

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-508156

(P2005-508156A)

(43) 公表日 平成17年3月31日(2005.3.31)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	4 B O 2 4
A 6 1 K 39/00	A 6 1 K 39/00	4 C O 8 5
A 6 1 K 39/08	A 6 1 K 39/08	4 H O 4 5
A 6 1 K 39/085	A 6 1 K 39/085	
A 6 1 K 39/09	A 6 1 K 39/09	
	審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 86 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願2003-525026 (P2003-525026)	(71) 出願人	592243793 カイロン ソチエタ ア レスポンサビリ タ リミタータ イタリア国 イー53100 シエナ, ピ ア フィオレンティーナ 1
(86) (22) 出願日	平成14年9月6日 (2002.9.6)	(74) 代理人	100078282 弁理士 山本 秀策
(85) 翻訳文提出日	平成16年3月5日 (2004.3.5)	(74) 代理人	100062409 弁理士 安村 高明
(86) 国際出願番号	PCT/IB2002/003904	(74) 代理人	100113413 弁理士 森下 夏樹
(87) 国際公開番号	W02003/020756	(72) 発明者	ピッツァ, マリアグラツィア イタリア国 イー53100 シエナ, ピア フィオレンティーナ 1, カイロ ン エセ. ピー. アー.
(87) 国際公開日	平成15年3月13日 (2003.3.13)		最終頁に続く
(31) 優先権主張番号	0121591.2		
(32) 優先日	平成13年9月6日 (2001.9.6)		
(33) 優先権主張国	英国 (GB)		

(54) 【発明の名称】 ナイセリアタンパク質のハイブリッドおよびタンデム発現

(57) 【要約】

2以上のナイセリアタンパク質は、単純ポリペプチド鎖として翻訳されるように結合される。ハイブリッドタンパク質は、化学式 $\text{NH}_2 - \text{A} - [- \text{X} - \text{L} -]_n - \text{B} - \text{COOH}$ によって表され、ここで、Xはアミノ酸配列であり、Lは任意のリンカーアミノ酸配列であり、Aは任意のN-末端アミノ酸配列であり、Bは任意のC-末端アミノ酸配列であり、そして、nは1より大きい整数である。タンパク質のn-X-部分の各々が、互いの-X-部分と配列同一性を共有する場合、そのタンパク質は「タンデムタンパク質」である。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ハイブリッドタンパク質であって、該ハイブリッドタンパク質は、以下の化学式：



を有し、ここで、Lは任意のリンカーアミノ酸配列、Aは任意のN末端アミノ酸配列、Bは任意のC末端アミノ酸配列、およびnは1よりも大きな整数であり、ならびにXは以下：

- (a) orf 1アミノ酸配列、orf 4アミノ酸配列、orf 25アミノ酸配列、orf 40アミノ酸配列、orf 46.1アミノ酸配列、orf 83アミノ酸配列、NMB 1343アミノ酸配列、230アミノ酸配列、233アミノ酸配列、287アミノ酸配列、292アミノ酸配列、594アミノ酸配列、687アミノ酸配列、736アミノ酸配列、741アミノ酸配列、907アミノ酸配列、919アミノ酸配列、936アミノ酸配列、953アミノ酸配列、961アミノ酸配列または983アミノ酸配列；
- (b) (a)由来のアミノ酸配列と配列同一性を有するアミノ酸配列；または、
- (c) (a)由来のアミノ酸配列のフラグメントを含むアミノ酸配列、
- のいずれかである、ハイブリッドタンパク質。

【請求項 2】

ハイブリッドタンパク質であって、該ハイブリッドタンパク質は、以下の化学式：



を有し、ここで、Xはアミノ酸配列、Lは任意のリンカーアミノ酸配列、Aは任意のN末端アミノ酸配列、Bは任意のC末端アミノ酸配列、およびnは1よりも大きな整数であり、ここで、第1のX部分(-X_a-)は以下のアミノ酸配列：

- (d) 参考文献3に開示される446個の配列番号の偶数のもの(すなわち、2、4、6、...、890、892)；
- (e) 参考文献4に開示される45個の配列番号の偶数のもの(すなわち、2、4、6、...、88、90)；
- (f) 参考文献5に開示される1674個の配列番号2~3020の偶数のもの、配列番号3040~3114の偶数のもの、および配列番号3115~3241のすべて；
- (g) 参考文献7からの2160アミノ酸配列NMB 0001~NMB 2160；もしくは、
- (h) 参考文献1または参考文献2に開示されるアミノ酸配列のいずれかならびに第2のX部分(-X_b-)を有し、ここで、-X_b-は-X_a-と配列同一性を有するおよび/または-X_b-は-X_a-のフラグメントを含む、ハイブリッドタンパク質。

【請求項 3】

請求項1または請求項2に記載のハイブリッドタンパク質であって、ここでn=2である、ハイブリッドタンパク質。

【請求項 4】

請求項2に記載のハイブリッドタンパク質であって、-X_a-はorf 46.1アミノ酸配列、230アミノ酸配列、287アミノ酸配列、741アミノ酸配列、919アミノ酸配列、936アミノ酸配列、953アミノ酸配列、961アミノ酸配列または983アミノ酸配列である、ハイブリッドタンパク質。

【請求項 5】

請求項2に記載のハイブリッドタンパク質であって、X₁、...、X_nは全て互いと配列同一性を有する、ハイブリッドタンパク質。

【請求項 6】

請求項1~5のいずれか1項に記載のハイブリッドタンパク質であって、ここでn=2であり、かつ前記X部分は以下：

G 287および230； G 287および936； G 287および741； 961c
 および287； 961cおよび230； 961cおよび936； 961cLおよび287

; 9 6 1 c L および 2 3 0 ; 9 6 1 c L および 9 3 6 ; O R F 4 6 . 1 および 9 3 6 ; O R F 4 6 . 1 および 2 3 0 ; 2 3 0 および 9 6 1 ; 2 3 0 および 7 4 1 ; 9 3 6 および 9 6 1 ; 9 3 6 および 7 4 1 ; G 7 4 1 および 7 4 1 ; または G 2 8 7 および 2 8 7 である、ハイブリッドタンパク質。

【請求項 7】

請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載のハイブリッドタンパク質であって、L は、20 以下のアミノ酸を有する、ハイブリッドタンパク質。

【請求項 8】

請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載のハイブリッドタンパク質であって、L は、ポリグリシンリンカーである、ハイブリッドタンパク質。

10

【請求項 9】

請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載のハイブリッドタンパク質であって、A は、40 以下のアミノ酸を有する、ハイブリッドタンパク質。

【請求項 10】

請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載のハイブリッドタンパク質であって、B は、40 以下のアミノ酸を有する、ハイブリッドタンパク質。

【請求項 11】

請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載のハイブリッドタンパク質であって、- X - 部分は、N . m e n i n g i t i d i s 血清群 B において見出されたアミノ酸配列を有する、ハイブリッドタンパク質。

20

【請求項 12】

請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載のハイブリッドタンパク質であって、少なくとも 1 つの - X - 部分は、1 以上のドメインが欠失した 9 6 1 アミノ酸配列である、ハイブリッドタンパク質。

【請求項 13】

配列番号 1 番 ~ 3 8 番からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、タンパク質。

【請求項 14】

請求項 1 ~ 13 のいずれか 1 項に記載のタンパク質をコードする、核酸。

【請求項 15】

請求項 1 ~ 14 のいずれか 1 項に記載のタンパク質または核酸を含む、組成物。

30

【請求項 16】

組成物であって、2 以上の以下のタンパク質：

(1) 2 8 7

(2) 7 4 1

(3) O R F 4 6 . 1

(4) 9 6 1

(5) $\text{NH}_2 - \text{A} - [- \text{X} - \text{L} -]_n - \text{B} - \text{COOH}$ であり、ここで $n = 2$ 、 $\text{X}_1 = 2 8 7$ 、 $\text{X}_2 = 9 5 3$ である

(6) $\text{NH}_2 - \text{A} - [- \text{X} - \text{L} -]_n - \text{B} - \text{COOH}$ であり、ここで $n = 2$ 、 $\text{X}_1 = 2 8 7$ 、 $\text{X}_2 = 9 1 9$ である

40

(7) $\text{NH}_2 - \text{A} - [- \text{X} - \text{L} -]_n - \text{B} - \text{COOH}$ であり、ここで $n = 2$ 、 $\text{X}_1 = 2 8 7$ 、 $\text{X}_2 = 9 6 1$ である

(8) $\text{NH}_2 - \text{A} - [- \text{X} - \text{L} -]_n - \text{B} - \text{COOH}$ であり、ここで $n = 2$ 、 $\text{X}_1 = 2 8 7$ 、 $\text{X}_2 = 7 4 1$ である

(9) $\text{NH}_2 - \text{A} - [- \text{X} - \text{L} -]_n - \text{B} - \text{COOH}$ であり、ここで $n = 2$ 、 $\text{X}_1 = 9 3 6$ 、 $\text{X}_2 = 7 4 1$ である

を含む、組成物。

【請求項 17】

請求項 16 に記載の組成物であって、タンパク質 (4) (5) および (9) を含む、組成物。

50

【請求項18】

請求項17に記載の組成物であって、ここで、タンパク質(4)は配列番号31を含み、タンパク質(5)は配列番号28または配列番号29を含み、タンパク質(9)は配列番号30を含む、組成物。

【請求項19】

請求項15~18のいずれか1項に記載の組成物であって、さらに、以下：

- *N. meningitidis* 由来のタンパク質抗原；
 - *N. meningitidis* 由来の外膜小胞(OMV)調製物；
 - *N. meningitidis* 由来の糖類抗原；
 - *Streptococcus pneumoniae* 由来の糖類抗原； 10
 - A型肝炎ウイルス、B型肝炎ウイルス、および/もしくはC型肝炎ウイルス由来の抗原；
 - *Bordetella pertussis* 由来の抗原；
 - ジフテリア抗原；
 - 破傷風抗原；
 - *Helicobacter pylori* 由来のタンパク質抗原；
 - *Haemophilus influenzae* 由来の糖類抗原；
 - *N. gonorrhoeae* 由来の抗原；
 - *Chlamydia pneumoniae* 由来の抗原；
 - *Chlamydia trachomatis* 由来の抗原； 20
 - *Porphyromonas gingivalis* 由来の抗原；
 - ポリオ抗原；
 - 狂犬病抗原；
 - はしか抗原、耳下腺炎抗原、および/もしくは風疹抗原；
 - インフルエンザ抗原；
 - *Moraxella catarrhalis* 由来の抗原；
 - *Streptococcus agalactiae* 由来の抗原；
 - *Streptococcus pyogenes* 由来の抗原；ならびに/または、
 - *Staphylococcus aureus* 由来の抗原、
- を含む、組成物。 30

【請求項20】

請求項15~19のいずれか1項に記載の組成物であって、さらに、薬学的に受容可能なキャリアを含む、組成物。

【請求項21】

請求項20に記載の組成物であって、医薬として使用するための、組成物。

【請求項22】

患者を処置する方法であって、治療的有効量の請求項20に記載の組成物を患者に投与する工程を包含する、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】 40

【0001】

本明細書中で引用される全ての文献は、その全体が参考として援用される。

【0002】

本発明は、タンパク質発現の分野における発明である。特に、ナイセリア属(例えば、*N. gonorrhoeae*または好ましくは、*N. meningitidis*)由来のタンパク質の発現に関連する。

【背景技術】

【0003】

参考文献1および2は、参考文献3~6に開示されたナイセリアタンパク質の発現のための代替アプローチおよび改良されたアプローチを開示している。そのような方法の一つは 50

、2以上のナイセリアタンパク質が単一のポリペプチド鎖として発現される「ハイブリッド」タンパク質の産生である。このアプローチは、2つの利点を提供する。第1に、単独では不安定であり得るか、またはほとんど発現されないかもしれないタンパク質は、この問題を克服する適切なハイブリッドパートナーの付加によって補助され得る。第2に、商業製造は、別個に有用な2種のタンパク質を産生するために、1つの発現および精製のみを用いることを必要とするので、単純化される。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

本発明の目的は、ナイセリアタンパク質の発現のための代替アプローチおよび改良されたアプローチをさらに提供することである。 10

【課題を解決するための手段】

【0005】

(発明の開示)

(ハイブリッドタンパク質)

本発明は、2以上(例えば、3、4、5、6またはそれより多く)のナイセリアタンパク質の同時発現のための方法を提供し、この方法では、前記の2以上のタンパク質が単一のポリペプチド鎖として翻訳されたように結合している。一般に、本発明のハイブリッドタンパク質は、以下の式： $NH_2 - A - [-X - L -]_n - B - COOH$

によって表され得、ここで、Xはアミノ酸配列であり、Lは任意のリンカーアミノ酸配列であり、Aは任意のN末端アミノ酸配列であり、Bは任意のC末端アミノ酸配列であり、そしてnは1よりも大きな整数である。 20

【0006】

nの値は、2とxとの間であり、このxの値は、典型的には、3、4、5、6、7、8、9または10である。好ましくは、nは2、3または4である；さらに好ましくは、2または3である；最も好ましくは、n = 2である。

【0007】

(-X-部分)

本発明によるハイブリッドタンパク質には、主要な2群がある。これらの2群は相互に排他的ではない。 30

【0008】

第1の群において、各-X-部分は、

(a) orf 1アミノ酸配列、orf 4アミノ酸配列、orf 25アミノ酸配列、orf 40アミノ酸配列、orf 46.1アミノ酸配列、orf 83アミノ酸配列、NMB 1343アミノ酸配列、230アミノ酸配列、233アミノ酸配列、287アミノ酸配列、292アミノ酸配列、594アミノ酸配列、687アミノ酸配列、736アミノ酸配列、741アミノ酸配列、907アミノ酸配列、919アミノ酸配列、936アミノ酸配列、953アミノ酸配列、961アミノ酸配列または983アミノ酸配列；

(b) (a)由来のアミノ酸配列に対する配列同一性を有するアミノ酸配列；または、

(c) (a)由来のアミノ酸配列のフラグメントを含有するアミノ酸配列、 40

【0009】

(a)の好ましいサブセットは：orf 46.1、230、287、741、919、936、953、961および983である。(a)のさらに好ましいサブセットは：orf 46.1、287、741および961である。図3は、好ましいハイブリッドタンパク質を示す。

【0010】

第2の群において、ハイブリッドタンパク質は、第1の-X-部分(-X_a-)および第2の-X-部分(-X_b-)を含有する。この-X_a-部分は、以下のアミノ酸配列の1つを有する：

- (d) 参考文献 3 に開示の 4 4 6 の偶数配列番号 (すなわち、2、4、6、...、890、892) ;
- (e) 参考文献 4 に開示の 4 5 の偶数配列番号 (すなわち、2、4、6、...、88、90) ;
- (f) 参考文献 5 に開示の 1 6 7 4 の偶数配列番号 2 ~ 3 0 2 0、偶数配列番号 3 0 4 0 ~ 3 1 1 4、および全配列番号 3 1 1 5 ~ 3 2 4 1 ;
- (g) 参考文献 7 由来の 2 1 6 0 のアミノ酸配列 N M B 0 0 0 1 ~ N M B 2 1 6 0 ; または、
- (h) 参考文献 1 もしくは参考文献 2 に開示のアミノ酸配列。

【0011】

- X_b - 部分は、以下のように - X_a - に関連する：(i) - X_b - は - X_a - に対する配列同一性を有し、および/または (j) - X_b - は - X_a - のフラグメントを含有する。

【0012】

この第 2 のタイプのハイブリッドタンパク質の例は、2 種以上の - X - 部分が同一であるようなタンパク質、またはこれらが同じタンパク質の改変体 (例えば、同じタンパク質の 2 種の多型形態は、- X_a - X_b - として発現され得、そして 3 種の多型形態は - X_a - X_b - X_c - として発現され得るなど) であるようなタンパク質を含む。

【0013】

- X_a - および - X_b - 部分は、N 末端から C 末端までのいずれかの順番で存在し得る。

【0014】

- X_a - 部分は、好ましくは、o r f 1 アミノ酸配列、o r f 4 アミノ酸配列、o r f 2 5 アミノ酸配列、o r f 4 0 アミノ酸配列、o r f 4 6 . 1 アミノ酸配列、o r f 8 3 アミノ酸配列、N M B 1 3 4 3 アミノ酸配列、2 3 0 アミノ酸配列、2 3 3 アミノ酸配列、2 8 7 アミノ酸配列、2 9 2 アミノ酸配列、5 9 4 アミノ酸配列、6 8 7 アミノ酸配列、7 3 6 アミノ酸配列、7 4 1 アミノ酸配列、9 0 7 アミノ酸配列、9 1 9 アミノ酸配列、9 3 6 アミノ酸配列、9 5 3 アミノ酸配列、9 6 1 アミノ酸配列または 9 8 3 アミノ酸配列である。- X_a - 部分は、さらに好ましくは、o r f 4 6 . 1 アミノ酸配列、2 3 0 アミノ酸配列、2 8 7 アミノ酸配列、7 4 1 アミノ酸配列、9 1 9 アミノ酸配列、9 3 6 アミノ酸配列、9 5 3 アミノ酸配列、9 6 1 アミノ酸配列または 9 8 3 アミノ酸配列である。- X_a - 部分は、最も好ましくは、o r f 4 6 . 1、2 8 7 アミノ酸配列、7 4 1 アミノ酸配列または 9 6 1 アミノ酸配列である。

【0015】

n 個の - X - 部分の各々が、互いの - X - 部分に対する配列同一性を共有するタンパク質において、そのタンパク質は「タンデムタンパク質」といわれる。n = 2 であるタンデムタンパク質が好ましい。

【0016】

(b) および (i) に言及された「配列同一性」の程度は、好ましくは、50% より大きい (例えば、60%、70%、80%、90%、95%、99% 以上、100% まで)。これは、変異体、ホモログ、オルソログ (o r t h o l o g)、対立遺伝子、改変体などを含む [例えば、参考文献 8 を参照のこと]。同一性は、好ましくは、ギャップオープンペナルティー = 1 2 およびギャップ伸長ペナルティー = 1 のパラメータを用いたアフィンギャップ検索を使用して、M P S R C H プログラム (O x f o r d M o l e c u l a r) で履行される S m i t h - W a t e r m a n 相同性検索アルゴリズムによって決定される。典型的には、2 つのタンパク質間において、50% 以上の同一性は機能的等価性の指標と見なされる。

【0017】

(c) および (j) に示された「フラグメント」は、(a)、(d)、(e)、(f)、(g) または (h) のアミノ酸配列由来の最低 m 個連続したアミノ酸からなるべきであり、特定の配列によって、m は 7 以上 (例えば、8、10、12、14、16、18、20

10

20

30

40

50

、25、30、35、40、50、60、70、80、90、100、150、200またはそれより多く)である。

【0018】

好ましくは、このフラグメントは、(a)、(d)、(e)、(f)、(g)または(h)のアミノ酸配列由来のエピトープを含有する。好ましいフラグメントは、参考文献9および10に開示されたフラグメントである。

【0019】

好ましい(c)および(j)のフラグメントは、C末端短縮物および/またはN末端短縮物(例えば、1-287、2-287など)である。

【0020】

好ましい(b)、(c)、(i)および(j)の配列は、ポリグリシン配列が削除されている。これは、発現を補助することが見出されている[参考文献2]。ポリグリシン配列は、(Gly)_gと表され得、ここで、g 3(例えば、4、5、6、7、8、9またはそれより多く)である。もし-X-部分が、その野生型形態においてポリグリシン配列を含有するならば、本発明のハイブリッドタンパク質において、この配列を削除するのが好ましい。これは、(Gly)_gを(欠失(例えば、CGGGGS CGGGGS、CGGS、CGSまたはCS))によって、置換(例えば、CGGGGS CGXGGGS、CGXGGS、CGXGXGSなど)によって、および/または挿入(例えば、CGGGGS CGXGGS、CGXGGGS、など)によって)破壊または除去することによって行われ得る。(Gly)_gの欠失が好ましく、ポリグリシン配列まで、およびこの配列を含むタンパク質N末端部分の欠失(例えば、配列番号1における残基1~32の欠失)を、本明細書中で「G」と呼ぶ。ポリグリシンの削除は、タンパク質287、タンパク質741、タンパク質983およびTbp2にとって特に有用である(G287、G741、G983およびGTbp2-参考文献1および2)。

10

20

【0021】

好ましい(c)および(j)フラグメントは、完全なタンパク質ドメインが削除されている。これは、タンパク質961、タンパク質287、およびORF46にとって特に有用である。一旦タンパク質がドメインへ概念的に分割されると、(c)および(j)フラグメントは、これらのドメインの1つ以上を削除し得る(例えば、287B、287C、287BC、ORF46₁₋₄₃₃、ORF46₄₃₄₋₆₀₈、961c-参考文献2; 本明細書中の図4および図5)。

30

【0022】

287タンパク質は、3ドメインへ概念的に分割され、それらはA、BおよびCと呼ばれる(参考文献2の図5を参照のこと)。ドメインBはIgAプロテアーゼと整列し、ドメインCはトランスフェリン結合タンパク質と整列し、ドメインAはデータベースの配列との強い整列は見られなかった。287の多型形態の整列は、参考文献8に開示されている。

【0023】

ORF46は、2ドメインへ概念的に分割される-第1のドメイン(アミノ酸1~433; ORF46.1)は、種間および血清群間でよく保存されており、第2のドメイン(アミノ酸434~608)は、あまり保存されていない。第2のドメインは、好ましくはORF46.1を残して欠失される。ORF46の多型形態の整列は、参考文献8に開示されている。

40

【0024】

961タンパク質は、いくつかのドメインへ概念的に分割される(図4)。

【0025】

もし-X-部分が、その野生型形態においてリーダーペプチド配列を含有するならば、本発明のハイブリッドタンパク質において、この配列は包含または削除され得る。リーダーペプチドが削除される場合、これは(c)および(j)の中のアミノ酸配列の好ましい例である。1つの実施形態において、リーダーペプチドは、ハイブリッドタンパク質のN末

50

端に位置する - X - 部分のリーダーペプチド以外は欠失される。すなわち、 X_1 のリーダーペプチドは保持されるが、 $X_2 \dots X_n$ のリーダーペプチドは削除される。これは、全てのリーダーペプチドを欠失し、 X_1 のリーダーペプチドを部分 - A - として使用することと等価である。

【0026】

$n = 2$ のとき、- X - 部分の好ましいペアは： G 2 8 7 および 2 3 0 ; G 2 8 7 および 9 3 6 ; G 2 8 7 および 7 4 1 ; 9 6 1 c および 2 8 7 ; 9 6 1 c および 2 3 0 ; 9 6 1 c および 9 3 6 ; 9 6 1 c L および 2 8 7 ; 9 6 1 c L および 2 3 0 ; 9 6 1 c L および 9 3 6 ; O R F 4 6 . 1 および 9 3 6 ; O R F 4 6 . 1 および 2 3 0 ; 2 3 0 および 9 6 1 ; 2 3 0 および 7 4 1 ; 9 3 6 および 9 6 1 ; 9 3 6 および 7 4 1 である。 $n = 2$ のとき、タンデムタンパク質にとって好ましい - X - 部分のペアは： G 7 4 1 および 7 4 1 ; G 2 8 7 および 2 8 7 である。さらに詳細には、 $n = 2$ のとき以下の X_1 および X_2 の組み合わせが好ましい：

10

【0027】

【数1】

X ₁	X ₂
ΔG287	230
ΔG287	936
ΔG287	741
ΔG287	961
ΔG287	ORF46.1
ΔG287	919
ΔG287	953
961c	287
961c	230
961c	936
961c	741
961c	983
961c	ΔG983
961c	ORF46.1
961	ORF46.1
961cL	287
961cL	230
961cL	936
ORF46.1	936
ORF46.1	230
ORF46.1	741
ORF46.1	ΔG741
ORF46.1	983
ORF46.1	ΔG983
230	961
230	741
230	ΔG741
936	961
936	741
936	ΔG741
ΔG741	741
ORF46.1	983
ΔG741	ORF46.1
ΔG741	983
ΔG741	961
ΔG741	961c
ΔG983	ORF46.1
ΔG983	961
ΔG983	961c

X ₁	X ₂
230	ΔG287
936	ΔG287
741	ΔG287
961	ΔG287
ORF46.1	ΔG287
919	ΔG287
953	ΔG287
287	961c
230	961c
936	961c
741	961c
983	961c
ΔG983	961c
ORF46.1	961c
ORF46.1	961
287	961cL
230	961cL
936	961cL
936	ORF46.1
230	ORF46.1
741	ORF46.1
ΔG741	ORF46.1
983	ORF46.1
ΔG983	ORF46.1
961	230
741	230
ΔG741	230
961	936
741	936
ΔG741	936
ΔG287	287
983	ORF46.1
ORF46.1	ΔG741
983	ΔG741
961	ΔG741
961c	ΔG741
ORF46.1	ΔG983
961	ΔG983
961c	ΔG983

10

20

30

40

287が全長形態で用いられる場合、ハイブリッドタンパク質のC末端に位置するのが好ましい；もしN末端で用いられるべき場合、287のG形態を用いるのが好ましい。同様に、741が全長形態で用いられる場合、ハイブリッドタンパク質のC末端に位置するのが好ましい；もしN末端で用いられる場合、741のG形態を用いるのが好ましい。

【0028】

(-L-部分)

[-X-L-]の各n例について、リンカーアミノ酸配列-L-は、存在してもよく、存在しなくてもよい。例えば、n=2のとき、ハイブリッドはNH₂-X₁-L₁-X₂-L₂-COOH、NH₂-X₁-X₂-COOH、NH₂-X₁-L₁-X₂-COOH

50

、 $\text{NH}_2 - \text{X}_1 - \text{X}_2 - \text{L}_2 - \text{COOH}$ 、などであり得る。

【0029】

リンカーアミノ酸配列 - L - は、典型的に短い（例えば、20またはもっと少数のアミノ酸、すなわち19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、1）。例としては、クローニングを容易にする短いペプチド配列、ポリグリシンリンカー（すなわち Gly_n であって、ここで $n = 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10$ またはそれより多く）およびヒスチジントグ（すなわち His_n であって、ここで $n = 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10$ またはそれより多く）を含有する。その他の適切なリンカーアミノ酸配列は、当業者に明らかである。有用なリンカーは、 GSGGGG （配列番号27）であり、 Gly-Ser ジペプチドが BamHI 制限酵素部位から形成されており、従って、クローニングおよび操作を補助しており、そして、 Gly_4 テトラペプチドは典型的なポリグリシンリンカーである。

10

【0030】

もし、 X_{n+1} がGタンパク質であり、且つ L_n がグリシンリンカーである場合、これは、 X_{n+1} がGタンパク質ではなく、且つ L_n が不在であることと等価であり得る。

【0031】

（-A-部分）

-A-は、任意のN末端アミノ酸配列である。これは、典型的には短い（例えば、40またはもっと少数のアミノ酸、すなわち39、38、37、36、35、34、33、32、31、30、29、28、27、26、25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、1）。例としては、タンパク質の輸送を導くためのリーダー配列、または、クローニングもしくは精製を容易にする短いペプチド配列（例えば、ヒスチジントグ、すなわち His_n であって、ここで $n = 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10$ またはそれより多く）が挙げられる。その他の適切なN末端アミノ酸配列は、当業者に明らかである。 X_1 がそれ自体のN末端メチオニンを欠くならば、-A-はメチオニン残基であり得る。

20

【0032】

（-B-部分）

-B-は、任意のC末端アミノ酸配列である。これは、典型的には短い（例えば、40またはもっと少数のアミノ酸、すなわち39、38、37、36、35、34、33、32、31、30、29、28、27、26、25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、1）。例としては、タンパク質の輸送を導くための配列、クローニングもしくは精製を容易にする短いペプチド配列（例えば、ヒスチジントグ、すなわち His_n であって、 $n = 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10$ またはそれより多くを含む）、またはタンパク質の安定性を高める配列が挙げられる。その他の適切なC末端アミノ酸配列は、当業者に明らかである。

30

【0033】

（タンパク質の多型形態）

本発明は、 N.meningitidis の任意の株由来のアミノ酸配列を使用し得る。従って、特定のタンパク質（例えば、「287」または「ORF46.1」）に対する言及は、任意の株由来のそのタンパク質を含む。株間の配列バリエーションは、(b)、(c)、(i)および(j)に含まれる。

40

【0034】

N.meningitidis 血清群B由来の参照配列は、以下を含む：

【0035】

【数2】

タンパク質	参考文献	タンパク質	参考文献
orf1	参考文献3, 配列番号 650	orf4	参考文献3, 配列番号 218
orf25	参考文献3, 配列番号 684	orf40	参考文献4, 配列番号 4
orf46	参考文献6, 配列番号 1049	orf83	参考文献3, 配列番号 314
NMB1343	参考文献7, NMB1343	230	参考文献5, 配列番号 830
233	参考文献5, 配列番号 860	287	参考文献5, 配列番号 3104
292	参考文献5, 配列番号 1220	594	参考文献5, 配列番号 1862
687	参考文献5, 配列番号 2282	736	参考文献5, 配列番号 2506
741	参考文献5, 配列番号 2536	907	参考文献5, 配列番号 2732
919	参考文献5, 配列番号 3070	936	参考文献5, 配列番号 2884
953	参考文献5, 配列番号 2918	961	参考文献5, 配列番号 940
983	参考文献7, NMB1969		

参考文献8は、タンパク質ORF4、タンパク質ORF40、タンパク質ORF46、タンパク質225、タンパク質235、タンパク質287、タンパク質519、タンパク質726、タンパク質919およびタンパク質953の多型形態を開示している。961の多型形態は、参考文献11および12に開示されている。これらの多型形態のいずれもが、本発明に従って使用され得る。

【0036】

本明細書中の配列表は、タンパク質741の多型形態（配列番号1～22）およびタンパク質NMB1343の多型形態（配列番号23～24）を包含し、それらは同定されている。

【0037】

（血清群および株）

本発明の好ましいタンパク質は、N. meningitidis血清群Bにおいて見出されたアミノ酸配列を有する-X-部分を含有する。本発明の1つのタンパク質の中で、個々の-X-部分は1以上の株由来であり得る。例えば、n=2の場合、 X_2 は、 X_1 と同じ株由来または異なる株由来であり得る。n=3の場合、その株は、(i) $X_1 = X_2 = X_3$ 、(ii) $X_1 = X_2 \neq X_3$ 、(iii) $X_1 \neq X_2 = X_3$ 、(iv) $X_1 \neq X_2 \neq X_3$ 、(v) $X_1 = X_3 \neq X_2$ 、などであり得る。

【0038】

血清群Bの中で、好ましい-X-部分は、株2996、株MC58、株95N477、または株394/98由来である。株95N477は、その電気泳動タイプにより、本明細書中で時々「ET37」と呼ばれる。株394/98は、ニュージーランド株であるので、本明細書中で時々「nz」と呼ばれる。

【0039】

287の形態が使用される場合、これは、好ましくは、株2996由来または株394/98由来である。

【0040】

741の形態が使用される場合、これは、好ましくは、血清群Bの株MC58、2996、394/98、または95N477由来、もしくは血清群Cの株90/18311由来である。

【0041】

961の形態が使用される場合、これは、好ましくは、株2996由来である。

【0042】

株は、下付き文字として表示され、例えば、741_{MC58}は、株MC58由来のタンパク質741である。他に言及しない限り、本明細書中に記載されたタンパク質（例えば、下付き文字の無いタンパク質）は、N. meningitidis株2996由来であり

10

20

30

40

50

、この株は「基準」株と解釈され得る。しかしながら、本発明は、一般に株によって制限されない認識される。前述のように、タンパク質（例えば、「287」、「919」など）に対する一般的言及は、任意の株由来のそのタンパク質を包含すると解釈され得る。これは、典型的に、2996に対する90%以上（例えば、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれより上）の配列同一性を有する。

【0043】

（タンパク質961のドメインに基づいた表現）

参考文献1および2は、どのようにタンパク質が概念的にドメインに分割され得、そしてどのようにこれらのドメインに基づいて操作され得るかを開示している。本発明は、タンパク質961（「NadA」としても知られる[11、12]）へとこのアプローチの適用を拡大する。

【0044】

N. meningitidis 血清群B株2996において、NadAは、405アミノ酸を有する。このタンパク質は、概念的に以下の9ドメインに分割されている（図4）：

【0045】

【数3】

ドメイン名	アミノ酸	ドメイン名	アミノ酸
961-1 「L」	1-23	961-6	269-286
961-2	24-87	961-7	287-330
961-3	88-143	961-8	331-350
961-4	144-180	961-9	351-405
961-5	181-268		

この情報は、他の961形態における同じドメインを位置付けるために使用され得る。

【0046】

これらのドメインは、株2996における961から種々の様式で欠失している（図5）。好ましい961のフラグメントは、これらの9ドメインのうち1つ以上（例えば以下：

- 961-2 ~ 961-5（「961a」）
 - 961-6 ~ 961-9（「961b」）
 - 961-1 ~ 961-8（「961cL」）
 - 961-2 ~ 961-8（「961c」）
 - 961-2 ~ 961-6および961-7ドメイン由来のアミノ酸287-325（「961d」）
 - 961-2 ~ 961-8および961-9ドメイン由来のアミノ酸351-383（「961 1」）
 - 961-1 ~ 961-8および961-9ドメイン由来のアミノ酸351-383（「961 1L」）
 - 961-1 ~ 961-7および961-8ドメイン由来のアミノ酸331-343（「961cL - aro」）
 - 961-1 ~ 961-6および961-7ドメイン由来のアミノ酸287-315（「961cL - cc」）
 - 961-1 ~ 961-5（「961aL」）
 - 961-1 ~ 961-4（「961aL - 1」）
 - 961-1 ~ 961-3（「961aL - 2」）
 - 961-1 ~ 961-2（「961aL - 3」）
- ）を省略する。

【0047】

10

20

30

40

50

これらの13のフラグメント（および、片側または両側の末端で1、2、3、4または5アミノ酸を欠失しているサブフラグメント）は、好ましい（c）フラグメントおよび（j）フラグメントであるが、それらはまた、本発明のハイブリッドタンパク質の形態ではなく、本来の状態で見出され得る。従って、本発明は、これらのフラグメントの1つを含有するタンパク質を提供するが、ただし、そのタンパク質は全長の961ではなく、参考文献1または参考文献2に明確に開示されたタンパク質ではない。このタンパク質は、融合タンパク質（例えば、GST-融合物またはHis-tag融合物）であり得る。

【0048】

（配列）

本発明はまた、配列番号1～24のアミノ酸配列を有するタンパク質も提供する。本発明はまた、これらと配列同一性を有するタンパク質および核酸も提供する。前述のように、「配列同一性」の程度は、好ましくは50%より大きい（例えば、60%、70%、80%、90%、95%、99%またはそれ以上）。

【0049】

本発明はまた、そのようなタンパク質をコードしている核酸も提供する。

【0050】

さらに本発明は、好ましくは「高いストリンジェンシー」条件下（例えば、0.1%×SSC、0.5%SDS中、65℃）で、この核酸とハイブリダイズし得る核酸を提供する。

【0051】

本発明はまた、本発明によるタンパク質をコードしている核酸も提供する。

【0052】

本発明が、前述の配列と相補的な配列を含有する核酸を提供することも、理解されるべきである（例えば、アンチセンスまたはプローブの目的のために）。

【0053】

本発明による核酸は、もちろん、多様な方法（例えば、化学合成によって、ゲノムまたはcDNAライブラリー由来、生物体自身由来、など）で調製され得、また、種々の形態（例えば、一本鎖、二本鎖、ベクター、プローブ、など）をとり得る。

【0054】

さらに、用語「核酸」は、DNAおよびRNAならびにそれらの修飾された骨格を含むアナログ、ならびにペプチド核酸（PNA）なども含む。

【0055】

（混合物）

本発明はまた、以下のタンパク質のうちの2つ以上（すなわち、2、3、4、5、6、または7）を含有する組成物も提供する：

（1）287

（2）741

（3）ORF46.1

（4）961

（5） $\text{NH}_2 - \text{A} - [- \text{X} - \text{L} -]_n - \text{B} - \text{COOH}$ （ここで、 $n = 2$ 、 $\text{X}_1 = 287$ 、 $\text{X}_2 = 953$ ）

（6） $\text{NH}_2 - \text{A} - [- \text{X} - \text{L} -]_n - \text{B} - \text{COOH}$ （ここで、 $n = 2$ 、 $\text{X}_1 = 287$ 、 $\text{X}_2 = 919$ ）

（7） $\text{NH}_2 - \text{A} - [- \text{X} - \text{L} -]_n - \text{B} - \text{COOH}$ （ここで、 $n = 2$ 、 $\text{X}_1 = 287$ 、 $\text{X}_2 = 961$ ）

前記混合物は、（1）～（7）の2つ以上との組み合わせ、もしくは（1）～（7）の1つだけとの組み合わせのいずれかで、以下のタンパク質の1つまたは両方を含有し得る：

（8） $\text{NH}_2 - \text{A} - [- \text{X} - \text{L} -]_n - \text{B} - \text{COOH}$ （ここで、 $n = 2$ 、 $\text{X}_1 = 287$ 、 $\text{X}_2 = 741$ ）

（9） $\text{NH}_2 - \text{A} - [- \text{X} - \text{L} -]_n - \text{B} - \text{COOH}$ （ここで、 $n = 2$ 、 $\text{X}_1 = 936$ 、

$X_2 = 741$)。

【0056】

タンパク質287および741が混合物(すなわち、タンパク質1、2、5、6、7または8の中)に含まれる場合、それらのタンパク質は「G」の形態であり得る。タンパク質961が含まれる場合、好ましくは、N末端リーダーおよびC末端膜アンカーが不在である「961c」の形態である[例えば、参考文献1、2、および11を参照のこと]。

【0057】

好ましい混合物は、以下の3種のタンパク質を含有する：

(1) 961c、好ましくは $961c_{2996}$ (例えば、本明細書中の配列番号31)；
 (2) $NH_2 - A - [-X - L -]_n - B - COOH$ (ここで、 n は2であり、 $-X_1 -$ はG287(好ましくは $G287_{NZ}$)であり、 $-X_2 -$ はリーダーペプチドの欠損した953(好ましくは 953_{2996})であり、 $-L_1 -$ はGSGGGGであり、そして $-A -$ はN末端メチオニンを含有する(例えば、 $-A -$ はMまたはMA)である(例えば、本明細書中の配列番号28および29))；ならびに

10

(3) $NH_2 - A - [-X - L -]_n - B - COOH$ (ここで、 $n = 2$ であり、 $X_1 = 936$ (好ましくは 936_{2996})であり、 $X_2 = G741$ (好ましくは $G741_{Mc58}$)であり、 $L_1 = GSGGGG$ (例えば、本明細書中の配列番号30))である。前記混合物はまた、*N. meningitidis*細菌外膜小胞も含有し得る。

【0058】

(異種宿主)

本発明のタンパク質の発現は、ナイセリアにおいて起こり得るが、本発明は、好ましくは、異種宿主を利用する。異種宿主は、原核細胞(例えば、細菌)または真核細胞であり得る。異種宿主は、好ましくは、*E. coli*であるが、その他の適切な宿主としては、*Bacillus subtilis*、*Vibrio cholerae*、*Salmonella typhi*、*Salmonella typhimurium*、*Neisseria lactamica*、*Neisseria cinerea*、*Mycobacterium tuberculosis*、酵母などが挙げられる。

20

【0059】

(ベクターなど)

本発明は以下を提供する：(a)前述のタンパク質をコードしている核酸(b)これらの核酸配列を含有するベクター(c)これらのベクターを含有する宿主細胞(d)本発明のタンパク質または核酸を含有する組成物であって、免疫原性組成物(例えばワクチン)としてまたは診断試薬として適切であり得る組成物(e)医薬として(例えばワクチンとして)または診断試薬として使用するためのこれらの組成物(f)以下：(1)ナイセリア細菌に起因する感染の処置もしくは予防のための医薬(2)ナイセリア細菌の存在もしくはナイセリア細菌に対して惹起された抗体の存在を検出するための診断試薬、および/または(3)ナイセリア細菌に対する抗体を惹起し得る試薬の製造におけるこれらの組成物の使用、ならびに(g)患者の処置の方法であって、治療有効量のこれらの組成物を患者へ投与する工程を包含する方法。

30

【0060】

本発明の実施には、典型的に以下の基礎的な工程を包含する：第一のタンパク質をコードしている第一の核酸を獲得する工程；第二のタンパク質をコードしている第二の核酸を獲得する工程；および第一の核酸と第二の核酸とを連結する工程。得られた核酸は、発現ベクターに挿入され得るか、または既に発現ベクターの一部であり得る。

40

【0061】

溶解性を改善するために、ハイブリッドタンパク質の精製は、本明細書中に開示された技術の再折り畳みを包含し得る。

【0062】

(免疫原性の組成物および医薬)

本発明の組成物は、好ましくは、免疫原性の組成物であり、より好ましくはワクチン組成

50

物である。この組成物のpHは、好ましくは、6と7との間である。pHは、緩衝液を用いて維持され得る。この組成物は無菌であり得る。

【0063】

本発明に従うワクチンは、予防薬（すなわち、感染の予防）または治療薬（すなわち、感染の処置）のいずれかであり得、典型的には予防薬である。

【0064】

本発明はまた、本発明の組成物を医薬として使用するために提供する。この医薬は、好ましくは、哺乳動物において免疫応答を惹起することが可能であり（すなわち、免疫原性の組成物である）、より好ましくは、ワクチンである。

【0065】

本発明はまた、哺乳動物において免疫応答を惹起するための医薬の製造における本発明の組成物の使用を提供する。その医薬は、好ましくはワクチンである。

【0066】

本発明はまた、哺乳動物において免疫応答を惹起するための方法を提供し、その方法は、有効量の本発明の組成物を投与する工程を包含する。この免疫応答は、好ましくは防御性である。本方法は、ブースター応答を惹起し得る。

【0067】

哺乳動物は、好ましくはヒトである。ワクチンの目的が予防的な使用にある場合、ヒトは好ましくは小児（例えば、幼児または乳児）である；ワクチンの目的が予防的な使用にある場合、ヒトは好ましくは成人である。小児を意図するワクチンはまた、例えば、安全性、投薬量、免疫原性などを評価するために、成人にも投与し得る。

【0068】

これらの使用および方法は、好ましくは、ナイセリアが原因の疾患（例えば、髄膜炎、敗血症、淋病など）の予防および/または治療のためである。細菌性髄膜炎の予防および/または治療が好ましい。

【0069】

（本組成物のさらなる成分）

本発明の組成物は、代表的には、上記組成物に加え、一つまたはそれ以上の「薬剂的に受容可能なキャリア」を含有し、この組成物を受容した個体に対し、それ自身は有害な抗体の生成を誘導しない任意のキャリアを含む。適切なキャリアは、典型的には、大きく、緩慢に代謝された巨大分子であり、例えば、タンパク質、多糖、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、多量体アミノ酸、アミノ酸コポリマー、トレハロース（W000/56365）および脂質集合体（例えば、油滴またはリポソーム）である。そのようなキャリアは、当業者に周知である。これらのワクチンはまた、水、生理食塩水、グリセロール、などのような希釈剤も含有し得る。さらに、湿潤剤または乳化剤、pH緩衝化物質などのような補助物質も存在し得る。薬剂的に受容可能な賦形剤の徹底的な議論は、Remington's Pharmaceutical Sciencesから入手可能である。

【0070】

ワクチンとして用いられる免疫原性の組成物は、必要に応じて、免疫学的有効量の抗原、および上記成分の他の任意の成分を含有する。「免疫学的有効量」によって、単回投与かまたは一連の投与のうちの一部としてかのいずれかで個体へこの量を投与することが、処置または予防のために有効であることを意味する。この量は、処置を受ける個体の健康状態および身体的条件、年齢、処置を受ける個体の分類学的な群（例えば、非ヒト霊長類、霊長類など）、抗体合成のための個体の免疫系の能力、要求される防御の度合い、ワクチンの調剤、処置する医者の医学的立場の評価、ならびにその他の関連性のある要因に依存して変化する。その量は、慣用的な試験によって決定され得る相対的に広い範囲にあることが期待される。投薬処置は、単回投与スケジュールまたは複数回投与スケジュール（例えば、ブースター投与が挙げられる）であり得る。ワクチンは、他の免疫調節薬剤と共に投与され得る。

【0071】

10

20

30

40

50

ワクチンは、他の免疫調節薬剤と共に投与され得る。

【0072】

本組成物は、アルミニウム塩に加えて（またはその代わりに）、他のアジュバントを含み得る。組成物の効果を高めるために好ましいアジュバントには以下のものが挙げられるが、それだけに限らない：（1）水中油エマルジョンの処方物（ムラミルペプチド（下記参照）または細菌の細胞壁成分のような他の特定の免疫刺激性の薬剤を伴うかまたは伴わない）、例えば、（a）マイクロフルイダイザーを用いてミクロン以下の微粒子にして処方されたMF59^{T M}（WO90/14837；参考文献13の10章）であって、5%スクワレン、0.5% Tween 80および0.5% Span 85（必要に応じてMTP-PEを含む）を含むMF59^{T M}、（b）ミクロン以下のエマルジョンにマイクロフルイ
10
ダイズされたか、または、より大きな微粒子サイズのエマルジョンを生成するために攪拌されたかいずれかのSAFであって、10%スクワレン、0.4% Tween 80、5% プロニック-blocked polymer L121、およびthr-MDPを含むSAF、ならびに（c）Ribi^{T M} アジュバントシステム（RAS）（Ribi Immunochem、Hamilton、MT）であって、2%スクワレン、0.2% Tween 80およびモノホスホリル脂質A（monophosphoryl lipid A）（MPL）、トレハロースジミコレート（TMD）および細胞壁骨格（CWS）からなる群由来の一つまたはそれ以上の細菌細胞壁成分（好ましくは、MPL+CWS（Detox^{T M}））を含む、Ribi^{T M} アジュバントシステム（RAS）；（2）QS21またはStimulon^{T M}（Cambridge Bioscience、Worcester、MA）のようなサポニンアジュバントを用い得、またはISCOM（免疫刺激複
20
合体）のようなそれらから生成する微粒子であり、そのISCOMは、例えばWO00/07621のような追加の界面活性剤を欠き得る；（3）フロイント完全アジュバント（CFA）およびフロイント不完全アジュバント（IFA）；（4）サイトカイン（例えば、インターロイキン（例えば、IL-1、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-12（WO99/44636）など）、インターフェロン（例えば、インターフェロン）、マクロファージコロニー刺激因子（M-CSF）、腫瘍壊死因子（TNF）など）；（5）モノホスホリル脂質A（MPL）または3-O-脱アシル化MPL（3dMPL）（例えばGB-2220221、EP-A-0689454）；（6）3
30
dMPLと、例えば、QS21および/または水中油エマルジョンとの組み合わせ（例えば、EP-A-0835318、EP-A-0735898、EP-A-0761231）；（7）CpGモチーフを含むオリゴヌクレオチド[Krieg Vaccine 2000、19、618-622；Krieg Curr Opin Mol Ther 2001 3：15-24；Romanら、Nat. Med.、1997、3、849-854；Weinerら、PNAS USA、1997、94、10833-10837；Davisら、J. Immunol.、1998、160、870-876；Chuら、J. Exp. Med.、1997、186、1623-1631；Lipfordら、Eur. J. Immunol.、1997、27、2340-2344；Moldoveanuら、Vaccine、1988、16、1216-1224、Kriegら、Nature、1995、374、546-549；Klinmanら、PNAS USA、
40
1996、93、2879-2883；Ballasら、J. Immunol.、1996、157、1840-1845；Cowderyら、J. Immunol.、1996、156、4570-4575；Halpernら、Cell. Immunol.、1996、167、72-78；Yamamotoら、Jpn. J. Cancer Res.、1988、79、866-873；Staceyら、J. Immunol.、1996、157、2116-2122；Messinaら、J. Immunol.、1991、147、1759-1764；Yiら、J. Immunol.、1996、157、4918-4925；Yiら、J. Immunol.、1996、157、5394-5402；Yiら、J. Immunol.、1998、160、4755-4761；およびYiら、J. Immunol.、1998、160、5898-5906；国際特許出願
50

WO 96 / 02555、WO 98 / 16247、WO 98 / 18810、WO 98 / 40100、WO 98 / 55495、WO 98 / 37919およびWO 98 / 52581] (すなわち、少なくとも一つのCGジヌクレオチドを含み、シトシンの代わりに必要に応じて5-メチルシトシンが使用されるオリゴヌクレオチド); (8) ポリオキシエチレンエーテルまたはポリオキシエチレンエステル(例えば、WO 99 / 52549); (9) オクトキシノールと組み合わせた、ポリオキシエチレンソルビタンエステル界面活性剤(例えば、WO 01 / 21207)あるいはオクトキシノールのような追加の非イオン系界面活性剤の少なくとも一つと組み合わせたポリオキシエチレンアルキルエーテルまたはポリオキシエチレンアルキルエステルの界面活性剤(例えば、WO 01 / 21152); (10) 免疫刺激性のオリゴヌクレオチド(例えば、CpGオリゴヌクレオチド)およびサポニン(例えばWO 00 / 62800); (11) 免疫刺激物および金属塩の粒子(例えば、WO 00 / 23105); (12) サポニンおよび水中油エマルジョン(例えば、WO 99 / 11241); (13) サポニン(例えば、QS 21) + 3dMPL + IL-12(必要に応じて+ステロール)(例えばWO 98 / 57659); (14) 本組成物の効果を高める免疫刺激する薬剤として作用するその他の物質。

10

20

30

40

50

【0073】

ムラミンペプチドとしては、N-アセチル-ムラミル-L-スレオニル-D-イソグルタミン(thr-MDP)、N-アセチル-ノルムラミル-L-アラニル-D-イソグルタミン(nor-MDP)、N-アセチルムラミル-L-アラニル-D-イソグルタミン-L-アラニン-2-(1'-2'-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ヒドロキシホスホリルオキシ)-エチルアミン(MTP-PE)などが挙げられる。

【0074】

(さらなる抗原)

本発明の組成物に含まれ得るさらなる抗原としては、以下が挙げられる:

- 参考文献14、15、16、17などにおいて開示されるような、N. meningitidis血清群B由来の膜外小胞(OMV)調製物。
- N. meningitidis血清群A、C、W135および/またはY由来のサッカリド抗原、例えば、参考文献18において開示された血清群C由来のオリゴサッカリド[参考文献19も参照のこと]または参考文献20のオリゴサッカリド。
- Streptococcus pneumoniae由来のサッカリド抗原[例えば、参考文献21、22、23]。
- CagA[例えば、24]、VacA[例えば、24]、NAP[例えば、25]、HoxP[例えば、26]、HopY[例えば、26]および/またはウレアーゼのような、Helicobacter pylori由来のタンパク質抗原。
- 不活性ウイルスのような、A型肝炎ウイルス由来の抗原[例えば、27、28]。
- 表面および/またはコアの抗原のような、B型肝炎ウイルス由来の抗原[例えば、28、29]。
- C型肝炎ウイルス由来の抗原[例えば、30]。
- Bordetella pertussis由来の抗原(例えば、ペルタクチン(peritactin)ならびに/または凝集原2および凝集原3との必要に応じて組み合わせた[例えば、参考文献31および32]、百日咳ホロトキシン(PT)およびB. pertussis由来の線維状血球凝集素(FHA))。
- ジフテリアトキソイド[例えば、参考文献33の3章]のようなジフテリア抗原(例えばCRM₁₉₇変異体[例えば、34])。
- 破傷風トキソイド[例えば、参考文献33の4章]のような破傷風抗原。
- Haemophilus influenzae B由来のサッカリド抗原[例えば、19]。
- N. gonorrhoeae由来の抗原[例えば、3、4、5]。
- Chlamydia pneumoniae由来の抗原[例えば、35、36、37、38、39、40、41]。

- *Chlamydia trachomatis* 由来の抗原 [例え、 42]。
- *Porphyromonas gingivalis* 由来の抗原 [例え、 43]。
- IPV または OPV のような、ポリオ抗原 [例え、 44、 45]。
- 凍結乾燥した非活性ウイルス [例え、 47、 *RabAvertTM*] のような狂犬病抗原 [例え、 46]。
- はしか、おたふくかぜおよび / または風疹抗原 [例え、 参考文献 33 の 9 章、 10 章および 11 章]。
- 血球凝集素および / またはノイラミニダーゼ表面タンパク質のような、インフルエンザ抗原 [例え、 参考文献 33 の 19 章]。
- *Moraxella catarrhalis* 由来の抗原 [例え、 48]。
- *Streptococcus agalactiae* (*streptococcus B* 群) 由来のタンパク質抗原 [例え、 49、 50]。
- *Streptococcus agalactiae* 由来のサッカリド抗原。
- *Streptococcus pyogenes* (*streptococcus A* 群) 由来の抗原 [例え、 50、 51、 52]。
- *Staphylococcus aureus* 由来の抗原 [例え、 53]。

10

【 0075 】

組成物は、一つ以上のこれらのさらなる抗原を含有し得る。

【 0076 】

サッカリドまたは糖質抗原が使用される場合、これは、好ましくは、免疫原性を高めるためにキャリアタンパク質に結合体化される [例え、 参考文献 54 ~ 63]。好ましいキャリアタンパク質は、ジフテリアトキソイドまたは破傷風トキソイドのような、細菌の毒素またはトキソイドである。CRM₁₉₇ ジフテリアトキソイドは、特に好ましい。その他の適切なキャリアタンパク質としては、*N. meningitidis* 外膜タンパク質 [例え、 参考文献 64]、合成ペプチド [例え、 65、 66]、熱ショックタンパク質 [例え、 67]、百日咳タンパク質 [例え、 68、 69]、*H. influenzae* 由来プロライン D [例え、 70]、*C. difficile* 由来の毒素 A または B [例え、 71] などが挙げられる。混合物が血清群 A および C の両方由来の夾膜サッカリドを含有する場合、Men A サッカリド : Men C サッカリドの比率 (w/w) が 1 よりも大きい (例え、 2 : 1、 3 : 1、 4 : 1、 5 : 1、 10 : 1 またはそれより高い) ことが好ましい。*N. meningitidis* の異なる血清群由来のサッカリドは、同種または異種のキャリアタンパク質に結合体化され得る。

20

30

【 0077 】

任意の適切な結合反応が使用され得、必要な場合は任意の適切なリンカーが用いられる。

【 0078 】

毒性のタンパク質抗原は、必要な場合は無毒化され得る (例え、 化学的手段および / または遺伝学的手段による百日咳毒素の無毒化 [32])。

【 0079 】

ジフテリア抗原が組成物内に含まれる場合、破傷風抗原および百日咳抗原を含むことも好ましい。同様に、破傷風抗原が含まれる場合、ジフテリア抗原および百日咳抗原を含むことも好ましい。同様に、百日咳抗原が含まれる場合、ジフテリア抗原および破傷風抗原を含むことも好ましい。

40

【 0080 】

抗原は、好ましくは、アルミニウム塩 (例え、リン酸塩、水酸化物、ヒドロキシリン酸塩、酸化水酸化物、オルトリン酸塩、硫酸塩) と混合 (より好ましくは、吸着) している。この塩は、任意の適切な形態をとり得る (例え、ゲル、結晶、非結晶など)。

【 0081 】

この組成物中の抗原は、典型的には、少なくとも各 1 μg/ml の濃度で存在する。一般的に、任意の所定の抗原の濃度は、その抗原に対する免疫応答を誘発するに充分である。

【 0082 】

50

本発明の組成物中のタンパク質抗原の使用に対する代替物として、その抗原をコードしている核酸が使用され得る〔例えば、参考文献72～80〕。従って、本発明の組成物のタンパク質成分は、そのタンパク質をコードしている核酸（好ましくは、（例えばプラスミドの形態の）DNA）によって置換され得る。

【0083】

（定義）

用語「含む（comprising）」は、「含む（including）」および「からなる（consisting）」を意味し、例えば、Xを「含む」組成物とは、Xのみからなっても、X+Yのように追加の何かを含んでもよい。

【0084】

数値xに関係する用語「約」は、例えば、 $x \pm 10\%$ を意味する。

【0085】

（発明を実施するための形態）

（ハイブリッドタンパク質 - $X_1 = G287$ ）

参考文献1および2に開示されるタンパク質に加えて、N末端に株2996由来のG287を有する7つのハイブリッドタンパク質を構築した。8つの287タンデムタンパク質もまた作製した（以下を参照のこと）。

【0086】

【数4】

番号	n	X_1	L_1	X_2	L_2
1	2	$\Delta G287$	-	230	(His) ₆
2	2		-	936	(His) ₆
3	2		-	741 _{MC58}	(His) ₆
4	2		-	741 _{ET37}	(His) ₆
5	2		-	741 _{90/18311}	(His) ₆
6	2		-	741 _{95N477}	(His) ₆
7	2	$\Delta G287_{nz}$	-	741 _{MC58}	(His) ₆

これらのタンパク質を、フロイントの完全アジュバント（FCA）または3mg/mlミョウバン（alum）のいずれかでアジュバント化し、マウスの免疫に使用した。得られた血清を、種々のナイセリア株に対して殺菌アッセイを用いて試験した。タンパク質番号3を用いた力価は以下の通りである：

【0087】

【数5】

株 ^(血清群)	2996 ^(B)	MC58 ^(B)	NGH38 ^(B)	394/98 ^(B)	44/76 ^(B)	F6124 ^(A)
水酸化アルミニウム	8192	32768	8192	>2048	16384	8192
FCA	16384	262144	8192	>2048	>32768	8192

水酸化アルミニウムでアジュバント化したタンパク質番号3を用いる、さらなる試験において、984150力価およびBCA力価をそれぞれ超えた抗287および抗741のELISA力価は以下の通りである：

【0088】

【数6】

10

20

30

40

2996 ^(B)	MC58 ^(B)	NGH38 ^(B)	394/98 ^(B)	44/76 ^(B)	F6124 ^(A)	BZ133 ^(C)
8000	65000	4000	4000	32000	8000	16000

参考文献 1 および 2 に開示されるタンパク質で免疫した後に得られた (相同株に対して試験した) 結果は、以下の通りである :

【 0 0 8 9 】

【 数 7 】

n	X ₁	L ₁	X ₂	L ₂	殺菌力価		ELISA	
					FCA	Alum	FCA	ミョウバン
2	ΔG287 _{394/98}	-	961	(His) ₆	-	32768	-	>109350
			919		32768	4096	4718	3678
			953		>32768	>16384	1900	6936
			741		16384	2048	232	862
2	ΔG287 ₂₉₉₆	-	961	(His) ₆	65536	32768	108627	>109350
			919		128000	32000	11851	2581
			953		65536	-	3834	-
			741		16384	8192	315	4645

10

20

(ハイブリッドタンパク質 - X₁ = 9 6 1 c または 9 6 1 c L)

参考文献 1 および 2 に開示されるタンパク質に加えて、N 末端に 9 6 1 c または 9 6 1 c L (すなわち、9 6 1 c + リーダーペプチド) のいずれかを有する 8 つのハイブリッドタンパク質を構築した :

【 0 0 9 0 】

【 数 8 】

番号	n	X ₁	L ₁	X ₂	L ₂
1	2	961c	-	287	-
2	2		-	287	(His) ₆
3	2		-	230	(His) ₆
4	2		-	936	(His) ₆
5	2	961cL	-	287	-
6	2		-	287	(His) ₆
7	2		-	230	(His) ₆
8	2		-	936	(His) ₆

30

40

これらのタンパク質を、フロイントの完全アジュバント (F C A) または 3 . 3 m g / m l ミョウバンのいずれかでアジュバント化し、マウスの免疫に使用した。得られた血清を、様々なナイセリア株に対し、殺菌アッセイを用いて試験した。タンパク質番号 8 を用いた力価は、以下の通りである :

【 0 0 9 1 】

【 数 9 】

株 (血清群)	2996 ^(B)	MC58 ^(B)	394/98 ^(B)	44/76 ^(B)	F6124 ^(A)
水酸化アルミニウム	8192	8192	512	1024	<16
FCA	65536	16384	>2048	>2048	8192

961c ~ 741 [参考文献 1 および 2] で免疫した後に得られた力価は、以下の通りである：

【 0 0 9 2 】

【 数 1 0 】

株 (血清群)	2996 ^(B)	MC58 ^(B)	394/98 ^(B)	44/76 ^(B)	F6124 ^(A)	BZ133 ^(C)
水酸化アルミニウム	65536	32768	4096	>32768	16384	>2048
FCA	>16384	262144	4096	>16384	-	>2048

10

これらの結果は、961c ~ 741 を ORF46.1 または G287 ~ 919 と混合することによって改善され得た。

【 0 0 9 3 】

参考文献 1 および 2 に開示されるタンパク質で免疫した後に得られた (相同株に対して試験した) 結果は、以下の通りである：

【 0 0 9 4 】

【 数 1 1 】

20

n	X ₁	L ₁	X ₂	L ₂	殺菌力価		ELISA	
					FCA	ミヨウバン	FCA	ミヨウバン
2	961c	-	ORF46.1	(His) ₆	32768	1024	>109350	>109350
			741		>16384	8192	>109350	>109350
			936		>32768	8192	>109350	>109350

(ハイブリッドタンパク質 - X₁ = ORF46.1)

30

参考文献 1 および 2 に開示されるタンパク質に加えて、N末端に ORF46.1 を有する 2 つのハイブリッドタンパク質を構築した：

【 0 0 9 5 】

【 数 1 2 】

番号	n	X ₁	L ₁	X ₂	L ₂
1	2	ORF46.1	-	936	(His) ₆
2	2		-	230	(His) ₆

これらのタンパク質をフロイントの完全アジュバント (FCA) または 3 m g / m l ミヨウバンのいずれかでアジュバント化し、マウスの免疫に使用した。得られた血清を、相同株に対して殺菌アッセイおよび ELISA によって、試験した。

40

【 0 0 9 6 】

参考文献 1 および 2 に開示されるタンパク質で免疫した後に得られた結果は、以下の通りである：

【 0 0 9 7 】

【 数 1 3 】

n	X ₁	L ₁	X ₂	L ₂	殺菌力価		ELISA	
					FCA	ミヨウバン	FCA	ミヨウバン
2	ORF46.1	-	961	(His) ₆	8192	8192	21558	>109350
		-	961c	(His) ₆	8192	128	9020	76545

(ハイブリッドタンパク質 - X₁ = 230)

参考文献 1 および 2 に開示されるタンパク質に加えて、N末端に 230 を有する 4 つのハイブリッドタンパク質を構築した：

【0098】

【数14】

番号	n	X ₁	L ₁	X ₂	L ₂
1	2	230	-	ORF46.1	(His) ₆
2	2		-	961	(His) ₆
3	2		-	961c	(His) ₆
4	2		-	741 _{MC58}	(His) ₆

(ハイブリッドタンパク質 - X₁ = 936)

参考文献 1 および 2 に開示されるタンパク質に加えて、N末端に 936 を有する 7 つのハイブリッドタンパク質を構築した：

【0099】

【数15】

番号	n	X ₁	L ₁	X ₂	L ₂
1	2	936	-	ORF46.1	(His) ₆
2	2		-	961	(His) ₆
3	2		-	741 _{ET37}	(His) ₆
4	2		-	741 _{MC58}	(His) ₆
5	2		-	741 _{90/18311}	(His) ₆
6	2		-	741 _{95N477}	(His) ₆
7	2		-	741	(His) ₆

これらのタンパク質をフロイントの完全アジュバント (FCA) または 3 mg / ml ミヨウバンのいずれかでアジュバント化し、マウスの免疫に使用した。得られた血清を、様々なナイセリア株に対して、殺菌アッセイを用いて試験した。タンパク質番号 2 を用いた力価は、以下の通りである：

【0100】

【数16】

株 (血清群)	2996 ^(B)	MC58 ^(B)	394/98 ^(B)	44/76 ^(B)	F6124 ^(A)
水酸化アルミニウム	16384	32768	1024	2048	<16
FCA	65536	65536	>2048	8192	2048 (36%)

タンパク質番号 4 を用いた力価は、以下の通りである：

【0101】

10

20

30

40

50

【数 1 7】

株 (血清群)	2996 ^(B)	MC58 ^(B)	394/98 ^(B)	44/76 ^(B)	F6124 ^(A)
水酸化アルミニウム	256	>262144	>2048	32768	8192
FCA	1024	>262144	>2048	>32768	>32768

タンパク質番号 7 を用いた力価は、以下の通りである：

【0 1 0 2】

【数 1 8】

株 (血清群)	2996 ^(B)	MC58 ^(B)	394/98 ^(B)	44/76 ^(B)	F6124 ^(A)	BZ133 ^(C)
水酸化アルミニウム	256	130000	16000	32000	8000	16000

10

参考文献 1 および 2 に開示されるタンパク質で免疫した後に得られた (相同株に対して試験した) 結果は、以下の通りである：

【0 1 0 3】

【数 1 9】

n	X ₁	L ₁	X ₂	L ₂	殺菌力価		ELISA	
					FCA	ミヨウバン	FCA	ミヨウバン
2	936	-	741	(His) ₆	1024	256	1466	5715
			936		>32768	>32768	>109350	>109350

20

(ハイブリッドタンパク質の混合物)

マウスを、水酸化アルミニウムでアジュバント化した 3 つのタンパク質を、以下の単独または 3 通りの組み合わせのいずれかで免疫した：(1) 287_{Nz} ~ 953；(2) 936 ~ 741；および (3) 961_c。この混合物は、様々な株に対して高い殺菌力価を誘導し得た：

30

【0 1 0 4】

【数 2 0】

	2996 ^(B)	MC58 ^(B)	NGH38	394/98 ^(B)	H44/76 ^(B)	F6124 ^(A)	BZ133 ^(C)	C11 ^(C)
(1)	32000	16000	130000	16000	32000	8000	16000	8000
(2)	256	131000	128	16000	32000	8000	16000	<4
(3)	32000	8000	—	—	—	8000	—	32000
混合	32000	32000	65000	16000	260000	65000	>65000	8000
(X)	4000	4000	1000	1000	>4000	1000	4000	n.d.

「—」は、この株が Na d A 遺伝子を含有しないことを示す。

(X) は、対照として、タンパク質 287 と外膜小胞とを組み合わせたもの。

40

個々のマウスを見ると、この混合物は、高くそして一貫した殺菌力価を誘導した：

【0 1 0 5】

【数 2 1】

番号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
2996	32768	16384	65536	32768	32768	65536	65536	32768	65536	8192
MC58	65536	32768	65536	65536	65536	8192	65536	32768	32768	65536
394/98	65536	4096	16384	4096	8192	4096	32768	16384	8192	16384

(タンデムタンパク質)

本発明のハイブリッドタンパク質は、式 $\text{NH}_2 - [- X - L -]_n - \text{COOH}$ によって表され得る。ここで、 $- X -$ の全 n 例は、同じ基礎的なタンパク質 (同一タンパク質、あるいは異なる株または種由来の同じタンパク質のいずれか) であり、そのタンパク質は「タンデム」タンパク質と呼ばれる。 10

【0106】

12の特異的なタンデムタンパク質は、以下の通りである：

【0107】

【数22】

番号	n	X_1	L_1	X_2	L_2
1	2	$\Delta\text{G741}_{\text{MC58}}$	-	741_{MC58}	(His) ₆
2	2	ΔG287_{2996}	(Gly) ₆	$\Delta\text{G287}_{394/98}$	(His) ₆
3	2	ΔG287_{2996}	(Gly) ₆	ΔG287_{2996}	(His) ₆
4	2	$\Delta\text{G287}_{394/98}$	(Gly) ₆	$\Delta\text{G287}_{394/98}$	(His) ₆
5	2	$\Delta\text{G287}_{394/98}$	(Gly) ₆	ΔG287_{2996}	(His) ₆

20

【0108】

【数23】

6	2	ΔG287_{2996}	(Gly) ₆	$\Delta\text{G287}_{394/98}$	-
7	2	ΔG287_{2996}	(Gly) ₆	ΔG287_{2996}	-
8	2	$\Delta\text{G287}_{394/98}$	(Gly) ₆	$\Delta\text{G287}_{394/98}$	-
9	2	$\Delta\text{G287}_{394/98}$	(Gly) ₆	ΔG287_{2996}	-
10	2	$\Delta\text{G741}_{\text{MC58}}$	-	$741_{394/98}$	(His) ₆
11	2	$\Delta\text{G741}_{\text{MC58}}$	-	$741_{90/18311}$	(His) ₆
12	2	$\Delta\text{G741}_{\text{MC58}}$	-	$741_{95\text{N}477}$	(His) ₆

30

タンパク質番号1~5は、E. coliにおいて、可溶型で全て発現された。発現レベルは、培地1リットル当たり0.24mgと0.50mgとの間であった。タンデムタンパク質を精製し、リン酸アルミニウムをアジュバントとして混合した。タンデムタンパク質番号2、4および5は、リン酸アルミニウムに容易に吸着した；吸着は、タンデムタンパク質番号1および3にとっては不完全であった。 40

【0109】

(対立遺伝子改変体 - 741)

22個の741の多型配列が発見された (配列番号1~22)。これらの配列およびMC58配列を、図1に整列した。

【0110】

(対立遺伝子改変体 - NMB1343)

様々な血清群の髄膜炎菌42株においてPCRを用いて、NMB1343タンパク質をコードする遺伝子は、42株中24株において見出され、42株中18株では不在であった (表1)。NMB1343遺伝子を、NMB1343⁺株のうち10株において配列決定 50

した(表1、縦列3)。核酸配列(従って、アミノ酸配列番号23; GenBank AAF41718)は、10株全てにおいて同一であった。

【0111】

NMB1343はまた、*N. gonorrhoeae*の2株(F62およびSN4)においても検出された。淋菌由来のアミノ酸配列は、配列番号24である。髄膜炎菌の配列とのアラインメントは、以下である:

【0112】

【数24】

```

      . . . .10 . . . .20 . . . .30 . . . .40 . . . .50
Ng    1: INNLWEISYLYRGISCCQDEQNNGQLKPKGNKAEVAIRYDGKFKYDGKAT: 50
Nm    1: ~~~~~MGNFLYRGISCCQDEQNNGQLKPKGNKAEVAIRYDGKFKYDGKAT: 45

      . . . .60 . . . .70 . . . .80 . . . .90 . . . .100
Ng   51: HGPSVKNAVYAHQIETDLYDGCYISTTTDKETAKKFATSSGIENGYIYVL:100
Nm   46: HGPSVKNAVYAHQIETGLYDGCYISTTTDKETAKKFATSSGIENGYIYVL: 95

      . . . .110 . . . .120 . . . .130 . . . .140 . . . .150
Ng  101: NRDLFGQYSIFEYEVEHPENPDEKEVTIRAEDCGCIPPEVVIKELIETN:150
Nm   96: NRDLFGQYSIFEYEVEHPENPNEKEVTIRAEDCGCIPPEVVIKELIETN:145

```

対応するヌクレオチド配列のアラインメントを図2に示す。これは、淋菌の配列がNMB1343遺伝子の5'領域に4マーの挿入を有することを示しており、このことが、フレームシフトおよび5'メチオニン残基の結果的な欠損の原因となっている。

【0113】

(ドメイン欠失 - 961)

周辺領域は、血清群Aと血清群Bとの間に保存されている(>90%)にも関わらず、961は、*N. meningitidis*血清群Aゲノム配列に存在しない[81]。参考文献11および12は、961の多型を開示する。この遺伝子は、過毒性系統(hypervirulent lineage)ET-5、ET-37およびクラスターA4に属する血清群B株の91%に存在することが見出されたが、試験した系統3の全株において不在であった。試験した血清群C株のほとんどは、たとえ過毒性系統に属さなくとも陽性であった。血清群B株は、血清型2aおよび2bと同じであった。血清群Aに関して、亜群IIIに属する1株は陽性であったのに対し、他方の亜群IV-1に属する2株は陰性であった。961は、*N. gonorrhoeae*ならびに共生種*N. lactamica*および*N. cinerea*において不在であった。

【0114】

図4および図5は、タンパク質961におけるドメインを示す。

【0115】

タンパク質961のアンカー領域(ドメイン9)が欠失し(「961cL」)、*E. coli*において発現される場合、そのタンパク質は、ペリプラズム中に運び出され、培地の上清に分泌される。

【0116】

さらにこれを追究するため、構造上の特色(961c_{aro}変異体の場合における芳香族残基の欠失、およびその他のコイルドコイル領域の欠失)に基づいて、961のC末端領域の欠失変異体を構築した(961cL-_{aro}、961cL-_{cc}、961aL、961aL-₁、961aL-₂、961aL-₃)。発現ならびにペリプラズム中および培地上清中への分泌についてこれらを分析した。これらの欠失変異体全てにおいて、このタンパク質は大量に産生され、ペリプラズム画分中に存在し、培地上清中に放出される。

【0117】

(G287 - 交雑株殺菌活性)

10

20

30

40

50

287を、異なるN.meningitidis血清群B株の5株についてクローン化し、ポリグリシン領域の終末までN末端を欠失するため、そしてC末端his-タグを導入するために、操作した。これにより5つのG287タンパク質を得た。これらをFCAでアジュバント化し、マウスの免疫血清を高めるために用い、次いで全5株の血清群B株ならびに血清群A株およびC株に対する殺菌活性を試験した。殺菌力価は、以下の通りである：

【0118】

【数25】

タンパク質株 (strain)	株に対する殺菌活性のための血清試験*						
	2996	BZ232	MC58	1000	394/98	F6124	BZ133
2996	16000	128	4096	4096	1024	8000	16000
BZ232	>8000	256	2048	8000	2048	16000	8000
MC58	>8000	64	>8000	8000	2048	8000	8000
1000	>8000	64	4096	8000	1024	16000	16000
394/98	>16000	128	16000	>2048	>16000	-	-

* 太字で相同株に対する力価を示した

10

(再折り畳み)

いくつかのハイブリッドタンパク質について、可溶性タンパク質のレベルを改善するために、参考文献2に開示された再折り畳みプロトコルに代わる方法を採用した。

【0119】

封入体(IB)を以下のように単離した。

【0120】

1. 細胞(湿重量5g)を、25mlの0.1M Tris-HCl(pH7)、1mM EDTA中、4で、ultraturrax(10000rpm)を用いてホモジナイズする。

【0121】

2. 細胞1g当たり1.5mgのリゾチームを加え、ultraturraxで手短に混合し、4で30分間インキュベートする。

【0122】

3. 超音波処理または高圧ホモジナイゼーション(French press)を用いて細胞を破碎する。

【0123】

4. DNAを消化するために、MgCl₂を最終濃度3mMおよびDNaseを最終濃度10μg/mlで加え、25で30分間インキュベートする。

【0124】

5. この溶液に、体積の0.5倍量の60mM EDTA、6% Triton X-100、1.5M NaCl(pH7)を加え、4で30分間インキュベートする。

【0125】

6. 封入体を遠心分離(31000g(20000rpm)で10分間、4)によって遠沈する。

【0126】

7. ペレットを、40mlの0.1M Tris-HCl(pH7)、20mM EDTA中に、ultraturraxを用いて再懸濁する。

【0127】

8. 工程6の遠心分離を繰り返す。

【0128】

9. 封入体ペレットは、使用され得るか、または-20で凍結保存され得る。

20

30

40

50

【0129】

ハイブリッドタンパク質は、以下のように *E. coli* 中に発現された：

【0130】

【数26】

タンパク質	培地体積 (リットル)	フラスコ容積 (リットル)	温度 (°C)	最終 OD ₆₀₀	封入体収量 (w/w)
ORF46.1-961-His	1	2	37	1.51	33.2%
ORF46.1-961c-His	1	2	37	1.6	28.3%
961c-ORF46.1His	1	2	37	1.18	23.5%
orf46.1-741 His	5	5	37	12.42	35.2

10

このペレットを可溶化し、再折り畳みし、限外濾過し、透析し、次いでタンパク質を精製した。

【0131】

(ORF46.1-961-His)

IBを、以下のように可溶化した：IBタンパク質を、4mlの6M グアニジンHCl、1mM EDTA (pH 8.5)の緩衝液中に、最終タンパク質濃度が1mg/mlとなるように再懸濁した。タンパク質の再折り畳みのために、2mlの可溶性タンパク質を400mlの再折り畳み緩衝液(0.1M Tris HCl、1M L-アルギニン、2mM EDTA (pH 8.2))中に希釈し、15℃で1時間インキュベートした結果、タンパク質濃度は5µg/mlとなった。その後、別の2mlの、可溶性タンパク質を添加し、さらに1時間、同じ温度でインキュベートした結果、最終タンパク質濃度は10µg/mlとなった。この物質を300mlのAmicon限外濾過セル(ultrafiltration cell)(8400)を用いて限外濾過し、30kDaカットオフのAmicon膜(YM30)に3バルブ圧を適用した結果、最終容量130mlを得た。この限外濾過した物質を、12~14kDaカットオフの再生セルロース管状膜(Cellulose Sep-Step bio)を用い、10Lの0.1M Tris HCl (pH 8.2)の緩衝液で24時間透析した。2回目の透析は、10Lの300mM NaCl、50mM リン酸ナトリウム(pH 8.0)の緩衝液で24時間行った。この透析した物質は、Beckman遠心分離ローターJA25.5において、22000rpmで45分間、4℃で遠心分離した。この遠心分離後に単離した上清を、His-タグ精製に使用した。

20

30

【0132】

(orf46.1-961c-His)

IBを、以下のように可溶化した：IBタンパク質を、4mlの6M グアニジンHCl、1mM EDTA (pH 8.5)の緩衝液中に、最終タンパク質濃度が1mg/mlとなるように再懸濁した。タンパク質の再折り畳みのために、2mlの可溶性タンパク質を400mlの再折り畳み緩衝液(0.5M Tris HCl、1M L-アルギニン、2mM EDTA (pH 8.2))中に希釈し、15℃で1時間インキュベートした結果、タンパク質濃度は5µg/mlとなった。その後、別の2mlの、可溶性タンパク質を添加し、さらに1時間、同じ温度でインキュベートした結果、最終タンパク質濃度は10µg/mlとなった。この物質を300mlのAmicon限外濾過セル(8400)を用いて限外濾過し、30kDaカットオフのAmicon膜(YM30)に3バルブ圧を適用した結果、最終容量150mlを得た。この限外濾過した物質を、12~14kDaカットオフの再生セルロース管状膜(Cellulose Sep-Step bio)を用い、10Lの0.1M Tris HCl (pH 8.2)の緩衝液で24時間透析した。2回目の透析は、10Lの300mM NaCl、50mM リン酸ナトリウム(pH 8.0)の緩衝液で24時間行った。この透析した物質は、Beckman遠心分離ローターJA

40

50

25.5において、22000rpmで45分間、4で遠心分離した。この遠心分離後に単離した上清を、His-タグ精製に使用した。

【0133】

(961c-orf46.1-His)

IBを、以下のように可溶化した：IBタンパク質を、4mlの6M グアニジンHCl、1mM EDTA (pH 8.5)の緩衝液中に、最終タンパク質濃度が1mg/mlとなるように再懸濁した。タンパク質の再折り畳みのために、2mlの可溶性タンパク質を400mlの再折り畳み緩衝液(0.1M Tris HCl、0.5M L-アルギニン、2mM EDTA (pH 8.2))中に希釈し、15で1時間インキュベートした結果、タンパク質濃度は5 μ g/mlとなった。その後、別の2mlの、可溶性タンパク質を添加し、さらに1時間、同じ温度でインキュベートした結果、最終タンパク質濃度は10 μ g/mlとなった。この物質を300mlのAmicon限外濾過セル(8400)を用いて限外濾過し、30kDaカットオフのAmicon膜(YM30)に3パール圧を適用した結果、最終容量150mlを得た。この限外濾過した物質を、12~14kDaカットオフの再生セルロース管状膜(Cellulosep-Step bio)を用い、10Lの0.1M Tris HCl (pH 8.2)の緩衝液で24時間透析した。2回目の透析は、10Lの300mM NaCl、50mM リン酸ナトリウム(pH 8.0)の緩衝液で24時間行った。この透析した物質は、Beckman遠心分離ローターJA25.5において、22000rpmで45分間、4で遠心分離した。この遠心分離後に単離した上清を、His-タグ精製に使用した。

10

20

【0134】

(orf46.1-741-His)

IBを、以下のように可溶化した：IBタンパク質を、4mlの6M グアニジンHCl、1mM EDTA (pH 8.5)の緩衝液中に、最終タンパク質濃度が10mg/mlとなるように再懸濁した。再折り畳みのために、2mlの可溶性タンパク質を400mlの再折り畳み緩衝液(0.5M Tris HCl、0.7M L-アルギニン、2mM EDTA (pH 7.2))中に希釈し、15で1時間インキュベートした結果、タンパク質濃度は50 μ g/mlとなった。その後、別の2mlの、可溶性タンパク質を添加し、さらに1時間、同じ温度でインキュベートした結果、最終タンパク質濃度は100 μ g/mlとなった。この物質を300mlのAmicon限外濾過セル(8400)を用いて限外濾過し、30kDaカットオフのAmicon膜(YM30)に3パール圧を適用した結果、最終容量120mlを得た。この限外濾過した物質を、12~14kDaカットオフの再生セルロース管状膜(Cellulosep-Step bio)を用い、10Lの0.1M Tris HCl (pH 8.2)の緩衝液で24時間透析した。2回目の透析は、10Lの300mM NaCl、50mM リン酸ナトリウム(pH 8.0)の緩衝液で24時間行った。この透析した物質は、Beckman遠心分離ローターJA25.5において、22000rpmで45分間、4で遠心分離した。この遠心分離後に単離した上清を、His-タグ精製に使用した。

30

【0135】

参考文献2に記載のように精製したタンパク質と比較して、殺菌活性力価は以下のようであった：

40

【0136】

【数27】

タンパク質	参考文献 2		再折り畳み		
	CFA	水酸化アルミニウム	水酸化アルミニウム	MF59	リン酸アルミニウム
ORF46.1-961-His	8192	8192	32768	-	-
ORF46.1-961c-His	8192	128	<64	8192	-
961c-ORF46.1His	32768	1024	16384	-	-
orf46.1-741 His	<4	16	<4	256	-

10

His - タグ (「ORF46.1K」) の発現がない場合、同様の手順をORF46.1に用いて、IBからタンパク質を精製した：

【0137】

【数28】

タンパク質	培地体積 (リットル)	フラスコ容積 (リットル)	温度 (°C)	最終 OD ₆₀₀	封入体収量 (w/w)
orf46.1K	5	5	37	13.7	29.4

20

IBタンパク質を、4mlの6M グアニジンHCl、1mM EDTA (pH 8.5) の緩衝液中に、最終タンパク質濃度が10mg/mlとなるように再懸濁した。再折り畳みのために、2mlの可溶性タンパク質を400mlの再折り畳み緩衝液(0.5M Tris HCl、0.7M L-アルギニン、2mM EDTA (pH 7.2))中に希釈し、15 で1時間インキュベートした結果、タンパク質濃度は50µg/mlとなった。その後、別の2mlの、可溶性タンパク質を添加し、さらに1時間、同じ温度でインキュベートした結果、最終タンパク質濃度は100µg/mlとなった。この物質を300mlのAmicon限外濾過セル(8400)を用いて限外濾過し、30kDaカットオフのAmicon膜(YM30)に3バール圧を適用した結果、最終容量120mlを得た。この限外濾過された物質を、12~14kDaカットオフの再生セルロース管状膜(Cellusep-Step bio)を用い、10Lの50mM リン酸ナトリウム、2mM EDTA (pH 7.2)の緩衝液で12時間透析した。2回目の透析は、10Lの同緩衝液で24時間行った。この透析された物質は、Beckman遠心分離ローターJA25.5において、22000rpmで45分間、4 で遠心分離した。この遠心分離後に単離した上清を、陽イオン交換クロマトグラフィーに使用した。この精製は、AKTA 診査(explorer)クロマトグラフィーシステム(Amersham-Pharmacia Biotech)で、5ml HiTrap SP セファロースHPカラム(Amersham-Pharmacia Biotech)を用いて行った。適用した流速は、1.5ml/分であった。このカラムを、35mlの50mM リン酸緩衝液(pH 7.2)で洗浄した。直線的勾配(0~1M NaCl)を、50mM リン酸緩衝液(pH 7.2)を用いて実行した。タンパク質を、92mMおよび380mMのNaClで、2つのピークにて溶出した。各ピークを構成している画分をプールし、それぞれプール1およびプール2と名付けた。

30

40

【0138】

参考文献2に記載のように精製したタンパク質と比較して、水酸化アルミニウムでアジュバント化した場合の殺菌活性力価は、4未満から1024に改善された。再折り畳みタンパク質と共にリン酸アルミニウムアジュバントを使用した力価は2048であった。ELISA力価は、以下の通りであった：

【0139】

【数29】

50

タンパク質	アルミニウムアジュバント	Elisa (M7)	SBA (2996)
Orf46.1k (プール1)	水酸化物 3.3mg/ml	1212	512
	リン酸塩 0.6 mg/ml	154	1024
Orf46.1k (プール2)	水酸化物 3.3mg/ml	1085	1024
	リン酸塩 0.6 mg/ml	250	1024

本発明は、例証としてのみ記述され、改変は、本発明の範囲および精神の範囲内に維持し 10
つつ成され得ることが理解される。

【 0 1 4 0 】

【 表 1 】

表1

株	1343	配列	株分類
72/00	+		ET5 B:15:P1.7,13,13a
30/00	+		ET5 B:15:P1.7,16
39/99	+		ET5 C:15:P1.7,16
95330	+		ET5 B:4:P1.15
M4102	+		ET5 nd
MC58(21)	+	+	ET5 B:15:P1.7,16b
BZ169(7)	+	+	ET5 B:NT:P1.16
BZ83(19)	+		ET5 B:15:-
CU385	+	+	ET5 B:4:P1.15
220173I	+		ET5 NG:4:P1.15
64/96	+	+	ET5 NG:15:P1.7,16 (キャリア)
220173I	+		ET5 B:4:P1.15 (キャリア)
ISS1071	+		nd B:15:P1.7,16 (ET5?)
BZ198(2)	+	+	lin.3 B:8:P1.1
980-2543	+	+	lin.3 B:NT:P1.4
16060	+	+	他の B:4:P1.14 (キャリア)
394-98	+		nd B:4:P1.4 (lin 3?)
ISS1106	+		nd B:4:P1.4 (lin.3?)
BZ133(10)	+	+	sub I B:NT:-
S3446	+	+	nd B:14:P1.23,14
ISS1001	+	+	nd B:14:P1.13
241175I	+		他の NG:21:P1.16 (キャリア)
171274I	+		他の NG:15:- (キャリア)
66/96	+		他の B:17:P1.15 (キャリア)
961-5945	-		A4
96217	-		A4
312294	-		A4
90/18311(24)	-		ET37
93/4286(25)	-		ET37
M986	-		ET37
1000(5)	-		他
NGE28(13)	-		他のキャリア
NGH38(14)	-		他のキャリア
BZ232(18)	-		他
F6124(23)	-		sub III A:-
C11	-		C:-
NMB	-		nd
8047	-		nd
ISS759	-		nd C:2b:P1.2
ISS1113	-		nd C:2:P1.5
65/96	-		nd 4:P1.14
2996(96)	-		nd B:2b:P1.5,2

【 0 1 4 1 】

【 表 2 】

参考文献（これらの内容は、参考として本明細書中に援用される）

- 1 - 国際特許出願 WO01/64920.
- 2 - 国際特許出願 WO01/64922.
- 3 - 国際特許出願 WO99/24578.
- 4 - 国際特許出願 WO99/36544.
- 5 - 国際特許出願 WO99/57280.
- 6 - 国際特許出願 WO00/22430.
- 7 - Tettelin *et al.* (2000) *Science* 287:1809-1815.
- 8 - 国際特許出願 WO00/66741. 10
- 9 - 国際特許出願 WO00/71574.
- 10 - 国際特許出願 WO01/04316
- 11 - 国際特許出願 PCT/IB02/03396.
- 12 - Comanducci *et al.* (2002) *J Exp Med* 195:1445-1454.
- 13 - *Vaccine Design: subunit & adjuvant approach* (1995) Powell & Newman (ISBN: 030644867X).
- 14 - 国際特許出願 WO01/52885.
- 15 - Bjune *et al.* (1991) *Lancet* 338(8775):1093-1096.
- 16 - Fukasawa *et al.* (1999) *Vaccine* 17:2951-2958.
- 17 - Rosenqvist *et al.* (1998) *Dev. Biol. Stand.* 92:323-333.
- 18 - Costantino *et al.* (1992) *Vaccine* 10:691-698.
- 19 - Costantino *et al.* (1999) *Vaccine* 17:1251-1263. 20
- 20 - 国際特許出願 PCT/IB02/03191.
- 21 - Watson (2000) *Pediatr Infect Dis J* 19:331-332.
- 22 - Rubin (2000) *Pediatr Clin North Am* 47:269-285, v.
- 23 - Jedrzejewski (2001) *Microbiol Mol Biol Rev* 65:187-207.
- 24 - 国際特許出願 WO93/18150.
- 25 - 国際特許出願 WO99/53310.
- 26 - 国際特許出願 WO98/04702.
- 27 - Bell (2000) *Pediatr Infect Dis J* 19:1187-1188.
- 28 - Iwarson (1995) *APMIS* 103:321-326.
- 29 - Gerlich *et al.* (1990) *Vaccine* 8 Suppl:S63-68 & 79-80. 30
- 30 - Hsu *et al.* (1999) *Clin Liver Dis* 3:901-915.
- 31 - Gustafsson *et al.* (1996) *N. Engl. J. Med.* 334:349-355.
- 32 - Rappuoli *et al.* (1991) *TIBTECH* 9:232-238.
- 33 - *Vaccines* (1988) eds. Plotkin & Mortimer. ISBN 0-7216-1946-0.
- 34 - Del Giudice *et al.* (1998) *Molecular Aspects of Medicine* 19:1-70.
- 35 - 国際特許出願 WO02/02606.
- 36 - Kalman *et al.* (1999) *Nature Genetics* 21:385-389.
- 37 - Read *et al.* (2000) *Nucleic Acids Res* 28:1397-406.
- 38 - Shirai *et al.* (2000) *J. Infect. Dis.* 181(Suppl 3):S524-S527.
- 39 - 国際特許出願 WO99/27105. 40
- 40 - 国際特許出願 WO00/27994.
- 41 - 国際特許出願 WO00/37494.
- 42 - 国際特許出願 WO99/28475.
- 43 - Ross *et al.* (2001) *Vaccine* 19:4135-4142.
- 44 - Sutter *et al.* (2000) *Pediatr Clin North Am* 47:287-308.
- 45 - Zimmerman & Spann (1999) *Am Fam Physician* 59:113-118, 125-126.

【 0 1 4 2 】

【 表 3 】

- 46 – Dreesen (1997) *Vaccine* 15 Suppl:S2-6.
 47 – *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1998 Jan 16;47(1):12, 19.
 48 – McMichael (2000) *Vaccine* 19 Suppl 1:S101-107.
 49 – Schuchat (1999) *Lancet* 353(9146):51-6.
 50 – WO02/34771.
 51 – Dale (1999) *Infect Dis Clin North Am* 13:227-43, viii.
 52 – Ferretti *et al.* (2001) *PNAS USA* 98: 4658-4663.
 53 – Kuroda *et al.* (2001) *Lancet* 357(9264):1225-1240; see also pages 1218-1219.
 54 – Ramsay *et al.* (2001) *Lancet* 357(9251):195-196. 10
 55 – Lindberg (1999) *Vaccine* 17 Suppl 2:S28-36.
 56 – Buttery & Moxon (2000) *J R Coll Physicians Lond* 34:163-168.
 57 – Ahmad & Chapnick (1999) *Infect Dis Clin North Am* 13:113-133, vii.
 58 – Goldblatt (1998) *J. Med. Microbiol.* 47:563-567.
 59 – 欧州特許 0 477 508.
 60 – 米国特許 5,306,492.
 61 – 国際特許出願 WO98/42721.
 62 – *Conjugate Vaccines* (eds. Cruse *et al.*) ISBN 3805549326, particularly vol. 10:48-114.
 63 – Hermanson (1996) *Bioconjugate Techniques* ISBN: 0123423368 or 012342335X.
 64 – 欧州特許出願 0372501.
 65 – 欧州特許出願 0378881. 20
 66 – 欧州特許出願 0427347.
 67 – 国際特許出願 WO93/17712.
 68 – 国際特許出願 WO98/58668.
 69 – 欧州特許出願 0471177.
 70 – 国際特許出願 WO00/56360.
 71 – 国際特許出願 WO00/61761.
 72 – Robinson & Torres (1997) *Seminars in Immunology* 9:271-283.
 73 – Donnelly *et al.* (1997) *Annu Rev Immunol* 15:617-648.
 74 – Scott-Taylor & Dagleish (2000) *Expert Opin Investig Drugs* 9:471-480.
 75 – Apostolopoulos & Plebanski (2000) *Curr Opin Mol Ther* 2:441-447. 30
 76 – Ilan (1999) *Curr Opin Mol Ther* 1:116-120.
 77 – Dubensky *et al.* (2000) *Mol Med* 6:723-732.
 78 – Robinson & Pertmer (2000) *Adv Virus Res* 55:1-74.
 79 – Donnelly *et al.* (2000) *Am J Respir Crit Care Med* 162(4 Pt 2):S190-193.
 80 – Davis (1999) *Mt. Sinai J. Med.* 66:84-90.
 81 – Parkhill *et al.* (2000) *Nature* 404:502-506.

【図面の簡単な説明】

【 0 1 4 3 】

【図 1】図 1 は、タンパク質 7 4 1 のための 2 3 配列のアラインメントを示す。これらは 40
 、配列番号 1 ~ 2 2 番に M C 5 8 由来の配列を加えたものである。

【図 2】図 2 は、淋菌（上端；配列番号 2 5 番）および髄膜炎菌（下端；配列番号 2 6 番）
 ）由来の N M B 1 3 4 3 配列のアラインメントを示している。

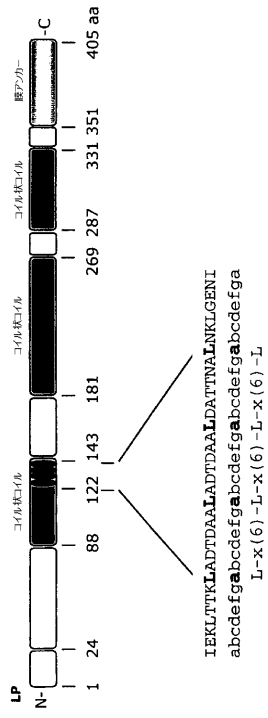
【図 3】図 3 は、本発明のハイブリッドタンパク質およびタンデムタンパク質を示している。

【図 4】図 4 は、9 6 1 2 9 9 6 内の 9 ドメインを示している。

【図 5】図 5 は、これらのドメインがどのように操作されているかを示している。

【 図 4 】

FIGURE 4



【国際公開パンフレット】

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
13 March 2003 (13.03.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/020756 A2

- (51) International Patent Classification: C07K 14/195
- (74) Agents: MARSHALL, Cameron, John et al.; Carpmas & Ransford, 43 Bloomsbury Square, London WC1A 2RA (GB).
- (21) International Application Number: PCT/IB02/03904
- (81) Designated States (national): AF, AG, AI, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TH, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (22) International Filing Date: 6 September 2002 (06.09.2002)
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NI, SN, TD, TG).
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 0121591.2 6 September 2001 (06.09.2001) GB
- (71) Applicant (for all designated States except US): CHIRON SPA [IT/IT]; Via Fiorentina, 1, I-53100 Siena (IT).
- (72) Inventor; and
- (75) Inventor/Applicant (for US only): PIZZA, Mariagrazia [IT/IT]; Chiron S.p.A., Via Fiorentina, 1, I-53100 Siena (IT).

[Continued on next page]

(54) Title: HYBRID AND TANDEM EXPRESSION OF NEISSERIAL PROTEINS

ΔG287-919-His	951c-741 _{MC58} -His	Orf46.1-287-His
ΔG287-Orf46.1-His	951c-953-His	Orf46.1-919-His
ΔG287-953-His	951c-Orf46.1-His	Orf46.1-741 _{MC58} -His
ΔG287-961-His	951cL-741 _{MC58}	Orf46.1-961-His
ΔG287-230-His	951cL-287	Orf46.1-961c-His
ΔG287-936-His	951c-230-His	Orf46.1-983-His
ΔG287-287-His	951c-936-His	Orf46.1-936-His
ΔG287-287 _{MC58} -His		Orf46.1-230-His
ΔG287-741 _{MC58} -His		230-741 _{MC58} -His
ΔG287-741 _{ET32} -His		230-Orf46.1-His
	ΔG741 _{MC58} -961c-His	230-961-His
ΔG287 _{MC58} -919-His	ΔG741 _{MC58} -961-His	230-961c-His
ΔG287 _{MC58} -953-His	ΔG741 _{MC58} -963-His	936-741 _{MC58} -His
ΔG287 _{MC58} -961-His	ΔG741 _{MC58} -Orf46.1-His	936-Orf46.1-His
ΔG287 _{MC58} -287-His	ΔG741 _{MC58} -741 _{MC58} -His	936-961-His
ΔG287 _{MC58} -287 _{MC58} -His	ΔG741 _{MC58} -741 _{ET32} -His	936-741 _{ET32} -His
ΔG287 _{MC58} -741 _{MC58} -His		
ΔG287-919-Orf46.1-His		ΔG983-741 _{MC58} -His
ΔG287-Orf46.1-919-His	919-287	ΔG983-961c-His
919-287-Orf46.1-His	953-287	ΔG983-961-His
Orf46.1-287-919-His	919-Orf46.1-His	ΔG983-Orf46.1-His

(57) Abstract: Two or more Neisserial proteins are joined such that they are translated as a single polypeptide chain. Hybrid proteins are represented by the formula NI₂-A-[X-L]_n-B-COOH where X is an amino acid sequence, L is an optional linker amino acid sequence, A is an optional N-terminal amino acid sequence, B is an optional C-terminal amino acid sequence, and n is an integer greater than 1. Proteins where each of the n-X- moieties shares sequence identity to each other-X- moiety, the protein is a 'tandem protein'.

WO 03/020756 A2

WO 03/020756 A2 

Published:

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

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

WO 03/020756

PCT/IB02/03904

-1-

HYBRID AND TANDEM EXPRESSION OF NEISSERIAL PROTEINS

All documents cited herein are incorporated by reference in their entirety.

TECHNICAL FIELD

This invention is in the field of protein expression. In particular, it relates to the expression of proteins from *Neisseria* (e.g. *N.gonorrhoeae* or, preferably, *N.meningitidis*).

BACKGROUND ART

References 1 and 2 disclose alternative and improved approaches for the expression of the Neisserial proteins disclosed in references 3 to 6. One such method is to produce 'hybrid' proteins in which two or more Neisserial proteins are expressed as a single polypeptide chain. This approach offers two advantages. First, a protein that may be unstable or poorly expressed on its own can be assisted by adding a suitable hybrid partner that overcomes the problem. Second, commercial manufacture is simplified as only one expression and purification need be employed in order to produce two separately-useful proteins.

It is an object of the present invention to provide further alternative and improved approaches for the expression of Neisserial proteins.

DISCLOSURE OF THE INVENTION**Hybrid proteins**

Thus the invention provides a method for the simultaneous expression of two or more (e.g. 3, 4, 5, 6 or more) Neisserial proteins, in which said two or more proteins are joined such that they are translated as a single polypeptide chain. In general, the hybrid proteins of the invention can be represented by the formula: $\text{NH}_2\text{-A-}[\text{-X-L-}]_n\text{-B-COOH}$

wherein X is an amino acid sequence, L is an optional linker amino acid sequence, A is an optional N-terminal amino acid sequence, B is an optional C-terminal amino acid sequence, and *n* is an integer greater than 1.

The value of *n* is between 2 and *x*, and the value of *x* is typically 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 or 10. Preferably *n* is 2, 3 or 4; it is more preferably 2 or 3; most preferably, *n* = 2.

The -X- moieties

There are two main groups of hybrid proteins according to the invention. These two groups are not mutually exclusive.

In the first group, each -X- moiety is:

- (a) an orf1, orf4, orf25, orf40, orf46.1, orf83, NMB1343, 230, 233, 287, 292, 594, 687, 736, 741, 907, 919, 936, 953, 961 or 983 amino acid sequence;

WO 03/020756

PCT/IB02/03904

-2-

- (b) an amino acid sequence having sequence identity to an amino acid sequence from (a); or
- (c) an amino acid sequence comprising a fragment of an amino acid sequence from (a).

A preferred subset of (a) is: orf46.1, 230, 287, 741, 919, 936, 953, 961 and 983. A more preferred subset of (a) is: orf46.1, 287, 741 and 961. Figure 3 shows preferred hybrid proteins.

- 5 **In the second group**, the hybrid protein comprises a first -X- moiety (-X_a-) and a second -X- moiety (-X_b-). The -X_a- moiety has one of the following amino acid sequences:
- (d) the 446 even SEQ IDs (i.e. 2, 4, 6, ... , 890, 892) disclosed in reference 3;
 - (e) the 45 even SEQ IDs (i.e. 2, 4, 6, ... , 88, 90) disclosed in reference 4;
 - (f) the 1674 even SEQ IDs 2-3020, even SEQ IDs 3040-3114, and all SEQ IDs
 - 10 3115-3241, disclosed in reference 5;
 - (g) the 2160 amino acid sequences NMB0001 to NMB2160 from reference 7; or
 - (h) an amino acid sequence disclosed in reference 1 or reference 2.

The -X_b- moiety is related to -X_a- such that: (i) -X_b- has sequence identity to -X_a-, and/or (j) -X_b- comprises a fragment of -X_a-.

- 15 Examples of this second type of hybrid protein include proteins in which two or more -X- moieties are identical, or in which they are variants of the same protein *e.g.* two polymorphic forms of the same protein may be expressed as -X_a-X_b-, and three polymorphic forms may be expressed as -X_a-X_b-X_c- *etc.*

The -X_a- and -X_b- moieties may be in either order from N-terminus to C-terminus.

- 20 The -X_a- moiety is preferably an orf1, orf4, orf25, orf40, orf46.1, orf83, NMB1343, 230, 233, 287, 292, 594, 687, 736, 741, 907, 919, 936, 953, 961 or 983 amino acid sequence. The -X_b- moiety is more preferably an orf46.1, 230, 287, 741, 919, 936, 953, 961 or 983 amino acid sequence. The -X_a- moiety is most preferably an orf46.1, 287, 741 or 961 amino acid sequence.

- In proteins where each of the *n* -X- moieties shares sequence identity to each other -X- moiety, the protein is referred to as a 'tandem protein'. Tandem proteins in which *n*=2 are preferred.

- 25 The degree of 'sequence identity' referred to in (b) and (i) is preferably greater than 50% (*eg.* 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% or more, up to 100%). This includes mutants, homologs, orthologs, allelic variants *etc.* [*e.g.* see ref. 8]. Identity is preferably determined by the Smith-Waterman homology search algorithm as implemented in the MPSRCH program (Oxford Molecular), using an affine gap search with parameters *gap open penalty*=12 and *gap extension penalty*=1. Typically,
- 30 50% identity or more between two proteins is considered as an indication of functional equivalence.

The 'fragment' referred to in (c) and (j) should consist of least *m* consecutive amino acids from an amino acid sequence from (a), (d), (e), (f), (g) or (h) and, depending on the particular sequence, *m* is 7 or more (*eg.* 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200 or more).

WO 03/020756

PCT/IB02/03904

-3-

Preferably the fragment comprises an epitope from an amino acid sequence from (a), (d), (e), (f), (g) or (h). Preferred fragments are those disclosed in references 9 and 10.

Preferred (c) and (j) fragments are C- and/or N-terminal truncations (*e.g.* $\Delta 1-287$, $\Delta 2-287$ *etc.*).

5 Preferred (b), (c), (i) and (j) sequences omit poly-glycine sequences. This has been found to aid expression [ref. 2]. Poly-glycine sequences can be represented as $(\text{Gly})_g$, where $g \geq 3$ (*e.g.* 4, 5, 6, 7, 8, 9 or more). If a -X- moiety includes a poly-glycine sequence in its wild-type form, it is preferred to omit this sequence in the hybrid proteins of the invention. This may be by disrupting or removing the $(\text{Gly})_g$ - by deletion (*e.g.* $\text{CGGGGS} \rightarrow \text{CGGGS}$, CGGS , CGS or CS), by substitution (*e.g.* $\text{CGGGGS} \rightarrow \text{CGXGGS}$, CGXXGS , CGXGXS *etc.*), and/or by insertion (*e.g.* $\text{CGGGGS} \rightarrow \text{CGGXGGS}$, CGXGGGS , *etc.*). Deletion of $(\text{Gly})_g$ is preferred, and deletion of the N-terminus portion of a protein up to and including the poly-glycine sequence (*e.g.* deletion of residues 1-32 in SEQ ID 1) is referred to herein as ' ΔG '. Poly-glycine omission is particularly useful for proteins 287, 741, 983 and Tbp2 ($\Delta G287$, $\Delta G741$, $\Delta G983$ and $\Delta GTbp2$ - references 1 & 2).

15 Preferred (c) and (j) fragments omit complete protein domains. This is particularly useful for protein 961, 287, and ORF46. Once a protein has been notionally divided into domains, (c) and (j) fragments can omit one or more of these domains (*e.g.* 287B, 287C, 287BC, ORF46₁₋₄₃₃, ORF46₄₃₄₋₆₀₈, 961c - reference 2; Figures 4 and 5 herein).

20 287 protein has been notionally split into three domains, referred to as A, B & C (see Figure 5 of reference 2). Domain B aligns with IgA proteases, domain C aligns with transferrin-binding proteins, and domain A shows no strong alignment with database sequences. An alignment of polymorphic forms of 287 is disclosed in reference 8.

25 ORF46 has been notionally split into two domains - a first domain (amino acids 1-433; ORF46.1) which is well-conserved between species and serogroups, and a second domain (amino acids 434-608) which is not well-conserved. The second domain is preferably deleted, leaving ORF46.1. An alignment of polymorphic forms of ORF46 is disclosed in reference 8.

961 protein has been notionally split into several domains (Figure 4).

30 If a -X- moiety has a leader peptide sequence in its wild-type form, this may be included or omitted in the hybrid proteins of the invention. Where the leader peptide is omitted, this is a preferred example of an amino acid sequence within (c) and (j). In one embodiment, the leader peptides will be deleted except for that of the -X- moiety located at the N-terminus of the hybrid protein *i.e.* the leader peptide of X_1 will be retained, but the leader peptides of $X_2 \dots X_n$ will be omitted. This is equivalent to deleting all leader peptides and using the leader peptide of X_1 as moiety -A-.

When $n=2$, preferred pairs of -X- moieties are: $\Delta G287$ and 230; $\Delta G287$ and 936; $\Delta G287$ and 741; 961c and 287; 961c and 230; 961c and 936; 961cL and 287; 961cL and 230; 961cL and 936;

WO 03/020756

PCT/IB02/03904

-4-

ORF46.1 and 936; ORF46.1 and 230; 230 and 961; 230 and 741; 936 and 961; 936 and 741. When $n=2$, preferred pairs of -X- moieties for tandem proteins are: $\Delta G741$ and 741; $\Delta G287$ and 287. More specifically, the following combinations of X_1 and X_2 are preferred when $n=2$:

X_1	X_2	X_1	X_2
$\Delta G287$	230	230	$\Delta G287$
$\Delta G287$	936	936	$\Delta G287$
$\Delta G287$	741	741	$\Delta G287$
$\Delta G287$	961	961	$\Delta G287$
$\Delta G287$	ORF46.1	ORF46.1	$\Delta G287$
$\Delta G287$	919	919	$\Delta G287$
$\Delta G287$	953	953	$\Delta G287$
961c	287	287	961c
961c	230	230	961c
961c	936	936	961c
961c	741	741	961c
961c	983	983	961c
961c	$\Delta G983$	$\Delta G983$	961c
961c	ORF46.1	ORF46.1	961c
961	ORF46.1	ORF46.1	961
961cL	287	287	961cL
961cL	230	230	961cL
961cL	936	936	961cL
ORF46.1	936	936	ORF46.1
ORF46.1	230	230	ORF46.1
ORF46.1	741	741	ORF46.1
ORF46.1	$\Delta G741$	$\Delta G741$	ORF46.1
ORF46.1	983	983	ORF46.1
ORF46.1	$\Delta G983$	$\Delta G983$	ORF46.1
230	961	961	230
230	741	741	230
230	$\Delta G741$	$\Delta G741$	230
936	961	961	936
936	741	741	936
936	$\Delta G741$	$\Delta G741$	936
$\Delta G741$	741	$\Delta G287$	287
ORF46.1	983	983	ORF46.1
$\Delta G741$	ORF46.1	ORF46.1	$\Delta G741$
$\Delta G741$	983	983	$\Delta G741$
$\Delta G741$	961	961	$\Delta G741$
$\Delta G741$	961c	961c	$\Delta G741$
$\Delta G983$	ORF46.1	ORF46.1	$\Delta G983$
$\Delta G983$	961	961	$\Delta G983$
$\Delta G983$	961c	961c	$\Delta G983$

Where 287 is used in full-length form, it is preferably at the C-terminal end of a hybrid protein; if it is to be used at the N-terminus, it is preferred to use a ΔG form of 287. Similarly, Where 741 is used

WO 03/020756

PCT/IB02/03904

-5-

in full-length form, it is preferably at the C-terminal end of a hybrid protein; if it is to be used at the N-terminus, it is preferred to use a ΔG form of 741.

The -L- moieties

For each n instances of [-X-L-], linker amino acid sequence -L- may be present or absent. For instance, when $n=2$ the hybrid may be $\text{NH}_2\text{-X}_1\text{-L}_1\text{-X}_2\text{-L}_2\text{-COOH}$, $\text{NH}_2\text{-X}_1\text{-X}_2\text{-COOH}$, $\text{NH}_2\text{-X}_1\text{-L}_1\text{-X}_2\text{-COOH}$, $\text{NH}_2\text{-X}_1\text{-X}_2\text{-L}_2\text{-COOH}$, etc.

Linker amino acid sequence(s) -L- will typically be short (e.g. 20 or fewer amino acids i.e. 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1). Examples include short peptide sequences which facilitate cloning, poly-glycine linkers (i.e. Gly $_n$ where $n = 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10$ or more), and histidine tags (i.e. His $_n$ where $n = 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10$ or more). Other suitable linker amino acid sequences will be apparent to those skilled in the art. A useful linker is GSGGGG (SEQ ID 27), with the Gly-Ser dipeptide being formed from a *Bam*HI restriction site, thus aiding cloning and manipulation, and the Gly $_4$ tetrapeptide being a typical poly-glycine linker.

If X_{n+1} is a ΔG protein and L_n is a glycine linker, this may be equivalent to X_{n+1} not being a ΔG protein and L_n being absent.

The -A- moiety

-A- is an optional N-terminal amino acid sequence. This will typically be short (e.g. 40 or fewer amino acids i.e. 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1). Examples include leader sequences to direct protein trafficking, or short peptide sequences which facilitate cloning or purification (e.g. histidine tags i.e. His $_n$ where $n = 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10$ or more). Other suitable N-terminal amino acid sequences will be apparent to those skilled in the art. If X_1 lacks its own N-terminus methionine, -A- may be a methionine residue.

The -B- moiety

-B- is an optional C-terminal amino acid sequence. This will typically be short (e.g. 40 or fewer amino acids i.e. 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1). Examples include sequences to direct protein trafficking, short peptide sequences which facilitate cloning or purification (e.g. comprising histidine tags i.e. His $_n$ where $n = 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10$ or more), or sequences which enhance protein stability. Other suitable C-terminal amino acid sequences will be apparent to those skilled in the art.

Polymorphic forms of proteins

The invention can use amino acid sequences from any strains of *N.meningitidis*. References to a particular protein (e.g. '287', or 'ORF46.1') therefore include that protein from any strain. Sequence variations between strains are included within (b), (c), (i) and (j).

WO 03/020756

PCT/IB02/03904

-6-

Reference sequences from *N.meningitidis* serogroup B include:

Protein	Reference	Protein	Reference
orf1	Ref. 3, SEQ ID 650	orf4	Ref. 3, SEQ ID 218
orf25	Ref. 3, SEQ ID 684	orf40	Ref. 4, SEQ ID 4
orf46	Ref. 6, SEQ ID 1049	orf83	Ref. 3, SEQ ID 314
NMB1343	Ref. 7, NMB1343	230	Ref. 5, SEQ ID 830
233	Ref. 5, SEQ ID 860	287	Ref. 5, SEQ ID 3104
292	Ref. 5, SEQ ID 1220	594	Ref. 5, SEQ ID 1862
687	Ref. 5, SEQ ID 2282	736	Ref. 5, SEQ ID 2506
741	Ref. 5, SEQ ID 2536	907	Ref. 5, SEQ ID 2732
919	Ref. 5, SEQ ID 3070	936	Ref. 5, SEQ ID 2884
953	Ref. 5, SEQ ID 2918	961	Ref. 5, SEQ ID 940
983	Ref. 7, NMB1969		

- Reference 8 discloses polymorphic forms of proteins ORF4, ORF40, ORF46, 225, 235, 287, 519, 726, 919 and 953. Polymorphic forms of 961 are disclosed in references 11 & 12. Any of these polymorphic forms may be used in accordance with the present invention.

The sequence listing herein includes polymorphic forms of proteins 741 (SEQ IDs 1-22) and NMB1343 (SEQ IDs 23-24) which have been identified.

Serogroups and strains

- Preferred proteins of the invention comprise -X- moieties having an amino acid sequence found in *N.meningitidis* serogroup B. Within a single protein of the invention, individual -X- moieties may be from one or more strains. Where $n=2$, for instance, X_2 may be from the same strain as X_1 or from a different strain. Where $n=3$, the strains might be (i) $X_1=X_2=X_3$ (ii) $X_1=X_2 \neq X_3$ (iii) $X_1 \neq X_2 = X_3$ (iv) $X_1 \neq X_2 \neq X_3$ or (v) $X_1 = X_3 \neq X_2$, etc.

- Within serogroup B, preferred -X- moieties are from strains 2996, MC58, 95N477, or 394/98. Strain 95N477 is sometimes referred to herein as 'ET37', this being its electrophoretic type. Strain 394/98 is sometimes referred to herein as 'nz', as it is a New Zealand strain.

Where a form of 287 is used, this is preferably from strain 2996 or from strain 394/98.

Where a form of 741 is used, this is preferably from serogroup B strains MC58, 2996, 394/98, or 95N477, or from serogroup C strain 90/18311.

- Where a form of 961 is used, this is preferably from strain 2996.

Strains are indicated as a subscript e.g. 741_{MC58} is protein 741 from strain MC58. Unless otherwise stated, proteins mentioned herein (e.g. with no subscript) are from *N.meningitidis* strain 2996, which

WO 03/020756

PCT/IB02/03904

-7-

can be taken as a 'reference' strain. It will be appreciated, however, that the invention is not in general limited by strain. As mentioned above, general references to a protein (e.g. '287', '919' etc.) may be taken to include that protein from any strain. This will typically have sequence identity to 2996 of 90% or more (e.g. 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% or more).

5 Domain-based expression of protein 961

References 1 and 2 disclose how a protein can be notionally divided into domains and how the protein can be manipulated based on these domains. The present invention extends the application of this approach to protein 961 (also known as 'NadA' [11,12]).

In *N.meningitidis* serogroup B strain 2996, NadA has 405 amino acids. This protein has notionally
10 been divided into the following nine domains (Figure 4):

Domain name	Amino acids	Domain name	Amino acids
961-1 'L'	1-23	961-6	269-286
961-2	24-87	961-7	287-330
961-3	88-143	961-8	331-350
961-4	144-180	961-9	351-405
961-5	181-268		

This information can be used to locate the same domains in other forms of 961.

These domains have been deleted from 961 in strain 2996 in various ways (Figure 5). Preferred fragments of 961 omit one or more of these nine domains e.g. the following:

- 15 - 961-2 to 961-5 ('961a')
- 961-6 to 961-9 ('961b')
- 961-1 to 961-8 ('961cL')
- 961-2 to 961-8 ('961c')
- 961-2 to 961-6 and amino acids 287-325 from domain 961-7 ('961d')
- 961-2 to 961-8 and amino acids 351-383 from domain 961-9 ('961Δ1')
- 20 - 961-1 to 961-8 and amino acids 351-383 from domain 961-9 ('961Δ1L')
- 961-1 to 961-7 and amino acids 331-343 from domain 961-8 ('961cL-Δaro')
- 961-1 to 961-6 and amino acids 287-315 from domain 961-7 ('961cL-Δcc')
- 961-1 to 961-5 ('961aL')
- 961-1 to 961-4 ('961aL-Δ1')
- 25 - 961-1 to 961-3 ('961aL-Δ2')
- 961-1 to 961-2 ('961aL-Δ3')

These thirteen fragments (and sub-fragments thereof missing 1, 2, 3, 4 or 5 amino acids at either or both ends) are preferred (c) and (j) fragments, but they may also be expressed in their own right i.e. not in the form of a hybrid protein of the invention. Thus the invention provides a protein comprising

WO 03/020756

PCT/IB02/03904

-8-

one of these fragments, providing that the protein is not full-length 961 and is not a protein specifically disclosed in reference 1 or 2. This protein may be a fusion protein (*e.g.* a GST-fusion or a His-tag fusion).

Sequences

- 5 The invention also provides a protein having an amino acid sequence from SEQ IDs 1 to 24. It also provides proteins and nucleic acid having sequence identity to these. As described above, the degree of 'sequence identity' is preferably greater than 50% (*eg.* 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% or more).

The invention also provides nucleic acid encoding such proteins.

- 10 Furthermore, the invention provides nucleic acid which can hybridise to this nucleic acid, preferably under "high stringency" conditions (*eg.* 65°C in a 0.1xSSC, 0.5% SDS solution).

The invention also provides nucleic acid encoding proteins according to the invention.

It should also be appreciated that the invention provides nucleic acid comprising sequences complementary to those described above (*eg.* for antisense or probing purposes).

- 15 Nucleic acid according to the invention can, of course, be prepared in many ways (*eg.* by chemical synthesis, from genomic or cDNA libraries, from the organism itself *etc.*) and can take various forms (*eg.* single stranded, double stranded, vectors, probes *etc.*).

In addition, the term "nucleic acid" includes DNA and RNA, and also their analogues, such as those containing modified backbones, and also peptide nucleic acids (PNA) *etc.*

Mixtures

- 20 The invention also provides a composition comprising two or more (*i.e.* 2, 3, 4, 5, 6 or 7) of the following proteins:

(1) 287

(2) 741

(3) ORF46.1

- 25 (4) 961

(5) $\text{NH}_2\text{-A-}[-\text{X-L-}]_n\text{-B-COOH}$, wherein $n=2$, $X_1=287$, $X_2=953$

(6) $\text{NH}_2\text{-A-}[-\text{X-L-}]_n\text{-B-COOH}$, wherein $n=2$, $X_1=287$, $X_2=919$

(7) $\text{NH}_2\text{-A-}[-\text{X-L-}]_n\text{-B-COOH}$, wherein $n=2$, $X_1=287$, $X_2=961$

- 30 The mixture may include one or both of the following proteins, either in combination with two or more of (1) to (7), or in combination with only one of (1) to (7):

(8) $\text{NH}_2\text{-A-}[-\text{X-L-}]_n\text{-B-COOH}$, wherein $n=2$, $X_1=287$, $X_2=741$

(9) $\text{NH}_2\text{-A-}[-\text{X-L-}]_n\text{-B-COOH}$, wherein $n=2$, $X_1=936$, $X_2=741$

WO 03/020756

PCT/IB02/03904

-9-

Where proteins 287 and 741 are included in the mixture (*i.e.* in protein 1, 2, 5, 6, 7 or 8), they may be in the 'ΔG' form. Where protein 961 is included, it is preferably in the form of '961c' in which the N-terminus leader and C-terminus membrane anchor are absent [*e.g.* see refs. 1, 2 & 11].

A preferred mixture comprises the following three proteins:

- 5 (1) 961c, preferably 961c₂₉₉₆ (*e.g.* SEQ ID 31 herein);
- (2) NH₂-A-[X-L]_n-B-COOH, wherein n is 2, -X₁- is ΔG287 (preferably ΔG287_{N2}), -X₂- is 953 (preferably 953₂₉₉₆) lacking its leader peptide, -L₁- is GSGGGG, and -A- comprises a N-terminus methionine (*e.g.* -A- is M or MA) (*e.g.* SEQ IDs 28 & 29 herein); and
- 10 (3) NH₂-A-[X-L]_n-B-COOH, wherein n=2, X₁=936 (preferably 936₂₉₉₆), X₂=ΔG741 (preferably ΔG741_{MC58}), L₁=GSGGGG (*e.g.* SEQ ID 30 herein).

The mixtures may also comprise *N.meningitidis* outer membrane vesicles.

Heterologous host

Whilst expression of the proteins of the invention may take place in *Neisseria*, the present invention preferably utilises a heterologous host. The heterologous host may be prokaryotic (*e.g.* a bacterium) or eukaryotic. It is preferably *E.coli*, but other suitable hosts include *Bacillus subtilis*, *Vibrio cholerae*, *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium*, *Neisseria lactamica*, *Neisseria cinerea*, *Mycobacteria* (*e.g.* *M.tuberculosis*), yeast *etc.*

Vectors etc.

The invention provides (a) nucleic acid encoding the proteins described above (b) vectors comprising these nucleic acid sequences (c) host cells containing said vectors (d) compositions comprising the proteins or nucleic acids of the invention, which may be suitable as immunogenic compositions (*e.g.* vaccines) or as diagnostic reagents (e) these compositions for use as medicaments (*e.g.* as vaccines) or as diagnostic reagents (f) the use of these compositions in the manufacture of (1) a medicament for treating or preventing infection due to Neisserial bacteria (2) a diagnostic reagent for detecting the presence of Neisserial bacteria or of antibodies raised against Neisseria bacteria, and/or (3) a reagent which can raise antibodies against Neisseria bacteria and (g) a method of treating a patient, comprising administering to the patient a therapeutically effective amount of these compositions.

Implementing the invention will typically involve the basic steps of: obtaining a first nucleic acid encoding a first protein; obtaining a second nucleic acid encoding a second protein; and ligating the first and second nucleic acids. The resulting nucleic acid may be inserted into an expression vector, or may already be part of an expression vector.

To improve solubility, purification of hybrid proteins may involve the refolding techniques disclosed herein.

WO 03/020756

PCT/IB02/03904

-10-

Immunogenic compositions and medicaments

The compositions of the invention are preferably immunogenic composition, and are more preferably vaccine compositions. The pH of the composition is preferably between 6 and 7. The pH may be maintained by the use of a buffer. The composition may be sterile.

- 5 Vaccines according to the invention may either be prophylactic (*i.e.* to prevent infection) or therapeutic (*i.e.* to treat infection), but will typically be prophylactic.

The invention also provides a composition of the invention for use as a medicament. The medicament is preferably able to raise an immune response in a mammal (*i.e.* it is an immunogenic composition) and is more preferably a vaccine.

- 10 The invention also provides the use of a composition of the invention in the manufacture of a medicament for raising an immune response in a mammal. The medicament is preferably a vaccine.

The invention also provides a method for raising an immune response in a mammal comprising the step of administering an effective amount of a composition of the invention. The immune response is preferably protective. The method may raise a booster response.

- 15 The mammal is preferably a human. Where the vaccine is for prophylactic use, the human is preferably a child (*e.g.* a toddler or infant); where the vaccine is for therapeutic use, the human is preferably an adult. A vaccine intended for children may also be administered to adults *e.g.* to assess safety, dosage, immunogenicity, *etc.*

- 20 These uses and methods are preferably for the prevention and/or treatment of a disease caused by a *Neisseria* (*e.g.* meningitis, septicaemia, gonorrhoea *etc.*). The prevention and/or treatment of bacterial meningitis is preferred.

Further components of the composition

- 25 The composition of the invention will typically, in addition to the components mentioned above, comprise one or more 'pharmaceutically acceptable carriers', which include any carrier that does not itself induce the production of antibodies harmful to the individual receiving the composition. Suitable carriers are typically large, slowly metabolised macromolecules such as proteins, polysaccharides, polylactic acids, polyglycolic acids, polymeric amino acids, amino acid copolymers, trehalose (WO00/56365) and lipid aggregates (such as oil droplets or liposomes). Such carriers are well known to those of ordinary skill in the art. The vaccines may also contain diluents, such as
- 30 water, saline, glycerol, *etc.* Additionally, auxiliary substances, such as wetting or emulsifying agents, pH buffering substances, and the like, may be present. A thorough discussion of pharmaceutically acceptable excipients is available in *Remington's Pharmaceutical Sciences*.

Immunogenic compositions used as vaccines comprise an immunologically effective amount of antigen, as well as any other of the above-mentioned components, as needed. By 'immunologically

WO 03/020756

PCT/IB02/03904

-11-

effective amount', it is meant that the administration of that amount to an individual, either in a single dose or as part of a series, is effective for treatment or prevention. This amount varies depending upon the health and physical condition of the individual to be treated, age, the taxonomic group of individual to be treated (*e.g.* non-human primate, primate, *etc.*), the capacity of the individual's immune system to synthesise antibodies, the degree of protection desired, the formulation of the vaccine, the treating doctor's assessment of the medical situation, and other relevant factors. It is expected that the amount will fall in a relatively broad range that can be determined through routine trials. Dosage treatment may be a single dose schedule or a multiple dose schedule (*e.g.* including booster doses). The vaccine may be administered in conjunction with other immunoregulatory agents.

The vaccine may be administered in conjunction with other immunoregulatory agents.

The composition may include other adjuvants in addition to (or in place of) the aluminium salt. Preferred adjuvants to enhance effectiveness of the composition include, but are not limited to: (1) oil-in-water emulsion formulations (with or without other specific immunostimulating agents such as muramyl peptides (see below) or bacterial cell wall components), such as for example (a) MF59™ (WO90/14837; Chapter 10 in ref. 13), containing 5% Squalene, 0.5% Tween 80, and 0.5% Span 85 (optionally containing MTP-PE) formulated into submicron particles using a microfluidizer, (b) SAF, containing 10% Squalene, 0.4% Tween 80, 5% pluronic-blocked polymer L121, and thr-MDP either microfluidized into a submicron emulsion or vortexed to generate a larger particle size emulsion, and (c) Ribi™ adjuvant system (RAS), (Ribi Immunochem, Hamilton, MT) containing 2% Squalene, 0.2% Tween 80, and one or more bacterial cell wall components from the group consisting of monophosphoryl lipid A (MPL), trehalose dimycolate (TDM), and cell wall skeleton (CWS), preferably MPL + CWS (Detox™); (2) saponin adjuvants, such as QS21 or Stimulon™ (Cambridge Bioscience, Worcester, MA) may be used or particles generated therefrom such as ISCOMs (immunostimulating complexes), which ISCOMs may be devoid of additional detergent *e.g.* WO00/07621; (3) Complete Freund's Adjuvant (CFA) and Incomplete Freund's Adjuvant (IFA); (4) cytokines, such as interleukins (*e.g.* IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12 (WO99/44636), *etc.*), interferons (*e.g.* gamma interferon), macrophage colony stimulating factor (M-CSF), tumor necrosis factor (TNF), *etc.*; (5) monophosphoryl lipid A (MPL) or 3-O-deacylated MPL (3dMPL) *e.g.* GB-2220221, EP-A-0689454; (6) combinations of 3dMPL with, for example, QS21 and/or oil-in-water emulsions *e.g.* EP-A-0835318, EP-A-0735898, EP-A-0761231; (7) oligonucleotides comprising CpG motifs [Krieg *Vaccine* 2000, 19, 618-622; Krieg *Curr opin Mol Ther* 2001 3:15-24; Roman *et al.*, *Nat. Med.*, 1997, 3, 849-854; Weiner *et al.*, *PNAS USA*, 1997, 94, 10833-10837; Davis *et al.*, *J. Immunol.*, 1998, 160, 870-876; Chu *et al.*, *J. Exp. Med.*, 1997, 186, 1623-1631; Lipford *et al.*, *Eur. J. Immunol.*, 1997, 27, 2340-2344; Moldoveanu *et al.*, *Vaccine*, 1988, 16, 1216-1224; Krieg *et al.*, *Nature*, 1995, 374, 546-549; Klinman *et al.*, *PNAS USA*, 1996, 93, 2879-2883; Ballas *et al.*, *J. Immunol.*, 1996, 157, 1840-1845; Cowdery *et al.*, *J. Immunol.*, 1996, 156, 4570-4575; Halpern *et al.*, *Cell. Immunol.*, 1996, 167, 72-78; Yamamoto *et al.*, *Jpn. J. Cancer Res.*, 1988, 79, 866-873; Stacey *et al.*, *J. Immunol.*, 1996, 157, 2116-2122; Messina *et al.*, *J. Immunol.*, 1991, 147, 1759-1764; Yi *et al.*, *J.*

WO 03/020756

PCT/IB02/03904

-12-

Immunol., 1996, 157, 4918-4925; Yi *et al.*, *J. Immunol.*, 1996, 157, 5394-5402; Yi *et al.*, *J. Immunol.*, 1998, 160, 4755-4761; and Yi *et al.*, *J. Immunol.*, 1998, 160, 5898-5906; International patent applications WO96/02555, WO98/16247, WO98/18810, WO98/40100, WO98/55495, WO98/37919 and WO98/52581] *i.e.* containing at least one CG dinucleotide, with 5-methylcytosine optionally being used in place of cytosine; (8) a polyoxyethylene ether or a polyoxyethylene ester *e.g.* WO99/52549; (9) a polyoxyethylene sorbitan ester surfactant in combination with an octoxynol (*e.g.* WO01/21207) or a polyoxyethylene alkyl ether or ester surfactant in combination with at least one additional non-ionic surfactant such as an octoxynol (*e.g.* WO01/21152); (10) an immunostimulatory oligonucleotide (*e.g.* a CpG oligonucleotide) and a saponin *e.g.* WO00/62800; (11) an immunostimulant and a particle of metal salt *e.g.* WO00/23105; (12) a saponin and an oil-in-water emulsion *e.g.* WO99/11241; (13) a saponin (*e.g.* QS21) + 3dMPL + IL-12 (optionally + a sterol) *e.g.* WO98/57659; (14) other substances that act as immunostimulating agents to enhance the efficacy of the composition.

Muramyl peptides include N-acetyl-muramyl-L-threonyl-D-isoglutamine (thr-MDP), N-acetyl-normuramyl-L-alanyl-D-isoglutamine (nor-MDP), N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutaminyl-L-alanine-2-(1'-2'-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-hydroxyphosphoryloxy)-ethylamine MTP-PE), *etc.*

Further antigens

Further antigens which can be included in the composition of the invention include:

- an outer-membrane vesicle (OMV) preparation from *N.meningitidis* serogroup B, such as those disclosed in refs. 14, 15, 16, 17 *etc.*
- a saccharide antigen from *N.meningitidis* serogroup A, C, W135 and/or Y, such as the oligosaccharide disclosed in ref. 18 from serogroup C [see also ref. 19] or the oligosaccharides of ref. 20.
- a saccharide antigen from *Streptococcus pneumoniae* [*e.g.* refs. 21, 22, 23].
- a protein antigen from *Helicobacter pylori* such as CagA [*e.g.* 24], VacA [*e.g.* 24], NAP [*e.g.* 25], HopX [*e.g.* 26], HopY [*e.g.* 26] and/or urease.
- an antigen from hepatitis A virus, such as inactivated virus [*e.g.* 27, 28].
- an antigen from hepatitis B virus, such as the surface and/or core antigens [*e.g.* 28, 29].
- an antigen from hepatitis C virus [*e.g.* 30].
- an antigen from *Bordetella pertussis*, such as pertussis holotoxin (PT) and filamentous haemagglutinin (FHA) from *B.pertussis*, optionally also in combination with pertactin and/or agglutinogens 2 and 3 [*e.g.* refs. 31 & 32].
- a diphtheria antigen, such as a diphtheria toxoid [*e.g.* chapter 3 of ref. 33] *e.g.* the CRM₁₉₇ mutant [*e.g.* 34].
- a tetanus antigen, such as a tetanus toxoid [*e.g.* chapter 4 of ref. 33].
- a saccharide antigen from *Haemophilus influenzae* B [*e.g.* 19].

WO 03/020756

PCT/IB02/03904

-13-

- an antigen from *N.gonorrhoeae* [e.g. 3, 4, 5].
- an antigen from *Chlamydia pneumoniae* [e.g. 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41].
- an antigen from *Chlamydia trachomatis* [e.g. 42].
- an antigen from *Porphyromonas gingivalis* [e.g. 43].
- 5 - polio antigen(s) [e.g. 44, 45] such as IPV or OPV.
- rabies antigen(s) [e.g. 46] such as lyophilised inactivated virus [e.g.47, RabAvert™].
- measles, mumps and/or rubella antigens [e.g. chapters 9, 10 & 11 of ref. 33].
- influenza antigen(s) [e.g. chapter 19 of ref. 33], such as the haemagglutinin and/or neuraminidase surface proteins.
- 10 - an antigen from *Moraxella catarrhalis* [e.g. 48].
- a protein antigen from *Streptococcus agalactiae* (group B streptococcus) [e.g. 49, 50].
- a saccharide antigen from *Streptococcus agalactiae*
- an antigen from *Streptococcus pyogenes* (group A streptococcus) [e.g. 50, 51, 52].
- an antigen from *Staphylococcus aureus* [e.g. 53].
- 15 The composition may comprise one or more of these further antigens.

Where a saccharide or carbohydrate antigen is used, it is preferably conjugated to a carrier protein in order to enhance immunogenicity [e.g. refs. 54 to 63]. Preferred carrier proteins are bacterial toxins or toxoids, such as diphtheria or tetanus toxoids. The CRM₁₉₇ diphtheria toxoid is particularly preferred. Other suitable carrier proteins include the *N.meningitidis* outer membrane protein [e.g. ref. 20 64], synthetic peptides [e.g. 65, 66], heat shock proteins [e.g. 67], pertussis proteins [e.g. 68, 69], protein D from *H.influenzae* [e.g. 70], toxin A or B from *C.difficile* [e.g. 71], etc. Where a mixture comprises capsular saccharides from both serogroups A and C, it is preferred that the ratio (w/w) of MenA saccharide:MenC saccharide is greater than 1 (e.g. 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 10:1 or higher). Saccharides from different serogroups of *N.meningitidis* may be conjugated to the same or different 25 carrier proteins.

Any suitable conjugation reaction can be used, with any suitable linker where necessary.

Toxic protein antigens may be detoxified where necessary (e.g. detoxification of pertussis toxin by chemical and/or genetic means [32]).

Where a diphtheria antigen is included in the composition it is preferred also to include tetanus 30 antigen and pertussis antigens. Similarly, where a tetanus antigen is included it is preferred also to include diphtheria and pertussis antigens. Similarly, where a pertussis antigen is included it is preferred also to include diphtheria and tetanus antigens.

WO 03/020756

PCT/IB02/03904

-14-

Antigens are preferably mixed with (and more preferably adsorbed to) an aluminium salt (*e.g.* phosphate, hydroxide, hydroxyphosphate, oxyhydroxide, orthophosphate, sulphate). The salt may take any suitable form (*e.g.* gel, crystalline, amorphous *etc.*).

Antigens in the composition will typically be present at a concentration of at least 1 µg/ml each. In general, the concentration of any given antigen will be sufficient to elicit an immune response against that antigen.

As an alternative to using proteins antigens in the composition of the invention, nucleic acid encoding the antigen may be used [*e.g.* refs. 72 to 80]. Protein components of the compositions of the invention may thus be replaced by nucleic acid (preferably DNA *e.g.* in the form of a plasmid) that encodes the protein.

Definitions

The term "comprising" means "including" as well as "consisting" *e.g.* a composition "comprising" X may consist exclusively of X or may include something additional *e.g.* X + Y.

The term "about" in relation to a numerical value *x* means, for example, $x \pm 10\%$.

15 BRIEF DESCRIPTION OF DRAWINGS

Figure 1 shows an alignment of twenty-three sequences for protein 741. These are SEQ IDs 1 to 22 plus the sequence from MC58.

Figure 2 shows an alignment of the NMB1343 sequence from gonococcus (top; SEQ ID 25) and meningococcus (bottom; SEQ ID 26).

20 Figure 3 shows hybrid and tandem proteins of the invention.

Figure 4 shows 9 domains within 961₂₉₉₆, and Figure 5 shows how these have been manipulated.

MODES FOR CARRYING OUT THE INVENTION

Hybrid proteins - $X_1 = \Delta G287$

In addition to those disclosed in references 1 & 2, seven hybrid proteins with $\Delta G287$ from strain 25 2996 at the N-terminus were constructed. Eight 287 tandem proteins were also made (see below).

#	n	X ₁	L ₁	X ₂	L ₂
1	2	ΔG287	-	230	(His) ₆
2	2		-	936	(His) ₆
3	2		-	741 _{MC58}	(His) ₆
4	2		-	741 _{ET37}	(His) ₆
5	2		-	741 _{90/18311}	(His) ₆
6	2		-	741 _{95N477}	(His) ₆
7	2	ΔG287 _{nz}	-	741 _{MC58}	(His) ₆

WO 03/020756

PCT/IB02/03904

-15-

These proteins were adjuvanted with either Freund's complete adjuvant (FCA) or 3mg/ml alum and used to immunise mice. The resulting sera were tested against various Neisserial strains using the bactericidal assay. Titres using protein #3 were as follows:

Strain ^(serogroup)	2996 ^(B)	MC58 ^(B)	NGH38 ^(B)	394/98 ^(B)	44/76 ^(B)	F6124 ^(A)
Al hydroxide	8192	32768	8192	>2048	16384	8192
FCA	16384	262144	8192	>2048	>32768	8192

In further experiments using protein #3 adjuvanted with aluminium hydroxide, anti-287 and anti-741

- 5 ELISA titres each exceeded 984150 and BCA titres were as follows:

2996 ^(B)	MC58 ^(B)	NGH38 ^(B)	394/98 ^(B)	44/76 ^(B)	F6124 ^(A)	BZ133 ^(C)
8000	65000	4000	4000	32000	8000	16000

Results obtained after immunisation with proteins disclosed in refs. 1 & 2, tested against the homologous strain, were as follows:

n	X ₁	L ₁	X ₂	L ₂	Bactericidal titre		ELISA	
					FCA	Alum	FCA	Alum
2	ΔG287 _{394/98}	-	961	(His) ₆	-	32768	-	>109350
			919		32768	4096	4718	3678
			953		>32768	>16384	1900	6936
			741		16384	2048	232	862
2	ΔG287 ₂₉₉₆	-	961	(His) ₆	65536	32768	108627	>109350
			919		128000	32000	11851	2581
			953		65536	-	3834	-
			741		16384	8192	315	4645

Hybrid proteins - X₁ = 961c or 961cL

- 10 In addition to those disclosed in references 1 & 2, eight hybrid proteins with either 961c or 961cL (i.e. 961c + leader peptide) at the N-terminus were constructed:

#	n	X ₁	L ₁	X ₂	L ₂
1	2	961c	-	287	-
2	2		-	287	(His) ₆
3	2		-	230	(His) ₆
4	2		-	936	(His) ₆
5	2	961cL	-	287	-
6	2		-	287	(His) ₆
7	2		-	230	(His) ₆
8	2		-	936	(His) ₆

WO 03/020756

PCT/IB02/03904

-16-

These proteins were adjuvanted with either Freund's complete adjuvant (FCA) or 3.3mg/ml alum and used to immunise mice. The resulting sera were tested against various Neisserial strains using the bactericidal assay. Titres using protein #8 were as follows:

Strain (serogroup)	2996 ^(B)	MC58 ^(B)	394/98 ^(B)	44/76 ^(B)	F6124 ^(A)
Al hydroxide	8192	8192	512	1024	<16
FCA	65536	16384	>2048	>2048	8192

Titres obtained after immunisation with 961c-741 [refs. 1 & 2] were as follows:

Strain (serogroup)	2996 ^(B)	MC58 ^(B)	394/98 ^(B)	44/76 ^(B)	F6124 ^(A)	BZ133 ^(C)
Al hydroxide	65536	32768	4096	>32768	16384	>2048
FCA	>16384	262144	4096	>16384	-	>2048

5

These results could be improved by mixing 961c-741 with ORF46.1 or with ΔG287-919.

Results obtained after immunisation with proteins disclosed in refs. 1 & 2, tested against the homologous strain, were as follows:

n	X ₁	L ₁	X ₂	L ₂	Bactericidal titre		ELISA	
					FCA	Alum	FCA	Alum
2	961c	-	ORF46.1	(His) ₆	32768	1024	>109350	>109350
			741		>16384	8192	>109350	>109350
			936		>32768	8192	>109350	>109350

10 Hybrid proteins - X₁ = ORF46.1

In addition to those disclosed in references 1 & 2, two hybrid proteins with ORF46.1 at the N-terminus were constructed:

#	n	X ₁	L ₁	X ₂	L ₂
1	2	ORF46.1	-	936	(His) ₆
2	2		-	230	(His) ₆

These proteins were adjuvanted with either Freund's complete adjuvant (FCA) or 3mg/ml alum and used to immunise mice. The resulting sera were tested against the homologous strain using the bactericidal assay and by ELISA.

15

Results obtained after immunisation with proteins disclosed in refs. 1 & 2 were as follows:

n	X ₁	L ₁	X ₂	L ₂	Bactericidal titre		ELISA	
					FCA	Alum	FCA	Alum
2	ORF46.1	-	961	(His) ₆	8192	8192	21558	>109350
		-	961c	(His) ₆	8192	128	9020	76545

WO 03/020756

PCT/IB02/03904

-17-

Hybrid proteins – X₁ = 230

In addition to those disclosed in references 1 & 2, four hybrid proteins with 230 at the N-terminus were constructed:

#	n	X ₁	L ₁	X ₂	L ₂
1	2	230	-	ORF46.1	(His) ₆
2	2		-	961	(His) ₆
3	2		-	961c	(His) ₆
4	2		-	741 _{MC58}	(His) ₆

5

Hybrid proteins – X₁ = 936

In addition to those disclosed in references 1 & 2, seven hybrid proteins with 936 at the N-terminus were constructed:

#	n	X ₁	L ₁	X ₂	L ₂
1	2	936	-	ORF46.1	(His) ₆
2	2		-	961	(His) ₆
3	2		-	741 _{ET37}	(His) ₆
4	2		-	741 _{MC58}	(His) ₆
5	2		-	741 _{90/18311}	(His) ₆
6	2		-	741 _{95N477}	(His) ₆
7	2		-	741	(His) ₆

10 These proteins were adjuvanted with either Freund's complete adjuvant (FCA) or 3mg/ml alum and used to immunise mice. The resulting sera were tested against various Neisserial strains using the bactericidal assay. Titres using protein #2 were as follows:

Strain ^(serogroup)	2996 ^(B)	MC58 ^(B)	394/98 ^(B)	44/76 ^(B)	F6124 ^(A)
Al hydroxide	16384	32768	1024	2048	<16
FCA	65536	65536	>2048	8192	2048 (36%)

Titres using protein #4 were as follows:

Strain ^(serogroup)	2996 ^(B)	MC58 ^(B)	394/98 ^(B)	44/76 ^(B)	F6124 ^(A)
Al hydroxide	256	>262144	>2048	32768	8192
FCA	1024	>262144	>2048	>32768	>32768

Titres using protein #7 were as follows:

Strain ^(serogroup)	2996 ^(B)	MC58 ^(B)	394/98 ^(B)	44/76 ^(B)	F6124 ^(A)	BZ133 ^(C)
Al hydroxide	256	130000	16000	32000	8000	16000

WO 03/020756

PCT/IB02/03904

-18-

Results obtained after immunisation with proteins disclosed in refs. 1 & 2, tested against the homologous strain, were as follows:

n	X ₁	L ₁	X ₂	L ₂	Bactericidal titre		ELISA	
					FCA	Alum	FCA	Alum
2	936	-	741	(His) ₆	1024	256	1466	5715
			936		>32768	>32768	>109350	>109350

Mixtures of hybrid proteins

- 5 Mice were immunised with three proteins adjuvanted with aluminium hydroxide, either single or in a triple combination: (1) 287_{NZ-953}; (2) 936-741; and (3) 961c. The mixture was able to induce high bactericidal titres against various strains:

	2996 ^(B)	MC58 ^(B)	NGH38	394/98 ^(B)	H44/76 ^(B)	F6124 ^(A)	BZ133 ^(C)	C11 ^(C)
(1)	32000	16000	130000	16000	32000	8000	16000	8000
(2)	256	131000	128	16000	32000	8000	16000	<4
(3)	32000	8000	—	—	—	8000	—	32000
mix	32000	32000	65000	16000	260000	65000	>65000	8000
(X)	4000	4000	1000	1000	>4000	1000	4000	n.d.

— indicates that this strain contains no NadA gene
(X) was a combination of protein 287 with outer membrane vesicles, for comparison

- 10 Looking at individual mice, the mixture induced high and consistent bactericidal titres:

#	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
2996	32768	16384	65536	32768	32768	65536	65536	32768	65536	8192
MC58	65536	32768	65536	65536	65536	8192	65536	32768	32768	65536
394/98	65536	4096	16384	4096	8192	4096	32768	16384	8192	16384

Tandem proteins

Hybrid proteins of the invention can be represented by formula NH₂-[X-L]_n-COOH. Where all n instances of -X- are the same basic protein (either identical, or the same protein from different strains or species), the protein is referred to as a 'tandem' protein.

- 15 Twelve specific tandem proteins are:

#	n	X ₁	L ₁	X ₂	L ₂
1	2	ΔG741 _{MC58}	-	741 _{MC58}	(His) ₆
2	2	ΔG287 ₂₉₉₆	(Gly) ₆	ΔG287 _{394/98}	(His) ₆
3	2	ΔG287 ₂₉₉₆	(Gly) ₆	ΔG287 ₂₉₉₆	(His) ₆
4	2	ΔG287 _{394/98}	(Gly) ₆	ΔG287 _{394/98}	(His) ₆
5	2	ΔG287 _{394/98}	(Gly) ₆	ΔG287 ₂₉₉₆	(His) ₆

WO 03/020756

PCT/IB02/03904

-19-

6	2	Δ G287 ₂₉₉₆	(Gly) ₆	Δ G287 _{394/98}	-
7	2	Δ G287 ₂₉₉₆	(Gly) ₆	Δ G287 ₂₉₉₆	-
8	2	Δ G287 _{394/98}	(Gly) ₆	Δ G287 _{394/98}	-
9	2	Δ G287 _{394/98}	(Gly) ₆	Δ G287 ₂₉₉₆	-
10	2	Δ G741 _{MC58}	-	741 _{994/98}	(His) ₆
11	2	Δ G741 _{MC58}	-	741 ₉₀₁₈₃₁₁	(His) ₆
12	2	Δ G741 _{MC58}	-	741 _{95N477}	(His) ₆

Proteins #1 to #5 have all been expressed in soluble form in *E.coli*. Expression levels were between 0.24 and 0.50 mg protein per litre of culture. The tandem proteins were purified and mixed with aluminium phosphate as an adjuvant. Tandem proteins #2, #4 and #5 adsorbed readily to aluminium phosphate; adsorption was less complete for tandem proteins #1 and #3.

5 Allelic variants – 741

Twenty-two polymorphic sequences of 741 were found (SEQ IDs 1 to 22). These and the MC58 sequence are aligned in Figure 1.

Allelic variants – NMB1343

Using PCR on 42 strains of meningococcus of various serogroups, the gene encoding NMB1343 protein was found in 24/42 and was absent in 18/42 strains (Table 1). The NMB1343 gene was sequenced for 10 of the NMB1343⁺ strains (Table 1, column 3). The nucleic acid sequence (and thus amino acid sequence SEQ ID 23; GenBank AAF41718) was identical in all 10 strains.

NMB1343 was also detected in two strains of *N.gonorrhoeae* (F62 and SN4). The amino acid sequence from gonococcus is SEQ ID 24. An alignment with the meningococcal sequence is:

```

15      . . . .10 . . . .20 . . . .30 . . . .40 . . . .50
    Ng  1: INNLEWELSYLYRGTSCQQDEQNNGLKPKGNKAEVAIRYDGRFKFYDGRKAT: 50
    Nm  1: ~~~~~MGNFLYRGTSCQQDEQNNGLKPKGNKAEVAIRYDGRFKFYDGRKAT: 45

20      . . . .60 . . . .70 . . . .80 . . . .90 . . . .100
    Ng  51: HGPSVKNNAVYAHQIETGLVDGCYLSITTTDKELAKKFATSSGIENGYIVVL:100
    Nm  46: HGPSVKNNAVYAHQIETGLVDGCYLSITTTDKELAKKFATSSGIENGYIVVL: 95

25      . . . .110 . . . .120 . . . .130 . . . .140 . . . .150
    Ng  101: NRDLFGQYSTFEYVEVHPENPDJEKVTTRAEDCGGCTPREVITAKELIETIN:150
    Nm  96: NRDLFGQYSTFEYVEVHPENPDJEKVTTRAEDCGGCTPREVITAKELIETIN:145

```

An alignment of the corresponding nucleotide sequences is shown in Figure 2. This shows that the gonococcal sequence has a 4mer insertion in the 5' region of the NMB1343 gene which causes a frameshift and consequent loss of the 5' methionine residue.

WO 03/020756

PCT/IB02/03904

-20-

Domain deletion – 961

961 is not present in the *N.meningitidis* serogroup A genome sequence [81], even though the surrounding regions are conserved (>90%) between serogroups A and B. References 11 and 12 disclose polymorphic forms of 961. The gene was found to be present in 91% of serogroup B strains belonging to hypervirulent lineages ET-5, ET-37 and cluster A4, but was absent in all strains of lineage 3 tested. Most of the serogroup C strains tested were positive even if not belonging to hypervirulent lineages. The same was true for the serogroup B strains with serotype 2a and 2b. For serogroup A, one strain belonging to subgroup III was positive whereas the other two strains belonging to subgroup IV-1 were negative. 961 was absent in *N.gonorrhoeae* and in commensal species *N.lactamica* and *N.cinerea*.

Figures 4 and 5 show domains in protein 961.

When the anchor region (domain 9) of protein 961 is deleted ('961cL') and expressed in *E.coli*, the protein is exported in the periplasm and secreted in the supernatant of the culture.

To investigate this further, deletion mutants in the C-terminal region of 961 were constructed (961cL-Δaro, 961cLΔcc, 961aL, 961aL-Δ1, 961aL-Δ2, 961aL-Δ3) on the basis of structural features (deletions of aromatic residues in the cases of 961cLΔaro mutant, and of coiled-coil regions for the others). These were analysed for expression and secretion into the periplasm and the supernatant of the culture. In all of these deletion mutants, the protein is produced in large amount, is present in periplasmic fraction, and is released in the supernatant of the culture.

ΔG287 – cross-strain bactericidal activity

287 was cloned for five different *N.meningitidis* serogroup B strains and was manipulated to delete the N-terminus up to the end of the poly-glycine region and to introduce a C-terminal his-tag. This gave five ΔG287 proteins. These were adjuvanted with FCA and used to raise immune sera in mice, which were then tested for bactericidal activity against all five serogroup B strains and also against serogroup A and C strains. Bactericidal titres were as follows:

Protein strain	Sera tested for bactericidal activity against strain *						
	2996	BZ232	MC58	1000	394/98	F6124	BZ133
2996	16000	128	4096	4096	1024	8000	16000
BZ232	>8000	256	2048	8000	2048	16000	8000
MC58	>8000	64	>8000	8000	2048	8000	8000
1000	>8000	64	4096	8000	1024	16000	16000
394/98	>16000	128	16000	>2048	>16000	-	-

* titres against homologous strain shown in bold

WO 03/020756

PCT/IB02/03904

-21-

Refolding

To improve the levels of soluble protein for some hybrid proteins, alternative refolding protocols to those disclosed in reference 2 were adopted.

Inclusion bodies (IBs) were isolated as follows:

- 5 1. Homogenize cells (5g wet weight) in 25 ml 0.1 M Tris-HCl pH 7, 1mM EDTA, at 4°C using an ultraturrax (10 000 rpm)
2. Add 1.5mg lysozyme per gram cells, mix shortly with an ultraturrax, and incubate at 4°C for 30 min.
3. Use sonication or high-pressure homogenization (French press) to disrupt the cells.
- 10 4. To digest DNA, add MgCl₂ to a final concentration of 3mM and DNase to a final concentration of 10µg/ml, and incubate for 30 min at 25°C
5. Add 0.5 vol. 60 mM EDTA, 6% Triton X-100, 1.5M NaCl pH7, to the solution, and incubate for 30 min at 4°C.
6. Spin down inclusion bodies by centrifugation at 31000g (20 000 rpm) for 10 min, 4°C.
- 15 7. Resuspend pellet in 40 ml 0.1 M tris-HCl pH 7, 20mM EDTA, using an ultraturrax
8. Repeat centrifugation step 6.
9. The inclusion body pellet may be used, or stored frozen at -20°C.

Hybrid proteins were expressed in *E.coli* as follows:

Protein	Culture volume (litres)	Flask volume (litres)	Temp (°C)	Final OD ₆₀₀	Inclusion body yield (w/w)
ORF46.1-961-His	1	2	37	1.51	33.2%
ORF46.1-961c-His	1	2	37	1.6	28.3%
961c-ORF46.1His	1	2	37	1.18	23.5%
orf46.1-741 His	5	5	37	12.42	35.2

The pellets were solubilised, refolded, ultrafiltered, dialysed, and protein was then purified:

- 20 **ORF46.1-961-His** IBs were solubilised as follows: IB proteins were resuspended in 4 ml of 6M guanidine HCl, 1 mM EDTA pH 8.5 buffer, to a final protein concentration of 1 mg/ml. To refold the protein, 2 ml of solubilised protein was diluted in 400 ml of refolding buffer (0.1M Tris HCl, 1M L-arginine, 2mM EDTA pH 8.2) and incubated for 1 hour at 15°C, resulting in a protein concentration of 5µg/ml. Subsequently, another 2 ml of the solubilised protein was added and incubated for an
- 25 additional hour at the same temperature resulting in a final protein concentration of 10 µg/ml. The material was ultrafiltered using a 300 ml Amicon ultrafiltration cell (8400), applying a 3 bar pressure on an Amicon membrane with a 30 kDa cut-off (YM30) resulting in 130 ml final volume. The

WO 03/020756

PCT/IB02/03904

-22-

ultrafiltered material was dialysed using a regenerated cellulose tubular membrane with a 12-14 kDa cutoff (Cellusep – Step bio) for 24 hours against 10 L of 0.1M Tris HCl pH 8,2 buffer. A second dialysis of 24h against 10 L of 300mM NaCl, 50 mM sodium phosphate pH 8,0 buffer was performed. The dialysed material was centrifuged at 22000 rpm for 45 minutes at 4°C in a Beckman centrifuge rotor JA25.5. The supernatant isolated after centrifugation was used for His-tag purification.

5 **orf 46.1-961c-His** IBs were solubilised as follows: IB proteins were resuspended in 4 ml of 6M guanidine HCl, 1 mM EDTA pH 8.5 buffer, to a final protein concentration of 1 mg/ml. To refold the protein, 2 ml of the solubilised protein was diluted in 400 ml refolding buffer (0.5M Tris HCl, 1M L-arginine, 2 mM EDTA pH 8.2) and incubated for 1 h at 15°C, resulting in a protein concentration of 5 µg/ml. Subsequently another 2 ml of the solubilised protein was added and incubated for an additional hour at the same temperature resulting in a final protein concentration of 10 µg/ml. The material was ultrafiltered using a 300 ml Amicon ultrafiltration cell (8400), applying a 3 bar pressure on an Amicon membrane with a 30 kDa cut-off (YM30) resulting in 150 ml final volume. The ultrafiltered material was dialysed using a regenerated cellulose tubular membrane with a 12-14 kDa cutoff (Cellusep – Step bio) for 24h against 10 L of 0.1M Tris HCl pH 8,2 buffer. A second dialysis of 24h against 10 L of 300mM NaCl, 50 mM sodium phosphate pH 8,0 buffer was performed. The dialysed material was centrifuged at 22000 rpm for 45 minutes at 4°C in a Beckman centrifuge rotor JA25.5. The supernatant isolated after centrifugation was used for His-tag purification.

15 **orf 961c-46.1-His** IBs were solubilised as follows: IB proteins were resuspended in 4 ml of 6M guanidine HCl, 1 mM EDTA pH 8.5 buffer, to a final protein concentration of 1 mg/ml. To refold the protein, 2 ml of the solubilised protein was diluted in 400 ml refolding buffer (0.1M Tris HCl, 0.5 M L-arginine, 2 mM EDTA pH 8.2) and incubated for 1 h at 15°C, resulting in a protein concentration of 5 µg/ml. Subsequently another 2 ml of the solubilized protein was added and incubated for an additional hour at the same temperature resulting in a final protein concentration of 10 µg/ml. The material was ultrafiltered using a 300 ml Amicon ultrafiltration cell (8400), applying a 3 bar pressure on an Amicon membrane with a 30 kDa cut-off (YM30) resulting in 150 ml final volume. The ultrafiltered material was dialysed using a regenerated cellulose tubular membrane with a 12-14 kDa cutoff (Cellusep – Step bio) for 24h against 10 L of 0.1M Tris HCl pH 8,2 buffer. A second dialysis of 24h against 10 L of 300mM NaCl, 50 mM sodium phosphate pH 8,0 buffer was performed. The dialysed material was centrifuged at 22000 rpm for 45 minutes at 4°C in a Beckman centrifuge rotor JA25.5. The supernatant isolated after centrifugation was used for His-tag purification.

20 **orf 46.1-741-His** IBs were solubilised as follows: IB proteins were resuspended in 4 ml of 6M guanidine HCl, 1 mM EDTA pH 8.5 buffer, to a final protein concentration of 10 mg/ml. To refold, 2 ml of the solubilised protein was diluted in 400 ml of the refolding buffer (0.5M Tris HCl, 0.7 M L-arginine, 2 mM EDTA pH 7.2) and incubated for 1 h at 15°C, resulting in a protein concentration of

25
30
35

WO 03/020756

PCT/IB02/03904

-23-

50µg/ml. Subsequently another 2 ml of the solubilised protein was added and incubated for an additional hour at the same temperature resulting in a final protein concentration of 100µg/ml. The material was ultrafiltered using a 300 ml Amicon ultrafiltration cell (8400), applying a 3 bar pressure on an Amicon membrane with a 30 kDa cut-off (YM30) resulting in 120 ml final volume. The

- 5 ultrafiltered material was dialysed using a regenerated cellulose tubular membrane with a 12-14 kDa cutoff (Cellusep – Step bio) for 24h against 10 L of 0.1M Tris HCl pH 8,2 buffer. A second dialysis of 24h against 10 L of 300mM NaCl, 50 mM sodium phosphate pH 8,0 buffer was performed. The dialysed material was centrifuged at 22000 rpm for 45 minutes at 4°C in a Beckman centrifuge rotor JA25.5 The supernatant isolated after centrifugation was used for His-tag purification.
- 10 Compared with proteins purified as described in ref. 2, bactericidal assay titres were as follows:

Protein	Reference 2		Refolded		
	CFA	Aluminium hydroxide	Aluminium hydroxide	MF59	Aluminium phosphate
ORF46.1-961-His	8192	8192	32768	-	-
ORF46.1-961c-His	8192	128	<64	8192	-
961c-ORF46.1His	32768	1024	16384	-	-
orf46.1-741 His	<4	16	<4	256	-

Similar procedures were used for ORF46.1 to purify the protein from IBs when expressed with no His-tag ('ORF46.1K'):

Protein	Culture volume (litres)	Flask volume (litres)	Temp (°C)	Final OD ₆₀₀	Inclusion body yield (w/w)
orf46.1K	5	5	37	13.7	29.4

- IB proteins were resuspended in 4 ml of 6M guanidine HCl, 1 mM EDTA pH 8.5 buffer, to a final protein concentration of 10 mg/ml. To refold, 2 ml of the solubilised protein was diluted in 400 ml of the refolding buffer (0.5M Tris HCl, 0.7 M L-arginine, 2 mM EDTA pH 7.2) and incubated for 1
- 15 hours at 15°C, resulting in a protein concentration of 50µg/ml. Subsequently another 2 ml of the solubilised protein was added and incubated for an additional hour at the same temperature resulting in a final protein concentration of 100µg/ml. The material was ultrafiltered using a 300ml Amicon ultrafiltration cell (8400), applying a 3 bar pressure on an Amicon membrane with a 30kDa cut-off
- 20 (YM30) resulting in 120 ml final volume. The ultrafiltered material was dialysed using a regenerated cellulose tubular membrane with a 12-14 kDa cutoff (Cellusep – Step bio) for 12h against 10 L of 50mM sodium phosphate, 2mM EDTA, pH 7,2 buffer. A second dialysis of 24h against 10 L of the same buffer was performed. The dialysed material was centrifuged at 22000 rpm for 45 minutes at 4°C in a Beckman centrifuge rotor JA25.5. The supernatant isolated after centrifugation was used for
- 25 cationic exchange chromatography. The purification was done on a AKTA explorer chromatography

WO 03/020756

PCT/IB02/03904

-24-

system (Amersham-Pharmacia Biotech) using a 5 ml HiTrap SP sepharose HP column (Amersham-Pharmacia Biotech). The flow rate applied was of 1.5 ml per minute. The column was washed with 35 ml of 50mM sodium phosphate buffer pH 7.2. A linear gradient (0-1 M NaCl) was performed using a 50mM sodium phosphate buffer pH 7.2. The protein eluted in two peaks at 92 mM and 380mM NaCl. The fractions constituting each peak were pooled and respectively named pool 1 and pool 2.

Compared with proteins purified as described in ref. 2, bactericidal assay titres when adjuvanted with aluminium hydroxide were improved from <4 to 1024. The titre using aluminium phosphate adjuvant with the refolded protein was 2048. ELISA titres were as follows:

Protein	Aluminium adjuvant	Elisa (M7)	SBA (2996)
Orf46.1k (pool 1)	Hydroxide 3.3mg/ml	1212	512
	Phosphate 0.6 mg/ml	154	1024
Orf46.1k (pool 2)	Hydroxide 3.3mg/ml	1085	1024
	Phosphate 0.6 mg/ml	250	1024

10 It will be understood that the invention has been described by way of example only and modifications may be made whilst remaining within the scope and spirit of the invention.

WO 03/020756

PCT/IB02/03904

-25-

TABLE 1

Strain	1343	Sequence	Strain classification
72/00	+		ET5 B:15:P1.7,13,13a
30/00	+		ET5 B:15:P1.7,16
39/99	+		ET5 C:15:P1.7,16
95330	+		ET5 B:4:P1.15
M4102	+		ET5 nd
MC58(21)	+	+	ET5 B:15:P1.7,16b
BZ169(7)	+	+	ET5 B:NT:P1.16
BZ83(19)	+		ET5 B:15:-
CU385	+	+	ET5 B:4:P1.15
2201731	+		ET5 NG:4:P1.15
64/96	+	+	ET5 NG:15:P1.7,16 (carrier)
2201731	+		ET5 B:4:P1.15 (carrier)
ISS1071	+		nd B:15:P1.7,16 (ET5?)
BZ198(2)	+	+	lin.3 B:8:P1.1
980-2543	+	+	lin.3 B:NT:P1.4
16060	+	+	other B:4:P1.14 (carrier)
394-98	+		nd B:4:P1.4 (lin 3?)
ISS1106	+		nd B:4:P1.4 (lin.3?)
BZ133(10)	+	+	sub I B:NT:-
S3446	+	+	nd B:14:P1.23,14
ISS1001	+	+	nd B:14:P1.13
2411751	+		other NG:21:P1.16 (carrier)
1712741	+		other NG:15:- (carrier)
66/96	+		other B:17:P1.15 (carrier)
961-5945	-		A4
96217	-		A4
312294	-		A4
90/18311(24)	-		ET37
93/4286(25)	-		ET37
M986	-		ET37
1000(5)	-		other
NGE28(13)	-		other carrier
NGH38(14)	-		other carrier
BZ232(18)	-		other
F6124(23)	-		sub III A:-
C11	-		C:-
NMB	-		nd
8047	-		nd
ISS759	-		nd C:2b:P1.2
ISS1113	-		nd C:2:P1.5
65/96	-		nd 4:P1.14
2996(96)	-		nd B:2b:P1.5,2

WO 03/020756

PCT/IB02/03904

-26-

REFERENCES (the contents of which are hereby incorporated by reference)

- 1 – International patent application WO01/64920.
- 2 – International patent application WO01/64922.
- 3 – International patent application WO99/24578.
- 4 – International patent application WO99/36544.
- 5 – International patent application WO99/57280.
- 6 – International patent application WO00/22430.
- 7 – Tettelin *et al.* (2000) *Science* 287:1809-1815.
- 8 – International patent application WO00/66741.
- 9 – International patent application WO00/71574.
- 10 – International patent application WO01/04316.
- 11 – International patent application PCT/IB02/03396.
- 12 – Comanducci *et al.* (2002) *J Exp Med* 195:1445-1454.
- 13 – *Vaccine Design: subunit & adjuvant approach* (1995) Powell & Newman (ISBN: 030644867X).
- 14 – International patent application WO01/52885.
- 15 – Bjune *et al.* (1991) *Lancet* 338(8775):1093-1096.
- 16 – Fukasawa *et al.* (1999) *Vaccine* 17:2951-2958.
- 17 – Rosenqvist *et al.* (1998) *Dev. Biol. Stand.* 92:323-333.
- 18 – Costantino *et al.* (1992) *Vaccine* 10:691-698.
- 19 – Costantino *et al.* (1999) *Vaccine* 17:1251-1263.
- 20 – International patent application PCT/IB02/03191.
- 21 – Watson (2000) *Pediatr Infect Dis J* 19:331-332.
- 22 – Rubin (2000) *Pediatr Clin North Am* 47:269-285, v.
- 23 – Jedrzejewski (2001) *Microbiol Mol Biol Rev* 65:187-207.
- 24 – International patent application WO93/18150.
- 25 – International patent application WO99/53310.
- 26 – International patent application WO98/04702.
- 27 – Bell (2000) *Pediatr Infect Dis J* 19:1187-1188.
- 28 – Iwarson (1995) *APMIS* 103:321-326.
- 29 – Gerlich *et al.* (1990) *Vaccine* 8 Suppl:S63-68 & 79-80.
- 30 – Hsu *et al.* (1999) *Clin Liver Dis* 3:901-915.
- 31 – Gustafsson *et al.* (1996) *N. Engl. J. Med.* 334:349-355.
- 32 – Rappuoli *et al.* (1991) *TIBTECH* 9:232-238.
- 33 – *Vaccines* (1988) eds. Plotkin & Mortimer. ISBN 0-7216-1946-0.
- 34 – Del Giudice *et al.* (1998) *Molecular Aspects of Medicine* 19:1-70.
- 35 – International patent application WO02/02606.
- 36 – Kalman *et al.* (1999) *Nature Genetics* 21:385-389.
- 37 – Read *et al.* (2000) *Nucleic Acids Res* 28:1397-406.
- 38 – Shirai *et al.* (2000) *J. Infect. Dis.* 181(Suppl 3):S524-S527.
- 39 – International patent application WO99/27105.
- 40 – International patent application WO00/27994.
- 41 – International patent application WO00/37494.
- 42 – International patent application WO99/28475.
- 43 – Ross *et al.* (2001) *Vaccine* 19:4135-4142.
- 44 – Sutter *et al.* (2000) *Pediatr Clin North Am* 47:287-308.
- 45 – Zimmerman & Spann (1999) *Am Fam Physician* 59:113-118, 125-126.

WO 03/020756

PCT/IB02/03904

-27-

- 46 – Dreesen (1997) *Vaccine* 15 Suppl:S2-6.
- 47 – *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1998 Jan 16;47(1):12, 19.
- 48 – McMichael (2000) *Vaccine* 19 Suppl 1:S101-107.
- 49 – Schuchat (1999) *Lancet* 353(9146):51-6.
- 50 – WO02/34771.
- 51 – Dale (1999) *Infect Dis Clin North Am* 13:227-43, viii.
- 52 – Ferretti *et al.* (2001) *PNAS USA* 98: 4658-4663.
- 53 – Kuroda *et al.* (2001) *Lancet* 357(9264):1225-1240; see also pages 1218-1219.
- 54 – Ramsay *et al.* (2001) *Lancet* 357(9251):195-196.
- 55 – Lindberg (1999) *Vaccine* 17 Suppl 2:S28-36.
- 56 – Buttery & Moxon (2000) *J R Coll Physicians Lond* 34:163-168.
- 57 – Ahmad & Chapnick (1999) *Infect Dis Clin North Am* 13:113-133, vii.
- 58 – Goldblatt (1998) *J. Med. Microbiol.* 47:563-567.
- 59 – European patent 0 477 508.
- 60 – US patent 5,306,492.
- 61 – International patent application WO98/42721.
- 62 – *Conjugate Vaccines* (eds. Cruse *et al.*) ISBN 3805549326, particularly vol. 10:48-114.
- 63 – Hermanson (1996) *Bioconjugate Techniques* ISBN: 0123423368 or 012342335X.
- 64 – European patent application 0372501.
- 65 – European patent application 0378881.
- 66 – European patent application 0427347.
- 67 – International patent application WO93/17712.
- 68 – International patent application WO98/58668.
- 69 – European patent application 0471177.
- 70 – International patent application WO00/56360.
- 71 – International patent application WO00/61761.
- 72 – Robinson & Torres (1997) *Seminars in Immunology* 9:271-283.
- 73 – Donnelly *et al.* (1997) *Annu Rev Immunol* 15:617-648.
- 74 – Scott-Taylor & Dalgleish (2000) *Expert Opin Investig Drugs* 9:471-480.
- 75 – Apostolopoulos & Plebanski (2000) *Curr Opin Mol Ther* 2:441-447.
- 76 – Ilan (1999) *Curr Opin Mol Ther* 1:116-120.
- 77 – Dubensky *et al.* (2000) *Mol Med* 6:723-732.
- 78 – Robinson & Pertmer (2000) *Adv Virus Res* 55:1-74.
- 79 – Donnelly *et al.* (2000) *Am J Respir Crit Care Med* 162(4 Pt 2):S190-193.
- 80 – Davis (1999) *Mr. Sinai J. Med.* 66:84-90.
- 81 – Parkhill *et al.* (2000) *Nature* 404:502-506.

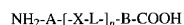
WO 03/020756

PCT/IB02/03904

-28-

CLAIMS

1. A hybrid protein having formula:



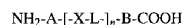
wherein L is an optional linker amino acid sequence, A is an optional N-terminal amino acid sequence, B is an optional C-terminal amino acid sequence, and n is an integer greater than 1, and X is either:

(a) an orf1, orf4, orf25, orf40, orf46.1, orf83, NMB1343, 230, 233, 287, 292, 594, 687, 736, 741, 907, 919, 936, 953, 961 or 983 amino acid sequence;

(b) an amino acid sequence having sequence identity to an amino acid sequence from (a); or

(c) an amino acid sequence comprising a fragment of an amino acid sequence from (a).

2. A hybrid protein having formula:



wherein X is an amino acid sequence, L is an optional linker amino acid sequence, A is an optional N-terminal amino acid sequence, B is an optional C-terminal amino acid sequence, n is an integer greater than 1, and wherein a first X moiety ($\text{-X}_a\text{-}$) has one of the following amino acid sequences:

(d) the 446 even SEQ IDs (i.e. 2, 4, 6, ..., 890, 892) disclosed in reference 3.

(e) the 45 even SEQ IDs (i.e. 2, 4, 6, ..., 88, 90) disclosed in reference 4;

(f) the 1674 even SEQ IDs 2-3020, even SEQ IDs 3040-3114, and all SEQ IDs 3115-3241, disclosed in reference 5;

(g) the 2160 amino acid sequences NMB0001 to NMB2160 from reference 7; or

(h) an amino acid sequence disclosed in reference 1 or reference 2,

and a second $\text{-X}_b\text{-}$ moiety ($\text{-X}_b\text{-}$), wherein $\text{-X}_b\text{-}$ has sequence identity to $\text{-X}_a\text{-}$ and/or $\text{-X}_b\text{-}$ comprises a fragment of $\text{-X}_a\text{-}$.

3. The hybrid protein of claim 1 or claim 2, wherein $n=2$.
4. The hybrid protein of claim 2, wherein $\text{-X}_a\text{-}$ is an orf46.1, 230, 287, 741, 919, 936, 953, 961 or 983 amino acid sequence.
5. The hybrid protein of claim 2, wherein X_1, \dots, X_n all have sequence identity to each other.
6. The hybrid protein of any preceding claim, wherein $n=2$, and wherein the -X- moieties are:

ΔG287 and 230; ΔG287 and 936; ΔG287 and 741; 961c and 287; 961c and 230; 961c and 936;

WO 03/020756

PCT/IB02/03904

-29-

- 961cL and 287; 961cL and 230; 961cL and 936; ORF46.1 and 936; ORF46.1 and 230; 230 and 961; 230 and 741; 936 and 961; 936 and 741; Δ G741 and 741; or Δ G287 and 287.
7. The hybrid protein of any preceding claim, wherein L has 20 or fewer amino acids.
8. The hybrid protein of any preceding claim, wherein L is a poly-glycine linker.
- 5 9. The hybrid protein of any preceding claim, wherein A has 40 or fewer amino acids.
10. The hybrid protein of any preceding claim, wherein B has 40 or fewer amino acids.
11. The hybrid protein of any preceding claim, wherein the -X- moieties have an amino acid sequence found in *N.meningitidis* serogroup B.
12. The hybrid protein of any preceding claim, wherein at least one -X- moiety is a 961 amino acid sequence in which one or more domains has been deleted.
- 10 13. A protein comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ IDs 1 to 38.
14. Nucleic acid encoding a protein of any preceding claim.
15. A composition comprising protein or nucleic acid according to any preceding claim.
- 15 16. A composition comprising two or more of the following proteins:
- (1) 287
 - (2) 741
 - (3) ORF46.1
 - (4) 961
- 20 (5) $\text{NH}_2\text{-A-}[-\text{X-L}]_n\text{-B-COOH}$, wherein $n=2$, $X_1=287$, $X_2=953$
- (6) $\text{NH}_2\text{-A-}[-\text{X-L}]_n\text{-B-COOH}$, wherein $n=2$, $X_1=287$, $X_2=919$
- (7) $\text{NH}_2\text{-A-}[-\text{X-L}]_n\text{-B-COOH}$, wherein $n=2$, $X_1=287$, $X_2=961$
- (8) $\text{NH}_2\text{-A-}[-\text{X-L}]_n\text{-B-COOH}$, wherein $n=2$, $X_1=287$, $X_2=741$
- (9) $\text{NH}_2\text{-A-}[-\text{X-L}]_n\text{-B-COOH}$, wherein $n=2$, $X_1=936$, $X_2=741$
- 25 17. The composition of claim 16, comprising proteins (4), (5) and (9).
18. The composition of claim 17, wherein protein (4) comprises SEQ ID 31, protein (5) comprises SEQ ID 28 or SEQ ID 29, and protein (9) comprises SEQ ID 30.
19. The composition of any one of claims 15 to 18, further comprising:
- 30 - a protein antigen from *N.meningitidis*;
- an outer-membrane vesicle (OMV) preparation from *N.meningitidis*;
- a saccharide antigen from *N.meningitidis*;
- a saccharide antigen from *Streptococcus pneumoniae*;

WO 03/020756

PCT/IB02/03904

-30-

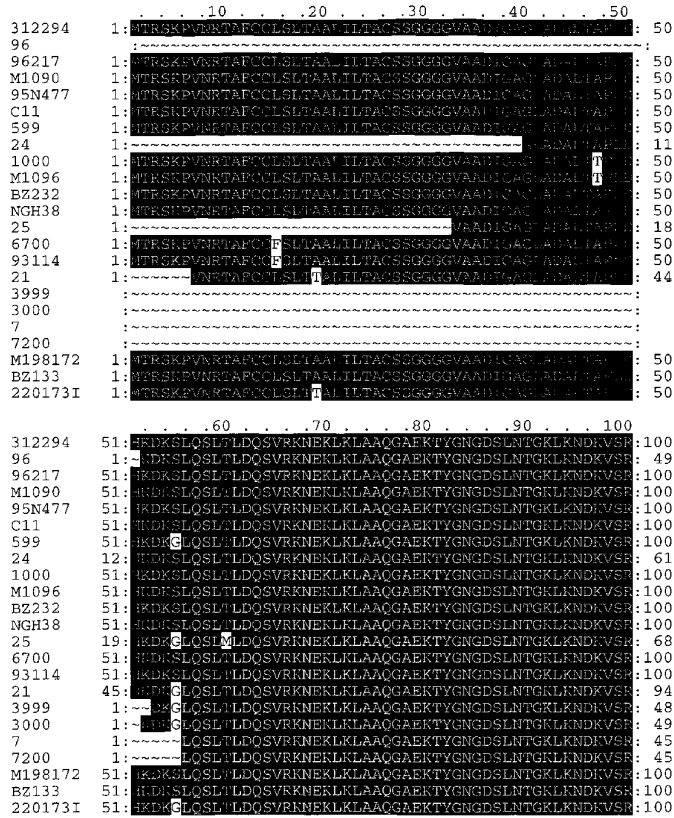
- an antigen from hepatitis A, B or C virus;
 - an antigen from *Bordetella pertussis*;
 - a diphtheria antigen;
 - a tetanus antigen;
 - 5 - a protein antigen from *Helicobacter pylori*;
 - a saccharide antigen from *Haemophilus influenzae*;
 - an antigen from *N. gonorrhoeae*;
 - an antigen from *Chlamydia pneumoniae*;
 - an antigen from *Chlamydia trachomatis*;
 - 10 - an antigen from *Porphyromonas gingivalis*;
 - polio antigen(s);
 - rabies antigen(s);
 - measles, mumps and/or rubella antigens;
 - influenza antigen(s);
 - 15 - an antigen from *Moraxella catarrhalis*;
 - an antigen from *Streptococcus agalactiae*;
 - an antigen from *Streptococcus pyogenes*; and/or
 - an antigen from *Staphylococcus aureus*.
20. The composition of any one of claims 15 to 19, further comprising a pharmaceutically acceptable
20 carrier.
21. The composition of claim 20 for use as a medicament.
22. A method of treating a patient, comprising administering to the patient a therapeutically effective
amount of the composition of claim 20.

WO 03/020756

PCT/IB02/03904

1/7

FIGURE 1



WO 03/020756

PCT/IB02/03904

2/7

FIGURE 1 CONTD...

```

110 . . . . 120 . . . . 130 . . . . 140 . . . . 150
312294 101: P D F I R Q I E V D G Q L I T L E S G E F Q I Y K O D H S A V V A L Q T E K N N D R I D S L I N : 150
96      50: P D F I R Q I E V D G Q L I T L E S G E F Q I Y K O D H S A V V A L Q T E K N N D R I D S L I N : 99
96217 101: P D F I R Q I E V D G Q L I T L E S G E F Q I Y K O D H S A V V A L Q T E K N N D R I D S L I N : 150
M1090 101: P D F I R Q I E V D G Q L I T L E S G E F Q I Y K O D H S A V V A L Q T E K N N D R I D S L I N : 150
95N477 101: P D F I R Q I E V D G Q L I T L E S G E F Q I Y K O D H S A V V A L Q T E K N N D R I D S L I N : 150
C11    101: P D F I R Q I E V D G Q L I T L E S G E F Q I Y K O D H S A V V A L Q T E K N N D R I D S L I N : 150
599    101: P D F I R Q I E V D G Q L I T L E S G E F Q I Y K O D H S A V V A L Q T E K N N D R I D S L I N : 150
24     62: P D F I R Q I E V D G Q L I T L E S G E F Q I Y K O D H S A V V A L Q T E K N N D R I D S L I N : 111
1000   101: P D F I R Q I E V D G Q I T T L A S G E F Q I Y K O N H S A V V A L Q T E K N N D R I D S L I N : 150
M1096 101: P D F I R Q I E V D G Q I T T L A S G E F Q I Y K O N H S A V V A L Q T E K N N D R I D S L I N : 150
BZ232 101: P D F I R Q I E V D G Q I T T L A S G E F Q I Y K O N H S A V V A L Q T E K N N D R I D S L I N : 150
NGH38 101: P D F I R Q I E V D G Q I T T L A S G E F Q I Y K O N H S A V V A L Q T E K N N D R I D S L I N : 150
25     69: P D F I R Q I E V D G Q I T T L A S G E F Q I Y K O N H S A V V A L Q T E K N N D R I D S L I N : 118
6700   101: P D F I R Q I E V D G Q I T T L A S G E F Q V Y K O S H S A L T A L Q T E Q C D E H S G R K W A : 150
93114 101: P D F I R Q I E V D G Q I T T L A S G E F Q V Y K O S H S A L T A L Q T E Q C D E H S G R K W A : 150
21     95: P D F I R Q I E V D G Q I T T L A S G E F Q V Y K O S H S A L T A L Q T E Q C D E H S G R K W A : 144
3999   49: P D F I R Q I E V D G Q I T T L A S G E F Q V Y K O S H S A L T A L Q T E Q C D E H S G R K W A : 98
3000   50: P D F I R Q I E V D G Q I T T L A S G E F Q V Y K O S H S A L T A L Q T E Q C D E H S G R K W A : 99
7      46: P D F I R Q I E V D G Q I T T L A S G E F Q V Y K O S H S A L T A L Q T E Q C D E H S G R K W A : 95
7200   46: P D F I R Q I E V D G Q I T T L A S G E F Q V Y K O S H S A L T A L Q T E Q C D E H S G R K W A : 95
M198172 101: P D F I R Q I E V D G Q I T T L A S G E F Q V Y K O S H S A L T A L Q T E Q C D E H S G R K W A : 150
BZ133 101: P D F I R Q I E V D G Q I T T L A S G E F Q V Y K O S H S A L T A L Q T E Q C D E H S G R K W A : 150
220173I 101: P D F I R Q I E V D G Q I T T L A S G E F Q V Y K O S H S A L T A L Q T E Q C D E H S G R K W A : 150

160 . . . . 170 . . . . 180 . . . . 190 . . . . 200
312294 151: Q S L V S G L G G E H T A F N Q L E S K R E Y H G K R A F S S D D G G N L Y I D F A A R : 199
96     100: Q S L V S G L G G E H T A F N Q L E S K R E Y H G K R A F S S D D G G N L Y I D F A A R : 148
96217 151: Q S L V S G L G G E H T A F N Q L E S K R E Y H G K R A F S S D D G G N L Y I D F A A R : 199
M1090 151: Q S L V S G L G G E H T A F N Q L E S K R E Y H G K R A F S S D D G G N L Y I D F A A R : 199
95N477 151: Q S L V S G L G G E H T A F N Q L E S K R E Y H G K R A F S S D D G G N L Y I D F A A R : 199
C11    151: Q S L V S G L G G E H T A F N Q L E S K R E Y H G K R A F S S D D P N R L H Y S I D F T K R : 199
599    151: Q S L V S G L G G E H T A F N Q L E S K R E Y H G K R A F S S D D P N R L H Y S I D F T K R : 199
24     112: Q S L V S G L G G E H T A F N Q L E S K R E Y H G K R A F S S D D P N R L H Y S I D F T K R : 160
1000   151: Q S L V S G L G G E H T A F N Q L E S K R E Y H G K R A F S S D D P N R L H Y S I D F T K R : 199
M1096 151: Q S L V S G L G G E H T A F N Q L E S K R E Y H G K R A F S S D D P N R L H Y S I D F T K R : 199
BZ232 151: Q S L V S G L G G E H T A F N Q L E S K R E Y H G K R A F S S D D P N R L H Y S I D F T K R : 199
NGH38 151: Q S L V S G L G G E H T A F N Q L E S K R E Y H G K R A F S S D D P N R L H Y S I D F T K R : 199
25     119: Q S L V S G L G G E H T A F N Q L E S K R E Y H G K R A F S S D D P N R L H Y S I D F T K R : 167
6700   151: K R R K R I G D I A G E H T S E D K L E K D V M A T Y R G T A F G S D D G G N L Y I D F A A R : 200
93114 151: K R R K R I G D I A G E H T S E D K L E K D V M A T Y R G T A F G S D D G G N L Y I D F A A R : 200
21     145: K R Q R R I G D I A G E H T S E D K L E Y G R A T Y R G T A F G S D D G G N L Y I D F A A R : 194
3999   99: K R Q R R I G D I A G E H T S E D K L E Y G R A T Y R G T A F G S D D G G N L Y I D F A A R : 148
3000   100: K R Q R R I G D I A G E H T S E D K L E Y G R A T Y R G T A F G S D D G G L L Y I D F A A R : 149
7      96: K R Q R R I G D I A G E H T S E D K L E Y G R A T Y R G T A F G S D D G G L L Y I D F A A R : 145
7200   96: K R Q R R I G D I A G E H T S E D K L E Y G R A T Y R G T A F G S D D G G L L Y I D F A A R : 145
M198172 151: K R Q R R I G D I A G E H T S E D K L E Y G R A T Y R G T A F G S D D G G N L Y I D F A A R : 200
BZ133 151: K R Q R R I G D I A G E H T S E D K L E Y G R A T Y R G T A F G S D D G G L L Y I D F A A R : 200
220173I 151: K R Q R R I G D I A G E H T S E D K L E Y G R A T Y R G T A F G S D D G G L L Y I D F A A R : 200

```

WO 03/020756

PCT/IB02/03904

3/7

FIGURE 1 CONTD...

```

                210      220      230      240      250
312294 200: QGHSKTEHLKDPPEQNVLLAA ELKADFRSHAVLLSDTRGGSEKGTWHLA:249
96      149: QGHSKTEHLKDPPEQNVLLAA ELKADFRSHAVLLSDTRGGSEKGTWHLA:198
96217 200: QGHSKTEHLKDPPEQNVLLAA ELKADFRSHAVLLSDTRGGSEKGTWHLA:249
M1090 200: QGHSKTEHLKDPPEQNVLLAS ELKADFRSHAVLLSDTRGGSEKGTWHLA:249
95N477 200: QGYRTEHLKDPPEQNVLLAS ELKADFRSHAVLLSDTRGGSEKGTWHLA:249
C11    200: QGYRTEHLKDPPEQNVLLAS ELKADFRSHAVLLSDTRGGSEKGTWHLA:249
599    200: QGYRTEHLKDPPEQNVLLAS ELKADFRSHAVLLSDTRGGSEKGTWHLA:249
24     161: QGYRTEHLKDPPEQNVLLAS ELKADFRSHAVLLSDTRGGSEKGTWHLA:210
1000   200: QGYRTEHLKDPPEQNVLLAS ELKADFRSHAVLLSDTRGGSEKGTWHLA:249
M1096 200: QGYRTEHLKDPPEQNVLLAS ELKADFRSHAVLLSDTRGGSEKGTWHLA:249
BZ232 200: QGYRTEHLKDPPEQNVLLAS ELKADFRSHAVLLSDTRGGSEKGTWHLA:249
NGH38 200: QGYRTEHLKDPPEQNVLLAS ELKADFRSHAVLLSDTRGGSEKGTWHLA:249
25     168: QGYRTEHLKDPPEQNVLLAS ELKADFRSHAVLLSDTRGGSEKGTWHLA:217
6700   201: QGHSKTEHLKSPFLAVFLATVETPFRHHAVLSSVLTNQAEKGSISG:250
93114 201: QGHSKTEHLKSPFLAVFLATVETPFRHHAVLSSVLTNQAEKGSISG:250
21     195: QGHSKTEHLKSPFLAVDLAA DITPFCRRHAVLSSVLTNQAEKGSISG:244
3999   149: QGHSKTEHLKSPFLAVDLAA DITPFCRRHAVLSSVLTNQAEKGSISG:198
3000   150: QGHSKTEHLKSPFLAVDLAA DITPFCRRHAVLSSVLTNQAEKGSISG:199
7       146: QGHSKTEHLKSPFLAVDLAA DITPFCRRHAVLSSVLTNQAEKGSISG:195
7200   146: QGHSKTEHLKSPFLAVDLAA DITPFCRRHAVLSSVLTNQAEKGSISG:195
M198172 201: QGHSKTEHLKSPFLAVDLAASDITPFCRRHAVLSSVLTNQAEKGSISG:250
BZ133  201: QGHSKTEHLKSPFLAVDLAASDITPFCRRHAVLSSVLTNQAEKGSISG:250
220173I 201: QGHSKTEHLKSPFLAVDLAASDITPFCRRHAVLSSVLTNQAEKGSISG:250

                260      270      280
312294 250: LFGDRAQETAGSATITGERVETITGCT:279
96      199: LFGDRAQETAGSATITGERVETITGCT:212
96217 250: LFGDRAQETAGSATITGERVETITGCT:279
M1090 250: LFGDRAQETAGSATITGERVETITGCT:279
95N477 250: LFGDRAQETAGSATITGERVETITGCT:279
C11    250: LFGDRAQETAGSATITGERVETITGCT:279
599    250: LFGDRAQETAGSATITGERVETITGCT:279
24     211: LFGDRAQETAGSATITGERVETITGCT:234
1000   250: LFGDRAQETAGSATITGERVETITGCT:279
M1096 250: LFGDRAQETAGSATITGERVETITGCT:279
BZ232 250: LFGDRAQETAGSATITGERVETITGCT:279
NGH38 250: LFGDRAQETAGSATITGERVETITGCT:279
25     218: LFGDRAQETAGSATITGERVETITGCT:247
6700   251: LFGGQAVVAGGAEETANGIRHLLAA:280
93114 251: LFGGQAVVAGGAEETANGIRHLLAA:280
21     245: LFGGKAVVAGGAEETVNGIRHLLAA:274
3999   199: LFGGKAVVAGGAEETVNGIRHLLAA:228
3000   200: LFGGKAVVAGGAEETVNGIRHLLAA:229
7       196: LFGGKAVVAGGAEETVNGIRHLLAA:225
7200   196: LFGGKAVVAGGAEETVNGIRHLLAA:225
M198172 251: LFGGQAVVAGGAEETANGIRHLLAA:280
BZ133  251: LFGGQAVVAGGAEETANGIRHLLAA:280
220173I 251: LFGGKAVVAGGAEETVNGIRHLLAA:256

```

WO 03/020756

PCT/IB02/03904

4/7

FIGURE 2

```

      10      20      30      40      50      60      70
TCCGCGCATTACCTTATAAAATAAAACATCCCTCTCAAGCAGTCTGATATGTTGGATTGCTTGAGATTGATGAG
.....
TCCGCGCATTACCTTATAAAATAAAACATCCCTCTCAAGCAGTCTGATATGTTGGATTGCTTGAGATTGATGAG
.....
      80      90      100     110     120     130     140     150
TGATGGTGTAAATTCAAACTTAAATTAATACTTATGGGAAATTCCTTATTTATATAGAGGCATTAGTTGCCAAC
.....
TAAATGGTGTAAATTCAAACTTAAATTAATACTTATGGGAAATTCCTA----TATAGAGGCATTAGTTGCCAAC

      160     170     180     190     200     210     220     230
AAGATGAGCAAAATAATGGACAGTTAAAACCTAAAGGTAATAAAGCTGAAGTGCATTCGTTATGATGGTAAGTTT
.....
AAGATGAGCAAAATAATGGACAGTTAAAACCTAAAGGTAATAAAGCTGAAGTGCATTCGTTATGATGGTAAGTTT

      240     250     260     270     280     290     300
AAATATGATGGTAAAGCTACACATGGTCCAGTGTGAAGAATGCAGTTTACGCCCATCAAATGAAACAGATCTATA
.....
AAATATGATGGTAAAGCTACACATGGTCCAGTGTGAAGAATGCAGTTTACGCCCATCAAATGAAACAGATCTATA

      310     320     330     340     350     360     370     380
TGACGGATGTTATATATCTACGACAAACAGCAAGGAAATGGCCAAAGAAATTTGCAACAAGCTCCGGCATCGAAAATG
.....
TGACGGATGTTATATATCTACGACAAACAGCAAGGAAATGGCCAAAGAAATTTGCAACAAGCTCCGGCATCGAAAATG

      390     400     410     420     430     440     450     460
GCTATATATATGTTTTAAATAGAGATTTGTTGGTCAATATCTATTTTGAATATGAGGTGAACATCCAGAAAAC
.....
GCTATATATATGTTTTAAATAGAGATTTGTTGGTCAATATCTATTTTGAATATGAGGTGAACATCCAGAAAAC

      470     480     490     500     510     520     530
CCAGATGAGAAAGGAGTAAACAATCAGAGCTGAAGATTGTGGCTGTATCCCTGAAGAGTGAATTAATGCTTAAGAGTT
.....
CCAAATGAGAAAGGAGTAAACAATCAGAGCTGAAGATTGTGGCTGTATCCCTGAAGAGTGAATTAATGCTTAAGAGTT

      540     550     560     570     580     590     600     610
GATAGAAATTAACCTAAGTTGAAAGGTCATATAAATGGCTTTAGTTGAATGAAAGTGCCCGACATTTGGCGGACACGA
.....
GATAGAAATTAACCTAAGTTGAAAGGTCATATAAATGGCTTTAGTTGAATGAAAGTGCCCGACATTTGGCGGACACGA

      620     630
AAATGTAGATATTATCCG
.....
AAATGTAGATATTATCCG

```

WO 03/020756

PCT/IB02/03904

5/7

FIGURE 3

ΔG287-919-His	961c-741 _{MC58} -His	Orf46.1-287-His
ΔG287-Orf46.1-His	961c-983-His	Orf46.1-919-His
ΔG287-953-His	961c-Orf46.1-His	Orf46.1-741 _{MC58} -His
ΔG287-961-His	961cL-741 _{MC58}	Orf46.1-961-His
ΔG287-230-His	961cL-287	Orf46.1-961c-His
ΔG287-936-His	961c-230-His	Orf46.1-983-His
ΔG287-287-His	961c-936-His	Orf46.1-936-His
ΔG287-287 _{nz} -His		Orf46.1-230-His
ΔG287-741 _{MC58} -His		230-741 _{MC58} -His
ΔG287-741 _{ET37} -His		230-Orf46.1-His
		230-961-His
ΔG287 _{nz} -919-His	ΔG741 _{MC58} -961c-His	230-961c-His
ΔG287 _{nz} -953-His	ΔG741 _{MC58} -961-His	936-741 _{MC58} -His
ΔG287 _{nz} -961-His	ΔG741 _{MC58} -983-His	936-Orf46.1-His
ΔG287 _{nz} -287-His	ΔG741 _{MC58} -Orf46.1-His	936-961-His
ΔG287 _{nz} -287 _{nz} -His	ΔG741 _{MC58} -741 _{MC58} -His	936-741 _{ET37} -His
ΔG287 _{nz} -741 _{MC58} -His	ΔG741 _{MC58} -741 _{ET37} -His	
		ΔG983-741 _{MC58} -His
ΔG287-919-Orf46.1-His		ΔG983-961c-His
ΔG287-Orf46.1-919-His	919-287	ΔG983-961-His
919-287-Orf46-His	953-287	ΔG983-Orf46.1-His
Orf46.1-287-919-His	919-Orf46.1-His	

FIGURE 4

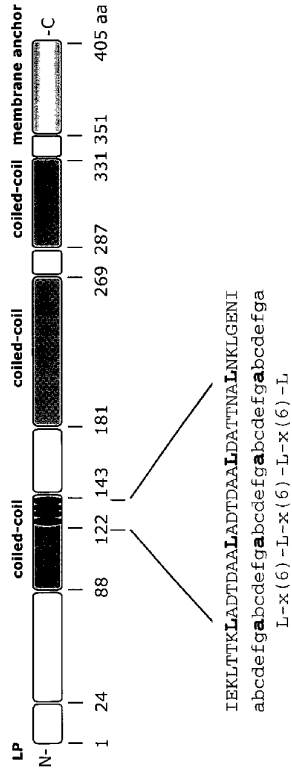
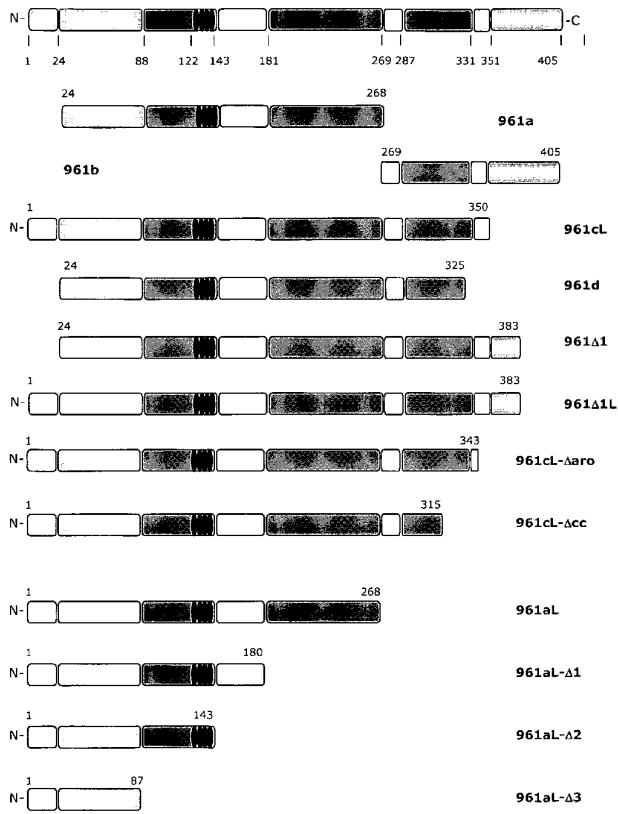


FIGURE 5



WO 03/020756

PCT/IB02/03904

1

SEQUENCE LISTING

SEQ ID 1 – 741 from strain 1000

MTRSKPVNRTAFCCLSLTAALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTPPLDHDKSLQSLTLDQSVRKNK
 LKLAQAQGAEKTYNGDLSLNTGKLNKDKVSRDFIRQIEVDGQITLLESGEFQIYKQNHSAVVALQIEKIN
 5 NPKIDSLINQSFVLSGLGGEHTAFNQLPDGKAIEYHGKAFSSDDPNGLRHSIDFTKKQGYGRIEHLKT
 PEQNVELASAEKKADEKSHAVILGDTTRYGGEKGTVHLALFGDRAQEIAGSATVKIREKVHEIGIAGKQ

SEQ ID 2 – 741 from strain 2201731 (premature stop codon, though reliable sequence)

MTRSKPVNRTAFCCLSLTAALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTPPLDHDKSLQSLTLDQSVRKNK
 LKLAQAQGAEKTYNGDLSLNTGKLNKDKVSRDFIRQIEVDGQITLLESGEFQIYKQNHSAVVALQIEKIN
 10 DSEHSGKMKVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPEGGRATYRGTAFGSDDAGGKLTYYTIDFAAQKQNGKIEHLK
 SPELVNVDLAAADIKPDGKRRAVIGSVLYNQAEKGSYSLGIFGGKA

SEQ ID 3 – 741 from strain 90/18311 (incomplete)

GLADALTAPLDHDKSLQSLTLDQSVRKNKELKLAQAQGAEKTYNGDLSLNTGKLNKDKVSRDFIRQIEV
 DGQITLLESGEFQIYKQNHSAVVALQIEKINNDKIDSLINQSFVLSGLGGEHTAFNQLPSGKAIEYHGK
 15 AFSSDDPNGLRHSIDFTKKQGYGRIEHLKTPEQNVELASAEKKADEKSHAVILGDTTRYGGEKGTVHLA
 LFGDRAQEIAGSATVKIREKVHET

SEQ ID 4 – 741 from strain 193/4286 (incomplete)

VAADIGAGLADALTPPLDHDKSLQSLMLDQSVRKNKELKLAQAQGAEKTYNGDLSLNTGKLNKDKVSRDF
 FIRQIEVDGQITLLESGEFQIYKQNHSAVVALQIEKINNDKIDSLINQSFVLSGLGGEHTAFNQLPDG
 20 KAEYHGKAFSSDDPNGLRHSIDFTKKQGYGRIEHLKTPEQNVELASAEKKADEKSHAVILGDTTRYGGE
 KGTVHLALFGDRAQEIAGSATVKIREKVHEIGIAGKQ

SEQ ID 5 – 741 from strain 2996

MTRSKPVNRTAFCCLSLTAALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTPPLDHDKSLQSLTLDQSVRKNK
 LKLAQAQGAEKTYNGDLSLNTGKLNKDKVSRDFIRQIEVDGQITLLESGEFQIYKQNHSAVVALQIEKIN
 25 NPKIDSLINQSFVLSGLGGEHTAFNQLPDGKAIEYHGKAFSSDDAGGKLTYYTIDFAAQKQCHGKIEHLKT
 PEQNVELAAAEKKADEKSHAVILGDTTRYGSEKGTVHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ

SEQ ID 6 – 741 from strain 30/00

KDKGLQSLTLDQSVRKNKELKLAQAQGAEKTYNGDLSLNTGKLNKDKVSRDFIRQIEVDGQITLLESGEF
 QVYKQSHSALTAFTQIEQDSEHSGKMKVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPEGGRATYRGTAFGSDDAGGK
 30 TYTIDFAAQKQNGKIEHLKSPPELVNVDLAAADIKPDGKRRAVIGSVLYNQAEKGSYSLGIFGGKAQEVAG
 SAEVKTNGIRHIGLAAKQ

SEQ ID 7 – 741 from strain 312294

MTRSKPVNRTAFCCLSLTAALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTPPLDHDKSLQSLTLDQSVRKNK
 LKLAQAQGAEKTYNGDLSLNTGKLNKDKVSRDFIRQIEVDGQITLLESGEFQIYKQNHSAVVALQIEKIN
 35 NPKIDSLINQSFVLSGLGGEHTAFNQLPDGKAIEYHGKAFSSDDAGGKLTYYTIDFAAQKQCHGKIEHLKT
 PEQNVELAAAEKKADEKSHAVILGDTTRYGSEKGTVHLALFGDRAQEIAGSATVKIGEKVHEIGIAGKQ

SEQ ID 8 – 741 from strain 39/99 (incomplete)

DKGLQSLTLDQSVRKNKELKLAQAQGAEKTYNGDLSLNTGKLNKDKVSRDFIRQIEVDGQITLLESGEFQ
 VYKQSHSALTAFTQIEQDSEHSGKMKVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPEGGRATYRGTAFGSDDAGGKLT
 40 TYTIDFAAQKQNGKIEHLKSPPELVNVDLAAADIKPDGKRRAVIGSVLYNQAEKGSYSLGIFGGKAQEVAGS
 AEVKTNGIRHIGLAAKQ

SEQ ID 9 – 741 from strain 5/99

MTRSKPVNRTAFCCLSLTAALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTPPLDHDKSLQSLTLDQSVRKNK
 LKLAQAQGAEKTYNGDLSLNTGKLNKDKVSRDFIRQIEVDGQITLLESGEFQIYKQNHSAVVALQIEKIN
 45 NPKIDSLINQSFVLSGLGGEHTAFNQLPSGKAIEYHGKAFSSDDPNGLRHSIDFTKKQGYGRIEHLKT
 PEQNVELASAEKKADEKSHAVILGDTTRYGGEKGTVHLALFGDRAQEIAGSATVKIREKVHEIGIAGKQ

WO 03/020756

PCT/IB02/03904

SEQ ID 10 - 741 from strain 67/00

MTRSKPVNRTAFCCPSLTAALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEK
LKLAQAQGAERTYNGDLSLNTGKLNKDKVSRFDIRQIEVDGQLITLESSEFQVYKQSHSALTALQTEQEQ
DPEHSGKMVAKRFRIGDIAGEHTSFDKLPKDVMTYRGTAFGSDDAGGKLYTIDFAAKQGHGKIEHLK
5 SPELNVELATAYIKPDEKHHAVISGSVLYNQDEKGSYSLGIFGGQAQEVAGSAEVEVTANGIHHIGLAAKQ

SEQ ID 11 - 741 from strain BZ169

LQSLTLDQSVRKNEKLLKLAQAQGAERTYNGDLSLNTGKLNKDKVSRFDIRQIEVDGQLITLESSEFQVYK
QSHSALTAFQTEQIQDSEHSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPPEGGRATYRGTAFGSDDAGGKLYTID
10 DFAAKQGNKIEHLKSPELNVDLAAADIKPDGKRHAVISGSVLYNQAEKGSYSLGIFGGQAQEVAGSAEVE
KTVNGIRHIGLAAKQ

SEQ ID 12 - 741 from strain 72/00

LQSLTLDQSVRKNEKLLKLAQAQGAERTYNGDLSLNTGKLNKDKVSRFDIRQIEVDGQLITLESSEFQVYK
QSHSALTAFQTEQIQDSEHSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPPEGGRATYRGTAFGSDDAGGKLYTID
15 DFAAKQGNKIEHLKSPELNVDLAAADIKPDGKRHAVISGSVLYNQAEKGSYSLGIFGGQAQEVAGSAEVE
KTVNGIRHIGLAAKQ

SEQ ID 13 - 741 from strain 93/114

MTRSKPVNRTAFCCPSLTAALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEK
LKLAQAQGAERTYNGDLSLNTGKLNKDKVSRFDIRQIEVDGQLITLESSEFQVYKQSHSALTALQTEQEQ
20 DPEHSGKMVAKRFRIGDIAGEHTSFDKLPKDVMTYRGTAFGSDDAGGKLYTIDFAAKQGHGKIEHLK
SPELNVELATAYIKPDEKHHAVISGSVLYNQDEKGSYSLGIFGGQAQEVAGSAEVEVTANGIHHIGLAAKQ

SEQ ID 14 - 741 from strain 95N477

MTRSKPVNRTAFCCPSLTAALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEK
LKLAQAQGAERTYNGDLSLNTGKLNKDKVSRFDIRQIEVDGQLITLESSEFQVYKQSHSALTALQTEQEQ
25 NPKIDSLINQSRFLVSLGGGEHTAFNQLPSGKAEYHGKAFSSDDPNGLRHYSIDFTKKQGYGRIEHLKT
PEQNVELASAEKKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTIHLALFGDRAQEIAGSATVKIREKVHEIGTAGKQ

SEQ ID 15 - 741 from strain 96217

MTRSKPVNRTAFCCPSLTAALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEK
LKLAQAQGAERTYNGDLSLNTGKLNKDKVSRFDIRQIEVDGQLITLESSEFQVYKQSHSALTALQTEQEQ
30 NPKIDSLINQSRFLVSLGGGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDAGGKLYTIDFAAKQGHGKIEHLKT
PEQNVELASAEKKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTIHLALFGDRAQEIAGSATVKIREKVHEIGTAGKQ

SEQ ID 16 - 741 from strain BZ133

MTRSKPVNRTAFCCPSLTAALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEK
LKLAQAQGAERTYNGDLSLNTGKLNKDKVSRFDIRQIEVDGQLITLESSEFQVYKQSHSALTALQTEQEQ
35 DSEHSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPPEGGRATYRGTAFGSDDAGGKLYTIDFAAKQGHGKIEHLK
SPELNVDLAAADIKPDGKRHAVISGSVLYNQAEKGSYSLGIFGGQAQEVAGSAEVEVTANGIRHIGLAAKQ

SEQ ID 17 - 741 from strain BZ232

MTRSKPVNRTAFCCPSLTAALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEK
LKLAQAQGAERTYNGDLSLNTGKLNKDKVSRFDIRQIEVDGQLITLESSEFQVYKQSHSALTALQTEQEQ
40 NPKIDSLINQSRFLVSLGGGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDPNGLRHYSIDFTKKQGYGRIEHLKT
PEQNVELASAEKKADEKSHAVILGDTRYGSEEKGTIHLALFGDRAQEIAGSATVKIREKVHEIGTAGKQ

SEQ ID 18 - 741 from strain C11

MTRSKPVNRTAFCCPSLTAALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEK
LKLAQAQGAERTYNGDLSLNTGKLNKDKVSRFDIRQIEVDGQLITLESSEFQVYKQSHSALTALQTEQEQ
45 DSEHSGKMVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPPEGGRATYRGTAFGSDDAGGKLYTIDFAAKQGHGKIEHLK
SPELNVDLAAADIKPDGKRHAVISGSVLYNQAEKGSYSLGIFGGQAQEVAGSAEVEVTANGIRHIGLAAKQ

SEQ ID 19 - 741 from strain M1090

MTRSKPVNRTAFCCPSLTAALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTAPLDHKDKSLQSLTLDQSVRKNEK
LKLAQAQGAERTYNGDLSLNTGKLNKDKVSRFDIRQIEVDGQLITLESSEFQVYKQSHSALTALQTEQEQ
NPKIDSLINQSRFLVSLGGGEHTAFNQLPSGKAEYHGKAFSSDDPNGLRHYSIDFTKKQGYGRIEHLKT

WO 03/020756

PCT/IB02/03904

3

NPKIDSLINQRSFLVSLGGEHTAFNQLPSGKAEYHGKAFSSDDAGGKLYTYTIDFAAQGHGKIEHLKT
PEQNVELASABELKADEKSHAVILGDTRYGGEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIREKVHEIGIAGKQ

SEQ ID 20 – 741 from strain M1096

5 MTRSKPVNRTAFCCLSLTAALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTPPLDHHKDKSLQSLTLDQSVRKNEK
LKLAQGAEKTYNGDLSLNTGKLNKDKVSRDFIRQIEVDGQITLASEGFQYKQNSAVVALQIEKIN
NPKIDSLINQRSFLVSLGGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDPNGLHYSIDFTKKQGYGRIEHLKT
PEQNVELASABELKADEKSHAVILGDTRYGGEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIREKVHEIGIAGKQ

SEQ ID 21 – 741 from strain M198/172

10 MTRSKPVNRTAFCCLSLTAALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTPPLDHHKDKSLQSLTLDQSVRKNEK
LKLAQGAEKTYNGDLSLNTGKLNKDKVSRDFIRQIEVDGQITLASEGFQYKQNSAVVALQIEKIN
DSEHSKMKVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLEPEGGRATYRGTAFSSDDASGLTYTIDFAAQGHGKIEHLK
SPELNVDLAAASDKPKDKRHAVISGSVLYNQAEKGSYSLGIFGGQAQEVAGSAEVEVTANGIRHTGLAAKQ

SEQ ID 22 – 741 from strain NGH38

15 MTRSKPVNRTAFCCLSLTAALILTACSSGGGGVAADIGAGLADALTPPLDHHKDKSLQSLTLDQSVRKNEK
LKLAQGAEKTYNGDLSLNTGKLNKDKVSRDFIRQIEVDGQITLASEGFQYKQNSAVVALQIEKIN
NPKIDSLINQRSFLVSLGGEHTAFNQLPDGKAEYHGKAFSSDDPNGLHYSIDFTKKQGYGRIEHLKT
PEQNVELASABELKADEKSHAVILGDTRYGGEKGTYHLALFGDRAQEIAGSATVKIREKVHEIGIAGKQ

SEQ ID 23 – NMB1343 from ten meningococcal strains

20 MGNFLYRIGISCCQDEQNNQLKPKGNKAEVAIRYDGFYDYGKATHGSPVKNVAVYAHQIETGLDYGCYIS
TTTDDKELIAKFKATSSGIENGYIYVLRNDRDFGQYSIFEYEVHEPENPNEKEVTIRAEDCGCIPEEVIIAKE
LIEIN

SEQ ID 24 – NMB1343 from gonococcus

25 INNLWEISYLYRIGISCCQDEQNNQLKPKGNKAEVAIRYDGFYDYGKATHGSPVKNVAVYAHQIETDLYD
GCYIISTTDDKELIAKFKATSSGIENGYIYVLRNDRDFGQYSIFEYEVHEPENPDEKEVTIRAEDCGCIPEEVI
IIAKELIEIN

SEQ ID 25 – NMB1343 nucleic acid sequence (gonococcus)

30 TCCGCCGCAATACCTTATAAAAATAAAACATCCCTCTCAAGCAGTCTGATAATGTTGGATTGCTTGAGAT
TGATGAGTGAATGGTGTAAATTCACCTTTAAATTAATAACTTATGGGAAATTTCTTATATAGAGGCATT
CATTAGTCCCAACAAGATGAGCAAAATAATGGACAGTTAAACCTAAAGGTAATAAAGCTGAAGTTGCA
ATTCGTTATGATGGTAAGTTAAATATGATGTAAGCTACACATGGTCCCAAGTGTGAAGAAATGCAGTTT
35 ACGCCCAATCAAAATGAACAGATCTATATGACGGATGTATATATCTACGACACAGACAGGAAATGCG
CAAGAAATTTCAACAGCTCCCGCATCGAAAATGGCTATATATATGTTTAAATAGAGATTGTTTGGT
CAATATCTATTTTGAATATGAGTTGAACATCCAGAAAACCCAGATGAGGAGGAACTAACAAACAGAG
CTGAAGATTGGCTGTATTCCTGAAGAAGTGATTATTGCTAAAGAGTTGATAGAAAATTAACATAAGTTGA
40 AAGGTCATATAATAGCTTTAGTTGAATGAAAAGTCCCGACATTTGGCGGACACGAAAATGTAGATAATTA
TCGC

SEQ ID 26 – NMB1343 nucleic acid sequence (meningococcus)

45 TCCGCCGCAATACCTTATAAAAATAAAACATCCCTCTCAAGCAGTCTGATAATGTTGGATTGCTTGAGAT
TGATGAGTGAATGGTGTAAATTCACCTTTAAATTAATAACTTATGGGAAATTTCTTATATAGAGGCATT
AGTTGCCAACAAGATGAGCAAAATAATGGACAGTTAAACCTAAAGGTAATAAAGCTGAAGTTGCAATTC
GTTATGATGTTAAGTTTAAATATGATGTTAAGCTACACATGGTCCCAAGTGTGAAGAAATGCAGTTTACGC
CCATCAAAATGAACAGGCTCTATATGACGGATGTATATATCTACGACACAGACAGGAAATTTGCCAAG
AAAATTTCAACAAGTTCCGGCATCGAAAATGGCTATATATATGTTTAAATAGGGAATTTGTTTGGTCAAT
ATTCATTTTGAATATGAGTTGAACATCCAGAAAACCCAAATGAGGAGGAAATCAACATCAGAGCTGA
45 AGATTGGCTGTATTCCTGAAGAAGTGATTATTGCTAAAGAGTTGATAGAAAATTAACATAAGTTGA
TCAATATAATGGCTTTAGTTGAATGAAAAGTCCCGACATTTGGCGGACACGAAAATGTAGATAATTCGCC

SEQ ID 27 – linker

GSGGGG

WO 03/020756

PCT/IB02/03904

4

SEQ ID 28 - preferred AG287-953 hybrid

MASPDVKSADTLKSPAAFPVVAEKETEVEKEDAPQAGSQGGAPSTQGSQDMAAVSAENTGNGGAATTDKPK
 NEDEGPQNDMPQNSAESANQTGNQPADSSDSAPASNPAPANGGSNFGRVDLANGVLIDGSPQNTLTHC
 5 KGDSKNGDNLLEDEAPSKSEFENLNESERLEKYKKGKSDKFTNLVATAVQANGTKYVVIYKDKSASS
 SARFRRSARSRSLPAEMPLIPVQNADTLIVDGEAVSLTGHSNIFAPEGNRYLTYGAEKLPGGSYALR
 VQGEPAKEMLAGTAVYNGEVLHFHTENGRPYTRGRFAAKVDFGSKSVGDIIDSGDDLHMGTKFKAAI
 DNGFKGTWTEGGGVDVSGRFYGPAGEEVAGKYSYRPTDAEKGGFVGFAGKKEQDGGGGATYKVDYH
 ANARFAIDHFNSTNVTGGFYGLTGSVEFDQAKRDGKIDITIIPVANLQSGSQHPTDHLKSADIPDAAQYVD
 10 IRFVSKFNFNKGLVSVVDGNLTMHGKTA PVKLAEKFNVCYQSPMAKTEVCGGDFSTTIDRTRKGVVDLYV
 NVGMTKSVRIDIQIEAAKQ

SEQ ID 29 - AG287_{N2}-953 hybrid

MASPDVKSADTLKSPAAFPVVEKETEAKEDAPQAGSQGGAPSAQGGQDMAAVSEENTGNGGAATTDKPK
 NEDEGPQNDMPQNSAEDTDSLTNHTFASNMPAGNMQAPDAGESEQANQPMANTADCMQDDPSAGG
 15 ENAGVTAQGTNQAENNTAGSQNPASSTNPSATNSGGDFGRITNVGNSVVIDGSPQNTLTHCKGDSG
 NNFLDEEVQLKSEFEKLSADAKISNYKKGKNDGKNDKFGVLVADSVQMKGINQYIIFYKFKPTSFARFR
 RSARSRSLPAEMPLIPVQNADTLIVDGEAVSLTGHSNIFAPEGNRYLTYGAEKLPGGSYALRVQGE
 SKGEMLAGTAVYNGEVLHFHTENGRPSRGRFAAKVDFGSKSVGDIIDSGDGLHMGTKFKAAIDNGFP
 KGTWTEGGGVDVSGRFYGPAGEEVAGKYSYRPTDAEKGGFVGFAGKKEQDGGGGATYKVDYH
 20 ANARFAIDHFNSTNVTGGFYGLTGSVEFDQAKRDGKIDITIIPVANLQSGSQHPTDHLKSADIPDAAQYVD
 IRFVSKFNFNKGLVSVVDGNLTMHGKTA PVKLAEKFNVCYQSPMAKTEVCGGDFSTTIDRTRKGVVDLYV
 NVGMTKSVRIDIQIEAAKQ

SEQ ID 30 - 936-AG741 hybrid

MKPKPHTVRLTAAIFSLALSGCVSAVIGSAAVGAKS AVDRRTTGAQTDDNVMLRIETTARSYLRQNNQ
 TKGYTPQISVVGYNRHL LLLGQVATEGEKQFVQIARSEQAAEGVYNYITVASLPRTAGDIAGDTWNTSK
 25 VRATLLGISPATQARVKIVTYGNVTVVMGLTPEEQALITQKVSTTVGVQKVIITLYQNYVORGSGGGGVA
 ADIGAGLADALTAFLDHDKQGLQSLTLQSVRKNEKLLAAQGAERTYNGDLSLTYGKLNKDKVSRFDPI
 RQIEVQGLITLRSSEGFQVYKQSHSALTAFTQEQIDSEHSGMKVAKRQFRIGDIAGEHTSFDKLPEGGR
 ATYRGTAFGSDDAGGKLTYYTIDFAAKQNGKIEHLKSPELNVDLAAADIKPDGKRHAVISSVLYNQAEK
 30 GSYSLGIFGGKAQEVAGSAEVKTVNGIRHIGLAAKQ

SEQ ID 31 - 961c

MATNDDVKAATVAIAAAYNNGQEIINGFKAGETIYDIDEDGTITKKDATAADVEADDFKGLGLKVVVTN
 LTKTVNENKQVDAKVAEAESELEKLTTLADTDAALADTDAALDATTNALNKLGENITTFEETKNTIV
 35 KIDKLEAVADTVDKHAEAFNDLADSLDETNTKAEAVKTANEAKQTAETKQNVDAKVAEAEAEAGKAE
 AAAGTANTAADKAEAVAAKVTDIKADIATNKDNIAKKANSADVITREESDSKFFVRIDGLNATTEKLDTRL
 ASAEKSTADHDTRLNGLDRTVSDLRKRETRQGLAEQAALSGLFQPPYNVG

【国際公開パンフレット(コレクション)】

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
13 March 2003 (13.03.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/020756 A3

- (51) International Patent Classification: C07K 14/22, C12N 15/62, A61K 38/16
- (21) International Application Number: PCT/IB02/03904
- (22) International Filing Date: 6 September 2002 (06.09.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 0121591.2 6 September 2001 (06.09.2001) GB
- (71) Applicant (for all designated States except US): CHIRON SRL, (IT/IT); Via Fiorentina, 1, I-53100 Siena (IT).
- (72) Inventor; and
(75) Inventor/Applicant (for US only): PIZZA, Mariagrazia (IT/IT); Chiron S.p.A., Via Fiorentina, 1, I-53100 Siena (IT).
- (74) Agents: MARSHALL, Cameron, John et al.; Carmichael & Ransford, 43 Bloomsbury Square, London WC1A 2RA (GB).
- (81) Designated States (national): AU, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KR, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IT, LU, MC, NL, PT, SI, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:
with international search report
- (88) Date of publication of the international search report: 20 November 2003
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 03/020756 A3

(54) Title: HYBRID AND TANDEM EXPRESSION OF NEISSERIAL PROTEINS

(57) Abstract: Two or more Neisserial proteins are joined such that they are translated as a single polypeptide chain. Hybrid proteins are represented by the formula $NH_2-A_1-X-I_1-B-COOH$ where X is an amino acid sequence, I₁ is an optional linker amino acid sequence, A is an optional N-terminal amino acid sequence, B is an optional C-terminal amino acid sequence, and n is an integer greater than 1. Proteins where each of the n -X- moieties shares sequence identity to each other -X- moiety, the protein is a 'tandem protein'.

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No PCT/IB 02/03904
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C07K14/22 C12N15/62 A61K38/16		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C07K C12N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, SEQUENCE SEARCH, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 99 57280 A (PIZZA MARIAGRATIA ;MORA MARIROSA (IT); RAPPUOLI RINO (IT); GALEOTT) 11 November 1999 (1999-11-11) p. 5, lines 25-30 p. 21, para. 3 p. 25, last para. pp. 1205/1206 ORF 741 ---	1,3,7-12
X	WO 00 23595 A (JUDD RALPH C ;MANNING SCOTT D (US); UNIV MONTANA (US)) 27 April 2000 (2000-04-27) page 22, line 6 - line 15 ---	1,3,7-12
X	EP 0 474 313 A (CIGB) 11 March 1992 (1992-03-11) page 7, line 2 - line 4 ---	1,3,7-12
	-/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 11 June 2003	Date of mailing of the international search report 27.08.03	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P. B. 5618 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk TEL. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-2016	Authorized officer Stolz, B	

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Inter.....Application No PCT/IB 02/03904
C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 88 00238 A (MAX PLANCK GESELLSCHAFT) 14 January 1988 (1988-01-14) the whole document ---	
A	EP 0 196 056 A (CHIRON CORP) 1 October 1986 (1986-10-01) the whole document ---	
A	EP 0 978 565 A (SUNTORY LTD) 9 February 2000 (2000-02-09) the whole document ---	
P,A	WO 01 64920 A (COMANDUCCI MAURIZIO ;PIZZA MARIAGRAZIA (IT); CHIRON SPA (IT); GALE) 7 September 2001 (2001-09-07) cited in the application page 2; table 1 ---	
E	WO 02 079242 A (PIZZA MARIAGRAZIA ;RAPPUOLI RINO (IT); CHIRON SPA (IT); MASIGNANI) 10 October 2002 (2002-10-10) page 34 -----	1,3,7-12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/IB 02/03904**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. Claims Nos.: 1 (partial), 2, 4-6
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
- 1, 3, 7-12

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/IB 02/03904

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

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

Invention 1

Claims 1,3, 7-12: hybrid proteins consisting of fusions of at least two proteins as defined in Seq IDs 1 to 26. Strictly speaking, each of the possible combinations could be regarded as an individual contribution. Since a search could be carried out for fusion proteins comprising the listed Seq IDs without undue extra effort, no further non-unities are invoked.

Inventions 2 to 39

Claims 13 to 15 (partial): further neisseria proteins as defined by Seq ID nos 1 to 38

Invention 40

Claims 16 to 22: Compositions comprising two or more of unspecified proteins. This invention basically disintegrates into as many inventions as there are possible combinations of the named sequences. However, since no sequence listings complying with Rule 5.2. PCT have been furnished, this point is not further investigated.

International Application No. PCT/IB 02/03904

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 1(partial),2,4-6

A sequence listing complying with Rule 5.2. PCT has only been furnished for Seq IDs 1 to 38 with Seq IDs 1 to 22 corresponding to 741 and Seq IDs 23 to 26 corresponding to NMB1343 of claim 1.

The remaining sequences of the underlying application have, according to PCT Rule 13ter.1.c., not been searched since the sequence references as present in the description and claims do not comply with WIPO standard ST25 prescribed in the administrative instructions under Rule 5.2. A sequence listing has been furnished neither in paper form nor in machine readable form and the applicant has not remedied the deficiencies within the time limit fixed in the invitation pursuant to CT Rule 13ter.1.a.

Consequently, claims 1, 3, and 7 to 12 have only been searched as far as they relate to fusion proteins comprising any of Seq IDs 1 to 26.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
 по результатам поиска патентных документов

International Application No
 PCT/IB 02/03904

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9957280	A	11-11-1999	AU 761780 B2 12-06-2003
			AU 3967799 A 23-11-1999
			CA 2330838 A1 11-11-1999
			CN 1373806 T 09-10-2002
			EP 1093517 A2 25-04-2001
			WO 9957280 A2 11-11-1999
WO 0023595	A	27-04-2000	WO 0023595 A1 27-04-2000
			CA 2347849 A1 27-04-2000
			EP 1123403 A1 16-08-2001
EP 0474313	A	11-03-1992	CJ 22302 B1 02-12-1994
			AT 152175 T 15-05-1997
			AU 657487 B2 16-03-1995
			AU 8368391 A 12-03-1992
			CA 2050749 A1 08-03-1992
			DE 69125769 D1 28-05-1997
			DE 69125769 T2 27-11-1997
			EP 0474313 A2 11-03-1992
			ES 2103295 T3 16-09-1997
			FI 914129 A 08-03-1992
			GR 3024127 T3 31-10-1997
			JP 3253327 B2 04-02-2002
			JP 6169779 A 21-06-1994
			RU 2132383 C1 27-06-1999
			US 5286484 A 15-02-1994
			WO 8800238
AT 89318 T 15-05-1993			
DE 3785798 D1 17-06-1993			
WO 8800238 A1 14-01-1988			
EP 0254090 A1 27-01-1988			
ES 2056798 T3 16-10-1994			
JP 7100039 B 01-11-1995			
JP 1500164 T 26-01-1989			
US 5268270 A 07-12-1993			
EP 0196056	A	01-10-1986	AT 63757 T 15-06-1991
			CA 1260858 A1 26-09-1989
			DE 3679343 D1 27-06-1991
			DK 142186 A 29-09-1986
			EP 0196056 A2 01-10-1986
			JP 2545686 B2 23-10-1996
			JP 6014793 A 25-01-1994
			JP 2115827 C 06-12-1996
			JP 8029096 B 27-03-1996
			JP 61268193 A 27-11-1986
			US 2002028481 A1 07-03-2002
			US 5866362 A 02-02-1999
			US 5342921 A 30-08-1994
			US 4751180 A 14-06-1988
			US 5523215 A 04-06-1996
			US 2002146764 A1 10-10-2002
EP 0978565	A	09-02-2000	AU 2185799 A 16-08-1999
			EP 0978565 A1 09-02-2000
			NZ 338004 A 31-08-2001
			CN 1255945 T 07-06-2000

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Int. application No
PCT/IB 02/03904

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0978565	A	WO 9938984 A1	05-08-1999
WO 0164920	A	07-09-2001	
		AU 3249200 A	17-11-2000
		AU 3947801 A	12-09-2001
		AU 3948801 A	12-09-2001
		BR 0010361 A	10-06-2003
		CA 2371032 A1	09-11-2000
		CA 2400562 A1	07-09-2001
		CA 2400570 A1	07-09-2001
		CN 1359426 T	17-07-2002
		CN 1426471 T	25-06-2003
		CN 1426473 T	25-06-2003
		EP 1185691 A1	13-03-2002
		EP 1261723 A2	04-12-2002
		EP 1259627 A2	27-11-2002
		WO 0164920 A2	07-09-2001
		WO 0164922 A2	07-09-2001
		WO 0066791 A1	09-11-2000
WO 02079242	A	10-10-2002	
		WO 02079242 A2	10-10-2002

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 39/095	A 6 1 K 39/095	
A 6 1 K 39/102	A 6 1 K 39/102	
A 6 1 K 39/106	A 6 1 K 39/106	
A 6 1 K 39/118	A 6 1 K 39/118	
A 6 1 K 39/13	A 6 1 K 39/13	
A 6 1 K 39/145	A 6 1 K 39/145	
A 6 1 K 39/165	A 6 1 K 39/165	
A 6 1 K 39/205	A 6 1 K 39/205	
A 6 1 K 39/29	A 6 1 K 39/29	
C 0 7 K 14/22	C 0 7 K 14/22	
C 0 7 K 19/00	C 0 7 K 19/00	

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, N O, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA31 CA04 CA05 CA06 CA07 DA06 EA04 FA02 FA10
 GA11 GA19 HA03 HA08 HA14
 4C085 AA03 AA05 BA10 BA12 BA13 BA14 BA15 BA16 BA17 BA18
 BA20 BA43 BA45 BA53 BA55 BA58 BA64 BA88 BA89 BA90
 CC07 CC08 CC24 DD62
 4H045 AA10 AA30 BA10 BA41 CA11 DA86 EA31 FA72 FA74 GA26