

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4689044号
(P4689044)

(45) 発行日 平成23年5月25日 (2011.5.25)

(24) 登録日 平成23年2月25日 (2011.2.25)

(51) Int. Cl.	F 1
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02
A 6 1 K 39/09 (2006.01)	A 6 1 K 39/09
A 6 1 P 31/10 (2006.01)	A 6 1 P 31/10

請求項の数 28 (全 40 頁)

(21) 出願番号	特願2000-589215 (P2000-589215)	(73) 特許権者	594186441
(86) (22) 出願日	平成11年12月21日 (1999.12.21)		メディミュン、インコーポレーテッド
(65) 公表番号	特表2002-532561 (P2002-532561A)		アメリカ合衆国、20878 メリーランド、ゲイザーズバーグ、ウエスト ワトキ
(43) 公表日	平成14年10月2日 (2002.10.2)		ンズ ミル ロード 35
(86) 国際出願番号	PCT/US1999/030390	(74) 代理人	100066061
(87) 国際公開番号	W02000/037105		弁理士 丹羽 宏之
(87) 国際公開日	平成12年6月29日 (2000.6.29)	(72) 発明者	ジョンソン、レスリー、エス.
審査請求日	平成18年12月21日 (2006.12.21)		アメリカ合衆国、20874 メリーランド、ジャーマンタウン、アンバサダー ド
(31) 優先権主張番号	60/113,048		ライブ 13545
(32) 優先日	平成10年12月21日 (1998.12.21)	(72) 発明者	ケーニッグ、スコット
(33) 優先権主張国	米国 (US)		アメリカ合衆国、20852 メリーランド、ロックビル、ラルストン ロード 1
			0732

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ワクチン用の肺炎連鎖球菌タンパク質と免疫原断片

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列識別番号 4 のアミノ酸 20-838 に少なくとも 95% 同一性を持つポリペプチドを含む組成物であって、前記ポリペプチドは、前記組成物が哺乳類に投与される時に肺炎連鎖球菌に結合する抗体の産生を引き出すのに有効な量で薬理許容担体に存在する、組成物。

【請求項 2】

前記パーセント同一性が少なくとも 97% である請求項 1 記載の組成物。

【請求項 3】

前記ポリペプチドが配列識別番号 4 のアミノ酸配列を含む請求項 1 記載の組成物。

10

【請求項 4】

前記ポリペプチドが少なくとも 2 個のコイルドコイル領域を含む請求項 1 記載の組成物。

。

【請求項 5】

前記ポリペプチドが少なくとも 5 個のヒスチジン三つ組領域を含む請求項 1 記載の組成物。

【請求項 6】

前記ポリペプチドが少なくとも 2 個のコイルドコイル領域と少なくとも 5 個のヒスチジン三つ組領域を含む請求項 1 記載の組成物。

【請求項 7】

20

前記ポリペプチドのアミノ酸配列と前記配列識別番号4のアミノ酸配列との間のいずれかの可変性がコイルドコイル領域またはヒスチジン三つ組領域以外のアミノ酸残基でのみ生じる請求項1記載の組成物。

【請求項8】

図6(a)、6(b)、および6(c)のPh t Dのアミノ酸に少なくとも95%同一性を持つポリペプチドを含む組成物であって、前記ポリペプチドは、前記組成物が哺乳類に投与される時に肺炎連鎖球菌に結合する抗体の産生を引き出すのに有効な量で薬理許容担体に存在する、組成物。

【請求項9】

前記パーセント同一性が少なくとも97%である請求項8記載の組成物。

10

【請求項10】

前記ポリペプチドが図6(a)、6(b)、および6(c)のPh t Dのアミノ酸配列を含む請求項8記載の組成物。

【請求項11】

前記ポリペプチドが少なくとも2個のコイルドコイル領域を含む請求項8記載の組成物。

【請求項12】

前記ポリペプチドが少なくとも5個のヒスチジン三つ組領域を含む請求項8記載の組成物。

【請求項13】

20

前記ポリペプチドが少なくとも2個のコイルドコイル領域と少なくとも5個のヒスチジン三つ組領域を含む請求項8記載の組成物。

【請求項14】

前記ポリペプチドのアミノ酸配列と前記図6(a)、6(b)、および6(c)のアミノ酸配列との間のいずれかの可変性がコイルドコイル領域またはヒスチジン三つ組領域以外のアミノ酸残基でのみ生じる請求項8記載の組成物。

【請求項15】

前記ポリペプチドが残基20のシスチンで開始するPh t Dタンパク質の少なくとも819アミノ酸残基である請求項8記載の組成物。

【請求項16】

30

図6(a)、6(b)、および6(c)のPh t Dのアミノ酸配列に少なくとも95%同一性を持つアミノ酸配列を含む単離ポリペプチドであって、前記ポリペプチドが肺炎連鎖球菌に結合する抗体に結合する単離ポリペプチド。

【請求項17】

前記パーセント同一性が少なくとも97%である請求項16記載の単離ポリペプチド。

【請求項18】

前記アミノ酸配列が図6(a)、6(b)、および6(c)のPh t Dのアミノ酸配列である請求項16記載の単離ポリペプチド。

【請求項19】

組成物が哺乳類に投与される時に肺炎球菌感染を予防し、肺炎球菌感染に結合する抗体の産生を引き出すのに有効な量で薬理許容担体に前記ポリペプチドを含有する前記組成物を調製するための、請求項16乃至18のいずれか1項に記載の単離ポリペプチドの使用。

40

【請求項20】

第1および第2ポリペプチドを含む組成物であって、前記第1ポリペプチドが図6(a)、6(b)、および6(c)のPh t Dのアミノ酸配列に少なくとも95%同一性のアミノ酸配列を含み、前記第1および第2ポリペプチドは、肺炎連鎖球菌に結合する抗体の産生を引き出すのに有効な量で薬理許容担体に存在する、組成物。

【請求項21】

前記パーセント同一性が少なくとも97%である請求項20記載の組成物。

50

【請求項 2 2】

前記第 1 ポリペプチドが、配列識別番号 4 のアミノ酸残基 2 0－8 3 8 のアミノ酸配列を含む請求項 2 0 記載の組成物。

【請求項 2 3】

前記第 2 ポリペプチドが図 6 (a)、6 (b)、および 6 (c) の P h t E に少なくとも 9 5 % 同一性を持つアミノ酸配列を含む請求項 2 0 記載の組成物。

【請求項 2 4】

前記第 2 ポリペプチドが図 6 (a)、6 (b)、および 6 (c) の P h t E のアミノ酸配列を含む請求項 2 0 記載の組成物。

【請求項 2 5】

前記第 2 ポリペプチドが図 6 (a)、6 (b)、および 6 (c) の P h t A に少なくとも 9 5 % 同一性を持つアミノ酸配列を含む請求項 2 0 記載の組成物。

【請求項 2 6】

前記第 2 ポリペプチドが図 6 (a)、6 (b)、および 6 (c) の P h t A のアミノ酸配列を含む請求項 2 0 記載の組成物。

【請求項 2 7】

前記第 2 ポリペプチドが図 6 (a)、6 (b)、および 6 (c) の P h t B に少なくとも 9 5 % 同一性を持つアミノ酸配列を含む請求項 2 0 記載の組成物。

【請求項 2 8】

前記第 2 ポリペプチドが図 6 (a)、6 (b)、および 6 (c) の P h t B のアミノ酸配列を含む請求項 2 0 記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【技術分野】

本出願は 1 9 9 8 年 1 2 月 2 1 日に受理された合衆国暫定特許出願番号第 6 0 / 1 1 3 , 0 4 8 号に基づくものであり、それはここでその全体を本出願に組み込まれている。

【0 0 0 2】

本発明は一般に細菌抗原とその用途、例えば免疫応答を刺激するためヒトおよび動物の免疫原薬としての細菌抗原とその用途に関する。より特異的には、これは病原体肺炎連鎖球菌の広範な血清型による感染からワクチン受容体を保護する抗体の産生を刺激する機構として、肺炎連鎖球菌から得られる少なくとも 1 個の保存ヒスチジン三つ組残基 (H x x H x H) と少なくとも 1 個のヘリックス形成ポリペプチドより成るポリペプチドでの哺乳類へのワクチン接種に関する。更に、本発明はそのような肺炎球菌感染の診断と処置に関連する診断と受動免疫療法に有用なポリペプチドに対する抗体に関する。

【0 0 0 3】

特殊な見地において、本発明は肺炎球菌細菌により生じる中耳、鼻咽頭、肺、気管支の各野、血液、脳脊髄液、その他の感染などの肺炎球菌感染の予防と処置に関する。

【0 0 0 4】

【背景技術】

肺炎連鎖球菌はグラム陽性細菌であり、それは動物およびヒトの侵襲性感染症、例えば敗血症、髄膜炎、中耳炎、大葉性肺炎などでの主要な作因となる (トゥオマネン他、ニュー・イングランド・ジャーナル・オブ・メディシン、3 2 2 巻、1 2 8 0 ~ 1 2 8 4 ページ (1 9 9 5 年))。感染過程の一部として、肺炎球菌はレクチン状のやり方で真核細胞炭水化物との結合により、上部および下部気道の非炎症性ヒト上皮細胞と容易に結合する (カンデル他、マイクロビアル・パソロジー、1 7 巻、3 6 1 ~ 3 7 4 ページ (1 9 9 4 年))。結合細菌の侵襲性肺炎球菌感染への変換は炎症性因子の局所生成を伴い、それは上皮細胞を活性化してその表面で受容体の数と型を変化させる (カンデル他、ネイチャー、3 7 7 巻、4 3 5 ~ 4 3 8 ページ (1 9 9 5 年))。明らかにそのような一つの受容体である血小板活性因子 (P A F, パフ) は肺炎球菌により係合され、また非常に短時間 (分単位) の間に肺炎球菌は強力に高められた粘着性と組織の侵襲を示す。ある可溶性受容体

10

20

30

40

50

類似体は肺炎球菌感染の進行を防ぐことが示された（イダンパーン－ヘイキーラ他、ジャーナル・オブ・インフェクシャス・ディーズ、１７６巻、７０４～７１２ページ（１９９７年））。数多くの各種の他のタンパク質が肺炎連鎖球菌の病原性に関連してきていることが示唆されてきている。広範な種類の肺炎連鎖球菌に対する予防を提供するワクチンとしてこのようなポリペプチドを利用するために肺炎連鎖球菌の各種菌株から共同のエピトープを持つポリペプチドを同定する必要がある存在する。

【０００５】

【発明の開示】

本発明にしたがって、肺炎連鎖球菌から得たポリペプチドおよびまたは前記ポリペプチドの変異体およびまたはそのようなポリペプチドの活性断片を含むワクチンおよびワクチン組成物が提供される。

10

【０００６】

ここで定義される活性断片はヒスチジン三つ組残基およびまたはそのようなペプチドのコイルドコイル（高次コイル、多段コイル）領域を含む。

【０００７】

配列を引用するときに「パーセント同一性」または「同一パーセント」という用語は、配列が、比較される配列の整列（アラインメント）からの請求されまたは説明される配列（比較配列）を説明または請求された配列（基準配列）と比較されることを意味する。パーセント同一性は以下のように定義される。

【０００８】

20

パーセント同一性 = $[1 - (C/R)] \times 100$

ここでCは、比較配列と基準配列の間の整列の全長にわたり基準配列と比較配列の間の数の差の数であり、ここで（i）比較配列の整列塩基またはアミノ酸を持たない基準配列の各塩基またはアミノ酸、（ii）基準配列の各ギャップおよび（iii）比較配列の整列塩基またはアミノ酸とは異なる基準配列の各整列塩基またはアミノ酸、のそれぞれは差異であり、またRは、同じく塩基またはアミノ酸として計数される基準配列で創り出された、いずれかのギャップを持つ比較配列との整列の全長にわたる基準配列の塩基またはアミノ酸の数である。

【０００９】

前記の計算されたパーセント同一性がほぼ同じまたはより大きい比較配列と基準配列の間に整列が存在するならば、比較配列以上の特定最小パーセント同一性は、ここで計算されたパーセント同一性が特定パーセント同一性よりも少ないようにたとえ整列が存在するとしても基準配列に対する特定の最小パーセント同一性を持つ。

30

【００１０】

ポリペプチドおよびまたはポリヌクレオチドに関して本発明のコンテキストにおける「分離された」という用語は、物質がもとの環境（例えば、それが自然に生じる場合は自然環境）から移動されることを意味する。例えば、生体に存在する自然発生ポリヌクレオチドまたはポリペプチドは分離されることはなく、自然系にある共存物質のいくらかまたはすべてから分離された同じポリヌクレオチドまたはポリペプチドが分離される。このようなポリヌクレオチドはベクターの一部であることができるし、およびまたはポリヌクレオチドまたはポリペプチドは一つの組成物の一部でもあり得るし、更にまたそのようなベクターまたは組成物が自然環境の一部ではないものとして分離される。本発明のポリペプチドおよびポリヌクレオチドは望ましくは分離形態で提供され、また望ましくは均質化のために精製される。

40

【００１１】

【発明の概要】

本発明の一つの見地に従って、一般に一つの組成物の形態でワクチンが提供され、それは（i）配列識別番号４のアミノ酸１－８１９より成るポリペプチド配列、または（ii）配列識別番号６のアミノ酸１－４６０より成るポリペプチド配列、あるいは前者の活性断片のいずれかと少なくとも９０％同一である少なくとも１個のポリペプチドを含む。

50

【0012】

本発明のもう一つの見地に従って、一般に一つの組成物の形態でワクチンが提供され、それは (i) 配列識別番号 8 のアミノ酸 1-800 より成るポリペプチド、または (ii) 配列識別番号 10 のアミノ酸 1-800 より成るポリペプチド、に少なくとも 90% 同一であるポリペプチドの活性断片を含む。

【0013】

「活性断片」という用語は 1 個もしくはそれ以上のヒスチジン三つ組残基およびまたは 1 個もしくはそれ以上のコイルドコイル領域を含む断片を意味する。「ヒスチジン三つ組残基」は配列 H x x H x H を持つポリペプチドの部分であり、ここで H はヒスチジンであり x はヒスチジン以外のアミノ酸である。

10

【0014】

コイルドコイル領域は「コイルズ」アルゴリズムにより予言された領域である。：ループス, A., ファンダイク, M., ストック, J. (1991 年) タンパク質配列からのコイルドコイルを予言する, サイエンス, 252 巻: 1162-1164 ページ。

【0015】

一つの実施例に従って、活性断片は 1 個もしくはそれ以上のヒスチジン三つ組残基と適用できるポリペプチド配列の少なくとも 1 個のコイルドコイル領域の両方を含む。も一つの実施例に従って、活性断片は少なくとも 2 個のヒスチジン三つ組残基を含む。

【0016】

も一つの実施例では、少なくとも 1 個のヒスチジン三つ組残基または適用できるポリペプチドの少なくとも 1 個のコイルドコイル領域を含む活性断片は、適用できるポリペプチドの少なくとも約 10% と適用できるポリペプチドの少なくとも約 85% を含む。

20

【0017】

配列識別番号 4 のポリペプチドは下記の 5 個のヒスチジン三つ組残基を含む。

【0018】

アミノ酸 83-88, 207-212, 315-320, 560-565, 644-649

配列識別番号 6 のポリペプチドは下記の 5 個のヒスチジン三つ組残基を含む。

【0019】

アミノ酸 83-88, 205-210, 309-314, 396-401, 461-469

更に配列識別番号 4 のポリペプチドは 2 個のコイルドコイル領域 (アミノ酸 139-159 とアミノ酸 769-791) を含み、また配列識別番号 6 のポリペプチドは 1 個のコイルドコイル領域 (アミノ酸 139-172) を含む。

30

【0020】

配列識別番号 8 のポリペプチドは下記の領域を含む。

【0021】

H x x H x H: アミノ酸 82-87, 208-213, 328-333, 569-574, 653-658

コイルドコイル: アミノ酸 137-164, 425-453, 481-512, 743-770

本発明の更なる見地に従って、前記のワクチンは肺炎連鎖球菌により生じる感染を予防しまたは処置する目的で投与される。

【0022】

40

本発明に従ってワクチン、またはワクチン組成物は 1 個もしくはそれ以上の前記ポリペプチドまたはその活性断片を含む。1 個以上のポリペプチドまたは活性断片を使用する時には、このような 2 個もしくはそれ以上のポリペプチドおよびまたは活性断片は 2 個もしくはそれ以上のポリペプチドまたは活性断片の物理的混合物または融合物として使用できる。融合断片または融合ポリペプチドは例えば組み換え技術によりまたは前もって調合されたポリペプチドまたは活性断片を融合する適切なリンカーの使用により産生することができる。

【0023】

本発明の実施例では (a), (i) 配列識別番号 4 のアミノ酸 1 乃至 819 より成るポリペプチド配列、または (ii) 配列識別番号 6 のアミノ酸 1-460 より成るポリペプチ

50

ド配列、に少なくとも95%と同一または少なくとも97%同一あるいは100%同一であるポリペプチド、もしくは(b)(a)のポリペプチドの活性断片が提供される。

【0024】

ポリペプチドが配列識別番号4または配列識別番号6の成熟ポリペプチド、あるいは本発明の活性断片のいずれかよりなるポリペプチドの変異体である場合には、ポリペプチドまたは断片での変異は一般にこれらの領域の1個以上でも行われるけれどもヒスチジン三つ組残基とコイルドコイル領域以外の部分にある。

【0025】

多くの場合、ポリペプチドまたは活性断片での変異は、他の置換も本発明の範囲内にあるが保存アミノ酸置換である。

10

【0026】

本発明に従って、ポリペプチド変異体は1個またはそれ以上のアミノ酸が置換され、およびまたは欠失され、およびまたは挿入されている変異体を含むポリペプチド変異体である。

【0027】

も一つの見地において、本発明は本発明のポリペプチドまたはポリペプチドの活性断片に対する抗体から形成される受動免疫ワクチンに関する。このような受動免疫ワクチンは患者の肺炎球菌感染を予防し、およびまたは処置するために利用することができる。このように、本発明の更なる見地に従って、ワクチンは本発明の合成または組換えポリペプチドあるいはそのようなポリペプチドに対する抗体から産生できる。

20

【0028】

更にも一つの見地において、本発明は肺炎球菌により生じる疾病の予防およびまたは処置で前に説明したように、本発明のポリペプチドに対する1個またはそれ以上の(モノクローナル、ポリクローナルまたは血清)抗体を使用する方法に関する。とりわけ、本発明は肺炎連鎖球菌により生じる感染性疾病の予防およびまたは処置のための方法に関する。更にまた望ましい見地において、本発明は本発明のワクチンを利用することによりヒトの中耳炎、鼻咽頭感染症、気管支感染症、その他の予防およびまたは処置のための方法に関する。

【0029】

一般にワクチンは水溶液または懸濁液の形態で注射可能医薬品として調製される。オイルベースのワクチンも吸入剤などで公知である。使用の前に溶解または懸濁される固体形態のものも調合される。活性成分に融和性であり薬剤用途で許容できる薬理担体が一般に加えられる。このような担体の例は、必ずしもそれに限定されないが、水、食塩水、デキストロース、またはグリセロールを含む。担体を組合わせたものも使用できる。

30

【0030】

ワクチン組成物は、pHを安定するために、またワクチンの効率を改良するのに役立つアジュバント、湿潤剤、または乳化剤として機能するために更に追加の物質を取り込むことができる。

【0031】

ワクチンは一般に非経口投与用として調合され、皮下または筋肉内に注射される。このようなワクチンは従来公知の方法を使用して坐薬としてまたは経口投与用に調合することができる。

40

【0032】

病原菌に免疫を与えるのに十分なワクチン量は当業者にとって公知の方法により決定される。この量はワクチン受容体の特徴と必要とされる免疫水準に基づいて決定されるであろう。典型的には、投与されるワクチン量は熟練し医師の判断で決定されるであろう。ワクチンが皮下または筋肉内注射で投与される場合には、50乃至500 μ gの範囲の精製タンパク質が与えられる。

【0033】

本発明はワクチンに向けられ、ここで本発明のポリペプチドまたは活性断片はポリペプチ

50

ドまたは活性断片をコード化するポリヌクレオチドの形態で送達または投与され、これによりポリヌクレオチドまたは活性断片が生体内で産生される。ポリヌクレオチドは適切な発現ベクターに含まれる薬理許容担体と組合わせられる。

【0034】

加えて、本発明のポリヌクレオチドは、受動免疫原で使用のため、診断試薬として使用のため、またアフィニティクロマトグラフィなどの他の工程で試薬として使用のために抗体の産生を刺激する免疫原として使用できる。

【0035】

も一つの見地において、本発明は前に記載した本発明のポリヌクレオチドと活性断片をコードするポリヌクレオチドを提供する。本発明のポリヌクレオチドはRNAの形態またはDNAの形態にあり、このDNAはcDNA、ゲノムDNA、および合成DNAを含む。DNAは二本鎖または一本鎖であり、一本鎖の場合にはコーディング鎖または非コーディング鎖（アンチセンス鎖）である。

【0036】

本発明のも一つの見地に従って、

(A) (i) 配列識別番号4のアミノ酸1-819より成るポリペプチド、(ii) 配列識別番号6のアミノ酸1-460より成るポリペプチドをコード化するポリヌクレオチド配列に少なくとも90%同一である分離ポリヌクレオチド、または

(B) 活性ポリヌクレオチド断片をコード化する(A)のポリヌクレオチドの断片、または

(C) (i) 配列識別番号8のアミノ酸1乃至800より成るポリヌクレオチドまたは(ii) 配列識別番号10のアミノ酸1乃至800より成るポリヌクレオチド、の活性断片をコード化するポリヌクレオチド配列に少なくとも90%同一であるポリヌクレオチド、が提供される。

【0037】

特異的实施例において、ポリヌクレオチドはこのようなポリヌクレオチド配列に少なくとも95%同一であり、望ましくは97%同一であり、また更には100%同一でさえある。

【0038】

「ポリペプチドをコード化するポリヌクレオチド」はポリペプチドのコーディング配列のみを含むポリヌクレオチド、ならびに追加のコーディングおよびまたは非コーディング配列を含むポリヌクレオチドを包含する。

【0039】

本発明はさらにポリヌクレオチドの変異体に関する。ポリヌクレオチドの変異体はポリヌクレオチドの自然発生対立変異体またはポリヌクレオチドの非自然発生変異体であることもある。変異体は1個またはそれ以上の塩基が置換され、欠失または挿入される変異体を含む。このようなコーディングポリヌクレオチドへの補体は同じまたは類似のポリペプチドをコード化するポリヌクレオチドを分離するのに利用される。とりわけ、このような手順は、多数の免疫区域を含む「連鎖」ポリヌクレオチドワクチンの産生に特に有用な肺炎連鎖球菌の異なった血清型からのポリペプチドの自然免疫原部分を得るのに有用である。

【0040】

配列識別番号5は配列識別番号4のポリペプチドをコード化するポリヌクレオチドの代表的な例であり、また配列識別番号7は配列識別番号6のポリペプチドをコード化するポリヌクレオチドの代表的な例である。配列識別番号9は配列識別番号8のポリペプチドをコード化するポリヌクレオチドの代表的な例であり、また配列識別番号11は配列識別番号10のポリペプチドをコード化するポリヌクレオチドの代表的な例である。遺伝子コードの既知の縮重の結果として、配列識別番号4、配列識別番号6、配列識別番号8、配列識別番号10のポリペプチドをコード化する他のポリヌクレオチドはここでの教示から当業者にとっては当然明らかであるに違いない。

【0041】

前記の免疫原ポリペプチドをコード化するポリヌクレオチドは、本発明のポリペプチドの精製を可能にするマーカー配列に対し骨組みに融合したコーディング配列を持つ。マーカー配列は、例えば細菌宿主の場合にマーカーに融合された成熟ポリペプチドの精製を提供するために p Q E - 9 ベクターで供給されるヘキサヒスチジン t a g であり、あるいは例えば、哺乳類宿主、例えば C O S - 7 細胞が使用される時には赤血球凝集素 (H A) t a g であることもできる。H A t a g はインフルエンザ赤血球凝集素タンパク質から誘導されるエпитープに対応する (ウイルソン, I., 他. 細胞, 37 巻, 767 ページ (1984 年))。

【0042】

本発明はまた本発明のポリペプチドの 1 個またはそれ以上をコード化するポリヌクレオチドを含むベクター、本発明のベクターで遺伝子操作された宿主細胞、組み換え手法により分離され事実上免疫原的に純粋な形態でこのような免疫原ポリペプチドの産生に関する。

【0043】

宿主細胞は本発明のポリペプチドをコード化するポリヌクレオチドより成るベクターで遺伝子操作 (形質導入または形質転換もしくは形質移入) される。ベクターは、例えばプラスミド、ウイルス粒子、ファージなどの形態にある。操作された宿主細胞はプロモーターを活性化し、形質転換株を選択し、あるいはこのようなポリペプチドをコード化するポリヌクレオチドを増幅するのに適したように修飾された従来の栄養培地で培養することができる。温度、pH およびその他の培養条件は発現のために選択された宿主細胞でこれまでに使用されたものであり、当業者にとっては明らかなものであろう。

【0044】

ベクターは染色体、非染色体および合成 D N A 配列、例えば S V 40 の誘導體; 細菌プラスミド; ファージ D N A; バキュロウイルス; 酵母プラスミド; プラスミドとファージ D N A、ウイルス D N A、例えば痘疹、アデノウイルス、鶏痘ウイルス、仮性狂犬病の組み合わせから誘導されるベクターを含む。しかし他の何れかのベクターでもそれが宿主内で複製可能で生存可能である限り使用されるであろう。

【0045】

適切な D N A 配列は各種の手順によりベクターに挿入することができる。一般に、D N A 配列は従来公知の技術による手順で適切な制限エンドヌクレアーゼ部位に挿入される。このような手順およびその他は当業者の範囲内にあるものと見做される。

【0046】

発現ベクターにおける D N A 配列は m R N A 合成に向うように適切な発現制御配列 (プロモーター) と操作的に結合される。このようなプロモーターの代表的な例として言及されるのは、L T R または S V 40 プロモーター、E. coli (エシェリキア属、大腸菌)、lac または trp、ファージラム P_L プロモーターおよび原核または真核細胞あるいはそのウイルスで遺伝子の発現を制御することで公知の他のプロモーターである。発現ベクターは更に翻訳開始のためのリボソーム結合部位と転写終結因子を含む。ベクターはまた発現を増幅するための適切な配列を含むことができる。

【0047】

加えて、発現ベクターは、例えば真核細胞培養のためのジヒドロ葉酸レダクターゼまたはネオマイシン耐性など、あるいは大腸菌でのテトラサイクリンまたはアンピシリン耐性などの形質転換宿主細胞の選択のための表現型特性を提供する 1 個またはそれ以上の選択マーカー遺伝子を望ましくは含む。

【0048】

前記の適切な D N A 配列、同じく適切なプロモーターまたは制御配列を含むベクターは宿主タンパク質を発現できるように適切な宿主を形質転換するために採用される。

【0049】

適切な宿主の代表的な例として言及されるのは、大腸菌、ストレプトミセス属、ネズミチフス菌などの細菌細胞; 酵母などの真菌細胞; ショウジョウバエ S 2 およびスポドプテラ

10

20

30

40

50

Sf9などの昆虫細胞；CHO，COSまたはBowes黒色腫などの動物細胞；アデノウイルス；植物細胞などである。適切な宿主の選択はここでの教示から当業者の範囲にあるものと見做される。

【0050】

より詳細には、本発明は更に広範に前記されているように、1個またはそれ以上の配列より成る組換え構築物を含む。構築物はプラスミドまたはウイルスベクターなどのベクターより成り、それに対して本発明の配列が前向きまたは後向き配向で挿入された。本実施例の望ましい見地において、構築物は更に例えば配列に操作可能に結合されたプロモーターを含む調節配列より成る。多数の適切なベクターとプロモーターは当業者にとって公知であり、商業的に利用できる。下記のベクターが例として提供される。細菌系：pQE70，pQE60，pQE-9（キャージェン，インコーポレイテッド），pbs，pD10，ファージスクリプト，psiX174，ピーブルススクリプトSK，pbsks，pNH8A，pNH16a，pNH18A，pNH46A（ストラータジーン）；ptrc99a，pKK223-3，pKK233-3，pDR540，pRIT5（ファルマチア）。真核生物系：pWLNEO，pSV2CAT，pOG44，pXT1，pSG（ストラータジーン），pSVK3，pBPV，pMSG，pSVL（ファルマチア）。しかしいずれか他のプラスミドまたはベクターでも、それが宿主内で複製可能であり生存可能である限り使用できる。

10

【0051】

プロモーター領域はCAT（クロラムフェニコール転換酵素）ベクターまたは他のベクターを選択マーカーと共に使用していずれか望ましい遺伝子から選択できる。2個の適切なベクターはpKK232-8とpCM7である。特に指定された細菌プロモーターはlac1，lacZ，T3，T7，gpt，ラムダP_R，P_LおよびTRPを含む。真核生物プロモーターはCMV即時初期（プロモーター）、HSVチミジンキナーゼ（プロモーター）、初期および後期SV40（プロモーター）、レトロウイルスからのLTRs（プロモーター）、およびマウスメタロチオネイン-1（プロモーター）を含む。適切なベクターとプロモーターの選択は、従来の技術の水準内に十分ある。

20

【0052】

更なる実施例において、本発明は前記の構築物を含む宿主細胞に関する。宿主細胞は高次の真核細胞、例えば哺乳類細胞、または低次の原核細胞、例えば細菌細胞などであり得る。構築物の宿主細胞への導入はリン酸カルシウム形質移入、DEAEデキストラン法、または電気穿孔法などにより実施することができる（デービス，L.，ディブナー，M.，バッティ，I.，分子生物学での基本的方法（1986年））。

30

【0053】

宿主細胞での構築物は組換え配列によりコード化される遺伝子生産物を産生する従来のやり方で使用することができる。選択肢として本発明のポリペプチドは従来のペプチド合成装置で合成により産生することができる。

【0054】

成熟タンパク質は適切なプロモーターの制御の下で哺乳類細胞、酵母、細菌、または他の細胞内で発現することができる。無細胞翻訳系も本発明のDNA構築物から誘導されるRNAsを用いてこのようなタンパク質を産生するために使用することができる。原核生物および真核生物宿主で使用される適切なクローニングおよび発現ベクターはサンプブルック他、分子クローニング：実験マニュアル，第2版、コールド・スプリング・ハーバー，ニューヨーク（1989年）に記載されており、その開示はここで引用文献として組み込まれている。

40

【0055】

より高次の真核生物による本発明のポリペプチドをコード化するDNAの転写はエンハンサー配列をベクターに挿入することで増加する。エンハンサーはDNAのシス作用領域であり、通常約10乃至300塩基対で転写を増加するためにプロモーターに作用する。その側は塩基対100乃至270の複製起点の後期側にあるSV40プロモーター、サイト

50

メガロウイルス初期プロモーターエンハンサー、複製起点の後期側にあるポリオーマエンハンサー、アデノウイルスエンハンサーなどを含む。

【0056】

一般に、組換え発現ベクターは複製起点と宿主細胞の形質転換を可能にする選択的マーカー、例えば大腸菌のアンピシリン耐性遺伝子とサッカロミセス・セレビシエ（ビール酵母菌等）TRP1遺伝子、および下流構造配列の直接転写に対して高次に発現された遺伝子から誘導されたプロモーターを含む。このようなプロモーターは解糖酵素をコード化するオペロン、例えば3-ホスホグリセリン酸キナーゼ（PGK）、 α 因子、酸性ホスファターゼ、または熱ショックタンパク質などから誘導することができる。異種構造配列は、翻訳開始および終結配列で適切な相で組立てられる。選択肢として、異種配列は望ましい特性、例えば発現された組換え産物の安定性または簡素化された精製を付与するN末端識別ペプチドを含む融合タンパク質をコード化することができる。

10

【0057】

細菌用として有用な発現ベクターは、機能的プロモーターと共に操作可能読み取り相で適切な翻訳開始終結コドンと一緒に望ましいタンパク質をコード化する構造DNA配列を挿入することにより構築される。ベクターは1個またはそれ以上の表現型選択マーカーと、ベクターの保存を確実なものとしまた望まなければ宿主内で増幅を提供する複製起点より成るであろう。形質転換のために適した原核生物宿主は、大腸菌、枯草菌、ネズミチフス菌、ならびにシュードモナス属、ストレプトミセス属、ブドウ球菌層など各種のもの、また選択の対象として選ばれるものなどを含む。

20

【0058】

代表的でしかし限定されない例として、細菌用としての有用な発現ベクターは公知のクローニングベクターpBR322（ATCC37017）の遺伝要素より成る商業的に利用可能なプラスミドから誘導される選択マーカーと複製起点より成ることができる。このような商業的ベクターは、例えばpKK223-3（ファルマチア・ファイン・ケミカルズ、ウプサラ、スウェーデン）とGEM1（プロメガ・バイオテック、マジソン、ウィスコンシン、アメリカ合衆国）を含む。これらのpBR322「バックボーン」切片は適切なプロモーターと発現される構築配列と結合される。

【0059】

適切な宿主菌株の形質転換と宿主菌株の適当な細胞密度への成長に続き、選択されたプロモーターが適当な手段（温度シフトまたは化学的誘導）により導入され、細胞は追加の期間培養される。

30

【0060】

細胞は典型的には遠心分離で収穫され、物理的・化学的手段で分離され、生成粗抽出物は更なる精製のために保持される。

【0061】

タンパク質の発現に使用される微生物細胞は凍結融解反復、音波破碎、フレンチプレス、機械的破碎、あるいは細胞溶解剤の使用などを含む何らかの都合のよい方法により破碎することができ、このような方法は当業者にとっては公知である。しかし望ましいものは本発明のポリペプチドを分泌し培養培地からポリペプチドの回収を可能にする宿主細胞である。

40

【0062】

各種の哺乳類細胞培養系もまた組換えタンパク質を発現するために使用できる。哺乳類発現系の例はグラズマン、細胞、23巻、175ページ（1981年）に記載されたサル腎臓線維芽細胞のCOS-7系、および適合性ベクターを発現できる他の細胞系、例えばC127、3T3、CHO、ヒーラおよびBHK細胞系などを含む。哺乳類発現ベクターは複製起点、適切なプロモーターとエンハンサーおよびいずれかの必要なリボーム結合部位、ポリアデニル化部位、スプライス供与体と受容体部位、転写終結配列、ならびに5'フランキング非転写配列を含むであろう。SV40スプライスから誘導されるDNA配列およびポリアデニル化部位は必要とされる非転写遺伝要素の提供するのに使用できる。

50

【0063】

ポリペプチドは十分公知のタンパク質回収精製方法により組換え細胞培養物から回収されおよびまたは精製することができる。このような方法は硫酸アンモニウムまたはエタノール沈殿、酸抽出、陰イオンまたは陽イオン交換クロマトグラフィー、ホスホセルロースクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、およびレクチンクロマトグラフィーを含む。必要に応じて、成熟タンパク質の配置を完成するため、タンパク質のリフォールディング（構造復元）段階を使用することができる。この点に関し、分子シャペロンがこのようなリフォールディング手順で使用される。最後に、高速流体クロマトグラフィー（HPLC）が最終的精製段階で使用できる。

10

【0064】

本発明の免疫原として有用なポリペプチドは自然精製産物または化学合成手順の産物、あるいは原核生物または真核生物宿主（例えば培養で微生物、酵母、高次の植物、昆虫および哺乳類などの細胞によるもの）からの組換え技術により産生される。組換え産生手順で採用される宿主に依存して、本発明のポリペプチドはグリコシル化され、また非グリコシル化される。

【0065】

個別に発現されたポリペプチドの分離の手順は従来公知の組換え発現／分離方法で分離される。このような分離の典型的な例はタンパク質構造の部分として発現されるタンパク質の保存領域またはHis tagあるいは切断リーダーまたは尾部に対する抗体を利用する。

20

【0066】

ポリペプチド、その断片または他の誘導体、あるいはその類似体、またはそれらを発現する細胞はその抗体を産生するための免疫原として使用することができる。これらの抗体は、例えばポリクローナル抗体であり、あるいはモノクローナル抗体である。本発明は更にキメラ抗体、一本鎖抗体およびヒト化抗体、ならびにFab断片、またはFab発現ライブラリーの産物を含む。従来技術で公知の各種技術はこのような抗体および断片の産生に使用することができる。

【0067】

本発明の配列に対応するポリペプチドに対して生成された抗体はポリペプチドの動物への直接注射により得ることができる。

30

【0068】

モノクローナル抗体の調製に関して、連続細胞系培養物により産生される抗体を提供する技術はいずれも使用することができる。その例はハイブリドーマ技術（ケーラーとミルシュタイン、1975年、ネイチャー、256巻：495-497ページ）、トリオーマ技術、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術（コズボー他、1983年、今日の免疫学、4巻：72ページ）、およびヒトモノクローナル抗体を産生するためのEBV-ハイブリドーマ技術（コール、他、1985年、モノクローナル抗体と癌治療、所収、アラン・R・リス、インコーポレイテッド、77-96ページ）を含む。

【0069】

一本鎖抗体の産生を記載した技術（合衆国特許第4,946,778号）としては本発明の免疫原ポリペプチドに対する一本鎖抗体の産生に適合させることができる。

40

【0070】

本発明は下記の実施例に関連して更に説明されるであろう。しかし、発明の範囲はそれにより限定されるものではない。

【0071】

【発明を実施するための最良の形態】

実施例1

抗Sp36での能動保護

A. Sp36のクローニング、発現、および精製

50

増幅の標的として使用されるゲノムDNAがゲノム配列に使用されたのと同じ菌株である肺炎連鎖球菌ノルウェー菌株（4血清型）から分離された。Sp36遺伝子の完全な配列（配列識別番号9）、およびその予想アミノ酸配列（配列識別番号8）はここに添付された配列表で与えられている。予想アミノ酸配列が疎水性リーダー配列に続きII型シグナルペプチダーゼのコンセンサス配列（LxxC、xの両方は典型的に小さいアミノ酸を表す）に類似の配列（LSVC）を含むことが注目された。プライマー（配列識別番号1-3として表示されたもの）はSp36遺伝子を増幅し、またヒスチジンで標識されたタンパク質がニッケルアフィニティークロマトグラフィーによる精製のためのシグナル配列を欠いているためにSp36のpQE10へのクローニングと発現を可能にするように設計された。配列識別番号1および3により増幅された断片のクローニングはSp36ノアミノ酸2乃至800を含むタンパク質に帰着するであろう。配列識別番号2および3により増幅された断片のクローニングはSp36のアミノ酸7乃至800を含むタンパク質に帰着するであろう（アミノ酸数は配列識別番号8を引用する）。

10

【0072】

B. Sp36ワクチン投与での能動保護

図1A-1Cで示される3種の実験のそれぞれにおいて、（3H/HeJマウス（グループ毎10匹）がSp36タンパク質（50μlの完全フロイトアジュバント（CFA）に乳化された50μlのPBSに15μg）で腹腔内（i.p.）で免疫化された。10匹のシャム免疫化マウスのグループがアジュバントと共にPBSを受けた。不完全フロイトアジュバント（IFA）での15μgのタンパク質の第2免疫が4週後に投与された。シャムグループはIFAでのPBSを受けた。血液が3、6、9週に（眼窩側方での瀉血で）引き出された。また各グループからの血清がエリザによる抗Sp36抗体の分析のために貯留された。マウスは約500CFUの肺炎連鎖球菌SJ2菌株（6B血清型、テネシー、メンフィス、セントジュード、チルドレンズ・リサーチ・ホスピタル、P. フリンにより提供されたもの）の腹腔内注射により10週で攻撃された。予備実験では、この菌株のLD₅₀は約10CFUであると決定された。マウスは14日間の生存が観察された。

20

【0073】

図1A-1Cで示された3種の実験は組換えSp36の微妙に異なった調合物が使用された。図1Aと1Bで示された実験は、いずれもアミノ酸20-815を含むSp36を使用した。異なったバッチのタンパク質が2種の実験で使用された。図1Cで示された実験は、アミノ酸25-815を含むSp36を使用した。

30

【0074】

図1Aで示された実験では、Sp36（第1バッチ）で免疫化された10匹のマウスから収集された9週の血清が1:4, 096, 000の endpoint エリザ力価を有していた。シャム免疫化マウスからの血清には抗Sp36抗体は検出されなかった。Sp36タンパク質で免疫化されたマウスの100%が14日間の攻撃（肺炎球菌の520CFU）に生存した。シャム免疫化マウスでは80%が4日までで死に、残りは生存した。

【0075】

図1Bで示された実験では、Sp36（第2バッチ）で免疫化された10匹のマウスから収集された9週の血清が>1:4, 096, 000の endpoint エリザ力価を有していた。シャム免疫化マウスからの血清には抗Sp36抗体は検出されなかった。Sp36タンパク質で免疫化されたマウスの100%が14日間の攻撃（肺炎球菌の510CFU）に生存した。シャム免疫化マウスでは80%が4日までで死に、またその全てが9日までに死んだ。

40

【0076】

図1Cで示された実験では、Sp36（アミノ酸25-815を含むもの）で免疫化された10匹のマウスから収集された9週の血清が1:4, 096, 000の endpoint エリザ力価を有していた。シャム免疫化マウスからの血清には抗Sp36抗体は検出されなかった。Sp36タンパク質で免疫化されたマウスの100%が14日間の攻撃（肺炎球菌の510CFU）に生存した。シャム免疫化マウスでは90%が4日までで死に、またそのすべ

50

てが12日までに死んだ。これらのデータは、組換えSp36タンパク質でのマウスの免疫化が全身肺炎球菌感染と死に対して保護できる応答を引き出すことを示している。この保護は菌株特異的ではなかった。組換え肺炎球菌タンパク質は4血清型菌株からクローンされ、一方攻撃は異種菌株SJ2（6B血清型）のものであった。

【0077】

実施例2

抗Sp36抗血清での受動保護

A. ラビット免疫血清の発生

免疫前血清の収集に続き、一匹のニュージーランドホワイトラビットがCFA内でSp36（アミノ酸20-815を含むもの）の250μgで免疫化された。このラビットは29日と50日にIFA内で125μgのSp36の2個の抗体補助刺激剤（ブースト）を受け、39日と60日に瀉血された。第2のラビットは対照抗原である大腸菌FimCで免疫化された。

【0078】

B. マウス内での受動保護

C3H/HeJマウス（グループ当たり10匹）が、ラビット血清100μlの2回の腹腔内注射で免疫化された。最初の注射は肺炎連鎖球菌SJ2菌株の172cfuで攻撃される24時間前に投与され、また第2の注射は攻撃の4時間後に与えられた。図2は肺炎球菌の2種の異なる菌株での感染後のマウスの生存%を示す。

【0079】

図2AはSJ2菌株（図2A）の172cfuで注射されたマウスの内、Sp36タンパク質に対して応答して産生されたラビット免疫血清で免疫化されたマウスの100%が21日の観察期間生存した。対照血清（抗FimC）で免疫化されたマウスの内、80%が8日までに死に、90%が12日までに死んだ。図12BはEF6796菌株862cfuを注射したマウスの内、Sp36タンパク質に対して応答して産生されたラビット免疫血清で免疫化されたマウスの90%が8日の観察期間生存した。（免疫化の前にラビットから収集された）対照血清を与えたものの内、90%は8日までに死んだ。

【0080】

これらのデータは、Sp36での免疫化から生じる肺炎球菌感染に対する保護が抗体媒介され、何故ならマウスは超免疫ラビットからの血清の受動移動により保護できることを示している。前に記載のマウス能動攻撃実験で見られるように、4血清型菌株からクローンされた組換えSp36タンパク質に対して向けられた血清は異種菌株での攻撃に対して保護的であった。

【0081】

実施例3

肺炎連鎖球菌の菌株内でのSp36の保存

A. ウェスタンブロット法

この実験で使用された23個の肺炎球菌株はアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション（ATCC；メリーランド，ロックビル）から入手したもので多価肺炎球菌ワクチンでの23個の血清型のそれぞれの1個の分離物を含む。全細胞溶解産物に対して、肺炎球菌は酵母抽出物（メーン、デトロイト、ジフコ）0.5%を含むドットーヒューイト肉汁2ml内で37℃で中対数相（620nmでの光学密度、0.4乃至0.6）に成長した。細菌は遠心分離で収穫され、2回水で洗浄された。ペレットは200mlの細胞溶解緩衝液（ドデシル硫酸ナトリウム0.01%、クエン酸ナトリウム0.15M、デオキシコール酸ナトリウム0.1%）に再懸濁され37℃で30分保温され、次いで、等量の2xSSC（塩化ナトリウム0.3M、クエン酸ナトリウム0.03M）で希釈された。溶解産物はSDS-PAGE（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）で分離され、ニトロセルロース膜（カリフォルニア，ハーキュリーズ，バイオラード・ラボラトリーズ）に移され、また標準ウェスタンブロット手順で抗体でプローブされた。

（実施例1記載の通り）Sp36で免疫化された10匹のC3H/HeJマウスからの血

10

20

30

40

50

清が貯留され、1：3000の希釈で使用された。結合抗体はエイマシヤム，インコーポレイテッド（マサチューセッツ，ケンブリッジ）の化学発光キットを用いてペルオキシダーゼ接合ヒツジ抗マウスIgGで検出された。

【0082】

マウス抗Sp36血清は（図3で示されるように）、試験された23個肺炎球菌溶解産物すべてで97キロダルトンと100キロダルトンの明白な分子量を持つ2個の主帯域を検出した。肺炎連鎖球菌血清型1、5、17Fおよび22Fから得られたSp36シグナルは低く、これはSp36発現の水準がこれらの菌株で減少しているか、もしくはこれらの菌株でのSp36が抗原として異なっているかのいずれかを示している。

【0083】

これらのデータは、Sp36が現在の多糖類ワクチンで代表される23個の肺炎球菌血清型の菌株の間で抗原的に保存されていることを示している。

【0084】

B. サザンブロット法

ゲノムDNAが前節でリストされた23個の肺炎球菌菌株のそれぞれから、また1個のSJ2菌株から調製された。DNAはPvuIIとBamHIで消化され、アガロースゲルで電気泳動されナイロン膜に移された。プローブがノルウェー4型DNA（実施例1のもの）からのSp36遺伝子を増幅し、またエイマシヤムからのキットを用いてランダムプライマー法でフルオレセインを用いて増幅断片を標識することにより調製された。雑種形成、洗浄、およびフィルムの露出はエマルシヤムから提供されたプロトコルに指示された通り実効された。図4は、24個の菌株それぞれからのDNAで雑種形成されたSp36プローブが研究されたことを示している。「M」で標識されたレーンは分子量マーカーとしてHindIIIで消化されフルオレセインで標識されたラムダファージからのDNAを含んでいた。

【0085】

実施例4

ヒトにおけるSp36の免疫原性

ヒト肺炎球菌感染の間Sp36が免疫原性であるかどうかを確認するために、培養証明された肺炎球菌菌血症の患者からの血清が組換えSp36タンパク質を含むウェスタンブロット法で使用された。図5で示される実験において（1乃至5として示される）5人の患者からの血清が1：3000希釈され、全長Sp36、Sp36のN末端半分（プロリン豊富領域に先行するもの）、またはSp36のC末端半分（プロリン豊富領域に続くもの）を含むプローブブロットに使用された。A（急性）と標識されたレーンは肺炎球菌感染の診断後すぐに収集された血清でプローブされた。レーンC（回復期）は最初の血清収集1ヶ月後（患者1，2，および3）もしくは8日後（患者4および5）に収集された血清でプローブされた。患者2，3および5では、Sp36での回復期血清の反応性は対応する急性（患者）血清の反応性よりも強かった。急性と回復期の血清間の差異はタンパク質のC末端半分での反応性で特に顕著であった。

【0086】

追加の実験（図示されてはいない）では、肺炎球菌感染での23患者からの回復期血清は全長Sp36での反応性を個別に検査された。23血清中20はウェスタンブロットでSp36を結合することが発見された。

【0087】

これらの実験は、Sp36がヒト免疫系により認識されることを示し、またSp36タンパク質に結合できる抗体がヒトでの自然の肺炎連鎖球菌感染の間に産生され得ることを示唆する。患者は多種多様の肺炎球菌菌で感染されたために、これらのデータは更にSp36が抗原として保存されることを示している。

【0088】

実施例5

表1は各種配列の間のパーセント同一性を提供する。

10

20

30

40

50

【0089】

レーザージーンのメガラインプログラムを使用する P h t A, P h t B, P h t D, および P h t E の予想されたアミノ酸配列の整列は、各 C 末端での実質的な開散（分岐）と共に強い N 末端相同性を示した。同じ遺伝子のヌクレオチド配列の整列は図 7 で示される。アミノ酸とヌクレオチド配列は、リップマン-ピアソン組状整列での同一性加重法を使って比較され、ここで適合する残基数が適合残基数プラス非適合残基数プラスギャップ内残基数で除される。下記の表（1）では、配列の各対の間のパーセント同一性は対応する行と列の交差部で示される。

【0090】

【表 1】

パーセント同一性

アミノ酸配列の間のパーセント同一性				
	P h t A	P h t B	P h t D	P h t E
P h t A		66.4	63.9	49.5
P h t B			87.2	49.5
P h t D				49.8
P h t E				
ヌクレオチド配列の間のパーセント同一性				
	P h t A	P h t B	P h t D	P h t E
P h t A		58.3	59.3	47.9
P h t B			86.4	47.4
P h t D				47.9
P h t E				

【0091】

実施例 6

P h t D ワクチン投与での能動保護

N 4 菌株から誘導される組換え P h t D で免疫化されたマウスは強力な抗体力価（2, 048, 000 乃至 4, 096, 000 にわたる相互端点力価）を生成した。P h t D で免疫化されたマウスは 3 種の異種菌株、すなわち S J 2（6 B 血清型；テネシー、メンフィス、セントジュード・チルドレンズ・リサーチ・ホスピタル、P. フリンにより提供されたもの）、E F 6 7 9 6（6 A 血清型）または E F 5 6 6 8（4 血清型；いずれもバーミンガム、ユニバーシティ・オブ・アラバマ、D. ブライルにより提供された菌株）のいずれかでの腹腔内注射後に死に対して保護された。図 8（パネル A）で示される実験では、シャム免疫マウスの 10 匹すべては有毒肺炎球菌（S J 2 菌株）での攻撃 10 日後以内に死に、一方 P h t D 免疫化マウスの 80 パーセントは 15 日の観察期間生存した。P h t D での免疫化はまた 6 A 血清型菌株、E F 6 7 9 6（パネル B）および 4 血清型菌株、E F 5 6 6 8（パネル C）に対して保護された。図 8（パネル B）で示された実験では、シャム免疫マウスの 10 匹すべてが有毒肺炎球菌（E F 6 7 9 6 菌株）での攻撃 7 日後以内に死に、一方 P h t D 免疫化マウスの 90 パーセントが 15 日の観察期間生存した。図 8（パネル C）で示された実験では、シャム免疫マウスの 10 匹すべてが有毒肺炎球菌（E F 5 6 6 8 菌株）との攻撃 6 日後以内に死んだが、一方 P h t D で免疫化された 9 匹のマウスは 15 日の観察期間生存した。

【図面の簡単な説明】

【図 1】 図 1 A - 1 C はそれぞれ S p 3 6 の異なる調合物を使用する 3 個の実験の結果を報告する。その結果は肺炎球菌菌株ノルウェー 4 血清型から誘導された組換え S p 3 6 での能動免疫化が異種菌株 S J 2（6 B 血清型）を用いる肺炎球菌敗血症のモデルでマウスを死から保護できることを示す。示された 3 種の実験それぞれにおいて、S p 3 6 で免

10

20

30

40

50

疫化されたマウスの100パーセントが肺炎球菌約500cfuでの攻撃後14日の観察期間生存し、一方（PBSとアジュバントを注射された）シャム免疫化マウスの80乃至100パーセントが同じ期間に死んだ。

【図2】 図2A-2Bはノルウェー型から誘導されるSp36に対して応答して産生されたラビット抗血清の受動投与が2個の異種菌株を用いる肺炎球菌敗血症のモデルでマウスを死から保護できたことを示す。図2AはSp36抗血清で免疫化されたマウスの100パーセントがSJ2菌株（6B血清型）の172cfuでの攻撃後21日の観察期間生存したことを示す。対照血清（ラビット抗FimC）で免疫されたマウスの80パーセントは8日までに死に、また90パーセントが12日までに死んだ。図2BはSp36抗血清で免疫化されたマウスの90パーセントがEF3796菌株（6A血清型）の862cfuでの攻撃後8日の観察期間生存した。（免疫化の前に収集された）対照血清で免疫化されたマウスの90%は5日までに死んだ。

10

【図3】 異種菌株のSp36と反応するためにノルウェー4型菌株から誘導された組換えSp36に対して応答して産生された抗血清の能力を示すウェスタンブロットである。全細胞溶解産物はSp36に対するマウス抗血清でイムノブロッティングされた。Sp36タンパク質を表す帯域は試験された23個の肺炎連鎖球菌菌株すべてで検出され、それは現在の多糖ワクチンで代表される23個の肺炎球菌血清型のそれぞれからの分離物を含んでいた。

【図4】 ノルウェー4型からのSp36遺伝子が24個の他の肺炎球菌菌株からのゲノムDNAで雑種形成することを示すサザンブロットであり、これら全ての菌株で類似の配列の存在を示している。

20

【図5】 患者の血清とSp36との反応性を示すウェスタンブロットである。Sp36（パネルAの全長、パネルBのN末端半分、あるいはパネルCのC末端半分のいずれか）はSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で電気泳動され、ニトロセルロースに移された。病気の発症直後（急性血清、レーンA）または8日乃至30日後（回復期血清、レーンC）に収集された患者血清がブロットをプローブするために使用された。患者2, 3, 5では、回復期血清は対応する急性血清が反応したより以上にSp36とより強く反応した。

【図6a】 4個の関連肺炎球菌タンパク質、すなわちそれぞれSp36A（Ph t A；配列識別番号8）、Sp36B（Ph t B；配列識別番号10）、Sp36D（Ph t D；配列識別番号4）、Sp36E（Ph t E；配列識別番号6）のアミノ酸整列比較である。配列内でのダッシュは配列類似性を最も最大化するために導入されたギャップを示す。適合するアミノ酸残基はボックスされる。

30

【図6b】 4個の関連肺炎球菌タンパク質、すなわちそれぞれSp36A（Ph t A；配列識別番号8）、Sp36B（Ph t B；配列識別番号10）、Sp36D（Ph t D；配列識別番号4）、Sp36E（Ph t E；配列識別番号6）のアミノ酸整列比較である。配列内でのダッシュは配列類似性を最も最大化するために導入されたギャップを示す。適合するアミノ酸残基はボックスされる。

【図6c】 4個の関連肺炎球菌タンパク質、すなわちそれぞれSp36A（Ph t A；配列識別番号8）、Sp36B（Ph t B；配列識別番号10）、Sp36D（Ph t D；配列識別番号4）、Sp36E（Ph t E；配列識別番号6）のアミノ酸整列比較である。配列内でのダッシュは配列類似性を最も最大化するために導入されたギャップを示す。適合するアミノ酸残基はボックスされる。

40

【図7a】 4個の関連肺炎球菌遺伝子、すなわちそれぞれSp36A（Ph t A；配列識別番号9）、Sp36B（Ph t B；配列識別番号11）、Sp36D（Ph t D；配列識別番号5）、Sp36E（Ph t E；配列識別番号7）のヌクレオチド整列比較である。配列内でのダッシュは配列類似性を最大化するために導入されたギャップを示す。

【図7b】 4個の関連肺炎球菌遺伝子、すなわちそれぞれSp36A（Ph t A；配列識別番号9）、Sp36B（Ph t B；配列識別番号11）、Sp36D（Ph t D；配列識別番号5）、Sp36E（Ph t E；配列識別番号7）のヌクレオチド整列比較であ

50

る。配列内でのダッシュは配列類似性を最大化するために導入されたギャップを示す。

【図7c】 4個の関連肺炎球菌遺伝子、すなわちそれぞれSp36A (Ph t A; 配列識別番号9)、Sp36B (Ph t B; 配列識別番号11)、Sp36D (Ph t D; 配列識別番号5)、Sp36E (Ph t E; 配列識別番号7)のヌクレオチド整列比較である。配列内でのダッシュは配列類似性を最大化するために導入されたギャップを示す。

【図7d】 4個の関連肺炎球菌遺伝子、すなわちそれぞれSp36A (Ph t A; 配列識別番号9)、Sp36B (Ph t B; 配列識別番号11)、Sp36D (Ph t D; 配列識別番号5)、Sp36E (Ph t E; 配列識別番号7)のヌクレオチド整列比較である。配列内でのダッシュは配列類似性を最大化するために導入されたギャップを示す。

【図7e】 4個の関連肺炎球菌遺伝子、すなわちそれぞれSp36A (Ph t A; 配列識別番号9)、Sp36B (Ph t B; 配列識別番号11)、Sp36D (Ph t D; 配列識別番号5)、Sp36E (Ph t E; 配列識別番号7)のヌクレオチド整列比較である。配列内でのダッシュは配列類似性を最大化するために導入されたギャップを示す。

【図7f】 4個の関連肺炎球菌遺伝子、すなわちそれぞれSp36A (Ph t A; 配列識別番号9)、Sp36B (Ph t B; 配列識別番号11)、Sp36D (Ph t D; 配列識別番号5)、Sp36E (Ph t E; 配列識別番号7)のヌクレオチド整列比較である。配列内でのダッシュは配列類似性を最大化するために導入されたギャップを示す。

【図7g】 4個の関連肺炎球菌遺伝子、すなわちそれぞれSp36A (Ph t A; 配列識別番号9)、Sp36B (Ph t B; 配列識別番号11)、Sp36D (Ph t D; 配列識別番号5)、Sp36E (Ph t E; 配列識別番号7)のヌクレオチド整列比較である。配列内でのダッシュは配列類似性を最大化するために導入されたギャップを示す。

【図7h】 4個の関連肺炎球菌遺伝子、すなわちそれぞれSp36A (Ph t A; 配列識別番号9)、Sp36B (Ph t B; 配列識別番号11)、Sp36D (Ph t D; 配列識別番号5)、Sp36E (Ph t E; 配列識別番号7)のヌクレオチド整列比較である。配列内でのダッシュは配列類似性を最大化するために導入されたギャップを示す。

【図8】 Ph t D組換えタンパク質でのマウスの免疫化の結果を示し、それは致死性敗血症からの保護に導く。C3H/HeJ (パネルAおよびB)またはBalb/cByJ (パネルC)マウスはPh t Dタンパク質 (完全フロイントアジュバント (CFA) 50 μ lで乳化されたPBS 50 μ l内の15 μ g)で皮下で免疫化された。保護実験で使用された組換えPh t Dタンパク質は819アミノ酸残基より成り、システイン (残基20)で出発していた。10匹のシャム免疫マウスのグループはアジュバントと共にPBSを受けた。不完全フロイントアジュバント (IFA)を用いた15 μ gのタンパク質の第2免疫化は3週後に投与された。シャムグループはIFAと共にPBSを受けた。血液は7週に (眼窩側方での瀉血で)引き出された。また各グループからの血清はエリザによる抗Ph t D抗体の分析のために貯留された。マウスは約550 c f uの肺炎連鎖球菌SJ2菌株、6B血清型 (パネルA)、850 c f uのEF6796菌株、6A血清型 (パネルB)、または450 c f uのEF5668菌株、4血清型 (パネルC)の腹腔内 (i. p.)注射で8週に攻撃された。予備実験では、SJ2とEF6796菌株に対するLD₅₀は両菌株とも約10 c f uであると決定された。EF5668菌株に対するLD₅₀は<5 c f uであると決定された。生存が以後15日間のコースにわたりすべてのグループで決定された。データは実験グループ当たり10匹のマウスの全体に対する生存のパーセントとして提示される。組換えPh t免疫化マウスをシャム免疫化マウスと比較する統計分析のために2個のサンプルのログランクテストが使用された。

【配列表】

10

20

30

40

SEQUENCE LISTING

<110> Johnson, Leslie S.
 Koenig, Scott
 Adamou, John E.

<120> Streptococcus Pneumoniae and Immunogenic Fragments for
 Vaccines

<130> 469201-444

<140>

<141>

10

<150> 60/113,048

<151> 1998-12-21

<160> 11

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Forward primer
 used in amplification of the Sp36 gene sequence.

<400> 1

atcggatcct tcttacgagt tgggactgta tcaagc

36

<210> 2

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Forward primer
 used in amplification of the Sp36 gene sequence.

<400> 2

atcggatcca ctgtatcaag ctagaacggt taagg

35

<210> 3

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Reverse primer
used in amplification of the Sp36 gene sequence.

<400> 3

agtcaagctt gtttattttt tccttactta cagatgaagg

40

<210> 4

<211> 838

<212> PRT

<213> Streptococcus pneumoniae

10

<400> 4

Met Lys Ile Asn Lys Lys Tyr Leu Ala Gly Ser Val Ala Val Leu Ala
1 5 10 15

Leu Ser Val Cys Ser Tyr Glu Leu Gly Arg His Gln Ala Gly Gln Val
20 25 30

Lys Lys Glu Ser Asn Arg Val Ser Tyr Ile Asp Gly Asp Gln Ala Gly
35 40 45

Gln Lys Ala Glu Asn Leu Thr Pro Asp Glu Val Ser Lys Arg Glu Gly
50 55 60

20

Ile Asn Ala Glu Gln Ile Val Ile Lys Ile Thr Asp Gln Gly Tyr Val
65 70 75 80

Thr Ser His Gly Asp His Tyr His Tyr Tyr Asn Gly Lys Val Pro Tyr
85 90 95

Asp Ala Ile Ile Ser Glu Glu Leu Leu Met Lys Asp Pro Asn Tyr Gln
100 105 110

Leu Lys Asp Ser Asp Ile Val Asn Glu Ile Lys Gly Gly Tyr Val Ile
115 120 125

30

Lys Val Asp Gly Lys Tyr Tyr Val Tyr Leu Lys Asp Ala Ala His Ala
130 135 140

Asp Asn Ile Arg Thr Lys Glu Glu Ile Lys Arg Gln Lys Gln Glu His
145 150 155 160

Ser His Asn His Gly Gly Gly Ser Asn Asp Gln Ala Val Val Ala Ala
165 170 175

Arg Ala Gln Gly Arg Tyr Thr Thr Asp Asp Gly Tyr Ile Phe Asn Ala
 180 185 190
 Ser Asp Ile Ile Glu Asp Thr Gly Asp Ala Tyr Ile Val Pro His Gly
 195 200 205
 Asp His Tyr His Tyr Ile Pro Lys Asn Glu Leu Ser Ala Ser Glu Leu
 210 215 220
 Ala Ala Ala Glu Ala Tyr Trp Asn Gly Lys Gln Gly Ser Arg Pro Ser
 225 230 235 240
 Ser Ser Ser Ser Tyr Asn Ala Asn Pro Ala Gln Pro Arg Leu Ser Glu
 245 250 255
 Asn His Asn Leu Thr Val Thr Pro Thr Tyr His Gln Asn Gln Gly Glu
 260 265 270
 Asn Ile Ser Ser Leu Leu Arg Glu Leu Tyr Ala Lys Pro Leu Ser Glu
 275 280 285
 Arg His Val Glu Ser Asp Gly Leu Ile Phe Asp Pro Ala Gln Ile Thr
 290 295 300
 Ser Arg Thr Ala Arg Gly Val Ala Val Pro His Gly Asn His Tyr His
 305 310 315 320
 Phe Ile Pro Tyr Glu Gln Met Ser Glu Leu Glu Lys Arg Ile Ala Arg
 325 330 335
 Ile Ile Pro Leu Arg Tyr Arg Ser Asn His Trp Val Pro Asp Ser Arg
 340 345 350
 Pro Glu Gln Pro Ser Pro Gln Ser Thr Pro Glu Pro Ser Pro Ser Pro
 355 360 365
 Gln Pro Ala Pro Asn Pro Gln Pro Ala Pro Ser Asn Pro Ile Asp Glu
 370 375 380
 Lys Leu Val Lys Glu Ala Val Arg Lys Val Gly Asp Gly Tyr Val Phe
 385 390 395 400
 Glu Glu Asn Gly Val Ser Arg Tyr Ile Pro Ala Lys Asp Leu Ser Ala
 405 410 415
 Glu Thr Ala Ala Gly Ile Asp Ser Lys Leu Ala Lys Gln Glu Ser Leu
 420 425 430

10

20

30

Ser His Lys Leu Gly Ala Lys Lys Thr Asp Leu Pro Ser Ser Asp Arg
 435 440 445
 Glu Phe Tyr Asn Lys Ala Tyr Asp Leu Leu Ala Arg Ile His Gln Asp
 450 455 460
 Leu Leu Asp Asn Lys Gly Arg Gln Val Asp Phe Glu Ala Leu Asp Asn
 465 470 475 480
 Leu Leu Glu Arg Leu Lys Asp Val Pro Ser Asp Lys Val Lys Leu Val
 485 490 495
 Asp Asp Ile Leu Ala Phe Leu Ala Pro Ile Arg His Pro Glu Arg Leu
 500 505 510
 Gly Lys Pro Asn Ala Gln Ile Thr Tyr Thr Asp Asp Glu Ile Gln Val
 515 520 525
 Ala Lys Leu Ala Gly Lys Tyr Thr Thr Glu Asp Gly Tyr Ile Phe Asp
 530 535 540
 Pro Arg Asp Ile Thr Ser Asp Glu Gly Asp Ala Tyr Val Thr Pro His
 545 550 555 560
 Met Thr His Ser His Trp Ile Lys Lys Asp Ser Leu Ser Glu Ala Glu
 565 570 575
 Arg Ala Ala Ala Gln Ala Tyr Ala Lys Glu Lys Gly Leu Thr Pro Pro
 580 585 590
 Ser Thr Asp His Gln Asp Ser Gly Asn Thr Glu Ala Lys Gly Ala Glu
 595 600 605
 Ala Ile Tyr Asn Arg Val Lys Ala Ala Lys Lys Val Pro Leu Asp Arg
 610 615 620
 Met Pro Tyr Asn Leu Gln Tyr Thr Val Glu Val Lys Asn Gly Ser Leu
 625 630 635 640
 Ile Ile Pro His Tyr Asp His Tyr His Asn Ile Lys Phe Glu Trp Phe
 645 650 655
 Asp Glu Gly Leu Tyr Glu Ala Pro Lys Gly Tyr Thr Leu Glu Asp Leu
 660 665 670
 Leu Ala Thr Val Lys Tyr Tyr Val Glu His Pro Asn Glu Arg Pro His
 675 680 685

10

20

30

Ser Asp Asn Gly Phe Gly Asn Ala Ser Asp His Val Arg Lys Asn Lys
 690 695 700

Val Asp Gln Asp Ser Lys Pro Asp Glu Asp Lys Glu His Asp Glu Val
 705 710 715 720

Ser Glu Pro Thr His Pro Glu Ser Asp Glu Lys Glu Asn His Ala Gly
 725 730 735

Leu Asn Pro Ser Ala Asp Asn Leu Tyr Lys Pro Ser Thr Asp Thr Glu
 740 745 750

Glu Thr Glu Glu Glu Ala Glu Asp Thr Thr Asp Glu Ala Glu Ile Pro
 755 760 765

Gln Val Glu Asn Ser Val Ile Asn Ala Lys Ile Ala Asp Ala Glu Ala
 770 775 780

Leu Leu Glu Lys Val Thr Asp Pro Ser Ile Arg Gln Asn Ala Met Glu
 785 790 795 800

Thr Leu Thr Gly Leu Lys Ser Ser Leu Leu Leu Gly Thr Lys Asp Asn
 805 810 815

Asn Thr Ile Ser Ala Glu Val Asp Ser Leu Leu Ala Leu Leu Lys Glu
 820 825 830

Ser Gln Pro Ala Pro Ile
 835

10

20

<210> 5
 <211> 2531
 <212> DNA
 <213> Streptococcus pneumoniae

<400> 5
 atgaaaatta ataaaaaata tctagcaggt tcagtggcag tccttgccct aagtgtttgt 60
 tcctatgaac ttggtcgtca ccaagctggg cagggttaaga aagagtctaa togagtttct 120
 tatatagatg gtgatcaggc tgggtcaaaag gcagaaaact tgacaccaga tgaagtcagt 180
 aagagggagg ggatcaacgc cgaacaaatc gtcacaaaga ttacggatca aggttatgtg 240
 acctctcatg gagaccatta tcattactat aatggcaagg tcctttatga tgccatcatc 300
 agtgaagagc tcctcatgaa agatccgaat tatcagttga aggattcaga cattgtcaat 360
 gaaatcaagg gtggttatgt tatcaaggta gatggaaaat actatgttta cottaaggat 420
 gcagctcatg cggataatat tcggacaaaa gaagagatta aacgtcagaa gcaggaacac 480
 agtcataatc acgggggtgg ttctaacgat caagcagtag ttgcagccag agcccaagga 540
 cgctatacaa cggatgatgg ttatatcttc aatgcacctg atatcattga ggacacgggt 600
 gatgcttata tcgttctctc cggcgaccat taccattaca ttctaagaa tgagttatca 660

30

gctagcgagt tagctgctgc agaagcctat tggaaatggga agcagggatc tcgtccttct 720
 tcaagtttcta gttataatgc aaatccagct caaccaagat tgtcagagaa ccacaatctg 780
 actgtcactc caacttatca tcaaaatcaa ggggaaaaca tttcaagcct tttacgtgaa 840
 ttgtatgcta aacccttatac agaacgccat gtggaatctg atggccttat tttcgaccca 900
 gcgcaaataca caagtcgaac cgccagaggt gtagctgtcc ctcatggtaa ccattaccac 960
 tttatccctt atgaacaaat gtctgaattg gaaaaacgaa ttgctcgtat tattccctt 1020
 cgttatcggt caaaccattg ggtaccagat tcaagaccag aacaaccaag tccacaatcg 1080
 actccggaac ctagtccaag tccgcaacct gcaccaaatc ctcaaccagc tccaagcaat 1140
 ccaattgatg agaaattggt caaagaagct gtccgaaaag taggcgatgg ttatgtcttt 1200
 gaggagaatg gagtttctcg ttatatccca gccaaaggatc ttccagcaga aacagcagca 1260
 ggcattgata gcaaactggc caagcaggaa agtttatctc ataagctagg agctaagaaa 1320
 actgacctcc catctagtga tgcagaatct tacaataagg cttagactt actagcaaga 1380
 attcaccaag atttacttga taataaaggt cgacaagttg attttgaggc ttgggataac 1440
 ctgttggaac gactcaagga tgtcccaagt gataaagtca agttagtggg tgatattctt 1500
 gccttcttag ctccgattcg tcatccagaa cgtttaggaa aaccaaattg gcaaattacc 1560
 tacactgatg atgagattca agtagccaag ttggcaggca agtacacaac agaagacggg 1620
 tatatctttg atcctcgtga tataaccagt gatgaggggg atgcctatgt aactccacat 1680
 atgacccata gccactggat taaaaaagat agtttgtctg aagctgagag agcggcagcc 1740
 caggcttatg ctaaagagaa aggtttgacc cctccttcga cagaccatca ggattcagga 1800
 aatactgagg caaaaggagc agaagctatc tacaaccgcg tgaaagcagc taagaagggtg 1860
 ccacttgatc gtatgcctta caatcttcaa tatactgtag aagtcaaaaa cggtagttta 1920
 atcatactc attatgacca ttaccataac atcaaatttg agtggtttga cgaaggcctt 1980
 tatgaggcac ctaaggggta tactcttgag gatcttttgg cgactgtcaa gtactatgtc 2040
 gaacatccaa acgaacgtcc gcattcagat aatggttttg gtaacgctag cgaccatgtt 2100
 cgtaaaaata aggtagacca agacagtaaa cctgatgaag ataaggaaca tgatgaagta 2160
 agtgagccaa ctcacccctga atctgatgaa aaagagaatc acgctggttt aaatccttca 2220
 gcagataatc tttataaacc aagcactgat acggaagaga cagaggaaga agctgaagat 2280
 accacagatg aggctgaaat tcctcaagta gagaattctg ttattaacgc taagatagca 2340
 gatgcggagg ccttgctaga aaaagtaaca gatcctagta ttagacaaaa tgctatggag 2400
 acattgactg gtctaaaaag tagtcttctt ctccggaacga aagataataa cactatttca 2460
 gcagaagtag atagtctctt ggctttgtta aaagaaagtc aaccggctcc tatatagtaa 2520
 aagcttaagc c 2531

<210> 6

<211> 484

<212> PRT

<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 6

Met Lys Phe Ser Lys Lys Tyr Ile Ala Ala Gly Ser Ala Val Ile Val
 1 5 10 15

Ser Leu Ser Leu Cys Ala Tyr Ala Leu Asn Gln His Arg Ser Gln Glu
 20 25 30

Asn Lys Asp Asn Asn Arg Val Ser Tyr Val Asp Gly Ser Gln Ser Ser
 35 40 45

10

20

30

Gln Lys Ser Glu Asn Leu Thr Pro Asp Gln Val Ser Gln Lys Glu Gly
 50 55 60
 Ile Gln Ala Glu Gln Ile Val Ile Lys Ile Thr Asp Gln Gly Tyr Val
 65 70 75 80
 Thr Ser His Gly Asp His Tyr His Tyr Tyr Asn Gly Lys Val Pro Tyr
 85 90 95
 Asp Ala Leu Phe Ser Glu Glu Leu Leu Met Lys Asp Pro Asn Tyr Gln
 100 105 110
 Leu Lys Asp Ala Asp Ile Val Asn Glu Val Lys Gly Gly Tyr Ile Ile
 115 120 125
 Lys Val Asp Gly Lys Tyr Tyr Val Tyr Leu Lys Asp Ala Ala His Ala
 130 135 140
 Asp Asn Val Arg Thr Lys Asp Glu Ile Asn Arg Gln Lys Gln Glu His
 145 150 155 160
 Val Lys Asp Asn Glu Lys Val Asn Ser Asn Val Ala Val Ala Arg Ser
 165 170 175
 Gln Gly Arg Tyr Thr Thr Asn Asp Gly Tyr Val Phe Asn Pro Ala Asp
 180 185 190
 Ile Ile Glu Asp Thr Gly Asn Ala Tyr Ile Val Pro His Gly Gly His
 195 200 205
 Tyr His Tyr Ile Pro Lys Ser Asp Leu Ser Ala Ser Glu Leu Ala Ala
 210 215 220
 Ala Lys Ala His Leu Ala Gly Lys Asn Met Gln Pro Ser Gln Leu Ser
 225 230 235 240
 Tyr Ser Ser Thr Ala Ser Asp Asn Asn Thr Gln Ser Val Ala Lys Gly
 245 250 255
 Ser Thr Ser Lys Pro Ala Asn Lys Ser Glu Asn Leu Gln Ser Leu Leu
 260 265 270
 Lys Glu Leu Tyr Asp Ser Pro Ser Ala Gln Arg Tyr Ser Glu Ser Asp
 275 280 285
 Gly Leu Val Phe Asp Pro Ala Lys Ile Ile Ser Arg Thr Pro Asn Gly
 290 295 300

10

20

30

Val Ala Ile Pro His Gly Asp His Tyr His Phe Ile Pro Tyr Ser Lys
 305 310 315 320
 Leu Ser Ala Leu Glu Glu Lys Ile Ala Arg Met Val Pro Ile Ser Gly
 325 330 335
 Thr Gly Ser Thr Val Ser Thr Asn Ala Lys Pro Asn Glu Val Val Ser
 340 345 350
 Ser Leu Gly Ser Leu Ser Ser Asn Pro Ser Ser Leu Thr Thr Ser Lys
 355 360 365
 Glu Leu Ser Ser Ala Ser Asp Gly Tyr Ile Phe Asn Pro Lys Asp Ile
 370 375 380
 Val Glu Glu Thr Ala Thr Ala Tyr Ile Val Arg His Gly Asp His Phe
 385 390 395 400
 His Tyr Ile Pro Lys Ser Asn Gln Ile Gly Gln Pro Thr Leu Pro Asn
 405 410 415
 Asn Ser Leu Ala Thr Pro Ser Pro Ser Leu Pro Ile Asn Pro Gly Thr
 420 425 430
 Ser His Glu Lys His Glu Glu Asp Gly Tyr Gly Phe Asp Ala Asn Arg
 435 440 445
 Ile Ile Ala Glu Asp Glu Ser Gly Phe Val Met Ser His Gly Asp His
 450 455 460
 Asn His Tyr Phe Phe Lys Lys Asp Leu Thr Glu Glu Gln Ile Lys Val
 465 470 475 480
 Arg Lys Asn Ile

10

20

<210> 7
 <211> 1455
 <212> DNA
 <213> Streptococcus pneumoniae

30

<400> 7
 atgaaattta gtaaaaaata tatagcagct ggatcagctg ttatcgtatc cttgagtcta 60
 tgtgcctatg cactaaacca gcatcggtcg caggaaaata aggacaataa tcgtgtctct 120
 tatgtggatg gcagccagtc aagtcagaaa agtgaaaact tgacaccaga ccaggtttagc 180
 cagaaagaag gaattcaggc tgagcaaatt gtaatcaaaa ttacagatca gggctatgta 240
 acgtcacacg gtgaccacta tcattactat aatgggaaag ttccttatga tgccctcttt 300

```

agtgaagaac tcttgatgaa ggatccaaac tatcaactta aagacgctga tattgtcaat 360
gaagtcaagg gtgggttatat catcaaggtc gatggaaaat attatgtcta cctgaaagat 420
gcagctcatg ctgataatgt tcgaactaaa gatgaaatca atcgtcaaaa acaagaacat 480
gtcaaaagata atgagaagggt taactctaata gttgctgtag caaggctctca gggacgatat 540
acgacaaatg atgggttatgt ctttaatacca gctgatatta tcgaagatac gggtaatgct 600
tatatcgttc tcatggaggg tcaactatcac tacattccca aaagcgattt atctgctagt 660
gaattagcag cagctaaagc acatctggct ggaaaaaata tgcaaccgag tcagttaagc 720
tattcttcaa cagctagtga caataacacg caatctgtag caaaaggatc aactagcaag 780
ccagcaataa aatctgaaaa tctccagagt cttttgaagg aactctatga ttcacctagc 840
gcccaacggt acagtgaatc agatggcctg gtctttgacc ctgctaagat tatcagtcgt 900
acaccaaatg gagttgcatg tccgcatggc gaccattacc actttattcc ttacagcaag 960
ctttctgctt tagaagaaaa gattgccaga atgggtgccta tcagtggaaac tggttctaca 1020
gtttctacaa atgcaaaacc taatgaagta gtgtctagtc taggcagtc ttcaagcaat 1080
ccttcttctt taacgacaag taaggagctc tcttcagcat ctgatgggta tatttttaat 1140
ccaaaagata tcgttgaaga aacggctaca gcttatattg taagacatgg tgatcatttc 1200
cattacattc caaaatcaaa tcaaattggg caaccgactc ttccaaacaa tagtctagca 1260
acaccttctc catctcttcc aatcaatcca ggaacttcac atgagaaaca tgaagaagat 1320
ggatacggat ttgatgctaa tcgtattatc gctgaagatg aatcagggtt tgtcatgagt 1380
cacggagacc acaatcatta tttcttcaag aaggacttga cagaagagca aattaagggt 1440
cgcaaaaaca tttag
1455

```

<210> 8

<211> 819

<212> PRT

<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 8

```

Met Lys Ile Asn Lys Lys Tyr Leu Val Gly Ser Ala Ala Ala Leu Ile
  1             5             10            15

Leu Ser Val Cys Ser Tyr Glu Leu Gly Leu Tyr Gln Ala Arg Thr Val
      20             25            30

Lys Glu Asn Asn Arg Val Ser Tyr Ile Asp Gly Lys Gln Ala Thr Gln
      35             40            45

Lys Thr Glu Asn Leu Thr Pro Asp Glu Val Ser Lys Arg Glu Gly Ile
      50             55            60

Asn Ala Glu Gln Ile Val Ile Lys Ile Thr Asp Gln Gly Tyr Val Thr
      65             70            75            80

Ser His Gly Asp His Tyr His Tyr Tyr Asn Gly Lys Val Pro Tyr Asp
      85             90            95

Ala Ile Ile Ser Glu Glu Leu Leu Met Lys Asp Pro Asn Tyr Lys Leu
      100            105            110

```

10

20

30

Lys Asp Glu Asp Ile Val Asn Glu Val Lys Gly Gly Tyr Val Ile Lys
 115 120 125
 Val Asp Gly Lys Tyr Tyr Val Tyr Leu Lys Asp Ala Ala His Ala Asp
 130 135 140
 Asn Val Arg Thr Lys Glu Glu Ile Asn Arg Gln Lys Gln Glu His Ser
 145 150 155 160
 Gln His Arg Glu Gly Gly Thr Pro Arg Asn Asp Gly Ala Val Ala Leu
 165 170 175
 Ala Arg Ser Gln Gly Arg Tyr Thr Thr Asp Asp Gly Tyr Ile Phe Asn
 180 185 190
 Ala Ser Asp Ile Ile Glu Asp Thr Gly Asp Ala Tyr Ile Val Pro His
 195 200 205
 Gly Asp His Tyr His Tyr Ile Pro Lys Asn Glu Leu Ser Ala Ser Glu
 210 215 220
 Leu Ala Ala Ala Glu Ala Phe Leu Ser Gly Arg Gly Asn Leu Ser Asn
 225 230 235 240
 Ser Arg Thr Tyr Arg Arg Gln Asn Ser Asp Asn Thr Ser Arg Thr Asn
 245 250 255
 Trp Val Pro Ser Val Ser Asn Pro Gly Thr Thr Asn Thr Asn Thr Ser
 260 265 270
 Asn Asn Ser Asn Thr Asn Ser Gln Ala Ser Gln Ser Asn Asp Ile Asp
 275 280 285
 Ser Leu Leu Lys Gln Leu Tyr Lys Leu Pro Leu Ser Gln Arg His Val
 290 295 300
 Glu Ser Asp Gly Leu Val Phe Asp Pro Ala Gln Ile Thr Ser Arg Thr
 305 310 315 320
 Ala Arg Gly Val Ala Val Pro His Gly Asp His Tyr His Phe Ile Pro
 325 330 335
 Tyr Ser Gln Met Ser Glu Leu Glu Glu Arg Ile Ala Arg Ile Ile Pro
 340 345 350
 Leu Arg Tyr Arg Ser Asn His Trp Val Pro Asp Ser Arg Pro Glu Gln
 355 360 365

10

20

30

Pro Ser Pro Gln Pro Thr Pro Glu Pro Ser Pro Gly Pro Gln Pro Ala
 370 375 380
 Pro Asn Leu Lys Ile Asp Ser Asn Ser Ser Leu Val Ser Gln Leu Val
 385 390 395 400
 Arg Lys Val Gly Glu Gly Tyr Val Phe Glu Glu Lys Gly Ile Ser Arg
 405 410 415
 Tyr Val Phe Ala Lys Asp Leu Pro Ser Glu Thr Val Lys Asn Leu Glu
 420 425 430
 Ser Lys Leu Ser Lys Gln Glu Ser Val Ser His Thr Leu Thr Ala Lys
 435 440 445
 Lys Glu Asn Val Ala Pro Arg Asp Gln Glu Phe Tyr Asp Lys Ala Tyr
 450 455 460
 Asn Leu Leu Thr Glu Ala His Lys Ala Leu Phe Glu Asn Lys Gly Arg
 465 470 475 480
 Asn Ser Asp Phe Gln Ala Leu Asp Lys Leu Leu Glu Arg Leu Asn Asp
 485 490 495
 Glu Ser Thr Asn Lys Glu Lys Leu Val Asp Asp Leu Leu Ala Phe Leu
 500 505 510
 Ala Pro Ile Thr His Pro Glu Arg Leu Gly Lys Pro Asn Ser Gln Ile
 515 520 525
 Glu Tyr Thr Glu Asp Glu Val Arg Ile Ala Gln Leu Ala Asp Lys Tyr
 530 535 540
 Thr Thr Ser Asp Gly Tyr Ile Phe Asp Glu His Asp Ile Ile Ser Asp
 545 550 555 560
 Glu Gly Asp Ala Tyr Val Thr Pro His Met Gly His Ser His Trp Ile
 565 570 575
 Gly Lys Asp Ser Leu Ser Asp Lys Glu Lys Val Ala Ala Gln Ala Tyr
 580 585 590
 Thr Lys Glu Lys Gly Ile Leu Pro Pro Ser Pro Asp Ala Asp Val Lys
 595 600 605
 Ala Asn Pro Thr Gly Asp Ser Ala Ala Ala Ile Tyr Asn Arg Val Lys
 610 615 620

10

20

30

Gly Glu Lys Arg Ile Pro Leu Val Arg Leu Pro Tyr Met Val Glu His
 625 630 635 640
 Thr Val Glu Val Lys Asn Gly Asn Leu Ile Ile Pro His Lys Asp His
 645 650 655
 Tyr His Asn Ile Lys Phe Ala Trp Phe Asp Asp His Thr Tyr Lys Ala
 660 665 670
 Pro Asn Gly Tyr Thr Leu Glu Asp Leu Phe Ala Thr Ile Lys Tyr Tyr
 675 680 685
 Val Glu His Pro Asp Glu Arg Pro His Ser Asn Asp Gly Trp Gly Asn
 690 695 700
 Ala Ser Glu His Val Leu Gly Lys Lys Asp His Ser Glu Asp Pro Asn
 705 710 715 720
 Lys Asn Phe Lys Ala Asp Glu Glu Pro Val Glu Glu Thr Pro Ala Glu
 725 730 735
 Pro Glu Val Pro Gln Val Glu Thr Glu Lys Val Glu Ala Gln Leu Lys
 740 745 750
 Glu Ala Glu Val Leu Leu Ala Lys Val Thr Asp Ser Ser Leu Lys Ala
 755 760 765
 Asn Ala Thr Glu Thr Leu Ala Gly Leu Arg Asn Asn Leu Thr Leu Gln
 770 775 780
 Ile Met Asp Asn Asn Ser Ile Met Ala Glu Ala Glu Lys Leu Leu Ala
 785 790 795 800
 Leu Leu Lys Gly Ser Asn Pro Ser Ser Val Ser Lys Glu Lys Ile Asn
 805 810 815
 Lys Leu Asn

10

20

30

<210> 9

<211> 2451

<212> DNA

<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 9

atgaaaatta ataagaaata ccttggtggt tctgcggcag ctttgatttt aagtgtttgt 60
 tcttacgagt tgggactgta tcaagctaga acggtaaggg aaaataatcg tgtttcctat 120

```

atagatggaa aacaagcgac gcaaaaaacg gagaatttga ctctgatga ggtagcaag 180
cgtgaaggaa tcaatgctga gcaaatcgtc atcaagataa cagaccaagg ctatgtcact 240
tcacatggcg accactatca ttattacaat ggtaagggtc cttatgacgc tatcatcagt 300
gaagaattac tcatgaaaga tccaaactat aagctaaaag atgaggatat tgttaatgag 360
gtcaagggtg gatatgttat caaggtagat ggaaaatact atgtttacct taaggatgct 420
gcccacgagg ataacgtccg tacaaaagag gaaatcaatc gacaaaaaca agagcatagt 480
caacatcggtg aagggtggaac tccaagaaac gatgggtgctg ttgccttggc acgttcgcaa 540
ggacgctata ctacagatga tggttatata tttaatgctt ctgatatcat agaggatact 600
ggtgatgctt atatcggttc tcatggagat cattaccatt acattcctaa gaatgagtta 660
tcagctagcg agttggctgc tgcagaagcc ttcctatctg gtcgaggaaa tctgtcaaat 720
tcaagaacct atcgccgaca aaatagcgat aacacttcaa gaacaaactg ggtaccttct 780
gtaagcaatc caggaaactac aaataactaac acaagcaaca acagcaacac taacagtcaa 840
gcaagtcaaa gtaatgacat tgatagtctc ttgaaacagc tctacaaact gcctttgagt 900
caacgacatg tagaatctga tggccttgct tttgatccag cacaaatcac aagtccaaca 960
gctagagggtg ttgcagtgc acacggagat cattaccact tcatccctta ctctcaaatg 1020
tctgaattgg aagaacgaat cgctcgtatt attccccctt gttatcgctt aaaccattgg 1080
gtaccagatt caaggccaga acaaccaagt ccacaaccga ctccggaacc tagtccaggc 1140
ccgcaacctg caccaaatct taaaatagac tcaaattctt ctttgggttag tcagctggta 1200
cgaaaagttg gggaaggata tgtattcgaa gaaaagggca tctctcgta tgtctttgag 1260
aaagatttac catctgaac tgttaaaaat cttgaaagca agttatcaaa acaagagagt 1320
gtttcacaca ctttaactgc taaaaaagaa aatgttgctc ctctgaccca agaattttat 1380
gataaagcat ataatctgtt aactgaggct cataaagcct tgtttgnaaa taagggtcgt 1440
aattctgatt tccaagcctt agacaaatta ttagaacgct tgaatgatga atcgactaat 1500
aaagaaaaat tggtagatga tttattggca ttcctagcac caattacca tccagagcga 1560
cttggcaaac caaattctca aattgagtat actgaagacg aagttcgtat tgcacaatta 1620
gctgataagt atacaacgct agatggttac atttttgatg aacatgatat aatcagtgat 1680
gaaggagatg catatgtaac gcctcatatg ggccatagtc actggattgg aaaagatagc 1740
ctttctgata aggaaaaaagt tgcagctcaa gccatacta aagaaaaagg taccctacct 1800
ccatctccag acgcagatgt taaagcaaact ccaactggag atagtgcagc agctatttac 1860
aatcgtgtga aaggggaaaa acgaattcca ctcttcgac ttccatataat ggttgagcat 1920
acagttgagg ttaaaaacgg taatttgatt attctccta aggatcatta ccataatatt 1980
aaatttgctt ggtttgatga tcacacatac aaagctccaa atggctatac cttggaagat 2040
ttgtttgcga cgattaagta ctacgtagaa caccctgacg aacgtccaca ttctaataat 2100
ggatggggca atgccagtg gcatgtgtta ggcaagaaag accacagtga agatccaaat 2160
aagaacttca aagcggatga agagccagta gaggaacac ctgctgagcc agaagtcct 2220
caagtagaga ctgaaaaagt agaagcccaa ctcaaagaag cagaagtttt gcttgcgaaa 2280
gtaacggatt ctagtctgaa agccaatgca acagaaactc tagctggttt acgaaataat 2340
ttgactcttc aaattatgga taacaatagt atcatggcag aagcagaaaa attacttgcg 2400
ttgttaaaag gaagtaatcc ttcactctga agtaaggaaa aaataaacta a 2451

```

10

20

30

<210> 10

<211> 819

<212> PRT

<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 10

Met Lys Ile Asn Lys Lys Tyr Leu Ala Gly Ser Val Ala Val Leu Ala

1

5

10

15

Leu Ser Val Cys Ser Tyr Glu Leu Gly Arg Tyr Gln Ala Gly Gln Asp
 20 25 30
 Lys Lys Glu Ser Asn Arg Val Ala Tyr Ile Asp Gly Asp Gln Ala Gly
 35 40 45
 Gln Lys Ala Glu Asn Leu Thr Pro Asp Glu Val Ser Lys Arg Glu Gly
 50 55 60
 Ile Asn Ala Glu Gln Ile Val Ile Lys Ile Thr Asp Gln Gly Tyr Val
 65 70 75 80
 Thr Ser His Gly Asp His Tyr His Tyr Tyr Asn Gly Lys Val Pro Tyr
 85 90 95
 Asp Ala Ile Ile Ser Glu Glu Leu Leu Met Lys Asp Pro Asn Tyr Gln
 100 105 110
 Leu Lys Asp Ser Asp Ile Val Asn Glu Ile Lys Gly Gly Tyr Val Ile
 115 120 125
 Lys Val Asn Gly Lys Tyr Tyr Val Tyr Leu Lys Asp Ala Ala His Ala
 130 135 140
 Asp Asn Ile Arg Thr Lys Glu Glu Ile Lys Arg Gln Lys Gln Glu Arg
 145 150 155 160
 Ser His Asn His Asn Ser Arg Ala Asp Asn Ala Val Ala Ala Ala Arg
 165 170 175
 Ala Gln Gly Arg Tyr Thr Thr Asp Asp Gly Tyr Ile Phe Asn Ala Ser
 180 185 190
 Asp Ile Ile Glu Asp Thr Gly Asp Ala Tyr Ile Val Pro His Gly Asp
 195 200 205
 His Tyr His Tyr Ile Pro Lys Asn Glu Leu Ser Ala Ser Glu Leu Ala
 210 215 220
 Ala Ala Glu Ala Tyr Trp Asn Gly Lys Gln Gly Ser Arg Pro Ser Ser
 225 230 235 240
 Ser Ser Ser Tyr Asn Ala Asn Pro Ala Gln Pro Arg Leu Ser Glu Asn
 245 250 255
 His Asn Leu Thr Val Thr Pro Thr Tyr His Gln Asn Gln Gly Glu Asn
 260 265 270

10

20

30

Ile Ser Ser Leu Leu Arg Glu Leu Tyr Ala Lys Pro Leu Ser Glu Arg
 275 280 285
 His Val Glu Ser Asp Gly Leu Ile Phe Asp Pro Ala Gln Ile Thr Ser
 290 295 300
 Arg Thr Ala Arg Gly Val Ala Val Pro His Gly Asn His Tyr His Phe
 305 310 315 320
 Ile Pro Tyr Glu Gln Met Ser Glu Leu Glu Lys Arg Ile Ala Arg Ile
 325 330 335
 Ile Pro Leu Arg Tyr Arg Ser Asn His Trp Val Pro Asp Ser Arg Pro
 340 345 350
 Glu Glu Pro Ser Pro Gln Pro Thr Pro Glu Pro Ser Pro Ser Pro Gln
 355 360 365
 Pro Ala Pro Ser Asn Pro Ile Asp Gly Lys Leu Val Lys Glu Ala Val
 370 375 380
 Arg Lys Val Gly Asp Gly Tyr Val Phe Glu Glu Asn Gly Val Ser Arg
 385 390 395 400
 Tyr Ile Pro Ala Lys Asp Leu Ser Ala Glu Thr Ala Ala Gly Ile Asp
 405 410 415
 Ser Lys Leu Ala Lys Gln Glu Ser Leu Ser His Lys Leu Gly Thr Lys
 420 425 430
 Lys Thr Asp Leu Pro Ser Ser Asp Arg Glu Phe Tyr Asn Lys Ala Tyr
 435 440 445
 Asp Leu Leu Ala Arg Ile His Gln Asp Leu Leu Asp Asn Lys Gly Arg
 450 455 460
 Gln Val Asp Phe Glu Ala Leu Asp Asn Leu Leu Glu Arg Leu Lys Asp
 465 470 475 480
 Val Ser Ser Asp Lys Val Lys Leu Val Glu Asp Ile Leu Ala Phe Leu
 485 490 495
 Ala Pro Ile Arg His Pro Glu Arg Leu Gly Lys Pro Asn Ala Gln Ile
 500 505 510
 Thr Tyr Thr Asp Asp Glu Ile Gln Val Ala Lys Leu Ala Gly Lys Tyr
 515 520 525

10

20

30

Thr Ala Glu Asp Gly Tyr Ile Phe Asp Pro Arg Asp Ile Thr Ser Asp
 530 535 540
 Glu Gly Asp Ala Tyr Val Thr Pro His Met Thr His Ser His Trp Ile
 545 550 555 560
 Lys Lys Asp Ser Leu Ser Glu Ala Glu Arg Ala Ala Ala Gln Ala Tyr
 565 570 575
 Ala Glu Glu Lys Gly Leu Thr Pro Pro Ser Thr Asp His Gln Asp Ser
 580 585 590
 Gly Asn Thr Glu Ala Lys Gly Ala Glu Ala Ile Tyr Asn Arg Val Lys
 595 600 605
 Ala Ala Lys Lys Val Pro Leu Asp Arg Met Pro Tyr Asn Leu Gln Tyr
 610 615 620
 Thr Val Glu Val Lys Asn Gly Ser Leu Ile Ile Pro His Tyr Asp His
 625 630 635 640
 Tyr His Asn Ile Lys Phe Glu Trp Phe Asp Glu Gly Leu Tyr Glu Ala
 645 650 655
 Pro Lys Gly Tyr Thr Leu Glu Asp Leu Leu Ala Thr Val Lys Tyr Tyr
 660 665 670
 Val Glu His Pro Asn Glu Arg Pro His Ser Asp Asn Gly Phe Gly Asn
 675 680 685
 Ala Ser Asp His Val Gln Arg Asn Lys Asn Gly Gln Ala Asp Thr Asn
 690 695 700
 Gln Thr Glu Lys Pro Ser Glu Glu Lys Pro Gln Thr Glu Lys Pro Glu
 705 710 715 720
 Glu Glu Thr Pro Arg Glu Glu Lys Pro Gln Ser Glu Lys Pro Glu Ser
 725 730 735
 Pro Lys Pro Thr Glu Glu Pro Glu Glu Ser Pro Glu Glu Ser Glu Glu
 740 745 750
 Pro Gln Val Glu Thr Glu Lys Val Glu Glu Lys Leu Arg Glu Ala Glu
 755 760 765
 Asp Leu Leu Gly Lys Ile Gln Asp Pro Ile Ile Lys Ser Asn Ala Lys
 770 775 780

10

20

30

Glu Thr Leu Thr Gly Leu Lys Asn Asn Leu Leu Phe Gly Thr Gln Asp
785 790 795 800

Asn Asn Thr Ile Met Ala Glu Ala Glu Lys Leu Leu Ala Leu Leu Lys
805 810 815

Glu Ser Lys

<210> 11
<211> 2531
<212> DNA
<213> Streptococcus pneumoniae

10

<400> 11
atgaaaatta ataaaaaata tctagcaggt tcagtggcag tccttgccct aagtgtttgt 60
tcctatgagc ttggacgtta ccaagctggt caggataaga aagagtctaa tcgagttgct 120
tatatagatg gtgatcaggc tggtaaaaag gcagaaaact tgacaccaga tgaagtcagt 180
aagagggagg ggatcaacgc cgaacaaatt gttatcaaga ttacggatca aggttatgtg 240
acctctcatg gagaccatta tcattactat aatggcaagg ttctttatga tgccatcatc 300
agtgaagagc tcctcatgaa agatccgaat tatcagttga aggattcaga cattgtcaat 360
gaaatcaagg gtggttatgt cattaaggta aacggtaaat actatgttta ccttaaggat 420
gcrctcatg cggataatat tcggacaaaa gaagagatta aacgtcagaa gcaggaaacgc 480
agtcataatc ataactcaag agcagataat gctgttgctg cagccagagc ccaaggacgt 540
tatacaacgg atgatgggta tatcttcaat gcactctgata tcattgagga cacgggtgat 600
gcttatatcg ttctctcagg cgaccattac cattacattc ctaagaatga gttatcagct 660
agcgagttag ctgctgcaga agcctattgg aatgggaagc agggatctcg tccttcttca 720
agttctagtt ataatgcaaa tcagctcaa ccaagattgt cagagaacca caatctgact 780
gtcactccaa cttatcatca aaatcaaggg gaaaacattt caagcctttt acgtgaattg 840
tatgctaacc ccttatcaga acgcatgtg gaactctgat gccttatttt cgaccacgcy 900
caaatcacia gtccaacgc cagaggtgta gotgtocctc atggtaacca ttaccacttt 960
atcccttatg acaaatgtc tgaattggaa aaacgaattg ctctgattat tcccttctgt 1020
tatcgttcaa accattgggt accagattca agaccagaag aaccaagtcc acaaccgact 1080
ccagaacctc gtccaagtcc gcaaccagct ccaagcaatc caattgatgg gaaattgggtc 1140
aaagaagctg ttcgaaaagt aggcgatggt tatgtctttg aggagaatgg agtttctcgt 1200
tatatccag ccaaggatct ttcagcagaa acagcagcag gcattgatag caaactggcc 1260
aagcaggaaa gtttatctca taagctagga actaagaaaa ctgacctccc atctagtgat 1320
cgagaatttt acaataaggc ttatgactta ctagcaagaa ttcaccaaga ttactttgat 1380
aataaagggtc gacaagttga ttttgaggct ttggataacc tggttggaacg actcaaggat 1440
gtctcaagtg ataaagtcaa gttagtggaa gatattcttg ccttcttagc tccgattcgt 1500
catccagaac gtttaggaaa accaaatgcg caaattacct acactgatga tgagattcaa 1560
gtagccaagt tggcaggcaa gtacacagca gaagacggtt atatctttga tcctcgtgat 1620
ataaccagtg atgaggggga tgcctatgta actccacata tgacctatag ccactggatt 1680
aaaaaagata gtttgtctga agctgagaga gcggcagccc aggtctatgc traagagaaa 1740
ggtttgacct ctctctcgac agaccatcag gattcaggaa atactgaggc aaaaggagca 1800
gaagctatct acaaccgmgt gaaagcagct aagaagggtgc cacttgatcg tatgccttac 1860

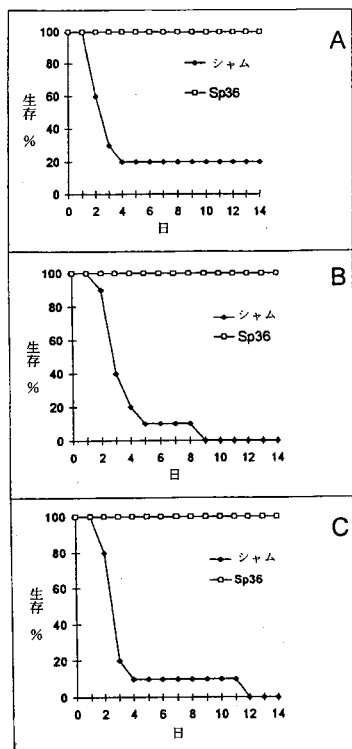
aatcttcaat atactgtaga agtcaaaaac ggtagttaa tcataacctca ttatgacctat 1920
taccataaca tcaaatgtga gtggtttgac gaaggccttt atgaggcacc taaggggtat 1980
actcttgagg atcttttggc gactgtcaag tactatgtcg aacatccaaa cgaacgtccg 2040
cattcagata atggttttgg taacgctagc gacctgttc aaagaaacaa aaatgggtcaa 2100
gctgatacca atcaaacgga aaaaccaagc gaggagaaac ctccagacaga aaaacctgag 2160
gaagaaaccc ctcgagaaga gaaaccgcaa agcgagaaac cagagtctcc aaaaccaaca 2220
gaggaaaccag aagaatcacc agaggaatca gaagaacctc aggtcgagac tgaaaagggtt 2280
gaagaaaaaac tgagagaggc tgaagattta ctggaaaaa tccaggatcc aattatcaag 2340
tccaatgcc aagagactct cacaggatta aaaaataatt tactatttgg caccaggac 2400
aacaatacta ttatggcaga agctgaaaaa ctattggctt tattaaagga gactaagtaa 2460
aggtagaagc ttaagggcga atttggcacc caggacaaca atactattat ggcagaagct 2520
gaaaaactat t 2531

20

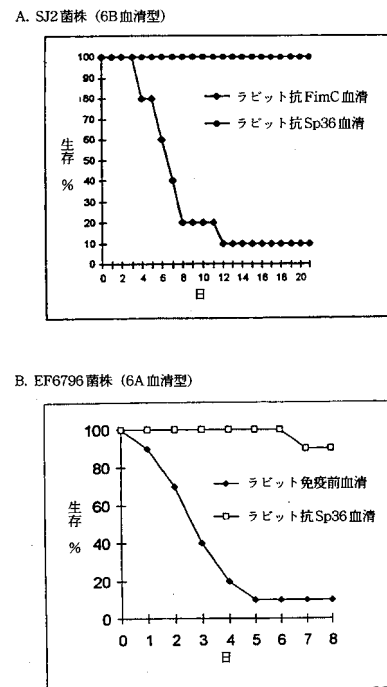
30

40

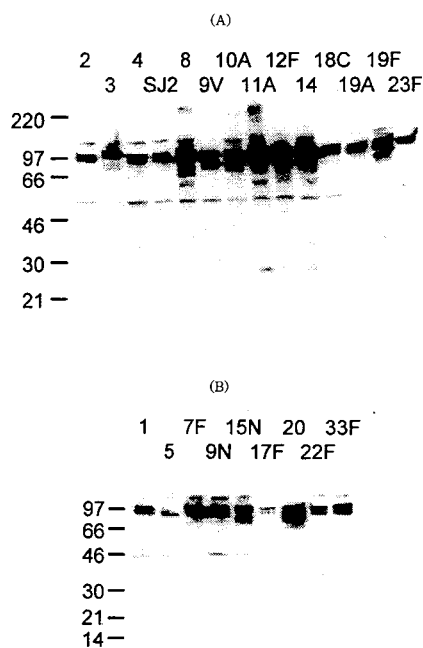
【図 1】



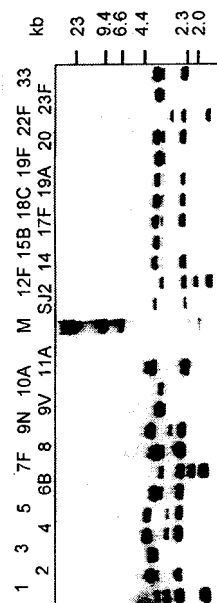
【図 2】



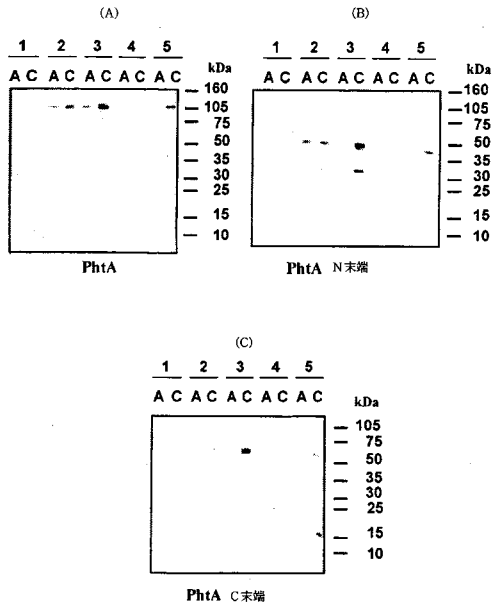
【図 3】



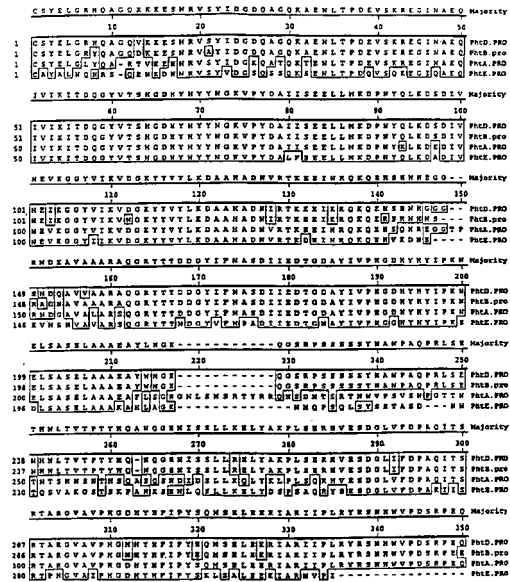
【図 4】



【図 5】



【図 6 a】



【図 7 b】

[illegible]

【图 7 d】

[illegible]

【図 7 f】

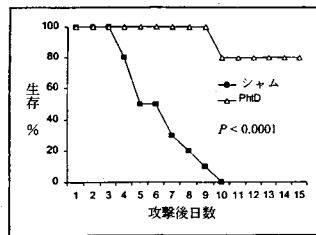
	1760	1780	1790	1800	
1176	TACCTTCATCTTCCAGAC	CATGACGATTTGCGGAAATCTGAGCGAAAGAAGCA			Majority
1198	TACCTTCATCTTCCAGAC	CGCGAGATCTTTAAAGCAAAATCCCACTGGCAGATCTT			phnx.1820
1336	CGACGATCTTCCAGACACCAT	CAGGATTCAGGAAATCTTACGCGCAAAAGCA			phnx.1846
1758	CGACGATCTTCCAGAC	CGATCTTGAAGATCTGACAAATCTGACGAAATCTG			phnx.1872
1167	CGACGATCTTCCAGAC	CGATCTTGAAGATCTGACAAATCTGACGAAATCTG			phnx.1882
	1810	1820	1830	1840	1850
1868	CGACGATCTTCTTACCAAT	CGCTTTGAAAGGCGAAAAAGCAATCTCCACTCT			phnx.1872
1738	CGGAAAGCTATCTTCAAC	CGCGTTGAAAGCAGCTTAAGAGAGTGTCCACTCTG			phnx.1846
1567	CGGAAAGCTATCTTCAAC	CGCGTTGAAAGCAGCTTAAGAGAGTGTCCACTCTG			phnx.1846
1267	CGGAAAGCTATCTTCAAC	CGCGTTGAAAGCAGCTTAAGAGAGTGTCCACTCTG			phnx.1846
	1860	1870	1880	1890	1900
1878	TCCATCTCCCTTCAATCTT	CAATATCTTGAGATCTGAGAACTCAAAACGCTACTT			Majority
	1910	1920	1930	1940	1950
1898	TCCACTTCCATATATGGT	TGAGATACAGTCTTAGGTTTCAAAACCGTAACT			phnx.1872
1798	TGCTATCTCTTCAACTAT	TGAGATACAGTCTTAGGATCTCAAAACCGTAACT			phnx.1846
1098	TGCTATCTCTTCAACTAT	TGAGATACAGTCTTAGGATCTCAAAACCGTAACT			phnx.1846
1279	TGCTATCTCTTCAACTAT	TGAGATACAGTCTTAGGATCTCAAAACCGTAACT			phnx.1846
	1960	1970	1980	1990	2000
1948	TATATCTCTCTCTATGAT	ATCTTCAATCAAGCATTAATCTGAGATGGTCT			Majority
	2010	2020	2030	2040	2050
1948	TATATCTCTCTCTATGAT	ATCTTCAATCAAGCATTAATCTGAGATGGTCT			Majority
1828	TATATCTCTCTCTATGAT	ATCTTCAATCAAGCATTAATCTGAGATGGTCT			phnx.1846
1558	TATATCTCTCTCTATGAT	ATCTTCAATCAAGCATTAATCTGAGATGGTCT			phnx.1872
1186	TATATCTCTCTCTATGAT	ATCTTCAATCAAGCATTAATCTGAGATGGTCT			phnx.1872
	2060	2070	2080	2090	2100
1998	TATATCTCTCTCTATGAT	ATCTTCAATCAAGCATTAATCTGAGATGGTCT			Majority
1998	TATATCTCTCTCTATGAT	ATCTTCAATCAAGCATTAATCTGAGATGGTCT			phnx.1846
1998	TATATCTCTCTCTATGAT	ATCTTCAATCAAGCATTAATCTGAGATGGTCT			phnx.1846
1210	TATATCTCTCTCTATGAT	ATCTTCAATCAAGCATTAATCTGAGATGGTCT			phnx.1846
	2110	2120	2130	2140	2150
2048	TATATCTCTCTCTATGAT	ATCTTCAATCAAGCATTAATCTGAGATGGTCT			Majority
2048	TATATCTCTCTCTATGAT	ATCTTCAATCAAGCATTAATCTGAGATGGTCT			phnx.1846
2048	TATATCTCTCTCTATGAT	ATCTTCAATCAAGCATTAATCTGAGATGGTCT			phnx.1846
1215	TATATCTCTCTCTATGAT	ATCTTCAATCAAGCATTAATCTGAGATGGTCT			phnx.1846
	2160	2170	2180	2190	2200
2098	TATATCTCTCTCTATGAT	ATCTTCAATCAAGCATTAATCTGAGATGGTCT			Majority
2098	TATATCTCTCTCTATGAT	ATCTTCAATCAAGCATTAATCTGAGATGGTCT			phnx.1846
2098	TATATCTCTCTCTATGAT	ATCTTCAATCAAGCATTAATCTGAGATGGTCT			phnx.1846
1287	TATATCTCTCTCTATGAT	ATCTTCAATCAAGCATTAATCTGAGATGGTCT			phnx.1846

【図 7 h】

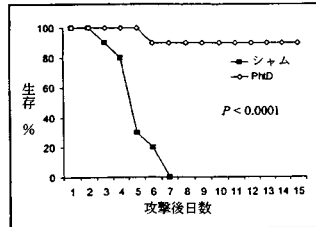
[illegible]

【図 8】

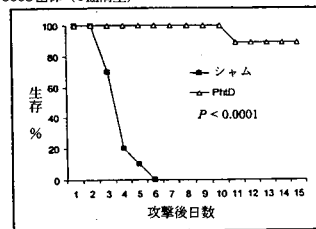
A. SJ2 菌株 (6B 血清型)



B. EF6796 菌株 (6A 血清型)



C. EF5668 菌株 (4 血清型)



フロントページの続き

(72)発明者 アダマウ, ジョン, イー.

アメリカ合衆国, 20874 メリーランド, ジャーマンタウン, シャムロック グレン サークル 20822

審査官 安藤 公祐

(56)参考文献 国際公開第98/018930 (WO, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K 38/00

A61K 39/09

A61P 31/10

CA/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

SwissProt/PIR/GeneSeq

PubMed

Science Direct

Wiley InterScience