q D H S A V V A L Q  
 I E K I N N P D K I D S L I N Q R S F L V S G L G G E H T A F N Q L P S G K  
 A E Y H G K A F S S D D A G G K L T Y T I D F A A K Q G H G K I E H L K T  
 P E Q N V E L A S A E L K A D E K S H A V I L G D T R Y G S E E K G T Y H  
 L A L F G D R A Q E I A G S A T V K I R E K V H E I G I A G K Q (配列番号  
 93、f H b p V 3.45、G I : 284466869、P 1のP o r A V R 2 P 1  
 .16)または同じ配列を含み得るか、またはこれからなり得、配列Y Y T K D T N N N  
 L T L V P (配列番号68)は、任意のP o r A V R 2ループ配列、例えば、表1に示  
 される任意のP o r Aループ配列で置き換えられる。

10

## 【0080】

一実施形態において、改変f H b pは、配列C S S G G G G V A A D I G A G L A D  
 A L T A P L D H K D K S L Q S L T L D Q S V R K N E K L K L A A Q G A E K  
 T Y G N G D S L N T G K L K N D K V S R F D F I R Q I E V D Y Y T K D T N  
 N N L T L V P Q L I T T E S G E F Q I Y K Q D H S A V V A L Q I E K I N N P  
 D K I D S L I N Q R S F L V S G L G G E H T A F N Q L P S G K A E Y H G K A  
 F S S D D A G G K L T Y T I D F A A K Q G H G K I E H L K T P E Q N V E L  
 A S A E L K A D E K S H A V I L G D T R Y G G E E K G T Y H L A L F G D R  
 A Q E I A G S A T V K I R E K V H E I G I A G K Q (配列番号94、f H b p V  
 2.19 G I : 488148626、P 1のP o r A V R 2 P 1.16)または同じ  
 配列を含み得るか、またはこれからなり得、配列Y Y T K D T N N N L T L V P (配列番  
 号68)は、任意のP o r A V R 2ループ配列、例えば、表1に示される任意のP o r  
 Aループ配列で置き換えられる。

20

## 【0081】

一実施形態において、改変f H b pは、配列C S S G G G G V A A D I G A G L A D  
 A L T A P L D H K D K G L Q S L T L D Q S V R K N E K L K L A A Q G A E K  
 T Y G N G D S L N T G K L K N D K V S R F D F I R Q I E V D G Q L I T L E  
 S G E F Q V Y K Q S H S A L T A F Q T E Q I Q D S E H S G K M V A K R Q F R  
 I G D I A G E H T S F D K L P E G G R A T Y R G T A F G S D D A G G K L T Y  
 T I D F A A K Q G N G K I E H L K S P E L N V D L A A A D I K P D Y Y T K  
 D T N N N L T L V P K R H A V I S G S V L Y N Q A E K G S Y S L G I F G G  
 K A Q E V A G S A E V K T V N G I R H I G L A A K Q (配列番号95、f H b p  
 V 1.1 G I : 316985482、P 2のP o r A V R 2 P 1.16)または同じ  
 配列を含み得るか、またはこれからなり得、配列Y Y T K D T N N N L T L V P (配列番  
 号68)は、任意のP o r A V R 2ループ配列、例えば、表1に示される任意のP o r  
 Aループ配列で置き換えられる。

30

## 【0082】

一実施形態において、改変f H b pは、配列C S S G S G S G G G G V A A D I G T  
 G L A D A L T A P L D H K D K G L K S L T L E D S I S Q N G T L T L S A Q  
 G A E K T F K V G D K D N S L N T G K L K N D K I S R F D F V Q K I E V D  
 G Q T I T L A S G E F Q I Y K Q D H S A V V A L Q I E K I N N P D K I D S L  
 I N Q R S F L V S G L G G E H T A F N Q L P S G K A E Y H G K A F S S D D A  
 G G K L T Y T I D F A A K Q G H G K I E H L K T P E Q N V E L A S A E L K  
 A D Y Y T K D T N N N L T L V P K S H A V I L G D T R Y G S E E K G T Y H  
 L A L F G D R A Q E I A G S A T V K I R E K V H E I G I A G K Q (配列番号9  
 6、f H b p V 3.45 G I : 284466869、P 2のP o r A V R 2 P 1.  
 16)または同じ配列を含み得るか、またはこれからなり得、配列Y Y T K D T N N N  
 L T L V P (配列番号68)は、任意のP o r A V R 2ループ配列、例えば、表1に示  
 される任意のP o r Aループ配列で置き換えられる。

40

## 【0083】

50

一実施形態において、改変 f H b p は、配列 C S S G G G G V A A D I G A G L A D A L T A P L D H K D K S L Q S L T L D Q S V R K N E K L K L A A Q G A E K T Y G N G D S L N T G K L K N D K V S R F D F I R Q I E V D G Q L I T L E S G E F Q I Y K Q D H S A V V A L Q I E K I N N P D K I D S L I N Q R S F L V S G L G G E H T A F N Q L P S G K A E Y H G K A F S S D D A G G K L T Y T I D F A A K Q G H G K I E H L K T P E Q N V E L A S A E L K A D Y Y T K D T N N N L T L V P K S H A V I L G D T R Y G G E E K G T Y H L A L F G D R A Q E I A G S A T V K I R E K V H E I G I A G K Q (配列番号 97、f H b p V 2.19 GI : 488148626、P2 の P o r A V R 2 P 1.16) または同じ配列を含み得るか、またはこれからなり得、配列 Y Y T K D T N N N L T L V P (配列番号 68) は、任意の P o r A V R 2 ループ配列、例えば、表 1 に示される任意の P o r A ループ配列で置き換えられる。

#### 【0084】

一実施形態において、改変 f H b p は、配列 C S S G G G G V A A D I G A G L A D A L T A P L D H K D K G L Q S L T L D Q S V R K N E K L K L A A Q G A E K T Y G N G D S L N T G K L K N D K V S R F D F I R Q I E V D G Q L I T L E S G E F Q V Y K Q S H S A L T A F Q T E Q I Q D S E H S G K M V A K R Q F R I G D I A G E H T S F D K L P E G G R A T Y R G T A F G S D D A G G K L T Y T I D F A A K Q G N G K I E H L K S P E L N V D L A A A D I K P D G K R H A V I S G S V L Y N Q A E K G S Y S L G I F G Y Y T K D T N N N L T L V P K A Q E V A G S A E V K T V N G I R H I G L A A K Q (配列番号 98、f H b p V 1.1 GI : 316985482、P3 の P o r A V R 2 P 1.16) または同じ配列を含み得るか、またはこれからなり得、配列 Y Y T K D T N N N L T L V P (配列番号 68) は、任意の P o r A V R 2 ループ配列、例えば、表 1 に示される任意の P o r A ループ配列で置き換えられる。

#### 【0085】

一実施形態において、改変 f H b p は、配列 C S S G S G S G G G G V A A D I G T G L A D A L T A P L D H K D K G L K S L T L E D S I S Q N G T L T L S A Q G A E K T F K V G D K D N S L N T G K L K N D K I S R F D F V Q K I E V D G Q T I T L A S G E F Q I Y K Q D H S A V V A L Q I E K I N N P D K I D S L I N Q R S F L V S G L G G E H T A F N Q L P S G K A E Y H G K A F S S D D A G G K L T Y T I D F A A K Q G H G K I E H L K T P E Q N V E L A S A E L K A D E K S H A V I L G D T R Y G S E E K G T Y H L A L F G Y Y T K D T N N N L T L V P R A Q E I A G S A T V K I R E K V H E I G I A G K Q (配列番号 99、f H b p V 3.45 GI : 284466869、P3 の P o r A V R 2 P 1.16) または同じ配列を含み得るか、またはこれからなり得、配列 Y Y T K D T N N N L T L V P (配列番号 68) は、任意の P o r A V R 2 ループ配列、例えば、表 1 に示される任意の P o r A ループ配列で置き換えられる。

#### 【0086】

一実施形態において、改変 f H b p は、配列 C S S G G G G V A A D I G A G L A D A L T A P L D H K D K S L Q S L T L D Q S V R K N E K L K L A A Q G A E K T Y G N G D S L N T G K L K N D K V S R F D F I R Q I E V D G Q L I T L E S G E F Q I Y K Q D H S A V V A L Q I E K I N N P D K I D S L I N Q R S F L V S G L G G E H T A F N Q L P S G K A E Y H G K A F S S D D A G G K L T Y T I D F A A K Q G H G K I E H L K T P E Q N V E L A S A E L K A D E K S H A V I L G D T R Y G G E E K G T Y H L A L F G Y Y T K D T N N N L T L V P R A Q E I A G S A T V K I R E K V H E I G I A G K Q (配列番号 100、f H b p V 2.19 GI : 488148626、P3 の P o r A V R 2 P 1.16) または同じ配列を含み得るか、またはこれからなり得、配列 Y Y T K D T N N N L T L V P (配列番号 68) は、任意の P o r A V R 2 ループ配列、例えば、表 1 に示される任意の P o r A ループ配列で置き換えられる。

10

20

30

40

50

r A ループ配列で置き換えられる。

【0087】

一実施形態において、改変 f H b p は、配列 C S S G G G G V A A D I G A G L A D A L T A P L D H K D K G L Q S L T L D Q S V R K N E K L K L A A Q Y Y T K D T N N N L T L V P A E K T Y G N G D S L N T G K L K N D K V S R F D F I R Q I E V D G Q L I T T L E S G E F Q V Y K Q S H S A L T A F Q T E Q I Q D S E H S G K M V A K R Q F R I G D I A G E H T S F D K L P E G G R A T Y R G T A F G S D D A G G K L T Y T I D F A A K Q G N G K I E H L K S P E L N V D L A A A D I K P D G K R H A V I S G S V L Y N Q A E K G S Y S L G I F G G K A Q E V A G S A E V K T V N G I R H I G L A A K Q (配列番号 101、f H b p V1.1 GI: 316985482、P4 の P o r A V R 2 P 1.16) または同じ配列を含み得るか、またはこれからなり得、配列 Y Y T K D T N N N L T L V P (配列番号 68) は、任意の P o r A V R 2 ループ配列、例えば、表 1 に示される任意の P o r A ループ配列で置き換えられる。

【0088】

一実施形態において、改変 f H b p は、配列 C S S G S G S G G G G V A A D I G T G L A D A L T A P L D H K D K G L K S L T L E D S I S Q N G T L T L S A Q Y Y T K D T N N N L T L V P A E K T F K V G D K D N S L N T G K L K N D K I S R F D F V Q K I E V D G Q T I T L A S G E F Q I Y K Q D H S A V V A L Q I E K I N N P D K I D S L I N Q R S F L V S G L G G E H T A F N Q L P S G K A E Y H G K A F E Y H G K A F S D D A G G K L T Y T I D F A A K Q G H G K I E H L K T P E Q N V E L A S A E L K A D E K S H A V I L G D T R Y G S E E K G T Y H L A L F G D R A Q E I A G S A T V K I R E K V H E I G I A G K Q (配列番号 102、f H b p V3.45 GI: 284466869、P4 の P o r A V R 2 P 1.16) または同じ配列を含み得るか、またはこれからなり得、配列 Y Y T K D T N N N L T L V P (配列番号 68) は、任意の P o r A V R 2 ループ配列、例えば、表 1 に示される任意の P o r A ループ配列で置き換えられる。

【0089】

一実施形態において、改変 f H b p は、配列 C S S G G G G V A A D I G A G L A D A L T A P L D H K D K S L Q S L T L D Q S V R K N E K L K L A A Q Y Y T K D T N N N L T L V P A E K T Y G N G D S L N T G K L K N D K V S R F D F I R Q I E V D G Q L I T L E S G E F Q V Y K Q S H S A L T A F Q T E Q I Q D S Y Y T K D T N N N L T L V P H S G K M V A K R Q F R I G D I A G E H T S F D K L P E G G R A T Y R G T A F G S D D A G G K L T Y T I D F A A K Q G N G K I E H L K S P E L N V D L A A A D I K P D G K R H A V I S G S V L Y N Q A E K G S Y S L G I F G G K A Q E V A G S A E V K T V N G I R H I G L A A K Q (配列番号 103、f H b p V2.19 GI: 488148626、P4 の P o r A V R 2 P 1.16) または同じ配列を含み得るか、またはこれからなり得、配列 Y Y T K D T N N N L T L V P (配列番号 68) は、任意の P o r A V R 2 ループ配列、例えば、表 1 に示される任意の P o r A ループ配列で置き換えられる。

【0090】

一実施形態において、改変 f H b p は、配列 C S S G G G G V A A D I G A G L A D A L T A P L D H K D K G L Q S L T L D Q S V R K N E K L K L A A Q G A E K T Y G N G D S L N T G K L K N D K V S R F D F I R Q I E V D G Q L I T L E S G E F Q V Y K Q S H S A L T A F Q T E Q I Q D S Y Y T K D T N N N L T L V P H S G K M V A K R Q F R I G D I A G E H T S F D K L P E G G R A T Y R G T A F G S D D A G G K L T Y T I D F A A K Q G N G K I E H L K S P E L N V D L A A A D I K P D G K R H A V I S G S V L Y N Q A E K G S Y S L G I F G G K A Q E V A G S A E V K T V N G I R H I G L A A K Q (配列番号 104、f H b p V1.1 GI: 316985482、P5 の P o r A V R 2 P 1.16) または同じ

10

20

30

40

50

配列を含み得るか、またはこれからなり得、配列 YYTKDTNNNLTLP (配列番号 68) は、任意の PorA VR2 ループ配列、例えば、表 1 に示される任意の PorA ループ配列で置き換えられる。

【0091】

一実施形態において、改変 fHbp は、配列 CSSGSGSGGG GVAADIGT GL ADALTAPLDH KDKGLKSLTL EDSISQNGTL TLSAQ GAEKT FKVGDKDNSL NTGKLKNDKI SRFDVFQKIE VD GQTITLAS GEFQIYKQDH SAVVALQIEK INNPYYTKDT NNNLTLPKI DSLINQRSFL VSGLGGEHTA FNQLPSGK AE YHGKAFSSDD AGGKLTYTID FAAKQGHGKI EHLKT PEQNV ELASAELKAD EKSHAVILGD TRYGSEEKGT YH LALFGDRA QEIAAGSATVK IREKVHEIGI AGKQ (配列番号 105、fHbp V3.45 GI: 284466869、P5 の PorA VR2 P1.16) または同じ配列を含み得るか、またはこれからなり得、配列 YYTKDTNNNLTLP (配列番号 68) は、任意の PorA VR2 ループ配列、例えば、表 1 に示される任意の PorA ループ配列で置き換えられる。

【0092】

一実施形態において、改変 fHbp は、配列 CSSGGGGVAA DIGAGLAD AL TAPLDHKDKS LQSLTLDQSV RKNEKLKLAQ QGAEK TYGNG DSLNTGKLKN DKVSRFDIF QIEVDGQLIT LE SGEFQIYK QDHSAVVALQ IEKINNPYYT KDTNNNLTLPV PKIDSLINQR SFLVSGLGGE HTAFNQLPSG KAEYHGKA FS SDDAGGKLTY TIDFAAKQGH GKIEHLKTPE QNVEL ASAEL KADEKSHAVI LGDTRYGEE KGTYHLALFG DR AQEIAGSA TVKIREKVHE IGIAGKQ (配列番号 106、fHbp V2.19 GI: 488148626、P5 の PorA VR2 P1.16) または同じ配列を含み得るか、またはこれからなり得、配列 YYTKDTNNNLTLP (配列番号 68) は、任意の PorA VR2 ループ配列、例えば、表 1 に示される任意の PorA ループ配列で置き換えられる。

【0093】

一実施形態において、改変 fHbp は、配列 CSSGGGGVAA DIGAGLAD AL TAPLDHKDKG LQSLTLDQSV RKNEKLKLAQ QGAEK TYGNG DSLNTGKLKN DKVSRFDIF QIEVDGQLIT LE SGEFQVYK QSHSALTAFQ TEQIQDSEHS GKMVAKRQFR IGDIAGEHTS FDKLPEGGRA TYRGTAFGSD DAGGKLTY TI DFAAKQGNGK IEHLKSPeln VDLAAADIKP DGKRH AVISG SVLYNQAEKG SYSLGIFGGK AQEVAGSAEV KT VYYTKDTN NNLTLPNGIR HIGLAAAKQ (配列番号 107、fHbp V1.1 GI: 316985482、P7 の PorA VR2 P1.16) または同じ配列を含み得るか、またはこれからなり得、配列 YYTKDTNNNLTLP (配列番号 68) は、任意の PorA VR2 ループ配列、例えば、表 1 に示される任意の PorA ループ配列で置き換えられる。

【0094】

一実施形態において、改変 fHbp は、CSSGSGSGGG GVAADIGTGL ADALTAPLDH KDKGLKSLTL EDSISQNGTL TLSAQ GAEKT FKVGDKDNSL NTGKLKNDKI SRFDVFQKIE VDGQT ITLAS GEFQIYKQDH SAVVALQIEK INNPDKIDSL IN QRSFLVSG LGGEHTAFNQ LPSGKAEYHG KAFSSDDAGG KLTYTIDFAA KQGHGKIEHL KTPEQNVLA SAELKADE KS HAVILGDTRY GSEEKGTYHL ALFGDRAQEAGSAT

10

20

30

40

50

V K I R Y Y T K D T N N N L T L V P K V H E I G I A G K Q (配列番号 108、  
f H b p V 3. 45 GI: 284466869、P7 の P o r A V R 2 P 1. 16)  
または同じ配列を含み得るか、またはこれからなり得、配列 Y Y T K D T N N N L T L  
V P (配列番号 68) は、任意の P o r A V R 2 ループ配列、例えば、表 1 に示される  
任意の P o r A ループ配列で置き換えられる。

## 【0095】

一実施形態において、改変 f H b p は、C S S G G G G V A A D I G A G L A D A L  
T A P L D H K D K S L Q S L T L D Q S V R K N E K L K L A A Q G A E K T Y G  
N G D S L N T G K L K N D K V S R F D F I R Q I E V D G Q L I T L E S G E  
F Q I Y K Q D H S A V V A L Q I E K I N N P D K I D S L I N Q R S F L V S  
G L G G E H T A F N Q L P S G K A E Y H G K A F S S D D A G G K L T Y T I D  
F A A K Q G H G K I E H L K T P E Q N V E L A S A E L K A D E K S H A V I L  
G D T R Y G G E E K G T Y H L A L F G D R A Q E I A G S A T V K I R Y Y T  
K D T N N N L T L V P K V H E I G I A G K Q (配列番号 109、f H b p V 2.  
19 GI: 488148626、P7 の P o r A V R 2 P 1. 16) または同じ配列  
を含み得るか、またはこれからなり得、配列 Y Y T K D T N N N L T L V P (配列番号 6  
8) は、任意の P o r A V R 2 ループ配列、例えば、表 1 に示される任意の P o r A ル  
ープ配列で置き換えられる。

## 【0096】

当業者は、1、2、3 または 4 つ以上のアミノ酸置換、欠失または付加が、その免疫原性機能を実質的に除去せずまたは安定性に影響を与えるに、本明細書の本発明の改変 f H b p に対してなされ得ることを理解するであろう。置換は、例えば、同様の M W、電荷、疎水性もしくは部分を有する同様のアミノ酸残基、または合成類似体に対する置換であり得る。このような改変は、本発明の一部として想定される。一実施形態において、改変 f H b p は、本明細書に記載の改変 f H b p のいずれか 1 つと少なくとも 75% の同一性を有し得る。一実施形態において、改変 f H b p は、本明細書に記載の改変 f H b p のいずれか 1 つと少なくとも 80% の同一性を有し得る。一実施形態において、改変 f H b p は、本明細書に記載の改変 f H b p のいずれか 1 つと少なくとも 85% の同一性を有し得る。一実施形態において、改変 f H b p は、本明細書に記載の改変 f H b p のいずれか 1 つと少なくとも 90% の同一性を有し得る。一実施形態において、改変 f H b p は、本明細書に記載の改変 f H b p のいずれか 1 つと少なくとも 95% の同一性を有し得る。一実施形態において、改変 f H b p は、本明細書に記載の改変 f H b p のいずれか 1 つと少なくとも 98% の同一性を有し得る。一実施形態において、改変 f H b p は、本明細書に記載の改変 f H b p のいずれか 1 つと少なくとも 99% の同一性を有し得る。一実施形態において、改変 f H b p は、本明細書に記載の改変 f H b p のいずれか 1 つと少なくとも 99.5% の同一性を有し得る。

## 【0097】

本発明の別の態様によれば、本明細書の本発明による改変 f H b p を本質的にまたは少なくともコードする核酸が提供される。

## 【0098】

核酸は、ウイルスベクターなどのベクター中に存在し得る。

## 【0099】

本発明の別の態様によれば、本明細書の本発明による改変 f H b p を含む組成物が提供される。

## 【0100】

組成物は、本明細書の本発明による 2 つ以上の異なる改変 f H b p 分子（例えば、その異なる形態 / 種）を含み得る。例えば、組成物は、本発明による改変 f H b p の 2 つ以上の異なる変異体を含み得る。例えば、組成物は、f H b p 変異体 v 1 および v 2 を含み得る。組成物は、f H b p 変異体 v 2 および v 3 を含み得る。別の実施形態において、組成物は、少なくとも f H b p 変異体 v 2 を含む。

10

20

30

40

50

**【0101】**

本発明の別の態様によれば、本明細書の本発明による核酸を含む組成物が提供される。

**【0102】**

組成物は薬学的に許容される担体を含み得る。組成物はアジュバントをさらに含み得る。

**【0103】**

本発明のさらなる態様によれば、薬剤としての使用のための本発明による改変 f H b p 、核酸または組成物が提供される。

**【0104】**

本発明のさらなる態様によれば、対象の病原性感染またはコロニー形成の治療または予防における使用のための、本発明による改変 f H b p 、核酸または組成物が提供される。

10

**【0105】**

本発明のさらなる態様によれば、本発明による改変 f H b p 、核酸または組成物の対象への投与を含む、対象の病原性感染またはコロニー形成の治療または予防方法が提供される。

**【0106】**

本発明のさらなる態様によれば、本発明による改変 f H b p 、核酸または組成物の対象への投与を含む、ワクチン接種法が提供される。

**【0107】**

投与は、治療有効量で行われ得る。当業者は、適正投与量および投与の反復を決定できるであろう。

20

**【0108】**

対象は、ヒトなどの哺乳動物であり得る。

**【0109】**

感染は、細菌感染であり得る。例えば、感染は、髄膜炎菌などの髄膜炎または淋菌であり得る。

**【0110】**

本発明のさらなる態様によれば、本発明による改変 H 因子結合タンパク質 ( f H b p ) を含む、単一タンパク質多価ワクチンが提供される。

**【0111】**

ワクチンは、Nmを対象とした予防または治療ワクチンとして用いられ得る。

30

**【0112】**

使用は、薬学的に許容される担体との併用であり得る。さらにまたはあるいは、使用はアジュバントとの併用であり得る。好適な薬学的に許容される担体およびアジュバントは、当業者によく知られている。

**【0113】**

本発明のさらなる態様によれば、本発明による改変 f H b p と少なくとも 1 つの他の予防または治療活性分子との組み合わせが提供される。

**【0114】**

少なくとも 1 つの他の予防または治療活性分子は、本明細書の本発明による改変 f H b p と異なるワクチンまたは抗原を含み得る。組み合わせは、組み合わせワクチンまたは療法で用いられ得る。例えば、組み合わせは、別の髄膜炎菌抗原が提供される組み合わせワクチンまたは療法で用いられ得る。

40

**【0115】**

一実施形態において、少なくとも 1 つの他の予防または治療活性分子は、一価タンパク質：莢膜多糖ワクチンを含む。一価タンパク質：莢膜多糖ワクチンは、細菌トキソイドを有する血清型 C または A 莢膜の、(細菌トキソイドに結合させた血清型 C および A 莢膜多糖による)二価ワクチン、四価(血清型 A 、 C 、 Y 、 W )または五価(血清型 A 、 C 、 Y 、 W 、 X )結合型ワクチンのいずれかを含み得る。

**【0116】**

あるいは、少なくとも 1 つの他の予防または治療活性分子は結合型ワクチンを含み得、

50

外来ペプチドループ（例えば、P o r A ループ）を保持する f H b p 足場を含む抗原は、タンパク質担体分子として結合型ワクチンに組み込まれ得る。結合型ワクチンは、A、C、Y、W または X 株からの血清型莢膜多糖のいずれかを個々にまたは組み合わせて含み得る。

【 0 1 1 7 】

本発明の別の態様によれば、エピトープ表示足場としての H 因子結合タンパク質 ( f H b p ) の使用が提供される。

【 0 1 1 8 】

エピトープ表示足場としての使用は、本明細書に記載の改変のいずれかを含む H 因子結合タンパク質 ( f H b p ) の使用を含み得る。

10

【 0 1 1 9 】

本発明による組成物または改変 f H b p は、ワクチンとしてのそれらの潜在的使用に加えて、診断試薬として、およびワクチンの免疫能力の尺度として有用であり得る。

【 0 1 2 0 】

用語「免疫原性」は、分子が、ヒトまたは動物の体内で免疫応答を誘発することができることを意味する。免疫応答は防御的であり得る。

【 0 1 2 1 】

本発明の改変 f H b p により誘発される免疫応答は、本発明の改変 f H b p で免疫した対象を感染させる髄膜炎菌 ( N m ) の能力に影響を与え得る。好ましくは、本発明の改変 f H b p で免疫した対象を感染させる N m の能力が、阻害または妨害される。誘発された免疫応答は N m を認識および破壊し得る。さらにまたはあるいは、誘発された免疫応答は N m の複製を阻害または妨害し得る。さらにまたはあるいは、誘発された免疫応答は、ヒトまたは非ヒト動物において N m 起因疾患を阻害または予防し得る。

20

【 0 1 2 2 】

本明細書で用いられる用語「ペプチドループ」は、両末端に固定された（例えば、f H b p などの足場に固定された）一本鎖ポリペプチド配列を指すことが意図される。用語「ループ」は、ポリペプチドにより採用される任意の特定の二次構造を暗示または要求しない。

【 0 1 2 3 】

「外来ペプチドループ」の文脈で用いられる用語「外来」は、ペプチドループが、f H b p タンパク質に対して異なる源に由来する（すなわち、f H b p またはそのフラグメントでない）ことを意味することが理解される。しかし、f H b p と同じ生物に由来し得る。例えば、改変 f H b p は、髄膜炎菌 P o r A に由来する（外来）ペプチドループで改変された髄膜炎菌 f H b p を含み得る。

30

【 0 1 2 4 】

本明細書で用いられる用語「融合タンパク質」は、異なる遺伝子産物または源からの配列の組み合わせを含むポリペプチドを意味することが理解される。

【 0 1 2 5 】

用語「融合タンパク質」は、用語「キメラ分子」と互換的に用いられ得る。

【 0 1 2 6 】

本明細書で用いられる配列「同一性」についての言及は、標準的な N C B I B L A S T p パラメーター ( h t t p : / / b l a s t . n c b i . n l m . n i h . g o v ) を用いた 2 つのアライメントした配列間のパーセント同一性を指し得る。

40

【 0 1 2 7 】

用語「単離された」は、本発明の改変 f H b p に適用される場合、( i ) 組換え D N A 法を用いて核酸またはウイルスベクターによりコードされるか；または ( i i ) 例えば、キメラ合成法により合成されるか；または ( i i i ) 生物学的物質から分離され、次いで精製される、タンパク質を意味する。本発明の単離されたポリペプチドは、タンパク質をコードする核酸配列から、またはタンパク質をコードする核酸配列を含有する組換えベクターから発現されたタンパク質を含む。

50

## 【0128】

用語「防御的」は、疾患の予防、疾患感染、伝播および／もしくは進行のリスクの低減、疾患の重症度の低減、状態もしくは疾患の治癒、症状の緩和、または疾患もしくは疾患症状の重症度の低減を意味する。

## 【0129】

用語「予防法」は、疾患の予防または防御的治療を意味する。予防法は、感染、伝播および／もしくは進行のリスクの低減、または疾患の重症度の低減を含み得る。

## 【0130】

用語「治療」は、状態または疾患の治癒、症状の緩和、または疾患もしくは疾患症状の重症度の低減を意味する。

10

## 【0131】

当業者は、本発明の一実施形態または態様の任意選択の特徴が、必要に応じて、本発明の他の実施形態または態様に適用可能であり得ることを理解するであろう。

## 【0132】

以下、単に例として添付の図面を参照しながら、本発明の実施形態についてさらに詳細に説明する。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0133】

【図1A】キメラ f H b p : P o r A の設計 (A) 主な外膜の特徴、リポオリゴ糖および type 4 pil i、ならびに重要な抗原 f H b p および P o r A を示す髄膜炎菌の表面概略図。免疫原性 P o r A VR 2 ループは強調されており、f H b p がヒト C F H のドメイン 6 および 7 と相互作用することが示されている。

20

【図1B】キメラ f H b p : P o r A の設計 (B) P o r A ループが挿入されたキメラ f H b p : P o r A を産生するのに使用した 6 つの位置 (P 1 ~ 5 および P 7 ) を示す C F H ドメイン 6 および 7 を有する V 1 f H b p の構造。注意：5 位は、f H b p : C F H の界面にある。

【図2A】分子足場としての f H b p の使用 A) キメラ f H b p : P o r A を産生するのに使用した 6 つの位置 (P 1 ~ 5 および P 7 ) を有する f H b p V 1.1 のタンパク質構造 (灰色、リボン表示)。B) f H b p V 1.1 の二次構造 (灰色、矢印はシートを表し、長方形はらせんを表す)。VR 2 P 1.16 P o r A 挿入サイトの場所は、黒の実線で示され、数字は、P o r A VR 2 ループが挿入され得る残基の範囲を示している (1D の残基番号に対応)。C) 野生型 (WT V 1.1) f H b p の 1 ~ 5 位または 7 位に P o r A P 1.16 VR 2 ループを有する精製された f H b p : P o r A の SDS-PAGE およびウェスタンプロットによる分析。プロットを、- V 1 f H b p pAb および - P 1.16 mAb でプローブした。D) 他のタンパク質からのループが挿入され得る 1 ~ 5 位および 7 位の場所 (下線) を示す、V 1.1 f H b p の一次配列 (配列番号 1)

30

【図2B】分子足場としての f H b p の使用 A) キメラ f H b p : P o r A を産生するのに使用した 6 つの位置 (P 1 ~ 5 および P 7 ) を有する f H b p V 1.1 のタンパク質構造 (灰色、リボン表示)。B) f H b p V 1.1 の二次構造 (灰色、矢印はシートを表し、長方形はらせんを表す)。VR 2 P 1.16 P o r A 挿入サイトの場所は、黒の実線で示され、数字は、P o r A VR 2 ループが挿入され得る残基の範囲を示している (1D の残基番号に対応)。C) 野生型 (WT V 1.1) f H b p の 1 ~ 5 位または 7 位に P o r A P 1.16 VR 2 ループを有する精製された f H b p : P o r A の SDS-PAGE およびウェスタンプロットによる分析。プロットを、- V 1 f H b p pAb および - P 1.16 mAb でプローブした。D) 他のタンパク質からのループが挿入され得る 1 ~ 5 位および 7 位の場所 (下線) を示す、V 1.1 f H b p の一次配列 (配列番号 1)

40

【図2C】分子足場としての f H b p の使用 A) キメラ f H b p : P o r A を産生するのに使用した 6 つの位置 (P 1 ~ 5 および P 7 ) を有する f H b p V 1.1 のタンパク質

50

構造（灰色、リボン表示）。B) f H b p V 1.1 の二次構造（灰色、矢印はシートを表し、長方形はらせんを表す）。VR2 P 1.16 PorA挿入サイトの場所は、黒の実線で示され、数字は、PorA VR2ループが挿入され得る残基の範囲を示している（1Dの残基番号に対応）。C) 野生型（WT V 1.1）f H b p の1～5位または7位にPorA P 1.16 VR2ループを有する精製されたf H b p : PorAの SDS-PAGEおよびウェスタンプロットによる分析。プロットを、- V 1 f H b p pAbおよび- P 1.16 mAbでプローブした。D) 他のタンパク質からのループが挿入され得る1～5位および7位の場所（下線）を示す、V 1.1 f H b p の一次配列（配列番号1）

【図2D】分子足場としてのf H b p の使用A) キメラf H b p : PorAを產生するのに使用した6つの位置（P 1～5およびP 7）を有するf H b p V 1.1 のタンパク質構造（灰色、リボン表示）。B) f H b p V 1.1 の二次構造（灰色、矢印はシートを表し、長方形はらせんを表す）。VR2 P 1.16 PorA挿入サイトの場所は、黒の実線で示され、数字は、PorA VR2ループが挿入され得る残基の範囲を示している（1Dの残基番号に対応）。C) 野生型（WT V 1.1）f H b p の1～5位または7位にPorA P 1.16 VR2ループを有する精製されたf H b p : PorAの SDS-PAGEおよびウェスタンプロットによる分析。プロットを、- V 1 f H b p pAbおよび- P 1.16 mAbでプローブした。D) 他のタンパク質からのループが挿入され得る1～5位および7位の場所（下線）を示す、V 1.1 f H b p の一次配列（配列番号1）

【図3】キメラf H b p : PorAの特性評価（A）- P 1.16 mAbのFabを有するP 1.16ループ（黒、PDBID: 2mpa）で覆われたf H b p : PorAおよび1位、3位および7位にループを有するf H b p : PorAの構造。エピトープが、殺菌抗体により認識された立体配座であることを実証している。（B）20～120の温度勾配を使用して行われた示差走査熱量分析によるf H b p のf H b p N末端（NT）およびC末端（CT）バレルの安定性。f H b p N末端（NT<sub>TM</sub>）およびC末端（CT<sub>TM</sub>）バレルの溶融温度が示されている。BIAcore CM5チップに結合させたf H b p およびキメラf H b p : PorAでの、f H b p : PorAの補体H因子（CFH）およびmAbへの結合のSPR解析。CFH（f H 67）を、0.5～32nMの希釈範囲で流し、解離定数（K<sub>D</sub>）を計算した；f H b p : PorAの解離定数（K<sub>D</sub>）からは、f H b p : CFHの界面にぶつかる5位にループを有するf H b p とCFHとの結合の欠如が確認される（図2A）。NB = 結合なし。

【図4-1】キメラf H b p : PorAのために選択された抗原のレパートリー（A、B）Meningitis Research Foundation Genome Library（<http://www.meningitis.org/research/genome>）から2010～2015年のUKにおける髄膜炎菌疾患分離株における、f H b p 変異体およびPorA VR2亜型各々の頻度。特定のf H b p およびPorAの頻度が円グラフ（上）および表（下）で示されている。注意：V2 f H b p は、分離株の38.9%を占める。

【図4-2】キメラf H b p : PorAのために選択された抗原のレパートリー（A、B）Meningitis Research Foundation Genome Library（<http://www.meningitis.org/research/genome>）から2010～2015年のUKにおける髄膜炎菌疾患分離株における、f H b p 変異体およびPorA VR2亜型各々の頻度。特定のf H b p およびPorAの頻度が円グラフ（上）および表（下）で示されている。注意：V2 f H b p は、分離株の38.9%を占める。

【0134】

10

20

30

40

50

## 【表 2】

表 2. 2009~2015年の髄膜炎菌UK分離株すべての正確な配列マッチ

抗原	変異体	% MenB カバレッジ	
fHbp	1. 4	21. 5	10
	2. 19	9. 1	
	3. 45	4. 8	
PorA	P1. 4	19. 3	
	P1. 9	19. 1	
	P1. 14	16. 3	
	P1. 16	7. 0	20
	P1. 15	5. 5	
	P1. 15_11	5. 3	
全UK株におけるカバレッジ% - 抗原オーバーラップ (2009~2015に単離)		70. 6	
全UK MenB株におけるカバレッジ% - 抗原オーバーラップ (2009~2015に単離)		79. 2	30

## 正確な配列マッチ

- Pfizerワクチン、3.02%
- Bexsero fHbp (V1.1) または PorA (P1.16)、15.86%
- キメラ fHbp : PorA、fHbp または PorA、72% (fHbp および PorA で 23.5%)

【図5】マウス免疫血清による髄膜炎菌fHbp (A) およびPorA (B) 抗原の認識。髄膜炎菌株H44/76 (WT)、H44/67 fHbp およびH44/67 PorAからの全細胞溶菌液を SDS-PAGE により分離し、PVDF膜に移し、マウス免疫血清でプローブした。P1、P2、P4、P5 または P7 に VR2ループを有する精製された fHbp - PorA キメラ 20 μg で BalbCマウスを 3回免疫することにより、マウス免疫血清を得た。

【図6】V2 fHbp の安定化 : fHbp : PorA の構築および免疫原性 (A) 6 (M6) または 2 (M2) つの a.a. 置換を有する V2 fHbp V2.22 および V2.25 の安定化。DSC 分析を、20~120 の温度勾配を用いてタンパク質 20 μM で行った。fHbp N末端 (NTTM) および C末端バレル (CTTM) の溶融温度を記録する。(B) キメラ fHbp : PorA の PorA ループを、対応する mAb により認識する。P1.2、P1.4、P1.9、P1.14 および P1.15 からの PorA VR2 ループを、V2.25 fHbp の 1位に挿入した。精製された野生型 V2.25

40

50

f H b p および V 3 . 4 5 f H b p - P o r A キメラの S D S - P A G E およびウェスタンプロット分析。ウェスタンプロットを f H b p V 2 . 2 5 p A b およびループ特異的 P o r A m A b ( N I B S C ) でプローブした。 C F H との結合が、正常なヒト血清および C F H p A b でのファーウエスタンプロットにより検出された。

【図7】キメラ f H b p : P o r A は防御免疫を誘発する。マウスをキメラ f H b p : P o r A、すなわち P ( 1 ) ( 1 ) ( 1 3 )、P ( 2 ) ( 1 ) ( 1 3 ) および P ( 3 ) ( 1 ) ( 1 3 ) で 3 回免疫し、S B A を、示された株に対して測定した； S B A > 8 は防御的とみなされる。ループが 1 位にある限りは f H b p バレルから突き出ないため、3 位、すなわち、P ( 3 ) ( 1 ) ( 1 3 ) に V R 2 ループを有する P o r A により誘発される S B A の欠如 ( すなわち、f H b p 突然変異に対して S B A 0 ) が起こり得る。

【図8 A】U K において 2 0 1 6 年に単離された 髄膜炎菌血清型 B 株 ( n = 2 4 3 ) における P o r A V R 2 ( A ) および f H b p 変異体 ( B ) の頻度。データは M e n i n g o c o c c a l R e s e a r c h F o u n d a t i o n 、 2 0 1 7 年 6 月 2 7 日からダウントロードした。他 : < 4 の分離株で生じる残りの対立遺伝子。 ( C ) 組換えキメラ抗原の S D S - P A G E およびウェスタンプロットによる分析。免疫プロットを、 - P o r A V R 2 m A b : P 1 . 4 、 P 1 . 9 、 P 1 . 1 4 および P 1 . 1 5 でプローブした。 ( D ) キメラ抗原 f H b p V 1 . 4 : P o r A 1 5 1 / P 1 . 1 . 1 0 \_ 1 、 f H b p V 1 . 4 : P o r A 1 5 1 / P 1 . 1 4 および f H b p V 1 . 4 : P o r A 1 5 1 / P 1 . 1 5 、 f H b p V 3 . 4 5 : P o r A 1 5 8 / P 1 . 4 および f H b p V 3 . 4 5 : P o r A 1 5 8 / P 1 . 9 からのマウスポリクローナル抗血清による 髄膜炎菌血清型 B 分離株のパネルにおける P o r A の検出。

【図8 B】U K において 2 0 1 6 年に単離された 髄膜炎菌血清型 B 株 ( n = 2 4 3 ) における P o r A V R 2 ( A ) および f H b p 変異体 ( B ) の頻度。データは M e n i n g o c o c c a l R e s e a r c h F o u n d a t i o n 、 2 0 1 7 年 6 月 2 7 日からダウントロードした。他 : < 4 の分離株で生じる残りの対立遺伝子。 ( C ) 組換えキメラ抗原の S D S - P A G E およびウェスタンプロットによる分析。免疫プロットを、 - P o r A V R 2 m A b : P 1 . 4 、 P 1 . 9 、 P 1 . 1 4 および P 1 . 1 5 でプローブした。 ( D ) キメラ抗原 f H b p V 1 . 4 : P o r A 1 5 1 / P 1 . 1 . 1 0 \_ 1 、 f H b p V 1 . 4 : P o r A 1 5 1 / P 1 . 1 4 および f H b p V 1 . 4 : P o r A 1 5 1 / P 1 . 1 5 、 f H b p V 3 . 4 5 : P o r A 1 5 8 / P 1 . 4 および f H b p V 3 . 4 5 : P o r A 1 5 8 / P 1 . 9 からのマウスポリクローナル抗血清による 髄膜炎菌血清型 B 分離株のパネルにおける P o r A の検出。

【図8 C】U K において 2 0 1 6 年に単離された 髄膜炎菌血清型 B 株 ( n = 2 4 3 ) における P o r A V R 2 ( A ) および f H b p 変異体 ( B ) の頻度。データは M e n i n g o c o c c a l R e s e a r c h F o u n d a t i o n 、 2 0 1 7 年 6 月 2 7 日からダウントロードした。他 : < 4 の分離株で生じる残りの対立遺伝子。 ( C ) 組換えキメラ抗原の S D S - P A G E およびウェスタンプロットによる分析。免疫プロットを、 - P o r A V R 2 m A b : P 1 . 4 、 P 1 . 9 、 P 1 . 1 4 および P 1 . 1 5 でプローブした。 ( D ) キメラ抗原 f H b p V 1 . 4 : P o r A 1 5 1 / P 1 . 1 . 1 0 \_ 1 、 f H b p V 1 . 4 : P o r A 1 5 1 / P 1 . 1 4 および f H b p V 1 . 4 : P o r A 1 5 1 / P 1 . 1 5 、 f H b p V 3 . 4 5 : P o r A 1 5 8 / P 1 . 4 および f H b p V 3 . 4 5 : P o r A 1 5 8 / P 1 . 9 からのマウスポリクローナル抗血清による 髄膜炎菌血清型 B 分離株のパネルにおける P o r A の検出。

【図8 D】U K において 2 0 1 6 年に単離された 髄膜炎菌血清型 B 株 ( n = 2 4 3 ) における P o r A V R 2 ( A ) および f H b p 変異体 ( B ) の頻度。データは M e n i n g o c o c c a l R e s e a r c h F o u n d a t i o n 、 2 0 1 7 年 6 月 2 7 日からダウントロードした。他 : < 4 の分離株で生じる残りの対立遺伝子。 ( C ) 組換えキメラ抗原の S D S - P A G E およびウェスタンプロットによる分析。免疫プロットを、 - P o r A V R 2 m A b : P 1 . 4 、 P 1 . 9 、 P 1 . 1 4 および P 1 . 1 5 でプローブした。 ( D ) キメラ抗原 f H b p V 1 . 4 : P o r A 1 5 1 / P 1 . 1 . 1 0 \_ 1 、 f H b p V 1 . 4

10

20

30

40

50

: Por A 151 / P1.14 および fHbp V1.4 : Por A 151 / P1.15、fHbp V3.45 : Por A 158 / P1.4 および fHbp V3.45 : Por A 158 / P1.9 からのマウスポリクローナル抗血清による髄膜炎菌血清型 B 分離株のパネルにおける Por A の検出。

【図 8 E】UKにおいて2016年に単離された髄膜炎菌血清型 B 株 (n = 243) における Por A VR2 (A) および fHbp 変異体 (B) の頻度。データは Meningococcal Research Foundation、2017年6月27日からダウンロードした。他: <4 の分離株で生じる残りの対立遺伝子。(C) 組換えキメラ抗原の SDS-PAGE およびウェスタンプロットによる分析。免疫プロットを、- Por A VR2 mAb: P1.4、P1.9、P1.14 および P1.15 でプローブした。(D) キメラ抗原 fHbp V1.4 : Por A 151 / P1.1.10-1、fHbp V1.4 : Por A 151 / P1.14 および fHbp V1.4 : Por A 151 / P1.15、fHbp V3.45 : Por A 158 / P1.4 および fHbp V3.45 : Por A 158 / P1.9 からのマウスポリクローナル抗血清による髄膜炎菌血清型 B 分離株のパネルにおける Por A の検出。[実施例 1]

#### 【0135】

免疫原性ペプチドを H 因子結合タンパク質 (fHbp) に導入でき、ペプチドを免疫系に提示して、防御応答を誘発できることが示された (図 5 および 7)。この方式の原理を証明するために、内在性膜タンパク質 Por A からのペプチドを使用した。Por A は、その膜貫通ドメインが不溶性であるため発現が困難である。分子の免疫原性部分は、免疫系に曝露される細胞外ループに存在する。しかし、有効な免疫応答は、正確な立体配座のループに対してのみ生じる; 直鎖ペプチド配列は、機能性免疫応答を誘発しない。fHbp 構造の知識から、Por A ループを fHbp に導入し、Por A に対する当該応答を生成することが可能である。これにより、キメラ分子を生成する特定のサイトに fHbp および Por A 配列に基づくキメラ分子が得られる。この方式は、任意の他の免疫原性内在性外膜タンパク質に使用できる。

#### 【0136】

v2 fHbp がワクチンから除去される理由として考えられるのは、その N 末端 バレルの固有の不安定性であることが示された: i) この部分の v2 fHbp の原子構造の決定が不可能であった<sup>10</sup>、ii) v2 fHbp は、プロテアーゼ消化に感受性である (質量分析から、切断サイトが、N 末端 バレルに存在することが実証される、図示せず)、および iii) 示差走査熱量測定は、不安定性がこの領域の v2 fHbp にあることを確認している<sup>10</sup>。

#### 【0137】

安定な v2 fHbp の產生に成功した。N 末端バレルに影響を与える突然変異誘発を行って、アミノ酸 (a. a. s) を単独でまたは組み合わせて置換した。M6 fHbp での 6 個のアミノ酸の置換により、v2 fHbp が安定化される (すなわち、この バレルの c130a. a. s で 6 つの変化、<0.5%) (突然変異の詳細については国際公開第 2014030003 号参照)。これは、示差走査熱量測定 (DSC) およびプロテアーゼ感受性から明らかである (詳細については国際公開第 2014030003 号参照)。変更された残基の側鎖は、N 末端バレルの - シート間の相互作用を促進し、したがって、分子の中心に向かって配向される; 变化は、予想通りタンパク質の免疫原性に影響を与えない (SBA または - fHbp IgG レベルにおける相違なし、図示せず)。

#### 【0138】

キメラ v1.1 fHbp は、OMV ワクチンのレシピエントにおいて SBA を誘発する、P1.16 Por A からの 13 アミノ酸 VR2 を組み込むことにより產生された<sup>16</sup>。内在性膜タンパク質は、疎水性 (それゆえ不溶性) バレルを含有し、fHbp は、高レベルで発現および精製され得る 2 つのバレルを含有する。VR2 配列を fHbp の 6 つの異なる位置に導入した (図 2B); これらのサイトは、fHbp の構造全体を破壊する挿入の可能性が低減されるように、Por A<sup>22</sup> および fHbp の隣接する シートの類

10

20

30

40

50

似の間隔に基づき選択された（挿入の予想される影響については図 2 B）。VR2を各 fHbpに挿入した3つのfHbp（図2B）の免疫原性を評価した。タンパク質はすべて、fHbpおよびPorAに対して認識する抗体応答を誘発し（図5および7）、重要なことに、（サイト1または2にVR2を有する）これまでに試験した両方のタンパク質が、独立にfHbpおよびPorAに対してSBAを誘発する（Nm H44/76、512に対する、および両方のfHbpのNm H44/76 fHbp、256に対するSBA）。これにより、この方式の原理が証明される。

#### 【0139】

##### 多価ワクチンのための足場としてのfHbp

ワクチンとしての非機能性fHbp-fHbpの機能は、fHbp含有ワクチンの臨床試験の開始時は知られていなかった；fHbpは、変異体群にかかわりなくfH（解離定数<5nM）との高親和性相互作用を示し、fHは、fHbpの大部分を占める<sup>5</sup>。この相互作用は、i)免疫原性エピトープをブロックし、fHと競合し得る抗体の産生を妨害することにより、ならびにii)（fHの動員により）補体活性、およびそこから免疫誘導サイトでのB細胞の活性を低下させることにより、ワクチンとしてのfHbpの使用を損なう可能性があった。非機能性fHbpの使用により、これらの問題が回避される。fHとの相互作用に必要なv1、2および3 fHbpの重要なアミノ酸が同定され<sup>10</sup>、fHとの結合を妨害するv1、v2およびv3 fHbpの单一a.a.sの変化は、この重要なワクチン抗原の免疫原性を保持するかまたはさらに高めることができた<sup>10</sup>、<sup>23</sup>。

#### 【0140】

##### 単一タンパク質多価ワクチン候補の産生および評価

Nmの（そのPorA配列で定義される）優勢な血清亜型からの防御PorAエピトープ<sup>15</sup>を、v1、v2、安定なv3タンパク質に導入した；これらの安定性、ならびにPorAおよびfHbp mAbによる認識を決定した。PorA配列は、UKの分離株の多様性に対応するように選択されたが、髄膜炎菌株の任意のコレクションからのデータを使用できる。

#### 【0141】

##### 研究方法

ワクチン候補の産生および特性評価 - 組換えfHbpを、標準プラスミドベクターを用いて大腸菌に構築および発現させた；既存のワクチン（v1.1および3.45）のいずれかに存在するため、またはタンパク質（v2）での経験により、またはNm株でのそれらの優勢により、キメラv1、V2およびV3 fHbpのタンパク質陰イオン交換およびゲルfiltration-PolyHisタグを用いてタンパク質を親和性精製した。PorAループを標準的な方法でfHbpに導入し、融合タンパク質が、PorAの一般的な血清亜型に対するmAbを結合することを実証した。この戦略を使用して、天然配列および設計された配列を比較し、候補の抗原結合およびfH結合のファインマッピングを行った。VPキャピラリーディスク（GE Healthcare）を用いてDSC、および先述のようにBiacore 3000（GE Healthcare）またはProteOn XRP36（BioRad）でSPRを実施した。

#### 【0142】

##### 参考文献

10

20

30

40

50

## 【表3】

1. Rosenstein, N. E., B. A. Perkins, D. S. Stephens, T. Popovic, and J. M. Hughes. 2001. Meningococcal disease. *N. Engl. J. Med.* 344:1378-1388.
2. Tan, L. K., Carbone, G. M., and Borrow, R. 2010. Advances in the development of vaccines against *Neisseria meningitidis*. *N. Engl. J. Med.* 362: 1511-1520
3. <http://www.meningitis.org/research/genome>
4. Finne, J., M. Leinonen, and P. H. Makela. 1983. Antigenic similarities between brain components and bacteria causing meningitis. Implications for vaccine development and pathogenesis. *Lancet* 2:355-357.
5. Schneider, M. C., B. E. Prosser, J. J. Caesar, E. Kugelberg, S. et al. 2009. *Neisseria meningitidis* recruits factor H using protein mimicry of host carbohydrates. *Nature* 458:890-893.
6. Fletcher, L. D., L. Bernfield, V. Barniak, J. E. Farley, et al. 2004. Vaccine potential of the *Neisseria meningitidis* 2086 lipoprotein. *Infect. Immun.* 72:2088-2100
7. Masiagnani, V., Comanducci, M., Giuliani, M., Bambini, S., et al. 2003. Vaccination against *Neisseria meningitidis* using three variants of the lipoprotein GNA1870. *J. Exp. Med.* 197:789-799.
8. Beernink, P. T., Shaughnessy, J., Pajon, R., Braga, E. M., et al. 2012. The Effect of Human Factor H on Immunogenicity of Meningococcal Native Outer Membrane Vesicle Vaccines with Over-Expressed Factor H Binding Protein. *PLoS Pathogens* 8: e1002688
9. Granoff, D. M., Welsch, J. A., and Ram, S. 2009. Binding of complement factor H (fH) to *Neisseria meningitidis* is specific for human fH and inhibits complement activation by rat and rabbit sera. *Infect. Immun.* 77: 764-769.

10

20

30

40

50

10. Johnson, S., Tan, L., van der Veen, S., Caesar, J., et al. (2012) Design and evaluation of meningococcal vaccines through structure-based modification of host and pathogen molecules. *PLoS pathogens* 8: e1002981
11. Zipfel, P. F., Skerka, C., Hellwage, J., Jokiranta, S. T., et al. 2002. Factor H family proteins: on complement, microbes and human diseases. *Biochem. Soc. Trans.* 30: 971-978.
12. Schneider, M. C., Exley, R. M., Ram, S., Sim, R. B., and Tang, C. M. 2007. Interactions between *Neisseria meningitidis* and the complement system. *Trends Microbiol* 15: 233-240
13. Richmond, P. C., Marshall, H. S., Nissen, M. D., Jiang, Q., et al. 2012. Safety, immunogenicity, and tolerability of meningococcal serogroup B bivalent recombinant lipoprotein 2086 vaccine in healthy adolescents: a randomised, single-blind, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet Infect Dis.* 12: 597-607.
14. Gorringe AR, Pajón R 2011. Bexsero: a multicomponent vaccine for prevention of meningococcal disease. *Expert Opin Biol Ther.* 11: 969-85.
15. Lucidarme, J., Comanducci, M., Findlow, J., Gray, S. J., et al. 2010. Characterization of fHbp, nhba (gna2132), nadA, porA, and sequence type in group B meningococcal case isolates collected in England and Wales during January 2008 and potential coverage of an investigational group B meningococcal vaccine. *Clin Vaccine Immunol.* 2010 17: 919-29
16. Rosenqvist, E., Høiby, E. A., Wedege, E., Caugant, D. A., et al. 1993. A new variant of serosubtype P1.16 in *Neisseria meningitidis* from Norway, associated with increased resistance to bactericidal antibodies induced by a serogroup B outer membrane protein vaccine. *Microb Pathog.* 15: 197
17. Martin, S. L., Borrow, R., van der Ley, P., Dawson, M., Fox, A. J., and Cartwright, K. A. 2000. Effect of sequence variation in meningococcal PorA outer membrane protein on the effectiveness of a hexavalent PorA outer membrane vesicle vaccine. *Vaccine* 18: 2476-81.
18. Martin, D. R., Ruijne, N., McCallum, L., O'Hallahan, J., and Oster, P. 2006. The VR2 epitope on the PorA P1.7-2,4 protein is the major target for the

10

20

30

40

50

immune response elicited by the strain-specific group B meningococcal vaccine MeNZB. *Clinical and Vaccine Immunology* 13: 486-491.

19. McGuinness, B., Barlow, A. K., Clarke, I. N., Farley, J. E. et al. 1990 Deduced amino acid sequences of class 1 protein (PorA) from three strains of Neisseria meningitidis. Synthetic peptides define the epitopes responsible for serosubtype specificity. *J Exp Med.* Jun 171: 1871-82.

20. Christodoulides, M., McGuinness, B.T., Heckels, J.E. 1993. Immunization with synthetic peptides containing epitopes of the class 1 outer-membrane protein of *Neisseria meningitidis*: production of bactericidal antibodies on immunization with a cyclic peptide. *J Gen Micro* 139: 1729

21. Gossger, N., Snape, M. D., Yu, L. M., Finn, A., et al. 2012. Immunogenicity and tolerability of recombinant serogroup B meningococcal vaccine administered with or without routine infant vaccinations according to different immunization schedules: a randomized controlled trial. *JAMA*. 307: 573-82.

22. van den Elsen, J. M. H., Herron, J. N., Hoogerhout, P., Poolman, J. T., et al. 1997. Bactericidal antibody recognition of a PorA epitope of *Neisseria meningitidis*: Crystal structure of a Fab fragment in complex with a fluorescein-conjugated peptide. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 29: 113-125.

23. Beernink, P. T., Shaughnessy, J., Braga, E. M., Liu, Q., et al. 2011. A meningococcal factor H binding protein mutant that eliminates factor H binding enhances protective antibody responses to vaccination. *J. Immunol.* 186: 3606-3614.

24. Ufret-Vincenty, R. L., Areo, B., Liu, X., McMahon, A., et al. 2010. Transgenic mice expressing variants of complement factor H develop AMD-like retinal findings. *Invest Ophthalmol Vis. Sci.* 51: 5878-5887.

すべての参考文献が参考により本明細書に援用される。

【0143】

実施例2-免疫応答を生成する、拡大範囲のPorA VR2ループを含有するキメラ抗原

fHbp: PorAキメラ抗原の適合性を試験するために、fHbpとPorA VR2との様々な組み合わせからなるいくつかのキメラ抗原を产生した。UKで単離された株に利用できる包括的な髄膜炎菌ゲノムデータ(Public health England, the Wellcome Trust Sanger Instituteおよびthe University of Oxfordにより共同研究開発されたMeningitis Research Foundation Meningococcus Genome Library)から、所与の領域において最も一般的な抗原とマッチする正

10

20

30

40

50

確な配列を有するキメラ抗原の構築が可能である。2016年、血清型B髄膜炎菌分離株で最も優勢なPorA VR2は、P1.4(15.2%)、P1.14(15.2%)、P1.9(12.8%)、P1.16(11.1%)およびP1.15(5.8%、図8B)であった。VR2 P1.10-1は、血清型B分離株の1.6%に存在した。最も優勢な変異体1、変異体2および変異体3 fHbpは、V1.4、V2.19およびV3.45であり、各々血清型B髄膜炎菌分離株の21.8%、5.3%および4.9%に存在した(図8C)。5つの異なるキメラ抗原を構築し、PorA VR2を、151位(V1.4)または158位(V3.45、図8A)に挿入した。キメラ抗原の発現および精製後、ウェスタンプロット分析により、これらのキメラ抗原すべてがその同種 - VR2 mAbおよび-fHbp pAbにより認識されるエピトープを保持することが確認された(図8D)。野生型fHbp V1.1、V1.4およびV3.45ならびにキメラ抗原の熱的安定性を、示差走査熱量測定(DSC、表3)により決定した。

#### 【0144】

免疫応答を誘発するこれらのfHbp:PorAキメラ抗原の能力を調べるために、CD1マウスの群を各キメラ抗原/100μlで免疫した;免疫付与後に得られた抗血清をプールした。得られたPorA免疫応答を評価するために、プールした抗血清および血清型B髄膜炎菌疾患分離株のパネルにウェスタンプロットを行った。図8Eは、すべてのキメラ抗原が、その同種PorA VR2を認識する - PorA抗体を誘発したことを実証している。 - PorA SBA応答を評価するために、プールしたキメラ抗原/100μl抗血清、およびfHbp交差防御を無効にするためにミスマッチfHbp変異体を有する血清型B髄膜炎菌株に血清殺菌アッセイを行った。力価は20~1280の範囲であり、髄膜炎菌に対する防御免疫の許容される相関に対する閾値8を上回る(Andrews, N.ら、Clin Diagn Lab Immunol 10, 780~786(2003))(表4)。

#### 【0145】

#### 【表4】

表3: 野生型fHbpおよびキメラ抗原の安定性

タンパク質	Cp (kcal mole <sup>-1</sup> °C <sup>-1</sup> )	
	N-末端 T <sub>m</sub>	C-末端 T <sub>m</sub>
fHbp V1.1	69.8	87.9
fHbp V1.4	64.0	89.0
fHbp V3.45	41.0	83.0
fHbp <sup>V1.4</sup> :PorA <sup>151/P1.10-1</sup>	54.0	89.0
fHbp <sup>V1.4</sup> :PorA <sup>151/P1.14</sup>	55.0	88.0
fHbp <sup>V1.4</sup> :PorA <sup>151/P1.15</sup>	55.0	89.0
fHbp <sup>V3.45</sup> :PorA <sup>158/P1.4</sup>	40.0	81.0
fHbp <sup>V3.45</sup> :PorA <sup>158/P1.9</sup>	39.0	80.0

融点、T<sub>m</sub>

#### 【0146】

10

20

30

40

50

【表 5】

表 4：血清殺菌アッセイ力価

プールした抗血清	血清型 B 分離株	fHbp 変異 体	PorA	VR2	SBA 力価
fHbp <sup>V3.45</sup> :PorA <sup>158/P1.4</sup>	M10240123	V1.92*	P1.4		1/160
fHbp <sup>V3.45</sup> :PorA <sup>158/P1.9</sup>	M11240431	V2.19	P1.9		1/1280
fHbp <sup>V1.4</sup> :PorA <sup>151/P1.1.10_1</sup>	M11240189	V3.84	P1.10_1		1/20
fHbp <sup>V1.4</sup> :PorA <sup>151/P1.14</sup>	M15240853	V3.45	P1.14		1/640

PorA SBA 力価は、プールしたキメラ抗原 / alum 抗血清、およびミスマッチ fHbp 変異体を有する血清型 B 髄膜炎菌分離株を用いて生成した。\* fHbp は残基 242 でトランケートされた。

PorA VR2 P1.15 を有する株の fHbp はミスマッチしないので、fHbp 株を産生する必要があったため、fHbp<sup>V1.4</sup>:PorA<sup>151/P1.15</sup> は試験しなかった。

10

20

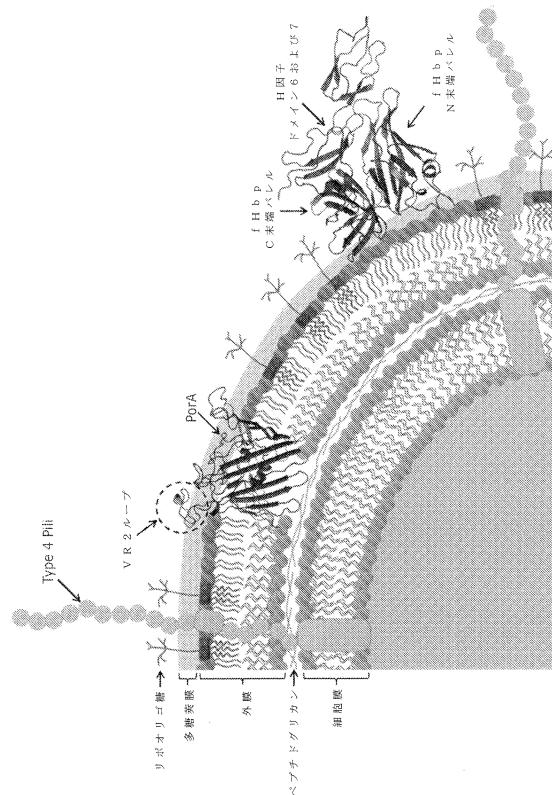
30

40

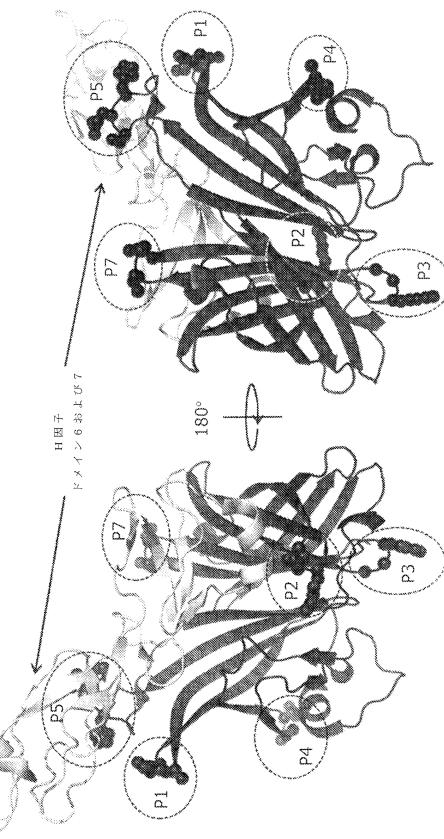
50

【図面】

【図 1 A】



【図 1 B】



10

20

30

【図 2 A】

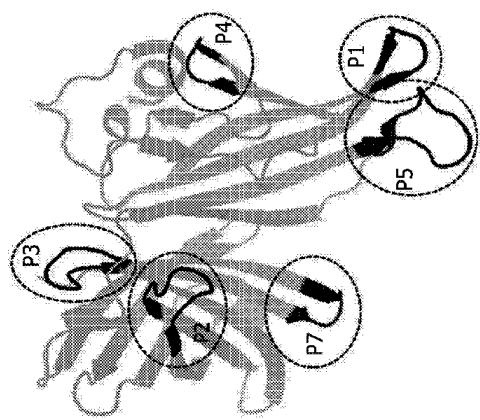
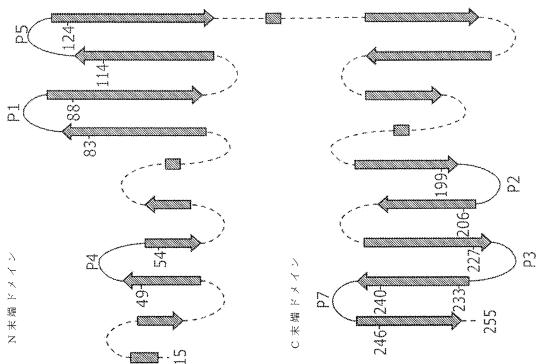


Figure 2A

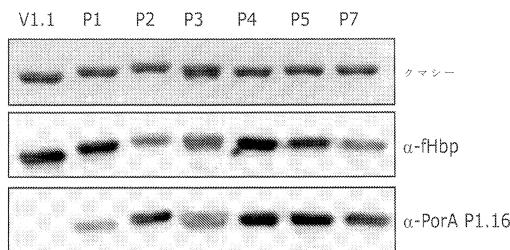
【図 2 B】



40

50

【図 2 C】



【図 2 D】

1 CSSGGGGVAA DIGAGLADAL TAPLDHKDKG LQSLTLDQSV

41 RKNEKLKLAA QGAEKTYGNG DSLNTGKLKN DKVSRFDFIR  
..P4...

81 QIEVDGQLIT LESGEFQVYK QSHSALTAFQ TEQIQDSEHS  
..P1.. ...P5..

121 GKMVAKRQFR IGDIAGEHTS FDKLPEGGRA TYRGTAFGSD  
...

161 DAGGKLTYTI DFAAKQGNGK IEHLKSPeln VDLAAADIKP  
10

201 DGKRHAVISG SVLYNQAEKG SYSLGIFGGK AQEVAGSAEV  
..P2... ...P3...

241 KTVNGIRHIG LAAKQ  
..P7..

Figure 2D

20

【図 3】

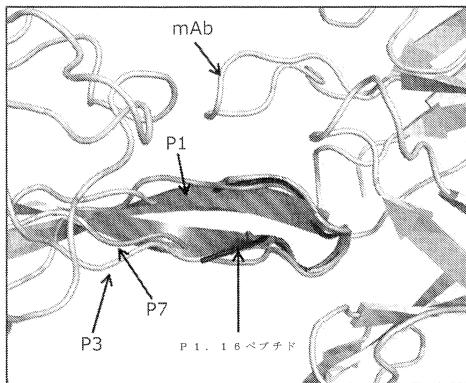
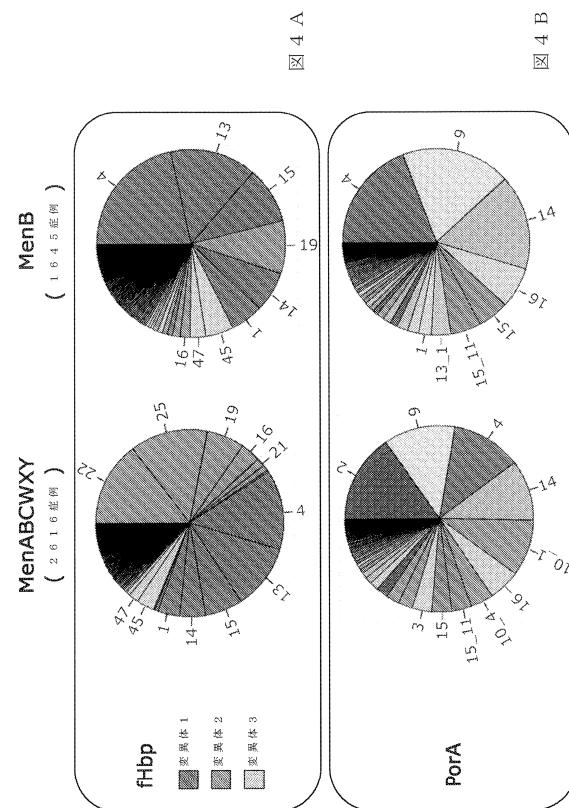


図 3 A

タンパク質	Cp (kcal mole <sup>-1</sup> °C <sup>-1</sup> )		Kd (nm)
	NT	CT	
V1.1	69.8	87.9	3.6
P1	60.5	87.3	2.3
P2	68.4	75.7	28
P3	61.7	72.4	2.7
P4	65	87.9	2.3
P5	68.8	88	NB
P7	69	76.9	5.5

図 3 B

【図 4 - 1】



20

30

40

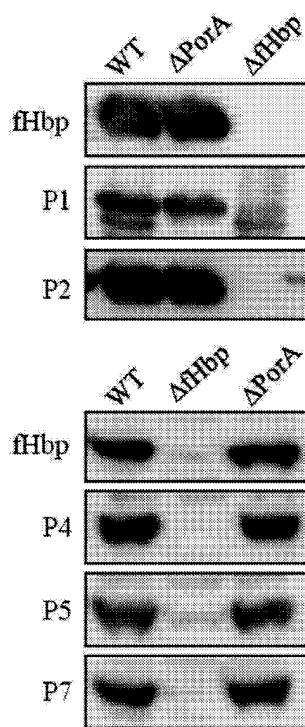
50

【図 4 - 2】

変異体	% MenABCWXY カバレッジ (2009-2015 UK)		% MenB カバレッジ (2009-2015 UK)
	MenABCWXY カバレッジ (2009-2015 UK)	MenB カバレッジ (2009-2015 UK)	
fHbp	1.4	13.8	21.5
	2.22	14.8	0.2
	2.19	6.5	9.1
	3.45	3.0	4.8
PorA	P1.2	15.4	1.3
	P1.9	12.3	19.1
	P1.4	12.1	19.3
	P1.14	10.5	16.3
	P1.10_1	9.7	1.3
	P1.16	5.4	7.0
	P1.15	3.4	5.5

図 4 続き

【図 5 A】

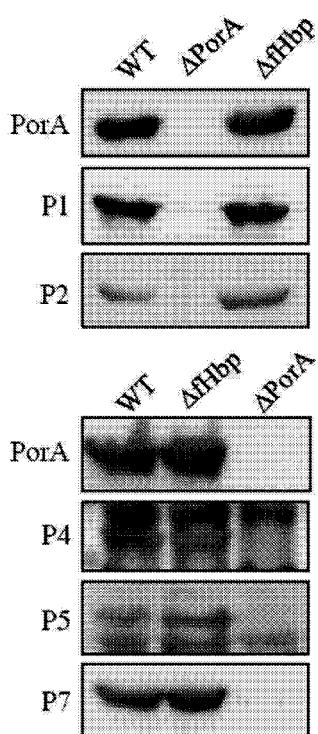


10

20

Figure 5A

【図 5 B】

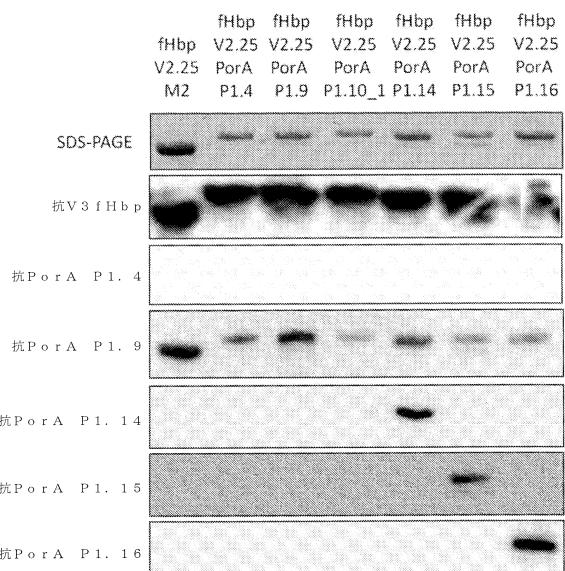


【図 6】

キメラ	NT <sub>TM</sub> (°C)	CT <sub>TM</sub> (°C)
V1.1 WT	71	90
V2.25 WT	33?	87
V2.25 MT	67	87
V2.25 M6 PorA (P1) P1.16	40	86

30

図 6 A



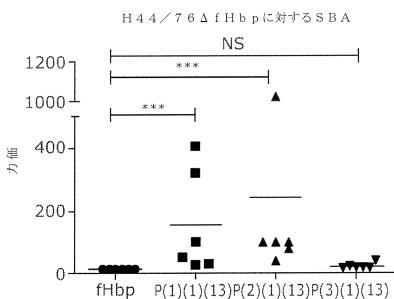
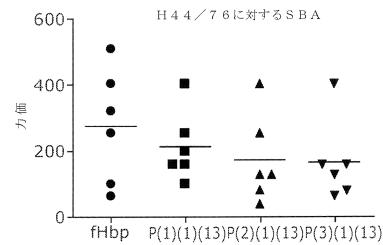
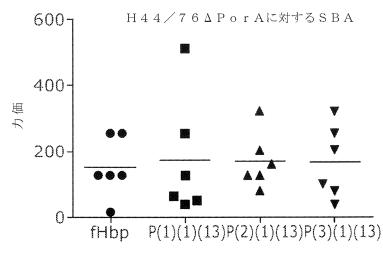
40

図 6 B

Figure 5B

50

【図 7】



【図 8 A】

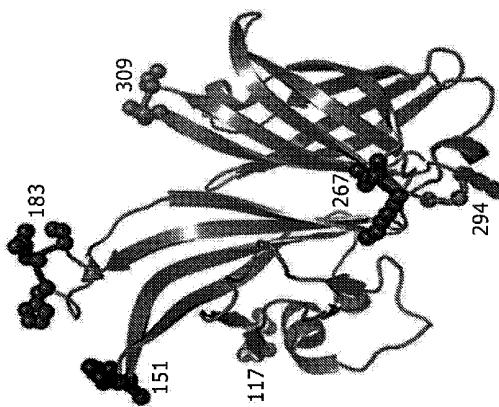


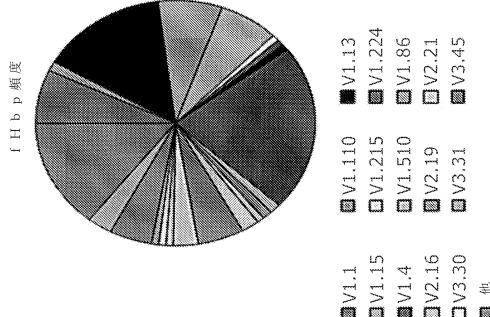
Figure 8A

10

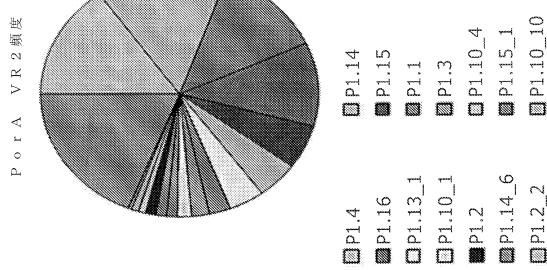
20

30

【図 8 B】



【図 8 C】



40

50

【図 8 D】

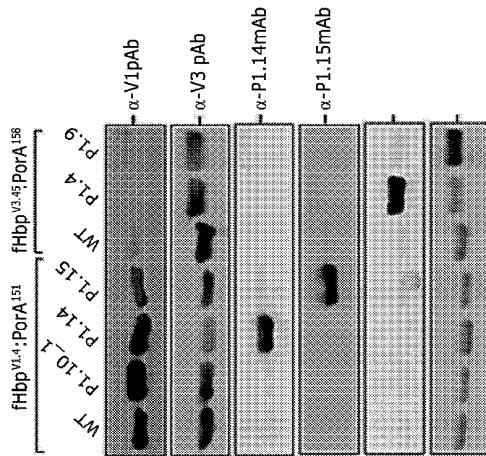
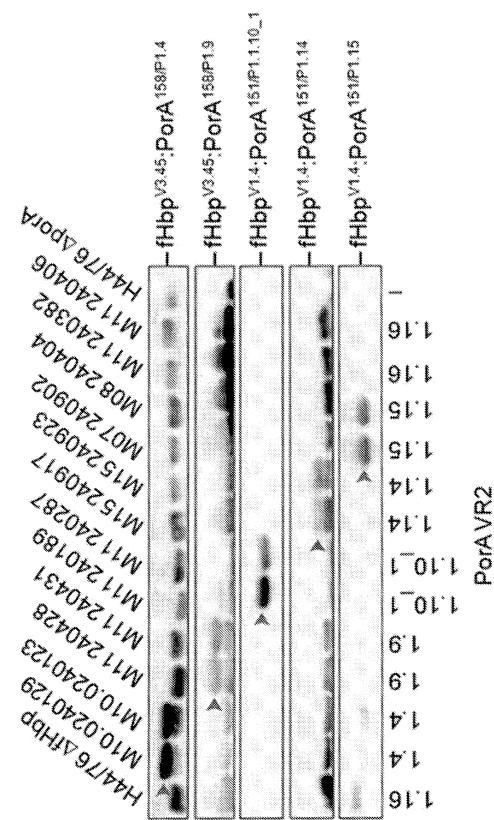


Figure 8D

【図8E】



## フロントページの続き

## (51)国際特許分類

A 61 K	48/00	(2006.01)	F I	A 61 K	48/00
A 61 P	31/04	(2006.01)		A 61 P	31/04
C 07 K	14/22	(2006.01)		C 07 K	14/22

英国(GB)

(74)代理人 100191086

弁理士 高橋 香元

(72)発明者 タン,クリストフ エム

イギリス国, オックスフォード オーエックス1 3アールイー, サウス パークス ロード, ユニバーシティ オブ オックスフォード, ダン スクール オブ パソロジー

## 合議体

審判長 長井 啓子

審判官 名和 大輔

審判官 天野 貴子

## (56)参考文献

特表2009-517377 (JP, A)

特表2013-537884 (JP, A)

国際公開第2016/083583 (WO, A1)

P L O S P a t h o g e n s , V o l . 8 , I s s u e 1 0 , e 1 0 0 2 9 8 1

## (58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C12N15/00-15/90

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )

B I O S I S / M E D L I N E / E M B A S E / C A p l u s ( S T N )

P u b M e d

U n i P r o t / G e n e S e q