

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-537955

(P2004-537955A)

(43) 公表日 平成16年12月24日(2004.12.24)

| (51) Int. Cl. ⁷ | F I | テーマコード (参考) |
|----------------------------|------------------------------------|-------------|
| C 1 2 N 15/09 | C 1 2 N 15/00 Z N A A | 4 B O 2 4 |
| A 6 1 K 31/7088 | A 6 1 K 31/7088 | 4 B O 6 4 |
| A 6 1 K 38/00 | A 6 1 K 39/095 | 4 B O 6 5 |
| A 6 1 K 39/095 | A 6 1 K 39/395 D | 4 C O 8 4 |
| A 6 1 K 39/395 | A 6 1 K 39/395 R | 4 C O 8 5 |
| | 審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 125 頁) 最終頁に続く | |

| | | | |
|---------------|------------------------------|----------|--|
| (21) 出願番号 | 特願2000-594925 (P2000-594925) | (71) 出願人 | 397062700 グラクソスミスクライン 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 1 3 3 0 ルー デ ランスティテユート 8 9 |
| (86) (22) 出願日 | 平成12年1月19日 (2000.1.19) | (74) 代理人 | 100077517 弁理士 石田 敬 |
| (85) 翻訳文提出日 | 平成13年7月19日 (2001.7.19) | (74) 代理人 | 100092624 弁理士 鶴田 準一 |
| (86) 国際出願番号 | PCT/EP2000/000425 | (74) 代理人 | 100108903 弁理士 中村 和広 |
| (87) 国際公開番号 | W02000/043517 | (74) 代理人 | 100082898 弁理士 西山 雅也 |
| (87) 国際公開日 | 平成12年7月27日 (2000.7.27) | | |
| (31) 優先権主張番号 | 9901462.3 | | |
| (32) 優先日 | 平成11年1月22日 (1999.1.22) | | |
| (33) 優先権主張国 | 英国 (GB) | | |
| (31) 優先権主張番号 | 9902069.5 | | |
| (32) 優先日 | 平成11年1月29日 (1999.1.29) | | |
| (33) 優先権主張国 | 英国 (GB) | | |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ナイセリア・メニンギティディス由来のBASB055ポリヌクレオチド及びポリペプチド、その使用

(57) 【要約】

本発明は、BASB055ポリペプチドと、BASB055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。本発明はまた、それらを用いた診断、予後予測、治療の方法も提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 2 のアミノ酸配列と少なくとも 85% が一致するアミノ酸配列を含む、単離されたポリペプチド。

【請求項 2】

前記アミノ酸配列が、配列番号 2 のアミノ酸配列と少なくとも 95% が一致する、請求の範囲第 1 項に記載の単離されたポリペプチド。

【請求項 3】

配列番号 2 のアミノ酸配列を含む、請求の範囲第 1 項に記載の単離されたポリペプチド。

【請求項 4】

配列番号 2 の単離されたポリペプチド。

【請求項 5】

請求の範囲第 1 ~ 4 項のいずれか 1 項に記載のポリペプチドの免疫原性断片であって、この免疫原性断片の免疫活性が、配列番号 2 のポリペプチドと実質的に同じであることを特徴とする免疫原性断片。

【請求項 6】

配列番号 2 のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む、単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 7】

配列番号 1 のポリヌクレオチドを含む、単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 8】

配列番号 2 のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含んでおり、配列番号 1 の配列またはその断片を有する標識された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下で適切なライブラリーをスクリーニングすることにより得ることができる、単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 9】

請求の範囲第 6 ~ 8 項のいずれか 1 項に記載の単離されたポリヌクレオチドを含む、発現ベクターまたは生きた組み換え微生物。

【請求項 10】

請求の範囲第 6 ~ 8 項のいずれか 1 項に記載のポリヌクレオチドを発現させる方法であって、これらポリヌクレオチドのうちの少なくとも 1 つを含む発現ベクターを用いて宿主細胞を形質転換させ、そして、そのポリヌクレオチドのうちの任意の 1 つを発現させるのに十分な条件下でこの宿主細胞を培養することを含む、ポリヌクレオチドの発現方法。

【請求項 11】

請求の範囲第 1 ~ 5 項のいずれか 1 項に記載のポリペプチドの有効量と、医薬として許容される担体とを含むワクチン組成物。

【請求項 12】

請求の範囲第 6 ~ 8 項のいずれか 1 項に記載のポリヌクレオチドの有効量と、医薬として許容される担体とを含むワクチン組成物。

【請求項 13】

少なくとも 1 つの別のナイセリア・メニンギティディス抗体を含む、請求の範囲第 11 項または第 12 項に記載のワクチン組成物。

【請求項 14】

請求の範囲第 1 ~ 5 項のいずれか 1 項に記載のポリペプチドまたは免疫原性断片に対して免疫特異的な抗体。

【請求項 15】

ナイセリア・メニンギティディスの感染を診断する方法であって、請求の範囲第 1 ~ 5 項のいずれか 1 項に記載のポリペプチド、またはこのポリペプチドに対して免疫特異的な抗体が、そのような感染が疑われる動物に由来する生物学的サンプルに存在するかどうかを同定することを含む診断方法。

10

20

30

40

50

【請求項 16】

動物に免疫応答を発生させる薬剤の製造のための、請求の範囲第1～5項のいずれか1項に記載のポリペプチドを免疫学的に有効な量含む組成物の使用。

【請求項 17】

動物に免疫応答を発生させる薬剤の製造のための、請求の範囲第6～8項のいずれか1項に記載のポリヌクレオチドを免疫学的に有効な量含む組成物の使用。

【請求項 18】

請求の範囲第1～5項のいずれか1項に記載のポリペプチドに対する少なくとも1つの抗体と、医薬として許容される担体とを含む、ナイセリア・メニンギティディスに感染した病人の治療において有用な治療用組成物。

10

【発明の詳細な説明】

【0001】

発明の属する技術分野

本発明は、ポリヌクレオチド（本明細書では、“BASB055ポリヌクレオチド”と呼ぶ）、これらポリヌクレオチドによってコードされたポリペプチド（本明細書では、“BASB055”、または“BASB055ポリペプチド”と呼ぶ）、ならびにこれらを生産させるための組み換え材料と方法に関するものである。別の側面として、本発明は、これらポリペプチドおよびポリヌクレオチドの利用方法にも関する。利用方法としては、例えば、細菌感染に対するワクチンが含まれる。さらに別の側面として、本発明は、所定の病原菌に感染したことを検出するための診断法にも関する。

20

発明の背景

ナイセリア・メニンギティディス（髄膜炎菌）は、ヒト上気道からしばしば単離されるグラム陰性細菌である。この細菌は、菌血症や髄膜炎などの侵入性細菌性疾患を引き起こすことがある。髄膜炎の発生には、地理差、季節差、年差が見られる（シュワルツ、B.、ムーア、P.S.、ブルーム、C.V.、Clin. Microbiol. Rev.、第2巻（補）、S18～S24ページ、1989年）。温かな気候の国においては、この疾患はたいてい血清型Bの菌株によって起こり、人口10万人あたり1年に1～10人の割合で発生するが、時にはさらに大きな割合になることもある（カツマルスキー、E.B.（1997）、Commun. Dis. Rep. Rev.、第7巻、R55～59ページ、1995年；ショルテン、R.J.P.M.、ビールマー、H.A.、ブルマン、J.T. 他、Clin. Infect. Dis.、第16巻、237～246ページ、1993年；クルス、C.、パベス、G.、アギラル、E. 他、Epidemiol. Infect.、第105巻、119～126ページ、1990年）。

30

【0002】

血清型Aの髄膜炎菌が優勢な主に中央アフリカにおいては、感染者の割合が人口10万人あたり1年に1000人に達することがある（シュワルツ、B.、ムーア、P.S.、ブルーム、C.V.、Clin. Microbiol. Rev.、第2巻（補）、S18～S24ページ、1989年）。全体として、髄膜炎のほとんどは血清型A、B、C、W-135、Yの髄膜炎菌によって起こり、4価のA、C、W-135、Y多糖ワクチンが利用できる（アルナン、J.、アルマンジョン、F.、ミナール、M.C.、ラフェ、C.、J. Biol. Stand.、第10巻、335～339ページ、1982年）。

40

【0003】

多糖ワクチンは、現在、輸送タンパク質と化学的に結合させるという改良が続けられている（リーパーマン、J.M.、チュー、S.S.、ウォン、V.K. 他、JAMA、第275巻、1499～1503ページ、1996年）。

【0004】

血清型Bのワクチンは利用できない。というのも、B荚膜多糖は免疫原性を示さないことが判明したからである。これは、宿主の成分と構造的に似ていることが原因である可能性

50

が高い(ヴァイル, F. A.、アーテンシュタイン, M. S.、プラント, M. L. 他、J. Infect. Dis.、第126巻、514~522ページ、1972年; フィンネ, J. M.、レイノネン, M.、メケレ, P. M.、Lancet、第2巻、355~357ページ、1983年)。

【0005】

長年にわたって努力が続けられ、髄膜炎菌の外膜に基づいたワクチンが開発された(デ・モラエス, J. C.、パーキンズ, B.、カマルゴ, M. C. 他、Lancet、第340巻、1074~1078ページ、1992年; ブジューン, G.、ホイビー, E. A.、グロンスビー, J. K. 他、Lancet、第338巻、1991年)。このワクチンは、年長の子ども(4歳より上)と青少年では57~85%に効果のあることが

10

20

30

40

50

【0006】

このワクチンの中には細菌の外膜成分が多数存在している。例えば、PorA、PorB、Rmp、Opc、Opa、FrpBである。しかし、観察されている防御効果に対するこれら成分の寄与は、さらに明確にする必要がある。細菌の他の外膜成分であるTbpBやNspAなどは、動物またはヒトの抗体を用いることにより、免疫防御に関係している可能性のあることが明らかにされている(マルタン, D.、カデュー, N.、アメル, J.、プロドゥー, B. R.、J. Exp. Med.、第185巻、1173~1183ページ、1997年; リソロ, L.、メートル-ヴィルモット, C.、デュマ, P. 他、Inf. Immun.、第63巻、884~890ページ、1995年)。免疫防御のメカニズムは、抗体を媒介とした細菌の活性とオプソニン食菌作用に関係しているであろう。

【0007】

抗体を媒介としたあらゆるメカニズムを合わせ持たせるのに菌血症モデル動物が用いられている(サウッコネン, K.、レイノネン, M.、アブディライ, H.、プールマン, J. T.、Vaccine、第7巻、325~328ページ、1989年)。髄膜炎に対する免疫にとって後期補体成分を媒介とした殺菌メカニズムが極めて重要であることが、一般に認められている(ロス, S. C.、ローゼンタール, P. J.、パーベリック, H. M.、デンセン, P.、J. Infect. Dis.、第155巻、1266~1275ページ、1987年)。

【0008】

ナイセリア・メニンギティディスに感染する頻度は、過去数十年の間に劇的に上昇した。これは、多数の抗生物質に対する耐性を持った菌の出現と、免疫系が弱い人の増加が原因である。標準的な抗生物質のいくつかまたはすべてに耐性のあるナイセリア・メニンギティディスが単離されるのはもはや珍しいことではない。この現象により、これまでに遭遇したことのない医療上の必要性が生じ、新しい抗菌剤、ワクチン、薬剤スクリーニング法、この生物を検出するための診断法に対する要求が生まれている。

発明の要約

本発明は、BASB055に関するものであり、中でも、BASB055ポリペプチド、BASB055ポリヌクレオチド、ならびにこれらを産生させるための組み換え材料と方法に関する。別の側面として、本発明は、これらポリペプチドおよびポリヌクレオチドの利用方法にも関する。利用方法には、特に、微生物による疾患の予防ならびに治療が含まれる。さらに別の側面として、本発明は、微生物の感染に伴う疾患や異常を検出するための診断法にも関する。例えば、BASB055ポリヌクレオチドまたはポリペプチドの発現または活性を検出するための方法に関する。

【0009】

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精神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。

発明の説明

本発明は、B A S B 0 5 5 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。特に、本発明は、ナイセリア・ゴノロエアエ (*N e i s s e r i a g o n o r r h o e a e*) M t r C タンパク質に対するアミノ酸配列の相同性により関係付けられる、ナイセリア・メニンギティディスの B A S B 0 5 5 のポリペプチド及びポリヌクレオチドに関する。本発明は、特に、配列番号 1 で与えられるヌクレオチド配列と配列番号 2 で与えられるアミノ酸配列をそれぞれ有する B A S B 0 5 5 に関する。“DNA”として以下の配列リストに示した配列は、本発明の一実施態様の具体例を表わしているものと理解する。当業者であれば、そうした配列を一般にポリヌクレオチド(リボポリヌクレオチドを含む)において利用できることがわかるはずだからである。

ポリペプチド

本発明の一側面によれば、この明細書で“B A S B 0 5 5”、または“B A S B 0 5 5 ポリペプチド”と呼ぶナイセリア・メニンギティディス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。

10

【0010】

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 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 の全長にわたって配列番号 1 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。

20

(c) 配列番号 2 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。

【0011】

配列番号 2 で与えられる B A S B 0 5 5 ポリペプチドは、ナイセリア・メニンギティディス菌株 A T C C 1 3 0 9 0 に由来する B A S B 0 5 5 ポリペプチドである。

30

【0012】

本発明により、B A S B 0 5 5 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 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 B A S B 0 5 5 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、B A S B 0 5 5 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 B A S B 0 5 5 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 B A S B 0 5 5 の免疫原性断片は、配列番号 2 の全長にわたって配列番号 2 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。

40

【0013】

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 5 5 ポリペプチドの場合のように、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。

【0014】

好ましい断片としては、例えば、配列番号 2 のアミノ酸配列またはその変異体の一部を含

50

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、アミノ末端およびノ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。

【0015】

好ましい断片としては、さらに、配列番号2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。

10

【0016】

本発明のポリペプチド断片は、ペプチド合成によって対応する完全長ポリペプチドを産生するのに用いることができる。したがって、この断片は本発明の完全長ポリペプチドを産生するための中間体として用いることができる。

【0017】

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。

20

【0018】

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。

【0019】

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。

30

【0020】

さらに本発明は、遺伝子工学によってこの融合タンパク質を調製する方法と、この融合タンパク質を利用した薬剤のスクリーニング、診断、治療に関する。本発明のさらに別の側面は、この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。融合タンパク質の技術に関する実例は、国際特許出願番号WO94/29458とWO94/22914に見ることができる。

40

【0021】

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。

50

【0022】

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、Ly t A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。Ly t Aは、N-アセチル-L-アラニン・アミダーゼと、アミダーゼLy t A(Ly 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。Ly t Aタンパク質のC末端領域は、コリンや、DEAE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-Ly t Aを発現するプラスミドが開発されている。C-Ly 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、Biotechnology、第10巻、795~798ページ、1992年に記載されている。Ly 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。

10

【0023】

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。

20

【0024】

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。

【0025】

本発明のポリペプチドはナイセリア・メニンギティディス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。

30

ポリヌクレオチド

本発明の1つの目的は、BASB055ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、特にこの明細書でBASB055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を提供することである。

【0026】

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で与えられる配列を有するBASB055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んでいる。

【0027】

配列番号1で与えられるBASB055ポリヌクレオチドは、ナイセリア・メニンギティディス菌株ATCC13090に由来するBASB055ポリヌクレオチドである。

40

【0028】

本発明のさらに別の側面によれば、BASB055ポリペプチドとポリヌクレオチド、特にナイセリア・メニンギティディスのBASB055ポリペプチドとポリヌクレオチドをコードおよび/または発現する、単離された核酸分子が提供される。そのような核酸分子としては、例えば、未処理のRNA、リボザイムRNA、mRNA、cDNA、ゲノムDNA、B-DNA、Z-DNAが挙げられる。本発明のさらに別の実施態様として、生物学的、診断上、予防上、臨床上、または治療上有効なポリヌクレオチドとポリペプチド、これらの変異体、これらを含む組成物がある。

50

【0029】

本発明の別の側面は、配列番号2の推定アミノ酸配列を有するBASB055ポリペプチドをコードしており、少なくとも1つの完全長遺伝子を含む単離されたポリヌクレオチドと、このポリヌクレオチドと密接に関係したポリヌクレオチドと、これらの変異体に関する。

【0030】

本発明の特に好ましい実施態様では、ナイセリア・メニンギティディスに由来し、配列番号2のアミノ酸配列を含むBASB055ポリペプチド、またはそのアミノ酸配列からなるBASB055ポリペプチド、またはその変異体が提供される。

【0031】

配列番号1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、BASB055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。なお標準的なクローニング法およびスクリーニング法としては、出発材料としてナイセリア・メニンギティディス細胞を用いて細菌から染色体DNAのクローニングとシーケンシングを行なう方法がある。例えば配列番号1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、ナイセリア・メニンギティディスの染色体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、厳しい条件での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。都合のよいことに、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。本発明の証拠として、配列番号1で与えられる各ポリヌクレオチドは、ナイセリア・メニンギティディスに由来するDNAライブラリーの中で発見された。

【0032】

さらに、配列番号1で与えられる各DNA配列は、配列番号2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。

【0033】

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1237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。

【0034】

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の全長にわたって配列番号1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の全長にわたって配列番号2と少なくとも85%が一致、好ましくは少

10

20

30

40

50

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。

【0035】

本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、ナイセリア・メニンギティディス以外の種からのホモログやオーソログも含め、配列番号1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。

10

【0036】

本発明により、配列番号1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・フレーム中におい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（キアジェン社）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elson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。

20

30

【0037】

配列番号2のBASB055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1~1236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のポリペプチドをコードする配列であってもよい。

【0038】

“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で与えられるアミノ酸配列を有するナイセリア・メニンギティディスのBASB055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。

40

【0039】

50

本発明はさらに、配列番号2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。

【0040】

さらに、特に好ましい実施態様によれば、配列番号2で与えられるB A S B 0 5 5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B A S B 0 5 5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、B A S B 0 5 5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。

10

【0041】

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で与えられるアミノ酸配列を有するB A S B 0 5 5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。

20

【0042】

好ましい実施態様によれば、配列番号1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。

【0043】

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 5 5ポリヌクレオチド配列、例えば配列番号1のポリヌクレオチドと特に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が提供される。

【0044】

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に関する。この明細書で用いる“厳しい(stringent)条件”、“厳しい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℃にて一晚培養し、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。

30

40

【0045】

本発明によればさらに、配列番号1で与えられるポリヌクレオチド配列にとって完全な遺伝子を含む適切なライブラリーを、配列番号1で与えられるこのポリヌクレオチド配列またはその断片を有するプローブを用いて厳しいハイブリダイゼーション条件のもとでスクリーニングし、そのポリヌクレオチド配列を単離することにより得られるポリヌクレオチ

50

ド配列からなるポリヌクレオチド、またはそうしたポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドが提供される。そのようなポリヌクレオチドを得るのに役立つ断片としては、例えば、この明細書の別の箇所に詳しく説明したプローブやプライマーが挙げられる。

【0046】

本発明のポリヌクレオチド・アッセイに関してはこの明細書の別の箇所に説明してあるが、例えば本発明のポリヌクレオチドをRNA、cDNA、ゲノムDNAのハイブリダイゼーション用プローブとして用い、BASB055をコードする完全長cDNAやゲノム・クローンを単離したり、BASB055遺伝子との一致度が高い他の遺伝子、特に配列の一致度が高いcDNAやゲノム・クローンを単離したりすることができる。このプローブは、一般に、少なくとも15のヌクレオチド残基または塩基対を含んでいることになろう。このプローブは、少なくとも30のヌクレオチド残基または塩基対を含んでいることが好ましく、少なくとも50のヌクレオチド残基または塩基対を含んでいてもよい。特に好ましいプローブは、20以上かつ30未満のヌクレオチド残基または塩基対を含むことになろう。

10

【0047】

BASB055遺伝子のコード領域は、配列番号1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。

20

【0048】

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ことで核酸の増幅(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、完全な配列を得ることができる。

30

【0049】

本発明のポリヌクレオチドとポリペプチドは、例えば、疾患、中でもヒトの疾患の治療法や診断法を発見するための研究試薬、研究材料として使用することができる。これについてはこの明細書においてポリヌクレオチド・アッセイとの関連で詳しく説明する。

40

【0050】

本発明のポリヌクレオチドは、配列番号1~2の配列から導かれたオリゴヌクレオチドである。これらポリヌクレオチドは、この明細書に記載した方法、好ましくはPCRにおいて利用して、ここで同定したポリヌクレオチドの全体または一部が、感染した組織内の細菌の中で転写されるかどうかを確かめるのに用いることができる。このような配列は、病原体の感染段階や感染タイプの診断にも利用できると考えられている。

【0051】

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

50

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。

【0052】

本発明のあらゆるポリヌクレオチドのそれぞれについて、相補的なポリヌクレオチドが提供される。これら相補的なポリヌクレオチドは、対象となる各ポリヌクレオチドに対して完全に相補的であることが好ましい。

10

【0053】

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。

【0054】

本発明のいくつかのポリヌクレオチドを記述するにあたって、ヌクレオチドに対する標準的な表記であるA、G、C、T/Uに加え、“N”という表記も用いることができる。“N”は、DNAまたはRNAの4つのヌクレオチドのうちの任意のものがDNA配列またはRNA配列の中の指定された位置に現われてよいことを意味している。ただし、正しいリーディング・フレームで隣接したヌクレオチドの位置と組み合わせで読んだ場合に、Nがそのリーディング・フレーム内で早すぎる終止コドンが発生させる効果を持つような核酸ではないことが好ましい場合は除く。

20

【0055】

要するに、本発明のポリヌクレオチドがコードできるのは、成熟タンパク質、成熟タンパク質+リーダー配列（これをプレタンパク質と呼ぶことができよう）、プレタンパク質のリーダー配列ではないプロ配列を1つまたはそれ以上有する成熟タンパク質前駆体、またはプレプロタンパク質である。プレプロタンパク質というのはプロタンパク質の前駆体であり、リーダー配列と1つまたはそれ以上のプロ配列を含んでいる。プロ配列は、一般に、活性がある成熟した形態のポリペプチドを生み出すための処理ステップにおいて除去される。

30

【0056】

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。

【0057】

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ピボ感染（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。

40

50

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、細胞フリーな翻訳系も用いることができる。

【0058】

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。

10

【0059】

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。

20

【0060】

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、放線菌、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、クルイヴェロミセス (*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、パウエス黒腫の細胞；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。

30

【0061】

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。

40

【0062】

真核生物における組み換え発現系においては、翻訳されたタンパク質を小胞体の内腔、細胞周辺腔、または細胞外環境に分泌させるため、適切な分泌シグナルが、発現されるポリ

50

ペプチドに組み込まれている可能性がある。このシグナルは、ポリペプチドにとって内在性である可能性と、異種性シグナルである可能性とがある。

【0063】

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。精製にはイオン金属アフィニティ・クロマトグラフィ（IMAC）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。

10

【0064】

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。

20

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BASB055ポリヌクレオチドとポリペプチドを診断用試薬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BASB055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BASB055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。

30

【0065】

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タリゼーションを、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BASB055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、不完全にしか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

40

50

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、RNA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。

【0066】

別の実施態様では、BASB055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）。

10

【0067】

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のポリペプチド、またはその断片；

20

(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のポリペプチドに対する抗体。

【0068】

このようなキット(a)、(b)、(c)、(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。

【0069】

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。

30

【0070】

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、BASB055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。

40

【0071】

本発明によれば、1、2、3、または4個のヌクレオチドが5'末端および/または3'末端から除去されたプライマーがさらに提供される。このプライマーは、特に、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BASB055DNAおよび/またはRNAを増幅するのに用いることができる。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

50

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。

【0072】

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、さらに好ましくはナイセリア・メニンギティディス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、配列番号1の配列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。B A S B 0 5 5 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、RNアーゼ保護法、ノーザン・プロット法、分光法、その他のハイブリダイゼーション法がある。

10

【0073】

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B A S B 0 5 5 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B A S B 0 5 5 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、放射線免疫検定法、競合結合アッセイ、ウエスタン・プロット解析法、抗体サンドイッチ・アッセイ、抗体検出法、E L I S A法などがある。

20

【0074】

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、特にナイセリア・メニンギティディス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。

30

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。

【0075】

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 5 5 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。

40

【0076】

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を発現する細胞を、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、

50

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。

【0077】

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。

【0078】

別の方法として、ファージ提示法を利用して、抗 B A S B 0 5 5 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 P C R 増幅された v - 遺伝子のレポトリから、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）。

【0079】

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。

【0080】

したがって、特に B A S B 0 5 5 ポリペプチドまたは B A S B 0 5 5 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。

【0081】

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。

【0082】

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、またはテンベスト他、Biotechnology、第 9 巻、266～273 ページ、1991 年に記載されている。

アンタゴニストとアゴニスト - アッセイと分子

本発明のポリペプチドとポリヌクレオチドは、例えば細胞、細胞フリーな調製物、化合物ライブラリー、天然産物の混合物の中で小さな分子からなる基質やリガンドの結合力を評価するのに用いることもできる。これら基質やリガンドは、天然の基質やリガンドでもよく、構造または機能を似せた人工物でもよい。例えば、コリガン他、『免疫学における最新のプロトコル』、第 1 (2) 巻、第 5 章、1991 年を参照のこと。

【0083】

スクリーニング法により、ポリペプチドまたはポリヌクレオチド、そのポリペプチドまたはポリヌクレオチドを有する細胞または膜、またはそのポリペプチドの融合タンパク質に対する候補化合物の結合を、その候補化合物に直接または間接に付随する標識を用いて容易に測定することが可能である。また、スクリーニング法では、標識した競合化合物との競合が起こることがある。さらに、これらスクリーニング法においてポリペプチドまたはポリヌクレオチドを含む細胞に対する適切な検出システムを用いることにより、候補化合物が、ポリペプチドまたはポリヌクレオチドの活性化または抑制によってシグナルを発生するかどうかをテストすることができる。活性のインヒビターは、一般に、既知のアゴニストの存在下で分析し、候補化合物が存在していることによってそのアゴニストが活性化

に及ぼす効果を観測する。構成的に活性なポリペプチドおよび/または構成的に発現するポリペプチドとポリヌクレオチドを用い、アゴニストまたはインヒビターの存在下で、候補化合物がそのポリペプチドまたはポリヌクレオチドの活性化を抑制するかどうかをテストすることにより、逆アゴニストまたは逆インヒビターのスクリーニングができる。さらに、スクリーニング法は、候補化合物を本発明のポリペプチドまたはポリヌクレオチドを含む溶液と混合して混合物にし、その混合物中のBASB055ポリペプチドおよび/またはポリヌクレオチドの活性を測定し、その混合物のBASB055ポリペプチドおよび/またはポリヌクレオチドの活性を基準と比較する操作だけを含むようにすることが可能である。融合タンパク質、例えばFcタンパク質とBASB055ポリペプチドとから作られる融合タンパク質は、すでに説明したように、本発明のポリペプチドのアンタゴニストや、系統発生上および/または機能上関連したポリペプチドのアンタゴニストを同定するためのハイスループット・スクリーニング・アッセイにも用いることができる(D. ベネット他、J. Mol. Recognition、第8巻、52~58ページ、1995年; K. ヨハンソン他、J. Biol. Chem.、第270巻(16)、9459~9471ページ、1995年を参照のこと)。

10

20

30

40

50

【0084】

本発明のポリペプチドと結合および/または相互作用するポリヌクレオチド、ポリペプチド、抗体は、付加化合物が細胞内におけるmRNAおよび/またはポリペプチドの産生に及ぼす効果を検出するスクリーニング法を設計するのにも用いることができる。例えば、モノクローナル抗体とポリクローナル抗体を用いてポリペプチドの分泌レベルまたは細胞付随レベルを測定するため、従来技術において標準的な方法によりELISAを構成することができる。これは、適切に処理した細胞または組織からのポリペプチドの産生を抑制または促進する可能性のある薬剤(それぞれ、アンタゴニスト、アゴニストと呼ばれる)を発見するのに利用できる。

【0085】

本発明により、BASB055ポリペプチドまたはポリヌクレオチドの作用を促進(アゴニスト)または阻止(アンタゴニスト)する化合物、特に細菌発育抑制性および/または殺菌性の化合物を同定するための化合物スクリーニング法も提供される。このスクリーニング法にはハイスループット技術を含めることが可能である。例えば、アゴニストまたはアンタゴニストをスクリーニングするため、BASB055ポリペプチドと、そのポリペプチドの基質またはリガンドを標識したものとを含む合成反応用混合物、細胞の区画(例えば膜、細胞外被、細胞壁)、またはこれらのうちの任意のもの調製物を、BASB055のアゴニストまたはアンタゴニストの可能性のある候補化合物の不在下または存在下で培養する。候補化合物がBASB055ポリペプチドを作動させる能力または拮抗する能力は、標識したリガンドの結合の低下、またはそのような基質からの産物の産生低下となって現われる。BASB055ポリペプチドの効果を誘起することなく結合する分子は、よいアンタゴニストである可能性が最も高い。よく結合する分子や、場合によっては基質からの産物の産生率を上昇させる分子、シグナル伝達を増加させる分子、化学チャネルの活性を増大させる分子は、アゴニストである。状況に応じて起こる基質からの産物の産生、シグナル伝達、化学チャネルの活性の割合やレベルは、レポーター系を用いることによって容易に検出することができる。この点に関して役に立つ可能性のあるレポーター系としては、測色用に標識した基質が産物に変換されたもの、BASB055ポリヌクレオチドまたはポリペプチドの活性の変化に関与するレポーター遺伝子、従来技術で既知の結合アッセイが挙げられるが、これだけに限定されるわけではない。

【0086】

BASB055のアゴニストを探すアッセイの別の一例は、競合抑制アッセイにとって適切な条件下で、BASB055と潜在的なアゴニストとを、BASB055と結合する分子、BASB055と結合する組み換え分子、天然の基質またはリガンド、あるいは基質またはリガンドを真似たものと結合させるという競合アッセイである。BASB055を放射活性物質または測色用化合物などで標識すると1つの結合分子に結合したり産物に変

換されたりする B A S B 0 5 5 の数を正確に測定できるため、潜在的なアンタゴニストの効果を評価することができる。

【 0 0 8 7 】

潜在的なアンタゴニストとしては、特に、本発明のポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチドと結合し、そのことによってその活性または発現が抑制されたり消えたりする小さな有機分子、ペプチド、ポリペプチド、抗体が挙げられる。潜在的なアンタゴニストとしては、結合分子の同じ部位に結合するが B A S B 0 5 5 によって誘起される活性を誘起せず、そのことによって B A S B 0 5 5 ポリペプチドおよび/またはポリヌクレオチドが結合するのを排除して B A S B 0 5 5 ポリペプチドおよび/またはポリヌクレオチドの作用または発現を阻止する小さな有機分子、ペプチド、密接な関係のあるタンパク質などのポリペプチド、抗体も可能である。

10

【 0 0 8 8 】

潜在的なアンタゴニストとしては、ポリペプチドの結合部位と結合してその部位を占拠し、そのことによって細胞と結合する分子の結合を阻止し、正常な生物活性を抑制する小さな分子も挙げられる。小さな分子の実例としては、小さな有機分子、ペプチド、ペプチド様分子が挙げられるが、これだけに限定されるわけではない。これ以外の潜在的なアンタゴニストとしては、アンチセンス分子がある(この分子の説明に関しては、オカノ、J. Neurochem.、第56巻、560ページ、1991年;『遺伝子発現のアンチセンス・インヒビターとしてのオリゴデオキシヌクレオチド』、CRCプレス、ボカ・ラトン、フロリダ州、1988年を参照のこと)。好ましい潜在的なアンタゴニストとしては、B A S B 0 5 5 と関係のある化合物、B A S B 0 5 5 の変異体が挙げられる。

20

【 0 0 8 9 】

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

30

【 0 0 9 0 】

この明細書に記載した各ポリヌクレオチド配列は、抗菌化合物の発見や開発に用いることができる。コードされたタンパク質は、発現すると、抗菌薬剤をスクリーニングするためのターゲットとして用いることができる。さらに、コードされたタンパク質のアミノ末端領域をコードしているポリヌクレオチド配列、シャイン・ダルガルノ配列、または個々のmRNAの翻訳を容易にする配列を用いてアンチセンス配列を構成し、対象とするコード配列の発現を制御することができる。

40

【 0 0 9 1 】

本発明により、本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチド、アゴニスト、アンタゴニストを利用して、1つまたは複数の病原体と、感染後の発病の原因である真核生物の宿主、好ましくは哺乳類の宿主との間の最初の物理的相互作用を阻止するという利用法も提供される。特に、本発明の分子は、細菌、中でもグラム陽性菌および/またはグラム陰性菌が、留置器具上の真核生物、好ましくは哺乳類の細胞外マトリックス・タンパク質に、または傷の細胞外マトリックス・タンパク質に付着するのを阻止するのに用いること;真核生物、好ましくは哺乳類の細胞外マトリックス・タンパク質と、組織の損傷をもたらす細菌のB A S B 0 5 5 タンパク質の間に細菌が付着するのを阻止するのに用いること、および/または;留置器具の移植その他の外科的方法とは異なる経緯により感染したことによって

50

発病が普通に進行するのを阻止するのに用いることができる。

【0092】

本発明のさらに別の側面によれば、B A S B 0 5 5 アゴニストとアンタゴニスト、好ましくは細菌発育抑制性および/または殺菌性のアゴニストとアンタゴニストが提供される。

【0093】

本発明のアゴニストとアンタゴニストは、例えば、疾病の予防、抑制、および/または、治療に用いることができる。

【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。ミモトープはまた、適切な担体と結合した場合に、天然のペプチドを認識する抗体を強化することもできる。

10

【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。

20

【0096】

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(E P 0 5 5 2 2 6 7 B 1)。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。

30

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、中でもナイセリア・ meningitidis 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B A S B 0 5 5 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。

【0097】

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。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 5 5 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 5 5 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、粒子のコートイ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

40

50

むことができる。

【0098】

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 5 5 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 5 5 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 5 5 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D N A および/またはR N A 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。

10

【0099】

B A S B 0 5 5 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(G S T)、 γ -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かに付着することができる。

20

【0100】

本発明のワクチン組成物では、B A S B 0 5 5 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。

【0101】

B A S B 0 5 5 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”も適している。O M 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. psittaci*)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、L.他、F E M S 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*)、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(*Escherichia coli*)、インフルエンザ菌(*Haemophilus influenzae*)、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(*Neisseria meningitidis*)、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。

30

40

【0102】

泡状突起(B l e b s)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

50

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 B A S B 0 5 5 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、L P S 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。

【0103】

B A S B 0 5 5 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。

10

【0104】

この配列情報により、B A S B 0 5 5 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、潜在的なリプレッサー、オペレーター要素、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体、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。

20

【0105】

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に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 p o r A、p o r B、l b p B、t b p B、p 1 1 0、1 s t、h p u A B；o m p C D、c o p B、l b p B、o m p E、U s p A 1；U s p A 2；モラクセラ・カタラーリス（M . C a t t a r r h a l i s）に由来する T b p B；インフルエンザ菌に由来する p 1、p 2、p 4、p 5、p 6、l p D、t b p B、D 1 5、H i a、H m w 1、H m w 2 が挙げられるが、これだけに限定されるわけではない。

30

40

【0106】

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

50

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。

【0107】

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。

【0108】

そこで本発明によれば、B A S B 0 5 5 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B A S B 0 5 5 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、B A S B 0 5 5 遺伝子の上流にある配列を含んでいる。上流領域は、B A S B 0 5 5 遺伝子のすぐ上流から始まり、通常は、A T G 開始コドンからこの遺伝子の約1000bp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、A T G の500～700bp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。

【0109】

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 5 5 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 5 5 遺伝子を含む核酸が提供される。

【0110】

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。

【0111】

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。

【0112】

本発明によれば、さらに、ナイセリア・メニンギティディス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、特にナイセリア・メニンギティディス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。

【0113】

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、例えば医薬として許容される担体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

10

20

30

40

50

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。

【0114】

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。アジュバント系は、T H 1タイプの応答を選択的に増加させることが好ましい。

【0115】

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、T H 1タイプの応答（細胞を媒介とした応答）、T H 2タイプの応答（体液を媒介とした応答）と呼ばれている。

10

【0116】

典型的なT H 1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、T H 1タイプの応答は、I g G 2 a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I g G 1タイプの抗体に対応する。T H 2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、I g G 1、I g A、I g Mが産生される。

20

【0117】

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ることができる。T H 1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、T H 2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。

【0118】

T H 1タイプの免疫応答とT H 2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、T H 1が優勢である、あるいはT H 2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C D 4 + v e 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ことがしばしばある（モスマン、T . R . とコフマン、R . L .、「T H 1細胞とT H 2細胞：さまざまな機能特性へと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、T H 1タイプの応答には、Tリンパ球によるI F N - とI L - 2というサイトカインの産生が伴っている。T H 1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I L - 12は、T細胞によって産生されない。これとは逆に、T H 2タイプの応答には、I L - 4、I L - 5、I L - 6、I L - 13の分泌が伴っている。

30

【0119】

ある種のワクチン・アジュバントは、T H 1タイプまたはT H 2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T H 1 : T H 2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T H 1タイプまたはT H 2タイプのサイトカイン産生を測定すること、および/または、抗原特異的な抗体反応のI g G 1 : I g G 2 aの比を測定することが挙げられる。

40

【0120】

したがってT H 1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T H 1タイプのサイトカインをハイレベルに産生させ、C D 8 + 細胞毒性Tリンパ球と、T H 1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。

【0121】

50

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。

【0122】

3デ-O-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、3デ-O-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。3デ-O-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・ピーチャム・バイオロジカルズ社)に開示されている。

【0123】

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)。

【0124】

3D-MPLは、一用量あたり10 μ g~100 μ g、好ましくは25~50 μ g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2~50 μ g含まれることになろう。

【0125】

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-O-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。

【0126】

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。

【0127】

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。

【0128】

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。

【0129】

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。

【0130】

本発明のワクチン組成物には基剤も含まれていることが好ましい。基剤は、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。

【0131】

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。

【0132】

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 μ g~200 μ g、例えば10~100 μ g、好ましくは10 μ g~50 μ 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

10

20

30

40

50

： 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。

【0133】

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。

【0134】

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。 10

【0135】

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。

【0136】

本発明を特定のBASB055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。 20

【0137】

抗原は、1個の細菌全体(死んだもの、または生きたもの)の形態として、または細胞以下の分画の形態として供給することもできる。その中には、もちろんナイセリア・メニンギティディスそのものを供給することも含まれる。

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、BASB055ポリヌクレオチドおよび/またはBASB055ポリペプチドを含む組成物が提供される。

【0138】

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つまたは複数の基剤、例えば個体に投与するのに適した医薬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、医薬として許容される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。 40

【0139】

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。

【0140】

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、膣、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。

【0141】

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 50

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。

【0142】

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基剤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。

10

【0143】

組成物は、投与経路、例えば全身か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 (fusidic acids)、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小および/または限局的に行なうことも可能である。

20

【0144】

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 $0.01 \text{ mg/kg} \sim 10 \text{ mg/kg}$ 、典型的には 1 mg/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。

【0145】

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、医者の判断に応じて変化する。しかし適切な用量は、患者の体重 1 kg につき $0.1 \sim 100 \mu\text{g}$ である。

30

【0146】

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 1 kg につき抗体が $0.5 \sim 5 \mu\text{g}$ 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。

【0147】

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。

40

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。

【0148】

50

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。

【0149】

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。

10

【0150】

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。

【0151】

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、参考のために特別かつ個別に組み込むよう指示されているかのようにして、その全体が参考としてこの明細書に組み込まれている。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中に援用される。

20

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一一致によって決まる配列関連度のことにも意味する。“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mana・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.、S I A M J . A p p l i e d M a t h .、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、G C G プログラム・パッケージのG A P プログラム (ドゥヴルー、J. 他、N u c l e i c A c i d s R e s e a r c h、第12巻(1)、387ページ、1984年)、B L A S T P、B L A S T N (アルトシュール、S. F. 他、J. M o l . B i o l .、第215巻、403~410ページ、1990年)、F A S T A (ピアソンとリップマン、P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A、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。B L A S Tファミリ

30

40

50

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。

【0152】

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、10 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。

【0153】

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）。

【0154】

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。

【0155】

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、場合に依じて以下の(1)と(2)で与えられる。

【0156】

(1) 実施態様のポリヌクレオチドがさらに、配列番号1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、

$$n_n \times n - (x_n \cdot y)$$

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

10

20

30

40

50

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 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。

【0157】

例えば、本発明のポリヌクレオチド配列は、配列番号 1 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。

【0158】

(2) 実施態様のポリペプチドがさらに、配列番号2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。

【0159】

例えば、本発明のポリペプチド配列は、配列番号2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。

【0160】

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。

【0161】

“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天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、その生物が活着しているか死んでいるかには関係なく、“単離され”ている。

【0162】

“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。

【0163】

“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に説明する。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。

【0164】

“疾患”とは、細菌の感染によって起こるあらゆる疾患、または細菌感染と関連したあらゆる疾患のことを意味し、例えば、上気道感染、菌血症や髄膜炎などの侵入性細菌疾患が挙げられる。

実施例

10

20

30

40

50

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。

実施例 1：ナイセリア・メニンギティディス血清型 B 株 ATCC 13090 中の BASB 055 の配列

ナイセリア・メニンギティディス菌株 ATCC 13090 の BASB 055 遺伝子の配列を配列番号 1 に示す。BASB 055 ポリヌクレオチド配列を翻訳したものが配列番号 2 に示してあるが、これは、ナイセリア・ゴノロエアエ (*Neisseria gonorrhoeae*) MtrC タンパク質との類似性が有意である。BASB 055 ポリペプチドは、リポタンパク質に特徴的なシグナル配列を含む。

10

実施例 2：組み換え BASB 055 を発現させるためのプラスミドの構成

A：BASB 055 のクローニング

遺伝子操作によって Nde I と Xho I という制限部位をそれぞれ増幅用プライマーである順方向 Lip11 - Fm/p (5' - AGG CAG AGG CAT ATG GCT TTT TAT GCT TTT AAG GCG ATG CG - 3') [配列番号 3] と逆方向 Lip11 - Rcf/p (5' - AGG CAG AGG CTC GAG TTC CG C TTC AGA AGC AGT TTT GGC TTC - 3') [配列番号 4] に組み込んだことにより、少コピー数の大腸菌発現プラスミド pTLZ2 に BASB 055 PCR 産物を方向性クローニングすることが可能になった。その結果、BASB 055 タンパク質を、C 末端に (ヒスチジン) 6 アフィニティ・クロマトグラフィ・タグを含む融合タンパク質として発現させることができた。シリカゲルをベースとしたスピン・カラム (キアジェン社) を製造メーカーの指示に従って用い、BASB 055 PCR 産物を増幅反応の産物から精製した。クローニングに必要な Nde I 末端と Xho I 末端を生み出すため、Nde I 制限酵素と Xho I 制限酵素を製造メーカー (ライフ・テクノロジー社) が勧める方法に従って順番に用いて精製した PCR 産物を完全に消化させた。第 1 回目の消化の後、PCR 産物を上記のスピン・カラムによって精製して塩類を除去し、殺菌水の中に溶離させた。次いで、第 2 回目の酵素による消化を行なわせた。消化された DNA 断片は、シリカゲルをベースとしたスピン・カラムを用いて再び精製し、pTLZ2 プラスミドと連結させた。

20

【0165】

30

B：発現ベクターの生産

連結のための発現プラスミド pTLZ2 を調製するため、Nde I と Xho I の両方を用いて PCR 産物を同様に完全に消化させ、仔ウシ腸ホスファターゼ (CIP、5' 末端を約 0.02 ユニット/ピコモル、ライフ・テクノロジー社) を製造メーカーの指示に従って用い、自己連結が起こらないよう処理した。調製されるベクターに対してモル量が約 5 倍過剰な消化断片を用い、連結反応をプログラムした。標準的な約 20 μ l の連結反応 (約 16、約 16 時間) を、T4 DNA リガーゼ (約 2.0 ユニット/反応、ライフ・テクノロジー社) を用いて従来技術で周知の方法に従って行なった。連結反応のアリコート (約 5 μ l) を用い、従来技術で周知の方法に従って電氣的抗体産生能力のある BL21 DE3 細胞を形質転換した。形質転換した細胞を 37 にした約 1.0 ml の LB 培養液の中で約 2 ~ 3 時間成長させた後、アンピシリン (100 μ g/ml) を含む LB 寒天プレートで培養した。形質転換した細胞がすべて pTLZ2 プラスミド (ApR) を含んでいるようにするため、この選択用培地には抗生物質を入れた。プレートを 37 にて約 16 時間培養した。殺菌した楊枝で個々の ApR コロニーを取り出し、新鮮な LB ApR プレートと約 1 ml の LB ApR R プロス培養物に “パッチ状に” 接種した。パッチ状プレートと培養液培養物の両方を、標準的な培養器 (プレート) または振動式水浴の中で 37 にて一晚培養した。

40

【0166】

細胞全体をベースとした PCR 解析法により、形質転換体が BASB 055 DNA 挿入物を含んでいるかどうかを確認した。このとき、一晚培養した約 1.0 ml の LB Kn

50

培養液培養物を1.5mlのポリプロピレン・チューブに移し、ベックマン・マイクロ遠心分離装置の中で遠心分離すること(約3分、室温、約12,000×g)により、細胞を回収した。細胞ペレットを殺菌水約200 μ lの中に分散させ、約10 μ lのアリコートを用いて、順方向と逆方向のBASB055増幅用プライマーを両方含み最終容積が約50 μ lのPCR反応をプログラムした。PCR反応成分の最終濃度は、Taqポリメラーゼを約5.0単位用いた点を除き、実施例2に示すのとほぼ同じであった。95での最初の変性ステップを長くして3分間にし、細菌細胞の熱破壊とプラスミドDNAの解放が確実に行なわれるようにした。ABIモデル9700熱サイクラーを用い、3ステップの熱増幅プロファイル、すなわち95で45秒間、55~58で45秒間、72で1分間を32サイクル行なって、溶解した形質転換サンプルからBASB055 PCR断片を増幅した。熱増幅の後、反応によるアリコート約20 μ lをアガロースゲル電気泳動(トリス酢酸EDTA(TAE)緩衝溶液中に0.8%のアガロース)によって解析した。DNA断片は、ゲル電気泳動にかけ、臭化エチジウム染色した後に紫外線を照射することにより目で見えるようにした。DNA分子のサイズの基準となるもの(1Kbのラダー、ライフ・テクノロジー社)を試験サンプルと同時に電気泳動にかけ、PCR産物のサイズを評価するのに用いた。予想されるPCR産物を産生する形質転換体が、BASB055発現構造体を含む菌株として同定された。次にこの菌株を含む発現プラスミドについて、組み換えBASB055の発現を誘起するかどうかを解析した。

【0167】

C: PCRポジティブな形質転換体の発現解析

上記のようにして同定されたそれぞれのPCRポジティブな形質転換体について、アンピシリン(100 μ g/ml)を含む約5.0mlのLB培養液をパッチ・プレートからの細胞に接種し、振動させながら(約250rpm)37にて一晚培養した。シードとなる一晚培養した培養物のアリコート(約1.0ml)を、約25mlのLB Apブrossを含む125mlの三角フラスコの中に接種し、培養物の濁度がO.D.600で約0.5に達するまで、すなわち中ログ相に達するまで(通常は約1.5~2時間)、振動させながら(約250rpm)37にて培養した。このとき、培養物のほぼ半分(約12.5ml)を第2の125mlのフラスコに移し、IPTG(1.0モルのストックを殺菌水中に調製したもの、シグマ社)を添加することによって、発現が誘起される組み換えBASB055の最終濃度を1.0mMにした。IPTGにより誘起される培養物と、IPTGによって誘起されない培養物の両方を、さらに約4時間にわたって振動させながら37にて培養を続けた。両方の培養物からのサンプル(約1.0ml)を誘起期間が過ぎた後に除去し、マイクロ遠心分離装置の中で室温にて約3分間遠心分離することにより細胞を回収した。個々の細胞ペレットを約50 μ lの殺菌水の中に分散させ、2-メルカプトエタノールを含む等容積の2×ラメリSDS-PAGEサンプル緩衝溶液と混合し、沸騰した水浴の中に約3分間入れてタンパク質を変性させた。IPTGにより誘起される未精製の細胞と、IPTGによって誘起されない細胞の両方のライセートを、それぞれ同じ量(約15 μ l)だけ、まったく同じ12%トリス/グリシン・ポリアクリルアミド・ゲル(厚さ1mmのミニゲル、ノヴェックス社)の上に載せた。標準的なSDS/トリス/グリシン・ランニング緩衝溶液(バイオラド社)を用いて、従来から知られている条件のもと、IPTGにより誘起される細胞とIPTGによって誘起されない細胞の両方のライセート・サンプルならびにあらかじめ染色した分子量マーカー(SeeBlue、ノヴェックス社)を電気泳動にかけた。電気泳動の後、一方のゲルをクーマッシー・ブリリアント・ブルーR250(バイオラド社)で染色し、IPTGにより誘起可能な新規なBASB055タンパク質が目で見えるように脱染色した。他方のゲルは、BioRad Mini-Protean IIプロテティング装置とタウピンのメタノール(20%)トランスファー緩衝溶液を用い、約2時間かけて4にてPVDF膜(孔のサイズが0.45ミクロン、ノヴェックス社)の上に電気泳動転写した。膜のブロッキングと抗体の培養を従来技術で周知の方法に従って行なった。モノクローナル抗(ヒスチジン)5抗体を用い、次に第2の抗体としてHRP(キアジェン社)が結合したウサギの抗マウス抗体を用い

、 B A S B 0 5 5 組み換えタンパク質の発現を確認し、同定した。抗ヒスチジン抗体の反応パターンを目で見られるようにするため、A B T不溶性基質、またはアマーシャム E C L 化学的蛍光系を備えたハイパーフィルムを用いた。

実施例 3 : 組換え B A S B 0 5 5 脂質化状態の分析

B A S B 0 5 5 組み換えタンパク質が脂質化されているかどうかを決定するために、脂質特異的組み込みタグとして³H-グリセラル及び³H-パルミチン酸を用いた放射標識実験を開始した。上記発現プラスミドを含む B L 2 1 D E 3 E . c o l i 株の培養物を、M 9 最小培地上で培養し、そして3時間の I P T G 誘導の間に 5 0 μ C i の³H-グリセラル又は³H-パルミチン酸のいずれかでパルス標識付けした。取り込まれなかった同位体を除去するための洗浄ステップの後、放射標識された培養物の全細胞溶解産物を、グラジエント・ポリアクリルアミド・ゲル(4~20%)上で走らせ、固定し、そして次に真空下で乾燥させた。オートラジオグラフを、上記乾燥ゲルを約7日間-70において H y p e r f i l m (A m e r s h a m) に露出させることより作製した。I P T G 誘導性クマシー染色タンパク質と同じサイズの可視性バンドが両標識付けにより検出された。³H 標識が I P T G 誘導性タンパク質中に取り込まれたということは、上記 B A S B 0 5 5 タンパク質が E . c o l i においてある程度まで脂質化されているという結論を支持する。

10

実施例 4 : 組換え B A S B 0 5 5 の産生

細菌株

ナイセリア・メニンギティディスに由来する B A S B 0 5 5 をコードする p T L Z 2 プラスミドを含む組み換え発現大腸菌株 B L 2 1 D E 3 を利用して、組換えタンパク質を精製するための細胞群を生産した。発現菌株を、100 μ g / m l のアンピシリン(" A p ") を含む L B 寒天プレート上で培養し、プラスミドが確実に維持されるようにした。- 8 0 の低温で保存するため、菌株を、等しい濃度の抗生物質を含む L B ブロスの中で増殖させ、次に 3 0 % (w / v) グリセロールを含む等容積の L B ブロスと混合した。

20

培地

組み換えタンパク質の産生に用いる発酵用培地は、100 μ g / m l の A p を含む 2 x Y T ブロス(ディフコ社)である。発泡防止剤(A n t i f o a m 2 0 4 、シグマ社)を 0 . 2 5 m l / L の割合で発酵装置に添加した。B A S B 0 5 5 組み換えタンパク質の発現を誘起するため、I P T G (イソプロピル - D - チオガラクトピラノシド)を発酵装置に添加した(最終的に 1 m M)。

30

発酵

作業容積 5 0 m l を有する 5 0 0 m l のシード用三角フラスコに、急速解凍した培養物 0 . 3 m l 、または選択した寒天プレート培養物からのいくつかのコロニーを接種し、振動プラットフォーム(I n n o v a 2 1 0 0 、ニュー・フランスウィック・サイエンティフィック社)上で 1 5 0 r p m で振動させながら約 1 2 時間にわたって 3 7 ± 1 にて培養した。次にこのシード用培養物を、2 x Y T ブロスと A p 抗生物質の両方を含む作業容積 5 - L の発酵装置に接種した。発酵装置(B i o f l o 3 0 0 0 、ニュー・フランスウィック・サイエンティフィック社)をラッシュトン圧縮機内で 3 7 ± 1 、 0 . 2 ~ 0 . 4 V V M 空気散布、2 5 0 r p m にて運転した。p H は、フラスコのシード用培養物と発酵装置のどちらにおいても制御しなかった。発酵の間、発酵装置内の p H は 6 . 5 ~ 7 . 3 であった。培養物の成長が中ログ相に達したとき(O . D . 6 0 0 が約 0 . 7 単位)に I P T G (1 . 0 モルのストックを殺菌水中に調製したもの)を発酵装置に添加した。細胞を約 2 ~ 4 時間を誘起し、次に 2 8 R S H e r a e u s (セパテック社)または R C 5 C 高速遠心分離装置(ソーヴァル・インスツルメンツ社)を用いて遠心分離することによって回収した。細胞ペーストは、処理するときまで - 2 0 で保存した。

40

精製

イミダゾールと、バイオテクノロジー品質またはそれ以上の品質の試薬は、すべてアメレスコ・ケミカルズ社、ソロン、オハイオ州から調達した。トリトン X - 1 0 0 (t - オクチルフェノキシポリエトキシ - エタノール)、トリトン X - 1 1 4、リン酸ナトリウム、

50

単塩基、尿素は、試薬品質またはそれ以上の品質であり、シグマ・ケミカル社、セントルイス、ミズーリ州から調達した。ダルベッコ・リン酸緩衝溶液(1×PBS)は、クオリティ・バイオリジカル社、ゲサースバーグ、メリーランド州から調達した。ダルベッコ・リン酸緩衝溶液(10×PBS)は、バイオホワイタッカー社、ウォーカーズビル、メリーランド州から調達した。BSAフリーなペンタ-ヒスチジン抗体は、キアジェン社、ヴァレンシア、カリフォルニア州から調達した。ペルオキシダーゼが結合したAffiniPureというヤギの抗マウスIgGは、ジャクソン・イムノ・リサーチ社、ウエスト・グローヴ、ペンシルベニア州から調達した。他の化学薬品はすべて、試薬品質またはそれ以上の品質であった。

【0168】

ニッケル-ケラチン・セファロース・ファースト・フロー樹脂は、ファルマシア社、スウェーデンから調達した。プレキャストのトリス-グリシン4~20%と10~20%ポリアクリルアミド・ゲル、あらゆるランニング緩衝溶液と溶液、SeeBlueであらかじめ染色した基準サンプル、MultiMark多色基準サンプル、PVDFトランスファー膜は、ノヴェックス社、サン・ディエゴ、カリフォルニア州から調達した。SDS-PAGE銀染色キットは、第一化学薬品株式会社、東京、日本から調達した。Coomassie染色溶液は、バイオラド・ラボラトリーズ社、ハーキュールズ、カリフォルニア州から調達した。Acrodisc(登録商標)PF0.2m注射器フィルターは、ポール・ゲルマン・サイエンシーズ社、アン・アーバー、ミシガン州から調達した。廃棄可能なGD/X25mm注射器フィルターは、ホワットマン社、クリフトン、ニュージャージー州から調達した。透析チュービング8,000MWCOは、バイオデザイン社、オッド・ニューヨーク、カール・ニューヨークから調達した。BCAタンパク質アッセイ試薬とスネイク・スキン透析チュービング3,500MWCOは、ピアース・ケミカル社、ロックフォード、イリノイ州から調達した。

抽出プロトコル

細胞ペーストは、室温で30~60分間かけて解凍した。この材料を5~6g測り、廃棄可能な50mlの遠心分離管に入れた。組換えBASB抗原を、1.0% Triton X114による細胞膜の抽出により精製し、そして37におけるTriton X114の濁点に基づき相分離させた。このTriton X114相を、10%グリセロール、5%エチレン・グリコール、及び0.5% Triton X100を含む50mM Tris-HClで希釈した。これを、ニッケル・キレート化セファロース・ファースト・フローに通過させた。このタンパク質をその後、200mMのイミダゾールで溶離し、ヒスチジン・タグを有するタンパク質をアフィニティ精製し、90%を超える純度のタンパク質を得た。

最終製剤

BASB055は、0.1%のトリトンX-100と1×PBS、pH7.4に対し、それを一晩で3回交換して透析することによって製剤にした。精製されたタンパク質をキャラクテリゼーションし、抗体を産生させるのに用いた。それについて以下に説明する。

生化学的キャラクテリゼーション：SDS-PAGEとウエスタン・ブロット解析

精製した組み換えタンパク質を4~20%のポリアクリルアミド・ゲル上で分解させ、すでに説明したように100Vで1時間かけて電気泳動することによりPVDF膜に移動させた(セベイン他、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、第76巻、4350~4354ページ、1979年)。次にPVDF膜を、5%の脱脂ドライミルクを含む25mlのダルベッコ・リン酸緩衝溶液で予備処理した。以後の培養はすべて、この予備処理した緩衝溶液を用いて行なった。

【0169】

アンチ・ヒスチジン尾部抗体の希釈物を用いてPVDF膜を室温にて1時間にわたって培養した。次にPVDF膜を、洗浄用緩衝溶液(150mMの塩化ナトリウムと0.05%のトウイーン-20(商標)を含む20mMのトリス緩衝溶液、pH7.5)を用いて2度洗浄した。PVDF膜を、ペルオキシダーゼで標識した種特異的複合体を1:5000

10

20

30

40

50

に希釈したもの 25 ml を用いて室温にて 30 分間培養した。次に P V D F 膜を洗浄用緩衝溶液を用いて 4 回洗浄し、3 - アミノ - 9 - エチルカルバゾールと尿素ペルオキシド (ザイメド社、サンフランシスコ、カリフォルニア州) をそれぞれ 10 分間用いて現像した。

【 0 1 7 0 】

S D S - P A G E の結果 (図 1 A) からは、90% を超える純度に精製された約 50 k D a のタンパク質が得られたことがわかる。また、S D S - P A G E のウエスタン・プロット (図 1 B) より、このタンパク質が抗テトラ (ヒスチジン) 抗体に対して反応していることもわかる。

組換え B A S B 0 5 5 を用いたマウスの免疫確立

大腸菌の中で発現した部分精製した組み換え B A S B 0 5 5 タンパク質を 0 日目、14 日目、28 日目の 3 回にわたって B a l b / C マウスに注射した (10 匹 / グループ) 。マウスには、皮下経路で約 5 μ g の抗原を 2 通りの製剤にして注射した。1 つは、100 μ g の A l P O ₄ に吸収させたもの、もう 1 つは S B A S 2 乳剤 (S B A S 2 乳剤は、一用量あたり 5 μ g の M P L と 5 μ g の Q S 2 1 を含んでいる) にしたものである。S B A S 2 乳剤だけで免疫を確立したマウスからなるネガティブ対照群も実験に追加した。28 日目 (14 日ポスト I I) と 35 日目 (7 日ポスト I I I) にマウスから血を抜き取り、特異的な抗 B A S B 0 5 5 抗体が検出されるかどうかを調べた。特異的な抗 - B A S B 0 5 5 抗体を、部分的に精製された B A S B 0 5 5 タンパク質及び E . c o l i タンパク質について E l i s a により計測した。抗体応答を、異なるナイセリア・メニンギティディス B 株に対してテストされたとき、ウエスタン・プロットイングによっても評価した。 (7 日ポスト I I I のみ) における両配合群からのプールされた血清 (10 匹マウス / 群からのもの) を上記アッセイにおいてテストした。図 2 に示す結果は、上記抗体応答が極めて良好であり、一方同じくポジティブである抗 - E . c o l i 抗体応答 (図 3) が、上記特異的 B A S B 0 5 5 応答 (図 2) よりもかなり低いということを確認している。上記 A l P O ₄ 配合物は、最高の抗体レベルを誘導する。図 4 と図 5 に示すウエスタン・プロットは、上記 B A S B 0 5 5 タンパク質が 50 k D a の予想された M W においてよく認識されていることを確信させる。

【 0 1 7 1 】

ウエスタン・プロット法によるさまざまなナイセリア・メニンギティディス血清型 B 菌株における B A S B 0 5 5 エピトープの認識

この試験では、免疫を確立したマウスの (プールした) 血清をウエスタン・プロット法によりテストし、7 つの異なるナイセリア・メニンギティディス B 菌株と部分精製した組み換え B A S B 0 5 5 タンパク質で B A S B 0 5 5 エピトープが認識されるかどうかを調べた。7 つの菌株とは、H 4 4 / 7 6 (B : 1 5 : P 1 . 7 、 1 6 、系統 E T - 5) 、 M 9 7 2 5 0 6 8 7 (B : 4 : P 1 . 1 5) 、 B Z 1 0 (B : 2 b : P 1 . 2 、系統 A 4) 、 B Z 1 9 8 (B : N T * : - 、系統 3) 、 E G 3 2 8 (B : N T * 、系統 S T - 1 8) 、 N G P 1 6 5 (B : 2 a : P 1 . 2 、 E T 3 7 クラスター) 、 A T C C 1 3 0 9 0 (B : 1 5 : P 1 . 1 5) ナイセリア・メニンギティディス B 菌株である (* とは N T 、すなわち型分類されない、の意味である) 。

【 0 1 7 2 】

簡単に説明すると以下のようなになる。サンプル緩衝溶液で (9 5 にて 10 分間) 処理した各サンプル 10 μ l (> 10⁸ 細胞 / レーン) を S D S - P A G E 勾配ゲル (トリス - グリシン 4 ~ 20% 、ノヴェックス社、コード番号 E C 6 0 2 8) に入れる。電気泳動による移動が 125 ボルトで 90 分間にわたって起こる。その後、バイオラド・トランスプロット・システム (コード番号 1 7 0 - 3 9 3 0) を用いて 100 ボルトで 1 時半にわたりタンパク質をニトロセルロース・シート (0 . 4 5 μ m 、バイオラド社、コード番号 1 6 2 - 0 1 1 4) に移す。P B S - 0 . 0 5 % トウイーン 2 0 (商標) を用いてフィルターを室温にて一晩ブロックし、A l P O ₄ 製剤と S B A S 2 製剤の両方からの抗 B A S B 0 5 5 抗体を含むマウス血清で培養する。これら血清を P B S - 0 . 0 5 % トウイーン 2

10

20

30

40

50

0 (商標) の中で 100 倍に希釈し、軽く振動させながらニトロセルロース・シート上で室温にて 2 時間にわたって培養する。PBS - 0.05% トウイン 20 (商標) の中で 5 分間洗浄するステップを 3 回繰り返した後、ニトロセルロース・シートを、同じ洗浄用緩衝溶液の中で 1/500 に希釈した適切な複合体 (ヒツジに由来するビオチニル化した抗マウス Ig 抗体、アマーシャム社、コード番号 RPN1001) とともに、軽く振動させながら室温にて 1 時間にわたって培養する。この膜を上記のようにして 3 回洗浄し、洗浄用緩衝溶液の中で 1/1000 に希釈したストレプトアビジン - ペルオキシダーゼ複合体 (アマーシャム社、コード番号 1051) を用い、攪拌しながら 30 分間にわたって培養する。最後に 3 回繰り返して洗浄した後、30 mg の 4 - クロロ - 1 - ナフトール (シグマ社)、10 ml のメタノール、40 ml の PBS、30 μ l の H₂O₂ を含む 50 ml の溶液の中で 20 分間培養している間に顕色が起こる。膜を蒸留水で数回洗浄しているときに染色を止める。

10

【0173】

図 4 と図 5 に示した結果から、テストしたすべての菌株が、50 kDa 付近のこの主要なバンドに加え、同じく上記抗原に関係するであろうより低い分子量における 2 ~ 3 の他のバンドに対して明らかな反応性を提示することがわかる。この結果は、BASB055 タンパク質がおそらくすべてのナイセリア・メニンギティディス B 菌株において発現していることを意味する。両図 4 と図 5 において、組み換え BASB055 タンパク質は、マウス血清によっても同じ MW において認識されている。しかしながら、E. coli 抽出物による最後のレーン (図 5) に示されるように、マウス血清により認識される最低のバンド (< 9 kDa) は、E. coli 汚染物に関係するようである。

20

【0174】

【化 1】

配列情報

BASB055ポリヌクレオチド及びポリペプチド配列

配列番号 1

ATCC 13090株からのナイセリア・メニンギティディスBASB055
ポリヌクレオチド配列

ATGGCTTTTTATGCTTTTTAAGCGGATGCGTGCGGCCGCGTTGGCTGCCGCCGTTGCATTG
 G TACTGTCTGCTTTGCGGTAAAGGCGGAGACGCGGCGCAGGGCGGGCAGCCTGCTGGTCGG 10
 GAAGCCCCCTGCGCCCGTCTGTCGGTGTGTAACCGTCCATCCGCAAACCGTTCGATTGACC
 GTTCGAGTTGCCGGGGCGTTTGAATCGCTGCGTACCGCCGATGTCCGCGCCCAAGTCGGC
 GGCATCATCCAAAACGCCCTGTTCCAAGAAGGCAGTTATGTCCGTGCCGGACAGCCGCTG
 TATCAGATCGACAGTTCCACTTATGAAGCAAATCTGGAAAGCGCGCGCGCAACTGGCA
 ACGGCTCAGGCAACGCTTGCCAAAGCGGATGCGGATTTGGCGGATACAAGCCTTTGGTT
 GCCGCCGAAGCCGTGAGCCGCGAGGAATACGATGCTGCGGTAACGGCGAAACGTTCTGCC
 GAGGCAGGTGTCAAAGCAGCACAGGCGGCAATCAAATCTGCCGGCATTAACTGAAACCGT
 TCGCGCATTACCGCGCCGATTTCCGGCTTTATCGGTGAGTCCAAAGTTTCCGAAGGTACG
 CTGTTGAATGCGGGCGATACGACCGTGTGGCAACCATCCGCCAAACCAATCCGATGTAT
 GTGAACGTTACCCAGTCTGCATCCGAAGTGTGAAATGCGCCGTCAGATAGCCGAAGGC
 AAACGCTGGCGCGGATGTTGTTGCGGTCGGCATCAAATTTGACGACGGCACAGTT
 TACCCTGAAAAGGCCGCTGCTGTTGCGGATCCGTCGTCACGAATCGACCCGGTCAG 20
 ATTACCCTGCGCGCCGCTACCGAACGATCAGAATATCCTGATGCCCGTCTGTATGTG
 CGCGTGTGATGGACCAAGTGGCGGTGGATAACGCATTTGTTGTGCCGACGAGCGGTA
 ACGCGCGGTGCGAAAGATACCGTGTGATTGTGAATGCCCAAGCGGTATGGAACCCCGC
 GAGGTAACGGTTGCGCAACAGCAGGTTACGAATGGATTGTTACGTCCGGTCTGAAGGAC
 GGGGACAAGGTGGTTGTGGAAGGCATCAGTATCGCCGGTATAACGGGTGCGAAAAGGTA
 ACGCCCAAAGAATGGCGTCTGCTGAAAACCAAGCCCGCGCCTCAATCCGGCGTTGAG
 ACGGCATCTGAAGCCAAAACGCTTCTGAAGCGGAATAA

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ナイセリア・
メニンギティディスBASB055ポリペプチド配列

MAFYAFKAMRAAALAAVALVLS SCGKGGDAAQGGQPAGREAPAPVVGVVTVHPQTVALT
 VELPGRLESLRTADVRAQVGGIIQKRLFQEGSYVRAGQPLYQIDSSTYEANLESARAQLA 30
 TAQATLAKADADLARYKPLVAEAVSRQEYDAAVTAKRSABAGVKAQAIAKSAGINLNR
 SRITAPISGFIGQSKVSEGLLNAGDTTVLATIRQTNPMYVNVTVQSASEVMKLRRIAE
 KLLAADGVIAVGIKFDDGTVYPEKGRLLFADPVVNESTGQITLRAAVPNDQNILMPGLYV
 RVLMDQVAVDNAFVVPQQA VTRGAKD TVMIVNAQGGMEPREVTVAQQQGTNWIVTSGLKD
 GDKVVVEGISIAGITGAKKVTPEKAWSENQAAAPQSGVQTASEAKTASEAE

配列番号 3

AGG CAG AGG CAT ATG GCT TTT TAT GCT TTT AAG GCG ATG CG

配列番号 4

AGG CAG AGG CTC GAG TTC CGC TTC AGA AGC AGT TTT GGC TTC 40

【 0 1 7 5 】

寄託した材料

ナイセリア・メニンギティディス血清型 B 株を含む寄託物を 1997 年 6 月 22 日にアメリカ基準培養コレクション（この明細書では“ATCC”と表記）に寄託し、寄託番号 13090 が与えられた。この寄託物はナイセリア・メニンギティディス（アルプレヒトとゴーン）と表記され、ナイセリア・メニンギティディス単離体から構成された、凍結乾燥された 1.5 ~ 2.9 kb の挿入体ライブラリーである。この寄託物は、Int. Bull. Bacteriol. Nomencl. Taxon.、第 8 巻、1 ~ 15 ペー 50

ジ、1958年に記載されている。

【0176】

ナイセリア・メニンギティディス菌株寄託物は、この明細書では、“寄託された菌株”または“寄託された菌株のDNA”と呼ぶ。

【0177】

寄託された菌株は、完全長BASB055遺伝子を含んでいる。寄託された菌株に含まれているポリヌクレオチドの配列と、それによってコードされるポリペプチドのアミノ酸配列は、この明細書における配列の記述と何らかの問題が起こったときに照合する対象となる。

【0178】

菌株の寄託は、特許手続き上の微生物の寄託の国際的承認に関するブダペスト条約に基づいてなされた。菌株は、特許発行の際に一般に対して公開されてそれが取り消されることはなく、しかもその際の制約または条件もない。寄託された菌株は当業者の便宜のために提供されるだけであり、35 USC § 112のもとで必要とされるように、寄託が効力発生のために必要とされることを認めるものではない。

【0179】

【表1】

| | |
|-----------------------|------|
| 出願人のファイル番号 KP/BM45353 | 国際出願 |
|-----------------------|------|

寄託された微生物に関する表示
(PCT Rule 13 bis)

| | |
|---|---|
| A. 明細書の64頁2～21行に言及した微生物に関する表示 | |
| B. 寄託の特定 他の寄託が別紙に記載されている <input type="checkbox"/> | |
| 寄託機関の名称 AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION | |
| 寄託機関のあて名（郵便番号及び国名を含む） 10801 UNIVERSITY BLVD, MANASSAS, VIRGINIA 20110-2209, UNITED STATES OF AMERICA | |
| 寄託日 1997年6月22日 (22.06.97) | 寄託番号 13090 |
| C. 追加記載（該当しない場合には空白にしておく）この情報は添付別紙に続いている <input type="checkbox"/> | |
| ヨーロッパ特許が求められるこれらの寄託に関し、寄託された微生物のサンプルは、ヨーロッパ特許の付与の公表まで、又は出願が拒絶され又は取り下げられもしくは取り下げられたものとみなされるまで入手可能となるであろう。但し、該サンプルを要求する人によって指名された専門家にのみそのようなサンプルを与える。 | |
| D. この記載が目的とする指定国（すべての指定国を目的としないとき） | |
| E. 別個の表示の届出（該当しない場合には空白にしておく） 下記の表示は国際事務局に届け出る予定である。（例えば「受託番号」のように表示事項を明記する） | |
| <p>— 受理官庁使用のみ —</p> <input type="checkbox"/> この用紙は国際出願と共に出願時に受理された。 権限のある職員 | <p>— 国際事務局使用のみ —</p> <input type="checkbox"/> 国際事務局が受理した日： 権限のある職員 |

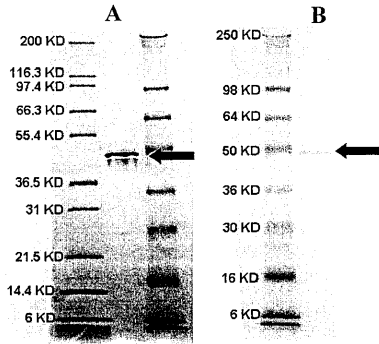
10

20

30

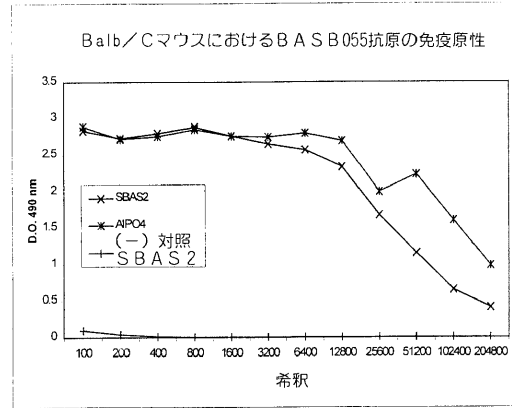
【 図 1 】

図1：粗換え、精製BASB055の分析。A. 精製されたBASB055のクマシー染色されたSDS-ポリヌクリルアミド・ゲル。B. 抗ヒスチジン免疫試薬による精製BASB055のウェスタン・プロット。



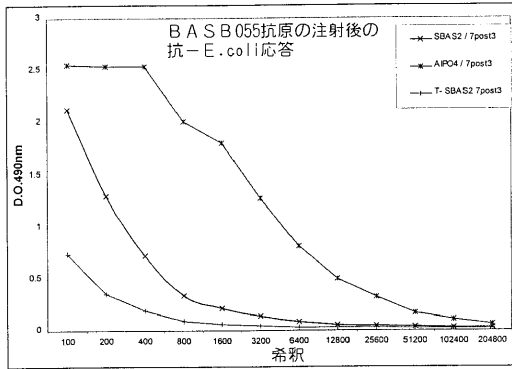
【 図 2 】

図2：Balb/Cマウスにおいて誘導された抗-BASB055抗体



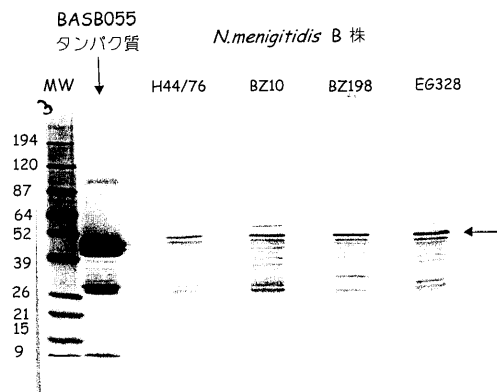
【 図 3 】

図3：BASB055免疫化マウス血清中に誘導された抗-E.coli応答



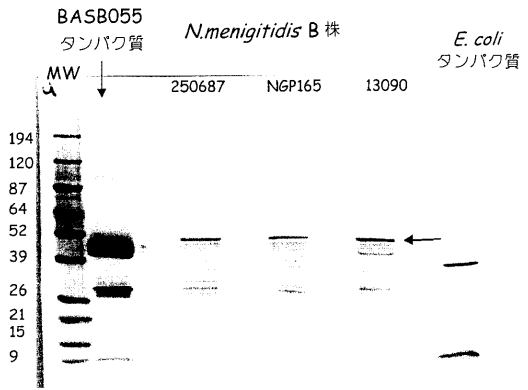
【 図 4 】

図4：BASB055免疫化マウス血清によるいくつかのナイセリア・メンギティディス株におけるBASB055タンパク質の認識



【 図 5 】

図5：B A S B 055免疫化マウス血清によるいくつかのナイセリア・メンギティディス株におけるB A S B 055タンパク質の認識



【国際公開パンフレット】

PCT

WORLD INTELLECTUAL PROPERTY ORGANIZATION
International Bureau

INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

| | | | |
|---|--|---|---|
| (51) International Patent Classification ⁷ : C12N 15/31, C07K 14/22, 16/12, G01N 33/68, A61K 39/095, 39/40, 31/70 | | A1 | (11) International Publication Number: WO 00/43517 |
| (21) International Application Number: PCT/EP00/00425 | | (43) International Publication Date: 27 July 2000 (27.07.00) | |
| (22) International Filing Date: 19 January 2000 (19.01.00) | | (81) Designated States: AE, AI, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, JE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG). | |
| (30) Priority Data: 9901462.3 22 January 1999 (22.01.99) GB 9902069.5 29 January 1999 (29.01.99) GB | | | |
| (71) Applicant (for all designated States except US): SMITHKLINE BEECHAM BIOLOGICALS S.A. [BE/BE]; Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart (BE). | | | |
| (72) Inventor; and (75) Inventor/Applicant (for US only): THONNARD, Joelle [BE/BE]; SmithKline Beecham Biologicals s.a., Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart (BE). | | | |
| (74) Agent: PRIVETT, Kathryn, Louise; SmithKline Beecham, Two New Horizons Court, Brentford, Middlesex TW8 9EP (GB). | | Published <i>With international search report. Before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of the receipt of amendments.</i> | |
| (54) Title: BASB055 POLYNUCLEOTIDE AND POLYPEPTIDE FROM NEISSERIA MENINGITIDIS. USES THEREOF | | | |
| (57) Abstract <p>The invention provides BASB055 polypeptides and polynucleotides encoding BASB055 polypeptides and methods for producing such polypeptides by recombinant techniques. Also provided are diagnostic, prophylactic and therapeutic uses.</p> | | | |

FOR THE PURPOSES OF INFORMATION ONLY

Codes used to identify States party to the PCT on the front pages of pamphlets publishing international applications under the PCT.

| | | | | | | | |
|----|--------------------------|----|--|----|--|----|--------------------------|
| AL | Albania | ES | Spain | LS | Lesotho | SI | Slovenia |
| AM | Armenia | FI | Finland | LT | Lithuania | SK | Slovakia |
| AT | Austria | FR | France | LU | Luxembourg | SN | Senegal |
| AU | Australia | GA | Gabon | LV | Latvia | SZ | Swaziland |
| AZ | Azerbaijan | GB | United Kingdom | MC | Monaco | TD | Chad |
| BA | Bosnia and Herzegovina | GE | Georgia | MD | Republic of Moldova | TG | Togo |
| BB | Barbados | GH | Ghana | MG | Madagascar | TJ | Tajikistan |
| BE | Belgium | GN | Guinea | MK | The former Yugoslav Republic of Macedonia | TM | Turkmenistan |
| BF | Burkina Faso | GR | Greece | ML | Mali | TR | Turkey |
| BG | Bulgaria | HU | Hungary | MN | Mongolia | TT | Trinidad and Tobago |
| BJ | Benin | IE | Ireland | MR | Mauritania | UA | Ukraine |
| BR | Brazil | IL | Israel | MT | Malawi | UG | Uganda |
| BY | Belarus | IS | Iceland | MX | Mexico | US | United States of America |
| CA | Canada | IT | Italy | NE | Niger | UZ | Uzbekistan |
| CF | Central African Republic | JP | Japan | NL | Netherlands | VN | Viet Nam |
| CG | Congo | KE | Kenya | NO | Norway | YU | Yugoslavia |
| CH | Switzerland | KG | Kyrgyzstan | NZ | New Zealand | ZW | Zimbabwe |
| CI | Côte d'Ivoire | KP | Democratic People's Republic of Korea | PL | Poland | | |
| CM | Cameroon | KR | Republic of Korea | PT | Portugal | | |
| CN | China | KZ | Kazakhstan | RO | Romania | | |
| CU | Cuba | LC | Saint Lucia | RU | Russian Federation | | |
| CZ | Czech Republic | LI | Liechtenstein | SD | Sudan | | |
| DE | Germany | LK | Sri Lanka | SE | Sweden | | |
| DK | Denmark | LR | Liberia | SG | Singapore | | |
| EE | Estonia | | | | | | |

WO 00/43517

PCT/EP00/00425

BASB055 POLYNUCLEOTIDE AND POLYPEPTIDE FROM NEISSERIA MENINGITIDS. USES THEREOF**FIELD OF THE INVENTION**

- 5 This invention relates to polynucleotides, (herein referred to as "BASB055 polynucleotide(s)"), polypeptides encoded by them (referred to herein as "BASB055" or "BASB055 polypeptide(s)"), recombinant materials and methods for their production. In another aspect, the invention relates to methods for using such polypeptides and polynucleotides, including vaccines against bacterial infections. In a further aspect, the
- 10 invention relates to diagnostic assays for detecting infection of certain pathogens.

BACKGROUND OF THE INVENTION

- Neisseria meningitidis* (meningococcus) is a Gram-negative bacterium frequently isolated from the human upper respiratory tract. It occasionally causes invasive bacterial diseases
- 15 such as bacteremia and meningitis. The incidence of meningococcal disease shows geographical seasonal and annual differences (Schwartz, B., Moore, P.S., Broome, C.V.; Clin. Microbiol. Rev. 2 (Supplement), S18-S24, 1989). Most disease in temperate countries is due to strains of serogroup B and varies in incidence from 1-10/100,000/year total population sometimes reaching higher values (Kaczmarek, E.B. (1997), Commun. Dis.
- 20 Rep. Rev. 7: R55-9, 1995; Scholten, R.J.P.M., Bijlmer, H.A., Poolman, J.T. et al. Clin. Infect. Dis. 16: 237-246, 1993; Cruz, C., Pavez, G., Aguilar, E., et al. Epidemiol. Infect. 105: 119-126, 1990).

- Epidemics dominated by serogroup A meningococci, mostly in central Africa, are
- 25 encountered, sometimes reaching levels up to 1000/100,000/year (Schwartz, B., Moore, P.S., Broome, C.V. Clin. Microbiol. Rev. 2 (Supplement), S18-S24, 1989). Nearly all cases as a whole of meningococcal disease are caused by serogroup A, B, C, W-135 and Y meningococci and a tetravalent A, C, W-135, Y polysaccharide vaccine is available (Armand, J., Arminjon, F., Mynard, M.C., Lafaix, C., J. Biol. Stand. 10: 335-339, 1982).

WO 00/43517

PCT/EP00/00425

The polysaccharide vaccines are currently being improved by way of chemical conjugating them to carrier proteins (Lieberman, J.M., Chiu, S.S., Wong, V.K., et al. JAMA 275 : 1499-1503, 1996).

5

A serogroup B vaccine is not available, since the B capsular polysaccharide was found to be nonimmunogenic, most likely because it shares structural similarity to host components (Wyle, F.A., Artenstein, M.S., Brandt, M.L. et al. J. Infect. Dis. 126: 514-522, 1972; Finne, J.M., Leinonen, M., Mäkelä, P.M. Lancet ii: 355-357, 1983).

10

For many years efforts have been initiated and carried out to develop meningococcal outer membrane based vaccines (de Moraes, J.C., Perkins, B., Camargo, M.C. et al. Lancet 340: 1074-1078, 1992; Bjune, G., Hoiby, E.A. Gronnesby, J.K. et al. 338: 1093-1096, 1991). Such vaccines have demonstrated efficacies from 57% - 85% in older children (>4 years) and adolescents.

15

Many bacterial outer membrane components are present in these vaccines, such as PorA, PorB, Rmp, Opc, Opa, FrpB and the contribution of these components to the observed protection still needs further definition. Other bacterial outer membrane components have been defined by using animal or human antibodies to be potentially relevant to the induction of protective immunity, such as TbpB and NspA (Martin, D., Cadieux, N., Hamel, J., Brodeux, B.R., J. Exp. Med. 185: 1173-1183, 1997; Lissolo, L., Maitre-Wilmotte, C., Dumas, p. et al., Inf. Immun. 63: 884-890, 1995). The mechanisms of protective immunity will involve antibody mediated bactericidal activity and opsonophagocytosis.

20

A bacteremia animal model has been used to combine all antibody mediated mechanisms (Saukkonen, K., Leinonen, M., Abdillahi, H. Poolman, J. T. Vaccine 7: 325-328, 1989). It is generally accepted that the late complement component mediated bactericidal mechanism is

25

WO 00/43517

PCT/EP00/00425

crucial for immunity against meningococcal disease (Ross, S.C., Rosenthal P.J., Berberic, H.M., Densen, P. J. Infect. Dis. 155: 1266-1275, 1987).

The frequency of *Neisseria meningitidis* infections has risen dramatically in the past few
5 decades. This has been attributed to the emergence of multiply antibiotic resistant strains
and an increasing population of people with weakened immune systems. It is no longer
uncommon to isolate *Neisseria meningitidis* strains that are resistant to some or all of the
standard antibiotics. This phenomenon has created an unmet medical need and demand for
new anti-microbial agents, vaccines, drug screening methods, and diagnostic tests for this
10 organism.

SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention relates to BASB055, in particular BASB055 polypeptides and
15 BASB055 polynucleotides, recombinant materials and methods for their production. In
another aspect, the invention relates to methods for using such polypeptides and
polynucleotides, including prevention and treatment of microbial diseases, amongst others.
In a further aspect, the invention relates to diagnostic assays for detecting diseases
associated with microbial infections and conditions associated with such infections, such
20 as assays for detecting expression or activity of BASB055 polynucleotides or
polypeptides.

Various changes and modifications within the spirit and scope of the disclosed invention
will become readily apparent to those skilled in the art from reading the following
25 descriptions and from reading the other parts of the present disclosure.

DESCRIPTION OF THE INVENTION

WO 00/43517

PCT/EP00/00425

The invention relates to BASB055 polypeptides and polynucleotides as described in greater detail below. In particular, the invention relates to polypeptides and polynucleotides of BASB055 of *Neisseria meningitidis*, which is related by amino acid sequence homology to *Neisseria gonorrhoeae* MtrC protein. The invention relates especially to BASB055

5 having the nucleotide and amino acid sequences set out in SEQ ID NO:1 and SEQ ID NO:2 respectively. It is understood that sequences recited in the Sequence Listing below as "DNA" represent an exemplification of one embodiment of the invention, since those of ordinary skill will recognize that such sequences can be usefully employed in polynucleotides in general, including ribopolynucleotides.

10

Polypeptides

In one aspect of the invention there are provided polypeptides of *Neisseria meningitidis* referred to herein as "BASB055" and "BASB055 polypeptides" as well as biologically, diagnostically, prophylactically, clinically or therapeutically useful variants thereof, and

15 compositions comprising the same.

The present invention further provides for:

- (a) an isolated polypeptide which comprises an amino acid sequence which has at least 85% identity, more preferably at least 90% identity, yet more preferably at least 95%
- 20 identity, most preferably at least 97-99% or exact identity, to that of SEQ ID NO:2;
- (b) a polypeptide encoded by an isolated polynucleotide comprising a polynucleotide sequence which has at least 85% identity, more preferably at least 90% identity, yet more preferably at least 95% identity, even more preferably at least 97-99% or exact identity to SEQ ID NO:1 over the entire length of SEQ ID NO:1; or
- 25 (c) a polypeptide encoded by an isolated polynucleotide comprising a polynucleotide sequence encoding a polypeptide which has at least 85% identity, more preferably at least 90% identity, yet more preferably at least 95% identity, even more preferably at least 97-99% or exact identity, to the amino acid sequence of SEQ ID NO:2.

WO 00/43517

PCT/EP00/00425

The BASB055 polypeptide provided in SEQ ID NO:2 is the BASB055 polypeptide from *Neisseria meningitidis* strains ATCC13090.

The invention also provides an immunogenic fragment of a BASB055 polypeptide, that is, a contiguous portion of the BASB055 polypeptide which has the same or substantially the same immunogenic activity as the polypeptide comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:2. That is to say, the fragment (if necessary when coupled to a carrier) is capable of raising an immune response which recognises the BASB055 polypeptide. Such an immunogenic fragment may include, for example, the BASB055 polypeptide lacking an N-terminal leader sequence, and/or a transmembrane domain and/or a C-terminal anchor domain. In a preferred aspect the immunogenic fragment of BASB055 according to the invention comprises substantially all of the extracellular domain of a polypeptide which has at least 85% identity, more preferably at least 90% identity, yet more preferably at least 95% identity, most preferably at least 97-99% identity, to that of SEQ ID NO:2 over the entire length of SEQ ID NO:2.

A fragment is a polypeptide having an amino acid sequence that is entirely the same as part but not all of any amino acid sequence of any polypeptide of the invention. As with BASB055 polypeptides, fragments may be "free-standing," or comprised within a larger polypeptide of which they form a part or region, most preferably as a single continuous region in a single larger polypeptide.

Preferred fragments include, for example, truncation polypeptides having a portion of an amino acid sequence of SEQ ID NO:2 or of variants thereof, such as a continuous series of residues that includes an amino- and/or carboxyl-terminal amino acid sequence. Degradation forms of the polypeptides of the invention produced by or in a host cell, are also preferred. Further preferred are fragments characterized by structural or functional attributes such as fragments that comprise alpha-helix and alpha-helix forming regions, beta-sheet and beta-sheet-forming regions, turn and turn-forming regions, coil and coil-

WO 00/43517

PCT/EP00/00425

forming regions, hydrophilic regions, hydrophobic regions, alpha amphipathic regions, beta amphipathic regions, flexible regions, surface-forming regions, substrate binding region, and high antigenic index regions.

5 Further preferred fragments include an isolated polypeptide comprising an amino acid sequence having at least 15, 20, 30, 40, 50 or 100 contiguous amino acids from the amino acid sequence of SEQ ID NO:2, or an isolated polypeptide comprising an amino acid sequence having at least 15, 20, 30, 40, 50 or 100 contiguous amino acids truncated or deleted from the amino acid sequence of SEQ ID NO:2.

10

Fragments of the polypeptides of the invention may be employed for producing the corresponding full-length polypeptide by peptide synthesis; therefore, these fragments may be employed as intermediates for producing the full-length polypeptides of the invention.

15

Particularly preferred are variants in which several, 5-10, 1-5, 1-3, 1-2 or 1 amino acids are substituted, deleted, or added in any combination.

20 The polypeptides, or immunogenic fragments, of the invention may be in the form of the "mature" protein or may be a part of a larger protein such as a precursor or a fusion protein. It is often advantageous to include an additional amino acid sequence which contains secretory or leader sequences, pro-sequences, sequences which aid in purification such as multiple histidine residues, or an additional sequence for stability during recombinant production. Furthermore, addition of exogenous polypeptide or
25 lipid tail or polynucleotide sequences to increase the immunogenic potential of the final molecule is also considered.

In one aspect, the invention relates to genetically engineered soluble fusion proteins comprising a polypeptide of the present invention, or a fragment thereof, and various

WO 00/43517

PCT/EP00/00425

portions of the constant regions of heavy or light chains of immunoglobulins of various subclasses (IgG, IgM, IgA, IgE). Preferred as an immunoglobulin is the constant part of the heavy chain of human IgG, particularly IgG1, where fusion takes place at the hinge region. In a particular embodiment, the Fc part can be removed simply by incorporation of a cleavage sequence which can be cleaved with blood clotting factor Xa.

Furthermore, this invention relates to processes for the preparation of these fusion proteins by genetic engineering, and to the use thereof for drug screening, diagnosis and therapy. A further aspect of the invention also relates to polynucleotides encoding such fusion proteins. Examples of fusion protein technology can be found in International Patent Application Nos. WO94/29458 and WO94/22914.

The proteins may be chemically conjugated, or expressed as recombinant fusion proteins allowing increased levels to be produced in an expression system as compared to non-fused protein. The fusion partner may assist in providing T helper epitopes (immunological fusion partner), preferably T helper epitopes recognised by humans, or assist in expressing the protein (expression enhancer) at higher yields than the native recombinant protein. Preferably the fusion partner will be both an immunological fusion partner and expression enhancing partner.

Fusion partners include protein D from *Haemophilus influenzae* and the non-structural protein from influenzae virus, NS1 (hemagglutinin). Another fusion partner is the protein known as LytA. Preferably the C terminal portion of the molecule is used. LytA is derived from *Streptococcus pneumoniae* which synthesizes an N-acetyl-L-alanine amidase, amidase LytA, (coded by the *lytA* gene {Gene, 43 (1986) page 265-272}) an autolysin that specifically degrades certain bonds in the peptidoglycan backbone. The C-terminal domain of the LytA protein is responsible for the affinity to the choline or to some choline analogues such as DEAE. This property has been exploited for the development of *E.coli* C-LytA expressing plasmids useful for

WO 00/43517

PCT/EP00/00425

expression of fusion proteins. Purification of hybrid proteins containing the C-LytA fragment at its amino terminus has been described (Biotechnology: 10, (1992) page 795-798). It is possible to use the repeat portion of the LytA molecule found in the C terminal end starting at residue 178, for example residues 188 - 305.

5

The present invention also includes variants of the aforementioned polypeptides, that is polypeptides that vary from the referents by conservative amino acid substitutions, whereby a residue is substituted by another with like characteristics. Typical such substitutions are among Ala, Val, Leu and Ile; among Ser and Thr; among the acidic residues Asp and Glu; among Asn and Gln; and among the basic residues Lys and Arg; or aromatic residues Phe and Tyr.

10

Polypeptides of the present invention can be prepared in any suitable manner. Such polypeptides include isolated naturally occurring polypeptides, recombinantly produced polypeptides, synthetically produced polypeptides, or polypeptides produced by a combination of these methods. Means for preparing such polypeptides are well understood in the art.

15

It is most preferred that a polypeptide of the invention is derived from *Neisseria meningitidis*, however, it may preferably be obtained from other organisms of the same taxonomic genus. A polypeptide of the invention may also be obtained, for example, from organisms of the same taxonomic family or order.

20

Polynucleotides

It is an object of the invention to provide polynucleotide that encode BASB055 polypeptide, particularly polynucleotides that encode the polypeptide herein designated BASB055.

25

WO 00/43517

PCT/EP00/00425

In a particularly preferred embodiment of the invention the polynucleotide comprises a region encoding BASB055 polypeptide comprising a sequence set out in SEQ ID NO:1 which includes a full length gene, or a variant thereof.

- 5 The BASB055 polynucleotide provided in SEQ ID NO:1 is the BASB055 polynucleotide from *Neisseria meningitidis* strains ATCC13090.

As a further aspect of the invention there are provided isolated nucleic acid molecules encoding and/or expressing BASB055 polypeptides and polynucleotides, particularly

10 *Neisseria meningitidis* BASB055 polypeptides and polynucleotides, including, for example, unprocessed RNAs, ribozyme RNAs, mRNAs, cDNAs, genomic DNAs, B- and Z-DNAs. Further embodiments of the invention include biologically, diagnostically, prophylactically, clinically or therapeutically useful polynucleotides and polypeptides, and variants thereof, and compositions comprising the same.

15 Another aspect of the invention relates to isolated polynucleotides, including at least one full length gene, that encodes a BASB055 polypeptide having a deduced amino acid sequence of SEQ ID NO:2 and polynucleotides closely related thereto and variants thereof.

- 20 In another particularly preferred embodiment of the invention there is a BASB055 polypeptide from *Neisseria meningitidis* comprising or consisting of an amino acid sequence of SEQ ID NO:2 or a variant thereof.

Using the information provided herein, such as a polynucleotide sequence set out in SEQ ID

25 NO:1 a polynucleotide of the invention encoding BASB055 polypeptide may be obtained using standard cloning and screening methods, such as those for cloning and sequencing chromosomal DNA fragments from bacteria using *Neisseria meningitidis* cells as starting material, followed by obtaining a full length clone. For example, to obtain a polynucleotide sequence of the invention, such as a polynucleotide sequence given in SEQ ID NO:1

WO 00/43517

PCT/EP00/00425

typically a library of clones of chromosomal DNA of *Neisseria meningitidis* in *E. coli* or some other suitable host is probed with a radiolabeled oligonucleotide, preferably a 17-mer or longer, derived from a partial sequence. Clones carrying DNA identical to that of the probe can then be distinguished using stringent hybridization conditions. By
5 sequencing the individual clones thus identified by hybridization with sequencing primers designed from the original polypeptide or polynucleotide sequence it is then possible to extend the polynucleotide sequence in both directions to determine a full length gene sequence. Conveniently, such sequencing is performed, for example, using denatured double stranded DNA prepared from a plasmid clone. Suitable techniques are described
10 by Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook et al., *MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL*, 2nd Ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989). (see in particular Screening By Hybridization 1.90 and Sequencing Denatured Double-Stranded DNA Templates 13.70). Direct genomic DNA sequencing may also be performed to obtain a full length gene sequence. Illustrative of
15 the invention, each polynucleotide set out in SEQ ID NO:1 was discovered in a DNA library derived from *Neisseria meningitidis*.

Moreover, each DNA sequence set out in SEQ ID NO:1 contains an open reading frame encoding a protein having about the number of amino acid residues set forth in SEQ ID
20 NO:2 with a deduced molecular weight that can be calculated using amino acid residue molecular weight values well known to those skilled in the art.

The polynucleotide of SEQ ID NO:1, between the start codon at nucleotide number 1 and the stop codon which begins at nucleotide number 1237 of SEQ ID NO:1, encodes the
25 polypeptide of SEQ ID NO:2.

In a further aspect, the present invention provides for an isolated polynucleotide comprising or consisting of:

WO 00/43517

PCT/EP00/00425

- (a) a polynucleotide sequence which has at least 85% identity, more preferably at least 90% identity, yet more preferably at least 95% identity, even more preferably at least 97-99% or exact identity to SEQ ID NO:1 over the entire length of SEQ ID NO:1;
- or
- 5 (b) a polynucleotide sequence encoding a polypeptide which has at least 85% identity, more preferably at least 90% identity, yet more preferably at least 95% identity, even more preferably at least 97-99% or 100% exact, to the amino acid sequence of SEQ ID NO:2 over the entire length of SEQ ID NO:2.
- 10 A polynucleotide encoding a polypeptide of the present invention, including homologs and orthologs from species other than *Neisseria meningitidis*, may be obtained by a process which comprises the steps of screening an appropriate library under stringent hybridization conditions (for example, using a temperature in the range of 45 – 65°C and an SDS concentration from 0.1 – 1%) with a labeled or detectable probe consisting of or comprising
- 15 the sequence of SEQ ID NO:1 or a fragment thereof; and isolating a full-length gene and/or genomic clones containing said polynucleotide sequence.

The invention provides a polynucleotide sequence identical over its entire length to a coding sequence (open reading frame) in SEQ ID NO:1. Also provided by the invention is a coding

20 sequence for a mature polypeptide or a fragment thereof, by itself as well as a coding sequence for a mature polypeptide or a fragment in reading frame with another coding sequence, such as a sequence encoding a leader or secretory sequence, a pre-, or pro- or prepro-protein sequence. The polynucleotide of the invention may also contain at least one non-coding sequence, including for example, but not limited to at least one non-coding 5'

25 and 3' sequence, such as the transcribed but non-translated sequences, termination signals (such as rho-dependent and rho-independent termination signals), ribosome binding sites, Kozak sequences, sequences that stabilize mRNA, introns, and polyadenylation signals. The polynucleotide sequence may also comprise additional coding sequence encoding additional amino acids. For example, a marker sequence that facilitates purification of the

WO 00/43517

PCT/EP00/00425

fused polypeptide can be encoded. In certain embodiments of the invention, the marker sequence is a hexa-histidine peptide, as provided in the pQE vector (Qiagen, Inc.) and described in Gentz *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 86: 821-824 (1989), or an HA peptide tag (Wilson *et al.*, *Cell* 37: 767 (1984), both of which may be useful in purifying

5 polypeptide sequence fused to them. Polynucleotides of the invention also include, but are not limited to, polynucleotides comprising a structural gene and its naturally associated sequences that control gene expression.

The nucleotide sequence encoding BASB055 polypeptide of SEQ ID NO:2 may be

10 identical to the polypeptide encoding sequence contained in nucleotides 1 to 1236 of SEQ ID NO:1. Alternatively it may be a sequence, which as a result of the redundancy (degeneracy) of the genetic code, also encodes the polypeptide of SEQ ID NO:2.

The term "polynucleotide encoding a polypeptide" as used herein encompasses

15 polynucleotides that include a sequence encoding a polypeptide of the invention, particularly a bacterial polypeptide and more particularly a polypeptide of the *Neisseria meningitidis* BASB055 having an amino acid sequence set out in SEQ ID NO:2. The term also encompasses polynucleotides that include a single continuous region or discontinuous regions encoding the polypeptide (for example, polynucleotides interrupted by integrated

20 phage, an integrated insertion sequence, an integrated vector sequence, an integrated transposon sequence, or due to RNA editing or genomic DNA reorganization) together with additional regions, that also may contain coding and/or non-coding sequences.

The invention further relates to variants of the polynucleotides described herein that encode

25 variants of a polypeptide having a deduced amino acid sequence of SEQ ID NO:2. Fragments of polynucleotides of the invention may be used, for example, to synthesize full-length polynucleotides of the invention.

WO 00/43517

PCT/EP00/00425

Further particularly preferred embodiments are polynucleotides encoding BASB055 variants, that have the amino acid sequence of BASB055 polypeptide of SEQ ID NO:2 in which several, a few, 5 to 10, 1 to 5, 1 to 3, 2, 1 or no amino acid residues are substituted, modified, deleted and/or added, in any combination. Especially preferred among these are
5 silent substitutions, additions and deletions, that do not alter the properties and activities of BASB055 polypeptide.

Further preferred embodiments of the invention are polynucleotides that are at least 85% identical over their entire length to a polynucleotide encoding BASB055 polypeptide having
10 an amino acid sequence set out in SEQ ID NO:2, and polynucleotides that are complementary to such polynucleotides. In this regard, polynucleotides at least 90% identical over their entire length to the same are particularly preferred, and among these particularly preferred polynucleotides, those with at least 95% are especially preferred. Furthermore, those with at least 97% are highly preferred among those with at least 95%,
15 and among these those with at least 98% and at least 99% are particularly highly preferred, with at least 99% being the more preferred.

Preferred embodiments are polynucleotides encoding polypeptides that retain substantially the same biological function or activity as the mature polypeptide encoded by a DNA of
20 SEQ ID NO:1.

In accordance with certain preferred embodiments of this invention there are provided polynucleotides that hybridize, particularly under stringent conditions, to BASB055 polynucleotide sequences, such as those polynucleotides in SEQ ID NO:1.

25 The invention further relates to polynucleotides that hybridize to the polynucleotide sequences provided herein. In this regard, the invention especially relates to polynucleotides that hybridize under stringent conditions to the polynucleotides described herein. As herein used, the terms "stringent conditions" and "stringent hybridization

WO 00/43517

PCT/EP00/00425

conditions" mean hybridization occurring only if there is at least 95% and preferably at least 97% identity between the sequences. A specific example of stringent hybridization conditions is overnight incubation at 42°C in a solution comprising: 50% formamide, 5x SSC (150mM NaCl, 15mM trisodium citrate), 50 mM sodium phosphate (pH7.6), 5x Denhardt's solution, 10% dextran sulfate, and 20 micrograms/ml of denatured, sheared salmon sperm DNA, followed by washing the hybridization support in 0.1x SSC at about 65°C. Hybridization and wash conditions are well known and exemplified in Sambrook, *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition, Cold Spring Harbor, N.Y., (1989), particularly Chapter 11 therein. Solution hybridization may also be used with the polynucleotide sequences provided by the invention.

The invention also provides a polynucleotide consisting of or comprising a polynucleotide sequence obtained by screening an appropriate library containing the complete gene for a polynucleotide sequence set forth in SEQ ID NO:1 under stringent hybridization conditions with a probe having the sequence of said polynucleotide sequence set forth in SEQ ID NO:1 or a fragment thereof; and isolating said polynucleotide sequence. Fragments useful for obtaining such a polynucleotide include, for example, probes and primers fully described elsewhere herein.

As discussed elsewhere herein regarding polynucleotide assays of the invention, for instance, the polynucleotides of the invention, may be used as a hybridization probe for RNA, cDNA and genomic DNA to isolate full-length cDNAs and genomic clones encoding BASB055 and to isolate cDNA and genomic clones of other genes that have a high identity, particularly high sequence identity, to the BASB055 gene. Such probes generally will comprise at least 15 nucleotide residues or base pairs. Preferably, such probes will have at least 30 nucleotide residues or base pairs and may have at least 50 nucleotide residues or base pairs. Particularly preferred probes will have at least 20 nucleotide residues or base pairs and will have less than 30 nucleotide residues or base pairs.

WO 00/43517

PCT/EP00/00425

A coding region of a BASB055 gene may be isolated by screening using a DNA sequence provided in SEQ ID NO:1 to synthesize an oligonucleotide probe. A labeled oligonucleotide having a sequence complementary to that of a gene of the invention is then used to screen a library of cDNA, genomic DNA or mRNA to determine which members of the library the probe hybridizes to.

There are several methods available and well known to those skilled in the art to obtain full-length DNAs, or extend short DNAs, for example those based on the method of Rapid Amplification of cDNA ends (RACE) (see, for example, Frohman, *et al.*, *PNAS USA 85*: 8998-9002, 1988). Recent modifications of the technique, exemplified by the Marathon™ technology (Clontech Laboratories Inc.) for example, have significantly simplified the search for longer cDNAs. In the Marathon™ technology, cDNAs have been prepared from mRNA extracted from a chosen tissue and an 'adaptor' sequence ligated onto each end. Nucleic acid amplification (PCR) is then carried out to amplify the "missing" 5' end of the DNA using a combination of gene specific and adaptor specific oligonucleotide primers. The PCR reaction is then repeated using "nested" primers, that is, primers designed to anneal within the amplified product (typically an adaptor specific primer that anneals further 3' in the adaptor sequence and a gene specific primer that anneals further 5' in the selected gene sequence). The products of this reaction can then be analyzed by DNA sequencing and a full-length DNA constructed either by joining the product directly to the existing DNA to give a complete sequence, or carrying out a separate full-length PCR using the new sequence information for the design of the 5' primer.

The polynucleotides and polypeptides of the invention may be employed, for example, as research reagents and materials for discovery of treatments of and diagnostics for diseases, particularly human diseases, as further discussed herein relating to polynucleotide assays.

WO 00/43517

PCT/EP00/00425

The polynucleotides of the invention that are oligonucleotides derived from a sequence of SEQ ID NOS:1 - 2 may be used in the processes herein as described, but preferably for PCR, to determine whether or not the polynucleotides identified herein in whole or in part are transcribed in bacteria in infected tissue. It is recognized that such sequences will also have utility in diagnosis of the stage of infection and type of infection the pathogen has attained.

The invention also provides polynucleotides that encode a polypeptide that is the mature protein plus additional amino or carboxyl-terminal amino acids, or amino acids interior to the mature polypeptide (when the mature form has more than one polypeptide chain, for instance). Such sequences may play a role in processing of a protein from precursor to a mature form, may allow protein transport, may lengthen or shorten protein half-life or may facilitate manipulation of a protein for assay or production, among other things. As generally is the case *in vivo*, the additional amino acids may be processed away from the mature protein by cellular enzymes.

For each and every polynucleotide of the invention there is provided a polynucleotide complementary to it. It is preferred that these complementary polynucleotides are fully complementary to each polynucleotide with which they are complementary.

A precursor protein, having a mature form of the polypeptide fused to one or more prosequences may be an inactive form of the polypeptide. When prosequences are removed such inactive precursors generally are activated. Some or all of the prosequences may be removed before activation. Generally, such precursors are called proproteins.

In addition to the standard A, G, C, T/U representations for nucleotides, the term "N" may also be used in describing certain polynucleotides of the invention. "N" means that any of the four DNA or RNA nucleotides may appear at such a designated position in the DNA or RNA sequence, except it is preferred that N is not a nucleic acid that when taken in

WO 00/43517

PCT/EP00/00425

combination with adjacent nucleotide positions, when read in the correct reading frame, would have the effect of generating a premature termination codon in such reading frame.

5 In sum, a polynucleotide of the invention may encode a mature protein, a mature protein plus a leader sequence (which may be referred to as a preprotein), a precursor of a mature protein having one or more prosequences that are not the leader sequences of a preprotein, or a preproprotein, which is a precursor to a proprotein, having a leader sequence and one or more prosequences, which generally are removed during processing steps that produce active and mature forms of the polypeptide.

10

In accordance with an aspect of the invention, there is provided the use of a polynucleotide of the invention for therapeutic or prophylactic purposes, in particular genetic immunization.

15 The use of a polynucleotide of the invention in genetic immunization will preferably employ a suitable delivery method such as direct injection of plasmid DNA into muscles (Wolff *et al.*, *Hum Mol Genet* (1992) 1: 363, Manthorpe *et al.*, *Hum. Gene Ther.* (1983) 4: 419), delivery of DNA complexed with specific protein carriers (Wu *et al.*, *J Biol Chem.* (1989) 264: 16985), coprecipitation of DNA with calcium phosphate (Benvenisty & Reshef, *PNAS USA*, (1986) 83: 9551), encapsulation of DNA in various forms of liposomes (Kaneda *et al.*, *Science* (1989) 243: 375), particle bombardment (Tang *et al.*, *Nature* (1992) 356:152, Eisenbraun *et al.*, *DNA Cell Biol* (1993) 12: 791) and *in vivo* infection using cloned retroviral vectors (Seeger *et al.*, *PNAS USA* (1984) 81: 5849).

25

Vectors, Host Cells, Expression Systems

The invention also relates to vectors that comprise a polynucleotide or polynucleotides of the invention, host cells that are genetically engineered with vectors of the invention and the production of polypeptides of the invention by recombinant techniques. Cell-free

WO 00/43517

PCT/EP00/00425

translation systems can also be employed to produce such proteins using RNAs derived from the DNA constructs of the invention.

Recombinant polypeptides of the present invention may be prepared by processes well known in those skilled in the art from genetically engineered host cells comprising expression systems. Accordingly, in a further aspect, the present invention relates to expression systems that comprise a polynucleotide or polynucleotides of the present invention, to host cells which are genetically engineered with such expression systems, and to the production of polypeptides of the invention by recombinant techniques.

10

For recombinant production of the polypeptides of the invention, host cells can be genetically engineered to incorporate expression systems or portions thereof or polynucleotides of the invention. Introduction of a polynucleotide into the host cell can be effected by methods described in many standard laboratory manuals, such as Davis, *et al.*,

15

BASIC METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, (1986) and Sambrook, *et al.*, *MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989), such as, calcium phosphate transfection, DEAE-dextran mediated transfection, transvection, microinjection, cationic lipid-mediated transfection, electroporation, transduction, scrape loading, ballistic

20

introduction and infection.

Representative examples of appropriate hosts include bacterial cells, such as cells of streptococci, staphylococci, enterococci, *E. coli*, streptomyces, cyanobacteria, *Bacillus subtilis*, *Moraxella catarrhalis*, *Haemophilus influenzae* and *Neisseria meningitidis*; fungal

25

cells, such as cells of a yeast, *Kluveromyces*, *Saccharomyces*, a basidiomycete, *Candida albicans* and *Aspergillus*; insect cells such as cells of *Drosophila* S2 and *Spodoptera* S9; animal cells such as CHO, COS, HeLa, C127, 3T3, BHK, 293, CV-1 and Bowes melanoma cells; and plant cells, such as cells of a gymnosperm or angiosperm.

WO 00/43517

PCT/EP00/00425

A great variety of expression systems can be used to produce the polypeptides of the invention. Such vectors include, among others, chromosomal-, episomal- and virus-derived vectors, for example, vectors derived from bacterial plasmids, from bacteriophage, from transposons, from yeast episomes, from insertion elements, from yeast chromosomal
5 elements, from viruses such as baculoviruses, papova viruses, such as SV40, vaccinia viruses, adenoviruses, fowl pox viruses, pseudorabies viruses, picornaviruses, retroviruses, and alphaviruses and vectors derived from combinations thereof, such as those derived from plasmid and bacteriophage genetic elements, such as cosmids and phagemids. The expression system constructs may contain control regions that regulate as well as engender
10 expression. Generally, any system or vector suitable to maintain, propagate or express polynucleotides and/or to express a polypeptide in a host may be used for expression in this regard. The appropriate DNA sequence may be inserted into the expression system by any of a variety of well-known and routine techniques, such as, for example, those set forth in Sambrook *et al.*, *MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL*, (*supra*).

15 In recombinant expression systems in eukaryotes, for secretion of a translated protein into the lumen of the endoplasmic reticulum, into the periplasmic space or into the extracellular environment, appropriate secretion signals may be incorporated into the expressed polypeptide. These signals may be endogenous to the polypeptide or they may be
20 heterologous signals.

Polypeptides of the present invention can be recovered and purified from recombinant cell cultures by well-known methods including ammonium sulfate or ethanol precipitation, acid extraction, anion or cation exchange chromatography, phosphocellulose
25 chromatography, hydrophobic interaction chromatography, affinity chromatography, hydroxylapatite chromatography and lectin chromatography. Most preferably, ion metal affinity chromatography (IMAC) is employed for purification. Well known techniques for refolding proteins may be employed to regenerate active conformation when the polypeptide is denatured during intracellular synthesis, isolation and or purification.

WO 00/43517

PCT/EP00/00425

The expression system may also be a recombinant live microorganism, such as a virus or bacterium. The gene of interest can be inserted into the genome of a live recombinant virus or bacterium. Inoculation and *in vivo* infection with this live vector will lead to *in vivo* expression of the antigen and induction of immune responses. Viruses and bacteria used for this purpose are for instance: poxviruses (e.g. vaccinia, fowlpox, canarypox), alphaviruses (Sindbis virus, Semliki Forest Virus, Venezuelan Equine Encephalitis Virus), adenoviruses, adeno-associated virus, picornaviruses (poliovirus, rhinovirus), herpesviruses (varicella zoster virus, etc), Listeria, Salmonella, Shigella, Neisseria, BCG. These viruses and bacteria can be virulent, or attenuated in various ways in order to obtain live vaccines. Such live vaccines also form part of the invention.

Diagnostic, Prognostic, Serotyping and Mutation Assays

This invention is also related to the use of BASB055 polynucleotides and polypeptides of the invention for use as diagnostic reagents. Detection of BASB055 polynucleotides and/or polypeptides in a eukaryote, particularly a mammal, and especially a human, will provide a diagnostic method for diagnosis of disease, staging of disease or response of an infectious organism to drugs. Eukaryotes, particularly mammals, and especially humans, particularly those infected or suspected to be infected with an organism comprising the BASB055 gene or protein, may be detected at the nucleic acid or amino acid level by a variety of well known techniques as well as by methods provided herein.

Polypeptides and polynucleotides for prognosis, diagnosis or other analysis may be obtained from a putatively infected and/or infected individual's bodily materials. Polynucleotides from any of these sources, particularly DNA or RNA, may be used directly for detection or may be amplified enzymatically by using PCR or any other amplification technique prior to analysis. RNA, particularly mRNA, cDNA and genomic DNA may also be used in the same ways. Using amplification, characterization of the species and strain of infectious or resident organism present in an individual, may be made by an analysis of the genotype of a

WO 00/43517

PCT/EP00/00425

selected polynucleotide of the organism. Deletions and insertions can be detected by a change in size of the amplified product in comparison to a genotype of a reference sequence selected from a related organism, preferably a different species of the same genus or a different strain of the same species. Point mutations can be identified by hybridizing

5 amplified DNA to labeled BASB055 polynucleotide sequences. Perfectly or significantly matched sequences can be distinguished from imperfectly or more significantly mismatched duplexes by DNase or RNase digestion, for DNA or RNA respectively, or by detecting differences in melting temperatures or renaturation kinetics. Polynucleotide sequence differences may also be detected by alterations in the electrophoretic mobility of

10 polynucleotide fragments in gels as compared to a reference sequence. This may be carried out with or without denaturing agents. Polynucleotide differences may also be detected by direct DNA or RNA sequencing. See, for example, Myers *et al.*, *Science*, 230: 1242 (1985). Sequence changes at specific locations also may be revealed by nuclease protection assays, such as RNase, V1 and S1 protection assay or a chemical cleavage method. See, for

15 example, Cotton *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 85: 4397-4401 (1985).

In another embodiment, an array of oligonucleotides probes comprising BASB055 nucleotide sequence or fragments thereof can be constructed to conduct efficient screening of, for example, genetic mutations, serotype, taxonomic classification or identification.

20 Array technology methods are well known and have general applicability and can be used to address a variety of questions in molecular genetics including gene expression, genetic linkage, and genetic variability (see, for example, Chee *et al.*, *Science*, 274: 610 (1996)).

Thus in another aspect, the present invention relates to a diagnostic kit which comprises:

25 (a) a polynucleotide of the present invention, preferably the nucleotide sequence of SEQ ID NO:1, or a fragment thereof ;

(b) a nucleotide sequence complementary to that of (a);

(c) a polypeptide of the present invention, preferably the polypeptide of SEQ ID NO:2 or a fragment thereof; or

WO 00/43517

PCT/EP00/00425

(d) an antibody to a polypeptide of the present invention, preferably to the polypeptide of SEQ ID NO:2.

It will be appreciated that in any such kit, (a), (b), (c) or (d) may comprise a substantial component. Such a kit will be of use in diagnosing a disease or susceptibility to a disease, among others.

This invention also relates to the use of polynucleotides of the present invention as diagnostic reagents. Detection of a mutated form of a polynucleotide of the invention, preferable, SEQ ID NO:1, which is associated with a disease or pathogenicity will provide a diagnostic tool that can add to, or define, a diagnosis of a disease, a prognosis of a course of disease, a determination of a stage of disease, or a susceptibility to a disease, which results from under-expression, over-expression or altered expression of the polynucleotide. Organisms, particularly infectious organisms, carrying mutations in such polynucleotide may be detected at the polynucleotide level by a variety of techniques, such as those described elsewhere herein.

Cells from an organism carrying mutations or polymorphisms (allelic variations) in a polynucleotide and/or polypeptide of the invention may also be detected at the polynucleotide or polypeptide level by a variety of techniques, to allow for serotyping, for example. For example, RT-PCR can be used to detect mutations in the RNA. It is particularly preferred to use RT-PCR in conjunction with automated detection systems, such as, for example, GeneScan. RNA, cDNA or genomic DNA may also be used for the same purpose, PCR. As an example, PCR primers complementary to a polynucleotide encoding BASB055 polypeptide can be used to identify and analyze mutations.

The invention further provides primers with 1, 2, 3 or 4 nucleotides removed from the 5' and/or the 3' end. These primers may be used for, among other things, amplifying BASB055 DNA and/or RNA isolated from a sample derived from an individual, such as a

WO 00/43517

PCT/EP00/00425

bodily material. The primers may be used to amplify a polynucleotide isolated from an infected individual, such that the polynucleotide may then be subject to various techniques for elucidation of the polynucleotide sequence. In this way, mutations in the polynucleotide sequence may be detected and used to diagnose and/or prognose the infection or its stage or course, or to serotype and/or classify the infectious agent.

The invention further provides a process for diagnosing disease, preferably bacterial infections, more preferably infections caused by *Neisseria meningitidis*, comprising determining from a sample derived from an individual, such as a bodily material, an increased level of expression of polynucleotide having a sequence of SEQ ID NO:1. Increased or decreased expression of a BASB055 polynucleotide can be measured using any one of the methods well known in the art for the quantitation of polynucleotides, such as, for example, amplification, PCR, RT-PCR, RNase protection, Northern blotting, spectrometry and other hybridization methods.

In addition, a diagnostic assay in accordance with the invention for detecting over-expression of BASB055 polypeptide compared to normal control tissue samples may be used to detect the presence of an infection, for example. Assay techniques that can be used to determine levels of a BASB055 polypeptide, in a sample derived from a host, such as a bodily material, are well-known to those of skill in the art. Such assay methods include radioimmunoassays, competitive-binding assays, Western Blot analysis, antibody sandwich assays, antibody detection and ELISA assays.

The polynucleotides of the invention may be used as components of polynucleotide arrays, preferably high density arrays or grids. These high density arrays are particularly useful for diagnostic and prognostic purposes. For example, a set of spots each comprising a different gene, and further comprising a polynucleotide or polynucleotides of the invention, may be used for probing, such as using hybridization or nucleic acid amplification, using a probe obtained or derived from a bodily sample,

WO 00/43517

PCT/EP00/00425

to determine the presence of a particular polynucleotide sequence or related sequence in an individual. Such a presence may indicate the presence of a pathogen, particularly *Neisseria meningitidis*, and may be useful in diagnosing and/or prognosing disease or a course of disease. A grid comprising a number of variants of the polynucleotide sequence of SEQ ID NO:1 are preferred. Also preferred is a grid comprising a number of variants of a polynucleotide sequence encoding the polypeptide sequence of SEQ ID NO:2.

Antibodies

The polypeptides and polynucleotides of the invention or variants thereof, or cells expressing the same can be used as immunogens to produce antibodies immunospecific for such polypeptides or polynucleotides respectively.

In certain preferred embodiments of the invention there are provided antibodies against BASB055 polypeptides or polynucleotides.

Antibodies generated against the polypeptides or polynucleotides of the invention can be obtained by administering the polypeptides and/or polynucleotides of the invention, or epitope-bearing fragments of either or both, analogues of either or both, or cells expressing either or both, to an animal, preferably a nonhuman, using routine protocols. For preparation of monoclonal antibodies, any technique known in the art that provides antibodies produced by continuous cell line cultures can be used. Examples include various techniques, such as those in Kohler, G. and Milstein, C., *Nature* 256: 495-497 (1975); Kozbor *et al.*, *Immunology Today* 4: 72 (1983); Cole *et al.*, pg. 77-96 in *MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY*, Alan R. Liss, Inc. (1985).

Techniques for the production of single chain antibodies (U.S. Patent No. 4,946,778) can be adapted to produce single chain antibodies to polypeptides or polynucleotides of this invention. Also, transgenic mice, or other organisms or animals, such as other mammals,

WO 00/43517

PCT/EP00/00425

may be used to express humanized antibodies immunospecific to the polypeptides or polynucleotides of the invention.

Alternatively, phage display technology may be utilized to select antibody genes with
5 binding activities towards a polypeptide of the invention either from repertoires of PCR
amplified v-genes of lymphocytes from humans screened for possessing anti-BASB055 or
from naive libraries (McCafferty, *et al.*, (1990), *Nature* 348, 552-554; Marks, *et al.*,
(1992) *Biotechnology* 10, 779-783). The affinity of these antibodies can also be improved
by, for example, chain shuffling (Clackson *et al.*, (1991) *Nature* 352: 628).

10

The above-described antibodies may be employed to isolate or to identify clones expressing
the polypeptides or polynucleotides of the invention to purify the polypeptides or
polynucleotides by, for example, affinity chromatography.

15 Thus, among others, antibodies against BASB055-polypeptide or BASB055-polynucleotide
may be employed to treat infections, particularly bacterial infections.

Polypeptide variants include antigenically, epitopically or immunologically equivalent
variants form a particular aspect of this invention.

20

Preferably, the antibody or variant thereof is modified to make it less immunogenic in the
individual. For example, if the individual is human the antibody may most preferably be
"humanized," where the complementarity determining region or regions of the hybridoma-
derived antibody has been transplanted into a human monoclonal antibody, for example
25 as described in Jones *et al.* (1986), *Nature* 321, 522-525 or Tempest *et al.*, (1991)
Biotechnology 9, 266-273.

Antagonists and Agonists - Assays and Molecules

WO 00/43517

PCT/EP00/00425

Polypeptides and polynucleotides of the invention may also be used to assess the binding of small molecule substrates and ligands in, for example, cells, cell-free preparations, chemical libraries, and natural product mixtures. These substrates and ligands may be natural substrates and ligands or may be structural or functional mimetics. See, e.g., Coligan *et al.*,
5 *Current Protocols in Immunology 1(2)*: Chapter 5 (1991).

The screening methods may simply measure the binding of a candidate compound to the polypeptide or polynucleotide, or to cells or membranes bearing the polypeptide or polynucleotide, or a fusion protein of the polypeptide by means of a label directly or
10 indirectly associated with the candidate compound. Alternatively, the screening method may involve competition with a labeled competitor. Further, these screening methods may test whether the candidate compound results in a signal generated by activation or inhibition of the polypeptide or polynucleotide, using detection systems appropriate to the cells comprising the polypeptide or polynucleotide. Inhibitors of activation are generally
15 assayed in the presence of a known agonist and the effect on activation by the agonist by the presence of the candidate compound is observed. Constitutively active polypeptide and/or constitutively expressed polypeptides and polynucleotides may be employed in screening methods for inverse agonists or inhibitors, in the absence of an agonist or inhibitor, by testing whether the candidate compound results in inhibition of activation of
20 the polypeptide or polynucleotide, as the case may be. Further, the screening methods may simply comprise the steps of mixing a candidate compound with a solution containing a polypeptide or polynucleotide of the present invention, to form a mixture, measuring BASB055 polypeptide and/or polynucleotide activity in the mixture, and comparing the BASB055 polypeptide and/or polynucleotide activity of the mixture to a
25 standard. Fusion proteins, such as those made from Fc portion and BASB055 polypeptide, as hereinbefore described, can also be used for high-throughput screening assays to identify antagonists of the polypeptide of the present invention, as well as of phylogenetically and and/or functionally related polypeptides (see D. Bennett *et al.*, *J Mol*

WO 00/43517

PCT/EP00/00425

Recognition, 8:52-58 (1995); and K. Johanson *et al.*, J Biol Chem, 270(16):9459-9471 (1995)).

The polynucleotides, polypeptides and antibodies that bind to and/or interact with a polypeptide of the present invention may also be used to configure screening methods for detecting the effect of added compounds on the production of mRNA and/or polypeptide in cells. For example, an ELISA assay may be constructed for measuring secreted or cell associated levels of polypeptide using monoclonal and polyclonal antibodies by standard methods known in the art. This can be used to discover agents which may inhibit or enhance the production of polypeptide (also called antagonist or agonist, respectively) from suitably manipulated cells or tissues.

The invention also provides a method of screening compounds to identify those which enhance (agonist) or block (antagonist) the action of BASB055 polypeptides or polynucleotides, particularly those compounds that are bacteriostatic and/or bactericidal. The method of screening may involve high-throughput techniques. For example, to screen for agonists or antagonists, a synthetic reaction mix, a cellular compartment, such as a membrane, cell envelope or cell wall, or a preparation of any thereof, comprising BASB055 polypeptide and a labeled substrate or ligand of such polypeptide is incubated in the absence or the presence of a candidate molecule that may be a BASB055 agonist or antagonist. The ability of the candidate molecule to agonize or antagonize the BASB055 polypeptide is reflected in decreased binding of the labeled ligand or decreased production of product from such substrate. Molecules that bind gratuitously, *i.e.*, without inducing the effects of BASB055 polypeptide are most likely to be good antagonists. Molecules that bind well and, as the case may be, increase the rate of product production from substrate, increase signal transduction, or increase chemical channel activity are agonists. Detection of the rate or level of, as the case may be, production of product from substrate, signal transduction, or chemical channel activity may be enhanced by using a reporter system. Reporter systems that may be useful in this regard include but are not limited to colorimetric, labeled substrate

WO 00/43517

PCT/EP00/00425

converted into product, a reporter gene that is responsive to changes in BASB055 polynucleotide or polypeptide activity, and binding assays known in the art.

Another example of an assay for BASB055 agonists is a competitive assay that combines
5 BASB055 and a potential agonist with BASB055-binding molecules, recombinant
BASB055 binding molecules, natural substrates or ligands, or substrate or ligand mimetics,
under appropriate conditions for a competitive inhibition assay. BASB055 can be labeled,
such as by radioactivity or a colorimetric compound, such that the number of BASB055
10 molecules bound to a binding molecule or converted to product can be determined
accurately to assess the effectiveness of the potential antagonist.

Potential antagonists include, among others, small organic molecules, peptides,
polypeptides and antibodies that bind to a polynucleotide and/or polypeptide of the
invention and thereby inhibit or extinguish its activity or expression. Potential antagonists
15 also may be small organic molecules, a peptide, a polypeptide such as a closely related
protein or antibody that binds the same sites on a binding molecule, such as a binding
molecule, without inducing BASB055-induced activities, thereby preventing the action or
expression of BASB055 polypeptides and/or polynucleotides by excluding BASB055
polypeptides and/or polynucleotides from binding.

20 Potential antagonists include a small molecule that binds to and occupies the binding site of
the polypeptide thereby preventing binding to cellular binding molecules, such that normal
biological activity is prevented. Examples of small molecules include but are not limited to
small organic molecules, peptides or peptide-like molecules. Other potential antagonists
25 include antisense molecules (see Okano, *J. Neurochem.* 56: 560 (1991);
OLIGODEOXYNUCLEOTIDES AS ANTISENSE INHIBITORS OF GENE EXPRESSION,
CRC Press, Boca Raton, FL (1988), for a description of these molecules). Preferred
potential antagonists include compounds related to and variants of BASB055.

WO 00/43517

PCT/EP00/00425

In a further aspect, the present invention relates to genetically engineered soluble fusion proteins comprising a polypeptide of the present invention, or a fragment thereof, and various portions of the constant regions of heavy or light chains of immunoglobulins of various subclasses (IgG, IgM, IgA, IgE). Preferred as an immunoglobulin is the constant part of the heavy chain of human IgG, particularly IgG1, where fusion takes place at the hinge region. In a particular embodiment, the Fc part can be removed simply by incorporation of a cleavage sequence which can be cleaved with blood clotting factor Xa. Furthermore, this invention relates to processes for the preparation of these fusion proteins by genetic engineering, and to the use thereof for drug screening, diagnosis and therapy. A further aspect of the invention also relates to polynucleotides encoding such fusion proteins. Examples of fusion protein technology can be found in International Patent Application Nos. WO94/29458 and WO94/22914.

Each of the polynucleotide sequences provided herein may be used in the discovery and development of antibacterial compounds. The encoded protein, upon expression, can be used as a target for the screening of antibacterial drugs. Additionally, the polynucleotide sequences encoding the amino terminal regions of the encoded protein or Shine-Delgarno or other translation facilitating sequences of the respective mRNA can be used to construct antisense sequences to control the expression of the coding sequence of interest.

The invention also provides the use of the polypeptide, polynucleotide, agonist or antagonist of the invention to interfere with the initial physical interaction between a pathogen or pathogens and a eukaryotic, preferably mammalian, host responsible for sequelae of infection. In particular, the molecules of the invention may be used: in the prevention of adhesion of bacteria, in particular gram positive and/or gram negative bacteria, to eukaryotic, preferably mammalian, extracellular matrix proteins on in-dwelling devices or to extracellular matrix proteins in wounds; to block bacterial adhesion between eukaryotic, preferably mammalian, extracellular matrix proteins and bacterial BASB055 proteins that mediate tissue damage and/or; to block the normal progression of

WO 00/43517

PCT/EP00/00425

pathogenesis in infections initiated other than by the implantation of in-dwelling devices or by other surgical techniques.

In accordance with yet another aspect of the invention, there are provided BASB055
5 agonists and antagonists, preferably bacteristatic or bactericidal agonists and antagonists.

The antagonists and agonists of the invention may be employed, for instance, to prevent, inhibit and/or treat diseases.

10 In a further aspect, the present invention relates to mimotopes of the polypeptide of the invention. A mimotope is a peptide sequence, sufficiently similar to the native peptide (sequentially or structurally), which is capable of being recognised by antibodies which recognise the native peptide; or is capable of raising antibodies which recognise the native peptide when coupled to a suitable carrier.

15 Peptide mimotopes may be designed for a particular purpose by addition, deletion or substitution of elected amino acids. Thus, the peptides may be modified for the purposes of ease of conjugation to a protein carrier. For example, it may be desirable for some chemical conjugation methods to include a terminal cysteine. In addition it may be
20 desirable for peptides conjugated to a protein carrier to include a hydrophobic terminus distal from the conjugated terminus of the peptide, such that the free unconjugated end of the peptide remains associated with the surface of the carrier protein. Thereby presenting the peptide in a conformation which most closely resembles that of the peptide as found in the context of the whole native molecule. For example, the peptides
25 may be altered to have an N-terminal cysteine and a C-terminal hydrophobic amidated tail. Alternatively, the addition or substitution of a D-stereoisomer form of one or more of the amino acids may be performed to create a beneficial derivative, for example to enhance stability of the peptide.

WO 00/43517

PCT/EP00/00425

Alternatively, peptide mimotopes may be identified using antibodies which are capable themselves of binding to the polypeptides of the present invention using techniques such as phage display technology (EP 0 552 267 B1). This technique, generates a large number of peptide sequences which mimic the structure of the native peptides and are, therefore, capable of binding to anti-native peptide antibodies, but may not necessarily themselves share significant sequence homology to the native polypeptide.

Vaccines

Another aspect of the invention relates to a method for inducing an immunological response in an individual, particularly a mammal, preferably humans, which comprises inoculating the individual with BASB055 polynucleotide and/or polypeptide, or a fragment or variant thereof, adequate to produce antibody and/ or T cell immune response to protect said individual from infection, particularly bacterial infection and most particularly *Neisseria meningitidis* infection. Also provided are methods whereby such immunological response slows bacterial replication. Yet another aspect of the invention relates to a method of inducing immunological response in an individual which comprises delivering to such individual a nucleic acid vector, sequence or ribozyme to direct expression of BASB055 polynucleotide and/or polypeptide, or a fragment or a variant thereof, for expressing BASB055 polynucleotide and/or polypeptide, or a fragment or a variant thereof *in vivo* in order to induce an immunological response, such as, to produce antibody and/ or T cell immune response, including, for example, cytokine-producing T cells or cytotoxic T cells, to protect said individual, preferably a human, from disease, whether that disease is already established within the individual or not. One example of administering the gene is by accelerating it into the desired cells as a coating on particles or otherwise. Such nucleic acid vector may comprise DNA, RNA, a ribozyme, a modified nucleic acid, a DNA/RNA hybrid, a DNA-protein complex or an RNA-protein complex.

WO 00/43517

PCT/EP00/00425

A further aspect of the invention relates to an immunological composition that when introduced into an individual, preferably a human, capable of having induced within it an immunological response, induces an immunological response in such individual to a BASB055 polynucleotide and/or polypeptide encoded therefrom, wherein the composition comprises a recombinant BASB055 polynucleotide and/or polypeptide encoded therefrom and/or comprises DNA and/or RNA which encodes and expresses an antigen of said BASB055 polynucleotide, polypeptide encoded therefrom, or other polypeptide of the invention. The immunological response may be used therapeutically or prophylactically and may take the form of antibody immunity and/or cellular immunity, such as cellular immunity arising from CTL or CD4+ T cells.

A BASB055 polypeptide or a fragment thereof may be fused with co-protein or chemical moiety which may or may not by itself produce antibodies, but which is capable of stabilizing the first protein and producing a fused or modified protein which will have antigenic and/or immunogenic properties, and preferably protective properties. Thus fused recombinant protein, preferably further comprises an antigenic co-protein, such as lipoprotein D from *Haemophilus influenzae*, Glutathione-S-transferase (GST) or beta-galactosidase, or any other relatively large co-protein which solubilizes the protein and facilitates production and purification thereof. Moreover, the co-protein may act as an adjuvant in the sense of providing a generalized stimulation of the immune system of the organism receiving the protein. The co-protein may be attached to either the amino- or carboxy-terminus of the first protein.

In a vaccine composition according to the invention, a BASB055 polypeptide and/or polynucleotide, or a fragment, or a mimotope, or a variant thereof may be present in a vector, such as the live recombinant vectors described above for example live bacterial vectors.

WO 00/43517

PCT/EP00/00425

Also suitable are non-live vectors for the BASB055 polypeptide, for example bacterial outer-membrane vesicles or "blebs". OM blebs are derived from the outer membrane of the two-layer membrane of Gram-negative bacteria and have been documented in many Gram-negative bacteria (Zhou, L *et al.* 1998. *FEMS Microbiol. Lett.* 163:223-228) including *C. trachomatis* and *C. psittaci*. A non-exhaustive list of bacterial pathogens reported to produce blebs also includes: *Bordetella pertussis*, *Borrelia burgdorferi*, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenza*, *Legionella pneumophila*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Yersinia enterocolitica*.

10 Blebs have the advantage of providing outer-membrane proteins in their native conformation and are thus particularly useful for vaccines. Blebs can also be improved for vaccine use by engineering the bacterium so as to modify the expression of one or more molecules at the outer membrane. Thus for example the expression of a desired immunogenic protein at the outer membrane, such as the BASB055 polypeptide, can be introduced or upregulated (e.g. by altering the promoter). Instead or in addition, the expression of outer-membrane molecules which are either not relevant (e.g. unprotective antigens or immunodominant but variable proteins) or detrimental (e.g. toxic molecules such as LPS, or potential inducers of an autoimmune response) can be downregulated.

20 These approaches are discussed in more detail below.

The non-coding flanking regions of the BASB055 gene contain regulatory elements important in the expression of the gene. This regulation takes place both at the transcriptional and translational level. The sequence of these regions, either upstream or downstream of the open reading frame of the gene, can be obtained by DNA sequencing.

25 This sequence information allows the determination of potential regulatory motifs such as the different promoter elements, terminator sequences, inducible sequence elements, repressors, elements responsible for phase variation, the shine-dalgarno sequence, regions

WO 00/43517

PCT/EP00/00425

with potential secondary structure involved in regulation, as well as other types of regulatory motifs or sequences. This sequence is a further aspect of the invention.

This sequence information allows the modulation of the natural expression of the
5 BASB055 gene. The upregulation of the gene expression may be accomplished by
altering the promoter, the shine-dalgarno sequence, potential repressor or operator
elements, or any other elements involved. Likewise, downregulation of expression can be
achieved by similar types of modification. Alternatively, by changing phase variation
10 sequences, the expression of the gene can be put under phase variation control, or it may
be uncoupled from this regulation. In another approach, the expression of the gene can be
put under the control of one or more inducible elements allowing regulated expression.
Examples of such regulation include, but are not limited to, induction by temperature
shift, addition of inductor substrates like selected carbohydrates or their derivatives, trace
elements, vitamins, co-factors, metal ions, etc.

15 Such modifications as described above can be introduced by several different means. The
modification of sequences involved in gene expression can be carried out *in vivo* by
random mutagenesis followed by selection for the desired phenotype. Another approach
consists in isolating the region of interest and modifying it by random mutagenesis, or
20 site-directed replacement, insertion or deletion mutagenesis. The modified region can then
be reintroduced into the bacterial genome by homologous recombination, and the effect
on gene expression can be assessed. In another approach, the sequence knowledge of the
region of interest can be used to replace or delete all or part of the natural regulatory
sequences. In this case, the regulatory region targeted is isolated and modified so as to
25 contain the regulatory elements from another gene, a combination of regulatory elements
from different genes, a synthetic regulatory region, or any other regulatory region, or to
delete selected parts of the wild-type regulatory sequences. These modified sequences can
then be reintroduced into the bacterium via homologous recombination into the genome.
A non-exhaustive list of preferred promoters that could be used for up-regulation of gene

WO 00/43517

PCT/EP00/00425

expression includes the promoters *porA*, *porB*, *lbpB*, *tbpB*, *p110*, *lst*, *hpuAB* from *N. meningitidis* or *N. gonorrhoeae*; *ompCD*, *copB*, *lbpB*, *ompE*, *UspA1*; *UspA2*; *TbpB* from *M. Catarrhalis*; *p1*, *p2*, *p4*, *p5*, *p6*, *lpD*, *tbpB*, *D15*, *Hia*, *Hmw1*, *Hmw2* from *H. influenzae*.

5

In one example, the expression of the gene can be modulated by exchanging its promoter with a stronger promoter (through isolating the upstream sequence of the gene, in vitro modification of this sequence, and reintroduction into the genome by homologous recombination). Upregulated expression can be obtained in both the bacterium as well as
10 in the outer membrane vesicles shed (or made) from the bacterium.

In other examples, the described approaches can be used to generate recombinant bacterial strains with improved characteristics for vaccine applications. These can be, but are not limited to, attenuated strains, strains with increased expression of selected
15 antigens, strains with knock-outs (or decreased expression) of genes interfering with the immune response, strains with modulated expression of immunodominant proteins, strains with modulated shedding of outer-membrane vesicles.

Thus, also provided by the invention is a modified upstream region of the BASB055
20 gene, which modified upstream region contains a heterologous regulatory element which alters the expression level of the BASB055 protein located at the outer membrane. The upstream region according to this aspect of the invention includes the sequence upstream of the BASB055 gene. The upstream region starts immediately upstream of the BASB055 gene and continues usually to a position no more than about 1000 bp upstream of the gene
25 from the ATG start codon. In the case of a gene located in a polycistronic sequence (operon) the upstream region can start immediately preceding the gene of interest, or preceding the first gene in the operon. Preferably, a modified upstream region according to this aspect of the invention contains a heterologous promoter at a position between 500 and 700 bp upstream of the ATG.

WO 00/43517

PCT/EP00/00425

Thus, the invention provides a BASB055 polypeptide, in a modified bacterial bleb. The invention further provides modified host cells capable of producing the non-live membrane-based bleb vectors. The invention further provides nucleic acid vectors comprising the

5 BASB055 gene having a modified upstream region containing a heterologous regulatory element.

Further provided by the invention are processes to prepare the host cells and bacterial blebs according to the invention.

10

Also provided by this invention are compositions, particularly vaccine compositions, and methods comprising the polypeptides and/or polynucleotides of the invention and immunostimulatory DNA sequences, such as those described in Sato, Y. *et al.* Science 273: 352 (1996).

15

Also, provided by this invention are methods using the described polynucleotide or particular fragments thereof, which have been shown to encode non-variable regions of bacterial cell surface proteins, in polynucleotide constructs used in such genetic immunization experiments in animal models of infection with *Neisseria meningitidis*.

20

Such experiments will be particularly useful for identifying protein epitopes able to provoke a prophylactic or therapeutic immune response. It is believed that this approach will allow for the subsequent preparation of monoclonal antibodies of particular value, derived from the requisite organ of the animal successfully resisting or clearing infection, for the development of prophylactic agents or therapeutic treatments of bacterial

25

infection, particularly *Neisseria meningitidis* infection, in mammals, particularly humans.

The invention also includes a vaccine formulation which comprises an immunogenic recombinant polypeptide and/or polynucleotide of the invention together with a suitable carrier, such as a pharmaceutically acceptable carrier. Since the polypeptides and

WO 00/43517

PCT/EP00/00425

polynucleotides may be broken down in the stomach, each is preferably administered parenterally, including, for example, administration that is subcutaneous, intramuscular, intravenous, or intradermal. Formulations suitable for parenteral administration include aqueous and non-aqueous sterile injection solutions which may contain anti-oxidants, buffers, bacteriostatic compounds and solutes which render the formulation isotonic with the bodily fluid, preferably the blood, of the individual; and aqueous and non-aqueous sterile suspensions which may include suspending agents or thickening agents. The formulations may be presented in unit-dose or multi-dose containers, for example, sealed ampoules and vials and may be stored in a freeze-dried condition requiring only the addition of the sterile liquid carrier immediately prior to use.

The vaccine formulation of the invention may also include adjuvant systems for enhancing the immunogenicity of the formulation. Preferably the adjuvant system raises preferentially a TH1 type of response.

An immune response may be broadly distinguished into two extreme categories, being a humoral or cell mediated immune responses (traditionally characterised by antibody and cellular effector mechanisms of protection respectively). These categories of response have been termed TH1-type responses (cell-mediated response), and TH2-type immune responses (humoral response).

Extreme TH1-type immune responses may be characterised by the generation of antigen specific, haplotype restricted cytotoxic T lymphocytes, and natural killer cell responses. In mice TH1-type responses are often characterised by the generation of antibodies of the IgG2a subtype, whilst in the human these correspond to IgG1 type antibodies. TH2-type immune responses are characterised by the generation of a broad range of immunoglobulin isotypes including in mice IgG1, IgA, and IgM.

WO 00/43517

PCT/EP00/00425

It can be considered that the driving force behind the development of these two types of immune responses are cytokines. High levels of TH1-type cytokines tend to favour the induction of cell mediated immune responses to the given antigen, whilst high levels of TH2-type cytokines tend to favour the induction of humoral immune responses to the antigen.

The distinction of TH1 and TH2-type immune responses is not absolute. In reality an individual will support an immune response which is described as being predominantly TH1 or predominantly TH2. However, it is often convenient to consider the families of cytokines in terms of that described in murine CD4 +ve T cell clones by Mosmann and Coffman (*Mosmann, T.R. and Coffman, R.L. (1989) TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. Annual Review of Immunology, 7, p145-173*). Traditionally, TH1-type responses are associated with the production of the INF- γ and IL-2 cytokines by T-lymphocytes. Other cytokines often directly associated with the induction of TH1-type immune responses are not produced by T-cells, such as IL-12. In contrast, TH2-type responses are associated with the secretion of IL-4, IL-5, IL-6 and IL-13.

It is known that certain vaccine adjuvants are particularly suited to the stimulation of either TH1 or TH2 - type cytokine responses. Traditionally the best indicators of the TH1:TH2 balance of the immune response after a vaccination or infection includes direct measurement of the production of TH1 or TH2 cytokines by T lymphocytes *in vitro* after restimulation with antigen, and/or the measurement of the IgG1:IgG2a ratio of antigen specific antibody responses.

Thus, a TH1-type adjuvant is one which preferentially stimulates isolated T-cell populations to produce high levels of TH1-type cytokines when re-stimulated with antigen *in vitro*, and promotes development of both CD8+ cytotoxic T lymphocytes and antigen specific immunoglobulin responses associated with TH1-type isotype.

WO 00/43517

PCT/EP00/00425

Adjuvants which are capable of preferential stimulation of the TH1 cell response are described in International Patent Application No. WO 94/00153 and WO 95/17209.

5 3 De-O-acylated monophosphoryl lipid A (3D-MPL) is one such adjuvant. This is known from GB 2220211 (Ribi). Chemically it is a mixture of 3 De-O-acylated monophosphoryl lipid A with 4, 5 or 6 acylated chains and is manufactured by Ribi Immunochem, Montana. A preferred form of 3 De-O-acylated monophosphoryl lipid A is disclosed in European Patent 0 689 454 B1 (SmithKline Beecham Biologicals SA).

10

Preferably, the particles of 3D-MPL are small enough to be sterile filtered through a 0.22micron membrane (European Patent number 0 689 454).

3D-MPL will be present in the range of 10µg - 100µg preferably 25-50µg per dose wherein the antigen will typically be present in a range 2-50µg per dose.

15

Another preferred adjuvant comprises QS21, an Hplc purified non-toxic fraction derived from the bark of Quillaja Saponaria Molina. Optionally this may be admixed with 3 De-O-acylated monophosphoryl lipid A (3D-MPL), optionally together with a carrier.

20

The method of production of QS21 is disclosed in US patent No. 5,057,540.

Non-reactogenic adjuvant formulations containing QS21 have been described previously (WO 96/33739). Such formulations comprising QS21 and cholesterol have
25 been shown to be successful TH1 stimulating adjuvants when formulated together with an antigen.

WO 00/43517

PCT/EP00/00425

Further adjuvants which are preferential stimulators of TH1 cell response include immunomodulatory oligonucleotides, for example unmethylated CpG sequences as disclosed in WO 96/02555.

- 5 Combinations of different TH1 stimulating adjuvants, such as those mentioned hereinabove, are also contemplated as providing an adjuvant which is a preferential stimulator of TH1 cell response. For example, QS21 can be formulated together with 3D-MPL. The ratio of QS21 : 3D-MPL will typically be in the order of 1 : 10 to 10 : 1; preferably 1:5 to 5 : 1 and often substantially 1 : 1. The preferred range for optimal
10 synergy is 2.5 : 1 to 1 : 1 3D-MPL: QS21.

Preferably a carrier is also present in the vaccine composition according to the invention. The carrier may be an oil in water emulsion, or an aluminium salt, such as aluminium phosphate or aluminium hydroxide.

- 15 A preferred oil-in-water emulsion comprises a metabolisable oil, such as squalene, alpha tocopherol and Tween 80. In a particularly preferred aspect the antigens in the vaccine composition according to the invention are combined with QS21 and 3D-MPL in such an emulsion. Additionally the oil in water emulsion may contain span 85 and/or
20 lecithin and/or tricaprilyn.

Typically for human administration QS21 and 3D-MPL will be present in a vaccine in the range of 1µg - 200µg, such as 10-100µg, preferably 10µg - 50µg per dose.

- 25 Typically the oil in water will comprise from 2 to 10% squalene, from 2 to 10% alpha tocopherol and from 0.3 to 3% tween 80. Preferably the ratio of squalene: alpha tocopherol is equal to or less than 1 as this provides a more stable emulsion. Span 85 may also be present at a level of 1%. In some cases it may be advantageous that the vaccines of the present invention will further contain a stabiliser.

WO 00/43517

PCT/EP00/00425

Non-toxic oil in water emulsions preferably contain a non-toxic oil, e.g. squalane or squalene, an emulsifier, e.g. Tween 80, in an aqueous carrier. The aqueous carrier may be, for example, phosphate buffered saline.

- 5 A particularly potent adjuvant formulation involving QS21, 3D-MPL and tocopherol in an oil in water emulsion is described in WO 95/17210.

The present invention also provides a polyvalent vaccine composition comprising a vaccine formulation of the invention in combination with other antigens, in particular
10 antigens useful for treating cancers, autoimmune diseases and related conditions. Such a polyvalent vaccine composition may include a TH-1 inducing adjuvant as hereinbefore described.

While the invention has been described with reference to certain BASB055 polypeptides
15 and polynucleotides, it is to be understood that this covers fragments of the naturally occurring polypeptides and polynucleotides, and similar polypeptides and polynucleotides with additions, deletions or substitutions which do not substantially affect the immunogenic properties of the recombinant polypeptides or polynucleotides.

- 20 The antigen can also be delivered in the form of whole bacteria (dead or alive) or as subcellular fractions, these possibilities do include *N.meningitidis* itself.

Compositions, kits and administration

In a further aspect of the invention there are provided compositions comprising a BASB055
25 polynucleotide and/or a BASB055 polypeptide for administration to a cell or to a multicellular organism.

The invention also relates to compositions comprising a polynucleotide and/or a polypeptide discussed herein or their agonists or antagonists. The polypeptides and polynucleotides of

WO 00/43517

PCT/EP00/00425

the invention may be employed in combination with a non-sterile or sterile carrier or carriers for use with cells, tissues or organisms, such as a pharmaceutical carrier suitable for administration to an individual. Such compositions comprise, for instance, a media additive or a therapeutically effective amount of a polypeptide and/or polynucleotide of the invention
5 and a pharmaceutically acceptable carrier or excipient. Such carriers may include, but are not limited to, saline, buffered saline, dextrose, water, glycerol, ethanol and combinations thereof. The formulation should suit the mode of administration. The invention further relates to diagnostic and pharmaceutical packs and kits comprising one or more containers filled with one or more of the ingredients of the aforementioned compositions of the
10 invention.

Polypeptides, polynucleotides and other compounds of the invention may be employed alone or in conjunction with other compounds, such as therapeutic compounds.

15 The pharmaceutical compositions may be administered in any effective, convenient manner including, for instance, administration by topical, oral, anal, vaginal, intravenous, intraperitoneal, intramuscular, subcutaneous, intranasal or intradermal routes among others.

In therapy or as a prophylactic, the active agent may be administered to an individual as
20 an injectable composition, for example as a sterile aqueous dispersion, preferably isotonic.

In a further aspect, the present invention provides for pharmaceutical compositions comprising a therapeutically effective amount of a polypeptide and/or polynucleotide, such
25 as the soluble form of a polypeptide and/or polynucleotide of the present invention, agonist or antagonist peptide or small molecule compound, in combination with a pharmaceutically acceptable carrier or excipient. Such carriers include, but are not limited to, saline, buffered saline, dextrose, water, glycerol, ethanol, and combinations thereof. The invention further relates to pharmaceutical packs and kits comprising one or more containers filled with one

WO 00/43517

PCT/EP00/00425

or more of the ingredients of the aforementioned compositions of the invention.

Polypeptides, polynucleotides and other compounds of the present invention may be employed alone or in conjunction with other compounds, such as therapeutic compounds.

- 5 The composition will be adapted to the route of administration, for instance by a systemic or an oral route. Preferred forms of systemic administration include injection, typically by intravenous injection. Other injection routes, such as subcutaneous, intramuscular, or intraperitoneal, can be used. Alternative means for systemic administration include transmucosal and transdermal administration using penetrants such as bile salts or fusidic
- 10 acids or other detergents. In addition, if a polypeptide or other compounds of the present invention can be formulated in an enteric or an encapsulated formulation, oral administration may also be possible. Administration of these compounds may also be topical and/or localized, in the form of salves, pastes, gels, solutions, powders and the like.
- 15 For administration to mammals, and particularly humans, it is expected that the daily dosage level of the active agent will be from 0.01 mg/kg to 10 mg/kg, typically around 1 mg/kg. The physician in any event will determine the actual dosage which will be most suitable for an individual and will vary with the age, weight and response of the particular individual. The above dosages are exemplary of the average case. There can, of course,
- 20 be individual instances where higher or lower dosage ranges are merited, and such are within the scope of this invention.

The dosage range required depends on the choice of peptide, the route of administration, the nature of the formulation, the nature of the subject's condition, and the judgment of the

25 attending practitioner. Suitable dosages, however, are in the range of 0.1-100 µg/kg of subject.

A vaccine composition is conveniently in injectable form. Conventional adjuvants may be employed to enhance the immune response. A suitable unit dose for vaccination is 0.5-5

WO 00/43517

PCT/EP00/00425

microgram/kg of antigen, and such dose is preferably administered 1-3 times and with an interval of 1-3 weeks. With the indicated dose range, no adverse toxicological effects will be observed with the compounds of the invention which would preclude their administration to suitable individuals.

5

Wide variations in the needed dosage, however, are to be expected in view of the variety of compounds available and the differing efficiencies of various routes of administration. For example, oral administration would be expected to require higher dosages than administration by intravenous injection. Variations in these dosage levels can be adjusted

10 using standard empirical routines for optimization, as is well understood in the art.

Sequence Databases, Sequences in a Tangible Medium, and Algorithms

15 Polynucleotide and polypeptide sequences form a valuable information resource with which to determine their 2- and 3-dimensional structures as well as to identify further sequences of similar homology. These approaches are most easily facilitated by storing the sequence in a computer readable medium and then using the stored data in a known macromolecular structure program or to search a sequence database using well known searching tools, such as the GCG program package.

20

Also provided by the invention are methods for the analysis of character sequences or strings, particularly genetic sequences or encoded protein sequences. Preferred methods of sequence analysis include, for example, methods of sequence homology analysis, such as identity and similarity analysis, DNA, RNA and protein structure analysis, sequence
25 assembly, cladistic analysis, sequence motif analysis, open reading frame determination, nucleic acid base calling, codon usage analysis, nucleic acid base trimming, and sequencing chromatogram peak analysis.

WO 00/43517

PCT/EP00/00425

A computer based method is provided for performing homology identification. This method comprises the steps of: providing a first polynucleotide sequence comprising the sequence of a polynucleotide of the invention in a computer readable medium; and comparing said first polynucleotide sequence to at least one second polynucleotide or polypeptide sequence to identify homology.

A computer based method is also provided for performing homology identification, said method comprising the steps of: providing a first polypeptide sequence comprising the sequence of a polypeptide of the invention in a computer readable medium; and comparing said first polypeptide sequence to at least one second polynucleotide or polypeptide sequence to identify homology.

All publications and references, including but not limited to patents and patent applications, cited in this specification are herein incorporated by reference in their entirety as if each individual publication or reference were specifically and individually indicated to be incorporated by reference herein as being fully set forth. Any patent application to which this application claims priority is also incorporated by reference herein in its entirety in the manner described above for publications and references.

20

DEFINITIONS

"Identity," as known in the art, is a relationship between two or more polypeptide sequences or two or more polynucleotide sequences, as the case may be, as determined by comparing the sequences. In the art, "identity" also means the degree of sequence relatedness between polypeptide or polynucleotide sequences, as the case may be, as determined by the match between strings of such sequences. "Identity" can be readily calculated by known methods, including but not limited to those described in (*Computational Molecular Biology*, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; *Biocomputing: Informatics and Genome Projects*, Smith, D.W., ed., Academic Press, New York, 1993;

WO 00/43517

PCT/EP00/00425

Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A.M., and Griffin, H.G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; *Sequence Analysis in Molecular Biology*, von Heine, G., Academic Press, 1987; and *Sequence Analysis Primer*, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991; and Carillo, H., and Lipman, D., *SIAM J. Applied Math.* 48: 1073 (1988). Methods to determine identity are designed to give the largest match between the sequences tested. Moreover, methods to determine identity are codified in publicly available computer programs. Computer program methods to determine identity between two sequences include, but are not limited to, the GAP program in the GCG program package (Devereux, J., et al., *Nucleic Acids Research* 12(1): 387 (1984)), BLASTP, BLASTN (Altschul, S.F. et al., *J. Mol. Biol.* 215: 403-410 (1990), and FASTA(Pearson and Lipman Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 2444-2448 (1988). The BLAST family of programs is publicly available from NCBI and other sources (*BLAST Manual*, Altschul, S., et al., NCBI NLM NIH Bethesda, MD 20894; Altschul, S., et al., *J. Mol. Biol.* 215: 403-410 (1990). The well known Smith Waterman algorithm may also be used to determine identity.

Parameters for polypeptide sequence comparison include the following:

Algorithm: Needleman and Wunsch, *J. Mol Biol.* 48: 443-453 (1970)

Comparison matrix: BLOSSUM62 from Henikoff and Henikoff,

20 Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89:10915-10919 (1992)

Gap Penalty: 8

Gap Length Penalty: 2

A program useful with these parameters is publicly available as the "gap" program from Genetics Computer Group, Madison WI. The aforementioned parameters are the default

25 parameters for peptide comparisons (along with no penalty for end gaps).

Parameters for polynucleotide comparison include the following:

Algorithm: Needleman and Wunsch, *J. Mol Biol.* 48: 443-453 (1970)

Comparison matrix: matches = +10, mismatch = 0

WO 00/43517

PCT/EP00/00425

Gap Penalty: 50

Gap Length Penalty: 3

Available as: The "gap" program from Genetics Computer Group, Madison WI. These are the default parameters for nucleic acid comparisons.

5

A preferred meaning for "identity" for polynucleotides and polypeptides, as the case may be, are provided in (1) and (2) below.

- (1) Polynucleotide embodiments further include an isolated polynucleotide comprising a polynucleotide sequence having at least a 50, 60, 70, 80, 85, 90, 95, 97 or 100% identity to the reference sequence of SEQ ID NO:1, wherein said polynucleotide sequence may be identical to the reference sequence of SEQ ID NO:1 or may include up to a certain integer number of nucleotide alterations as compared to the reference sequence, wherein said alterations are selected from the group consisting of at least one nucleotide deletion, substitution, including transition and transversion, or insertion, and wherein said alterations may occur at the 5' or 3' terminal positions of the reference nucleotide sequence or anywhere between those terminal positions, interspersed either individually among the nucleotides in the reference sequence or in one or more contiguous groups within the reference sequence, and wherein said number of nucleotide alterations is determined by multiplying the total number of nucleotides in SEQ ID NO:1 by the integer defining the percent identity divided by 100 and then subtracting that product from said total number of nucleotides in SEQ ID NO:1, or:

$$n_n \leq x_n - (x_n \bullet y).$$

25

wherein n_n is the number of nucleotide alterations, x_n is the total number of nucleotides in SEQ ID NO:1, y is 0.50 for 50%, 0.60 for 60%, 0.70 for 70%, 0.80 for 80%, 0.85 for 85%, 0.90 for 90%, 0.95 for 95%, 0.97 for 97% or 1.00 for 100%, and \bullet is the symbol for the multiplication operator, and wherein any non-integer product of x_n and y is rounded

WO 00/43517

PCT/EP00/00425

down to the nearest integer prior to subtracting it from x_n . Alterations of a polynucleotide sequence encoding the polypeptide of SEQ ID NO:2 may create nonsense, missense or frameshift mutations in this coding sequence and thereby alter the polypeptide encoded by the polynucleotide following such alterations.

5

By way of example, a polynucleotide sequence of the present invention may be identical to the reference sequence of SEQ ID NO:1, that is it may be 100% identical, or it may include up to a certain integer number of nucleic acid alterations as compared to the reference sequence such that the percent identity is less than 100% identity. Such

10 alterations are selected from the group consisting of at least one nucleic acid deletion, substitution, including transition and transversion, or insertion, and wherein said alterations may occur at the 5' or 3' terminal positions of the reference polynucleotide sequence or anywhere between those terminal positions, interspersed either individually

15 within the reference sequence. The number of nucleic acid alterations for a given percent identity is determined by multiplying the total number of nucleic acids in SEQ ID NO:1 by the integer defining the percent identity divided by 100 and then subtracting that product from said total number of nucleic acids in SEQ ID NO:1, or:

$$20 \quad n_n \leq x_n - (x_n \cdot y),$$

wherein n_n is the number of nucleic acid alterations, x_n is the total number of nucleic acids in SEQ ID NO:1, y is, for instance 0.70 for 70%, 0.80 for 80%, 0.85 for 85% etc., \cdot is the symbol for the multiplication operator, and wherein any non-integer product of x_n

25 and y is rounded down to the nearest integer prior to subtracting it from x_n .

(2) Polypeptide embodiments further include an isolated polypeptide comprising a polypeptide having at least a 50, 60, 70, 80, 85, 90, 95, 97 or 100% identity to a polypeptide reference sequence of SEQ ID NO:2, wherein said polypeptide sequence may

WO 00/43517

PCT/EP00/00425

be identical to the reference sequence of SEQ ID NO:2 or may include up to a certain integer number of amino acid alterations as compared to the reference sequence, wherein said alterations are selected from the group consisting of at least one amino acid deletion, substitution, including conservative and non-conservative substitution, or insertion, and
5 wherein said alterations may occur at the amino- or carboxy-terminal positions of the reference polypeptide sequence or anywhere between those terminal positions, interspersed either individually among the amino acids in the reference sequence or in one or more contiguous groups within the reference sequence, and wherein said number of amino acid alterations is determined by multiplying the total number of amino acids in
10 SEQ ID NO:2 by the integer defining the percent identity divided by 100 and then subtracting that product from said total number of amino acids in SEQ ID NO:2, or:

$$n_a \leq x_a - (x_a \bullet y),$$

15 wherein n_a is the number of amino acid alterations, x_a is the total number of amino acids in SEQ ID NO:2, y is 0.50 for 50%, 0.60 for 60%, 0.70 for 70%, 0.80 for 80%, 0.85 for 85%, 0.90 for 90%, 0.95 for 95%, 0.97 for 97% or 1.00 for 100%, and \bullet is the symbol for the multiplication operator, and wherein any non-integer product of x_a and y is rounded down to the nearest integer prior to subtracting it from x_a .

20

By way of example, a polypeptide sequence of the present invention may be identical to the reference sequence of SEQ ID NO:2, that is it may be 100% identical, or it may include up to a certain integer number of amino acid alterations as compared to the reference sequence such that the percent identity is less than 100% identity. Such
25 alterations are selected from the group consisting of at least one amino acid deletion, substitution, including conservative and non-conservative substitution, or insertion, and wherein said alterations may occur at the amino- or carboxy-terminal positions of the reference polypeptide sequence or anywhere between those terminal positions, interspersed either individually among the amino acids in the reference sequence or in one

WO 00/43517

PCT/EP00/00425

or more contiguous groups within the reference sequence. The number of amino acid alterations for a given % identity is determined by multiplying the total number of amino acids in SEQ ID NO:2 by the integer defining the percent identity divided by 100 and then subtracting that product from said total number of amino acids in SEQ ID NO:2, or:

5

$$n_a \leq x_a - (x_a \bullet y),$$

wherein n_a is the number of amino acid alterations, x_a is the total number of amino acids in SEQ ID NO:2, y is, for instance 0.70 for 70%, 0.80 for 80%, 0.85 for 85% etc., and \bullet is the symbol for the multiplication operator, and wherein any non-integer product of x_a and y is rounded down to the nearest integer prior to subtracting it from x_a .

"Individual(s)," when used herein with reference to an organism, means a multicellular eukaryote, including, but not limited to a metazoan, a mammal, an ovid, a bovid, a simian, a primate, and a human.

15

"Isolated" means altered "by the hand of man" from its natural state, *i.e.*, if it occurs in nature, it has been changed or removed from its original environment, or both. For example, a polynucleotide or a polypeptide naturally present in a living organism is not "isolated," but the same polynucleotide or polypeptide separated from the coexisting materials of its natural state is "isolated", as the term is employed herein. Moreover, a polynucleotide or polypeptide that is introduced into an organism by transformation, genetic manipulation or by any other recombinant method is "isolated" even if it is still present in said organism, which organism may be living or non-living.

20

25

"Polynucleotide(s)" generally refers to any polyribonucleotide or polydeoxyribonucleotide, which may be unmodified RNA or DNA or modified RNA or DNA including single and double-stranded regions.

WO 00/43517

PCT/EP00/00425

“Variant” refers to a polynucleotide or polypeptide that differs from a reference polynucleotide or polypeptide, but retains essential properties. A typical variant of a polynucleotide differs in nucleotide sequence from another, reference polynucleotide. Changes in the nucleotide sequence of the variant may or may not alter the amino acid sequence of a polypeptide encoded by the reference polynucleotide. Nucleotide
5 changes may result in amino acid substitutions, additions, deletions, fusions and truncations in the polypeptide encoded by the reference sequence, as discussed below. A typical variant of a polypeptide differs in amino acid sequence from another, reference polypeptide. Generally, differences are limited so that the sequences of the
10 reference polypeptide and the variant are closely similar overall and, in many regions, identical. A variant and reference polypeptide may differ in amino acid sequence by one or more substitutions, additions, deletions in any combination. A substituted or inserted amino acid residue may or may not be one encoded by the genetic code. A
15 variant of a polynucleotide or polypeptide may be a naturally occurring such as an allelic variant, or it may be a variant that is not known to occur naturally. Non-naturally occurring variants of polynucleotides and polypeptides may be made by mutagenesis techniques or by direct synthesis.

“Disease(s)” means any disease caused by or related to infection by a bacteria, including ,
20 for example, upper respiratory tract infection, invasive bacterial diseases, such as bacteremia and meningitis.

WO 00/43517

PCT/EP00/00425

EXAMPLES:

The examples below are carried out using standard techniques, which are well known and routine to those of skill in the art, except where otherwise described in detail. The examples are illustrative, but do not limit the invention.

Example 1: Sequence of BASB055 in *N. meningitidis* serogroup B strain**ATCC13090.**

10 The sequence of the BASB055 gene of *N. meningitidis* strain ATCC13090 is shown in SEQ ID NO:1. The translation of the BASB055 polynucleotide sequence, showed in SEQ ID NO:2, is related by amino acid sequence homology to *Neisseria gonorrhoeae* MtrC protein. The BASB055 polypeptide contains a signal sequence characteristic of a lipoprotein.

15

Example 2: Construction of Plasmid to Express Recombinant BASB055**A: Cloning of BASB055.**

The *NdeI* and *XhoI* restriction sites engineered into the forward Lip11-Fm/p (5'- AGG CAG AGG CAT ATG GCT TTT TAT GCT TTT AAG GCG ATG CG -3') ([SEQ ID NO:3]) and reverse Lip11-RC/p (5'- AGG CAG AGG CTC GAG TTC CGC TTC AGA AGC AGT TTT GGC TTC -3') ([SEQ ID NO:4]) amplification primers, respectively, permitted directional cloning of a BASB055 PCR product into the low copy number *E. coli* expression plasmid pTLZ2 such that a BASB055 protein could be expressed as a fusion protein containing a (His)₆ affinity chromatography tag at the C-terminus. The BASB055 PCR product was purified from the amplification reaction using silica gel-based spin columns (QiaGen) according to the manufacturers instructions. To produce the required *NdeI* and *XhoI* termini necessary for cloning, purified PCR product was sequentially digested to completion with *NdeI* and *XhoI* restriction enzymes as recommended by the manufacturer (Life Technologies).

WO 00/43517

PCT/EP00/00425

Following the first restriction digestion, the PCR product was purified via spin column as above to remove salts and eluted in sterile water prior to the second enzyme digestion. The digested DNA fragment was again purified using silica gel-based spin columns prior to ligation with the pTLZ2 plasmid.

5

B: Production of Expression Vector.

To prepare the expression plasmid pTLZ2 for ligation, it was similarly digested to completion with both *Nde*I and *Xho*I and then treated with calf intestinal phosphatase (CIP, ~0.02 units / pmole of 5' end, Life Technologies) as directed by the manufacturer to prevent self-ligation. An approximately 5-fold molar excess of the digested fragment to the prepared vector was used to program the ligation reaction. A standard ~20 μ l ligation reaction (~16°C, ~16 hours), using methods well known in the art, was performed using T4 DNA ligase (~2.0 units / reaction, Life Technologies). An aliquot of the ligation (~5 μ l) was used to transform electro-competent BL21 DE3 cells according to methods well known in the art. Following a ~2-3 hour outgrowth period at 37°C in ~1.0 ml of LB broth, transformed cells were plated on LB agar plates containing ampicilline (100 μ g/ml). The antibiotic was included in the selection media to ensure that all transformed cells carried the pTLZ2 plasmid (ApR). Plates were incubated overnight at 37°C for ~16 hours. Individual ApR colonies were picked with sterile toothpicks and used to "patch" inoculate fresh LB ApR plates as well as a ~1.0 ml LB ApR broth culture. Both the patch plates and the broth culture were incubated overnight at 37°C in either a standard incubator (plates) or a shaking water bath.

A whole cell-based PCR analysis was employed to verify that transformants contained the BASB055 DNA insert. Here, the ~1.0 ml overnight LB Ap broth culture was transferred to a 1.5 ml polypropylene tube and the cells collected by centrifugation in a Beckman microcentrifuge (~3 min., room temperature, ~12,000 X g). The cell pellet was suspended in ~200 μ l of sterile water and a ~10 μ l aliquot used to program a ~50 μ l final volume PCR reaction containing both BASB055 forward and reverse amplification

WO 00/43517

PCT/EP00/00425

primers. Final concentrations of the PCR reaction components were essentially the same as those specified in example 2 except ~5.0 units of *Taq* polymerase was used. The initial 95°C denaturation step was increased to 3 minutes to ensure thermal disruption of the bacterial cells and liberation of plasmid DNA. An ABI Model 9700 thermal cycler and a 32 cycle, three-step thermal amplification profile, i.e. 95°C, 45sec; 55-58°C, 45sec, 72°C, 1min., were used to amplify the BASB055 PCR fragment from the lysed transformant samples. Following thermal amplification, a ~20µl aliquot of the reaction was analyzed by agarose gel electrophoresis (0.8 % agarose in a Tris-acetate-EDTA (TAE) buffer). DNA fragments were visualized by UV illumination after gel electrophoresis and ethidium bromide staining. A DNA molecular size standard (1 Kb ladder, Life Technologies) was electrophoresed in parallel with the test samples and was used to estimate the size of the PCR products. Transformants that produced the expected PCR product were identified as strains containing a BASB055 expression construct. Expression plasmid containing strains were then analyzed for the inducible expression of recombinant BASB055.

C: Expression Analysis of PCR-Positive Transformants.

For each PCR-positive transformant identified above, ~5.0 ml of LB broth containing ampicilline (100 µg/ml) was inoculated with cells from the patch plate and grown overnight at 37 °C with shaking (~250 rpm). An aliquot of the overnight seed culture (~1.0 ml) was inoculated into a 125 ml erlenmeyer flask containing ~25 ml of LB Ap broth and grown at 37 °C with shaking (~250 rpm) until the culture turbidity reached O.D.600 of ~0.5, i.e. mid-log phase (usually about 1.5 - 2.0 hours). At this time approximately half of the culture (~12.5 ml) was transferred to a second 125 ml flask and expression of recombinant BASB055 protein induced by the addition of IPTG (1.0 M stock prepared in sterile water, Sigma) to a final concentration of 1.0 mM. Incubation of both the IPTG-induced and non-induced cultures continued for an additional ~4 hours at 37 °C with shaking. Samples (~1.0 ml) of both induced and non-induced cultures were removed after the induction period and the cells collected by

WO 00/43517

PCT/EP00/00425

centrifugation in a microcentrifuge at room temperature for ~3 minutes. Individual cell pellets were suspended in ~50 μ l of sterile water, then mixed with an equal volume of 2X Laemmli SDS-PAGE sample buffer containing 2-mercaptoethanol, and placed in boiling water bath for ~3 min to denature protein. Equal volumes (~15 μ l) of both the crude IPTG-induced and the non-induced cell lysates were loaded onto duplicate 12% Tris/glycine polyacrylamide gel (1 mm thick Mini-gels, Novex). The induced and non-induced lysate samples were electrophoresed together with prestained molecular weight markers (SeeBlue, Novex) under conventional conditions using a standard SDS/Tris/glycine running buffer (BioRad). Following electrophoresis, one gel was stained with comassie brilliant blue R250 (BioRad) and then destained to visualize novel BASB055 IPTG-inducible protein(s). The second gel was electroblotted onto a PVDF membrane (0.45 micron pore size, Novex) for ~2 hrs at 4 °C using a BioRad Mini-Protein II blotting apparatus and Towbin's methanol (20 %) transfer buffer. Blocking of the membrane and antibody incubations were performed according to methods well known in the art. A monoclonal anti- (His)5 antibody, followed by a second rabbit anti-mouse antibody conjugated to HRP (QiaGen), was used to confirm the expression and identity of the BASB055 recombinant protein. Visualization of the anti-His antibody reactive pattern was achieved using either an ABT insoluble substrate or using Hyperfilm with the Amersham ECL chemiluminescence system.

20

Example 3: Analysis of Recombinant BASB055 lipidation status

To determine if the BASB055 recombinant protein is lipidated, radiolabelling experiments using ³H-glycerol and ³H-palmitic acid as lipid-specific incorporation tag have been initiated. Cultures of the BL21 DE3 *E. coli* strain containing the expression plasmid was grown on M9 minimal medium and pulse-labelled with either 50 μ Ci of ³H-glycerol or ³H-palmitic acid during the 3 hours of IPTG induction. Following a wash step to remove unincorporated isotope, whole cell lysates of radiolabelled cultures were run on gradient polyacrylamide gels (4-20%), fixed and then dried under vacuum. An autoradiograph was produced by exposing the dried gel to Hyperfilm (Amersham) at –

WO 00/43517

PCT/EP00/00425

70°C for ~ about 7 days. A visible band of the same size as the IPTG-inducible coomassie stainable protein was detected by both labelling. That ³H-label incorporated into the IPTG inducible protein support the conclusion that the BASB055 protein is lipidated to some extent in *E. coli*.

5

Example 4: Production of Recombinant BASB055Bacterial strain

- 10 A recombinant expression strain of *E. coli* BL21 DE3 containing a pTLZ2 plasmid encoding BASB055 from *N. meningitidis*. was used to produce cell mass for purification of recombinant protein. The expression strain was cultivated on LB agar plates containing 100µg/ml ampicilline ("Ap") to ensure plasmid maintenance. For cryopreservation at -80 °C, the strain was propagated in LB broth containing the same
- 15 concentration of antibiotic then mixed with an equal volume of LB broth containing 30% (w/v) glycerol.

Media

- 20 The fermentation medium used for the production of recombinant protein consisted of 2X YT broth (Difco) containing 100µg/ml Ap. Antifoam was added to medium for the fermentor at 0.25 ml/L (Antifoam 204, Sigma). To induce expression of the BASB055 recombinant protein, IPTG (Isopropyl β-D-Thiogalactopyranoside) was added to the fermentor (1 mM, final).

25 Fermentation

- A 500-ml erlenmeyer seed flask, containing 50ml working volume, was inoculated with 0.3 ml of rapidly thawed frozen culture, or several colonies from a selective agar plate culture, and incubated for approximately 12 hours at 37 ± 1°C on a shaking platform at 150rpm (Innova 2100, New Brunswick Scientific). This seed culture was then used to
- 30 inoculate a 5-L working volume fermentor containing 2X YT broth and both Ap

WO 00/43517

PCT/EP00/00425

antibiotic. The fermentor (Bioflo 3000, New Brunswick Scientific) was operated at 37 ± 1°C, 0.2 - 0.4 VVM air sparge, 250 rpm in Rushton impellers. The pH was not controlled in either the flask seed culture or the fermentor. During fermentation, the pH ranged 6.5 to 7.3 in the fermentor. IPTG (1.0 M stock, prepared in sterile water) was added to the fermentor when the culture reached mid-log of growth (~0.7 O.D.600 units). Cells were induced for 2 - 4 hours then harvested by centrifugation using either a 28RS Heraeus (Sepatech) or RC5C superspeed centrifuge (Sorvall Instruments). Cell paste was stored at -20 C until processed.

10 Purification

Imidazole and biotechnology grade or better reagents were all obtained from Ameresco Chemical, Solon, Ohio. Triton X-100 (t-Octylphenoxypolyethoxy-ethanol), Triton X-114, sodium phosphate, monobasic, and urea were reagent grade or better and obtained from Sigma Chemical Company, St. Louis, Missouri. Dulbecco's Phosphate Buffered Saline(1x PBS) was obtained from Quality Biological, Inc., Gaithersburg, Maryland. Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (10x PBS) was obtained from BioWhittaker, Walkersville, Maryland. Penta-His Antibody, BSA free was obtained from QiaGen, Valencia, California. Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat Anti-mouse IgG was obtained from Jackson Immuno Research, West Grove, Penn. All other chemicals were reagent grade or better.

Ni-chelating Sepharose Fast Flow resin was obtained from Pharmacia, Sweden. Precast Tris-Glycine 4-20% and 10-20% polyacrylamide gels, all running buffers and solutions, SeeBlue Pre-Stained Standards, MultiMark Multi-Colored Standards and PVDF transfer membranes were obtained from Novex, San Diego, California. SDS-PAGE Silver Stain kits were obtained from Daiichi Pure Chemicals Company Limited, Tokyo, Japan. Coomassie Stain Solution was obtained from Bio-Rad Laboratories, Hercules, California. Acrodisc® PF 0.2 m syringe filters were obtained from Pall Gelman Sciences, Ann Arbor, Michigan. GD/X 25mm disposable syringe filters were obtained

WO 00/43517

PCT/EP00/00425

from Whatman Inc., Clifton, New Jersey. Dialysis tubing 8,000 MWCO was obtained from BioDesign Inc. Od New York, Carmal New York. BCA Protein Assay Reagents and Snake Skin dialysis tubing 3,500 MWCO were obtained from Pierce Chemical Co., Rockford, Illinois.

5

Extraction Protocol

Cell paste was thawed at room temperature for 30 to 60 minutes. Five to six grams of material was weighed out into a 50-ml disposable centrifuge tube. Recombinant BASB055 antigen was purified by extraction of cell membranes with 1.0 % Triton X114, and allowing phase partitioning based on Triton X114 cloud point at 37°C. The Triton X114 phase was diluted with 50 mM Tris-HCl containing 10% glycerol, 5% ethylene glycol and 0.5% Triton X100. This was applied to nickel-chelating Sepharose Fast Flow. The protein is afterwards eluted with 200 mM imidazole to affinity purify the histidine-tagged protein and yielded greater than 90% pure protein.

15

Final Formulation

BASB055 was formulated by dialysis overnight against, three changes of 0.1 % Triton X-100 and 1x PBS, pH 7.4. The purified protein was characterized and used to produce antibodies as described below.

20

Biochemical Characterizations : SDS-PAGE and Western Blot Analysis

The recombinant purified protein was resolved on 4-20 % polyacrylamide gels and electrophoretically transferred to PVDF membranes at 100 V for 1 hour as previously described (Thebaine et al. 1979, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:4350-4354). The PVDF membranes were then pretreated with 25 ml of Dulbecco's phosphate buffered saline containing 5 % non-fat dry milk. All subsequent incubations were carried out using this pretreatment buffer.

WO 00/43517

PCT/EP00/00425

PVDF membranes were incubated with a dilution of anti-His tail antibodies for 1 hour at room temperature. PVDF membranes were then washed twice with wash buffer (20 mM Tris buffer, pH 7.5, containing 150 mM sodium chloride and 0.05 % Tween-20). PVDF membranes were incubated with 25 ml of a 1:5000 dilution of peroxidase-labeled species specific conjugate for 30 minutes at room temperature. PVDF membranes were then washed 4 times with wash buffer, and were developed with 3-amino-9-ethylcarbazole and urea peroxide as supplied by Zymed (San Francisco, CA) for 10 minutes each.

The results of an SDS-PAGE (Figure 1A) show a protein about 50 kDa purified to greater than 90 % and that is reactive to an anti-tetra (His) antibody by western blots (Figure 1B) of the SDS-PAGE.

Example 5 : Immunization of mice with recombinant BASB055

Partially purified recombinant BASB055 protein expressed in *E. coli* has been injected three times in Balb/C mice on days 0, 14 and 28 (10 animals/group). Animals were injected by the subcutaneous route with around 5 µg of antigen in two different formulations: either adsorbed on 100 µg AlPO₄ or formulated in SBAS2 emulsion (SB62 emulsion containing 5 µg MPL and 5µg QS21 per dose). A negative control group consisting of mice immunized with the SBAS2 emulsion only has also been added in the experiment. Mice were bled on days 28 (14 days Post II) and 35 (7 days Post III) in order to detect specific anti-BASB055 antibodies. Specific anti-BASB055 antibodies were measured by Elisa on partially purified BASB055 protein as well as on *E. coli* proteins. Antibody responses were also evaluated by western-blotting when tested against different *Neisseria meningitidis* B strains. Pooled sera (from 10 mice/group) from both formulations (on day 7 Post III only) were tested in these assays. Results illustrated in Figure 2 clearly indicate that the antibody response is quite good, while the anti-*E. coli* antibody response (Figure 3), which is clearly positive, is much lower than the specific BASB055 response (Figure 2). The AlPO₄ formulation induces

WO 00/43517

PCT/EP00/00425

the highest antibody levels. Western-blot illustrations in Figures 4 and 5 confirm that the BASB055 protein is well recognized at the expected MW of 50 kDa by immunized mice sera.

WO 00/43517

PCT/EP00/00425

Recognition of the BASB055 epitopes on different *Neisseria meningitidis* serogroup B strains by western-blotting

In this test, immunized mice sera (pooled) have been tested by western-blotting for
5 recognition of the BASB055 epitopes on seven different *Neisseria meningitidis* B
strains: H44/76 (B:15:P1.7, 16, lineage ET-5), M97 250687 (B:4:P1.15), BZ10
(B:2b:P1.2, lineage A4), BZ198 (B:NT*: -, lineage 3), EG328 (B:NT*, lineage ST-18),
NGP165 (B:2a:P1.2, ET 37 cluster) and the ATCC 13090 (B:15:P1.15) *Neisseria*
meningitidis B strains, as well as on partially purified recombinant BASB055 protein.
10 (* : NT : Not Typed).
Briefly, 10 µl (> 10⁸ cells/lane) of each sample treated with sample buffer (10 min at
95°C) are put into a SDS-PAGE gradient gel (Tris-glycine 4-20%, Novex, code
n°EC6028). Electrophoretic migration occurs at 125 volts for 90 min. (35mA/gel).
Afterwards, proteins are transferred to nitrocellulose sheet (0.45 µm, Bio-rad code n°
15 162-0114) at 100 volts for 1:30 hour using a Bio-rad Trans-blot system (code n°170-
3930). Filter was blocked with PBS - 0.05 % Tween 20 overnight at room temperature,
before incubation with the mice sera containing the anti-BASB055 antibodies from both
AIPO4 and SBAS2 formulations. These sera are diluted 100 times in PBS - 0.05 %
Tween 20, and incubated on the nitrocellulose sheet for two hours at room temperature
20 with gentle shaking. After three repeated washing steps in PBS - 0.05 % Tween 20 for 5
min., the nitrocellulose sheet is incubated at room temperature for 1 hour under gentle
shaking with the appropriate conjugate (biotinylated anti-mouse Ig antibodies from
sheep, Amersham code n°RPN1001) diluted at 1/500 in the same washing buffer. The
membrane is washed three times as previously, and incubated for 30 min with agitation
25 using the streptavidin-peroxidase complex (Amersham code n°1051) diluted at 1/1000
in the washing buffer. After the last three repeated washing steps, the revelation occurs
during the 20 min incubation time in a 50 ml solution containing 30 mg 4-chloro-1-
naphtol (Sigma), 10 ml methanol, 40 ml PBS, and 30 µl of H₂O₂. The staining is
stopped while washing the membrane several times in distilled water.

WO 00/43517

PCT/EP00/00425

Results illustrated in Figures 4 and 5 show that all strains tested present a clear reactivity against the major BASB055 band around 50 kDa, plus few other bands at lower MW, which are most probably related to the antigen, as they are not present on the *E. coli* preparation (Figure 5). These results suggest that the BASB055 protein is expressed in probably all *Neisseria meningitidis* B strains. In both Figures 4 and 5, the recombinant BASB055 protein is recognized by mice sera at the same MW. However, the lowest band recognized by mice sera (< 9 kDa) appears to be related to an *E. coli* contaminant, as demonstrated in the last lane (Figure 5) with *E. coli* extract.

WO 00/43517

PCT/EP00/00425

SEQUENCE INFORMATION

BASB055 Polynucleotide and Polypeptide Sequences

SEQ ID NO:1

5 *Neisseria meningitidis* BASB055 polynucleotide sequence from strain ATCC 13090
 ATGGCTTTTATGCTTTTAAGGCGATGCGTGGCGCGCGTGGCTGCCCGCTTGCATTG
 GTACTGTCTCTTGGGTAAGGCGGAGACGCGCGCAGGGCGGCGAGCCTGCTGCTCGG
 GARGCCCTTCCGCGCGTCTCGGTTGCTAACCGTCCATCCGCAAAACCGTCCGATTGACC
 GTCGAGTTCCGCGGCGCTTTSAAATCGCTGCGTACCGCGATGTCCGCGCCAAAGTCGGC
 10 GGCATCATCCAAAAGCGCTGTCCAGAAGGCGATTATGTCCGTGCCGSAACGCCGCTG
 TATCAGATCGACAGTTCACCTTATGAAAGCAATCTGGAAAGCGCGCGCAACTGGCA
 ACGGCTCAGGCAACGCTTGGCAAAGCGGATGCGGATTTGGCGGATACAAAGCCTTTGGTT
 GCCGCCGAAGCCGTGAGCGCGCAGGAAATCGATGCTGCGGTAAACGCGCAACCGTTCTGCC
 GAGGCGAGTGTCAAAGCAGCACAGGCGGCAATCAAATCTGCCGGCATTAACTGAAACCGT
 15 TCGCGCATTACCGCGCGATTTCGCGCTTTATCGGTGAGTCCAAAGTTTCGAAAGTACG
 CTGTTGAAATGCGGGGATACGACCGTGGCAACCATCCGCGCAACCAATCCGATGTAT
 GTGAACGTTACCCAGTCTCGATCCGAAAGTGAATGAAATGCGCGCTCAGATAGCCGAGGC
 AACTGTGCGGGCGGATGGTGTGATTGCGGTCCGATCAAATTTGACGACGCGCACAGTT
 TACCTGAAAAGGCGCGCTGCTGTTTGGCGATCCGCTCAACGAAATCGACCGGTCAG
 20 ATTACCTGCGCGCGCGCTACCGAAAGTACGAAATATCTGATGCCCGCTCTGATGTG
 CGGTGCTGATGGAACCAAGTGGCGGTGATTAACGCATTTGTTGTCGCGCAGCAGGCGGTA
 ACGCGGCTGCGAAAGTACCGGTGATGATTGTAATGCCAAGCGGTATGGAACCCCGC
 GAGGTAAAGTTGCGCAACGCGAGGTACGAATGGATTGTTACGTCGGGCTGAAAGGAC
 GGGACAAAGTGGTTGTGGAAGGCATCAGTATCGCGGTATAACGGGTGCGAAAAAGGTA
 25 ACGCCAAAGAAATGGGCTCGTCTGAAAACCAAGCGCGCGCTCAATCCGCGCTTCAG
 ACGCATCTGAAGCCAAAACCTGCTTCTGAAGCGGAATAA

SEQ ID NO:2

Neisseria meningitidis BASB055 polypeptide sequence deduced from the polynucleotide of
 30 SeQ ID NO:1
 MAFVAFKAMRAAALAAVALVLSGCGGDAAGQGGPAGREAPAPVVGVTVHPQTVALT
 VELPGRLESLELTADVRAQVGGIQRKLPQEGSVVRAGQPLYQIDSSITYEANLESARAQLA
 TRQATLAKADADLARVYKPLVAEAVSRQEYDAAVTAKRSAEAGVKAQAALIKSAGINLNR
 35 SRIADPISGFIGQSKVSEGTLLNAGDPTTFLATIRQTNEMVYVNTQSASEVMKLRRLRQIAG
 KLLAADGVIAVGIKDDGTVVBEKGRLLFADPVVNESTGQITLRAAVPNDQNLMPGLNY
 RVLMDQVAVDNAFVFPQAVTRGAKDVTMIVNAQGGMEPREVTVAQQQGTNWIVTSLGLD
 GDKVVVEGISIAGITGAKRVTPEWASSENQAAPQSGVQTASEAKTASEAE

40 SEQ ID NO:3
 AGG CAG AGG CAT ATG GCT TTT TAT GCT TTT AAG GCG ATG CG

SEQ ID NO:4
 45 AGG CAG AGG CTC GAG TTC CGC TTC AGA AGC AGT TTT GGC TTC

WO 00/43517

PCT/EP00/00425

Deposited materials

A deposit containing a *Neisseria meningitidis* Serogroup B strain has been deposited with the American Type Culture Collection (herein "ATCC") on June 22, 1997 and assigned deposit number 13090. The deposit was described as *Neisseria meningitidis* (Albrecht and Ghon) and is a freeze-dried, 1.5-2.9 kb insert library constructed from *N. meningitidis* isolate. The deposit is described in Int. Bull. Bacteriol. Nomencl. Taxon. 8: 1-15 (1958).

The *Neisseria meningitidis* strain deposit is referred to herein as "the deposited strain" or as "the DNA of the deposited strain."

10

The deposited strain contains the full length BASB055 gene. The sequence of the polynucleotides contained in the deposited strain, as well as the amino acid sequence of any polypeptide encoded thereby, are controlling in the event of any conflict with any description of sequences herein.

15

The deposit of the deposited strain has been made under the terms of the Budapest Treaty on the International Recognition of the Deposit of Micro-organisms for Purposes of Patent Procedure. The strain will be irrevocably and without restriction or condition released to the public upon the issuance of a patent. The deposited strain is provided merely as convenience to those of skill in the art and is not an admission that a deposit is required for enablement, such as that required under 35 U.S.C. §112.

20

WO 00/43517

PCT/EP00/00425

INDICATIONS RELATING TO DEPOSITED MICROORGANISM OR OTHER BIOLOGICAL MATERIAL

(PCT Rule 13bis)

| | |
|--|--|
| A. The indications made below relate to the deposited microorganism or other biological material referred to in the description on page <u>64</u> , line <u>2-21</u> | |
| B. IDENTIFICATION OF DEPOSIT Further deposits are identified on an additional sheet <input type="checkbox"/> | |
| Name of depositary institution AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION | |
| Address of depositary institution (including postal code and country) 10801 UNIVERSITY BLVD, MANASSAS, VIRGINIA 20110-2209, UNITED STATES OF AMERICA | |
| Date of deposit 22 June 1997 (22.06.97) | Accession Number 13090 |
| C. ADDITIONAL INDICATIONS (leave blank if not applicable) This information is continued on an additional sheet <input type="checkbox"/> | |
| In respect of those designations where a European Patent is sought, a sample of the deposited microorganism will be made available until the publication of the mention of the grant of the European Patent or until the date on which the application has been refused or withdrawn, only by issue of such a sample to an expert nominated by the person requesting the sample. | |
| D. DESIGNATED STATES FOR WHICH INDICATIONS ARE MADE (if the indications are not for all designated States) | |
| | |
| E. SEPARATE FURNISHING OF INDICATIONS (leave blank if not applicable) | |
| The indications listed below will be submitted to the International Bureau later (specify the general nature of the indications e.g. "Accession Number of Deposit") | |
| | |
| For receiving Office use only | For International Bureau use only |
| <input type="checkbox"/> This sheet was received with the international application | <input type="checkbox"/> This sheet was received by the International Bureau on: |
| Authorized officer | Authorized officer |

WO 00/43517

PCT/EP00/00425

CLAIMS

1. An isolated polypeptide comprising an amino acid sequence which has at least 85% identity to the amino acid sequence of: SEQ ID NO:2.
5
2. An isolated polypeptide as claimed in claim 1 in which the amino acid sequence has at least 95% identity to the amino acid of: SEQ ID NO:2.
3. The polypeptide as claimed in claim 1 comprising the amino acid of: SEQ ID NO: 2.
10
4. An isolated polypeptide of SEQ ID NO:2.
5. An immunogenic fragment of the polypeptide as claimed in any one of claims 1 to 4 in which the immunogenic activity of said immunogenic fragment is substantially the same as the polypeptide of SEQ ID NO:2.
15
6. An isolated polynucleotide comprising a nucleotide sequence encoding the polypeptide of SEQ ID NO:2.
- 20 7. An isolated polynucleotide comprising the polynucleotide of SEQ ID NO:1.
8. An isolated polynucleotide comprising a nucleotide sequence encoding the polypeptide of SEQ ID NO:2, obtainable by screening an appropriate library under stringent hybridization conditions with a labeled probe having the sequence of SEQ ID NO:1 or a
25 fragment thereof.
9. An expression vector or a recombinant live microorganism comprising an isolated polynucleotide according to any one of claims 6 - 8.

WO 00/43517

PCT/EP00/00425

10. A process for expressing a polynucleotide of any one of claims 6 - 8 comprising transforming a host cell with the expression vector comprising at least one of said polynucleotides and culturing said host cell under conditions sufficient for expression of any one of said polynucleotides.
- 5
11. A vaccine composition comprising an effective amount of the polypeptide of any one of claims 1 to 5 and a pharmaceutically acceptable carrier.
- 10
12. A vaccine composition comprising an effective amount of the polynucleotide of any one of claims 6 to 8 and a pharmaceutically acceptable carrier.
13. The vaccine composition according to either one of claims 11 or 12 wherein said composition comprises at least one other *Neisseria meningitidis* antigen.
- 15
14. An antibody immunospecific for the polypeptide or immunological fragment as claimed in any one of claims 1 to 5.
15. A method of diagnosing a *Neisseria meningitidis* infection, comprising identifying a polypeptide as claimed in any one of claims 1 - 5, or an antibody that is immunospecific for said polypeptide, present within a biological sample from an animal suspected of having such an infection.
- 20
16. Use of a composition comprising an immunologically effective amount of a polypeptide as claimed in any one of claims 1 - 5 in the preparation of a medicament for use in generating an immune response in an animal.
- 25

WO 00/43517

PCT/EP00/00425

17. Use of a composition comprising an immunologically effective amount of a polynucleotide as claimed in any one of claims 6 - 8 in the preparation of a medicament for use in generating an immune response in an animal.
- 5 18. A therapeutic composition useful in treating humans with *Neisseria meningitidis* disease comprising at least one antibody directed against the polypeptide of claims 1 - 5 and a suitable pharmaceutical carrier.

Figure 1: Analysis of recombinant, purified BASB055. A. Coomassie stained SDS-polyacrylamide gel of purified BASB055. B. Western blot of purified BASB055 with anti histidine immune reagent.

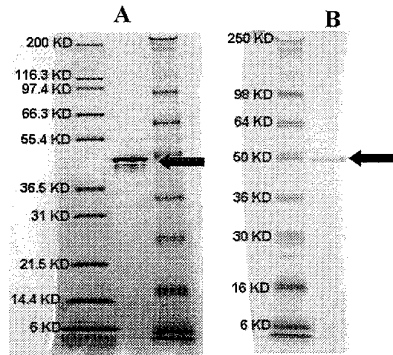


Figure 2 : Anti-BASB055 antibodies induced in Balb/C mice

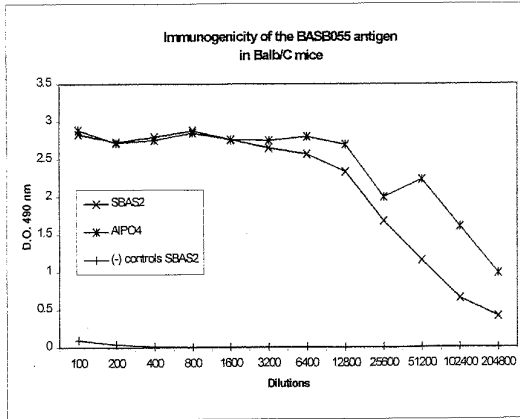


Figure 3 : Anti-*E. coli* response induced in BASB055 immunized mice sera

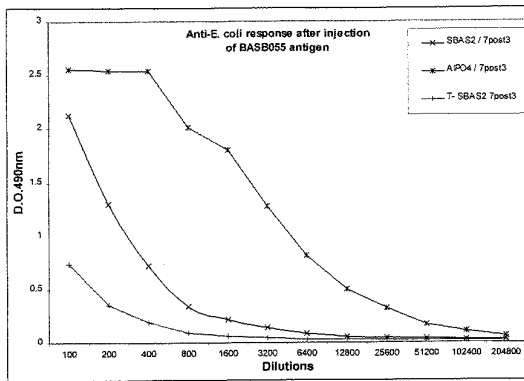


Figure 4 : Recognition of the BASB055 protein on several *Neisseria meningitidis* strains with BASB055 immunized mice sera.

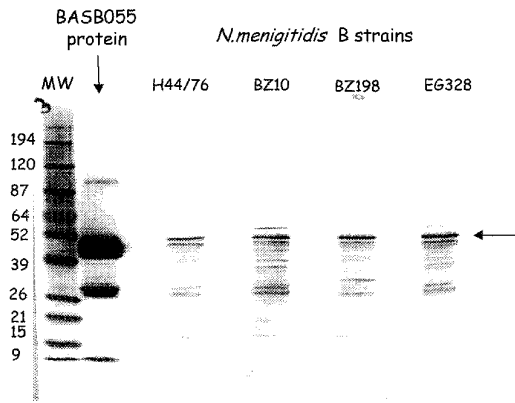
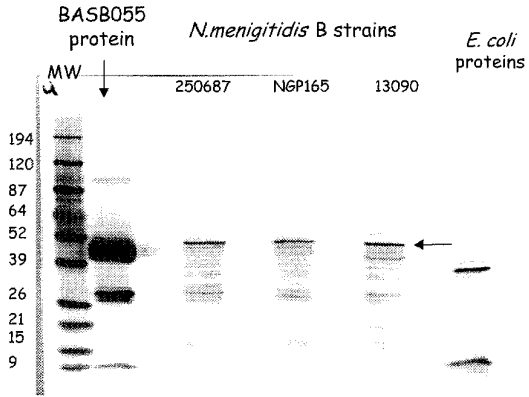


Figure 5 : Recognition of the BASB055 protein on several *Neisseria meningitidis* strains with BASB055 immunized mice sera.



WO 00/43517

PCT/EP00/00425

SEQUENCE LISTING

<110> SmithKline Beecham Biologicals S.A.

<120> Novel compounds

<130> BM45353

<160> 4

<170> FastSEQ for Windows Version 3.0

<210> 1

<211> 1239

<212> DNA

<213> Neisseria meningitidis

<400> 1

```

atgacctttt atgcttttaa ggcgatgcgt gggccgcgt tggctgccgc cgttcattg      60
gtactctgt cttgcggtaa agccggagac gggccgcagg ggggcagcc tgcctggtcg      120
gaagcccccg cgcccgtcgt cgggtctgta accgtccatc gcaaacctt cgcattgacc      180
gtcagttgc cggggcgttt ggaatgcctg cgtaccgcct atgtccgcgc ccaagtcggc      240
ggcatcatcc aaaaacgcct gttccaagaa ggcagttatg tccytgccgg acagccgctg      300
tatcagatcg acagttccac ttatgaagca aatctggaaa ggcgcgcgc gcaactggca      360
acggctcagg caacgcctgc caaagcggat gcggatttgg cgcgatacaa gcctttggtt      420
gcccgcgaag ccgtcagccg gcaagaaatac gatgctgcgg taacggcgaa acgtttctgc      480
gaggcaggtg tcaaagcagc acagggcgca atcaaatctg ccggcattaa tctgaaccgt      540
tcgcgcatta ccgcgccgat ttcggccttt atcggctcag ccaaagtttc cgaagtaacg      600
ctgttgaatg cgggcgatac gaccygtctg gcaaccatcc gccaaaccaa tccgatgtat      660
gtgaacgtta cccagtctgc atccgaagtg atgaaattgc gccctcagat agccgaaaggc      720
aaactgctgg cggcggatgg tctgattgcy gtcggcatca aatttgaoga cggcacagtt      780
taccctgaaa aaggccgcct gctgtttgcc gatccggtcg tcaacgaatc gaccggtcag      840
attaccctgc gcgcgccgt accgaacgat cagaatatcc tgatgcccg tctgtatgtg      900
cgcgtcctga tggaccaagt ggocgtggat aacgcatttg ttgtgccgca gcaggcggta      960
acgcgcggtg cgaagatac cgtgatgatt gtgaatgcc aaggcggat ggaaccccg      1020
gaggtaacgg ttgcgcaaca gcaaggtacg aattggattg ttacgtcggg tctgaaggac      1080
ggggacaagg tggttggga aggcacatcgt atcccggtg taacgggtgc gaaaaaggtg      1140
acgccccaaa aatggggctc gctcgaaac caagccgcgc gcctcaatc cggcgttcag      1200

```

WO 00/43517

PCT/EP00/00425

acggcatctg aagccaaaac tgcttctgaa gcggaataa

1239

<210> 2
 <211> 412
 <212> PRT
 <213> Neisseria meningitidis

<400> 2
 Met Ala Phe Tyr Ala Phe Lys Ala Met Arg Ala Ala Ala Leu Ala Ala
 1 5 10 15
 Ala Val Ala Leu Val Leu Ser Ser Cys Gly Lys Gly Gly Asp Ala Ala
 20 25 30
 Gln Gly Gly Gln Pro Ala Gly Arg Glu Ala Pro Ala Pro Val Val Gly
 35 40 45
 Val Val Thr Val His Pro Gln Thr Val Ala Leu Thr Val Glu Leu Pro
 50 55 60
 Gly Arg Leu Glu Ser Leu Arg Thr Ala Asp Val Arg Ala Gln Val Gly
 65 70 75 80
 Gly Ile Ile Gln Lys Arg Leu Phe Gln Glu Gly Ser Tyr Val Arg Ala
 85 90 95
 Gly Gln Pro Leu Tyr Gln Ile Asp Ser Ser Thr Tyr Glu Ala Asn Leu
 100 105 110
 Glu Ser Ala Arg Ala Gln Leu Ala Thr Ala Gln Ala Thr Leu Ala Lys
 115 120 125
 Ala Asp Ala Asp Leu Ala Arg Tyr Lys Pro Leu Val Ala Ala Glu Ala
 130 135 140
 Val Ser Arg Gln Glu Tyr Asp Ala Ala Val Thr Ala Lys Arg Ser Ala
 145 150 155 160
 Glu Ala Gly Val Lys Ala Ala Gln Ala Ala Ile Lys Ser Ala Gly Ile
 165 170 175
 Asn Leu Asn Arg Ser Arg Ile Thr Ala Pro Ile Ser Gly Phe Ile Gly
 180 185 190
 Gln Ser Lys Val Ser Glu Gly Thr Leu Leu Asn Ala Gly Asp Thr Thr
 195 200 205
 Val Leu Ala Thr Ile Arg Gln Thr Asn Pro Met Tyr Val Asn Val Thr
 210 215 220
 Gln Ser Ala Ser Glu Val Met Lys Leu Arg Arg Gln Ile Ala Glu Gly
 225 230 235 240
 Lys Leu Leu Ala Ala Asp Gly Val Ile Ala Val Gly Ile Lys Phe Asp
 245 250 255

WO 00/43517

PCT/EP00/00425

Asp Gly Thr Val Tyr Pro Glu Lys Gly Arg Leu Leu Phe Ala Asp Pro
260 265 270
Val Val Asn Glu Ser Thr Gly Gln Ile Thr Leu Arg Ala Ala Val Pro
275 280 285
Asn Asp Gln Asn Ile Leu Met Pro Gly Leu Tyr Val Arg Val Leu Met
290 295 300
Asp Gln Val Ala Val Asp Asn Ala Phe Val Val Pro Gln Gln Ala Val
305 310 315 320
Thr Arg Gly Ala Lys Asp Thr Val Met Ile Val Asn Ala Gln Gly Gly
325 330 335
Met Glu Pro Arg Glu Val Thr Val Ala Gln Gln Gln Gly Thr Asn Trp
340 345 350
Ile Val Thr Ser Gly Leu Lys Asp Gly Asp Lys Val Val Val Glu Gly
355 360 365
Ile Ser Ile Ala Gly Ile Thr Gly Ala Lys Lys Val Thr Pro Lys Glu
370 375 380
Trp Ala Ser Ser Glu Asn Gln Ala Ala Ala Pro Gln Ser Gly Val Gln
385 390 395 400
Thr Ala Ser Glu Ala Lys Thr Ala Ser Glu Ala Glu
405 410

<210> 3
<211> 41
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 3
aggcagaggc atatggcttt ttatgctttt aaggogatgc g

41

<210> 4
<211> 42
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

WO 00/43517

PCT/EP00/00425

<400> 4
aggcagaggc tcgagttcog cttcagaagc agttttgget tc

42

【国際調査報告】

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT | | International Application No. PCT/EP 00/00425 |
|--|---|--|
| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N15/31 C07K14/22 C07K16/12 G01N33/68 A61K39/095 A61K39/40 A61K31/70 | | |
| 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 | | |
| 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) | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | W. PAN ET AL: "Regulation of the permeability of the gonococcal cell envelope by the mtr system" MOLECULAR MICROBIOLOGY, vol. 11, no. 4, 1994, pages 769-775, XP000907174 the whole document | 1,2 |
| A | especially fig.2 page 771 | 3-10 |
| X | D.C. MARCHION ET AL: "Generation of antiserum to specific epitopes" MOLECULAR BIOTECHNOLOGY, vol. 6, 1996, pages 231-240, XP000910676 the whole document | 1, 2, 5, 11, 14, 16-18 |
| | -/- | |
| <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 19 May 2000 | | Date of mailing of the international search report 06/06/2000 |
| Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016 | | Authorized officer Le Cornec, N |

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No
 PCT/EP 00/00425

| C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|--|---|-----------------------|
| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | K.E. HAGMAN ET AL: "Resistance of <i>Neisseria gonorrhoeae</i> to antimicrobial hydrophobic agents is modulated by the mtrRCD E efflux system" MICROBIOLOGY, vol. 141, no. part3, March 1995 (1995-03), pages 611-622, XP000907176 the whole document | 1,2 |
| A | --- | 3-10 |
| A | J.R. FARIBORZ ET AL: "Rifampin resistance in <i>Neisseria meningitidis</i> due to alterations in membrane permeability" ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, vol. 40, no. 3, March 1996 (1996-03), pages 646-651, XP000907188 page 647, right-hand column -page 648, left-hand column; figures 1,4 | 1-10 |
| A | C.E. ROUQUETTE ET AL: " <i>Neisseria meningitidis</i> contains IS elements within the mtr operon" ABSTRACTS OF THE GENERAL MEETING OF THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY., vol. 97, 4 - 8 May 1997, page 60 XP002138146 AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, WASHINGTON, US ISSN: 0067-2777 abstract B-181 | 1-10 |
| A | EP 0 467 714 A (MERCK & CO INC) 22 January 1992 (1992-01-22) the whole document | 1-18 |
| A | EP 0 301 992 A (NACIONAL DE BIOPREPARADOS CENT) 1 February 1989 (1989-02-01) abstract; claims | 1-18 |
| A | WO 98 02547 A (INST NAT SANTE RECH MED ;MAX PLANCK GESELLSCHAFT (DE); SMITHKLINE) 22 January 1998 (1998-01-22) abstract; claims | 1-18 |

1

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/EP 00/00425

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date | | |
|--|------------------|-------------------------|------------------|--------------|------------|
| EP 0467714 A | 22-01-1992 | AU 8114091 A | 23-01-1992 | | |
| | | CA 2047043 A | 20-01-1992 | | |
| | | FI 913473 A | 20-01-1992 | | |
| | | JP 6056690 A | 01-03-1994 | | |
| | | MX 9100272 A | 28-02-1992 | | |
| | | NO 912822 A | 20-01-1992 | | |
| | | PT 98381 A | 29-05-1992 | | |
| | | ZA 9105629 A | 25-03-1992 | | |
| | | AU 8113691 A | 23-01-1992 | | |
| | | CA 2050635 A | 20-01-1992 | | |
| | | FI 913475 A | 20-01-1992 | | |
| | | JP 6016569 A | 25-01-1994 | | |
| | | JP 6055679 B | 27-07-1994 | | |
| | | NO 912823 A | 20-01-1992 | | |
| | | NZ 238974 A | 23-12-1992 | | |
| | | PT 98382 A | 29-05-1992 | | |
| | | ZA 9105627 A | 25-03-1992 | | |
| | | AU 8113791 A | 23-01-1992 | | |
| | | CA 2047030 A | 20-01-1992 | | |
| | | FI 913474 A | 20-01-1992 | | |
| | | JP 6041197 A | 15-02-1994 | | |
| | | MX 9100274 A | 28-02-1992 | | |
| | | NO 912824 A | 20-01-1992 | | |
| | | PT 98383 A | 30-06-1992 | | |
| | | ZA 9105628 A | 25-03-1992 | | |
| | | EP 0301992 A | 01-02-1989 | AT 122893 T | 15-06-1995 |
| | | | | AU 615461 B | 03-10-1991 |
| | | | | AU 2031288 A | 25-05-1989 |
| | | | | AU 5319794 A | 24-03-1994 |
| | | | | AU 706213 B | 10-06-1999 |
| | | | | AU 7422696 A | 20-02-1997 |
| | | | | AU 8134991 A | 31-10-1991 |
| DE 3853854 D | 29-06-1995 | | | | |
| DE 3853854 T | 08-02-1996 | | | | |
| ES 2074445 T | 16-09-1995 | | | | |
| GR 3017218 T | 30-11-1995 | | | | |
| IN 167607 A | 24-11-1990 | | | | |
| JP 1125328 A | 17-05-1989 | | | | |
| RU 2023448 C | 30-11-1994 | | | | |
| US 5597572 A | 28-01-1997 | | | | |
| US 5747653 A | 05-05-1998 | | | | |
| WO 9802547 A | 22-01-1998 | FR 2751000 A | 16-01-1998 | | |
| | | AU 3697797 A | 09-02-1998 | | |
| | | EP 0951552 A | 27-10-1999 | | |

フロントページの続き

| (51)Int.Cl. ⁷ | F I | テーマコード(参考) |
|--------------------------|----------------|------------|
| A 6 1 P 31/04 | A 6 1 P 31/04 | 4 C 0 8 6 |
| C 0 7 K 14/22 | C 0 7 K 14/22 | 4 H 0 4 5 |
| C 0 7 K 16/12 | C 0 7 K 16/12 | |
| C 1 2 N 1/15 | C 1 2 N 1/15 | |
| C 1 2 N 1/19 | C 1 2 N 1/19 | |
| C 1 2 N 1/21 | C 1 2 N 1/21 | |
| C 1 2 N 5/10 | G 0 1 N 33/53 | N |
| G 0 1 N 33/53 | G 0 1 N 33/569 | F |
| G 0 1 N 33/569 | C 1 2 N 5/00 | A |
| // C 1 2 P 21/02 | A 6 1 K 37/02 | |
| (C 1 2 N 1/21 | C 1 2 P 21/02 | C |
| C 1 2 R 1:36) | C 1 2 N 1/21 | |
| | C 1 2 R 1:36 | |

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

(74)代理人 100081330

弁理士 樋口 外治

(72)発明者 トンナール, ジョーエル

ベルギー国, ベ - 1 3 3 0, リクサンサール リュ ドゥ ランスティテュ 8 9

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA13 BA50 CA04 DA06 EA04 GA11 HA12 HA15
 4B064 AG27 AG31 CA02 CA19 CC24 CE12 DA01 DA15
 4B065 AA01Y AA26X AB01 AC14 BA02 BA25 CA24 CA45 CA46
 4C084 AA02 AA07 BA01 BA02 BA22 CA04 NA14 ZB35
 4C085 AA03 AA13 AA14 BA16 CC07 EE01 GG01 GG08 GG10
 4C086 AA01 AA03 EA16 MA01 MA04 NA14 ZB35
 4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 CA11 DA76 DA86 EA29 EA31
 EA52 FA74 GA26

| | | | |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译) | BASB 055多核苷酸和多肽来自脑膜炎奈瑟氏球菌，其用途 | | |
| 公开(公告)号 | JP2004537955A | 公开(公告)日 | 2004-12-24 |
| 申请号 | JP2000594925 | 申请日 | 2000-01-19 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 葛兰素史密丝克莱恩生物有限公司 | | |
| 申请(专利权)人(译) | 葛兰素史克生物制品兴业ANONYME | | |
| [标]发明人 | トンナールジョーエル | | |
| 发明人 | トンナール,ジョーエル | | |
| IPC分类号 | G01N33/53 A61K31/7088 A61K38/00 A61K39/00 A61K39/095 A61K39/395 A61P31/04 C07K14/22 C07K16/12 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12N15/31 C12P21/02 C12R1/36 G01N33/569 | | |
| CPC分类号 | A61K39/00 A61K2039/505 A61P31/04 C07K14/22 | | |
| FI分类号 | C12N15/00.ZNA.A A61K31/7088 A61K39/095 A61K39/395.D A61K39/395.R A61P31/04 C07K14/22 C07K16/12 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 G01N33/53.N G01N33/569.F C12N5/00.A A61K37/02 C12P21/02.C C12R1/36 | | |
| F-TERM分类号 | 4B024/AA01 4B024/AA13 4B024/BA50 4B024/CA04 4B024/DA06 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA12 4B024/HA15 4B064/AG27 4B064/AG31 4B064/CA02 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/CE12 4B064/DA01 4B064/DA15 4B065/AA01Y 4B065/AA26X 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/BA25 4B065/CA24 4B065/CA45 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA07 4C084/BA01 4C084/BA02 4C084/BA22 4C084/CA04 4C084/NA14 4C084/ZB35 4C085/AA03 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BA16 4C085/CC07 4C085/EE01 4C085/GG01 4C085/GG08 4C085/GG10 4C086/AA01 4C086/AA03 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZB35 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA11 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA29 4H045/EA31 4H045/EA52 4H045/FA74 4H045/GA26 | | |
| 代理人(译) | 石田 敬 中村弘 西山雅也 | | |
| 优先权 | 1999001462 1999-01-22 GB 1999002069 1999-01-29 GB | | |
| 外部链接 | Espacenet | | |

摘要(译)

本发明提供了BASB055多肽和编码BASB055多肽的多核苷酸，以及通过重组技术生产这种多肽的方法。还提供了诊断，预防和治疗用途。

| (51) Int. Cl. 7 | F I | テーマコード (参考) |
|------------------------|----------------------------------|-------------|
| C 1 2 N 15/09 | C 1 2 N 15/00 Z N A A | 4 B O 2 4 |
| A 6 1 K 31/7088 | A 6 1 K 31/7088 | 4 B O 6 4 |
| A 6 1 K 38/00 | A 6 1 K 39/095 | 4 B O 6 5 |
| A 6 1 K 39/095 | A 6 1 K 39/395 D | 4 C O 8 4 |
| A 6 1 K 39/395 | A 6 1 K 39/395 R | 4 C O 8 5 |
| | 審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 125 頁) 最終頁1 | |

| | | | |
|---------------|------------------------------|----------|--------------------|
| (21) 出願番号 | 特願2000-594925 (P2000-594925) | (71) 出願人 | 397062700 |
| (86) (22) 出願日 | 平成12年1月19日 (2000. 1. 19) | | グラクソスミスクライン バイオロジ |
| (85) 翻訳文提出日 | 平成13年7月19日 (2001. 7. 19) | | ズ ソシエテ アノニム |
| (86) 国際出願番号 | PCT/EP2000/000425 | | ベルギー国 リキセンザール ビー |
| (87) 国際公開番号 | W02000/043517 | | 3 O ルー ナ ランスティテュート |
| (87) 国際公開日 | 平成12年7月27日 (2000. 7. 27) | | 9 |
| (31) 優先権主張番号 | 9901462.3 | (74) 代理人 | 100077517 |
| (32) 優先日 | 平成11年1月22日 (1999. 1. 22) | | 弁理士 石田 敬 |
| (33) 優先権主張国 | 英国 (GB) | (74) 代理人 | 100082624 |
| (31) 優先権主張番号 | 9902069.5 | | 弁理士 藤田 準一 |
| (32) 優先日 | 平成11年1月29日 (1999. 1. 29) | (74) 代理人 | 100108903 |
| (33) 優先権主張国 | 英国 (GB) | | 弁理士 中村 和広 |
| | | (74) 代理人 | 100082898 |
| | | | 弁理士 西山 聖也 |