

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4695763号
(P4695763)

(45) 発行日 平成23年6月8日(2011.6.8)

(24) 登録日 平成23年3月4日(2011.3.4)

(51) Int.Cl.	F 1		
A 6 1 K 39/118 (2006.01)	A 6 1 K 39/118	Z N A	
A 6 1 K 39/39 (2006.01)	A 6 1 K 39/39		
A 6 1 P 9/10 (2006.01)	A 6 1 P 9/10	1 0 1	
A 6 1 P 11/00 (2006.01)	A 6 1 P 11/00		
A 6 1 P 11/02 (2006.01)	A 6 1 P 11/02		

請求項の数 16 (全 60 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2000-615762 (P2000-615762)	(73) 特許権者	501174136
(86) (22) 出願日	平成12年5月3日(2000.5.3)		サノフィ、パストゥール、リミテッド
(65) 公表番号	特表2002-542827 (P2002-542827A)		Sanofi Pasteur Limited
(43) 公表日	平成14年12月17日(2002.12.17)		カナダ国オンタリオ州、トロント、ステイ ーレス、アベニュー、ウェスト、1755
(86) 国際出願番号	PCT/CA2000/000511	(74) 代理人	100075812
(87) 国際公開番号	W02000/066739		弁理士 吉武 賢次
(87) 国際公開日	平成12年11月9日(2000.11.9)	(74) 代理人	100091487
審査請求日	平成19年2月6日(2007.2.6)		弁理士 中村 行孝
(31) 優先権主張番号	60/132, 270	(74) 代理人	100094640
(32) 優先日	平成11年5月3日(1999.5.3)		弁理士 紺野 昭男
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100107342
(31) 優先権主張番号	60/141, 276		弁理士 横田 修孝
(32) 優先日	平成11年6月30日(1999.6.30)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 クラミジア抗原および対応するDNA断片ならびにその使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

医薬上許容される担体と、

- (a) 配列番号2に記載のアミノ酸配列；
- (b) 配列番号4に記載のアミノ酸配列；
- (c) 配列番号6に記載のアミノ酸配列；
- (d) 配列番号2の少なくともアミノ酸1～452からなる、免疫原性断片；または
- (e) 配列番号2の少なくともアミノ酸69～651からなる、免疫原性断片

を含んでなる、ポリペプチド

とを含んでなる、クラミジア感染に対するワクチン。

10

【請求項2】

ポリペプチドが、配列番号2に記載のアミノ酸配列を含んでなる、請求項1に記載のワクチン。

【請求項3】

ポリペプチドが、配列番号4に記載のアミノ酸配列を含んでなる、請求項1に記載のワクチン。

【請求項4】

ポリペプチドが、配列番号6に記載のアミノ酸配列を含んでなる、請求項1に記載のワクチン。

【請求項5】

20

ポリペプチドが、配列番号 2 の少なくともアミノ酸 1 ~ 4 5 2 からなる、請求項 1 に記載のワクチン。

【請求項 6】

ポリペプチドが、配列番号 2 の少なくともアミノ酸 6 9 ~ 6 5 1 からなる、請求項 1 に記載のワクチン。

【請求項 7】

ポリペプチドが、配列番号 2 に記載のアミノ酸配列からなる、請求項 1 に記載のワクチン。

【請求項 8】

ポリペプチドが、配列番号 4 に記載のアミノ酸配列からなる、請求項 1 に記載のワクチン。

10

【請求項 9】

ポリペプチドが、配列番号 6 に記載のアミノ酸配列からなる、請求項 1 に記載のワクチン。

【請求項 10】

ポリペプチドが、(a) ~ (e) のいずれかに融合した異種シグナルペプチドをさらに含んでなる、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載のワクチン。

【請求項 11】

アジュバントをさらに含んでなる、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載のワクチン。

【請求項 12】

20

患者における肺炎クラミジアの増殖を阻害するための医薬の製造における、核酸の使用であって、

核酸が

(i) 配列番号 2 に記載のアミノ酸配列；

(ii) 配列番号 4 に記載のアミノ酸配列；

(iii) 配列番号 6 に記載のアミノ酸配列；

(iv) 配列番号 2 の少なくともアミノ酸 1 ~ 4 5 2 からなる、免疫原性断片；または

(v) 配列番号 2 の少なくともアミノ酸 6 9 ~ 6 5 1 からなる、免疫原性断片；

をコードするものである、使用。

【請求項 13】

30

核酸が配列番号 1、3 または 5 のいずれかに記載のヌクレオチド配列を含んでなる、請求項 12 に記載の使用。

【請求項 14】

患者における肺炎クラミジアの増殖を阻害するための医薬の製造における、ポリペプチドの使用であって、

ポリペプチドが

(a) 配列番号 2 に記載のアミノ酸配列；

(b) 配列番号 4 に記載のアミノ酸配列；

(c) 配列番号 6 に記載のアミノ酸配列；

(d) 配列番号 2 の少なくともアミノ酸 1 ~ 4 5 2 からなる、免疫原性断片；または

(e) 配列番号 2 の少なくともアミノ酸 6 9 ~ 6 5 1 からなる、免疫原性断片

40

を含んでなる、使用。

【請求項 15】

患者における肺炎クラミジアの増殖を阻害するために用いられる、請求項 1 ~ 11 のいずれか一項を記載のワクチン。

【請求項 16】

肺炎クラミジアの感染症を予防または治療するために用いられる、請求項 1 ~ 11 のいずれか一項に記載のワクチン。

【発明の詳細な説明】

【0001】

50

【発明の背景】

発明の分野

本発明はヒトなどの哺乳類におけるクラミジア感染症の予防および治療に使用できるクラミジア (*Chlamydia*) 7 6 K D a 外膜タンパク質抗原および対応する DNA 分子に関する。

【0002】

背景技術

クラミジアは原核生物である。それらは、リポ多糖および大腸菌 (*E. coli*) で見られるタンパク質と構造的および機能的に類似するいくつかの膜タンパク質を含む三層の外膜をはじめ、グラム陰性菌との形態的および構造的類似性を示す。それらは、代謝上不活性であるが感染力のある細胞外段階と、複製はするが感染力のない細胞内段階からなる独自の二相性生活環を有する偏性細胞内寄生体である。生活環の複製段階は感染した宿主細胞の細胞質からこの細菌を隔離する膜に結合した封入体内で起こる。

10

【0003】

肺炎クラミジア (*C. pneumonia*) は一般的なヒト病原体で、初めにオウム病クラミジア (*Chlamydia psittaci*) の TWAR 株として記載されていたが、その後は新種であると認識されている。肺炎クラミジアは他のクラミジア種 (トラコーマクラミジア (*C. trachomatis*)、C. ペコラム (*C. pecorum*) およびオウム病クラミジアとは抗原的、遺伝的および形態的に異なっている。それはトラコーマクラミジアまたはオウム病クラミジアといずれかと DNA 配列において 10% 以下の相同性しか示さない。

20

【0004】

C. ニューモニアはコミュニティ獲得性の肺炎の一般的な原因であり、肺炎球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) および肺炎マイコプラズマ (*Mycoplasma pneumoniae*) よりもわずかに低い頻度である (Grayston et al. (1995) *Journal of Infectious Diseases* 168:1231; Campos et al. (1995) *Investigation of Ophthalmology and Visual Science* 36:1477)。それはまた気管支炎および副鼻腔炎をはじめとする上気道症状および疾患を引き起こす (Grayston et al. (1990) *Journal of Infectious Diseases* 168:1231; Grayston et al. (1990) *Journal of Infectious Diseases* 161:618; Marrie (1993) *Clinical Infectious Diseases*, 18:501; Wang et al. (1986) *Chlamydial infectious*, Cambridge University Press, Cambridge, p.329)。大部分の成人集団 (60% を超える) は肺炎クラミジアに対する抗体を持っており (Wang et al. (1986) *Chlamydial infection*, Cambridge University Press, Cambridge, p.329)、これはまだ認識されていないか、または無症候性である過去の感染を示している。

30

【0005】

肺炎クラミジア感染は通常には急性呼吸器系疾患 (すなわち、咳、咽頭炎、嚔声、および発熱; 聴診での異常な胸部音) として示される。ほとんどの患者では咳が 2 ~ 6 週間持続し、回復が遅い。このようなケースの約 10% で、上気道感染の後に気管支炎または肺炎が起こる。さらに肺炎クラミジア流行の際には、次ぎにこれらの肺炎患者の約半数、特に虚弱者や高齢者で肺炎球菌の同時感染が認められた。上記で示されたように、肺炎クラミジア感染が呼吸器系感染以外の疾患にも関連するさらに多くの証拠がある。

40

【0006】

この生物の貯蔵庫はおそらくヒトである。オウム病クラミジアとは対照的に、鳥類または動物の貯蔵庫は知られていない。伝染については明らかには定義されていない。それは分泌物との直接的な接触、媒介物、または風媒拡散によると考えられる。長い潜伏期間があり、それは何ヶ月も持続する。流行の分析に基づけば、感染者はその生物の効率の悪い媒介者であるので、肺炎クラミジアはある集団にゆっくり拡散すると考えられる (患者から患者の間隔は平均 30 日)。肺炎クラミジア罹病率は普遍的である。小児期に最初に感染した後、成人期に再感染が起こる。肺炎クラミジアは、2 ~ 3 年持続する高い発病率 (流行病) 間隔を重ね合わせると著しくは世界中の伝染病であると考えられる。トラコーマクラミジア感染は肺炎クラミジアに対する交差免疫を付与しない。感染症は経口抗せ物質テ

50

トラサイクリンまたはエリスロマイシン(2g/d、少なくとも10~14日間)で容易に治療される。最近開発された薬剤アジスロマイジンはクラミジア感染症に対して単回投与として極めて有効である。

【0007】

ほとんどの場合、肺炎クラミジア感染は軽いことが多く、合併症もなく、感染症の90%までは亜急性であるか、認識されない。工業国の小児の間では感染は5才まではまれであると考えられていたが、最近の研究(E Normann et al, Chlamydia pneumoniae in children with acute respiratory tract infections, Acta Paediatrica, 1998, Vol 87, Iss 1, pp 23-27)では、この世代の子供の多くは血清反応陰性であるにもかかわらず感染のPCR証拠を示し、2~4才の17~19%有病率と見積もられることが報告されている。発展途上国では、幼児の間の肺炎クラミジア抗体の血清有病率は上昇し、肺炎クラミジアは急性下気道疾患、ならびに世界の熱帯地方の幼児および小児の死亡率の重要な原因であり得ると疑われる。

10

【0008】

血清有病率の研究および地方の流行病の研究によれば、肺炎クラミジアの一次感染は通常、5才から20才の間で起こる。米国では例えば、肺炎クラミジアによって引き起こされる毎年の小児肺炎の30,000症例であると見積もられる。感染は小児または若年(例えば、学生や徴兵)群の中で集団発生する。

【0009】

肺炎クラミジアはコミュニティ獲得性の下気道感染症の10~25%を起こす(スウェーデン、イタリア、フィンランドおよび米国から報告)。流行中、肺炎クラミジアは感染は肺炎の症例の50~60%にのぼると考えられる。このような期間にはまた、さらに肺炎球菌による混合感染があることが報告されている。

20

【0010】

成人期の再感染もよくあり、臨床徴候はより軽い傾向にある。集団血清有病率の研究に基づけば、年齢とともに曝露が増す傾向にあり、これは特にヒトにおいて明らかである。何人かの研究者が、持続性、無症候性の肺炎クラミジア感染状態がよくあることであると推測している。

【0011】

中年または高年者では、肺炎クラミジア感染は慢性気管支炎および副鼻腔炎へと進行する可能性がある。米国での研究は、60才より若い人において肺炎クラミジアによって引き起こされた発病率は年間1,000人につき1症例であるが、若年層では発病率は3倍に上昇していたことを明らかにした。肺炎クラミジア感染は病床中にある患者を除いては入院につながることはまれである。

30

【0012】

極めて重要なのは、アテローム性動脈硬化症と肺炎クラミジア感染との関連である。従来肺炎クラミジア感染と心臓発作、冠動脈疾患および頸動脈疾患との関係を示すいくつかの疫学研究がある(Saikku et al. (1988) *Lancet*; ii:983; Thom et al. (1992) *JAMA* 268:68; Linnanmaki et al. (1993), *Circulation* 87:1030; Saikku et al. (1992) *Annals Internal Medicine* 116:273; Melnick et al (1993) *American Journal of Medicine* 95:499)。さらに、この微生物は冠動脈、頸動脈、末梢動脈および大動脈のアテロームおよび脂肪索で検出されている(Shor et al. (1992) *South African Medical Journal* 82:158; Kuo et al. (1993) *Journal of Infectious Diseases* 167:841; Kuo et al. (1993) *Arteriosclerosis and Thrombosis* 13:1500; Campbell et al (1995) *Journal of Infectious Diseases* 172:585; Chiu et al. *Circulation*, 1997 (In Press))。種々の肺炎クラミジアは冠動脈および頸動脈から回収されている(Ramirez et al (1996) *Annals of Internal Medicine* 125:979; Jackson et al. Abst. K121, p272, 36th ICAAC, 15-18 Sept. 1996, New Orleans)。さらに肺炎クラミジアはウサギモデルにおけるアテローム性動脈硬化症の変化を誘導することが示されている(Fong et al (1997) *Journal of Clinical Microbiology* 35:48)。考え併せるとこれらの結果は、クラミジア性のアテローム性動脈硬

40

50

化症の疫学的重要性は依然証明されてはいないが、肺炎クラミジアがヒトにおいてアテローム性動脈硬化症を引き起こし得るという高い可能性があることを示している。

【 0 0 1 3 】

いくつかの最近の研究はまた、肺炎クラミジア感染と喘息との間の関連も示している。感染は喘鳴性の喘息性気管支炎、成人発症喘息および成人における喘息の急性再燃に結びつけられており、小規模研究では何人かで長期抗生物質治療が効果的にゆっくりと疾病の重篤度を軽減することが示されている(Hahn DL, et al. Evidence for Chlamydia pneumoniae infection in steroid-dependent asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 1998 Jan; 80(1): 45-49; Hahn DL, et al. Association of Chlamydia pneumoniae IgA antibodies with recently symptomatic asthma. *Epidemiol Infect.* 1996 Dec; 117(3): 513-517; Bjornsson E, et al. Serology of chlamydia in relation to asthma and bronchial hyperresponsiveness. *Scand J Infect Dis.* 1996; 28(1): 63-69; Hahn DL. Treatment of Chlamydia pneumoniae infection in adult asthma: a before-after trial. *J Fam Pract.* 1995 Oct; 41(4): 345-351; Allegra L, et al. Acute exacerbations of asthma in adults: role of Chlamydia pneumoniae infection. *Eur Respir J.* 1994 Dec; 7(12): 2165-2168; Hahn DL, et al. Association of Chlamydia pneumoniae (strain TWAR) infection with wheezing, asthmatic bronchitis, and adult-onset asthma. *JAMA.* 1991 Jul 10; 266(2): 225-230)。

10

【 0 0 1 4 】

これらの結果に照らして、肺炎クラミジア感染に対する防御ワクチンが極めて重要であると考えられる。いずれのヒトクラミジア感染にも有用なワクチンはまだない。有効なワクチンは物理的または化学的に不活化したクラミジアを用いて開発できると考えられる。しかしながらかかるワクチンは高い安全域がない。一般に、安全なワクチンはその微生物の遺伝子操作のよって弱毒化するか、または組換えによって作出される。従って、ヒトクラミジア感染に対する有効かつ安全なワクチンを作成する主な障壁は、クラミジア、特に肺炎クラミジアに関する遺伝情報が不十分であることであった。

20

【 0 0 1 5 】

肺炎クラミジアおよびオウム病クラミジアを用いた研究では、クラミジアに対する安全かつ有効なワクチンが達成可能な目標であることを示している。例えば、トラコーマクラミジアの肺感染から回復したマウスはその後の膣攻撃によって誘導される不妊症から保護される(Pal et al. (1996) *Infection and Immunity.* 64:5341)。同様に、不活化したオウム病クラミジアで免疫化したヒツジはその後のクラミジア誘発性の流産および死産から保護された(Jones et al. (1995) *Vaccine* 13:715)。クラミジア感染症からの保護はTh1免疫応答、特にINFγ(CD4+T細胞を産生する)の誘導と関連づけられている(Igietsemes et al. (1993) *Immunology* 5:317)。CD4+細胞系またはクローンの、ヌードマウスまたはSCIDマウスへの養子移入は攻撃または明らかな慢性疾患からの防御を付与し(Igietsemes et al (1993) *Regional Immunology* 5:317; Magee et al (1993) *Regional Immunology* 5: 305)、またCD4+T細胞のin vivo潤滑は攻撃後の疾病を悪化させた(Lander et al. (1991) *Infection & Immunity* 59:3774; Magee et al (1995) *Infection & Immunity* 63:516)。しかしながら、粘膜表面の十分高力価の中和抗体の存在も保護作用を発揮し得る(Cotter et al. (1995) *Infection and Immunity* 63:4704)。

30

40

【 0 0 1 6 】

肺炎クラミジア種内の抗原のバリエーションは遺伝情報が不十分であるために十分記載されていないが、バリエーションはトラコーマクラミジアに基づいて存在しているものと予測される。トラコーマクラミジアの血清学的亜型は主要外膜タンパク質(MOMP)における抗原バリエーションに基づいて定義されているが、公表されている肺炎クラミジアMOMP遺伝子配列はこの微生物のいくつかの異なる単離物の間ではダリエーションを示していない(Campbell et al (1990) *Infection and Immunity* 58:93; McCafferty et al (1995) *Infection and Immunity* 63:2387-9; Knudsen et al (1996) Third Meeting of the

50

European Society for Chlamydia Research, Vienna)。Melgosa et al. (Infect. Immun. 1994. 62:880)は、肺炎クラミジアの単一株から76 kDaの抗原をコードする遺伝子をクローニングすることを請求している。9 kDaおよび9 kDaのシステイン豊富な外膜タンパク質遺伝子を含むオペロンが記載されている(Watson et al., Nucleic Acids Res (1990) 18:5299; Watson et al., Microbiology (1995) 141:2489)。肺炎クラミジアに対する免疫血清によって認識される多くの抗原は総てのクラミジア間で保存されているが、98 kDa、76 kDaおよび他のいくつかのタンパク質は肺炎クラミジア特異的である可能性がある(Perez Melgosa et al., Infect. Immun. 1994. 62:880; Melgosa et al., FEMS Microbiol Lett (1993) 112:119; Campbell et al., J Clin Microbiol (1994) 32:583)。肺炎クラミジア血清型の数および相対頻度の評価、ならびに抗原の定義はまだ可能ではない。肺炎クラミジアCWL-029株の全ゲノム配列はすでに知られており(<http://chlamydia-www.berkeley.edu:4231/>)、さらなる配列が入手できるので、抗原バリエーションのよりよい理解が得られる。

10

【0017】

肺炎クラミジアに対して血清を免疫化することによって認識される多くの抗原は総てのクラミジアにわたって保存されているが、98 kDa、76 kDaおよび54 kDaタンパク質は肺炎クラミジア特異的であると思われる(Campos et al. (1995) Investigation of Ophthalmology and Visual Science 36: 1477; Marrie (1993) Clinical Infectious Diseases, 18:501; Wiedmann-Al-Ahmad M, et al. Reactions of polyclonal and neutralizing anti-p54 monoclonal antibodies with an isolated, species-specific 54-kilodalton protein of Chlamydia pneumoniae, Clin Diagn Lab Immunol. 1997 Nov; 4(6): 700-704)。

20

患者由来の血清による単離物の免疫プロットティングは、単離物間でプロットティングパターンにバリエーションがあることを示し、血清型肺炎クラミジアが存在し得ることを示している(Grayston et al. (1995) Journal of Infectious Diseases 168:1231; Ramirez et al. (1996) Annals of Internal Medicine 125:979)。しかしながらこの結果は、患者の血清の免疫プロットプロフィールが感染後経時的に変化するので、患者の感染状態によって混乱しているかもしれない。血清型の数および相対頻度の評価、ならびに抗原の定義は依然として可能ではない。

【0018】

従って、クラミジア感染を予防および治療するのに用いられる治療する肺炎クラミジアのポリヌクレオチド配列を同定および単離する必要性がある。

30

【0019】

【発明の概要】

本発明は、クラミジア感染を予防、治療または診断する方法に使用できる、クラミジアポリペプチド指定76 kDaタンパク質(配列番号1)をコードする精製および単離されたポリヌクレオチド分子を提供する。本発明の一つの形態では、ポリヌクレオチド分子は配列番号2のポリペプチドをコードするDNAである。

【0020】

本発明のもう一つの形態は単離されたDNA分子に対応するポリペプチドを提供する。対応するコードペプチドのアミノ酸配列は配列番号2で示されている。

40

【0021】

本発明のもう一つの形態は末端切断型DNAに対応する末端切断型ポリペプチドを提供する。一つの実例では、末端切断型ヌクレオチドおよびアミノ酸配列はそれぞれ配列番号3および4で示されている。もう一つの実例では、末端切断型ヌクレオチドおよびアミノ酸配列はそれぞれ配列番号5および6で示されている。

【0022】

Melgosa et al.は肺炎クラミジアから76 kDaタンパク質をクローニングし、Melgosa et al.によって報告されているように公開されている肺炎クラミジアのゲノム配列(<http://chlamydia-www.berkeley.edu:4231/>)と遺伝子配列を比較し、これにより実際にこの領

50

域のゲノム配列が、5'部分と3'部分に少なくとも二つのオープンリーディングフレーム(ORF)を含んでいることが明らかになったことを報告している。Melgosa et al.によって報告された配列は5'ORFの5'末端のフレーム内融合したものである。このようにMelgosaの推定タンパク質は単に76kDa融合タンパク質に過ぎず、種々の肺炎クラミジア単離物からの免疫プロットングによって見られる76kDaタンパク質でない。これに対し、本発明の76kDaタンパク質はゲノムのこの領域の3'ORFによってコードされている全長タンパク質である。注目すべきは、このゲノム配列のさらなる解析(<http://chlamydia-www.berkeley.edu:4231/>)により、5'ORFの開始コドンの上流にある少なくとも一つのフレーム内ATGが明らかとなることであり、このことはその5'ORFが一以上のより大きなORFの一部をないしている可能性があることを示唆している。

10

【0023】

当業者ならば、クラミジア76kDaタンパク質をコードするポリヌクレオチド配列を提供する限り、本発明はまたかかるポリペプチドに由来する断片をコードするポリヌクレオチドを提供することが分かるであろう。さらに、本発明は、本明細書に記載の非必須アミノ酸の付加、欠失または置換によって生じるかかるペプチドおよびそれらに由来する断片の変異体および誘導体、ならびにを提供するものと理解される。当業者ならば、本発明はクラミジアポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列が提供される限り、さらにかかるポリペプチドと特異的に結合する単一特異性抗体を提供することが容易に分かるであろう。

20

【0024】

本発明は広い応用を有し、発現カセット、ベクターおよび本発明のポリヌクレオチドで形質転換またはトランスフェクトされた細胞を含む。従って、本発明はさらに(i)組換え宿主系において本発明のポリペプチドを製造する方法、ならびに関連の発現カセット、ベクター、および形質転換またはトランスフェクト細胞；(ii)希釈剤または担体と組み合わせた、本発明のポリヌクレオチドを含有するワクチン、またはボックスウイルス、ネズミチフス菌(*Salmonella typhimurium*)またはコレラ菌(*Viblerae cholerae*)ベクターなどの生ワクチン(かかるワクチンおよびワクチンベクターは、例えばクラミジア感染を予防および治療するのに有用である)、ならびに関連の医薬組成物および関連の治療および/または予防方法；(iii)裸の形態もしくは送達ビヒクルと配合した本発明のRNAまたはDNA分子、本発明のポリペプチドもしくはポリペプチドの組合せ、または単一特異性抗体、ならびに関連の医薬組成物の治療的および/または予防的使用；(iv)DNAまたはRNA分子、単一特異性抗体、または本発明のポリペプチドの使用を含み得る、生物学的サンプルにおけるクラミジアの存在の診断方法；および(v)抗体に基づくアフィニティークロマトグラフィーによる本発明のポリペプチドの精製方法を提供する。

30

【0025】

【発明の具体的説明】

本発明の具体例である以下の配列を参照しながら本発明を説明する。

配列番号1は76kDaタンパク質遺伝子の全長配列である。

配列番号2は76kDaタンパク質の推定全長アミノ酸配列である。

40

配列番号3は76kDaタンパク質遺伝子の5'末端切断型ヌクレオチド配列である。

配列番号4は76kDaタンパク質の5'末端切断型アミノ酸配列である。

配列番号5は76kDaタンパク質遺伝子の3'末端切断型ヌクレオチド配列である。

配列番号6は図9のpCAD76kDaによる免疫防御の基礎をなす76kDaタンパク質の3'末端切断型アミノ酸配列である。

配列番号7は末端切断型76kDaタンパク質を含むポリペプチドをコードする配列である。この配列を鋳型として用い、断片をPCR増幅して構築物pCAD76kDaの一部を形成する。

配列番号8はpCAD76kDaから発現させた場合の末端切断型76kDaタンパク質の推定アミノ酸配列である。

50

配列番号 9 は全長 76 kDa タンパク質遺伝子をクローニングし、さらに pCACPNM555a の全長 76 kDa タンパク質遺伝子を増幅するために用いられる 5' プライマーである。

【0026】

配列番号 10 は全長 76 kDa タンパク質遺伝子をクローニングし、さらに pCACPNM555a の全長 76 kDa タンパク質遺伝子を増幅するために用いる 3' プライマーである。

配列番号 11 は pCAI555 の 5' 末端切断型 76 kDa タンパク質遺伝子を増幅するために用いる 5' プライマーである。

配列番号 12 は pCAI555 の 5' 末端切断型 76 kDa タンパク質遺伝子断片を増幅するために用いる 3' プライマーである。

配列番号 13 は pCAD76kDa の 3' 末端切断型 76 kDa タンパク質遺伝子を増幅するために用いる 5' プライマーである。

配列番号 14 は pCAD76kDa の末端切断型 76 kDa タンパク質遺伝子断片を増幅するために用いる 3' プライマーである。

【0027】

クラミジア 76 kDa 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 (ORF) は肺炎クラミジアゲノムから同定されてものである。このタンパク質をコードする遺伝子およびその断片を発現プラスミドに挿入したところ、クラミジア感染に対する免疫防御が付与されることが示された。従ってこの 76 kDa タンパク質および関連のポリペプチドを用いてクラミジア感染を予防および治療することができる。

【0028】

本発明の第一の態様によれば、クラミジアポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチドを提供し、そのアミノ酸配列は配列番号 2、4 および 6 で示されている。

【0029】

「単離されたポリヌクレオチド」とは、天然に存在する環境から取り出されたポリヌクレオチドと定義される。例えば生細菌のゲノム中、または遺伝子バンクの一部として存在する天然 DNA 分子は単離されないが、細菌ゲノムの残存部分から同分子は分離される、例えばクローニング (増幅) の結果として単離される。典型的には単離された DNA 分子は天然に存在するゲノムの 5' または 3' 末端にすぐ隣接する DNA 領域 (例えばコドン領域) から遊離している。かかる単離ポリヌクレオチドはベクターまたは組成物の一部であってもよいが、かかるベクターまたは組成物がかかるポリヌクレオチドの自然環境の一部ではないということから「単離された」と定義される。

【0030】

本発明のポリヌクレオチドは RNA または DNA (cDNA、ゲノム DNA または合成 DNA) のいずれか、またはその改変体、変異体、相同体もしくは断片である。DNA は二本鎖または一本鎖のいずれかであり、一本鎖であれば、コード鎖または非コード (アンチセンス) 鎖のいずれかである。配列番号 1、3 または 5 で示される本発明のポリペプチドをコードする配列のいずれか 1 つが、(a) コード配列、(b) (a) の転写により誘導されるリボヌクレオチド配列、または (c) 遺伝子コードの重複または縮重により同じポリペプチドをコードするコード配列である。「ポリペプチド」または「タンパク質」とは、長さまたは翻訳後修飾 (例えばグリコシル化またはリン酸化) にかかわらず、いずれのアミノ酸鎖をも意味する。本願では両用語を相互に使用してもよい。

【0031】

本発明の第一の態様によれば、配列番号 2、4 または 6 と相同なアミノ酸配列が提供される。本明細書において使用される「相同アミノ酸配列」とは、臨界融解温度 (T_m) を超えない 25 ~ 35 において、配列番号 1、3 または 5 の核酸配列のいずれの部分ともハイブリダイズする核酸配列によって総てまたは一部がコードされるいずれかのポリペプチドである。相同アミノ酸配列は配列番号 2、4 または 6 で示されるアミノ酸配列と 1 つ以上の保存的アミノ酸置換に関して異なるものである。またかかる配列は血清型変異体 (下

10

20

30

40

50

記)ならびに免疫原性などのポリペプチド本来の特徴を維持する、欠失または挿入を含む配列も包含する。かかる配列は配列番号2、4または6と好ましくは少なくとも75%、さらに好ましくは80%、および最も好ましくは90%同一である。

【0032】

相同アミノ酸配列には配列番号2、4または6と同一または実質的に同一の配列が挙げられる。「実質的に同一のアミノ酸配列」とは、参照アミノ酸配列と少なくとも90%、好ましくは95%、さらに好ましくは97%、および最も好ましくは99%同一であり、かつ好ましくは参照配列と大部分の保存的アミノ酸置換に関して異なる配列を意味する。

【0033】

保存的アミノ酸置換は同種類のアミノ酸間の置換である。これらの種類には、例えばアスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、およびチロシンのような非荷電極性側鎖を有するアミノ酸；リジン、アルギニン、およびヒスチジンのような塩基性側鎖を有するアミノ酸；アスパラギン酸、およびグルタミン酸のような酸性側鎖を有するアミノ酸；およびグリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン、およびシステインのような非極性側鎖を有するアミノ酸が挙げられる。

【0034】

相同性は、Genetics Computer Group, University of Wisconsin Biotechnology Center, 1710 University Avenue, Madison, WI 53705のSequence Analysis Software Packageのような配列解析ソフトウェアを用いて求められる。アミノ酸配列を同一性が最大となるように配列する。配列に人為的にギャップを挿入し適当な配列を得てもよい。ひと度最適なアライメントが設定されれば、全位置数に対し、両配列のアミノ酸が一致する位置を総て記録することにより相同性の程度が確認される。

【0035】

同様に相同ポリヌクレオチド配列も定義される。相同配列はコード配列配列番号1、3または5と好ましくは少なくとも45%、さらに好ましくは60%、および最も好ましくは85%同一のものである。

【0036】

本発明の第一の態様によれば、配列番号2、4または6と相同な配列を有するポリペプチドには、天然に存在する対立遺伝子変異体、ならびに配列番号2、4または6のポリペプチド本来の特徴を維持する変異体または天然には存在しないいずれの他の変異体も包含される。

【0037】

当技術分野では公知であるように、対立遺伝子変異体はポリペプチドの生物学的機能を変更しない、1つ以上のアミノ酸の置換、欠失または付加を有することを特徴とするポリペプチドのもう一つの形態である。「生物学的機能」とは、たとえその機能が細胞の増殖または生存に必要でなくとも、それが天然に存在する細胞におけるポリペプチドの機能を意味する。例えばポーリンの生物学的機能は細胞外媒質に存在する化合物を細胞へ侵入させることである。生物学的機能は抗原性特性とは性質が異なる。ポリペプチドは1以上の生物学的機能を有し得る。

【0038】

対立遺伝子変異体は本来極めて一般的なものである。例えば肺炎クラミジアなどの細菌種は通常対立遺伝子の小さな変化に関し互いに異なる種々の株で表される。実際、異なる株において同じ生物学的機能を果たすポリペプチドはそれぞれの株で同一でないアミノ酸配列(およびポリヌクレオチド配列)を有していてもよい。この変動にかかわらず、一般に多くの対立遺伝子変異体に対して向けられた免疫応答が実証されている。クラミジアMOMP抗原の研究では、株間のMOMPのアミノ酸配列の変化にかかわらず、雑種株抗体結合が起こるとともに感染力の中和がなされ、免疫原として用いた際に、MOMPがアミノ酸変化を許容することが示される。

【0039】

相同ポリペプチドまたは対立遺伝子変異体をコードするポリヌクレオチドは、常法により抽出されたゲノム細菌DNAのポリメラーゼ鎖反応（PCR）増幅法によって回収される。これにはコードドメインの5'および3'末端の上流および下流に適合する合成オリゴヌクレオチドプライマーの使用が含まれる。好適なプライマーは配列番号1、3または5で提供されるヌクレオチド配列情報により設計される。その工程は次の通りである：10～40個、好ましくは15～25個のヌクレオチドからなるプライマーを選択する。効率的なハイブリダイゼーションを確実にするのに十分な比率でCおよびGを含有する、すなわちCおよびGヌクレオチド量が全ヌクレオチド含量の少なくとも40%、好ましくは50%である、プライマーを選択することが有利である。標準的なPCR反応は典型的には100μLにつき0.5～5単位のTaqDNAポリメラーゼ、各20～200μMのデオキシヌクレオチド（好ましくは同濃度）、全デオキシヌクレオチド濃度にわたって0.5～2.5mM、 $10^5 \sim 10^6$ の標的分子、および約20pmolの各プライマーを含む。PCRサイクル約25～50回を行い、アニーリング温度をプライマーの真のTmより15～5低い温度とする。よりストリンジентなアニーリング温度にすると誤ってアニーリングしたプライマーの識別が向上し、プライマーの3'末端への誤ったヌクレオチドの組み込みが少なくなる。変性温度は95～97が典型であるが、G+C豊富な標的の変性についてはより高い温度が適当であろう。実施するサイクル数は最初の標的分子の濃度にもよるが、典型的には特異的でないバックグラウンド産物が集積する傾向にあるので、40サイクルを超えない方がよい。

10

【0040】

20

相同ポリペプチドまたは対立遺伝子変異体をコードするポリヌクレオチドを回収する別法としては、DNAまたはRNAライブラリーのハイブリダイゼーションスクリーニングによるものがある。ハイブリダイゼーション手順は当技術分野では十分に知られており、Ausubel et al., (Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons Inc., 1994), Silhavy et al. (Silhavy et al. Experiments with Gene Fusions, Cold Spring harbor Laboratory Press, 1994)、およびDavis et al. (Davis et al. A Manual for Genetic Engineering: Advanced Bacterial Genetics, Cold Spring harbor Laboratory Press, 1980)に記載されている。ハイブリダイゼーション条件を至適化する重要なパラメーターは、その温度を超えると2本の相補DNA鎖が互いに分離する臨界融解温度を得るのに用いる式で表される(Casey & Davidson, Nucl. Acid Res. (1977) 4: 1539)。約600個以上のヌクレオチドでなるポリヌクレオチドの場合、この式は次の通りである：

30

$$T_m = 81.5 + 0.41x(\%G+C) + 16.6 \log(\text{陽イオン濃度}) - 0.63x(\% \text{ホルムアミド}) - 600 / \text{塩基数}$$

【0041】

好適なストリンジент条件下では、ハイブリダイゼーション温度（Th）は約20～40、20～25、または好ましくは計算値Tmを超えない30～40である。最適温度および塩条件が容易に求め得ることは当業者には明らかであろう。

【0042】

本発明のポリヌクレオチドに関しては(i)42で4～16時間以内、6×50%ホルムアミド含有SSCにおける、または(ii)65で4～16時間以内、6×SSC水溶液（1M NaCl、0.1Mクエン酸ナトリウム（pH7.0））における、プレハイブリダイゼーションおよびハイブリダイズインキュベーション双方の間にストリンジент条件に達する。

40

【0043】

典型的には、ハイブリダイゼーション実験は60～68、例えば65で行われる。このような温度では、ストリンジентなハイブリダイゼーション条件は6×SSC、好ましくは2×SSCまたは1×SSC、より好ましくは0.5×SSC、0.3×SSCまたは0.1×SSC（ホルムアミドの不在下）行うことができる。1×SSCは0.15M NaClおよび0.015Mクエン酸ナトリウムを含む。

50

【0044】

天然には存在しない有用な相同体およびその断片は、アミノ酸配列変化および/または欠失を許容すると思われる抗原の領域を同定する公知の方法を用いて設計される。例として、異なる種由来の相同ポリペプチドを比較し、保存された配列を同定することを挙げる。さらに分岐した配列が最も配列変化を許容すると考えられる。配列間の相同性は例えば *Altschul et al., Nucleic Acids Res.*; 25:3389-3402 (1997) の B L A S T 相同性検索アルゴリズムを用いて解析すればよい。あるいは、コンピューターによって支援される可能性のある T または B 細胞エピトープの解析に基づいて配列が T および/または B 細胞とより高い反応性を有するように改変する。さらにもう 1 つの別法では、*in vitro* においてポリペプチド内のある特定のアミノ酸残基または配列を変異させ、次いでその変異ポリペ

10

【0045】

当業者ならば、本発明のスクリーニングプロセスに従うことによって配列番号 2、4 または 6 のある特定の相同体がクラミジア感染症の予防または治療に有用であるかを過度な実験を行うことなく求められることが容易に理解されるであろう。

【0046】

スクリーニング手順は

(i) 動物、好ましくはマウスを試験相同体または断片により免疫化し;

(ii) 免疫化した動物にクラミジアを接種し; さらに

(iii) クラミジアに対する感染防御を付与するそれらの相同体または断片を選択する工程を含んでなる。

20

【0047】

「感染防御を付与する」とは、試験相同体または断片で免疫化していない対照動物と比べた場合のクラミジア感染症のいずれかの影響の重篤度の軽減を意味する。

【0048】

本発明の第一の態様によれば、配列番号 2、4 または 6 の部分配列、配列番号 2、4 または 6 と相同なポリペプチド配列の部分配列、内部欠失により全長ポリペプチドから誘導されたポリペプチド、および融合タンパク質であるポリペプチド誘導体が提供される。

【0049】

タンパク質に対する免疫応答を誘導するのに必要とされるものは総てタンパク質の小さな (例えば 8 ~ 10 個のアミノ酸) 免疫原性領域であるため、ワクチンとしてタンパク質免疫原の断片および変異体を使用することは免疫学の分野では一般に認められた慣例である。クラミジア以外の病原体の表面に曝された抗原に対応する種々の短い合成ペプチドがそれぞれの病原体、例えばネズミ乳癌ウイルスの 11 残基ペプチド (*Casey & Davidson, Nucl. Acid Res.* (1977) 4:1539)、セムリキ森林ウイルスの 16 残基ペプチド (*Snijders et al., J.Gen.Virol.* 72:557-565)、およびイヌパルボウイルス由来の 15 残基各々の 2 つの重複ペプチド (*Langeveld et al., Vaccine* 12(15):1473-1480, 1994) に対する有効なワクチン抗原であることが分かっている。

30

【0050】

従って本記載により、配列番号 2、4 または 6 の部分配列またはその相同アミノ酸配列が全長配列固有のものであり、本発明により教示されることは当業者には容易に理解されるであろう。かかるポリペプチド断片の長さは少なくとも 12 個のアミノ酸であることが好ましい。それらの長さが少なくとも 20 個のアミノ酸、好ましくは少なくとも 50 個のアミノ酸、および、さらに好ましくは少なくとも 75 個のアミノ酸、およびさらに好ましくは少なくとも 100 個のアミノ酸であることが有利である。

40

【0051】

配列番号 2、4 または 6 と相同な配列の部分配列をコードする 30 ~ 600 個のヌクレオチドからなるポリヌクレオチドは、以下に概略を記したパラメーターを用い、かつ増幅される断片の 5' および 3' 末端の上流および下流の配列に適合するプライマーを使用する

50

PCR増幅法により回収される。かかる増幅物の鋳型ポリヌクレオチドは配列番号1、3または5と相同な全長ポリヌクレオチド、またはDNAまたはRNAライブラリーなどのポリヌクレオチド混合物に含まれるポリヌクレオチドのいずれかである。部分配列を回収する別法としては、上記の条件下において T_m の計算式を用いてスクリーニングハイブリダイゼーションを行う。30~600個のヌクレオチドからなる断片を回収する場合、計算値 T_m を減法(600/塩基対のポリヌクレオチドサイズ)により補正し、ストリンジェント条件を T_m を超えない5~10であるハイブリダイゼーション温度で定義する。20~30塩基より短いオリゴヌクレオチドを得る場合、 T_m の計算式は次の通りである： $T_m = 4 \times (G + C) + 2 \times (A + T)$ 。例えば、50% C + Gの18個のヌクレオチド断片は約54の T_m を有するであろう。配列番号2、4または6の断片またはその相同配列である短いペプチドは化学合成(E. Gross and H. J. Meinhofer, 4 The Peptides: A analysis, Synthesis, Biology; Modern Techniques of Peptide Synthesis, John Wiley & Sons (1981)、およびM. Bodanzki, Principles of Peptide Synthesis, Springer-Verlag (1984))により直接得られる。

10

【0052】

有用なポリペプチド誘導體、例えばポリペプチド断片をアミノ酸配列のコンピューター支援解析を用いて設計する。これにより表面に曝された有望な抗原性領域が同定されよう(Hughes et al., 1992. Infect. Immun. 60(9):3497)。プログラムSEQSEE(Wishart DS, et al., "SEQSEE: タンパク質配列解析に適した総合プログラム" Comput Appl Biosci. 1994 Apr; 10 (2): 121-32)を使用する、産物の順応性および疎水性に基づく配列番号2、4または6にある6個のアミノ酸配列の解析では、有用な免疫原性断片および変異体を選択する基準として使用してもよい、可能性あるBおよびT細胞エピトープが明らかとなり得る。この解析では抗体により認識されると考えられる外面特徴の適当な組合せを使用する。HLA-A0201 MHCサブクラスの有望なT細胞エピトープがNIHで開発されたアプローチとエミュレートする、アルゴリズムにより明らかにすることができる(Parker KC, et al. "Peptide binding to MHC class I molecules: implications for antigenic peptide prediction." Immunol Res 1995; 14 (1) 34-57)。

20

【0053】

感染防御T細胞依存性免疫応答を誘導するエピトープはポリペプチドの長さの範囲全体に存在する。しかしながら、いくつかのエピトープはポリペプチドの2次および3次構造によりマスクされる。かかるマスクされたエピトープを明らかにするため、大きな内部欠失を引き起こし、それによってもとのタンパク質構造の大部分を取り除いてマスクされたエピトープを露出させる。かかる内部欠失は時に株間の高変異性の免疫優性領域を取り去るという付加的な利点をもたらす。

30

【0054】

ポリペプチド断片をコードするポリヌクレオチドおよび大きな内部欠失を有するおよびポリペプチドを常法により構築する(Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons Inc., 1994)。かかる方法には標準PCR、逆PCR、クローニングしたDNA分子の制限酵素処理、またはKunkel et al.(Kunkel et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1985) 82:448)の方法が挙げられる。これらの方法の成分およびその使用説明書はStratageneなどの様々な販売元から容易に入手可能である。ひと度欠失変異体を構築すれば、それらを上記のようにクラミジア感染症を予防または治療する能力について調べる。

40

【0055】

本明細書において使用される「融合ポリペプチド」は、他のいずれかのポリペプチドとNまたはC末端で融合した本発明のポリペプチドまたはポリペプチド誘導體を含有するものである(以後ペプチドテールと記す)。かかる融合ペプチドを得る簡便な方法はポリヌクレオチド配列のインフレーム融合物、すなわちハイブリッド遺伝子の翻訳による。融合ポリペプチドをコードするハイブリッド遺伝子を発現ベクターに挿入し、それを用いて宿主細胞を形質転換またはトランスフェクトする。そうでなければ、ポリペプチドまたはポ

50

リペプチド誘導体をコードするポリヌクレオチド配列を、ペプチドテールをコードするポリヌクレオチドが既に存在する発現ベクターに挿入する。かかるベクターおよびその使用説明書は商業的に入手可能である、例えばペプチドテールがマルトース結合タンパク質である、New England Biolabsの p M a l - c 2 または p M a l - p 2 系、Pharmaciaのグルタチオン - S - トランスフェラーゼ系、またはNovagenから入手可能な H i s - T a g 系。これらおよび他の発現系により本発明のポリペプチドおよび誘導体のさらなる単離のための便宜な手段が提供される。

【 0 0 5 6 】

融合ポリペプチドの有利な例としては、本発明のポリペプチドまたは相同体もしくは断片と、コレラ毒素または大腸菌(*E. coli*)易熱性毒素のいずれかのサブユニットBのようなアジュバント活性を有するポリペプチドとを融合したものである。もう一つの有利な融合物はポリペプチド、相同体または断片と、強力なT細胞エピトープまたはB細胞エピトープとを融合したものである。かかるエピトープは当技術分野で公知のもの(例えば、B型肝炎コア抗原、D. R. Millich et al., "Antibody production to the nucleocapsid and envelope of the Hepatitis B virus primed by a single synthetic T cell site", *Nature*. 1987. 329: 547-549)、または、可能性のあるTまたはB細胞のコンピュータ補助分析に基づく本発明のもう一つのポリペプチドにおいて同定されたものであってよい。本発明のこの態様に従い、融合ポリペプチドは配列番号2、4または6、またはその相同体もしくは断片由来のTまたはB細胞エピトープを含んでなる(ここで、エピトープはそのポリペプチドまたは相同体もしくは断片の多様な変異体から誘導され、各々のエピトープはそのエピトープのポリペプチド内の位置および配列において他とは異なっている)。かかる融合物は全ポリペプチド、相同体または断片に対するTまたはB細胞応答を最適にするため、それはクラミジア感染症の予防および治療に有効である。

【 0 0 5 7 】

融合を達成するために、本発明のポリペプチドと、アジュバント活性を有するポリペプチドのN、または好ましくはC末端、またはTもしくはB細胞エピトープとを融合する。そうでなければ、本発明のポリペプチド断片をアジュバント活性を有するポリペプチドのアミノ酸配列内に挿入する。またTまたはB細胞エピトープを本発明のポリペプチドのアミノ酸配列内に挿入してもよい。

【 0 0 5 8 】

第一の態様によれば、本発明のポリヌクレオチドは異種シグナルペプチドを含有する、本発明のポリペプチドへと成熟するハイブリッド前駆体ポリペプチドもコードする。「異種シグナルペプチド」とは、本発明のポリペプチドの天然に存在する前駆体には見られないシグナルペプチドを意味する。

【 0 0 5 9 】

RNA、DNA、または改変体もしくはその組合せを包含する本発明のポリヌクレオチド分子は多方面に適用される。DNA分子は例えば(i)組換え宿主系においてコードされたポリペプチドを生産するプロセスにおいて、(ii)クラミジア感染症を予防および/または治療する方法および組成物においてさらに用いられる、ポックスウイルスなどのワクチンベクターの構築において、(iii)裸の形態で、または送達ビヒクルと配合したワクチン薬剤として(RNA分子と同様)、および(iv)本発明のポリヌクレオチドを過剰発現できる、またはそれを無毒性、変異型で発現する弱毒クラミジア株の構築において用いられる。

【 0 0 6 0 】

従って、本発明の第二の態様は、(i)発現に必要なエレメントの制御下、特に適当なプロモーターの制御下に置かれた本発明のDNA分子を含有する発現カセット；(ii)本発明の発現カセットを含有する発現ベクター；(iii)本発明の発現カセットおよび/またはベクターで形質転換またはトランスフェクトした原核生物または真核生物細胞、ならびに(iv)本発明のDNA分子の発現を可能にする条件下において、本発明の発現カセットおよび/またはベクターで形質転換またはトランスフェクトした原核生物または真核生物

10

20

30

40

50

細胞を培養し、細胞培養物からコードされたポリペプチドまたはポリペプチド誘導体を回収することを含む、本発明のポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチドまたはポリペプチド誘導体を生産する方法を含む。

【0061】

組換え発現系は原核生物および真核生物宿主から選択される。真核生物宿主には、酵母細胞（例えばサッカロミセス・セレビスエ(*Saccharomyces cerevisiae*)またはピキア・パストリス(*Pichia pastoris*)）、哺乳類細胞（例えばC O S I、N I H 3 T 3、またはJ E G 3細胞）、節足動物細胞（例えばスポドプテラ・フルギペルダ(*Spodoptera frugiperda*) (S F 9)細胞)、および植物細胞が挙げられる。好ましい発現系としては大腸菌のような原核生物宿主がある。当業者には細菌および真核生物細胞は商業的供給者をはじめいくつもの異なる供給者、例えばAmerican Type Culture Collection (ATCC; Rockville, Maryland)から入手可能である。組換えタンパク質発現に用いる細胞の商業的供給者は細胞の使用説明書も提供する。

10

【0062】

発現系の選択は発現されるポリペプチドに望まれる特徴によって異なる。例えば、特定の脂質化形態(lipidated form)または他のいずれかの形で本発明のポリヌクレオチドを生産するのが有用であると考えられる。

【0063】

総てのベクターおよび発現制御配列ならびに宿主が本発明のポリヌクレオチドを等しく十分に発現するとは考えられないことは当業者には容易に理解されるであろう。しかしながら、下記の指針により、過度な実験を行うことなく、かつ本発明の範囲を逸脱することなく、ベクター、発現制御配列および宿主が選択できよう。

20

【0064】

ベクターを選択する場合、そこに存在し、かつ可能な限り複製し得るベクターと適合する宿主を選択する必要がある。ベクターコピー数、コピー数を調節する能力、抗生物質耐性などの他のタンパク質の発現が考慮される。発現制御配列を選択する場合、いくつかの変数が考慮される。重要な変数には配列の相対強度（例えば、種々の条件下において発現を駆動する能力）、配列の機能を調節する能力、発現されるポリヌクレオチドと制御配列間の適合性（例えば二次構造は効率的な転写を妨げるヘアピン構造を回避すると考えられる）がある。宿主を選択する場合、所望のコンホメーションで産物を発現でき、スケールアップが容易で、さらにそれが最終産物の精製を容易にすることが望むならば、選択されたベクターと適合し、発現産物のいずれかの起こりうる有毒作用に耐性であり、発現産物を効率的に分泌できる単細胞宿主を選択する。

30

【0065】

発現カセットの選択は発現されるポリペプチドに望まれる特徴だけでなく選択される宿主系にもよっても異なる。典型的には発現カセットは選択された宿主系において機能し得るものであり、かつ構成的または誘導性であり得るプロモーター；リボソーム結合部位；要すれば開始コドン（A T G）；シグナルペプチド、例えば脂質化(lipidation)シグナルペプチドをコードする領域；本発明のDNA分子；停止コドン；および所望により3'末端領域（翻訳および/または転写ターミネーター）を含む。シグナルペプチドコード領域は本発明のポリヌクレオチドに隣接し、適当なリーディングフレームに存在する。シグナルペプチドコード領域は成熟ポリペプチドをコードするDNA分子と相同または異種であり、発現に用いられる宿主の分泌機構と適合する。本発明のDNA分子により単独またはシグナルペプチドとともに構成されるリーディングフレームは転写および翻訳が宿主系において起こるようにプロモーターの制御下に置かれる。プロモーターおよびシグナルペプチドコード領域は広く知られており、当業者ならば入手可能である。例えばアラビノースにより誘導可能であり（プロモーター a r a B）かつ大腸菌などのグラム陰性菌において機能し得る、ネズミチフス菌(*Salmonella typhimurium*)（および誘導体）のプロモーター（米国特許第5,028,530号およびCagnon et al., (Cagnon et al., Protein Engineering (1991) 4(7):843)に記載）；T7ポリメラーゼを発現する数多くの大腸菌株におい

40

50

て機能し得る、RNAポリメラーゼをコードするバクテリオファージT7遺伝子のプロモーター（米国特許第4,952,496号に記載）；OspA脂質化シグナルペプチド；およびRlpB脂質化シグナルペプチド(Takase et al., J. Bact. (1987) 169:5692)が挙げられる。

【0066】

典型的には発現カセットは選択された発現系で複製する能力が選択される発現ベクターの一部である。発現ベクター（例えばプラスミドまたはウイルスベクター）は、例えばPouwels et al. (Cloning Vectors: A Laboratory Manual 1985, Supp. 1987)に記載されるものから選択することができる。好適な発現ベクターは商業的供給者から購入することができる。

10

【0067】

宿主細胞を発現ベクターで形質転換/トランスフェクトする方法は当技術分野では十分に公知であり、Ausubel et al., (Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons Inc., 1994)に記載されるように選択した宿主系によって異なる。

【0068】

発現の際、本発明の組換えポリペプチド（またはポリペプチド誘導体）は生産され細胞内コンパートメントに留まり、細胞外媒質または原形質膜空間に分泌/放出されるか、または細胞膜に埋め込まれる。ポリペプチドは組換え細胞培養物の遠心分離後の細胞抽出物からまたは上清から実質的に精製された形で回収される。典型的には組換えポリペプチドは抗体に基づくアフィニティー精製により、またはポリペプチドまたはその誘導体をコードするポリヌクレオチドとアフィニティー結合小ドメインとの融合などの当業者によって容易に適合できる十分に公知な他の方法により精製する。本発明のポリペプチドを免疫アフィニティーにより精製するのに有用な抗体は下記のようにして得られる。

20

【0069】

本発明のポリヌクレオチドはまたワクチンとしても有用である。遺伝子送達ビヒクル（生ワクチンベクター）としてウイルスまたは細菌宿主を用いるか、または遺伝子を遊離型で、例えばプラスミドに挿入して投与するかの2つの主要な経路がある。本発明のポリヌクレオチドの治療または予防効力は下記のようにして評価される。

【0070】

従って、本発明の第三の態様によれば、(i) 発現に必要なエレメントの制御下に置かれた本発明のDNA分子を含有するポックスウイルスなどのワクチンベクター；(ii) 本発明のワクチンベクターとともに希釈剤または担体を含んでなる材料の組成物；とりわけ(iii) 治療または予防上有効な量の本発明のワクチンベクターを含有する医薬組成物；(iv) 哺乳類に免疫原性上有効な量の本発明のワクチンベクターを投与してクラミジアに対する感染防御または治療免疫応答を誘導することを含む、哺乳類（例えばヒト）のクラミジアに対する免疫応答を誘導する方法；またこの方法は動物（例えばネコまたは鳥）のクラミジア感染症を治療または予防する獣医学的適用に用いることができる；さらに詳しくは(v) 感染した個体に予防または治療量の本発明のワクチンベクターを投与することを含む、クラミジア（例えばC. トラチョマチス(C. trachomatis)、C. プシタチ(C. psittaci)、肺炎クラミジア、C. ペコラム(C. pecorum)）感染症を予防および/または治療する方法が提供される。さらに本発明の第三の態様によれば、クラミジア感染症を予防および/または治療する医薬の製造における本発明のワクチンベクターの使用が含まれる。

30

40

【0071】

本明細書において、ワクチンベクターは本発明の1つまたはいくつかのポリペプチドまたは誘導体を発現する。ワクチンベクターはさらに免疫応答を増大する（アジュバント効果）インターロイキン-2(IL-2)またはインターロイキン-12(IL-12)などのサイトカインを発現すると考えられる。発現される各成分が哺乳類細胞における発現に必要なエレメントの制御下に置かれていることは明らかである。

【0072】

50

本発明の第三の態様によれば、組成物はそれぞれが本発明のポリペプチドまたは誘導体を発現し得るいくつかのワクチンベクターを含んでなる。組成物はまた付加的なクラミア抗原、またはそのサブユニット、断片、相同体、変異体もしくは誘導体；または必要に応じてIL-2もしくはIL-12などのサイトカインと共に、または該サイトカインをを発現し得るワクチンベクターを含んでなってもよい。

【0073】

哺乳類における感染症を治療または予防する予防接種方法は、いずれかの一般的な経路により、特に粘膜（例えば目、鼻腔内、口腔、胃、肺、腸、直腸、膣、または尿管）表面にまたは非経口（例えば皮下、皮内、筋肉内、静脈内、または腹腔内）経路により投与される本発明のワクチンベクターの使用を含んでなる。好ましい経路はワクチンベクターの選択による。1回の投与で治療を果たしてもよいし、または間隔をおいて反復してもよい。好適な用量は当業者に理解されている、ワクチンベクター自体、投与経路または予防接種する哺乳類の条件（重量、年齢など）といった種々のパラメーターによって異なる。

10

【0074】

当技術分野で入手可能な生ワクチンベクターには、アデノウイルスおよびポックスウイルスなどのウイルスベクター、ならびに細菌ベクター（例えば赤痢菌属(*Shigella*)、サルモネラ菌(*Salmonella*)、コレラ菌(*Vibrio cholerae*)、乳酸桿菌(*Lactobacillus*)、カルメットゲラン菌(*Bacille bilie de Calmette-Guerin*) (BCG)、および連鎖球菌(*Streptococcus*))が挙げられる。

【0075】

アデノウイルスベクター例、ならびに本発明のDNA分子を発現し得るアデノウイルスベクターの構築方法が米国特許第4,920,209号に記載されている。ポックスウイルスベクターにはワクシニアおよびカナリヤポックスウイルスがあり、それぞれ米国特許第4,722,848号および米国特許第5,364,773号に記載されている。例えばワクシニアウイルスベクターの記載はTartaglia et al., *Virology* (1992) 188:217、カナリヤポックスの参照文献はTaylor et al. *Vaccine* (1995) 13:539も参照。哺乳類細胞における発現に好適な条件下で本発明のポリヌクレオチドをウイルスゲノムに挿入するために、本発明のポリヌクレオチドを発現し得るポックスウイルスベクターをKieny et al., *Nature* (1984) 312:163に記載される相同組換えにより得る。一般に治療または予防に使用するワクチンウイルスベクターの用量はキログラム当たりのプラーク形成単位が、約 1×10^4 ~ 約 1×10^{11} 、有利には約 1×10^7 ~ 約 1×10^{10} 、好ましくは約 1×10^7 ~ 約 1×10^9 であってよい。好ましくは、ウイルスベクターを、例えば4週間おきに3回で、非経口投与する。本発明のウイルスベクターを含有する組成物に化学アジュバントを加えることを避け、それによってウイルスベクター自身に対する免疫応答を最小にすることが好ましい。

20

30

【0076】

経口生ワクチンとして有用な無毒性コレラ菌変異株が知られている。Mekalanos et al., *Nature* (1983) 306:551および米国特許第4,882,278号では、機能し得るコレラ毒素が生産されないように欠失させた、2つのctxA対立遺伝子それぞれの実在する量のコード配列を有する株が記載されている。WO92/11354では、変異（この変異を単一株においてctxA変異と組み合わせてもよい）によりirgA遺伝子座を不活性化した株が記載されている。WO94/01533では、機能し得るctxAおよびattRS1 DNA配列を欠いた欠失変異体が記載されている。WO94/19482に記載されるように、これらの変異株を遺伝子操作して非対応抗原を発現させる。本発明のDNA分子によりコードされるポリペプチドまたはポリペプチド誘導体を発現し得るコレラ菌株の有効なワクチン用量は、選択された投与経路に適した用量中の生存細菌数、約 1×10^5 ~ 約 1×10^9 、好ましくは約 1×10^6 ~ 約 1×10^8 を含有する。好ましい投与経路としてはあらゆる粘膜経路が挙げられ、最も好ましくはこれらのベクターは鼻腔内または経口投与される。

40

【0077】

50

非対応抗原の組換え発現用に遺伝子操作した、またはしない弱毒ネズミチフス菌株、および経口ワクチンとしてのそれらの使用は、Nakayama et al. (Bio/Technology (1988) 6:693)およびWO 92 / 1 1 3 6 1に記載されている。

好ましい投与経路としてはあらゆる粘膜経路が挙げられ、最も好ましくはこれらのベクターは鼻腔内または経口投与される。

【 0 0 7 8 】

本発明においてワクチンベクターとして用いられる他の細菌株は、High et al., EMBO (1992) 11:1991およびSizemore et al., Science (1995) 270:299 (フレクスナー赤痢菌(*Shigella flexneri*)); Medaglini et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1995) 92:6868 (ストレプトコッカス・ゴルドニー(*Streptococcus gordonii*)), Flynn J. L., Cell. Mol. Biol. (1994) 40 (suppl. 1): 31 (Bacille Calmette Guerin)、WO 88 / 0 6 6 2 6、WO 90 / 0 0 5 9 4、WO 91 / 1 3 1 5 7、WO 92 / 0 1 7 9 6、およびWO 92 / 2 1 3 7 6 (カルメット-ゲラン菌)に記載されている。

【 0 0 7 9 】

細菌ベクターでは本発明のポリヌクレオチドを細菌ゲノムに挿入するか、または遊離状態でプラスミドの一部として残す。

【 0 0 8 0 】

本発明のワクチン細菌ベクターを含んでなる組成物はアジュバントをさらに含有してもよい。いくつかのアジュバントが当業者に公知である。好ましいアジュバントは以下に挙げるように選択される。

【 0 0 8 1 】

従って、本発明の第四の態様によれば、(i)本発明のポリヌクレオチドとともに希釈剤または担体を含んでなる材料の組成物；(ii)治療または予防上有効な量の本発明のポリヌクレオチドを含有する医薬組成物；(iii)免疫原性上有効な量の本発明のポリヌクレオチドを投与してクラミジアに対する感染防御免疫応答を誘導することにより哺乳類のクラミジアに対する免疫応答を誘導する方法；さらに詳しくは(iv)感染した個体に予防または治療量の本発明のポリヌクレオチドを投与することにより、クラミジア(例えばC.トラチョマチス、C.プシタチ、肺炎クラミジア、またはC.ペコラム)感染症を予防および/または治療する方法が提供される。さらに本発明の第四の態様によれば、クラミジア感染症を予防および/または治療する医薬の製造における本発明のポリヌクレオチドの使用が含まれる。好ましい使用には哺乳類細胞における、特に哺乳類細胞において複製できず、かつ哺乳類ゲノムに実質的に組み込むことのできないプラスミドにおける発現の条件下に置かれたDNA分子の使用が挙げられる。

【 0 0 8 2 】

本発明のポリヌクレオチドの使用には、治療または予防目的での哺乳類へのワクチンとしての投与が挙げられる。かかるポリヌクレオチドは哺乳類細胞において複製できず、かつ哺乳類ゲノムに組み込むことのできないプラスミドの一部としてDNAの形で用いられる。典型的には、かかるDNA分子は哺乳類細胞の発現に好適なプロモーターの制御下に置かれる。プロモーターは遍在して、または組織特異的のいずれかで機能する。非組織特異的プロモーターの例としては、初期サイトメガロウイルス(CMV)プロモーター(米国特許第4,168,062号に記載される)およびラウス肉腫ウイルスプロモーター(Norton & Coffin, Molec. Cell Biol. (1985) 5:281に記載される)が挙げられる。組織特異的プロモーターの例としては、筋肉細胞における発現を駆動するデスミンプロモーター(Li et al., Gene (1989) 78:243、Li & Paulin, J. Biol. Chem. (1991) 266:6562およびLi & Paulin, J. Biol. Chem. (1993) 268:10403に記載される)である。プロモーターの使用については当業者は十分に公知である。有用なベクターは多くの公報、特にWO 94 / 2 1 7 9 7およびMartikka et al., Human Gene Therapy (1996) 7: 1205に記載されている。

【 0 0 8 3 】

ワクチンとして用いられる本発明のポリヌクレオチドは対応するポリペプチドの前駆体ま

たは成熟型のいずれかをコードする。前駆体型ではシグナルペプチドは相同または異種のいずれかである。後者の場合、組織型プラスミノゲン因子 (t P A) のリーダー配列などの真核生物リーダー配列が好ましい。

【 0 0 8 4 】

本明細書において、本発明の組成物は1つまたはいくつかのポリヌクレオチドとともに所望によりウレアーゼサブユニットA、Bもしくはその両方などの別のクラミジア抗原、またはその断片、誘導體、変異体もしくは類似体をコードする少なくとも一つの付加的なポリヌクレオチドを含有する。また組成物は免疫応答を増強するためにインターロイキン - 2 (I L - 2) またはインターロイキン - 1 2 (I L - 1 2) などのサイトカインをコードする付加的なポリヌクレオチドを含有してもよい。これらの付加的なポリヌクレオチドは発現に好適な制御下に置かれている。同じ組成物に含まれる本発明のDNA分子および/または付加的なDNA分子は同じプラスミドに存在することが有利である。

10

【 0 0 8 5 】

本発明のポリヌクレオチド治療薬の製造に分子生物学におけるポリヌクレオチドの調製および精製標準手法を用いる。ワクチンとして用いるための本発明のポリヌクレオチドは以下に概略を記した種々の方法により処方される。

【 0 0 8 6 】

一つの方法ではポリヌクレオチドはいずれの送達ビヒクルも用いない裸の形態で使用される。かかるポリヌクレオチドは単に滅菌生理食塩水または滅菌緩衝溶液などの生理学上許容される溶液に、担体を用いてまたは用いずに希釈する。担体が存在する場合には、担体が等張性、低張性、または弱高張性であることが好ましく、スクロース溶液、例えば20%スクロース含有溶液により得られるような比較的低いイオン強度を有する。

20

【 0 0 8 7 】

別法では細胞の取り込みを助ける薬剤と結合したポリヌクレオチドを使用する。かかる薬剤の例は (i) プピバカインなどの細胞透過性を改変する化学物質 (例えば W O 9 4 / 1 6 7 3 7 参照) 、 (ii) ポリヌクレオチドをカプセル封入するリポソーム、または (iii) それ自身がポリヌクレオチドと結合する陽イオン脂質またはシリカ、金、もしくはタングステン微粒子である。

【 0 0 8 8 】

陰イオンおよび中性リポソームは当技術分野では十分に公知であり (例えばリポソーム作製方法の詳細な説明に関する、Liposomes: A Practical Approach, Rpc New Ed, IRL press (1990) 参照) 、 ポリヌクレオチドをはじめとする広範囲の産物を送達するのに有用である。

30

【 0 0 8 9 】

陽イオン脂質もまた当技術分野では公知であり、遺伝子送達には常用されている。かかる脂質には、DOTMA (N - [1 - (2 , 3 - ジオレイルオキシ) プロピル] - N , N , N - トリメチルアンモニウムクロリド) としても知られるリポフェクチン (商標) 、 D O T A P (1 , 2 - ビス (オレイルオキシ) - 3 - (トリメチルアンモニオ) プロパン) 、 D D A B (ジメチルジオクタデシルアンモニウムプロミド) 、 D O G S (ジオクタデシルアミドログリシルスベルミン) および D C - C h o l (3 - (N - (N ' , N ' - ジメチルアミノメタン) - カルバモイル) コレステロール) などのコレステロール誘導體が挙げられる。これらの陽イオン脂質の記載は E P 1 8 7 , 7 0 2 、 W O 9 0 / 1 1 0 9 2 、 米国特許第 5 , 2 8 3 , 1 8 5 号、 W O 9 1 / 1 5 5 0 1 、 W O 9 5 / 2 6 3 5 6 、 および 米国特許第 5 , 5 2 7 , 9 2 8 号に見出すことができる。遺伝子送達用の陽イオン脂質は、例えば W O 9 0 / 1 1 0 9 2 に記載されるように D O P E (ジオレイルホスファチジルエタノールアミン) のような中性脂質と結合させて用いることが好ましい。

40

【 0 0 9 0 】

陽イオンリポソームを含有する製剤は所望により他のトランスフェクション促進化合物を含有してもよい。それらの多くは W O 9 3 / 1 8 7 5 9 、 W O 9 3 / 1 9 7 6 8 、 W O 9 4 / 2 5 6 0 8 、 および W O 9 5 / 2 3 9 7 に記載されている。それらには核膜を通る D

50

NAの輸送を促進するのに有用なスペルミン誘導体(例えばWO93/18759参照)およびGALA、グラミシジンS、ならびに陽イオン胆汁酸塩などの膜透過性化合物(例えばWO93/19768参照)が挙げられる。

【0091】

金またはタングステン微粒子はWO91/00359、WO93/17706、およびTang et al. (Nature (1992) 356:152)に記載されるように遺伝子送達に用いられる。米国特許第4,945,050号、米国特許第5,015,580号、およびWO94/24263に記載されるもののように、微粒子で被覆したポリヌクレオチドを無針注入装置(「遺伝子銃」)を用いて皮内または表皮内経路で注入する。

【0092】

ワクチン受容者に用いるDNA量は、例えばDNA構築に用いるプロモーターの強さ、発現遺伝子産物の免疫原性、投与をしようとする哺乳類の条件(例えば哺乳類の体重、年齢、および全身の健康状態)、投与様式、および剤型による。一般に、治療または予防上有効な量、約1μg~約1mg、好ましくは約10μg~約800μg、およびさらに好ましくは約25μg~約250μgをヒト成人に投与してもよい。1回の投与で投与を果たしてもよいし、または間隔をおいて反復してもよい。

【0093】

投与経路はワクチン分野で用いるいずれの便宜な経路であってもよい。一般的な指針として、本発明のポリヌクレオチドは粘膜表面、例えば目、鼻腔内、肺、口腔、腸、直腸、膈、および尿管表面により;または非経口経路、例えば静脈内、皮下、腹膜内、皮内、表皮内、または筋肉内経路により投与する。投与経路の選択は選択される製剤による。プピバカインと結合させて処方したポリヌクレオチドは筋肉投与が有利である。中性もしくは陰イオンリポソームまたはDOTMAまたはDC-Cholなどの陽イオン脂質を用いる場合、製剤は静脈内、鼻腔内(エアゾル化)、筋肉内、皮内、および皮下経路により注入することが有利であろう。裸の形態のポリヌクレオチドは筋肉内、皮内、または皮下経路により投与することが有利であろう。

【0094】

必ずしも必要ではないが、かかる組成物はアジュバントを含有していてもよい。もしそうであれば、アジュバント作用を示すために同時投与する必要のない浸透性アジュバント、例えば米国特許第5,057,546号に記載されるQS21などが好ましい。

【0095】

本願で提供される配列情報により診断目的で用いる特異的なヌクレオチドプローブおよびプライマーの設計が可能になる。従って、本発明の第五の態様によれば、配列番号1、3または5に示される配列の遺伝子コードの縮重で見られる、または縮重により誘導された配列を有するヌクレオチドプローブまたはプライマーが提供される。

【0096】

本願において使用される「プローブ」とは、上記のように、ストリンジェント条件下で、配列番号1、3または5を有する核酸分子と、または配列番号1、3または5と相同な配列と、またはその相補もしくはアンチセンス配列とハイブリダイズするDNA(好ましくは一本鎖)またはRNA分子(または改変体もしくはその組合せ)をいう。一般に、プローブは全長配列よりかなり短い。かかるプローブは約5~約100個、好ましくは約10~約80個のヌクレオチドを含有する。特にプローブは配列番号1、3または5の一部と少なくとも75%、好ましくは少なくとも85%、さらに好ましくは95%相同である、またはかかる配列と相補的である配列を有する。プローブはイノシン、メチル-5-デオキシシチジン、デオキシウリジン、ジメチルアミノ-5-デオキシウリジン、またはジアミノ-2,6-プリンなどの改変塩基を含有してもよい。糖またはリン酸残基も改変または置換してもよい。例えばデオキシリボース残基をポリアミドで置き換えてもよく(Nielsen et al., Science (1991) 254:1497)、リン酸残基をジホスフェート、アルキル、アールホスホネートおよびホスホロチオエートエステルなどのエステル基で置き換えてもよい。さらにリボヌクレオチドの2'-ヒドロキシ基をアルキル基のような官能基などで改

10

20

30

40

50

変してもよい。

【0097】

本発明のプローブは捕捉または検出プローブとして診断試験に用いられる。便宜にはかかる捕捉プローブは共有結合手段によりまたは受動的吸着により固相支持体に直接的または間接的に固定する。検出プローブは放射性同位元素、ペルオキシダーゼ、アルカリ性ホスファターゼ、ならびに発色性、蛍光性、または発光性基質を加水分解し得る酵素、発色性、蛍光性、または発光性化合物、ヌクレオチド塩基類似体、およびビオチンから選択される検出マーカで標識する。

【0098】

本発明のプローブをドットプロット法(Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (1982) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York)、サザンプロット法(Southern, J. Mol. Biol. (1975) 98:503)、ノーザンプロット法(RNAを標的として用いることを除いて、サザンプロットと同じ)、またはサンドイッチ手法(Dunn et al., Cell (1977) 12:23)などのいずれの通常ハイブリダイゼーション手法にも用いてよい。後の手法では互いに少なくとも部分的に異なるヌクレオチド配列を有する特異的な捕捉プローブおよび/または特異的な検出プローブの使用が含まれる。

10

【0099】

プライマーは増幅プロセス(例えばPCR)、伸長プロセス、または逆転写法における酵素的DNA重合を開始するのに用いる、通常約10~約40個のヌクレオチドのプローブである。PCRをはじめとする診断法に用いるプライマーを当技術分野で公知な方法で標識する。

20

【0100】

本明細書において記載されるように、本発明はまた(i)生物学的材料においてクラミジアの存在を検出および/または同定する本発明のプローブを含んでなる試薬;(ii)(a)該生物学的材料からサンプルを採取または誘導し、(b)該材料からDNAまたはRNAを抽出して変性させ、さらに(c)ストリンジェントハイブリダイゼーション条件下で、ハイブリダイゼーションが検出されるように本発明のプローブ、例えば捕捉、検出プローブもしくはその両方に曝す、生物学的材料においてクラミジアの存在を検出および/または同定する方法;および(iii)(a)該生物学的材料からサンプルを採取または誘導し、(b)そこからDNAを抽出し、(c)抽出したDNAに少なくとも1つ、および好ましくは2つの本発明のプライマーを提供してポリメラーゼ鎖反応により増幅し、さらに(d)増幅したDNA断片を生産する、生物学的材料においてクラミジアの存在を検出および/または同定する方法も包含する。

30

【0101】

配列番号1、3または5ポリヌクレオチド配列、その相同体、および各々の部分配列の開示によりそれらの対応するアミノ酸配列が使用可能になることは明らかである。従って本発明の第六の態様によれば、本発明のポリヌクレオチドによりコードされるアミノ酸配列を有する、実質的に精製されたポリペプチドまたはポリペプチド誘導体が提供される。

【0102】

本明細書において使用される「実質的に精製されたポリペプチド」はそれが天然に存在する環境から選別されたポリヌクレオチド、および/またはそれが合成される環境に存在する多数のポリヌクレオチドから遊離したポリペプチドと定義される。例えば、実質的に精製されたポリペプチドは細胞質ポリペプチドから遊離したものである。本発明のポリペプチドが天然源、すなわちクラミジア株から精製され得る、または組換え手段により生産され得ることは当業者には容易に理解されよう。

40

【0103】

本発明の第六の態様によれば、ポリペプチド、相同体または断片がクラミジアに対する感染防御を考えると考えられる標的動物において、その免疫原性を向上させるために改変されたまたは処理されたポリペプチド、相同体または断片が提供される。かかる改変または処理には:3-メチルヒスチジン、4-ヒドロキシプロリン、5-ヒドロキシリジンなどの

50

アミノ酸誘導体によるアミノ酸置換、アミノ酸の遊離アミノ、カルボキシルまたはヒドロキシル側基の改変などのポリペプチド、相同体または断片の調整後に行われる改変または欠失が挙げられる。

【0104】

特異的抗原性を有する本発明のポリヌクレオチドによりコードされる相同ポリペプチドまたはポリペプチド誘導体の同定は、配列番号1、3または5のアミノ酸配列を有する参照ポリペプチドに対して作製した抗血清との交差反応性によるスクリーニングにより達成される。の手順は次の通りである：単一特異性高度免疫抗血清を、精製参照ポリペプチド、融合ポリペプチド（例えばMBP、GST、またはHis-tag系の発現産物、その使用に関する記載および説明についてはpcDNA3.1/Myc-His(+)A、BおよびCに関する、またXpress(商標)系タンパク質精製に関するInvitrogen製品マニュアルに含まれている)、または抗原性であると推測される合成ペプチドに対して作製する。抗血清を融合ポリペプチドに対して作製する場合、2つの異なる融合系を使用する。特異性抗原性は以下のようにウエスタンブロット法(Towbin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1979) 76:4350)、ドットブロット法、およびELISA法などのいくつかの方法により求めることができる。

10

【0105】

ウエスタンブロットアッセイでは、スクリーニングする産物を精製調製物または大腸菌全抽出物のいずれかとして、Laemmli(Nature (1970) 227:680)により記載されたSDS-PAGE電気泳動法に付す。ニトロセルロース膜に移した後、この材料を約1:5~約1:5000、好ましくは約1:100~約1:500の希釈範囲で、希釈した単一特異性高度免疫抗血清とともにさらにインキュベートする。その産物に対応する一つのバンドが上記の希釈範囲のいずれかで反応性を呈すれば、特異的抗原性が示される。

20

【0106】

ELISA法では、スクリーニングする産物を被覆抗原として用いることが好ましい。全細胞抽出物を用いてもよいが、精製調製物が好ましい。要するに、約10 μ gタンパク質/mlの調製物約100 μ lを96-ウェルポリカーボネートELISAプレートに分注する。このプレートを37 $^{\circ}$ Cで2時間、次いで4 $^{\circ}$ Cで一晩インキュベートする。プレートを0.05%Tween 20含有リン酸緩衝生理食塩水(PBS)(PBS/Tweenバッファー)で洗浄する。ウェルを1%ウシ血清アルブミン(BSA)含有PBS 250 μ lで飽和させ、非特異的抗体結合を妨げる。37 $^{\circ}$ Cで1時間インキュベーションした後、プレートをPBS/Tweenバッファーで洗浄する。抗血清は0.5%BSA含有PBS/Tweenバッファーで連続的に希釈する。各ウェルに希釈物100 μ lを加える。プレートを37 $^{\circ}$ Cで90分間インキュベートし、洗浄して標準法により評価する。例えば、特異的抗体をウサギで生産した場合、ヤギ抗ウサギペルオキシダーゼ複合体をウェルに加える。インキュベーションを37 $^{\circ}$ Cで90分間で行い、プレートを洗浄する。適当な基質により反応物を顕出させ、この反応物を比色定量(分光光度計により測定された吸光度)により測定する。上記の試験条件下で、O.D.値が非免疫対照血清より大きい場合に陽性反応を示す。

30

【0107】

ドットブロット法でも、全細胞抽出物を用いてもよいが、精製産物が好ましい。要するに、約100 μ g/mlの産物の溶液を50mM Tris-HCl(pH 7.5)で連続的に2倍希釈する。各希釈物100 μ lを96-ウェルドットブロット装置(Biorad)にセットしたニトロセルロース膜0.45 μ mに塗布する。系を減圧してバッファーを除去する。50mM Tris-HCl(pH 7.5)を加えてウェルを洗浄し、膜を風乾する。膜をブロッキングバッファー(50mM Tris-HCl(pH 7.5)、0.15M NaCl、10g/L脱脂乳)で飽和させ、約1:50~約1:5000、好ましくは約1:500の抗血清希釈物とともにインキュベートする。反応物を標準手順により調べる。例えば、ウサギ抗体を用いる場合、ヤギ抗ウサギペルオキシダーゼ複合体をウェルに加える。インキュベーションを37 $^{\circ}$ Cで90分間で行い、ブロットを洗浄する。適当な

40

50

基質により反応物を顕出させて停止させる。この反応物を発色スポットの様子から、例えば比色定量により視覚的に測定する。上記の試験条件下で、発色スポットが少なくとも約 1 : 5、好ましくは少なくとも約 1 : 500 の希釈物と結合する場合に陽性反応を示す。

【0108】

本発明のポリペプチドまたは誘導体の治療または予防効力は下記のように評価できる。本発明の第七の態様によれば、(i) 本発明のポリペプチドとともに希釈剤または担体を含んでなる材料の組成物；とりわけ(ii) 治療または予防上有効な量の本発明のポリペプチドを含有する医薬組成物；(iii) 免疫上有効な量の本発明のポリペプチドを哺乳類に投与してクラミジアに対する感染防御免疫応答を誘導することにより哺乳類のクラミジアに対する免疫応答を誘導する方法；さらに詳しくは(iv) 感染した個体に予防または治療量の本発明のポリペプチドを投与することにより、クラミジア（例えば C . トラチョマチス、C . プシタチ、肺炎クラミジア、または C . ペコラム）感染症を予防および/または治療する方法が提供される。さらに本発明の第七の態様によれば、クラミジア感染症を予防および/または治療する医薬の製造における本発明のポリペプチドの使用が含まれる。

10

【0109】

本明細書において、本発明の免疫原性組成物はワクチン分野で知られる便宜な経路、特に粘膜（例えば目、鼻腔内、肺、口腔、胃、腸、直腸、膣、または尿管）表面にまたは非経口（例えば皮下、皮内、筋肉内、静脈内、または腹腔内）経路により投与する。投与経路の選択はポリペプチドと結合したアジュバントなどのいくつかのパラメーターによる。粘膜アジュバントを用いる場合には鼻腔内または口腔経路が好ましい。脂質処方またはアルミニウム化合物を用いる場合には非経口経路が好ましく、皮下または筋肉内経路が最も好ましい。この選択もまたワクチン薬剤の性質による。例えば、CTB または LT B と融合した本発明のポリペプチドは粘膜表面に投与することが最もよい。

20

【0110】

本明細書において、本発明の組成物は 1 つまたはいくつかの本発明のポリペプチドまたは誘導体を含有する。所望により組成物は少なくとも一つの付加的なクラミジア抗原、またはそのサブユニット、断片、相同体、変異体もしくは誘導体を含有してもよい。

【0111】

本発明の組成物における使用では、ポリペプチドまたはその誘導体をリポソーム、好ましくは中性または陰イオンリポソーム、ミクロスフェア、ISCOMS、またはウイルス様粒子 (VLP) 中にまたはそれとともに処方して、送達を促進および/または免疫応答を増強する。当業者はこれらの化合物を容易に入手できる；例えば Liposomes: A Practical Approach, RCP New Ed, IRL press(1990) 参照。

30

【0112】

リポソームなど以外のアジュバントも用いられ、当技術分野では公知である。アジュバントは抗原を局所デポジットに封鎖することにより、それを急速な分散から守る、またはそれらは宿主を刺激して免疫系のマクロファージまたは他の成分に対し化学走性である因子を分泌する物質を含有すると考えられる。一般的には当業者によって、例えば以下に記載されるもの（本発明の第 11 の態様に基づくもの）から適切な選択がなされるであろう。

【0113】

当業者ならば容易に決定できるが、治療は 1 回の投与で果たしてもよいし、または必要に応じて間隔をおいて反復してもよい。例えば、開始用量の後、週単位または 1 ヶ月単位の間隔をおいて 3 回の追加免疫抗原投与を続ける。好適な用量は当業者には容易に決定できるが、受容者（例えば成人または小児）、個々のワクチン抗原、投与経路または頻度、アジュバントの有無またはタイプ、および所望の効果（例えば感染防御および/または治療）を含む種々のパラメーターによって異なる。一般に、本発明のワクチン抗原を粘膜経路によって約 10 μ g ~ 約 500 mg、好ましくは約 1 mg ~ 約 200 mg の量を投与する。投与が非経口経路の場合、通常用量は約 1 mg、好ましくは約 100 μ g の限度を超えない。

40

【0114】

50

ワクチン薬剤として用いる場合、本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチドを多段階免疫化プロセスの要素として連続的に用いてもよい。例えば、まず哺乳類にポックスウイルスなどの本発明のワクチンベクターを、例えば非経口経路により注入し、次いでワクチンベクターによりコードされるポリペプチドで2回、例えば粘膜経路により追加免疫抗原を加える。また別の例では本発明のポリペプチドまたは誘導体と結合したリポソームを開始に用い、粘膜アジュバント（例えばLT）と組み合わせた本発明の可溶性ポリペプチドまたは誘導体を用いて粘膜により追加免疫抗原刺激を行う。

【0115】

本発明の第七の態様によれば、本発明のポリペプチド誘導体はまた、例えば血液サンプルにおいて抗クラミジア抗体の存在を検出する診断試薬として用いられる。かかるポリペプチドの長さは約5～約80個、好ましくは約10～約50個のアミノ酸である。診断方法により、それらを標識するまたは標識しないのいずれかである。かかる試薬を含む診断方法を以下に記載する。

10

【0116】

公知の実験室手法を用い、本発明のDNA分子の発現においてポリペプチドまたはポリペプチド誘導体を生産し精製する。以下に記載されるように、ポリペプチドまたはポリペプチド誘導体は精製を促進する融合テールを有した融合タンパク質として生産される。融合産物を用いて小型哺乳類、例えばマウスまたはウサギを免疫化し、ポリペプチドまたはポリペプチド誘導体に対する抗体（単一特異性抗体）を作製する。よって本発明の第八の態様によれば、本発明のポリペプチドまたはポリペプチド誘導体と結合する単一特異性抗体が提供される。

20

【0117】

「単一特異性抗体」とは特異な天然に存在するクラミジアポリペプチドと反応し得る抗体を意味する。本発明の抗体はポリクローナルまたはモノクローナル抗体のいずれかである。単一特異性抗体は組換え体、例えばキメラ（例えば、ヒト不変部と結合したネズミ由来の可変部により構成された）、ヒト化型（動物、例えばネズミ由来の超可変部とともにあるヒト免疫グロブリン不変主鎖）および/または一本鎖であってよい。ポリクローナルおよび単一特異性抗体は双方とも免疫グロブリン断片、例えばF(ab)²またはFabフラグメントの形であってよい。本発明の抗体はいずれのイソ型のもの、例えばIgGまたはIgAであってよいが、ポリクローナル抗体は単一イソ型またはイソ型の混合物ある。

30

【0118】

本発明のポリペプチド、相同体または断片に対する抗体はそのポリペプチド、相同体または断片を含んでなる組成物による哺乳類の免疫化により産生される。かかる抗体はポリクローナルまたはモノクローナル抗体であってよい。ポリクローナルまたはモノクローナル抗体の産生方法は当技術分野では十分に公知である。例えば、"Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Eds. E. Harlow and D. Lane (1988)、およびD. E. Yelton et al., 1981. Ann. Rev. Biochem. 50: 657-680参照。モノクローナル抗体についてはKohl and Milstein (1975) Nature 256:495-497参照。

【0119】

本発明のポリペプチドまたはポリペプチド誘導体に対して作製される本発明の抗体を標準免疫学的アッセイ法、例えばウエスタンブロット解析法、ドットブロットアッセイ法、またはELISA法（例えばColigan et al., Current Protocols in Immunology (1994) John Wiley & Sons, Inc., New York, NY参照）を用いて作製して同定する。抗体は生物学的サンプルなどのサンプルにおいてクラミジア抗原の存在を検出する診断法に用いられる。また抗体は本発明のポリペプチドまたはポリペプチド誘導体を精製するアフィニティークロマトグラフィーにも用いられる。以下でさらに考察するように、かかる抗体を予防および治療的受動的免疫化方法に用いてもよい。

40

【0120】

よって本発明の第九の態様によれば、本発明の抗体、ポリペプチド、またはポリペプチド

50

誘導体を含有する生物学的サンプルにおいてクラミジアの存在を検出する試薬；および（ii）免疫複合体が形成されるように生物学的サンプルと本発明の抗体、ポリペプチド、またはポリペプチド誘導体とを接触させて、かかる複合体を検出してサンプルまたはサンプルが誘導される生物体においてクラミジアの存在を示すことにより、生物学的サンプルにおいてクラミジアの存在を検出する方法が提供される。

【0121】

いずれを用いるとしても免疫複合体がサンプルの成分と抗体、ポリペプチド、またはポリペプチド誘導体とで形成されること、および結合していない材料がいずれも複合体の検出前に除去されることは当業者には容易に理解されるであろう。ポリペプチド試薬がサンプル、例えば血液サンプルにおいて抗クラミジア抗体の存在を検出するのに有用であり、本発明の抗体が胃抽出物または生検などのサンプルをクラミジアポリペプチドの存在についてスクリーニングするのに有用であることは明らかである。

10

【0122】

診断適用では、試薬（すなわち本発明の抗体、ポリペプチド、またはポリペプチド誘導体）は遊離状態にあるか、またはチューブ、ビーズ、または当分野において用いられるいずれかの他の通常の支持体などの固相支持体に固定されているかである。固定は直接的または間接的手段によりなし遂げられる。直接的手段としては受動的吸着（非共有結合）または支持体と試薬との共有結合が挙げられる。「間接的手段」とは試薬と相互作用する抗試薬化合物が固相支持体に最初に付着することを意味する。例えば、ポリペプチド試薬を用いる場合に、それが生物学的サンプルにおいて抗体の認識に関係していないエピトープと結合するのであれば、それに結合する抗体が抗試薬として作用し得る。間接的手段にはまた、例えばビタミンなどの分子がポリペプチド試薬に接合され、その対応する受容体が固相に固定されるリガンド-受容体系も用いられる。これはビオチン-ストレプトアビジン系によって例示される。あるいは、ペプチドテールを化学的にまたは遺伝子操作により試薬に加え、接合または融合された産物をペプチドテールの受動的吸着または共有結合により固定する。

20

【0123】

使用説明書も含んでなるキットにかかる診断薬が含まれていてもよい。この試薬はそれがその標的と結合した場合に試薬の検出がなされる検出手段によって標識される。検出手段はフルオレセインイソシアネートまたはフルオレセインイソチオシアネートなどの蛍光剤、またはセイヨウワサビペルオキシダーゼもしくはルシフェラーゼ、またはアルカリ性ホスファターゼなどの酵素、または ^{125}I または ^{51}Cr などの放射性元素であってよい。

30

【0124】

従って本発明の第10の態様によれば、生物学的サンプルについて本発明の単一特異性抗体に基づくアフィニティークロマトグラフィーを行うことを含む、生物学的サンプルから、本発明のポリペプチドまたはポリペプチド誘導体を精製する方法が提供される。

【0125】

本発明の精製法における使用に関し、抗体はポリクローナルまたは単一特異性抗体のいずれか、および好ましくはIgG型である。精製IgGは常法により抗血清から調製する(Coligan et al., Current Protocols in Immunology (1994) John Wiley & Sons, Inc., New York, NY.)。一般的なクロマトグラフィー支持体、ならびに抗体を接合する標準方法については、例えばAntibodies: A Laboratory Manual, D. Lane, E. Harlow, Eds. (1988)に記載されている。以下に概略を記す。

40

【0126】

要するに、好ましくはバッファー溶液中の肺炎クラミジア抽出物などの生物学的サンプルを、本発明のポリペプチドまたはポリペプチド誘導体（すなわち抗原）をクロマトグラフィー材に吸着させるように、好ましくは生物学的サンプルの希釈に用いるバッファーで平衡化した材料に適用する。本発明の抗体と結合したゲルまたは樹脂などのクロマトグラフィー材はバッチ型またはカラムのいずれかである。結合しない成分を洗い流し、次いで抗

50

原をグリシンバッファー、またはカオトロピック剤、例えばグアニジンHCl、もしくは高塩濃度（例えば、3M MgCl₂）を含有するバッファーなどの好適な溶出バッファーで溶出する。溶出画分を回収し、例えば280nmにおける吸光度を測定することにより抗原の存在を検出する。

【0127】

本発明の第11の態様によれば、(i)本発明の単一特異性抗体とともに希釈剤または担体を含んでなる材料の組成物；(ii)治療または予防上有効な量の本発明の単一特異性抗体を含んでなる医薬組成物；および(iii)感染した個体に治療または予防量の本発明の単一特異性抗体を投与することにより、クラミジア（例えばC.トラチョマチス、C.プシタチ、肺炎クラミジア、またはC.ペコラム）感染症を治療または予防する方法が提供される。さらに本発明の第11の態様によれば、クラミジア感染症を治療または予防する医薬の製造における本発明の単一特異性抗体の使用が含まれる。

10

【0128】

単一特異性抗体はポリクローナルまたはモノクローナルのいずれか、好ましくはIgAイソ型のもの（優勢）である。受動的免疫化では抗体を重炭酸バッファーの存在下で哺乳類の粘膜表面、例えば胃粘膜に、例えば経口または胃内投与することが有利である。また全身投与は重炭酸バッファーを用いずに行われる。本発明の単一特異性抗体を単一有効成分として、または異なるクラミジアポリペプチドに対して特異的な少なくとも一つの単一特異性抗体との混合物として投与する。用いる抗体量および特定の管理方法は当業者により容易に決定される。大部分の目的には、例えば抗体約100~1,000mgを1週間毎日投与、または抗体約100~1,000mgを2または3日間1日当たり3回投与が有効な管理法である。

20

【0129】

治療または予防効力を当技術分野の常法を用いて、例えば粘膜免疫応答の誘導または感染防御および/または治療的免疫の誘導を、例えば肺炎クラミジアマウスモデルを用いて測定することにより評価する。モデルの肺炎クラミジア株を別のクラミジア株と置き換えてもよいことは当業者に容易に理解されるであろう。例えば、肺炎クラミジア由来のDNA分子およびポリペプチドの効果は、好ましくはマウスモデルにおいて肺炎クラミジア株を用いて評価する。感染防御はクラミジア感染症の程度を対照群のものと比較して求める。感染症が対照群に比べて軽減されている場合に感染防御を示す。本発明のポリヌクレオチド、ワクチンベクター、ポリペプチドおよびその誘導體、ならびに抗体に対してかかる評価がなされる。

30

【0130】

上記のいずれのワクチン組成物においても有用なアジュバントは以下の通りである。

【0131】

非経口投与用アジュバントには、水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウム、およびヒドロキシリン酸アルミニウムなどのアルミニウム化合物が挙げられる。標準プロトコールに従い、抗原をアルミニウム化合物で沈降させる、またはそれに吸着させる。RIBI(ImmuChem, Hamilton, MT)などの他のアジュバントも非経口投与に用いられる。

【0132】

粘膜投与用アジュバントには細菌毒、例えばコレラ毒（CT）、大腸菌易熱性毒（LT）、クロストリジウム・ディフィシル(*Clostridium difficile*)毒Aおよび百日咳毒（PT）、もしくはその組合せ、サブユニット、変性毒素、または天然コレラ毒サブユニットB（CTB）の精製剤などのその変異体が挙げられる。これらの毒素のいずれに対する断片、相同体、誘導體、および融合物もアジュバント活性を保有している場合にはそれらもまた適当である。好ましくは弱毒化した変異体を用いる。好適な変異体は、例えばWO95/17211（Arg-7-Lys CT変異体）、WO96/06627（Arg-192-Gly LT変異体）、およびWO95/34323（Arg-9-LysおよびGlu-129-Gly PT変異体）に記載される。本発明の方法および組成物において用いられるさらなるLT変異体には、例えばSer-63-Lys、Ala-69G

40

50

ly、Glu-110-Asp、およびGlu-112-Asp変異体が挙げられる。例えば大腸菌、サルモネラ・ミネソタ(*Salmonella minnesota*)、ネズミチフス菌、またはシゲラ・フレクスネリ(*Shigella Flexneri*)の細菌モノホスホリル脂質A(MPLA)；サポニン、またはポリアクチドグリコリド(PLGA)マイクロスフェアなどの他のアジュバントも粘膜投与に用いられる。

【0133】

粘膜および非経口投与の双方に有用なアジュバントには、ポリホスファゼン(WO95/02415)、DC-cho1(3b-(N-(N',N'-ジメチルアミノメタン)-カルバモイル)コレステロール；米国特許第5,283,185号およびWO96/14831)およびQS-21(WO88/09336)が挙げられる。

10

【0134】

本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、ポリペプチド誘導体、または抗体を含有する本発明の医薬組成物は常法で製造される。特に医薬上許容される希釈剤または担体、例えば水またはリン酸緩衝生理食塩水などの生理食塩水とともに処方される。一般に希釈剤または担体は投与形ならびに経路、および医薬上の標準法に基づき選択される。好適な医薬上の担体または希釈剤、ならびに医薬製剤における使用に医薬上必要不可欠なものは、Remington's Pharmaceutical Sciences、当分野における標準的な参照文献およびUSP/NFに記載されている。

【0135】

本発明はまた、本発明のクラミジアポリペプチドおよび粘膜アジュバントと抗生物質、制酸剤、スクラルファート、またはその組合せとを併用した経口投与によりクラミジア感染症を治療する方法も含む。ワクチン抗原およびアジュバントとともに投与し得るかかる化合物の例としては、例えばマクロライド、テトラサイクリン、およびその誘導体(用い得る抗生物質の特異例として、アジトロマイシンもしくはドキシサイクリンまたはサイトカインもしくはステロイド類などの免疫調節剤が挙げられる)などの抗生物質がある。さらにも結合した1種を超える上記成分を含有する化合物を用いる。本発明はまたこれらの方法を行うための組成物、すなわち医薬上許容される担体または希釈剤中に本発明のクラミジア抗原(または抗体)、アジュバント、および1種以上の上記の化合物を含有する組成物も含む。

20

【0136】

最近、9kDaのシステイン豊富な外膜タンパク質は、ヒトにおいて保存されているエピトープ、ネズミ ミオシン重鎖エピトープM7A-と交差反応する配列を含んでいることが示されている(Bachmaier et al., Science (1999) 283:1335)。この交差反応性は心血管疾患の発症の一因であることを示しているので、ワクチンとして使用される場合はそのタンパク質からこのエピトープおよびヒト抗原と交差反応するその他のエピトープのいずれもを除去するのが有効であり得る。従って、本発明のさらなる具体例は、例えばタンパク質をコードするポリヌクレオチドからエピトープをコードするヌクレオチドを欠失させるまたは置換して、ワクチンとしてのタンパク質の有効性と安全性を向上させることでコード配列を改変することを含む。ヒト抗原との望ましくない相同性または交差反応性を持つことがわかっているいずれの防御抗原に対しても同様のアプローチが適当であり得る。

30

40

【0137】

本発明の方法および組成物において用いられる上記化合物の量については当業者ならば容易に求められる。治療/免疫化計画についても公知であり、当業者によって容易に計画される。例えば、非ワクチン成分を1~14日目に投与して、ワクチン抗原+アジュバントを7、14、21、および28日目に投与することが可能である。

【0138】

【実施例】

上記の開示は一般に本発明を説明するものである。さらに完全な理解は以下の具体的な例により得られる。これらの例は単に例示のために記載されるものであって、本発明の範囲

50

を限定しようとするものではない。状況が提案されまたは便宜となる限り、形態の変更および同等物との置換も考えられる。ここでは特定の用語が用いられているが、かかる用語は説明を意図したものであって、限定しようとするものではない。

【 0 1 3 9 】

例 1 :

この例は全長 7 6 k D a タンパク質遺伝子を含むプラスミドベクター p C A C P N M 5 5 5 a の調製を示すものである。

全長 7 6 k D a タンパク質遺伝子を 5 ' プライマー (5 ' ATAAGAATGCGGCCGCCACCATGGTTAATCCTATTGGTCCAGG3 ') (配列番号 9) および 3 ' プライマー (5 ' GCGCCGGATCCCTTGGAGATAACCA GAATATAGAG3 ') (配列番号 1 0) を用いるポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) によって、肺炎クラミジアゲノム D N A から増幅した。5 ' プライマーは N o t I 制限部位、リボソーム結合部位、開始コドン、および全長 7 6 k D a タンパク質コード配列の 5 ' 末端付近の配列を含む。3 ' プライマーは 7 6 k D a タンパク質の C 末端配列をコードする配列および B a m H I 制限部位を含む。停止コドンを除き、さらなるヌクレオチドを挿入してヒスチジンタグとのフレーム内融合物を得た。

増幅後、Q I A q u i c k (商標) P C R 精製キット (Qiagen) を用いて P C R 断片を精製し、その後 N o t I および B a m H I で消化し、ヒト C M V プロモーターの制御下で転写する例 2 に記載の p C A - M y c - H i s 真核生物発現ベクター (図 4) へクローニングした。

【 0 1 4 0 】

例 2 :

この例は真核生物発現ベクター p C A / M y c - H i s の調製を示す。

プラスミド p c D N A 3 . 1 (-) M y c - H i s C (Invitrogen) を S p e I および B a m H I で制限処理して C M V プロモーターを除去し、残りのベクター断片を単離した。プラスミド V R - 1 0 1 2 (Vical) 由来の C M V プロモーターおよびイントロン A を S p e I / B a m H I 断片上に単離した。これらの断片を連結してプラスミド p C A / M y c - H i s を作出した。全長 7 6 k D a タンパク質遺伝子を含んだ P C R 断片を N o t I / B a m H I で制限処理したものを N o t I および B a m H I で制限処理したプラスミド p C A / M y c - H i s と連結してプラスミド p C A C P N M 5 5 5 a を作出した (図 4) 。

【 0 1 4 1 】

得られたプラスミド p C A C P N M 5 5 5 a をエレクトロポレーションによって大腸菌 X L - 1 ブルー (Stratagene) ヘトランスフェクトし、これを 5 0 μ g / m l のカルベニシリンを含む L B 培地で増殖させた。プラスミドはエンド・フリー・プラスミド・ギガ・キット (商標) (Qiagen) 大スケール D N A 精製系によって単離した。D N A 濃度は 2 6 0 n m の吸光度で求め、ゲル電気泳動に付して臭化エチジウム染色し、分子量標準と比較してプラスミドを確認した。遺伝子の 5 ' および 3 ' 末端は L i c o r モデル 4 0 0 0 L D N A シーケンサーおよび I R D - 8 0 0 標識プライマーを用いた配列決定によって確認した。

【 0 1 4 2 】

例 3 :

この例は肺炎クラミジアの鼻腔攻撃に対する防御を達成するためのマウスの免疫化を示す。

これまでに、マウスが肺炎クラミジアの種々の単離物による鼻腔内感染に感受性があることが示されている (Yang et al . , 1993) 。 A R - 3 9 株 (Grayston , 1989) は、裸の D N A として送達されたクラミジア遺伝子産物の致死下の肺炎クラミジアの肺感染に対する防御応答を誘起する能力を調べるための抗原投与感染モデルとして B a l / c マウスにおいて用いた。防御免疫は肺感染の加速化されたクリアランスと定義される。

【 0 1 4 3 】

7 ~ 9 週齢の雄 B a l / c マウス群 (7 ~ 1 0 匹 / 群) を例 1 および 2 に記載の肺炎クラミジア全長 7 6 k D a タンパク質のコード配列を含むプラスミド D N A で筋肉内 (i . m

10

20

30

40

50

．)および鼻腔内(i.n.)感作させた。対照個体群には生理食塩水またはクラミジア遺伝子の挿入物を欠いたプラスミドベクターを与えた。

【0144】

i.m.感作では、0、3および6週の3回、PBS 50 μ l中DNA 100 μ gを左、右の四頭筋に交互に注射した。i.n.感作では、0、3および6週の3回、DNA 50 μ gを含むPBS 50 μ lを麻酔したマウスに吸入させた。8週目に、致死下の肺炎クラミジア抗原投与の増殖を制限する能力を試験するために、免疫化しマウスにSPGバッファ-100 μ l中の肺炎クラミジアAR39株 5×10^5 IFUを鼻腔内接種した。

【0145】

抗原投与後5および9日目にマウスから肺を摘出し、直ちにSPGバッファ- (7.5%スクロース、5mMグルタミン酸塩、12.5mMリン酸塩 pH7.5)中で本発明ホモジネートした。このホモジネートはアッセイまで-70で凍結保存した。ホモジネート希釈物を感受性細胞の単層に接種することで感染性クラミジアの存在に関してアッセイした。この接種物を3000rpmで1時間細胞上へ遠心分離した後、シクロヘキシミド1 μ g/mlの存在下で35にて3日間インキュベートした。単層のインキュベーション後、ホルマリンおよびメタノールで固定し、次に肺炎クラミジアおよびペルオキシダーゼ基質として金属で増強したDABを感染させたウサギからの回復期血清を用いてクラミジア封入体の存在に対して免疫ペルオキシダーゼ染色した。

【0146】

図7および表1は、pCACPNM555aをi.n.およびi.m.感作させたマウスの肺のクラミジア力価が9日目で6例中5例で30,000 IFU/肺(平均23,550)未満であり、一方、生理食塩水を感作させた偽性の対照マウスの値の範囲は20,800~323,300 IFU/肺(平均206,375)であった(表1)。他の2種のプラスミドDNA構築物のpCACPNM806およびpCACPNM760では防御できず、感作マウスの肺の力価は生理食塩水を感作させた対照マウスで得られたものと同等であったので、DNAの感作自体は認められた防御効果の一因ではなかった。構築物pCACPNM806およびpCACPNM760は全長76kDaタンパク質をコードするヌクレオチド配列が関連のない配列をコードする肺炎クラミジアヌクレオチド配列に置換されていること以外はpCACPNM555aと同一である。

【0147】

【表1】

10

20

30

マウス	種々のDNA感作構築物を感作させたb a 1 b / cマウスの肺における細菌存在量 (封入体単位/肺)			
	感作構築物			
	生理食塩水	pCACPNM906	pCACPNM760	pCACPNM555a
	9日目	9日目	9日目	9日目
1	225900	36700	140300	27300
2	20800	238700	128400	15200
3	286100	52300	88700	34600
4	106700	109600	25600	20500
5	323300	290000	37200	22000
6	144300	298800	5900	21700
7	261700			
8	282200			
平均値	206375	171016.667	71016.6667	23550
標準偏差	105183.9	119141.32	56306.57	6648.53
Wilcoxon P		0.8518	0.0293	0.008

【0148】

例4:

この例は5'末端切断型76kDaタンパク質遺伝子を含むプラスミドベクターpCAI 555の調製を示すものである。

5'末端切断型76kDaタンパク質遺伝子を5'プライマー(5'ATAAGAATGCGGCCGCCACC ATGAGTCTGGCAGATAAGCTGGG3')(配列番号11)および3'プライマー(5'GCGCCGGATCCCTT GGAGATAACCAGAATATA3')(配列番号12)を用いるポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によって、肺炎クラミジアゲノムDNAから増幅した。5'プライマーはNotI制限部位、リボゾーム結合部位、開始コドン、および76kDaタンパク質コード配列の2番目のMetコドンを含む。3'プライマーは3'76kDaタンパク質のC末端配列をコードする配列およびBamHI制限部位を含む。停止コドンを除き、さらなるヌクレオチドを挿入してヒスチジンタグとのフレーム内融合物を得た。

増幅後、QIAquick(商標)PCR精製キット(Qiagen)を用いてPCR断片を精製し、その後NotIおよびBamHIで消化し、ヒトCMVプロモーターの制御下で転写する例5に記載のpCA-Myc-His真核生物発現ベクター(図5)へクローニングした。

【0149】

例5:

この例は真核生物発現ベクターpCA/Myc-Hisの調製を示す。

プラスミドpcDNA3.1(-)Myc-HisC(Invitrogen)をSpeIおよびBamHIで制限処理してCMVプロモーターを除去し、残りのベクター断片を単離した。プラスミドVR-1012(Vical)由来のCMVプロモーターおよびイントロンAをSpeI/BamHI断片上に単離した。これらの断片を連結してプラスミドpCA/Myc

10

20

30

40

50

- His を作出した。5'末端切断型76kDaタンパク質遺伝子を含んだPCR断片をNotI/BamHIで制限処理したものをNotIおよびBamHIで制限処理したプラスミドpCA/Myc-Hisと連結してプラスミドpCAI555を作出した(図5)。

【0150】

得られたプラスミドpCAI555をエレクトロポレーションによって大腸菌XL-1ブルー(Stratagene)へ導入し、これを50μg/mlのカルベニシリンを含むLB培地で増殖させた。プラスミドはエンド・フリー・プラスミド・ギガ・キット(商標)(Qiagen)大スケールDNA精製系によって単離した。DNA濃度は260nmの吸光度で求め、ゲル電気泳動に付して臭化エチジウム染色し、分子量標準と比較してプラスミドを確認した。遺伝子の5'および3'末端はLicorモデル4000L DNAシーケンサーおよびIRD-800標識プライマーを用いた配列決定によって確認した。

10

【0151】

例6:

この例は肺炎クラミジアの鼻腔攻撃に対する防御を達成するためのマウスの免疫化を示す。例4および5に記載されているように感作に用いるDNAプラスミドが肺炎クラミジア5'末端切断型76kDaタンパク質のコード配列を含んでいること以外は上記例3に記載されている。

【0152】

図8および表2は、pCAI555をi.n.およびi.m.感作させたマウスの肺のクラミジア力価が9日目6例中6例で13,000IFU/肺(平均6,050)未満であり、一方、生理食塩水を感作させた偽性の対照マウスの値は106,100IFU/肺(平均39,625)であった(表2)。他の2種のプラスミドDNA構築物のpCAI116およびpCAI178では防御できず、感作マウスの肺の力価は生理食塩水を感作させた対照マウスで得られたものと同等であったので、DNAの感作自体は認められた防御効果の一因ではなかった。構築物pCAI116およびpCAI178は5'末端切断型76kDaタンパク質をコードするヌクレオチド配列が防御性のない配列をコードする肺炎クラミジアヌクレオチド配列およびヌクレオチド5'ニリン酸ホスホトランスフェラーゼタンパク質に置換されていること以外はpCAI555と同一である。

20

【表2】

30

マウス	種々のDNA感作構築物を感作させたb a l b / cマウスの肺における細菌存在量（封入体単位／肺）			
	感作構築物			
	生理食塩水	pCAI116	pCAI178	pCAI555
	9日目	9日目	9日目	9日目
1	1700	47700	80600	6100
2	36200	12600	31900	10700
3	106100	28600	30600	500
4	33500	17700	6500	5100
5	70400	77300	53000	1100
6	48700	17600	79500	12800
7	600			
8	19800			
9	29500			
10	100000			
11	15000			
12	56600			
13	60300			
14	88800			
15	30400			
16	69300			
17	47500			
18	96500			
19	30200			
20	84800			
21	3800			
22	65900			
23	33000			
平均値	49069.57	33583.33	47016.67	6050
標準偏差	32120.48	24832.67	29524.32	4967.80

【0153】

例7：

この例は3'末端切断型76kDaタンパク質遺伝子を含むプラスミドベクターpCAD76kDaの調製を示すものである。

3'末端切断型76kDaタンパク質遺伝子を5'プライマー（5'GCTCTAGACCGCCATGACAA AAAACATTATGCTTGGG3'）（配列番号13）および3'プライマー（5'CGGGATCCATAGA ACTG CTGCAGCGGG3'）（配列番号14）を用いるポリメラーゼ連鎖反応（PCR）によって、肺炎クラミジアゲノムDNAから増幅した。5'プライマーはXbaI制限部位、リボソーム結合部位、開始コドン、および76kDaタンパク質コード配列の5'末端の上流の7

10

20

30

40

50

65bp配列を含む。3'プライマーは76kDaタンパク質のコード452の下流の21bp配列、およびBamHI制限部位を含む。さらなるヌクレオチドを挿入してヒスタジタグとのフレーム内融合物を得た。ただし、765bp5'領域および21bp3'領域を含んだことは意図的なものではない。これらの配列は76kDaタンパク質遺伝子の一部ではない。しかしながら、この配列を用いて免疫防御が達成された(例6)。増幅後、QIAquick(商標)PCR精製キット(Qiagen)を用いてPCR断片を精製し、その後XbaIおよびBamHIで消化し、ヒトCMVプロモーターの制御下で転写する例8に記載のpCA-Myc-His真核生物発現ベクター(図6)へクローニングした。

【0154】

10

例8:

この例は真核生物発現ベクターpCA/Myc-Hisの調製を示す。プラスミドpcDNA3.1(-)Myc-HisC(Invitrogen)をSpeIおよびBamHIで制限処理してCMVプロモーターを除去し、残りのベクター断片を単離した。プラスミドVR-1012(Vical)由来のCMVプロモーターおよびイントロンAをSpeI/BamHI断片上に単離した。これらの断片を連結してプラスミドpCA/Myc-Hisを作出した。3'末端切断型76kDaタンパク質遺伝子を含んだPCR断片をXbaI/BamHIで制限処理したものをXbaIおよびBamHIで制限処理したプラスミドpCA/Myc-Hisと連結してプラスミドpCAD76kDaを作出した(図6)。

20

【0155】

得られたプラスミドpCAD76kDaをエレクトロポレーションによって大腸菌XL-1ブルー(Stratagene)へ導入し、これを50μg/mlのカルベニシリンを含むLB培地で増殖させた。プラスミドはエンド・フリー・プラスミド・ギガ・キット(商標)(Qiagen)大スケールDNA精製系によって単離した。DNA濃度は260nmの吸光度で求め、ゲル電気泳動に付して臭化エチジウム染色し、分子量標準と比較してプラスミドを確認した。遺伝子の5'および3'末端はLicorモデル4000L DNAシーケンサーおよびIRD-800標識プライマーを用いた配列決定によって確認した。

【0156】

例9:

30

この例は肺炎クラミジアの鼻腔攻撃に対する防御を達成するためのマウスの免疫化を示す。例7および8に記載されているように感作に用いるDNAプラスミドが肺炎クラミジア3'末端切断型76kDaタンパク質のコード配列を含んでいること以外は上記例3に記載されている。

【0157】

図9および表3は、pCAD76kDaをi.n.およびi.m.感作させたマウスの肺のクラミジア力価が5例中5例で2,400IFU/肺未満であり、一方、生理食塩水を感作させた、または改変されていないベクターを感作させた偽性の対照マウスの値の範囲はそれぞれ1,800~23,100IFU/肺(平均11,811)、および16,600~26,100IFU/肺(平均22,100)であった(表2)。改変されていないベクターによっては防御が認められないことから、DNA自体は認められた防御効果の一因ではないことが確認される。このことはさらに付加的なプラスミドDNA構築物では防御できず、その肺の平均力価が生理食塩水で感作された対照マウスで認められるものと同様であるという結果によって支持される。構築物pdagAは3'末端切断型76kDaタンパク質をコードするヌクレオチド配列がタンパク質dagAをコードする肺炎クラミジアヌクレオチド配列に置換されていること以外はpCAD76kDaと同一である。

40

【0158】

【表3】

マウス	種々のDNA感作構築物を感作させたbalb/cマウスの肺における細菌存在量（封入体単位/肺）			
	感作構築物			
	生理食塩水	ベクター	pdagA	pCAD76kDa
1	17700	19900	16000	1700
2	3900	16600	500	2000
3	1800	24300	18500	2300
4	16400	26100	12800	2100
5	11700	23600	6400	600
6	23100			
7	12000			
8	5300			
9	14400			
10	18700			
11	7300			
12	8400			
平均値	11725	22100	10840	1740
標準偏差	6567.71	3813.79	7344.59	673.05

10

20

30

【図面の簡単な説明】

【図1】 肺炎クラミジア由来の76kDaタンパク質遺伝子の全長ヌクレオチド配列（配列番号1）および76kDaタンパク質の推定アミノ酸配列（配列番号2）を示す。

【図2】 肺炎クラミジア76kDaタンパク質遺伝子の制限酵素解析を示す。

【図3】 肺炎クラミジア由来の3'末端切断型76kDaタンパク質遺伝子を含むヌクレオチド配列およびその対応する推定アミノ酸配列を示す（注：ヌクレオチド1～665および2122～2238は76kDaタンパク質遺伝子とは関連がない）。

40

【図4】 全長76kDa遺伝子を含むプラスミドpCACPNM555aの構成および構成要素を示す。

【図5】 5'末端切断型の76kDa遺伝子を含むプラスミドpCAI555の構成および構成要素を示す。

【図6】 図3の3'末端切断型の76kDa遺伝子を含むプラスミドpCAD76kDaの構成および構成要素を示す。

【図7】 DNA感作後のpCACPNM555aによる肺炎クラミジア感染に対する防御を示す。

【図8】 DNA感作後のpCAI555aによる肺炎クラミジア感染に対する防御を示す。

50

【図9】 DNA感作後のpCAD76kDaによる肺炎クラミジア感染に対する防御を示す。図7～9で、個々のデータ点は各動物についてのもの（白抜きの菱形）、ならびに各群の平均値および標準偏差（黒四角）を示す。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Aventis Pasteur Limited

<120> Chlamydia antigens and corresponding DNA fragments and uses thereof

<130> 77813-13

<140>

<141>

<150> US 60/132,270

<151> 1999-05-03

<150> US 60/141,276

<151> 1999-06-30

<160> 14

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 2156

<212> DNA

<213> Chlamydia pneumoniae

<220>

<221> CDS

<222> (101)..(2053)

<400> 1

ataaaatctt taaaaacagg ctcgcattaa ttattagtga gagctttttt tttatttttt 60

ataataaaaac taaaagattt ttattatttt ttgagttttt atg gtt aat cct att 115
Met Val Asn Pro Ile
1 5

ggt cca ggt cct ata gac gaa aca gaa cgc aca cct ccc gca gat ctt 163
Gly Pro Gly Pro Ile Asp Glu Thr Glu Arg Thr Pro Pro Ala Asp Leu
10 15 20

tct gct caa gga ttg gag gcg agt gca gca aat aag agt gcg gaa gct 211
Ser Ala Gln Gly Leu Glu Ala Ser Ala Ala Asn Lys Ser Ala Glu Ala
25 30 35

caa aga ata gca ggt gcg gaa gct aag cct aaa gaa tct aag acc gat 259
Gln Arg Ile Ala Gly Ala Glu Ala Lys Pro Lys Glu Ser Lys Thr Asp
40 45 50

tct gta gag cga tgg agc atc ttg cgt tct gca gtg aat gct ctc atg 307
Ser Val Glu Arg Trp Ser Ile Leu Arg Ser Ala Val Asn Ala Leu Met
55 60 65

agt ctg gca gat aag ctg ggt att gct tct agt aac agc tcg tct tct 355
Ser Leu Ala Asp Lys Leu Gly Ile Ala Ser Ser Asn Ser Ser Ser Ser
70 75 80 85

10

20

30

act agc aga tct gca gac gtg gac tca acg aca gcg acc gca cct acg	403
Thr Ser Arg Ser Ala Asp Val Asp Ser Thr Thr Ala Thr Ala Pro Thr	
90 95 100	
cct cct cca ccc acg ttt gat gat tat aag act caa gcg caa aca gct	451
Pro Pro Pro Pro Thr Phe Asp Asp Tyr Lys Thr Gln Ala Gln Thr Ala	
105 110 115	
tac gat act atc ttt acc tca aca tca cta gct gac ata cag gct gct	499
Tyr Asp Thr Ile Phe Thr Ser Thr Ser Leu Ala Asp Ile Gln Ala Ala	
120 125 130	
ttg gtg agc ctc cag gat gct gtc act aat ata aag gat aca gcg gct	547
Leu Val Ser Leu Gln Asp Ala Val Thr Asn Ile Lys Asp Thr Ala Ala	
135 140 145	
act gat gag gaa acc gca atc gct gcg gag tgg gaa act aag aat gcc	595
Thr Asp Glu Glu Thr Ala Ile Ala Ala Glu Trp Glu Thr Lys Asn Ala	
150 155 160 165	
gat gca gtt aaa gtt ggc gcg caa att aca gaa tta gcg aaa tat gct	643
Asp Ala Val Lys Val Gly Ala Gln Ile Thr Glu Leu Ala Lys Tyr Ala	
170 175 180	
tcg gat aac caa gcg att ctt gac tct tta ggt aaa ctg act tcc ttc	691
Ser Asp Asn Gln Ala Ile Leu Asp Ser Leu Gly Lys Leu Thr Ser Phe	
185 190 195	
gac ctc tta cag gct gct ctt ctc caa tct gta gca aac aat aac aaa	739
Asp Leu Leu Gln Ala Ala Leu Leu Gln Ser Val Ala Asn Asn Asn Lys	
200 205 210	
gca gct gag ctt ctt aaa gag atg caa gat aac cca gta gtc cca ggg	787
Ala Ala Glu Leu Leu Lys Glu Met Gln Asp Asn Pro Val Val Pro Gly	
215 220 225	
aaa acg cct gca att gct caa tct tta gtt gat cag aca gat gct aca	835
Lys Thr Pro Ala Ile Ala Gln Ser Leu Val Asp Gln Thr Asp Ala Thr	
230 235 240 245	
gcg aca cag ata gag aaa gat gga aat gcg att agg gat gca tat ttt	883
Ala Thr Gln Ile Glu Lys Asp Gly Asn Ala Ile Arg Asp Ala Tyr Phe	
250 255 260	
gca gga cag aac gct agt gga gct gta gaa aat gct aaa tct aat aac	931
Ala Gly Gln Asn Ala Ser Gly Ala Val Glu Asn Ala Lys Ser Asn Asn	
265 270 275	
agt ata agc aac ata gat tca gct aaa gca gca atc gct act gct aag	979
Ser Ile Ser Asn Ile Asp Ser Ala Lys Ala Ala Ile Ala Thr Ala Lys	
280 285 290	
aca caa ata gct gaa gct cag aaa aag ttc ccc gac tct cca att ctt	1027
Thr Gln Ile Ala Glu Ala Gln Lys Lys Phe Pro Asp Ser Pro Ile Leu	
295 300 305	

10

20

30

caa gaa gcg gaa caa atg gta ata cag gct gag aaa gat ctt aaa aat 1075
 Gln Glu Ala Glu Gln Met Val Ile Gln Ala Glu Lys Asp Leu Lys Asn
 310 315 320 325

atc aaa cct gca gat ggt tct gat gtt cca aat cca gga act aca gtt 1123
 Ile Lys Pro Ala Asp Gly Ser Asp Val Pro Asn Pro Gly Thr Thr Val
 330 335 340

gga ggc tcc aag caa caa gga agt agt att ggt agt att cgt gtt tcc 1171
 Gly Gly Ser Lys Gln Gln Gly Ser Ser Ile Gly Ser Ile Arg Val Ser
 345 350 355

atg ctg tta gat gat gct gaa aat gag acc gct tcc att ttg atg tct 1219
 Met Leu Leu Asp Asp Ala Glu Asn Glu Thr Ala Ser Ile Leu Met Ser
 360 365 370

ggg ttt cgt cag atg att cac atg ttc aat acg gaa aat cct gat tct 1267
 Gly Phe Arg Gln Met Ile His Met Phe Asn Thr Glu Asn Pro Asp Ser
 375 380 385

caa gct gcc caa cag gag ctc gca gca caa gct aga gca gcg aaa gcc 1315
 Gln Ala Ala Gln Gln Glu Leu Ala Ala Gln Ala Arg Ala Ala Lys Ala
 390 395 400 405

gct gga gat gac agt gct gct gca gcg ctg gca gat gct cag aaa gct 1363
 Ala Gly Asp Asp Ser Ala Ala Ala Ala Leu Ala Asp Ala Gln Lys Ala
 410 415 420

tta gaa gcg gct cta ggt aaa gct ggg caa caa cag ggc ata ctc aat 1411
 Leu Glu Ala Ala Leu Gly Lys Ala Gly Gln Gln Gln Gly Ile Leu Asn
 425 430 435

gct tta gga cag atc gct tct gct gct gtt gtg agc gca gga gtt cct 1459
 Ala Leu Gly Gln Ile Ala Ser Ala Ala Val Val Ser Ala Gly Val Pro
 440 445 450

ccc gct gca gca agt tct ata ggg tca tct gta aaa cag ctt tac aag 1507
 Pro Ala Ala Ala Ser Ser Ile Gly Ser Ser Val Lys Gln Leu Tyr Lys
 455 460 465

acc tca aaa tct aca ggt tct gat tat aaa aca cag ata tca gca ggt 1555
 Thr Ser Lys Ser Thr Gly Ser Asp Tyr Lys Thr Gln Ile Ser Ala Gly
 470 475 480 485

tat gat gct tac aaa tcc atc aat gat gcc tat ggt agg gca cga aat 1603
 Tyr Asp Ala Tyr Lys Ser Ile Asn Asp Ala Tyr Gly Arg Ala Arg Asn
 490 495 500

gat gcg act cgt gat gtg ata aac aat gta agt acc ccc gct ctc aca 1651
 Asp Ala Thr Arg Asp Val Ile Asn Asn Val Ser Thr Pro Ala Leu Thr
 505 510 515

cga tcc gtt cct aga gca cga aca gaa gct cga gga cca gaa aaa aca 1699
 Arg Ser Val Pro Arg Ala Arg Thr Glu Ala Arg Gly Pro Glu Lys Thr
 520 525 530

10

20

30

gat caa gcc ctc gct agg gtg att tct ggc aat agc aga act ctt gga 1747
 Asp Gln Ala Leu Ala Arg Val Ile Ser Gly Asn Ser Arg Thr Leu Gly
 535 540 545

gat gtc tat agt caa gtt tcg gca cta caa tct gta atg cag atc atc 1795
 Asp Val Tyr Ser Gln Val Ser Ala Leu Gln Ser Val Met Gln Ile Ile
 550 555 560 565

cag tcg aat cct caa gcg aat aat gag gag atc aga caa aag ctt aca 1843
 Gln Ser Asn Pro Gln Ala Asn Asn Glu Glu Ile Arg Gln Lys Leu Thr
 570 575 580

tcg gca gtg aca aag cct cca cag ttt ggc tat cct tat gtg caa ctt 1891
 Ser Ala Val Thr Lys Pro Pro Gln Phe Gly Tyr Pro Tyr Val Gln Leu
 585 590 595

tct aat gac tct aca cag aag ttc ata gct aaa tta gaa agt ttg ttt 1939
 Ser Asn Asp Ser Thr Gln Lys Phe Ile Ala Lys Leu Glu Ser Leu Phe
 600 605 610

gct gaa gga tct agg aca gca gct gaa ata aaa gca ctt tcc ttt gaa 1987
 Ala Glu Gly Ser Arg Thr Ala Ala Glu Ile Lys Ala Leu Ser Phe Glu
 615 620 625

acg aac tcc ttg ttt att cag cag gtg ctg gtc aat atc ggc tct cta 2035
 Thr Asn Ser Leu Phe Ile Gln Gln Val Leu Val Asn Ile Gly Ser Leu
 630 635 640 645

tat tct ggt tat ctc caa taacaacacc taagtgttcg tttggagaga 2083
 Tyr Ser Gly Tyr Leu Gln
 650

ttattatgtg ctttggttaag gcctttgttg aggccttacc aacacactag aacgatcttc 2143

aataaataaa aga 2156

10

20

<210> 2
 <211> 651
 <212> PRT
 <213> Chlamydia pneumoniae

<400> 2
 Met Val Asn Pro Ile Gly Pro Gly Pro Ile Asp Glu Thr Glu Arg Thr
 1 5 10 15
 Pro Pro Ala Asp Leu Ser Ala Gln Gly Leu Glu Ala Ser Ala Ala Asn
 20 25 30
 Lys Ser Ala Glu Ala Gln Arg Ile Ala Gly Ala Glu Ala Lys Pro Lys
 35 40 45
 Glu Ser Lys Thr Asp Ser Val Glu Arg Trp Ser Ile Leu Arg Ser Ala
 50 55 60

30

Val Asn Ala Leu Met Ser Leu Ala Asp Lys Leu Gly Ile Ala Ser Ser
65 70 75 80

Asn Ser Ser Ser Ser Thr Ser Arg Ser Ala Asp Val Asp Ser Thr Thr
85 90 95

Ala Thr Ala Pro Thr Pro Pro Pro Thr Phe Asp Asp Tyr Lys Thr
100 105 110

Gln Ala Gln Thr Ala Tyr Asp Thr Ile Phe Thr Ser Thr Ser Leu Ala
115 120 125

Asp Ile Gln Ala Ala Leu Val Ser Leu Gln Asp Ala Val Thr Asn Ile
130 135 140

Lys Asp Thr Ala Ala Thr Asp Glu Glu Thr Ala Ile Ala Ala Glu Trp
145 150 155 160

Glu Thr Lys Asn Ala Asp Ala Val Lys Val Gly Ala Gln Ile Thr Glu
165 170 175

Leu Ala Lys Tyr Ala Ser Asp Asn Gln Ala Ile Leu Asp Ser Leu Gly
180 185 190

Lys Leu Thr Ser Phe Asp Leu Leu Gln Ala Ala Leu Leu Gln Ser Val
195 200 205

Ala Asn Asn Asn Lys Ala Ala Glu Leu Leu Lys Glu Met Gln Asp Asn
210 215 220

Pro Val Val Pro Gly Lys Thr Pro Ala Ile Ala Gln Ser Leu Val Asp
225 230 235 240

Gln Thr Asp Ala Thr Ala Thr Gln Ile Glu Lys Asp Gly Asn Ala Ile
245 250 255

Arg Asp Ala Tyr Phe Ala Gly Gln Asn Ala Ser Gly Ala Val Glu Asn
260 265 270

Ala Lys Ser Asn Asn Ser Ile Ser Asn Ile Asp Ser Ala Lys Ala Ala
275 280 285

Ile Ala Thr Ala Lys Thr Gln Ile Ala Glu Ala Gln Lys Lys Phe Pro
290 295 300

Asp Ser Pro Ile Leu Gln Glu Ala Glu Gln Met Val Ile Gln Ala Glu
305 310 315 320

Lys Asp Leu Lys Asn Ile Lys Pro Ala Asp Gly Ser Asp Val Pro Asn
325 330 335

Pro Gly Thr Thr Val Gly Gly Ser Lys Gln Gln Gly Ser Ser Ile Gly
340 345 350

10

20

30

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

10

20

30

Asn Ile Gly Ser Leu Tyr Ser Gly Tyr Leu Gln
 645 650

<210> 3
 <211>
 <212> DNA
 <213> Chlamydia pneumoniae
 <220> 1842
 <221> CDS
 <222> (101..(2053)

<400> 3
 atg agt ctg gca gat aag ctg ggt att gct tct agt aac agc tcg tct 48
 Met Ser Leu Ala Asp Lys Leu Gly Ile Ala Ser Ser Asn Ser Ser Ser
 1 5 10 15 10
 tct act agc aga tct gca gac gtg gac tca acg aca gcg acc gca cct 96
 Ser Thr Ser Arg Ser Ala Asp Val Asp Ser Thr Thr Ala Thr Ala Pro
 20 25 30
 acg cct cct cca ccc acg ttt gat gat tat aag act caa gcg caa aca 144
 Thr Pro Pro Pro Thr Phe Asp Asp Tyr Lys Thr Gln Ala Gln Thr
 35 40 45
 gct tac gat act atc ttt acc tca aca tca cta gct gac ata cag gct 192
 Ala Tyr Asp Thr Ile Phe Thr Ser Thr Ser Leu Ala Asp Ile Gln Ala
 50 55 60
 gct ttg gtg agc ctc cag gat gct gtc act aat ata aag gat aca gcg 240
 Ala Leu Val Ser Leu Gln Asp Ala Val Thr Asn Ile Lys Asp Thr Ala
 65 70 75 80 20
 gct act gat gag gaa acc gca atc gct gcg gag tgg gaa act aag aat 288
 Ala Thr Asp Glu Glu Thr Ala Ile Ala Ala Glu Trp Glu Thr Lys Asn
 85 90 95
 gcc gat gca gtt aaa gtt ggc gcg caa att aca gaa tta gcg aaa tat 336
 Ala Asp Ala Val Lys Val Gly Ala Gln Ile Thr Glu Leu Ala Lys Tyr
 100 105 110
 gct tcg gat aac caa gcg att ctt gac tct tta ggt aaa ctg act tcc 384
 Ala Ser Asp Asn Gln Ala Ile Leu Asp Ser Leu Gly Lys Leu Thr Ser
 115 120 125
 ttc gac ctc tta cag gct gct ctt ctc caa tct gta gca aac aat aac 432
 Phe Asp Leu Leu Gln Ala Ala Leu Leu Gln Ser Val Ala Asn Asn Asn
 130 135 140 30
 aaa gca gct gag ctt ctt aaa gag atg caa gat aac cca gta gtc cca 480
 Lys Ala Ala Glu Leu Leu Lys Glu Met Gln Asp Asn Pro Val Val Pro
 145 150 155 160
 ggg aaa acg cct gca att gct caa tct tta gtt gat cag aca gat gct 528
 Gly Lys Thr Pro Ala Ile Ala Gln Ser Leu Val Asp Gln Thr Asp Ala
 165 170 175

10

20

30

aca gcg aca cag ata gag aaa gat gga aat gcg att agg gat gca tat 576
 Thr Ala Thr Gln Ile Glu Lys Asp Gly Asn Ala Ile Arg Asp Ala Tyr
 180 190 195

ttt gca gga cag aac gct agt gga gct gta gaa aat gct aaa tct aat 624
 Phe Ala Gly Gln Asn Ala Ser Gly Ala Val Glu Asn Ala Lys Ser Asn
 200 205 210

aac agt ata agc aac ata gat tca gct aaa gca gca atc gct act gct 672
 Asn Ser Ile Ser Asn Ile Asp Ser Ala Lys Ala Ala Ile Ala Thr Ala
 215 220 225

aag aca caa ata gct gaa gct cag aaa aag ttc ccc gac tct cca att 720
 Lys Thr Gln Ile Ala Glu Ala Gln Lys Lys Phe Pro Asp Ser Pro Ile
 230 235 240 245

ctt caa gaa gcg gaa caa atg gta ata cag gct gag aaa gat ctt aaa 768
 Leu Gln Glu Ala Glu Gln Met Val Ile Gln Ala Glu Lys Asp Leu Lys
 250 255 260

aat atc aaa cct gca gat ggt tct gat gtt cca aat cca gga act aca 816
 Asn Ile Lys Pro Ala Asp Gly Ser Asp Val Pro Asn Pro Gly Thr Thr
 265 270 275

gtt gga ggc tcc aag caa caa gga agt agt att ggt agt att cgt gtt 864
 Val Gly Gly Ser Lys Gln Gln Gly Ser Ser Ile Gly Ser Ile Arg Val
 280 285 290

tcc atg ctg tta gat gat gct gaa aat gag acc gct tcc att ttg atg 912
 Ser Met Leu Leu Asp Asp Ala Glu Asn Glu Thr Ala Ser Ile Leu Met
 295 300 305

tct ggg ttt cgt cag atg att cac atg ttc aat acg gaa aat cct gat 960
 Ser Gly Phe Arg Gln Met Ile His Met Phe Asn Thr Glu Asn Pro Asp
 310 315 320 325

tct caa gct gcc caa cag gag ctc gca gca caa gct aga gca gcg aaa 1008
 Ser Gln Ala Ala Gln Gln Glu Leu Ala Ala Gln Ala Arg Ala Ala Lys
 330 335 340

gcc gct gga gat gac agt gct gct gca gcg ctg gca gat gct cag aaa 1056
 Ala Ala Gly Asp Asp Ser Ala Ala Ala Ala Leu Ala Asp Ala Gln Lys
 345 350 355

gct tta gaa gcg gct cta ggt aaa gct ggg caa caa cag ggc ata ctc 1104
 Ala Leu Glu Ala Ala Leu Gly Lys Ala Gly Gln Gln Gln Gly Ile Leu
 360 365 370

aat gct tta gga cag atc gct tct gct gct gtt gtg agc gca gga gtt 1152
 Asn Ala Leu Gly Gln Ile Ala Ser Ala Ala Val Val Ser Ala Gly Val
 375 380 385

CCT ccc gct gca gca agt tct ata ggg tca tct gta aaa cag ctt tac 1200
 Pro Pro Ala Ala Ala Ser Ser Ile Gly Ser Ser Val Lys Gln Leu Tyr
 390 395 400 405

10

20

30

aag acc tca aaa tct aca ggt tct gat tat aaa aca cag ata tca gca 1248
 Lys Thr Ser Lys Ser Thr Gly Ser Asp Tyr Lys Thr Gln Ile Ser Ala
 410 415 420

ggt tat gat gct tac aaa tcc atc aat gat gcc tat ggt agg gca cga 1296
 Gly Tyr Asp Ala Tyr Lys Ser Ile Asn Asp Ala Tyr Gly Arg Ala Arg
 425 430 435

aat gat gcg act cgt gat gtg ata aac aat gta agt acc ccc gct ctc 1344
 Asn Asp Ala Thr Arg Asp Val Ile Asn Asn Val Ser Thr Pro Ala Leu
 440 445 450

aca cga tcc gtt cct aga gca cga aca gaa gct cga gga cca gaa aaa 1392
 Thr Arg Ser Val Pro Arg Ala Arg Thr Glu Ala Arg Gly Pro Glu Lys
 455 460 465

aca gat caa gcc ctc gct agg gtg att tct ggc aat agc aga act ctt 1440
 Thr Asp Gln Ala Leu Ala Arg Val Ile Ser Gly Asn Ser Arg Thr Leu
 470 475 480 485

gga gat gtc tat agt caa gtt tcg gca cta caa tct gta atg cag atc 1488
 Gly Val Tyr Ser Gln Val Ser Ala Leu Gln Ser Val Met Gln Ile Ile
 490 495 500

act cag tcg aat cct caa gcg aat aat gag gag atc aga caa aag ctt 1536
 Ile Gln Ser Asn Pro Gln Ala Asn Asn Glu Glu Ile Arg Gln Lys Leu
 505 510 515

aca tcg gca gtg aca aag cct cca cag ttt ggc tat cct tat gtg caa 1584
 Thr Ser Ala Val Thr Lys Pro Pro Gln Phe Gly Tyr Pro Tyr Val Gln
 520 525 530

ctt tct aat gac tct aca cag aag ttc ata gct aaa tta gaa agt ttg 1632
 Leu Ser Asn Asp Ser Thr Gln Lys Phe Ile Ala Lys Leu Glu Ser Leu
 535 540 545

ttt gct gaa gga tct agg aca gca gct gaa ata aaa gca ctt tcc ttt 1670
 Phe Ala Glu Gly Ser Arg Thr Ala Ala Glu Ile Lys Ala Leu Ser Phe
 550 555 560 565

gaa acg aac tcc ttg ttt att cag cag gtg ctg gtc aat atc ggc tct 1718
 Glu Thr Asn Ser Leu Phe Ile Gln Gln Val Leu Val Asn Ile Gly Ser
 570 575 580

cta tat tct ggt tat ctc caa taacaacacc taagtgttcg ttggagaga 1769
 Leu Tyr Ser Gly Tyr Leu Gln
 585

ttattatgtg ctttggtaag gcctttgttg aggccttacc aacacactag aacgatcttc 1829

aataaataaa aga 1842

10

20

30

<210> 4

<211> 583

<212> PRT

<213> Chlamydia pneumoniae

<400> 4

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

Ser Thr Ser Arg Ser Ala Asp Val Asp Ser Thr Thr Ala Thr Ala Pro
 20 25 30

Thr Pro Pro Pro Pro Thr Phe Asp Asp Tyr Lys Thr Gln Ala Gln Thr
 35 40 45

Ala Tyr Asp Thr Ile Phe Thr Ser Thr Ser Leu Ala Asp Ile Gln Ala
 50 55 60

Ala Leu Val Ser Leu Gln Asp Ala Val Thr Asn Ile Lys Asp Thr Ala
 65 70 75 80

Ala Thr Asp Glu Glu Thr Ala Ile Ala Ala Glu Trp Glu Thr Lys Asn
 85 90 95

Ala Asp Ala Val Lys Val Gly Ala Gln Ile Thr Glu Leu Ala Lys Tyr
 100 105 110

Ala Ser Asp Asn Gln Ala Ile Leu Asp Ser Leu Gly Lys Leu Thr Ser
 115 120 125

Phe Asp Leu Leu Gln Ala Ala Leu Leu Gln Ser Val Ala Asn Asn Asn
 130 135 140

Lys Ala Ala Glu Leu Leu Lys Glu Met Gln Asp Asn Pro Val Val Pro
 145 150 155 160

Gly Lys Thr Pro Ala Ile Ala Gln Ser Leu Val Asp Gln Thr Asp Ala
 165 170 175

Thr Ala Thr Gln Ile Glu Lys Asp Gly Asn Ala Ile Arg Asp Ala Tyr
 180 185 190

Phe Ala Gly Gln Asn Ala Ser Gly Ala Val Glu Asn Ala Lys Ser Asn
 195 200 205

Asn Ser Ile Ser Asn Ile Asp Ser Ala Lys Ala Ala Ile Ala Thr Ala
 210 215 220

Lys Thr Gln Ile Ala Glu Ala Gln Lys Lys Phe Pro Asp Ser Pro Ile
 225 230 235 240

Leu Gln Glu Ala Glu Gln Met Val Ile Gln Ala Glu Lys Asp Leu Lys
 245 250 255

10

20

30

Asn Ile Lys Pro Ala Asp Gly Ser Asp Val Pro Asn Pro Gly Thr Thr
 260 265 270
 Val Gly Gly Ser Lys Gln Gln Gly Ser Ser Ile Gly Ser Ile Arg Val
 275 280 285
 Ser Met Leu Leu Asp Asp Ala Glu Asn Glu Thr Ala Ser Ile Leu Met
 290 295 300
 Ser Gly Phe Arg Gln Met Ile His Met Phe Asn Thr Glu Asn Pro Asp
 305 310 315 320
 Ser Gln Ala Ala Gln Gln Glu Leu Ala Ala Gln Ala Arg Ala Ala Lys
 325 330 335
 Ala Ala Gly Asp Asp Ser Ala Ala Ala Ala Leu Ala Asp Ala Gln Lys
 340 345 350
 Ala Leu Glu Ala Ala Leu Gly Lys Ala Gly Gln Gln Gln Gly Ile Leu
 355 360 365
 Asn Ala Leu Gly Gln Ile Ala Ser Ala Ala Val Val Ser Ala Gly Val
 370 375 380
 Pro Pro Ala Ala Ala Ser Ser Ile Gly Ser Ser Val Lys Gln Leu Tyr
 385 390 395 400
 Lys Thr Ser Lys Ser Thr Gly Ser Asp Tyr Lys Thr Gln Ile Ser Ala
 405 410 415
 Gly Tyr Asp Ala Tyr Lys Ser Ile Asn Asp Ala Tyr Gly Arg Ala Arg
 420 425 430
 Asn Asp Ala Thr Arg Asp Val Ile Asn Asn Val Ser Thr Pro Ala Leu
 435 440 445
 Thr Arg Ser Val Pro Arg Ala Arg Thr Glu Ala Arg Gly Pro Glu Lys
 450 455 460
 Thr Asp Gln Ala Leu Ala Arg Val Ile Ser Gly Asn Ser Arg Thr Leu
 465 470 475 480
 Gly Asp Val Tyr Ser Gln Val Ser Ala Leu Gln Ser Val Met Gln Ile
 485 490 495
 Ile Gln Ser Asn Pro Gln Ala Asn Asn Glu Glu Ile Arg Gln Lys Leu
 500 505 510
 Thr Ser Ala Val Thr Lys Pro Pro Gln Phe Gly Tyr Pro Tyr Val Gln
 515 520 525
 Leu Ser Asn Asp Ser Thr Gln Lys Phe Ile Ala Lys Leu Glu Ser Leu
 530 535 540

10

20

30

Phe Ala Glu Gly Ser Arg Thr Ala Ala Glu Ile Lys Ala Leu Ser Phe
 545 550 555 560

Glu Thr Asn Ser Leu Phe Ile Gln Gln Val Leu Val Asn Ile Gly Ser
 565 570 575

Leu Tyr Ser Gly Tyr Leu Gln
 580

<210> 5
 <211> 1456
 <212> DNA
 <213> Chlamydia pneumoniae

10

<220>
 <221> CDS
 <222> (101)..(1456)

<400> 5
 ataaaatcct taasaacagg ctgcattaa ttattagtga gagctttttt tttatttttt 60

ataataaaac taaaagattt ttattatttt ttgagttttt atg gtt aat cct att 115
 Met Val Asn Pro Ile
 1 5

ggt cca ggt cct ata gac gaa aca gaa cgc aca cct ccc gca gat ctt 163
 Gly Pro Gly Pro Ile Asp Glu Thr Glu Arg Thr Pro Pro Ala Asp Leu
 10 15 20

20

tct gct caa gga ttg gag gcg agt gca gca aat aag agt gcg gaa gct 211
 Ser Ala Gln Gly Leu Glu Ala Ser Ala Ala Asn Lys Ser Ala Glu Ala
 25 30 35

caa aga ata gca ggt gcg gaa gct aag cct aaa gaa tct aag acc gat 259
 Gln Arg Ile Ala Gly Ala Glu Ala Lys Pro Lys Glu Ser Lys Thr Asp
 40 45 50

tct gta gag cga tgg agc atc ttg cgt tct gca gtg aat gct ctc atg 307
 Ser Val Glu Arg Trp Ser Ile Leu Arg Ser Ala Val Asn Ala Leu Met
 55 60 65

agt ctg gca gat aag ctg ggt att gct tct agt aac agc tcg tct tct 355
 Ser Leu Ala Asp Lys Leu Gly Ile Ala Ser Ser Asn Ser Ser Ser Ser
 70 75 80 85

30

act agc aga tct gca gac gtg gac tca acg aca gcg acc gca cct acg 403
 Thr Ser Arg Ser Ala Asp Val Asp Ser Thr Thr Ala Thr Ala Pro Thr
 90 95 100

cct cct cca ccc acg ttt gat gat tat aag act caa gcg caa aca gct 451
 Pro Pro Pro Pro Thr Phe Asp Asp Tyr Lys Thr Gln Ala Gln Thr Ala
 105 110 115

gga ggc tcc aag caa caa gga agt agt att ggt agt att cgt gtt tcc 1171
 Gly Gly Ser Lys Gln Gln Gly Ser Ser Ile Gly Ser Ile Arg Val Ser
 345 350 355

atg ctg tta gat gat gct gaa aat gag acc gct tcc att ttg atg tct 1219
 Met Leu Leu Asp Asp Ala Glu Asn Glu Thr Ala Ser Ile Leu Met Ser
 360 365 370

ggg ttt cgt cag atg att cac atg ttc aat acg gaa aat cct gat tct 1267
 Gly Phe Arg Gln Met Ile His Met Phe Asn Thr Glu Asn Pro Asp Ser
 375 380 385

caa gct gcc caa cag gag ctc gca gca caa gct aga gca gcg aaa gcc 1315
 Gln Ala Ala Gln Gln Glu Leu Ala Ala Gln Ala Arg Ala Ala Lys Ala
 390 395 400 405

gct gga gat gac agt gct gct gca gcg ctg gca gat gct cag aaa gct 1363
 Ala Gly Asp Asp Ser Ala Ala Ala Leu Ala Asp Ala Gln Lys Ala
 410 415 420

tta gaa gcg gct cta ggt aaa gct ggg caa caa cag ggc ata ctc aat 1411
 Leu Glu Ala Ala Leu Gly Lys Ala Gly Gln Gln Gln Gly Ile Leu Asn
 425 430 435

gct tta gga cag atc gct tct gct gct gtt gtg agc gca gga gta 1456
 Ala Leu Gly Gln Ile Ala Ser Ala Val Val Ser Ala Gly Val
 440 445 450

10

<210> 6
 <211> 452
 <212> PRT
 <213> Chlamydia pneumoniae

20

<400> 6
 Met Val Asn Pro Ile Gly Pro Gly Pro Ile Asp Glu Thr Glu Arg Thr
 1 5 10 15

Pro Pro Ala Asp Leu Ser Ala Gln Gly Leu Glu Ala Ser Ala Ala Asn
 20 25 30

Lys Ser Ala Glu Ala Gln Arg Ile Ala Gly Ala Glu Ala Lys Pro Lys
 35 40 45

Glu Ser Lys Thr Asp Ser Val Glu Arg Trp Ser Ile Leu Arg Ser Ala
 50 55 60

Val Asn Ala Leu Met Ser Leu Ala Asp Lys Leu Gly Ile Ala Ser Ser
 65 70 75 80

Asn Ser Ser Ser Ser Thr Ser Arg Ser Ala Asp Val Asp Ser Thr Thr
 85 90 95

Ala Thr Ala Pro Thr Pro Pro Pro Pro Thr Phe Asp Asp Tyr Lys Thr
 100 105 110

30

Gln Ala Gln Thr Ala Tyr Asp Thr Ile Phe Thr Ser Thr Ser Leu Ala
 115 120 125
 Asp Ile Gln Ala Ala Leu Val Ser Leu Gln Asp Ala Val Thr Asn Ile
 130 135 140
 Lys Asp Thr Ala Ala Thr Asp Glu Glu Thr Ala Ile Ala Ala Glu Trp
 145 150 155 160
 Glu Thr Lys Asn Ala Asp Ala Val Lys Val Gly Ala Gln Ile Thr Glu
 165 170 175
 Leu Ala Lys Tyr Ala Ser Asp Asn Gln Ala Ile Leu Asp Ser Leu Gly
 180 185 190
 Lys Leu Thr Ser Phe Asp Leu Leu Gln Ala Ala Leu Leu Gln Ser Val
 195 200 205
 Ala Asn Asn Asn Lys Ala Ala Glu Leu Leu Lys Glu Met Gln Asp Asn
 210 215 220
 Pro Val Val Pro Gly Lys Thr Pro Ala Ile Ala Gln Ser Leu Val Asp
 225 230 235 240
 Gln Thr Asp Ala Thr Ala Thr Gln Ile Glu Lys Asp Gly Asn Ala Ile
 245 250 255
 Arg Asp Ala Tyr Phe Ala Gly Gln Asn Ala Ser Gly Ala Val Glu Asn
 260 265 270
 Ala Lys Ser Asn Asn Ser Ile Ser Asn Ile Asp Ser Ala Lys Ala Ala
 275 280 285
 Ile Ala Thr Ala Lys Thr Gln Ile Ala Glu Ala Gln Lys Lys Phe Pro
 290 295 300
 Asp Ser Pro Ile Leu Gln Glu Ala Glu Gln Met Val Ile Gln Ala Glu
 305 310 315 320
 Lys Asp Leu Lys Asn Ile Lys Pro Ala Asp Gly Ser Asp Val Pro Asn
 325 330 335
 Pro Gly Thr Thr Val Gly Gly Ser Lys Gln Gln Gly Ser Ser Ile Gly
 340 345 350
 Ser Ile Arg Val Ser Met Leu Leu Asp Asp Ala Glu Asn Glu Thr Ala
 355 360 365
 Ser Ile Leu Met Ser Gly Phe Arg Gln Met Ile His Met Phe Asn Thr
 370 375 380
 Glu Asn Pro Asp Ser Gln Ala Ala Gln Gln Glu Leu Ala Ala Gln Ala
 385 390 395 400

10

20

30

Arg Ala Ala Lys Ala Ala Gly Asp Asp Ser Ala Ala Ala Ala Leu Ala
 405 410 415

Asp Ala Gln Lys Ala Leu Glu Ala Ala Leu Gly Lys Ala Gly Gln Gln
 420 425 430

Gln Gly Ile Leu Asn Ala Leu Gly Gln Ile Ala Ser Ala Ala Val Val
 435 440 445

Ser Ala Gly Val
 450

<210> 7
 <211> 2238
 <212> DNA
 <213> Chlamydia pneumoniae

10

<220>
 <221> CDS
 <222> (766)..(2235)

<400> 7
 atgacaaaaa aacattatgc ttgggttga gaagggatcc tcaatcgttt gcctaaacag 60
 ttttttgtga aatgtagtgt tgcgactgg aacacattcg ttccttcaga aacctccact 120
 acagaaaaag ctgctacaaa cgctatgaaa tacaataact gtgtttggca gtggctcgtc 180
 ggaagcata gtcaggttcc ttggatcaat ggacagaaaa agcctctata tctttatgga 240
 gctttcttaa tgaacccttt agcaaaggct acgaagacta cgtaaagtgg aaaagaaaac 300
 ctagcttgggt ttattggagg aactttaggg ggactcagaa aagctggaga ctggctcgtc 360
 acagtacggt atgagtatgt cgaagccttg tgggtccag aaatagatgt ttcagggatt 420
 ggccgtggta atttatataa gttttggttc gcccaagcaa ttgctgctaa ctatgatcct 480
 aaagaggcta atggttttac aaattataaa ggattttccg ctctatatat gtatggcacc 540
 acagattctc tatcattcag agcttatggg gcttactcca aaccagcaaa cgataaactc 600
 ggcagtgatt ttactttccg aaagtttgat ctaggataaa tttcagcgtt ttaagtcaaa 660
 ttttaataaa atctttaaaa acaggctcgc attaattatt agtgagagct ttttttttat 720
 tttttataat aaaactaaaa gatttttatt attttttgag ttttt atg gtt aat cct 777
 Met Val Asn Pro

20

30

1
 att ggt cca ggt cct ata gac gaa aca gaa cgc aca cct ccc gca gat 825
 Ile Gly Pro Gly Pro Ile Asp Glu Thr Glu Arg Thr Pro Pro Ala Asp
 5 10 15 20

ctt tct gct caa gga ttg gag gcg agt gca gca aat aag agt gcg gaa Leu Ser Ala Gln Gly Leu Glu Ala Ser Ala Ala Asn Lys Ser Ala Glu 25 30 35	873	
gct caa aga ata gca ggt gcg gaa gct aag cct aaa gaa tct aag acc Ala Gln Arg Ile Ala Gly Ala Glu Ala Lys Pro Lys Glu Ser Lys Thr 40 45 50	921	
gat tct gta gag cga tgg agc atc ttg cgt tct gca gtg aat gct ctc Asp Ser Val Glu Arg Trp Ser Ile Leu Arg Ser Ala Val Asn Ala Leu 55 60 65	969	
atg agt ctg gca gat aag ctg ggt att gct tct agt aac agc tcg tct Met Ser Leu Ala Asp Lys Leu Gly Ile Ala Ser Ser Asn Ser Ser Ser 70 75 80	1017	10
tct act agc aga tct gca gac gtg gac tca acg aca gcg acc gca cct Ser Thr Ser Arg Ser Ala Asp Val Asp Ser Thr Thr Ala Thr Ala Pro 85 90 95 100	1065	
acg cct cct cca ccc acg ttt gat gat tat aag act caa gcg caa aca Thr Pro Pro Pro Thr Phe Asp Asp Tyr Lys Thr Gln Ala Gln Thr 105 110 115	1113	
gct tac gat act atc ttt acc tca aca tca cta gct gac ata cag gct Ala Tyr Asp Thr Ile Phe Thr Ser Thr Ser Leu Ala Asp Ile Gln Ala 120 125 130	1161	
gct ttg gtg agc ctc cag gat gct gtc act aat ata aag gat aca gcg Ala Leu Val Ser Leu Gln Asp Ala Val Thr Asn Ile Lys Asp Thr Ala 135 140 145	1209	20
gct act gat gag gaa acc gca atc gct gcg gag tgg gaa act aag aat Ala Thr Asp Glu Glu Thr Ala Ile Ala Ala Glu Trp Glu Thr Lys Asn 150 155 160	1257	
gcc gat gca gtt aaa gtt ggc gcg caa att aca gaa tta gcg aaa tat Ala Asp Ala Val Lys Val Gly Ala Gln Ile Thr Glu Leu Ala Lys Tyr 165 170 175 180	1305	
gct tcg gat aac caa gcg att ctt gac tct tta ggt aaa ctg act tcc Ala Ser Asp Asn Gln Ala Ile Leu Asp Ser Leu Gly Lys Leu Thr Ser 185 190 195	1353	
ttc gac ctc tta cag gct gct ctt ctc caa tct gta gca aac aat aac Phe Asp Leu Leu Gln Ala Ala Leu Leu Gln Ser Val Ala Asn Asn Asn 200 205 210	1401	30
aaa gca gct gag ctt ctt aaa gag atg caa gat aac cca gta gtc cca Lys Ala Ala Glu Leu Leu Lys Glu Met Gln Asp Asn Pro Val Val Pro 215 220 225	1449	
ggg aaa acg cct gca att gct caa tct tta gtt gat cag aca gat gct Gly Lys Thr Pro Ala Ile Ala Gln Ser Leu Val Asp Gln Thr Asp Ala 230 235 240	1497	

aca gcg aca cag ata gag aaa gat gga aat gcg att agg gat gca tat 1545
 Thr Ala Thr Gln Ile Glu Lys Asp Gly Asn Ala Ile Arg Asp Ala Tyr
 245 250 255 260

ttt gca gga cag aac gct agt gga gct gta gaa aat gct aaa tct aat 1593
 Phe Ala Gly Gln Asn Ala Ser Gly Ala Val Glu Asn Ala Lys Ser Asn
 265 270 275

aac agt ata agc aac ata gat tca gct aaa gca gca atc gct act gct 1641
 Asn Ser Ile Ser Asn Ile Asp Ser Ala Lys Ala Ala Ile Ala Thr Ala
 280 285 290

aag aca caa ata gct gaa gct cag aaa aag ttc ccc gac tct cca att 1689
 Lys Thr Gln Ile Ala Glu Ala Gln Lys Lys Phe Pro Asp Ser Pro Ile
 295 300 305

ctt caa gaa gcg gaa caa atg gta ata cag gct gag aaa gat ctt aaa 1737
 Leu Gln Glu Ala Glu Gln Met Val Ile Gln Ala Glu Lys Asp Leu Lys
 310 315 320

aat atc aaa cct gca gat ggt tct gat gtt cca aat cca gga act aca 1785
 Asn Ile Lys Pro Ala Asp Gly Ser Asp Val Pro Asn Pro Gly Thr Thr
 325 330 335 340

gtt gga ggc tcc aag caa caa gga agt agt att ggt agt att cgt gtt 1833
 Val Gly Gly Ser Lys Gln Gln Gly Ser Ile Gly Ser Ile Arg Val
 345 350 355

tcc atg ctg tta gat gat gct gaa aat gag acc gct tcc att ttg atg 1881
 Ser Met Leu Leu Asp Asp Ala Glu Asn Glu Thr Ala Ser Ile Leu Met
 360 365 370

tct ggg ttt cgt cag atg att cac atg ttc aat acg gaa aat cct gat 1929
 Ser Gly Phe Arg Gln Met Ile His Met Phe Asn Thr Glu Asn Pro Asp
 375 380 385

tct caa gct gcc caa cag gag ctc gca gca caa gct aga gca gcg aaa 1977
 Ser Gln Ala Ala Gln Gln Glu Leu Ala Ala Gln Ala Arg Ala Ala Lys
 390 395 400

gcc gct gga gat gac agt gct gct gca gcg ctg gca gat gct cag aaa 2025
 Ala Ala Gly Asp Asp Ser Ala Ala Ala Ala Leu Ala Asp Ala Gln Lys
 405 410 415 420

gct tta gaa gcg gct cta ggt aaa gct ggg caa caa cag ggc ata ctc 2073
 Ala Leu Glu Ala Ala Leu Gly Lys Ala Gly Gln Gln Gln Gly Ile Leu
 425 430 435

aat gct tta gga cag atc gct tct gct gct gtt gtg agc gca gga gta 2121
 Asn Ala Leu Gly Gln Ile Ala Ser Ala Ala Val Val Ser Ala Gly Val
 440 445 450

10

20

30

ctc ccg ctg cag caa gtt cta tgg atc cga gct cgg tac caa gct tac 2169
 Leu Pro Leu Gln Gln Val Leu Trp Ile Arg Ala Arg Tyr Gln Ala Tyr
 455 460 465

gta gaa caa aaa ctc atc tca gaa gag gat ctg aat agc gcc gtc gac 2217
 Val Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp
 470 475 480

cat cat cat cat cat cat tga 2238
 His His His His His His
 485 490

<210> 8
 <211> 490
 <212> PRT
 <213> Chlamydia pneumoniae

10

<400> 8
 Met Val Asn Pro Ile Gly Pro Gly Pro Ile Asp Glu Thr Glu Arg Thr
 1 5 10 15

Pro Pro Ala Asp Leu Ser Ala Gln Gly Leu Glu Ala Ser Ala Ala Asn
 20 25 30

Lys Ser Ala Glu Ala Gln Arg Ile Ala Gly Ala Glu Ala Lys Pro Lys
 35 40 45

Glu Ser Lys Thr Asp Ser Val Glu Arg Trp Ser Ile Leu Arg Ser Ala
 50 55 60

20

Val Asn Ala Leu Met Ser Leu Ala Asp Lys Leu Gly Ile Ala Ser Ser
 65 70 75 80

Asn Ser Ser Ser Ser Thr Ser Arg Ser Ala Asp Val Asp Ser Thr Thr
 85 90 95

Ala Thr Ala Pro Thr Pro Pro Pro Thr Phe Asp Asp Tyr Lys Thr
 100 105 110

Gln Ala Gln Thr Ala Tyr Asp Thr Ile Phe Thr Ser Thr Ser Leu Ala
 115 120 125

Asp Ile Gln Ala Ala Leu Val Ser Leu Gln Asp Ala Val Thr Asn Ile
 130 135 140

30

Lys Asp Thr Ala Ala Thr Asp Glu Glu Thr Ala Ile Ala Ala Glu Trp
 145 150 155 160

Glu Thr Lys Asn Ala Asp Ala Val Lys Val Gly Ala Gln Ile Thr Glu
 165 170 175

Leu Ala Lys Tyr Ala Ser Asp Asn Gln Ala Ile Leu Asp Ser Leu Gly
 180 185 190

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

10

20

30

Ser Ala Val Asp His His His His His His
 485 490

<210> 9
 <211> 43
 <212> DNA
 <213> primer

<400> 9

ataagaatgc ggccgccacc atggttaatc ctatttgtcc agg 43

<210> 10
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> primer

10

<400> 10

gcgccggatc ccttggagat aaccagaata tagag 35

<210> 11
 <211> 43
 <212> DNA
 <213> primer

<400> 11

20

ataagaatgc ggccgccacc atgagtctgg cagataagct ggg 43

<210> 12
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> primer

<400> 12

gcgccggatc ccttggagat aaccagaata ta 32

<210> 13
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> primer

30

<400> 13

gctctagacc gccatgacaa aaaaacatta tgcttggg 38

<210> 14
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> primer

<400> 14

cgggatccat agaacttgct gcagcggg 28

40

Fnu4HI Fnu4HI BbvI
 TseI MwoI MspAII
 BanII TseI
 BsiHKAI BbvI
 Bsp1286I CjePI Fnu4HI
 CacBI BfaII TauI
 SacI AluI CviJI
 HinFI CviJI AluI CviJI MwoI
 TfiI TseI CviJI MwoI MwoI

TGATTCACAAGCTGCCAACAGGAGCTGGCAGCACAGCTAGAGCAGCGAAGCGCTGG
 1261
 ACTAAGAGTTCCGACGGGTTGTCTCGAGCGTCTGTTCGATCTCGCTCTTCGGCGACC

FauI
 PstI
 Fnu4HI
 MnlI
 Sth132I
 CviRI
 TseI
 Fnu4HI
 SfcI
 MspAII
 TseI
 BbvI
 AluI
 HhaI Acii SfcI SimI CviJI

TGTGAGCGCAGGAGTTCTCCCGCTGCAGCAAGTCTTATAGGTCATCTGTAAACAGCT
 1441
 ACACCTCGGCTCTCAAGGAGGGCGACCTCTTCAGATATCCCGTAGACATTTTGTGCA

CacBI
 HaeII
 MwoI
 HhaI
 Eco4VIIII
 PstI
 SfaNI
 BpmI
 Fnu4HI
 CviRI
 MwoI
 Fnu4HI
 SfcI AluI BfaI
 TseI CviJI CviJI
 CjePI HindIII Fnu4HI
 TspRI MwoI TauI
 Fnu4HI Hpy188IX BseMII
 TseI DdeI MwoI

AGATGACAGTGTCTGCTGCAGCGCTGGCAGATCTCAGAAAGCTTTAGAAGCGCTCTAGG
 1321
 TCTACTGTCCAGCAGCGTCCGACCGTCTACGAGTCTTCGAAATCTTCGCCGAGATCC

Hpy188IX
 MnlI SfcI AlwNI Psi BspMI EcoRV SfaNI
 Bsp1286I
 BmgI
 BseSI
 SfaNI
 Hpy178III
 BssSI
 PleI HinFI

TTACAAGACCTCAAAAATCTACAGGTTCTGATTATAAAACACAGATATCAGCAGGTTATGA
 1501
 AATGTTCTGGAGTTTTAGATGTCCAGACTAAATATTTGTGTCTATAGTCTCCCAACT

AluI DpnI Fnu4HI
 CviJI Sau3AI MwoI TseI
 BbvI

TAAAGCTGGGCAACAACAGGGCATACTCAATGCTTTAGGACAGATCGCTTCTGTCTGTGT
 1381
 ATTCGACCGTGTGTTGCCCGTATGAGTTACGAAATCTGCTACCGAGACGACGACA

DpnI
 Sau3AI
 FauI
 AlwNI
 Sth132I
 BsrBI
 RsaI Acii
 BsiHKAI
 Bsp1286I
 MnlI
 CviJI
 Hpy178III
 BssSI
 PleI HinFI

GATAAACAAATGTAAGTACCCCGCTCTCACAGATCCGTTCTTAGACACGAACAGAGC
 1621
 CTATTGTTACATTCATGGGGGAGAGTGTGCTAGGCAAGGATCTGTGCTGTCTTCG

AluI DpnI Fnu4HI
 CviJI Sau3AI MwoI TseI
 BbvI

TCTTGAGATGTCTATAGTCAAGTTTCGGCACTCAATCTGTAATGAGATCATCTCAGTCT
 1741
 AGAACCTCTCAGATATCAGTTCRAAGCGGTGATGTAGACATTACGCTTAGTAGGTACG

AvaII DpnI BclI
 Sau96I Sau3AI CviJI BclI MnlI HphI

TCGAGGACCAGAAAAACAGATCAAGCCCTCGTAGGCTGATTTCTGGCAATAGCAGAAC
 1681
 AGCTCTGTGCTTTTTTGTCTAGTTCGGGAGCGATCCCACTAAAGACCGTTATCGTCTTG

Bce81I
 DpnI
 Sau3AI
 FokI
 CviRI
 BsrI
 TaqI

TCTTGAGATGTCTATAGTCAAGTTTCGGCACTCAATCTGTAATGAGATCATCTCAGTCT
 1801
 AGAACCTCTCAGATATCAGTTCRAAGCGGTGATGTAGACATTACGCTTAGTAGGTACG

MslI
 DdeI
 BsbI

TGTTATCTCCAATACACACCTTAGTCTCTGTTGAGAGATTAATATGTGCTTTGGT
 2041
 ACCRAATAGAGTTATGTTGTGGATTCACAGCAACCTCTCTAATAATACAGAAACCA

CviJI
 MnlI
 BsiI
 PflMI
 TaaI
 CviRI
 PleI
 HinFI
 AluI
 CviJI

TCCACAGTTGGCTATCCTTATGTGCAACTTCTAATGACTCTACACAGAAGTCTCATAGC
 1861
 AGGTGTCAACCGATAGGAATACAGCTTGAAGATTACTGAGATGTGTCTCAAGTATCG

MnlI
 CviJI
 HaeI
 HaeIII
 StuI
 CviJI
 HaeI
 HaeIII
 StuI
 MboII
 BsaI
 BfaI

AAGGCTTTGTTGAGGCTTACCAACACTAGACGATCTCAATAAATAAAGA
 2101
 TTCGGAAACAACCTCCGGAATGGTGTGTACTTGTGATCTGCTAGAAGTTATTTATTTCT

Eco57I
 AluI
 AlwNI
 CviJI
 MspAII
 PvuII
 DpnI Fnu4HI
 TseI
 Tth1111I BstYI
 Tsp509I Sau3AI AlwI BbvI

TAAATFAGAAAGTTTGTTCCTGAGGATCTAGGACAGCAGCTGAAATAAAGCACITTC
 1921
 ATTTAATCTTCAACAACAGACTTCTTAGATCTGTGTGACTTTATTTTCGTGAAG

BspMI
 AarI
 CviJI

CTTTGAAACGAACTCTTGTATTTCAGCAGGCTGCTGCTCAATATCGGCTCTCTAATTC
 1981
 GAAACTTCTGTGAGGACAAATTAAGTCTCCACGACCGATTATAGCCGAGAGATATAAG

【図3】

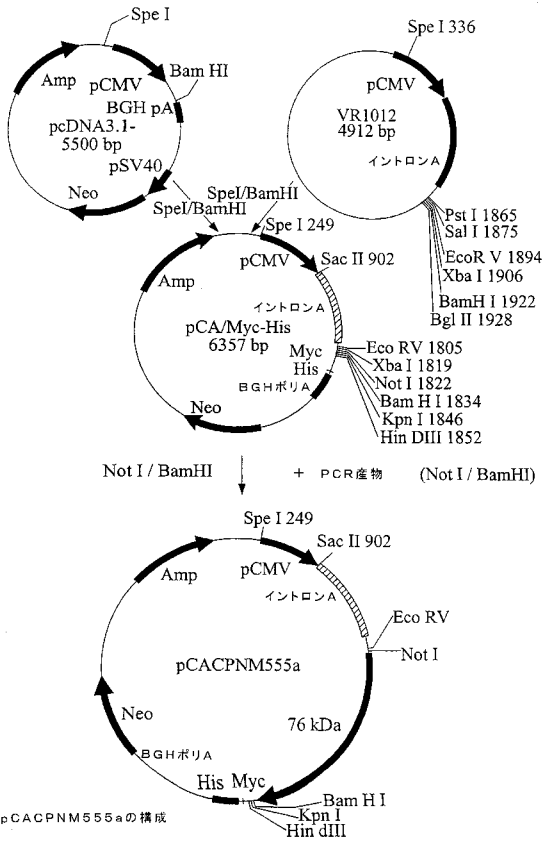
肺炎クラミジア76kDa遺伝子の配列を含む切断バージョン
(ヌクレオチド1~665および2122~2238は該76kDa遺伝子とは
関連がない)

atgacaaaaa aacattatgc ttgggttga gaagggattc tcaatcgttt gcttaaacag 60
tttttttga aatgatgtg tgcgactgg aacacattcg ttccttcaga aacctccact 120
acagaaaaag ctgctacaaa cgctatgaaa tacaataact gtgtttggca gtggctcgtc 180
ggaaagcata gtcaggctcc ttggatcaat ggacagaaaa agcctctata tctttatgga 240
gctttcttaa tgaacctttt agcaaggctt acgaagacta cgttaaatgg aaaagaaaac 300
ctagcttggt ttattggagg aactttaggg ggactcagaa aegctggaga ctggctctgc 360
acagtacgtt atgagtatgt cgaagccttg tccgttccag aaatagatgt ttcagggtatt 420
ggcctgggta atttataaa gttttgttc gcccaagcaa ttgctgtaa ctatgatctc 480
aaagaggcta atggtttac aaattataaa ggattttccg ctctatatat gtatggcctc 540
acagattctc tatcattcag agcttatggg gcttactcca aaccagaaa cgtataaac 600
ggcagtgatt ttactttccg aaagtttgat ctaggataaa ttcagcgtt ttaagtcaaa 660
ttttaataaa atctttaaaa acagctcgc attaattatt agtcagagct ttttttttat 720
ttttataat aaaactaaaa gatttttatt attttttgag ttttt atg gtt aat cct 777
Met Val Asn Pro
1

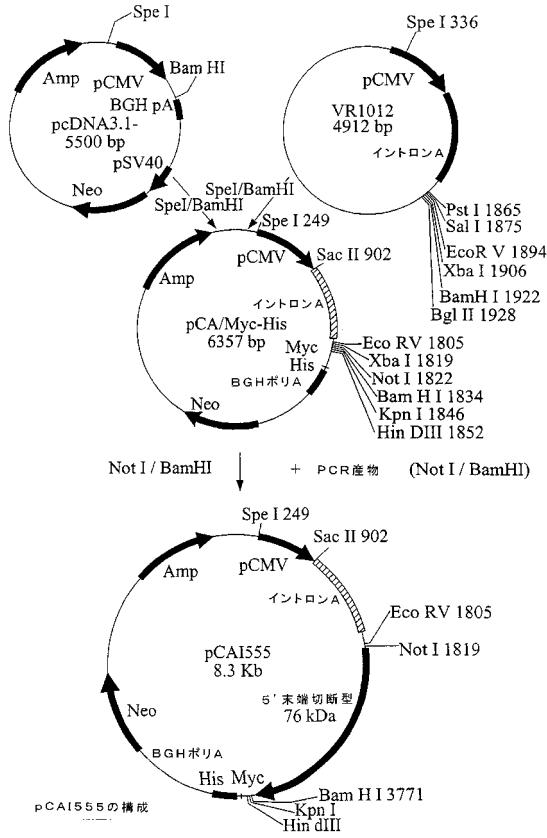
acg cct cct cca ccc acg ttt gat gat tat aag act caa gcg caa aca 1113
Thr Pro Pro Pro Thr Phe Asp Asp Tyr Lys Thr Gln Ala Gln Thr 115
gct tac gat act atc ttt acc tca aca tca cta gct gac ata cag gct 1161
Ala Tyr Asp Thr Ile Phe Thr Ser Thr Ser Leu Val Asp Ile Gln Ala 130
gct ttg gtg agc ctc cag gat gct gtc act aat ata aag gat aca gcg 1209
Ala Leu Val Ser Leu Gln Asp Ala Val Thr Asn Ile Lys Asp Thr Ala 145
gct act gat gag gaa acc gca atc gct gcg gag tgg gaa act aag aat 1257
Ala Thr Asp Glu Glu Thr Ala Ile Ala Ala Glu Trp Glu Thr Lys Asn 160
gcc gat gca gtt aaa gtt ggc gcg caa att aca gaa tta gcg aaa tat 1305
Ala Asp Ala Val Lys Val Gly Ala Gln Ile Thr Glu Leu Ala Lys Tyr 180
gct tgc gat aac caa gcg att ctt gac tct tta ggt aaa ctg act tcc 1353
Ala Ser Asp Asn Gln Ala Ile Leu Asp Ser Leu Gly Lys Leu Thr Ser 195
ttc gac ctc tta cag gct gct ctt ctc caa tct gta gca aac aat aac 1401
Phe Asp Leu Leu Gln Ala Ala Leu Leu Gln Ser Val Ala Asn Asn Asn 210
aaa gca gct gag ctt ctt aaa gag atg caa gat aac cca gta gtc cca 1449
Lys Ala Ala Glu Leu Leu Lys Glu Met Gln Asp Asn Pro Val Val Pro 225
ggg aaa acg cct gca att gct caa tct tta gtt gat cag aca gat gct 1497
Gly Lys Thr Pro Ala Ile Ala Gln Ser Leu Val Asp Gln Thr Asp Ala 240
aca gcg aca cag ata gag aaa gat gga aat gcg att agg gat gca tat 1545
Thr Ala Thr Gln Ile Glu Lys Asp Gly Asn Ala Ile Arg Asp Ala Tyr 260
ttt gca gga cag aac gct agt gga gct gta gaa aat gct aaa tct aat 1593
Phe Ala Gly Gln Asn Ala Ser Gly Ala Val Glu Asn Ala Lys Ser Asn 275
aac agt ata agc aac ata gat tca gct aaa gca gca atc gct act gct 1641
Asn Ser Ile Ser Asn Ile Asp Ser Ala Lys Ala Ala Ile Ala Thr Ala 290
aag aca caa ata gct gaa gct cag aaa aag ttc ccc gac tct cca att 1689
Lys Thr Gln Ile Ala Glu Ala Gln Lys Lys Phe Pro Asp Ser Pro Ile 305

ctt caa gaa gcg gaa caa atg gta ata cag gct gag aaa gat ctt aaa 1737
Leu Gln Glu Ala Glu Gln Met Val Ile Gln Ala Glu Lys Asp Leu Lys 310
aat atc aaa cct gca gat ggt tct gat gtt cca aat cca gga act aca 1785
Asn Ile Lys Pro Ala Asp Gly Ser Asp Val Pro Asn Pro Gly Thr Thr 340
ggt gga ggc tcc aag caa caa gga agt agt att ggt agt att cgt gtt 1833
Val Gly Gly Ser Lys Gln Gln Gly Ser Ser Ile Gly Ser Ile Arg Val 355
tcc atg ctg tta gat gat gct gaa aat gag acc gct tcc att ttg atg 1881
Ser Met Leu Leu Asp Asp Ala Glu Asn Glu Thr Ala Ser Ile Leu Met 370
tct ggg ttt cgt cag atg att cac atg ttc aat acg gaa aat cct gat 1929
Ser Gly Phe Arg Gln Met Ile His Met Phe Asn Thr Glu Asn Pro Asp 385
tct caa gct gcc caa cag gag ctc gca gca caa gct aga gca gcg aaa 1977
Ser Gln Ala Ala Gln Gln Glu Leu Ala Ala Gln Ala Arg Ala Ala Lys 400
gcc gct gga gat gac agt gct gct gca gcg ctg gca gat gct cag aaa 2025
Ala Ala Gly Asp Asp Ser Ala Ala Ala Ala Leu Ala Asp Ala Gln Lys 420
gct tta gaa gcg gct cta ggt aaa gct ggg caa caa cag gcc ata ctc 2073
Ala Leu Glu Ala Ala Leu Gly Lys Ala Gly Gln Gln Gln Gly Ile Leu 435
aat gct tta gga cag atc gct tct gct gct gtt gtg agc gca gga gta 2121
Asn Ala Leu Gly Gln Ile Ala Ser Ala Ala Val Val Ser Ala Gly Val 450
ctc cgg ctg cag caa gtt cta tgg atc cga gct cgg tac caa gct tac 2169
Leu Pro Leu Gln Gln Val Leu Trp Ile Arg Ala Arg Tyr Gln Ala Tyr 465
gta gaa caa aaa ctc atc tca gaa gag gat ctg aat agc gcc gtc gac 2217
Val Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp 480
cat cat cat cat cat tga 2238
His His His His His His 490

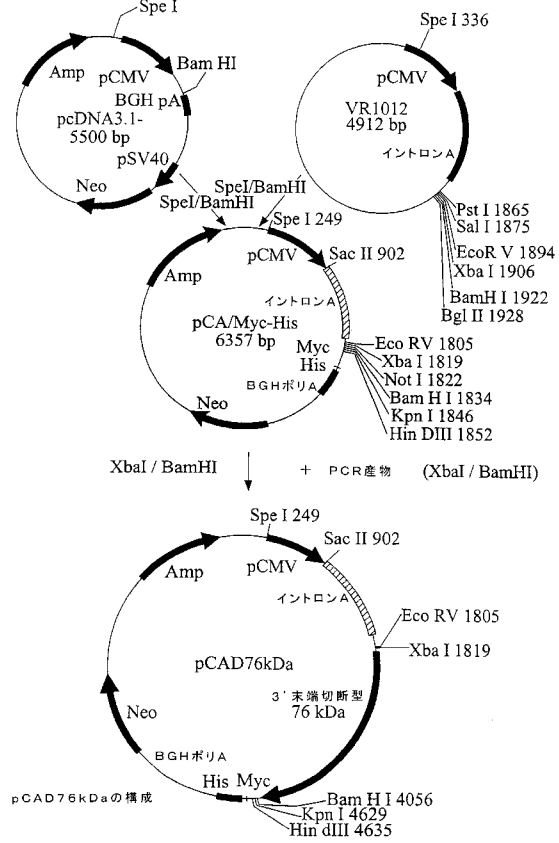
【図4】



【図5】

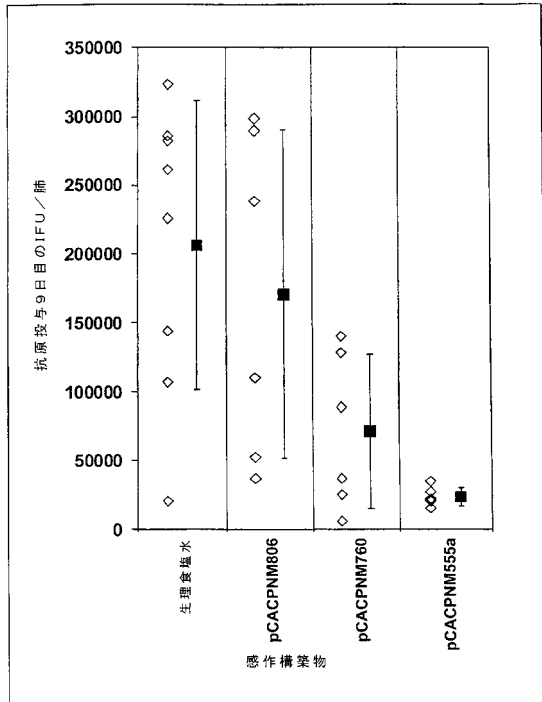


【図6】



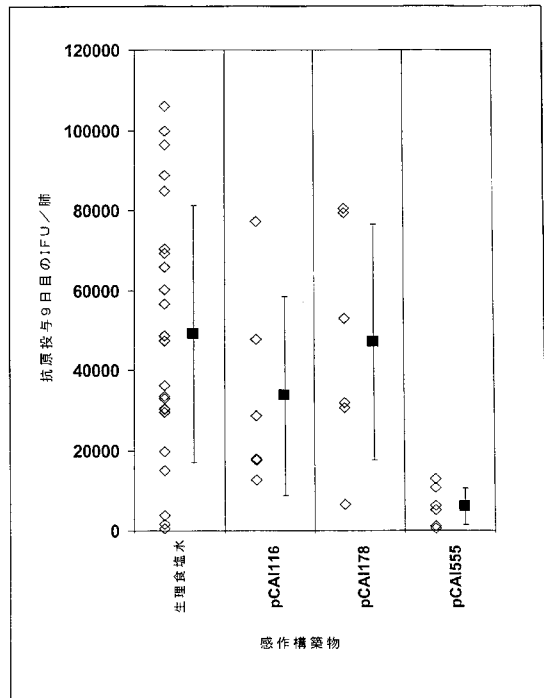
【図7】

pCACPNM555aは肺炎クラミジア感染に対する防御を付与



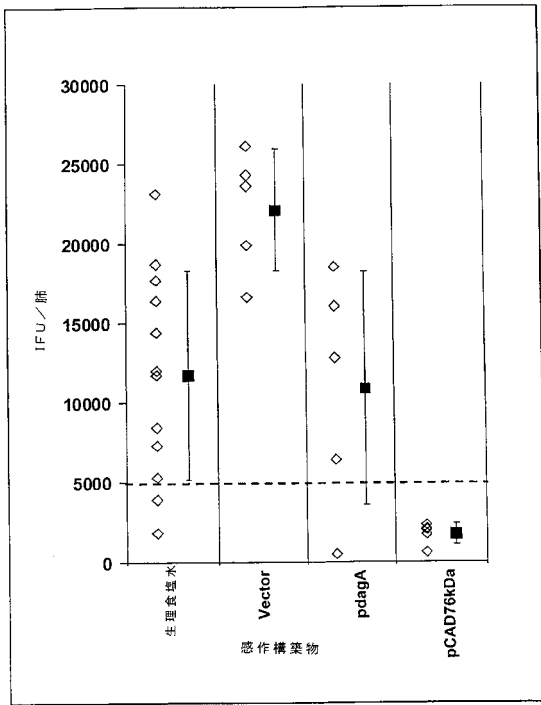
【図8】

pCAI555は肺炎クラミジア感染に対する防御を付与



【 図 9 】

pCAD76kDaは肺炎クラミジア感染に対する防御を付与



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
 A 6 1 P 11/06 (2006.01) A 6 1 P 11/06
 A 6 1 P 31/04 (2006.01) A 6 1 P 31/04

(74)代理人 100111730

弁理士 伊藤 武泰

(72)発明者 アンドリュウ、ディー・モーディン

カナダ国オンタリオ州、ニューマッケット、ロウズ、サークル、146

(72)発明者 レイモンド、ピー・オーメン

カナダ国オンタリオ州、オーロラ、ケネディー、ストリート、ダブリュ、29

(72)発明者 ジョー、ウォン

カナダ国オンタリオ州、エトピコウク、トゥエンティーナインス、ストリート、48

(72)発明者 パメラ、ダン

カナダ国オンタリオ州、ミシソーガ、カネフ、クレセント、370、アパートメント、703

審査官 伊藤 基章

(56)参考文献 特表2002-536958(JP,A)

国際公開第98/058953(WO,A1)

国際公開第99/017741(WO,A1)

KALMAN,S. et al, Comparative genomes of Chlamydia pneumoniae and C. trachomatis, Nat G
 enet, 1999年, Vol.21, No.4, p.385-9

PEREZ MELGOZA M, INFECTION AND IMMUNITY, 米国, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, 19
 94年 3月 1日, V62 N3, P880-886

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K 39/118

CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

专利名称(译)	衣原体抗原和相应的DNA片段及其用途		
公开(公告)号	JP4695763B2	公开(公告)日	2011-06-08
申请号	JP2000615762	申请日	2000-05-03
申请(专利权)人(译)	安万特，巴斯德有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	赛诺菲巴斯德有限公司		
[标]发明人	アンドリューディーモーデン レイモンドピーオーメン ジョーウォン パメラダン		
发明人	アンドリュー、ディー.モーデン レイモンド、ピー.オーメン ジョー、ウォン パメラ、ダン		
IPC分类号	A61K39/118 A61K39/39 A61P9/10 A61P11/00 A61P11/02 A61P11/06 A61P31/04 G01N33/53 A61K39/00 A61K39/395 A61K48/00 C07K14/295 C07K16/12 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12N15/31 C12N15/85 C12P21/02 C12Q1/68 G01N33/566 G01N33/569		
CPC分类号	A61K39/00 A61K2039/505 A61K2039/53 A61P9/10 A61P11/00 A61P11/02 A61P11/06 A61P31/04 C07K14/295 C07K2319/00 C12N15/85 C12N2830/42 Y02A50/476 Y10S435/975		
FI分类号	A61K39/118.ZNA A61K39/39 A61P9/10.101 A61P11/00 A61P11/02 A61P11/06 A61P31/04		
代理人(译)	耀希达凯贤治 中村KoTakashi		
优先权	60/132270 1999-05-03 US 60/141276 1999-06-30 US		
其他公开文献	JP2002542827A5 JP2002542827A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供用于免疫宿主(包括人)免于由衣原体菌株,特别是肺炎衣原体感染引起的疾病的疫苗和方法。疫苗和方法使用肺炎衣原体菌株的全长,5'-截短的或3'-截短的76kDa蛋白质。在本发明的范围内可以进行修改。

マウス	種々のDNA感作構築物を感作させたb a l b / cマウスの肺における細菌存在量(封入体単位/肺)			
	感作構築物			
	生理食塩水	pCACPNM906	pCACPNM760	pCACPNM555a
	9日目	9日目	9日目	9日目
1	225900	36700	140300	27300
2	20800	238700	128400	15200
3	286100	52300	88700	34600
4	106700	109600	25600	20500
5	323300	290000	37200	22000
6	144300	298800	5900	21700
7	261700			
8	282200			
平均値	206375	171016.667	71016.6667	23550
標準偏差	105183.9	119141.32	56306.57	6648.53
Wilcoxon P		0.8518	0.0293	0.008