

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-529643

(P2004-529643A)

(43) 公表日 平成16年9月30日(2004.9.30)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 15/09</b>	C 1 2 N 15/00	4 B O 2 4
<b>A 6 1 K 39/00</b>	A 6 1 K 39/00	4 B O 6 4
<b>A 6 1 K 39/395</b>	A 6 1 K 39/395	4 B O 6 5
<b>A 6 1 P 31/04</b>	A 6 1 K 39/395	4 C O 8 5
<b>C O 7 K 1/22</b>	A 6 1 P 31/04	4 H O 4 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 123 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2002-581466 (P2002-581466)	(71) 出願人	591076811
(86) (22) 出願日	平成14年4月11日 (2002.4.11)		カイロン コーポレーション
(85) 翻訳文提出日	平成15年10月15日 (2003.10.15)		アメリカ合衆国, カリフォルニア 946
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/011501		08, エミリービル, ホートン ストリー
(87) 国際公開番号	W02002/083711		ト 4560
(87) 国際公開日	平成14年10月24日 (2002.10.24)	(71) 出願人	503377467
(31) 優先権主張番号	60/284, 554		チルドレンズ ホスピタル オークランド
(32) 優先日	平成13年4月17日 (2001.4.17)		リサーチ インスティテュート
(33) 優先権主張国	米国 (US)		アメリカ合衆国 カリフォルニア 946
(31) 優先権主張番号	60/326, 838		09-1673, オークランド, マー
(32) 優先日	平成13年10月3日 (2001.10.3)		ティン ルーサー キング ジュニア ウ
(33) 優先権主張国	米国 (US)		エイ 5700
		(74) 代理人	100078282
			弁理士 山本 秀策
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 機能活性抗体を誘発する髄膜炎菌性Bエピトープの分子模倣物

## (57) 【要約】

*Neisseria meningitidis* 血清型 B (Men B) P1.2 血清型型の PorA のループ 4 に対する表面に露出したエピトープの分子模倣物およびこの模倣物に対して産生される抗体を開示する。アミノ酸配列 QTP を含む GNA33 ペプチドであって、このペプチドが、*Neisseria meningitidis* 血清型 B 細菌に対して、補体媒介性の殺菌活性および/またはオプソニン活性を示す抗体の産生を誘発し得る。このような分子模倣物またはこれに対する抗体を含有する組成物は、Men B 疾患を予防するため、および Men B 感染の診断のために使用され得る。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

アミノ酸配列 Q T P を含む G N A 3 3 ペプチドであって、該ペプチドが、*Neisseria meningitidis* 血清型 B 細菌に対して、補体媒介性の殺菌活性および / またはオプソニン活性を示す抗体の産生を誘発し得る、G N A 3 3 ペプチド。

## 【請求項 2】

請求項 1 に記載の G N A 3 3 ペプチドであって、該ペプチドが、F Q T P V ( 配列番号 2 )、F Q T P V H S ( 配列番号 3 )、A F Q T P V H S ( 配列番号 4 )、Q A F Q T P V H S ( 配列番号 5 )、A Q A F Q T P V H S ( 配列番号 6 )、A Q A F Q T P V H ( 配列番号 7 )、A Q A F Q T P V ( 配列番号 8 )、Q A F Q T P V H S F ( 配列番号 9 )、A F Q T P V H S F Q ( 配列番号 10 )、F Q T P V H S F Q A ( 配列番号 11 )、Q T P V H S F Q A K ( 配列番号 12 )、D V S A Q A F Q T P ( 配列番号 12 )、V S A Q A F Q T P V ( 配列番号 13 ) および S A Q A F Q T P V H ( 配列番号 14 ) からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、G N A 3 3 ペプチド。

10

## 【請求項 3】

前記ペプチドが、アミノ酸配列 F Q T P V ( 配列番号 2 ) を含む、請求項 2 に記載の G N A 3 3 ペプチド。

## 【請求項 4】

請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の G N A 3 3 ペプチド、および薬学的に受容可能な賦形剤を含む、組成物。

20

## 【請求項 5】

哺乳動物被験体において、*Neisseria meningitidis* 血清型 B 細菌に対する免疫応答を誘発するための方法における、請求項 4 に記載の組成物の使用。

## 【請求項 6】

哺乳動物被験体において *Neisseria meningitidis* 血清型 B 細菌に対する免疫応答を誘発するための方法であって、該被験体に有効量の請求項 4 に記載の組成物を投与する工程を包含する、方法。

## 【請求項 7】

請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の G N A 3 3 ペプチドに対して指向されるモノクローナル抗体であって、該抗体が、*Neisseria meningitidis* 血清型 B 細菌に対して、補体媒介性の殺菌活性および / またはオプソニン活性を示す、モノクローナル抗体。

30

## 【請求項 8】

請求項 7 に記載のモノクローナル抗体、および薬学的に受容可能な賦形剤を含む、組成物。

## 【請求項 9】

G N A 3 3 ポリペプチドに対する抗体を含む組成物であって、該抗体が、*Neisseria meningitidis* 血清型 B 細菌に対して、補体媒介性の殺菌活性および / またはオプソニン活性を示す、組成物。

## 【請求項 10】

前記抗体が、モノクローナル抗体である、請求項 9 に記載の組成物。

40

## 【請求項 11】

哺乳動物被験体において、*Neisseria meningitidis* 血清型 B 細菌に対する免疫応答を誘発するための方法における、請求項 8 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の組成物の使用。

## 【請求項 12】

哺乳動物被験体において、*Neisseria meningitidis* 血清型 B 細菌に対する免疫応答を誘発するための方法であって、該被験体に有効量の請求項 8 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の組成物を投与する工程を包含する、方法。

## 【請求項 13】

50

請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載のペプチドをコードする、ポリヌクレオチド。

【請求項 14】

組換えベクターであって、以下：

(a) 請求項 13 に記載のポリヌクレオチド；および

(b) 該ポリヌクレオチドに作動可能に連結される、少なくとも 1 つの異種制御エレメント、

を含む、組換えベクターであって、該組換えベクターによって、該ポリヌクレオチドが、宿主細胞中で転写および翻訳され得、そして該制御エレメントの少なくとも 1 つが、該ポリヌクレオチドに対して異種である、組換えベクター。

【請求項 15】

請求項 14 に記載の組換えベクターを含む、宿主細胞。

10

【請求項 16】

GNA33 ペプチドを産生するための方法であって、該方法が、タンパク質を産生するための条件下で、請求項 15 に記載の宿主細胞を培養する工程を包含する、方法。

【請求項 17】

*Neisseria meningitidis* 血清型 B 細菌のエピトープの分子模倣物を単離するための方法であって、該方法が、以下：

(a) *Neisseria meningitidis* 血清型 B 細菌のエピトープの推定上の分子模倣物を含む分子の集団を提供する工程；

(b) 該分子の集団を抗 GNA33 抗体と接触させる工程であって、該抗体と該分子模倣物（存在する場合）との間の免疫学的結合を可能にして、複合体を提供する条件下で接触させる工程；および

(c) 非結合分子から該複合体を分離する工程、を包含する、方法。

20

【請求項 18】

生物学的サンプル中で *Neisseria meningitidis* 血清型 B 抗体を検出するための方法における、GNA33 ポリペプチドの使用。

【請求項 19】

生物学的サンプル中で *Neisseria meningitidis* 血清型 B 抗体を検出するための方法における、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の GNA33 ペプチドの使用。

30

【請求項 20】

生物学的サンプル中で *Neisseria meningitidis* 血清型 B 抗体を検出するための方法であって、該方法が、以下：

(a) 生物学的サンプルを提供する工程；

(b) 該生物学的サンプルを GNA33 ポリペプチドと反応させる工程であって、該生物学的サンプル中に存在する場合、*Neisseria meningitidis* 血清型 B 抗体を、該 GNA33 ポリペプチドと結合させて、抗体 / GNA33 ポリペプチド複合体を形成する条件下で反応させる工程、および

(c) 該複合体の存在または非存在を検出する工程であって、それによって、該サンプル中の *Neisseria meningitidis* 血清型 B 抗体の存在または非存在を検出する工程、を包含する、方法。

40

【請求項 21】

生物学的サンプル中の *Neisseria meningitidis* 血清型 B 抗体を検出するための方法であって、該方法が、以下：

(a) 生物学的サンプルを提供する工程；

(b) 該生物学的サンプルを請求項 1 ~ 3 に記載のいずれか 1 項に記載の GNA33 ペプチドと反応させる工程であって、該生物学的サンプル中に存在する場合、*Neisseria meningitidis* 血清型 B 抗体を、該 GNA33 ポリペプチドと結合させ

50

て、抗体 / G N A 3 3 ポリペプチド複合体を形成する条件下で反応させる工程 ; および  
( c ) 該複合体の存在または非存在を検出する工程であって、それによって、該サンプル  
中の *Neisseria meningitidis* 血清型 B 抗体の存在または非存在を  
検出する工程、  
を包含する、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【 0 0 0 1 】

( 技術分野 )

本発明は、一般的には、細菌性病原体に関する。特に、本発明は、*Neisseria meningitidis* 血清型 B ( Men B ) P 1 . 2 血清亜型の P o r A のループ 4 10  
に対する表面に露出したエピトープの分子模倣物およびこの模倣物に対して産生される抗体に関する。

【背景技術】

【 0 0 0 2 】

( 発明の背景 )

*Neisseria meningitidis* は、細菌性の髄膜炎および敗血症の原因物質である。髄膜炎菌は、莢膜抗原および細胞壁抗原の免疫学的特徴に基づいて血清学的な群に分類される。現在認識されている血清型は、A、B、C、W - 1 3 5、X、Y、Z および 2 9 E を含む。血清型特異性の原因である多糖類は、これらの群のいくつかから精製され、A、B、C、W - 1 3 5 および Y が挙げられる。 20

【 0 0 0 3 】

*N. meningitidis* 血清型 B ( 本明細書中で「Men B」または「Nm B」と呼ばれる ) は、アメリカ合衆国およびヨーロッパに居住している未成年者および小児における大部分の細菌性髄膜炎の原因となる。この生物はまた、若年成人における致死的な敗血症を引き起こす。青年では、外膜タンパク質 ( O M P ) 小胞からなる実験的な Men B ワクチンが、幾分防御性である。しかし、ワクチン接種した未成年者 ( 疾患の危険性が最大の年齢層 ) では、防御性は、観察されていない。さらに、O M P ワクチンは、血清型特異性および亜型特異性であり、そして優性 Men B 株は、地理的な変異および時間的な変異の両方に制約され、このようなワクチンの有用性を制限している。 30

【 0 0 0 4 】

効果的な莢膜の多糖類に基づくワクチンは、血清型 A、C、Y および W 1 3 5 によって引き起こされる髄膜炎菌性疾患に対して開発されている。しかし、Men B 多糖類ワクチンを開発する同様な試みは、莢膜 Men B 多糖類 ( 本明細書中で「Men B P S」と呼ばれる ) の乏しい免疫原性に起因して失敗している。Men B P S は、N - アセチル ( 2 - > 8 ) ノイラミン酸のホモポリマーである。*Escherichia coli* K 1 は、同一の莢膜多糖類を有する。Men B P S により誘発される抗体は、宿主のポリシアル酸 ( P S A ) と交差反応する。P S A は、胎児および新生児の組織、特に、脳組織に見られる神経細胞接着分子 (「N C A M」) 上で大量に発現される。P S A はまた、腎臓、心臓および嗅神経を含む成人組織で、より少ない程度に見出される。従って、ほとんどの抗 Men B P S 抗体はまた、自己抗体である。それゆえ、このような抗体は、胎児の発育に悪影響を与えるか、または自己免疫疾患をもたらす可能性を有する。 40

【 0 0 0 5 】

Men B P S 誘導体は、Men B P S の乏しい免疫原性を回避する試みにおいて調製されてきた。例えば、C<sub>3</sub> ~ C<sub>8</sub> N - アシル置換 Men B P S 誘導体が、記載されている。J e n n i n g s らに対する E P 公開番号 5 0 4 , 2 0 2 B を参照のこと。同様に、J e n n i n g s らに対する米国特許第 4 , 7 2 7 , 1 3 6 号は、本明細書中で「N P r - Men B P S」と呼ばれる N - プロピオニル化 Men B P S 分子を記載している。N P r - Men B P S 複合糖質で免疫したマウスが、高い力価の I g G 抗体を誘発することが報告された。J e n n i n g s ら、( 1 9 8 6 ) J . I m m u n o l . 1 3 7 : 1 50

708。ウサギでは、2つの異なる抗体の集団（2つの異なるエピトープと結合されるといわれ、1つは、ネイティブなMenB PSによって共有され、そして1つは共有されていない）を、誘導体を用いて作製した。殺菌活性は、MenB PSと交差反応しない抗体集団で見出された。Jenningsら、(1987) J. Exp. Med. 165: 1207。この結合体によって誘発される防御性抗体と反応する、細菌性表面エピトープの同一性は、未知のままである。さらに、このワクチンによって誘発される抗体の部分集合は、宿主のポリシアル酸と自己反応性を有するので(Granoffら、(1998) J. Immunol. 160: 5028)、ヒトにおけるこのワクチンの安全性は、不確かなままである。

#### 【0006】

これらの試みにも関わらず、従来のアプローチは、安全かつMenB感染に対して広範な防御性を付与し得る抗原の同定に失敗している。

#### 【0007】

種々の病原体に対して防御性の免疫応答を誘発するため、ならびに癌および自己免疫疾患の処置のために、分子模倣性抗原を使用することに、相当な関心が存在する。感染性疾患の予防のためにワクチンを開発するこのアプローチは、名目上の抗原が毒性であるかもしくは精製が困難である場合、または限定した数のエピトープに免疫応答を指向することが望ましい場合、最大の有用性を有する。それにも関わらず、病原体に対する防御性抗体を誘発する模倣性ワクチンの成功を報告する研究は、比較的わずかしかない。

#### 【0008】

MenB PS誘導体に対して指向される多数の機能的に活性な抗体は、米国特許第6,048,527号に記載されている。これらの抗体は、宿主組織と、交差反応しないかまたは最小限に交差反応し、従って、自己免疫疾患を惹起する最小限の危険性をもたらす。米国特許第6,030,619号は、これらの抗体を使用して同定されたMenB PSの固有なエピトープの分子模倣物を記述している。しかし、他のMenB抗原のペプチド模倣物の発見は、相当の関心を残している。

#### 【0009】

MenB (MC58株)の完全なゲノム配列は、記述されている。Tettelinら、Science (2000) 287: 1809。血清殺菌性抗体応答を誘発するいくつかのタンパク質が、全体のゲノム配列決定によって同定されている。これらのタンパク質は、保存された配列を有し、そしてカプセル化されたMenB株上の表面に露出されているようである。Pizzara、Science (2000) 287: 1816。これらのタンパク質の1つは、GNA33 (ゲノム由来の抗原)である。GNA33は、リボタンパク質であり、そして推定されたアミノ酸配列は、E. coliおよびSynecchocystis sp. 由来の膜結合溶解性ムレイントランスグリコシラーゼ (MltA) と相同性を示す。Lommatszschら、J. Bacteriol. (1997) 179: 5465~5470。GNA33は、Neisseria meningitidisの中で高度に保存されている。Pizzara、Science (2000) 287: 1816。組換えGNA33で免疫したマウスは、カプセル化MenB 2996株に対して測定された場合、高い血清殺菌性抗体力価を発生した。抗体応答の大きさは、2996株から調製されたOMP小胞で免疫したコントロール動物の大きさと同様であった。しかし、GNA33が防御性抗体を誘発する機構は、同定されておらず、異なるMenB株に対する防御性応答の寛容も同定されていなかった。

#### 【0010】

MenBに対して安全かつ有効なワクチンの産生が、特に望ましいことが容易に理解される。

#### 【発明の開示】

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0011】

(発明の要旨)

10

20

30

40

50

本発明は、G N A 3 3 が、P 1 . 2 血清型亜型を有する株の P o r A のループ 4 において、表面に露出したエピトープを模倣することによって M e n B に対する保護抗体を誘発するという、思いがけない発見に基づく。このような抗体の機能活性は、本明細書中に記載されるように、ヒトにおける髄膜炎菌性疾患に対して保護する分子因子の能力を予測するインビトロおよびインビボでの機能アッセイを用いることによって評価されている。

#### 【 0 0 1 2 】

従って、一実施形態において、本発明は、M e n B 細菌に対する機能的活性を行う抗体の産生に有用なエピトープを含む、G N A 3 3 ペプチドに関する。このペプチドは、全長未満の G N A 3 3 配列を含む。特に好ましい実施形態において、このペプチドは、アミノ酸配列 Q T P および、必要に応じて、Q T P 配列に対して C 末端または N 末端のいずれかに生じる、さらなる Q T P 配列の前または後ろのフランキング配列（好ましくは 1 ~ 5 0 またはそれ以上であるが全長配列ではない（例えば、1 ~ 3、1 ~ 5、もしくは 1 ~ 1 0 または 1 ~ 2 5 あるいはこれらの範囲間の任意の整数値）アミノ酸）を含む。代表的な G N A 3 3 配列を図 3（配列番号 1）に示す。この Q T P は、図 3 の 1 0 6 ~ 1 0 8 位に生じる。この配列は、種々の M e n B 株（例えば、本明細書中に記載される）が異なるフランキング配列を有するように、図 3 に示されるように、Q T P に隣接する配列に限定されないことが理解される。種々の菌株における P o r A 領域の配列は公知であり、そのいくつかは、表 2 に示される。

10

#### 【 0 0 1 3 】

特定の実施形態において、G N A 3 3 ペプチドは、以下からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む：F Q T P V（配列番号 2）、F Q T P V H S（配列番号 3）、A F Q T P V H S（配列番号 4）、Q A F Q T P V H S（配列番号 5）、A Q A F Q T P V H S（配列番号 6）、A Q A F Q T P V H（配列番号 7）、A Q A F Q T P V（配列番号 8）、Q A F Q T P V H S F（配列番号 9）、A F Q T P V H S F Q（配列番号 1 0）、F Q T P V H S F Q A（配列番号 1 1）、Q T P V H S F Q A K（配列番号 1 2）、D V S A Q A F Q T P（配列番号 1 2）、V S A Q A F Q T P V（配列番号 1 3）および S A Q A F Q T P V H（配列番号 1 4）。

20

#### 【 0 0 1 4 】

他の実施形態において、本発明は、血清学的に異なる外膜タンパク質の他のエピトープを挿入するためのキャリア、ならびに一般的なキャリアとしての、G N A 3 3 ポリペプチドの使用に関する。

30

#### 【 0 0 1 5 】

別の実施形態において、本発明は、これらのペプチドをコードするポリヌクレオチドおよびこのポリヌクレオチドを含む組み換えベクター、このベクターを含む宿主細胞、ならびにこのペプチドを組み換え生成する方法に関する。

#### 【 0 0 1 6 】

なお他の実施形態において、本発明は、G N A 3 3 エピトープに対する抗体に関し、ここで、この抗体は、G N A 3 3 エピトープによって結合され得、そして / または M e n B 細菌に対する機能活性を立証する。さらに以下に説明されるように、本明細書中に記載されるアッセイを用いて決定されるように、この抗体分子が M e n B に対して補体が媒介する殺菌活性および / またはオプソニン活性を示す場合、抗体は、M e n B 生物に対する機能活性を示す。代表的な G N A 3 3 エピトープとしては、Q T P、F Q T P V（配列番号 2）、F Q T P V H S（配列番号 3）、A F Q T P V H S（配列番号 4）、Q A F Q T P V H S（配列番号 5）、A Q A F Q T P V H S（配列番号 6）、A Q A F Q T P V H（配列番号 7）、A Q A F Q T P V（配列番号 8）、Q A F Q T P V H S F（配列番号 9）、A F Q T P V H S F Q（配列番号 1 0）、F Q T P V H S F Q A（配列番号 1 1）、Q T P V H S F Q A K（配列番号 1 2）、D V S A Q A F Q T P（配列番号 1 2）、V S A Q A F Q T P V（配列番号 1 3）および S A Q A F Q T P V H（配列番号 1 4）が挙げられる。

40

#### 【 0 0 1 7 】

50

本発明の別の実施形態は、G N A 3 3 エピトープに対するモノクローナル抗体およびそれらのモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマに関する。好ましくは、このモノクローナル抗体は、M e n B 生物に対する機能活性を示す。

【0018】

本発明のなおさらなる実施形態は、M e n B のエピトープのさらなる分子模倣物 ( m i m e t i c ) を単離するための方法およびこの方法を用いて同定される分子模倣物に関する。この方法は、以下の工程を包含する：

- ( a ) M e n B のエピトープの推定分子模倣物を含む分子集団を提供する工程；
- ( b ) 存在する場合、複合体を提供するために、抗体および分子模倣物の間の免疫学的結合を可能にする条件下で、この分子集団を、本明細書中に記載される抗体と接触させる工程；および
- ( c ) 非結合分子から複合体を分離する工程。

【0019】

別の実施形態において、本発明は、薬学的に受容可能な賦形剤と組み合わせて、G N A 3 3、または上記のようなエピトープを含むG N A 3 3 のペプチドを含む組成物に関する。

【0020】

なお別の実施形態において、本発明は、薬学的に受容可能な賦形剤と組み合わせて、G N A 3 3 ポリペプチドに対する抗体を含む組成物に関する。

【0021】

別の実施形態において、本発明は、哺乳動物被験体におけるN e i s s e r i a m e n i n g i t i d i s 血清型Bに対する免疫応答を誘発する方法に関し、この方法は、被験体に対し、上記のようなG N A 3 3 ペプチドを投与する工程を包含する。

【0022】

別の実施形態において、本発明は、哺乳動物被験体においてM e n B 疾患を処置または予防するための方法に関し、この方法は、有効量の上記組成物を被験体に投与する工程を包含する。

【0023】

別の実施形態において、本発明は、生物学的サンプル中のN e i s s e r i a m e n i n g i t i d i s 血清型B抗体を検出するための方法に関し、この方法は、以下の工程を包含する：

- ( a ) 生物学的サンプルを提供する工程；
- ( b ) N e i s s e r i a m e n i n g i t i d i s 血清型B抗体を、上記生物学的サンプル中に存在する場合、G N A 3 3 ポリペプチドに結合し得る条件下で、生物学的サンプルをG N A 3 3 ポリペプチドと反応させ、抗体 / G N A 3 3 ポリペプチド複合体を形成する工程；および
- ( c ) この複合体の存在または非存在を検出し、これによって、サンプル中のN e i s s e r i a m e n i n g i t i d i s 血清型B抗体の存在または非存在を検出する工程。

【0024】

代表的なG N A 3 3 ポリペプチドとしては、以下からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、G N A 3 3 ペプチドが挙げられる：Q T P、F Q T P V ( 配列番号2 )、F Q T P V H S ( 配列番号3 )、A F Q T P V H S ( 配列番号4 )、Q A F Q T P V H S ( 配列番号5 )、A Q A F Q T P V H S ( 配列番号6 )、A Q A F Q T P V H ( 配列番号7 )、A Q A F Q T P V ( 配列番号8 )、Q A F Q T P V H S F ( 配列番号9 )、A F Q T P V H S F Q ( 配列番号10 )、F Q T P V H S F Q A ( 配列番号11 )、Q T P V H S F Q A K ( 配列番号12 )、D V S A Q A F Q T P ( 配列番号12 )、V S A Q A F Q T P V ( 配列番号13 ) およびS A Q A F Q T P V H ( 配列番号14 )。

【0025】

本発明のこれらまたは他の実施形態は、本明細書中の開示を考慮して、当業者に容易になされ得る。

10

20

30

40

50

## 【0026】

(本発明の詳細な説明)

本発明の実施は、他に示されなければ、免疫学、微生物学および分子生物学の慣習的な技術を使用し、これらは当該分野の技術の範囲内である。このような技術は以下の文献で十分説明されている。例えば、Sambrookら、*Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (第2版、1989); SambrookおよびRussell、*Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2001); MorrisonおよびBoyd、*Organic Chemistry* (第3版、1973); CareyおよびSundberg、*Advanced Organic Chemistry* (第2版、1985); Smith, M. B., *Organic Synthesis* (1994); Perbal, *A Practical Guide to Molecular Cloning* (1984); および *Handbook of Experimental Immunology*, 第I巻 - 第IV巻 (D. M. Weir および C. C. Blackwell 編、1986, Blackwell Scientific Publications) を参照のこと。

10

## 【0027】

本明細書中および添付の特許請求の範囲において使用される場合、単数形態「a」「an」「the」は、他に指示されなければ、複数の言及を含む。

## 【0028】

(I. 定義)

20

本発明の記載において、以下の用語が使用され、そして以下に示されるように定義されることが意図される。

## 【0029】

「GNA33ポリペプチド」とは、GNA33タンパク質由来のポリペプチドを意味し、このポリペプチドは、MenBに対する免疫学的応答（例えば、以下に示すようなMenB細菌に対する機能的活性を実証する抗体の産生）を誘発し得る。この用語は、GNA33由来の個々の高分子または抗原性高分子の相同性集団もしくは異種集団を示すために用いられ得る。本発明の目的のために、GNA33ポリペプチドは、種々の公知のMenB株のいずれかから誘導され得る。2996株についてのGNA33配列を、図3（配列番号1）に示す。しかし、他のMenB株由来の多数のGNA33配列が知られている。例えば、GenBank登録番号C81244、B82023、AF226395、AF226392、AF226390、AF226403、AF226413、AF226412、AF226387、AF226409、AF22641、AF226397、AF226389、AF226393、AF226416、AF226414、AF226402、AF226404、AF235145、AF235144、AF235143、*Neisseria meningitidis*; E83491、*Pseudomonas aeruginosa* (PAO1株); AF300471、*Zymomonas mobilis*; AAK85834、*Agrobacterium tumefaciens*; CAC41396、*Sinorhizobium meliloti*; AAK25702、*Caulobacter crescentus*; S76334、*Synechocystis* sp. (PCC 6803株); AAK03012、*Pasteurella multocida*; Q9KPQ4、*Vibrio cholerae*; AAB40463、AAC45723、P46885、*Escherichia coli*; P57531、*Buchnera aphidicola* (*Acyrtosiphon pisum*); NP143714、*Pyrococcus horikoshii* を参照のこと。

30

40

## 【0030】

本明細書中に使用される場合、「GNA33ポリペプチド」はまた、シグナル配列（図3のアミノ酸1～21）を有するか、またはそれを有さない、全長GNA33参照配列を含む、ネイティブのGNA33配列由来の分子、および組換え産生または化学合成されたG

50



N A 3 3 ポリペプチド、ならびに下記のように免疫原性を保持する G N A 3 3 ペプチドを含む。

#### 【 0 0 3 1 】

用語「アナログ」とは、参照分子の誘導体をいう。アナログは、上記のような、生物学的活性（例えば、M e n B に対する機能的活性を有する抗体の形成を誘発する能力）を保持し得る。一般に、用語「アナログ」とは、改変が活性を損なわない限りにおける、ネイティブの分子に対して 1 以上のアミノ酸の付加、（一般的には、性質が保存される）置換、および/または欠失を有するネイティブのポリペプチドの配列および構造を有する化合物をいう。好ましくは、アナログは、親分子と少なくとも同じ生物学的活性を有し、そして親分子よりも増強された活性さえ示し得る。ポリペプチドアナログを作製するための方法は、当該分野において公知であり、以下にさらに記載される。

10

#### 【 0 0 3 2 】

例えば、アナログは、一般的には、参照分子に対して少なくとも約 5 0 % のアミノ酸同一性を有し、より好ましくは、問題のネイティブペプチド配列の関連する部分に対して約 7 5 ~ 8 5 % の同一性、そして最も好ましくはそれに対して約 9 0 ~ 9 5 % 以上の同一性を有する。そのアミノ酸配列は、約 1 0 ~ 7 5 アミノ酸以下の置換を有するか、約 5 ~ 5 0 アミノ酸以下の置換を有するか、または 1、2、3 もしくは 5 つまでの置換有するのみであるか、あるいは上記の範囲の間の任意の置換を有する。特に好ましい置換は、一般に、性質を保存する（すなわち、これらの置換は、アミノ酸のファミリー内で起こり得る）。この事について、アミノ酸は、一般的に、以下の 4 つのファミリーに分類される：（ 1 ）酸性 - - アスパラギン酸およびグルタミン酸；（ 2 ）塩基性 - - リジン、アルギニン、ヒスチジン；（ 3 ）非極性 - - 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、；ならびに（ 4 ）非荷電極性 - - グリシン、アスパラギン、グルタミン、システイン、セリン、トレオニン、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、しばしば、芳香族アミノ酸として分類される。例えば、ロイシンとイソロイシンまたはバリンとの単発的置換、またはその逆；アスパラギン酸とグルタミン酸との単発的置換またはその逆；トレオニンとセリンとの単発的置換またはその逆；あるいは、アミノ酸と、構造的に関連するアミノ酸との類似の保存的置換が、その活性に対する主要な効果を有さないことは、理論的に予想できる。従って、参照分子と本質的に同じアミノ酸配列を有するが、そのタンパク質の免疫原性に実質的に影響しない、主要でないアミノ酸置換を有するタンパク質は、G N A 3 3 ポリペプチドの定義の範囲内である。当業者は、本明細書中で規定される生物学的活性を保持するという理論的な見こみをもって改変され得る目的の分子の領域を容易に決定し得る。

20

30

#### 【 0 0 3 3 】

「G N A 3 3 ペプチド」とは、全長に満たない問題の参照 G N A 3 3 分子を含み、かつ以下に規定される少なくとも 1 つのエピトープを含む、本明細書中に記載される G N A 3 3 ポリペプチドである。従って、G N A 3 3 ペプチドを含む組成物は、全長分子の一部を含むが、問題の G N A 3 3 ペプチドの全ては含まない。G N A 3 3 ペプチドの非限定の例としては、Q T P、F Q T P V（配列番号 2）、F Q T R V H S（配列番号 3）、A F Q T P V H S（配列番号 4）、Q A F Q T P V H S（配列番号 5）、A Q A F Q T P V H S（配列番号 6）、A Q A F Q T P V H（配列番号 7）、A Q A F Q T P V（配列番号 8）、Q A F Q T P V H S F（配列番号 9）、A F Q T P V H S F Q（配列番号 10）、F Q T P V H S F Q A（配列番号 11）、Q T P V H S F Q A K（配列番号 12）、D V S A Q A F Q T P（配列番号 12）、V S A Q A F Q T P V（配列番号 13）および S A Q A F Q T P V H（配列番号 14）が挙げられる。

40

#### 【 0 0 3 4 】

M e n B の「分子模倣物」とは、M e n B 細菌上で発現される少なくとも 1 つのエピトープを機能的に模倣する分子である。そのような分子模倣物は、ワクチン組成物として、および以下にさらに記載されるような、診断適用または治療適用のための抗体の誘発に有用である。分子模倣物としては、以下：低分子有機化合物、核酸および核酸誘導体；多糖ま

50

たはオリゴ糖；ペプチド、タンパク質およびそれらの誘導体を含むペプチド模倣物（例えば、非ペプチド有機部分を含有するペプチド、合成ペプチド（これらはアミノ酸結合および/またはペプチド結合を保有していても、保有してなくてもよいが、ペプチドリガンドの構造的特徴および機能的特徴を保持している））；ピロリジン；ペプトイドおよびオリゴペプトイド（これらはN置換グリシン（例えば、Simonら、(1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 9367により記載されるN置換グリシン）を含む分子である）ならびに抗体（抗イディオタイプ抗体を含む）が挙げられるが、これらに限定されない。分子模倣物を同定および産生するための方法が、以下により詳細に記載される。

#### 【0035】

10

用語「抗体」は、ポリクローナル抗体調製物およびモノクローナル抗体調製物、ならびにハイブリッド抗体、変更された抗体、ヒト化抗体、 $F(ab')_2$ フラグメント、 $F(ab)$ 分子、 $Fv$ フラグメント、ファージ上に提示された単鎖フラグメント改変体（ $scFv$ ）、単ドメイン抗体、キメラ抗体および本発明の抗体分子の免疫学的結合特性を示すそれらの機能性フラグメントを含む調製物を包含する。

#### 【0036】

本明細書中で使用される場合、「モノクローナル抗体」とは、相同性抗体集団を有する抗体組成物をいう。この用語は、それが作製される様式により限定されない。この用語は、免疫グロブリン分子、ならびに $Fab$ 分子、 $F(ab')_2$ フラグメント、 $Fv$ フラグメント、ファージ上に提示された単鎖フラグメント改変体（ $scFv$ ）、ヒト化抗体および本発明のモノクローナル抗体分子の免疫学的結合特性を示す他の分子を包含する。ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体を作製する方法は、当該分野において公知であり、そして以下により十分に記載される。

20

#### 【0037】

「エピトープ」とは、特異的なB細胞およびT細胞が応答する抗原上の部位を意味する。この用語はまた、「抗原決定基」または「抗原決定部位」と互換的に使用され得る。タンパク質、多糖、またはその他の生体ポリマー上のB細胞エピトープ部位は、折りたたみによって同時に送達される高分子の異なる部分由来の部分で構成され得る。この種のエピトープは、コンフォメーションエピトープまたは不連続なエピトープとして参照される。なぜなら、この部位は、そのポリマーが直鎖状配列においては不連続だが、折りたたまれたコンフォメーションにおいて連続的であるポリマーのセグメントからなるためである。生体ポリマーまたは他の分子の単一セグメントからなるエピトープは、連続的エピトープまたは直鎖状エピトープと呼ばれる。T細胞エピトープは、一般的に、直鎖状のペプチドに切断される。ペプチドエピトープは、このエピトープに特異的な空間的なコンフォメーションの5以上のアミノ酸を含み得る。一般的に、エピトープは、少なくとも5～8のそのようなアミノ酸からなり、より一般には、少なくとも8～10以上のそのようなアミノ酸からなる。アミノ酸の空間的コンフォメーションを決定する方法は、当該分野において公知であり、例えば、X線結晶解析および二次元核磁気共鳴分光法を含む。

30

#### 【0038】

エピトープは、任意の多くの当該分野において周知のエピトープマッピング技術を用いて同定され得る。例えば、*Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology*, Vol. 66 (Glenn E. Morris編、1996) Humana Press, Totowa, New Jerseyを参照のこと。例えば、直鎖状エピトープは、例えば、固体支持体上に多数のペプチドを同時に合成し（これらのペプチドは、タンパク質分子の部分に対応する）そしてこれらのペプチドがなお、支持体に付着されている状態で、これらのペプチドと抗体とを反応させることによって決定される。そのような技術は、当該分野において公知であり、例えば、米国特許第4,708,871号；Geysenら(1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 3998-4002；Geysenら、(1986) *Molec. Immunol.* 23: 709-715（これらのすべては

40

50

、その全体が本明細書中に参考として援用される)に記載される。同様に、コンフォメーションエピトープは、例えば、X線結晶学および二次元核磁気共鳴分光法により、アミノ酸の空間的コンフォメーションを決定することによって容易に同定される。例えば、Epitope Mapping Protocols (前出)を参照のこと。例えば、Kyteら、J. Mol. Biol. (1982) 157: 105 - 132; ならびにHoppおよびWoods、Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1981) 78: 3824 - 3828に記載されるように、20のアミノ酸の各々の疎水特性および親水特性を利用して、タンパク質のアミノ酸配列からヒドロパシー(hydrophathy)スケールを公式化するコンピュータプログラムもまた用いられて、所定の分子の抗原性部分を決定し得る。例えば、HoppおよびWoodの技術は、各々のアミノ酸に複数の親水性値を割り当て、次いでペプチド鎖に沿って、反復的にこれらの値を平均する。局所的平均親水性の最も高い点は、その分子の抗原性部分を示す。

10

#### 【0039】

抗体は、その抗体分子が補体により媒介される細菌活性を示し、そして/または本明細書中に記載されるアッセイを用いて決定されるようなMenBに対するオプソニン活性を示す場合に、MenB生物に対する「機能的活性」を示す。

#### 【0040】

ポリペプチドまたはポリヌクレオチドに対していう場合、「精製された」または「単離された」とは、同じ型の他の生体高分子の実質的非存在下で、指示された分子が存在することを意味する。本明細書中で使用される場合、用語「精製された」とは、同じ型の生物学的高分子が、好ましくは少なくとも75重量%、より好ましくは少なくとも85重量%、なおより好ましくは少なくとも95重量%、そして最も好ましくは少なくとも98重量%が存在することを意味する。特定のポリペプチドをコードする「単離された」ポリヌクレオチドとは、目的のポリペプチドをコードしない他の核酸分子を実質的に含まない核酸分子をいう;しかし、この分子は、その組成物の塩基特性に有害な影響を与えない幾分かの追加の塩基または部分を含み得る。

20

#### 【0041】

「組換えGNA33ポリペプチド」とは、上記の技術を用いて測定される生物学的活性を有し、本明細書中に記載されるような組換えDNA技術により調製される、GNA33ポリペプチドが意図される。一般的に、所望のGNA33ポリペプチドをコードする遺伝子は、以下でさらに記載されるように、クローニングされ、次いで形質転換された生物中で発現される。宿主生物は、発現条件下で、外来遺伝子を発現してGNA33ポリペプチドを産生する。組換え的に調製される場合、本発明のポリペプチドは、通常細胞中に存在する他の分子の非存在下で産生され得る。例えば、組換え非MenB宿主細胞により産生される唯一のMenBタンパク質は、組換えGNA33ポリペプチドであるので、MenBタンパク質汚染のいかなる痕跡もないGNA33ポリペプチド組成物は、容易に得ることができる。

30

#### 【0042】

本明細書中で使用される場合、用語「ポリヌクレオチド」または「核酸分子」とは、任意の長さのリボヌクレオチドまたはデオキシリボヌクレオチドのいずれかの、ヌクレオチドの重合体形態をいう。この用語は、この分子の1次構造のみをいい、従って、二本鎖および一本鎖のDNAおよびRNAを含む。それはまた、公知の型の改変、例えば、当該分野において公知の標識、メチル化、「キャップ」、天然に存在する1つ以上のヌクレオチドとアナログとの置換、例えば、非荷電の連結(例えば、メチルホスフェート、ホスホトリエステル、ホスホアミデート、カルバメート等)および荷電された連結(例えば、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート等)を有する内部ヌクレオチド改変、例えば、タンパク質(例えば、ヌクレアーゼ、毒素、抗体、シグナルペプチド、ポリリジン等を含む)のようなペンダント基を有する改変、インターカレーター(intercalator)(例えば、アクリジン、ソラレン等)での改変、キレート(例えば、金属、放射性金属、ホウ素、酸化金属等)を含む改変、アルキル化剤(alkylator)を含む改変、

40

50

改変された連結（例えば、アノマー核酸等）での改変、ならびに改変されていない形態のポリヌクレオチドもまた含む。

【0043】

本明細書中で使用される用語「組換えDNA分子」または「組換えポリヌクレオチド」は、ゲノム起源のポリヌクレオチド、cDNA起源のポリヌクレオチド、半合成起源ポリヌクレオチド、または合成起源のポリヌクレオチドをいい、それらは、その起源または操作によって、以下：（１）それが天然で会合するポリヌクレオチドの全てまたは一部と会合していないか、（２）それが天然で連結するポリヌクレオチド以外のポリヌクレオチドに連結しているか、（３）天然に存在しないポリヌクレオチドである。従って、この用語は、「合成により誘導された」核酸分子を包含する。

10

【0044】

「コード配列」とは、適切な調節配列の制御下に配置される場合に、通常、mRNAを介して、ポリペプチドへと翻訳される核酸分子である。コード配列の境界は、5'末端の翻訳開始コドンおよび3'末端の翻訳終結コドンにより決定され得る。コード配列としては、cDNAおよび組換えヌクレオチド配列が挙げられ得るが、これらに限定されない。

【0045】

「制御配列」とは、それらが連結しているコード配列の発現をもたらすのに必要な核酸配列をいう。そのような制御配列の性質は、宿主生物に依存して異なる；原核生物において、そのような制御配列は、一般的に、プロモーター、リボソーム結合部位、および転写終結配列を含む；真核生物において、そのような制御配列は、プロモーターおよび転写終結配列を含む。用語「制御配列」とは、最小で、コード配列の発現に必要な全ての成分を含み、そして追加の成分（例えば、リーダー配列および融合パートナー配列）も含み得ることが意図される。

20

【0046】

制御エレメント（例えば、プロモーター）は、RNAポリメラーゼがこのプロモーターに結合し、そしてコード配列をmRNAに転写するときに細胞内のコード配列の「転写を指向し」、次いでこのmRNAは、そのコード配列によりコードされるポリヌクレオチドへと翻訳される。

【0047】

「作動可能に連結される」とは、そのように記載された成分が、それらの意図された様式にて機能することを可能にする関係にある近位をいう。コード配列に「作動可能に連結される」制御配列は、コード配列の発現が、制御配列と適合する条件下で達成されるような方法にて連結される。制御エレメントは、そのコード配列の発現を方向づけるように機能する限り、コード配列と連続している必要はない。従って、例えば、介在する、翻訳されないが転写される配列は、プロモーターとコード配列との間に存在し得、そのプロモーターは、コード配列に「作動可能に連結される」と考えられ得る。

30

【0048】

本明細書中で使用される場合、用語「発現カセット」とは、制御配列（これは、コード配列のクローニングされたコピーの転写および適切な宿主細胞におけるmRNAの翻訳に必要な全てのヌクレオチド配列を含む）に作動可能に連結される少なくとも1つのコード配列を含む分子をいう。このような発現カセットは、細菌、藍藻類、植物細胞、酵母細胞、昆虫細胞および動物細胞のような種々の宿主において真核生物遺伝子を発現させるために使用され得る。本発明において、発現カセットとしては、クローニングベクター、具体的に指定されたプラスミド、ウイルスまたはウイルス粒子が挙げられ得るが、これらに限定されない。このカセットは、宿主細胞中での自律複製のための複製起点、選択マーカー、種々の制限部位、高コピー数のための能力および強いプロモーターをさらに含み得る。

40

【0049】

「ベクター」とは、プラスミド、ファージ、トランスポゾン、コスミド、染色体、ウイルスなどのような任意の遺伝エレメントを意味する。これらは、適切な制御エレメントと関連づけられた場合に複製し得、細胞間で遺伝子配列を移動させ得る。従って、この用語は

50

、クローニングベヒクルおよび発現ベヒクル、ならびにウイルスベクターを含む。

【0050】

細胞は、ポリヌクレオチドが細胞膜内部に挿入された場合に外因性ポリヌクレオチドにより「形質転換される」。この外因性ポリヌクレオチドは、細胞のゲノムを構成する染色体DNAに組み込まれても（共有結合されても）よいし、されなくてもよい。原核生物細胞および酵母において、例えば、外因性DNAは、エピソードエレメント（例えば、プラスミド）上で維持され得る。真核生物細胞に関して、安定に形質転換された細胞は、外因性DNAが染色体複製を通じて娘細胞により遺伝されるように染色体へと組み込まれた細胞である。この安定性は、真核生物細胞が、この外因性DNAを含む細胞株または娘細胞の集団から構成されるクローンを樹立する能力により示される。

10

【0051】

「宿主細胞」は、形質転換された細胞または外因性核酸分子により形質転換され得る細胞である。

【0052】

「同一性」とは、2つのポリヌクレオチド間または2つのポリペプチド部分間での同一性%をいう。2つのDNA、または2つのポリペプチドの配列が、その分子の規定の長さにより、少なくとも約50%、好ましくは、少なくとも約75%、より好ましくは、少なくとも約80~85%、好ましくは、少なくとも約90%、そしてもっとも好ましくは、少なくとも約95~98%の配列同一性を示すか、または特定の範囲の間で任意の同一性%を示す場合、これら2つのDNA、または2つのポリペプチド配列は、互いに「実質的に同じ」である。本明細書中で使用される場合、実質的に相同な、はまた、特定のDNA配列または特定のポリペプチド配列に対して完全な同一性を示す配列をいう。

20

【0053】

概して、「同一性」とは、2つのポリヌクレオチド配列または2つのポリペプチド配列に、それぞれ、正確なヌクレオチド間の対応またはアミノ酸間の対応があることをいう。同一性%は、2つの分子の配列を整列させ、この2つの整列された配列間の正確なマッチ数を係数し、短い方の配列の長さで除し、結果に100をかけることによるこれら分子間の配列情報の直接比較により決定され得る。整列は、目的の配列と同一数のアミノ酸を有する配列を用いて行われ得る。

【0054】

好ましくは、天然に存在するタンパク質改変体または天然に存在しないタンパク質改変体は、図3（配列番号1）に由来する特定のGNA33ポリペプチドと、少なくとも70%、80%、85%、90%、92%または95%以上同一のアミノ酸配列を有する。より好ましくは、この分子は、98%または99%同一である。配列同一性%は、ギャップオープンペナルティー12およびギャップ伸長ペナルティー2、BLOSUMマトリクス62による、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を使用して決定される。このSmith-Waterman相同性検索アルゴリズムは、SmithおよびWaterman, Adv. Appl. Math. 2: 482-489 (1981)において教示される。

30

【0055】

あるいは、相同性は、相同領域間で安定な二重鎖を形成する条件下でポリヌクレオチドのハイブリダイゼーション、続いて一本鎖特異的ヌクレアーゼでの消化、および消化したフラグメントのサイズ決定により決定され得る。実質的に相同なDNA配列は、例えば、特定の系について規定されるストリンジェントな条件下で、サザンハイブリダイゼーション実験において同定され得る。適切なハイブリダイゼーション条件を規定することは、当該分野の技術範囲内である。例えば、Sambrookら（前出）；DNA Cloning（前出）；Nucleic Acid Hybridization（前出）を参照のこと。

40

【0056】

用語「有効量」または「薬学的に有効な量」とは、非毒性であるが、所望の生物学的結果

50

を提供するに十分な薬剤の量をいう。その結果は、本明細書中のアッセイを使用して決定される、MenBに対する機能的活性を有する抗体の生成であり得る。さらに、その量は、髄膜炎菌性疾患の症状、徴候または原因の軽減および/または改善を引き起こすに十分であり得る。任意の個々の症例における適切な「有効」量は、慣用的な実験法を使用して、当業者により決定され得る。

#### 【0057】

「薬学的に受容可能な」または「薬理学的に受容可能な」とは、生物学的でない、さもなければ所望でない材料を意味する。すなわち、その材料は、所望でない生物学的効果を引き起こすことも、含まれる組成物の成分のいずれによっても有害な様式にて相互作用することなく、個体に投与され得る。

10

#### 【0058】

「生理学的pH」または「生理学的範囲のpH」とは、約7.2~8.0の範囲のpH、より代表的には、約7.2~7.6の範囲のpHを意味する。

#### 【0059】

本明細書中で使用される場合、用語「哺乳動物」としては、哺乳動物網の任意のメンバー：ヒト、非ヒト霊長類（例えば、チンパンジー）、および他のサル（ape）およびサル（monkey）種：家畜（farm animal）（例えば、ウシ、ウマ、ヒツジ、ヤギ、ブタ）；ペット（domestic animal）（例えば、ウサギ、イヌ、およびネコ）；実験動物（ラット、マウスおよびモルモットなどのような齧歯類を含む）が挙げられるが、これらに限定されない。この用語は、特定の年齢も性別も意味しない。

20

#### 【0060】

本明細書中で使用される場合、用語「免疫学的に結合（する）」および「免疫学的な結合特性」とは、免疫グロブリン分子と抗原（これに、その免疫グロブリンが特異的である）との間に生じる、非共有結合的相互作用の型をいう。

#### 【0061】

本明細書中で使用される場合、「生物学的サンプル」とは、被験体から単離された組織または流体のサンプル（このサンプルとしては、例えば、血液、血漿、血清、糞便、尿、骨髄、胆汁、髄液、リンパ液、皮膚サンプル、皮膚、呼吸管、腸管および尿生殖管の外分泌物、涙、唾液、乳汁、血球、器官、生検が挙げられるが、これらに限定されない）そしてまた、インビトロの細胞培養物の構成成分のサンプル（このサンプルとしては、培養培地中の細胞および組織（例えば、組換え細胞）および細胞成分の増殖から得られた馴化培地が挙げられるが、これらに限定されない）をいう。

30

#### 【0062】

本明細書中で使用される場合、用語「標識」および「検出可能な標識」とは、検出し得る分子をいい、これらとしては、放射活性同位体、蛍光剤（fluorescer）、化学発光剤（chemiluminescer）、酵素、酵素基質、酵素補因子、酵素インヒビター、発色団、色素、金属イオン、金属ゾル、リガンド（例えば、ビオチンまたはハプテン）などが挙げられるが、これらに限定されない。用語「蛍光分子」とは、検出可能な範囲にて蛍光を示し得る物質またはその部分をいう。本発明において使用され得る標識の特定の例としては、フルオレセイン、ローダミン、ダンシル、ウンベリフェロン、テキサスレッド、ルミノール、NADPH、および - ガラクトシダーゼが挙げられる。

40

#### 【0063】

（II. 本発明を実施する態様）

本発明は、GNA33（E.coli ムレイントランスグリコシラーゼと相同性を有するリボタンパク質）が、血清型P1.2の株においてPorAのループ4上のエピトープを模倣する結果として、防御抗体を惹起するという発見に基づく。GNA33は、生細菌では表面に露出していないが、細胞質周辺腔に位置する。重複ペプチドを使用した殺菌性抗GNA33 mAbのエピトープマッピングにより、このmAbがGNA33由来のペプチドおよびPorA（結合に必要なQTP配列を共有する）由来のペプチドを認識することが示される。フローサイトメトリーにより、抗GNA33 mAbは、コントロール

50

抗 P o r A ( P 1 . 2 ) m A b と同様に、P 1 . 2 血清型の大部分の M e n B 株の細菌表面に結合する。抗 G N A 3 3 抗体は、P 1 . 2 株でチャレンジした新生仔ラットにおいて受動性防御を付与する。従って、G N A 3 3 は、P o r A に対する防御抗体を惹起する新規な模倣物である。P o r A とは異なり、G N A 3 3 は、投与された場合、タンパク質を再生する必要性なくして防御抗体を惹起する。本明細書中において本発明者らは、G N A 3 3 が今日までに同定されたもっとも強力な模倣抗原のうちの 1 つであることを発見した。

#### 【 0 0 6 4 】

G N A 3 3 が、P o r A P 1 . 2 エピトープの免疫学的模倣を示すという発見は、P 1 . 2 株（これは、米国における血清型 B 単離株の約 8 % を示す（T o n d e l l a ら、J . C l i n . M i c r o b i o l . ( 2 0 0 0 ) 3 8 : 3 3 2 3 - 3 3 2 8 ））により引き起こされる疾患の予防のためのワクチンにおける使用についての G N A 3 3 の有用性を立証する。さらに、他の P o r A ループを G N A 3 3 または G N A 3 3 のサブドメインに弛緩することにより、髄膜炎菌の多価ワクチンにおける抗原として有用な他の血清型 P o r A エピトープの免疫学的模倣物を生成することが可能である。このようなワクチンは、組換え P o r A に基づくワクチンを超える多くの利点を有する。例えば、このようなワクチンの調製は、界面活性剤による抽出も、再折りたたみも、脂質ビヒクル中での再構成もする必要なく、従来のように非感染性 E . c o l i において大量に発現され得る r G N A 3 3 として非常に簡単にされる。また、疾患を引き起こす新たに出現した N m B 株由来の P o r A 変体のエピトープ含有セグメントは、必要に応じて、G N A 3 3 に置換され得る。

10

20

#### 【 0 0 6 5 】

従って、G N A 3 3 ポリペプチド、G N A 3 3 ペプチド、G N A 3 3 抗体および他の M e n B 模倣物は、診断試薬として、および / または M e n B 疾患を予防するための組成物中で使用され得る。G N A 3 3 に対して調製される抗体は、M e n B 細菌に対する機能的活性を示し、ここで、機能的活性は、M e n B 疾患に対する防御を付与する際に重要である。この抗体は、アイソタイプに関して、抗原的特異性および機能的活性が十分に特徴づけられ得る。

#### 【 0 0 6 6 】

本発明での使用のための G N A 3 3 ポリペプチドは、当該分野で公知の技術を使用して、このポリペプチドを生成する細菌から直接単離され得る。あるいは、このポリペプチドは、ペプチド分野の当業者に公知のいくつかの技術のいずれかにより、化学合成され得る。例えば、固相ペプチド合成技術については、J . M . S t e w a r t および J . D . Y o u n g , S o l i d P h a s e P e p t i d e S y n t h e s i s ( P i e r c e C h e m i c a l C o . , R o c k f o r d , I L , 1 9 8 4 ) ならびに G . B a r a n y および R . B . M e r r i f i e l d , T h e P e p t i d e s : A n a l y s i s , S y n t h e s i s , B i o l o g y , E . G r o s s および J . M e i e n h o f e r 編 , 第 2 巻 ( A c a d e m i c P r e s s , N e w Y o r k , 1 9 8 0 ) , p p . 3 - 2 5 4 、ならびに従来の溶液合成については、M . B o d a n s k y , P r i n c i p l e s o f P e p t i d e S y n t h e s i s ( S p r i n g e r - V e r l a g , B e r l i n 1 9 8 4 ) ならびに E . G r o s s および J . M e i e n h o f e r 編 , T h e P e p t i d e s : A n a l y s i s , S y n t h e s i s , B i o l o g y , 第 1 巻を参照のこと。本発明のポリペプチドはまた、同時に複数のペプチドを合成する方法により化学的に調製され得る。例えば、H o u g h t e n P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A ( 1 9 8 5 ) 8 2 : 5 1 3 1 - 5 1 3 5 ; 米国特許第 4 , 6 3 1 , 2 1 1 号を参照のこと。

30

40

#### 【 0 0 6 7 】

好ましくは、ポリペプチドは、分子生物学の標準的な技術を使用して、このポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの発現により組換え生成される。例えば、上記の分子をコードするポリヌクレオチド配列は、例えば、その遺伝子を発現する細菌に由来する、c D

50

NAライブラリーおよびゲノムライブラリーをスクリーニングするか、またはこの遺伝子を含むことが公知のベクターからこの遺伝子を得ることにより、組換え方法を使用して得られ得る。さらに所望の遺伝子は、この遺伝子を含む細胞から、標準的な技術（例えば、フェノール抽出およびcDNAまたはゲノムDNAのPCR）を使用して、直接単離され得る。例えば、DNAを獲得および単離するために使用される技術の記載については、Sambrookら（前出）を参照のこと。目的の遺伝子はまた、クローニングされるよりむしろ、合成により生成され得る。この分子は、特定の配列についての適切なコドンを使用して設計され得る。次いで、完全な配列は、標準的な方法により調製される重複オリゴヌクレオチドから組み立てられ、完全なコード配列へと組み立てられる。例えば、Edg  
e (1981) Nature 292: 756; Nambairら (1984) Science 223: 1299; およびJayら (1984) J. Biol. Chem. 259: 6311を参照のこと。 10

#### 【0068】

従って、特定のヌクレオチド配列は、所望の配列を有するベクターから得られ得るか、または当該分野で公知の種々のオリゴヌクレオチド合成技術（例えば、適切な場合、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）技術）を使用して完全にまたは一部合成され得る。例えば、Sambrookら（前出）を参照のこと。特に、所望の配列をコードするヌクレオチド配列を得る1つの方法は、従来の自動化ポリヌクレオチド合成機にて生成された重複合成オリゴヌクレオチドの相補的なセットをアニーリングさせ、続いて、適切なDNAリガーゼと連結し、連結したヌクレオチド配列を、PCRを介して増幅させることによる。例えば、Jayaramanら (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 4084 - 4088を参照のこと。さらに、オリゴヌクレオチド特異的合成（Jonesら (1986) Nature 54: 75 - 82）、すでに存在するヌクレオチド領域のオリゴヌクレオチド特異的変異誘発（Riechmannら (1988) Nature 332: 323 - 327およびVerhoevenら (1988) Science 239: 1534 - 1536）、およびギャップ形成されたオリゴヌクレオチド（gapped oligonucleotide）のT<sub>4</sub> DNAポリメラーゼを使用した酵素的充填（Queenら (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 10029 - 10033）は、改変された抗原結合能力または増強された抗原結合能力を有する分子を提供するために、本発明にて使用され得る。 20 30

#### 【0069】

一旦、コード配列が調製または単離されると、このような配列は、任意の適切なベクターまたはレプリコンにクローン化され得る。多数のクローニングベクターが当業者に公知であり、そして適切なクローニングベクターの選択が可能である。適切なベクターとしては、プラスミド、ファージ、トランスポゾン、コスミド、染色体または適切なコントロールエレメントと会合した場合に複製し得るウイルスが挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【0070】

次いで、コード配列は、発現のために使用される系に依存して、適切なコントロールエレメントの制御下に置かれる。従って、このコード配列は、プロモータ、リボソーム結合部位（細菌の発現のため）、および必要に応じて、オペレーターの制御下に置かれ得、その結果、目的のDNA配列は、適切な形質転換体によってRNAに転写される。このコード配列は、シグナルペプチドまたはリーダー配列をコードする配列（これは後に、翻訳後プロセッシングにおいて、宿主によって除去され得る）を含んでも含まなくても良い。例えば、米国特許第4,431,739号；同第4,425,437号；同第4,338,397号を参照のこと。シグナル配列が存在する場合、ネイティブな配列であり得るか、または非相同的なシグナル配列のいずれかであり得る。 40

#### 【0071】

制御配列に加えて、宿主細胞の増殖に関連した配列の発現の調節を可能にする調節配列を加えることが所望であり得る。調節配列は、当業者に公知であり、そして例としては、調 50



節化合物の存在を含む、化学的刺激または物理的刺激に対してオンまたはオフにされる遺伝子の発現を引き起こすものが挙げられる。他の型の調節エレメントはまた、ベクター中に存在し得る。例えば、エンハンサーエレメントは、構築物の発現レベルを増加するために本明細書中で使用され得る。例としては、SV40初期遺伝子エンハンサー(Dijkemaら(1985)EMBO J. 4:761)、ラウス肉腫ウイルスの長末端反復(LTR)に由来するエンハンサー/プロモーター(Gormanら(1982)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:6777)およびヒトCMVに由来するエレメント(Boshartら(1985)Cell 41:521)(例えば、CMVイントロンA配列に含まれるエレメント(米国特許第5,688,688))が挙げられる。発現カセットはさらに、適切な宿主細胞において自律的に複製するための複製起点、1つ以上の選択マーカー、1つ以上の制限部位、高いコピー数についての可能性および強力なプロモーターを含む。

10

#### 【0072】

発現ベクターは、特定のコード配列が適切な制御配列と共にベクター中に位置するように構築され、制御配列に対するコード配列の位置および配向は、コード配列が制御配列の「制御」下で転写されるように存在する(すなわち、制御配列のDNA分子に結合するRNAポリメラーゼは、コード配列を転写する)。目的の分子をコードする配列の改変は、この目的を達成するために所望であり得る。例えば、いくつかの場合において、適切な配向で配列が制御配列に付着し得るように配列を改変することすなわち、リーディングフレームを維持することが必要であり得る。制御配列および他の調節配列は、ベクターへの挿入の前にコード配列に連結され得る。あるいは、コード配列は、制御配列および適切な制限部位をすでに含む発現ベクターに直接クローニングされ得る。

20

#### 【0073】

上に説明されるように、参照GNA33ポリペプチドの変異体またはアナログを生成することが所望であり得る。変異体またはアナログは、GNA33ポリペプチドをコードする配列の一部の欠損によって、配列の挿入によって、および/または配列内での1つ以上のヌクレオチドの置換によって、調製され得る。ヌクレオチド配列を改変するための技術(例えば、部位特異的変異誘発など)は、当業者に周知である。例えば、Sambrookら、前出; Kunkel, T. A. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1985) 82:448; Geisselsoderら(1987) BioTechniques 5:786; ZollerおよびSmith(1983) Methods Enzymol. 100:468; Dalbavie-McFarlandら(1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:6409を参照のこと。

30

#### 【0074】

分子は、昆虫発現系、哺乳動物発現系、細菌発現系、ウイルス発現系および酵母発現系を含む広範な種々の系において発現され得、これらは全て当該分野で公知である。例えば、昆虫細胞発現系(例えば、バキュロウイルス系)は、当業者に公知であり、そして例えば、SummersおよびSmith, Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No. 1555(1987)において記載されている。バキュロウイルス/昆虫細胞発現系のための材料および方法は、特に、Invitrogen, San Diego CA(「MaxBac」キット)からキットの形態で市販されている。同様に、細菌および哺乳動物細胞発現系は、当該分野で周知であり、そして例えば、Sambrookら、前出、において記載されている。酵母発現系はまた、当該分野で公知であり、そして例えば、Yeast Genetic Engineering(Barrら編、1989)Butterworths, Londonにおいて記載されている。

40

#### 【0075】

上の系を用いる使用のための多数の適切な宿主細胞がまた公知である。例えば、哺乳動物細胞株は、当該分野で公知であり、そして例えば、チャイニーズハムスター卵巣(CHO

50

細胞、HeLa細胞、乳児ハムスター腎(BHK)細胞、サル腎細胞(COS)、ヒト胚腎細胞、ヒト肝細胞癌細胞(例えば、Hep G2)、Madin-Darbyウシ腎(「MDBK」)細胞、およびその他を含むがこれらに限定されない、American Type Culture Collection(ATCC)から入手可能な不死化細胞株を含む。同様に、E. coli、Bacillus subtilis、およびStreptococcus spp.のような細菌宿主は、本発明の発現構築物を用いる用途を見出す。本発明において有用な酵母宿主としては特に、Saccharomyces cerevisiae、Candida albicans、Candida maltosa、Hansenula polymorpha、Kluyveromyces fragilis、Kluyveromyces lactis、Pichia guillierimondii、Pichia pastoris、Schizosaccharomyces pombeおよびYarrowia lipolyticaが挙げられる。バキュロウイルス発現ベクターを用いる使用のための昆虫細胞としては特に、Aedes aegypti、Autographa californica、Bombyx mori、Drosophila melanogaster、Spodoptera frugiperdaおよびTrichoplusia niが挙げられる。

10

#### 【0076】

目的のヌクレオチド配列を含む核酸分子は、当該分野で周知の種々の遺伝子送達技術を使用して、宿主細胞ゲノムに安定に組み込まれ得るか、または適切な宿主細胞中の安定なエピソームエレメント上に維持され得る。例えば、米国特許第5,399,346号を参照のこと。

20

#### 【0077】

選択される発現系および宿主に依存して、分子は、タンパク質が発現される条件下で、上記の発現ベクターによって形質転換された宿主細胞を増殖することによって生成される。次いで、発現されたタンパク質は、宿主細胞から単離され、そして精製される。発現系が、タンパク質を増殖培地中に分泌する場合、生成物は、この培地から直接精製され得る。生成物が分泌されない場合、この生成物は細胞溶解物から単離され得る。適切な増殖条件および回収方法の選択は、当該分野内である。

#### 【0078】

一旦生成されると、GNA33ポリペプチドを使用して抗体を生成し得る。従って、ポリペプチドは、哺乳動物の被験体(げっ歯類およびウサギのような標準実験動物を含む)を免疫するための組成物中に提供される。この組成物は、ポリクローナル血清の生成を誘発するための適切なアジュバントを含む。動物のグループは、この組成物を用いて、一般的に免疫され、そして数回追加免疫される。免疫された動物由来の抗血清が、得られ得る。殺菌性抗血清の形成を誘発し得るGNA33ポリペプチドは、モノクローナル抗体の生成においての使用のために適切である。これらの抗体を、順に使用して、抗MenBワクチンに対するエピトープを提供するMenB抗原のさらなる模倣物を検索し得る。

30

#### 【0079】

従って、本発明の実行において、選択されたGNA33ポリペプチドを使用して、モノクローナル抗体およびその機能的等価物を提供する。特定のモノクローナル抗体に対しての用語「機能的等価物」は、本明細書中で使用される場合、以下に記載される標準アッセイによって決定されるように、以下のような分子を意味する：(a)例証されたモノクローナル抗体を相互にブロックする；(b)問題のGNA33ポリペプチドに選択的に結合する；(c)そして、必要に応じて、MenB細菌細胞に対して機能的活性(例えば、補体媒介殺菌および/またはオプソニン活性)を示す。さらに、本発明の特定のモノクローナル抗体産生ハイブリドーマに関して本明細書中で使用される場合、用語「子孫」は、世代または核型同一性に関係なく、親によって産生されるモノクローナル抗体を産生する親ハイブリドーマ全ての誘導体、子孫(issueおよびoffspring)を含む。

40

#### 【0080】

モノクローナル抗体は、当該分野で周知の標準技術(例えば、KohlerおよびMil

50

stein, Nature (1975) 256: 495の方法、またはその改変、Buckら(1982) In Vitro 18: 377によって記載される)を用いて調製される。代表的に、マウスまたはラットは、タンパク質キャリアに結合されたGNA33ポリペプチドを用いて免疫され、追加免疫され、そして脾臓(および必要であれば、いくつかの大きさのリンパ節)は、除去されそして単一細胞へと分離される。所望である場合、脾臓細胞は、(非特異性接着細胞の除去後)抗原でコーティングされたプレートまたはウェルに細胞懸濁液を適用することによって、スクリーニングされ得る。抗原に対して特異的な膜結合免疫グロブリンを発現するB細胞は、プレートに結合し、そして残りの懸濁液で洗い流されない。得られたB細胞または全ての分離された脾臓細胞は、次いで、骨髄腫細胞と融合するように誘導され、ハイブリドーマを形成する。ハイブリダイゼーションでの使用のための代表的なマウス骨髄腫株は、American Type Culture Collection(ATCC)から入手可能なものを含む。

10

#### 【0081】

より特定には、体細胞ハイブリッドは、アザグアニン耐性の非分泌マウス骨髄腫細胞株P3X63-Ag8.653(ATCCから入手可能)を用いてBuckら(前出)の方法によって調製され得る。ハイブリドーマ細胞株は、一般に、限界希釈によってクローン化され、そして免疫化抗原に特異的に結合し、そして無関係な抗原に結合しない抗体の産生についてアッセイされる。次いで、選択されたモノクローナル抗体分泌ハイブリドーマは、インビトロ(例えば、組織培養ボトルまたは中空繊維リアクター内で)か、またはインビボ(例えば、マウス中の腹水として)のいずれかで培養される。

20

#### 【0082】

ハイブリドーマの上清は、例えば、免疫GNA33ポリペプチドを用いた固相ELISAか、または標的抗原としてMenB細菌を用いる間接的な免疫蛍光アッセイのいずれかを使用して抗MenB反応性抗体についてアッセイされ得る。ハイブリドーマによって分泌されるモノクローナル抗体の選択性は、競合特異的結合アッセイ(例えば、阻害ELISAなど)を用いてアッセイされ得る。例えば、緩衝液か、または可溶性GNA33ポリペプチドを含む緩衝液のいずれかに希釈される抗体分子を、結合GNA33ポリペプチドの存在下、ELISA容器中で反応させる。洗浄の後、結合抗体は、二次抗体としての標識化抗Ig(抗IgM、IgGおよびIgA)によって決定される。可溶性GNA33ポリペプチドによって阻害される抗体は、特異的とみなされ得、従って、アイソタイピングおよびMenB結合および機能的活性についてのさらなるスクリーニングを含むさらなる研究のために選択される。

30

#### 【0083】

特に、部分的に精製されたモノクローナル抗体分子は、本明細書中の実施例に記載されるような標準アッセイを用いて、MenBの表面に結合するそれらの能力について個々に評価され得る。機能的活性は、補体媒介殺菌活性および/またはオプソニン活性を評価することによって決定され得る。特に、抗体の補体媒介殺菌活性は、Goldら(1970) Infect. Immun. 1: 479, Westerinkら(1988) Infect. Immun. 56: 1120, Mandrellら(1995) J. Infect. Dis. 172: 1279, およびGranoffら(1995) Clin. Diagn. Laboratory Immunol. 2: 574によって記載されるような標準アッセイを用いて評価され得る。これらのアッセイにおいて、N. meningitidisは、補体供給源ならびに試験されるべき抗体と反応される。細菌の計数は、種々のサンプリング時間でなされる。抗体および相補体と共に60分間インキュベートした後決定された、時間0でのコロニー数と比較される場合、生存可能な細菌細胞数において最少50%の減少によって示されるような補体媒介殺菌活性を示す抗体は、本発明の目的に対する殺菌活性を示すと考えられ、そしてさらなる使用のために適切である。

40

#### 【0084】

補体媒介溶菌は、侵襲性髄膜炎菌性疾患に対する宿主保護を担う主要な機構であると考えられる。しかし、証拠はまた、オプソニン作用に対する重要な保護的役割を支持する(例

50

例えば、Bjerknesら(1995) *Infect. Immun.* 63:160を参照のこと)。従って、本明細書中で産生される抗体のオプソニン活性は、機能的活性を評価するために、二次手段かまたは代替の手段として評価され得る。オプソニンアッセイからの結果を使用して、殺菌データを追加し、そして保護を与え得る抗体の選択を助ける。オプソニン活性の評価はまた、IgG1アイソタイプを有する本発明のマウスモノクローナル抗体の評価のために本明細書中で特に有用である。マウスIgG1(ヒトIgG1とは著しく異なる)は、補体の活性化において効果がない。従って、マウスIgG1抗体は、上記のアッセイにおいてMenBの補体媒介溶菌を活性化しない。しかし、IgG1抗GN A33モノクローナル抗体の機能的活性は、補体の非存在下でオプソニン作用によって評価され得る。

10

#### 【0085】

種々のオプソニンアッセイ方法は、当該分野で公知であり、そして本発明のモノクローナル抗体の機能的活性を評価するために使用され得る。このような標準アッセイとしては、Sjursenら(1987) *Acta Path. Microbiol. Immunol. Scand.*, Sec. C 95:283, Halstensensら(1989) *Scand. J. Infect. Dis.* 21:267, Lehmannら(1991) *APMIS* 99:769, Halstensensら(1991) *NIPH Annals* 14:157, Fredlundら(1992) *APMIS* 100:449, Guttormsenら(1992) *Infect. Immun.* 60:2777, Guttormsenら(1993) *J. Infect. Dis.* 167:1314, Bjerknesら(1995) *Infect. Immun.* 63:160, Hayrinenら(1995) *J. Infect. Dis.* 171:1481, de Velascoら(1995) *J. Infect. Dis.* 172:262、およびVerheul, A. F. M. (1991) 「Meningococcal LPS Derived Oligosaccharide-Protein Conjugate Vaccines, Immunochemical and Immunological Aspects」、Thesis, Utrecht University, The Netherlands, pp. 112-135によって記載されるものが挙げられる。

20

#### 【0086】

目的の選択されたモノクローナル抗体は、慣用的な組織培養方法を用いてインビトロで、または哺乳動物の被験体を用いてインビボで、拡大され得る。例えば、プリスタンブライム化マウスは、腹水産生のために、PBS中のlog期のハイブリドーマ細胞を播種され得る。腹水は、さらなる精製の前に-70℃で保存され得る。

30

#### 【0087】

特に、例えば、MenBに対する受動的保護を提供するための予防的または治療的薬学的調製物中ならびにMenB診断用調製物において、抗体が使用される場合、キメラ抗体を提供することが所望され得る。ヒトおよび非ヒトアミノ酸配列から構成されるキメラ抗体は、マウスモノクローナル抗体分子から形成され得、ヒトにおけるそれらの免疫原性を減少する(Winterら(1991) *Nature* 349:293; Lobuglioら(1989) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 86:4220; Shawら(1987) *J. Immunol.* 138:4534; およびBrownら(1987) *Cancer Res.* 47:3577; Riechmannら(1988) *Nature* 332:323; Verhoevenら(1988) *Science* 239:1534; およびJonesら(1986) *Nature* 321:522; 1992年12月23日に公開された欧州公開番号第519,596号; および1994年9月21日に公開された英国特許公開番号第GB 2,276,169号)。

40

#### 【0088】

親のモノクローナル抗体分子の免疫学的結合特性を提示し得る、抗体分子フラグメント(例えば、F(ab')<sub>2</sub>、FvおよびsFvの分子)は、公知の技術を使用して産生され得る(Inbarら(1972) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 69:

50

2659; Hochmanら(1976) Biochem 15:2706; Ehrlichら(1980) Biochem 19:4091; Hustonら(1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85(16):5879; ならびにHustonらに対する米国特許第5,091,513号および同第5,132,405号; およびLadnerらに対する同第4,946,778号)。

#### 【0089】

代替的に、ファージディスプレイ系を使用して、インビトロでモノクローナル抗体分子集団を拡大し得る。Saikiら(1986) Nature 324:163; Scharfら(1986) Science 233:1076; 米国特許第4,683,195および同第4,683,202号; Yangら(1995) J. Mol. Biol. 254:392; Barbas, IIIら(1995) Methods: Comp. Meth. Enzymol. 8:94; Barbas, IIIら(1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:7978。 10

#### 【0090】

一旦作製されると、ファージディスプレイライブラリーを使用して、公知の技術を使用して、Fab分子の免疫学的結合アフィニティーを改善し得る。例えば、Figiniら(1994) J. Mol. Biol. 239:68を参照のこと。

#### 【0091】

ファージディスプレイライブラリーより選択されるFab分子の重鎖部分および軽鎖部分のコード配列を、単離または合成し得、そして発現のために任意の適切なベクターまたはレプリコンの中にクローニングし得る。例えば、細菌、酵母、昆虫、両生類および哺乳動物の系を含む、任意の適切な発現系を使用し得る。細菌における発現系としては、以下に記載される系が挙げられる: Changら(1978) Nature 275:615、Goeddelら(1979) Nature 281:544、Goeddelら(1980) Nucleic Acids Res. 8:4057、欧州特許出願第EP36,776号、米国特許第4,551,433号、deBoerら(1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:21~25、およびSiebenlistら(1980) Cell 20:269。 20

#### 【0092】

酵母における発現系としては、以下に記載される系が挙げられる: Hinnenら(1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75:1929、Itoら(1983) J. Bacteriol. 153:163、Kurtzら(1986) Mol. Cell. Biol. 6:142、Kunzeら(1985) J. Basic Microbiol. 25:141、Gleesonら(1986) J. Gen. Microbiol. 132:3459、Roggenkampら(1986) Mol. Gen. Genet. 202:302、Dasら(1984) J. Bacteriol. 158:1165、De Louvencourtら(1983) J. Bacteriol. 154:737、Van den Bergら(1990) Bio/Technology 8:135、Kunzeら(1985) J. Basic Microbiol. 25:141、Creggら(1985) Mol. Cell. Biol. 5:3376、米国特許第4,837,148号および同第4,929,555号、Beachら(1981) Nature 300:706、Davidowら(1985) Curr. Genet. 10:380、Gaillardinら(1985) Curr. Genet. 10:49、Ballanceら(1983) Biochem. Biophys. Res. Commun. 112:284~289、Tilburnら(1983) Gene 26:205-221、Yeltonら(1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:1470~1474、Kellyら(1985) EMBO J. 4:475479; 欧州特許出願第EP244,234号、ならびに国際公開第WO91/00357号。 30 40

#### 【0093】

昆虫において異種性遺伝子の発現は、以下に記載されるように達成され得る: 米国特許第 50

4, 745, 051号、欧州特許出願第EP127, 839および同EP155, 476号、Vlakら(1988) J. Gen. Virol. 69: 765~776、Millerら(1988) Ann. Rev. Microbiol. 42: 177、Carbonellら(1988) Gene 73: 409、Maedaら(1985) Nature 315: 592~594、Lebacqz-Verheydenら(1988) Mol. Cell. Biol. 8: 3129、Smithら(1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 8404、Miyajimaら(1987) Gene 58: 273、ならびにMartinら(1988) DNA 7: 99。多くのバキュロウイルスの株および改変体、ならびに宿主由来の対応の許容な昆虫宿主細胞は、以下に記載される: Luckowら(1988) Bio/Technology 6: 47~55, Millerら(1986) GENERIC ENGINEERING、Setlow, J. K. ら編、Vol. 8, Plenum Publishing, 277~279頁、およびMaedaら(1985) Nature 315: 592~594。

10

#### 【0094】

哺乳動物の発現は、以下に記載されるように達成され得る: Dijkemaら(1985) EMBO J. 4: 761、Gormanら(1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 6777、Boshartら(1985) Cell 41: 521、および米国特許第4, 399, 216号。哺乳動物の発現の他の特徴は、以下に記載されるように容易にされ得る: Hamら(1979) Meth. Enz. 58: 44、Barnesら(1980) Anal. Biochem. 102: 255、米国特許第4, 767, 704号、同第4, 657, 866号、同第4, 927, 762号、同第4, 560, 655号および再登録された米国特許第RE30, 985、ならびに国際公開第WO90/103430号、同WO87/00195号。

20

#### 【0095】

任意の上記抗体分子を本発明中で使用して、抗MenB治療剤または抗MenB予防薬剤を提供し得る。さらに、例示のマウスモノクローナル抗体由来の抗原結合部位を含む、「ヒト化」抗体分子を、上記に記載される技術を使用して産生し得る。

#### 【0096】

上記に記載の本発明のMenB抗体は、米国特許第6, 030, 619号、および同第6, 048, 527号(本明細書中で参考としてそれらの全体が援用される)に記載されるような方法を使用して、レセプターとして便利に使用して、多様な分子ライブラリーをスクリーニングして、MenB由来のエピトープの分子模倣物を同定し得る。分子ライブラリーにおいて模倣物を同定する方法は、一般的に、以下の手順のうちの1つ以上の使用を含む: (1) 固定化した標的レセプターを用いたアフィニティー精製; (2) 連結されたリガンドとの可溶性レセプターの結合; および(3) 可溶性化合物を直接的に抗原競合アッセイにおいて、または生物学的活性について試験する行程。分子模倣物についてスクリーニングされる分子としては、低分子有機化合物、有機化合物のコンビナトリアルライブラリー、核酸、核酸誘導体、サッカライドもしくはオリゴサッカライド、ペプチド、可溶性ペプチド、固相上に連結されたペプチド、細菌ファージ表面タンパク質上に提示されるペプチド、細菌表面のタンパク質もしくは抗体、および/または非ペプチド有機部分を含むペプチドが挙げられるが、これらに限定されない。

30

40

#### 【0097】

例えば、コンビナトリアル有機合成を使用して、多様な分子種のライブラリーを作製し得る。例えば、Gordonら(1994) J. Med. Chem. 37: 1335を参照のこと。例示としては、ピロリジン; オリゴカルバメート(Choら(1993) Science 261: 1303); N置換されたグリシンポリマーのようなペプチド(Simonら(1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 9367); およびビニル基化(vinyllogous)ペプチド(Hagiharaら(1992) J. Am. Chem. Soc. 114: 6568)が挙げられるが、これらに限定されない。

50

## 【0098】

当該分野で公知の種々のアプローチを使用して、合成中に付加を受ける基礎単位を探索して、その結果個々のライブラリーのメンバーの変遷 (history) を決定し得る。これらのアプローチとしては、以下が挙げられる：フォトリトグラフのチップ上のアドレス可能な位置 (オリゴカルバメート)、部分的に合成された (ペプチド、ピロリジン、ペプチド) ライブラリーおよびヌクレオチドの分離合成によるコードのコンビナトリアルライブラリー (Nielsenら (1993) J. Am. Chem. Soc. 115: 9812) または他の有機部分の分離合成によるコードのコンビナトリアルライブラリー (Ohlmeyerら (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 10922) (「タグ (tag)」) へのモノマーの再帰的な付加により「ヒット」を同定する脱回旋 (deconvolution) ストラテジー。次いで、模倣物を選択した後、各々のライブラリーのメンバーと結合するコードされるタグを、解読し得る。例えば、核酸タグを、DNA 配列決定法によって解読し得る。

10

## 【0099】

ペプチドコンビナトリアルライブラリーは、MenB エピトープの分子模倣物を同定するために特に有用である。ペプチドは、N 置換されたグリシンのオリゴマーであり (Simonら、(1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 9367)、そしてこれらを使用して、新規分子の多様なライブラリーを化学的に作製し得る。モノマーは、t-ブチルベースの側鎖保護および 9-フルオレニル-メトキシ-カルボニルの -アミン (α-amine) 保護を含み得る。例えば、Zuckermannら (1992) J. Am. Chem. Soc. 114: 10646 らの「副モノマー方法 (submonomer method)」を使用して、固相上でモノマーのペプチドオリゴマーへの組み立てを実施し得る。この方法において、Rink アミドポリスチレン樹脂 (Rinkら (1987) Tetrahedron Lett. 28: 3787) との化学合成を行い得る。プロモ酢酸のジソプロピルカルボジイミドとのインサイチュ活性化によって、樹脂に結合したアミンをプロモアセチル化する。その後、この樹脂に結合したプロモアセトアミドをアミンの付加によって置換する。このアミンは、さらなる反応基の t-ブチルベースの保護を含み得る。この 2 工程のサイクルを、所望の数のモノマーが付加するまで繰り返す。次いで、このオリゴペプチドを 95% トリフルオロ酢酸 / 5% 水での処置によって樹脂から切り離す。この合成を、好ましくはロボットの合成機を使用して実施する。例えば、Zuckermannら (1992) Pept. Protein Res. 40: 498; および Zuckermannら (1996) Methods in Enzymology 267: 437 を参照のこと。代替的には、ベンゾトリアゾール-1-イルオキシトリス (ピロリジノ) ホスホニウムヘキサフルオロホスフェート (hexafluorophosphate) またはプロモトリス (ピロリジノ) ホスホニウムヘキサフルオロホスフェートのどちらかによるインサイチュ活性化によって、ペプチドモノマーのオリゴマー化を実施し得る。この代替の方法において、その他は、α- (9-フルオレニルメトキシカルボニル) アミノ酸を使用して従来のペプチド合成と同じである (例えば、Simonら、(1992)、上述を参照のこと)。

20

30

## 【0100】

一旦ペプチドライブラリーを作製すると、これらのライブラリーを、例えば、MenB ポリペプチドまたは MenB 細菌でコーティングされたマイクロリットラプレートのウェルに、コンビナトリアルペプチドの様々なプールと一緒に本発明のモノクローナル抗体を添加することによって、スクリーニングし得る。インキュベーションの期間および非結合抗体の除去のための洗浄の後、結合した抗体の存在を、標準的な ELISA アッセイによって決定する。例えば、Harlow および Lane, Antibodies: A Laboratory Manual (1988), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 553 を参照のこと。結合した抗体を含まないウェルは、抗体に結合するペプチド模倣物の存在を示す。プール中のペプチド模倣物の特定の同定を、モノマー単位をライブラリーの部分

40

50

的に合成したメンバーに再帰的に添加することによって決定する。Zuckermannら(1994) J. Med. Chem. 37: 2678。低分子プール中の活性化合物を同定する他の方法は、そのプールを逆相HPLCまたはアフィニティー選択/質量分析によって分画する工程を包含する(Nedved M. L.ら(1996) Anal. Chem. 68: 4228)。

#### 【0101】

一旦、推定の分子模倣物を同定すると、上記のように、機能的に活性な(例えば、殺菌の、および/またはオプソニンの)抗体を導く能力について、それらを試験する。これらの特性を有する分子模倣物は、さらなる使用(例えば、ワクチン組成物における使用)について適切である。

10

#### 【0102】

本発明の機能的に活性な抗MenB抗体を使用して同定した分子模倣物、およびGNA33抗体をまた使用して、診断アッセイにおける使用のための抗体試薬を作製し得る。例えば、分子模倣物と反応性のさらなる抗体、および本明細書中に記載されるGNA33抗体を使用して、競合アッセイ、直接反応アッセイまたはサンドイッチ型アッセイのような免疫診断技術を使用して、生物学的サンプル中の細菌の抗原を検出し得る。このようなアッセイとしては、ウエスタンブロット;凝集試験;酵素標識免疫アッセイおよび酵素媒介免疫アッセイ(例えば、ELISA);ピオチン/アビジン型アッセイ;放射性免疫アッセイ;免疫電気泳動;免疫沈殿などが挙げられる。これらの反応は、一般的に、蛍光、化学発光、放射性、酵素性の標識分子もしくは色素分子のような標識を検出する工程、または模倣物とそれに反応した抗体との間の複合体形成を検出する他の方法を包含する。

20

#### 【0103】

前述のアッセイは、一般的に、抗原-抗体複合体が結合される固体支持体からの、液相中の非結合抗体の分離を包含する。本発明の実施において使用され得る固体支持体は、ニトロセルロース(例えば、膜またはマイクロタイターウェルの形態で);ポリビニルクロライド(例えば、シートまたはマイクロタイターウェルの形態で);ポリスチレンラテックス(例えば、ビーズまたはマイクロタイタープレートの形態で);ポリビニリジンフルオリド;ジアゾ化ペーパー;ナイロン膜;活性化ビーズ;磁気反応ビーズなどのような、基材を含む。

#### 【0104】

代表的に、固体支持体を、最初に、適切な結合条件下で固相の成分(例えば、一つ以上のMenB抗原またはMenB分子模倣物)と反応させて、その結果、その成分は支持体に十分に固定化される。時々、支持体への固定化を、最初により良い結合特性を有するタンパク質にカップリングすることによって増強し得る。適切なカップリングタンパク質として、血清アルブミン(ウシ血清アルブミン(BSA))、鍵穴吸着(keyhole limpet)ヘモシアニン、免疫グロブリン分子、チログロブリン、オプアルブミン、および当業者に周知の他のタンパク質のような高分子が挙げられるが、これに限定されない。その抗原または模倣物を支持体に固定化するために使用され得る他の分子としては、ポリサッカライド、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、ポリマー性アミノ酸、アミノ酸コポリマーなどが挙げられる。これらの分子およびこれらの分子を抗原とカップリングさせるこれらの方法は、当業者に周知である。例えば、Brinkley, M. A. Bioconjugate Chem. (1992) 3: 2-13; Hashidaら J. Appl. Biochem. (1984) 6: 56-63; ならびにAnjaneyuluおよびStaros, International J. of Peptide and Protein Res. (1987) 30: 117-124を参照のこと。

30

40

#### 【0105】

固体支持体の固相の成分との反応の後、任意の非固定化固相成分を洗浄によってこの支持体から除去し、次いで支持体に結合した成分を、適切な結合条件下でリガンド部分(例えば、MenB抗体)を含むと推定される生物学的サンプルと接触させる。洗浄して任意の非結合のリガンドを除去した後、二次的な結合体部分を、適切な結合条件下で添加する。

50



ここで、二次的結合体は、結合したリガンドと選択的に結合し得る。次いで、二次的結合体の存在を、当該分野で周知の技術を使用して検出し得る。

【0106】

さらに特定すると、E L I S A方法を使用し得、ここで、マイクロタイタープレートのウェルを、本発明に従うM e n BエピトープまたはM e n B模倣物でコーティングする。次いで、抗M e n B免疫グロブリン分子を含む、またはこれを含むと推定される生物学的サンプルを、コーティングされたウェルに添加する。抗体が固定化された分子に結合し得るのに十分な期間のインキュベーションの後、そのプレートを洗浄して、非結合部分を除去し、そして検出可能に標識された二次的な結合分子を添加する。この二次的結合分子は、任意の捕捉されたサンプル抗体と反応し得、そのプレートを洗浄し、そして二次的結合分子の存在を、当該分野で周知の方法を使用して検出する。

10

【0107】

従って、1つの特定の実施形態において、生物学的サンプルからのM e n B結合リガンドの存在を、抗体リガンドに対して特異的な抗体を含む二次的結合体を使用して、容易に検出し得る。当業者に公知の方法を使用して、検出可能な酵素標識（例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、またはウレアーゼ）と容易に結合体化され得る多くの抗ウシ免疫グロブリン（I g）分子が、当該分野で公知である。次いで、適切な酵素基質を使用して、検出可能なシグナルを生成する。他の関連の実施形態において、当業者に公知の方法を使用して、競合型E L I S A技術を実行し得る。

【0108】

アッセイはまた、溶液中で行われ得、その結果、M e n Bエピトープまたは模倣物、およびこれらの分子に対して特異的な抗体は、沈殿条件下で複合体を形成する。1つの特定の実施形態において、これらの分子は、当該分野で公知のカップリング技術を使用して、例えば、直接的な化学的カップリングまたは間接的なカップリングによって、固相粒子（例えば、アガロースビーズなど）に結合され得る。次いでコーティングされた粒子を、適切な結合条件下で、M e n Bに対する抗体を含むことが予想される生物学的サンプルと接触させる。結合した抗体の間の架橋は、粒子 - エピトープ - 抗体または粒子 - 模倣物 - 抗体の複合凝集体の形成を生じ、この凝集体を、洗浄および/または遠心分離を使用して、サンプルから沈殿させ得、かつ分離させ得る。反応混合物を、任意の多くの標準的な方法（例えば、上記に記載のそれらの免疫診断方法）を使用して分析して、複合体の存在または不在を決定し得る。

20

30

【0109】

なおさらなる実施形態において、免疫アフィニティマトリクスを提供し得、ここで、M e n B抗体を含むことが予想される生物学的サンプルから抗体のポリクローナル集団を、基材に固定化する。これに関して、サンプルの最初のアフィニティ精製を、固定化された抗原を使用して実施し得る。従って、生じたサンプル調製物は、アフィニティ支持中の潜在的な非特異的結合特性を回避しつつ、抗M e n B部分のみを含む。高収量で、かつ抗原結合活性を良く保存して、免疫グロブリン（完全かまたは特定のフラグメントにおいて）を固定化する多くの方法は、当該分野で公知である。任意の特定の方法に限定されずに、固定化されたプロテインAおよびプロテインGを使用して、免疫グロブリンを固定化し得る。

40

【0110】

従って、一旦免疫グロブリン分子を免疫アフィニティマトリクスを提供するために固定化すると、標識された分子は適切な結合条件下で結合した抗体と接触する。非特異的に結合された任意のM e n Bエピトープまたはその模倣物を、免疫アフィニティ支持体から洗い落とした後、結合した抗原の存在を、当該分野で公知の方法を使用して、標識に対してアッセイすることによって決定し得る。

【0111】

本発明のG N A 3 3ポリペプチドおよび/もしくはその模倣物またはそれらに対する抗体を含む、上に記載されたアッセイ試薬は、上に記載される免疫アッセイを行うために、適

50

切な指示書および他の必要な試薬と共に、キットで提供され得る。このキットはまた、使用される特定の免疫アッセイに依存して、適切な標識ならびに他の包装される試薬および材料（すなわち、洗浄緩衝液など）を含み得る。標準的な免疫アッセイ（例えば、上に記載されるアッセイ）を、これらのキットを使用して行い得る。

#### 【0112】

さらに、このGNA33ポリペプチド、分子模倣物および抗体を本明細書中で使用して、哺乳動物の被験体においてMenBを妨げ得る。特に、これらの分子を含むワクチン組成物を、ワクチン接種された被験体においてMenB疾患の防止のために使用し得る。このワクチンを、他の抗原または免疫調節因子（例えば、IL-2、改変体IL-2(cys125からser125への改変体)、GM-CSF、IL-12、g-インターフェロン、IP-10、MIP1bおよびRANTESを含むがこれらに限定されない、免疫グロブリン、サイトカイン、リンフォカインおよびケモカイン）と組み合わせて投与し得る。

10

#### 【0113】

これらワクチンは、一般的に、水、生理食塩水、グリセリン、エタノールなどのような、1つ以上の「薬学的に受容可能な賦形剤またはビヒクル」を含む。さらに、補助物質（例えば、保湿剤または乳化剤、pH緩衝剤など）がそのようなビヒクル中に存在し得る。

#### 【0114】

また、アジュバントを使用して、ワクチンの有効性を増強し得る。アジュバントをワクチン組成物に直接添加し得るか、またはワクチン投与の同時もしくはその直後のいずれかで別々に投与し得る。このようなアジュバントとしては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：（1）アルミニウム塩（alum）（例えば、水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウム、硫酸アルミニウム、など）；（2）O/Wのエマルジョン処方物（ムラミルペプチド（以下を参照のこと）もしくは細菌細胞壁成分のような他の特異的免疫刺激因子を含むか、または含まない）（例えば、（a）MF59（国際出願公報第WO 90/14837；Vaccine design: the subunit and adjuvant approach, PowellおよびNewman編、Plenum Press 1995、第10節）、これは、Model 110Yマイクロフリューダイザ（Microfluidics, Newton, MA）のようなマイクロフリューダイザを使用してサブミクロンの粒子中に処方され、5% スクアレン、0.5% TWEEN 80<sup>TM</sup>、および0.5% SPAN 85<sup>TM</sup>（必要ではないが、随意に種々の量のMTP-PE（以下を参照のこと）を含む）を含む；（b）SAF、（これは、サブミクロンのエマルジョン中にフリューダイズされるか、またはより大きな粒子サイズのエマルジョンを生成するようボルテックスされるかのいずれかで、10% スクアレン、0.4% TWEEN 80<sup>TM</sup>、5% プルロニックブロック（pluronic-blocked）ポリマー L121、およびthr-MDPを含む）、ならびに（c）RIBI<sup>TM</sup> アジュバントシステム（RAS）、（Ribi Immunochem, Hamilton, MT）、これは、2% スクアレン、0.2% TWEEN 80<sup>TM</sup>、ならびにモノリン脂質A（MPL）、トレハロースジミコレート（TDM）および1つ以上の細胞壁骨格（CWS）からなる群からの細菌細胞壁成分（好ましくは、MPL + CWS（DET OX<sup>TM</sup>））を含む；（3）サポニンアジュバント（例えば、Q21またはSTIMULON<sup>TM</sup>（Cambridge Bioscience, Worcester, MA））を使用し得るか、またはこれらから生成される粒子（例えば、ISCOM（免疫刺激複合体））、ここで、ISCOMはさらなる界面活性剤を欠き得る（例えば、国際出願公開番号WO 00/07621を参照のこと）；（4）完全フロイントアジュバント（CFA）および不完全フロイントアジュバント（IFA）；（5）サイトカイン（例えば、インターロイキン（IL-1、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-12（国際公開番号第WO 99/44636号）など）、インターフェロン（例えば、インターフェロン）、マクロファージコロニー刺激因子（M-CSF）、腫瘍壊死因子（TNF）、など；（6）細菌のADP-リボシル化を行う毒素の無害化変異体（例え

20

30

40

50

ば、コレラ毒素 (C T)、百日咳毒素 (P T) または E. coli 熱不安定毒素 (L T)、具体的には L T - K 6 3 (ここで、6 3 位の野生型アミノ酸がリジンで置換される)、L T - R 7 2 (ここで、7 2 位の野生型アミノ酸がアルギニンで置換される)、C T - S 1 0 9 (ここで、1 0 9 位の野生型アミノ酸がセリンで置換される)、および P T - K 9 / G 1 2 9 (ここで、9 位の野生型アミノ酸がリジンで置換され、そして 1 2 9 位の野生型アミノ酸がグリシンで置換される) (例えば、国際特許公開番号第 W O 9 3 / 1 3 2 0 2 号および同第 W O 9 2 / 1 9 2 6 5 号を参照のこと); (7) M P L または 3 - O - 脱アセチル化 M P L (3 d M P L) (例えば、G B 2 2 2 0 2 2 1 を参照のこと)、E P - A - 0 6 8 9 4 5 4、肺炎球菌のサッカライドで 사용되는場合、必要に応じて、a l u m の実質的非存在下である、(例えば、国際特許公開第 W O 0 0 / 5 6 3 5 8 号を参照のこと); (8) 3 d M P L と、例えば Q S 2 1 および / または O / W エマルジョンの組み合わせ (例えば、E P - A - 0 8 3 5 3 1 8、E P - A - 0 7 3 5 8 9 8、E P - A - 0 7 6 1 2 3 1 を参照のこと); (9) C p G モチーフを含むオリゴヌクレオチド (例えば、Roman ら (1997) Nat. Med. 3: 849 - 854; Weiner ら (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 10833 - 10837; Davis ら (1998) J. Immunol. 160: 870 - 876; Chu ら (1997) J. Exp. Med. 186: 1623 - 1631; Lipford ら (1997) Eur. J. Immunol. 27: 2340 - 2344; Moldoveanu ら (1988) Vaccine 16: 1216 - 1224; Krieger ら (1995) Nature 374: 546 - 549; Klinman ら (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 2879 - 2883; Ballas ら (1996) J. Immunol. 157: 1840 - 1845; Cowdery ら (1996) J. Immunol. 156: 4570 - 4575; Halpern ら (1996) Cell Immunol. 167: 72 - 78; Yamamoto ら (1988) Jpn. J. Cancer Res. 79: 866 - 873; Stacey ら (1996) J. Immunol. 157: 2116 - 2122; Messina ら (1991) J. Immunol. 147: 1759 - 1764; Yi ら (1996) J. Immunol. 157: 4918 - 4925; Yi ら (1996) J. Immunol. 157: 5394 - 5402; Yi ら (1998) J. Immunol. 160: 4755 - 4761; Yi ら (1998) J. Immunol. 160: 5898 - 5906; 国際公開第 W O 9 6 / 0 2 5 5 5 号、同第 W O 9 8 / 1 6 2 4 7 号、同第 W O 9 8 / 1 8 8 1 0 号、同第 W O 9 8 / 4 0 1 0 0 号、同第 W O 9 8 / 5 5 4 9 5 号、同第 W O 9 8 / 3 7 9 1 9 号および同第 W O 9 8 / 5 2 5 8 1 号)、(例えば、これらを少なくとも C G ジヌクレオチド上に含み、シトシンは必要に応じて 5 - メチルシトシンで置換される); (10) ポリオキシエチレンエーテルまたはポリオキシエチレンエステル (例えば、国際公開第 W O 9 9 / 5 2 5 4 9 号を参照のこと); (11) オクトキシノールと組み合わせたポリオキシエチレンソルビタンエステル界面活性剤 (例えば、国際公開第 W O 0 1 / 2 1 2 0 7 号)、または少なくとも 1 つのさらなる非イオン性界面活性剤 (例えば、オクトキシノール) と組み合わせた、ポリオキシエチレンアルキルエーテル界面活性剤もしくはエステル界面活性剤 (例えば、国際公開第 W O 0 1 / 2 1 1 5 2 号); (12) C p G オリゴヌクレオチドのような、サポニンおよび免疫刺激性オリゴヌクレオチド (例えば、国際公開第 W O 0 0 / 6 2 8 0 0 号); (13) 免疫刺激剤および金属塩の粒子 (例えば、国際公開第 W O 0 0 / 2 3 1 0 5 号を参照のこと); ならびに (14) 組成物の有効性を増強させるための免疫刺激因子として作用する他の物質。

#### 【0115】

ムラミルペプチドとしては、N - アセチル - ムラミル - L - スレオニル - D - イソグルタミン (t h r - M D P)、N - アセチル - ノルムラミル - L - アラニル - D - イソグルタミン (i s o g l u a t m e) (n o r - M D P)、N - アセチルムラミル - L - アラニル - D - イソグルタミニル - L - アラニン - 2 - (1' - 2' - ジパルミトイル - s n - グリセロ - 3 - ヒドロキシホスホリルオキシ) - エチルアミン (M T P - P R) などが挙

げられるが、これらに限定されない。

【0116】

組成物の有効性を増強させるために、活性因子をキャリア分子と結合させることが必要であり得る。このようなキャリア分子は、それ自体は有害な抗体の産生を誘導しない。適切なキャリアは、代表的に大きく、代謝の遅い巨大分子（例えば、タンパク質、多糖類、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、ポリマー性アミノ酸、アミノ酸コポリマー、脂質凝集体（例えば、油滴またはリポソーム）、不活性化ウイルス粒子、CRM<sub>197</sub>（無毒な変異ジフテリア毒素）など）である。このようなキャリアは、当業者に周知である。

【0117】

代表的に、ワクチン組成物は注射可能なものとして、液体の溶液または懸濁液のいずれかとして調製される；注射前の液体ビヒクル中の溶液または懸濁液に適切な固体形態もまた調製され得る。これらの調製はまた、上に記載するように、アジュバントの効果を増強するために、エマルジョン化もしくはリポソーム中でカプセル封入され得るか、または粒子に吸収され得る。

【0118】

ワクチンは、有効量の活性な因子（例えば、GNA33ポリペプチドまたはそれらに対する抗体）、および必要に応じて他の任意の上述の成分およびインヒビターを含む。「有効量」によって、ワクチンが投与される個体において免疫学的な応答を誘導する分子の量を意味する。このような応答は、一般的に、ワクチンに対して、分泌性免疫応答、細胞性免疫応答および/または抗体媒介性免疫応答の被験体における発達を生じる。通常は、このような応答としては、以下の効果のうちの1つ以上が挙げられるが、これらに限定されない：任意の免疫学的クラスの抗体の産生（例えば、免疫グロブリンA、免疫グロブリンD、免疫グロブリンE、免疫グロブリンGまたは免疫グロブリンM）；Bリンパ球およびTリンパ球の増殖；免疫学的細胞の活性化シグナル、増殖シグナルおよび分化シグナルの提供；ヘルパーT細胞、サプレッサーT細胞および/もしくは細胞傷害性T細胞、ならびに/またはgdT細胞集団の増殖。

【0119】

一旦処方されると、ワクチンは、皮下注射または筋肉内注射のいずれかによって、非経口で通常通りに投与される。他の投与形態に適切なさらなる処方物としては、経口処方物または肺の処方物、坐薬、ならびに経皮的適用が挙げられる。投薬処置は、単回投薬スケジュールか、または複数回投薬スケジュールであり得る。

【0120】

（III. 実験）

本発明を実施する為の具体的な実施形態の例を以下である。これらの例は、例示目的のみのために、提供され、そして、いかなる方法においても本発明の範囲を限定することを意図するものではない。

【0121】

使用される数値（例えば、量、温度など）に関する精度を保証するための努力がなされているが、実験誤差および偏差は、当然のこととして、許容されるべきである。

【0122】

（材料および方法）

（細菌株）

本研究に含まれるN. meningitidis血清型B株を、異なる国に滞在する、髄膜炎菌性疾患を有する患者から単離し、36年の期間にわたって収集した。21株が、血清型B株であり、1株が血清型C株であった。これらの株を、表1に要約する。電気泳動分類（ET）に基づいて、これらの収集物は、疾患を引き起こすMenB株についての広範な遺伝的多様性を表す。

【0123】

MC58株、BZ232株およびNMB株の変異体（それぞれ、MC58 GNA33、BZ232 GNA33およびNMB GNA33）（これらの株において、gna33

10

20

30

40

50

遺伝子が欠失され、そして、抗生物質カセットを用いた対立遺伝子交換によって置き換えられている)を、プラスミド pBSUD33ERM で親株を形質転換することによって調製した。このプラスミドは、対立遺伝子交換のための上流および下流の隣接遺伝子領域および *ermC* 遺伝子 (エリスロマイシン耐性) を含む。簡潔には、- 867 から + 75 の上流隣接領域 (開始コドンを含む)、および + 1268 から + 1744 の下流隣接領域 (終止コドンを含む) を、以下のプライマーを使用して、MC58 から増幅した:

【0124】

【化1】

U33 FOR 5'-GCTCTAGAGATGAGTCGAACACAATGAACAATGTCCTGA-3' (SEQ ID

NO:26);

U33REV 5'-TCCCCCGGGCTCTTGTCTTGGCAGGCGGCGA-3' (SEQ ID NO:27);

D33FOR 5'-TCCCCCGGGCACGGGATATGTGTGGC-3' (SEQ ID NO:28),

D33REV 5'-CCCGCTCGAGAGTAGGGACAACCGG-3' (SEQ ID NO:29)

10

。

【0125】

これらのフラグメントを、pBluescript (Stratgene, Milan, Italy) にクローニングし、標準的技術 (Sambrook and Russell, Molecular Cloning. A Laboratory Manual (2001)) を使用して *E. coli* DH5 に形質転換した。一旦、全てのサブクローニングが完遂されると、天然のコンピテント *Neisseria* MC58 株、*Neisseria* BZ232 株および *Neisseria* NMB 株を、チョコレート寒天プレート (chocolate agar) (Remel, Laztakas, KA) 上で一晩増殖したいくつかのコロニーを選択し、これらを、1  $\mu$ g のプラスミド DNA を含有する 20  $\mu$ l の 10 mM Tris-HCl (pH 6.5) と混合することによって形質転換した。この混合物をチョコレート寒天プレート上にスポティングし、5% CO<sub>2</sub>、37 で、6 時間インキュベートし、次いで、PBS 中に希釈し、そして、7  $\mu$ g/ml のエリスロマイシンを含有するチョコレート寒天プレートに塗った。これらの3つの株の各々についてエリスロマイシン耐性コロニーのゲノム中の *gna33* 遺伝子の非存在を、以下のプライマーを使用する PCR によって確認した:

20

30

【0126】

【化2】

F33 5'-GCTCTAGAGGGCGACGACAGGCGG-3' (SEQ ID NO:30) および

R33 5'-CCCGCTCGAGTTACGGGCGGTATTCGG-3' (SEQ ID NO:31)

。これらのプライマーは、それぞれ、*gna33* 遺伝子の 5' センス鎖および *gna33* 遺伝子の 3' アンチセンス鎖に対応した。*GNA33* 発現の欠失は、以下で説明されるようなウェスタンブロット分析によって確認された。

40

【0127】

(モノクローナル抗体 (mAb) 試薬)

フローサイトメトリー、殺菌剤、およびインビボ保護実験 (*in vivo* protection experiment) に使用される抗体としては、以下が挙げられた: Rijksinstituut Voor Volksgezondheid en Milieu, Bilthoven, The Netherlands、または Wendell Zollinger, Walter Reed Army Institute of Research, Washington DC から得られる髄膜炎菌 PorA P1.2 特異的サブタイプ mAb (MN 16C 13F4、サブクラス IgG2a);

50

カプセル化した、血清型 B , S E A M 1 2 および S E A M 3 ( G r a n o f f ら、J . I m m u n o l . ( 1 9 9 8 ) 1 6 0 : 5 0 2 8 - 5 0 3 6 ) , サブクラス I g G 2 a ) ならびに、血清型 C ( m A b 1 8 1 . 1 ( G a r c i a - O j e d a ら、I n f e c t . I m m u n . ( 2 0 0 0 ) 6 8 : 2 3 9 - 2 4 6 , サブクラス I g G 3 ) に特異的である抗ポリサッカリド m A b 。 M A b 1 8 1 . 1 は、K a t h r y n S t e i n , U . S . F o o d a n d D r u g A d m i n i s t r a t i o n によって提供された。このネガティブコントロールは、関連のない特異性のマウス I g G m A b ( V I G 1 0 ) 、または r G N A 3 3 を発現するのに使用された株由来の E . c o l i タンパク質に対して調製されたマウスポリクローナル抗血清からなった。

#### 【0128】

10

( G N A 3 3 の発現および精製 )

g n a 3 3 O R F を、プライマーとして使用される合成オリゴヌクレオチドを用いて、2 9 9 6 株 ( P . v a n d e r L e y a n d J . T . P o o l m a n , I n f e c t . I m m u n . ( 1 9 9 2 ) 6 0 : 3 1 5 6 , 1 9 9 2 ) 由来の染色体 DNA における P C R によって増幅された。増幅された DNA フラグメントを、H i s タグ化 ( H T - G N A 3 3 ) されたタンパク質またはシグナル配列または脂質改変配列のない可溶性タンパク質 ( r G N A 3 3 ) として、タンパク質を発現するために p E T - 2 1 b + ベクター ( N o v a g e n , M a d i s o n , W I ) にクローニングした。組換えタンパク質の発現を、上述のように実施された S D S - ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって評価した。この H i s タグ化タンパク質は、N i <sup>2+</sup> 結合体化キレートファーストフロー S e p h a r o s e ( A m e r s h a m - P h a r m a c i a B i o t e c h , U p p s a l a , S w e d e n ) のアフィニティークロマトグラフィーによって精製し、そして非タグ化形態を、モノイオン交換樹脂 ( A m e r s h a m - P h a r m a c i a ) を使用する F P L C によって精製した。

20

#### 【0129】

( ポリクローナル抗 G N A 3 3 抗血清の調製 )

G N A 3 3 に対する抗血清を調製するために、2 0 μ g の精製した、H T - G N A 3 3 または非タグ化 r G N A 3 3 を、6 週齢の C D 1 雌性マウス ( 1 グループ当たり 4 ~ 1 0 のマウス ) を免疫するために使用された。これらのマウスを、C h a r l e s R i v e r ( I t a l i a S . P . A . , C a l c o , I t a l y , または H o l l i s t e r , C a l i f o r n i a ) から入手した。組換えタンパク質は、初回投薬について完全フロイントアジュバント ( C F A ) と共に i . p . で投与し、第 2 回追加免疫投薬 ( 第 2 1 日目 ) および第 3 回投薬 ( 第 3 5 日目 ) について不完全フロイントアジュバント ( I F A ) と共に i . p . で投与した。血液サンプルを第 3 4 日目および第 4 9 日目に採取した。

30

#### 【0130】

( モノクローナル抗体の調製 )

4 ~ 6 週齢の雌性 C D 1 マウスを、第 3 回目の投薬はアジュバントなしで投与した以外、上述のように免疫した。3 日後に、マウスを屠殺し、そして、それらの肝細胞を、1 黒色腫細胞に対して 5 脾臓細胞の比で黒色腫細胞 P 3 X 6 3 - A g 8 . 6 5 3 と融合した。H A T 選択培地中での 2 週間のインキュベーション後に、ハイブリドーマ上清は、E L I S A によって抗体結合活性についてスクリーニングした。この E L I S A を、この N . m e n i n g i t i d i s M 7 株は、0 . 0 2 5 % パラホルムアルデヒドで処理することによって不活性化されているナノカプセル化した N . m e n i n g i t i d i s M 7 株 ( S t e p h e n s ら、I n f e c t . I m m u n . ( 1 9 9 1 ) 5 9 : 4 0 9 7 - 4 1 0 2 ) でコートされたマイクロタイタープレート上で実施した。G N A 3 3 特異的抗体を分泌するハイブリドーマを、限界希釈によって 2 回クローン化し、次いで、増殖し、組織培養における次なる使用または B A L B / c マウスにおける腹水産生の為に凍結した。

40

#### 【0131】

これらのモノクローナル抗体のサブクラスを、マウスモノクローナル抗体アイソタイプングキット ( A m e r s h a m - P h a r m a c i a . ) を使用して決定した。選択された

50

mAbの中に、1つのIgG2a抗GNA33mAb(mAb 25と命名した)を、以下に説明した、結合研究または機能研究の全てにおいて使用された。このモノクローナル抗体を、Hi-Trap親和性カラム(Amersham-Pharmacia)によってマウス腹水から精製し、PBS緩衝液での徹底的な透析の後に、精製したmAbの濃度は、基準としてBSAを使用する改変Lowry法(DC, Bio-Rad, Rome, Italy)を使用して決定した。mAb 25結合の特異性を、MC58株、BZ232株およびNM B株ならびにそれぞれのGNA33ノックアウト体(MC58 GNA33, BZ232 GNA33およびNM B GNA33; 以下を参照のこと)から調製された膜タンパク質を使用するウェスタンブロットによって決定された。

#### 【0132】

10

(生カプセル化髄膜炎菌の表面に対する抗血清の結合)

ポリクローナル抗GNA33抗血清およびmAb 25の、生Nm B株の表面に結合する能力は、以前に記載されたように実行される(Moeら, Infect. Immun. (1999) 67: 5664-5675)、間接蛍光アッセイのフローサイトメトリー検出を使用して決定された。図1Aは、代表的な4つのNm B株、親株2996(P1.5, 2)および他の3つの株である、M3735(P1.5, 2)、M4207(P1.5)およびMC58(P1.7, 16)に対するポリクローナル抗rGNA33抗血清の結合を示す。抗GNA33ポリクローナル抗血清は、2996株およびM3735株とのみ反応した。この抗カプセルポジティブコントロールmAbは、4つ全ての株に結合した一方、E. coliのタンパク質で免疫された動物から調製されたネガティブコントロール抗血清は、バックグラウンド結合のみを示した。図1Bは、3つの株(M3735[P1.5, 2], M4207[P1.5]およびMC58[P1.7, 16])の細菌細胞表面への抗GNA33 mAb 25の結合を測定する類似の実験の結果を示す。このmAbは、M3735(P1.5, 2)株にのみ結合した。

20

#### 【0133】

表Iは、22の遺伝的に多様なカプセル化された髄膜炎菌株(21の血清型Bおよび1つの血清型C)由来の生きている細菌の表面に結合する、抗GNA33抗血清またはmAb 25の能力を測定するフローサイトメトリーの結果をまとめている。この抗GNA33抗体は、P1.5, 2血清型またはP1.2血清型を有する株にのみ結合した(9のうち9に対して、他のPorA血清型を有する13株のうち0である;  $P < 0.001$ )。9つのポジティブ株のうち1つである、M986は、他の8つの株よりも弱い結合を示した(以下を参照のこと)。PorAのループ1上に存在するP1.5エピトープを発現するが、P1.2エピトープ(ループ4)を発現しない3つの株(M4207、1000およびBZ83)に対して結合はなかった。PorA(すなわち、P1-)を発現しないM136株に対する結合も存在なかった。これらのデータは、細菌表面に対する抗GNA33抗体の結合はPorA血清型P1.2の発現と相関することを示している。

30

#### 【0134】

(補体依存的殺菌抗体活性)

殺菌活性を、以前に説明されたように測定された(Moeら, Infect. Immun. (2001) 69: 3762-3771)。述べない限り、この補体供給源は、ELISAで試験した場合に、血清型Bまたは血清型Cのポリサッカリドに対して検出可能な抗カプセル抗体も、20%または40%の最終血清濃度で、標的株に対する検出可能な内因性の殺菌活性を有さない健康な成人(MAS)に由来するヒト血清であった。以下のようにいくつかの実施形態において、未処置の無ガンマグロブリン血症の患者に由来する血清(Steelera, Infect. Immun. (1984) 44: 452-458)、仔ウサギ血清、または成体ラット血清を補体供給源として使用して、殺菌活性は測定した。

40

#### 【0135】

(動物防御)

抗GNA33抗体が、N. meningitidis血清型B菌血症に対する受動的防御

50

を付与する能力を、腹腔内チャレンジした乳児ラットにおいて試験した。このアッセイを、以前に記載されるように実行した (Moeら、Infect. Immun. (1999) 67: 5664 - 5675)。簡潔には、チャレンジの開始時にコロニーを取り、ブロス培養物中に接種し、そして増殖させ、殺菌アッセイについて上記したように調製した。感受性を最大化するために株 M986 を用いて、その動物に、0 時点で、約  $5 \times 10^3$  のチャレンジ MenB 試験株と混合した試験抗血清およびコントロール抗血清の異なる希釈物  $100 \mu\text{l}$  を、腹腔内注射した。他の試験株を用いた実験において、この抗体を、0 時点で腹腔内投与し、そして細菌チャレンジを 2 時間後に腹腔内で行った。使用したポジティブコントロール抗膜 mAb は、SEAM3 であった。細菌チャレンジの 18 時間後に、針と約  $10 \mu\text{l}$  のヘパリン ( $1000$  単位 /  $\text{ml}$ ; Fujisawa USA、Deerfield, IL) (保存料なし) を含むシリンジとを用いて、心臓穿刺によって血液試料を獲得した。 $1 \mu\text{L}$ 、 $10 \mu\text{L}$  および  $100 \mu\text{L}$  の血液アリコートをし、チョコレート寒天上に配置した。血液  $1 \text{ml}$  当たりの CFU を、このプレートを  $37^\circ\text{C}$  で  $5\% \text{CO}_2$  中にて一晩インキュベートした後に決定した。相乗平均 CFR /  $\text{ml}$  の計算のために、滅菌培養物を受けた動物に、 $1 \text{CFR} / \text{ml}$  という値を割り当てた。

10

#### 【0136】

(SDS-PAGE およびウェスタンブロット)

髄膜炎菌株の総細胞抽出物を、以下のように調製した。シングルコロニーを、 $0.25\%$  グルコースを補充した Mueller-Hinton ブロス (Difco、Detroit, MI)  $7 \text{ml}$  中で、 $0.5 \sim 0.7$  の  $A_{620 \text{nm}}$  まで増殖させた。その細菌を、 $5000 \times g$  で 15 分間遠心分離することによって収集し、そして PBS 中に再懸濁した。凍結-解凍後、細菌懸濁物をサンプル緩衝液 ( $0.06 \text{M}$  Tris-HCl (pH 6.8)、 $10\%$  (V/V) グリセロール、 $2\%$  (W/V) SDS、 $5\%$  (V/V) 2-メルカプトエタノール) と混合し、そして 10 分間煮沸した。髄膜炎菌株由来の精製タンパク質 ( $0.5 \mu\text{g} / \text{レーン}$ ) または総細胞抽出物 ( $25 \mu\text{g}$ ) を、 $12.5\%$  の SDS-ポリアクリルアミドゲル上 (Laemmli、U.K、Nature (1970) 227: 680 - 685) にロードし、そしてニトロセルロース膜上に移した (Towbinら、Proc. Natl. Acad. Sci. (1979) 76: 4350 - 4354)。トランスファー緩衝液 ( $0.3\%$  Tris 塩基、 $1.44\%$  グリシン、 $20\%$  (v/v) メタノール) を使用して、4 にて  $150 \text{mA}$  で 2 時間トランスファーを実行した。このニトロセルロース膜を、飽和緩衝液 (PBS 中  $10\%$  スキムミルク、 $0.1\%$  Triton X100) 中で 4 で一晩インキュベートすることによって飽和した。この膜を洗浄緩衝液 (PBS 中の  $3\%$  スキムミルク、 $0.1\%$  Triton X100) で 2 回洗浄し、洗浄緩衝液で 200 倍希釈されたマウス抗血清、最終濃度が  $6 \mu\text{g} / \text{ml}$  の mAb 25、または抗 PorA P1.2 mAb の 100 倍希釈希物と共にその後、ホースラディッシュペルオキシダーゼで標識された抗マウス Ig (Dako、Glostrup、Denmark) の 2000 倍希釈物と共に  $37^\circ\text{C}$  で 2 時間インキュベートした。膜を、PBS 中の  $0.1\%$  Triton X100 で 2 回洗浄し、Opti-4CN Substrate Kit (Bio-Rad) を用いて発色させた。水を加えることによって反応を停止させた。

20

30

40

#### 【0137】

(ペプチドスポット合成)

ペプチドスポット合成を、モデル ASP 222 自動スポット合成機 (ABIMED) およびジイソプロピルカーボジイミド (DIC) / N-ヒドロキシベンゾトリアゾール (HOBt) 活性化 (Frank および Overwin、Methods Mol. Biol. (1996) 66: 149 - 169) を用いて、アミノ-PEG セルロース膜 (ABIMED、Langerfeld, Germany) 上で行なった。インサイチュ調製された、フルオレニルメトキシカルボニル (Fmoc) - アミノ酸誘導体の HOBt エステル ( $0.2 \text{M}$ ) をカップリング反応にした。スポット上の遊離アミノ官能基を、ジメチルホルムアミド中のプロモフェノールブルーの溶液で処理した。これにより、青色染色を生じ

50



る、この染色により、全ての合成工程を可視的に観察することができた。最終サイクルの後、全てのペプチドを2%無水酢酸でN末端をアセチル化した。合成の最後に、トリフルオロ酢酸/トリイソブチルシラン/水/ジクロロメタン(50/3/2/45)の混合物を用いて、側鎖保護基を取り除いた。

#### 【0138】

(ペプチド結合アッセイ)

セルロース結合ペプチドを、ペプチド間の疎水性相互作用を防ぐためにエタノールに浸した。非特異性結合を、0.05%のTween 20を含むTris緩衝化生理食塩水(TBS: 50mM Tris-HCl、137mM NaCl、27mM KCl、pH 7.0)(T-TBS)中の2%カゼイン(10ml)と共に、4で一晩セルロースシートをインキュベートすることによって、ブロックした。このシートを、T-TBSブロッキング緩衝液で100倍希釈した、抗GNA33mAb 25(6µg/ml)または抗PorA 1.2mAbと共に37で2時間インキュベートした。次にアルカリホスファターゼ結合体化ヤギ抗マウスIgG(BioRad)を、37で1時間、T-TBSブロッキング緩衝液中3000倍希釈で加えた。シートをT-TBSで3回洗浄し、基質緩衝液(100mM Tris、pH 8.9、100mM NaCl、2mM MgCl<sub>2</sub>)中のプロモ-4-クロロ-3-インドリル-ホスフェート(BCIP)(Sigma、Steinheim、Germany)および3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-2,5ジフェニル-テトラゾリウムブロミド(MTT; Sigma)と共にそのシートをインキュベートすることにより、結合の検出を達成した。シグナルの定量評価を、Umax Speedy II 2200オプティカルスキャナを用いて行なった。

10

20

#### 【実施例】

#### 【0139】

(実施例1)

(間接蛍光フローサイトメトリーにより測定される、細菌細胞表面への抗GNA33抗体の結合)

CD1マウスをrGNA33(2996株由来の遺伝子によってコードされる)を用いて免疫化した。得られたポリクローナル抗体含有抗血清を、間接免疫蛍光結合アッセイのフローサイトメトリー検出により測定される、様々なMenB株の生細菌細胞への結合能力について試験した。図1Aは、4つの代表的なMenB株、親2996株(P1.5, 2)および3つの他の株(M3735株(P1.5, 2)、M4207株(P1.5)およびMC58株(P1.7, 16))へのポリクローナル抗rGNA33抗血清の結合を示す。抗GNA33ポリクローナル抗血清は、2996株およびM3735株のみと反応した。抗莢膜ポジティブコントロールmAbは4つの株全てと結合したが、E.coliタンパク質で免疫化された動物から調製されたネガティブコントロール抗血清は、バックグラウンド結合のみを示した。図1Bは、3つの株(M3735株(P1.5, 2)、M4207株(P1.5)およびMC58株(P1.7, 16))の細菌細胞表面への抗GNA33mAb 25の結合を測定する、同様の実験の結果を示す。mAbはM3735株(P1.5, 2)のみと結合した。

30

#### 【0140】

表1は、22個の遺伝的に多様な莢膜化髄膜炎菌株(21個の血清型Bおよび1つの血清型C)からの生細菌の表面に結合する、抗GNA33抗体またはmAb 25の能力を測定するフローサイトメトリー実験の結果を要約したものである。抗GNA33抗体は、P1.5, 2血清型またはP1.2血清型を有する株にのみと結合した(9株中9株; これに対して、他のPorA血清型を有する13株中0株;  $P < 0.001$ )。9個のポジティブ株の1つであるM986株は、他の8個の株より低い結合を示した(下記参照)。P1.5エピトープ(PorAのループ1上に存在、Sacchiら、Infect. Dis. (2000) 182: 1169-1176)を発現するが、P1.2エピトープ(ループ4)を発現しない、3つの株(M4207株、1000株およびBZ83株)への結合はなかった。PorAを発現しない(すなわち、P1-)M136株への結合も

40

50

またなかった。これらのデータは、細菌表面への抗 G N A - G N A 3 3 抗体の結合が P o r A 血清型 P 1 . 2 の発現と関連することを示している。

#### 【 0 1 4 1 】

##### ( 実施例 2 )

( 異なる N . m e n i n g i t i d i s B 群株から調製された総膜画分のウェスタンブロット )

細菌表面への抗 G N A 3 3 抗体の結合と P 1 . 2 血清型の明らかな関係は、予想外であった。この関係を代表的な株から調製した総タンパク質のウェスタンブロットによりさらに研究し、そして S D S - P A G E により解決した。4つの血清型 B 株 ( フローサイトメトリーで抗 G N A 3 3 表面結合についてネガティブであった2つの株 ( N G 3 / 8 8 株 ( P 1 . 7 , 1 ) および M C 5 8 株 ( P 1 . 1 7 , 1 6 ) 、およびポジティブであった2つの株 ( B Z 2 3 2 株および N M B 株 ( 共に P 1 . 5 , 2 ) ) からの結果を図 2 に示す。データはまた、G N A 3 3 をコードする遺伝子が不活性化された3つの株 ( M C 5 8 株、B Z 2 3 2 株および N M B 株 ) からの総膜調製物について示す。

#### 【 0 1 4 2 】

図 2 A において、約 4 8 k D a の見かけの質量を有する単一バンドを、2つの非 P 1 . 2 株 ( N G 3 / 8 8 株 ( レーン 3 ) および M C 5 8 株 ( レーン 4 ) ) からの膜調製物中の抗 G N A 3 3 m A b 2 5 によって検出した。バンドは、r G N A 3 3 ( レーン 1 ) に予想される見かけの分子量を有し、コントロール E . c o l i 株 ( レーン 2 ) から、および M C 5 8 株 ( レーン 5 ) 中の G N A 3 3 ノックアウトから調製された総タンパク質中に存在しなかった。レーン 6 およびレーン 8 は、それぞれ B Z 2 3 2 株および N M B 株から調製される総タンパク質を含む。これらの株は共に、P o r A 血清型 P 1 . 5 , 2 を有する。それぞれのレーンにおいて、2つの抗 G N A 3 3 反応性バンドが存在する。より高分子量である 4 8 k D a バンドは B Z 2 3 2 株および N M B 株 ( それぞれレーン 7 とレーン 9 ) から誘導される G N A 3 3 ノックアウトに存在せず、この結果はこのタンパク質が G N A 3 3 であることを確証する。より低分子量である抗 G N A 3 3 反応性バンドは、P 1 . 2 と反応性である m A b との反応性に基づき P o r A であるようである ( 図 2 B を参照のこと ) 。

#### 【 0 1 4 3 】

図 2 B は、図 2 A に記載されるものと同じタンパク質試料のウェスタンブロットを示すが、一次検出抗体として抗 P o r A P 1 . 2 m A b を使用する。予想されるように、r G N A 3 3 ( レーン 1 ) と、ネガティブコントロール E . c o l i タンパク質 ( レーン 2 ) とまたは P o r A P 1 . 2 ( レーン 3 , 4 および 5 ) を発現しない株から調製される総膜と、抗 P o r A m A b との反応性はなかった。しかしながら、P o r A に期待される見かけの質量を有するタンパク質が、B Z 2 3 2 株 ( レーン 6 ) 、B Z 2 3 2 G N A 3 3 ( レーン 7 ) 、N M B ( レーン 8 ) および N M B G N A 3 3 ( レーン 9 ) からの膜調製物中に検出された。それらは P o r A P 1 . 2 を発現する。このタンパク質はまた、それらのそれぞれの G N A 3 3 ノックアウトからの調製物 ( それぞれレーン 7 およびレーン 9 ) 中に存在する。これらの結果は、図 2 A の抗 G N A 3 3 m A b と反応する 4 1 k D a の見かけの質量を有するタンパク質が P o r A であったことを確証する。対照的に、抗 P o r A P 1 . 2 m A b は、ウェスタンブロットで G N A 3 3 と反応しなかった。

#### 【 0 1 4 4 】

##### ( 実施例 3 )

( 抗 G N A 3 3 m A b 2 5 によって認識される表面露出した P o r A エピトープのペプチドマッピング )

抗 P 1 . 2 m A b は、ループ 4 上に存在する P o r A 上のエピトープを認識することが知られている。表 2 は、本研究に含まれる選択された M e n B 株についてのループ 4 可変領域 ( V R <sub>2</sub> ) アミノ酸配列の比較を示す ( 最近改訂された P o r A V R 命名の慣例会議について S a c c h i ら、I n f e c t . D i s . ( 2 0 0 0 ) 1 8 2 : 1 1 6 9 - 1 1 7 6 、または <http://mlst.zoo.ox.ac.uk/Meningoc> )

occusを参照のこと)。表2中に、抗GNA33 mAbによる表面結合についてネガティブであった、2つの密接に関連するVR<sub>2</sub>型(それぞれ、BZ83株(P1.10)からのP1.10およびM4207株(P1.10-1)からのP1.10-1)の配列を含む。2つのネガティブ株のループ4配列は、6個のアミノ酸ペプチドで抗GNA33ポジティブ株と異なる。ポジティブP1.2株は、ヘキサペプチドQTPKSEQ(配列番号16)またはQTPQSQ(配列番号17)を含むが、ネガティブP1.10株またはP1.10-1株は、ヘキサペプチドNKQNR(配列番号18)またはNKQNP(配列番号19)をそれぞれ含む(表2)。

#### 【0145】

特に、抗GNA33 mAb25によって認識される特定のアミノ酸配列を同定するために、GNA33のアミノ酸配列全体(表3)およびPorA(2996株からのP1.2-2)のループ4のアミノ酸配列全体に広がるオーバーラップ直鎖デカペプチド、GenBank登録番号X57180)を合成した(注釈:X57180中に与えられる配列は、配列QTP E(配列番号20)を有するVR<sub>2</sub>をコードする)。しかしながら、この配列はその後間違いであることが見出されている(C.T.Sacchi、CDC、Atlanta、GA,私信)。正しい配列はQTPQ(配列番号21)である。mAb25で8色素単位以上ポジティブであったペプチドが表3に詳述される。8個のポジティブGNA33ペプチドは全て、トリペプチドQTPを共有する。QTP配列はまた、mAb25と反応した5つの全てのポジティブPorA P1.2ペプチドの中に存在する。しかしながら、QTPを含むがその前のFVQ配列を含まない3つのループ4ペプチドへのmAb結合が存在しなかったため、QTP配列は、抗GNA33結合に十分でない。

#### 【0146】

抗GNA mAb25結合に十分である、それぞれのタンパク質の最小ペプチド配列を規定するために、AQAFQTPVHS(図4A;配列番号6)から始めて、次第に小さくなるペプチド、およびTPAHFVQQTP(図4B;配列番号22)で始めてPorA P1.2ペプチドを合成した。mAbは、FQTPV(配列番号2)を含むGNA33ペプチド、およびFVQQTP(配列番号23)を含むPorA P1.2ペプチドと強く結合したが、より小さいどのペプチドとも結合しなかった。それぞれのタンパク質について同じ最小エピトープを、PorAのループ4の適切なペプチドおよびGNA33内に含まれる、アミノ酸の体系的なアラニン置換またはグリシン置換により、同定した。PorAループ4VR型P1.2-2についてのアラニン置換のデータの概要について、表4を参照のこと。

#### 【0147】

これらのデータは、rGNA33によって惹起された抗体が、QTP配列を含むPorAのP1.2エピトープとの交差反応性の結果として、P1.2エピトープを発現するNm株に対して殺菌作用を有することを示唆している。

#### 【0148】

##### (実施例4)

(抗GNA33抗体および抗PorA P1.2抗体のP1.2 NmB株への比較結合)

抗rGNA33抗体がPorA P1.2エピトープと交差反応するという予想外の発見は、PorA血清型P1.2によって惹起された抗体の活性とrGNA33によって産出された抗体の活性を比較する機会を与えた。1つの例外を除いて、試験した9個のP1.2株について、抗GNA33 mAbの濃度依存結合は、コントロール抗PorA P1.2 mAbの濃度依存結合と類似していた(図5Aの8047株およびBZ232株についての代表的なデータを参照のこと)。例外のM986株は、他のP1.2株への結合と比較した場合に、相対的に弱い抗GNA33抗体結合を示した(表5B)。対照的に、抗PorA P1.2 mAbによる結合は、M986を含む全てのP1.2株について同様であった。

#### 【0149】

10

20

30

40

50

M 9 8 6 株の V R<sub>2</sub> 配列型は P 1 . 2 であると報告され ( G e n B a n k 登録番号 U 9 2 9 1 2 )、それは、F V Q Q T P K セグメント ( 配列番号 2 4 ) を含むループ 4 配列によって定義され、8 0 4 7 株および B Z 2 3 2 ( V R<sub>2</sub> 型 P 1 . 2 - 2 ; 表 1 ) についての F V Q Q T P Q ( 配列番号 2 5 ) と対照的である。この V R<sub>2</sub> 型は、特定の P 1 . 2 エピトープのアミノ酸配列に基づく。V R<sub>2</sub> 配列型 P 1 . 2 ( M 3 7 3 5 株および M 5 6 8 2 株 ) を有することが報告されている他の 2 つの株は、それぞれの株中に、コントロール抗 P o r A P 1 . 2 m A b のそれぞれの結合と匹敵した、強い抗 G N A 3 3 抗体結合を示した ( 例えば、M 3 7 3 5 株 ( 図 1 A ) および M 5 6 8 2 ( 図 5 B ) を用いた結合のデータ )。M 9 8 6 株、M 3 7 3 5 株および M 5 6 8 2 株中の P o r A ループ 4 の V R<sub>2</sub> 配列型は、2 回目のヌクレオチド配列決定によって P 1 . 2 であることが確認された。従って、配列の差異 ( Q に対する K ) は、M 9 8 6 株との減少した抗 G N A 3 3 結合活性を説明するために十分であることが明らかではない。

10

# 【 0 1 5 0 】

( 実施例 5 )

( 殺菌活性 )

P o r A P 1 . 2 ( r G N A 3 3 ) に対するマウス m A b ( m A b 2 5 ) ならびに血清 B 型に対するマウス m A b ( S E A M 1 2 ) および血清 C 型に対するマウス m A b ( m A B 1 8 1 . 1 ) 多糖莢膜に対するマウス m A b の補体依存殺菌活性を比較した。N m C 株 M 5 9 5 4 を試験するために使用した血清 C 型抗莢膜 m A b ( サブクラス I g G 3 ) を除いて、他の m A b の全サブクラスは I g G 2 a であった。ヒト補体の存在下において抗 P o r A P 1 . 2 m A b の B C<sub>50</sub> は、全ての 9 株について 0 . 5 μ g / m l 未満であった。血清 B 型抗莢膜 m A b の対応する B C<sub>50</sub> 値は高く ( 5 ~ 1 2 μ g / m l の範囲 )、そして血清 C 型 m A b ( 株 M 5 9 5 4 ) については 1 μ g / m l 未満であった。表 5 にまとめたように、抗 G N A 3 3 m A b の殺菌活性は多様であり、そして使用した補体供給源に依存した。3 つの株 ( 8 0 4 7、N M B および M 3 7 3 5 ) について、ヒト補体の存在下において抗 G N A 3 3 m A b の B C<sub>50</sub> 値は、7 ~ 1 5 μ g / m l の範囲であった。これらの株の値は、抗莢膜抗体の値と類似した。残りの 6 つの株 ( 2 9 9 6、B Z 2 3 2、M 5 5 4 5、M 5 6 8 2、M 5 9 5 4 および M 9 8 6 ) について、ヒト補体の存在下において、抗 G N A 3 3 m A b を用いて観察された殺傷は存在しなかった ( 内在性殺菌活性のない正常成体由来の血清を用いて試験した場合、B C<sub>50</sub> は 6 0 μ g / m l 未満 ( 表 5 ) であり、そして無グロブリン血症を有する患者由来の血清を用いて試験した場合、3 0 μ g / m l 未満であった )。胎仔ウサギ血清を補体供給源として使用した場合、6 株のうち 1 つを除いて全てが、抗 G N A 3 3 誘導溶解に対して感受性であった。感受性株の B C<sub>50</sub> 値は、1 μ g / m l 以上 8 μ g / m l の範囲であった ( 表 5 )。一方、例外は株 M 9 8 6 であり、ここで、ヒトおよびウサギ補体で試験した場合、抗 G N A 3 3 m A b を用いて観察された殺傷は存在しなかった ( B C<sub>50</sub> 値は、それぞれ 1 5 0 μ g / m l 超および 3 0 μ g / m l 超である )。この株に対する細菌溶解の欠如は、フローサイトメトリーによって測定されるように、m A b のより低い表面結合に関連し得る ( 図 5 B )。試験した 5 株に対して、ヒト補体を用いたポリクローナルマウス抗 r G N A 3 3 抗血清のそれぞれの殺菌力価は、抗 G N A 3 3 m A b 2 5 を用いて測定した結果と一致した ( 表 5 )。

20

30

40

# 【 0 1 5 1 】

( 実施例 6 )

( 抗 G N A 3 3 抗血清による受動性防御 )

M e n B 菌血症に対する受動性防御を与えるポリクローナルマウス抗 G N A 3 3 抗体の能力を、胎仔ラットモデルにおいて評価した。3 株を使用した : 8 0 4 7、ヒトまたはウサギの補体の存在下で抗 G N A 3 3 細菌溶解に感受性である株 ; B Z 2 3 2、すなわちヒト補体での抗 G N A 3 3 細菌溶解に耐性であるが、ウサギまたはラットの補体に感受性である株 ; および M 9 8 6、すなわちヒト、ウサギまたはラットの補体の存在下で抗 G N A 3 3 細菌溶解に耐性である株。このモデルにおいて試験する受動性防御の結果を、表 6 にまとめる。

50

## 【0152】

実験1において、ポリクローナルマウス抗GNA33抗血清の1:5または1:25希釈物(100 µl)を株8047の $5.8 \times 10^3$  CFUと混合し、そして菌血症に対して完全に保護したラットにi.p.で与え、チャレンジの18時間後に測定した。同様の実験において、株M986(抗GNA33細菌溶解に対して耐性の株)の $6.5 \times 10^3$  CFUと混合した抗GNA33抗血清の1:5または1:25(100 µl)を与えた全ての動物は、細菌血症を発症した。殺菌活性の欠如にかかわらず、抗GNA33抗血清で処理し、そして株M986でチャレンジした動物血液の幾何平均CFU/mlは、E.coliタンパク質に対して調製したネガティブコントロール抗血清を用いて試験したコントロール動物よりも、10~20倍低かった( $P = 0.02$ )。同様の結果は、抗GNA33 mAb 25を用いた第2の実験(実験2)において観察された。全6匹のラットを、i.p.によりmAb 25の20 µgで前処理し(時点0)、2時間後に株M986の $3.5 \times 10^3$  CFUでチャレンジし、チャレンジの18時間後に採集した血液サンプルには細菌が存在した。しかし、幾何平均CFU/mlは、無関係のmAbを用いて前処理したコントロール動物の幾何平均CFU/mlの0.3%よりも少なかった( $p < 0.02$ )。同様の実験において、ラット1匹あたり20 µgの抗P1.2 mAbは、株M986に対して完全な防御であり、そしてラット1匹あたり2 µgは部分的防御であった(試験した6匹のうち1匹のみが菌血症を発症した)。

10

## 【0153】

第3および第4(実験3および4)において、ラットを株BZ232(ヒト補体での抗GNA33細菌溶解に耐性であるが、ウサギまたはラットの補体に感受性である)でチャレンジした。この実験において、この株に対する抗GNA33 mAbの保護活性は、コントロールの抗莢膜抗体の防御活性と同じであるか、または高く、そして抗PorA P1.2 mAbの防御活性よりもわずかに少ないだけである。

20

## 【0154】

上に示すように、rGNA33を用いた免疫の結果として生じたマウス抗体は、補体の存在下においてN.meningitidis株の細菌溶解を媒介し得る。なぜなら、抗GNA33抗体と、ポーリン(porin)タンパク質(PorA)のP1.2エピトープとの交差活性に起因するからである。この結果は、予測した結果ではなかった。なぜなら、GNA33およびPorAは十分な配列相同性を有しておらず、構造的および機能的に関連がなく、そして異なる細菌的亜構造に物理的に局在するからである。従って、GNA33はPorAの免疫学的模倣物として記載され得る。

30

## 【0155】

GNA33によって示される分子模倣は例外的である。第1に、GNA33は上記のような非免疫グロブリンタンパク質であり、PorAとは関連がない。第2に、rGNA33は抗体反応を誘発し、これは、(多くの点において)外部膜ピヒクル調製物におけるネイティブなPorAによって誘発される抗体反応と機能活性が類似する。第3に、本明細書中に記載されるポリクローナルマウス抗rGNA33抗血清を、2つの独立した研究室において調製し、そして殺菌データを独立して繰り返した。

## 【0156】

以前の研究において、PorA P1.2のループ4に対応するペプチドを用いた免疫は、ネイティブタンパク質に結合されたか、または補体の存在下で細菌溶解を媒介する抗体を惹起することに失敗した(McGuinnessら、J. Exp. Med. (1990) 171:1871-1872)。おそらく、より小さなペプチドフラグメントは、ネイティブポーリンに示される安定なコンフォメーションをとることは出来なかった。同様に、E.coliまたはB.subtilisにおいて発現されるrPorAを用いた免疫は、組換えタンパク質において表面受容可能なPorAエピトープのコンフォメーションがリボソームまたは界面活性剤を用いて再構築される場合を除いては、殺菌抗体を惹起することに失敗した(Christodoulidesら、Microbiology (1998) 144:3027-3037およびIdanpaan-Heikkiläら、Va

40

50

c c i n e ( 1 9 9 5 ) 1 3 : 1 5 0 1 - 1 5 0 8 )。これらの結果は、殺菌抗体の惹起を担うP o r Aのエピトープが立体的であることを示唆する。対照的に、本明細書中に示されるように、r G N A 3 3 模倣物を用いた免疫は、P o r A ループ 4 の P 1 . 2 エピトープと交差反応する殺菌抗体を惹起した。r P o r A と違って、免疫源として使用される組換え G N A 3 3 タンパク質が、組換え分子の再生についての必要性を有さず、フロイントのアジュバントと単に混合される場合に、これが生じる。

【 0 1 5 7 】

従って、G N A 3 3 ポリペプチド、エピトープ、G N A 3 3 に対して指向された抗体およびこれらの分子の使用は、記載されている。上記より、本発明の特定の実施形態が本明細書中に、例示目的のために記載されているが、種々の改変が、添付の特許請求の範囲によって規定される精神および範囲から逸脱することなくなされ得ることが理解される。

10

【 0 1 5 8 】

【 表 1 】

表

表 1 生存する、被包性 <i>N. meningitidis</i> 株の表面への抗GNA33抗体の結合を、 血清型分類およびPorA VR指定について、フローサイトメトリーによって測定した。					
Nm 株	国名	年	血清型分類 <sup>A</sup>	PorA VR 指定 (配列) <sup>B</sup>	抗 GNA33 <sup>C</sup>
M5954	米国	1997	C:2a:P1.2	ND	+
M5682	米国	1999	B:2a:P1.5,2	P1.5,2	+
M986	米国	1963	B:2a: P1.5, 2	P1.5,2	+
M3735	米国	1992	B:NT: P1.5,2	P1.5-1,2	+
M5545	米国	1998	B:NT:P1.5,2	P1.5-4,2-2	+
8047	米国	1978	B:2b:P1.5,2	P1.5-2,2-2	+
NMB	米国	1982	B:2b:P1.5,2	P1.5-2,2-2	+
BZ232	オランダ	1964	B:NT:P1.2	P1.5-2,2-2	+
2996	オランダ	1975	B:2b:P1.5,2	P1.5-1,2-2	+
M136	米国	1968	B:16,11: P1-	P1.5-1,2-2	-
M4207	米国	1997	B:10:P1.5	P1.5-1,10-1 <sup>C</sup>	-
1000	USSR	1989	B:NT:P1.5	P1.5-1,10-4	-
BZ83	オランダ	1984	B:P1.5,10	P1.5-1,10	-

10

20

30

40

NG6/88	ノルウェー	1988	B:NT: P1.1	P1.7-4,1	-
BZ198	オランダ	1986	B:NT: P.NST	P1.7-4,4	-
S3446	米国	1972	B:19,14: P1.22, 14	P1.22-1,14	-
IH5341	フィンランド	1985	B:15:P1.7,16	ND	-
CU385	キューバ	1980	B:4,7: P1.19,15	P1.19,15	-
SWZ107	スイス	1980	B:4:P.NST	P1.22-1,14	-
H44/76	ノルウェー	1976	B:15: P1.7, 16	P1.7, 16	-
NG3/88	ノルウェー	1988	B:8: P1.7,1	P1.7,1	-
MC58	イギリス	1985	B:15:P1.7,16	15:P1.7,16-2	-
^NST =利用可能な mAbを有する非血清サブタイプ ; - = PorA 発現が、SDS-PAGEによって検出できない。					
^Sacchi et al., <i>Infect. Dis.</i> (2000) 182:1169-1176 および <a href="http://neisseria.mist.net">http://neisseria.mist.net</a> によって提案された改変 PorA VR型指定命名法に基づく。					
^マウスポリクローナル抗GNA33血清および/またはmAB 25を用いて測定した。					

10

20

30

【 0 1 5 9 】

【 表 2 】



表 2: 異なるMenB株の細胞表面への抗GNA33抗体の結合			
株	VR2 血清型	PorAループ4 アミノ酸配列	表面結合
M3735	P1.2	HFVQ QTPKSQ PTLVP (SEQ ID NO:32)	ポジティブ
BZ232	P1.2-2	HFVQ QTPQSQ PTLVP (SEQ ID NO:33)	ポジティブ
2996	P1.2-2	HFVQ QTPQSQ PTLVP (SEQ ID NO:33)	ポジティブ
BZ83	P1.10	HFVQ NKQNQR PTLVP (SEQ ID NO:34)	ネガティブ
M4207	P1.10-1	HFVQ NKQNQP PTLVP (SEQ ID NO:34)	ネガティブ

10

20

【 0 1 6 0 】

【 表 3 】

表 3 PorA P1.2 (株2996) のGNA33およびループ4から調製された重複するペプチドに対する抗GNA33mAb25のエピトープマッピング			
GNA33 <sup>A</sup>	染色単位	PorA P1.2 <sup>A</sup> のループ4	染色単位
QDVSAQAFQT (SEQ ID NO:35)	0	YTPAHFVQQT (SEQ ID NO:37)	0
DVSAQAFQTP (SEQ ID NO:12)	23	TPAHFVQQTP (SEQ ID NO:22)	8
VSAQAFQTPV (SEQ ID NO:13)	27	PAHFVQQTPQ (SEQ ID NO:38)	10
SAQAFQTPVH (SEQ ID NO:14)	29	AHFVQQTPQS (SEQ ID NO:15)	14
AQAFQTPVHS (SEQ ID NO:6)	30	HFVQQTPQSQ (SEQ ID NO:39)	15
QAFQTPVHSF (SEQ ID NO:9)	30	FVQQTPQSQP (SEQ ID NO:40)	9
AFQTPVHSFQ (SEQ ID NO:10)	24	VQQTPQSQPT (SEQ ID NO:41)	4
FQTPVHSFQA (SEQ ID NO:11)	22	QQTPQSQPTL (SEQ ID NO:42)	0
QTPVHSFQAK (SEQ ID NO:12)	19	QTPQSQPTLV (SEQ ID NO:43)	2
TPVHSFQAKQ (SEQ ID NO:36)	2	TPQSQPTVP (SEQ ID NO:44)	2
<sup>A</sup> ペプチド配列を、発色したスポットが10染色単位であった場合に、抗GNA33mAbへの結合に対してポジティブとみなした。			

10

20

30

【 0 1 6 1 】

【 表 4 】

表 4: 抗GNA33mA25の結合に対するアラニン置換の効果

10-マーペプチド	相対的結合	コンセンサスペプチド  FVQQTPA (SEQ ID NO:54)
PGH FVQ QTP Q (SEQ ID NO:45)	8	
PAA FVQ QTP Q (SEQ ID NO:46)	8	
PAH AVQ QTP Q (SEQ ID NO:47)	1	
PAH FAQ QTP Q (SEQ ID NO:48)	4	
PAH FVA QTP Q (SEQ ID NO:49)	2	
PAH FVQ ATP Q (SEQ ID NO:50)	0	
PAH FVQ QAP Q (SEQ ID NO:51)	0	
PAH FVQ QTA Q (SEQ ID NO:52)	0	
PAH FVQ QTP A (SEQ ID NO:53)	2	

10

20

【 0 1 6 2 】

【 表 5 】

表 5

異なるNm株に対する抗GNA33抗体の殺菌活性

		ポリクローナル 抗血清	mAb 25	
		BC <sub>50</sub> (1/力価) <sup>A</sup>	BC <sub>50</sub> (μg/ml) <sup>A</sup>	
株	VR2 配列型	ヒト補体 <sup>B,C</sup>	ヒト補体 <sup>B</sup>	ウサギ補体
8047	P1.2-2	⇒16	15	<0.5
NMB	P1.2-2	⇒16	9	ND <sup>C</sup>
M3735	P1.2	ND	7	ND
2996	P1.2-2	<4	>60	<0.5
BZ232	P1.2-2	<4	>150	<0.5
M5682	P1.2	ND	>60	<0.5
M5954	P1.2	ND	>60	1
M5545	P1.2	ND	>60	8
M986	P1.2	<4	>150	>30

<sup>A</sup> 細菌細胞および20%の補体とともに 60分間 インキュベートした場合に、0時間と比較して1mlあたりCFUにおいて50%減少するBC<sub>50</sub>、mAbの濃度または抗血清の相互希釈。

<sup>B</sup> ヒト補体を用いた抗PorA P1.2 mAbのBC<sub>50</sub>値は、0.25 μg/ml～0.5 μg/mlの範囲であった。8つの血清B型株に対して、ヒト補体を用いた血清B型型抗カプセルmAb (SEAM12)のBC<sub>50</sub>は、5 μg/ml～15 μg/mlであった。ヒト補体を用いた血清C型抗カプセルmAb (181.1)の株M5954についてのBC<sub>50</sub>は、1 μg/ml未満であった。

<sup>C</sup> ND, 実施していない。

10

20

30

【 0 1 6 3 】

【 表 6 】

表 6: *N. meningitidis* 血清B型株 8047, M986, または BZ232 でチャレンジした胎仔ラット  
における抗GNA33抗体受動性防御

実験	株 (ラット1匹当たりのCFUチャ抗血清ジ)	処理 <sup>A</sup>	血清希釈または用量	18時間での血液培養物	
				ポジティブ/合計の数	CFU/ml (幾何平均, $10^3$ ) <sup>B</sup>
1	8047 ( $5.8 \times 10^3$ )	抗莢膜 mAb	2	0/5	<0.001
		抗-GNA33 抗血清	1:5	0/5	<0.001
		抗-GNA33 抗血清	1:25	0/5	<0.001
		抗- <i>E. coli</i> 抗血清	1:5	5/5	53
		無関係な mAb	2	5/5	63
1	M986 ( $6.5 \times 10^3$ )	抗莢膜 mAb	2	0/5	<0.001
		抗-GNA33 抗血清	1:5	5/5	19
		抗-GNA33 抗血清	1:25	5/5	41
		抗- <i>E. coli</i> 抗血清	1:5	5/5	408
		無関係な mAb	2	5/5	203
2	M986 ( $3.5 \times 10^3$ )	抗莢膜 mAb	20	1/6	0.002
		抗-GNA33 mAb	20	6/6	1.873
		抗-PorA P1.2 mAb	20	0/6	<0.001
		抗-PorA P1.2 mAb	2	1/6	0.003
		無関係な mAb	20	6/6	630
3	BZ232 ( $7.1 \times 10^3$ )	抗莢膜 mAb	10	3/6	<0.056
		抗-GNA33 mAb	15	0/6	<0.001
		抗-GNA33 mAb	3	1/6	<0.006
		抗-GNA33 mAb	0.6	5/6	0.282
		抗-PorA P1.2 mAb	15	0/6	<0.001
		抗-PorA P1.2 mAb	3	0/6	0.001
		無関係な mAb	15	6/6	>500.
4	BZ232 ( $4.7 \times 10^3$ )	抗-GNA33 mAb	0.6	5/6	4.562
		抗-PorA P1.2	3.0	0/6	<0.001
		抗-PorA P1.2	0.6	0/6	<0.001
		抗-PorA P1.2	0.12	3/7	0.022
		無関係な mAb	3	8/8	273

<sup>A</sup> 実験1において、細菌を、i.p.によるチャレンジの直前に、抗血清またはコントロールmAbと一緒に混合した。実験2、3および4において、0時間において、動物をmAbを用いてi.p.で処理した。2時間後、その動物を、細菌を用いてi.p.チャレンジした。両方の実験において、血液培養物をチャレンジの18時間後に得た。

<sup>B</sup> 幾何平均のCFU/mlの計算のために、滅菌培地を用いた動物に、1CFU/mlの値を割り当てた。実験1において、抗GNA33抗血清の1:5または1:25希釈を与えそして、株M986( $28.8 \times 10^3$ )でチャレンジした動物の組み合わせ群の幾何平均CFU/mlは、無関係なmAbまたは*E. coli*抗血清( $350 \times 10^3$ 、 $P = 0.02$ )を与えたコントロールの組み合わせた群のものよりも低かった。実験2、3および4において、抗GNA33 mAbで処置された動物の幾何平均CFU/mlは、無

10

20

30

40

50

関係な m A b を与えたコントロールの物より低かった (  $P < 0.02$  )。

【図面の簡単な説明】

【0164】

【図1】図1は、抗 G N A 3 3 抗血清 ( 1 A ) と生存する被包性の N m B 株の表面に対する抗体との結合を示す。図1Aは、間接性蛍光フローサイトメトリーによって決定された、ポリクローナル抗 G N A 3 3 抗血清と、生存する被包性の N m B 株 2 9 9 6、M 3 7 3 5、M 4 2 0 7、および M C 5 8 に対するコントロール m A b との結合を示す。コントロール m A b s および抗血清としては、抗血清型 B の被膜特異的マウス m A b ( S E A M 1 2、Grano f f ら、J. Immunol. ( 1 9 9 8 ) 1 6 0 : 5 0 2 8 - 5 0 3 6 )、N. meningitidis 血清型 m A b 抗 P o r A P 1. 2、および E. coli の外膜小胞によって免役したマウス由来のポリクローナル抗血清が挙げられる。図1Bは、抗 G N A 3 3 m A b 2 5 と N m B 株 M 3 7 3 5、M 4 2 0 7、および M C 5 8 に対するコントロール m A b との結合を示す。このマウスコントロール m A b としては、無関係の特異性を有する m A b ( V I G 1 0 ) および図1Aについて上記と同じ抗被包性 m A b および抗 P o r A P 1. 2 m A b が挙げられる。

【図2】図2は、異なる M e n B 菌株から調製され、そして S D S - P A G E によって分離された総膜分画のウェスタンブロットを示す。図2Aは、抗 G N A 3 3 m A b 2 5 との反応性を示す。レーン1、r G N A 3 3。レーン2、コントロール E. coli 細胞から調製された総タンパク質。レーン3、4および5：それぞれ、M e n B 菌株である、N G 3 / 8 8 ( P 1. 1 )、M C 5 8 ( P 1. 7, 1 6 )、M C 5 8 の変異体から調製された総タンパク質、M C 5 8 変異体において、G N A 3 3 をコードする遺伝子が不活化されている ( M C 5 8 G N A 3 3 )。レーン6、7、8および9：それぞれ、M e n B 菌株である B Z 2 3 2、B Z 2 3 2 G N A 3 3、N M B および N M B G N A 3 3 から調製された総タンパク質。4つの菌株全ては、血清型 P 1. 5, 2 である。図2Bは、図2Aに記載されるのと同じタンパク質サンプルのウェスタンブロットを示すが、一次検出抗体として抗 P o r A P 1. 2 m A b を用いている。

【図3】図3 ( 配列番号 1 ) は、代表的な G N A 3 3 ポリペプチドの全長アミノ酸配列を示す。下線を引かれた 1 ~ 2 1 位に存在するアミノ酸は、リーダー配列に一致する。

【図4】図4は、( A ) G N A 3 3 および ( B ) P o r A P 1. 2 ( 菌株 2 9 9 6 ) 由来のセグメントに対応する連続的小ペプチドへの抗 G N A 3 3 m A b 2 5 の結合を示す。示される個々のペプチドは、各タンパク質から調製された重複する 1 0 マーのペプチドを用いたマッピング研究から同定され、そして m A b 2 5 によって認識されているエピトープを含むことが示された。

【図5】図5は、間接性蛍光フローサイトメトリーによって決定されるように、生存する被包性 N m B へのマウス m A b の結合を示す。試験される m A b は、図1Bに整列して記載されている。図5Aは、菌株 8 0 4 7 ( ヒト補体を有する、 $B C_{50} = 15 \mu g / ml$  ) および B Z 2 3 2 ( ヒト補体を有する、 $B C_{50} > 150 \mu g / ml$  ) への抗 G N A 3 3 m A b 2 5 の濃度依存性結合を示す。両方の菌株は、ウサギ ( 原文参照のこと ) を用いて試験した場合、溶菌作用に対して感受性であった。図5Bは、菌株 8 0 4 7 ( P o r A V R<sub>2</sub> 型 P 1. 2 - 2 ) と比較した場合の、菌株 M 9 8 6 ( P o r A V R<sub>2</sub> 型 P 1. 2 ) および菌株 M 5 6 8 2 ( P o r A V R<sub>2</sub> 型 P 1. 2 ) への抗 G N A 3 の濃度依存性の結合を示す。M 9 8 6 は、抗 G N A 3 3 溶菌作用 ( ヒトまたはウサギ ) に対して耐性であり、M 5 6 8 2 は感受性であり ( ウサギ補体 )、そして菌株 8 0 4 7 は感受性であった ( ヒトまたはウサギ )。

【 圖 1 】

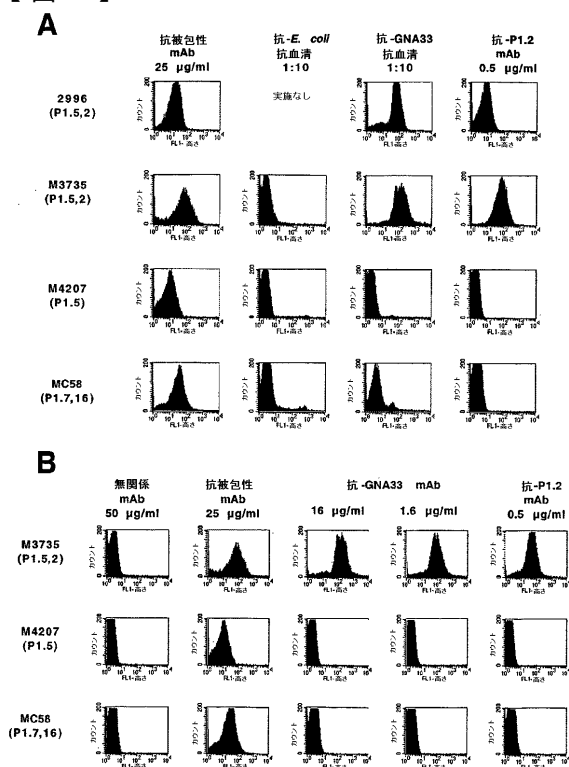


FIG. 1

【图 4】

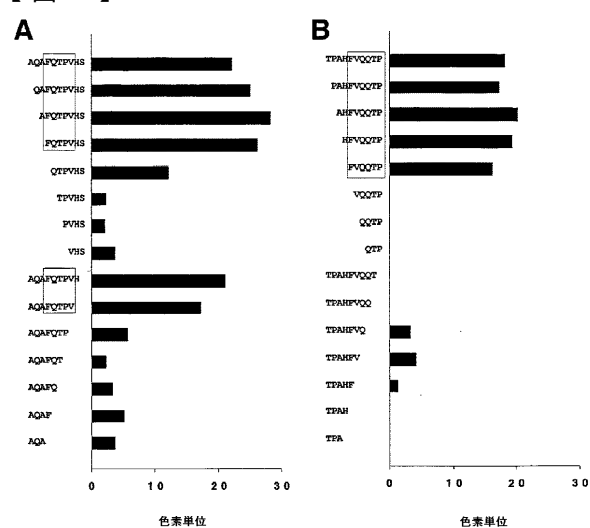


FIG. 4

【 図 5 】

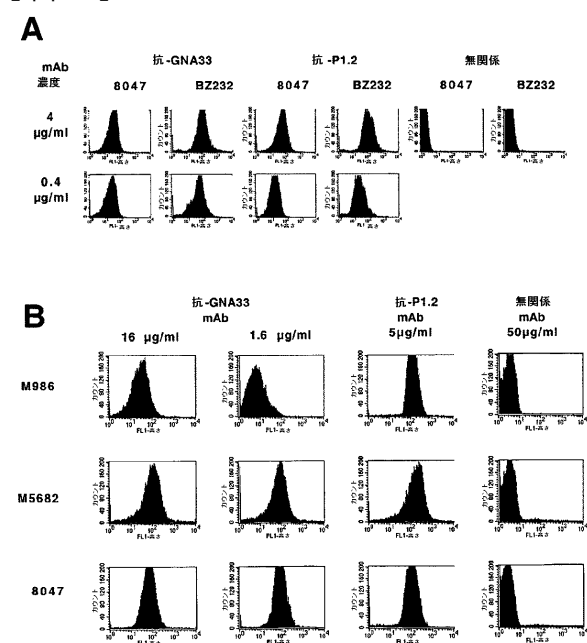


FIG. 5

## 【国際公開パンフレット】

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

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
24 October 2002 (24.10.2002)

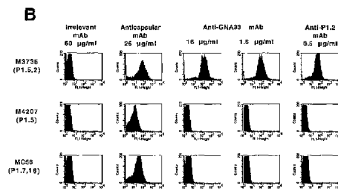
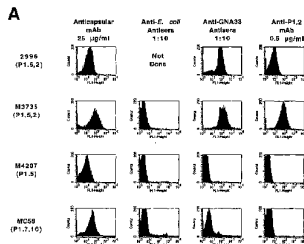
PCT

(10) International Publication Number  
WO 02/083711 A2

- (51) International Patent Classification: C07K  
Martin Luther King Jr. Way, Oakland, CA 94609-1673 (US).
- (21) International Application Number: PCT/US02/11501
- (22) International Filing Date: 11 April 2002 (11.04.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:  
60/284,554 17 April 2001 (17.04.2001) US  
60/326,838 3 October 2001 (03.10.2001) US
- (71) Applicants (for all designated States except US): CHIRON CORPORATION [US/US]; 4560 Horton Street, Emeryville, CA 94608 (US); CHILDREN'S HOSPITAL OAKLAND RESEARCH INSTITUTE [US/US]; 5700
- (72) Inventors; and  
(75) Inventors/Applicants (for US only): GRANOFF, Dan [US/US]; 5700 Martin Luther King Jr. Way, Oakland, CA 94609-1673 (US); MOE, Gregory [US/US]; 5700 Martin Luther King Jr. Way, Oakland, CA 94609-1673 (US); RAPPUOLI, Rino [IT/IT]; Via Calamandrei, 39, Quercegrossa, I-53010 Monteriggioni (IT).
- (74) Agents: HARBIN, Alisa, A. et al.; Chiron Corporation, Intellectual Property - R440, P.O. Box 8097, Emeryville, CA 94662 (US).
- (81) Designated States (national): AI, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GL, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,

[Continued on next page]

(54) Title: MOLECULAR MIMETICS OF MENINGOCOCCAL B LEPTOPUS WHICH ELICIT FUNCTIONALLY ACTIVE ANTIBODIES



(57) Abstract: Molecular mimetics of a surface-exposed epitope on loop 4 of PorA of *Neisseria meningitidis* serogroup B (MenB) P1.2 serosubtype and antibodies produced against the same are disclosed. Compositions containing such molecular mimetics or the antibodies thereto can be used to prevent MenB disease, as well as for diagnosis of MenB infection.

WO 02/083711 A2



WO 02/083711 A2



LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,  
MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SI, SG,  
SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,  
VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(BI, BJ, CI, CG, CL, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR,  
NE, SN, TD, TG).

**Published:**

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

**(84) Designated States (regional):** ARIPO patent (GH, GM,  
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),  
Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),  
European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR,  
GB, GR, IL, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent

*For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-  
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-  
ning of each regular issue of the PCT Gazette.*

WO 02/083711

PCT/US02/11501

5                    MOLECULAR MIMETICS OF MENINGOCOCCAL B EPITOPES WHICH  
                      ELICIT FUNCTIONALLY ACTIVE ANTIBODIES

Technical Field

10            The present invention pertains generally to bacterial pathogens. In particular,  
the invention relates to molecular mimetics of a surface-exposed epitope on loop 4 of  
PorA of *Neisseria meningitidis* serogroup B (MenB) P1.2 serosubtype and antibodies  
produced against the same.

Background of the Invention

15            *Neisseria meningitidis* is a causative agent of bacterial meningitis and sepsis.  
Meningococci are divided into serological groups based on the immunological  
characteristics of capsular and cell wall antigens. Currently recognized serogroups  
include A, B, C, W-135, X, Y, Z and 29E. The polysaccharides responsible for the  
serogroup specificity have been purified from several of these groups, including A, B,  
20            C, W-135 and Y.

*N. meningitidis* serogroup B (termed "MenB" or "NmB" herein) accounts for a  
large percentage of bacterial meningitis in infants and children residing in the U.S.  
and Europe. The organism also causes fatal sepsis in young adults. In adolescents,  
experimental MenB vaccines consisting of outer membrane protein (OMP) vesicles  
25            are somewhat protective. However, no protection has been observed in vaccinated  
infants, the age group at greatest risk of disease. Additionally, OMP vaccines are  
serotype- and subtype-specific, and the dominant MenB strains are subject to both  
geographic and temporal variation, limiting the usefulness of such vaccines.

              Effective capsular polysaccharide-based vaccines have been developed against  
30            meningococcal disease caused by serogroups A, C, Y and W135. However, similar  
attempts to develop a MenB polysaccharide vaccine have failed due to the poor  
immunogenicity of the capsular MenB polysaccharide (termed "MenB PS" herein).

WO 02/083711

PCT/US02/11501

MenB PS is a homopolymer of (N-acetyl ( $\alpha$  2 $\rightarrow$ 8) neuraminic acid. *Escherichia coli* K1 has the identical capsular polysaccharide. Antibodies elicited by MenB PS cross-react with host polysialic acid (PSA). PSA is abundantly expressed in fetal and newborn tissue, especially on neural cell adhesion molecules ("NCAMs") found in brain tissue. PSA is also found to a lesser extent in adult tissues including in kidney, heart and the olfactory nerve. Thus, most anti-MenB PS antibodies are also autoantibodies. Such antibodies therefore have the potential to adversely affect fetal development, or to lead to autoimmune disease.

MenB PS derivatives have been prepared in an attempt to circumvent the poor immunogenicity of MenB PS. For example, C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> N-acyl-substituted MenB PS derivatives have been described. See, EP Publication No. 504,202 B, to Jennings et al. Similarly, U.S. Patent No. 4,727,136 to Jennings et al. describes an N-propionylated MenB PS molecule, termed "NPr-MenB PS" herein. Mice immunized with NPr-MenB PS glycoconjugates were reported to elicit high titers of IgG antibodies. Jennings et al. (1986) *J. Immunol.* 137:1708. In rabbits, two distinct populations of antibodies, purportedly associated with two different epitopes, one shared by native MenB PS and one unshared, were produced using the derivative. Bactericidal activity was found in the antibody population that did not cross react with MenB PS. Jennings et al. (1987) *J. Exp. Med.* 165:1207. The identity of the bacterial surface epitope(s) reacting with the protective antibodies elicited by this conjugate remains unknown. Also, because a subset of antibodies elicited by this vaccine have autoreactivity with host polysialic acid (Granoff et al. (1998) *J. Immunol.* 160:5028) the safety of this vaccine in humans remains uncertain.

Despite these attempts, conventional approaches have failed to identify antigens that are safe and capable of conferring broad protection against MenB infection.

There has been considerable interest in using molecular mimetic antigens to elicit protective immune responses to various pathogens, as well as for the treatment of cancer and autoimmune diseases. This approach to vaccine development for the prevention of infectious diseases has the greatest utility when the nominal antigen is toxic or difficult to purify, or when it is desirable to direct the immune response to a limited number of epitopes. Nevertheless, there are relatively few studies that report

WO 02/083711

PCT/US02/11501

success of a mimetic vaccine in eliciting protective antibodies to a pathogen.

A number of functionally active antibodies directed against MenB PS derivatives have been described in U.S. Patent No. 6,048,527. These antibodies do not cross-react, or are minimally cross-reactive with host tissues, and thus pose minimal risk of evoking autoimmune disease. U.S. Patent No. 6,030,619 describes molecular mimetics of unique epitopes of MenB PS identified using these antibodies. However, the discovery of peptide mimetics of other MenB antigens remains of considerable interest.

The complete genomic sequence of MenB, strain MC58, has been described. Tettelin et al., *Science* (2000) 287:1809. Several proteins that elicited serum bactericidal antibody responses have been identified by whole genome sequencing. These proteins have conserved sequences and appear to be surface-exposed on encapsulated MenB strains. Pizza et al., *Science* (2000) 287:1816. One of these proteins is GNA33 (genome derived antigen). GNA33 is a lipoprotein and the predicted amino acid sequence shows homology with a membrane-bound lytic murein transglycosylase (MltA) from *E. coli* and *Synechocystis* sp. Lommatzsch et al., *J. Bacteriol.* (1997) 179:5465-5470. GNA33 is highly conserved among *Neisseria meningitidis*. Pizza et al., *Science* (2000) 287:1816. Mice immunized with recombinant GNA33 developed high serum bactericidal antibody titers measured against encapsulated MenB strain 2996. The magnitude of the antibody response was similar to that of control animals immunized with OMP vesicles prepared from strain 2996. However, the mechanism by which GNA33 elicits protective antibody was not identified, nor was the breadth of the protective response to different MenB strains.

It is readily apparent that the production of a safe and effective vaccine against MenB would be particularly desirable.

#### Summary of the Invention

The present invention is based on the unexpected discovery that GNA33 elicits protective antibodies to MenB by mimicking a surface-exposed epitope on loop 4 of PorA of strains with the P1.2 serosubtype. The functional activity of such antibodies has been assessed as described herein, using *in vitro* and *in vivo* functional assays that predict the ability of molecular agents to protect against meningococcal disease in

WO 02/083711

PCT/US02/11501

humans.

Accordingly, in one embodiment, the subject invention relates to GNA33 peptides which include epitopes useful for the production of antibodies that demonstrate functional activity against MenB bacteria. The peptides include less than the full-length GNA33 sequence. In particularly preferred embodiments, the peptides include the amino acid sequence QTP and, optionally, additional flanking sequences preceding or following the QTP sequence, preferably 1-50 or more amino acids but less than the full-length sequence, such as 1-3, 1-5, or 1-10, or 1-25, or any integer between these ranges, occurring either C- or N-terminally to the QTP sequence. An exemplary GNA33 sequence is shown in Figure 3 (SEQ ID NO:1). The QTP occurs at positions 106-108 of Figure 3. It is to be understood that the sequence is not limited to the sequences flanking QTP as shown in Figure 3, as the various MenB strains, such as those described herein, have different flanking sequences. The sequences of the PorA region in various strains are known and several are shown in Table 2.

In certain embodiments, the GNA33 peptide comprises an amino acid sequence selected from the group consisting of FQTPV (SEQ ID NO:2), FQTPVHS (SEQ ID NO:3), AFQTPVHS (SEQ ID NO:4), QAFQTPVHS (SEQ ID NO:5), AQAQTPVHS (SEQ ID NO:6), AQAQTPVH (SEQ ID NO:7), AQAQTPV (SEQ ID NO:8), QAFQTPVHSF (SEQ ID NO:9), AFQTPVHSFQ (SEQ ID NO:10), FQTPVHSFQA (SEQ ID NO:11), QTPVHSFQAK (SEQ ID NO:12), DVSAQAFQTP (SEQ ID NO:12), VSAQAFQTPV (SEQ ID NO:13) and SAQAQTPVH (SEQ ID NO:14).

In other embodiments, the subject invention is directed to the use of GNA33 polypeptides as carriers to insert other epitopes of serologically different outer membrane proteins, as well as a general carrier.

In another embodiment, the invention is directed to polynucleotides encoding these peptides, as well as recombinant vectors including the polynucleotides, host cells comprising the vectors and methods of recombinantly producing the peptides.

In yet other embodiments, the invention relates to antibodies directed against GNA33 epitopes, wherein the antibodies are capable of being bound by GNA33 epitopes and/or demonstrate functional activity against MenB bacteria. As explained

WO 02/083711

PCT/US02/11501

further below, an antibody displays functional activity against a MenB organism when the antibody molecule exhibits complement-mediated bactericidal activity and/or opsonic activity against MenB as determined using the assays described herein.

Representative GNA33 epitopes include QTP, FQTPV (SEQ ID NO:2), FQTPVHS (SEQ ID NO:3), AFQTPVHS (SEQ ID NO:4), QAFQTPVHS (SEQ ID NO:5), AQAQFQTPVHS (SEQ ID NO:6), AQAQFQTPVH (SEQ ID NO:7), AQAQFQTPV (SEQ ID NO:8), QAFQTPVHSF (SEQ ID NO:9), AFQTPVHSFQ (SEQ ID NO:10), FQTPVHSFQA (SEQ ID NO:11), QTPVHSFQAK (SEQ ID NO:12), DVSAQAQFQTP (SEQ ID NO:12), VSAQAQFQTPV (SEQ ID NO:13) and SAQAQFQTPVH (SEQ ID NO:14).

Another embodiment of the invention relates to monoclonal antibodies directed against GNA33 epitopes, and hybridomas producing those monoclonal antibodies. Preferably, the monoclonal antibodies display functional activity against a MenB organism.

Still further embodiments of the subject invention are related to methods for isolating further molecular mimetics of epitopes of MenB and the molecular mimetics identified using the methods. The methods comprise:

- (a) providing a population of molecules including a putative molecular mimetic of an epitope of MenB;
- (b) contacting the population of molecules with the antibodies described herein under conditions that allow immunological binding between the antibody and the molecular mimetic, if present, to provide a complex; and
- (c) separating the complexes from non-bound molecules.

In another embodiment, the subject invention is directed to a composition comprising GNA33, or a peptide of GNA33 comprising an epitope as described above, in combination with a pharmaceutically acceptable excipient.

In yet another embodiment, the invention is directed to a composition comprising an antibody directed against a GNA33 polypeptide in combination with a pharmaceutically acceptable excipient.

In another embodiment, the invention is directed to a method of eliciting an immune response against *Neisseria meningitidis* serogroup B in a mammalian subject, comprising administering a GNA33 peptide as described above to the subject.

WO 02/083711

PCT/US02/11501

In another embodiment, the subject invention is directed to a method for treating or preventing MenB disease in a mammalian subject comprising administering an effective amount of the above compositions to the subject.

In another embodiment, the invention is directed to a method for detecting

5 *Neisseria meningitidis* serogroup B antibodies in a biological sample comprising:

(a) providing a biological sample;

(b) reacting said biological sample with a GNA33 polypeptide under conditions which allow *Neisseria meningitidis* serogroup B antibodies, when present in the biological sample, to bind to the GNA33 polypeptide to form an

10 antibody/GNA33 polypeptide complex; and

(c) detecting the presence or absence of the complex

thereby detecting the presence or absence of *Neisseria meningitidis* serogroup B antibodies in the sample.

Representative GNA33 polypeptides include a GNA33 peptide that comprises  
15 an amino acid sequence selected from the group consisting of QTP, FQTPV (SEQ ID NO:2), FQTPVHS (SEQ ID NO:3), AFQTPVHS (SEQ ID NO:4), QAFQTPVHS (SEQ ID NO:5), AQAFQTPVHS (SEQ ID NO:6), AQAFQTPVH (SEQ ID NO:7), AQAFQTPV (SEQ ID NO:8), QAFQTPVHSF (SEQ ID NO:9), AFQTPVHSFQ (SEQ ID NO:10), FQTPVHSFQA (SEQ ID NO:11), QTPVHSFQAK (SEQ ID NO:12), DVSAQAFQTP (SEQ ID NO:12), VSAQAFQTPV (SEQ ID NO:13) and  
20 SAQAFQTPVH (SEQ ID NO:14).

These and other embodiments of the present invention will readily occur to those of ordinary skill in the art in view of the disclosure herein.

#### 25 Brief Description of the Figures

Figure 1 shows the binding of anti-GNA33 antisera (1A) and antibodies to the surface of live encapsulated NmB strains. Figure 1A shows binding of polyclonal anti-GNA33 antisera and control mAbs to live encapsulated NmB strains 2996, M3735, M4207, and MC58 as determined by indirect fluorescence flow cytometry.

30 The control mAbs and antisera include an anti-serogroup B capsular-specific murine mAb (SEAM 12, Granoff et al., *J. Immunol.* (1998) 160:5028-5036), an *N. meningitidis* serosubtype mAb anti-PorA P1.2, and polyclonal antisera from mice

WO 02/083711

PCT/US02/11501

immunized with *E. coli* outermembrane vesicles. Figure 1B shows binding of anti-GNA33 mAb 25 and control mAbs to NmB strains M3735, M4207, and MC58. The murine control mAbs included a mAb having an irrelevant specificity (VIG10), and the same anticapsular and anti-PorA P1.2 mAbs described above for Figure 1A.

5 Figure 2 shows a western blot of total membrane fractions prepared from different MenB strains and resolved by SDS-PAGE. Figure 2A shows reactivity with anti-GNA33 mAb 25. Lane 1: rGNA33. Lane 2: Total protein prepared from control *E. coli* cells. Lanes 3, 4 and 5, respectively: total protein prepared from MenB strains NG3/88 (P1.1), MC58 (P1.7,16), and a mutant of MC58 in which the gene encoding  
10 GNA33 has been inactivated (MC58ΔGNA33). Lanes 6, 7, 8 and 9: Total protein from MenB strains BZ232, BZ232ΔGNA33, NMB and NMBΔGNA33, respectively. All four strains are serosubtype P1.5,2. Figure 2B shows a western blot of the same protein samples as described for Figure 2A but using the anti-PorA P1.2 mAb as the primary detecting antibody.

15 Figure 3 (SEQ ID NO:1) shows the full-length amino acid sequence of a representative GNA33 polypeptide. The underlined amino acids occurring at positions 1-21 correspond to a leader sequence.

Figure 4 shows binding of anti-GNA33 mAb 25 to progressively smaller peptides corresponding to segments from (A) GNA33 and (B) PorA P1.2 (Strain  
20 2996). The respective peptides shown were identified from mapping studies with overlapping 10 mer peptides prepared from each protein and shown to contain an epitope recognized by mAb 25.

Figure 5 shows binding of murine mAbs to live encapsulated NmB strains as determined by indirect fluorescence flow cytometry. The mAbs tested are described  
25 in legend to Figure 1B. Figure 5A shows concentration-dependent binding of anti-GNA33 mAb 25 to strains 8047 ( $BC_{50} = 15 \mu\text{g/ml}$  with human complement) and BZ232 ( $BC_{50} > 150 \mu\text{g/ml}$  with human complement). Both strains were susceptible to bacteriolysis when tested with rabbit (see text). Figure 5B shows concentration-dependent anti-GNA33 binding to strains M986 (Por A VR<sub>2</sub> type P1.2) and M5682  
30 (PorA VR<sub>2</sub> type P1.2), as compared to strain 8047 (PorA VR<sub>2</sub> type P1.2-2). M986 was resistant to anti-GNA33 bacteriolysis (human or rabbit), M5682 was susceptible (rabbit complement), and strain 8047 was susceptible (human or rabbit).



WO 02/083711

PCT/US02/11501

Detailed Description of the Invention

The practice of the present invention will employ, unless otherwise indicated, conventional methods of immunology, microbiology, and molecular biology within the skill of the art. Such techniques are explained fully in the literature. See, e.g., Sambrook, et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd Edition, 1989); Sambrook and Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2001); Morrison and Boyd, *Organic Chemistry* (3rd Edition 1973); Carey and Sundberg, *Advanced Organic Chemistry* (2nd Edition, 1985); Smith, M. B., *Organic Synthesis* (1994); Perbal, *A Practical Guide to Molecular Cloning* (1984); and *Handbook of Experimental Immunology*, Vols. 1-IV (D.M. Weir and C.C. Blackwell eds., 1986, Blackwell Scientific Publications).

As used in this specification and the appended claims, the singular forms "a," "an" and "the" include plural references unless the content clearly dictates otherwise.

I. Definitions

In describing the present invention, the following terms will be employed, and are intended to be defined as indicated below.

By "GNA33 polypeptide" is meant a polypeptide derived from the GNA33 protein which is capable of eliciting an immunological response against MenB, such as the production of antibodies which demonstrate functional activity against MenB bacteria, as defined below. The term may be used to refer to an individual macromolecule or to a homogeneous or heterogeneous population of antigenic macromolecules derived from GNA33. For purposes of the present invention, a GNA33 polypeptide may be derived from any of the various known MenB strains. The GNA33 sequence for strain 2996 is shown in Figure 3 (SEQ ID NO:1). However, a number of GNA33 sequences from other MenB strains are known. See, e.g., GenBank accession nos. C81244, B82023, AF226395, AF226392, AF226390, AF226403, AF226413, AF226412, AF226387, AF226409, AF22641, AF226397, AF226389, AF226393, AF226416, AF226414, AF226402, AF226404, AF235145, AF235144, AF235143, *Neisseria meningitidis*; E83491, *Pseudomonas aeruginosa*

WO 02/083711

PCT/US02/11501

(strain PAO1); AF300471, *Zymomonas mobilis*; AAK85834, *Agrobacterium tumefaciens*; CAC41396, *Sinorhizobium meliloti*; AAK25702, *Caulobacter crescentus*; S76334, *Synechocystis* sp. (strain PCC 6803); AAK03012, *Pasteurella multocida*; Q9KPQ4, *Vibrio cholerae*; AAB40463, AAC45723, P46885, *Escherichia coli*; P57531, *Buchnera aphidicola* (*Acyrtosiphon pisum*); NP143714, *Pyrococcus horikoshii*.

As used herein a "GNA33 polypeptide" also includes a molecule derived from a native GNA33 sequence, as well as recombinantly produced or chemically synthesized GNA33 polypeptides including the full-length GNA33 reference sequence, with or without the signal sequence (amino acids 1-21 of Figure 3), as well as GNA33 peptides which remain immunogenic, as described below.

The term "analog" refers to derivatives of the reference molecule. The analog may retain biological activity, as described above, such as the ability to elicit formation of antibodies with functional activity against MenB. In general, the term "analog" refers to compounds having a native polypeptide sequence and structure with one or more amino acid additions, substitutions (generally conservative in nature) and/or deletions, relative to the native molecule, so long as the modifications do not destroy activity. Preferably, the analog has at least the same biological activity as the parent molecule, and may even display enhanced activity over the parent molecule. Methods for making polypeptide analogs are known in the art and are described further below.

For example, the analog will generally have at least about 50% amino acid identity to the reference molecule, more preferably about 75-85% identity and most preferably about 90-95% identity or more, to the relevant portion of the native peptide sequence in question. The amino acid sequence will have not more than about 10-75 amino acid substitutions, or not more than about 5-50 amino acid substitutions, or even only 1, 2, 3 or up to 5 substitutions, or any number between the above described ranges. Particularly preferred substitutions will generally be conservative in nature, i.e., those substitutions that take place within a family of amino acids. In this regard, amino acids are generally divided into four families: (1) acidic -- aspartate and glutamate; (2) basic -- lysine, arginine, histidine; (3) non-polar -- alanine, valine, leucine, isoleucine, proline, phenylalanine, methionine, tryptophan; and (4) uncharged

WO 02/083711

PCT/US02/11501

polar -- glycine, asparagine, glutamine, cystine, serine threonine, tyrosine.

Phenylalanine, tryptophan, and tyrosine are sometimes classified as aromatic amino acids. For example, it is reasonably predictable that an isolated replacement of leucine with isoleucine or valine, or vice versa; an aspartate with a glutamate or vice versa; a threonine with a serine or vice versa; or a similar conservative replacement of an amino acid with a structurally related amino acid, will not have a major effect on the activity. Proteins having substantially the same amino acid sequence as the reference molecule, but possessing minor amino acid substitutions that do not substantially affect the immunogenicity of the protein, are therefore within the definition of a GNA33 polypeptide. One of skill in the art may readily determine regions of the molecule of interest that can be modified with a reasonable likelihood of retaining biological activity as defined herein.

A "GNA33 peptide" is a GNA33 polypeptide, as described herein, which includes less than the full-length of the reference GNA33 molecule in question and which includes at least one epitope as defined below. Thus, a composition comprising a GNA33 peptide would include a portion of the full-length molecule but not the entire GNA33 molecule in question. Non-limiting examples of GNA33 peptides include QTP, FQTPV (SEQ ID NO:2), FQTPVHS (SEQ ID NO:3), AFQTPVHS (SEQ ID NO:4), QAFQTPVHS (SEQ ID NO:5), AQAFQTPVHS (SEQ ID NO:6), AQAFQTPVH (SEQ ID NO:7), AQAFQTPV (SEQ ID NO:8), QAFQTPVHSF (SEQ ID NO:9), AFQTPVHSFQ (SEQ ID NO:10), FQTPVHSFQA (SEQ ID NO:11), QTPVHSFQAK (SEQ ID NO:12), DVSAQAFQTP (SEQ ID NO:12), VSAQAFQTPV (SEQ ID NO:13) and SAQAFQTPVH (SEQ ID NO:14).

"Molecular mimetics" of MenB are molecules that functionally mimic at least one epitope expressed on a MenB bacterium. Such molecular mimetics are useful in vaccine compositions and in eliciting antibodies for diagnostic or therapeutic applications, as described further below. Molecular mimetics include, but are not limited to: small organic compounds; nucleic acids and nucleic acid derivatives; saccharides or oligosaccharides; peptide mimetics including peptides, proteins, and derivatives thereof, such as peptides containing non-peptide organic moieties, synthetic peptides which may or may not contain amino acids and/or peptide bonds, but retain the structural and functional features of a peptide ligand; pyrrolidines;

WO 02/083711

PCT/US02/11501

peptoids and oligopeptoids which are molecules comprising N-substituted glycine, such as those described by Simon et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:9367; and antibodies, including anti-idiotypic antibodies. Methods for the identification and production of molecular mimetics are described more fully below.

5       The term "antibody" encompasses polyclonal and monoclonal antibody preparations, as well as preparations including hybrid antibodies, altered antibodies, humanized antibodies, F(ab')<sub>2</sub> fragments, F(ab) molecules, Fv fragments, single chain fragment variable displayed on phage (scFv), single domain antibodies, chimeric antibodies and functional fragments thereof which exhibit immunological binding  
10       properties of the parent antibody molecule.

As used herein, the term "monoclonal antibody" refers to an antibody composition having a homogeneous antibody population. The term is not limited by the manner in which it is made. The term encompasses whole immunoglobulin molecules, as well as Fab molecules, F(ab')<sub>2</sub> fragments, Fv fragments, single chain  
15       fragment variable displayed on phage (scFv), humanized antibodies and other molecules that exhibit immunological binding properties of the parent monoclonal antibody molecule. Methods of making polyclonal and monoclonal antibodies are known in the art and described more fully below.

By "epitope" is meant a site on an antigen to which specific B cells and T cells  
20       respond. The term is also used interchangeably with "antigenic determinant" or "antigenic determinant site." B cell epitope sites on proteins, polysaccharides, or other biopolymers may be composed of moieties from different parts of the macromolecule that have been brought together by folding. Epitopes of this kind are referred to as conformational or discontinuous epitopes, since the site is composed of  
25       segments the polymer that are discontinuous in the linear sequence but are continuous in the folded conformation(s). Epitopes that are composed of single segments of biopolymers or other molecules are termed continuous or linear epitopes. T cell epitopes are generally restricted to linear peptides. A peptide epitope can comprise 5 or more amino acids in a spatial conformation unique to the epitope. Generally, an  
30       epitope consists of at least 5-8 such amino acids and, more usually, consists of at least 8-10 such amino acids or more. Methods of determining spatial conformation of

WO 02/083711

PCT/US02/11501

amino acids are known in the art and include, for example, x-ray crystallography and 2-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy.

Epitopes can be identified using any number of epitope mapping techniques, well known in the art. See, e.g., *Epitope Mapping Protocols* in *Methods in Molecular Biology*, Vol. 66 (Glen E. Morris, Ed., 1996) Humana Press, Totowa, New Jersey. For example, linear epitopes may be determined by e.g., concurrently synthesizing large numbers of peptides on solid supports, the peptides corresponding to portions of the protein molecule, and reacting the peptides with antibodies while the peptides are still attached to the supports. Such techniques are known in the art and described in, e.g., U.S. Patent No. 4,708,871; Geysen et al. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:3998-4002; Geysen et al. (1986) *Molec. Immunol.* 23:709-715, all incorporated herein by reference in their entireties. Similarly, conformational epitopes are readily identified by determining spatial conformation of amino acids such as by, e.g., x-ray crystallography and 2-dimensional nuclear magnetic resonance. See, e.g., *Epitope Mapping Protocols*, *supra*. Computer programs that formulate hydropathy scales from the amino acid sequence of the protein, utilizing the hydrophobic and hydrophilic properties of each of the 20 amino acids, as described in, e.g., Kyte et al., *J. Mol. Biol.* (1982) 157:105-132; and Hopp and Woods, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1981) 78:3824-3828, can also be used to determine antigenic portions of a given molecule. For example, the technique of Hopp and Woods assigns each amino acid a numerical hydrophilicity value and then repetitively averages these values along the peptide chain. The points of highest local average hydrophilicities are indicative of antigenic portions of the molecule.

An antibody displays "functional activity" against a MenB organism when the antibody molecule exhibits complement-mediated bactericidal activity and/or opsonic activity against MenB as determined using the assays described herein.

By "purified" and "isolated" is meant, when referring to a polypeptide or polynucleotide, that the indicated molecule is present in the substantial absence of other biological macromolecules of the same type. The term "purified" as used herein preferably means at least 75% by weight, more preferably at least 85% by weight, more preferably still at least 95% by weight, and most preferably at least 98% by weight, of biological macromolecules of the same type are present. An "isolated"

WO 02/083711

PCT/US02/11501

polynucleotide which encodes a particular polypeptide refers to a nucleic acid molecule which is substantially free of other nucleic acid molecules that do not encode the subject polypeptide; however, the molecule may include some additional bases or moieties which do not deleteriously affect the basic characteristics of the composition.

By a "recombinant GNA33 polypeptide" is intended a GNA33 polypeptide having biological activity, as measured using the techniques described above and which has been prepared by recombinant DNA techniques as described herein. In general, the gene coding for the desired GNA33 polypeptide is cloned and then expressed in transformed organisms, as described further below. The host organism expresses the foreign gene to produce the GNA33 polypeptide under expression conditions. If prepared recombinantly, the polypeptides of the invention can be produced in the absence of other molecules normally present in cells. For example, GNA33 polypeptide compositions free of any trace of MenB protein contaminants can be readily obtained because the only MenB protein produced by a recombinant non-MenB host cell is the recombinant GNA33 polypeptide.

The term "polynucleotide" or "nucleic acid molecule" as used herein refers to a polymeric form of nucleotides of any length, either ribonucleotides or deoxyribonucleotides. This term refers only to the primary structure of the molecule and thus includes double- and single-stranded DNA and RNA. It also includes known types of modifications, for example, labels which are known in the art, methylation, "caps", substitution of one or more of the naturally occurring nucleotides with an analog, internucleotide modifications such as, for example, those with uncharged linkages (e.g., methyl phosphonates, phosphotriesters, phosphoamidates, carbamates, etc.) and with charged linkages (e.g., phosphorothioates, phosphorodithioates, etc.), those containing pendant moieties, such as, for example proteins (including for e.g., nucleases, toxins, antibodies, signal peptides, poly-L-lysine, etc.), those with intercalators (e.g., acridine, psoralen, etc.), those containing chelates (e.g., metals, radioactive metals, boron, oxidative metals, etc.), those containing alkylators, those with modified linkages (e.g., alpha anomeric nucleic acids, etc.), as well as unmodified forms of the polynucleotide.

WO 02/083711

PCT/US02/11501

The terms "recombinant DNA molecule," or "recombinant polynucleotide" are used herein to refer to a polynucleotide of genomic, cDNA, semisynthetic, or synthetic origin which, by virtue of its origin or manipulation: (1) is not associated with all or a portion of a polynucleotide with which it is associated in nature, (2) is  
5 linked to a polynucleotide other than that to which it is linked in nature, or (3) does not occur in nature. Thus, the term encompasses "synthetically derived" nucleic acid molecules.

A "coding sequence" is a nucleic acid molecule which is translated into a polypeptide, usually via mRNA, when placed under the control of appropriate  
10 regulatory sequences. The boundaries of the coding sequence may be determined by a translation start codon at the 5'-terminus and a translation stop codon at the 3'-terminus. A coding sequence can include, but is not limited to, cDNA, and recombinant nucleotide sequences.

"Control sequences" refer to nucleic acid sequences which are necessary to  
15 effect the expression of coding sequences to which they are ligated. The nature of such control sequences differs depending upon the host organism; in prokaryotes, such control sequences generally include promoter, ribosomal binding site, and transcription termination sequence; in eukaryotes, generally, such control sequences include promoters and transcription termination sequences. The term "control  
20 sequences" is intended to include, at a minimum, all components necessary for expression of a coding sequence, and may also include additional components, for example, leader sequences and fusion partner sequences.

A control element, such as a promoter, "directs the transcription" of a coding sequence in a cell when RNA polymerase will bind the promoter and transcribe the  
25 coding sequence into mRNA, which is then translated into the polypeptide encoded by the coding sequence.

"Operably linked" refers to a juxtaposition wherein the components so described are in a relationship permitting them to function in their intended manner. A control sequence "operably linked" to a coding sequence is ligated in such a way  
30 that expression of the coding sequence is achieved under conditions compatible with the control sequences. The control elements need not be contiguous with the coding sequence, so long as they function to direct the expression thereof. Thus, for example,

WO 02/083711

PCT/US02/11501

intervening untranslated yet transcribed sequences can be present between a promoter and the coding sequence and the promoter can still be considered "operably linked" to the coding sequence.

5 As used herein, the term "expression cassette" refers to a molecule comprising at least one coding sequence operably linked to a control sequence which includes all nucleotide sequences required for the transcription of cloned copies of the coding sequence and the translation of the mRNAs in an appropriate host cell. Such expression cassettes can be used to express eukaryotic genes in a variety of hosts such as bacteria, blue-green algae, plant cells, yeast cells, insect cells and animal cells.

10 Under the invention, expression cassettes can include, but are not limited to, cloning vectors, specifically designed plasmids, viruses or virus particles. The cassettes may further include an origin of replication for autonomous replication in host cells, selectable markers, various restriction sites, a potential for high copy number and strong promoters.

15 By "vector" is meant any genetic element, such as a plasmid, phage, transposon, cosmid, chromosome, virus etc., which is capable of replication when associated with the proper control elements and which can transfer gene sequences between cells. Thus, the term includes cloning and expression vehicles, as well as viral vectors.

20 A cell has been "transformed" by an exogenous polynucleotide when the polynucleotide has been introduced inside the cell membrane. The exogenous polynucleotide may or may not be integrated (covalently linked) into chromosomal DNA making up the genome of the cell. In procaryotes and yeasts, for example, the exogenous DNA may be maintained on an episomal element, such as a plasmid. With

25 respect to eucaryotic cells, a stably transformed cell is one in which the exogenous DNA has become integrated into the chromosome so that it is inherited by daughter cells through chromosome replication. This stability is demonstrated by the ability of the eucaryotic cell to establish cell lines or clones comprised of a population of daughter cells containing the exogenous DNA.

30 A "host cell" is a cell which has been transformed, or is capable of transformation, by an exogenous nucleic acid molecule.



WO 02/083711

PCT/US02/11501

“Homology” refers to the percent identity between two polynucleotide or two polypeptide moieties. Two DNA, or two polypeptide sequences are “substantially homologous” to each other when the sequences exhibit at least about 50% , preferably at least about 75%, more preferably at least about 80%-85%, preferably at least about 90%, and most preferably at least about 95%-98% sequence identity, or any percent identity between the specified ranges, over a defined length of the molecules. As used herein, substantially homologous also refers to sequences showing complete identity to the specified DNA or polypeptide sequence.

In general, “identity” refers to an exact nucleotide-to-nucleotide or amino acid-to-amino acid correspondence of two polynucleotides or polypeptide sequences, respectively. Percent identity can be determined by a direct comparison of the sequence information between two molecules by aligning the sequences, counting the exact number of matches between the two aligned sequences, dividing by the length of the shorter sequence, and multiplying the result by 100. Alignment may be with a sequence that has the identical number of amino acids as the sequence of interest.

Preferably, naturally or non-naturally occurring protein variants have amino acid sequences which are at least 70%, 80%, 85%, 90%, 92% or 95% or more identical to the particular GNA33 polypeptide derived from Figure 3 (SEQ ID NO:1). More preferably, the molecules are 98% or 99% identical. Percent sequence identity is determined using the Smith-Waterman homology search algorithm using an affine gap search with a gap open penalty of 12 and a gap extension penalty of 2, BLOSUM matrix of 62. The Smith-Waterman homology search algorithm is taught in Smith and Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482-489 (1981).

Alternatively, homology can be determined by hybridization of polynucleotides under conditions which form stable duplexes between homologous regions, followed by digestion with single-stranded-specific nuclease(s), and size determination of the digested fragments. DNA sequences that are substantially homologous can be identified in a Southern hybridization experiment under, for example, stringent conditions, as defined for that particular system. Defining appropriate hybridization conditions is within the skill of the art. See, e.g., Sambrook et al., *supra*; *DNA Cloning, supra*; *Nucleic Acid Hybridization, supra*.

WO 02/083711

PCT/US02/11501

The terms "effective amount" or "pharmaceutically effective amount" refer to a nontoxic but sufficient amount of the agent to provide the desired biological result. That result can be the production of antibodies with functional activity against MenB, as determined using the assays herein. Moreover, the amount may be sufficient to  
5 cause the reduction and/or alleviation of the signs, symptoms, or causes of meningococcal disease. An appropriate "effective" amount in any individual case may be determined by one of ordinary skill in the art using routine experimentation.

By "pharmaceutically acceptable" or "pharmacologically acceptable" is meant a material which is not biologically or otherwise undesirable, i.e., the material may be  
10 administered to an individual without causing any undesirable biological effects or interacting in a deleterious manner with any of the components of the composition in which it is contained.

By "physiological pH" or a "pH in the physiological range" is meant a pH in the range of approximately 7.2 to 8.0 inclusive, more typically in the range of  
15 approximately 7.2 to 7.6 inclusive.

As used herein, the term "mammal" includes, but is not limited to, any member of the Mammalia class: humans, non-human primates such as chimpanzees, and other apes and monkey species; farm animals such as cattle, horses, sheep, goats, swine; domestic animals such as rabbits, dogs, and cats; laboratory animals including  
20 rodents, such as rats, mice and guinea pigs, and the like. The term does not denote a particular age or gender.

As used herein, the terms "immunological binding," and "immunological binding properties" refer to non-covalent interactions of the type which occur between an immunoglobulin molecule and an antigen for which the immunoglobulin is  
25 specific.

As used herein, a "biological sample" refers to a sample of tissue or fluid isolated from a subject, including but not limited to, for example, blood, plasma, serum, fecal matter, urine, bone marrow, bile, spinal fluid, lymph fluid, samples of the skin, external secretions of the skin, respiratory, intestinal, and genitourinary tracts,  
30 tears, saliva, milk, blood cells, organs, biopsies and also samples of *in vitro* cell culture constituents including but not limited to conditioned media resulting from the

WO 02/083711

PCT/US02/11501

growth of cells and tissues in culture medium, e.g., recombinant cells, and cell components.

As used herein, the terms "label" and "detectable label" refer to a molecule capable of detection, including, but not limited to, radioactive isotopes, fluorescers, chemiluminescers, enzymes, enzyme substrates, enzyme cofactors, enzyme inhibitors, 5 chromophores, dyes, metal ions, metal sols, ligands (e.g., biotin or haptens) and the like. The term "fluorescer" refers to a substance or a portion thereof which is capable of exhibiting fluorescence in the detectable range. Particular examples of labels which may be used under the invention include fluorescein, rhodamine, dansyl, 10 umbelliferone, Texas red, luminol, NADPH and  $\beta$ -galactosidase.

## II. Modes of Carrying Out the Invention

The present invention is based on the discovery that GNA33, a lipoprotein with homology to *E. coli* murein transglycosylase, elicits protective antibodies as a 15 result of mimicking an epitope on loop 4 of PorA in strains with serosubtype P1.2. GNA33 is not surface-exposed on live bacteria but is located in the periplasmic space. Epitope mapping of a bactericidal anti-GNA33 mAb using overlapping peptides shows that the mAb recognizes peptides from GNA33 and PorA that share a QTP sequence that is necessary for binding. By flow cytometry, the anti-GNA33 mAb 20 binds as well as a control anti-PorA (P1.2) mAb to the bacterial surface of most MenB strains with the P1.2 serosubtype. Anti-GNA33 antibody confers passive protection in infant rats challenged with P1.2 strains. Thus, GNA33 is a novel mimetic that elicits protective antibody directed at PorA. Unlike PorA, GNA33 elicits protective antibodies when administered without the need for renaturation of the protein. The 25 inventors herein have discovered that GNA33 is one of the most potent mimetic antigens identified to date.

The discovery that GNA33 exhibits immunologic mimicry of the PorA P1.2 epitope evidences the utility of GNA33 for use in a vaccine for the prevention of disease caused by P1.2 strains, which represent approximately 8% of serogroup B 30 isolates in the US (Tondella et al., *J. Clin. Microbiol.* (2000) 38:3323-3328). Further, by substituting other PorA loops into GNA33 or into subdomains of GNA33, it is possible to generate immunogenic mimetics of other serosubtype PorA epitopes

WO 02/083711

PCT/US02/11501

useful as antigens in a multivalent meningococcal vaccine. Such a vaccine has many advantages over vaccines based on recombinant PorA. For example, the preparation of such a vaccine is greatly simplified as rGNA33 can be conveniently expressed in large amounts in non-infectious *E. coli*, without the need for detergent extractions, refolding, or for reconstitution in lipid vesicles. Also, the epitope-containing segments of PorA variants from newly emergent NmB strains causing disease can be substituted into GNA33 as needed.

Thus, GNA33 polypeptides, peptides, antibodies and other MenB mimetics can be used as diagnostic reagents and/or in compositions to prevent MenB disease. Antibodies prepared against GNA33 exhibit functional activity against MenB bacteria, wherein the functional activity is important in conferring protection against MenB disease. The antibodies can be fully characterized with respect to isotype, antigenic specificity and functional activity.

GNA33 polypeptides for use with the present invention can be isolated directly from bacteria that produce the same, using techniques known in the art. Alternatively, the polypeptides can be synthesized chemically, by any of several techniques that are known to those skilled in the peptide art. See, e.g., J. M. Stewart and J. D. Young, *Solid Phase Peptide Synthesis* (Pierce Chemical Co., Rockford, IL, 1984) and G. Barany and R. B. Merrifield, *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology*, editors E. Gross and J. Meienhofer, Vol. 2, (Academic Press, New York, 1980), pp. 3-254, for solid phase peptide synthesis techniques; and M. Bodansky, *Principles of Peptide Synthesis*, (Springer-Verlag, Berlin 1984) and E. Gross and J. Meienhofer, Eds., *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology*, Vol. 1, for classical solution synthesis. The polypeptides of the present invention can also be chemically prepared by the method of simultaneous multiple peptide synthesis. See, e.g., Houghten *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1985) 82:5131-5135; U.S. Patent No. 4,631,211.

Preferably, polypeptides are produced recombinantly, by expression of a polynucleotide encoding the same, using standard techniques of molecular biology. For example, polynucleotide sequences coding for the above-described molecules can be obtained using recombinant methods, such as by screening cDNA and genomic libraries from bacteria expressing the gene, or by deriving the gene from a vector known to include the same. Furthermore, the desired gene can be isolated directly

WO 02/083711

PCT/US02/11501

- from cells containing the same, using standard techniques, such as phenol extraction and PCR of cDNA or genomic DNA. See, e.g., Sambrook et al., *supra*, for a description of techniques used to obtain and isolate DNA. The gene of interest can also be produced synthetically, rather than cloned. The molecules can be designed with appropriate codons for the particular sequence. The complete sequence is then assembled from overlapping oligonucleotides prepared by standard methods and assembled into a complete coding sequence. See, e.g., Edge (1981) *Nature* 292:756; Nambair et al. (1984) *Science* 223:1299; and Jay et al. (1984) *J. Biol. Chem.* 259:6311.
- Thus, particular nucleotide sequences can be obtained from vectors harboring the desired sequences or synthesized completely or in part using various oligonucleotide synthesis techniques known in the art, such polymerase chain reaction (PCR) techniques where appropriate. See, e.g., Sambrook, *supra*. In particular, one method of obtaining nucleotide sequences encoding the desired sequences is by annealing complementary sets of overlapping synthetic oligonucleotides produced in a conventional, automated polynucleotide synthesizer, followed by ligation with an appropriate DNA ligase and amplification of the ligated nucleotide sequence via PCR. See, e.g., Jayaraman et al. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:4084-4088. Additionally, oligonucleotide directed synthesis (Jones et al. (1986) *Nature* 54:75-82), oligonucleotide directed mutagenesis of pre-existing nucleotide regions (Riechmann et al. (1988) *Nature* 332:323-327 and Verhoeyen et al. (1988) *Science* 239:1534-1536), and enzymatic filling-in of gapped oligonucleotides using T<sub>4</sub> DNA polymerase (Queen et al. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:10029-10033) can be used under the invention to provide molecules having altered or enhanced antigen-binding capabilities.
- Once coding sequences have been prepared or isolated, such sequences can be cloned into any suitable vector or replicon. Numerous cloning vectors are known to those of skill in the art, and the selection of an appropriate cloning vector is a matter of choice. Suitable vectors include, but are not limited to, plasmids, phages, transposons, cosmids, chromosomes or viruses which are capable of replication when associated with the proper control elements.
- The coding sequence is then placed under the control of suitable control

WO 02/083711

PCT/US02/11501

elements, depending on the system to be used for expression. Thus, the coding sequence can be placed under the control of a promoter, ribosome binding site (for bacterial expression) and, optionally, an operator, so that the DNA sequence of interest is transcribed into RNA by a suitable transformant. The coding sequence may or may not contain a sequence coding for a signal peptide or leader sequence which can later be removed by the host in post-translational processing. See, e.g., U.S. Patent Nos. 4,431,739; 4,425,437; 4,338,397. If a signal sequence is present, it can either be the native sequence or it may be a heterologous signal sequence.

In addition to control sequences, it may be desirable to add regulatory sequences which allow for regulation of the expression of the sequences relative to the growth of the host cell. Regulatory sequences are known to those of skill in the art, and examples include those which cause the expression of a gene to be turned on or off in response to a chemical or physical stimulus, including the presence of a regulatory compound. Other types of regulatory elements may also be present in the vector. For example, enhancer elements may be used herein to increase expression levels of the constructs. Examples include the SV40 early gene enhancer (Dijkema et al. (1985) *EMBO J.* 4:761), the enhancer/promoter derived from the long terminal repeat (LTR) of the Rous Sarcoma Virus (Gorman et al. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:6777) and elements derived from human CMV (Boshart et al. (1985) *Cell* 41:521), such as elements included in the CMV intron A sequence (U.S. Patent No. 5,688,688). The expression cassette may further include an origin of replication for autonomous replication in a suitable host cell, one or more selectable markers, one or more restriction sites, a potential for high copy number and a strong promoter.

An expression vector is constructed so that the particular coding sequence is located in the vector with the appropriate regulatory sequences, the positioning and orientation of the coding sequence with respect to the control sequences being such that the coding sequence is transcribed under the "control" of the control sequences (i.e., RNA polymerase which binds to the DNA molecule at the control sequences transcribes the coding sequence). Modification of the sequences encoding the molecule of interest may be desirable to achieve this end. For example, in some cases it may be necessary to modify the sequence so that it can be attached to the control sequences in the appropriate orientation; i.e., to maintain the reading frame. The

WO 02/083711

PCT/US02/11501

control sequences and other regulatory sequences may be ligated to the coding sequence prior to insertion into a vector. Alternatively, the coding sequence can be cloned directly into an expression vector which already contains the control sequences and an appropriate restriction site.

- 5 As explained above, it may also be desirable to produce mutants or analogs of the reference GNA33 polypeptide. Mutants or analogs may be prepared by the deletion of a portion of the sequence encoding the GNA33 polypeptide, by insertion of a sequence, and/or by substitution of one or more nucleotides within the sequence. Techniques for modifying nucleotide sequences, such as site-directed mutagenesis, and the like, are well known to those skilled in the art. See, e.g., Sambrook et al.,  
 10 *supra*; Kunkel, T.A. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1985) 82:448; Geisselsoder et al. (1987) *BioTechniques* 5:786; Zoller and Smith (1983) *Methods Enzymol.* 100:468; Dalbadie-McFarland et al. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 79:6409.

- The molecules can be expressed in a wide variety of systems, including insect, mammalian, bacterial, viral and yeast expression systems, all well known in the art.  
 15 For example, insect cell expression systems, such as baculovirus systems, are known to those of skill in the art and described in, e.g., Summers and Smith, *Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No. 1555* (1987). Materials and methods for baculovirus/insect cell expression systems are commercially available in kit form  
 20 from, *inter alia*, Invitrogen, San Diego CA ("MaxBac" kit). Similarly, bacterial and mammalian cell expression systems are well known in the art and described in, e.g., Sambrook et al., *supra*. Yeast expression systems are also known in the art and described in, e.g., *Yeast Genetic Engineering* (Barr et al., eds., 1989) Butterworths, London.

- A number of appropriate host cells for use with the above systems are also known. For example, mammalian cell lines are known in the art and include immortalized cell lines available from the American Type Culture Collection (ATCC), such as, but not limited to, Chinese hamster ovary (CHO) cells, HeLa cells, baby hamster kidney (BHK) cells, monkey kidney cells (COS), human embryonic  
 30 kidney cells, human hepatocellular carcinoma cells (e.g., Hep G2), Madin-Darby bovine kidney ("MDBK") cells, as well as others. Similarly, bacterial hosts such as *E. coli*, *Bacillus subtilis*, and *Streptococcus spp.*, will find use with the present

WO 02/083711

PCT/US02/11501

expression constructs. Yeast hosts useful in the present invention include *inter alia*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, *Candida maltosa*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces fragilis*, *Kluyveromyces lactis*, *Pichia guilliermondii*, *Pichia pastoris*, *Schizosaccharomyces pombe* and *Yarrowia lipolytica*. Insect cells for use with baculovirus expression vectors include, *inter alia*, *Aedes aegypti*, *Autographa californica*, *Bombyx mori*, *Drosophila melanogaster*, *Spodoptera frugiperda*, and *Trichoplusia ni*.

Nucleic acid molecules comprising nucleotide sequences of interest can be stably integrated into a host cell genome or maintained on a stable episomal element in a suitable host cell using various gene delivery techniques well known in the art. See, e.g., U.S. Patent No. 5,399,346.

Depending on the expression system and host selected, the molecules are produced by growing host cells transformed by an expression vector described above under conditions whereby the protein is expressed. The expressed protein is then isolated from the host cells and purified. If the expression system secretes the protein into growth media, the product can be purified directly from the media. If it is not secreted, it can be isolated from cell lysates. The selection of the appropriate growth conditions and recovery methods are within the skill of the art.

Once produced, the GNA33 polypeptides can be used to produce antibodies. Thus, the polypeptides are provided in compositions to immunize mammalian subjects, including standard laboratory animals such as rodents and rabbits. The compositions may include a suitable adjuvant to elicit the production of polyclonal sera. Groups of animals are generally immunized and boosted several times with the compositions. Antisera from immunized animals can be obtained. GNA33 polypeptides that are capable of eliciting the formation of bactericidal antisera are suitable for use in the production of monoclonal antibodies. These antibodies, in turn, may be used to search for further mimetics of MenB antigens that will provide epitopes for anti-MenB vaccines.

Thus, in the practice of the invention, selected GNA33 polypeptides are used to provide monoclonal antibodies and functional equivalents thereof. The term "functional equivalent" with respect to a particular monoclonal antibody, as used herein, means a molecule that: (a) cross-blocks an exemplified monoclonal antibody;



WO 02/083711

PCT/US02/11501

(b) binds selectively to the GNA33 polypeptide in question; (c) and, optionally, displays functional activity (e.g., complement-mediated bactericidal and/or opsonic activity) against MenB bacterial cells as determined by standard assays described below. Further, as used herein with regard to a particular monoclonal antibody-producing hybridoma of the invention, the term "progeny" is intended to include all derivatives, issue, and offspring of the parent hybridoma that produce the monoclonal antibody produced by the parent, regardless of generation or karyotypic identity.

Monoclonal antibodies are prepared using standard techniques, well known in the art, such as by the method of Kohler and Milstein, *Nature* (1975) 256:495, or a modification thereof, such as described by Buck et al. (1982) *In Vitro* 18:377. Typically, a mouse or rat is immunized with the GNA33 polypeptide conjugated to a protein carrier, boosted and the spleen (and optionally several large lymph nodes) removed and dissociated into single cells. If desired, the spleen cells may be screened (after removal of non-specifically adherent cells) by applying a cell suspension to a plate or well coated with the antigen. B-cells, expressing membrane-bound immunoglobulin specific for the antigen, will bind to the plate, and will not be rinsed away with the rest of the suspension. Resulting B-cells, or all dissociated spleen cells, are then induced to fuse with myeloma cells to form hybridomas. Representative murine myeloma lines for use in the hybridizations include those available from the American Type Culture Collection (ATCC).

More particularly, somatic cell hybrids can be prepared by the method of Buck et al., (*supra*), using the azaguanine resistant, non-secreting murine myeloma cell line P3X63-Ag8.653 (obtainable from the ATCC). The hybridoma cell lines are generally cloned by limiting dilution, and assayed for the production of antibodies which bind specifically to the immunizing antigen and which do not bind to unrelated antigens. The selected monoclonal antibody-secreting hybridomas are then cultured either *in vitro* (e.g., in tissue culture bottles or hollow fiber reactors), or *in vivo* (e.g., as ascites in mice).

Hybridoma supernatant can be assayed for anti-MenB-reactive antibody using, for example, either solid phase ELISA with the immunizing GNA33 polypeptide or an indirect immunofluorescence assay using MenB bacteria as the target antigen. The selectivity of monoclonal antibodies secreted by the hybridomas can be assessed using

WO 02/083711

PCT/US02/11501

competitive specific binding assays, such as inhibition ELISA, or the like. For example, antibody molecules, either diluted in buffer, or buffer containing soluble GNA33 polypeptide, are reacted in an ELISA vessel in the presence of bound GNA33 polypeptide. After washing, bound antibody is detected by labeled anti-Ig (anti-IgM, IgG and IgA) as the secondary antibody. Antibodies that are inhibited by the soluble GNA33 polypeptide can be considered specific and, thus are selected for further study including, isotyping and additional screening for MenB binding and functional activity.

Specifically, partially purified monoclonal antibody molecules can be individually evaluated for their ability to bind to the surface of MenB using standard assays, such as those described in the examples herein. Functional activity can be determined by assessing complement-mediated bactericidal activity and/or opsonic activity. In particular, complement-mediated bactericidal activity of the antibodies can be evaluated using standard assays such as those described by Gold et al. (1970) *Infect. Immun.* 1:479, Westerink et al. (1988) *Infect. Immun.* 56:1120, Mandrell et al. (1995) *J. Infect. Dis.* 172:1279, and Granoff et al. (1995) *Clin. Diagn. Laboratory Immunol.* 2:574. In these assays, *N. meningitidis* is reacted with a complement source as well as with the antibody to be tested. Bacterial counts are done at various sampling times. Those antibodies that demonstrate complement-mediated bactericidal activity, as demonstrated by a minimum of a 50% reduction in viable bacterial cell counts determined after sixty minutes incubation with antibody and complement, as compared to colony counts at time zero, are considered to exhibit bactericidal activity for purposes of the present invention and are suitable for further use.

Complement-mediated bacteriolysis is thought to be the major mechanism responsible for host protection against invasive Meningococcal disease. However, evidence also supports an important protective role for opsonization (see, e.g., Bjerknes et al. (1995) *Infect. Immun.* 63:160). Accordingly, the opsonic activity of the antibodies produced herein can be evaluated as a second measure, or as an alternative measure, to assess functional activity. Results from opsonic assays can be used to supplement bactericidal data, and to help in the selection of antibodies capable of conferring protection. Evaluation of opsonic activity is also particularly useful herein for the evaluation of the murine monoclonal antibodies of the invention which

WO 02/083711

PCT/US02/11501

have an IgG1 isotype. Murine IgG1 (in contrast to human IgG1) is ineffective in activation of complement. Thus, murine IgG1 antibodies do not activate complement-mediated bacteriolysis of MenB in the above-described assays. However, functional activity of IgG1 anti-GNA33 monoclonal antibodies can be assessed by opsonization in the absence of complement.

A variety of opsonic assay methods are known in the art, and can be used to evaluate functional activity of the monoclonal antibodies of the present invention. Such standard assays include those described by Sjursen et al. (1987) *Acta Path. Microbiol. Immunol. Scand., Sec. C* 95:283, Halstensen et al. (1989) *Scand. J. Infect. Dis.* 21:267, Lehmann et al. (1991) *APMIS* 99:769, Halstensen et al. (1991) *NIPH Annals* 14:157, Fredlund et al. (1992) *APMIS* 100:449, Guttormsen et al. (1992) *Infect. Immun.* 60:2777, Guttormsen et al. (1993) *J. Infect. Dis.* 167:1314, Bjerknes et al. (1995) *Infect. Immun.* 63:160, Hayrinen et al. (1995) *J. Infect. Dis.* 171:1481, de Velasco et al. (1995) *J. Infect. Dis.* 172:262, and Verheul, A.F.M. (1991) "Meningococcal LPS Derived Oligosaccharide-Protein Conjugate Vaccines, Immunochemical and Immunological Aspects," Thesis, Utrecht University, The Netherlands, pp. 112-135.

Selected monoclonal antibodies of interest can be expanded *in vitro*, using routine tissue culture methods, or *in vivo*, using mammalian subjects. For example, pristane-primed mice can be inoculated with log phase hybridoma cells in PBS for ascites production. Ascites fluid can be stored at -70°C prior to further purification.

It may be desirable to provide chimeric antibodies, especially if the antibodies are to be used in preventive or therapeutic pharmaceutical preparations, such as for providing passive protection against MenB, as well as in MenB diagnostic preparations. Chimeric antibodies composed of human and non-human amino acid sequences may be formed from the mouse monoclonal antibody molecules to reduce their immunogenicity in humans (Winter et al. (1991) *Nature* 349:293; Lobuglio et al. (1989) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 86:4220; Shaw et al. (1987) *J. Immunol.* 138:4534; and Brown et al. (1987) *Cancer Res.* 47:3577; Riechmann et al. (1988) *Nature* 332:323; Verhoeven et al. (1988) *Science* 239:1534; and Jones et al. (1986) *Nature* 321:522; EP Publication No. 519,596, published 23 December 1992; and U.K. Patent Publication No. GB 2,276,169, published 21 September 1994).

WO 02/083711

PCT/US02/11501

- Antibody molecule fragments, e.g., F(ab')<sub>2</sub>, Fv, and sFv molecules, that are capable of exhibiting immunological binding properties of the parent monoclonal antibody molecule can be produced using known techniques. Inbar et al. (1972) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 69:2659; Hochman et al. (1976) *Biochem* 15:2706; Ehrlich et al. (1980) *Biochem* 19:4091; Huston et al. (1988) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 85(16):5879; and U.S. Patent Nos. 5,091,513 and 5,132,405, to Huston et al.; and 4,946,778, to Ladner et al.
- In the alternative, a phage-display system can be used to expand the monoclonal antibody molecule populations *in vitro*. Saiki, et al. (1986) *Nature* 324:163; Scharf et al. (1986) *Science* 233:1076; U.S. Patent Nos. 4,683,195 and 4,683,202; Yang et al. (1995) *J Mol Biol* 254:392; Barbas, III et al. (1995) *Methods: Comp. Meth Enzymol* 8:94; Barbas, III et al. (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* 88:7978.
- Once generated, the phage display library can be used to improve the immunological binding affinity of the Fab molecules using known techniques. See, e.g., Figini et al. (1994) *J. Mol. Biol.* 239:68.
- The coding sequences for the heavy and light chain portions of the Fab molecules selected from the phage display library can be isolated or synthesized, and cloned into any suitable vector or replicon for expression. Any suitable expression system can be used, including, for example, bacterial, yeast, insect, amphibian and mammalian systems. Expression systems in bacteria include those described in Chang et al. (1978) *Nature* 275:615, Goeddel et al. (1979) *Nature* 281:544, Goeddel et al. (1980) *Nucleic Acids Res.* 8:4057, European Application No. EP 36,776, U.S. Patent No. 4,551,433, deBoer et al. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:21-25, and Siebenlist et al. (1980) *Cell* 20:269.
- Expression systems in yeast include those described in Hinnen et al. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:1929, Ito et al. (1983) *J. Bacteriol.* 153:163, Kurtz et al. (1986) *Mol. Cell. Biol.* 6:142, Kunze et al. (1985) *J. Basic Microbiol.* 25:141, Gleeson et al. (1986) *J. Gen. Microbiol.* 132:3459, Roggenkamp et al. (1986) *Mol. Gen. Genet.* 202:302, Das et al. (1984) *J. Bacteriol.* 158:1165, De Louvencourt et al. (1983) *J. Bacteriol.* 154:737, Van den Berg et al. (1990) *Bio/Technology* 8:135, Kunze et al. (1985) *J. Basic Microbiol.* 25:141, Cregg et al. (1985) *Mol. Cell. Biol.* 5:3376, U.S. Patent Nos. 4,837,148 and 4,929,555, Beach et al. (1981) *Nature*

WO 02/083711

PCT/US02/11501

- 300:706, Davidow et al. (1985) *Curr. Genet.* 10:380, Gaillardin et al. (1985) *Curr. Genet.* 10:49, Ballance et al. (1983) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 112:284-289, Tilburn et al. (1983) *Gene* 26:205-221, Yellón et al. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:1470-1474, Kelly et al. (1985) *EMBO J.* 4:475479; European Application No. EP 244,234, and International Publication No. WO 91/00357.

- Expression of heterologous genes in insects can be accomplished as described in U.S. Patent No. 4,745,051, European Application Nos. EP 127,839 and EP 155,476, Vlak et al. (1988) *J. Gen. Virol.* 69:765-776, Miller et al. (1988) *Ann. Rev. Microbiol.* 42:177, Carbonell et al. (1988) *Gene* 73:409, Maeda et al. (1985) *Nature* 315:592-594, Lebacqz-Verheyden et al. (1988) *Mol. Cell. Biol.* 8:3129, Smith et al. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:8404, Miyajima et al. (1987) *Gene* 58:273, and Martin et al. (1988) *DNA* 7:99. Numerous baculoviral strains and variants and corresponding permissive insect host cells from hosts are described in Luckow et al. (1988) *BioTechnology* 6:47-55, Miller et al. (1986) *GENERIC ENGINEERING*, Setlow, J.K. et al. eds., Vol. 8, Plenum Publishing, pp. 277-279, and Maeda et al. (1985) *Nature* 315:592-594.

- Mammalian expression can be accomplished as described in Dijkema et al. (1985) *EMBO J.* 4:761, Gorman et al. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:6777, Boshart et al. (1985) *Cell* 41:521, and U.S. Patent No. 4,399,216. Other features of mammalian expression can be facilitated as described in Ham et al. (1979) *Meth. Enz.* 58:44, Barnes et al. (1980) *Anal. Biochem.* 102:255, U.S. Patent Nos. 4,767,704, 4,657,866, 4,927,762, 4,560,655 and Reissued U.S. Patent No. RE 30,985, and in International Publication Nos. WO 90/103430, WO 87/00195.

- Any of the above-described antibody molecules can be used herein to provide anti-MenB therapeutic or preventive pharmaceutical agents. Additionally, "humanized" antibody molecules, comprising antigen-binding sites derived from the instant murine monoclonal antibodies, can be produced using the techniques described above.

- The anti-MenB antibodies of the present invention, described above, are conveniently used as receptors to screen diverse molecular libraries in order to identify molecular mimetics of epitopes from MenB, using methods such as those described in U.S. Patent Nos. 6,030,619 and 6,048,527, incorporated by reference

WO 02/083711

PCT/US02/11501

herein in their entirety. Methods for identifying mimetics in molecular libraries generally involve the use of one or more of the following procedures: (1) affinity purification with an immobilized target receptor; (2) binding of a soluble receptor to tethered ligands; and (3) testing soluble compounds directly in antigen competition assays or for biological activity. Molecules screened for molecular mimics include but are not limited to small organic compounds, combinatorial libraries of organic compounds, nucleic acids, nucleic acid derivatives, saccharides or oligosaccharides, peptoids, soluble peptides, peptides tethered on a solid phase, peptides displayed on bacterial phage surface proteins, bacterial surface proteins or antibodies, and/or peptides containing non-peptide organic moieties.

For example, libraries of diverse molecular species can be made using combinatorial organic synthesis. See, e.g., Gordon et al. (1994) *J. Med. Chem.* 37:1335. Examples include but are not limited to pyrrolidines; oligocarbamates (Cho et al. (1993) *Science* 261:1303); peptoids such as N-substituted glycine polymers (Simon et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:9367); and vinyllogous polypeptides (Hagihara et al. (1992) *J. Am. Chem. Soc.* 114:6568).

A variety of approaches, known in the art, can be used to track the building blocks as they are added during synthesis so that the history of individual library members can be determined. These approaches include addressable location on a photolithographic chip (oligocarbamates), a deconvolution strategy in which "hits" are identified through recursive additions of monomers to partially synthesized libraries (peptoids, pyrrolidines, peptides), and coding combinatorial libraries by the separate synthesis of nucleotides (Nielsen et al. (1993) *J. Am. Chem. Soc.* 115: 9812) or other organic moieties (Ohlmeyer et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:10922) ("tags"). The coded tags associated with each library member can then be decoded after a mimetic has been selected. For example, nucleic acid tags can be decoded by DNA sequencing.

Peptoid combinatorial libraries are particularly useful for identifying molecular mimetics of MenB epitopes. Peptoids are oligomers of N-substituted glycine (Simon et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:9367) and can be used to generate chemically diverse libraries of novel molecules. The monomers may incorporate *t*-butyl-based side-chain and 9- fluorenyl-methoxy-carbonyl  $\alpha$ -amine

WO 02/083711

PCT/US02/11501

protection. The assembly of monomers into peptoid oligomers can be performed, for example, on a solid phase using the "submonomer method" of Zuckermann et al. (1992) *J. Am. Chem. Soc.* **114**:10646. In this method, syntheses are conducted with Rink amide polystyrene resin (Rink et al. (1987) *Tetrahedron Lett.* **28**:3787). Resin-bound amines are bromoacetylated by *in situ* activation of bromoacetic acid with diisopropyl-carbodiimide. Subsequently, the resin-bound bromoacetamides are displaced by addition of an amine. The amines may incorporate t-butyl-based protection of additional reactive groups. This two-step cycle is repeated until the desired number of monomers is added. The oligopeptide is then released from the resin by treatment with 95% trifluoroacetic acid/5% water. The syntheses are performed, preferably, using a robotic synthesizer. See, e.g., Zuckermann et al. (1992) *Pept. Protein Res.* **40**:498; and Zuckermann et al. (1996) *Methods in Enzymology* **267**:437. In the alternative, oligomerization of the peptoid monomers may be performed by *in situ* activation by either benzotriazol-1-yloxytris (pyrrolidino)phosphonium hexafluorophosphate or bromotris(pyrrolidino)phosphonium hexafluorophosphate. In this alternative method, the other steps are identical to conventional peptide synthesis using a-(9- fluorenyl methoxycarbonyl) amino acids (see, e.g., Simon et al. (1992), *supra*).

Once the peptoid libraries are generated, they can be screened by, e.g., adding the monoclonal antibodies of the present invention, along with various pools of the combinatorial peptoids, to wells of microtiter plates coated with MenB polypeptides or MenB bacteria. After a period of incubation and a wash to remove unbound antibody, the presence of bound antibody is determined by standard ELISA assays. See, e.g., Harlow & Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual* (1988), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 553. Wells that do not contain bound antibody indicate the presence of peptoid mimetics that bind to the antibody. The particular identities of the peptoid mimetics in the pools are determined by recursively adding back monomer units to partially synthesized members of the libraries. Zuckermann et al. (1994) *J. Med. Chem.* **37**:2678. Other methods for identifying active compounds in pools of small molecules include fractionating the pool by reverse phase HPLC or affinity selection/mass spectroscopy (Nedved M. L. Et al (1996) *Anal. Chem.* **68**:4228).

WO 02/083711

PCT/US02/11501

Once putative molecular mimetics are identified, they are tested for their ability to elicit functionally active (e.g., bactericidal and/or opsonic) antibodies, as described above. Molecular mimetics that have these properties are appropriate for further use, for example, in vaccine compositions.

5       The GNA33 antibodies, as well as molecular mimetics identified using the functionally active anti-MenB antibodies of the invention can be used to generate antibody reagents for use in diagnostic assays. For example, the GNA33 antibodies described herein, as well as further antibodies reactive with the molecular mimetics, can be used to detect bacterial antigen in biological samples using immunodiagnostic  
10 techniques such as competition, direct reaction, or sandwich type assays. Such assays include Western blots; agglutination tests; enzyme-labeled and mediated immunoassays, such as ELISAs; biotin/avidin type assays; radioimmunoassays; immunoelectrophoresis; immunoprecipitation, and the like. The reactions generally include revealing labels such as fluorescent, chemiluminescent, radioactive,  
15 enzymatic labels or dye molecules, or other methods for detecting the formation of a complex between the mimetic and the antibody or antibodies reacted therewith.

The aforementioned assays generally involve separation of unbound antibody in a liquid phase from a solid phase support to which antigen-antibody complexes are bound. Solid supports which can be used in the practice of the invention include  
20 substrates such as nitrocellulose (e.g., in membrane or microtiter well form); polyvinylchloride (e.g., sheets or microtiter wells), polystyrene latex (e.g., beads or microtiter plates); polyvinylidene fluoride; diazotized paper; nylon membranes; activated beads, magnetically responsive beads, and the like.

Typically, a solid support is first reacted with a solid phase component (e.g.,  
25 one or more MenB antigens or molecular mimetics) under suitable binding conditions such that the component is sufficiently immobilized to the support. Sometimes, immobilization to the support can be enhanced by first coupling to a protein with better binding properties. Suitable coupling proteins include, but are not limited to, macromolecules such as serum albumins including bovine serum albumin (BSA),  
30 keyhole limpet hemocyanin, immunoglobulin molecules, thyroglobulin, ovalbumin, and other proteins well known to those skilled in the art. Other molecules that can be used to bind the antigen or mimetic to the support include polysaccharides, polylactic



WO 02/083711

PCT/US02/11501

acids, polyglycolic acids, polymeric amino acids, amino acid copolymers, and the like. Such molecules and methods of coupling these molecules to the antigens, are well known to those of ordinary skill in the art. See, e.g., Brinkley, M.A. *Bioconjugate Chem.* (1992) 3:2-13; Hashida et al., *J. Appl. Biochem.* (1984) 6:56-63; and Anjaneyulu and Staros, *International J. of Peptide and Protein Res.* (1987) 30:117-124.

After reacting the solid support with the solid phase component, any non-immobilized solid-phase components are removed from the support by washing, and the support-bound component is then contacted with a biological sample suspected of containing ligand moieties (e.g., MenB antibodies) under suitable binding conditions. After washing to remove any non-bound ligand, a secondary binder moiety is added under suitable binding conditions, wherein the secondary binder is capable of associating selectively with the bound ligand. The presence of the secondary binder can then be detected using techniques well known in the art.

More particularly, an ELISA method can be used, wherein the wells of a microtiter plate are coated with a MenB epitope or mimetic according to the present invention. A biological sample containing or suspected of containing anti-MenB immunoglobulin molecules is then added to the coated wells. After a period of incubation sufficient to allow antibody binding to the immobilized molecule, the plate(s) can be washed to remove unbound moieties and a detectably labeled secondary binding molecule added. The secondary binding molecule is allowed to react with any captured sample antibodies, the plate washed and the presence of the secondary binding molecule detected using methods well known in the art.

Thus, in one particular embodiment, the presence of bound MenB ligands from a biological sample can be readily detected using a secondary binder comprising an antibody directed against the antibody ligands. A number of anti-bovine immunoglobulin (Ig) molecules are known in the art which can be readily conjugated to a detectable enzyme label, such as horseradish peroxidase, alkaline phosphatase or urease, using methods known to those of skill in the art. An appropriate enzyme substrate is then used to generate a detectable signal. In other related embodiments, competitive-type ELISA techniques can be practiced using methods known to those skilled in the art.

WO 02/083711

PCT/US02/11501

Assays can also be conducted in solution, such that the MenB epitopes or mimetics and antibodies specific for these molecules form complexes under precipitating conditions. In one particular embodiment, the molecules can be attached to a solid phase particle (e.g., an agarose bead or the like) using coupling techniques known in the art, such as by direct chemical or indirect coupling. The coated particle is then contacted under suitable binding conditions with a biological sample suspected of containing antibodies for MenB. Cross-linking between bound antibodies causes the formation of particle-epitope or mimetic-antibody complex aggregates which can be precipitated and separated from the sample using washing and/or centrifugation.

10 The reaction mixture can be analyzed to determine the presence or absence of complexes using any of a number of standard methods, such as those immunodiagnostic methods described above.

In yet a further embodiment, an immunoaffinity matrix can be provided, wherein a polyclonal population of antibodies from a biological sample suspected of containing MenB antibodies is immobilized to a substrate. In this regard, an initial affinity purification of the sample can be carried out using immobilized antigens. The resultant sample preparation will thus only contain anti-MenB moieties, avoiding potential nonspecific binding properties in the affinity support. A number of methods of immobilizing immunoglobulins (either intact or in specific fragments) at high yield and good retention of antigen binding activity are known in the art. Not being limited by any particular method, immobilized protein A or protein G can be used to immobilize immunoglobulins.

15 20

Accordingly, once the immunoglobulin molecules have been immobilized to provide an immunoaffinity matrix, labeled molecules are contacted with the bound antibodies under suitable binding conditions. After any non-specifically bound MenB epitope or mimetic has been washed from the immunoaffinity support, the presence of bound antigen can be determined by assaying for label using methods known in the art.

25

The above-described assay reagents, including the GNA33 polypeptides and/or mimetics of the invention or antibodies thereto, can be provided in kits, with suitable instructions and other necessary reagents, in order to conduct immunoassays as described above. The kit can also contain, depending on the particular

30

WO 02/083711

PCT/US02/11501

immunoassay used, suitable labels and other packaged reagents and materials (i.e. wash buffers and the like). Standard immunoassays, such as those described above, can be conducted using these kits.

In addition, the GNA33 polypeptides, molecular mimetics and antibodies, can be used herein to prevent MenB disease in mammalian subjects. Particularly, vaccine compositions containing these molecules can be used for the prevention of MenB disease in vaccinated subjects. The vaccines may be administered in conjunction with other antigens and immunoregulatory agents, for example, immunoglobulins, cytokines, lymphokines, and chemokines, including but not limited to IL-2, modified IL-2 (cys125 to ser125), GM-CSF, IL-12, g- interferon, IP-10, MIP1b and RANTES.

The vaccines will generally include one or more "pharmaceutically acceptable excipients or vehicles" such as water, saline, glycerol, ethanol, etc. Additionally, auxiliary substances, such as wetting or emulsifying agents, pH buffering substances, and the like, may be present in such vehicles.

Adjuvants may also be used to enhance the effectiveness of the vaccines. Adjuvants can be added directly to the vaccine compositions or can be administered separately, either concurrently with or shortly after, vaccine administration. Such adjuvants include, but are not limited to: (1) aluminum salts (alum), such as aluminum hydroxide, aluminum phosphate, aluminum sulfate, etc.; (2) oil-in-water emulsion formulations (with or without other specific immunostimulating agents such as muramyl peptides (see below) or bacterial cell wall components), such as for example (a) MF59 (International Publication No. WO 90/14837; Chapter 10 in *Vaccine design: the subunit and adjuvant approach*, eds. Powell & Newman, Plenum Press 1995), containing 5% Squalene, 0.5% TWEEN 80<sup>TM</sup>, and 0.5% SPAN 85<sup>TM</sup> (optionally containing various amounts of MTP-PE (see below), although not required) formulated into submicron particles using a microfluidizer such as Model 110Y microfluidizer (Microfluidics, Newton, MA), (b) SAF, containing 10% Squalene, 0.4% TWEEN 80<sup>TM</sup>, 5% pluronic-blocked polymer L121, and thr-MDP either microfluidized into a submicron emulsion or vortexed to generate a larger particle size emulsion, and (c) RIBI<sup>TM</sup> adjuvant system (RAS), (Ribi Immunochem, Hamilton, MT) containing 2% Squalene, 0.2% TWEEN 80<sup>TM</sup>, and one or more bacterial cell wall components from the group consisting of monophosphorylipid A

WO 02/083711

PCT/US02/11501

(MPL), trehalose dimycolate (TDM), and cell wall skeleton (CWS), preferably MPL + CWS (DETOX™); (3) saponin adjuvants, such as QS21 or STIMULON™ (Cambridge Bioscience, Worcester, MA) may be used or particles generated therefrom such as ISCOMs (immunostimulating complexes), which ISCOMs may be devoid of additional detergent, see, e.g., International Publication No. WO 00/07621;

5 (4) Complete Freund's Adjuvant (CFA) and Incomplete Freund's Adjuvant (IFA); (5) cytokines, such as interleukins (IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12 (International Publication No. WO 99/44636), etc.), interferons (e.g., gamma interferon), macrophage colony stimulating factor (M-CSF), tumor necrosis factor (TNF), etc.; (6)

10 detoxified mutants of a bacterial ADP-ribosylating toxin such as a cholera toxin (CT), a pertussis toxin (PT), or an *E. coli* heat-labile toxin (LT), particularly LT-K63 (where lysine is substituted for the wild-type amino acid at position 63) LT-R72 (where arginine is substituted for the wild-type amino acid at position 72), CT-S109 (where serine is substituted for the wild-type amino acid at position 109), and PT-K9/G129

15 (where lysine is substituted for the wild-type amino acid at position 9 and glycine substituted at position 129) (see, e.g., International Publication Nos. W093/13202 and W092/19265); (7) MPL or 3-O-deacylated MPL (3dMPL) (see, e.g., GB 2220221), EP-A-0689454, optionally in the substantial absence of alum when used with pneumococcal saccharides (see, e.g., International Publication No. WO 00/56358); (8)

20 combinations of 3dMPL with, for example, QS21 and/or oil-in-water emulsions (see, e.g., EP-A-0835318, EP-A-0735898, EP-A-0761231; (9) oligonucleotides comprising CpG motifs (see, e.g., Roman et al. (1997) *Nat. Med.* 3:849-854; Weiner et al. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:10833-10837; Davis et al. (1998) *J. Immunol.* 160:870-876; Chu et al. (1997) *J. Exp. Med.* 186:1623-1631; Lipford et al. (1997) *Eur. J. Immunol.* 27:2340-2344; Moldoveanu et al. (1988) *Vaccine* 16:1216-1224; Krieg et al. (1995) *Nature* 374:546-549; Klinman et al. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:2879-2883; Ballas et al. (1996) *J. Immunol.* 157:1840-1845; Cowdery et al. (1996) *J. Immunol.* 156:4570-4575; Halpern et al. (1996) *Cell Immunol.* 167:72-78; Yamamoto et al. (1988) *Jpn. J. Cancer Res.* 79:866-873; Stacey et al. (1996) *J. Immunol.* 157:2116-2122; Messina et al. (1991) *J. Immunol.* 147:1759-1764; Yi et al. (1996) *J. Immunol.* 157:4918-4925; Yi et al. (1996) *J. Immunol.* 157:5394-5402; Yi et al. (1998) *J. Immunol.* 160:4755-4761; Yi et al. (1998) *J. Immunol.* 160:5898-5906;

25

30

WO 02/083711

PCT/US02/11501

International Publication Nos. WO 96/02555, WO 98/16247, WO 98/18810, WO 98/40100, WO 98/55495, WO 98/37919 and WO 98/52581), such as those containing at least on CG dinucleotide, with cytosine optionally replaced with 5-methylcytosine; (10) a polyoxyethylene ether or a polyoxyethylene ester (see, e.g., International Publication No. WO 99/52549); (11) a polyoxyethylene sorbitan ester surfactant in combination with an octoxynol (see, e.g., International Publication No. WO 01/21207) or a polyoxyethylene alkyl ether or ester surfactant in combination with at least one additional non-ionic surfactant such as an octoxynol (see, e.g., International Publication No. WO 01/21152); (12) a saponin and an immunostimulatory oligonucleotide such as a CpG oligonucleotide (see, e.g., International Publication No. WO 00/62800); (13) an immunostimulant and a particle of metal salt (see, e.g., International Publication No. WO 00/23105); and (14) other substances that act as immunostimulating agents to enhance the effectiveness of the composition.

Muramyl peptides include, but are not limited to, N-acetyl-muramyl-L-threonyl-D-isoglutamine (thr-MDP), -acetyl-normuramyl-L-alanyl-D-isoglutamate (nor-MDP), -acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutaminyl-L-alanine-2-(1'-2'-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-hydroxyphosphoryloxy)- ethylamine (MTP-PE), etc.

In order to enhance the effectiveness of the compositions, it may be necessary to conjugate the active agent to a carrier molecule. Such carrier molecules will not themselves induce the production of harmful antibodies. Suitable carriers are typically large, slowly metabolized macromolecules such as proteins, polysaccharides, polylactic acids, polyglycolic acids, polymeric amino acids, amino acid copolymers, lipid aggregates (such as oil droplets or liposomes), inactive virus particles, CRM<sub>197</sub> (a nontoxic mutant diphtheria toxin), and the like. Such carriers are well known to those of ordinary skill in the art.

Typically, the vaccine compositions are prepared as injectables, either as liquid solutions or suspensions; solid forms suitable for solution in, or suspension in, liquid vehicles prior to injection may also be prepared. The preparation also may be emulsified or encapsulated in liposomes, or adsorbed to particles for enhanced adjuvant effect, as discussed above.

The vaccines will comprise an effective amount of the active agent, such as GNA33 polypeptide or antibody thereto, and any other of the above-mentioned

WO 02/083711

PCT/US02/11501

components, as needed. By "an effective amount" is meant an amount of a molecule which will induce an immunological response in the individual to which it is administered. Such a response will generally result in the development in the subject of a secretory, cellular and/or antibody-mediated immune response to the vaccine.

- 5 Usually, such a response includes but is not limited to one or more of the following effects; the production of antibodies from any of the immunological classes, such as immunoglobulins A, D, E, G or M; the proliferation of B and T lymphocytes; the provision of activation, growth and differentiation signals to immunological cells; expansion of helper T cell, suppressor T cell, and/or cytotoxic T cell and/or gd T cell
- 10 populations.

- Once formulated, the vaccines are conventionally administered parenterally, e.g., by injection, either subcutaneously or intramuscularly. Additional formulations suitable for other modes of administration include oral and pulmonary formulations, suppositories, and transdermal applications. Dosage treatment may be a single dose
- 15 schedule or a multiple dose schedule.

WO 02/083711

PCT/US02/11501

### III. Experimental

Below are examples of specific embodiments for carrying out the present invention. The examples are offered for illustrative purposes only, and are not intended to limit the scope of the present invention in any way.

- 5        Efforts have been made to ensure accuracy with respect to numbers used (e.g., amounts, temperatures, etc.), but some experimental error and deviation should, of course, be allowed for.

### MATERIALS AND METHODS

#### 10        **Bacterial strains.**

- N. meningitidis* serogroup B strains included in this study were isolated from patients with meningococcal disease residing in different countries, and were collected over a period of 36 years. 21 strains were serogroup B strains and one strain was a serogroup C strain. The strains are summarized in Table 1. Based on  
15        electrophoretic typing (ET), the collection represents a broad range of genetic diversity for MenB strains causing disease.

- Mutants of strains MC58, BZ232 and NMB (MC58ΔGNA33, BZ232ΔGNA33, and NMBΔGNA33, respectively) in which the *gna33* gene was deleted and replaced by allelic exchange with an antibiotic cassette were prepared by  
20        transforming the parent strain with the plasmid pBSUD33ERM. This plasmid contains the upstream and downstream flanking gene regions for allelic exchange and the *ermC* gene (erythromycin resistance). Briefly, the upstream flanking region (including the start codon) from - 867 to + 75 and the downstream flanking region (including the stop codon) from +1268 to +1744, were amplified from MC58 using  
25        the following primers:

U33 FOR 5'-GCTCTAGAGATGAGTCGAACACAATGAACAATGCTCTGA-3' (SEQ ID NO:26);

U33REV 5'-TCCCCCGGGCTCTTGCTTTGGCAGGCGGCGA-3' (SEQ ID NO:27);

- 30        D33FOR 5'-TCCCCCGGGCACGGGATATGTGTGGC-3' (SEQ ID NO:28),

D33REV 5'-CCCGCTCGAGAGTAGGGACAACCGG-3' (SEQ ID NO:29).

WO 02/083711

PCT/US02/11501

The fragments were cloned into pBluescript (Stratgene, Milan, Italy) and transformed into *E. coli* DH5 using standard techniques (Sambrook and Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2001)). Once all subcloning was complete, naturally competent *Neisseria* strains MC58, BZ232 and NMB were transformed by selecting a few colonies grown overnight on chocolate agar plates (Remel, Laztakas, KA) and mixing them with 20  $\mu$ l of 10mM Tris-HCl pH 6.5 containing 1  $\mu$ g of plasmid DNA. The mixture was spotted onto a chocolate agar plate, incubated for 6 hrs at 37°C, 5% CO<sub>2</sub> then diluted in PBS and spread on chocolate agar plates containing 7  $\mu$ g/ml of erythromycin. The absence of the *gna33* gene in the genome of the erythromycin-resistant colonies for each of the three strains was confirmed by PCR using the following primers:

F33 5'-GCTCTAGAGGGCGACGACAGGCGG-3' (SEQ ID NO:30) and  
R33 5'-CCCGCTCGAGTTACGGGCGGTATTCGG-3' (SEQ ID NO:31).

These primers correspond to the 5'-sense and 3'-antisense strands, respectively, of the *gna33* gene. Lack of GNA33 expression was confirmed by western blot analysis as described below.

#### Monoclonal antibody (mAb) reagents.

Antibodies used for flow cytometry, bactericidal, and *in vivo* protection experiments included the following: a meningococcal Por A P1.2-specific subtyping mAb (MN16C13F4, subclass IgG2a) obtained from Rijksinstituut Voor Volksgezondheid en Milieu, Bilthoven, The Netherlands, or from Wendell Zollinger, Walter Reed Army Institute of Research, Washington DC); anti-polysaccharide mAbs specific for encapsulated serogroup B, SEAM 12 and SEAM 3 (Granoff et al., *J. Immunol.* (1998) 160:5028-5036), subclass IgG2a), and serogroup C (mAb 181.1 (Garcia-Ojeda et al., *Infect. Immun.* (2000) 68:239-246, subclass IgG3). MAb 181.1 was provided by Kathryn Stein, U.S. Food and Drug Administration. The negative control consisted of a mouse IgG mAb (VIG10) of irrelevant specificity, or mouse polyclonal antiserum prepared against *E. coli* proteins from the strain used to express rGNA33.

#### Expression and purification of GNA33.



WO 02/083711

PCT/US02/11501

The *gna33* ORF was amplified by PCR on chromosomal DNA from strain 2996 (P.van der Ley and J .T. Poolman, *Infect.Immun.* (1992) 60:3156,1992) with synthetic oligonucleotides used as primers. The amplified DNA fragment was cloned into pET-21b+ vector (Novagen, Madison, WI) to express the protein as His-tagged (HT-GNA33) or as a soluble protein without the signal and lipid modification sequences (rGNA33). The expression of recombinant protein was evaluated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, performed as described. The His-tagged protein was purified by affinity chromatography on Ni<sup>2+</sup>-conjugated chelating fast flow Sepharose (Amersham-Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) and the untagged form was purified by FPLC using a mono S ion-exchange resin (Amersham-Pharmacia).

**Preparation of polyclonal anti-GNA33 antisera.**

In order to prepare antisera against GNA33, 20 µg of purified HT-GNA33 or untagged rGNA33 was used to immunize six-week old CD1 female mice (four to ten mice per group). The mice were obtained from Charles River (Italia S.P.A., Calco, Italy, or Hollister, California). The recombinant protein was given i.p, together with complete Freund's adjuvant (CFA) for the first dose and incomplete Freund's adjuvant (IFA) for the second (day 21) and third (day 35) booster doses. Blood samples were taken on days 34 and 49.

**Preparation of monoclonal antibodies.**

Four to six weeks old female CD1 mice were immunized as described above except that the third dose was given without adjuvant. Three days later, mice were sacrificed and their spleen cells were fused with myeloma cells P3X63-Ag8.653 at a ratio of 5 spleen cells to 1 myeloma cells. After two weeks incubation in HAT selective medium, hybridoma supernatants were screened for antibody binding activity by ELISA, performed on microtiter plates coated with the noncapsulated *N. meningitidis* strain, M7 (Stephens et al., *Infect. Immun.* (1991) 59:4097-4102) that had been inactivated by treatment with 0.025% paraformaldehyde. Hybridomas secreting GNA33-specific antibody were cloned twice by limiting dilution and then expanded and frozen for subsequent use in tissue culture, or for ascites production in BALB/c mice.

The subclasses of the monoclonal antibodies were determined using a mouse monoclonal antibody isotyping kit (Amersham-Pharmacia.). Among the selected

WO 02/083711

PCT/US02/11501

mAbs, one IgG2a anti-GNA33 mAb, designated mAb 25, was used in all of the binding and functional studies described below. This monoclonal antibody was purified from mouse ascites by Hi-Trap affinity columns (Amersham-Pharmacia) and, after exhaustive dialysis in PBS buffer, the concentration of the purified mAb was determined using a modified Lowry method with BSA as a standard (DC, Bio-Rad, Rome, Italy). Specificity of mAb 25 binding was determined by Western blot using membrane proteins prepared from strains MC58, BZ232 and NMB, and their respective GNA33 knockouts (MC58ΔGNA33, BZ232ΔGNA33 and NMBΔGNA33; see below).

#### 10      **Binding of antisera to the surface of live encapsulated meningococci.**

The ability of the polyclonal anti-GNA33 antisera and mAb 25 to bind to the surface of live NmB strains was determined using a flow cytometric detection of indirect fluorescence assay, performed as described previously (Moe et al., *Infect. Immun.* (1999) 67:5664-5675). Figure 1A shows binding of polyclonal anti-rGNA33 antisera to four representative NmB strains, the parent strain, 2996 (P1.5,2), and three other strains M3735 (P1.5,2), M4207 (P1.5) and MC58 (P1.7,16). The anti-GNA33 polyclonal antiserum reacted only with strains 2996 and M3735. The anticapsular positive control mAb bound to all four strains, whereas the negative control antiserum prepared from animals immunized with *E. coli* proteins, showed only background binding. Figure 1B shows the results of similar experiments measuring binding of the anti-GNA33 mAb 25 to the bacterial cell surface of three strains (M3735 [P1.5,2], M4207 [P1.5] and MC58 [P1.7,16]). The mAb bound only to strain M3735 (P1.5,2).

Table I summarizes the results of flow cytometry experiments measuring the ability of anti-GNA33 antisera or mAb 25 to bind to the surface of live bacteria from 22 genetically diverse encapsulated meningococcal strains (21 serogroup B and 1 serogroup C). The anti-GNA33 antibody bound only to strains with the P1.5,2 or P1.2 serosubtypes (9 of 9 vs. 0 of 13 strains with other PorA serosubtypes;  $P < 0.001$ ). One of the nine positive strains, M986, showed lower binding than the other eight strains (vide infra). There was no binding to three strains (M4207, 1000, and BZ83) that express the P1.5 epitope present on loop 1 of PorA but not the P1.2 epitope (loop 4). Also, there was no binding to strain M136, which does not express PorA (i.e. P1-). These data indicate that binding of anti-GNA33 antibody to the bacterial surface

WO 02/083711

PCT/US02/11501

correlates with expression of the PorA serosubtype P1.2.

**Complement-dependent bactericidal antibody activity.**

Bactericidal activity was measured a previously described (Moe et al., *Infect. Immun.* (2001) 69:3762-3771). Except where noted, the complement source was human serum from a healthy adult (MAS) with no detectable anticapsular antibody to serogroup B or C polysaccharide as tested by ELISA, and no detectable intrinsic bactericidal activity against the target strains when tested at a final serum concentration of 20 or 40%. In a few experiments described below, bactericidal activity was measured using serum from a patient with untreated agammaglobulinemia (Steele et al., *Infect. Immun.* (1984) 44:452-458), infant rabbit serum or adult rat serum as complement sources.

**Animal protection.**

The ability of anti-GNA33 antibodies to confer passive protection against *N. meningitidis* serogroup B bacteremia was tested in infant rats challenged i.p. The assay was performed as previously described (Moe et al., *Infect. Immun.* (1999) 67:5664-5675). In brief, on the morning of the challenge, colonies were picked, inoculated into a broth culture, and grown and prepared as described above for the bactericidal assay. With strain M986, to maximize sensitivity, the animals were injected i.p. at time 0 with 100  $\mu$ l of different dilutions of test or control antisera mixed with approximately  $5 \times 10^3$  of the challenge MenB test strain. In experiments with other test strains, the antibody was administered i.p. at time 0 and the bacterial challenge was performed i.p. 2 hours later. The positive control anticapsular mAb used was SEAM 3. Blood specimens were obtained 18 h after the bacterial challenge by cardiac puncture with a needle and syringe containing approximately 10  $\mu$ l heparin without preservative (1000 Units/ml; Fujisawa USA, Deerfield, IL). Aliquots of 1, 10 and 100  $\mu$ L of blood were plated onto chocolate agar. The CFU per ml of blood was determined after overnight incubation of the plates at 37° C in 5% CO<sub>2</sub>. For calculation of geometric mean CFR/ml, animals with sterile cultures were assigned a value of 1 CFR/ml.

**SDS-PAGE and Western blots.**

Total cell extracts of meningococcal strains were prepared as follows. Single colonies were grown in 7 mL of Mueller-Hinton broth (Difco, Detroit, MI)

WO 02/083711

PCT/US02/11501

supplemented with 0.25% glucose to an  $A_{620nm}$  of 0.5-0.7. The bacteria were collected by centrifugation at 5000 x g for 15 min and resuspended in PBS. After freeze-thawing, the bacterial suspension was mixed with sample buffer (0.06 M Tris-HCl, pH 6.8, 10% (v/v) glycerol, 2% (w/v) SDS, 5% (v/v) 2-mercaptoethanol) and boiled 10 min. Purified proteins (0.5  $\mu$ g/lane), or total cell extracts (25  $\mu$ g) derived from meningococcal strains were loaded onto a 12.5% SDS-polyacrylamide gels (Laemmli, U.K., *Nature* (1970) 227:680-685) and transferred to a nitrocellulose membrane (Towbin et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* (1979) 76:4350-4354). The transfer was performed for 2 hours at 150mA at 4°C, using transfer buffer (0.3% Tris base, 1.44% glycine, 20% (v/v) methanol). The nitrocellulose membrane was saturated by overnight incubation at 4°C in saturation buffer (10% skimmed milk, 0.1% Triton X100 in PBS). The membrane was washed twice with washing buffer (3% skimmed milk, 0.1% Triton X100 in PBS) and incubated for 2 hours at 37°C with mouse antisera diluted 1:200 in washing buffer, mAb 25 at a final concentration of 6  $\mu$ g/ml, or a 1:100 dilution of an anti-Por A P1.2 mAb followed by a 1:2000 dilution of horseradish peroxidase labelled anti-mouse Ig (Dako, Glostrup, Denmark). The membrane was washed twice with 0.1% Triton X100 in PBS and developed with the Opti-4CN Substrate Kit (Bio-Rad). The reaction was stopped by adding water.

#### Peptide spot synthesis.

Peptide spot synthesis was carried out on amino-PEG-cellulose membranes (ABIMED, Langerfeld, Germany) using a model ASP 222 automated spot synthesizer (ABIMED) and diisopropylcarbodiimide (DIC)/N-hydroxybenzotriazole (HOBt) activation (Frank and Overwin, *Methods Mol. Biol.* (1996) 66:149-169). In situ-prepared 0.2 M HOBt esters of fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc)-amino acid derivatives were used for the coupling reaction. Free amino functions on the spots were treated with a solution of bromophenol blue in dimethylformamide, which resulted in a blue staining that allowed for the visual monitoring of all synthesis steps. After the final cycle, all the peptides were N-terminally acetylated with 2% acetic anhydride. At the end of the synthesis, the side-chain protecting groups were removed using a mixture of trifluoroacetic acid/triisobutylsilane/water/dichloromethane (50/3/2/45).

#### Peptide binding assay.

WO 02/083711

PCT/US02/11501

Cellulose-bound peptides were soaked in ethanol to prevent hydrophobic interactions between the peptides. Non-specific binding was blocked by incubating cellulose sheets overnight at 4°C with 10 ml of 2% casein in Tris buffered saline (TBS: 50 mM Tris-HCl, 137 mM NaCl, 27 mM KCl, pH 7.0), containing 0.05% Tween 20 (T-TBS). The sheets were incubated for 2 hr at 37°C with the anti-GNA33 mAb 25 (6 µg/ml) or an anti-PorA 1.2 mAb diluted 1:100 in T-TBS blocking buffer. Alkaline phosphatase-conjugated goat anti-mouse IgG (BioRad) was then added at 1:3000 dilution in T-TBS blocking buffer for 1 hr at 37°C. Sheets were washed three times with T-TBS and detection of binding was achieved by incubating the sheets with bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate (BCIP) (Sigma, Steinheim, Germany) and 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyl-tetrazolium bromide (MTT; Sigma) in substrate buffer (100 mM Tris, pH 8.9, 100 mM NaCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>). Quantitative evaluation of the signal was obtained using a Umax Speedy II 2200 optical scanner.

15

Example 1Binding of Anti-GNA33 Antibodies to the Bacterial Cell Surfaceas Determined by Indirect Fluorescence Flow Cytometry

CD1 mice were immunized with rGNA33 (encoded by the gene from strain 2996). The resulting polyclonal antibody-containing antisera were tested for their ability to bind to live bacterial cells of various MenB strains as determined by a flow cytometric detection of indirect immunofluorescence binding assay. Figure 1A shows binding of polyclonal anti-rGNA33 antisera to four representative MenB strains, the parent strain 2996 (P1.5,2), and three other strains M3735 (P1.5,2), M4207 (P1.5) and MC58 (P1.7,16). The anti-GNA33 polyclonal antiserum reacted only with strains 2996 and M3735. The anti-capsular positive control mAb bound to all four strains, whereas the negative control antiserum prepared from animals immunized with *E. coli* proteins, showed only background binding. Figure 1B shows the results of similar experiments measuring binding of the anti-GNA33 mAb 25 to the bacterial cell surface of three strains (M3735 (P1.5,2), M4207 (P1.5) and MC58 (P1.7,16). The mAb bound only to strain M3735 (P1.5,2).

30

Table 1 summarizes the results of flow cytometry experiments measuring the ability of anti-GNA33 antibody or mAb 25 to bind to the surface of live bacteria from

WO 02/083711

PCT/US02/11501

22 genetically diverse encapsulated meningococcal strains (21 serogroup B and 1 serogroup C). The anti-GNA33 antibody bound only to strains with the P1.5,2 or P1.2 serosubtypes (9 of 9 vs. 0 of 13 strains with other PorA serosubtypes;  $P < 0.001$ ). One of the nine positive strains, M986, showed lower binding than the other eight strains (vide infra). There was no binding to three strains (M4207, 1000, and BZ83) that express the P1.5 epitope (present on loop 1 of PorA, Sacchi et al., *Infect. Dis.* (2000) 182:1169-1176) but not the P1.2 epitope (loop 4). Also, there was no binding to strain M136, which does not express PorA (i.e. P1-). These data indicate that binding of anti-GNA33 antibody to the bacterial surface correlates with expression of the PorA serosubtype P1.2.

#### Example 2

##### Western Blot of Total Membrane Fractions Prepared from Different *N. meningitidis* Group B Strains

The apparent association between binding of anti-GNA33 antibody to the bacterial surface and the P1.2 serosubtype was unexpected and investigated further by Western blot of total protein prepared from representative strains and resolved by SDS-PAGE. Results from four serogroup B strains, two that were negative for anti-GNA33 surface binding by flow cytometry, NG3/88 (P1.7,1) and MC58 (P1.17,16), and two that were positive, BZ232 and NMB (both P1.5,2), are shown in Figure 2. Data also are shown for total membrane preparations from three strains (MC58, BZ232 and NMB) in which the genes encoding GNA33 had been inactivated.

In Figure 2A, a single band with an apparent mass of approximately 48 kDa was detected by the anti-GNA33 mAb 25 in membrane preparations from the two non-P1.2 strains, NG3/88 (lane 3) and MC58 (lane 4). The band has an apparent molecular mass expected for rGNA33 (lane 1), and was absent in total protein prepared from the control *E. coli* strain (lane 2), and from the GNA33 knockout in strain MC58 (lane 5). Lanes 6 and 8 contain total proteins prepared from strains BZ232 and NMB, respectively. Both of these strains have the PorA serosubtype P1.5,2. In each of the lanes there are two anti-GNA33-reactive bands. The higher 48 kDa band is absent from the GNA33 knockouts derived from BZ232 and NMB (lanes 7 and 9, respectively), a result confirming that this protein is GNA33. The lower

WO 02/083711

PCT/US02/11501

molecular mass anti-GNA33-reactive bands appear to be PorA based on reactivity with a mAb reactive with P1.2 (see Figure 2B).

Figure 2B shows a Western blot of the same protein samples as described for Figure 2A but using the anti-PorA P1.2 mAb as the primary detecting antibody. As expected, there was no reactivity of the anti-PorA mAb with rGNA33 (lane 1), the negative control *E. coli* proteins (lane 2), or with total membranes prepared from strains that do not express PorA P1.2 (lanes 3, 4 and 5). However, a protein having an apparent mass expected for PorA was detected in total membrane preparations from strains BZ232 (lane 6), BZ232ΔGNA33 (lane 7), NMB (lane 8) and NMBΔGNA33 (lane 9), that express PorA P1.2. This protein also is present in preparations from their respective GNA33 knockouts (lanes 7 and 9, respectively). These results confirm that the protein with an apparent mass of 41 kDa reacting with the anti-GNA33 mAb in Figure 2A was PorA. In contrast, the anti-PorA P1.2 mAb did not react by Western blot with GNA33.

### Example 3

#### Peptide Mapping of the Surface-Exposed PorA Epitope

##### Recognized by the Anti-GNA33 mAb 25

The anti- P1.2 mAb is known to recognize an epitope on PorA present on loop 4. Table 2 shows a comparison of the loop 4 variable region (VR<sub>2</sub>) amino acid sequences for selected MenB strains included in the present study (see Sacchi et al., *Infect. Dis.* (2000) 182:1169-1176, or <http://mlst.zoo.ox.ac.uk/Meningococcus> for recently revised PorA VR designation conventions). Included in Table 2 are the sequences of two closely related VR<sub>2</sub> types, P1.10 and P1.10-1 from BZ83 (P1.10) and M4207 (P1.10-1), respectively, which were negative for surface binding by the anti-GNA33 mAb. The loop 4 sequences of the two negative strains differ from the anti-GNA33 positive strains by a six amino acid peptide. The positive P1.2 strains contain the hexapeptide QTPKSQ (SEQ ID NO:16) or QTPQSQ (SEQ ID NO:17), whereas the negative P1.10 or P1.10-1 strains contain the hexapeptide NKQNQR (SEQ ID NO:18) or NKQNQP (SEQ ID NO:19), respectively (Table 2).

In particular, to identify the specific amino acid sequence recognized by anti-GNA33 mAb 25, overlapping linear decapeptides spanning the entire amino acid

WO 02/083711

PCT/US02/11501

sequences of GNA33 (Table 3), and of loop 4 of PorA (P1.2-2 from strain 2996), GenBank accession number X57180, were synthesized [Note: The sequence given in X57180 encodes a VR<sub>2</sub> having the sequence QTPE (SEQ ID NO:20). However, this sequence has subsequently be found to be in error (C. T. Sacchi, CDC, Atlanta, GA, personal communication). The correct sequence is QTPQ (SEQ ID NO:21).]. The peptides that were positive  $\geq 8$  dye units) with mAb 25 are detailed in Table 3. All eight of the positive GNA33 peptides share a tripeptide, QTP. The QTP sequence is also present in all five positive PorA P1.2 peptides that reacted with mAb 25. However, the QTP sequence is not sufficient for anti-GNA33 binding as there was no mAb binding to three loop 4 peptides that contained QTP but lacked the preceding FVQ sequence.

To define the minimal peptide sequence from each protein that is sufficient for anti-GNA mAb 25 binding, progressively smaller peptides were synthesized beginning with AQAFTQTPVHS (Figure 4A; SEQ ID NO:6), and PorA P1.2 peptides beginning with TPAHFVQQTP (Figure 4B; SEQ ID NO:22). The mAb bound strongly with GNA33 peptides containing FQTPV (SEQ ID NO:2), and PorA P1.2 peptides containing FVQQTP (SEQ ID NO:23), but not with any of the smaller peptides. The same minimal epitopes for each protein were identified by systematic alanine or glycine substitutions of amino acids contained within the relevant peptides of loop 4 of PorA and the GNA33. See Table 4 for a summary of the alanine substitution data for PorA loop 4 VR type P1.2-2.

These data suggest that the antibodies elicited by rGNA33 have bactericidal activity against Nm strains expressing the P1.2 epitope as the result of cross-reactivity with the P1.2 epitope of PorA that contains the sequence QTP.

25

#### Example 4

##### Comparative Binding of Anti-GNA33 and Anti-PorA

##### P1.2 Antibodies to P1.2 NmB Strains

The unexpected finding that anti-rGNA33 antibodies cross-react with the PorA P1.2 epitope provided an opportunity to compare the activity of antibody raised to rGNA33 with that elicited by PorA serosubtype P1.2. With one exception, the concentration-dependent binding of the anti-GNA33 mAb was similar to that of a

30



WO 02/083711

PCT/US02/11501

control anti-PorA P1.2 mAb for the nine P1.2 strains tested (see representative data for strains 8047 and BZ232 in Figure 5A). The exception, strain M986, showed relatively weaker anti-GNA33 antibody binding when compared with binding to the other P1.2 strains (Figure 5B). In contrast, binding by the anti-PorA P1.2 mAb was similar for all P1.2 strains including M986.

The VR<sub>2</sub> sequence type of strain M986 is reported to be P1.2 (GenBank accession number U92912), which is defined by a loop 4 sequence that includes the segment FVQQTPK (SEQ ID NO:24), as opposed to FVQQTPQ (SEQ ID NO:25) for strains 8047 and BZ232 (VR<sub>2</sub> type P1.2-2; Table 1). The VR<sub>2</sub> type is based on the amino acid sequence of the particular P1.2 epitope. Two other strains reported to have VR<sub>2</sub> sequence type P1.2 (strains M3735 and M5682) showed strong anti-GNA33 antibody binding which, in each strain, was comparable to the respective binding of the control anti-PorA P1.2 mAb (see for example, binding data with strain M3735, Figure 1A and M5682, Figure 5B). The VR<sub>2</sub> sequence type of PorA loop 4 in M986, M3735, and M5682 was confirmed to be P1.2 by nucleotide sequencing a second time. Therefore, the sequence difference (K to Q) does not appear to be sufficient to explain the decreased anti-GNA33 binding activity with strain M986.

#### Example 5

##### Bactericidal Activity

The complement-dependent bactericidal activity of murine mAbs to PorA P1.2, rGNA33 (mAb 25), and serogroup B (SEAM 12) and C (mAb 181.1) polysaccharide capsules were compared. With the exception of the serogroup C antipcapsular mAb (subclass IgG3) that was used to test NmC strain M5954, the subclass of all of the other mAbs was IgG2a. The BC<sub>50</sub> of the anti-PorA P1.2 mAb in the presence of human complement was <0.5 µg/ml for all nine strains. The corresponding BC<sub>50</sub> values of the serogroup B antipcapsular mAb were higher, ranging between 5 to 12 µg/ml, and for the serogroup C mAb (strain M5954), <1 µg/ml. As summarized in Table 5, the bactericidal activity of the anti-GNA33 mAb was variable and was dependent on the complement source used. For three of the strains (8047, NMB and M3735), BC<sub>50</sub> values of the anti-GNA33 mAb in the presence of human complement ranged from 7 to 15 µg/ml. The values for these strains were similar to

WO 02/083711

PCT/US02/11501

those of the anticapsular antibody. For the remaining six strains (2996, BZ232, M5545, M5682, M5954, and M986), there was no killing observed with the anti-GNA33 mAb in the presence of human complement ( $BC_{50} > 60 \mu\text{g/ml}$  when tested with serum from a normal adult with no endogenous bactericidal activity (Table 5), and  $> 30 \mu\text{g/ml}$  when tested with serum from a patient with agammaglobulinemia). When infant rabbit serum was used as the complement source, all but one of the six strains were susceptible to anti-GNA33-induced lysis. The  $BC_{50}$  values of the susceptible strains ranged from  $\leq 1 \mu\text{g/ml}$  to  $8 \mu\text{g/ml}$  (Table 5). Again, the exception was strain M986, where no killing was observed with the anti-GNA33 mAb when tested with human or rabbit complement ( $BC_{50}$  values  $> 150$  and  $> 30 \mu\text{g/ml}$ , respectively). Lack of bacteriolysis for this strain may be related to the lower surface binding of the mAb as measured by flow cytometry (Figure 5B). The respective bactericidal titers of polyclonal mouse anti-rGNA33 antiserum with human complement against the five strains tested corresponded to the results measured with anti-GNA33 mAb 25 (Table 5).

#### Example 6

##### Passive Protection by Anti-GNA33 Antisera

The ability of polyclonal mouse anti-GNA33 antibody to confer passive protection against MenB bacteremia was assessed in an infant rat model. Three strains were used: 8047, a strain susceptible to anti-GNA33 bacteriolysis in the presence of human or rabbit complement; BZ232, a strain resistant to anti-GNA33 bacteriolysis with human complement but susceptible with rabbit or rat complement; and M986, a strain resistant to anti-GNA33 bacteriolysis in the presence of human, rabbit or rat complement. The results of testing passive protection in this model are summarized in Table 6.

In experiment 1,  $100 \mu\text{l}$  of a 1:5 or 1:25 dilution of polyclonal mouse anti-GNA33 antisera mixed with  $5.8 \times 10^3$  CFU of strain 8047 and given i.p. completely protected rats against bacteremia measured 18 hours after the challenge. In the same experiment, all animals given  $100 \mu\text{l}$  of a 1:5 or 1:25 dilution of the anti-GNA33 antisera mixed with  $6.5 \times 10^3$  CFU of strain M986, a strain resistant to anti-GNA33 bacteriolysis, developed bacteremia. Despite lack of bactericidal activity, the

WO 02/083711

PCT/US02/11501

geometric mean CFU/ml of blood of the animals treated with the anti-GNA antisera and challenged with strain M986 was 10- to 20- fold lower than that of control animals treated with a negative control antiserum prepared against *E. coli* proteins (P=0.02). Similar results were obtained in a second experiment (experiment 2) with anti-GNA33 mAb 25. All six rats pretreated with 20 µg of mAb 25, i.p., at time 0 and challenged 2 hours later with  $3.5 \times 10^3$  CFU of strain M986 had bacteria present in blood samples obtained 18 hours after challenge. However, the geometric mean CFU/ml was less than 0.3% of that of control animals pre-treated with an irrelevant mAb (P<0.02). In the same experiment, 20 µg per rat of the anti-P1.2 mAb was completely protective against strain M986, and 2 µg per rat was partially protective (only 1 of 6 treated animals developed bacteremia).

In third and fourth (experiments 3 and 4), rats were challenged with strain BZ232 (resistant to anti-GNA33 bacteriolysis with human complement but susceptible with rabbit or rat complement). In this experiment, the protective activity of the anti-GNA33 mAb against this strain was similar or higher than that of the control anticapsular antibody, and only slightly less than that of the anti-PorA P1.2 mAb.

As shown above, mouse antibodies produced as the result of immunization with rGNA33 are able to mediate bacteriolysis of *N. meningitidis* strains in the presence of complement because of cross-reactivity of anti-GNA33 antibodies with the P1.2 epitope of the porin protein, PorA. This result was unexpected since GNA33 and PorA have no significant sequence homology, are structurally and functionally unrelated, and are physically located in different bacterial sub-structures. Hence, GNA33 can be described as an immunologic mimic of PorA.

The molecular mimicry exhibited by GNA33 is exceptional. First, GNA33 is a non-immunoglobulin protein that, as described above, is unrelated to PorA. Second, rGNA33 elicits an antibody response that, in many respects, is similar in functional activity to that elicited by native PorA in outer membrane vesicle preparations. Third, the polyclonal mouse anti-rGNA33 antisera described here were prepared in two independent laboratories and the bactericidal data were independently replicated.

WO 02/083711

PCT/US02/11501

- In previous studies, immunization with peptides corresponding to loop 4 of PorA P1.2 failed to elicit antibodies that bound to the native protein, or mediated bacteriolysis in the presence of complement (McGuinness et al., *J. Exp. Med.* (1990) 171:1871-1872). Presumably, the smaller peptide fragments were unable to adopt stable conformations present in native porin. Similarly, immunization with rPorA expressed in *E. coli* or *B. subtilis*, failed to elicit bactericidal antibody unless the conformation of the surface-accessible PorA epitopes in the recombinant protein were reconstituted using liposomes or detergents (Christodoulides et al., *Microbiology* (1998) 144:3027-3037 and Idänpää-Heikkilä et al., *Vaccine* (1995) 13:1501-1508).
- These results suggest that the epitopes on PorA responsible for eliciting bactericidal antibody are conformational. In contrast, as shown herein, immunization with the rGNA33 mimetic elicited bactericidal antibody that cross-reacted with the P1.2 epitope of PorA loop 4. Unlike rPorA, this occurred when the recombinant GNA33 protein used as the immunogen was simply mixed with Freund's adjuvant, without the need for renaturation of the recombinant molecule.
- Thus, GNA33 polypeptides, epitopes, antibodies directed against the same and uses of these molecules are described. From the foregoing, it will be appreciated that, although specific embodiments of the invention have been described herein for purposes of illustration, various modifications may be made without deviating from the spirit and scope defined by the appended claims.

WO 02/083711

PCT/US02/11501

## TABLES

	<b>Table 1</b> Binding of anti-GNA33 antibodies to the surface of live, encapsulated <i>N. meningitidis</i> strains as measured by flow cytometry in relation to serological classification and PorA VR designation.					
	Nm strain	Country	Year	Serologic classification <sup>A</sup>	PorA VR designation (sequence) <sup>B</sup>	Anti-GNA33 <sup>C</sup>
10	M5954	U.S.	1997	C:2a:P1.2	ND	+
	M5682	U.S.	1999	B:2a:P1.5,2	P1.5,2	+
	M986	U.S.	1963	B:2a: P1.5, 2	P1.5,2	+
	M3735	U.S.	1992	B:NT: P1.5,2	P1.5-1,2	+
	M5545	U.S.	1998	B:NT:P1.5,2	P1.5-4,2-2	+
15	8047	U.S.	1978	B:2b:P1.5,2	P1.5-2,2-2	+
	NMB	U.S.	1982	B:2b:P1.5,2	P1.5-2,2-2	+
	BZ232	Netherlands	1964	B:NT:P1.2	P1.5-2,2-2	+
	2996	Netherlands	1975	B:2b:P1.5,2	P1.5-1,2-2	+
	M136	U.S.	1968	B:16,11: P1-	P1.5-1,2-2	-
20	M4207	U.S.	1997	B:10:P1.5	P1.5-1,10-1 <sup>C</sup>	-
	1000	USSR	1989	B:NT:P1.5	P1.5-1,10-4	-
	BZ83	Netherlands	1984	B:P1.5,10	P1.5-1,10	-

WO 02/083711

PCT/US02/11501

	NG6/88	Norway	1988	B:NT: P1.1	P1.7-4,1	-
	BZ198	Netherlands	1986	B:NT: P.NST	P1.7-4,4	-
	S3446	U.S.	1972	B:19,14: P1.22, 14	P1.22-1,14	-
	IH5341	Finland	1985	B:15:P1.7,16	ND	-
5	CU385	Cuba	1980	B:4,7: P1.19,15	P1.19,15	-
	SWZ107	Switzerland	1980	B:4:P.NST	P1.22-1,14	-
	H44/76	Norway	1976	B:15: P1.7, 16	P1.7, 16	-
	NG3/88	Norway	1988	B:8: P1.7,1	P1.7,1	-
	MC58	U.K.	1985	B:15:P1.7,16	15:P1.7,16-2	-
10						
	<sup>a</sup> NST = non-serosubtypable with available mAbs; - = PorA expression not detectable by SDS-PAGE.					
	<sup>b</sup> Based on the revised PorA VR type designation nomenclature proposed by Sacchi et al., <i>Infect. Dis.</i> (2000) 182:1169-1176 and <a href="http://neisseria.mist.net">http://neisseria.mist.net</a> .					
15	<sup>c</sup> Measured with mouse polyclonal anti-GNA33 antisera and/or mAB 25.					

WO 02/083711

PCT/US02/11501

5

<b>Table 2: Binding of Anti-GNA33 Antibody to the Cell Surface of Different MenB Strains</b>			
Strain	VR2 Sequence Type	PorA Loop 4 Amino Acid Sequence	Surface Binding
M3735	P1.2	HFVQ QTPKSQ PTLVP (SEQ ID NO: 32)	Pos
BZ232	P1.2-2	HFVQ QTFQSQ PTLVP (SEQ ID NO: 33)	Pos
2996	P1.2-2	HFVQ QTFQSQ PTLVP (SEQ ID NO: 33)	Pos
BZ83	P1.10	HFVQ NKQNQR PTLVP (SEQ ID NO: 34)	Neg
M4207	P1.10-1	HFVQ NKQNQP PTLVP (SEQ ID NO: 34)	Neg

10

WO 02/083711

PCT/US02/11501

5	<b>Table 3</b> Epitope mapping of anti-GNA33 mAb 25 against overlapping peptides prepared from GNA33 and loop 4 of PorA P1.2 (strain 2996)			
	GNA33 <sup>A</sup>	Dye Units	Loop 4 of PorA P1.2 <sup>A</sup>	Dye Units
10	QDVSAQAFQT (SEQ ID NO:35)	0	YTPAHFVQQT (SEQ ID NO:37)	0
	DVSAQAFQTE (SEQ ID NO:12)	23	TPAHFVQOTE (SEQ ID NO:22)	8
	VSAQAFQTEPV (SEQ ID NO:13)	27	PAHFVQOTEQ (SEQ ID NO:38)	10
15	SAQAFQTEVH (SEQ ID NO:14)	29	AHFVQOTEQS (SEQ ID NO:15)	14
	AQAFQTEVHS (SEQ ID NO:6)	30	HFVQOTEQSQ (SEQ ID NO:39)	15
	QAFQTEVHSF (SEQ ID NO:9)	30	FVQOTEQSQP (SEQ ID NO:40)	9
20	AFQTEVHSFQ (SEQ ID NO:10)	24	VQOTEQSQPT (SEQ ID NO:41)	4
	FQTEVHSFQA (SEQ ID NO:11)	22	QOTEQSQPTL (SEQ ID NO:42)	0
	QTEVHSFQAK (SEQ ID NO:12)	19	QTEQSQPTLV (SEQ ID NO:43)	2
25	TPVHSFQAKQ (SEQ ID NO:36)	2	TPQSQPTVP (SEQ ID NO:44)	2
30	<sup>A</sup> The peptide sequences were considered positive for binding to the anti-GNA33 mAb if the developed spots were =10 dye units.			

**Table 4:** Effect of Alanine Substitution on Binding of Anti-GNA33 mAb 25



WO 02/083711

PCT/US02/11501

	10-mer Peptide	Relative Binding	
	PGH FVQ QTF Q (SEQ ID NO:45)	8	Consensus Peptide FVQQTPA (SEQ ID NO:54)
5	PAA FVQ QTF Q (SEQ ID NO:46)	8	
	PAH AVQ QTF Q (SEQ ID NO:47)	1	
	PAH FAQ QTF Q (SEQ ID NO:48)	4	
10	PAH FVA QTF Q (SEQ ID NO:49)	2	
	PAH FVQ ATP Q (SEQ ID NO:50)	0	
15	PAH FVQ QAF Q (SEQ ID NO:51)	0	
	PAH FVQ QTA Q (SEQ ID NO:52)	0	
20	PAH FVQ QTF A (SEQ ID NO:53)	2	

WO 02/083711

PCT/US02/11501

5

10

15

20

25

30

Strain	VR2 sequence type	Polyclonal antisera	mAb 25	
		BC <sub>50</sub> (1/titer) <sup>a</sup>	BC <sub>50</sub> (μg/ml) <sup>a</sup>	
		Human complement <sup>a,c</sup>	Human complement <sup>a</sup>	Rabbit complement
8047	P1.2-2	⇒16	15	<0.5
NMB	P1.2-2	⇒16	9	ND <sup>c</sup>
M3735	P1.2	ND	7	ND
2996	P1.2-2	<4	>60	<0.5
BZ232	P1.2-2	<4	>150	<0.5
M5682	P1.2	ND	>60	<0.5
M5954	P1.2	ND	>60	1
M5545	P1.2	ND	>60	8
M986	P1.2	<4	>150	>30

<sup>a</sup>BC<sub>50</sub>, concentration of mAb, or reciprocal dilution of antiserum that when incubated for 60 min with bacterial cells and 20% complement yielded a 50% decrease in CFU per ml compared to that at time zero.

<sup>b</sup>The BC<sub>50</sub> values of the anti-PortA P1.2 mAb with human complement ranged from =0.25 μg/ml to 0.5 μg/ml. The BC<sub>50</sub> of the serogroup B anticapsular mAb (SEAM 12) with human complement for the eight serogroup B strains ranged from 5 μg/ml to 15 μg/ml. The BC<sub>50</sub> for the serogroup C anticapsular mAb (181.1) for strain M5954 with human complement was <1 μg/ml.

<sup>c</sup>ND, not done.

WO 02/083711

PCT/US02/11501

**Table 6:** Anti-GNA33 antibody passive protection in infant rats challenged with *N. meningitidis* serogroup B strains 8047, M986, or BZ232

Experiment	Strain (challenge CFU per rat)	Treatment <sup>a</sup>	Serum Dilution or dose	Blood culture at 18 hrs	
				No. positive/ Total	CFU/ml (geo. mean, 10 <sup>3</sup> ) <sup>a</sup>
1	8047 (5.8 x 10 <sup>3</sup> )	Anticapsular mAb	2	0/5	<0.001
		Anti-GNA33 antiserum	1:5	0/5	<0.001
		Anti-GNA33 antiserum	1:25	0/5	<0.001
		Anti- <i>E. coli</i> antiserum	1:5	5/5	53
		Irrelevant mAb	2	5/5	63
1	M986 (6.5 x 10 <sup>3</sup> )	Anticapsular mAb	2	0/5	<0.001
		Anti-GNA33 antiserum	1:5	5/5	19
		Anti-GNA33 antiserum	1:25	5/5	41
		Anti- <i>E. coli</i> antiserum	1:5	5/5	408
		Irrelevant mAb	2	5/5	203
2	M986 (3.5 x 10 <sup>3</sup> )	Anticapsular mAb	20	1/6	0.002
		Anti-GNA33 mAb	20	6/6	1.873
		Anti-PorA P1.2 mAb	20	0/6	<0.001
		Anti-PorA P1.2 mAb	2	1/6	0.003
		Irrelevant mAb	20	6/6	630
3	BZ232 (7.1 x 10 <sup>3</sup> )	Anticapsular mAb	10	3/6	<0.056
		Anti-GNA33 mAb	15	0/6	<0.001
		Anti-GNA33 mAb	3	1/6	<0.006
		Anti-GNA33 mAb	0.6	5/6	0.282
		Anti-PorA P1.2 mAb	15	0/6	<0.001
		Anti-PorA P1.2 mAb	3	0/6	0.001
4	BZ232 (4.7 x 10 <sup>3</sup> )	Irrelevant mAb	15	6/6	>500
		Anti-GNA33 mAb	0.6	5/6	4.562
		Anti-PorA P1.2	3.0	0/6	<0.001
		Anti-PorA P1.2	0.6	0/6	<0.001
		Anti-PorA P1.2	0.12	3/7	0.022
4	BZ232 (4.7 x 10 <sup>3</sup> )	Irrelevant mAb	3	8/8	273
		Irrelevant mAb	3	8/8	273

<sup>a</sup>In experiment 1, bacteria were mixed together with antisera or control mAb immediately before the i.p. challenge. In experiment 2, 3, and 4, animals were treated i.p. with the mAb at time 0. Two hours later they were challenged i.p. with the bacteria. In both experiments, blood cultures were obtained 18 hours after the challenge.

WO 02/083711

PCT/US02/11501

- <sup>10</sup>For calculation of geometric mean CFU/ml, animals with sterile cultures were assigned a value of 1 CFU/ml. In experiment 1, the geometric mean CFU/ml of the combined group of animals given a 1:5 or 1:25 dilution of anti-GNA33 antisera and challenged with strain
- 5 M986 ( $28.8 \times 10^3$ ) was lower than that of the combined group of controls given the irrelevant mAb or *E. coli* antiserum ( $350 \times 10^3$ ,  $P=0.02$ ). In experiments 2, 3, and 4, the geometric mean CFU/ml of the animals treated with the anti-GNA33 mAb was lower than that of controls given the irrelevant mAb ( $P<0.02$ ).

WO 02/083711

PCT/US02/11501

Claims:

1. A GNA33 peptide comprising the amino acid sequence QTP, wherein said peptide is capable of eliciting the production of antibodies that exhibit complement-mediated bactericidal activity and/or opsonic activity against a *Neisseria meningitidis* serogroup B bacterium.
2. The GNA33 peptide of claim 1, wherein the peptide comprises an amino acid sequence selected from the group consisting of FQTPV (SEQ ID NO:2), FQTPVHS (SEQ ID NO:3), AFQTPVHS (SEQ ID NO:4), QAFQTPVHS (SEQ ID NO:5), AQAFQTPVHS (SEQ ID NO:6), AQAFQTPVH (SEQ ID NO:7), AQAFQTPV (SEQ ID NO:8), QAFQTPVHSF (SEQ ID NO:9), AFQTPVHSFQ (SEQ ID NO:10), FQTPVHSFQA (SEQ ID NO:11), QTPVHSFQAK (SEQ ID NO:12), DVSAQAFQTP (SEQ ID NO:12), VSAQAFQTPV (SEQ ID NO:13) and SAQAFQTPVH (SEQ ID NO:14).
3. The GNA33 peptide of claim 2, wherein the peptide comprises the amino acid sequence FQTPV (SEQ ID NO:2).
4. A composition comprising the GNA33 peptide of any of claims 1-3, and a pharmaceutically acceptable excipient.
5. Use of a composition according to claim 4 in a method for eliciting an immune response against a *Neisseria meningitidis* serogroup B bacterium in a mammalian subject.
6. A method for eliciting an immune response against a *Neisseria meningitidis* serogroup B bacterium in a mammalian subject comprising administering an effective amount of the composition of claim 4 to said subject.
7. A monoclonal antibody directed against a GNA33 peptide according to any of claims 1-3, wherein the antibody exhibits complement-mediated bactericidal activity and/or opsonic activity against a *Neisseria meningitidis* serogroup B bacterium.

WO 02/083711

PCT/US02/11501

8. A composition comprising the monoclonal antibody of claim 7, and a pharmaceutically acceptable excipient.
9. A composition comprising an antibody against a GNA33 polypeptide, wherein the antibody exhibits complement-mediated bactericidal activity and/or opsonic activity against a *Neisseria meningitidis* serogroup B bacterium.
10. The composition of claim 9, wherein said antibody is a monoclonal antibody.
11. Use of a composition according to any of claims 8-10 in a method for eliciting an immune response against a *Neisseria meningitidis* serogroup B bacterium in a mammalian subject.
12. A method for eliciting an immune response against a *Neisseria meningitidis* serogroup B bacterium in a mammalian subject comprising administering an effective amount of the composition according to any of claims 8-10 to said subject.
13. A polynucleotide encoding the peptide of any of claims 1-3.
14. A recombinant vector comprising:  
(a) the polynucleotide of claim 13; and  
(b) at least one heterologous control element operably linked to said polynucleotide, whereby said polynucleotide can be transcribed and translated in a host cell, and at least one of said control elements is heterologous to said polynucleotide.
15. A host cell comprising the recombinant vector of claim 14.
16. A method for producing a GNA33 peptide, said method comprising culturing the host cell of claim 15 under conditions for producing said protein.
17. A method for isolating a molecular mimetic of an epitope of a *Neisseria meningitidis* serogroup B bacterium, said method comprising:

WO 02/083711

PCT/US02/11501

- (a) providing a population of molecules including a putative molecular mimetic of an epitope of the *Neisseria meningitidis* serogroup B bacterium;
- (b) contacting the population of molecules with an anti-GNA33 antibody under conditions that allow immunological binding between the antibody and the molecular mimetic, if present, to provide a complex; and
- 5 (c) separating the complexes from non-bound molecules.
18. Use of a GNA33 polypeptide in a method for detecting *Neisseria meningitidis* serogroup B antibodies in a biological sample.
- 10 19. Use of a GNA33 peptide according to any of claims 1-3 in a method for detecting *Neisseria meningitidis* serogroup B antibodies in a biological sample.
20. A method for detecting *Neisseria meningitidis* serogroup B antibodies in a
- 15 biological sample comprising:
- (a) providing a biological sample;
- (b) reacting said biological sample with a GNA33 polypeptide under conditions which allow *Neisseria meningitidis* serogroup B antibodies, when present in the biological sample, to bind to the GNA33 polypeptide to form an antibody/GNA33 polypeptide
- 20 complex; and
- (c) detecting the presence or absence of the complex
- thereby detecting the presence or absence of *Neisseria meningitidis* serogroup B antibodies in the sample.
- 25 21. A method for detecting *Neisseria meningitidis* serogroup B antibodies in a biological sample comprising:
- (a) providing a biological sample;
- (b) reacting said biological sample with a GNA33 peptide according to any of claims 1-3 under conditions which allow *Neisseria meningitidis* serogroup B antibodies, when
- 30 present in the biological sample, to bind to the GNA33 polypeptide to form an antibody/GNA33 polypeptide complex; and
- (c) detecting the presence or absence of the complex

WO 02/083711

PCT/US02/11501

thereby detecting the presence or absence of *Neisseria meningitidis* serogroup B antibodies in the sample.



WO 02/083711

PCT/US02/11501

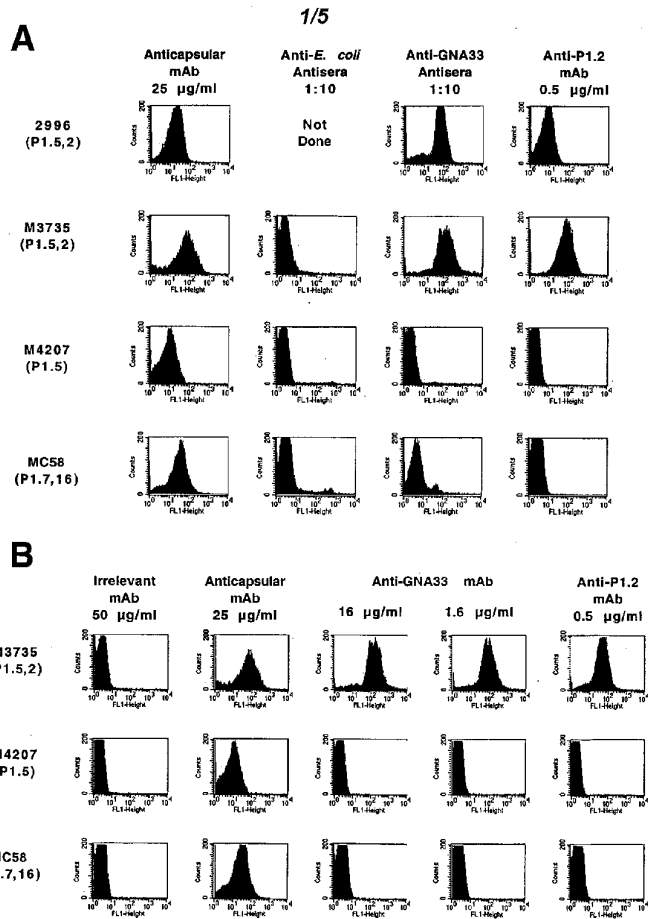


FIG. 1

WO 02/083711

PCT/US02/11501

2/5

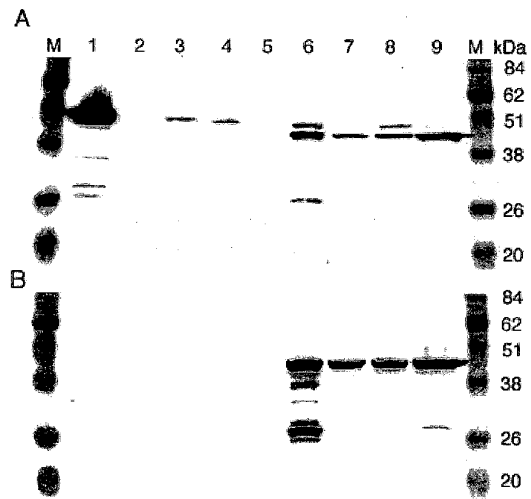


FIG. 2

WO 02/083711

PCT/US02/11501

3/5

```
1  MKKYLERAAL CGIAAAILAA COSKSIQTFP QPDTSVINGP DRPVGIPDPA
51 GTTVGGGGAV YTVVPHLSLP HWAAQDPKAS LQSFRLGCAN LKNRQGWQDV
101 CAQAFQTPVH SVQAKQFFER YFTPWQVAGN GSLAGTVTGY YEPVLKGDDR
151 RTAQAARFPIY GIPDDFISVP LPAGLRSGKA LVRIRQTGKN SGTIDNTGGT
201 HTADLSQFFI TARTTAIKGR FEGSRFLPYH TRNQINGGAL DGKAPILGYA
251 EDPVELFFMH IQGSGRLKTP SGKYIRIGYA DKNEHPYVSI GRYMADKGYL
301 KLGQTSMQGI KAYMQQNPQR LAEVLGQNPS YIFFRELTGS SNDGPEVGALG
351 TPLMGEYAGA VDRHYITLGA PLFVATAHPV TRKALNRLIM AQDTGSAIKG
401 AVRVDYFWGY GDEAGELAGK QKTTGYVWQL LPNGMKPEYR P
```

FIG. 3

WO 02/083711

PCT/US02/11501

4/5

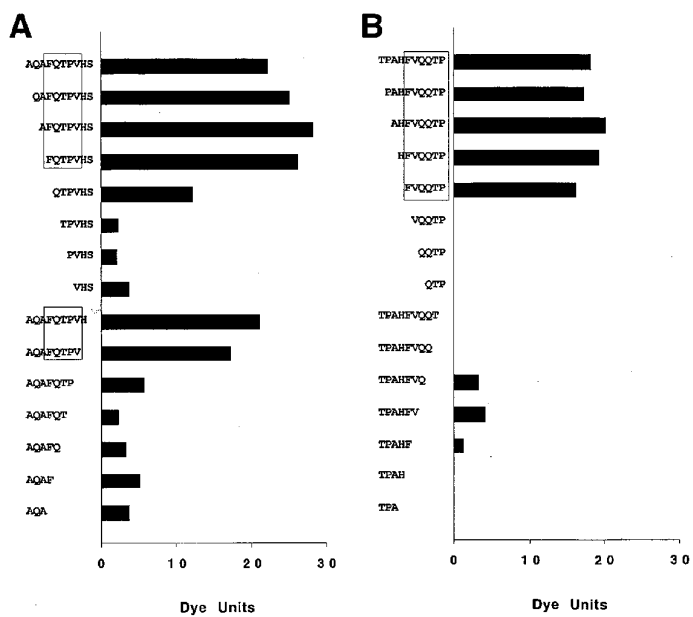


FIG. 4

WO 02/083711

PCT/US02/11501

5/5

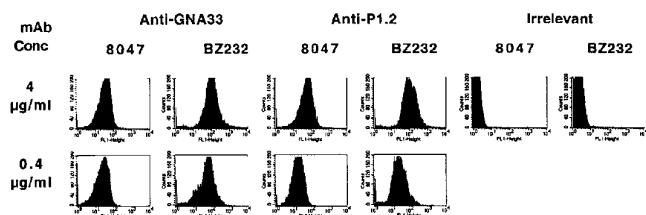
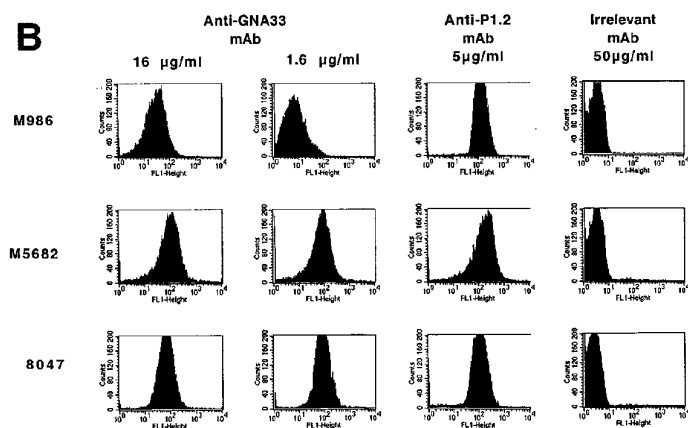
**A****B**

FIG. 5

## 【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

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

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
24 October 2002 (24.10.2002)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 02/083711 A3(51) International Patent Classification: A61K 39/095,  
C12Q 1/68, C12P 19/34, C07H 21/02, 21/04(74) Agents: HARBIN, Alisa, A. et al.; Chiron Corporation,  
Intellectual Property - R440, P.O. Box 8097, Emeryville,  
CA 94662 (US).

(21) International Application Number: PCT/US02/11501

(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU,  
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,  
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH,  
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,  
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,  
MX, MY, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG,  
SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,  
VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(22) International Filing Date: 11 April 2002 (11.04.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:  
60/284,554 17 April 2001 (17.04.2001) US  
60/326,838 3 October 2001 (03.10.2001) US(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GI, GM,  
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),  
Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),  
European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR,  
GB, GR, IL, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent  
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR,  
NE, SN, TD, TG).(71) Applicants (for all designated States except US): CHI-  
RON CORPORATION [US/US]; 4560 Horton Street,  
Emeryville, CA 94608 (US); CHILDREN'S HOSPITAL  
OAKLAND RESEARCH INSTITUTE [US/US]; 5700  
Martin Luther King Jr. Way, Oakland, CA 94609-1673  
(US).Published:  
— with international search report  
— before the expiration of the time limit for amending the  
claims and to be republished in the event of receipt of  
amendments

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): GRANOFF, Dan  
[US/US]; 5700 Martin Luther King Jr. Way, Oakland, CA  
94609-1673 (US); MOE, Gregory [US/US]; 5700 Mar-  
tin Luther King Jr. Way, Oakland, CA 94609-1673 (US);  
RAPPUOLI, Rino [IT/IT]; Via Calamandre, 39, Querce-  
grossa, I-53010 Monteriggioni (IT).(88) Date of publication of the international search report:  
6 November 2003For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-  
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-  
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/083711 A3

(54) Title: MOLECULAR MIMETICS OF MENINGOCOCCAL B EPITOPES WHICH ELICIT FUNCTIONALLY ACTIVE AN-  
TIBODIES(57) Abstract: Molecular mimetics of a surface-exposed epitope on loop 4 of PorA of *Neisseria meningitidis* serogroup B (MenB)  
P1.2 serosubtype and antibodies produced against the same are disclosed. Compositions containing such molecular mimetics or the  
antibodies thereto can be used to prevent MenB disease, as well as for diagnosis of MenB infection.

## 【 国際調査報告 】

<b>INTERNATIONAL SEARCH REPORT</b>		International application No. PCT/US02/11501
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(7) : A61K 39/095; C12Q 1/68; C12P 19/34; C07H 21/02, 21/04 US CL : 424/249.1, 184.1, 197.11, 192.1, 193.1, 200.1, 249.1; 435/69.1, 69.7, 6, 91.2; 536/23.1, 24.33 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 424/249.1, 184.1, 197.11, 192.1, 193.1, 200.1, 249.1; 435/69.1, 69.7, 6, 91.2; 536/23.1, 24.33 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) Please See Continuation Sheet		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	PIZZA et al. Identification of Vaccine Candidates Against Serogroup B Meningococcus by Whole-Genome Sequencing. Science. 10 March 2000, Vol. 287, No. 5459, pages 1816-1820, especially abstract and Tables.	1, 4-6 (in part)
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input 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 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 prior art 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 "A" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 10 August 2003 (10.08.2003)		Date of mailing of the international search report 28 AUG 2003
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703)305-3230		Authorized officer <i>William D. Roberts for</i> Facsimile No. (703)308-0196

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/11501
<b>Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)</b>		
This international report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:		
1.	<input type="checkbox"/>	Claim Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2.	<input type="checkbox"/>	Claim Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.	<input checked="" type="checkbox"/>	Claim Nos.: 11 and 12 because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).
<b>Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)</b>		
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows: Please See Continuation Sheet		
1.	<input type="checkbox"/>	As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.	<input type="checkbox"/>	As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.	<input type="checkbox"/>	As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.	<input checked="" type="checkbox"/>	No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1, 4-6 (IN PART)
Remark on Protest	<input type="checkbox"/>	The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
	<input type="checkbox"/>	No protest accompanied the payment of additional search fees.



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US02/11501

**BOX II. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING**

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be searched, the appropriate additional search fees must be paid.

Group 1 claim(s) 1 and 4-6 in part drawn to a GNA33 peptide of *Neisseria* comprising the amino acid sequence QTP, composition comprising said GNA33 peptide and a method of eliciting an immune response using said peptide.

Groups 2-14 as represented by SEQ.ID.NO: 2-14 respectively, claims 2-3 and 4-6 in part drawn to a GNA33 peptide of *Neisseria* comprising the amino acid sequence FQTPV, FQTPVHS through SAQAFQTPVH (SEQ.ID.NO: 2-14) and a composition comprising said GNA33 peptides and a method of eliciting an immune response using said GNA33 peptides.

Groups 15-28 as represented by GNA33 peptide comprising QTP and SEQ.ID.NO: 2-14 comprising FQTPV (SEQ.ID.NO: 2), FQTPVHS (SEQ.ID.NO: 3) through SAQAFQTPVH (SEQ.ID.NO: 14) respectively, claims 7-10 drawn to a monoclonal antibody and composition comprising said monoclonal antibody directed against GNA33 peptide QTP, FQTPV FQTPVHS (SEQ.ID.NO: 3) through SAQAFQTPVH (SEQ.ID.NO: 14).

Groups 29-42, as represented by GNA33 peptide comprising QTP and SEQ.ID.NO: 2-14 comprising FQTPV (SEQ.ID.NO: 2), FQTPVHS (SEQ.ID.NO: 3) through SAQAFQTPVH (SEQ.ID.NO: 14) respectively, claims 13-16 drawn to a polynucleotide encoding GNA33 peptide comprising the amino acid sequence comprising QTP and FQTPV (SEQ.ID.NO: 2), FQTPVHS (SEQ.ID.NO: 3) through SAQAFQTPVH (SEQ.ID.NO: 14), etc, recombinant vector, host cell and a method of obtaining peptide by culturing said host cells.

Group 43, claim(s) 17, drawn to a method for isolating molecular mimetic epitope of an *N.meningitidis*.

Groups 44-57 as represented by GNA33 peptide comprising QTP and SEQ.ID.NO: 2-14 comprising FQTPV (SEQ.ID.NO: 2), FQTPVHS (SEQ.ID.NO: 3) through SAQAFQTPVH (SEQ.ID.NO: 14) respectively, claim(s) 18-21, drawn to a method for detecting antibodies to *N.meningitidis* using GNA33 peptide comprising the amino acid sequence QTP and FQTPV (SEQ.ID.NO: 2), FQTPVHS (SEQ.ID.NO: 3) through SAQAFQTPVH (SEQ.ID.NO: 14).

Claims 11 and 12 have been found unsearchable because claims 11 and 12 are improperly multiple dependent claims and fail to comply with the prescribed requirements under PCT Article 17 to such an extent that a meaningful search could not be carried out.

The inventions listed as Groups 1-57 do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

The technical feature linking groups 1-57 appears to be that they all relate to GNA33 peptide.

However, Pizza et al 2000 discloses a GNA33 peptide comprising the amino acid QTP and a method of inducing an immune response with said peptide by immunizing mice (see entire document). Further, the antibody obtained from said immunized mice was able to induce bactericidal activity (see abstract and Tables).

Therefore, the technical feature the linking the inventions 1-57 does not constitute a special technical feature as defined by PCT Rule 13.2 as it does not define a contribution over the prior art.

The technical feature of Groups 1 is considered to be a GNA33 peptide of *Neisseria* comprising the amino acid sequence QTP, wherein said peptide is capable of eliciting the production of antibodies that exhibit bactericidal activity.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US02/11501

The technical feature of Groups 2-14 is considered to be a GNA33 peptide comprising the amino acid sequence FQTPV, FQTPVHS through SAQAFQTPVH as represented by SEQ. ID.NO: 2-14.

The technical feature of Groups 15-28 is considered to be monoclonal antibody directed against GNA33 peptide QTP and FQTPV, FQTPVHS through SAQAFQTPVH as represented by SEQ. ID.NO: 2-14.

The technical feature of Groups 29-42 is considered to be a polynucleotide encoding GNA33 peptide comprising the amino acid sequence QTP and FQTPV, FQTPVHS through SAQAFQTPVH as represented by SEQ. ID.NO: 2-14.

The technical feature of Group 43 is considered to be a method for isolating molecular mimetic epitope of an N.meningitidis.

The technical feature of Groups 44-57 is considered to be a method for detecting antibodies to N.meningitidis using GNA 33 peptide comprising the amino acid sequence QTP and FQTPV, FQTPVHS through SAQAFQTPVH as represented by SEQ. ID.NO: 2-14.

Accordingly, Groups 1-57 are not so linked by the same or a corresponding special technical feature as to form a single general inventive concept.

**Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:**

MEDLINE, STN, A -GENSEQ, N-GENSEQ, EST, DERWENT, SWISS-PROT, PIR, USPTOWEST SWISSPTREMBL, OENEMBEL, PUBLISHED APPLICATIONS AND ISSUED PATENTS

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード(参考)
C 0 7 K 14/22	C 0 7 K 1/22	
C 0 7 K 16/12	C 0 7 K 14/22	
C 1 2 N 1/15	C 0 7 K 16/12	
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 5/10	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 P 21/02	C 1 2 P 21/02	C
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53	N
G 0 1 N 33/569	G 0 1 N 33/569	F
// C 1 2 P 21/08	C 1 2 N 5/00	A
(C 1 2 P 21/02	C 1 2 P 21/08	
C 1 2 R 1:36 )	C 1 2 P 21/02	C
	C 1 2 R 1:36	

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

(74)代理人 100062409

弁理士 安村 高明

(74)代理人 100113413

弁理士 森下 夏樹

(72)発明者 グランオフ, ダン

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 6 0 9 - 1 6 7 3 , オークランド, マーティン ルー  
サー キング ジュニア ウェイ 5 7 0 0

(72)発明者 モエ, グレゴリー

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 6 0 9 - 1 6 7 3 , オークランド, マーティン ルー  
サー キング ジュニア ウェイ 5 7 0 0

(72)発明者 ラプオリ, リノ

イタリア国 モンテリギオニ イー - 5 3 0 1 0 , クエルスグロサ, 3 9 , ピア カラマン  
ドレ

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 AA13 AA15 BA31 BA41 BA50 CA01 DA02 DA05  
DA11 EA04 GA11 HA03 HA04 HA11 HA15  
4B064 AG27 AG31 CA02 CA19 CC24 CE13 DA01 DA13 DA15  
4B065 AA01X AA01Y AA57X AA72X AA87X AB01 BA01 BA02 BD14 CA24  
CA43 CA44 CA46  
4C085 AA03 AA14 BA07 BB31 CC23 DD88 EE01  
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 BA13 BA14 BA15 CA11 DA76  
DA86 EA20 EA29 EA50 EA54 FA10 FA71 FA74 GA20