(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2012년05월07일
(11) 등록번호 10-1140033
(24) 등록일자 2012년04월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 39/095 (2006.01) *A61K 39/02* (2006.01)
C12N 15/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2005-7001941
(22) 출원일자(국제) 2003년07월31일
심사청구일자 2008년07월31일
(85) 번역문제출일자 2005년02월02일
(65) 공개번호 10-2005-0042143
(43) 공개일자 2005년05월04일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2003/008571
(87) 국제공개번호 WO 2004/014418
국제공개일자 2004년02월19일
(30) 우선권주장
0218035.4 2002년08월02일 영국(GB)
(뒷면에 계속)
(56) 선행기술조사문헌
WO2000071725 A2*
WO2001009350 A2*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
글락소스미스클라인 바이오로지칼즈 에스.에이.
벨기에왕국 릭센사르트 (비-1330) 루 드 린스티튜트 89
(72) 발명자
베르테트, 프랑스와-크사비어, 쟈끄
벨기에 비-1330 릭센사르트 브뤼셀 루 드 린스티튜트 89글락소스미스클라인 바이오로지칼즈 에스.에이.
비만스, 랄프
벨기에 비-1330 릭센사르트 브뤼셀 루 드 린스티튜트 89글락소스미스클라인 바이오로지칼즈 에스.에이.
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
남상선

전체 청구항 수 : 총 9 항 심사관 : 이수정

(54) 발명의 명칭 **항원 조합물을 포함하는 나이세리아 백신 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 나이세리아 감염을 치료하고 예방하기 위한 면역원성 조성물 및 백신에 관한 것이다. 본 발명의 면역원성 조성물은 부착소, 자가수송체 단백질, 독소, 철 획득 단백질 및 막-결합 단백질 (바람직하게는 내재성 외막 단백질)을 포함하는 항원들의 최소한 두 개의 상이한 부류로부터 선택된 항원의 조합을 포함한다. 그러한 항원 조합은 나이세리아 생명주기의 상이한 측면들에 대한 면역 반응을 표적화할 수 있고, 그 결과 보다 효과적인 면역 반응이 유발된다.

(72) 발명자

드노엘, 필립

벨기에 비-1330 릭센사르트 브뤼셀 루 드 린스티튜트 89글락소스미스클라인 바이오로지칼즈 에스.에이.

페론, 크리스티안

벨기에 비-1330 릭센사르트 브뤼셀 루 드 린스티튜트 89글락소스미스클라인 바이오로지칼즈 에스.에이.

고라즈, 카린

벨기에 비-1330 릭센사르트 브뤼셀 루 드 린스티튜트 89글락소스미스클라인 바이오로지칼즈 에스.에이.

풀만, 얀

벨기에 비-1330 릭센사르트 브뤼셀 루 드 린스티튜트 89글락소스미스클라인 바이오로지칼즈 에스.에이.

바이난츠, 빈센트

벨기에 비-1330 릭센사르트 브뤼셀 루 드 린스티튜트 89글락소스미스클라인 바이오로지칼즈 에스.에이.

(30) 우선권주장

0218036.2 2002년08월02일 영국(GB)
0218037.0 2002년08월02일 영국(GB)
0218051.1 2002년08월02일 영국(GB)
0220197.8 2002년08월30일 영국(GB)
0220199.4 2002년08월30일 영국(GB)
0225524.8 2002년11월01일 영국(GB)
0225531.3 2002년11월01일 영국(GB)
0230164.6 2002년12월24일 영국(GB)
0230168.7 2002년12월24일 영국(GB)
0230170.3 2002년12월24일 영국(GB)
0305028.3 2003년03월05일 영국(GB)

특허청구의 범위

청구항 1

Hsf 나이세리아 자가수송체 (autotransporter) 항원;

NadA 나이세리아 부착소 항원; 및

고분자량 TbpA, 저분자량 TbpA 또는 Lipo28(GNA2132)인 나이세리아 Fe 획득 단백질(Fe acquisition protein) 항원을 포함하는 면역원성 조성물로서,

이러한 항원들이 외막 소포에 존재하는 경우 상기 외막 소포에서 상향 조절된 것인 면역원성 조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

제 1항에 있어서, 서브유니트(subunit) 조성물인 면역원성 조성물.

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

제 1항에 있어서, 상기 나이세리아 Fe 획득 단백질 항원이 고분자량 TbpA를 포함하는 면역원성 조성물.

청구항 13

제 1항에 있어서, 상기 나이세리아 Fe 획득 단백질 항원이 저분자량 TbpA를 포함하는 면역원성 조성물.

청구항 14

제 12항에 있어서, Hap, LbpB 및 OMP85로 이루어지는 군으로부터 선택된 하나 이상의 추가 항원을 추가로 포함

하는 면역원성 조성물.

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

제 1항 또는 제 3항에 있어서, 나이세리아 메닌기티디스(*Neisseria meningitidis*)로부터 유래되는 항원을 포함하는 면역원성 조성물.

청구항 47

삭제

청구항 48

제 1항 또는 제 3항에 있어서, 모든 나이세리아 항원이 나이세리아 메닌기티디스로부터 유래된 것인 면역원성 조성물.

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

제 1항 또는 제 3항에 있어서, 애쥬번트를 포함하는 면역원성 조성물.

청구항 53

제 52항에 있어서, 알루미늄 염을 포함하는 면역원성 조성물.

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

청구항 69

삭제

청구항 70

삭제

청구항 71

삭제

청구항 72

삭제

청구항 73

삭제

청구항 74

삭제

청구항 75

삭제

청구항 76

삭제

청구항 77

삭제

청구항 78

삭제

청구항 79

삭제

청구항 80

삭제

청구항 81

삭제

청구항 82

삭제

청구항 83

삭제

청구항 84

삭제

청구항 85

삭제

청구항 86

삭제

청구항 87

삭제

청구항 88

삭제

청구항 89

삭제

청구항 90

삭제

청구항 91

삭제

청구항 92

삭제

청구항 93

삭제

청구항 94

삭제

청구항 95

삭제

청구항 96

삭제

청구항 97

삭제

청구항 98

삭제

청구항 99

삭제

청구항 100

삭제

청구항 101

삭제

청구항 102

삭제

청구항 103

삭제

청구항 104

삭제

청구항 105

삭제

청구항 106

삭제

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 나이세리아 (Neisserial) 면역원성 조성물 및 백신, 그것들의 제조 방법 및 그러한 조성물의 의약에서의 용도에 관한 것이다. 보다 구체적으로 본 발명은 본 발명의 백신이 보호 분석 또는 혈청 살균 분석에서 측정된 바와 같이 놀랄 만큼 우수한 면역 반응을 유도하는 것을 가능하게 만드는 성질을 가지는 항원 조합물을 포함하는 백신 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 박테리아의 나이세리아 균주 (*Neisserial* strain)는 수많은 사람 병리의 원인이 되는 병원체로서, 그것에 대해 효과적인 백신이 개발될 필요가 있다. 특히 나이세리아 고노레아(*Neisseria gonorrhoeae*) 및 나이세리아 메닌기티디스(*Neisseria meningitidis*)는 예방접종에 의해 치료될 수 있는 병리를 유발한다.

[0003] 나이세리아 고노레아는 전 세계적으로 연간 발생률이 6200만 케이스로 추정되는, 가장 빈번하게 보고 되는 성 전염성 질병중 하나인 임질의 병인학적 병원체이다 (Gerbase et al. 1998 Lancet 351; (Suppl 3) 2-4). 임질의 임상적인 징후로는 비뇨 생식기관, 목구멍 또는 직장의 점막의 염증 및 신생아 눈 감염을 포함한다. 여성에게서 늘어나는 임질균 감염은 불임, 자궁외 임신, 만성 골반 염증성 질병 및 터보(tubo)-난소 종기 형성을 유도할 수 있다. 패혈증, 관절염, 심장 내막염 및 수막염도 임질 합병증과 관련이 있다.

[0004] 항생물질에 내성을 보이는 수많은 임질균 균주는 임질과 관련된 증가하는 이환율 및 합병증의 원인이다. 항생물질을 사용하여 임질을 치료하기 위한 매력적인 대체 방법은 예방접종을 이용하여 그것을 방지하는 것일 것이다. 그러나 현재 나이세리아 고노레아 감염에 대한 백신은 존재하지 않는다.

[0005] 나이세리아 메닌기티디스는 특히 어린이 및 성년 초기에 중요한 병원균이다. 패혈증 및 수막염은 침입성 수막구균 질병 (IMD)중에서도 생명에 가장 위협적인 형태이다. 이 질병은 그것의 높은 이환율과 사망률 때문에 전 세계적인 건강 문제가 되었다.

[0006] 캡슐 모양의 다당류의 항원적 차이를 토대로 하여 13개의 나이세리아 메닌기티디스 혈청군이 확인되었고, 그 중에서도 가장 일반적인 것이 혈청군 A, B 및 C이며, 그것들이 세계적인 질병의 90 %의 원인이 된다. 혈청군 B가 유럽, 미국 및 라틴 아메리카의 여러 나라에서 발견되는 수막구균 질병의 가장 공통되는 원인이다.

[0007] 혈청군 A, C, W 및 Y의 캡슐 다당류를 토대로 한 백신이 개발되었고, 수막구균 질병의 돌발적인 출현을 제어하는 것으로 밝혀졌다 (Peltola et al., 1985 Pediatrics 76;91-96). 그러나 혈청군 B는 면역원성이 약하며, 단지 우세한 IgM 이소타입(isotype)의 일시적인 항체 반응만을 유도한다 (Ala'Aldeen D 및 Cartwright K 1996, J. Infect. 33;153-157). 그러므로 대부분의 온대성 기후의 나라에서 질병의 주요 원인인 혈청군 B 수막구균에 대해 현재 활용할 수 있는 광범위하게 효과적인 백신은 없다. 이것은 특히 혈청군 B 질병의 발생이 유럽, 오스트레일리아 및 아메리카에서, 대부분 5 세 이하의 어린이들에게서 증가하고 있기 때문에 문제가 된다. 혈청군 B 수막구균에 대한 백신의 개발은, 다당류 캡슐이 그것의 사람 신경 세포 점착 분자에 대한 면역원성 유사성으로 인해 면역원성이 빈약하기 때문에 특별히 어려운 것으로 나타난다. 그러므로 백신 제조를 위한 전략이 수막구균 외막의 노출된 표면 구조에 집중되었지만 균주들 중에서도 이들 항원의 뚜렷한 변이에 의해 방해를 받아왔다.

[0008] 그러나 추가의 개발로 박테리아 막의 정상적인 내용물을 구성하는 많은 단백질을 함유할 외막 소포(vesicle)로 구성된 백신의 도입이 유도되었다. 그런 것중의 하나는 N. 메닌기티디스 혈청군 B 와 C에 대한 VA-MENGOC-BC® Cuban 백신이다 (Rodriguez et al., 1999 Mem Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janerio 94;433-440). 이 백신은 캡슐 다당류 AC 백신을 사용하는 예방접종 프로그램에 의해 제거되지 않았던 쿠바에서의 돌발적인 침습성 수막구균 질병 출현에 대항하기 위하여 고안되었다. 우세한 혈청군은 B와 C 였고, VA-MENGOC-BC® 백신은 돌발적인 출현을 제어하는 데 성공적이었는데, 추정된 백신 효율은 N. 메닌기티디스의 혈청군 B 균주에 대하여 83 % 였다 (Sierra et al., 1990 In Neisseria, Walter Gruyter, Berlin, m. Atchman et al (eds) p129-134, Sierra et al 1991, NIPH Ann 14;195-210). 이 백신은 특이한 돌발 출현에 효과적이었지만, 유도된 면역 반응은 N. 메닌기티디스의 다른 균주에 대하여는 방어적이지 못하였다.

[0009] 동종성 및 이종성 혈청군 B 수막구균 균주에 의해 유발된 전염병이 돌고 있는 가운데 라틴 아메리카에서 수행된 후속적인 효능 연구는 나이가 좀 더 많은 어린이들과 성인들에게서는 약간 효능이 있는 것으로 나타났지만, 그것의 효력은 감염의 가장 위험한 대상인 더 어린 아이들에게서는 상당히 더 낮았다 (Milagres et al 1994, Infect. Immun. 62; 4419-4424). 영국과 같이 다중 균주로 인한 풍토병이 만연된 나라에서 그러한 백신이 얼마나 효과적일 지는 의문스럽다. 이종성 균주에 대한 면역원성의 연구는 특별히 유아에게서 단지 제한된 교차반응성 혈청 살균 활성만을 증명하였다 (Tappero et al., 1999, JAMA 281;1520-1527).

[0010] 두 번째의 외막 소포 백신은 노르웨이에서, 스칸디나비아에서 우세했던 전형인 혈청형 B 이소타입을 사용하여 개발되었다 (Fredriksen et al., 1991, NIPH Ann, 14;67-80). 이 백신은 임상적인 시도로 시험되었고 57 %에게서 29 개월 후에 보호적 효력을 갖는 것으로 나타났다 (Bjune et al., 1991, Lancet, 338;1093-1096).

[0011] 그러나 백신에서 외막 소포의 사용은 몇 가지 문제와 관련된다. 예를 들어 OMV는 독성 지질다당류를 함유하고, 그로써 균주 특이적이거나 가변적으로 발현되는 면역-우세한 항원을 함유할 수 있다. 외막 소포 제제 백신의 이런 몇 가지 문제를 극복하기 위해 사용될 수 있는 여러 가지 방법들이 설명되었다. WO01/09350은 이들 문제 중 일부를, 예를 들면 외막 소포에 존재하는 항원을 변형시키고 독성을 감소시킴으로써 해결하는 방법을 설명하

고 있다.

[0012] WO01/52885에는 외막 소포를 다른 항원과 조합하는 가능성과 2,000 개 이상의 잠재적인 나이세리아 단백질의 목록이 포함되어 있으며, 그것으로부터 좀 더 넓은 범위의 혈청형에 대하여 효능을 나타내는 백신이 개발될 수 있다고 추측된다.

[0013] 현재 활용될 수 있는 항-수막구균 백신에는 다양한 문제가 있다. 단백질에 기초한 외막 백신은 단지 소수의 균주에만 특이적이고 효과적이기 쉽다. 다당류 백신은 또한 그것이 특히 혈청군 B에 대하여 빈약하고 짧은 면역 반응을 유도하는 경향이 있기 때문에 가장 적합한 백신이 아니다 (Lepow et al., 1986; Peltola 1998, Pediatrics 76;91-96).

[0014] 나이세리아 감염은 N. 고노레아의 경우 활용할 수 있는 백신이 없거나 N. 메닌기티디스의 경우 이종성 균주에 대하여 효능이나 보호 능력 면에서 제한을 받는 백신을 이용할 수밖에 없는 심각한 건강 보호 문제를 나타낸다. 따라서 분명히 현재 이용할 수 있는 백신의 효능을 개선시키거나 보다 넓은 범위의 균주에 대하여 보호할 수 있을, 나이세리아 감염에 대해 월등한 백신을 개발할 필요가 있다.

발명의 상세한 설명

[0024] 본 발명은 조합될 때 나이세리아 감염에 대하여 놀랄만한 백신 효능의 증강을 유도하는 나이세리아 항원의 특별한 조합을 개시한다.

[0025] 나이세리아 감염은 여러 가지 상이한 단계를 통하여 진행한다. 예를 들어 수막구균 생명주기는 비인강(鼻咽腔)의(nasopharyngeal) 집락 형성, 점막 부착, 혈류로의 교차 (crossing), 혈액에서의 복제, 독성 쇼크의 유도, 혈액/뇌 장벽 교차 및 뇌척수액 및/또는 뇌막에서의 복제를 포함한다. 박테리아의 표면에 있는 상이한 분자들은 감염 사이클의 상이한 단계에 포함될 것이다. 나이세리아 감염의 상이한 진행 과정에 포함된 특정 항원의 조합의 효과적인 양에 대한 면역 반응을 표적화함으로써, 의외로 높은 효능을 가진 나이세리아 백신이 이루어질 수 있다.

[0026] 특히 상이한 부류로부터의 특정 항원의 조합이 다중 단계의 감염에 대하여 보호하는 면역 반응을 유도할 수 있는데, 그런 특정 항원의 일부는 숙주 세포에 대한 점착에 포함되고, 일부는 철 획득에 포함되며, 일부는 자가수송에, 그리고 일부는 독소에 포함된다. 그러한 항원들의 조합은 놀랍게도 나이세리아 감염에 대한 백신 효능이 개선되는 (바람직하게는 상승작용적으로 개선되는) 것을 유도할 수 있는데, 그 때 박테리아의 하나 이상의 기능이 최적 방식의 면역 반응에 의해 표적화 된다.

[0027] 백신의 효능은 다양한 분석을 통하여 평가될 수 있다. 동물 모델에서의 보호 분석은 당해 기술분야에 잘 알려져 있다. 나아가 혈청 살균 분석 (SBA)은 수막구균 백신의 효능을 측정하기 위한 가장 보편적으로 인정받은 면역학적 마커이다 (Perkins et al., J Infect Dis. 1998, 177:683-691).

[0028] 항원의 일부 조합 (예를 들면 특정 자가수송체 단백질과 특정 철 획득 단백질의 조합)은 동물 모델 분석에서 개선된 보호 및/또는 상승작용적으로 더 높은 SBA 역가를 유도할 수 있다. 어떤 이론에 구속되기를 원하지는 않지만, 항원들의 그러한 상승작용적 조합은 항원 조합에 대한 면역 반응의 많은 특징에 의해 가능할 수 있다. 항원 자체는 통상 나이세리아 세포상에 노출되며 보존되기 쉽지만, 또한 항원 단독에 대해 유도된 항체를 사용하여 일어나는 최적 살균 반응에 대해서는 충분한 양으로 포면 세포에 존재하지 않게 되기 쉽다. 발명의 항원들의 조합은 임계 역치를 뛰어 넘어 나이세리아 세포와 상호 작용하는 살균성 항체의 유익한 조합을 유도하는 제형을 초래할 수 있다. 이런 임계적인 수준에서 충분한 양의 충분한 항체가 박테리아 표면에 결합되어 그 결과로서 나타나는 보체 및 훨씬 더 높은 살균 효과에 의해 효과적인 사멸이 가능하다.

[0029] 혈청 살균 분석 (SBA)이 백신 후보의 효능을 밀접하게 반영하기 때문에 항원의 조합에 의한 양호한 SBA 역가의 달성은 항원의 조합을 함유하고 있는 백신의 보호적 효능에 대한 좋은 표식이다. 본 발명은 다른 항원과의 혼합물에서 분리되거나 풍부해진 두 개의 항원의 조합을 사용하는 것과도 관련된다. 그러한 항원 조합은 조합되었을 때 유익하게 상호 작용하며, 바람직하게는 상승작용적으로 살균 활성의 견지에서 더 높은 (혈청 살균 측정 또는 SBA에 의해 측정되는 바와 같이), 바람직하게는 개별적으로 항원에 의해 유도된 부가 반응보다 더 높은, 보다 바람직하게는 최소한 1.2, 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 배, 가장 바람직하게는 최소한 10배 더 높은 면역 반응을 유도한다.

[0030] 발명의 부가적인 장점은 보다 광범위한 범위의 균주에 대하여 보호할 수 있는 면역원성 조성물에 상이한 패밀리 단백질로부터 얻어지는 발명의 항원을 조합하는 것이다.

[0031] 본 발명은 나이세리아 내에서 상이한 기능을 가지고 있는, 최소한 2 개의 상이한 범주의 단백질로부터 선택된 다수의 (2개 이상의) 단백질을 포함하고 있는 면역원성 조성물에 관한 것이다. 그러한 단백질의 범주에 관한 실예는 부착소(adhesin), 자가수송체 단백질, 독소, 내재성 외막 단백질 및 Fe 획득 단백질이다. 본 발명의 백신 조성물은 동종성 나이세리아 균주 (항원이 유도되는 균주)에 대하여, 그리고 바람직하게는 이종성 나이세리아 균주에 대해서도 백신 효능에서 놀랄만한 개선을 나타내다.

[0032] 본 발명은 다음의 범주들로부터 선택된 최소한 또는 정확하게는 2, 3, 4, 또는 5 개의 모든 범주의 항원으로부터 선택된 최소한 또는 정확하게는 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10 개의 상이한 항원을 포함하고 있는 면역원성 조성물을 제공한다:

[0033] ● 하나 이상의 나이세리아 부착소;

[0034] ● 하나 이상의 나이세리아 자가수송체;

[0035] ● 하나 이상의 나이세리아 독소;

[0036] ● 하나 이상의 나이세리아 Fe 획득 단백질;

[0037] ● 하나 이상의 나이세리아 막-결합 단백질 (바람직하게는 외막 단백질, 특히 내재성 외막 단백질).

[0038] 바람직하게는 본 발명은 최소한 또는 정확하게는 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개의 상이한 나이세리아 항원을 포함하는 면역원성 조성물을 제공한다. 가장 바람직하게는 이들 항원은 최소한 또는 정확하게는 2, 3, 4, 또는 5개의 다음으로부터 선택되는 단백질 군으로부터 선택된다:

[0039] ● FhaB, NspA, PilC, Hsf, Hap, MafA, MafB, Omp26, NMB0315, NMB0995, NMB1119 및 NadA로 이루어지는 군으로부터 선택된 하나 이상의 나이세리아 부착소;

[0040] ● Hsf, Hap, IgA 프로테아제, AspA, 및 NadA로 이루어지는 군으로부터 선택된 하나 이상의 나이세리아 자가수송체;

[0041] ● FrpA, FrpC, FrpA/C, VapD, NM-ADPRT 및 LPS 면역형 L2와 LPS 면역형 L3중 어느 하나 또는 둘 모두로 이루어지는 군으로부터 선택된 하나 이상의 나이세리아 독소;

[0042] ● TbpA, TbpB, LbpA, LbpB, HpuA, HpuB, Lipo28 (GNA2132), Sibp, NMB0964, NMB0293, FbpA, Bcp, BfrA, BfrB 및 P2086 (XthA)로 이루어지는 군으로부터 선택된 하나 이상의 나이세리아 Fe 획득 단백질; 및

[0043] ● PilQ, OMP85, FhaC, NspA, TbpA, LbpA, TspA, TspB, TdfH, ProB, MltA, HpuB, HimD, HisD, GNA1870, OstA, HlpA (GNA1946), NMB1124, NMB1162, NMB1220, NMB1313, NMB1953, HtrA, 및 PldA (Omp1A)로 이루어지는 군으로부터 선택된, 하나 이상의 나이세리아 막-결합 단백질, 바람직하게는 외막 단백질, 특히 내재성 외막 단백질.

[0044] 본 발명의 항원은 모두 분리된다. 이것은 항원이 사람 손에 의해 변경된다는 것을 의미한다. 바람직하게도 항원은 어느 정도는 정제되며, 가장 바람직하게는 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95 또는 99 % 이상이 순수하다 (발명의 면역원성 조성물의 다른 성분들과의 조합 전에).

[0045] 바람직하게도 본 발명의 면역원성 조성물은 하나 이상의 나이세리아 부착소와 하나 이상의 나이세리아 자가수송체 및 임의로 나이세리아 독소, 나이세리아 Fe 획득 단백질 또는 나이세리아 막-결합 단백질 (바람직하게는 내재성 외막 단백질)을 포함한다. 바람직하게도 항원은 상기 열거된 항원들로부터 선택된다.

[0046] 바람직하게는 본 발명의 면역원성 조성물은 하나 이상의 나이세리아 부착소와 하나 이상의 나이세리아 독소 및 임의로 나이세리아 자가수송체, 나이세리아 Fe 획득 단백질 또는 나이세리아 막-결합 단백질 (바람직하게는 내재성 외막 단백질)을 포함한다. 바람직하게도 항원은 상기 열거된 항원들로부터 선택된다.

[0047] 바람직하게는 본 발명의 면역원성 조성물은 하나 이상의 나이세리아 부착소와 하나 이상의 나이세리아 Fe 획득 단백질 및 임의로 나이세리아 독소, 나이세리아 자가수송체 또는 나이세리아 막-결합 단백질 (바람직하게는 내재성 외막 단백질)을 포함한다. 바람직하게도 항원은 상기 열거된 항원들로부터 선택된다.

[0048] 바람직하게도 본 발명의 면역원성 조성물은 하나 이상의 나이세리아 부착소와 하나 이상의 나이세리아 막-결합 단백질 (바람직하게는 내재성 외막 단백질) 및 임의로 나이세리아 독소, 나이세리아 Fe 획득 단백질 또는 나이세리아 자가수송체를 포함한다. 바람직하게도 항원은 상기 열거된 항원들로부터 선택된다.

[0049] 바람직하게는 본 발명의 면역원성 조성물은 하나 이상의 나이세리아 자가수송체와 하나 이상의 나이세리아 독소

및 임의로 나이세리아 부착소, 나이세리아 Fe 획득 단백질 또는 나이세리아 막-결합 단백질 (바람직하게는 내재성 외막 단백질)을 포함한다. 바람직하게도 항원은 상기 열거된 항원들로부터 선택된다.

[0050] 바람직하게는 본 발명의 면역원성 조성물은 하나 이상의 나이세리아 자가수송체와 하나 이상의 나이세리아 Fe 획득 단백질 및 임의로 나이세리아 부착소, 나이세리아 독소 또는 나이세리아 막-결합 단백질 (바람직하게는 내재성 외막 단백질)을 포함한다. 바람직하게도 항원은 상기 열거된 항원들로부터 선택된다.

[0051] 바람직하게는 본 발명의 면역원성 조성물은 하나 이상의 나이세리아 자가수송체와 하나 이상의 나이세리아 막-결합 단백질 (바람직하게는 내재성 외막 단백질) 및 임의로 나이세리아 부착소, 나이세리아 Fe 획득 단백질 또는 나이세리아 독소를 포함한다. 바람직하게도 항원은 상기 열거된 항원들로부터 선택된다.

[0052] 바람직하게는 본 발명의 면역원성 조성물은 하나 이상의 나이세리아 독소와 하나 이상의 나이세리아 Fe 획득 단백질 및 임의로 나이세리아 부착소, 나이세리아 자가수송체 또는 나이세리아 막-결합 단백질 (바람직하게는 내재성 외막 단백질)을 포함한다. 바람직하게도 항원은 상기 열거된 항원들로부터 선택된다.

[0053] 바람직하게는 본 발명의 면역원성 조성물은 하나 이상의 나이세리아 독소와 하나 이상의 나이세리아 막-결합 단백질 (바람직하게는 내재성 외막 단백질) 및 임의로 나이세리아 부착소, 나이세리아 자가수송체 또는 나이세리아 독소를 포함한다. 바람직하게도 항원은 상기 열거된 항원들로부터 선택된다.

[0054] 바람직하게는 본 발명의 면역원성 조성물은 하나 이상의 나이세리아 Fe 획득 단백질과 하나 이상의 나이세리아 막-결합 단백질 (바람직하게는 내재성 외막 단백질) 및 임의로 나이세리아 부착소, 나이세리아 자가수송체 또는 나이세리아 독소를 포함한다. 바람직하게도 항원은 상기 열거된 항원들로부터 선택된다.

[0055] 바람직하게는 5개의 항원 군 모두 본 발명의 면역원성 조성물에 제공된다.

[0056] 단백질이 구체적으로 본원에서 언급된 것인 경우 바람직하게는 천연의 전장의 단백질, 및 그것의 천연 변이체 (즉 나이세리아, 바람직하게는 수막구균 균주로부터 얻을 수 있는 천연 단백질)를 언급하는 것이지만, 또한 그것의 항원성 단편 (특히 서브유니트 백신의 맥락에서)도 포함할 수 있다. 그것들은 단백질의 아미노산 서열로부터 연속적으로 선택되는 최소한 10 개의 아미노산, 바람직하게는 20 개의 아미노산, 보다 바람직하게는 30 개의 아미노산, 보다 바람직하게는 40 개의 아미노산 또는 가장 바람직하게는 50 개의 아미노산을 포함 또는 함유하고 있는 단편 (본원에서 자주 구체적으로 설명되는)이다. 또한 항원성 단편은 나이세리아의 전장 단백질에 대하여 생성된 항체와 또는 나이세리아로 인한 포유류 숙주의 감염에 의해 생성된 항체와 면역학적으로 반응하는 단편을 나타낸다. 항원성 단편은 또한 유효량으로 투여될 때 나이세리아 감염에 대하여 보호성 면역 반응을 유도하는, 보다 바람직하게는 N. 메닌기티디스 및/또는 N. 고노레아 감염에 대하여 보호성인, 가장 바람직하게는 N. 메닌기티디스 혈청군 B 감염에 대하여 보호성인 단편을 포함한다.

[0057] 또한 본 발명에는 본 발명의 나이세리아 단백질의 재조합 융합 단백질, 또는 그것의 단편이 포함된다. 이것들은 동일한 폴리펩티드에서 상이한 나이세리아 단백질 또는 그것의 단편들을 조합할 수 있다. 또는 달리 본 발명은 또한 T-세포 에피토프 제공자 또는 정제 태그(tag), 예를 들면 β-갈락토시다제, 글루타티온-S-트란스페라제, 녹색 형광 단백질 (GFP), 에피토프 태그, 예컨대 FLAG, myc 태그, 폴리히스티딘, 또는 바이러스 표면 단백질, 예컨대 인플루엔자 바이러스 헤마글루티닌, 파상풍 변성 독소, 디프테리아 변성 독소, CRM197과 같은 이종성 서열을 가지고 있는 융합 단백질로서, 나이세리아 단백질 또는 그것의 단편의 개별적인 융합 단백질도 포함한다.

[0058] 본 발명의 항원

[0059] NMB참조는 www.neisseria.org로부터 입수할 수 있는 서열에 대한 참조 번호를 나타낸다.

[0060] 1. 부착소

[0061] 부착소는 FhaB (WO98/02547), NadA (J. Exp. Med (2002) 195:1445; NMB1994), NhhA (NMB0992)로도 알려져 있는 Hsf (WO99/31132), Hap (NMB1985)(WO99/55873), NspA (WO96/29412), MafA (NMB0652) 및 MafB (NMB0643)(Annu Rev Cell Dev Biol. 16;423-457 (2000); Nature Biotech 20; 914-921 (2002)), Omp26 (NMB0181), NMB0315, NMB0995, NMB1119 및 PilC (Mol. Microbiol. 1997, 23;879-892)를 포함한다. 이것들은 숙주 세포의 표면에 나이세리아가 결합할 때 관련되는 단백질이다. Hsf는 부착소의 실예일 뿐 아니라 자가수송체 단백질이기도 하다. 그러므로 본 발명의 면역원성 조성물은 Hsf와 다른 자가수송체 단백질의 조합을 포함할 수 있으며, 그 때 Hsf는 부착소로 작용한다. 이들 부착소는 나이세리아 메닌기티디스 또는 나이세리아 고노레아 또는 다른 나이세리아

균주로부터 유래될 수 있다. 본 발명은 또한 나이세리아로부터 얻어지는 다른 부착소도 포함한다.

[0062] **FhaB**

[0063] 이 항원은 WO98/02547 SEQ ID NO 38 (누클레오티드 3083 - 9025)에서 설명되었다 - NMB0497 참조. 본 발명자들은 FhaB가 항-점착성 항체를 단독으로 유도할 때 특히 효과적이며, 또 본 발명의 다른 항원과도 특히 효과적임을 발견하였다. 비록 전장의 FhaB가 사용될 수 있지만, 본 발명자들은 특정 C-말단 트렁케이트 (truncates)가 의외로 최소한적으로 효과적이고, 바람직하게는 교차-균주 효과의 관점에서는 더 효과적이기까지 한다는 것을 발견하였다. 그러한 트렁케이트는 또한 유익하게도 클로닝하기가 훨씬 더 쉬운 것으로 나타났다. 본 발명의 FhaB 트렁케이트는 전형적으로 FhaB 분자의 N-말단 2/3에 해당하며, 바람직하게는 1200 내지 1600 위치, 보다 바람직하게는 위치 1300 내지 1500, 가장 바람직하게는 위치 1430 내지 1440에 놓여있는 새로운 C-말단에 상응한다. 특정 구체예는 1433 또는 1436에 있는 C-말단을 포함한다. 따라서 본 발명의 그러한 FhaB 트렁케이트 및 그러한 트렁케이트를 포함하고 있는 백신은 본 발명의 독립적인 측면일 뿐 아니라 발명의 조합 면역원성 조성물의 구성 요소이기도 하다. N-말단은 또한 10, 20, 30, 40 또는 50 개의 아미노산만큼 트렁케이팅될 수 있다.

[0064] 2. 자가수송체 *단백질*

[0065] 자가수송체 단백질은 전형적으로 신호 서열, 패신저(passenger) 도메인 및 외막에 부착되기 위한 고착 도메인으로 구성된다. 자가수송체 단백질의 실예로는 Hsf(WO99/31132)(NMB0992), HMW, Hia (van Ulsen et al., Immunol. Med. Microbiol. 2001 32;53-64), Hap (NMB1985)(WO99/55873; van Ulsen et al., Immunol. Med. Microbiol. 2001 32;53-64), UspA, UspA2, NadA (NMB1994)(Comanducci et al., J. Exp. Med. 2002 195;1445-1454), AspA (Infection and Immunity 2002, 70(8);4447-4461; NMB1029), Aida-1 유사 단백질, SSh-2 및 Tsh가 있다. NadA (J. Exp. Med (2002) 195:1445)는 자가수송체 단백질의 또 다른 실예일 뿐 아니라 부착소이기도 하다. 그러므로 본 발명의 면역원성 조성물은 NadA와 부착소와의 조합을 포함할 수 있으며, 그 때에 NadA는 자가수송체 단백질로서 작용한다. 이들 단백질은 나이세리아 메닌기티디스 또는 나이세리아 고노레아 또는 다른 나이세리아 균주로부터 유래될 수 있다. 본 발명은 또한 나이세리아로부터 얻어지는 다른 자가수송체 단백질도 포함한다.

[0066] **Hsf**

[0067] Hsf는 자가수송체 단백질에 공통적인 구조를 갖는다. 예를 들어 N. 메닌기티디스 균주 H44/76 으로부터의 Hsf는 아미노산 1 내지 51로 구성된 신호 서열, 성숙한 단백질의 아미노 말단에 있고 (아미노산 52-479) 표면 노출되며 가변 영역 (아미노산 52-106, 121-124, 191-210 및 230-234)을 함유하고 있는 헤드 영역, 목 영역 (아미노산 480-509), 소수성 알파-나선 영역 (아미노산 518-529) 및 4개의 트랜스멤브레인 가닥이 외막 주변을 회전하는 고착 도메인 (아미노산 539-591)으로 구성된다.

[0068] 비록 전장의 Hsf가 본 발명의 면역원성 조성물에 사용될 수 있지만, 다양한 Hsf 트렁케이트 및 결실이 또한 유익하게도 백신 유형에 따라 사용될 수 있다.

[0069] Hsf가 서브유니트 백신에 사용되는 경우 가용성 패신저 도메인의 일부, 예를 들어 아미노산 52 내지 479의 완전한 도메인, 가장 바람직하게는 그것의 보존된 부분, 예를 들면 아미노산 134 내지 479의 특별히 유익한 서열이 사용된다. Hsf의 바람직한 형태는 WO01/55182에 개시된 것과 같이 단백질의 가변 영역이 결실되도록 트렁케이팅될 수 있다. 바람직한 변이체는 WO01/55182에서 규정된 것과 같이 1, 2, 3, 4, 또는 5 개의 가변 영역의 결실을 포함할 수 있다. 상기 서열 및 하기에서 설명되는 서열들은 N 또는 C 말단중 어느 하나에서 또는 양쪽에서 모두 1, 3, 5, 7, 10 또는 15 개까지의 아미노산만큼 연장 또는 트렁케이팅될 수 있다.

[0070] 그러므로 Hsf의 바람직한 단편은 Hsf의 전체 헤드 영역, 바람직하게는 아미노산 52-473을 함유하고 있는 영역을 포함한다. Hsf의 추가의 바람직한 단편은 하나 이상의 다음 아미노산 서열을 포함하는 헤드의 표면 노출된 영역을 포함한다: 52-62, 76-93, 116-134, 147-157, 157-175, 199-211, 230-252, 252-270, 284-306, 328-338, 362-391, 408-418, 430-440 및 469-479.

[0071] Hsf가 외막 소포 제제에 존재하는 경우 그것은 전장의 단백질로서 또는 바람직하게는 아미노산 1-51과 134-591의 융합 (아미노산 서열 134 에서 C-말단 까지의 성숙한 외막 단백질을 생성함)으로 구성된 유익한 변이체로서 발현될 수 있다. Hsf의 바람직한 형태는 WO01/55182에 개시된 단백질의 가변 영역을 결실시키기 위해 트렁케이팅될 수 있다. 바람직한 변이체는 WO01/55182에서 규정된 것과 같이 1, 2, 3, 4, 또는 5개의 가변 영역이 결실될 것이다. 바람직하게는 첫 번째와 두 번째 가변 영역이 결실된다. 바람직한 변이체는 아미노산 52 에서

237 사이 또는 54 에서 237 사이로부터, 보다 바람직하게는 아미노산 52 에서 133 사이 또는 55 에서 133 사이의 잔기를 결실시킬 수 있을 것이다. 성숙한 단백질은 신호 펩티드가 결여되어 있을 것이다.

[0072] **Hap**

[0073] 나이세리아 메닌기티디스로부터 얻어지는 Hap-유사 단백질의 컴퓨터 분석으로 최소한 3개의 구조적 도메인이 드러났다. H44/76으로부터 얻어지는 Hap-유사 서열을 참조로서 고려하면, 아미노산 1 내지 42를 포함하고 있는 도메인 1은 자가-수송체 패밀리의 특징인 sec-의존성 신호 펩티드를 엔코딩하고, 아미노산 43 내지 950을 포함하는 도메인 2는 표면 노출되는 것 같고 면역 시스템의 영향을 받기 쉬운 패신저 도메인을 엔코딩하며, 잔기 951 내지 C-말단 (1457)을 포함하는 도메인 3은 배럴(barrel)-모양 구조를 조립하는 것 같고 외막에 고착하는 것 같은 베타-가닥을 엔코딩하는 것으로 예상된다. 도메인 2가 표면-노출되고 잘 보존되며 (시험된 모든 균주에서 80 % 이상) 대장균에서 서브유니트 항원으로서 생성될 수 있는 것으로 보이기 때문에, 도메인 2는 관심을 끄는 백신 후보를 나타낸다. 도메인 2와 3은 표면-노출되고, 잘 보존되는 것으로 보이기 때문에 (Pizza et al., (2000), Science 287:1816-1820), 그것들도 관심을 끄는 백신 후보를 나타낸다. 도메인 2는 패신저 도메인으로서 알려져 있다.

[0074] 본 발명의 면역원성 조성물은, 바람직하게는 OMV 제제에 통합되어 있는 전장의 Hap 단백질을 포함할 수 있다. 발명의 면역원성 조성물은 또한 H44/76 균주에서 아미노산 잔기 43-950으로 구성되는 Hap의 패신저 도메인을 포함할 수 있다. Hap의 이 단편은 특히 발명의 서브유니트 조성물에 유익하게 사용될 것이다. Hap의 패신저 도메인에 대한 상기 서열은 N 또는 C 말단 중 어느 한 쪽 또는 양쪽에서 모두 1, 3, 5, 7, 10, 15, 20, 25, 또는 30 아미노산만큼 연장되거나 트렁케이팅될 수 있다.

[0075] 3. *철 획득 단백질*

[0076] 철 획득 단백질은 TbpA (NMB0461)(WO92/03467, US5912336, WO93/06861 및 EP586266), TbpB (NMB0460)(WO93/06861 및 EP586266), LbpA (NMB1540)(Med Microbiol (1999) 32:1117), LbpB (NMB1541)(WO99/09176), HpuA (U73112.2)(Mol Microbiol. 1997, 23; 737-749), HpuB (NC_003116.1)(Mol Microbiol. 1997, 23; 737-749), XthA로도 알려져 있는 P2086 (NMB0399)(13th International Pathogenic Neisseria Conference 2002), FbpA (NMB0634), FbpB, BfrA (NMB1207), BfrB (NMB1206), GNA2132로도 알려져 있는 Lipo28 (NMB2132), Sibp (NMB1882), HmbR, HemH, Bcp (NMB0750), 철(III) ABC 수송체-투과효소 단백질 (Tettelin et al Science 287;1809-1815 2000), 철 (III) ABC 수송체-페리플라스믹(periplasmic) (Tettelin et al Science 287;1809-1815 2000), TonB-의존성 수송체 (NMB0964 및 NMB0293)(Tettelin et al Science 287;1809-1815 2000) 및 트란스페린 결합 단백질 관련 단백질 (Tettelin et al Science 287;1809-1815 2000)을 포함한다. 이들 단백질은 나이세리아 메닌기티디스, 나이세리아 고노레아 또는 다른 나이세리아 균주로부터 유래될 수 있다. 본 발명은 또한 나이세리아로부터 얻어지는 다른 철 획득 단백질도 포함한다.

[0077] **TbpA**

[0078] TbpA는 TbpB와 상호 작용하여 나이세리아의 외막 위에 단백질 복합체를 형성하고, 그것은 트란스페린에 결합한다. 구조적으로 TbpA는 TonB 박스와 플러그 도메일을 가지고 있는 세포내 N-말단 도메인, 짧은 세포내 및 더 긴 세포외 루프에 의해 연결된 다중 트랜스멤브레인 베타 가닥을 함유한다.

[0079] 두 부류의 TbpB가 식별되었는데, 각각 고분자량과 저분자량을 가지는 것이었다. TbpB의 높고 낮은 분자량 형태는 상동성을 토대로 구별 가능한 TbpA의 상이한 2개의 패밀리와 결합한다. 유사한 분자량에도 불구하고 그것들은 TbpB의 높거나 낮은 분자량 형태와의 결합 때문에 고분자량 및 저분자량 패밀리로서 공지된다 (Rokbi et al., FEMS Microbiol. Lett. 100;51, 1993). 용어 고분자량 TbpA 및 저분자량 TbpA은 TbpA의 이런 두 가지 형태를 언급하기 위해 사용되고, TbpB에 대해서도 마찬가지다. 본 발명의 면역원성 조성물은 N. 고노레아를 포함한 다른 박테리아로부터의 철 획득 단백질 뿐 아니라 N. 메닌기티디스의 혈청군 A, B, C, Y 및 W-135로부터의 TbpA 및 TbpB를 포함할 수 있다. 트란스페린 결합 단백질 TbpA와 TbpB는 또한 각각 Tbp1 및 Tbp2로서도 언급된다 (Cornelissen et al., Infection and Immunity 65;822, 1997).

[0080] TbpA는 여러 개의 구별되는 영역을 함유한다. 예를 들어 N. 메닌기티디스 균주 H44/76으로부터 얻어지는 TbpA의 경우에, 아미노 말단의 186개의 아미노산은 내부 구형 도메인을 형성하고, 22개의 베타 가닥은 막 주위를 회전하여 베타 배럴 구조를 형성한다. 이것들은 짧은 세포내 루프와 더 큰 세포외 루프에 의해 연결된다. 세포외 루프 2, 3 및 5는 가장 높은 서열 변이도를 가지는데, 그 중에서도 루프 5는 표면 노출된다. 루프 5와 4는

리간드 결합에 포함된다.

[0081] TbpA의 바람직한 단편은 TbpA의 세포외재성 루프를 포함한다. N. 메닌기티디스 균주 H44/76으로부터 얻어지는 TbpA의 서열을 사용하면 이들 루프는 루프 1의 경우 아미노산 200-202, 루프 2의 경우 아미노산 226-303, 루프 3의 경우 아미노산 348-395, 루프 4의 경우 아미노산 438-471, 루프 5의 경우 아미노산 512-576, 루프 6의 경우 아미노산 609-625, 루프 7의 경우 아미노산 661-671, 루프 8의 경우 아미노산 707-723, 루프 9의 경우 아미노산 769-790, 루프 10의 경우 아미노산 814-844, 및 루프 11의 경우 아미노산 872-903에 상응한다. 다른 Tbp 단백질에서 서열 배열 후에 상응하는 서열은 또한 바람직한 단편을 구성할 것이다. 가장 바람직한 단편으로는 Tbp의 루프 2, 루프 3, 루프 4 또는 루프 5를 구성하는 아미노산 서열을 포함할 것이다.

[0082] 본 발명의 면역원성 조성물이 TbpA를 포함하는 경우에 고분자량 TbpA 및 저분자량 TbpA을 둘 다 포함하는 것이 바람직하다.

[0083] 비록 TbpA가 OMV 백신에 존재하는 것이 바람직하긴 하지만, 그것은 또한 서브유니트 백신의 일부일 수 있다. 예를 들어 본 발명의 면역원성 조성물에 도입될 수 있는 분리된 철 획득 단백질은 당해 기술분야에 잘 알려져 있다 (WO00/25811). 그것들은 박테리아 숙주에서 발현되고, 계면활성제 (예컨대 2 % Elugent)를 사용하여 추출되며, 친화성 크로마토그래피에 의하여 또는 당해 기술 분야에 잘 알려져 있는 표준 칼럼 크로마토그래피 기법을 사용함으로써 정제된다 (Oakhill et al., Biochem J. 2002 364;613-6).

[0084] TbpA가 OMV 백신에 존재하는 경우에 그것의 발현은 본원에서 논의되는 유전 기법에 의해 상향 조절되거나 바람직하게는 하기에서 논의되는 바와 같이 철 제한 조건하에서 부모 균주를 성장시킴으로써 상향 조절될 수 있다. 이 방법은 또한 가변적인 철-조절된 단백질, 특히 면역우세하게 될 수 있는 FrpB의 상향 조절을 초래할 것이며, 따라서 본 발명의 면역원성 조성물이 광범위한 나이세리아 균주에 존재하는 항원에 대한 면역 반응을 유도하는 것을 보장하기 위하여 하기에서 설명되는 바와 같은 단백질 (특히 FrpB)의 발현을 하향 조절하는 것 (및 바람직하게는 엔코딩하는 유전자를 결실하는 것)이 유익하다. 고분자량 TbpA 및 저분자량 TbpA은 둘 다 면역원성 조성물에 존재하는 것이 바람직하며, 이것은 바람직하게도 다른 형태의 TbpA를 발현하는, 두 개의 균주로부터 유래된 OMV를 조합함으로써 이루어진다.

[0085] 4. 독소

[0086] 독소는 FrpA (NMB0585; NMB1405), FrpA/C (정의에 대해서는 하기 참조), FrpC (NMB1415; NMB1405)(WO92/01460), NM-ADPRT (NMB1343)(13th International Pathogenic Neisseria Conference 2002 Masignari et al., p135), VapD (NMB1753), 지질다당류 (LPS; 지질올리고당류 또는 LOS로도 불림) 면역형 L2 및 LPS 면역형 L3을 포함한다. FrpA와 FrpC는 이들 두 개의 단백질 사이에 보존된 영역 및 이 보존된 단편을 함유하고 있는, 바람직하게는 FrpA/C의 서열의 아미노산 227-1004를 포함하고 있는 폴리펩티드일 단백질의 바람직한 단편을 함유한다. 이들 항원은 나이세리아 메닌기티디스, 나이세리아 고노레아 또는 다른 나이세리아 균주로부터 유래될 수 있다. 본 발명은 또한 나이세리아로부터 얻어지는 다른 독소도 포함한다.

[0087] 다른 구체예에서 독소는 독성의 조절에 관련된 항원, 예를 들면 지질다당류의 합성에서 작용하는 OstA를 포함할 수 있다.

[0088] **FrpA 및 FrpC**

[0089] 나이세리아 메닌기티디스는 철이 제한될 때 분비되는, FrpA & FrpC로 언급되는 두 개의 RTX 단백질을 엔코딩한다 (Thompson et al., (1993) J. Bacteriol. 175:811-818; Thompson et al., (1993) Infect. Immun. 61:2906-2911). RTX (반복 변성 독소) 단백질 패밀리는 공통적으로 일치(consensus)가 포함된 C-말단 가까이에 일련의 9 개의 아미노산으로 된 반복부를 가지고 있다: Leu Xaa Gly Gly Xaa Gly (Asn/Asp) Asp Xaa. ($LXGGXGN_{/D}DX$).

대장균 HlyA에서 반복부는 Ca2+ 결합 부위로 여겨진다. 도 4에서 나타난 바와 같이, 수막구균의 FrpA 및 FrpC 단백질은 균주 FAM20에서 특징지어진 것처럼, 그것들의 중심 및 C-말단 영역에서 광범위한 아미노산 유사성을 공유하고 있지만 N-말단에서는 매우 제한된 유사성을 (존재하는 경우라도) 나타낸다. 더우기 FrpA와 FrpC 사이의 보존된 영역은 9 개의 아미노산 모티프의 반복 (FrpA에서는 13회, FrpC에서는 43회)으로 인해 약간의 다형태를 나타낸다.

[0090] 본 발명의 면역원성 조성물은 전장의 FrpA 및/또는 FrpC 또는 바람직하게는 FrpA와 FrpC 사이의 보존된 서열을 포함하고 있는 단편을 포함한다. 보존된 서열은 9 개의 아미노산으로 된 반복 유니트로 구성된다. 발명의 면역원성 조성물은 바람직하게는 3회 이상의 반복, 10회 이상의 반복, 13회 이상의 반복, 20회 이상의 반복 또는

23회 이상의 반복을 포함할 것이다.

[0091] 그러한 트렁케이트는 전장의 분자를 능가하는 유익한 성질을 가지고 있으며, 그러한 항원을 포함하고 있는 백신은 발명의 면역원성 조성물에 통합될 뿐 아니라 발명의 독립적인 측면을 형성한다.

[0092] FrpA와 FrpC 사이에 보존된 서열은 FrpA/C로 표시되고 FrpA 또는 FrpC는 언제든지 발명의 면역원성 조성물의 구성 요소를 형성하며, FrpA/C가 유익하게 사용될 수 있다. FrpA 서열의 아미노산 277-1004가 바람직한 보존된 영역이다. 상기 서열은 N 또는 C 말단의 어느 한 쪽 또는 양쪽에서 모두 1, 3, 5, 7, 10, 15, 20, 25, 또는 30 개의 아미노산만큼 연장되거나 트렁케이팅될 수 있다.

[0093] LPS

[0094] LPS (지질다당류, 또는 LOS-지질올리고당류으로도 알려져 있음)는 나이세리아의 외막 위에 있는 내독소이다. LPS의 다당류 부분은 살균 항생물질을 유도하는 것으로 알려져있다.

[0095] LPS의 올리고당류 부분의 이종성으로 말미암아 상이한 나이세리아 균주 중에서도 구조적 및 항원적 다양성이 생긴다 (Griffiss et al., Inf. Immun. 1987; 55:1792-1800). 이것은 수막구균 균주를 12개의 면역형으로 세분하기 위하여 사용되었다 (Scholtan et al., J Med Microbiol 1994, 41:236-243). 면역형 L3, L7 및 L9는 면역학적으로 동일하고 구조적으로 유사하며 (또는 동일하기도 하다), 따라서 L3,7,9로 (또는 본 명세서의 목적을 위해서는 총체적으로 "L3"으로) 표시되었다. 수막구균의 LPS L3,7,9 (L3), L2 및 L5는 시알화에 의해, 또는 시티딘 5'-모노포스페이트-N-아세틸뉴라민산을 첨가함으로써 변형될 수 있다. 비록 L2, L4 및 L6 LPS가 면역학적으로 구별될 수 있긴 하지만 그것들은 구조적으로 유사하고, L2가 언급되는 경우 L4 또는 L6가 임의로 본 발명의 범주 내에서 대체될 수 있다 (M. P. Jennings et al, Microbiology 1999, 145, 3013-3021; Mol Microbiol 2002, 43:931-43; LPS 구조 및 이종성에 대한 추가의 설명).

[0096] LPS, 바람직하게는 수막구균의 LPS가 본 발명의 백신에 포함되는 경우, 바람직하게나 유익하게 면역형 L2 및 L3 중 어느 하나 또는 두 가지가 모두 존재한다. LPS는 바람직하게는 외막 소포에 존재하지만 (바람직하게는 소포가 낮은 백분율, 보다 바람직하게는 0 내지 0.5 %, 0.02 내지 0.4 %, 0.04 내지 0.3 %, 0.06 내지 0.2 %, 0.08 내지 0.15 % 또는 0.1 %, 가장 바람직하게는 데옥시콜레이트 [DOC]의 계면활성제로 추출되는 경우), 서브유니트 백신의 일부일 수도 있다. LPS는 고온수-페놀 과정을 포함한 잘 알려져 있는 과정을 사용하여 분리될 수 있다 (Wesphal and Jann Meth. Carbo. Chem. 5;83-91 1965) (Galanos et al., 1969, Eur J Biochem 9:245-249; Wu et al., 1987, Anal Bio Chem 160:281-289). LPS는 플레인으로(plain) 또는 파상풍 변성 독소, 디프테리아 변성 독소, CRM-197 또는 OMV 외막 단백질과 같은 T-세포 에피토프의 공급원에 컨쥬게이팅되어 사용될 수 있다. 분리된 LPS를 컨쥬게이팅하는 기법도 또한 공지되어 있다 (예컨대 EP 941738 참조).

[0097] LOS (특히 본 발명의 LOS)가 수포(bleb) 제형에 존재하는 경우 LOS는 수포 제제에 또한 존재하는 하나 이상의 외막 단백질 (예컨대 수막구균의 PorA 또는 PorB)에 LOS 컨쥬게이팅을 가능하게 하는 방법에 의하여 제자리 컨쥬게이팅되는 것이 바람직하다.

[0098] 이 방법은 수포 제형 내에 있는 LOS 항원의 안정성 및/또는 면역원성 (T-세포 도움을 제공함) 및/또는 항원성을 유익하게 증강시킬 수 있고, 그로써 그것의 가장 보호적인 형태로, 즉 수막구균 외막의 표면에 있는 천연 환경의 LOS로서 T-무관한 올리고당류 면역원에 대한 T-세포 도움을 제공할 수 있다. 또한 수포 내에서 LOS의 컨쥬게이팅은 LOS의 해독을 초래할 수 있다 (그로써 외막에 안정하게 묻히는 지질 A 부분은 독성을 덜 유발하게 된다). 그로써 htrB$^-$ 또는 msbB$^-$ 돌연변이체로부터 수포를 분리하거나, 또는 조성물에 폴리믹신 B (지질 A에 대한 친화력이 높은 분자)의 비-독성 펩티드 기능적 동등물을 첨가하는 것에 의한 (폴리믹신 B의 비-독성 펩티드 기능적 동등물 - 특히 (2개의 시스테인이 이황화물 브리지를 형성하는 서열 KTKCKFLKKC의) 펩티드 SAEP 2의 사용에 대한 상세한 설명의 참조를 위해 WO 93/14115, WO 95/03327, Velucchi et al (1997) J Endotoxin Res 4:1-12; EP 976402 참조), 본원에서 언급된 해독 방법은 필요하지 않을 수도 있다 (그러나 이 방법들은 추가의 안정성을 위해 조합하여 부가될 수 있다). 그러므로 본 발명자들은 수포에 존재하는 LOS가 수포내 방식으로 역시 수포에 존재하는 외막 단백질에 컨쥬게이팅되어 있는 수포를 포함하고 있는 조성물이, 그것으로부터 수포가 유래된 유기체에 의해 유발된 질병의 치료 또는 예방을 위한 백신의 기초를 형성할 수 있고, 그러한 백신은 실질적으로 비독성이며 그것의 천연 환경의 LOS에 대한 T-의존성 살균 반응을 유도할 수 있음을 발견하였다.

[0099] 본 발명은 그러므로 추가로 그러한 수포내 LOS 컨쥬게이팅된 수막구균 수포 제제를 제공한다.

[0100] 그러한 수포 제제는 의문의 대상인 박테리아로부터 분리된 후 (WO 01/09350), 수포 외막 단백질 상에 있는 기

(예컨대 NH_2 또는 COOH)에 LOS의 올리고당류 부분에 있는 기 (예컨대 NH_2 또는 COOH)를 연결시키기 위해 공지의 컨쥬게이팅 화학 작용을 받는다. 글루타르알데히드, 포름알데히드, 또는 글루타르알데히드/포름알데히드 혼합물을 사용하는 교차-결합 기법들이 사용될 수 있지만, 보다 선택적인 화학, 예컨대 EDAC 또는 EDAC/NHS를 사용하는 것이 바람직하다 (J. V. Staros, R. W. Wright and D. M. Swingle. 수용성 카보디이미드-매개된 커플링 반응의 N-히드록시숙신이미드에 의한 증강. Analytical chemistry 156:220-222 (1986); Biotconjugates Techniques. Greg T. Hermanson (1996) pp173-176). 사용될 수 있는 단백질 분자와 LOS 사이에 공유 결합을 생성할 수 있는 다른 컨쥬게이팅 화학 또는 처리가 EP 941738에 기재되어 있다.

[0101] 바람직하게는 수포 제제는 캡슐 다당류의 부재시에 컨쥬게이팅된다. 수포는 캡슐 다당류 (하기에서 설명되는 바와 같이 천연적으로 또는 돌연변이를 경유하여)를 생성하지 못하는 균주로부터 분리되거나, 또는 대부분의, 바람직하게는 모든 오염 캡슐 다당류로부터 정제될 수 있다. 이런 방법으로 수포내 LOS 컨쥬게이팅 반응이 훨씬 더 효과적이다.

[0102] 바람직하게는 수포에 존재하는 LOS의 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 또는 95 % 이상이 교차-결합/컨쥬게이팅된다.

[0103] 수포내 컨쥬게이팅은 바람직하게는 다음의 방법 단계중 1, 2 또는 3개 모두를 통합해야 한다: 컨쥬게이팅 pH는 pH 7.0 초과, 바람직하게는 pH 7.5 또는 그 이상이 되어야 한다 (가장 바람직하게는 pH 9 미만); 1 내지 5 %, 바람직하게는 2 내지 4 %, 가장 바람직하게는 약 3 %의 수크로스 조건이 반응 중에 유지되어야 한다; NaCl은 컨쥬게이팅 반응에서 최소화되어야 한다, 바람직하게는 0.1 M, 0.05 M, 0.01 M, 0.005 M, 0.001 M 이하, 가장 바람직하게는 전혀 존재하지 않는 것이다. 이들 방법상의 특징은 모두 수포가 안정하게 유지되고 컨쥬게이팅 방법 전체를 통해서 용액으로 유지되는 것을 보장한다.

[0104] EDAC/NHS 컨쥬게이팅 방법은 수포내 컨쥬게이팅에 바람직한 방법이다. EDAC/NHS는 너무 많이 교차결합할 수 있어서 여과 능력에 역효과를 가져올 수 있는 포름알데히드에 바람직하다. EDAC는 카르복실산 (예컨대 LOS중의 KDO)과 반응하여 활성-에스테르 중간체를 생성한다. 친핵성 아민(예컨대 PorB와 같은 외막 단백질의 리신)이 있을 때 아미드 결합은 이소우레아 부산물을 방출하면서 형성된다. 그러나 EDAC-매개된 반응의 효율은 술포-NHS 에스테르 중간체의 형성을 통하여 증가될 수 있다. 수용액중의 술포-NHS 에스테르는 EDAC 단독과 카르복실레이트와의 반응으로부터 형성된 활성 에스테르보다 더 오래 존재한다. 그로써 더 높은 수율의 아미드 결합 형성이 이 2-단계 방법을 사용하여 이루어질 수 있다. EDAC/NHS 컨쥬게이팅은 문헌에서 논의된다 (J.V. Staros, R. W. Wright and D. M. Swingle. 수용성 카보디이미드-매개된 커플링 반응의 N-히드록시숙신이미드에 의한 증강. Analytical chemistry 156:220-222 (1986); Biotconjugates Techniques. Greg T. Hermanson (1996) pp173-176). 바람직하게는 0.01 내지 5 mg의 EDAC/mg 수포, 보다 바람직하게는 0.05 내지 1 mg의 EDAC/mg 수포가 반응에 사용된다. 사용된 EDAC의 양은 샘플에 존재하는 LOS의 양에 좌우되고, 그것은 수포를 추출하기 위하여 사용된 데옥시콜레이트 (DOC) %에 좌우된다. 낮은 % (예컨대 0.1 %)의 DOC에서 많은 양 (1 mg/mg 및 그 이상)의 EDAC가 사용되지만, 보다 높은 % (예컨대 0.5 %)의 DOC에서는 너무 많은 수포내 교차결합을 피하기 위해 보다 적은 양 (0.025 내지 0.1 mg/mg)의 EDAC가 사용된다.

[0105] 그러므로 본 발명의 바람직한 방법은 수포내 컨쥬게이팅된 LOS (바람직하게는 수막구균의)를 제조하는 방법으로, 수포를 EDAC/NHS의 존재하에 pH 7.0과 pH 9.0 사이의 (바람직하게는 pH 7.5 정도의) pH에서, 1 내지 5 % (바람직하게는 약 3 %)의 수크로스에서, 및 임의로 실질적으로 NaCl을 피할 수 있는 조건에서 (상술된 바와 같이) 컨쥬게이팅시키는 단계와, 컨쥬게이팅된 수포를 반응 혼합물로부터 분리하는 단계로 이루어진다.

[0106] 반응은 반응 시간이 경과함에 따라 수포중의 LOS의 보다 큰 비율에 대한 LOS 분자량의 증가를 보기 위하여 항-LOS (예컨대 항-L2 또는 항-L3) mAb를 사용하여 반응 혼합물의 웨스턴 분리 겔 상에서 수행될 수 있다.

[0107] 99 % 수율의 수포가 그런 기법을 사용하여 회수될 수 있다.

[0108] EDAC는 그것이 개선된 LOS T-의존성 면역원성을 위해 OMP에 LOS를 충분히 교차결합시켰다는 점에서 우수한 수포내 교차결합제인 것으로 밝혀졌지만, 빈약한 여과 능력, 응집 및 수포내 교차 결합과 같은 문제가 크게 일어날 정도로는 교차결합시키지 못하였다. 생성된 수포의 형태학은 컨쥬게이팅되지 않은 수포의 그것과 유사하다 (전자 현미경에 의한 관찰). 또한 상기 프로토콜은 과도하게 높은 교차-결합이 일어나는 것을 피하였다 (그것은 예컨대 TbpA 또는 Hsf와 같은 수포의 표면에 천연적으로 존재하는 보호성 OMP의 면역원성을 감소시킬 수 있다).

[0109] 수포가 유래되는 수막구균 균주는 캡슐 다당류를 생성할 수 없는 돌연변이 균주인 것이 바람직하다 (예컨대 하

기에서 기술되는 돌연변이중 하나, 특히 siaD$^-$). 또한 수막구균 질병에 대해 효과적인 면역원성 조성물은 L2와 L3를 모두 포함하는 것이 바람직한데, 이 때 L2와 L3는 둘 다 수포 외막 단백질에 컨쥬게이팅된다. 나아가 수포내 컨쥬게이팅된 수포 내의 LOS 구조는 lgtB$^-$ 수막구균 균주 (하기 설명되는 것과 같음)로부터 유래된 것과 일치하는 것이 바람직하다. 가장 바람직한 것은 면역원성 조성물이 다음과 같은 수포내-컨쥬게이팅된 수포를 포함하는 것이다: 캡슐 다당류를 생성하지 못하고 lgtB$^-$인 돌연변이 수막구균으로부터 유래된 수포; 캡슐 다당류를 생성하지 못하는 돌연변이 수막구균 균주로부터 유래된 L2 및 L3 수포를 포함한 수포; lgtB$^-$인 돌연변이 수막구균으로부터 유래된 L2 및 L3를 포함하는 수포; 또는 가장 바람직하게는 캡슐 다당류를 생성하지 못하고 lgtB$^-$인 돌연변이 수막구균으로부터 유래된 2 및 L3를 포함하는 수포.

[0110] 본 발명에 사용될 수 없는 전형적인 L3 수막구균 균주는 H44/76 menB 균주이다. 전형적인 L2 균주는 B16B6 menB 균주 또는 39E 수막구균 타입 C 균주이다.

[0111] 상기에서 언급된 바와 같이, 본 발명의 수포는 컨쥬게이팅 작용에 의해 어느 정도, 더 이상의 해독이 필요없을 정도로 해독되었지만, 추가의 안전성을 위해, 예를 들면 htrB$^-$ 또는 msbB$^-$인 수막구균 균주로부터 유래된 수포를 사용하거나 폴리믹신B의 비독성 펩티드 기능적 동등물 [지질 A에 높은 친화력을 가지고 있는 분자](바람직하게는 SEAP 2)을 수포 조성물 (상기 설명된 것과 같은)에 첨가하는 추가의 해독 방법이 사용될 수 있다.

[0112] 상기 방식으로 실질적으로 비독성이고 자가 면역 문제를 피할 수 있으며, T-의존성 특징을 가지고 있고, 그것의 천연 환경에 존재하며, 90 % 이상의 수막구균 균주에 대하여 살균 항체 반응을 유도할 수 있는 (L2+L3 조성물의 경우에) LOS를 중요한 항원으로서 가지고 있는 수막구균의 수포와 수포를 포함하고 있는 면역원성 조성물이 제공된다.

[0113] 바람직하게는 수포내 LOS 컨쥬케이팅은 다음의 방법 단계중 1, 2 또는 3개 모두를 통합해야 한다: 컨쥬게이팅 pH는 pH 7.0 초과, 바람직하게는 pH 7.5 또는 그 이상이 되어야 한다 (가장 바람직하게는 pH 9 미만); 1 내지 5 %, 바람직하게는 2 내지 4 %, 가장 바람직하게는 약 3 %의 수크로스 조건이 반응 중에 유지되어야 한다; NaCl은 컨쥬게이팅 반응에서 최소화되어야 한다, 바람직하게는 0.1 M, 0.05 M, 0.01 M, 0.005 M, 0.001 M 이하, 가장 바람직하게는 전혀 존재하지 않는 것이다. 이들 방법상의 특징은 모두 수포가 안정하게 유지되고 컨쥬게이팅 방법 전체를 통해서 용액으로 유지되는 것을 보장한다.

[0114] 비록 LOS가 수포내에서 다양한 기법 및 화학에 의해 외막 단백질에 컨쥬게이팅될 수 있긴 하지만, EDAC/NHS 컨쥬게이팅 방법이 수포내 컨쥬게이팅에 바람직한 방법이다. EDAC/NHS는 너무 많이 교차결합할 수 있어서 여과 능력에 역효과를 가져올 수 있는 포름알데히드에 바람직하다. EDAC는 카르복실산과 반응하여 활성-에스테르 중간체를 생성한다. 친핵성 아민이 있을 때 아미드 결합은 이소우레아 부산물을 방출하면서 형성된다. 그러나 EDAC-매개된 반응의 효율은 술포-NHS 에스테르 중간체의 형성을 통하여 증가될 수 있다. 수용액중의 술포-NHS 에스테르는 EDAC 단독과 카르복실레이트와의 반응으로부터 형성된 활성 에스테르보다 더 오래 잔류한다. 그로써 더 높은 수율의 아미드 결합 형성이 이 2-단계 방법을 사용하여 이루어질 수 있다. EDAC/NHS 컨쥬게이팅은 문헌에서 논의된다 (J.V. Staros, R. W. Wright and D. M. Swingle. 수용성 카보디이미드-매개된 커플링 반응의 N-히드록시숙신이미드에 의한 증강. Analytical chemistry 156:220-222 (1986); Biotconjugates Techniques. Greg T. Hermanson (1996) pp173-176).

[0115] 그러므로 본 발명의 바람직한 방법은 수포내 컨쥬게이팅된 LOS (바람직하게는 수막구균의)를 제조하는 방법으로, 수포를 EDAC/NHS의 존재하에 pH 7.0과 pH 9.0 사이의 (바람직하게는 pH 7.5 정도의) pH에서, 1 내지 5 % (바람직하게는 약 3 %)의 수크로스에서, 및 임의로 실질적으로 NaCl을 피할 수 있는 조건에서 (상술된 바와 같이) 컨쥬게이팅시키는 단계와, 컨쥬게이팅된 수포를 반응 혼합물로부터 분리하는 단계로 이루어진다.

[0116] 반응은 반응 시간이 경과함에 따라 수포중의 LOS의 보다 큰 비율에 대한 LOS 분자량의 증가를 보기 위하여 항-LOS (예컨대 항-L2 또는 항-L3) mAb를 사용하여 반응 혼합물의 웨스턴 분리 겔 상에서 수행될 수 있다.

[0117] 99 % 수율의 수포가 그런 기법을 사용하여 회수될 수 있다.

[0118] EDAC는 그것이 개선된 LOS T-의존성 면역원성을 위해 OMP에 LOS를 충분히 교차결합 시켰다는 점에서 우수한 수포내 교차결합제인 것으로 밝혀졌지만, 빈약한 여과 능력 및 수포내 교차 결합과 같은 문제가 크게 일어날 정도로는 교차결합시키지 못하였다. 생성된 수포의 형태학은 컨쥬게이팅되지 않은 수포의 그것과 유사하다. 너무 많은 교차-결합은 또한 예컨대 TbpA와 같은 수포의 표면에 천연적으로 존재하는 보호성 OMP의 면역원성의 어떠

한 감소든지 피하기 위해 피해야만 한다.

[0119] 5. *내재성 외막 단백질*

[0120] 나이세리아 단백질의 다른 범주는 또한 본 발명의 나이세리아 백신에의 포함을 위한 후보일 수 있으며, 놀랄만큼 효과적인 방식으로 다른 항원과 조합될 수 있다. 막 결합 단백질, 특히 통합 막 단백질과 가장 유익하게는 외막 단백질, 특히 내재성 외막 단백질이 본 발명의 조성물에 사용될 수 있다. 그러한 단백질의 실예는 또한 Omp1A로도 알려져 있는 PldA (NMB0464)(WO00/15801)로, 그것은 나이세리아 포스포리파제 외막 단백질이다. 추가의 실예로는 다음과 같은 것들이 있다: TspA (NMB0341)(Infect. Immun. 1999, 67;3533-3541) 및 TspB (T-세포 자극 단백질)(WO 00/03003; NMB1548, NMB1628 또는 NMB1747). 추가의 실예로는 다음과 같은 것들이 있다: PilQ (NMB1812)(WO 99/61620), OMP85 -또한 D15로도 알려져 있음- (NMB0182)(WO00/23593), NspA (U52066)(WO96/29412), FhaC (NMB0496 또는 NMB1780), PorB (NMB2039)(Mol. Biol. Evol. 12;363-370, 1995), HpuB (NC_003116.1), TdfH (NMB1497)(Microbiology 2001, 147;1277-1290), OstA (NMB0280), GNA 33 및 Lipo30으로도 알려져 있는 MltA (NMB0033), HtrA (NMB0532; WO99/55872), HimD (NMB1302), HisD (NMB1581), GNA 1870 (NMB1870), HlpA (NMB1946), NMB1124, NMB1162, NMB1220, NMB1313, NMB1953, HtrA, TbpA (NMB0461)(WO92/03467)(철 획득 단백질 단원 참조) 및 LbpA (NMB1541).

[0121] **OMP85**

[0122] 본 발명의 면역원성 조성물은 전장의 OMP85를, 바람직하게는 OMV 제제의 일부로서 포함할 수 있다. OMP85의 단편은 또한 발명의 면역원성 조성물에 사용될 수 있으며, 특히 아미노산 잔기 1-475 또는 50-475로 구성된 OMP85의 표면 노출 도메인은 바람직하게도 본 발명의 면역원성 조성물의 서브유니트 성분으로 통합된다. OMP85의 표면 노출 도메인에 대한 상기 서열은 N 또는 C 말단의 어느 한 쪽에서 또는 양 쪽 모두에서 1, 3, 5, 7, 10, 15, 20, 25, 또는 30 아미노산만큼 연장 또는 트렁케이팅될 수 있다. 신호 서열이 OMP85 단편으로부터 생략되는 것이 바람직하다.

[0123] **OstA**

[0124] OstA는 지질다당류의 합성에서 작용하고 독성의 조절제로서 간주될 수 있다. 또는 달리 OstA는 독소 범주가 독소 뿐 아니라 독성의 조절제도 함유하는 것으로 확장된다면 독소 범주에 포함될 수 있다.

[0125] 면역원성 조성물

[0126] 면역원성 조성물은 숙주에 투여될 때 면역 반응을 생성할 수 있는 하나 이상의 항원을 포함하고 있는 조성물이다. 바람직하게도 그러한 면역원성 제제는 나이세리아, 바람직하게는 나이세리아 메닌기티디스 또는 나이세리아 고노레아 감염에 대한 보호성 면역 반응을 생성할 수 있다.

[0127] 본 발명은 바람직하게는 하나 이상의 상승작용적 살균, 보호, 또는 점착 차단 반응을 유도하는 항원을 최소한 2개 포함하는 면역원성 조성물에 관한 것이다.

[0128] *발명의 SBA 살균 분석*

[0129] 그러한 상승작용적 반응은 각 항원이 개별적으로 유도한 SBA보다 최소한 50 %, 2배, 3배, 바람직하게는 4배, 5배, 6배, 7배, 8배, 9배, 가장 바람직하게는 10배 더 높은 SBA가 항원의 조합에 의해 유도됨을 특징으로 할 수 있다. 바람직하게도 SBA는 항원이 유래되는 동종성 균주에 대하여 측정되고 바람직하게는 또한 이종성 균주의 패널에 대해서도 측정된다. (대표적인 패널, 예컨대 A-4 클러스터에 속하는 BZ10 (B:2b:P1.2); ET-37 복합체에 속하는 B16B6 (B:2a:P1.2); 및 H44/76 (B:15:P1.7,16)에 대해서는 하기 참조). SBA는 수막구균의 백신의 효능을 평가하기 위한, 가장 통상적으로 승인된 면역학적 마커이다 (Perkinsos et al., J Infect Dis. 1998, 177:683-691). 만족스러운 SBA는 공지된 어떠한 방법에 의해서도 확인될 수 있다. SBA는 동물 모델로부터 (실시예 17 내지 20), 또는 사람 대상으로부터 얻어진 혈청을 사용하여 수행될 수 있다.

[0130] 사람 혈청으로 SBA를 수행하는 바람직한 방법은 다음과 같다. 혈액 샘플을 첫 번째 예방접종 전, 두 번째 예방접종 후 2달 후, 및 세 번째 예방접종 후 1달 후에 취한다 (1년에 3회의 예방접종은 예를 들면 0, 2, 및 4개월, 또는 0, 1, 및 6개월에 투여되는 전형적인 사람 기본 예방접종 스케줄이다). 그러한 사람 기본 예방접종 스케줄은 1살 이전의 유아에 대해 수행될 수 있으며 (예컨대 Hib 예방접종과 동시에 수행된다) 또는 2 내지 4살 아이 또는 청년은 그러한 기본 예방접종 스케줄로 SBA를 시험하기 위하여 예방접종될 수 있다. 추가의 혈액 샘플은 기본 예방접종 후 6 내지 12 개월에 및 필요에 따라 추가 면역 후 1달 후에 취해질 수 있다.

[0131] 만약 세 번째 예방접종 (기본 예방접종 스케줄의) 후 1달 후에 (2 내지 4살 아이, 또는 청년에서, 그러나 바람직하게는 1살 이전의 유아에서) 본 발명의 항원이 유래된 수막구균의 균주에 대한 SBA (항체 희석) 역가의 견지에서 (예방접종 전 역가와 비교하여) 역가가 4배 증가된 피실험자의 백분율이 대상의 30 % 초과, 바람직하게는 40 % 초과, 보다 바람직하게는 50 % 초과, 가장 바람직하게는 60 % 초과라면, 동종성 살균 활성을 가지는 항원 또는 수포 제제에 대해 SBA는 만족스러운 것일 것이다.

[0132] 물론 이종성 살균 활성을 가지는 항원 또는 수포 제제가 또한 그것이 유래되는 수막구균 균주에 대해 만족스러울 만한 SBA를 유도할 수 있다면 그것은 이종성 살균 활성을 가지는 수포 제제를 구성할 수 있다.

[0133] 만약 세 번째 예방접종 (기본 예방접종 스케줄의) 후 1달 후에 (2 내지 4살 아이, 또는 청년에서, 그러나 바람직하게는 1살 이전의 유아에서) 본 발명의 항원이 유래된 수막구균의 균주에 대한 SBA (항체 희석) 역가의 견지에서 (예방접종 전 역가와 비교하여) 역가가 4배 증가된 피실험자의 백분율이 대상의 20 % 초과, 바람직하게는 30 % 초과, 보다 바람직하게는 35 % 초과, 가장 바람직하게는 40 % 초과라면, 이종성 살균 활성을 가지는 항원 또는 수포 제제에 대해 SBA는 만족스러운 것일 것이다. 그러한 시험은 이종성 살균 활성을 가지는 항원 또는 수포 제제가 다양한 수막구균 균주에 대하여 교차-살균 항체를 유래할 수 있는지의 여부에 대한 좋은 표식이다. 바람직하게는 3가지 이종성 균주는 상호간에 및 바람직하게는 이종성 살균 활성을 가지는 항원 또는 수포 제제가 제조되거나 유래되는 균주 간에 상이한 전기영동적 유형의 (ET)-복합체 또는 다중 유전자좌 서열 유형 분류 (MLST) 패턴을 가져야 한다 (Maiden et al., PNAS USA 1998, 95:3140-3145). 당업자는 수막구균 중에서, 특히 중요한 질병의 원인인 것으로서 인지되는 및/또는 인지된 MenB 과대-악성 계통을 나타내는 (Maiden et al., 상기 동일) 수막구균 유형 B 균주들 중에서 관찰된 유전적 다양성을 반영하는 상이한 ET-복합체를 가지는 3 가지 균주를 쉽게 측정할 수 있을 것이다. 예를 들어 사용될 수 있는 3가지 균주는 다음과 같다: A-4 클러스터에 속하는 BZ10 (B:2b:P1.2); ET-37 복합체에 속하는 B16B6 (B:2a:P1.2); 및 ET-5 복합체에 속하는 H44/76 (B:15:P1.7,16), 또는 동일한 ET/클러스터에 속하는 어떠한 다른 균주들. 그러한 균주는 예를 들면 ET-5 복합체에 속하는 수막구균 CU385 (B:4:P1.15)로부터 제조되거나 유도된 이종성 살균 활성을 가지는 항원 또는 수포 제제를 시험하기 위해 사용될 수 있다. 사용될 수 있는 다른 샘플 균주는 계통 3 전염병 클론 (예컨대 NZ124 [B:4:P1.7,4])으로부터 유래된다. 다른 ET-37 균주는 NGP 165 (B:2a:P1.2)이다.

[0134] SBA 활성을 측정하기 위한 방법은 당해 기술 분야에 공지이다. 예를 들면 사용될 수 있는 방법이 WO 99/09176의 실시예 10C에 기재되어 있다. 일반적인 관점에서 시험하고자 하는 균주의 배양물은 성장의 로그 단계에서 성장된다 (바람직하게는 EDDA와 같은 철 킬레이터를 성장 배지에 첨가함으로써 철-고갈 조건에서). 이것은 대략 20000 CFU/ml로 조정된 작동하는 세포 현탁액을 얻기 위하여 BSA가 첨가된 배지 (예컨대 0.3 % BSA가 첨가된 행크 배지)에서 현탁될 수 있다. 일련의 반응 혼합물은 시험하고자 하는 혈청 (바람직하게는 56 ℃에서 30분 동안 열-비활성화됨)[예컨대 50 ㎕/웰 부피로] 및 시험하고자 하는 20000 CFU/ml 수막구균 균주 현탁액 [예컨대 25 ㎕/웰 부피로]의 연속적인 2-배 희석액을 혼합하여 제조할 수 있다. 반응 바이알은 인큐베이션되고 (예컨대 37 ℃에서 15분 동안) 흔들어주어야 한다 (예컨대 210 rpm에서). 최종 반응 혼합물 [예컨대 100 ㎕ 부피]은 부가적으로 보체 공급원 [예컨대 25 % 최종 부피의 예비시험된 어린 토끼 혈청]을 함유하며, 상기와 같이 인큐베이션된다 [예컨대 37 ℃에서 60분 동안]. 이 분석을 위해 멸균 폴리스티렌 U-자형 바닥 96-웰 미소역가 플레이트가 사용될 수 있다. 다중 채널 피펫을 사용하여 각 웰로부터 일정액 [예컨대 10 ㎕]을 취하여 Mueller-Hinton 아가 플레이트 (바람직하게는 1 %의 이소비탈렉스와 1 %의 열-비활성화된 말 혈청이 함유되어 있음) 위에 떨어뜨린 후, 인큐베이션된다 (예컨대 18 시간 동안 37 ℃에서 및 5 % CO_2 중에서). 바람직하게는 개별적인 집락이 일정액당 80 CFU 까지 계수될 수 있다. 대조 표준으로서 다음의 3 가지 시험 샘플이 사용될 수 있다: 완충액+박테리아+보체; 완충액+박테리아+비활성화된 보체; 혈청+박테리아+비활성화된 보체. SBA 역가는 회귀 계산에 의하여 세포 죽음의 50 %에 상응하는 희석액의 측정을 제공하기 위하여 데이터를 처리하는 프로그램을 사용하여 직접적으로 계산될 수 있다.

[0135] *동물 보호 분석*

[0136] 또는 달리 동물 보호 분석에서 상승작용적 반응은 항원 조합의 효능을 특징으로 할 것이다. 예를 들어 실시예 12 또는 13에서 설명되는 분석이 사용될 수 있다. 바람직하게도 항원의 조합에 의해 보호되는 동물의 수는 항원을 그 자체로, 특히 항원을 차선 용량으로 사용하여 얻어진 것과 비교하여 상당히 개선된다.

[0137] N. 고노(N. gono)에 의한 감염의 예방에 성공적인 백신은 다음 엘레먼트들 중 하나 이상을 필요로 할 것이다: 임균의 보체 매개된 죽음을 촉진하기 위하여, 및/또는 다형핵 백혈구와 같은 백혈구에 의한 식균 작용 및 미생물 죽음을 증강시키기 위하여, 및/또는 숙주 조직에 임균의 부착을 방지하기 위하여 혈청 및/또는 점막 항체의

생성; 세포 매개된 면역 반응의 유도도 또한 보호에 참여할 것이다.

[0138] 본 발명의 수포 고노 백신 제제의 효능의 개선은 다른 사람들에 의해 설명된 바와 같이 항점착성, 및/또는 옵소닌화하는 성질, 및/또는 살균 활성을 가지는 혈청 및/또는 점막 항체에 대한 유도된 면역 반응을 분석함으로써 평가될 수 있다 (McChesney D et al., Infect. Immun. 36:1006, 1982; Boslego J et al: Efficacy trial of a purified gonococcal pilus vaccine, in Program and Abstracts of the 24th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Washington, American Society for Microbiology, 1984; Siegel M et al., J. Infect. Dis 145:300, 1982; de la Pas, Microbiology, 141 (Pt4):913-20, 1995).

[0139] N. 고노에 의한 질 감염된 마우스 모델이 최근에 설명되었다 (Plante M, J. Infect. Dis., 182:848-55, 2000). 본 발명의 수포 고노 백신의 효능의 개선은 이 마우스 감염 모델에서 N. 고노에 의한 집락화를 방지 또는 감소시키는 능력에 의해 평가될 수 있다.

[0140] *점착 차단 분석*

[0141] 또는 달리 상승작용적 반응은 점착 차단 분석에서 항원 조합의 효능을 특징으로 할 수 있다. 예를 들어 실시예 11에서 설명된 분석이 사용될 수 있다. 바람직하게도 항원 조합에 대해 생성된 항혈청에 의해 유도된 차단의 크기는 항원을 그 자체로, 특히 항원을 차선 용량으로 사용하여 얻어진 것과 비교하여 상당히 개선된다.

[0142] 서브유니트 조성물

[0143] 본 발명의 면역원성 조성물은 서브유니트 조성물일 수 있다. 서브유니트 조성물은 구성 성분들이 항원 조성물을 형성하기 위하여 혼합되기 전에 분리되고 최소한 50 %, 바람직하게는 최소한 60 %, 70 %, 80 %, 90 % 순도로 정제된 조성물이다.

[0144] 본 발명의 면역원성 서브유니트 조성물은 바람직하게는 다음 목록으로부터 선택되는 2개 이상의 항원을 포함한다: FhaB, PilC, Hsf, Hap, NadA, OMP85, IgA 프로테아제, AspA, AspA의 패신저 도메인, Hsf의 패신저 도메인, Hap의 패신저 도메인, FrpA, FrpC, TbpA, TbpB, LbpA, LbpB, HpuA, HpuB, TspA, TspB, PldA, PilQ, FhaC, NspA, 및 LPS 면역형 L2 및 LPS 면역형 L3 중 어느 하나 또는 둘 다.

[0145] 서브유니트 조성물은 수용성 단백질의 수용액일 수 있다. 그것들은 항원의 소수성 부분을 녹이기 위하여 계면활성제, 바람직하게는 비-이온성, 쯔비터 이온성 또는 이온성 계면활성제를 포함할 수 있다. 조성물은 리포솜 구조가 형성되어 지질 막 주변을 회전하는 구조를 가지는 항원을 제공할 수 있도록 지질을 포함할 수 있다.

[0146] 외막 소포 제제

[0147] N. 메닌기티디스 혈청군 B (menB)는 외막 수포를, 그것의 산업적 규모의 제조를 충분히 가능하게 하는 양으로 분비한다. 외막 소포는 또한 박테리아 세포의 계면활성제 추출 방법을 통하여 제조될 수 있다 (예컨대 EP 11243).

[0148] 본 발명의 면역원성 조성물은 또한 재조합적으로 또는 철-고갈 조건하에서의 성장을 포함한 다른 수단에 의해 상향 조절된 2개 이상의 항원을 가지고 있는 외막 소포 제제를 포함할 수 있다. 그러한 외막 소포 제제에서 상향 조절될 수 있는 항원의 실예는 다음과 같다: NspA, Hsf, Hap, OMP85, 고분자량 TbpA, 저분자량 TbpA, LbpA, TbpB, LbpB, PilQ, AspA, TdfH, PorB, HpuB, P2086, NM-ADPRT, MafA, MafB 및 PldA. 그러한 제제는 또한 LPS 면역형 L2 및 LPS 면역형 L3 중 어느 하나 또는 두 가지 모두를 임의로 포함할 수 있다.

[0149] 나이세리아 균주로부터 수포 제제의 제조는 당업자가 잘 알고 있는 어떠한 방법에 의해서든지 이루어질 수 있다. 바람직하게는 다음의 문헌에 개시된 방법들이 사용된다: EP 301992, US 5,597,572, EP 11243 또는 US 4,271,147, Frederikson et al. (NIPH Annals [1991], 14:67-80), Zollinger et al. (J. Clin. Invest. [1979], 63:836-848), Saunders et al. (Infect. Immun. [1999], 67:113-119), Drabick et al. (Vaccine [2000], 18:160-172) 또는 WO01/09350 (실시예 8)). 일반적으로 OMV는 계면활성제, 바람직하게는 데옥시콜레이트로 추출되고, 핵산은 임의로 효소적으로 제거된다. 정제는 초원심분리와 임의로 크기 축출 크로마토그래피에 의해 이루어진다. 만약 본 발명의 2 또는 그 이상의 상이한 수포가 포함된다면, 그것들은 단일 용기에서 조합되어 발명의 다가 제제를 형성할 수 있다 (제제가 발명의 상이한 수포들이 숙주에게 동시에 [동시에 의사 방문] 투여되는 별도의 용기에 담긴 별도의 조성물인 경우에 제제는 다가로 간주되는 경우도 있다). OMV 제제는 보통 0.2 ㎛ 필터를 통과하는 여과에 의해 멸균되며, 바람직하게는 수포 제제를 안정화시키는 것으로 알려진 수크로스 용액 (예컨대 3 %)에 저장된다.

[0150] 외막 소포 제제 내에서 단백질의 상향 조절은 OMV 제제가 유래되는 나이세리아 균주에 유전자의 외부 복사물을 삽입함으로써 이루어질 수 있다. 또는 달리 유전자의 프로모터가 OMV 제제가 유래되는 나이세리아 균주에서 보다 강력한 프로모터로 교환될 수 있다. 그러한 기법은 WO01/09350에 설명되어 있다. 단백질의 상향 조절은 변형되지 않은 N. 메닌기티디스 (예컨대 균주 H44/76)으로부터 유래된 OMV에 존재하는 단백질 수준에 비교하여 OMV에 존재하는 단백질의 수준을 더 높게 유도할 것이다. 바람직하게는 그 수준은 1.5, 2, 3, 4, 5, 7, 10 또는 20배 더 높을 것이다.

[0151] LPS가 OMV의 추가 항원으로 의도되는 경우 저농도의 추출용 계면활성제 (예컨대 데옥시콜레이트 또는 DOC)를 사용하는 프로토콜이, 바람직하게도 고수준의 결합된 LPS는 보존하면서 특별히 빈약하게 결합된 독성 LPS는 제거하기 위하여 OMV 제조 방법에 사용될 수 있다. 사용된 DOC의 농도는 바람직하게는 0-0.5 % DOC, 0.02-0.4 % DOC, 0.04-0.3 % DOC, 보다 바람직하게는 0.06 %-0.2 % DOC 또는 0.08-0.15 % DOC, 가장 바람직하게는 약 또는 정확히 0.1% DOC 이다.

[0152] "더 강력한 프로모터 서열"이란 관심의 항원을 엔코딩하는 유전자에 대한 전사를 증가시키는 조절 제어 엘레먼트를 말한다.

[0153] "상향 조절 발현"은 변형되지 않은 (즉 천연 발생의) 수포의 항원 발현과 관련하여 관심의 항원 발현을 증강시키는 모든 수단을 말한다. '상향 조절'의 양은 관심의 특별한 항원에 따라 달라지겠지만, 수포의 막 통합성을 파괴할 양을 초과하지는 않을 것이다. 항원의 상향 조절이란 변형되지 않은 수포의 발현보다 최소한 10 % 더 높은 발현을 말한다. 바람직하게는 그것은 최소한 50 % 더 높다. 보다 바람직하게는 최소한 100 % (2배) 더 높다. 가장 바람직하게는 3, 4, 5, 7, 10, 20배 더 높다. 또는 달리 또는 부가적으로 상향 조절되는 발현은 대사상의 또는 영양상의 변화에 대해, 특히 TbpA, TbpB, LbpA 및 LbpB의 경우에 비-조건적인 발현을 계속 하게 하는 것을 말한다. 바람직하게는 발현 수준은 수포가 철이 제한된 조건 (예컨대 철 킬레이터의 존재)에서 성장된 박테리아로부터 유래되었을 때 평가된다.

[0154] 다시 한번 목적을 분명히 하기 위해, 용어 '상기 항원을 덜 생성하도록 박테리아 균주를 공학 처리하는 것' 또는 하향 조절이라 함은, 바람직하게는 결실에 의하여 발현이 변형되지 않은 수포의 그것보다 최소한 10 % 더 낮도록, 변형되지 않은 (즉 천연 발생의) 항원 발현과 관련하여 관심의 항원 발현 (또는 기능적인 유전자 생성물의 발현)을 감소시키는 모든 수단을 말한다. 바람직하게는 발현이 최소한 50 % 더 낮은 것이며, 가장 바람직한 것은 발현이 완전히 없는 것이다. 만약 하향 조절된 단백질이 효소 또는 기능성 단백질이라면, 하향 조절은 10 %, 20 %, 50 %, 80 % 또는 바람직하게는 100 %의 효소적 또는 기능적 활성의 감소를 초래하는 하나 이상의 돌연변이를 도입함으로써 이루어질 수 있다.

[0155] 나이세리아 단백질의 발현을 조절하기 위해 필요한 공학 처리 단계는 당업자에게 공지되어 있는 다양한 방법으로 수행될 수 있다. 예를 들어 서열 (예컨대 프로모터 또는 오픈 리딩 프레임)이 삽입되거나, 프로모터/유전자가 트랜스포존 삽입 기법에 의해 파괴될 수 있다. 예를 들어 유전자 발현의 상향 조절을 위해서는 강력한 프로모터가 유전자의 개시 코돈의 대략 2 kb 상류 (보다 바람직하게는 200 내지 600 bp 상류, 가장 바람직하게는 대략 400 bp 상류)에 있는 트랜스포존을 경유하여 삽입될 수 있다. 점 돌연변이 또는 결실이 또한 사용될 수 있다 (특히 유전자의 하향 조절 발현의 경우).

[0156] 그러나 그러한 방법들은 꽤 불안정하거나 불확실할 수 있고, 따라서 공학 처리 단계가 동종성 재조합 사건을 통해 수행되는 것이 바람직하다. 바람직하게는 그런 사건은 박테리아 염색체상의 최소한 30 누클레오티드의 서열 (재조합 발생(recombinogenic) 영역)과 균주 내에서 형질 전환된 벡터상의 최소한 30 누클레오티드의 서열 (두번째 재조합 발생 영역) 사이에서 일어난다. 바람직하게도 영역의 길이는 40 내지 1000 누클레오티드, 보다 바람직하게는 100 내지 800 누클레오티드, 가장 바람직하게는 500 누클레오티드이다. 이들 재조합 발생 영역은 그것들이 매우 엄격한 조건하에서 상호간에 혼성화할 수 있을 정도로 충분히 유사해야 한다.

[0157] 본원에서 설명되는 유전자 변형 사건 (예컨대 재조합 사건 및 추가의 유전자 서열의 나이세리아 게놈안으로의 도입에 의한 유전자의 상향 조절 또는 하향 조절)을 수행하기 위하여 사용된 방법들은 WO01/09350에 기재되어 있다. 나이세리아에 통합될 수 있는 전형적인 강력한 프로모터는 *porA*, *porB*, *lgtF*, Opa, *p110*, *lst*, 및 *hpuAB*이다. PorA와 PorB가 구성성의 강력한 프로모터로서 바람직하다. PorB 프로모터 활성은 *porB*의 개시 코돈의 누클레오티드-1 내지 -250 상류에 상응하는 단편에 함유되도록 수립되었다.

[0158] 철 제한 배지에서의 성장에 의한 항원 발현의 상향 조절

[0159] 본 발명의 외막 소포 제제의 일부 항원의 상향 조절은 바람직하게는 철 제한 조건하에 성장된 나이세리아의 원

(parental) 균주로부터 외막 소포를 분리함으로써 이루어진다. 배지 중의 저농도의 철은 TbpA, TbpB, LbpA, LbpB, HpuA, HpuB 및 P2086을 포함하여 철 획득에 관련된 단백질의 증가된 발현을 초래할 것이다. 그로써 이들 단백질의 발현은 예를 들면 더 강력한 프로모터의 삽입 또는 유전자의 추가의 복사물의 삽입을 필요로 하지 않고서도 상향 조절된다. 본 발명은 또한 유전자가 재조합적으로 변형된 경우에 철 제한 배지에서의 성장에 의한 철 획득 단백질의 상향 조절을 포함할 것이다.

[0160] 철 제한은 배양 배지에 철 킬레이터를 첨가함으로써 이루어진다. 적절한 철 킬레이터로는 2,2-디피리딜, EDDHA (에틸렌디아민-디(o-히드록시페닐아세트산) 및 데스페랄 (데페록사민 메실레이트, Sigma)이 있다. 데스페랄이 바람직한 철 킬레이터이고 배양 배지에 10 내지 100 μM 사이의 농도, 바람직하게는 25 내지 75 μM, 보다 바람직하게는 50 내지 75 μM, 가장 바람직하게는 60 μM의 농도로 첨가된다. 배지의 철 함량은 기본적으로는 효모 추출물과 콩 펩톤 구성성분으로부터 온 것이며, 존재하는 양은 배치마다 달라질 것이다. 그러므로 상이한 농도의 데스페랄이 상이한 배지의 배치에서 철 획득 단백질의 상향 조절을 이루기 위해 최적일 것이다. 숙련가들은 최적 조건을 쉽게 결정할 수 있어야 한다. 기본적인 관점에서 원하는 철-조절된 단백질의 발현을 상향 조절하기 위해서는 배지에 충분한 양의 철 킬레이터가 첨가되어야 하지만, 박테리아의 성장에 불리한 영향을 줄 정도로 많아서는 안된다.

[0161] 바람직하게도 철 제한된 조건하에서의 성장에 의한 철 획득 단백질의 상향 조절은 다른 항원의 재조합 상향 조절과 조합되어 본 발명의 외막 소포가 이루어진다.

[0162] 가변적이거나 비-보호적인 면역 우세한 항원의 하향 조절/제거

[0163] 많은 표면 항원들이 박테리아 균주들 중에서 가변적이고, 그 결과로서 밀접하게 관련된 균주의 제한된 세트에 대해서만 보호적이다. 본 발명의 측면은 다른 단백질의 발현이 감소되거나, 또는 바람직하게는 가변 표면 단백질(들)을 엔코딩하는 유전자(들)이 결실된 본 발명의 외막 소포를 포함한다. 그러한 결실은 백신으로 투여될 때 백신의 면역 시스템상에 보존된 단백질 (외막에 보유된)에 의해 발휘된 보다 강력한 영향으로 인해 다양한 균주에 대한 보다 강력한 잠재적인 교차반응성을 가지는 수포를 생성하는 박테리아 균주를 초래한다. 본 발명의 수포 면역원성 조성물에서 하향 조절될 수 있는, 나이세리아의 그러한 가변 항원의 실예로는 PorA, PorB, Opa가 있다.

[0164] 하향 조절되거나 작동 중지될 수 있는 유전자의 다른 유형은 생체내에서 박테리아에 의해 쉽게 작동이 개시되거나 (발현) 또는 중지될 수 있는 유전자들이다. 그러한 유전자에 의해 엔코딩된 외막 단백질이 언제나 박테리아에 존재하는 것이 아니기 때문에, 수포 제제에 그러한 단백질이 존재하는 것은 또한 상기 언급된 이유 때문에 백신의 효력에 손해를 끼칠 수 있다. 하향 조절 또는 결실에 대한 바람직한 실예는 나이세리아 Opc 단백질이다. Opc 함유 수포 백신에 의해 유도된 항-Opc 면역성은 유기체를 감염시키는 것이 쉽게 Opc^-로 될 수 있기 때문에 단지 제한된 보호 능력을 가질 것이다.

[0165] 예를 들어 이들 가변적인 또는 비-보호성 유전자들은 발현에서 하향 조절되거나, 또는 궁극적으로는 작동 중지될 수 있다. 이것은 수포의 외막상에 소량으로 존재하는 좀 더 나은 항원에 대해 면역 시스템을 농축시키는 장점을 갖는다. 하향 조절은 또한 상기 외막 단백질의 표면 노출되고 가변적인, 면역우세한 루프가 면역적으로 덜 우세한 외막 단백질을 초래하도록 변경되거나 결실될 수 있다는 것을 의미한다.

[0166] 발현의 하향 조절에 대한 방법은 WO01/09350에 개시되어 있다. 본 발명의 수포 면역원성 조성물에서 하향 조절될 단백질의 바람직한 조합은 PorA와 OpA; PorA와 OpC; OpA와 OpC; PorA와 OpA 및 OpC 이다.

[0167] 4가지의 상이한 Opa 유전자가 수막구균 게놈에 존재하는 것으로 알려져 있고 (Aho et al. 1991 Mol. Microbiol. 5:1429-37), 따라서 Opa는 발현이 하향 조절된다고 말할 수 있는데, 그것은 바람직하게는 수막구균에 존재하는 1, 2, 3, 또는 (바람직하게는) 4개의 유전자가 모두 하향 조절된다는 것을 의미한다. 그러한 하향 조절은 WO 01/09350에서 설명된 것과 같이 유전학적으로 수행되거나 Opa 유전자좌로부터의 발현이 없거나 낮은, 쉽게 발견되고 천연의 안정한 수막구균 균주를 발견함으로써 수행될 수 있다. 그런 균주는 풀만 등에 의해 설명된 기법을 사용하여 발견될 수 있는데 (Poolman et al.,1985, J. Med. Micro. 19:203-209), Opa^-인 세포는 플레이트상에서 또는 현미경 하에서 세포의 외관을 볼 때 찾을 수 있는 Opa를 발현하는 세포와는 상이한 표현형을 갖는다. 일단 발견되면 그 균주는 Opa의 결핍을 확립하기 위하여 발효시킨 후에 세포 내용물에 대해 웨스턴 블롯을 수행함으로써 안정하게 Opa^-인 것으로 밝혀질 수 있다.

[0168] 외막 소포의 일부 항원의 상향 조절이 철 제한 조건하에서의 성장에 의해 이루어지는 경우에, 가변적인 단백질

FrpB (Microbiology 142;3269-3274, (1996); J. Bacteriol. 181;2895-2901 (1999))가 또한 상향 조절될 수 있다. 본 발명자들은 WO 01/09350에서 설명된 바와 같이 전체 단백질의 하향 조절되는 발현에 의해 또는 FrpB의 가변 영역(들)의 결실에 의해 이들 환경 하에서 FrpB의 발현을 하향 조절하는 것이 유익하다는 것을 발견하였다. 이것은 면역원성 조성물에 의해 유도된 면역 반응이 광범위한 균주에 존재하는 항원들에 직접적으로 향해 있음을 보장할 것이다. FrpB의 하향 조절은 바람직하게는 본 발명의 수포 면역원성 조성물에서 PorA와 OpA; PorA와 OpC; OpA와 OpC; PorA와 OpA 및 OpC의 하향 조절과 조합된다.

[0169] 발명의 또 다른 구체예에서 FrpB는 철 제한 조건하에서 성장되지 않은 나이세리아 균주로부터 제조된 외막 소포에서도 하향 조절된다.

[0170] LPS의 해독

[0171] 본 발명의 면역원성 조성물의 수포는 WO01/09350에 개시된 LPS의 해독 방법을 통하여 해독될 수 있다. 본 발명의 LPS의 해독을 위한 구체적인 방법은 WO01/09350에 개시된 htrB 및/또는 msbB 효소의 하향 조절/결실을 포함한다. 나이세리아의 msbB 및 htrB 유전자는 또한 각각 lpxL1과 lpxL2로 불리고 (WO 00/26384) 이들 유전자의 결실 돌연변이는 하나의 이차 아실 사슬을 잃어버린 msbB- 돌연변이 LOS에 의해 표현형적인 특징을 나타내며, htrB- 돌연변이 LOS는 두 개의 이차 아실 사슬을 잃어버리는 것을 특징으로 한다. WO93/14155 및 WO95/03327에는 본 발명의 조성물에 사용될 수 있는 폴리믹신 B의 비독성 펩티드 기능적 동등물이 기재되어 있다.

[0172] 그러한 방법들은 바람직하게는 저수준의 DOC, 바람직하게는 0-0.3 %의 DOC, 보다 바람직하게는 0.05 %-0.2 %의 DOC, 가장 바람직하게는 약 또는 정확하게 0.1 % DOC를 포함하는 수포 추출 방법과 조합된다. 나아가 LPS 해독 방법은 상기에서 설명된 것과 같은 폴리믹신 B의 비독성 펩티드 기능 동등물 (바람직하게는 SAEP 2)을 수포 제제에 첨가하는 것을 포함한다.

[0173] 교차 반응성 다당류

[0174] 캡슐화된 그람-네가티브 박테리아로부터 박테리아 외막 수포를 분리하는 방법은 종종 캡슐 다당류의 공동-정제를 초래한다. 어떤 경우에 이 "오염" 물질은 다당류가 다른 수포 성분들에 의해 제공되는 면역 반응을 증강시킬 수 있기 때문에 유용한 것으로 증명되기도 한다. 그러나 다른 경우에는 박테리아 수포 제제 중에 오염시키는 다당류 물질의 존재가 백신의 수포 사용에 해가 될 수도 있다고 입증된다. 예를 들어 최소한 N. 메닌기티디스의 경우에는 혈청군 B의 캡슐 다당류가 보호성 면역을 제공하지 못하고 사람에게서 불리한 자가-면역 반응을 유도하기 쉬운 것으로 밝혀졌다. 따라서 본 발명의 외막 소포는 수포 제조를 위해 박테리아 균주로부터 분리될 수 있으며, 그것은 캡슐 다당류가 없도록 공학적으로 처리되었다. 그런 다음 수포는 사람에게 사용하기에 적절해진다. 그런 수포 제제의 특히 바람직한 실예는 캡슐 다당류가 없는 N. 메닌기티디스 혈청군 B로부터 얻어진 것이다.

[0175] 이것은 캡슐 생합성 및/또는 유출에 필요한 유전자가 손상되어 있는 변형된 수포 제조 균주를 사용함으로써 이루어질 수 있다. 캡슐 생합성 및/또는 유출을 엔코딩하는 유전자의 비활성화는 제어 영역, 코딩 영역중 하나 또는 둘 다 를 돌연변이 (점 돌연변이, 결실 또는 삽입)시킴으로써 (바람직하게는 상기에서 설명된 동종 재조합을 사용하여), 또는 그런 유전자의 효소적 기능을 감소시키는 어떠한 다른 방법에 의해 이루어질 수 있다. 더우기 캡슐 생합성 유전자의 비활성화는 또한 안티센스 과발현 또는 트랜스포존 돌연변이에 의해서도 이루어질 수 있다. 바람직한 방법은 다당류 생합성 및 유출에 필요한 나이세리아 메닌기티디스 *cps* 유전자의 일부 또는 전부의 결실이다. 이 목적에 대하여 대체 플라스미드 pMF121 (Frosh et al., 1990, *Mol. Microbiol.* 4:1215-1218)이 *cpsCAD*(+*galE*) 유전자 클러스터를 결실시키는 돌연변이를 전달하기 위해 사용될 수 있다.

[0176] L3 또는 L2 LPS에 대해 생성된 항체의 안전성이, 사람 글리코스핑고지질에 존재하는 락토-N-네오테트라오스 올리고당류 그룹 (Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glcβ1-)에 유사한 구조의 존재 때문에 문제가 되었다. 만약 대다수의 사람이 잔류하는 양의 L3 LPS를 함유하고 있는 데옥시콜레이트 추출된 소포 백신으로 안전하게 예방접종되었어도 (G. Bjune et al, Lancet (1991), 338, 1093-1096; GVG. Sierra et al, NIPH ann (1991), 14,195-210), LOS 당의 말단 부분의 결실이 사람 조직 표면에 존재하는 구조와의 모든 교차 반응을 방지하는 데 유익하다. 바람직한 구체예에서 *lgtB* 유전자의 비활성화는 말단 갈락토스 잔기와 시알산이 없는 중간 LPS 구조를 초래한다 (돌연변이는 L2 및 L3 LOS에서 4GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glcβ1- 구조를 남긴다). 그런 중간체는 L3 및 L2 LPS 균주에서 얻어질 수 있다. LPS를 대체할 수 있거나 덜 바람직한 (짧은) 버전은 *lgtE* 유전자를 작동 정지시킴으로써 얻어질 수 있다. 만약 그런 lgtA$^-$ 돌연변이가 선택된다면 비-면역원성 L1 면역형이 형성되는 것을 방지하기 위하여 또한 lgtC 발현을 작동 정지시키는 것이 바람직하다.

[0177] LgtB- 돌연변이체는 이것이 여전히 살균 항체 반응을 유도할 수 있는 LPS 보호성 올리고당류 에피토프를 계속해서 보유하는 한편으로 안전성 문제를 해결하기 위한 최적 트렁케이트인 것을 본 발명자들이 발견한 이래로 가장 바람직하다.

[0178] 그러므로 추가로 L2 또는 L3 제제 (정제된 것이든 분리된 수포중에 있든) 또는 일반적인 수막구균 수포 제제를 포함하는 본 발명의 면역원성 조성물은 유익하게도 lgtB, lgtA 또는 lgtE 유전자로부터의 기능적인 유전자 생성물의 발현이, 바람직하게는 유전자의 작동 정지에 의해, 가장 바람직하게는 유전자의 프로모터 및/또는 오픈-리딩 프레임의 전부 또는 부분을 결실함으로써 영구적으로 하향 조절되도록 유전 공학 처리된 나이세리아 균주 (바람직하게는 수막구균)으로부터 유래된다.

[0179] 본 발명의 상기 면역원성 조성물이 수막구균 B 균주로부터 유래되는 경우에 캡슐 다당류 (또한 사람-유사 당 구조를 함유한다)가 또한 제거되는 것이 추가로 바람직하다. 비록 많은 유전자들이 이것을 이루기 위해 작동 정지될 수 있지만, 본 발명자들은 유익하게도 수포 생성 균주이 siaD 유전자로부터의 기능적 유전자 생성물의 발현이 영구적으로 하향 조절되도록 (즉 α-2-8 폴리시알릴트란스페라제 활성의 하향 조절) 바람직하게는 유전자의 작동 정지에 의해, 가장 바람직하게는 유전자의 프로모터 및/또는 오픈-리딩 프레임의 전부 또는 부분을 결실함으로써 유전적으로 공학 처리된 것이 바람직함을 보였다. 그러한 비활성화는 WO 01/09350에 기재되어 있다. siaD (또한 synD로도 알려져 있다) 돌연변이가 캡슐 다당류로부터 사람-유사 에피토프의 제거를 초래할 수 있는 많은 돌연변이 중 가장 유리한데, 왜냐 하면 그것이 LOS의 보호성 에피토프의 생합성에 아무런 영향을 미치지 않는 유일한 돌연변이이고, 그로써 보호성 항원으로서 LOS를 궁극적으로 사용하는 것을 도와주고, 박테리아의 성장에 최소한의 효과를 나타내는 방법에서 유익하기 때문이다. 발명의 바람직한 측면은 그러므로 상술된 바와 같이 lgtE$^-$siaD$^-$, lgtA$^-$siaD$^-$ 또는 바람직하게는 lgtB$^-$siaD$^-$ 수막구균 B 돌연변이 균주로부터 유래된 수포 면역원성 제제이다. 균주 그 자체는 또한 발명의 추가의 측면이다.

[0180] 비록 siaD$^-$ 돌연변이가 상기 이유들 때문에 바람직하긴 하지만, 수막구균 B 캡슐 다당류 합성을 정지시키는 다른 돌연변이가 사용될 수 있다. 그로써 수포 생성 균주는 다음 유전자들 중 하나 이상으로부터의 기능적 유전자 생성물의 발현이 영구적으로 하향 조절되도록, 바람직하게는 유전자의 작동 정지에 의해, 가장 바람직하게는 유전자의 프로모터 및/또는 오픈-리딩 프레임의 전부 또는 부분을 결실함으로써 유전적으로 공학 처리될 수 있다: ctrA, ctrB, ctrC, ctrD, synA (synX 및 siaA와 동등함), synB (siaB와 동등함) 또는 synC (siaC와 동등함). lgtE$^-$ 돌연변이는 이들 돌연변이 중 하나 또는 그 이상과 조합될 수 있다. 바람직하게는 lgtB$^-$ 돌연변이가 하나 이상의 이들 돌연변이와 조합된다. 그러므로 본 발명의 추가의 측면은 수막구균 B의 그러한 조합된 돌연변이 균주로부터 유래된 상술된 바와 같은 수포 면역원성 제제다.

[0181] lgtB 및 lgtE를 포함하여 다양한 lgt 유전자를 함유하고 있는 나이세리아 유전자좌 및 그것의 서열은 당해 기술분야에 공지이다 (M. P. Jennings et al, Microbiology 1999, 145, 3013-3021 및 거기에 인용된 공보들, 및 J. Exp. Med. 180:2181-2190 [1994]).

[0182] 전장 (트렁케이팅되지 않은)의 LOS가 최종 생성물에 사용되는 경우 LOS가 시알화되지 않는 것이 바람직하다 (그런 LOS가 또한 시알화되지 않은 가장 위험하고 침습적인 수막구균 B 균주에 대한 면역 반응을 생성하기 때문에). 그런 경우에 결실된 synA (synX 및 siaA와 동등함), synB (siaB와 동등함) 또는 synC (siaC와 동등함) 유전자를 가지는 캡슐 네가티브 균주를 사용하는 것이 유익한데, 왜냐하면 그런 돌연변이가 또한 menB LOS가 시알화될 수 없도록 만들기 때문이다.

[0183] 수포 제제, 특히 저농도의 DOC로 추출된 제제에서, LPS는 본 발명의 면역원성 조성물의 항원으로서 사용될 수 있다. 그러나 사람 유사 락토-N-네오테트라오스 구조를 제거하기 위하여 lgtE, lgtA (특히 lgtC와 조합된) 중 어느 하나, 또는 바람직하게는 lgtB 유전자들/유전자의 효소적 기능을 하향 조절/결실/비활성화하는 것이 유익하다. LPS 올리고당류 구조의 생합성을 위한 lgt 유전자들을 포함하고 있는 나이세리아 유전자좌 (및 그것의 서열)은 당해 기술분야에 공지이다 (Jennings et al, Microbiology 1999, 145;3013-3021 및 거기에 인용된 공보들, 및 J. Exp. Med. 180:2181-2190 [1994]). lgtB (또는 기능적 유전자 생성물)의 하향 조절/결실이 LPS 보호성 에피토프를 무상으로 남겨둘 수 있기 때문에 바람직하다.

[0184] 본 발명의 N. 메닌기티디스 혈청군 B 수포 제제에서, 수포 제제가 최적의 안전성을 가지고 LPS 보호성 에피토프를 보유할 수 있도록 유도하는 siaD 및 lgtB 두 가지 모두의 하향 조절/결실이 바람직하다 (수막구균 B 수포 생성 균주에서는 lgtB$^-$와 ctrA$^-$, ctrB$^-$, ctrC$^-$, ctrD$^-$, synA$^-$ (synX$^-$ 및 siaA$^-$와 동등함), synB$^-$ (siaB$^-$와 동등함)

또는 synC$^-$ (siaC$^-$와 동등함) 중 어느 하나와의 조합도 사용될 수 있다).

[0185] 발명의 추가의 측면은 그러므로 수막구균 B의 그러한 조합된 돌연변이 균주로부터 유래된 상술된 바와 같은 수포 면역원성 제제다. 균주 자체도 발명의 추가의 측면이다.

[0186] 본 발명의 면역원성 조성물은 최소한 하나, 둘, 셋, 넷, 또는 다섯 개의 상이한 외막 소포 제제를 포함할 수 있다. 2개 이상의 OMV 제제가 포함되는 경우 발명의 하나 이상의 항원이 각각의 OMV에서 상향 조절된다. 그러한 OMV 제제는 동일한 종 및 혈청군의 나이세리아 균주로부터 또는 바람직하게는 상이한 부류, 혈청군, 혈청형, 하위 혈청형 또는 면역형의 나이세리아 균주로부터 유래될 수 있다. 예를 들어 면역원성 조성물은 면역형 L2의 LPS를 함유하는 하나 이상의 외막 소포 제제(들)와 면역형 L3의 LPS를 함유하는 하나 이상의 외막 소포 제제를 포함할 수 있다. L2 또는 L3 OMV 제제는 바람직하게는 LPS 올리고당류 합성 유전자 유전자좌에 최소 단계 가변성을 가지는 안정한 균주로부터 유래된다.

[0187] 서브유니트 조성물과 조합된 외막 소포

[0188] 본 발명의 면역원성 조성물은 또한 서브유니트 조성물과 외막 소포를 포함할 수 있다. 그것들의 용해도에 따라 서브유니트 조성물에 포함되기에 특히 적당한 항원이 여러 개 있다. 그러한 단백질로는 FhaB, NspA, Hsf의 패신저 도메인, Hap의 패신저 도메인, AspA의 패신저 도메인, AspA, OMP85, FrpA, FrpC, TbpB, LbpB, PilQ가 있다. 외막 소포 제제는 외막 소포에서 재조합적으로 상향 조절된 다음 목록: NspA, Hsf, Hap, OMP85, 고분자량 TbpA, 저분자량 TbpA, LbpA, TbpB, LbpB, NadA, TspA, TspB, PilC, PilQ, TdfH, PorB, HpuB, P2086, NM-ADPRT, MafA, MafB 및 PldA로부터 선택된 하나 이상의 상이한 항원을 가질 것이며; LPS 면역형 L2 및 LPS 면역형 L3 중 어느 하나 또는 두 가지 모두를 임의로 포함한다.

[0189] 발명의 특정 면역원성 조성물

[0190] 하기에서 열거되는 구체적인 조합에서, 항원의 조합이 수포에 존재하는 경우 그런 항원들의 조합은 상술된 바와 같이 상향 조절되어야 한다.

[0191] 본 발명의 특히 바람직한 구체예는 자가수송체 단백질 및 철 획득 단백질ㅡ 보다 바람직하게는 Hsf 및 고분자량 TbpA 및/또는 저분자량 TbpA를 포함한다. 그런 면역원성 조성물은 보다 바람직하게는 추가로 OMP 85, FrpA, FrpC, LbpA, LbpB, Lipo28, Sibp, NMB0964, NMB0293, TspA, NadA, TspB, PilQ, FhaC, NspA, PldA, HimD, HisD, GNA1870, OspA, HlpA, FhaB, PilC, Omp26, NMB0315, NMB0995, NMB1119, TdfH, PorB, HpuB, P2086, NM-ADPRT, VapD 및 Hap 중 최소한 하나를 포함할 수 있다. 상기 면역원성 조성물은 모두 추가로 LPS 면역형 L2 및 LPS 면역형 L3 중 어느 하나 또는 두 가지 모두를 포함할 수 있다.

[0192] 본 발명의 추가의 바람직한 구체예는 Hsf와 다음으로 이루어지는 군으로부터 선택된 하나 이상의 추가 항원을 포함한다: FrpA, FrpC, NM-ADPRT, VapD, LbpB, LbpA, TbpB, TbpA, P2086, HpuA, HpuB, Lipo28, Sibp, Hap, AspA, IgA 프로테아제, OMP85, NspA, PilQ, HimD, HisD, GNA1870, OspA, HlpA, FhaC, NadA, PldA, TspA, TspB, TdfH, PorB 및 FhaB. 상기 면역원성 조성물은 모두 추가로 LPS 면역형 L2 및 LPS 면역형 L3 중 어느 하나 또는 두 가지 모두를 포함할 수 있다. 바람직한 조합은 Hsf와 OMP85 (임의로 하나 이상의 Hap, FrpA 또는 LbpB와 함께); Hsf와 Hap (임의로 하나 이상의 FrpA, LbpB 또는 OMP85와 함께); Hsf와 FrpA (임의로 하나 이상의 Hap, LbpB 또는 OMP85와 함께); Hsf와 LbpB (임의로 하나 이상의 Hap, OMP85 또는 FrpA와 함께)를 포함한다. Hsf가 부착소 및 자가수송체 단백질인 경우, 특히 바람직한 조합은 Hsf, OMP85, TbpA, LPS 면역형 L2 및/또는 L3을, 바람직하게는 표시된 5 개의 항원군을 모두 가지는 다가 수포 제제에 포함한다. 바람직하게는 저분자량 TbpA과 고분자량 TbpA가 두 가지 모두 존재한다.

[0193] 본 발명의 추가의 면역원성 조성물은 FhaB와 다음의 것들로 이루어지는 군으로부터 선택된 하나 이상의 추가 항원을 포함한다: FrpA, FrpC, NM-ADPRT, VapD, LbpB, LbpA, TbpB, HpuA, HpuB, P2086, Lipo28, Sibp, NMB0964, NMB0293, TdfH, PorB, PldA, Hap, IgA 프로테아제, AspA, PilQ, HimD, HisD, GNA1870, OspA, HlpA, OMP85, NspA, PilC, Omp26, NMB0315, NMB0995, NMB1119, NadA, PldA, TbpA, Hsf, TspA 및 TspB, 및 LPS 면역형 L2 및 LPS 면역형 L3 중 어느 하나 또는 둘 다. 바람직한 조합은 FhaB와 Hsf (임의로 하나 이상의 OMP85, LbpB, Hap 또는 FrpA와 함께); FhaB와 OMP85 (임의로 하나 이상의 LbpB, Hap 또는 FrpA와 함께); FhaB와 LbpB (임의로 하나 이상의 Hap 또는 FrpA와 함께); FhaB와 Hap (임의로 FrpA와 함께)를 포함한다. 바람직한 조합은 표시된 항원의 5 가지 군 모두의 구성원인 FhaB, LbpB, Hsf (OMP로서) 및 FrpA를 포함한다.

[0194] 발명의 추가의 면역원성 조성물은 NspA와 다음의 것들로 이루어지는 군으로부터 선택된 하나 이상의 추가 항원

을 포함한다: FrpA, FrpC, NM-ADPRT, VapD, LbpB, LbpA, TbpB, TbpA, HpuA, HpuB, P2086, Lipo28, Sibp, NMB0964, NMB0293, Hap, OMP85, PilQ, AspA, IgA 프로테아제, NadA, PldA, Hsf, Hap, TspA, TspB, TdfH, PorB, 및 LPS 면역형 L2 및 LPS 면역형 L3중 어느 하나 또는 둘 다. 바람직한 조합은 NspA와 Hsf (임의로 하나 이상의 OMP85, Hap, LbpA 또는 TbpA와 함께); NspA와 OMP85 (임의로 하나 이상의 Hap, LbpA 또는 TbpA와 함께); NspA와 Hap (임의로 하나 이상의 LbpA 또는 TbpA와 함께); NspA와 LbpA (임의로 TbpA와 함께)를 포함한다. 특히 바람직한 조합은 표시된 항원의 5 가지 군 모두의 구성원인 NspA, Hsf, TbpA, LPS 면역형 L2 및/또는 L3을, 바람직하게는 다가 수포 제제 중에 포함한다. 바람직하게는 저분자량 TbpA과 고분자량 TbpA가 두 가지 모두 존재한다.

[0195] WO 00/25811에서 개시된 항원의 개별화된 조합을 가지는 면역원성 조성물은 본 발명의 청구 대상이 아니다. 바람직하게는 면역원성 조성물 또는 백신은 그것들이 트란스페린 결합 단백질 및 NspA만으로 구성된 항원 내용물을 가진다면 (또는 수포 백신의 경우에는 트란스페린 결합 단백질과 NspA만으로 구성된 상향 조절된 또는 풍부화된 항원 내용물을 가진다면) 본 발명에 의해 포함되지 않지만, NspA 뿐 아니라 고분자량 TbpA과 저분자량 TbpA 둘 다를 포함하거나 그것들로 구성되는 항원들 (또는 상향 조절된 항원들)의 특정 조합은 포함될 수 있다. 임의로 트란스페린 결합 단백질과 NspA의 조합 (서브유니트) 또는 상향 조절 (수포)을 포함하는 조성물 또는 백신은 청구되지 않는다.

[0196] 본 발명의 추가의 면역원성 조성물은 NadA와 다음의 것들로 이루어지는 군으로부터 선택된 하나 이상의 추가 항원을 포함한다: FrpA, FrpC, NM-ADPRT, VapD, LbpB, LbpA, TbpB, TbpA, P2086, Lipo28, Sibp, NMB0964, NMB0293, Hap, OMP85, NspA, PilQ, HimD, HisD, GNA1870, OspA, HlpA, HpuA, HpuB, AspA, IgA 프로테아제, PldA, Hsf, TspA, TspB, TdfH, PorB, 및 LPS 면역형 L2 및 LPS 면역형 L3 중 어느 하나 또는 둘 다.

[0197] 본 발명의 추가의 면역원성 조성물은 저분자량 TbpA과 다음의 것들로 이루어지는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 추가 항원을 포함한다: FrpA, FrpC, NM- ADPRT, VapD, LbpB, LbpA, TbpB, IgA 프로테아제, NspA, HpuA, HpuB, Hap, OMP85, NspA (추가로 고분자량 TbpA과 조합될 때), PilQ, HimD, HisD, GNA1870, OspA, HlpA, PilC, Omp26, NMB0315, NMB0995, NMB1119, MafA, MafB, AspA, NadA, PldA, Hsf, TspA, TspB, TdfH, PorB 및 FhaB, 및 LPS 면역형 L2 및 LPS 면역형 L3 중 어느 하나 또는 둘 다. 바람직한 조합은 저분자량 TbpA과 Hsf 및 LbpA; 저분자량 TbpA과 OMP85 (임의로 LbpA 및 Hap 중 어느 하나 또는 둘 다와 함께); 저분자량 TbpA과 LbpA 및 Hap를 포함한다.

[0198] 본 발명의 추가의 면역원성 조성물은 고분자량 TbpA과 다음의 것들로 이루어지는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 추가 항원을 포함한다: FrpA, FrpC, NM- ADPRT, VapD, LbpB, LbpA, TbpB, Hap, OMP85, NspA (추가로 저분자량 TbpA과 조합될 때), PilC, Omp26, NMB0315, NMB0995, NMB1119, PilQ, HimD, HisD, GNA1870, OspA, HlpA, MafA, MafB, AspA, IgA 프로테아제, PldA, FhaB, NadA, PldA, Hsf, TspA, TspB, TdfH, PorB 및 FhaB, 및 LPS 면역형 L2 및 LPS 면역형 L3 중 어느 하나 또는 둘 다. 바람직한 조합은 고분자량 TbpA과 Hsf 및 LbpA; 고분자량 TbpA과 OMP85 (임의로 LbpA 및 Hap중 어느 하나 또는 둘 다와 함께); 고분자량 TbpA과 LbpA 및 Hap를 포함한다.

[0199] 본 발명의 추가의 면역원성 조성물은 LbpA와 다음의 것들로 이루어지는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 추가 항원을 포함한다: FrpA, FrpC, NM-ADPRT, VapD, LbpB, TbpB, Hap, OMP85, NspA, PilC, Omp26, NMB0315, NMB0995, NMB1119, NadA, PldA, TbpA, Hsf, TspA, TspB, MafA, MafB, IgA 프로테아제, AspA, FhaB, PilQ, HimD, HisD, GNA1870, OspA, HlpA, TdfH, PorB 및 FhaB, 및 LPS 면역형 L2 및 LPS 면역형 L3 중 어느 하나 또는 둘 다. 바람직한 조합은 LbpA와 Hsf (임의로 Hap와 함께)를 포함한다.

[0200] 본 발명의 추가의 면역원성 조성물은 LbpB와 다음의 것들로 이루어지는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 추가 항원을 포함한다: FrpA, FrpC, NM-ADPRT, VapD, LbpA, TbpB, Hap, OMP85, NspA, PilC, Omp26, NMB0315, NMB0995, NMB1119, NadA, PldA, TbpA, Hsf, TspA, TspB, MafA, MafB, IgA 프로테아제, AspA, FhaB, PilQ, HimD, HisD, GNA1870, OspA, HlpA, TdfH, PorB 및 FhaB, 및 LPS 면역형 L2 및 LPS 면역형 L3 중 어느 하나 또는 둘 다. 바람직한 조합은 LbpB와 Hsf (임의로 OMP85, Hap 또는 FrpA 중 어느 하나 또는 그 이상과 함께); LbpB와 OMP85 (임의로 하나 또는 2개의 Hap 또는 FrpA와 함께); LbpB와 Hap (임의로 FrpA와 함께)를 포함한다.

[0201] 본 발명의 추가의 면역원성 조성물은 OMP85와 다음의 것들로 이루어지는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 추가 항원을 포함한다: FrpA, FrpC, NM-ADPRT, VapD, LbpB, LbpA, TbpB, TbpA, HpuA, HpuB, P2086, Lipo28, Sibp, NMB0964, NMB0293, Hap, IgA 프로테아제, AspA, Hsf, NspA, PilC, Omp26, NMB0315, NMB0995, NMB1119, MafA,

MafB, NadA, PldA, Hsf, TspA, TspB, PilQ, TdfH, PorB 및 FhaB, 및 LPS 면역형 L2 및 LPS 면역형 L3 중 어느 하나 또는 둘 다. 바람직한 조합은 OMP85와 Hsf (임의로 하나 또는 둘 다의 LbpA 또는 NspA와 함께); OMP85와 LbpA (임의로 하나 또는 둘 다의 Hap 및 NspA와 함께); OMP85와 Hap (임의로 NspA와 함께)를 포함한다.

[0202] 본 발명의 추가의 면역원성 조성물은 Hap와 다음의 것들로 이루어지는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 추가 항원을 포함한다: FrpA, FrpC, NM-ADPRT, VapD, LbpB, LbpA, TbpB, TbpA, HpuA, HpuB, 2086, Lipo28, Sibp, NMB0964, NMB0293, PilQ, HimD, HisD, NA1870, OspA, HlpA, NspA, IgA 프로테아제, AspA, OMP85, NspA, PilC, Omp26, NMB0315, NMB0995, NMB1119, MafA, MafB, NadA, PldA, Hsf, TspA, TspB, TdfH, PorB 및 FhaB, 및 LPS 면역형 L2 및 LPS 면역형 L3 중 어느 하나 또는 둘 다.

[0203] 본 발명의 추가의 면역원성 조성물은 FrpA와 다음의 것들로 이루어지는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 추가 항원을 포함한다: LbpB, LbpA, TbpA, TbpB, HpuA, HpuB, P2086, Lipo28, Sibp, NMB0964, NMB0293, PilQ, HimD, HisD, GNA1870, OspA, HlpA, TspA, TspB, Hap, IgA 프로테아제, AspA, NadA, FhaB, PilQ, HimD, HisD, GNA1870, OspA, HlpA, OMP85, NspA, PilC, Omp26, NMB0315, NMB0995, NMB1119, MafA, MafB, PldA, Hsf, TspA, TspB, TdfH, PorB 및 FhaB, 및 LPS 면역형 L2 및 LPS 면역형 L3 중 어느 하나 또는 둘 다.

[0204] 본 발명의 추가의 면역원성 조성물은 FrpC와 다음의 것들로 이루어지는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 추가 항원을 포함한다: LbpB, LbpA, TbpA, TbpB, HpuA, HpuB, P2086, Lipo28, Sibp, NMB0964, NMB0293, PilQ, HimD, HisD, GNA1870, OspA, HlpA, TspA, TspB, Hap, IgA 프로테아제, AspA, NadA, FhaB, OMP85, NspA, PilC, Omp26, NMB0315, NMB0995, NMB1119, MafA, MafB, PldA, Hsf, TspA, TspB, TdfH, PorB 및 FhaB, 및 LPS 면역형 L2 및 LPS 면역형 L3 중 어느 하나 또는 둘 다.

[0205] 본 발명의 추가의 면역원성 조성물은 LPS 면역형 L2 및 LPS 면역형 L3 중 어느 하나 또는 둘 다와 다음의 것들로 이루어지는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 추가 항원을 포함한다: LbpB, LbpA, TbpA, TbpB, HpuA, HpuB, P2086, Lipo28, Sibp, NMB0964, NMB0293, PilQ, HimD, HisD, GNA1870, OspA, HlpA, TspA, TspB, Hap, IgA 프로테아제, AspA, NadA, FhaB, OMP85, NspA, PilC, Omp26, NMB0315, NMB0995, NMB1119, MafA, MafB, PldA, Hsf, TspA, TspB, TdfH, PorB 및 FhaB.

[0206] 본 발명의 면역원성 조성물 중의 항원의 바람직한 조합은 철 획득 단백질, 자가수송체 단백질 및 FhaB; 철 획득 단백질, 자가수송체 단백질 및 PilC; 철 획득 단백질, 자가수송체 단백질 및 NadA; 철 획득 단백질, 자가수송체 단백질 및 FrpA; 철 획득 단백질, 자가수송체 단백질 및 PilQ; 철 획득 단백질, 자가수송체 단백질 및 TspA; 철 획득 단백질, 자가수송체 단백질 및 TspB; 철 획득 단백질, 자가수송체 단백질 및 NspA; 철 획득 단백질, 자가수송체 단백질 및 FrpC를 포함하고 있는 조합, 보다 바람직하게는 철 획득 단백질, 자가수송체 단백질 및 Hap; 철 획득 단백질, 자가수송체 단백질 및 FrpA/C; 철 획득 단백질, 자가수송체 단백질 및 LbpB; 철 획득 단백질, 자가수송체 단백질 및 OMP85 (D15)를 포함하고 있는 조합을 포함한다. 가장 바람직한 것은 OMP85 (D15)가 외막 소포 제제의 일부로서 통합되는 것이다.

[0207] LPS를 함유하는 본 발명의 면역원성 조성물은 바람직하게는 T-헬퍼 에피토프의 공급원, 바람직하게는 단백질, OMV 중의 LPS의 경우에는 바람직하게는 외막 단백질에 컨쥬게이팅된 LPS를 가질 것이다. 특히 바람직한 구체예는 외막 소포 제제에서 (예컨대 상술된 것과 같이) 제자리에서 OMP에 (바람직하게는 수포내) 컨쥬게이팅된 LPS를 함유한다.

[0208] 본 발명의 면역원성 조성물은 나이세리아 메닌기티디스 혈청군 A, B, C, Y, W-135 또는 나이세리아 고노레아로부터 유래된 항원 (단백질, LPS 및 다당류)을 포함할 수 있다.

[0209] 바람직하게도 본 발명의 면역원성 조성물 또는 백신은 WO 00/71725의 3 페이지, 라인 18 에서 52 페이지, 라인 2까지에 있는 표에 열거된 SEQ ID들의 특정 조합 및/또는 WO 00/71725의 실시예 1 내지 11에서 설명된 어떠한 개별적인 조합으로 구성되거나 및/또는 포함하지 않는다.

[0210] 바람직하게는 WO 01/52885에 개시된 어떠한 개별적인 조합은 본 발명에서 청구되지 않는다.

[0211] 추가의 조합

[0212] 본 발명의 면역원성 조성물은 추가로 박테리아의 캡슐 다당류 또는 올리고당류를 포함할 수 있다. 캡슐 다당류 또는 올리고당류는 나이세리아 메닌기티디스 혈청군 A, C, Y, 및/또는 W-135, 해모필루스 인플루엔자 b, 스트렙토코쿠스 뉴모니애, 그룹 A 스트렙토코쿠스, 그룹 B 스트렙토코쿠스, 스타필로코쿠스 아우레우스 및 스타필로코쿠스 에피더미디스 중 하나 이상으로부터 유래될 수 있다.

[0213] 발명의 추가의 측면은 바이러스 또는 그람 포지티브 박테리아와 관련된 질병 상태를 포함하여 특정 질병 상태에 대하여 유익하게 사용된 다른 항원과 발명의 항원성 조성물을 포함하는 백신 조합이다.

[0214] 바람직한 조합에서 발명의 항원성 조성물은 단백질 담체에 컨쥬게이팅되거나 플레인일 수 있는 다음의 수막구균 캡슐 다당류 또는 올리고당류: A, C, Y, 또는 W-135 중 1, 2, 3, 또는 바람직하게는 4개 전부와 제형된다. 바람직하게는 발명의 면역원성 조성물은 A와 C; 또는 C; 또는 C와 Y로 제형된다. N. 메닌기티디스, 바람직하게는 혈청군 B로부터의 단백질을 함유하는 그런 백신은 유익하게 포괄적인 수막구균 백신으로서 사용될 수 있다.

[0215] 추가의 바람직한 구체예에서 발명의 항원성 조성물, 바람직하게는 플레인 또는 컨쥬게이팅된 수막구균 캡슐 다당류 또는 올리고당류 A, C, Y 또는 W-135 (상술된 바와 같음)중 1, 2, 3 또는 4 개 전부로 제형된 조성물은 컨쥬게이팅된 H. 인플루엔자 b 캡슐 다당류 또는 올리고당류, 및/또는 하나 이상의 플레인 또는 컨쥬게이팅된 폐렴구균 캡슐 다당류 또는 올리고당류로 제형된다. 임의로 백신은 또한 스트렙토코쿠스 뉴모니애 감염에 대해 숙주를 보호할 수 있는 하나 이상의 단백질 항원을 포함할 수 있다. 그러한 백신은 유익하게도 포괄적인 수막구균 백신으로서 사용될 수 있다.

[0216] 여전히 추가의 바람직한 구체예에서 본 발명의 면역원성 조성물은 나이세리아 메닌기티디스, 해모필루스 인플루엔자 b, 스트렙토코쿠스 뉴모니애, 그룹 A 스트렙토코쿠스, 그룹 B 스트렙토코쿠스, 스타필로코쿠스 아우레우스 및 스타필로코쿠스 에피더미디스 중 하나 이상으로부터 유래된 캡슐 다당류 또는 올리고당류로 제형된다. 폐렴구균 캡슐 다당류 항원은 바람직하게는 혈청형 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F 및 33F (가장 바람직하게는 혈청형 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F 및 23F)로부터 선택된다. 추가로 바람직한 구체예는 헤모필루스 인플루엔자의 PRP 캡슐 다당류를 함유할 것이다. 추가의 바람직한 구체예는 스트필로코쿠스 아루레우스의 타입 5, 타입 8 또는 336 캡슐 다당류를 함유할 것이다. 추가의 바람직한 구체예는 스타필로코쿠스 에피더미디스의 타입 I, 타입 II 또는 타입 III의 캡슐 다당류를 함유할 것이다. 추가의 바람직한 구체예는 그룹 B 스트렙토코쿠스의 타입 Ia, 타입 Ic, 타입 II 또는 타입 III의 캡슐 다당류를 함유할 것이다. 추가의 바람직한 구체예는 그룹 A 스트렙토코쿠스의 캡슐 다당류를 함유할 것이며, 바람직하게는 추가로 하나 이상의 M 단백질을, 보다 바람직하게는 다중 유형의 M 단백질을 포함할 것이다.

[0217] 발명의 그러한 캡슐 다당류는 컨쥬게이팅되지 않을 수도 있고, 파상풍 변성 독소, 파상풍 변성 독소 단편 C, 디프테리아 변성 독소, CRM197, 뉴모리신, 단백질 D (US634224)와 같은 담체 단백질에 컨쥬게이팅될 수도 있다. 다당류 컨쥬게이트는 공지의 커플링 기법중 어느 것에 의해서든지 제조될 수 있다. 예를 들어 다당류는 티오에테르 연쇄를 통하여 커플될 수 있다. 이 컨쥬게이팅 방법은 다당류가 1-시아노-4-디메틸아미노 피리디늄 테트라플루오로보레이트 (CDAP)로 활성화되어 시아네이트 에스테르를 형성하는 것에 의존한다. 활성화된 다당류는 그로써 직접 또는 스페이서 기를 통하여 담체 단백질 상에 있는 아미노기에 커플될 수 있다. 바람직하게는 시아네이트 에스테르는 헥산 디아민과 커플되고 아미노-유래된 다당류는 티오에테르 연쇄 형성을 포함하는 헤테로 결찰 화학을 사용하여 담체 단백질에 컨쥬게이팅된다. 그러한 컨쥬게이트는 PCT 공개 공보 WO 93/15760 (Uniformed Services University)에서 설명된다.

[0218] 컨쥬게이트는 또한 US 4365170 (Jennings) 및 US 4673574 (Anderson)에서 설명된 것과 같이 직접 환원 아민화 방법에 의하여 제조될 수 있다. 다른 방법들은 EP-0-161-188, EP-208375 및 EP-0-477508에 기재되어 있다. 추가의 방법은 아디프산 히드라지드 (ADH)로 유도화된 시아노겐 브로마이드 활성화된 다당류를 카보디이미드 축합에 의해 단백질 담체에 커플링시키는 것을 포함한다 (Chu C. et al., Infect. Immunity, 1983 245 256). 올리고당류가 포함되는 경우에는 그것들이 컨쥬게이팅되는 것이 바람직하다.

[0219] 바람직한 폐렴구균 단백질 항원은 폐렴구균의 외면에 노출되는 폐렴구균 단백질 (폐렴구균의 최소한 일부의 생명주기 동안에 숙주의 면역 시스템에 의해 인지될 수 있다), 또는 폐렴구균에 의해 분비되거나 방출되는 단백질이다. 가장 바람직하게는 단백질이 독소, 부착소, 2-성분 신호 트랜스듀서(transducer), 또는 스트렙토코쿠스 뉴모니애의 지질단백질, 또는 그것의 단편이다. 특히 바람직한 단백질로는 그것들에 한정되지는 않지만, 다음과 같은 것들을 포함한다: 뉴모라이신 (바람직하게는 화학적 처리 또는 돌연변이에 의해 해독됨) [Mitchell et al. Nucleic Acids Res. 1990 Jul 11;18 (13):4010 "Comparison of pneumolysin genes and proteins from Streptococcus pneumoniae types 1 and 2.", Mitchell et al. Biochim Biophys Acta 1989 Jan 23;1007(1):67-72 "Expression of the pneumolysin gene in Escherichia coli: rapid purification and biological properties.", WO 96/05859 (A. Cyanamid), WO 90/06951 (Paton et al), WO 99/03884 (NAVA)]; PspA 및 그것의 트랜스멤브레인 결실 변이체 (US 5804193 - Briles et al.); PspC 및 그것의 트랜스멤브레인

결실 변이체 (WO 97/09994 - Briles et al.); PsaA 및 그것의 트랜스멤브레인 결실 변이체 (Berry & Paton, Infect Immun 1996 Dec; 64 (12):5255-62 "Sequence heterogeneity of PsaA, a 37-kilodalton putative adhesin essential for virulence of Streptococcuspraeumoniae"); 폐렴구균 콜린 결합 단백질 및 그것의 트랜스멤브레인 결실 변이체; CbpA 및 그것의 트랜스멤브레인 결실 변이체 (WO 97/41151; WO 99/51266); 글리세르알데히드-3-포스페이트 - 데히드로게나제 (Infect. Immun. 1996 64: 3544); HSP70 (WO 96/40928); PcpA (Sanchez-Beato et al. FEMS Microbiol Lett 1998, 164:207-14); M 유사 단백질 (EP 0837130) 및 부착소 18627 (EP 0834568). 추가로 바람직한 폐렴구균 단백질 항원은 WO 98/18931에 기재된 것들, 특히 WO 98/18930 및 PCT/US99/30390에 기재된 것들이다.

[0220] 본 발명의 면역원성 조성물/백신은 또한 임의로 그람 네가티브 박테리아, 예를 들면 모락셀라 카타르할리스(*Moraxella catarrhalis*) 또는 헤모필루스 인플루엔자(*Haemophilus influenzae*)로부터 제조된 외막 소포 제제를 포함할 수 있다.

[0221] 모락셀라 카타르할리스 수포 제제

[0222] 본 발명의 면역원성 조성물은 추가로 모락셀라 카타르할리스로부터 유래된 OMV 제제를 포함할 수 있다. 공학처리된 OMV 제제는 WO 01/09350에 기재된 것과 같이 모락셀라 카타르할리스로부터 유래될 수 있다. 하나 이상의 다음의 유전자들 (보호성 항원을 엔코딩함)이 상향 조절에 바람직하다: OMP106 (WO 97/41731 & WO 96/34960), HasR (PCT/EP99/03824), PilQ (PCT/EP99/03823), OMP85 (PCT/EP00/01468), lipo06 (GB 9917977.2), lipo10 (GB 9918208.1), lipo11 (GB 9918302.2), lipo18 (GB 9918038.2), P6 (PCT/EP99/03038), ompCD, CopB (Helminen ME, et al., (1993) Infect. Immun. 61:2003-2010), D15 (PCT/EP99/03822), Omp1A1(PCT/EP99/06781), Hly3 (PCT/EP99/03257), LbpA 및 LbpB (WO 98/55606), TbpA 및 TbpB (WO 97/13785 & WO 97/32980), OmpE, UspA1 및 UspA2 (WO 93/03761), 및 Omp21. 그것들은 또한 다른 그람-네가티브 박테리아에 이종적으로 도입될 수 있는 유전자로서도 바람직하다.

[0223] 하나 이상의 다음 유전자들이 하향 조절에 바람직하다: CopB, OMP106, OmpB1, TbpA, TbpB, LbpA, 및 LbpB.

[0224] 하나 이상의 다음 유전자들이 하향 조절에 바람직하다: htrB, msbB 및 lpxK.

[0225] 하나 이상의 다음 유전자들이 상향 조절에 바람직하다: pmrA, pmrB, pmrE, 및 pmrF.

[0226] 헤모필루스 인플루엔자 수포 제제

[0227] 본 발명의 면역원성 조성물은 또한 추가로 헤모필루스 인플루엔자로부터 유래된 OMV 제제를 포함할 수 있다. 공학 처리된 OMV 제제는 WO 01/09350에 기재된 것과 같이 헤모필루스 인플루엔자로부터 유래될 수 있다. 하나 이상의 다음의 유전자들 (보호성 항원을 엔코딩함)이 상향 조절에 바람직하다: D15 (WO 94/12641), P6 (EP 281673), TbpA (W096/40929; W095/13370), TbpB (W096/40929; W095/13370), P2, P5 (WO 94/26304), OMP26 (WO 97/01638), HMW1, HMW2, HMW3, HMW4, Hia, Hsf, Hap, Hin47, 및 Hif (이 오페론(operon)에 있는 모든 유전자는 필린을 상향 조절하기 위하여 상향 조절되어야 한다). 그것들은 또한 다른 그람-네가티브 박테리아에 이종적으로 도입될 수 있는 유전자로서도 바람직하다.

[0228] 하나 이상의 다음 유전자들이 하향 조절에 바람직하다: P2, P5, Hif, IgA1-프로테아제, HgpA, HgpB, HMW1, HMW2, Hxu, htrB, msbB 및 dlpxK.

[0229] 하나 이상의 다음 유전자들이 상향 조절에 바람직하다: pmrA, pmrB, pmrE, 및 pmrF.

[0230] 본 발명의 면역원성 조성물/백신은 또한 임의로 하나 이상의 디프테리아, 파상풍 및 보르데텔라 페르투시스(*Bordetella pertussis*) 감염에 대한 보호를 제공하는 항원들을 포함할 수 있다. 백일해 성분은 전체 세포 B. 페르투시스 (Pw) 또는 PT, FHA 및 69 kDa 페르탁틴(pertactin)으로부터의 하나 이상의 항원 (바람직하게는 2개 또는 3개 전부)을 함유하는 무세포 페르투시스 (Pa)를 사멸할 수 있다. 전형적으로 디프테리아 및 파상풍에 대하여 보호를 제공하는 항원은 디프테리아 변성 독소 및 파상풍 변성 독소일 것이다. 변성 독소는 화학적으로 비활성화된 독소 또는 점 돌연변이의 도입에 의해 비활성화된 독소다.

[0231] 면역원성 조성물/백신은 또한 임의로 유형을 분류할 수 없는 헤모필루스 인플루엔자, RSV에 대하여 숙주를 보호할 수 있는 하나 이상의 항원 및/또는 인플루엔자 바이러스에 대하여 숙주를 보호할 수 있는 하나 이상의 항원을 포함할 수 있다. 그러한 백신은 유익하게도 포괄적인 중이염 백신으로서 사용될 수 있다.

[0232] 바람직한 비-분류형 H. 인플루엔자 단백질 항원은 핌브린(Fimbrin) 단백질 (US 5766608) 및 그것으로부터의 펩

티드를 포함하고 있는 융합물 (예컨대 LB1 융합)(US 5843464 - Ohio State Research Foundation), OMP26, P6, 단백질 D, TbpA, TbpB, Hia, Hmw1, Hmw2, Hap, 및 D15를 포함하고 있는 융합물을 포함한다.

[0233] 바람직한 인플루엔자 바이러스 항원으로는 알(egg) 또는 MDCK 세포, 또는 베로 세포에서 성장된 전체의, 살아있거나 비활성화된 바이러스, 분열된 인플루엔자 바이러스 또는 전체 유행성 감기 비로솜(virosome)(R. Gluck, Vaccine, 1992, 10, 915-920에서 설명된 것과 같음) 또는 정제되거나 재조합 제조된 그것의 단백질, 예컨대 HA, NP, NA, 또는 M 단백질, 또는 그것들의 조합이 있다.

[0234] 바람직한 RSV (호흡기 신시튬 바이러스) 항원은 F 당단백질, G 당단백질, HN 단백질, M 단백질 또는 그것들의 유도체를 포함한다.

[0235] 본 발명의 면역원성 조성물은 모락셀라 카타르할리스의 단백질, 이를테면 TbpA (WO97/13785; WO99/52947), TbpB (WO97/13785; WO99/52947; Mathers et al., FEMS Immunol Med Microbiol 1997 19;231-236; Myers et al., Infect Immun 1998 66;4183-4192), LbpA, LbpB (Du et al., Infect Immun1998 66;3656-3665), UspA1, UspA2 (Aebi et al., Infect Immun. 1997 65;4367-4377), OMP106 (US6214981), Ton-B 의존성 수용체 (WO00/78968), CopB (Sethi et al., Infect. Immun. 1997 65;3666-3671), 및 HasR 수용체 (WO00/78968); 헤모필루스 인플루엔자의 단백질, 이를테면 HMW (St Geme et al., Infect Immun 1998 66;364-368), Hia (St Geme et al., J. Bacteriol. 2000 182;6005-6013), Tbp1 (WO96/40929; WO95/13370), Tbp2 (WO96/40929; WO95/13370; Gray-Owen et al., Infect Immun 1995 63;1201-1210), LbpA, LbpB (Schryvers et al., 1989, 29:121-130), HasR, TonB-의존성 수용체 (Fleishmann et al., Science 1995 269;496-512), 헤모글로빈-결합 단백질, HhuA (Cope et al., Infect Immun 2000 68;4092-4101), HgpA (Maciver et al., Infect Immun 1996 64;3703-3712), HgbA, HgbB 및 HgbC (Jin et al., Infect Immun 1996 64;3134-3141), HxuA (Cope et al., Mol Microbiol 1994 13;863-873), HxuC (Cope et al., Infect Immun 2001 69;2353-2363); 나이세리아 메닌기티디스로부터의 단백질, 이를테면 Tbp1, Tbp2, FbpA, FbpB, BfrA, BfrB (Tettelin et al., Science 2000 287;1809-1815), LbpA, LbpB 및 HmbR을 포함한다.

[0236] 백신 제형

[0237] 본 발명의 바람직한 구체예는 약제학적으로 허용될 수 있는 부형제 또는 담체를 포함할 수 있는 백신중의 본 발명의 면역원성 조성물의 제형이다.

[0238] 상기 언급된 변형된 균주의 어느 것으로부터 외막 소포 제제를 제조하는 것은 당업자에게 잘 알려져 있는 어떠한 방법에 의해서든지 이루어질 수 있다. 바람직하게는 EP 301992, US 5,597,572, EP 11243 또는 US 4,271,147에 기재된 방법들이 사용된다. 가장 바람직하게는 WO 01/09350에 기재된 방법이 사용된다.

[0239] 백신 제제는 일반적으로 백신 디자인(Vaccine Design)에 설명되어 있다 ("The subunit and adjuvant approach" (eds Powell M. F. & Newman M. J.) (1995) Plenum Press New York).

[0240] 본 발명의 항원성 조성물은 발명의 백신 제형 중에 애쥬번트가 첨가될 수 있다. 적당한 애쥬번트는 알루미늄 히드록시드 겔 (alum) 또는 알루미늄 포스페이트와 같은 알루미늄 염을 포함하지만, 또한 칼슘염 (특히 칼슘 카보네이트), 철 또는 아연의 염일 수 있으며, 또는 아실화된 티로신의 불용성 현탁액, 또는 아실화된 당, 양이온적으로 또는 음이온적으로 유도된 다당류, 또는 폴리포스파잔일 수 있다.

[0241] 사용될 수 있는 적당한 Th1 애쥬번트 시스템으로는 모노포스포릴 지질 A, 특히 3-데-O-아실화된 모노포스포릴 지질 A, 및 모노포스포릴 지질 A, 특히 3-데-O-아실화된 모노포스포릴 지질 A (3D-MPL)와 알루미늄 염 (바람직하게는 알루미늄 포스페이트)과의 조합이 있다. 증강된 시스템은 모노포스포릴 지질 A와 사포닌 유도체, 특히 WO 94/00153에 개시된 바와 같은 QS21과 3D-MPL의 조합, 또는 QS21이 WO 96/33739에 개시되어 있는 것과 같이 콜레스테롤로 켄칭되는 경우의 덜 반응성인 조성물을 포함한다. QS21 3D-MPL과 유중수 에멀션중의 토코페롤을 포함하는 특히 강력한 애쥬번트 제형은 WO 95/17210에 기재되어 있고, 바람직한 제형이다.

[0242] 백신은 사포닌, 보다 바람직하게는 QS21을 포함할 수 있다. 그것은 또한 유중수 에멀션과 토코페롤을 포함할 수 있다. 올리고누클레오티드를 함유하고 있는 메틸화되지 않은 CpG (WO 96/02555)는 또한 TH1 반응의 우선적인 인듀서이고, 본 발명에 사용하기에 적당하다.

[0243] 본 발명의 백신 제제는 상기 백신을 전신적인 또는 점막 경로를 통하여 투여하는 것에 의해, 감염에 걸리기 쉬운 포유류를 보호 또는 치료하기 위해 사용될 수 있다. 이들 투여는 점막내, 복막내, 피부내 또는 피하 경로를 통한; 또는 경구/영양관, 호흡기관, 비뇨 생식기관에 대한 점막 투여를 통한 주입을 포함할 것이다. 그러므로

본 발명의 한 측면은 그람-네가티브 박테리아의 감염에 의하여 유발된 질병에 대하여 사람 숙주를 면역시키는 방법이며, 그 방법은 본 발명의 OMV 제제의 면역 보호 용량을 숙주에게 투여하는 것으로 이루어진다.

[0244] 각 백신 용량중의 항원의 양은 전형적인 백신에서 유의할만하고 해로운 부작용 없이 면역 보호 반응을 유도하는 양으로서 선택된다. 그러한 양은 어떤 구체적인 면역원이 사용되고, 어떻게 제공되는 지에 따라 달라질 것이다. 일반적으로 각 용량은 1 내지 100 ㎍의 단백질 항원 또는 OMV 제제, 바람직하게는 5 내지 50 ㎍, 가장 전형적으로는 5 내지 25 ㎍ 범위일 것이다.

[0245] 특정 백신의 최적량은 피실험자에게서 적절한 면역 반응을 관찰하는 것을 포함하는 표준 연구에 의해 확실하게 될 수 있다. 초기 예방접종 후에 피실험자는 적절한 간격을 두고 1회 또는 여러 번의 추가 예방접종을 받을 수 있다.

[0246] 본 발명의 백신은 바람직하게는 면역 보호적이고 비독성이며 소아과 또는 청년기를 대상으로 사용하기에 적당하다.

[0247] 소아과 사용이란 4살 미만의 유아에게 사용하는 것을 의미한다.

[0248] 면역 보호적이라는 것은 상술된 SBA 및/또는 동물 보호 모델 및/또는 점착 차단 분석이 만족할만한게 충족된다는 것을 의미한다.

[0249] 비독성이라 함은 잘 알려져 있는 LAL 및 발열성 분석에 의해 측정되는 바와 같이 백신의 내독소 활성의 만족할만한 수준에 못미친다는 것을 의미한다.

[0250] 본 발명의 폴리누클레오티드

[0251] "폴리누클레오티드"는 일반적으로 변형되지 않은 RNA 또는 DNA 또는 변형된 RNA 또는 DNA일 수 있는 모든 폴리리보누클레오티드 또는 폴리데옥시리보누클레오티드를 말한다. "폴리누클레오티드"는 제한 없이 단일- 및 이중-가닥의 DNA, 단일- 및 이중-가닥 영역의 혼합물인 DNA, 단일- 및 이중-가닥의 RNA, 단일- 및 이중-가닥 영역의 혼합물인 RNA, 단일-가닥의 또는 보다 전형적으로는 이중-가닥일 수 있는 또는 단일- 및 이중-가닥 영역의 혼합물일 수 있는 DNA 및 RNA를 포함하는 하이브리드 분자를 포함한다. 또한 "폴리누클레오티드"는 RNA 또는 DNA 또는 RNA와 DNA를 모두 포함하는 삼중-가닥 영역을 말한다. 폴리누클레오티드란 용어는 또한 하나 이상의 변형된 염기 및 안정성 또는 그 외 다른 이유들 때문에 변형된 골격을 가지고 있는 DNA 또는 RNA를 함유하고 있는 DNA 또는 RNA를 포함한다. "변형된" 염기는 예컨대 트리틸화된 염기 및 비통상적인 염기, 예컨대 이노신을 포함한다. 다양한 변형이 DNA 및 RNA에 대해 이루어지며; 따라서 "폴리누클레오티드"는 자연에서 전형적으로 발견되는 폴리누클레오티드의 화학적으로, 효소적으로 또는 대사적으로 변형된 형태뿐만 아니라 바이러스와 세포의 특징인 DNA와 RNA의 화학적 형태를 포함한다. "폴리누클레오티드"는 또한 때로 올리고누클레오티드로 불리는 상대적으로 짧은 폴리누클레오티드를 포함한다.

[0252] 본 발명의 다른 측면은 하나 이상의 폴리누클레오티드(들)을 포함하는 면역학적/백신 제형에 관한 것이다. 그러한 기법은 당해 기술 분야에 공지이다 (Wolff et al., Science, (1990) 247:1465-8).

[0253] 그런 백신은 상술된 본 발명의 단백질 조합에 상응하는 다수의 단백질을 엔코딩하는 하나 이상의 폴리누클레오티드(들)을 포함한다.

[0254] 그러한 폴리누클레오티드로부터의 단백질의 발현은 포유류 세포 내에서의 발현을 구동할 수 있는 진핵 프로모터의 제어하에 있을 것이다. 폴리누클레오티드는 추가로 다른 항원을 엔코딩하는 서열을 포함할 수 있다. 발현을 구동할 수 있는 진핵 프로모터의 실예는 아데노바이러스 프로모터, 레트로바이러스 프로모터를 포함하여 바이러스로부터 얻어지는 바이러스 프로모터를 포함한다. 또는 달리 발현을 구동시키기 위하여 포유류의 프로모터가 사용될 수도 있다.

[0255] 발명의 다른 측면

[0256] 본 발명의 다른 측면은 나이세리아 질병의 치료 또는 예방 방법을 포함하는데, 그 방법은 본 발명의 백신이 필요한 숙주에게 백신의 보호량 (또는 유효량)을 투여하는 것으로 이루어진다. 나이세리아 메닌기티디스 혈청군 A, B, C, Y, 또는 W135 및/또는 나이세리아 고노레아 감염은 유익하게 예방되거나 치료될 수 있다.

[0257] 본 발명은 또한 나이세리아 감염의 치료를 위한 약물의 제조에 본 발명의 백신을 사용하는 것을 포함한다. 나이세리아 감염은 나이세리아 메닌기티디스 혈청군 A, B, C, Y, 또는 W135 및/또는 나이세리아 고노레아에 의한 감염을 포함한다.

[0258] 본 발명의 다른 측면은 본 발명의 외막 소포가 유래될 수 있는 유전적으로 공학 처리된 나이세리아 균주이다 (상술된 바와 같이 재조합적으로 상향 조절된 발명의 균주를 최소한 2개 가진다). 그러한 나이세리아 균주는 나이세리아 메닌기티디스 또는 나이세리아 고노레아일 수 있다.

[0259] 균주는 또한 LgtB, LgtE, SiaD, OpC, OpA, PorA, FrpB, msbB 및 HtrB 중 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 또는 8개의 발현을 포함하는 다른 나이세리아 단백질의 발현을 하향 조절하도록 (상술된 바와 같이) 공학 처리될 수 있다. 하향 조절의 바람직한 조합은 최소한 LgtB와 SiaD의 하향 조절 (바람직하게는 결실), 최소한 PorA와 OpC의 하향 조절, 최소한 PorA와 OpA의 하향 조절 및 최소한 PorA, OpA 및 OpC의 하향 조절을 포함한다.

[0260] 본 발명의 추가의 측면은 본 발명의 면역원성 조성물 또는 백신의 제조 방법이다. 이것들은 나이세리아로부터 본 발명의 나이세리아 균주로부터 유래된 수포의 형태로 존재할 수 있는 2개 이상의 분리된 항원 또는 단백질을 함께 혼합하여 본 발명의 면역원성 조성물을 제조하는 단계를 포함하며, 발명의 백신을 제조하는 방법은 본 발명의 면역원성 조성물과 약제학적으로 허용되는 담체를 조합시키는 단계를 포함한다.

[0261] 또한 본 발명에는 나이세리아 배양물로부터 본 발명의 외막 소포를 분리하는 단계를 포함하는, 본 발명의 면역원성 조성물의 제조 방법이 포함된다. 그러한 방법은 2개 이상의 외막 소포 제제를 조합하는 추가의 단계를 포함할 수 있는데, 이 때 하나 이상의 외막 소포 제제는 면역형 L2의 LPS를 함유하고, 하나 이상의 외막 소포 제제는 면역형 L3의 LPS를 함유한다. 본 발명은 또한 외막 소포가 0 내지 0.5 % 농도의 DOC로 추출됨으로써 분리되는 그런 방법을 포함한다. LPS 함량을 최소화하기 위하여 0.3 % 내지 0.5 %의 DOC가 사용된다. LPS가 항원으로서 보존된 OMV 제제에서는 0 내지 0.3 %의 DOC 농도, 바람직하게는 0.05 % 내지 0.2 %, 가장 바람직하게는 약 0.1 %의 DOC 농도가 추출을 위해 사용된다.

[0262] 고스트(Ghost) 또는 죽은 전체 세포 백신

[0263] 본 발명자들은 수포 제제 및 백신에 대한 상기 개선점들이 고스트 또는 죽은 전체 세포 제제 및 백신에 대해서도 쉽게 연장될 수 있다 (동일한 장점을 가짐)고 생각하였다. 수포 제제가 제조될 수 있는 본 발명의 변형된 그람-네가티브 균주는 또한 고스트 및 죽은 전체 세포 제제를 제조하기 위해 사용될 수 있다. 그람-네가티브 균주로부터 고스트 제제 (무상 엔벨로프(envelope)를 가지고 있는 비어 있는 세포)의 제조 방법은 당해 기술 분야에 잘 알려져 있다 (WO 92/01791 참조). 백신에 사용하기 위하여 비활성화된 세포 제제를 만들기 위해 전체 세포를 죽이는 방법도 또한 잘 알려져 있다. 그러므로 본 명세서 전제를 통하여 설명된 방법 뿐 아니라 '수포 [또는 OMV] 제제' 및 '수포 [또는 OMV] 백신'이라는 용어는 본 발명의 목적에 대해 '고스트 제제' 및 '고스트 백신', 및 '죽은 전체 세포 제제' 및 '죽은 전체 세포 백신'이라는 용어에도 적용될 수 있다.

[0264] 항체 및 수동 예방접종

[0265] 본 발명의 다른 측면은 나이세리아 감염의 예방 또는 치료에 사용하기 위하여 면역 글로불린을 제조하는 방법으로서, 그 방법은 본 발명의 백신으로 수용체를 예방접종하는 단계와 그 수용체로부터 면역 글로불린을 분리하는 단계로 이루어진다. 이 방법에 의해 제조된 면역 글로불린은 본 발명의 추가의 측면이다. 발명의 면역 글로불린과 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하고 있는 약제학적 조성물은, 나이세리아 질병의 치료 또는 예방을 위한 약물의 제조에 사용될 수 있는 본 발명의 추가의 측면이다. 본 발명의 약제학적 제제의 유효량을 나이세리아 감염 환자에게 투여하는 것으로 이루어지는, 나이세리아 감염을 치료 또는 예방하는 방법도 본 발명의 추가의 측면이다.

[0266] 다클론성 항체 제조를 위한 접종물은 전형적으로 항원성 조성물을 사람에게 사용하기에 적당한 식염수 또는 다른 애쥬번트와 같은 생리적으로 허용되는 희석제에 분산시킴으로써 수성 조성물을 형성하는 것에 의해 제조된다. 면역을 자극할 정도의 양의 접종물이 포유류에게 투여되고, 그런 다음 접종된 포유류는 항원성 조성물이 보호성 항체를 유도하기에 충분한 시간동안 유지된다.

[0267] 항체는 친화성 크로마토그래피와 같이 잘 알려져 있는 기법에 의해 원하는 정도로 분리될 수 있다 (Harlow and Lane Antibodies; a laboratory manual 1988).

[0268] 항체는 통상적으로 사용되는 다양한 동물, 예컨대 염소, 영장류, 당나귀, 돼지, 말, 기니아 피그, 쥐 또는 사람으로부터 얻어지는 항혈청 제제를 포함할 수 있다. 동물은 출혈되고 혈청이 회수된다.

[0269] 본 발명에 따라 제조된 면역 글로불린은 전체 항체, 항체 단편 또는 하위 단편들을 포함할 수 있다. 항체는 어떠한 부류든지 전체 면역글로불린, 예컨대 IgG, IgM, IgA, IgD 또는 IgE, 키메라 항체 또는 본 발명의 2개 이상의 항원에 대해 이중 특이성을 가지고 있는 하이브리드 항체일 수 있다. 그것들은 또한 단편, 예컨대 하이브리

드 단편을 포함하고 있는 F(ab')2, Fab', Fab, Fv 등일 수 있다. 면역 글로불린은 또한 특정 항원에 결합하여 복합체를 형성함으로써 항체같은 작용을 하는 천연, 합성 또는 유전적으로 공학 처리된 단백질을 포함한다.

[0270] 본 발명의 백신은 나중에 면역 글로불린의 공급원으로서 작용하게 될 수용체에 투여되고, 특정 백신으로부터의 공격에 대한 반응으로 생성된다. 그렇게 처리된 환자는 과민 면역 글로불린이 얻어질 수 있는 혈장을 종래의 혈장 분류 방법을 통해 증여할 수 있을 것이다. 과민 면역 글로불린은 나이세리아 감염에 대한 내성을 제공하기 위해 또는 감염을 치료하기 위해 다른 환자에게 투여될 수 있다. 본 발명의 과민 면역 글로불린은 특히 유아, 면역 손상된 개체 또는 치료가 필요하지만 그 개체에게서 예방접종에 대한 반응으로 항체가 생성될 시간이 없는 경우에 나이세리아 질병의 치료 또는 예방에 유용하다.

[0271] 본 발명의 부가적인 측면은 본 발명의 면역원성 조성물의 2개 이상의 구성 요소에 대하여 반응하는 2개 이상의 단클론성 항체 (또는 그것의 단편; 바람직하게는 사람 또는 인간화된 항체)를 포함하고 있는 약제학적 조성물로서, 그것은 그람 네가티브 박테리아, 바람직하게는 나이세리아, 보다 바람직하게는 나이세리아 메닌기티디스 또는 나이세리아 고노레아 및 가장 바람직하게는 나이세리아 메닌기티디스 혈청군 B에 의한 감염을 치료 또는 예방하는 데 사용될 수 있다.

[0272] 그러한 약제학적 조성물은 어떠한 부류의 것이든 전체 면역 글로불린, 예컨대 IgG, IgM, IgA, IgD 또는 IgE, 키메라 항체 또는 본 발명의 2개 이상의 항원에 대해 이중 특이성을 가지고 있는 하이브리드 항체일 수 있는 단클론성 항체들을 포함한다. 그것들은 또한 단편, 예컨대 하이브리드 단편을 포함하고 있는 F(ab')2, Fab', Fab, Fv 등일 수 있다.

[0273] 단클론성 항체의 제조 방법은 당해 기술 분야에 잘 알려져 있고, 비장 세포와 골수종 세포와의 융합을 포함할 수 있다 (Kohler and Milstein 1975 Nature 256:495; Antibodies - a laboratory manual Harlow and Lane 1988). 또는 달리 단클론성 Fv 단편은 적절한 단계의 표시 라이브러리를 스크리닝함으로써 얻어질 수 있다 (Vaughan TJ et al., 1998 Nature Biotechnology 16;535). 단클론성 항체는 공지된 방법에 의하여 인간화되거나 부분적으로 인간화될 수 있다.

[0274] 본 특허 명세서에 인용된 모든 참조 문헌 또는 특허 공보는 참조 문헌으로 삽입되었다.

[0275] 본원에서 사용된 용어 "포함하고 있는" 및 "포함하는"는 본 발명자에 의해 임의로 모든 경우에 각각 "구성되고 있는" 및 "구성되는"이라는 용어로 대체될 수 있는 것으로 의도된다.

실 시 예

[0276] 하기의 실시예는 특별히 다른 언급이 있는 경우를 제외하고는, 당업자들에게 잘 알려져 있고 통상적인 표준 기법을 사용하여 수행되었다. 실시예는 예시적인 것이며 본 발명을 제한하지 않는다.

[0277] **실시예 1:** 외막 소포 제조에 사용된 나이세리아 메닌기티디스 혈청군 B의 균주의 제조 방법.

[0278] WO 01/09350은 외막 소포를 제조하고, 외막 소포가 유래되는 박테리아 균주를 조작하는 방법에 대한 상세한 설명을 제공한다. 외막 소포가 TbpB 및/또는 지질다당류과 같은 지질단백질을 보유하고 있는 것이라면, 저수준의 데옥시콜레이트를 사용하거나 사용하지 않고서 분리하는 방법이 바람직하다.

[0279] **실시예 2:** 기능적인 *cps* 유전자가 없지만 PorA를 발현하는 재조합 나이세리아 메닌기티디스 혈청군 B에서의 Hsf 단백질 항원의 상향 조절.

[0280] WO 01/09350의 실시예에서 설명된 것처럼 어떤 나라에서는 외막 소포에서 PorA의 존재가 유익하고, 재조합 개선된 수포의 백신 효능을 강화시킬 수도 있다. 다음 실시예에서는 본 발명자들은 기능적인 *cps* 유전자가 없지만 PorA를 발현하는 균주에서 Hsf 단백질 항원 발현의 상향 조절을 위해 변형된 pCMK(+) 벡터를 사용하였다. 원래의 pCMK(+) 벡터는 $lacI^q$를 발현하지만 나이세리아 메닌기티디스에서 전사적으로 활성인 대장균 숙주에서 억제된 키메라 *porA/lac0* 프로모터를 함유하고 있다. 변형된 pCMK(+)에서는 천연 *porA* 프로모터가 *hsf* 유전자의 전사를 구동시키기 위해 사용되었다. Hsf를 코딩하는 유전자를 하기 표에 제시되어 있는 HSF 01-*Nde*I 및 HSF 02-*Nhe*I 올리고누클레오티드 프라이머를 사용하여 PCR 증폭시켰다. HSF 01-*Nde*I 프라이머의 서열 때문에 발현된 HSF 단백질은 5' 단부에 2개의 메티오닌 잔기를 함유할 것이다. PCR 증폭에 사용된 조건은 공급자에 의해 설명된 것과 같았다 (HiFi DNA 중합효소, Boehringer Mannheim, GmbH). 열 주기는 다음과 같았다: 25회 (94 ℃에서 1분, 48 ℃에서 1분, 72 ℃에서 3분) 및 1회 (72 ℃에서 10분, 회수할 때까지 4 ℃). 상응하는 암플리콘을 계속해서 pCMK(+) 전달 벡터의 상응하는 제한 부위에 클로닝시켰다. pCMK(+)-Hsf로 명명한 이 재조합 플라스미

드에서 본 발명자들은 재조합 PCR 스트래티지에 의해 키메라 *porA/lac0* 프로모터에 존재하는 *lac0*를 결실시켰다. pCMK(+)-Hsf 플라스미드를 아래의 2개의 별도의 DNA 단편을 PCR 증폭시키기 위한 주형으로서 사용하였다:

[0281] - 단편 1: *porA* 5' 재조합 발생 영역, 카나마이신 내성 유전자 및 *porA* 프로모터를 함유한다. 사용된 올리고누클레오티드 프라이머, RP1 (SacII) 및 RP2를 하기 표에 나타낸다. RP1 프라이머는 *lac* 작동자 바로 위에 있는 서열에 상동한다.

[0282] - 단편 2: *porA* 유전자로부터 얻어지는 샤인-달가노(Shine-Dalgarno) 서열, *hsf* 유전자 및 *porA* 3' 재조합 발생 영역을 함유한다. 사용된 올리고누클레오티드 프라이머, RP3 및 RP4 (AphI)를 하기 표에 나타낸다. RP3 프라이머는 *lac* 작동자 바로 아래에 있는 서열에 상동한다.

[0283] 단편 1의 3' 단부와 단편 2의 5' 단부는 48 염기가 겹친다. 프라이머 RP1과 RP4를 사용하는 최종 PCR 반응을 수행하기 위해 500 ng의 각각의 PCR (1 및 2)을 사용하였다. 얻어진 최종 암플리콘을 SacII와 AphI으로 제한시켜 놓은 pSL1180 벡터에 서브클로닝시켰다. 변형된 플라스미드 pCMK(+)-Hsf를 QIAGEN 맥시프렙(maxiprep) 키트를 사용하여 대규모로 정제하고, 이 물질 2 ㎍을 사용하여 기능적인 *cps* 유전자가 없는 나이세리아 메닌기티디스 혈청군 B 균주를 형질 전환시켰다. *porA*의 발현을 보존하기 위하여 단일 교차로부터 초래된 통합을 PCR과 웨스턴 블롯 스크리닝 과정을 조합하여 선택하였다. *porA*-특이적 PCR과 웨스턴 블롯에 의해 포지티브로 시험된 카나마이신 내성 클론을 글리세롤 스톡으로서 -70 ℃에서 보관하였다가 추가의 연구에 사용하였다. 박테리아 (약 5.10^8 박테리아에 상응함)를 50 ㎕의 PAGE-SDS 완충액중에 재현탁시키고, 냉동시켰다가 (-20 ℃)/끓이고 (100 ℃)를 3회 반복한 후 12.5 % 겔 상에서 PAGE-SDS 전기영동에 의해 분리하였다. Hsf의 발현을 NMB[Cps-, PorA+] 또는 NMB[Cps-, PorA+, Hsf+]로부터 유래된 전체-세포 박테리아 용해물 (WCBL)에서 조사하였다. 쿠마시 염색으로 Hsf의 발현이 상당히 증가된 것을 검출하였다 (내인성 Hsf 수준과 관련됨). 이 결과는 변형된 pCMK(+)-Hsf 벡터가 기능적이고 주요 PorA 외막 단백질 항원의 생성을 없애지 않고서도, 외막 단백질의 발현을 성공적으로 상향 조절하는 데 사용될 수 있음을 확증한다.

[0284] 이 실시예에서 사용된 올리고누클레오티드

[0285]

올리고누클레오티드	서열	주
Hsf 01-Nde	5'-GGA ATT C**CA TAT G**AT GAA CAA AAT ATA CCG C-3'	NdeI 클로닝 부위
Hsf 02-Nhe	5'-GTA GCT A**GC TAG CT**T ACC ACT GAT AAC CGA C-3'	NheI 클로닝 부위
GFP-mut-Asn	5'-AAC TGC AGA**ATT AAT** ATG AAA GGA GAA GAA CTT TTC-3'	NdeI과 부합하는 AsnI 클로닝 부위
GFP-Spe	5'-GAC AT**A CTA GT**T TAT TTG TAG AGC TCA TCC ATG -3'	NheI과 부합하는 SpeI 클로닝 부위
RP1 (SacII)	5'-TCC**CG CGG** GCC GTC TGA ATA CAT CCC GTC-3'	SacII 클로닝 부위
RP2	5'-CAT ATG GGC TTC CTT TTG TAA ATT TGA GGG CAA ACA CCC GAT ACG TCT TCA-3'	
RP3	5'-AGA CGT ATC GGG TGT TTG CCC TCA AAT TTA CAA AAG GAA GCC CAT ATG-3'	
RP4 (ApaI)	5'-GGG TAT TCC**GGG CCC** TTC AGA CGG CGC AGC AGG-3'	ApaI 클로닝 부위

[0286] **실시예 3:** 프로모터 대체에 의한 N. 메닌기티디스 혈청군 B *tbpA* 유전자의 상향 조절.

[0287] 본 실험의 목적은 TbpA 항원의 생성을 상향-조절하기 위하여 *tbpA* 유전자의 내인성 프로모터 영역을 강력한 *porA* 프로모터로 대체하는 것이었다. 이 목적을 위해 프로모터 대체 플라스미드를 대장균 클로닝 방법을 사용하여 구성하였다. *tbpA* 코딩 서열로부터 위쪽에 위치한 DNA 영역 (731 bp)은 나이세리아 메닌기티디스 균주 ATCC 13090의 사설 Incyte PathoSeq 데이터 베이스에서 발견하였다. 이 DNA는 TbpB 항원을 코딩하는 서열을 함유한다. 유전자는 오페론으로 조직한다. *tbpB* 유전자를 결실시키고 *CmR/porA* 프로모터 카세트로 대체시켰다. 이것을 위해 *tbpB* 유전자의 509 bp 5' 플랭킹 영역, 2139 bp의 *tbpB* 코딩 서열, 87 bp의 유전자간 (intergenic) 서열 및 *tbpA* 코딩 서열의 처음 483 누클레오티드에 상응하는 3218 bp의 DNA 단편을, 흡수 서열 및 NheI 및 HindIII 제한 부위 (밑줄친 곳)을 함유하고 있는 올리고누클레오티드 **BAD16** (5' - GGC CTA GCT

AGC CGT CTG AAG CGA TTA GAG TTT CAA AAT TTA TTC-3') 및 **BAD17** (5' - GGC CAA GCT TCA GAC GGC GTT CGA CCG AGT TTG AGC CTT TGC-3')을 사용하여 나이세리아 메닌기티디스 혈청군 B 게놈 DNA로부터 PCR 증폭시켰다. 이 PCR 단편을 고순도 키트 (Boerhinger Mannheim, Germany)로 깨끗하게 하고 직접 pGemT 벡터 (Promega, USA)에 클로닝시켰다. 이 플라스미드를 순환 PCR 돌연변이시켜서 (Jones & Winistofer (1992)) (i) *CmR/porA* 프로모터 카세트가 클로닝될 수 있도록 적당한 제한 부위를 삽입하고 (ii) *tbpB*의 209 bp의 5' 플랭킹 서열 및 *tbpB* 코딩 서열을 결실시켰다. 순환 PCR을 적당한 제한 부위 XmaI, BglII 및 XhoI (밑줄친 곳)을 함유하고 있는 올리고누클레오티드 **BAD 18** (5'-TCC CCC GGG AAG ATC TGG ACG AAA AAT CTC AAG AAA CCG-3') 및 **BAD 19** (5'-GGA AGA TCT CCG CTC GAG CAA ATT TAC AAA AGG AAG CCG ATA TGC AAC AGC AAC ATT TGT TCC G-3')를 사용하여 수행하였다. *CmR/*PorA 프로모터 카세트를 전술한 pUCD15/Omp85 플라스미드로부터, 적당한 제한 부위 XmaI, SpeI, BglII 및 XhoI (밑줄친 곳)을 함유하고 있는 프라이머 **BAD 21** (5'-GGA AGA TCT CCG CTC GAG ACA TCG GGC AAA CAC CCG-3') 및 **BAD 20** (5'-TCC CCC GGG AGA TCT CAC TAG TAT TAC CCT GTT ATC CC-3')을 사용하여 증폭시켰다. 이 PCR 단편을 순환 PCR 플라스미드에 클로닝시켰다. 이 플라스미드는 나이세리아 메닌기티디스 혈청군 B [*cps*-] 및 [*cps- porA*-] 균주를 형질 전환시키는데 사용할 것이다. *tbpA*의 상류 영역에 이중 교차를 통합시킴으로써 *tbpA* ATG 바로 위에 *porA* 프로모터가 삽입될 것이다.

[0288] **실시예 4:**2개의 항원: TbpA와 Hsf의 발현을 위해 상향 조절된 N. 메닌기티디스 혈청군 B 균주의 제조

[0289] 본 실험의 목적은 동일한 N. 메닌기티디스 혈청군 B 균주에서 동시에 TbpA와 Hsf의 발현을 상향-조절하는 것이었다. TbpA의 생성은 그것의 내인성 프로모터를 강력한 *porA* 프로모터로 대체시킴으로써 상향-조절되었다 (프로모터 대체). 이런 맥락에서 *tbpA*의 위쪽에 위치한 *tbpB* 유전자를 결실시켰더니 TbpB 단백질이 더 이상 외막에 존재하지 않았다. Hsf의 발현은 *porA* 유전자좌에서 상응하는 유전자의 두 번째 복사물을 삽입시킴으로써 (동종 재조합) 상향-조절되었다 (유전자 전달). 두 개의 균주 모두 WO 01/09350으로서 언급되는 별도의 특허에서 설명되었다. 두 개의 스트래티지에서 사용된 선택 마커 (Cm^R 또는 Kan^R)는 동일한 염색체안으로의 두 가지의 통합이 조합되는 것을 가능하게 하였다.

[0290] 총 게놈 DNA를 재조합 *Nm*.B *cps*-/TbpA+/PorA+ 균주로부터 Qiagen Genomic 팁 500-G 프로토콜에 의해 추출하였다. 10 ㎍의 DNA를 DraIII 제한 효소로 밤새 제한하여 고전적인 형질 전환 프로토콜에 의해 나이세리아 메닌기티디스 혈청군 B를 형질 전환하는 데 사용하였다. 형질 전환에 사용된 세포는 재조합 NMB*cps*-/Hsf+/PorA+ (*porA* 유전자좌로의 1회 교차에 의해 동종 재조합됨) 또는 재조합 NMB*cps*-/Hsf+/PorA- (*porA* 유전자좌로의 2회 교차에 의해 대립형질 교환/동종 재조합됨)이었다. 그것들을 200 ㎍/ml의 카나마이신을 함유하고 있는 GC 아가 위에 밤새 플레이팅시키고, 10 mM의 $MgCl_2$가 들어 있는 GC 액체 배지중에서 DO_{650}=0.1이 되도록 희석한 후, 37℃에서 10 ㎍의 DraIII 제한된 게놈 DNA와 함께 격렬하게 교반하면서 6시간 동안 인큐베이션하였다. 이중 교차 이벤트 (PCR 스크리닝)으로부터 생성된 재조합 나이세리아 메닌기티디스를 200 ㎍/ml의 카나마이신과 5 ㎍/ml의 클로람페니콜이 함유되어 있는 GC 배지상에서 선택하고, OMV 제제중에서의 TbpA 및 Hsf 발현에 대해 분석하였다. 도 1에 도시된 바와 같이, TbpA 및 Hsf 두 가지의 생성은 NMB*cps*- 대조 균주로부터 제조된 OMV와 비교할 때 TbpA/Hsf 재조합 NMB균주로부터 제조된 OMV에서 상당히 증가하였다. 이중 재조합체에서 각 단백질의 과발현의 수준은 상응하는 단일 재조합체에서 얻어진 발현 수준에 필적하였다. TbpA 및 Hsf의 과발현 수준은 PorA+ 및 PorA- 균주와 필적하였다 (데이터는 제시하지 않음). 전체적으로 이들 데이터는 (i) TbpA 및 Hsf의 발현이 N. 메닌기티디스안으로 연대적으로 및 동시적으로 상향 조절될 수 있으며, (ii) TbpA 및 Hsf에 대하여 풍부해진 재조합 수포가 얻어질 수 있고 예방접종에 사용될 수 있다는 것을 증명한다.

[0291] **실시예 5:**2개의 항원: TbpA와 NspA의 발현을 위해 상향 조절된 N. 메닌기티디스 혈청군 B 균주의 제조

[0292] 본 실험의 목적은 동일한 N. 메닌기티디스 혈청군 B 균주에서 동시에 TbpA와 NspA의 발현을 상향-조절하는 것이었다. TbpA의 생성은 그것의 내인성 프로모터 영역을 강력한 *porA* 프로모터로 대체시킴으로써 상향-조절되었다 (프로모터 대체). NspA의 발현은 *porA* 유전자좌에서 상응하는 유전자의 두 번째 복사물을 삽입시킴으로써 (동종 재조합) 상향-조절되었다 (유전자 전달). 두 개의 별개의 균주 모두 특허 WO 01/09350에 개별적으로 언급되어 있다. 두 개의 스트래티지에서 사용된 선택 마커 (Cm^R 또는 Kan^R)는 동일한 염색체안으로의 두 가지의 통합이 조합되는 것을 가능하게 하였다.

[0293] 재조합 NMB*cps*-/TbpA+/PorA+ 균주로부터 총 게놈 DNA를 Qiagen Genomic 팁 500-G 프로토콜에 의해 추출하였다. 10 ㎍의 DNA를 AatII 제한 효소로 밤새 제한하여 고전적인 형질 전환 프로토콜에 의해 나이세리아 메닌기티디스 혈청군 B를 형질 전환하는 데 사용하였다. 형질 전환에 사용된 세포는 재조합 NMB*cps*-/NspA+/PorA- 였다. 그

것들을 200 ㎍/ml의 카나마이신을 함유하고 있는 GC 아가 위에 밤새 플레이팅시키고 10 mM의 $MgCl_2$가 들어 있는 GC 액체 배지중에서 DO_{650}=0.1이 되도록 희석한 후, 37 ℃에서 10 ㎍의 AatII 제한된 게놈 DNA와 함께 격렬하게 교반하면서 6시간 동안 인큐베이션하였다. 이중 교차 이벤트 (PCR 스크리닝)으로부터 생성된 재조합 나이세리아 메닌기티디스를 200 ㎍/ml의 카나마이신과 5 ㎍/ml의 클로람페니콜이 함유되어 있는 GC 배지상에서 선택하고, OMV 제제중에서 TbpA 및 NspA 발현에 대해 분석하였다. TbpA 및 NspA 두 가지의 생성은 NMB*cps*- 대조 균주로부터 제조된 OMV와 비교할 때 TbpA/NspA 재조합 NMB균주로부터 제조된 OMV에서 상당히 증가하였다. 이중 재조합체에서 각 단백질의 과발현의 수준은 상응하는 단일 재조합체에서 얻어진 발현 수준에 필적하였다. 전체적으로 이들 데이터는 (i) TbpA 및 NspA의 발현이 N. 메닌기티디스안으로 연대적으로 및 동시적으로 상향 조절될 수 있으며, (ii) TbpA 및 NspA에 대하여 풍부해진 재조합 수포가 얻어질 수 있고 예방접종에 사용될 수 있다는 것을 증명한다.

[0294] **실시예 6:**2개의 항원: NspA와 D15/Omp85의 발현을 위해 상향 조절된 N. 메닌기티디스 혈청군 B 균주의 제조

[0295] 본 실험의 목적은 동일한 N. 메닌기티디스 혈청군 B 균주에서 동시에 NspA와 D15/Omp85의 발현을 상향-조절하는 것이었다. D15/Omp85의 생성은 그것의 내인성 프로모터를 강력한 *porA* 프로모터로 대체시킴으로써 상향-조절되었다 (프로모터 대체). NspA의 발현은 *porA* 유전자좌에서 상응하는 유전자의 두 번째 복사물을 삽입시킴으로써 (동종 재조합) 상향-조절되었다 (유전자 전달). 두 개의 균주 모두 특허 WO 01/09350에서 개별적으로 기술되어 있다. 두 개의 스트래티지에서 사용된 선택 마커 (Cm^R 또는 Kan^R)는 동일한 염색체안으로의 두 가지의 통합이 조합되는 것을 가능하게 하였다.

[0296] 총 게놈 DNA를 재조합 NMB*cps*-/D15-Omp85/PorA+ 균주로부터 Qiagen Genomic 팁 500-G 프로토콜에 의해 추출하였다. 10 ㎍의 DNA를 AatII 제한 효소로 밤새 제한하여 고전적인 형질 전환 프로토콜에 의해 나이세리아 메닌기티디스 혈청군 B를 형질 전환하는 데 사용하였다. 형질 전환에 사용된 세포는 재조합 NMB*cps*-/NspA+/PorA- 였다. 그것들을 200 ㎍/ml의 카나마이신을 함유하고 있는 GC 아가 위에 밤새 플레이트하고 10 mM의 $MgCl_2$가 들어 있는 GC 액체 배지중에서 DO_{650}=0.1이 되도록 희석한 후, 37 ℃에서 10 ㎍의 AatII 제한된 게놈 DNA와 함께 격렬하게 교반하면서 6 시간 동안 인큐베이션하였다. 이중 교차 이벤트 (PCR 스크리닝)으로부터 생성된 재조합 나이세리아 메닌기티디스를 200 ㎍/ml의 카나마이신과 5 ㎍/ml의 클로람페니콜이 함유되어 있는 GC 배지상에서 선택하고, OMV 제제중에서의 NspA 및 D15/Omp85 발현에 대해 분석하였다. NspA와 D15/Omp85 두 가지의 생성은 NMB*cps*- 대조 균주로부터 제조된 OMV와 비교할 때 NspA/D15-Omp85 재조합 NMB균주로부터 제조된 OMV에서 상당히 증가하였다. 이중 재조합체에서 각 단백질의 과발현의 수준은 상응하는 단일 재조합체에서 얻어진 발현 수준에 필적하였다. 전체적으로 이들 데이터는 (i) NspA 및 Omp85의 발현이 N. 메닌기티디스안으로 연대적으로 및 동시적으로 상향 조절될 수 있으며, (ii) NspA 및 Omp85에 대하여 풍부해진 재조합 수포가 얻어질 수 있고 예방접종에 사용될 수 있다는 것을 증명한다.

[0297] **실시예 7:**대장균에서 재조합 Hsf 형태의 제조 및 정제

[0298] 나이세리아 메닌기티디스로부터 얻어지는 Hsf-유사 단백질에 대한 컴퓨터 분석 결과 최소한 4가지의 구조적 도메인이 나타난다. 균주 H44/76을 참조하여 Hsf 서열을 고려하면 도메인은 다음과 같다: 도메인 1은 아미노산 1 내지 51을 포함하고, 자가-수송체 패밀리의 특징인 sec-의존성 신호 펩티드를 엔코딩하며, 도메인 2는 아미노산 52 내지 473을 포함하고, 표면 노출되는 듯 하며 면역 시스템에 영향을 받기 쉬운 패신저 도메인을 엔코딩하며, 도메인 3은 아미노산 474 내지 534를 포함하고, 단백질 올리고머화에 필요한 추정되는 코일형-코일 도메인 및 힌지 (목 부분)을 엔코딩하며, 도메인 4는 C-말단 쪽으로 535개의 잔기를 포함하고, 배럴(barrel)-모양 구조로 어셈블리되고 외막에 고착되는 것으로 보이는 베타-가닥을 엔코딩하는 것으로 예상된다 (Henderson et al. (1998), Trends Microbiol. 6:370-378; Hoiczyk et al. (2000), EMBO 22:5989-5999). 도메인 2와 3이 표면 노출되고 잘 보존되는 것 같기 때문에 (시험된 모든 균주에서 80 % 이상; Pizza et al. (2000), Science 287: 1816-1820), 그것들은 관심을 끄는 백신 후보를 나타낸다. 그 목적에 대해 도메인 2 (Hsf 패신저 도메인으로 언급됨) 및 도메인 2+3 (Hsf 목 부분+코일형-코일 도메인으로 언급됨)을 대장균에서 발현시키고 그것으로부터 정제하였다. 아미노산 52 내지 473 (Hsf 패신저) 및 52 내지 534 (Hsf n+cc)를 엔코딩하는 DNA 단편을 올리고누클레오티드 부가 말단 RcaI (전방 프라이머) 및 XhoI (역 프라이머) 제한 부위를 사용하여 PCR 증폭시켰다. 정제된 암플리콘을 공급자에 의해 권장된 조건에서 RcaI/XhoI로 절단시키고, 계속해서 pET24d (Novagen Inc., Madison WI) 대장균 발현 벡터의 NcoI (rcaI과 부합할 수 있다)/XhoI 부위에 클로닝시켰다. 재조합 플라스미드를 선택하여 정제된 재조합 플라스미드를 제조하는 데 사용하였다. 발현 연구를 위하여 이들 벡터 (pET-Hsf

pas & pET-Hsf ncc)를 대장균 균주 B121DE3 (Novagen)에 도입하였는데, 거기에서 T7 중합효소에 대한 유전자가 이소프로필-베타-D 티오갈락토시드 (IPTG)-조절 가능한 *lac* 프로모터의 제어하에 놓이게 된다. 노바블루 (Novablue)(DE3) [pET-24b/BASB029] 대장균 재조합 균주의 액체 배양물 (700 ml)을 37 ℃에서 교반 하에 600 nm에서의 광학 밀도 (OD600)가 0.6에 도달할 때까지 성장시켰다. 그 시점에서 IPTG를 1 mM의 최종 농도로 첨가하고, 배양물을 추가로 4 시간 동안 성장시켰다. 그런 다음 배양물을 10,000 rpm에서 원심분리하고, 펠릿을 -20 ℃에서 최소한 10 시간 동안 냉동시켰다. 그것을 해동시킨 후 펠릿 (680 ml 배양물)을 30분 동안 22 ℃에서 20 mM의 포스페이트 완충액 pH 7.0에 재현탁시킨 후, 라니(Rannie) 파쇄기를 통한 2회 통과에 의해 세포를 용해시켰다. 용해된 세포를 30분 동안 15,000 rpm (Beckman J2-HS 원심분리, JA-20 로터)에서 4 ℃에서 펠릿화하였다. 상층액을 20 mM의 트리스-HCl 완충액 pH 8.0으로 평형화시킨 Q-세파로스 패스트 플로우 칼럼 (Pharmacia)상에 로딩하였다. 칼럼을 통하여 통과시킨 후 칼럼을 5 칼럼 부피의 20 mM의 트리스-HCl 완충액 pH 8.0으로 세척하였다. 재조합 단백질을 20 mM의 트리스-HCl 완충액 pH 8.0 중의 250 mM NaCl에 의해 칼럼으로부터 용출하였다. 항원 포지티브 분획을 모아서 20 mM의 인산염 완충액 pH 7.0에 대하여 밤새 투석하였다. 투석된 샘플에 0.5 M의 NaCl과 20 mM의 이미다졸을 첨가하였다. 그런 다음 샘플을 500 mM의 NaCl과 20 mM의 이미다졸을 함유하고 있는 20 mM의 인산염 완충액 pH 7.0으로 평형화시킨 Ni-NTA 아가로스 칼럼 (Qiagen)상에 부가하였다. 칼럼을 통하여 통과시킨 후 칼럼을 500 mM의 NaCl과 20 mM의 이미다졸을 함유하고 있는 20 mM의 인산염 완충액 pH 7.0의 5 칼럼 부피로 세척하였다. 오염물을 20 mM의 인산염 완충액 pH 7.0 중의 100 mM 이미다졸에 의해 용출하였다. 재조합 단백질을 20 mM 인산염 완충액 pH 7.0 중의 250 mM 이미다졸에 의해 칼럼으로부터 용출하였다. 항원 포지티브 분획을 모아서 150 mM의 NaCl을 함유하고 있는 10 mM의 인산염 완충액 pH 6.8에 대하여 투석하였다. 도 2에서 알 수 있는 것처럼, 47 kDa (추정된 상대 분자량) 근처에서 이동하는 풍부해진 (CBB 염색된 SDS-PAGE에서 90 % 이상 순수한 것으로 추정된 순도) Hsf-유사 패신저 단백질을 칼럼으로부터 용출하였다. 이 폴리펩티드는 5-히스티딘 모티프에 대하여 생성된 마우스 단클론성 항체에 대하여 반응성이었다. 전체적으로 이들 데이터는 Hsf 패신저와 Hsf ncc 유전자 두 가지가 모두 대장균에서 재조합체 형태로 발현될 수 있고 정제될 수 있음을 나타낸다.

[0299] **실시예 8:**대장균에서 재조합 Hap 패신저의 제조 및 정제

[0300] 나이세리아 메닌기티디스로부터 얻어지는 Hap-유사 단백질에 대한 컴퓨터 분석 결과 최소한 3가지의 구조적 도메인이 나타난다. 균주 H44/76을 참조하여 Hap-유사 서열을 고려하면 도메인은 다음과 같다: 도메인 1은 아미노산 1 내지 42를 포함하고, 자가-수송체 패밀리의 특징인 sec-의존성 신호 펩티드를 엔코딩하며, 도메인 2는 아미노산 43 내지 950을 포함하고, 표면 노출되는 것 같고 면역 시스템에 영향을 받기 쉬운 패신저 도메인을 엔코딩하며, 도메인 3은 C-말단 (1457) 쪽으로 951개의 잔기를 포함하고, 배럴-모양 구조로 어셈블리되고 외막에 고착되는 것으로 보이는 베타-가닥을 엔코딩하는 것으로 예상된다. 도메인 2가 표면 노출되고 잘 보존되는 (시험된 모든 균주에서 80 % 이상) 것으로 보이고 대장균에서 서브유니트 항원으로서 생성될 수 있기 때문에 그것은 관심을 끄는 백신 후보를 나타낸다. 도메인 2와 3이 표면 노출되고 잘 보존되는 것 같기 때문에 (시험된 모든 균주에서 80 % 이상; Pizza et al. (2000), Science 287: 1816-1820), 그것들은 관심을 끄는 백신 후보를 나타낸다. 그 목적을 위해 도메인 2 (Hap 패신저 도메인으로 언급됨)를 대장균에서 발현시키고 대장균으로부터 정제하였다. 아미노산 43 내지 950 (Hap 패신저)을 엔코딩하는 DNA 단편을 올리고누클레오티드 부가 말단 NcoI (전방 프라이머) 및 XhoI (역 프라이머) 제한 부위를 사용하여 PCR 증폭시켰다. 정제된 암플리콘을 공급자에 의해 권장된 조건에서 RcoI/XhoI로 절단시키고, 계속해서 pET24d (NovagenInc., Madison WI) 대장균 발현 벡터의 NcoI/XhoI 부위에 클로닝시켰다. 재조합 플라스미드를 선택하여 대규모로 정제하였다. 발현 연구를 위하여 이들 벡터 (pET-Hap pass)를 대장균 균주 B121DE3 (Novagen) 안에 도입하였고, 그 안에서 T7 중합효소에 대한 유전자가 이소프로필-베타-D 티오갈락토시드 (IPTG)-조절 가능한 *lac* 프로모터의 제어하에 놓이게 된다.

[0301] **발효기에서 대장균 BL21[pET-Hap pass]의 배양:** 마스터 시드(master seed)로부터의 일정액 분획 (100 ㎕)을 FEC013AA 플레이트 (Soja 펩톤 A3 20 g/L, 효모 추출물 5 g/L, NaCl 5 g/L, 아가 18 g/L, 1 L를 채우는 양의 증류된 H_2O) 위에 얇게 바르고, 20 시간 동안 37 ℃에서 성장시켰다. 박테리아 론(lawn)을 수득하여 0.9 %의 NaCl을 함유하고 있는 멸균수에 재현탁하였다. 이 용액을 사용하여 FEC011AC 배지 (Soja 펩톤 24 g/L, 효모 추출물 48 g/L, $MgSO_4/7H_20$ 0.5 g/L, K_2HPO_4 2 g/L, $NaH_2PO_4/2H_20$ 0.45 g/L, 글리세롤 (87%) 40g 및 1 L를 채우는 양의 증류된 H_20)가 담긴 배치식으로 사용된 20 L 발효기에 접종시켰다. 온도 (30 ℃), pH (6.8, NaOH 25 %/H_3PO_4 25 %) 및 압력 (500 mbar)을 일정하게 유지하고 산소 공급을 20 L/분으로 설정하였다. 이들 조건에서 용해된 산소 압력을 교반을 조율함으로써 (100 에서 1000 rpm) 20 %로 유지하였다. 성장 후 8 시간 후 (OD =

27.8)에 인듀서 (IPTG, 1 mM)을 첨가하였다. 샘플 (6 L)을 6 시간 후 (OD = 49.2)와 16 시간 30분 후 (OD = 48.6)에 수집하고, 원심분리에 의해 바이오매스(biomass)를 수득하여 상응하는 펠릿을 -20 ℃에 보관하였다.

[0302] Hap 패신저의 정제:

[0303] HAP 패신저를 배치식의 발효기로부터 정제하였다. 정제 개략도를 하기에 나타낸다.

[0304] 프렌치 프레스

[0305] (트리스 50 mM/EDTA 5 mM, pH 8.0)

[0306] ↓

[0307] 10000 rpm(JA10)에서 30'

[0308] ↓

[0309] 펠릿을 Pi 20 mM/우레아 8 M, pH 7.0에서 녹임

[0310] 1 시간 동안 실온에서 교반함

[0311] ↓

[0312] 10000 rpm(JA10)에서 30'

[0313] ↓

[0314] **SP-세파로스-XL**

[0315] Pi 20 mM/우레아 8 M; 용출+/- 50 mM NaCl

[0316] ↓

[0317] 킬레이팅 세파로스-FF-Cu++

[0318] Pi 20 mM/NaCl 0.5 M/우레아 8 M; 용출+/- 100 mM 이미다졸

[0319] ↓

[0320] **투석**

[0321] (PBS pH 6.8/아르기닌 0.5 M)

[0322] ↓

[0323] 멸균 여과

[0324] Hap 패신저의 대부분은 세포 파괴후 원심분리 펠릿에서 회수된다. 용해는 8 M 우레아에 의해 가능해졌다. N-말단의 His-꼬리에도 불구하고 IMAC는 첫 번째 단계에서는 작동하지 않았지만, 첫 번째 단계 후 SP-XL 양이온 교환기에서는 잘 작동하였다. 이 SP-세파로스-XL 상에서 단백질은 선형 NaCl (0 내지 250 mM) 구배의 중간에서 정량적으로 용출되었다. IMAC는 FHAb에 대해서처럼, Cu^{++}-로딩된 킬레이팅 세파로스 FF를 사용하여 수행하였다. 이 때 FHAb와는 대조적으로 IMAC는 중요한 정제 인자를 나타낸다. SDS-PAGE 상에서 HAP2/3은 IMAC 후에 순수한 것처럼 보인다. 그러나 HAP2/3 피크는 0 내지 200 mM 이미다졸 구배상에서 매우 넓어서 본 발명자들은 이미다졸 단계 (10 mM 에서 100 mM)에 의해 용출하려 노력하였다; 그러나 구배 모드가 순도의 관점에서는 더 효과적으로 보였다. 마지막 단계로서 본 발명자들은 겔 여과에 의해 우레아-대-아르기닌 완충액 교환을 시도하였지만 이 경우 단백질은 2개의 피크상에서 용출되었다. 이들 2개의 피크는 SDS-PAGE 상에서 비교할만한 프로필을 나타냈고; 따라서 HAP 패신저의 부분적인 재접힘 때문이라는 가정을 세울 수 있었다. 그런 다음 본 발명자들은 완충액 교환을 위한 마지막 단계로서 고전적인 투석으로 되돌아갔다. SDS-PAGE 분석은 최종 물질의 양호한 순도를 나타냈다 (도 3 참조). HAP 패신저 순도는 추가로 WB 항-his에 의해 확증된다. 그것은 항-대장균에 의해 인지된다. 분자량은 96.1 KD 인 것으로 발견되었다.

[0325] **실시예 9:** 대장균에서 재조합 FrpA/C 형태의 제조 및 정제

[0326] 나이세리아 메닌기티디스는 철이 제한될 때 분비되는, FrpA와 FrpC로 언급되는 2개의 RTX 단백질을 엔코딩한다 (Thompson et al., (1993) J. Bacteriol. 175: 811-818; Thompson et al., (1993) Infect. Immun. 61:2906-

2911). RTX (반복 독소) 단백질 패밀리는 공통적으로 그것들의 C-말단 가까이에 일치하는 일련의 9개의 아미노산 반복부를 가지고 있다: Leu Xaa Gly Gly Xaa Gly (Asn/Asp) Asp Xaa. (LXGGXGN/DDX). 대장균 HlyA에서의 반복부는 Ca2+ 결합 부위로 여겨진다. 도 4에 나타나 있는 것처럼, 수막구균의 FrpA와 FrpC 단백질은 균주 FAM20에서 특성확인된 것처럼 중심 부분과 C-말단 영역에서 광범위한 아미노산 유사성을 공유하고 있지만, N-말단에서는 (있다 해도) 매우 제한된 유사성을 가지고 있다. 더욱이 FrpA와 FrpC 사이에 보존된 영역은 9개의 아미노산 모티프의 반복 (FrpA에서 13회, FrpC에서 43회)으로 인한 약간의 다형태를 나타낸다. FrpA 및 FrpC의 백신 잠재력을 평가하기 위하여 본 발명자들은 대장균에서 FrpA와 FrpC 사이에 보존된 단백질 영역을 재조합적으로 제조하였다. 그 목적을 위해 아미노산 277 부터 1007 까지 (N. 메닌기티디스 FAM20 퓁티드 서열과 관련하여)를 포함하는 DNA 절편을, 전방 프라이머 FrpA-19 (5'-CTCGAGACCATGGGCAAATATCATGTCTACGACCCCCTCGC-3') 및 역 프라이머 FrpA-18 (3'-GTGCATAGTGTCAGAGTTTTTGTCGACGTCGTAATTATAGACC-3')을 사용하여 N. 메닌기티디스 혈청군 B H44/76 게놈으로부터 PCR 증폭시켰다. 각각 ~1530 bp (3회 반복), ~2130 bp (13회 반복) 및 2732 bp (23회 반복)의 암플리콘을 얻어서 NcoI과 SalI 제한 엔도누클레아제로 절단시켰다. 그런 다음 이들 단편을 pET24d의 NcoI/XhoI (SalI과 부합할 수 있다) 부위에 삽입하고, 재조합 플라스미드 (각각 pET-Frp3, pET-Frp13 및 pET-Frp23)를 선택하여 대장균 BL21DE3 세포를 형질 전환하는 데 사용하였다. 도 5에 도시된 것처럼, 세개의 구성물은 모두 유도될 때 재조합 FrpA/C 보존된 도메인을 생성하였다. 더우기 반복 횟수를 증가시킴으로써 세포 분획화 분석에 의해 측정되는 바와 같이 재조합 단백질의 용해도가 증가되었다 (데이터는 제시하지 않음).

[0327] **노나펩티드 LXGGXGN/DDX의 23회 반복을 함유하고 있는 FrpA/C 보존된 도메인 (총 911 아미노산)의 정제:** 대장균 B121DE3[pET-Frp23] 3.5 리터를 배양하고 OD가 0.6에 이르렀을 때 2 mM의 IPTG를 첨가함으로써 4 시간 동안 유도하였다. 세포를 원심분리에 의해 수득하고 상응하는 펠릿을 압력으로 파괴한 후, 원심분리에 의해 정화하고 상응하는 상층액을 Ni2+-이온 금속 친화성 칼럼 (Ni-NTA-아가로스, Qiagen GmBh)에 로딩하였다. 용출을 위하여 이미다졸을 사용하고 최종적으로 10 mM Na 포스페이트 pH 6.8, 150 mM NaCl에 대하여 광범위한 투석을 함으로써 제거하였다.

[0328] **실시예 10:** 대장균에서 재조합 FHA 형태의 제조 및 정제

[0329] **N. 메닌기티디스로부터 트렁케이팅된 FhaB의 클로닝**

[0330] 게놈 DNA를 10^{10} 세포의 N. 메닌기티디스 혈청군 B 균주 H44/76으로부터, QIAGEN 게놈 DNA 추출 키트 (Qiagen Gmbh)를 사용하여 추출하였다. 이 물질 1 μg을 FhaB 유전자에 특정한 다음의 프라이머들: JKP:5' AAT GGA ATA CAT ATG AAT AAA GGT TTA CAT CGC ATT ATC 3' 및 57JKP 5' CCA ACT AGT GTT TTT CGC TAC TTG GAG CTG T 3'을 사용하여 중합효소 연쇄 반응으로 DNA를 증폭시켰다. 단백질의 처음 1433 N-말단 아미노산을 엔코딩하는 약 4200 bp의 DNA 단편을 얻었고, 이것을 NdeI/SpeI 제한 엔도누클레아제로 절단시킨 다음, pMG MCS (pMG 유도체, Proc Natl Acad Sci USA 1985 Jan; 82(1):88-92)의 상응하는 부위에 표준 분자 생물학 기법을 사용하여 삽입하였다 (Molecular Cloning, a Laboratory Manual, Second Edition, Eds: Sambrook, Fritsch & Maniatis, Cold Spring Harbor press 1989). 클로닝된 FhaB 단편의 DNA 서열을 빅 다이 사이클 (Big Dye Cycle) 서열화 키트 (Perkin-Elmer) 및 ABI 373A/PRISM DNA 서열화기를 사용하여 측정하였다 (도 1 참조). 그런 다음 재조합 pMG-FhaB 플라스미드 (1 μg)에 대해 FhaB에 특이적인 프라이머들 (XJKP03 5' AATGGAATACATATGAATAAAGGTTTACATCGCATTATCTTTAG 3' 및 XJKP5702 5' GGGGCCACTCGAGGTTTTTCGCTACTTGGAGCTGTTTCAGATAGG 3')을 사용하여 중합효소 연쇄 반응으로 DNA를 증폭시켰다. 4214 bp의 DNA 단편을 얻었고, 이것을 NdeI/XhoI 제한 엔도누클레아제로 절단시킨 다음, pET-24b 클로닝/발현 벡터 (Novagen)의 상응하는 부위에 표준 분자 생물학 기법을 사용하여 삽입하였다 (Molecular Cloning, a Laboratory Manual, Second Edition, Eds: Sambrook, Fritsch & Maniatis, Cold Spring Harbor press 1989). 트렁케이팅된 FhaB를 함유하고 있는 재조합 pET-24b (pET24b/FhaB2/3)의 확증적인 서열분석을 빅 다이 키트 (Applied Biosystems) 및 ABI 373/A DNA 서열분석기 상에서 공급자에 의해 설명된 조건에서의 분석을 사용하여 수행하였다. 그 결과의 누클레오티드 서열은 도 6에 도시된다.

[0331] **대장균에서 재조합 트렁케이팅된 FhaB 단백질의 발현 및 정제**

[0332] pET24b/FhaB2/3 클로닝/발현 벡터의 제조는 상기에서 설명하였다. 이 벡터는 강력한 박테리오파지 T7 유전자 10 프로모터의 제어하에 놓여 있는, 균주 H44/76으로부터 분리되고 6 히스티딘 잔기의 스트레치 (재조합 생성물의 C-말단에 있는)와 융합된 상태의 트렁케이팅된 FhaB 유전자를 지니고 있다. 발현 연구를 위하여 이 벡터를 대장균 균주 Novablue (DE3)(Novagen)에 도입시켰는데, 거기에서 T7 중합효소에 대한 유전자는 이소프로필-베타-D 티오갈락토시드 (IPTG)-조절가능한 *lac* 프로모터의 제어 하에 놓인다. 노바블루(Novablue)(DE3)

[pET24b/FhaB2/3] 대장균 재조합 균주의 액체 배양물 (100 ml)을 37 ℃에서 교반 하에, 600 nm에서의 광학 밀도 (OD600)가 0.6에 도달할 때까지 성장시켰다. 그 시점에서 IPTG를 1 mM의 최종 농도로 첨가하고, 배양물을 추가로 4 시간 동안 성장시켰다. 그런 다음 배양물을 10,000 rpm에서 원심분리하고, 펠릿을 -20 ℃에서 최소한 10 시간 동안 냉동시켰다. 그것을 해동시킨 후 펠릿을 30분 동안 25 ℃에서 완충액 A (6 M의 염산 구아니딘, 0.1 M의 Na_2HPO_4, 0.01 M의 트리스, pH 8.0)중에 재현탁시킨 후 바늘을 통하여 3회 통과시키고, 원심분리 (20000 rpm, 15 분)에 의하여 정화시켰다. 그런 다음 샘플을 Ni2+-로딩된 Hitrap 칼럼 (Pharmacia Biotech)상에 1 ml/분의 유속으로 로딩하였다. 칼럼을 통과하여 통과시킨 후 칼럼을 계속해서 40 ml의 완충액 B (8 M 우레아, 0.1M NaH_2PO_4, 0.01M 트리스, pH 8. 0)와 40 ml의 완충액 C (8 M 우레아, 0.1M NaH_2PO_4, 0.01 M 트리스, pH 6.3)로 세척하였다. 그런 다음 재조합 단백질 FhaB2/3/His6을 칼럼으로부터, 500 mM의 이미다졸을 함유하고 있는 30 ml의 완충액 D (8 M 우레아, 0.1M NaH2PO4, 0.01 M 트리스, pH 6.3)를 사용하여 용출하고, 3 ml-크기의 분획을 수집하였다. 도 7에 나타낸 바와 같이 154 kDa 부근 (추정된 상대적인 분자량)에서 이동하는 매우 풍부해진 FhaB-2/3/His6 단백질을 칼럼으로부터 용출하였다. 이 폴리펩티드는 5-히스티딘 모티프에 대하여 생성된 마우스 단클론성 항체에 대하여 반응성이었다. 전체적으로 이들 데이터는 FhaB2/3이 대장균에서 발현될 수 있고 재조합 형태로 정제될 수 있다는 것을 나타낸다.

[0333] **재조합 FhaB2/3/His를 사용한 마우스 예방접종**

[0334] 대장균에서 발현된 부분적으로 정제된 재조합 FhaB2/3/His6 단백질을 Balb/C 마우스에 0, 14 및 29일에 3회 주사하였다 (10 마리 동물/군). 동물들에게 피하 경로에 의하여 100 ㎍의 $AlPO_4$상에 흡착되거나 SBAS2 에멀션에 제형된 (SB62는 단위 용량 당 5 ㎍의 MPL과 5 ㎍의 QS21을 함유함) 형태의 2가지의 상이한 제형 중의 약 5 ㎍의 항원을 주사하였다. SBAS2 에멀션만으로 예방접종된 마우스로 이루어진 네가티브 대조군도 본 실험에 포함시켰다. 마우스를 제 29일 (두번째 투여 후 15일)과 35일 (세번째 투여 후 6일)에 채혈하여 특정 항-FhaB 항체를 검출하였다. 특정 항-FhaB 항체는 정제된 재조합 FhaB2/3/His에 대한 ELISA에 의해 (군 당 10마리의 마우스들로부터) 모아진 혈청에 대해 측정하였다.

[0335] **실시예 11:**FHA, Hap 및 Hsf 항원에 대하여 생성된 마우스 및 토끼 혈청의 점착 차단 활성

[0336] 수막구균의 FHAB-유사, Hsf-유사, 및 Hap-유사 단백질에 상동하는 단백질은 중요한 독성 결정인자이고, 보르데텔라 페르투시스 (FHA) 및 헤모필루스 인플루엔자 (Hap 및 Hsf)의 박테리아 점착을 매개하는 것으로 기존에 설명되었다. 상피 및 내피 세포에 대한 점착은 수막구균에 의한 비인강의 집락화 및 혈액-뇌 장벽의 교차에 결정적인 것으로 알려져 있다. 그러므로 N. 메닌기티디스의 점착을 간섭하는 것은 수막구균의 집락화 및 감염을 조절하는 매우 유익한 접근법임을 나타낸다. 본 발명자들은 수막구균의 FHAB 2/3rd, Hap-유사 및 Hsf-유사 항원에 대해 특정된 항-혈청이 나이세리아 메닌기티디스의 내피 세포에의 점착을 간섭할 수 있는지의 여부를 알기 위해 시험하였다. 다음의 실험 과정을 사용하였다:

[0337] **HUVEC에 대한 점착의 억제:** 이 연구에서 사용한 수막구균 시험 균주는 균주 NmA8013의 캡슐화되지 않고, 필리에이트되지 않은 (non-piliated) Opa- 및 Opc- 유도체였다. 수막구균 세포 (NmA8013 유도체의 2.10E5 집락 형성 유니트 (CFU))를 30분 동안 37 ℃에서 400 ㎕의 RPMI, 50 ㎕의 우태아 혈청 및 50 ㎕의 점착 차단 성질에 대하여 시험하고자 하는 혈청으로 구성된 배지중에서 인큐베이션하였다. 그런 다음 이 혼합물을 배양 배지를 이미 제거하여 놓은 사람 태반 정맥 내피 세포 (HUVEC)의 컨플루언스 (confluence) 단층을 함유하고 있는 웰에 놓았다. 박테리아와 HUVEC 세포를 4 시간 동안 37 ℃에서, 5 % CO2 하에서 인큐베이션하였다. 그런후 세포 단층을 신선한 RPMI 배지로 3회 세척하고, 계속해서 플레이트를 스크랩핑하였다. HUVEC 세포와 관련된 CFU를 여러 번의 희석에 대하여 측정하였고, 세포 용해물을 GC 플레이트 위에 플레이팅하였다. 플레이트를 48 시간 동안 37 ℃에서 인큐베이션하여 세포-관련 수막구균의 회수 및 성장을 가능하게 하였다.

[0338] **재조합 FHAB 2/3rd, Hap 및 hsf 항원에 대해 생성된 마우스 및 토끼 혈청의 점착-차단 활성:** 항-FHA 2/3, 항-Hsf 전장 (WO 99/58683에 설명되어 있음) 및 항-Hap 전장 (WO 99/55873) 항체와 상응하는 Hsf 및 Hap 패신저 도메인에 대해 특정된 항-혈청은 내피 HUVEC 세포에 대한 수막구균의 점착을 간섭한다. 도 8은 $AlPO_4$ 중에 제형된 FHA 2/3에 의해 유래된 특정 항체가 애쥬번트 단독과 비교할 때 HUVEC 세포에 대한 나이세리아 메닌기티디스 B 점착을 억제할 수 있음을 예시한다. SBAS2 애쥬번트 단독 (항원 없음, 그룹 4)과 비교할 때 항-FHA 2/3 abs (SBAS2 제형)가 여전히 효과적이지만 $ALPO_4$보다는 덜 강력하다. SBAS2 애쥬번트 단독 (항원 없음)으로는 점착을 간섭하는 항체를 유도하지 못한다. 그룹 4와 비교할 때 항-Hap 항체 (그룹 1)는 약간 억제 효과를 가질 수

있다. 그룹 5에서 항-FHA 2/3, 항-Hsf 및 항-Hap 항체의 혼합물이 시험되는 경우, 점착 억제는 항-FHA 2/3 단독보다 더 강력한데, 이것은 항-Hap와 항-Hsf 항체에 의해 제공된 상승작용적 효과를 시사한다. 두 번째 억제 실험에서 (도 2), 항 OMV 과발현 Hsf (후보 단백질로서)에 대해 특정된 특정 토끼 항혈청은 네가티브 대조 표준 (그룹 3 대 4)과 비교하여 내피 세포에 대한 나이세리아 메닌기티디스 B의 고정을 부분적으로 억제할 수 있었다. 이 토끼 항혈청은 매우 높은 특정 항-Hsf 항체 역가를 함유하는 것으로 증명되었다. 재조합 Hsf (Hsf 패신저 및 Hsf 전장)에 대한 항체는 또한 박테리아의 HUVEC 세포상에서의 점착을 억제할 수 있다. 이것은 마우스 혈청 (그룹 5-6)뿐만 아니라 토끼 혈청 (더 적은 규모에서)(그룹 7-8)에서 모두 사실이다. 이 두 번째 실험에서 이미 첫 번째 실험에서 시험된 특정 항-재조합 FHA 2/3 항체 (그룹 1)는 그것들의 매우 높은 억제 효과를 확증한다. 이들 결과는 분리되거나 조합된 상태의 이들 특정 항원 (Hap, FHA2/3 및 Hsf)이 관심을 끄는 백신 항원임을 나타낸다.

[0339] **실시예 12:** 마우스 공격 모델에서 재조합 OMV의 보호 효과

[0340] 여러 가지 재조합 OMV가 Balb/C 마우스에서 치명적인 공격 후의 그것들의 보호 효과에 대하여 평가되었다. 이 능동적인 예방접종 모델은 여러 가지 균주로부터의 수막구균 (철 고갈된 TSB 배지에 현탁됨)을 일련의 피하 경로에 의한 예방접종 후에 성체 Balb/C 또는 OF1 마우스 (6 내지 8주령)에 복막내 주사하는 것을 포함하였다. 외부 철 공급원으로서 사용된 철 덱스트란은 균혈증을 유지하는 데 필요한 것으로 보이며 감염된 동물에서 사망을 유도하는 것으로 보인다. 비록 마우스에서의 이 IP 모델이 독성, 면역 보호 및 감염에서의 철의 역할을 평가하는 데 효과적인 것으로 밝혀지긴 하였지만, 그것들은 사람에서의 균혈증 및 수막염에 선행하는 인두 보균 단계를 포함하지 않는다. 이 모델은 NspA, TbpA, 또는 Hsf를 과발현하는 본 실험의 여러 가지 OMV 후보를 스크린하는데 사용할 수 있었다. 이어지는 실험에서 Balb/C (동종 교배) 또는 OF 1 (이계 교배) 마우스들을 0, 14 및 28일에 피하 경로에 의해, $Al(OH)_3$ (100 ㎍의 $Al(OH)_3$/동물) (PV00N035 및 PV00N043) 또는 $AlPO_4$ (100 ㎍의 $AlPO_4$/동물)에 대해 제형된 Hsf, NspA 또는 TbpA를 과발현하는 재조합 OMV의 3 ㎍ (PV00N049) 내지 5 ㎍ (PV00N035 및 PV00N043 실험)으로 3회 예방접종하였다. 그런 다음 동물들을 28일에 (두번째 투여 후 14일) 또는 35일에 (세번째 투여 후 7일) 특정 Ab 평가를 위해 채혈하였다. 35일에 10 mg의 철 덱스트란을 공격 한 시간 전에 복막내 주사하였다. 공격은 H44/76 (B:15:P1.7,16) 또는 CU-385 (B:4:P1.19,15) 균주를 사용하여, 약 1.10 e7 CFU/동물로 시행하였다 (정확한 공격 용량에 대해서는 결과 표 참조). CU-385 균주로 시행한 이종성 균주는 동종성 균주를 사용했을 때보다 더 엄격하였다. 1일 부터 5일 까지의 사망률을 기록하였다. 하기의 표 1은 OMV porA(-) 및 OMV porA(+)와 더 작은 규모로 비교했을 때 이미 OMV TbpA (+) (porA (-)에 대해 1/10 및 3/5, 및 porA (+)에 대해 9/10 및 3/5), OMV NspA (+) (4/10 및 4/5) 및 OMV Hsf (+) (3/10, 2/10 및 3/5)를 사용했을때 더 좋은 보호가 관찰되었음을 나타낸다. 이것은 위의 세 가지 실험에서 이끌어낼 수 있는 포괄적인 관찰이다. 이들 데이터는 수포 표면에서 발현된 TbpA, Hsf 및 NspA 항원이 미래의 *men*B 백신으로서 중요한 것임을 지지한다.

[0341] **표 1: 재조합 외막 소포의 마우스 모델에서의 보호 활성**

[0342] 표는 3 가지 실험 (PV00N35, PV00N043 & PV00N049)동안 얻어진 결과를 요약한 것이다.

[0343] OMV (수포)

[0344]

재조합 OMV (H44/76 바탕값= porA P1.17,16)	생존율 (일) 능동적인 마우스 보호			ELISA에 의한 면역 특이적 Ab 평균-
	PV00N035, OF1 마우스	PV00N043, Balb/C 마우스	PV00N049, OF1 마우스	
	공격 균주 (+)			
	H44/76 (B:15:P1.7,1.27)	H44/76 (B:15:P1.7,1.0)	CU-385 (B:4:P1.19,11.1)	PV00N049 단독
OMV porA(-)	1/10	0/10	1/5	/
OMV porA(+)	2/10	9/10	4/5	/
OMVTbpA porA(+)	NT	9/10	3/5	<
OMVTbpA porA(-)	NT	1/10	3/5	<
OMVNspA porA(-)	1/10	4/10	4/5	155-(<
OMV Hsf porA(-)	3/10	2/10	3/5	7802-(5496)
OMV Hsf porA(+)	NT	9/9	NT	/
항원 없음	0/10	0/10	1/5	/

[0345] NT: 시험되지 않음.

[0346] **실시예 13:** 마우스 공격 모델에서 재조합 서브유니트 항원의 보호 효과

[0347] 여러 가지 재조합 정제 단백질을 Balb/C 마우스에서 그것들의 치명적 공격 후의 보호 효과에 대하여 평가하였다. 이 능동적인 예방접종 모델은 여러 가지 균주로부터의 수막구균 (철 고갈된 TSB 배지에 현탁됨)을, 일련의 피하 경로에 의한 예방접종 후에 성인 Balb/C 또는 OF1 마우스 (6 내지 8주령)에 복막내 주사하는 것을 포함하였다.

[0348] 외부 철 공급원으로서 사용된 철 덱스트란은 균혈증을 유지하는 데 필요한 것으로 보이며 감염된 동물에서 사망을 유도하는 것으로 보인다. 비록 마우스에서의 이 IP 모델이 독성, 면역 보호 및 감염에서의 철의 역할을 평가하는 데 효과적인 것으로 밝혀지긴 하였지만, 그것들은 사람에서의 균혈증 및 수막염에 선행하는 인두 보균 단계를 포함하지 않는다. 이 모델은 여러 개의 menB 서브-유니트 백신 후보같은 재조합 FrpC, TbpA, FHA2/3 및 Hap 분자를 스크린하는 데 사용할 수 있었다.

[0349] 이 실험에서 OF 1 (이계 교배) 마우스들을 0, 14 및 28일에 피하 경로에 의해, 10 ㎍의 MPL (동물 1마리 당)의 존재하에 $AlPO_4$ (100 ㎍)에 대해 제형된 상기 단백질 5 ㎍ (PV00N050)으로 3회 예방접종하였다. 그런 다음 동물들을 28일에 (두번째 투여 후 14일) 또는 35일에 (세번째 투여 후 7일) 특정 Ab 평가를 위해 채혈하고, 35일에 공격하였다. 공격일 (35일)에 10 mg의 철 덱스트란을 공격 한 시간 전에 복막내 주사하였다. 공격은, TbpA에 대한 서열이 B16B6 균주 (B:2a:P1.2)로부터 유래한 것을 제외하고는 이 경우에는 실제로 H44/76 (B:15:P1.7,16)으로부터의 항원 서열에 이종성인 CU-385 (B:4:P1.19,15) 균주를 사용하여 시행하였다.

[0350] 표 2에 나타낸 그 결과는 이 모델에서 FrpC, TbpA, FHAB2/3rd, Hap가 상당한 보호를 유도하였음을 나타낸다: 애쥬번트만으로는 5마리 중 1마리만이 생존한 것과 비교하여, 5마리의 마우스 중에서 2 내지 4마리가 공격 후에 살아남았다. 하나를 제외한 모든 그룹에서 특정 항체 역가는 높았다 (특정 항-TbpA 역가는 중간이었다). 이들 데이터는 모두 서브유니트 항원, 분리된 항원 또는 조합된 형태로 존재하는 FrpC, FrpA, FrpA/C 보존 도메인, TbpA, FHAB2/3rd, Hap가 menB 백신의 개발을 위해 중요하다는 것을 지지한다.

[0351] **표 2: 재조합 외막 소포의 마우스 모델에서의 보호 활성**

[0352] 표는 한 실험 (PV00N050)동안 얻어진 결과를 요약한 것이다.

[0353]

재조합 서브유니트 항원 (H44/76 Ag 서열로부터)	생존율 (제 5일) 능동적인 마우스 보호 모델 PV00N050 (OF1 마우스) 공격 균주 (+ 용량) CU-385 (B:4:P1.19,15) 1.4 10e7	ELISA에 의한 면역 특이적인 Ab 평균-(GMT)
FrpC Ca2++ 처리됨	3/5	31477-(27068)
FHAB 2/3 재접힘	2/5	98200-(73220)
FHAB 2/3 재접힘 없음	3/5	55939-(35347)
Hap N-ter	4/5	9960-(12811)
SBAS4상에서의 재조합 TbpA	3/5	875-(520)
SBAS4	1/5	/

[0354] **실시예 14:** 백신 항원 조합의 상승작용 효과를 나타내는 방법

[0355] 활용할 수 있는 상이한 재조합 OMV들 (OMVs porA(+)rmp-LbpB, OMVs porA(-) TbpA(+) Hsf(+), OMVs porA(-) TbpA(+), OMVs porA(-) NspA(+), OMVs porA(-) Hsf(+), OMVs porA(-) TbpA(+) NspA(+))이 통계학적으로 가장 좋은 조합을 측정하기 위하여, 그러한 백신 후보의 조합의 상승작용적 효과를 검출하는 관점에서 단독으로 또는 조합하여 측정될 수 있다. 이 작업은 또한 서브유니트 항원의 조합뿐만 아니라 서브유니트 항원 + 재조합 OMV의 조합으로도 수행할 수 있다. 5 OF1 마우스/군의 32개 군에게 주사하여 혈청 살균 활성 및 옵소닌 활성, 마우스 모델에서 능동 및 수동 보호에 대해 시험할 수 있다 (만약 개별적인 항원의 차선적인 양을 사용할 필요가 있는 경우). 상승작용적인 항원 조합의 징후는 조합된 예방접종 후에 부여된 보호 수준이 개별적인 항원의 보

호의 합보다 더 높은 지의 여부이다.

[0356] **실시예 15:** 외막 소포의 Hsf 및 TbpA 함량의 분석

[0357] 쿠마시 블루 염색된 SDS-PAGE

[0358] Hsf 또는 TbpA 또는 Hsf와 TbpA 둘 다 상향 조절된 외막 소포 제제 중의 15 ㎍의 단백질을 β-메르캅토에탄올을 함유하고 있는 샘플 완충액중에 희석하고 95 ℃에서 10분 동안 가열하였다. 그런 다음 샘플을 SDS-PAGE 폴리아크릴아미드 겔 (Novex 4-20% 트리스-글리신 1.5 mm 2Dwell SDS Page) 상에서 작동시키고, 쿠마시 블루로 1시간 동안 염색한 다음, 여러 번 세척하여 탈색시켰다. 그 결과는 도 9에 도시되며, 그것은 Hsf 및 TbpA 의 수준이 발현 수준이 증강된 N. 메닌기티디스로부터 유래된 외막 소포 제제에서 상당히 더 높은 것을 보여준다.

[0359] **실시예 16:**Hsf 및/또는 TbpA의 상향 조절을 사용한 OMV의 면역원성

[0360] 20마리의 군을 OMV로, 0, 21 및 28일에 근육내 경로에 의하여 예방접종하였다. 각각의 접종을 MPL이 첨가된 AlPO4 상에서 제형된 OMV 5 ㎍ (단백질 함량)으로 시행하였다. OMV는 N. 메닌기티디스 균주 H44/76으로부터 유래되었고, 캡슐 다당류 및 PorA가 하향 조절되도록 공학 처리되었다. Hsf, TbpA, Hsf와 TbpA 둘 다 상향조절되거나 전혀 조절되지 않은 OMV들을 비교하였다. 제 41일에 혈액 샘플을 취하여 ELISA 또는 혈청 살균 활성에 대하여 분석하였다.

[0361] Hsf에 대한 항체를 검출하기 위한 ELISA

[0362] 96 웰의 마이크로플레이트 (Nunc, Maxisorb)를 PBS 중의 1 ㎍/ml의 특정 항원 100 ㎕로 4 ℃에서 밤새 코팅하였다. NaCl 150 mM 및 Tween 20 0.05 %로 세척한 후에 플레이트를 100 ㎕의 PBS-BSA 1 %로, 30분 동안 실온에서 흔들어주면서 포화시켰다. 각 단계 (실온에서 30분 동안 흔들어주고, 희석 완충제로서 PBS-BSA 2 %를 사용하여 수행됨) 사이에서 과량의 시약을 NaCl-트윈 20으로 세척함으로써 제거하였다. 100 ㎕의 희석된 혈청 샘플을 마이크로웰당 첨가하였다. 결합된 항체는 비오티닐화된 항-마우스 Ig (Prosan)(1/2000)에 의해 인지되었다. 항원-항체 복합체는 스트렙트아비딘-비오티닐화된 과산화효소 컨쥬게이트 (Amersham)(1/4000)와의 인큐베이션에 의해 드러났다. 오르토페닐렌디아민/H_2O_2 (4 mg/10 ml의 시트레이트 완충액 0.1 M, pH 4.5 + 5 ㎕의 H_2O_2)를 사용하여 분석을 나타냈다. 플레이트를 15분 동안 실온에서 어두운 곳에서 인큐베이션한 후 50 ㎕의 1 N HCl을 첨가함으로써 반응을 중지시켰다. 흡광도는 490 nm에서 판독하였다.

[0363]

	역가 중간 지점 (모아진 혈청에 대하여)
g1, 수포 TbpA-HSF, IM	15471
g2, 수포 TbpA, IM	15.41
g3, 수포 HSF, IM	14508
g4, 수포 CPS(-)PorA(-), IM	-
g5, 수포 MPL/AlPO4, IM	-

[0364] 상기 표에 나타낸 결과는 Hsf에 대한 높으면서도 동등한 항체 역가가 Hsf 또는 Hsf와 TbpA 두 가지가 모두 상향 조절된 OMV를 사용한 예방접종에 의하여 생성되었음을 나타낸다. 실제로 애쥬번트만으로 또는 Hsf나 TbpA가 상향 조절되지 않았거나 오직 TbpA만 상향 조절된 OMV로 접종한 후에 생성된 혈청에서는 Hsf에 대한 항체가 검출되지 않았다.

[0365] **실시예 17:**Hsf 및/또는 TbpA가 상향 조절된 OMV에 대해 생성된 항혈청의 혈청 살균 활성

[0366] Hsf, TbpA, Hsf 및 TbpA 두 가지 모두 상향 조절된 또는 상향 조절되지 않은 OMV로 접종된 마우스로부터 얻어진 항혈청의 혈청 살균 활성을, 동종성 균주 H44/76 또는 이종성 균주 Cu385 중 어느 하나를 사용한 분석에서 비교하였다. 혈청 살균 분석은 보호와 양호한 상관관계를 보여주었고, 그러므로 후보 조성물이 보호적인 면역 반응을 유도하는 데 얼마나 효과적인가를 보여주는 좋은 표식이다.

[0367] 나이세리아 메닌기티디스 혈청군 B 야생형 균주 (H44/76 균주 = B:15P1.7,16 L3,7, 9 및 CU385 균주 = B:4P1.19,15 L3,7, 9)을 밤새 MH+1 % 폴리비텍스+1 % 말 혈청 페트리 디쉬 상에서 37 ℃ + 5 % CO2에서 배양하였다. 균주를 3 시간 동안 50 μM의 데스페랄 (철 킬레이터)이 첨가되어 있는 액체 TSB 배지에서 37 ℃에서 진동 하에 470 nm에서의 광학 밀도가 대략 0.5에 이를 때까지 계대배양하였다. 모아진 혈청 또는 개별적인 혈청을 40분 동안 56 ℃에서 비활성화시켰다. 혈청 샘플을 HBSS-BSA 0.3 % 중에서 1/100으로 희석한 후 연속적으로 둥근 바닥 마이크로플레이트에서 50 ㎕의 부피로 2배 (8회) 희석하였다.

[0368] 적절한 OD에서 박테리아를 HBSS-BSA 0.3 % 중에서 희석하여 ml당 1.3 10e4 CFU로 만들었다. 이 희석액 37.5 ㎕를 혈청 희석액에 첨가하고, 마이크로플레이트를 15분 동안 37 ℃에서 진동 하에 인큐베이션하였다. 그런 다음 12.5 ㎕의 토끼 보체를 각 웰에 첨가하였다. 이것을 37 ℃에서 1 시간 동안 진동 하에 인큐베이션한 후 마이크로플레이트를 얼음 위에 놓아 사멸을 중지시켰다.

[0369] 틸트(Tilt) 방법을 사용하여 20 ㎕의 각 웰을 MH + 1 % 폴리비텍스 + 1 % 말 혈청 페트리 디쉬위에 플레이트하고 37 ℃ + CO2에서 밤새 인큐베이션하였다. CFU를 계수하고 사멸 백분율을 계산하였다. 혈청 살균 역가는 50 % 이상의 사멸을 초래하는 마지막 희석이었다.

[0370]

OMV	H44/76		CU385	
	GMT	% 반응체	GMT	% 반응체
CPS(-) PorA(-)	93	30 %	58	5 %
CPS(-) PorA(-) Hsf	158	40 %	108	20 %
CPS(-) PorA(-) TbpA	327	60 %	147	30 %
CPS(-) PorA(-) Hsf-TbpA	**3355**	**100 %**	**1174**	**80 %**

[0371] 상기 표에서 나타낸 것과 유사한 결과를 두 개의 다른 유사한 실험에서 얻었다.

[0372] 동종성 균주과 이종성 균주에 대한 살균 역가 (GMT)의 극적인 증가는 Hsf와 TbpA 두 가지가 모두 상향 조절된 OMV로 예방접종한 후에 나타났다. 비교하면, Hsf 또는 TbpA가 상향 조절된 OMV로 예방접종된 마우스에서 측정된 살균 GMT는 대조 OMV로 예방접종된 마우스들에게서 얻어진 것과 유사하였다.

[0373] 살균 항체의 상당한 수준을 생성한 마우스의 백분율에서 (역가는 1/100 보다 크다), 특히 이종성 균주를 사용한 실험에서 이중 상향-조절의 장점이 또한 분명하게 관찰되었다.

[0374] **실시예 18:**항-Hsf 및 항-TbpA 혈청의 혼합이 살균 활성에 미치는 효과

[0375] 20 마리씩의 군을 OMV를 사용하여 0, 21 및 28일에 근육내 경로에 의해 3회 예방접종하였다. 각 접종물은 MPL이 첨가된 AlPO4에 대해 제형된 OMV의 5 ㎍(단백질 함량)으로 구성되었다. OMV는 N. 메닌기티디스 균주 H44/76으로부터 유도되었고, 캡슐 다당류 및 PorA가 하향 조절되도록 공학처리되었다. 한 군의 마우스를 단백질이 상향 조절되지 않은 대조 OMV로 면역시켰다. 두 번째 군에서는 Hsf 발현을 상향 조절하였고, 세 번째 군에서는 TbpA 발현을 상향 조절하였으며, 네 번째 군에서는 HsF와 TbpA 두 가지의 발현을 상향 조절하였다.

[0376] 동일한 군에 속한 마우스로부터 얻어진 혈청을 사용하거나 Hsf 단독 또는 TbpA 단독이 상향 조절된 군으로부터 분리한 혈청을 혼합함으로써 혈청을 모았다. 혈청 살균 활성을 각각의 모아진 혈청에 대하여 측정하였고, 그 결과를 아래의 표로 나타낸다.

[0377]

아래의 것으로 면역된 마우스로부터 모아진 혈청에 대해 시행된 SBA	SBA 역가
TbpA-Hsf 수포	774
TbpA 수포	200
Hsf 수포	50
CPS(-) PorA(-) 수포	50
항-TbpA + 항-Hsf 혈청의 혼합	1162

[0378] 상기 표의 결과는 항-Hsf 및 항-TbpA 항혈청의 혼합이 각각의 항혈청을 개별적으로 사용하여 얻어진 것보다 훨씬 더 높은 혈청 살균 활성을 초래하였음을 나타낸다. 이런 상승작용적 효과는 Hsf와 TbpA 두 가지에 대한 항체의 존재에 의해 이루어지는 것으로 보인다.

[0379] **실시예 19:** 트렁케이팅된 Hsf 단백질은 TbpA와 상승작용적으로 조합할 수 있다.

[0380] 일련의 트렁케이팅된 Hsf 구성물을 표준 분자 생물학 과정을 사용하여 제조하였다. 이것들은 Hsf의 신호 서열을 함유하는 아미노산 1 내지 54와 Hsf의 아미노산 134 내지 592 (Tr1Hsf)를 엔코딩하는 구성물을 포함한다. 두 번째 트렁케이팅된 Hsf는 Hsf의 신호 서열의 아미노산 1 내지 53과 이어서 Hsf의 아미노산 238 내지 592를 함유하였다 (Tr2Hsf). 이들 두 개의 트렁케이팅된 Hsf 구성물 및 전장의 Hsf를 N. 메닌기티디스 균주 MC58 siaD-, Opc-, PorA-에 도입시켜서 그것들의 발현이 상향 조절되고 외막 소포가 상술된 방법들을 사용하여 생성

되도록 하였다.

[0381] 외막 소포 제제를 Al(OH)3에 흡수시키고, 그것을 0, 21 및 28일에 마우스에게 주사하였다. 제 42일에 마우스에 대해 채혈하고 혈청을 준비하였다. 혈청을 상향-조절된 TbpA OMV로 예방접종한 마우스로부터 얻어진 혈청과 혼합하고, 혈청 살균 분석을 상술된 바와 같이 수행하였다.

[0382] 결과

[0383]

군	혈청 살균 역가	
	H44/76	CU385
MC58 PorA + siaD +	25600	25600
MC58 PorA- siaD- Hsf	1530	800
MC58 PorA- siaD- Tr1Hsf	1015	1360
MC58 PorA- siaD- Tr2Hsf	50	50
네가티브 대조표준	50	50
TbpA + MC58 PorA + siaD +	25600	24182
TbpA + MC58 PorA- siaD- Hsf	2595	1438
TbpA + MC58 PorA- siaD- Tr1Hsf	**4383**	**2891**
TbpA + MC58 PorA- siaD- Tr2Hsf	1568	742
TbpA + 네가티브 대조표준	778	532

[0384] 상기 표에 나타낸 결과는 첫 번째 트렁케이션 (Tr1Hsf)이 TbpA에 대한 항혈청과 조합하여 전장의 Hsf가 사용될 때보다 더 큰 혈청 살균 활성을 생성할 수 있는 면역 반응을 유도하는 것을 나타낸다. 그러나 트렁케이션의 크기가 중요하며, Tr2에서 생성된 트렁케이션는 전장의 Hsf와 비교하여 불리한 효과를 나타낸다. Tr1Hsf의 증강된 살균 활성은 사용된 두 가지의 균주 모두에 대해 나타났다.

[0385] **실시예 20:**TbpA, Hsf 및 세 번째 수막구균 단백질에 대한 항체의 혈청 살균 활성

[0386] PorA와 캡슐 다당류가 상술된 바와 같이 하향 조절되어 있는 N. 메닌기티디스 균주 H66/76을 TbpA 및 Hsf, LbpB, D15, PilQ 또는 NspA를 상술된 과정을 사용하여 상향 조절하기 위한 바탕 균주로서 사용하였다. 다른 막 소포를 상술된 바와 같이 각 균주로부터 제조하였다. 재조합 FHAb, FrpC, FrpA/C 및 Hap를 지금까지 설명한 기법들과 문헌에 공지되어 있는 (PCT/EP99/02766, WO92/01460 및 WO98/02547) 기법들을 사용하여 제조하였다.

[0387] 외막 소포 제제 및 재조합 단백질을 Al(OH)3상에 흡착시키고, 그것을 0, 21 및 28일에 마우스에 주사하였다. 제 42일에 마우스에 대해 채혈하고 혈청을 준비하였다. TbpA 및 Hsf 상향-조절된 OMV에 대한 혈청을 상향-조절된 LbpB, D15, PilQ 또는 NspA OMV 또는 재조합 FHAb, FrpC, FrpA/C 또는 Hap를 함유하고 있는 OMV로 예방접종한 마우스로부터 얻어지는 혈청과 혼합하고, 혈청 살균 분석을 상술된 바와 같이 수행하였다.

[0388] 결과

[0389] 결과는 아래의 표에 나타낸다. 동종성 H44/76 균주를 사용한 분석에서, FrpC를 제외한 세 번째 수막구균 항원에 대한 항체의 첨가는 TbpA나 Hsf 단독에 대한 항체를 사용하여 생성된 것보다 더 높은 혈청 살균 역가를 생성하지 못하였다.

[0390] 그러나 세 번째 항원에 대한 항체의 첨가는 이종성 균주를 사용한 혈청 살균 분석에 유익하였다. D15(OMP85), Hap, FrpA/C 및 LbpB에 대한 항체가 특히 CU385 균주에 대한 혈청 살균 역가를 증가시키는 데 효과적이었다.

[0391]

항혈청 혼합물	혈청 살균 역가	
	H44/76	CU385
항-TbpA-Hsf 및 비면역 혈청	5378	2141
항-TbpA-Hsf 및 항-FHA	5260	2563
항-TbpA-Hsf 및 항-Hap	4577	5150
항-TbpA-Hsf 및 항-FrpA/C	5034	4358
항-TbpA-Hsf 및 항-LbpB	5400	4834
항-TbpA-Hsf 및 항-D15	4823	4657
항-TbpA-Hsf 및 항-PilQ	4708	2242
항-TbpA-Hsf 및 항-NspA	4738	2518
항-TbpA-Hsf 및 항-FrpC	6082	2300

[0392] **실시예 21:** 동종성 및 이종성 균주에서 살균 면역 반응을 유도하는 능력에 미치는 외막 소포의 FrpB KO의 효과

[0393] H44/76 N. 메닌기티디스의 두 개의 균주를 사용하여 WO01/09350에서 설명된 것과 같은 외막 소포 제제를, 0.1 % DOC 추출을 사용하여 LOS 함량이 약 20 %가 되도록 제조하였다. 균주 B1733은 siaD(-), PorA(-)이고, Tr1 Hsf가 상향 조절되어 있으며 (실시예 19) lgtB가 녹아웃되어 있다. 균주 B1820 B1733은 siaD(-), PorA(-)이고, Tr1 Hsf가 상향 조절되어 있으며 lgtB가 녹아웃되어 있고, FrpB가 또한 녹아웃되어 있다. 두 개의 균주를 모두 60 μM 의 데사페랄이 첨가된 배지에서 배양하여 LbpA/B 및 TbpA/B와 같은 철 조절된 단백질이 상향 조절되도록 하였다.

[0394] 수포 제제를 Al(OH)3에 흡착시키고, 5 ㎍을 30 마리씩의 군에 0일과 21일에 마우스들에게 근육내로 주사하였다. 혈액 샘플을 제 28일에 취하였다.

[0395] 혈청 살균 분석을 실시예 17에서 설명된 것과 같이 세 개의 L3 균주 (동종성 야생형 균주 H44/76 및 두 개의 이종성 L3 균주: NZ124 및 M97250687)에 대해 수행하였다.

[0396] 결과

[0397]

접종에 사용된 수포	H44/76		M97250687		NZ124	
	GMT	SC	GMT	SC	GMT	SC
B1733	1518	30/30	151	11/30	70	4/29
B1820	781	19/30	1316	24/30	276	19/30

[0398] GMT는 SBA의 혈청의 기하학적 평균 역가를 나타낸다.

[0399] SC는 마우스의 혈청변환 횟수를 나타낸다 (SBA 역가 > 1/100).

[0400] 상기 결과는 분명하게 FrpB KO (B1820) 수포가 FrpB(+) 수포 (B1733)보다 더 좋은 이종성 교차-살균 반응을 유도하는 것을 보여준다. SBA 역가는 더 높았고 균주 M97250687 및 NZ124에서 혈청 변환된 마우스의 비율은 더 높았다. 동종성 균주에서의 결과는 FrpB가 결실되었을 때만큼 좋지 않았다. 이들 데이터는 FrpB가 면역 반응을 유도하지만 이 외막 단백질이 매우 가변적이기 때문에 이 단백질에 대한 항체는 단지 동종성 균주의 치사만을 유도할 수 있을 뿐이라는 것을 시사한다.

도면의 간단한 설명

[0015] 도 1은 *tbpA*와 *hsf*의 발현에 대해 상향 조절된 재조합 N. 메닌기티디스 균주로부터 제조된 OMV에서의 TbpA 및 Hsf의 검출을 도시한다. 쿠마시 브릴리언트 블루로 염색된 SDS-PAGE 분석 (4 내지 20 % 구배 겔)에 의한 OMV 제제 (10 ㎍)의 분리를 나타낸다.

[0016] 도 2는 대장균에서 생성된 재조합 Hsf 패신저 도메인의 검출을 도시한다. 10 ㎍의 정제된 Hsf 패신저 단백질 (레인 2 & 3)이 SDS-PAGE에 의해 12 % 겔 상에서 분자량 마커 (레인 1)와 비교하여 분리되었다.

[0017] 도 3은 (A) 쿠마시 염색, (B) 은 염색, (C) 항-His5 웨스턴 블롯팅 및 (D) 항-대장균에 의해 검출된 바와 같은 Hap 패신저 순도의 분석을 도시한다. 10 ㎍의 정제된 항원이 SDS-PAGE에 의해 4 내지 20 % 아크릴아미드 구배 겔 상에서 분리되었다.

[0018] 도 4는 N. 메닌기티디스 균주 FAM20으로부터 분리된 FrpA 및 FrpC 단백질에 의해 공유된 서열 유사성 영역을 도시한다. (A) N. 메닌기티디스 균주 FAM20 RTX 단백질 FrpA 및 FrpC의 도메인 조직. (B) N. 메닌기티디스 균주 H44/76으로부터 얻어진 FrpA/C 증폭 생성물.

[0019] 도 5는 대장균에서 재조합 Frp23 (23회 반복된 FrpA/C 보존 영역) 항원의 발현을 도시한다. 대조 벡터 (pET24d) 또는 재조합 구성물 (각각 Frp3, Frp13 및 Frp23)으로 형질 전환된 대장균 BL21DE3의 비-유도된 (NI) 및 유도된 (I) 총 세포 추출물의 SDS-PAGE 분석을 나타낸다. 겔은 쿠마시 블루로 염색되었거나 (A) 또는 니트로셀룰로스에 전달되고 항-His6 마우스 혈청으로 면역-검출되었다.

[0020] 도 6은 대장균에서 발현된 FHAB 2/3rd 단편의 바람직한 DNA 서열을 도시한다.

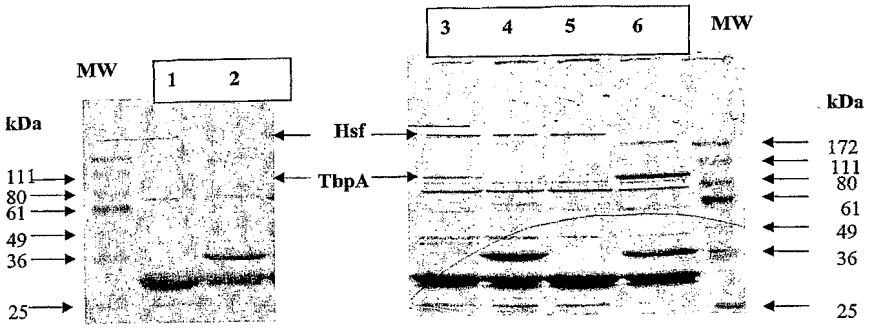
[0021] 도 7은 유도된 대장균 B121DE3 추출물로부터의 재조합 FHAB 2/3rd의 정제를 도시한다. (A) 정제 방법의 주요 단계. (B) 정제 방법의 상이한 단계에서 샘플화된 단백질 분획의 SDS-PAGE 분석.

[0022] 도 8은 N. 메닌기티디스의 FHAB 2/3rd, Hap, Hap 패신저 도메인, Hsf 및 Hsf 패신저 도메인 항원에 대해 생성된 항-혈청의 점착 차단 활성을 도시한다.

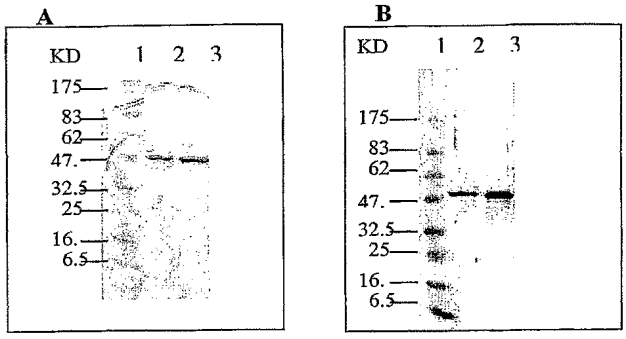
[0023] 도 9는 N. 메닌기티디스 균주로부터 유래된 외막 소포 제제에서의 Hsf, TbpA 및 NspA의 발현 수준을 나타내는 쿠마시 염색된 겔을 도시한다. 레인 1 - 분자량 마커; 레인 2 - 캡슐 다당류가 하향 조절되어 있는 균주 H44/76으로부터 제조된 외막 소포; 레인 3 - 캡슐 다당류와 PorA가 하향 조절되어 있는 균주 H44/76으로부터 제조된 외막 소포; 레인 4 - 캡슐 다당류와 PorA가 하향 조절되어 있고 NspA가 상향 조절되어 있는 균주 H44/76으로부터 제조된 외막 소포; 레인 5 - 캡슐 다당류와 PorA가 하향 조절되어 있고 Hsf가 상향 조절되어 있는 균주 H44/76으로부터 제조된 외막 소포; 레인 6 - 캡슐 다당류와 PorA가 하향 조절되어 있고 TbpA가 상향 조절되어 있는 균주 H44/76으로부터 제조된 외막 소포; 레인 7 - 캡슐 다당류와 PorA가 하향 조절되어 있고 TbpA 및 Hsf가 상향 조절되어 있는 균주 H44/76으로부터 제조된 외막 소포; 레인 8 - 캡슐 다당류와 PorA가 하향 조절되어 있고 TbpA 및 NspA가 상향 조절되어 있는 균주 H44/76으로부터 제조된 외막 소포.

도면

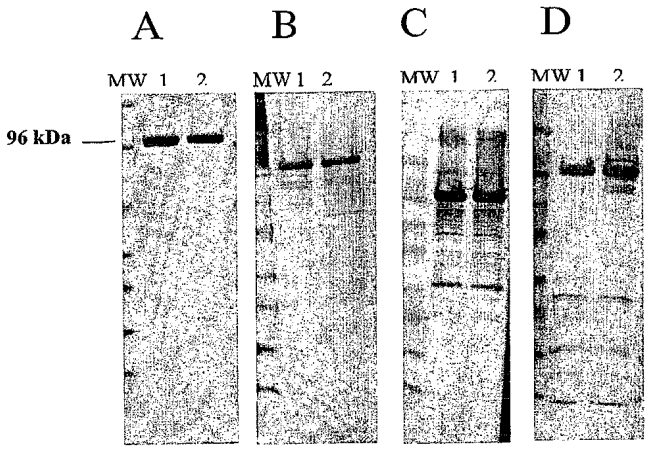
도면1



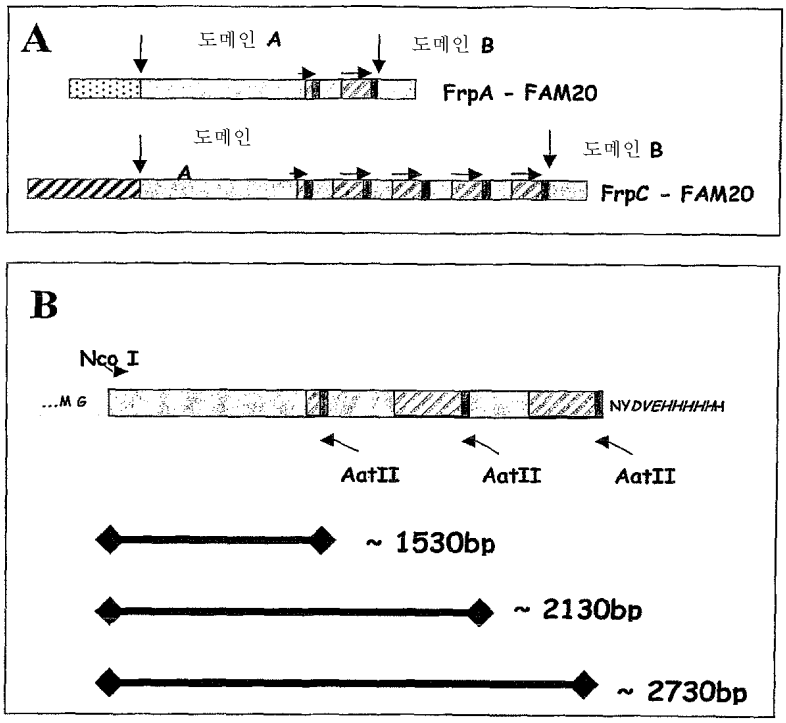
도면2



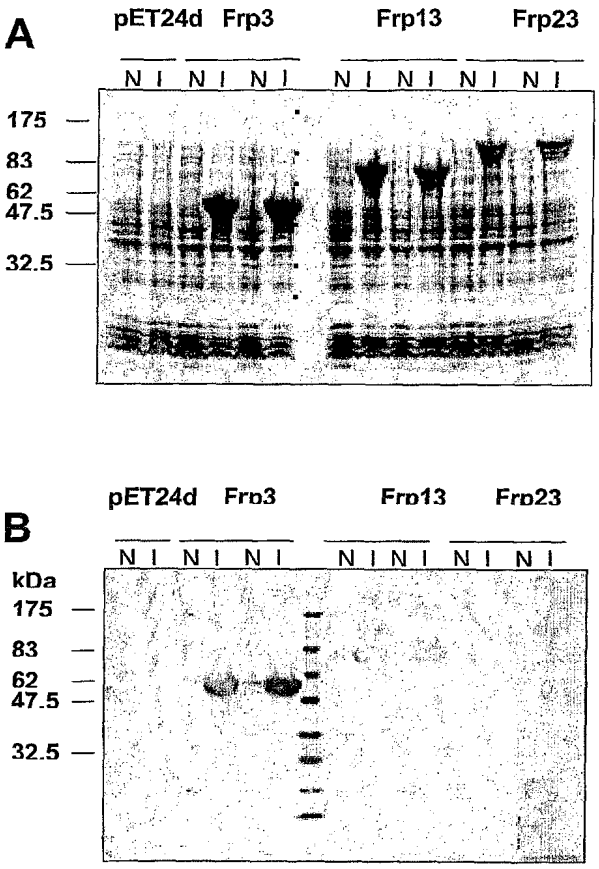
도면3


A
B
C
D
MW 1 2
MW 1 2
MW 1 2
MW 1 2
96 kDa

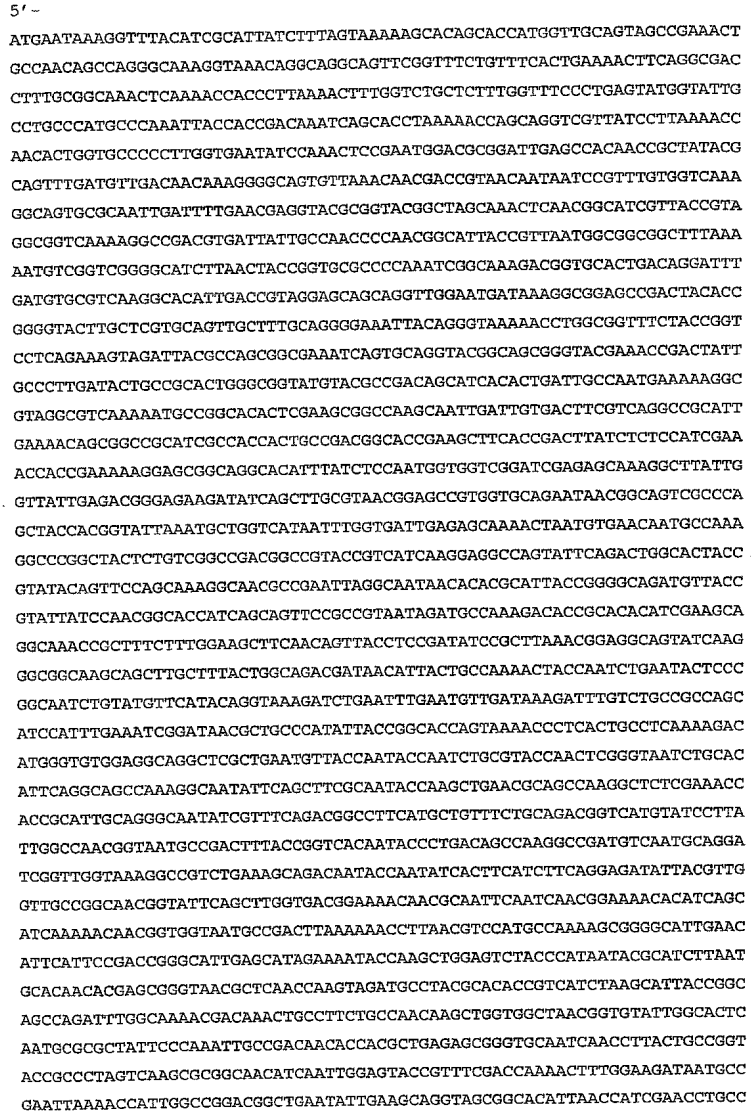
도면4


A
도메인 A
도메인 B
FrpA - FAM20
도메인
A
도메인 B
FrpC - FAM20
B
Nco I
...M G
NYDVEHHHHHH
AatII
AatII
AatII
~ 1530bp
~ 2130bp
~ 2730bp

도면5


A
pET24d
Frp3
Frp13
Frp23
N I N I N I N I N I N I
175
83
62
47.5
32.5
B
pET24d
Frp3
Frp13
Frp23
N I N I N I N I N I N I
kDa
175
83
62
47.5
32.5

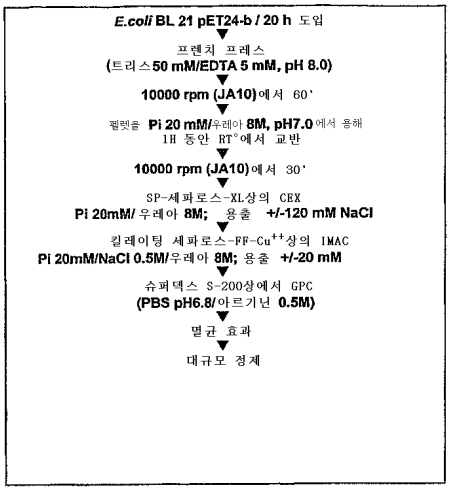
도면6A


5'-
ATGAATAAAGGTTTACATCGCATTATCTTTAGTAAAAAGCACAGCACCATGGTTGCAGTAGCCGAAACT
GCCAACAGCCAGGGCAAAGGTAAACAGGCAGGCAGTTCGGTTTCTGTTTCACTGAAAACTTCAGGCGAC
CTTTGCGGCAAACTCAAAACCACCCTTAAAACTTTGGTCTGCTCTTTGGTTTCCCTGAGTATGGTATTG
CCTGCCCATGCCCAAATTACCACCGACAAATCAGCACCTAAAAACCAGCAGGTCGTTATCCTTAAAACC
AACACTGGTGCCCCCTTGGTGAATATCCAAACTCCGAATGGACGCGGATTGAGCCACAACCGCTATACG
CAGTTTGATGTTGACAACAAAGGGGCAGTGTTAAACAACGACCGTAACAATAATCCGTTTGTGGTCAAA
GGCAGTGCGCAATTGATTTTGAACGAGGTACGCGGTACGGCTAGCAAACTCAACGGCATCGTTACCGTA
GGCGGTCAAAAGGCCGACGTGATTATTGCCAACCCCAACGGCATTACCGTTAATGGCGGCGGCTTTAAA
AATGTCGGTCGGGGCATCTTAACTACCGGTGCGCCCCAAATCGGCAAAGACGGTGCACTGACAGGATTT
GATGTGCGTCAAGGCACATTGACCGTAGGAGCAGCAGGTTGGAATGATAAAGGCGGAGCCGACTACACC
GGGGTACTTGCTCGTGCAGTTGCTTTGCAGGGGAAATTACAGGGTAAAAACCTGGCGGTTTCTACCGGT
CCTCAGAAAGTAGATTACGCCAGCGGCGAAATCAGTGCAGGTACGGCAGCGGGTACGAAACCGACTATT
GCCCTTGATACTGCCGCACTGGGCGGTATGTACGCCGACAGCATCACACTGATTGCCAATGAAAAAGGC
GTAGGCGTCAAAAATGCCGGCACACTCGAAGCGGCCAAGCAATTGATTGTGACTTCGTCAGGCCGCATT
GAAAACAGCGGCCGCATCGCCACCACTGCCGACGGCACCGAAGCTTCACCGACTTATCTCTCCATCGAA
ACCACCGAAAAAGGAGCGGCAGGCACATTTATCTCCAATGGTGGTCGGATCGAGAGCAAAGGCTTATTG
GTTATTGAGACGGGAGAAGATATCAGCTTGCGTAACGGAGCCGTGGTGCAGAATAACGGCAGTCGCCCA
GCTACCACGGTATTAAATGCTGGTCATAATTTGGTGATTGAGAGCAAAACTAATGTGAACAATGCCAAA
GGCCCGGCTACTCTGTCGGCCGACGGCCGTACCGTCATCAAGGAGGCCAGTATTCAGACTGGCACTACC
GTATACAGTTCCAGCAAAGGCAACGCCGAATTAGGCAATAACACACGCATTACCGGGGCAGATGTTACC
GTATTATCCAACGGCACCATCAGCAGTTCCGCCGTAATAGATGCCAAAGACACCGCACACATCGAAGCA
GGCAAACCGCTTTCTTTGGAAGCTTCAACAGTTACCTCCGATATCCGCTTAAACGGAGGCAGTATCAAG
GGCGGCAAGCAGCTTGCTTTACTGGCAGACGATAACATTACTGCCAAAACTACCAATCTGAATACTCCC
GGCAATCTGTATGTTCATACAGGTAAAGATCTGAATTTGAATGTTGATAAAGATTTGTCTGCCGCCAGC
ATCCATTTGAAATCGGATAACGCTGCCCATATTACCGGCACCAGTAAAACCCTCACTGCCTCAAAAGAC
ATGGGTGTGGAGGCAGGCTCGCTGAATGTTACCAATACCAATCTGCGTACCAACTCGGGTAATCTGCAC
ATTCAGGCAGCCAAAGGCAATATTCAGCTTCGCAATACCAAGCTGAACGCAGCCAAGGCTCTCGAAACC
ACCGCATTGCAGGGCAATATCGTTTCAGACGGCCTTCATGCTGTTTCTGCAGACGGTCATGTATCCTTA
TTGGCCAACGGTAATGCCGACTTTACCGGTCACAATACCCTGACAGCCAAGGCCGATGTCAATGCAGGA
TCGGTTGGTAAAGGCCGTCTGAAAGCAGACAATACCAATATCACTTCATCTTCAGGAGATATTACGTTG
GTTGCCGGCAACGGTATTCAGCTTGGTGACGGAAAACAACGCAATTCAATCAACGGAAAACACATCAGC
ATCAAAAACAACGGTGGTAATGCCGACTTAAAAAACCTTAACGTCCATGCCAAAAGCGGGGCATTGAAC
ATTCATTCCGACCGGGCATTGAGCATAGAAAATACCAAGCTGGAGTCTACCCATAATACGCATCTTAAT
GCACAACACGAGCGGGTAACGCTCAACCAAGTAGATGCCTACGCACACCGTCATCTAAGCATTACCGGC
AGCCAGATTTGGCAAAACGACAAACTGCCTTCTGCCAACAAGCTGGTGGCTAACGGTGTATTGGCACTC
AATGCGCGCTATTCCCAAATTGCCGACAACACCACGCTGAGAGCGGGTGCAATCAACCTTACTGCCGGT
ACCGCCCTAGTCAAGCGCGGCAACATCAATTGGAGTACCGTTTCGACCAAAACTTTGGAAGATAATGCC
GAATTAAAACCATTGGCCGGACGGCTGAATATTGAAGCAGGTAGCGGCACATTAACCATCGAACCTGCC

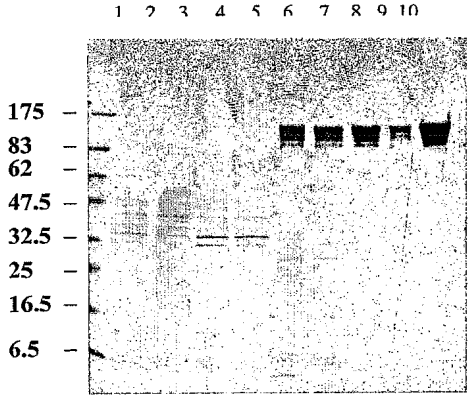
도면6B

AACCGCATCAGTGCGCATACCGACCTGAGCATCAAAACAGGCGGAAAATTGCTGTTGTCTGCAAAAGGA
GGAAATGCAGGTGCGCCTAGTGCTCAAGTTTCCTCATTGGAAGCAAAAGGCAATATCCGTCTGGTTACA
GGAGAAACAGATTTAAGAGGTTCTAAAATTACAGCCGGTAAAAACTTGGTTGTCGCCACCACCAAAGGC
AAGTTGAATATCGAAGCCGTAAACAACTCATTCAGCAATTATTTTCCTACACAAAAAGCGGCTGAACTC
AACCAAAAATCCAAAGAATTGGAACAGCAGATTGCGCAGTTGAAAAAAAGCTCGCCTAAAAGCAAGCTG
ATTCCAACCCTGCAAGAAGAACGCGACCGTCTCGCTTTCTATATTCAAGCCATCAACAAGGAAGTTAAA
GGTAAAAAACCCAAAGGCAAAGAATACCTGCAAGCCAAGCTTTCTGCACAAAATATTGACTTGATTTCC
GCACAAGGCATCGAAATCAGCGGTTCCGATATTACCGCTTCCAAAAAACTGAACCTTCACGCCGCAGGC
GTATTGCCAAAGGCAGCAGATTCAGAGGCGGCTGCTATTCTGATTGACGGCATAACCGACCAATATGAA
ATTGGCAAGCCCACCTACAAGAGTCACTACGACAAAGCTGCTCTGAACAAGCCTTCACGTTTGACCGGA
CGTACAGGGGTAAGTATTCATGCAGCTGCGGCACTCGATGATGCACGTATTATTATCGGTGCATCCGAA
ATCAAAGCTCCCTCAGGCAGCATAGACATCAAAGCCCATAGTGATATTGTACTGGAGGCTGGACAAAAC
GATGCCTATACCTTCTTAAAAACCAAAGGTAAAAGCGGCAAAATCATCAGAAAAACCAAGTTTACCAGC
ACCCGCGACCACCTGATTATGCCAGCCCCCGTCGAGCTGACCGCCAACGGCATAACGCTTCAGGCAGGC
GGCAACATCGAAGCTAATACCACCCGCTTCAATGCCCCTGCAGGTAAAGTTACCCTGGTTGCGGGTGAA
GAGCTGCAACTGCTGGCAGAAGAAGGCATCCACAAGCACGAGTTGGATGTCCAAAAAAGCCGCCGCTTT
ATCGGCATCAAGGTAGGCAAGAGCAATTACAGTAAAAACGAACTGAACGAAACCAAATTGCCTGTCCGC
GTCGTCGCCCAAACTGCAGCCACCCGTTCAGGCTGGGATACCGTGCTCGAAGGTACCGAATTCAAAACC
ACGCTGGCCGGTGCGGACATTCAGGCAGGTGTAGGCGAAAAAGCCCGTGCCGATGCGAAAATTATCCTC
AAAGGCATTGTGAACCGTATCCAGTCGGAAGAAAAATTAGAAACCAACTCAACCGTATGGCAGAAACAG
GCCGGACGCGGCAGCACTATCGAAACGCTGAAACTGCCCAGCTTCGAAAGCCCTACTCCGCCCAAACTG
ACCGCCCCCGGTGGCTATATCGTCGACATTCCGAAAGGCAATTTGAAAACCGAAATCGAAAAGCTGGCC
AAACAGCCCGAGTATGCCTATCTGAAACAGCTCCAAGTAGCGAAAAACACTAGTGGCCACCATCACCAT
CACCATTA STOP -3'

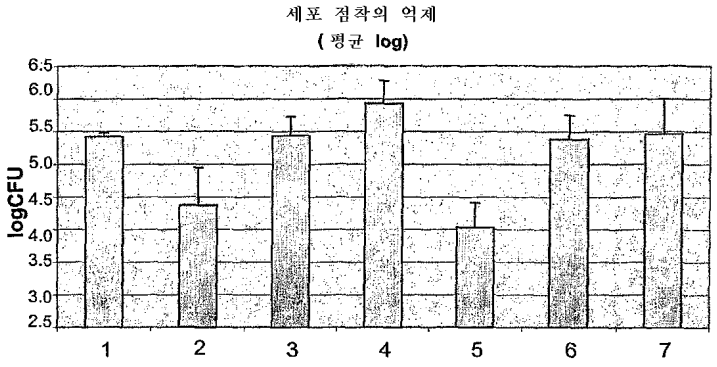
도면7A



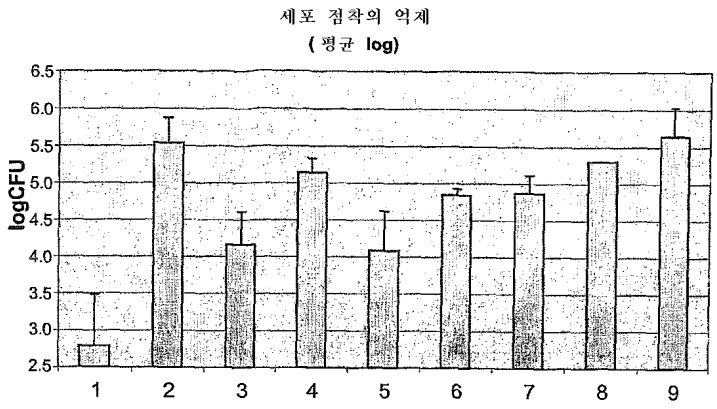
도면7B



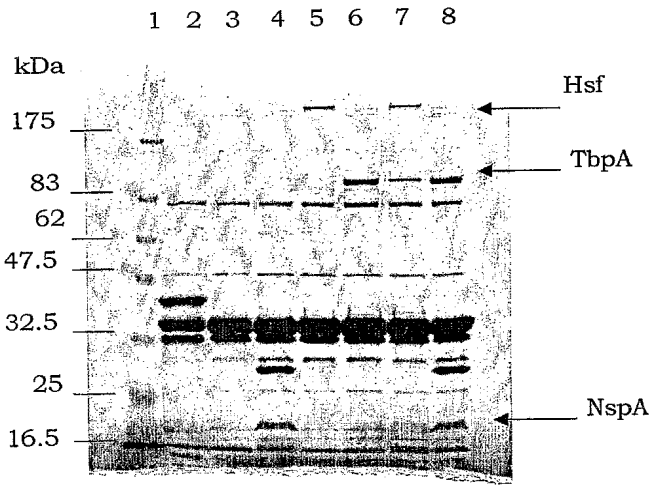
도면8A



도면8B



도면9



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> GlaxoSmithKline Biologicals s.a.

<120> Vaccine Composition

<130> B45315

<160> 24

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1
<211> 9
<212> PRT
<213> Neisseria meningitidis

<220>
<221> VARIANT
<222> (1)...(9)
<223> Xaa = Any Amino Acid

<400> 1
Leu Xaa Gly Gly Xaa Gly Asn Asp Xaa

1 5

<210> 2
<211> 9
<212> PRT
<213> Neisseria meningitidis

<220>
<221> VARIANT
<222> (1)...(9)
<223> Xaa = Any Amino Acid

<400> 2
Leu Xaa Gly Gly Xaa Gly Asp Asp Xaa
1 5

<210> 3
<211> 10
<212> PRT
<213> Neisseria meningitidis

<400> 3
Lys Thr Lys Cys Lys Phe Leu Lys Lys Cys
1 5 10

<210> 4
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 4
ggaattccat atgatgaaca aaatataccg c 31

<210> 5
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 5
gtagctagct agcttaccac tgataaccga c 31

<210> 6
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 6
aactgcagaa ttaatatgaa aggagaagaa cttttc 36

<210> 7
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 7
gacatactag tttatttgta gagctcatcc atg 33

<210> 8
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 8
tccccgcggg ccgtctgaat acatcccgtc 30

<210> 9
<211> 51
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 9
catatgggct tccttttgta aatttgaggg caaacacccg atacgtcttc a 51

<210> 10
<211> 48
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 10
agacgtatcg ggtgtttgcc ctcaaattta caaaaggaag cccatatg 48

<210> 11
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 11
gggtattccg ggcccttcag acggcgcagc agg 33

<210> 12
<211> 45
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 12
ggcctagcta gccgtctgaa gcgattagag tttcaaaatt tattc 45

<210> 13
<211> 42
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 13
ggccaagctt cagacggcgt tcgaccgagt ttgagccttt gc 42

<210> 14
<211> 39
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 14
tcccccggga agatctggac gaaaaatctc aagaaaccg 39

<210> 15
<211> 64
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 15
ggaagatctc cgctcgagca aatttacaaa aggaagccga tatgcaacag caacatttgt 60
tccg 64

<210> 16
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 16
ggaagatctc cgctcgagac atcgggcaaa cacccg 36

<210> 17
<211> 38

<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 17
tcccccggga gatctcacta gtattaccct gttatccc 38

<210> 18
<211> 41
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 18
ctcgagacca tgggcaaata tcatgtctac gacccctcg c 41

<210> 19
<211> 43
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 19
gtgcatagtg tcagagtttt tgtcgacgtc gtaattatag acc 43

<210> 20
<211> 39
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 20
aatggaatac atatgaataa aggtttacat cgcattatc 39

<210> 21

<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 21
ccaactagtg tttttcgcta cttggagctg t 31

<210> 22
<211> 44
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 22
aatggaatac atatgaataa aggtttacat cgcattatct ttag 44

<210> 23
<211> 45
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 23
ggggccactc gaggtttttc gctacttgga gctgtttcag atagg 45

<210> 24
<211> 4217
<212> DNA
<213> Neisseria meningitidis

<400> 24
atgaataaag gtttacatcg cattatcttt agtaaaaagc acagcaccat ggttgcagta 60
gccgaaactg ccaacagcca gggcaaaggt aaacaggcag gcagttcggt ttctgtttca 120
ctgaaaactt caggcgacct ttgcggcaaa ctcaaaacca cccttaaaac tttggtctgc 180
tctttggttt ccctgagtat ggtattgcct gcccatgccc aaattaccac cgacaaatca 240
gcacctaaaa accagcaggt cgttatcctt aaaaccaaca ctggtgcccc cttggtgaat 300
atccaaactc cgaatggacg cggattgagc cacaaccgct atacgcagtt tgatgttgac 360
aacaaagggg cagtgttaaa caacgaccgt aacaataatc cgtttgtggt caaaggcagt 420

gcgcaattga ttttgaacga ggtacgcggt acggctagca aactcaacgg catcgttacc 480
gtaggcggtc aaaaggccga cgtgattatt gccaacccca acggcattac cgttaatggc 540
ggcggcttta aaaatgtcgg tcggggcatc ttaactaccg gtgcgcccca aatcggcaaa 600
gacggtgcac tgacaggatt tgatgtgcgt caaggcacat tgaccgtagg agcagcaggt 660
tggaatgata aaggcggagc cgactacacc ggggtacttg ctcgtgcagt tgctttgcag 720
gggaaattac agggtaaaaa cctggcggtt tctaccggtc ctcagaaagt agattacgcc 780
agcggcgaaa tcagtgcagg tacggcagcg ggtacgaaac cgactattgc ccttgatact 840
gccgcactgg gcggtatgta cgccgacagc atcacactga ttgccaatga aaaaggcgta 900

ggcgtcaaaa atgccggcac actcgaagcg gccaagcaat tgattgtgac ttcgtcaggc 960
cgcattgaaa acagcggccg catcgccacc actgccgacg gcaccgaagc ttcaccgact 1020
tatctctcca tcgaaaccac cgaaaaagga gcggcaggca catttatctc caatggtggt 1080
cggatcgaga gcaaaggctt attggttatt gagacgggag aagatatcag cttgcgtaac 1140
ggagccgtgg tgcagaataa cggcagtcgc ccagctacca cggtattaaa tgctggtcat 1200
aatttggtga ttgagagcaa aactaatgtg aacaatgcca aaggcccggc tactctgtcg 1260
gccgacggcc gtaccgtcat caaggaggcc agtattcaga ctggcactac cgtatacagt 1320
tccagcaaag gcaacgccga attaggcaat aacacacgca ttaccggggc agatgttacc 1380

gtattatcca acggcaccat cagcagttcc gccgtaatag atgccaaaga caccgcacac 1440
atcgaagcag gcaaaccgct ttctttggaa gcttcaacag ttacctccga tatccgctta 1500
aacggaggca gtatcaaggg cggcaagcag cttgctttac tggcagacga taacattact 1560
gccaaaacta ccaatctgaa tactcccggc aatctgtatg ttcatacagg taaagatctg 1620
aatttgaatg ttgataaaga tttgtctgcc gccagcatcc atttgaaatc ggataacgct 1680
gcccatatta ccggcaccag taaaaccctc actgcctcaa aagacatggg tgtggaggca 1740
ggctcgctga atgttaccaa taccaatctg cgtaccaact cgggtaatct gcacattcag 1800
gcagccaaag gcaatattca gcttcgcaat accaagctga acgcagccaa ggctctcgaa 1860

accaccgcat tgcagggcaa tatcgtttca gacggccttc atgctgtttc tgcagacggt 1920
catgtatcct tattggccaa cggtaatgcc gactttaccg gtcacaatac cctgacagcc 1980
aaggccgatg tcaatgcagg atcggttggt aaaggccgtc tgaaagcaga caataccaat 2040
atcacttcat cttcaggaga tattacgttg gttgccggca acggtattca gcttggtgac 2100
ggaaaacaac gcaattcaat caacggaaaa cacatcagca tcaaaaacaa cggtggtaat 2160
gccgacttaa aaaaccttaa cgtccatgcc aaaagcgggg cattgaacat tcattccgac 2220
cgggcattga gcatagaaaa taccaagctg gagtctaccc ataatacgca tcttaatgca 2280
caacacgagc gggtaacgct caaccaagta gatgcctacg cacaccgtca tctaagcatt 2340

accggcagcc agatttggca aaacgacaaa ctgccttctg ccaacaagct ggtggctaac 2400
ggtgtattgg cactcaatgc gcgctattcc caaattgccg acaacaccac gctgagagcg 2460
ggtgcaatca accttactgc cggtaccgcc ctagtcaagc gcggcaacat caattggagt 2520
accgtttcga ccaaaacttt ggaagataat gccgaattaa aaccattggc cggacggctg 2580
aatattgaag caggtagcgg cacattaacc atcgaacctg ccaaccgcat cagtgcgcat 2640
accgacctga gcatcaaaac aggcggaaaa ttgctgttgt ctgcaaaagg aggaaatgca 2700
ggtgcgccta gtgctcaagt ttcctcattg gaagcaaaag gcaatatccg tctggttaca 2760
ggagaaacag atttaagagg ttctaaaatt acagccggta aaaacttggt tgtcgccacc 2820

accaaaggca agttgaatat cgaagccgta aacaactcat tcagcaatta ttttcctaca 2880
caaaaagcgg ctgaactcaa ccaaaaatcc aaagaattgg aacagcagat tgcgcagttg 2940
aaaaaaagct cgcctaaaag caagctgatt ccaaccctgc aagaagaacg cgaccgtctc 3000
gctttctata ttcaagccat caacaaggaa gttaaaggta aaaaacccaa aggcaaagaa 3060
tacctgcaag ccaagctttc tgcacaaaat attgacttga tttccgcaca aggcatcgaa 3120
atcagcggtt ccgatattac cgcttccaaa aaactgaacc ttcacgccgc aggcgtattg 3180
ccaaaggcag cagattcaga ggcggctgct attctgattg acggcataac cgaccaatat 3240
gaaattggca agcccaccta caagagtcac tacgacaaag ctgctctgaa caagccttca 3300

cgtttgaccg gacgtacagg ggtaagtatt catgcagctg cggcactcga tgatgcacgt 3360
attattatcg gtgcatccga aatcaaagct ccctcaggca gcatagacat caaagcccat 3420
agtgatattg tactggaggc tggacaaaac gatgcctata ccttcttaaa aaccaaaggt 3480

aaaagcggca aaatcatcag aaaaaccaag tttaccagca cccgcgacca cctgattatg 3540
ccagcccccg tcgagctgac cgccaacggc ataacgcttc aggcaggcgg caacatcgaa 3600
gctaatacca cccgcttcaa tgcccctgca ggtaaagtta ccctggttgc gggtgaagag 3660
ctgcaactgc tggcagaaga aggcatccac aagcacgagt tggatgtcca aaaaagccgc 3720
cgctttatcg gcatcaaggt aggcaagagc aattacagta aaaacgaact gaacgaaacc 3780

aaattgcctg tccgcgtcgt cgcccaaact gcagccaccc gttcaggctg ggataccgtg 3840
ctcgaaggta ccgaattcaa aaccacgctg gccggtgcgg acattcaggc aggtgtaggc 3900
gaaaaagccc gtgccgatgc gaaaattatc ctcaaaggca ttgtgaaccg tatccagtcg 3960
gaagaaaaat tagaaaccaa ctcaaccgta tggcagaaac aggccggacg cggcagcact 4020
atcgaaacgc tgaaactgcc cagcttcgaa agccctactc cgcccaaact gaccgccccc 4080
ggtggctata tcgtcgacat tccgaaaggc aatttgaaaa ccgaaatcga aaagctggcc 4140
aaacagcccg agtatgccta tctgaaacag ctccaagtag cgaaaaacac tagtggccac 4200
catcaccatc accatta 4217