

(19)日本国特許庁 ( J P )

(12) **公表特許公報** ( A ) (11)特許出願公表番号

**特表2002 - 536998**

(P2002 - 536998A)

(43)公表日 平成14年11月5日(2002.11.5)

(51) Int.Cl <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マコード* (参考)
C 1 2 N 15/09	ZNA	A 6 1 K 39/145	4 B 0 2 4
A 6 1 K 38/00		A 6 1 P 31/16	4 B 0 6 4
39/145		C 0 7 K 14/285	4 B 0 6 5
A 6 1 P 31/16		16/12	4 C 0 8 4
C 0 7 K 14/285		C 1 2 N 1/15	4 C 0 8 5

審査請求 未請求 予備審査請求 (全 99数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2000 - 601163(P2000 - 601163)

(86)(22)出願日 平成12年2月22日(2000.2.22)

(85)翻訳文提出日 平成13年8月24日(2001.8.24)

(86)国際出願番号 PCT/EP00/01423

(87)国際公開番号 W000/50599

(87)国際公開日 平成12年8月31日(2000.8.31)

(31)優先権主張番号 9904183.2

(32)優先日 平成11年2月24日(1999.2.24)

(33)優先権主張国 イギリス(GB)

(71)出願人 スミスクライン ビーチャム バイオロジカルズ ソシエテ アノニム

ベルギー国 リキセンザール ビー 1330  
ルー デ ランスティテユート 89

(72)発明者 リュール, ジャン - ルイ  
ベルギー国, ベ - 1330 リクサンサール, リ  
ュ ドウ ランスティテユ 89, スミスクラ  
イン ビーチャム バイオロジカルズ ソ  
シエテ アノニム

(74)代理人 弁理士 石田 敬 (外4名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ヘモフィラス抗原

(57)【要約】

本発明は、B A S B 0 7 0 ポリペプチドと、B A S B 0 7 0 ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドと、組み換え技術を利用してそのようなポリペプチドを産生する方法とを提供する。本発明は、B A S B 0 7 0 ポリペプチドを用いて抗バクテリア化合物をスクリーニングする方法をも提供する。

**【特許請求の範囲】**

【請求項1】 配列番号2又は4のアミノ酸配列に対し又はその免疫原性断片に対し少なくとも85%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ、医薬として許容される担体とともに、上記アミノ酸配列又はその免疫原性断片のミモトープを含む、ポリペプチドの有効量を含むワクチン製剤。

【請求項2】 前記アミノ酸配列が配列番号2又は4のアミノ酸配列に対し又はその免疫原性断片に対し少なくとも95%の同一性を有する、請求項1に記載のワクチン製剤。

【請求項3】 配列番号1又は3のヌクレオチド配列又はその断片であって免疫原性ポリペプチドをコードするものに対し少なくとも85%の同一性を有するヌクレオチド配列を、医薬として許容される担体とともに含むポリヌクレオチドの有効量を含むワクチン製剤。

【請求項4】 前記製剤が少なくとも1の他のヘモフィラス・インフルエンザ (*Haemophilus influenzae*) 抗原を含む、請求項1～3のいずれか1項に記載のワクチン製剤。

【請求項5】 免疫原性ポリペプチドをコードする配列番号1又は3のアミノ酸配列又はその断片に対し少なくとも85%の同一性を有するヌクレオチド配列を含む単離されたポリヌクレオチドを含む発現ベクター又は生きた組換え微生物。

【請求項6】 配列番号2又は4のアミノ酸配列又はその免疫原性断片に対し少なくとも85%の同一性を有するアミノ酸配列を含む単離ポリペプチドを発現する、請求項5に記載の発現ベクターを含む宿主細胞又はその宿主細胞の膜。

【請求項7】 配列番号2又は4のアミノ酸配列又はその免疫原性断片に対し少なくとも85%の同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチドの製法であって、上記ポリペプチドの製造のために十分な条件下で請求項6に記載の宿主細胞を培養し、そしてその培養基から上記ポリペプチドを回収することを含む、前記製法。

【請求項8】 免疫原性ポリペプチドをコードする配列番号1又は3のヌクレオチド配列又はその断片に対して少なくとも85%の同一性を有するヌクレオ

チド配列を含むポリヌクレオチドの製法であって、宿主細胞を、上記ポリヌクレオチドを含む発現ベクターで形質転換させ、そして上記ポリヌクレオチドの発現のために十分な条件下で上記宿主細胞を培養することを含む、前記製法。

【請求項9】 配列番号2又は4のポリペプチドに特異的な抗体又はその抗体の免疫学的に活性な断片。

【請求項10】 ヘモフィラス・インフルエンザ (*Haemophilus influenzae*) 感染を診断する方法であって、その感染を疑われる動物からの生物学的サンプル中に存在する。配列番号2又は4のアミノ酸配列又はその断片に対して少なくとも85%の同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチド、又はそのポリペプチドに特異的な抗体を同定することを含む、前記方法。

【請求項11】 哺乳動物における免疫応答の生成における使用のための薬物の製造における、配列番号2又は4のアミノ酸配列又はその免疫学的断片に対し少なくとも85%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、又は上記アミノ酸配列又は免疫原性断片のミモトープを含む、ポリペプチドの免疫学的有効量を含む組成物の使用。

【請求項12】 哺乳動物における免疫応答の生成における使用のための薬物の製造における、免疫原性ポリペプチドをコードする請求項1又は3のヌクレオチド又はその断片に対して少なくとも85%の同一性を有するヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドの免疫学的有効量を含む組成物の使用。

【請求項13】 配列番号2又は4のポリペプチドに対する少なくとも1の抗体、及び好適な医薬担体を含む、ヘモフィラス・インフルエンザ (*Haemophilus influenzae*) 疾患にかかったヒトの治療において有用な治療用組成物。

【請求項14】 配列番号4のアミノ酸配列又はその断片又はミモトープを含む単離ポリペプチド。

【請求項15】 請求項14のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む単離ポリヌクレオチド。

【請求項16】 配列番号3のヌクレオチド配列又はその断片を含む、請求

項15記載のポリヌクレオチド。

**【発明の詳細な説明】****【0001】**

## 本発明の分野

本発明は、ポリヌクレオチド（本明細書中、“BASB070”ポリヌクレオチドという）、それによりコードされたポリペプチド（本明細書中、“BASB070”又は“BASB070ポリペプチド”という）、及び組換え材料に関する。他の局面においては、本発明は、上記ポリペプチド又はポリヌクレオチドの使用方法でってバクテリア感染に対するワクチンを含むものに関する。さらなる局面においては、本発明は、特定の病原体の感染を検出するための診断アッセイに関する。

**【0002】**

## 本発明の背景

ヘモフィラス・インフルエンザ（*Haemophilus influenzae*）は、非運動性のグラム陰性バクテリアである。ヒトはその唯一の天然宿主である。*H. influenzae*単離物は、通常、それらの多糖莢膜に従って分類される。a～fまで指定された6つの異なる莢膜タイプが同定されている。上記6つの血清型の中の1に対して生じた抗血清により凝集されない単離物は、非分類として分類され、そして莢膜を発現しない。

**【0003】**

*H. influenzae* b型は、それがバクテリアの髄膜炎及び全身性疾患の主原因である点で、他のタイプは明らかに異なる。非分類*H. influenzae*（NTHi）は、全身性疾患をもつ患者の血液からときどき単離されるだけである。

**【0004】**

NTHiは、肺炎、慢性気管支炎、洞炎、及び中耳炎の一般原因である。

**【0005】**

中耳炎は、ケース数及びその潜在的な後遺症の両者により重要な小児疾患である。350万以上のケースが毎年米国内で記録されており、そして子供の80%が3歳に達する前に少なくとも1の耳炎の症状の出現を経験していると推定され

ている(1)。治療されずに、又は慢性になると、この病気は、(中耳内の液の蓄積の場合)一過性であり又は(聴覚神経が損傷した場合)永久性であることができる聴覚損失を導くことができる。幼児においては、このような聴覚損失は、遅延した会話学習の原因となりうる。

#### 【0006】

3つのバクテリア種: ストレプトコッカス・ニューモニエ(*Streptococcus pneumoniae*)、NTHi、及びM.カタリス(*M. catarrhalis*)が、中耳炎にかかった子供の中耳から主に単離される。これらは、ケースの60~90%において存在している。最近の試験の論文は、*S. pneumoniae*とNTHiはともに中耳炎の約30%を、そしてM. *catarrhalis*は約15%を占めることを示している(2)。他のバクテリアも、中耳から単離されることができ、(*H. influenzae* B型、*S. ピオゲネス*(*S. pyogenes*)、...)かなり低い頻度である(ケースの2%以下)。

#### 【0007】

疫学的データは、中耳内に存在する病原体について、気管上部のコロニー形成が耳炎の発達のための絶対条件であることを示している;しかしながら、他の要因も、上記疾患を導くために必要とされる(3~9)。これらは、エウスタキヤ管を介して中耳内にバクテリアが移動すること、その後の炎症過程の開始を誘発するために重要である。これらの他の要因は、今日まで知られていない。例えば、ウイルス感染後の免疫系の一過性の異常が、気管のコロニー形成の制御可能を引き起こすことができるのであろうと推定されている(5)。他の説明は、環境因子への暴露がいくらかの子供のより重要なコロニー形成を許容し、その子供がその後、中耳病原体の持続的な存在のために中耳炎の発達を受け易くなるというものである(2)。

#### 【0008】

*H. influenzae*のさまざまなタンパク質が、病気の発生に関係することが示されており、又は動物モデルにおいてワクチン接種の間に保護を提供することが示されている。

## 【0009】

ヒト鼻咽頭上皮細胞へのNTHiの付着が報告されている(10)。縁毛(fimbriae)及び線毛(pili)とは別に(11~15)、多くのアドヘシンがNTHi内で同定されている。これらの中で、HMW1とHMW2と命名された2つの表面露出高分子量タンパク質が、上皮細胞へのNTHiの接着を仲介することが示されている(16)。高分子量タンパク質の他のファミリーが、HMW1/HMW2ファミリーに属するタンパク質を欠くNTHi株内で同定されている。このNTHi 115kDa Hiaタンパク質(17)は、H. influenzae b型株により発現されるHsfアドヘシン(adhesin)(18)に酷似している。他のタンパク質、Hapタンパク質もIgA1セリン・プロテアーゼに対する類似性を示し、そして接着と細胞侵入の両者に関係することが示されている(19)。

## 【0010】

5つの主要な外膜タンパク質(OMP)が同定され、そして数字で番号を付けられている。

## 【0011】

H. influenzae b型株を用いた元の試験は、P1とP2に特異的な抗体がその後の感染から幼ラットを保護することを示した(20~21)。P2は、この完全OMPの表面に露出したループ構造中に存在する可変領域に対する、殺菌性及びオプソニン作用性の抗体を誘導することができることが判っている(22~23)。リポプロテインP4も殺菌性抗体を誘導する(24)。

## 【0012】

P6は、外膜の1~5%までを作る、保存されたペプチドグリカン会合リポタンパク質である(25)。その後、ほぼ同分子量のリポタンパク質が認識され、PCP(P6交差反応性タンパク質)といわれた(26)。保存されたりポタンパク質P4、P6、及びPCPの混合物は、チンチラ中耳炎モデルにおいて計測されたとき保護を現わさなかった(27)。P6は単独で、チンチラ・モデルにおいて保護を誘導するようである(28)。

## 【0013】

P5に対してホモロジーをもつ他のフィンブリン (*fimbrin*) が記載されており、これは、その自体、完全大腸菌 (*Escherichia coli*) OmpAに対する配列ホモロジーをもつ (29~30)。このパラドックスは、ピリン (*pilin*)、ピリン会合タンパク質、ピリン排出タンパク質、及びP5の性質及び役割を明らかにするためのさらなる調査を必要とする。しかしながら、NTHiは、縁毛により粘液 (*mucus*) に接着することが示されている (29)。P5は、NTHiによる持続性感染の間に抗原ドリフトを経験するようである。 (31)。

## 【0014】

淋菌 (*gonococci*) 及び髄膜炎菌を用いて行われた観察に沿って、NTHiは、鉄制限下で培養されるとき、TbpAとTbpBから成る2つのヒト・トランスフェリン・レセプターを発現する。抗-TbpBは幼ラットを保護した (32)。ヘモグロビン/ハプトグロビン (*haptoglobin*) レセプターも、NTHiに関して記載されてきた (32)。ヘム (*Haem*) :ヘモペキシン (*Hemopexin*) のためのレセプターも同定されている (34)。ラクトフェリン・レセプターもNTHi中に存在するが、未だ特徴付けされていない (35)。ナイセリアのFrpB-タンパク質に似たタンパク質は、NTHi中には記載されていない。

## 【0015】

80kDa OMP、D15表面抗原は、マウス感染モデルにおいてNTHiに対する保護を提供する (36)。42kDaの外膜リポタンパク質、LPDは、*Haemophilus influenzae*の間で保存されており、そしてバクテリア抗体を誘導する (37)。僅かな98kDa OMP (38) が保護抗原であることが発見され、このOMPは、十分に、Fe-制限誘導性のOMPの中の1又はその後特徴付けられた高分子量のアドヘシンでありうる。*H. influenzae*は、IgA1-プロテアーゼ活性を作り出す (39)。NTHiのIgA1-プロテアーゼは、高度の抗原可変性を現す (40)。NTHiの他のOMP、OMP26、26kDaタンパク質は、ラット・モデルにおいて肺クリアラン

スを高めることが示されている(41)。NTHi HtrAタンパク質も、保護抗原であることが示されている。実際、このタンパク質は、中耳炎に対してチンチラを保護し、そしてH. influenzae b型バクテリア血症に対して幼ラットを保護した(42)。

【0016】

参考文献

【0017】

【化1】

1. Klein, JO (1994) Clin.Inf.Dis 19:823
2. Murphy, TF (1996) Microbiol.Rev. 60:267

【0018】

【化2】

3. Dickinson, DP et al. (1988) *J. Infect. Dis.* 158:205
4. Faden, HL et al. (1991) *Ann. Otorhinol. Laryngol.* 100:612
5. Faden, HL et al (1994) *J. Infect. Dis.* 169:1312
6. Leach, AJ et al. (1994) *Pediatr. Infect. Dis. J.* 13:983
7. Prellner, KP et al. (1984) *Acta Otolaryngol.* 98:343
8. Stenfors, L-E and Raisanen, S. (1992) *J. Infect. Dis.* 165:1148
9. Stenfors, L-E and Raisanen, S. (1994) *Acta Otolaryngol.* 113:191
10. Read, RC. et al. (1991) *J. Infect. Dis.* 163:549
11. Brinton, CC. et al. (1989) *Pediatr. Infect. Dis. J.* 8:S54
12. Kar, S. et al. (1990) *Infect. Immun.* 58:903
13. Gildorf, JR. et al. (1992) *Infect. Immun.* 60:374
14. St. Geme, JW et al. (1991) *Infect. Immun.* 59:3366
15. St. Geme, JW et al. (1993) *Infect. Immun.* 61: 2233
16. St. Geme, JW. et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:2875
17. Barenkamp, SJ. et JW St Geme (1996) *Mol. Microbiol.* (In press)
18. St. Geme, JW. et al. (1996) *J. Bact.* 178:6281
19. St. Geme, JW. et al. (1994) *Mol. Microbiol.* 14:217
20. Loeb, MR. et al. (1987) *Infect. Immun.* 55:2612
21. Musson, RS. Jr. et al. (1983) *J. Clin. Invest.* 72:677
22. Haase, EM. et al. (1994) *Infect. Immun.* 62:3712
23. Troelstra, A. et al. (1994) *Infect. Immun.* 62:779
24. Green, BA. et al. (1991) *Infect. Immun.* 59:3191
25. Nelson, MB. et al. (1991) *Infect. Immun.* 59:2658
26. Deich, RM. et al. (1990) *Infect. Immun.* 58:3388
27. Green, BA. et al. (1993) *Infect. Immun.* 61:1950
28. Demaria, TF. et al. (1996) *Infect. Immun.* 64:5187
29. Miyamoto, N., Bakaletz, LO (1996) *Microb. Pathog.* 21:343
30. Munson, RS.j.r. et al. (1993) *Infect. Immun.* 61:1017

【 0 0 1 9 】

【化3】

31. Duim, B. et al. (1997) *Infect. Immun.* 65:1351
32. Loosmore, SM. et al. (1996) *Mol. Microbiol.* 19:575
33. Maciver, I. et al. (1996) *Infect. Immun.* 64:3703
34. Cope, LD. et al. (1994) *Mol. Microbiol.* 13:868
35. Schryvers, AB. et al. (1989) *J. Med. Microbiol.* 29:121
36. Flack, FS. et al. (1995) *Gene* 156:97
37. Akkoyunlu, M. et al. (1996) *Infect. Immun.* 64:4586
38. Kimura, A. et al. (1985) *Infect. Immun.* 47:253
39. Mulks, MH. et Shoberg, RJ (1994) *Meth. Enzymol.* 235:543
40. Lomholt, H. Alphen, Lv, Kilian, M. (1993) *Infect. Immun.* 61:4575
41. Kyd, J.M. and Cripps, A.W. (1998) *Infect. Immun.* 66:2272
42. Loosmore, S.M. et al. (1998) *Infect. Immun.* 66:899

#### 【0020】

NTHi 感染の頻度は、過去数十年の間劇的に上昇してきた。この現象は、この生物のための新規抗微生物剤、ワクチン、医薬スクリーニング法、及び診断テストの満たされていない医学的要求を作り出している。本発明はこの要求を満たすことを目的とする。特に本発明は、NTHi に対して有効なワクチンの要求を満たすことを目的とする。

#### 【0021】

##### 本発明の要約

本発明は、特に治療用又は予防用ワクチン中での使用のための、BASB070の製造のための組換え材料及び方法、特にBASB070ポリペプチド及びBASB070ポリヌクレオチドに関する。他の局面においては、本発明は、とりわけ、微生物疾患の予防及び治療を含む。上記ポリペプチド及びポリヌクレオチドの使用方法に関する。さらなる局面においては、本発明は、微生物感染に関する疾患及び上記感染に係る症状を検出するための診断アッセイ、例えばB

ASB070ポリヌクレオチド又はポリペプチドの発現又は活性を検出するためのアッセイに関する。

【0022】

BASB070が、免疫系により認識されることができる表面露出分子の特徴をもつポリペプチドをコードすることが発見されている。例えば、BASB070によりコードされるポリペプチドは、シグナル・ペプチドを含み、これは、それがバクテリアの内膜と外膜間の周辺腔に少なくとも輸送されるということを示している。さらに、本ポリペプチドは、他の知られた表面露出タンパク質に対して類似性を持ち、そして他の知られた免疫原性及び免疫保護性ペプチドに対して潜在的な類似性をもつ。

【0023】

BASB070は、817アミノ酸の重複において、セラチア・マルセセンス (*Serratia marcescens*) のHasRタンパク質に同一である。*S. marcescens* HasRはHasAヘモフォア (hemophore) タンパク質のためのレセプターである。それは、TonB依存性タンパク質である。それは、 $\beta$ -バレル3D構造をもつ完全外膜タンパク質の特徴をもつ。この完全外膜タンパク質により形成された $\beta$ -バレル ( $\beta$ -barrels) は、逆平行の、両親媒性の $\beta$ -ストランドから成る。それらの外側ループは、しばしば免疫優性なB-細胞エピトープを含む。BASB070は、*Serratia marcescens* のHasRタンパク質に十分に密接に関連しており、BASB070も $\beta$ -バレル・コンフォメーションをもつ完全外膜タンパク質であるということが出来る。BASB070又はその断片は、それ故、潜在的なワクチン抗原を提供する。

【0024】

当業者であれば、この明細書の以下の記述やそれ以外の箇所を読むことにより、この明細書に開示された本発明の本質および範囲におけるさまざまな変更や修正を容易に思いつくであろう。

【0025】

本発明の説明

本発明は、BASB070ポリペプチドとポリヌクレオチドに関するものであり、それについて以下に詳細に説明する。本発明は、*Serratia marcescens* HasRヘモフォア・レセプター・ポリペプチドに対するアミノ酸配列のホモロジーにより関係付けられた、*Haemophilus influenzae*のBASB070のポリペプチド及びポリヌクレオチドの使用に関する。本発明は、特に、配列番号1又は3で与えられるヌクレオチド配列と配列番号2又は4で与えられるアミノ酸配列をそれぞれ有するBASB070の使用に関する。

#### 【0026】

本発明は、さらに、配列番号1又は3、及び配列番号2又は4に示す配列に対して、少なくとも85%の同一性、好ましくは少なくとも90%の同一性、より好ましくは少なくとも95%の同一性、最も好ましくは少なくとも97~99%の同一性又は完全同一性を有するポリヌクレオチド及びポリペプチドの使用に関する。

#### 【0027】

本発明は、本明細書中に開示する新規NTHiポリヌクレオチド及びポリペプチド配列にも関する。

#### 【0028】

##### ポリペプチド

本発明の一側面によれば、本明細書中“BASB070”、及び“BASB070ポリペプチド”という*Haemophilus influenzae*のポリペプチドのほか、生物学的、診断上、予防上、臨床上、または治療上有効なこれらポリペプチドの変異体と、これらを含む組成物とが提供される。

#### 【0029】

本発明によれば、以下のものがさらに提供される：

(a) 配列番号2又は4と少なくとも85%が一致、好ましくは少なくとも90%が一致、さらに好ましくは少なくとも95%が一致、最も好ましくは少なくとも97~99%が一致または完全に一致したアミノ酸配列を含む、単離されたポリペプチド；

(b) 配列番号1又は3それぞれの全長にわたって配列番号1又は3と少なくとも85%が一致、好ましくは少なくとも90%が一致、さらに好ましくは少なくとも95%が一致、それ以上に好ましくは少なくとも97~99%が一致または完全に一致したポリヌクレオチド配列を含む単離されたポリヌクレオチドによりコードされたポリペプチド;又は

(c) 配列番号2又は4のアミノ酸配列と少なくとも85%が一致、好ましくは少なくとも90%が一致、さらに好ましくは少なくとも95%が一致、それ以上に好ましくは少なくとも97~99%が一致または完全に一致したポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含む単離されたポリヌクレオチドによってコードされたポリペプチド。

#### 【0030】

配列番号2又は4で与えられるBASB070ポリペプチドは、Haemophilus influenzae株Rd KW20及びntHi3224に由来するBASB070ポリペプチドである。

#### 【0031】

本発明により、BASB070ポリペプチドの免疫原性断片も提供される。すなわち、配列番号2又は4のアミノ酸配列を含むポリペプチドと同じか実質的に同じ免疫活性を有するBASB070ポリペプチドの連続部分が提供される。要するに、この断片(必要であれば担体と結合したときの断片)は、BASB070ポリペプチドを認識する免疫応答を向上させることができる。この免疫原性断片は、例えば、N末端のリーダー配列、および/または膜貫通領域、および/またはC末端のアンカー領域を欠いたBASB070ポリペプチドを含んでいてもよい。好ましい一実施態様では、本発明によるBASB070の免疫原性断片は、配列番号2又は4の全長にわたって配列番号2又は4と少なくとも85%が一致、好ましくは少なくとも90%が一致、さらに好ましくは少なくとも95%が一致、最も好ましくは少なくとも97~99%が一致したポリペプチドの細胞外領域の実質的にすべてを含んでいる。

#### 【0032】

断片とは、本発明の任意のポリペプチドの任意のアミノ酸配列の全部ではなく

一部と完全に一致したアミノ酸配列を有するポリペプチドのことである。B A S B 0 7 0 の場合のように、断片は、“独立して”いてもよい。すなわち、より大きなポリペプチドに含まれていてその一部または一領域を形成していてもよい。最も好ましいのは、より大きな単一のポリペプチドの中の単一の連続領域を形成していることである。

#### 【0033】

好ましい断片としては、例えば、配列番号2又は4のアミノ酸配列またはその変異体の一部を含む先の切れたポリペプチドが挙げられる。具体例としては、アミノ末端および/またはカルボキシル末端のアミノ酸配列を含む連続残基列がある。宿主細胞によって、または宿主細胞内で産生された本発明のポリペプチドが分解された形態も好ましい。さらに好ましいのは、構造上または機能上の特性を有する断片、例えば、螺旋と螺旋形成領域、シートとシート形成領域、ターンとターン形成領域、コイルとコイル形成領域、親水性領域、疎水性領域、両親媒性領域、両親媒性領域、柔軟領域、表面形成領域、基質結合領域、抗体高指示領域を含む断片などである。

#### 【0034】

好ましい断片としては、さらに、配列番号2又は4のアミノ酸配列からの連続したアミノ酸を少なくとも15、20、30、40、50、または100個有するアミノ酸配列を含む単離されたポリペプチド、あるいは、配列番号2又は4のアミノ酸配列から切断または除去した少なくとも15、20、30、40、50、または100個の連続したアミノ酸を有するアミノ酸配列を含む単離されたポリペプチドが挙げられる。

#### 【0035】

特に好ましいのは、いくつかのアミノ酸、例えば5～10個、1～5個、1～3個、1～2個、または1個のアミノ酸の置換、欠失、または付加が任意に組み合わせられた変異体である。

#### 【0036】

本発明のポリペプチドまたは免疫原性断片は、“成熟”タンパク質の形態でもよいし、前駆体または融合タンパク質などのより大きなタンパク質の一部でもよ

い。分泌配列またはリーダー配列、プロ配列、複数のヒスチジン残基など精製に役立つ配列を含む付加アミノ酸配列、組み換え体産生の間の安定性を維持するための付加配列が含まれていると望ましいことがしばしばある。さらに、最終的に得られる分子の免疫性を向上させるため、外来性ポリペプチド、脂質テイル、またはポリヌクレオチド配列を付加することも考えられる。

#### 【0037】

一側面によれば、本発明は、本発明のポリペプチドまたはその断片と、さまざまなサブクラスの免疫グロブリン(IgG、IgM、IgA、IgE)のH鎖またはL鎖の定常領域のさまざまな部分とを含む、遺伝子工学による可溶性融合タンパク質に関する。免疫グロブリンとして好ましいのは、ヒトIgG、特にIgG1のH鎖の定常部分であり、そのヒンジ領域で融合が起こる。特別な実施態様では、血液凝固第Xa因子でもって切断することのできる切断配列を組み込むだけでFc部分を除去することができる。

#### 【0038】

融合タンパク質の技術に関する例は、国際特許出願番号WO94/29458とWO94/22914中に見ることができる。

#### 【0039】

このタンパク質は、化学的に結合させたり組み換え融合タンパク質として発現させたりすることにより、非融合タンパク質と比べて発現系内での発現レベルを向上させることができる。融合パートナーは、Tヘルパー・エピトープ(免疫性融合パートナー)、好ましくはヒトによって認識されるTヘルパー・エピトープを提供するのに役立ったり、もとの組み換えタンパク質よりも高い効率でタンパク質を発現させる(発現エンハンサー)のに役立ったりする可能性がある。融合パートナーは、免疫性融合パートナーであると同時に発現エンハンサー・パートナーにもなっていることが好ましかろう。

#### 【0040】

融合パートナーは、インフルエンザ菌に由来するプロテインDと、インフルエンザ・ウイルスに由来する非構造タンパク質NS1(ヘマグルチニン)を含んでいる。別の融合パートナーは、LytAとして知られるタンパク質である。この

タンパク質のC末端部を用いることが好ましい。L y t Aは、N - アセチル - L - アラニン・アミダーゼと、アミダーゼL y t A ( L y t A遺伝子によってコードされている (Gene、第43巻、265~272ページ、1986年) ) と、ペプチドグリカン骨格における所定の結合を特異的に分解するオートリシンを合成する肺炎球菌に由来する。L y t Aタンパク質のC末端領域は、コリンや、D E A Eなどのコリンのアナログに対する親和性に関与している。この特性を利用して、融合タンパク質の発現に役立つ、大腸菌のC - L y t Aを発現するプラスミドが開発されている。C - L y t A断片をアミノ末端に有するハイブリッド・タンパク質の精製については、Biotechnenology、第10巻、795~798ページ、1992年に記載されている。L y t Aタンパク質のC末端にあって残基番号178から始まる繰り返し部分、例えば残基番号188~305を用いることが可能である。

#### 【0041】

本発明には、上記のポリペプチドの変異体も含まれる。すなわち、参照基準と比べて保存されたアミノ酸置換だけが異なるポリペプチドも含まれる。なお保存されたアミノ酸置換とは、1つの残基が特性の似た別の残基で置換されることである。そうした置換の典型例は、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン相互の置換；セリンとトレオニンの置換；酸性残基であるアスパラギン酸とグルタミン酸の置換；アスパラギンとグルタミンの置換；塩基性残基であるリジンとアルギニンの置換；芳香性残基であるフェニルアラニンとチロシンの置換である。

#### 【0042】

本発明のポリペプチドは、適切な任意の方法で調製することができる。そうしたポリペプチドとしては、単離した天然のポリペプチド、組み換えによるポリペプチド、合成したポリペプチド、これらの方法を組み合わせて作ったポリペプチドが挙げられる。このようなポリペプチドを調製する方法は従来技術で周知である。

#### 【0043】

本発明において使用されるポリペプチドはH a e m o p h i l u s i n f l u e n z a eから由来したものであることが最も好ましいが、分類学上同じ属の他の生物から得られたものも好ましい。本発明のポリペプチドは、例えば、分類

学上同じ科または目の生物から得られたものでもよい。

【0044】

ポリヌクレオチド

本発明の1つの目的は、本明細書中に記載するワクチン製剤中での使用又はその製造における、BASB070ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、特に本明細書でBASB070と表記するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドのための使用を提供することである。

【0045】

本発明の特に好ましい実施態様では、このポリヌクレオチドは、完全長の遺伝子を含んでいて配列番号1又は3で与えられる配列を有するBASB070ポリペプチドをコードする領域、またはその変異体をコードする領域を含む。

【0046】

配列番号1又は3で与えられるBASB070ポリヌクレオチドは、Haemophilus influenzae株Rd KW20とntHi3224に由来するBASB070ポリヌクレオチドである。

【0047】

配列番号1又は3で与えられるポリヌクレオチド配列など、この明細書の情報を用いると、標準的なクローニング法およびスクリーニング法を利用し、次に完全長のクローンを得ることによって、BASB070ポリペプチドをコードする本発明のポリヌクレオチドを得ることができる。例えば配列番号1又は3で与えられるポリヌクレオチド配列などの本発明のポリヌクレオチド配列を得るためには、大腸菌またはそれ以外の適切な宿主の中で、Haemophilus influenzaeの染色体DNAのクローンのライブラリーを、部分配列から由来し、好ましくは17マーまたはそれよりも長い放射線標識したオリゴヌクレオチドでプローブするのが一般的である。次に、ストリンジェント・ハイブリダイゼーションを行なうと、プローブのDNAと同じDNAを有するクローンを識別することができる。もとのポリペプチド配列またはポリヌクレオチド配列から設計したシーケンシング用プライマーを用いたハイブリダイゼーションを通じてこのように同定された個々のクローンをシーケンシングすることにより、ポリ

ヌクレオチド配列を両方の方向に伸長させ、完全長遺伝子の配列を決定することができる。便利には、このようなシーケンシングは、例えばプラスミド・クローンから調製した変性した二本鎖DNAを用いて実施することができる。適切な方法は、マニアティス、T、フリッチ、E.F.、サムブルック他、『分子クローニング：実験室マニュアル』第2版（コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー・プレス、コールド・スプリング・ハーバー、ニューヨーク州、1989年）に記載されている（特に「ハイブリダイゼーションによるスクリーニング」1.90と、「変性した二本鎖DNA鋳型のシーケンシング」13.70を参照のこと）。直接的にゲノムDNAのシーケンシングを行なって完全長遺伝子の配列を得ることもできる。

#### 【0048】

さらに、配列番号1又は3で与えられる各DNA配列は、配列番号2又は4で与えられるアミノ酸残基とほぼ同数のアミノ酸残基を有するタンパク質をコードするオープン・リーディング・フレームを含んでいる。このタンパク質の推定分子量は、当業者には周知のアミノ酸残基の分子量の値を用いて計算することができる。

#### 【0049】

配列番号1のポリヌクレオチドは、配列番号1のヌクレオチド番号1の開始コドンとヌクレオチド番号2740から始まる終止コドンの間で、配列番号2のポリペプチドをコードしている。

#### 【0050】

配列番号3のポリヌクレオチドは、配列番号3のヌクレオチド番号1の開始コドンとヌクレオチド番号2755から始まる終止コドンの間で、配列番号4のポリペプチドをコードしている。

#### 【0051】

本発明のさらに別の側面によれば、以下のものを含む単離されたポリヌクレオチド、または以下のものからなる単離されたポリヌクレオチドが提供される。

(a) 配列番号1又は3それぞれの全長にわたって配列番号1又は3と少なくとも85%が一致、好ましくは少なくとも90%が一致、さらに好ましくは少なく

とも95%が一致、それ以上に好ましくは少なくとも97~99%が一致または完全に一致したポリヌクレオチド配列；または

(b) 配列番号2又は4それぞれの全長にわたって配列番号2又は3と少なくとも85%が一致、好ましくは少なくとも90%が一致、さらに好ましくは少なくとも95%が一致、それ以上に好ましくは少なくとも97~99%が一致または100%正確に一致したポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列。

#### 【0052】

本発明において使用されるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、*Haemophilus influenzae*以外の種からのホモログやオソログも含め、配列番号1又は3の配列またはその断片からなる標識したプローブまたは検出可能なプローブ、あるいはこれらの配列またはその断片を含む標識したプローブまたは検出可能なプローブを用いてストリンジェント・ハイブリダイゼーション条件（例えば、温度が45~65、SDSの濃度が0.1~1%）のもとで適切なライブラリーをスクリーニングし、完全長遺伝子および/またはそのポリヌクレオチド配列を含むゲノム・クローンを単離するステップを含む方法によって得ることができる。

#### 【0053】

本発明により、配列番号1又は3の中のコード配列（オープン・リーディング・フレーム）と全長にわたって一致するポリヌクレオチド配列が提供される。さらに本発明により、成熟ポリペプチドのためのコード配列またはその断片のほか、成熟ポリペプチドのためのコード配列またはリーディング・フレーム中にあって別のコード配列を有する断片が提供される。別のコード配列とは、例えば、リーダー配列または分泌配列、プレタンパク質配列、プロタンパク質配列、プレプロタンパク質配列をコードする配列である。本発明のポリヌクレオチドは、少なくとも1つの非コード配列も含んでいてよい。例示するならば、少なくとも1つの非コード5'配列や3'配列、例えば転写はされるが翻訳はされない配列や、終結シグナル（依存性終結シグナルや非依存性終結シグナルなど）、リボソーム結合部位、コザック配列、mRNAを安定化させる配列、イントロン、ポリアデニル化シグナルなどが挙げられるが、これだけに限定されるわけではない。

ポリヌクレオチド配列は、付加アミノ酸をコードする付加コード配列も含んでいてよい。例えば、融合したポリペプチドの精製を容易にするマーカー配列をコードすることができる。本発明のいくつかの実施態様では、マーカー配列は、pQEベクター（ギアジェン社）の中に与えられるヘキサヒスチジン・ペプチド（ゲンツ他、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、第86巻、821～824ページ、1989年）、またはHAペプチド・タグ（ウイルソン他、Cell、第37巻、767ページ、1984年）である。そのどちらも、融合することになるポリペプチド配列を精製するのに役立てることができる。本発明のポリヌクレオチドは、構造遺伝子と、それにもともと付随していて遺伝子の発現を制御する配列とを有するポリヌクレオチドも含んでいる。ただし、本発明のポリヌクレオチドに含まれているのがそれだけとは限らない。

#### 【0054】

配列番号2又は4のBASB070ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列は、それぞれ配列番号1のヌクレオチド番号1～2739に含まれるポリペプチド・コード配列と同じ、配列番号3のヌクレオチド番号1～2754に含まれるポリペプチド・コード配列と同じであってよい。あるいは、遺伝暗号の冗長性（縮重）の結果として、配列番号2又は4のポリペプチドをコードする配列であってもよい。

#### 【0055】

“ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド”という表現は、この明細書では、本発明のポリペプチド、特に細菌のポリペプチド、さらに特定するならば、配列番号2又は4で与えられるアミノ酸配列を有するHaemophilus influenzaeのBASB070ポリペプチドをコードする配列を含むポリヌクレオチドのことを意味する。この表現は、ポリペプチドをコードする単一の連続領域または不連続領域（例えば、組み込まれたファージ、組み込まれた挿入配列、組み込まれたベクター配列、組み込まれたトランスポゾン配列によって中断されたポリヌクレオチド、またはRNAの編集、ゲノムDNAの再構成のために中断されたポリヌクレオチド）に加え、やはりコード配列および/または非コード配列を含んでいる可能性のある付加領域を含むポリヌクレオチドのことも

意味する。

【0056】

本発明はさらに、配列番号2又は4の推定アミノ酸配列を有するポリペプチドの変異体をコードする、この明細書に記載したポリヌクレオチドの変異体にも関する。本発明のポリヌクレオチドの断片は、例えば、本発明の完全長ポリヌクレオチドを合成するのに用いることができる。

【0057】

さらに、特に好ましい実施態様によれば、配列番号2又は4で与えられるBASB070ポリペプチドのアミノ酸配列のうち、いくつかのアミノ酸残基、例えば5～10個、1～5個、1～3個、2個、1個、0個のアミノ酸残基が置換、変更、欠失、および/または、付加された状態が任意に組み合わせられたBASB070変異体をコードするポリヌクレオチドが提供される。その中でも特に好ましいのは、BASB070ポリペプチドの特性および活性を変化させないサイレントな置換、付加、欠失である。

【0058】

さらに、本発明の好ましい実施態様によれば、全長にわたって少なくとも85%が配列番号2又は4で与えられるアミノ酸配列を有するBASB070ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドと一致するポリヌクレオチドと、そのポリヌクレオチドと相補的なポリヌクレオチドが提供される。この点に関し、全長にわたって少なくとも90%が一致するポリヌクレオチドが特に好ましく、そうした特に好ましいポリヌクレオチドの中でも、少なくとも95%が一致するポリヌクレオチドが特に好ましい。さらに、少なくとも95%が一致するポリヌクレオチドの中でも少なくとも97%が一致するポリヌクレオチドがさらに好ましく、その中でも少なくとも98%一致するもの、少なくとも99%一致するものがそれ以上に好ましく、少なくとも99%一致するものがより一層好ましい。

【0059】

好ましい実施態様によれば、配列番号1又は3のDNAによってコードされる成熟ポリペプチドと実質的に同じ生物学的な機能または活性を保持しているポリペプチドをコードするポリヌクレオチドが提供される。

## 【0060】

本発明の好ましいいくつかの実施態様によれば、B A S B 0 7 0 ポリヌクレオチド配列、例えば配列番号1又は3のポリヌクレオチドと特に厳しい条件下においてハイブリダイズするポリヌクレオチドが提供される。

## 【0061】

本発明はさらに、この明細書に記載したポリヌクレオチド配列とハイブリダイズするポリヌクレオチドに関する。この点に関し、本発明は、特に、この明細書に記載したポリヌクレオチドとストリンジェント条件下においてハイブリダイズするポリヌクレオチドに関する。この明細書で用いる“ストリンジェント ( s t r i n g e n t ) 条件”、“ストリンジェント・ハイブリダイゼーション条件”という表現は、配列間で少なくとも95%、好ましくは少なくとも97%が一致した場合にのみ起こるハイブリダイゼーションのことを意味する。厳しいハイブリダイゼーション条件の具体例は、50%ホルムアミド、5×SSC(150mMのNaCl、15mMのクエン酸三ナトリウム)、50mMのリン酸ナトリウム(pH7.6)、5×デンハルト溶液、10%硫酸デキストラン、20µg/mlの変性、切断したサケ精子DNAを含む溶液中で42℃にて一晩培養し、次に、ハイブリダイゼーション用支持体を約65℃にて0.1×SSCの中で洗浄するというものである。ハイブリダイゼーションと洗浄の条件は周知であり、例えばサムブルック他、『分子クローニング：実験室マニュアル』第2版(コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー・プレス、コールド・スプリング・ハーバー、ニューヨーク州、1989年)の特に第11章に記載されている。本発明のポリヌクレオチド配列には溶液ハイブリダイゼーションを行なうこともできる。

## 【0062】

B A S B 0 7 0 遺伝子のコード領域は、配列番号1又は3で与えられるDNA配列を用いてオリゴヌクレオチド・プローブを合成し、このプローブを用いてスクリーニングを行なうことによって単離できる。そこで、本発明の遺伝子と相補的な配列を有する標識したオリゴヌクレオチドを用いてcDNA、ゲノムDNA、またはmRNAのライブラリーをスクリーニングし、ライブラリーのどのメンバーにプローブがハイブリダイズするかを確認する。

## 【0063】

完全長DNAを得るため、または短いDNAを伸長させるためには、当業者が利用している周知の方法がいくつかある。例えば、cDNA末端高速増幅(RACE)法に基づいた方法である(例えば、フローマン他、PNAS USA、第85巻、8998~9002ページ、1988年を参照のこと)。最近この技術が改良されて例えばMarathon(登録商標)法(クロンテック・ラボラトリーズ社)となり、従来よりも長いcDNAの探索が非常に簡単になった。このMarathon(登録商標)法では、cDNAは選択した組織から抽出したmRNAから調製され、“アダプター”配列が各末端部に連結される。次に、遺伝子特異的なオリゴヌクレオチド・プライマーとアダプター特異的なオリゴヌクレオチド・プライマーを組み合わせる核酸の増幅(PCR)を行ない、DNAの“欠けている”5'末端を増幅する。次に、“入れ子になった”プライマー、すなわち増幅された産物の中でアニールするよう設計されたプライマー(代表例は、アダプター配列において3'末端をさらにアニールするアダプター特異的なプライマーや、選択した遺伝子配列において5'末端をさらにアニールする遺伝子特異的なプライマー)を用いてPCR反応を繰り返す。次に、この反応の産物をDNAシーケンシングにより解析し、存在しているDNAに直接この産物を結合させることによって、あるいは5'プライマーを設計するための新しい配列情報を用いて独立した完全長PCRを行なうことによって完全長DNAを構成し、完全に配列を得ることができる。

## 【0064】

本発明により、成熟タンパク質に対してアミノ末端またはカルボキシル末端にアミノ酸が付加されたポリペプチド、または成熟ポリペプチド内のアミノ酸からなるポリペプチド(成熟した形態が例えばポリペプチド鎖を2本以上持っている場合)をコードするポリヌクレオチドも提供される。このような配列はいろいろな機能を有するが、中でも、タンパク質を前駆体から成熟した形態へと処理する際にある役割を演じていたり、タンパク質の輸送を可能にしたり、タンパク質の半減期を長くしたり短くしたり、アッセイまたは産生のためにタンパク質の取り扱いを容易にしたりできる可能性がある。生体内では一般的なことだが、付加さ

れたアミノ酸は細胞の酵素によって成熟タンパク質から除去される可能性がある。

#### 【0065】

前駆体タンパク質は、成熟タンパク質に1つまたはそれ以上のプロ配列が融合した形態であるため、不活性になっている可能性がある。プロ配列を除去すると、そうした不活性な前駆体は一般に活性化される。プロ配列のいくつかまたはすべてを除去すると活性化させることができる。一般に、このような前駆体をプロタンパク質と呼ぶ。

#### 【0066】

本発明の1つの側面によれば、本発明のポリヌクレオチドを疾病の治療または予防、特に遺伝子免疫法に利用する方法が提供される。これを、以下より詳しく、“ワクチン”の章で説明する。

#### 【0067】

本発明のポリヌクレオチドを遺伝子免疫法に利用する際には、適切なデリバリー方法を用いることが好ましかろう。例えば、プラスミドDNAを筋肉に直接注射する方法（ウォルフ他、Hum. Mol. Genet.、第1巻、363ページ、1992年；マンソープ他、Hum. Gene. Ther.、第4巻、419ページ、1983年）、特定のタンパク質担体と複合体を形成したDNAのデリバリー（ウー他、J. Biol. Chem.、第264巻、16985ページ、1989年）、DNA-リン酸カルシウム沈殿法（ベンヴェニスティとリシェフ、PNAS USA、第83巻、9551ページ、1986年）、さまざまな形態のリポソーム内にDNAを包み込む方法（カナダ他、Science、第243巻、375ページ、1989年）、粒子衝撃（タン他、Nature、第356巻、152ページ、1992年；アイゼンブラウン他、DNA Cell Biol.、第12巻、791ページ、1993年）、クローニングしたレトロウイルス・ベクターを用いたインビボ感染（シーガー他、PNAS USA、第81巻、5849ページ、1984年）といった方法がある。

#### ベクター、宿主細胞、発現系

本発明は、本発明の1つまたは複数のポリヌクレオチドを含むベクターと、本発明のベクターを用いて遺伝子改変した宿主細胞と、組み換え技術による本発明のポリペプチドの産生とに関する。本発明のDNA構造体に由来するRNAを用

いてそのようなタンパク質を産生させるには、無細胞な翻訳系も用いることができる。

#### 【0068】

本発明の組み換えポリペプチドは、発現系を含む遺伝子改変した宿主細胞をもとにして当業者に周知の方法で調製することができる。したがって、さらに別の側面として、本発明は、本発明の1つまたは複数のポリヌクレオチドを含む発現系と、その発現系を用いて遺伝子改変した宿主細胞と、組み換え技術による本発明のポリペプチドの産生とに関する。

#### 【0069】

本発明のポリペプチドを遺伝子組み換えにより産生させるには、遺伝子工学により宿主細胞に発現系またはその一部、あるいは本発明のポリヌクレオチドを組み込む。ポリヌクレオチドを宿主細胞に導入するには、標準的な実験の手引書に記載されている方法を用いる。実験の手引書としては、例えば、デイヴィス他、『分子生物学における基本的な方法』（1986年）、サムブルック他、『分子クローニング：実験室マニュアル』第2版（コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー・プレス、コールド・スプリング・ハーバー、ニューヨーク州、1989年）がある。方法としては、例えば、リン酸カルシウム・トランスフェクション、DEAE-デキストランを媒介としたトランスフェクション、トランスベクション、微量注入、陽イオン性脂質を媒介としたトランスフェクション、電気穿孔、形質導入、スクレープ・ローディング、バリスティック導入、感染がある。

#### 【0070】

適切な宿主細胞の代表例としては、細菌細胞である連鎖球菌、ブドウ球菌、腸球菌、大腸菌、放射菌、シアノバクテリア、枯草菌、モラクセラ・カタラーリス (*Moraxella catarrhalis*)、インフルエンザ菌、髄膜炎菌の細胞；菌類の細胞である酵母、クレイヴェロミセス (*Kluyveromyces*)、サッカロミセス、担子菌、カンジダ・アルビカンス (*Candida albicans*)、コウジカビの細胞；昆虫の細胞であるショウジョウバエ S2、スポドプテラ (*Spodoptera*) Sf9の細胞；動物の細胞である CHO、COS、HeLa、C127、3T3、BHK、293、CV-1、バ

ウエス黒腫の細胞；植物の細胞である裸子植物、被子植物の細胞が挙げられる。

【0071】

本発明のポリペプチドを産生させるのに多彩な発現系を用いることができる。そのようなベクターとしては、特に、染色体由来のベクター、エピソーム由来のベクター、ウイルス由来のベクターが挙げられる。具体的には、細菌プラスミド由来のベクター、バクテリオファージ由来のベクター、トランスポゾン由来のベクター、酵母エピソーム由来のベクター、挿入要素由来のベクター、酵母染色体要素由来のベクターや、バキュロウイルス、SV40などのパポバウイルス、ワクシニアウイルス、アデノウイルス、鶏痘ウイルス、仮性狂犬病ウイルス、ピコルナウイルス、レトロウイルス、アルファウイルスなどのウイルスに由来するベクターのほか、これらの組み合わせに由来するベクター、例えばプラスミドとバクテリオファージの遺伝子要素であるコスミドとファージミドの組み合わせに由来するベクターが挙げられる。発現系構造体は、発現の調節と発生を制御する領域を含んでいてよい。一般に、宿主内でポリヌクレオチドの維持、伝播、発現および/またはポリペプチドの発現をさせるのに適した任意の系またはベクターを用いて発現させることができる。周知のさまざまな一般的な方法のうちの任意の方法を用いて適切なDNA配列を発現系に挿入することができる。そうした方法は、例えば、サムブルック他、『分子クローニング：実験室マニュアル』（前掲）に記載されている。

【0072】

本発明のポリペプチドは、周知の方法によって組み換え細胞培養物から回収し、精製することができる。周知の方法としては、例えば、硫酸アンモニウムまたはエタノールによる沈殿、酸抽出、陰イオンまたは陽イオン交換クロマトグラフィ、ホスホセルロース・クロマトグラフィ、疎水性相互作用クロマトグラフィ、アフィニティ・クロマトグラフィ、ヒドロキシルアパタイト・クロマトグラフィ、レクチン・クロマトグラフィが挙げられる。精製には高性能液体クロマトグラフィを利用するのが最も好ましい。ポリペプチドが細胞内合成、単離、精製の間に変性した場合には、周知の方法を用いてタンパク質を再度折り畳み、活性な立体配座を再現することができる。

## 【0073】

発現系は、ウイルスや細菌などの生きた組み換え微生物であってもよい。対象とする遺伝子を生きた組み換えウイルスや細菌のゲノムに挿入することができる。この生きたベクターを接種して生体に感染させると、抗原が生体内で発現し、免疫応答が誘導されることになる。この目的で使用されるウイルスや細菌としては、例えば、ポックスウイルス（例えばワクシニア、禽痘、カナリア痘）、アルファウイルス（シンドビスウイルス、セムリキ森林ウイルス、ベネズエラ馬脳炎ウイルス）、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ピコルナウイルス（ポリオウイルス、ライノウイルス）、ヘルペスウイルス（水痘帯状ヘルペスウイルスなど）、リステリア菌、サルモネラ菌、ナイセリア菌、BCGが挙げられる。これらのウイルスや細菌は毒性を持っている可能性があり、生ワクチンを得るためにさまざまな方法で毒性を弱めることができる。このような生ワクチンも本発明の一部である。

診断法、予後予測法、血清型分類法、突然変異検出法

本発明は、本発明のBASB070というポリヌクレオチドとポリペプチドを診断用試験として用いることにも関する。真核生物、特に哺乳類、その中でもヒトにおけるBASB070ポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチドを検出することにより、疾病の診断、疾病の段階分類、感染した生体の薬剤に対する反応を診断する方法が提供されることになる。真核生物、特に哺乳類、その中でもヒト、その中でもBASB070という遺伝子またはタンパク質を含む生物に感染したヒト、またはその生物の感染が疑われるヒトは、周知のさまざまな方法ならびにこの明細書に記載した方法によって、核酸またはアミノ酸レベルで検出することが可能である。

## 【0074】

予後、診断、またはそれ以外の解析のためのポリペプチドとポリヌクレオチドは、感染が推定される個体および/または感染した個体の体内物質から得ることができる。他の任意の供給源、特にDNAまたはRNAに由来するポリヌクレオチドは、直接検出に用いること、あるいは解析を行なう前にPCRまたはその他の任意の方法で酵素による増幅を行なうことができる。RNA、特にmRNAや

、cDNA、ゲノムDNAも同様にして用いることができる。増幅を行なうことにより、個人に感染した生物またはその個人の体内に住み着いている生物の種や菌株のキャラクテリゼーションを、その生物から選択したポリヌクレオチドの血清型を分析することにより実現できる。増幅された産物を、関連した生物、好ましくは同じ属の異なる種、または同じ種の異なる株から選択した参照配列の血清型と比較した場合のサイズ変化により、欠失および挿入を検出することができる。点突然変異は、増幅したDNAを、標識したBASB070ポリヌクレオチド配列とハイブリダイズさせることにより同定できる。完全に一致した配列、またはかなりの割合が一致した配列は、DNAとRNAのそれぞれについてDAアーゼまたはRNアーゼによる消化によって、あるいは溶解温度または再生キネティックスの差を検出することによって、不完全にした一致していない複製、またはかなりの割合が一致していない複製と区別することができる。ポリヌクレオチド配列の差は、参照配列と比較した場合のゲル中におけるポリヌクレオチド断片の電気泳動における移動度の変化としても検出することができる。その場合に変性剤は用いても用いなくてもよい。ポリヌクレオチドの差は、DNAまたはRNAを直接シーケンシングすることによっても検出することができる。例えば、マイヤーズ他、Science、第230巻、1242ページ、1985年を参照のこと。特定の位置における配列の変化は、RNアーゼ、V1、S1保護アッセイなどのヌクレアーゼ保護アッセイや、化学的切断法によっても明らかにすることができる。例えば、コットン他、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、第85巻、4397~4401ページ、1985年を参照のこと。

#### 【0075】

別の実施態様では、BASB070ヌクレオチド配列またはその断片を含むオリゴヌクレオチド・プローブをアレイに構成して、例えば遺伝子突然変異、血清型、分類、同定のスクリーニングを効果的に行なうことができる。アレイ技術は周知で一般性があるため、遺伝子発現、遺伝子連鎖、遺伝子可変性などの分子遺伝学のさまざまな問題に適用することができる（例えば、チー他、Science、第274巻、610ページ、1996年を参照のこと）。

#### 【0076】

そこで別の側面として、本発明は、以下のものを含む診断キットに関する。

(a) 本発明のポリヌクレオチド、好ましくは配列番号1又は3のヌクレオチド配列、またはその断片；

(b) (a)の配列と相補的なヌクレオチド配列；

(c) 本発明のポリペプチド、好ましくは配列番号2又は4のポリペプチド、またはその断片；又は

(d) 本発明のポリペプチドに対する抗体、好ましくは配列番号2又は4のポリペプチドに対する抗体。

#### 【0077】

このようなキット(a)、(b)、(c)又は(d)のいずれもが実質的な成分を含んでいることが理解されよう。このようなキットは、特に、疾病の診断または疾病に対する感受性の診断に用いられる。

#### 【0078】

本発明は、診断用試薬としての本発明のポリヌクレオチドの利用法にも関する。本発明のポリヌクレオチド、好ましくは配列番号1又は3のポリヌクレオチドが突然変異して過少発現、過剰発現、または変化した発現を起こすと疾病や病原性と関係してくるので、そうした突然変異を検出することは診断の手段となり、疾病の診断、疾病の予後予測、疾病段階の決定、疾病に対する感受性の確認の参考にしたり、そうしたことを明確にしたりすることができる。このようなポリヌクレオチドに突然変異を起こした生物、特にそのような状態の感染生物は、さまざまな方法、例えばこの明細書の別の箇所に記載した方法によってポリヌクレオチド・レベルで検出することができる。

#### 【0079】

本発明のヌクレオチド配列は、生物の染色体の同定のためにも有益である。この配列は、生物の染色体上の特定の位置を、特に *Haemophilus influenzae* 染色体を、特別に標的とし、そしてこれとハイブリダイズすることができる。本発明に従って染色体に関連配列をマッピングすることは、これらの配列を、ある生物の病因の潜在的及び/又は生態学的なニッチ、及び/又はある生物の薬剤耐性、並びにその遺伝子のその生物に対する不可欠性と関連させ

ることによって重要なステップであることができる。一旦、配列が正確な染色体位置にマッピングされれば、その染色体上の配列の物理的な位置が、遺伝子マップ・データと相関されることができる。このようなデータは、配列データベース中にオンラインで見られることができる。遺伝子と、同一の染色体領域にマッピングされている病気との間の関係を次に、知られた遺伝子方法、例えば、関連分析（物理的に隣接する遺伝子の同時遺伝）又は接合試験、例えばコンジュゲーションによるものを通して、同定される。

#### 【0080】

第1の表現型を有する生物と、異なる第2の表現型を有する生物の間の、ポリヌクレオチド及び/又はポリペプチド配列における差も決定することができる。突然変異が第1の表現型を有する生物のいくつか又は全部において観察されるが、第2の表現型を有する生物においては観察されない場合、その突然変異は、第1の表現型の原因作用物質であろう。

#### 【0081】

本発明のポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチドに突然変異または多型（対立遺伝子の変異）を有する生物からの細胞は、さまざまな方法によってポリヌクレオチドまたはポリペプチドのレベルで検出し、例えば血清型を決めることもできる。例えば、RT-PCRを利用してRNAにおける突然変異を検出することができる。RT-PCRを自動化した検出システム、例えばジーンスキャンと組み合わせることが特に好ましい。RNA、cDNA、ゲノムDNAに対してもPCRを行なうことができる。一例として、BASB070ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドと相補的なPCRプライマーを用いて突然変異を同定したり解析したりすることができる。

#### 【0082】

本発明はさらに、とりわけ、個体に由来するサンプル、例えば体を構成している物質に由来するサンプルから単離したBASB070 DNAおよび/またはRNAを増幅するためのプライマーを提供する。感染した個体から単離したポリヌクレオチドをこのプライマーを用いて増幅すると、次にさまざまな方法によりそのポリヌクレオチドの配列を明らかにすることができる。このようにして、ポ

リヌクレオチド配列における突然変異を検出し、その突然変異をもとにして、感染状態またはその段階や進行状況の診断および/または予後予測、感染体の血清型決定および/または分類を行なうことができる。

#### 【0083】

本発明によればさらに、疾病の診断、好ましくは細菌感染の診断、さらに好ましくは*Haemophilus influenzae*によって起こる感染を診断する方法も提供される。この方法には、個体に由来するサンプル、例えば体を構成している物質に由来するサンプルから、表1の配列〔配列番号1又は3〕を有するポリヌクレオチドの発現レベルの上昇を測定する操作が含まれる。BASB070ポリヌクレオチドの発現の上昇または減少は、ポリヌクレオチドの定量法として当業者には周知の方法のうちの任意の方法を用いて測定することができる。そうした方法としては、例えば、増幅法、PCR法、RT-PCR法、RNAアーゼ保護法、ノーザン・ブロット法、分光法、その他のハイブリダイゼーション法がある。

#### 【0084】

さらに、対照用の正常組織サンプルと比べることによってBASB070ポリペプチドの過剰発現を検出するという本発明の診断法を利用し、例えば感染の存在を検出することができる。宿主に由来するサンプル、例えば体を構成している物質に由来するサンプル中のBASB070ポリペプチドのレベルを測定するのに用いることができるアッセイ法は当業者には周知である。そうしたアッセイ法としては、放射線免疫検出法、競合結合アッセイ、ウエスタン・ブロット解析法、抗体サンドイッチ・アッセイ、抗体検出法、ELISA法などがある。

#### 【0085】

本発明のポリヌクレオチドは、ポリヌクレオチド・アレイの成分、好ましくは高密度アレイまたはグリッドの成分として用いることができる。この高密度アレイは、診断および予後予測に特に有効である。例えば、それぞれが、異なる遺伝子に加えて本発明の1つまたは複数のポリヌクレオチドを含むスポットの集合を用い、体を構成している物質から得られた、またはそうした物質に由来するプローブを用い、ハイブリダイゼーションまたは核酸増幅などを利用してプロービン

グを行ない、個体の体内に特定のポリヌクレオチド配列または関連した配列が存在しているかどうかを決定することができる。そのようなものが存在しているということは、病原体、特に *Haemophilus influenzae* が存在していることを示唆している可能性があり、疾病または疾病進行の診断および/または予後予測を明確にするのに役立つ可能性がある。配列番号1のポリヌクレオチド配列の多数の変異体を含むグリッドが好ましい。配列番号2のポリペプチド配列をコードするポリヌクレオチド配列の多数の変異体を含むグリッドも好ましい。

#### 抗体

本発明のポリペプチドとポリヌクレオチド、またはその変異体、またはそれを発現する細胞を免疫原として用い、そのようなポリペプチドまたはポリヌクレオチドに対して免疫特異的な抗体を産生させることができる。

#### 【0086】

本発明の好ましいいくつかの実施態様によれば、BASB070ポリペプチドまたはポリヌクレオチドに対する抗体が提供される。

#### 【0087】

本発明のポリペプチドまたはポリヌクレオチドに対する抗体は、本発明のポリペプチドおよび/またはポリヌクレオチド、あるいはエピトープを有するその一方または両方の断片、あるいはその一方または両方のアナログ、あるいはその一方または両方の発現する細胞を、動物、好ましくはヒトでない動物に一般的なプロトコルに従って投与することにより得ることができる。モノクローナル抗体を調製するためには、連続的細胞系培養によって産生される抗体を提供する任意の従来法を用いることができる。さまざまな方法があり、例えば、ケーラー、G、ミルシュタイン、C.、Nature、第256巻、495~497ページ、1975年；コズボー他、Immunology Today、第4巻、72ページ、1983年；コール他、『モノクローナル抗体とガン治療』（アラン R. リス社、1985年）の77~96ページが挙げられる。

#### 【0088】

一本鎖の抗体の産生法（アメリカ合衆国特許第4,946,778号）を利用

して本発明のポリペプチドまたはポリヌクレオチドに対する一本鎖の抗体を産生させることができる。また、トランスジェニック・マウス、またはそれ以外の生物や動物、例えば哺乳類を利用して、本発明のポリペプチドまたはポリヌクレオチドに対する免疫特異的なヒト化した抗体を発現させることができる。

#### 【0089】

別の方法として、ファージ提示法を利用して、抗BASB070を処理するためにスクリーニングされたヒト由来リンパ球のPCR増幅されたv-遺伝子のレパートリーから、あるいは実験されたことのないライブラリーから、本発明のポリペプチドに対する結合活性を有する抗体遺伝子を選択することができる（マッカファーティ他、Nature、第348巻、552～554ページ、1990年；マークス他、Biotechnology、第10巻、779～783ページ、1992年）。これら抗体の親和性は、例えばチェーン・シャッフリングによって向上させることもできる（クラクソン他、Nature、第352巻、628ページ、1991年）。

#### 【0090】

上記の抗体を用いて本発明のポリペプチドまたはポリヌクレオチドを発現するクローンを単離または同定し、例えばアフィニティ・クロマトグラフィによってそのポリペプチドまたはポリヌクレオチドを精製することができる。

#### 【0091】

したがって、特にBASB070ポリペプチドまたはBASB070ポリヌクレオチドに対する抗体を用いて感染、特に細菌感染を治療することができる。

#### 【0092】

ポリペプチドの変異体として、抗原、エピトープ、または免疫に関して等価な変異体は、本発明の特別な一側面を構成する。

#### 【0093】

抗体またはその変異体を修飾して個体の中で免疫性を低下させることが好ましい。例えば、個体がヒトである場合、抗体が“ヒト化され”ていて、ハイブリドーマに由来する抗体の相補性決定領域がヒトのモノクローナル抗体に移植されていることが最も好ましい。これについては、例えば、ジョーンズ他、Nature、第321巻、522～525ページ、1986年、またはテンペスト他、Biotechnology、第9巻

、266～273ページ、1991年に記載されている。

#### 【0094】

さらに別の側面として、本発明は、本発明のポリペプチドまたはその断片と、さまざまなサブクラスの免疫グロブリン(IgG、IgM、IgA、IgE)のH鎖またはL鎖の定常領域のさまざまな部分を含む遺伝子組み換え可溶性融合タンパク質に関する。免疫グロブリンとして好ましいのは、ヒトIgG、特にIgG1のH鎖の定常部分であり、そのヒンジ領域において融合が起こる。特別な実施態様によると、Fc部は、血液凝固第Xa因子を用いて切断することのできる切断配列を組み込むことによって簡単に除去することができる。本発明はさらに、遺伝子工学によるこの融合タンパク質の調製方法と、この融合タンパク質を利用して行なう薬剤のスクリーニング、診断、治療にも関する。本発明のさらに別の側面は、そのような融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドにも関する。融合タンパク質に関する技術の実例は、国際特許出願WO94/29458、WO94/22914に見ることができる。

#### ミモトープ

さらに別の側面として、本発明は、本発明のポリペプチドのミモトープに関する。ミモトープは、天然のペプチドと(配列または構造が)非常によく似たペプチド配列であり、天然のペプチドを認識する抗体によって認識される。従って、抗体結合性ミモトープに関する限り、ミモトープは、天然のペプチドを認識する抗体により認識されることができ；又は場合により好適な担体に結合されるとき天然のペプチドを認識する抗体を作り出すことができる。T細胞認識の場合、ミモトープは、天然のペプチドを認識する同一T細胞により認識されることができ；又は天然ペプチドを認識するT細胞応答を生成することができる。

#### 【0095】

ペプチド・ミモトープは、選択したアミノ酸を付加したり、欠失させたり、置換したりすることによって特定の目的用に設計することができる。したがってペプチドは、タンパク質担体と容易に結合できるように修飾することができる。例えば、いくつかの化学的結合法にとっては末端にシステインを含むようにすることが望ましかろう。それに加え、タンパク質担体と結合したペプチドにおいて、

そのペプチドの結合した末端とは反対側に疎水性末端を含むようにして、そのペプチドの結合していないこの自由な末端がタンパク質担体の表面と会合したままになっているようにすることが望ましかろう。そうすることにより、このペプチドが、もとの分子全体の文脈にあるときのペプチドの配座と非常によく似た配座になる。例えばペプチドは、N末端のシステインとC末端の疎水性のアミド化された尾部を持つように変えることができる。また、1つまたはそれ以上のアミノ酸についてD-立体異性体を付加または置換して、例えばペプチドの安定性を向上させるという好ましい誘導体を作ることができる。

#### 【0096】

ミモトープは、その配列方向が逆である点で、天然のペプチド配列のレトロ配列であることもできる；あるいは、その配列は全体的に又は少なくとも部分的にD-立体異性体アミノ酸から構成されることもできる（インバーソ（*inverso*）配列）。また、上記ペプチド配列は、その配列方向が逆であり、かつ、そのアミノ酸配列がD-立体異性体形をもつ点で、記号としてレトロ-インバーソ（*retro-inverso*）であることができる。レトロ、インバーソ、及びレトロ-インバーソ・ペプチドは、WO95/24916、及びWO94/05311中に記載されている。

#### 【0097】

また、ペプチド・ミモトープは、ファージ提示法などの方法を利用し、本発明のポリペプチドと結合することのできる抗体を用いて同定することができる（EP 0 552 267 B1）。この方法により、天然のペプチドと構造が似ており、したがってアンチ天然のペプチド抗体に結合できるが、必ずしも天然のポリペプチドとは配列がそれほど似てはいない多数のペプチド配列が生まれる。

#### ワクチン

本発明の別の側面は、個体、特に哺乳類、好ましくはヒトにおいて免疫応答を誘起する方法に関する。この方法は、その個体を、感染、特に細菌感染、中でも *Haemophilus influenzae* の感染から保護するため、抗体および/またはT細胞免疫応答を発生させるのに十分なBASB070ポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチド、あるいはその断片または変異体をこの個

体に接種する操作を含んでいる。

【0098】

本発明により、そのような免疫応答によって細菌の複製速度が遅くなる方法も提供される。

【0099】

本発明のさらに別の側面は、個体において免疫応答を誘起する別の方法に関する。この方法は、その個体に核酸ベクター、配列、またはリボザイムを供給して B A S B 0 7 0 ポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチド、あるいはその断片または変異体の発現を指示し、B A S B 0 7 0 ポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチド、あるいはその断片または変異体を生体内で発現させて、疾病がすでにその個体、好ましくはヒトの体内で発生しているかどうかに関係なく、その個体をその疾病から保護するために、抗体および/またはT細胞（例えばサイトカイン産生T細胞または細胞障害性T細胞を含む）の免疫応答の発生などの免疫応答を誘起する操作を含んでいる。遺伝子投与の一例は、その遺伝子を、粒子のコーティングなどとして望む細胞の中に急いで入れるというものである。このような核酸ベクターは、DNA、RNA、リボザイム、修飾された核酸、DNA/RNAハイブリッド、DNA-タンパク質複合体、またはRNA-タンパク質複合体を含むことができる。

【0100】

本発明のさらに別の側面は、個体、好ましくはヒトに導入されたときにその個体の体内で免疫応答を誘起することができて、その個体に B A S B 0 7 0 ポリヌクレオチドおよび/またはそれによってコードされたポリペプチドに対する免疫応答を誘起する免疫性組成物に関する。この免疫性組成物は、組み換え B A S B 0 7 0 ポリヌクレオチドおよび/またはそれによってコードされたポリペプチド、および/または、この B A S B 0 7 0 ポリヌクレオチド、それによってコードされたポリペプチド、または本発明の他のポリペプチドの抗体をコードし発現する DNA および/または RNA を含んでいる。この免疫応答を治療または予防に利用することが可能である。また、この免疫応答は、抗体免疫の形態および/または細胞免疫の形態、例えば C T L または C D 4 + T 細胞から生まれる細胞免疫

の形態を取ることができる。

#### 【0101】

BASB070ポリペプチドまたはその断片を、補タンパク質または化合物断片と融合させることが可能である。補タンパク質または化合物断片は、それ自体は抗体を産生させても産生させなくてもよいが、第1のタンパク質を安定化させて、抗原特性および/または免疫特性、好ましくは保護特性を有する融合タンパク質または修飾タンパク質を産生させることができるものである。したがって、組み換え融合タンパク質は、例えばインフルエンザ菌、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)、 $\beta$ -ガラクトシダーゼなどの抗原性補タンパク質、またはそのタンパク質を可溶化しその産生と精製を容易にする任意の他の比較的大きな補タンパク質からのリポタンパク質をさらに含んでいることが好ましい。さらに、補タンパク質は、そのタンパク質を受け入れる生物の免疫系を一般的に刺激するという意味のアジュバントとして作用することができる。補タンパク質は、第1のタンパク質のアミノ末端またはカルボキシル末端のいずれにか付着することができる。

#### 【0102】

本発明のワクチン組成物では、BASB070ポリペプチドおよび/またはポリヌクレオチド、その断片、そのミモトープ、その変異体が、上記の生きた組み換えベクター、例えば生きた細菌ベクターなどのベクター内に存在していてもよい。

#### 【0103】

BASB070ポリペプチドにとっては、生きていないベクター、例えば細菌の外膜小胞、すなわち“泡状突起(blebs)”も適している。OM泡状突起はグラム陰性菌の2層膜の外膜に由来するものであり、クラミジア・トラコマティス(*C. trachomatis*)やオウム病クラミジア(*C. psittacii*)を始めとする多数のグラム陰性菌において記録されている(ツウ, L. 他、FEMS Microbiol. Lett., 第163巻、223~228ページ、1998年)。泡状突起を発生させると報告されている細菌性病原体としては、ボルデテラ・ペルトゥシス(*Bordetella pertussis*)、ボレリア・ブルグドルフェリ(*Borrelia burgdorferi*)

*Borrelia burgdorferi*）、ブルセラ・メリテンシス (*Brucella melitensis*)、ブルセラ・オヴィス (*Brucella ovis*)、大腸菌、インフルエンザ菌、レジオネラ・プヌーモフィラ (*Legionella pneumophila*)、ナイセリア・ゴノロエア (*Neisseria gonorrhoeae*)、ナイセリア・メニンギティディス、スードモナス・アエルギノサ (*Pseudomonas aeruginosa*)、イエルシニア・エンテロコリティカ (*Yersinia enterocolitica*) などがあるが、これだけに限定されるわけではない。

#### 【0104】

泡状突起 (Blebs) は、もともとの配座において外膜タンパク質を提供できるという利点があり、したがってワクチンに特に有効である。泡状突起は、外膜にある1つまたはそれ以上の分子の発現が変化するように細菌を遺伝子改変することにより、ワクチン用に改良することもできる。そこで、例えば外膜の所望の免疫タンパク質の発現、例えばBASB070ポリペプチドの発現を(例えばプロモーターを変化させることによって)導入したり上方調節したりすることができる。その代わりに、あるいはそれに加えて、関係のない外膜分子(例えば、非保護抗原、または免疫優勢であるが可変性のあるタンパク質)または、有害な外膜分子(例えば、LPSなどの毒性分子、または自己免疫応答を誘起する可能性のある分子)の発現を下方調節することができる。これらの方法について以下に詳しく説明する。

#### 【0105】

BASB070遺伝子の非コード・フランキング領域は、その遺伝子の発現にとって重要な調節領域を含んでいる。この調節は、転写レベルと翻訳レベルの両方で起こる。遺伝子のオープン・リーディング・フレームの上流または下流に位置しているこれら領域の配列は、DNAシーケンシングによって得ることができる。この配列情報により、潜在的な調節モチーフを決定すること、例えばさまざまなプロモーター要素、ターミネーター配列、誘起可能な配列要素、リプレッサー、相変異の原因となる要素、シャイン・ダルガルノ配列、潜在的な二次構造を有する調節関与領域のほか、これ以外のタイプの調節モチーフや調節配列を決

定することができる。

【0106】

この配列情報により、BASB070 遺伝子の自然な発現を変化させることができる。遺伝子発現の上方調節は、プロモーター、シャイン・ダルガルノ配列、潜在的なりプレッサー、オペレータ要素、または関係のある他の要素を変えることによって実現できる。同様に、発現の下方調節は、似たような変更によって実現することができる。また、相変異配列を変化させることにより、遺伝子の発現を相変異の制御下に置いたり、この調節から独立させたりすることができる。別の方法では、遺伝子を1つまたはそれ以上の誘起要素の制御下に置いて、発現を制御できるようにすることができる。そうした制御の具体例としては、温度シフトによる誘起や、誘起性基質の付加、例えば選択した炭水化物またはその誘導體、微量元素、ビタミン、補因子、金属イオンなどの付加が挙げられるが、これだけに限定されるわけではない。

【0107】

上記のような変更は、いくつかの異なったやり方で導入することができる。遺伝子の発現に関係する配列の変更は、生体内でランダムな突然変異を起こした後、望む表現型を選択することによって実現できる。別の方法は、興味の対象となる領域を分離した後、その領域をランダムに突然変異させること、または部位特異的突然変異による置換、挿入、または欠失を起こさせることにより変化させることからなる。次に、このように変化した領域を相同的組み換えによって細菌の遺伝子に再導入して、遺伝子の発現に及ぼす効果を評価することができる。別の方法では、対象となる領域の配列に関する知識を利用して、天然の調節配列の全部または一部を置換または除去する。この場合、ターゲットとなる調節領域を分離・変更して、別の遺伝子からの調節要素、さまざまな遺伝子からの調節要素の組み合わせ、合成した調節要素、またはそれ以外の任意の調節要素が含まれるように、あるいは野生型の調節配列の特定の部分が除去されるようにする。するとこれらの変更された配列は、相同的組み換えを通じて細菌の遺伝子に再導入することができる。遺伝子発現の上方調節に利用できる可能性のある好ましいプロモーターとしては、ナイセリア・メニンギティディスまたはナイセリア・ゴノロエ

アに由来するプロモーターである *porA*、*porB*、*lbpB*、*tbpB*、*p110*、*1st*、*hpuAB*；*ompCD*、*copB*、*lbpB*、*ompE*、*UspA1*；*UspA2*；モラクセラ・カタラーリス (*M. Catarrhalis*) に由来する *TbpB*；インフルエンザ菌に由来する *p1*、*p2*、*p4*、*p5*、*p6*、*lpD*、*tbpB*、*D15*、*Hia*、*Hmw1*、*Hmw2* が挙げられるが、これだけに限定されるわけではない。

#### 【0108】

一実施態様によれば、遺伝子の発現は、(この遺伝子の上方配列を分離し、この配列をインビトロで変化させ、相同的組み換えによってゲノムを再導入する操作を通じて) この遺伝子のプロモーターをより強力なプロモーターと交換することにより変化させることができる。上方調節された発現は、細菌内と、細菌から選別した(細菌が作った)外膜小胞の中の両方で実現することができる。

#### 【0109】

別の実施態様によれば、上記の方法を利用して、ワクチンへの応用特性が改善された組み換え細菌株を生み出すことができる。そうした株としては、毒性を弱めた株、特定の抗原の発現が増えた株、免疫応答を妨げる遺伝子がロックアウトされた(またはその遺伝子の発現が低下した)株、免疫優勢なタンパク質の発現が調節された株、外膜小胞の選別が調節された株が挙げられるが、これだけに限定されるわけではない。

#### 【0110】

そこで本発明によれば、*BASB070* 遺伝子の変化した上流領域も提供される。この変化した上流領域は、外膜に位置する *BASB070* タンパク質の発現レベルを変化させる異種性調節要素を含んでいる。本発明のこの側面による上流領域は、*BASB070* 遺伝子上流にある配列を含んでいる。上流領域は、*BASB070* 遺伝子のすぐ上流から始まり、通常は、*ATG* 開始コドンからこの遺伝子の約 1000 bp 上流を超えない位置まで続いている。ポリシストロン性配列(オペロン)に位置する遺伝子の場合、上流領域は、対象となる遺伝子の直前、またはオペロン内の最初の遺伝子の前から始まることがある。本発明のこの側面による変化した上流領域は、*ATG* の 500 ~ 700 bp 上流の位置に異種性プ

ロモーターを含んでいることが好ましい。

【0111】

そこで本発明により、変化した細菌の泡状突起内に、B A S B 0 7 0 ポリペプチドが提供される。さらに本発明によれば、膜をベースとした生きていない泡状突起ベクターを生み出すことのできる宿主細胞が提供される。さらに本発明によれば、異種性調節要素を含む変化した上流領域を有するB A S B 0 7 0 遺伝子を含むベクターが提供される。

【0112】

さらに本発明によれば、本発明による宿主細胞と細菌の泡状突起を調製する方法が提供される。

【0113】

ワクチン抗原は、そのタンパク質の特性に依存して、さまざまな、本分野において知られた他の形態で提供されうる。例えば、リポタンパク質は、それらのN-末端に付加された脂質の疎水性のために、凝集し、そしてミセルを形成することができる。これらの構造の粒状性は、そのタンパク質の脂質化されていないバージョンに比較して、そのリポタンパク質の免疫原性を強化することができる。上記ミセルのサイズも、そのリポタンパク質の免疫原性に対して影響を及ぼすことができ、そしてこれは、例えば、抽出手順を調整することにより修飾されることができる。

【0114】

本発明によれば、さらに、組成物、特にワクチン組成物が提供されるほか、本発明のポリペプチドおよび/またはポリヌクレオチドと免疫促進性DNA配列を含む方法が提供される。免疫促進性DNA配列についてはサトウ, Y. 他、Science、第273巻、352ページ、1996年に記載されている。

【0115】

本発明によれば、さらに、Haemophilus influenzaeに感染したモデル動物における遺伝子を使った免疫確立実験で用いられるポリヌクレオチド構造体中において、上記のポリヌクレオチド、またはその特定の断片で細菌細胞の表面タンパク質の非可変領域をコードすることが知られている断片を

用いる方法も提供される。このような実験は、予防または治療のための免疫応答を起こすことのできるタンパク質エピトープを同定する上で特に役立つであろう。この方法により、感染に対して抵抗力のある動物、あるいは感染を除去することのできる動物の必要な器官に由来する特別な価値を有するモノクローナル抗体を、哺乳類、特にヒトにおける細菌感染、特に *Haemophilus influenzae* の感染の予防薬または治療方法の開発のためにまもなく調製できるようになると考えられている。

#### 【0116】

本発明には、本発明の免疫性組み換えポリペプチドおよび/またはポリヌクレオチドと、適切な基剤、例えば薬理的に受容可能な基剤とを含むワクチン製剤も含まれる。ポリペプチドとポリヌクレオチドは胃で分解される可能性があるため、それぞれを非経口的に投与することが好ましい。例えば、皮下、筋肉内、静脈内、皮内に投与する。非経口投与に適した製剤としては、抗酸化剤、緩衝溶液、細菌発育抑制化合物、製剤を個体の体液、好ましくは血液と等張にする溶質とを含む可能性のある水性、非水性の無菌注射液や；分散剤または増粘剤を含む可能性のある水性、非水性の無菌分散液が挙げられる。製剤は、単位用量、または複数回用量の容器、例えば密封したアンプルやガラス瓶の形態にすることができる。製剤は、凍結乾燥状態にして保管し、使用する直前に無菌基剤を添加するだけでよいようにすることができる。

#### 【0117】

本発明のワクチン製剤は、その製剤の免疫性を向上させるためにアジュバント系をさらに含んでいてもよい。

#### 【0118】

免疫応答は、大きく2つの典型的なカテゴリーに分けることができる。それは、体液を媒介とした免疫応答と細胞を媒介とした免疫応答である（伝統的に、抗体と、防護のための細胞エフェクター機構をそれぞれ特徴とする）。応答のこれらカテゴリーは、TH1タイプの応答（細胞を媒介とした応答）、TH2タイプの応答（体液を媒介とした応答）と呼ばれている。

#### 【0119】

典型的なTH1タイプの免疫応答は、抗原特異的でハプロタイプが限定された細胞毒性のあるTリンパ球と、ナチュラルキラー細胞の応答とを生み出すことが特徴であると言えよう、マウスでは、TH1タイプの応答は、IgG2aサブタイプの抗体を産生することを特徴とするのに対し、ヒトでは、この応答はIgG1タイプの抗体に対応する。TH2タイプの免疫応答は、免疫グロブリンのさまざまなイソタイプを産生させることを特徴とする。例えばマウスでは、IgG1、IgA、IgMが産生される。

#### 【0120】

これら2つのタイプの免疫応答が展開するとき裏で操っているのはサイトカインであると考えられることができる。TH1タイプのサイトカインがハイレベルだと、所定の抗原に対して細胞を媒介とした免疫応答が誘起され、TH2タイプのサイトカインがハイレベルだと、その抗原に対して体液を媒介とした免疫応答が誘起される傾向がある。

#### 【0121】

TH1タイプの免疫応答とTH2タイプの免疫応答の区別は厳密ではない。実際には、個体は、TH1が優勢である、あるいはTH2が優勢であると記述される免疫応答を支持することになる。しかし、ネズミ類のCD4-T細胞クローンにおいてモスマンとコフマンによって記述されているサイトカイン・ファミリーを考えると便利ながしばしばある(モスマン, T.R. とコフマン, R.L., 「TH1細胞とTH2細胞: さまざまな機能特性へに通じるさまざまなパターンのリンホカイン分泌」、Annual Review of Immunology、第7巻、145~173ページ、1989年)。一般に、TH1タイプの応答には、Tリンパ球によるIFN- $\gamma$ とIL-2というサイトカインの産生が伴っている。TH1タイプの免疫応答の誘起にしばしば直接関係する他のサイトカイン、例えばIL-12は、T細胞によって産生されない。これとは逆に、TH2タイプの応答には、IL-4、IL-5、IL-6、IL-13の分泌が伴っている。

#### 【0122】

ある種のワクチン・アジュバントは、TH1タイプまたはTH2タイプのサイトカイン応答のいずれかを刺激するのに特に適していることが知られている。一

般に、ワクチン接種後または感染後の免疫応答のTH1：TH2のバランスを示す最良の指標としては、抗原で再度刺激した後にインビトロでTリンパ球によるTH1タイプまたはTH2タイプのサイトカイン産生を直接測定すること、および/または、(ネズミ系においては)抗原特異的な抗体反応のIgG1：IgG2aの比を測定することが挙げられる。

#### 【0123】

したがってTH1タイプのアジュバントは、インビトロで抗体によって再度刺激を受けたときに、分離したT細胞群を選択的に刺激してTH1タイプのサイトカインをハイレベルに産生させ、CD8+細胞毒性Tリンパ球と、TH1タイプのアイソタイプに伴う抗原特異的免疫グロブリン応答の両方の展開を促進するアジュバントである。TH1タイプの細胞応答を選択的に刺激することのできるアジュバントは、国際特許出願WO94/00153、WO95/17209に記載されている。

#### 【0124】

3D-0-アクリル化モノホスホリル脂質A(3D-MPL)は、そうしたアジュバントの1つである。これは、GB2220211(リビ)により公知である。化学的には、これは、3D-0-アクリル化モノホスホリル脂質Aと4、5、または6アクリル化した鎖の混合物であり、リビ・イムノケム社、モンタナ州が製造している。3D-0-アクリル化モノホスホリル脂質Aの好ましい形態は、欧州特許第0689454B1号(スミスクライン・ビーチャム・バイオロジカルズ社)に開示されている。

#### 【0125】

3D-MPLの粒子は十分小さくし、0.22ミクロンの膜を通過して滅菌濾過されることが好ましい(欧州特許第0689454号)。

#### 【0126】

3D-MPLは、一用量あたり10μg~100μg、好ましくは25~50μg含まれることになろう。そのとき抗原は、典型例では一用量あたり2~50μg含まれることになろう。

#### 【0127】

別の好ましいアジュバントとしてはQS21がある。これは、キラヤに由来するHp1c精製された非毒性の分画である。場合によっては、これに3デ-0-アクリル化モノホスホリル脂質A(3D-MPL)を混合し、さらに基剤を混合することもできる。

【0128】

QS21の製造方法は、アメリカ合衆国特許第5,057,540号に開示されている。

【0129】

QS21を含む非反応性アジュバント製剤は、過去の文献に記載されている(WO96/33739)。QS21とコレステロールを含むそのような製剤は、抗原と合わせて処方したときにTH1を刺激するアジュバントとしてうまくいくことが知られている。

【0130】

TH1タイプの細胞応答を選択的に刺激するさらに別のアジュバントとしては、免疫調節性オリゴヌクレオチドがある。例えばメチル化されていないCpG配列が、WO96/02555に開示されている。

【0131】

TH1を刺激する上記のようなさまざまなアジュバントの組み合わせも、TH1タイプの細胞応答を選択的に刺激するアジュバントとして考えられる。例えば、QS21を3D-MPLと合わせて処方することができる。QS21:3D-MPLの比は、典型的には1:10から10:1であろうが、1:5から5:1であることが好ましく、実質的に1:1であることもしばしばある。最適な相乗効果が得られるQS21:3D-MPLの比の好ましい範囲は、2.5:1から1:1である。

【0132】

本発明のワクチン組成物には担体も含まれていることが好ましい。担体は、水中油型乳剤、またはアルミニウム塩、例えばリン酸アルミニウムや水酸化アルミニウムである。

【0133】

好ましい水中油型乳剤は、スクワレン、トコフェロール、トウイーン80（商標）などの代謝可能な油である。特に好ましい側面では、本発明のワクチン組成物中の抗原は、そのような乳剤中でQS21および3D-MPLと結合している。さらに、水中油型乳剤は、スパン85および/またはレシチンおよび/またはトリカプリリンを含んでいてもよい。

#### 【0134】

ヒトに投与する場合には、典型的には、QS21と3D-MPLがワクチン中に、一用量あたり1 $\mu$ g~200 $\mu$ g、例えば10~100 $\mu$ g、好ましくは10 $\mu$ g~50 $\mu$ g含まれることになろう。水中油型乳剤は、典型的には、2~10%のスクワレン、2~10%のトコフェロール、0.3%~3%のトウイーン80を含むことになろう。スクワレン：トコフェロールの比は、等しいか1未満であることが好ましい。というのも、このようにすると乳剤がより安定になるからである。スパン85が1%のレベルで存在していてもよい。場合によっては、本発明のワクチンに安定剤がさらに含まれていることが望ましい。

#### 【0135】

非毒性の水中油型乳剤は、毒性のない油、例えばスクワランまたはスクワレンと、乳化剤、例えばトウイーン80とを水溶性基剤の中に含んでいることが好ましい。水溶性基剤は、例えばリン酸緩衝溶液にすることができる。

#### 【0136】

水中油型乳剤中にQS21、3D-MPL、トコフェロールを含む特に強力なアジュバント製剤は、WO95/17210に記載されている。

#### 【0137】

本発明により、本発明のワクチン製剤に加えて他の抗原、特にガンの治療、自己免疫疾患や関連した疾患の治療に有効な抗原を含む多価のワクチン組成物が提供される。そのような多価のワクチン組成物には、上記のTH-1を誘起するアジュバントが含まれていてもよい。

#### 【0138】

本発明を特定のBASB070ポリペプチドとポリヌクレオチドに関して記述してきたが、本発明には、天然に存在するポリペプチドとポリヌクレオチドの断

片や、ポリペプチドまたはポリヌクレオチドの免疫特性に実質的に影響を与えない付加、欠失、または置換を伴う同様の組み換えたポリペプチドとポリヌクレオチドも含まれるものと理解する。

#### 組成物、キット、投与

本発明のさらに別の側面によれば、1個の細胞または多細胞生物に投与するための、BASB070ポリヌクレオチドおよび/またはBASB070ポリペプチドを含む組成物が提供される。

#### 【0139】

本発明は、この明細書に記載したポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチド、あるいはそのアゴニストまたはアンタゴニストを含む組成物にも関する。本発明のポリペプチドとポリヌクレオチドは、細胞、組織、または生物に対して使用するために、無菌でない、または無菌の1つまたは複数の担体、例えば個体に投与するのに適した薬理的な担体と組み合わせて用いることができる。このような組成物は、例えば、媒体に添加する量、すなわち治療に効果がある量の本発明のポリペプチドおよび/またはポリヌクレオチドと、薬理的に受容可能な担体または賦形剤とを含んでいる。担体としては、生理的食塩水、緩衝生理的食塩水、デキストロース、水、グリセロール、エタノールのほか、これらの組み合わせが挙げられるが、これだけに限定されない。製剤は、投与形態に合致している必要がある。本発明はさらに、本発明の上記組成物の1つまたはそれ以上の成分を充填した1つまたはそれ以上の容器を備える診断用、薬理学用のパックまたはキットにも関する。

#### 【0140】

本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチド、その他の化合物は、単独で、あるいは他の化合物、例えば治療用化合物と組み合わせて用いることができる。

#### 【0141】

本発明の薬理的組成物は、効果的かつ使いやすい任意の方法で投与することができる。具体例としては、特に、局所的、経口、肛門、腔、静脈内、腹腔内、筋肉内、皮下、鼻孔内、皮内の投与が挙げられる。

#### 【0142】

治療において、あるいは予防として、活性な薬剤を注射可能な組成物として、例えば無菌の好ましくは等張の水性分散液として、個体に投与することができる。

#### 【0143】

さらに別の側面では、本発明により、治療に効果的な量のポリペプチドおよび/またはポリヌクレオチド、例えば本発明のポリペプチドおよび/またはポリヌクレオチド、アゴニストまたはアンタゴニストのペプチド、または小分子化合物を可溶形態にしたものを、薬理的に受容可能な担体または賦形剤と組み合わせて含む薬理的組成物が提供される。基剤としては、生理的食塩水、緩衝生理的食塩水、デキストロース、水、グリセロール、エタノール、これらの組み合わせが挙げられるが、これだけに限定されない。本発明はさらに、本発明の上記組成物の1つまたはそれ以上の成分を充填した1つまたはそれ以上の容器を備える薬理学用のパックまたはキットにも関する。本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチド、その他の化合物は、単独で、あるいは他の化合物、例えば治療用化合物と組み合わせて用いることができる。

#### 【0144】

組成物は、投与経路、例えば全身が経口かに応じて適した形態にされることになる。全身投与の好ましい形態としては、注射、典型的には静脈内注射が挙げられる。他の注射経路、例えば皮下注射、筋肉内注射、腹腔内注射も可能である。全身投与の別の手段としては、胆汁塩、フシジン酸、または他の洗浄剤といった浸透剤を用いた経粘膜投与や経皮投与が挙げられる。さらに、本発明のポリペプチドまたはその他の化合物を溶腸性製剤またはカプセル化製剤の形態にすることができる場合には、経口投与も可能である。これら化合物の投与は、軟膏、ペースト、ゲル、溶液、粉末などの形態で局所的および/または限局的に行なうことも可能である。

#### 【0145】

哺乳類、特にヒトへの投与では、活性のある薬剤の1日の用量が $0.01 \mu\text{g}/\text{kg} \sim 10 \mu\text{g}/\text{kg}$ 、典型的には $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ となることが予想される。いずれにせよ、内科医が、個人にとって最適な実際の用量を決定することになる。用量は

、個々人の年齢、体重、反応によって異なる。上記の用量は、平均的な場合の例である。もちろん、用量がより多かたりより少なかたりするほうが好ましい場合も存在しており、それも本発明の範囲に含まれる。

【0146】

要求される用量の幅は、選択したペプチド、投与経路、製剤の性質、患者の疾病の性質、医者判断に応じて変化する。しかし適切な用量は、患者の体重1kgにつき0.1~100 $\mu$ gである。

【0147】

ワクチン組成物は、注射可能な形態が都合がよい。従来のアジュバントを用いて免疫応答を増大させることができる。ワクチンの適切な単位用量は、体重1kgにつき抗体が0.5~5 $\mu$ gであり、このような用量を1~3週間の間隔で1~3回投与することが好ましい。上記の幅の用量だと、本発明の化合物を用いた場合に不都合な中毒効果が観察されてその化合物を投与するのに適した個体に投与できなくなることはなからう。

【0148】

しかし、利用可能な化合物が多彩であり、投与経路によって効果が異なることを考えると、必要とされる用量の幅は広いことが予想される。例えば、経口投与の場合には、静脈内注射による投与よりも用量を多くする必要がある。用量レベルの差は、従来技術で周知のように、最適化のための標準的な経験的作業によって調節することができる。

【0149】

配列データベース、有形媒体に記憶させた配列、アルゴリズム

ポリヌクレオチドとポリペプチドの配列は、2次元構造や3次元構造を決定したり、似たホモロジー配列をさらに同定したりするための貴重な情報源となる。コンピュータで読むことのできる媒体にデータを記憶させ、記憶させたデータを既知の巨大分子構造プログラムにおいて利用したり、GCGプログラム・パッケージなどの周知の探索ツールを用いて配列データベースを探索したりすることにより、こうしたことが非常に容易になる。

【0150】

本発明により、特徴的な配列またはストリングの解析法、特に遺伝子配列またはコードされたタンパク質配列の解析法も提供される。好ましい配列解析法としては、例えば、一致解析や類似性解析などの配列ホモロジー解析法、DNA、RNA、タンパク質の構造の解析、配列集合分岐解析、配列モチーフ解析、オープン・リーディング・フレーム決定、核酸塩基コーリング、コドン利用解析、核酸塩基トリミング、シーケンシング・クロマトグラムのピーク解析が挙げられる。

#### 【0151】

ホモロジーを同定するための、コンピュータに基づいた方法が提供される。この方法は、本発明のポリヌクレオチド配列を含む第1のポリヌクレオチド配列をコンピュータが読むことのできる媒体に与え；この第1のポリヌクレオチド配列を少なくとも1つの第2のポリヌクレオチド配列またはポリペプチド配列と比較してホモロジーを同定するステップを含んでいる。

#### 【0152】

ホモロジーを同定するための、コンピュータに基づいた別の方法も提供される。この方法は、本発明のポリヌクレオチド配列を含む第1のポリペプチド配列をコンピュータが読むことのできる媒体に与え；この第1のポリペプチド配列を少なくとも1つの第2のポリヌクレオチド配列またはポリペプチド配列と比較してホモロジーを同定するステップを含んでいる。

#### 【0153】

この明細書で引用したあらゆる出版物や参考文献は、特許や特許出願なども含め、個々の出版物や参考文献が十分に説明されたものとして、特別かつ個別に援用するよう指示されているかのようにして、その全体が本明細書に援用されている。この特許出願のほうに優先権があることをわれわれが主張する他のあらゆる特許出願も、出版物や参考文献に関して上に説明したのと同様にして、その全体が本明細書に援用されている。

#### 【0154】

##### 定義

従来技術で知られている“一致 ( i d e n t i t y ) ” は、2つまたはそれ以

上のポリペプチド配列、あるいは場合によっては2つまたはそれ以上のポリヌクレオチド配列を比較することによって決まる関係である。従来技術では、“一致”は、複数のポリペプチド配列あるいは場合によっては複数のポリヌクレオチド配列の間でストリング同士の一致によって決まる配列関連度のこととも意味する。“一致”は、既知の方法を用いて容易に計算することができる。そうした方法は、例えば以下の文献に記載されているが、これだけに限定されるわけではない。『計算分子生物学』、レスク, A.M. 編、オックスフォード大学出版、ニューヨーク州、1988年；『バイオコンピューティング：情報学とゲノム計画』、スミス, D.W. 編、アカデミック・プレス、ニューヨーク州、1993年；『配列データのコンピュータ解析』、第1部、グリフィン, A.M. とグリフィン, H.G. 編、ヒューマナ・プレス、ニュージャージー州、1994年；『分子生物学における配列解析』、フォン・ハイネ, G.、アカデミック・プレス、1987年；『配列解析プライマー』、グリブスコフ, M. とドゥヴルー, J. 編、Mストックトン・プレス、ニューヨーク州、1991年；カリージョ, H とリップマン, D.、SIAM J. Applied Math.、第48巻、1073ページ、1988年。一致を確認する方法は、テストする配列同士の一致が最大になるように設計する。さらに、一致を確認する方法は、誰もが利用可能なコンピュータ・プログラムにコード化されている。2つの配列の間の一一致を確認するのにコンピュータ・プログラムを用いる方法としては、GCGプログラム・パッケージのGAPプログラム(ドゥヴルー, J. 他、Nucleic Acids Research、第12巻(1)、387ページ、1984年)、BLASTP、BLASTN(アルトシュール, S.F. 他、J. Mol. Biol.、第215巻、403~410ページ、1990年)、FASTA(ピアソンとリップマン、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、第85巻、2444~2448ページ、1988年)があるが、それだけに限定されるわけではない。BLASTファミリーのプログラムは、NCBIその他のソースから誰でも利用することができる(『BLASTマニュアル』、アルトシュール, S. 他、NCBI NLM NIHベセスダ、MD 20894；アルトシュール, S. 他、J. Mol. Biol.、第215巻、403~410ページ、1990年)。よく知られているスミス・ウォーターマンのアルゴリズムも一致を確認するのに用いることができる。

ポリペプチド配列を比較するためのパラメータには以下のものがある。

アルゴリズム：ニードルマンとヴァンシュ、J. Mol. Biol.、第48巻、443～453 ページ、1970年、

比較行列：ヘニコフとヘニコフ、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、第89巻、10915～10919ページ、1992年によるBLOSSUM62、

ギャップ・ペナルティ：8、

ギャップ長ペナルティ：2。

#### 【0156】

これらパラメータを含む有用なプログラムは、ジェネティクス・コンピュータ・グループ（マディソン、ウィスコンシン州）から“ギャップ”プログラムとして誰でも利用することができる。上記のパラメータは、ペプチドを比較するためのデフォルト・パラメータである（端部のギャップに対するペナルティはない）。

#### 【0157】

ポリヌクレオチドを比較するためのパラメータには以下のものがある。

アルゴリズム：ニードルマンとヴァンシュ、J. Mol. Biol.、第48巻、443～453 ページ、1970年、

比較行列：一致 = +10、不一致 = 0、

ギャップ・ペナルティ：50、

ギャップ長ペナルティ：3。

ジェネティクス・コンピュータ・グループ（マディソン、ウィスコンシン州）から“ギャップ”プログラムとして利用できる。これらパラメータは、核酸を比較するためのデフォルト・パラメータである。

#### 【0158】

ポリヌクレオチドとポリペプチドに対する“一致”の好ましい意味は、場合に応じて以下の（1）と（2）で与えられる。

#### 【0159】

（1）実施態様のポリヌクレオチドがさらに、配列番号1又は3の参照配列と少なくとも50、60、70、80、85、90、95、97、または100%

一致したポリヌクレオチド配列を含む単離されたポリヌクレオチドを含んでいる。このポリヌクレオチド配列は、配列番号1又は3の参照配列と一致していてもよいし、参照配列と比べて所定の数までヌクレオチドが変化していてもよい。この変化は、少なくとも1つのヌクレオチドの欠失、置換(トランジションやトランスバージョンを含む)、または挿入のいずれかである。またこの変化は、参照ヌクレオチド配列の5'末端または3'末端の位置に起こってもよいし、これら末端の間の任意の位置に起こり、参照配列のヌクレオチドの間に個別に点在するか、または参照配列内の1つまたはそれ以上の連続的なグループの中に点在していてもよい。変化するヌクレオチドの数は、配列番号1又は3のヌクレオチドの総数に、パーセント一致を定義する整数を100で割った値を掛け、次にその積を配列番号1又は3のヌクレオチドの総数から差し引くことによって決まる。すなわち、

$$n_n = x_n - (x_n \cdot y)$$

となる。ここに、 $n_n$  は変化したヌクレオチドの数であり、 $x_n$  は配列番号1又は3のヌクレオチドの総数であり、 $y$  は、50%の場合に0.50、60%の場合に0.60、70%の場合に0.70、80%の場合に0.80、85%の場合に0.85、90%の場合に0.90、95%の場合に0.95、97%の場合に0.97、100%の場合に1.00であり、 $\cdot$  は、積演算の記号であり、 $x_n$  と  $y$  の積が非整数になった場合には、その値よりも小さな最も近い整数に丸めた後に  $x_n$  から差し引く。配列番号2又は4のポリペプチドをコードしているポリヌクレオチド配列の変化により、このコード配列中にナンセンス突然変異、ミスセンス突然変異、またはフレームシフト突然変異が発生し、そのことによって、そうした変化後のポリヌクレオチドによってコードされたポリペプチドが変化する可能性がある。

#### 【0160】

例えば、本発明のポリヌクレオチド配列は、配列番号1又は3の参照配列と一致していてもよい。すなわち、このポリヌクレオチド配列は、100%一致していてもよいし、参照配列と比べて所定数までの核酸変化が含まれていてパーセント一致が100%よりも小さくなっていてもよい。この変化は、少なくとも1つ

のポリヌクレオチドの欠失、置換（トランジションやトランスバージョンを含む）、または挿入のいずれかである。またこの変化は、参照ポリヌクレオチド配列の5'末端または3'末端の位置に起こってもよいし、これら末端の間の任意の位置に起こり、参照配列の核酸の間に個別に点在するか、または参照配列内の1つまたはそれ以上の連続的なグループの中に点在していてもよい。所定のパーセント一致に対する変化した核酸の数は、配列番号1又は3の核酸の総数に、パーセント一致を定義する整数を100で割った値を掛け、次にその積を配列番号1又は3の核酸の総数から差し引くことによって決まる。すなわち、

$$n_n = x_n - (x_n \cdot y)$$

となる。ここに、 $n_n$  は変化した核酸の数であり、 $x_n$  は配列番号1又は3の核酸の総数であり、 $y$  は、例えば70%の場合に0.70、80%の場合に0.80、85%の場合に0.85などであり、 $\cdot$  は、積演算の記号であり、 $x_n$  と $y$  の積が非整数になった場合には、その値よりも小さな最も近い整数に丸めた後に $x_n$  から差し引く。

#### 【0161】

(2) 実施態様のポリペプチドがさらに、配列番号2又は4の参照配列と少なくとも50、60、70、80、85、90、95、97、または100%一致したポリペプチド配列を含む単離されたポリペプチドを含んでいる。このポリペプチド配列は、配列番号2又は4の参照配列と一致していてもよいし、参照配列と比べて所定の数までアミノ酸が変化していてもよい。この変化は、少なくとも1つのアミノ酸の欠失、置換（保存された置換や保存されていない置換を含む）、または挿入のいずれかである。またこの変化は、参照ポリペプチド配列のアミノ酸末端またはカルボキシル末端の位置に起こってもよいし、これら末端の間の任意の位置に起こり、参照配列のアミノ酸の間に個別に点在するか、または参照配列内の1つまたはそれ以上の連続的なグループの中に点在していてもよい。変化するアミノ酸の数は、配列番号2又は4のアミノ酸の総数に、パーセント一致を定義する整数を100で割った値を掛け、次にその積を配列ID番号2のアミノ酸の総数から差し引くことによって決まる。すなわち、

$$n_a = x_a - (x_a \cdot y)$$

となる。ここに、 $n_a$  は変化したヌクレオチドの数であり、 $x_a$  は配列番号2又は4のアミノ酸の総数であり、 $y$  は、50%の場合に0.50、60%の場合に0.60、70%の場合に0.70、80%の場合に0.80、85%の場合に0.85、90%の場合に0.90、95%の場合に0.95、97%の場合に0.97、100%の場合に1.00であり、 $\cdot$  は、積演算の記号であり、 $x_a$  と $y$  の積が非整数になった場合には、その値よりも小さな最も近い整数に丸めた後に $x_a$  から差し引く。

### 【0162】

例えば、本発明のポリペプチド配列は、配列番号2又は4の参照配列と一致していてもよい。すなわち、このポリペプチド配列は、100%一致していてもよいし、参照配列と比べて所定数までのアミノ酸変化が含まれていてパーセント一致が100%よりも小さくなっていてもよい。この変化は、少なくとも1つのアミノ酸の欠失、置換（保存された置換や保存されていない置換を含む）、または挿入のいずれかである。またこの変化は、参照ポリペプチド配列のアミノ末端またはカルボキシル末端の位置に起こってもよいし、これら末端の間の任意の位置に起こり、参照配列のアミノ酸の間に個別に点在するか、または参照配列内の1つまたはそれ以上の連続的なグループの中に点在していてもよい。所定のパーセント一致に対する変化するアミノ酸の数は、配列番号2又は4のアミノ酸の総数に、パーセント一致を定義する整数を100で割った値を掛け、次にその積を配列番号2又は4のアミノ酸の総数から引くことによって決まる。すなわち、

$$n_a = x_a - (x_a \cdot y)$$

となる。ここに、 $n_a$  は変化したアミノ酸の数であり、 $x_a$  は配列番号2又は4のアミノ酸の総数であり、 $y$  は、例えば70%の場合に0.70、80%の場合に0.80、85%の場合に0.85などであり、 $\cdot$  は、積演算の記号であり、 $x_a$  と $y$  の積が非整数になった場合には、その値よりも小さな最も近い整数に丸めた後に $x_a$  から差し引く。

### 【0163】

この明細書で生物に関して用いる“個体”は、多細胞真核生物のことを意味する。その中には後生生物、哺乳類、ヒツジ科動物、ウシ科動物、類人猿、霊長類

、ヒトが含まれるが、これだけに限定されるわけではない。

【0164】

“単離された”とは、天然の状態から“人間の手によって”変えられたことを意味する。すなわち、そうしたことが自然界で起こるならば、もとの環境から変化しているか、隔離されている、あるいはその両者が起こっている。例えば、生物の体内に存在するポリヌクレオチドまたはポリペプチドは“単離されて”はいないが、その同じポリヌクレオチドまたはポリペプチドが自然の状態と共に存在している物質から分離されている場合には、この明細書で用いる意味で“単離されて”いる。さらに、形質転換、遺伝子操作、またはそれ以外の組み換え技術によって生体内に導入されたポリヌクレオチドまたはポリペプチドは、その生体の中にまだ存在しているとしても、その生物が生きているか死んでいるかには関係なく、“単離され”ている。

【0165】

“ポリヌクレオチド”とは、一般に、任意のポリリボヌクレオチドまたはポリデオキシリボヌクレオチドのことである。それは修飾されていないRNAまたはDNAでもよいし、修飾されたRNAまたはDNAでもよく、1本鎖の領域と2本鎖の領域を含んでいる。

【0166】

“変異体”とは、参照用のポリヌクレオチドまたはポリペプチドとは異なるが、主要な特性は維持しているポリヌクレオチドまたはポリペプチドのことである。ポリヌクレオチドの典型的な変異体は、参照ポリヌクレオチドとヌクレオチド配列が異なっている。変異体のヌクレオチド配列における変化により、参照ポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドのアミノ酸配列が異なることもあるし、異なることもある。ヌクレオチドの変化により、参照配列によってコードされるポリペプチドにおいてアミノ酸の置換、付加、欠失、融合、切断が起こることがある。これについては以下の説明する。ポリペプチドの典型的な変異体は、参照ポリペプチドとはアミノ酸配列が異なっている。一般に、差は、参照ポリペプチドの配列と変異体が全体として非常に似ており、多くの領域で配列が一致しているものに限定される。変異体と参照ポリペプチドの違いは、アミノ

酸配列において1つまたはそれ以上のアミノ酸の置換、付加、欠失が任意に組み合わせられたものである可能性がある。置換または挿入されたアミノ酸残基は、遺伝暗号によってコードされたアミノ酸でもよいし、遺伝暗号によってコードされていないアミノ酸でもよい。ポリヌクレオチドまたはポリペプチドの変異体は、対立遺伝子変異体などの自然に起こる変異体でもよいし、自然に起こることが知られていない変異体でもよい。ポリヌクレオチドまたはポリペプチドの自然には起こらない変異体は、突然変異技術または直接的合成によって作ることができる。

#### 【0167】

“疾患”とは、細菌の感染によって起こるあらゆる疾患、または細胞感染と関連したあらゆる疾患のことを意味し、例えば、中耳炎、急性中耳炎、再発性中耳炎、流出性中耳炎、洞炎、結膜炎、鼻咽喉炎、喉頭炎、閉塞性喉頭炎、肺炎、気管支炎、慢性気管支炎、慢性閉塞性肺疾患の強化、嚢胞性線維症の合併症、心外膜炎、心内臓炎、関節炎、尿生殖器官のコロニー形成、及び新生児感染、バクテリア血症、敗血症、髄膜炎、などが挙げられる。

#### 【0168】

##### 実施例：

以下の実施例は、当業者には周知かつ当然となっている標準的な方法で実施する。ただし、別の方法を詳しく記載した場合は別である。実施例は単なる例示であって、本発明がそれだけに限定されることはない。

#### 【0169】

実施例1：Haemophilus influenzae株Rd KW20及び非分類(non-typeable)Haemophilus influenzae(NTHi)株3224からのBASB070遺伝子

A：H：株Rd中のBASB070

配列番号1のBASB070遺伝子は、Haemophilus influenzae株Rd KW20に由来する。BASB070ポリヌクレオチド配列の翻訳を配列番号2に示す。

#### 【0170】

B : N T H i 株 3 2 2 4 中の B A S B 0 7 0

B A S B 0 7 0 遺伝子の配列は、N T H i 株 3 2 2 4 の配列決定に由来する。

**【 0 1 7 1 】**

D N A S T A R ソフトウェア・パッケージからの M e g A l i g n プログラムを用いて、配列番号 1 と配列番号 3 のポリヌクレオチド配列のアラインメントを行い、そして図 1 に示す；同一性の対毎の比較は、2 つの B A S B 0 7 0 ポリヌクレオチド遺伝子配列が 9 0 . 3 % 同一であることを示す。同一の M e g A l i g n プログラムを用いて、配列番号 2 と配列番号 4 のポリペプチド配列のアラインメントを行い、そして図 2 に示す；同一性の対毎の比較は、2 つの B A S B 0 7 0 タンパク質配列が 9 0 . 6 % 同一であることを示す。これらのデータは、2 つの株 N T H i 3 2 2 4 と H i R D の間で B A S B 0 7 0 遺伝子が保存されているが、それらの間に可変領域も存在することを示している。

**【 0 1 7 2 】**実施例 2 : 組換え B A S B 0 7 0 を発現させるためのプラスミドの構築A : B A S B 0 7 0 のクローニング

N c o I、及び A s p 7 1 8 制限部位  C C A T G G、及び  G G T A C  C を、それぞれ特別に設計した前進及び後退増幅プライマーに遺伝子操作し、そして商業的に入手可能な E . c o l i 発現プラスミド p B A D g I I I ( A ) ( Invitrogen, USA、アンピシリン耐性) 内への B A S B 0 7 0 P C R 産物のディレクショナル・クローニングを可能にした。このプラスミドは、成熟 B A S B 0 7 0 タンパク質が E . c o l i の周辺腔を標的にすることができるように、バクテリオファージ f d p I I I タンパク質からのシグナル・ペプチドを提供する。B A S B 0 7 0 P C R 産物を、製造者の指示に従って、W i z a r d P C R p r e p T M ( P r o m e g a ) を用いて、上記増幅反応物から精製した。クローニングのために必要な要求 N c o I、及び A s p 7 1 8 末端を作るために、製造者 ( B o e h r i n g e r M a n n h e i m ) により推奨されるように、N c o I、及び A s p 7 1 8 制限酵素で順番に、完全に消化した。消化された B A S B 0 7 0 P C R 産物と p B A D をゲル精製し、そして約 5 倍モル過剰の消化断片を用いて共に上記ベクターにライゲートした。本分野において周知の

方法を用いて標準的な $\sim 20 \mu\text{l}$ ライゲーション反応( $\sim 16$ 、 $\sim 16$ 時間)を、T4 DNAリガーゼ( $\sim 2.0$ ユニット/反応、Boehringer Mannheim)を用いて行った。上記ライゲーションのアリコートを、本分野において周知の方法に従って、エレクトロ-コンピテントなE. coli Top10細胞を形質転換させるために使用した。 $\sim 1.0\text{ml}$ のLBブロス中37で $\sim 2-3$ 時間成長させた後、形質転換された細胞を、アンピシリン( $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ )を含むLB寒天プレート上にプレートした。個々のアンピシリン耐性コロニーを選択し、そして全細胞ベースのPCRにより分析して、形質転換体がBASB070 DNA挿入物を含んでいたかどうかを確認した。予想されたPCR産物を生産した形質転換体を、BASB070発現構築物を含む株として同定した。次に発現プラスミド含有株を、組換えBASB070の誘導性発現について分析した。

### 【0173】

#### B: PCR - 陽性形質転換体の発現分析

先に同定された各PCR - 陽性形質転換体について、アンピシリン( $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ )を含む $\sim 5.0\text{ml}$ のLBブロスを、上記パッチ・プレートからの細胞で接種し、そして振とうしながら( $\sim 250\text{rpm}$ )37で一夜培養した。この一夜種培養物のアリコート( $\sim 1.0\text{ml}$ )を、 $\sim 25\text{ml}$ のLB AMPICILLINEブロスを含む125mlのエーレンマイヤー・フラスコ1内に接種し、そして、その培養物の濁度が $\sim 0.5$ のO.D.600、すなわち、対数中期(通常約1.5 $\sim 2.0$ 時間)に達するまで、振とうしながら( $\sim 250\text{rpm}$ )37で培養した。このとき、上記培養物の約半分( $\sim 12.5\text{ml}$ )を、第2の125mlフラスコに移し、そして組換えBASB070タンパク質の発現を、0.2%(w/v)の最終濃度までのL-アラビノースの添加により誘導した。アラビノース誘導培養物と非誘導培養物の両者のインキュベーションを、振とうしながら37でさらに $\sim 4$ 時間続けた。両誘導及び非誘導培養物のサンプル( $\sim 1.0\text{ml}$ )を、上記誘導期間の後に取り出し、そして細胞を、 $\sim 3$ 分間の室温におけるマイクロ遠心分離機内での遠心分離により集めた。個々の細胞ペレットを、 $\sim 50 \mu\text{l}$ の滅菌水中に懸濁させ、次に2-メルカプトエタノールを含有する等容量の

2 × Laemmli SDS-PAGE サンプル・バッファーを混合し、そして ~ 3 分間沸騰水浴内に入れて、タンパク質を変性させた。等容量 (~ 15 μl) の両粗アラビノース誘導及び非誘導細胞溶解産物を、2 連の 12% Tris / グリシン・ポリアクリルアミド・ゲル (1mm 厚、Mini-ゲル、Novex) 上にロードした。誘導及び非誘導溶解産物サンプルを、標準的な SDS / Tris / グリシン展開バッファーを用いて慣用条件下、事前に染色された分子量マーカーとともに電気泳動にかけた。電気泳動後、1 つのゲルを、ワマシー・ブリリアント・ブルー R250 (BioRad) で染色し、そして次に脱色して、新規の BASB070 アラビノース・誘導性タンパク質を可視化した。

【0174】

NTHi 株

以下の *Haemophilus influenzae* 株を、本発明のための有用な参照として提供する。本発明に従って利用される BASB070 遺伝子は、上記株に関しては限定されないが、それは、以下の列記する株のいずれか又はいずれかの関連株内に存在するときの BASB070 遺伝子に対応することができる。この情報は、単に当業者の便宜のために提供されるものであり、寄託の規定が実施可能性のために要求されるという自白ではない。

【0175】

株 3219C (ET7)

株 3241A (ET30)

株 840645 (ET51)

株 901905U (ET60)

株 A840177 (ET40)

株 A840177 (ET69)

上記株の全てが、van Alphen, L., Caugant, D.A, Duim, B.A., O'Rourke, M., Bowler, L.D. (1997) Differences in genetic diversity of non-encapsulated *H. influenzae* from various diseases. *Microbiology*, 143 : 1423-1431 中に記載されていた。

【0176】

H i R d株

H i R d株の例は、株名KW20をもって、R.D. Fleischmann et al., Science. Vol 269 : 496-512 (1995) 及び K.W. Wilcox et al., J. Bact. Vol 122 : 443 (1975) 中に記載されている。この株は、受託番号ATCC 51907の下、the American Type Culture Collectionに、著者により寄託された。

【0177】

## 配列情報

BASB070 ポリヌクレオチド及びポリペプチド配列

【0178】

【化4】

## 配列番号 1

Rd KW20株からの *Haemophilus influenzae* BASB070 ポリヌクレオチド配列

ATGAAGAAAGCTATAAAATTAATTTAATTACACTTGGCCTAATTAATACGATCGGTATGACGATTACACAAGCTCAAGC  
 CGAAGAAACATTAGGACAAATTGATGTAGTGGAAGTATATCAAACGATAAAAAACCTTCACTGAAGCCAAAGCCA  
 AAAGTACACGTGAAAATGTCTTTAAGGAAACACAAACCATTGACCAAGTGATTCGAAGTATCCCTGGTGCATTTACTCAA  
 CAAGATAAAGGCTCGGGTGTCTTTCTGTGAATATTCGTGGCGAAAATGGATTAGGTCTGTCATACTATGGTTGATGG  
 TGTAACACAGACCTTCTATTCTACAGCCTTAGACTCAGGTCAATCAGGCGGAAGTTCTCAATTTGGTGGCGCAATCGATC  
 CTAATTTTATTGCAGGTGTAGATGTTAATAAAAGCAACTTTTCAGGAGCAAGCGGTATAAATGCGTTAGCAGGCAGTGTCT  
 AATTTTAGAACATTAGGCGTTAATGATGTTATTACCAGTACAAAACCTTTGGCATTATTCTGAAAGGAATGACAGGGAG  
 TAATGCCACTAAATCCAATTTTATGACAATGGCTGCTGGCAGAAAATGGCTTGATAATGGTGGCTATGTAGCGTGGTGT  
 ATGGTTATAGCCAACGTGAAGTATCTCAAGATTACCGTATCGGTGGCGGAGAACGATTAGCATCATTAGGGCAGGATATT  
 CTCGGGAAAGAAAAGAAGCTTATTTTCGTAATCGGGTATATTTTAAATCCTGAAGGGCAATGGACACCTGATTTAAG  
 CAAAAACATTGGTCTGTAAACAAACCAGATTATCAGAAAATGGTGATGTTAGTTATTATCGTATTGGATCTGCTGCAA  
 AGACTAGAAGAGAAATTCACAAGAATTATTAACAAATGAAAAAACCTAAGGATATTGAAAAGCTCAAAAAGGTAAT  
 GATGGAATTGAAGAACTGACAAATCATTGAACGTAATAAAGATCAATATAGTGTGCACCGATTGAGCCGGGTAGTTT  
 GCAATCTCGTTCTCGTAGCCATTTATTAATTTGAATATGGCGATGATCACCAAAATTTAGGGCGCAATTACGCACGT  
 TGGATAATAAAATTTGGTCTCGCAAAATGAAAACCGTAATTACCAAGTCAATTATAAATCAATAATAACAGCTATCTT  
 GATCTTAATTTAATGGCTGCACATAACATTGAAAAACTATTTATCCTAAAGCGGTTTTTTTGTCTGGCTGGCAAGTGGC  
 AGATAAACTTACTATAAAATGTCGCAATATTGTTGATATAACAACAGCCATACTTTCTTACTGCCAAAAGAAATG  
 ATTTAAAACCCACATTAGGTTTTAACTATTTACCAATGAATACAGTAAAACCGTTTTCCAGAAGAAATTAAGTTTGT  
 TATAACGATGCTTACATGATCAAGGCTTATATTCACACAGTAAAAGAGGGCGATATTCTGGCACAAAAGTTTATTACC  
 ACAACGTTCAAGTAACTTACAACCTTCTGGCAAGCAAAATTTAAACCGTGTATTTTGATACCGCACTTTCTAAAGGCA  
 TTTATCATTTAAATTACAGCGTGAATTTACCCATTATGCCTTTAATGGTGAATGATGATGTTACGAAAATACAGCGGGT  
 CAACAATTAATGAACCTATTTGTCATAAATCAGGGCATAAAAAGGCATTCAATCATTCTGCCACATTAAGTGCAGAACT  
 GAGTGATTATTTTATGCCATTTTTTACTTATTCACGCCTCACAGAATGCCGAATATTCAAGAGATGTTTTCTCTCAAG  
 TGTCTAATGCAGGGGTAACACAGCATTAAAACCTGAACAATCTGACACCTATCAACTAGGCTTTAATACTTATAAAAA  
 GGTCTCTTCACTCAAGACGATGTGCTAGGCGTAAAATTAGTAGGCTATCGTAGCTTTATTAAAAACCTATATCCATAATGT  
 TTATGGTGTGGTGGCGAGATGGCATGCCTACGTGGCGAGAAAGTAAATGGATTTAAATATACTATTGCTCATCAAAAT  
 ATAAGCCTATTGTGAAAAAGAGCGGGCTGAGTTAGAAATTAATGACATGGGACGTTTTTTTGGCAATGTCTCTTAT  
 GCATATCAACGAACAAATCAACCAACCAATTATGCCGATGCCAGCCCGCTCCGAATAATGCTTACAAGAAGACATTTT  
 GAAACAAGGTTATGGCTTATCTCGTGTTCATGCTACAAAAGACTACGGCAGATTAGAGCTTGGCACACGTTGGTTG  
 ATCAAAAATTAACCTTAGGTCTGGCAGCTCGTTATATGAAAAAGTAAACGTGCGACAATGAAGAAGAAATATATCAAT  
 GGATCTCGCTTTAAAAAAAATACCTTGCCTCGTGAATTAATGCTGCTGAAAAACCGAAGATATTAAAAACAACC  
 GATTATTTTAGATTTACACGTGAGCTATGAACCAATCAAAGATTTGATTATTAAGCGGAAGTACAAAATCTATTAGATA  
 AACGTTATGTTGATCCGTTAGATGCTGGAATGACGCGCTTCGCAACGTTATTATCAAGTTAAATAATCTATAGAA  
 TGTGGCGAAGATTTCTGCTTGGGTGGTTCAGATAAAACCGTCTTTATAAATTTGCACGTGGAAGAATTTATTTCT  
 GAGTTTAACTATAAATCTAA

【0179】

【化5】

## 配列番号2

配列番号1のポリヌクレオチドから演繹されたHaemophilus influenzae

## BASB070 ポリペプチド配列

MKKAIKLNLITLGLINTIGMTITQAQAEETLGQIDVVEKVISNDKKPFTEAKAKSTRENVFKETQIDQVIRSIPGAFTQ  
 QDKGSGVVSVNIRGENGLGRVNTMVDGVTQTFYSTALDSGQSGGSSQFGAAIDPNFIAGVDVKNKSNFSGASGINALAGSA  
 NFRTLGVNDVITDDKPFGIILKGMTGSNATKSNFMTMAAGRKWLNDNGGYVGVVYGYSQREVSQDYRIGGGERLASLGQDI  
 LAKEKEYFRNAGYILNPEGQWTPDLSKHKWSCNKPDYQKNGDCSYRIGSAAKTRREILQELLTNGKKPKDIEKLQKGN  
 DGIEETDKSFERNKDQYSVAPIEPGSLQSRSRSHLLKFEYGDHQNLAGAQLRTLNDNKIGSRKIENRNYQVNYNFNNSYL  
 DLNLMAAHNIGKTIYPKGGFFAGWQVADKLITKNVANIVDINNSHTFLLPKEIDLKTTLGFNYFTNEYSKNRFPPELSLF  
 YNDASHDQGLYSHSKRGRYSGTKSLLPQRSVILQPSGKQKFKTVYFDTALS KGIYHLNYSVNFTHYAFNGEYVGYENTAG  
 QQINEPILHKS GHKKA FNHSATLSAELSDYFMPFFTYSRTHRPNIQEMFFSQVSNAGVNTALKEQSDTYQLGFNTYK  
 GLFTQDDVLGVKLVGYRSFIKNYIHNVYGVWRDGMPTWAESNGFKYTIHQNYKPIVKKSGVELEINYDMGRFFANVSY  
 AYQRNTQPTNYADASPRPNNASQEDILKQGYLSRVSMPLPKDYGRLELGTRWFDQKLTGLAARYYGKSKRATIEEYIN  
 GSRFKNTRLRENNYAVKKTEDIKKQPIILDHVSYPEIKDLIIKAEVQNLLDKRYVDPLDAGNDAASQRYSSLNNSIE  
 CAQDSSACGGSDKTVLYNFARGRTYIISLNYKF

## 配列番号3

ntHi3224からの Haemophilus influenzae BASB070 ポリヌクレオチド配列

ATGAAGAAAGCTATAAAATTAATTTAATTACACTTAGCCTAATCAATACAATCGGTATGACGATTACACAAGCTCAAGC  
 CGAAGAACATATTAGGCAAATGATGTCGTAGAAAAAGTGATATCAAATGACAAAAACCTTCACTGAAGCCAAAGCCA  
 AAAGTACGCGTGAAAATGTCTTTAAGGAAACACAAACCATTGACCAAGTCATTTCGGAGCATTCTCGGGCATTACTCAA  
 CAAGATAAAGGCTCGGGTGTGGTTTCTGTAAATATTCGTGGCGAAAATGGATTAGGTGCTGTCAATACGATGGTTGATGG  
 TGTAACCCAAACCTTCTATTCTACAGCCTTAGACTCTGGTCAATCAGGCGGAAGTTCTCAATTTGGTGGCAATCGACC  
 CTAATTTTATTGACAGGTGATGATGTTAATAAAGCAACTTTTCGGGAGCAAGCGGTATAAATGCCTTAGCAGGCAGTGCT  
 AATTTTAGAACATTAAGCGTTAATGATGTGATTACCGATGACAAACCATTTCGGCATTATTCTGAAAGGAATGACAGGGAG  
 CAATGCCACTAAATCCAATTTTATGACGACAGCTGCAGGCAGAAAATGGCTTGATAATGGTGGCTATGTAGGCGTAGTGT  
 ATGGTTATAGCCAACGTGAAGTTTACACAAGATTATCGTATAGGTGGCGGAGAACGATTAGCATCATTAGGGCAAGATATT  
 CTTGCTAAAGAAAAGAAAAGATTTTTCGTAATGATGGTTATGTTTTAAATTCGTGACCAATGGGCACCTGATTTAAA  
 CAAACCACATTTGGTCTTGTAAATACCCCGAGTTCTTTAAAGATAAAAGTATGAGTACATCTTGTAAAGCCTTATCGTCTTG  
 GACCTGCTGCAACGACTAGACAAGAAATCTAAAAGAAATATTAGAAGATGGAAAAGAACCTAAGGATATTGAAAAGCTC  
 CAAAAAGTAATGATGGAATGAAGAACTGAAAATCATTGAAACGTAATAAAGATCAATATGACGTCGCCCTTATGA  
 GCCTGGTAGTTTGAATCTCGTTCACGTAGTCATTTATAAAAATTTGAATATAGCGATGATCACCATACGCTAGGGGGCGC  
 AAATACGTACCCTTGATAATAAAATGGTTCTCGCAAAATGAAAACCGTAATTACCAAGTCAATTATAACTTCAATAAT  
 AACAGCTATCTTGATCTTAATTTAATGGCTGCACATAACATTGGCAAACTATTTATCCTAAGGGTGGTTTTTTTGTCTGG  
 CTGGCAAGTGGCAGACAACTTATCACAAAAATGTGGCAAAATATTGTTGATATAAATAACAGCCATACTTTCTTACTGC  
 CAAAAGAAATCGATTTAAAACACATTTAGGGTTAACTATTTTACCAATGAATACAGTAAAAACCGTTTTCCAGAAGAA  
 TTAAGTTTGTATTTATGTGAATGAATCACATGATCAAGGCTTATATTTCACTCAGTAATAAAGGGCGATATTCTGGCTCAA  
 AGGTTTATTACCACAACGTTTCAGTAATCTTACAACCTTCTGGCAAGCAAAAATTTAAAACAGTGATTTTGTATACCGCAC  
 TTTCTAAAGGTATTTATCATTAAATACAGCGTGAATTTTACCATTATGCCTTTAATGGTGAGTATGTTGGATATAAA  
 AATACAGCAGATAAAATTAATGAACCTATTTGCATAAATCAGGGCATAAAAAGGCATTCAATCATTCTGCTACATTAAG  
 TGCAGAGCTAAGTGATATTTTATGCCATTTTTACTTATTTACCGCACACAGAAATGCCGAATTTCAAGAGATGTTTT

【0180】

【化6】

TCTCTCAAGTGTCTGATGCTGGGGTAAACACCGCATTAACCTGAACAATCTGACACCTATCAACTAGGCTTTAATACT  
 TATAAAAAAGGCTTATTCCTCAAGACGATGATTAGGCATCAAATTAGTGGGCTATCGTAGCTTTATAAAACTATAT  
 CCACAATGTGTATGGAGATTGGTCACGAGATGGTGTATGCCAGAGTGGGCAAGACTCAATGGTTTTCGTCTGACGATTG  
 CTCATCAAATTATCAACCAATAGTAAAAAAGCGGAGCTGAGTTAGAGCTCAATTATGATATGGGGCGTTTTTTGCA  
 AATCTGTCTTATGCTTATCAACGTACTAATCAGCCAACCAATTATGCCGATGCCAGCTCACGTCCGCGTAATGCTTCAA  
 AGAAGAGATTTTGAACAAGGTTATGGTTTATCACGAATCTCTATGTTACCAAAGGACTACGGTAGATTAGAGCTTGGCA  
 CACGCTGGTTGATCAAAAATTAACCTTGGTATCGCAGCCCGTTACTATGAAAAAGTAAACGTGCTACAACCAAGAA  
 GAATACATCAACGGCTCTCGCTATGAAAAAATACTACGCGCGACAGAATTTATATGCTATTAAGAGCAGAAGAGAT  
 TAAAAACAACCTATTATTTAGATTTACACGTCAGCTATGAACCAATCAAAGATTTGATTATTAAGCGGAAGTACAAA  
 ATCTATTAGATAACGTTATGTTGATCCGTTAGCTGGAAATGATGCGGCTTCGCAACGTTATTATCAAGTTAAAT  
 GATCTTTAGCCTGTAAATAAATGAATCAACCTGTAATGATGGTTCAGAGAAAAGTGTCTTTATAACTTTGCACGTGG  
 AAGAACTTATATTCTGAGTTTGAACATAAATTCTAG

#### 配列番号4

配列番号3のポリヌクレオチドから演繹されたHaemophilus influenzae  
 BASB070 ポリペプチド配列

MKKAIKLNLITLSLINTIGMTITQAQAEETLGQIDVVEKVISNDKPFTEAKAKSTRENVFKETQIDQVIRSIPGAFTQ  
 QDKGSGVSVNIRGENGLGRVNTMVDGVTQTFYSTALDSGQSGSSQFGAAIDPNFIAGVDVNKSNFSGASGINALAGSA  
 NFRTLSVNDVITDDKPFGIILKGMTGSNATKSNFMTAAGRKWL DNGGYVGVVYGYSQREVSQDYRIGGGERLASLGQDI  
 LAKEKEKIFRNDGYVLNSAGQWAPDLNKPWSCNTPSSLKDKSMSTSCPKYRLGPAATTRQEILKELLEDDGKEPKDIEKL  
 QKSNDDGIEETESFERNKDQYDVAPIEPGSLQSRSRSHLLKFEYSDHHTLGAQIRTLDNKIGSRKIENRNYQVNYNPN  
 NSYLDLNLMAAHNIGKTIYPKGGFFAGWQVADKLITKNVANIVDINNSHTFLLPKEIDLKTTLGFNYFTNEYSKNRFPEE  
 LSLFYVNESHQQGLYLSLNKGRYSGSKGLLPQRSVILQPSGKQKFKTVYFDTALS KGIYHLNYSVNFTHYAFNGEYVGYK  
 NTADKINEPILHKS GHKKA FNHSATLSAELSDYFMFFFTYSRTHRMPNIQEMFFSQVSDAGVNTALKPEQSDTYQLGFNT  
 YKKGLETFQDDVLGIKLVGYRSFIKNYIHNVDWSDRGMPEWARLNGFRLLIAHQNYQPIVKKSGAELELN YDMGRFFA  
 NLSYAYQRTNQPTNYADASSRPRNASKEEILKQGYGLSRISMLPKDYGRLELGTRWFDQKLTGLIAARYYKSKRATTQE  
 EYINGSRYEKNTTRDRIYYAIKKTEEIKKQPIILDHVSYEPIKDLIIKAEVQNLLDKRYVDPLDAGNDAASQRYSSLN  
 DSLACKINESTCNDGSEKTVLYNFARGRTYILSLNYKF

#### 【配列表】

## SEQUENCE LISTING

5 <110> SmithKline Beecham Biologicals S.A.  
 <120> Novel Compounds  
 <130> BM45376  
 10 <160> 4  
 <170> FastSEQ for Windows Version 3.0  
 15 <210> 1  
 <211> 2742  
 <212> DNA  
 <213> *Haemophilus influenzae* strain Rd KW20  
 20 <400> 1  
 atgaagaaag ctataaaatt aaatttaatt acacttggcc taattaatac gatcggtagt 60  
 acgattacac aagctcaagc cgaagaaaca ttaggacaaa ttgatgtagt ggaaaaagtt 120  
 atatcaaacg ataaaaaac tttcactgaa gccaaagcca aaagtacacg tgaaaaatgtc 180  
 ttttaaggaaa cacaaaacct tgaccaagtg attcgaagta tcctcgggtgc atttactcaa 240  
 25 caagataaag gctcgggtgt cgtttctgtg aatattcgtg gcgaaaatgg attaggctgt 300  
 gtcaactacta tggttgatgg tgtaacacag accttctatt ctacagcctt agactcaggt 360  
 caatcaggcg gaagttctca atttggtgcg gcaatcgatc ctaattttat tgcagggtga 420  
 gatgttaata aaagcaactt ttcaggagca agcgggtataa atgcgtttagc aggcagtgct 480  
 aatthttagaa cattaggcgt taatgatgtt attaccgatg acaaaccatt tggcattatt 540  
 30 ctgaaaaggaa tgacagggag taatgccact aaatccaatt ttatgacaat ggctgctggc 600  
 agaaaatggc ttgataatgg tggctatgta ggcgtggtgt atggttatag ccaacgtgaa 660  
 gtatctcaag attaccgat cgggtggcga gaacgattag catcattagg gcaggatatt 720  
 ctgcgaaaag aaaaaagaagc ttattttcgt aatgcggggt atatttttaa tcctgaaggg 780  
 caatggacac ctgatthtaag caaaaaacat tggctctgta acaaaccaga ttatcagaaa 840  
 35 aatggtgatt gtagttatta tcgtattgga tctgctgcaa agactagaag agaaattcta 900  
 caagaattat taacaaatgg aaaaaaacct aaggatattg aaaagctcca aaaaggtaat 960  
 gatggaattg aagaaactga caaatcattt gaacgtaata aagatcaata tagtgttgca 1020  
 ccgattgagc cgggtagttt gcaatctcgt tctcgtagcc atttattaaa atttgaatat 1080  
 ggogatgatc accaaaattt aggggogcaa ttacgcacgt tggataataa aattggttct 1140  
 40 cgcaaaattg aaaaccgtaa ttaccaagtc aattataact tcaataataa cagctatctt 1200

gatcttaatt taatggctgc acataacatt ggaaaaacta tttatcctaa aggcggtttt 1260  
tttgcctggc ggcaagtggc agataaactt atcactaaaa atgtcgcaaa tattgttgat 1320  
ataaacaaca gccatacttt cttactgcca aaagaaattg atttaaaaac cacattaggt 1380  
tttaactatt ttaccaatga atacagtaaa aaccgttttc cagaagaatt aagtttgttt 1440  
5 tataacgatg cttcacatga tcaaggctta tattcacaca gtaaaagagg gcgatattct 1500  
ggcacaacaaa gtttattacc acaacgttca gtaatcctac aaccttctgg caagcaaaaa 1560  
tttaaaaccg tgtattttga taccgcactt tctaaaggca tttatcattt aaattacagc 1620  
gtgaatttta cccattatgc ctttaagtgt gagtatgtag gttacgaaaa tacagcgggt 1680  
caacaattaa atgaacctat tttgcataaa tcagggcata aaaaggcatt caatcattct 1740  
10 gccacattaa gtgcagaact gagtgattat tttatgccat tttttactta ttcacgcact 1800  
cacagaatgc cgaatattca agagatgttt ttctctcaag tgtctaagtc aggggtaaac 1860  
acagcattaa aacctgaaca atctgacacc tatcaactag gctttaatac ttataaaaaa 1920  
ggtctcttca ctcaagacga tgtgctaggc gtaaaattag taggctatcg tagctttatt 1980  
aaaaactata tccataatgt ttatgggttt tgggtggcgag atggcatgcc tacgtgggca 2040  
15 gaaagtaatg gatttaaaat tactattgct catcaaaatt ataagcctat tgtgaaaaag 2100  
agcggcgtcg agttagaat taactatgac atgggacgtt tttttcgaa tgtctcttat 2160  
gcataatcaac gaacaaatca accaaccaat tatgccgatg ccagcccgcg tccgaataat 2220  
gcttcacaag aagacatttt gaaacaaggt tatggcttat ctctgttttc aatgotacca 2280  
aaagactacg gcagattaga gcttggcaca cgttgggttt atcaaaaatt aaccttaggt 2340  
20 ctggcagctc gttattatgg aaaaagtaaa cgtgcgacaa ttgaagaaga atatatcaat 2400  
ggatctcgct ttaaaaaaaa taccttgcgt cgtgaaaatt actatgccgt gaaaaaacg 2460  
gaagatatta aaaaacaacc gattatttta gatttacacg tcagctatga accaatcaaa 2520  
gatttgatta ttaaagcgga agtacaaaa ctattagata aacgttatgt tgatccgtta 2580  
gatgtggaa atgacgoggc ttcgcaactg tattattcaa gtttaataaa ttctatagaa 2640  
25 tgtgogcaag attcttctgc ttgoggtggt tcagataaaa ccgtgcttta taactttgca 2700  
cgtggaagaa cttatattct gagtttaaac tataaattct aa 2742

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 913

30 &lt;212&gt; PRT

<213> *Haemophilus influenzae* strain Rd KW20

&lt;400&gt; 2

Met Lys Lys Ala Ile Lys Leu Asn Leu Ile Thr Leu Gly Leu Ile Asn  
35 1 5 10 15  
Thr Ile Gly Met Thr Ile Thr Gln Ala Gln Ala Glu Glu Thr Leu Gly  
20 25 30  
Gln Ile Asp Val Val Glu Lys Val Ile Ser Asn Asp Lys Lys Pro Phe  
35 40 45  
40 Thr Glu Ala Lys Ala Lys Ser Thr Arg Glu Asn Val Phe Lys Glu Thr  
50 55 60  
Gln Thr Ile Asp Gln Val Ile Arg Ser Ile Pro Gly Ala Phe Thr Gln  
65 70 75 80





Gly Thr Arg Trp Phe Asp Gln Lys Leu Thr Leu Gly Leu Ala Ala Arg  
 770 775 780  
 Tyr Tyr Gly Lys Ser Lys Arg Ala Thr Ile Glu Glu Glu Tyr Ile Asn  
 785 790 795 800  
 5 Gly Ser Arg Phe Lys Lys Asn Thr Leu Arg Arg Glu Asn Tyr Tyr Ala  
 805 810 815  
 Val Lys Lys Thr Glu Asp Ile Lys Lys Gln Pro Ile Ile Leu Asp Leu  
 820 825 830  
 10 His Val Ser Tyr Glu Pro Ile Lys Asp Leu Ile Ile Lys Ala Glu Val  
 835 840 845  
 Gln Asn Leu Leu Asp Lys Arg Tyr Val Asp Pro Leu Asp Ala Gly Asn  
 850 855 860  
 Asp Ala Ala Ser Gln Arg Tyr Tyr Ser Ser Leu Asn Asn Ser Ile Glu  
 865 870 875 880  
 15 Cys Ala Gln Asp Ser Ser Ala Cys Gly Gly Ser Asp Lys Thr Val Leu  
 885 890 895  
 Tyr Asn Phe Ala Arg Gly Arg Thr Tyr Ile Leu Ser Leu Asn Tyr Lys  
 900 905 910

Phe

20

<210> 3

<211> 2757

<212> DNA

25

<213> non typeable *Haemophilus influenzae* strain 3224

<400> 3

atgaagaaag ctataaaatt aaatttaatt acacttagcc taatcaatac aatcggtatg 60  
 acgattacac aagctcaagc cgaagaaaca ttagggcaaa ttgatgtcgt agaaaaagtg 120  
 30 atatcaaatg acaaaaaacc tttcactgaa gccaaagcca aaagtacgcg tgaaaatgtc  
 180 ttttaaggaaa cacaaacccat tgaccaagtc attcggagca ttcctggggc atttactcaa  
 240 caagataaag gctcgggtgt ggtttctgta aatattcgtg gcgaaaatgg attaggtcgt  
 300 gtcaatacga tggttgatgg tghtaacccaa accttctatt ctacagcctt agactctggt  
 360 caatcaggcg gaagttctca atttgggtcg gcaatcgacc ctaattttat tgcaggtgta  
 420 gatgttaata aaagcaactt ttcgggagca agcggtataa atgccttagc aggcagtgct  
 480 aatttttagaa cattaagcgt taatgatgtg attaccgatg acaaaccatt cggcattatt  
 540 ctgaaaggaa tgacagggag caatgccact aaatccaatt ttatgacgac agctgcaggc  
 600 agaaaatggc ttgataatgg tggctatgta ggcgtagtgt atggttatag ccaacgtgaa  
 660 gtttcacaag attatcgtat aggtggcgga gaacgattag catcattagg gcaagatatt  
 720 cttgctaaag aaaaagaaaa gatttttctg aatgatggtt atgttttaaa ttctgctgga  
 780 caatgggcac ctgatttaaa caaacacat tggctcttga ataccccgag ttcttttaaa  
 840 gataaaagta tgagtacatc ttgtaagcct tatcgtcttg gacctgctgc aacgactaga  
 900 caagaaattc taaaagaatt attagaagat ggaaaagaac ctaaggatat tgaaaagctc  
 960

caaaaaagta atgatggaat tgaagaaact gaaaaatcat ttgaacgtaa taaagatcaa 1020  
 tatgacgtcg cccctattga gcctggtagt ttgcaatctc gttcacgtag tcatttatta 1080  
 aaatttgaat atagcgatga tcaccatacg ctaggggcgc aaatcacgtac ccttgataat 1140  
 5 aaatttggtt ctgcacaaat tgaaaaccgt aattaccaag tcaattataa cttcaataat 1200  
 aacagctatc ttgatcttaa tttaatggct gcacataaca ttggcaaaac tatttatcct 1260  
 aagggtggtt tttttgctgg ctggcaagtg gcagacaaac ttatcacaaa aaatgtggca 1320  
 aatattgttg atataaataa cagccatact ttcttactgc caaaagaaat cgatttaaaa 1380  
 accacattag ggtttaacta ttttaccat gaatacagta aaaaccgttt tccagaagaa 1440  
 ttaagttgtt tttatgtgaa tgaatcacat gatcaaggct tatattcact cagtaataaa 1500  
 10 gggcgatatt ctggtcctaaa aggtttatta ccacaacggt cagtaatctt acaaccttct 1560  
 ggcaagcaaa aatttaaaac agtgtatttt gataccgcac tttctaaagg tatttatcat 1620  
 ttaaattaca gcgtgaattt taccattat gcctttaatg gtgagtatgt tggatataaa 1680  
 aatacagcag ataaaaataa tgaacctatt ttgcataaat cagggcataa aaaggcattc 1740  
 aatcattctg ctacattaag tgcaagcgtc agtgattatt ttatgccatt ttttacttat 1800  
 15 tcacgcacac acagaatgcc gaatattcaa gagatgtttt tctctcaagt gtctgatgct 1860  
 ggggtaaaac ccgcatthaa acctgaacaa tctgacacct atcaactagg ctttaatact 1920  
 tataaaaaag gtctattcac tcaagacgat gtattaggca tcaaattagt gggctatcgt 1980  
 agctttatta aaaactatat ccacaatgtg tatggagatt ggtcacgaga tgggtttatg 2040  
 ccagagtggg caagactcaa tggttttcgt ctgacgattg ctcacaaaa ttatcaacca 2100  
 20 atagtgaaaa aaagcggagc tgagtttagc ctcaattatg atatggggcg tttttttgca 2160  
 aatctgtctt atgcttatca acgtactaat cagccaacca attatgccga tggcagctca 2220  
 cgtccgcgta atgcttcaaa agaagagatt ttgaaacaag gttatggttt atcacgaatc 2280  
 tctatgttac caaaggacta cggtagatta gagcttggca cacgctggtt tgatcaaaaa 2340  
 ttaactcttg gtatcgcagc ccgttactat ggaaaaagta aacgtgctac aactcaagaa 2400  
 25 gaatacatca acggctctcg ctatgaaaaa aatactacgc gcgacagaat ttattatgct 2460  
 attaaaaaga cagaagagat taaaaaacia cctattattt tagatttaca cgtcagctat 2520  
 gaaccaatca aagattttgat tattaaagcg gaagtacaaa atctattaga taaacgttat 2580  
 gttgatccgt tagatgctgg aaatgatgcy gcttcgcaac gttattattc aagtttaaat 2640  
 gattccttag cctgtaaaaa aaatgaatca acctgtaatg atggttcaga gaaaactgty 2700  
 30 ctttataact ttgcacgtgg aagaacttat attctgagtt tgaactataa attctag 2757

<210> 4

<211> 918

<212> PRT

35 <213> non typeable *Haemophilus influenzae* strain 3224

<400> 4

Met Lys Lys Ala Ile Lys Leu Asn Leu Ile Thr Leu Ser Leu Ile Asn

1 5 10 15

40 Thr Ile Gly Met Thr Ile Thr Gln Ala Gln Ala Glu Glu Thr Leu Gly

20 25 30

Gln Ile Asp Val Val Glu Lys Val Ile Ser Asn Asp Lys Lys Pro Phe

35 40 45

	Thr	Glu	Ala	Lys	Ala	Lys	Ser	Thr	Arg	Glu	Asn	Val	Phe	Lys	Glu	Thr
	50						55						60			
	Gln	Thr	Ile	Asp	Gln	Val	Ile	Arg	Ser	Ile	Pro	Gly	Ala	Phe	Thr	Gln
	65					70					75					80
5	Gln	Asp	Lys	Gly	Ser	Gly	Val	Val	Ser	Val	Asn	Ile	Arg	Gly	Glu	Asn
					85						90					95
	Gly	Leu	Gly	Arg	Val	Asn	Thr	Met	Val	Asp	Gly	Val	Thr	Gln	Thr	Phe
					100					105					110	
	Tyr	Ser	Thr	Ala	Leu	Asp	Ser	Gly	Gln	Ser	Gly	Gly	Ser	Ser	Gln	Phe
10					115				120						125	
	Gly	Ala	Ala	Ile	Asp	Pro	Asn	Phe	Ile	Ala	Gly	Val	Asp	Val	Asn	Lys
					130				135						140	
	Ser	Asn	Phe	Ser	Gly	Ala	Ser	Gly	Ile	Asn	Ala	Leu	Ala	Gly	Ser	Ala
	145					150						155				160
15	Asn	Phe	Arg	Thr	Leu	Ser	Val	Asn	Asp	Val	Ile	Thr	Asp	Asp	Lys	Pro
					165						170					175
	Phe	Gly	Ile	Ile	Leu	Lys	Gly	Met	Thr	Gly	Ser	Asn	Ala	Thr	Lys	Ser
					180					185						190
	Asn	Phe	Met	Thr	Thr	Ala	Ala	Gly	Arg	Lys	Trp	Leu	Asp	Asn	Gly	Gly
20					195				200						205	
	Tyr	Val	Gly	Val	Val	Tyr	Gly	Tyr	Ser	Gln	Arg	Glu	Val	Ser	Gln	Asp
	210						215								220	
	Tyr	Arg	Ile	Gly	Gly	Gly	Glu	Arg	Leu	Ala	Ser	Leu	Gly	Gln	Asp	Ile
	225						230						235			240
25	Leu	Ala	Lys	Glu	Lys	Glu	Lys	Ile	Phe	Arg	Asn	Asp	Gly	Tyr	Val	Leu
					245						250					255
	Asn	Ser	Ala	Gly	Gln	Trp	Ala	Pro	Asp	Leu	Asn	Lys	Pro	His	Trp	Ser
					260					265						270
	Cys	Asn	Thr	Pro	Ser	Ser	Leu	Lys	Asp	Lys	Ser	Met	Ser	Thr	Ser	Cys
30					275				280						285	
	Lys	Pro	Tyr	Arg	Leu	Gly	Pro	Ala	Ala	Thr	Thr	Arg	Gln	Glu	Ile	Leu
					290				295					300		
	Lys	Glu	Leu	Leu	Glu	Asp	Gly	Lys	Glu	Pro	Lys	Asp	Ile	Glu	Lys	Leu
	305						310						315			320
35	Gln	Lys	Ser	Asn	Asp	Gly	Ile	Glu	Glu	Thr	Glu	Lys	Ser	Phe	Glu	Arg
					325						330					335
	Asn	Lys	Asp	Gln	Tyr	Asp	Val	Ala	Pro	Ile	Glu	Pro	Gly	Ser	Leu	Gln
					340					345						350
	Ser	Arg	Ser	Arg	Ser	His	Leu	Leu	Lys	Phe	Glu	Tyr	Ser	Asp	Asp	His
40					355				360						365	
	His	Thr	Leu	Gly	Ala	Gln	Ile	Arg	Thr	Leu	Asp	Asn	Lys	Ile	Gly	Ser
					370				375					380		
	Arg	Lys	Ile	Glu	Asn	Arg	Asn	Tyr	Gln	Val	Asn	Tyr	Asn	Phe	Asn	Asn

	385				390					395				400		
	Asn	Ser	Tyr	Leu	Asp	Leu	Asn	Leu	Met	Ala	Ala	His	Asn	Ile	Gly	Lys
					405					410					415	
	Thr	Ile	Tyr	Pro	Lys	Gly	Gly	Phe	Phe	Ala	Gly	Trp	Gln	Val	Ala	Asp
5					420					425					430	
	Lys	Leu	Ile	Thr	Lys	Asn	Val	Ala	Asn	Ile	Val	Asp	Ile	Asn	Asn	Ser
					435					440					445	
	His	Thr	Phe	Leu	Leu	Pro	Lys	Glu	Ile	Asp	Leu	Lys	Thr	Thr	Leu	Gly
					450					455					460	
10	Phe	Asn	Tyr	Phe	Thr	Asn	Glu	Tyr	Ser	Lys	Asn	Arg	Phe	Pro	Glu	Glu
	465						470					475				480
	Leu	Ser	Leu	Phe	Tyr	Val	Asn	Glu	Ser	His	Asp	Gln	Gly	Leu	Tyr	Ser
							485				490					495
	Leu	Ser	Asn	Lys	Gly	Arg	Tyr	Ser	Gly	Ser	Lys	Gly	Leu	Leu	Pro	Gln
15					500					505					510	
	Arg	Ser	Val	Ile	Leu	Gln	Pro	Ser	Gly	Lys	Gln	Lys	Phe	Lys	Thr	Val
					515					520					525	
	Tyr	Phe	Asp	Thr	Ala	Leu	Ser	Lys	Gly	Ile	Tyr	His	Leu	Asn	Tyr	Ser
					530					535					540	
20	Val	Asn	Phe	Thr	His	Tyr	Ala	Phe	Asn	Gly	Glu	Tyr	Val	Gly	Tyr	Lys
	545						550				555					560
	Asn	Thr	Ala	Asp	Lys	Ile	Asn	Glu	Pro	Ile	Leu	His	Lys	Ser	Gly	His
							565				570					575
	Lys	Lys	Ala	Phe	Asn	His	Ser	Ala	Thr	Leu	Ser	Ala	Glu	Leu	Ser	Asp
25					580					585					590	
	Tyr	Phe	Met	Pro	Phe	Phe	Thr	Tyr	Ser	Arg	Thr	His	Arg	Met	Pro	Asn
					595					600					605	
	Ile	Gln	Glu	Met	Phe	Phe	Ser	Gln	Val	Ser	Asp	Ala	Gly	Val	Asn	Thr
					610					615					620	
30	Ala	Leu	Lys	Pro	Glu	Gln	Ser	Asp	Thr	Tyr	Gln	Leu	Gly	Phe	Asn	Thr
	625										630			635		640
	Tyr	Lys	Lys	Gly	Leu	Phe	Thr	Gln	Asp	Asp	Val	Leu	Gly	Ile	Lys	Leu
											645					655
	Val	Gly	Tyr	Arg	Ser	Phe	Ile	Lys	Asn	Tyr	Ile	His	Asn	Val	Tyr	Gly
35					660						665				670	
	Asp	Trp	Ser	Arg	Asp	Gly	Val	Met	Pro	Glu	Trp	Ala	Arg	Leu	Asn	Gly
					675						680				685	
	Phe	Arg	Leu	Thr	Ile	Ala	His	Gln	Asn	Tyr	Gln	Pro	Ile	Val	Lys	Lys
					690						695				700	
40	Ser	Gly	Ala	Glu	Leu	Glu	Leu	Asn	Tyr	Asp	Met	Gly	Arg	Phe	Phe	Ala
	705										710			715		720
	Asn	Leu	Ser	Tyr	Ala	Tyr	Gln	Arg	Thr	Asn	Gln	Pro	Thr	Asn	Tyr	Ala
											725			730		735



## 【図1 - 1】

Figure 1 : B A S B 070ポリヌクレオチド配列のアラインメント  
配列番号1との同一性を点で示し、そしてギャップはーで示す

	*	20	*	
Seqid1	:	ATGAAGAAAGCTATAAAAATTAAATTTAATT	:	30
Seqid3	:	.....	:	30
		40	*	60
Seqid1	:	ACACTTGGCCTAATTAATACGATCGGTATG	:	60
Seqid3	:	.....A.....C.....A.....	:	60
	*	80	*	
Seqid1	:	ACGATTACACAAGCTCAAGCCGAAGAAACA	:	90
Seqid3	:	.....	:	90
		100	*	120
Seqid1	:	TTAGGACAAATTGATGTAGTGGAAAAGTT	:	120
Seqid3	:	.....G.....C..A.....G	:	120
	*	140	*	
Seqid1	:	ATATCAAACGATAAAAAACCTTTCACTGAA	:	150
Seqid3	:	.....T..C.....	:	150
		160	*	180
Seqid1	:	GCCAAAGCCAAAAGTACACGTGAAAATGTC	:	180
Seqid3	:	.....G.....	:	180

## 【図1 - 2】

	*	200	*	
Seqid1	:	TTTAAGGAAACACAAACCATTGACCAAGTG	:	210
Seqid3	:	.....C	:	210
		220	*	240
Seqid1	:	ATTCGAAGTATCCCTGGTGCATTTACTCAA	:	240
Seqid3	:	.....G..C..T.....G.....	:	240
	*	260	*	
Seqid1	:	CAAGATAAAGGCTCGGGTGTTCGTTTCTGTG	:	270
Seqid3	:	.....G.....A	:	270
		280	*	300
Seqid1	:	AATATTCGTGGCGAAAATGGATTAGGTCGT	:	300
Seqid3	:	.....	:	300
	*	320	*	
Seqid1	:	GTCAATACTATGGTTGATGGTGTAACACAG	:	330
Seqid3	:	.....G.....C..A	:	330
		340	*	360
Seqid1	:	ACCTTCTATTCTACAGCCTTAGACTCAGGT	:	360
Seqid3	:	.....T...	:	360
	*	380	*	
Seqid1	:	CAATCAGGCGGAAGTTCTCAATTTGGTGCG	:	390
Seqid3	:	.....	:	390

## 【図1 - 3】

	400	*	420	
Seqid1 :	GCAATCGATCCTAATTTTATTGCAGGTGTA	:	420	
Seqid3 :	.....C.....	:	420	
		*	440	*
Seqid1 :	GATGTTAATAAAAGCAACTTTTCAGGAGCA	:	450	
Seqid3 :	.....G.....	:	450	
	460	*	480	
Seqid1 :	AGCGGTATAAATGCGTTAGCAGGCAGTGCT	:	480	
Seqid3 :	.....C.....	:	480	
		*	500	*
Seqid1 :	AATTTTAGAACATTAGGCGTTAATGATGTT	:	510	
Seqid3 :	.....A.....G	:	510	
	520	*	540	
Seqid1 :	ATTACCGATGACAAACCATTGGCATTATT	:	540	
Seqid3 :	.....C.....	:	540	
		*	560	*
Seqid1 :	CTGAAAGGAATGACAGGGAGTAATGCCACT	:	570	
Seqid3 :	.....C.....	:	570	
	580	*	600	
Seqid1 :	AAATCCAATTTTATGACAATGGCTGCTGGC	:	600	
Seqid3 :	.....G.CA.....A...	:	600	

## 【図1 - 4】

	*	620	*	
Seqid1	:	AGAAAATGGCTTGATAATGGTGGCTATGTA	:	630
Seqid3	:	.....	:	630
		640	*	660
Seqid1	:	GGCGTGGTGTATGGTTATAGCCAACGTGAA	:	660
Seqid3	:	.....A.....	:	660
	*	680	*	
Seqid1	:	GTATCTCAAGATTACCGTATCGGTGGCGGA	:	690
Seqid3	:	..T..A.....T.....A.....	:	690
		700	*	720
Seqid1	:	GAACGATTAGCATCATTAGGGCAGGATATT	:	720
Seqid3	:	.....A.....	:	720
	*	740	*	
Seqid1	:	CTCGCGAAAGAAAAGAAGCTTATTTTCGT	:	750
Seqid3	:	..T..T.....AAGAT.....	:	750
		760	*	780
Seqid1	:	AATGCGGGTTATATTTTAAATCCTGAAGGG	:	780
Seqid3	:	....AT.....G.....T...CT..A	:	780
	*	800	*	
Seqid1	:	CAATGGACACCTGATTTAAGCAAAAACAT	:	810

## 【図1 - 5】

Seqid3 : .....G.....A....CC.... : 810

820 \* 840  
Seqid1 : TGGTCTTGTAACAAACCAGATTATCAGAAA : 840  
Seqid3 : .....T.CC..GAG..C.TTA... : 840

\* 860 \*  
Seqid1 : AATGGTGAT-----TGTAGTTAT : 858  
Seqid3 : G..AAAAG.ATGAGTACATCT....AGCC. : 870

880 \* 900  
Seqid1 : TATCGTATTGGATCTGCTGCAAAGACTAGA : 888  
Seqid3 : .....C.....C.....C..... : 900

\* 920 \*  
Seqid1 : AGAGAAATTCTACAAGAATTATTAACAAAT : 918  
Seqid3 : CA.....A.....GA.G.. : 930

940 \* 960  
Seqid1 : GGAAAAAACCTAAGGATATTGAAAAGCTC : 948  
Seqid3 : .....G..... : 960

\* 980 \*  
Seqid1 : CAAAAGGTAATGATGGAATTGAAGAACT : 978  
Seqid3 : .....A..... : 990

## 【図1 - 6】

1000 \* 1020  
 Seqid1 : GACAAATCATTTGAACGTAATAAAGATCAA : 1008  
 Seqid3 : ..A..... : 1020

\* 1040 \*  
 Seqid1 : TATAGTGTTGCACCGATTGAGCCGGGTAGT : 1038  
 Seqid3 : ...GAC..C..C..T.....T..... : 1050

1060 \* 1080  
 Seqid1 : TTGCAATCTCGTTCTCGTAGCCATTTATTA : 1068  
 Seqid3 : .....A.....T..... : 1080

\* 1100 \*  
 Seqid1 : AAATTTGAATATGGCGATGATCACCAAAT : 1098  
 Seqid3 : .....A.....T.CG : 1110

1120 \* 1140  
 Seqid1 : TTAGGGGCGCAATTACGCACGTTGGATAAT : 1128  
 Seqid3 : C.....A....T..CC.T..... : 1140

\* 1160 \*  
 Seqid1 : AAAATTGGTTCTCGCAAATGAAAACCGT : 1158  
 Seqid3 : ..... : 1170

1180 \* 1200  
 Seqid1 : AATTACCAAGTCAATTATAACTTCAATAAT : 1188  
 Seqid3 : ..... : 1200

## 【図1 - 7】

\*            1220            \*

Seqid1 : AACAGCTATCTTGATCTTAATTTAATGGCT : 1218  
 Seqid3 : ..... : 1230

          1240            \*            1260

Seqid1 : GCACATAACATTGGAAAACTATTTATCCT : 1248  
 Seqid3 : .....C..... : 1260

\*            1280            \*

Seqid1 : AAAGGCGGTTTTTTTGGCTGGCTGGCAAGTG : 1278  
 Seqid3 : ..G..T..... : 1290

          1300            \*            1320

Seqid1 : GCAGATAAACTTATCACTAAAAATGTCGCA : 1308  
 Seqid3 : .....C.....A.....G... : 1320

\*            1340            \*

Seqid1 : AATATTGTTGATATAAACAACAGCCATACT : 1338  
 Seqid3 : .....T..... : 1350

          1360            \*            1380

Seqid1 : TTCTTACTGCCAAAAGAAATTGATTTAAAA : 1368  
 Seqid3 : .....C..... : 1380

\*            1400            \*

Seqid1 : ACCACATTAGGTTTTAACTATTTTACCAAT : 1398

## 【図1 - 8】

Seqid3 : .....G..... : 1410

1420 \* 1440

Seqid1 : GAATACAGTAAAAACCGTTTTCCAGAAGAA : 1428

Seqid3 : ..... : 1440

\* 1460 \*

Seqid1 : TTAAGTTTGTTTTATAACGATGCTTCACAT : 1458

Seqid3 : .....GTGA...AA..... : 1470

1480 \* 1500

Seqid1 : GATCAAGGCTTATATTCACACAGTAAAAGA : 1488

Seqid3 : .....T.....T.A. : 1500

\* 1520 \*

Seqid1 : GGGCGATATTCTGGCACAAAAGTTTATTA : 1518

Seqid3 : .....T.....G..... : 1530

1540 \* 1560

Seqid1 : CCACAACG TTCAGTAATCTTACAACCTTCT : 1548

Seqid3 : ..... : 1560

\* 1580 \*

Seqid1 : GGCAAGCAAAAATTTAAAACCGTGTATTTT : 1578

Seqid3 : .....A..... : 1590

## 【図1 - 9】

	1600	*	1620	
Seqid1	:	GATACCGCACTTTCTAAAGGCATTTATCAT	:	1608
Seqid3	:	.....T.....	:	1620
		*	1640	*
Seqid1	:	TTAAATTACAGCGTGAATTTTACCCATTAT	:	1638
Seqid3	:	.....	:	1650
	1660	*	1680	
Seqid1	:	GCCTTTAATGGTGAGTATGTAGGTTACGAA	:	1668
Seqid3	:	.....T..A..TA..	:	1680
		*	1700	*
Seqid1	:	AATACAGCGGGTCAACAAATTAATGAACCT	:	1698
Seqid3	:	.....A.A.---A.....	:	1707
	1720	*	1740	
Seqid1	:	ATTTTGCATAAATCAGGGCATAAAAAGGCA	:	1728
Seqid3	:	.....	:	1737
		*	1760	*
Seqid1	:	TTCAATCATTCTGCCACATTAAGTGCAGAA	:	1758
Seqid3	:	.....T.....G	:	1767
	1780	*	1800	
Seqid1	:	CTGAGTGATTATTTTATGCCATTTTTTACT	:	1788
Seqid3	:	..A.....	:	1797

## 【図1-10】

	*	1820	*	
Seqid1	:	TATTCACGCACTCACAGAATGCCGAATATT	:	1818
Seqid3	:	.....A.....	:	1827
		1840	*	1860
Seqid1	:	CAAGAGATGTTTTTCTCTCAAGTGTCTAAT	:	1848
Seqid3	:	.....G..	:	1857
	*	1880	*	
Seqid1	:	GCAGGGGTAAACACAGCATTAAACCTGAA	:	1878
Seqid3	:	..T.....C.....	:	1887
		1900	*	1920
Seqid1	:	CAATCTGACACCTATCAACTAGGCTTTAAT	:	1908
Seqid3	:	.....	:	1917
	*	1940	*	
Seqid1	:	ACTTATAAAAAAGGTCTCTTCACTCAAGAC	:	1938
Seqid3	:	.....A.....	:	1947
		1960	*	1980
Seqid1	:	GATGTGCTAGGCGTAAAATTAGTAGGCTAT	:	1968
Seqid3	:	.....AT.....A.C.....G.....	:	1977
	*	2000	*	
Seqid1	:	CGTAGCTTTATTAAAACTATATCCATAAT	:	1998

## 【図1-11】

Seqid3 : .....C... : 2007

2020 \* 2040

Seqid1 : GTTTATGGTGGTTTGGTGGCGAGATGGC--- : 2025

Seqid3 : ..G.....A.A.....CA.....TGTT : 2037

\* 2060 \*

Seqid1 : ATGCCTACGTGGGCAGAAAGTAATGGATTT : 2055

Seqid3 : .....AGA.....AG.CTC.....T... : 2067

2080 \* 2100

Seqid1 : AAATATACTATTGCTCATCAAATTATAAG : 2085

Seqid3 : CGTCTG..G.....C.A : 2097

\* 2120 \*

Seqid1 : CCTATTGTGAAAAAGAGCGGCGTCGAGTTA : 2115

Seqid3 : ..A..A.....A.....A.CT..... : 2127

2140 \* 2160

Seqid1 : GAAATTA ACTATGACATGGGACGTTTTTTT : 2145

Seqid3 : ..GC.C..T.....T.....G..... : 2157

\* 2180 \*

Seqid1 : GCGAATGTCTCTTATGCATATCAACGAACA : 2175

Seqid3 : ..A...C.G.....T.....T..T : 2187

2200 \* 2220

## 【図1-12】

Seqid1 : AATCAACCAACCAATTATGCCGATGCCAGC : 2205  
 Seqid3 : .....G..... : 2217

\*            2240            \*

Seqid1 : CCGCGTCCGAATAATGCTTCACAAGAAGAC : 2235  
 Seqid3 : T.A.....CG.....A.....G : 2247

2260                            \*                            2280

Seqid1 : ATTTTGAAACAAGGTTATGGCTTATCTCGT : 2265  
 Seqid3 : .....T.....A..A : 2277

\*            2300            \*

Seqid1 : GTTTC AATGCTACCAA AAGACTACGGCAGA : 2295  
 Seqid3 : A.C..T...T.....G.....T... : 2307

2320                            \*                            2340

Seqid1 : TTAGAGCTTGGCACACGTTGGTTTGATCAA : 2325  
 Seqid3 : .....C..... : 2337

\*            2360            \*

Seqid1 : AAATTAACCTTAGGTCTGGCAGCTCGTTAT : 2355  
 Seqid3 : .....TC.T...A.C.....C.....C : 2367

2380                            \*                            2400

Seqid1 : TATGGAAAAAGTAAACGTGCGACAATTGAA : 2385  
 Seqid3 : .....T.....C.C.. : 2397

## 【図1-13】

\*            2420            \*

Seqid1 : GAAGAATATATCAATGGATCTCGCTTTAAA : 2415  
 Seqid3 : .....C.....C..C.....A.G.. : 2427

2440                            \*            2460

Seqid1 : AAAAATACCTTGCGTCGTGAAAATTACTAT : 2445  
 Seqid3 : .....TAC...CGACAG..T...T... : 2457

\*            2480            \*

Seqid1 : GCCGTGAAAAAACGGAAGATATTAAAAAA : 2475  
 Seqid3 : ..TA.T.....G..A.....G..... : 2487

2500                            \*            2520

Seqid1 : CAACCGATTATTTTAGATTACACGTCAGC : 2505  
 Seqid3 : .....T..... : 2517

\*            2540            \*

Seqid1 : TATGAACCAATCAAAGATTTGATTATTTAAA : 2535  
 Seqid3 : ..... : 2547

2560                            \*            2580

Seqid1 : GCGGAAGTACAAAATCTATTAGATAAACGT : 2565  
 Seqid3 : ..... : 2577

\*            2600            \*

Seqid1 : TATGTTGATCCGTTAGATGCTGGAAATGAC : 2595

## 【図1-14】

Seqid3 : .....T : 2607

2620 \* 2640

Seqid1 : GCGGCTTCGCAACGTTATTATTCAAGTTA : 2625

Seqid3 : ..... : 2637

\* 2660 \*

Seqid1 : AATAATTCTATAGAATGTGCGCAAGATTCT : 2655

Seqid3 : ...G.....T...CC...AAAAT.A..GAA : 2667

2680 \* 2700

Seqid1 : TCTGCTTGC---GGTGGTTCAGATAAAACC : 2682

Seqid3 : ..AA.C..TAAT.A.....G.....T : 2697

\* 2720 \*

Seqid1 : GTGCTTTATAACTTTGCACGTGGAAGAACT : 2712

Seqid3 : ..... : 2727

2740 \* 2760

Seqid1 : TATATTCTGAGTTTAACTATAAATTCTAA : 2742

Seqid3 : .....G.....G : 2757

【図2 - 1】

Figure 2 : B A S B 070ポリペプチド配列のアラインメント  
配列番号2との同一性を点で示し、そしてギャップは-で示す

```

*                20                *
Seqid2 : MKKAIKLNLI TLGLINTIGMTITQAQAEET : 30
Seqid4 : .....S..... : 30

40                *                60
Seqid2 : LGQIDVVEKVISNDKKPFTEAKAKSTRENV : 60
Seqid4 : ..... : 60

*                80                *
Seqid2 : FKETQTIDQVIRSIPGAFTQQDKGSGVVSV : 90
Seqid4 : ..... : 90

100                *                120
Seqid2 : NIRGENGLGRVNTMVDGVTQTFYSTALDSG : 120
Seqid4 : ..... : 120

*                140                *

```

【図2-2】

Seqid2 : QSGGSSQFGAAIDPNFIAGVDVNKSNFSGA : 150

Seqid4 : ..... : 150

160 \* 180

Seqid2 : SGINALAGSANFRTLGVNDVITDDKPGFII : 180

Seqid4 : .....S..... : 180

\* 200 \*

Seqid2 : LKGMTGSNATKSNFMTMAAGRKWLNDNGGYV : 210

Seqid4 : .....T..... : 210

220 \* 240

Seqid2 : GVVYGYVSQREVSQDYRIGGGERLASLGQDI : 240

Seqid4 : ..... : 240

\* 260 \*

Seqid2 : LAKEKEAYFRNAGYILNPEGQWTPDLSKKH : 270

Seqid4 : .....KI...D.....SA...A...N.P. : 270

【図2-3】

280 \* 300

Seqid2 : WSCNKPDYQKN----GDCSYRIGSAAKTR : 296

Seqid4 : ....T.SSL..KSMSTS.KP....P..T.. : 300

\* 320 \*

Seqid2 : REILQELLTNGKKPKDIEKLGNDGIEET : 326

Seqid4 : Q...K...E...E.....S..... : 330

340 \* 360

Seqid2 : DKSFERNKDQYSVAPIEPGSLQSRSHLL : 356

Seqid4 : E.....D..... : 360

\* 380 \*

Seqid2 : KFEYGDDHQNLGAQLRTLNDKIGSRKIENR : 386

Seqid4 : ....S...HT..... : 390

400 \* 420

Seqid2 : NYQVNYNFNNNSYLDLNLMAAHNIGKTIYP : 416

【図2-4】

Seqid4 : ..... : 420

\* 440 \*

Seqid2 : KGGFFAGWQVADKLITKNVANIVDINNSHT : 446

Seqid4 : ..... : 450

460 \* 480

Seqid2 : FLLPKEIDLKTTLGFNYFTNEYSKNRFPEE : 476

Seqid4 : ..... : 480

\* 500 \*

Seqid2 : LSLFYNDASHDQGLYSHSKRGRYSGTKSLL : 506

Seqid4 : .....V.E.....L.N.....G.. : 510

520 \* 540

Seqid2 : PQRSVILQPSGKQKFKTVYFDTALSKGIYH : 536

Seqid4 : ..... : 540

【図2-5】

\* 560 \*

Seqid2 : LNYSVNFTHYAFNGEYVGYENTAGQQINEP : 566

Seqid4 : .....K...-DK.... : 569

580 \* 600

Seqid2 : ILHKSGHKKAFNHSATLSAELSDYFMPFFT : 596

Seqid4 : ..... : 599

\* 620 \*

Seqid2 : YSRTHRMPNIQEMFFSQVSNAGVNTALKPE : 626

Seqid4 : ..... : 629

640 \* 660

Seqid2 : QSDTYQLGFNTYKKGLFTQDDVLGVKLVGY : 656

Seqid4 : ..... : 659

\* 680 \*

Seqid2 : RSFIKNYIHNVYGVWWRDG-MPTWAESNGF : 685

Seqid4 : .....D.S...V..E..RL... : 689

【図2-6】

700 \* 720

Seqid2 : KYTIAHQNYKPIVKKSGVELEINYDMGRFF : 715

Seqid4 : .L.....Q.....A..... : 719

\* 740 \*

Seqid2 : ANVSYAYQRTNQPTNYADASPRPNNASQED : 745

Seqid4 : .....S..R...K.E : 749

760 \* 780

Seqid2 : ILKQGYGLSRVSMPLPKDYGRLELGTRWFDQ : 775

Seqid4 : ..... : 779

\* 800 \*

Seqid2 : KLTLGLAARYYGKSKRATIEEEYINGSRFK : 805

Seqid4 : .....T.....E : 809

820 \* 840

Seqid2 : KNTLRRENYAVKKTEDIKKQPIILDLHVS : 835

【図2-7】

Seqid4 : ...T.DRI.....E..... : 839

\* 860 \*

Seqid2 : YEPIKDLIIKAEVQNLLDKRYVDPLDAGND : 865

Seqid4 : ..... : 869

880 \* 900

Seqid2 : AASQRYSSLNNSIECAQDSSACG-GSDKT : 894

Seqid4 : .....A.KI.E.T.ND..E.. : 899

\*

Seqid2 : VLYNFARGRTYILSLNYKF : 913

Seqid4 : ..... : 918

## 【國際調查報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		International Application No PCT/EP 00/01423
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC 7	C12N15/31 A61K39/40	C07K14/285 G01N33/50
	C07K16/12	A61K31/70 A61K39/102
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 C12N C07K A61K G01N		
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		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	FLEISCHMANN R. ET AL.: "Haemophilus influenzae Rd section 116; AC U32801; P45114" EBI DATABASE, 1995, XP002144210 the whole document	1-13
X	WO 96 33276 A (HUMAN GENOME SCIENCES INC; UNIV JOHNS HOPKINS (US)) 24 October 1996 (1996-10-24)	1-13
A	see description pp.1-46; p.76.30	14-16
A	WO 97 01638 A (CORTECS INTERNATIONAL LIMITED; KYD JENNELLE (AU); CRIPPS ALLAN (AU)) 16 January 1997 (1997-01-16) the whole document	1-13
	-/--	
<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 doubt 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		Date of mailing of the international search report
4 August 2000		17/08/2000
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Kania, T

2

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/EP 00/01423
---

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0 680 765 A (AMERICAN CYANAMID CO) 8 November 1995 (1995-11-08) the whole document	1-13
A	WO 93 19090 A (BARENKAMP STEPHEN J) 30 September 1993 (1993-09-30) the whole document	1-13
A	FLEISCHMANN R D ET AL: "WHOLE-GENOME RANDOM SEQUENCING AND ASSEMBLY OF HAEMOPHILUS INFLUENZAE RD" SCIENCE, US, AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE,, vol. 269, no. 5223, 28 July 1995 (1995-07-28), pages 496-512, XP000517090 ISSN: 0036-8075 cited in the application the whole document	1-15

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.  
PCT/EP 00/01423

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9633276 A	24-10-1996	AU 5552396 A	07-11-1996
		CA 2218741 A	24-10-1996
		EP 0821737 A	04-02-1998
		JP 11501520 T	09-02-1999
WO 9701638 A	16-01-1997	AU 708061 B	29-07-1999
		AU 6236396 A	30-01-1997
		CA 2225405 A	16-01-1997
		EP 0835313 A	15-04-1998
		JP 11510373 T	14-09-1999
		NO 976119 A	26-02-1998
		NZ 311120 A	28-10-1999
EP 0680765 A	08-11-1995	US 5770213 A	23-06-1998
		AU 704882 B	06-05-1999
		AU 1781495 A	16-11-1995
		CA 2148563 A	06-11-1995
		FI 952144 A	06-11-1995
		JP 8337598 A	24-12-1996
		NO 951750 A	06-11-1995
WO 9319090 A	30-09-1993	AU 3916893 A	21-10-1993
		BR 9306109 A	18-11-1997
		CA 2131837 A	17-09-1993
		EP 0632814 A	11-01-1995
		FI 944273 A	15-11-1994
		JP 2810235 B	15-10-1998
		JP 7506248 T	13-07-1995
		NO 943431 A	10-11-1994
		US 5549897 A	27-08-1996
		US 5603938 A	18-02-1997
		US 5876733 A	02-03-1999

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マ-コ-ト' (参考)	
C 0 7 K	16/12	C 1 2 N	1/19	4 H 0 4 5
C 1 2 N	1/15		1/21	
	1/19	C 1 2 P	21/02	C
	1/21	G 0 1 N	33/53	D
	5/10			N
C 1 2 P	21/02		33/569	L
G 0 1 N	33/53	C 1 2 N	15/00	Z N A A
			5/00	A
	33/569	A 6 1 K	37/02	

(81)指定国 E P ( A T , B E , C H , C Y ,  
 D E , D K , E S , F I , F R , G B , G R , I E , I  
 T , L U , M C , N L , P T , S E ) , O A ( B F , B J  
 , C F , C G , C I , C M , G A , G N , G W , M L ,  
 M R , N E , S N , T D , T G ) , A P ( G H , G M , K  
 E , L S , M W , S D , S L , S Z , T Z , U G , Z W  
 ) , E A ( A M , A Z , B Y , K G , K Z , M D , R U ,  
 T J , T M ) , A E , A L , A M , A T , A U , A Z ,  
 B A , B B , B G , B R , B Y , C A , C H , C N , C  
 R , C U , C Z , D E , D K , D M , E E , E S , F I  
 , G B , G D , G E , G H , G M , H R , H U , I D ,  
 I L , I N , I S , J P , K E , K G , K P , K R , K  
 Z , L C , L K , L R , L S , L T , L U , L V , M A  
 , M D , M G , M K , M N , M W , M X , N O , N Z ,  
 P L , P T , R O , R U , S D , S E , S G , S I , S  
 K , S L , T J , T M , T R , T T , T Z , U A , U G  
 , U S , U Z , V N , Y U , Z A , Z W

(72)発明者 トンナール, ジョエル  
 ベルギー国, ベ - 1330 リクサンサール,  
 リュ ドゥ ランスティテュ 89, スミス  
 クライン ビーチャム バイオロジカルズ  
 ソシエテ アノニム

F タ-ム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA31 CA02 EA04  
 GA11 HA01  
 4B064 AG31 CA01 CA19 CC24 DA01  
 DA13  
 4B065 AA01X AA01Y AA58X AA72X  
 AA90X AB01 AC14 BA02  
 CA24 CA45 CA46  
 4C084 AA01 BA01 BA23 CA01 ZB33  
 4C085 AA03 BA55 CC08 CC32  
 4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10  
 CA11 DA75 DA86 EA52 FA72  
 FA73 FA74

专利名称(译)	嗜血杆菌抗原		
公开(公告)号	<a href="#">JP2002536998A</a>	公开(公告)日	2002-11-05
申请号	JP2000601163	申请日	2000-02-22
[标]申请(专利权)人(译)	史克必成生物兴业ANONYME		
申请(专利权)人(译)	史克必成生物兴业ANONYME		
[标]发明人	リユールジャンルイ トンナールジョエル		
发明人	リユール,ジャン-ルイ トンナール,ジョエル		
IPC分类号	A61K39/00 C07K14/285 C12N15/31 C12N15/09 A61K38/00 A61K39/145 A61P31/16 C07K16/12 C12N11/15 C12N11/19 C12N11/21 C12N5/10 C12P21/02 G01N33/53 G01N33/569		
CPC分类号	C07K14/285 A61K39/00 A61K2039/505 A61K2039/53		
FI分类号	A61K39/145 A61P31/16 C07K14/285 C07K16/12 C12N11/15 C12N11/19 C12N11/21 C12P21/02.C G01N33/53.D G01N33/53.N G01N33/569.L C12N15/00.ZNA.A C12N5/00.A A61K37/02		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA31 4B024/CA02 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA01 4B064 /AG31 4B064/CA01 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA01X 4B065/AA01Y 4B065/AA58X 4B065/AA72X 4B065/AA90X 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA45 4B065/CA46 4C084/AA01 4C084/BA01 4C084/BA23 4C084/CA01 4C084/ZB33 4C085 /AA03 4C085/BA55 4C085/CC08 4C085/CC32 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA11 4H045/DA75 4H045/DA86 4H045/EA52 4H045/FA72 4H045/FA73 4H045 /FA74		
优先权	1999004183 1999-02-24 GB		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

本发明提供了BASB070多肽，编码BASB070多肽的多核苷酸，以及使用重组技术生产这种多肽的方法。本发明还提供了使用BASB070多肽筛选抗菌化合物的方法。