

(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 I	
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 O 7 K 19/00 (2006.01)	C O 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)	(73) 特許権者	305060279
(86) (22) 出願日	平成25年10月15日 (2013.10.15)		グラクソスミスクライン バイオリジカル
(65) 公表番号	特表2015-536312 (P2015-536312A)		ズ ソシエテ アノニム
(43) 公表日	平成27年12月21日 (2015.12.21)		ベルギー ベー ー 1 3 3 0 リクセンサー
(86) 国際出願番号	PCT/EP2013/071472		ル リュ ドランスティテュ 8 9
(87) 国際公開番号	W02014/060383	(74) 代理人	100091096
(87) 国際公開日	平成26年4月24日 (2014.4.24)		弁理士 平木 祐輔
審査請求日	平成28年9月16日 (2016.9.16)	(74) 代理人	100118773
(31) 優先権主張番号	1218660.7		弁理士 藤田 節
(32) 優先日	平成24年10月17日 (2012.10.17)	(74) 代理人	100122389
(33) 優先権主張国	英国 (GB)		弁理士 新井 栄一
(31) 優先権主張番号	61/714, 942	(74) 代理人	100111741
(32) 優先日	平成24年10月17日 (2012.10.17)		弁理士 田中 夏夫
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(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、1 0、1 5、2 0、2 5、3 0 または 5 0 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  
式 I :

$$(X)m - (R1)n - A - (Y)o - B - (Z)p \quad (\text{式 I})$$

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。

【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 ~ 1 0 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【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 ~ 1 1 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 ~ 1 2 のいずれ

10

20

30

40

50

か一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 1 4】

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 ~ 1 3 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項 1 5】

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 ~ 1 4 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

10

【請求項 1 6】

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 ~ 1 5 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

20

【請求項 1 7】

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 末端切断型、L y t X (自己分解酵素) ファミリー、L y t X 末端切断型、C b p X 末端切断型 - L y t X 末端切断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 ~ 1 6 のいずれか 1 項に記載の免疫原性組成物。

30

【請求項 1 8】

請求項 1 ~ 1 7 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 1 9】

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 ~ 1 7 のいずれか一項に記載の免疫原性組成物または請求項 1 8 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 2 0】

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 (QIQKAEQN DVKLAPPTDV RSGYIRLVKN VNYIIDSESI WVDNQEPQIV HFDVAVNLDK GL YVYPEPKR YARSVRQYKI LNCANYHLTQ VRTDFYDEFW GGGLRAAPKK QKKHTLSLTP DTTLYNAAQI ICANY GEAFS VDKKGGTKKA AVSELLQASA PYKADVELCV YSTNETTCT GKGNGIAADI TTAGYVKS SV TTSNGAIT VK GDGTLANMEY ILQATGNAAT GVTWTTTCKG TDASLFANF CGSVTQ) 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 2 1】

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 2 1 9 (IQKAEQND VKLAPPTDVR SGYIRLVKNV NYYIDSESIW VDNQEPQ IVH FDAVVNLDKG L YVYPEPKRY ARSVRQYKIL NCANYHLTQV RTDFYDEFWG QGLRAAPKKQ KKHTLSLTPD TTLYNAAQII CANY GEAFSV DKKGGTKKAA VSELLQASAP YKADVELCVY STNETTNCTG GKNGLAADIT TAKGYVKSVT TSNGAIT VKG DGTLANMEYI LQATGNAATG VTWTTTCKGT DASLFANFC 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 P i l A を含む、免疫原性組成物に関する。

【背景技術】

【0002】

無莢膜型インフルエンザ菌(non-typeable *Haemophilus influenzae*) ( N T H i ) は、乳幼児および小児に中耳炎を引き起こす重要かつ一般的な呼吸器系の病原体である。N T H i 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))。N T H i 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 11:177-182 (2009))。N T H i は、成人における慢性閉塞性肺疾患( C O P D ) 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 3:109-115 (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 11:177-182 (2009))。

【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 , 0 0 0 症例の髄膜炎、5 0 , 0 0 0 症例の菌血症、5 0 0 , 0 0 0 症例の肺炎、および 7 , 0 0 0 , 0 0 0 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。

【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(Invasive pneumococcal diseases) ( I P D ) 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)。

【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 2 0 0 5 年におよそ死者 2 0 人に 1 人が基礎原因として C O P D を有していた( Drugs and Aging 26:985-999 (2009))。2 0 2 0 年には C O P D 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

(Lancet 349:1498-1504 (1997))。

【 0 0 0 6 】

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。

【 0 0 0 7 】

タンパク質 E ( P E ) は、接着特性を有する外膜リポタンパク質である。 P E は、無莢膜型インフルエンザ菌 ( N T H i ) 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))。 P E 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 R d と比較して、異なるヘモフィルス種には 1 3 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 2 0 0  
7 / 0 8 4 0 5 3 号 ) 。

10

【 0 0 0 8 】

タンパク質 E はまた、結合ピ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 ( I  
mmunology 183: 2593-2601 (2009))。 P E は、結合ドメイン 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 ( 配列番号 1、配列番号 4 のアミノ酸 8 4 ~ 1 0 8 に相当  
 ) により、終末補体経路の重要な阻害剤であるピトロネクチンと結合する ( J . Immunology  
183:2593-2601 (2009))。

【 0 0 0 9 】

20

ピリン ( Pilin ) A ( P i l A ) は、おそらくツイッティング運動 ( twitching motility )  
に関与するインフルエンザ菌 I V 型 P i l u s ( T f p ) 絨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))。 N T H i P i l  
A は、 i n v i v o で発現される保存されたアドヘシンである。 N T H i 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))。

【 0 0 1 0 】

本発明者らは、 P i l A および P E 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 P i l A お  
よびタンパク質 E を添加することができることを見出した。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 ) 。

30

【 先行技術文献 】

【 特許文献 】

【 0 0 1 1 】

【 特許文献 1 】 国際公開第 2 0 0 7 / 0 8 4 0 5 3 号

【 非特許文献 】

【 0 0 1 2 】

40

【 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: S  
11

【 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

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

【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 P i l A、P E (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 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が提供される。

【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。

【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。

【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。

10

20

30

40

50

## 【図面の簡単な説明】

## 【0022】

【図1】融合タンパク質構築物LV L 2 9 1、LV L 2 6 8およびLV L 2 6 9に関する誘導細菌抽出物のSDS - PAGE。誘導(ind)前後のLV L 2 9 1、LV L 2 6 8およびLV 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。

【図2】融合タンパク質構築物LV L 2 9 1、LV L 2 6 8およびLV L 2 6 9の精製抽出物に関するSDS - PAGEおよびウエスタンブロット。LV L 2 9 1、LV L 2 6 8およびLV L 2 6 9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LV L 2 9 1およびLV L 3 1 5に関する誘導細菌抽出物および精製抽出物のSDS - PAGE。LV L 2 9 1およびLV L 3 1 5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LV L 3 1 2に関する誘導細菌抽出物および精製抽出物のSDS - PAGE。LV L 3 1 2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LV L 3 1 7に関する誘導(1 mMおよび10  $\mu$ M 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LV L 3 1 8に関する誘導(1 mMおよび10  $\mu$ M 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、Pil AおよびPE - Pil A融合タンパク質のCDスペクトル。

【図8】PEおよびPil A CDスペクトルの組合せ。

【図9】Pil Aの熱変性曲線。

【図10】PEの熱変性曲線。

【図11】PE - Pil A融合タンパク質の熱変性曲線。

【図12】典型的なS Pセファロース(商標)ファーストフクロマトグラム。

30

【図13】典型的なQセファロース(商標)ファーストフクロマトグラム。

【図14】PE - Pil A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 - Pil A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ブロット。ウサギポリクローナル抗PEを用いたブロット。

【図16】PE - Pil A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ブロット。ウサギポリクローナル抗大腸菌(E.coli)(BLR)を用いたブロット。

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

40

【図18】Balb/cマウスモデルにおけるLV L 2 9 1 PE - Pil A融合タンパク質ならびに一価PEおよびPil Aに対する抗体応答。

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

【図20】マウス鼻咽頭におけるNTHi 3224 A細菌株のクリアランスに対するPE - Pil A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Pil A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LVL317 PE-PilA融合タンパク質の結合および(b) LVL317およびビトロネクチンに対するLVL735 PE-PilA融合タンパク質の結合。

【図24】PE-PilA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LVL291、LVL702、LVL736、LVL737、LVL738、LVL739、LVL740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-PilA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LVL291、LVL702、LVL736、LVL737、LVL738、LVL739、LVL740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-PilA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LVL291、LVL702、LVL736、LVL737、LVL738、LVL739、LVL740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-PilA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パーセンテージ。

【図27】LVL317およびLVL735に対するPEおよびPilA抗体応答。

【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LVL735およびLVL317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 tD、dPl yおよびPE-PilA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 tD、dPl yおよびPE-PilA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 = 幾何平均力価。

【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 tD、dPl yおよびPE-PilAを含む組成物(12V+prot)と、Ph tD、dPl yおよびPE-PilAのみを含む組成物(prot)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 tD、dPl yおよびPE-PilA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 = 幾何平均力価。

【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 tD、dPl yおよびPE-PilA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。

【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 tD、dPl yおよびPE-PilAを含む組成物(12V+prot)と、Ph tD、dPl yおよびPE-PilAのみを含む組成物(prot)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】

10

20

30

40

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P i l A（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P i l A（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、P i l A単独、タンパク質Eの免疫原性断片単独、P i l Aの免疫原性断片単独、タンパク質EとP i l A、タンパク質Eの免疫原性断片とP i l A、タンパク質Eの免疫原性断片とP i l Aの免疫原性断片またはタンパク質EとP i l A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 (MKKII LTSL GLLTACSAQI QKAEQNDVKL APPTDVRSGY IRL VKNVNY IDSESIWVDN QEPQIVHFDA VVNLDKGLYV YPEPKRYARS VRQYKILNCA NYHLTQVRTD FYDEFW GQGL RAAPKKQKKH TSLTPDRTL YNAAQI IICAN 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とおおよそ77%～おおよそ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ずれか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】

【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	MKKIILTLSLGLLTACSAQIQKAKQNDVKLAPPTDVRSGYIRLVKNVNYIDSES IWVDNQEPQIVHFDVAVNLDKGLYVYPEPKRYARSVRQYKILNCANYHLTQV RTDFYDEFWGGQLRAAPKKQKKHTLSLTPDITLYNAAQIICANYGEAFSVDK K (配列番号 5)
RdKW20	MKKIILTLSLGLLTACSAQIQKAEQNDVKLAPPTDVRSGYIRLVKNVNYIDSES IWVDNQEPQIVHFDVAVNLDKGLYVYPEPKRYARSVRQYKILNCANYHLTQIR TDFYDEFWGGQLRAAPKKQKKHTLSLTPDITLYNAAQIICANYGKAFSVDKK (配列番号 6)
86-028NP	MKKIILTLSLGLLTACSAQIQKAKQNDVKLAPPTDVRSGYIRLVKNVNYIDSES IWVDNQEPQIVHFDVAVNLDKGLYVYPEPKRYARSVRQYKILNCANYHLTQV RTDFYDEFWGGQLRAAPKKQKKHTLSLTPDITLYNAAQIICANYGEAFSVDK K (配列番号 7)
R2846	MKKIILTLSLGLLTACSAQIQKAEQNDVKLAPPTDVRSGYIRLVKNVNYIDSES IWVDNQEPQIVHFDVAVNLDKGLYVYPEPKRYARSVRQYKILNCANYHLTQV RTDFYDEFWGGQLRAAPKKQKKHTLSLTPDITLYNAAQIICANYGKAFSVDK K (配列番号 8)
R2866	MKKIILTLSLGLLTACSAQIQKAEQNDVKLAPPTDVRSGYIRLVKNVNYIDSES IWVDNQEPQIVHFDVAVNLDKGLYVYPEPKRYARSVRQYKILNCANYHLTQV RTDFYDEFWGGQLRAAPKKQKKHTLSLTPDITLYNAAQIICANYGKAFSVDK K (配列番号 9)
3655	MKKIILTLSLGLLTACSAQIQKAEQNDMKLAPPTDVRSGYIRLVKNVNYIDSE SIWVDNQEPQIVHFDVAVNLDKGLYVYPEPKRYARSVRQYKILNCANYHLTQ VRTDFYDEFWGGQLRAAPKKQKKHTLSLTPDITLYNAAQIICANYGKAFSVD KK (配列番号 10)
PittAA	MKKIILTLSLGLLTACSAQIQKAKQNDVKLAPPTDVRSGYIRLVKNVNYIDSES IWVDNQEPQIVHFDVAVNLDKGLYVYPEPKRYARSVRQYKILNCANYHLTQV RTDFYDEFWGGQLRAAPKKQKKHTLSLTPDITLYNAAQIICANYGEAFSVDK K (配列番号 11)
PittEE	MKKIILTLSLGLLTACSAQIQKAEQNDMKLAPPTDVRSGYIRLVKNVNYIDSE SI-VDNQEPQ IVHFDVAVNLDKGLYVYPEPKRYARSVRQYKILNCANYHLTQVRTDFYDEFW GGQLRAAPKKQKKHTLSLTPDITLYNAAQIICANYGKAFSVDKK (配列番号 12)
PittHH	MKKIILTLSLGLLTACSAQIQKAEQNDVKLAPPTDVRSGYIRLVKNVNYIDSES IWVDNQEPQIVHFDVAVNLDKGLYVYPEPKRYARSVRQYKILNCANYHLTQV RTDFYDEFWGGQLRAAPKKQKKHTLSLTPDITLYNAAQIICANYGKAFSVDK K (配列番号 13)
PittII	MKKIILTLSLGLLTACSAQIQKAEQNDVKLAPPTDVRSGYIRLVKNVNYIDSES IWVDNQEPQIVHFDVAVNLDKGLYVYPEPKRYARSVRQYKILNCANYHLTQV RTDFYDEFWGGQLRAAPKKQKKHTLSLTPDITLYNAAQIICANYGKAFSVDK

10

20

30

40

50

	K (配列番号 14)
R3021	MKKIILTLSLGLLTACSAQTQKAEQNDVKLTPTDVQSGYVRLVKNVNYIDSE SIWVDNQEPQIVHFDVAVNLDKGLYVYPEPKRYARSVRQYKILNCANYHLTQ VRIDFYDEFWQGLRAAPKKQKKHTLSLTPDTTLYNAAQIICANYGKAFSVDK NKKICT-LISLNFQILLGCREYSIFLQLLLFYC WHF (配列番号 15)
22.4-21	MKKIILTLSLGLLTACSAQIQKAEQNDVKLAPPTDVRSGYIRLVKNVNYIDSES IWVDNQEPQIVHFDVAVNLDKGLYVYPEPKRYARSVRQYKILNCANYHLTQV RTDFYDEFWQGLRAAPKKQKKHTLSLTPDTTLYNAAQIICANYGKAFSVDK KIKKICTLISLNFQILLGCREYSIFLQLLLFYCWHF (配列番号 16)
3219C	MKKIILTLSLGLLTACSAQIQKAEQNDMKLAPPTDVRSGYIRLVKNVNYIDSE SIWVDNQEPQIVHFDVAVNLDKGLYVYPEPKRYARSVRQYKILNCANYHLTQ VRTDFYDEFWQGLRAAPKKQKKHTLSLTPDTTLYNAAQIICANYGKAFSVD KK (配列番号 17)
3185	MKKIILTLSLGLLTACSAQIQKAEQNDVKLAPPTDVRSGYIRLVKNVNYIDSES IWVDNQEPQIVHFDVAVNLDKGLYVYPEPKRYARSVRQYKILNCANYHLTQV RTDFYDEFWQGLRAAPKKQKKHTLSLTPDTTLYNAAQIICANYGKAFSVDK K (配列番号 18)
3241A	MKKIILTLSLGLLTACSAQIQKAKQNDVKLAPPTDVRSGYIRLVKNVNYIDSES IWVDNQEPQIVHFDVAVNLDKGLYVYPEPKRYARSVRQYKILNCANYHLTQV RTDFYDEFWQGLRAAPKKQKKHTLSLTPDTTLYNAAQIICANYGEAFSVDK K (配列番号 19)
038144S1	MKKIILTLSLGLLTACSAQTQKVEQNDVKLTAPT DVRSGFVRLVKNVNYIDSE SIWVDNQEPQIVHFDVAVNLDKGLYVYPEPKRYARSVRQYKILNCANYHLTQ VRTDFYDEFWQGLRAAPKKQKKHTLSLTPDTTLYNAAQIICANYGKAFLVDK K (配列番号 20)
810956	MKKIILTLSLGLLTACSAQIQKAKQNDVKLAPPTDVRSGYIRLVKNVNYIDSES IWVDNQEPQIVHFDVAVNLDKGLYVYPEPKRYARSVRQYKILNCANYHLTQV RTDFYDEFWQGLRAAPKKQKKHTLSLTPDTTLYNAAQIICANYGEAFSVDK K (配列番号 21)
821246	MKKIILTLSLGLLTACSAQIQKAEQNDVKLAPPTDVRSGYIRLVKNVNYIDSES IWVDNQEPQIVHFDVAVNLDKGLYVYPEPKRYARSVRQYKILNCANYHLTQIR TDFYDEFWQGLRAAPKKQKKHTLSLTPDTTLYNAAQIICANYGKAFSVDKK (配列番号 22)
840645	MKKIILTLSLGLLTACSAQIQKAKQNDVKLAPPTDVRSGYIRLVKNVNYIDSES IWVDNQEPQIVHFDVAVNLDKGLYVYPEPKRYARSVRQYKILNCANYHLTQV RTDFYDEFWQGLRAAPKKQKKHTLSLTPDTTLYNAAQIICANYGEAFSVDK K (配列番号 23)
902550Z19	MKKIILTLSLGLLTACSAQTQKVEQNDVKLTPTDVQSGYVRLVKNVNYIDSE SIWVDNQEPQIVHFDVAVNLDKGLYVYPEPKRYARSVRQYKILNCANYHLTQ VRTDFYDEFWQGLRAAPKKQKKHTLSLTPDTTLYNAAQIICANYGKAFSVD KK (配列番号 24)
A840177	MKKIILTLSLGLLTACSAQIQKAKQNDVKLAPPTDVRSGYIRLVKNVNYIDSES IWVDNQEPQIVHFDVAVNLDKGLYVYPEPKRYARSVRQYKILNCANYHLTQV RTDFYDEFWQGLRAAPKKQKKHTLSLTPDTTLYNAAQIICANYGEAFSVDK

10

20

30

40

	K (配列番号 25)
A860514	MKKIILTSLGLLTACSAQTQKVEQNDVKLTAPTDVRSYVRLVKNANYIDSE SIWVDNQEPQIVHFDAVVNLDKGLYVYPEPKRYARSVRQYKILNCANYHLTQ VRTDFYDEFWGQGLRAAPKKQKKHTLSLTPDITLYNAAQIICANYGKAFSVD KK (配列番号 26)
A950014	MKKIILTSLGLLTACSAQIQKAEQNDVKLAPPTDVRSYIRLVKNVNYIDSES IWVDNQEPQIVHFDAVVNLDKGLYVYPEPKRYARSVRQYKILNCANYHLTQV RIDFYDEFWGQGLRAAPKKQKKHTLSLTPDITLYNAAQIICANYGKAFSVDKK (配列番号 27)
306543X4	MKKIILTSLGLLTACSAQIQKAEQNDVKLAPPTDVRSYIRLVKNVNYIDSES IWVDNQEPQIVHFDAVVNLDKGLYVYPEPKRYARSVRQYKILNCANYHLTQV RTDFYDEFWGQGLRAAPKKQKKHTLSLTPDITLYNAAQIICANYGKAFSVDK K (配列番号 28)
A930105	MKKIILTSLGLLTACSAQIQKAEQNDVKLAPPTDVRSYIRLVKNVNYIDSES IWVDNQEPQIVHFDTVVNLDKGLYVYPEPKRYARSVRQYKILNCANYHLTQV RTDFYDEFWGQGLRAAPKKQKKHTLSLTPDITLYNAAQIICANYGKAFSVDK K (配列番号 29)
901905U	MKKIILTSLGLLTACSAQIQKAEQNDVKLAPPTDVRSYIRLVKNVNYIDSES IWVDNQEPQIVHFDAVVNLDKGLYVYPEPKRYARSVRQYKILNCANYHLTQV RTDFYDEFWGQGLRAAPKKQKKHTLSLTPDITLYNAAQIICANYGKAFSVDK K (配列番号 30)
A920030	MKKIILTSLGLLTACSAQIQKAEQNDVKLAPPTDVRSYIRLVKNVNYIDSES IWVDNQEPQIVHFDAVVNLDKGLYVYPEPKRYARSVRQYKILNCANYHLTQV RTDFYDEFWGQGLRAAPKKQKKHTLSLTPDITLYNAAQIICANYGEAFSVDK K (配列番号 31)
3221B	MKKIILTSLGLLTACSAQIQKAEQNDVKLAPPTDVRSYIRLVKNVNYIDSES IWVDNQEPQIVHFDAVVNLDKGLYVYPEPKRYARSVRQYKILNCANYHLTQV RTDFYDEFWGQGLRAAPKKQKKHTLSLTPDITLYNAAQIICANYGKAFSVDK K (配列番号 32)
27W116791 N	MKKIILTSLGLLTACSAQTQKVEQNDVKLTPPTDVRSYVRLVKNVNYIDSE SIWVDNQEPQIVHFDAVVNLDKGLYVYPEPKRYARSVRQYKILNCANYHLTQ VRTDFYDEFWGQGLRAAPKKQKKHTLSLTPDITLYNAAQIICANYGKAFSVD KK (配列番号 33)
N218	MKKIILTSLGLLTACSAQIQKAEQNDVKLAPPTDVRSYIRLVKNVNYIDSES IWVDNQEPQIVHFDAVVNLDKGLYVYPEPKRYARSVRQYKILNCANYHLTQV RTDFYDEFWGQGLRAAPKKQKKHTLSLTPDITLYNAAQIICANYGKAFSVDK K (配列番号 34)
N163	MKKIILTSLGLLTACSAQIQKAEQNDVKLAPPTDVRSYIRLVKNVNYIDSES IWVDNQEPQIVHFDAVVNLDKGLYVYPEPKRYARSVRQYKILNCANYHLTQV RTDFYDEFWGQGLRAAPKKQKKHTLSLTPDITLYNAAQIICANYGEAFSVDK K (配列番号 35)
N162	MKKIILTSLGLLTACSAQIQKAEQNDVKLAPPTDVRSYIRLVKNVNYIDSES IWVDNQEPQIVHFDAVVNLDKGLYVYPEPKRYARSVRQYKILNCANYHLTQV RTDFYDEFWGQGLRAAPKKQKKHTLSLTPDITLYNAAQIICANYGEAFSVDK

10

20

30

40

	K (配列番号 36)	
N107	MKKIILTSLGLLTACSAQTQKAEQNDVKLAPPTDVRSGYIRLVKNVNYIDSE SIWVDNQEPQIVHFDVAVNLDKGLYVYPEPKRYARSVRQYKILNCANYHLTQI RTDFYDEFWGGQLRAAPKKQKKHTLSLTPDTTLYNAAQIICANYGKAFSVDK K (配列番号 37)	
N91	MKKIILTSLGLLTACSAQTQKVEQNDVKLTAPADVRSYVRLVKNVNYIDSE SIWVDNQEPQIVHFDVAVNLDKGLYVYPEPKRYARSVRQYKILNCANYHLTQ VRTDFYDEFWGGQLRAAPKKQKKHTLSLTPDTTLYNAAQIICANYGKAFSVD KK (配列番号 38)	
D211PG	MKKIILTSLGLLTACSAQIQKAKQNDVKLAPPTDVRSGYIRLVKNVNYIDSES IWVDNQEPQIVHFDVAVNLDKGLYVYPEPKRYARSVR- YKILNCANYHLTQVRTDFYDEFWGGQLRAAPKKQK KHTLSLTPDTTLYNAAQIICANYGEAFSVDKK (配列番号 39)	10
D211PD	MKKIILTSLGLLTACSAQIQKAKQNDVKLAPPTDVRSGYIRLVKNVNYIDSES IWVDNQEPQIVHFDVAVNLDKGLYVYPEPKRYARSVR- YKILNCANYHLTQVRTDFYDEFWGGQLRAAPKKQK KHTLSLTPDTTLYNAAQIICANYGEAFSVDKK (配列番号 40)	
D201PG	MKKIILTSLGLLTACSAQIQKAEQNDVKLAPPTDVRSGYIRLVKNVNYIDSES IWVDNQEPQIVHFDVAVNLDKGLYVYPEPKRYARSVRQYKILNCANYHLTQV RTDFYDEFWGGQLRAAPKKQKKHTLSLTPDTTLYNAAQIICANYGKAFSVDK K (配列番号 41)	
D201PD	MKKIILTSLGLLTACSAQIQKAEQNDVKLAPPTDVRSGYIRLVKNVNYIDSES IWVDNQEPQIVHFDVAVNLDKGLYVYPEPKRYARSVRQYKILNCANYHLTQV RTDFYDEFWGGQLRAAPKKQKKHTLSLTPDTTLYNAAQIICANYGKAFSVDK K (配列番号 42)	20
D198PG	MKKIILTSLGLLTACSAQIQKAEQNDVKLAPPTDVRSGYIRLVKNVNYIDSES IWVDNQEPQIVHFDVAVNLDKGLYVYPEPKRYARSVRQYKILNCANYHLTQV RTDFYDEFWGGQLRAAPKKQKKHTLSLTPDTTLYNAAQIICANYGKAFSVDK K (配列番号 43)	
D198PD	MKKIILTSLGLLTACSAQIQKAEQNDVKLAPPTDVRSGYIRLVKNVNYIDSES IWVDNQEPQIVHFDVAVNLDKGLYVYPEPKRYARSVRQYKILNCANYHLTQV RTDFYDEFWGGQLRAAPKKQKKHTLSLTPDTTLYNAAQIICANYGKAFSVDK K (配列番号 44)	30
D195PD	MKKIILTSLGLLTACSAQIQKAEQNDVKLAPPTDVRSGYIRLVKNVNYIDSES IWVDNQEPQIVHFDVAVNLDKGLYVYPEPKRYARSVRQYKILNCANYHLTQV RTDFYDEFWGGQLRAAPKKQKKHTLSLTPDTTLYNAAQIICANYGKAFSVDKK (配列番号 45)	
D189PG	MKKIILTSLGLLTACSAQTQKVEQNDVKLTPTDVRSGYVRLVKNVNYIDSE SIWVDNQEPQIVHFDVAVNLDKGLYVYPEPKRYARSVRQYKILNCANYHLTQ VRTDFYDEFWGGQLRAAPKKQKKHTLSLTPDTTVYNAQIICANYGKAFSVD KK (配列番号 46)	
D189PD	MKKIILTSLGLLTACSAQTQKVEQNDVKLTPTDVRSGYVRLVKNVNYIDSE SIWVDNQEPQIVHFDVAVNLDKGLYVYPEPKRYARSVRQYKILNCANYHLTQ VRTDFYDEFWGGQLRAAPKKQKKHTLSLTPDTTVYNAQIICANYGKAFSVD	40

	KK (配列番号 47)	
D129CG	MKKIILTSLGLLTACSAQIQKAKQNDVKLAPPTDVRSGYIRLVKKNVNYIDSES IWVDNQEPQIVHFDAVVNLDKGLYVYPEPKRYARSVRQYKILNCANYHLTQV RTDFYDEFWGQGLRAAPKKQKKHTLSLTPDTTLYNAAQIICANYGEAFSVDK K (配列番号 48)	
D124PG	MKKIILTSLGLLTACSAQIQKAEQNDVKLAPPTDVRSGYIRLVKKNVNYIDSES IWVDNQEPQIVHFDTVVNLDKGLYVYPEPKRYARSVRQYKILNCANYHLTQV RTDFYDEFWGQGLRAAPKKQKKHTLSLTPDTTLYNAAQIICANYGKAFSVDK K (配列番号 49)	
D124PD	MKKIILTSLGLLTACSAQIQKAEQNDVKLAPPTDVRSGYIRLVKKNVNYIDSES IWVDNQEPQIVHFDTVVNLDKGLYVYPEPKRYARSVRQYKILNCANYHLTQV RTDFYDEFWGQGLRAAPKKQKKHTLSLTPDTTLYNAAQIICANYGKAFSVDK K (配列番号 50)	10
D58PG	MKKIILTSLGLLTACSAQTQKAEQNDVKLTPPTDVRSGYIRLVKKNVNYIDSE SIWVDNQEPQIVHFDAVVNLDKGLYVYPEPKRYARSVRQYKILNCANYHLTQ VRTDFYDEFWGQGLRAAPKKQKKHTLSLTPDTTLYNAAQIICANYGKAFSVD KK (配列番号 51)	
D33OD	MKKIILTSLGLLTACSAQIQKAKQNDVKLAPPTDVRSGYIRLVKKNVNYIDSES IWVDNQEPQIVHFDAVVNLDKGLYVYPEPKRYARSVRQYKILNCANYHLTQV RTDFYDEFWGQGLRAAPKKQKKHTLSLTPDTTLYNAAQIICANYGKAFSVDK K (配列番号 52)	
BS433	MKKIILTSLGLLTACSAQIQKAEQNDVKLAPPTDVRSGYIRLVKKNVNYIDSES IWVDNQEPQIVHFDTVVNLDKGLYVYPEPKRYARSVRQYKILNCANYHLTQV RTDFYDEFWGQGLRAAPKKQKKHTLSLTPDTTLYNAAQIICANYGKAFSVDK K (配列番号 53)	20
BS432	MKKIILTSLGLLTACSAQTQKAEQNDVKLAPPTDVRSGYIRLVKKNVNYIDSE SIWVDNQEPQIVHFDAVVNLDKGLYVYPEPKRYARSVRQYKILNCANYHLTQI RTDFYDEFWGQGLRAAPKKQKKHTLSLTPDTTLYNAAQIICANYGKAFSVDK K (配列番号 54)	
1714	MKKIILTSLGLLTACSAQIQKAKQNDVKLAPPTDVRSGYIRLVKKNVNYIDSES IWVDNQEPQIVHFDAVVNLDKGLYVYPEPKRYARSVRQYKILNCANYHLTQV RTDFYDEFWGQGLRAAPKKQKKHTLSLTPDTTLYNAAQIICANYGEAFSVDK K (配列番号 55)	
1128	MKKIILTSLGLLTACSAQIQKAEQNDVKLAPPTDVRSGYIRLVKKNVNYIDSES IWVDNQEPQIVHFDAVVNLDKGLYVYPEPKRYARSVRQYKILNCANYHLTQV RTDFYDEFWGQGLRAAPKKQKKHTLSLTPDTTLYNAAQIICANYGKAFSVDK K (配列番号 56)	30
BS430	MKKIILTSLGLLTACSAQIQKAEQNDMKLAPPTDVRSGYIRLVKKNVNYIDSE SI-VDNQEPQ IVHFDAVVNLDKGLYVYPEPKRYARSVRQYKILNCANYHLTQVRTDFYDEFW GQGLRAAPKKQKKHTLSLTPDTTLYNAAQIICANYGKAFSVDKK (配列番号 57)	

タンパク質 E は、インフルエンザ菌株 3 2 2 4 A、R d K W 2 0、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 E E、P i t t H H、P i  
t t I I、R 3 0 2 1、2 2 . 4 - 2 1、3 2 1 9 C、3 1 8 5、3 2 4 1 A、0 3 8 1  
4 4 S 1、8 1 0 9 5 6、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 8 6 0 5 1 4、A 9 5 0 0 1 4、3 0 6 5 4 3 X 4、A 9 3 0 1 0 5、9 0 1  
9 0 5 U、A 9 2 0 0 3 0、3 2 2 1 B、2 7 W 1 1 6 7 9 1 N、N 2 1 8、N 1 6 3、  
N 1 6 2、N 1 0 7、N 9 1、D 2 1 1 P G、D 2 1 1 P D、D 2 0 1 P G、D 2 0 1 P  
D、D 1 9 8 P G、D 1 9 8 P D、D 1 9 5 P D、D 1 8 9 P G、D 1 8 9 P D、D 1 2  
9 C G、D 1 2 4 P G、D 1 2 4 P D、D 5 8 P G、D 3 3 O D、B S 4 3 3、B S 4 3  
2、1 7 1 4、1 1 2 8 または B S 4 3 0 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 5 7 のいずれかで示されるタンパク質 E であり得る。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 2 7 】

タンパク質 E は、配列番号 4 ~ 配列番号 5 7 のいずれかとその全長にわたって少なくとも 9 5 % または 9 8 %、9 9 % 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 5 7 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 9 5 % の同一性を有する配列であり得る。

## 【 0 0 2 8 】

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、1 0、1 5、2 0、2 5、3 0 または 5 0 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 1 5 0、1 2 5、1 0 0、7 5、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 1 5 0、1 2 5、1 0 0、7 5 または 6 0 個未満のアミノ酸を含む。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 / または T 細胞エピトープを含み得る。

## 【 0 0 2 9 】

タンパク質 E の免疫原性断片は、配列番号 4 ~ 配列番号 5 7 のいずれかの少なくとも 7、1 0、1 5、2 0、2 5、3 0 または 5 0 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 5 7 の B 細胞および / または 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 1 7 ~ 1 6 0 (配列番号 1 2 2)、配列番号 4 のアミノ酸 1 8 ~ 1 6 0 (配列番号 1 2 3)、配列番号 4 のアミノ酸 1 9 ~ 1 6 0 (配列番号 1 2 4)、配列番号 4 のアミノ酸 2 0 ~ 1 6 0 (配列番号 1 2 5) および配列番号 4 のアミノ酸 2 2 ~ 1 6 0 (配列番号 1 2 6) 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 1 7 ~ 1 6 0 (配列番号 1 2 2)、配列番号 4 のアミノ酸 1 8 ~ 1 6 0 (配列番号 1 2 3)、配列番号 4 のアミノ酸 1 9 ~ 1 6 0 (配列番号 1 2 4)、配列番号 4 のアミノ酸 2 0 ~ 1 6 0 (配列番号 1 2 5)、配列番号 4 のアミノ酸 2 2 ~ 1 6 0 (配列番号 1 2 6)、配列番号 4 のアミノ酸 2 3 ~ 1 6 0 (配列番号 1 7 9) および配列番号 4 のアミノ酸 2 4 ~ 1 6 0 (配列番号 1 8 0) からなる群から選択される。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 1 7 ~ 1 6 0 (配列番号 1 2 2)、配列番号 4 のアミノ酸 1 8 ~ 1 6 0 (配列番号 1 2 3)、配列番号 4 のアミノ酸 2 0 ~ 1 6 0 (配列番号 1 2 5)、配列番号 4 のアミノ酸 2 2 ~ 1 6 0 (配列番号 1 2 6)、配列番号 4 のアミノ酸 2 3 ~ 1 6 0 (配列番号 1 7 9) および配列番号 4 のアミノ酸 2 4 ~ 1 6 0 (配列番号 1 8 0) 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 1 2 4、すなわち、配列番号 4 のアミノ酸 1 9 ~ 1 6 0 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 1 2 5、すなわち、配列番号 5 のアミノ酸 2 0 ~ 1 6 0 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 2 3 ~ 1 6 0 (配列番号 1 7 9) および配列番号 4 のアミノ酸 2 4 ~ 1 6 0 (配列番号 1 8 0) 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。

## 【 0 0 3 0 】

タンパク質 E は、1 0 0 を超える臨床 N T H i 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 1 2 8) を含有する。Singh らは、タンパク質 E が N T H i 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 9 6 . 9 % ~ 1 0 0 % 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 1 2 8 (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 IRLVKNVNY IDSESIWVDN QEPQIVHFDA VVN LDKGLYV YPEPKRYARS VRQYKILNCA NYHLTQVRTD FYDEFWQGL RAAPKKQKKH TLSLTPDTTL YNAAQI

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 IRLVKNVNY 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 IRLVKNVNY 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 IRLVKNVNY IDSESIWVDN QEPQIVHFDA VVNLDKGLYV YPEPKRYARS  
VRQYKILNCA NYHLTQVRTD FYDEFWGQGL RAAPKKQKKH TLSLTPDTTL YNAAQIICAN YGEAFSVDKK

10

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 IRLVKNVNY IDSESIWVDN QEPQIVHFDA VVNLDKGLYV YPEPKRYARS V  
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 IRLVKNVNY 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 IRLVKNVNY IDSESIWVDN QEPQIVHFDA VVNLDKGLYV YPEPKRYARS VRQY  
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

20

EQNDVKL APPTDVRSGY IRLVKNVNY IDSESIWVDN QEPQIVHFDA VVNLDKGLYV YPEPKRYARS VRQYK  
ILNCA 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 (MKLTQTQTLK KGFTLIELMI VIAIIAILAT IAIPSYQNYT KKAADVSE  
LLQ ASAPYKADVE LCVYSTNETT NCTGGKNGIA ADITTAKGYV KSVTTSNGAI TVKGDGTLAN MEYILQATGN  
AATGVTWTTT CKGTDASLFP ANFCGSVTQ) のタンパク質配列ならびに配列番号 58 と 80 % ~

30

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 1  
00 % 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 # 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 #

40

50



99はアラニン（A）またはグリシン（G）であり得；アミノ酸#103はアラニン（A）またはリシン（K）であり得；アミノ酸#109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#110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#112はセリン（S）またはグルタミン酸（E）であり得；アミノ酸#114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#116はトレオニン（T）またはグルタミン（Q）であり得；アミノ酸#118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#121はセリン（S）またはアラニン（A）であり得；アミノ酸#122はアラニン（A）またはトレオニン（T）であり得；アミノ酸#123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#128はリシン（K）またはトレオニン（T）であり得；アミノ酸#135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#136はアラニン（A）またはトレオニン（T）であり得；アミノ酸#145はグリシン（G）またはアルギニン（R）であり得；アミノ酸#149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。

# 【0031】

Pi1Aは、アミノ酸#6、アミノ酸#7、アミノ酸#37、アミノ酸#44、アミノ酸#57、アミノ酸#67、アミノ酸#68、アミノ酸#69、アミノ酸#71、アミノ酸#73、アミノ酸#76、アミノ酸#84、アミノ酸#86、アミノ酸#91、アミノ酸#94、アミノ酸#96、アミノ酸#97、アミノ酸#99、アミノ酸#103、アミノ酸#109、アミノ酸#110、アミノ酸#112、アミノ酸#114、アミノ酸#116、アミノ酸#118、アミノ酸#121、アミノ酸#122、アミノ酸#123、アミノ酸#128、アミノ酸#135、アミノ酸#136、アミノ酸#145およびアミノ酸#149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58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#37はリシン（K）であり；アミノ酸#44はセリン（S）であり；アミノ酸#57はセリン（S）であり；アミノ酸#67はグリシン（G）であり；アミノ酸#68はリシン（K）であり；アミノ酸#69はプロリン（P）であり；アミノ酸#71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#73はセリン（S）またはメチオニン（M）であり；アミノ酸#76はセリン（S）またはアスパラギン（N）であり；アミノ酸#84はリシン（K）であり；アミノ酸#86はバリン（V）であり；アミノ酸#91はアラニン（A）であり；アミノ酸#94はイソロイシン（I）またはリシン（K）であり；アミノ酸#96はグルタミン（Q）であり；アミノ酸#97はセリン（S）であり；アミノ酸#99はグリシン（G）であり；アミノ酸#103はアラニン（A）であり；アミノ酸#109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#110はグリシン（G）またはアルギニン（R）であり；アミノ酸#112はセリン（S）であり；アミノ酸#114はトレオニン（T）であり；アミノ酸#116はトレオニン（T）であり；アミノ酸#118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#121はセリン（S）；アミノ酸#122はトレオニン（T）であり；アミノ酸#123はリシン（K）またはアラニン（A）であり；アミノ酸#128はリシン（K）であり；アミノ酸#135はグルタミン酸（E）であり；アミノ酸#136はトレオニン（T）であり；アミノ酸#145はアルギニン（R）であり；アミノ酸#149はリシン（K）である。

# 【0032】

【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	PilA 配列
86-028NP	MKLTTQQTLLKKGFTLIELMIVIAIIAILATIAIPSYQNYTKKAAVSELLQASAPYKA DVELCVYSTNETTNCTGGKNGIAADITTAKGYVKSVTTSNGAITVKG DGTLAN MEYILQATGNAATGVTWTTTCKGTDASLFPANFCGSVTQ (配列番号 58)
NTHi3219C	MKLTTQQTLLKKGFTLIELMIVIAIIAILATIAIPSYQNYTKKAAVSELLQASAPYKA DVELCVYSTNETTKCTGGKNGIAADITTAKGYVKSVTTSNGAITVAGNGTLDG MSYTLTAEGDSAAGVTWKTTCKGTDASLFPANFCGSVTQ (配列番号 59)
NTHi3224A	MKLTTQQTLLKKGFTLIELMIVIAIIAILATIAIPSYQNYTKKAAVSELLQASAPYKA DVELCVYSTNETTNCTGGKNGIAADITTAKGYVKSVTTSNGAITVKG DGTLAN MEYILQATGNAATGVTWTTTCKGTDASLFPANFCGSVTQ (配列番号 60)
NTHi12	MKLTTQQTLLKKGFTLIELMIVIAIIAILATIAIPSYKNTTKKAAVSELLQASAPYKA DVELCVYSTGKPSSCSGGSNGIAADITTAKGYVASVITQSGGITVKG DGTLAN MEYILQAAGNAAAGVTWTTTCKGTDASLFPANFCGSVTQ (配列番号 61)
NTHi44	MKLTTQQTLLKKGFTLIELMIVIAIIAILATIAIPSYQNYTKKAAVSELLQASAPYKA DVELCVYSTNETTNCTGGKNGIAADITTAKGYVKSVTTSNGAITVKG DGTLAN MEYILQATGNAATGVTWTTTCKGTDASLFPANFCGSVTQ (配列番号 62)
NTHi67	MKLTTQQTLLKKGFTLIELMIVIAIIAILATIAIPSYQNYTKKAAVSELLQASAPYKS DVELCVYSTGKPSTCSGGSNGIAADITTVKGYVKSVTTSNGAITVAGNGTLDG MSYTLTAEGDSAAGVTWTTTCKGTDASLFPANFCGSVTQ (配列番号 63)
1054MEE	MKLTTQQTLLKKGFTLIELMIVIAIIAILATIAIPSYQNYTKKAAVSELLQASAPYKA DVELCVYSTNETTNCTGGKNGIAADITTAKGYVKSVTTSNGAITVKG DGTLAN MEYILQATGNAATGVTWTTTCKGTDASLFPANFCGSVTQ (配列番号 64)
1729MEE	MKLTTQQTLLKKGFTLIELMIVIAIIAILATIAIPSYQNYTKKAAVSELLQASAPYKA DVELCVYSTNETTNCTGGKNGIAADITTAKGYVKSVTTSNGAITVKG DGTLAN MEYILQATGNAATGVTWTTTCKGTDASLFPANFCGSVTQ (配列番号 65)
1728MEE	MKLTTQQTLLKKGFTLIELMIVIAIIAILATIAIPSYQNYTKKAAVSELLQASAPYKA DVELCVYSTNETTNCTGGKNGIAADITTAKGYVKSVTTSNGAITVKG DGTLAN MEYILQATGNAATGVTWTTTCKGTDASLFPANFCGSVTQ (配列番号 66)
1885MEE	MKLTTQQTLLKKGFTLIELMIVIAIIAILATIAIPSYKNTTKKAAVSELLQASAPYKA DVELCVYSTNEITNCMGGKNGIAADITTAKGYVASVKTQSGGITVKG DGTLAN MEYILQATGNAAGVTWTTTCKGTDASLFPANFCGSITQ (配列番号 67)
1060MEE	MKLTTQQTLLKKGFTLIELMIVIAIIAILATIAIPSYQNYTKKASVSELLQASAPYKA DVELCVYSTNETTNCTGGKNGIAADITTAKGYVASVKTQSGGITVKGNGTLAN MEYILQAKGNATAGVTWTTTCKGTDASLFPANFCRSVTK (配列番号 68)
RdKW20	MKLTTLQTLKKGFTLIELMIVIAIIAILATIAIPSYQNYTKKAAVSELLQASAPYKA DVELCVYSTNETTSTCTGGKNGIAADIKTAKGYVASVITQSGGITVKGNGTLAN MEYILQAKGNAAAGVTWTTTCKGTDASLFPANFCGSVTK (配列番号 69)
214NP	MKLTTQQTLLKKGFTLIELMIVIAIIAILATIAIPSYQNYTKKAAVSELLQASAPYKA DVELCVYSTGKPSSCSGGSNGIAADITTAKGYVKSVTTSNGAITVKG DGTLAN

10

20

30

40

	MEYLQASGNAATGVTWTTTCKGTDASLFPANFCGSVTQ (配列番号 70)
1236MEE	MKLTTTLQTLKKGFTLIELMIVIAIIAILATIAIPSYQNYTKKAAVSELLQASAPYKA DVELCVYSTNETTSTCTGGKNGIAADITAKGYVASVITQSGGITVKGNGLAN MEYLQAKGNAAAGVTWTTTCKGTDASLFPANFCGSVTK (配列番号 71)
1714MEE	MKLTTTLQTLKKGFTLIELMIVIAIIAILATIAIPSYQNYTKKAAVSELLQASAPYKA DVELCVYSTGKPSTCSGGSNGIAADITAKGYVASVKTQSGGITVKGNGLAN MEYLQATGNAATGVTWTTTCKGTDASLFPANFCGSVTQ (配列番号 72)
1128MEE	MKLTTQQTLLKKGFTLIELMIVIAIIAILATIAIPSYQNYTKKASVSELLQASAPYKS DVELCVYSTGKPSTCSGGSNGIAADITAKGYVASVKTQSGGITVKGNGLAN MEYLQAKGNATAGVTWTTTCKGTDASLFPANFCRSVTK (配列番号 73)
R2846	MKLTTQQTLLKKGFTLIELMIVIAIIAILATIAIPSYQNYTKKAAVSELLQASAPYKA DVELCVYSTNETTNTCTGGKNGIAADITAKGYVKSVTTSNGAITVKGDGLAN MEYLQATGNAATGVTWTTTCKGTDASLFPANFCGSVTQ (配列番号 74)
R2866	MKLTTQQTLLKKGFTLIELMIVIAIIAILATIAIPSYQNYTKKAAVSELLQASAPYKA DVELCVYSTNETTNTCTGGKNGIAADITAKGYVASVKTQSGGITVKGDGLAN MEYLQATGNAATGVTWTTTCKGTEASLFPANFCGSVTQ (配列番号 75)
3655	MKLTTQQTLLKKGFTLIELMIVIAIIAILATIAIPSYQNYTKKASVSELLQASAPYKA DVELCVYSTNETTNTCTGGKNGIAADITAKGYVASVKTQSGGITVKGNGLAN MEYLQAKGNATAGVTWTTTCKGTDASLFPANFCRSVTK (配列番号 76)
PittAA	MKLTTTLQTLKKGFTLIELMIVIAIIAILATIAIPSYQNYTKKAAVSELLQASAPYKA DVELCVYSTGKPSTCSGGSNGIAADITAKGYVASVKTQSGGITVKGNGLAN MEYLQATGNAATGVTWTTTCKGTDASLFPANFCGSVTQ (配列番号 77)
PittGG	MKLTTQQTLLKKGFTLIELMIVIAIIAILATIAIPSYQNYTKKAAVSELLQASAPYKA DVELCVYSTGKPSTCSGGSNGIAADITAKGYVASVKTQSGGITVKGNGLAN MEYLQAKGNATAGVTWTTTCKGTDASLFPANFCRSVTK (配列番号 78)
PittII	MKLTTQQTLLKKGFTLIELMIVIAIIAILATIAIPSYQNYTKKAAVSELLQASAPYKA DVELCVYSTNETTNTCTGGKNGIAADITAKGYVASVKTQSGGITVKGDGLAN MEYLQATGNAATGVTWTTTCKGTEASLFPANFCGSVTQ (配列番号 79)
R3021	MKLTTQQTLLKKGFTLIELMIVIAIIAILATIAIPSYQNYTKKAAVSELLQASAPYKA DVELCVYSTNETTNTCTGGKNGIAADITAKGYVASVKTQSGGITVKGDGLAN MEYLQATGNAATGVTWTTTCKGTEASLFPANFCGSVTQ (配列番号 80)
22.4-21	MKLTTQQTLLKKGFTLIELMIVIAIIAILATIAIPSYQNYTKKAAVSELLQASAPYKS DVELCVYSTGKPSTCSGGSNGIAADITAKGYVKSVTTSNGAITVAGNGTLDG MSYTLTAEGDSAGVWTKTCKGTDASLFPANFCGSVTK (配列番号 81)
3185A	MKLTTQQTLLKKGFTLIELMIVIAIIAILATIAIPSYQNYTKKAAVSELLQASAPYKA DVELCVYSTNEATKCTGGKNGIAADITAKGYVKSVTTSNGAITVKGDGLAN MEYLQASGNAATGVTWTTTCKGTDASLFPANFCGSVTQ (配列番号 82)
3221B	MKLTTQQTLLKKGFTLIELMIVIAIIAILATIAIPSYQNYTKKAAVSELLQASAPYKA DVELCVYSTNEATKCTGGKNGIAADITAKGYVKSVTTSNGAITVKGDGLAN MEYLQASGNAATGVTWTTTCKGTDASLFPANFCGSVTQ (配列番号 83)
3241A	MKLTTQQTLLKKGFTLIELMIVIAIIAILATIAIPSYQNYTKKAAVSELLQASAPYKA DVELCVYSTNETTNTCTGGKNGIAADITAKGYVKSVTTSNGAITVKGDGLAN

10

20

30

40

	MEYILQATGNAATGVTWTTTCKGTDASLFPANFCGSVTQ (配列番号 84)
038144S1	MKLTTQQTLLKKGFTLIELMIVIAIIAILATIAIPSYQNYTKKAAISELLQASAPYKSD VELCVYSTGKPSTCSGGSNGIAADITTAKGYVASVKTQSGGITVKGNGLAN MEYILQAKGNATAGVTWTTTCKGTDASLFPANFCRSVTQ (配列番号 85)
821246	MKLTTQQTLLKKGFTLIELMIVIAIIAILATIAIPSYQNYTKKAAVSELLQASAPYKA DVELCVYSTNETTNTCTGGKNGIAADITTAKGYVASVKTQSGGITVKGDGTLAN MEYILQATGNAATGVTWTTTCKGTEASLFPANFCGSVTQ (配列番号 86)
840645	MKLTTQQTLLKKGFTLIELMIVIAIIAILATIAIPSYQNYTKKAAVSELLQASAPYKA DVELCVYSTNETTNTCTGGKNGIAADITTAKGYVKSVTTSNGAITVKGDGTLAN MEYILQATGNAATGVTWTTTCKGTDASLFPANFCGSVTQ (配列番号 87)
902550Z19	MKLTTQQTLLKKGFTLIELMIVIAIIAILATIAIPSYQNYTKKAAVSELLQASAPYKS DVELCVYSTGKPSTCSGGSNGIAADITTVKGYVKSVTTSNGAITVAGNGTLDG MSYTLTAEGDSAKGVTWTTTCKGTDASLFPANFCGSVTQ (配列番号 88)
A840177	MKLTTQQTLLKKGFTLIELMIVIAIIAILATIAIPSYQNYTKKAAVSELLQASAPYKA DVELCVYSTNETTNTCTGGKNGIAADITTAKGYVKSVTTSNGAITVKGDGTLAN MEYILQATGNAATGVTWTTTCKGTDASLFPANFCGSVTQ (配列番号 89)
A920030	MKLTTQQTLLKKGFTLIELMIVIAIIAILATIAIPSYQNYTKKAAVSELLQASAPYKA DVELCVYSTNETTNTCTGGKNGIAADITTAKGYVASVKTQSGGITVKGNGLAN MEYILQATGNAATGVTWTTTCKGTDASLFPANFCGSVTQ (配列番号 90)
A950014	MKLTTQQTLLKKGFTLIELMIVIAIIAILATIAIPSYQNYTKKAAVSELLQASAPYKA DVELCVYSTGKPSTCSGGSNGIAADITTAKGYVKSVTTSNGAITVAGNGTLDR MSYTLTAEGDSAKGVTWTTTCKGTDASLFPANFCGSVTQ (配列番号 91)
901905U	MKLTTQQTLLKKGFTLIELMIVIAIIAILATIAIPSYQNYTKKAAVSELLQASAPYKA DVELCVYSTGKPSSCSGGSNGIAADITTAKGYVKSVTTSNGAITVKGDGTLAN MEYILQASGNAATGVTWTTTCKGTDASLFPANFCGSVTQ (配列番号 92)
A920029	MKLTTQQTLLKKGFTLIELMIVIAIIAILATIAIPSYQNYTKKAAVSELLQASAPYKS DVELCVYSTNETTNTCTGGKNGIAADITTAKGYVASVITQSGGITVKGNGLTN MEYILQATGNAATGVTWTTTCKGTDASLFPANFCGSITQ (配列番号 93)
A930105	MKLTTQLTLKKGFTLIELMIVIAIIAILATIAIPSYQNYTKKAAVSELLQASAPYKA DVELCVYSTGKPSTCSGGNNGIAADIKTAKGYVASVKTQSGGITVKGDGTLA NMEYILQATGNAATGVTWTTTCKGTDASLFPANFCGSVTQ (配列番号 94)
306543X4	MKLTTQQTLLKKGFTLIELMIVIAIIAILATIAIPSYQNYTKKAAVSELLQASAPYKA DVELCVYSTGKPSSCSGGSNGIAADITTAKGYVKSVTTSNGAITVKGDGTLAN MEYILQASGNAATGVTWTTTCKGTDASLFPANFCGSVTQ (配列番号 95)
N218	MKLTTQQTLLKKGFTLIELMIVIAIIAILATIAIPSYQNYTKKAAVSELLQASAPYKA DVELCVYSTNEATKCTGGKNGIAADITTAKGYVKSVTTSNGAITVKGDGTLAN MEYILQASGNAATGVTWTTTCKGTDTSLFPANFCGSVTQ (配列番号 96)
N163	MKLTTQQTLLKKGFTLIELMIVIAIIAILATIAIPSYQNYTKKAAVSELLQASAPYKA DVELCVYSTNETTNTCTGGKNGIAADITTAKGYVKSVTTSNGAITVKGDGTLAN MEYILQATGNAATGVTWTTTCKGTDASLFPANFCGSVTQ (配列番号 97)
N162	MKLTTQQTLLKKGFTLIELMIVIAIIAILATIAIPSYQNYTKKAAVSELLQASAPYKA DVELCVYSTNETTNTCTGGKNGIAADITTAKGYVASVKTQSGGITVKGNGLAN

10

20

30

40

	MEYLQATGNAATGVTWTTTCKGTDASLFPANFCGSVTQ (配列番号 98)	
N120	MKLTTQQTLLKKGFTLIELMIVIAIIAILATIAIPSYQNYTKKAAVSELLQASAPYKA DVELCVYSTGKPSTCSGGNSNGIAADITTAKGYVASVKTQSGGITVKGNGLAN MEYLQAKGNATAGVTWTTTCKGTDASLFPANFCRSVTK (配列番号 99)	
N107	MKLTTQQTLLKKGFTLIELMIVIAIIAILATIAIPSYQNYTKKAAVSELLQASAPYKA DVELCVYSTGKPSTCSGGNSNGIAADITTAKGYVASVKTQSGGITVKGNGLAN MEYLQAKGNATAGVTWTTTCKGTDASLFPANFCRSVTK (配列番号 100)	
N92	MKLTTQQTLLKKGFTLIELMIVIAIIAILATIAIPSYQNYTKKAAVSELLQASAPYKA DVELCVYSTNETTNETTCTGGKNGIAADITTAKGYVKSVTTSNGAITVKGDGTLAN MEYLQATGNAATGVTWTTTCKGTDASLFPANFCGSVTQ (配列番号 101)	10
N91	MKLTTQQTLLKKGFTLIELMIVIAIIAILATIAIPSYQNYTKKAAVSELLQASAPYKA DVELCVYSTGKPSTCSGGNSNGIAADITTAKGYVASVKTQSGGITVKGNGLAN MEYLQAKGNATAGVTWTTTCKGTDASLFPANFCRSVTK (配列番号 102)	
D219PG	MKLTTQQTLLKKGFTLIELMIVIAIIAILATIAIPSYQNYTKKAAVSELLQASAPYKA DVELCVYSTNEATKCTGGKNGIAADITTAKGYVKSVTTSNGAITVKGDGTLAN MEYLQASGNAATGVTWTTTCKGTDASLFPANFCGSVTQ (配列番号 103)	
D211PG	MKLTTQQTLLKKGFTLIELMIVIAIIAILATIAIPSYQNYTKKAAVSELLQASAPYKA DVELCVYSTNETTNETTCTGGKNGIAADITTAKGYVKSVTTSNGAITVKGDGTLAN MEYLQATGNAATGVTWTTTCKGTDASLFPANFCGSVTQ (配列番号 104)	
D211PD	MKLTTQQTLLKKGFTLIELMIVIAIIAILATIAIPSYQNYTKKAAVSELLQASAPYKA DVELCVYSTNETTNETTCTGGKNGIAADITTAKGYVKSVTTSNGAITVKGDGTLAN MEYLQATGNAATGVTWTTTCKGTDASLFPANFCGSVTQ (配列番号 105)	20
D204CD	MKLTTQQTLLKKGFTLIELMIVIAIIAILATIAIPSYQNYTKKAAVSELLQASAPYKA DVELCVYSTNETTNETTCTGGKNGIAADITTAKGYVKSVTTSNGAITVKGDGTLAN MEYLXATGNAATGVTWTTTCKGTDASLFPANFCGSVTQ (配列番号 106)	
D198PG	MKLTTQQTLLKKGFTLIELMIVIAIIAILATIAIPSYQNYTKKAAVSELLQASAPYKA DVELCVYSTNETTNETTCTGGKNGIAADITTAKGYVKSVTTSNGAITVKGDGTLAN MEYLQATGNAATGVTWTTTCKGTDASLFPANFCGSVTQ (配列番号 107)	
D198PD	MKLTTQQTLLKKGFTLIELMIVIAIIAILATIAIPSYQNYTKKAAVSELLQASAPYKA DVELCVYSTNETTNETTCTGGKNGIAADITTAKGYVKSVTTSNGAITVKGDGTLAN MEYLQATGNAATGVTWTTTCKGTDASLFPANFCGSVTQ (配列番号 108)	
D195PD	MKLTTLQTLKKGFTLIELMIVIAIIAILATIAIPSYQNYTKKAAVSELLQASAPYKA DVELCVYSTGKPSTCSGGNSNGIAADIKTAKGYVASVKTQSGGITVKGDGTLA NMEYLQATGNAATGVTWTTTCKGTDASLFPANFCGSVTQ (配列番号 109)	30
D195CD	MKLTTLQTLKKGFTLIELMIVIAIIAILATIAIPSYQNYTKKAAVSELLQASAPYKA DVELCVYSTGKPSTCSGGNSNGIAADIKTAKGYVASVKTQSGGITVKGDGTLA NMEYLQATGNAATGVTWTTTCKGTDASLFPANFCGSVTQ (配列番号 110)	
D189PG	MKLTTQQTLLKKGFTLIELMIVIAIIAILATIAIPSYQNYTKKAAVSELLQASAPYKA DVELCVYSTNETTSTCTGGKNGIAADITTAKGYVKSVTTSNGAITVAGNGTLDG MSYTLTAEGDSAGVTWKTTCCKGTDASLFPANFCGSVTQ (配列番号 111)	
D189PD	MKLTTQQTLLKKGFTLIELMIVIAIIAILATIAIPSYQNYTKKAAVSELLQASAPYKA DVELCVYSTNETTSTCTGGKNGIAADITTAKGYVKSVTTSNGAITVAGNGTLDG	40

	MSYTLTAEGDSAKGVTWKTTCCKGTDASLFPANFCGSVTQ (配列番号 112)
D124PG	MKLTTTLQTLKKGFTLIELMIVIAIIAILATIAIPSYQNYTKKAAVSELLQASAPYKA DVELCVYSTGKPGSTCSGGNNGIAADIKTAKGYVASVKTQSGGITVKGDGTLA NMEYILQATGNAATGVTWTTTCKGTDASLFPANFCGSVTQ (配列番号 113)
D124PD	MKLTTTLQTLKKGFTLIELMIVIAIIAILATIAIPSYQNYTKKAAVSELLQASAPYKA DVELCVYSTGKPGSTCSGGNNGIAADIKTAKGYVASVKTQSGGITVKGDGTLA NMEYILQATGNAATGVTWTTTCKGTDASLFPANFCGSVTQ (配列番号 114)
D124CG	MKLTTTLQTLKKGFTLIELMIVIAIIAILATIAIPSYQNYTKKAAVSELLQASAPYKA DVELCVYSTGKPGSTCSGGNNGIAADIKTAKGYVASVKTQSGGITVKGDGTLA NMEYILQATGNAATGVTWTTTCKGTDASLFPANFCGSVTQ (配列番号 115)
D58PG	MKLTTQQTLLKKGFTLIELMIVIAIIAILATIAIPSYQNYTKKAAVSELLQASAPYKA DVELCVYSTNETTCTGGKNGIAADITTAKGYVASVKTQSGGITVKGDGTLAN MEYILQATGNAATGVTWTTTCKGTEASLFPANFCGSVTQ (配列番号 116)
BS433	MKLTTTLQTLKKGFTLIELMIVIAIIAILATIAIPSYQNYTKKAAVSELLQASAPYKA DVELCVYSTGKPGSTCSGGNNGIAADIKTAKGYVASVKTQSGGITVKGDGTLA NMEYILQATGNAATGVTWTTTCKGTDASLFPANFCGSVTQ (配列番号 117)
BS432	MKLTTQQTLLKKGFTLIELMIVIAIIAILATIAIPSYQNYTKKAAVSELLQASAPYKA DVELCVYSTGKPGSTCSGGNNGIAADITTAKGYVASVKTQSGGITVKGNGLAN MEYILQAKGNATAGVTWTTTCKGTDASLFPANFCRSVTK (配列番号 118)
BS430	MKLTTQQTLLKKGFTLIELMIVIAIIAILATIAIPSYQNYTKKAAVSELLQASAPYKA DVELCVYSTNEATKCTGGKNGIAADITTAKGYVKSVTTSNGAITVKGDGTLAN MEYILQASGNAATGVTWTTTCKGTDASLFPANFCGSVTQ (配列番号 119)
1714	MKLTTTLQTLKKGFTLIELMIVIAIIAILATIAIPSYQNYTKKAAVSELLQASAPYKA DVELCVYSTGKPGSTCSGGNNGIAADITTAKGYVASVKTQSGGITVKGNGLAN MEYILQATGNAATGVTWTTTCKGTDASLFPANFCGSVTQ (配列番号 120)
1128	MKLTTQQTLLKKGFTLIELMIVIAIIAILATIAIPSYQNYTKKASVSELLQASAPYKS DVELCVYSTGKPGSTCSGGNNGIAADITTAKGYVASVKTQSGGITVKGNGLAN MEYILQAKGNATAGVTWTTTCKGTDASLFPANFCRSVTK (配列番号 121)

10

20

P i l A は、インフルエンザウイルス株 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。インフルエンザウイルス株 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。

30

40

#### 【 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。

50

## 【 0 0 3 4 】

P i l Aの免疫原性断片は、配列番号～配列番号 1 2 1の少なくとも7、1 0、1 5、2 0、2 5、3 0または5 0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 5 8～配列番号 1 2 1のB細胞および/またはT細胞エピトープを含み得る。

## 【 0 0 3 5 】

例えば、P i l Aの免疫原性断片は、配列番号 5 8の少なくとも7、1 0、1 5、2 0、2 5、3 0または5 0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 i l Aの免疫原性断片は、P i l Aの1 5 0、1 2 5、1 0 0、7 5、または6 0個未満のアミノ酸を含み、さらなる実施形態では、P i l Aの免疫原性組成物は、1 5 0、1 2 5、1 0 0、7 5または6 0個未満のアミノ酸を含む。免疫原性断片は、配列番号 5 8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 5 8のB細胞および/またはT細胞エピトープを含み得る。

10

## 【 0 0 3 6 】

一実施形態では、P i l Aの免疫原性断片は、P i l Aが配列番号 5 8である、インフルエンザ菌 8 6 - 0 2 8 N P株由来の断片である。

## 【 0 0 3 7 】

インフルエンザ菌 8 6 - 0 2 8 N P株由来のP i l A - 配列番号 5 8  
MKLTQTQTLK KGFTLIELMI VIAIIAILAT IAIPSYQNYT KKAHVSELLQ ASAPYKADVE LCVYSTNETT NCT  
GGKNGIA ADITTAKGYV KSVTTSNGAI TVKGDGTLAN MEYILQATGN AATGVTWTTT CKGTDASLFP ANFCGS  
VTQL

20

別の実施形態では、P i l Aの免疫原性断片は、配列番号 1 2 7とおよそ少なくとも7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 8 %または9 9 %同一である。より具体的には、一実施形態では、P i l Aの免疫原性断片は、配列番号 1 2 7、すなわち、配列番号 5 8のアミノ酸 4 0～1 4 9からなる断片である。

## 【 0 0 3 8 】

インフルエンザ菌 8 6 - 0 2 8 N P株由来のP i l Aのアミノ酸 4 0～1 4 9 - 配列番号 1 2 7  
T KKAHVSELLQ ASAPYKADVE LCVYSTNETT NCTGGKNGIA ADITTAKGYV KSVTTSNGAI TVKGDGTLAN M  
EYILQATGN AATGVTWTTT CKGTDASLFP ANFCGSVTQ

30

別の実施形態では、P i l Aの免疫原性断片は、配列番号 5 8～配列番号 1 2 1のいずれかに由来のアミノ酸 4 0～1 4 9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 5 8～配列番号 1 2 1のいずれかに由来のアミノ酸 4 0～1 4 9と少なくとも9 5 %同一である。

## 【 0 0 3 9 】

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、E M B O S S パッケージ (フリーソフトウェア; EMBOS: The European Molecular Biology Open Software Suite (2000). Trends in Genetics 16(6): 276-277) のN e e d l eプログラムおよびG C G (登録商標) パッケージ (A c c e l r y s I n c .) のG a p プログラムが使用可能である。このG a p プログラムは、Needleman, S. B. and Wunsch, C. D. (1970) J. Mol. Biol. 48, 443-453に記載のN e e d l e m a n - W u n s c h アルゴリズムの実装形態である。B L O S U M 6 2 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

## 【 0 0 4 0 】

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1 0 0を掛けること (例えば、N e e d l e プログラム分析の場合)、( 2 ) 同一の数を最長配列の長さで割った商に1 0 0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) :

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

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 ;

R<sub>1</sub> 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)<sub>h</sub> (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)、FlgI (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)、PhdD (ポリヒスチジントライアドタンパク質 D)、PhdE (ポリヒスチジン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 細胞エンベローブ複合体成分 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 Yra1 (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グ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、FlgI 由来のシグナル配列 (flgI<sub>sp</sub>) 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<sub>sp</sub>) 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、FlgI、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、(R<sub>1</sub>)<sub>n</sub> 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 R<sub>1</sub> 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。

【0045】

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、 $(R_1)_n$  が D、E、A T N D D D (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  $R_1$  および  $n$  が定義される。

【0046】

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。

【0047】

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。

【0048】

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

MKKIILTLSL GLLTACSAQI QKAEQNDVKL APPTDVRSGY IRLVKNVNY IDSESIWVDN QEPQIVHFDA VVNLDKGLYV YPEPKRYARS VRQYKILNCA NYHLTQVRTD FYDEFWQGL RAAPKKQKKH TLSLTPDTTL YNAAQI 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 IRLVKNVNY IDSESIWVDN QEPQIVHFDA VVNLDKGLYV YPEPKRYARS VRQYKILNCA NYHLTQVRTD FYDEFWQGL RAAPKKQKKH TLSLTPDTTL YNAAQI ICAN 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 IRLVKNVNY IDSESIWVDN QEPQIVHFDA VVNLDKGLYV YPEPKRYARS VRQYKILNCA NYHLTQVRTD FYDEFWQGL RAAPKKQKKH TLSLTPDTTL YNAAQI ICAN 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 IRLVKNVNY IDSESIWVDN QEPQIVHFDA VVNLDKGLYV YPEPKRYARS VRQYKILNCA NYHLTQVRTD FYDEFWQGL RAAPKKQKKH TLSLTPDTTL YNAAQI ICAN 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 IRLVKNVNY IDSESIWVDN QEPQIVHFDA VVNLDKGLYV YPEPKRYARS VRQYKILNCA NYHLTQVRTD FYDEFWQGL RAAPKKQKKH TLSLTPDTTL YNAAQI ICAN 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 IRLVKNVNY IDSESIWVDN QEPQIVHFDA VVNLDKGLYV YPEPKRYARS VRQYKILNCA NYHLTQVRTD FYDEFWQGL RAAPKKQKKH TLSLTPDTTL YNAAQI ICAN 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 IRLVKNVNY 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 2 4 ~ 1 6 0 - 配列番号 1 8 0

EQNDVKL APPTDVRSGY IRLVKNVNY 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 i l A 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 5 8、配列番号 5 9、配列番号 6 0、配列番号 6 1、配列番号 6 2、配列番号 6 3、配列番号 6 4、配列番号 6 5、配列番号 6 6、配列番号 6 7、配列番号 6 8、配列番号 6 9、配列番号 7 0、配列番号 7 1、配列番号 7 2、配列番号 7 3、配列番号 7 4、配列番号 7 5、配列番号 7 6、配列番号 7 7、配列番号 7 8、配列番号 7 9、配列番号 8 0、配列番号 8 1、配列番号 8 2、配列番号 8 3、配列番号 8 4、配列番号 8 5、配列番号 8 6、配列番号 8 7、配列番号 8 8、配列番号 8 9、配列番号 9 0、配列番号 9 1、配列番号 9 2、配列番号 9 3、配列番号 9 4、配列番号 9 5、配列番号 9 6、配列番号 9 7、配列番号 9 8、配列番号 9 9、配列番号 1 0 0、配列番号 1 0 1、配列番号 1 0 2、配列番号 1 0 3、配列番号 1 0 4、配列番号 1 0 5、配列番号 1 0 6、配列番号 1 0 7、配列番号 1 0 8、配列番号 1 0 9、配列番号 1 1 0、配列番号 1 1 1、配列番号 1 1 2、配列番号 1 1 3、配列番号 1 1 4、配列番号 1 1 5、配列番号 1 1 6、配列番号 1 1 7、配列番号 1 1 8、配列番号 1 1 9、配列番号 1 2 0 および配列番号 1 2 1 ; または配列番号 5 8 ~ 配列番号 1 2 1 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 i l A 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 i l A であり、P i l A は配列番号 5 8 とおよそ少なくとも 7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 2 %、9 5 %、9 8 % または 9 9 % 同一である。別の実施形態では、A は P i l A であり、P i l A は配列番号 5 8 ~ 配列番号 1 2 1 のいずれかと少なくとも 9 5 % 同一である。特定の実施形態では、A は配列番号 5 8 の P i l A である。

#### 【 0 0 5 1 】

別の実施形態では、A がインフルエンザ菌由来の P i l A 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 i l A の免疫原性断片であり、P i l A は配列番号 5 8 とおよそ少なくとも 7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 2 %、9 5 %、9 8 % または 9 9 % 同一である。例えば、A は P i l A の免疫原性断片であり、P i l A は、配列番号 5 8、配列番号 5 9、配列番号 6 0、配列番号 6 1、配列番号 6 2、配列番号 6 3、配列番号 6 4、配列番号 6 5、配列番号 6 6、配列番号 6 7、配列番号 6 8、配列番号 6 9、配列番号 7 0、配列番号 7 1、配列番号 7 2、配列番号 7 3、配列番号 7 4、配列番号 7 5、配列番号 7 6、配列番号 7 7、配列番号 7 8、配列番号 7 9、配列番号 8 0、配列番号 8 1、配列番号 8 2、配列番号 8 3、配列番号 8 4、配列番号 8 5、配列番号 8 6、配列番号 8 7、配列番号 8 8、配列番号 8 9、配列番号 9 0、配列番号 9 1、配列番号 9 2、配列番号 9 3、配列番号 9 4、配列番号 9 5、配列番号 9 6、配列番号 9 7、配列番号 9 8、配列番号 9 9、配列番号 1 0 0、配列番号 1 0 1、配列番号 1 0 2、配列番号 1 0 3、配列番号 1 0 4、配列番号 1 0 5、配列番号 1 0 6、配列番号 1 0 7、配列番号 1 0 8、配列番号 1 0 9、配列番号 1 1 0、配列番号 1 1 1、配列番号 1 1 2、配列番号 1 1 3、配列番号 1 1 4、配列番号 1 1 5、配列番号 1 1 6、配列番号 1 1 7、配列番号 1 1 8、配列番号 1 1 9、配列番号 1 2 0 および配列番号 1 2 1 ; または配列番号 5 8 ~ 配列番号 1 2 1 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 i l A の免疫原性断片であり、P i l A は配列番号 5 8 ~ 配列番号 1 2 1 のいずれかと少なくとも 9 5 % 同一である。特定の実施形態では、A はインフルエンザ菌 8 6 - 0 2 8 N P 株由来の P i l A の免疫原性断片であり、P i l A は配列番号 5 8 である。

#### 【 0 0 5 2 】

インフルエンザ菌 8 6 - 0 2 8 N P 株由来の P i l A - 配列番号 5 8

MKLTTQQTLLK KGFTLIELMI VIAIIAILAT IAIPSYQNYT KKAHVSELLQ ASAPYKADVE LCVYSTNETT NCT  
GGKNGIA ADITTAKGYV KSVTTSNGAI TVKGDGTLAN MEYILQATGN AATGVTWTTT CKGTDASLFP ANFCGS

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 i l A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 i l Aのアミノ酸40～149-配列番号127

T KKAIVSELLQ ASAPYKADVE LCVYSTNETT NCTGGKNGIA ADITTAKGYV KSVTTNSGAI TVKGDGTLAN M EYILQATGN AATGVTWTTT CKGTDASLFP ANFCGSVTQ

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 i l A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G G、S GおよびS S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G GまたはS G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G G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 i l Aまたはインフルエンザ菌由来のP i l A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 l A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 i l Aである。別の実施形態では、BはP i l Aであり、P i l A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 i l Aであり、P i l A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 i l Aである。

30

40

## 【0057】

別の実施形態では、BはP i l Aであり、P i l A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。

50

## 【 0 0 5 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場合に、Bがインフルエンザ菌由来のP i l A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 l Aの免疫原性断片である。別の実施形態では、BはP i l Aの免疫原性断片であり、P i l A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 l Aの免疫原性断片であり、P i l A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 l Aの免疫原性断片であり、P i l A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 l Aの免疫原性断片であり、P i l A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 l A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 l A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。

## 【 0 0 5 9 】

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 l A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 l A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 l A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。

## 【 0 0 6 0 】

別の実施形態では、BはP i l Aの免疫原性断片であり、P i l A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。

## 【 0 0 6 1 】

別の実施形態では、Aがインフルエンザ菌由来のP i l A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

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。

#### 【0062】

別の実施形態では、Aがインフルエンザ菌由来のP i l A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。

#### 【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

ある。

【 0 0 6 4 】

ある特定の実施形態では、A が配列番号 1 2 7 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 1 2 3、すなわち、配列番号 4 のアミノ酸 1 8 ~ 1 6 0 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 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 および配列番号 2 0 4；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 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 のいずれかとおよそ 8 5 %、8 8 %、9 0 %、9 2 %、9 5 % または 9 8 % 同一である。

【 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 1 4 8 の融合タンパク質、すなわち、配列番号 1 7 7 (QIQKAEQN DVKLAPPTDV RSGYI RLVKN VNYIDSESI WVDNQEPQIV HFDVVNLDK GLVYYPEPKR YARSVRQYKI LNCANYHLTQ VRTDFYDE FW GQGLRAAPKK QKKHTLSLTP DTTLYNAAQI ICANYGEAFS VDKKGGTKKA AVSELLQASA PYKADVELCV YSTNETTNTCT GKGNGIAADI TTAKGYVKS V TTSNGAITVK GDGTLANMEY ILQATGNAAT GVTWTTTCKG TDA SLFPANF CGSVTQ) である。

【 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 1 9 4 の融合タンパク質、すなわち、配列番号 2 1 9 (IQKAEQND VKLAPPTDVR SGYIR LVKNV NYYIDSESIW VDNQEPQIVH FDAVVNLDKG LYVYYPEPKRY ARSVRQYKIL NCANYHLTQV RTDFYDEF WG QGLRAAPKKQ KKHTLSLTPD TTLYNAAQII CANYGEAFSV DKKGGTKKAA VSELLQASAP YKADVELCVY STNETTNTCTG GKGNGIAADIT TAKGYVKS V TSNNGAITVK GDGTLANMEYI LQATGNAATG VTWTTTCKGT DAS LFPANFC GSVTQ) である。

肺炎球菌荚膜糖類コンジュゲート

荚膜糖類という用語には、荚膜多糖および荚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荚膜糖類に関する。

【 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 2 3 未満である。一実施形態では、免疫原性組成物は、2 3、2 2、2 1、2 0、1 9、1 8、1 7、1 6、1 5、1 4、または 1 3 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、1 0 ~ 2 3 の血清型、1 0 ~ 1 6 の血清型、1 0 ~ 1 5 の血清型、1 0 ~ 1 4 の血清型、1 0 ~ 1 3 の血清型または 1 0 ~ 1 2 の血清型を含む。

【 0 0 7 0 】

一実施形態では、肺炎球菌荚膜糖類コンジュゲートは、下記の血清型 1、2、3、4、5、6 A、6 B、7 F、8、9 N、9 V、1 0 A、1 1 A、1 2 F、1 4、1 5 B、1 7 F、1 8 C、1 9 A、1 9 F、2 0、2 2 F、2 3 F および 3 3 F 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

10

20

30

40

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 価免疫原性組成物は、血清型 1、5 および 7 F 由来の糖類をさらに含み得る。12 価免疫原性組成物は、血清型 6 A、19 A 由来の糖類をさらに含み得る。15 価免疫原性組成物は、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 価（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пит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пит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、髄膜炎菌（N. meningitides）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пит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（Baral doi 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、Sp36 と呼ばれる）、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、Sp036D と呼ばれる）、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、Sp036B と呼ばれる）、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）、無毒化ニュー

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。

【 0 0 7 4 】

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。

【 0 0 7 5 】

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 ~ 2 0 の間、1 ~ 1 8 の間、1 ~ 1 6 の間、1 ~ 1 4 の間、1 ~ 1 2 の間、1 ~ 1 0 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 1 9 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 1 8 C を含む。

【 0 0 7 6 】

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 6 B 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 6 B 糖類を含む。一実施形態では、免疫原性組成物は、血清型 7 F 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 7 F 糖類を含む。一実施形態では、免疫原性組成物は、9 V 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 9 V 糖類を含む。一実施形態では、免疫原性組成物は、血清型 1 4 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 1 4 糖類を含む。一実施形態では、免疫原性組成物は、血清型 1 8 C 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 1 8 C 糖類を含む。一実施形態では、免疫原性組成物は、血清型 1 9 F 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 1 9 F 糖類を含む。一実施形態では、免疫原性組成物は、血清型 2 3 F 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 2 3 F 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 6 A 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 1 9 A 糖類を含む。

【 0 0 7 7 】

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 6 B 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 7 F 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 9 V 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 1 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 2 3 F 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 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肺炎球菌 1 9 F 糖類を含む。一実施形態では、免疫原性組成物は、CRM 1 9 7 にコンジュゲートされた肺炎球菌血清型 6 A および CRM 1 9 7 にコンジュゲートされた肺炎球菌血清型 1 9 A 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 ~ 2 0  $\mu$  g の間、1 ~ 5  $\mu$  g の間、1 ~ 1 0  $\mu$  g の間または 1 ~ 3  $\mu$  g 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 ~ 2 0  $\mu$  g の間 ; 0 . 5 ~ 1 0  $\mu$  g の間 ; 0 . 5 ~ 5  $\mu$  g の間または 1 ~ 3  $\mu$  g の間の用量で各肺炎球菌荚膜糖類コンジュゲートを含有する。一実施形態では、荚膜糖類は異なる用量で存在してよく、例えば、ある荚膜糖類は正確に 1  $\mu$  g の用量で存在してよく、またはある荚膜糖類は正確に 3  $\mu$  g の用量で存在してよい。一実施形態では、血清型 3、1 8 C および 1 9 F ( または 4、1 8 C および 1 9 F ) 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、1 8 C および 1 9 F ( または 4、1 8 C および 1 9 F ) はおよそまたは正確に 3  $\mu$  g 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  $\mu$  g の用量で存在する。一実施形態では、血清型 1、5、6 B、7 F、9 V、1 4 および 2 3 F はおよそまたは正確に 1  $\mu$  g 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 4 9 7 5 2 4 号および欧州特許第 4 9 7 5 2 5 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 ~ 3 0 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】

肺炎球菌の荚膜多糖は、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、荚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、それらのサイズは、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 2 3 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

## 【 0 0 8 4 】

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 (Gever et 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 US 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 S 4459286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。

## 【 0 0 8 5 】

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ン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の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 HCL] 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、シアン酸エステル (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。

## 【 0 0 8 6 】

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 - N H S、EDC、T S T U 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 C D I 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、C D I 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 C D I カルバミン酸中間体の形成、およびこの C D I 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。

## 【 0 0 8 7 】

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 E P - 0 - 161 - 188、E P - 208375 および E P - 0 - 477508 に記載されている。

## 【 0 0 8 8 】

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NH<sub>2</sub>。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 + NH<sub>2</sub> - Prot  
 - - - - - > コンジュゲート

糖類 - アルデヒド + NH<sub>2</sub> - Prot - - - - - > シッフ塩基 + NaCNBH<sub>3</sub> - - - - - >  
 コンジュゲート

糖類 - COOH + NH<sub>2</sub> - Prot + EDAC - - - - - > コンジュゲート

糖類 - NH<sub>2</sub> + COOH - Prot + EDAC - - - - - > コンジュゲート

スパーサー（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 + NH<sub>2</sub> - - - - - NH<sub>2</sub>  
 - - - - - > 糖類 - - - - - NH<sub>2</sub> + COOH - Prot + EDAC - - - - - > コンジュ  
 ゲート

10

糖類 - OH + CNBr または CDAP - - - - - > シアン酸エステル + NH<sub>2</sub> - - - - - SH  
 H - - - - - > 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ば SPDP 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 + NH<sub>2</sub> - - - - - 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 + NH<sub>2</sub> - - - - - SH  
 - - - - - > 糖類 - SH + ハロアセチル化 - Prot - - - - - > コンジュゲート

糖類 - COOH + EDAC + NH<sub>2</sub> - - - - - NH<sub>2</sub> - - - - - > 糖類 - - - - - NH<sub>2</sub> +  
 EDAC + COOH - Prot - - - - - > コンジュゲート

20

糖類 - COOH + EDAC + NH<sub>2</sub> - - - - - 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ば 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 + NH<sub>2</sub> - - - - - 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 + NH<sub>2</sub> - - - - - 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 + NH<sub>2</sub> - - - - - NH<sub>2</sub> - - - - - > 糖類 - - - - - NH<sub>2</sub> + EDAC + C  
 OOH - Prot - - - - - > コンジュゲート

30

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（例えば、リシン残基上）、COOH 基（例えば、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）（例えば、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、肺炎球菌英膜糖類の全てが、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。

40

#### 【0102】

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、CDAP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、CDAP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、CDAP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、CDAP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。

10

#### 【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、CDAP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。

20

#### 【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、CDAP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、CDAP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

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 (Ph 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末端切断型、L y t X (自己分解酵素) ファミリー、L y t X末端切断型、C b p X末端切断型 - L y t X末端切断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 タンパク質 A)、S p 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。

#### 【0105】

P h t (ポリヒスチジントライアド) ファミリーは、タンパク質 P h t A、P h t B、P h t D、および P h t E を含む。P h t 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關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 P h t タンパク質は P h t D である。しかしながら、P h t A、P h t B、P h t D および P h t E 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。

#### 【0106】

P h t X タンパク質に関して、P h t A は国際公開第 9 8 / 1 8 9 3 0 号に開示され、S p 3 6 と呼ばれる。上述のように、それは P h t ファミリー由来のタンパク質であり、L X X C の I I 型シグナルモチーフを有する。P h t D は国際公開第 0 0 / 3 7 1 0 5 号に開示され、S p 0 3 6 D と呼ばれる。上述のように、それも P h t ファミリー由来のタンパク質であり、I I 型 L X X C シグナルモチーフを有する。一実施形態では、用語「P h t D」は、配列番号 2 2 0 を指す。P h t B は国際公開第 0 0 / 3 7 1 0 5 号に開示され、S p 0 3 6 B と呼ばれる。P h t B ファミリーの別のメンバーは、国際公開第 0 0 / 1 7 3 7 0 号に開示されているように、C 3 分解ポリペプチドである。このタンパク質も P h t ファミリーに由来し、I I 型 L X X C 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 9 8 / 1 8 9 3 0 号に開示されているタンパク質 S p 4 2 である。P h t B 末端切断型(およそ 7 9 k D) は国際公開第 9 9 / 1 5 6 7 5 号に開示され、これも P h t ファミリーのメンバーと見なされる。P h t E は国際公開第 0 0 / 3 9 2 9 9 号に開示され、B V H - 3 と呼ばれる。本明細書で任意の P h t タンパク質に言及する場合、P h t 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、P h t X という場合、任意の P h t 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。P h t D または P h t B という場合、例えば、国際公開第 0 1 / 9 8 3 3 4 号に見出されるように、それぞれ P h t D E (P h t D および P h t E を含む融合タンパク質) または P h t B E (P h t B および P h t E を含む融合タンパク質) を排除しない。

#### 【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

10

20

30

40

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00/37105号の配列番号4のアミノ酸21～838の配列と少なくとも85%、90%、95%、98%、99%または100%同一のアミノ酸配列を含む。

【0108】

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。

【0109】

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。

【0110】

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（R1および/またはR2）、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97/41151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97/41151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00/29434号に開示されている。P s p Cは、国際公開第97/09994号に開示されている。P b c Aは、国際公開第98/21337号に開示されている。S p s Aは、国際公開第98/39450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。

【0111】

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50%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（R1またはR2）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（R1およびR2）を保持する。このような実施形態の例は、国際公開第99/51266号または国際公開第99/51188号に例示されているN R 1 x R 2およびR 1 x 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。

【0112】

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、L y t XファミリーのC末端ドメインは、L y t Xタンパク質の触媒ドメインを含む。このファミリーは、L y t A、L y t BおよびL y t Cを含む。L y t Xファミリーに関して、L y t AはRonda et al., Eur J Biochem, 164:621-624 (1987)に開示されている。L y t Bは国際公開第98/18930号に開示され、S p 4 6とも呼ばれる。L y t Cもまた国際公開第98/18930号に開示され、S p 9 1とも呼ばれる。本発明の実施形態はL y t Cを含む。

#### 【0113】

別の実施形態は、L y t X末端切断型を含み、ここで、「L y t X」は上記で定義され、「末端切断型」は、コリン結合領域の50%以上を欠くL y t 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、C b p X末端切断型 - L y t X末端切断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、C b p XのN R 1 x R 2 (またはR 1 x R 2) およびL y t XのC末端部分(C t e r m、すなわち、コリン結合ドメインを欠くタンパク質)(例えば、L y t C C t e r mまたはS p 9 1 C t e r m)を含む。任意選択により、C b p X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。任意選択により、それはC b p Aである。任意選択により、L y t XはL y t C (S p 9 1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、L y t Xとの融合タンパク質として発現されるP s p AまたはP s a A末端切断型である。任意選択により、L y t XはL y t Cである。

#### 【0114】

P s a AおよびP s p A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、P s a Aおよびその膜貫通欠失変異体は、Berry & Paton, Infect Immun 1996 Dec;64(12):5255-62により記載されている。P s p Aおよびその膜貫通欠失変異体は、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】

P c p A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、P c p Aは国際公開第2011/075823号に記載されている。用語「P c p A」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、250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。  
30

#### 【0116】

S p 1 2 8およびS p 1 3 0は、国際公開第00/76540号に開示されている。S p 1 2 5は、L P X T G (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ことが分かっており、従って、本発明のさらなるタンパク質と見なされる。S p 1 2 5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Z m p Bとしても知られる。S p 1 0 1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 8 5 9 9 3を有する)。それはI型シグナル配列を特徴とする。S p 1 3 3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 8 5 9 9 2を有する)。これもまたI型シグナル配列を特徴とする。  
40

#### 【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、Ph t B、Ph t E、Ph t A、Ph t B DおよびPh t D Eからなる群から選択されるポリヒスチジンファミリー(Ph t X)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、3 D - M P L)、サポニン(例えば、Q S 2 1)、水中油エマルジョン、グラム陰性菌株由来のブ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、ヒト一用量当たり100~750、150~600、200~500、250~450、300~400、または350 μ g 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" (Powell 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0.5 ml 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(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。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。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。

【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。

【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(cocmprise)」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。

【0136】

本明細書で使用する場合、「対象」は、ヒト、非ヒト霊長類、および非霊長類哺乳類、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。

【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。これは癌治療に関し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】

保存的置換は周知であり、一般に、配列アラインメントコンピュータ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、P A M 2 5 0 (Dayhoft M.O. et al., (1978), "A model of evolutionary changes in proteins", In "Atlas of Protein sequence and structure" 5(3) M.O. Dayhoft (編), 345-352), National Biomedical Research Foundation, Washington、および B l o s u m 6 2 (Steven Henikof and Jorja G. Henikof (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 P E または P i l A (例えば、配列番号 4 ~ 配列番号 5 7 で示されるいずれかの P E 配列、配列番号 5 8 ~ 配列番号 1 2 1 で示されるいずれかの任意の P i l A 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。

10

#### 【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。

20

#### 【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。

30

#### 【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考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。

40

#### 【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。

6 x h i s = 6 ヒスチジン ;

50

× 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 l <sub>2</sub> = 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 = ジチオトレイトール ;	10
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 ;	
K <sub>2</sub> H P O <sub>4</sub> = 第二リン酸カリウム ;	20
K H <sub>2</sub> P O <sub>4</sub> = 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 l <sub>2</sub> = 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 ;	
m M = モリモル ;	
μ L = マイクロリットル ;	30
N a C l = 塩化ナトリウム ;	
N a <sub>2</sub> H P O <sub>4</sub> = 第二リン酸水素ナトリウム ;	
N a H <sub>2</sub> P O <sub>4</sub> = 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 = 一晚 ;	
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 ;	40
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。

## 【 0 1 4 8 】

下表に作製した融合タンパク質構築物を記載する。

## 【 0 1 4 9 】

## 【 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	
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)	
	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	
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)	
A.A.	1	22	23	163	166	275	283

10

20

30

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)	GGHHHHH 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)
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)
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)
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)
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

10

20

30

40

50

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:

atgaaatacctgctgccgaccgctgctgctggtctgctgctcctcgctgccagccggcgatggcc

*pelB* シグナルペプチド(アミノ酸) - 配列番号 130:

MKYLLPTAAA GLLLLAAQPA MA

*FlgI* シグナルペプチド(DNA) - 配列番号 131:

atgattaaattctctctgcattaattcttctactggtcacgacggcggtcaggct

10

*FlgI* シグナルペプチド(アミノ酸) - 配列番号 132:

MIKFLSALIL LLVTAAQA

*NadA* シグナルペプチド(DNA) - 配列番号 133:

atgaaacactttccatccaaagtactgaccacagccatccttgccactttctgtagcggcgactggca

*NadA* シグナルペプチド(アミノ酸) - 配列番号 134:

MKHFPSKVL TAILATFCSG ALA

20

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 *PilA* 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:

atgattaaattctctgcattaattctctactgggtcacgacggcggtcaggctgagactaaaaagcagcgggtatctgaattactg  
caagcgtcagcgccttataaggctgatgtggaattatgtgtatatagcacaaatgaacaacaaactgtacgggtggaaaaatg  
gtattgcagcagatataaccacagcaaaaggctatgtaaatcagtgacaacaagcaacgggtgcaataacagtaaaaggggat  
ggcacattggcaaatatggaatatatttgcagctacaggtaaatgctgcaacagggtgaacttgacaacaactgcaaaaggaac  
ggatgcctcttatttccagcaaaatttgcggaaggtgcacacaaggcggtgcgcagattcagaaggctgaacaaatgatgtgaa  
gctggcaccgcccactgatgtacgaagcggatataacgttggtaagaatgtgaattattacatcgatagtgatcgatctgggtg  
gataaccaagagccacaaattgtacatttgcagtggtgaatttagataagggtatgtgttatcctgagcctaaccgttatgca  
cgttctgtcgtcagtataagatctgaattgtgcaaatatcatttaactcaagtagcaactgatttctatgatgaatttggggacagggg  
ttgcgggcagcacctaaaaagcaaaagaaacatacgttaagtttaacacctgatacaacgctttataatgctgctcagattattgtg  
cgaactatggtgaagcatttgcagttgataaaaaaggcggtccaccaccaccaccactaa

10

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

MIKFLSALIL LLVTTAAQAE TKKAAVSELL QASAPYKADV ELCVYSTNET TNCTGGKNGI  
AADITTAKEY VKSVTTSNGA ITVKGDTLA NMEYILQATG NAATGVTWTT TCKGTDASLF  
PANFCGSVTQ GGAQIQKAEQ NDVKLAPPTD VRSGYIRLVK NVNYYIDSES IWDNQEPQI  
VHFDVAVNLD KGLYVYPEPK RYARSVRQYK ILNCANYHLT QVRTDFYDEF  
WGQGLRAAPK KQKKHTLSLT PDDTLYNAAQ IICANYGEAF SVDKKGGHHH HHH

20

LVL291 (DNA) - 配列番号 137:

atgaaatacctgctgccgaccgctgctgctggtctgctgctcctcgctgccagccggcgatggccagattcagaaggctgaaca  
aatgatgtgaagctggcaccgcccactgatgtacgaagcggatataacgttggtaagaatgtgaattattacatcgatagtg  
atcgatctgggtggataaccaagagccacaaattgtacatttgcagtggtgaatttagataagggtatgtgttatcctgagcc  
taaacgttatgcagttctgtcgtcagtataagatctgaattgtgcaaatatcatttaactcaagtagcaactgatttctatgatgaatt  
tggggacaggggttgcgggcagcacctaaaaagcaaaagaaacatacgttaagtttaacacctgatacaacgctttataatgctgc  
tcagattattgtgcgaactatgggaagcatttgcagttgataaaaaaggcggtcactaaaaagcagcgggtatctgaattactgcaa  
gcgtcagcgccttataaggctgatgtggaattatgtgtatatagcacaaatgaacaacaaactgtacgggtggaaaaatgggtatt  
gcagcagatataaccacagcaaaaggctatgtaaatcagtgacaacaagcaacgggtgcaataacagtaaaaggggatggc  
acattggcaaatatggaatatatttgcagctacaggtaatgctgcaacaggtgtaactggacaacaactgcaaaaggaacgga  
tgctcttatttccagcaaaatttgcggaaggtgcacacaaggcggtccaccaccaccaccactaa

30

LVL291 (タンパク質)(pelB sp)(ProtE aa 19-160)(GG)(PilA aa40-149)(GGHHHHHH) - 配列番  
号 138

MKYLLPTAAA GLLLAAQPA MAQIQKAEQN DVKLAPPTDV RSGYIRLVKN VNYIIDSESI  
WVDNQEPQIV HFDVAVNLDK GLYVYPEPKR YARSVRQYKI LNCANYHLTQ  
VRTDFYDEFW GQGLRAAPKK QKKHTLSLTP DTTLYNAAQI ICANYGEAFS VDKKGGTKKA  
AVSELLQASA PYKADVELCV YSTNETTNCT GGKNGIAADI TTAKGYVKS V TTSNGAITVK  
GDGTLANMEY ILQATGNAAT GVTWTTTCKG TDSLFPANF CGSVTQGGHH HHHH

LVL268 (DNA) - 配列番号 139:

atgaaataacctgctgccgaccgctgctgctggctgctgctcctcgctgccagccggcgatggccgataattcagaaggctgaaca  
aaatgatgtgaagctggcaccgcccactgatgtacgaagcggatatatacgtttggtaaagaatgtgaattattacatcgatagtga  
atcgaatctgggtggataaccaagagccacaaattgtacatttgaatgtcagtggtgaatttagataagggtatgtttatcctgagcc  
taaacgttatgcacgtttctgttcgtagataaagatcttgaattgtgcaaattatcatttaactcaagtacgaactgatttctatgatgaatt  
tggggacaggggttgcgggcagcacctaaaaagcaaaagaaacatacgtaagttaaacacctgatacaacgctttataatgctgc  
tcagattatttgtgcgaactatggtgaagcatttccagttgataaaaaaggcggcactaaaaaagcagcggtatctgaattactgcaa  
gcgtcagcgccttataaggctgatgtggaattatgtgtatatgcacaaatgaacaacaaactgtacgggtggaaaaaatggtatt  
gcagcagatataaccacagcaaaaggctatgtaaatcagtgacaacaagcaacgggtgcaataacagtaaaaggggatggc  
acatggc aaatatggaatatatttgcagctacaggtaatgtctgcaacagggtgaacttgacaacaactgcaaaaggaacgga  
tgcccttttatttcagcaaattttgcggaagtgtcacacaaggcggccaccaccaccaccaccac

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

MKYLPTAAA GLLLAAQPA MADIQKAEQN DVKLAPPTDV RSGYIRLVKN VNYIIDSESI  
WVDNQEPQIV HFDVAVNLDK GLYVYPEPKR YARSVRQYKI LNCANYHLTQ  
VRTDFYDEFW GQGLRAAPKK QKKHTLSLTP DTTLYNAAQI ICANYGEAFS VDKKGGTKKA  
AVSELLQASA PYKADVELCV YSTNETTNCT GGKNGIAADI TTAKEYVKSQ TTSNGAITVK  
GDGTLANMEY ILQATGNAAT GVTWTTTCKG TDASLFANF CGSVTQGGHH HHHH

LVL269 (DNA) - 配列番号 141:

atgaaacactttccatccaaagtactgaccacagccatcctgccactttctgtagcggcgccactggcagccacaaacgacgacg  
ataaggctgaacaaaatgatgtgaagctggcaccgcccagctgatgtacgaagcggatatatacgtttggttaaagaatgtgaattatt  
acatcgatagtgaatcgatctgggtggataaccaagagccacaaattgtacattttgatgcagtggtaatttagataagggtatgtat  
gtttatcctgagcctaaacggtatgcacgttctgttcgtcagtataagatctgaattgtgcaaattatcatttaactcaagtacgaactgat  
ttctatgatgaattttggggacagggtttgcgggcagcacctaaaaagcaaaagaaacatacgttaagttaacacctgatacaac  
gctttataatgctgctcagattatttgtgcgaactatggtgaagcattttcagttgataaaaaaggcggcactaaaaaagcagcgggat  
ctgaattactgcaagcgtcagcgcctataaggctgatgtggaattatgtgtatatagcacaaatgaaacaacaaactgtacgggtg  
gaaaaaatggattgctgagcagatataaccacagcaaaaggctatgtaaaatcagtgacaacaagcaacggtgcaataacaqta

aaaggggatggcacattggcaaatatggaatataatgtgcaagctacaggtaatgctgcaacaggtgtaactggacaacaactg  
caaaggaacggatgcctcttatttccagcaaattttgcggaagtgtcacacaaggcgccaccaccaccaccactaa

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

MKHFPSKVLT TAILATFCSG ALAATNDDDK AEQNDVKLAP PTDVRSYIR LVKNVNYID  
SESIWVDNQE PQIVHFDVV NLDKGLVYYP EPKRYARVR QYKILNCANY HLTQVRTDFY  
DEFWGQLRA APKKQKKHTL SLTPDTTLYN AAQICANYG EAFSVDKKGK TKKAAVSELL  
QASAPYKADV ELCVYSTNET TNCTGGKNGI AADITTAKGY VKSVTTSNGA ITVKGDGTLA  
NMEYILQATG NAATGVTWTT TCKGTDASLF PANFCGSVTQ GGHHHHHH

10

LVL270 (DNA) - 配列番号 143:

atgcaccaccaccaccacagcgcgagattcagaaggctgaacaaatgatgtgaagctggcaccgcccactgatgtacg  
aagcgatatacgtttgtaagaatgtgaattattacatcgatagtgatctgggtggataaccaagagccacaaattgta  
catttgatgcagtggtgaattagataagggattgtatgttatcctgagcctaaacgttatgcacgttctgtcgtcagtataagatctg  
aattgtgcaaattatcatttaactcaagtacgaactgatttctatgatgaatttggggacagggttgcgggcagcacctaaaaagca  
aaagaaacatacgttaagttaacacctgatacaacgcttataatgctgctcagattttgtgcgaactatggtgaagcattttagt  
gataaaaaaggcgccactaaaaaagcagcggtatctgaattactgcaagcgtcagcgcttataaggctgatgtggaattatgtg  
atatagcacaatgaaacaacaaactgtacgggtggaaaaatggtattgcagcagatataaccacagcaaaaggctatgtaa  
aatcagtgacaacaagcaacggtgcaataacagtaaaaggggatggcacattggcaaataatggaatataatgtgcaagctacag  
gtaatgtgcaacaggtgtaactggacaacaactgcaaaggaacggatgcctcttatttccagcaaattttgcggaagtgtcac  
acaataa

20

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

MHHHHHHSAQ IQKAEQNDVK LAPPTDVRSY YIRLVKNVNY YIDSESIWVD NQEPQIVHFD  
AVVNLKGLY VYPEPKRYAR SVRQYKILNC ANYHLTQVRT DFYDEFWGQG  
LRAAPKKQKK HTLSLTPDTT LYNAAQIICA NYGEAFSVDK KGGTKKAAS ELLQASAPYK  
ADVELCVYST NETTNCTGGK NGIAADITTA KGYVKSVTTS NGAITVKGDG TLANMEYILQ  
ATGNAATGVT WTTTCKGTDA SLFPANFCGS VTQ

30

LVL315 (DNA) - 配列番号 145:

atgaaatacctgctgccgaccgctgctgctgctgctcctcgctgccagccggcgatggccatggataaggctgaacaaaa  
tgatgtgaagctggcaccgcccactgatgtacgaagcgatatacgtttgtaagaatgtgaattattacatcgatagtgatcg  
atctgggtggataaccaagagccacaaattgtacatttgatgcagtggtgaattagataagggattgtatgttatcctgagcctaaa  
cgttatgcacgttctgtcgtcagtataagatctgaattgtgcaaattatcatttaactcaagtacgaactgatttctatgaatttggg

40

gacaggggttgcgggcagcacctaaaaagcaaaagaaacatacgttaagtttaacacctgatacaacgctttataatgctgctcag  
attattgtgcgaactatgggaagcattttcagttgataaaaaaggcggcactaaaaagcagcggtatctgaattactgcaagcgt  
cagcgccctataaggctgatgtggaattatgtgtatatagcacaaatgaaacaacaaactgtacgggtggaaaaaatggtattgca  
gcagatataaccacagcaaaaggctatgtaaaatcagtgacaacaagcaacggtgcaataacagtaaaaggggatggcacat  
tggcaaatatggaatatatttgaagctacaggtaatgctgcaacaggtgtaactggacaacaactgcaaaggaacggatgcc  
tctttattccagcaaattttgcggaagtgtcacacaaggcggccaccaccaccaccactaa

LVL315 (タンパク質): (pelB sp)(MD)(ProtE aa 22-160)(GG)(PilA aa40-149)(GGHHHHHH) -  
配列番号 146:

10

MKYLLPTAAA GLLLLAAQPA MAMDKAEQND VKLAPPTDVR SGYIRLVKNV NYYIDSESIW  
VDNQEPQIVH FDAVVNLDKG LYVYPEPKRY ARSVRQYKIL NCANYHLTQV  
RTDFYDEFWG QGLRAAPKKQ KKHLSLTPD TTYLNAQII CANYGEAFSV DKKGGTKKAA  
VSELLQASAP YKADVELCVY STNETTNCTG GKNGIAADIT TAKGYVKSVT TSNGAITVKG  
DGTLANMEYI LQATGNAATG VTWTTTCKGT DASLFPANFC GSVTQGGHHH HHH

LVL317 (DNA) - 配列番号 147:

atgaaatacctgctgccgaccgctgctgctggtctgctgctcctcgctgccagccggcgatggcccagattcagaaggctgaaca  
aaatgatgtgaagctggcaccgctgactgatgtacgaagcggtatatacgtttggtaaagaatgtgaattattacatcgatagta  
atcgatctgggtggataaccaagagccacaaattgtacattttgatgcagtggtgaatttagataagggattgtatgtttatcctgagcc  
taaacggtatgcacgttctgttcgtcagtataagatctgaattgtgcaattatcatttaactcaagtacgaactgatttctatgatgaattt  
tggggacaggggttgcgggcagcacctaaaaagcaaaagaaacatacgttaagtttaacacctgatacaacgctttataatgctgc  
tcagattattgtgcgaactatgggaagcatttcagttgataaaaaaggcggcactaaaaagcagcggtatctgaattactgcaa  
gcgtcagcgccctataaggctgatgtgaattatgtgtatatagcacaaatgaaacaacaaactgtacgggtggaaaaaatggtatt  
gcagcagatataaccacagcaaaaggctatgtaaaatcagtgacaacaagcaacggtgcaataacagtaaaaggggatggc  
acattggcaaatatggaatatatttgaagctacaggtaatgctgcaacaggtgtaacttggaacaacaactgcaaaggaacgga  
tgccctcttattccagcaaattttgcggaagtgtcacacaataa

20

30

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

MKYLLPTAAA GLLLLAAQPA MAQIQKAEQN DVKLAPPTDV RSGYIRLVKN VNYIDSESI  
WVDNQEPQIV HFDAVVNLDK GLYVYPEPKR YARSVRQYKI LNCANYHLTQ  
VRTDFYDEFW GQGLRAAPKK QKKHLSLTP DTTYLNAQII ICANYGEAFS VDKKGGTKKA  
AVSELLQASA PYKADVELCV YSTNETTNCT GKNGIAADI TTAAGYVKS SVTTSNGAITVK  
GDGTLANMEY ILQATGNAAT GVTWTTTCKG TDASLFPANF CGSVTQ

LVL318 (DNA) - 配列番号 149:

40

atgaaatacctgctgccgaccgctgctgctggtctgctgctcctcgctgccagccggcgatggccatggataaggctgaacaaaa  
tgatgtgaagctggcaccgcccactgatgtacgaagcggatatatacgtttggtaaagaatgtgaattattacatcgatagtgatcg  
atctgggtggataaccaagagccacaaaattgtacattttgatgcagtggtgaatttagataagggattgtatgtttatcctgagcctaaa  
cgttatgcacgttctgtctgctcagtataagatcttgaattgtgcaaatatcatftaactcaagtacgaactgatttctatgatgaattttggg  
gacaggggttgcgggcagcacctaaaaagcaaaagaaacatacgttaagttaacacctgatacaacgctttataatgctgctcag  
attatttgcgaactatggtgaagcattttcagttgataaaaaaggcggcactaaaaagcagcggtatctgaattactgcaagcgt  
cagcgccctataaggctgatgtggaattatgtgtatatagcacaatgaacaacaaactgtacgggtggaaaaaatggtattgca  
gcagatataaccacagcaaaaggctatgtaaatcagtgacaacaagcaacgggtgcaataacagtaaaaggggatggcacat  
tggcaaatatggaatatatttgcagctacaggtaatgctgcaacaggtgtaacttgacaacaactgcaaaggaacgggatgcc  
tctttattccagcaaattttgcggaagtgtcacacaataa

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  
VDNQEPQIVH FDAVNLDKG LYVYPEPKRY ARSVRQYKIL NCANYHLTQV  
RTDFYDEFWG QGLRAAPKKQ KKHTLSLTPD TTYLNAAQII CANYGEAFSV DKKGGTKKAA  
VSELLQASAP YKADVELCVY STNETTNTCTG GKNQIAADIT TAKGYVKSVT TSNGAITVKG  
DGTLANMEYI LQATGNAATG VTWTTTCKGT DASLFPANFC GSVTQ

20

LVL702 (DNA) - 配列番号 181:

atgaaatacctgctgccgaccgctgctgctggtctgctgctcctcgctgccagccggcgatggccattcagaaggctgaacaaaa  
tgatgtgaagctggcaccgcccactgatgtacgaagcggatatatacgtttggtaaagaatgtgaattattacatcgatagtgatcg  
atctgggtggataaccaagagccacaaaattgtacattttgatgcagtggtgaatttagataagggattgtatgtttatcctgagcctaaa  
cgttatgcacgttctgtctgctcagtataagatcttgaattgtgcaaatatcatftaactcaagtacgaactgatttctatgatgaattttggg  
gacaggggttgcgggcagcacctaaaaagcaaaagaaacatacgttaagttaacacctgatacaacgctttataatgctgctcag  
attatttgcgaactatggtgaagcattttcagttgataaaaaaggcggcactaaaaagcagcggtatctgaattactgcaagcgt  
cagcgccctataaggctgatgtggaattatgtgtatatagcacaatgaacaacaaactgtacgggtggaaaaaatggtattgca  
gcagatataaccacagcaaaaggctatgtaaatcagtgacaacaagcaacgggtgcaataacagtaaaaggggatggcacat  
tggcaaatatggaatatatttgcagctacaggtaatgctgcaacaggtgtaacttgacaacaactgcaaaggaacgggatgcc  
tctttattccagcaaattttgcggaagtgtcacacaaggcggccaccaccaccaccac

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  
VDNQEPQIVH FDAVNLDKG LYVYPEPKRY ARSVRQYKIL NCANYHLTQV

40



RTDFYDEFWG QGLRAAPKKQ KKHTLSLTPD TTYNAAQII CANYGEAFSV DKKGGTCKAA  
VSELLQASAP YKADVELCVY STNETTCTG GKNIAADIT TAKGYVKSVT TSNGAITVKG  
DGTLANMEYI LQATGNAATG VTWTTTCKGT DASLFANFC GSVTQGGHHH HHH

LVL736 (DNA) - 配列番号 183:

atgaaatacctgctgccgaccgctgctgctggtctgctgctcctcgctgccagccggcgatggccagcgcccagattcagaaggc  
 tgaacaaatgatgtgaagctggcaccgcccactgatgtacgaagcggatatatacgtttgtaaagaatgtgaattattacatcga  
 tagtgaatcgatctgggtggataaccaagagccacaaattgtacattttgatgcagtggtgaatttagataagggattgtatgtttatcct  
 gagcctaaacgttatgcacgttctgttcgtcagtataagatcttgaattgtgcaaatatcatttaactcaagtagcaactgatttctatgat  
 gaattttggggacaggggttgcgggcagcacctaaaaagcaaaagaaacatacgftaagttaacacctgatacaacgctttataa  
 tgctgctcagattatttgcgaactatgggaagcattttcagttgataaaaaaggcggcactaaaaagcagcgggtatctgaatta  
 ctgaagcgtcagcgccttataaggctgatgtggaattatgtgtatagcacaaatgaaacaacaaactgtacgggtggaaaaa  
 atggtattgcagcagatataaccacagcaaaaggctatgtaaaatcagtgacaacaagcaacgggtgaataacagtaaaagg  
 gatggcacattggcaaatatggaatatatttgcagctacaggaatgctgcaacaggtgtaacttggaacaacactgcaagg  
 aacggatgcctcttatttccagcaaattttgcggaagtgtcacacaaggcggccaccaccaccaccaccac

10

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

20

MKYLPTAAA GLLLLAAQPA MASAQIKAE QNDVKLAPPT DVRSGYIRLV KNVNYYIDSE  
SIWVDNQEPQ IVHFDVAVNL DKGLYVYPEP KRYARSVRQY KILNCANYHL TQVRTDFYDE  
FWGQGLRAAP KKQKKHTLSL TPDTTYNAA QICANYGEA FSVDKKGGTK KAAVSELLQA  
SAPYKADVEL CVYSTNETTN CTGGKNIAA DITTAKGYVK SVTTSNGAIT VKGDGTLANM  
EYILQATGNA ATGVTWTTTC KGTDASLFPA NFCGSVTQGG HHHHHH

LVL737 (DNA) - 配列番号 185:

30

atgaaatacctgctgccgaccgctgctgctggtctgctgctcctcgctgccagccggcgatggccgcccagattcagaaggctga  
 acaaaatgatgtgaagctggcaccgcccactgatgtacgaagcggatatatacgtttgtaaagaatgtgaattattacatcgatag  
 tgaatcgatctgggtggataaccaagagccacaaattgtacattttgatgcagtggtgaatttagataagggattgtatgtttatcctga  
 gcctaaacgttatgcacgttctgttcgtcagtataagatcttgaattgtgcaaatatcatttaactcaagtagcaactgatttctatgatga  
 attttggggacaggggttgcgggcagcacctaaaaagcaaaagaaacatacgftaagttaacacctgatacaacgctttataatgc  
 tgctcagattatttgcgaactatgggaagcattttcagttgataaaaaaggcggcactaaaaagcagcgggtatctgaattactg  
 caagcgtcagcgccttataaggctgatgtggaattatgtgtatagcacaaatgaaacaacaaactgtacgggtggaaaaaatg  
 gtattgcagcagatataaccacagcaaaaggctatgtaaaatcagtgacaacaagcaacgggtgaataacagtaaaaggggat

40

ggcacattggcaaataatggaatatatttgaagctacaggtaatgctgcaacaggtgtaactggacaacaacttgcaaaggaac  
ggatgcctcttatttccagcaaatgttgcggaagtgacacaaggcgccaccaccaccaccaccac

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 VHFDAWNLD KGLYVYPEPK RYARSVRQYK ILNCANYHLT QVRTDFYDEF  
WGQGLRAAPK KQKKHTLSLT PDTTYLYNAAQ IICANYGEAF SVDKKGGTKK AAVSELLQAS  
APYKADVELC VYSTNETTNC TGGKNGIAAD ITTAKGYVKS VTTSNGAITV KGDGTLANME  
YILQATGNAA TGVTTTCK GTDASLFPAN FCGSVTQGGH HHHHH

10

LVL738 (DNA) - 配列番号 187:

atgaaatacctgctgccgaccgctgctgctgctgctcctgctgccagccggcgatggccaaggctgaacaaatgatgt  
gaagctggcaccgccgactgatgtacgaagcggatatatacgttggtaaagaatgtgaattattacatcgatagatcgatctg  
gggtggataaccaagagccacaaattgtacatttgcagtggtgaatttagataagggtatgtatgttctcctgagcctaaacgtta  
tgcacgttctgtcgtcagtataagatctgaattgtgcaaatatcatttaactcaagtacgaactgatttctatgatgaatttggggaca  
gggttgcgggcagcacctaaaaagcaaaagaaacatacgttaagtttaacacctgatacaacgcttataatgctgctcagattatt  
tgtgcgaactatggtgaagcatttgcagttgataaaaaaggcgccactaaaaagcagcggatctgaattactgcaagcgtcagc  
gcctataaggctgatgtgaattatgtgtatatagcacaatgaacaacaaactgtacgggtggaaaaatggtattgcagcag  
atataaccacagcaaaaggctatgtaaaatcagtgacaacaagcaacggtgcaataacagtaaaaggggatggcacattggc  
aaatatggaatatatttgaagctacaggtaatgctgcaacaggtgtaacttgacaacaacttgcaaaggaacggatgcctctt  
attccagcaaatgttgcggaagtgacacaaggcgccaccaccaccaccaccac

20

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

MKYLLPTAAA GLLLLAAQPA MAKAEQNDVK LAPPTDVRSG YIRLVKNVNY YIDSESIWVD  
NQEPQIVHFD AVVNLDKGLY VYPEPKRYAR SVRQYKILNC ANYHLTQVRT  
DFYDEFWGQG LRAAPKKQKK HTLSLTPDIT LYNAAQIIICA NYGEAFSVDK KGGTKKAAYS  
ELLQASAPYK ADVELCVYST NETTNCTGGK NGIAADITTA KGYVKSVTTS NGAITVKGDG  
TLANMEYILQ ATGNAATGVT WTTTCKGTDA SLFPANFCGS VTQGGHHHHH H

30

LVL739 (DNA) - 配列番号 189:

ATGAAATACCTGCTGCCGACCGCTGCTGCTGGTCTGCTGCTCCTCGCTGCCAGCCGGC  
GATGGCCGCTGAACAAAATGATGTGAAGCTGGCACC GCCGACTGATGTACGAAGCGGAT  
ATATACGTTTGGTAAAGAATGTGAATTATTACATCGATAGTGAATCGATCTGGGTGGATAA  
CCAAGAGCCACAAATTGTACATTTTGTGTCAGTGGTGAATTTAGATAAGGGATTGTATGTT  
TATCCTGAGCCTAAACGTTATGCACGTTCTGTTCTGTCAGTATAAGATCTTGAATTGTGCAA  
ATTATCATTTAACTCAAGTACGAAGTATTTCTATGATGAATTTTGGGGACAGGGTTTGC  
GGCAGCACCTAAAAAGCAAAAGAAACATACGTTAAGTTTAAACACCTGATACAACGCTTTAT  
AATGCTGCTCAGATTATTTGTGCGAACTATGGTGAAGCATTTTCAGTTGATAAAAAAGGC  
GGCACTAAAAAGCAGCGGTATCTGAATTACTGCAAGCGTCAGCGCCTTATAAGGCTGAT  
GTGGAATTATGTGTATATAGCACAAATGAAACAACAACTGTACGGGTGGAAAAATGGT  
ATTGCAGCAGATATAACACAGCAAAAGGCTATGTAAATCAGTGACAACAAGCAACGGT  
GCAATAACAGTAAAAGGGGATGGCACATTGGCAAATATGGAATATATTTTGAAGCTACA  
GGTAATGCTGCAACAGGTGTAAGTTGGACAACAAGTTGCAAAGGAACGGATGCCTCTTTA  
TTCCAGCAAATTTTTCGGAAGTGTACACAAGGCGGCCACCACCACCACCACCAC

10

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

20

MKYLPTAAA GLLLAAQPA MAAEQNDVKL APPTDVRSGY IRLVKNVNY IDSESIWVDN  
QEPQIVHFDA VVNLDKGLYV YPEPKRYARS VRQYKILNCA NYHLTQVRTD  
FYDEFWQGGL RAAPKKQKKH TLSLTPDTTL YNAAQIICAN YGEAFSVDKK GGTKKAHVSE  
LLQASAPYKA DVELCVYSTN ETTNCTGGKN GIAADITTAK GYVKSVTTSN GAITVKGDGT  
LANMEYILQA TGNAATGVTW TTTCKGTDAS LFPANFCGSV TQGGHHHHHH

LVL740 (DNA) - 配列番号 191:

30

atgaaatacctgctgccgaccgctgctgctggtctgctgctcctcgctgccagccggcgatggccgaacaaatgatgtgaagct  
ggcaccgcccactgatgtacgaagcggatatactgttgtaaagaatgtgaattattacatcgatagtgatcgatctgggtggat  
aaccaagagccacaaattgtacatttgatgcagtggtgaattagataagggattgtatggtatcctgagcctaaacggtatgcacgt  
tctgttcgctcagtataagatcttgaattgtgcaaattatcatttaactcaagtacgaactgatttctatgatgaattttggggacaggggttg  
cgggcagcacctaaaaagcaaaagaaacatacgtaagttaacacctgatacaacgctttataatgctgctcagattattgtgcg  
aactatggtgaagcatttcagttgataaaaaaggcgcactaaaaagcagcggatctgaattactgaagcgtcagcgccctat  
aaggctgatgtgaattatgtgtatatagcacaatgaaacaacaaactgtacgggtggaaaaaatggtattgcagcagatataa  
ccacagcaaaaggctatgtaaatcagtgacaacaagcaacgggtgcaataacagtaaaaggggatggcacattggcaaatat

40

ggaatatattttgcaagctacaggtaatgctgcaacaggtgtaacttgacaacaacttgcaaaggaacggatgcctctttattcca  
gcaaatttttgcggaaggtgtcacacaaggcgccaccaccaccaccaccac

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

MKYLLPTAAA GLLLLAAQPA MAEQNDVKLA PPTDVRSGYI RLVKNVNYI DSESIWVDNQ  
EPQIVHFDV VNLDKGLYVY PEPKRYARSV RQYKILNCAN YHLTQVRTDF YDEFWGOGLR  
AAPKKQKKHT LSLTPDTTLY NAAQIICANY GEAFSVDKKG GTKKAAVSEL LQASAPYKAD  
VELCVYSTNE TTNCTGGKNG IAADITTAKG YVKSVTTSNG AITVKGDGTL ANMEYILQAT  
GNAATGVTWT TTCKGTDASL FPAFNCGSVT QGGHHHHHH

10

LVL735 (DNA) - 配列番号 193:

ATGAAATACCTGCTGCCGACCGCTGCTGCTGGTCTGCTGCTCCTCGCTGCCAGCCGGC  
GATGGCCATTCAGAAGGCTGAACAAAATGATGTGAAGCTGGCACC GCCGACTGATGTAC  
GAAGCGGATATATACGTTTGGTAAAGAATGTGAATTATTACATCGATAGTGAATCGATCTG  
GGTGGATAACCAAGAGCCACAAATTGTACATTTTGTGTCAGTGGTGAATTTAGATAAGGG  
ATTGTATGTTTATCCTGAGCCTAAACGTTATGCACGTTCTGTTTCGTCAGTATAAGATCTTG  
AATTGTGCAAATTATCATTTAACTCAAGTACGAACTGATTTCTATGATGAATTTTGGGGAC  
AGGGTTTGC GGCGAGCACCTAAAAAGCAAAGAAACATACGTTAAGTTTAACACCTGATA  
CAACGCTTTATAATGCTGCTCAGATTATTTGTGCGAACTATGGTGAAGCATTTTCAGTTGA  
TAAAAAGGCGGCACTAAAAAGCAGCGGTATCTGAATTACTGCAAGCGTCAGCGCCTTA  
TAAGGCTGATGTGGAATTATGTGTATATAGCACAAATGAAACAACAACTGTACGGGTGG  
AAAAAATGGTATTGCAGCAGATATAACCACAGCAAAGGCTATGTAAATCAGTGACAAC  
AAGCAACGGTGCAATAACAGTAAAAGGGGATGGCACATTGGCAAATATGGAATATATTTT  
GCAAGCTACAGGTAATGCTGCAACAGGTGTAACCTGGACAACAACCTGCAAAGGAACGG  
ATGCCTCTTTATTTCCAGCAAATTTTTCGGAAGTGTACACAA

20

30

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

MKYLLPTAAA GLLLLAAQPA MAIQKAEQND VKLAPPTDVR SGYIRLVKNV NYYIDSESIW  
VDNQEPQIVH FDAVVNLDKG LYVYPEPKRY ARSVRQYKIL NCANYHLTQV  
RTDFYDEFWG QGLRAAPKKQ KKHTLSLTPD TTYNAAQII CANYGAEFSV DKKGGTKKAA  
VSELLQASAP YKADVELCVY STNETTNCTG GKNGIAADIT TAKGYVKSVT TSNGAITVKG  
DGTLANMEYI LQATGNAATG VTWTTTCKGT DASLFPANFC GSVTQ

40

LVL778 (DNA) - 配列番号 195:

atgaaatacctgctgccgaccgctgctgctggctgctgctcctcgctgcccagccggcgatggccagcgcccagattcagaaggc  
tgaacaaaatgatgtgaagctggcaccgcccactgatgtacgaagcggatatatacgtttgtaaagaatgtgaattattacatcga  
tagtgaatcgatctgggtggataaccaagagccacaaaattgtacatttgatgcagtggtgaatttagataagggattgtatgtttatcct  
gagcctaaacggtatgcacgttctgttcgctcagtataagatctgaattgtgcaaattatcatttaactcaagtacgaactgatttctatgat  
gaattttggggacaggggttgcgggcagcacctaaaaagcaaaagaacatacggttaagttaacacctgatacaacgctttataa  
tgctgctcagattattgtgcgaactatgggaagcatttcagttgataaaaaaggcggcactaaaaaagcagcggtatctgaatta  
ctgaagcgtcagcgcttataaggctgatgtggaattatgtgtatatagcacaatgaaacaacaaactgtacgggtggaaaaa  
atggtattgcagcagatataaccacagcaaaaggctatgtaaaatcagtgacaacaagcaacgggtgcaataacagtaaaaggg  
gatggcacattggcaaatatggaatataatttgcaagctacaggtaatgctgcaacagggtgaactggacaacaactgcaaaagg  
aacggatgcctctttatttcagcaaattttgcggaagtgtcacacaa

10

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

MKYLPTAAA GLLLLAAQPA MASAQIQKAE QNDVKLAPPT DVRSGYIRLV KNVNYYIDSE  
SIWVDNQEPQ IVHFDVAVNL DKGLYVYPEP KRYARSVRQY KILNCANYHL TQVRTDFYDE  
FWGQGLRAAP KKQKKHTLSL TPDITLYNAA QIICANYGEA FSVDKKGGTK KAAVSELLQA  
SAPYKADVEL CVYSTNETTN CTGGKNGIAA DITTAKGYVK SVTTSNGAIT VKGDGTLANM  
EYILQATGNA ATGVTWTTTC KGTDASLFPA NFCGSVTQ

20

LVL779 (DNA) - 配列番号 197:

atgaaatacctgctgccgaccgctgctgctggctgctgctcctcgctgcccagccggcgatggccgcccagattcagaaggctga  
acaaaatgatgtgaagctggcaccgcccactgatgtacgaagcggatatatacgtttgtaaagaatgtgaattattacatcgatag  
tgaatcgatctgggtggataaccaagagccacaaaattgtacatttgatgcagtggtgaatttagataagggattgtatgtttatcctga  
gcctaaacggtatgcacgttctgttcgctcagtataagatctgaattgtgcaaattatcatttaactcaagtacgaactgatttctatgatga  
attttggggacaggggttgcgggcagcacctaaaaagcaaaagaacatacggttaagttaacacctgatacaacgctttataatgc  
tgctcagattattgtgcgaactatgggaagcatttcagttgataaaaaaggcggcactaaaaaagcagcggtatctgaattactg  
caagcgtcagcgcttataaggctgatgtggaattatgtgtatatagcacaatgaaacaacaaactgtacgggtggaaaaaatg  
gtattgcagcagatataaccacagcaaaaggctatgtaaaatcagtgacaacaagcaacgggtgcaataacagtaaaaggggat  
ggcacattggcaaatatggaatataatttgcaagctacaggtaatgctgcaacagggtgaactggacaacaactgcaaaagggaac  
ggatgcctctttatttcagcaaattttgcggaagtgtcacacaa

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  
IWVDNQEPQI VHFDAVNLD KGLYVYPEPK RYARSVRQYK ILNCANYHLT QVRTDFYDEF  
WGQGLRAAPK KQKKHTLSLT PDDTLYNAAQ IICANYGEAF SVDKKGGTKK AAVSELLQAS  
APYKADVELC VYSTNETTNC TGGKNGIAAD ITTAKGYVKS VTTSNGAITV KGDGTLANME  
YILQATGNAA TGVWTWTTCK GTDASLFPAN FCGSVTQ

LVL780 (DNA) - 配列番号 199:

atgaaatacctgctgccgaccgctgctgctggtctgctgctcctcgctgccagccggcgatggccaaggctgaacaaaatgatgt  
 gaagctggcaccgcccactgatgtacgaagcggatatatacgtttgtaagaatgtgaattattacatcgatagtgatcgatctg  
 ggtggataaccaagagccacaaaattgtacatttgatgcagtggtgaatttagataagggattgtatgtttatcctgagcctaaccgtta  
 tgcacgttctgtcgtcagtataagatctgaattgtgcaattatcatttaactcaagtacgaactgatttctatgatgaatttggggaca  
 ggggttgcgggcagcacctaaaaagcaaaagaacatacgttaagtttaacacctgatacaacgctttataatgctgctcagattatt  
 tgtgcgaactatgggaagcatttcagttgataaaaaaggcggcactaaaaagcagcggatctgaattactgcaagcgtcagc  
 gccttataaggctgatgtggaattatgtgtatatagcacaatgaacaacaaactgtacgggtggaaaaatggtattgcagcag  
 atataaccacagcaaaaggctatgtaaatcagtgacaacaagcaacgggtgcaataacagtaaaaggggatggcacattggc  
 aaatatggaatatatttgcagctacaggaatgtgcaacagggtgaacttggacaacaactgcaaggaacggatgcctctt  
 atttcagcaaattttgcggaagtgtcacacaa

10

20

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

MKYLLPTAAA GLLLLAAQPA MAKAEQNNDVK LAPPTDVRSG YIRLVKNVNY YIDSESIWVD  
NQEPQIVHFD AVVNLDKGLY VYPEPKRYAR SVRQYKILNC ANYHLTQVRT  
DFYDEFWGQG LRAAPKKQKK HTLSLTPDDT LYNAAQIICA NYGEAFSVDK KGGTKKAAYS  
ELLQASAPYK ADVELCVYST NETTNCCTGGK NGIAADITTA KGYVKSVTTS NGAITVKGDG  
TLANMEYILQ ATGNAATGVT WTTTCKGTDA SLFPANFCGS VTQ

30

LVL781 (DNA) - 配列番号 201:

Atgaaatacctgctgccgaccgctgctgctggtctgctgctcctcgctgccagccggcgatggccgctgaacaaaatgatgtgaa  
 gctggcaccgcccactgatgtacgaagcggatatatacgtttgtaagaatgtgaattattacatcgatagtgatcgatctgggtg  
 gataaccaagagccacaaaattgtacatttgatgcagtggtgaatttagataagggattgtatgtttatcctgagcctaaccgttatgca  
 cgttctgtcgtcagtataagatctgaattgtgcaattatcatttaactcaagtacgaactgatttctatgatgaatttggggacagggg  
 ttgcgggcagcacctaaaaagcaaaagaacatacgttaagtttaacacctgatacaacgctttataatgctgctcagattatttg  
 cgaactatgggaagcatttcagttgataaaaaaggcggcactaaaaagcagcggatctgaattactgcaagcgtcagcgct  
 tataaggctgatgtggaattatgtgtatatagcacaatgaacaacaaactgtacgggtggaaaaatggtattgcagcagatat  
 aaccacagcaaaaggctatgtaaatcagtgacaacaagcaacgggtgcaataacagtaaaaggggatggcacattggcaaat

40

atggaatatatttgcagctacaggtaatgctgcaacaggtgtaactggacaacaactgcaaaggaacggatgcctctttatttcc  
agcaaattttgcggaaggtgcacacaa

LVL781 (タンパク質): (pelB sp)(ProtE aa 23-160)(GG)(PilA aa40-149) - 配列番号 202:

MKYLLPTAAA GLLLLAAQPA MAEEQNVDKL APPTDVRSGY IRLVKNVNYI IDSESIWVDN  
QEPQIVHFDA VNLDKGLYV YPEPKRYARS VRQYKILNCA NYHLTQVRTD  
FYDEFWGQGL RAAPKKQKKH TLSLTPDTTL YNAAQIICAN YGEAFSVDKK GGTKKAAVSE  
LLQASAPYKA DVELCVYSTN ETTNCTGGKN GIAADITAK GYVKSVTTSN GAITVKGDGT  
LANMEYILQA TGNAATGVTW TTTCKGTDAS LFPANFCGSV TQ

10

LVL782 (DNA) - 配列番号 203:

atgaaatacctgctccgaccgctgctgctggtctgctgctcctcgctgccagccggcgatggccgaacaaaatgatgtgaagct  
ggcaccgccgactgatgtacgaagcggatatatacgtttgtaaagaatgtgaattattacatcgatagtgatcgatctgggtggat  
aaccaagagccacaaattgtacatttgcagtggtgaatttagataagggattgtatgtttatcctgagcctaaacgttatgcagct  
tctgttcgctagataagattgtgaattgtgcaattatcatttaactcaagtacgaactgatttctatgatgaattttgggacagggttg  
cgggcagcacctaaaaagcaaaagaaacatacgtaagtttaacacctgatacaacgcttataatgctgctcagattattgtgcg  
aactatggtgaagcatttgcagtgataaaaaaggcggcactaaaaagcagcggtatctgaattactgcaagcgtcagcgccttat  
aaggctgatgtggaattatgtgtatatagcacaatgaaacaacaactgtacgggtggaaaaaatgtattgcagcagatataa  
ccacagcaaaaggctatgtaaatcagtgacaacaagcaacgggtgcaataacagtaaaaggggatggcattggcaaatat  
ggaatatatttgcagctacaggtaatgctgcaacaggtgtaactggacaacaactgcaaaggaacggatgcctctttatttcca  
gcaaattttgcggaaggtgcacacaa

20

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

MKYLLPTAAA GLLLLAAQPA MAEQNDVKLA PPTDVRSGYI RLVKNVNYI DSESIWVDNQ  
EPQIVHFDAV VNLDKGLYVY PEPKRYARSV RQYKILNCAN YHLTQVRTDF YDEFWGQGLR  
AAPKKQKKHT LSLTPDTTL YNAAQIICANY GEAFSVDKKG GTKKAHVSEL LQASAPYKAD  
VELCVYSTNE TTNCTGGKNG IAADITAKG YVKSVTTSNG AITVKGDGTL ANMEYILQAT  
GNAATGVTWT TTCKGTDASL FPNFCGSVT Q

30

上記配列が得られた P E 及び P i l A の全長配列を、配列番号 4 ( P E ) 及び配列番号 5 8 ( P i l 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、2 4 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 # 2 4 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

atgaaaaaaattatttaacattatcacttgggttacttaccgctgttctgctcaaatccaaaaggctgaacaaaatgatgtgaagctggc  
 accgccgactgatgtacgaagcggatatacgtttggtaaagaatgtgaattattacatcgatagtaacgatctgggtggataacc  
 aagagccacaaaattgtacattttagtctgtgtgaatttagataggggattgtatgtttatcctgagcctaaacggtatgcacgttctgttcg  
 tcagtataagatttgaattgtgcaaattatcatttaactcaaatcgaactgatttctatgatgaatttggggacaggggttgcgggcagc  
 acctaaaaagcaaaagaacatacgttaagttaacacctgatacaacgctttataatgctgctcagattattgtgcaaattatggtaaa  
 gcattttcagttgataaaaaataa

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 IRLVKNVNY IDSESIWVDN  
 QEPQIVHFDA VVNLDRGLYV YPEPKRYARS VRQYKILNCA NYHLTQIRTD FYDEFWQGL  
 RAAPKKQKKH TLSLTPDTTL YNAAQIICAN YGKAFSVDKK

*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

atgaaaaaaattatttaacattatcacttgggttacttactgcctgttctgctcaaatccaaaaggctaaacaaaatgatgtgaagctggc  
 accgccgactgatgtacgaagcggatatacgtttggtaaagaatgtgaattattacatcgatagtaacgatctgggtggataacc  
 aagagccacaaaattgtacattttagtgcagtggtgaatttagataagggattgtatgtttatcctgagcctaaacggtatgcacgttctgttc  
 gtcagtataagatctgaattgtgcaaattatcatttaactcaagtacgaactgatttctatgatgaatttggggacaggggttgcgggcag  
 cacctaaaaagcaaaagaacatacgttaagttaacacctgatacaacgctttataatgctgctcagattattgtgcgaactatggtg  
 aagcattttcagttgataaaaaa

*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 IRLVKNVNY IDSESIWVDN  
 QEPQIVHFDA VVNLDKGLYV YPEPKRYARS VRQYKILNCA NYHLTQVRTD FYDEFWQGL  
 RAAPKKQKKH TLSLTPDTTL YNAAQIICAN YGEAFSVDKK

## ベクター構築:

LVL312、LVL291、LVL268、LVL269、LVL270、LVL7  
 02、LVL735、LVL778、LVL779、LVL780、LVL781および  
 LVL782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  
 ー #1 10×、5 μl の dNTP 2 mM、2 μl の MgCl<sub>2</sub> 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 の鋳型 (100 ng / μl) および 0.4 μl の KOD HiFi DNA ポリメラー  
 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PB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了。次に、バッファーPBを含むPCR調製物をボルテックスにより混合した。QIAQUICK(登録商標)カラムを2mlのコレクションチューブに入れた。PCR調製物中のDNAをカラムに結合させるため、混合したサンプルをQIAQUICK(登録商標)カラムに適用し、14000RPMで30~60秒間遠心分離した。フロースルーを廃棄し、QIAQUICK(登録商標)カラムを同じチューブに戻した。結合したDNAを洗浄するために、QIAQUICK(登録商標)PCR精製キットに提供されている0.75mlのバッファーPEをQIAQUICK(登録商標)カラムに加え、このカラムを14000RPMで30~60秒間遠心分離した。フロースルーを廃棄し、QIAQUICK(登録商標)カラムを同じチューブに戻した。残留する洗浄バッファーを除去するために、QIAQUICK(登録商標)カラムを2ml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QIAQUICK(登録商標)カラムを1.5mlの透明なマイクロ遠沈管に入れた。DNAを溶出させるため、33μlの水をQIAQUICK(登録商標)膜の中央に加え、カラムを14000RPM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5μlのpET26bベクター(100ng/μl)、2μlのNEバッファー2(New England Biolabs、1×NEバッファー2:50mM NaCl、10mM Tris-HCl、10mM MgCl<sub>2</sub>、1mMジチオトレイトール、pH7.9、25)、1μlのNdeI(20000単位/ml)、1μlのHindIII(20000単位/ml)および11μlの脱イオン水を混合し、DNA消化のために37

10

20

#### 【0150】

ライゲーションは、New England BiolabsからのQuick T4 DNAリガーゼおよびQuickライゲーション反応バッファーを用いて行った。例えば、10μlの脱イオン水中、10ng前後のベクターおよび30ngのインサートを、10μlの2×Quickライゲーション反応バッファー(New England Biolabs、132mM Tris-HCl、20mM MgCl<sub>2</sub>、2mMジチオトレイトール、2mM ATP、15%ポリエチレングリコール、pH7.6、25)および1μlのQuick T4 DNA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

#### 【0151】

LVL315、LVL317、LVL318、LVL736、LVL737、LVL738、LVL739およびLVL740を作製するために、下記の成分のPCR調製物を調製した: 40μlの脱イオン水、5μlの反応バッファー10×、1μlのdNTPsミックス、1μlのプライマー#1(10μM)、1μlのプライマー#2(10μM)、1μlの鋳型(25ng/μl)および1μlのPfuUltra High-Fidelity DNAポリメラーゼ2.5単位/μl(QuikChange II部位特異的突然変異誘発キット、Agilent Technologies、Stratagene Division)を配合した。ポリメラーゼ連鎖反応は、95で30秒の変性1サイクル、95で30秒の変性、55で1分のアニーリング、および68で5分30秒のプライマー伸長18サイクルを含んだ。PCR産物を1μlのDpnI制限酵素を用い、37で1時間消化した後、形質転換を行った。

40

#### 【0152】

増幅に用いたPCRプライマー配列の詳細な一覧を表4に示す。

#### 【0153】

pRIT16711を作製するため、配列番号4のアミノ酸22~160をコードするPE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、NTHi 772株のゲノムDNAからPCRにより増幅した。増幅プライマーは、利用可能なHi

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、NTHi 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PE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。PCR 増幅後、BamHI および XhoI 制限部位を用い、インサートを pET-26 (+) 発現ベクター（NOVAGEN（登録商標））にクローニングした。

#### 【0154】

pRIT16671 を生成するために、PilA 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DNA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、NTHi 86-028NP株のゲノムDNAから増幅し、pET15発現ベクターにクローニングした。ベクターpRIT16790（NTHi 86-028NP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pRIT16671を作製した。PilA 遺伝子断片は、ベクターpRIT16790ならびにプライマーMDES PILA-3およびMDES PILA-4を用い、PCRにより増幅した。このPilA断片を、NdeI/XhoI制限部位を用いてpET-26発現ベクターにクローニングした。6ヒスチジン（his）アミノ酸をコードするDNA配列を5'プライマーに組み込み、PilA配列のN末端に6ヒスチジン（6xhis）を付加した（MDES PILA-3）。

#### 【0155】

LVL312（FlgIシグナルペプチド-E-PilA断片-GG-PE断片-GGHHHHHH）を作製するために、鋳型としてのpRIT16671ベクターとプライマーCAN534およびCAN537を用いてポリメラーゼ連鎖反応を行い、PilA 遺伝子（アミノ酸40～149/86-028NP株）を増幅した。FlgIシグナルペプチド（sp）およびグルタミン酸（E）アミノ酸に相当するDNA配列を5'プライマー（CAN534）に組み込んだ。PilA配列をPE配列に連結させるために、2個のグリシン（GG）に相当するDNA配列をアミノ酸リンカーおよびN末端PEアミノ酸を3'プライマー（CAN537）に組み込んだ。鋳型としてのpRIT16711ベクターとプライマーCAN536およびCAN538を用い第2のポリメラーゼ連鎖反応を行い、PE 遺伝子（アミノ酸18～160）を増幅した。pilAをPE配列に連結するために、C末端PilAアミノ酸およびGGアミノ酸に相当するDNA配列を5'プライマー（CAN536）に組み込んだ。GGアミノ酸リンカーおよび6xhisアミノ酸に相当するDNA配列を3'プライマー（CAN538）に組み込んだ。最後に、LVL312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FlgIシグナルペプチド、FlgIとpilAの間にグルタミン酸（E）アミノ酸、PilA配列とPE配列の間にGGリンカーおよびPEとC末端の6xhisアミノ酸の間にGGリンカーとなるように融合したPilAおよびPE 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CAN534およびCAN538とともに用いた。NdeI制限部位に相当するDNA配列を5'プライマーに組み込み、HindIII制限部位を3'プライマーに組み込んだ。作製されたPCR産物を次に、pET-26b (+) クローニングベクター（NOVAGEN（登録商標））に挿入した。

#### 【0156】

LVL291（pelBシグナルペプチド-PE断片-GG-PilA断片-GG-6xhis）を作製するために、鋳型としてのpRIT16711ベクターとプライマーCAN544およびCAN546を用いてポリメラーゼ連鎖反応を行い、PE 遺伝子（アミノ酸19～160）を増幅した。pelBシグナルペプチド（sp）アミノ酸に相当するDNA配列を5'プライマー（CAN544）に組み込んだ。PilA配列をPE配列に連結させるために、GGアミノ酸リンカーおよびN末端PilAアミノ酸に相当するDNA配列を3'プライマー（CAN546）に組み込んだ。鋳型としてのpRIT16671ベクターをプライマーCAN545およびCAN535とともに用いて第2のポリメ

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 58 のアミノ酸 40 ~ 149、配列番号 127）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 545）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 535）に組み込んだ。最後に、L V L 291 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、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 544 および C A N 535 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 - 26 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

#### 【0157】

L V L 268（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、鋳型としての p R I T 16711 ベクターをプライマー C A N 547 および C A N 546 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 20 ~ 160）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 547）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 546）に組み込んだ。鋳型としての p R I T 16671 ベクターを C A N 545 および C A N 535 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 40 ~ 149 / N T H i 86 - 028 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 545）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 535）に組み込んだ。最後に、L V L 268 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、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 547 および C A N 535 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 - 26 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

30

#### 【0158】

L V L 269（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、鋳型としての p R I T 16711 ベクターをプライマー C A N 548 および C A N 546 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 22 ~ 160）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 548）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 546）に組み込んだ。鋳型としての p R I T 16671 ベクターをプライマー C A N 545 および C A N 535 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 58 のアミノ酸 40 ~ 149、配列番号 127）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 545）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 535）に

40

50

組み込んだ。最後に、LVL269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NadAシグナルペプチド、pelBシグナルペプチドとPEの間にATND DDDアミノ酸、PE配列とpilA配列の間にGGリンカーおよびPilAとC末端の6xhisアミノ酸の間にGGリンカーとなるように融合したPEおよびPilA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CAN548およびCAN535とともに用いた。NdeI制限部位に相当するDNA配列を5'プライマーに組み込み、HindIII制限部位を3'プライマーに組み込んだ。作製されたPCR産物を次に、pET-26b(+)クローニングベクター(NOVAGEN(登録商標))に挿入した。

#### 【0159】

LVL270(M-6xHis-PE断片-GG-PilA断片)を作製するために、鋳型としてのpRIT16711ベクターをプライマーCAN540およびCAN542とともに用いてポリメラーゼ連鎖反応を行い、PE遺伝子(アミノ酸17~160)を増幅した。6xhisアミノ酸に相当するDNA配列を5'プライマー(CAN540)に組み込んだ。PilA配列をPE配列と連結させるために、GGアミノ酸リンカーおよびN末端PilAアミノ酸に相当するDNA配列を3'プライマー(CAN542)に組み込んだ。鋳型としてのpRIT16671ベクターをプライマーCAN541およびCAN543とともに用いて第2のポリメラーゼ連鎖反応を行い、PilA遺伝子(アミノ酸40~149/NTHi 86-028NP株)を増幅した。PilAをPE配列と連結させるために、C末端PEアミノ酸およびGGアミノ酸に相当するDNA配列を5'プライマー(CAN541)に組み込んだ。最後に、LVL270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-his-PE-GG-PilA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、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CAN540およびCAN543とともに用いた。NdeI制限部位に相当するDNA配列を5'プライマーに組み込み、HindIII制限部位を3'プライマーに組み込んだ。作製されたPCR産物を次に、pET-26b(+)クローニングベクター(NOVAGEN(登録商標))に挿入した。

#### 【0160】

LVL315(pelBシグナルペプチド-MD-PE断片-GG-PilA断片-GG-6xhis)を作製するために、鋳型としてのLVL291をプライマーCAN670およびCAN671とQuikChange II部位特異的突然変異誘発キット(Agilent Technologies、Stratagene Division)を用いて部位特異的突然変異誘発を行い、N末端PEアミノ酸配列のQIQ~MDを変化させた。

#### 【0161】

LVL317(pelBシグナルペプチド-PE断片-GG-pilA断片)を作製するために、鋳型としてのLVL291をプライマーCAN678およびCAN679とQuikChange II部位特異的突然変異誘発キット(Agilent Technologies、Stratagene Division)を用いて部位特異的突然変異誘発を行い、PilA遺伝子とGGHHHHHHアミノ酸残基に相当するDNA配列(配列番号3)の間に終止コドンを組み込んだ。

#### 【0162】

LVL318(pelBシグナルペプチド-MD-PE-GG-PilA)を作製するために、鋳型としてのLVL315をプライマーCAN678およびCAN679とQuikChange II部位特異的突然変異誘発キット(Agilent Technologies、Stratagene Division)を用いて部位特異的突然変異誘発を行い、PilA遺伝子とGGHHHHHHアミノ酸残基(配列番号3)に相当するDNA配列との間に終止コドンを組み込んだ。

#### 【0163】

LVL702(LVL291 Q)を作製するために、鋳型としてのLVL291ベ

10

20

30

40

50

クターとプライマーCAN1517およびCAN1518を用いてポリメラーゼ連鎖反応を行った。LVL291配列上の23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。LVL702とLVL291の間の唯一の違いは、LVL291配列上の23番におけるアミノ酸Qの欠失である。NdeI制限部位およびHindIII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PCR産物を次に、pET-26b(+)クローニングベクター(NOVAGEN(登録商標))に挿入した。

#### 【0164】

LVL735(LVL317 Q)を作製するために、鋳型としてのLVL317ベクターとプライマーCAN1517およびCAN1519を用いてポリメラーゼ連鎖反応を行った。LVL317配列上の23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。LVL735とLVL317の間の唯一の違いは、LVL317配列上の23番におけるアミノ酸Qの欠失である。NdeI制限部位およびHindIII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PCR産物を次に、pET-26b(+)クローニングベクター(NOVAGEN(登録商標))に挿入した。

10

#### 【0165】

LVL736(LVL291+SA)を作製するために部位特異的突然変異誘発を行い、LVL291配列上のアミノ酸22と23の間にアミノ酸SおよびAを付加した。鋳型としてのLVL291をプライマーCAN1531およびCAN1532とQuikChange II部位特異的突然変異誘発キット(Agilent Technologies、Stratagene Division)とともに用いた。

20

#### 【0166】

LVL737(LVL291+A)を作製するために部位特異的突然変異誘発を行い、LVL291配列上のアミノ酸22と23の間にアミノ酸Aを付加した。鋳型としてのLVL291をプライマーCAN1529およびCAN1530とQuikChange II部位特異的突然変異誘発キット(Agilent Technologies、Stratagene Division)とともに用いた。

#### 【0167】

LVL738(LVL291 QIQ)を作製するために部位特異的突然変異誘発を行い、LVL291配列上の23~25番のアミノ酸Q、IおよびQを欠失させた。鋳型としてのLVL291をプライマーCAN1523およびCAN1524とQuikChange II部位特異的突然変異誘発キット(Agilent Technologies、Stratagene Division)とともに用いた。

30

#### 【0168】

LVL739(LVL291 QIQK)を作製するために部位特異的突然変異誘発を行い、LVL291配列上の23~26番のアミノ酸Q、I、QおよびKを欠失させた。鋳型としてのLVL291をプライマーCAN1525およびCAN1526とQuikChange II部位特異的突然変異誘発キット(Agilent Technologies、Stratagene Division)とともに用いた。

40

#### 【0169】

LVL740(LVL291 QIQKA)を作製するために部位特異的突然変異誘発を行い、LVL291配列上の23~27番のアミノ酸Q、I、Q、KおよびAを欠失させた。鋳型としてのLVL291をプライマーCAN1527およびCAN1528とQuikChange II部位特異的突然変異誘発キット(Agilent Technologies、Stratagene Division)とともに用いた。

#### 【0170】

LVL778(LVL736 6xHisタグ)、LVL779(LVL737 6xHisタグ)、LVL780(LVL738 6xHisタグ)、LVL781(LVL739 6xHisタグ)およびLVL782(LVL740 6xHisタグ)

50

グ)を作製するために、それぞれ鋳型としてのLV L 7 3 6、LV L 7 3 7、LV L 7 3 8、LV L 7 3 9およびLV L 7 4 0ベクターをプライマーCAN 1 6 6 9およびCAN 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 x 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 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PCR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。

【0171】

【表4】

PE, PiiA 及び PE-PiiA 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	CACACACATATGATTAAATTTCTCTCTGCATTAATTCTTCTACTGGTCACGACG GCGGCTCAGGCTGAGACTAAAAAAGCAGCGGTATCTG (配列番号 155)
CAN535	TGTGTGAAGCTTTTAGTGGTGGTGGTGGTGGTGGCCGCCTTGTGTGACACTT CCGCAAAAATTTGC (配列番号 156)
CAN536	TTTGCGGAAGTGTACACAAGGCGGCGCGCAGATTCAGAAGGCTGAACAAA ATGATGT (配列番号 157)
CAN537	ACATCATTTTGTTCAGCCTTCTGAATCTGCGCGCCGCCTTGTGTGACACTTCC GCAAA (配列番号 158)
CAN538	TGTGTGAAGCTTTTAGTGGTGGTGGTGGTGGTGGCCGCCTTTTTATCAACT GAAAATG (配列番号 159)
CAN540	CACACACATATGCACCACCACCACCACCACAGCGCGCAGATTCAGAAGGCT GAACAAAATGATGT (配列番号 160)
CAN541	CATTTTCAGTTGATAAAAAAGGCGGCACTAAAAAAGCAGCGGTATC (配列番号 161)
CAN542	GATACCGCTGCTTTTTTAGTGCCGCCTTTTTATCAACTGAAAATG (配列番号 162)
CAN543	TGTGTGAAGCTTTTATTGTGTGACACTTCCGCAAA (配列番号 163)
CAN544	CACACACATATGAAATACCTGCTGCCGACCGCTGCTGCTGGTCTGCTGCTCC TCGCTGCCAGCCGGCGATGGCCGATTCAGAAGGCTGAACAAAATGATG T (配列番号 164)
CAN545	GCATTTTCAGTTGATAAAAAAGGCGGCACTAAAAAAGCAGCGGTATCTG (配 列番号 165)
CAN546	CAGATACCGCTGCTTTTTTAGTGCCGCCTTTTTATCAACTGAAAATGC (配列 番号 166)
CAN547	CACACACATATGAAATACCTGCTGCCGACCGCTGCTGCTGGTCTGCTGCTCC TCGCTGCCAGCCGGCGATGGCCGATTCAGAAGGCTGAACAAAATGATG T (配列番号 167)
CAN548	CACACACATATGAAACACTTTCCATCCAAAGTACTGACCACAGCCATCCTTGC CACTTTCTGTAGCGGCGCACTGGCCGATTCAGAAGGCTGAACAAAATGATG ACAAAATGATG (配列番号 168)
CAN670	GCCGCGGATGGCCATGGATAAGGCTGAACAAAATG (配列番号 169)
CAN671	CATTTTGTTCAGCCTTATCCATGGCCATCGCCGGC (配列番号 170)
CAN678	GGAAGTGTACACAATAAGGCGGCCACCACCACC (配列番号 171)
CAN679	GGTGGTGGTGGCCGCCTTATTGTGTGACACTTCC (配列番号 172)
CAN1517	GATATACATATGAAATACCTGCTGCCGACCGCTGCTGCTGGTCTGCTGCTCC TCGCTGCCAGCCGGCGATGGCCATTCAGAAGGCTGAACAAA (配列番号 205)
CAN1518	GGCCGCAAGCTTTTAGTGGTGGTGGTGGTGGTGGCCGCC (配列番号 206)
CAN1519	GGCCGCAAGCTTTTATTGTGTGACACTTCC (配列番号 207)
CAN1523	GCTGCCAGCCGGCGATGGCCAAGGCTGAACAAAATGATGTG (配列番号 208)

10

20

30

40

CAN1524	CACATCATTTTGTTCAGCCTTGGCCATCGCCGGCTGGGCAGC (配列番号 209)
CAN1525	GCTGCCCAGCCGGCGATGGCCGCTGAACAAAATGATGTGAAGC (配列番号 210)
CAN1526	GCTTCACATCATTTTGTTCAGCGGCCATCGCCGGCTGGGCAGC (配列番号 211)
CAN1527	GCTGCCCAGCCGGCGATGGCCGAACAAAATGATGTGAAGCTGG (配列番号 212)
CAN1528	CCAGCTTCACATCATTTTGTTCGGCCATCGCCGGCTGGGCAGC (配列番号 213)
CAN1529	GCTGCCCAGCCGGCGATGGCCGCCAGATTGAGAAGGCTGAAC (配列番号 214)
CAN1530	GTTTCAGCCTTCTGAATCTGGGCGGCCATCGCCGGCTGGGCAGC (配列番号 215)
CAN1531	GCTGCCCAGCCGGCGATGGCCAGCGCCCAGATTGAGAAGGCTGAAC (配列番号 216)
CAN1532	GTTTCAGCCTTCTGAATCTGGGCGCTGGCCATCGCCGGCTGGGCAGC (配列番号 217)
CAN1669	CACACACATATGAAATACCTGCTGCCGACC (配列番号 218)
MDesPILA-3	GAATTCCATATGCACCATCACCATCACCATACTAAAAAAGCAGCGGTATCTGA A (配列番号 173)
MDesPILA-4	GCGCCGCTCGAGTCATTGTGTGACACTTCCGC (配列番号 174)
MnoNTHi-44	GCCCAGCCGGCGATGGCCAGATCCAGAAGGCTGAACAAAATG (配列番号 175)
MnoNTHi-45	CATTTTGTTCAGCCTTCTGGATCTGGGCCATCGCCGGCTGGGC (配列番号 176)

10

20

### 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<sub>2</sub> 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、熱パルスをおこなった後、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。

30

#### 【 0 1 7 2 】

B L R ( D E 3 ) : B L R は、B L 2 1 の r e c A<sup>-</sup> 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 ) ) 。

40

#### 【 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

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、800 ml 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 50 μ g / ml カナマイシン ( S i g m a ) を、O . D . <sub>600nm</sub> が 0 . 1 ~ 0 . 2 となるまで播種した。培養物を、O . D . <sub>600nm</sub> が約 0 . 8 に達するまで、37 °C にて 250 R P M の回転でインキュベートした。

10

【 0 1 7 4 】

次に、1 ml の各培養物を回収し、14000 R P M で 5 分間遠心分離し、上清およびペレットを - 20 °C で別々に冷凍した。

【 0 1 7 5 】

O . D . <sub>600nm</sub> が約 0 . 8 の時、B L R ( D E 3 ) 培養物を冷却 ( - 20 °C、20 分または 4 °C、1 時間、好ましくは、4 °C、1 時間) した後、1 mM 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 : 5815 ) を添加して 16、22 および 30 °C で一晩、または 250 R P M で振盪しながら 37 °C で 3 時間、好ましくは、22 °C 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 14000 R P M で 5 分間または 6000 R P M で 15 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 - 20 °C 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、500 mM N a C l、10 mM イミダゾールおよび R o c h e 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 / 500 mM N a C l を含有する 50 ml の H E P E S バッファー、R o c h e C O M P L E T E ( 登録商標 ) U L T R A 錠、R o c h e D i a g n o s t i c s C o r p o r a t i o n ) を含有する 20 mM の 4 - ( 2 - ヒドロキシエチル ) - 1 - ピペラジニエタンスルホン酸 ( 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 20 ~ 50 mM のピシンバッファーを用いてよい。例えば、20 mM のピシンバッファーを用いてよい。細菌を、C o n s t a n t S y s t e m 1 . 1 K W 2 X 30000 P S I ( pounds per square inch ) 用いて溶解させた。20000 g で 4 °C にて 20 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 】

40

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 ml 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 ml / 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 10 カラム容量の同バッファーを用い、10 ml / 分の測度で洗浄した ( 「 洗浄画分 # 1 」 を形成 ) 。500 mM N a C l および 20 mM イミダゾールを含有する 20 mM ピシンバッファーまたは 20 mM 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 ) 。500 mM N a

50



C1および250mMイミダゾールを含有する2カラム容量の20mM HEPESバッファまたは50mMピシンバッファ(pH8.0)を用い、10ml/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 137mM、KCl 2.7mM、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8.1mM、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.47mM、pH7.4)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 Healthcare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。Centricon 10000MW(Millipore)を用いてサンプルを濃縮した。

【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およびウエスタンブ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1mlの培養物(例えば、上記の実施例3参照)を14000RPMで2分間遠心分離した。ペレットを、40μl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14000RPM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、70μlの脱イオン水、5μlのジチオトレイトール(DTT)1Mおよび25μl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4x(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30μlの脱イオン水、5μlのDTT 1Mおよび25μlのLDSサンプルバッファ4xに加えた。

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100μlの上清(例えば、上記の実施例3参照)を、500μl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、500μl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14000RPMで10分間遠心分離した。ペレットを、28μlの脱イオン水、2μlのDTT 1Mおよび10μlのLDS SB 4xを用いて再可溶化した。

精製画分の調製

例えば、SDS-PAGE分析のために、70μlのサンプル、5μlのDTT 1Mおよび25μlのLDSサンプルバッファ4x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。

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

10

20

30

40

50

## 【0182】

サンプルをNUPAGE（登録商標）Bis-Tris 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/PBS 1×新鮮溶液を用い、37、60RPM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（6X Hisタグ（登録商標）抗体、Abcam PLC、カタログ番号：ab9108）3%ミルク/PBS 1×新鮮溶液中1：1000倍希釈で、37、60RPM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(polysorbate) 20（例えば、TWEEN（商標）20）/PBS 1×を用いて5分間、3回洗浄した。二次抗体（アルカリ性ホスファターゼ（AP）ウサギ抗IgG（H+L）ウサギ、Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.）を、3%ミルク/PBS 1×新鮮溶液を用いて1：14000希釈で加えた。膜を37、60RPM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、TWEEN（商標）20）/PBS 1×を用いて室温で5分間3回洗浄した後、膜を5-ブロモ-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、BCIP（登録商標）/NBT Sigma-Aldrich（登録商標）製、1錠剤/10ml水）に曝した。

10

## 【0184】

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に関しては図1を参照。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。

20

## 【0185】

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およびウエスタンブロットに関しては図2を参照。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タグを用いて抽出物をプロービングした。

## 【0186】

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に関しては図3を参照。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。

30

## 【0187】

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に関しては図4を参照。LVL312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。

40

## 【0188】

融合タンパク質構築物LVL291、LVL702、LVL736、LVL737、LVL738、LVL739、LVL740およびpET26b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SDS-PAGEに関しては図25を参照。（a）実験1（b）実験2（c）実験3。PE-PilA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26を参照。

## 【0190】

図5および図6のそれぞれにおいてSDS-PAGE分析に使用したLVL317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 m M および 1 0  $\mu$  M I P T G ) 細菌抽出物の S D S - P A G E 。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 m M および 1 0  $\mu$  M I P T G ) 細菌抽出物の S D S - P A G E 。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 】

S D S - P A G E によるタンパク質分離物を I m m o b i l o n - P 膜に転写した。クーマシーブルー染色タンパク質バンドを切り取り、シークネーターリアクター (sequenator reactor) に入れた。配列決定は、A p p l i e d B i o s y s t e m s P R O C I S E (登録商標) タンパク質シーケンサー、モデル 4 9 4 - c L C 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 】

【表 5】

融合タンパク質構築物に関する振盪プ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 - ATNDDD - PE 断片 - GG - PilA 断片 - GGHHHHHH	In: +++ So: ++ Se: +	確定
LVL270	MHHHHHH - 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 UV 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  $\alpha$ -シートを呈するか  $\beta$ -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 UV 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  $^{\circ}$ C に維持する。測定の間、1 0 L / 分の窒素流を維持した。

結果 :

PE (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 PE - P i l A タンパク質に関して得られた遠 UV C D 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、PE は P i l A および PE - P i l A よりも ヘリックスが有意に豊富である (図 7、PE、P i l A および PE - P i l A 融合タンパク質の C D スペクトル)。

#### 【 0 1 9 6 】

ひと度、キメラタンパク質として相互に結合した PE 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。

#### 【 0 1 9 7 】

PE 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 PE - P i l A キメラ(chimer)のスペクトルに重なる (図 8、PE および P i l A C D スペクトルの組合せ)。この結果は、PE - 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、PE 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らないことも示唆する。

#### 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、PE、P i l A および PE - 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。

#### 【 0 1 9 8 】

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 C D 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 (T<sub>m</sub>) の決定が可能となる。

#### 【 0 1 9 9 】

融点は、C D 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。

#### 【 0 2 0 0 】

遠 UV C D により決定された P i l A および PE 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、PE の熱変性曲線)。

#### 【 0 2 0 1 】

PE - 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 T<sub>m</sub> を示す (図 11、PE - P i l A の融合タンパク質熱変性曲線)。それらの値は、PE 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 PE 部分の T<sub>m</sub> に影響を及ぼさないという所見は、融合物内での PE 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、PE 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、PE 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：PE、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 PE 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 をプライマー 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 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 ) 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 ブロス中、 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 <sub>600</sub> 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 <sub>600</sub> 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 <sub>600</sub> 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 x 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、ペレットをバ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 , p H 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 x 3 0 k P s i ; 1 x 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 , p H 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 , p H 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 , p H 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 プ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 , p H 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 プール」、総容量およそ 4 8 m l ) 。 5 0 0 m

Mのアルギニンを含むS E C プールに加えた。

上記S E C プロトコルで作製された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  $\mu$ Lをマイクロ遠沈管に二反復で分注した。125  $\mu$ 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  $\mu$ LのB i o - R a d R C 試薬II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  $\mu$ Lの試薬A (1 mLの試薬Aにつき20  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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 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  $\cdot$  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  $\cdot$  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、カラムフロースルーを回収する。樹脂を例えば、300 mM N a C l、50 mM N a H <sub>2</sub> P O <sub>4</sub>、25 mM イミダゾン、pH 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 <sub>2</sub> P O <sub>4</sub>、250 mM イミダゾン、pH 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、ヒスチジントグを除去する。

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、pH 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 mL/分でロードした。0.3 C V ~ 0.9 C V 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



7 mg / ml であった。

PBS 1 × pH 7.4 による P i l A S E C プールの透析 (透析倍率 = 1600) および R C D C による処理

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

#### L V L 3 1 7 の精製

##### 浸透圧ショック

L V L 3 1 7 融合タンパク質は細菌周辺質で発現されプロセッシングされるので、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 のファーマンター培養物からの、L V L 3 1 7 を含有する冷凍 ( - 20 ) 採取した大腸菌 B 2 4 4 8 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 (S N 1) 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 MgCl<sub>2</sub> 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 (S N 2) 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、S N 2 の清澄化を行った。

##### 【0207】

S N 2 を 20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> - Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、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 S N 2 を 2 CV の 20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> / Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 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 Healthcare) にロードし、捕捉させた。カラムを 5 CV の 20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> / Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> バッファー pH 7.0 で洗浄した後、抗原 (L V L 3 1 7 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 Healthcare) 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  $\text{KH}_2\text{PO}_4 / \text{K}_2\text{HPO}_4$  バッファpH6.5でダイアフィльтра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分間撹拌した。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およびウエスタンブロット分析

20

SDS-PAGEおよびウエスタンブロット分析：

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中、室温（RT）、200ボルトで35分。ゲルをインスタントブルー（Novex incat. : ISB01L）で2時間染色し、水中で一晩脱染した。

レーン内容：

- 1：MW標品（10μL）
- 2：開始（全画分）（10μg）
- 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）
- 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TFF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：大腸菌細胞駆Rix（0.5μg）

30

40

PE-PilA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】

ウエスタンブロットについては、タンパク質をNUPAGE（登録商標）転写バッファ－＋20%メタノール、0.1%SDS中、30ボルト、4で一晩、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－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－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－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-PilA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ブ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を用いてブロットした。

レーン内容：

- 1：MW標品（10μL）
- 2：開始（全画分）（10μg）
- 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）
- 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TFF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：大腸菌細胞駆Rix（0.5μg）

20

30

PE-PilA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ブ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）を用いてブロットした。

40

レーン内容：

- 1：MW標品（10μL）
- 2：開始（全画分）（10μg）
- 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）

50

- 9 : 溶出 S P F F ( 1 0 μ g )  
 1 0 : ストリップ S P F F ( 1 0 μ g )  
 1 1 : ロード Q F F ( 8 . 9 μ g )  
 1 2 : 溶出 Q F F ( 9 . 8 μ g )  
 1 3 : ストリップ Q F F ( 4 . 8 μ g )  
 1 4 : 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 )  
 1 5 : 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 )  
 1 6 : 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 )  
 1 7 : 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 ) )  
 1 8 : 大腸菌細胞溶解液 R i x ( 2 μ g )  
 1 9 : 大腸菌細胞溶解液 R i x ( 1 μ g )  
 2 0 : 大腸菌細胞 駅 R i x ( 0 . 5 μ g )

10

S D S - P A G E およびウエスタンブロット図の説明 : 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 1 0 および 1 3 ) 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 1 6 ) 。

20

#### 【 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 1 1 : 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。

30

#### 【 0 2 1 4 】

D S C 前に、P E および P i l A を 1 0 m M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> / KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 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 ) 中で一晚透析し、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。

40

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 1 7 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<sub>1</sub> : 5 3 . 7

50

および  $Tm_2$  : 66.1  
 4 - FC濃度 60  $\mu\text{g}/\text{ml}$  に希釈した PE - P i l A P B  $Tm_1$  : 53.2 およ  
 び  $Tm_2$  : 67.6

精製融合タンパク質 ( L V L 3 1 7 ) において2つの遷移が検出された ( 曲線3および  
 4 ) 。

【 0 2 1 6 】

PE - P i l A 融合タンパク質の  $Tm_1$  ( 53.7 ) は、P i l A 遷移 ( 53 ) に  
 類似している。

【 0 2 1 7 】

PE 遷移 ( 63 ) に比べて PE - P i l A の  $Tm_2$  ( 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。

【 0 2 1 8 】

無希釈に比べて希釈融合タンパク質の  $Tm_2$  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。

【 0 2 1 9 】

L V L 7 3 5 および L V L 7 7 8 の抗原折り畳み分析は、L V L 3 1 7 の場合と同様で  
 ある。

実施例 1 2 : B a l b / c マウスにおける PE - P i l A 融合タンパク質構築物 L V L 2  
 9 1 抗 P i l A の免疫原性応答

A S 0 3 <sub>A</sub> 中に配合した精製 L V L 2 9 1 PE - P i l A 融合タンパク質 ( 異種シグ  
 ナルペプチドを含まない L V L 2 9 1 融合タンパク質 ) に対する免疫応答を B a l b / 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 A S 0 3 <sub>A</sub> 中に配合した 10  $\mu\text{g}$  の PE ( ベクター p R I T 1 6 7 6 2 由来 ) 、  
 P i l A ( ベクター p R I T 1 6 7 9 0 由来 ) または PE - P i l A で筋肉内により免疫  
 した。対照群には A S 0 3 <sub>A</sub> 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。抗体応答は陰性対照で得られた。図18に示される  
 ように、P i l A に対する抗体応答は、一価 P i l A で免疫したマウスにおける抗体応答  
 に比べて PE - P i l A 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 =  
 幾何平均力価。W I N D O W S ( 登録商標 ) ( M i c r o s o f t ) 下で実行する S O F  
 T M A X ( 登録商標 ) P r o ソフトウェア ( M o l e c u l a r D e v i c e s ) 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 ~ 8  
 0 % ) 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 B a l b / c マウスモデルにおける L V L 2 9 1 PE - P i l A 融合タ  
 ンパク質に対する抗体応答および一価 PE および P i l A に対する抗体応答をグラフで示  
 したものである。

実施例 1 3 : マウス鼻咽頭定着モデル。PE - P i l A による免疫誘導。N T H i 8 6  
 - 0 2 8 N P 株および N T H i 3 2 2 4 A 株による抗原刺激

B a l b / 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  
 scherichia coli ) の易熱性毒素 ) を配合した 6  $\mu\text{g}$  の精製 PE - P i l A 融合タンパク質 (  
 86 - 0 2 8 N P による抗原刺激には L V L 2 9 1 ; 3 2 2 4 A 株による抗原刺激には L  
 V L 3 1 7 ) で、28日目にはリン酸緩衝生理食塩水 ( P B S ) 中、6  $\mu\text{g}$  の精製 PE -  
 P i l A 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  $5 \times 10^6$  C F U ( コロニー形成単位 ) の同種 N T H i  
 86 - 0 2 8 N P 株および異種 N T H i 3 2 2 4 A 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 N T H i 株のリファレンスにより決定される。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。D 1 = 1日目。D 2 = 2日目。P E - P i l A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N T H i 86 - 028NP株および3224A株のクリアランスを高めた。

【0220】

N T H i 86 - 028NP株で行った実験に関して： 応答として計数値のlog 10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に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。P E - P i l A融合群(6 μg / マウス)は、対照群(L T)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】

N T H i 3224A株で行った実験に関して： 応答としてlog 10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。S h a p i r o - W i l kおよびL e v e n e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。P E - P i l A / L T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N T H i 86 - 028NP株細菌クリアランスに対するP E - P i l A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N T H i 3224A株細菌クリアランスに対するP E - P i l A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。P i l Aによる免疫誘導。N T H i 3219C株による抗原刺激。

【0224】

雌O F 1マウス(20マウス/群)の鼻腔内に0日目と14日目にL Tを配合した3 μgのP i l A(ベクター16790由来)で、28日目にはP B S中3 μgのP i l Aで免疫を行った。対照マウスにはL Tのみを接種した。次に、マウスの鼻腔内を5 × 10<sup>6</sup>

30

CFUのN T H i 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。D 3 = 3日目。D 4 = 4日目。

【0225】

マウス鼻咽頭における細菌クリアランスに対するP i l A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。P Eによる免疫誘導。N T H i 3224A株による抗原刺激。

【0226】

B a l b / c雌マウス(20マウス/群)の鼻腔内に0日目と14日目にL Tを配合した3 μgのP E(ベクターp R I T 16762由来)で、28日目にはP B S中3 μgのP Eで免疫を行った。対照マウスにはL Tのみを接種した。次に、マウスの鼻腔内を5 × 10<sup>6</sup> CFUのN T H i 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(D 3)に調べた。10個体のマウスを4日目(D 4)に調べた。P E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N T H i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P E接種の効果に関しては図22を参照。

実施例16：ビブロンネクチン(vibronectin)結合。L V L 317およびL V L 735 P

50

E - P i l A 融合タンパク質によるビブロネクチン(vibronectin)結合の阻害。**【 0 2 2 8 】**

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 ( P O L Y S O R P ( 商標 )、N u n c、T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c ) 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 ( 1 0 μ g / m l ) でコーティングした。プレートを N a C l 1 5 0 m M - ポリソルベート 2 0、0 . 0 5 % ( 例えば、T W E E N ( 商標 ) 2 0 ) で 4 回洗浄し、P B S - B S A 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、S I G M A - A L D R I C H ( 登録商標 ) ) を加え ( 1 0 μ g / m l )、2 倍希釈し ( 1 2 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 N a C l 1 5 0 m M - ポリソルベート 2 0、0 . 0 5 % ( 例えば、T W E E N ( 商標 ) 2 0 ) 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 B i o l o g i c a l ) を用いて検出した後、オルトフェニレンジアミン / H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 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

**【 0 2 2 9 】**

( 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 2 3 を参照。

20

実施例 1 7 : ビブロネクチン(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ブロネクチン(vibronectin)の阻害。

**【 0 2 3 0 】**

マイクロタイタープレート ( P O L Y S O R P ( 商標 )、N u n c、T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c ) 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 ( 1 0 μ g / m l ) でコーティングした。プレートを N a C l 1 5 0 m M - ポリソルベート 2 0、0 . 0 5 % ( 例えば、T W E E N ( 商標 ) 2 0 ) で 4 回洗浄し、P B S - B S A 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、S I G M A - A L D R I C H ( 登録商標 ) ) を 5 0 μ g / m l 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 N a C l 1 5 0 m M - ポリソルベート 2 0、0 . 0 5 % ( 例えば、T W E E N ( 商標 ) 2 0 ) 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 B i o l o g i c a l ) を用いて検出した後、オルトフェニレンジアミン / H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 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

**【 0 2 3 1 】**

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

**【 0 2 3 2 】**

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 2 4 を参照。

実施例 1 8 : L V L 2 9 1 P E - P i l A 融合タンパク質の抗原性。E L I S A。

**【 0 2 3 3 】**

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 2 2 ~ 1 6 0 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。3 0 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 I g ( J a c k s o n I m m 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 . ) を用いて検出した後、オルトフェニレンジアミン / H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 基質を加えた。発色は、存在する抗原の量に正比例する。マイクロタイター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、μ g / m l で表す。参照は 1 0 0 % 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

	PE 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

	PE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 l b / c マウス ( n = 3 4 ) を A S 0 1 <sub>E</sub> または A l P O <sub>4</sub> (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 μ g 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 μ l 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 I g G レベルを測定し、μ g / 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 = 幾何平均力価。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 l b / c マウスの鼻腔内に 0 日目と 1 4 日目に 0 . 5 μ g の大腸菌易熱性毒素 ( L T ) と混合した 5 . 8 μ g の L V L 7 3 5 または L V L 3 1 7 を含有する 1 0 μ l 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 μ g 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PBSを接種した。42日目に動物の鼻腔内を $5 \times 10^6$  cfuのNTHi 3224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CFU/ml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LV L735およびLV L317接種の効果に関しては図28を参照。

#### 実施例21：PE-PilA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-PD)、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-PD)、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-PD)、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-PD)、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-PD)、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-PD)、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-PD)、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-PD)、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-TT)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-DT)を含有する10価(10V)のワクチン。

20

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Ph tD、dPl yおよびPE-PilA融合タンパク質を含むワクチン。

dPl 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用い、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。

30

Ph tDの発現および精製：

Ph tDの発現： Ph tD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(Ph t)タンパク質ファミリーのメンバーである。Ph tD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(Med 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)。Ph tD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。Ph tDは20aaのN末端シグナル配列を有する。Ph tD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。

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 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 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 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 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 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

10

20

30

40

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Flg1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-XL工程とヒドロキシアパ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-Sepharose 4FF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。

10

#### 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、多糖を本質的に欧州特許第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。

20

#### 【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。未反応のシアン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。

30

#### 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に微少溶液操作を行った。

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)による破傷風トキシソイドの誘導体化

40

破傷風トキシ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スパーサーを終濃度が0.2Mとなるように加えた。スパ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。

50

## 【0244】

TT<sub>AH</sub> (ADH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。

TT<sub>AH</sub> の PS 18C 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PSを定義された濃度で水に希釈し、NaCl粉末を加えることにより2M NaClに調整した。

## 【0246】

CDA P 溶液 (100mg/ml 50/50 v/v アセトニトリル/WFI 中に新たに調製) を、適当なCDA P / PS 比となるように加えた。

10

## 【0247】

0.3M NaOHを加えることによりpHを活性化pH9.0まで上昇させ、TT<sub>AH</sub> の添加までこのpHで安定させた。

## 【0248】

3分後、誘導体化されたTT<sub>AH</sub> (0.2M NaCl中20mg/ml) をTT<sub>AH</sub> / PS 比が2となるように加え、pHをカップリングpH9.0に調整した。この溶液を1時間、pH調整下に置いた。

## 【0249】

クエンチングのため、2Mグリシン溶液をPS / TT<sub>AH</sub> / CDA P 混合物に加えた。

20

## 【0250】

pHをクエンチングpH (pH9.0) に調整した。

## 【0251】

この溶液を25 で30分間撹拌した後、ゆっくり連続撹拌しながら一晩2~8 に置いた。

肺炎球菌莢膜糖類 - タンパク質D / TT / DT / Ph 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「μfluid」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 <sub>a</sub> =pH <sub>c</sub> =pH <sub>q</sub>	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

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

担体タンパク質 濃縮物 (mg/ml)	10.0	10.0	20.0 (TT)	15.0 (CRM19 7)	20.0 (DT)	5.0
最初の担体タン 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 <sub>a</sub> =pH <sub>c</sub> =pH <sub>q</sub>	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<sub>a</sub>、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、0.15 M NaCl（ただし、18CではSS00HRをバッファとして使用し、19Aでは1.15 M NaClを含有する20 mM酢酸塩 pH 6.2を使用した）で平衡化したSephacryl S400HRゲル濾過カラムを用いたゲル濾過により小分子（DMAP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DMAP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<sub>280nm</sub>により検出される。画分をそれらのK<sub>d</sub>に従ってプールし、濾過除菌し（0.22 μm）、+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、1 μgのヒト用量で吸着された肺炎球菌荚膜糖類血清型1、4、5、6B、7F、9V、14、18C、19Fおよび23Fコンジュゲートを一緒に含有する（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、それらを一緒に混合し、リン酸アルミニウムのレベルを500 μg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2 μg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30 μg（注：これは30 μgのPE-PilAを表し、30 μgのPEと30 μg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

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

10

20

30

40

50

び P S 3、5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の P S 4、5、6 A、6 B、7 F、9 V または 1 4 ; 1 0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の P S 1 9 A および 2 3 F または 4 0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の P S 1 8 C および P S 1 9 F、1 0 0  $\mu\text{l}$  / ウェル) で 3 7 にて 2 時間コーティングした。これらのプレートを Na C l 1 5 0 m M ( 0 . 9 % ) - ポリソルベート 2 0 0 . 0 5 % で 3 回洗浄した。C P S ( 2 . 5 m g / m l であった 6 A および 6 B 以外は (except or) 1 m g C P S / m l の無希釈血清) V / V を含有する P B S - ポリソルベート 2 0 0 . 0 5 % 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 / 1 0 )、C P S に対する抗体を中和させるために 3 7 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照 ( C h r o m p u r e マウス I g G で校正した内部参照) をマイクロウェルに加え、P B S - ポリソルベート 2 0 0 . 0 5 % で連続希釈して 1 0 0  $\mu\text{l}$  とした (二倍希釈工程)。これらのプレートを振盪下、室温で 3 0 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 I g G 抗体 ( 1 0 0  $\mu\text{l}$  / ウェル) を加え、プレートを振盪しながら室温で 3 0 分間インキュベートした。洗浄後、基質 ( 1 0 m l のクエン酸塩 0 . 1 M p H 4 . 5 ~ 4 . 6 および 5  $\mu\text{l}$  の  $\text{H}_2\text{O}_2$  中、4 m g 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 ( 1 0 0  $\mu\text{l}$  )、これらのプレートを暗所で 1 5 分間インキュベートした。H C l 1 N ( 5 0  $\mu\text{l}$  ) 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、4 9 0 n m または参照に関しては 6 2 0 n m 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。

#### P D、P E および P i l A 抗体を測定するための E L I S A の説明

プレートを、1 0 0  $\mu\text{l}$  / ウェルの、炭酸バッファー p H 9 . 6 中、2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の P D ( 1 m g / m l )、2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の P E ( 1 5 0 0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  )、2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の P i l A ( 3 6 6 0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ) で 4 にて一晚コーティングした。これらのプレートを Na C l 0 . 9 % ポリソルベート 2 0 0 . 0 5 % で 4 回洗浄した。P E および P i l A E L I S A に関しては、プレートを室温で 3 0 分間 ( 振盪しながら ) P B S - B S A 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照 ( C h r o m p u r e マウス I g G で校正した内部参照) をマイクロウェルに加え、P B S ポリソルベート 2 0 0 . 0 5 % ( P D アッセイの場合) および P B S ポリソルベート 2 0 0 . 0 5 % B S A 0 . 1 % ( P E および P i l A アッセイの場合) で連続希釈して 1 0 0  $\mu\text{l}$  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 3 0 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 I g G 抗体とともに ( 1 0 0  $\mu\text{l}$  / ウェル) 振盪しながら室温で 3 0 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 ( 1 0 m l のクエン酸塩 0 . 1 M p H 4 . 5 ~ 4 . 6 および 5  $\mu\text{l}$  の  $\text{H}_2\text{O}_2$  中、4 m g 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 ( 1 0 0  $\mu\text{l}$  )、暗所で 1 5 分間置いた。H C l 1 N 5 0  $\mu\text{l}$  の添加により反応を停止させ、4 9 0 n m ( 参照に関しては 6 2 0 n m ) で吸光度を読み取った。

#### P h t D および d P l y 抗体を測定するための E L I S A の説明

プレートを、1 0 0  $\mu\text{l}$  / ウェルの 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の P h t D ( 1 0 2 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ) または 4  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の P l y ( 3 6 7  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ) で 3 7 にて 2 時間コーティングした。次に、これらのプレートを Na C l 0 . 0 9 % ポリソルベート 0 . 0 5 % 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照 ( C h r o m p u r e マウス I g G で校正した内部参照) をマイクロウェルに加え、P B S ポリソルベート 2 0 0 . 0 5 % で連続希釈して 1 0 0  $\mu\text{l}$  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 3 0 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 I g G 抗体とともに ( 1 0 0  $\mu\text{l}$  / ウェル) 振盪しながら室温で 3 0 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 0.1 M pH 4.5 および 5  $\mu$ l の  $H_2O_2$  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  $\mu$ l)、暗所で 15 分間置いた。HCl 1 N 50  $\mu$ l 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 (OPA) の説明

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 25  $\mu$ l のアリコート、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  $\mu$ l 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  $\times$  10<sup>7</sup> 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ば、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  $\mu$ l を希釈血清に加え、最終容量を 50  $\mu$ l 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 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  $\mu$ l 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  $\mu$ l の Todd-Hewitt ブロス - 0.9 % 寒天を各ウェルに加えた。37、5 % CO<sub>2</sub> 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。

#### 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 Balb/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 (Ph 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、パータクチン、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。



### 実施例 23：モルモットにおける 10 V、12 V および 12 V + 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 P S 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 P S 1、5  $\mu$ g / ml の P S 4、5、6 A、6 B、7 F、9 V または 14；10  $\mu$ g / ml の P S 19 A および 23 F、40  $\mu$ g / ml の P S 18 C および P S 19 F または参照ウェルに関しては P B S 中 2  $\mu$ g / ml に希釈した A f f i n i p u r e ヤギ抗モルモット I g G (2.4 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 N a C l 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、C P S (2.5 mg / ml の 6 A および 6 B 以外は 1 mg C P S / ml の無希釈血清) V / V を含有する P B S - ポリソルベート 20 0.05% 中に希釈し (P S 6 A および 6 B に関しては 1 / 2、他の全ての血清型に関しては 1 / 10)、C P S 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、P B S - 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 (P B S - ポリソルベート 20 0.05% で 0.25  $\mu$ g / ml に希釈した C h r o m p u r e モルモット I g G (11 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 I g G 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 (10 ml のクエン酸塩 0.1 M pH 4.5 ~ 4.6 および 5  $\mu$ l の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 中、4 mg の O P D A) 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。H C l 1 N 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 P D、P E、および P i l A 抗体を測定するための E L I S A の説明

プレートを、100  $\mu$ l / ウェルの、P B S 中の炭酸バッファー pH 9.6 中、2  $\mu$ g / ml の P D (1 mg / ml)、2  $\mu$ g / ml の P E (1500  $\mu$ g / ml)、または 2  $\mu$ g / ml の P i l A (3660  $\mu$ g / ml) または参照ウェルに関しては P B S 中 2  $\mu$ g / ml に希釈した A f f i n i p u r e ヤギ抗モルモット I g G (2.4 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 N a C l 0.9% ポリソルベート 20 0.05% で 4 回洗浄した。P E および P i l A E L I S A については (この工程は P D および P l y E L I S A については実施しなかった)、プレートを室温で 30 分、P B S - B S A 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 (C h r o m p u r e モルモット I g G で校正した内部標準) をマイクロウェルに加え、P B S ポリソルベート 20 0.05% (P D E L I S A の場合) および P B S ポリソルベート 20 0.05% B S A 0.1% (P E および P i l A E L I S A 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 I g G 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 (10 ml のクエン酸塩 0.1 M pH 4.5 ~ 4.6 および 5  $\mu$ l の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 中、4 mg の O P D A) を各ウェルに加え (100  $\mu$ l)、暗所で 15 分間置いた。H C l 1 N 50  $\mu$ l 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。

#### P h t D および d P l y 抗体を測定するための E L I S A の説明

プレートを、100  $\mu$ l / ウェルの、P B S 中 1  $\mu$ g / ml の P h t D (1021  $\mu$ g / ml) または 2  $\mu$ g / ml P l y (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 N a C l 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 (Chrompure モルモット IgG で校正した内部標準) をマイクロウェルに加え、PBS ポリソルベート 200.05 % 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 (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 (10 ml のクエン酸塩 0.1 M pH 4.5 ~ 4.6 および 5  $\mu$ l の  $H_2O_2$  中、4 mg の OPDA) を各ウェルに加え (100  $\mu$ l)、暗所で15分間置いた。HCl 1 N 50  $\mu$ l 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) で吸光度を読み取った。

10

#### 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 25  $\mu$ l のアリコートをし、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  $\mu$ l 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  $\times$  10<sup>7</sup> 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ば、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  $\mu$ l を希釈血清に加え、最終容量を 50  $\mu$ l 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 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 20  $\mu$ l 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  $\mu$ l の Todd-Hewitt プロス - 0.9 % 寒天を各ウェルに加えた。37、5 % CO<sub>2</sub> 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、オーバーコッペン、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。

20

30

#### 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 (PhTD、dPlly および PEPiLA)、Prevna 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 (DSP 2A017) および 12 V + タンパク質 (DSP 2A012) 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、パータクチン、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 (PRP) 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)。

40

##### 【0261】

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 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、12 V + タンパク質、12 V および 10 V 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

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。

【0264】

12V + タンパク質は、12V製剤に類似する応答を誘導した。

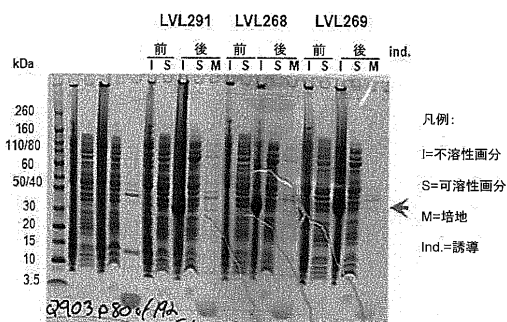
【0265】

図34の結果は、P E P i l Aと組み合わせた場合に、12価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。

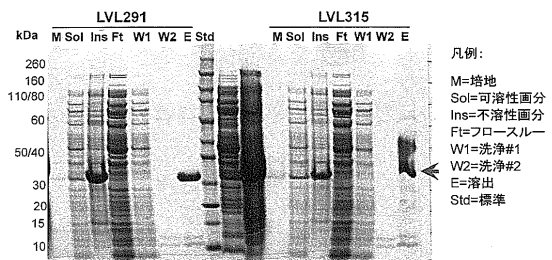
【0266】

12V + タンパク質 G M P 製剤で得られた結果は、10V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。

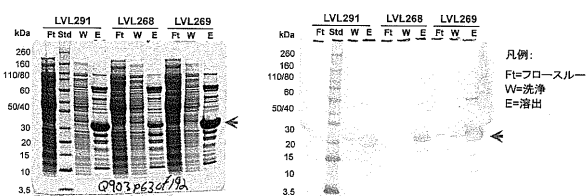
【図1】



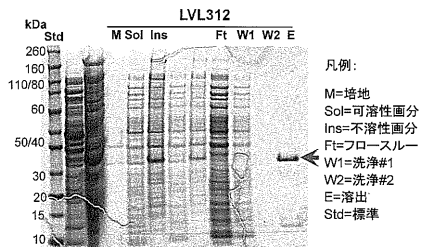
【図3】



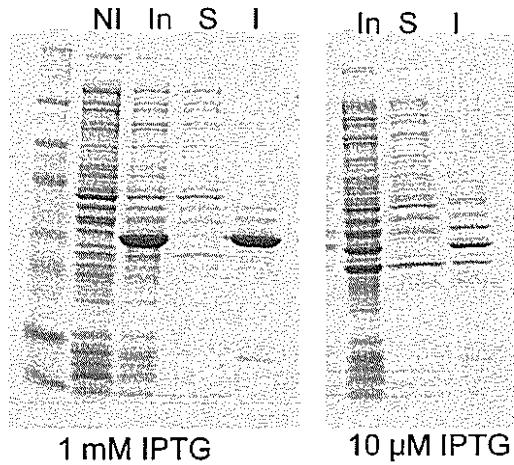
【図2】



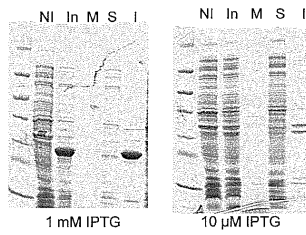
【図4】



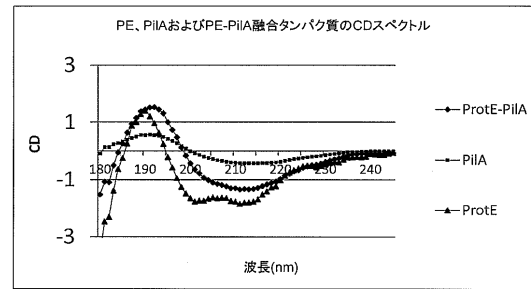
【図 5】



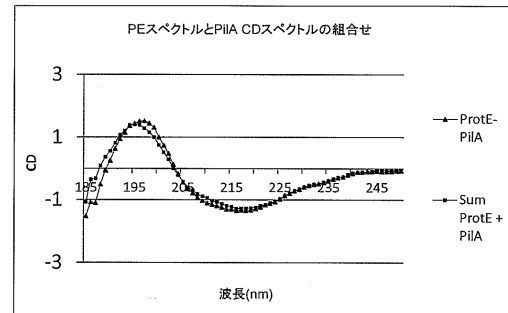
【図 6】



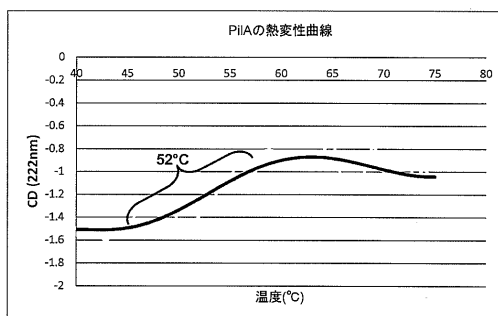
【図 7】



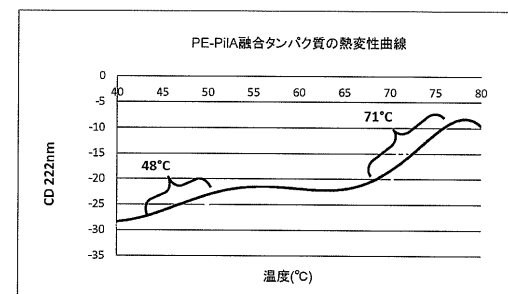
【図 8】



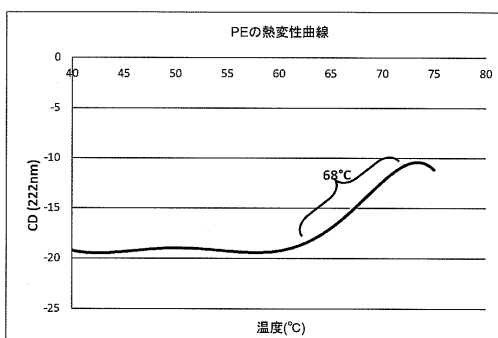
【図 9】



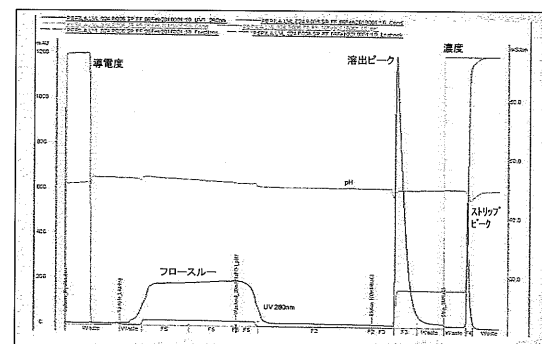
【図 11】



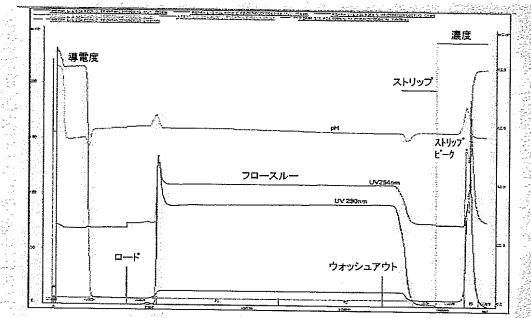
【図 10】



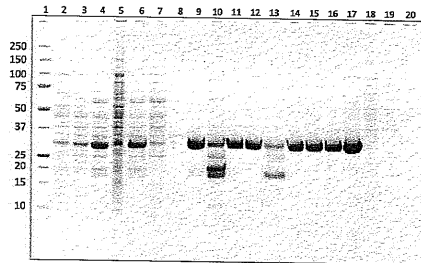
【図 12】



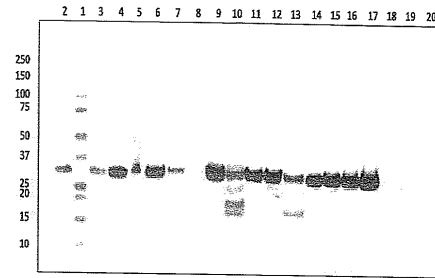
【図 13】



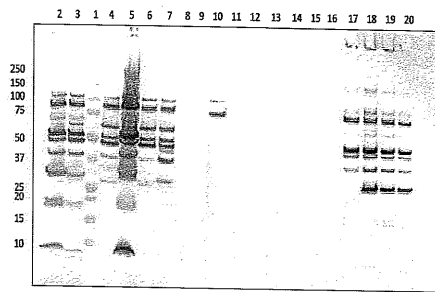
【図 14】



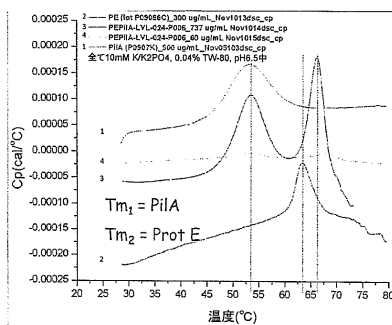
【図 15】



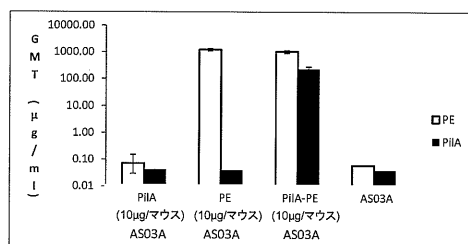
【図 16】



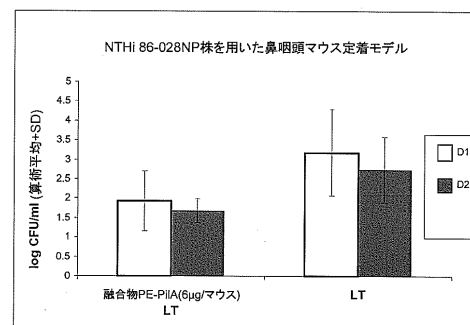
【図 17】



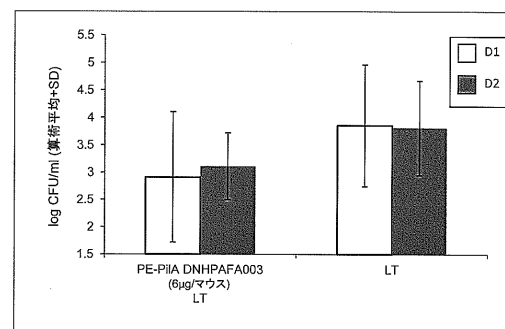
【図 18】



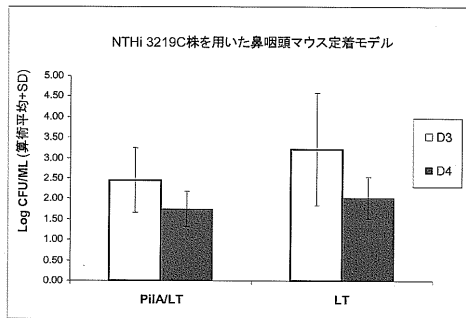
【図 19】



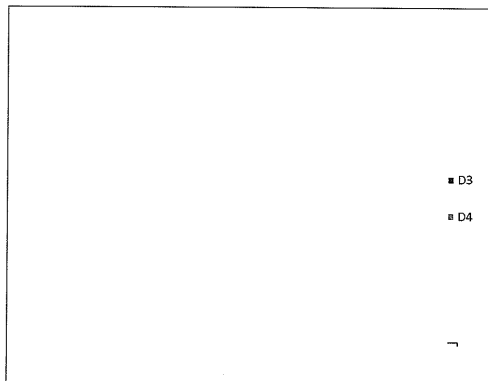
【図 20】



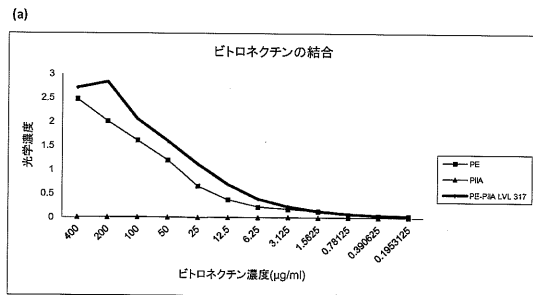
【図 2 1】



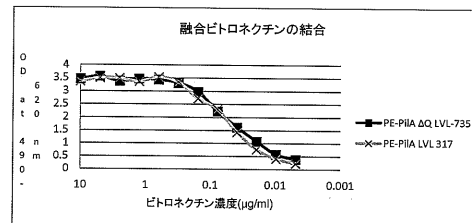
【図 2 2】



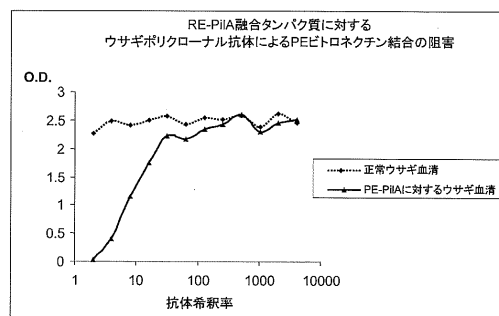
【図 2 3】



(b)

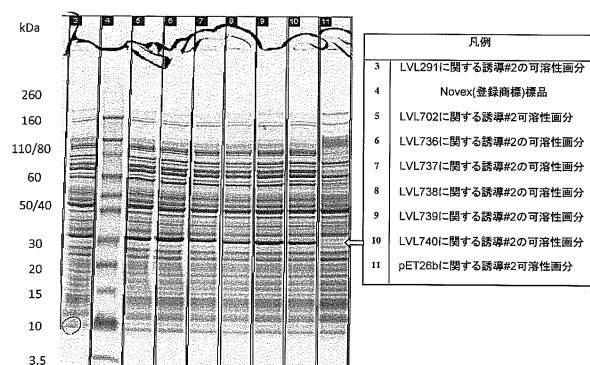


【図 2 4】



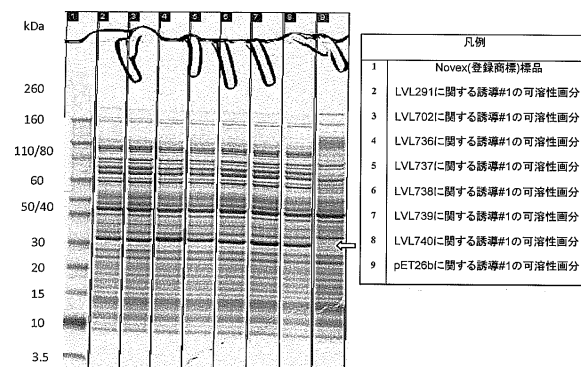
【図 2 5 b】

(b) 実験2



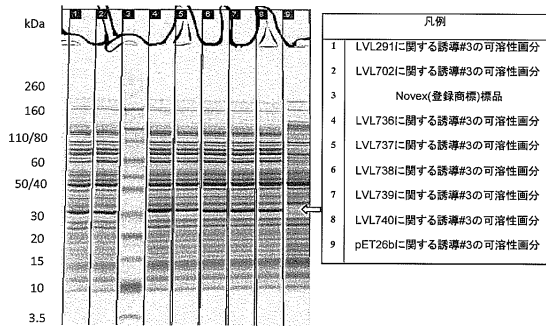
【図 2 5 a】

(a) 実験1

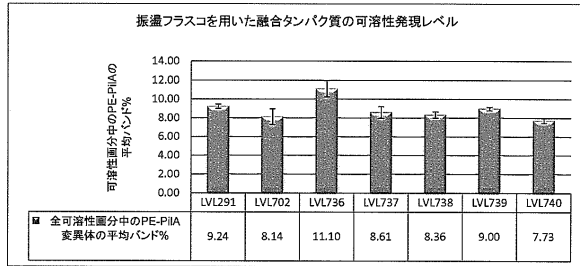


## 【図 25 c】

(c) 実験3

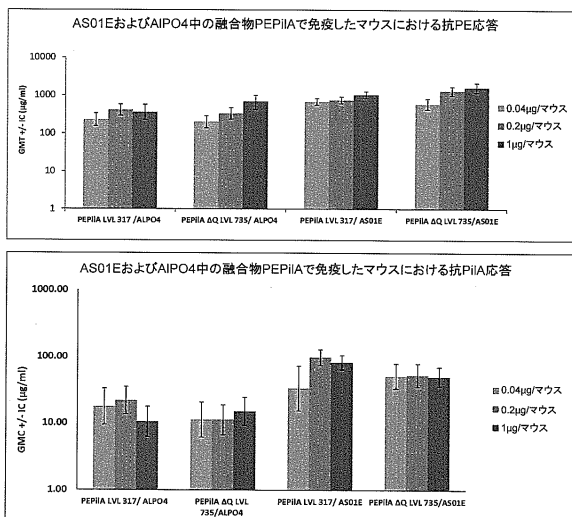


## 【図 26】

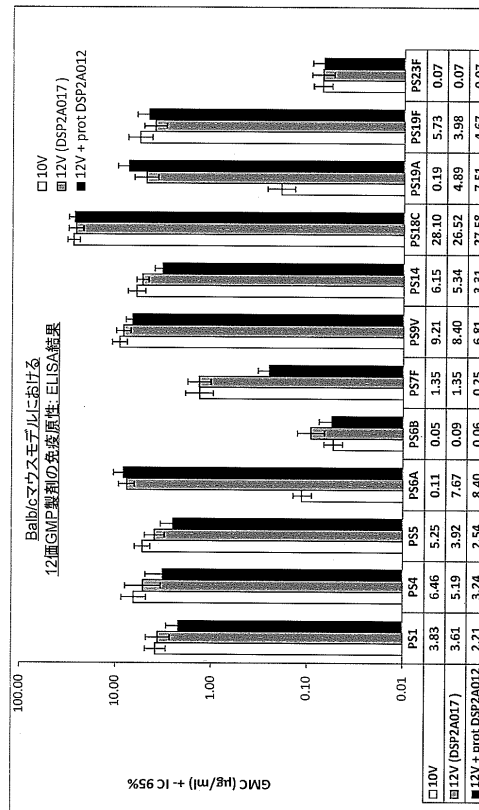


構築物ID	%融合タンパク質 ゲル#1	%融合タンパク質 ゲル#2	%融合タンパク質 ゲル#3	平均融合 タンパク質%	SD偏差
LVL291	9.3	8.98	9.43	9.24	0.231588716
LVL702	7.2	8.85	8.37	8.14	0.848704896
LVL736	11.16	10.2	11.94	11.10	0.871550343
LVL737	8.18	8.33	9.32	8.61	0.619435227
LVL738	8.56	8.55	7.97	8.36	0.337786915
LVL739	8.91	8.88	9.21	9.00	0.182482876
LVL740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

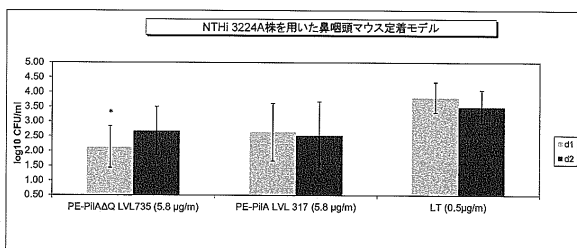
## 【図 27】



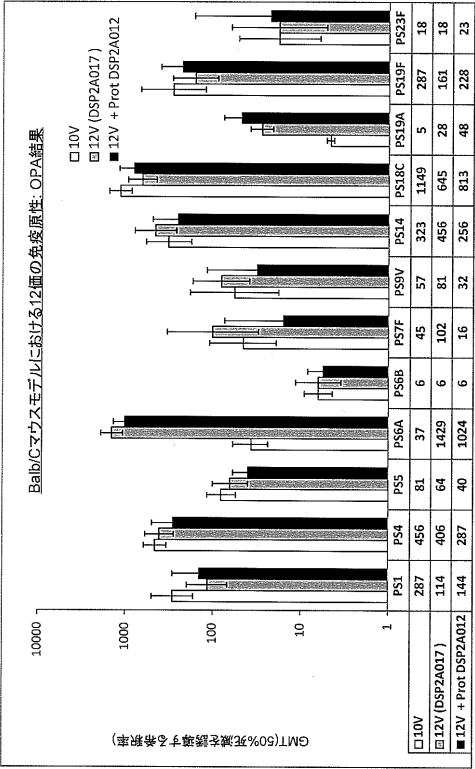
## 【図 29】



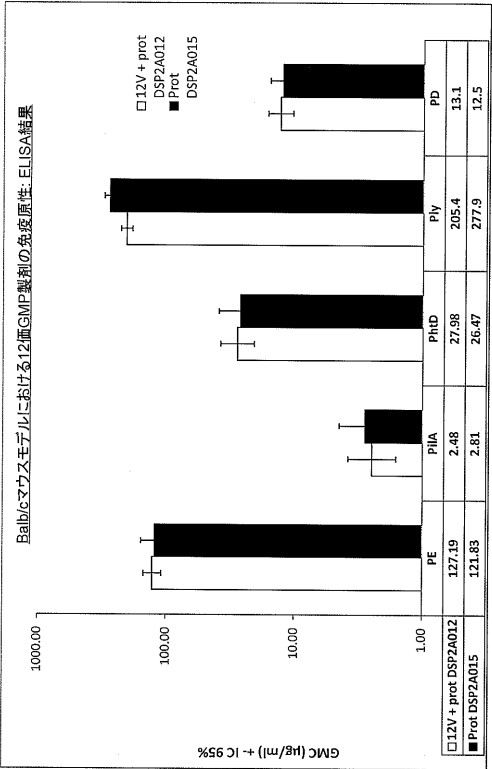
## 【図 28】



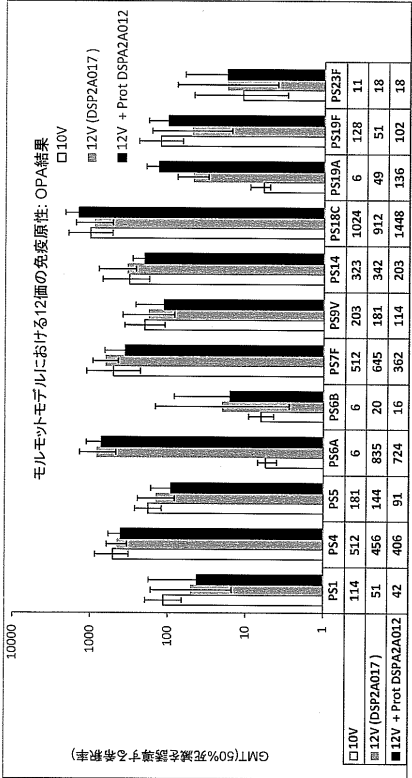
【図 30】



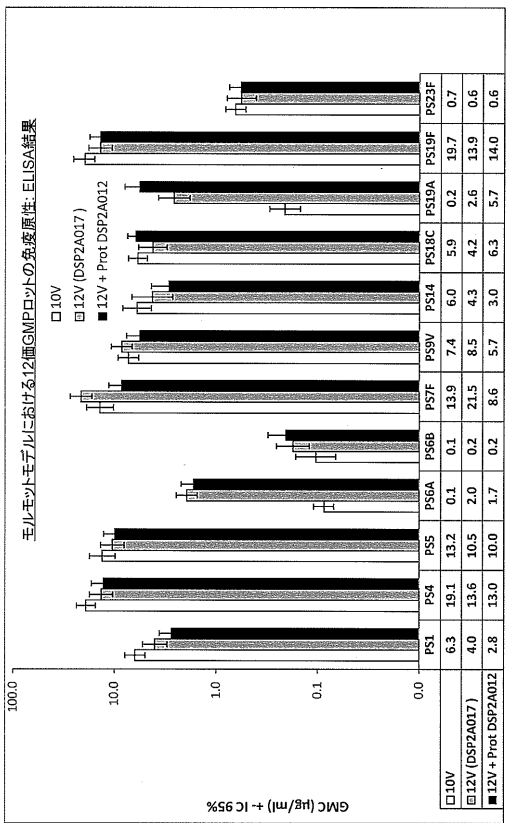
【図 31】



【図 32】

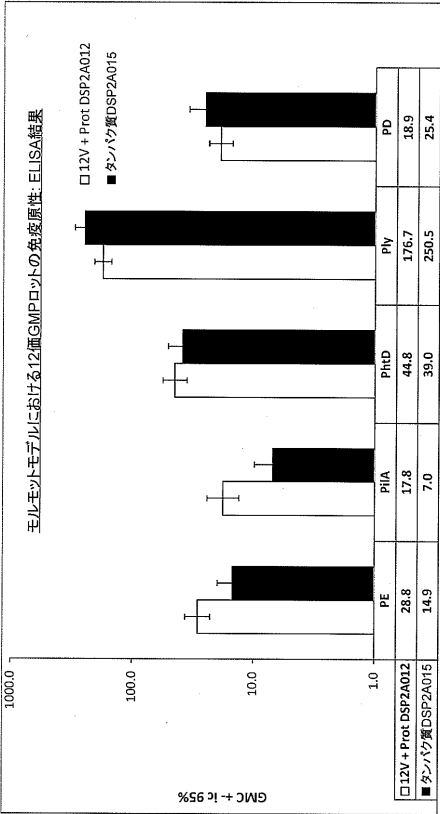


【図 33】





【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 - 1 3 0 0 ワーフェル, アベニュー フルミング 2 0 , グラクソスミスクライン  
 バイオリジカルズ 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 - 1 3 0 0 ワーフェル, アベニュー フルミング 2 0 , グラクソスミスクライン  
 バイオリジカルズ 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 - 1 3 0 0 ワーフェル, アベニュー フルミング 2 0 , グラクソスミスクライン  
 バイオリジカルズ 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 - 1 3 3 0 リクセンサール, リュ ドランスティテュ 8 9 , グラクソスミスク  
 ライン バイオリジカルズ 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 6 1 K 3 9 / 0 9  
 A 6 1 K 3 9 / 0 7  
 A 6 1 K 3 9 / 0 8  
 A 6 1 P 3 1 / 0 4  
 C 0 7 K 1 4 / 2 8 5  
 C 0 7 K 1 4 / 3 1 5  
 C 0 7 K 1 9 / 0 0  
 C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T N )