

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6236086号
(P6236086)

(45) 発行日 平成29年11月22日(2017.11.22)

(24) 登録日 平成29年11月2日(2017.11.2)

(51) Int.Cl.	F 1
A 6 1 K 39/09	(2006.01) A 6 1 K 39/09
A 6 1 K 39/07	(2006.01) A 6 1 K 39/07
A 6 1 P 31/04	(2006.01) A 6 1 P 31/04
A 6 1 K 39/08	(2006.01) A 6 1 K 39/08
C 0 7 K 19/00	(2006.01) C 0 7 K 19/00 Z N A

請求項の数 21 (全 106 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2015-537216 (P2015-537216)
(86) (22) 出願日	平成25年10月15日 (2013.10.15)
(65) 公表番号	特表2015-536312 (P2015-536312A)
(43) 公表日	平成27年12月21日 (2015.12.21)
(86) 國際出願番号	PCT/EP2013/071472
(87) 國際公開番号	W02014/060383
(87) 國際公開日	平成26年4月24日 (2014.4.24)
審査請求日	平成28年9月16日 (2016.9.16)
(31) 優先権主張番号	1218660.7
(32) 優先日	平成24年10月17日 (2012.10.17)
(33) 優先権主張国	英國 (GB)
(31) 優先権主張番号	61/714,942
(32) 優先日	平成24年10月17日 (2012.10.17)
(33) 優先権主張国	米国 (US)

(73) 特許権者	305060279 グラクソsmithkline バイオロジカル ズ ソシエテ アノニム ベルギー ベー-1330 リクセンサー ル リュ ドランスティチュ 89
(74) 代理人	100091096 弁理士 平木 祐輔
(74) 代理人	100118773 弁理士 藤田 節
(74) 代理人	100122389 弁理士 新井 栄一
(74) 代理人	100111741 弁理士 田中 夏夫
(74) 代理人	100169971 弁理士 菊田 尚子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 1種以上の肺炎球菌莢膜糖類コンジュゲートとインフルエンザ菌由来のタンパク質Eおよび/またはP i l Aを含むタンパク質成分とを含む免疫原性組成物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

1種以上の肺炎球菌莢膜糖類コンジュゲートとタンパク質成分とを含み、そのタンパク質成分がインフルエンザ菌由来のタンパク質Eもしくはタンパク質Eの免疫原性断片およびP i l AもしくはP i l Aの免疫原性断片を含む、免疫原性組成物。

【請求項2】

1種以上の肺炎球菌莢膜糖類コンジュゲートとタンパク質成分とを含み、そのタンパク質成分がインフルエンザ菌由来のタンパク質EおよびP i l Aを含む、免疫原性組成物。

【請求項3】

タンパク質Eまたはタンパク質Eの免疫原性断片が、配列番号4とその全長にわたって少なくとも75%、77%、80%、85%、90%、95%、97%、99%または100%の同一性を有する配列を含むポリペプチドである、請求項1または2に記載の免疫原性組成物。

【請求項4】

タンパク質Eの免疫原性断片が、配列番号4の少なくとも7、10、15、20、25、30、50、75または100個の連続するアミノ酸の免疫原性断片を含むポリペプチドである、請求項1~3のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項5】

P i l AまたはP i l Aの免疫原性断片が、配列番号58とその全長にわたって少なくとも80%、85%、90%、95%、97%または100%の同一性を有する配列を含

10

20

むポリペプチドである、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 6】

P i l A または P i l A の免疫原性断片が、配列番号 5 8 の少なくとも 7、10、15、20、25、30 または 50 個の連続するアミノ酸の免疫原性断片を含むポリペプチドである、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 7】

P i l A または P i l A の免疫原性断片と共有結合により連結されて融合タンパク質を形成するタンパク質 E またはタンパク質 E の免疫原性断片を含む、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 8】

前記融合タンパク質が 10

式 I :

(X)_m - (R 1)_n - A - (Y)_o - B - (Z)_p (式 I)

を有し、式中、

X は、シグナルペプチドまたは M H H H H H H (配列番号 2) であり ;

m は、0 であり ;

R 1 は、アミノ酸であり ;

n は、0 であり ;

A は、タンパク質 E の免疫原性断片であり、ここでタンパク質 E が配列番号 4 ~ 配列番号 5 7 のいずれか 1 つから選択される ;

Y は、G G であり ;

o は、0 または 1 であり ;

B は、P i l A の免疫原性断片であり、ここで P i l A が配列番号 5 8 ~ 配列番号 1 2 1 のいずれか 1 つから選択される ;

Z は、G G H H H H H H (配列番号 3) であり ; かつ

p は、0 または 1 である、

請求項 7 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 9】

前記融合タンパク質が、配列番号 1 9 4 である、請求項 7 または 8 に記載の免疫原性組成物。30

【請求項 10】

前記融合タンパク質が、配列番号 1 3 6、配列番号 1 3 8、配列番号 1 4 0、配列番号 1 4 2、配列番号 1 4 4、配列番号 1 4 6、配列番号 1 4 8、配列番号 1 5 0、配列番号 1 8 2、配列番号 1 8 4、配列番号 1 8 6、配列番号 1 8 8、配列番号 1 9 0、配列番号 1 9 2、配列番号 1 9 4、配列番号 1 9 6、配列番号 1 9 8、配列番号 2 0 0、配列番号 2 0 2 または配列番号 2 0 4 のいずれかと少なくとも 9 5 %、9 8 % または 9 9 % 同一である、請求項 7 または 8 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 11】

シグナルペプチドが除去されている、請求項 7 ~ 10 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。40

【請求項 12】

前記 1 種以上の肺炎球菌莢膜糖類コンジュゲートがコンジュゲートされた血清型 1 糖類、コンジュゲートされた血清型 4 糖類、コンジュゲートされた血清型 5 糖類、コンジュゲートされた血清型 6 B 糖類、コンジュゲートされた血清型 7 F 糖類、コンジュゲートされた血清型 9 V 糖類、コンジュゲートされた血清型 1 4 糖類、コンジュゲートされた血清型 1 8 C 糖類、コンジュゲートされた血清型 1 9 F 糖類およびコンジュゲートされた血清型 2 3 F 糖類を含む、請求項 1 ~ 11 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 13】

前記 1 種以上の肺炎球菌莢膜糖類コンジュゲートがコンジュゲートされた血清型 6 A 糖類およびコンジュゲートされた血清型 1 9 A 糖類をさらに含む、請求項 1 ~ 12 のいずれ 50

か一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 14】

前記 1 種以上の肺炎球菌莢膜糖類コンジュゲートがコンジュゲートされた血清型 3 3 F 糖類およびコンジュゲートされた血清型 2 2 F 糖類をさらに含む、請求項 1 ~ 13 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 15】

前記 1 種以上の肺炎球菌莢膜糖類コンジュゲートが、破傷風トキソイド (T T) 、 T T の C 断片、ジフテリアトキソイド、 C R M 1 9 7 (交差反応物質 1 9 7) 、ニュー・モリシン、タンパク質 D (インフルエンザ菌由来) 、 P h t D (ポリヒスチジントライアド D) 、 P h t D E (肺炎球菌ヒスチジントライアド D と E の間の融合物) および N 1 9 からなる群から独立に選択される担体タンパク質にコンジュゲートされている、請求項 1 ~ 14 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。 10

【請求項 16】

前記 1 種以上の肺炎球菌莢膜糖類コンジュゲートが、タンパク質 D にコンジュゲートされた血清型 1 糖類、タンパク質 D にコンジュゲートされた血清型 4 糖類、タンパク質 D にコンジュゲートされた血清型 5 糖類、タンパク質 D にコンジュゲートされた血清型 6 B 糖類、タンパク質 D にコンジュゲートされた血清型 7 F 糖類、タンパク質 D にコンジュゲートされた血清型 9 V 糖類、タンパク質 D にコンジュゲートされた血清型 1 4 糖類、タンパク質 D にコンジュゲートされた血清型 2 3 F 糖類、破傷風トキソイドにコンジュゲートされた血清型 1 8 C 糖類およびジフテリアトキソイドにコンジュゲートされた血清型 1 9 F 糖類を含む、請求項 1 ~ 15 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。 20

【請求項 17】

免疫原性組成物がさらに、ポリヒスチジントライアドファミリー (P h t X) 、無毒化ニュー・モリシン (d P l y) 、コリン結合タンパク質ファミリー (C b p X) 、 C b p X 末端切斷型、 L y t X (自己分解酵素) ファミリー、 L y t X 末端切斷型、 C b p X 末端切斷型 - L y t X 末端切斷型キメラタンパク質、 P c p A (肺炎球菌コリン結合タンパク質 A) 、 P s p A (肺炎球菌表面タンパク質 A) 、 P s a A (肺炎球菌表面アドヘシン A) 、 S p 1 2 8 (肺炎球菌 1 2 8) 、 S p 1 0 1 (肺炎球菌 1 0 1) 、 S p 1 3 0 (肺炎球菌 1 3 0) 、 S P 1 2 5 (肺炎球菌 1 2 5) および S P 1 3 3 (肺炎球菌 1 3 3) からなる群から選択される少なくとも 1 つの非コンジュゲートまたはコンジュゲート肺炎球菌タンパク質を含む、請求項 1 ~ 16 のいずれか 1 項に記載の免疫原性組成物。 30

【請求項 18】

請求項 1 ~ 17 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物と薬学上許容される賦形剤とを含むワクチン。

【請求項 19】

肺炎球菌感染またはインフルエンザ菌感染により引き起こされる疾患の治療または予防において使用するための、請求項 1 ~ 17 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物または請求項 18 に記載のワクチンであって、該疾患が、肺炎、浸潤性肺炎球菌性疾患 (I P D) 、慢性閉塞性肺疾患 (C O P D) の増悪、中耳炎、髄膜炎、菌血症、および結膜炎からなる群から選択される少なくとも 1 つの疾患を含む、上記免疫原性組成物またはワクチン。 40

【請求項 20】

融合タンパク質が、シグナルペプチドが除去されている配列番号 1 4 8 、すなわち、配列番号 1 7 7 (Q I Q K A E Q N D V K L A P P T D V R S G Y I R L V K N V N Y Y I D S E S I W V D N Q E P Q I V H F D A V V N L D K G L Y V Y P E P K R Y A R S V R Q Y K I L N C A N Y H L T Q V R T D F Y D E F W G Q G L R A A P K K Q K K H T L S L T P D T T L Y N A A Q I I C A N Y G E A F S V D K K G G T K K A A V S E L L Q A S A P Y K A D V E L C V Y S T N E T T N C T G G K N G I A A D I T T A K G Y V K S V T T S N G A I T V K G D G T L A N M E Y I L Q A T G N A A T G V T W T T C K G T D A S L F P A N F C G S V T Q) である、請求項 7 または 8 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 21】

融合タンパク質が、シグナルペプチドが除去されている配列番号 1 9 4 、すなわち、配 50

列番号 219 (IQKAEQND VKLAPPTDVR SGYIRLVKNV NYIIDS ESIW VDNQEPQ IVH FADAVNL DKG L YVYPEPKRY ARSVRQYKIL NCANYHLTQV RTDFYDEFWG QGLRAAPKKQ KKHTLSLTPD TTLYNAAQII CANY GEAFSV DKKGGTKKAA VSELLQASAP YKADVELCVY STNETTNCTG GKNGIAADIT TAKGYVKS VT TSNGAIT VKG DGTLANMEYI LQATGNAATG VTWTTTCKGT DASLFNFC GSVTQ) である、請求項7または8に記載の免疫原性組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、1種以上の肺炎球菌(*Streptococcus pneumoniae*)莢膜糖類コンジュゲートとタンパク質成分とを含み、そのタンパク質成分がインフルエンザ菌(*Haemophilus influenzae*)由来のタンパク質Eおよび/またはPilAを含む、免疫原性組成物に関する。 10

【背景技術】

【0002】

無莢膜型インフルエンザ菌(non-typeable *Haemophilus influenzae*) (NTHi)は、乳幼児および小児に中耳炎を引き起こす重要な一般的な呼吸器系の病原体である。NTHiは、肺炎球菌に次いで、小児における急性中耳炎の最も多い原因である(J. Immunology 183: 2593-2601 (2009), Pediatrics 113:1451-1465 (2004))。NTHiは、小児および成人における副鼻腔炎の重要な原因である(Current Infectious Disease Reports 11:1 77-182 (2009))。NTHiは、成人における慢性閉塞性肺疾患(COPD)の増悪のリスク上昇と関連付けられている(Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease 3:10 9-115 (2006))。さらに、無莢膜型インフルエンザ菌は、成人に市中肺炎を引き起こし、発展途上国では小児に肺炎を引き起こし得る(Current Infectious Disease Reports 11:1 77-182 (2009))。 20

【0003】

肺炎球菌(*S. pneumoniae*)は、肺炎球菌(pneumococcus)としても知られるグラム陽性細菌である。肺炎球菌は世界の至る所で大きな公衆衛生問題であり、特に、乳幼児、高齢者および免疫不全者の間では相当な罹患および死亡の原因となっている。肺炎球菌は、市中肺炎、急性副鼻腔炎、中耳炎、髄膜炎、菌血症、敗血症、骨髄炎、敗血性関節炎、心内膜炎、腹膜炎、心膜炎、蜂巣炎、および脳膿瘍を含む、広範囲の重要なヒト病態を引き起こす。肺炎球菌は、米国だけで、年間、3,000症例の髄膜炎、50,000症例の菌血症、500,000症例の肺炎、および7,000,000症例の中耳炎の病原となっていると推計される(Reichler, M. R. et al., 1992, J. Infect. Dis. 166: 1346; Stool, S. E. and Field, M. J., 1989 Pediatr. Infect. Dis J. 8: S11)。肺炎球菌性疾患による死亡率は、先進国および発展途上国の両方で、5歳未満の小児において特に高い。高齢者、免疫不全者および他の基礎病態(糖尿病、喘息)を有する患者も特に罹患しやすい。 30

【0004】

肺炎球菌により引き起こされる主要な臨床症候群は広く認識されており、標準的な医学の教科書に記述されている(Fedson D S, Muscher D M. In: Plotkin S A, Orenstein W A, editors. Vaccines. 第4版. Philadelphia WB Saunders Co, 2004a: 529-588)。例えば、浸潤性肺炎球菌性疾患(Invative pneumococcal disease) (IPD)は、肺炎球菌が血液または通常無菌である別の部位から単離された場合の感染と定義される(Musher D M. *Streptococcus pneumoniae*. In Mandell G L, Bennett J E, Dolin R (編). Principles and Practice of Infectious diseases (第5版). New York, Churchill Livingstone, 2001, p 2128-2147)。 40

【0005】

慢性閉塞性肺疾患は、肺の慢性炎症性疾患であり、世界の罹患および死亡の主因である。米国では2005年におよそ死者20人に1人が基礎原因としてCOPDを有していた(Drugs and Aging 26:985-999 (2009))。2020年にはCOPDは、障害調整生命年、慢性無効化疾患の主因の第5位、そして最も重大な死因の第3位に浮上すると予想される 50

(Lancet 349:1498-1504 (1997))。

【0006】

よって、肺炎球菌およびインフルエンザ菌に対する組合せワクチンの必要がある。

【0007】

タンパク質E(PE)は、接着特性を有する外膜リポタンパク質である。PEは、無莢膜型インフルエンザ菌(NTHi)の上皮細胞への接着/浸潤に役割を果たす(J. Immunology 183: 2593-2601 (2009); The Journal of Infectious Diseases 199:522-531 (2009), Microbes and Infection 10:87-96 (2008))。PEは、有莢膜型インフルエンザ菌と無莢膜型インフルエンザ菌の両方で保存性が高く、保存された上皮結合ドメインを有する(The Journal of Infectious Diseases 201:414-419 (2010))。参照株としてのインフルエンザ菌Rdと比較して、異なるヘモフィルス種には13の異なる点突然変異が記載されている。その発現は対数増殖期の細菌と静止期の細菌の両方で見られる(国際公開第2007/084053号)。

【0008】

タンパク質Eはまた、結合ビトロネクチンを介したヒト補体抵抗性にも関与している(Immunology 183: 2593-2601 (2009))。PEは、結合ドメインPKRYARSVRQYKILNCANYHLTQVR(配列番号1、配列番号4のアミノ酸84~108に相当)により、終末補体経路の重要な阻害剤であるビトロネクチンと結合する(J. Immunology 183:2593-2601 (2009))。

【0009】

ピリン(Pilin)A(PilA)は、おそらくツイッティング運動(twitching motility)に関するインフルエンザ菌IV型Pilus(Tfp)纖毛の主要ピリンサブユニットであると思われる(Infection and Immunity, 73: 1635-1643 (2005))。NTHi PilAは、in vivoで発現される保存されたアドヘシソNTHiの接着、定着およびバイオフィルム形成に関与することが示されている(Molecular Microbiology 65: 1288-1299 (2007))。

【0010】

本発明者らは、PilAおよびPEはインフルエンザ菌を回避するための免疫原性組成物中に有利に存在し得ること、およびさらに、インフルエンザ菌および肺炎球菌感染を予防し得る免疫原性組成物を提供するために、肺炎球菌莢膜糖類を含む組成物にPilAおよびタンパク質Eを添加することができるを見出した。当業者ならば、担体により誘導されるエピトープ的抑制の効果に気づくであろうし、一般に複数のコンジュゲート抗原に同時に曝されると免疫応答の増強か低減のいずれかが起こり得ることを知っているであろう(Plotkin et al, Vaccines fourth addition 2003)。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0011】

【特許文献1】国際公開第2007/084053号

【非特許文献】

【0012】

【非特許文献1】J. Immunology 183: 2593-2601 (2009)

【非特許文献2】Pediatrics 113:1451-1465 (2004)

【非特許文献3】Current Infectious Disease Reports 11:177-182 (2009)

【非特許文献4】Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease 3:109-115 (2006)

【非特許文献5】Reichler, M. R. et al., 1992, J. Infect. Dis. 166: 1346

【非特許文献6】Stool, S. E. and Field, M. J., 1989 Pediatr. Infect. Dis J. 8: S11

【非特許文献7】Fedson D S, Muscher D M. In: Plotkin S A, Orenstein W A, editors. Vaccines. 第4版. Philadelphia WB Saunders Co, 2004a: 529-588

10

20

30

40

50

【非特許文献 8】Musher D M. *Streptococcus pneumoniae*. In Mandell G L, Bennett J E, Dolin R (編). *Principles and Practice of Infectious diseases* (第5版). New York, Churchill Livingstone, 2001, p 2128-2147

【非特許文献 9】Drugs and Aging 26:985-999 (2009)

【非特許文献 10】Lancet 349:1498-1504 (1997)

【非特許文献 11】The Journal of Infectious Diseases 199:522-531 (2009)

【非特許文献 12】Microbes and Infection 10:87-96 (2008)

【非特許文献 13】The Journal of Infectious Diseases 201:414-419 (2010)

【非特許文献 14】Infection and Immunity, 73: 1635-1643 (2005)

【非特許文献 15】Molecular Microbiology 65: 1288-1299 (2007)

【非特許文献 16】Plotkin et al, *Vaccines fourth addition* 2003

10

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0013】

簡単な概要

本発明者らは、肺炎球菌由来のPilA、PE（またはその断片）および糖類が、インフルエンザ菌および肺炎球菌に対する効果的な防御を提供するために免疫原性組成物中で有利に配合可能なことを見出した。

【0014】

よって、第1の態様において、1種以上（例えば、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19または20種）の肺炎球菌莢膜糖類コンジュゲートとタンパク質成分とを含み、そのタンパク質成分がインフルエンザ菌由来のタンパク質Eもしくはタンパク質Eの免疫原性断片および／またはPilA（もしくはPilAの免疫原性断片）を含む免疫原性組成物が提供される。

20

【0015】

第2の態様において、本発明の免疫原性組成物と薬学上許容される賦形剤とを含むワクチンが提供される。

【0016】

第3の態様において、肺炎球菌感染により引き起こされる疾患に対して対象を免疫する方法であって、前記対象に治療上有効な用量の本発明の免疫原性組成物または本発明のワクチン投与することを含む方法が提供される。

30

【0017】

第4の態様において、インフルエンザ菌感染により引き起こされる疾患に対して対象を免疫する方法であって、前記対象に治療上有効な用量の本発明の免疫原性組成物または本発明のワクチンを投与することを含む方法が提供される。

【0018】

第5の態様において、肺炎球菌感染により引き起こされる疾患の治療または予防において使用するための本発明の免疫原性組成物または本発明のワクチンが提供される。

【0019】

第6の態様において、インフルエンザ菌感染により引き起こされる疾患の治療または予防において使用するための本発明の免疫原性組成物または本発明のワクチンが提供される。

40

【0020】

第7の態様において、肺炎球菌感染により引き起こされる疾患の治療または予防のための薬剤の製造における本発明の免疫原性組成物または本発明のワクチンの使用が提供される。

【0021】

第8の態様において、インフルエンザ菌感染により引き起こされる疾患の治療または予防のための薬剤の製造における本発明の免疫原性組成物または本発明のワクチンの使用が提供される。

50

【図面の簡単な説明】

【0022】

【図1】融合タンパク質構築物LVL291、LVL268およびLVL269に関する誘導細菌抽出物のSDS-PAGE。誘導(ind)前後のLVL291、LVL268およびLVL269に関して不溶性画分(I)、可溶性画分(S)および培養培地画分(M)をロードした。

【図2】融合タンパク質構築物LVL291、LVL268およびLVL269の精製抽出物に関するSDS-PAGEおよびウエスタンプロット。LVL291、LVL268およびLVL269の精製に関して、フロースルー画分(Ft)、洗浄画分(W)および溶出画分(E)をロードした。抗hisタグを抽出物のプローブに用いた。

10

【図3】融合タンパク質構築物LVL291およびLVL315に関する誘導細菌抽出物および精製抽出物のSDS-PAGE。LVL291およびLVL315に関して培養培地画分(M)、可溶性画分(Sol)、不溶性画分(Ins)、フロースルー画分(Ft)、洗浄画分#1(W1)、洗浄画分#2(W2)および溶出画分(E)をロードした。

【図4】融合タンパク質構築物LVL312に関する誘導細菌抽出物および精製抽出物のSDS-PAGE。LVL312に関する培養培地画分(M)、可溶性画分(Sol)、不溶性画分(Ins)、フロースルート画分(Ft)、洗浄画分#1(W1)、洗浄画分#2(W2)および溶出画分(E)をロードした。

【図5】融合タンパク質構築物LVL317に関する誘導(1mMおよび10μM IPTG)細菌抽出物のSDS-PAGE。誘導前(NI)および誘導後(In)、可溶性画分(S)、不溶性画分(I)由来の抽出物。

20

【図6】融合タンパク質構築物LVL318に関する誘導(1mMおよび10μM IPTG)細菌抽出物のSDS-PAGE。誘導(In)前後、培養培地画分(M)、可溶性画分(S)、不溶性画分(I)由来の抽出物。

【図7】PE、Pi1AおよびPE-Pi1A融合タンパク質のCDスペクトル。

【図8】PEおよびPi1A CDスペクトルの組合せ。

【図9】Pi1Aの熱変性曲線。

【図10】PEの熱変性曲線。

【図11】PE-Pi1A融合タンパク質の熱変性曲線。

【図12】典型的なSPセファロース(商標)ファーストフロークロマトグラム。

30

【図13】典型的なQセファロース(商標)ファーストフロークロマトグラム。

【図14】PE-Pi1A融合タンパク質の精製プロセスからのインプロセスサンプルのSDS-PAGE。

【図15】PE-Pi1A融合タンパク質からの精製プロセスのインプロセスサンプルのウエスタンプロット。ウサギポリクローナル抗PEを用いたプロット。

【図16】PE-Pi1A融合タンパク質からの精製プロセスのインプロセスサンプルのウエスタンプロット。ウサギポリクローナル抗大腸菌(E.coli)(BLR)を用いたプロット。

【図17】PE-Pi1A融合タンパク質およびPEおよびPi1Aタンパク質の温度遷移。曲線:Pi1A(1)、タンパク質E(Prot E、PE)(2)、PE-Pi1A精製バルク無希釈液737μg/ml(3)、および最終容器濃度60μg/mlのPE-Pi1A精製バルク希釈液(4)。

40

【図18】Balb/cマウスモデルにおけるLVL291 PE-Pi1A融合タンパク質ならびに一価PEおよびPi1Aに対する抗体応答。

【図19】マウス鼻咽頭における86-028NP細菌株のクリアランスに対するPE-Pi1A融合タンパク質接種の効果。

【図20】マウス鼻咽頭におけるNTHi3224A細菌株のクリアランスに対するPE-Pi1A融合タンパク質接種の効果。

【図21】マウス鼻咽頭における細菌クリアランスに対するPi1A接種の効果。

【図22】マウス鼻咽頭における細菌クリアランスに対するPE接種の効果。

50

【図23】(a)ビトロネクチンに対するLV L 317 PE - Pi 1 A融合タンパク質の結合および(b) LV L 317およびビトロネクチンに対するLV L 735 PE - Pi 1 A融合タンパク質の結合。

【図24】PE - Pi 1 A融合タンパク質に対するポリクローナル抗体によるビトロネクチン結合の阻害。

【図25a】融合タンパク質構築物LV L 291、LV L 702、LV L 736、LV L 737、LV L 738、LV L 739、LV L 740およびpET26bベクター(陰性対照)に関する誘導細菌抽出物の可溶性画分のSDS-PAGE。(a)実験1。PE - Pi 1 A融合タンパク質は矢印で示す。

【図25b】融合タンパク質構築物LV L 291、LV L 702、LV L 736、LV L 737、LV L 738、LV L 739、LV L 740およびpET26bベクター(陰性対照)に関する誘導細菌抽出物の可溶性画分のSDS-PAGE。(b)実験2。PE - Pi 1 A融合タンパク質は矢印で示す。

【図25c】融合タンパク質構築物LV L 291、LV L 702、LV L 736、LV L 737、LV L 738、LV L 739、LV L 740およびpET26bベクター(陰性対照)に関する誘導細菌抽出物の可溶性画分のSDS-PAGE。(c)実験3。PE - Pi 1 A融合タンパク質は矢印で示す。

【図26】実験1、2および3からの可溶性画分における融合タンパク質の平均バンドバー・センテージ。

【図27】LV L 317およびLV L 735に対するPEおよびPi 1 A抗体応答。

20

【図28】無莢膜型インフルエンザ菌鼻咽頭定着のマウスモデルにおける細菌クリアランスに対するLV L 735およびLV L 317接種の効果。

【図29】マウス注射後に抗糖類ELISAアッセイを用いて測定した12の糖類コンジュゲート、Ph t D、d P l yおよびPE - Pi 1 Aを含む組成物(12V + prot)と、12の糖類コンジュゲートを含む組成物(12V)および10の糖類コンジュゲートを含む組成物(10V)の免疫原性を比較したグラフ。GMC = 幾何平均濃度。IC = 信頼区間。

【図30】マウス注射後にオプソニン化貪食作用アッセイを用いて測定した12の糖類コンジュゲート、Ph t D、d P l yおよびPE - Pi 1 Aを含む組成物(12V + prot)と、12の糖類コンジュゲートを含む組成物(12V)および10の糖類コンジュゲートを含む組成物(10V)の免疫原性を比較したグラフ。GMT = 幾何平均力値。

30

【図31】マウス注射後に抗タンパク質ELISAアッセイを用いて測定した12のコンジュゲート、Ph t D、d P l yおよびPE - Pi 1 Aを含む組成物(12V + prot)と、Ph t D、d P l yおよびPE - Pi 1 Aのみを含む組成物(proto)の免疫原性を比較したグラフ。GMC = 幾何平均濃度。IC = 信頼区間。

【図32】モルモット注射後にオプソニン化貪食作用アッセイを用いて測定した12の糖類コンジュゲート、Ph t D、d P l yおよびPE - Pi 1 Aを含む組成物(12V + prot)と、12の糖類コンジュゲートを含む組成物(12V)および10の糖類コンジュゲートを含む組成物(10V)の免疫原性を比較したグラフ。GMT = 幾何平均力値。

【図33】モルモット注射後に抗糖類ELISAを用いて測定した12の糖類コンジュゲート、Ph t D、d P l yおよびPE - Pi 1 Aを含む組成物(12V + prot)と、12の糖類コンジュゲートを含む組成物(12V)および10の糖類にコンジュゲートを含む組成物(10V)の免疫原性を比較したグラフ。GMC = 幾何平均濃度。IC = 信頼区間。

40

【図34】モルモット注射に抗タンパク質ELISAを用いて測定した12の糖類コンジュゲート、Ph t D、d P l yおよびPE - Pi 1 Aを含む組成物(12V + prot)と、Ph t D、d P l yおよびPE - Pi 1 Aのみを含む組成物(proto)の免疫原性を比較したグラフ。GMC = 幾何平均濃度。ic = 信頼区間。

【発明を実施するための形態】

【0023】

50

詳細な説明

第1の態様において、本発明は、1種以上（例えば、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19または20種）の肺炎球菌莢膜糖類コンジュゲートとタンパク質成分とを含み、そのタンパク質成分がインフルエンザ菌由来のタンパク質E（もしくはその免疫原性断片）および/またはPilA（もしくはその免疫原性断片）を含む免疫原性組成物に関する。

【0024】

用語「タンパク質成分」は、タンパク質E（もしくはその免疫原性断片）および/またはPilA（もしくはその免疫原性断片）を含むアミノ酸の配列に関し、前記タンパク質成分は、タンパク質E単独、PilA単独、タンパク質Eの免疫原性断片単独、PilAの免疫原性断片単独、タンパク質EとPilA、タンパク質Eの免疫原性断片とPilA、タンパク質Eの免疫原性断片とPilAの免疫原性断片またはタンパク質EとPilAの免疫原性断片を（例えば、融合タンパク質として）含み得る。前記タンパク質成分は、付加的配列をさらに含んでよい。

タンパク質E

本明細書で使用する場合、「タンパク質E(Protein E)」、「タンパク質E(protein E)」、「Prot E」、および「PE」は、インフルエンザ菌由来のタンパク質Eを意味する。タンパク質Eは、配列番号4(MKKIILTLSL GLLTACSAQI QKAEQNDVKL APPTDVRSGY IRL VKNVNYY IDSESIWVDN QEPQIVHFDA VVNLDKGLYV YPEPKRYARS VRQYKILNCA NYHLTQVRTD FYDEFW GQGL RAAPKKQKKH TLSLTPDTTL YNAAQIICAN YGEAFSVDKK)のアミノ酸配列ならびに配列番号4とその全長にわたって少なくともまたは正確に75%、77%、80%、85%、90%、95%、97%、99%もしくは100%の同一性を有する配列からなり得るか、または前記配列を含み得る。インフルエンザ菌由来のタンパク質Eの53配列（表1の配列番号5～配列番号57）を比較したところ、配列番号4で示されるタンパク質Eとおよそ77%～およそ100%の同一性が示された。例えば、タンパク質Eのアミノ酸配列では、アミノ酸#20はイソロイシン(I)またはトレオニン(T)であり得；アミノ酸#23はアラニン(A)またはバリン(V)であり得；アミノ酸#24はリシン(K)またはグルタミン酸(E)であり得；アミノ酸#31はアラニン(A)またはトレオニン(T)であり得；アミノ酸#32はプロリン(P)またはアラニン(A)であり得；アミノ酸#34はトレオニン(T)またはアラニン(A)であり得；アミノ酸#37はアルギニン(R)またはグルタミン(Q)であり得；アミノ酸#47はバリン(V)またはアラニン(A)であり得；アミノ酸#57はトリプトファン(W)であり得るか、または不在(-)であり得；アミノ酸#70はアラニン(A)またはトレオニン(T)であり得；アミノ酸#93はグルタミン(Q)または不在(-)であり得；アミノ酸#109はトレオニン(T)またはイソロイシン(I)であり得；アミノ酸#119はグリシン(G)またはセリン(S)であり得；アミノ酸#153はグルタミン酸(E)またはリシン(K)であり得；アミノ酸#156はセリン(S)またはロイシン(L)であり得；アミノ酸#160はリシン(K)またはアスパラギン(N)であり得；アミノ酸#161はリシン(K)、イソロイシン(I)または不在(-)であり得；アミノ酸#162～#195は不在であり得るか、または配列番号15((-))はアミノ酸#166が不在であることを示す)で示される通り、もしくは配列番号16で示される通りであり得；またはそれらの任意の組合せであり得る。

【0025】

タンパク質Eは、アミノ酸#20、アミノ酸#23、アミノ酸#24、アミノ酸#31、アミノ酸#32、アミノ酸#34、アミノ酸#37、アミノ酸#47、アミノ酸#57、アミノ酸#70、アミノ酸#93、アミノ酸#109、アミノ酸#119、アミノ酸#153、アミノ酸#156、アミノ酸#160、アミノ酸#161およびアミノ酸#162～#195からなる群から選択されるいづれか1以上のアミノ酸が配列番号4と異なるアミノ酸配列からなり得るか、または前記配列を含み得、ここで、アミノ酸#20はトレオニン(T)であり；アミノ酸#23はバリン(V)であり；アミノ酸#24はリシン(

10

20

30

40

50

K) であり；アミノ酸#31はトレオニン(T)であり；アミノ酸#32はアラニン(A)であり；アミノ酸#34はアラニン(A)であり；アミノ酸#37はグルタミン(Q)であり；アミノ酸#47はアラニン(A)であり；アミノ酸#57は不在(-)であり；アミノ酸#70はトレオニン(T)であり；アミノ酸#93は不在(-)であり；アミノ酸#109はイソロイシン(I)であり；アミノ酸#119はセリン(S)であり；アミノ酸#153はリシン(K)であり；アミノ酸#156はロイシン(L)であり；アミノ酸#160はアスパラギン(N)であり；アミノ酸#161はリシン(K)またはイソロイシン(I)であり；またはアミノ酸#162～#195は配列番号15((-)はアミノ酸#166が不在であることを示す)で示されるか、または配列番号16で示される。

【0026】

10

【表1】

53 株のインフルエンザ菌 (*Haemophilus influenzae*) に由来するタンパク質Eアミノ酸配列(配列番号5～配列番号57)。「-」はアミノ酸が存在しないことを示す。

株名	タンパク質Eアミノ酸配列	
3224A	MKKIILTSLGLLTACSAQIQKAKQNDVKLAPPTDVRSGYIRLVKNVNYYIDSES IWVDNQEPQIVHFDAAVNLDKGLYVYPEPKRYARSVRQYKILNCANYHLTQV RTDFYDEFWGQGLRAAPKKQKHTSLTPDTTLYNAAQIICANYGEAFSVDK K (配列番号 5)	
RdKW20	MKKIILTSLGLLTACSAQIQKAEQNDVKLAPPTDVRSGYIRLVKNVNYYIDSES IWVDNQEPQIVHFDAAVNLDRGLYVYPEPKRYARSVRQYKILNCANYHLTQIR TDFYDEFWGQGLRAAPKKQKHTSLTPDTTLYNAAQIICANYGKAESVDKK (配列番号 6)	20
86-028NP	MKKIILTSLGLLTACSAQIQKAKQNDVKLAPPTDVRSGYIRLVKNVNYYIDSES IWVDNQEPQIVHFDAAVNLDKGLYVYPEPKRYARSVRQYKILNCANYHLTQV RTDFYDEFWGQGLRAAPKKQKHTSLTPDTTLYNAAQIICANYGEAFSVDK K (配列番号 7)	
R2846	MKKIILTSLGLLTACSAQIQKAEQNDVKLAPPTDVRSGYIRLVKNVNYYIDSES IWVDNQEPQIVHFDAAVNLDKGLYVYPEPKRYARSVRQYKILNCANYHLTQV RTDFYDEFWGQGLRAAPKKQKHTSLTPDTTLYNAAQIICANYGKAESVDK K (配列番号 8)	
R2866	MKKIILTSLGLLTACSAQIQKAEQNDVKLAPPTDVRSGYIRLVKNVNYYIDSES IWVDNQEPQIVHFDAAVNLDKGLYVYPEPKRYARSVRQYKILNCANYHLTQV RTDFYDEFWGQGLRAAPKKQKHTSLTPDTTLYNAAQIICANYGKAESVDK K (配列番号 9)	30
3655	MKKIILTSLGLLTACSAQIQKAEQNDMKLAPPTDVRSGYIRLVKNVNYYIDSE SIWVDNQEPQIVHFDAAVNLDKGLYVYPEPKRYARSVRQYKILNCANYHLTQ VRTDFYDEFWGQGLRAAPKKQKHTSLTPDTTLYNAAQIICANYGKAESVD KK (配列番号 10)	
PittAA	MKKIILTSLGLLTACSAQIQKAKQNDVKLAPPTDVRSGYIRLVKNVNYYIDSES IWVDNQEPQIVHFDAAVNLDKGLYVYPEPKRYARSVRQYKILNCANYHLTQV RTDFYDEFWGQGLRAAPKKQKHTSLTPDTTLYNAAQIICANYGEAFSVDK K (配列番号 11)	
PittEE	MKKIILTSLGLLTACSAQIQKAEQNDMKLAPPTDVRSGYIRLVKNVNYYIDSE SI-VDNQEPQ IVHFDAAVNLDKGLYVYPEPKRYARSVRQYKILNCANYHLTQVRTDFYDEFW GQGLRAAPKKQKHTSLTPDTTLYNAAQIICANYGKAESVDKK(配列番号 12)	40
PittHH	MKKIILTSLGLLTACSAQIQKAEQNDVKLAPPTDVRSGYIRLVKNVNYYIDSES IWVDNQEPQIVHFDTVVNLDKGLYVYPEPKRYARSVRQYKILNCANYHLTQV RTDFYDEFWGQGLRAAPKKQKHTSLTPDTTLYNAAQIICANYGKAESVDK K (配列番号 13)	
PittII	MKKIILTSLGLLTACSAQIQKAEQNDVKLAPPTDVRSGYIRLVKNVNYYIDSES IWVDNQEPQIVHFDAAVNLDKGLYVYPEPKRYARSVRQYKILNCANYHLTQV RTDFYDEFWGQGLRAAPKKQKHTSLTPDTTLYNAAQIICANYGKAESVDK	

50

	K (配列番号 14)	
R3021	MKKIILTLGGLLTACSAQTQKAEQNDVKLAPPTDVRSGYIRLVKNVNYYIDSE SIWVDNQEPQIVHFDAVVNLDKGLYVYPEPKRYARSVRQYKILNCANYHTQ VRIDFYDEFWGQGLRAAPKKQKHTSLTPDTTLNAAQIICANYGKAFLVDK KK (配列番号 15) WHF (配列番号 15)	
22.4-21	MKKIILTLGGLLTACSAQIQKAEQNDVKLAPPTDVRSGYIRLVKNVNYYIDSES IWVDNQEPQIVHFDAVVNLDKGLYVYPEPKRYARSVRQYKILNCANYHTQV RTDFYDEFWGQGLRAAPKKQKHTSLTPDTTLNAAQIICANYGKAFLVDK KIKKICTLSNFQLLGCREYSIFLQLLLFYC WHF (配列番号 16)	10
3219C	MKKIILTLGGLLTACSAQIQKAEQNDMKLAPPTDVRSGYIRLVKNVNYYIDSE SIWVDNQEPQIVHFDAVVNLDKGLYVYPEPKRYARSVRQYKILNCANYHTQ VRTDFYDEFWGQGLRAAPKKQKHTSLTPDTTLNAAQIICANYGKAFLVDK KK (配列番号 17)	
3185	MKKIILTLGGLLTACSAQIQKAEQNDVKLAPPTDVRSGYIRLVKNVNYYIDSES IWVDNQEPQIVHFDAVVNLDKGLYVYPEPKRYARSVRQYKILNCANYHTQV RTDFYDEFWGQGLRAAPKKQKHTSLTPDTTLNAAQIICANYGKAFLVDK K (配列番号 18)	
3241A	MKKIILTLGGLLTACSAQIQKAKQNDVKLAPPTDVRSGYIRLVKNVNYYIDSES IWVDNQEPQIVHFDAVVNLDKGLYVYPEPKRYARSVRQYKILNCANYHTQV RTDFYDEFWGQGLRAAPKKQKHTSLTPDTTLNAAQIICANYGEAFSVDK K (配列番号 19)	20
038144S1	MKKIILTLGGLLTACSAQTQKVEQNDVKLTAPTDVRSGFVRLVKNVNYYIDSE SIWVDNQEPQIVHFDAVVNLDKGLYVYPEPKRYARSVRQYKILNCANYHTQ VRTDFYDEFWGQGLRAAPKKQKHTSLTPDTTLNAAQIICANYGKAFLVDK K (配列番号 20)	
810956	MKKIILTLGGLLTACSAQIQKAKQNDVKLAPPTDVRSGYIRLVKNVNYYIDSES IWVDNQEPQIVHFDAVVNLDKGLYVYPEPKRYARSVRQYKILNCANYHTQV RTDFYDEFWGQGLRAAPKKQKHTSLTPDTTLNAAQIICANYGEAFSVDK K (配列番号 21)	
821246	MKKIILTLGGLLTACSAQIQKAEQNDVKLAPPTDVRSGYIRLVKNVNYYIDSES IWVDNQEPQIVHFDAVVNLDKGLYVYPEPKRYARSVRQYKILNCANYHTQIR TDFYDEFWGQGLRAAPKKQKHTSLTPDTTLNAAQIICANYGKAFLVDK KK (配列番号 22)	30
840645	MKKIILTLGGLLTACSAQIQKAKQNDVKLAPPTDVRSGYIRLVKNVNYYIDSES IWVDNQEPQIVHFDAVVNLDKGLYVYPEPKRYARSVRQYKILNCANYHTQV RTDFYDEFWGQGLRAAPKKQKHTSLTPDTTLNAAQIICANYGEAFSVDK K (配列番号 23)	
902550Z19	MKKIILTLGGLLTACSAQTQKVEQNDVKLTPPTDVRSGYVRLVKNVNYYIDSE SIWVDNQEPQIVHFDAVVNLDKGLYVYPEPKRYARSVRQYKILNCANYHTQ VRTDFYDEFWGQGLRAAPKKQKHTSLTPDTTLNAAQIICANYGKAFLVDK KK (配列番号 24)	
A840177	MKKIILTLGGLLTACSAQIQKAKQNDVKLAPPTDVRSGYIRLVKNVNYYIDSES IWVDNQEPQIVHFDAVVNLDKGLYVYPEPKRYARSVRQYKILNCANYHTQV RTDFYDEFWGQGLRAAPKKQKHTSLTPDTTLNAAQIICANYGEAFSVDK	40

	K(配列番号 25)	
A860514	MKKIILTSLGLLTACSAQTQKVEQNDVKLAPPTDVRSGYIRLVKNVNYYIDSE SIWVDNQEPQIVHFDAVNLDKGLYVYPEPKRYARSVRQYKILNCANYHLTQ VRTDFYDEFWGQGLRAAPKKQKHTSLPDTTLYNAAQIIICANYGKAESVDK K(配列番号 26)	
A950014	MKKIILTSLGLLTACSAQIQKAEQNDVKLAPPTDVRSGYIRLVKNVNYYIDSES IWVDNQEPQIVHFDAVNLDKGLYVYPEPKRYARSVRQYKILNCANYHLTQV RTDFYDEFWGQGLRAAPKKQKHTSLPDTTLYNAAQIIICANYGKAESVDK (配列番号 27)	10
306543X4	MKKIILTSLGLLTACSAQIQKAEQNDVKLAPPTDVRSGYIRLVKNVNYYIDSES IWVDNQEPQIVHFDAVNLDKGLYVYPEPKRYARSVRQYKILNCANYHLTQV RTDFYDEFWGQGLRAAPKKQKHTSLPDTTLYNAAQIIICANYGKAESVDK K(配列番号 28)	
A930105	MKKIILTSLGLLTACSAQIQKAEQNDVKLAPPTDVRSGYIRLVKNVNYYIDSES IWVDNQEPQIVHFDTVNLDKGLYVYPEPKRYARSVRQYKILNCANYHLTQV RTDFYDEFWGQGLRAAPKKQKHTSLPDTTLYNAAQIIICANYGKAESVDK K(配列番号 29)	
901905U	MKKIILTSLGLLTACSAQIQKAEQNDVKLAPPTDVRSGYIRLVKNVNYYIDSES IWVDNQEPQIVHFDAVNLDKGLYVYPEPKRYARSVRQYKILNCANYHLTQV RTDFYDEFWGQGLRAAPKKQKHTSLPDTTLYNAAQIIICANYGKAESVDK K(配列番号 30)	20
A920030	MKKIILTSLGLLTACSAQIQKAKQNDVKLAPPTDVRSGYIRLVKNVNYYIDSES IWVDNQEPQIVHFDAVNLDKGLYVYPEPKRYARSVRQYKILNCANYHLTQV RTDFYDEFWGQGLRAAPKKQKHTSLPDTTLYNAAQIIICANYGEAFSVDK K(配列番号 31)	
3221B	MKKIILTSLGLLTACSAQIQKAEQNDVKLAPPTDVRSGYIRLVKNVNYYIDSES IWVDNQEPQIVHFDAVNLDKGLYVYPEPKRYARSVRQYKILNCANYHLTQV RTDFYDEFWGQGLRAAPKKQKHTSLPDTTLYNAAQIIICANYGKAESVDK K(配列番号 32)	
27W116791 N	MKKIILTSLGLLTACSAQTQKVEQNDVKLPPTDVRSGYIRLVKNVNYYIDSE SIWVDNQEPQIVHFDAVNLDKGLYVYPEPKRYARSVRQYKILNCANYHLTQ VRTDFYDEFWGQGLRAAPKKQKHTSLPDTTLYNAAQIIICANYGKAESVDK K(配列番号 33)	30
N218	MKKIILTSLGLLTACSAQIQKAEQNDVKLAPPTDVRSGYIRLVKNVNYYIDSES IWVDNQEPQIVHFDAVNLDKGLYVYPEPKRYARSVRQYKILNCANYHLTQV RTDFYDEFWGQGLRAAPKKQKHTSLPDTTLYNAAQIIICANYGEAFSVDK K(配列番号 34)	
N163	MKKIILTSLGLLTACSAQIQKAKQNDVKLAPPTDVRSGYIRLVKNVNYYIDSES IWVDNQEPQIVHFDAVNLDKGLYVYPEPKRYARSVRQYKILNCANYHLTQV RTDFYDEFWGQGLRAAPKKQKHTSLPDTTLYNAAQIIICANYGEAFSVDK K(配列番号 35)	
N162	MKKIILTSLGLLTACSAQIQKAKQNDVKLAPPTDVRSGYIRLVKNVNYYIDSES IWVDNQEPQIVHFDAVNLDKGLYVYPEPKRYARSVRQYKILNCANYHLTQV RTDFYDEFWGQGLRAAPKKQKHTSLPDTTLYNAAQIIICANYGEAFSVDK	40

	K (配列番号 36)	
N107	MKKIILTSLGLLTACSAQTQKAEQNDVKLAPPTDVRSGYIRLVKNVNYYIDSE SIWVDNQEPQIVHFDAVVNLDKGLYVYPEPKRYARSRVRQYKILNCANYHTQI RTDFYDEFWGQGLRAAPKKQKHTSLPDTTLYNAAQIICANYGKAESVDK K (配列番号 37)	
N91	MKKIILTSLGLLTACSAQTQKVEQNDVKLTAPADVRSGYVRLVKNVNYYIDSE SIWVDNQEPQIVHFDAVVNLDKGLYVYPEPKRYARSRVRQYKILNCANYHTQ VRTDFYDEFWGQGLRAAPKKQKHTSLPDTTLYNAAQIICANYGKAESVDK KK (配列番号 38)	
D211PG	MKKIILTSLGLLTACSAQIQKAKQNDVKLAPPTDVRSGYIRLVKNVNYYIDSES IWVDNQEPQIVHFDAVVNLDKGLYVYPEPKRYARSRV- YKILNCANYHTQVRTDFYDEFWGQGLRAAPKKQK KHTSLPDTTLYNAAQIICANYGEAFSVDKK (配列番号 39)	10
D211PD	MKKIILTSLGLLTACSAQIQKAKQNDVKLAPPTDVRSGYIRLVKNVNYYIDSES IWVDNQEPQIVHFDAVVNLDKGLYVYPEPKRYARSRV- YKILNCANYHTQVRTDFYDEFWGQGLRAAPKKQK KHTSLPDTTLYNAAQIICANYGEAFSVDKK (配列番号 40)	
D201PG	MKKIILTSLGLLTACSAQIQKAEQNDVKLAPPTDVRSGYIRLVKNVNYYIDSES IWVDNQEPQIVHFDAVVNLDKGLYVYPEPKRYARSRVRQYKILNCANYHTQV RTDFYDEFWGQGLRAAPKKQKHTSLPDTTLYNAAQIICANYGKAESVDK K (配列番号 41)	
D201PD	MKKIILTSLGLLTACSAQIQKAEQNDVKLAPPTDVRSGYIRLVKNVNYYIDSES IWVDNQEPQIVHFDAVVNLDKGLYVYPEPKRYARSRVRQYKILNCANYHTQV RTDFYDEFWGQGLRAAPKKQKHTSLPDTTLYNAAQIICANYGKAESVDK K (配列番号 42)	20
D198PG	MKKIILTSLGLLTACSAQIQKAEQNDVKLAPPTDVRSGYIRLVKNVNYYIDSES IWVDNQEPQIVHFDAVVNLDKGLYVYPEPKRYARSRVRQYKILNCANYHTQV RTDFYDEFWGQGLRAAPKKQKHTSLPDTTLYNAAQIICANYGKAESVDK K (配列番号 43)	
D198PD	MKKIILTSLGLLTACSAQIQKAEQNDVKLAPPTDVRSGYIRLVKNVNYYIDSES IWVDNQEPQIVHFDAVVNLDKGLYVYPEPKRYARSRVRQYKILNCANYHTQV RTDFYDEFWGQGLRAAPKKQKHTSLPDTTLYNAAQIICANYGKAESVDK K (配列番号 44)	30
D195PD	MKKIILTSLGLLTACSAQIQKAEQNDVKLAPPTDVRSGYIRLVKNVNYYIDSES IWVDNQEPQIVHFDTVVNLDKGLYVYPEPKRYARSRVRQYKILNCANYHTQV RTDFYDEFWGQSLRAAPKKQKHTSLPDTTLYNAAQIICANYGKAESVDK KK (配列番号 45)	
D189PG	MKKIILTSLGLLTACSAQTQKVEQNDVKLTPPTDVRSGYVRLVKNVNYYIDSE SIWVDNQEPQIVHFDAVVNLDKGLYVYPEPKRYARSRVRQYKILNCANYHTQ VRTDFYDEFWGQGLRAAPKKQKHTSLPDTTVYNAAQIICANYGKAESVDK KK (配列番号 46)	
D189PD	MKKIILTSLGLLTACSAQTQKVEQNDVKLTPPTDVRSGYVRLVKNVNYYIDSE SIWVDNQEPQIVHFDAVVNLDKGLYVYPEPKRYARSRVRQYKILNCANYHTQ VRTDFYDEFWGQGLRAAPKKQKHTSLPDTTVYNAAQIICANYGKAESVDK	40

	KK (配列番号 47)	
D129CG	MKKIILTSLGLLTACSAQIQKAKQNDVKLAPPTDVRSGYIRLVKNVNYYIDSES IWVDNQEPQIVHFDAVVNLDKGLYVYPEPKRYARSVRQYKILNCANYHLTQV RTDFYDEFWGQGLRAAPKKQKHTSLPDTTLYNAAQIICANYGEAFSVDK K (配列番号 48)	
D124PG	MKKIILTSLGLLTACSAQIQKAEQNDVKLAPPTDVRSGYIRLVKNVNYYIDSES IWVDNQEPQIVHFDTVVNLDKGLYVYPEPKRYARSVRQYKILNCANYHLTQV RTDFYDEFWGQGLRAAPKKQKHTSLPDTTLYNAAQIICANYGKAFSVDK K (配列番号 49)	10
D124PD	MKKIILTSLGLLTACSAQIQKAEQNDVKLAPPTDVRSGYIRLVKNVNYYIDSES IWVDNQEPQIVHFDTVVNLDKGLYVYPEPKRYARSVRQYKILNCANYHLTQV RTDFYDEFWGQGLRAAPKKQKHTSLPDTTLYNAAQIICANYGKAFSVDK K (配列番号 50)	
D58PG	MKKIILTSLGLLTACSAQQTQKAEQNDVKLTPPTDVRSGYIRLVKNVNYYIDSE SIWVDNQEPQIVHFDAVVNLDKGLYVYPEPKRYARSVRQYKILNCANYHLTQ VRTDFYDEFWGQGLRAAPKKQKHTSLPDTTLYNAAQIICANYGKAFSVD K (配列番号 51)	
D33OD	MKKIILTSLGLLTACSAQIQKAKQNDVKLAPPTDVRSGYIRLVKNVNYYIDSES IWVDNQEPQIVHFDAVVNLDKGLYVYPEPKRYARSVRQYKILNCANYHLTQV RTDFYDEFWGQGLRAAPKKQKHTSLPDTTLYNAAQIICANYGKAFSVDK K (配列番号 52)	20
BS433	MKKIILTSLGLLTACSAQIQKAEQNDVKLAPPTDVRSGYIRLVKNVNYYIDSES IWVDNQEPQIVHFDTVVNLDKGLYVYPEPKRYARSVRQYKILNCANYHLTQV RTDFYDEFWGQGLRAAPKKQKHTSLPDTTLYNAAQIICANYGKAFSVDK K (配列番号 53)	
BS432	MKKIILTSLGLLTACSAQQTQKAEQNDVKLAPPTDVRSGYIRLVKNVNYYIDSE SIWVDNQEPQIVHFDAVVNLDKGLYVYPEPKRYARSVRQYKILNCANYHLTQI RTDFYDEFWGQGLRAAPKKQKHTSLPDTTLYNAAQIICANYGKAFSVDK K (配列番号 54)	
1714	MKKIILTSLGLLTACSAQIQKAKQNDVKLAPPTDVRSGYIRLVKNVNYYIDSES IWVDNQEPQIVHFDAVVNLDKGLYVYPEPKRYARSVRQYKILNCANYHLTQV RTDFYDEFWGQGLRAAPKKQKHTSLPDTTLYNAAQIICANYGEAFSVDK K (配列番号 55)	30
1128	MKKIILTSLGLLTACSAQIQKAEQNDVKLAPPTDVRSGYIRLVKNVNYYIDSES IWVDNQEPQIVHFDAVVNLDKGLYVYPEPKRYARSVRQYKILNCANYHLTQV RTDFYDEFWGQGLRAAPKKQKHTSLPDTTLYNAAQIICANYGKAFSVDK K (配列番号 56)	
BS430	MKKIILTSLGLLTACSAQIQKAEQNDMKLAPPTDVRSGYIRLVKNVNYYIDSE SI-VDNQEPQ IVHFDAVVNLDKGLYVYPEPKRYARSVRQYKILNCANYHLTQVRTDFYDEFW GQGLRAAPKKQKHTSLPDTTLYNAAQIICANYGKAFSVDKK (配列番号 57)	

タンパク質 E は、インフルエンザ菌株 3224A、Rd KW20、86-028NP、
R2846、R2866、3655、PittAA、PittEE、PittHH、PittII、
R3021、22.4-21、3219C、3185、3241A、0381
44S1、810956、821246、840645、902550Z19、A840
177、A860514、A950014、306543X4、A930105、901
905U、A920030、3221B、27W116791N、N218、N163、
N162、N107、N91、D211PG、D211PD、D201PG、D201P
D、D198PG、D198PD、D195PD、D189PG、D189PD、D12
9CG、D124PG、D124PD、D58PG、D33OD、BS433、BS43
2、1714、1128 または BS430 由来のタンパク質 E であり得る。タンパク質 E
は、配列番号 5 ~ 配列番号 57 のいずれかで示されるタンパク質 E であり得る。 50

【0027】

タンパク質Eは、配列番号4～配列番号57のいずれかとその全長にわたって少なくとも95%または98%、99%の同一性を有する配列であり得る。タンパク質Eは、表1の配列番号5～配列番号57で示される配列のいずれかとその全長にわたって少なくとも95%の同一性を有する配列であり得る。

【0028】

タンパク質Eの免疫原性断片は、配列番号4の少なくとも7、10、15、20、25、30または50個の連続するアミノ酸の免疫原性断片を含む。一実施形態では、前記断片は、タンパク質Eの150、125、100、75、または個未満のアミノ酸であり、例えば、一実施形態では、本発明の免疫原性組成物は、タンパク質Eの150、125、100、75または60個未満のアミノ酸を含む。10 前記免疫原性断片は、配列番号4と結合することができる抗体を惹起し得る。前記免疫原性断片は、配列番号4のB細胞および/T細胞エピトープを含み得る。

【0029】

タンパク質Eの免疫原性断片は、配列番号4～配列番号57のいずれかの少なくとも7、10、15、20、25、30または50個の連続するアミノ酸の免疫原性断片を含み得る。前記免疫原性断片は、その断片が由来する全長配列と結合することができる抗体を惹起し得る。前記免疫原性断片は、配列番号4～配列番号57のB細胞および/T細胞エピトープを含み得る。一実施形態では、タンパク質Eの免疫原性断片は、配列番号4のアミノ酸17～160（配列番号122）、配列番号4のアミノ酸18～160（配列番号123）、配列番号4のアミノ酸19～160（配列番号124）、配列番号4のアミノ酸20～160（配列番号125）および配列番号4のアミノ酸22～160（配列番号126）からなる群から選択される。別の実施形態では、タンパク質Eの免疫原性断片は、配列番号4のアミノ酸17～160（配列番号122）、配列番号4のアミノ酸18～160（配列番号123）、配列番号4のアミノ酸19～160（配列番号124）、配列番号4のアミノ酸20～160（配列番号125）、配列番号4のアミノ酸22～160（配列番号126）、配列番号4のアミノ酸23～160（配列番号179）および配列番号4のアミノ酸24～160（配列番号180）からなる群から選択される。20 さらなる実施形態では、インフルエンザ菌由来のタンパク質Eの免疫原性断片は、配列番号4のアミノ酸17～160（配列番号122）、配列番号4のアミノ酸18～160（配列番号123）、配列番号4のアミノ酸20～160（配列番号125）、配列番号4のアミノ酸22～160（配列番号126）、配列番号4のアミノ酸23～160（配列番号179）および配列番号4のアミノ酸24～160（配列番号180）からなる群から選択される。より具体的には、一実施形態では、前記免疫原性断片は、配列番号124、すなわち、配列番号4のアミノ酸19～160である。さらなる実施形態では、前記免疫原性断片は、配列番号125、すなわち、配列番号5のアミノ酸20～160である。別の実施形態では、前記免疫原性断片は、配列番号4のアミノ酸23～160（配列番号179）および配列番号4のアミノ酸24～160（配列番号180）からなる群から選択される、インフルエンザ菌由来のタンパク質Eの免疫原性断片である。30

【0030】

タンパク質Eは、100を超える臨床NTHi単離株、莢膜型インフルエンザ菌、および分析されたカルチャーコレクション株の間で保存されていることが報告されている（Singh et al, J. Infect. Dis. 201(3):414-9 (2010)）、上皮細胞結合領域（PKRYARSVRQ YKILNCANYH LTQVR、配列番号128）を含有する。Singhらは、タンパク質EがNTHiおよび莢膜型インフルエンザ菌の両方で保存性が高かったことを報告している（シグナルペプチドを除いて96.9%～100%の同一性）。一実施形態では、タンパク質Eの断片は、配列番号128（PKRYARSVRQ YKILNCANYH LTQVR）の結合領域を含む。

タンパク質E - 配列番号4

MKKIILTLSL GLLTACSAQI QKAEQNDVKL APPTDVRSGY IRLVKNVNYY IDSESIWVDN QEPQIVHFDA VVN LDKGLYV YPEPKRYARS VRQYKILNCA NYHLTQVRTD FYDEFWGQGL RAAPKKQKKH TLSLTPDTTL YNAAQI50

ICAN YGEAFSVDKK

配列番号 4 由来のタンパク質 E のアミノ酸 17 ~ 160 - 配列番号 122

SAQI QKAEQNDVKL APPTDVRSGY IRLVKNVNYY IDSESIWVDN QEPQIVHFDA VVNLDKGLYV YPEPKRYAR
S VRQYKILNCA NYHLTQVRTD FYDEFWGQGL RAAPKKQKKH TLSLTPDTTL YNAAQIICAN YGEAFSVDKK

配列番号 4 由来のタンパク質 E のアミノ酸 18 ~ 160 - 配列番号 123

AQI QKAEQNDVKL APPTDVRSGY IRLVKNVNYY IDSESIWVDN QEPQIVHFDA VVNLDKGLYV YPEPKRYARS
VRQYKILNCA NYHLTQVRTD FYDEFWGQGL RAAPKKQKKH TLSLTPDTTL YNAAQIICAN YGEAFSVDKK

配列番号 4 由来のタンパク質 E のアミノ酸 19 ~ 160 - 配列番号 124

QI QKAEQNDVKL APPTDVRSGY IRLVKNVNYY IDSESIWVDN QEPQIVHFDA VVNLDKGLYV YPEPKRYARS
VRQYKILNCA NYHLTQVRTD FYDEFWGQGL RAAPKKQKKH TLSLTPDTTL YNAAQIICAN YGEAFSVDKK

配列番号 4 由来のタンパク質 E のアミノ酸 20 ~ 160 - 配列番号 125

I QKAEQNDVKL APPTDVRSGY IRLVKNVNYY IDSESIWVDN QEPQIVHFDA VVNLDKGLYV YPEPKRYARS
RQYKILNCA NYHLTQVRTD FYDEFWGQGL RAAPKKQKKH TLSLTPDTTL YNAAQIICAN YGEAFSVDKK

配列番号 4 由来のタンパク質 E のアミノ酸 22 ~ 160 - 配列番号 126

KAEQNDVKL APPTDVRSGY IRLVKNVNYY IDSESIWVDN QEPQIVHFDA VVNLDKGLYV YPEPKRYARS VRQY
KILNCA NYHLTQVRTD FYDEFWGQGL RAAPKKQKKH TLSLTPDTTL YNAAQIICAN YGEAFSVDKK

配列番号 4 由来のタンパク質 E のアミノ酸 23 ~ 160 - 配列番号 179

AEQNDVKL APPTDVRSGY IRLVKNVNYY IDSESIWVDN QEPQIVHFDA VVNLDKGLYV YPEPKRYARS VRQYK
ILNCA NYHLTQVRTD FYDEFWGQGL RAAPKKQKKH TLSLTPDTTL YNAAQIICAN YGEAFSVDKK

配列番号 4 由来のタンパク質 E のアミノ酸 24 ~ 160 - 配列番号 180

EQNDVKL APPTDVRSGY IRLVKNVNYY IDSESIWVDN QEPQIVHFDA VVNLDKGLYV YPEPKRYARS VRQYK
LNCA NYHLTQVRTD FYDEFWGQGL RAAPKKQKKH TLSLTPDTTL YNAAQIICAN YGEAFSVDKK

一実施形態では、タンパク質 E またはその免疫原性断片は、配列番号 4 を認識する免疫応答を惹起し得る。第 1 のタンパク質が第 2 のタンパク質を認識する免疫応答を惹起し得るかどうかは E L I S A アッセイ（例えば、実施例 22 の記載の E L I S A）を用いて判定することができる。

P i l A

本明細書で使用する場合、「P i l A」は、インフルエンザ菌由来のピリン A を意味する。P i l A は、配列番号 58 (MKLTTQQTLK KGFTLIELMI VIAIIAILAT IAIPSYQNYT KKAADVSE
LLQ ASAPYKADVE LCVYSTNETT NCTGGKNGIA ADITTAKGYV KSVTTSNGAI TVKGDGTLAN MEYILQATGN
AATGVTWT TT CKGTDASLFP ANFCGSVTQ) のタンパク質配列ならびに配列番号 58 と 80% ~
100% の同一性を有する配列からなり得るか、または前記配列を含み得る。例えば、P
i l A は、配列番号 58 と少なくとも 80%、85%、90%、95%、97% または 100% 同一であり得る。インフルエンザ菌由来の P i l A の 64 の配列（表 2 の配列番号
58 ~ 配列番号 121）の全長比較によれば、配列番号 58 で示される P i l A とおよそ
80% ~ 100% の同一性が示された。例えば、P i l A のアミノ酸配列では、アミノ酸 # 6
はグルタミン (Q) またはロイシン (L) であり得；アミノ酸 # 7 はグルタミン (Q)
またはトレオニン (T) であり得；アミノ酸 # 37 はグルタミン (Q) またはリシン (K)
であり得；アミノ酸 # 6 はアラニン (A) またはセリン (S) であり得；アミノ酸 # 5
7 はアラニン (A) またはセリン (S) であり得；アミノ酸 # 67 はアスパラギン (N)
またはグリシン (G) であり得；アミノ酸 # 68 はグルタミン酸 (E) またはリシン (K)
であり得；アミノ酸 # 69 はトレオニン (threonine) (T) またはプロリン (P) であり得；
アミノ酸 # 71 はリシン (K)、アスパラギン (N)、セリン (S) またはトレオニン (T)
であり得；アミノ酸 # 73 はトレオニン (T)、セリン (S) またはメチオニン (M)
であり得；アミノ酸 # 76 はリシン (K)、セリン (S) またはアスパラギン (N)
であり得；アミノ酸 # 84 はトレオニン (T) またはリシン (K) であり得；アミノ酸 # 86
はアラニン (A) またはバリン (V) であり得；アミノ酸 # 91 はリシン (K)
またはアラニン (A) であり得；アミノ酸 # 94 はトレオニン (T)、イソロイシン (I)
またはリシン (K) であり得；アミノ酸 # 96 はセリン (S) またはグルタミン (Q)
であり得；アミノ酸 # 97 はアスパラギン (N) またはセリン (S) であり得アミノ酸 #

10

20

30

40

50

9 9 はアラニン (A) またはグリシン (G) であり得 ; アミノ酸 # 1 0 3 はアラニン (A) またはリシン (K) であり得 ; アミノ酸 # 1 0 9 はアスパラギン酸 (D) 、アラニン (A) またはトレオニン (T) であり得 ; アミノ酸 # 1 1 0 はグリシン (G) 、アスパラギン (N) 、またはアルギニン (R) であり得 ; アミノ酸 # 1 1 2 はセリン (S) またはグルタミン酸 (E) であり得 ; アミノ酸 # 1 1 4 はトレオニン (T) またはイソロイシン (I) であり得 ; アミノ酸 # 1 1 6 はトレオニン (T) またはグルタミン (Q) であり得 ; アミノ酸 # 1 1 8 はグルタミン酸 (E) 、トレオニン (T) 、アラニン (A) 、リシン (K) またはセリン (S) であり得 ; アミノ酸 # 1 2 1 はセリン (S) またはアラニン (A) であり得 ; アミノ酸 # 1 2 2 はアラニン (A) またはトレオニン (T) であり得 ; アミノ酸 # 1 2 3 はリシン (K) 、トレオニン (T) またはアラニン (A) であり得 ; アミノ酸 # 1 2 8 はリシン (K) またはトレオニン (T) であり得 ; アミノ酸 # 1 3 5 はアスパラギン酸 (D) またはグルタミン酸 (E) であり得 ; アミノ酸 # 1 3 6 はアラニン (A) またはトレオニン (T) であり得 ; アミノ酸 # 1 4 5 はグリシン (G) またはアルギニン (R) であり得 ; アミノ酸 # 1 4 9 はグルタミン (Q) またはリシン (K) であり得 ; またはそれらの任意の組合せであり得る。

【 0 0 3 1 】

P i 1 A は、アミノ酸 # 6 、アミノ酸 # 7 、アミノ酸 # 3 7 、アミノ酸 # 4 4 、アミノ酸 # 5 7 、アミノ酸 # 6 7 、アミノ酸 # 6 8 、アミノ酸 # 6 9 、アミノ酸 # 7 1 、アミノ酸 # 7 3 、アミノ酸 # 7 6 、アミノ酸 # 8 4 、アミノ酸 # 8 6 、アミノ酸 # 9 1 、アミノ酸 # 9 4 、アミノ酸 # 9 6 、アミノ酸 # 9 7 、アミノ酸 # 9 9 、アミノ酸 # 1 0 3 、アミノ酸 # 1 0 9 、アミノ酸 # 1 1 0 、アミノ酸 # 1 1 2 、アミノ酸 # 1 1 4 、アミノ酸 # 1 1 6 、アミノ酸 # 1 1 8 、アミノ酸 # 1 2 1 、アミノ酸 # 1 2 2 、アミノ酸 # 1 2 3 、アミノ酸 # 1 2 8 、アミノ酸 # 1 3 5 、アミノ酸 # 1 3 6 、アミノ酸 # 1 4 5 およびアミノ酸 # 1 4 9 からなる群から選択されるいずれか 1 以上のアミノ酸が配列番号 5 8 と異なるアミノ酸配列からなり得るか、または前記配列を含み得、ここで、アミノ酸 # 6 はロイシン (L) であり；アミノ酸 # 7 はトレオニン (T) であり；アミノ酸 # 3 7 はリシン (K) であり；アミノ酸 # 4 4 はセリン (S) であり；アミノ酸 # 5 7 はセリン (S) であり；アミノ酸 # 6 7 はグリシン (G) であり；アミノ酸 # 6 8 はリシン (K) であり；アミノ酸 # 6 9 はプロリン (P) であり；アミノ酸 # 7 1 はリシン (K) 、セリン (S) またはトレオニン (T) であり；アミノ酸 # 7 3 はセリン (S) またはメチオニン (M) であり；アミノ酸 # 7 6 はセリン (S) またはアスパラギン (N) であり；アミノ酸 # 8 4 はリシン (K) であり；アミノ酸 # 8 6 はバリン (V) であり；アミノ酸 # 9 1 はアラニン (A) であり；アミノ酸 # 9 4 はイソロイシン (I) またはリシン (K) であり；アミノ酸 # 9 6 はグルタミン (Q) であり；アミノ酸 # 9 7 はセリン (S) であり；アミノ酸 # 9 9 はグリシン (G) であり；アミノ酸 # 1 0 3 はアラニン (A) であり；アミノ酸 # 1 0 9 はアスパラギン酸 (D) またはトレオニン (T) であり；アミノ酸 # 1 1 0 はグリシン (G) またはアルギニン (R) であり；アミノ酸 # 1 1 2 はセリン (S) であり；アミノ酸 # 1 1 4 はトレオニン (T) であり；アミノ酸 # 1 1 6 はトレオニン (T) であり；アミノ酸 # 1 1 8 はグルタミン酸 (E) 、アラニン (A) 、リシン (K) またはセリン (S) であり；アミノ酸 # 1 2 1 はセリン (S) ；アミノ酸 # 1 2 2 はトレオニン (T) であり；アミノ酸 # 1 2 3 はリシン (K) またはアラニン (A) であり；アミノ酸 # 1 2 8 はリシン (K) であり；アミノ酸 # 1 3 5 はグルタミン酸 (E) であり；アミノ酸 # 1 3 6 はトレオニン (T) であり；アミノ酸 # 1 4 5 はアルギニン (R) であり；アミノ酸 # 1 4 9 はリシン (K) である。

【 0 0 3 2 】

【表2】

64 株のインフルエンザ菌 (*Haemophilus influenzae*) に由来する Pilin A アミノ酸配列 (配列番号 58~配列番号 121)

株名	Pilin A 配列	
86-028NP	MKLTTQQTLKKGFTLIELMIVIAIIAILATIAIPSYQNYTKKAAVSELLQASAPYKA DVELCVYSTNETTNCTGGKNGIAADITTAKGYVKSVTSNGAITVKGDGLAN MEYILQATGNAATGVTWTTCKGTDASLFPANFCGSVTQ (配列番号 58)	
NTHi3219C	MKLTTQQTLKKGFTLIELMIVIAIIAILATIAIPSYQNYTKKAAVSELLQASAPYKA DVELCVYSTNETTKCTGGKNGIAADITTAKGYVKSVTSNGAITVAGNGTLDG MSYTLTAEGDSAKGVTWTTCKGTDASLFPANFCGSVTQ (配列番号 59)	10
NTHi3224A	MKLTTQQTLKKGFTLIELMIVIAIIAILATIAIPSYQNYTKKAAVSELLQASAPYKA DVELCVYSTNETTNCTGGKNGIAADITTAKGYVKSVTSNGAITVKGDGLAN MEYILQATGNAATGVTWTTCKGTDASLFPANFCGSVTQ (配列番号 60)	
NTHi12	MKLTTQQTLKKGFTLIELMIVIAIIAILATIAIPSYKNYTKKAAVSELLQASAPYKA DVELCVYSTGKPSSCGGSNGIAADITTAKGYVASVITQSGGITVKGDGLAN MEYILQAAGNAAAGVTWTTCKGTDASLFPANFCGSVTQ (配列番号 61)	
NTHi44	MKLTTQQTLKKGFTLIELMIVIAIIAILATIAIPSYQNYTKKAAVSELLQASAPYKA DVELCVYSTNETTNCTGGKNGIAADITTAKGYVKSVTSNGAITVKGDGLAN MEYILQATGNAATGVTWTTCKGTDASLFPANFCGSVTQ (配列番号 62)	
NTHi67	MKLTTQQTLKKGFTLIELMIVIAIIAILATIAIPSYQNYTKKAAVSELLQASAPYKS DVELCVYSTGKPSTCGGSNGIAADITTVKGYVKSVTSNGAITVAGNGTLDG MSYTLTAEGDSAKGVTWTTCKGTDASLFPANFCGSVTQ (配列番号 63)	20
1054MEE	MKLTTQQTLKKGFTLIELMIVIAIIAILATIAIPSYQNYTKKAAVSELLQASAPYKA DVELCVYSTNETTNCTGGKNGIAADITTAKGYVKSVTSNGAITVKGDGLAN MEYILQATGNAATGVTWTTCKGTDASLFPANFCGSVTQ (配列番号 64)	
1729MEE	MKLTTQQTLKKGFTLIELMIVIAIIAILATIAIPSYQNYTKKAAVSELLQASAPYKA DVELCVYSTNETTNCTGGKNGIAADITTAKGYVKSVTSNGAITVKGDGLAN MEYILQATGNAATGVTWTTCKGTDASLFPANFCGSVTQ (配列番号 65)	
1728MEE	MKLTTQQTLKKGFTLIELMIVIAIIAILATIAIPSYQNYTKKAAVSELLQASAPYKA DVELCVYSTNETTNCTGGKNGIAADITTAKGYVKSVTSNGAITVKGDGLAN MEYILQATGNAATGVTWTTCKGTDASLFPANFCGSVTQ (配列番号 66)	30
1885MEE	MKLTTQQTLKKGFTLIELMIVIAIIAILATIAIPSYKNYTKKAAVSELLQASAPYKA DVELCVYSTNEITNCMGGKNGIAADITTAKGYVASVKTQSGGITVKGDGLAN MEYILQATGNAAGVTWTTCKGTDASLFPANFCGSITQ (配列番号 67)	
1060MEE	MKLTTQQTLKKGFTLIELMIVIAIIAILATIAIPSYQNYTKKASVSELLQASAPYKA DVELCVYSTNETTNCTGGKNGIAADITTAKGYVASVKTQSGGITVKGNGLAN MEYILQAKGNATAGVTWTTCKGTDASLFPANFCRSVTK (配列番号 68)	
RdKW20	MKLTTLQTLKKGFTLIELMIVIAIIAILATIAIPSYQNYTKKAAVSELLQASAPYKA DVELCVYSTNETSCTGGKNGIAADIKTAGYVASVITQSGGITVKGNGLAN MEYILQAKGNAAAGVTWTTCKGTDASLFPANFCGSVTK (配列番号 69)	
214NP	MKLTTQQTLKKGFTLIELMIVIAIIAILATIAIPSYQNYTKKAAVSELLQASAPYKA DVELCVYSTGKPSSCGGSNGIAADITTAKGYVKSVTSNGAITVKGDGLAN	40

	MEYILQASGNAATGVTWTTCKGTDASLFPANFCGSVTQ (配列番号 70)	
1236MEE	MKLTTQQLKKGFTLIELMIVIAIIAILATIAIPSYQNYTKKAAVSELLQASAPYKA DVELCVYSTNETSCTGGKNGIAADIKTAKGYVASVITQSGGITVKGNGLAN MEYILQAKGNAAGVTWTTCKGTDASLFPANFCGSVTK (配列番号 71)	
1714MEE	MKLTTQQLKKGFTLIELMIVIAIIAILATIAIPSYQNYTKKAAVSELLQASAPYKA DVELCVYSTGKPSTCGGSNGIAADITTAKGYVASVKTQSGGITVKGNGLAN MEYILQATGNAATGVTWTTCKGTDASLFPANFCGSVTQ (配列番号 72)	
1128MEE	MKLTTQQLKKGFTLIELMIVIAIIAILATIAIPSYQNYTKKASVSELLQASAPYKS DVELCVYSTGKPSTCGGSNGIAADITTAKGYVASVKTQSGGITVKGNGLAN MEYILQAKGNATAGVTWTTCKGTDASLFPANFCRSVTK (配列番号 73)	10
R2846	MKLTTQQLKKGFTLIELMIVIAIIAILATIAIPSYQNYTKKAAVSELLQASAPYKA DVELCVYSTNETTNCTGGKNGIAADITTAKGYVASVKTQSGGITVKGDGLAN MEYILQATGNAATGVTWTTCKGTDASLFPANFCGSVTQ (配列番号 74)	
R2866	MKLTTQQLKKGFTLIELMIVIAIIAILATIAIPSYQNYTKKAAVSELLQASAPYKA DVELCVYSTNETTNCTGGKNGIAADITTAKGYVASVKTQSGGITVKGDGLAN MEYILQATGNAATGVTWTTCKGTEASLFPANFCGSVTQ (配列番号 75)	
3655	MKLTTQQLKKGFTLIELMIVIAIIAILATIAIPSYQNYTKKASVSELLQASAPYKA DVELCVYSTNETTNCTGGKNGIAADITTAKGYVASVKTQSGGITVKGNGLAN MEYILQAKGNATAGVTWTTCKGTDASLFPANFCRSVTK (配列番号 76)	
PittAA	MKLTTQQLKKGFTLIELMIVIAIIAILATIAIPSYQNYTKKAAVSELLQASAPYKA DVELCVYSTGKPSTCGGSNGIAADITTAKGYVASVKTQSGGITVKGNGLAN MEYILQATGNAATGVTWTTCKGTDASLFPANFCGSVTQ (配列番号 77)	20
PittGG	MKLTTQQLKKGFTLIELMIVIAIIAILATIAIPSYQNYTKKAAVSELLQASAPYKA DVELCVYSTGKPSTCGGSNGIAADITTAKGYVASVKTQSGGITVKGNGLAN MEYILQAKGNATAGVTWTTCKGTDASLFPANFCRSVTK (配列番号 78)	
PittII	MKLTTQQLKKGFTLIELMIVIAIIAILATIAIPSYQNYTKKAAVSELLQASAPYKA DVELCVYSTNETTNCTGGKNGIAADITTAKGYVASVKTQSGGITVKGDGLAN MEYILQATGNAATGVTWTTCKGTEASLFPANFCGSVTQ (配列番号 79)	
R3021	MKLTTQQLKKGFTLIELMIVIAIIAILATIAIPSYQNYTKKAAVSELLQASAPYKA DVELCVYSTNETTNCTGGKNGIAADITTAKGYVASVKTQSGGITVKGDGLAN MEYILQATGNAATGVTWTTCKGTEASLFPANFCGSVTQ (配列番号 80)	
22.4-21	MKLTTQQLKKGFTLIELMIVIAIIAILATIAIPSYQNYTKKAAVSELLQASAPYKS DVELCVYSTGKPSTCGGSNGIAADITTAKGYVASVKTQSGGITVKAGNTLDG MSYTLTAEGDSAKGVTWKTCKGTDASLFPANFCGSVTK (配列番号 81)	30
3185A	MKLTTQQLKKGFTLIELMIVIAIIAILATIAIPSYQNYTKKAAVSELLQASAPYKA DVELCVYSTNEATKCTGGKNGIAADITTAKGYVASVKTQSGGITVKGDGLAN MEYILQASGNAATGVTWTTCKGTDASLFPANFCGSVTQ (配列番号 82)	
3221B	MKLTTQQLKKGFTLIELMIVIAIIAILATIAIPSYQNYTKKAAVSELLQASAPYKA DVELCVYSTNEATKCTGGKNGIAADITTAKGYVASVKTQSGGITVKGDGLAN MEYILQASGNAATGVTWTTCKGTDASLFPANFCGSVTQ (配列番号 83)	
3241A	MKLTTQQLKKGFTLIELMIVIAIIAILATIAIPSYQNYTKKAAVSELLQASAPYKA DVELCVYSTNETTNCTGGKNGIAADITTAKGYVASVKTQSGGITVKGDGLAN	40

	MEYILQATGNAATGVTWTTCKGTDASLFPANFCGSVTQ (配列番号 84)	
038144S1	MKLTTQQTLKKGFTLIELMIVIAIIAILATIAIPSYQNYTKKAAISELLQASAPYKSD DVELCVYSTGKPSTCGGSNGIAADITTAKGYVASVKTQSGGITVKGNGLAN MEYILQAKGNATAGVTWTTCKGTDASLFPANFCRSVTK (配列番号 85)	
821246	MKLTTQQTLKKGFTLIELMIVIAIIAILATIAIPSYQNYTKKAAVSELLQASAPYKA DVELCVYSTNETTNCTGGKNGIAADITTAKGYVASVKTQSGGITVKGDGLAN MEYILQATGNAATGVTWTTCKGTEASLFPANFCGSVTQ (配列番号 86)	10
840645	MKLTTQQTLKKGFTLIELMIVIAIIAILATIAIPSYQNYTKKAAVSELLQASAPYKA DVELCVYSTNETTNCTGGKNGIAADITTAKGYVKSVTTSNGAITVKGDGLAN MEYILQATGNAATGVTWTTCKGTDASLFPANFCGSVTQ (配列番号 87)	
902550Z19	MKLTTQQTLKKGFTLIELMIVIAIIAILATIAIPSYQNYTKKAAVSELLQASAPYKS DVELCVYSTGKPSTCGGSNGIAADITTVKGYVKSVTTSNGAITVAGNGTLDG MSYLTAEGDSAKGVTWTTCKGTDASLFPANFCGSVTQ (配列番号 88)	
A840177	MKLTTQQTLKKGFTLIELMIVIAIIAILATIAIPSYQNYTKKAAVSELLQASAPYKA DVELCVYSTNETTNCTGGKNGIAADITTAKGYVKSVTTSNGAITVKGDGLAN MEYILQATGNAATGVTWTTCKGTDASLFPANFCGSVTQ (配列番号 89)	
A920030	MKLTTQQTLKKGFTLIELMIVIAIIAILATIAIPSYQNYTKKAAVSELLQASAPYKA DVELCVYSTNETTNCTGGKNGIAADITTAKGYVASVKTQSGGITVKGNGLAN MEYILQATGNAATGVTWTTCKGTDASLFPANFCGSVTQ (配列番号 90)	20
A950014	MKLTTQQTLKKGFTLIELMIVIAIIAILATIAIPSYQNYTKKAAVSELLQASAPYKA DVELCVYSTGKPSTCGGSNGIAADITTAKGYVKSVTTSNGAITVAGNGTLDR MSYLTAEGDSAKGVTWTTCKGTDASLFPANFCGSVTQ (配列番号 91)	
901905U	MKLTTQQTLKKGFTLIELMIVIAIIAILATIAIPSYQNYTKKAAVSELLQASAPYKA DVELCVYSTGKPSSCSGGSNGIAADITTAKGYVKSVTTSNGAITVKGDGLAN MEYILQASGNAATGVTWTTCKGTDASLFPANFCGSVTQ (配列番号 92)	
A920029	MKLTTQTTLKKGFTLIELMIVIAIIAILATIAIPSYQNYTKKAAVSELLQASAPYKS DVELCVYSTNETTNCTGGKNGIAADITTAKGYVASVITQSGGITVKGNGLTN MEYILQATGNAATGVTWTTCKGTDASLFPANFCGSITQ (配列番号 93)	
A930105	MKLTTLQTLKKGFTLIELMIVIAIIAILATIAIPSYQNYTKKAAVSELLQASAPYKA DVELCVYSTGKPSTCGGNNNGIAADIKTAGYVASVKTQSGGITVKGDGLA NMEYILQATGNAATGVTWTTCKGTDASLFPANFCGSVTQ (配列番号 94)	30
306543X4	MKLTTQQTLKKGFTLIELMIVIAIIAILATIAIPSYQNYTKKAAVSELLQASAPYKA DVELCVYSTGKPSSCSGGSNGIAADITTAKGYVKSVTTSNGAITVKGDGLAN MEYILQASGNAATGVTWTTCKGTDASLFPANFCGSVTQ (配列番号 95)	
N218	MKLTTQQTLKKGFTLIELMIVIAIIAILATIAIPSYQNYTKKAAVSELLQASAPYKA DVELCVYSTNEATKCTGGKNGIAADITTAKGYVKSVTTSNGAITVKGDGLAN MEYILQASGNAATGVTWTTCKGTDTSLFPANFCGSVTQ (配列番号 96)	
N163	MKLTTQQTLKKGFTLIELMIVIAIIAILATIAIPSYQNYTKKAAVSELLQASAPYKA DVELCVYSTNETTNCTGGKNGIAADITTAKGYVKSVTTSNGAITVKGDGLAN MEYILQATGNAATGVTWTTCKGTDASLFPANFCGSVTQ (配列番号 97)	
N162	MKLTTQQTLKKGFTLIELMIVIAIIAILATIAIPSYQNYTKKAAVSELLQASAPYKA DVELCVYSTNETTNCTGGKNGIAADITTAKGYVASVKTQSGGITVKGNGLAN	40

	MEYILQATGNAATGVTWTTCKGTDASLFPANFCGSVTQ (配列番号 98)	
N120	MKLTTQQTLKKGFTLIELMIVIAIIAILATIAIPSYQNYTKKAAVSELLQASAPYKA DVELCVYSTGKPSTCGGSNGIAADITTAKGYVASVKTQSGGITVKGNGLAN MEYILQAKGNATAGVTWTTCKGTDASLFPANFCRSVTK (配列番号 99)	
N107	MKLTTQQTLKKGFTLIELMIVIAIIAILATIAIPSYQNYTKKAAVSELLQASAPYKA DVELCVYSTGKPSTCGGSNGIAADITTAKGYVASVKTQSGGITVKGNGLAN MEYILQAKGNATAGVTWTTCKGTDASLFPANFCRSVTK (配列番号 100)	
N92	MKLTTQQTLKKGFTLIELMIVIAIIAILATIAIPSYQNYTKKAAVSELLQASAPYKA DVELCVYSTNETTNCTGGKNGIAADITTAKGYVKSVTSNGAITVKGDGLAN MEYILQATGNAATGVTWTTCKGTDASLFPANFCGSVTQ (配列番号 101)	10
N91	MKLTTQQTLKKGFTLIELMIVIAIIAILATIAIPSYQNYTKKAAVSELLQASAPYKA DVELCVYSTGKPSTCGGSNGIAADITTAKGYVASVKTQSGGITVKGNGLAN MEYILQAKGNATAGVTWTTCKGTDASLFPANFCRSVTK (配列番号 102)	
D219PG	MKLTTQQTLKKGFTLIELMIVIAIIAILATIAIPSYQNYTKKAAVSELLQASAPYKA DVELCVYSTNEATKCTGGKNGIAADITTAKGYVKSVTSNGAITVKGDGLAN MEYILQASGNAATGVTWTTCKGTDASLFPANFCGSVTQ (配列番号 103)	
D211PG	MKLTTQQTLKKGFTLIELMIVIAIIAILATIAIPSYQNYTKKAAVSELLQASAPYKA DVELCVYSTNETTNCTGGKNGIAADITTAKGYVKSVTSNGAITVKGDGLAN MEYILQATGNAATGVTWTTCKGTDASLFPANFCGSVTQ (配列番号 104)	
D211PD	MKLTTQQTLKKGFTLIELMIVIAIIAILATIAIPSYQNYTKKAAVSELLQASAPYKA DVELCVYSTNETTNCTGGKNGIAADITTAKGYVKSVTSNGAITVKGDGLAN MEYILQATGNAATGVTWTTCKGTDASLFPANFCGSVTQ (配列番号 105)	20
D204CD	MKLTTQQTLKKGFTLIELMIVIAIIAILATIAIPSYQNYTKKAAVSELLQASAPYKA DVELCVYSTNETTNCTGGKNGIAADITTAKGYVKSVTSNGAITVKGDGLAN MEYILXATGNAATGVTWTTCKGTDASLFPANFCGSVTQ (配列番号 106)	
D198PG	MKLTTQQTLKKGFTLIELMIVIAIIAILATIAIPSYQNYTKKAAVSELLQASAPYKA DVELCVYSTNETTNCTGGKNGIAADITTAKGYVKSVTSNGAITVKGDGLAN MEYILQATGNAATGVTWTTCKGTDASLFPANFCGSVTQ (配列番号 107)	
D198PD	MKLTTQQTLKKGFTLIELMIVIAIIAILATIAIPSYQNYTKKAAVSELLQASAPYKA DVELCVYSTNETTNCTGGKNGIAADITTAKGYVKSVTSNGAITVKGDGLAN MEYILQATGNAATGVTWTTCKGTDASLFPANFCGSVTQ (配列番号 108)	30
D195PD	MKLTTLQTLKKGFTLIELMIVIAIIAILATIAIPSYQNYTKKAAVSELLQASAPYKA DVELCVYSTGKPSTCGGNNGIAADIKTAKGYVASVKTQSGGITVKGDGLA NMEYILQATGNAATGVTWTTCKGTDASLFPANFCGSVTQ (配列番号 109)	
D195CD	MKLTTLQTLKKGFTLIELMIVIAIIAILATIAIPSYQNYTKKAAVSELLQASAPYKA DVELCVYSTGKPSTCGGNNGIAADIKTAKGYVASVKTQSGGITVKGDGLA NMEYILQATGNAATGVTWTTCKGTDASLFPANFCGSVTQ (配列番号 110)	
D189PG	MKLTTQQTLKKGFTLIELMIVIAIIAILATIAIPSYQNYTKKAAVSELLQASAPYKA DVELCVYSTNETSCTGGKNGIAADITTAKGYVKSVTSNGAITVAGNGTLDG MSYLTAEQDSAKGVTWKTCKGTDASLFPANFCGSVTQ (配列番号 111)	
D189PD	MKLTTQQTLKKGFTLIELMIVIAIIAILATIAIPSYQNYTKKAAVSELLQASAPYKA DVELCVYSTNETSCTGGKNGIAADITTAKGYVKSVTSNGAITVAGNGTLDG	40

	MSYLTAEGDSAKGVTWKTTCKGTDASLFPANFCGSVTQ (配列番号 112)
D124PG	MKLTLQTLKKGFTLIELMIVIAIIAILATIAIPSYQNYTKKAAVSELLQASAPYKA DVELCVYSTGKPSTCSGGNNNGIAADIKTAKGYVASVKTQSGGITVKGDGLA NMEYILQATGNAATGVTWTTCKGTDASLFPANFCGSVTQ (配列番号 113)
D124PD	MKLTLQTLKKGFTLIELMIVIAIIAILATIAIPSYQNYTKKAAVSELLQASAPYKA DVELCVYSTGKPSTCSGGNNNGIAADIKTAKGYVASVKTQSGGITVKGDGLA NMEYILQATGNAATGVTWTTCKGTDASLFPANFCGSVTQ (配列番号 114)
D124CG	MKLTLQTLKKGFTLIELMIVIAIIAILATIAIPSYQNYTKKAAVSELLQASAPYKA DVELCVYSTGKPSTCSGGNNNGIAADIKTAKGYVASVKTQSGGITVKGDGLA NMEYILQATGNAATGVTWTTCKGTDASLFPANFCGSVTQ (配列番号 115)
D58PG	MKLTTQTLKKGFTLIELMIVIAIIAILATIAIPSYQNYTKKAAVSELLQASAPYKA DVELCVYSTNETTNCTGGKNGIAADITTAKGYVASVKTQSGGITVKGDGLAN MEYILQATGNAATGVTWTTCKGTEASLFPANFCGSVTQ (配列番号 116)
BS433	MKLTTQTLKKGFTLIELMIVIAIIAILATIAIPSYQNYTKKAAVSELLQASAPYKA DVELCVYSTGKPSTCSGGNNNGIAADIKTAKGYVASVKTQSGGITVKGDGLA NMEYILQATGNAATGVTWTTCKGTDASLFPANFCGSVTQ (配列番号 117)
BS432	MKLTTQQTLLKGFTLIELMIVIAIIAILATIAIPSYQNYTKKAAVSELLQASAPYKA DVELCVYSTGKPSTCSGGNSNGIAADITTAKGYVASVKTQSGGITVKGNGLAN MEYILQAKGNATAGVTWTTCKGTDASLFPANFCRSVTK (配列番号 118)
BS430	MKLTTQQTLLKGFTLIELMIVIAIIAILATIAIPSYQNYTKKAAVSELLQASAPYKA DVELCVYSTNEATKCTGGKNGIAADITTAKGYVKSVTSNGAITVKGDGLAN MEYILQASGNATGVTWTTCKGTDASLFPANFCGSVTQ (配列番号 119)
1714	MKLTTQTLKKGFTLIELMIVIAIIAILATIAIPSYQNYTKKAAVSELLQASAPYKA DVELCVYSTGKPSTCSGGNSNGIAADITTAKGYVASVKTQSGGITVKGNGLAN MEYILQATGNAATGVTWTTCKGTDASLFPANFCGSVTQ (配列番号 120)
1128	MKLTTQQTLLKGFTLIELMIVIAIIAILATIAIPSYQNYTKKASVSELLQASAPYKS DVELCVYSTGKPSTCSGGNSNGIAADITTAKGYVASVKTQSGGITVKGNGLAN MEYILQAKGNATAGVTWTTCKGTDASLFPANFCRSVTK (配列番号 121)

P i l A は、インフルエンザ菌株 N T H i 3 2 1 9 C 、 N T H i 3 2 2 4 A 、 N T H i 1 2 、 N T H i 4 4 、 N T H i 6 7 、 1 0 5 4 M E E 、 1 7 2 9 M E E 、 1 7 2 8 M E E 、 1 8 8 5 M E E 、 1 0 6 0 M E E 、 R d K W 2 0 、 2 1 4 N P 、 1 2 3 6 M E E 、 1 7 1 4 M E E 、 1 1 2 8 M E E 、 8 6 - 0 2 8 N P 、 R 2 8 4 6 、 R 2 8 6 6 、 3 6 5 5 、 P i t t A A 、 P i t t G G 、 P i t t I I 、 R 3 0 2 1 、 2 2 . 4 - 2 1 、 3 1 8 5 A 、 3 2 2 1 B 、 3 2 4 1 A 、 0 3 8 1 4 4 S 1 、 8 2 1 2 4 6 、 8 4 0 6 4 5 、 9 0 2 5 5 0 Z 1 9 、 A 8 4 0 1 7 7 、 A 9 2 0 0 3 0 、 A 9 5 0 0 1 4 、 9 0 1 9 0 5 U 、 A 9 2 0 0 2 9 、 A 9 3 0 1 0 5 、 3 0 6 5 4 3 X 4 、 N 2 1 8 、 N 1 6 3 、 N 1 6 2 、 N 1 2 0 、 N 1 0 7 、 N 9 2 、 N 9 1 、 D 2 1 9 P G 、 D 2 1 1 P G 、 D 2 1 1 P D 、 D 2 0 4 C D 、 D 1 9 8 P G 、 D 1 9 8 P D 、 D 1 9 5 P D 、 D 1 9 5 C D 、 D 1 8 9 P G 、 D 1 8 9 P D 、 D 1 2 4 P G 、 D 1 2 4 P D 、 D 1 2 4 C G 、 D 5 8 P G 、 B S 4 3 3 、 B S 4 3 2 、 B S 4 3 0 、 1 7 1 4 または 1 1 2 8 由来の P i l A であり得る。インフルエンザ菌株 D 2 0 4 C D 由来の P i l A のアミノ酸配列は配列番号 1 0 6 で示され、ここで、X の # 1 1 6 の位置はグルタミン (Q) またはロイシン (L) のいずれかであり；# 1 1 6 の位置におけるアミノ酸についての曖昧さは、アミノ酸 # 1 1 6 をコードする第 2 のヌクレオチドの、D 2 0 4 C D 株の P i l A 配列を明らかにする技術的解決によって明瞭にすることができる。P i l A は、配列番号 5 8 ~ 配列番号 1 2 1 のいずれかで示される P i l A であり得る。

【 0 0 3 3 】

P i l A は、配列番号 5 8 ~ 配列番号 1 2 1 (表 2 に示される通り) のいずれかとその全長にわたって少なくとも 9 5 % 、 9 8 % 、または 9 9 % の同一性を有する配列であり得る。

10

20

30

40

50

【0034】

P_i1Aの免疫原性断片は、配列番号～配列番号121の少なくとも7、10、15、20、25、30または50個の連続するアミノ酸の免疫原性断片を含む。免疫原性断片は、その断片が由来する全長配列と結合することができる抗体を惹起し得る。前記免疫原性断片は、配列番号58～配列番号121のB細胞および/またはT細胞エピトープを含み得る。

【0035】

例えば、P_i1Aの免疫原性断片は、配列番号58の少なくとも7、10、15、20、25、30または50個の連続するアミノ酸の免疫原性断片を含む。一実施形態では、P_i1Aの免疫原性断片は、P_i1Aの150、125、100、75、または60個未満のアミノ酸を含み、さらなる実施形態では、P_i1Aの免疫原性組成物は、150、125、100、75または60個未満のアミノ酸を含む。免疫原性断片は、配列番号58と結合することができる抗体を惹起し得る。免疫原性断片は、配列番号58のB細胞および/またはT細胞エピトープを含み得る。

【0036】

一実施形態では、P_i1Aの免疫原性断片は、P_i1Aが配列番号58である、インフルエンザ菌86-028NP株由来の断片である。

【0037】

インフルエンザ菌86-028NP株由来のP_i1A - 配列番号58

MKLTTQQQLK KGFTLIELMI VIAIIAILAT IAIPSYQNYT KKAVALLLQ ASAPYKADVE LCVYSTNETT NCTGGKNGIA ADITTAKGYV KSVTTSNGAI TVKGDGTLAN MEYILQATGN AATGVTWTTT CKGTDASLFP ANFCGSVTQL

20

別の実施形態では、P_i1Aの免疫原性断片は、配列番号127とおよそ少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、98%または99%同一である。より具体的には、一実施形態では、P_i1Aの免疫原性断片は、配列番号127、すなわち、配列番号58のアミノ酸40～149からなる断片である。

【0038】

インフルエンザ菌86-028NP株由来のP_i1Aのアミノ酸40～149 - 配列番号127

T KKAVALLLQ ASAPYKADVE LCVYSTNETT NCTGGKNGIA ADITTAKGYV KSVTTSNGAI TVKGDGTLAN MEYILQATGN AATGVTWTTT CKGTDASLFP ANFCGSVTQ

30

別の実施形態では、P_i1Aの免疫原性断片は、配列番号58～配列番号121のいずれかに由来のアミノ酸40～149からなる。さらなる実施形態では、免疫原性断片は、配列番号58～配列番号121のいずれかに由来のアミノ酸40～149と少なくとも95%同一である。

【0039】

ポリペプチド間の同一性は、様々なアルゴリズムによって計算され得る。例えば、EMBOSSパッケージ(フリーソフトウェア; EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite (2000). Trends in Genetics 16(6): 276-277)のNeedleプログラムおよびGCG(登録商標)パッケージ(Accelrys Inc.)のGapプログラムが使用可能である。このGapプログラムは、Needleman, S. B. and Wunsch, C. D. (1970) J. Mol. Biol. 48, 443-453に記載のNeedleman-Wunschアルゴリズムの実装形態である。BLOSUM62スコアリングマトリックスが使用されており、ギャップオープンペナルティーおよびエクステンションペナルティーはそれぞれ8および2であった。

40

【0040】

コンピューター処理されたアラインメントを調べれば、2つの比較配列間で同一の残基を見出すことができる。同一性パーセンテージは、(1)同一の数をアラインメントの長さで割った商に100を掛けること(例えば、Needleプログラム分析の場合)、(2)同一の数を最長配列の長で割った商に100を掛けること、(3)同一の数を最短配

50

列の長さで割った商に 100 を掛けること、または(4)同一の数をアラインされた残基の数で割った商に 100 を掛けること(ある残基が別の残基の正面にくる場合にその残基はアラインされたという)(例えば、Gap プログラム分析の場合)によりコンピューター処理され得る。

【0041】

一実施形態では、PilA は、配列番号 58 を認識する免疫応答を惹起し得る。

タンパク質 E / PilA 融合タンパク質

一実施形態では、タンパク質 E および PilA は、融合タンパク質中に存在する。さらなる実施形態では、融合タンパク質は式(I) :

$$L(X)_m - (R_1)_n - A - (Y)_o - B - (Z)_p \quad (\text{式 I}) \quad 10$$

を有し、式中、

X は、シグナルペプチドまたは MHHHHHH (配列番号 2) であり ;

m は、0 または 1 であり ;

R₁ は、アミノ酸であり ;

n は、0、1、2、3、4、5 または 6 であり ;

A は、インフルエンザ菌由来のタンパク質 E もしくはその免疫原性断片、またはインフルエンザ菌由来の PilA もしくはその免疫原性断片であり ;

Y は、GG、SG、SS、GGG および (G)_h (ここで、h は 4、5、6、7、8、9、または 10 である) からなる群から選択され ;

o は、0 または 1 であり ;

B は、インフルエンザ菌由来の PilA もしくはその免疫原性断片、またはインフルエンザ菌由来のタンパク質 E もしくはその免疫原性断片であり ;

Z は、GGHHHHHH (配列番号 3) であり ; かつ

p は、0 または 1 である。

【0042】

一実施形態では、X が CcmH (シトクロム c 膜タンパク質 H)、DsbA (周辺質タンパク質ジスルフィド異性化 I)、DsbB (ジスルフィド結合膜タンパク質 B)、F1gI (鞭毛ペプチドグリカン環タンパク質)、FocC (F1c シャペロンタンパク質)、MalE (マルトース輸送体サブユニット E)、NadA (キノリン酸シンターゼサブユニット A)、NikA (ニッケル ABC 輸送体成分 A)、NspA (ナイセリア表面タンパク質 A)、Omp26 (外膜タンパク質 26)、OmpA (外膜タンパク質 A)、OspA (外表タンパク質 A)、pelB (ペクチン酸リアーゼ B)、PhoA (細菌アルカリ性ホスファターゼ)、PhtD (ポリヒスチジントライアドタンパク質 D)、PhtE (ポリヒスチジトライアドタンパク質 E)、SfmC (周辺質ピリンシャペロン)、Sip1 (表面免疫原性タンパク質)、TolB (Tol-Pal 細胞エンベロープ複合体成分 B)、TorA (トリメチルアミン N - オキシドレダクターゼシステムサブユニット A)、TorT (トリメチルアミン N - オキシドレダクターゼシステム周辺質タンパク質 T) および Yral (推定周辺質ピリンシャペロン) ; またはそれらのいずれかのサブループからなる群から選択されるシグナル配列である、式(I)の融合タンパク質が定義される。一実施形態では、X は、共翻訳シグナルペプチドまたは翻訳後シグナルペプチドである。一実施形態では、X は、F1gI 由来のシグナル配列 (f1gI_sip) である。別の特定の実施形態では、X は、pelB 由来のシグナル配列 (pelB_sip) である。別の実施形態では、X は、翻訳後シグナルペプチドである。別の実施形態では、X は、F1gI、NadA および pelB 由来のシグナル配列からなる群から選択される。

【0043】

一実施形態では、m が 1 である式(I)の融合タンパク質が定義される。別の実施形態では、m は 0 である。

【0044】

ある特定の実施形態では、(R₁)_n が、小型の、通常は親水性のアミノ酸が富化された 1 ~ 6 個のアミノ酸である R₁ および n が定義される。親水性アミノ酸には、グルタミ

10

20

30

40

50

ン酸(E)、アスパラギン酸(D)およびアスパラギン(N)が含まれる。

【 0 0 4 5 】

一実施形態では、nが0、1、2および6からなる群から選択される式(I)の融合タンパク質が定義される。ある特定の実施形態では、(R₁)_nがD、E、ATND_{DD}(配列番号178)およびMDまたはそれらのいずれかのサブセットからなる群から選択されるR₁およびnが定義される。

【 0 0 4 6 】

ある特定の実施形態では、nは、1、2および6からなる群から選択される。ある特定の実施形態では、nは0である。

【 0 0 4 7 】

一実施形態では、Aがインフルエンザ菌由来のタンパク質Eである式(I)の融合タンパク質が定義される。別の実施形態では、Aが配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号11、配列番号12、配列番号13、配列番号14、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19、配列番号20、配列番号21、配列番号22、配列番号23、配列番号24、配列番号25、配列番号26、配列番号27、配列番号28、配列番号29、配列番号30、配列番号31、配列番号32、配列番号33、配列番号34、配列番号35、配列番号36、配列番号37、配列番号38、配列番号39、配列番号40、配列番号41、配列番号42、配列番号43、配列番号44、配列番号45、配列番号46、配列番号47、配列番号48、配列番号49、配列番号50、配列番号51、配列番号52、配列番号53、配列番号54、配列番号55、配列番号56および配列番号57；または配列番号5～配列番号57のいずれかのサブセットからなる群から選択されるアミノ酸配列によりコードされるようなタンパク質Eである式(I)の融合タンパク質が定義される。別の実施形態では、Aはタンパク質Eであり、タンパク質Eは配列番号4で示されるタンパク質Eのアミノ酸配列とおよそ少なくとも75%、80%、85%、90%、92%、95%、98%または99%同一である式(I)の融合タンパク質が定義される。別の実施形態では、Aはタンパク質Eであり、タンパク質Eは、配列番号4で示されるタンパク質Eのアミノ酸配列とおよそ90%～100%同一である。別の実施形態では、Aはタンパク質Eであり、タンパク質Eは、配列番号4で示されるタンパク質Eのアミノ酸配列と少なくとも95%同一である。さらなる実施形態では、Aはタンパク質Eであり、タンパク質Eは、配列番号4～配列番号57のいずれかで示されるタンパク質Eと少なくとも95%同一である。特定の実施形態では、Aは、配列番号4で示されるアミノ酸配列を有するタンパク質Eである。

【 0 0 4 8 】

別の実施形態では、Aがインフルエンザ菌由来のタンパク質Eの免疫原性断片である式(I)の融合タンパク質が定義される。別の実施形態では、Aはタンパク質Eの免疫原性断片であり、タンパク質Eは、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号11、配列番号12、配列番号13、配列番号14、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19、配列番号20、配列番号21、配列番号22、配列番号23、配列番号24、配列番号25、配列番号26、配列番号27、配列番号28、配列番号29、配列番号30、配列番号31、配列番号32、配列番号33、配列番号34、配列番号35、配列番号36、配列番号37、配列番号38、配列番号39、配列番号40、配列番号41、配列番号42、配列番号43、配列番号44、配列番号45、配列番号46、配列番号47、配列番号48、配列番号49、配列番号50、配列番号51、配列番号52、配列番号53、配列番号54、配列番号55、配列番号56および配列番号57；または配列番号4～配列番号57のいずれかのサブセットからなる群から選択されるアミノ酸配列を有する。別の実施形態では、Aはタンパク質Eの免疫原性断片であり、タンパク質Eは、配列番号4で示されるアミノ酸配列とおよそ75%、80%、85%、90%、92%、95%、98%または99%同一である。別の実施形態では、Aはタンパク質Eの免疫原性断片であり、

10

20

30

40

50

タンパク質Eは、配列番号4とおよそ90%～100%同一である。さらなる実施形態では、Aはタンパク質Eの免疫原性断片であり、タンパク質Eは、配列番号4～配列番号57のいずれかと少なくとも95%同一である。より具体的には、一実施形態では、Aはタンパク質Eの免疫原性断片であり、タンパク質Eは、配列番号124と少なくとも93%、95%、98%、99%または100%同一である。特定の実施形態では、Aはタンパク質Eの免疫原性断片であり、タンパク質Eは配列番号4である。

【0049】

別の実施形態では、Aは、配列番号4のアミノ酸17～160配列番号122)、配列番号4のアミノ酸18～160(配列番号123)、配列番号4のアミノ酸19～160(配列番号124)、配列番号4のアミノ酸20～160(配列番号125)および配列番号4のアミノ酸22～160(配列番号126)からなる群から選択されるインフルエンザ菌由来のタンパク質Eの免疫原性断片である。別の実施形態では、Aは、配列番号4のアミノ酸17～160(配列番号122)、配列番号4のアミノ酸18～160(配列番号123)、配列番号4のアミノ酸19～160(配列番号124)、配列番号4のアミノ酸20～160(配列番号125)、配列番号4のアミノ酸22～160(配列番号126)、配列番号4のアミノ酸23～160(配列番号179)および配列番号4のアミノ酸24～160(配列番号180)からなる群から選択されるインフルエンザ菌由来のタンパク質Eの免疫原性断片である。さらなる実施形態では、Aは、配列番号4のアミノ酸17～160(配列番号122)、配列番号4のアミノ酸18～160(配列番号123)、配列番号4のアミノ酸20～160(配列番号125)、配列番号4のアミノ酸22～160(配列番号126)、配列番号4のアミノ酸23～160(配列番号179)および配列番号4のアミノ酸24～160(配列番号180)からなる群から選択されるインフルエンザ菌由来のタンパク質Eの免疫原性断片である。より具体的には、一実施形態では、Aは配列番号124、すなわち、配列番号4のアミノ酸19～160である。さらなる実施形態では、Aは配列番号125、すなわち、配列番号5のアミノ酸20～160である。別の実施形態では、Aは、配列番号4のアミノ酸23～160(配列番号179)および配列番号4のアミノ酸24～160(配列番号180)からなる群から選択されるインフルエンザ菌由来のタンパク質Eの免疫原性断片である。

【0050】

タンパク質E - 配列番号4

MKIIILTLSL GLLTACSAQI QKAEQNDVKL APPTDVRSGY IRLVKVNYYY IDSESIWVDN QEPQIVHFDA VVNLDKGLYV YPEPKRYARS VRQYKILNCA NYHLTQVRTD FYDEFWGQGL RAAPKKQKKH TLSLTPDTTL YNAAQIICAN YGEAFSVDKK

配列番号4由来のタンパク質Eのアミノ酸17～160 - 配列番号122
SAQI QKAEQNDVKL APPTDVRSGY IRLVKVNYYY IDSESIWVDN QEPQIVHFDA VVNLDKGLYV YPEPKRYARS VRQYKILNCA NYHLTQVRTD FYDEFWGQGL RAAPKKQKKH TLSLTPDTTL YNAAQIICAN YGEAFSVDKK

配列番号4由来のタンパク質Eのアミノ酸18～160 - 配列番号123
AQI QKAEQNDVKL APPTDVRSGY IRLVKVNYYY IDSESIWVDN QEPQIVHFDA VVNLDKGLYV YPEPKRYARS VRQYKILNCA NYHLTQVRTD FYDEFWGQGL RAAPKKQKKH TLSLTPDTTL YNAAQIICAN YGEAFSVDKK

配列番号4由来のタンパク質Eのアミノ酸19～160 - 配列番号124
QI QKAEQNDVKL APPTDVRSGY IRLVKVNYYY IDSESIWVDN QEPQIVHFDA VVNLDKGLYV YPEPKRYARS VRQYKILNCA NYHLTQVRTD FYDEFWGQGL RAAPKKQKKH TLSLTPDTTL YNAAQIICAN YGEAFSVDKK

配列番号4由来のタンパク質Eのアミノ酸20～160 - 配列番号125
I QKAEQNDVKL APPTDVRSGY IRLVKVNYYY IDSESIWVDN QEPQIVHFDA VVNLDKGLYV YPEPKRYARS VRQYKILNCA NYHLTQVRTD FYDEFWGQGL RAAPKKQKKH TLSLTPDTTL YNAAQIICAN YGEAFSVDKK

配列番号4由来のタンパク質Eのアミノ酸22～160 - 配列番号126
KAEQNDVKL APPTDVRSGY IRLVKVNYYY IDSESIWVDN QEPQIVHFDA VVNLDKGLYV YPEPKRYARS VRQYKILNCA NYHLTQVRTD FYDEFWGQGL RAAPKKQKKH TLSLTPDTTL YNAAQIICAN YGEAFSVDKK

配列番号4由来のタンパク質Eのアミノ酸23～160 - 配列番号179
AEQNDVKL APPTDVRSGY IRLVKVNYYY IDSESIWVDN QEPQIVHFDA VVNLDKGLYV YPEPKRYARS VRQYK

10

20

30

40

50

ILNCA NYHLTQVRTD FYDEFWGQGL RAAPKKQKKH TLSLTPDTTL YNAAQIICAN YGEAFSVDKK

配列番号 4 由来のタンパク質 E のアミノ酸 24 ~ 160 - 配列番号 180

EQNDVKL APPTDVRSGY IRLVKNVNYY IDSESIWVDN QEPQIVHFDA VVNLDKGLYV YPEPKRYARS VRQYKI
LNCA NYHLTQVRTD FYDEFWGQGL RAAPKKQKKH TLSLTPDTTL YNAAQIICAN YGEAFSVDKK

別の実施形態では、Aがインフルエンザ菌由来のP_i1Aである式(I)の融合タンパク質が定義される。別の実施形態では、Aが配列番号58、配列番号59、配列番号60、配列番号61、配列番号62、配列番号63、配列番号64、配列番号65、配列番号66、配列番号67、配列番号68、配列番号69、配列番号70、配列番号71、配列番号72、配列番号73、配列番号74、配列番号75、配列番号76、配列番号77、配列番号78、配列番号79、配列番号80、配列番号81、配列番号82、配列番号83、配列番号84、配列番号85、配列番号86、配列番号87、配列番号88、配列番号89、配列番号90、配列番号91、配列番号92、配列番号93、配列番号94、配列番号95、配列番号96、配列番号97、配列番号98、配列番号99、配列番号100、配列番号101、配列番号102、配列番号103、配列番号104、配列番号105、配列番号106、配列番号107、配列番号108、配列番号109、配列番号110、配列番号111、配列番号112、配列番号113、配列番号114、配列番号115、配列番号116、配列番号117、配列番号118、配列番号119、配列番号120および配列番号121；または配列番号58～配列番号121のいずれかのサブセットからなる群から選択されるアミノ酸配列を有するインフルエンザ菌由来のP_i1Aである式(I)の融合タンパク質が定義される。別の実施形態では、AはP_i1Aであり、P_i1Aは配列番号58とおよそ少なくとも75%、80%、85%、90%、92%、95%、98%または99%同一である。別の実施形態では、AはP_i1Aであり、P_i1Aは配列番号58～配列番号121のいずれかと少なくとも95%同一である。特定の実施形態では、Aは配列番号58のP_i1Aである。

【0051】

別の実施形態では、Aがインフルエンザ菌由来のP_i1Aの免疫原性断片である式(I)の融合タンパク質が定義される。別の実施形態では、AはP_i1Aの免疫原性断片であり、P_i1Aは配列番号58とおよそ少なくとも75%、80%、85%、90%、92%、95%、98%または99%同一である。例えば、AはP_i1Aの免疫原性断片であり、P_i1Aは、配列番号58、配列番号59、配列番号60、配列番号61、配列番号62、配列番号63、配列番号64、配列番号65、配列番号66、配列番号67、配列番号68、配列番号69、配列番号70、配列番号71、配列番号72、配列番号73、配列番号74、配列番号75、配列番号76、配列番号77、配列番号78、配列番号79、配列番号80、配列番号81、配列番号82、配列番号83、配列番号84、配列番号85、配列番号86、配列番号87、配列番号88、配列番号89、配列番号90、配列番号91、配列番号92、配列番号93、配列番号94、配列番号95、配列番号96、配列番号97、配列番号98、配列番号99、配列番号100、配列番号101、配列番号102、配列番号103、配列番号104、配列番号105、配列番号106、配列番号107、配列番号108、配列番号109、配列番号110、配列番号111、配列番号112、配列番号113、配列番号114、配列番号115、配列番号116、配列番号117、配列番号118、配列番号119、配列番号120および配列番号121；または配列番号58～配列番号121のいずれかのサブセットからなる群から選択されるアミノ酸配列を有する。さらなる実施形態では、AはP_i1Aの免疫原性断片であり、P_i1Aは配列番号58～配列番号121のいずれかと少なくとも95%同一である。特定の実施形態では、Aはインフルエンザ菌86-028NP株由来のP_i1Aの免疫原性断片であり、P_i1Aは配列番号58である。

【0052】

インフルエンザ菌86-028NP株由来のP_i1A - 配列番号58

MKLTTQQQLK KGFTLIELMI VIAIIAILAT IAIPSYQNYT KKAVALSELLQ ASAPYKADVE LCVYSTNETT NCT GGKNGIA ADITTAKGYV KSVTTSNGAI TVKGDGTLAN MEYILQATGN AATGVTWTNT CKGTDASLFP ANFCGS

10

20

30

40

50

VTQL

別の実施形態では、Aは、配列番号127とおよそ少なくとも75%、80%、85%、90%、92%、95%、98%または99%同一のP_{i1A}の免疫原性断片である。より具体的には、一実施形態では、Aは、配列番号58のアミノ酸40～149からなる断片である配列番号127である。

【0053】

インフルエンザ菌86-028NP株由来のP_{i1A}のアミノ酸40～149-配列番号127

T KKA AVSELLQ ASAP YKADVE LCVYSTNETT NCTGGKNGIA ADITTAKGYV KSVTT SNGAI TVKG DGT LAN M EY ILQATGN AATGVTWTTT CKG TDASLFP ANFC GSVTQ

10

別の実施形態では、Aは、配列番号58～配列番号121のいずれか由来のアミノ酸40～149からなるP_{i1A}の免疫原性断片である。さらなる実施形態では、Aは、配列番号58～配列番号121のいずれかに由来のアミノ酸40～149と少なくとも95%同一の免疫原性断片である。

【0054】

一実施形態では、YがGG、SGおよびSSからなる群から選択される式(I)の融合タンパク質が定義される。別の実施形態では、YがGGまたはSGである式(I)の融合タンパク質が定義される。ある特定の実施形態では、YはGGである。

【0055】

一実施形態では、oが1である式(I)の融合タンパク質が定義される。別の実施形態では、oは0である。

20

【0056】

一実施形態では、Aがインフルエンザ菌由来のタンパク質Eまたはインフルエンザ菌由来のタンパク質Eの免疫原性断片である場合に、Bがインフルエンザ菌由来のP_{i1A}またはインフルエンザ菌由来のP_{i1A}の免疫原性断片である、式(I)の融合タンパク質が定義される。例えば、Bはインフルエンザ菌86-028NP株由来のP_{i1A}である。別の実施形態では、Bは、配列番号58、配列番号59、配列番号60、配列番号61、配列番号62、配列番号63、配列番号64、配列番号65、配列番号66、配列番号67、配列番号68、配列番号69、配列番号70、配列番号71、配列番号72、配列番号73、配列番号74、配列番号75、配列番号76、配列番号77、配列番号78、配列番号79、配列番号80、配列番号81、配列番号82、配列番号83、配列番号84、配列番号85、配列番号86、配列番号87、配列番号88、配列番号89、配列番号90、配列番号91、配列番号92、配列番号93、配列番号94、配列番号95、配列番号96、配列番号97、配列番号98、配列番号99、配列番号100、配列番号101、配列番号102、配列番号103、配列番号104、配列番号105、配列番号106、配列番号107、配列番号108、配列番号109、配列番号110、配列番号111、配列番号112、配列番号113、配列番号114、配列番号115、配列番号116、配列番号117、配列番号118、配列番号119、配列番号120および配列番号121；または配列番号58～配列番号121のいずれかのサブセットからなる群から選択されるアミノ酸配列を有するインフルエンザ菌由来のP_{i1A}である。別の実施形態では、BはP_{i1A}であり、P_{i1A}は配列番号58とおよそ少なくとも75%、80%、85%、90%、92%、95%、98%または99%同一である。別の実施形態では、BはP_{i1A}であり、P_{i1A}は配列番号58～配列番号121のいずれかと少なくとも95%、98%または99%同一である。特定の実施形態では、Bは配列番号58のP_{i1A}である。

30

【0057】

別の実施形態では、BはP_{i1A}であり、P_{i1A}は配列番号58～配列番号121のいずれかと少なくとも95%、98%または99%同一であり、かつ、AはP_Eであり、P_Eは配列番号4～配列番号57のいずれかと少なくとも95%、98%または99%同一である。

40

50

【0058】

別の実施形態では、Aがインフルエンザ菌由来のタンパク質Eの免疫原性断片である場合に、Bがインフルエンザ菌由来のP*i*1Aの免疫原性断片である、式(I)の融合タンパク質が定義される。例えば、Bは、インフルエンザ菌86-028NP株由来のP*i*1Aの免疫原性断片である。別の実施形態では、BはP*i*1Aの免疫原性断片であり、P*i*1Aは配列番号58とおよそ少なくとも80%、85%、90%、95%、98%または99%同一である。別の実施形態では、BはP*i*1Aの免疫原性断片であり、P*i*1Aは、配列番号58、配列番号59、配列番号60、配列番号61、配列番号62、配列番号63、配列番号64、配列番号65、配列番号66、配列番号67、配列番号68、配列番号69、配列番号70、配列番号71、配列番号72、配列番号73、配列番号74、配列番号75、配列番号76、配列番号77、配列番号78、配列番号79、配列番号80、配列番号81、配列番号82、配列番号83、配列番号84、配列番号85、配列番号86、配列番号87、配列番号88、配列番号89、配列番号90、配列番号91、配列番号92、配列番号93、配列番号94、配列番号95、配列番号96、配列番号97、配列番号98、配列番号99、配列番号100、配列番号101、配列番号102、配列番号103、配列番号104、配列番号105、配列番号106、配列番号107、配列番号108、配列番号109、配列番号110、配列番号111、配列番号112、配列番号113、配列番号114、配列番号115、配列番号116、配列番号117、配列番号118、配列番号119、配列番号120および配列番号121；または配列番号58～配列番号121のいずれかのサブセットからなる群から選択されるアミノ酸を有する。別の実施形態では、BはP*i*1Aの免疫原性断片であり、P*i*1Aは配列番号58～配列番号121のいずれかと少なくとも95%、98%または99%同一である。特定の実施形態では、Bはインフルエンザ菌由来のP*i*1Aの免疫原性断片であり、P*i*1Aは配列番号58で示されるアミノ酸配列を有する。別の実施形態では、Bは、配列番号58～配列番号121のいずれかに由来のアミノ酸40～149からなるP*i*1Aの免疫原性断片である。より具体的には、一実施形態では、Bは配列番号127で示されるP*i*1Aの断片である。さらなる実施形態では、Bは配列番号58～配列番号121のいずれかのアミノ酸40～149と少なくとも95%、98%または99%同一の免疫原性断片である。

【0059】

ある特定の実施形態では、Bは配列番号127で示されるP*i*1Aの断片であり、かつ、Aは配列番号122、配列番号124、配列番号125および配列番号126からなる群から選択されるタンパク質Eの免疫原性断片である。より詳しくは、Bは配列番号127で示されるP*i*1Aの断片であり、かつ、Aは配列番号124、すなわち、配列番号4由来のタンパク質Eのアミノ酸19～160で示されるタンパク質Eの断片である。別の実施形態では、Bは配列番号127で示されるP*i*1Aの断片であり、かつ、Aは配列番号125で示されるタンパク質Eの断片である。

【0060】

別の実施形態では、BはP*i*1Aの免疫原性断片であり、P*i*1Aは配列番号58～配列番号121のいずれかと少なくとも95%同一であり、かつ、AはP*E*の免疫原性断片であり、P*E*は配列番号4～配列番号57のいずれかと少なくとも95%同一である。

【0061】

別の実施形態では、Aがインフルエンザ菌由来のP*i*1Aである場合に、Bがインフルエンザ菌由来のタンパク質Eである、式(I)の融合タンパク質が定義される。例えば、Bは、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号11、配列番号12、配列番号13、配列番号14、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19、配列番号20、配列番号21、配列番号22、配列番号23、配列番号24、配列番号25、配列番号26、配列番号27、配列番号28、配列番号29、配列番号30、配列番号31、配列番号32、配列番号33、配列番号34、配列番号35、配列番号36、配列番号37、配列番号3

10

20

30

40

50

8、配列番号39、配列番号40、配列番号41、配列番号42、配列番号43、配列番号44、配列番号45、配列番号46、配列番号47、配列番号48、配列番号49、配列番号50、配列番号51、配列番号52、配列番号53、配列番号54、配列番号55、配列番号56および配列番号57；または配列番号4～配列番号57のいずれかのサブセットからなる群から選択されるアミノ酸配列を有するタンパク質Eである。別の実施形態では、Bがタンパク質Eであり、タンパク質Eが配列番号4で示されるタンパク質Eのアミノ酸配列とおよそ少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、98%または99%同一である式(I)の融合タンパク質である。別の実施形態では、Bはタンパク質Eであり、タンパク質Eは配列番号4で示されるタンパク質Eのアミノ酸配列とおよそ90%、95%、98%、または99%同一である。例えば、Bはタンパク質Eであり、タンパク質Eは配列番号4で示されるタンパク質Eと少なくとも95%同一である。別の実施形態では、Bはタンパク質Eであり、タンパク質Eは配列番号4～配列番号57のいずれかと少なくとも95%同一である。特定の実施形態では、Bは配列番号4で示されるアミノ酸配列を有するタンパク質Eである。
10

【0062】

別の実施形態では、Aがインフルエンザ菌由来のP11Aの免疫原性断片である場合に、Bがインフルエンザ菌由来のタンパク質Eの免疫原性断片である、式(I)の融合タンパク質が定義される。例えば、Bは、タンパク質Eが配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号11、配列番号12、配列番号13、配列番号14、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19、配列番号20、配列番号21、配列番号22、配列番号23、配列番号24、配列番号25、配列番号26、配列番号27、配列番号28、配列番号29、配列番号30、配列番号31、配列番号32、配列番号33、配列番号34、配列番号35、配列番号36、配列番号37、配列番号38、配列番号39、配列番号40、配列番号41、配列番号42、配列番号43、配列番号44、配列番号45、配列番号46、配列番号47、配列番号48、配列番号49、配列番号50、配列番号51、配列番号52、配列番号53、配列番号54、配列番号55、配列番号56および配列番号57；または配列番号4～配列番号57のいずれかのサブセットからなる群から選択されるアミノ酸配列を有するタンパク質Eの免疫原性断片である。別の実施形態では、Bがタンパク質Eの免疫原性断片であり、タンパク質Eが配列番号4で示されるタンパク質Eのアミノ酸配列とおよそ少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、98%または99%同一である式(I)の融合タンパク質が定義される。別の実施形態では、Bはタンパク質Eの免疫原性断片であり、タンパク質Eは配列番号4で示されるタンパク質Eのアミノ酸配列とおよそ90%～100%同一である。特定の実施形態では、Bは、配列番号4で示されるアミノ酸配列を有するタンパク質Eの免疫原性断片である。さらなる実施形態では、Bはタンパク質Eの免疫原性断片であり、タンパク質Eは配列番号4～配列番号57のいずれかと少なくとも95%同一である。
20
30

【0063】

別の実施形態では、Bは、配列番号4のアミノ酸17～160(配列番号122)、配列番号4のアミノ酸18～160(配列番号123)、配列番号4のアミノ酸19～160(配列番号124)、配列番号4のアミノ酸20～160(配列番号125)および配列番号4のアミノ酸22～160(配列番号126)からなる群から選択される、インフルエンザ菌由来のタンパク質Eの断片である。別の実施形態では、Bは、配列番号4のアミノ酸17～160(配列番号122)、配列番号4のアミノ酸18～160(配列番号123)、配列番号4のアミノ酸19～160(配列番号124)、配列番号4のアミノ酸20～160(配列番号125)、配列番号4のアミノ酸22～160(配列番号126)、配列番号4のアミノ酸23～160(配列番号179)および配列番号4のアミノ酸24～160(配列番号180)からなる群から選択される、インフルエンザ菌由来のタンパク質Eの免疫原性断片である。より具体的には、一実施形態では、Bは、配列番号123、すなわち、配列番号4のアミノ酸18～160で示されるタンパク質Eの断片で
40
50

ある。

【 0 0 6 4 】

ある特定の実施形態では、Aが配列番号127で示されるP i l Aの免疫原性断片である場合に、Bは、配列番号123、すなわち、配列番号4のアミノ酸18～160で示されるタンパク質Eの免疫原性断片である。

【 0 0 6 5 】

一実施形態では、pが0である式(I)の融合タンパク質が定義される。別の実施形態では、pが1である式(I)の融合タンパク質が定義される。

【 0 0 6 6 】

一実施形態では、式(I)の融合タンパク質は、配列番号136、配列番号138、配列番号140、配列番号142、配列番号144、配列番号146、配列番号148、配列番号150、配列番号182、配列番号184、配列番号186、配列番号188、配列番号190、配列番号192、配列番号194、配列番号196、配列番号198、配列番号200、配列番号202および配列番号204；またはそれらのいずれかのサブセットからなる群から選択される。別の実施形態では、式(I)の融合タンパク質は、配列番号136、配列番号138、配列番号140、配列番号142、配列番号144、配列番号146、配列番号148、配列番号150、配列番号182、配列番号184、配列番号186、配列番号188、配列番号190、配列番号192、配列番号194、配列番号196、配列番号198、配列番号200、配列番号202または配列番号204のいずれかとおよそ85%、88%、90%、92%、95%または98%同一である。

10

【 0 0 6 7 】

一実施形態では、式(I)の融合タンパク質は、シグナルペプチドが除去されている配列番号148の融合タンパク質、すなわち、配列番号177(QIQKAEQN DVKLAPPTDV RSGYIRLVKN VNYYIDSESI WVDNQEPQIV HFDAVNLDK GLYVYPEPKR YARSRQYKI LNCANYHLTQ VRTDFYDEFW GQGLRAAPKK QKKHTLSLTP DTTLYNAAQI ICANYGEAFS VDKKGGTAKKA AVSELLQASA PYKADVELCVYSTNETTNCT GGKNGIAADI TTAKGYVKSV TTSNGAITVK GDGTLANMEY ILQATGNAAT GVTWTTCKG TDA SLFPANF CGSVTQ)である。

20

【 0 0 6 8 】

一実施形態では、式(I)の融合タンパク質は、シグナルペプチドが除去されている配列番号194の融合タンパク質、すなわち、配列番号219(IQKAEQND VKLAPPTDVR SGYIRLVKN NYYIDSESI WDNQEPQIVH FDAVNLDKG LYVYPEPKRY ARSRQYKIL NCANYHLTQV RTDFYDEFWG QGLRAAPKKQ KKHTLSLTPD TTLYNAAQII CANYGEAFS VDKKGGTAKKA VSELLQASAP YKADVELCVYSTNETTNCTG GKNGIAADIT TAKGYVKSVT TSNGAITVKG DGTLANMEYI LQATGNAATG VTWTTCKGT DASLFPANFC GSVDQ)である。

30

肺炎球菌莢膜糖類コンジュゲート

莢膜糖類という用語には、莢膜多糖および莢膜多糖に由来するオリゴ糖が含まれる。オリゴ糖は、少なくとも4つの糖残基を含有する。コンジュゲートおよびコンジュゲートされたという用語は、担体タンパク質に共有結合されている莢膜糖類に関する。

【 0 0 6 9 】

免疫原性組成物において、糖類血清型の総数は任意選択により23未満である。一実施形態では、免疫原性組成物は、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、または13未満の肺炎球菌糖類を含み、任意選択により、免疫原性組成物は、10～23の血清型、10～16の血清型、10～15の血清型、10～14の血清型、10～13の血清型または10～12の血清型を含む。

40

【 0 0 7 0 】

一実施形態では、肺炎球菌莢膜糖類コンジュゲートは、下記の血清型1、2、3、4、5、6A、6B、7F、8、9N、9V、10A、11A、12F、14、15B、17F、18C、19A、19F、20、22F、23Fおよび33Fに由来するが、ワクチンを受容するレシピエントの年齢および免疫原性組成物が投与される地理的位置に応じて1つまたは2つの他の血清型が置き換えられると認識される。例えば、7価の免疫原性組

50

成物は、血清型 4、6 B、9 V、14、18 C、19 F および 23 F 由来の糖類を含み得る。10 倍免疫原性組成物は、血清型 1、5 および 7 F 由来の糖類をさらに含み得る。12 倍免疫原性組成物は、血清型 6 A、19 A 由来の糖類をさらに含み得る。15 倍免疫原性組成物は、血清型 22 F および 33 F 由来の糖類をさらに含み得る。

【0071】

さらなる糖類抗原、例えば、23 倍（血清型 1、2、3、4、5、6 B、7 F、8、9 N、9 V、10 A、11 A、12 F、14、15 B、17 F、18 C、19 A、19 F、20、22 F、23 F および 33 F など）も本発明により企図される。

【0072】

用語「担体タンパク質」は、小ペプチドおよび大ポリペプチド（>10 kDa）の両方を包含することを意図する。担体タンパク質はいずれのペプチドまたはタンパク質であってもよい。担体タンパク質は、1以上のT-ヘルパーエピトープを含み得る。担体タンパク質は、破傷風トキソイド（TT）、破傷風トキソイドC断片、破傷風菌毒素の非毒性変異体〔注：TTのこのような変異体は全て、本発明の目的で同タイプの担体タンパク質であると見なされる〕、N19（国際公開第2006/067632号）などの破傷風菌毒素T細胞エピトープを含むポリペプチド、ジフテリアトキソイド（DT）、CRM197（交差反応物質197）、ジフテリア毒素の他の非毒性変異体〔例えば、CRM176、CRM197、CRM228、CRM45（Uchida et al J. Biol. Chem. 218; 3838-3844, 1973）；CRM9、CRM45、CRM102、CRM103 および CRM107（ここで、CRMは、交差反応物質(cross reacting material)を表す）およびNicholls and Youle in Genetically Engineered Toxins, Ed: Frankel, Maecel Dekker Inc, 1992により記載されている他の突然変異；Glu-148の欠失またはAsp、GlnもしくはSerへの突然変異および/またはAla-158のGlyへの突然変異および米国特許第4709017号または米国特許第4950740号に開示されている突然変異；少なくとも1つもしくは複数の残基Lys 516、Lys 526、Phe 530および/もしくはLys 534の突然変異、および米国特許第5917017号もしくは米国特許第6455673号に開示されている他の突然変異；または米国特許第5843711号に開示されている断片〕（注：DTのこのような変異体は全て、本発明の目的で同タイプの担体タンパク質であると見なされる）、肺炎球菌ニューモリシン（Kuo et al (1995) Infect Immun 63; 2706-13）、OMP C（通常、髄膜炎得菌（*N. meningitidis*）血清群Bから抽出される髄膜炎菌由来の外膜タンパク質C - 欧州特許第0372501号）、合成ペプチド（欧州特許第0378881号、欧州特許第0427347号）、熱ショックタンパク質（国際公開第93/17712号、国際公開第94/03208号）、百日咳菌タンパク質（国際公開第98/58668号、欧州特許第0471177号）、サイトカイン、リンホカイン、増殖因子またはホルモン（国際公開第91/01146号）、種々の病原体由来抗原に由来する複数のヒトCD4+ T細胞エピトープを含む人工タンパク質（Falugi et al (2001) Eur J Immunol 31; 3816-3824）、例えば、N19タンパク質（Baraldoi et al (2004) Infect Immun 72; 4884-7）、肺炎球菌表面タンパク質PspA（国際公開第02/091998号）、鉄取り込みタンパク質（国際公開第01/72337号）、クロストリジウム・ディフィシル（*Clostridium difficile*）の毒素Aまたは毒素B（国際公開第00/61761号）、インフルエンザ菌タンパク質D（欧州特許第594610号および国際公開第00/56360号）、肺炎球菌PhtA（国際公開第098/18930号、Sph36とも呼ばれる）、肺炎球菌PhtD（国際公開第00/37105号に開示されているポリヒスチジントライアドD、Sph036Dとも呼ばれる）、肺炎球菌PhtB（国際公開第00/37105号に開示されているポリヒスチジントライアドB、Sph036Bとも呼ばれる）、またはPhtE（国際公開第00/30299号に開示されているポリヒスチジントライアドE、BVH-3とも呼ばれる）であり得る。

【0073】

一実施形態では、肺炎球菌莢膜糖類コンジュゲートは、破傷風トキソイド（TT）、TTのC断片、ジフテリアトキソイド、CRM197（交差反応物質197）、無毒化ニュ

10

20

30

40

50

ーモリシン、タンパク質D（インフルエンザ菌由来）、P h t D、P h t D E（ポリヒスチジントライアドタンパク質Dおよびポリヒスチジントライアドタンパク質Eを含有するタンパク質）およびN 1 9からなる群から独立に選択される担体タンパク質にコンジュゲートされている。さらなる実施形態では、肺炎球菌莢膜糖類コンジュゲートは、全て独立にC R M 1 9 7にコンジュゲートされている。

【0074】

この文脈において用語「にコンジュゲートされる」は、そのタンパク質が糖類と共有結合されることを意味し、この場合、タンパク質は担体タンパク質として機能する。

【0075】

一実施形態では、免疫原性組成物は、タンパク質Dにコンジュゲートされた少なくとも1種の肺炎球菌莢膜糖類を含む。一実施形態では、コンジュゲートされた肺炎球菌糖類の少数がタンパク質Dにコンジュゲートされ、ここで、用語「少数」は、その組成物中の糖類の総数の半分未満がタンパク質Dにコンジュゲートされていることを意味する。さらなる実施形態では、免疫原性組成物は、タンパク質Dにコンジュゲートされた1～20の間、1～18の間、1～16の間、1～14の間、1～12の間、1～10の間、1～9の間、1～8の間、1～7の間、1～6の間、1～5の間、1～4の間、1～4の間または1～2の間の肺炎球菌莢膜糖類を含む。一実施形態では、免疫原性組成物は、ジフテリアトキソイドにコンジュゲートされた少なくとも1種の肺炎球菌莢膜糖類を含む。さらなる実施形態では、免疫原性組成物は、ジフテリアトキソイドにコンジュゲートされている19 Fを含む。一実施形態では、免疫原性組成物は、破傷風トキソイドにコンジュゲートされている少なくとも1種の肺炎球菌莢膜糖類を含む。さらなる実施形態では、免疫原性組成物は、破傷風トキソイドにコンジュゲートされている18 Cを含む。

10

20

30

40

【0076】

一実施形態では、免疫原性組成物は、タンパク質DまたはC R M 1 9 7にコンジュゲートされたコンジュゲート血清型1糖類を含む。一実施形態では、免疫原性組成物は、タンパク質DまたはC R M 1 9 7にコンジュゲートされたコンジュゲート血清型4糖類を含む。一実施形態では、免疫原性組成物は、血清型5糖類がタンパク質DまたはC R M 1 9 7にコンジュゲートされているコンジュゲート血清型5糖類を含む。一実施形態では、免疫原性組成物は、血清型6B糖類がタンパク質DまたはC R M 1 9 7にコンジュゲートされているコンジュゲート血清型6B糖類を含む。一実施形態では、免疫原性組成物は、血清型7F糖類がタンパク質DまたはC R M 1 9 7にコンジュゲートされているコンジュゲート血清型7F糖類を含む。一実施形態では、免疫原性組成物は、9V糖類がタンパク質DまたはC R M 1 9 7にコンジュゲートされているコンジュゲート血清型9V糖類を含む。一実施形態では、免疫原性組成物は、血清型14糖類がタンパク質DまたはC R M 1 9 7にコンジュゲートされているコンジュゲート血清型14糖類を含む。一実施形態では、免疫原性組成物は、血清型18C糖類が破傷風トキソイドまたはC R M 1 9 7にコンジュゲートされているコンジュゲート血清型18C糖類を含む。一実施形態では、免疫原性組成物は、血清型19F糖類がジフテリアトキソイドまたはC R M 1 9 7にコンジュゲートされているコンジュゲート19F糖類を含む。一実施形態では、免疫原性組成物は、血清型23F糖類がタンパク質DまたはC R M 1 9 7にコンジュゲートされているコンジュゲート23F糖類を含む。一実施形態では、免疫原性組成物は、C R M 1 9 7にコンジュゲートされたコンジュゲート6A糖類を含む。一実施形態では、免疫原性組成物は、C R M 1 9 7にコンジュゲートされたコンジュゲート19A糖類を含む。

【0077】

一実施形態では、免疫原性組成物は、タンパク質Dにコンジュゲートされた肺炎球菌血清型1糖類、タンパク質Dにコンジュゲートされた肺炎球菌血清型4糖類、タンパク質Dにコンジュゲートされた肺炎球菌血清型5糖類、タンパク質Dにコンジュゲートされた肺炎球菌血清型6B糖類、タンパク質Dにコンジュゲートされた肺炎球菌血清型7F糖類、タンパク質Dにコンジュゲートされた肺炎球菌血清型9V糖類、タンパク質Dにコンジュゲートされた肺炎球菌血清型14糖類、タンパク質Dにコンジュゲートされた肺炎球菌血

50

清型 23F 糖類、破傷風トキソイドにコンジュゲートされた肺炎球菌血清型 18C 糖類およびジフテリアトキソイドにコンジュゲートされた肺炎球菌 19F 糖類を含む。一実施形態では、免疫原性組成物は、CRM197 にコンジュゲートされた肺炎球菌血清型 6A および CRM197 にコンジュゲートされた肺炎球菌血清型 19A をさらに含む。

【0078】

任意選択により、担体タンパク質と肺炎球菌糖類の比は 1 : 5 ~ 5 : 1 の間 ; 1 : 2 ~ 2.5 : 1 の間 ; 1 : 1 ~ 2 : 1 (w / w) の間である。一実施形態では、コンジュゲートの大多数、例えば、6、7、8、9 またはそれを超えるコンジュゲートの担体タンパク質と糖類の比が 1 : 1、例えば、1.1 : 1、1.2 : 1、1.3 : 1、1.4 : 1、1.5 : 1 または 1.6 : 1 である。

10

【0079】

一般に、本発明の免疫原性組成物は、糖類 0.1 ~ 20 μg の間、1 ~ 5 μg の間、1 ~ 10 μg の間または 1 ~ 3 μg の間の各糖類コンジュゲート用量を含み得る。

【0080】

一実施形態において、本発明の免疫原性組成物は、糖類 0.1 ~ 20 μg の間；0.5 ~ 10 μg の間；0.5 ~ 5 μg の間または 1 ~ 3 μg の間の用量で各肺炎球菌莢膜糖類コンジュゲートを含有する。一実施形態では、莢膜糖類は異なる用量で存在してよく、例えば、ある莢膜糖類は正確に 1 μg の用量で存在してよく、またはある莢膜糖類は正確に 3 μg の用量で存在してよい。一実施形態では、血清型 3、18C および 19F (または 4、18C および 19F) 由来の糖類は、他の糖類よりも高い用量で存在する。この実施形態の一態様において、血清型 3、18C および 19F (または 4、18C および 19F) はおよそまたは正確に 3 μg の用量で存在するが、免疫原性組成物中の他の糖類はおよそまたは正確に 1 μg の用量で存在する。一実施形態では、血清型 1、5、6B、7F、9V、14 および 23F はおよそまたは正確に 1 μg の用量で存在する。

20

【0081】

本発明を通じて用語「糖類」は多糖またはオリゴ糖を示す場合があり、両方を含む。多糖は細菌から単離し、公知の方法（例えば、欧州特許第 497524 号および欧州特許第 497525 号参照）により、また、任意選択の微少溶液操作によって一定の程度にサイズ調整してもよい。多糖は、多糖サンプル中での粘度を小さくするためおよび / またはコンジュゲート生成物の濾過性を向上させるためにサイズ調整することができる。オリゴ糖は低数の反復単位（一般に、5 ~ 30 の反復単位）を持ち、一般に加水分解された多糖である。

30

【0082】

肺炎球菌の莢膜多糖は、最大 8 個の糖残基を含有し得る反復オリゴ糖単位を含む。重要な肺炎球菌血清型のオリゴ糖単位に関する総説としては、JONES, Christopher. Vaccines based on the cell surface carbohydrates of pathogenic bacteria. An. Acad. Bras. Cienc., June 2005, vol.77, no.2, p.293-324. ISSN 0001-3765 を参照。一実施形態では、莢膜糖類抗原は全長多糖であり得るが、他の実施形態では、1 オリゴ糖単位、または反復オリゴ糖単位の天然長糖鎖よりも短くてもよい。一実施形態では、ワクチン中に存在する糖類の全てが多糖である。全長多糖は「サイズ調整」が可能であり、すなわち、これらのサイズは、酸加水分解処理、過酸化水素処理、emulsiflex (登録商標) によるサイズ調整とその後の過酸化水素処置によるオリゴ糖断片の生成、または微少溶液操作などの種々の方法によって小さくすることができる。

40

【0083】

一実施形態では、免疫原性組成物は、コンジュゲートされたものとは異なる血清型の非コンジュゲート肺炎球菌糖類を、コンジュゲート糖類血清型と非コンジュゲート糖類血清型の数が 23 以下となるようにさらに含む。

コンジュゲーション

本発明の免疫原性組成物中に存在する糖類コンジュゲートは、任意のコンジュゲーション技術を用いて、担体タンパク質にコンジュゲートさせることができる。

50

【0084】

一実施形態では、肺炎球菌糖類は、リンカー、例えば、二官能性リンカーを介して担体タンパク質にコンジュゲートされている。リンカーは、任意選択により、例えば、1個の反応性アミノ基および反応性カルボン酸基、2個の反応性アミノ基または2個の反応性カルボン酸基を有する、ヘテロ二官能性またはホモ二官能性である。リンカーは、例えば、4~20個の間、4~12個の間、5~10個の間の炭素原子を有する。可能性のあるリンカーはアジピン酸ジヒドラジド(ADH)である。他のリンカーとしては、B-プロピオンアミド(国際公開第00/10599号)、ニトロフェニル-エチルアミン(Gevert al(1979) Med. Microbiol. Immunol. 165; 171-288)、ハロアルキルハリド(米国特許第4057685号)、グリコシド結合(米国特許第4673574号、米国特許第U.S. 4808700号)、ヘキサンジアミンおよび6-アミノカプロン酸(米国特許第S4459286号)が含まれる。一実施形態では、ADHが、血清型18C由来の糖類にコンジュゲートさせるためのリンカーとして使用される。

【0085】

本発明の免疫原性組成物中に存在する糖類コンジュゲートは、いずれの既知のカップリング技術によって作製してもよい。コンジュゲーション法は、1-シアノ-4-ジメチルアミノピリジニウムテトラフルオロホウ酸塩(CDAP)を用いた糖類の活性化によるシアノ酸エステルの形成に頼るものであり得る。このように、活性化された糖類を、担体タンパク質上のアミノ基に直接またはスペーサー(リンカー)基を介して結合させることができる。例えば、スペーサーは、チオール化多糖を得るためにシスタミンまたはシステアミンであってよく、チオール化多糖は、マレイミドにより活性化された担体タンパク質(例えば、GMB Sを使用)またはハロアセチル化担体タンパク質(例えば、ヨードアセトイミド[例えば、エチルヨードアセトイミドHC1]またはN-スクシンイミジルプロモアセテートもしくはS I A B、もしくはS I A、もしくはS B A P)との反応の後に得られるチオエーテル結合を介して担体に結合させることができる。任意選択により、シアノ酸エステル(任意選択により、CDAP化学により作製)をヘキサンジアミンまたはADHと結合させ、このアミノで誘導体化された糖類を、カルボジイミド(例えば、EDACまたはEDC)化学を用い、タンパク質担体上のカルボキシル基を介して担体タンパク質にコンジュゲートさせる。このようなコンジュゲートは、PCT公開出願国際公開第93/15760号Uniformed Services Universityならびに国際公開第95/08348号および国際公開第96/29094号に記載されている。

【0086】

他の好適な技術では、カルボジイミド、カルビイニド(carbiinides)、ヒドラジド、活性エステル、ノルボラン、p-ニトロ安息香酸、N-ヒドロキシスクシンイミド、S-NHS、EDC、TSTUを使用する。多くが国際公開第98/42721号に記載されている。コンジュゲーションは、糖類の遊離ヒドロキシル基とCDIの反応(Bethell et al J. Biol. Chem. 1979, 254; 2572-4, Hearn et al J. Chromatogr. 1981. 218; 509-18)とその後のタンパク質との反応によるカルバミン酸結合の形成により形成され得るカルボニルリンカーを含んでよい。これは、アノマー末端の第一ヒドロキシル基への還元、任意選択の、CDIを用いた第一ヒドロキシル基の第一ヒドロキシル基反応の保護/脱保護によるCDIカルバミン酸中間体の形成、およびこのCDIカルバミン酸中間体とタンパク質上のアミノ基とのカップリングを含み得る。

【0087】

前記コンジュゲートはまた、米国特許第4365170号(Jennings)および米国特許第4673574号(Anderson)に記載の直接的還元的アミノ化法によって製造することもできる。他の方法はEP-0-161-188、EP-208375およびEP-0-477508に記載されている。

【0088】

さらなる方法は、アジピン酸ジヒドラジド(ADH)誘導体化糖類を臭化シアノゲン(またはCDAP)で活性化したものを、例えば、EDAC(1-エチル-3-(3-ジメ

10

20

30

40

50

チルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩)を用いた、カルボジイミド縮合(Chu C. et al Infect. Immunity, 1983 245 256)によってタンパク質担体に結合させることを含む。

【0089】

一実施形態では、糖類上のヒドロキシル基(任意選択により、活性化ヒドロキシル基、例えば、活性化してシアノ酸エステルを形成させたヒドロキシル基[例えば、CDAPを使用])をタンパク質上のアミノ基またはカルボキシル基に、直接的または間接的(リンカーを介する)に連結する。リンカーが存在する場合、糖類上のヒドロキシル基は、任意選択により、例えば、CDAPコンジュゲーションを用い、リンカー上のアミノ基に連結してもよい。リンカー、例えばADH中のさらなるアミノ基は、例えばカルボジイミド化学を使用することにより、例えばEDACを使用することにより、タンパク質上のカルボン酸基にコンジュゲートしてもよい。一実施形態では、肺炎球菌莢膜糖類をまずリンカーにコンジュゲートした後、そのリンカーを担体タンパク質にコンジュゲートする。あるいは、リンカーを担体にコンジュゲートした後に糖類にコンジュゲートしてもよい。

10

【0090】

一部の糖類-タンパク質コンジュゲートをCDAPにより作製し、一部を還元的アミノ化により作製するといった技術の組合せも使用可能である。

【0091】

一般に、タンパク質担体上の下記のタイプの化学基をカップリング/コンジュゲーションに使用することができる:

20

A)カルボキシル(例えば、アスパラギン酸またはグルタミン酸を介する)。一実施形態では、この基は、糖類上のアミノ基に直接、またはカルボジイミド化学を用いて、例えば、EDACを用いて、リンカー上のアミノ基に連結させる。

【0092】

B)アミノ基(例えば、リシンを介する)。一実施形態では、この基は、糖類上のカルボキシル基に直接、またはカルボジイミド化学を用いて、例えば、EDACを用いて、リンカー上のカルボキシル基に連結させる。別の実施形態では、この基は、糖類上のCDAPもしくはCNBrで活性化したヒドロキシル基に直接、またはリンカー上のこのような基に;アルデヒド基を有する糖類またはリンカーに;スクシンイミドエステル基を有する糖類またはリンカーに連結させる。

30

【0093】

C)スルフヒドリル(例えば、システインを介する)。一実施形態では、この基は、マレイミド化学を用いて、プロモまたはクロロアセチル化糖類またはリンカーに連結させる。一実施形態では、この基は、ビスジアゾベンジンで活性化/修飾する。

【0094】

D)ヒドロキシル基(例えば、チロシンを介する)。一実施形態では、この基は、ビスジアゾベンジンで活性化/修飾する。

【0095】

E)イミダゾリル基(例えば、ヒスチジンを介する)。一実施形態では、この基は、ビスジアゾベンジンで活性化/修飾する。

40

【0096】

F)グアニジル基(例えば、アルギニンを介する)。

【0097】

G)インドリル基(例えば、トリプトファンを介する)。

【0098】

糖類上では、一般に、下記の基がカップリングに使用可能である:OH、COOHまたはNH₂。アルデヒド基は、過ヨウ素酸塩、酸加水分解、過酸化水素などの当技術分野で公知の種々の処理の後に生成し得る。

【0099】

直接的カップリング手法:

50

糖類 - OH + CNBr または CDAP - - - - > シアン酸エステル + NH₂ - Prot
 - - - - > コンジュゲート

糖類 - アルデヒド + NH₂ - Prot - - - - > シップ塩基 + NaCNBH₃ - - - - >
 コンジュゲート

糖類 - COOH + NH₂ - Prot + EDAC - - - - > コンジュゲート

糖類 - NH₂ + COOH - Prot + EDAC - - - - > コンジュゲート

スペーサー(リンカー)を介した間接的カップリング手法:

糖類 - OH + CNBr または CDAP - - - > シアン酸エステル + NH₂ - - - NH₂
 - - - - > 糖類 - - - NH₂ + COOH - Prot + EDAC - - - - > コンジュ
 ゲート

糖類 - OH + CNBr または CDAP - - - > シアン酸エステル + NH₂ - - - SH
 - - - - > 糖類 - - - SH + SH - Prot (システインが露出した天然タンパク質
 またはタンパク質のアミノ基の例えは SPPDによる修飾後に得られる天然タンパク質
) - - - - > 糖類 - S - S - Prot

糖類 - OH + CNBr または CDAP - - - > シアン酸エステル + NH₂ - - - SH
 - - - - > 糖類 - - - SH + マレイミド - Prot (アミノ基の修飾) - - -
 > コンジュゲート

糖類 - OH + CNBr または CDAP - - - > シアン酸エステル + NH₂ - - - SH
 - - - > 糖類 - SH + ハロアセチル化 - Prot - - - > コンジュゲート

糖類 - COOH + EDAC + NH₂ - - - NH₂ - - - > 糖類 - - - NH₂ +
 EDAC + COOH - Prot - - - > コンジュゲート

糖類 - COOH + EDAC + NH₂ - - - SH - - - > 糖類 - - - SH + SH -
 Prot (システインが露出した天然タンパク質またはタンパク質のアミノ基の例えは S
 PDPによる修飾後に得られる天然タンパク質) - - - - > 糖類 - S - S - Prot

糖類 - COOH + EDAC + NH₂ - - - SH - - - > 糖類 - - - SH + マレイ
 ミド - Prot (アミノ基の修飾) - - - > コンジュゲート

糖類 - COOH + EDAC + NH₂ - - - SH - - - > 糖類 - SH + ハロアセチル化 -
 Prot - - - > コンジュゲート

糖類 - アルデヒド + NH₂ - - - NH₂ - - - > 糖類 - - - NH₂ + EDAC + C
 OOH - Prot - - - > コンジュゲート

注: 上記の EDAC の代わりに、任意の好適なカルボジイミドを使用してもよい。

【0100】

まとめると、糖類とのカップリングに一般に使用可能なタンパク質担体化学基のタイプ
 はアミノ基(例えは、リシン残基上)、COOH基(例えは、アスパラギン酸およびグル
 タミン酸残基上)およびSH基(利用可能な場合)(例えは、システイン残基上)。

【0101】

一実施形態では、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12
 、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、または23の肺炎球
 菌糖類が、還元的アミノ化を介して担体タンパク質にコンジュゲートされている。一実施
 形態では、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12
 、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2または1未満の肺炎球菌糖類が、還元的
 アミノ化を介して担体タンパク質にコンジュゲートされている。一実施形態では、1~2
 3、2~22、3~21、4~20、5~19、6~18、7~17、8~16、9~1
 5、10~14、11~13、1~23、および22、1~21、1~20、1~19、
 1~18、1~17、1~16、1~15、1~14、1~13、1~12、1~11、
 1~10、1~9、1~8、1~7、1~6、1~5、1~4、1~3の間、または1も
 しくは2種の肺炎球菌糖類が、還元的アミノ化を介して担体タンパク質にコンジュゲート
 されている。さらなる実施形態では、肺炎球菌莢膜糖類の全てが、還元的アミノ化を介
 して担体タンパク質にコンジュゲートされている。

【0102】

10

20

30

40

50

一実施形態では、少なくとも 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、または 23 の肺炎球菌糖類が、C D A P 化学を介して担体タンパク質にコンジュゲートされている。一実施形態では、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2 または 1 未満の肺炎球菌糖類が、C D A P 化学を介して担体タンパク質にコンジュゲートされている。一実施形態では、1~23、2~22、3~21、4~20、5~19、6~18、7~17、8~16、9~15、10~14、11~13、1~23、および 22、1~21、10~23、10~22、10~21、10~20、10~19、10~18、10~17、10~16、10~15、10~14、10~13、10~12、10~11、1~20、1~19、1~18、1~17、1~16、1~15、1~14、1~13、1~12、1~11、1~10、1~9、1~8、1~7、1~6、1~5、1~4、1~3 の間、または 1 もしくは 2 種の肺炎球菌糖類が、C D A P 化学を介して担体タンパク質にコンジュゲートされている。さらなる実施形態では、肺炎球菌莢膜糖類の全てが、C D A P 化学を介して担体タンパク質にコンジュゲートされている。

【0103】

一実施形態では、本発明の免疫原性組成物は、還元的アミノ化を介して担体タンパク質にコンジュゲートされた少なくとも 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21 または 22 の糖類を含み、かつ、還元的アミノ化以外の化学、例えば、C D A P 化学を介して担体タンパク質にコンジュゲートされた少なくとも 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、または 22 の糖類を含む。

【0104】

一実施形態では、血清型 1、3、19A および 19F からなる群から選択される血清型のうちの少なくとも 1 つに由来の莢膜糖類が、還元的アミノ化以外の化学を介してコンジュゲートされ、かつ、血清型 4、5、6A、6B、6C、7F、9V、14、18C および 23F からなる群から選択される血清型のうちの少なくとも 1 つが還元的アミノ化を介してコンジュゲートされている。一実施形態では、本発明の免疫原性組成物は、還元的アミノ化以外の化学を介してコンジュゲートされた血清型 1 または 3 または 19A または 19F；1 および 3；1 および 19A；1 および 19F；3 および 19A；3 および 19F；19A および 19F；1、3 および 19A；1、3 および 19F；1、19A および 19F；3、19A および 19F；または 1、3、19A および 19F 由来の肺炎球菌莢膜糖類を含む。一実施形態では、19F は、還元的アミノ化以外の化学を介して担体タンパク質にコンジュゲートされている。一実施形態では、本発明の免疫原性組成物は、C D A P 化学などのシアニル化化学を介してタンパク質担体にコンジュゲートされた血清型 1 または 3 または 19A または 19F；1 および 3；1 および 19A；1 および 19F；3 および 19A；3 および 19F；19A および 19F；1、3 および 19A；1、3 および 19F；1、19A および 19F；3、19A および 19F；または 1、3、19A および 19F 由来の肺炎球菌莢膜糖類を含む。一実施形態では、19F は、C D A P 化学により担体タンパク質にコンジュゲートされている。本発明の一実施形態では、下記の 1 または複数の肺炎球菌莢膜糖類が還元的アミノ化により担体タンパク質にコンジュゲートされている；血清型 4、5、6A、6B、7F、9V、14、18C または 23F、4 および 5、4 および 6A、4 および 6B、4 および 7F、4 および 9V、4 および 14、4 および 18C、4 および 23F、5 および 6A、5 および 6B、5 および 7F、5 および 9V、5 および 14、5 および 18C、5 および 23F、6A および 6B、6A および 7F、6A および 9V、6A および 14、6A および 18C、6A および 23F、6B および 7F、6B および 9V、6B および 14、6B および 18C、6B および 23F、7F および 9V、7F および 14、7F および 18C、7F および 23F、9V および 14、9V および 18C、9V および 23F、14 および 18C、14 および 23F または 18C および 23F。一実施形態では、血清型 23F は、還元的アミノ化化学により担体タンパク

10

20

30

40

50

質にコンジュゲートされている。

非コンジュゲートまたはコンジュゲート肺炎球菌タンパク質

本発明の免疫原性組成物は、少なくとも1つの非コンジュゲートまたはコンジュゲート肺炎球菌タンパク質を含み得る。一実施形態では、少なくとも1つの非コンジュゲートまたはコンジュゲート肺炎球菌タンパク質は、ポリヒスチジントライアドファミリー（PhtX）、無毒化ニューモリシン（dPly）、コリン結合タンパク質ファミリー（CbpX）、CbpX末端切斷型、Lytx（自己分解酵素）ファミリー、Lytx末端切斷型、CbpX末端切斷型-Lytx末端切斷型キメラタンパク質、PcpA（肺炎球菌コリン結合タンパク質A）、PspA（肺炎球菌表面タンパク質A）、PsaA（肺炎球菌表面アドヘシンタンパク質A）、Sp128、Sp101（肺炎球菌101）、Sp130（肺炎球菌130）、SP125（肺炎球菌125）およびSP133（肺炎球菌133）からなる群から選択される。
10

【0105】

Pht（ポリヒスチジントライアド）ファミリーは、タンパク質PhtA、PhtB、PhtD、およびPhtEを含む。Phtファミリーはポリヒスチジントライアドファミリーまたは肺炎球菌ヒスチジントライアドファミリーと呼ぶことができ、従って、用語「ポリヒスチジントライアド」および「肺炎球菌ヒスチジントライアド」は互換的であると見なされ得ることに留意されたい。このファミリーは、脂質化配列、プロリンリッチ領域により分離された2つのドメインおよびおそらく金属またはヌクレオシド結合または酵素活性に関与するいくつかのヒスチジントライアド、（3-5）コイルドコイル領域、保存されたN末端および異種C末端を特徴とする。それは試験した全ての肺炎球菌株に存在する。他の連鎖球菌およびナイセリア菌でも、相同タンパク質が見つかった。本発明の一実施形態では、本発明のPhtタンパク質はPhtDである。しかしながら、PhtA、PhtB、PhtDおよびPhtEという用語は、下記の引例に開示される配列を有するタンパク質ならびに参照タンパク質と少なくとも90%同一である配列相同性を有するその天然の（および人工の）変異体を意味すると理解される。任意選択により、それは少なくとも95%同一または少なくとも97%同一である。
20

【0106】

PhtXタンパク質に関して、PhtAは国際公開第98/18930号に開示され、Sp36とも呼ばれる。上述のように、それはPhtファミリー由来のタンパク質であり、LXXCのII型シグナルモチーフを有する。PhtDは国際公開第00/37105号に開示され、Sp036Dとも呼ばれる。上述のように、それもPhtファミリー由来のタンパク質であり、II型LXXCシグナルモチーフを有する。一実施形態では、用語「PhtD」は、配列番号220を指す。PhtBは国際公開第00/37105号に開示され、Sp036Bとも呼ばれる。PhtBファミリーの別のメンバーは、国際公開第00/17370号に開示されているように、C3分解ポリペプチドである。このタンパク質もPhtファミリーに由来し、II型LXXCシグナルモチーフを有する。例えば、免疫学的に機能的な等価物は国際公開第98/18930号に開示されているタンパク質Sp42である。PhtB末端切斷型（およそ79kD）は国際公開第99/15675号に開示され、これもPhtファミリーのメンバーと見なされる。PhtEは国際公開第00/39299号に開示され、BVH-3と呼ばれる。本明細書で任意のPhtタンパク質に言及する場合、Phtタンパク質の免疫原性断片またはその融合物が使用可能であることを意味する。例えば、PhtXという場合、任意のPhtタンパク質由来の免疫原性断片またはその融合物を含む。PhtDまたはPhtBtいう場合、例えば、国際公開第01/98334号に見出されるように、それぞれPhtDE（PhtDおよびPhtEを含む融合タンパク質）またはPhtBE（PhtBおよびPhtEを含む融合タンパク質）を排除しない。
30
40

【0107】

一実施形態では、少なくとも1つの非コンジュゲートまたはコンジュゲート肺炎球菌タンパク質(unconjugated to conjugated Streptococcus pneumoniae protein)は、ポリヒ
50

スチジントライアドファミリー由来の少なくとも 1 つのタンパク質（例えば、前記タンパク質は P h t D、P h t B D および P h t D E 融合タンパク質からなる群から選択され得る）を含む。さらなる実施形態では、少なくとも 1 つの非コンジュゲートまたはコンジュゲート肺炎球菌タンパク質は、P h t D タンパク質である。さらなる実施形態では、P h t D タンパク質は、国際公開第 0 0 / 3 7 1 0 5 号の配列番号 4 のアミノ酸 2 1 ~ 8 3 8 の配列と少なくとも 8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 8 %、9 9 % または 1 0 0 % 同一のアミノ酸配列を含む。

【 0 1 0 8 】

一実施形態では、少なくとも 1 つの非コンジュゲートまたはコンジュゲート肺炎球菌タンパク質は、無毒化ニューモリシン (d P l y) である。一実施形態では、ニューモリシンは化学的に無毒化されている。さらなる実施形態では、ニューモリシンは化学的に無毒化されている。なおさらなる実施形態では、ニューモリシンは化学的および遺伝学的の両面で無毒化されている。

【 0 1 0 9 】

さらなる実施形態では、本発明の免疫原性組成物は、無毒化ニューモリシン (d P l y) および P h t D を含む。さらなる実施形態では、本発明の免疫原性組成物は、非コンジュゲート無毒化ニューモリシン (d P l y) および非コンジュゲート P h t D を含む。

【 0 1 1 0 】

コリン結合タンパク質ファミリー (C b p X) に関して、このファミリーのメンバーは元々、コリン - アフィニティークロマトグラフィーによって精製できた肺炎球菌タンパク質として同定された。コリン結合タンパク質は、細胞壁テイコ酸および膜結合性リポテイコ酸のホスホリルコリン部分に非共有結合的に結合されている。構造上、それらはファミリー全体に共通のいくつかの領域を有するが、そのタンパク質の厳密な性質（アミノ酸配列、長さなど）は様々であり得る。一般に、コリン結合タンパク質は、N 末端領域 (N) 、保存されている反復領域 (R 1 および / または R 2) 、プロリンリッチ領域 (P) 、ならびにタンパク質のおよそ半分を含む複数の反復で構成された保存されているコリン結合領域 (C) を含む。本出願で使用する場合、用語「コリン結合タンパク質ファミリー (C b p X) 」は、国際公開第 9 7 / 4 1 1 5 1 号で同定されたコリン結合タンパク質 P b c A、S p s A、P s p C、C b p A、C b p D および C b p G からなる群に由来するタンパク質を含む。C b p A は、国際公開第 9 7 / 4 1 1 5 1 号に開示されている。C b p D および C b p G は、国際公開第 0 0 / 2 9 4 3 4 号に開示されている。P s p C は、国際公開第 9 7 / 0 9 9 9 4 号に開示されている。P b c A は、国際公開第 9 8 / 2 1 3 3 7 号に開示されている。S p s A は、国際公開第 9 8 / 3 9 4 5 0 号に開示されているコリン結合タンパク質である。任意選択により、コリン結合タンパク質は、C b p A、P b c A、S p s A および P s p C からなる群から選択される。

【 0 1 1 1 】

本発明の一実施形態は、C b p X 末端切断型を含み、ここで、「C b p X」は上記で定義され、「末端切断型」は、コリン結合領域 (C) の 5 0 % 以上を欠く C b p X タンパク質を意味する。任意選択により、このようなタンパク質は、コリン結合領域全体を欠く。任意選択により、前記タンパク質末端切断型は、(i) コリン結合領域を欠き、かつ (i i) タンパク質の N 末端半分の部分も欠くが、少なくとも 1 つの反復領域 (R 1 または R 2) を保持する。任意選択により、末端切断型は、2 つの反復領域 (R 1 および R 2) を保持する。このような実施形態の例は、国際公開第 9 9 / 5 1 2 6 6 号または国際公開第 9 9 / 5 1 1 8 8 号に例示されている N R 1 × R 2 および R 1 × R 2 であるが、同様のコリン結合領域を欠く他のコリン結合タンパク質も本発明の範囲内で企図される。

【 0 1 1 2 】

L y t X ファミリーは、細胞溶解に関連する膜結合タンパク質である。その N 末端ドメインは、コリン結合ドメインを含む。しかしながら、L y t X ファミリーは、上記の C b p X ファミリーに見られる特徴の全てを持つわけではない。本発明に関しては、L y t X ファミリーは C b p X ファミリーとは異なると考えられる。C b p X ファミリーとは対照

10

20

30

40

50

的に、Lyt X ファミリーの C 末端ドメインは、Lyt X タンパク質の触媒ドメインを含む。このファミリーは、Lyt A、Lyt B および Lyt C を含む。Lyt X ファミリーに関して、Lyt A は Ronda et al., Eur J Biochem, 164:621-624 (1987) に開示されている。Lyt B は国際公開第 98 / 18930 号に開示され、Sp46 とも呼ばれる。Lyt C もまた国際公開第 98 / 18930 号に開示され、Sp91 とも呼ばれる。本発明の実施形態は Lyt C を含む。

【0113】

別の実施形態は、Lyt X 末端切斷型を含み、ここで、「Lyt X」は上記で定義され、「末端切斷型」は、コリン結合領域の 50% 以上を欠く Lyt X タンパク質を意味する。任意選択により、このようなタンパク質は、コリン結合領域全体を欠く。本発明のさら 10 に別の実施形態は、CbpX 末端切斷型 - Lyt X 末端切斷型キメラタンパク質または融合タンパク質を含む。任意選択により、融合タンパク質は、CbpX の NR1xR2 (または R1xR2) および Lyt X の C 末端部分 (Cterm、すなわち、コリン結合ドメインを欠くタンパク質) (例えば、LytCCterm または Sp91Cterm) を含む。任意選択により、CbpX は、CbpA、PbcA、SpsA および PspC からなる群から選択される。任意選択により、それは CbpA である。任意選択により、Lyt X は Lyt C (Sp91 とも呼ばれる) である。本発明の別の実施形態は、コリン結合ドメイン (C) を欠き、Lyt X との融合タンパク質として発見される PspA または Ps 20 a A 末端切斷型である。任意選択により、Lyt X は Lyt C である。

【0114】

PsaA および PspA に関しては、両方とも当技術分野で記述されている。例えば、PsaA およびその膜貫通消失変異体は、Berry & Paton, Infect Immun 1996 Dec;64(12):5255-62 により記載されている。PspA およびその膜貫通消失変異体は、例えば、米国特許第 5804193 号、国際公開第 92 / 14488 号、および国際公開第 99 / 53940 号に記載されている。

【0115】

PcpA に関して、このタンパク質は当技術分野で記載されており、例えば、PcpA は国際公開第 2011 / 075823 号に記載されている。用語「PcpA」は、国際公開第 2011 / 075823 号の配列番号 2 もしくは 7 と少なくとも 80%、85%、90%、95%、98%、99% または 100% の同一を含むタンパク質、または国際公開第 2011 / 075823 号の配列番号 2 もしくは 7 の少なくとも 100、150、200、25 もしくはそれを超える連続するアミノ酸の断片を意味する。

【0116】

Sp128 および Sp130 は、国際公開第 00 / 76540 号に開示されている。Sp125 は、LPXTG (ここで、X は任意のアミノ酸である) の細胞壁係留モチーフを有する肺炎球菌表面タンパク質の例である。このモチーフを有するこの種の肺炎球菌表面タンパク質内のタンパク質は、本発明の文脈内で有用であるところが分かっており、従って、本発明のさらなるタンパク質と見なされる。Sp125 自体は国際公開第 98 / 18930 号に開示されており、亜鉛メタロプロテイナーゼである ZmpB としても知られる。Sp101 は国際公開第 98 / 06734 号に開示されている (そこで、それは参照 # y 85993 を有する)。それは I 型シグナル配列を特徴とする。Sp133 は国際公開第 98 / 06734 号に開示されている (そこで、それは参照 # y 85992 を有する)。これもまた I 型シグナル配列を特徴とする。

【0117】

存在し得るこれらのさらなる肺炎球菌タンパク質はいずれも、非コンジュゲート型またはコンジュゲート型である。1 以上の肺炎球菌タンパク質は、任意選択により、肺炎球菌糖類にコンジュゲートされる (上記の肺炎球菌莢膜糖類コンジュゲートと題された節に記載)。任意選択により、1 以上の肺炎球菌タンパク質は、異なる細菌に由来する糖類にコンジュゲートされる。

【0118】

10

20

30

40

50

この文脈において用語「コンジュゲートされる」は、タンパク質が糖類に共有結合されることを意味し、この場合、タンパク質は担体タンパク質として機能する。

【0119】

一実施形態では、少なくとも1つのさらなる非コンジュゲートまたはコンジュゲート肺炎球菌タンパク質は、PhtB、PhtE、PhtA、PhtBDおよびPhtDEからなる群から選択されるポリヒスチジンファミリー(PhtX)タンパク質を含む。

アジュバント

一実施形態では、免疫原性組成物はアジュバントを含む。

【0120】

好適なアジュバントとしては、限定されるものではないが、アルミニウム塩(例えば、リン酸アルミニウムまたは水酸化アルミニウム)、モノホスホリル脂質A(例えば、3D-MPL)、サポニン(例えば、QS21)、水中油エマルション、グラム陰性菌株由来のプレブまたは外膜小胞調製物(国際公開第02/09746号により教示されるものなど)、脂質Aまたはその誘導体、リン酸アルキルグルコサミドまたはこれらのアジュバントの2種以上の組合せが含まれる。一実施形態では、リン酸アルミニウムである。さらなる実施形態では、アジュバントは、ヒト用量当たり100~750、150~600、200~500、250~450、300~400、または350μg前後のアルミニウムをリン酸アルミニウムとして含む。

ワクチン

本発明は、本発明の免疫原性組成物を含むワクチンを提供する。本発明の「免疫原性組成物」に関する本明細書内の実施形態は、本発明の「ワクチン」に関する実施形態にも適用可能であり、逆も同じである。一実施形態では、ワクチンは、本発明の免疫原性組成物と薬学上許容される賦形剤とを含む。

【0121】

本発明のワクチンは、皮内、粘膜、例えば、鼻腔内、経口の筋肉内または皮下などのいずれの好適な送達経路によって投与してもよい。他の送達経路も当技術分野で周知である。ワクチン製剤は一般に、Vaccine Design ("The subunit and adjuvant approach" (owell M.F. & Newman M.J.編) (1995) Plenum Press New York)に記載されている。

【0122】

一態様において、本発明の免疫原性組成物は、筋肉内送達経路によって投与される。筋肉内投与は、大腿または上腕に対するものであり得る。注射は一般に、針(例えば、皮下針)によるが、無針注射も選択使用することができる。典型的な筋肉内用量は0.5mlである。

【0123】

本発明のさらなる態様は、非コンジュゲート肺炎球菌タンパク質をアジュバント組成物と混合する工程を含む、本発明のワクチンの製造方法である。

【0124】

本発明の一態様において、肺炎球菌感染により引き起こされる疾患に対して対象を免疫する方法であって、前記対象に治療上有効な用量の本発明の免疫原性組成物またはワクチンを投与することを含む方法が提供される。本発明のさらなる態様において、インフルエンザ菌感染により引き起こされる疾患に対して対象を免疫する方法であって、前記対象に治療上有効な用量の本発明の免疫原性組成物またはワクチンを投与することを含む方法が提供される。さらなる実施形態では、肺炎球菌およびインフルエンザ菌感染により引き起こされる疾患に対して対象を免疫する方法であって、前記対象に治療上有効な用量の本発明の免疫原性組成物またはワクチンを投与することを含む方法が提供される。一実施形態では、前記疾患は、肺炎、浸潤性肺炎球菌性疾患(IPD)、慢性閉塞性肺疾患(COPD)の増悪、中耳炎、髄膜炎、菌血症、および結膜炎からなる群から選択される少なくとも1つの疾患を含む。一実施形態では、対象は哺乳類対象である。さらなる実施形態では、哺乳類対象は、マウス、モルモットおよびヒトからなる群から選択される。一実施形態では、対象は成人、任意選択により、高齢者である。さらなる実施形態では、対象は乳幼

10

20

30

40

50

児である。

【0125】

本発明のさらなる態様では、肺炎球菌感染により引き起こされる疾患の治療または予防において使用するための本発明の免疫原性組成物またはワクチンが提供される。本発明のさらなる態様では、インフルエンザ菌感染により引き起こされる疾患の治療または予防において使用するための本発明の免疫原性組成物またはワクチンが提供される。さらなる実施形態では、肺炎球菌およびインフルエンザ菌感染により引き起こされる疾患の治療または予防において使用するための本発明の免疫原性組成物またはワクチンが提供される。一実施形態では、前記使用は、成人宿主、任意選択により、高齢者宿主への免疫原性組成物の投与を含む。さらなる実施形態では、前記使用は、乳幼児宿主への免疫原性組成物の投与を含む。さらなる実施形態では、前記疾患は、肺炎、浸潤性肺炎球菌性疾患（IPD）、慢性閉塞性肺疾患（COPD）の増悪、中耳炎、髄膜炎、菌血症、および結膜炎からなる群から選択される少なくとも1つの疾患を含む。10

【0126】

本発明のさらなる態様では、肺炎球菌感染により引き起こされる疾患の治療または予防のための薬剤の製造における本発明の免疫原性組成物またはワクチンの使用が提供される。本発明のさらなる態様では、インフルエンザ菌感染により引き起こされる疾患の治療または予防のための薬剤の製造における本発明の免疫原性組成物またはワクチンの使用が提供される。さらなる実施形態では、インフルエンザ菌および肺炎球菌感染により引き起こされる疾患の治療または予防のための薬剤の製造における本発明の免疫原性組成物またはワクチンの使用が提供される。一実施形態では、前記疾患は、肺炎、浸潤性肺炎球菌性疾患（IPD）、慢性閉塞性肺疾患（COPD）の増悪、中耳炎、髄膜炎、菌血症、および結膜炎からなる群から選択される少なくとも1つの疾患を含む。20

【0127】

一実施形態では、前記使用は、成人宿主、高齢者宿主および乳幼児宿主からなる群から選択される宿主への本発明の免疫原性組成物またはワクチンの投与を含む。

【0128】

式（I）の融合タンパク質および肺炎球菌莢膜糖類コンジュゲートは、哺乳類、特にヒトなどの対象において免疫原として有用である。特に、式（I）の融合タンパク質および肺炎球菌莢膜糖類コンジュゲートは、対象、特にヒトにおいてインフルエンザ菌に対する免疫応答を誘導する上で有用である。さらに、式（I）の融合タンパク質および肺炎球菌莢膜糖類コンジュゲートは、対象、特にヒトにおいて肺炎球菌に対する免疫応答を誘導する上で有用である。より具体的には、式（I）の融合タンパク質は、中耳炎および/またはAECOPDおよび/または肺炎の治療または予防において有用である。30

【0129】

一実施形態では、本発明はさらに、必要とする対象において中耳炎を治療または予防する方法であって、前記対象に本明細書に記載の式（I）の融合タンパク質および肺炎球菌莢膜糖類コンジュゲートを含む治療上有効な量の免疫原性組成物を投与することを含む方法を提供する。別の実施形態では、本発明は、必要とする対象において慢性閉塞性肺疾患（AECOPD）の急性増悪を治療または予防するための方法であって、前記対象に本明細書に記載の式（I）の融合タンパク質および肺炎球菌莢膜糖類コンジュゲートを含む治療上有効な量の免疫原性組成物を投与することを含む方法を提供する。40

【0130】

別の実施形態では、本発明は、必要とする対象において肺炎を治療または予防する方法であって、前記対象に本明細書に記載の式（I）の融合タンパク質および肺炎球菌莢膜糖類コンジュゲートを含む治療上有効な量の免疫原性組成物を投与することを含む方法を提供する。

【0131】

別の実施形態では、本発明は、必要とする対象においてインフルエンザ菌感染また疾患を治療または予防するための方法であって、前記対象に本明細書に記載の式（I）の融合50

タンパク質および肺炎球菌莢膜糖類コンジュゲートを含む治療上有効な量の免疫原性組成物を投与することを含む方法を提供する。

【0132】

別の実施形態では、本発明は、必要とする対象において肺炎球菌感染または疾患を治療または予防するための方法であって、前記対象に本明細書に記載の式(I)の融合タンパク質および肺炎球菌莢膜糖類コンジュゲートを含む治療上有効な量の免疫原性組成物を投与することを含む方法を提供する。

さらなる定義

本明細書においてそうではないことが説明または定義されない限り、本明細書で使用する全ての技術用語および科学用語は、本開示が属する技術分野の熟練者によって一般に理解されているものと同じ意味を有する。例えば、分子生物学における一般用語の定義はBenjamin Lewin, Genes V, published by Oxford University Press, 1994 (ISBN 0-19-854287-9); Kendrew et al. (編), The Encyclopedia of Molecular Biology, Blackwell Science Ltd.出版, 1994 (ISBN 0-632-02182-9); およびRobert A. Meyers (編), Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference, VCH Publishers出版, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8)に見出せる。10

【0133】

単数形の用語「1つの(a)」、「1つの(an)」および「その(the)」は、文脈がそうではないことを明示しない限り、複数の指示語を含む。同様に、「または」という語は、文脈がそうではないことを明示しない限り、「および」を含むことが意図される。さらに、核酸またはポリペプチドに関して示される全ての塩基サイズまたはアミノ酸サイズ、および分子量または分子質量値は概数であり、記述のために示されるものと理解される。さらに、抗原などの物質の濃度またはレベルに関して示される数値限界も概数であり得る。従って、濃度が(例えば、)およそ200 pgであると示される場合、その濃度が200 pgよりもやや多いまたはやや少ない(「約」または「~」)値を含むことが意図される。20

【0134】

本明細書に記載のものと類似または等価な方法および材料本開示の実施または教示に使用可能であるが、好適な方法および材料を以下に記載する。

【0135】

用語「含む(comprises)」は、「包含する/includes」を意味する。従って、文脈がそうではないことを要さない限り、「含む(comprises)」および「含む(comprise)」および「含む(comprising)」などの変形形態は、記載の化合物または組成物(例えば、核酸、ポリペプチド、抗原)もしくは工程、または化合物群もしくは工程群の包含を意味するが、他の任意の化合物、組成物、工程、またはそれらの群の排除を意味しないものと理解される。省略形「e.g.」は、ラテン語の例えば(exempli gratia)に由来し、本明細書では限定されない例を示すために使用される。従って、省略形「e.g.」は、用語「例えば」と同義である。30

【0136】

本明細書で使用する場合、「対象」は、ヒト、非ヒト靈長類、および非靈長類哺乳類、例えば、齧歯属(限定されるものではないが、マウスおよびラットを含む)のメンバーおよびウサギ目(限定されるものではないが、ウサギを含む)のメンバーを含む、哺乳類である。40

【0137】

本明細書で使用する場合、「アジュバント」は、ワクチン、免疫療法薬、または他の抗原もしくは免疫原含有組成物とのコンジュゲーションで対象に投与した際に、投与された抗原または免疫原に対する対象の免疫応答を(アジュバントの不在下で得られるであろう免疫応答に比べて)増大または増強する化合物または物質を意味する。これは癌治療について米国国立衛生研究所の国立癌研究所により定義される、一次治療の後に施される、癌が再発するリスクを低減するための追加治療としての「補助療法」とは区別される。

【0138】

50

保存的置換は周知であり、一般に、配列アライメントコンピュータープログラムにおいてデフォルトスコアリングマトリックスとして設定される。これらのプログラムには、PAM250 (Dayhoff M.O. et al., (1978), "A model of evolutionary changes in proteins", In "Atlas of Protein sequence and structure" 5(3) M.O. Dayhoff (編), 345-352), National Biomedical Research Foundation, Washington、およびBlosum 62 (Steven Henikoff and Jorja G. Henikoff (1992), "Amino acid substitution matrices from protein blocks"), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 (Biochemistry): 10915-10919が含まれる。本発明はさらに、保存的アミノ酸置換を含有する式(I)の融合タンパク質を提供する。例えば、式(I)の融合タンパク質は、本明細書に示される配列のいずれかに記載されるインフルエンザ菌のPEまたはP1A(例えば、配列番号4～配列番号57で示されるいずれかのPE配列、配列番号58～配列番号121で示されるいずれかの任意のP1A配列)に由来する任意のアミノ酸の保存的置換を含み得る。

【0139】

本明細書で使用する場合、「シグナルペプチド」は、前駆体タンパク(一般にN末端)上に存在し、一般に成熟タンパク質には不在の短い(60個未満のアミノ酸、例えば、3～60個のアミノ酸)ポリペプチドを意味する。シグナルペプチド(s p)は一般に疎水性アミノ酸に富む。シグナルペプチドは、翻訳されたタンパク質の膜を経た輸送および/または分泌を指示する。シグナルペプチドはまた、標的シグナル、輸送ペプチド、局在シグナル、またはシグナル配列とも呼ばれる。例えば、シグナル配列は、共翻訳または翻訳後シグナルペプチドであり得る。

【0140】

異種シグナルペプチドは、タンパク質輸送または分泌の際またはその後にシグナルペプチドペプチダーゼにより融合タンパク質構築物から切断され得る。例えば、シグナルペプチドペプチダーゼは、シグナルペプチドペプチダーゼIである。「異種」シグナルペプチドは、それが天然に存在する場合にそのタンパク質とは会合していないものである。

【0141】

本明細書で使用する場合、「処置」は、対象におけるその病態または疾患の症状の発生の予防、対象におけるその病態または疾患の症状の再発の予防、対象におけるその病態または疾患の症状の再発の遅延、対象におけるその病態または疾患の症状の重篤度または頻度の低減、病態の進行の緩徐化または排除、および対象における疾患または病態の症状の部分的または完全排除を意味する。

【0142】

本明細書で使用する場合、「任意選択により」は、続いて記載される事象が存在しても存在しなくてもよいことを意味し、存在する事象および存在しない事象を含むことを意味する。

【0143】

本特許明細書内に引用される参照文献または特許出願は全て、引用することにより本明細書の一部とされる。

【0144】

本明細書で使用する場合、「乳幼児」は、0～2歳のヒトを意味する。

【0145】

本明細書で使用する場合、「成人」は、18歳を超えるヒトを意味する。

【0146】

本明細書で使用する場合、「高齢者」は、60歳を超える、任意選択により、65歳を超えるヒトを意味する。

【実施例】

【0147】

実施例では、以下の用語は、示された意味を有する。

$\times g$ = 遠心力（重力数）；
 A T P = アデノシン三リン酸；
 B C A = ビシンコニン酸；
 B S A = ウシ血清アルブミン；
 = 摂氏度；
 C a C l₂ = 塩化カルシウム；
 C V = カラム容量；
 D N A = デオキシリボ核酸；
 D S C = 示差走査熱量測定；
 D T T = ジチオトレイトル；
 d N T P = デオキシヌクレオシド三リン酸；
 E D T A = エチレンジアミン四酢酸；
 F T = フロースルー；
 H C l = 塩化水素；
 H i s = h i s = ヒスチジン；
 H E P E S = 4 - (2 - ヒドロキシエチル) - 1 - ピペラジンエタンスルホン酸；
 I M A C = 固定化メタルアフィニティークロマトグラフィー；
 I P T G = イソプロピル - D - 1 - チオガラクトピラノシド；
 K C l = 塩化カリウム；
 K₂HPO₄ = 第二リン酸カリウム；
 KH₂PO₄ = 第一リン酸カリウム；
 L D S = ドデシル硫酸リチウム；
 L = リットル；
 M E S = 2 - (N - モルホリノ) エタンスルホン酸；
 M g C l₂ = 塩化マグネシウム；
 m l = ミリリットル；
 R P M = 回転毎分
 m i n = 分；
 mM = モリモル；
 μ L = マイクロリットル；
 N a C l = 塩化ナトリウム；
 Na₂HPO₄ = 第二リン酸水素ナトリウム；
 NaH₂PO₄ = 第一リン酸ナトリウム；
 n g = ナノグラム；
 n m = ナノメートル；
 O / N = 一晩；
 P B S = リン酸緩衝生理食塩水；
 P C R = ポリメラーゼ連鎖反応；
 S B = サンプルバッファー；
 s e c = 秒；
 w / v = 重量 / 容量
 P S = 多糖、「糖類」と互換的に使用することができる。

1. 実施例

実施例 1：融合タンパク質

種々のシグナルペプチドおよびアミノ酸リンカー配列との融合タンパク質を作製した。これらの融合タンパク質は、タンパク質 E および P i l A (またはそれらの断片) の両方の分泌を、単一の細菌株に限定されることなく可能とした。融合タンパク質は、シグナルペプチドペプチダーゼにより異種シグナルペプチドが取り除かれた後に周辺質に放出される。細菌から精製された融合タンパク質は、異種シグナルペプチドを含有しない。「精製された」タンパク質は、細菌から取り出され、シグナルペプチドを欠く。

【0148】

下表に作製した融合タンパク質構築物を記載する。

【0149】

【表3】

PilAおよびタンパク質Eを含有する融合タンパク質構築物

構築物ID	N末端 ----- C末端					
LVL312	flg I sp	E	PilA 断片 (A.A.: 配列番号 58 の 40-149, 配列番号 127)	G G	ProtE 断片 (A.A.: 配列番号 4 の 18-160, 配列番号 123)	GGHHHH HH
A.A.	1 19 21		130	133		275 276 283
LVL291	pelB sp		ProtE 断片 (A.A.: 配列番号 4 の 19-160, 配列番号 124)	G G	PilA 断片 (A.A.: 配列番号 58 の 40-149, 配列番号 127)	GGHHHH HH
A.A.	1 22 23		164	167		276 277 284
LVL268	pelB sp	D	ProtE 断片 (A.A.: 配列番号 4 の 20-160, 配列番号 125)	G G	PilA 断片 (A.A.: 配列番号 58 の 40-149, 配列番号 127)	GGHHHH HH
A.A.	1 22 24		164	167		276 277 284
LVL269	nadA sp	AT ND DD	ProtE 断片 (A.A.: 配列番号 4 の 22-160, 配列番号 126)	G G	PilA 断片 (A.A.: 配列番号 58 の 40-149, 配列番号 127)	GGHHH HHH
A.A.	1 23 24-29 30		168	171		280 281 288

10

20

30

40

LVL270	M HH HH HH	ProtE 断片 (A.A.: 配列番号 4 の 17-160, 配列番号 122)	G G	PilA 断片 (A.A.: 配列番号 58 の 40-149, 配列番号 127)		
A.A.	1 7 8		151	154	263	
						10
LVL315	pelB sp	M D	ProtE 断片 (A.A.: 配列番号 4 の 22- 160, 配列番号 126)	G G	PilA 断片 (A.A.: 配列番号 58 の 40-149, 配 列番号 127)	GGHHHHHH
	1 22 25		163	166	275 276	283
LVL317	pelB sp		ProtE 断片 (A.A.: 配列番号 4 の 19-160, 配列番号 124)	G G	PilA 断片 (A.A.: 配列番号 58 の 40-149, 配 列番号 127)	
A.A.	1 22 23		164	167	276	
LVL318	pelB sp	M D	ProtE 断片 (A.A.: 配列番号 4 の 22- 160, 配列番号 126)	G G	PilA 断片 (A.A.: 配列番号 58 の 40-149, 配 列番号 127)	
A.A.	1 22 25		163	166	275	
						30
LVL702	pelB sp		ProtE 断片 (A.A.: 配列番号 4 の 20-160, 配列番号 125)	G G	PilA 断片 (A.A.: 配列番号 58 の 40-149, 配 列番号 127)	GGHHHHH H
A.A.	1 22 23		163	166	275	283
						40

LVL736	pelB sp	ProtE 断片 (A.A.: 配列番号 4 の 17-160, 配列番号 122)	G G	PilA 断片 (A.A.: 配列番号 58 の 40-149, 配列番号 127)	G G HH HH HH
A.A.	1	22 23	166	169	278 286
LVL737	pelB sp	ProtE 断片 (A.A.: 1 配列番号 4 の 8-160, 配列番号 123)	G G	PilA 断片 (A.A.: 配列番号 58 の 40-149, 配列番号 127)	GGH HHH HH
A.A.	1	22 23	165	168	277 285
LVL738	pelB sp	ProtE 断片 (A.A.: 配列番号 4 の 22-160, 配列番号 126)	G G	PilA 断片 (A.A.: 配列番号 58 の 40-149, 配列番号 127)	GGHHHHHH
A.A.	1	22 23	161	164	273 281
LVL739	pelB sp	ProtE 断片 (A.A.: 配列番号 4 の 23-160, 配列番号 179)	G G	PilA 断片 (A.A.: 配列番号 58 の 40-149, 配列番号 127)	GGHHHH HH
A.A.	1	22 23	160	163	272 280
LVL740	pelB sp	ProtE 断片 (A.A.: 配列番号 4 の 24-160, 配列番号 180)	G G	PilA 断片 (A.A.: 配列番号 58 の 40-149, 配列番号 127)	GGHHHH H
A.A.	22 23	159	162	271	279
LVL735	pelB sp	ProtE 断片 (A.A.: 配列番号 4 の 20-160, 配	G G	PilA 断片 (A.A.: 配列番号 58	

10

20

30

40

		列番号 125)		の 40-149, 配列番号 127)	
A.A.	1	22 23	163	166	275
LVL778	pelB sp	ProtE 断片 (A.A.: 配列番号 4 の 17-160, 配列番号 122)	G G	PilA 断片 (A.A.: 配列番号 58 の 40-149, 配列番号 127)	10
A.A.	1	22 23	166	169	278
LVL779	pelB sp	ProtE 断片 (A.A.: 配列番号 4 の 18-160, 配列番号 123)	G G	PilA 断片 (A.A.: 配列番号 58 の 40-149, 配列番号 127)	20
A.A.	1	22 23	165	168	277
LVL780	pelB sp	ProtE 断片 (A.A.: 配列番号 4 の 22-160, 配列番号 126)	G G	PilA 断片 (A.A.: 配列番号 58 の 40-149, 配列番号 127)	30
A.A.	1	22 23	161	164	273
LVL781	pelB sp	ProtE 断片 (A.A.: 配列番号 4 の 23-160, 配列番号 179)	G G	PilA 断片 (A.A.: 配列番号 58 の 40-149, 配列番号 127)	40
A.A.	1	22 23	160	163	272
LVL782	pelB sp	ProtE 断片	G	PilA 断片	
		(A.A.: 配列番号 4 の 24-160, 配列番号 180)	G	(A.A.: 配列番号 58 の 40-149, 配列番号 127)	
A.A.	1	22 23	159	162	271

sp = シグナルペプチド; A.A. = アミノ酸

表 3 に挙げたシグナルペプチドおよびプラスミドそれぞれの DNA 配列およびアミノ酸

配列を以下に示す。

シグナル配列：

pelB シグナルペプチド(DNA) - 配列番号 129:

atgaaaatacctgctgccgaccgctgtgtggctgtgtcccgctgcccagccggcgatggcc

pelB シグナルペプチド(アミノ酸) - 配列番号 130:

MKYLLPTAAA GLLLLAAQPA MA

Flgl シグナルペプチド(DNA) - 配列番号 131:

10

atgattaaatttcctctgcatttaattttactggcacgacggcggctcaggct

Flgl シグナルペプチド(アミノ酸) - 配列番号 132:

MIKFLSALIL LLVTAAQQA

NadA シグナルペプチド(DNA) - 配列番号 133:

atgaaacacttccatccaaagtactgaccacagccatcctgccactttctgtacggcgcactggca

NadA シグナルペプチド(アミノ酸) - 配列番号 134:

20

MKHFPSKVLT TAILATFCSG ALA

融合タンパク質構築物配列：

アミノ酸配列の一本の下線を引いた箇所は *Haemophilus influenzae* 86-028NP 株由来の P1A に由来する。アミノ酸配列の太い下線を引いた箇所は *Haemophilus influenzae* 772 株に由来するタンパク質 E に由来した。

LVL312 (DNA) - 配列番号 135:

atgattaaattctctcgcattaattctctactggtcacgacggcggctcaggctgagactaaaaaaggcagcggtatctgaattactg
caagcgtcagcgcctataaggctgatgtggattatgttatagcacaaatgaaacaacaactgtacgggtggaaaaaatg
gtattgcagcagataaccacagcaaaaggctatgaaaatcagtgacaacaagcaacggtgcataacactgaaaaggggat
ggcacattgcaaataatgaaatatttcaagctacaggtaatgcaacaggtaacttgacaacaacttgcaaaaggaaac
ggatgcctttatccagcaaatttgcggaaatgtcacacaaggcggcgcagattcagaaggctgaaacaaatgatgtgaa
gctggcaccggcactgtacgaagcggatatacgttggtaagaatgtgaaattacatcgatagtgaatcgatctgggtg
gataaccaagagccacaaatgtacatttgatgcagtggtaatttagataaggattgtatgtttatcctgagccaaacgttatgca
cgttctgtcgtcagtataagatctgcaaattatcatttaactcaagtacgaactgattctatgatgaatttgggacagggt
ttgcgggcagcacctaaaaagcaaaagaaacatacgtaagttaacacctgatacaacgcttataatgctcagatttgt
cgaactatggtaagcatttcagttgataaaaaaggcggccaccaccaccaccactaa

10

LVL312 (タンパク質): (flgl sp)(E)(PilA aa 40-149)(GG)(ProtE aa 18-160)(GGHHHHHH) - 配列番号 136

MIKFLSALIL LLVTTAAQAE TKKAAVSELL QASAPYKADV ELCVYSTNET TNCTGGKNGI
AADITTAKGY VKSVTSNGA ITVKGDGTLA NMEYILQATG NAATGVTWTT TCKGTDASLF
PANFCGSVTQ GGAQIQKAEQ NDVKLAPPTD VRSGYIRLVK NVNYYIDSES IWDNQEPCI
VHFDAVNLD KGLYVYPEPK RYARSRVRQYK ILNCANYHLT QVRTDFYDEF
WGQGLRAAPK KQKKHTLSLT PDTTLYNAAQ IICANYGEAF SVDKKGGHHH HHH

20

LVL291 (DNA) - 配列番号 137:

atgaaatacctgctgccgaccgctgtgtggctgtctgcgtcccagccggcgatggccagattcagaaggctgaaaca
aaatgtgaaatggcaccggcactgtacgaagcggatatacgttggtaaagaatgtgaaattacatcgatagtga
atcgatctgggtgataaccaagagccacaaattgtacatttgatgcagtggtaatttagataaggattgtatgtttatcctgagcc
taaacgttatgcacgttctgtcgtcagtataagatctgaaatttgcaaaattatcatttaactcaagtacgaactgattctatgaaattt
tggggacagggtttgcggcggcggcacctaaaaagcaaaagaaacatacgtaagttaaacacctgatacaacgcttataatgctgc
tcagattatttgtcgaactatggtaagcatttcagttgataaaaaaggcggcactaaaaagcagcggtatctgaaattactgcaa
gcgtcagcgcctataaggctgatgtggattatgttatagcacaaatgaaacaacaactgtacgggtggaaaaaatggatt
gcagcagataaccacagcaaaaggctatgaaaatcagtgacaacaagcaacggtgcataacactgaaaaggggatggc
acattggcaaataatgaaatatttcaagctacaggtaatgctcaacaggtaacttgacaacaactgcaaaaggaaacgg
tgcctttatccagcaaatttgcggaaatgtcagttgatccacacaaggcggccaccaccaccaccactaa

30

LVL291 (タンパク質)(pelB sp)(ProtE aa 19-160)(GG)(PilA aa 40-149)(GGHHHHHH) - 配列番号 138

MKYLLPTAAA GLLLLAAQPA MAQIQKAEQN DVKLAPPTDV RSGYIRLVKN VNYYIDSEI
WWDNQEPQIV HFDAVNLDK GLYVYPEPKR YARSRQYKI LNCANYHLTQ
VRTDFYDEFW GQGLRAAPKK QKKHTLSLTP DTTLYNAAQI ICANYGEAFS VDKKG~~G~~TKKA
AVSELLQASA PYKADVELCV YSTNETTNCT GGKNGIAADI TTAKGYVKSV TTSNGAITVK
GDGT~~L~~ANMEY ILQATGNAAT GVTWTTCKG TDASLFPANF CGS~~V~~TQGGHH HHHH

LVL268 (DNA) - 配列番号 139:

10

LVL268 (タンパク質): (pelB sp)(D)(ProtE aa 20-160)(GG)(PilA aa40-149)(GGHHHHHH) - 配列番号 140:

MKYLLPTAAA GLLLLAAQPA MADIQKAEQN DVKLAPPTDV RSGYIRLVKN VNYYIDSESI
WVDNQEPIV HFDAVNLDK GLYVYPEPKR YARSVRQYKI LNCANYHLTQ
VRTDFYDEFW GQGLRAAPKK QKKHTLSLTP DTTLYNAAQI ICANYGEAFS VDKKGGTTKKA
AVSELLQASA PYKADVELCV YSTNETTNCT GGKNGIAADI TTAKGYVKSV TTSNGAITVK
GDGTLANMEY ILQATGNAAT GVTWTTCKG TDASI FPANE CGSVTOGGHH HHHH

IVI 269 (DNA) - 配列番号 141

30

aaaggggatggcacatggcaaataatgaaatatatttgcagctacaggtaatgtcaacagggttaactggacaacaacttg
caaaqqqaacqgatqcctctttttccaqcaaattttgcqqaqgtcatacacaqqcqgcccaccaccaccaccactaa

LVL269 (タンパク質): (nadA sp)(ATNDDD)(ProtE aa 22-160)(GG)(PilA aa 40-149)(GGHHHHHH) - 配列番号 142

MKHFPSKVLT TAILATFCSG ALAATNDDDK AEQNDVKLAP PTDVRSGYIR LVKNVNYYID
SESIWVDNQE PQIVHFDAAV NLDKGLYVYP EPKRYARSRV QYKILNCANY HLTQVRTDFY
DEFWGQQLRA APKKQKKHTL SLTPDTTLYN AAQIICANYG EAFSVDKKGG TKKAAVSELL
QASAPYKADV ELCVYSTNET TNCTGGKNGI AADITTAKGY VKSVTTNSGA ITVKGDGTLA
NMEYILQATG NAATGVTWTT TCKGTDASLF PANFCGSVTQ GGHHHHHHH

10

LVL270 (DNA) - 配列番号 143:

20

LVL270 (タンパク質): (MHHHHHHH)(ProtE aa 17-160)(GG)(PilA aa40-149) - 配列番号 144:

MHHHHHHSAQ IQKAEQNDVK LAPPTDVRSG YIRLVKNVNY YIDSESIWWD NQEPOIVHFD
AVVNLDKGLY VYPEPKRYAR SVRQYKILNC ANYHLTQVRT DFYDEFWGQG
LRAAPKKQKK HTLSLTPDTT LYNAAQIICA NYGEAFSVDK KGGTKKAAVS ELLQASAPYK
ADVELCVYST NETTNCTGGK NGIAADITTA KGTVKSVTTS NGAITVKGDG TLANMEYILQ
ATGNAATGVT WTTTCKGTD A SLFPANFCGS VTQ

30

LVL315 (DNA) - 配列番号 145:

atgaaatacgtccggaccgtcgctggctgcgtccctcgcccagccggatggccatggataaggctgaacaaa
tgatgtgaagctggcaccggcactgtatgtacgaagcgatatacgtttgtaaagaatgtgaatttacatcgatgtatcg
atctgggtgataaccaagagccacaattgtacatttgatgcagtgtgaatttagataagggattgtatgtttatccctgagcctaaa
cgttatgcacgttctgttcgtcagttataagatctgtcaaattatcatttaactcaagtgactcaactqatttttatqatgtaaattttqqq

40

gacagggttgcggcagcacctaaaaagcaaaagaaacatacgtaagttaacacccgtataatgcgtctag
attatttgtcgactatggtaagcatttcagttgataaaaaaggcgccactaaaaagcagcgttatctgaattactgcgat
cagcgccttataaggctgtgtggattatgttatatgcacaatgaaacaacaaactgtacggtgaaaaatggattgca
gcagatataaccacagcaaaaggctatgtaaaatcagtgacaacaagcaacggtgcaataacagtaaaagggatggcat
tggcaaataatgaaatatttgcaagctacaggtaatgctgcaacaggtaactggacaacaactgcaaaaggAACGGATGCC
tcctttttccagcaattttgcggaaatgtcacacaaggccggccaccaccaccaccactaa

LVL315 (タンパク質): (pepB sp)(MD)(ProtE aa 22-160)(GG)(PilA aa40-149)(GGHHHHHH) -

10

配列番号 146:

MKYLLPTAAA GLLLAAQPA MAMD**KAEQND VKLAPPTDVR SGYIRLVKNV NYYIDSESIW**
VDNQECPQIVH FDAVNLDKG LYVYPEPKRY ARSVRQYKIL NCANYHLTQV
RTDFYDEFWG QGLRAAPKKQ KKHTLSLTPD TTLYNAAQII CANYGEAFSV DKKGGTKAA
VSELLQASAP YKADVELCVY STNETTNCTG GKNGIAADIT TAKGYVKSVT TSNGAITVKG
DGTLANMEYI LQATGNAATG VTWTTCKGT DASLFPANFC GSVTOGGHHH HHH

LVL317 (DNA) - 配列番号 147:

atgaaatacctgctgccgaccgtcgctggtctgcctcgcccagccggcatggccagattcagaaggctgaaca
aaatgatgtgaagctggcaccggccgactgtacgaagcgatatacgttgtttagataaggattgtatgtttatccctgagcc
atcgatctgggtggataaccaagagccacaaatgtacatttgatgcagtggtaatttagataaggattgtatgtttatccctgagcc
taaacgttatgcacgttctgtcgtcagttataagatctgtcaaattatcattaactcaagtgactcaacgtatctatgtgaattt
tggggacagggttgcggcagcacctaagaaaagcaaaagaaacatacgttaagttAACACCTGATAACCGTTATAATGCTGC
tcagattattgtcgactatgttgcggcactatgttgcggcactaaaaagggcgactaaaaagcagcggtatctgaaattactgc
gcgtcagcgccattataaggctgttgcggcactatgttgcggcactaaaaagggcgactaaaaagcagcggtatctgaaattactgc
gcagcgatataaccacagcaaaaggctgttgcggcactaaaaatgttgcggcactaaaaagggcgactaaaaagggcgact
acattggcaaatatggaaatatatttgcaagctacaggtaatgttgcggcactatgttgcggcactaaaaagggcgact
tgccttatttccaaqcaatttqcqqaaqtgcacacaataa

20

LVL317 (タンパク質): (peIB sp)(ProtE aa 19-160)(GG)(PilA aa40-149) - 配列番号 148

MKYLLPTAAA GLLLAAQPA MAQIQKAEQN DVKLAPPTDV RSGYIRLVKN VNYYIDSEI
WWDNQEPQIV HFDAVVNLDK GLYVYPEPKR YARSVRQYKI LNCANYHLTQ
VRTDFYDEFW GQQLRAAPKK QKKHTLSLTP DTTLYNAAQI ICANYGEAFS VDKGGTKA
AVSELLQASA PYKADVELCV YSTNETTNCT GGKNGIAADI TTAKGYVKSV TTSNGAITVK
GDGTLANMEY IQATGNAAT GVTWTTCKG TDASI FFANF CGSVTO

LVL318 (DNA) - 配列番号 149:

48

atgaaatacctgctgccgaccgctgctggctgctgcctcgctgcccagccggcatggccatggataaggctgaacaaaa
 t_{gatgtgaagctggcaccggcactgtacgaagccgatatacgttggtaaagaatgtgaatttacatcgatgtgaatcg}
 atctgggtggataaccaagagccacaaattgtacatttgatgcagltgtgaatttagataaggattgtatgtttatcctgagcctaaa
 cg_{ttatgcacgtctgtcgtcagtataagatctgtcaattatcattaactcaagtacgaactgtacgttctatgtatgtaaatttggg}
 gacagggttgcggcagcacctaaaagcaaaagaaacatacgttaacaccgtataatgcgtcag
 attatttg_{cgaactatggtaaaggcatttcagttgataaaaaaggccgactaaaaaagcagcgttatctgaattactgcaagcgt}
 cagcgcctataaggctgatgtggattatgttatagcacaatgaaacaactgtacgggtggaaaaatgttatgca
 g_{catataaccacagcaaaaggctatgtaaaatcagtgacaacaaagcaacggtcaataacagtaaaagggatggcacat}
 tggcaa_{atatgaaatatttgcaagctacaggtaatgtcaacacaggtaacttggacaacaacttgcaaaaggAACGGATGCC}
 tctttattccagcaaatttg_{cggaagtgtcacacaataa}

10

LVL318 (タンパク質): (pelB sp)(MD)(ProtE aa 22-160)(GG)(PilA aa40-149) - 配列番号 150:
MKYLLPTAAA GLLLLAAQPA MAMDKAEQND VKLAPPTDVR SGYIRLVKNV NYYIDSESIW
VDNQEIQIVH FDAVNLDKG LYVYPEPKRY ARSVRQYKIL NCANYHLTQV
RTDFYDEFWG QGLRAAPKKQ KKHTLSLTPD TTLYNAAQII CANYGEAFSV DKKGGTKKAA
VSELLQASAP YKADVELCVY STNETTNCTG GKNGIAADIT TAKGYVKSVT TSNGAITVKG
DGTLANMEYI LQATGNAATG VTWTTTCKGT DASLFPANFC GSVTQ

20

LVL702 (DNA) - 配列番号 181:

atgaaatacctgctgccgaccgctgctggctgctgcctcgctgcccagccggcatggccattcagaaggctgaacaaaa
 t_{gatgtgaagctggcaccggcactgtacgaagccgatatacgttggtaaagaatgtgaatttacatcgatgtgaatcg}
 atctgggtggataaccaagagccacaaattgtacatttgatgcagltgtgaatttagataaggattgtatgtttatcctgagcctaaa
 cg_{ttatgcacgtctgtcgtcagtataagatctgtcaattatcattaactcaagtacgaactgtacgttctatgtatgtaaatttggg}
 gacagggttgcggcagcacctaaaagcaaaagaaacatacgttaacaccgtataacacgcttataatgcgtcag
 attatttg_{cgaactatggtaaaggcatttcagttgataaaaaaggccgactaaaaaagcagcgttatctgaattactgcaagcgt}
 cagcgcctataaggctgatgtgaattatgttatagcacaatgaaacaacaactgtacgggtggaaaaatgttatgca
 g_{catataaccacagcaaaaggctatgtaaaatcagtgacaacaaagcaacggtcaataacagtaaaagggatggcacat}
 tggcaa_{atatgaaatatttgcaagctacaggtaatgtcaacacaggtaacttggacaacaacttgcaaaaggAACGGATGCC}
 tctttattccagcaaatttg_{cggaagtgtcacacaaggccaccaccaccaccac}

30

LVL702 (タンパク質): (pelB sp)(ProtE aa 20-160)(GG)(PilA aa40-149)(GGHHHHHH) - 配列番
 号 182:
MKYLLPTAAA GLLLLAAQPA MAIQKAEQND VKLAPPTDVR SGYIRLVKNV NYYIDSESIW
VDNQEIQIVH FDAVNLDKG LYVYPEPKRY ARSVRQYKIL NCANYHLTQV

40

RTDFYDEFWG QGLRAAPKKQ KKHTSLTPD TTLYNAAQII CANYGEAFSV DKKGGTKAA
VSELLQASAP YKADVELCVY STNETTNCTG GKNGIAADIT TAKGYVKSVT TSNGAITVKG
DGTLANMEYI LQATGNAATG VTWTTCKGT DASLFPANFC GSVTQGGHHH HHH

LVL736 (DNA) - 配列番号 183:

atggaaaatccctgcgtccgaccgctgcgtggctgtcgtccctcgctgcccagccggcgtgccgcgcaggatccagaagg
tgaacaaaatgtgtgaagctggcaccggcactgtacgaagcggtatatacgttggtaagaatgtgaattttacatcgat
tagtgaatcgatclgggfgataaccaagagccacaattgtacatttgatgcagtggtaatttagataagggttgtatgtttatcc
gagcctaaccgttatgcacgttcgttcgtcgtataagatctgtcaattatcatttaactcaagtacgaactgattctatgt
gaattttggggacagggttgccccacacccatacgttaagttaacacctgatacaacgccttataat
tgctgctcagattttgtgcgaactatggtaagcatttcgttgcataaaaaaggccgcactaaaaaaggcagcggtatctgt
ctgcgaaggcgtcagcgcctataaggctgttgcataatgtgtatagcacaaatgaaacaacaactgtacgggtggaaaa
atggttatgcagcagatataaccacacagcaaaaggctgttgcataatgtgttgcataacaagcaacgggtgcataacagtaaaagg
gatggcacattggcaaatatggaatatatttgcagactacaggtaatgtcaacagggtgtacttggacaacaacttgcaaagg
aacccgtgcctttatccagcaatttgcggaaatgttgcgtacacacaaggccggccaccaccaccaccac

10

LVL736 (タンパク質): (pelB sp)(ProtE aa 17-160)(GG)(PilA aa40-149)(GGHHHHHH) - 配列番号184:

20

MKYLLPTAAA GLLLAAQPA MASAIQKAE QNDVKLAPPT DVRSGYIRLV KNVNYYIDSE
SIWVDNQEQ IVHFDAVVNL DKGLYVYPEP KRYARSVRQY KILNCANYHL TQVRTDFYDE
FWGQGLRAAP KKQKKHTLSL TPDTTLYNAA QIICANYGEA FSVDKKGGTK KAAVSELLQA
SAPYKADVEL CVYSTNETTN CTGGKNGIAA DITTAKGYVK SVTSNGAIT VKGDGTLANM
EYILQATGNA ATGVTWTTTC KGTDASLFPA NFCGSVTQGG HHHHHH

LVL737 (DNA) - 配列番号 185:

30

atgaaaataccgtgccgaccgtcgctggctgtccctcgcccagccggcgatggcccccagattcagaaggctga
acaaaatgtatgtaaagctggcacccggactgtatgtacgaagccgatatacgtttgttaagaatgtgaatttacatcgatag
tgaatcgatctgggtggataaccaagagccacaattgtacatttatgtgcagtgtgaatttagataagggattgtatgtttatccgtga
gcctaaacgttacgtcacgttcgtcgtcgtataagatctgtcaattatcatgtactcaactacgtacactgtatgtttatccgtga
atttggggacagggttgcgcccagcacctaaaagcaaaagaaacatacgttaagttiacacctgtatacaacgcittataatgc
tgctcagattttgtgcgaactatgtgaagcatttcgtgtataaaaaaggcggcactaaaaaagcagcggtatctgtaaatactgc
caagcgtcagcgcctataaggctgtgtgaattatgtgtatagcacaatgtaaacaacaactgtacgggtggaaaaaaatgc
gtattgcagcagatataaccacacqcaaaaqqctatgtaaaatcaqtqacaacaqcaaccqgtqcaataacqtaaaaqqqatgc

40

ggcacattggcaaataatgaaatatttgcagactacaggtaatgtcaacagggtgtacttggacaacaacttgcaaaggAAC
ggatgcctttatccagcaaatttgcggaaagtgtcacacaaggcgccaccaccaccaccaccac

LVL737 (タンパク質): (*pelB* sp)(*ProtE* aa 18-160)(GG)(*PilA* aa40-149)(GGHHHHHH) - 配列番号 186:

MKYLLPTAAA GLLLLAAQPA MAAQIQKAEQ NDVKLAPPTD VRSGYIRLVK NVNYYIDSES
IWVDNQEPQI VHFDAVNLD KGLYVYPEPK RYARSRQYK ILNCANYHLT QVRTDFYDEF
WGQGLRAAPK KQKKHTLSLT PDTTLYNAAQ IICANYGEAF SVDKKGGTKK AAVSELLQAS
APYKADVELC VYSTNETTNC TGGKNGIAAD ITTAKGYVKS VTTSGAITV KGDGTLANME
YILQATGNAA TGVWTTCCK GTDASLFPAN FCGSVTQGGH HHHHH

10

LVL738 (DNA) - 配列番号 187:

atgaaaatacgtcgccgaccgtcgctggctctgcctcgcccagccggcgatggcaaggctgaacaaaatgtgt
gaagctggcaccggccactgtacgaagcgatatatacgttggtaaagaatgtgaattattacatcgatagtgaatcgatctg
ggtgataaccaagagccacaaattgtacatttgatgcagtgtgaatttagataagggatgtatgtttatctgagcctaaccgtta
tgcacgttcgttcgtcagttataagatctgtcaaattatcattaactcaagtgactcaacgtattctatgtatgtaaatttggggaca
gggttgcgggcagcacctaaaaagcaaaagaaacatacgttaagttaacacctgatacaacgcttataatgtctcagattatt
tgtgcgaactatgttgcatttcgttgcataaaaaaggccggcactaaaaaagcagcggtatctgtatgttgcataactgcagcgtcagc
gccttataaggctgttgcataatgttgcataactgcataacacaaactgtacgggtggaaaaaatggtattgcagcag
atataaccacagcaaaaggctatgtaaaatcgtgacaacaagcaacgggtgcaataacagtaaaaggggatggcacattggc
aaatatgaaatataatttgcagctacaggtaatgtcaacagggttaacttggacaacaacttgcaaaaggaaacggatgcctt
attccagcaaaatttgcggaaagtgtcacacaqqccqccaccaccaccaccac

20

LVL738 (タンパク質): (*pelB* sp)(*ProtE* aa 22-160)(GG)(*PilA* aa40-149)(GGHHHHHH) - 配列番号 188:

30

MKYLLPTAAA GLLLAAQPA MAKAEQNDVK LAPPTDVRSG YIRLVKNVNY YIDSESIWVD
NQEPQIVHFD AVNLDKGLY VYPEPKRYAR SVRQYKILNC ANYHLTQVRT
DFYDEFWGQG LRAAPKKQKK HTLSLTPDTT LYNAAQIICA NYGEAFSVDK KGGTKKAAVS
ELLQASAPYK ADVELCVYST NETTNCTGGK NGIAADITTA KG_YVKS_TTS NGAITVKGDG
TLANMEYILQ ATGNAATGVT WTTTCKGTDA SLFPANFCGS VTQGGHHHHHH H

LVL739 (DNA) - 配列番号 189:

ATGAAATACCTGCTGCCGACCGCTGCTGGTCTGCTGCCTCGCTGCCAGCCGGC
 GATGGCCGCTGAACAAAATGATGTGAAGCTGGCACCGCCGACTGATGTACGAAGCGGAT
 ATATAACGTTGGTAAAGAATGTGAATTATTACATCGATAGTGAATCGATCTGGTGGATAA
 CCAAGAGCCACAAATTGTACATTTGATGCAGTGGTAAGTTAGATAAGGGATTGTATGTT
 TATCCTGAGCCTAACGTTATGCACGTTCTGTCAGTATAAGATCTTGAATTGTGCAA
 ATTATCATTTAACTCAAGTACGAAC TGATTCTATGATGAATTGGGGACAGGGTTGCG
 GGCAGCACCTAAAAAGCAAAAGAACATACGTTAACACCTGATACAACGCTTAT 10
 AATGCTGCTCAGATTATTGTGCGAACTATGGTGAAGCATTTCAGTTGATAAAAAAGGC
 GGCACTAAAAAAGCAGCGGTATCTGAATTACTGCAAGCGTCAGCGCCTATAAGGCTGAT
 GTGGAATTATGTGTATAGCACAAATGAAACAACAAACTGTACGGGTGGAAAAATGGT
 ATTGCAGCAGATATAACCACAGCAAAAGGCTATGAAAATCAGTGACAACAAGCAACGGT
 GCAATAACAGTAAAAGGGATGGCACATTGGCAAATATGGAATATATTGCAAGCTACA
 GGTAATGCTGCAACAGGTGTACTTGGACAACAAC TTGCAAAGGAACGGATGCCTCTTA
 TTTCCAGCAAATTTGCGGAAGTGTACACACAAGGCGGCCACCACCACACCACAC

LVL739 (タンパク質): (peIB sp)(ProtE aa 23-160)(GG)(PiI A aa40-149)(GGHHHHHH) - 配列番号 190:

20

MKYLLPTAAA GLLLAAQPA MAAEQNDVKL APPTDVRSGY IRLVKNVNYY IDSESIWVDN
QEPQIVHFDA VNLDKGLYV YPEPKRYARS VRQYKILNCA NYHLTQVRTD
FYDEFWGQGL RAAPKKQKHH TLSLTPDTTL YNAAQIICAN YGEAFSVDKK GGT
KKAAVSELQASAPYKA DVELCVYSTN ETTNCTGGKN GIAADITTAK GYVKSVTTSN GAITVKGDGT
LANMEYILQA TGNAATGVTW TTTCKGTDAS LFPANFCGSV TQGGHHHHHH

LVL740 (DNA) - 配列番号 191:

30

atgaaatacctgctgccgaccgtcgctggctgcgtccctcgctgcccagccggcatggccgaacaaaatgtgtaaagct
 ggcaccggccactgtacgtacgaaaggcatatacgtttgttaaaagaatgtgaatttacatcgatagtgaatcgatctgggtggat
 aaccaagagccacaaattgtacatttgatgcagtggtaatttagataaggatgtatgtttatcctgagcctaaacgttaigcacgt
 tctgttcgtcagtataagatctgtcaaatttatcaactcaagtacgaactgattctatgtgaattttggggacagggttg
 cgggcagcacctaagcaaaagaaacatacgttaagttaacacctgatacaacgcttataatgctgctcagattttgtgcg
 aactatgttgaagcatttcagtgtataaaaaaggcggcactaaaaagcagcggatctgtaaactgcaagcgtcagcgccttat
 aaggctgtatgttgcataatgtgtatagcacaaatgaaacaacaaactgtacgggtggaaaaatgttgcagcagatataa
 ccacagcaaaaggctatgtaaaatcgtgacaacaagcaacggtgcaataacagtaaaaggggatggcacattggcaaatat 40

ggaatataatggcaagctacaggtaatgtcaacacaggtaactggacaacaactgcaaaggaaacggatgccttttattcca
gcaaattttcgaaagtgtcacacaaggccaccaccaccaccac

LVL740 (タンパク質): (*pelB sp*)(*ProtE aa 24-160*)(GG)(*PilA aa40-149*)(GGHHHHHH) - 配列番号 192:

MKYLLPTAAA GLLLAAQPA MAEQNDVKLA PPTDVRSGYI RLVKNVNYYI DSESIWVDNQ
EPQIVHFDAV VNLDKGLYVY PEPKRYARSV RQYKILNCAN YHLTQVRTDF YDEFWGQQGLR
AAPKKQKKHT LSLTPDTTLY NAAQIICANY GEAFSVDKKG GTKAAVSEL LQASAPYKAD 10
VELCVYSTNE TTNCTGGKNG IAADITTAKG YVKSVTTSNG AITVKGDGT ANMEYILQAT
GNAATGVTWT TTCKGTDASL FPANFCGSVT QGGHHHHHH

LVL735 (DNA) - 配列番号 193:

ATGAAATACCTGCTGCCGACCGCTGCTGGCTGCTGCTCCTCGCTGCCAGCCGGC
GATGGCCATTCAAAGGCTGAACAAAATGATGTGAAGCTGGCACCGCCGACTGATGTAC
GAAGCGGATATACGTTGGTAAAGAATGTGAATTATTACATCGATAGTGAATCGATCTG
GGTGGATAACCAAGAGCCACAAATTGTACATTGATGCAGTGGTAATTAGATAAGGG 20
ATTGTATGTTATCCTGAGCCTAAACGTTATGCACGTTCTGTCAGTATAAGATCTG
AATTGTGCAAATTATCATTTAACTCAAGTACGAACGTGATTCTATGATGAATTGGGGAC
AGGGTTGCGGGCAGCACCTAAAAGCAAAAGAACATACGTTAAGTTAACACCTGATA
CAACGCTTATAATGCTGCTCAGATTATTGTGCGAACTATGGTGAAGCATTTCAGTTGA
AAAAAAAGGGGGCACTAAAAAGCAGCGGTATCTGAATTACTGCAAGCGTCAGCGCCTTA
TAAGGCTGATGTGGAATTATGTGTATAGCACAAATGAAACAACAAACTGTACGGGTGG
AAAAAAATGGTATTGCAAGCAGATATAACCACAGCAAAAGGCTATGTAATCAGTGACAAAC 30
AAGCAACGGTGCAATAACAGTAAAAGGGGATGGCACATTGGCAAATATGGAATATTTT
GCAAGCTACAGGTAAATGCTGCAACAGGTGTACTTGGACAACAACTTGCAAAGGAACGG
ATGCCTCTTATTCAGCAAATTTCAGGAAAGTGTACACACAA

LVL735 (タンパク質): (*pelB sp*)(*ProtE aa 20-160*)(GG)(*PilA aa40-149*) - 配列番号 194:

MKYLLPTAAA GLLLAAQPA MAIQKAEQND VKLAPPTDVR SGYIRLVKNV NYIIDS
VDNQEPQIVH FDAVNLDKG LYVYPEPKRY ARSVRQYKIL NCANYHLTQV
RTDFYDEFWG QGLRAAPKKQ KKHTLSLTPD TTLYNAAQII CANYGEAFSV DKKGGTKKAA
VSELLQASAP YKADVELCVY STNETTNCTG GKNGIAADIT TAKGYVKSVT TSNGAITVKG
DGTLANMEYI LQATGNAATG VTWTTCKGT DASLFPANFC GSQTQ 40

LVL778 (DNA) - 配列番号 195:

atgaaatacctgctgccgaccgctgtctggctgtctccctcgctgcccagccggcgatggccagcgcaggattcagaaggc
tgaacaaaatgtatgtgaagctggcaccggcactgtacgaagcgatatacgtttggtaaagaatgtgaatttacatcgat
tagtgaatcgatctgggtggataaccaagagccacaaattgtacatttgatgcagtggtaatttagataaggattgtatgttatcc
gaggcctaaacgttatgcacgttcgtcgtcgtataagatctgtcaatttacatttaactcaagtacgaactgtatctatgat
gaattttggggacagggttgcggcagcacctaaaaagcaaaagaaacatacgttaacacctgataacaacgccttataa
tgctgctcagattttgtcgaactatgttgcattttcgttgcgttatccatgttatccatgttatccatgttatccatgttatcc
ctgcaaggcgtcagcgcctataaggctgttgcattttgttatccatgttatccatgttatccatgttatccatgttatccatgttatcc
atggtattgcagcagatataaccacagcaaaaggctatgtaaaatcagtgacaacaaggcaacgggtcaataacagtaaaagg
gatggcacattggcaaataatggaatattttgcagctacaggtaatgtcaacacggtaacttggacaacaacttgcaaaagg
aacggatgccttttattccagcaaattttgcggagttgtcacacaa

10

LVL778 (タンパク質): (pelB sp)(ProtE aa 17-160)(GG)(PilA aa40-149) - 配列番号 196:

MKYLLPTAAA GLLLAAQPA MASAQIQKAE QNDVKLAPPT DVRSGYIRLV KNVNYYIDSE
SIWVDNQEQQ IVHFDAVVNL DKGLYVYPEP KRYARSVRQY KILNCANYHL TQVRTDFYDE
FWGQGLRAAP KKOKKHTLSI TPDTTLYNAA QIICANYGEA FSVDKKGGTK KAAVSELLQA
SAPYKADVEL CVYSTNETTN CTGGKNGIAA DITTAKGYVK SVTTSNGAIT VKGDGTLANM
EYILQATGNA ATGVWTTTTC KGTDASLFPA NFCGSVTQ

20

LVL779 (DNA) - 配列番号 197:

atgaaatacctgctgccgaccgctgtctggctgtctccctcgctgcccagccggcgatggccgcccagattcagaaggctga
acaaaatgtatgtgaagctggcaccggcactgtacgaagcgatatacgtttggtaaagaatgtgaatttacatcgatag
tgaatcgatctgggtggataaccaagagccacaaattgtacatttgatgcagtggtaatttagataaggattgtatgttatccatga
gcctaaacgttatgcacgttcgtcgtcgtataagatctgttgcacccatattcaactcaagtacgaactgtatctatgatga
atttggggacagggttgcggcagcacctaaaaagcaaaagaaacatacgttaacacccgtataacaacgccttataatgc
tgctcagattttgtcgaactatgttgcagttgcataaaaaaggcgccactaaaaagcagcggtatctgaattactg
caagcgtcagcgcctataaggctgttgcattttgcacccatattcaactcaagtacgtttgcacccatattcaactcaagtacgaac
gtattgcagcagatataaccacagcaaaaggctatgtaaaatcagtgacaacaaggcaacgggtcaataacagtaaaaggat
ggcacattggcaaataatggaatattttgcagctacaggtaatgtcaacacgggttaacttggacaacaacttgcaaaaggAAC
ggatgccttttattccagcaaattttgcggagttgtcacacaa

30

LVL779 (タンパク質): (pelB sp)(ProtE aa 18-160)(GG)(PilA aa40-149) - 配列番号 198:

MKYLLPTAAA GLLLLAAQPA MAAQIQKAEQ NDVKLAPPTD VRSGYIRLVK NVNYYIDSES
IWVDNQEPCI VHFDAVNLD KGLYVYPEPK RYARSRQYK ILNCANYHLT QVRTDFYDEF
WGQQLRAAPK KQKKHTLSLT PDTTLYNAAQ IICANYGEAF SVDKKGGTKK AAVSELLQAS
APYKADVELC VYSTNETTNC TGGKNGIAAD ITAKGYVKS VTTSGNAITV KGDTLANME
YILQATGNAA TGVTWTTCK GTDASLFPAN FCGSVTQ

LVL780 (DNA) - 配列番号 199:

atgaaataccgtgccgaccgctgctggctgtcgtccctcgccagccggcatggccaaggctgaacaaaatgtgt
 gaagctggcaccggccactgtacgaagccgatatacggttggtaaaaagaatgtgaattttacatcgatgtgaatcgatctg
 ggtggataaccaagagccacaaattgtacatttgatgcagtggtaatttagataaggattgtatgtttatcctgagcctaaccgta
 tgcacgtctgttcgtcagtataagatctgtcaaatttatcattaactcaagtacgaaactgttctatgtgaattttgggaca
 gggttgcgggcagcacctaaaagcaaaagaaacatacgtaagttAACACCTGATAACGCTTATAATGCTGTCAGATT
 ttgtcgaactatgtgaagcatttcagtgtataaaaaaggccgactaaaaaagcagcggatctgtgaattactgcaagcgtcagc
 gccttataaggctgtgaattatgtatatacgacaaaatgtacaaacaaactgtacgggtggaaaaaatggtattgcagcag
 atataaccacagcaaaaggctgtaaaatcagtgcacaacaagcaacggtcaataacagtaaaagggatggcacattggc
 aaatatgaaataatttcaagctacaggtaatgtcaacaggtaacttgacaaactgcaaggaacggatgcctt
 attccagcaaatttgcggaagtgtcacacaa 10

LVL780 (タンパク質): (pelB sp)(ProtE aa 22-160)(GG)(PilA aa40-149) - 配列番号 200:

MKYLLPTAAA GLLLLAAQPA MAKAEQNDVK LAPPTDVRSG YIRLVKNVY YIDSESIWVD
NQEPCIHFD AVVNLDKGLY VYPEPKRYAR SVRQYKILNC ANYHLTQVRT
DFYDEFWGQG LRAAPKKQKK HTSLTPDTT LYNAAQIICA NYGEAFSVDK KGGTKKAAVS
ELLQASAPYK ADVELCVYST NETTNCTGGK NGIAADITTA KGYVKSVTTS NGAITVKGDG
TLANMEYILQ ATGNAATGVT WTTTCKGTDA SLFPANFCGS VTQ 20

LVL781 (DNA) - 配列番号 201:

Atgaaataccgtgccgaccgctgctggctgtcgtccctcgccagccggcatggccgtgaacaaaatgtgtaa
 gctggcaccggccactgtacgaagccgatatacggttggtaaaaagaatgtgaattttacatcgatgtgaatcgatctgggt
 gataaccaagagccacaaattgtacatttgatgcagtggtaatttagataaggattgtatgtttatcctgagcctaaccgttatgca
 cgttctgtcgtcagtataagatctgtaaattcatatcatcaagtacgaaactgttctatgtgaattttgggacagggt
 ttgcggcagcacctaaaagcaaaagaaacatacgtaagttAACACCTGATAACGCTTATAATGCTGTCAGATT
 cgaactatggtaagcatttcagtgtataaaaaaggccgactaaaaaagcagcggatctgtgaattactgcaagcgtcagcgcct
 tataaggctgtgaaattatgttatagcacaatgtacaaacaaactgtacgggtggaaaaaatggtattgcagcagat 40
 aaccacagcaaaaggctatgtaaaatcagtgcacaacaagcaacggtcaataacagtaaaagggatggcacattggcaaatt

atggaatatatttgcagaagctacaggtaatgctcaacagggttaactggacaacaactgcaaaggaaacggatgcctttattcc
agcaaattttgcgaaagtgtcacacaa

LVL781 (タンパク質): (peIB sp)(ProtE aa 23-160)(GG)(PiA aa40-149) - 配列番号 202:
MKYLLPTAAA GLLLLAAQPA MAAEQNDVKL APPTDVRSGY IRLVKNVNYY DSESIWVDN
QEPQIVHFDA VNLDKGLYV YPEPKRYARS VRQYKILNCA NYHLTQVRTD
FYDEFWGQGL RAAPKKQKKH TLSLTPDTTL YNAAQIICAN YGEAFSVDKK GGTAAVSE
LLQASAPYKA DVELCVYSTN ETTNCTGGKNG GIAADITTAK GYVKSVTTSN GAITVKGDGT
LANMEYILQA TGNAATGVTW TTTCKGTDAS LFPANFCGSV TQ

10

LVL782 (DNA) - 配列番号 203:

atgaaatacctgctgccgaccgctgctggctgtctcgctccgcgtcccagccggcgatggccgaacaaaatgtgaagct
ggcacccggactgtatgtacgaaggatatacgtttggtaaagaatgtgaattttacatcgatgtgaatcgatctgggtggat
aaccaagagccacaaattgtacatttgatgcgttgtgaatttagataagggtatgtttatccgtggctaaacgttatgcacgt
tctgttcgtcagtataagatctgttgcacattactcaactcaactgtacttctatgtgaattttggggacagggttt
cgggcagcacctaagaaaaagaaacatacgtaagttaacacctgataacaacgcttataatgctcagattttgtcg
aactatgtgaagcatttcagttgataaaaaaggcgcactaaaaaagcagcggtatctgttgcacattactgcacgccttat
aaggctgttgcattatgttatagcacaaatgaaacaacaaactgtacgggtggaaaaaatgttgcacgtataaa
ccacagcaaaaggctatgttacatgttgcacacaacagcaacggtgcataaactgttgcacattttggcaaat
ggaatataatttgcagaactacaggtaatgctcaacagggttaactggacaacaacttgcaaaaggaaacggatgcctttattcca
gcaaattttgcgaaagtgtcacacaa

20

LVL782 (タンパク質): (peIB sp)(ProtE aa 24-160)(GG)(PiA aa40-149) - 配列番号 204:

MKYLLPTAAA GLLLLAAQPA MAEQNDVKLA PPTDVRSGYI RLVKNVNYYI DSESIWVDNQ
EPQIVHFDAV VNLDKGLYVY PEPKRYARSV RQYKILNCAN YHLTQVRTDF YDEFWGQGLR
AAPKKQKKHT LSLTPDTTL YNAAQIICANY GEAFSVDKKG GTKAAVSEL LQASAPYKAD
VELCVYSTNE TTNCTGGKNG IAADITTAKG YVKSVTTSNG AITVKGDGTL ANMEYILQAT
GNAATGVTWT TTCKGTDASL FPANFCGSVT Q

30

上記配列が得られた P E 及び P i 1 A の全長配列を、配列番号 4 (P E) 及び配列番号 5 8 (P i 1 A) にそれぞれ示す。

実施例 2 : ベクター構築物及び形質転換

H . i n f l u e n z a e 7 7 2 株由来の P E を増幅するためのプライマーを H . i n f l u e n z a e H i R d 株の配列に基づいて設計した。5' プライマー配列は N T H i 7 7 2 配列と比べて一つ異なるヌクレオチドを含み、これは現在報告されている N T H i 7 7 2 ゲノム配列と比べて、24位に異なるアミノ酸が導入されている。融合タンパク質構築物におけるアミノ酸 # 24 は、N T H i 7 7 2 にて見出される K (リシン) に代えて、グルタミン酸である。

40

H. influenzae Rd 株由来の PE の DNA 配列 配列番号 151

atgaaaaaaaaatttaacattatcactgggtacttaccgttgtctgcataatccaaaaggctgaacaaaatgtgaagctggc
 accggccgactgtacgaagcgatatatacggttggtaagaatgtgaattttacatcgatagtgaatcgatctgggtggataacc
 aagagccacaaattgtacatttgatgctgtggtaatttagataagggattgtatgtttatccctgagccctaaacgttatgcacgttcgtcg
 tcagtataagatgtgaaattgtgcaaatatcatataactcaaatacgaactgattctatgtatgaatttggggacagggttgcggcagc
 acctaataaaagcaaaagaaacatacgtaagttAACACCTGATAACAACGCTTATAATGCTCAGATTGTGCAAATTGGTAA
 gcattttcagttgataaaaaataaa

10

H. influenzae Rd 株由来の PE のタンパク質配列 配列番号 152

MKKIILTLSL GLLTACSAQI QKAEQNDVKL APPTDVRSGY IRLVKNVNYY IDSESIWVDN
 QEPQIVHFDA VVNLDKGLYV YPEPKRYARS VRQYKILNCA NYHLTQIRTD FYDEFWGQGL
 RAAPKKQKKH TLSLTPDTTL YNAAQIICAN YGKAQFSVDKK

H. influenzae 772 株由来の PE の DNA 配列 (*Microbes & Infection, Corrigendum to
 "Identification of a novel Haemophilus influenzae protein important for adhesion to epithelia cells"
 [Microbes Infect. 10 (2008) 87-97], available online July 6, 2010, "Article in Press"* にて示される)
 - 配列番号 153

20

atgaaaaaaaaatttaacattatcactgggtacttactgcctgtctgcataatccaaaaggctaaacaaaatgtgaagctggc
 accggccgactgtacgaagcgatatatacggttggtaagaatgtgaattttacatcgatagtgaatcgatctgggtggataacc
 aagagccacaaattgtacatttgatgcagtgtggtaatttagataagggattgtatgtttatccctgagccctaaacgttatgcacgttcgtcg
 gtcaagtataagatctgaattgtgcaaatatcatataactcaagtacgaactgattctatgtatgaatttggggacagggttgcggcagc
 cacctaataaaagcaaaagaaacatacgtaagttAACACCTGATAACAACGCTTATAATGCTCAGATTGTGCGAACTATGGT
 aagcattttcagttgataaaaaaa

H. influenzae 772 株由来の PE のタンパク質配列 (*Microbes & Infection, Corrigendum to
 "Identification of a novel Haemophilus influenzae protein important for adhesion to epithelia cells"
 [Microbes Infect. 10 (2008) 87-97], available online July 6, 2010, "Article in Press"* にて示され
 る) - 配列番号 154

30

MKKIILTLSL GLLTACSAQI QKAKQNDVKL APPTDVRSGY IRLVKNVNYY IDSESIWVDN
 QEPQIVHFDA VVNLDKGLYV YPEPKRYARS VRQYKILNCA NYHLTQVRTD FYDEFWGQGL
 RAAPKKQKKH TLSLTPDTTL YNAAQIICAN YGEAFSVDKK

ベクター構築 :

L V L 3 1 2 、 L V L 2 9 1 、 L V L 2 6 8 、 L V L 2 6 9 、 L V L 2 7 0 、 L V L 7
 0 2 、 L V L 7 3 5 、 L V L 7 7 8 、 L V L 7 7 9 、 L V L 7 8 0 、 L V L 7 8 1 および
 L V L 7 8 2 を作製するために、下記の成分のポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 調製物を
 調製した（具体的な成分を次に例示する）：36.6 μl の脱イオン水、5 μl のバッファ
 - # 1 10 ×、5 μl の d N T P 2 mM、2 μl の M g C l₂ 25 mM、0.4 μ
 l のプライマー # 1 (50 μM)、0.4 μl のプライマー # 2 (50 μM)、0.5 μ
 l の錆型 (100 ng / μl) および 0.4 μl の K O D H i F i D N A ポリメラ
 ゼ 2.5 単位 / μl (NOVAGEN (登録商標)) を配合した。ポリメラーゼ連鎖反応
 は、98 °で 15 秒の変性、55 °で 2 秒のアニーリングおよび 72 °で 20 秒のプライ
 マー伸長を 25 サイクル含んだ。PCR 産物を QIAQUICK (登録商標) PCR 精製
 キット (QIAGEN (登録商標)) を用いて精製した。この産物を、1 容量の PCR 調
 製物に対して、QIAQUICK (登録商標) PCR 精製キットに提供されている 5 容量
 40

50

のバッファー P B の添加という供給者により推奨されている条件下で使用した。次に、バッファー P B を含む P C R 調製物をボルテックスにより混合した。 Q I A Q U I C K (登録商標) カラムを 2 m l のコレクションチューブに入れた。 P C R 調製物中の D N A をカラムに結合させるため、混合したサンプルを Q I A Q U I C K (登録商標) カラムに適用し、 1 4 0 0 0 R P M で 3 0 ~ 6 0 秒間遠心分離した。フロースルーを廃棄し、 Q I A Q U I C K (登録商標) カラムを同じチューブに戻した。結合した D N A を洗浄するために、 Q I A Q U I C K (登録商標) P C R 精製キットに提供されている 0 . 7 5 m l のバッファー P E を Q I A Q U I C K (登録商標) カラムに加え、このカラムを 1 4 0 0 0 R P M で 3 0 ~ 6 0 秒間遠心分離した。フロースルーを廃棄し、 Q I A Q U I C K (登録商標) カラムを同じチューブに戻した。¹⁰ 残留する洗浄バッファーを除去するために、 Q I A Q U I C K (登録商標) カラムを 2 m l コレクションチューブ中でもう 1 回、 1 分間、遠心分離した。各 Q I A Q U I C K (登録商標) カラムを 1 . 5 m l の透明なマイクロ遠沈管に入れた。 D N A を溶出させるため、 3 3 μ l の水を Q I A Q U I C K (登録商標) 膜の中央に加え、カラムを 1 4 0 0 0 R P M で 1 分間遠心分離した。制限酵素および関連のバッファーは New England Biolabs から入手した。例えば、およそ 5 μ l の p E T 2 6 b ベクター (1 0 0 n g / μ l) 、 2 μ l の N E バッファー - 2 (New England Biolabs 、 1 × N E バッファー - 2 : 5 0 mM N a C l 、 1 0 mM Tris - H C l 、 1 0 mM M g C l₂ 、 1 mM ジチオトレイトル、 pH 7 . 9 、 2 5) 、 1 μ l の N d e I (2 0 0 0 0 単位 / m l) 、 1 μ l の H i n d I I I (2 0 0 0 0 単位 / m l) および 1 1 μ l の脱イオン水を混合し、 D N A 消化のために 3 7 ²⁰ で 2 時間インキュベートした。その後、 Q I A Q U I C K (登録商標) P C R 精製キット (Q I A G E N (登録商標)) を上記の手順に従って用い、第 2 段階の精製を行った。

【 0 1 5 0 】

ライゲーションは、 New England Biolabs からの Qu i c k T 4 D N A リガーゼおよび Qu i c k ライゲーション反応バッファーを用いて行った。例えば、 1 0 μ l の脱イオン水中、 1 0 n g 前後のベクターおよび 3 0 n g のインサートを、 1 0 μ l の 2 × Qu i c k ライゲーション反応バッファー (New England Biolabs 、 1 3 2 mM Tris - H C l 、 2 0 mM M g C l₂ 、 2 mM ジチオトレイトル、 2 mM A T P 、 1 5 % ポリエチレングリコール、 pH 7 . 6 、 2 5) および 1 μ l の Qu i c k T 4 D N A リガーゼ (New England Biolabs) と混合した。この酵素反応物を室温で 5 分間インキュベートした後、形質転換を行った。³⁰

【 0 1 5 1 】

L V L 3 1 5 、 L V L 3 1 7 、 L V L 3 1 8 、 L V L 7 3 6 、 L V L 7 3 7 、 L V L 7 3 8 、 L V L 7 3 9 および L V L 7 4 0 を作製するために、下記の成分の P C R 調製物を調製した： 4 0 μ l の脱イオン水、 5 μ l の反応バッファー - 1 0 × 、 1 μ l の d N T P s ミックス、 1 μ l のプライマー # 1 (1 0 μ M) 、 1 μ l のプライマー # 2 (1 0 μ M) 、 1 μ l の鑄型 (2 5 n g / μ l) および 1 μ l の P f u U l t r a H i g h - F i d e l i t y D N A ポリメラーゼ 2 . 5 单位 / μ l (Qu i c k C h a n g e I I 部位特異的突然変異誘発キット、 Ag i l e n t T e c h n o l o g i e s 、 S t r a t a g e n e D i v i s i o n) を配合した。ポリメラーゼ連鎖反応は、 9 5 で 3 0 秒の変性 1 サイクル、 9 5 で 3 0 秒の変性、 5 5 で 1 分のアニーリング、および 6 8 で 5 分 3 0 秒のプライマー伸長 1 8 サイクルを含んだ。 P C R 産物を 1 μ l の D p n I 制限酵素を用い、 3 7 で 1 時間消化した後、形質転換を行った。⁴⁰

【 0 1 5 2 】

増幅に用いた P C R プライマー配列の詳細な一覧を表 4 に示す。

【 0 1 5 3 】

p R I T 1 6 7 1 1 を作製するため、配列番号 4 のアミノ酸 2 2 ~ 1 6 0 をコードする P E 遺伝子断片 (その対応する分泌シグナルをコードする配列を除く) を、 N T H i 7 7 2 株のゲノム D N A から P C R により増幅した。増幅プライマーは、利用可能な H i ⁵⁰

R d 株配列に基づいて設計した（その時点で、772配列は未知であった）。5'プライマー配列は、N T H i 772配列（現在利用可能なものとしての配列）に比べて1つの突然変異を含み、24番のP Eコード配列に1つのアミノ酸の違い、すなわち、リシン（K）の代わりにグルタミン酸（E）が導入されている。P C R增幅後、B a m H IおよびX h o I制限部位を用い、インサートをp E T - 2 6 (+)発現ベクター（NOVAGE N（登録商標））にクローニングした。

【0154】

p R I T 1 6 6 7 1を生成するために、P i l A 遺伝子断片（配列番号58のアミノ酸40～149、配列番号127）をコードするD N A断片（そのリーダーペプチドならびに推定疎水性ヘリックスの部分を除く）を、N T H i 8 6 - 0 2 8 N P株のゲノムD N Aから増幅し、p E T 1 5 発現ベクターにクローニングした。ベクター-p R I T 1 6 7 9 0（N T H i 8 6 - 0 2 8 N P株に由来するアミノ酸40～149を含有する）を鋳型として用い、ベクター-p R I T 1 6 6 7 1を作製した。P i l A 遺伝子断片は、ベクター-p R I T 1 6 7 9 0ならびにプライマー-M D E S P I L A - 3およびM D E S P I L A - 4を用い、P C Rにより増幅した。このP i l A断片を、N d e I / X h o I制限部位を用いてp E T - 2 6 発現ベクターにクローニングした。6ヒスチジン（h i s）アミノ酸をコードするD N A配列を5'プライマーに組み込み、P i l A配列のN末端に6ヒスチジン（6xh i s）を付加した（M D E S P I L A - 3）。

【0155】

L V L 3 1 2 (F 1 g I シグナルペプチド - E - P i l A 断片 - G G - P E 断片 - G G H H H H H) を作製するために、鋳型としてのp R I T 1 6 6 7 1 ベクターとプライマー-C A N 5 3 4 およびC A N 5 3 7 を用いてポリメラーゼ連鎖反応を行い、P i l A 遺伝子（アミノ酸40～149/86～028N P株）を増幅した。F 1 g I シグナルペプチド（s p）およびグルタミン酸（E）アミノ酸に相当するD N A配列を5'プライマー（C A N 5 3 4）に組み込んだ。P i l A配列をP E配列に連結させるために、2個のグリシン（G G）に相当するD N A配列をアミノ酸リンカーおよびN末端P Eアミノ酸を3'プライマー（C A N 5 3 7）に組み込んだ。鋳型としてのp R I T 1 6 7 1 1 ベクターとプライマー-C A N 5 3 6 およびC A N 5 3 8 を用い第2のポリメラーゼ連鎖反応を行い、P E 遺伝子（アミノ酸18～160）を増幅した。p i l AをP E配列に連結するために、C末端P i l Aアミノ酸およびG Gアミノ酸に相当するD N A配列を5'プライマー（C A N 5 3 6）に組み込んだ。G Gアミノ酸リンカーおよび6xh i sアミノ酸に相当するD N A配列を3'プライマー（C A N 5 3 8）に組み込んだ。最後に、L V L 3 1 2 を作製するために、第3のポリメラーゼ連鎖反応を行い、N末端にF 1 g I シグナルペプチド、F 1 g I とp i l Aの間にグルタミン酸（E）アミノ酸、P i l A配列とP E配列の間にG GリンカーおよびP EとC末端の6xh i sアミノ酸の間にG Gリンカーとなるように融合したP i l AおよびP E遺伝子を増幅した。この増幅を達成するために、鋳型としての上記の2つのポリメラーゼ連鎖反応の産物をプライマー-C A N 5 3 4 およびC A N 5 3 8とともに用いた。N d e I 制限部位に相当するD N A配列を5'プライマーに組み込み、H i n d I I I 制限部位を3'プライマーに組み込んだ。作製されたP C R 産物を次に、p E T - 2 6 b (+)クローニングベクター（NOVAGEN（登録商標））に挿入した。

【0156】

L V L 2 9 1 (p e l B シグナルペプチド - P E 断片 - G G - P i l A 断片 - G G - 6 x h i s) を作製するために、鋳型としてのp R I T 1 6 7 1 1 ベクターとプライマー-C A N 5 4 4 およびC A N 5 4 6 を用いてポリメラーゼ連鎖反応を行い、P E 遺伝子（アミノ酸19～160）を増幅した。p e l B シグナルペプチド（s p）アミノ酸に相当するD N A配列を5'プライマー（C A N 5 4 4）に組み込んだ。P i l A配列をP E配列に連結させるために、G Gアミノ酸リンカーおよびN末端P i l Aアミノ酸に相当するD N A配列を3'プライマー（C A N 5 4 6）に組み込んだ。鋳型としてのp R I T 1 6 6 7 1 ベクターをプライマー-C A N 5 4 5 およびC A N 5 3 5 とともに用いて第2のポリメラ

10

20

30

40

50

ーゼ連鎖反応を行い、P i l A 遺伝子（配列番号 5 8 のアミノ酸 4 0 ~ 1 4 9、配列番号 1 2 7）を増幅した。P i l A 配列を P E 配列に連結させるために、C 末端 P E アミノ酸および G G アミノ酸に相当する D N A 配列を 5' プライマー (C A N 5 4 5) に組み込んだ。リンカー G G アミノ酸および 6 x h i s アミノ酸に相当する D N A 配列を 3' プライマー (C A N 5 3 5) に組み込んだ。最後に、L V L 2 9 1 を作製するために、第 3 のポリメラーゼ連鎖反応を行い、N 末端に p e l B シグナルペプチド、P E 配列と P i l A 配列の間に G G リンカーおよび P i l A と C 末端の 6 x h i s アミノ酸の間に G G リンカーとなるように融合した P E および P i l A 遺伝子を増幅した。この増幅を達成するために、鑄型としての上記の 2 つのポリメラーゼ連鎖反応の産物をプライマー C A N 5 4 4 および C A N 5 3 5 とともに用いた。N d e I 制限部位に相当する D N A 配列を 5' プライマーに組み込み、H i n d I I I 制限部位を 3' プライマーに組み込んだ。作製された P C R 産物を次に、p E T - 2 6 b (+) クローニングベクター (N O V A G E N (登録商標)) に挿入した。
10

【 0 1 5 7 】

L V L 2 6 8 (p e l B シグナルペプチド - D - P E 断片 - G G - P i l A 断片 - G G - 6 x h i s) を作製するために、鑄型としての p R I T 1 6 7 1 1 ベクターをプライマー - C A N 5 4 7 および C A N 5 4 6 とともに用いてポリメラーゼ連鎖反応を行い、P E 遺伝子（アミノ酸 2 0 ~ 1 6 0 ）を増幅した。p e l B シグナルペプチド (s p) アミノ酸およびアスパラギン酸 (D) アミノ酸に相当する D N A 配列を 5' プライマー (C A N 5 4 7) に組み込んだ。P i l A 配列を P E 配列に連結させるために、G G アミノ酸リンカーおよび N 末端 P i l A アミノ酸に相当する D N A 配列を 3' プライマー (C A N 5 4 6) に組み込んだ。鑄型としての p R I T 1 6 6 7 1 ベクターを C A N 5 4 5 および C A N 5 3 5 を用いて第 2 のポリメラーゼ連鎖反応を行い、P i l A 遺伝子（アミノ酸 4 0 ~ 1 4 9 / N T H i 8 6 - 0 2 8 N P 株）を増幅した。P i l A 配列を P E 配列に連結させるために、C 末端 P E アミノ酸および G G アミノ酸に相当する D N A 配列を 5' プライマー (C A N 5 4 5) に組み込んだ。リンカー G G アミノ酸および 6 x h i s アミノ酸に相当する D N A 配列を 3' プライマー (C A N 5 3 5) に組み込んだ。最後に、L V L 2 6 8 を作製するために、第 3 のポリメラーゼ連鎖反応を行い、N 末端に p e l B シグナルペプチド、p e l B シグナルペプチドと P E の間に D アミノ酸、P E 配列と p i l A 配列の間に G G リンカーおよび P i l A と C 末端の 6 x h i s アミノ酸の間に G G リンカーとなるように融合した P E および P i l A 遺伝子を増幅した。この増幅を達成するために、鑄型としての上記の 2 つのポリメラーゼ連鎖反応の産物をプライマー C A N 5 4 7 および C A N 5 3 5 とともに用いた。N d e I 制限部位に相当する D N A 配列を 5' プライマーに組み込み、H i n d I I I 制限部位を 3' プライマーに組み込んだ。作製された P C R 産物を次に、p E T - 2 6 b (+) クローニングベクター (N O V A G E N (登録商標)) に挿入した。
20

【 0 1 5 8 】

L V L 2 6 9 (N a d A シグナルペプチド - A T N D D D - P E 断片 - G G - P i l A 断片 - G G - 6 x h i s) を作製するために、鑄型としての p R I T 1 6 7 1 1 ベクターをプライマー C A N 5 4 8 および C A N 5 4 6 とともに用いてポリメラーゼ連鎖反応を行い、P E 遺伝子（配列番号 4 のアミノ酸 2 2 ~ 1 6 0 ）を増幅した。p e l B シグナルペプチド (s p) アミノ酸および A T N D D D アミノ酸に相当する D N A 配列を 5' プライマー (C A N 5 4 8) に組み込んだ。P i l A 配列を P E 配列に連結させるために、G G アミノ酸リンカーおよび N 末端 P i l A アミノ酸に相当する D N A 配列を 3' プライマー (C A N 5 4 6) に組み込んだ。鑄型としての p R I T 1 6 6 7 1 ベクターをプライマー C A N 5 4 5 および C A N 5 3 5 とともに用いて第 2 のポリメラーゼ連鎖反応を行い、P i l A 遺伝子（配列番号 5 8 のアミノ酸 4 0 ~ 1 4 9、配列番号 1 2 7 ）を増幅した。P i l A 配列を P E 配列に連結させるために、C 末端 P E アミノ酸および G G アミノ酸に相当する D N A 配列を 5' プライマー (C A N 5 4 5) に組み込んだ。リンカー G G アミノ酸および 6 x h i s アミノ酸に相当する D N A 配列を 3' プライマー (C A N 5 3 5) に
30
40
50

組み込んだ。最後に、LV L 2 6 9を作製するために、第3のポリメラーゼ連鎖反応を行い、N末端にN a d Aシグナルペプチド、p e l BシグナルペプチドとP Eの間にA T N D D Dアミノ酸、P E配列とp i l A配列の間にG G リンカーおよびP i l AとC末端の6 x h i sアミノ酸の間にG G リンカーとなるように融合したP EおよびP i l A遺伝子を増幅した。この増幅を達成するために、鑄型としての上記の2つのポリメラーゼ連鎖反応の産物をプライマーC A N 5 4 8およびC A N 5 3 5とともに用いた。N d e I制限部位に相当するD N A配列を5'プライマーに組み込み、H i n d I I I制限部位を3'プライマーに組み込んだ。作製されたP C R産物を次に、p E T - 2 6 b (+)クローニングベクター(NOVAGEN (登録商標))に挿入した。

【0159】

LV L 2 7 0 (M - 6 x H i s - P E断片 - G G - P i l A断片)を作製するために、鑄型としてのp R I T 1 6 7 1 1ベクターをプライマーC A N 5 4 0およびC A N 5 4 2とともに用いてポリメラーゼ連鎖反応を行い、P E遺伝子(アミノ酸17~160)を増幅した。6 x h i sアミノ酸に相当するD N A配列を5'プライマー(C A N 5 4 0)に組み込んだ。P i l A配列をP E配列と連結させるために、G Gアミノ酸リンカーおよびN末端P i l Aアミノ酸に相当するD N A配列を3'プライマー(C A N 5 4 2)に組み込んだ。鑄型としてのp R I T 1 6 6 7 1ベクターをプライマーC A N 5 4 1およびC A N 5 4 3とともに用いて第2のポリメラーゼ連鎖反応を行い、P i l A遺伝子(アミノ酸40~149/N T H i 8 6 - 0 2 8 N P株)を増幅した。P i l AをP E配列と連結させるために、C末端P Eアミノ酸およびG Gアミノ酸に相当するD N A配列を5'プライマー(C A N 5 4 1)に組み込んだ。最後に、LV L 2 7 0を作製するために、第3のポリメラーゼ連鎖反応を行い、6-h i s - P E - G G - P i l A遺伝子を融合物として増幅した。この増幅を達成するために、鑄型としての上記の2つのポリメラーゼ連鎖反応の産物をプライマーC A N 5 4 0およびC A N 5 4 3とともに用いた。N d e I制限部位に相当するD N A配列を5'プライマーに組み込み、H i n d I I I制限部位を3'プライマーに組み込んだ。作製されたP C R産物を次に、p E T - 2 6 b (+)クローニングベクター(NOVAGEN (登録商標))に挿入した。

【0160】

LV L 3 1 5 (p e l Bシグナルペプチド - M D - P E断片 - G G - P i l A断片 - G G - 6 x h i s)を作製するために、鑄型としてのLV L 2 9 1をプライマーC A N 6 7 0およびC A N 6 7 1とQu i k C h a n g e I I部位特異的突然変異誘発キット(A g i l e n t T e c h n o l o g i e s、S t r a t a g e n e D i v i s i o n)を用いて部位特異的突然変異誘発を行い、N末端P Eアミノ酸配列のQ I Q ~ M Dを変化させた。

【0161】

LV L 3 1 7 (p e l Bシグナルペプチド - P E断片 - G G - p i l A断片)を作製するために、鑄型としてのLV L 2 9 1をプライマーC A N 6 7 8およびC A N 6 7 9とQ u i k C h a n g e I I部位特異的突然変異誘発キット(A g i l e n t T e c h n o l o g i e s、S t r a t a g e n e D i v i s i o n)を用いて部位特異的突然変異誘発を行い、P i l A遺伝子とG G H H H H H Hアミノ酸残基に相当するD N A配列(配列番号3)の間に終止コドンを組み込んだ。

【0162】

LV L 3 1 8 (p e l Bシグナルペプチド - M D - P E - G G - P i l A)を作製するために、鑄型としてのLV L 3 1 5をプライマーC A N 6 7 8およびC A N 6 7 9とQu i k C h a n g e I I部位特異的突然変異誘発キット(A g i l e n t T e c h n o l o g i e s、S t r a t a g e n e D i v i s i o n)を用いて部位特異的突然変異誘発を行い、P i l A遺伝子とG G H H H H H Hアミノ酸残基(配列番号3)に相当するD N A配列との間に終止コドンを組み込んだ。

【0163】

LV L 7 0 2 (LV L 2 9 1 Q)を作製するために、鑄型としてのLV L 2 9 1ベ

10

20

30

40

50

クターとプライマー C A N 1 5 1 7 および C A N 1 5 1 8 を用いてポリメラーゼ連鎖反応を行った。 L V L 2 9 1 配列上の 2 3 番におけるアミノ酸 Q に相当する 3 つのヌクレオチドの欠失を 5' プライマーに組み込んだ。 L V L 7 0 2 と L V L 2 9 1 の間の唯一の違いは、 L V L 2 9 1 配列上の 2 3 番におけるアミノ酸 Q の欠失である。 N d e I 制限部位および H i n d I I I 制限部位をそれぞれ 5' プライマーおよび 3' プライマーに組み込んだ。作製された P C R 産物を次に、 p E T - 2 6 b (+) クローニングベクター (N O V A G E N (登録商標)) に挿入した。

【 0 1 6 4 】

L V L 7 3 5 (L V L 3 1 7 Q) を作製するために、鑄型としての L V L 3 1 7 ベクターとプライマー C A N 1 5 1 7 および C A N 1 5 1 9 を用いてポリメラーゼ連鎖反応を行った。 L V L 3 1 7 配列上の 2 3 番におけるアミノ酸 Q に相当する 3 つのヌクレオチドの欠失を 5' プライマーに組み込んだ。 L V L 7 3 5 と L V L 3 1 7 の間の唯一の違いは、 L V L 3 1 7 配列上の 2 3 番におけるアミノ酸 Q の欠失である。 N d e I 制限部位および H i n d I I I 制限部位をそれぞれ 5' プライマーおよび 3' プライマーに組み込んだ。作製された P C R 産物を次に、 p E T - 2 6 b (+) クローニングベクター (N O V A G E N (登録商標)) に挿入した。

【 0 1 6 5 】

L V L 7 3 6 (L V L 2 9 1 + S A) を作製するために部位特異的突然変異誘発を行い、 L V L 2 9 1 配列上のアミノ酸 2 2 と 2 3 の間にアミノ酸 S および A を付加した。鑄型としての L V L 2 9 1 をプライマー C A N 1 5 3 1 および C A N 1 5 3 2 と Qu i k C h a n g e I I 部位特異的突然変異誘発キット (Ag i l e n t T e c h n o l o g i e s 、 S t r a t a g e n e D i v i s i o n) とともに用いた。

【 0 1 6 6 】

L V L 7 3 7 (L V L 2 9 1 + A) を作製するために部位特異的突然変異誘発を行い、 L V L 2 9 1 配列上のアミノ酸 2 2 と 2 3 の間にアミノ酸 A を付加した。鑄型としての L V L 2 9 1 をプライマー C A N 1 5 2 9 および C A N 1 5 3 0 と Qu i k C h a n g e I I 部位特異的突然変異誘発キット (Ag i l e n t T e c h n o l o g i e s 、 S t r a t a g e n e D i v i s i o n) とともに用いた。

【 0 1 6 7 】

L V L 7 3 8 (L V L 2 9 1 Q I Q) を作製するために部位特異的突然変異誘発を行い、 L V L 2 9 1 配列上の 2 3 ~ 2 5 番のアミノ酸 Q 、 I および Q を欠失させた。鑄型としての L V L 2 9 1 をプライマー C A N 1 5 2 3 および C A N 1 5 2 4 と Qu i k C h a n g e I I 部位特異的突然変異誘発キット (Ag i l e n t T e c h n o l o g i e s 、 S t r a t a g e n e D i v i s i o n) とともに用いた。

【 0 1 6 8 】

L V L 7 3 9 (L V L 2 9 1 Q I Q K) を作製するために部位特異的突然変異誘発を行い、 L V L 2 9 1 配列上の 2 3 ~ 2 6 番のアミノ酸 Q 、 I 、 Q および K を欠失させた。鑄型としての L V L 2 9 1 をプライマー C A N 1 5 2 5 および C A N 1 5 2 6 と Qu i k C h a n g e I I 部位特異的突然変異誘発キット (Ag i l e n t T e c h n o l o g i e s 、 S t r a t a g e n e D i v i s i o n) とともに用いた。

【 0 1 6 9 】

L V L 7 4 0 (L V L 2 9 1 Q I Q K A) を作製するために部位特異的突然変異誘発を行い、 L V L 2 9 1 配列上の 2 3 ~ 2 7 番のアミノ酸 Q 、 I 、 Q 、 K および A を欠失させた。鑄型としての L V L 2 9 1 をプライマー C A N 1 5 2 7 および C A N 1 5 2 8 と Qu i k C h a n g e I I 部位特異的突然変異誘発キット (Ag i l e n t T e c h n o l o g i e s 、 S t r a t a g e n e D i v i s i o n) とともに用いた。

【 0 1 7 0 】

L V L 7 7 8 (L V L 7 3 6 6 × H i s タグ) 、 L V L 7 7 9 (L V L 7 3 7 6 × H i s タグ) 、 L V L 7 8 0 (L V L 7 3 8 6 × H i s タグ) 、 L V L 7 8 1 (L V L 7 3 9 6 × H i s タグ) および L V L 7 8 2 (L V L 7 4 0 6 × H i s タグ) を作製するための方法。

グ)を作製するために、それぞれ鋳型としての L V L 7 3 6 、 L V L 7 3 7 、 L V L 7 3 8 、 L V L 7 3 9 および L V L 7 4 0 ベクターをプライマー C A N 1 6 6 9 および C A N 5 4 3 とともに用いてポリメラーゼ連鎖反応を行った。6 × H i s タグの欠失は、C 末端配列のアミノ酸配列 G G H H H H H (配列番号 3) に相当する。この欠失を 3' プライマーに組み込んだ。N d e I 制限部位および H i n d I I I 制限部位をそれぞれ 5' プライマーおよび 3' プライマーに組み込んだ。生成された P C R 産物を次に、p E T - 2 6 b (+) クローニングベクター (N O V A G E N (登録商標)) に挿入した。

【 0 1 7 1 】

【表 4 】

PE, P i l A 及び PE-P i l A 増幅に用いられる PCR プライマー配列

プライマー ID	DNA 配列 5' – 3'
CAN534	CACACACATATGATTAAATTTCTCTGCATTAATTCTTACTGGTCACGACG GCGGCTCAGGCTGAGACTAAAAAAGCAGCGGTATCTG (配列番号 155)
CAN535	TGTGTGAAGCTTTAGTGGTGGTGGTGGTGGCCGCCCTGTGACACTT CCGAAAAATTG (配列番号 156)
CAN536	TTTGCAGAAGTGTACACACAAGGCGGCCGAGATTAGAAGGCTGAACAAA ATGATGT (配列番号 157)
CAN537	ACATCATTTGTTCAAGCCTCTGAATCTGCGCGCCGCCTGTGACACTTCC GCAA (配列番号 158)
CAN538	TGTGTGAAGCTTTAGTGGTGGTGGTGGTGGCCGCCCTTTTTATCAACT GAAAATG (配列番号 159)
CAN540	CACACACATATGCACCACCACACCACAGCGCGCAGATTAGAAGGCT GAACAAAATGATGT (配列番号 160)
CAN541	CATTTCAGTTGATAAAAAAGGCGGCACTAAAAAAGCAGCGGTATC (配列番号 161)
CAN542	GATACCGCTGCTTTTAGTGCCGCCTTTTATCAACTGAAAATG (配列番号 162)
CAN543	TGTGTGAAGCTTTATTGTGACACTTCCGCAA (配列番号 163)
CAN544	CACACACATATGAAATACCTGCTGCCGACCGCTGCTGGTCTGCTCC TCGCTGCCAGCCGGCGATGGCCAGATTAGAAGGCTGAACAAAATGATGT (配列番号 164)
CAN545	GCATTTCAGTTGATAAAAAAGGCGGCACTAAAAAAGCAGCGGTATCTG (配列番号 165)
CAN546	CAGATACCGCTGCTTTTAGTGCCGCCTTTTATCAACTGAAAATGC (配列番号 166)
CAN547	CACACACATATGAAATACCTGCTGCCGACCGCTGCTGGTCTGCTCC TCGCTGCCAGCCGGCGATGGCGATTAGAAGGCTGAACAAAATGATGT (配列番号 167)
CAN548	CACACACATATGAAACACTTTCCATCCAAGTACTGACCACAGCCATCCTGC CACTTCTGTAGCGGGCGACTGGCAGCCACAAACGACGACGATAAGGCTGA ACAAAATGATG (配列番号 168)
CAN670	GCCGGCGATGCCATGGATAAGGCTGAACAAAATG (配列番号 169)
CAN671	CATTTGTTCAAGCCTTATCCATGCCATGCCGGC (配列番号 170)
CAN678	GGAAGTGTACACAAATAAGGCGGCCACCACCA (配列番号 171)
CAN679	GGTGGTGGTGGCCGCCCTATTGTGACACTTCC (配列番号 172)
CAN1517	GATATACATATGAAATACCTGCTGCCGACCGCTGCTGGTCTGCTCC TCGCTGCCAGCCGGCGATGGCCATTAGAAGGCTGAACAAA (配列番号 205)
CAN1518	GGCCGCAAGCTTTAGTGGTGGTGGTGGTGGCC (配列番号 206)
CAN1519	GGCCGCAAGCTTTATTGTGACACTTCC (配列番号 207)
CAN1523	GCTGCCAGCCGGCGATGCCAAGGCTGAACAAAATGATGTG (配列番号 208)

10

20

30

40

CAN1524	CACATCATTGTTAGCCTGGCCATGCCGGCTGGCAGC (配列番号 209)	
CAN1525	GCTGCCAGCCGGCGATGGCCGCTGAACAAAATGATGTGAAGC (配列番号 210)	
CAN1526	GCTTCACATCATTGTTAGCCTGGCCATGCCGGCTGGCAGC (配列番号 211)	
CAN1527	GCTGCCAGCCGGCGATGGCCGAAACAAAATGATGTGAAGCTGG (配列番号 212)	
CAN1528	CCAGCTTCACATCATTGTTAGCCTGGCCATGCCGGCTGGCAGC (配列番号 213)	
CAN1529	GCTGCCAGCCGGCGATGGCCGCCCAGATTAGAAGGCTGAAC (配列番号 214)	10
CAN1530	GTTCAGCCTCTGAATCTGGCGGCCATGCCGGCTGGCAGC (配列番号 215)	
CAN1531	GCTGCCAGCCGGCGATGGCCAGCGCCCAGATTAGAAGGCTGAAC (配列番号 216)	
CAN1532	GTTCAGCCTCTGAATCTGGCGCTGGCCATGCCGGCTGGCAGC (配列番号 217)	
CAN1669	CACACACATATGAAATACCTGCTGCCGACC (配列番号 218)	
MDesPILA -3	GAATTCATATGCACCATCACCATACATAAAAAAGCAGCGGTATCTGA A (配列番号 173)	
MDesPILA -4	GCGCCGCTCGAGTCATTGTGTGACACTTCCGC (配列番号 174)	
MnоНTHi-44	GCCCAGCCGGCGATGGCCCAGATCCAGAAGGCTGAACAAAATG (配列番号 175)	20
MnоНTHi-45	CATTTGTTAGCCTCTGGATCTGGCCATGCCGGCTGGC (配列番号 176)	

形質転換

大腸菌(*Escherichia coli*) B L R (D E 3) または大腸菌 H M S (D E 3) 細胞を、 C a C l ₂ 処理細胞を用いた標準的方法に従ってプラスミド D N A で形質転換した(Hanahan D. Plasmid transformation by Simanis. In Glover, D. M. (Ed), DNA cloning. IRL Press London. (1985): p. 109-135.)。簡単に述べれば、 B L R (D E 3) または H M S 1 7 4 (D E 3) コンピテント細胞を氷上で温和に解凍した。およそ 4 μ l のプラスミド(1 0 ~ 1 0 0 n g)を、 5 0 ~ 1 0 0 μ l コンピテント細胞を用いて混合した。その後、この配合物を氷上で 3 0 分間インキュベートした。形質転換反応を行うために、配合物に 4 2 ℃ で 4 5 秒、熱パルスをかけた後、氷上で 2 分間インキュベートした。およそ 0 . 5 m l の S O C 培地(Super Optimal broth with Catabolite repression)を形質転換細胞に加え、細胞培養物を 3 7 ℃ で 1 時間インキュベートした後、 5 0 u g / m l のカナマイシンを含む L u r i a - B e r t a n i (L B) 寒天に播種した。 1 0 0 μ l 前後の形質転換細胞培養物を播種し、 3 7 ℃ で一晩インキュベートした。

【 0 1 7 2 】

B L R (D E 3) : B L R は、 B L 2 1 の r e c A ⁻ 誘導体(F - o m p T h s d S B (r B - m B -) g a l d c m (D E 3))である。組換えタンパク質の発現に使用されるこの大腸菌株はプラスミド単量体収率を改善し、反復配列を含有するまたはその産物が D E 3 プロファージの損失を生じ得る標的プラスミドを安定化させる助けとなり得る(Studier, F.W. (1991) J. Mol. Biol. 219: 37-44)。大腸菌 B L R (D E 3) の詳細な遺伝子型は、 N O V A G E N (登録商標) により公開されている(F - o m p T h s d S B (r B - m B -) g a l d c m (s r l - r e c A) 3 0 6 : : T n 1 0 (T e t R) (D E 3))。

【 0 1 7 3 】

H M S 1 7 4 (D E 3) : H M S 1 7 4 株は、 K - 1 2 バックグラウンドで r e c A 突然変異を提供する。 B L R と同様に、これらの株は、その産物が D E 3 プロファージの損失を生じ得るある特定の標的遺伝子を安定化させ得る。大腸菌 H M S 1 7 4 (D E 3) の詳細な遺伝子型は、 N O V A G E N (登録商標) により公開されている(F - r e c

10

20

30

40

50

A 1 h s d R (r K 1 2 - m K 1 2 +) (D E 3) (R i f R)。

B L R (D E 3) を用いた生産および H i s タグを有する構築物の特徴を実施例 3 ~ 実施例 6 に記載する。

実施例 3 : 振盪フラスコを用いたタンパク質発現

一般に、組換えプラスミドで形質転換された大腸菌 B L R (D E 3) を播種した 1 枚のコンフルエント寒天プレートを掻き取り、培養培地に再懸濁させ、これを用いて、 8 0 0 m l の L B ブロス (B e c t o n , D i c k i n s o n a n d C o m p a n y) ± 1 % (重量 / 容量、 w / v) グルコース (L a b o r a t o i r e M A T 、 カタログ番号 : G R - 0 1 0 1) および 5 0 μ g / m l カナマイシン (S i g m a) を、 O . D . 6 0 0 n m が 0 . 1 ~ 0 . 2 となるまで播種した。培養物を、 O . D . 6 0 0 n m が約 0 . 8 に達するまで、 3 7 ℃ にて 2 5 0 R P M の回転でインキュベートした。 10

【 0 1 7 4 】

次に、 1 m l の各培養物を回収し、 1 4 0 0 0 R P M で 5 分間遠心分離し、 上清およびペレットを - 2 0 ℃ で別々に冷凍した。

【 0 1 7 5 】

O . D . 6 0 0 n m が約 0 . 8 の時、 B L R (D E 3) 培養物を冷却 (- 2 0 ℃ 、 2 0 分または 4 ℃ 、 1 時間、 好ましくは、 4 ℃ 、 1 時間) した後、 1 m M イソプロピル - D - 1 - チオガラクトピラノシド (I P T G ; E M D C h e m i c a l s I n c . 、 カタログ番号 : 5 8 1 5) を添加して 1 6 、 2 2 および 3 0 ℃ で一晩、 または 2 5 0 R P M で振盪しながら 3 7 ℃ で 3 時間、 好ましくは、 2 2 ℃ で一晩インキュベートすることにより組換えタンパク質の発現を誘導した。この誘導期間の後、 培養物を 1 4 0 0 0 R P M で 5 分間または 6 0 0 0 R P M で 1 5 分間遠心分離し、 上清 (培地画分サンプル) およびペレット (可溶性および不溶性画分を含有する) を - 2 0 ℃ で別々に冷凍した。 20

【 0 1 7 6 】

これらの条件を周辺質タンパク質発現に用いた。

実施例 4 : 振盪フラスコ、 細胞ペースト、 H i s タグを有する構築物を用いたタンパク質精製

誘導後に得られた各細菌ペレットを、 5 0 0 m M N a C l 、 1 0 m M イミダゾールおよび Roche C O M P L E T E (登録商標) プロテアーゼ阻害剤カクテル (1 錠 / 5 0 0 m M N a C l を含有する 5 0 m l の H E P E S バッファー、 Roche C O M P L E T E (登録商標) U L T R A 錠、 Roche Diagnostics Corporation を含有する 2 0 m M の 4 - (2 - ヒドロキシエチル) - 1 - ピペラジンエタンスルホン酸 (H E P E S) バッファー (p H 8 . 0) を再懸濁した。 30

【 0 1 7 7 】

あるいは、 N a C l を含有する H E P E S バッファーの代わりに 2 0 ~ 5 0 m M のビシンバッファー用いてよい。例えば、 2 0 m M のビシンバッファーを用いてよい。細菌を、 Constant System 1 . 1 K W 2 X 3 0 0 0 0 P S I (pounds per square inch) 用いて溶解させた。 2 0 0 0 0 g で 4 ℃ にて 2 0 分間遠心分離することによって可溶性 (上清) と不溶性 (ペレット) 成分を分離した。

【 0 1 7 8 】

6 - H i s タグを有するタンパク質を、 P R O F I N I A (商標) タンパク質精製プロトコール (B i o - R a d L a b o r a t o r i e s , I n c .) を用い、 固定化金属アフィニティークロマトグラフィー (I M A C) にて、 非変性条件下で精製した。可溶性成分を細菌の再懸濁に用いたものと同じバッファーで予め平衡化した 5 m l 容の H i s T r a p カラム (B i o - R a d L a b o r a t o r i e s , I n c .) にロードした。なお、 可溶性成分は最大 5 m l / 分で添加した (「 フロースルー画分 」 を形成) 。カラムにロードした後に、 カラムを 1 0 カラム容量の同バッファーを用い、 1 0 m l / 分の測度で洗浄した (「 洗浄画分 # 1 」 を形成) 。 5 0 0 m M N a C l および 2 0 m M イミダゾールを含有する 2 0 m M ビシンバッファーまたは 2 0 m M H E P E S バッファー (p H 8 . 0) を用いて第 2 の洗浄を行った (「 洗浄画分 # 2 」 を形成) 。 5 0 0 m M N a 50

C1および250 mMイミダゾールを含有する2カラム容量の20 mM HEPESバッファーまたは50 mMビシンバッファー(pH 8.0)を用い、10 ml/分の測度で溶出を行った(「溶出画分」を形成する)。

【0179】

タンパク質の純度を改善するために、IMACからの陽性溶出画分をプールし、カルシウムまたはマグネシウム(NaCl 137 mM、KCl 2.7 mM、Na₂HPO₄ 8.1 mM、KH₂PO₄ 1.47 mM、pH 7.4)を除いたリン酸緩衝生理食塩水で予め平衡化したサイズ排除クロマトグラフィー(SEC)カラム(GE Health careからのHILOAD(商標)SUPERDEX(商標)200 26/60)にロードした。溶出画分からのサンプルをドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)により分析した。Centrificon 10000 MW(Millipore)を用いてサンプルを濃縮した。
10

【0180】

タンパク質濃度は分光計を用いて測定した。

実施例5: Hisタグを有する構築物のSDS-PAGEおよびウエスタンプロット分析ならびにhisタグを有さないLVL317およびLVL318構築物のSDS-PAGE分析

可溶性画分および不溶性画分の調製

例えば、誘導後の1 mlの培養物(例えば、上記の実施例3参照)を14000 RPMで2分間遠心分離した。ペレットを、40 µlのBUGBUSTE(登録商標)タンパク質抽出試薬(NOVAGEN(登録商標)、EMD4 Biosciences、Merck)を用いて再可溶化して細胞懸濁液を作製した。この細胞懸濁液を回転プラットフォーム上、室温で10分間インキュベートした。次に、この細胞懸濁液を14000 RPMで2分間遠心分離して可溶性画分を分離した。得られたペレット(不溶性画分)を、70 µlの脱イオン水、5 µlのジチオトレイトル(DTT)1Mおよび25 µlのNUPAGE(登録商標)LDS(ドデシル硫酸リチウム)サンプルバッファー4×(INVITROGEN(商標))を用いて再可溶化した。可溶性画分(再可溶化ペレットの細胞懸濁液からの上清)を30 µlの脱イオン水、5 µlのDTT 1Mおよび25 µlのLDSサンプルバッファー4×に加えた。
20

培地画分の調製

例えば、培地画分を調製するために、遠心分離後の誘導済みの全細胞培養物からの100 µlの上清(例えば、上記の実施例3参照)を、500 µlのRC試薬I(Bio-Rad Laboratories, Inc.)を加えることによって濃縮し、このサンプルを室温で1分間混合し、インキュベートした。次に、500 µlの試薬II(Bio-Rad Laboratories, Inc.)をこのサンプルに加え、混合した。この配合物を14000 RPMで10分間遠心分離した。ペレットを、28 µlの脱イオン水、2 µlのDTT 1Mおよび10 µlのLDS SB 4×を用いて再可溶化した。
30

精製画分の調製

例えば、SDS-PAGE分析のために、70 µlのサンプル、5 µlのDTT 1Mおよび25 µlのLDSサンプルバッファー4×を加えることにより、精製タンパク質(例えば、実施例4に記載の通りに得た)調製した。
40

SDS-PAGE分析およびニトロセルロース膜への転写

SDS-PAGE分析およびニトロセルロース膜への転写は、NUPAGE(登録商標)Bis-Tris 4-12%ゲルを用い、製造者の推奨(INVITROGEN)に従って行った。サンプル、バッファーの調製および泳動条件は、供給者が推奨している条件下で行った。

【0181】

一例では、ゲルに、70 µlの精製タンパク質画分、5 µlのDTT 1Mおよび25 µlのLDS SB 4×を含むマスター・ミックスからの20 µlサンプルをロードした。
50

【0182】

サンプルをN U P A G E（登録商標）B i s - T r i s 4～12%ゲルに流した後、それらのタンパク質をニトロセルロース膜に転写した。

【0183】

ニトロセルロース膜を、3%ミルク/P B S 1×新鮮溶液を用い、37、60 R P Mで30分間ブロッキングした。このブロッキングインキュベーションの後、一次抗体を(6 X H i s タグ（登録商標）抗体、A b c a m P L C、カタログ番号：a b 9 1 0 8)3%ミルク/P B S 1×新鮮溶液中1：1000倍希釈で、37、60 R P Mにて1時間加えた。その後、膜を、各回、室温で0.02%ポリソルベート(polsorbate)20（例えば、T W E E N（商標）20）/P B S 1×を用いて5分間、3回洗浄した。
10
二次抗体（アルカリ性ホスファターゼ（A P）ウサギ抗I g G（H + L）ウサギ、J a c k s o n I mm u n o R e s e a r c h L a b o r a t o r i e s , I n c . ）を、3%ミルク/P B S 1×新鮮溶液を用いて1：14000希釈で加えた。膜を37、60 R P Mで1時間インキュベートした。その後、膜を、0.02%ポリソルベート20（例えば、T W E E N（商標）20）/P B S 1×を用いて室温で5分間3回洗浄した後、膜を5-プロモ-4-クロロ-3-インドリルホスフェート/ニトロブルーテトラゾリウム（例えば、B C I P（登録商標）/N B T S i g m a - A l d r i c h（登録商標）製、1錠剤/10ml水）に曝した。

【0184】

融合タンパク質構築物L V L 2 9 1、L V L 2 6 8およびL V L 2 6 9に関する誘導細菌抽出物のS D S - P A G Eに関しては図1を参照。誘導(ind)前後のL V L 2 9 1、L V L 2 6 8およびL V L 2 6 9に関して、不溶性画分(I)、可溶性画分(S)および培養培地画分(M)をロードした。
20

【0185】

融合タンパク質構築物L V L 2 9 1、L V L 2 6 8およびL V L 2 6 9の精製抽出物に関するS D S - P A G Eおよびウエスタンプロットに関しては図2を参照。L V L 2 9 1、L V L 2 6 8およびL V L 2 6 9の精製に関して、フロースルー画分(F t)、洗浄画分(W)および溶出画分(E)をロードした。抗h i s タグを用いて抽出物をプローピングした。

【0186】

融合タンパク質構築物L V L 2 9 1およびL V L 3 1 5に関する誘導細菌抽出物および精製抽出物のS D S - P A G Eに関しては図3を参照。L V L 2 9 1およびL V L 3 1 5に関して、培養培地画分(M)、可溶性画分(S o l)、不溶性画分(I n s)、フロースルー画分(F t)、洗浄画分#1(W 1)、洗浄画分#2(W 2)および溶出画分(E)をロードした。
30

【0187】

融合タンパク質構築物L V L 3 1 2に関する誘導細菌抽出物および精製抽出物のS D S - P A G Eに関しては図4を参照。L V L 3 1 2に関して、培養培地画分(M)、可溶性画分(S o l)、不溶性画分(I n s)、フロースルー画分(F t)、洗浄画分#1(W 1)、洗浄画分#2(W 2)および溶出画分(E)をロードした。
40

【0188】

融合タンパク質構築物L V L 2 9 1、L V L 7 0 2、L V L 7 3 6、L V L 7 3 7、L V L 7 3 8、L V L 7 3 9、L V L 7 4 0およびp E T 2 6 bベクター（陰性対照）に関する誘導細菌抽出物由来の可溶性画分のS D S - P A G Eに関しては図2 5を参照。(a)実験1(b)実験2(c)実験3。P E - P i l A融合タンパク質を矢印で示す。

【0189】

実験1、2および3からの可溶性画分中の融合タンパク質の平均バンドパーセンテージに関しては図2 6を参照。

【0190】

図5および図6のそれぞれにおいてS D S - P A G E分析に使用したL V L 3 1 7およ
50

び L V L 3 1 8 細菌抽出物は一般に上記のように調製した。

【 0 1 9 1 】

図 5 . 融合タンパク質構築物 L V L 3 1 7 に関する誘導 (1 mM および 10 μM I P T G) 細菌抽出物の SDS - PAGE。誘導前 (N I) および誘導後 (I n) 、可溶性画分 (S) 、不溶性画分 (I) からの抽出物。

【 0 1 9 2 】

図 6 . 融合タンパク質構築物 L V L 3 1 8 に関する誘導 (1 mM および 10 μM I P T G) 細菌抽出物の SDS - PAGE。誘導前 (N I) および誘導後 (I n) 、培養培地画分 (M) 、可溶性画分 (S) 、不溶性画分 (I) からの抽出物。

【 0 1 9 3 】

SDS - PAGE によるタンパク質分離物を Immobilon - P 膜に転写した。クーマシープルー染色タンパク質バンドを切り取り、シーケンターリアクター (sequenator reactor) に入れた。配列決定は、Applied Biosystems PROCISE (登録商標) タンパク質シーケンサー、モデル 494 - cLC を用いて、製造者のプロトコールに従って行った。

【 0 1 9 4 】

10

【表 5】

融合タンパク質構築物に関する振盪フラスコタンパク質発現プロファイルおよびシグナルペプチド切断

融合タンパク質構築物 ID	Description N-term → C-term	タンパク質 発現プロファイル	シグナルペプチド切断
LVL312	FlgI sp - E - PilA 断片 - GG - PE 断片 - GGHHHHHH	In: +++ So: + Se: +	確定
LVL291	PelB sp - PE 断片 - GG - PilA 断片 - GGHHHHHH	In : +++ So : ++ Se : +	確定
LVL268	PelB sp - D - PE 断片 - GG - PilA 断片 - GGHHHHHH	In : +++ So : ++ Se : +	確定
LVL269	NadA sp - ATND - PE 断片 - GG - PilA 断片 - GGHHHHHH	In : +++ So : ++ Se : +	確定
LVL270	MHHHHHHH - PE 断片 - GG - PilA 断片	In : + So : - Se : -	試験せず
LVL315	PelB sp - MD - PE 断片 - GG - PilA 断片 - GGHHHHHH	In : +++ So : ++ Se : +	確定
LVL317	PelB - PE 断片 - GG - PilA 断片	In : +++ So : + Se: Nt	確定

10

20

30

40

LVL318	PelB sp - MD - PE 断片 - GG - PilA 断片	In : +++ So : + Se: -	
LVL702	PelB sp - PE 断片 - GG - PilA 断片 - GGHHHHHH	In : +++ So : ++ Se: Nt	確定
LVL736	PelB sp - PE 断片 - GG - PilA 断片 - GGHHHHHH	In : +++ So : ++ Se: Nt	確定
LVL737	PelB sp - PE 断片 - GG - PilA 断片 - GGHHHHHH	In : +++ So : ++ Se: Nt	確定
LVL738	PelB sp - PE 断片 - GG - PilA 断片 - GGHHHHHH	In : +++ So : ++ Se: Nt	確定
LVL739	PelB sp - PE 断片 - GG - PilA 断片 - GGHHHHHH	In : +++ So : ++ Se: Nt	確定
LVL740	PelB sp - PE 断片 - GG - PilA 断片 - GGHHHHHH	In : +++ So : ++ Se: Nt	確定

So = 可用性画分 In = 不溶性画分 Se = 培地画分に分泌されたタンパク質 Nt = 試験せず 以下の

評定は視覚的検査(クーマシー)に基づいた + : 低発現 ++ : 培地発現 +++ : 高発現 - : 発現なし

実施例 6 : L V L 2 9 1 融合タンパク質の特徴

L V L 2 9 1 の物理的特性 : L V L 2 9 1 における P E および P i l A の折り畳みおよび融点

円偏光二色性 :

二次構造の解析

円偏光二色性 (C D) を用いて、構造的非対称による左円偏光と右円偏光の吸収の違いを測定することによってタンパク質の二次構造組成を決定する。遠 U V 領域 (1 9 0 ~ 2 5 0 n m) 内の C D スペクトルの形状および大きさは、タンパク質が - シートを呈するか - ヘリックスを呈するかまたはランダムコイル構造を呈するかによって異なる。あるタンパク質サンプルにおける各二次構造タイプの相対的存在量は、参照スペクトルとの比較によって計算することができる。

【 0 1 9 5 】

遠 U V スペクトルは、 J a s c o J - 7 2 0 分光偏光計にて、 0 , 0 1 c m の光路長を用いて 1 7 8 ~ 2 5 0 n m まで、 1 n m の分解能帯域幅で測定する。セルの温度は、 P e l t i e r サーモスタット R T E - 1 1 1 セルブロックによって 2 3 ℃ に維持する。測定の間、 1 0 L / 分の窒素流を維持した。

結果 :

10

20

30

40

50

P E (構築物 p R I T 1 6 7 6 2 由来)、P i l A (構築物 p R I T 1 6 7 9 0 由来)およびP E - P i l A タンパク質に関して得られた遠UV CDスペクトルは、構造と構造の混合物を含有する折り畳まれたタンパク質に特徴的なものであるが、P E はP i l A およびP E - P i l A よりもヘリックスが有意に豊富である(図7、P E、P i l A およびP E - P i l A 融合タンパク質のCDスペクトル)。

【0196】

ひと度、キメラタンパク質として相互に結合したP E およびP i l A 個々のタンパク質の折り畳みの完全性を評価し、次に、両方の間の可能性のある相互作用を確認するために、様々なスペクトルを計算した。

【0197】

P E およびP i l A 遠UVスペクトルが組み合わさると、得られるスペクトルはP E - P i l A キメラ(chimer)のスペクトルに重なる(図8、P E およびP i l A CDスペクトルの組合せ)。この結果は、P E - P i l A キメラ(chimer)が個々の成分中に検出される全ての二次構造を含むことを示唆する。それはまた、これらのタンパク質の融合が個々の成分の二次構造に大きな影響を持たないこと、および結果として、P E およびP i l A の折り畳みが、これらのタンパク質が分離状態であっても融合していても有意に異なることを示唆する。

融点評価:

融合物としての発現が個々のタンパク質の熱力学的特性に影響力を持つかどうかを評価するために、P E、P i l A およびP E - P i l A の融点を、温度によるヘリックスの折り畳みの解除を円偏光二色性によってモニタリングすることにより評価した。

【0198】

ヘリックスの存在は、222 nmにおける円偏光二色性シグナルが最小であることを特徴とし、従って、温度上昇中の222 nmにおけるCDシグナルの有意な増強は、タンパク質変性の指標となる。タンパク質が二次構造の欠如を受ける温度を決定することで、それらのタンパク質の半数がその構造を失ってしまう温度に相当する融点(Tm)の決定が可能となる。

【0199】

融点は、CD 222 nmプロットに対する温度から得られる熱変性曲線上の変曲点の同定により決定することができる。

【0200】

遠UV CDにより決定されたP i l A およびP E の融点は、それぞれ52 および68 である(図9、P i l A の熱変性曲線；図10、P E の熱変性曲線)。

【0201】

P E - P i l A 融合タンパク質は、48 および71 に2つの明瞭に異なるTmを示す(図11、P E - P i l A の融合タンパク質熱変性曲線)。それらの値は、P E およびP i l A タンパク質がキメラ(chimer)中に結合されてもなお独立に折り畳まれること、およびそれらは分離状態であっても融合していても同様の温度で折り畳みを解くことを示す。48 でのP i l A 部分の折り畳み解除が沈殿を生じない、または71 におけるP E 部分のTmに影響を及ぼさないという所見は、融合物内でのP E とP i l A の間の相互作用が最小であること、およびそれらは互いに観察可能な大きな影響を持たないことを強く示唆する。タンパク質の融点は、バッファー組成物または相互作用分子の存在を含む様々な外部条件に感受性があり、P E とP i l A の融合時に大きな変動が見られないということは、P E とP i l A が相互に結合されている際に両者の構造および特性の大部分が保存されていることを強く示唆する。

実施例7：発酵プロセス

本発明の融合タンパク質は、当業者に公知の方法によって作製することができる。

実施例8：P E、P i l A、およびL V L 3 1 7 のタンパク質の精製

p R I T 1 6 7 6 2 からのP E タンパク質の精製：

p R I T 1 6 7 6 2 発現ベクターを作製するために、B a m H I およびN c o I 制限酵

10

20

30

40

50

素を用いて p R I T 1 6 7 1 1 ベクターを消化し、シグナル配列 (p e l B) と P E の間の 6 個のアミノ酸残基を削除した。得られたベクターを p R I T 1 6 7 1 2 と呼称した。このベクターでは、シグナル配列 p e l B と P E の間に 3 個のアミノ酸 M D P が存在する。第 2 段階で、鋳型としての p R I T 1 6 7 1 2 をプライマ - M n o N T H i - 4 4 および M n o N T H i - 4 5 (表 4 に記載) と Qu i k C h a n g e I I 部位特異的突然変異誘発キット (Ag i l e n t T e c h n o l o g i e s 、 S t r a t a g e n e D i v i s i o n) とともに用いて部位特異的突然変異誘発を行い、アミノ酸配列を M D P から Q I Q へ変化させた。

【 0 2 0 2 】

P E Q I Q (p R I T 1 6 7 6 2 構築物由来) を含有する大腸菌 B L R (D E 3) のワーキングシードを - 8 0 から解凍し、これを用い、 3 7 、 2 1 5 R P M の振盪下で一晩インキュベートすることにより、 L B プロス中、 1 0 0 m l の前培養物を調製した。一晩インキュベートした後、 8 0 0 m l の L B A P S を含有する 8 つのフラスコに 1 2 . 5 m l の前培養物を播種し、 O D ₆₀₀ は 0 . 0 6 前後と測定された。これらの培養物を 3 7 で振盪しながら 3 時間インキュベートした。 O D ₆₀₀ が 0 . 9 前後の際に、 1 m M の I P T G を加え、誘導を開始した。誘導中、培養物を 2 2 で振盪しながら 1 9 時間インキュベートした。誘導後、 O D ₆₀₀ は 2 . 2 前後であった。これらの細胞培養物を、 1 L ボトル内に入れた 1 L 遠心バッグ中に移し、 4 で 3 0 分間、 6 , 0 0 0 × g 遠心分離し、上清を廃棄した。誘導前後の培養物および上清の 1 m l アリコートをさらなる分析のために保持した。

P E Q I Q で誘導した B L R (D E 3) の溶解

遠心分離ボトルから遠心バッグを取り出し、開封し、ペレットをパックからビーカーに出した。 8 つのペレットを一緒にし、 1 0 0 m l の結合バッファー (2 0 m M H e p e s 、 1 0 m M イミダゾール、 5 0 0 m M N a C l 、 pH 8 . 0 1) に再懸濁させた。 P E Q I Q 構築物を含有する大腸菌 B L R (D E 3) を C o n s t a n t S y s t e m s L t d . 製の T S S e r i e s B e n c h T o p 細胞粉碎器 (1 × 3 0 k P s i ; 1 × 1 5 k P s i) で粉碎した。溶解液を 3 0 分間、 6 0 0 0 R P M 、 4 で遠心分離した。上清を維持し、 I M A C カラムにロードした。

P E Q I Q の I M A C 精製

I M A C カラム (B i o R a d 、 B i o - S c a l e M i n i P r o f i n i t y I M A C カートリッジ 5 m l) を 5 C V の結合バッファー (2 0 m M H E P E S 、 1 0 m M イミダゾール、 5 0 0 m M N a C l 、 pH 8 . 0 1) を 5 m l / 分で用いて平衡化した。 1 0 0 m l の溶解液上清を I M A C に 2 . 5 m L / 分でロードした。フロースルーバーをさらなる分析のために 5 0 m l 画分として回収した。カラムを 3 C V の結合バッファーで洗浄して、結合していないタンパク質を除去した。結合していないタンパク質を含有するサンプルを 5 0 m l のチューブに 1 5 m l の 1 アリコートとして回収した。カラムを 2 C V の洗浄バッファー (2 0 m M H E P E S 、 2 0 m M イミダゾール、 5 0 0 m M N a C l 、 pH 8 . 0 1) で洗浄し、 9 6 ウェルプレートに 2 m l 画分として回収した。次に、結合したタンパク質を 6 C V の 1 0 0 % 溶出バッファー (2 0 m M H E P E S 、 2 5 0 m M イミダゾール、 5 0 0 m M N a C l 、 pH 8 . 0 1) で溶出した。溶出されたタンパク質を 9 6 ウェルプレートに 2 m l 画分として回収した。洗浄および溶出は 5 m l / 分で行った。

P E Q I Q の I M A C ブールに対するサイズ排除クロマトグラフィー (S E C)

S E C カラム (G E h e a l t h c a r e 、 H I L O A D (商標) 2 6 / 6 0 S U P E R D E X (商標) 7 5 分取グレード分取グレード、高さ 6 0 c m 容積およそ 3 1 9 m l) を 3 C V の S E C バッファー (2 0 m M H E P E S 、 1 5 0 m M N a C l 、 pH 8 . 4 9) で平衡化した。 1 1 m l の I M A C 溶出液を 2 . 5 m l / 分の流速でカラムにロードした。 0 . 3 C V ~ 0 . 9 C V から 2 m l 画分を回収した。 2 回実施した後に、画分を S D S - P A G E により分析した。 P r o t E タンパク質を含有する 2 回の実施からの画分を一緒にプールした (「 S E C ブール」、総容量およそ 4 8 m l) 。 5 0 0 m

10

20

30

40

50

MのアルギニンをS E Cプールに加えた。

上記S E Cプロトコールで作製されたP E Q I Qプールサンプルの用量

S E Cプールに対して、製造者のプロトコールに従い、B i o - R a d R C D C (商標)キットからのR C D C (還元剤およびD e t e r g e n t C o m p a t i b l e)法を行った：

各供試サンプルおよび標品について、 $25\text{ }\mu\text{L}$ をマイクロ遠沈管に二反復で分注した。
 $125\text{ }\mu\text{L}$ のB i o - R a d R C試薬Iを各遠沈管に加え、各遠沈管をボルテックスにかけ、室温で1分間インキュベートした。 $125\text{ }\mu\text{L}$ のB i o - R a d R C試薬I Iを各遠沈管に加え、各遠沈管をボルテックスにかけた後、 $14,000\times g$ で5分間遠心分離する。きれいな吸収性のティッシュペーパー上に遠沈管を逆さに置き、遠沈管から液体を完全に排出させることによって上清を排出する。 $25.4\text{ }\mu\text{L}$ の試薬A (1 mL の試薬Aにつき $20\text{ }\mu\text{L}$ の試薬Sを混合することにより予め調製)を各遠沈管に加え、各遠沈管をボルテックスにかけ、室温で5分間、または沈殿が完全に溶解するまでインキュベートする。ボルテックスにかけた後、次工程に進む。 $200\text{ }\mu\text{L}$ のD C試薬Bを各遠沈管に加え、すぐにボルテックスにかける。室温で15分間インキュベートした。全てのサンプルを96ウェルプレートに移し、 750 nm での吸光度を読み取り、各未知のタンパク質サンプルのタンパク質濃度を決定する。

【0203】

P r o t E 濃度は 1.069 mg/mL であった。

P i l A H i s タグを有するタンパク質の精製：

P i l Aは、下記の一般手順に従って精製した：

P i l Aまたはその断片をコードする構築物を含有する大腸菌細胞を、B U G B U S T E R (登録商標)およびB E N Z O N A S E (登録商標)ヌクレアーゼ(N O V A G E N (登録商標))、例えば、 10 mL B U G B U S T E R (登録商標)および $10\text{ }\mu\text{l}$ B E N Z O N A S E (登録商標)ヌクレアーゼに懸濁させる。細胞溶解液を室温にて回転プラットフォーム上で、例えば15分間混合する。細胞溶解液を4にて、例えば、 $16,000\text{ g}$ にて20分間遠心分離する。タンパク質を含有する上清を、N i N T A H I S · B I N D (登録商標)樹脂を含むN i N T Aカラムに加え、4で、例えば、1時間混合する。このカラムは 2 mL のN i N T A H I S · B I N D (登録商標)樹脂(N O V A G E N (登録商標))および 10 mL $1\times$ 結合バッファー(N O V A G E N (登録商標)のN i - N T Aバッファー-キット)からなり得る。次に、カラムフロースル-を回収する。樹脂を例えば、 300 mM N a C l、 50 mM N a H ₂ P O ₄、 25 mM イミダゾン、p H 8.0を含有する $1\times$ 洗浄バッファーで2回洗浄する。洗液を重力流により回収する。タンパク質をカラムから $1\times$ 溶出バッファー、例えば、 300 mM N a C l、 50 mM N a H ₂ P O ₄、 250 mM イミダゾン、p H 8.0で溶出させる。タンパク質は、結合バッファーで透析し、上記のようにN i N T Aカラムに再び流すことによりさらに精製することができる。

P i l Aのトロンビン切断

次に、P i l Aをトロンビン($1/50$ 希釈)とともに室温で16時間インキュベートし、ヒスチジンタグを除去する。

トロンビンで切断したP i l Aに対するサイズ排除クロマトグラフィー(S E C)

S E Cカラム(G E h e a l t h c a r e、H I L O A D (商標) 26 / 60 S U P E R D E X (商標) 75分取グレード、高さ 60 cm 容積およそ 319 mL)を5 C VのS E Cバッファー(20 mM H E P E S、 150 mM N a C l、p H 8.52)で平衡化した。およそ 10 mL の切断P i l Aをこのカラムに流速 $2.5\text{ mL}/\text{分}$ でロードした。 $0.3\text{ CV} \sim 0.9\text{ CV}$ から 2 mL 画分を回収した。2回の流出を行った後、画分をS D S - P A G Eにより分析した。切断P i l Aタンパク質を含有する2回の流出からの画分をプールした(「S E Cプール」、総容量およそ 52 mL)。

P i l A、S E Cプールの量

S E Cプールに対して上記のようにR C D C法を行った。切断P i l Aの濃度は 5.3

10

20

30

40

50

7 mg / ml であった。

PBS 1 × pH 7.4 による PILA SEC プールの透析（透析倍率 = 1600）および RCD C による処理

RCD C により測定された透析後濃度は 3.0 mg / ml であった。

LVL317 の精製

浸透圧ショック

LVL317 融合タンパク質は細菌周辺質で発現されプロセシングされるので、このタンパク質は浸透圧ショックにより抽出された。

【0204】

4 L のファーメンター培養物からの、LVL317 を含有する冷凍（-20℃）採取した大腸菌 B2448 細胞ペーストをプールし、24 mM Tris-HCl、16% (w/v) スクロース、9.9% (w/v) グルコース、10 mM EDTA、pH 8.0 からなる高張バッファーに、最終容量が 4 L となるまで再懸濁させた。この懸濁液を、RW 16 基本攪拌機に装備した 3 翼プロペラを用い、中速で室温にて 30 分間穏やかに混合した。懸濁液を 15,900 × g にて室温で 30 分間遠心分離した。上清 (SN1) をゲル分析用に保持した。

【0205】

得られたペレットを低張溶液；38 mM MgCl₂ に再懸濁させ、室温で 30 分間混合した。この混合物を室温にて 15,900 × g で 30 分間遠心分離し、上清 (SN2) 中に抗原を回収した。

【0206】

600 ml / 分の流速で 0.45 / 0.2 μm ポリエーテルスルホン Sartorius Sartopore 2 Midicap フィルターで濾過することにより、SN2 の清澄化を行った。

【0207】

SN2 を 20 mM NaH₂PO₄ - Na₂HPO₄、pH 7.0 で 1 : 3 希釈し、必要であれば pH を 7.0 に調整し、600 ml / 分で 0.45 / 0.2 μm ポリエーテルスルホン Sartorius Sartopore 2 Midicap フィルターでの濾過によりさらに清澄化を行った。

SP SEPHAROSE (商標) ファーストフロー (SP FF) クロマトグラフィー希釈 / 濾過した SN2 を 2 CV の 20 mM NaH₂PO₄ / Na₂HPO₄ バッファー - pH 7.0 で平衡化した 14 cm ID (内径) × 20 cm 長のカラム (カラム容積 3100 ml) 中の強陽イオン交換樹脂 (SP SEPHAROSE (商標) FF - GE Health care) にロードし、捕捉させた。カラムを 5 CV の 20 mM NaH₂PO₄ / Na₂HPO₄ バッファー pH 7.0 で洗浄した後、抗原 (LVL317 内に含有) を、同じ洗浄バッファー中 100 mM まで NaCl 濃度を高めることにより溶出させた。

典型的な SP SEPHAROSE (商標) ファーストフロークロマトグラムに関しては図 12 を参照。

Q SEPHAROSE (商標) ファーストフロー (Q FF) クロマトグラフィー SP FF 溶出液中に存在する抗原を 20 mM Tris pH 8.5 で 1 : 4 希釈し、必要であれば pH を 8.5 に調整し、2 CV の 20 mM Tris バッファー pH 8.5 で平衡化した 14 cm ID × 11.8 cm 長のカラム (カラム容積 1800 ml) 中の強陰イオン交換樹脂 (Q SEPHAROSE (商標) FF - GE Health care) に通した。抗原はフロースルー画分に回収された。

【0208】

典型的な Q SEPHAROSE (商標) ファーストフロークロマトグラムに関しては図 13 を参照。

濃度、ダイアフィルトレーション、ポリソルベート 80 の添加および濾過除菌

抗原を含有する Q FF フロースルーをクロマトグラム UV に基づいて 0.7 ~ 0.8

10

20

30

40

50

mg/ml まで濃縮し、Pellicon-2（商標）10kDaカットオフメンブレン（Millipore）を用いて、5DVの10mM KH₂PO₄/K₂HPO₄バッファーpH 6.5でダイアフィルトレーションを行った。

【0209】

5%保存溶液を用い、ポリソルベート80（例えば、TWEEN（商標）80）を前記限外濾過保持液に加え、マグネチックスターラーを用いて130rpm、4で30分間攪拌した。ポリソルベート80の終濃度は0.04%であった。限外濾過保持液を0.45/0.2μm酢酸セルロースメンブレン（Sartobran 300、Sartorius）で濾過することにより除菌した。精製されたバルクを-20または-80で保存した。絶対タンパク質濃度はAAA（アミノ酸分析）により0.737mg/mlで測定した。10

実施例9：ポリソルベート80の使用

滴定実験は、濾過除菌の前に精製バルクに終濃度0.04%（w/v）までポリソルベート80、具体的には、TWEEN（商標）80を加えると、微細線維粒子の形成および凝集が軽減されることを示した。

【0210】

DSC分析によれば、TWEEN（商標）80は、-20で保存した後の冷凍/解凍サイクル後、ならびに4、-20および-80および37で4日間保存した後に見られる構造変化（30~45）を軽減した。

実施例10：LVL317のSDS-PAGEおよびウエスタンプロット分析

20

SDS-PAGEおよびウエスタンプロット分析：

NUPAGE（登録商標）、Bis-Tris 4~12%ゲルに、95で5分間加熱した、50mM DTTを含有するNUPAGE（登録商標） LDSサンプルバッファー中、10μgのサンプルを下記のようにロードした（低濃度のサンプルに関しては20μLのサンプルをロードした）。泳動：NUPAGE（登録商標）MESランニングバッファー中、室温（RT）、200ボルトで35分。ゲルをインスタントブルー（Novexin cat. : ISB01L）で2時間染色し、水中で一晩脱染した。

レーン内容：

- 1 : MW標準品 (10μL)
 - 2 : 開始 (全画分) (10μg) 30
 - 3 : 濾過なしのSN1 (10μg)
 - 4 : 濾過なしのSN2 (10μg)
 - 5 : 抽出なし (10μg)
 - 6 : ロードSP FF (10μg)
 - 7 : フロースルーSP FF (6.9μg)
 - 8 : 洗浄SP FF (20μL)
 - 9 : 溶出SP FF (10μg)
 - 10 : ストリップSP FF (10μg)
 - 11 : ロードQ FF (8.9μg) 40
 - 12 : 溶出Q FF (9.8μg)
 - 13 : ストリップQ FF (4.8μg)
 - 14 : 0.04% TWEEN（商標）80添加前のFFF保持液 (10μg)
 - 15 : 0.04% TWEEN（商標）80添加後の濾過しない精製バルク (10μg)
 - 16 : 0.04% TWEEN（商標）80添加後の濾過除菌した精製バルク (10μg)
 - 17 : 0.04% TWEEN（商標）80添加後の濾過除菌した精製バルク (20μg + 添加大腸菌細胞溶解液Rix (1μg))
 - 18 : 大腸菌細胞溶解液Rix (2μg)
 - 19 : 大腸菌細胞溶解液Rix (1μg)
 - 20 : 大腸菌細胞駅Rix (0.5μg)
- PE-Pi1A融合タンパク質の精製プロセスからのインプロセスサンプルのSDS - 50

PAGEに関しては図14を参照。

【0211】

ウエスタンプロットについては、タンパク質をNUPAGE（登録商標）転写バッファー+20%メタノール、0.1%SDS中、30ボルト、4度一晩、ニトロセルロース膜に転写した。膜を50mM Tris、150mM NaCl pH7.4+5%脱脂粉乳で1時間ブロッキングし、ブロッキングバッファーで希釈したウサギポリクローナル一次抗体（抗Prot-E 1/50000および抗大腸菌（BLR）1/1000）中で2時間インキュベートし、50mM Tris pH7.4+0.05% Tween 20中で5分間3回洗浄し、二次抗体（ブロッキングバッファーで1/5000希釈したアルカリ性ホスファターゼ結合ヤギ抗ウサギ中で1時間インキュベートし、洗浄バッファー中で5分間3回洗浄し、BCIP/NBT基質（1錠/10ml）に溶解した。インキュベーションは全て25ml/膜で行った。
10

【0212】

PE-Pi1A融合タンパク質からの精製プロセスのインプロセスサンプルのウエスタンプロットに関しては図15を参照。ウサギポリクローナル抗PEを用いてプロットした。
20

レーン内容：

- 1 : MW標準品 (10 μL)
- 2 : 開始 (全画分) (10 μg)
- 3 : 濾過なしのSN1 (10 μg)
- 4 : 濾過なしのSN2 (10 μg)
- 5 : 抽出なし (10 μg)
- 6 : ロードSP FF (10 μg)
- 7 : フロースルーSP FF (6.9 μg)
- 8 : 洗浄SP FF (20 μL)
- 9 : 溶出SP FF (10 μg)
- 10 : ストリップSP FF (10 μg)
- 11 : ロードQ FF (8.9 μg)
- 12 : 溶出Q FF (9.8 μg)
- 13 : ストリップQ FF (4.8 μg)
- 30
14 : 0.04% Tween (商標) 80 添加前のFFF保持液 (10 μg)
- 15 : 0.04% Tween (商標) 80 添加後の濾過しない精製バルク (10 μg)
- 16 : 0.04% Tween (商標) 80 添加後の濾過除菌した精製バルク (10 μg)
- 17 : 0.04% Tween (商標) 80 添加後の濾過除菌した精製バルク (20 μg + 添加大腸菌細胞溶解液Rix (1 μg))
- 18 : 大腸菌細胞溶解液Rix (2 μg)
- 19 : 大腸菌細胞溶解液Rix (1 μg)
- 20 : 大腸菌細胞駆Rix (0.5 μg)

PE-Pi1A融合タンパク質からの精製プロセスのインプロセスサンプルのウエスタンプロットに関しては図16参照。ウサギポリクローナル抗大腸菌（BLR）を用いてプロットした。
40

レーン内容：

- 1 : MW標準品 (10 μL)
- 2 : 開始 (全画分) (10 μg)
- 3 : 濾過なしのSN1 (10 μg)
- 4 : 濾過なしのSN2 (10 μg)
- 5 : 抽出なし (10 μg)
- 6 : ロードSP FF (10 μg)
- 7 : フロースルーSP FF (6.9 μg)
- 8 : 洗浄SP FF (20 μL)
- 50

9 : 溶出 S P F F (1 0 μ g)
 10 : ストリップ S P F F (1 0 μ g)
 11 : ロード Q F F (8 . 9 μ g)
 12 : 溶出 Q F F (9 . 8 μ g)
 13 : ストリップ Q F F (4 . 8 μ g)
 14 : 0 . 0 4 % T W E E N (商標) 8 0 添加前の T F F 保持液 (1 0 μ g)
 15 : 0 . 0 4 % T W E E N (商標) 8 0 添加後の濾過しない精製バルク (1 0 μ g)
 16 : 0 . 0 4 % T W E E N (商標) 8 0 添加後の濾過除菌した精製バルク (1 0 μ g)
 17 : 0 . 0 4 % T W E E N (商標) 8 0 添加後の濾過除菌した精製バルク (2 0 μ g +
 添加大腸菌細胞溶解液 R i x (1 μ g))
 18 : 大腸菌細胞溶解液 R i x (2 μ g)
 19 : 大腸菌細胞溶解液 R i x (1 μ g)
 20 : 大腸菌細胞駆 R i x (0 . 5 μ g)

S D S - P A G E およびウエスタンプロット図の説明 : P E - P i l A 融合タンパク質は 3 0 k D a に移動する。浸透圧ショックによる抽出は、細菌の周辺質で発現され、プロセシングされた融合タンパク質を抽出し、細菌由来のコンタミネーションを軽減した。高張処理中の融合タンパク質の損失は小さい(レーン 3)。低張処理により小さな割合ながら抽出されないものがあり、細胞との結合を維持する(レーン 5)。S P F F フロースルー(レーン 7)および両カラムにおけるストリップ画分(レーン 10 および 13)の損失は小さい。ストリップ画分の総容量は少ないので、融合タンパク質の損失は有意ではない。ストリップ画分には分解されたバンドが見られるが、最終産物には見られない。精製バルクには大腸菌宿主細胞タンパク質由来の有意なコンタミネーションはない(レーン 16)。

【 0 2 1 3 】

L V L 7 3 5 および L V L 7 7 8 分析から L V L 3 1 7 と同様のプロファイルが得られた。

実施例 11 : P E 、 P i l A および L V L 3 1 7 の融点データ

P E - P i l A 融合 H i s タグ不含タンパク質(L V L 3 1 7)の温度遷移を、上記のように精製した P E h i s タグ含有(実施例 8 に記載の通り)タンパク質および切断型 P i l A (実施例 8 に記載の通り)タンパク質の両方の温度遷移と比較した。

【 0 2 1 4 】

D S C 前に、P E および P i l A を 1 0 m M K 2 H P O 4 / K H 2 P O 4 p H 6 . 5 + 0 . 0 4 % T w e e n 8 0 (1 : 2 5 0 サンプル : バッファー容量比) 中で一晩透析し、それらを融合タンパク質と同じバッファーとした。透析後、B C A によりタンパク質濃度を測定し、3 0 0 μ g / m l (P E) および 5 0 0 μ g / m l (P i l A) に調整した。

【 0 2 1 5 】

M i c r o C a l , L L C (G E H e a l t h c a r e の一部門) 製の V P (商標) - D S C で行った分析。最終的な透析バッファーを参照として用い、スキャンから差し引いた。D S C スキャン速度 9 0 / 時。配合後の最終容器(F C)にて温度遷移を測定する能力を評価するために、融合タンパク質を F C 濃度(6 0 μ g / m l)まで希釈した。最終容器のデータは示されていない。

結果 :

P E - P i l A 融合タンパク質および P E および P i l A タンパク質の温度遷移に関しては図 17 を参照。曲線 : P i l A (1) 、タンパク質 E (P r o t E 、 P E) (2) 、無希釈の P E - P i l A P B 7 3 7 μ g / m l (3) 、および F C 濃度 6 0 μ g / m l に希釈した P E - P i l A P B (4) 。

1 - P i l A T m : 5 3

2 - タンパク質 E T m : 6 3

3 - 無希釈の P E - P i l A P B (精製バルク) 7 3 7 μ g / m l T m : 5 3 . 7

10

20

30

40

50

および $T_m_2 : 66.1$
 4 - FC 濃度 $60 \mu g / ml$ に希釈した PE - PilA PB $T_m_1 : 53.2$ および $T_m_2 : 67.6$

精製融合タンパク質 (LVL317) において 2 つの遷移が検出された (曲線 3 および 4)。

【0216】

PE - PilA 融合タンパク質の $T_m_1 (53.7)$ は、PilA 遷移 (53) に類似している。

【0217】

PE 遷移 (63) に比べて PE - PilA の $T_m_2 (66.1)$ は有意なシフトである。両ドメインの融合物は PE 断片を安定化すると思われる。 10

【0218】

無希釈に比べて希釈融合タンパク質の T_m_2 のシフトは、濃度依存的である凝集に典型的な、急激に低下する勾配から生じる濃度の人為現象である。

【0219】

LVL735 および LVL778 の抗原折り畳み分析は、LVL317 の場合と同様である。

実施例 12 : Balb/c マウスにおける PE - PilA 融合タンパク質構築物 LVL291 抗 PilA の免疫原性応答

AS03_A 中に配合した精製 LVL291 PE - PilA 融合タンパク質 (異種シグナルペプチドを含まない LVL291 融合タンパク質) に対する免疫応答を Balb/c マウスにおいて評価した。0、14 および 28 日目に、動物 (マウス 20 個体 / 群) を、それぞれ AS03_A 中に配合した 10 μg の PE (ベクター pRIT16762 由来)、PilA (ベクター pRIT16790 由来) または PE - PilA で筋肉内により免疫した。対照群には AS03_A のみを接種した。各抗原に対する抗体応答を、42 日目に採取した個々の血清において測定した。抗体応答は陰性对照で得られた。図 18 に示されるように、PilA に対する抗体応答は、一価 PilA で免疫したマウスにおける抗体応答に比べて PE - PilA 融合物で免疫したマウスで高かった。PE に対する抗体応答は、融合タンパク質で免疫したマウスと一価 PE で免疫したマウスで同等であった。GMT = 幾何平均力値。WINDOWS (登録商標) (Microsoft) 下で実行する SofTMAX (登録商標) Pro ソフトウェア (Molecular Devices) を用いてデータを取り込んで解析し、4 パラメーターロジスティック対数関数を用いて標準曲線を計算した。4 パラメーターロジスティック対数関数は、濃度に対する光学密度 (対数) スケール上にプロットした際に明白な S 字型を示す参照血清の曲線を高精度で表す。抗体濃度は、マウス血清サンプルの各希釈において、標準曲線の補間によって計算した。品質管理血清および未知の血清サンプル中の抗体は、参照の希釈曲線の有効範囲 (10 ~ 80 %) 内にある全ての希釈からの値の平均を取ることによって得られる。結果は図 18 に示すが、これは Balb/c マウスマodel における LVL291 PE - PilA 融合タンパク質に対する抗体応答および一価 PE および PilA に対する抗体応答をグラフで示したものである。 40

実施例 13 : マウス鼻咽頭定着モデル。PE - PilA による免疫誘導。NTHi 86-028NP 株および NTHi 3224A 株による抗原刺激

Balb/c 雌マウス (20 / 群) を鼻腔内に、0 日目と 14 日目に、LT (大腸菌 *E. coli*) の易熱性毒素) を配合した 6 μg の精製 PE - PilA 融合タンパク質 (86-028NP による抗原刺激には LVL291; 3224A 株による抗原刺激には LVL317) で、28 日目にはリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 中、6 μg の精製 PE - PilA 融合タンパク質で免疫を行った。対照マウス (20 / 群) には LTのみを接種した。次に、マウスの鼻腔内を 5×10^6 CFU (コロニー形成単位) の同種 NTHi 86-028NP 株および異種 NTHi 3224A 株で抗原刺激した。同種および異種は、マウスが免疫された NTHi 株のリファレンスにより決定される。抗原刺激の 1 日後 50

および2日後に取り出した鼻腔において細菌コロニーを計数した。D1 = 1日目。D2 = 2日目。PE - Pi1A接種は、抗原刺激から1日後および2日後に、鼻咽頭におけるNTHi 86-028NP株および3224A株のクリアランスを高めた。

【0220】

NTHi 86-028NP株で行った実験に関して：応答として計数値のlog10値を用いて2要因固定ANOVAを行った。なお、これらの固定要因は群（4水準）および日（2水準）であった。変数の異種性の仮説は棄却され、異種変数を有するモデルをデータに当てはめた。これらの2つの要因の間には有意な相互作用は検出されなかった。PE - Pi1A融合群（6μg / マウス）は、対照群（LT）に比べてCFUを有意に低下させ、幾何平均比は0.01、0.25の95%信頼区間で0.06に相当した。

10

【0221】

NTHi 3224A株で行った実験に関して：応答としてlog10値を用いて3要因固定ANOVAを行った。なお、これらの固定要因は群、日および実験であった。Shapiro-WilkおよびLeveneの検定では、変数の正規性および異種性の仮説は棄却されなかった。いずれの2要因の間にもまたは3要因の間にも有意な相互作用は検出されず、この分析では主要な要因のみが維持された。PE - Pi1A / LTは、対照群に比べてCFUを有意に低下させ、幾何平均比は0.02、0.61の95%信頼区間で0.11に相当した。

【0222】

マウス鼻咽頭におけるNTHi 86-028NP株細菌クリアランスに対するPE - Pi1A融合タンパク質接種の効果に関しては図19を参照。

20

【0223】

マウス鼻咽頭におけるNTHi 3224A株細菌クリアランスに対するPE - Pi1A融合タンパク質接種の効果に関しては図20を参照。

実施例14：マウス鼻咽頭定着モデル。Pi1Aによる免疫誘導。NTHi 3219C株による抗原刺激。

【0224】

雌OF1マウス（20マウス / 群）の鼻腔内に0日目と14日目にLTを配合した3μgのPi1A（ベクター16790由来）で、28日目にはPBS中3μgのPi1Aで免疫を行った。対照マウスにはLTのみを接種した。次に、マウスの鼻腔内を 5×10^6 CFUのNTHi 3219C株で抗原刺激した。抗原刺激の3日後および4日後に取り出した鼻腔において細菌コロニーを計数した。D3 = 3日目。D4 = 4日目。

30

【0225】

マウス鼻咽頭における細菌クリアランスに対するPi1A接種の効果に関しては図21を参照。

実施例15：マウス鼻咽頭定着モデル。PEによる免疫誘導。NTHi 3224A株による抗原刺激。

【0226】

Balb/c雌マウス（20マウス / 群）の鼻腔内に0日目と14日目にLTを配合した3μgのPE（ベクターpRIT16762由来）で、28日目にはPBS中3μgのPEで免疫を行った。対照マウスにはLTのみを接種した。次に、マウスの鼻腔内を 5×10^6 CFUのNTHi 3224A株で抗原刺激した。抗原刺激の3日後および4日後に取り出した鼻腔において細菌コロニーを計数した。10個体のマウスを3日目（D3）に調べた。10個体のマウスを4日目（D4）に調べた。PE接種は、統計分析のためにダン(Dunn)検定を用いたところ、抗原刺激後4日目に鼻咽頭におけるNTHiのクリアランスを有意に増大させた（図22）。

40

【0227】

マウスの鼻咽頭における細菌クリアランスに対するPE接種の効果に関しては図22を参照。

実施例16：ビブロネクチン(vibronectin)結合。LVL317およびLVL735 P

50

E - P i l A 融合タンパク質によるビプロネクチン(vibronectin)結合の阻害。**【0228】**

精製された L V L 3 1 7 P E - P i l A 融合タンパク質構築物における、P E のビトロネクチンとの結合能を評価した。マイクロタイタープレート (POLYSORP (商標))、Nunc、Thermo Fisher Scientific を P E (ベクター p R I T 1 6 7 6 2 由来) または精製 L V L 3 1 7 P E - P i l A 融合タンパク質 (10 μg / ml) でコーティングした。プレートを NaCl 150 mM - ポリソルベート 20、0.05% (例えば、TWEEN (商標) 20) で4回洗浄し、PBS - BSA 1% で1~2時間ブロッキングした。4回の洗浄の後、ビトロネクチン (ヒト血漿由来ビトロネクチン、SIGMA - ALDRICH (登録商標)) を加え (10 μg / ml) 、2倍希釈し (12種の希釈液) 、これらのプレートを室温で1時間インキュベートした。次に、プレートを NaCl 150 mM - ポリソルベート 20、0.05% (例えば、TWEEN (商標) 20) で4回洗浄した。洗浄後、結合したビトロネクチンを、ペルオキシダーゼヒツジ抗ヒトビトロネクチン (U.S. Biological) を用いて検出した後、オルトフェニレンジアミン / H₂O₂ 基質を添加した。発色は、ビトロネクチンに固定された抗体の量に正比例する。
10

【0229】

(a) ビトロネクチンに結合した L V L 3 1 7 P E - P i l A 融合タンパク質 P i l A = N T H i 8 6 - 0 2 8 N P 由来 P i l A (p R I T 1 6 7 9 0 に関して記載の通り) ; P E = タンパク質 E (p R I T 1 6 7 6 2 に関して記載の通り) および (b) ビトロネクチンに結合した L V L 3 1 7 および L V L 7 3 5 P E - P i l A 融合タンパク質に関しては図 23 を参照。
20

実施例 17 : ビプロネクチン(vibronectin)結合。L V L 2 9 1 P E - P i l A 融合タンパク質に対する抗体によるビプロネクチン(vibronectin)の阻害。**【0230】**

マイクロタイタープレート (POLYSORP (商標) 、Nunc、Thermo Fisher Scientific) を P E (ベクター p R I T 1 6 7 6 2 由来) または 精製 P E - P i l A 融合タンパク質 (10 μg / ml) でコーティングした。プレートを NaCl 150 mM - ポリソルベート 20、0.05% (例えば、TWEEN (商標) 20) で4回洗浄し、PBS - BSA 1% で2時間ブロッキングした。洗浄後、ビトロネクチン (ヒト血漿由来ビトロネクチン、SIGMA - ALDRICH (登録商標)) を 50 μg / ml で加え、精製抗体抗 P E - P i l A (自家生産および精製) を2倍連続希釈し、室温で1時間インキュベートした。次に、プレートを NaCl 150 mM - ポリソルベート 20、0.05% (例えば、TWEEN (商標) 20) で4回洗浄した。4回の洗浄の後、結合したビトロネクチンを、ペルオキシダーゼヒツジ抗ビトロネクチン (U.S. Biological) を用いて検出した後、オルトフェニレンジアミン / H₂O₂ 基質を加えた。発色は、ビトロネクチンに固定された抗体の量に正比例する。
30

【0231】

P E - P i l A に対するポリクローナル抗体による P E へのビトロネクチン結合の阻害を観察した。
40

【0232】

P E - P i l A 融合タンパク質に対するポリクローナル抗体によるビトロネクチン結合の阻害に関しては図 24 を参照。

実施例 18 : L V L 2 9 1 P E - P i l A 融合タンパク質の抗原性。ELISA。**【0233】**

精製された L V L 2 9 1 P E - P i l A 融合タンパク質を、対照として一価タンパク質を用いた抗原性試験でバリデートした。融合タンパク質は、配列番号 4 のアミノ酸 22 ~ 160 をコードする P E 遺伝子断片 (p R I T 1 6 7 1 1 に関して記載の通り) に対して、または N T H i 8 6 - 0 2 8 N P 株由来の P i l A (ベクター p R I T 1 6 7 9 0 由来) に対して作製されたポリクローナル抗体 (ウサギおよびモルモット) で現像するサ
50

ンドイッチ E L I S A で試験した。

【 0 2 3 4 】

P i l A または P E は 1 0 0 n g / m l で加え、連続 2 倍希釈した。30 分のインキュベーションの後および洗浄の後、結合した抗原を、P E または P i l A での免疫誘導の後に得られたウサギポリクローナル血清により検出した。結合した抗体を、ペルオキシダーゼ抗ウサギ Ig (Jackson Immunoresearch Laboratories, Inc.) を用いて検出した後、オルトフェニレンジアミン / H₂O₂ 基質を加えた。発色は、存在する抗原の量に正比例する。マイクロタイプレート用の分光光度計を用いて吸光度を測定した。サンプルの抗原性は、全長 P E または全長 P i l A 参照抗原の曲線との比較により決定し、μg / m l で表す。参照は 100 % の抗原性を示した。

10

【 0 2 3 5 】

表 6 に見られるように、抗原性は、一価 P E および P i l A 抗原に比べて精製 L V L 2 9 1 P E - P i l A 融合タンパク質で見られた。

【 0 2 3 6 】

【表 6】

抗原性試験において精製 L V L 2 9 1 P E - P i l A 融合タンパク質で得られた相対的抗原性

	P E の相対的抗原性(%)
参照としてのタンパク質 E	100
PE-PilA	130-148

20

	P E の相対的抗原(%)
参照としての PilA	100
PE-PilA	120-152

30

実施例 1 9 : L V L 7 3 5 P E - P i l A 融合タンパク質の免疫原性

雌 B a 1 b / c マウス (n = 3 4) を A S O 1 E または A 1 P O₄ (リン酸アルミニウム) を配合していない 1 、 0 . 2 または 0 . 0 4 μg の P E - P i l A 融合タンパク質 L V L 3 1 7 または L V L 7 3 5 を含有する 0 、 1 4 および 2 8 日目に 5 0 μl のワクチン製剤で、筋肉内経路により免疫した。4 2 日目に採取した個々の血清において P E および P i l A に対する抗体応答を決定し、P E および P i l A に対する Ig G レベルを測定し、μg / m l で表した。

40

【 0 2 3 7 】

L V L 3 1 7 および L V L 7 3 5 に対する P E および P i l A 抗体の応答に関しては図 2 7 を参照。G M C = 幾何平均濃度。G M T = 幾何平均力値。I C = 信頼区間。

実施例 2 0 : 無莢膜型インフルエンザ菌鼻咽頭定着のマウスモデルにおける L V L 7 3 5 および L V L 3 1 7 融合タンパク質の防御有効性

雌 B a 1 b / c マウスの鼻腔内に 0 日目と 1 4 日目に 0 . 5 μg の大腸菌易熱性毒素 (L T) と混合した 5 . 8 μg の L V L 7 3 5 または L V L 3 1 7 を含有する 1 0 μl のワクチン製剤で免疫を行った。2 8 日目に追加免疫用量 5 . 8 μg のアジュバント不含 L V L 7 3 5 または L V L 3 1 7 を投与した。対照マウスには 0 日目と 1 4 日目に L T のみを

50

、28日目にはP B Sを接種した。42日目に動物の鼻腔内を 5×10^6 c f uのN T H i 3224A株で抗原刺激した。抗原刺激の1日後および2日後に取り出した鼻腔において細菌コロニーを計数した(n = 10 / 時点)。

【0238】

鼻腔を媒体中でホモジナイズし、細菌の定量を行う。結果はC F U / m lで良好に表される。

【0239】

無莢膜型インフルエンザ菌鼻咽頭定着のマウスモデルにおいて細菌クリアランスに対するL V L 735およびL V L 317接種の効果に関しては図28を参照。

実施例21：P E - P i 1 A融合タンパク質を含む多価ワクチンの調剤

10

3種類のワクチンを設計した：

10V：下記の10種の肺炎球菌莢膜糖類コンジュゲート：タンパク質Dにコンジュゲートされた血清型1由来の莢膜糖類(1-P D)、タンパク質Dにコンジュゲートされた血清型4由来の莢膜糖類(4-P D)、タンパク質Dにコンジュゲートされた血清型5由来の莢膜糖類(5-P D)、タンパク質Dにコンジュゲートされた血清型6B由来の莢膜糖類(6B-P D)、タンパク質Dにコンジュゲートされた血清型7F由来の莢膜糖類(7F-P D)、タンパク質Dにコンジュゲートされた血清型9V由来の莢膜糖類(9V-P D)、タンパク質Dにコンジュゲートされた血清型14由来の莢膜糖類(14-P D)、タンパク質Dにコンジュゲートされた血清型23F由来の莢膜糖類(23F-P D)、破傷風トキソイドにコンジュゲートされた血清型18C由来の莢膜糖類(18C-T T)およびジフテリア毒素にコンジュゲートされた血清型19F由来の莢膜糖類(19F-D T)を含有する10価(10V)のワクチン。

12V：10Vと同じ10種の肺炎球菌莢膜糖類コンジュゲートを含有し、さらに2つの肺炎球菌糖類コンジュゲート、すなわち、CRM197にコンジュゲートされた19A(19ACRM)およびCRM197にコンジュゲートされた6A(6ACRM)を含む12価(12V)のワクチン。

12V+タンパク質(12V+prot)：12Vと同じ12種の肺炎球菌莢膜糖類コンジュゲートを含有し、さらにP h t D、d P l yおよびP E - P i 1 A融合タンパク質を含むワクチン。

d P l yの調製：肺炎球菌ニューモリシンを調製し、ホルムアルデヒド無毒化を行い、国際公開第2004/081515号および国際公開第2006/32499号に記載の通りに無毒化した。

P h t Dの発現および精製：

P h t Dの発現：P h t Dタンパク質は、ヒスチジントライアドの存在を特徴とする肺炎球菌ヒスチジントライアド(P h t)タンパク質ファミリーのメンバーである。P h t Dは、838aaの分子であり、5つのヒスチジントライアドを有する(M e d l m m u n e 国際公開第00/37105号 アミノ酸配列は配列番号4およびDNA配列は配列番号5)。P h t Dはまた、中央(アミノ酸348~380番)にプロリンリッチ領域を含む。P h t Dは20aaのN末端シグナル配列を有する。P h t Dの調製および精製は国際公開第2007/071710号(例えば、実施例1b参照)に記載されている。国際公開第00/37105号からの配列番号4のアミノ酸21~838の配列は配列番号220に相当する。

20

30

40

配列番号 220

Ser Tyr Glu Leu Gly Arg His Gln Ala Gly Gln Val Lys Lys Glu Ser Asn Arg Val Ser Tyr Ile
 Asp Gly Asp Gln Ala Gly Gln Lys Ala Glu Asn Leu Thr Pro Asp Glu Val Ser Lys Arg Glu Gly
 Ile Asn Ala Glu Gln Ile Val Ile Lys Ile Thr Asp Gln Gly Tyr Val Thr Ser His Gly Asp His Tyr
 His Tyr Tyr Asn Gly Lys Val Pro Tyr Asp Ala Ile Ile Ser Glu Glu Leu Leu Met Lys Asp Pro Asn
 Tyr Gln Leu Lys Asp Ser Asp Ile Val Asn Glu Ile Lys Gly Gly Tyr Val Ile Lys Val Asp Gly Lys
 Tyr Tyr Val Tyr Leu Lys Asp Ala Ala His Ala Asp Asn Ile Arg Thr Lys Glu Glu Ile Lys Arg
 Gln Lys Gln Glu His Ser His Asn His Gly Gly Ser Asn Asp Gln Ala Val Val Ala Ala Arg
 Ala Gln Gly Arg Tyr Thr Thr Asp Asp Gly Tyr Ile Phe Asn Ala Ser Asp Ile Ile Glu Asp Thr Gly
 Asp Ala Tyr Ile Val Pro His Gly Asp His Tyr His Tyr Ile Pro Lys Asn Glu Leu Ser Ala Ser Glu
 Leu Ala Ala Ala Glu Ala Tyr Trp Asn Gly Lys Gln Gly Ser Arg Pro Ser Ser Ser Tyr Asn
 Ala Asn Pro Ala Gln Pro Arg Leu Ser Glu Asn His Asn Leu Thr Val Thr Pro Thr Tyr His Gln
 Asn Gln Gly Glu Asn Ile Ser Ser Leu Leu Arg Glu Leu Tyr Ala Lys Pro Leu Ser Glu Arg His
 Val Glu Ser Asp Gly Leu Ile Phe Asp Pro Ala Gln Ile Thr Ser Arg Thr Ala Arg Gly Val Ala Val
 Pro His Gly Asn His Tyr His Phe Ile Pro Tyr Glu Gln Met Ser Glu Leu Glu Lys Arg Ile Ala Arg
 Ile Ile Pro Leu Arg Tyr Arg Ser Asn His Trp Val Pro Asp Ser Arg Pro Glu Gln Pro Ser Pro Gln
 Ser Thr Pro Glu Pro Ser Pro Gln Pro Ala Pro Asn Pro Gln Pro Ala Pro Ser Asn Pro Ile
 Asp Glu Lys Leu Val Lys Glu Ala Val Arg Lys Val Gly Asp Gly Tyr Val Phe Glu Glu Asn Gly
 Val Ser Arg Tyr Ile Pro Ala Lys Asp Leu Ser Ala Glu Thr Ala Ala Gly Ile Asp Ser Lys Leu Ala
 Lys Gln Glu Ser Leu Ser His Lys Leu Gly Ala Lys Lys Thr Asp Leu Pro Ser Ser Asp Arg Glu
 Phe Tyr Asn Lys Ala Tyr Asp Leu Leu Ala Arg Ile His Gln Asp Leu Leu Asp Asn Lys Gly Arg
 Gln Val Asp Phe Glu Ala Leu Asp Asn Leu Leu Glu Arg Leu Lys Asp Val Pro Ser Asp Lys Val
 Lys Leu Val Asp Asp Ile Leu Ala Phe Leu Ala Pro Ile Arg His Pro Glu Arg Leu Gly Lys Pro
 Asn Ala Gln Ile Thr Tyr Thr Asp Asp Glu Ile Gln Val Ala Lys Leu Ala Gly Lys Tyr Thr Thr Glu
 Asp Gly Tyr Ile Phe Asp Pro Arg Asp Ile Thr Ser Asp Glu Gly Asp Ala Tyr Val Thr Pro His Met
 Thr His Ser His Trp Ile Lys Lys Asp Ser Leu Ser Glu Ala Glu Arg Ala Ala Ala Gln Ala Tyr Ala
 Lys Glu Lys Gly Leu Thr Pro Pro Ser Thr Asp His Gln Asp Ser Gly Asn Thr Glu Ala Lys Gly
 Ala Glu Ala Ile Tyr Asn Arg Val Lys Ala Ala Lys Lys Val Pro Leu Asp Arg Met Pro Tyr Asn
 Leu Gln Tyr Thr Val Glu Val Lys Asn Gly Ser Leu Ile Ile Pro His Tyr Asp His Tyr His Asn Ile
 Lys Phe Glu Trp Phe Asp Glu Gly Leu Tyr Glu Ala Pro Lys Gly Tyr Thr Leu Glu Asp Leu Leu
 Ala Thr Val Lys Tyr Val Glu His Pro Asn Glu Arg Pro His Ser Asp Asn Gly Phe Gly Asn
 Ala Ser Asp His Val Arg Lys Asn Lys Val Asp Gln Asp Ser Lys Pro Asp Glu Asp Lys Glu His
 Asp Glu Val Ser Glu Pro Thr His Pro Glu Ser Asp Glu Lys Glu Asn His Ala Gly Leu Asn Pro
 Ser Ala Asp Asn Leu Tyr Lys Pro Ser Thr Asp Thr Glu Glu Thr Glu Glu Ala Glu Asp Thr
 Thr Asp Glu Ala Glu Ile Pro Gln Val Glu Asn Ser Val Ile Asn Ala Lys Ile Ala Asp Ala Glu Ala
 Leu Leu Glu Lys Val Thr Asp Pro Ser Ile Arg Gln Asn Ala Met Glu Thr Leu Thr Gly Leu Lys
 Ser Ser Leu Leu Leu Gly Thr Lys Asp Asn Asn Thr Ile Ser Ala Glu Val Asp Ser Leu Leu Ala
 Leu Leu Lys Glu Ser Gln Pro Ala Pro Ile

タンパク質Dは、国際公開第2007/071710号に記載の通りに発現させた。
CRM197大腸菌の発現および精製：

CRM197の生産工程の収率を高めるために、選択的発現様式を、10倍の工程収率の標的を用いて評価した。選択した構築物を大腸菌株(B834(DE3))で、大腸菌由来F1g1シグナル配列(19aa)とCRM197(537aa)の間の融合物として発現させた。このシグナル配列は周辺質への輸送の際に切断される。CRM197は浸透圧ショックにより抽出された後に精製される。この精製プロセスは、Q-Sepharose-Extein工程とヒドロキシアバタイト工程の間に付加的なクロマトグラフィー工程(フェニルセファロース)が追加されること、および最後のオクチル-Sepharose4FFでのクロマトグラフィー工程が除かれること以外は、国際公開第2006/100108号に開示されているものと同様である。

コンジュゲートの調製

精製された肺炎球菌多糖をいかにして調製するかは当技術分野で周知である。これらの実施例の目的で、多糖を本質的に欧洲特許第072513号に記載の通りに、または密接に関連した方法により作製した。コンジュゲーション前に、多糖は下記のような微少溶液操作によってサイズ調整してもよい。

【0240】

活性化およびカップリング条件は、各多糖に特異的である。これらを表1に示す。サイズ調整済みの多糖(6Bおよび23F以外)はNaCl 2M、NaCl 0.2Mまたは注射水(WFI)に溶かした。全ての血清型について最適多糖濃度を評価した。血清型18C以外の全ての血清型は、下記に詳述するように、担体タンパク質に直接コンジュゲートした。

【0241】

アセトニトリルまたはアセトニトリル/水(50%/50%)溶液中100mg/mlの保存溶液から、CDAP(1-シアノ-4-ジメチルアミノピリジニウムテトラフルオロボレート)(CDAP/PS比0.5~1.5mg/mg PS)を多糖溶液に加えた。1.5分後に、0.2M~0.3MのNaOHを加えて特定の活性化pHとした。多糖の活性化はこのpHにて25で3分間行った。活性化した多糖に精製タンパク質(タンパク質D、CRM197またはDT)(この量は最初のPS/担体タンパク質比に依存する)を加え、その特定のpHで最大2時間(血清型による)、pH調整下でカップリング反応を行った。未反応のシアノ酸エステル基をクエンチするために、次に、2Mグリシン溶液をこの混合物に加えた。pHをクエンチングpH(pH9.0)に調整した。この溶液を25で30分間攪拌した後、ゆっくり連続攪拌しながら2~8で一晩インキュベートした。

18Cの調製：

18Cを、リンカー-アジピン酸ジヒドラジド(ADH)を介して担体タンパク質に連結した。

【0242】

コンジュゲーション前に多糖血清型18Cに微少溶液操を行った。
EDAC(2-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩)による破傷風トキソイドの誘導体化

破傷風トキソイドの誘導体化のため、精製したTTを0.2M NaCl中で25mg/mlに希釈し、ADHスペーサーを終濃度が0.2Mとなるように加えた。スペーサーの溶解が完了したところで、pHを6.2に調整した。次に、EDAC(1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド)を終濃度が0.02Mとなるように加え、この混合物をpH調整下で1時間攪拌した。この縮合反応を、pHを25で少なくとも30分間9.0まで高めることによって停止させた。

【0243】

誘導体化されたTTに、次に、ダイアフィルトレーションを行い(10kDa CO膜)、残留するADHおよびEDAC試薬を除去した。

【0244】

T T_{AH} (A D H リンカーにコンジュゲートされた破傷風トキソイド) バルクを最後に濾過除菌し、カップリング工程まで - 70 °で保存した。

T T_{AH} の P S 18 C への化学的カップリング

コンジュゲーションパラメーターの詳細は表 1 に見出すことができる。

【0245】

2 グラムの微少溶液操済み P S を定義された濃度で水に希釈し、 N a C l 粉末を加えることにより 2 M N a C l に調整した。

【0246】

C D A P 溶液 (1 0 0 m g / m l 5 0 / 5 0 v / v アセトニトリル / W F I 中に新たに調製) を、適当な C D A P / P S 比となるように加えた。 10

【0247】

0 . 3 M N a O H を加えることにより p H を活性化 p H 9 . 0 まで上昇させ、 T T_{AH} の添加までこの p H で安定させた。

【0248】

3 分後、誘導体化された T T_{AH} (0 . 2 M N a C l 中 2 0 m g / m l) を T T_{AH} / P S 比が 2 となるように加え、 p H をカップリング p H 9 . 0 に調整した。この溶液を 1 時間、 p H 調整下に置いた。

【0249】

クエンチングのため、 2 M グリシン溶液を P S / T T_{AH} / C D A P 混合物に加えた。 20

【0250】

p H をクエンチング p H (p H 9 . 0) に調整した。

【0251】

この溶液を 2 5 ° で 3 0 分間攪拌した後、ゆっくり連続攪拌しながら一晩 2 ~ 8 ° に置いた。

肺炎球菌莢膜糖類 - タンパク質 D / T T / D T / P h t D / P l y コンジュゲートの特定の活性化 / カップリング / クエンチング条件

行ヘッダーに「 μ f l u i d 」とある場合は、その糖類がコンジュゲーション前に微少溶液操作によりサイズ調整されたことを示す。微少溶液操作後の糖類のサイズは表 2 に示す。 30

【0252】

【表7】

表1 肺炎球菌莢膜糖類-タンパク質D/TT/DT/CRM197コンジュゲートの特定の活性化/カップリング/クエンチング条件

血清型	1 μfluid	4 μfluid	5 mfluid	6A mfluid	6B	7F μfluid
PS 濃縮物.(mg/ml)	2.27	2.37	7.1	10	5.0	5.0
PS 溶解	WFI	WFI	WFI	NaCl 2M	NaCl 2M	NaCl 2M
担体濃縮物.(mg/ml)	10.0 PD	10.0 PD	5.0 PD	10 CRM197	5.0 PD	10.0 PD
最初のPROT/PS比(w/w)	1.65/1	1.60/1	1/1	1/1	1.1/1	1.2/1
CDAP 濃縮物.(mg/mg PS)	0.55	0.55	0.79	1.0	0.83	0.75
pH _a =pH _c =pH _q	9.0/9.0/9.0	9.5/9.5/9.0	9.0/9.0/9.0	9.5/9.5/9.0	9.5/9.5/9.0	9.5/9.5/9.0

10

20

30

血清型	9V μfluid	14 μfluid	18C μfluid	19A μfluid	19F μfluid	23F
PS 濃縮物.(mg/ml)	5.0	5.0	4.5	15.0	9.0	2.38
PS 溶解	NaCl 2M	NaCl 2M	NaCl 2M	NaCl 2M	NaCl 2M	NaCl 2M

40

担体ンパク質 濃縮物 (mg/ml)	10.0	10.0	20.0 (TT)	15.0 (CRM19 7)	20.0 (DT)	5.0
最初の担体ンパ ク質PS比 (w/w)	1.2/1	1.2/1	2/1	1.5/1	1.5/1	1/1
CDAP 濃縮物 (mg/mg PS)	0.50	0.75	0.75	1.5	1.5	0.79
pH _a =pH _c =pH _q	9.5/9.5/9.0	9.5/9.5/9.0	9.0/9.0/9.0	9.0/9.0/9.0	9.0/9.0/9.0	9.5/9.5/9.0

注 pH_a、c、qは、それぞれ活性化合物 カップリングおよびクエンチングに相当する。

コンジュゲートの精製：

コンジュゲートは、0.15M NaCl（ただし、18°Cでは500HRをバッファーとして使用し、19Aでは1.15M NaClを含有する20mM酢酸塩pH6.2を使用した）で平衡化したSephacyr 1 S400HRゲル濾過カラムを用いたゲル濾過により小分子（D MAPを含む）および非コンジュゲート糖類およびタンパク質を除去することで精製した。反応成分の分子サイズの違いに基づき、PS-PD、PS-TT、PS-CRM197またはPS-DTコンジュゲートが最初に溶出し、遊離PS、次いで、遊離タンパク質担体、最後にD MAPおよび他の塩（NaCl、グリシン）が続く。

【0253】

コンジュゲートを含有する画分はUV_{280nm}により検出される。画分をそれらのKdに従ってプールし、濾過除菌し(0.22μm)、+2~8で保存する。コンジュゲート調製物のPS/タンパク質比を決定した。

ワクチンの調剤

10Vワクチンは、リン酸アルミニウム上に、1、3、1、1、1、1、1、3、3、1μgのヒト用量で吸着された肺炎球菌莢膜糖類血清型1、4、5、6B、7F、9V、14、18C、19Fおよび23Fコンジュゲートと一緒に含有する（これらの糖類はリン酸アルミニウムに個々に吸着させた後、それらと一緒に混合し、リン酸アルミニウムのレベルを500μgに調整した）。

【0254】

12Vワクチンは、リン酸アルミニウム上に吸着された2μg用量の血清型19Aおよび6Aコンジュゲートを追加し、10Vワクチンと同様にして作製した。

【0255】

12V+タンパク質ワクチンは、タンパク質PhtD、dPlyおよびPE-PilAを加えたこと以外は、12Vワクチンと同様にして作製した。PE-PilAは本明細書に記載の通りに作製した。12コンジュゲートと前記タンパク質を、12Vに関しては上記した用量、タンパク質は各30μg（注：これは30μgのPE-PilAを表し、30μgのPEと30μgのPilAを表すのではない）の用量を用いて一緒に混合した。

実施例22：マウスにおける10V、12Vおよび12V+タンパク質ワクチンの免疫原性の比較

抗肺炎球菌多糖PS（多糖）ELISAの説明

マイクロプレートを、莢膜多糖（CPS）（PBS中、2.5μg/mlのPS1およ

び P S 3、5 μg / ml の P S 4、5、6 A、6 B、7 F、9 V または 14；10 μg / ml の P S 19 A および 23 F または 40 μg / ml の P S 18 C および P S 19 F、100 μl / ウエル) で 37 にて 2 時間コーティングした。これらのプレートを NaCl 150 mM (0.9%) - ポリソルベート 20 0.05% で 3 回洗浄した。CPS (2.5 mg / ml であった 6 A および 6 B 以外は(except or) 1 mg CPS / ml の無希釈血清) V/V を含有する PBS - ポリソルベート 20 0.05% 中に血清を希釈し (6 A および 6 B に関しては 1/2、他の血清型に関しては 1/10)、CPS に対する抗体を中和させるために 37 で 1 時間インキュベートした。「マウスにおける 3 種のワクチン製剤の免疫原性」と題された節に記載の通りに免疫したマウス由来の血清または参考 (Chrompure マウス IgG で較正した内部参照) をマイクロウェルに加え、PBS - ポリソルベート 20 0.05% で連続希釈して 100 μl とした(二倍希釈工程)。これらのプレートを振盪下、室温で 30 分間インキュベートした。これらのプレートを上記のように洗浄し、ペルオキシダーゼにコンジュゲートされた抗マウス IgG 抗体 (100 μl / ウエル) を加え、プレートを振盪しながら室温で 30 分間インキュベートした。洗浄後、基質 (10 ml のクエン酸塩 0.1M pH 4.5~4.6 および 5 μl の H₂O₂ 中、4 mg の OPDA (オルトフェニレン - ジアミン)) を各ウェルに加え (100 μl)、これらのプレートを暗所で 15 分間インキュベートした。HCl 1N (50 μl) を添加することにより反応を停止させた。分光光度計を用い、490 nm または参考に関しては 620 nm で吸光度を読み取った。発色は、血清中に存在する抗体の量に正比例する。

10

20

P D、P E および Pi1A 抗体を測定するための ELISA の説明

プレートを、100 μl / ウエルの、炭酸バッファー pH 9.6 中、2 μg / ml の PD (1 mg / ml)、2 μg / ml の PE (1500 μg / ml)、2 μg / ml の Pi1A (3660 μg / ml) で 4 にて一晩コーティングした。これらのプレートを NaCl 0.9% ポリソルベート 20 0.05% で 4 回洗浄した。PE および Pi1A ELISA に関しては、プレートを室温で 30 分間 (振盪しながら) PBS - BSA 1% で飽和させた。洗浄後、「マウスにおける 3 種のワクチン製剤の免疫原性」と題された節に記載の通りに免疫したマウス由来の血清または参考 (Chrompure マウス IgG で較正した内部参照) をマイクロウェルに加え、PBS ポリソルベート 20 0.05% (PD アッセイの場合) および PBS ポリソルベート 20 0.05% BSA 0.1% (PE および Pi1A アッセイの場合) で連続希釈して 100 μl とした(二倍希釈工程)。次に、これらのプレートを振盪しながら室温で 30 分間インキュベートした。洗浄後、プレートをペルオキシダーゼにコンジュゲートされた抗マウス IgG 抗体とともに (100 μl / ウエル) 振盪しながら室温で 30 分間インキュベートした。次に、これらのプレートを上記のように洗浄し、基質コンジュゲート (10 ml のクエン酸塩 0.1M pH 4.5~4.6 および 5 μl の H₂O₂ 中、4 mg の OPDA (オルトフェニレン - ジアミン)) を各ウェルに加え (100 μl)、暗所で 15 分間置いた。HCl 1N 50 μl の添加により反応を停止させ、490 nm (参考に関しては 620 nm) で吸光度を読み取った。

30

PhtD および dP1y 抗体を測定するための ELISA の説明

40

プレートを、100 μl / ウエルの 1 μg / ml の PhtD (1021 μg / ml) または 4 μg / ml の P1y (367 μg / ml) で 37 にて 2 時間コーティングした。次に、これらのプレートを NaCl 0.09% ポリソルベート 0.05% で 3 回洗浄した。洗浄後、「マウスにおける 3 種のワクチン製剤の免疫原性」と題された節に記載の通りに免疫したマウス由来の血清または参考 (Chrompure マウス IgG で較正した内部参照) をマイクロウェルに加え、PBS ポリソルベート 20 0.05% で連続希釈して 100 μl とした(二倍希釈工程)。次に、これらのプレートを振盪しながら室温で 30 分間インキュベートした。洗浄後、プレートをペルオキシダーゼにコンジュゲートされた抗マウス IgG 抗体とともに (100 μl / ウエル) 振盪しながら室温で 30 分間インキュベートした。これらのプレートを上記のように洗浄し、基質コンジュゲート (10 ml のクエン酸塩 0.1M pH 4.5~4.6 および 5 μl の H₂O₂ 中、4 mg の OPDA (オルトフェニレン - ジアミン)) を各ウェルに加え (100 μl)、暗所で 15 分間置いた。HCl 1N 50 μl の添加により反応を停止させ、490 nm (参考に関しては 620 nm) で吸光度を読み取った。

50

10 ml のクエン酸塩 0.1M pH 4.5 および 5 μl の H₂O₂ 中、4 mg の O P D A (オルトフェニレン - ジアミン)) を各ウェルに加え (100 μl) 、暗所で 15 分間置いた。H C l 1 N 50 μl の添加により反応を停止させ、490 nm (参照フィルターに関しては 620 nm) で吸光度を読み取った。

オプソニン化貪食作用アッセイ (O P A) の説明

血清サンプルを 56 度で 45 分間加熱して残存する内因性補体を不活性化した。各 1 : 2 希釀血清サンプルの 25 μl のアリコートを、96 ウェル丸底マイクロタイタープレートのウェル当たり 25 μl の O P A バッファー (H B S S (ハンクス平衡塩溶液) - 14.4 % 不活性化 F C S (ウシ胎児血清)) 中に二倍連続希釀した。次に、活性化 H L - 60 細胞 (1 × 10⁷ 細胞 / ml) 、新たに解凍した肺炎球菌ワーキングシードおよび新たに解凍したベビーウサギ補体の例えは、4 / 2 / 1 比 (v / v / v) (ただし、血清型 1、6 B および 6 A の場合、その比は 4 / 2 / 2 とした) の混合物 25 μl を希釀血清に加え、最終容量を 50 μl とした。このアッセイプレートを、オービタルシェーカー (210 rpm) を用い、37 度で 2 時間インキュベートし、貪食作用プロセスを促進した。マイクロプレートを氷上に少なくとも 1 分間置くことにより反応を停止させ、プレートは使用するまで氷上で維持した。次に、プレートの各ウェルの 20 μl アリコートを 96 ウェル平底マイクロプレートの対応するウェルに移し、50 μl の T o d d - H e w i t t ブロス - 0.9 % 寒天を各ウェルに加えた。37 度、5% CO₂ で一晩インキュベートした後、寒天内に現れた肺炎球菌コロニーを、自動画像解析システム (K S 400、Z e i s s、オーバーコッヘン、ドイツ) を用いて計数した。血清サンプルを含まない 8 ウェルを細菌対照として使用し、ウェル当たりの肺炎球菌の数を決定した。対照ウェルの C F U の平均数を決定し、各血清サンプルの殺傷活性の計算に用いた。血清サンプルの O P A 力価は、肺炎球菌の 50 % 殺傷を促すことができる血清の希釀率の逆数により決定した。オプソニン化貪食作用力価は、4 パラメーター曲線当てはめ解析を用いて計算した。

マウスにおける 3 種のワクチン製剤の免疫原性

2 試験区に分配した 2 群の 27 個体雌 B a l b / c マウスを、0、14 および 28 日目に 1 / 10 ヒト用量の、タンパク質単独 (P h t D、d P l y および P E P i l A) 、P r e v n a r 13 (商標) (市販の連鎖球菌ワクチン - 結果は示さず)、10 V、12 V (D S P 2 A 0 1 7) および 12 V + タンパク質 (D S P 2 A 0 1 2) G M P ロットを含む種々の製剤の筋肉内 (I M) 注射によって免疫した。マウスの違う肢に、1 / 10 ヒト用量の I n f a n r i x H e x a (商標) (ジフテリアトキソイド、破傷風トキソイド、百日咳トキソイド、線維状ヘマグルチニン、パートクチン、B 型肝炎表面抗原、不活性化 1、2 および 3 型ポリオウイルスならびにインフルエンザ菌 b 糖類 (P R P) を含むワクチン) を施した (臨床試験における乳幼児の異なる部位における併用投与を模倣)。

【0256】

42 日目に採取した個々の血清およびプールした血清においてそれぞれ抗 I g G レベルおよびオプソニン化貪食作用力価を決定した。

【0257】

12 V + タンパク質ワクチンの、I g G 抗体力価およびオプソニン化活性を誘導する能力を評価し、12 V および 10 V ワクチンの場合と比較した。

【0258】

種々の製剤を注射したマウス由来の血清を、多糖血清型およびタンパク質に対して E L I S A (上記のように) で試験し、また、12 の多糖血清型に対して O P A で試験した。

【0259】

12 V + タンパク質ワクチンは、ほとんどの血清型に対して 12 V に類似する応答を誘導した。

【0260】

図 31 の結果は、12 V + 製剤および肺炎球菌糖類コンジュゲートを含まなかった製剤に関して測定された P E、P i l A、P h t D、P l y および P D 抗体応答間に統計学的な差は無かったことを示した。

10

20

30

40

50

実施例23：モルモットにおける10V、12Vおよび12V+タンパク質ワクチンの免疫原性の比較

E L I S A 抗肺炎球菌多糖PSの説明

マイクロプレートを、 $100\mu l$ / ウェルの $2.5\mu g / ml$ の PS 1、 $5\mu g / ml$ の PS 4、5、6A、6B、7F、9V または $14; 10\mu g / ml$ の PS 19A および 23F、 $40\mu g / ml$ の PS 18C および PS 19F または参照ウェルに関しては PBS 中 $2\mu g / ml$ に希釈した Affinipure ヤギ抗モルモット IgG ($2.4\text{mg} / ml$) で 37°にて 2 時間コーティングした。これらのプレートを NaCl 150 mM (0.9%) - ポリソルベート 20 0.05% で 3 回洗浄した。各群からプールした血清を、CPS ($2.5\text{mg} / ml$ の 6A および 6B 以外は $1\text{mg CPS} / ml$ の無希釈血清) V/V を含有する PBS - ポリソルベート 20 0.05% 中に希釈し (PS 6A および 6B に関しては 1/2、他の全ての血清型に関しては 1/10)、CPS に対する抗体を中和させるために 37°で 1 時間インキュベートした。「モルモットにおける 3 種のワクチン製剤の免疫原性」と題された節に記載の通りに免疫したモルモット由来の血清をマイクロウェルに加え、PBS - ポリソルベート 20 0.05% で連続希釈して $100\mu l$ とするか (二倍希釈工程)、または参照 (PBS - ポリソルベート 20 0.05% で $0.25\mu g / ml$ に希釈した Chromopure モルモット IgG ($11\text{mg} / ml$) を加えた。これらのプレートを振盪下、室温で 30 分間インキュベートした。これらのプレートを上記のように洗浄し、ペルオキシダーゼにコンジュゲートされた抗モルモット IgG 抗体 ($100\mu l$ / ウェル) を加え、プレートを振盪しながら室温で 30 分間インキュベートした。洗浄後、基質 (10ml のクエン酸塩 0.1M pH 4.5 ~ 4.6 および $5\mu l$ の H₂O₂ 中、 4mg の OPDA) を各ウェルに加え ($100\mu l$)、暗所で 15 分間インキュベートした。HCl 1N を添加することにより反応を停止させた。分光光度計を用い、490 nm (参照に関しては 620 nm) で吸光度を読み取った。発色は、血清中に存在する抗体の量に正比例する。

抗PD、PE、およびPilA抗体を測定するためのELISAの説明

プレートを、 $100\mu l$ / ウェルの、PBS 中の炭酸バッファー pH 9.6 中、 $2\mu g / ml$ の PD ($1\text{mg} / ml$)、 $2\mu g / ml$ の PE ($1500\mu g / ml$)、または $2\mu g / ml$ の PilA ($3660\mu g / ml$) または参照ウェルに関しては PBS 中 $2\mu g / ml$ に希釈した Affinipure ヤギ抗モルモット IgG ($2.4\text{mg} / ml$) で 37°にて 2 時間コーティングした。これらのプレートを NaCl 0.9% ポリソルベート 20 0.05% で 4 回洗浄した。PE および PilA ELISA については (この工程は PD および PilY ELISA については実施しなかった)、プレートを室温で 30 分、PBS - BSA 1% で飽和させた。洗浄後、「モルモットにおける 3 種のワクチン製剤の免疫原性」と題された節に記載の通りに免疫したモルモット由来の血清または参照血清サンプル (Chromopure モルモット IgG で較正した内部標準) をマイクロウェルに加え、PBS ポリソルベート 20 0.05% (PD ELISA の場合) および PBS ポリソルベート 20 0.05% BSA 0.1% (PE および PilA ELISA の場合) 中に連続希釈して $100\mu l$ とした (二倍希釈工程)。これらのプレートを室温で 30 分間インキュベートした。洗浄後、プレートをペルオキシダーゼにコンジュゲートされた抗モルモット IgG 抗体 ($100\mu l$ / ウェル) とともに振盪しながら室温で 30 分間インキュベートした。プレートを上記のように洗浄し、基質コンジュゲート (10ml のクエン酸塩 0.1M pH 4.5 ~ 4.6 および $5\mu l$ の H₂O₂ 中、 4mg の OPDA) を各ウェルに加え ($100\mu l$)、暗所で 15 分間置いた。HCl 1N 50 μl を添加することにより反応を停止させ、490 nm (参照フィルターに関しては 620 nm) で吸光度を読み取る。

PhtD および dPly 抗体を測定するためのELISAの説明

プレートを、 $100\mu l$ / ウェルの、PBS 中 $1\mu g / ml$ の PhtD ($1021\mu g / ml$) または $2\mu g / ml$ Ply ($376\mu g / ml$) で 37°にて 2 時間コーティングした。次に、これらのプレートを NaCl 0.9% ポリソルベート 20 0.0

5 %で4回洗浄した。洗浄後、「モルモットにおける3種のワクチン製剤の免疫原性」と題された節に記載の通りに免疫したモルモット由来の血清または参照(Chromopur-eモルモットIgGで較正した内部標準)をマイクロウェルに加え、PBSポリソルベート20 0.05%中に連続希釈して100μlとした(二倍希釈工程)。これらのプレートを振盪しながら室温で30分間インキュベートした。洗浄後、プレートをペルオキシダーゼにコンジュゲートされた抗モルモットIgG抗体(100μl/ウェル)とともに振盪しながら室温で30分間インキュベートした。プレートを上記のように洗浄し、基質コンジュゲート(10m1のクエン酸塩0.1M pH4.5~4.6および5μlのH₂O₂中、4mgのOPDA)を各ウェルに加え(100μl)、暗所で15分間置いた。HCl 1N 50μlを添加することにより反応を停止させ、490nm(参照フィルターに関しては620nm)で吸光度を読み取った。

オプソニン化貪食作用アッセイ

血清サンプルを56で45分間加熱して残存する内因性補体を不活性化した。各1:2希釈血清サンプルの25μlのアリコートを、96ウェル丸底マイクロタイヤープレートのウェル当たり25μlのOPAバッファー(HBSS(ハンクス平衡塩溶液)-14.4%不活性化FCS(ウシ胎児血清))中に二倍連続希釈した。次に、活性化HL-60細胞(1×10⁷細胞/m1)、新たに解凍した肺炎球菌ワーキングシードおよび新たに解凍したベビーウサギ補体の例えは、4/2/1比(v/v/v)(ただし、血清型1、6Bおよび6Aの場合、その比は4/2/2とした)の混合物25μlを希釈血清に加え、最終容量を50μlとした。このアッセイプレートを、オービタルシェーカー(210rpm)を用い、37で2時間インキュベートし、貪食作用プロセスを促進した。マイクロプレートを氷上に少なくとも1分間置くことにより反応を停止させた(プレートはさらなる使用まで氷上で維持しなければならない)。次に、プレートの各ウェルの20μlアリコートを96ウェル平底マイクロプレートの対応するウェルに移し、50μlのTodd-Hewittプロス-0.9%寒天を各ウェルに加えた。37、5%CO₂で一晩インキュベートした後、寒天内に現れた肺炎球菌コロニーを、自動画像解析システム(KS 400、Zeiss、オーバーコッヘン、ドイツ)を用いて計数した。血清サンプルを含まない8ウェルを細菌対照として使用し、ウェル当たりの肺炎球菌の数を決定した。対照ウェルのCFUの平均数を決定し、各血清サンプルの殺傷活性の計算に用いた。血清サンプルのOPA力価は、肺炎球菌の50%殺傷を促すことができる血清の希釈率の逆数により決定した。オプソニン化貪食作用力価は、4パラメーター曲線当てはめ解析を用いて計算した。

モルモットにおける3種の製剤の免疫原性

2試験区に分配した2群の17個体モルモットを、0、14および28日目に、1/4ヒト用量の、タンパク質単独(PhytD、dPlyおよびPEP1A)、Prevnar 13(商標)(市販の連鎖球菌ワクチン-結果は示さず)、10V、12V(DSP2A017)および12V+タンパク質(DSP2A012)GMPロットを含む種々の製剤の筋肉内(IM)注射によって免疫した。モルモットの違う肢に、ヒト用量の1/4のInfanrix Hexa(商標)(ジフテリアトキソイド、破傷風トキソイド、百日咳トキソイド、線維状ヘマグルチニン、パートクチン、B型肝炎表面抗原、不活性化1、2および3型ポリオウイルス、ならびにインフルエンザ菌b糖類(PPR)を含むワクチン)を施した(臨床試験における乳幼児の異なる部位における併用投与を模倣)。

【0261】

42日目に採取した個々の血清およびブールした血清においてそれぞれ抗IgGレベルおよびオプソニン化貪食作用力価を決定した。

【0262】

IgG抗体力価およびオプソニン化活性を評価し、12V+タンパク質、12Vおよび10Vワクチン間で比較した。

【0263】

種々の製剤を注射したモルモット由来の血清を、多糖血清型およびタンパク質に対して

10

20

30

40

50

E L I S A で試験し、また、製剤中の 12 の多糖血清型に対して O P A で試験した。

【 0 2 6 4 】

12 V + タンパク質は、12 V 製剤に類似する応答を誘導した。

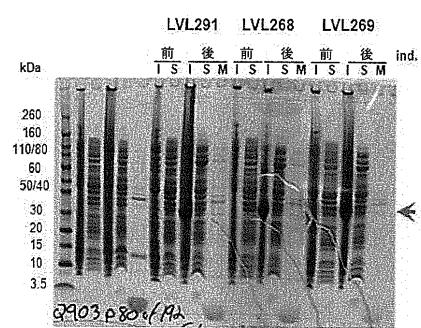
【 0 2 6 5 】

図 34 の結果は、P E P i 1 A と組み合わせた場合に、12 倍コンジュゲートの免疫原性に対して負の影響は無いことを示した。

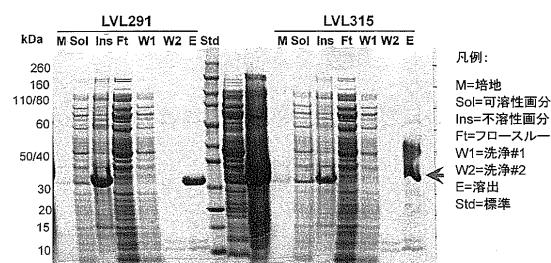
【 0 2 6 6 】

12 V + タンパク質 G M P 製剤で得られた結果は、10 V 多糖ならびにタンパク質の免疫原性を実証し、この製剤の臨床評価を裏付ける。

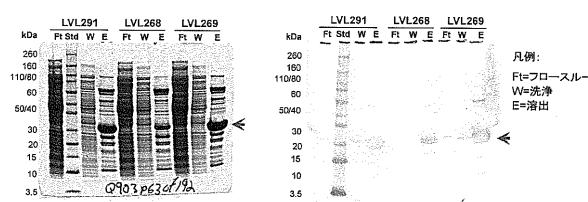
【 図 1 】



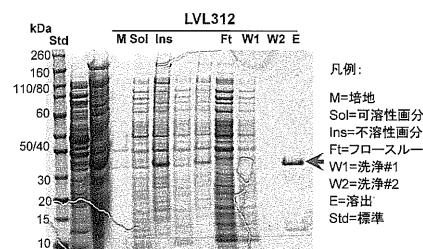
【 図 3 】



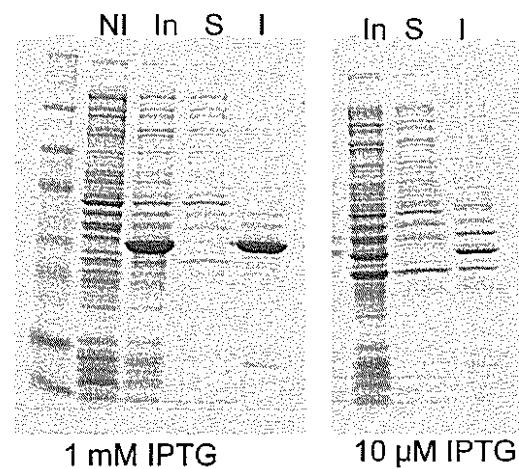
【 図 2 】



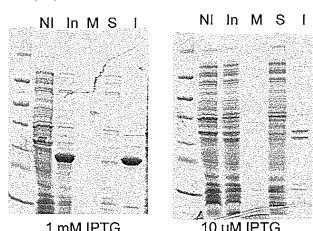
【 図 4 】



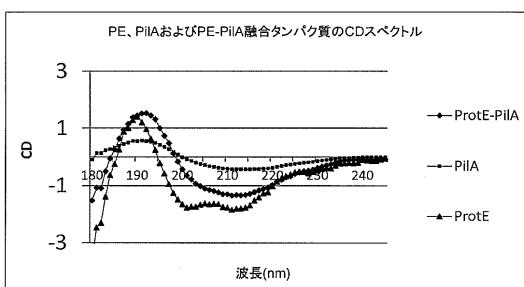
【図5】



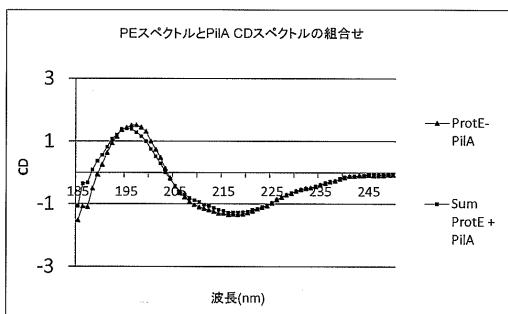
【図6】



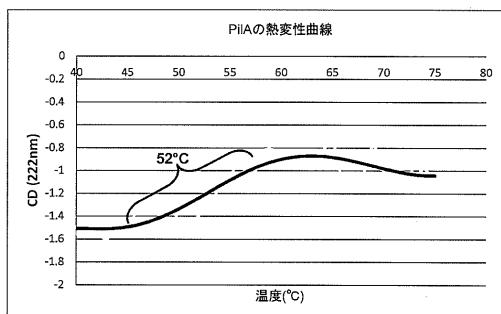
【図7】



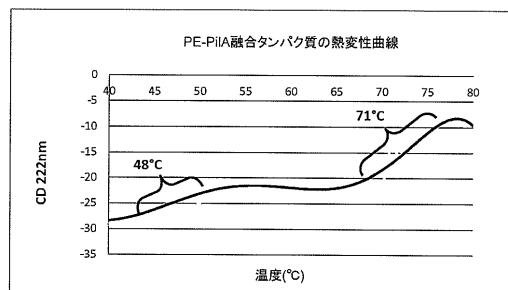
【図8】



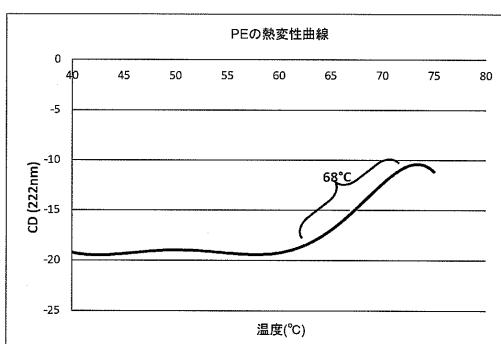
【図9】



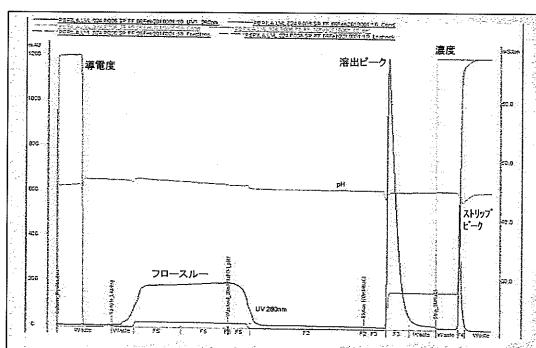
【図11】



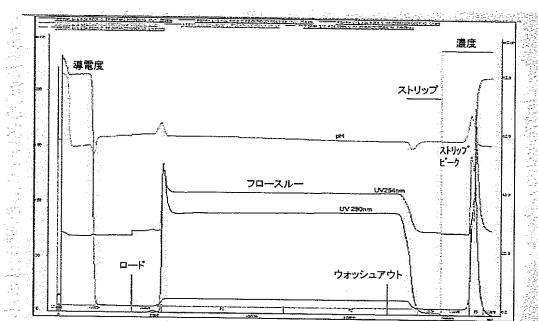
【図10】



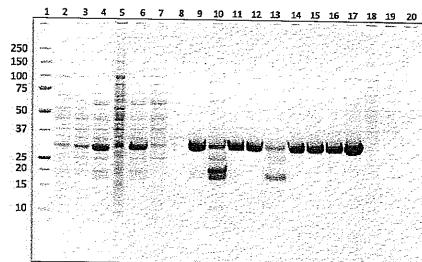
【図12】



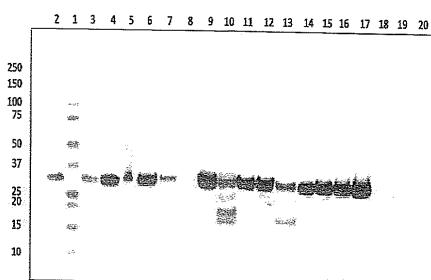
【図13】



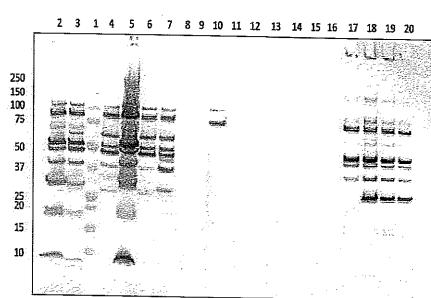
【図14】



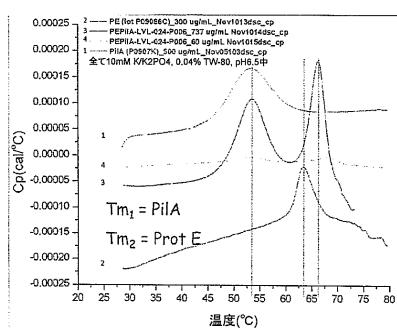
【図15】



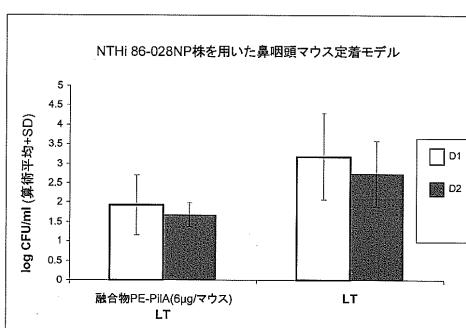
【図16】



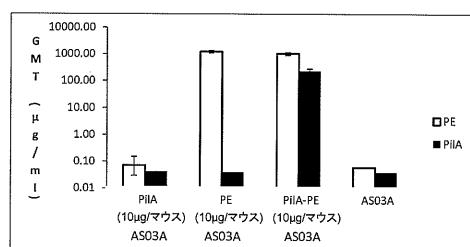
【図17】



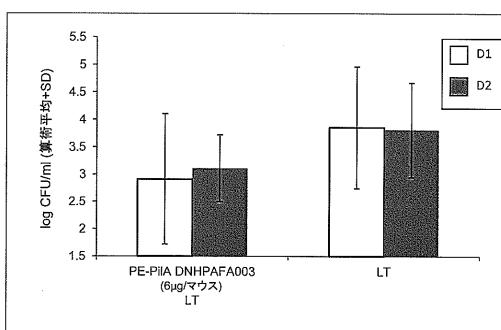
【図19】



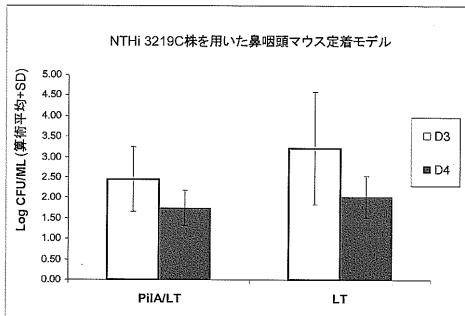
【図18】



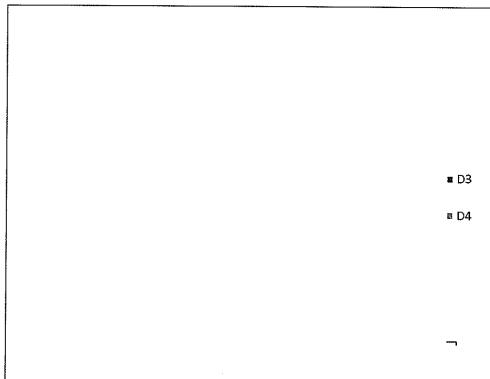
【図20】



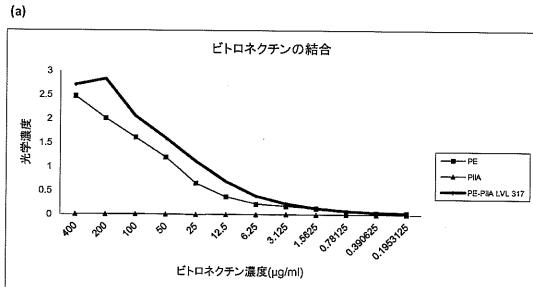
【図21】



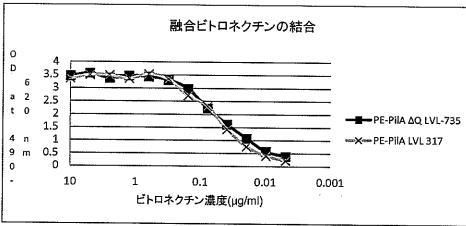
【図22】



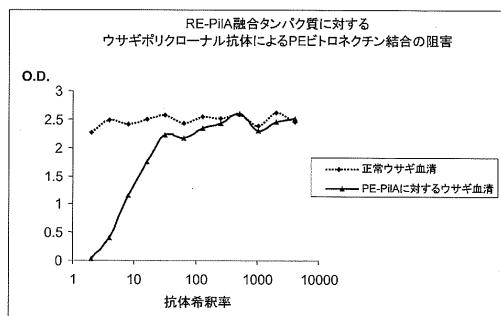
【図23】



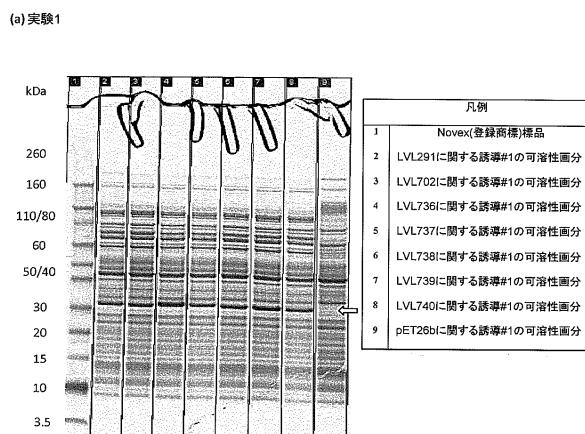
(b)



【図24】

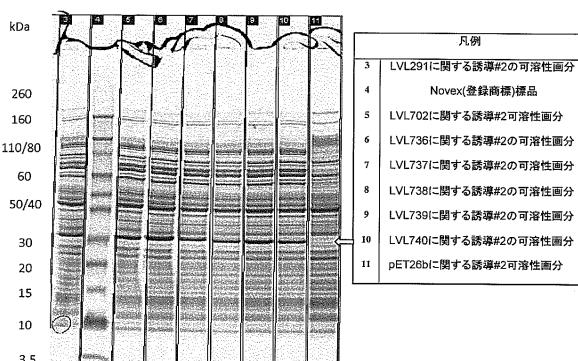


【図25a】



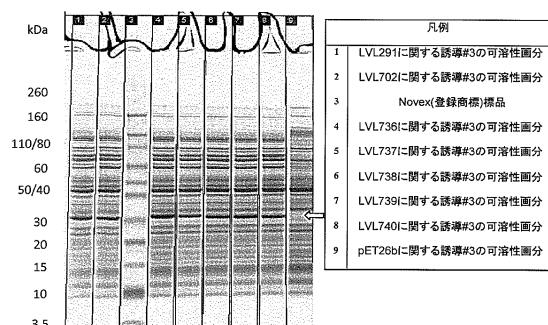
【図25b】

(b) 実験2

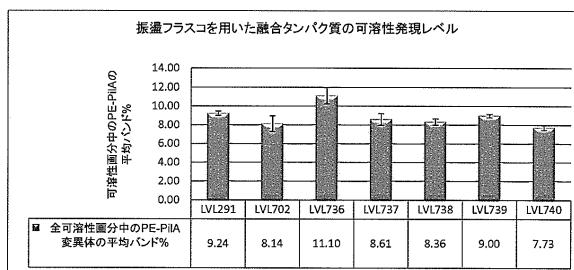


【図25c】

(c) 実験3

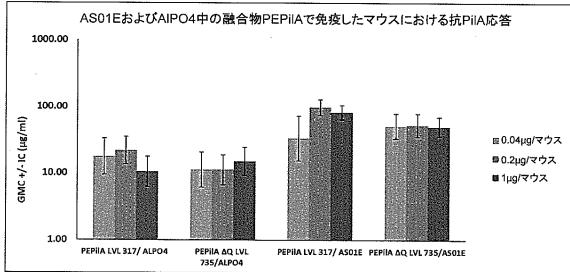
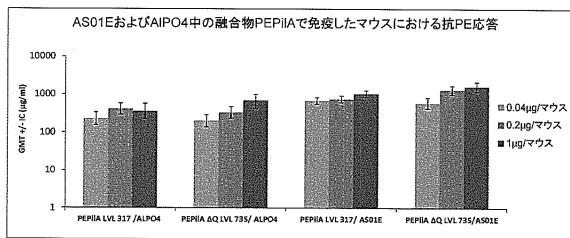


【図26】

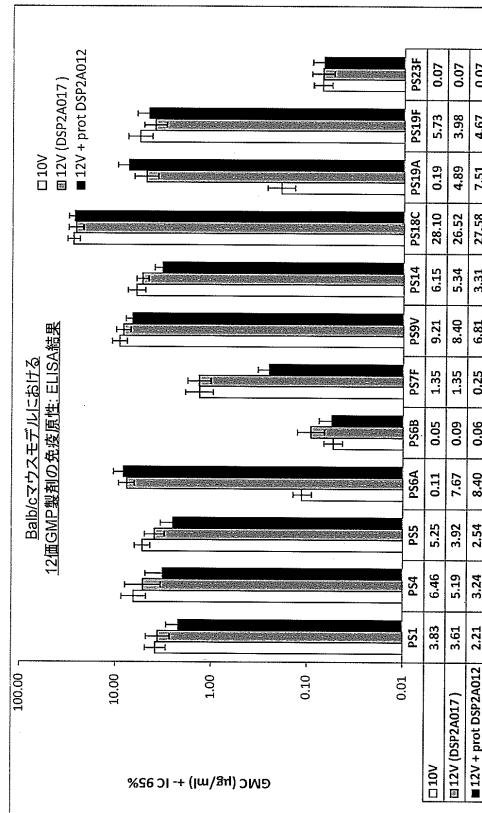


構築物ID	%融合タンパク質 ゲル#1	%融合タンパク質 ゲル#2	%融合タンパク質 ゲル#3	平均融合 タンパク質%	SD偏差
LVL291	9.3	8.98	9.43	9.24	0.231588716
LVL702	7.2	8.85	8.37	8.14	0.848704896
LVL736	11.16	10.2	11.94	11.10	0.871550343
LVL737	8.18	8.33	9.32	8.61	0.619435227
LVL738	8.56	8.55	7.97	8.36	0.337786915
LVL739	8.91	8.88	9.21	9.00	0.182482876
LVL740	7.69	7.49	8	7.73	0.256969518

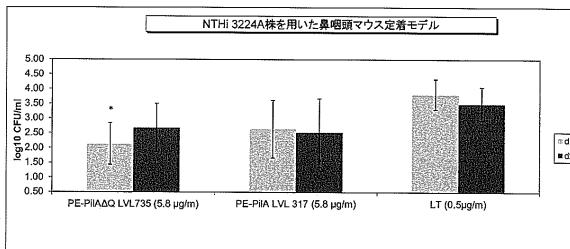
【図27】



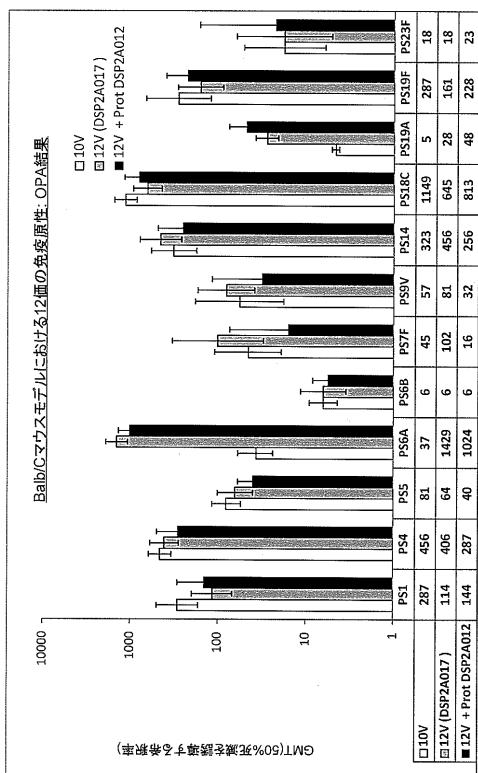
【図29】



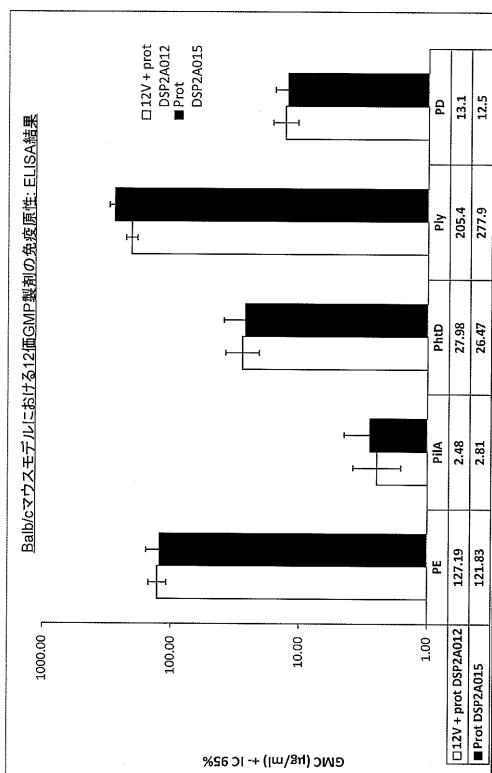
【図28】



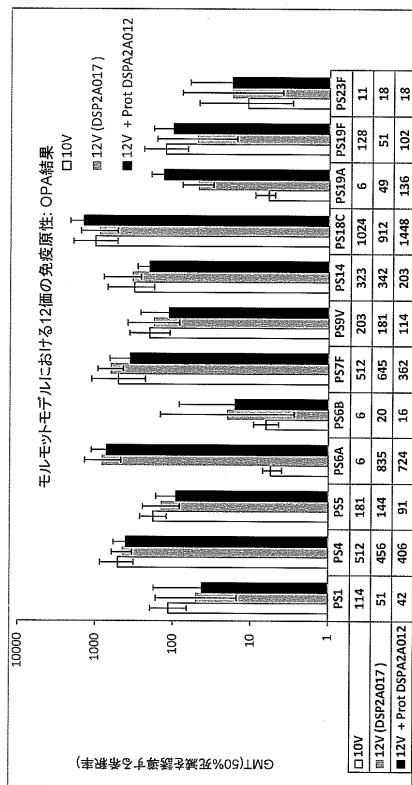
【図 3 0】



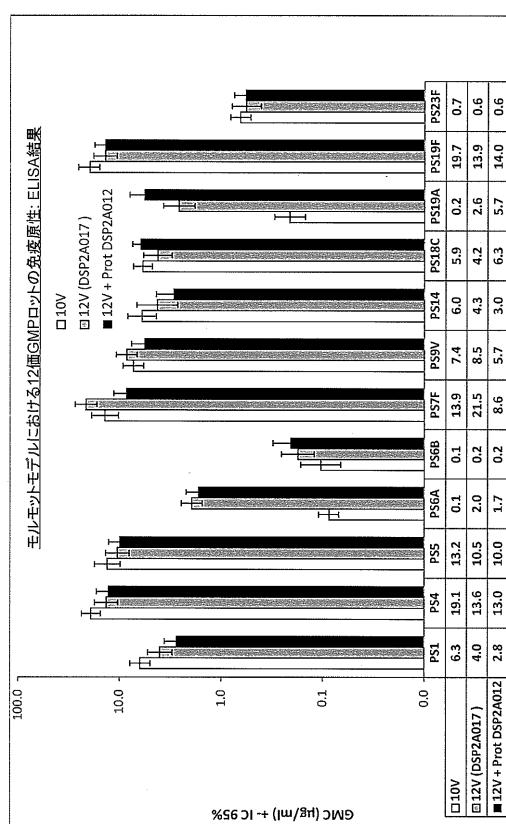
【図 3 1】



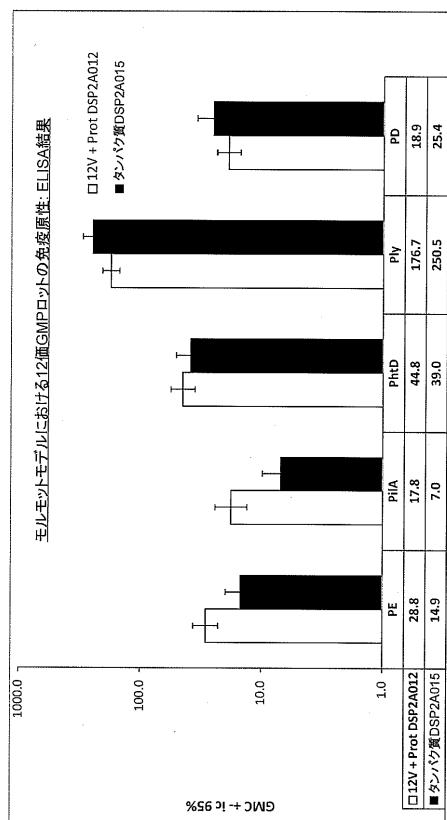
【図 3 2】



【図 3 3】



【図 3 4】



【配列表】

0006236086000001.app

 フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I
C 0 7 K 14/285	(2006.01) C 0 7 K 14/285
C 0 7 K 14/315	(2006.01) C 0 7 K 14/315

(31)優先権主張番号 61/714,956
(32)優先日 平成24年10月17日(2012.10.17)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 13/826,696
(32)優先日 平成25年3月14日(2013.3.14)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 13/826,932
(32)優先日 平成25年3月14日(2013.3.14)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 13/827,203
(32)優先日 平成25年3月14日(2013.3.14)
(33)優先権主張国 米国(US)

(74)代理人 100144794
弁理士 大木 信人
(72)発明者 セディア , フランチェスカ
ベルギー ベー - 1300 ワーフェル , アベニュ フルミング 20 , 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
(72)発明者 ハウスドルフ , ウィリアム ポール
ベルギー ベー - 1300 ワーフェル , アベニュ フルミング 20 , 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
(72)発明者 ヴェルラント , ヴィンセント
ベルギー ベー - 1300 ワーフェル , アベニュ フルミング 20 , 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
(72)発明者 イスパアート , カリーヌ
ベルギー ベー - 1330 リクセンサール , リュ ドランステイテュ 89 , 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

審査官 山村 祥子

(56)参考文献 特表2010-531331 (JP, A)
特表2009-500037 (JP, A)
特表2009-523790 (JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
A 61 K 39 / 09
A 61 K 39 / 07
A 61 K 39 / 08
A 61 P 31 / 04
C 07 K 14 / 285
C 07 K 14 / 315
C 07 K 19 / 00
Caplus / MEDLINE / EMBASE / BIOSIS (STN)