

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-537956

(P2004-537956A)

(43) 公表日 平成16年12月24日(2004.12.24)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)	
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	Z N A A	4 B O 2 4
A 6 1 K 39/00	A 6 1 K 39/00	H	4 B O 6 4
A 6 1 K 39/095	A 6 1 K 39/095		4 B O 6 5
A 6 1 K 39/395	A 6 1 K 39/395	R	4 C O 8 5
C O 7 K 14/22	C O 7 K 14/22		4 H O 4 5
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 163 頁)	最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2000-594927 (P2000-594927)	(71) 出願人	397062700
(86) (22) 出願日	平成12年1月19日 (2000.1.19)		グラクソスミスクライン バイオロジカル
(85) 翻訳文提出日	平成13年7月19日 (2001.7.19)		ズ ソシエテ アノニム
(86) 国際出願番号	PCT/EP2000/000428		ベルギー国 リキセンザール ビー 13
(87) 国際公開番号	W02000/043519		30 ルー デ ランスティテュート 8
(87) 国際公開日	平成12年7月27日 (2000.7.27)		9
(31) 優先権主張番号	9901368.2	(74) 代理人	100077517
(32) 優先日	平成11年1月22日 (1999.1.22)		弁理士 石田 敬
(33) 優先権主張国	英国 (GB)	(74) 代理人	100092624
(31) 優先権主張番号	9901944.0		弁理士 鶴田 準一
(32) 優先日	平成11年1月28日 (1999.1.28)	(74) 代理人	100108903
(33) 優先権主張国	英国 (GB)		弁理士 中村 和広
(31) 優先権主張番号	9902086.9	(74) 代理人	100082898
(32) 優先日	平成11年1月29日 (1999.1.29)		弁理士 西山 雅也
(33) 優先権主張国	英国 (GB)		
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規化合物

## (57) 【要約】

本発明は、B A S B 0 4 7、B A S B 0 5 4、B A S B 0 6 8、及びB A S B 0 6 9 ポリペプチドと、B A S B 0 4 7、B A S B 0 5 4、B A S B 0 6 8、及びB A S B 0 6 9 ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドと、組み換え技術を利用してそのようなポリペプチドを産生する方法とを提供する。本発明はまた、それらを用いた診断、予後予測、治療の方法も提供する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

配列番号 2、4、6、及び 8 からなるグループの中から選択したアミノ酸配列と少なくとも 85% が一致するアミノ酸配列を含む、単離されたポリペプチド。

## 【請求項 2】

上記アミノ酸配列が、配列番号 2、4、6、及び 8 からなるグループの中から選択したアミノ酸配列と少なくとも 95% が一致する、請求の範囲第 1 項に記載の単離されたポリペプチド。

## 【請求項 3】

配列番号 2、4、6、及び 8 からなるグループの中から選択したアミノ酸配列を含む、請求の範囲第 1 項に記載の単離されたポリペプチド。 10

## 【請求項 4】

配列番号 2、4、6、及び 8 の単離されたポリペプチド。

## 【請求項 5】

請求の範囲第 1 ~ 4 項のいずれか 1 項に記載のポリペプチドの免疫原性断片であって、この免疫原性断片の免疫活性が、配列番号 2、4、6、及び 8 のポリペプチドと実質的に同じであることを特徴とする免疫原性断片。

## 【請求項 6】

配列番号 2、4、6 又は 8 それぞれの全長にわたって配列番号 2、4、6 又は 8 のアミノ酸配列と少なくとも 85% が一致するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む、単離されたポリヌクレオチド；またはこの単離されたポリヌクレオチドと相補的なヌクレオチド配列を含む、単離されたポリヌクレオチド。 20

## 【請求項 7】

配列番号 2、4、6 又は 8 のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列とコード領域の全長にわたって少なくとも 85% が一致するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む、単離されたポリヌクレオチド；またはこの単離されたポリヌクレオチドと相補的なヌクレオチド配列を含む、単離されたポリヌクレオチド。

## 【請求項 8】

配列番号 1、3、5 又は 7 それぞれの全長にわたって配列番号 1、3、5 又は 7 のヌクレオチド配列と少なくとも 85% が一致するヌクレオチド配列を含む、単離されたポリヌクレオチド；またはこの単離されたポリヌクレオチドと相補的なヌクレオチド配列を含む、単離されたポリヌクレオチド。 30

## 【請求項 9】

配列番号 1、3、5 又は 7 と少なくとも 95% が一致する、請求の範囲第 6 ~ 8 項のいずれか 1 項に記載の単離されたポリヌクレオチド。

## 【請求項 10】

配列番号 2、4、6 又は 8 のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む、単離されたポリヌクレオチド。

## 【請求項 11】

配列番号 1、3、5 又は 7 のポリヌクレオチドを含む、単離されたポリヌクレオチド。 40

## 【請求項 12】

配列番号 2、4、6 又は 8 のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含んでおり、配列番号 1、3、5 又は 7 の配列またはその断片を有する標識されたプローブを用いてストリンジェント・ハイブリダイゼーション条件のもとで適切なライブラリーをスクリーニングすることにより得ることができる、単離されたポリヌクレオチド。

## 【請求項 13】

請求の範囲第 6 ~ 12 項のいずれか 1 項に記載の単離されたポリヌクレオチドを含む、発現ベクターまたは生きた組み換え微生物。

## 【請求項 14】

請求の範囲第 13 項の発現ベクターを含む宿主細胞、または、配列番号 2、4、6、及び 50

8 からなるグループの中から選択したアミノ酸配列と少なくとも 85% が一致するアミノ酸配列を含む単離されたポリペプチドを発現する、この宿主細胞の細胞以下断片または膜。

【請求項 15】

配列番号 2、4、6、及び 8 からなるグループの中から選択したアミノ酸配列と少なくとも 85% が一致するアミノ酸配列を含むポリペプチドの産生方法であって、このポリペプチドを産生させるのに十分な条件下で請求の範囲第 14 項の宿主細胞を培養し、培地からこのポリペプチドを回収する操作を含む、ポリペプチドの産生方法。

【請求項 16】

請求の範囲第 6 ~ 12 項のいずれか 1 項に記載のポリヌクレオチドを発現させる方法であって、これらポリヌクレオチドのうち少なくとも 1 つを含む発現ベクターを用いて宿主細胞を形質転換し、そのポリヌクレオチドのうち任意の 1 つを発現させるのに十分な条件下でこの宿主細胞を培養する操作を含む、ポリヌクレオチドの発現方法。

10

【請求項 17】

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

【請求項 18】

請求の範囲第 6 ~ 12 項のいずれか 1 項に記載のポリヌクレオチドの有効量と、医薬として有効な担体とを含むワクチン組成物。

【請求項 19】

少なくとも 1 つの別のナイセリア・メニンギティディス抗原を含む、請求の範囲第 17 項または第 18 項に記載のワクチン組成物。

20

【請求項 20】

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

【請求項 21】

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

30

【請求項 22】

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

【請求項 23】

動物に免疫応答を発生させる薬剤の製造における、請求の範囲第 6 ~ 12 項のいずれか 1 項に記載のポリヌクレオチドを免疫学的に有効な量含む組成物の使用。

【請求項 24】

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

40

【発明の詳細な説明】

【0001】

発明の属する技術分野

本発明は、ポリヌクレオチド（本明細書では、“BASB047 ポリヌクレオチド”、“BASB054 ポリヌクレオチド”、“BASB068 ポリヌクレオチド”、及び“BASB069 ポリヌクレオチド”と呼ぶ）、これらポリヌクレオチドによってコードされたポリペプチド（本明細書では、それぞれ“BASB047”、“BASB054”、“BASB068”、及び“BASB069”、またはそれぞれ“BASB047 ポリペプチド”、“BASB054 ポリペプチド”、“BASB068 ポリペプチド”、“BASB069 ポリペプチド”と呼ぶ）、ならびにこれらを産生させるための組み換え材料と方法

50

に関するものである。別の側面として、本発明は、これらポリペプチドおよびポリヌクレオチドの利用方法にも関する。利用方法としては、例えば、細菌感染に対するワクチンが含まれる。さらに別の側面として、本発明は、所定の病原菌に感染したことを検出するための診断法にも関する。

#### 発明の背景

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

10

#### 【0002】

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

20

#### 【0003】

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

30

#### 【0004】

血清型Bのワクチンは利用できない。というのも、B莢膜多糖は免疫原性を示さないことが判明したからである。これは、宿主の成分と構造的に似ていることが原因である可能性が高い（ヴァイル, F. A., アーテンシュタイン, M. S., プラント, M. L. 他, J. Infect. Dis., 第126巻, 514~522ページ, 1972年; フィンネ, J. M., レイノネン, M., メケレ, P. M., Lancet, 第2巻, 355~357ページ, 1983年）。

#### 【0005】

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

40

#### 【0006】

このワクチンの中には細菌の外膜成分が多数存在している。例えば、PorA, PorB, Rmp, Opc, Opa, FrpBである。しかし、観察されている防御効果に対するこれら成分の寄与は、さらに明確にする必要がある。細菌の他の外膜成分であるTbpBやNspAなどは、動物またはヒトの抗体を用いることにより、免疫防御に関係している

50

可能性のあることが明らかにされている(マルタン, D., カデュー, N., アメル, J., プロドゥー, B. R., J. Exp. Med., 第185巻、1173~1183ページ、1997年; リソロ, L., メートル-ヴィルモット, C., デュマ, P. 他, Inf. Immun., 第63巻、884~890ページ、1995年)。免疫防御のメカニズムは、抗体を媒介とした細菌の活性とオプソニン食菌作用に関係しているであろう。

#### 【0007】

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

10

#### 【0008】

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

20

#### 発明の要約

本発明は、BASB047、BASB054、BASB068、及びBASB069に関するものであり、中でも、BASB047、BASB054、BASB068、及びBASB069ポリペプチド、BASB047、BASB054、BASB068、及びBASB069ポリヌクレオチド、ならびにこれらを産生させるための組み換え材料と方法に関する。別の側面として、本発明は、これらポリペプチドおよびポリヌクレオチドの利用方法にも関する。利用方法には、特に、微生物による疾患の予防ならびに治療が含まれる。さらに別の側面として、本発明は、微生物の感染に伴う疾患や異常を検出するための診断法にも関する。例えば、BASB047、BASB054、BASB068、及びBASB069ポリペプチドまたはポリヌクレオチドの発現または活性を検出するための方法に関する。

30

#### 【0009】

当業者であれば、この明細書の以下の記述やそれ以外の箇所を読むことにより、この明細書に開示された本発明の精神および範囲におけるさまざまな変更や修正を容易に思いつくであろう。

#### 発明の説明

本発明は、BASB047、BASB054、BASB068、及びBASB069ポリペプチドとポリヌクレオチドに関するものであり、それについて以下に詳細に説明する。本発明は、特に、配列番号1、3、5、7で与えられるヌクレオチド配列と配列番号2、4、6、8で与えられるアミノ酸配列をそれぞれ有するBASB047、BASB054、BASB068、及びBASB069に関する。“DNA”として以下の配列リストに示した配列は、本発明の一実施態様の具体例を表わしているものと理解する。当業者であれば、そうした配列を一般にポリヌクレオチド(リボポリヌクレオチドを含む)において利用できることがわかるはずだからである。

40

#### ポリペプチド

本発明の一側面によれば、この明細書で“BASB047”、“BASB054”、“BASB068”、“BASB069”、または“BASB047ポリペプチド”、“BASB054ポリペプチド”、“BASB068ポリペプチド”、“BASB069ポリペプチド”と呼ぶナイセリア・メニンギティディスのポリペプチドのほか、生物学的、診断

50

上、予防上、臨床上、または治療上有効なこれらポリペプチドの変異体と、これらを含む組成物とが提供される。

【0010】

本発明によれば、以下のものがさらに提供される。

(a) 配列番号2と少なくとも85%が一致、好ましくは少なくとも90%が一致、さらに好ましくは少なくとも95%が一致、最も好ましくは少なくとも97~99%が一致または完全に一致したアミノ酸配列を含む、単離されたポリペプチド。

(b) 配列番号1の全長にわたって配列番号1と少なくとも85%が一致、好ましくは少なくとも90%が一致、さらに好ましくは少なくとも95%が一致、それ以上に好ましくは少なくとも97~99%が一致または完全に一致したポリヌクレオチド配列を含む単離されたポリヌクレオチドによりコードされたポリペプチド。

(c) 配列番号2のアミノ酸配列と少なくとも85%が一致、好ましくは少なくとも90%が一致、さらに好ましくは少なくとも95%が一致、それ以上に好ましくは少なくとも97~99%が一致または完全に一致したポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含む単離されたポリヌクレオチドによってコードされたポリペプチド。

10

【0011】

配列番号2で与えられるBASB047ポリペプチドは、ナイセリア・メニンギティディス菌株ATCC13090に由来するBASB047ポリペプチドである。

【0012】

本発明により、BASB047ポリペプチドの免疫原性断片も提供される。すなわち、配列番号2のアミノ酸配列を含むポリペプチドと同じか実質的に同じ免疫活性を有するBASB047ポリペプチドの連続部分が提供される。要するに、この断片(必要であれば担体と結合したときの断片)は、BASB047ポリペプチドを認識する免疫応答を向上させることができる。この免疫原性断片は、例えば、N末端のリーダー配列、および/または膜貫通領域、および/またはC末端のアンカー領域を欠いたBASB047ポリペプチドを含んでいてもよい。好ましい一実施態様では、本発明によるBASB047の免疫原性断片は、配列番号2の全長にわたって配列番号2と少なくとも85%が一致、好ましくは少なくとも90%が一致、さらに好ましくは少なくとも95%が一致、最も好ましくは少なくとも97~99%が一致したポリペプチドの細胞外領域の実質的にすべてを含んでいる。

20

30

【0013】

本発明によれば、以下のものがさらに提供される。

(a) 配列番号4と少なくとも85%が一致、好ましくは少なくとも90%が一致、さらに好ましくは少なくとも95%が一致、最も好ましくは少なくとも97~99%が一致または完全に一致したアミノ酸配列を含む、単離されたポリペプチド。

(b) 配列番号3の全長にわたって配列番号3と少なくとも85%が一致、好ましくは少なくとも90%が一致、さらに好ましくは少なくとも95%が一致、それ以上に好ましくは少なくとも97~99%が一致または完全に一致したポリヌクレオチド配列を含む単離されたポリヌクレオチドによりコードされたポリペプチド。

(c) 配列番号4のアミノ酸配列と少なくとも85%が一致、好ましくは少なくとも90%が一致、さらに好ましくは少なくとも95%が一致、それ以上に好ましくは少なくとも97~99%が一致または完全に一致したポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含む単離されたポリヌクレオチドによってコードされたポリペプチド。

40

【0014】

配列番号4で与えられるBASB054ポリペプチドは、ナイセリア・メニンギティディス菌株ATCC13090に由来するBASB054ポリペプチドである。

【0015】

本発明により、BASB054ポリペプチドの免疫原性断片も提供される。すなわち、配列番号4のアミノ酸配列を含むポリペプチドと同じか実質的に同じ免疫活性を有するBASB054ポリペプチドの連続部分が提供される。要するに、この断片(必要であれば担

50

体と結合したときの断片)は、B A S B 0 5 4 ポリペプチドを認識する免疫応答を向上させることができる。この免疫原性断片は、例えば、N末端のリーダー配列、および/または膜貫通領域、および/またはC末端のアンカー領域を欠いたB A S B 0 5 4 ポリペプチドを含んでいてもよい。好ましい一実施態様では、本発明によるB A S B 0 5 4 の免疫原性断片は、配列番号4の全長にわたって配列番号4と少なくとも85%が一致、好ましくは少なくとも90%が一致、さらに好ましくは少なくとも95%が一致、最も好ましくは少なくとも97~99%が一致したポリペプチドの細胞外領域の実質的にすべてを含んでいる。

#### 【0016】

本発明によれば、以下のものがさらに提供される。

10

(a) 配列番号6と少なくとも85%が一致、好ましくは少なくとも90%が一致、さらに好ましくは少なくとも95%が一致、最も好ましくは少なくとも97~99%が一致または完全に一致したアミノ酸配列を含む、単離されたポリペプチド。

(b) 配列番号5の全長にわたって配列番号5と少なくとも85%が一致、好ましくは少なくとも90%が一致、さらに好ましくは少なくとも95%が一致、それ以上に好ましくは少なくとも97~99%が一致または完全に一致したポリヌクレオチド配列を含む単離されたポリヌクレオチドによりコードされたポリペプチド。

(c) 配列番号6のアミノ酸配列と少なくとも85%が一致、好ましくは少なくとも90%が一致、さらに好ましくは少なくとも95%が一致、それ以上に好ましくは少なくとも97~99%が一致または完全に一致したポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含む単離されたポリヌクレオチドによってコードされたポリペプチド。

20

#### 【0017】

配列番号6で与えられるB A S B 0 6 8 ポリペプチドは、ナイセリア・メニンギティディス菌株A T C C 1 3 0 9 0 に由来するB A S B 0 6 8 ポリペプチドである。

#### 【0018】

本発明により、B A S B 0 6 8 ポリペプチドの免疫原性断片も提供される。すなわち、配列番号6のアミノ酸配列を含むポリペプチドと同じか実質的に同じ免疫活性を有するB A S B 0 6 8 ポリペプチドの連続部分が提供される。要するに、この断片(必要であれば担体と結合したときの断片)は、B A S B 0 6 8 ポリペプチドを認識する免疫応答を向上させることができる。このような免疫原性断片は、例えば、N末端のリーダー配列、および/または膜貫通領域、および/またはC末端のアンカー領域を欠いたB A S B 0 6 8 ポリペプチドを含んでいてもよい。好ましい一実施態様では、本発明によるB A S B 0 6 8 の免疫原性断片は、配列番号6の全長にわたって配列番号6と少なくとも85%が一致、好ましくは少なくとも90%が一致、さらに好ましくは少なくとも95%が一致、最も好ましくは少なくとも97~99%が一致したポリペプチドの細胞外領域の実質的にすべてを含んでいる。

30

#### 【0019】

本発明によれば、以下のものがさらに提供される。

(a) 配列番号8と少なくとも85%が一致、好ましくは少なくとも90%が一致、さらに好ましくは少なくとも95%が一致、最も好ましくは少なくとも97~99%が一致または完全に一致したアミノ酸配列を含む、単離されたポリペプチド。

40

(b) 配列番号7の全長にわたって配列番号7と少なくとも85%が一致、好ましくは少なくとも90%が一致、さらに好ましくは少なくとも95%が一致、それ以上に好ましくは少なくとも97~99%が一致または完全に一致したポリヌクレオチド配列を含む単離されたポリヌクレオチドによりコードされたポリペプチド。

(c) 配列番号8のアミノ酸配列と少なくとも85%が一致、好ましくは少なくとも90%が一致、さらに好ましくは少なくとも95%が一致、それ以上に好ましくは少なくとも97~99%が一致または完全に一致したポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含む単離されたポリヌクレオチドによってコードされたポリペプチド。

#### 【0020】

50

配列番号 8 で与えられる B A S B 0 6 9 ポリペプチドは、ナイセリア・メニンギティディス菌株 A T C C 1 3 0 9 0 に由来する B A S B 0 6 9 ポリペプチドである。

【 0 0 2 1 】

本発明により、B A S B 0 6 9 ポリペプチドの免疫原性断片も提供される。すなわち、配列番号 8 のアミノ酸配列を含むポリペプチドと同じか実質的に同じ免疫活性を有する B A S B 0 6 9 ポリペプチドの連続部分が提供される。要するに、この断片（必要であれば担体と結合したときの断片）は、B A S B 0 6 9 ポリペプチドを認識する免疫応答を向上させることができる。このような免疫原性断片は、例えば、N末端のリーダー配列、および/または膜貫通領域、および/またはC末端のアンカー領域を欠いた B A S B 0 6 9 ポリペプチドを含んでいてもよい。好ましい一実施態様では、本発明による B A S B 0 6 9 の免疫原性断片は、配列番号 8 の全長にわたって配列番号 8 と少なくとも 8 5 % が一致、好ましくは少なくとも 9 0 % が一致、さらに好ましくは少なくとも 9 5 % が一致、最も好ましくは少なくとも 9 7 ~ 9 9 % が一致したポリペプチドの細胞外領域の実質的にすべてを含んでいる。

10

【 0 0 2 2 】

断片とは、本発明の任意のポリペプチドの任意のアミノ酸配列の全部ではなく一部と完全に一致したアミノ酸配列を有するポリペプチドのことである。B A S B 0 4 7、B A S B 0 5 4、B A S B 0 6 8、及び B A S B 0 6 9 の場合のように、断片は、“独立して”いてもよい。すなわち、より大きなポリペプチドに含まれていてその一部または一領域を形成していてもよい。最も好ましいのは、より大きな単一のポリペプチドの中の単一の連続領域を形成していることである。

20

【 0 0 2 3 】

好ましい断片としては、例えば、配列番号 2、4、6 又は 8 のアミノ酸配列またはその変異体の一部を含む先の切れたポリペプチドが挙げられる。具体例としては、アミノ末端および/またはカルボキシル末端のアミノ酸配列を含む連続残基列がある。宿主細胞によって、または宿主細胞内で産生された本発明のポリペプチドが分解された形態も好ましい。さらに好ましいのは、構造上または機能上の特性を有する断片、例えば、螺旋と螺旋形成領域、シートとシート形成領域、ターンとターン形成領域、コイルとコイル形成領域、親水性領域、疎水性領域、両親媒性領域、両親媒性領域、柔軟領域、表面形成領域、基質結合領域、抗体高指示領域を含む断片などである。

30

【 0 0 2 4 】

好ましい断片としては、さらに、配列番号 2、4、6、8 のアミノ酸配列からの連続したアミノ酸を少なくとも 1 5、2 0、3 0、4 0、5 0、または 1 0 0 個有するアミノ酸配列を含む単離されたポリペプチド、あるいは、配列番号 2、4、6、8 のアミノ酸配列から切断または除去した少なくとも 1 5、2 0、3 0、4 0、5 0、または 1 0 0 個の連続したアミノ酸を有するアミノ酸配列を含む単離されたポリペプチドが挙げられる。

【 0 0 2 5 】

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

40

【 0 0 2 6 】

特に好ましいのは、いくつかのアミノ酸、例えば 5 ~ 1 0 個、1 ~ 5 個、1 ~ 3 個、1 ~ 2 個、または 1 個のアミノ酸の置換、欠失、または付加が任意に組み合わせられた変異体である。

【 0 0 2 7 】

本発明のポリペプチドまたは免疫原性断片は、“成熟”タンパク質の形態でもよいし、前駆体または融合タンパク質などのより大きなタンパク質の一部でもよい。分泌配列またはリーダー配列、プロ配列、複数のヒスチジン残基など精製に役立つ配列を含む付加アミノ酸配列、組み換え体産生の間の安定性を維持するための付加配列が含まれていると望ましいことがしばしばある。さらに、最終的に得られる分子の免疫性を向上させるため、外来

50

性ポリペプチド、脂質テイル、またはポリヌクレオチド配列を付加することも考えられる。

【0028】

一側面によれば、本発明は、本発明のポリペプチドまたはその断片と、さまざまなサブクラスの免疫グロブリン(IgG、IgM、IgA、IgE)のH鎖またはL鎖の定常領域のさまざまな部分とを含む、遺伝子工学による可溶性融合タンパク質に関する。免疫グロブリンとして好ましいのは、ヒトIgG、特にIgG1のH鎖の定常部分であり、そのヒンジ領域で融合が起こる。特別な実施態様では、血液凝固第Xa因子でもって切断することのできる切断配列を組み込むだけでFc部分を除去することができる。

【0029】

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

【0030】

このタンパク質は、化学的に結合させたり組み換え融合タンパク質として発現させたりすることにより、非融合タンパク質と比べて発現系内での発現レベルを向上させることができる。融合パートナーは、Tヘルパー・エピトープ(免疫性融合パートナー)、好ましくはヒトによって認識されるTヘルパー・エピトープを提供するのに役立ったり、もとの組み換えタンパク質よりも高い効率でタンパク質を発現させる(発現エンハンサー)のに役立ったりする可能性がある。融合パートナーは、免疫性融合パートナーであると同時に発現エンハンサー・パートナーにもなっていることが好ましかろう。

【0031】

融合パートナーは、インフルエンザ菌に由来するプロテインDと、インフルエンザ・ウイルスに由来する非構造タンパク質NS1(ヘマグルチニン)を含んでいる。別の融合パートナーは、LytAとして知られるタンパク質である。このタンパク質のC末端部を用いることが好ましい。LytAは、N-アセチル-L-アラニン・アミダーゼと、アミダーゼLytA(LytA遺伝子によってコードされている(Gene、第43巻、265~272ページ、1986年))と、ペプチドグリカン骨格における所定の結合を特異的に分解するオートリシンを合成する肺炎球菌に由来する。LytAタンパク質のC末端領域は、コリンや、DEAEなどのコリンのアナログに対する親和性に関与している。この特性を利用して、融合タンパク質の発現に役立つ、大腸菌のC-LytAを発現するプラスミドが開発されている。C-LytA断片をアミノ末端に有するハイブリッド・タンパク質の精製については、Biotechnology、第10巻、795~798ページ、1992年に記載されている。LytAタンパク質のC末端にあって残基番号178から始まる繰り返し部分、例えば残基番号188~305を用いることが可能である。

【0032】

本発明には、上記のポリペプチドの変異体も含まれる。すなわち、参照基準と比べて保存されたアミノ酸置換だけが異なるポリペプチドも含まれる。なお保存されたアミノ酸置換とは、1つの残基が特性の似た別の残基で置換されることである。そうした置換の典型例は、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン相互の置換；セリンとトレオニンの置換；酸性残基であるアスパラギン酸とグルタミン酸の置換；アスパラギンとグルタミンの置換；塩基性残基であるリジンとアルギニンの置換；芳香性残基であるフェニルアラニンとチロシンの置換である。

【0033】

本発明のポリペプチドは、適切な任意の方法で調製することができる。そうしたポリペプチドとしては、単離した天然のポリペプチド、組み換えによるポリペプチド、合成したポリペプチド、これらの方法を組み合わせて作ったポリペプチドが挙げられる。このようなポリペプチドを調製する方法は従来技術で周知である。

10

20

30

40

50

## 【0034】

本発明のポリペプチドはナイセリア・メニンギティディスから由来したものであることが最も好ましいが、分類学上同じ属の他の生物から得られたものも好ましい。本発明のポリペプチドは、例えば、分類学上同じ科または目の生物から得られたものでもよい。

ポリヌクレオチド

本発明の1つの目的は、B A S B 0 4 7ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、特にこの明細書でB A S B 0 4 7と表記するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを提供することである。

## 【0035】

本発明の特に好ましい実施態様では、このポリヌクレオチドは、完全長の遺伝子を含んでいて配列番号1で与えられる配列を有するB A S B 0 4 7ポリペプチドをコードする領域、またはその変異体をコードする領域を含んでいる。 10

## 【0036】

配列番号1で与えられるB A S B 0 4 7ポリヌクレオチドは、ナイセリア・メニンギティディス菌株A T C C 1 3 0 9 0に由来するB A S B 0 4 7ポリヌクレオチドである。

## 【0037】

本発明のさらに別の側面によれば、B A S B 0 4 7ポリペプチドとポリヌクレオチド、特にナイセリア・メニンギティディスのB A S B 0 4 7ポリペプチドとポリヌクレオチドをコードおよび/または発現する、単離された核酸分子が提供される。そのような核酸分子としては、例えば、未処理のRNA、リボザイムRNA、mRNA、cDNA、ゲノムDNA、B-DNA、Z-DNAが挙げられる。本発明のさらに別の実施態様として、生物学的、診断上、予防上、臨床上、または治療上有効なポリヌクレオチドとポリペプチド、これらの変異体、これらを含む組成物がある。 20

## 【0038】

本発明の別の側面は、配列番号2の推定アミノ酸配列を有するB A S B 0 4 7ポリペプチドをコードしており、少なくとも1つの完全長遺伝子を含む単離されたポリヌクレオチドと、このポリヌクレオチドと密接に関係したポリヌクレオチドと、これらの変異体に関する。

## 【0039】

本発明の特に好ましい実施態様では、ナイセリア・メニンギティディスに由来し、配列番号2のアミノ酸配列を含むB A S B 0 4 7ポリペプチド、またはそのアミノ酸配列からなるB A S B 0 4 7ポリペプチド、またはその変異体が提供される。 30

## 【0040】

配列番号1で与えられるポリヌクレオチド配列など、この明細書の情報を用いると、標準的なクローニング法およびスクリーニング法を利用し、次に完全長のクローンを得ることによって、B A S B 0 4 7ポリペプチドをコードする本発明のポリヌクレオチドを得ることができる。なお標準的なクローニング法およびスクリーニング法としては、出発材料としてナイセリア・メニンギティディス細胞を用いて細菌から染色体DNAのクローニングとシーケンシングを行なう方法がある。例えば配列番号1で与えられるポリヌクレオチド配列などの本発明のポリヌクレオチド配列を得るためには、大腸菌またはそれ以外の適切な宿主の中で、ナイセリア・メニンギティディスの染色体DNAのクローンのライブラリーを、部分配列から由来し、好ましくは17マーまたはそれよりも長い放射線標識したオリゴヌクレオチドでプローブするのが一般的である。次に、厳しい条件でのハイブリダイゼーションを行なうと、プローブのDNAと同じDNAを有するクローンを識別することができる。もとのポリペプチド配列またはポリヌクレオチド配列から設計したシーケンシング用プライマーを用いたハイブリダイゼーションを通じてこのように同定された個々のクローンをシーケンシングすることにより、ポリヌクレオチド配列を両方の方向に伸長させ、完全長遺伝子の配列を決定することができる。都合のよいことに、このようなシーケンシングは、例えばプラスミド・クローンから調製した変性した二本鎖DNAを用いて実施することができる。適切な方法は、マニアティス、T、フリッチ、E.F. 40 50

、サムブルック他、『分子クローニング：実験室マニュアル』第2版（コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー・プレス、コールド・スプリング・ハーバー、ニューヨーク州、1989年）に記載されている（特に「ハイブリダイゼーションによるスクリーニング」1.90と、「変性した二本鎖DNA鋳型のシーケンシング」13.70を参照のこと）。直接的にゲノムDNAのシーケンシングを行なって完全長遺伝子の配列を得ることもできる。本発明の証拠として、配列番号1で与えられる各ポリヌクレオチドは、ナイセリア・メニンギティディスに由来するDNAライブラリーの中で発見された。

**【0041】**

さらに、配列番号1で与えられる各DNA配列は、配列番号2で与えられるアミノ酸残基とほぼ同数のアミノ酸残基を有するタンパク質をコードするオープン・リーディング・フレームを含んでいる。このタンパク質の推定分子量は、当業者には周知のアミノ酸残基の分子量の値を用いて計算することができる。

10

**【0042】**

配列番号1のポリヌクレオチドは、配列番号1のヌクレオチド番号1の開始コドンとヌクレオチド番号1201から始まる終止コドンの間で、配列番号2のポリペプチドをコードしている。

**【0043】**

本発明のさらに別の側面によれば、以下のものを含む単離されたポリヌクレオチド、または以下のものからなる単離されたポリヌクレオチドが提供される。

(a) 配列番号1の全長にわたって配列番号1と少なくとも85%が一致、好ましくは少なくとも90%が一致、さらに好ましくは少なくとも95%が一致、それ以上に好ましくは少なくとも97~99%が一致または完全に一致したポリヌクレオチド配列、または  
(b) 配列番号2の全長にわたって配列番号2と少なくとも85%が一致、好ましくは少なくとも90%が一致、さらに好ましくは少なくとも95%が一致、それ以上に好ましくは少なくとも97~99%が一致または100%正確に一致したポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列。

20

**【0044】**

本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、ナイセリア・メニンギティディス以外の種からのホモログやオーソログも含め、配列番号1の配列またはその断片からなる標識したプローブまたは検出可能なプローブ、あるいはこれらの配列またはその断片を含む標識したプローブまたは検出可能なプローブを用いて厳しいハイブリダイゼーション条件（例えば、温度が45~65、SDSの濃度が0.1~1%）のもとで適切なライブラリーをスクリーニングし、完全長遺伝子および/またはそのポリヌクレオチド配列を含むゲノム・クローンを単離するステップを含む方法によって得ることができる。

30

**【0045】**

本発明により、配列番号1の中のコード配列（オープン・リーディング・フレーム）と全長にわたって一致するポリヌクレオチド配列が提供される。さらに本発明により、成熟ポリペプチドのためのコード配列またはその断片のほか、成熟ポリペプチドのためのコード配列またはリーディング・フレーム中において別のコード配列を有する断片が提供される。別のコード配列とは、例えば、リーダー配列または分泌配列、プレタンパク質配列、プロタンパク質配列、プレプロタンパク質配列をコードする配列である。本発明のポリヌクレオチドは、少なくとも1つの非コード配列も含んでいてよい。例示するならば、少なくとも1つの非コード5'配列や3'配列、例えば転写はされるが翻訳はされない配列や、終結シグナル（依存性終結シグナルや非依存性終結シグナルなど）、リボソーム結合部位、コザック配列、mRNAを安定化させる配列、イントロン、ポリアデニル化シグナルなどが挙げられるが、これだけに限定されるわけではない。ポリヌクレオチド配列は、付加アミノ酸をコードする付加コード配列も含んでいてよい。例えば、融合したポリペプチドの精製を容易にするマーカー配列をコードすることができる。本発明のいくつかの実施態様では、マーカー配列は、pQEベクター（キアジェン社）の中に与えられるヘキサヒスチジン・ペプチド（ゲンツ他、Proc. Natl. Acad. Sci. USA

40

50

、第86巻、821～824ページ、1989年）、またはHAペプチド・タグ（ウイルソン他、Cell、第37巻、767ページ、1984年）である。そのどちらも、融合することになるポリペプチド配列を精製するのに役立つことができる。本発明のポリヌクレオチドは、構造遺伝子と、それにもともと付随していて遺伝子の発現を制御する配列とを有するポリヌクレオチドも含んでいる。ただし、本発明のポリヌクレオチドに含まれているのがそれだけとは限らない。

【0046】

配列番号2のBASB047ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列は、それぞれ配列番号1のヌクレオチド番号1～1200に含まれるポリペプチド・コード配列と同じであってよい。あるいは、遺伝暗号の冗長性（縮重）の結果として、配列番号2のポリペプチドをコードする配列であってもよい。

10

【0047】

“ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド”という表現は、この明細書では、本発明のポリペプチド、特に細菌のポリペプチド、さらに特定するならば、配列番号2で与えられるアミノ酸配列を有するナイセリア・メニンギティディスのBASB047ポリペプチドをコードする配列を含むポリヌクレオチドのことを意味する。この表現は、ポリペプチドをコードする単一の連続領域または不連続領域（例えば、組み込まれたファージ、組み込まれた挿入配列、組み込まれたベクター配列、組み込まれたトランスポゾン配列によって中断されたポリヌクレオチド、またはRNAの編集、ゲノムDNAの再構成のために中断されたポリヌクレオチド）に加え、やはりコード配列および/または非コード配列を含んでいる可能性のある付加領域を含むポリヌクレオチドのことも意味する。

20

【0048】

本発明はさらに、配列番号2の推定アミノ酸配列を有するポリペプチドの変異体をコードする、この明細書に記載したポリヌクレオチドの変異体にも関する。本発明のポリヌクレオチドの断片は、例えば、本発明の完全長ポリヌクレオチドを合成するのに用いることができる。

【0049】

さらに、特に好ましい実施態様によれば、配列番号2で与えられるBASB047ポリペプチドのアミノ酸配列のうち、いくつかのアミノ酸残基、例えば5～10個、1～5個、1～3個、2個、1個、0個のアミノ酸残基が置換、変更、欠失、および/または、付加された状態が任意に組み合わせられたBASB047変異体をコードするポリヌクレオチドが提供される。その中でも特に好ましいのは、BASB047ポリペプチドの特性および活性を変化させないサイレントな置換、付加、欠失である。

30

【0050】

さらに、本発明の好ましい実施態様によれば、全長にわたって少なくとも85%が、配列番号2で与えられるアミノ酸配列を有するBASB047ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドと一致するポリヌクレオチドと、そのポリヌクレオチドと相補的なポリヌクレオチドが提供される。この点に関し、全長にわたって少なくとも90%が一致するポリヌクレオチドが特に好ましく、そうした特に好ましいポリヌクレオチドの中でも、少なくとも95%が一致するポリヌクレオチドが特に好ましい。さらに、少なくとも95%が一致するポリヌクレオチドの中でも少なくとも97%が一致するポリヌクレオチドがさらに好ましく、その中でも少なくとも98%一致するもの、少なくとも99%一致するものがそれ以上に好ましく、少なくとも99%一致するものがより一層好ましい。

40

【0051】

好ましい実施態様によれば、配列番号1のDNAによってコードされる成熟ポリペプチドと実質的に同じ生物学的な機能または活性を保持しているポリペプチドをコードするポリヌクレオチドが提供される。

【0052】

本発明の好ましいいくつかの実施態様によれば、BASB047ポリヌクレオチド配列、例えば配列番号1のポリヌクレオチドと特にストリンジェント条件下ハイブリダイズする

50

ポリヌクレオチドが提供される。

【0053】

本発明はさらに、この明細書に記載したポリヌクレオチド配列とハイブリダイズするポリヌクレオチドに関する。この点に関し、本発明は、特に、この明細書に記載したポリヌクレオチドと厳しい条件下においてハイブリダイズするポリヌクレオチドに関する。この明細書で用いる“厳しい(stringent)条件”、“厳しいハイブリダイゼーション条件”という表現は、配列間で少なくとも95%、好ましくは少なくとも97%が一致した場合にのみ起こるハイブリダイゼーションのことを意味する。厳しいハイブリダイゼーション条件の具体例は、50%ホルムアミド、5×SSC(150mMのNaCl、15mMのクエン酸三ナトリウム)、50mMのリン酸ナトリウム(pH7.6)、5×デンハルト溶液、10%硫酸デキストラン、20μg/mlの変性、切断したサケ精子DNAを含む溶液中で42℃にて一晚培養し、次に、ハイブリダイゼーション用支持体を約65℃にて0.1×SSCの中で洗浄するというものである。ハイブリダイゼーションと洗浄の条件は周知であり、例えばサムブルック他、『分子クロニング：実験室マニュアル』第2版(コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー・プレス、コールド・スプリング・ハーバー、ニューヨーク州、1989年)の特に第11章に記載されている。本発明のポリヌクレオチド配列には溶液ハイブリダイゼーションを行なうこともできる。

10

【0054】

本発明によればさらに、配列番号1で与えられるポリヌクレオチド配列にとって完全な遺伝子を含む適切なライブラリーを、配列番号1で与えられるこのポリヌクレオチド配列またはその断片を有するプローブを用いて厳しいハイブリダイゼーション条件のもとでスクリーニングし、そのポリヌクレオチド配列を単離することにより得られるポリヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド、またはそうしたポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドが提供される。そのようなポリヌクレオチドを得るのに役立つ断片としては、例えば、この明細書の別の箇所に詳しく説明したプローブやプライマーが挙げられる。

20

【0055】

本発明のポリヌクレオチド・アッセイに関してはこの明細書の別の箇所に説明してあるが、例えば本発明のポリヌクレオチドをRNA、cDNA、ゲノムDNAのハイブリダイゼーション用プローブとして用い、BASB047をコードする完全長cDNAやゲノム・クローンを単離したり、BASB047遺伝子との一致度が高い他の遺伝子、特に配列の一致度が高いcDNAやゲノム・クローンを単離したりすることができる。このプローブは、一般に、少なくとも15のヌクレオチド残基または塩基対を含んでいることになる。このプローブは、少なくとも30のヌクレオチド残基または塩基対を含んでいることが好ましく、少なくとも50のヌクレオチド残基または塩基対を含んでもよい。特に好ましいプローブは、20以上かつ30未満のヌクレオチド残基または塩基対を含むことになる。

30

【0056】

BASB047遺伝子のコード領域は、配列番号1で与えられるDNA配列を用いてオリゴヌクレオチド・プローブを合成し、このプローブを用いてスクリーニングを行なうことによって単離できる。そこで、本発明の遺伝子と相補的な配列を有する標識したオリゴヌクレオチドを用いてcDNA、ゲノムDNA、またはmRNAのライブラリーをスクリーニングし、ライブラリーのどのメンバーにプローブがハイブリダイズするかを確認する。

40

【0057】

本発明の1つの目的は、BASB054ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、特にこの明細書でBASB054と表記するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを提供することである。

【0058】

本発明の特に好ましい実施態様では、このポリヌクレオチドは、完全長の遺伝子を含んでいて配列番号3で表わされる配列を有するBASB054ポリペプチドをコードする領域、またはその変異体をコードする領域を含んでいる。

50

## 【0059】

配列番号3で与えられるB A S B 0 5 4ポリヌクレオチドは、ナイセリア・メニンギティディス菌株ATCC13090に由来するB A S B 0 5 4ポリヌクレオチドである。

## 【0060】

本発明のさらに別の側面によれば、B A S B 0 5 4ポリペプチドとポリヌクレオチド、特にナイセリア・メニンギティディスのB A S B 0 5 4ポリペプチドとポリヌクレオチドをコードおよび/または発現する、単離された核酸分子が提供される。そのような核酸分子としては、例えば、未処理のRNA、リボザイムRNA、mRNA、cDNA、ゲノムDNA、B-DNA、Z-DNAが挙げられる。本発明のさらに別の実施態様として、生物学的、診断上、予防上、臨床上、または治療上有効なポリヌクレオチドとポリペプチド、これらの変異体、これらを含む組成物がある。

10

## 【0061】

本発明の別の側面は、配列番号4の推定アミノ酸配列を有するB A S B 0 5 4ポリペプチドをコードしており、少なくとも1つの完全長遺伝子を含む単離されたポリヌクレオチドと、このポリヌクレオチドと密接に関係したポリヌクレオチドと、これらの変異体に関する。

## 【0062】

本発明の特に好ましい実施態様では、ナイセリア・メニンギティディスに由来し、配列番号4のアミノ酸配列を含むB A S B 0 5 4ポリペプチド、またはそのアミノ酸配列からなるB A S B 0 5 4ポリペプチド、またはその変異体が提供される。

20

## 【0063】

配列番号3で与えられるポリヌクレオチド配列など、この明細書の情報を用いると、標準的なクローニング法およびスクリーニング法を利用し、次に完全長のクローンを得ることによって、B A S B 0 5 4ポリペプチドをコードする本発明のポリヌクレオチドを得ることができる。なお標準的なクローニング法およびスクリーニング法としては、出発材料としてナイセリア・メニンギティディス細胞を用いて細菌から染色体DNAのクローニングとシーケンシングを行なう方法がある。例えば配列番号3で与えられるポリヌクレオチド配列などの本発明のポリヌクレオチド配列を得るためには、大腸菌またはそれ以外の適切な宿主の中で、ナイセリア・メニンギティディスの染色体DNAのクローンのライブラリーを、部分配列から由来し、好ましくは17マーまたはそれよりも長い放射線標識オリゴヌクレオチドでプローブするのが一般的である。次に、厳しい条件でのハイブリダイゼーションを行なうと、プローブのDNAと同じDNAを有するクローンを識別することができる。もとのポリペプチド配列またはポリヌクレオチド配列から設計したシーケンシング用プライマーを用いたハイブリダイゼーションを通じてこのように同定された個々のクローンをシーケンシングすることにより、ポリヌクレオチド配列を両方の方向に伸長させ、完全長遺伝子の配列を決定することができる。都合のよいことに、このようなシーケンシングは、例えばプラスミド・クローンから調製した変性した二本鎖DNAを用いて実施することができる。適切な方法は、マニアティス、T、フリッチ、E.F.、サムブルック他、『分子クローニング：実験室マニュアル』第2版（コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー・プレス、コールド・スプリング・ハーバー、ニューヨーク州、1989年）に記載されている（特に「ハイブリダイゼーションによるスクリーニング」1.90と、「変性した二本鎖DNA鑄型のシーケンシング」13.70を参照のこと）。直接的にゲノムDNAのシーケンシングを行なって完全長遺伝子の配列を得ることもできる。本発明の証拠として、配列番号3で与えられる各ポリヌクレオチドは、ナイセリア・メニンギティディスに由来するDNAライブラリーの中で発見された。

30

40

## 【0064】

さらに、配列番号3で与えられる各DNA配列は、配列番号4で与えられるアミノ酸残基とほぼ同数のアミノ酸残基を有するタンパク質をコードするオープン・リーディング・フレームを含んでいる。このタンパク質の推定分子量は、当業者には周知のアミノ酸残基の分子量の値を用いて計算することができる。

50

## 【0065】

配列番号3のポリヌクレオチドは、配列番号3のヌクレオチド番号1の開始コドンとヌクレオチド番号2407から始まる終止コドンの間で、配列番号4のポリペプチドをコードしている。

## 【0066】

本発明のさらに別の側面によれば、以下のものを含む単離されたポリヌクレオチド、または以下のものからなる単離されたポリヌクレオチドが提供される。

(a) 配列番号3の全長にわたって配列番号3と少なくとも85%が一致、好ましくは少なくとも90%が一致、さらに好ましくは少なくとも95%が一致、それ以上に好ましくは少なくとも97~99%が一致または完全に一致したポリヌクレオチド配列、または  
(b) 配列番号4の全長にわたって配列番号4と少なくとも85%が一致、好ましくは少なくとも90%が一致、さらに好ましくは少なくとも95%が一致、それ以上に好ましくは少なくとも97~99%が一致または100%正確に一致したポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列。

## 【0067】

本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、ナイセリア・メニンギティディス以外の種からのホモログやオーソログも含め、配列番号3の配列またはその断片からなる標識したプローブまたは検出可能なプローブ、あるいはこれらの配列またはその断片を含む標識したプローブまたは検出可能なプローブを用いて厳しいハイブリダイゼーション条件(例えば、温度が45~65、SDSの濃度が0.1~1%)のもとで適切なライブラリーをスクリーニングし、完全長遺伝子および/またはそのポリヌクレオチド配列を含むゲノム・クローンを単離するステップを含む方法によって得ることができる。

## 【0068】

本発明により、配列番号3の中のコード配列(オープン・リーディング・フレーム)と全長にわたって一致するポリヌクレオチド配列が提供される。さらに本発明により、成熟ポリペプチドのためのコード配列またはその断片のほか、成熟ポリペプチドのためのコード配列またはリーディング・フレーム中において別のコード配列を有する断片が提供される。別のコード配列とは、例えば、リーダー配列または分泌配列、プレタンパク質配列、プロタンパク質配列、プレプロタンパク質配列をコードする配列である。本発明のポリヌクレオチドは、少なくとも1つの非コード配列も含んでいてよい。例示するならば、少なくとも1つの非コード5'配列や3'配列、例えば転写はされるが翻訳はされない配列や、終結シグナル(依存性終結シグナルや非依存性終結シグナルなど)、リボソーム結合部位、コザック配列、mRNAを安定化させる配列、イントロン、ポリアデニル化シグナルなどが挙げられるが、これだけに限定されるわけではない。ポリヌクレオチド配列は、付加アミノ酸をコードする付加コード配列も含んでいてよい。例えば、融合したポリペプチドの精製を容易にするマーカー配列をコードすることができる。本発明のいくつかの実施態様では、マーカー配列は、pQEベクター(キアジェン社)の中に与えられるヘキサヒスチジン・ペプチド(ゲンツ他、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、第86巻、821~824ページ、1989年)、またはHAペプチド・タグ(ウイelson他、Cell、第37巻、767ページ、1984年)である。そのどちらも、融合することになるポリペプチド配列を精製するのに役立てることができる。本発明のポリヌクレオチドは、構造遺伝子と、それにもともと付随していて遺伝子の発現を制御する配列とを有するポリヌクレオチドも含んでいる。ただし、本発明のポリヌクレオチドに含まれているのがそれだけとは限らない。

## 【0069】

配列番号4のBASB054ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列は、配列番号3のヌクレオチド番号1~2406に含まれるポリペプチド・コード配列と同じであってよい。あるいは、遺伝暗号の冗長性(縮重)の結果として、配列番号4のポリペプチドをコードする配列であってよい。

## 【0070】

10

20

30

40

50

“ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド”という表現は、この明細書では、本発明のポリペプチド、特に細菌のポリペプチド、さらに特定するならば、配列番号4で与えられるアミノ酸配列を有するナイセリア・メニンギティディスのBASB054ポリペプチドをコードする配列を含むポリヌクレオチドのことを意味する。この表現は、ポリペプチドをコードする単一の連続領域または不連続領域（例えば、組み込まれたファージ、組み込まれた挿入配列、組み込まれたベクター配列、組み込まれたトランスポゾン配列によって中断されたポリヌクレオチド、またはRNAの編集、ゲノムDNAの再構成のために中断されたポリヌクレオチド）に加え、やはりコード配列および/または非コード配列を含んでいる可能性のある付加領域を含むポリヌクレオチドのことも意味する。

【0071】

10

本発明はさらに、配列番号4の推定アミノ酸配列を有するポリペプチドの変異体をコードする、この明細書に記載したポリヌクレオチドの変異体にも関する。本発明のポリヌクレオチドの断片は、例えば、本発明の完全長ポリヌクレオチドを合成するのに用いることができる。

【0072】

さらに、特に好ましい実施態様によれば、配列番号4で与えられるBASB054ポリペプチドのアミノ酸配列のうち、いくつかのアミノ酸残基、例えば5~10個、1~5個、1~3個、2個、1個、0個のアミノ酸残基が置換、変更、欠失、および/または、付加された状態が任意に組み合わせられたBASB054変異体をコードするポリヌクレオチドが提供される。その中でも特に好ましいのは、BASB054ポリペプチドの特性および活性を変化させないサイレントな置換、付加、欠失である。

20

【0073】

さらに、本発明の好ましい実施態様によれば、全長にわたって少なくとも85%が、配列番号4で与えられるアミノ酸配列を有するBASB054ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドと一致するポリヌクレオチドと、そのポリヌクレオチドと相補的なポリヌクレオチドが提供される。この点に関し、全長にわたって少なくとも90%が一致するポリヌクレオチドが特に好ましく、そうした特に好ましいポリヌクレオチドの中でも、少なくとも95%が一致するポリヌクレオチドが特に好ましい。さらに、少なくとも95%が一致するポリヌクレオチドの中でも少なくとも97%が一致するポリヌクレオチドがさらに好ましく、その中でも少なくとも98%一致するもの、少なくとも99%一致するものがそれ以上に好ましく、少なくとも99%一致するものがより一層好ましい。

30

【0074】

好ましい実施態様によれば、配列番号3のDNAによってコードされる成熟ポリペプチドと実質的に同じ生物学的な機能または活性を保持しているポリペプチドをコードするポリヌクレオチドが提供される。

【0075】

本発明の好ましいいくつかの実施態様によれば、BASB054ポリヌクレオチド配列、例えば配列番号3のポリヌクレオチドと特にストリンジェント条件下ハイブリダイズするポリヌクレオチドが提供される。

【0076】

40

本発明はさらに、この明細書に記載したポリヌクレオチド配列とハイブリダイズするポリヌクレオチドに関する。この点に関し、本発明は、特に、この明細書に記載したポリヌクレオチドと厳しい条件下においてハイブリダイズするポリヌクレオチドに関する。この明細書で用いる“厳しい条件”、“厳しいハイブリダイゼーション条件”という表現は、配列間で少なくとも95%、好ましくは少なくとも97%が一致した場合にのみ起こるハイブリダイゼーションのことを意味する。厳しいハイブリダイゼーション条件の具体例は、50%ホルムアミド、5×SSC(150mMのNaCl、15mMのクエン酸三ナトリウム)、50mMのリン酸ナトリウム(pH7.6)、5×デンハルト溶液、10%硫酸デキストラン、20μg/mlの変性、切断したサケ精子DNAを含む溶液中で42にて一晩培養し、次に、ハイブリダイゼーション用支持体を約65にて0.1×SSCの

50

中で洗浄するというものである。ハイブリダイゼーションと洗浄の条件は周知であり、例えばサムブルック他、『分子クローニング：実験室マニュアル』第2版（コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー・プレス、コールド・スプリング・ハーバー、ニューヨーク州、1989年）の特に第11章に記載されている。本発明のポリヌクレオチド配列には溶液ハイブリダイゼーションを行なうこともできる。

**【0077】**

本発明によればさらに、配列番号3で与えられるポリヌクレオチド配列にとって完全な遺伝子を含む適切なライブラリーを、配列番号3で与えられるこのポリヌクレオチド配列またはその断片を有するプローブを用いて厳しいハイブリダイゼーション条件のもとでスクリーニングし、そのポリヌクレオチド配列を単離することにより得られるポリヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド、またはそうしたポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドが提供される。そのようなポリヌクレオチドを得るのに役立つ断片としては、例えば、この明細書の別の箇所に詳しく説明したプローブやプライマーが挙げられる。

10

**【0078】**

本発明のポリヌクレオチド・アッセイに関してはこの明細書の別の箇所に説明してあるが、例えば本発明のポリヌクレオチドをRNA、cDNA、ゲノムDNAのハイブリダイゼーション用プローブとして用い、BASB054をコードする完全長cDNAやゲノム・クローンを単離したり、BASB054遺伝子との一致度が高い他の遺伝子、特に配列の一致度が高いcDNAやゲノム・クローンを単離したりすることができる。このプローブは、一般に、少なくとも15のヌクレオチド残基または塩基対を含んでいることになろう。このプローブは、少なくとも30のヌクレオチド残基または塩基対を含んでいることが好ましく、少なくとも50のヌクレオチド残基または塩基対を含んでいてもよい。特に好ましいプローブは、20以上かつ30未満のヌクレオチド残基または塩基対を含むことになろう。

20

**【0079】**

BASB054遺伝子のコード領域は、配列番号3で与えられるDNA配列を用いてオリゴヌクレオチド・プローブを合成し、このプローブを用いてスクリーニングを行なうことによって単離できる。そこで、本発明の遺伝子と相補的な配列を有する標識したオリゴヌクレオチドを用いてcDNA、ゲノムDNA、またはmRNAのライブラリーをスクリーニングし、ライブラリーのどのメンバーにプローブがハイブリダイズするかを確認する。

30

**【0080】**

本発明の1つの目的は、BASB068ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、特にこの明細書でBASB068と表記するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを提供することである。

**【0081】**

本発明の特に好ましい実施態様では、このポリヌクレオチドは、完全長の遺伝子を含んでいて配列番号5で与えられる配列を有するBASB068ポリペプチドをコードする領域、またはその変異体をコードする領域を含んでいる。

**【0082】**

配列番号5で与えられるBASB068ポリヌクレオチドは、ナイセリア・メニンギティディス菌株ATCC13090に由来するBASB068ポリヌクレオチドである。

40

**【0083】**

本発明のさらに別の側面によれば、BASB068ポリペプチドとポリヌクレオチド、特にナイセリア・メニンギティディスのBASB068ポリペプチドとポリヌクレオチドをコードおよび/または発現する、単離された核酸分子が提供される。そのような核酸分子としては、例えば、未処理のRNA、リボザイムRNA、mRNA、cDNA、ゲノムDNA、B-DNA、Z-DNAが挙げられる。本発明のさらに別の実施態様として、生物学的、診断上、予防上、臨床上、または治療上有効なポリヌクレオチドとポリペプチド、これらの変異体、これらを含む組成物がある。

**【0084】**

50

本発明の別の側面は、配列番号6の推定アミノ酸配列を有するBASB068ポリペプチドをコードしており、少なくとも1つの完全長遺伝子を含む単離されたポリヌクレオチドと、このポリヌクレオチドと密接に関係したポリヌクレオチドと、これらの変異体に関する。

【0085】

本発明の特に好ましい実施態様では、ナイセリア・メニンギティディスに由来し、配列番号6のアミノ酸配列を含むBASB068ポリペプチド、またはそのアミノ酸配列からなるBASB068ポリペプチド、またはその変異体が提供される。

【0086】

配列番号5で与えられるポリヌクレオチド配列など、この明細書の情報を用いると、標準的なクローニング法およびスクリーニング法を利用し、次に完全長のクローンを得ることによって、BASB068ポリペプチドをコードする本発明のポリヌクレオチドを得ることができる。なお標準的なクローニング法およびスクリーニング法としては、出発材料としてナイセリア・メニンギティディス細胞を用いて細菌から染色体DNAのクローニングとシーケンシングを行なう方法がある。例えば配列番号5で与えられるポリヌクレオチド配列などの本発明のポリヌクレオチド配列を得るためには、大腸菌またはそれ以外の適切な宿主の中で、ナイセリア・メニンギティディスの染色体DNAのクローンのライブラリーを、部分配列から由来し、好ましくは17マーまたはそれよりも長い放射線標識したオリゴヌクレオチドでプローブするのが一般的である。次に、厳しい条件でのハイブリダイゼーションを行なうと、プローブのDNAと同じDNAを有するクローンを識別することができる。もとのポリペプチド配列またはポリヌクレオチド配列から設計したシーケンシング用プライマーを用いたハイブリダイゼーションを通じてこのように同定された個々のクローンをシーケンシングすることにより、ポリヌクレオチド配列を両方の方向に伸長させ、完全長遺伝子の配列を決定することができる。都合のよいことに、このようなシーケンシングは、例えばプラスミド・クローンから調製した変性した二本鎖DNAを用いて実施することができる。適切な方法は、マニアティス、T、フリッチ、E.F.、サムブルック他、『分子クローニング：実験室マニュアル』第2版（コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー・プレス、コールド・スプリング・ハーバー、ニューヨーク州、1989年）に記載されている（特に「ハイブリダイゼーションによるスクリーニング」1.90と、「変性した二本鎖DNA鑄型のシーケンシング」13.70を参照のこと）。直接的にゲノムDNAのシーケンシングを行なって完全長遺伝子の配列を得ることもできる。本発明の証拠として、配列番号5で与えられる各ポリヌクレオチドは、ナイセリア・メニンギティディスに由来するDNAライブラリーの中で発見された。

【0087】

さらに、配列番号5で与えられる各DNA配列は、配列番号6で与えられるアミノ酸残基とほぼ同数のアミノ酸残基を有するタンパク質をコードするオープン・リーディング・フレームを含んでいる。このタンパク質の推定分子量は、当業者には周知のアミノ酸残基の分子量の値を用いて計算することができる。

【0088】

配列番号5のポリヌクレオチドは、配列番号5のヌクレオチド番号1の開始コドンとヌクレオチド番号2014から始まる終止コドンの間で、配列番号6のポリペプチドをコードしている。

【0089】

本発明のさらに別の側面によれば、以下のものを含む単離されたポリヌクレオチド、または以下のものからなる単離されたポリヌクレオチドが提供される。

(a) 配列番号5それぞれの全長にわたって配列番号5と少なくとも85%が一致、好ましくは少なくとも90%が一致、さらに好ましくは少なくとも95%が一致、それ以上に好ましくは少なくとも97~99%が一致または完全に一致したポリヌクレオチド配列、または

(b) 配列番号6それぞれの全長にわたって配列番号6と少なくとも85%が一致、好ま

しくは少なくとも90%が一致、さらに好ましくは少なくとも95%が一致、それ以上に好ましくは少なくとも97~99%が一致または100%正確に一致したポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列。

**【0090】**

本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、ナイセリア・メニンギティディス以外の種からのホモログやオーソログも含め、配列番号5の配列またはその断片からなる標識したプローブまたは検出可能なプローブ、あるいはこれらの配列またはその断片を含む標識したプローブまたは検出可能なプローブを用いて厳しいハイブリダイゼーション条件（例えば、温度が45~65、SDSの濃度が0.1~1%）のもとで適切なライブラリーをスクリーニングし、完全長遺伝子および/またはそのポリヌクレオチド配列を含むゲノム・クローンを単離するステップを含む方法によって得ることができる。

10

**【0091】**

本発明により、配列番号5の中のコード配列（オープン・リーディング・フレーム）と全長にわたって一致するポリヌクレオチド配列が提供される。さらに本発明により、成熟ポリペプチドのためのコード配列またはその断片のほか、成熟ポリペプチドのためのコード配列またはリーディング・フレーム中において別のコード配列を有する断片が提供される。別のコード配列とは、例えば、リーダー配列または分泌配列、プレタンパク質配列、プロタンパク質配列、プレプロタンパク質配列をコードする配列である。本発明のポリヌクレオチドは、少なくとも1つの非コード配列も含んでいてよい。例示するならば、少なくとも1つの非コード5'配列や3'配列、例えば転写はされるが翻訳はされない配列や、終結シグナル（依存性終結シグナルや非依存性終結シグナルなど）、リボソーム結合部位、コザック配列、mRNAを安定化させる配列、イントロン、ポリアダニル化シグナルなどが挙げられるが、これだけに限定されるわけではない。ポリヌクレオチド配列は、付加アミノ酸をコードする付加コード配列も含んでいてよい。例えば、融合したポリペプチドの精製を容易にするマーカー配列をコードすることができる。本発明のいくつかの実施態様では、マーカー配列は、pQEベクター（キアジェン社）の中に与えられるヘキサヒスチジン・ペプチド（ゲンツ他、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、第86巻、821~824ページ、1989年）、またはHAペプチド・タグ（ウイルソン他、Cell、第37巻、767ページ、1984年）である。そのどちらも、融合することになるポリペプチド配列を精製するのに役立てることができる。本発明のポリヌクレオチドは、構造遺伝子と、それにもともと付随していて遺伝子の発現を制御する配列とを有するポリヌクレオチドも含んでいる。ただし、本発明のポリヌクレオチドに含まれているのがそれだけとは限らない。

20

30

**【0092】**

配列番号6のBASB068ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列は、それぞれ配列番号5のヌクレオチド番号1~2013に含まれるポリペプチド・コード配列と同じであってよい。あるいは、遺伝暗号の冗長性（縮重）の結果として、配列番号6のポリペプチドをコードする配列であってもよい。

**【0093】**

“ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド”という表現は、この明細書では、本発明のポリペプチド、特に細菌のポリペプチド、さらに特定するならば、配列番号6で与えられるアミノ酸配列を有するナイセリア・メニンギティディスのBASB068ポリペプチドをコードする配列を含むポリヌクレオチドのことを意味する。この表現は、ポリペプチドをコードする単一の連続領域または不連続領域（例えば、組み込まれたファージ、組み込まれた挿入配列、組み込まれたベクター配列、組み込まれたトランスポゾン配列によって中断されたポリヌクレオチド、またはRNAの編集、ゲノムDNAの再構成のために中断されたポリヌクレオチド）に加え、やはりコード配列および/または非コード配列を含んでいる可能性のある付加領域を含むポリヌクレオチドのことも意味する。

40

**【0094】**

本発明はさらに、配列番号6の推定アミノ酸配列を有するポリペプチドの変異体をコード

50

する、この明細書に記載したポリヌクレオチドの変異体にも関する。本発明のポリヌクレオチドの断片は、例えば、本発明の完全長ポリヌクレオチドを合成するのに用いることができる。

【0095】

さらに、特に好ましい実施態様によれば、配列番号6で与えられるBASB068ポリペプチドのアミノ酸配列のうち、いくつかのアミノ酸残基、例えば5~10個、1~5個、1~3個、2個、1個、0個のアミノ酸残基が置換、変更、欠失、および/または、付加された状態が任意に組み合わせられたBASB068変異体をコードするポリヌクレオチドが提供される。その中でも特に好ましいのは、BASB068ポリペプチドの特性および活性を変化させないサイレントな置換、付加、欠失である。

10

【0096】

さらに、本発明の好ましい実施態様によれば、全長にわたって少なくとも85%が、配列番号6で与えられるアミノ酸配列を有するBASB068ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドと一致するポリヌクレオチドと、そのポリヌクレオチドと相補的なポリヌクレオチドが提供される。この点に関し、全長にわたって少なくとも90%が一致するポリヌクレオチドが特に好ましく、そうした特に好ましいポリヌクレオチドの中でも、少なくとも95%が一致するポリヌクレオチドが特に好ましい。さらに、少なくとも95%が一致するポリヌクレオチドの中でも少なくとも97%が一致するポリヌクレオチドがさらに好ましく、その中でも少なくとも98%一致するもの、少なくとも99%一致するものがそれ以上に好ましく、少なくとも99%一致するものがより一層好ましい。

20

【0097】

好ましい実施態様によれば、配列番号5のDNAによってコードされる成熟ポリペプチドと実質的に同じ生物学的な機能または活性を保持しているポリペプチドをコードするポリヌクレオチドが提供される。

【0098】

本発明の好ましいいくつかの実施態様によれば、BASB068ポリヌクレオチド配列、例えば配列番号5のポリヌクレオチドと特にストリンジェント条件下ハイブリダイズするポリヌクレオチドが提供される。

【0099】

本発明はさらに、この明細書に記載したポリヌクレオチド配列とハイブリダイズするポリヌクレオチドに関する。この点に関し、本発明は、特に、この明細書に記載したポリヌクレオチドと厳しい条件下においてハイブリダイズするポリヌクレオチドに関する。この明細書で用いる“厳しい条件”、“厳しいハイブリダイゼーション条件”という表現は、配列間で少なくとも95%、好ましくは少なくとも97%が一致した場合にのみ起こるハイブリダイゼーションのことを意味する。厳しいハイブリダイゼーション条件の具体例は、50%ホルムアミド、5xSSC(150mMのNaCl、15mMのクエン酸三ナトリウム)、50mMのリン酸ナトリウム(pH7.6)、5xデンハルト溶液、10%硫酸デキストラン、20µg/mlの変性、切断したサケ精子DNAを含む溶液中で42にて一晚培養し、次に、ハイブリダイゼーション用支持体を約65にて0.1xSSCの中で洗浄するというものである。ハイブリダイゼーションと洗浄の条件は周知であり、例えばサムブルック他、『分子クローニング：実験室マニュアル』第2版(コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー・プレス、コールド・スプリング・ハーバー、ニューヨーク州、1989年)の特に第11章に記載されている。本発明のポリヌクレオチド配列には溶液ハイブリダイゼーションを行なうこともできる。

30

40

【0100】

本発明によればさらに、配列番号5で与えられるポリヌクレオチド配列にとって完全な遺伝子を含む適切なライブラリーを、配列番号5で与えられるこのポリヌクレオチド配列またはその断片を有するプローブを用いて厳しいハイブリダイゼーション条件のもとでスクリーニングし、そのポリヌクレオチド配列を単離することにより得られるポリヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド、またはそうしたポリヌクレオチド配列を含むポリヌク

50

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

【0101】

本発明のポリヌクレオチド・アッセイに関してはこの明細書の別の箇所に説明してあるが、例えば本発明のポリヌクレオチドをRNA、cDNA、ゲノムDNAのハイブリダイゼーション用プローブとして用い、B A S B 0 6 8をコードする完全長cDNAやゲノム・クローンを単離したり、B A S B 0 6 8遺伝子との一致度が高い他の遺伝子、特に配列の一致度が高いcDNAやゲノム・クローンを単離したりすることができる。このプローブは、一般に、少なくとも15のヌクレオチド残基または塩基対を含んでいることになる。このプローブは、少なくとも30のヌクレオチド残基または塩基対を含んでいることが好ましく、少なくとも50のヌクレオチド残基または塩基対を含んでもよい。特に好ましいプローブは、20以上かつ30未満のヌクレオチド残基または塩基対を含むことになる。

10

【0102】

B A S B 0 6 8遺伝子のコード領域は、配列番号5で与えられるDNA配列を用いてオリゴヌクレオチド・プローブを合成し、このプローブを用いてスクリーニングを行なうことにより単離できる。そこで、本発明の遺伝子と相補的な配列を有する標識したオリゴヌクレオチドを用いてcDNA、ゲノムDNA、またはmRNAのライブラリーをスクリーニングし、ライブラリーのどのメンバーにプローブがハイブリダイズするかを確認する。

【0103】

本発明の1つの目的は、B A S B 0 6 9ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、特にこの明細書でB A S B 0 6 9と表記するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを提供することである。

20

【0104】

本発明の特に好ましい実施態様では、このポリヌクレオチドは、完全長の遺伝子を含んでいて配列番号7で表わされる配列を有するB A S B 0 6 9ポリペプチドをコードする領域、またはその変異体をコードする領域を含んでいる。

【0105】

配列番号7で与えられるB A S B 0 6 9ポリヌクレオチドは、ナイセリア・メニンギティディス菌株A T C C 1 3 0 9 0に由来するB A S B 0 6 9ポリヌクレオチドである。

30

【0106】

本発明のさらに別の側面によれば、B A S B 0 6 9ポリペプチドとポリヌクレオチド、特にナイセリア・メニンギティディスのB A S B 0 6 9ポリペプチドとポリヌクレオチドをコードおよび/または発現する、単離された核酸分子が提供される。そのような核酸分子としては、例えば、未処理のRNA、リボザイムRNA、mRNA、cDNA、ゲノムDNA、B-DNA、Z-DNAが挙げられる。本発明のさらに別の実施態様として、生物学的、診断上、予防上、臨床上、または治療上有効なポリヌクレオチドとポリペプチド、これらの変異体、これらを含む組成物がある。

【0107】

本発明の別の側面は、配列番号8の推定アミノ酸配列を有するB A S B 0 6 9ポリペプチドをコードしており、少なくとも1つの完全長遺伝子を含む単離されたポリヌクレオチドと、このポリヌクレオチドと密接に関係したポリヌクレオチドと、これらの変異体に関する。

40

【0108】

本発明の特に好ましい実施態様では、ナイセリア・メニンギティディスに由来し、配列番号8のアミノ酸配列を含むB A S B 0 6 9ポリペプチド、またはそのアミノ酸配列からなるB A S B 0 6 9ポリペプチド、またはその変異体が提供される。

【0109】

配列番号7で与えられるポリヌクレオチド配列など、この明細書の情報を用いると、標準的なクローニング法およびスクリーニング法を利用し、次に完全長のクローンを得ること

50

によって、B A S B 0 6 9 ポリペプチドをコードする本発明のポリヌクレオチドを得ることができる。なお標準的なクローニング法およびスクリーニング法としては、出発材料としてナイセリア・メニンギティディス細胞を用いて細菌から染色体DNAのクローニングとシーケンシングを行なう方法がある。例えば配列番号7で与えられるポリヌクレオチド配列などの本発明のポリヌクレオチド配列を得るためには、大腸菌またはそれ以外の適切な宿主の中で、ナイセリア・メニンギティディスの染色体DNAのクローンのライブラリーを、部分配列から由来し、好ましくは17マーまたはそれよりも長い放射線標識したオリゴヌクレオチドでプローブするのが一般的である。次に、厳しい条件でのハイブリダイゼーションを行なうと、プローブのDNAと同じDNAを有するクローンを識別することができる。もとのポリペプチド配列またはポリヌクレオチド配列から設計したシーケンシング用プライマーを用いたハイブリダイゼーションを通じてこのように同定された個々のクローンをシーケンシングすることにより、ポリヌクレオチド配列を両方の方向に伸長させ、完全長遺伝子の配列を決定することができる。都合のよいことに、このようなシーケンシングは、例えばプラスミド・クローンから調製した変性した二本鎖DNAを用いて実施することができる。適切な方法は、マニアティス、T、フリッチ、E.F.、サムブルック他、『分子クローニング：実験室マニュアル』第2版（コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー・プレス、コールド・スプリング・ハーバー、ニューヨーク州、1989年）に記載されている（特に「ハイブリダイゼーションによるスクリーニング」1.90と、「変性した二本鎖DNA鋳型のシーケンシング」13.70を参照のこと）。直接的にゲノムDNAのシーケンシングを行なって完全長遺伝子の配列を得ることもできる。本発明の証拠として、配列番号7で与えられる各ポリヌクレオチドは、ナイセリア・メニンギティディスに由来するDNAライブラリーの中で発見された。

10

20

**【0110】**

さらに、配列番号7で与えられる各DNA配列は、配列番号8で与えられるアミノ酸残基とほぼ同数のアミノ酸残基を有するタンパク質をコードするオープン・リーディング・フレームを含んでいる。このタンパク質の推定分子量は、当業者には周知のアミノ酸残基の分子量の値を用いて計算することができる。

**【0111】**

配列番号7のポリヌクレオチドは、配列番号7のヌクレオチド番号1の開始コドンとヌクレオチド番号2074から始まる終止コドンの間で、配列番号8のポリペプチドをコード

30

**【0112】**

本発明のさらに別の側面によれば、以下のものを含む単離されたポリヌクレオチド、または以下のものからなる単離されたポリヌクレオチドが提供される。

(a) 配列番号7の全長にわたって配列番号7と少なくとも85%が一致、好ましくは少なくとも90%が一致、さらに好ましくは少なくとも95%が一致、それ以上に好ましくは少なくとも97~99%が一致または完全に一致したポリヌクレオチド配列、または  
(b) 配列番号8の全長にわたって配列番号8と少なくとも85%が一致、好ましくは少なくとも90%が一致、さらに好ましくは少なくとも95%が一致、それ以上に好ましくは少なくとも97~99%が一致または100%正確に一致したポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列。

40

**【0113】**

本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、ナイセリア・メニンギティディス以外の種からのホモログやオーソログも含め、配列番号7の配列またはその断片からなる標識したプローブまたは検出可能なプローブ、あるいはこれらの配列またはその断片を含む標識したプローブまたは検出可能なプローブを用いて厳しいハイブリダイゼーション条件（例えば、温度が45~65、SDSの濃度が0.1~1%）のもとで適切なライブラリーをスクリーニングし、完全長遺伝子および/またはそのポリヌクレオチド配列を含むゲノム・クローンを単離するステップを含む方法によって得ることができる。

**【0114】**

50

本発明により、配列番号7の中のコード配列（オープン・リーディング・フレーム）と全長にわたって一致するポリヌクレオチド配列が提供される。さらに本発明により、成熟ポリペプチドのためのコード配列またはその断片のほか、成熟ポリペプチドのためのコード配列またはリーディング・フレーム中において別のコード配列を有する断片が提供される。別のコード配列とは、例えば、リーダー配列または分泌配列、プレタンパク質配列、プロタンパク質配列、プレプロタンパク質配列をコードする配列である。本発明のポリヌクレオチドは、少なくとも1つの非コード配列も含んでいてよい。例示するならば、少なくとも1つの非コード5'配列や3'配列、例えば転写はされるが翻訳はされない配列や、終結シグナル（依存性終結シグナルや非依存性終結シグナルなど）、リボソーム結合部位、コザック配列、mRNAを安定化させる配列、イントロン、ポリアデニル化シグナルなどが挙げられるが、これだけに限定されるわけではない。ポリヌクレオチド配列は、付加アミノ酸をコードする付加コード配列も含んでいてよい。例えば、融合したポリペプチドの精製を容易にするマーカー配列をコードすることができる。本発明のいくつかの実施態様では、マーカー配列は、pQEベクター（キアジェン社）の中に与えられるヘキサヒスチジン・ペプチド（ゲンツ他、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、第86巻、821～824ページ、1989年）、またはHAペプチド・タグ（ウイリソン他、Cell、第37巻、767ページ、1984年）である。そのどちらも、融合することになるポリペプチド配列を精製するのに役立てることができる。本発明のポリヌクレオチドは、構造遺伝子と、それにもともと付随していて遺伝子の発現を制御する配列とを有するポリヌクレオチドも含んでいる。ただし、本発明のポリヌクレオチドに含まれているのがそれだけとは限らない。

#### 【0115】

配列番号8のBASB069ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列は、配列番号7のヌクレオチド番号1～2073に含まれるポリペプチド・コード配列と同じであってよい。あるいは、遺伝暗号の冗長性（縮重）の結果として、配列番号8のポリペプチドをコードする配列であってもよい。

#### 【0116】

“ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド”という表現は、この明細書では、本発明のポリペプチド、特に細菌のポリペプチド、さらに特定するならば、配列番号8で与えられるアミノ酸配列を有するナイセリア・メニングティディスのBASB069ポリペプチドをコードする配列を含むポリヌクレオチドのことを意味する。この表現は、ポリペプチドをコードする単一の連続領域または不連続領域（例えば、組み込まれたファージ、組み込まれた挿入配列、組み込まれたベクター配列、組み込まれたトランスポゾン配列によって中断されたポリヌクレオチド、またはRNAの編集、ゲノムDNAの再構成のために中断されたポリヌクレオチド）に加え、やはりコード配列および/または非コード配列を含んでいる可能性のある付加領域を含むポリヌクレオチドのことも意味する。

#### 【0117】

本発明はさらに、配列番号8の推定アミノ酸配列を有するポリペプチドの変異体をコードする、この明細書に記載したポリヌクレオチドの変異体にも関する。本発明のポリヌクレオチドの断片は、例えば、本発明の完全長ポリヌクレオチドを合成するのに用いることができる。

#### 【0118】

さらに、特に好ましい実施態様によれば、配列番号8で与えられるBASB069ポリペプチドのアミノ酸配列のうち、いくつかのアミノ酸残基、例えば5～10個、1～5個、1～3個、2個、1個、0個のアミノ酸残基が置換、変更、欠失、および/または、付加された状態が任意に組み合わせられたBASB069変異体をコードするポリヌクレオチドが提供される。その中でも特に好ましいのは、BASB069ポリペプチドの特性および活性を変化させないサイレントな置換、付加、欠失である。

#### 【0119】

さらに、本発明の好ましい実施態様によれば、全長にわたって少なくとも85%が、配列

番号 8 で与えられるアミノ酸配列を有する B A S B 0 6 9 ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドと一致するポリヌクレオチドと、そのポリヌクレオチドと相補的なポリヌクレオチドが提供される。この点に関し、全長にわたって少なくとも 90% が一致するポリヌクレオチドが特に好ましく、そうした特に好ましいポリヌクレオチドの中でも、少なくとも 95% が一致するポリヌクレオチドが特に好ましい。さらに、少なくとも 95% が一致するポリヌクレオチドの中でも少なくとも 97% が一致するポリヌクレオチドがさらに好ましく、その中でも少なくとも 98% 一致するもの、少なくとも 99% 一致するものがそれ以上に好ましく、少なくとも 99% 一致するものがより一層好ましい。

【 0 1 2 0 】

好ましい実施態様によれば、配列番号 7 の D N A によってコードされる成熟ポリペプチドと実質的に同じ生物学的な機能または活性を保持しているポリペプチドをコードするポリヌクレオチドが提供される。

10

【 0 1 2 1 】

本発明の好ましいいくつかの実施態様によれば、B A S B 0 6 9 ポリヌクレオチド配列、例えば配列番号 7 のポリヌクレオチドと特にストリンジェント条件下ハイブリダイズするポリヌクレオチドが提供される。

【 0 1 2 2 】

本発明はさらに、この明細書に記載したポリヌクレオチド配列とハイブリダイズするポリヌクレオチドに関する。この点に関し、本発明は、特に、この明細書に記載したポリヌクレオチドと厳しい条件下においてハイブリダイズするポリヌクレオチドに関する。この明細書で用いる“厳しい条件”、“厳しいハイブリダイゼーション条件”という表現は、配列間で少なくとも 95%、好ましくは少なくとも 97% が一致した場合にのみ起こるハイブリダイゼーションのことを意味する。厳しいハイブリダイゼーション条件の具体例は、50% ホルムアミド、5 × S S C ( 1 5 0 m M の N a C l 、 1 5 m M の クエン酸三ナトリウム )、50 m M のリン酸ナトリウム ( p H 7 . 6 )、5 × デンハルト溶液、10% 硫酸デキストラン、20 μ g / m l の変性、切断したサケ精子 D N A を含む溶液中で 4 2 にて一晚培養し、次に、ハイブリダイゼーション用支持体を約 6 5 にて 0 . 1 × S S C の中で洗浄するというものである。ハイブリダイゼーションと洗浄の条件は周知であり、例えばサムブルック他、『分子クロニング：実験室マニュアル』第 2 版 ( コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー・プレス、コールド・スプリング・ハーバー、ニューヨーク州、1989年) の特に第 1 1 章に記載されている。本発明のポリヌクレオチド配列には溶液ハイブリダイゼーションを行なうこともできる。

20

30

【 0 1 2 3 】

本発明によればさらに、配列番号 7 で与えられるポリヌクレオチド配列にとって完全な遺伝子を含む適切なライブラリーを、配列番号 7 で与えられるこのポリヌクレオチド配列またはその断片を有するプローブを用いて厳しいハイブリダイゼーション条件のもとでスクリーニングし、そのポリヌクレオチド配列を単離することにより得られるポリヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド、またはそうしたポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドが提供される。そのようなポリヌクレオチドを得るのに役立つ断片としては、例えば、この明細書の別の箇所に詳しく説明したプローブやプライマーが挙げられる。

40

【 0 1 2 4 】

本発明のポリヌクレオチド・アッセイに関してはこの明細書の別の箇所に説明してあるが、例えば本発明のポリヌクレオチドを R N A 、 c D N A 、 ゲノム D N A のハイブリダイゼーション用プローブとして用い、B A S B 0 6 9 をコードする完全長 c D N A やゲノム・クローンを単離したり、B A S B 0 6 9 遺伝子との一致度が高い他の遺伝子、特に配列の一致度が高い c D N A やゲノム・クローンを単離したりすることができる。このプローブは、一般に、少なくとも 1 5 のヌクレオチド残基または塩基対を含んでいることになる。このプローブは、少なくとも 3 0 のヌクレオチド残基または塩基対を含んでいることが好ましく、少なくとも 5 0 のヌクレオチド残基または塩基対を含んでもよい。特に好ましいプローブは、20 以上かつ 3 0 未満のヌクレオチド残基または塩基対を含むことに

50

なるう。

【0125】

B A S B 0 6 9 遺伝子のコード領域は、配列番号7で与えられるDNA配列を用いてオリゴヌクレオチド・プローブを合成し、このプローブを用いてスクリーニングを行なうこと  
によって単離できる。そこで、本発明の遺伝子と相補的な配列を有する標識したオリゴヌ  
クレオチドを用いてcDNA、ゲノムDNA、またはmRNAのライブラリーをスクリー  
ニングし、ライブラリーのどのメンバーにプローブがハイブリダイズするかを確認する。

【0126】

完全長DNAを得るため、または短いDNAを伸長させるためには、当業者が利用してい  
る周知の方法がいくつかある。例えば、cDNA末端高速増幅(RACE)法に基づいた  
方法である(例えば、フローマン他、PNAS USA、第85巻、8998~9002  
ページ、1988年を参照のこと)。最近この技術が改良されて例えばMarathon  
(登録商標)法(クロンテック・ラボラトリーズ社)となり、従来よりも長いcDNAの  
探索が非常に簡単になった。このMarathon(登録商標)法では、cDNAは選択  
した組織から抽出したmRNAから調製され、“アダプター”配列が各末端部に連結され  
る。次に、遺伝子特異的なオリゴヌクレオチド・プライマーとアダプター特異的なオリゴ  
ヌクレオチド・プライマーを組み合わせることで核酸の増幅(PCR)を行ない、DNAの“欠  
けている”5'末端を増幅する。次に、“入れ子になった”プライマー、すなわち増幅さ  
れた産物の中でアニールするよう設計されたプライマー(代表例は、アダプター配列にお  
いて3'末端をさらにアニールするアダプター特異的なプライマーや、選択した遺伝子配  
列において5'末端をさらにアニールする遺伝子特異的なプライマー)を用いてPCR反  
応を繰り返す。次に、この反応の産物をDNAシーケンシングにより解析し、存在して  
いるDNAに直接この産物を結合させることによって、あるいは5'プライマーを設計す  
るための新しい配列情報を用いて独立した完全長PCRを行なうことによって完全長DN  
Aを構成し、完全な配列を得ることができる。

【0127】

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

【0128】

本発明のポリヌクレオチドは、配列番号1~8の配列から導かれたオリゴヌクレオチドで  
ある。これらポリヌクレオチドは、この明細書に記載した方法、好ましくはPCRにお  
いて利用して、ここで同定したポリヌクレオチドの全体または一部が、感染した組織内の細  
菌の中で転写されるかどうかを確かめるのに用いることができる。このような配列は、病  
原体の感染段階や感染タイプの診断にも利用できると思われる。

【0129】

本発明により、成熟タンパク質に対してアミノ末端またはカルボキシル末端にアミノ酸が  
付加されたポリペプチド、または成熟ポリペプチド内のアミノ酸からなるポリペプチド(成  
熟した形態が例えばポリペプチド鎖を2本以上持っている場合)をコードするポリヌク  
レオチドも提供される。このような配列はいろいろな機能を有するが、中でも、タンパク  
質を前駆体から成熟した形態へと処理する際にある役割を演じていたり、タンパク質の輸  
送を可能にしたり、タンパク質の半減期を長くしたり短くしたり、アッセイまたは産生の  
ためにタンパク質の取り扱いを容易にしたりできる可能性がある。生体内では一般的なこ  
とだが、付加されたアミノ酸は細胞の酵素によって成熟タンパク質から除去される可能性  
がある。

【0130】

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

【0131】

10

20

30

40

50

前駆体タンパク質は、成熟タンパク質に1つまたはそれ以上のプロ配列が融合した形態であるため、不活性になっている可能性がある。プロ配列を除去すると、そうした不活性な前駆体は一般に活性化される。プロ配列のいくつかまたはすべてを除去すると活性化させることができる。一般に、このような前駆体をプロタンパク質と呼ぶ。

#### 【0132】

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

10

#### 【0133】

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

20

#### 【0134】

本発明の1つの側面によれば、本発明のポリヌクレオチドを疾病の治療または予防、特に遺伝子免疫法に利用する方法が提供される。

#### 【0135】

本発明のポリヌクレオチドを遺伝子免疫法に利用する際には、適切なデリバリー方法を用いることが好ましかろう。例えば、プラスミドDNAを筋肉に直接注射する方法（ウォルフ他、Hum. Mol. Genet.、第1巻、363ページ、1992年；マンソーブ他、Hum. Gene. Ther.、第4巻、419ページ、1983年）、特定のタンパク質担体と複合体を形成したDNAのデリバリー（ウー他、J. Biol. Chem.、第264巻、16985ページ、1989年）、DNA-リン酸カルシウム沈殿法（ベンヴェニスティとリシェフ、PNAS USA、第83巻、9551ページ、1986年）、さまざまな形態のリポソーム内にDNAを包み込む方法（カネダ他、Science、第243巻、375ページ、1989年）、粒子衝撃（タン他、Nature、第356巻、152ページ、1992年；アイゼンブラウン他、DNA Cell Biol.、第12巻、791ページ、1993年）、クローニングしたレトロウイルス・ベクターを用いたインビボ感染（シーガー他、PNAS USA、第81巻、5849ページ、1984年）といった方法がある。

30

#### ベクター、宿主細胞、発現系

本発明は、本発明の1つまたは複数のポリヌクレオチドを含むベクターと、本発明のベクターを用いて遺伝子改変した宿主細胞と、組み換え技術による本発明のポリペプチドの産生とに関する。本発明のDNA構造体に由来するRNAを用いてそのようなタンパク質を産生させるには、細胞フリーな翻訳系も用いることができる。

40

#### 【0136】

本発明の組み換えポリペプチドは、発現系を含む遺伝子改変した宿主細胞をもとにして当業者に周知の方法で調製することができる。したがって、さらに別の側面として、本発明は、本発明の1つまたは複数のポリヌクレオチドを含む発現系と、その発現系を用いて遺伝子改変した宿主細胞と、組み換え技術による本発明のポリペプチドの産生とに関する。

#### 【0137】

本発明のポリペプチドを遺伝子組み換えにより産生させるには、遺伝子工学により宿主細胞に発現系またはその一部、あるいは本発明のポリヌクレオチドを組み込む。ポリヌクレ

50

オチドを宿主細胞に導入するには、標準的な実験の手引書に記載されている方法を用いる。実験の手引書としては、例えば、デイヴィス他、『分子生物学における基本的な方法』（1986年）、サムブルック他、『分子クローニング：実験室マニュアル』第2版（コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー・プレス、コールド・スプリング・ハーバー、ニューヨーク州、1989年）がある。方法としては、例えば、リン酸カルシウム・トランスフェクション、DEAE-デキストランを媒介としたトランスフェクション、トランスフェクション、微量注入、陽イオン性脂質を媒介としたトランスフェクション、電気穿孔、形質導入、スクレープ・ローディング、バリスティック導入、感染がある。

#### 【0138】

適切な宿主細胞の代表例としては、細菌細胞である連鎖球菌 (*streptococci*)、ブドウ球菌 (*staphylococci*)、腸球菌 (*enterococci*)、大腸菌 (*E. coli*)、放線菌 (*streptomyces*)、シアノバクテリア (*cyanobacteria*)、枯草菌 (*Bacillus*)、モラクセラ・カタラーリス (*Moraxella catarrhalis*)、インフルエンザ菌 (*Haemophilus influenzae*)、髄膜炎菌の細胞 (*Neisseria meningitidis*)；菌類の細胞である酵母、クイヴェロミセス (*Kluyveromyces*)、サッカロミセス、担子菌、カンジダ・アルビカンス (*Candida albicans*)、コウジカビ (*Aspergillus*) の細胞；昆虫の細胞であるショウジョウバエ S2、スポドプテラ (*Spodoptera*) Sf9 の細胞；動物の細胞である CHO、COS、HeLa、C127、3T3、BHK、293、CV-1、パウエス黒腫の細胞；植物の細胞である裸子植物、被子植物の細胞が挙げられる。

#### 【0139】

本発明のポリペプチドを産生させるのに多彩な発現系を用いることができる。そのようなベクターとしては、特に、染色体由来のベクター、エピソーム由来のベクター、ウイルス由来のベクターが挙げられる。具体的には、細菌プラスミド由来のベクター、バクテリオファージ由来のベクター、トランスポゾン由来のベクター、酵母エピソーム由来のベクター、挿入要素由来のベクター、酵母染色体要素由来のベクターや、バキュロウイルス、SV40 などのパポバウイルス、ワクシニアウイルス、アデノウイルス、鶏痘ウイルス、仮性狂犬病ウイルス、ピコルナウイルス、レトロウイルス、アルファウイルスなどのウイルスに由来するベクターのほか、これらの組み合わせに由来するベクター、例えばプラスミドとバクテリオファージの遺伝子要素であるコスミドとファージミドの組み合わせに由来するベクターが挙げられる。発現系構造体は、発現の調節と発生を制御する領域を含んでいてよい。一般に、宿主内でポリヌクレオチドの維持、伝播、発現および/またはポリペプチドの発現をさせるのに適した任意の系またはベクターを用いて発現させることができる。周知のさまざまな一般的な方法のうちの任意の方法を用いて適切な DNA 配列を発現系に挿入することができる。そうした方法は、例えば、サムブルック他、『分子クローニング：実験室マニュアル』（前掲）に記載されている。

#### 【0140】

真核生物における組み換え発現系においては、翻訳されたタンパク質を小胞体の内腔、細胞周辺腔、または細胞外環境に分泌させるため、適切な分泌シグナルが、発現されるポリペプチドに組み込まれている可能性がある。このシグナルは、ポリペプチドにとって内在性である可能性と、異種性シグナルである可能性とがある。

#### 【0141】

本発明のポリペプチドは、周知の方法によって組み換え細胞培養物から回収し、精製することができる。周知の方法としては、例えば、硫酸アンモニウムまたはエタノールによる沈殿、酸抽出、陰イオンまたは陽イオン交換クロマトグラフィ、ホスホセルロース・クロマトグラフィ、疎水性相互作用クロマトグラフィ、アフィニティ・クロマトグラフィ、ヒドロキシルアパタイト・クロマトグラフィ、レクチン・クロマトグラフィが挙げられる。精製にはイオン金属アフィニティ・クロマトグラフィ (IMAC) を利用するのが最も好ましい。ポリペプチドが細胞内合成、単離、精製の間に変性した場合には、周知の方法を

用いてタンパク質を再度折り畳み、活性な立体配座を再現することができる。

【0142】

発現系は、ウイルスや細菌などの生きた組み換え微生物であってもよい。対象とする遺伝子を生きた組み換えウイルスや細菌のゲノムに挿入することができる。この生きたベクターを接種して生体に感染させると、抗原が生体内で発現し、免疫応答が誘導されることになる。この目的で使用されるウイルスや細菌としては、例えば、ポックスウイルス（例えばワクシニア、禽痘、カナリア痘）、アルファウイルス（シンドビスウイルス、セムリキ森林ウイルス、ベネズエラ馬脳炎ウイルス）、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ピコルナウイルス（ポリオウイルス、ライノウイルス）、ヘルペスウイルス（水痘帯状ヘルペスウイルスなど）、リステリア菌、サルモネラ菌、ナイセリア菌、BCGが挙げられる。これらのウイルスや細菌は毒性を持っている可能性があり、生ワクチンを得るためにさまざまな方法で毒性を弱めることができる。このような生ワクチンも本発明の一部である。

10

診断法、予後予測法、血清型分類法、突然変異検出法

本発明は、本発明のBASB047、BASB054、BASB068又はBASB069というポリヌクレオチドとポリペプチドを診断用試薬として用いることにも関する。真核生物、特に哺乳類、その中でもヒトにおけるBASB047、BASB054、BASB068又はBASB069ポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチドを検出することにより、疾病の診断、疾病の段階分類、感染した生体の薬剤に対する反応を診断する方法が提供されることになる。真核生物、特に哺乳類、その中でもヒト、その中でもBASB047、BASB054、BASB068又はBASB069という遺伝子またはタンパク質を含む生物に感染したヒト、またはその生物の感染が疑われるヒトは、周知のさまざまな方法ならびにこの明細書に記載した方法によって、核酸またはアミノ酸レベルで検出することが可能である。

20

【0143】

予後、診断、またはそれ以外の解析のためのポリペプチドとポリヌクレオチドは、感染が推定される個体および/または感染した個体の体内物質から得ることができる。他の任意の供給源、特にDNAまたはRNAに由来するポリヌクレオチドは、直接検出に用いること、あるいは解析を行なう前にPCRまたはその他の任意の方法で酵素による増幅を行なうことができる。RNA、特にmRNAや、cDNA、ゲノムDNAも同様にして用いることができる。増幅を行なうことにより、個人に感染した生物またはその個人の体内に住み着いている生物の種や菌株のキャラクテリゼーションを、その生物から選択したポリヌクレオチドの血清型を分析することにより実現できる。増幅された産物を、関連した生物、好ましくは同じ属の異なる種、または同じ種の異なる株から選択した参照配列の血清型と比較した場合のサイズ変化により、欠失および挿入を検出することができる。点突然変異は、増幅したDNAを、標識したBASB047、BASB054、BASB068又はBASB069ポリヌクレオチド配列とハイブリダイズさせることにより同定できる。完全に一致した配列、またはかなりの割合が一致した配列は、DNAとRNAのそれぞれについてDAアーゼまたはRNアーゼによる消化によって、あるいは溶解温度または再生キネティックスの差を検出することによって、不完全にしか一致していない複製、またはかなりの割合が一致していない複製と区別することができる。ポリヌクレオチド配列の差は、参照配列と比較した場合のゲル中におけるポリヌクレオチド断片の電気泳動における移動度の変化としても検出することができる。その場合に変性剤は用いても用いなくてもよい。ポリヌクレオチドの差は、DNAまたはRNAを直接シーケンシングすることによって検出することができる。例えば、マイヤーズ他、Science、第230巻、1242ページ、1985年を参照のこと。特定の位置における配列の変化は、RNアーゼ、V1、S1保護アッセイなどのヌクレアーゼ保護アッセイや、化学的切断法によっても明らかにすることができる。例えば、コットン他、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、第85巻、4397~4401ページ、1985年を参照のこと。

30

40

【0144】

50

別の実施態様では、B A S B 0 4 7、B A S B 0 5 4、B A S B 0 6 8又はB A S B 0 6 9ヌクレオチド配列またはその断片を含むオリゴヌクレオチド・プローブをアレイに構成して、例えば遺伝子突然変異、血清型、分類、同定のスクリーニングを効果的に行なうことができる。アレイ技術は周知で一般性があるため、遺伝子発現、遺伝子連鎖、遺伝子可変性などの分子遺伝学のさまざまな問題に適用することができる（例えば、*Science*、第274巻、610ページ、1996年を参照のこと）。

【0145】

そこで別の側面として、本発明は、以下のものを含む診断キットに関する。

(a) 本発明のポリヌクレオチド、好ましくは配列番号1、3、5、7のヌクレオチド配列、またはその断片；

(b) (a)の配列と相補的なヌクレオチド配列；

(c) 本発明のポリペプチド、好ましくは配列番号2、4、6、8のポリペプチド、またはその断片；

(d) 本発明のポリペプチドに対する抗体、好ましくは配列番号2、4、6、8のポリペプチドに対する抗体。

【0146】

このようなキット(a)、(b)、(c)、(d)のいずれもが実質的な成分を含んでいることが理解されよう。このようなキットは、特に、疾病の診断または疾病に対する感受性の診断に用いられる。

【0147】

本発明は、診断用試薬としての本発明のポリヌクレオチドの利用法にも関する。本発明のポリヌクレオチド、好ましくは配列番号1、3、5又は7のポリヌクレオチドが突然変異して過少発現、過剰発現、または変化した発現を起こすと疾病や病原性と関係してくるので、そうした突然変異を検出することは診断の手段となり、疾病の診断、疾病の予後予測、疾病段階の決定、疾病に対する感受性の確認の参考にしたり、そうしたことを明確にしたりすることができる。このようなポリヌクレオチドに突然変異を起こした生物、特にそのような状態の感染生物は、さまざまな方法、例えばこの明細書の別の箇所に記載した方法によってポリヌクレオチド・レベルで検出することができる。

【0148】

本発明のポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチドに突然変異または多型(対立遺伝子の変異)を有する生物からの細胞は、さまざまな方法によってポリヌクレオチドまたはポリペプチドのレベルで検出し、例えば血清型を決めることもできる。例えば、RT-PCRを利用してRNAにおける突然変異を検出することができる。RT-PCRを自動化した検出システム、例えばジーンスキャンと組み合わせることが特に好ましい。RNA、cDNA、ゲノムDNAに対してもPCRを行なうことができる。一例として、B A S B 0 4 7、B A S B 0 5 4、B A S B 0 6 8又はB A S B 0 6 9ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドと相補的なPCRプライマーを用いて突然変異を同定したり解析したりすることができる。

【0149】

本発明によれば、1、2、3、または4個のヌクレオチドが5'末端および/または3'末端から除去されたプライマーがさらに提供される。このプライマーは、特に、個体に由来するサンプル、例えば体を構成している物質に由来するサンプルから単離したB A S B 0 4 7、B A S B 0 5 4、B A S B 0 6 8又はB A S B 0 6 9のDNAおよび/またはRNAを増幅するのに用いることができる。感染した個体から単離したポリヌクレオチドをこのプライマーを用いて増幅すると、次にさまざまな方法によりそのポリヌクレオチドの配列を明らかにすることができる。このようにして、ポリヌクレオチド配列における突然変異を検出し、その突然変異をもとにして、感染状態またはその段階や進行状況の診断および/または予後予測、感染体の血清型決定および/または分類を行なうことができる。

【0150】

本発明によればさらに、疾病の診断、好ましくは細菌感染の診断、さらに好ましくはナイ

10

20

30

40

50

セリア・メニンギティディスによって起こる感染を診断する方法も提供される。この方法には、個体に由来するサンプル、例えば体を構成している物質に由来するサンプルから、配列番号 1、3、5 又は 7 の配列を有するポリヌクレオチドの発現レベルの上昇を測定する操作が含まれる。B A S B 0 4 7、B A S B 0 5 4、B A S B 0 6 8 又は B A S B 0 6 9 ポリヌクレオチドの発現の上昇または減少は、ポリヌクレオチドの定量法として当業者には周知の方法のうちの任意の方法を用いて測定することができる。そうした方法としては、例えば、増幅法、P C R 法、R T - P C R 法、R N アーゼ保護法、ノーザン・プロット法、分光法、その他のハイブリダイゼーション法がある。

#### 【0151】

さらに、対照用の正常組織サンプルと比べることによって B A S B 0 4 7、B A S B 0 5 4、B A S B 0 6 8 又は B A S B 0 6 9 ポリペプチドの過剰発現を検出するという本発明の診断法を利用し、例えば感染の存在を検出することができる。宿主に由来するサンプル、例えば体を構成している物質に由来するサンプル中の B A S B 0 4 7、B A S B 0 5 4、B A S B 0 6 8 又は B A S B 0 6 9 ポリペプチドのレベルを測定するのに用いることができるアッセイ法は当業者には周知である。そうしたアッセイ法としては、放射線免疫検定法、競合結合アッセイ、ウエスタン・プロット解析法、抗体サンドイッチ・アッセイ、抗体検出法、E L I S A 法などがある。

#### 【0152】

本発明のポリヌクレオチドは、ポリヌクレオチド・アレイの成分、好ましくは高密度アレイまたはグリッドの成分として用いることができる。この高密度アレイは、診断および予後予測に特に有効である。例えば、それぞれが、異なる遺伝子に加えて本発明の 1 つまたは複数のポリヌクレオチドを含むスポットの集合を用い、体を構成している物質から得られた、またはそうした物質に由来するプローブを用い、ハイブリダイゼーションまたは核酸増幅などを利用してプロービングを行ない、個体の体内に特定のポリヌクレオチド配列または関連した配列が存在しているかどうかを決定することができる。そのようなものが存在しているということは、病原体、特にナイセリア・メニンギティディスが存在していることを示唆している可能性があり、疾病または疾病進行の診断および/または予後予測を明確にするのに役立つ可能性がある。配列番号 1、3、5、7 のポリヌクレオチド配列の多数の変異体を含むグリッドが好ましい。配列番号 2、4、6 又は 8 のポリペプチド配列をコードするポリヌクレオチド配列の多数の変異体を含むグリッドも好ましい。

#### 抗体

本発明のポリペプチドとポリヌクレオチド、またはその変異体、またはそれを発現する細胞を免疫原として用い、そのようなポリペプチドまたはポリヌクレオチドに対して免疫特異的な抗体を産生させることができる。

#### 【0153】

本発明の好ましいいくつかの実施態様によれば、B A S B 0 4 7、B A S B 0 5 4、B A S B 0 6 8 又は B A S B 0 6 9 ポリペプチドまたはポリヌクレオチドに対する抗体が提供される。

#### 【0154】

本発明のポリペプチドまたはポリヌクレオチドに対する抗体は、本発明のポリペプチドおよび/またはポリヌクレオチド、あるいはエピトープを有するその一方または両方の断片、あるいはその一方または両方のアナログ、あるいはその一方または両方を発現する細胞を、動物、好ましくはヒトでない動物に一般的なプロトコルに従って投与することにより得ることができる。モノクローナル抗体を調製するためには、連続的細胞系培養によって産生される抗体を提供する任意の従来法を用いることができる。さまざまな方法があり、例えば、ケーラー、G、ミルシュタイン、C.、Nature、第 256 巻、495 ~ 497 ページ、1975 年；コズポー他、Immunology Today、第 4 巻、72 ページ、1983 年；コール他、『モノクローナル抗体とガン治療』（アラン R. リス社、1985 年）の 77 ~ 96 ページが挙げられる。

#### 【0155】

一本鎖の抗体の産生法（アメリカ合衆国特許第4,946,778号）を利用して本発明のポリペプチドまたはポリヌクレオチドに対する一本鎖の抗体を産生させることができる。また、トランスジェニック・マウス、またはそれ以外の生物や動物、例えば哺乳類を利用して、本発明のポリペプチドまたはポリヌクレオチドに対する免疫特異的なヒト化した抗体を発現させることができる。

【0156】

別の方法として、ファージ提示法を利用して、抗B A S B 0 4 7、抗B A S B 0 5 4、抗B A S B 0 6 8又は抗B A S B 0 6 9を処理するためにスクリーニングされたヒト由来リンパ球のPCR増幅されたv-遺伝子のレパートリーから、あるいは実験されたことのないライブラリーから、本発明のポリペプチドに対する結合活性を有する抗体遺伝子を選択することができる（マッカファーティ他、Nature、第348巻、552～554ページ、1990年；マークス他、Biotechnology、第10巻、779～783ページ、1992年）。これら抗体の親和性は、例えばチェーン・シャッフリングによって向上させることもできる（クラクソン他、Nature、第352巻、628ページ、1991年）。

10

【0157】

上記の抗体を用いて本発明のポリペプチドまたはポリヌクレオチドを発現するクローンを単離または同定し、例えばアフィニティ・クロマトグラフィによってそのポリペプチドまたはポリヌクレオチドを精製することができる。

【0158】

したがって、特にB A S B 0 4 7、B A S B 0 5 4、B A S B 0 6 8又はB A S B 0 6 9ポリペプチドまたはB A S B 0 4 7、B A S B 0 5 4、B A S B 0 6 8又はB A S B 0 6 9ポリヌクレオチドに対する抗体を用いて感染、特に細菌感染を治療することができる。

20

【0159】

ポリペプチドの変異体として、抗原、エピトープ、または免疫に関して等価な変異体は、本発明の特別な一側面を構成する。

【0160】

抗体またはその変異体を修飾して個体の中で免疫性を低下させることが好ましい。例えば、個体がヒトである場合、抗体が“ヒト化され”ていて、ハイブリドーマに由来する抗体の相補性決定領域がヒトのモノクローナル抗体に移植されていることが最も好ましい。これについては、例えば、ジョーンズ他、Nature、第321巻、522～525ページ、1986年、またはテンペスト他、Biotechnology、第9巻、266～273ページ、1991年に記載されている。

30

アンタゴニストとアゴニスト-アッセイと分子

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

【0161】

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

40

50

ポリペプチドとポリヌクレオチドを用い、アゴニストまたはインヒビターの存在下で、候補化合物がそのポリペプチドまたはポリヌクレオチドの活性化を抑制するかどうかをテストすることにより、逆アゴニストまたは逆インヒビターのスクリーニングができる。さらに、スクリーニング法は、候補化合物を本発明のポリペプチドまたはポリヌクレオチドを含む溶液と混合して混合物にし、その混合物中のBASB047、BASB054、BASB068又はBASB069ポリペプチドおよび/またはポリヌクレオチドの活性を測定し、その混合物のBASB047、BASB054、BASB068又はBASB069ポリペプチドおよび/またはポリヌクレオチドの活性を基準と比較する操作だけを含むようにすることが可能である。融合タンパク質、例えばFcタンパク質とBASB047、BASB054、BASB068、またはBASB069ポリペプチドとから作られる融合タンパク質は、すでに説明したように、本発明のポリペプチドのアンタゴニストや、系統発生上および/または機能上関連したポリペプチドのアンタゴニストを同定するためのハイスループット・スクリーニング・アッセイにも用いることができる(D. ベネット他、J. Mol. Recognition、第8巻、52~58ページ、1995年; K. ヨハンソン他、J. Biol. Chem.、第270巻(16)、9459~9471ページ、1995年を参照のこと)。

#### 【0162】

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

#### 【0163】

本発明により、BASB047、BASB054、BASB068又はBASB069ポリペプチドまたはポリヌクレオチドの作用を促進(アゴニスト)または阻止(アンタゴニスト)する化合物、特に細菌発育抑制性および/または殺菌性の化合物を同定するための化合物スクリーニング法も提供される。このスクリーニング法にはハイスループット技術を含めることが可能である。例えば、アゴニストまたはアンタゴニストをスクリーニングするため、BASB047、BASB054、BASB068又はBASB069ポリペプチドと、そのポリペプチドの基質またはリガンドを標識したものとを含む合成反応混合物、細胞の区画(例えば膜、細胞外被、細胞壁)、またはこれらのうちの任意のものの調製物を、BASB047、BASB054、BASB068又はBASB069のアゴニストまたはアンタゴニストの可能性のある候補化合物の不在下または存在下で培養する。候補化合物がBASB047、BASB054、BASB068又はBASB069ポリペプチドを作動させる能力または拮抗する能力は、標識したリガンドの結合の低下、またはそのような基質からの産物の産生低下となって現われる。BASB047、BASB054、BASB068又はBASB069ポリペプチドの効果を誘起することなく結合する分子は、よいアンタゴニストである可能性が最も高い。よく結合する分子や、場合によっては基質からの産物の産生率を上昇させる分子、シグナル伝達を増加させる分子、化学チャネルの活性を増大させる分子は、アゴニストである。状況に応じて起こる基質からの産物の産生、シグナル伝達、化学チャネルの活性の割合やレベルは、レポーター系を用いることによって容易に検出することができる。この点に関して役に立つ可能性のあるレポーター系としては、測色用に標識した基質が産物に変換されたもの、BASB047、BASB054、BASB068又はBASB069ポリヌクレオチドまたはポリペプチドの活性の変化に関与するレポーター遺伝子、従来技術で既知の結合アッセイが挙げられるが、これだけに限定されるわけではない。

#### 【0164】

B A S B 0 4 7、B A S B 0 5 4、B A S B 0 6 8 又は B A S B 0 6 9 のアゴニストを探すアッセイの別の一例は、競合抑制アッセイにとって適切な条件下で、B A S B 0 4 7、B A S B 0 5 4、B A S B 0 6 8 又は B A S B 0 6 9 と潜在的なアゴニストとを、B A S B 0 4 7、B A S B 0 5 4、B A S B 0 6 8 又は B A S B 0 6 9 と結合する分子、B A S B 0 4 7、B A S B 0 5 4、B A S B 0 6 8 又は B A S B 0 6 9 と結合する組み換え分子、天然の基質またはリガンド、あるいは基質またはリガンドを真似たものと結合させるという競合アッセイである。B A S B 0 4 7、B A S B 0 5 4、B A S B 0 6 8 又は B A S B 0 6 9 を放射活性物質または測色用化合物などで標識すると1つの結合分子に結合したり産物に変換されたりする B A S B 0 4 7、B A S B 0 5 4、B A S B 0 6 8 又は B A S B 0 6 9 の数を正確に測定できるため、潜在的なアンタゴニストの効果を評価することができる。

10

#### 【0165】

潜在的なアンタゴニストとしては、特に、本発明のポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチドと結合し、そのことによってその活性または発現が抑制されたり消えたりする小さな有機分子、ペプチド、ポリペプチド、抗体が挙げられる。潜在的なアンタゴニストとしては、結合分子の同じ部位に結合するが B A S B 0 4 7、B A S B 0 5 4、B A S B 0 6 8 又は B A S B 0 6 9 によって誘起される活性を誘起せず、そのことによって B A S B 0 4 7、B A S B 0 5 4、B A S B 0 6 8 又は B A S B 0 6 9 ポリペプチドおよび/またはポリヌクレオチドが結合するのを排除して B A S B 0 4 7、B A S B 0 5 4、B A S B 0 6 8 又は B A S B 0 6 9 ポリペプチドおよび/またはポリヌクレオチドの作用または発現を阻止する小さな有機分子、ペプチド、密接な関係のあるタンパク質などのポリペプチド、抗体も可能である。

20

#### 【0166】

潜在的なアンタゴニストとしては、ポリペプチドの結合部位と結合してその部位を占拠し、そのことによって細胞と結合する分子の結合を阻止し、正常な生物活性を抑制する小さな分子も挙げられる。小さな分子の実例としては、小さな有機分子、ペプチド、ペプチド様分子が挙げられるが、これだけに限定されるわけではない。これ以外の潜在的なアンタゴニストとしては、アンチセンス分子がある(この分子の説明に関しては、オカノ、J. Neurochem.、第56巻、560ページ、1991年;『遺伝子発現のアンチセンス・インヒビターとしてのオリゴデオキシヌクレオチド』、CRCプレス、ボカ・ラトン、フロリダ州、1988年を参照のこと)。好ましい潜在的なアンタゴニストとしては、B A S B 0 4 7、B A S B 0 5 4、B A S B 0 6 8 又は B A S B 0 6 9 と関係のある化合物、B A S B 0 4 7、B A S B 0 5 4、B A S B 0 6 8 又は B A S B 0 6 9 の変異体が挙げられる。

30

#### 【0167】

さらに別の側面として、本発明は、本発明のポリペプチドまたはその断片と、さまざまなサブクラスの免疫グロブリン(IgG、IgM、IgA、IgE)のH鎖またはL鎖の定常領域のさまざまな部分を含む遺伝子組み換え可溶性融合タンパク質に関する。免疫グロブリンとして好ましいのは、ヒトIgG、特にIgG1のH鎖の定常部分であり、そのヒンジ領域において融合が起こる。特別な実施態様によると、Fc部は、血液凝固第Xa因子を用いて切断することのできる切断配列を組み込むことによって簡単に除去することができる。本発明はさらに、遺伝子工学によるこの融合タンパク質の調製方法と、この融合タンパク質を利用して行なう薬剤のスクリーニング、診断、治療にも関する。本発明のさらに別の側面は、そのような融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドにも関する。融合タンパク質に関する技術の実例は、国際特許出願WO94/29458、WO94/22914に見ることができる。

40

#### 【0168】

この明細書に記載した各ポリヌクレオチド配列は、抗菌化合物の発見や開発に用いることができる。コードされたタンパク質は、発現すると、抗菌薬剤をスクリーニングするためのターゲットとして用いることができる。さらに、コードされたタンパク質のアミノ末端

50

領域をコードしているポリヌクレオチド配列、シャイン・ダルガルノ配列、または個々の mRNA の翻訳を容易にする配列を用いてアンチセンス配列を構成し、対象とするコード配列の発現を制御することができる。

【0169】

本発明により、本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチド、アゴニスト、アンタゴニストを利用して、1つまたは複数の病原体と、感染後の発病の原因である真核生物の宿主、好ましくは哺乳類の宿主との間の最初の物理的相互作用を阻止するという利用法も提供される。特に、本発明の分子は、細菌、中でもグラム陽性菌および/またはグラム陰性菌が、留置器具上の真核生物、好ましくは哺乳類の細胞外マトリックス・タンパク質に、または傷の細胞外マトリックス・タンパク質に付着するのを阻止するのに用いること；真核生物、好ましくは哺乳類の細胞外マトリックス・タンパク質と、組織の損傷をもたらす細菌の BASB047、BASB054、BASB068 又は BASB069 タンパク質の間に細菌が付着するのを阻止するのに用いること、および/または；留置器具の移植その他の外科的方法とは異なる経緯により感染したことによって発病が普通に進行するのを阻止するのに用いることができる。

10

【0170】

本発明のさらに別の側面によれば、BASB047、BASB054、BASB068 又は BASB069 アゴニストとアンタゴニスト、好ましくは細菌発育抑制性および/または殺菌性のアゴニストとアンタゴニストが提供される。

【0171】

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

20

【0172】

さらに別の側面として、本発明は、本発明のポリペプチドのミモトープに関する。ミモトープは、天然のペプチドと（配列または構造が）非常によく似たペプチド配列であり、天然のペプチドを認識する抗体によって認識される。ミモトープはまた、適切な担体と結合した場合に、天然のペプチドを認識する抗体を強化することもできる。

【0173】

ペプチド・ミモトープは、選択したアミノ酸を付加したり、欠失させたり、置換したりすることによって特定の目的用に設計することができる。したがってペプチドは、タンパク質担体と容易に結合できるように修飾することができる。例えば、いくつかの化学的結合法にとっては末端にシステインを含むようにすることが望ましかろう。それに加え、タンパク質担体と結合したペプチドにおいて、そのペプチドの結合した末端とは反対側に疎水性末端を含むようにして、そのペプチドの結合していないこの自由な末端がタンパク質担体の表面と会合したままになっているようにすることが望ましかろう。そうすることにより、このペプチドが、もとの分子全体の文脈にあるときのペプチドの配座と非常によく似た配座になる。例えばペプチドは、N末端のシステインとC末端の疎水性のアミド化された尾部を持つように変えることができる。また、1つまたはそれ以上のアミノ酸について D-立体異性体を付加または置換して、例えばペプチドの安定性を向上させるという好ましい誘導体を作ることができる。

30

40

【0174】

また、ペプチド・ミモトープは、ファージ提示法などの方法を利用し、本発明のポリペプチドと結合することのできる抗体を用いて同定することができる（EP 0 552 267 B1）。この方法により、天然のペプチドと構造が似ており、したがってアンチ天然のペプチド抗体に結合できるが、必ずしも天然のポリペプチドとは配列がそれほど似てはいない多数のペプチド配列が生まれる。

ワクチン

本発明の別の側面は、個体、特に哺乳類、好ましくはヒトにおいて免疫応答を誘起する方法に関する。この方法は、その個体を、感染、特に細菌感染、中でもナイセリア・ meningitidis の感染から保護するため、抗体および/または T 細胞免疫応答を発生させる

50

のに十分なBASB047、BASB054、BASB068又はBASB069ポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチド、あるいはその断片または変異体をこの個体に接種する操作を含んでいる。

【0175】

本発明により、そのような免疫応答によって細菌の複製速度が遅くなる方法も提供される。本発明のさらに別の側面は、個体において免疫応答を誘起する別の方法に関する。この方法は、その個体に核酸ベクター、配列、またはリボザイムを供給してBASB047、BASB054、BASB068又はBASB069ポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチド、あるいはその断片または変異体の発現を指示し、BASB047、BASB054、BASB068又はBASB069ポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチド、あるいはその断片または変異体を生体内で発現させて、疾病がすでにその個体、好ましくはヒトの体内で発生しているかどうかどうかに関係なく、その個体をその疾病から保護するために、抗体および/またはT細胞（例えばサイトカイン産生T細胞または細胞障害性T細胞を含む）の免疫応答の発生などの免疫応答を誘起する操作を含んでいる。遺伝子投与の一例は、その遺伝子を、粒子のコートイングなどとして望む細胞の中に急いで入れるというものである。このような核酸ベクターは、DNA、RNA、リボザイム、修飾された核酸、DNA/RNAハイブリッド、DNA-タンパク質複合体、またはRNA-タンパク質複合体を含むことができる。

10

【0176】

本発明のさらに別の側面は、個体、好ましくはヒトに導入されたときにその個体の体内で免疫応答を誘起することができて、その個体にBASB047、BASB054、BASB068又はBASB069ポリヌクレオチドおよび/またはそれによってコードされたポリペプチドに対する免疫応答を誘起する免疫性組成物に関する。この免疫性組成物は、組み換えBASB047、BASB054、BASB068又はBASB069ポリヌクレオチドおよび/またはそれによってコードされたポリペプチド、および/または、このBASB047、BASB054、BASB068又はBASB069ポリヌクレオチド、それによってコードされたポリペプチド、または本発明の他のポリペプチドの抗体をコードし発現するDNAおよび/またはRNAを含んでいる。この免疫応答を治療または予防に利用することが可能である。また、この免疫応答は、抗体免疫の形態および/または細胞免疫の形態、例えばCTLまたはCD4+T細胞から生まれる細胞免疫の形態を取ることができる。

20

30

【0177】

BASB047、BASB054、BASB068又はBASB069ポリペプチドまたはその断片を、補タンパク質または化合物断片と融合させることが可能である。補タンパク質または化合物断片は、それ自体は抗体を産生させても産生させなくてもよいが、第1のタンパク質を安定化させて、抗原特性および/または免疫特性、好ましくは保護特性を有する融合タンパク質または修飾タンパク質を産生させることができるものである。したがって、組み換え融合タンパク質は、例えばインフルエンザ菌 (*Haemophilus influenzae*)、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST)、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼなどの抗原性補タンパク質、またはそのタンパク質を可溶化しその産生と精製を容易にする任意の他の比較的大きな補タンパク質からのリポタンパク質をさらに含んでいることが好ましい。さらに、補タンパク質は、そのタンパク質を受け入れる生物の免疫系を一般的に刺激するという意味のアジュバントとして作用することができる。補タンパク質は、第1のタンパク質のアミノ末端またはカルボキシル末端のいずれかに付着することができる。

40

【0178】

本発明のワクチン組成物では、BASB047、BASB054、BASB068又はBASB069ポリペプチドおよび/またはポリヌクレオチド、その断片、そのミモトープ、その変異体が、上記の生きた組み換えベクター、例えば生きた細菌ベクターなどのベクター内に存在していてもよい。

50

## 【0179】

BASB047、BASB054、BASB068又はBASB069ポリペプチドにとっては、生きていないベクター、例えば細菌の外膜小胞、すなわち“泡状突起”も適している。OM泡状突起はグラム陰性菌の2層膜の外膜に由来するものであり、クラミジア・トラコマティス(*C. trachomatis*)やオウム病クラミジア(*C. psittaci*)を始めとする多数のグラム陰性菌において記録されている(ツウ, L. 他、FEMS Microbiol. Lett., 第163巻、223~228ページ、1998年)。泡状突起を発生させると報告されている細菌性病原体としては、ボルデテラ・ペルトウシス(*Bordetella pertussis*)、ボレリア・ブルグドルフェリ(*Borrelia burgdorferi*)、ブルセラ・メリテンシス(*Brucella melitensis*)、ブルセラ・オヴィス(*Brucella ovis*)、大腸菌、インフルエンザ菌、レジオネラ・プヌーモフィラ(*Legionella pneumophila*)、ナイセリア・ゴノロエア(*Neisseria gonorrhoeae*)、ナイセリア・メニンギティディス、スードモナス・アエルギノサ(*Pseudomonas aeruginosa*)、イエルシニア・エンテロコリティカ(*Yersinia enterocolitica*)などがあるが、これだけに限定されるわけではない。

10

## 【0180】

泡状突起(Blebs)は、もともとの配座において外膜タンパク質を提供できるという利点があり、したがってワクチンに特に有効である。泡状突起は、外膜にある1つまたはそれ以上の分子の発現が変化するように細菌を遺伝子改変することにより、ワクチン用に改良することもできる。そこで、例えば外膜の所望の免疫タンパク質の発現、例えばBASB047、BASB054、BASB068又はBASB069ポリペプチドの発現を(例えばプロモーターを変化させることによって)導入したり上方調節したりすることができる。その代わりに、あるいはそれに加えて、関係のない外膜分子(例えば、非保護抗原、または免疫優勢であるが可変性のあるタンパク質)または、有害な外膜分子(例えば、LPSなどの毒性分子、または自己免疫応答を誘起する可能性のある分子)の発現を下方調節することができる。これらの方について以下に詳しく説明する。

20

## 【0181】

BASB047、BASB054、BASB068又はBASB069遺伝子の非コード・フランキング領域は、その遺伝子の発現にとって重要な調節領域を含んでいる。この調節は、転写レベルと翻訳レベルの両方で起こる。遺伝子のオープン・リーディング・フレームの上流または下流に位置しているこれら領域の配列は、DNAシーケンシングによって得ることができる。この配列情報により、潜在的な調節モチーフを決定すること、例えばさまざまなプロモーター要素、ターミネーター配列、誘起可能な配列要素、リプレッサー、相変異の原因となる要素、シャイン・ダルガルノ配列、潜在的な二次構造を有する調節関与領域のほか、これ以外のタイプの調節モチーフや調節配列を決定することができる。

30

## 【0182】

この配列情報により、BASB047、BASB054、BASB068又はBASB069遺伝子の自然な発現を変化させることができる。遺伝子発現の上方調節は、プロモーター、シャイン・ダルガルノ配列、潜在的なリプレッサー、オペレータ要素、または関係のある他の要素を変えることによって実現できる。同様に、発現の下方調節は、似たような変更によって実現することができる。また、相変異配列を変化させることにより、遺伝子の発現を相変異の制御下に置いたり、この調節から独立させたりすることができる。別の方法では、遺伝子を1つまたはそれ以上の誘起要素の制御下に置いて、発現を制御できるようにすることができる。そうした制御の具体例としては、温度シフトによる誘起や、誘起性基質の付加、例えば選択した炭水化物またはその誘導体、微量元素、ビタミン、補因子、金属イオンなどの付加が挙げられるが、これだけに限定されるわけではない。

40

## 【0183】

50

上記のような変更は、いくつかの異なったやり方で導入することができる。遺伝子の発現に関係する配列の変更は、生体内でランダムな突然変異を起こした後に望む表現型を選択することによって実現できる。別の方法は、興味の対象となる領域を分離した後、その領域をランダムに突然変異させること、または部位特異的突然変異による置換、挿入、または欠失を起こさせることにより変化させることからなる。次に、このように変化した領域を相同的組み換えによって細菌の遺伝子に再導入して、遺伝子の発現に及ぼす効果を評価することができる。別の方法では、対象となる領域の配列に関する知識を利用して、天然の調節配列の全部または一部を置換または除去する。この場合、ターゲットとなる調節領域を分離・変更して、別の遺伝子からの調節要素、さまざまな遺伝子からの調節要素の組み合わせ、合成した調節要素、またはそれ以外の任意の調節要素が含まれるように、あるいは野生型の調節配列の特定の部分が除去されるようにする。するとこれらの変更された配列は、相同的組み換えを通じて細菌の遺伝子に再導入することができる。遺伝子発現の上方調節に利用できる可能性のある好ましいプロモーターとしては、ナイセリア・メニギティディスまたはナイセリア・ゴノロエアに由来するプロモーターである *p o r A*、*p o r B*、*l b p B*、*t b p B*、*p 1 1 0*、*1 s t*、*h p u A B*；*o m p C D*、*c o p B*、*l b p B*、*o m p E*、*U s p A 1*；*U s p A 2*；モラクセラ・カタラーリス (*M. C a t a r r h a l i s*) に由来する *T b p B*；インフルエンザ菌に由来する *p 1*、*p 2*、*p 4*、*p 5*、*p 6*、*l p D*、*t b p B*、*D 1 5*、*H i a*、*H m w 1*、*H m w 2* が挙げられるが、これだけに限定されるわけではない。

10

## 【0184】

20

一実施態様によれば、遺伝子の発現は、(この遺伝子の上方配列を分離し、この配列をインビトロで変化させ、相同的組み換えによってゲノムを再導入する操作を通じて)この遺伝子のプロモーターをより強力なプロモーターと交換することにより変化させることができる。上方調節された発現は、細菌内と、細菌から選別した(細菌が作った)外膜小胞の中の両方で実現することができる。

## 【0185】

別の実施態様によれば、上記の方法を利用して、ワクチンへの応用特性が改善された組み換え細菌株を生み出すことができる。そうした株としては、毒性を弱めた株、特定の抗原の発現が増えた株、免疫応答を妨げる遺伝子がロックアウトされた(またはその遺伝子の発現が低下した)株、免疫優勢なタンパク質の発現が調節された株、外膜小胞の選別が調節された株が挙げられるが、これだけに限定されるわけではない。

30

## 【0186】

そこで本発明によれば、*B A S B 0 4 7*、*B A S B 0 5 4*、*B A S B 0 6 8* 又は *B A S B 0 6 9* 遺伝子の変化した上流領域も提供される。この変化した上流領域は、外膜に位置する *B A S B 0 4 7*、*B A S B 0 5 4*、*B A S B 0 6 8* 又は *B A S B 0 6 9* タンパク質の発現レベルを変化させる異種性調節要素を含んでいる。本発明のこの側面による上流領域は、*B A S B 0 4 7*、*B A S B 0 5 4*、*B A S B 0 6 8* 又は *B A S B 0 6 9* 遺伝子の上流にある配列を含んでいる。上流領域は、*B A S B 0 4 7*、*B A S B 0 5 4*、*B A S B 0 6 8* 又は *B A S B 0 6 9* 遺伝子のすぐ上流から始まり、通常は、*A T G* 開始コドンからこの遺伝子の約 *1 0 0 0 b p* 上流を超えない位置まで続いている。ポリシストロン性配列(オペロン)に位置する遺伝子の場合、上流領域は、対象となる遺伝子の直前、またはオペロン内の最初の遺伝子の前から始まることがある。本発明のこの側面による変化した上流領域は、*A T G* の *5 0 0 ~ 7 0 0 b p* 上流の位置に異種性プロモーターを含んでいることが好ましい。

40

## 【0187】

そこで本発明により、変化した細菌の泡状突起内に、*B A S B 0 4 7*、*B A S B 0 5 4*、*B A S B 0 6 8* 又は *B A S B 0 6 9* ポリペプチドが提供される。さらに本発明によれば、膜をベースとした生きていない泡状突起ベクターを生み出すことのできる宿主細胞が提供される。さらに本発明によれば、異種性調節要素を含む変化した上流領域を有する *B A S B 0 4 7*、*B A S B 0 5 4*、*B A S B 0 6 8* 又は *B A S B 0 6 9* 遺伝子を含む核酸が提供

50

される。

【0188】

さらに本発明によれば、本発明による宿主細胞と細菌の泡状突起を調製する方法が提供される。

【0189】

本発明によれば、さらに、組成物、特にワクチン組成物が提供されるほか、本発明のポリペプチドおよび/またはポリヌクレオチドと免疫促進性DNA配列を含む方法が提供される。免疫促進性DNA配列についてはサトウ, Y. 他、Science、第273巻、352ページ、1996年に記載されている。

【0190】

本発明によれば、さらに、ナイセリア・メニンギティディスに感染したモデル動物における遺伝子を使った免疫確立実験で用いられるポリヌクレオチド構造体中において、上記のポリヌクレオチド、またはその特定の断片で細菌細胞の表面タンパク質の非可変領域をコードすることが知られている断片を用いる方法も提供される。このような実験は、予防または治療のための免疫応答を起こすことのできるタンパク質エピトープを同定する上で特に役立つであろう。この方法により、感染に対して抵抗力のある動物、あるいは感染を除去することのできる動物の必要な器官に由来する特別な価値を有するモノクローナル抗体を、哺乳類、特にヒトにおける細菌感染、特にナイセリア・メニンギティディスの感染の予防薬または治療方法の開発のためにまもなく調製できるようになると考えられている。

【0191】

本発明には、本発明の免疫性組み換えポリペプチドおよび/またはポリヌクレオチドと、適切な担体、例えば医薬として許容される担体とを含むワクチン製剤も含まれる。ポリペプチドとポリヌクレオチドは胃で分解される可能性があるため、それぞれを非経口的に投与することが好ましい。例えば、皮下、筋肉内、静脈内、皮内に投与する。非経口投与に適した製剤としては、抗酸化剤、緩衝溶液、細菌発育抑制化合物、製剤を個体の体液、好ましくは血液と等張にする溶質とを含む可能性のある水性、非水性の無菌注射液や；分散剤または増粘剤を含む可能性のある水性、非水性の無菌分散液が挙げられる。製剤は、単位用量、または複数回用量の容器、例えば密封したアンプルやガラス瓶の形態にすることができる。製剤は、凍結乾燥状態にして保管し、使用する直前に無菌基剤を添加するだけでよいようにすることができる。

【0192】

本発明のワクチン製剤は、その製剤の免疫性を向上させるためにアジュバント系をさらに含んでいてもよい。アジュバント系は、TH1タイプの応答を選択的に増加させることが好ましい。

【0193】

免疫応答は、大きく2つの典型的なカテゴリーに分けることができる。それは、体液を媒介とした免疫応答と細胞を媒介とした免疫応答である（伝統的に、抗体と、防護のための細胞エフェクター機構をそれぞれ特徴とする）。応答のこれらカテゴリーは、TH1タイプの応答（細胞を媒介とした応答）、TH2タイプの応答（体液を媒介とした応答）と呼ばれている。

【0194】

典型的なTH1タイプの免疫応答は、抗原特異的でハプロタイプが限定された細胞毒性のあるTリンパ球と、ナチュラルキラー細胞の応答とを生み出すことが特徴であると言えよう。マウスでは、TH1タイプの応答は、IgG2aサブタイプの抗体を産生することを特徴とするのに対し、ヒトでは、この応答はIgG1タイプの抗体に対応する。TH2タイプの免疫応答は、免疫グロブリンのさまざまなイソタイプを産生させることを特徴とする。例えばマウスでは、IgG1、IgA、IgMが産生される。

【0195】

これら2つのタイプの免疫応答が展開するとき裏で操っているのはサイトカインであると考えられる。TH1タイプのサイトカインがハイレベルだと、所定の抗原に対

10

20

30

40

50

して細胞を媒介とした免疫応答が誘起され、T H 2タイプのサイトカインがハイレベルだと、その抗原に対して体液を媒介とした免疫応答が誘起される傾向がある。

【0196】

T H 1タイプの免疫応答とT H 2タイプの免疫応答の区別は厳密ではない。実際には、個体は、T H 1が優勢である、あるいはT H 2が優勢であると記述される免疫応答を支持することになる。しかし、ネズミ類のC D 4 + v e T細胞クローンにおいてモスマンとコフマンによって記述されているサイトカイン・ファミリーを考えると便利なことがしばしばある(モスマン, T . R . とコフマン, R . L .、*「T H 1細胞とT H 2細胞：さまざまな機能特性へと通じるさまざまなパターンのリンホカイン分泌」*、*Annual Review of Immunology*、第7巻、145～173ページ、1989年)。一般に、T H 1タイプの応答には、Tリンパ球によるI F N - とI L - 2というサイトカインの産生が伴っている。T H 1タイプの免疫応答の誘起にしばしば直接関係する他のサイトカイン、例えばI L - 12は、T細胞によって産生されない。これとは逆に、T H 2タイプの応答には、I L - 4、I L - 5、I L - 6、I L - 13の分泌が伴っている。

10

【0197】

ある種のワクチン・アジュバントは、T H 1タイプまたはT H 2タイプのサイトカイン応答のいずれかを刺激するのに特に適していることが知られている。一般に、ワクチン接種後または感染後の免疫応答のT H 1 : T H 2のバランスを示す最良の指標としては、抗原で再度刺激した後にインビトロでTリンパ球によるT H 1タイプまたはT H 2タイプのサイトカイン産生を測定すること、および/または、抗原特異的な抗体反応のI g G 1 : I g G 2 aの比を測定することが挙げられる。

20

【0198】

したがってT H 1タイプのアジュバントは、インビトロで抗体によって再度刺激を受けたときに、分離したT細胞群を選択的に刺激してT H 1タイプのサイトカインをハイレベルに産生させ、C D 8 +細胞毒性Tリンパ球と、T H 1タイプのアイソタイプに伴う抗原特異的免疫グロブリン応答の両方の展開を促進するアジュバントである。

【0199】

T H 1タイプの細胞応答を選択的に刺激することのできるアジュバントは、国際特許出願W O 9 4 / 0 0 1 5 3、W O 9 5 / 1 7 2 0 9に記載されている。

【0200】

3デ - O - アクリル化モノホスホリル脂質A ( 3 D - M P L ) は、そうしたアジュバントの1つである。これは、G B 2 2 2 0 2 1 1 ( リビ ) により公知である。化学的には、これは、3デ - O - アクリル化モノホスホリル脂質Aと4、5、または6アクリル化した鎖の混合物であり、リビ・イムノケム社、モンタナ州が製造している。3デ - O - アクリル化モノホスホリル脂質Aの好ましい形態は、欧州特許第0 6 8 9 4 5 4 B 1号(スミスクライン・ピーチャム・バイオロジカルズ社)に開示されている。

30

【0201】

3 D - M P L の粒子は十分小さくし、0 . 2 2 ミクロンの膜を通過して滅菌濾過されることが好ましい(欧州特許第0 6 8 9 4 5 4号)。

【0202】

3 D - M P L は、一用量あたり10 μ g ~ 100 μ g、好ましくは25 ~ 50 μ g含まれることになろう。そのとき抗原は、典型例では一用量あたり2 ~ 50 μ g含まれることになろう。

40

【0203】

別の好ましいアジュバントとしてはQ S 2 1がある。これは、キラヤに由来するH p 1 c精製された非毒性の分画である。場合によっては、これに3デ - O - アクリル化モノホスホリル脂質A ( 3 D - M P L ) を混合し、さらに基剤を混合することもできる。

【0204】

Q S 2 1の製造方法は、アメリカ合衆国特許第5, 057, 540号に開示されている。

【0205】

50

Q S 2 1 を含む非反応性アジュバント製剤は、過去の文献に記載されている ( W O 9 6 / 3 3 7 3 9 ) 。 Q S 2 1 とコレステロールを含むそのような製剤は、抗原と合わせて処方したときに T H 1 を刺激するアジュバントとしてうまくいくことが知られている。

【 0 2 0 6 】

T H 1 タイプの細胞応答を選択的に刺激するさらに別のアジュバントとしては、免疫調節性オリゴヌクレオチドがある。例えばメチル化されていない C p G 配列が、 W O 9 6 / 0 2 5 5 5 に開示されている。

【 0 2 0 7 】

T H 1 を刺激する上記のようなさまざまなアジュバントの組み合わせも、 T H 1 タイプの細胞応答を選択的に刺激するアジュバントとして考えられる。例えば、 Q S 2 1 を 3 D - M P L と合わせて処方することができる。 Q S 2 1 : 3 D - M P L の比は、典型的には 1 : 1 0 から 1 0 : 1 であろうが、 1 : 5 から 5 : 1 であることが好ましく、実質的に 1 : 1 であることもしばしばある。最適な相乗効果が得られる Q S 2 1 : 3 D - M P L の比の好ましい範囲は、 2 . 5 : 1 から 1 : 1 である。

【 0 2 0 8 】

本発明のワクチン組成物には基剤も含まれていることが好ましい。基剤は、水中油型乳剤、またはアルミニウム塩、例えばリン酸アルミニウムや水酸化アルミニウムである。

【 0 2 0 9 】

好ましい水中油型乳剤は、スクワレン、 トコフェロール、 トウイーン 8 0 などの代謝可能な油である。特に好ましい側面では、本発明のワクチン組成物中の抗原は、そのような乳剤中で Q S 2 1 および 3 D - M P L と結合している。さらに、水中油型乳剤は、スパン 8 5 ( 商標 ) および / またはレシチン ( l e c i t h i n ) および / またはトリカプリリン ( t r i c a p r y l i n ) を含んでいてもよい。

【 0 2 1 0 】

ヒトに投与する場合には、典型的には、 Q S 2 1 と 3 D - M P L がワクチン中に、一用量あたり  $1 \mu\text{g} \sim 200 \mu\text{g}$ 、例えば  $10 \sim 100 \mu\text{g}$ 、好ましくは  $10 \mu\text{g} \sim 50 \mu\text{g}$  含まれることになる。水中油型乳剤は、典型的には、 2 ~ 1 0 % のスクワレン、 2 ~ 1 0 % の トコフェロール、 0 . 3 ~ 3 % のトウイーン 8 0 を含むことになる。スクワレン : トコフェロールの比は、等しいか 1 未満であることが好ましい。というのも、このようにすると乳剤がより安定になるからである。スパン 8 5 が 1 % のレベルで存在していてもよい。場合によっては、本発明のワクチンに安定剤がさらに含まれていることが望ましい。

【 0 2 1 1 】

非毒性の水中油型乳剤は、毒性のない油、例えばスクワランまたはスクワレンと、乳化剤、例えばトウイーン 8 0 ( 商標 ) とを水溶性基剤の中に含んでいることが好ましい。水溶性基剤は、例えばリン酸緩衝溶液にすることができる。

【 0 2 1 2 】

水中油型乳剤中に Q S 2 1 、 3 D - M P L 、 トコフェロールを含む特に強力なアジュバント製剤は、 W O 9 5 / 1 7 2 1 0 に記載されている。

【 0 2 1 3 】

本発明により、本発明のワクチン製剤に加えて他の抗原、特にガンの治療、自己免疫疾患や関連した疾患の治療に有効な抗原を含む多価のワクチン組成物が提供される。そのような多価のワクチン組成物には、上記の T H - 1 を誘起するアジュバントが含まれていてもよい。

【 0 2 1 4 】

本発明を特定の B A S B 0 4 7 、 B A S B 0 5 4 、 B A S B 0 6 8 又は B A S B 0 6 9 ポリペプチドとポリヌクレオチドに関して記述してきたが、本発明には、天然に存在するポリペプチドとポリヌクレオチドの断片や、ポリペプチドまたはポリヌクレオチドの免疫特性に実質的に影響を与えない付加、欠失、または置換を伴う同様の組み換えたポリペプチドとポリヌクレオチドも含まれるものと理解する。

10

20

30

40

50

## 【0215】

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

組成物、キット、投与

本発明のさらに別の側面によれば、1個の細胞または多細胞生物に投与するための、BASB047、BASB054、BASB068又はBASB069ポリヌクレオチドおよび/またはBASB047、BASB054、BASB068又はBASB069ポリペプチドを含む組成物が提供される。

## 【0216】

本発明は、この明細書に記載したポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチド、あるいはそのアゴニストまたはアンタゴニストを含む組成物にも関する。本発明のポリペプチドとポリヌクレオチドは、細胞、組織、または生物に対して使用するために、無菌でない、または無菌の1つまたは複数の基剤、例えば個体に投与するのに適した医薬担体と組み合わせることができる。このような組成物は、例えば、媒体に添加する量、すなわち治療に効果がある量の本発明のポリペプチドおよび/またはポリヌクレオチドと、医薬として許容される担体または賦形剤とを含んでいる。基剤としては、生理的食塩水、緩衝生理的食塩水、デキストロース、水、グリセロール、エタノールのほか、これらの組み合わせが挙げられるが、これだけに限定されない。製剤は、投与形態に合致している必要がある。本発明はさらに、本発明の上記組成物の1つまたはそれ以上の成分を充填した1つまたはそれ以上の容器を備える診断用、薬理学用のパックまたはキットにも関する。

## 【0217】

本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチド、その他の化合物は、単独で、あるいは他の化合物、例えば治療用化合物と組み合わせることができる。

## 【0218】

本発明の薬理的組成物は、効果的かつ使いやすい任意の方法で投与することができる。具体例としては、特に、局所的、経口、肛門、腔、静脈内、腹腔内、筋肉内、皮下、鼻孔内、皮内の投与が挙げられる。

## 【0219】

治療において、あるいは予防として、活性な薬剤を注射可能な組成物として、例えば無菌の好ましくは等張の水性分散液として、個体に投与することができる。

## 【0220】

さらに別の側面では、本発明により、治療に効果的な量のポリペプチドおよび/またはポリヌクレオチド、例えば本発明のポリペプチドおよび/またはポリヌクレオチド、アゴニストまたはアンタゴニストのペプチド、または小分子化合物を可溶形態にしたものを、薬理的に受容可能な基剤または賦形剤と組み合わせることで含む薬理的組成物が提供される。基剤としては、生理的食塩水、緩衝生理的食塩水、デキストロース、水、グリセロール、エタノール、これらの組み合わせが挙げられるが、これだけに限定されない。本発明はさらに、本発明の上記組成物の1つまたはそれ以上の成分を充填した1つまたはそれ以上の容器を備える薬理学用のパックまたはキットにも関する。本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチド、その他の化合物は、単独で、あるいは他の化合物、例えば治療用化合物と組み合わせることができる。

## 【0221】

組成物は、投与経路、例えば全身が経口かに応じて適した形態にされることになる。全身投与の好ましい形態としては、注射、典型的には静脈内注射が挙げられる。他の注射経路、例えば皮下注射、筋肉内注射、腹腔内注射も可能である。全身投与の別の手段としては、胆汁塩、フシジン酸（fusidic acids）、または他の洗浄剤といった浸透剤を用いた経粘膜投与や経皮投与が挙げられる。さらに、本発明のポリペプチドまたはその他の化合物を溶腸性製剤またはカプセル化製剤の形態にすることができる場合には、経口投与も可能である。これら化合物の投与は、軟膏、ペースト、ゲル、溶液、粉末などの

10

20

30

40

50

形態で局所のおよび／または限局的に行なうことも可能である。

【0222】

哺乳類、特にヒトへの投与では、活性のある薬剤の1日の用量が0.01mg/kg～10mg/kg、典型的には約1mg/kgとなることが予想される。いずれにせよ、内科医が、個人にとって最適な実際の用量を決定することになる。用量は、個々人の年齢、体重、反応によって異なる。上記の用量は、平均的な場合の例である。もちろん、用量がより多かたりより少なかたりするほうが好ましい場合も存在しており、それも本発明の範囲に含まれる。

【0223】

要求される用量の幅は、選択したペプチド、投与経路、製剤の性質、患者の疾病の性質、  
10 医者の判断に応じて変化する。しかし適切な用量は、患者の体重1kgにつき0.1～100μgである。

【0224】

ワクチン組成物は、注射可能な形態が都合がよい。従来のアジュバントを用いて免疫応答を増大させることができる。ワクチンの適切な単位用量は、体重1kgにつき抗体が0.5～5μgであり、このような用量を1～3週間の間隔で1～3回投与することが好ましい。上記の幅の用量だと、本発明の化合物を用いた場合に不都合な中毒効果が観察されてその化合物を投与するのに適した個体に投与できなくなることはなからう。

【0225】

しかし、利用可能な化合物が多彩であり、投与経路によって効果が異なることを考えると  
20 、必要とされる用量の幅は広いことが予想される。例えば、経口投与の場合には、静脈内注射による投与よりも用量を多くする必要がある。用量レベルの差は、従来技術で周知のように、最適化のための標準的な経験的作業によって調節することができる。

配列データベース、有形媒体に記憶させた配列、アルゴリズム

ポリヌクレオチドとポリペプチドの配列は、2次元構造や3次元構造を決定したり、似たホモロジー配列をさらに同定したりするための貴重な情報源となる。コンピュータで読むことのできる媒体にデータを記憶させ、記憶させたデータを既知の巨大分子構造プログラムにおいて利用したり、GCGプログラム・パッケージなどの周知の探索ツールを用いて配列データベースを探索したりすることにより、こうしたことが非常に容易になる。

【0226】

本発明により、特徴的な配列またはストリングの解析法、特に遺伝子配列またはコードされたタンパク質配列の解析法も提供される。好ましい配列解析法としては、例えば、一致解析や類似性解析などの配列ホモロジー解析法、DNA、RNA、タンパク質の構造の解析、配列集合分岐解析、配列モチーフ解析、オープン・リーディング・フレーム決定、核酸塩基コーリング、コドン利用解析、核酸塩基トリミング、シーケンシング・クロマトグラムのピーク解析が挙げられる。

【0227】

ホモロジーを同定するための、コンピュータに基づいた方法が提供される。この方法は、本発明のポリヌクレオチド配列を含む第1のポリヌクレオチド配列をコンピュータが読むことのできる媒体に与え；この第1のポリヌクレオチド配列を少なくとも1つの第2のポリヌクレオチド配列またはポリペプチド配列と比較してホモロジーを同定するステップを含んでいる。  
40

【0228】

ホモロジーを同定するための、コンピュータに基づいた別の方法も提供される。この方法は、本発明のポリヌクレオチド配列を含む第1のポリペプチド配列をコンピュータが読むことのできる媒体に与え；この第1のポリペプチド配列を少なくとも1つの第2のポリヌクレオチド配列またはポリペプチド配列と比較してホモロジーを同定するステップを含んでいる。

【0229】

この明細書で引用したあらゆる出版物や参考文献は、特許や特許出願なども含め、個々の  
50

出版物や参考文献が十分に説明されたものとして、参考のために特別かつ個別に組み込むよう指示されているかのようにして、その全体が参考としてこの明細書に組み込まれている。この特許出願のほうに優先権があることをわれわれが主張する他のあらゆる特許出願も、出版物や参考文献に関して上に説明したのと同様にして、その全体が本明細書に援用される。

#### 定義

従来技術で知られている“一致 ( i d e n t i t y ) ” は、2つまたはそれ以上のポリペプチド配列、あるいは場合によっては2つまたはそれ以上のポリヌクレオチド配列を比較することによって決まる関係である。従来技術では、“一致”は、複数のポリペプチド配列あるいは場合によっては複数のポリヌクレオチド配列の間でストリング同士の一致によって決まる配列関連度のことにも意味する。“一致”は、既知の方法を用いて容易に計算することができる。そうした方法は、例えば以下の文献に記載されているが、これだけに限定されるわけではない。『計算分子生物学』、レスク, A. M. 編、オックスフォード大学出版、ニューヨーク州、1988年；『バイオコンピューティング：情報学とゲノム計画』、スミス, D. W. 編、アカデミック・プレス、ニューヨーク州、1993年；『配列データのコンピュータ解析』、第1部、グリフィン, A. M. とグリフィン, H. G. 編、ヒューマナ・プレス、ニュージャージー州、1994年；『分子生物学における配列解析』、フォン・ハイネ, G.、アカデミック・プレス、1987年；『配列解析プライマー』、グリブスコフ, M. とドゥヴルー, J. 編、M ストックトン・プレス、ニューヨーク州、1991年；カリージョ, H とリップマン, D.、S I A M J  
20  
. A p p l i e d M a t h .、第48巻、1073ページ、1988年。一致を確認する方法は、テストする配列同士の一致が最大になるように設計する。さらに、一致を確認する方法は、誰もが利用可能なコンピュータ・プログラムにコード化されている。2つの配列の間の一致を確認するのにコンピュータ・プログラムを用いる方法としては、G C G  
30  
プログラム・パッケージのG A Pプログラム(ドゥヴルー, J. 他、N u c l e i c A c i d s R e s e a r c h、第12巻(1)、387ページ、1984年)、B L A S T P、B L A S T N(アルトシュール, S. F. 他、J. M o l . B i o l .、第215巻、403~410ページ、1990年)、F A S T A(ピアソンとリップマン、P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A、第85巻、2444~2448ページ、1988年)があるが、それだけに限定されるわけではない。B L A S Tファミリーのプログラムは、N C B Iその他のソースから誰でも利用することができる(『B L A S Tマニュアル』、アルトシュール, S. 他、N C B I N L M N I H ベセスダ、M D  
30  
20894；アルトシュール, S. 他、J. M o l . B i o l .、第215巻、403~410ページ、1990年)。よく知られているスミス・ウォーターマンのアルゴリズムも一致を確認するのに用いることができる。

#### 【0230】

ポリペプチド配列を比較するためのパラメータには以下のものがある。

アルゴリズム：ニードルマンとヴンシュ、J. M o l . B i o l .、第48巻、443~453ページ、1970年、

比較行列：ヘニコフとヘニコフ、P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A、40  
第89巻、10915~10919ページ、1992年によるB L O S S U M 6 2、

ギャップ・ペナルティ：8、

ギャップ長ペナルティ：2。

#### 【0231】

これらパラメータを含む有用なプログラムは、ジェネティクス・コンピュータ・グループ(マディソン、ウィスコンシン州)から“ギャップ”プログラムとして誰でも利用することができる。上記のパラメータは、ペプチドを比較するためのデフォルト・パラメータである(端部のギャップに対するペナルティはない)。

#### 【0232】

ポリヌクレオチドを比較するためのパラメータには以下のものがある。

10

20

30

40

50

アルゴリズム：ニードルマンとヴァンシュ、J. Mol. Biol.、第48巻、443  
～453ページ、1970年、

比較行列：一致 = +10、不一致 = 0、

ギャップ・ペナルティ：50、

ギャップ長ペナルティ：3。

ジェネティックス・コンピュータ・グループ（マディソン、ウィスコンシン州）から“ギャップ”プログラムとして利用できる。これらパラメータは、核酸を比較するためのデフォルト・パラメータである。

#### 【0233】

ポリヌクレオチドとポリペプチドに対する“一致”の好ましい意味は、場合に応じて以下の(1)と(2)で与えられる。 10

#### 【0234】

(1) 実施態様のポリヌクレオチドがさらに、配列番号1の参照配列と少なくとも50、60、70、80、85、90、95、97、または100%一致したポリヌクレオチド配列を含む単離されたポリヌクレオチドを含んでいる。このポリヌクレオチド配列は、配列番号1の参照配列と一致していてもよいし、参照配列と比べて所定の数までヌクレオチドが変化していてもよい。この変化は、少なくとも1つのヌクレオチドの欠失、置換（トランジションやトランスバージョンを含む）、または挿入のいずれかである。またこの変化は、参照ヌクレオチド配列の5'末端または3'末端の位置に起こってもよいし、これら末端の間の任意の位置に起こり、参照配列のヌクレオチドの間に個別に点在するか、または参照配列内の1つまたはそれ以上の連続的なグループの中に点在していてもよい。変化するヌクレオチドの数は、配列番号1のヌクレオチドの総数に、パーセント一致を定義する整数を100で割った値を掛け、次にその積を配列番号1のヌクレオチドの総数から差し引くことによって決まる。すなわち、 20

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

となる。ここに、 $n_n$  は変化したヌクレオチドの数であり、 $x_n$  は配列番号1のヌクレオチドの総数であり、 $y$  は、50%の場合に0.50、60%の場合に0.60、70%の場合に0.70、80%の場合に0.80、85%の場合に0.85、90%の場合に0.90、95%の場合に0.95、97%の場合に0.97、100%の場合に1.00であり、 $\cdot$  は、積演算の記号であり、 $x_n$  と  $y$  の積が非整数になった場合には、その値よりも小さな最も近い整数に丸めた後に  $x_n$  から差し引く。配列番号2のポリペプチドをコードしているポリヌクレオチド配列の変化により、このコード配列中にナンセンス突然変異、ミスセンス突然変異、またはフレームシフト突然変異が発生し、そのことによって、そうした変化後のポリヌクレオチドによってコードされたポリペプチドが変化する可能性がある。 30

#### 【0235】

例えば、本発明のポリヌクレオチド配列は、配列番号1の参照配列と一致していてもよい。すなわち、このポリヌクレオチド配列は、100%一致していてもよいし、参照配列と比べて所定数までの核酸変化が含まれていてパーセント一致が100%よりも小さくなっている。この変化は、少なくとも1つのヌクレオチドの欠失、置換（トランジションやトランスバージョンを含む）、または挿入のいずれかである。またこの変化は、参照ポリヌクレオチド配列の5'末端または3'末端の位置に起こってもよいし、これら末端の間の任意の位置に起こり、参照配列の核酸の間に個別に点在するか、または参照配列内の1つまたはそれ以上の連続的なグループの中に点在していてもよい。所定のパーセント一致に対する変化した核酸の数は、配列番号1の核酸の総数に、パーセント一致を定義する整数を100で割った値を掛け、次にその積を配列番号1の核酸の総数から差し引くことによって決まる。すなわち、 40

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

となる。ここに、 $n_n$  は変化した核酸の数であり、 $x_n$  は配列番号1の核酸の総数であり、 $y$  は、例えば70%の場合に0.70、80%の場合に0.80、85%の場合に0. 50

85 などであり、 $\cdot$  は、積演算の記号であり、 $x_n$  と  $y$  の積が非整数になった場合には、その値よりも小さな最も近い整数に丸めた後に  $x_n$  から差し引く。

【0236】

(2) 実施態様のポリペプチドがさらに、配列番号2の参照配列と少なくとも50、60、70、80、85、90、95、97、または100%一致したポリペプチド配列を含む単離されたポリペプチドを含んでいる。このポリペプチド配列は、配列番号2の参照配列と一致していてもよいし、参照配列と比べて所定の数までアミノ酸が変化していてもよい。この変化は、少なくとも1つのアミノ酸の欠失、置換(保存された置換や保存されていない置換を含む)、または挿入のいずれかである。またこの変化は、参照ポリペプチド配列のアミノ末端またはカルボキシル末端の位置に起こってもよいし、これら末端の間の任意の位置に起こり、参照配列のアミノ酸の間に個別に点在するか、または参照配列内の1つまたはそれ以上の連続的なグループの中に点在していてもよい。変化するアミノ酸の数は、配列番号2のアミノ酸の総数に、パーセント一致を定義する整数を100で割った値を掛け、次にその積を配列番号2のアミノ酸の総数から差し引くことによって決まる。

すなわち、

$$n_a = x_a - (x_a \cdot y)$$

となる。ここに、 $n_a$  は変化したヌクレオチドの数であり、 $x_a$  は配列番号2のアミノ酸の総数であり、 $y$  は、50%の場合に0.50、60%の場合に0.60、70%の場合に0.70、80%の場合に0.80、85%の場合に0.85、90%の場合に0.90、95%の場合に0.95、97%の場合に0.97、100%の場合に1.00であり、 $\cdot$  は、積演算の記号であり、 $x_a$  と  $y$  の積が非整数になった場合には、その値よりも小さな最も近い整数に丸めた後に  $x_a$  から差し引く。

【0237】

例えば、本発明のポリペプチド配列は、配列番号2の参照配列と一致していてもよい。すなわち、このポリペプチド配列は、100%一致していてもよいし、参照配列と比べて所定数までのアミノ酸変化が含まれていてパーセント一致が100%よりも小さくなっていてもよい。この変化は、少なくとも1つのアミノ酸の欠失、置換(保存された置換や保存されていない置換を含む)、または挿入のいずれかである。またこの変化は、参照ポリペプチド配列のアミノ末端またはカルボキシル末端の位置に起こってもよいし、これら末端の間の任意の位置に起こり、参照配列のアミノ酸の間に個別に点在するか、または参照配列内の1つまたはそれ以上の連続的なグループの中に点在していてもよい。所定のパーセント一致に対する変化するアミノ酸の数は、配列番号2のアミノ酸の総数に、パーセント一致を定義する整数を100で割った値を掛け、次にその積を配列番号2のアミノ酸の総数から引くことによって決まる。すなわち、

$$n_a = x_a - (x_a \cdot y)$$

となる。ここに、 $n_a$  は変化したアミノ酸の数であり、 $x_a$  は配列番号2のアミノ酸の総数であり、 $y$  は、例えば70%の場合に0.70、80%の場合に0.80、85%の場合に0.85などであり、 $\cdot$  は、積演算の記号であり、 $x_a$  と  $y$  の積が非整数になった場合には、その値よりも小さな最も近い整数に丸めた後に  $x_a$  から差し引く。

【0238】

この明細書で生物に関して用いる“個体”は、多細胞真核生物のことを意味する。その中には後生生物、哺乳類、ヒツジ科動物、ウシ科動物、類人猿、霊長類、ヒトが含まれるが、これだけに限定されるわけではない。

【0239】

“単離された”とは、天然の状態から“人間の手によって”変えられたことを意味する。すなわち、そうしたことが自然界で起こるならば、もとの環境から変化しているか、隔離されている、あるいはその両者が起こっている。例えば、生物の体内に存在するポリヌクレオチドまたはポリペプチドは“単離されて”はいないが、その同じポリヌクレオチドまたはポリペプチドが自然の状態と共に存在している物質から分離されている場合には、この明細書で用いる意味で“単離されて”いる。さらに、形質転換、遺伝子操作、またはそ

10

20

30

40

50

れ以外の組み換え技術によって生体内に導入されたポリヌクレオチドまたはポリペプチドは、その生体の中にまだ存在しているとしても、その生物が生きているか死んでいるかには関係なく、“単離され”ている。

【0240】

“ポリヌクレオチド”とは、一般に、任意のポリリボヌクレオチドまたはポリデオキシリボヌクレオチドのことである。それは修飾されていないRNAまたはDNAでもよいし、修飾されたRNAまたはDNAでもよく、1本鎖の領域と2本鎖の領域を含んでいる。

【0241】

“変異体”とは、参照用のポリヌクレオチドまたはポリペプチドとは異なるが、主要な特性は維持しているポリヌクレオチドまたはポリペプチドのことである。ポリヌクレオチドの典型的な変異体は、参照ポリヌクレオチドとヌクレオチド配列が異なっている。変異体のヌクレオチド配列における変化により、参照ポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドのアミノ酸配列が異なることもあるし、異なることもある。ヌクレオチドの変化により、参照配列によってコードされるポリペプチドにおいてアミノ酸の置換、付加、欠失、融合、切断が起こることがある。これについては以下に説明する。ポリペプチドの典型的な変異体は、参照ポリペプチドとはアミノ酸配列が異なっている。一般に、差は、参照ポリペプチドの配列と変異体が全体として非常に似ており、多くの領域で配列が一致しているものに限定される。変異体と参照ポリペプチドの違いは、アミノ酸配列において1つまたはそれ以上のアミノ酸の置換、付加、欠失が任意に組み合わさったものである可能性がある。置換または挿入されたアミノ酸残基は、遺伝暗号によってコードされたアミノ酸でもよいし、遺伝暗号によってコードされていないアミノ酸でもよい。ポリヌクレオチドまたはポリペプチドの変異体は、対立遺伝子変異体などの自然に起こる変異体でもよいし、自然に起こることが知られていない変異体でもよい。ポリヌクレオチドまたはポリペプチドの自然には起こらない変異体は、突然変異技術または直接的合成によって作ることができる。

10

20

【0242】

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

実施例

30

以下の実施例は、当業者には周知かつ当然となっている標準的な方法で実施する。ただし、別の方法を詳しく記載した場合は別である。実施例は単なる例示であって、本発明がそれだけに限定されることはない。

実施例 1

ナイセリア・メニンギティディス株 ATCC 13090 における BASB047 遺伝子  
 ナイセリア・メニンギティディス株 ATCC 13090 の BASB047 遺伝子を配列番号 1 に示す。配列番号 2 に示す BASB047 ポリヌクレオチド配列の翻訳産物は、E. coli 第 2 鉄エアロバクチン (ferric aerobactin) レセプター前駆体 (クロアシン (cloacin) レセプター) に対する有意な類似性を示す。上記 BASB047 ポリペプチドは、リーダー・シグナル配列の特徴をもつ配列を含む。上記シグナル配列は、配列番号 2 に示す配列の残基 25 の後で解裂されるであろう。BASB047 は、イオン取り込みに関係する外膜タンパク質の特徴をもつ。

40

実施例 2

ナイセリア・メニンギティディス株 ATCC 13090 における BASB054 遺伝子  
 ナイセリア・メニンギティディス株 ATCC 13090 の BASB054 遺伝子を配列番号 3 に示す。配列番号 4 に示す BASB054 ポリヌクレオチド配列の翻訳産物は、E. coli の有機溶媒耐性タンパク質に対する有意な類似性を示す。上記 BASB054 ポリペプチドは、リーダー・シグナル配列の特徴をもつ配列を含む。上記シグナル配列は、配列番号 4 のポリペプチドの残基 22 の後で解裂されるであろう。

実施例 3

50

ナイセリア・メニンギティディス株 ATCC 13090 における BASB068 遺伝子  
ナイセリア・メニンギティディス株 ATCC 13090 の BASB068 遺伝子を配列番号 5 に示す。配列番号 6 に示す BASB068 ポリヌクレオチド配列の翻訳産物は、E. coli の AIDA-I タンパク質に対する有意な類似性を示す。上記 BASB068 ポリペプチドは、リーダー・シグナル配列の特徴をもつ配列を含む。上記シグナル配列は、配列番号 6 に示すポリペプチドの残基 34 の後で解裂されるであろう。BASB068 は、イオン取り込みに関係する外膜タンパク質の特徴をもつ。

#### 実施例 4

ナイセリア・メニンギティディス株 ATCC 13090 における BASB069 遺伝子  
ナイセリア・メニンギティディス株 ATCC 13090 の BASB069 遺伝子を配列番号 7 に示す。配列番号 8 に示す BASB069 ポリヌクレオチド配列の翻訳産物は、E. coli の AIDA-I タンパク質に対する有意な類似性を示す。上記 BASB069 ポリペプチドは、リーダー・シグナル配列の特徴をもつ配列を含む。上記シグナル配列は、配列番号 8 に示す配列の残基 31 の後で解裂されるであろう。BASB047 は、イオン取り込みに関係する外膜タンパク質の特徴をもつ。

10

【0243】

【化1】

## ポリヌクレオチド及びポリペプチド配列

### 配列番号 1

ATCC 13090株からのナイセリア・メニンギティディスBASB 047  
ポリヌクレオチド配列

ATGCGTCATCCCACATTTTCAATGGTTATCTTTGCCTTACTAAGTGTGGCAGTAACT  
CAGCAGTTGTACGCTCAACCCAATGAGTCATTACCAACGGTTGAATTAGAGCCTGTGGTT  
ATTACCATTTGATAAGAGCGGTATGGCACTTGCCAATCGTATCACGCAAATGCCCATACC  
ACCAAAGTTATTATGAAAGAGCAAATTCAGAGCAAGCAACAGGCTCTCGACAGCTTGCC  
GATGTGATGGCACAGCTCATCCAAGTTTGGGGSTAAGTAGTGGCACTACCAGTAACTTT  
GGGCAAACCATGCACGGTCGTCAAGTGCAATTTTGTAAATGGCGTGCCTTTGACAGGT  
TCGCCGAGACATCTCTAGACAGCTTAATAGTATCAATCCCAATCAAGTGGCTAGAATTGAA  
GTTTTTATCAGGAGCAACCAGTATTTATGGGTCTGGAGCAACAGGCGGTTTGATTAATATC  
GTTACTAAGTCTGATTTGGAAGAGGAGCAATTTGAAACCCGCATCGGTGTACATGGTAGT  
AAATTATCCAGTGAAGGTATCGGTTATCAGGTAGGTCAGAGTGTAGCAGGTGTAGCGAA  
AATGGTAATGTCTCTTGACAGCTTGATGTGCACTATCGCACCACAGGAGGGGCATTTGAT  
GCTAACGGTAAACGCATCGCTCCTGAGCCTGCCCAAACGATAAGCAAGACAGCAAAGC  
CTAAGTGTCAATACAAATGTTGATTTGGCAACTTGACGACAAGCAAATATCAATCTGGCA  
TTGACGCATTATAACGACAACAAGATACCGATTATGCACCTGATTTATGGTAATCGCCTT  
CGCGTGTGTTTGGAGAAAAGCCTTCATTAATGCCATCAAAGGCTTATCATTATCAGAA  
CAGCCAAAACCAACCAAAAGCACCTTTAATCAACTATCATCATGATGATTTGTGGGGT  
AACACCATCAATACCAATGCTTATTATCGCAGAGAGAAAGGCAGATTTTATCCCTTTGTT  
GCCCGTTTTTCGATCGCAAAGCCCTGCTATTTTACAAAGCATGAATTTGCCATCAGCC  
ACTTTGGATGCTTATACCAAGGCTCCACAAGCTCGCGCCTATGGGGTGTACAAATCCGAA  
TCTAAGGCAGAGGTACTAGGGCGTGTCCCTAATTTGAATAAGCCCAAAGAGCCCTATTT  
TAA

10

20

### 配列番号 2

配列番号 1 のポリヌクレオチド配列から演繹されるナイセリア・  
メニンギティディスBASB 047ポリペプチド配列

MRHSHYFQWLSLPLLSVAVTQQLYAQPNESELPVLEPVVITIDKSGMALANRITQMPHT  
TKVIYEEQIQEQATGSRQLADVMAQLIPSLGVSSGTTSNFGQTMHGRQVQFLNNGVPLTG  
SRDISRQLNSINPNQVARIEVLGATS IYSGGATGGLINIVTKSDLBEEQFETRIGVHGS  
KLSSEGIGYQVQSVAGVSENGNVLARLDVDRYRTGGAFDANGKRIAPPAQTDKQDSKS  
LSVNTNVDWQLDDKQINLALTHYNDKQDQTDYAPDYGNRLAVLFGEKPSLNAIKGLSLSE  
QPKTKSTFNINVHDDLWGNTINTNAYRREKGRFYPFVAPFSIAKALPILQSMNLPSA  
TLDAYTKAPQARAYGVLSQESKAEVLGRVFNLNKPKRALF

30

### 配列番号 3

ATCC 13090株からのナイセリア・メニンギティディスBASB 054  
ポリヌクレオチド配列

TTGGCTCGTTATTTTCACTCAAACCACTGGTGTGGCATTGGGCTTCTGCTTCGGCAG  
CATTGCGCCGCGCCGATGCCGTTGCGGCGGAGGAAACGGACAATCCGACCGCCGGAGGA  
AGTGTTCGGAGCGTGTCCGAACCCATGCAGCCTGCCGCGCTGAGCCTCGGTTCCGACCTGC  
CTGTTTTGCAGTAACGAAAGCGGCAAACCCGAAAAAACCGAATCTGCCGTCAAAGGAAGC

40

【 0 2 4 4 】

【 化 2 】

GGCGAAGGGCCTGTGCCGAAAACCACACGGGAATTGTCCGCCGACAAGGTGGAAGGGCAG  
 TCGCAGGTCAAGGTACGCGCGGAGGGCGGCGTCTGTTGTCGAACGCAACCGGACGACCCCTT  
 AATGCCGACTGGGCGGATTACGACCAGTCCGGGCGACACCGTTACCGTAGGGCAGCCGGTTC  
 GCCTCCAACTAGGACGGTACGCTGATTCGGGGCGAAACCCTGACCTACAATCTCGAGCAG  
 CAGACCGGCGAAGCGCACACGTCCTCGCATGGAAACCGAACAAAGGCGGACGGCGGCTGCAA  
 AGCGTCAGCCGACCCGCCGAAATGTTGGGGCAAGGGCATTACAAACTGACGGAAACCCAA  
 TTCAACACCTGTTCGCGCGGCGATGCCGGCTGATGTCGAAGGCAGCCTCTGTCGAAGCC  
 GATCGGAAAAAAGGCATAGGCGTTGCCAAACACGCGCCTTCGGTTCGGCGGCGTTCCT  
 ATTTCTACACCCCTTGGGCGGACTTCCCGCTTGACGGCAACCGCAAAAGCGGCGTCTT  
 GTTCCCTCACTGTCCGCGGTTCCGACGGCGTTCCTTTCCGTTCCCTATTATTTC AAC  
 CTGCCCCCAATCTCGATGCCACGTTCCGCGCCAGCGTGATCGGCGAACGGCGGCGGTC  
 TTTGACGGGCGAGGTACGCTACCTGCGGCGGATTATGCCGGCCAGTCCGACCTGACCTGG  
 CTGCGCGCACGACAAGAAAAGCGGCGAGGAATAACCGCTATCAGGCGAAATGGCAGCATCGG  
 CAGCAGATTTCCGACACGCTTCAGGCGGGTTCGATTTC AACCAAGTCTCCGACAGCGCG  
 TACTACCGCGACTTTTACGGCAACAAGAAATCGCCGGCAACGTC AACCTCAACCGCCGT  
 GTATGGCTGGATTATGGCGGCGAGGGCGGCGGGCGGCGAGCCTGAATGCCGGCCTTTCGGTT  
 CTGAAATACCAGACGCTGGCAAAACAAAGCGGCTACAAAGCAAAACCGTATGCCCTGATG  
 CCGCGCCTTTCCGCGGATGGCGCAAAACACCGGCGAGGGCGCAAAATCGGGGTGTCGCA  
 CAATTTACCGCTTCAGCCACGACAGCGCCCAAGACGGCAGCCGCTCGTCTATATCCC  
 GACATCAAAATGGGATTTAGCAACAGCTGGGGTTACGTCCTCCAAACTCGGACTGCAC  
 GCCACCTATTACAGCCTCAACCGCTTCGGCAGCCAAGAAGCCCGACGCGTTCAGCCGACT  
 CTACCCATCGTCAACATCGACAGCGGCATGACCTTCGAACGCAATACGCGGATGTTCCGGC  
 GGAGAAGTCTTCGCAAAACCTCGAGCCGCGCCTGTTCTACAACATATATTCGCAAAATCC  
 CAAAACGACTGCCCAATTTGATTGTCGCGAAAGCAGCTTCGGCTACGGGCGAGCTTTT  
 CGTGAAAACCTCTATTACGGCAACGACAGGATTAACACCGCAACAGCCTTTCGCGCGCC  
 GTGCAAGCCGATTTTGGACGGCGCGACGGGGCGAGCGCTTTCGCGCGCGCATCGGG  
 CAGAAATCTACTTCAAAAACGACGCGAGTCAATGCTTGACGGCAGTGTGGCAAAAACCG  
 CGCAGCCGTTCCGACTGGGTGGCATTTCGCTCCAGCGGCATCGGCGAGCCGCTTCATCCTC  
 GACAGCAGCATCCACTACAACAAAACGACAAAACGCGCCGAGAACTACGCCGTTCGGTGCA  
 AGCTACCGTCCCGCACAGGGCAAGTGTGAACGCCCGCTACAAAATACGGGCGCAACGAA  
 AAAATCTACCTGAAGTCCGACGGTTCCTATTTTACGACAAACTAGCCAGCTTCGACCTG  
 TCCGCACAATGGCCCTGACGCGCAACCTGTCCGCGCTCGTCCGTTACAACCTACGGTTTT  
 GAAGCCAAAAACCGATAGAGGTGCTGGCGGGTGGGAATACAAAAGCAGTTGCGGCTGC  
 TGGGGCGGGGCGGTGTACGCCCAACGCTACGTTACCGGCGAAAACACCTACAAAACGCT  
 GTCTTTTTCTCACTTCAGTTGAAAGACCTCAGCAGTGTCCGCAGAAACCCCGCAGACAGG  
 ATGGATGTCGCGCTTCCCGGCTATATCCCGCCACTCTCTTTCGCGCGGACGCAACAAA  
 CGGCCCTGA

10

20

配列番号 4  
 配列番号 3 のポリヌクレオチド配列から演繹されるナイセリア・  
 メニンギティディスBASB 054ポリペプチド配列

30

MARLFSLKPLVLALGFCFGTHCAAADAVAAEETDNPTAGGSVRSVSEPMQPAGLSLGSTC  
 LFCSNESGKPEKTESAVKGSGEVPEVNHTRIVADKVEGQSQVKVRAEGGVVVERNRTL  
 NADWADYDQSGDVTVVGDRFALQQDGTLRGETLTYNLEQQTGEAHNVRMETEQGRRRLQ  
 SVSRTAEMLGEGHYKLTETQFNTCSAGDAGWYVKAASVEADREKGIKVAKHAAFVFGGVP  
 E FYTPWADFPDLDGNRKSGLLVPSLSAGSDGWSLSVPHYFNLPNLDATFAPSVIGERGAV  
 FDGQVRYLRPDYAGQSDLTWLPDHDKKSGRNRYQAKWQHRHDSITLQAGVDFNQVSDSG  
 YYRDFYGNKEIAGNVNLRVWLDYGGRAAGGSLNAGLSVLKYQTLANQSGYKDKPYALM  
 PRLSADWRKNTGRAQIGVSAQFTRFSHDSRQDGSRLVVYPDIKWDFSNSWGYVRPKLGLH  
 ATYYSLNRFSGEARRVSRLEIVNIDSGMTFERNTRMFGGEVLQTLERFLFYNYIPAKS

【 0 2 4 5 】

【 化 3 】

40



EYWK EET YHIKSNRVYPNIPALF PKHPFDPPENINNSKRISFYDKEYTEDYLVGFAOGL  
 GVAKRNGETEKPIRQYFKECLNTGKYSDDTCKSQS IPTVRSDFALNTKIKNSHINSEI  
 FAVGN YTKLMYSAQHHSIWSEHLYSNSLSLDVDNSHVIGQITIDLGALELTNSLWEP  
 SNIDYLITKNAEIRFNTKSESLVKEDYAGGARFRFAYGLKDKVPETPILTFEKNITGTS  
 DIIFEGKALDNLKHLDHGQIIKVN GTADKHAFLRSLGKHQKGIYTL SLQQREPEGFFTKVQE  
 RDDIAIYAQQQAANTL FALRLNDKNSDI FDR TLP RKGLWLRVIDGHSSQWVQGTAPVE  
 GNRKGIQLGGDVFSLQNHNYQLSVGLMGGQAEQRSTFRNPDTDNL TGNVKGFGAGVYAT  
 WHQLQDKQTGAYADSWVQYQRFRRHRINTE DGTERTSKGITASIEAGYNALLAEHVTKKG  
 NSLRVYLQPPAQLTYLVGNGKFS DSENAHVNL LGS RQLQSRVGVQAKA QFAFTNGVTFQP  
 FVSVNSIYQQKPFVGVEMDGERRVINNKTAIESQLGVAVKIKSHLTLQATFNRQTGKHHQA  
 KQGALNLQWTF

配列番号 7

ATCC 13090株からのナイセリア・メニンギティディスBASB 069  
 ポリヌクレオチド配列

ATGACACTGAAAGCAAGCAAGCAAGCAAGCGGTCGGGTTAATCTATTAAACATTATCTGTT  
 TTATCGCTGTTTTGCACGCCATATGTTTTGGTTCGGATGCGTACGATCCCGTCAAAGAA  
 GCCGAGATTAAAAACAAATTTATTTTAGAAGCGCGGGAAGACAGAAATCCACGTTTGG  
 CGCGGCCCGTGCAGCATATCTTTTGATTGCTTCGGTATGTTTCAGAGCTCAGCTTGGTTCA  
 AATACTCGTTCTACCAAAATCGGCGACGATGCCGATTTTTTCATTTTCAGACAAGCCGAAA  
 CCCGGCACTCCCATTTATTTTCCAGCGGTAAAACCGATCAAATTCATCCGAATATGGG  
 TATGACGAAATCAATATCCAAGGTAAAAACTACAATAGCGGCATACTCGCCGTCGATAAT  
 ATGCCCGTTGTTAAGAAATATATTACAGATACTTACGGGGATAATTTAAAGGATGCCGTT  
 AAGAAAGCAATTACAGGATTATACAAAACAAGACCCCGAAGCTTGGGAAGAAAATAAAAA  
 CGGACTGAGGAGCGGTATATAGAACAGCTTGGACCAAAATTTAGTATACTCAAACAGAAA  
 AACCCCGATTTAATTAATAAAATTTGGTAGAAGATTCCTACTCACTCCCATAGTAATACA  
 TCACAGACTAGTCTCAACAACATCTTCAATAAAAAATTACACGTCAAAATCGAAAACAAA  
 TCCACAGTCCGCGGACAGGTGTTGGAAC TGACCAAGATGACGCTGAAAGATTCCCTTTGG  
 GAACCGCGCCGATTCGACATCCATACGCTGGAACACTCCGATAATGCCCGCATCCGC  
 CTGAACACGAAAGATGAAAAACTGACCGTCCATAAAGCGTATCAGGGCGCGCGGATTTTC  
 CTGTTTCGGCTACGACGTGCGGGAGTCCGACGAAACCCGCTGACCTTTGAACAAAACGTC  
 AGCGGAAAATCCCGGCTGTTTTGGAACCGCGCGGAAAATCTGAAAACGCTCGACGGG  
 CGCAAACTGATTGCGGCGGAAAAGGCAGACCCTAATTCGTTTGGCTTTAAACAAAATTAC  
 CGGCAGGACTGTACGAATTATTGCTCAAGCAATGCGAAGGCGGATTTGCTTGGGTGTG  
 CAGCGTTTTGGCTATCCCTGAGGCGGAAGCGGTTTTATATGCCCAACAGGCTTATGCGGCA  
 AATACTTTGTTTGGGCTGCGTGCCGCGGACAGGGGCGACGCGTGTATGCCGCGATCCG  
 TCCCGTCAAATAATTGTGGCTGCGCTTCAATCGGCGGCGCGTCCATCAAATAATACGGGGC  
 GCGCGGCTGCGGACGGGCGGCGCAAAGGCGTGCAAATCGGCGGTGAGGTGTTTTGTACGG  
 CAAAATGAAGGCAGTTCGGCTGGCAATCGGCGTGATGGGCGGACAGGCTGGCCAGCAGCA  
 TCAGTCAACGGCAAAGGCGGTGCGGACGCGAGTTATTTGCATGTTATGGCGGGGTGTT  
 TATGCTGCGTGGCATCAGTTGCGGATAAAACAAACGGGTGCGTATTTGGACGGCTGTTG  
 CAATACCAACGTTTTCAAACACCGCATCAATGATGAAAACCGTGCGGAACGCTACAAAACC  
 AAAGGTTGGACGGCTTCTGTGAAAGGCGGCTACAACGCGCTTGTGGCGGAAGGCGTTGTC  
 GGAAAAGGCAATAATGTGCGGTTTTACCTGCAACCGCAGGCGAGTTTACCTACTTGGGC  
 GTAAACGGCGGCTTACCAGACAGGAGGGGACGGCGGTCGGACTGCTCGGCAGCGGTCAG  
 TGGCAAAGCCGCGCGCATTCGGGCAAAAACCGTTTTGCTTTGCGTAACGGTGTCAAT  
 CTTCAGCCTTTTGGCGTTTTAATGTTTTGCACAGGTCAAAATCTTTTCGGCGTGAAATG  
 GACGGCGAAAACAGACGCTGGCAGGACGCGGCTCGAAGGCGGTTCCGCATTTGAA  
 GCCGTTTGGAAAGGCCATATGTCGACGCGATCGGATACGGCAAAGGACGGACGGCGAC  
 AAAGAAGCCGATTTGTCGCTCAAATGGCTGTTTTGA

10

20

30

【 0 2 4 7 】

【 化 5 】

## 配列番号 8

## 配列番号 7 のポリヌクレオチド配列から演繹されるナイセリア・メニンギティディス BASB 069 ポリペプチド配列

MTLKASKQASGRVNLTLVLSLFCPTPYVCGSDAYDPVKEAEIKNKFILEAAEDRNSHW  
 RGPCSI SFDCFGMFRALGSDNTRSTKIGDDADFSFSDKPKPGTSHYFSSGKTQNSSEYG  
 YDEINIQQKMYNSGILAVDMMPVVKYITDTYGDNLKDAVKKQLQDLYKTRPEAWENKK  
 RTEEAYIEQLGPKFSILKQKNPDLINKLVEDSVLTPHSNTSQTSLNNIFNKLVKIKENK  
 SHVAGQVLELTKMTLKDSLWEPRRHSDIHTLETSDNARIRLNTKDEKLTVHKAYQGGADF  
 LFGYDVRESDEPALTFEQNVSGKSGVVLERRPENLKTLDGRKLIAAEKADPNSFAFKQNY  
 RQGLYELLLKQCEGGFCLGVQRLAIPAEAVLYAQQAYAANTLFGLEAADRGDDVYAADP  
 SRQKLWLF IGGRSHQNI RGGAAADGRRKGVQIGGEV FVRQNEGSRLAIGVMGGRAGQHA  
 SVNGKGGAGSYLHG YGGGVYAAWHQLRDKQTGAYLDGWLQYQRFKHRINDENRAERYKT  
 KGWTASVEGGYNALVAEGVVGKGNVRFYLPQAQFTYLVGNGGFTDSEGTAVGLLGSQ  
 WQSRAGIRAKTRFALRNGVNLQPFPAFNVLHRSKSFGVEMDGEKQTLAGR TALEGRFGIE  
 AGWKGHMSARIGYKRTDGDKEAALS LKWL F

10

## 【0248】

## 寄託した材料

ナイセリア・メニンギティディス血清型 B 株を含む寄託物を 1997 年 6 月 22 日にアメリカ基準培養コレクション（この明細書では“ATCC”と表記）に寄託し、寄託番号 13090 が与えられた。この寄託物はナイセリア・メニンギティディス（アルブレヒトと

20

## 【0249】

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

## 【0250】

寄託された菌株は、完全長 BASB 047、BASB 054、BASB 068、及び BASB 069 遺伝子を含んでいる。寄託された菌株に含まれているポリヌクレオチドの配列と、それによってコードされるポリペプチドのアミノ酸配列は、この明細書における配列の記述と何らかの問題が起こったときに照合する対象となる。

30

## 【0251】

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

## 【0252】

## 【表 1】

40

出願人のファイル番号 KP/BM45352	国際出願
-----------------------	------

寄託された微生物に関する表示  
(PGT Rule 13 bis)

A. 明細書の84頁3～22行に言及した微生物に関する表示	
B. 寄託の特定 他の寄託が別紙に記載されている <input type="checkbox"/>	
寄託機関の名称 AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION	
寄託機関のあて名（郵便番号及び国名を含む） 10801 UNIVERSITY BLVD, MANASSAS, VIRGINIA 20110-2209, UNITED STATES OF AMERICA	
寄託日 1997年6月22日 (22.06.97)	寄託番号 13090
C. 追加記載（該当しない場合には空白にしておく）この情報は添付別紙に続いている <input type="checkbox"/>	
<p>ヨーロッパ特許が求められるこれらの寄託に関し、寄託された微生物のサンプルは、ヨーロッパ特許の付与の公表まで、又は出願が拒絶され又は取り下げられもしくは取り下げられたものとみなされるまで入手可能となるであろう。但し、該サンプルを要求する人によって指名された専門家にのみそのようなサンプルを与える。</p>	
D. この記載が目的とする指定国（すべての指定国を目的としないとき）	
E. 別個の表示の届出（該当しない場合には空白にしておく）	
下記の表示は国際事務局に届け出る予定である。（例えば「受託番号」のように表示事項を明記する）	
—— 受理官庁使用のみ ——	—— 国際事務局使用のみ ——
<input type="checkbox"/> この用紙は国際出願と共に出願時に受理された。	<input type="checkbox"/> 国際事務局が受理した日：
権限のある職員	権限のある職員

10

20

30

40

## 【国際公開パンフレット】

PCT

WORLD INTELLECTUAL PROPERTY ORGANIZATION  
International Bureau

INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(51) International Patent Classification <sup>7</sup> : C12N 15/31, C07K 14/22, A61K 39/095, C07K 16/12		A2	(11) International Publication Number: <b>WO 00/43519</b>
			(43) International Publication Date: 27 July 2000 (27.07.00)
(21) International Application Number: PCT/EP00/00428	(81) Designated States: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).		
(22) International Filing Date: 19 January 2000 (19.01.00)	<b>Published</b> Without international search report and to be republished upon receipt of that report.		
(30) Priority Data: 9901368.2 22 January 1999 (22.01.99) GB 9901944.0 28 January 1999 (28.01.99) GB 9902086.9 29 January 1999 (29.01.99) GB 9903417.5 15 February 1999 (15.02.99) GB 9903535.4 16 February 1999 (16.02.99) GB			
(71) Applicant (for all designated States except US): SMITHKLINE BEECHAM BIOLOGICALS S.A. [BE/BE]; Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart (BE).			
(72) Inventor; and (75) Inventor/Applicant (for US only): RUELLE, Jean-Louis [BE/BE]; SmithKline Beecham Biologicals s.a., Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart (BE).			
(74) Agent: PRIVEITT, Kathryn, Louise; SmithKline Beecham, Two New Horizons Court, Brentford, Middlesex TW8 9EP (GB).			
(54) Title: NOVEL COMPOUNDS			
(57) Abstract The invention provides BASB047, BASB054, BASB068 and BASB069 polypeptides, and polynucleotides encoding BASB047, BASB054, BASB068 and BASB069 polypeptides and methods for producing such polypeptides by recombinant techniques. Also provided are diagnostic, prophylactic and therapeutic uses.			

*FOR THE PURPOSES OF INFORMATION ONLY*

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

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

WO 00/43519

PCT/EP00/00428

**Novel Compounds****FIELD OF THE INVENTION**

This invention relates to polynucleotides, (herein referred to as "BASB047  
5 polynucleotide(s)", "BASB054 polynucleotide(s)", "BASB068 polynucleotide(s)" and  
"BASB069 polynucleotide(s)"), polypeptides encoded by them (referred to herein as  
"BASB047", "BASB054", "BASB068" and "BASB069" respectively or "BASB047  
polypeptide(s)", "BASB054 polypeptide(s)", "BASB068 polypeptide(s)" and "BASB069  
10 polypeptide(s)" respectively), recombinant materials and methods for their production. In  
another aspect, the invention relates to methods for using such polypeptides and  
polynucleotides, including vaccines against bacterial infections. In a further aspect, the  
invention relates to diagnostic assays for detecting infection of certain pathogens.

**BACKGROUND OF THE INVENTION**

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

25 Epidemics dominated by serogroup A meningococci, mostly in central Africa, are  
encountered, sometimes reaching levels up to 1000/100,000/year (Schwartz, B., Moore,  
P.S., Broome, C.V. Clin. Microbiol. Rev. 2 (Supplement), S18-S24, 1989). Nearly all cases  
as a whole of meningococcal disease are caused by serogroup A, B, C, W-135 and Y

WO 00/43519

PCT/EP00/00428

meningococci and a tetravalent A, C, W-135, Y polysaccharide vaccine is available (Armand, J., Arminjon, F., Mynard, M.C., Lafaix, C., *J. Biol. Stand.* 10: 335-339, 1982).

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

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

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

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

A bacteremia animal model has been used to combine all antibody mediated mechanisms (Saukkonen, K., Leinonen, M., Abdillahi, H. Poolman, J. T. *Vaccine* 7: 325-328, 1989). It is

WO 00/43519

PCT/EP00/00428

generally accepted that the late complement component mediated bactericidal mechanism is crucial for immunity against meningococcal disease (Ross, S.C., Rosenthal P.J., Berberic, H.M., Densen, P. J. Infect. Dis. 155: 1266-1275, 1987).

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

#### SUMMARY OF THE INVENTION

- 15 The present invention relates to BASB047, BASB054, BASB068 and BASB069, in particular BASB047, BASB054, BASB068 and BASB069 polypeptides and BASB047, BASB054, BASB068 and BASB069 polynucleotides, recombinant materials and methods for their production. In another aspect, the invention relates to methods for using such polypeptides and polynucleotides, including prevention and treatment of microbial
- 20 diseases, amongst others. In a further aspect, the invention relates to diagnostic assays for detecting diseases associated with microbial infections and conditions associated with such infections, such as assays for detecting expression or activity of BASB047, BASB054, BASB068 and BASB069 polynucleotides or polypeptides.
- 25 Various changes and modifications within the spirit and scope of the disclosed invention will become readily apparent to those skilled in the art from reading the following descriptions and from reading the other parts of the present disclosure.

WO 00/43519

PCT/EP00/00428

**DESCRIPTION OF THE INVENTION**

The invention relates to BASB047, BASB054, BASB068 and BASB069 polypeptides and polynucleotides as described in greater detail below. The invention relates especially to BASB047, BASB054, BASB068 and BASB069 having the nucleotide and amino acid sequences set out in SEQ ID NO:1,3,5,7 and SEQ ID NO:2,4,6,8 respectively. It is understood that sequences recited in the Sequence Listing below as "DNA" represent an exemplification of one embodiment of the invention, since those of ordinary skill will recognize that such sequences can be usefully employed in polynucleotides in general, including ribopolynucleotides.

10

**Polypeptides**

In one aspect of the invention there are provided polypeptides of *Neisseria meningitidis* referred to herein as "BASB047", "BASB054", "BASB068" and "BASB069", and "BASB047 polypeptides", "BASB054 polypeptides", "BASB068 polypeptides" and "BASB069 polypeptides" as well as biologically, diagnostically, prophylactically, clinically or therapeutically useful variants thereof, and compositions comprising the same.

15

The present invention further provides for:

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

20

25

WO 00/43519

PCT/EP00/00428

The BASB043 polypeptide provided in SEQ ID NO:2 is the BASB047 polypeptide from *Neisseria meningitidis* strain ATCC13090.

- 5 The invention also provides an immunogenic fragment of a BASB047 polypeptide, that is, a contiguous portion of the BASB047 polypeptide which has the same or substantially the same immunogenic activity as the polypeptide comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:2. That is to say, the fragment (if necessary when coupled to a carrier) is capable of raising an immune response which recognises the BASB047 polypeptide.
- 10 Such an immunogenic fragment may include, for example, the BASB047 polypeptide lacking an N-terminal leader sequence, and/or a transmembrane domain and/or a C-terminal anchor domain. In a preferred aspect the immunogenic fragment of BASB047 according to the invention comprises substantially all of the extracellular domain of a polypeptide which has at least 85% identity, more preferably at least 90% identity, yet
- 15 more preferably at least 95% identity, most preferably at least 97-99% identity, to that of SEQ ID NO:2 over the entire length of SEQ ID NO:2.

The present invention further provides for:

- (a) an isolated polypeptide which comprises an amino acid sequence which has at least
- 20 85% identity, more preferably at least 90% identity, yet more preferably at least 95% identity, most preferably at least 97-99% or exact identity, to that of SEQ ID NO:4.
- (b) a polypeptide encoded by an isolated polynucleotide comprising a polynucleotide sequence which has at least 85% identity, more preferably at least 90% identity, yet more preferably at least 95% identity, even more preferably at least 97-99% or exact identity to
- 25 SEQ ID NO:3 over the entire length of SEQ ID NO:3.
- (c) a polypeptide encoded by an isolated polynucleotide comprising a polynucleotide sequence encoding a polypeptide which has at least 85% identity, more preferably at least 90% identity, yet more preferably at least 95% identity, even more preferably at least 97-99% or exact identity, to the amino acid sequence of SEQ ID NO:4

WO 00/43519

PCT/EP00/00428

The BASB054 polypeptide provided in SEQ ID NO:4 is the BASB054 polypeptide from *Neisseria meningitidis* strain ATCC13090.

- 5 The invention also provides an immunogenic fragment of a BASB054 polypeptide, that is, a contiguous portion of the BASB054 polypeptide which has the same or substantially the same immunogenic activity as the polypeptide comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:4. That is to say, the fragment (if necessary when coupled to a carrier) is capable of raising an immune response which recognises the BASB054 polypeptide.
- 10 Such an immunogenic fragment may include, for example, the BASB054 polypeptide lacking an N-terminal leader sequence, and/or a transmembrane domain and/or a C-terminal anchor domain. In a preferred aspect the immunogenic fragment of BASB054 according to the invention comprises substantially all of the extracellular domain of a polypeptide which has at least 85% identity, more preferably at least 90% identity, yet
- 15 more preferably at least 95% identity, most preferably at least 97-99% identity, to that of SEQ ID NO:4 over the entire length of SEQ ID NO:4.

The present invention further provides for:

- (a) an isolated polypeptide which comprises an amino acid sequence which has at least
- 20 85% identity, more preferably at least 90% identity, yet more preferably at least 95% identity, most preferably at least 97-99% or exact identity, to that of SEQ ID NO:6.
- (b) a polypeptide encoded by an isolated polynucleotide comprising a polynucleotide sequence which has at least 85% identity, more preferably at least 90% identity, yet more preferably at least 95% identity, even more preferably at least 97-99% or exact identity to
- 25 SEQ ID NO:5 over the entire length of SEQ ID NO:5.
- (c) a polypeptide encoded by an isolated polynucleotide comprising a polynucleotide sequence encoding a polypeptide which has at least 85% identity, more preferably at least 90% identity, yet more preferably at least 95% identity, even more preferably at least 97-99% or exact identity, to the amino acid sequence of SEQ ID NO:6

WO 00/43519

PCT/EP00/00428

The BASB068 polypeptide provided in SEQ ID NO:6 is the BASB068 polypeptide from *Neisseria meningitidis* strain ATCC13090.

- 5 The invention also provides an immunogenic fragment of a BASB068 polypeptide, that is, a contiguous portion of the BASB068 polypeptide which has the same or substantially the same immunogenic activity as the polypeptide comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:6. That is to say, the fragment (if necessary when coupled to a carrier) is capable of raising an immune response which recognises the BASB068 polypeptide.
- 10 Such an immunogenic fragment may include, for example, the BASB068 polypeptide lacking an N-terminal leader sequence, and/or a transmembrane domain and/or a C-terminal anchor domain. In a preferred aspect the immunogenic fragment of BASB068 according to the invention comprises substantially all of the extracellular domain of a polypeptide which has at least 85% identity, more preferably at least 90% identity, yet
- 15 more preferably at least 95% identity, most preferably at least 97-99% identity, to that of SEQ ID NO:6 over the entire length of SEQ ID NO:6.

The present invention further provides for:

- (a) an isolated polypeptide which comprises an amino acid sequence which has at least
- 20 85% identity, more preferably at least 90% identity, yet more preferably at least 95% identity, most preferably at least 97-99% or exact identity, to that of SEQ ID NO:8.
- (b) a polypeptide encoded by an isolated polynucleotide comprising a polynucleotide sequence which has at least 85% identity, more preferably at least 90% identity, yet more preferably at least 95% identity, even more preferably at least 97-99% or exact identity to
- 25 SEQ ID NO:7 over the entire length of SEQ ID NO:7.
- (c) a polypeptide encoded by an isolated polynucleotide comprising a polynucleotide sequence encoding a polypeptide which has at least 85% identity, more preferably at least 90% identity, yet more preferably at least 95% identity, even more preferably at least 97-99% or exact identity, to the amino acid sequence of SEQ ID NO:8

WO 00/43519

PCT/EP00/00428

The BASB069 polypeptide provided in SEQ ID NO:8 is the BASB069 polypeptide from *Neisseria meningitidis* strain ATCC13090.

- 5 The invention also provides an immunogenic fragment of a BASB069 polypeptide, that is, a contiguous portion of the BASB069 polypeptide which has the same or substantially the same immunogenic activity as the polypeptide comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:8. That is to say, the fragment (if necessary when coupled to a carrier) is capable of raising an immune response which recognises the BASB069 polypeptide.
- 10 Such an immunogenic fragment may include, for example, the BASB069 polypeptide lacking an N-terminal leader sequence, and/or a transmembrane domain and/or a C-terminal anchor domain. In a preferred aspect the immunogenic fragment of BASB069 according to the invention comprises substantially all of the extracellular domain of a polypeptide which has at least 85% identity, more preferably at least 90% identity, yet
- 15 more preferably at least 95% identity, most preferably at least 97-99% identity, to that of SEQ ID NO:8 over the entire length of SEQ ID NO:8.

- A fragment is a polypeptide having an amino acid sequence that is entirely the same as part
- 20 but not all of any amino acid sequence of any polypeptide of the invention. As with BASB047, BASB054, BASB068 and BASB069 polypeptides, fragments may be "free-standing", or comprised within a larger polypeptide of which they form a part or region, most preferably as a single continuous region in a single larger polypeptide.

- 25 Preferred fragments include, for example, truncation polypeptides having a portion of an amino acid sequence of SEQ ID NO:2,4,6,8 or of variants thereof, such as a continuous series of residues that includes an amino- and/or carboxyl-terminal amino acid sequence. Degradation forms of the polypeptides of the invention produced by or in a host cell, are also preferred. Further preferred are fragments characterized by structural or functional

WO 00/43519

PCT/EP00/00428

attributes such as fragments that comprise alpha-helix and alpha-helix forming regions, beta-sheet and beta-sheet-forming regions, turn and turn-forming regions, coil and coil-forming regions, hydrophilic regions, hydrophobic regions, alpha amphipathic regions, beta amphipathic regions, flexible regions, surface-forming regions, substrate binding region, and high antigenic index regions.

Further preferred fragments include an isolated polypeptide comprising an amino acid sequence having at least 15, 20, 30, 40, 50 or 100 contiguous amino acids from the amino acid sequence of SEQ ID NO:2,4,6,8 or an isolated polypeptide comprising an amino acid sequence having at least 15, 20, 30, 40, 50 or 100 contiguous amino acids truncated or deleted from the amino acid sequence of SEQ ID NO:2,4,6,8.

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

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

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

WO 00/43519

PCT/EP00/00428

In one aspect, the invention relates to genetically engineered soluble fusion proteins comprising a polypeptide of the present invention, or a fragment thereof, and various portions of the constant regions of heavy or light chains of immunoglobulins of various subclasses (IgG, IgM, IgA, IgE). Preferred as an immunoglobulin is the constant part of the heavy chain of human IgG, particularly IgG1, where fusion takes place at the hinge region. In a particular embodiment, the Fc part can be removed simply by incorporation of a cleavage sequence which can be cleaved with blood clotting factor Xa.

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

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

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

WO 00/43519

PCT/EP00/00428

the choline or to some choline analogues such as DEAE. This property has been exploited for the development of *E. coli* C-LytA expressing plasmids useful for expression of fusion proteins. Purification of hybrid proteins containing the C-LytA fragment at its amino terminus has been described {Biotechnology: 10, (1992) page 5 795-798}. It is possible to use the repeat portion of the LytA molecule found in the C terminal end starting at residue 178, for example residues 188 - 305.

The present invention also includes variants of the aforementioned polypeptides, that is polypeptides that vary from the referents by conservative amino acid substitutions, 10 whereby a residue is substituted by another with like characteristics. Typical such substitutions are among Ala, Val, Leu and Ile; among Ser and Thr; among the acidic residues Asp and Glu; among Asn and Gln; and among the basic residues Lys and Arg; or aromatic residues Phe and Tyr.

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

20

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

25

#### **Polynucleotides**

It is an object of the invention to provide polynucleotides that encode BASB047 polypeptides, particularly polynucleotides that encode the polypeptide herein designated BASB047.

WO 00/43519

PCT/EP00/00428

In a particularly preferred embodiment of the invention the polynucleotide comprises a region encoding BASB047 polypeptides comprising a sequence set out in SEQ ID NO:1 which includes a full length gene, or a variant thereof.

5

The BASB047 polynucleotide provided in SEQ ID NO:1 is the BASB047 polynucleotide from *Neisseria meningitidis* strains ATCC13090.

As a further aspect of the invention there are provided isolated nucleic acid molecules encoding and/or expressing BASB047 polypeptides and polynucleotides, particularly *Neisseria meningitidis* BASB047 polypeptides and polynucleotides, including, for example, unprocessed RNAs, ribozyme RNAs, mRNAs, cDNAs, genomic DNAs, B- and Z-DNAs. Further embodiments of the invention include biologically, diagnostically, prophylactically, clinically or therapeutically useful polynucleotides and polypeptides, and variants thereof, and compositions comprising the same.

10  
15

Another aspect of the invention relates to isolated polynucleotides, including at least one full length gene, that encodes a BASB047 polypeptide having a deduced amino acid sequence of SEQ ID NO:2 and polynucleotides closely related thereto and variants thereof.

20

In another particularly preferred embodiment of the invention there is a BASB047 polypeptide from *Neisseria meningitidis* comprising or consisting of an amino acid sequence of SEQ ID NO:2 or a variant thereof.

Using the information provided herein, such as a polynucleotide sequence set out in SEQ ID NO:1 a polynucleotide of the invention encoding BASB047 polypeptide may be obtained using standard cloning and screening methods, such as those for cloning and sequencing chromosomal DNA fragments from bacteria using *Neisseria meningitidis* cells as starting material, followed by obtaining a full length clone. For example, to obtain a polynucleotide

25

WO 00/43519

PCT/EP00/00428

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

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

The polynucleotide of SEQ ID NO:1, between the start codon at nucleotide number 1 and the stop codon which begins at nucleotide number 1201 of SEQ ID NO:1, encodes the polypeptide of SEQ ID NO:2.

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

WO 00/43519

PCT/EP00/00428

- (a) a polynucleotide sequence which has at least 85% identity, more preferably at least 90% identity, yet more preferably at least 95% identity, even more preferably at least 97-99% or exact identity to SEQ ID NO:1 over the entire length of SEQ ID NO:1; or
- (b) a polynucleotide sequence encoding a polypeptide which has at least 85% identity, more preferably at least 90% identity, yet more preferably at least 95% identity, even more preferably at least 97-99% or 100% exact, to the amino acid sequence of SEQ ID NO:2 over the entire length of SEQ ID NO:2.

A polynucleotide encoding a polypeptide of the present invention, including homologs and orthologs from species other than *Neisseria meningitidis*, may be obtained by a process which comprises the steps of screening an appropriate library under stringent hybridization conditions (for example, using a temperature in the range of 45 – 65°C and an SDS concentration from 0.1 – 1%) with a labeled or detectable probe consisting of or comprising the sequence of SEQ ID NO:1 or a fragment thereof; and isolating a full-length gene and/or genomic clones containing said polynucleotide sequence.

The invention provides a polynucleotide sequence identical over its entire length to a coding sequence (open reading frame) in SEQ ID NO:1. Also provided by the invention is a coding sequence for a mature polypeptide or a fragment thereof, by itself as well as a coding sequence for a mature polypeptide or a fragment in reading frame with another coding sequence, such as a sequence encoding a leader or secretory sequence, a pre-, or pro- or prepro-protein sequence. The polynucleotide of the invention may also contain at least one non-coding sequence, including for example, but not limited to at least one non-coding 5' and 3' sequence, such as the transcribed but non-translated sequences, termination signals (such as rho-dependent and rho-independent termination signals), ribosome binding sites, Kozak sequences, sequences that stabilize mRNA, introns, and polyadenylation signals. The polynucleotide sequence may also comprise additional coding sequence encoding additional amino acids. For example, a marker sequence that facilitates purification of the fused polypeptide can be encoded. In certain embodiments of the invention, the marker

WO 00/43519

PCT/EP00/00428

sequence is a hexa-histidine peptide, as provided in the pQE vector (Qiagen, Inc.) and described in Gentz *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 86: 821-824 (1989), or an HA peptide tag (Wilson *et al.*, *Cell* 37: 767 (1984), both of which may be useful in purifying polypeptide sequence fused to them. Polynucleotides of the invention also include, but are not limited to, polynucleotides comprising a structural gene and its naturally associated sequences that control gene expression.

The nucleotide sequence encoding BASB047 polypeptide of SEQ ID NO:2 may be identical to the polypeptide encoding sequence contained in nucleotides 1 to 1200 of SEQ ID NO:1. Alternatively it may be a sequence, which as a result of the redundancy (degeneracy) of the genetic code, also encodes the polypeptide of SEQ ID NO:2. The term "polynucleotide encoding a polypeptide" as used herein encompasses polynucleotides that include a sequence encoding a polypeptide of the invention, particularly a bacterial polypeptide and more particularly a polypeptide of the *Neisseria meningitidis* BASB047 having an amino acid sequence set out in SEQ ID NO:2. The term also encompasses polynucleotides that include a single continuous region or discontinuous regions encoding the polypeptide (for example, polynucleotides interrupted by integrated phage, an integrated insertion sequence, an integrated vector sequence, an integrated transposon sequence, or due to RNA editing or genomic DNA reorganization) together with additional regions, that also may contain coding and/or non-coding sequences.

The invention further relates to variants of the polynucleotides described herein that encode variants of a polypeptide having a deduced amino acid sequence of SEQ ID NO:2. Fragments of polynucleotides of the invention may be used, for example, to synthesize full-length polynucleotides of the invention.

Further particularly preferred embodiments are polynucleotides encoding BASB047 variants, that have the amino acid sequence of BASB047 polypeptide of SEQ ID NO:2 in which several, a few, 5 to 10, 1 to 5, 1 to 3, 2, 1 or no amino acid residues are substituted,

WO 00/43519

PCT/EP00/00428

modified, deleted and/or added, in any combination. Especially preferred among these are silent substitutions, additions and deletions, that do not alter the properties and activities of BASB047 polypeptide.

- 5 Further preferred embodiments of the invention are polynucleotides that are at least 85% identical over their entire length to a polynucleotide encoding BASB047 polypeptide having an amino acid sequence set out in SEQ ID NO:2 and polynucleotides that are complementary to such polynucleotides. In this regard, polynucleotides at least 90% identical over their entire length to the same are particularly preferred, and among these
- 10 particularly preferred polynucleotides, those with at least 95% are especially preferred. Furthermore, those with at least 97% are highly preferred among those with at least 95%, and among these those with at least 98% and at least 99% are particularly highly preferred, with at least 99% being the more preferred.
- 15 Preferred embodiments are polynucleotides encoding polypeptides that retain substantially the same biological function or activity as the mature polypeptide encoded by a DNA of SEQ ID NO:1.

- In accordance with certain preferred embodiments of this invention there are provided
- 20 polynucleotides that hybridize, particularly under stringent conditions, to BASB047 polynucleotide sequences, such as those polynucleotides in SEQ ID NO:1.

- The invention further relates to polynucleotides that hybridize to the polynucleotide sequences provided herein. In this regard, the invention especially relates to
- 25 polynucleotides that hybridize under stringent conditions to the polynucleotides described herein. As herein used, the terms "stringent conditions" and "stringent hybridization conditions" mean hybridization occurring only if there is at least 95% and preferably at least 97% identity between the sequences. A specific example of stringent hybridization conditions is overnight incubation at 42°C in a solution comprising: 50% formamide, 5x

WO 00/43519

PCT/EP00/00428

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

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

As discussed elsewhere herein regarding polynucleotide assays of the invention, for instance, the polynucleotides of the invention, may be used as a hybridization probe for RNA, cDNA and genomic DNA to isolate full-length cDNAs and genomic clones encoding BASB047 and to isolate cDNA and genomic clones of other genes that have a high identity, particularly high sequence identity, to the BASB047 gene. Such probes generally will comprise at least 15 nucleotide residues or base pairs. Preferably, such probes will have at least 30 nucleotide residues or base pairs and may have at least 50 nucleotide residues or base pairs. Particularly preferred probes will have at least 20 nucleotide residues or base pairs and will have less than 30 nucleotide residues or base pairs.

A coding region of a BASB047 gene may be isolated by screening using a DNA sequence provided in SEQ ID NO:1 to synthesize an oligonucleotide probe. A labeled oligonucleotide having a sequence complementary to that of a gene of the invention is then

WO 00/43519

PCT/EP00/00428

used to screen a library of cDNA, genomic DNA or mRNA to determine which members of the library the probe hybridizes to.

WO 00/43519

PCT/EP00/00428

It is an object of the invention to provide polynucleotides that encode BASB054 polypeptides, particularly polynucleotides that encode the polypeptide herein designated BASB054.

- 5 In a particularly preferred embodiment of the invention the polynucleotide comprises a region encoding BASB054 polypeptides comprising a sequence set out in SEQ ID NO:3 which includes a full length gene, or a variant thereof.

- The BASB054 polynucleotide provided in SEQ ID NO:3 is the BASB054  
10 polynucleotide from *Neisseria meningitidis* strains ATCC13090.

- As a further aspect of the invention there are provided isolated nucleic acid molecules encoding and/or expressing BASB054 polypeptides and polynucleotides, particularly *Neisseria meningitidis* BASB054 polypeptides and polynucleotides, including, for  
15 example, unprocessed RNAs, ribozyme RNAs, mRNAs, cDNAs, genomic DNAs, B- and Z-DNAs. Further embodiments of the invention include biologically, diagnostically, prophylactically, clinically or therapeutically useful polynucleotides and polypeptides, and variants thereof, and compositions comprising the same.

- 20 Another aspect of the invention relates to isolated polynucleotides, including at least one full length gene, that encodes a BASB054 polypeptide having a deduced amino acid sequence of SEQ ID NO:4 and polynucleotides closely related thereto and variants thereof.

- In another particularly preferred embodiment of the invention there is a BASB054  
25 polypeptide from *Neisseria meningitidis* comprising or consisting of an amino acid sequence of SEQ ID NO:4 or a variant thereof.

Using the information provided herein, such as a polynucleotide sequence set out in SEQ ID NO:3 a polynucleotide of the invention encoding BASB054 polypeptide may be obtained

WO 00/43519

PCT/EP00/00428

using standard cloning and screening methods, such as those for cloning and sequencing chromosomal DNA fragments from bacteria using *Neisseria meningitidis* cells as starting material, followed by obtaining a full length clone. For example, to obtain a polynucleotide sequence of the invention, such as a polynucleotide sequence given in SEQ ID NO:3

5 typically a library of clones of chromosomal DNA of *Neisseria meningitidis* in *E.coli* or some other suitable host is probed with a radiolabeled oligonucleotide, preferably a 17-mer or longer, derived from a partial sequence. Clones carrying DNA identical to that of the probe can then be distinguished using stringent hybridization conditions. By

10 sequencing the individual clones thus identified by hybridization with sequencing primers designed from the original polypeptide or polynucleotide sequence it is then possible to extend the polynucleotide sequence in both directions to determine a full length gene sequence. Conveniently, such sequencing is performed, for example, using denatured double stranded DNA prepared from a plasmid clone. Suitable techniques are described

15 by Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook et al., *MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL*, 2nd Ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989). (see in particular Screening By Hybridization 1.90 and Sequencing Denatured Double-Stranded DNA Templates 13.70). Direct genomic DNA sequencing may also be performed to obtain a full length gene sequence. Illustrative of

20 the invention, each polynucleotide set out in SEQ ID NO:3 was discovered in a DNA library derived from *Neisseria meningitidis*.

Moreover, the DNA sequence set out in SEQ ID NO:3 contains an open reading frame encoding a protein having about the number of amino acid residues set forth in SEQ ID NO:4 with a deduced molecular weight that can be calculated using amino acid residue

25 molecular weight values well known to those skilled in the art.

The polynucleotide of SEQ ID NO:3, between the start codon at nucleotide number 1 and the stop codon which begins at nucleotide number 2407 of SEQ ID NO:3, encodes the polypeptide of SEQ ID NO:4.

WO 00/43519

PCT/EP00/00428

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

- (a) a polynucleotide sequence which has at least 85% identity, more preferably at least 90% identity, yet more preferably at least 95% identity, even more preferably at least 97-99% or exact identity to SEQ ID NO:3 over the entire length of SEQ ID NO:3; or
- (b) a polynucleotide sequence encoding a polypeptide which has at least 85% identity, more preferably at least 90% identity, yet more preferably at least 95% identity, even more preferably at least 97-99% or 100% exact, to the amino acid sequence of SEQ ID NO:4 over the entire length of SEQ ID NO:4.

A polynucleotide encoding a polypeptide of the present invention, including homologs and orthologs from species other than *Neisseria meningitidis*, may be obtained by a process which comprises the steps of screening an appropriate library under stringent hybridization conditions (for example, using a temperature in the range of 45 – 65°C and an SDS concentration from 0.1 – 1%) with a labeled or detectable probe consisting of or comprising the sequence of SEQ ID NO:3 or a fragment thereof, and isolating a full-length gene and/or genomic clones containing said polynucleotide sequence.

The invention provides a polynucleotide sequence identical over its entire length to a coding sequence (open reading frame) in SEQ ID NO:3. Also provided by the invention is a coding sequence for a mature polypeptide or a fragment thereof, by itself as well as a coding sequence for a mature polypeptide or a fragment in reading frame with another coding sequence, such as a sequence encoding a leader or secretory sequence, a pre-, or pro- or prepro-protein sequence. The polynucleotide of the invention may also contain at least one non-coding sequence, including for example, but not limited to at least one non-coding 5' and 3' sequence, such as the transcribed but non-translated sequences, termination signals (such as rho-dependent and rho-independent termination signals), ribosome binding sites, Kozak sequences, sequences that stabilize mRNA, introns, and polyadenylation signals.

WO 00/43519

PCT/EP00/00428

The polynucleotide sequence may also comprise additional coding sequence encoding additional amino acids. For example, a marker sequence that facilitates purification of the fused polypeptide can be encoded. In certain embodiments of the invention, the marker sequence is a hexa-histidine peptide, as provided in the pQE vector (Qiagen, Inc.) and described in Gentz *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 86: 821-824 (1989), or an HA peptide tag (Wilson *et al.*, *Cell* 37: 767 (1984), both of which may be useful in purifying polypeptide sequence fused to them. Polynucleotides of the invention also include, but are not limited to, polynucleotides comprising a structural gene and its naturally associated sequences that control gene expression.

10

The nucleotide sequence encoding BASB054 polypeptide of SEQ ID NO:4 may be identical to the polypeptide encoding sequence contained in nucleotides 1 to 2406 of SEQ ID NO:3. Alternatively it may be a sequence, which as a result of the redundancy (degeneracy) of the genetic code, also encodes the polypeptide of SEQ ID NO:4.

15 The term "polynucleotide encoding a polypeptide" as used herein encompasses polynucleotides that include a sequence encoding a polypeptide of the invention, particularly a bacterial polypeptide and more particularly a polypeptide of the *Neisseria meningitidis* BASB054 having an amino acid sequence set out in SEQ ID NO:4. The term also encompasses polynucleotides that include a single continuous region or discontinuous regions encoding the polypeptide (for example, polynucleotides interrupted by integrated phage, an integrated insertion sequence, an integrated vector sequence, an integrated transposon sequence, or due to RNA editing or genomic DNA reorganization) together with additional regions, that also may contain coding and/or non-coding sequences.

20  
25 The invention further relates to variants of the polynucleotides described herein that encode variants of a polypeptide having a deduced amino acid sequence of SEQ ID NO:4. Fragments of polynucleotides of the invention may be used, for example, to synthesize full-length polynucleotides of the invention.

WO 00/43519

PCT/EP00/00428

Further particularly preferred embodiments are polynucleotides encoding BASB054 variants, that have the amino acid sequence of BASB054 polypeptide of SEQ ID NO:4 in which several, a few, 5 to 10, 1 to 5, 1 to 3, 2, 1 or no amino acid residues are substituted, modified, deleted and/or added, in any combination. Especially preferred among these are  
5 silent substitutions, additions and deletions, that do not alter the properties and activities of BASB054 polypeptide.

Further preferred embodiments of the invention are polynucleotides that are at least 85% identical over their entire length to a polynucleotide encoding BASB054 polypeptide having  
10 an amino acid sequence set out in SEQ ID NO:4 and polynucleotides that are complementary to such polynucleotides. In this regard, polynucleotides at least 90% identical over their entire length to the same are particularly preferred, and among these particularly preferred polynucleotides, those with at least 95% are especially preferred. Furthermore, those with at least 97% are highly preferred among those with at least 95%,  
15 and among these those with at least 98% and at least 99% are particularly highly preferred, with at least 99% being the more preferred.

Preferred embodiments are polynucleotides encoding polypeptides that retain substantially the same biological function or activity as the mature polypeptide encoded by a DNA of  
20 SEQ ID NO:3.

In accordance with certain preferred embodiments of this invention there are provided polynucleotides that hybridize, particularly under stringent conditions, to BASB054 polynucleotide sequences, such as those polynucleotides in SEQ ID NO:3.  
25

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

WO 00/43519

PCT/EP00/00428

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

The invention also provides a polynucleotide consisting of or comprising a polynucleotide sequence obtained by screening an appropriate library containing the complete gene for a polynucleotide sequence set forth in SEQ ID NO:3 under stringent hybridization conditions with a probe having the sequence of said polynucleotide sequence set forth in SEQ ID NO:3 or a fragment thereof; and isolating said polynucleotide sequence. Fragments useful for obtaining such a polynucleotide include, for example, probes and primers fully described elsewhere herein.

As discussed elsewhere herein regarding polynucleotide assays of the invention, for instance, the polynucleotides of the invention, may be used as a hybridization probe for RNA, cDNA and genomic DNA to isolate full-length cDNAs and genomic clones encoding BASB054 and to isolate cDNA and genomic clones of other genes that have a high identity, particularly high sequence identity, to the BASB054 gene. Such probes generally will comprise at least 15 nucleotide residues or base pairs. Preferably, such probes will have at least 30 nucleotide residues or base pairs and may have at least 50 nucleotide residues or base pairs. Particularly preferred probes will have at least 20 nucleotide residues or base pairs and will have less than 30 nucleotide residues or base pairs.

WO 00/43519

PCT/EP00/00428

A coding region of a BASB054 gene may be isolated by screening using a DNA sequence provided in SEQ ID NO:3 to synthesize an oligonucleotide probe. A labeled oligonucleotide having a sequence complementary to that of a gene of the invention is then used to screen a library of cDNA, genomic DNA or mRNA to determine which members of  
5 the library the probe hybridizes to.

WO 00/43519

PCT/EP00/00428

It is an object of the invention to provide polynucleotides that encode BASB068 polypeptides, particularly polynucleotides that encode the polypeptide herein designated BASB068.

- 5 In a particularly preferred embodiment of the invention the polynucleotide comprises a region encoding BASB068 polypeptides comprising a sequence set out in SEQ ID NO:5 which includes a full length gene, or a variant thereof.

The BASB068 polynucleotide provided in SEQ ID NO:5 is the BASB068  
10 polynucleotide from *Neisseria meningitidis* strains ATCC13090.

As a further aspect of the invention there are provided isolated nucleic acid molecules encoding and/or expressing BASB068 polypeptides and polynucleotides, particularly  
15 *Neisseria meningitidis* BASB068 polypeptides and polynucleotides, including, for example, unprocessed RNAs, ribozyme RNAs, mRNAs, cDNAs, genomic DNAs, B- and Z-DNAs. Further embodiments of the invention include biologically, diagnostically, prophylactically, clinically or therapeutically useful polynucleotides and polypeptides, and variants thereof, and compositions comprising the same.

- 20 Another aspect of the invention relates to isolated polynucleotides, including at least one full length gene, that encodes a BASB068 polypeptide having a deduced amino acid sequence of SEQ ID NO:6 and polynucleotides closely related thereto and variants thereof.

In another particularly preferred embodiment of the invention there is a BASB068  
25 polypeptide from *Neisseria meningitidis* comprising or consisting of an amino acid sequence of SEQ ID NO:6 or a variant thereof.

Using the information provided herein, such as a polynucleotide sequence set out in SEQ ID NO:5 a polynucleotide of the invention encoding BASB068 polypeptide may be obtained

WO 00/43519

PCT/EP00/00428

using standard cloning and screening methods, such as those for cloning and sequencing chromosomal DNA fragments from bacteria using *Neisseria meningitidis* cells as starting material, followed by obtaining a full length clone. For example, to obtain a polynucleotide sequence of the invention, such as a polynucleotide sequence given in SEQ ID NO:5

5 typically a library of clones of chromosomal DNA of *Neisseria meningitidis* in *E.coli* or some other suitable host is probed with a radiolabeled oligonucleotide, preferably a 17-mer or longer, derived from a partial sequence. Clones carrying DNA identical to that of the probe can then be distinguished using stringent hybridization conditions. By

10 sequencing the individual clones thus identified by hybridization with sequencing primers designed from the original polypeptide or polynucleotide sequence it is then possible to extend the polynucleotide sequence in both directions to determine a full length gene sequence. Conveniently, such sequencing is performed, for example, using denatured

15 double stranded DNA prepared from a plasmid clone. Suitable techniques are described by Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook et al., *MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL*, 2nd Ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989). (see in particular Screening By Hybridization 1.90 and Sequencing Denatured Double-Stranded DNA Templates 13.70). Direct genomic DNA sequencing may also be performed to obtain a full length gene sequence. Illustrative of the invention, each polynucleotide set out in SEQ ID NO:5 was discovered in a DNA

20 library derived from *Neisseria meningitidis*.

Moreover, the DNA sequence set out in SEQ ID NO:5 contains an open reading frame encoding a protein having about the number of amino acid residues set forth in SEQ ID NO:6 with a deduced molecular weight that can be calculated using amino acid residue

25 molecular weight values well known to those skilled in the art.

The polynucleotide of SEQ ID NO:5, between the start codon at nucleotide number 1 and the stop codon which begins at nucleotide number 2014 of SEQ ID NO:5, encodes the polypeptide of SEQ ID NO:6.

WO 00/43519

PCT/EP00/00428

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

- (a) a polynucleotide sequence which has at least 85% identity, more preferably at least 90% identity, yet more preferably at least 95% identity, even more preferably at least 97-99% or exact identity to SEQ ID NO:5 over the entire length of SEQ ID NO:5; or
- (b) a polynucleotide sequence encoding a polypeptide which has at least 85% identity, more preferably at least 90% identity, yet more preferably at least 95% identity, even more preferably at least 97-99% or 100% exact, to the amino acid sequence of SEQ ID NO:6 over the entire length of SEQ ID NO:6.

A polynucleotide encoding a polypeptide of the present invention, including homologs and orthologs from species other than *Neisseria meningitidis*, may be obtained by a process which comprises the steps of screening an appropriate library under stringent hybridization conditions (for example, using a temperature in the range of 45 – 65°C and an SDS concentration from 0.1 – 1%) with a labeled or detectable probe consisting of or comprising the sequence of SEQ ID NO:5 or a fragment thereof; and isolating a full-length gene and/or genomic clones containing said polynucleotide sequence.

The invention provides a polynucleotide sequence identical over its entire length to a coding sequence (open reading frame) in SEQ ID NO:5. Also provided by the invention is a coding sequence for a mature polypeptide or a fragment thereof, by itself as well as a coding sequence for a mature polypeptide or a fragment in reading frame with another coding sequence, such as a sequence encoding a leader or secretory sequence, a pre-, or pro- or prepro-protein sequence. The polynucleotide of the invention may also contain at least one non-coding sequence, including for example, but not limited to at least one non-coding 5' and 3' sequence, such as the transcribed but non-translated sequences, termination signals (such as rho-dependent and rho-independent termination signals), ribosome binding sites, Kozak sequences, sequences that stabilize mRNA, introns, and polyadenylation signals.

WO 00/43519

PCT/EP00/00428

The polynucleotide sequence may also comprise additional coding sequence encoding additional amino acids. For example, a marker sequence that facilitates purification of the fused polypeptide can be encoded. In certain embodiments of the invention, the marker sequence is a hexa-histidine peptide, as provided in the pQE vector (Qiagen, Inc.) and described in Gentz *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 86: 821-824 (1989), or an HA peptide tag (Wilson *et al.*, *Cell* 37: 767 (1984), both of which may be useful in purifying polypeptide sequence fused to them. Polynucleotides of the invention also include, but are not limited to, polynucleotides comprising a structural gene and its naturally associated sequences that control gene expression.

10

The nucleotide sequence encoding BASB068 polypeptide of SEQ ID NO:6 may be identical to the polypeptide encoding sequence contained in nucleotides 1 to 2013 of SEQ ID NO:5. Alternatively it may be a sequence, which as a result of the redundancy (degeneracy) of the genetic code, also encodes the polypeptide of SEQ ID NO:6.

15

The term "polynucleotide encoding a polypeptide" as used herein encompasses polynucleotides that include a sequence encoding a polypeptide of the invention, particularly a bacterial polypeptide and more particularly a polypeptide of the *Neisseria meningitidis* BASB068 having an amino acid sequence set out in SEQ ID NO:6. The term also encompasses polynucleotides that include a single continuous region or discontinuous regions encoding the polypeptide (for example, polynucleotides interrupted by integrated phage, an integrated insertion sequence, an integrated vector sequence, an integrated transposon sequence, or due to RNA editing or genomic DNA reorganization) together with additional regions, that also may contain coding and/or non-coding sequences.

20

25

The invention further relates to variants of the polynucleotides described herein that encode variants of a polypeptide having a deduced amino acid sequence of SEQ ID NO:6. Fragments of polynucleotides of the invention may be used, for example, to synthesize full-length polynucleotides of the invention.

WO 00/43519

PCT/EP00/00428

Further particularly preferred embodiments are polynucleotides encoding BASB068 variants, that have the amino acid sequence of BASB068 polypeptide of SEQ ID NO:6 in which several, a few, 5 to 10, 1 to 5, 1 to 3, 2, 1 or no amino acid residues are substituted, modified, deleted and/or added, in any combination. Especially preferred among these are  
5 silent substitutions, additions and deletions, that do not alter the properties and activities of BASB068 polypeptide.

Further preferred embodiments of the invention are polynucleotides that are at least 85% identical over their entire length to a polynucleotide encoding BASB068 polypeptide having  
10 an amino acid sequence set out in SEQ ID NO:6 and polynucleotides that are complementary to such polynucleotides. In this regard, polynucleotides at least 90% identical over their entire length to the same are particularly preferred, and among these particularly preferred polynucleotides, those with at least 95% are especially preferred. Furthermore, those with at least 97% are highly preferred among those with at least 95%,  
15 and among these those with at least 98% and at least 99% are particularly highly preferred, with at least 99% being the more preferred.

Preferred embodiments are polynucleotides encoding polypeptides that retain substantially the same biological function or activity as the mature polypeptide encoded by a DNA of  
20 SEQ ID NO:5.

In accordance with certain preferred embodiments of this invention there are provided polynucleotides that hybridize, particularly under stringent conditions, to BASB068 polynucleotide sequences, such as those polynucleotides in SEQ ID NO:5.  
25

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

WO 00/43519

PCT/EP00/00428

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

The invention also provides a polynucleotide consisting of or comprising a polynucleotide sequence obtained by screening an appropriate library containing the complete gene for a polynucleotide sequence set forth in SEQ ID NO:5 under stringent hybridization conditions with a probe having the sequence of said polynucleotide sequence set forth in SEQ ID NO:5 or a fragment thereof; and isolating said polynucleotide sequence. Fragments useful for obtaining such a polynucleotide include, for example, probes and primers fully described elsewhere herein.

As discussed elsewhere herein regarding polynucleotide assays of the invention, for instance, the polynucleotides of the invention, may be used as a hybridization probe for RNA, cDNA and genomic DNA to isolate full-length cDNAs and genomic clones encoding BASB068 and to isolate cDNA and genomic clones of other genes that have a high identity, particularly high sequence identity, to the BASB068 gene. Such probes generally will comprise at least 15 nucleotide residues or base pairs. Preferably, such probes will have at least 30 nucleotide residues or base pairs and may have at least 50 nucleotide residues or base pairs. Particularly preferred probes will have at least 20 nucleotide residues or base pairs and will have less than 30 nucleotide residues or base pairs.

WO 00/43519

PCT/EP00/00428

A coding region of a BASB068 gene may be isolated by screening using a DNA sequence provided in SEQ ID NO:5 to synthesize an oligonucleotide probe. A labeled oligonucleotide having a sequence complementary to that of a gene of the invention is then used to screen a library of cDNA, genomic DNA or mRNA to determine which members of  
5 the library the probe hybridizes to.

WO 00/43519

PCT/EP00/00428

It is an object of the invention to provide polynucleotides that encode BASB069 polypeptides, particularly polynucleotides that encode the polypeptide herein designated BASB069.

- 5 In a particularly preferred embodiment of the invention the polynucleotide comprises a region encoding BASB069 polypeptides comprising a sequence set out in SEQ ID NO:7 which includes a full length gene, or a variant thereof.

- The BASB069 polynucleotide provided in SEQ ID NO:7 is the BASB069  
10 polynucleotide from *Neisseria meningitidis* strains ATCC13090.

- As a further aspect of the invention there are provided isolated nucleic acid molecules encoding and/or expressing BASB069 polypeptides and polynucleotides, particularly *Neisseria meningitidis* BASB069 polypeptides and polynucleotides, including, for  
15 example, unprocessed RNAs, ribozyme RNAs, mRNAs, cDNAs, genomic DNAs, B- and Z-DNAs. Further embodiments of the invention include biologically, diagnostically, prophylactically, clinically or therapeutically useful polynucleotides and polypeptides, and variants thereof, and compositions comprising the same.

- 20 Another aspect of the invention relates to isolated polynucleotides, including at least one full length gene, that encodes a BASB069 polypeptide having a deduced amino acid sequence of SEQ ID NO:8 and polynucleotides closely related thereto and variants thereof.

- In another particularly preferred embodiment of the invention there is a BASB069  
25 polypeptide from *Neisseria meningitidis* comprising or consisting of an amino acid sequence of SEQ ID NO:8 or a variant thereof.

Using the information provided herein, such as a polynucleotide sequence set out in SEQ ID NO:7 a polynucleotide of the invention encoding BASB069 polypeptide may be obtained

WO 00/43519

PCT/EP00/00428

using standard cloning and screening methods, such as those for cloning and sequencing chromosomal DNA fragments from bacteria using *Neisseria meningitidis* cells as starting material, followed by obtaining a full length clone. For example, to obtain a polynucleotide sequence of the invention, such as a polynucleotide sequence given in SEQ ID NO:7

5 typically a library of clones of chromosomal DNA of *Neisseria meningitidis* in *E.coli* or some other suitable host is probed with a radiolabeled oligonucleotide, preferably a 17-mer or longer, derived from a partial sequence. Clones carrying DNA identical to that of the probe can then be distinguished using stringent hybridization conditions. By

10 sequencing the individual clones thus identified by hybridization with sequencing primers designed from the original polypeptide or polynucleotide sequence it is then possible to extend the polynucleotide sequence in both directions to determine a full length gene sequence. Conveniently, such sequencing is performed, for example, using denatured

15 double stranded DNA prepared from a plasmid clone. Suitable techniques are described by Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook et al., *MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL*, 2nd Ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989). (see in particular Screening By Hybridization 1.90 and Sequencing Denatured Double-Stranded DNA Templates 13.70). Direct genomic DNA sequencing may also be performed to obtain a full length gene sequence. Illustrative of

20 the invention, each polynucleotide set out in SEQ ID NO:7 was discovered in a DNA library derived from *Neisseria meningitidis*.

Moreover, the DNA sequence set out in SEQ ID NO:7 contains an open reading frame encoding a protein having about the number of amino acid residues set forth in SEQ ID NO:8 with a deduced molecular weight that can be calculated using amino acid residue

25 molecular weight values well known to those skilled in the art.

The polynucleotide of SEQ ID NO:7, between the start codon at nucleotide number 1 and the stop codon which begins at nucleotide number 2074 of SEQ ID NO:7, encodes the polypeptide of SEQ ID NO:8.

WO 00/43519

PCT/EP00/00428

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

- 5 (a) a polynucleotide sequence which has at least 85% identity, more preferably at least 90% identity, yet more preferably at least 95% identity, even more preferably at least 97-99% or exact identity to SEQ ID NO:7 over the entire length of SEQ ID NO:7; or
- 10 (b) a polynucleotide sequence encoding a polypeptide which has at least 85% identity, more preferably at least 90% identity, yet more preferably at least 95% identity, even more preferably at least 97-99% or 100% exact, to the amino acid sequence of SEQ ID NO:8 over the entire length of SEQ ID NO:8.

15 A polynucleotide encoding a polypeptide of the present invention, including homologs and orthologs from species other than *Neisseria meningitidis*, may be obtained by a process which comprises the steps of screening an appropriate library under stringent hybridization conditions (for example, using a temperature in the range of 45 – 65°C and an SDS concentration from 0.1 – 1%) with a labeled or detectable probe consisting of or comprising the sequence of SEQ ID NO:7 or a fragment thereof; and isolating a full-length gene and/or genomic clones containing said polynucleotide sequence.

20 The invention provides a polynucleotide sequence identical over its entire length to a coding sequence (open reading frame) in SEQ ID NO:7. Also provided by the invention is a coding sequence for a mature polypeptide or a fragment thereof, by itself as well as a coding sequence for a mature polypeptide or a fragment in reading frame with another coding sequence, such as a sequence encoding a leader or secretory sequence, a pre-, or pro- or

25 prepro-protein sequence. The polynucleotide of the invention may also contain at least one non-coding sequence, including for example, but not limited to at least one non-coding 5' and 3' sequence, such as the transcribed but non-translated sequences, termination signals (such as rho-dependent and rho-independent termination signals), ribosome binding sites, Kozak sequences, sequences that stabilize mRNA, introns, and polyadenylation signals.

WO 00/43519

PCT/EP00/00428

5 The polynucleotide sequence may also comprise additional coding sequence encoding additional amino acids. For example, a marker sequence that facilitates purification of the fused polypeptide can be encoded. In certain embodiments of the invention, the marker sequence is a hexa-histidine peptide, as provided in the pQE vector (Qiagen, Inc.) and described in Gentz *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 86: 821-824 (1989), or an HA peptide tag (Wilson *et al.*, *Cell* 37: 767 (1984), both of which may be useful in purifying polypeptide sequence fused to them. Polynucleotides of the invention also include, but are not limited to, polynucleotides comprising a structural gene and its naturally associated sequences that control gene expression.

10

The nucleotide sequence encoding BASB069 polypeptide of SEQ ID NO:8 may be identical to the polypeptide encoding sequence contained in nucleotides 1 to 2073 of SEQ ID NO:7. Alternatively it may be a sequence, which as a result of the redundancy (degeneracy) of the genetic code, also encodes the polypeptide of SEQ ID NO:8.

15 The term "polynucleotide encoding a polypeptide" as used herein encompasses polynucleotides that include a sequence encoding a polypeptide of the invention, particularly a bacterial polypeptide and more particularly a polypeptide of the *Neisseria meningitidis* BASB069 having an amino acid sequence set out in SEQ ID NO:8. The term also encompasses polynucleotides that include a single continuous region or discontinuous regions encoding the polypeptide (for example, polynucleotides interrupted by integrated phage, an integrated insertion sequence, an integrated vector sequence, an integrated transposon sequence, or due to RNA editing or genomic DNA reorganization) together with additional regions, that also may contain coding and/or non-coding sequences.

20  
25 The invention further relates to variants of the polynucleotides described herein that encode variants of a polypeptide having a deduced amino acid sequence of SEQ ID NO:8. Fragments of polynucleotides of the invention may be used, for example, to synthesize full-length polynucleotides of the invention.

WO 00/43519

PCT/EP00/00428

Further particularly preferred embodiments are polynucleotides encoding BASB069 variants, that have the amino acid sequence of BASB069 polypeptide of SEQ ID NO:8 in which several, a few, 5 to 10, 1 to 5, 1 to 3, 2, 1 or no amino acid residues are substituted, modified, deleted and/or added, in any combination. Especially preferred among these are  
5 silent substitutions, additions and deletions, that do not alter the properties and activities of BASB069 polypeptide.

Further preferred embodiments of the invention are polynucleotides that are at least 85% identical over their entire length to a polynucleotide encoding BASB069 polypeptide having  
10 an amino acid sequence set out in SEQ ID NO:8 and polynucleotides that are complementary to such polynucleotides. In this regard, polynucleotides at least 90% identical over their entire length to the same are particularly preferred, and among these particularly preferred polynucleotides, those with at least 95% are especially preferred. Furthermore, those with at least 97% are highly preferred among those with at least 95%,  
15 and among these those with at least 98% and at least 99% are particularly highly preferred, with at least 99% being the more preferred.

Preferred embodiments are polynucleotides encoding polypeptides that retain substantially the same biological function or activity as the mature polypeptide encoded by a DNA of  
20 SEQ ID NO:7.

In accordance with certain preferred embodiments of this invention there are provided polynucleotides that hybridize, particularly under stringent conditions, to BASB069 polynucleotide sequences, such as those polynucleotides in SEQ ID NO:7.  
25

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

WO 00/43519

PCT/EP00/00428

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

The invention also provides a polynucleotide consisting of or comprising a polynucleotide sequence obtained by screening an appropriate library containing the complete gene for a polynucleotide sequence set forth in SEQ ID NO:7 under stringent hybridization conditions with a probe having the sequence of said polynucleotide sequence set forth in SEQ ID NO:7 or a fragment thereof; and isolating said polynucleotide sequence. Fragments useful for obtaining such a polynucleotide include, for example, probes and primers fully described elsewhere herein.

As discussed elsewhere herein regarding polynucleotide assays of the invention, for instance, the polynucleotides of the invention, may be used as a hybridization probe for RNA, cDNA and genomic DNA to isolate full-length cDNAs and genomic clones encoding BASB069 and to isolate cDNA and genomic clones of other genes that have a high identity, particularly high sequence identity, to the BASB069 gene. Such probes generally will comprise at least 15 nucleotide residues or base pairs. Preferably, such probes will have at least 30 nucleotide residues or base pairs and may have at least 50 nucleotide residues or base pairs. Particularly preferred probes will have at least 20 nucleotide residues or base pairs and will have less than 30 nucleotide residues or base pairs.

WO 00/43519

PCT/EP00/00428

A coding region of a BASB069 gene may be isolated by screening using a DNA sequence provided in SEQ ID NO:7 to synthesize an oligonucleotide probe. A labeled oligonucleotide having a sequence complementary to that of a gene of the invention is then used to screen a library of cDNA, genomic DNA or mRNA to determine which members of the library the probe hybridizes to.

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

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

WO 00/43519

PCT/EP00/00428

The polynucleotides of the invention that are oligonucleotides derived from a sequence of SEQ ID NOS:1 - 8 may be used in the processes herein as described, but preferably for PCR, to determine whether or not the polynucleotides identified herein in whole or in part are transcribed in bacteria in infected tissue. It is recognized that such sequences will also have utility in diagnosis of the stage of infection and type of infection the pathogen has attained.

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

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

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

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

WO 00/43519

PCT/EP00/00428

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

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

10

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

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

25 **Vectors, Host Cells, Expression Systems**

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

WO 00/43519

PCT/EP00/00428

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

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

10

For recombinant production of the polypeptides of the invention, host cells can be genetically engineered to incorporate expression systems or portions thereof or polynucleotides of the invention. Introduction of a polynucleotide into the host cell can be effected by methods described in many standard laboratory manuals, such as Davis, *et al.*, 15 *BASIC METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY*, (1986) and Sambrook, *et al.*, *MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989), such as, calcium phosphate transfection, DEAE-dextran mediated transfection, transfection, microinjection, cationic lipid-mediated transfection, electroporation, transduction, scrape loading, ballistic 20 introduction and infection.

Representative examples of appropriate hosts include bacterial cells, such as cells of streptococci, staphylococci, enterococci, *E. coli*, streptomyces, cyanobacteria, *Bacillus subtilis*, *Moraxella catarrhalis*, *Haemophilus influenzae* and *Neisseria meningitidis*; fungal 25 cells, such as cells of a yeast, *Kluveromyces*, *Saccharomyces*, a basidiomycete, *Candida albicans* and *Aspergillus*; insect cells such as cells of *Drosophila* S2 and *Spodoptera* Sf9; animal cells such as CHO, COS, HeLa, C127, 3T3, BHK, 293, CV-1 and Bowes melanoma cells; and plant cells, such as cells of a gymnosperm or angiosperm.

WO 00/43519

PCT/EP00/00428

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

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

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

WO 00/43519

PCT/EP00/00428

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

#### Diagnostic, Prognostic, Serotyping and Mutation Assays

- 15 This invention is also related to the use of BASB047, BASB054, BASB068 or BASB069 polynucleotides and polypeptides of the invention for use as diagnostic reagents. Detection of BASB047, BASB054, BASB068 or BASB069 polynucleotides and/or polypeptides in a eukaryote, particularly a mammal, and especially a human, will provide a diagnostic method for diagnosis of disease, staging of disease or response of an infectious organism to drugs.
- 20 Eukaryotes, particularly mammals, and especially humans, particularly those infected or suspected to be infected with an organism comprising the BASB047, BASB054, BASB068 or BASB069 gene or protein, may be detected at the nucleic acid or amino acid level by a variety of well known techniques as well as by methods provided herein.
- 25 Polypeptides and polynucleotides for prognosis, diagnosis or other analysis may be obtained from a putatively infected and/or infected individual's bodily materials. Polynucleotides from any of these sources, particularly DNA or RNA, may be used directly for detection or may be amplified enzymatically by using PCR or any other amplification technique prior to analysis. RNA, particularly mRNA, cDNA and genomic DNA may also be used in the

WO 00/43519

PCT/EP00/00428

- same ways. Using amplification, characterization of the species and strain of infectious or resident organism present in an individual, may be made by an analysis of the genotype of a selected polynucleotide of the organism. Deletions and insertions can be detected by a change in size of the amplified product in comparison to a genotype of a reference sequence
- 5 selected from a related organism, preferably a different species of the same genus or a different strain of the same species. Point mutations can be identified by hybridizing amplified DNA to labeled BASB047, BASB054, BASB068 or BASB069 polynucleotide sequences. Perfectly or significantly matched sequences can be distinguished from imperfectly or more significantly mismatched duplexes by DNase or RNase digestion, for
- 10 DNA or RNA respectively, or by detecting differences in melting temperatures or renaturation kinetics. Polynucleotide sequence differences may also be detected by alterations in the electrophoretic mobility of polynucleotide fragments in gels as compared to a reference sequence. This may be carried out with or without denaturing agents. Polynucleotide differences may also be detected by direct DNA or RNA sequencing. See,
- 15 for example, Myers *et al.*, *Science*, 230: 1242 (1985). Sequence changes at specific locations also may be revealed by nuclease protection assays, such as RNase, V1 and S1 protection assay or a chemical cleavage method. See, for example, Cotton *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 85: 4397-4401 (1985).
- 20 In another embodiment, an array of oligonucleotides probes comprising a BASB047, BASB054, BASB068 or BASB069 nucleotide sequence or fragments thereof can be constructed to conduct efficient screening of, for example, genetic mutations, serotype, taxonomic classification or identification. Array technology methods are well known and have general applicability and can be used to address a variety of questions in molecular
- 25 genetics including gene expression, genetic linkage, and genetic variability (see, for example, Chee *et al.*, *Science*, 274: 610 (1996)).

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

WO 00/43519

PCT/EP00/00428

- (a) a polynucleotide of the present invention, preferably the nucleotide sequence of SEQ ID NO:1,3,5,7 or a fragment thereof ;
- (b) a nucleotide sequence complementary to that of (a);
- (c) a polypeptide of the present invention, preferably the polypeptide of SEQ ID NO:2,4,6,8 or a fragment thereof; or
- 5 (d) an antibody to a polypeptide of the present invention, preferably to the polypeptide of SEQ ID NO:2,4,6,8.

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

This invention also relates to the use of polynucleotides of the present invention as diagnostic reagents. Detection of a mutated form of a polynucleotide of the invention, preferably of SEQ ID NO:1,3,5 or 7 which is associated with a disease or pathogenicity will provide a diagnostic tool that can add to, or define, a diagnosis of a disease, a prognosis of a course of disease, a determination of a stage of disease, or a susceptibility to a disease, which results from under-expression, over-expression or altered expression of the polynucleotide. Organisms, particularly infectious organisms, carrying mutations in such polynucleotide may be detected at the polynucleotide level by a variety of techniques, such as those described elsewhere herein.

15

20

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

25

WO 00/43519

PCT/EP00/00428

BASB047, BASB054, BASB068 or BASB069 polypeptide can be used to identify and analyze mutations.

5 The invention further provides primers with 1, 2, 3 or 4 nucleotides removed from the 5' and/or the 3' end. These primers may be used for, among other things, amplifying  
BASB047, BASB054, BASB068 or BASB069 DNA and/or RNA isolated from a sample  
derived from an individual, such as a bodily material. The primers may be used to amplify a  
polynucleotide isolated from an infected individual, such that the polynucleotide may then  
10 be subject to various techniques for elucidation of the polynucleotide sequence. In this way,  
mutations in the polynucleotide sequence may be detected and used to diagnose and/or  
prognose the infection or its stage or course, or to serotype and/or classify the infectious  
agent.

15 The invention further provides a process for diagnosing disease, preferably bacterial  
infections, more preferably infections caused by *Neisseria meningitidis*, comprising  
determining from a sample derived from an individual, such as a bodily material, an  
increased level of expression of polynucleotide having a sequence of SEQ ID NO:1,3,5 or  
7. Increased or decreased expression of a BASB047, BASB054, BASB068 or BASB069  
polynucleotide can be measured using any one of the methods well known in the art for the  
20 quantitation of polynucleotides, such as, for example, amplification, PCR, RT-PCR,  
RNase protection, Northern blotting, spectrometry and other hybridization methods.

In addition, a diagnostic assay in accordance with the invention for detecting over-  
expression of BASB047, BASB054, BASB068 or BASB069 polypeptide compared to  
25 normal control tissue samples may be used to detect the presence of an infection, for  
example. Assay techniques that can be used to determine levels of a BASB047, BASB054,  
BASB068 or BASB069 polypeptide, in a sample derived from a host, such as a bodily  
material, are well-known to those of skill in the art. Such assay methods include

WO 00/43519

PCT/EP00/00428

radioimmunoassays, competitive-binding assays, Western Blot analysis, antibody sandwich assays, antibody detection and ELISA assays.

The polynucleotides of the invention may be used as components of polynucleotide  
5 arrays, preferably high density arrays or grids. These high density arrays are  
particularly useful for diagnostic and prognostic purposes. For example, a set of spots  
each comprising a different gene, and further comprising a polynucleotide or  
polynucleotides of the invention, may be used for probing, such as using hybridization  
10 or nucleic acid amplification, using a probe obtained or derived from a bodily sample,  
to determine the presence of a particular polynucleotide sequence or related sequence in  
an individual. Such a presence may indicate the presence of a pathogen, particularly  
*Neisseria meningitidis*, and may be useful in diagnosing and/or prognosing disease or a  
course of disease. A grid comprising a number of variants of the polynucleotide  
15 sequence of SEQ ID NO:1,3,5,7 are preferred. Also preferred is a grid comprising a  
number of variants of a polynucleotide sequence encoding the polypeptide sequence of  
SEQ ID NO:2,4,6 or 8.

#### Antibodies

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

In certain preferred embodiments of the invention there are provided antibodies against  
25 BASB047, BASB054, BASB068 or BASB069 polypeptides or polynucleotides.

Antibodies generated against the polypeptides or polynucleotides of the invention can be  
obtained by administering the polypeptides and/or polynucleotides of the invention, or  
epitope-bearing fragments of either or both, analogues of either or both, or cells expressing

WO 00/43519

PCT/EP00/00428

either or both, to an animal, preferably a nonhuman, using routine protocols. For preparation of monoclonal antibodies, any technique known in the art that provides antibodies produced by continuous cell line cultures can be used. Examples include various techniques, such as those in Kohler, G. and Milstein, C., *Nature* 256: 495-497 (1975);

5 Kozbor *et al.*, *Immunology Today* 4: 72 (1983); Cole *et al.*, pg. 77-96 in *MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY*, Alan R. Liss, Inc. (1985).

Techniques for the production of single chain antibodies (U.S. Patent No. 4,946,778) can be adapted to produce single chain antibodies to polypeptides or polynucleotides of this

10 invention. Also, transgenic mice, or other organisms or animals, such as other mammals, may be used to express humanized antibodies immunospecific to the polypeptides or polynucleotides of the invention.

Alternatively, phage display technology may be utilized to select antibody genes with

15 binding activities towards a polypeptide of the invention either from repertoires of PCR amplified *v*-genes of lymphocytes from humans screened for possessing anti- BASB047, BASB054, BASB068 or BASB069 or from naive libraries (McCafferty, *et al.*, (1990), *Nature* 348, 552-554; Marks, *et al.*, (1992) *Biotechnology* 10, 779-783). The affinity of these antibodies can also be improved by, for example, chain shuffling (Clackson *et al.*,

20 (1991) *Nature* 352: 628).

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

25

Thus, among others, antibodies against BASB047, BASB054, BASB068 or BASB069 - polypeptide or BASB047, BASB054, BASB068 or BASB069 -polynucleotide may be employed to treat infections, particularly bacterial infections.

WO 00/43519

PCT/EP00/00428

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

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

10

#### Antagonists and Agonists - Assays and Molecules

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

20 The screening methods may simply measure the binding of a candidate compound to the polypeptide or polynucleotide, or to cells or membranes bearing the polypeptide or polynucleotide, or a fusion protein of the polypeptide by means of a label directly or indirectly associated with the candidate compound. Alternatively, the screening method may involve competition with a labeled competitor. Further, these screening methods may test whether the candidate compound results in a signal generated by activation or inhibition of the polypeptide or polynucleotide, using detection systems appropriate to the cells comprising the polypeptide or polynucleotide. Inhibitors of activation are generally assayed in the presence of a known agonist and the effect on activation by the agonist by the presence of the candidate compound is observed. Constitutively active polypeptide and/or constitutively expressed polypeptides and polynucleotides may be employed in

WO 00/43519

PCT/EP00/00428

screening methods for inverse agonists or inhibitors, in the absence of an agonist or inhibitor, by testing whether the candidate compound results in inhibition of activation of the polypeptide or polynucleotide, as the case may be. Further, the screening methods may simply comprise the steps of mixing a candidate compound with a solution

5 containing a polypeptide or polynucleotide of the present invention, to form a mixture, measuring BASB047, BASB054, BASB068 or BASB069 polypeptide and/or polynucleotide activity in the mixture, and comparing the BASB047, BASB054, BASB068 or BASB069 polypeptide and/or polynucleotide activity of the mixture to a standard. Fusion proteins, such as those made from Fc portion and BASB047, BASB054,

10 BASB068 or BASB069 polypeptide, as hereinbefore described, can also be used for high-throughput screening assays to identify antagonists of the polypeptide of the present invention, as well as of phylogenetically and and/or functionally related polypeptides (see D. Bennett *et al.*, *J Mol Recognition*, 8:52-58 (1995); and K. Johanson *et al.*, *J Biol Chem*, 270(16):9459-9471 (1995)).

15 The polynucleotides, polypeptides and antibodies that bind to and/or interact with a polypeptide of the present invention may also be used to configure screening methods for detecting the effect of added compounds on the production of mRNA and/or polypeptide in cells. For example, an ELISA assay may be constructed for measuring secreted or cell

20 associated levels of polypeptide using monoclonal and polyclonal antibodies by standard methods known in the art. This can be used to discover agents which may inhibit or enhance the production of polypeptide (also called antagonist or agonist, respectively) from suitably manipulated cells or tissues.

25 The invention also provides a method of screening compounds to identify those which enhance (agonist) or block (antagonist) the action of BASB047, BASB054, BASB068 or BASB069 polypeptides or polynucleotides, particularly those compounds that are bacteriostatic and/or bactericidal. The method of screening may involve high-throughput techniques. For example, to screen for agonists or antagonists, a synthetic reaction mix, a

WO 00/43519

PCT/EP00/00428

cellular compartment, such as a membrane, cell envelope or cell wall, or a preparation of any thereof, comprising BASB047, BASB054, BASB068 or BASB069 polypeptide and a labeled substrate or ligand of such polypeptide is incubated in the absence or the presence of a candidate molecule that may be a BASB047, BASB054, BASB068 or BASB069 agonist or antagonist. The ability of the candidate molecule to agonize or antagonize the BASB047, BASB054, BASB068 or BASB069 polypeptide is reflected in decreased binding of the labeled ligand or decreased production of product from such substrate. Molecules that bind gratuitously, *i.e.*, without inducing the effects of BASB047, BASB054, BASB068 or BASB069 polypeptide are most likely to be good antagonists. Molecules that bind well and, as the case may be, increase the rate of product production from substrate, increase signal transduction, or increase chemical channel activity are agonists. Detection of the rate or level of, as the case may be, production of product from substrate, signal transduction, or chemical channel activity may be enhanced by using a reporter system. Reporter systems that may be useful in this regard include but are not limited to colorimetric, labeled substrate converted into product, a reporter gene that is responsive to changes in BASB047, BASB054, BASB068 or BASB069 polynucleotide or polypeptide activity, and binding assays known in the art.

Another example of an assay for BASB047, BASB054, BASB068 or BASB069 agonists is a competitive assay that combines BASB047, BASB054, BASB068 or BASB069 and a potential agonist with BASB047, BASB054, BASB068 or BASB069 -binding molecules, recombinant BASB047, BASB054, BASB068 or BASB069 binding molecules, natural substrates or ligands, or substrate or ligand mimetics, under appropriate conditions for a competitive inhibition assay. BASB047, BASB054, BASB068 or BASB069 can be labeled, such as by radioactivity or a colorimetric compound, such that the number of BASB047, BASB054, BASB068 or BASB069 molecules bound to a binding molecule or converted to product can be determined accurately to assess the effectiveness of the potential antagonist.

WO 00/43519

PCT/EP00/00428

Potential antagonists include, among others, small organic molecules, peptides, polypeptides and antibodies that bind to a polynucleotide and/or polypeptide of the invention and thereby inhibit or extinguish its activity or expression. Potential antagonists also may be small organic molecules, a peptide, a polypeptide such as a closely related  
5 protein or antibody that binds the same sites on a binding molecule, such as a binding molecule, without inducing BASB047, BASB054, BASB068 or BASB069 -induced activities, thereby preventing the action or expression of BASB047, BASB054, BASB068 or BASB069 polypeptides and/or polynucleotides by excluding BASB047, BASB054, BASB068 or BASB069 polypeptides and/or polynucleotides from binding.

10

Potential antagonists include a small molecule that binds to and occupies the binding site of the polypeptide thereby preventing binding to cellular binding molecules, such that normal biological activity is prevented. Examples of small molecules include but are not limited to small organic molecules, peptides or peptide-like molecules. Other potential antagonists  
15 include antisense molecules (see Okano, *J. Neurochem.* 56: 560 (1991); *OLIGODEOXYNUCLEOTIDES AS ANTISENSE INHIBITORS OF GENE EXPRESSION*, CRC Press, Boca Raton, FL (1988), for a description of these molecules). Preferred potential antagonists include compounds related to and variants of BASB047, BASB054, BASB068 or BASB069.

20

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

WO 00/43519

PCT/EP00/00428

therapy. A further aspect of the invention also relates to polynucleotides encoding such fusion proteins. Examples of fusion protein technology can be found in International Patent Application Nos. WO94/29458 and WO94/22914.

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

- The invention also provides the use of the polypeptide, polynucleotide, agonist or antagonist of the invention to interfere with the initial physical interaction between a pathogen or pathogens and a eukaryotic, preferably mammalian, host responsible for  
15 sequela of infection. In particular, the molecules of the invention may be used: in the prevention of adhesion of bacteria, in particular gram positive and/or gram negative bacteria, to eukaryotic, preferably mammalian, extracellular matrix proteins on in-dwelling devices or to extracellular matrix proteins in wounds; to block bacterial adhesion between eukaryotic, preferably mammalian, extracellular matrix proteins and bacterial  
20 BASB047, BASB054, BASB068 or BASB069 proteins that mediate tissue damage and/or; to block the normal progression of pathogenesis in infections initiated other than by the implantation of in-dwelling devices or by other surgical techniques.

- In accordance with yet another aspect of the invention, there are provided BASB047,  
25 BASB054, BASB068 or BASB069 agonists and antagonists, preferably bacteristatic or bactericidal agonists and antagonists.

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

WO 00/43519

PCT/EP00/00428

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

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

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

#### Vaccines

WO 00/43519

PCT/EP00/00428

Another aspect of the invention relates to a method for inducing an immunological response in an individual, particularly a mammal, preferably humans, which comprises inoculating the individual with BASB047, BASB054, BASB068 or BASB069

5 polynucleotide and/or polypeptide, or a fragment or variant thereof, adequate to produce antibody and/ or T cell immune response to protect said individual from infection, particularly bacterial infection and most particularly *Neisseria meningitidis* infection. Also provided are methods whereby such immunological response slows bacterial replication. Yet another aspect of the invention relates to a method of inducing

10 immunological response in an individual which comprises delivering to such individual a nucleic acid vector, sequence or ribozyme to direct expression of BASB047, BASB054, BASB068 or BASB069 polynucleotide and/or polypeptide, or a fragment or a variant thereof, for expressing BASB047, BASB054, BASB068 or BASB069 polynucleotide and/or polypeptide, or a fragment or a variant thereof *in vivo* in order to induce an

15 immunological response, such as, to produce antibody and/ or T cell immune response, including, for example, cytokine-producing T cells or cytotoxic T cells, to protect said individual, preferably a human, from disease, whether that disease is already established within the individual or not. One example of administering the gene is by accelerating it into the desired cells as a coating on particles or otherwise. Such nucleic acid vector may

20 comprise DNA, RNA, a ribozyme, a modified nucleic acid, a DNA/RNA hybrid, a DNA-protein complex or an RNA-protein complex.

A further aspect of the invention relates to an immunological composition that when introduced into an individual, preferably a human, capable of having induced within it an

25 immunological response, induces an immunological response in such individual to a BASB047, BASB054, BASB068 or BASB069 polynucleotide and/or polypeptide encoded therefrom, wherein the composition comprises a recombinant BASB047, BASB054, BASB068 or BASB069 polynucleotide and/or polypeptide encoded therefrom and/or comprises DNA and/or RNA which encodes and expresses an antigen of said BASB047,

WO 00/43519

PCT/EP00/00428

BASB054, BASB068 or BASB069 polynucleotide, polypeptide encoded therefrom, or other polypeptide of the invention. The immunological response may be used therapeutically or prophylactically and may take the form of antibody immunity and/or cellular immunity, such as cellular immunity arising from CTL or CD4+ T cells.

5 A BASB047, BASB054, BASB068 or BASB069 polypeptide or a fragment thereof may be fused with co-protein or chemical moiety which may or may not by itself produce antibodies, but which is capable of stabilizing the first protein and producing a fused or modified protein which will have antigenic and/or immunogenic properties, and  
10 preferably protective properties. Thus fused recombinant protein, preferably further comprises an antigenic co-protein, such as lipoprotein D from *Haemophilus influenzae*, Glutathione-S-transferase (GST) or beta-galactosidase, or any other relatively large co-protein which solubilizes the protein and facilitates production and purification thereof. Moreover, the co-protein may act as an adjuvant in the sense of providing a generalized  
15 stimulation of the immune system of the organism receiving the protein. The co-protein may be attached to either the amino- or carboxy-terminus of the first protein.

In a vaccine composition according to the invention, a BASB047, BASB054, BASB068 or BASB069 polypeptide and/or polynucleotide, or a fragment, or a mimotope, or a variant  
20 thereof may be present in a vector, such as the live recombinant vectors described above for example live bacterial vectors.

Also suitable are non-live vectors for the BASB047, BASB054, BASB068 or BASB069 polypeptide, for example bacterial outer-membrane vesicles or "blebs". OM blebs are  
25 derived from the outer membrane of the two-layer membrane of Gram-negative bacteria and have been documented in many Gram-negative bacteria (Zhou, L *et al.* 1998. *FEMS Microbiol. Lett.* 163:223-228) including *C. trachomatis* and *C. psittaci*. A non-exhaustive list of bacterial pathogens reported to produce blebs also includes: *Bordetella pertussis*, *Borrelia burgdorferi*, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis*, *Escherichia coli*, *Haemophilus*

WO 00/43519

PCT/EP00/00428

*influenza, Legionella pneumophila, Neisseria gonorrhoeae, Neisseria meningitidis, Pseudomonas aeruginosa and Yersinia enterocolitica.*

- Blebs have the advantage of providing outer-membrane proteins in their native conformation and are thus particularly useful for vaccines. Blebs can also be improved for vaccine use by engineering the bacterium so as to modify the expression of one or more molecules at the outer membrane. Thus for example the expression of a desired immunogenic protein at the outer membrane, such as the BASB047, BASB054, BASB068 or BASB069 polypeptide, can be introduced or upregulated (e.g. by altering the promoter). Instead or in addition, the expression of outer-membrane molecules which are either not relevant (e.g. unprotective antigens or immunodominant but variable proteins) or detrimental (e.g. toxic molecules such as LPS, or potential inducers of an autoimmune response) can be downregulated. These approaches are discussed in more detail below.
- 15 The non-coding flanking regions of the BASB047, BASB054, BASB068 or BASB069 gene contain regulatory elements important in the expression of the gene. This regulation takes place both at the transcriptional and translational level. The sequence of these regions, either upstream or downstream of the open reading frame of the gene, can be obtained by DNA sequencing. This sequence information allows the determination of
- 20 potential regulatory motifs such as the different promoter elements, terminator sequences, inducible sequence elements, repressors, elements responsible for phase variation, the shine-dalgarno sequence, regions with potential secondary structure involved in regulation, as well as other types of regulatory motifs or sequences.
- 25 This sequence information allows the modulation of the natural expression of the BASB047, BASB054, BASB068 or BASB069 gene. The upregulation of the gene expression may be accomplished by altering the promoter, the shine-dalgarno sequence, potential repressor or operator elements, or any other elements involved. Likewise, downregulation of expression can be achieved by similar types of modification.

WO 00/43519

PCT/EP00/00428

Alternatively, by changing phase variation sequences, the expression of the gene can be put under phase variation control, or it may be uncoupled from this regulation. In another approach, the expression of the gene can be put under the control of one or more inducible elements allowing regulated expression. Examples of such regulation include, but are not limited to, induction by temperature shift, addition of inductor substrates like selected carbohydrates or their derivatives, trace elements, vitamins, co-factors, metal ions, etc.

Such modifications as described above can be introduced by several different means. The modification of sequences involved in gene expression can be carried out *in vivo* by random mutagenesis followed by selection for the desired phenotype. Another approach consists in isolating the region of interest and modifying it by random mutagenesis, or site-directed replacement, insertion or deletion mutagenesis. The modified region can then be reintroduced into the bacterial genome by homologous recombination, and the effect on gene expression can be assessed. In another approach, the sequence knowledge of the region of interest can be used to replace or delete all or part of the natural regulatory sequences. In this case, the regulatory region targeted is isolated and modified so as to contain the regulatory elements from another gene, a combination of regulatory elements from different genes, a synthetic regulatory region, or any other regulatory region, or to delete selected parts of the wild-type regulatory sequences. These modified sequences can then be reintroduced into the bacterium via homologous recombination into the genome. A non-exhaustive list of preferred promoters that could be used for up-regulation of gene expression includes the promoters *porA*, *porB*, *lbpB*, *tbpB*, *p110*, *lst*, *hpuAB* from *N. meningitidis* or *N. gonorrhoeae*; *ompCD*, *copB*, *lbpB*, *ompE*, *UspA1*; *UspA2*; *TbpB* from *M. Catarrhalis*; *p1*, *p2*, *p4*, *p5*, *p6*, *lpD*, *tbpB*, *D15*, *Hia*, *Hmw1*, *Hmw2* from *H. influenzae*.

In one example, the expression of the gene can be modulated by exchanging its promoter with a stronger promoter (through isolating the upstream sequence of the gene, *in vitro* modification of this sequence, and reintroduction into the genome by homologous

WO 00/43519

PCT/EP00/00428

recombination). Upregulated expression can be obtained in both the bacterium as well as in the outer membrane vesicles shed (or made) from the bacterium.

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

Thus, also provided by the invention is a modified upstream region of the BASB047, BASB054, BASB068 or BASB069 gene, which modified upstream region contains a heterologous regulatory element which alters the expression level of the BASB047, BASB054, BASB068 or BASB069 protein located at the outer membrane. The upstream region according to this aspect of the invention includes the sequence upstream of the BASB047, BASB054, BASB068 or BASB069 gene. The upstream region starts immediately upstream of the BASB047, BASB054, BASB068 or BASB069 gene and continues usually to a position no more than about 1000 bp upstream of the gene from the ATG start codon. In the case of a gene located in a polycistronic sequence (operon) the upstream region can start immediately preceding the gene of interest, or preceding the first gene in the operon. Preferably, a modified upstream region according to this aspect of the invention contains a heterologous promoter at a position between 500 and 700 bp upstream of the ATG.

Thus, the invention provides a BASB047, BASB054, BASB068 and BASB069 polypeptide, in a modified bacterial bleb. The invention further provides modified host cells capable of producing the non-live membrane-based bleb vectors. The invention further provides nucleic acid vectors comprising the BASB047, BASB054, BASB068 and

WO 00/43519

PCT/EP00/00428

BASB069 gene having a modified upstream region containing a heterologous regulatory element.

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

Also provided by this invention are compositions, particularly vaccine compositions, and  
methods comprising the polypeptides and/or polynucleotides of the invention and  
immunostimulatory DNA sequences, such as those described in Sato, Y. *et al.* Science  
10 273: 352 (1996).

Also, provided by this invention are methods using the described polynucleotide or  
particular fragments thereof, which have been shown to encode non-variable regions of  
bacterial cell surface proteins, in polynucleotide constructs used in such genetic  
15 immunization experiments in animal models of infection with *Neisseria meningitidis*.  
Such experiments will be particularly useful for identifying protein epitopes able to  
provoke a prophylactic or therapeutic immune response. It is believed that this approach  
will allow for the subsequent preparation of monoclonal antibodies of particular value,  
derived from the requisite organ of the animal successfully resisting or clearing infection,  
20 for the development of prophylactic agents or therapeutic treatments of bacterial  
infection, particularly *Neisseria meningitidis* infection, in mammals, particularly humans.

The invention also includes a vaccine formulation which comprises an immunogenic  
recombinant polypeptide and/or polynucleotide of the invention together with a suitable  
25 carrier, such as a pharmaceutically acceptable carrier. Since the polypeptides and  
polynucleotides may be broken down in the stomach, each is preferably administered  
parenterally, including, for example, administration that is subcutaneous, intramuscular,  
intravenous, or intradermal. Formulations suitable for parenteral administration include  
aqueous and non-aqueous sterile injection solutions which may contain anti-oxidants,

WO 00/43519

PCT/EP00/00428

5 buffers, bacteristatic compounds and solutes which render the formulation isotonic with the bodily fluid, preferably the blood, of the individual; and aqueous and non-aqueous sterile suspensions which may include suspending agents or thickening agents. The formulations may be presented in unit-dose or multi-dose containers, for example, sealed ampoules and vials and may be stored in a freeze-dried condition requiring only the addition of the sterile liquid carrier immediately prior to use.

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

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

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

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

WO 00/43519

PCT/EP00/00428

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

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

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

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

WO 00/43519

PCT/EP00/00428

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

Preferably, the particles of 3D-MPL are small enough to be sterile filtered through a 0.22micron membrane (European Patent number 0 689 454). 3D-MPL will be present in the range of 10µg - 100µg preferably 25-50µg per dose wherein the antigen will typically be present in a range 2-50µg per dose.

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

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

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

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

Combinations of different TH1 stimulating adjuvants, such as those mentioned hereinabove, are also contemplated as providing an adjuvant which is a preferential

WO 00/43519

PCT/EP00/00428

stimulator of TH1 cell response. For example, QS21 can be formulated together with 3D-MPL. The ratio of QS21 : 3D-MPL will typically be in the order of 1 : 10 to 10 : 1; preferably 1:5 to 5 : 1 and often substantially 1 : 1. The preferred range for optimal synergy is 2.5 : 1 to 1 : 1 3D-MPL: QS21.

5

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

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

15

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

Typically the oil in water will comprise from 2 to 10% squalene, from 2 to 10% alpha tocopherol and from 0.3 to 3% tween 80. Preferably the ratio of squalene: alpha

20 tocopherol is equal to or less than 1 as this provides a more stable emulsion. Span 85 may also be present at a level of 1%. In some cases it may be advantageous that the vaccines of the present invention will further contain a stabiliser.

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

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

WO 00/43519

PCT/EP00/00428

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

While the invention has been described with reference to certain BASB047, BASB054, BASB068 and BASB069 polypeptides and polynucleotides, it is to be understood that this  
10 covers fragments of the naturally occurring polypeptides and polynucleotides, and similar polypeptides and polynucleotides with additions, deletions or substitutions which do not substantially affect the immunogenic properties of the recombinant polypeptides or polynucleotides.

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

#### Compositions, kits and administration

20 In a further aspect of the invention there are provided compositions comprising a BASB047, BASB054, BASB068 or BASB069 polynucleotide and/or a BASB047, BASB054, BASB068 or BASB069 polypeptide for administration to a cell or to a multicellular organism.

25 The invention also relates to compositions comprising a polynucleotide and/or a polypeptide discussed herein or their agonists or antagonists. The polypeptides and polynucleotides of the invention may be employed in combination with a non-sterile or sterile carrier or carriers for use with cells, tissues or organisms, such as a pharmaceutical carrier suitable for administration to an individual. Such compositions comprise, for instance, a media additive

WO 00/43519

PCT/EP00/00428

or a therapeutically effective amount of a polypeptide and/or polynucleotide of the invention and a pharmaceutically acceptable carrier or excipient. Such carriers may include, but are not limited to, saline, buffered saline, dextrose, water, glycerol, ethanol and combinations thereof. The formulation should suit the mode of administration. The invention further  
5 relates to diagnostic and pharmaceutical packs and kits comprising one or more containers filled with one or more of the ingredients of the aforementioned compositions of the invention.

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

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

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

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

WO 00/43519

PCT/EP00/00428

The composition will be adapted to the route of administration, for instance by a systemic or an oral route. Preferred forms of systemic administration include injection, typically by intravenous injection. Other injection routes, such as subcutaneous, intramuscular, or  
5 intraperitoneal, can be used. Alternative means for systemic administration include transmucosal and transdermal administration using penetrants such as bile salts or fusidic acids or other detergents. In addition, if a polypeptide or other compounds of the present invention can be formulated in an enteric or an encapsulated formulation, oral  
10 administration may also be possible. Administration of these compounds may also be topical and/or localized, in the form of salves, pastes, gels, solutions, powders and the like.

For administration to mammals, and particularly humans, it is expected that the daily dosage level of the active agent will be from 0.01 mg/kg to 10 mg/kg, typically around 1  
15 mg/kg. The physician in any event will determine the actual dosage which will be most suitable for an individual and will vary with the age, weight and response of the particular individual. The above dosages are exemplary of the average case. There can, of course, be individual instances where higher or lower dosage ranges are merited, and such are within the scope of this invention.

20 The dosage range required depends on the choice of peptide, the route of administration, the nature of the formulation, the nature of the subject's condition, and the judgment of the attending practitioner. Suitable dosages, however, are in the range of 0.1-100  $\mu$ g/kg of subject.

25 A vaccine composition is conveniently in injectable form. Conventional adjuvants may be employed to enhance the immune response. A suitable unit dose for vaccination is 0.5-5 microgram/kg of antigen, and such dose is preferably administered 1-3 times and with an interval of 1-3 weeks. With the indicated dose range, no adverse toxicological effects will

WO 00/43519

PCT/EP00/00428

be observed with the compounds of the invention which would preclude their administration to suitable individuals.

Wide variations in the needed dosage, however, are to be expected in view of the variety of compounds available and the differing efficiencies of various routes of administration. For example, oral administration would be expected to require higher dosages than administration by intravenous injection. Variations in these dosage levels can be adjusted using standard empirical routines for optimization, as is well understood in the art.

10 **Sequence Databases, Sequences in a Tangible Medium, and Algorithms**

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

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

A computer based method is provided for performing homology identification. This method comprises the steps of: providing a first polynucleotide sequence comprising the sequence of a polynucleotide of the invention in a computer readable medium; and

WO 00/43519

PCT/EP00/00428

comparing said first polynucleotide sequence to at least one second polynucleotide or polypeptide sequence to identify homology.

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

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

#### DEFINITIONS

"Identity," as known in the art, is a relationship between two or more polypeptide sequences  
20 or two or more polynucleotide sequences, as the case may be, as determined by comparing the sequences. In the art, "identity" also means the degree of sequence relatedness between polypeptide or polynucleotide sequences, as the case may be, as determined by the match between strings of such sequences. "Identity" can be readily calculated by known methods, including but not limited to those described in (*Computational Molecular*  
25 *Biology*, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; *Biocomputing: Informatics and Genome Projects*, Smith, D.W., ed., Academic Press, New York, 1993; *Computer Analysis of Sequence Data*, Part I, Griffin, A.M., and Griffin, H.G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; *Sequence Analysis in Molecular Biology*, von Heine, G., Academic Press, 1987; and *Sequence Analysis Primer*, Gribskov, M. and Devereux, J.,

WO 00/43519

PCT/EP00/00428

eds., M Stockton Press, New York, 1991; and Carillo, H., and Lipman, D., *SIAM J. Applied Math.*, 48: 1073 (1988). Methods to determine identity are designed to give the largest match between the sequences tested. Moreover, methods to determine identity are codified in publicly available computer programs. Computer program methods to

5 determine identity between two sequences include, but are not limited to, the GAP program in the GCG program package (Devereux, J., et al., *Nucleic Acids Research* 12(1): 387 (1984)), BLASTP, BLASTN (Altschul, S.F. et al., *J. Mol. Biol.* 215: 403-410 (1990), and FASTA( Pearson and Lipman Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85; 2444-2448 (1988). The BLAST family of programs is publicly available from NCBI and other sources

10 (*BLAST Manual*, Altschul, S., et al., NCBI NLM NIH Bethesda, MD 20894; Altschul, S., et al., *J. Mol. Biol.* 215: 403-410 (1990). The well known Smith Waterman algorithm may also be used to determine identity.

Parameters for polypeptide sequence comparison include the following:

- 15 Algorithm: Needleman and Wunsch, *J. Mol Biol.* 48: 443-453 (1970)  
Comparison matrix: BLOSSUM62 from Henikoff and Henikoff,  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89:10915-10919 (1992)  
Gap Penalty: 8  
Gap Length Penalty: 2
- 20 A program useful with these parameters is publicly available as the "gap" program from Genetics Computer Group, Madison WI. The aforementioned parameters are the default parameters for peptide comparisons (along with no penalty for end gaps).

Parameters for polynucleotide comparison include the following:

- 25 Algorithm: Needleman and Wunsch, *J. Mol Biol.* 48: 443-453 (1970)  
Comparison matrix: matches = +10, mismatch = 0  
Gap Penalty: 50  
Gap Length Penalty: 3

WO 00/43519

PCT/EP00/00428

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

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

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

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

wherein  $n_n$  is the number of nucleotide alterations,  $x_n$  is the total number of nucleotides in SEQ ID NO:1,  $y$  is 0.50 for 50%, 0.60 for 60%, 0.70 for 70%, 0.80 for 80%, 0.85 for 85%, 0.90 for 90%, 0.95 for 95%, 0.97 for 97% or 1.00 for 100%, and  $\bullet$  is the symbol for the multiplication operator, and wherein any non-integer product of  $x_n$  and  $y$  is rounded down to the nearest integer prior to subtracting it from  $x_n$ . Alterations of a polynucleotide sequence encoding the polypeptide of SEQ ID NO:2 may create nonsense, missense or

WO 00/43519

PCT/EP00/00428

frameshift mutations in this coding sequence and thereby alter the polypeptide encoded by the polynucleotide following such alterations.

By way of example, a polynucleotide sequence of the present invention may be identical  
5 to the reference sequence of SEQ ID NO:1, that is it may be 100% identical, or it may  
include up to a certain integer number of nucleic acid alterations as compared to the  
reference sequence such that the percent identity is less than 100% identity. Such  
alterations are selected from the group consisting of at least one nucleic acid deletion,  
substitution, including transition and transversion, or insertion, and wherein said  
10 alterations may occur at the 5' or 3' terminal positions of the reference polynucleotide  
sequence or anywhere between those terminal positions, interspersed either individually  
among the nucleic acids in the reference sequence or in one or more contiguous groups  
within the reference sequence. The number of nucleic acid alterations for a given percent  
identity is determined by multiplying the total number of nucleic acids in SEQ ID NO:1  
15 by the integer defining the percent identity divided by 100 and then subtracting that  
product from said total number of nucleic acids in SEQ ID NO:1, or:

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

20 wherein  $n_n$  is the number of nucleic acid alterations,  $x_n$  is the total number of nucleic  
acids in SEQ ID NO:1,  $y$  is, for instance 0.70 for 70%, 0.80 for 80%, 0.85 for 85% etc.,  $\bullet$   
is the symbol for the multiplication operator, and wherein any non-integer product of  $x_n$   
and  $y$  is rounded down to the nearest integer prior to subtracting it from  $x_n$ .

25 (2) Polypeptide embodiments further include an isolated polypeptide comprising a  
polypeptide having at least a 50, 60, 70, 80, 85, 90, 95, 97 or 100% identity to a  
polypeptide reference sequence of SEQ ID NO:2, wherein said polypeptide sequence may  
be identical to the reference sequence of SEQ ID NO:2 or may include up to a certain  
integer number of amino acid alterations as compared to the reference sequence, wherein

WO 00/43519

PCT/EP00/00428

said alterations are selected from the group consisting of at least one amino acid deletion, substitution, including conservative and non-conservative substitution, or insertion, and wherein said alterations may occur at the amino- or carboxy-terminal positions of the reference polypeptide sequence or anywhere between those terminal positions,

5 interspersed either individually among the amino acids in the reference sequence or in one or more contiguous groups within the reference sequence, and wherein said number of amino acid alterations is determined by multiplying the total number of amino acids in SEQ ID NO:2 by the integer defining the percent identity divided by 100 and then subtracting that product from said total number of amino acids in SEQ ID NO:2, or:

10

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

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

15

By way of example, a polypeptide sequence of the present invention may be identical to the reference sequence of SEQ ID NO:2, that is it may be 100% identical, or it may include up to a certain integer number of amino acid alterations as compared to the reference sequence such that the percent identity is less than 100% identity. Such alterations are selected from the group consisting of at least one amino acid deletion, substitution, including conservative and non-conservative substitution, or insertion, and

20 wherein said alterations may occur at the amino- or carboxy-terminal positions of the reference polypeptide sequence or anywhere between those terminal positions, interspersed either individually among the amino acids in the reference sequence or in one or more contiguous groups within the reference sequence. The number of amino acid alterations for a given % identity is determined by multiplying the total number of amino

25

WO 00/43519

PCT/EP00/00428

acids in SEQ ID NO:2 by the integer defining the percent identity divided by 100 and then subtracting that product from said total number of amino acids in SEQ ID NO:2, or:

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

5

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

10

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

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

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

"Variant" refers to a polynucleotide or polypeptide that differs from a reference polynucleotide or polypeptide, but retains essential properties. A typical variant of a

WO 00/43519

PCT/EP00/00428

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

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

WO 00/43519

PCT/EP00/00428

**EXAMPLES**

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

**Example 1****The BASB047 gene in *N.meningitidis* strain ATCC 13090.**

10

The BASB047 gene of *N. meningitidis* strain ATCC 13090 is shown in SEQ ID NO:1. The translation of the BASB047 polynucleotide sequence, shown in SEQ ID NO:2, shows significant similarity to *E. coli* ferric aerobactin receptor precursor (cloacin receptor). The BASB047 polypeptide contains a sequence which has the characteristics of a leader signal sequence. The signal sequence would be cleaved after residue 25 of the sequence shown in SEQ ID NO:2. BASB047 has the characteristics of an outer membrane protein involved iron uptake.

**Example 2**

20

**The BASB054 gene in *N.meningitidis* strain ATCC 13090.**

The BASB054 gene of *N. meningitidis* strain ATCC 13090 is shown in SEQ ID NO:3. The translation of the BASB054 polynucleotide sequence, shown in SEQ ID NO:4, shows significant similarity to a *E. coli* organic solvent tolerance protein. The BASB054 polypeptide contains a sequence which has the characteristics of a leader signal sequence. This signal sequence would be cleaved after residue 22 of the SEQ ID NO:4 polypeptide.

WO 00/43519

PCT/EP00/00428

**Example 3****The BASB068 gene in *N.meningitidis* strain ATCC 13090.**

- 5 The BASB068 gene of *N. meningitidis* strain ATCC 13090 is shown in SEQ ID NO:5. The translation of the BASB068 polynucleotide sequence, shown in SEQ ID NO:6, shows significant similarity to *E. coli* AIDA-I protein. The BASB068 polypeptide contains a sequence which has the characteristics of a leader signal sequence. This signal sequence would be cleaved after residue 34 of the polypeptide
- 10 in SEQ ID NO:6. BASB068 has the characteristics of an outer membrane protein.

**Example 4****The BASB069 gene in *N.meningitidis* strain ATCC 13090.**

- 15 The BASB069 gene of *N. meningitidis* strain ATCC 13090 is shown in SEQ ID NO:7. The translation of the BASB069 polynucleotide sequence, shown in SEQ ID NO:8, shows significant similarity to *E coli* AIDA-I protein. The BASB069 polypeptide contains a sequence which has the characteristics of a leader signal
- 20 sequence. This signal sequence would be cleaved after residue 31 of the sequence of SEQ ID NO:8. BASB069 has the characteristics of an outer membrane protein.

25

WO 00/43519

PCT/EP00/00428

## Polynucleotide and Polypeptide Sequences

## SEQ ID NO:1

*Neisseria meningitidis* BASB047 polynucleotide sequence from strain ATCC 13090

5 ATGCGTCATCCCACATTTTCAATGGTTATCTTGCCTTTACTAAGTGTGGCAGTA  
 CAGCAGTTGTACGCTCAACCAATGAGTCATTACCAACGGTTGAATAGAGCCCTGGTT  
 ATTACCATTTGATAAGAGCGGTATGGCACTTGCCAACTCGTATCAGCAATGCCCATACC  
 ACCAAAGTTATTTATGAAAGCAAAATCAAGAGCAAGCAACAGGCTCTCGACAGCTTGC  
 10 GATGTGATGGCAGCTCATTTCCAAGTTTGGGGTAAGTAGTGGCACTACCAAGTAACTT  
 GGGCAAAACCATGCAAGTCTCAAGTCAATTTTGTAAATGGCGTCTTGACAGGT  
 TCGCGAGACATCTTAGACAGCTTAATAGTATCAATCCAATCAAGTGGCTAGAAATGAA  
 GTTTTATCAGGAGCAACCAAGTATTTATGGCTCTGGAGCAACAGGCGTTTGAATTAATC  
 GTTACTAAGTCTGATTTGGAAGAGGAGCAATTTGAAACCCGATCGGTGTACATGGTAGT  
 15 AAATTAATCCAGTGAAGGTATCGGTATCAGGTAGTCAAGTGTAGTCAAGTGTCAAGGAA  
 AATGGTAATGTCTTGCAGCACTTGTGCACTATCGCACACAGGAGGGCAATTGAT  
 GCTAACGGTAAACGATCGCTCTGAGCTGCCCCAACTGATAGCAAGCAGCAAAAAGC  
 CTAAGTGTCAATACAAATTTGATTTGGCACTTGCAGCAAGCAAAATATCAATCTGGCA  
 TTGACGCAATATACGACAAACAGATACCGATTATGCACTGATATGTTAATCGCCTT  
 20 GCGGTGTGTTGGAGAAAAGCCTTCAATTAATGCCATCAAGGCTTATCATATCAGAA  
 CAGCCAAAACCAAAAAGCACCTTAAATCAACTATCATGATGATTTGTGGGT  
 AACCCATCAATCAAAATGCTTATATCGCAGAGAAAAGCAGATTTATCCCTTTGTT  
 GCCCGCTTTCGATCGCAAGCCCTGCTATTTTACAAAGCATGAAATTTGCCATCAGCC  
 ACTTTGGATGCTTATACCAAGGCTCCACAAGCTCGCGCTATGGGTGTTACAAATCCGAA  
 25 TCTAAGGCAGAGTACTAGGGCGTCTCCCTAATTTGAATAGCCAAAAGAGCCCTATTT  
 TAA

## SEQ ID NO:2

*Neisseria meningitidis* BASB047 polypeptide sequence deduced from the polynucleotide sequence of SEQ ID NO:1

30 MRHSHYFQWLSLELLSVAVTQQLYAQPNESLPTVELEPVVITIDKSGMALANRITQMPHT  
 TKVIYEEQIQEQAATGSRQLADVMAQLIPSLGVSSGTTSNFGQTMHGRQVQFLNGVPLTG  
 SRDISRQLNSINDNQVARIIEVLSGATSIVYSGATGGLINIVTKSDLBEEQFETRIQVHGS  
 KLSSEGIYQVCGSVAGVSEKGNVLABLDVDYRTTGGAFDANGKR IAEPEPAQTDKQDSKS  
 35 LSVNTNVDWLDKQINHLALHYNDKQDTDYAPDYGNRLAVLFGKPSLNAIKGLSLSE  
 QPKTKSTFMINHYHDDLWNTINTNAYRREKGRFYFVAFPSIAKALPILQSMNLP  
 TLDAYTKAPQARAYGLVQSEKAEVLGRVPLNPKRALF

## SEQ ID NO:3

*Neisseria meningitidis* BASB054 polynucleotide sequence from strain ATCC 13090

40 TTGGCTCGTTTATTTCACTCAAACCACTGGTGTGGCATTGGGCTTCTGCTCGGCAAG  
 CATTCGCGCGCCGCGGATGCGTTTGGCGGAGGAAACGGACAAATCCGACCCCGGAGGA  
 AGTGTTCGGAGCGTGTCCGAACCAATGCAGCTGCGCGCTGAGCCTCGGTTCCGACCTGC  
 CTGTTTGCAGTAACGAAAGCGCAAAACCCGAAAAACCGAATCTGCGCTCAAAGGAAGC

WO 00/43519

PCT/EP00/00428

5 GCGAAGGGCTGTGCCGAAAACACACGGAATTGTCCGCGACAAGGTGGAAGGGCAG  
 TCGCAGGTCAAGGTACGCGCGGAGGGCGGCGTCTGTTCGAAACGCAACCGGACGACCCCTT  
 AATGCGACTGGGCGGATTACGACCACTGGGCGACACCGTTACCGTAGGCGACCGGTT  
 GCCCTCCAACAGGACGATACCTGATTCGGGGGAAACCCCTGACCTACAAATCTCGAGCAG  
 10 CABACCGCGGAGCGCACCACTGCGCATGGAAACCGAAACAAGGCGGACGGCGGCTGCAA  
 AGGCTCAGCGCACCGCGAAATGTTGGGCGAAGGCGATTACAAACTGACGGAACCCAAA  
 TTCAAACCTGTTCCGCGCGGATGCGGCTGGTATGTCAGGCGAGCTCTGTGCGAAGCG  
 GATCGGAAAAAGGCATAGGCGTTGCCAAACACCGCGCTTCCGTTCCGCGCGGTTCCCT  
 ATTTCTACACCCCTTGGGCGGACTTCCCGCTTGACGGCAACCGCAAAAGCGGCTGATT  
 15 GTTCCCTCACTGTCCGCGGCTTCGACCGGCTTCCCTTTCCGTTCCCTATATTTCAAC  
 CTGCCCCCAATCTCGATGCGCAAGTTCGCGCCAGCGTGATCGGCGAACGCGGCGCGGCT  
 TTGACGGGCGAGTACGCTACCTGCGCGGATATGCGCGGCGAGTCCGACCTGACCTGG  
 CTGCGCACGACAAGAAAGCGGAGGAAATACCGCTATCAGGCGAAATGGCAGCATCGG  
 CAGCAGATTTCCGACAGCTTCAGGCGGGTGTGATTTCAAACCACTCTCCGACAGCGCG  
 20 TACTACCGGACTTTTACGGCAACAAGAAATCGCGGCAACGTCACCTCAACCGCGCT  
 GTATGGCTGGATTATGGCGGAGGCGGCGGCGGCGGCTGATCCCGCTTCCGCTTCCGCT  
 CTGAATAACGACGCTGGCAACCAAGCGGCTACAAAGCAAAACCTATGSCCTGATG  
 CCGCGCTTCCGCGGATTCGCGCAAAACACCGGCGGCGCAAAATCGGCTGTCCGCA  
 CAATTTACCGCTTCAGCGCACGACCGCGCCAGACGCGCGCGCTCTGCTCTATCC  
 25 GACATCAATGGGATTTACGACACAGCTGGGTTACGCTCCGCGCAAACTCGGACTGCAC  
 GCCACCTATACGCGCTCAACCGCTTCGCGCGCAAGAGCCCGACGCGCTCAGCCGCACT  
 CTACCCATCTCAACTCGACGCGGCGCATGACTTCGAACGCAATACGCGATGTTCCG  
 GGAGAGTCTGCAACCTTCGAGCGCGGCTGTTCTACAACTATATCTGCGCAAACTCC  
 30 CAAACGACCTGCCAATTTGATTCGCTCGAAAGCAGCTTCGCGCGCAACGCGCTTCCG  
 CGTGAACCTCTATTCGCGCAACGAGGATTAACACCGCAACAGCGCTTCCGCGCGG  
 GTGCAAGCGGATTTGAGCGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGG  
 CAGAAATCTACTTCAAAAACGACGCGATGCTTTCGCGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGG  
 35 CGCGCGCTTCCGCACTGGGCGGCTTCCGCTTCAGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCTTCACTC  
 GACGCGCATCTCACTACCAACCAACGACAAACGCGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGG  
 AGCTACCGTCCGCGCACAGGCGAAAGTGTGAACGCGCGCTACAAATAAGGCGCAACGAA  
 AAAATCTACCTGAAGTCCGCGGTTCTATTTTACGCAAACTCAGCGGCGGCGGCGGCGG  
 TCCGCGCAATGGCCCTGACGCGCAACCTGTCGCGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGG  
 40 GAAGCGAAAAACGATAGAGGTGCTCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGG  
 TGGGCGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGG  
 GTCTTTTCTCACTTCACTTGAAGACCTCAGCAGTGTGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGG  
 45 ATGGATGTCGCGCTTCCGCGGCTATCCCGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGG  
 CGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGG

SEQ ID NO:4

40 *Neisseria meningitidis* BASB054 polypeptide sequence deduced from the polynucleotide sequence of SEQ ID NO:3

MARLFLKPLVLALGFCFGTHCAAADAVAAEETDNPTAGGSVRSVSEFMQFAGLSLGSCT  
 LFCSNESGKPEKTESAVKSGGEGPVPENHTRIVADKVEGQSOVKVRAEGGVVVERNRITL  
 NADWADYDQSDPTVTVGRFALQDGLIRGETLTYNLRQQTGEAHNVMEQGGRRLLQ  
 45 SVSRTAEMLGEGHYKLTSTQPNFCSAGDAGWYVKAASVRADREKIGVAKHAAFVFGGVP  
 IFYTPWADFLPDGKRSGLLWPLSLSAGDGVSLSPVYFNLAENLDTAFAPSVIGERGV  
 FDGQVYLRPDYAGQSDLTNLPHDKSGRNNRYQAKNHRHDSIDLQAGVDFNQVSDSG  
 YYRDFYGNKEIAGNVNLRVWLDYGGRAAGGSLNAGLSVLKYQTLANQSYKDKPKLGLH  
 PRLSADWRKNTGRAQIGVSAQFTRFSDSRDGSRLVYVPELKNDFSNHSYVVRKPLGLH  
 50 ATYSLNRPFGQEARRVSRLLP I V N I D S G M T F E R N T R M P G G E V L Q T L E P R L F Y N I P A K S



WO 00/43519

PCT/EP00/00428

EYMKEEYHIKSNRVPYVNI.PALFPKHPPDFPENINNSKRI SFYDKEYTEDYLVGFAQGL  
 GVARNKGETKPIRQYFKCECLNTGKYSDDTCKSQSIPTVRSDFALNTRKINSHINSEI  
 FAVGNPTKLMYSAQHHSIWSEHLYSNSSELSLDVNSHVIGQTTDLGALELITNSLWEP  
 SNIDYLIITKNAEIR.FNTKSESLLVKEDYAGGARFRFRAYGLKDKVPEPILTFEKNITGTS  
 5 D I I F E G K A L D M L K H L D G H Q I I K V N G T A D K H A P R L S G K H Q K G I Y T L S L Q R P E G F F T K V Q E  
 R D D I A I Y A Q Q A Q A A N L F A L R L M D K N S D I F D R T L P R K G L W L R V I D G H S S Q W V Q K T A P V E  
 G N R K G I Q L G S D V F S L Q M H N Y Q L S V G L M G G Q A E Q R S T F R N P D T D N L T T G N V K G F G A G V Y A T  
 W H Q L Q D K Q T G A Y A D S W V Y Q R F R H R I N T E D G T E R F T S K G I T A S I E A G Y N A L L A E H V T K K G  
 10 N S L R V Y L Q P Q A Q L T Y L G V N G K F S D S E N A H V N L L G S R L Q S R V G V Q A K A Q F A F T N G V T F Q P  
 F V S V N S I Y Q Q K P F G V E M D G E R R V I N N K T A I E S Q L G V A V K I K S H L T L Q A T F N R Q T G K H H Q A  
 K Q G A L N L Q W T F

SEQ ID NO:7

*Neisseria meningitidis* BASB069 polynucleotide sequence from strain ATCC 13090

15 ATGACACTGAAAGCAAGCAAGCAAGCAAGCGGTCGGGTTAATCTATTAACATTACTGTT  
 TTATCGCTGTTTTCACGCCATATGTTTGTGGTTCCGATGCGTACGATCCCGTCAAAGAA  
 GCCGAGATTAATAACAATTTATTTAGAAAGCGGCGGAAGACAGAAATCCCACGTTTGG  
 CGCGCCCGTGCAGCATATCTTTGATTGCTTCGGTATGTTACAGACTCAGCTTGGTCA  
 20 AATACTCGTTCTACCAAAATCGCGCAGATGCCGATTTTTCATTTACAGACAAGCGAAA  
 CCCGGCACTFCCCAATATTTTTCAGCGGTAAACCGATCAAATTCATCCGAATATGGG  
 TATGACGAATCAATCCAAAGTAAAACTACAAATAGCGGATACTCGCCGTCGATTAAT  
 ATGCCCGTTGTTAAGAAATATATTACAGATACTTACGGGGATAATTAAGGATGCGGTT  
 AAGAAACAATTAAGGATTTATACAAAGACCGGAGCTGGGAAGAAATAAATAA  
 CGGACTGAGGAGCGTATATAGAACAGCTTGGACCAAATTTAGTATCTCAAAACAGAAA  
 25 AACCCCGATTAAATATAAATGGTAGAGATTCCGTACTACTCTCTAGTAAATCA  
 TCACAGACTAGTCTCAACACACTCTCAATAAATAATACACGTCAAATCGAAACAAA  
 TCCACGTCGCGGACAGGTGTTGGAATGACCAAGATGACGTCGAAGATTCCTTTGG  
 GAACCGCGCCCATTCGACATCCATCCTGGAACCTGGAACCTTCCGATAATGCCCGCATCCG  
 CTGAACGGAAGATGAAAACTGACCGTCCATTAAGCCATTCAGGCGCGCGGATTTCC  
 30 CTGTTCCGCTACGACTGCGGGAGTCCGACGAAACCGCCCTGACCTTTGAACAAAACGTC  
 AGCGGAAATCCCGCGTGGTTTGGAAAGCGCGCGGAAATCTGAAAACGCTCGACGGG  
 CGCAAATGATTCGCGCGGAAAGCGCAAGCCCTAATTCGTTTGGGTTAAACAAAATAC  
 CGCAGGAGCTGTACGAATATTTCTCAAGCAATGCGAAGGCGGATTTGCTTGGGTGTG  
 CAGCGTTTGGCTATCCCTGAGCGGAAAGCGGTTTATATGCCCCAACAGGCTTATGCGGCA  
 35 AATCTTTGTTGSGCTGCTGCGCTTCAATCGCGCGCTGCGATCAAAATATACGGGG  
 TCCGCTCAAATTTGSGCTGCTGCGCTTCAATCGCGCGCTGCGATCAAAATATACGGGG  
 GCGCGGCTGCGGACGGGCGCGCAAGGCGTGCAAAATCGCGGTTGAGGTGTTTGTACGG  
 CAAAATGAAGGCAAGTCCGCTGCAATCGCGGTGATGGCGCGGAGGCTGGCCAGCACGCA  
 40 TCAGTCAACGCAAGGCGGTGCGCGAGTAAACAAACGGGTGCGTATTGGACGGTGGTTG  
 TATGCTGCTGGCATCAGTTGCGCGATAAACAAACGGGTGCGTATTGGACGGTGGTTG  
 CAATACCAACGTTTCAACACCGCATCAATGATGAAAACCGTGGGAACGCTACAAAACC  
 AAAGTTGACGCTTCTGTGCAAGGCGGTACAAACCGCTTGGCGGAAAGGCGTTGTC  
 45 GGAAAAGGCAATATGTCGGTTTACCTGCAACCGCAGGCGAGTTACCTACTTGGGC  
 GTAAACGGCGCTTACCGACAGCGAGGGGACGGCGCTCGGACTCTCGGACGCGTCA  
 TGGCAAAGCCGCGCGCATTCGGGCAAAAACCGTTTGGCTTGGCTAACGCTGTCAAT  
 CTTCAAGCTTTTGGCGCTTTAATGTTTTCACAGGTCAAATCTTTGGCGTGGAAATG  
 GACGGGAAAACAGACGCTGGCAGGACGCGCTCGAAGGCGGTTCCGGCATTTGAA  
 50 CCGGTTGGAAAGGCCATATGTCGCGACGCTCGGATACGGCAAAAGGACGGACCGCGAC  
 AAAGAAGCCGCTTCTGCTCAATGGCTGTTTGA

WO 00/43519

PCT/EP00/00428

## SEQ ID NO:8

*Neisseria meningitidis* BASB069 polypeptide sequence deduced from the polynucleotide sequence of SEQ ID NO:7

```
5  MTLKASKQASGRVNLTLVLSLFCYVCGSDAYDPVKEAEIHNKFILEAAEDRNSHVW
  RGPCSIISFDCFGMFAQLGSNTRSTKIGDDADFSFDKPKPGTSHYFSSGKTDQNSSEYG
  YDEINIQGNKYNNGILAVDNMPVVKYITDITYGDNLRDANKKQLQDLYKTRPRAWENKK
  RTEEAYIEQLGPKFSLKQKNPDLINKLVEDSVLTPHSNTSQTSLNIFNKKLHVKIENK
  SHVAGQVLELTKMTLKDSLWEPRRHSDIHTLETSDNARIRLNTKDEKLTVHKAYGGADF
10  LFGYDVRESDEPALTFEQNVSGKSGVLERPENLKTLDGRKLIJAEKADPNSFAFKQNY
  RQGLVELLLKQCEGGFCLGVQRLAIPAEAVLYAQQAYAAANTLFGLRADRGDDVYAADP
  SRQKLWLRFIGGRSHQNIIRGGAADGRKGVQIGGEVFRQNEGSKLALGVMGGRAGQHA
  SVNGKGAAGSYLHGVCYAAHQLRDKQTGAYLDGWLQYQRFKHRINDENRAERYKT
15  KGWTRAVEGGYNALVLEGVVGKNNVRFYLPQAQFTYLVGNVGGFTDSEGTAVGLLGGGQ
  WQSRAGIRAKTRFALRNGVNLQFFAFAFNVLHRSKSPGVEMDGEKQTLAGRTALEGRFGIE
  AGWKGHMSARIGYKRTDGDKEAALSLEKWL
```

WO 00/43519

PCT/EP00/00428

**Deposited materials**

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

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

The deposited strain contains the full length BASB047, BASB054, BASB068 and  
BASB069 genes. The sequence of the polynucleotides contained in the deposited strain, as  
well as the amino acid sequence of any polypeptide encoded thereby, are controlling in the  
15 event of any conflict with any description of sequences herein.

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

WO 00/43519

PCT/EP00/00428

INDICATIONS RELATING TO DEPOSITED MICROORGANISM OR OTHER BIOLOGICAL MATERIAL

(PCT Rule 13bis)

A. The indications made below relate to the deposited microorganism or other biological material referred to in the description on page 84, line 3-22

B. IDENTIFICATION OF DEPOSIT Further deposits are identified on an additional sheet

Name of depositary institution  
AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION

Address of depositary institution (including postal code and country)  
10801 UNIVERSITY BLVD, MANASSAS, VIRGINIA 20110-2209,  
UNITED STATES OF AMERICA

Date of deposit 22 June 1997 (22.06.97) Accession Number 13090

C. ADDITIONAL INDICATIONS (leave blank if not applicable) This information is continued on an additional sheet


In respect of those designations where a European Patent is sought, a sample of the deposited microorganism will be made available until the publication of the mention of the grant of the European Patent or until the date on which the application has been refused or withdrawn, only by issue of such a sample to an expert nominated by the person requesting the sample.

D. DESIGNATED STATES FOR WHICH INDICATIONS ARE MADE (if the indications are not for all designated States)

E. SEPARATE FURNISHING OF INDICATIONS (leave blank if not applicable)  
The indications listed below will be submitted to the International Bureau later (specify the general nature of the indications e.g. "Accession Number of Deposit")

For receiving Office use only

This sheet was received with the international application  
**19 JAN 2000** (19. 01. 2000)

Authorized officer  
 **M. Legendre**

For International Bureau use only

This sheet was received by the International Bureau on:

Authorized officer

WO 00/43519

PCT/EP00/00428

## CLAIMS

1. An isolated polypeptide comprising an amino acid sequence which has at least 85%  
5 identity to an amino acid sequence selected from the group consisting of: SEQ ID NO:2,  
SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8.
2. An isolated polypeptide as claimed in claim 1 in which the amino acid sequence has at  
least 95% identity to the amino acid sequence selected from the group consisting of: SEQ  
10 ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8.
3. The polypeptide as claimed in claim 1 comprising the amino acid sequence selected  
from the group consisting of: SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID  
NO:8.  
15
4. An isolated polypeptide of: SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6 or SEQ ID  
NO:8.
5. An immunogenic fragment of the polypeptide as claimed in any one of claims 1 to 4 in  
20 which the immunogenic activity of said immunogenic fragment is substantially the same  
as that of the polypeptide of: SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6 or SEQ ID  
NO:8.
6. An isolated polynucleotide comprising a nucleotide sequence encoding a polypeptide  
25 that has at least 85% identity to the amino acid sequence of SEQ ID NO:2,4,6 or 8 over the  
entire length of SEQ ID NO:2,4,6 or 8 respectively; or a nucleotide sequence  
complementary to said isolated polynucleotide.

WO 00/43519

PCT/EP00/00428

7. An isolated polynucleotide comprising a nucleotide sequence that has at least 85% identity to a nucleotide sequence encoding a polypeptide of SEQ ID NO:2,4,6 or 8 over the entire coding region; or a nucleotide sequence complementary to said isolated polynucleotide.
- 5
8. An isolated polynucleotide which comprises a nucleotide sequence which has at least 85% identity to that of SEQ ID NO:1,3,5 or 7 over the entire length of SEQ ID NO:1,3,5 or 7 respectively; or a nucleotide sequence complementary to said isolated polynucleotide.
- 10
9. The isolated polynucleotide as claimed in any one of claims 6 to 8 in which the identity is at least 95% to SEQ ID NO:1,3,5 or 7.
10. An isolated polynucleotide comprising a nucleotide sequence encoding the polypeptide of SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6 or SEQ ID NO:8.
- 15
11. An isolated polynucleotide comprising the polynucleotide of SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5 or SEQ ID NO:7.
12. An isolated polynucleotide comprising a nucleotide sequence encoding the polypeptide of SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6 or SEQ ID NO:8 obtainable by screening an appropriate library under stringent hybridization conditions with a labeled probe having the sequence SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7 or a fragment thereof.
- 20
13. An expression vector or a recombinant live microorganism comprising an isolated polynucleotide according to any one of claims 6 to 12.
- 25
14. A host cell comprising the expression vector of claim 13 or a subcellular fraction or a membrane of said host cell expressing an isolated polypeptide comprising an amino acid

WO 00/43519

PCT/EP00/00428

sequence that has at least 85% identity to the amino acid sequence selected from the group consisting of: SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8.

- 15 15. A process for producing a polypeptide comprising an amino acid sequence that has at least 85% identity to an amino acid sequence selected from the group consisting of: SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8 comprising culturing a host cell of claim 14 under conditions sufficient for the production of said polypeptide and recovering the polypeptide from the culture medium.
- 10 16. A process for expressing a polynucleotide of any one of claims 6 to 12 comprising transforming a host cell with the expression vector comprising at least one of said polynucleotides and culturing said host cell under conditions sufficient for expression of any one of said polynucleotides.
- 15 17. A vaccine composition comprising an effective amount of the polypeptide of any one of claims 1 to 5 and a pharmaceutically acceptable carrier.
18. A vaccine composition comprising an effective amount of the polynucleotide of any one of claims 6 to 12 and a pharmaceutically effective carrier.
- 20 19. The vaccine composition according to either one of claims 17 or 18 wherein said composition comprises at least one other *Neisseria meningitidis* antigen.
- 25 20. An antibody immunospecific for the polypeptide or immunological fragment as claimed in any one of claims 1 to 5.
21. A method of diagnosing a *Neisseria meningitidis* infection, comprising identifying a polypeptide as claimed in any one of claims 1 to 5, or an antibody that is immunospecific

WO 00/43519

PCT/EP00/00428

for said polypeptide, present within a biological sample from an animal suspected of having such an infection.

22. Use of a composition comprising an immunologically effective amount of a polypeptide as claimed in any one of claims 1 to 5 in the preparation of a medicament for use in generating an immune response in an animal.

23. Use of a composition comprising an immunologically effective amount of a polynucleotide as claimed in any one of claims 6 to 12 in the preparation of a medicament for use in generating an immune response in an animal.

24. A therapeutic composition useful in treating humans with *Neisseria meningitidis* disease comprising at least one antibody directed against the polypeptide of claims 1 to 5 and a suitable pharmaceutical carrier.

15

WO 00/43519

PCT/EP00/00428

SEQUENCE LISTING

<110> SmithKline Beecham Biologicals S.A.

<120> Novel compounds

<130> BM45352

<160> 8

<170> FastSEQ for Windows Version 3.0

<210> 1

<211> 1203

<212> DNA

<213> *Neisseria meningitidis*

<400> 1

```

atgagtcatt cccactatt tcaatggtta tctttgocct tactaagtgt ggcagtaact    60
cagcagttgt acgctcaacc caatgagtca ttaccaacgg ttgaattaga gcctgtggtt    120
attaccattg ataagagcgg tatggcactt gccaatcgtc tcacgcaaat gccccatacc    180
accaaagtta tttatgaaga gcaaattcaa gagcaagcaa caggctctcg acagcttgcc    240
gatgtgatgg cacagctcat tccaagttty gyygtaagta gtggcactac cagtaacttt    300
gggcaaaaca tgcacggtcg tcaagtgyaa tttttgtaa atggcgtgcc ttgacaggt    360
tcgcgagaca tctctagaca gcttaatagt atcaatccca atcaagtggc tagaattgaa    420
gttttatcag gagcaaccag tatttatggg tctgagcaa caggcgggtt gattaatatac    480
gttactaagt ctgatttggg agaggagcaa ttgaaaccc gcacggtgtt acatggtagt    540
aaattatcca gtgaaggtat cggttatcag gttagtcaga gtgtagcagg tgcagcggaa    600
aatggtaatg tccttgcacg acttgatgac gactatcgca ccacaggagg gycatttgat    660
gctaacggta aacgcaatgc tctgagcct gccaaaactg ataaagcaaga cagcaaaagc    720
ctaagtgtca atacaatgt tgattggcaa cttgacgaca agcaaaatat caatctggca    780
ttgacgcatt ataagacaa acaagatacc gattatgcaac ctgattatgg taatgccttt    840
ggcgtgttgt ttggagaaaa gccttcatta aatgccatca aaggcttatac attatcagaa    900
cagccaaaaa ccaccaaaaag cacccttaac atcaactatc atcatgatga tttgtggggt    960
aacaccatca ataccaatgc ttattatcgc agagagaaaag gcaagtttta tcccttttgt    1020
gccccgtttt cgatgcgcaa agccctgcct attttacaaa gcatgaaattt gccatcagcc    1080
actttggatg cttataccaa ggctccacaa gctogcgctt atggggtgtt acaatccgaa    1140
tctaaaggcag aggtactagg gcggtgccct aatttgaata agcccaaaaag agccctattt    1200
taa

```

<210> 2

<211> 400

<212> PRT

<213> *Neisseria meningitidis*

WO 00/43519

PCT/EP00/00428

```

<400> 2
Met Arg His Ser His Tyr Phe Gln Trp Leu Ser Leu Pro Leu Leu Ser
1          5          10          15
Val Ala Val Thr Gln Gln Leu Tyr Ala Gln Pro Asn Glu Ser Leu Pro
20          25          30
Thr Val Glu Leu Glu Pro Val Val Ile Thr Ile Asp Lys Ser Gly Met
35          40          45
Ala Leu Ala Asn Arg Ile Thr Gln Met Pro His Thr Thr Lys Val Ile
50          55          60
Tyr Glu Glu Gln Ile Gln Glu Gln Ala Thr Gly Ser Arg Gln Leu Ala
65          70          75          80
Asp Val Met Ala Gln Leu Ile Pro Ser Leu Gly Val Ser Ser Gly Thr
85          90          95
Thr Ser Asn Phe Gly Gln Thr Met His Gly Arg Gln Val Gln Phe Leu
100         105         110
Leu Asn Gly Val Pro Leu Thr Gly Ser Arg Asp Ile Ser Arg Gln Leu
115         120         125
Asn Ser Ile Asn Pro Asn Gln Val Ala Arg Ile Glu Val Leu Ser Gly
130         135         140
Ala Thr Ser Ile Tyr Gly Ser Gly Ala Thr Gly Gly Leu Ile Asn Ile
145         150         155         160
Val Thr Lys Ser Asp Leu Glu Glu Gln Phe Glu Thr Arg Ile Gly
165         170         175
Val His Gly Ser Lys Leu Ser Ser Glu Gly Ile Gly Tyr Gln Val Gly
180         185         190
Gln Ser Val Ala Gly Val Ser Glu Asn Gly Asn Val Leu Ala Arg Leu
195         200         205
Asp Val Asp Tyr Arg Thr Thr Gly Gly Ala Phe Asp Ala Asn Gly Lys
210         215         220
Arg Ile Ala Pro Glu Pro Ala Gln Thr Asp Lys Gln Asp Ser Lys Ser
225         230         235         240
Leu Ser Val Asn Thr Asn Val Asp Trp Gln Leu Asp Asp Lys Gln Asn
245         250         255
Ile Asn Leu Ala Leu Thr His Tyr Asn Asp Lys Gln Asp Thr Asp Tyr
260         265         270
Ala Pro Asp Tyr Gly Asn Arg Leu Ala Val Leu Phe Gly Glu Lys Pro
275         280         285
Ser Leu Asn Ala Ile Lys Gly Leu Ser Leu Ser Glu Gln Pro Lys Thr
290         295         300
Thr Lys Ser Thr Phe Asn Ile Asn Tyr His His Asp Asp Leu Trp Gly
305         310         315         320
Asn Thr Ile Asn Thr Asn Ala Tyr Tyr Arg Arg Glu Lys Gly Arg Phe
325         330         335
Tyr Pro Phe Val Ala Pro Phe Ser Ile Ala Lys Ala Leu Pro Ile Leu
340         345         350
Gln Ser Met Asn Leu Pro Ser Ala Thr Leu Asp Ala Tyr Thr Lys Ala

```

WO 00/43519

PCT/EP00/00428

	355		360		365										
Pro	Gln	Ala	Arg	Ala	Tyr	Gly	Val	Leu	Gln	Ser	Glu	Ser	Lys	Ala	Glu
370				375					380						
Val	Leu	Gly	Arg	Val	Pro	Asn	Leu	Asn	Lys	Pro	Lys	Arg	Ala	Leu	Phe
385				390					395						400

<210> 3  
 <211> 2409  
 <212> DNA  
 <213> *Neisseria meningitidis*

<400> 3  
 ttggctcgtt tattttcaact caaaccactg gtgctggcat tgggcttctg cttcggcagc 60  
 cattgcgccg ccgccgatgc cgttcggcgg gaggaacgag acaatccgac cgcgcggagg 120  
 agtggtccga gcggtgtccga acccatgcaag cctgcccggc tgagcctcgg ttcgacctgc 180  
 ctggttttgcg gtaacgaaag cggcaaaccc gaaaaaaccc aatctgcctg caaagggaagc 240  
 ggcgaaggcg ctgtgcccga aaaccacacy cgaattgtcg ccgacaaggt ggaaggcgag 300  
 tccagagta aggtacgcgc ggaggcggcg gtctgtgtcg aacgcaaccg gacgaccttt 360  
 aatgcgcact gggcggatta cgcaccagtc ggcgacaccg ttaccgttag cgcacggttc 420  
 gccctccaac aggacggtac gctgattcgg ggcgaaaccc tgacctacaa tctcgaagca 480  
 cagaccggcg aagcgcacaa cgtccgatg gaaaccgac aagcggcagc cggcctgcaa 540  
 agcgtcagcc gcaccgccga aatgttggcg gaaggycatt acaaatgac ggaaccccaa 600  
 tcaaacact gttccgcgg cgatgcccgc tggtagtca agcagcctc tctcgaagcc 660  
 gatcgggaaa aagccatagg cgttgcaaaa cacgcccct tctgttctcg cggcgttct 720  
 attttctaca ccccttggcg ggaactcccg cttgacggca accgcaaaa cggcctgctt 780  
 gttccctcac tctccgcgg ttccgacggc gttcccttt cgttcccta ttattcaac 840  
 cttgcccaca atctcgatgc cacttccgc cccagcgtga tccgcaaac cggcgcggtc 900  
 tttgacggcg aggtacgcta cctgcccgcg gattatgcc gccagtcga cctgacctgg 960  
 ctgcccagcg acaagaaaag cggcaggaa aaccgctatc aggcgaaaat gcagcctcgg 1020  
 cagcacttt ccgacacgct tcaggcgggt gtcgatttca accaagtctc gcacagcggc 1080  
 tactaccgag acttttacgg caacaaagaa atcgcgggca acgtcaact caaccgccc 1140  
 gtagtctgg attatggcgg caggcggcgg ggcggcagcc tgaatgccg cctttcgggt 1200  
 ctgaaatacc agacgctggc aaaccaaagc ggctacaaa acaaaccgta tgcctgatg 1260  
 ccgccccttt ccgcccattg gcgcaaaaac accggcaggg cgcaaaatcg cgtgtccgca 1320  
 caatttacc gttccagcca cgcacgccc caagcagcca gccgcctcgt cgtctatccc 1380  
 gacatcaaat gggatttccg caacagctgg ggttacgtcc gtcccaact cggactgca 1440  
 gccacctatt acagcctcaa ccgcttcggc agccaagaag ccgacgcgt cagccgcact 1500  
 ctaccatcg tcaacatcga cagcggcatg acctcgaac gcaatcggc gatgttcggc 1560  
 ggagaagtcc tgcaaacctt cgaaccgccc ctgttttaca actatattcc tgccaaatcc 1620  
 caaacgacc tgcccaattt tgattcgtcg gaaagcagct tggctacgg gcagcttttt 1680  
 cgtgaaaacc tctattacgg caacgacagg attaacacgg caaacagcct tccgcccgc 1740  
 gtgcaagcc gtattttgga cggcgcagc ggggcagagc gtttccggc cggcctcgg 1800  
 cagaaattct acttcaaaa cgcgcagtc atgcttgac gcagtgtcg caaaaaaccg 1860  
 ccgaccggtt ccgactgggt ggcattcgc tccagcgca tccgagcgg cttcactcctc 1920  
 gacagcagca tcaactacaa ccaaacgcac aacgcggcgg agaactacgc cgtcgggtga 1980  
 agctaccgct ccgacaggg caaagtgtg aacgcccgtt acaatacgg gcgcaacgaa 2040  
 aaaaattacc tgaagtccga cggttcctat ttttacgaca aactcagcca gctcagcctg 2100

WO 00/43519

PCT/EP00/00428

```

tcgcacaat ggcacctgac gcgcaacctg tcggcogtgc tccgttacaa ctacggtttt 2160
gaagccaaaa aaccgataga ggtgctggcg gttgcggaat acaaaagcag ttgcggctgc 2220
tggggcgcgg gcgtgtacgc ccaacgctac gttaccggcg aaaaacacta caaaaacgct 2280
gtctttttct cacttcagtt gaagacctc agcagtgtcg gcagaaaacc cgcagacagg 2340
atggatgtcg cagttcccggt ctatatcccc gcccaactctc ttccgcgcgg acgcaacaaa 2400
cggcctga 2409

```

```

<210> 4
<211> 802
<212> PRT
<213> Neisseria meningitidis

```

```

<400> 4
Met Ala Arg Leu Phe Ser Leu Lys Pro Leu Val Leu Ala Leu Gly Phe
1 5 10 15
Cys Phe Gly Thr His Cys Ala Ala Ala Asp Ala Val Ala Ala Glu Glu
20 25 30
Thr Asp Asn Pro Thr Ala Gly Gly Ser Val Arg Ser Val Ser Glu Pro
35 40 45
Met Gln Pro Ala Gly Leu Ser Leu Gly Ser Thr Cys Leu Phe Cys Ser
50 55 60
Asn Glu Ser Gly Lys Pro Glu Lys Thr Glu Ser Ala Val Lys Gly Ser
65 70 75 80
Gly Glu Gly Pro Val Pro Glu Asn His Thr Arg Ile Val Ala Asp Lys
85 90 95
Val Glu Gly Gln Ser Gln Val Lys Val Arg Ala Glu Gly Gly Val Val
100 105 110
Val Glu Arg Asn Arg Thr Thr Leu Asn Ala Asp Trp Ala Asp Tyr Asp
115 120 125
Gln Ser Gly Asp Thr Val Thr Val Gly Asp Arg Phe Ala Leu Gln Gln
130 135 140
Asp Gly Thr Leu Ile Arg Gly Glu Thr Leu Thr Tyr Asn Leu Glu Gln
145 150 155 160
Gln Thr Gly Glu Ala His Asn Val Arg Met Glu Thr Glu Gln Gly Gly
165 170 175
Arg Arg Leu Gln Ser Val Ser Arg Thr Ala Glu Met Leu Gly Glu Gly
180 185 190
His Tyr Lys Leu Thr Glu Thr Gln Phe Asn Thr Cys Ser Ala Gly Asp
195 200 205
Ala Gly Trp Tyr Val Lys Ala Ala Ser Val Glu Ala Asp Arg Glu Lys
210 215 220
Gly Ile Gly Val Ala Lys His Ala Ala Phe Val Phe Gly Gly Val Pro
225 230 235 240
Ile Phe Tyr Thr Pro Trp Ala Asp Phe Pro Leu Asp Gly Asn Arg Lys
245 250 255
Ser Gly Leu Leu Val Pro Ser Leu Ser Ala Gly Ser Asp Gly Val Ser
260 265 270

```

WO 00/43519

PCT/EP00/00428

Leu Ser Val Pro Tyr Tyr Phe Asn Leu Ala Pro Asn Leu Asp Ala Thr  
275 280 285  
Phe Ala Pro Ser Val Ile Gly Glu Arg Gly Ala Val Phe Asp Gly Gln  
290 295 300  
Val Arg Tyr Leu Arg Pro Asp Tyr Ala Gly Gln Ser Asp Leu Thr Trp  
305 310 315 320  
Leu Pro His Asp Lys Lys Ser Gly Arg Asn Asn Arg Tyr Gln Ala Lys  
325 330 335  
Trp Gln His Arg His Asp Ile Ser Asp Thr Leu Gln Ala Gly Val Asp  
340 345 350  
Phe Asn Gln Val Ser Asp Ser Gly Tyr Tyr Arg Asp Phe Tyr Gly Asn  
355 360 365  
Lys Glu Ile Ala Gly Asn Val Asn Leu Asn Arg Arg Val Trp Leu Asp  
370 375 380  
Tyr Gly Gly Arg Ala Ala Gly Gly Ser Leu Asn Ala Gly Leu Ser Val  
385 390 395 400  
Leu Lys Tyr Gln Thr Leu Ala Asn Gln Ser Gly Tyr Lys Asp Lys Pro  
405 410 415  
Tyr Ala Leu Met Pro Arg Leu Ser Ala Asp Trp Arg Lys Asn Thr Gly  
420 425 430  
Arg Ala Gln Ile Gly Val Ser Ala Gln Phe Thr Arg Phe Ser His Asp  
435 440 445  
Ser Arg Gln Asp Gly Ser Arg Leu Val Val Tyr Pro Asp Ile Lys Trp  
450 455 460  
Asp Phe Ser Asn Ser Trp Gly Tyr Val Arg Pro Lys Leu Gly Leu His  
465 470 475 480  
Ala Thr Tyr Tyr Ser Leu Asn Arg Phe Gly Ser Gln Glu Ala Arg Arg  
485 490 495  
Val Ser Arg Thr Leu Pro Ile Val Asn Ile Asp Ser Gly Met Thr Phe  
500 505 510  
Glu Arg Asn Thr Arg Met Phe Gly Gly Glu Val Leu Gln Thr Leu Glu  
515 520 525  
Pro Arg Leu Phe Tyr Asn Tyr Ile Pro Ala Lys Ser Gln Asn Asp Leu  
530 535 540  
Pro Asn Phe Asp Ser Ser Glu Ser Ser Phe Gly Tyr Gly Gln Leu Phe  
545 550 555 560  
Arg Glu Asn Leu Tyr Tyr Gly Asn Asp Arg Ile Asn Thr Ala Asn Ser  
565 570 575  
Leu Ser Ala Ala Val Gln Ser Arg Ile Leu Asp Gly Ala Thr Gly Ala  
580 585 590  
Glu Arg Phe Arg Ala Gly Ile Gly Gln Lys Phe Tyr Phe Lys Asn Asp  
595 600 605  
Ala Val Met Leu Asp Gly Ser Val Gly Lys Lys Pro Arg Ser Arg Ser  
610 615 620  
Asp Trp Val Ala Phe Ala Ser Ser Gly Ile Gly Ser Arg Phe Ile Leu  
625 630 635 640  
Asp Ser Ser Ile His Tyr Asn Gln Asn Asp Lys Arg Ala Glu Asn Tyr



WO 00/43519

PCT/EP00/00428

```

cgttaaacg acaaaaacag cgatatttt gaccgcactt taccgcgcaa aggcttgtgg 1200
ttacgtgtga ttgacggaca tccagccaa tgggtacsag gcaaaaacgac accagtagaa 1260
ggaatcgtga aaggcataca acttgggtggc gatgttttct cattgcacaaa tcacaactat 1320
caactttccg ttggcttaat gggcggacaa gcagaacaac gcagtacttt ccgcaaccca 1380
gatacagaca atctttacaac gggaaatgtg aaaggctttg gtgcagcgt ttacgcoact 1440
tggcatcagc ttcaggacaa acagacaggt gcgtatggcg atagctgggt acaatatcaa 1500
cgtttccgcc accgatatac cactgaagat ggtacagAAC gttttacttc aaaaggtatt 1560
actgcctcaa tgaagcagc ttacaacgct ttattggcgg aacacgtaac taaaaagggc 1620
aacagccttc gtgtttactt acaaccacag gcgcaattga cttatttggg ggtaaaacgga 1680
aaattcagcg atagcgaaaa tggccacgtg aatttacttg gctctcgcca attacaagc 1740
cgagtggcgc ttcaagctaa agtcaattt gctttacta atggcgtcac ttccaacca 1800
ttgtttccg tcaattcaat ctaccaacaa aaaccttctg ggtagaat ggcggagaa 1860
cgtcagtgta taaacaacaa aaccgcgatt gaaagccaat taggcgttgc ggtaaaaatt 1920
aaatcact taactttaca agcaacattc aaccgcaaa caggcaacaa tcatcaagct 1980
aaacaaggcg cattgaattt acagtggcgc ttttaa 2016

```

<210> 6  
 <211> 671  
 <212> PRT  
 <213> *Neisseria meningitidis*

<400> 6  
 Met Lys Leu Glu Ala Ser Lys Gln Ala Ser Lys Gln Lys Phe Lys Lys  
 1 5 10 15  
 Ser Phe Ile Ile Ser Leu Phe Phe Ser Ile Leu Tyr Thr Ser Pro Leu  
 20 25 30  
 Leu Ala Val Asp Tyr Val Tyr Asp Lys Thr Lys Leu Thr Asp Asp Glu  
 35 40 45  
 Ile Thr Arg Leu Lys Lys Leu Arg Asp Arg Asn Ser Glu Tyr Trp Lys  
 50 55 60  
 Glu Glu Thr Tyr His Ile Lys Ser Asn Asn Arg Val Tyr Pro Asn Ile  
 65 70 75 80  
 Pro Ala Leu Phe Pro Lys His Pro Phe Asp Pro Phe Glu Asn Ile Asn  
 85 90 95  
 Asn Ser Lys Arg Ile Ser Phe Tyr Asp Lys Glu Tyr Thr Glu Asp Tyr  
 100 105 110  
 Leu Val Gly Phe Ala Gln Gly Leu Gly Val Ala Lys Arg Asn Gly Glu  
 115 120 125  
 Thr Glu Lys Pro Ile Arg Gln Tyr Phe Lys Glu Cys Leu Asn Thr Gly  
 130 135 140  
 Lys Tyr Ser Asp Asp Thr Cys Lys Ser Gln Gln Ser Ile Pro Thr Val  
 145 150 155 160  
 Arg Ser Asp Ile Phe Ala Leu Asn Thr Lys Ile Lys Asn Ser His Ile  
 165 170 175  
 Asn Ser Glu Ile Phe Ala Val Gly Asn Tyr Thr Lys Leu Met Tyr Ser  
 180 185 190  
 Ala Gln His His Ser Ile Trp Ser Glu His Leu Tyr Ser Asn Ser Glu

WO 00/43519

PCT/EP00/00428

```

195          200          205
Leu Ser Leu Asp Val Asp Asn Ser His Val Ile Gly Gln Thr Ile Asp
210          215          220
Leu Gly Ala Leu Glu Leu Thr Asn Ser Leu Trp Glu Pro Arg Trp Asn
225          230          235          240
Ser Asn Ile Asp Tyr Leu Ile Thr Lys Asn Ala Glu Ile Arg Phe Asn
245          250          255
Thr Lys Ser Glu Ser Leu Leu Val Lys Glu Asp Tyr Ala Gly Gly Ala
260          265          270
Arg Phe Arg Phe Ala Tyr Gly Leu Lys Asp Lys Val Pro Glu Thr Pro
275          280          285
Ile Leu Thr Phe Glu Lys Asn Ile Thr Gly Thr Ser Asp Ile Ile Phe
290          295          300
Glu Gly Lys Ala Leu Asp Asn Leu Lys His Leu Asp Gly His Gln Ile
305          310          315          320
Ile Lys Val Asn Gly Thr Ala Asp Lys His Ala Phe Arg Leu Ser Gly
325          330          335
Lys His Gln Lys Gly Ile Tyr Thr Leu Ser Leu Gln Gln Arg Pro Glu
340          345          350
Gly Phe Phe Thr Lys Val Gln Glu Arg Asp Asp Ile Ala Ile Tyr Ala
355          360          365
Gln Gln Ala Gln Ala Ala Asn Thr Leu Phe Ala Leu Arg Leu Asn Asp
370          375          380
Lys Asn Ser Asp Ile Phe Asp Arg Thr Leu Pro Arg Lys Gly Leu Trp
385          390          395          400
Leu Arg Val Ile Asp Gly His Ser Ser Gln Trp Val Gln Gly Lys Thr
405          410          415
Ala Pro Val Glu Gly Asn Arg Lys Gly Ile Gln Leu Gly Gly Asp Val
420          425          430
Phe Ser Leu Gln Asn His Asn Tyr Gln Leu Ser Val Gly Leu Met Gly
435          440          445
Gly Gln Ala Glu Gln Arg Ser Thr Phe Arg Asn Pro Asp Thr Asp Asn
450          455          460
Leu Thr Thr Gly Asn Val Lys Gly Phe Gly Ala Gly Val Tyr Ala Thr
465          470          475          480
Trp His Gln Leu Gln Asp Lys Gln Thr Gly Ala Tyr Ala Asp Ser Trp
485          490          495
Val Gln Tyr Gln Arg Phe Arg His Arg Ile Asn Thr Glu Asp Gly Thr
500          505          510
Glu Arg Phe Thr Ser Lys Gly Ile Thr Ala Ser Ile Glu Ala Gly Tyr
515          520          525
Asn Ala Leu Leu Ala Glu His Val Thr Lys Lys Gly Asn Ser Leu Arg
530          535          540
Val Tyr Leu Gln Pro Gln Ala Gln Leu Thr Tyr Leu Gly Val Asn Gly
545          550          555          560
Lys Phe Ser Asp Ser Glu Asn Ala His Val Asn Leu Leu Gly Ser Arg
565          570          575

```

WO 00/43519

PCT/EP00/00428

Gln Leu Gln Ser Arg Val Gly Val Gln Ala Lys Ala Gln Phe Ala Phe  
580 585 590  
Thr Asn Gly Val Thr Phe Gln Pro Phe Val Ser Val Asn Ser Ile Tyr  
595 600 605  
Gln Gln Lys Pro Phe Gly Val Glu Met Asp Gly Glu Arg Arg Val Ile  
610 615 620  
Asn Asn Lys Thr Ala Ile Glu Ser Gln Leu Gly Val Ala Val Lys Ile  
625 630 635 640  
Lys Ser His Leu Thr Leu Gln Ala Thr Phe Asn Arg Gln Thr Gly Lys  
645 650 655  
His His Gln Ala Lys Gln Gly Ala Leu Asn Leu Gln Trp Thr Phe  
660 665 670

<210> 7  
<211> 2076  
<212> DNA  
<213> *Neisseria meningitidis*

<400> 7  
atgcaactga aagcaagcaa gcaagcaagc ggtcgggta atctattaac attatctgtt 60  
ttatcgcgtt ttgcacgcc atagtgttt ggtcgggatg cgtacgatcc cgtcaaaaga 120  
gccgagatta aaaacaaatt tattttagaa gcggcgggag acagaaattc ccacgtttgg 180  
cgcggcccggt gcagcatatc ttttgattgc ttcggtatgt tcagagctca gcttggttca 240  
aatactcgtt ctaccaaaat cggcagcat gccgattttt cattttcaga caagccgaaa 300  
cccgccactt cccattatct ttccagcggg aaaaccgatc aaatttcac cgaatatggg 360  
tatgacgaaa tcaatatcca aggtaaaaac tacaatagcg gcatactcgc cgtcgataat 420  
atgcccgttg ttaagaaata tattacagat actracgggg ataatttaa ggatgcgggt 480  
aagaaagcaat tacaggattt atacaaaaca agaccogaag ctgggaaga aataaaaaa 540  
cggactgagg agcgtatat agaacagctt ggacaaaat ttagtatact caaacagaaa 600  
aaccccgatt taattastaa atgggtagaa gattccgtac tcaactcctca tagtaataca 660  
tcacagacta gtctcaacaa catcttcaat aaaaattac acgtcaaat cgaaaacaaa 720  
tcccacgtcg ccggacaggt gttgaaactg accaagatga cgtgaaaga ttccctttgg 780  
gaaccgcgcc gccattccga catccatacy ctggaacctt ccgataatgc ccgcatccgc 840  
ctgaacacga aagatgaaa actgaccgct cataaagct atcagggcgg cgcggatttc 900  
ctgttcggct acgacgtgcy gtagtcggac gaaccgcgcc tgaaccttga acaaaacgctc 960  
agcggaaat ccggcgtggt tttgaaacyc cggccggaaa atctgaaac gctcgaacgg 1020  
cgcacaactga ttgcggcggg aaagcgagac cctaattcgt ttgcgtttaa acaaaattac 1080  
cggcagggac tgtacgaatt atgtccaag caatgcgaag gcggattttg cttgggtgtg 1140  
cagcgtttgg ctatccctga ggcggaagcg gttttatag ccaaacaggg ttatgcggca 1200  
aatactttgt ttgggtgcyg tgcgcagac aggggcgacg acgtgtatgc cgcgatccg 1260  
tcccgtaaaa aattgtgct gcgcttcato ggcggccggt cgcataaaa tatacggggc 1320  
ggcgcggctg cggacggggc gcgcaaaagg gtgcaaatcg gcggtgaggt gttgtacgg 1380  
caaaatgaag gcagtcggct ggcaatcggc gtgatggcg gcagggctgg ccagcacgca 1440  
tcagtcaacg gcaaaaggcg tgcggcaggc agttatttgc atggttatgg cgggggtgtt 1500  
tatgtcgcgt ggcatacgtt gcgcgataaa caaacgggtg cgtatattga cggctggtg 1560  
caataccaac gtttcaaca ccgcataat gatgaaaacc gtgcggaacg ctcaaaaacc 1620  
aaaggttga cggcttctgt cgaaggcgc tacaacgcgc ttgtgcgga aggcgttgtc 1680

WO 00/43519

PCT/EP00/00428

```

ggaaaaggca ataatgtgcg gttttacctg caaccgcagg cgcagtttac ctacttgggc 1740
gtaaacggcg gottttaccga cagcagagggg acggcggtcg gactgctcgg cagcggtcag 1800
tggcaaaagcc gcgcccggcat tcgggcaaaa acccgttttg ctttgcgtaa cgggtgcaat 1860
cttcagcctt ttgcccgttt taatgttttg cacaggtcaa atcttttcgg cgtggaaaatg 1920
gacggcgaaa aacagacgct ggcaggcagg acggcgctcg aagggcggtt cggcattgaa 1980
gccggttggg aaggccatat gtccgcacgc atcggatacg gcaaaaaggac ggacggcgac 2040
aaagaagccg cattgtgct caaatggctg ttttga 2076

```

```

<210> 8
<211> 691
<212> PRT
<213> Neisseria meningitidis

```

```

<400> 8
Met Thr Leu Lys Ala Ser Lys Gln Ala Ser Gly Arg Val Asn Leu Leu
1          5          10          15
Thr Leu Ser Val Leu Ser Leu Phe Cys Thr Pro Tyr Val Cys Gly Ser
20          25          30
Asp Ala Tyr Asp Pro Val Lys Glu Ala Glu Ile Lys Asn Lys Phe Ile
35          40          45
Leu Glu Ala Ala Glu Asp Arg Asn Ser His Val Trp Arg Gly Pro Cys
50          55          60
Ser Ile Ser Phe Asp Cys Phe Gly Met Phe Arg Ala Gln Leu Gly Ser
65          70          75          80
Asn Thr Arg Ser Thr Lys Ile Gly Asp Asp Ala Asp Phe Ser Phe Ser
85          90          95
Asp Lys Pro Lys Pro Gly Thr Ser His Tyr Phe Ser Ser Gly Lys Thr
100         105         110
Asp Gln Asn Ser Ser Glu Tyr Gly Tyr Asp Glu Ile Asn Ile Gln Gly
115         120         125
Lys Asn Tyr Asn Ser Gly Ile Leu Ala Val Asp Asn Met Pro Val Val
130         135         140
Lys Lys Tyr Ile Thr Asp Thr Tyr Gly Asp Asn Leu Lys Asp Ala Val
145         150         155         160
Lys Lys Gln Leu Gln Asp Leu Tyr Lys Thr Arg Pro Glu Ala Trp Glu
165         170         175
Glu Asn Lys Lys Arg Thr Glu Glu Ala Tyr Ile Glu Gln Leu Gly Pro
180         185         190
Lys Phe Ser Ile Leu Lys Gln Lys Asn Pro Asp Leu Ile Asn Lys Leu
195         200         205
Val Glu Asp Ser Val Leu Thr Pro His Ser Asn Thr Ser Gln Thr Ser
210         215         220
Leu Asn Asn Ile Phe Asn Lys Lys Leu His Val Lys Ile Glu Asn Lys
225         230         235         240
Ser His Val Ala Gly Gln Val Leu Glu Leu Thr Lys Met Thr Leu Lys
245         250         255
Asp Ser Leu Trp Glu Pro Arg Arg His Ser Asp Ile His Thr Leu Glu

```

WO 00/43519

PCT/EP00/00428

260 265 270  
 Thr Ser Asp Asn Ala Arg Ile Arg Leu Asn Thr Lys Asp Glu Lys Leu  
 275 280 285  
 Thr Val His Lys Ala Tyr Gln Gly Gly Ala Asp Phe Leu Phe Gly Tyr  
 290 295 300  
 Asp Val Arg Glu Ser Asp Glu Pro Ala Leu Thr Phe Glu Gln Asn Val  
 305 310 315 320  
 Ser Gly Lys Ser Gly Val Val Leu Glu Arg Arg Pro Glu Asn Leu Lys  
 325 330 335  
 Thr Leu Asp Gly Arg Lys Leu Ile Ala Ala Glu Lys Ala Asp Pro Asn  
 340 345 350  
 Ser Phe Ala Phe Lys Gln Asn Tyr Arg Gln Gly Leu Tyr Glu Leu Leu  
 355 360 365  
 Leu Lys Gln Cys Glu Gly Gly Phe Cys Leu Gly Val Gln Arg Leu Ala  
 370 375 380  
 Ile Pro Glu Ala Glu Ala Val Leu Tyr Ala Gln Gln Ala Tyr Ala Ala  
 385 390 395 400  
 Asn Thr Leu Phe Gly Leu Arg Ala Ala Asp Arg Gly Asp Asp Val Tyr  
 405 410 415  
 Ala Ala Asp Pro Ser Arg Gln Lys Leu Trp Leu Arg Phe Ile Gly Gly  
 420 425 430  
 Arg Ser His Gln Asn Ile Arg Gly Gly Ala Ala Ala Asp Gly Arg Arg  
 435 440 445  
 Lys Gly Val Gln Ile Gly Gly Glu Val Phe Val Arg Gln Asn Glu Gly  
 450 455 460  
 Ser Arg Leu Ala Ile Gly Val Met Gly Gly Arg Ala Gly Gln His Ala  
 465 470 475 480  
 Ser Val Asn Gly Lys Gly Gly Ala Ala Gly Ser Tyr Leu His Gly Tyr  
 485 490 495  
 Gly Gly Gly Val Tyr Ala Ala Trp His Gln Leu Arg Asp Lys Gln Thr  
 500 505 510  
 Gly Ala Tyr Leu Asp Gly Trp Leu Gln Tyr Gln Arg Phe Lys His Arg  
 515 520 525  
 Ile Asn Asp Glu Asn Arg Ala Glu Arg Tyr Lys Thr Lys Gly Trp Thr  
 530 535 540  
 Ala Ser Val Glu Gly Gly Tyr Asn Ala Leu Val Ala Glu Gly Val Val  
 545 550 555 560  
 Gly Lys Gly Asn Asn Val Arg Phe Tyr Leu Gln Pro Gln Ala Gln Phe  
 565 570 575  
 Thr Tyr Leu Gly Val Asn Gly Gly Phe Thr Asp Ser Glu Gly Thr Ala  
 580 585 590  
 Val Gly Leu Leu Gly Ser Gly Gln Trp Gln Ser Arg Ala Gly Ile Arg  
 595 600 605  
 Ala Lys Thr Arg Phe Ala Leu Arg Asn Gly Val Asn Leu Gln Pro Phe  
 610 615 620  
 Ala Ala Phe Asn Val Leu His Arg Ser Lys Ser Phe Gly Val Glu Met  
 625 630 635 640

WO 00/43519

PCT/EP00/00428

Asp Gly Glu Lys Gln Thr Leu Ala Gly Arg Thr Ala Leu Glu Gly Arg  
645 650 655  
Phe Gly Ile Glu Ala Gly Trp Lys Gly His Met Ser Ala Arg Ile Gly  
660 665 670  
Tyr Gly Lys Arg Thr Asp Gly Asp Lys Glu Ala Ala Leu Ser Leu Lys  
675 680 685  
Trp Leu Phe  
690

## 【国際公開パンフレット(コレクトバージョン)】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
27 July 2000 (27.07.2000)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 00/43519 A3

- (51) International Patent Classification: C12N 15/31, C07K 14/22, A61K 39/095, C07K 16/12 (74) Agent: PRIVETT, Kathryn, Louise; SmithKline Beecham, Two New Horizons Court, Brentford, Middlesex TW8 9EP (GB).
- (21) International Application Number: PCT/EP00/00428 (81) Designated States (national): AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (22) International Filing Date: 19 January 2000 (19.01.2000)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:  
9901368.2 22 January 1999 (22.01.1999) GB  
9901944.0 28 January 1999 (28.01.1999) GB  
9902086.9 29 January 1999 (29.01.1999) GB  
9903417.5 15 February 1999 (15.02.1999) GB  
9903535.4 16 February 1999 (16.02.1999) GB
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, JE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

## Published:

— With international search report.

(71) Applicant (for all designated States except US):  
SMITHKLINE BEECHAM BIOLOGICALS S.A.  
[BE/BE]; Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart (BE).(88) Date of publication of the international search report:  
7 December 2000

(72) Inventor; and

(75) Inventor/Applicant (for US only): RUELLE, Jean-Louis  
[BE/BE]; SmithKline Beecham Biologicals s.a., Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart (BE).

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 00/43519 A3

(54) Title: NEISSERIA MENINGITIDIS POLYPEPTIDES

(57) Abstract: The invention provides BASB047, BASB054, BASB068 and BASB069 polypeptides, and polynucleotides encoding BASB047, BASB054, BASB068 and BASB069 polypeptides and methods for producing such polypeptides by recombinant techniques. Also provided are diagnostic, prophylactic and therapeutic uses.

## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PLI/EP 00/00428
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N15/31 C07K14/22 A61K39/095 C07K16/12		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12N C07K A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 98 02547 A (INST NAT SANTE RECH MED ;MAX PLANCK GESELLSCHAFT (DE); SMITHKLINE) 22 January 1998 (1998-01-22) the whole document ---	1-24
A	MARTIN D ET AL: "HIGHLY CONSERVED NEISSERIA MENINGITIDIS SURFACE PROTEIN CONFERS PROTECTION AGAINST EXPERIMENTAL INFECTION" JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, vol. 185, no. 7, 1997, pages 1173-1183, XP000884332 ISSN: 0022-1007 cited in the application the whole document ---	1-24
-/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents:		
*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance		*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
*E* earlier document but published on or after the international filing date		*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
*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)		*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.
*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		*B* document member of the same patent family
*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 17 April 2000		Date of mailing of the international search report 24 JULY 2000
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5518 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax. (+31-70) 340-3016		Authorized officer ANDRES S.M.

Form PCT/ISA210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PC 1/EP 00/00428

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	LISSOLO L ET AL: "EVALUATION OF TRANSFERRIN-BINDING PROTEIN 2 WITHIN THE TRANSFERRIN-BINDING PROTEIN COMPLEX AS A POTENTIAL ANTIGEN FOR FUTURE MENINGOCOCCAL VACCINES" INFECTION AND IMMUNITY, vol. 63, no. 3, March 1995 (1995-03), pages 884-890, XP000877152 ISSN: 0019-9567 cited in the application ---	
A	SATO Y ET AL: "IMMUNOSTIMULATORY DNA SEQUENCES NECESSARY FOR EFFECTIVE INTRADERMAL GENE IMMUNIZATION" SCIENCE, vol. 273, 19 July 1996 (1996-07-19), pages 352-354, XP002058357 ISSN: 0036-8075 cited in the application ---	
A	CHEE M ET AL: "ACCESSING GENETIC INFORMATION WITH HIGH-DENSITY DNA ARRAYS" SCIENCE, vol. 274, 25 October 1996 (1996-10-25), pages 610-614, XP002050640 ISSN: 0036-8075 cited in the application -----	

1

<b>INTERNATIONAL SEARCH REPORT</b>	International application No. PCT/EP 00/00428
<b>Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)</b>	
This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:	
1.	<input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2.	<input type="checkbox"/> 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.	<input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).
<b>Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)</b>	
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:	
1.	<input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2.	<input type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.	<input type="checkbox"/> 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.	<input checked="" type="checkbox"/> 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.: Claims 1-24, (all partially)
<b>Remark on Protest</b>	<input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest. <input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/EP 00/00428

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

## 1. Claims: 1-24 (all partially)

An isolated Neisseria meningitidis polypeptide defined as BASB047, nucleic acids or immunogenic fragments derived therefrom, its use in vaccine formulation; Antibodies directed against it, and their use in diagnostic or therapeutic compositions.

## 2. Claims: 1-24 (all partially)

As for subject 1, but concerning BASB054.

## 3. Claims: 1-24 (all partially)

As for subject 1, but concerning BASB068.

## 4. Claims: 1-24 (all partially)

As for subject 1, but concerning BASB069.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International Application No.  
PCT/EP 00/00428

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9802547 A	22-01-1998	FR 2751000 A	16-01-1998
		AU 3697797 A	09-02-1998
		EP 0951552 A	27-10-1999

---

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

## フロントページの続き

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード(参考)
C 0 7 K 16/12	C 0 7 K 16/12	
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10	C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 P 21/02	G 0 1 N 33/53	M
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53	N
G 0 1 N 33/569	G 0 1 N 33/569	F
/(C 1 2 P 21/02	C 1 2 N 5/00	A
C 1 2 R 1:19 )	C 1 2 P 21/02	C
	C 1 2 R 1:19	

- (31)優先権主張番号 9903417.5  
(32)優先日 平成11年2月15日(1999.2.15)  
(33)優先権主張国 英国(GB)  
(31)優先権主張番号 9903535.4  
(32)優先日 平成11年2月16日(1999.2.16)  
(33)優先権主張国 英国(GB)

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

(74)代理人 100081330

弁理士 樋口 外治

(72)発明者 ルール, ジャン - ルイ

ベルギー国, ベー - 1 3 3 0 リクサンサール, リュ ドゥ ランスティテュ 8 9, スミスクラ  
イン ビーチャム バイオロジカルズ ソシエテ アノニム

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA13 BA31 BA42 CA02 GA11 HA01 HA12

4B064 AG27 AG31 CA02 CA19 CC24 DA01 DA15

4B065 AA01Y AB01 AC14 BA02 CA24 CA45

4C085 AA03 AA14 BA16 BB11 CC22 DD62 DD86

4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 CA11 DA76 DA86 EA29 EA31

EA52 FA74

专利名称(译)	新規化合物		
公开(公告)号	<a href="#">JP2004537956A</a>	公开(公告)日	2004-12-24
申请号	JP2000594927	申请日	2000-01-19
[标]申请(专利权)人(译)	葛兰素史密丝克莱恩生物有限公司		
申请(专利权)人(译)	葛兰素史克生物制品兴业ANONYME		
[标]发明人	ルールジャンルイ		
发明人	ルール,ジャン-ルイ		
IPC分类号	G01N33/53 A61K39/00 A61K39/095 A61K39/395 C07K14/22 C07K16/12 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12N15/31 C12P21/02 C12R1/19 G01N33/569		
CPC分类号	A61P31/04 C07K14/22		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K39/00.H A61K39/095 A61K39/395.R C07K14/22 C07K16/12 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.C G01N33/53.M G01N33/53.N G01N33/569.F C12N5/00.A C12R1/19		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA13 4B024/BA31 4B024/BA42 4B024/CA02 4B024/GA11 4B024/HA01 4B024/HA12 4B064/AG27 4B064/AG31 4B064/CA02 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA15 4B065/AA01Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA45 4C085/AA03 4C085/AA14 4C085/BA16 4C085/BB11 4C085/CC22 4C085/DD62 4C085/DD86 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA11 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA29 4H045/EA31 4H045/EA52 4H045/FA74		
代理人(译)	石田 敬 中村弘 西山雅也		
优先权	1999001368 1999-01-22 GB 1999001944 1999-01-28 GB 1999002086 1999-01-29 GB 1999003417 1999-02-15 GB 1999003535 1999-02-16 GB		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本发明提供了BASB047, BASB054, BASB068和BASB069多肽, 以及编码BASB047, BASB054, BASB068和BASB069多肽的多核苷酸, 以及通过重组技术生产这种多肽的方法。还提供了诊断, 预防和治疗用途。

寄託された微生物に関する表示 (PCT Rule 13 bis)

A. 明細書の84頁3~22行に言及した微生物に関する表示	
B. 寄託の特定 他の寄託が別紙に記載されている <input type="checkbox"/>	
寄託機関の名称 AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION	
寄託機関のあて名 (郵便番号及び国名を含む) 10801 UNIVERSITY BLVD, MANASSAS, VIRGINIA 20110-2209, UNITED STATES OF AMERICA	
寄託日 1997年6月22日 (22.06.97)	寄託番号 13090
C. 追加記載 (該当しない場合には空白にしておく) この情報は添付別紙に続いている <input type="checkbox"/>	
ヨーロッパ特許が求められるこれらの寄託に関し、寄託された微生物のサンプルは、ヨーロッパ特許の付与の公表まで、又は出願が拒絶され又は取り下げられもしくは取り下げられたものとみなされるまで入手可能となるであろう。但し、該サンプルを要求する人によって指名された専門家のみそのようなサンプルを与える。	
D. この記載が目的とする指定国 (すべての指定国を目的としないとき)	
E. 別個の表示の届出 (該当しない場合には空白にしておく) 下記の表示は国際事務局に届け出る予定である。(例えば「受託番号」のように表示事項を明記する)	
受理官庁使用のみ	国際事務局使用のみ
<input type="checkbox"/> この用紙は国際出願と共に出願時に受理された。	<input type="checkbox"/> 国際事務局が受理した日:
権限のある職員	権限のある職員