

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A) (11)特許出願公表番号

特表2003 - 533990

(P2003 - 533990A)

(43)公表日 平成15年11月18日(2003.11.18)

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マコード* (参考)
C 1 2 N 15/09	ZNA	A 6 1 K 39/395	R 4 B 0 2 4
A 6 1 K 39/395		A 6 1 P 31/04	4 B 0 2 9
A 6 1 P 31/04		C 0 7 K 14/235	4 B 0 6 3
C 0 7 K 14/235		16/12	4 B 0 6 4
		19/00	4 C 0 8 5

審査請求 未請求 予備審査請求 (全 66数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 586330(P2001 - 586330)

(86)(22)出願日 平成13年5月23日(2001.5.23)

(85)翻訳文提出日 平成14年11月25日(2002.11.25)

(86)国際出願番号 PCT/EP01/06457

(87)国際公開番号 W001/090143

(87)国際公開日 平成13年11月29日(2001.11.29)

(31)優先権主張番号 60/206,969

(32)優先日 平成12年5月25日(2000.5.25)

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 インスティチュート・パスツール
I N S T I T U T P A S T E U R
フランス国、75724 パリ・セデュ・15、リ
ュー・デュ・ドクトール・ルー、25 - 28

(72)発明者 ギソマクルーフ、ニコル
フランス国、エフ - 75008 パリ、リュ・ク
リストフ・コローブ 4

(72)発明者 ブーソー - ユード、カロリン
フランス国、エフ - 92160 アントニー、リ
ュ・デュ・コロネル・ファビアン 9

(74)代理人 弁理士 津国 肇 (外1名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 百日咳菌、パラ百日咳菌および気管支敗血症菌のペルタクチンの繰返し領域の多型性を有するポリペプチド、ならびに診断および免疫原性組成物におけるその使用

(57)【要約】

本発明は、百日咳菌、パラ百日咳菌および気管支敗血症菌により発現されるペルタクチン (P R N) と呼ばれる外膜タンパク質に関する。該タンパク質は、ボルデテラ属の感染に対する防御免疫を誘導する。ペルタクチンの免疫優性および防御的免疫エピトープは、二つの反復領域、第1領域と第2領域を含む。これら2つの反復領域の比較から、パラ百日咳菌のペルタクチンは変異型でないことが示された。一方、百日咳のペルタクチンは、第1領域において最も変異し、気管支敗血症菌のペルタクチンは、反復する第1領域と第2領域の両方で変異していた。これら領域の変異配列を有するペルタクチンおよびペルタクチンフラグメントを含有する組成物は、免疫原性組成物として有用である。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ボルデテラ (Bordetella) 属のペルタクチンの混合物を含む免疫原性組成物であって、

該免疫原性組成物を投与された動物に、パラ百日咳菌 (Bordetella parapertussis) および気管支敗血症菌 (Bordetella bronchiseptica) に対する体液性または細胞性免疫応答を誘導するのに十分な量の

(a) パラ百日咳菌のペルタクチンと、

(b) 気管支敗血症菌のペルタクチンと

を含む免疫原性組成物。

【請求項2】 免疫原性組成物を投与された動物に、百日咳菌 (Bordetella pertussis) に対する体液性または細胞性免疫応答を誘導するのに十分な量の百日咳菌のペルタクチンも含む、請求項1記載の免疫原性組成物。

【請求項3】 ボルデテラ属のペルタクチンまたはそのフラグメントの混合物を含む免疫原性組成物であって、該ペルタクチンまたはそのフラグメントが、気管支敗血症菌ペルタクチンの少なくとも2種類の変異型を含み、該ボルデテラ属のペルタクチンまたはそのフラグメントが、該組成物を投与された動物に気管支敗血症菌に対する体液性または細胞性免疫応答を誘導するのに十分な量で存在する免疫原性組成物。

【請求項4】 ボルデテラ属のペルタクチンまたはそのフラグメントの混合物を含み、該ペルタクチンまたはそのフラグメントが、気管支敗血症菌ペルタクチンの少なくとも2種類の変異型を含み、気管支敗血症菌ペルタクチンの該少なくとも2種類の変異型が、少なくともその第2領域において互いに異なる、請求項3記載の免疫原性組成物。

【請求項5】 ボルデテラ属のペルタクチンまたはそのフラグメントの混合物を含む免疫原性組成物であって、該ペルタクチンまたはそのフラグメントが、気管支敗血症菌ペルタクチンの変異型の混合物を含み、気管支敗血症菌ペルタクチンの変異型が、それぞれ、その第2領域に6、7、8または9回反復するPQPアミノ酸配列を含み、該気管支敗血症菌ペルタクチンの変異型が、該免疫原性組成物を投与された動物に、気管支敗血症菌に対する体液性または細胞性免疫応

答を誘導するのに十分な量で存在する免疫原性組成物。

【請求項6】 気管支敗血症菌ペルタクチンの少なくとも2種類の変異型が、少なくともその第2領域中の反復するPQPアミノ酸配列の数において互いに異なる、請求項5記載の免疫原性組成物。

【請求項7】 免疫原性組成物を投与された動物に、パラ百日咳菌または百日咳菌に対する体液性または細胞性免疫応答を誘導するのに十分な量の、パラ百日咳菌のペルタクチンもしくはそのフラグメント、百日咳菌のペルタクチンもしくはそのフラグメント、またはそれらの混合物も含む、請求項5または6に記載の免疫原性組成物。

【請求項8】 ボルデテラ属のペルタクチンまたはそのフラグメントの混合物を含み、該ペルタクチンまたはその変異型が、気管支敗血症菌ペルタクチンの少なくとも2種類の変異型を含み、気管支敗血症菌ペルタクチンの該少なくとも2種類の変異型が、少なくともその第1領域において互いに異なる、請求項3記載の免疫原性組成物。

【請求項9】 ボルデテラ属のペルタクチンまたはそのフラグメントの混合物を含む免疫原性組成物であって、該ペルタクチンまたはそのフラグメントが、気管支敗血症菌ペルタクチンの変異型の混合物を含み、気管支敗血症菌ペルタクチンの変異型が、それぞれ、その第1領域に1、2または3回反復するGGXXPアミノ酸配列を含み、該気管支敗血症菌ペルタクチンの変異型が、それぞれ、該免疫原性組成物を投与された動物に、気管支敗血症菌に対する体液性または細胞性免疫応答を誘導するのに十分な量で存在する免疫原性組成物。

【請求項10】 気管支敗血症菌ペルタクチンの少なくとも2種類の変異型が、少なくともその第1領域中の反復するGGXXPアミノ酸配列の数において異なる免疫原性組成物。

【請求項11】 免疫原性組成物を投与された動物に、パラ百日咳菌または百日咳菌に対する体液性または細胞性免疫応答を誘導するのに十分な量の、パラ百日咳菌のペルタクチンもしくはそのフラグメント、百日咳菌のペルタクチンもしくはそのフラグメント、またはそれらの混合物も含む、請求項9項記載の免疫原性組成物。

【請求項12】 気管支敗血症菌の種のペルタクチンまたはそのフラグメントの混合物を含む免疫原性組成物であって、該ペルタクチンまたはそのフラグメントの混合物が、気管支敗血症菌ペルタクチンの変異型の混合物を含み、該気管支敗血症菌ペルタクチンの少なくとも一つの変異型が、その第2領域に6、7、8または9回反復するPQPアミノ酸配列を有する、気管支敗血症菌のペルタクチンの第2領域を含み、該気管支敗血症菌ペルタクチンの少なくとももう一つの変異型が、その第1領域に1、2または3回反復するGGXXPアミノ酸配列を有する、気管支敗血症菌のペルタクチンの第1領域を含む免疫原性組成物。

【請求項13】 ボルデテラ属のペルタクチンのフラグメントの混合物を含む免疫原性組成物であって、

該免疫原性組成物を投与された動物に、パラ百日咳菌および気管支敗血症菌に対する体液性または細胞性免疫応答を誘導するのに十分な量の

(a) パラ百日咳菌のペルタクチンまたはそのフラグメントと、

(b) 気管支敗血症菌のペルタクチン、または第1領域、第2領域、もしくは第1領域および第2領域の双方を含むそのフラグメントと

を含む免疫原性組成物。

【請求項14】 免疫原性組成物を投与された動物に、百日咳菌に対する体液性または細胞性免疫応答を誘導するのに十分な量の、百日咳菌のペルタクチンもしくはそのフラグメントもまた含む、請求項13記載の免疫原性組成物。

【請求項15】 気管支敗血症菌ペルタクチンの少なくとも2種類の変異型の混合物を含む組成物であって、該変異型が、それぞれ、気管支敗血症菌のペルタクチンの第2領域を含み、かつ少なくともそれぞれに含まれる第2領域において互いに異なる組成物。

【請求項16】 気管支敗血症菌ペルタクチンの変異型の混合物を含む組成物であって、気管支敗血症菌ペルタクチンの変異型が、それぞれ、その第2領域に6、7、8または9回反復するPQPアミノ酸配列を含み、該気管支敗血症菌ペルタクチンの少なくとも2種類の変異型が、それに含まれる該反復するPQPアミノ酸配列の数において異なる組成物。

【請求項17】 パラ百日咳菌のペルタクチンもしくはそのフラグメント、

百日咳菌のペルタクチンもしくはそのフラグメント、またはそれらの混合物も含む、請求項16記載の組成物。

【請求項18】 気管支敗血症菌ペルタクチンの少なくとも2種類の変異型の混合物を含む組成物であって、気管支敗血症菌のペルタクチンの変異型が、それぞれ、気管支敗血症菌のペルタクチンの第1領域を含み、かつ該変異型が、少なくともそれぞれに含まれる第1領域において互いに異なる組成物。

【請求項19】 気管支敗血症菌のペルタクチンの変異型の混合物を含む組成物であって、該気管支敗血症菌ペルタクチンの変異型が、それぞれ、その第1領域に1、2または3回反復するGGXXPアミノ酸配列を含み、該気管支敗血症菌ペルタクチンの少なくとも2種類の変異型が、それに含まれる該反復するGGXXPアミノ酸配列の数において異なる組成物。

【請求項20】 パラ百日咳菌のペルタクチンもしくはそのフラグメント、百日咳菌のペルタクチンもしくはそのフラグメント、またはそれらの混合物も含む、請求項19記載の組成物。

【請求項21】 気管支敗血症菌のペルタクチンの変異型の混合物を含む組成物であって、該気管支敗血症菌ペルタクチンの変異型の一つが、気管支敗血症菌ペルタクチンの第2領域を含み、該気管支敗血症菌ペルタクチンの変異型のもう一つが、気管支敗血症菌ペルタクチンの第1領域を含む組成物。

【請求項22】 第2領域が、6、7、8または9回反復するPQPアミノ酸配列を有する、請求項21記載の組成物。

【請求項23】 該第1領域が、1、2または3回反復するGGXXPアミノ酸配列を有する、請求項21記載の組成物。

【請求項24】 気管支敗血症菌のペルタクチンの変異型の混合物を含む組成物であって、該気管支敗血症菌ペルタクチンの変異型の一つが、その第2領域中に6、7、8または9回反復するPQPアミノ酸配列を有する気管支敗血症菌ペルタクチンの第2領域を含み、該気管支敗血症菌ペルタクチンの変異型のもう一つが、その第1領域中に1、2または3回反復するGGXXPアミノ酸配列を有する気管支敗血症菌ペルタクチンの第1領域を含む組成物。

【請求項25】 パラ百日咳菌のペルタクチンもしくはそのフラグメント、

百日咳菌のペルタクチンもしくはそのフラグメント、またはそれらの混合物も含む、請求項24記載の組成物。

【請求項26】 配列番号7、配列番号8、配列番号9、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および配列番号22からなる群より選ばれる配列、または該配列のフラグメントを含むポリペプチド。

【請求項27】 配列番号7、配列番号8、配列番号9、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または配列番号22中のアミノ酸からなるポリペプチド。

【請求項28】 請求項26に記載のポリペプチドをコードしているポリヌクレオチド。

【請求項29】 請求項28に記載のポリヌクレオチド、またはそのうちの少なくとも15のヌクレオチドと中程度のか、もしくは高い緊縮度の条件下でハイブリダイズする、精製されたDNAもしくはRNA配列。

【請求項30】 請求項27に記載のポリペプチドをコードしているポリヌクレオチド。

【請求項31】 請求項30に記載のポリヌクレオチド、またはそのうちの少なくとも15のヌクレオチドと中程度のか、もしくは高い緊縮度の条件下でハイブリダイズする、精製されたDNAもしくはRNA配列。

【請求項32】 請求項26に記載のポリペプチドと結合する、精製された抗体。

【請求項33】 抗体がモノクローナル抗体である、請求項32記載の精製抗体。

【請求項34】 抗体がポリクローナル抗体である、請求項32記載の精製抗体。

【請求項35】 請求項26に記載のポリペプチドと、該ポリペプチドを特異的に認識する抗体とを含む免疫学的複合体。

【請求項36】 ボルデテラ属による感染を検出する方法であって、ボルデ

テラ属に感染していると推測される生物学的材料を含む組成物を提供する工程と、請求項26に記載のポリペプチドの存在について検定する工程とを含む方法。

【請求項37】 ポリペプチドを、該ポリペプチドと免疫学的反応性である抗体を用いる電気泳動または免疫アッセイによって検定する、請求項36記載の方法。

【請求項38】 請求項26に記載のポリペプチドを含む抗原と結合する抗体の存否を検出するインビトロ診断の方法であって、生物学的流体中の抗原および抗体が抗原抗体複合体を形成するのに十分な時間かつ条件で、該抗原を該生物学的流体に接触させる工程と、該複合体の形成を検出する工程とを含む方法。

【請求項39】 抗原抗体複合体の形成を測定する工程をさらに含む、請求項38記載の方法。

【請求項40】 抗原抗体複合体の形成を、ウエスタンブロット手法、ELISA、間接免疫蛍光アッセイまたは免疫沈降アッセイに基づく免疫アッセイによって検出する、請求項38記載の方法。

【請求項41】 請求項26に記載のポリペプチドまたはその混合物と結合する抗体の存否を検出するための診断キットであって、請求項26に記載のポリペプチド、または該ポリペプチドの混合物を含む抗原と、抗原と抗体との間の免疫複合体の形成を検出するための、該検出を実施するのに十分な量で存在する手段とを含むキット。

【請求項42】 免疫原性または防御性応答をインビボで誘導するのに十分な量の請求項26に記載の少なくとも1種類のポリペプチドと、そのための薬学的に許容され得る担体とを含む免疫原性組成物。

【請求項43】 請求項26に記載の少なくとも1種類のポリペプチドの中和量を含む、請求項1～14に記載の免疫原性組成物。

【請求項44】 請求項28～31のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドを含む免疫原性組成物。

【請求項45】 請求項1～14、42、43または44のいずれか一項に記載の免疫原性組成物を、薬学的に許容され得る賦形剤とともに含むワクチン。

【請求項46】 ボルデテラ属の存否を検出する方法であって、

(1) ボルデテラ属の遺伝学的材料を含有すると推測されるサンプルを、少なくとも1種類のヌクレオチドプローブに接触させる工程と、
(2) 該ヌクレオチドプローブと、サンプル中の遺伝学的材料との間のハイブリダイゼーションを検出する工程と
を含み、該ヌクレオチドプローブが、請求項28または30のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド配列に相補的である方法。

【請求項47】 少なくとも請求項1～14、または42～44に記載の免疫原性組成物と、動物へ該組成物を投与する手段とを含む予防接種用キット。

【請求項48】 (A) 百日咳菌のペルタクチンの、第1領域および第2領域を含むポリペプチド、または第1領域を含む一つのポリペプチドおよび第2領域を含む一つのポリペプチド；

(B) パラ百日咳菌のペルタクチンの、第1領域および第2領域を含むポリペプチド、または第1領域を含む一つのポリペプチドおよび第2領域を含む一つのポリペプチドならびに；

(C) 気管支敗血症菌9.73株のペルタクチンの、第1領域および第2領域を含むポリペプチド、または第1領域を含む一つのポリペプチド、および第2領域を含む一つのポリペプチド、ならびに気管支敗血症菌SEI株のペルタクチンの、第1領域および第2領域を含むポリペプチド、または第1領域を含む一つのポリペプチドおよび第2領域を含む一つのポリペプチド
から本質的になる免疫原性組成物。

【請求項49】 (A) 気管支敗血症菌のペルタクチン；

(B) 気管支敗血症菌のFHAおよび；

(C) パラ百日咳菌のペルタクチン

から本質的になる免疫原性組成物。

【請求項50】 気管支敗血症菌のペルタクチンが9.73株に由来する、請求項49記載の免疫原性組成物。

【請求項51】 気管支敗血症菌のFHAが9.73株に由来する、請求項49記載の免疫原性組成物。

【請求項52】 FHA、AGG2、AGG3からなる群より選ばれる、ポ

ルデテラ属の少なくとも1種類のアドヘシン、および/またはPTX、DNT、TCT、Ac-Hlyからなる群より選ばれる、ボルデテラ属の少なくとも1種類の毒素をさらに含む、請求項1～14、42～44、または48～51のいずれか一項に記載の免疫原性組成物。

【請求項53】 請求項28～31に記載の少なくとも1種類のポリペプチド、またはそのフラグメントを含むDNAチップ。

【請求項54】 ボルデテラ属の感染を処置するための、請求項33記載のモノクローナル抗体の使用。

【請求項55】 マイクロビーズを含むマイクロアレーであって、該マイクロアレーが、それぞれ、請求項28～31のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドまたはそのフラグメントの複数の複製物を担持し、該ポリヌクレオチドまたはそのフラグメントが、マイクロビーズごとに互いに異なるマイクロアレー。

【発明の詳細な説明】**【0001】**

本発明は、ボルデテラ属 (*Bordetella*) のペルタクチンと呼ばれる外膜タンパク質のタンパク質およびポリペプチド、ならびにそれらをコードしているポリヌクレオチドに関する。本発明は、免疫原性組成物、診断方法および診断キット中のこれらのタンパク質およびポリペプチドの使用にも関する。

【0002】

ボルデテラという属は、7つの種を包含する。最も研究されている種は、百日咳菌 (*Bordetella pertussis*)、パラ百日咳菌 (*Bordetella parapertussis*) および気管支敗血症菌 (*Bordetella bronchiseptica*) である。百日咳菌は、ヒトにおいてのみ呼吸器感染の原因となるにすぎない。パラ百日咳菌は、ヒトおよびヒツジに感染を生じ、気管支敗血症菌は、ヒトを包含する多くの動物種に感染する。

【0003】

これらの病原体は、二成分の *bvgAS* (2, 21) 系によって合成が調節される、一連の病原因子を産生する。これらの因子は、毒素、たとえば、百日咳菌に特異的な唯一の毒素である百日咳毒素、気管細胞毒素、アデニル酸シクラーゼ溶血素、ならびにアドヘシン、たとえば繊維状血球凝集素、線毛およびペルタクチン (PRN) を包含する。

【0004】

PRNは、百日咳菌では69 kDa、パラ百日咳菌では70 kDa、気管支敗血症菌では68 kDaの見かけ分子量を有する、外膜タンパク質である(5, 14, 15)。PRNの前駆体は、大きさが、それぞれ91.5 kDa、93 kDa、92.5 kDaである。百日咳菌では、PRNは、凝集原であって(4)、Arg - Gly - Asp (RGD) のモチーフによる一定の真核細胞への付着を促進することが立証されている(13)。

【0005】

気管支敗血症菌PRNに特異的な抗体は、感作した子ブタで高力価で検出されるが、非防御動物では、これらの抗体は、あるとしても僅かにのみ検出されるに

すぎない(19)。気管支敗血症菌によるPRNの合成は、防御と相関する(16)。PRNの調製品によるマウスまたは子ブタの感作は、気管支敗血症菌の感染に対する防御免疫を誘導し(12、19)、受動的に投与されたモノクローナル抗体は、気管支敗血症菌で攻撃された動物の死を予防する(16)。百日咳菌PRNは、マウスにおける百日咳菌による脳内、エアゾルおよび鼻内攻撃に対して防御免疫を誘導することも示されている(11、18、20)。

【0006】

そのため、PRNは、現在は、いくつかの非細胞性百日咳ワクチン(すなわち、精製された細菌タンパク質で構成されるワクチン)に包含される(9)。しかし、これら3種のPRNは、明確に関連付けられるものの、異なる免疫原特性を有する。たとえば、百日咳菌PRNの調製品は、百日咳菌の鼻内攻撃からマウスを防御するが、パラ百日咳菌の鼻内攻撃からは防御しない(11)。また、百日咳菌の脳内攻撃からもマウスを防御するが、気管支敗血症菌PRNタンパク質は、防御しない(18)。

【0007】

3種類のタンパク質、すなわち百日咳菌PRN、パラ百日咳菌PRNおよび気管支敗血症菌PRNの推定されるアミノ酸の比較からは、高度の類似性が明らかにされていて、気管支敗血症菌とパラ百日咳菌のタンパク質は、互いに、百日咳菌PRNタンパク質に対してより類似している(5、14、15)。

【0008】

3種類のタンパク質の配列では、第1および第2領域における反復の回数が異なる(図1a)。モノクローナル抗体を用いて、Charlesらは、P.69-PRNタンパク質の防御的免疫優性エピトープを特定かつ特徴付けた(6)。このエピトープは、第2領域に位置する5回反復する配列(Pro-Gln-Pro)にまたがっている。この領域における相違は、気管支敗血症菌PRNを認識する子ブタからの血清が、これらのタンパク質間の高度の類似性にもかかわらず、百日咳菌PRNと反応しないという所見(12)、および3つのタンパク質が与える交差防御の欠如(11、18、20)を説明し得る。

【0009】

最近、百日咳菌の臨床単離体が産生するPRNは、多様であることが示されている。様々な臨床単離体のprn遺伝子の配列から、PRN変異型の主要な3型が明らかにされた(17)。オランダにおける流行は、PRNおよびPTをコードしている遺伝子の配列の変化から生じることが示唆されているが、それは、現在流行している様々な臨床単離体中に存在するタンパク質は、この国で用いられるワクチン株によって観察されるものとは配列が異なるからである(17)。

【0010】

百日咳菌のPRNについては、観察されたすべてのアミノ酸の相違は、第1領域に位置する。対立遺伝子prnのA=1型およびC=3型は、非常に似ていて、二つのアミノ酸で異なるにすぎないが、B=2型は、全く異なっていて、同じ領域に5アミノ酸の挿入がある(17)。

【0011】

第2領域では、一つの型が見出されたにすぎない。この型(A*=6)は、百日咳菌のWHO参照株18323、およびフランスの1臨床単離体が産生する(3)。しかし、唯一の臨床単離体で検出されているにすぎないため、一般的であるとは思われない(3)。この百日咳菌株によるPRNのこの異例の型の産生は、パラ百日咳菌と気管支敗血症菌という種に共有される多くの共通する特性を反映する。異なるPRNを有する百日咳菌臨床単離体の動物モデルでは、表現型および挙動における相違は全く見出されなかった(3)。

【0012】

当技術には、ボルデテラ属の感染から防御し、ボルデテラ属に感染した対象者を処置するための免疫原性組成物に用いることができる、ボルデテラ属ペルタクチンのタンパク質およびポリペプチドを含有する組成物に対する必要性がある。理想的には、このタンパク質、ポリペプチド、およびこれらをコードしているポリヌクレオチドは、ボルデテラ属の感染の診断、およびそのような感染の診断用キットにも役立つ。

【0013】

本発明は、当技術におけるこれらの必要性を満たす助けとなる。一実施態様では、本発明は、ボルデテラ属のペルタクチンの混合物を含む免疫原性組成物であ

って、該免疫原性組成物を投与された動物に、パラ百日咳菌および気管支敗血症菌に対する体液性または細胞性免疫応答を誘導するのに十分な量の

(a) パラ百日咳菌のペルタクチンと、

(b) 気管支敗血症菌のペルタクチンと

を含む免疫原性組成物を提供する。この免疫原性組成物は、また、該免疫原性組成物を投与された動物に、百日咳菌に対する体液性または細胞性免疫応答を誘導するのに十分な量の百日咳菌のペルタクチンも含むことができる。

【0014】

もう一つの実施態様では、本発明の免疫原性組成物は、ボルデテラ属のペルタクチンまたはそのフラグメントの混合物を含む。具体的には、該混合物は、気管支敗血症菌ペルタクチンの変異型の混合物を含み、この気管支敗血症菌ペルタクチンの変異型は、それぞれ、その第2領域に6、7、8または9回反復するPQPアミノ酸配列を含む。この気管支敗血症菌ペルタクチンの変異型は、該免疫原性組成物を投与された動物に気管支敗血症菌に対する体液性または細胞性免疫応答を誘導するのに十分な量で存在する。この免疫原性組成物は、また、該免疫原性組成物を投与された動物に、パラ百日咳菌または百日咳菌に対する体液性または細胞性免疫応答を誘導するのに十分な量の、パラ百日咳菌もしくは百日咳菌のペルタクチンまたはそれらの混合物も含むことができる。

【0015】

本発明のさらに一つの実施態様では、該免疫原性組成物は、ボルデテラ属のペルタクチンまたはそのフラグメントの混合物を含み、この混合物は、気管支敗血症菌ペルタクチンの変異型の混合物を含み、この気管支敗血症菌ペルタクチンの変異型は、それぞれ、その第1領域中に1、2または3回反復するGGXXPアミノ酸配列を含む。この気管支敗血症菌ペルタクチンの変異型は、該免疫原性組成物を投与された動物に、気管支敗血症菌に対する体液性または細胞性免疫応答を誘導するのに十分な量で存在する。この免疫原性組成物は、該免疫原性組成物を投与された動物に、パラ百日咳菌または百日咳菌に対する体液性または細胞性免疫応答を誘導するのに十分な量の、パラ百日咳菌もしくは百日咳菌のペルタクチン、またはそれらの混合物も含むことができる。

【0016】

本発明の組成物は、ボルデテラ属のペルタクチンのフラグメントの混合物を含むことができる。該免疫原性組成物は、免疫原性または防御性応答をインビボで誘導するのに十分な量の本発明の少なくとも1種類のポリペプチドと、そのための薬学的に許容され得る担体とを含むこともできる。加えて、該免疫原性組成物は、中和量の本発明の少なくとも1種類のポリペプチドも含むことができる。

【0017】

本発明の好適な免疫原性組成物は、気管支敗血症菌の種のペルタクチンまたはそのフラグメントの混合物を含み、該ペルタクチンまたはそのフラグメントは、気管支敗血症菌ペルタクチンの変異型の混合物を含み、その中において、気管支敗血症菌ペルタクチンの少なくとも一つの変異型が、6、7、8または9回反復するPQPアミノ酸配列をその第2領域中に有する気管支敗血症菌のペルタクチンの第2領域を含み、気管支敗血症菌ペルタクチンの少なくとももう一つの変異型が、1、2または3回反復するGGXXPアミノ酸配列をその第1領域中に有する気管支敗血症菌のペルタクチンの第1領域を含む。

【0018】

もう一つの好適実施態様では、本発明の免疫原性組成物は、

- (A) 百日咳菌のペルタクチンの、第1領域および第2領域を含むポリペプチド、または第1領域を含む一つのポリペプチド、および第2領域を含む一つのポリペプチド；
- (B) パラ百日咳菌のペルタクチンの、第1領域および第2領域を含むポリペプチド、または第1領域を含む一つのポリペプチドおよび第2領域を含む一つのポリペプチド；
- (C) 気管支敗血症菌9.73株のペルタクチンの、第1領域および第2領域を含むポリペプチド、または第1領域を含む一つのポリペプチドおよび第2領域を含む一つのポリペプチド、ならびに気管支敗血症菌SEI株のペルタクチンの、第1領域および第2領域を含むポリペプチド、または第1領域を含む一つのポリペプチドおよび第2領域を含む一つのポリペプチドから本質的になる。

【0019】

本発明は、本発明のタンパク質およびポリペプチドをコードしているポリヌクレオチド、ならびに該タンパク質およびポリペプチドを認識する抗体も提供する。また、本発明による少なくとも一つのポリヌクレオチド、またはそのフラグメントを含むDNAチップ、あるいは、それぞれ、請求項28～31に記載のポリヌクレオチドまたはそのフラグメントの複数の複製物を担持するマイクロビーズを含み、該ポリヌクレオチドまたはそのフラグメントがビーズごとに互いに異なる、マイクロアレーも提供する。

【0020】

該抗体は、モノクローナルまたはポリクローナル抗体であることができる。モノクローナル抗体は、ボルデテラ属の感染を処置するのに用いることができる。また、本発明のタンパク質またはポリペプチドと、該タンパク質またはポリペプチドを特異的に認識する抗体とを含む免疫学的複合体も提供される。

【0021】

さらに、本発明は、ボルデテラ属による感染を検出する方法を提供する。該方法は、ボルデテラ属に感染していると推測される生物学的材料を含む組成物を提供する工程と、本発明のタンパク質またはポリペプチドの存在について検定する工程とを含む。該ポリペプチドは、たとえば、該ポリペプチドとの免疫学的反応性を有する抗体による電気泳動または免疫アッセイによって検定することができる。

【0022】

該方法は、生物学的流体中の抗原および抗体が、抗原抗体複合体を形成するのに十分な時間かつ条件で、該抗原を該生物学的流体に接触させる工程と、該複合体の形成を検出する工程とも含む。該方法は、場合により、該抗原抗体複合体の形成を測定する工程を包含することができる。好適実施態様では、該抗原抗体複合体の形成を、ウエスタンブロット手法、ELISA、間接免疫蛍光アッセイまたは免疫沈降アッセイに基づく免疫アッセイによって検出する。

【0023】

さらに、本発明は、本発明のタンパク質もしくはポリペプチド、またはそれら

の混合物と結合する、抗体の存否を検出するための診断キットを提供する。該キットは、該タンパク質もしくはポリペプチド、またはタンパク質およびポリペプチドの混合物を含む抗原と、該抗原と抗体間の免疫複合体の形成を検出するための手段とを含むことができる。該手段は、該検出を実施するのに十分な量で存在する。

【0024】

ボルデテラ属の存否を検出するための、本発明のもう一つの方法は、

(1) ボルデテラ属の遺伝学的材料を含有すると推測されるサンプルを、少なくとも1種類のヌクレオチドプローブに接触させる工程と、

(2) 該ヌクレオチドプローブと、サンプル中の遺伝学的材料との間のハイブリダイゼーションを検出する工程と

を含む。該ヌクレオチドプローブは、本発明のポリヌクレオチド配列と相補的である。

【0025】

本発明を、図面を参照して、さらに詳しく説明する。従来、ペルタクチンファミリーの種特異的なメンバーは、外膜タンパク質(OMP)であることが立証されている。気管支敗血症菌では、ペルタクチンは、pm遺伝子の産物であり、68 kDaのM_rのタンパク質として(P. 68)、百日咳菌では69 kDaのM_rのタンパク質として(P. 69)、パラ百日咳菌では70 kDaのM_rのタンパク質として(P. 70)表される。これら3種のペルタクチンのヌクレオチド配列は、添付の配列表に、それぞれ配列番号1、配列番号2および配列番号3として包含される。これらのヌクレオチド配列によってコードされる、対応するアミノ酸配列は、配列表に、それぞれ配列番号4、配列番号5および配列番号6として包含される。

【0026】

P. 68、P. 69およびP. 70のタンパク質に対して推定されるタンパク質配列の比較から、該タンパク質間の高度の相同性が立証される。P. 68とP. 70とのタンパク質間の比較は、17カ所にすぎないアミノ酸の相違を示すのに対して、P. 68とP. 69との間の同様の比較は80カ所の相違を、またP

. 69とP. 70との間の比較は79カ所の相違を示す。この三つの推定されるタンパク質配列間のアミノ酸の相違の大部分は、3タンパク質すべてに存在する反復する配列の2つのファミリー中の反復単位の数に出現する。P. 68は、Gly - Gly - Xaa - Xaa - Proの反復（すなわち、図1bのGGXXP）の3つの複製を有するのに対して、P. 70は4つの複製、P. 69は5つの複製を有する。同様に、P. 68は、7つのPro - Gln - Proの反復（すなわち、図1cのPQP）を、P. 70は9つの、P. 69は5つ有する。

【0027】

最近、百日咳菌の臨床単離体が産生するPRNは、多様であることが示されている。様々な臨床単離体のprn遺伝子の配列から、PRN変異型の主要な3型が明らかにされた。オランダにおける流行は、PRNおよびPTをコードしている遺伝子の配列の変化から生じることが示唆されているが、それは、現在流行している様々な臨床単離体中に存在するタンパク質は、この国で用いられるワクチン株によって観察されるものとは配列が異なるからである。

【0028】

研究者の、本発明へと導いた目的は、百日咳菌で観察されたPRN多型が、パラ百日咳菌および気管支敗血症菌にも出現するか否かを解析することであった。ヒト起源のパラ百日咳菌の10種類の単離体、および動物またはヒト起源の気管支敗血症菌の40種類の単離体のprn遺伝子の2つの反復領域を、配列決定し、比較した（図1a）。

【0029】

表Iは、本発明に用いた単離体、および対応するペルタクチンの型のリストを示す。

【0030】

【表1】

表 I

ボルデテラ属の種	代表的な単離体	PRNの第1および 第2領域の型/ 単離体の数	受託番号*、 第1領域、 第2領域
BB	9.73H+	I-1, II-3/3	AJ250076, AJ250077
BB	LAPR	I-2, II-3/8	AJ250078, AJ250079
BB	5	I-2, II-4/8	AJ250080, AJ250081
BB	335	I-2, II-1/3	AJ250082, AJ250083
BB	CVGEO	I-2, II-5/6	AJ250084, AJ250085
BB	BBCH	I-2, II-6/4	AJ250086, AJ250087
BB	DEL	I-1, II-2/5	AJ250088, AJ250089

ボルデテラ属の種	代表的な単離体	PRNの第1および 第2領域の型/ 単離体の数	受託番号*、 第1領域、 第2領域
BB	CAT1	I-1, II-7/1	AJ250090, AJ250091
BB	286	I-3, II-8/1	AJ250093, AJ250092
BB	SEI	I-3, II-9/1	AJ250094, AJ250095
BPP	63.2	I-1, II-2/10	P24328 と同一
種	菌株	PRNの型	受託番号
BPP	CN2591	I-1, II-2	P24328
BB	CN7531	I-2, II-4	Q03035

ボルデテラ属の種	代表的な単離体	PRNの第1および第2領域の型/ 単離体の数	受託番号*、 第1領域、 第2領域
----------	---------	---------------------------	-------------------------

種	菌株または単離体	対立遺伝子 <i>prn</i> の型	受託番号
BP	Tohama	<i>prn1</i>	AJ006158
BP	18323	<i>prn6</i>	AJ006152
BP	Hav	<i>prn2</i>	AJ007361
BP	Fr287	<i>prn3</i>	AJ006156

BB: 気管支敗血症菌 ; **BP:** 百日咳菌 ; **BPP:** パラ百日咳菌

* **EMBL** バンク

【0031】

本発明を実施するには、以前に記載したとおり、DNAを抽出し、PCRによって増幅し、配列決定した(3)。増幅されたPCR産物は、ESGS社(ESGS, Cybergene group, Evry, フランス国)が精製かつ配列決定した。推定されるアミノ酸配列は、GCGソフトウェア(Wisconsin Packageバージョン9.1, Genetics Computer Group, Madison, WI, 米国)で解析した。第1および第2領域の推定アミノ酸配列を比較し、アミノ酸配列のマルチプルアライメントを、GCGのCLUSTAL Wプログラム(10)により、各領域について創出した(図1b、c)。

【0032】

パラ百日咳菌の10単離体が産生したPRNの第1および第2領域の配列、および刊行された配列(15)の間には、相違が全く見出されなかった。しかし、解析された気管支敗血症菌の40個の*prn*遺伝子間には、3種類の異なる型が

見出されて、第1領域の反復の回数(1~3回)に相違があった(図1b)。最大の群は、反復配列の3つの複製を有する配列に対応し、以前に報告された配列と同一であった(14)。変異のパターンと単離体の起源との間には、相関関係が全く見出されなかった。

【0033】

気管支敗血症菌PRNの第二の反復領域には、高度の可変性が観察された(図1c)。9種類の変異型が観察された。これら9変異型の間では、反復の回数は、6~9回である。

【0034】

百日咳菌の変異型と同じパターンを示す気管支敗血症菌の変異型は、皆無であった。さらに、第1領域の一つの型と第2領域の一つの型との間の独自の関連性は、全く観察されなかった。百日咳菌、気管支敗血症菌およびパラ百日咳菌の間の中間体であると見なされる、18323株およびCZ単離体のそれに類似するパターンは、3種のいずれにおいても観察されなかった(3)。これらのデータは、百日咳菌のprn遺伝子より、互いに類似しているパラ百日咳菌および気管支敗血症菌のprn遺伝子と整合する(1)。PRNの型に関しては、宿主特異性は、全く観察されなかった。

【0035】

第2領域は、防御免疫の誘導に重要な役割を果たすことが示されている(6)。百日咳菌、パラ百日咳菌および気管支敗血症菌からのPRNの間の交差防御の欠如は、これらのタンパク質間の大きい相違がこの領域で生じることから、このことと整合する。百日咳菌単離体が産生するPRNについては、この領域での変異は全く観察されなかった。これらのデータは、30年間の予防接種が、一つの免疫優性反復領域には変異を誘導したが、防御免疫の誘導に最も関与する領域には変異を誘導しなかったらしいことを示唆する。百日咳菌PRNの第2領域での変異は、百日咳菌ワクチンの薬効の低下を示す可能性がある。

【0036】

対照的に、気管支敗血症菌のPRNの分析からは、両領域での多型が示された。これは、気管支敗血症菌ワクチンが永続的な防御を誘導できないことを説明し

得る。この多型は、気管支敗血症菌が慢性的感染を誘導できることにも関連し得る(7、8、22)。それは、この細菌が宿主の免疫応答を免れるための手段を与える可能性がある。

【0037】

これらの実験および観察から帰結された本発明は、そのため、一定のボルデテラ属のペルタクチンおよびそのフラグメントを含有する組成物を含む。これらのペルタクチンおよびペルタクチンフラグメントは、これらをコードしているポリヌクレオチドとともに、免疫原性組成物に、かつ診断上の用途に役立つ。

【0038】

特に、本発明は、気管支敗血症菌の完全長ペルタクチンの異なる種、すなわち、その第2領域に6、7、8または9回反復するPQPアミノ酸配列を含む種、およびその第1領域に1、2または3回反復するGGXXPアミノ酸配列(ここで、XXは、FD、FGまたはAVであることができる)を含む、気管支敗血症菌の完全長ペルタクチンの種が存在することの発見の結果である。したがって、これらの完全長ペルタクチン、およびこれらの反復配列のいかなる組合せでのペルタクチンの混合物も、本発明によって提供される。

【0039】

本明細書に用いられる限りで、表現「気管支敗血症菌のペルタクチン」とは、病原因子であり、約68kDaの見かけ分子量を有し、気管支敗血症菌ペルタクチンの第1および第2領域として知られる二つの領域を含む、気管支敗血症菌の外膜タンパク質を意味する。異なるボルデテラ属菌株のペルタクチンの第1および第2領域は、配列番号1~6ではかっこ内に特定される。気管支敗血症菌株の異なる単離体のペルタクチンは、たとえば、第1領域、第2領域、または第1および第2領域の双方はもとより、他の領域でも、互いに異なるアミノ酸配列を有してもよい。

【0040】

本明細書に用いられる限りで、表現「気管支敗血症菌ペルタクチンの変異型」とは、気管支敗血症菌のペルタクチン、または気管支敗血症菌ペルタクチンの、少なくとも第1領域、第2領域、または第1および第2領域の双方を有するフラ

グメントであって、この気管支敗血症菌のペルタクチンまたはそのフラグメントが、少なくとも第1領域、第2領域、または第1および第2領域の双方で、それぞれのアミノ酸配列において互いに異なるものを意味する。下記の独特の気管支敗血症菌ペルタクチン変異型が、発見され、本発明の一部を構成している。

【0041】

本明細書に用いられる限りで、表現「気管支敗血症菌ペルタクチンのフラグメント」、「パラ百日咳菌ペルタクチンのフラグメント」および「百日咳菌ペルタクチンのフラグメント」とは、完全長ペルタクチンタンパク質の部分であり、ボルデテラ属の感染に対する体液性または免疫応答を誘導できるポリペプチドを意味する。

【0042】

【表2】

B. 気管支敗血症菌ペルタクチン-第1領域

I-1 QRATIRRGDAPAGGAVPGGAVPG-----GFGPLLDGWYGVSDSTVDLAQ (SEQ ID NO: 7)

I-2 QRATIRRGDAPAGGAVPG-----GAVPG-----GFGPLLDGWYGVSDSTVDLAQ (SEQ ID NO: 8)

I-3 QRATIRRGDAPAGGAVPG-----GAVPG-----GFDPGGFGGFPVLDGWYGVDSGSTVELAQ (SEQ ID NO: 9)

prn1 QRATIRRGDAPAGGAVPG-----GAVPG-----GAVPGGFGGFPVLDGWYGVDSGSSVELAQ (SEQ ID NO: 10)

prn2 QRATIRRGDAPAGGAVPG-----GAVPGGFGGFPVLDGWYGVDSGSSVELAQ (SEQ ID NO: 11)

prn3 QRATIRRGDAPAGGAVPG-----GAVPG-----GFGPGGFGGFPVLDGWYGVDSGSSVELAQ (SEQ ID NO: 12)

prn4 QRATIRRGDAPAGGAVPG-----GAVPG-----GFGPGGFGFPVLDGWYGVDSGSSVELAQ (SEQ ID NO: 13)

*****.****

B. 気管支敗血症菌ペルタクチン-第2領域

II-1 GAKAPPAPKPAQPGPQPGP-----QPPQPQP-PQRQP--EAPAPQPPAGRELSAA (SEQ ID NO: 14)

II-2 GAKAPPAPKPAQPGPQPGP-----QPPQPQP-PQRQP--EAPAPQPPAGRELSAA (SEQ ID NO: 15)

II-3 GAKAPPAPKPAQPGPQPGPQPGPQPGPQPGPQPGP-----EAPAPQPPAGRELSAA (SEQ ID NO: 16)

II-4 GAKAPPAPKPAQPGPQPGPQPGP-----QPPQPQP-PQRQP--EAPAPQPPAGRELSAA (SEQ ID NO: 17)

II-5 GAKAPPAPKPAQPGPQPGPQPGP-----PQPPQPQP-PQRQP--EAPAPQPPAGRELSAA (SEQ ID NO: 18)

II-6 GAKAPPAPKPAQPGPQPGPQPGP-----QPPQPQP-PQRQP--EAPAPQPPAGRELSAA (SEQ ID NO: 19)

II-7 GAKAPPAPKPAQPGPQPGP-----QPPQPQP-PQRQP--EAPAPQPPAGRELSAA (SEQ ID NO: 20)

II-8 GAKAPPAPKPAQPGPQPGP-----QPPQPQP-PQPP-----EAPAPQPPAGRELSAA (SEQ ID NO: 21)

II-9 GAKAPPAPKPAQPGPQPGP-----QPPQPQP-PQPP-----EAPAPQPPAGRELSAA (SEQ ID NO: 22)

prn1 GAKAPPAPKPAQPGPQPGP-----PQPP-----EAPAPQPPAGRELSAA (SEQ ID NO: 23)

prn6 GAKAPPAPKPAQPGPQPGP-----PQP-----EAPAPQPPAGRELSAA (SEQ ID NO: 24)

【0043】

特定の実施態様では、本発明は、配列番号7、配列番号8、配列番号9、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および配列番号22からなる群より選ばれ

る配列、もしくは該配列のフラグメントを含むポリペプチドを包含する。該ポリペプチドは、配列番号7、配列番号8、配列番号9、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もしくは配列番号22またはそのフラグメント中のアミノ酸からなることができる。本発明は、これらのポリペプチドの一つをコードしているポリヌクレオチド、および該ポリヌクレオチド、または少なくともそのうち15個のヌクレオチドと、中程度のか、もしくは高い緊縮度の条件下でハイブリダイズする、精製されたDNAまたはRNAも包含する。

【0044】

本明細書に用いられる限りで、表現「気管支敗血症菌ペルタクチンの変異型の混合物」とは、固体、液体、乳濁液または懸濁液形態での混合物をなす、気管支敗血症菌ペルタクチンの2もしくは3種類の変異型を意味する。該混合物中の気管支敗血症菌ペルタクチンの少なくとも2種類の変異型は、当然、少なくとも第1領域、第2領域、または第1および第2領域の双方で、そのそれぞれのアミノ酸配列において互いに異なる。

【0045】

本発明が、その第2領域に6、7、8もしくは9回反復するPQPアミノ酸配列、またはその第1領域に1、2または3回反復するGGXXPアミノ酸配列を含む、気管支敗血症菌ペルタクチンのポリペプチドフラグメントを提供することは、直ちに明白である。反復配列のいかなる組合せでの、これらのポリペプチドフラグメントの混合物も、本発明の対象範囲内にある。

【0046】

本発明のポリペプチドフラグメントが気管支敗血症菌ペルタクチンの第1領域のみを含むとき、該ポリペプチドフラグメントは、典型的には、第1領域の反復配列を包含する、少なくとも約46～約56個のアミノ酸を含む。本発明のポリペプチドフラグメントが第2領域のみを含むとき、該ポリペプチドフラグメントは、典型的には、第2領域の反復配列を包含する、少なくとも約48～約60個のアミノ酸を含む。本発明のポリペプチドフラグメントが気管支敗血症菌の第1および第2領域の双方を含むとき、該フラグメントは、典型的には、第1および

第2領域の反復配列を包含する、少なくとも約906～約928個のアミノ酸を含む。

【0047】

したがって、例示的な一実施態様では、本発明は、気管支敗血症菌ペルタクチンの変異型の混合物を含む組成物であって、該気管支敗血症菌ペルタクチンの変異型が、それぞれ、気管支敗血症菌ペルタクチンの第2領域を含み、さらに該気管支敗血症菌ペルタクチンの変異型が、それぞれ、その第2領域に6、7、8または9回反復するPQPアミノ酸配列を含み、該気管支敗血症菌ペルタクチンの変異型が、それに含まれる該PQP反復アミノ酸配列の数において異なる、組成物を提供する。該組成物は、また、パラ百日咳菌もしくは百日咳菌のペルタクチン、またはその混合物も含むことができる。該ポリペプチドは、完全長ペルタクチンまたはそのフラグメントであることができる。

【0048】

もう一つの実施態様では、本発明は、気管支敗血症菌のペルタクチンの変異型の混合物を含む組成物であって、該気管支敗血症菌ペルタクチンの変異型が、それぞれ、気管支敗血症菌ペルタクチンの第1領域を含み、さらに、該気管支敗血症菌ペルタクチンの変異型が、それぞれ、その第1領域に1、2または3個のGGXPという反復アミノ酸配列を含み、該気管支敗血症菌ペルタクチンの少なくとも2種類の変異型が、それに含まれる該GGXPという反復アミノ酸配列の数において異なる組成物を提供する。この組成物は、また、パラ百日咳菌もしくは百日咳菌のペルタクチン、またはその混合物も含むことができる。該気管支敗血症菌ペルタクチンの変異型は、完全長またはフラグメントであることができる。

【0049】

さらに一つの実施態様では、本発明は、気管支敗血症菌ペルタクチンの変異型の混合物を含む免疫原性組成物であって、該気管支敗血症菌ペルタクチンの変異型の一つが、その第2領域に6、7、8または9回反復するPQPアミノ酸配列を有する気管支敗血症菌のペルタクチンの第2領域を含み、該気管支敗血症菌ペルタクチンの変異型のもう一つが、その第1領域に1、2または3回反復するG

G X X P アミノ酸配列を有する、気管支敗血症菌のペルタクチンの第1領域を含む組成物を提供する。この組成物は、また、パラ百日咳菌もしくは百日咳菌のペルタクチン、またはその混合物も含むことができる。該気管支敗血症菌ペルタクチンの変異型は、完全長ペルタクチンまたはそのフラグメントであることができる。

【0050】

好適実施態様では、本発明は、配列番号7、配列番号8および配列番号9からなる群より選ばれる配列を含むポリペプチドを提供する。

【0051】

もう一つの好適実施態様では、本発明は、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および配列番号22からなる群より選ばれる配列を含むポリペプチドを提供する。

【0052】

本発明による組成物は、体液性免疫応答および細胞性免疫応答を生じる。気管支敗血症菌に感染した後は、百日咳菌およびパラ百日咳菌による感染の場合のように、体液性免疫および細胞性免疫の誘導が存在する。さらに、本発明の組成物によるワクチン接種の後は、感染または再感染後に誘導されるのと類似の、体液性および細胞性の種類の免疫の誘導が存在する。

【0053】

本発明の一実施態様では、本発明の免疫原性組成物を有効成分として、薬学的に許容され得る賦形剤、および適切な場合はアジュバントと組み合わせて含む、ワクチン接種用組成物が提供される。

【0054】

市場で現在入手できる百日咳ワクチンと同様に、本発明による免疫原性組成物は、その他のワクチン接種用有効成分、たとえば、ジフテリア、ポリオ、もしくはヘモフィルス属によって生じる疾病に対するワクチンのそれとか、または一般的に述べると、いかなる免疫原成分、たとえば特に不活性化された病原性作用因子もしくは毒素と組み合わせてもよい。

【0055】

本発明によるワクチン接種用組成物は、種特異的であり、その結果、百日咳菌もしくはパラ百日咳菌または気管支敗血症菌に対する防御を誘導可能であることができる。これに代えて、それは、上に定義されたとおりの気管支敗血症菌に対する免疫原性組成物、およびパラ百日咳菌および/または百日咳菌に対する免疫原性組成物を有効成分として含む混合物であることができる。

【0056】

分子生物学における最近の手法の結果として、百日咳菌の病原性に関与する数多くの因子が、特徴付けられていて、それらの発現の調節が理解されている。これらの因子は、二つの範疇、すなわち、感染性症候群に関与するもの（アドヘシン）と、毒素誘導症候群に役割を果たすもの（毒素）とに分類し得る。ボルデテラ属に関連するアドヘシンおよび毒素は、本発明の組成物に含ませることができる。アドヘシンの例は、

【0057】

線毛上皮への細菌の付着に大きな役割を演じると考えられる、繊維状血球凝集素またはFHA；

【0058】

菌株が血清型に分類されるのを可能にする、百日咳菌の2種類の凝集原またはAGG；および

【0059】

その細胞病原性効果に加えて、そのBサブユニットを介して付着に関与する分泌型A - B毒素である、百日咳菌毒素またはPTXである。

【0060】

本発明に用いるための毒素の例は、
分泌される、百日咳菌毒素またはPTX；

【0061】

作用が未だ十分に特徴付けられていない、皮膚壊死性毒素またはDNT、および細菌のプロテオグリカンに由来する、ムラミルペプチドファミリーの、分泌さ

れる低分子糖タンパク質であって、宿主の呼吸系装置の線毛細胞を破壊するよう、協力して作用すると思われる、気管細胞毒素またはTCT；

【0062】

アデニル酸シクラーゼ活性と溶血活性とを有する二機能性タンパク質であって、「毒素中の反復」を意味する「RTX」と呼ばれる毒素のファミリーに属することが見出された、アデニル酸シクラーゼ-溶血素またはAc-Hly；である。

【0063】

同様に、パラ百日咳菌および気管支敗血症菌の病原性に関与する因子が、特定されていて、本発明の組成物に含ませることができる。

【0064】

刊行された結果は、試験された一価(PTX)、二価(PTX、FHA)、三価(PTX、FHA、PRN)、または五価(PTX、FHA、PRN、AGG2、AGG3)の非細胞性ワクチンは、非常に僅かな副作用を誘導するにすぎず、すべて免疫原性であり、かつすべてが該疾病に対して、70%より高いか、または等しい薬効(WHOの定義による)を有する。本発明の組成物は、これらのワクチンその他の非細胞性ワクチンに含ませることができる。たとえば、該免疫原性組成物は、FHA、AGG2、AGG3からなる群から選ばれる、ボルデテラ属の少なくとも1種類のアドヘシン、ならびに/またはPTX、DNT、TCTおよびAc-Hlyからなる群から選ばれる、ボルデテラ属の少なくとも1種類の毒素をさらに含むことができる。

【0065】

本発明のタンパク質、ポリペプチドおよび組成物は、精製された形態をなすことができる。用語「精製(された)」は、本明細書に用いられる限りで、ペルタクチンまたはそのフラグメントが、たとえば、宿主の組換え細胞培地中の精製生成物としてか、または組換えではない供給源からの精製生成物として、他のタンパク質またはポリペプチドとの結合を本質的に含まないことを意味する。本明細書に用いられる限りでの用語「実質的に精製された」とは、ペルタクチンまたはそのフラグメントを含有し、特異的な抗体を用いて除去できる既知のタンパク質

の存在以外は、他のタンパク質またはポリペプチドとの結合を本質的に含まず、その実質的に精製されたペルタクチンというポリペプチドを抗原として用いることができる、混合物を意味する。

【0066】

本発明の態様の範囲内で、ペルタクチンおよびそのフラグメントは、ペルタクチンというポリペプチドに特異的に結合する抗体を調製するのに利用することができる。用語「抗体」とは、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、それらのフラグメント、たとえばF(ab)およびFabフラグメントはもとより、組換えによって産生された結合パートナー(binding partner)も包含することを意味する。抗体は、ペルタクチンおよびそのフラグメントに、約 10^7M^{-1} より大きいか、または等しい K_d で結合するならば、特異的に結合していると定義される。結合パートナーまたは抗体の親和性は、慣用の手法、たとえばScatchardら[Ann. N.Y. Acad., 51:660 (1949)]が、記載したものをを用いて、容易に決定することができる。ポリクローナル抗体は、様々な供給源、たとえばウマ、ウシ、ヤギ、ヒツジ、イヌ、ニワトリ、ウサギ、マウスまたはラットから、当技術分野において周知である手順を用いて容易に産生することができる。

【0067】

本発明は、さらに、単離されたフラグメントおよびオリゴヌクレオチドであって、その第2領域において6、7、8もしくは9回反復するPQPアミノ酸配列、および/またはその第1領域において1、2もしくは3回反復するGGXXPアミノ酸配列をコードしている、気管支敗血症菌、百日咳菌およびパラ百日咳菌のペルタクチンのヌクレオチド配列(配列番号1、配列番号2および配列番号3)から誘導された、フラグメントおよびオリゴヌクレオチドを包含する。本発明は、これらのフラグメントおよびオリゴヌクレオチドがコードしているポリペプチドも包含する。混合物は、該混合物中の実体が、それぞれ、独立して、本発明のポリヌクレオチドから選ばれる、反復配列を含むヌクレオチド配列も包含することができる。

【0068】

本発明の範囲内の核酸配列は、本明細書に開示された未変性のペルタクチン核

酸と、中程度のか、または厳しい緊縮度の条件下でハイブリダイズし、ペルタクチンというポリペプチドをコードしている、単離されたDNAおよびRNA配列を包含する。本明細書に用いられる限りで、中程度の緊縮度の条件は、当業者には公知であり、Sambrookら [Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2 ed., Vol. 1, pp. 1.101-104, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)] によって定義されたとおり、 $5 \times \text{SSC}$ 、 $0.5\% \text{SDS}$ 、 1.0mM EDTA (pH 8.0) のニトロセルロースフィルター用予洗液、 $50\% \text{ホルムアミド}$ 、 $6 \times \text{SSC}$ 、 42°C のハイブリダイゼーション条件 (または他の類似のハイブリダイゼーション液、たとえば $50\% \text{ホルムアミド}$ 中のスタークス液、 42°C)、および $0.5 \times \text{SSC}$ 、 $0.1\% \text{SDS}$ 、約 60°C の洗浄条件の使用を包含する。高い緊縮度の条件は、上記のとおりであり、かつ 68°C 、 $0.2 \times \text{SSC}$ 、 $0.1\% \text{SDS}$ での洗浄を伴うハイブリダイゼーション条件として定義される。当業者は、温度および洗浄液の塩濃度は、プローブの長さのような因子に応じて必要なおりに調整できる。

【0069】

一つより多くのコドンが同じアミノ酸をコードすることができる、遺伝暗号の公知の縮重のため、DNA配列は、異なりながらも、配列番号7～配列番号24のアミノ酸配列を有するペルタクチンポリペプチドをコードすることができる。そのような変異型DNA配列は、サイレント突然変異 (たとえばPCR増幅の際に生じる) の結果として生じることができるか、または未変性配列の計画的な突然変異誘発の産物であることができる。

【0070】

したがって、本発明は、

- (a) 未変性ペルタクチン遺伝子のコーディング領域に由来するDNA；
- (b) 配列番号7～配列番号24のヌクレオチド配列を含むcDNA；
- (c) 中程度の緊縮度の条件下で(a)のDNAとハイブリダイズすることができ、そしてペルタクチンポリペプチドをコードしているDNA；および
- (d) (a)、(b)または(c)に定義されたDNAに対する遺伝暗号の結果として縮重し、そしてペルタクチンポリペプチドをコードしているDNA

から選ばれる、ペルタクチンポリペプチドをコードしている、等価の単離DNA配列を提供する。そのようなDNA等価配列がコードしているペルタクチンポリペプチドは、本発明に包含される。

【0071】

本発明は、単離または精製された形態での、前記のタンパク質およびポリペプチドを、本明細書に記載された手法を用いて得られたと、他の方法を用いて得られたとを問わず包含するよう意図されていることが理解される。本発明の好適実施態様では、該ペルタクチンポリペプチドは、ヒトその他の動物の組織、およびヒトその他の動物の組織成分、核酸、外来タンパク質および脂質、外来性の微生物、たとえば細菌およびウイルスを実質的に含まない。本発明は、実質的に同じ生物学および免疫原性特性有する等価のタンパク質を包含することも理解される。したがって、本発明は、本発明のポリペプチドの血清型上の変異型を網羅する。

【0072】

本発明のペルタクチンポリペプチドを利用する用途に応じて、それらを標識化することが望ましい場合がある。適切な標識の例は、放射性標識、酵素的標識、蛍光性標識、化学発光性標識および発色団である。標識化の方法は、免疫グロブリンを標識化するのに広く用いられるものと本質的に異ならない。標識化する必要性は、本発明の抗原に対する標識化抗体、または間接的マーカーとしての抗原に対する抗体に対する抗免疫グロブリンを用いることによって回避してもよい。

【0073】

本発明のペルタクチンポリペプチドが得られたならば、それらは、それらとの反応性を有するポリクローナルおよびモノクローナル抗体を生成するのに用いることができる。したがって、本発明のタンパク質またはポリペプチドは、当該技術分野に公知の手法によって、動物である宿主を感作するのに用いることができる。そのような手法は、通常、接種を伴うが、その他の投与方式を伴ってもよい。充分量のタンパク質またはポリペプチドを投与して、免疫原性応答を動物宿主に生じさせる。本発明の抗原に対する抗体を生成する、いかなる宿主を用いることもできる。動物を感作し、それが抗原に対する抗体の生成を開始するのに充分

な時間が経過したならば、ポリクローナル抗体を回収することができる。一般的な方法は、この動物から血液を取り出し、該血液から血清を分離することを含む。該抗原に対する抗体を含有するこの血清は、該抗原に対する抗血清として用いることができる。これに代えて、抗体を血清から回収することもできる。アフィニティー精製は、抗原に対する精製抗体を血清から回収するのに好適な手法である。

【0074】

本発明の抗原に対するモノクローナル抗体も調製することができる。抗原と反応するモノクローナル抗体を生成する一つの方法は、宿主を抗原で感作する工程と；該宿主の脾臓から抗体産生細胞を回収する工程と；該抗体産生細胞をヒポキサンチン - グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼという酵素を欠く骨髓腫細胞と融合させて、ハイブリドーマを形成する工程と；ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジンを含む培地での増殖によって、少なくとも一つのハイブリドーマを選別する工程と；該抗原に対する抗体を産生する少なくとも一つのハイブリドーマを特定し、特定されたハイブリドーマを培養して、回収できる量の抗体を産生させる工程と；培養されたハイブリドーマが産生した抗体を回収する工程とを含む。

【0075】

これらのポリクローナルまたはモノクローナル抗体は、様々な用途に用いることができる。とりわけ、対応するタンパク質の中和がある。それらは、生物学的調製品中のボルデテラ属の抗原を検出するためにか、またはたとえばアフィニティークロマトグラフィー用カラムに用いたときに、対応するタンパク質、糖タンパク質もしくはそれらの混合物を精製するのに用いることもできる。

【0076】

本発明のペルタクチンポリペプチドは、材料中のボルデテラ属に対する抗体を特定し、これらの材料中の抗体の濃度を決定するための抗原として用いることができる。したがって、該抗原は、材料中のボルデテラ属の定性的または定量的測定に用いることができる。そのような材料は、当然、ヒトその他の動物組織、およびヒトその他の動物細胞はもとより、生物学的流体、たとえば、ヒトの血清を

はじめとする、ヒトその他の動物体液を包含する。ボルデテラ属に対する抗体の存在または濃度を決定するための免疫アッセイにおける試薬として用いられたとき、本発明の抗原は、簡便、迅速、鋭敏かつ特異的であるアッセイを提供する。

【0077】

より詳しくは、本発明の抗原は、流体中の体液性成分を検出または定量する際の周知の使用である、免疫アッセイの手段によって、ボルデテラ属を検出するのに用いることができる。したがって、二次反応、たとえば沈降または凝集によって、抗原抗体相互作用を直接観察または決定することができる。加えて、免疫電気泳動の手法を用いることもできる。たとえば、寒天中で電気泳動を実施した後に、抗血清と反応させる古典的な組合せはもとより、二次元電気泳動、ロケット電気泳動、およびポリアクリルアミドゲルパターンの免疫標識化（ウエスタンブロット分析または免疫ブロット分析）も利用することができる。本発明の抗原を用いることができる、その他の免疫アッセイは、放射性免疫アッセイ、競合免疫沈降アッセイ、酵素免疫アッセイおよび免疫蛍光アッセイを包含するが、これらに限定されない。濁度測定、比色分析および比濁分析の手法を用い得ることが理解される。ウエスタンブロット分析手法に基づく免疫アッセイが好ましい。

【0078】

免疫アッセイは、本発明の抗原、または該抗原に対する本発明の抗体のいずれかの、免疫試薬の一つを、試薬の免疫活性を保持しつつ、担体表面に固定化することによって実施することができる。相反性の免疫試薬は、標識化されないか、または免疫反応性も保持されるようにして標識化することができる。これらの手法は、酵素免疫アッセイ、たとえば酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）および競合阻害酵素免疫アッセイ（CIEIA）に用いるのに特に適する。

【0079】

本発明の抗原、または該抗原に対する抗体のいずれかを、固体支持体に固着させるときは、該支持体は、通常、ガラスまたはプラスチック材料である。平板、管状、ビーズ状または円板の形態に成形されたプラスチック材料が好ましい。適切なプラスチック材料の例は、ポリスチレンおよびポリ塩化ビニルである。免疫試薬が固体支持体に容易に結合しないならば、試薬と支持体との間に、担体材料

を挿入することができる。適切な担体材料の例は、タンパク質、たとえばウシ血清アルブミン、化学的試薬、たとえばグルタルアルデヒドまたは尿素である。固相のコーティングは、慣用の手法を用いて実施することができる。

【0080】

本発明は、免疫原性ペルタクチンポリペプチド、およびより詳細には、ボルデテラ属に対するワクチン組成物の製造に用いるための防御性ポリペプチドを提供する。したがって、これらのポリペプチドは、ボルデテラ属の感染に犯され易い哺乳動物に該ポリペプチドを投与することによって、ワクチンとして用いることができる。慣用の投与方式が使用できる。たとえば、投与は、経口的、呼吸器または非経口的経路によって実施することができる。皮内、皮下および筋内の投与経路は、ワクチンを非経口的に投与するときに好ましい。

【0081】

ボルデテラ属に感染した哺乳動物における免疫応答の主な目的は、ボルデテラ属を不活性化し、感染性のウイルスを放出する可能性を有する、ボルデテラ属感染細胞を排除することである。免疫応答のB細胞分枝が、ボルデテラ属の不活性化の主要な責務を有する。これが達成される第一の方式は、感染性の中和による。ボルデテラ属感染細胞の破壊のためのもう一つの主要な機構は、細胞表面のクラスI組織適合性抗原と組み合わせて発現される、ペルタクチン抗原を認識する細胞毒性Tリンパ球(CTL)によって与えられる。CTLは、たとえば感染細胞によって、産生されたか、または食細胞によって取り込まれたペルタクチンというタンパク質から細胞内でプロセッシングされた、ペルタクチンポリペプチドを認識する。したがって、本発明は、ペルタクチンポリペプチドに対するB細胞の応答、ならびに感染後のCTLの応答によって媒介される免疫を刺激するのに用いることができる。CTL応答は、ボルデテラ属初感染からの回復を媒介し、その後の感染の際の回復を加速するのに重要な役割を果たすことができる。

【0082】

本発明のペルタクチンポリペプチドおよびワクチンが防御レベルの中和抗体を宿主に誘導できる能力は、アジュバントで乳化すること、リポソームに組み込むこと、適切な担体に結合すること、またはこれらの手法の組合せによって増強す

ることができる。たとえば、本発明のペルタクチンポリペプチドは、宿主における体液性または細胞性免疫応答を強化するのに十分な量の、慣用のアジュバント、たとえばリン酸アルミニウムおよび水酸化アルミニウムのゲルとともに投与することができる。同様に、ペルタクチンポリペプチドは、脂質膜と結合させるか、または脂質膜に組み込んで、リポソームを形成することができる。核酸その他の外来物質を含まない非発熱性脂質の使用を、この目的に採用することができる。

【0083】

感作のスケジュールは、いくつかの因子、たとえば、感染に対する宿主の感受性、および宿主の年齢に依存する。本発明のワクチンの単回用量を、宿主に投与することができるか、または感作の初期経過の後に、時間的間隔を置いて、数回投与することができる。ブースターとして用いられる、その後の投与は、初期経過の後に必要されるとおりに投与することができる。

【0084】

本発明のペルタクチンのタンパク質、ポリペプチドおよびワクチンは、ボルデテラ属の感染、またはインビボでの複製を予防または阻害するのに十分な量で、宿主に投与することができる。いかなる事態でも、投与される量は、たとえボルデテラ属の感染を完全に防止し得ないとしても、実質的な免疫抑制に対して宿主を防御するのに少なくとも充分でなければならない。免疫原性応答は、本発明のタンパク質またはポリペプチドを、ある量、たとえば体重1kgあたり抗原約1～約50 μg、好ましくは体重1kgあたり抗原約5～約10 mgで宿主に投与することによって得ることができる。本発明のタンパク質、ポリペプチドおよびワクチンは、生理学的に許容され得る担体とともに投与することができる。たとえば、希釈剤、たとえば水または生理食塩水を用いることができる。

【0085】

本発明のもう一つの態様は、ペルタクチンポリペプチドをコードしている核酸、タンパク質およびポリペプチドそれ自体のいかなる組合せをも、担体分子とともに、またはそれなしに個体に投与することを包含する。該個体は、動物であることができる。本明細書に用いられる限りで、用語「動物」とは、哺乳動物を

意味し、好ましくは、該哺乳動物は、ヒト、ウサギ、マウス、イヌ、ネコ、ウシ、ブタおよびウマからなる群より選ばれる。特に好適な実施態様では、該哺乳動物はヒトである。

【0086】

処置方法は、ペルタクチンタンパク質またはポリペプチドを含む免疫原性組成物ばかりでなく、ペルタクチンタンパク質またはポリペプチドをコードしている核酸を含む組成物の投与も包含する。当業者は、核酸ワクチン（たとえばDNAワクチン）および核酸ワクチン技術はもとより、タンパク質およびポリペプチドに基づく技術の概念、適用および有効性も認識している。核酸に基づく技術は、ペルタクチンポリペプチドをコードしている、裸であるか、またはカプセル封入された、核酸を、コードされているタンパク質の投与前の生成を必要とせずに組織および細胞に直接投与することを可能にする。この技術は、これらの核酸が受容生物の細胞によって取り込まれ、発現され、受容体の免疫系が応答する免疫原性決定基を生成できる能力に基づく。典型的には、発現された抗原は、核酸を取り込み、そして発現させた、細胞の表面に表示されるが、コードされた抗原の発現および受容個体の循環系内への輸送も、本発明の範囲内にある。そのような核酸ワクチン技術は、裸のDNAおよびRNAの送達、ならびにペルタクチンポリペプチドをコードしている発現ベクターの送達を包含するが、これらに限定されない。この技術は、「ワクチン」と呼ばれてはいるが、防御応答につながらない免疫原性組成物にも等しく適用可能である。そのような非防御誘導組成物および方法は、本発明の範囲内に包含される。

【0087】

ペルタクチンポリペプチドをコードしている核酸および担体分子を、裸の核酸として送達することは、本発明の範囲内にあるが、本発明は、より大きく、より複雑な組成物の一部としての核酸の送達も包含する。これらの送達システムには、ペルタクチンポリペプチドをコードしている核酸を含有する、ウイルス、ウイルス様粒子または細菌が包含される。また、本発明の核酸および担体分子と、細胞浸透性化合物、たとえばリポソームとの複合体も、本発明の範囲内に包含される。その他の化合物、たとえば分子状ベクター（EP 696,191, Samain et al.）

、および核酸ワクチンの送達システムは、当業者には公知であり、たとえばWO 93 06223およびWO 90 11092、US 5,580,859およびUS 5,589,466 (Vical特許) (参照によって本明細書に組み込まれる) に例示されており、不当または過剰な実験なしに製造かつ使用することができる。

【0088】

目的をさらに達成するため、そして本発明の目的により、ボルデテラ属の感染を診断できるキットが記載される。このキットは、一実施態様では、細菌RNAまたは類似のDNA配列とハイブリダイズして、ボルデテラ属感染の存在を表示することができる、本発明のDNA配列を含有する。(1)制限酵素で消化され得るか、またはされ得ない細胞DNAを特定するためのサザンブロット分析の手順；(2)細胞から抽出されたRNAを特定するためのノーザンブロット分析の手法；(3)ドットブロット手法、すなわち、事前のアガロースゲル上での分離なしに、膜、たとえばニトロセルロースまたはナイロン越しにサンプルを直接濾過する手法を包含する、異なる診断手法を用いることができるが、これらに限定されない。

【0089】

ドットブロット手法に適する材料は、血清および血漿を包含するが、これらに限定されない体液、培養細胞からの上清、または細胞溶解と遠心分離による細胞の膜および核の除去後に得られる細胞質抽出物から得ることができる。

【0090】

下記は、本発明に関する研究に用いた菌株の参考文献である：

- ・ 9 . 7 3 H + 5 , D E L , S E I : Infect. Immun. (1993) 61:4072-4078, Guierard, P & Guiso, N., 1989年5月12日付けでCNCMにより受理。第858号、
- ・ C V H A I 2 8 6 , 3 3 5 株と同一のC V G E O : Microbiol. (1997) 143: 1433-1441, Le Blay, K et al.,
- ・ 6 3 . 2 : CIP - Lab. Ident., Inst. Pasteur, Paris、フランス国 - J. Clin. Microbiol., 1993, 31:2745、
- ・ T I : CIP81.32 - Lab. Ident., Inst. Pasteur, Paris、フランス国 - J. Cl

in. Microbiol., 1993, 31:2746、

- ・ F r 2 8 7 : Vaccine (1999) 17:2651:2660, Boursaux-Eurde, C. et al.,
- ・ 1 8 2 3 2 : 参照OMS : ATCC 97 . 97 (C I P 6 3 . 1)

【 0 0 9 1 】

【表3】

B. 気管支敗血症菌p.68ペルタクチン遺伝子[配列番号1]

```

atcgatgatg cgtcgctgta acacggcaaa taccgtgcat tgcagcgggt ctggatggcg
ttcttcgtac gtttgctgcg cccattcttc cctgttccat cgcggtgceg ccatggcggg
cgtctgctct tcacccggca tccaatgaac atgtctctgt cacgcattgt cttggcggcg
cccctgcgcc gcaccacact ggccatggcg ctgggcgcgc tgggcgccgc gcccgccgcg
tacgccgact ggaacaacca gtccatcacc aaggccggcg agcggcagca cggcatccac
atcaagcaaa gcgatggcg cggcgtacgg accgccaccg gaacgacat caaggttaagc
ggtcgtcagg cccagggcgt cctgctggaa aatcccgcgg ccgagctgcg gttccagaac
ggcagcgtca cgtcttcggg acagctgttc gacgaaggcg tccggcgctt tctgggcacc
gtcaccgtca aggccggcaa gctggtcgcc gatcacgcca cgctggccaa cgtcagcgac
accggggacg acgacggcat cgcgctctat gtggccggcg agcaggccca ggccagcatc
gccgacagca ccctgcaggg cgcgggcggc gtgcccgtcg agcggcgcg caatgtcacg
gtccaacgca gcaccatcgt tgacgggggc ttgcatatcg gcaacctgca gccgctgcag
ccggaagacc ttccgccag ccgggtggtg ctgggcgaca ccagcgtgac cgccgtgccc
gccagcggcg cgcggcgggc ggtgtctgta ttccgggcca atgagcttac ggttgatggc
gggcacatca cggggggcg ggcagcgggg gtggcgcca tggacggggc gatcgtgcat
ctg[cagcgcg cgacgatacg gcggggggac gcgcctgccg gcggtgcggt tccaggcggg
gctgttcccg gcggcttcgg cccctcctt gacggctggt atggcgtgga tgtatcggat
tccaccgtgg acctcgctca - g]*tcgatcgtc gaggcgccgc agctgggcgc
cgcgatccgg gcgggcccgc gcgccagggt gacggtgtcg ggcggcagct tgtccgcacc
gcacggcaat gtcacgaga ccggcggcg cgcgctcgc ttcccgcctc cggcctcgcc
cctgtcgatc accttgagg cgggcgcacg ggcgcagggg agggcgctgc tgtaccgggt
cctgccggag cccgtgaagc tgacgctggc gggcggcgcc caggggcagg gcgacatcgt
cgcgacggag ctgcctcca ttccaggcgc gtcgagcggg ccgctcgacg tggcgtggc
cagccaggcc

```

* 第1領域

cgatggacgg gcgctacccg cgcggtcgac tcgctgtcca tcgacaacgc cacctgggtc
 atgacggaca actcgaacgt cggcgcgctg cggctggcca gcgacggcag cgtcgatttc
 cagcagccgg ccgaagctgg gcggttcaag tgcctgatgg tcgatacgtt ggcgggttcg
 gggctgttcc gcatgaatgt cttcgcggac ctggggctga gcgacaagct ggtcgtcatg
 cgggacgcca gggccagca caggctgttg gtccgcaaca gcggcagcga gccggccagc
 ggcaacacca tgctgctggg gcagacgcca cgaggcagcg cggcgacctt tacccttgcc
 aacaaggacg gcaaggcga tatcgggtacc taccgctatc gattggccgc caacggcaat
 gggcagtggg gcctgggtg [gg cgcgaaggcg ccgccggcgc ccaagcccgc gccgcagccc
 ggtccccagc ccggtcccca gccgccgag ccgccgcagc cgccgcagcc gccacagagg
 cagccggaag cgccggcgcc gcaaccgccg gcgggcaggg agttgtccgc
 cgcc]**gccaac gcggcgggtca acacgggtgg ggtgggcctg gccagcacgc
 tctggtacgc cgaaagcaat gcgttgtcca agcgcctggg cgagttgcgc ctgaatccgg
 acgccggcgg cgcttggggc cgcggcttcg cgcaacgcca gcaactggac aaccgcgccg
 ggcggcgctt cgaccagaag gtggccggct tcgagctggg cgccgaccac gcggtggcgg
 tggccggcgg gcgctggcac ctggggcggg tggccggcta tacgcgcggc gaccgcggct
 ttaccggcga cggcggcggc cacaccgaca gcgtgcatgt cgggggctat gccacctata
 tcgccaacag cggtttctac ctggacgcga cgtgcgcgc cagccgcctc gaaaatgact
 tcaagtggtg gggcagcgat gggtagcgg tcaagggcaa gtaccgcacc catggggtag
 gcgcctcgct cgaggcgggc cggcgccttc cccatgccga cggctgggtc ctcgagccgc
 aggccgagct ggcgggtgtc cgggtcggcg gcggttcgta ccgcgcggcc aatggcctgc
 ggggtgcgcga cgaaggcggc agctcgggtc tgggtcgcct gggcctggag gtcggcaagc
 gcatcgaact ggcaggcggc aggcaggtgc agccatacat caaggccagc gtgctgcagg
 agttcgacgg cgcgggtacg gtacgcacca acggcatcgc gcaccgcacc gaactgcgcg
 gcacgcgcgc cgaactgggc ctgggcatgg ccgccgcgct gggccgcggc cacagcctgt
 atgcctcgta cgagtactcc aagggcccga agctggccat gccgtggacc ttccacgcgg
 gctaccggta cagctggtaa

** 第2領域

agcgagaagg gtccatcccc ccgcggggga gattttcctg gaggttgcc ggtgccagtc
 tccaggetca ggcggccagg gcgtgcgggc cgggcaggcc gtgctggtgc tggccgaacc

B. 気管支敗血症菌p.68ペルタクチンタンパク質[配列番号4]

MNMSLSRIVL AAPLRRTTLA MALGALGAAP AAYADWNNQS IIKAGERQHG IHIKQSDGAG
 VRTATGTTIK VSGRQAQGV LLENPAAELRF QNGSVTSSGQ LFDEGVRRFL GTVTVKAGKL
 VADHATLANV SDTRDDGIA LYVAGEQAQA SIADSTLQGA GGVRVERGAN VTVQRSTIVD
 GGLHIGTLQP LQPEDLPPSR VVLGDTSVTA VPASGAPAAV SVFGANELTV DGGHITGGRA
 AGVAAMDGAI VHL[QRATIRR GDAPAGGAVP GGAVPGGFGP LLDGWYGV DV
 SDSTVDLAQ]*S IVEAPQLGAA IRAGRGARVT VSGGSLSAPH GNVIETGGGA
 RRFPPASPL SITLQAGARA QGRALLYRVL PEPVKLTLAG GAQGQGDIVA TELPPIPGAS
 SGPLDVALAS QARWTGATRA VDSLSDNAT WVMTDNSNVG ALRLASDGSV DFOQPAEAGR
 FKCLMVDTLA GSGLFRMNVF ADLGLSDKLV VMRDASGQHR LLVRNSGSEP ASGNTMLLVQ
 TPRGSAATFT LANKDGKVDI GTYRYRLAAN GNGQWSLV[GA KAPPAPKPAP QPGPQPGPOP
 PQQPPQPP QROPEAPAPQ PPAGRELSAA]** ANAAVNTGGV GLASTLWYAE
 SNALSKRLGE LRLNPDAGGA WGRGFAQRQQ LDNRAGRRFD QKVAGFELGA DHAVAVAGGR
 WHLGGLAGYT RGDRGFTGDG GGHTDSVHVG GYATYIANSF FYLDATLRAS RLENDFKVAG
 SDGYAVKGY RTHGVGASLE AGRRFAHADG WFLEPQAELA VFRVGGGSYR AANGLRVRDE
 GGSSVLGRLG LEVKGRIELA GGRQVQPYIK ASVLQEFDGA GTVRTNGIAH RTELGRTRAE
 LGLGMAAALG RGHSLYASYE YSKGPKLAMP WTFHAGYRYS W

* 第1領域

** 第2領域

B. 百日咳菌 p.69 遺伝子 [配列番号 2]

atgaacatgt ctctgtcacg cattgtcaag gggcgcccc tgcgccgcac cacgctggcc
atggcgctgg gcgcgctggg cgccgccccg gggcgcatg ccgactggaa caaccagtcc
atcgtcaaga ccggtgagcg ccagcatggc atccatatcc agggctccga cccggcgggc
gtacggaccg ccagcggaac caccatcaag gtaagcggcc gtcaggccca gggcatcctg
ctagaaaatc ccgcgccga gctgcagttc cggaacggca gtgtcacgtc gtcgggacag
ttgtccgacg atggcatccg gcgctttctg ggcaccgtca ccgtcaaggc cggcaagctg
gtcgccgacg acgccacgct ggccaacggt ggcgacacct gggacgacga cggcatcgcg
ctctatgtgg ccggcgaaca ggcccaggcc agcatcgccg acagcaccct gcagggcgct
ggggcgctgc agatcgagcg cggcgccaat gtcacgggtc aacgcagcgc catcgctgac
gggggcttgc atatcggcgc cctgcagtca ttgcagccgg aagacctcc gccagccgg
gtggtgctgc gcgacaccaa cgtgaccgcc gtgcccgcca gggcgcgcc cgcgcggtg
tctgtgttgg gggccagtga gcttacgctc gacggcgggc acatcaccgg cggcggggca
gcgggggtg cggccatgca agggcggtc gtgcatctg [c agcgcgcgac gatacggcgc
ggggacgcgc ctgcccggcg tgcggttccc ggcgggtgcg ttcccgggtg tgcggttccc
ggcggtctcg gtcccggcg cttcggtccc gtcctcgacg gctggtatgg cgtggacgta
tcgggctcca gcggtggagct cgcccag]*tcg atcgtcgagg cgccggagct
gggcgccgca atccgggtgg gccgcggcgc cagggtgacg gtgtcggcg gcagcttgtc
cgaccgcac ggcaatgtca tcgagaccgg cggcgcgct cgctttgcgc ctcaagccgc
gcccctgtcg atcaccttgc aggcggcgc gcatgccag gggaaagcgc tgctgtaccg
ggtcctgccg gagcccgtga agctgacgct gaccgggggc gccgatgcgc agggcgacat
cgtcgcgacg gagctgccct ccattcccgg cacgtcgatc gggccgctcg acgtggcgct
ggccagccag gcccgatgga cgggcgctac ccgcgcggtc gactcgctgt ccatcgaaa
cgccacctgg gtcatgacgg acaactcgaa cgtcggtgcg ctacggctgg ccagcgacgg
cagcgtcgat

* 第1領域

ttccagcagc cggccgaagc tgggcggttc aaggtcctga cggtaatac gctggcgggt
 tcggggctgt tccgcatgaa tgtcttcgcg gacctggggc tgagcgacaa gctggctcgtc
 atgcaggacg ccagcggcca gcacaggctg tgggtccgca acagcggcag cgagccggcc
 agcgccaaca ccctgctgct ggtgcagacg ccacaggca gcgcggcgac ctttaccctt
 gccacaagg acggcaaggc cgatatcggc acctatcgtc atcgattggc cgccaacggc
 aatgggcagt ggagcctggc g[ggcgcaag gcgcgcggc cgccaagcc cgcgccgag
 ccgggtcccc agccgccgca gccgccgag ccgcagcggc aagcgccggc gccgcaaccg
 ccggcgggca gggagttgtc cgccgcc]**gcc aacgcggcgg tcaacacggg
 tggggtgggc ctggccagca cgctctggta cgccgaaagc aatgcgttgt ccaagcgcct
 gggcgagttg cgcctgaatc cggacgcggc cggcgctgg ggccgcggct tcgcgcaacg
 ccagcagctg gacaaccgcg ccggggcgcg cttcgaccag aaggtggccg gcttcgagct
 gggcgccgac cacgcggtgg cgggtggccg cggacgctgg cacctgggcg ggctggccgg
 ctatacgcgc ggcgaccgcg gcttcaccgg cgacggcggc ggccacaccg acagcgtgca
 tgtcgggggc tatgccacat atatcgccga cagcggtttc tacctggacg cgacgctgcg
 cgccagccgc ctggagaatg acttcaaggc ggcgggcagc gacgggtacg cggccaaggg
 caagtaccgc acccatgggg tgggcgcctc gctcgaggcg ggccggcgct ttaccatgc
 cgacggctgg ttctcagc cgcaggccga gctggcggta ttccgggccc gcggcggtgc
 gtaccgcgcg gccaacggcc tgcgggtgcg cgacgaaggc ggcagctcgg tgctgggtcg
 cctgggcctg gaggtcggca agcgcacgca actggcaggc ggcaggcagg tgcagccata
 catcaaggcc agcgtgctgc aggagttcga cggcgcggtt acggtacaca ccaacggcat
 cgcgcacccg accgaactgc gcggcacgcg cgccgaactg ggccctgggca tggccgccgc
 gctgggcccg ggccacagcc tgtatgcctc gtacaggtac tccaagggcc cgaagctggc
 catgcccgtg accttccacg cgggctaccg gtacagctgg taa

** 第2領域

B. 百日咳菌 p.69 タンパク質 [配列番号5]

MNMSLSRIVK AAPLRRTTLA MALGALGAAP AAHADWNNQS IVKTGERQHG IHIQSDPGG
 VRTASGTTIK VSGRQAQGIL LENPAAELQF RNGSVTSSGQ LSDDGIRRFL GTVTVKAGKL
 VADHATLANV GDTWDDDGIA LYVAGEQAQA SIADSTLQGA GGVQIERGAN VTVQRSAIVD
 GGLHIGALQS LQPEDLPPSR VVLRDTNVTA VPASGAPAAV SVLGASELTL DGGHITGGRA
 AGVAAMQGAV VHL[QRATIRR GDAPAGGAVP GGAVPGGAVP GGFGPGGFGP VLDGWYGV DV
 SGSSVELAQ]*S IVEAPELGAA IRVGRGARVT VSGGSL SAPH GNV IETGGAR
 RFAPQAAPLS ITLQAGAHQ GKALLYRVLP EPVKLTLTGG ADAQGDIVAT ELPSIPGTSI
 GPLDVALASQ ARWTGATRAV DSLSIDNATW VMTDNSNVGA LRLASDGSVD FQQPAEAGR F
 KVLTVNTLAG SGLFRMNVFA DLGLSDKLVV MQDASGQHRL WVRNSGSEPA SANTLLL VQT
 PRGSAATFTL ANKDGKVDIG TYRYRLAANG NGQWSLV[GAK APPAPKPAPQ PGPQPQPPQ
 POPEAPAPQP PAGRELSAA]**A NAAVNTGGVG LASTLWYAES NALSKRLGEL
 RLNPDAGGAW GRGFAQRQQL DNRAGRRFDQ KVAGFELGAD HAVAVAGGRW HLGGLAGYTR
 GDRGFTGDGG GHTDSVHVGG YATYIADSGF YLDATLRASR LENDFKVAGS DGYAVKGYR
 THGVGASLEA GRRFTHADGW FLEPQAE LAV FRAGGGAYRA ANGLRVRDEG GSSVLGRLGL
 EVGKRIELAG GRQVQPYIKA SVLQEFDGAG TVHTNGIAHR TELRGTRAE L GLGMAAALGR
 GHSLYASYEY SKGPKLAMPW TFHAGYRYSW

* 第1領域

** 第2領域

B. パラ百日咳菌 p.70 遺伝子 [配列番号3]

atcgatgatg cgctcgctgta acacggcaaa taccgtgcat tgcagcgggt ctggatggcg
 ttcttcgtac gtttgctgcg cccattcttc cctgttccat cgcggtgcyg gcatggcggg
 cgtctgctct tcaaccggca tccaatgaac atgtctctgt cacgcattgt caaggcggcg
 cccctgogcc gcaccacact ggccatggcg ctgggcgcgc tgggcgccgc gcccgccgcg
 tacgccgact ggaacaacca gtccatcatc aaggccggcg agcgcagca cggcatccac
 atcaagcaaa gcgatggcgc cggcgtacgg accgccaccg gaacgacat caaggtaagc
 ggtcgtcagg cccagggcgt cctgctggaa aatcccgcgg ccgagctgcy gttccagaac
 ggcagcgtca cgtcttcggg acagctgttc gacgaaggcg tccggcgctt tctgggcacc
 gtcaccgtca aggccggcaa gctggctgcc gatcacgcca cgctggccaa cgtcagcgac
 acccgggacg acgacggcat cgcgctctat gtggccggcg agcaggccca ggccagcatc
 gcgacagca ccctgcaggg cgcggggcggc gtgcgggtcg agcgcggcgc caatgtcagc
 gtccaacgca gcaccatcgt tgacgggggc ttgcatatcg gcaccctgca gccgctgcag

ccggaagacc ttccgcccag ccgggtggtg ctgggcgaca ccagcgtgac cgccgtgccc
gccagcggcg cgcccgggc ggtgtttgta ttcggggcca atgagcttac ggttgatggc
gggcacatca ccggggggcg ggcagcgggg gtggcgcca tggacggggc gatcgtgcat
ctg[cagcgcg cgacgatacg gcggggggac gcgcctgccg gcggtgcggt tccagggcgt
gcggttcccg gcggtgccgt tcccggcggc ttcggccccc tccttgacgg ctggtatggc
gtggatgtat cggactccac cgtggacctc gctcag]*tcga tcgtcgaggc
gccgcagctg ggcgccgca tccggggcggg ccgcggcgcc agggtgacgg tgcggggcgg
cagcttgtcc gcaccgacg gcaatgtcat cgagaccggc ggcggtgcgc gtcgcttccc
gcctccggcc tcgcccctgt cgatcacctt gcaggcgggc gcacggggcg aggggagggc
gctgctgtac cgggtcctgc cggagcccgt gaagctgacg ctggcggggc gcgccaggg
gcagggcgac atcgtcgca cggagctgcc tcccattcca ggcgcgtcga gcgggcccgt
cgacgtggcg ctggccagcc aggcccgatg gacgggcgct acccgcgcgg tcgactcgct
gtccatcgac aacgccacct gggtcatgac ggacaactcg aacgtcggcg cgctgcggct
ggccagcgac ggcagcgtcg atttccagca gccggccgaa gctggggcgg tcaaggtcct
gatggtcgat acgctggcgg gttcggggct gttccgcatg aatgtcttcg cggacctggg
gctgagcgac aagctggtcg tcatgcggga cgccagcggc cagcacaggc tgtgggtccg
caacagcggc agcgagccgg ccagcggcaa caccatgctg ctggtgcaga cgccacgagg
cagcgcggcg

* 第1領域

acctttaccc ttgccaacaa ggacggcaag gtogatatcg gtacctaccg ctatcgattg
 gccgccaacg gcaatgggca gtggagcctg gtg [ggcgcga aggcgccgcc ggcgccaag
 cccgcgcgc agcccgggtcc ccagcccggc ccccagccgc cgcagccgcc gcagccgccg
 cagccgccgc agccgccgca gccgccacag aggcagccgg aagcgcggc gccgcaaccg
 ccggcgggca gggagttgtc cgccgcc]**gcc aacgcggcgg tcaacacggg
 tggggtgggc ctggccagca cgctctggta cgccgaaagc aatgcgttgt ccaagcgcct
 gggcgagttg cgctgaatc cggacgccgg cggcgcttgg ggccgcggct tcgcgcaacg
 ccagcaactg gacaaccgcg ccgggcggcg cttcgaccag aaggtggccg gcttcgagct
 gggcgccgac cacgcggtgg cggtgccggc cgggcgctgg cacctgggcg ggctggccgg
 ctatacgcgc ggcgaccgcg gctttaccgg cgacggcggc ggccacaccg acagcgtgca
 tgtcgggggc tatgccacct atatcgcaa cagcggtttc tacctggacg cgacgctgcg
 cgccagccgc ctcgaaaatg acttcaaggc ggcgggcagc gatgggtacg cggcgaaggg
 caagtaccgc acccatgggg taggcgtctc gctcgaggcg ggccggcgct tcgcccagtc
 cgacggctgg ttctcgagc cgcaggccga gctggcggtg ttccgggtcg gggcggtgc
 gtaccgcgc gccaatggcc tgcgggtgcg cgacgaaggc ggccagctcg tgctgggtcg
 cctgggcctg gaggtcggca agcgcacgca actggcaggc ggccagcagg tgcagccata
 catcaaggcc agcgtggtgc aggagttcga cggcgcggtt acggtacgca ccaacggcat
 cgcgcacgca accgaaactgc gcggcacgcg cgccgaaactg ggccctgggca tggccgccc
 gctgggcccgc ggccacagcc tgtatgcctc gtacgagtac tccaagggcc cgaagctggc
 catgccgtgg accttccacg cgggctaccg gtacagctgg taaagcgaga agggctccatc
 ccccgcggag gagtttttcc tggagggttg ccggtgccag tctccaggct caggcggcca
 gggcctgcgg gccgggcagg ccgtgctggt gctggccgaa ccattgcaca ggggtgttcgg
 ccaagggcgg cgacttcgcc gatgaccagc aacgccgggg ggcgcacgct gcgcccgcgc
 gcgatc

** 第1領域

B. パラ百日咳菌 p.70タンパク質[配列番号6]

MNMSLSRIVK AAPLRRTTLA MALGALGAAP AAYADWNNQS IIKAGERQHG IHIKQSDGAG
 VRTATGTTIK VSGRQAQGV LLENPAAELRF QNGSVTSSGQ LFDEGVRRFL GTVTVKAGKL
 VADHATLANV SDTRDDDGIA LYVAGEQAQA SIADSTLQGA GGVRVERGAN VTVQRSTIVD
 GGLHIGTLQP LQPEDLPPSR VVLGDTSVTA VPASGAPAAV FVFGANELTV DGGHITGGRA
 AGVAAMDGAI VHL[QRATIRR GDAPAGGAVP GGAVPPGAVP GGFGLLDGW YGVDVSDSTV
 DLAQ]*SIVEAP QLGAAIRAGR GARVTVSGGS LSAPHGNVIE TGGGARRFPP
 PASPLSITLQ AGARAQGRAL LYRVLPEPVK LTLAGGAQGO GDIVATELPP IPGASSGPLD
 VALASQARWT GATRAVDSLS IDNATWVMTD NSNVGALRLA SDGSVDFQOP AEAGRFKVLM
 VDTLAGSGLF RMNVFADLGL SDKLVVMRDA SGQHRLWVRN SGSEPASGNT MLLVQTPRGS
 AATFTLANKD GKVDIGTYRY RLAANGNGQW SLV[GAKAPPA PKPAPQPGPO PGPQPPQPPQ
 PPQPPQPPQP PQRQPEAPAP QPPAGRELSA A]**ANAAVNTGG VGLASTLWYA
 ESNALSKRLG ELRLNPDAGG AWGRGFAQRQ QLDNRAGRRF DQKVAGFELG ADHAVAVAGG
 RWHLGGLAGY TRGDRGFTGD GGGHTDSVHV GGYATYIANS GFYLDATLRA SRLENDFKVA
 GSDGYAVK GK YRTHGVGVSL EAGRRAFAHAD GWFLEPQAE AVFRVGGGAY RAANGLRVRD
 EGGSSVLGRL GLEV GKRIEL AGGRQVQPYI KASVLQEFDG AGTVRTNGIA HRTELRGTRA
 ELGLGMAAAL GRGHSLYASY EYSGPKLAM PWTFHAGYRY SW

* 第1領域

** 第2領域

【0092】

【表4】

参考文献

The following references have been cited in this application. The entire disclosure of each of these references is relied upon and incorporated by reference herein.

1. Arico, B., R. Gross, J. Smida, and R. Rappuoli. 1987. Evolutionary relationships in the genus *Bordetella*. *Mol. Microbiol.* 1:301-308.
2. Arico, B., J. F. Miller, C. Roy, S. Stibitz, D. Monack, S. Falkow, R. Gross, and R. Rappuoli. 1989. Sequences required for expression of *Bordetella pertussis* virulence factors share homology with prokaryotic signal transduction proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86:6671-6675.
3. Boursaux-Eude, C., G. Thiberge, G. Carletti, and N. Guiso. 1999. Intranasal murine model of *Bordetella pertussis* infection: II. Sequence variation and protection induced by a tricomponent acellular vaccine. *Vaccine. Infect. Immun.* 56:3189-3195.
4. Brennan, M. J., Z. M. Li, J. L. Cowell, M. E. Bisher, A. C. Steven, P. Novotny, and C. R. Manclark. 1988. Identification of a 69-kilodalton nonfimbrial protein as an agglutinin of *Bordetella pertussis*. *Infect. Immun.* 56:3189-3195.
5. Charles, I. G., G. Dougan, D. Pickard, S. Chatfield, M. Smith, P. Novotny, P. Morrissey, and N. F. Fairweather. 1989. Molecular cloning and characterization of protective outer membrane protein P.69 from *Bordetella pertussis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86:3554-3558.
6. Charles, I. G., J. L. Li, M. Roberts, K. Beesley, M. Romanos, D. J. Pickard, M. Francis, D. Campbell, G. Dougan, M. J. Brennan, C. R. Manclark, M. A. Jensen, I. Heron, A. Chubb, P. Novotny, and N. F. Fairweather. 1991. Identification and characterization of a protective immunodominant B cell epitope of pertactin (P.69) from *Bordetella pertussis*. *Eur. J. Immunol.* 21:1147-1153.
7. Goodnow, R.A. 1980. Biology of *Bordetella bronchiseptica*. *Microbiol. Rev.* 44:722-738.
8. Gueirard, P., C. Weber, A. Le Coustumier, and N. Guiso. 1995. Human *Bordetella bronchiseptica* infection related to contact with infected animals: persistence of bacteria in host. *J. Clin. Microbiol.* 33:2002-2006.

9. Hewlett, E. L., and J. D. Cherry. 1997. New and improved vaccines against pertussis, vol. 2nd. Coordinating eds., M. M. Levine, G. C. Woodrow, J. B. Kaper, and G. S. Cobon. Marcel Dekker, New York.
10. Higgins, D. G., and P. M. Sharp. 1988. CLUSTAL: a package for performing multiple sequence alignment on a microcomputer. *Gene*. 73:237-244.
11. Khelef, N., B. Danve, M. J. Quentin-Millet, and N. Guiso. 1993. *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis*: two immunologically distinct species. *Infect. Immun.* 61:486-490.
12. Kobisch, M., and P. Novotny. 1990. Identification of a 68-kilodalton outer membrane protein as the major protective antigen of *Bordetella bronchiseptica* by using specific-pathogen-free piglets. *Infect. Immun.* 58:352-357.
13. Leininger, E., M. Roberts, J. G. Kenimer, I. G. Charles, N. Fairweather, P. Novotny, and M. J. Brennan. 1991. Pertactin, an Arg-Gly-Asp-containing *Bordetella pertussis* surface protein that promotes adherence of mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88:345-349.
14. Li, J., N. F. Fairweather, P. Novotny, G. Dougan, and I. G. Charles. 1992. Cloning, nucleotide sequence and heterologous expression of the protective outer-membrane protein P.68 pertactin from *Bordetella bronchiseptica*. *J. Gen. Microbiol.* 138:1697-1705.
15. Li, L. J., G. Dougan, P. Novotny, and I. G. Charles. 1991. P.70 pertactin, an outer-membrane protein from *Bordetella parapertussis*: cloning, nucleotide sequence and surface expression in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 5:409-417.
16. Montaraz, J. A., P. Novotny, and J. Ivanyi. 1985. Identification of a 68-kilodalton protective protein antigen from *Bordetella bronchiseptica*. *Infect. Immun.* 47:744-751.
17. Mooi, F. R., H. van Oirschot, K. Heuvelman, H. G. J. van der Heide, W. Gaastra, and R. J. L. Willems. 1998. Polymorphism in the *Bordetella pertussis* virulence factors P.69/pertactin and pertussis toxin in the Netherlands: Temporal trends and evidence of vaccine-driven evolution. *Infect. Immun.* 66:670-675.

18. Novotny, P., A. P. Chubb, K. Cownley, J. A. Montaraz, and J. E. Beesley. 1985. *Bordetella* adenylate cyclase: a genus specific protective antigen and virulence factor. *Develp. Biol. Standard.* 61:27-41.
19. Novotny, P., M. Kobisch, K. Cownley, A. P. Chubb, and J. A. Montaraz. 1985. Evaluation of *Bordetella bronchiseptica* vaccines in specific-pathogen-free piglets with bacterial cell surface antigens in enzyme-linked immunosorbent assay. *Infect. Immun.* 50:190-198.
20. Shahin, R. D., M. J. Brennan, Z. M. Li, B. D. Meade, and C. R. Manclark. 1990. Characterization of the protective capacity and immunogenicity of the 69-kD outer membrane protein of *Bordetella pertussis*. *J. Exp. Med.* 171:63-73.
21. Stibitz, S., W. Aaronson, D. Monack, and S. Falkow. 1989. Phase variation in *Bordetella pertussis* by frameshift mutation in a gene for a novel two-component system. *Nature.* 338:266-269.
22. Woolfrey, B. F., and J. A. Moody. 1991. Human infections associated with *Bordetella bronchiseptica*. *Clin. Microbiol. Rev.* 4:243-255.

【図面の簡単な説明】

【図1 a】

気管支敗血症菌のペルタクチンという外膜タンパク質中の、反復の2領域、すなわち第1領域および第2領域を示す地図である。

【図1 b】

気管支敗血症菌の異なる菌株のペルタクチンという外膜タンパク質の第1領域のアライメントを示す図である。

【図1 c】

気管支敗血症菌の異なる菌株のペルタクチンという外膜タンパク質の第2領域のアライメントを示す図である。

【配列表】

B. bronchiseptica p.68 pertactin gene [SEQ ID NO:1]

atcgatgatg cgtcgtgta acacggcaaa taccgtgcat tgcagcgggt ctggatggcg
 ttcttcgtac gtttgctgog occattcttc cctgttccat cgcggtgogg ccatggcggg
 cgtctgctct tcaccoggca tccaatgaac atgtctctgt caccgattgt cttggcggcg
 cccctgcgcc gcaccacact ggccatggcg ctgggcgcgc tgggcgccgc gcccgccgcg
 tacgccgact ggaacaacca gtccatcatc aaggccggcg agcggccagca cggcatccac
 atcaagcaaa gcgatggcgc cggcgtacgg accgccaccg gaaogacat caaggtaagc
 ggtcgtcagg cccagggcgt cctgctggaa aatcccggcg ccgagctgcg gttccagaac
 ggacgcgtca cgtcttcggg acagctgttc gacgaaggcg tccggcgctt tctgggcacc
 gtcaccgtca aggccggcaa gctggtcgcc gatcacgcca cgtcggccaa cgtcagcgac
 acccgggacg acgaoggcac cgcgctctat gtggccggcg agcaggccca ggccagcatc
 gccgacagca ccctgcaggg cgcgggcggc gtgcgggtcg agcgcggcgc caatgtcacg
 gtccaacgca gcaccatcgt tgacgggggc ttgcatatcg gcaacctgca gccgctgcag
 ccggaagacc ttccgcccag ccgggtggtg ctgggcgaca ccagcgtgac cgcctgccc
 gccagcggcg cgcggcggc ggtgtctgta ttgggggcca atgagcttac ggttgatggc
 ggccacatca ccggggggcg ggcagcgggg gtggcggcca tggacggggc gatcgtgcat
 ctg[cagcgcg cgaagatacg gcggggggac gcgcctgccg gcggtgccgt tccaggcggg
 gctgttcccg gcggcttcgg cccctcctt gacggctggt atggcgtgga tgtatcggat
 tccaccgtgg acctcgtca g]*tcgatcgtc gaggcgccgc agctgggcgc
 cgcgatccgg gcgggccgcg gcgccagggt gacgggtgctg ggccggcagct tgtccgcacc
 gcacggcaat gtcatcgaga ccggcggcgg cgcgcgtcgc ttcccgcctc cggcctcgcc
 cctgtcgatc accttgacgg cgggcgcacg ggccgagggg agggcgctgc tgtaccgggt
 cctgccggag cccgtgaagc tgacgctggc gggcggcgcc caggggcagg gcgacatcgt
 cgcgacggag ctgcctccca ttccaggcgc gtcgagcggg ccgctcgacg tggcgtggc
 cagccaggcc

* Region I

cgatggacgg ggcctaccog cgcggctgac tcgctgtcca tcgacaacgc cacctgggtc
 atgacggaca actcgaacgt cggcgcgctg cggctggcca ggcacggcag cgtcgatttc
 cagcagccgg ccgaagctgg gcggttcaag tgctgatgg tcgatacgt ggcgggttcg
 gggctgttcc gcatgaatgt cttcgcggac ctggggctga gcgacaagct ggtcgtcatg
 cgggacgcca gggccagca caggctgttg gtccgcaaca gcggcagcga gccggccagc
 ggcaacacca tgctgctggg gcagacgcca cgaggcagcg cggcgacctt tacccttgc
 aacaaggacg gcaaggtcga tatcggtagc tacccgtatc gattggccgc caacggcaat
 gggcagtgga gctcgtgg [gg cgcgaaggcg ccgccggcgc ccaagcccgc gccgcagccc
 ggtccccagc ccggtcccc gcccgcgag ccgccgcagc cgcgcagcc gccacagagg
 cagccggaag cgcggcgcc gcaaccgccc gcgggcaggg agttgtccgc
 cgcc]**gccaac gcggcgggtca acacgggtgg ggtgggctg gccagcacgc
 tctggtacgc cgaaagcaat gcgtgtcca agcgcctggg cgagttgcgc ctgaatccgg
 acgccggcgg cgttggggc cgcggcttcg cgcaacgcca gcaactggac aaccgcgccg
 ggcggcgctt cgaccagaag gtggccggtc tcgagctggg cgcgcaccac gccgtggcgg
 tggccggcgg gcgctggcac ctgggcgggc tggccggcta tacgcgcggc gaccgcggct
 ttaccggcga cggcggcggc cacaccgaca gcgtgcatgt cgggggctat gccacctata
 tcgccaacag cggtttctac ctggacgoga cgtgcgcgc cagccgcctc gaaaatgact
 tcaaggtagc gggcagcgat gggtaacggg tcaagggcaa gtaccgcacc catgggtag
 gcgcctcgtc cgaggcgggc cggcgttcg cccatgccga cggctggttc ctcgagccgc
 aggccgagct ggcgggtgtc cgggtcggcg gcggttcgta ccgcgcggcc aatggcctgc
 gggtagcoga cgaaggcggc agctcggtag tgggtcgct gggcctggag gtcggcaagc
 gcatcgaact ggcaggcggc aggcaggtag agccatacat caaggccagc gtgctgcagg
 agttcgacgg cgcgggtacg gtacgcacca acggcatcgc gcaccgcacc gaactgcgcg
 gcacgcgcgc cgaactgggc ctgggcagtg ccgccgcgct gggcgcggc cacagcctgt
 atgcctcgtc cgagtaactc aaggcccca agctggccat gccgtggacc ttccacgcgg
 gctaccggtc cagctggtaa

** Region II

agcgagaagg gtccatcccc ccgcggggga gattttcctg gaggttgcc ggtgccagtc
 tccaggctca ggcggccagg gcgtgcgggc cgggcaggcc gtgctggtgc tggccaacc

B. bronchiseptica p.68 pertactin protein [SEQ ID NO:4]

MNMSLSRIVL AAPLRRTTLA MALGALGAAP AAYADWNNQS IIKAGERQHG IHIKQSDGAG
 VRTATGTTIK VSGRQAQGVL LENPAAELRF QNGSVTSSGQ LFDEGVRRFL GTVTVKAGKL
 VADHATLANV SDTRDDDGIA LYVAGEQAQA SIADSTLQGA GGVRVERGAN VTVQRSTIVD
 GGLHIGTLQP LQPEDLPPSR VVLGDTSVTA VPASGAPAAV SVFGANELTV DGGHITGGRA
 AGVAAMDGAI VHL[QRATIRR GDAPAGGAVP GGAVPGGFDP LLDGWYGVDP
 SDSTVDLAQ]*S IVEAPQLGAA IRAGRGARVT VSGGSLSPH GNVIETGGGA
 RRFPPASPL SITLQAGARA QGRALLYRVL PEPVKLTLAG GAQQQGDIVA TELPPIPGAS
 SGPLDVALAS QARWTGATRA VDSLSDNAT WVMTDNSNVG ALRLASDGSV DFQQPAEAGR
 FKCLMVDTLA GSGLFRMNVF ADLGLSDKLV VMRDASGQHR LLVRNSGSEP ASGNTMLLVQ
 TPRGSAATFT LANKDGKVDI GTYRYRLAAN GNGQWSLV[GA KAPPAPKPAP QPGPQPGPQP
 PQQPPQPPPP QRQPEAPAPQ PPAGRELSAA]** ANAAVNTGGV GLASTLWYAE
 SNALSKRLGE LRLNPDAGGA WGRGFAQRQQ LDNRAGRREF QKVAGFELGA DHAVAVAGGR
 WHLGGLAGYT RGRGFTGDG GGHTDSVHVG GYATYIANSV FYLDATLRAS RLENDFKVAG
 SDGYAVKGY RTHGVGASLE AGRRFAHADG WFLEPQAELA VFRVGGGSYR AANGLRVRDE
 GGSSVLGRLG LEVGKRIELA GGRQVQPYIK ASVLQEPDGA GTVRTNGIAH RTELGRTRAE
 LGLGMAAALG RGHSLYASYE YSKGPKLAMP WTFHAGYRYS W

* Region I

** Region II

B. pertussis p.69 gene [SEQ ID NO:2]

atgaacatgt ctctgtcacg cattgtcaag ggggcccc tgcgcgcac cacgctggcc
 atggcgctgg gcgcgctggg cgccgccccg gggcgcatg ccgactggaa caaccagtcc
 atcgtcaaga ccggtgagcg ccagcatggc atccatatcc agggctccga cccgggcggc
 gtacggaccg ccagcggaac caccatcaag gtaagcggcc gtcaggccca gggcatcctg
 ctagaaaatc ccgcgccga gctgcagttc cggaacggca gtgtcacgtc gtcgggacag
 ttgtccgacg atggcatccg gcgctttctg ggcaccgtca ccgtcaaggc cggcaagctg
 gtcgccgatc acgccacgct ggccaacggt ggcgacacct gggacgacga cggcatcgcg
 ctctatgtgg ccggcgaaca ggcccaggcc agcatcgccg acagaccct gcaggcgct
 gggcgctgc agatcgagcg cggcgccaat gtcacggcc aacgcagcgc catcgtcgac
 gggggcttgc atatcggcgc cctgcagtca ttgcagccgg aagacctcc gccagccgg
 gtggtgctgc gcgacaccaa cgtgacggcc gtgcccgcca gggcgcgcc cgcggcggtg
 tctgtgttgg gggccagtga gcttacgctc gacggcgggc acatcaccgg cggcgggca
 gcgggggtg cggccatgca agggcggtc gtgcatctg [c agcgcgcgac gatacggcgc
 ggggacgccc ctgccggcgg tgcggtccc ggcggtgccc ttcccgtgg tgcggtccc
 ggcggtctcg gtcccggcgg cttcggtccc gtcccgacg gctggtatgg cgtggacgta
 tcgggctcca gcgtggagct cgcccag]*tcg atcgtcgagg cgccggagct
 gggcgccga atccgggtgg gcccgggcgc cagggtgacg gtgtcggcg gcagcttgtc
 cgcaccgac ggcaatgtca tcgagaccgg cggcgcgct cgcttgcgc ctcaagccgc
 gccctgtcg atcaccttgc aggcggcgc gcatgccag gggaaagcgc tgetgtaccg
 ggtctgccg gagccgtga agctgacgct gaccgggggc gccgatgcgc agggcgacat
 cgtcgcgacg gagctgcct ccattcccgg cacgtcgatc gggcgcctcg acgtggcgt
 ggccagccag gcccgatgga cggcgctac ccgcgggtc gactcgtgt ccatcgaaa
 cgccacctgg gtcatgacgg acaactcgaa cgtcgggtgc ctacggctgg ccagcgacgg
 cagcgtcgat

* Region I

ttccagcagc cggcogaagc tgggcgggtc aaggtcctga cggcacaatac gctggcgggt
 tcggggctgt tccgcatgaa tgtcttcgcg gacctggggc tgagcgacaa gctggctcgtc
 atgcaggacg ccagcggcca gcacaggctg tgggtccgca acagcggcag cgagccggcc
 agcgcacaaca ccctgctgct ggtgcagacg ccacgaggca gcgcggcgac cttaccctt
 gccacaagc acggcaaggt cgatatcggc acctatcgtc atcgattggc cgccaacggc
 aatgggcagt ggagcctggc g[ggcgcgaag gcgcggcgg cgccaagcc cgcgccgag
 ccgggtcccc agcgcgcgca gccgcgcgag ccgcagccgg aagcgcggc gccgcaaccg
 ccggcgggca gggagttgtc cgccgcc]**gcc aacgcggcgg tcaacacggg
 tggggtgggc ctggccagca cgctctggta cgccgaaagc aatgcgttgt ccaagcgcct
 gggcgagttg cgcctgaatc cggacgcggc cggcgcctgg ggccgcggct tcgcgcaacg
 ccagcagctg gacaaccgcg ccgggcggcg cttcgaccag aaggtggccg gcttcgagct
 gggcgcgcgac cacgcggtgg cggcggcggc cggacgcctg cacctgggcg ggctggccgg
 ctatacgcgc ggcgaccgcg gcttcaccgg cgacggcggc ggccacaccg acagcgtgca
 tgtcgggggc tatgccacat atatcgccga cagcgggttc tacctggacg cgacgcctcg
 cgccagccgc ctggagaatg acttcaaggt ggcgggcagc gacgggtacg cggcgaaggc
 caagtaccgc acccatgggg tgggcgcctc gctcgaggcg ggccggcgct ttaccatgc
 cgacggctgg ttctcagac cgcaggccga gctggcggtc ttccggggcc gcggcggtgc
 gtaccgcgcg gccaacggcc tgcgggtgcg cgacgaaggc ggccagctcgg tgctgggtcg
 cctgggcctg gaggtcggca agcgcacgca actggcaggc ggccagggcagg tgcagccata
 catcaaggcc agcgtgctgc aggagttcga cggcgcgggt acggtacaca ccaacggcat
 cgcgcacccg accgaactgc gcggcacgcg cgccgaactg ggccctgggca tggccgcgcg
 gctggggcgc ggccacagcc tgtatgcctc gtacgagtac tccaagggcc cgaagctggc
 catgcgctgg accttccacg cgggctaccg gtacagctgg taa

** Region II

B. pertussis p.69 protein [SEQ ID NO:5]

MNMSLSRIVK AAPLRRTLA MALGALGAAP AAHADWNNQS IVKTGERQHG IHIQGSDFGG
 VRTASGTTIK VSGRQAQGIL LENPAAELQF RNGSVTSSGQ LSDDGIRRFL GTVTVKAGKL
 VADHATLANV GDTWDDDGIA LYVAGEQAQA SIADSTLQGA GGVQIERGAN VTVQRSAIVD
 GGLHIGALQS LQPEDLPPSR VVLRDTNVTA VPASGAPAAV SVLGASELTL DGGHITGGRA
 AGVAAMQGAV VHL[QRATIRR GDAPAGGAVP GGAVPGGAVP GGFGPGGFGP VLDGWYGV DV
 SGSSVELAQ]*S IVEAPELGAA IRVGRGARVT VSGGSLSAPH GNVIETGGAR
 RFAPQAAPLS ITLQAGAHAQ GKALLYRVLP EPVKLTLTGG ADAQGDIVAT ELPSIPGTSI
 GPLDVALASQ ARWTGATRAV DSLSIDNATW VMTDNSNVGA LRLASDGSVD FQQPAEAGRF
 KVLTVNTLAG SGLFRMNVFA DLGLSDKLVV MQDASGQHRL WVRNSGSEPA SANTLLLVQT
 PRGSAATFTL ANKDGKVDIG TYRYRLAANG NGQWSLV[GAK APPAPKPAPQ PGPPPPPPQ
 PQPEAPAPQP PAGRELSAA]**A NAAVNTGGVG LASTLWYAES NALSKRLGEL
 RLNPDAGGAW GRGFAQRQOL DNRAGRFRDQ KVAGFELGAD HAVAVAGGRW HLGGLAGYTR
 GDRGFTGDGG GHTDSVHVGG YATYIADSGF YLDATLRASR LENDFKVAGS DGYAVKGYR
 THGVGASLEA GRRFTHADGW FLEPQAE LAV FRAGGAYRA ANGLRVRDEG GSSVLGRLGL
 EVGKRIELAG GRVQPYIKA SVLQEFDGAG TVHTNGIAHR TELRGTRAE L GLGMAAALGR
 GHSLYASYEY SKGPKLAMPW TFHAGYRYSW

* Region I

** Region II

B. parapertussis p.70 gene [SEQ ID NO:3]

atcgatgatg cgtcgcgtgta acacggcaaa taccgtgcat tgcagcgggt ctggatggcg
 ttcttcgtac gtttgcgtcg cccattcttc cctgttccat cgcggtgccc gcatggcggg
 cgtctgctct tcacccggca tccaatgaac atgtctctgt cacgcattgt caaggcggcg
 cccctgcgcc gcaccacact ggccatggcg ctgggcgcgc tgggcgcgcg gcccgccgcg
 tacgccgact ggaacaacca gtccatcadc aaggccggcg agcgcagca cggcatccac
 atcaagcaaa gcgatggcgc cggcgtacgg accgccaccg gaacgacat caaggaagc
 ggtcgtcagg cccagggcgt cctgctggaa aatcccgcgg ccgagctgcg gttccagaac
 ggcagcgtca cgtcttcggg acagctgttc gacgaaggcg tccggcgctt tctgggcacc
 gtcaccgtca aggcggcaa gctggcgcg gatcacgcca cgctggccaa cgtcagcgac
 acccgggacg acgacggcat cgcgctctat gtggccggcg agcaggccca ggccagcacc
 gccgacagca ccctgcaggg cgcgggcggc gtgcgggtcg agcgcggcgc caatgtcacg
 gtccaacgca gcaccatcgt tgacgggggc ttgcatatcg gcaccctgca gccgctgcag

ccggaagacc ttccgcccag ccgggtggtg ctgggcgaca ccagcgtgac cgccgtgccc
 gccagcggcg cgcccgcggc ggtgtttgta ttcggggcca atgagcttac ggttgatggc
 gggcacatca ccggggggcg ggcagcgggg gtggcggcca tggacggggc gatcgtgcat
 ctg[cagcgcg cgacgatacg gcggggggac gcgcctgccg gcggtgcggt tccaggcggg
 gcggttcccg gcggtgcggt tcccggcggc ttcggccccc tcttgacgg ctggtatggc
 gtggatgtat cggactccac cgtggacctc gctcag]*tcga tgcgcgaggg
 gccgcagctg ggcgcgcga tccgggcggg ccgcggcgcc aggggtgacgg tgcggggcg
 cagcttgtcc gcaccgcaag gcaatgtcat cgagaccggc ggcgggtgcgc gtcgcttccc
 gcctccggcc tcgcccctgt cgatcacctt gcaggcgggc gcacggggcg aggggagggc
 gctgctgtac cgggtcctgc cggagcccggt gaagctgacg ctggcggggc gcgcccaggg
 gcagggcgac atcgtcgcga cggagctgcc tccattcca ggcgcgtcga gcgggcccgt
 cgacgtggcg ctggccagcc aggcccgatg gacgggcgct acccgcgcgg tcgactcgct
 gtccatcgac aacgccacct gggatcatgac ggacaactcg aacgtcggcg cgtgcggct
 ggccagcgac ggcagcgtcg atttccagca gccggccgaa gctgggagggt tcaaggctct
 gatggtcgat acgctggcg gttcggggct gttccgcacg aatgtcttcg cggacctggg
 gctgagcgac aagctggtcg tcatgcggga cgcagcggc cagcacaggc tgtgggtccg
 caacagcggc agcagaccgg ccagcggcaa caccatgctg ctggtgcaga cgccacgagg
 cagcgcggcg

* Region I



acctttaccc ttgccaacaa ggacggcaag gtcgatatcg gtacctaccg ctatcgattg
 gccgccaacg gcaatgggca gtggagcctg gtg[ggcgcga aggcgcgcgc gccgcccagg
 cccgcgcgc agcccgggcc ccagcccggc cccagcgcgc cgcagcgcgc gcagccgcgc
 cagccgcgc agccgcgcga gccgccacag aggcagccgg aagcgcgcgc gccgcaaccg
 ccggcgggca gggagttgtc cgccgcc]**gcc aacgcggcgg tcaacacggg
 tggggtgggc ctggccagca cgctctggta cgccgaaagc aatgcggtgt ccaagcgcct
 gggcgagttg cgcctgaatc cggacgcgcgc cggcgccttg gccgcgcgcct tcgcgcaacg
 ccagcaactg gacaaccgcgc ccgggcgggc cttegaccag aaggtggcgc gcttegagct
 gggcgcgcgc cacgcggtgg cggtgccgcgc cgggcgcctgg caacctgggcgc ggctggccgc
 ctatacgcgc ggcgaccgcgc gctttaccgc cgacggcgcgc gccacaccgc acagcgtgca
 tgtcgggggc tatgccacct atatgccaa cagcggtttc tacctggacg cgacgctgcg
 cgccagccgc ctcgaaaatg acttcaaggc gccgggcagc gatgggtacg cggccaaggg
 caagtaccgc acccatgggg tagggtctc gctcgaggcg gccgggcgcct tcgccatgc
 cgacggctgg ttccctcagc cgcaggccga gctggcggtg ttccgggtcg gccgcggtgc
 gtaccgcgc gccaatggcc tgcgggtgcgc cgaacgaaggc gccagctcgc tgctgggtcg
 cctgggcctg gaggtcggca agcgcacgca actggcaggc gccagggcagg tgcagccata
 catcaaggcc agcgtgtgc aggagttcga cggcgcgggt acggtacgca ccaacggcat
 cgcgcacgc accgaactgc gcggcacgcgc cgcgaactg gccctgggca tggccgcgcgc
 gctgggcgcgc gccacagcc tgtatgcctc gtacgagtac tccaagggcc cgaagctggc
 catgccgtgg accttccacg cgggctaccg gtacagctgg taaagcgaga agggccatc
 cccgcgcgag gagttttcc tggaggttg cgggtgccag totccaggct caggcggcca
 gggcctgcgc gccgggcagg ccgtgctggt gctggccgaa ccattgcaca ggggtgttcgc
 ccaagggcgc gcacttcgcc gatgaccagc aacgcggggg gccgcacgct gcgcgggcgc
 gcgac

** Region I

B. paraptussis p.70 protein [SEQ ID NO:6]

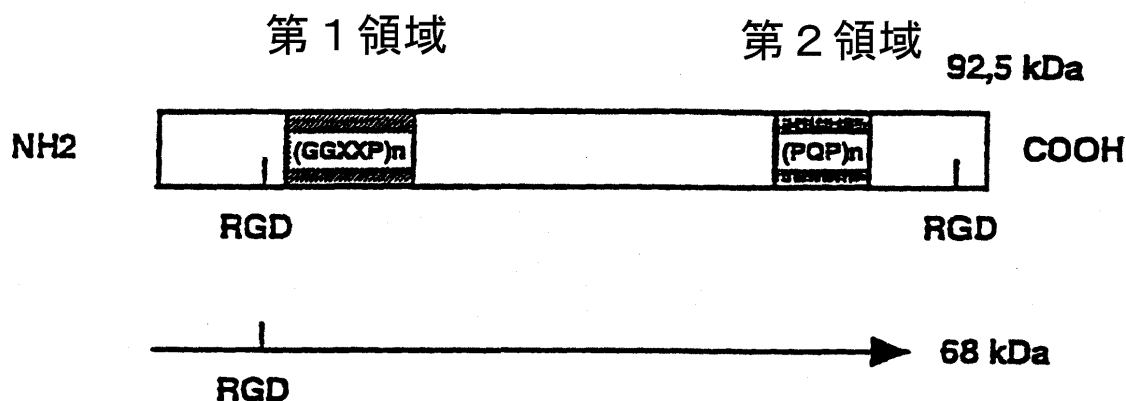
MNMSLSRIVK AAPLRRTTLA MALGALGAAP AAYADWNNQS IIKAGERQHG IHIKQSDGAG
 VRTATGTTIK VSGRQAQGV LLENPAEELRF QNGSVTSSGQ LFDEGVRRFL GTVTVKAGKL
 VADHATLANV SDTRDDGGIA LYVAGEQAQA SIADSTLQGA GGVRVERGAN VTVQRSTIVD
 GGLHIGTLQP LQPEDLPPSR VVLGDTSVTA VPASGAPAAV FVFGANELTV DGGHITGGRA
 AGVAAMDGAI VHL[QRATIRR GDAPAGGAVP GGAVPGGAVP GGFGLLDGW YGVDVSDSTV
 DLAQ]*SIVEAP QLGAAIRAGR GARVTVSGGS LSAPHGNVIE TGGGARRFPP
 PASPLSITLQ AGARAQGRAL LYRVLPEPVK LTLAGGAQQG GDIVATELPP IPGASSGPLD
 VALASQARWT GATRAVDSLS IDNATWVMTD NSNVGALRLA SDGSVDFQQP AEAGRFKVLM
 VDTLAGSGLF RMNVFADLGL SDKLVVMRDA SGQHRLWVRN SGSEFASGNT MLLVQTPRGS
 AATFTLANKD GKVDIGTYRY RLAANGNQW SLV[GAKAPPA PKPAPQPGPQ PGPQPPQPPQ
 PPQPPQPPQ PQRQPEAPAP QPPAGRELSA A]**ANAAVNTGG VGLASTLWYA
 ESNALSKRLG ELRLNPDAGG AWGRGFAQRQ QLDNRAGRFR DQKVAGFELG ADHAVAVAGG
 RWHLGGLAGY TRGDRGFTGD GGGHTDSVHV GGYATYIANS GFYLDATLRA SRLENDFKVA
 GSDGYAVK GK YRTHGVGVSL EAGRFAHAD GWFLEPQAE L AVFRVGGGAY RAANGLRVRD
 EGGSSVLGRL GLEV GKRIEL AGGRQVQPYI KASVLQEPDG AGTVRTNGIA HRTELRGTRA
 ELGLGMAAAL GRGHSLYASY EYKGPKLAM PWTFHAGYRY SW

* Region I

** Region II

【図1 a】

気管支敗血症菌ペルタクチンの2つの領域



【図1 b】

気管支敗血症菌ペルタクチンの第1領域のマルチプルアライメント

I-1 QRATIRRGDAPAGGAVPGGAVPGGAVPG—————GFGPLLDGWYGVDVSDSTVDLAQ (SEQ ID NO: 7)
 I-2 QRATIRRGDAPAGGAVPG—GAVPG—————GFGPLLDGWYGVDVSDSTVDLAQ (SEQ ID NO: 8)
 I-3 QRATIRRGDAPAGGGVPG—GAVPG—GFDPGGFGPGGFGPVLGDWYGVDVSGSTVELAQ (SEQ ID NO: 9)
prn1 QRATIRRGDAPAGGAVPG—GAVPG—GAVPGGFGPGGFGPVLGDWYGVDVSGSSVELAQ (SEQ ID NO: 10)
prn2 QRATIRRGDA?AGGAVPG—GAVPGGFGPGGFGPVLGDWYGVDVSGSSVELAQ (SEQ ID NO: 11)
prn3 QRATIRRGDAPAGGAVPG—GAVPG—GFGPGGFGPGGFGPVLGDWYGVDVSGSSVELAQ (SEQ ID NO: 12)
prn4 QRATIRRGDAPAGGAVPG—GAVPG—————GFGPGGFGPVLGDWYGVDVSGSSVELAQ (SEQ ID NO: 13)

***** ** * ***** **

【図1 c】

気管支敗血症菌ペルタクチンの第2領域のマルチプルアライメント

II-1 GAKAPPAPKPAPQPGPQP—QPPQPQP-PQRQP-EAPAPQPPAGRELSAA (SEQ ID NO: 14)
 II-2 GAKAPPAPKPAPQPGPQP—QPPQPQP-PQRQP-EAPAPQPPAGRELSAA (SEQ ID NO: 15)
 II-3 GAKAPPAPKPAPQPGPQP—QPPQPQP-PQRQP-EAPAPQPPAGRELSAA (SEQ ID NO: 16)
 II-4 GAKAPPAPKPAPQPGPQP—QPPQPQP-PQRQP-EAPAPQPPAGRELSAA (SEQ ID NO: 17)
 II-5 GAKAPPAPKPAPQPGPQP—QPPQPQP-PQRQP-EAPAPQPPAGRELSAA (SEQ ID NO: 18)
 II-6 GAKAPPAPKPAPQPGPQP—QPPQPQP-PQRQP-EAPAPQPPAGRELSAA (SEQ ID NO: 19)
 II-7 GAKAPPAPKPAPQPGPQP—QPPQPQP-PQRQP-EAPAPQPPAGRELSAA (SEQ ID NO: 20)
 II-8 GAKVPPAPKPAPQPGPQP—QPPQPQP-PQRQP-EAPAPQPPAGRELSAA (SEQ ID NO: 21)
 II-9 GAKVPPAPKPAPQPGPQP—QPPQPQP-PQRQP-EAPAPQPPAGRELSAA (SEQ ID NO: 22)
prn1 GAKAPPAPKPAPQPGPQP—QPPQPQP—QP-EAPAPQPPAGRELSAA (SEQ ID NO: 23)
prn6 GAKAPPAPKPAPQPGPQP—QPPQPQP—QP-EAPAPQPPAGRELSAA (SEQ ID NO: 24)

【國際調查報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		International Application No PCT/EP 01/06457
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC 7	C07K14/235 A61K39/10 A61K48/00 C12Q1/68	C12N15/31 A61K39/40 C07K16/12 G01N33/569
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C07K A61K C12N G01N C12Q		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, MEDLINE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	L.J. LI ET AL.: "P.70 pertactin, an outer membrane protein from Bordetella parapertussis: cloning, nucleotide sequence and surface expression in Escherichia coli" MOLECULAR MICROBIOLOGY, vol. 5, no. 2, 1991, pages 409-417, XP000283120	26, 28, 29, 32-42, 44, 46
Y	page 410, right-hand column, paragraph 2 -page 414, right-hand column, paragraph 1; figure 2 page 415, right-hand column, paragraph 3 --- -/-	1-25, 43, 45, 47-52
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents:		
'A' document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance 'E' earlier document but published on or after the International filing date 'L' document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) 'O' document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means 'P' document published prior to the International filing date but later than the priority date claimed		'*T' later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention '*X' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone '*Y' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. '*&' document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 19 July 2002		Date of mailing of the international search report 02. 08. 2002
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Montero Lopez, B

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 01/06457

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JINGLI LI ET AL.: "Cloning, nucleotide sequence and heterologous expression of the protective outer-membrane protein P.68 pertactin from Bordetella bronchiseptica" JOURNAL OF GENERAL MICROBIOLOGY, vol. 138, 1992, pages 1697-1705, XP000974978	26,28, 29, 32-42, 44,46
Y	page 1697, right-hand column, paragraph 2 -page 1698, left-hand column, paragraph 2; figure 1 page 1699, right-hand column, paragraph 4 -page 1703, right-hand column, last paragraph	1-25,43, 45,47-52
Y	--- NADIA KHELEF ET AL.: "Bordetella pertussis and Bordetella parapertussis: two immunologically distinct species" INFECTION AND IMMUNITY, vol. 61, no. 2, February 1993 (1993-02), pages 486-490, XP000971413 abstract page 486, right-hand column, paragraph 2 - paragraph 3 page 487, right-hand column, last paragraph -page 488, left-hand column, paragraph 1 page 488, right-hand column, last paragraph -page 489, right-hand column, last paragraph	1-25,43, 45,47-52
A	--- MOOI F R ET AL: "POLYMORPHISM IN THE BORDETELLA PERTUSSIS VIRULENCE FACTORS: P69/PERTACTIN AND PERTUSSIS TOXIN IN THE NETHERLANDS: TEMPORAL TRENDS AND EVIDENCE FOR VACCINE-DRIVEN EVOLUTION" INFECTION AND IMMUNITY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, WASHINGTON, US, vol. 66, no. 2, February 1998 (1998-02), pages 670-675, XP000971410 ISSN: 0019-9567 cited in the application abstract page 670, right-hand column, last paragraph -page 671, left-hand column, paragraph 1 page 671, right-hand column, paragraph 3 -page 974, left-hand column, last paragraph	1-25,43, 45,47-52
	--- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 01/06457

D.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CRISTINA PAGLIACCIA ET AL.: "Pertactin antigens extracted from Bordetella pertussis and Bordetella bronchiseptica differ in the isoelectric point" ARCHIVES OF MICROBIOLOGY, vol. 168, 1997, pages 437-440, XP002191967 the whole document ---	1-25,43, 45,47-52
A	CAROLINE BOURSAX-EUDE ET AL.: "Intranasal murine model of Bordetella pertussis infection: II. Sequence variation and protection induced by a tricomponent acellular vaccine" VACCINE, vol. 17, 1999, pages 2651-2660, XP004169678 the whole document ---	1-25,43, 45,47-52
P,X	KAREN B. REGISTER : "Novel genetic and phenotypic heterogeneity in Bordetella bronchiseptica pertactin" INFECTION AND IMMUNITY, vol. 69, no. 3, March 2001 (2001-03), pages 1917-1921, XP002206752 the whole document ---	26,28
P,X	BOURSAX-EUDE C ET AL: "POLYMORPHISM OF REPEATED REGIONS OF PERTACTIN IN BORDETELLA PERTUSSIS, BORDETELLA PARAPERTUSSIS, AND BORDETELLA BRONCHISEPTICA" INFECTION AND IMMUNITY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY. WASHINGTON, US, vol. 68, no. 8, August 2000 (2000-08), pages 4815-4817, XP000971415 ISSN: 0019-9567 the whole document -----	26,28

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP 01/06457

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claim 54 is directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:

see additional sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. Claims: 1-25, 48-51 and partially 43, 45, 47 and 52

Immunogenic composition comprising a mixture of pertactins of Bordetella species and vaccine comprising the same

2. Claims: 26-42, 44, 46, 53-55 and partially 43, 45, 47 and 52

Bordetella polypeptides of sequences SEQ ID NOs:7-9, 14-22; polynucleotides encoding them; antibodies thereof and their use for treating Bordetella infections; immunological complex comprising the polypeptide; use of the polypeptides and polynucleotides for detecting Bordetella infection; DNA chip and microarray comprising the polynucleotides

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マ-コ-ト' (参考)		
C 0 7 K	16/12	C 1 2 M	1/00	A	4 H 0 4 5
	19/00	C 1 2 Q	1/68	A	
C 1 2 M	1/00	G 0 1 N	33/53	D	
C 1 2 Q	1/68			M	
G 0 1 N	27/447		33/566		
	33/53		33/569	F	
	33/566	C 1 2 P	21/08		
	33/569	C 1 2 R	1:01		
// C 1 2 P	21/08	C 1 2 N	15/00	Z N A A	
(C 1 2 Q	1/68			F	
C 1 2 R	1:01)	G 0 1 N	27/26	3 0 1 A	

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

Fターム(参考) 4B024 AA11 BA31 CA04 CA09 CA11
 HA12
 4B029 AA07 AA23 AA27 CC02 FA01
 4B063 QA01 QQ06 QQ41 QR31 QR56
 QR83 QS34 QX01
 4B064 AG27 CA10 CA20 CC24 DA15
 4C085 AA14 BA17 CC07 CC23
 4H045 AA10 AA11 AA30 BA10 CA11
 DA86 EA31 EA52

专利名称(译)	具有百日咳博德特氏菌，副百日咳博德特氏菌和支气管败血性博德特氏菌重复区域多态性的多肽及其在诊断和免疫原性组合物中的用途		
公开(公告)号	JP2003533990A	公开(公告)日	2003-11-18
申请号	JP2001586330	申请日	2001-05-23
[标]申请(专利权)人(译)	巴斯德研究所		
申请(专利权)人(译)	巴斯德研究所		
[标]发明人	ギソマクルーフニコル ブーソーユードカロリン		
发明人	ギソマクルーフ,ニコル ブーソー-ユード,カロリン		
IPC分类号	G01N33/53 A61K39/00 A61K39/395 A61P31/04 C07K14/235 C07K16/12 C07K19/00 C12M1/00 C12N15/09 C12P21/08 C12Q1/68 C12Q1/689 C12R1/01 G01N27/447 G01N33/566 G01N33/569		
CPC分类号	C07K14/235 A61K39/00 C12Q1/689 Y10S435/975		
FI分类号	A61K39/395.R A61P31/04 C07K14/235 C07K16/12 C07K19/00 C12M1/00.A C12Q1/68.A G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 G01N33/569.F C12P21/08 C12R1/01 C12N15/00.ZNA.A C12N15/00.F G01N27/26.301.A		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/BA31 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/CA11 4B024/HA12 4B029/AA07 4B029/AA23 4B029/AA27 4B029/CC02 4B029/FA01 4B063/QA01 4B063/QQ06 4B063/QQ41 4B063/QR31 4B063/QR56 4B063/QR83 4B063/QS34 4B063/QX01 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA15 4C085/AA14 4C085/BA17 4C085/CC07 4C085/CC23 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA11 4H045/DA86 4H045/EA31 4H045/EA52		
优先权	60/206969 2000-05-25 US		
其他公开文献	JP2003533990A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及由百日咳博德特氏菌，副百日咳博德特氏菌和支气管败血性博德特氏菌表达的被称为百日咳杆菌粘附素 (PRN) 的外膜蛋白。该蛋白可诱导针对博德特氏菌感染的保护性免疫。粘附素的免疫显性和保护性免疫表位包含两个重复区域，第一区域和第二区域。这两个重复区域的比较显示百日咳博德特氏菌百日咳杆菌粘附素未突变。另一方面，百日咳的百日咳是在第一区域中突变最多的，而支气管败血性博德特氏菌的胃泌素在重复的第一和第二区域中都是突变的。包含百日咳杆菌粘附素和百日咳杆菌粘附素片段在这些区域中具有突变序列的组合物可用作免疫原性组合物。

ボルデテラ属の種	代表的な単離体	PRNの第1および第2領域の型/単離体の数	受託番号*、第1領域、第2領域
BB	9.73H+	I-1, II-3/3	AJ250076, AJ250077
BB	LAFR	I-2, II-3/8	AJ250078, AJ250079
BB	5	I-2, II-4/8	AJ250080, AJ250081
BB	335	I-2, II-1/3	AJ250082, AJ250083
BB	CVGEO	I-2, II-5/6	AJ250084, AJ250085
BB	BBCH	I-2, II-6/4	AJ250086, AJ250087
BB	DEL	I-1, II-2/5	AJ250088, AJ250089