

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2007-520688

(P2007-520688A)

(43) 公表日 平成19年7月26日(2007.7.26)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53	D
GO 1 N 33/545 (2006.01)	GO 1 N 33/545	Z
GO 1 N 33/548 (2006.01)	GO 1 N 33/548	Z
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543	5 O 1 J
GO 1 N 33/569 (2006.01)	GO 1 N 33/569	G

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 96 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2006-515556 (P2006-515556)	(71) 出願人	503352291
(86) (22) 出願日	平成16年6月28日 (2004.6.28)		プロテオム システムズ インテレクチュ
(85) 翻訳文提出日	平成18年2月27日 (2006.2.27)		アル プロパティ プロプライエタリー
(86) 国際出願番号	PCT/AU2004/000856		リミテッド
(87) 国際公開番号	W02005/001480		オーストラリア国 ニューサウスウェール
(87) 国際公開日	平成17年1月6日 (2005.1.6)		ズ州 2 1 1 3 ノース ライド ウォー
(31) 優先権主張番号	2003903317		タールー ロード 35-41 ユニット
(32) 優先日	平成15年6月27日 (2003.6.27)		1
(33) 優先権主張国	オーストラリア (AU)	(74) 代理人	230104019
			弁護士 大野 聖二
		(74) 代理人	100106840
			弁理士 森田 耕司
		(74) 代理人	100105991
			弁理士 田中 玲子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 タンパク質の単離方法

(57) 【要約】

本発明は、免疫グロブリンもしくはその混合物を含んでなるタンパク質複合体または免疫グロブリン含有画分から免疫原性タンパク質を単離および/または同定する方法を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

免疫応答を誘発可能な免疫原性タンパク質またはその断片を同定する方法であって、被験体またはその細胞、組織もしくは器官から免疫グロブリンもしくはその混合物を含んでなるタンパク質複合体または免疫グロブリン含有画分を得ることと、抗原抗体相互作用によって免疫グロブリンと結合しているタンパク質またはその断片を同定することとを含んでなり、それによって免疫応答を誘発可能な免疫原性タンパク質またはその断片を同定する、方法。

【請求項 2】

被験体からタンパク質複合体またはその混合物または免疫グロブリン含有画分を含んでなるサンプルを得ることをさらに含んでなる、請求項 1 に記載の方法。 10

【請求項 3】

サンプルから 1 以上の免疫グロブリン含有画分を得ることをさらに含んでなる、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

全血、血漿、血清、痰、唾液、胸腔内液、心嚢液、腹水、リンパ液、リンパ節、脾臓、卵黄、全血の画分、血漿の画分、血清の画分、痰の画分、唾液の画分、胸腔内液の画分、心嚢液の画分、腹水の画分、リンパ液の画分、リンパ節の画分、脾臓の画分および卵黄の画分からなる群からサンプルを選択する、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

サンプルが末梢血単核球 (P B M C)、リンパ球、B - リンパ球、T リンパ球、ヘルパー T 細胞、細胞傷害性 T 細胞、マクロファージ、樹状細胞、多形核細胞および肥満細胞からなる群から選択される細胞を含んでなる、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の方法。 20

【請求項 6】

サンプルが血清または血清の免疫グロブリン含有画分を含んでなる、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 7】

タンパク質複合体または免疫グロブリン含有画分が、I g M、I g G、I g A、I g E、I g D および I g Y またはその混合物からなる群から選択される 1 種以上の免疫グロブリンを含んでなる、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の方法。 30

【請求項 8】

タンパク質複合体または免疫グロブリン含有画分が I g G を含んでなる、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

タンパク質複合体またはその免疫グロブリン含有画分が I g A を含んでなる、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 10】

タンパク質複合体または免疫グロブリン含有画分を、サンプルを被験体から分離または精製することを含んでなり、それによって前記タンパク質複合体または免疫グロブリン含有画分が得られるプロセスによって得る、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の方法。 40

【請求項 11】

前記の、サンプルを被験体から分離または精製することが、サンプルを免疫グロブリンと結合可能な 1 種以上の化合物と、結合が生じるのに十分な条件下で一定時間接触させ、その化合物を単離することを含んでなる、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

1 種以上の化合物を固体支持体、マトリックスまたは樹脂上に事前に固定化する、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

固体支持体、マトリックスまたは樹脂が、セルロースビーズ、アガロース、ナイロン、 50

磁性粒子、常磁性粒子、ポリマー樹脂およびその混合物からなる群から選択される、請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 4】

1 種以上の固定化された化合物を洗浄することをさらに含んでなり、それによって非特異的に結合しているか、結合していないタンパク質を除去する、請求項 1 2 または 1 3 に記載の方法。

【請求項 1 5】

化合物がタンパク質 A またはそのミメティック、タンパク質 G またはそのミメティック、タンパク質 L またはそのミメティック、抗免疫グロブリン抗体、マルトース結合タンパク質 (MBP)、チオフィリック樹脂およびその混合物からなる群から選択される、請求項 1 2 から 1 4 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 1 6】

化合物がタンパク質 A またはタンパク質 G またはその混合物である、請求項 1 5 に記載の方法。

【請求項 1 7】

被験体が感染症を患っているか、以前に感染症を患ったことがある、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 1 8】

感染症が急性感染症である、請求項 1 7 に記載の方法。

【請求項 1 9】

感染症が慢性感染症である、請求項 1 7 に記載の方法。

20

【請求項 2 0】

感染症が、ウイルス感染症、細菌感染症、酵母感染症、真菌感染症および寄生生物感染症からなる群から選択される、請求項 1 7 から 1 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 1】

感染症が細菌感染症である、請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 2】

細菌感染症がシュードモナス属感染症である、請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 2 3】

細菌感染症がマイコバクテリウム属感染症である、請求項 2 2 に記載の方法。

30

【請求項 2 4】

感染症が肺感染症である、請求項 1 7 から 2 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 5】

肺感染症が緑膿菌または結核菌の存在によって引き起こされるか、それと関連している、請求項 2 4 に記載の方法。

【請求項 2 6】

被験体が自己免疫状態に苦しんでいる、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 2 7】

自己免疫状態が炎症性状態と関連している、請求項 2 6 に記載の方法。

【請求項 2 8】

被験体を、免疫原性タンパク質もしくはその断片を含んでなる 1 種以上の細胞またはその抽出物で免疫することをさらに含んでなり、それによって免疫原性タンパク質またはその断片に対する免疫応答を誘発する、請求項 1 または 2 に記載の方法。

40

【請求項 2 9】

1 種以上の細胞またはその抽出物が、免疫原性タンパク質またはその断片を発現する感染性病原体に由来する、請求項 2 8 に記載の方法。

【請求項 3 0】

1 種以上の細胞が、ウイルス細胞、細菌細胞、酵母細胞、真菌細胞もしくは寄生生物の細胞からなる群から選択されるか、または細胞抽出物がウイルスの抽出物、細菌の抽出物、酵母の抽出物、真菌の抽出物および寄生生物の抽出物からなる群から選択される、請求

50

項 28 または 29 に記載の方法。

【請求項 31】

1 種以上の細胞が細菌細胞であるか、または細胞抽出物が細菌抽出物である、請求項 30 に記載の方法。

【請求項 32】

細菌細胞がシュードモナス種またはマイコバクテリウム種である、請求項 31 に記載の方法。

【請求項 33】

細菌細胞が緑膿菌または結核菌である、請求項 32 に記載の方法。

【請求項 34】

被験体が非ヒト動物である、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 35】

非ヒト動物がマウス、ラット、ウサギ、ニワトリ、イヌ、ヒツジ (sheep)、ヒツジ (ovine)、ウマおよびヤギからなる群から選択される、請求項 34 に記載の方法。

【請求項 36】

被験体がヒトである、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 37】

免疫グロブリンを 1 種以上の化合物と結合させることをさらに含んでなる、請求項 11 から 36 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 38】

結合させることが、架橋剤を、結合している免疫グロブリンを有する 1 種以上の化合物と、化合物と免疫グロブリン間に共有結合が生じるのに十分な条件下で一定時間接触させることを含んでなるプロセスを実施することを含んでなる、請求項 37 に記載の方法。

【請求項 39】

架橋剤が、イミドエステル架橋剤、N - ヒドロキシスクシンイミド架橋剤、マレイミド架橋剤、ハロアセチル架橋剤、ピリジルジスルフィド架橋剤、ヒドラジド架橋剤、およびカルボジイミド架橋剤からなる群から選択される、請求項 38 に記載の方法。

【請求項 40】

架橋剤が N - ヒドロキシスクシンイミド架橋剤である、請求項 39 に記載の方法。

【請求項 41】

N - ヒドロキシスクシンイミド架橋剤が、ジスクシンイミジルグルタレート、スベリン酸ジスクシンイミジル、スベリン酸ビス (スルホスクシンイミジル)、ジチオビス (プロピオン酸スクシンイミジル)、3, 3' - ジチオビス (プロピオン酸スクシンイミジル)、エチレングリコビス (コハク酸スクシンイミジル)、エチレングリコビス (コハク酸スルホスクシンイミジル)、ジスクシンイミジルタルタレート、ジスルホスクシンイミジルタルタレート、ビス [2 - (スクシンイミジルオキシ - カルボニルオキシ) エチル] スルホン、ビス [2 - (スルホスクシンイミジルオキシ - カルボニルオキシ) エチル] スルホン、スクシンイミジル 4 - (N - マレイミドメチル) シクロヘキサン - 1 - カルボキシレート、スルホスクシンイミジル 4 - (N - マレイミドメチル) シクロヘキサン - 1 - カルボキシレート、m - マレイミドベンゾイル - N - ヒドロキシスクシンイミドエステル、m - マレイミドベンゾイル - N - ヒドロキシスルホスクシンイミドエステル、スクシンイミジル 4 - (p - マレイミドフェニル) - ブチレート、スルホスクシンイミジル 4 - (p - マレイミドフェニル) - ブチレート、ビスマレイミドヘキサン、N - (g - マレイミドブチリルオキシ) スクシンイミドエステルおよび N - (g - マレイミドブチリルオキシ) スルホスクシンイミドエステルからなる群から選択される、請求項 40 に記載の方法。

【請求項 42】

N - ヒドロキシスクシンイミド架橋剤がスベリン酸ジスクシンイミジルである、請求項 41 に記載の方法。

【請求項 43】

被験体において疾病または疾患を引き起こす病原体の免疫原性タンパク質または免疫原

10

20

30

40

50

性タンパク質断片を同定する方法であって、

(i) 該疾病または疾患を患っているか、以前に該疾病または疾患を患ったことのある被験体またはその細胞、組織もしくは器官から、免疫グロブリンもしくはその混合物を含んでなるタンパク質複合体または免疫グロブリン含有画分を得ることと、

(i i) タンパク質複合体または免疫グロブリン含有画分中の免疫グロブリンを、該疾病もしくは疾患を引き起こす病原体またはその誘導体を含んでなるサンプルと接触させることと、

(i i i) 抗原抗体相互作用によって前記免疫グロブリンと結合しているタンパク質またはその断片を同定することとを含んでなり、

同定されるタンパク質が、被験体において疾病または疾患を引き起こす病原体の免疫原性タンパク質または免疫原性タンパク質断片である、方法。 10

【請求項 4 4】

被験体から、タンパク質複合体または免疫グロブリン含有画分を含んでなるサンプルを得ることをさらに含んでなる、請求項 4 3 に記載の方法。

【請求項 4 5】

サンプルから免疫グロブリン含有画分を得ることをさらに含んでなる、請求項 4 4 に記載の方法。

【請求項 4 6】

全血、血漿、血清、痰、唾液、胸腔内液、心嚢液、腹水、リンパ液、リンパ節、脾臓、卵黄、全血の画分、血漿の画分、血清の画分、痰の画分、唾液の画分、胸腔内液の画分、心嚢液の画分、腹水の画分、リンパ液の画分、リンパ節の画分、脾臓の画分および卵黄の画分からなる群からサンプルを選択する、請求項 4 3 から 4 5 のいずれか一項に記載の方法。 20

【請求項 4 7】

サンプルが末梢血単核球 (P B M C)、リンパ球、B - リンパ球、T リンパ球、ヘルパー T 細胞、細胞傷害性 T 細胞、マクロファージ、樹状細胞、多形核細胞および肥満細胞からなる群から選択される細胞を含んでなる、請求項 4 3 から 4 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 8】

サンプルが血清または血清の免疫グロブリン含有画分を含んでなる、請求項 4 6 に記載の方法。 30

【請求項 4 9】

タンパク質複合体または免疫グロブリン含有画分が、I g M、I g G、I g A、I g E、I g D および I g Y またはその混合物からなる群から選択される 1 種以上の免疫グロブリンを含んでなる、請求項 4 3 から 4 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 0】

タンパク質複合体または免疫グロブリン含有画分が I g G を含んでなる、請求項 4 9 に記載の方法。

【請求項 5 1】

タンパク質複合体または免疫グロブリン含有画分が I g A を含んでなる、請求項 4 9 に記載の方法。 40

【請求項 5 2】

タンパク質複合体または免疫グロブリン含有画分を、サンプルを被験体から分離または精製することを含んでなり、それによって前記タンパク質複合体または免疫グロブリン含有画分が得られるプロセスによって得る、請求項 4 3 から 4 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 3】

前記の、サンプルを被験体から分離または精製することが、サンプルを免疫グロブリンと結合可能な 1 種以上の化合物と、結合が生じるのに十分な条件下で一定時間接触させ、その化合物を単離することを含んでなる、請求項 5 2 に記載の方法。 50

【請求項 5 4】

1 種以上の化合物を固体支持体、マトリックスまたは樹脂上に事前に固定化する、請求項 5 3 に記載の方法。

【請求項 5 5】

固体支持体、マトリックスまたは樹脂が、セルロースビーズ、アガロース、ナイロン、ポリマー樹脂およびその混合物からなる群から選択される、請求項 5 4 に記載の方法。

【請求項 5 6】

1 種以上の固定化された化合物を洗浄することを含んでなり、それによって非特異的に結合しているか、結合していないタンパク質を除去する、請求項 5 4 または 5 5 に記載の方法。

10

【請求項 5 7】

化合物が、タンパク質 A またはそのミメティック、タンパク質 G またはそのミメティック、タンパク質 L またはそのミメティック、抗免疫グロブリン抗体、マルトース結合タンパク質 (MBP)、チオフィリック樹脂およびその混合物からなる群から選択される、請求項 5 3 から 5 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 8】

化合物がタンパク質 A、タンパク質 G またはその混合物である、請求項 5 7 に記載の方法。

【請求項 5 9】

免疫グロブリンを 1 種以上の化合物と結合させることをさらに含んでなる、請求項 5 3 から 5 8 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 6 0】

結合させることが、架橋剤を、結合している免疫グロブリンを有する 1 種以上の化合物と、化合物と免疫グロブリン間に共有結合が生じるのに十分な条件下で一定時間接触させることを含んでなるプロセスを実施することを含んでなる、請求項 5 9 に記載の方法。

【請求項 6 1】

架橋剤が、イミドエステル架橋剤、N - ヒドロキシスクシンイミド架橋剤、マレイミド架橋剤、ハロアセチル架橋剤、ヒドラジド架橋剤、およびカルボジイミド架橋剤からなる群から選択される、請求項 6 0 に記載の方法。

【請求項 6 2】

架橋剤が N - ヒドロキシスクシンイミド架橋剤である、請求項 6 1 に記載の方法。

30

【請求項 6 3】

N - ヒドロキシスクシンイミド架橋剤が、ジスクシンイミジルグルタレート、スベリン酸ジスクシンイミジル、スベリン酸ビス (スルホスクシンイミジル)、ジチオビス (プロピオン酸スクシンイミジル)、3, 3' - ジチオビス (プロピオン酸スクシンイミジル)、エチレングリコビス (コハク酸スクシンイミジル)、エチレングリコビス (コハク酸スルホスクシンイミジル)、ジスクシンイミジルタルタレート、ジスルホスクシンイミジルトアルタレート、ビス [2 - (スクシンイミジルオキシ - カルボニルオキシ) エチル] スルホン、ビス [2 - (スルホスクシンイミジルオキシ - カルボニルオキシ) エチル] スルホン、スクシンイミジル 4 - (N - マレイミドメチル) シクロヘキサン - 1 - カルボキシレート、スルホスクシンイミジル 4 - (N - マレイミドメチル) シクロヘキサン - 1 - カルボキシレート、m - マレイミドベンゾイル - N - ヒドロキシスクシンイミドエステル、m - マレイミドベンゾイル - N - ヒドロキシスルホスクシンイミドエステル、スクシンイミジル 4 - (p - マレイミドフェニル) - ブチレート、スルホスクシンイミジル 4 - (p - マレイミドフェニル) - ブチレート、ビスマレイミドヘキサン、N - (g - マレイミドブチリルオキシ) スクシンイミドエステルおよび N - (g - マレイミドブチリルオキシ) スルホスクシンイミドエステルからなる群から選択される、請求項 6 2 に記載の方法。

40

【請求項 6 4】

N - ヒドロキシスクシンイミド架橋剤がスベリン酸ジスクシンイミジルである、請求項 6 3 に記載の方法。

50

【請求項 6 5】

サンプルが、疾病または疾患を引き起こす病原体のタンパク質または細胞抽出物を含んでなる、請求項 4 3 に記載の方法。

【請求項 6 6】

疾病または疾患を引き起こす病原体が感染性病原体である、請求項 4 3 に記載の方法。

【請求項 6 7】

感染性病原体が、ウイルス、細菌、酵母、真菌および寄生生物からなる群から選択される、請求項 6 6 に記載の方法。

【請求項 6 8】

感染性病原体が細菌である、請求項 6 7 に記載の方法。

10

【請求項 6 9】

細菌が緑膿菌または結核菌である、請求項 6 8 に記載の方法。

【請求項 7 0】

細菌が臨床分離株である、請求項 6 8 または 6 9 に記載の方法。

【請求項 7 1】

癌細胞の免疫原性タンパク質または免疫原性タンパク質断片を同定する方法であって、
 (i) 癌を患っているか、以前に癌を患ったことがある被験体から、免疫グロブリンもしくはその混合物を含んでなるタンパク質複合体または免疫グロブリン含有画分を得ることと、

(i i) タンパク質複合体または免疫グロブリン含有画分中の免疫グロブリンを、腫瘍細胞またはそのタンパク質抽出物または細胞抽出物を含んでなるサンプルと接触させることと、

20

(i i i) 抗原抗体相互作用によって、前記免疫グロブリンと結合しているタンパク質またはその断片を同定することを含んでなり、

同定されるタンパク質が癌細胞の免疫原性タンパク質または免疫原性タンパク質断片である、方法。

【請求項 7 2】

癌細胞が、膀胱癌細胞、乳癌細胞、結腸直腸癌細胞、子宮内膜癌細胞、頭頸部癌細胞、白血病細胞、肺癌細胞、リンパ腫細胞、メラノーマ細胞、非小細胞肺癌細胞、卵巣癌細胞、前立腺癌細胞、急性リンパ性白血病細胞、成人急性骨髄性白血病細胞、成人非ホジキン
 スリンパ腫細胞、脳腫瘍細胞、子宮頸癌細胞、小児肉腫細胞、慢性リンパ性白血病細胞、慢性骨髄性白血病細胞、食道癌細胞、ヘアリー細胞白血病細胞、腎臓癌細胞、肝臓癌細胞、多発性骨髄腫細胞、神経芽細胞腫細胞、口腔癌細胞、膵臓癌細胞、中枢神経系原発リン
 パ腫細胞、皮膚癌細胞および小細胞肺癌細胞からなる群から選択される、請求項 7 0 に記載の方法。

30

【請求項 7 3】

癌細胞が卵巣癌細胞または乳癌細胞である、請求項 7 2 に記載の方法。

【請求項 7 4】

被験体からタンパク質複合体または免疫グロブリン含有画分を含んでなるサンプルを得ることをさらに含んでなる、請求項 7 1 に記載の方法。

40

【請求項 7 5】

サンプルからタンパク質複合体または免疫グロブリン含有画分を得ることをさらに含んでなる、請求項 7 4 に記載の方法。

【請求項 7 6】

全血、血漿、血清、痰、唾液、胸腔内液、心嚢液、腹水、リンパ液、リンパ節、脾臓、卵黄、全血の画分、血漿の画分、血清の画分、痰の画分、唾液の画分、胸腔内液の画分、心嚢液の画分、腹水の画分、リンパ液の画分、リンパ節の画分、脾臓の画分および卵黄の画分からなる群からサンプルを選択する、請求項 7 1 から 7 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7 7】

50

サンプルが末梢血単核球 (P B M C)、リンパ球、B - リンパ球、T リンパ球、ヘルパー T 細胞、細胞傷害性 T 細胞、マクロファージ、樹状細胞、多形核細胞および肥満細胞からなる群から選択される細胞を含んでなる、請求項 7 1 から 7 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7 8】

サンプルが血清または血清の免疫グロブリン含有画分を含んでなる、請求項 7 6 に記載の方法。

【請求項 7 9】

タンパク質複合体または免疫グロブリン含有画分が、I g M、I g G、I g A、I g E、I g D および I g Y またはその混合物からなる群から選択される 1 種以上の免疫グロブリンを含んでなる、請求項 7 1 から 7 5 のいずれか一項に記載の方法。 10

【請求項 8 0】

タンパク質複合体または免疫グロブリン含有画分が I g G を含んでなる、請求項 7 9 に記載の方法。

【請求項 8 1】

タンパク質複合体または免疫グロブリン含有画分が I g A を含んでなる、請求項 7 9 に記載の方法。

【請求項 8 2】

タンパク質複合体または免疫グロブリン含有画分を、サンプルを被験体から分離または精製することを含んでなり、それによって前記タンパク質複合体または免疫グロブリン含有画分が得られるプロセスによって得る、請求項 7 1 から 7 5 のいずれか一項に記載の方法。 20

【請求項 8 3】

前記の、サンプルを被験体から分離または精製することが、サンプルを免疫グロブリンと結合可能な 1 種以上の化合物と、結合が生じるのに十分な条件下で一定時間接触させ、その化合物を単離することを含んでなる、請求項 8 2 に記載の方法。

【請求項 8 4】

1 種以上の化合物を、固体支持体、マトリックスまたは樹脂上に事前に固定化する、請求項 8 3 に記載の方法。

【請求項 8 5】 30

固体支持体、マトリックスまたは樹脂が、セルロースベース、アガロース、ナイロン、ポリマー樹脂およびその混合物からなる群から選択される、請求項 8 4 に記載の方法。

【請求項 8 6】

1 種以上の固定化された化合物を洗浄することを含んでなり、それによって非特異的に結合しているか、結合していないタンパク質を除去する、請求項 8 4 または 8 5 に記載の方法。

【請求項 8 7】

化合物がタンパク質 A またはそのミメティック、タンパク質 G またはそのミメティック、タンパク質 L またはそのミメティック、抗免疫グロブリン抗体、マルトース結合タンパク質 (M B P)、チオフィリック樹脂およびその混合物からなる群から選択される、請求項 8 3 から 8 6 のいずれか一項に記載の方法。 40

【請求項 8 8】

化合物がタンパク質 A またはタンパク質 G またはその混合物である、請求項 8 7 に記載の方法。

【請求項 8 9】

免疫グロブリンを 1 種以上の化合物と結合させることをさらに含んでなる、請求項 8 3 から 8 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9 0】

結合させることが、架橋剤を、結合している免疫グロブリンを有する 1 種以上の化合物と、化合物と免疫グロブリン間に共有結合が生じるのに十分な条件下で一定時間接触させ 50

ることを含んでなるプロセスを実施することを含んでなる、請求項 8 9 に記載の方法。

【請求項 9 1】

架橋剤がイミドエステル架橋剤、N - ヒドロキシスクシンイミド架橋剤、マレイミド架橋剤、ハロアセチル架橋剤、ヒドラジド架橋剤、およびカルボジイミド架橋剤からなる群から選択される、請求項 9 0 に記載の方法。

【請求項 9 2】

架橋剤が N - ヒドロキシスクシンイミド架橋剤である、請求項 9 1 に記載の方法。

【請求項 9 3】

N - ヒドロキシスクシンイミド架橋剤が、ジスクシンイミジルグルタレート、スベリン酸ジスクシンイミジル、スベリン酸ビス(スルホスクシンイミジル)、ジチオビス(プロピオン酸スクシンイミジル)、3, 3' - ジチオビス(プロピオン酸スクシンイミジル)、エチレングリコビス(コハク酸スクシンイミジル)、エチレングリコビス(コハク酸スルホスクシンイミジル)、ジスクシンイミジルトアルタレート、ジスルホスクシンイミジルトアルタレート、ビス[2 - (スクシンイミジルオキシ - カルボニルオキシ)エチル]スルホン、ビス[2 - (スルホスクシンイミジルオキシ - カルボニルオキシ)エチル]スルホン、スクシンイミジル4 - (N - マレイミドメチル)シクロヘキサン - 1 - カルボキシレート、スルホスクシンイミジル4 - (N - マレイミドメチル)シクロヘキサン - 1 - カルボキシレート、m - マレイミドベンゾイル - N - ヒドロキシスクシンイミドエステル、m - マレイミドベンゾイル - N - ヒドロキシスルホスクシンイミドエステル、スクシンイミジル4 - (p - マレイミドフェニル) - ブチレート、スルホスクシンイミジル4 - (p - マレイミドフェニル) - ブチレート、ビスマレイミドヘキサン、N - (g - マレイミドブチリルオキシ)スクシンイミドエステルおよびN - (g - マレイミドブチリルオキシ)スルホスクシンイミドエステルからなる群から選択される、請求項 9 2 に記載の方法。

【請求項 9 4】

N - ヒドロキシスクシンイミド架橋剤がスベリン酸ジスクシンイミジルである、請求項 9 3 に記載の方法。

【請求項 9 5】

被験体における自己免疫状態において免疫応答を誘発可能な免疫原性タンパク質またはその断片を同定する方法であって、

(i) 自己免疫状態に苦しんでいる被験体またはその細胞、組織もしくは器官から、免疫グロブリンもしくはその混合物を含んでなるタンパク質複合体または免疫グロブリン含有画分を得ること、

(ii) タンパク質複合体または免疫グロブリン含有画分中の免疫グロブリンを、自己免疫状態に苦しんでいる被験体由来のタンパク質を含んでなるサンプルと接触させることと、

(iii) 抗原抗体相互作用によって前記免疫グロブリンと結合しているタンパク質またはその断片を同定することを含んでなり、

同定されるタンパク質が、被験体における自己免疫状態において免疫応答を誘発可能な免疫原性タンパク質またはその断片である、方法。

【請求項 9 6】

被験体からタンパク質複合体または免疫グロブリン含有画分を含んでなるサンプルを得ることをさらに含んでなる、請求項 9 5 に記載の方法。

【請求項 9 7】

サンプルから免疫グロブリン含有画分を得ることをさらに含んでなる、請求項 9 6 に記載の方法。

【請求項 9 8】

全血、血漿、血清、痰、唾液、胸腔内液、心嚢液、腹水、リンパ液、リンパ節、脾臓、卵黄、全血の画分、血漿の画分、血清の画分、痰の画分、唾液の画分、胸腔内液の画分、心嚢液の画分、腹水の画分、リンパ液の画分、リンパ節の画分、脾臓の画分および卵黄の画分からなる群からサンプルを選択する、請求項 9 6 または 9 7 に記載の方法。

【請求項 99】

サンプルが末梢血単核球 (P B M C)、リンパ球、B - リンパ球、Tリンパ球、ヘルパーT細胞、細胞傷害性T細胞、マクロファージ、樹状細胞、多形核細胞および肥満細胞からなる群から選択される細胞を含んでなる、請求項 95 から 98 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 100】

サンプルが血清または血清の免疫グロブリン含有画分を含んでなる、請求項 98 に記載の方法。

【請求項 101】

タンパク質複合体または免疫グロブリン含有画分が、I g M、I g G、I g A、I g E、I g D および I g Y またはその混合物からなる群から選択される 1 種以上の免疫グロブリンを含んでなる、請求項 95 から 97 のいずれか一項に記載の方法。 10

【請求項 102】

タンパク質複合体またはその免疫グロブリン含有画分が I g G を含んでなる、請求項 101 に記載の方法。

【請求項 103】

タンパク質複合体またはその免疫グロブリン含有画分が I g A を含んでなる、請求項 101 に記載の方法。

【請求項 104】

タンパク質複合体または免疫グロブリン含有画分を、サンプルを被験体から分離または精製することを含んでなり、それによって前記タンパク質複合体または免疫グロブリン含有画分が得られるプロセスによって得る、請求項 95 から 97 のいずれか一項に記載の方法。 20

【請求項 105】

前記の、サンプルを被験体から分離または精製することが、サンプルを免疫グロブリンと結合可能な 1 種以上の化合物と、結合が生じるのに十分な条件下で一定時間接触させ、その化合物を単離することを含んでなる、請求項 104 に記載の方法。

【請求項 106】

1 種以上の化合物を、固体支持体、マトリックスまたは樹脂上に事前に固定化する、請求項 105 に記載の方法。 30

【請求項 107】

固体支持体、マトリックスまたは樹脂が、セルロースベース、アガロース、ナイロン、磁性粒子、常磁性粒子、ポリマー樹脂およびその混合物からなる群から選択される、請求項 106 に記載の方法。

【請求項 108】

1 種以上の固定化された化合物を洗浄することを含んでなり、それによって非特異的に結合しているか、結合していないタンパク質を除去する、請求項 106 または 107 に記載の方法。

【請求項 109】

化合物がタンパク質 A またはそのミメティック、タンパク質 G またはそのミメティック、タンパク質 L またはそのミメティック、抗免疫グロブリン抗体、マルトース結合タンパク質 (M B P)、チオフィリック樹脂およびその混合物からなる群から選択される、請求項 106 から 108 のいずれか一項に記載の方法。 40

【請求項 110】

化合物がタンパク質 A またはタンパク質 G またはその混合物である、請求項 109 に記載の方法。

【請求項 111】

免疫グロブリンを 1 種以上の化合物と結合させることをさらに含んでなる、請求項 105 から 110 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 112】

結合させることが、架橋剤を、結合している免疫グロブリンを有する 1 種以上の化合物と、化合物と免疫グロブリン間に共有結合が生じるのに十分な条件下で一定時間接触させることを含んでなるプロセスを実施することを含んでなる、請求項 90 に記載の方法。

【請求項 113】

架橋剤が、イミドエステル架橋剤、N - ヒドロキシスクシンイミド架橋剤、マレイミド架橋剤、ハロアセチル架橋剤、ヒドラジド架橋剤、およびカルボジイミド架橋剤からなる群から選択される、請求項 112 に記載の方法。

【請求項 114】

架橋剤が N - ヒドロキシスクシンイミド架橋剤である、請求項 113 に記載の方法。

【請求項 115】

N - ヒドロキシスクシンイミド架橋剤が、ジスクシンイミジルグルタレート、スベリン酸ジスクシンイミジル、スベリン酸ビス(スルホスクシンイミジル)、ジチオビス(プロピオン酸スクシンイミジル)、3, 3' - ジチオビス(プロピオン酸スクシンイミジル)、エチレングリコビス(コハク酸スクシンイミジル)、エチレングリコビス(コハク酸スルホスクシンイミジル)、ジスクシンイミジルトアルレート、ジスルホスクシンイミジルトアルレート、ビス[2 - (スクシンイミジルオキシ - カルボニルオキシ)エチル]スルホン、ビス[2 - (スルホスクシンイミジルオキシ - カルボニルオキシ)エチル]スルホン、スクシンイミジル 4 - (N - マレイミドメチル)シクロヘキサン - 1 - カルボキシレート、スルホスクシンイミジル 4 - (N - マレイミドメチル)シクロヘキサン - 1 - カルボキシレート、m - マレイミドベンゾイル - N - ヒドロキシスクシンイミドエステル、m - マレイミドベンゾイル - N - ヒドロキシスルホスクシンイミドエステル、スクシンイミジル 4 - (p - マレイミドフェニル) - ブチレート、スルホスクシンイミジル 4 - (p - マレイミドフェニル) - ブチレート、ビスマレイミドヘキサン、N - (g - マレイミドブチリルオキシ)スクシンイミドエステルおよび N - (g - マレイミドブチリルオキシ)スルホスクシンイミドエステルからなる群から選択される、請求項 114 に記載の方法。

10

20

【請求項 116】

N - ヒドロキシスクシンイミド架橋剤がスベリン酸ジスクシンイミジルである、請求項 115 に記載の方法。

【請求項 117】

被験体がヒトであり、かつ、自己免疫状態に苦しんでいる、請求項 95 または 96 に記載の方法。

30

【請求項 118】

自己免疫状態が自己免疫疾患である、請求項 117 に記載の方法。

【請求項 119】

自己免疫疾患が、関節リウマチ、多発性硬化症、I 型糖尿病、炎症性腸疾患、クローン病、潰瘍性大腸炎、全身性エリテマトーデス、乾癬、強皮症、自己免疫甲状腺疾患、中枢神経系脈管炎、および自己免疫筋炎からなる群から選択される、請求項 118 に記載の方法。

【請求項 120】

被験体が嚢胞性繊維症を患っている、請求項 117 に記載の方法。

40

【請求項 121】

被験体が以前に急性肺疾患増悪を起こしたことがある、請求項 120 に記載の方法。

【請求項 122】

被験体が急性肺疾患増悪を起こしている、請求項 120 に記載の方法。

【請求項 123】

被験体が感染症をさらに患っている、請求項 120 から 122 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 124】

感染症が細菌によって引き起こされる、請求項 123 に記載の方法。

【請求項 125】

50

細菌が、黄色ブドウ球菌、緑膿菌、インフルエンザ菌、アスペルギルス・フミガーツス、セバシア菌複合体、ステノトロホモナス・マルトフィラ、アルカリゲネス(アクロモバクター)キシロソキシダンス、B.グラディオリおよびラルストニア・ピックティ-またはその混合物からなる群から選択される、請求項104に記載の方法。

【請求項126】

細菌が緑膿菌感染症を含んでなる、請求項125に記載の方法。

【請求項127】

サンプルが、免疫グロブリンもしくはその混合物を含んでなるタンパク質複合体または免疫グロブリン含有画分の由来する被験体に由来する、請求項95または96に記載の方法。

10

【請求項128】

被験体において免疫応答を誘発可能な免疫原性タンパク質またはその断片を同定する方法であって、

(i) 免疫原性タンパク質もしくはその断片を含んでなる細胞または細胞抽出物またはその混合物を含んでなるサンプルを事前に投与された被験体に由来するサンプルまたはその被験体によって産生されたサンプルから、免疫グロブリンもしくはその混合物を含んでなるタンパク質複合体または免疫グロブリン含有画分を得ることと、

(ii) タンパク質複合体または免疫グロブリン含有画分を、細胞またはその細胞抽出物またはその混合物を含んでなるサンプルと接触させることと、

(iii) 抗原抗体相互作用によってタンパク質複合体または免疫グロブリン含有画分中の免疫グロブリンと結合しているタンパク質またはその断片を同定することとを含んでなり、

20

それによって被験体において免疫応答を誘発可能な免疫原性タンパク質またはその断片を同定する、方法。

【請求項129】

細胞または細胞抽出物を含んでなるサンプルを被験体に投与することをさらに含んでなる、請求項128に記載の方法。

【請求項130】

細胞または細胞抽出物が、疾病または疾患を引き起こす病原体に由来する、請求項129に記載の方法。

30

【請求項131】

疾病または疾患を引き起こす病原体が感染性病原体である、請求項130に記載の方法。

【請求項132】

感染性病原体が、ウイルス、細菌、酵母、真菌および寄生生物からなる群から選択される、請求項131に記載の方法。

【請求項133】

感染性病原体が細菌である、請求項132に記載の方法。

【請求項134】

細菌が結核菌である、請求項133に記載の方法。

40

【請求項135】

被験体に由来するか、被験体によって産生されたサンプルを得ることをさらに含んでなる、請求項128または129に記載の方法。

【請求項136】

被験体が非ヒト動物である、請求項135に記載の方法。

【請求項137】

非ヒト動物が、マウス、ラット、ウサギ、ニワトリ、イヌ、ヒツジ(sheep)、ヒツジ(ovine)、ウマ、ロバおよびヤギからなる群から選択される、請求項136に記載の方法。

【請求項138】

被験体が鳥類であり、かつ、被験体によって産生される生体サンプルが卵またはその抽

50

出物またはその誘導体である、請求項 1 3 5 から 1 3 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 3 9】

被験体がニワトリである、請求項 1 3 8 に記載の方法。

【請求項 1 4 0】

サンプルから免疫グロブリン含有画分を得ることをさらに含んでなる、請求項 1 2 8 に記載の方法。

【請求項 1 4 1】

全血、血漿、血清、痰、唾液、胸腔内液、心嚢液、腹水、リンパ液、リンパ節、脾臓、卵黄、全血の画分、血漿の画分、血清の画分、痰の画分、唾液の画分、胸腔内液の画分、心嚢液の画分、腹水の画分、リンパ液の画分、リンパ節の画分、脾臓の画分および卵黄の画分からなる群からサンプルを選択する、請求項 1 4 0 に記載の方法。

10

【請求項 1 4 2】

サンプルが末梢血単核球 (P B M C)、リンパ球、B - リンパ球、T リンパ球、ヘルパー T 細胞、細胞傷害性 T 細胞、マクロファージ、樹状細胞、多形核細胞および肥満細胞からなる群から選択される細胞を含んでなる、請求項 1 4 0 または 1 4 1 に記載の方法。

【請求項 1 4 3】

サンプルが血清もしくは血清の免疫グロブリン含有画分または卵黄もしくは卵黄の免疫グロブリン含有画分を含んでなる、請求項 1 4 1 に記載の方法。

【請求項 1 4 4】

タンパク質複合体または免疫グロブリン含有画分が、I g M、I g G、I g A、I g E、I g D および I g Y またはその混合物からなる群から選択される 1 種以上の免疫グロブリンを含んでなる、請求項 9 5 に記載の方法。

20

【請求項 1 4 5】

タンパク質複合体またはその免疫グロブリン含有画分が I g G を含んでなる、請求項 1 4 4 に記載の方法。

【請求項 1 4 6】

タンパク質複合体またはその免疫グロブリン含有画分が I g A を含んでなる、請求項 1 4 4 に記載の方法。

【請求項 1 4 7】

タンパク質複合体またはその免疫グロブリン含有画分が I g Y を含んでなる、請求項 1 4 4 に記載の方法。

30

【請求項 1 4 8】

タンパク質複合体または免疫グロブリン含有画分を、サンプルを被験体から分離または精製することを含んでなり、それによって前記タンパク質複合体またはその免疫グロブリン含有画分が得られるプロセスによって得る、請求項 1 2 8 に記載の方法。

【請求項 1 4 9】

前記の、分離または精製することが、サンプルを免疫グロブリンと結合可能な 1 種以上の化合物と、結合が生じるのに十分な条件下で一定時間接触させ、その化合物を単離することを含んでなる、請求項 1 4 8 に記載の方法。

【請求項 1 5 0】

1 種以上の化合物を、固体支持体、マトリックスまたは樹脂上に事前に固定化する、請求項 1 4 9 に記載の方法。

40

【請求項 1 5 1】

固体支持体、マトリックスまたは樹脂が、セルロースベース、アガロース、ナイロン、磁性粒子、常磁性粒子、ポリマー樹脂からなる群から選択される、請求項 1 3 1 に記載の方法。

【請求項 1 5 2】

1 種以上の固定化された化合物を洗浄することをさらに含んでなり、それによって非特異的に結合しているか、結合していないタンパク質を除去する、請求項 1 5 0 または 1 5 1 に記載の方法。

50

【請求項 153】

1種以上の化合物が、タンパク質Aまたはそのミメティック、タンパク質Gまたはそのミメティック、タンパク質Lまたはそのミメティック、抗免疫グロブリン抗体、マルトース結合タンパク質(MBP)、チオフィリック樹脂およびその混合物からなる群から選択される、請求項149から152のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 154】

化合物がタンパク質Aまたはタンパク質Gまたはその混合物である、請求項153に記載の方法。

【請求項 155】

免疫グロブリンを1種以上の化合物と結合させることをさらに含んでなる、請求項149から154のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 156】

結合させることが、架橋剤を、結合している免疫グロブリンを有する1種以上の化合物と、化合物と免疫グロブリン間に共有結合が生じるのに十分な条件下で一定時間接触させることを含んでなるプロセスを実施することを含んでなる、請求項155に記載の方法。

【請求項 157】

架橋剤が、イミドエステル架橋剤、N-ヒドロキシスクシンイミド架橋剤、マレイミド架橋剤、ハロアセチル架橋剤、ヒドラジド架橋剤、およびカルボジイミド架橋剤からなる群から選択される、請求項156に記載の方法。

【請求項 158】

架橋剤がN-ヒドロキシスクシンイミド架橋剤である、請求項157に記載の方法。

20

【請求項 159】

N-ヒドロキシスクシンイミド架橋剤が、ジスクシンイミジルグルタレート、スベリン酸ジスクシンイミジル、スベリン酸ビス(スルホスクシンイミジル)、ジチオビス(プロピオン酸スクシンイミジル)、3,3'-ジチオビス(プロピオン酸スクシンイミジル)、エチレングリコビス(コハク酸スクシンイミジル)、エチレングリコビス(コハク酸スルホスクシンイミジル)、ジスクシンイミジルトアルタレート、ジスルホスクシンイミジルトアルタレート、ビス[2-(スクシンイミジルオキシ-カルボニルオキシ)エチル]スルホン、ビス[2-(スルホスクシンイミジルオキシ-カルボニルオキシ)エチル]スルホン、スクシンイミジル4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート、スルホスクシンイミジル4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート、m-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル、m-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスルホスクシンイミドエステル、スクシンイミジル4-(p-マレイミドフェニル)-ブチレート、スルホスクシンイミジル4-(p-マレイミドフェニル)-ブチレート、ビスマレイミドヘキサン、N-(g-マレイミドブチリルオキシ)スクシンイミドエステルおよびN-(g-マレイミドブチリルオキシ)スルホスクシンイミドエステルからなる群から選択される、請求項158に記載の方法。

30

【請求項 160】

N-ヒドロキシスクシンイミド架橋剤がスベリン酸ジスクシンイミジルである、請求項159に記載の方法。

40

【請求項 161】

免疫グロブリンもしくはその混合物を含んでなるタンパク質複合体またはその免疫グロブリン含有画分と接触させる、細胞または細胞抽出物またはその混合物を含んでなるサンプルが、細胞または細胞抽出物を含んでなる被験体に由来する、請求項128に記載の方法。

【請求項 162】

細胞または細胞抽出物が疾病または疾患を引き起こす病原体に由来し、かつ、細胞または細胞抽出物またはその混合物を含んでなるサンプルが疾病または疾患を患っている被験体に由来する、請求項161に記載の方法。

【請求項 163】

50

疾病または疾患を引き起こす病原体が感染性病原体である、請求項 1 6 2 に記載の方法。

【請求項 1 6 4】

感染性病原体が、ウイルス、細菌、酵母、真菌および寄生生物からなる群から選択される、請求項 1 6 3 に記載の方法。

【請求項 1 6 5】

感染性病原体が細菌である、請求項 1 6 4 に記載の方法。

【請求項 1 6 6】

細菌が結核菌である、請求項 1 6 5 に記載の方法。

【請求項 1 6 7】

抗原抗体相互作用によって、免疫グロブリンと結合している免疫原性タンパク質またはその断片を、免疫グロブリンから分離することをさらに含んでなる、請求項 1 から 1 6 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 6 8】

タンパク質複合体または免疫グロブリン含有画分を、抗原抗体相互作用を乱す化合物と、抗原抗体相互作用を乱すのに十分な条件下で一定時間接触させることを含んでなる方法によって、免疫原性タンパク質またはその断片を免疫グロブリンから分離する、請求項 1 6 7 に記載の方法。

【請求項 1 6 9】

抗原抗体相互作用を乱す化合物が、免疫グロブリン画分の pH を調節する化合物、塩、イオン性界面活性剤、解離剤およびカオトロピック剤からなる群から選択される、請求項 1 6 8 に記載の方法。

【請求項 1 7 0】

免疫グロブリン含有画分と抗原抗体相互作用によって結合しているか、結合していたタンパク質を単離することをさらに含んでなる、請求項 1 から 1 6 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 7 1】

タンパク質をゲル電気泳動を用いて単離する、請求項 1 7 0 に記載の方法。

【請求項 1 7 2】

ゲル電気泳動が二次元ゲル電気泳動である、請求項 1 7 1 に記載の方法。

【請求項 1 7 3】

免疫グロブリン含有画分と抗原抗体相互作用によって結合しているか、結合していたタンパク質を質量分析を用いて同定する、請求項 1、4 3、9 5 または 1 2 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 7 4】

前記質量分析がマトリックス支援レーザー脱離 / イオン化 - 飛行時間型質量分析 (MALDI-TOF MS) である、請求項 1 7 2 に記載の方法。

【請求項 1 7 5】

(a) 被験体由来のサンプルを免疫グロブリンと結合可能な 1 種以上の化合物と、結合が生じるのに十分な条件下で一定時間接触させ、1 種以上の化合物を単離することを含んでなる方法によって、免疫原性タンパク質もしくはその断片に対して免疫応答を起こした被験体またはその細胞、組織もしくは器官から、免疫グロブリンもしくはその混合物を含んでなるタンパク質複合体または免疫グロブリン含有画分を得ることと、

(b) タンパク質複合体または免疫グロブリン含有画分中の免疫グロブリンを 1 種以上の化合物と結合させることと、

(c) 免疫原性タンパク質またはその断片を、結合している免疫グロブリンから分離することと、

(d) 免疫原性タンパク質またはその断片を含んでなるサンプルを、結合している免疫グロブリンと接触させることと、

(e) 免疫原性タンパク質またはその断片を、結合している免疫グロブリンから分離す

10

20

30

40

50

ることと、

(f) (d) および (e) を場合によって 1 回以上反復することと、

(g) 免疫グロブリンから分離したタンパク質またはその断片を同定することとを含んでなり、

それによって免疫原性タンパク質またはその断片を同定する、方法。

【請求項 176】

(e) 免疫原性タンパク質またはその断片を、結合している免疫グロブリンから分離することを、(d) 免疫原性タンパク質またはその断片を含んでなるサンプルを、結合している免疫グロブリンと接触させることの前に実施する、請求項 175 に記載の方法。

【請求項 177】

(d) 免疫原性タンパク質またはその断片を含んでなるサンプルを、結合している免疫グロブリンと接触させることを、(e) 免疫原性タンパク質またはその断片を、結合している免疫グロブリンから分離することの前に実施する、請求項 175 に記載の方法。

【請求項 178】

(d) 免疫原性タンパク質またはその断片を含んでなるサンプルを、結合している免疫グロブリンと接触させることおよび (e) 免疫原性タンパク質またはその断片を、結合している免疫グロブリンから分離することを、1 種以上の免疫原性タンパク質を同定するのに十分な回数反復する、請求項 175 から 177 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 179】

被験体が、疾病または疾患を引き起こす病原体に対して免疫応答を起こしている、請求項 175 に記載の方法。

【請求項 180】

結合している免疫グロブリンと接触させる、免疫原性タンパク質またはその断片を含んでなるサンプルが、疾病または疾患を引き起こす病原体またはその誘導体を含んでなる、請求項 177 に記載の方法。

【請求項 181】

疾病または疾患を引き起こす病原体が感染性病原体である、請求項 179 または 180 に記載の方法。

【請求項 182】

感染性病原体が細菌である、請求項 181 に記載の方法。

【請求項 183】

細菌が結核菌である、請求項 182 に記載の方法。

【請求項 184】

被験体が自己免疫状態に苦しんでいる、請求項 175 に記載の方法。

【請求項 185】

結合している免疫グロブリンと接触させる、免疫原性タンパク質またはその断片を含んでなるサンプルが、自己免疫状態に苦しんでいる被験体由来のタンパク質を含んでなる、請求項 184 に記載の方法。

【請求項 186】

被験体が、免疫原性タンパク質もしくはその断片を含んでなる細胞またはその抽出物またはその混合物を含んでなるサンプルで事前に免疫されている、請求項 175 に記載の方法。

【請求項 187】

結合している免疫グロブリンと接触させる、免疫原性タンパク質またはその断片を含んでなるサンプルが、細胞またはその抽出物を含んでなる、請求項 186 に記載の方法。

【請求項 188】

被験体がニワトリである、請求項 186 または 187 に記載の方法。

【請求項 189】

被験体が、疾病または疾患と関連のある病原体由来の細胞または細胞抽出物で事前に免疫されている、請求項 186 から 188 のいずれか一項に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 190】

疾病または疾患と関連のある病原体が感染性病原体である、請求項 189 に記載の方法。

【請求項 191】

感染性病原体が細菌である、請求項 190 に記載の方法。

【請求項 192】

細菌が結核菌である、請求項 191 に記載の方法。

【請求項 193】

状態のマーカーを同定するプロセスにおける、請求項 1 から 192 のいずれか一項に記載の方法の使用。

10

【請求項 194】

状態の診断における、請求項 1 から 192 のいずれか一項に記載の方法の使用。

【請求項 195】

状態が疾病または疾患である、請求項 193 または 194 に記載の使用。

【請求項 196】

疾病または疾患が感染性疾患である、請求項 195 に記載の使用。

【請求項 197】

疾病または疾患が癌である、請求項 195 に記載の使用。

【請求項 198】

状態が自己免疫状態である、請求項 194 または 195 に記載の使用。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は 1 種以上のタンパク質を、ヒトまたは動物被験体の生体サンプルから同定および単離する新規方法に関し、ここで、生体サンプルは、免疫グロブリンと、その免疫グロブリンまたは免疫グロブリンの混合物と 1 以上の抗体抗原相互作用によって結合している、単離され同定されるタンパク質とを含んでなるタンパク質複合体、または 1 種以上の免疫グロブリンと結合している、単離されるタンパク質を含んでなる免疫グロブリン含有画分を含んでなる。本発明は注目するタンパク質の免疫グロブリン画分からの分離を明確に包含する。本発明はまた、免疫グロブリン画分の免疫捕獲と結合していないタンパク質の溶出あるいは除去、および場合によっては、捕獲された免疫グロブリンからの注目する結合しているタンパク質の単離または回収による、注目するタンパク質の部分または完全濃縮または精製を包含する。

30

【背景技術】

【0002】

概説

本明細書はパテントイン(PatentIn)バージョン 3.1 を用いて準備されたヌクレオチドおよびアミノ酸配列情報を含む。各ヌクレオチド配列は、数字表示 < 210 > とそれに続く配列識別子(例えば、< 210 > 1、< 210 > 2、< 210 > 3 など)によって配列表に同定されている。配列の長さおよび種類(DNA、タンパク質(PRT)など)および各ヌクレオチド配列の供給源生物はそれぞれ、数字表示フィールド < 211 >、< 212 > および < 213 > で提供される情報によって示されている。本明細書においてヌクレオチド配列は、用語「配列番号」とそれに続く配列識別子によって定義される(例えば、配列番号 1 は配列表中の < 400 > 1 と名づけられた配列を指す)。

40

【0003】

本明細書に記載したヌクレオチド残基の記号表示は IUPAC - IUB 生化学命名法委員会(Biochemical Nomenclature Commission)によって推奨されるものであり、これでは、A はアデニンを表し、C はシトシンを表し、G はグアニンを表し、T はチミンを表し、Y はピリミジン残基を表し、R はプリン残基を表し、M はアデニンまたはシトシンを表し

50

、Kはグアニンまたはチミンを表し、Sはグアニンまたはシトシンを表し、Wはアデニンまたはチミンを表し、Hはグアニン以外のヌクレオチドを表し、Bはアデニン以外のヌクレオチドを表し、Vはチミン以外のヌクレオチドを表し、Dはシトシン以外のヌクレオチドを表し、Nはいずれかのヌクレオチド残基を表す。

【0004】

本明細書において用語「に由来する」とは、特定の供給源から、必ずしもその供給源から直接ではないにしても、指定の整数が得られることを示すと取られるものとする。

【0005】

文脈上他の意味に解すべき場合を除き、または特に断りのない限り、単数形の整数、ステップまたはエレメントとして本明細書に挙げられた本発明の整数、ステップまたはエレメントは、挙げられた整数、ステップまたはエレメントの単数および複数形の双方を明確に包含する。

10

【0006】

本明細書を通じて、文脈上他の意味に解すべき場合を除き、語句「含んでなる (comprise)」または「含んでなる (comprises)」または「含んでなっている (comprising)」のような変形は、記載したステップもしくはエレメントもしくは整数またはステップもしくはエレメントもしくは整数の群の包含を意味するが、何らかの他のステップもしくはエレメントもしくは整数またはエレメントもしくは整数の群の排除を意味しないと理解されるものとする。

【0007】

本明細書を通じて、特に断りのない限り、または文脈上他の意味に解すべき場合を除き、単一のステップ、組成物、ステップの群または組成物の群は、1つおよび複数の(すなわち、1以上の)そのようなステップ、組成物、ステップの群または組成物の群を包含すると取られるものとする。

20

【0008】

特に断りのない限り、本発明の具体的な態様または実施形態に関して本明細書に記載した各特徴は、本発明のありとあらゆる態様または実施形態について準用すると取られるものとする。

【0009】

当業者ならば、本明細書に記載された本発明は具体的に記載されたもの以外の変化および改変を受け入れる余地があるということは理解するであろう。当然のことながら、本発明はこのような変化および改変のすべてを含む。本発明はまた、本明細書において、個別にまたは集合的に言及されたか示された、ステップ、特徴、組成物および化合物のすべて、および前記ステップまたは特徴のありとあらゆる組合せまたはいずれか2以上を含む。

30

【0010】

本発明は、本明細書に記載された具体的な実施形態による範囲に限定されるものではない。機能的に同等な産物、組成物および方法は、明確に、本明細書に記載された本発明の範囲内にある。

【0011】

本願に引用されたすべての参照文献は、参照により本明細書に特に組み込まれる。

40

【0012】

本発明は過度の実験を行わなくとも、特に示さない限り、分子生物学、微生物学、ウイルス学の従来技術、組換えDNA技術、溶液中でのペプチド合成、固相ペプチド合成および免疫学を用いて実施される。かかる手順は、例えば、参照により組み込まれる以下の教本に記載されている：

サムブロック (Sambrook)、フリッチ (Fritsch)&マニアティス (Maniatis)、モレキュラー・クローニング (Molecular Cloning) : ア・ラボラトリー・マニュアル (A Laboratory Manual)、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリーズ (Cold Spring Harbor Laboratories)、ニューヨーク、第2版 (1989)、I、IIおよびIII全巻；

DNAクローニング (DNA Cloning) : ア・プラクティカル・アプローチ (A Practical Approach)

50

- oach)、IおよびII巻(D. N. グローバー(Glover)編、1985)、IRLプレス、オックスフォード、教本全体；
- オリゴヌクレオチド・シンセシス(Oligonucleotide Synthesis)：ア・プラクティカル・アプローチ(M. J. ゲイト(Gait)編、1984) IRLプレス、オックスフォード、教本全体、および特にその中のゲイトによる論文、1～22頁；アトキンソン(Atkinson)ら、35～81頁；スプロート(Sproat)ら、83～115頁およびウー(Wu)ら、135～151頁；
- ヌクレイック・アシッド・ハイブリダイゼーション(Nucleic Acid Hybridization)：ア・プラクティカル・アプローチ(B. D. ハメス(Hames)& S. J. ヒギンス(Higgins)編、1985) IRLプレス、オックスフォード、教本全体； 10
- イモビライズド・セルズ・アンド・エンザイムス：ア・プラクティカル・アプローチ(Immobilized Cells and Enzymes: A Practical Approach)(1986) IRLプレス、オックスフォード、教本全体；
- パーバル(Perbal)、B.、ア・プラクティカル・ガイド・トゥー・モレキュラー・クローニング(A Practical Guide to Molecular Cloning)(1984)；
- メソッズ・イン・エンジモロジー(Methods In Enzymology)(S. コロウィック(Colowick)およびN. カプラン(Kaplan)編、アカデミックプレス社(Academic Press, Inc.))、シリーズ全体；
- ナレッジ・データベース・オブ・アクセス・トゥー・ヴァーチャル・ラボラトリー・ウェブサイト(Knowledge database of Access to Virtual Laboratory website)(インタラクティブ(Interactiva)、ドイツ)中の、J. F. ラマルホ・オルチガオ(Ramalho Ortigao)、「ザ・ケミストリー・オブ・ペプチド・シンセシス(The Chemistry of peptide Synthesis)」； 20
- サカキバラ、D.、タイヒマン(Teichman)、J. レイン、E. およびフェニケル(Fenichel)、R. L. (1976) バイオケミカル・バイオフィジオロジー・リサーチ・コミュニケーション(Biochemical Biophysiology Research Communication)73、336～342頁
- メリフィールド、R. B. (1963) ジャーナル・オブ・ジ・アメリカン・ケミカル・ソサイエティー(Journal of the American Chemical Society)85、2149～2154頁、 30
- サ・ペプチド(The Peptide)(グロス(Gross)、E. およびメイエンホファー(Meienhofer)、J. 編)2巻、1～284頁、アカデミックプレス(Academic Press)、ニューヨーク中の、バラニー(Barany)、G. およびメリフィールド(Merrifield)、R. B. (1979) 、
- ビュンシュ(Wunsch)、E. 編(1974) ジンテーゼ・フォン・ペプチデン・イン・ハウベン・ヴァイルス・メトードン・デア・オルガーツシェン・ケミー(Synthese von peptiden in Houben-Weyls Methoden der Organischen Chemie)(ミュラー(Muler)E. 編)15巻、第4版、1頁および2頁、ティエメ(Thieme)、シュツツガルト、
- ボダンツキー(Bodanszky)、M (1984) プリンシプルス・オブ・ペプチド・シンセシス(Principles of peptide Synthesis)、スプリンガー・ヴェルラグ(Springer-Verlag)、 40
ヘイデルバーグ、
- ボダンツキー、M. & ボダンツキー、A (1984) ザ・プラクティス・オブ・ペプチド・シンセシス(The Practice of Peptide Synthesis)、スプリンガー・ヴェルラグ、ヘイデルバーグ、
- ボダンツキー、M. (1985)、インターナショナル・ジャーナル・オブ・ペプチド・アンド・プロテイン・リサーチ(International journal of Peptide and protein Research)25、449～474頁、
- ハンドブック・オブ・エクスペリメンタル・イムノロジー(Handbook of Experimental Immunology)I - IV巻(D. M. ウィアー(Weir)およびC. C. ブラックウェル(Blackwell)編、1986)ブラックウェル・サイエンティフィック・パブリケーションズ(Blackwell 50

Scientific Publications)。

【0013】

(関連技術の説明)

新しい診断標的、リード化合物および新規標的の同定および確認試薬の要求が高まるのに答えて、製薬産業は、例えば、感染症または自己免疫疾患の診断/予後および/または治療などにおいて、病原性生物または疾病状態に特異的な新規マーカーまたは化合物のスクリーニングを増やしてきた。

【0014】

多くの病原性生物は独特なタンパク質またはタンパク質のイソ型を発現するので、多くの研究はこのようなタンパク質を同定し、新規診断/予後および/または治療戦略の開発に使用することに焦点を当ててきた。しかし、病原性生物によって発現されたタンパク質のすべてが、診断法において、または治療戦略において使用するのに適した標的に相当するわけではない。したがって、新規診断および/または治療戦略の同定においては多量の研究は、適した標的分子の同定を対象としている。

10

【0015】

おそらく、注目する診断/予後標的の同定における最も単純なアプローチは、疾病または状態に関連する病原体に由来するタンパク質を決定すること、あるいは、疾病または状態の結果として発現パターンが変わった宿主細胞タンパク質を決定することである。次いで、決定したタンパク質を用いて、前記タンパク質またはその領域と特異的に結合できる抗体を作製または同定し、このタンパク質が、免疫診断試薬の調製においてこれを使用するのを容易にするのに十分にほど免疫原性であるかどうかを調べる。しかし、このような方法は、試験するタンパク質の多くが免疫原性でないか、少なくとも、免疫診断試薬およびキットまたはワクチンを製造するために、宿主において免疫応答を誘発するために求められる程度ではないので高い確立で失敗する。

20

【0016】

さらに、抗体、リガンドまたは小分子の標的は、天然の環境では、すなわち、他のタンパク質との複合体中または細胞内では比較的近づきにくく、それによって免疫アッセイによる検出が妨げられる場合がある。

【0017】

したがって、推定標的を同定する前にいくつかの可能性ある標的を試験しなければならないことが多いので、このような方法の高い失敗率は、このアプローチが骨の折れるもので、かつ、費用のかかるものであるということを意味する。

30

【0018】

いくつかの病原性生物のゲノムの配列決定が完了したので、研究者らは、この情報を用いてこのような病原性生物によって発現されるタンパク質の機能を予測する試みに着手した。研究者らは、機能および配列情報の双方を用いて、病原性生物によって発現されるタンパク質の位置および近づきやすさ、ひいては、タンパク質が感染性生物の治療のための診断または治療標的に相当する可能性を予測しようと試みている。マシグナニ(Masignani)ら、エキスパート・オピニオン・オン・バイオリジカル・セラピー(Expert Opinion on Biological Therapy) 2(8)、895~905頁、2002によって報告されるように、このプロセスは、推定診断、治療および/またはワクチン標的の迅速な予測をもたらし、これによって新規治療/診断機会の開発が加速され得る。

40

【0019】

生物のゲノム配列の解析に依存する方法では、注目する生物のゲノムまたは少なくともゲノムの相当割合が配列決定されていることが必要である。したがって、この方法は、いまだ配列決定される予定であるゲノムを有する生物における、特に、最近同定されたばかりの生物における診断/治療標的の予測では有効でない。さらに、このようなアプローチは、例えば、高い突然変異率を維持し、したがって、そのゲノム配列が恒常的に変化するいくつかのレトロウイルスなどの病原体における可能性ある治療/診断標的の予測ではあまり役に立たない。

50

【0020】

さらに、これらの方法では、あるとすれば、予測された標的タンパク質が病原性生物によって *in vivo* で実際に発現されるかどうかを調べるために熟練した技術者が必要である。このことは、タンパク質の中には疾病または疾患の特定のステージでのみ発現されるものもあるという観察結果を踏まえると、より困難になる。したがって、例えば、感染の後期に発現されるタンパク質は、初期の診断またはワクチンの関係ではあまり役に立たない場合がある。

【0021】

前記の議論から理解されるように、依然として、診断アッセイおよび/または治療方法の魅力的な標的であるタンパク質の迅速な単離および/または同定法が必要である。

10

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0022】

本発明者らは、本発明に到達するまでの研究において、結核菌または緑膿菌による感染症の新規診断薬、ワクチンおよび薬剤標的タンパク質を同定しようとしてきた。本発明者らは、患者血清サンプルの免疫グロブリン (I g) 画分から免疫原性標的タンパク質またはペプチド断片を回収でき、これではタンパク質またはペプチド断片がそのアミノ酸配列を決定するのに十分なほど分解されていないことを見出した。タンパク質は感染の間に迅速に分解されることが知られていたために、これは驚くべきことであった。したがって、本発明者らは、結核を患っている患者から得た血清の I g 画分からいくつかのタンパク質/断片を同定することによって、当技術分野での従来の見識に対抗して突き進んだ。

20

【0023】

本発明者らは、この方法を用いて T B 患者の痰および血清の I g G 画分から結核菌グルタミンシンセターゼ (R v 2 8 6 0 c) を同定した。また、記載した免疫分離技術を用いて T B 患者の血清の I g G 画分から結核菌タンパク質伸張因子 T u (R v 0 6 8 5) を単離および同定した。

【0024】

本発明者らは、感染症を患っている被験体から免疫グロブリン含有画分を獲得することによって本発明の方法をさらに開発した。次いで、獲得した免疫グロブリン含有画分を固定化し、例えば、感染性生物に感染した被験体の体液、または細胞もしくは細胞抽出物と接触させる。この方法では、被験体の I g 画分を用いて感染性生物から免疫原性タンパク質を精製する。本発明者らは結合しているタンパク質を、固定化した I g 画分から溶出または単離することによって、免疫原性タンパク質の獲得レベルを高めることができ、それによってそのタンパク質の同定および解析が容易になった。本発明者らは、緑膿菌感染症を患っている C F を患っている被験体の I g 画分を用いて、前記細菌からいくつかの免疫原性タンパク質、例えば、熱ショックタンパク質 G r o E S を単離した。

30

【0025】

さらに、本発明者らは前述の方法を適用して、C F 被験体の痰から、急性臨床増悪を起こしている C F 被験体がそれに対する自己抗体を発生させたタンパク質を単離した。したがって、本方法は自己免疫状態に苦しんでいる被験体がそれに対して特異的免疫応答を起

40

【0026】

本発明者らは被験体を感染性生物由来のタンパク質補体で免疫することによって本方法をさらに発展させた。前記動物から、または被験体によって産生されたサンプルから単離した免疫グロブリン含有画分を、次いで、単離し、固定化する。次いで、この固定化した I g 画分を、同様の生物に感染した患者の体液と接触させ、感染性生物から、それに対して被験体が抗体応答を起こす、*in vivo* で発現されたタンパク質を捕獲し、溶出し、同定し、それによって *in vivo* で発現されたタンパク質を決定する。

【0027】

本発明者らがとったアプローチは、どんな免疫原性タンパク質の同定においても一般的

50

に用いられるものである。このような免疫原性タンパク質は、魅力的な標的に相当し、例えば、病原性生物または被験体における感染状態または自己免疫状態を同定するための診断適用にとって有用である。さらに、このようなタンパク質はまた、被験体において、そのタンパク質を単離する病原性生物による感染症または自己免疫状態を処置するための治療または予防戦略の開発にも有用である。

【0028】

本発明は免疫応答を誘発可能な免疫原性タンパク質またはその断片を同定する方法を提供し、この方法は、被験体またはその細胞、組織もしくは器官から、免疫グロブリンもしくはその混合物を含んでなるタンパク質複合体または免疫グロブリン含有画分を得ることと、免疫グロブリンと抗原抗体相互作用によって結合しているタンパク質またはその断片を同定することとを含んでなり、それによって免疫応答を誘発可能な免疫原性タンパク質またはその断片を同定する。

10

【0029】

本発明は、例えば、被験体からタンパク質複合体もしくはその混合物または免疫グロブリン含有画分を含んでなるサンプルを得ることをさらに提供する。本発明は、サンプルから1以上の免疫グロブリン含有画分を得ることさらに提供する。

【0030】

例えば、全血、血漿、血清、痰、唾液、胸腔内液、心嚢液、腹水、リンパ液、リンパ節、脾臓、卵黄、全血の画分、血漿の画分、血清の画分、痰の画分、唾液の画分、胸腔内液の画分、心嚢液の画分、腹水の画分、リンパ液の画分、リンパ節の画分、脾臓の画分および卵黄の画分からなる群からサンプルを選択する。もう1つの実施例では、サンプルは末梢血単核球(PBMC)、リンパ球、B-リンパ球、Tリンパ球、ヘルパーT細胞、細胞傷害性T細胞、マクロファージ、樹状細胞、多形核細胞および肥満細胞からなる群から選択される細胞を含んでなる。さらにもう1つの実施例では、サンプルは血清または血清の免疫グロブリン含有画分を含んでなる。

20

【0031】

一実施例では、タンパク質複合体またはその免疫グロブリン含有画分は、IgM、IgG、IgA、IgE、IgDおよびIgYまたはその混合物からなる群から選択される1以上の免疫グロブリンを含んでなる。例えば、タンパク質複合体またはその免疫グロブリン含有画分はIgGを含んでなる。あるいは、またはさらに、タンパク質複合体または免疫グロブリン含有画分はIgAを含んでなる。

30

【0032】

このようなタンパク質複合体または免疫グロブリン含有画分は、例えば、サンプルを被験体から分離または精製することを含んでなり、それによって前記タンパク質複合体または免疫グロブリン含有画分が得られるプロセスによって得る。例えば、前記の、サンプルを被験体から分離または精製することは、サンプルを免疫グロブリンと結合可能な1種以上の化合物と、結合が生じるのに十分な条件下で一定時間接触させ、その化合物を単離することを含んでなる。

【0033】

例えば、化合物を固体支持体、マトリックスまたは樹脂、例えば、セルロースビーズ、アガロース、ナイロン、磁性粒子、常磁性粒子、ポリマー樹脂およびその混合物からなる群から選択される固体支持体、マトリックスまたは樹脂上に事前に固定化する。

40

【0034】

本発明の方法は、1種以上の固定化された化合物の洗浄をさらに提供し、それによって非特異的に結合しているか、結合していないタンパク質を除去する。

【0035】

一実施例では、化合物はタンパク質Aまたはそのミメティック、タンパク質Gまたはそのミメティック、タンパク質Lまたはそのミメティック、抗免疫グロブリン抗体、マルトース結合タンパク質(MBP)、チオフィリック樹脂およびその混合物からなる群から選択される。例えば、化合物はタンパク質A、タンパク質Gまたはその混合物である。

50

【0036】

本発明の方法の一実施例では、被験体は感染症を患っているか、感染症を以前に患ったことがある。例えば、感染症は急性感染症または慢性感染症である。このような感染症は、例えば、ウイルス感染症、細菌感染症、酵母感染症、真菌感染症、寄生生物感染症からなる群から選択される。例えば、感染症は細菌感染症、例えば、シュードモナス属感染症またはマイコバクテリウム属感染症である。

【0037】

もう1つの実施例では、感染症は肺感染症、例えば、緑膿菌または結核菌の存在によって引き起こされるか、それに関連する肺感染症（例えば、結核）である。

【0038】

さらなる実施例では、被験体は自己免疫状態、例えば、炎症状態と関連する自己免疫状態に苦しんでいる。

【0039】

いっそうさらなる実施例では、本方法は、被験体を免疫原性タンパク質またはその断片を含んでなる1種以上の細胞またはその抽出物で免疫することをさらに含んでなり、それによって免疫原性タンパク質またはその断片に対する免疫応答を誘発する（例えば、被験体において、または被験体に由来するか被験体によって産生されたサンプルにおいて）。例えば、1種以上の細胞またはその抽出物は免疫原性タンパク質またはその断片を発現する感染性病原体に由来する。有用な細胞またはその抽出物の例は、ウイルス粒子、細菌細胞、酵母細胞、真菌細胞または寄生生物の細胞もしくは寄生生物に由来する細胞からなる群から選択されるか、あるいは、細胞抽出物はウイルスの抽出物、細菌の抽出物、酵母の抽出物、真菌の抽出物および寄生生物の抽出物からなる群から選択される。例えば、1種以上の細胞が細菌細胞であるか、細胞抽出物が細菌抽出物、例えば、シュードモナス種、例えば、緑膿菌またはマイコバクテリウム属、例えば、結核菌である。

【0040】

本発明の一実施例では、被験体は非ヒト動物であり、例えば、非ヒト動物はマウス、ラット、ウサギ、ニワトリ、イヌ、ヒツジ (sheep)、ヒツジ (ovine)、ウマおよびヤギからなる群から選択される。

【0041】

もう1つの実施例では、被験体はヒト被験体である。

【0042】

本発明の方法は、例えば、架橋剤を、結合している免疫グロブリンを有する1種以上の化合物と、化合物と免疫グロブリン間に共有結合が生じるのに十分な条件下で一定時間接触させることを含んでなるプロセスを実施することによって、免疫グロブリンを1種以上の化合物と結合させることをさらに提供する。

【0043】

このような架橋剤は、例えば、イミドエステル架橋剤、N-ヒドロキシスクシンイミド架橋剤、マレイミド架橋剤、ハロアセチル架橋剤、ヒドラジド架橋剤、およびカルボジイミド架橋剤からなる群から選択される、例えば、この架橋剤はN-ヒドロキシスクシンイミド架橋剤であり、例えば、N-ヒドロキシスクシンイミド架橋剤は、ジスクシンイミジルグルタレート、スベリン酸ジスクシンイミジル、スベリン酸ビス(スルホスクシンイミジル)、ジチオビス(プロピオン酸スクシンイミジル)、3,3'-ジチオビス(プロピオン酸スクシンイミジル)、エチレングリコビス(コハク酸スクシンイミジル)、エチレングリコビス(コハク酸スルホスクシンイミジル)、ジスクシンイミジルタルタレート、ジスルホスクシンイミジルタルタレート、ビス[2-(スクシンイミジルオキシ-カルボニルオキシ)エチル]スルホン、ビス[2-(スルホスクシンイミジルオキシ-カルボニルオキシ)エチル]スルホン、スクシンイミジル4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート、スルホスクシンイミジル4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート、m-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル、m-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスルホスクシンイミ

10

20

30

40

50

ドエステル、スクシンイミジル 4 - (p - マレイミドフェニル) - ブチレート、スルホスクシンイミジル 4 - (p - マレイミドフェニル) - ブチレート、ビスマレイミドヘキサン、N - (g - マレイミドブチリルオキシ) スクシンイミドエステルおよび N - (g - マレイミドブチリルオキシ) スルホスクシンイミドエステルからなる群から選択される。例えば、N - ヒドロキシスクシンイミド架橋剤はスペリン酸ジスクシンイミジルである。

【 0 0 4 4 】

本発明はまた、被験体において疾病または疾患を引き起こす病原体の免疫原性タンパク質または免疫原性タンパク質断片を同定する方法を提供し、これは、

(i) 疾病または疾患を患っているか、以前に疾病または疾患を患ったことがある被験体、またはその細胞、組織もしくは器官から免疫グロブリンもしくはその混合物を含んでなるタンパク質複合体または免疫グロブリン含有画分を得ることと、

(i i) タンパク質複合体または免疫グロブリン含有画分中の免疫グロブリンを、疾病または疾患を引き起こす病原体またはその誘導体を含んでなるサンプルと接触させることと、

(i i i) 前記免疫グロブリンと、抗原抗体相互作用によって結合しているタンパク質またはその断片を同定することとを含んでなり、

同定されるタンパク質は、被験体において疾病または疾患を引き起こす病原体の免疫原性タンパク質または免疫原性タンパク質断片である。

【 0 0 4 5 】

一例では、誘導体は疾病または疾患を引き起こす病原体、例えば、感染性病原体、例えば、ウイルス感染、細菌、酵母、真菌および寄生生物からなる群から選択される感染性病原体のタンパク質または細胞抽出物を含んでなる。例えば、感染性病原体は細菌、例えば、緑膿菌または結核菌である。例えば、細菌は臨床分離株である。

【 0 0 4 6 】

本発明は、癌細胞の免疫原性タンパク質または免疫原性タンパク質断片を同定する方法をさらに提供し、これは、

(i) 癌を患っているか、以前に癌を患ったことがある被験体から、免疫グロブリンもしくはその混合物を含んでなるタンパク質複合体または免疫グロブリン含有画分を得ることと、

(i i) タンパク質複合体または免疫グロブリン含有画分中の免疫グロブリンを、腫瘍細胞またはそのタンパク質抽出物もしくは細胞抽出物を含んでなるサンプルと接触させることと、

(i i i) 前記免疫グロブリンと、抗原抗体相互作用によって結合しているタンパク質またはその断片を同定することとを含んでなり、

同定されるタンパク質は、癌細胞の免疫原性タンパク質または免疫原性タンパク質断片である。

【 0 0 4 7 】

例えば、癌細胞は膀胱癌細胞、乳癌細胞、結腸直腸癌細胞、子宮内膜癌細胞、頭頸部癌細胞、白血病細胞、肺癌細胞、リンパ腫細胞、メラノーマ細胞、非小細胞肺癌細胞、卵巣癌細胞、前立腺癌細胞、急性リンパ性白血病細胞、成人急性骨髄性白血病細胞、成人非ホジキンスリンパ腫細胞、脳腫瘍細胞、子宮頸癌細胞、小児肉腫細胞、慢性リンパ性白血病細胞、慢性骨髄性白血病細胞、食道癌細胞、ヘアリー細胞白血病細胞、腎臓癌細胞、肝臓癌細胞、多発性骨髄腫細胞、神経芽細胞腫細胞、口腔癌細胞、膵臓癌細胞、中枢神経系原発リンパ腫細胞、皮膚癌細胞および小細胞肺癌細胞からなる群から選択される。

【 0 0 4 8 】

本発明は、例えば、被験体からタンパク質複合体またはその混合物またはその免疫グロブリン含有画分を含んでなるサンプルを得ることをさらに提供する。本発明は、サンプルから 1 以上の免疫グロブリン含有画分を得ることを、なお、さらに提供する。

【 0 0 4 9 】

例えば、サンプルは全血、血漿、血清、痰、唾液、胸腔内液、心嚢液、腹水、リンパ液

10

20

30

40

50

、リンパ節、脾臓、卵黄、全血の画分、血漿の画分、血清の画分、痰の画分、唾液の画分、胸腔内液の画分、心嚢液の画分、腹水の画分、リンパ液の画分、リンパ節の画分、脾臓の画分および卵黄の画分からなる群から選択される。もう1つの実施例では、サンプルは末梢血単核球(PBMC)、リンパ球、B-リンパ球、Tリンパ球、ヘルパーT細胞、細胞傷害性T細胞、マクロファージ、樹状細胞、多形核細胞および肥満細胞からなる群から選択される細胞を含んでなる。さらにもう1つの実施例では、サンプルは血清または血清の免疫グロブリン含有画分を含んでなる。

【0050】

一実施例では、タンパク質複合体または免疫グロブリン含有画分は、IgM、IgG、IgA、IgE、IgDおよびIgYまたはその混合物からなる群から選択される1種以上の免疫グロブリンを含んでなる。例えば、タンパク質複合体または免疫グロブリン含有画分はIgGを含んでなる。あるいは、またはさらに、タンパク質複合体または免疫グロブリン含有画分はIgAを含んでなる。あるいは、またはさらに、タンパク質複合体または免疫グロブリン含有画分はIgMを含んでなる。

10

【0051】

本発明はまた、タンパク質複合体または免疫グロブリン含有画分を、サンプルを被験体から分離または精製することを含んでなり、それによって前記タンパク質複合体または免疫グロブリン含有画分が得られるプロセスによって得ることを提供する。例えば、前記の、サンプルを被験体から分離または精製することは、サンプルを免疫グロブリンと結合可能な1種以上の化合物と、結合が生じるのに十分な条件下で一定時間接触させ、その化合物を単離することを含んでなる。

20

【0052】

例えば、1種以上の化合物は固体支持体、マトリックスまたは樹脂上に事前に固定化し、例えば、固体支持体、マトリックスまたは樹脂は、セルロースビーズ、アガロース、ナイロン、磁性粒子、常磁性粒子、ポリマー樹脂およびその混合物からなる群から選択される。

【0053】

本発明の方法は、1種以上の固定化された化合物の洗浄をさらに提供し、それによって非特異的に結合しているか、結合していないタンパク質を除去する。

【0054】

一実施例では、化合物はタンパク質Aまたはそのミメティック、タンパク質Gまたはそのミメティック、タンパク質Lまたはそのミメティック、抗免疫グロブリン抗体、マルトース結合タンパク質(MBP)およびチオフィリック樹脂またはその混合物からなる群から選択される。例えば、化合物はタンパク質A、タンパク質Gまたはその混合物である。

30

【0055】

本発明の方法は、例えば、架橋剤を、結合している免疫グロブリンを有する1種以上の化合物と、化合物と免疫グロブリン間に共有結合が生じるのに十分な条件下で一定時間接触させることを含んでなるプロセスを実施することによって、免疫グロブリンを1種以上の化合物と結合させることをさらに提供する。

【0056】

このような架橋剤は、例えば、イミドエステル架橋剤、N-ヒドロキシスクシンイミド架橋剤、マレイミド架橋剤、ハロアセチル架橋剤、ヒドラジド架橋剤、およびカルボジイミド架橋剤からなる群から選択される。例えば、この架橋剤はN-ヒドロキシスクシンイミド架橋剤であり、例えば、N-ヒドロキシスクシンイミド架橋剤は、ジスクシンイミジルグルタレート、スベリン酸ジスクシンイミジル、スベリン酸ビス(スルホスクシンイミジル)、ジチオビス(プロピオン酸スクシンイミジル)、3,3'-ジチオビス(プロピオン酸スクシンイミジル)、エチレングリコビス(コハク酸スクシンイミジル)、エチレングリコビス(コハク酸スルホスクシンイミジル)、ジスクシンイミジルタルタレート、ジスルホスクシンイミジルタルタレート、ビス[2-(スクシンイミジルオキシ-カルボニルオキシ)エチル]スルホン、ビス[2-(スルホスクシンイミジルオキシ-カルボニ

40

50

ルオキシ)エチル]スルホン、スクシンイミジル4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサ-1-カルボキシレート、スルホスクシンイミジル4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサ-1-カルボキシレート、m-マレイミドベンゾイル-Nヒドロキシスクシンイミドエステル、m-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスルホスクシンイミドエステル、スクシンイミジル4-(p-マレイミドフェニル)-ブチレート、スルホスクシンイミジル4-(p-マレイミドフェニル)-ブチレート、ビスマレイミドヘキサ-、N-(g-マレイミドブチリルオキシ)スクシンイミドエステルおよびN-(g-マレイミドブチリルオキシ)スルホスクシンイミドエステルからなる群から選択される。例えば、N-ヒドロキシスクシンイミド架橋剤はスベリン酸ジスクシンイミジルである。

【0057】

本発明はまた、自己免疫状態から、被験体において免疫応答を誘発可能な免疫原性タンパク質またはその断片を同定する方法を提供し、この方法は、

(i)自己免疫状態に苦しんでいる被験体またはその細胞、組織もしくは器官から、免疫グロブリンもしくはその混合物を含んでなるタンパク質複合体または免疫グロブリン含有画分を得ることと、

(ii)タンパク質複合体または免疫グロブリン含有画分中の免疫グロブリンを、自己免疫疾患を患っている被験体に由来するタンパク質を含んでなるサンプルと接触させることと、

(iii)前記免疫グロブリンと、抗原抗体相互作用によって結合しているタンパク質またはその断片を同定することとを含んでなり、

同定されるタンパク質は、自己免疫状態に由来する、ヒトまたは非ヒト動物被験体において免疫応答を誘発し得る免疫原性タンパク質またはその断片である。

【0058】

一例では、本発明は、自己免疫疾患を患っている被験体から、タンパク質複合体または免疫グロブリン含有画分を含んでなるサンプルを得ることと、例えば、サンプルから免疫グロブリンまたはその混合物またはその免疫グロブリン含有画分を得ることとをさらに含んでなる。さらに、本方法は、例えば、サンプルから免疫グロブリン含有画分を得ることをさらに含んでなる。

【0059】

例えば、サンプルは全血、血漿、血清、痰、唾液、胸腔内液、心嚢液、腹水、リンパ液、リンパ節、脾臓、卵黄、全血の画分、血漿の画分、血清の画分、痰の画分、唾液の画分、胸腔内液の画分、心嚢液の画分、腹水の画分、リンパ液の画分、リンパ節の画分、脾臓の画分および卵黄の画分からなる群から選択される。もう1つの実施例では、サンプルは末梢血単核球(PBMC)、リンパ球、B-リンパ球、Tリンパ球、ヘルパーT細胞、細胞傷害性T細胞、マクロファージ、樹状細胞、多形核細胞および肥満細胞からなる群から選択される細胞を含んでなる。さらにもう1つの実施例では、サンプルは血清または血清の免疫グロブリン含有画分を含んでなる。

【0060】

一実施例では、タンパク質複合体または免疫グロブリン含有画分は、IgM、IgG、IgA、IgE、IgDおよびIgYまたはその混合物からなる群から選択される1種以上の免疫グロブリンを含んでなる。例えば、タンパク質複合体または免疫グロブリン含有画分はIgGを含んでなる。あるいは、またはさらに、タンパク質複合体または免疫グロブリン含有画分はIgAを含んでなる。あるいは、またはさらに、タンパク質複合体または免疫グロブリン含有画分はIgMを含んでなる。

【0061】

本発明は、タンパク質複合体または免疫グロブリン含有画分を、サンプルを被験体から分離または精製することを含んでなり、それによって前記タンパク質複合体または免疫グロブリン含有画分が得られるプロセスによって得ることを提供する。例えば、前記の、サンプルを被験体から分離または精製することは、サンプルを免疫グロブリンと結合可能な1種以上の化合物と、結合が生じるのに十分な条件下で一定時間接触させ、その化合物を

10

20

30

40

50

単離することを含んでなる。

【0062】

例えば、化合物を固体支持体、マトリックスまたは樹脂、例えば、セルロースビーズ、アガロース、ナイロン、磁性粒子、常磁性粒子およびポリマー樹脂ならびにその混合物からなる群から選択される固体支持体、マトリックスまたは樹脂上に事前に固定化する。

【0063】

本発明の方法は、1種以上の固定化された化合物の洗浄をさらに提供し、それによって非特異的に結合しているか、結合していないタンパク質を除去する。

【0064】

一実施例では、化合物はタンパク質Aまたはそのミメティック、タンパク質Gまたはそのミメティック、タンパク質Lまたはそのミメティック、抗免疫グロブリン抗体、マルトース結合タンパク質(MBP)、チオフィリック樹脂およびその混合物からなる群から選択される。例えば、化合物はタンパク質A、タンパク質Gまたはその混合物である。

【0065】

本発明の方法は、例えば、架橋剤を、結合している免疫グロブリンを有する1種以上の化合物と、化合物と免疫グロブリン間に共有結合が生じるのに十分な条件下で一定時間接触させることを含んでなるプロセスを実施することによって、免疫グロブリンを1種以上の化合物と結合させることをさらに提供する。

【0066】

このような架橋剤は、例えば、イミドエステル架橋剤、N-ヒドロキシスクシンイミド架橋剤、マレイミド架橋剤、ハロアセチル架橋剤、ヒドラジド架橋剤、およびカルボジイミド架橋剤からなる群から選択される。例えば、この架橋剤はN-ヒドロキシスクシンイミド架橋剤であり、例えば、N-ヒドロキシスクシンイミド架橋剤は、ジスクシンイミジルグルタレート、スベリン酸ジスクシンイミジル、スベリン酸ビス(スルホスクシンイミジル)、ジチオビス(プロピオン酸スクシンイミジル)、3,3'-ジチオビス(プロピオン酸スクシンイミジル)、エチレングリコビス(コハク酸スクシンイミジル)、エチレングリコビス(コハク酸スルホスクシンイミジル)、ジスクシンイミジルタルタレート、ジスルホスクシンイミジルタルタレート、ビス[2-(スクシンイミジルオキシ-カルボニルオキシ)エチル]スルホン、ビス[2-(スルホスクシンイミジルオキシ-カルボニルオキシ)エチル]スルホン、スクシンイミジル4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート、スルホスクシンイミジル4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート、m-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル、m-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスルホスクシンイミドエステル、スクシンイミジル4-(p-マレイミドフェニル)-ブチレート、スルホスクシンイミジル4-(p-マレイミドフェニル)-ブチレート、ビスマレイミドヘキサン、N-(g-マレイミドブチリルオキシ)スクシンイミドエステルおよびN-(g-マレイミドブチリルオキシ)スルホスクシンイミドエステルからなる群から選択される。例えば、N-ヒドロキシスクシンイミド架橋剤はスベリン酸ジスクシンイミジルである。

【0067】

一実施例では、被験体はヒトであり、かつ、自己免疫状態に苦しんでいる。例えば、自己免疫状態は、例えば、関節リウマチ、多発性硬化症、I型糖尿病、炎症性腸疾患、クローン病、潰瘍性大腸炎、全身性エリテマトーデス、乾癬、強皮症、自己免疫甲状腺疾患、中枢神経系脈管炎、および自己免疫筋炎からなる群から選択されるような自己免疫疾患である。

【0068】

もう1つの実施例では、被験体は嚢胞性繊維症(CF)を患っている。一実施例では、このようなCF被験体は以前に急性肺疾患増悪を起こしたことがある。もう1つの実施例では、CF被験体は急性肺疾患増悪を起こしている。さらにもう1つの実施例では、被験体は感染症、例えば、細菌によって引き起こされる感染症をさらに患っている。このような感染症は、例えば、黄色ブドウ球菌、緑膿菌、インフルエンザ菌、アスペルギルス・フ

10

20

30

40

50

ミガーツス (*Aspergillus fumigatus*)、セパシア菌複合体、ステノトロホモナス・マルトフィラ (*Stenotrophomonas maltophilia*)、アルカリゲネス (アクロモバクター) キシロソキシダンス (*Alcaligenes (Achromobacter) xylosoxidans*)、B. グラディオリ (*gladioli*) およびラルストニア・ピックティ (*Ralstonia picketti*) およびその混合物からなる群から選択される細菌によって引き起こされ、例えば、細菌感染症は、緑膿菌感染症を含んでなる。

【0069】

本発明の方法の一実施例では、サンプルは、免疫グロブリンもしくはその混合物を含んでなるタンパク質複合体またはその免疫グロブリン含有画分が由来した被験体に由来する。

10

【0070】

本発明は、被験体において免疫応答を誘発可能な免疫原性タンパク質またはその断片を同定する方法をさらに提供し、この方法は、

(i) 免疫グロブリンもしくはその混合物を含んでなるタンパク質複合体または免疫グロブリン含有画分を、免疫原性タンパク質またはその断片を含んでなる細胞または細胞抽出物またはその混合物を含んでなるサンプルを事前に投与された被験体に由来するか、被験体によって産生されたサンプルから得ることと、

(ii) タンパク質複合体または免疫グロブリン含有画分を、細胞または細胞抽出物またはその混合物を含んでなるサンプルと接触させることと、

(iii) タンパク質複合体または免疫グロブリン含有画分中の免疫グロブリンと、抗原抗体相互作用によって結合しているタンパク質またはその断片を同定することとを含んでなり、

20

それによって被験体において免疫応答を誘発可能な免疫原性タンパク質またはその断片を同定する。

【0071】

一実施例では、本方法は、被験体に細胞または細胞抽出物を含んでなるサンプルを投与することをさらに含んでなる。細胞または細胞抽出物は、例えば、疾病または疾患を引き起こす病原体に由来する。

【0072】

疾病または疾患を引き起こす病原体は、例えば、感染性病原体、例えば、ウイルス、細菌、酵母、真菌および寄生生物からなる群から選択される感染性病原体である。例えば、感染性病原体は細菌、例えば、結核菌、例えば、結核菌の臨床分離株である。

30

【0073】

一例では、本発明は、被験体に由来するか、被験体によって産生されたサンプルを得ること、および/またはタンパク質複合体または免疫グロブリン含有画分を得ることをさらに含んでなる。さらに、本方法は、例えば、サンプルから免疫グロブリン含有画分を得ることを含んでなる。

【0074】

本方法の一形態では、被験体は非ヒト動物、例えば、マウス、ラット、ウサギ、ニワトリ、イヌ、ヒツジ (sheep)、ヒツジ (ovine)、ウマ、ロバおよびヤギからなる群から選択される非ヒト動物である。本発明の一例示的形態では、被験体は鳥類 (例えば、ニワトリ) であり、被験体によって産生された生体サンプルは卵またはその抽出物またはその誘導体である。

40

【0075】

もう1つの実施例では、サンプルは全血、血漿、血清、痰、唾液、胸腔内液、心嚢液、腹水、リンパ液、リンパ節、脾臓、卵黄、全血の画分、血漿の画分、血清の画分、痰の画分、唾液の画分、胸腔内液の画分、心嚢液の画分、腹水の画分、リンパ液の画分、リンパ節の画分、脾臓の画分および卵黄の画分からなる群から選択される。もう1つの実施例では、サンプルは末梢血単核球 (PBMC)、リンパ球、B-リンパ球、Tリンパ球、ヘルパーT細胞、細胞傷害性T細胞、マクロファージ、樹状細胞、多形核細胞および肥満細胞

50

からなる群から選択される細胞を含んでなる。さらにもう1つの実施例では、サンプルは血清または血清の免疫グロブリン含有画分または卵黄または卵黄の免疫グロブリン含有画分を含んでなる。

【0076】

一実施例では、タンパク質複合体または免疫グロブリン含有画分は、IgM、IgG、IgA、IgE、IgDおよびIgYまたはその混合物からなる群から選択される1種以上の免疫グロブリンを含んでなる。例えば、タンパク質複合体または免疫グロブリン含有画分はIgGを含んでなる。あるいは、またはさらに、タンパク質複合体または免疫グロブリン含有画分はIgAを含んでなる。あるいは、またはさらに、タンパク質複合体または免疫グロブリン含有画分またはタンパク質複合体はIgYを含んでなる。あるいは、またはさらに、タンパク質複合体または免疫グロブリン含有画分はIgMを含んでなる。

10

【0077】

本発明は、タンパク質複合体または免疫グロブリン含有画分を、サンプルを被験体から分離または精製することを含んでなり、それによって前記タンパク質複合体または免疫グロブリン含有画分が得られるプロセスによって得ることを提供する。例えば、前記の、サンプルを被験体から分離または精製することは、サンプルを免疫グロブリンと結合可能な1種以上の化合物と、結合が生じるのに十分な条件下で一定時間接触させ、その化合物を単離することを含んでなる。

【0078】

例えば、化合物を固体支持体、マトリックスまたは樹脂、例えば、セルロースビーズ、アガロース、ナイロン、磁性粒子、常磁性粒子、ポリマー樹脂およびその混合物からなる群から選択される固体支持体、マトリックスまたは樹脂上に事前に固定化する。

20

【0079】

本発明の方法は、固定化された化合物を洗浄し、それによって非特異的に結合しているか、結合していないタンパク質を除去することをさらに提供する。

【0080】

一実施例では、1種以上の化合物は、タンパク質Aまたはそのミメティック、タンパク質Gまたはそのミメティック、タンパク質Lまたはそのミメティック、抗免疫グロブリン抗体、マルトース結合タンパク質(MBP)、チオフィリック樹脂およびその混合物からなる群から選択される。例えば、化合物はタンパク質Aまたはタンパク質Gまたはその混合物である。

30

【0081】

本発明の方法は、例えば、架橋剤を、結合している免疫グロブリンを有する1種以上の化合物と、化合物と免疫グロブリン間に共有結合が生じるのに十分な条件下で一定時間接触させることを含んでなるプロセスを実施することによって、免疫グロブリンを化合物と結合させることをさらに提供する。

【0082】

このような架橋剤は、例えば、イミドエステル架橋剤、N-ヒドロキシスクシンイミド架橋剤、マレイミド架橋剤、ハロアセチル架橋剤、ヒドラジド架橋剤、およびカルボジイミド架橋剤からなる群から選択される、例えば、この架橋剤はN-ヒドロキシスクシンイミド架橋剤であり、例えば、N-ヒドロキシスクシンイミド架橋剤は、ジスクシンイミジルグルタレート、スベリン酸ジスクシンイミジル、スベリン酸ビス(スルホスクシンイミジル)、ジチオビス(プロピオン酸スクシンイミジル)、3,3'-ジチオビス(プロピオン酸スクシンイミジル)、エチレングリコビス(コハク酸スクシンイミジル)、エチレングリコビス(コハク酸スルホスクシンイミジル)、ジスクシンイミジルタルタレート、ジスルホスクシンイミジルタルタレート、ビス[2-(スクシンイミジルオキシ-カルボニルオキシ)エチル]スルホン、ビス[2-(スルホスクシンイミジルオキシ-カルボニルオキシ)エチル]スルホン、スクシンイミジル4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート、スルホスクシンイミジル4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート、m-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシス

40

50

クシンイミドエステル、m - マレイミドベンゾイル - N - ヒドロキシスルホスクシンイミドエステル、スクシンイミジル 4 - (p - マレイミドフェニル) - ブチレート、スルホスクシンイミジル 4 - (p - マレイミドフェニル) - ブチレート、ビスマレイミドヘキササン、N - (g - マレイミドブチリルオキシ) スクシンイミドエステルおよび N - (g - マレイミドブチリルオキシ) スルホスクシンイミドエステルからなる群から選択される。例えば、N - ヒドロキシスクシンイミド架橋剤はスベリン酸ジスクシニミジルである。

【 0 0 8 3 】

本発明の方法の一実施例では、タンパク質複合体または免疫グロブリン含有画分と接触させる、細胞または細胞抽出物またはその混合物を含んでなるサンプルは、細胞または細胞抽出物を含んでなる被験体に由来する。例えば、細胞または細胞抽出物は、疾病または疾患を引き起こす病原体に由来し、細胞または細胞抽出物またはその混合物を含んでなるサンプルは疾病または疾患を患っている被験体に由来する。

10

【 0 0 8 4 】

一実施例では、疾病または疾患を引き起こす病原体は感染性病原体、例えば、ウイルス、細菌、酵母、真菌および寄生生物からなる群から選択される感染性病原体である。

【 0 0 8 5 】

本明細書に例示されるように、感染性病原体は細菌、例えば、結核菌である。

【 0 0 8 6 】

本発明は、例えば、免疫グロブリンと抗原抗体相互作用によって結合している免疫原性タンパク質またはその断片を、免疫グロブリンから分離することをさらに含んでなる。このような分離は、例えば、免疫グロブリンもしくはその混合物を含んでなるタンパク質複合体またはその免疫グロブリン含有画分を、抗原抗体相互作用を乱す化合物と、抗原抗体相互作用を乱すのに十分な条件下で一定時間接触させることを含んでなるプロセスを実施することによって達成する。

20

【 0 0 8 7 】

例えば、抗原抗体相互作用を乱す化合物は、免疫グロブリン含有画分の pH を調節する化合物、塩、イオン性界面活性剤、解離剤およびカオトロピック剤ならびにその混合物からなる群から選択される。

【 0 0 8 8 】

もう 1 つの実施例では、本発明は、免疫グロブリン含有画分と抗原抗体相互作用によって結合しているか結合していたタンパク質を単離することをさらに含んでなる。例えば、このタンパク質はゲル電気泳動、例えば、二次元ゲル電気泳動を用いて単離する。

30

【 0 0 8 9 】

さらにもう 1 つの実施例では、免疫グロブリン含有画分と抗原抗体相互作用によって結合しているか結合していたタンパク質を、質量分析、例えば、マトリックス支援レーザー脱離 / イオン化 - 飛行時間型質量分析 (MALDI - TOF MS) を用いて同定する。

【 0 0 9 0 】

本発明は、

(a) 被験体に由来するサンプルを、免疫グロブリンと結合可能な 1 種以上の化合物と、結合が生じるのに十分な条件下で一定時間接触させ、1 種以上の化合物を単離すること含んでなる方法によって、免疫原性タンパク質またはその断片に対して免疫応答を起こした被験体、またはその細胞、組織もしくは器官から、免疫グロブリンもしくはその混合物を含んでなるタンパク質複合体または免疫グロブリン含有画分を得ることと、

40

(b) タンパク質複合体または免疫グロブリン含有画分中の免疫グロブリンと、1 種以上の化合物を結合させることと、

(c) 免疫原性タンパク質またはその断片を、結合している免疫グロブリンから分離することと、

(d) 免疫原性タンパク質またはその断片を含んでなるサンプルを、結合している免疫グロブリンと接触させることと、

(e) 免疫原性タンパク質またはその断片を、結合している免疫グロブリンから分離す

50

ることと、

(f) 場合によって (d) および (e) を 1 回以上反復することと、

(g) 免疫グロブリンから分離したタンパク質またはその断片を同定することを含んでなり、

それによって免疫原性タンパク質またはその断片を同定する方法をさらに提供する。

【 0 0 9 1 】

本方法の一形態では、(e) 免疫原性タンパク質またはその断片を、結合している免疫グロブリンから分離することは、(d) 免疫原性タンパク質またはその断片を含んでなるサンプルを、結合している免疫グロブリンと接触させることの前に実施する。

【 0 0 9 2 】

本発明のもう 1 つの形態では、(d) 免疫原性タンパク質またはその断片を含んでなるサンプルを、結合している免疫グロブリンと接触させることは、(e) 免疫原性タンパク質またはその断片を、結合している免疫グロブリンから分離することの前に実施する。

【 0 0 9 3 】

(d) 免疫原性タンパク質またはその断片を含んでなるサンプルを、結合している免疫グロブリンと接触させること、および (e) 免疫原性タンパク質またはその断片を、結合している免疫グロブリンから分離することは、1 種以上の免疫原性タンパク質を同定するのに十分な回数反復することが好ましい。例えば、(d) 免疫原性タンパク質またはその断片を含んでなるサンプルを、結合している免疫グロブリンと接触させること、および (e) 免疫原性タンパク質またはその断片を、結合している免疫グロブリンから分離することを、ゲル電気泳動、例えば、二次元ゲル電気泳動を用いてゲル上で 1 種以上のタンパク質またはその断片を区別するのに十分な回数反復する。

【 0 0 9 4 】

本方法の一実施例では、被験体は、疾病または疾患を引き起こす病原体に対して免疫応答を起こしている。この実施例によれば、結合している免疫グロブリンと接触させる、免疫原性タンパク質またはその断片を含んでなるサンプルは、疾病もしくは疾患を引き起こす病原体またはその誘導体を含んでなる。

【 0 0 9 5 】

例えば、疾病または疾患を引き起こす病原体は感染性病原体、例えば、細菌、例えば、結核菌である。

【 0 0 9 6 】

もう 1 つの実施例では、被験体は自己免疫状態に苦しんでいる。この実施例によれば、結合している免疫グロブリンと接触させる、免疫原性タンパク質またはその断片を含んでなるサンプルは、自己免疫状態に苦しんでいる被験体に由来するタンパク質を含んでなる。

【 0 0 9 7 】

さらにもう 1 つの実施例では、被験体は、免疫原性タンパク質またはその断片を含んでなる、細胞またはその抽出物またはその混合物を含んでなるサンプルで事前に免疫されている。この実施例によれば、結合している免疫グロブリンと接触させる、免疫原性タンパク質またはその断片を含んでなるサンプルは、細胞またはその抽出物を含んでなる。一形態では、被験体はニワトリである。

【 0 0 9 8 】

本方法の例示的形態では、被験体は、疾病または疾患と関連する病原体、例えば、感染性病原体、例えば、細菌に由来する細胞または細胞抽出物で事前に免疫されている。一実施例では、細菌は結核菌である。

【 0 0 9 9 】

本発明はまた、状態のマーカ-を同定するプロセスにおける、本明細書に記載した方法の使用を提供する。

【 0 1 0 0 】

本発明は、状態の診断における本明細書に記載した方法の使用をさらに提供する。

10

20

30

40

50

【0101】

一実施例では、状態は疾病または疾患、例えば、感染性疾患または癌である。

【0102】

もう1つの実施例では、状態は自己免疫状態である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0103】

本発明は免疫応答を誘発可能な免疫原性タンパク質またはその断片を同定する方法を提供し、この方法は、被験体またはその細胞、組織もしくは器官から、免疫グロブリンもしくはその混合物を含んでなるタンパク質複合体または免疫グロブリン含有画分を得ることと、免疫グロブリンと抗原抗体相互作用によって結合しているタンパク質またはその断片を同定することとを含んでなり、それによって免疫応答を誘発可能な免疫原性タンパク質またはその断片を同定する。

10

【0104】

本明細書において、用語「免疫原性タンパク質」とは、被験体において免疫応答を誘導し、その結果、被験体によってそのタンパク質に対する特異的抗体が生じる、いずれかのペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質を意味すると理解されるものとする。したがって、このような「免疫原性タンパク質」は、抗原として抗体と相互作用し得る、すなわち、抗体は、抗体の高頻度可変性領域または相補性決定領域との相互作用によって非共有結合で免疫原性タンパク質と結合できる。

【0105】

免疫グロブリンと抗原抗体相互作用によって結合可能なタンパク質または断片は、さまざまな結合または引力のうちのいずれか1以上によってこれを行う。例えば、抗原は水素結合（すなわち、抗体と抗原の適当な分子間での水素橋の形成）、ファンデルワールス結合（電子雲間、すなわち、振動する双極子の相互作用）または無極性の疎水性基の会合に依存する疎水性結合によって抗体と結合する。あるいは、またはさらに、抗原抗体相互作用は静電気力、すなわち、タンパク質側鎖の反対に荷電した基の相互作用によって促進される。

20

【0106】

一実施例では、本発明の免疫グロブリンを用いて単離する免疫原性タンパク質を単離および/または同定する方法によって、天然または非修飾型の免疫原性タンパク質が単離される。本明細書において、用語「天然または非修飾型」とは、天然に見られるタンパク質の一形態を意味すると取られるものとする。したがって、この用語は、このタンパク質が天然に見られる環境において、例えば、このタンパク質が天然に発現される細胞において見られる前記タンパク質の修飾を包含する。このような修飾としては、例えば、タンパク質分解による切断、翻訳後修飾、代替スプライシング型および分子量、電荷の変化、タンパク質のアミノ酸組成の変化をもたらす何らかのその他の修飾が挙げられる。

30

【0107】

もう1つの実施例では、本発明の免疫グロブリン含有画分を用いて単離する免疫原性タンパク質を単離および/または同定する方法では、免疫原性タンパク質の修飾型、断片またはペプチドが単離される。本明細書において、用語「修飾型」は、前記タンパク質の天然型とは異なるタンパク質を意味すると理解されるものとする。このような方法によって検出され得る修飾としては、例えば、タンパク質分解による切断、翻訳後修飾および分子量、電荷、またはアミノ酸組成の変化をもたらす何らかのその他の修飾が挙げられる。この実施形態によれば、免疫原性タンパク質の修飾型、断片またはペプチドは、生体サンプルが由来する被験体による免疫応答の結果として産生され得る。このような免疫応答の際には、多数のタンパク質分解性酵素、例えば、好中球エラスターゼおよび病原体由来エラスターゼなどが産生され、その結果、タンパク質が切断され、分解されることが多い。したがって、本発明によって明確に包含される免疫原性タンパク質の修飾型は、前記タンパク質の断片である。結果として、本発明は免疫原性タンパク質の断片またはタンパク質の免疫原性断片の単離を明確に包含する。

40

50

【0108】

好ましい断片としては、個体がそれに対して特異的免疫応答を開始するタンパク質の断片が挙げられ、特異的抗体応答を開始するタンパク質の断片がより好ましい。本発明の方法によって同定されるタンパク質の断片は、少なくとも約5個のアミノ酸を含んでなることが好ましく、少なくとも約6個のアミノ酸がより好ましく、約10個のアミノ酸がより好ましく、約20個のアミノ酸がよりいっそう好ましく、約50個のアミノ酸がさらによりいっそう好ましく、約100個のアミノ酸がさらによりいっそう好ましい。

【0109】

本明細書において、用語「免疫応答を誘発すること」とは、被験体の、抗原に対する特異的抗体応答および/または特異的T細胞応答を生じる能力を指すことと理解されるものとする。免疫応答は抗体応答であることが好ましい。理論または作用様式に拘束されようとは思わないが、このような抗体応答は、免疫原性タンパク質または抗原と特異的に結合するIgDおよびIgMを産生するBリンパ球(または細胞)を含んでなると予想される。次いで、前記Bリンパ球が、前記免疫原性タンパク質と特異的に結合するIgMおよび/またはIgGおよび/またはIgEおよび/またはIgAおよび/またはIgYを分泌する血漿細胞に分化することが特に好ましい。

【0110】

本明細書において、用語「免疫グロブリンを含んでなるタンパク質複合体」とは、1種以上の免疫グロブリンタンパク質および/または1以上の種類の免疫グロブリンタンパク質を含んでなる複数の相互作用タンパク質を意味すると取られるものとする。一実施形態では、このようなタンパク質複合体は抗体複合体、例えば、共有結合で(例えば、ジスルフィド結合によって)結合して抗体を形成しているいくつかの免疫グロブリン分子である。例えば、IgGの場合では、このような抗体複合体は、2つの軽鎖と2つの重鎖を含んでなり、各軽鎖は少なくとも1つのジスルフィド結合によって重鎖と結合しており、重鎖はまた、少なくとも1つのジスルフィド結合によって結合している。他の型の抗体複合体、例えば、IgMの五量体構造も本発明によって明確に意図される。さらに、一実施形態では、このような抗体複合体は、免疫グロブリンと結合している抗原を含んでなる。タンパク質複合体が、1種以上の免疫グロブリンと抗原抗体相互作用によって結合している免疫原性タンパク質またはその断片を含むことは明確である。

【0111】

本明細書において、用語「免疫グロブリン含有画分」とは、免疫グロブリンを用いて単離される生体サンプルの成分を意味すると取られるものとする。このような画分は、例えば、免疫複合体、抗体-HLA複合体、抗体、免疫グロブリン軽鎖、免疫グロブリン重鎖、補体経路の成分、フィブリノーゲン、ハプトグロビン、 γ -1-抗トリプシン、 γ -1-酸性糖タンパク質、 γ -1-マクログロブリン、トランスフェリン、低密度リポタンパク質、セルロプラスミン、もしくは血清アルブミンタンパク質または抗原抗体相互作用によって免疫グロブリンと結合しているそれらの断片、あるいは他の成分の中でもそれらの混合物を含んでなり得る。

【0112】

好ましい実施形態では、「免疫グロブリン含有画分」および/または「免疫グロブリンまたはその混合物を含んでなるタンパク質複合体」は、免疫グロブリン結合性化合物、例えば、タンパク質G、タンパク質Aまたはタンパク質Lなどによって直接結合されているタンパク質と考えられるものとする。

【0113】

本明細書において、用語「免疫グロブリン」とは、リンパ球によって産生されるタンパク質を意味すると取られるものとし、ここで、このタンパク質は特異的抗体活性を有すること、すなわち、好ましくは、共有結合を形成しないで、特異的タンパク質と相互作用できる/結合できることが好ましい。免疫グロブリンは4つのポリペプチド鎖、ジスルフィド結合によって結合されている2つの同一の重鎖と2つの同一の軽鎖とを含んでなることが好ましい。免疫グロブリンはIgA、IgD、IgE、IgG、IgMおよびIgYか

10

20

30

40

50

らなる群から選択されることが好ましい。

【0114】

本明細書において、用語「抗体」とは、無傷のモノクローナルまたはポリクローナル抗体、免疫グロブリン(IgA、IgD、IgG、IgM、IgE、IgY)画分、ヒト化抗体、組換え単鎖抗体、ならびにその断片、例えば、Fab、F(ab)₂およびFv断片などを指す。

【0115】

本発明の一実施例では、タンパク質複合体または免疫グロブリン含有画分は、IgGおよび/またはIgAおよび/またはIgYを含んでなる。本発明のもう1つの実施例では、タンパク質複合体または免疫グロブリン含有画分はIgGを含んでなる。本発明のさらにもう1つの実施例では、免疫グロブリン含有画分はIgAを含んでなる。本発明のさらなる実施例では、タンパク質複合体または免疫グロブリン含有画分はIgYを含んでなる。本発明のなおさらなる実施例では、タンパク質複合体または免疫グロブリン含有画分はIgMを含んでなる。

10

【0116】

本発明は、免疫グロブリン含有画分または免疫グロブリン含有画分の成分の単離を提供する。このプロセスは、抗原または免疫原性タンパク質と複合体を形成している免疫グロブリンから遊離免疫グロブリンを精製せずに実施することが好ましい。

【0117】

(生体サンプル)

免疫グロブリンは種々の体内組織および/または体液内で見られるので、本発明は、このような体内組織または体液を含んでなるサンプルから、タンパク質複合体または免疫グロブリン含有画分を含んでなる生体サンプルを得ることを明確に包含する。タンパク質複合体もしくはその混合物または免疫グロブリン含有画分を単離するのに有用な生体サンプルの例としては、全血、血漿、血清、痰、唾液、胸腔内液、心嚢液、腹水、リンパ液、リンパ節、脾臓、卵黄、全血の画分、血漿の画分、血清の画分、痰の画分、唾液の画分、胸腔内液の画分、心嚢液の画分、腹水の画分、リンパ液の画分、リンパ節の画分、脾臓の画分および卵黄の画分からなる群から選択されるサンプルがある。

20

【0118】

本発明を実施するのに有用な生体サンプルは、例えば、末梢血単核球(PBMC)、リンパ球、B-リンパ球、Tリンパ球、ヘルパーT細胞、細胞傷害性T細胞、マクロファージ、樹状細胞、多形核細胞および肥満細胞からなる群から選択される細胞を含んでなる。例えば、このような生体サンプルは血清または血清の免疫グロブリン含有画分を含んでなる。

30

【0119】

また本発明が、前記生体サンプルの誘導体を包含することは明確である。例えば、本発明は生体サンプルから1種以上のタンパク質を単離するよう(例えば、所定の分子量より小さいタンパク質を除去するよう、または一般的なタンパク質、例えば、アルブミンなどを除去するよう)処理されたサンプルを包含する。あるいは、またはさらに、生体サンプル、例えば、全血などを赤血球の凝固を引き起こすよう処理して、血漿または血清の単離を容易にする。

40

【0120】

本発明は生体サンプルを得ることを包含するので、本発明のいくつかの形態では、当技術分野で公知の方法を用いて、例えば、シリンジを用いて、または手術などによって、生体サンプルを被験体から事前に得ることは明らかであろう。

【0121】

本発明の方法は、抗原に対する免疫応答を誘発可能な被験体であれば、いずれに由来する生体サンプルも包含する。例えば、このような被験体は非ヒト動物、例えば、ショウジョウバエ、シノラプディス・エレガンス(Caenorhabditis elegans)、ゼブラフィッシュ、マウス、ラット、ウサギ、ニワトリ、イヌ、ヒツジ(sheep)、ヒツジ(ovine)、ウマまたは

50

ヤギなどである。これらの動物の発達段階もまた本発明によって包含されることは明確であり、例えば、本明細書に例示されるように、ニワトリに細胞抽出物を注射することで、その細胞抽出物中の特異的抗原に対する特異的免疫応答を引き起こし、そのニワトリが産んだ卵から、抽出物中の抗原と結合する免疫グロブリンを単離する。

【0122】

あるいは、本発明の方法は、ヒト由来の生体サンプル中の免疫原性タンパク質またはその断片を同定するのに同様に有用である。このような方法は、例えば、感染症または自己免疫疾患を患っているヒトにおいて、診断標的または治療標的であるタンパク質またはその断片を同定するのに有用である。

【0123】

あるいは、またはさらに、タンパク質またはその断片と特異的に結合する免疫グロブリンは、被験体中に存在するか、または被験体によって感染後に産生されるので、以前に感染したか、現在感染している被験体に由来する免疫グロブリン含有画分は、感染性病原体に由来する免疫原性タンパク質を同定するのに有用である。

【0124】

感染症を患っているか、以前に感染性病原体に感染した被験体に由来する生体サンプルは、例えば、前記感染症のマーカールおよび/または治療標的を同定するのに有用である。このような感染症としては、例えば、急性感染症または慢性感染症がある。「慢性」とは、感染症が長期に持続しているか、頻繁な再発を特徴とすることを意味する。例えば、慢性細菌感染症は、嚢胞性繊維症を患っている被験体においてしばしば観察される。

【0125】

「急性」とは、感染症が急激に発症し、続いて、短い場合によって重大な経過をたどることを意味する。例えば、C型肝炎感染症またはインフルエンザ菌を患っている被験体は急性感染症に苦しむことが多い。

【0126】

ウイルス感染症、細菌感染症、酵母感染症、真菌感染症および寄生生物感染症からなる群から選択される感染症を患っているか、以前に感染症（急性または慢性にかかわらず）を患っていた被験体に由来する生体サンプルは、本発明に包含される。

【0127】

例えば、生体サンプルは細菌感染症を患っている（または以前に患っていた）被験体に由来し、この場合、その細菌感染症の原因である細菌は、アビオトロフィア(Abiotrophia)、アクロモバクター、アシダミノコッカス、アシドボラックス(Acidovorax)、アシネトバクター、アクチノバチルス、アクチノバキュラム(Actinobaculum)、アクチノマツラ、アクチノミセス、アエロコッカス、アエロモナス、アフピア(Afipia)、アグロバクテリウム(Agrobacterium)、アルカリゲネス、アロイオコッカス(Alloiococcus)、アルテロモナスアミコラタ(amycolata)、アミコラトプシス(Amycolatopsis)、アナエロボスピリルム(Anaerobosporillum)、アナエロラブツス(Anaerorhabdus)、「アンギリナ(Anguillina)」、アラクニア、アルカノバクテリウム、アルコバクター(Arcobacter)、アルスロバクター、アトポビウム(Atopobium)、オーレオバクテリウム(Aureobacterium)、バチルス、バクテロイデス(Bacteroides)、バルネアトリックス(Balneatrix)、バルトネラ、ベルゲイエラ(Bergeyella)、ピフィドバクテリウム、バイロフィラ(Bilophila)、ブランハメラ、ボレリア、ボルデテラ、ブラキスピラ(Brachyspira)、ブレビバチルス(Brevibacillus)、ブレビバクテリウム、ブレブンジモナス(Brevundimonas)、ブルセラ、バーホルディア(Burkholderia)、バッチオークセラ(Buttiauxella)、プチリビプリオ、カリマトバクテリウム、カンピロバクター、カプノシトファガ、カルディオバクテリウム、カトネラ(Catonella)、セデセア(Cedecea)、セルロモナス(Cellulomonas)、センチペダ(Centipeda)、クラミジア、クラミドフィラ(Chlamydia)、クロモバクテリウム、チセオバクテリウム(Chyseeobacterium)、クリセオモナス(Chryseomonas)、シトロバクター、クロストリジウム、コリンゼラ(Collinsella)、コマモナス(Comamonas)、コリネバクテリウム、コクシエラ、クリプトバクテリウム(Cryptobacterium)、デルフチア(Delftia)、デルマバクター(Dermabacter)

10

20

30

40

50

、デルマトフィルス(Dermatophilus)、デスルフォモナス(Desulfomonas)、デスルホビブリオ(Desulfovibrio)、ジアリスタ、ジシエロバクター(Dichelobacter)、ドロシコッカス(Dolosicoccus)、ドロシグラヌルム(Dolosigranulum)、エドワードシエラ、エッゲルセラ(Eggerthella)、エールリヒア、エイケネラ(Eikenella)、エンペドバクター(Empedobacter)、エンテロバクター、エンテロコッカス、エルビニア、エリジペロスリックス、エシェリキア、ユウバクテリウム(Eubacterium)、ユーイングセラ、エキシグオバクテリウム(Exiguobacterium)、ファクラミア(Facklamia)、フィリファクター(Filifactor)、フラヴィモナス(Flavimonas)、フラボバクテリウム(Flavobacterium)、フレキシスピラ(Flexispira)、フランシセラ、フゾバクテリウム、ガルドネセラ、ジェメラ(Gemella)、グロピカテラ(Globicatella)、ゴルドナ(Gordona)、ヘモフィルス、ハフニア、ヘリコバクター、ヘロコッカス(Helococcus)、ホールデマニア(Holdemania)、イグナビグラナム(Ignavigranum)、ジョンソネラ(Johnsonella)、キングセラ(Kingella)、クレブシエラ、コクリア(Kocuria)、コセラ(Koserella)、クルシア(Kurthia)、キトコッカス(Kytococcus)、ラクトバチルス(Lactobacillus)、ラクトコッカス(Lactococcus)、ロートロピア(Lautropia)、レクレルシア(Leclercia)、レジオネラ、レミノセラ(Leminorella)、レプトスピラ、レプトトリキア(Leptotrichia)、ロイコノストック(Leuconostoc)、リステリア、リストネラ(Listonella)、メガスフェラ(Megasphaera)、メチロバクテリウム(Methylobacterium)、ミクロバクテリウム(Microbacterium)、ミクロコッカス、ミツオケラ(Mitsuokella)、 Mobiluncus)、メレセラ(Moellerella)、モラクセラ、モルガネラ、マイコバクテリウム、マイコプラズマ、ミロイデス、ナイセリア、ノカルジア、ノカルジオプシス(Nocardiosis)、オクロバクトラム(Ochrobactrum)、オエスコビアオリゲラ(OeskoviaOligella)、オリエンチア(Orientia)、パエニバチルス(Paenibacillus)、パンテア(Pantoea)、パラクラミジア、パスツレラ、ペジオコックス、ペプトコッカス、ペプトストレプトコッカス、フォトバクテリウム(Photobacterium)、フォトラブズス(Photorhabdus)、プレシオモナス、ポリフィリモナス(Porphyrimonas)、プレボテラ(Prevotella)、プロピオニバクテリウム(Propionibacterium)、プロテウス、プロビデンシア(Providencia)、シュードモナス、シュードノカルジア(Pseudonocardia)、シュードラミバクター(Pseudoramibacter)、サイクロバクター(Psychrobacter)、ラーネラ(Rahnella)、ラルストニア(Ralstonia)、ロドコッカス、リケッチア、ロカリメア(Rochalimaea)、ロセオモナス(Roseomonas)、ロチア、ルミノコッカス(Ruminococcus)、サルモネラ、セレノモナス、セルプリナ、セラチア、シェウエネラ(Shewenella)、シゲラ、シムカニア、スラキア(Slackia)、スフィンゴバクテリウム(Sphingobacterium)、スフィンゴモナス(Sphingomonas)、スピリルム、スタフィロコッカス、ステノトロフォモナス(Stenotrophomonas)、ストマトコッカス(Stomatococcus)、ストレプトバチラス、ストレプトコッカス、ストレプトミセス、スクシニビブリオ(Succinivibrio)、ステレラ(Sutterella)、ストネラ(Suttonella)、タツメラ(Tatumella)、チシエセラ(Tissierella)、トラブルシエラ(Trabulsiella)、トレポネーマ(Treponema)、トロフェリマ(Tropheryma)、ツサカムセラ(Tsakamuraella)、ツルシア(Turicella)、ウレアプラズマ(Ureaplasma)、バゴコッカス(Vagococcus)、ベイヨネラ、ビブリオ、ウィークセラ(Weeksella)、ウォリネラ(Wolinella)、キサントモナス(Xanthomonas)、ксеノラブズス(Xenorhabdus)、エルシニア(Yersinia)およびヨーケネラ(Yokenella)からなる群から選択される属のものである。

【 0 1 2 8 】

例えば、細菌感染症は、アクチノミセス・ユーロペウス(Actinomyces europeus)、アクチノミセス・ゲオルギエ(Actinomyces georgiae)、アクチノミセス・ゲレンスセリエ(Actinomyces gerencseriae)、アクチノミセス・グラエベニトジー(Actinomyces graevenitzi)、アクチノミセス・イスレリー(Actinomyces israelii)、アクチノミセス・メエリ(Actinomyces meyeri)、アクチノミセス・ネスランディ(Actinomyces naeslundii)、アクチノミセス・ニューイー・ニューイー(Actinomyces neuii nueii)、アクチノミセス・ニューイー・アニトラツス(Actinomyces neuii anitratus)、アクチノミセス・オドントリチクス(Actinomyces odontolyticus)、アクチノミセス・ラジンゲ(Actinomyces radingae)、

アクチノミセス・ツリセンシス (*Actinomyces turisensis*)、アクチノミセス・ビスコス
 ス (*Actinomyces viscosus*)、アルスロバクター・クレアチノリチクス (*Arthrobacter crea
 tinolyticus*)、アルスロバクター・クミンシー (*Arthrobacter cumminsii*)、アルスロバク
 ター・ウォルウェンシス (*Arthrobacter woluwensis*)、炭疽菌、バチルス・セレウス、バ
 チルス・サーキュランズ (*Bacillus circulans*)、バチルス・コアグランス (*Bacillus coag
 ulans*)、バチルス・リシェニフォルミス (*Bacillus licheniformis*)、巨大菌、バチルス・
 ミロイデス、バチルス・プミルス (*Bacillus pumilus*)、バチルス・スファエリクス (*Bacil
 lus sphaericus*)、枯草菌、バチルス・スリンギエンシス (*Bacillus thuringiensis*)、ボ
 レリア・アフゼリー (*Borrelia afzelii*)、ボレリア・アンデルソニー (*Borrelia anderson
 ii*)、ボレリア・ビセッティ (*Borrelia bissettii*)、ライム病菌、ボレリア・ガリニー (10
Borrelia garinii)、ボレリア・ジャポニカ (*Borrelia japonica*)、ボレリア・ルシタニエ
 (*Borrelia lusitaniae*)、ボレリア・タヌキー (*Borrelia tanukii*)、ボレリア・ツルジ (*Bo
 rrelia turdi*)、ボレリア・バラシアナ (*Borrelia valaisiana*)、ボレリア・カウカシカ
 (*Borrelia caucasica*)、ボレリア・クロシデュレ (*Borrelia crocidurae*)、ボレリア・レ
 キュレンティス (*Borrelia recurrentis*)、ボレリア・ツットニ (*Borrelia duttoni*)、ボレ
 リア・グラインゲリ (*Borrelia graingeri*)、ボレリア・ヘルムシー (*Borrelia hermsii*)、
 ボレリア・ヒスパニカ (*Borrelia hispanica*)、ボレリア・ラチシェウィー (*Borrelia laty
 schewii*)、ボレリア・マゾッティ (*Borrelia mazzottii*)、ボレリア・パルケリ (*Borreli
 a parkeri*)、ボレリア・ペルシカ (*Borrelia persica*)、ボレリア・レキュレンティス (*Bor
 relia recurrentis*)、ボレリア・ツリカテ (*Borrelia turicatae*)、ボレリア・ベネズエレ 20
 ンシ (*Borrelia venezuelensi*)、気管支敗血症菌、ボルデテラ・ヒンジ (*Bordetella hin
 zii*)、ボルデテラ・ホルムセイ (*Bordetella holmseii*)、ボルデテラ・パラペルツシス (*B
 ordetella parapertussis*)、百日咳菌、ボルデテラ・トレマツム (*Bordetella trematum*)
 、クロストリジウム・アブソナム (*Clostridium absonum*)、クロストリジウム・アルゲン
 チネンセ (*Clostridium argentinense*)、クロストリジウム・バラティー (*Clostridium bar
 atii*)、クロストリジウム・ピフェルメンタンス (*Clostridium bifermentans*)、クロスト
 リジウム・ベイジェリンキー (*Clostridium beijerinckii*)、クロストリジウム・ブチリカ
 ム (*Clostridium butyricum*)、クロストリジウム・カダベリス (*Clostridium cadaveris*)、
 クロストリジウム・カルニス (*Clostridium carnis*)、クロストリジウム・セラツム (*Clost
 ridium celatum*)、クロストリジウム・クロストリジオフォルメ (*Clostridium clostridio
 forme*)、クロストリジウム・コクレアリウム (*Clostridium cochlearium*)、クロストリジ
 ヴム・コクレアツム (*Clostridium cocleatum*)、クロストリジウム・ファラックス (*Clostr
 idium fallax*)、クロストリジウム・ゴニー (*Clostridium ghonii*)、クロストリジウム・
 グリコリカム (*Clostridium glycolicum*)、クロストリジウム・ヘモリチカム (*Clostridium
 haemolyticum*)、クロストリジウム・ハスティフォルメ (*Clostridium hastiforme*)、クロ
 ストリジウム・ヒストチリカム (*Clostridium histolyticum*)、クロストリジウム・インド
 リス (*Clostridium indolis*)、クロストリジウム・イノキウム (*Clostridium innocuum*)、
 クロストリジウム・イレギュラレ (*Clostridium irregulare*)、クロストリジウム・レプツ
 ム (*Clostridium leptum*)、クロストリジウム・リモサム (*Clostridium limosum*)、クロス
 トリジウム・マレノミナツム (*Clostridium malenominatum*)、クロストリジウム・ノービ 40
 ー (*Clostridium novyi*)、クロストリジウム・オロチカム (*Clostridium oroticum*)、クロ
 ストリジウム・パラプトリフィカム (*Clostridium paraputrificum*)、クロストリジウム・
 ピリフォルメ (*Clostridium piliforme*)、クロストリジウム・プトレファシエンズ (*Clostr
 idium putrefasciens*)、クロストリジウム・ラモサム (*Clostridium ramosum*)、クロスト
 リジウム・セプチカム (*Clostridium septicum*)、クロストリジウム・ソルデリー (*Clostri
 dium sordelii*)、クロストリジウム・スフェノイデス (*Clostridium sphenoides*)、クロス
 トリジウム・スポロゲネス (*Clostridium sporogenes*)、クロストリジウム・サブテルミナ
 ール (*Clostridium subterminale*)、クロストリジウム・シンビオサム (*Clostridium symbi
 osum*)、クロストリジウム・テルチウム (*Clostridium tertium*)、大腸菌 (*Escherichia col
 i*)、エシェリキア・フェルグソニー (*Escherichia fergusonii*)、エシェリキア・ヘルマニ 50

- (*Escherichia hermannii*)、エシェリキア・ブルネリス (*Escherichia vulneris*)、エンテ
 ロコッカス・アビウム (*Enterococcus avium*)、エンテロコッカス・カッセリフラブス (*Ente*
rococcus casseliflavus)、エンテロコッカス・セコラム (*Enterococcus cecorum*)、エン
 テロコッカス・ジスバル (*Enterococcus dispar*)、エンテロコッカス・デュランズ (*Entero*
coccus durans)、エンテロコッカス・フェカリス (*Enterococcus faecalis*)、エンテロコ
 ッカス・フェシウム (*Enterococcus faecium*)、エンテロコッカス・フラベセンス (*Enteroc*
occus flavescens)、エンテロコッカス・ガリナラム (*Enterococcus gallinarum*)、エンテ
 ロコッカス・ヒレ (*Enterococcus hirae*)、エンテロコッカス・マロドラツス (*Enterococcu*
s malodoratus)、エンテロコッカス・ムンドティー (*Enterococcus mundtii*)、エンテロコ
 ッカス・シュードアビウム (*Enterococcus pseudoavium*)、エンテロコッカス・ラフフィノ
 サス (*Enterococcus raffinosus*)、エンテロコッカス・ソリタルルス (*Enterococcus solit*
arius)、ヘモフィルス・アエギプチウス (*Haemophilus aegyptius*)、ヘモフィルス・アプ
 ロフィルス (*Haemophilus aphrophilus*)、ヘモフィルス・パラプロフィルス (*Haemophilus*
paraphrophilus)、ヘモフィルス・パラインフルエンゼ (*Haemophilus parainfluenzae*)、
 ヘモフィルス・セグニス (*Haemophilus segnis*)、ヘモフィルス・デュクレイ (*Haemophilus*
ducreyi)、インフルエンザ菌、クレブシエラ・オルニトリチカ (*Klebsiella ornitholyti*
ca)、クレブシエラ・オキシトカ (*Klebsiella oxytoca*)、クレブシエラ・プランチコラ (*KL*
ebsiella planticola)、クレブシエラ・ニューモニエ (*Klebsiella pneumoniae*)、クレブ
 シエラ・オザエネ (*Klebsiella ozaenae*)、クレブシエラ・テリゲナ (*Klebsiella terrigen*
a)、リステリア・イバノビー (*Lysteria ivanovii*)、リステリア・モノサイトジェネス (*Ly*
steria monocytogenes)、マイコバクテリウム・アブセサス (*Mycobacterium abscessus*)、
 マイコバクテリウム・アフリカナム (*Mycobacterium africanum*)、マイコバクテリウム・
 アルベイ (*Mycobacterium alvei*)、マイコバクテリウム・アジアティカム (*Mycobacterium*
asiaticum)、マイコバクテリウム・オーラム (*Mycobacterium aurum*)、マイコバクテリウ
 ム・アビウム (*Mycobacterium avium*)、マイコバクテリウム・ボヘミカム (*Mycobacterium*
bohemicum)、マイコバクテリウム・ボビス (*Mycobacterium bovis*)、マイコバクテリウム
 ・ブランデリ (*Mycobacterium branderi*)、マイコバクテリウム・ブルメ (*Mycobacterium b*
rumae)、マイコバクテリウム・セラタム (*Mycobacterium celatum*)、マイコバクテリウム
 ・シェロネ (*Mycobacterium chelonae*)、マイコバクテリウム・チュベンセ (*Mycobacterium*
chubense)、マイコバクテリウム・コンフルエンティス (*Mycobacterium confluentis*)、
 マイコバクテリウム・コンスピカム (*Mycobacterium conspicuum*)、マイコバクテリウム・
 クッキー (*Mycobacterium cookii*)、マイコバクテリウム・フラベセンス (*Mycobacterium f*
lavescens)、マイコバクテリウム・フォルツイタム (*Mycobacterium fortuitum*)、マイコ
 バクテリウム・ガディウム (*Mycobacterium gadium*)、マイコバクテリウム・ガストリ (*Myc*
obacterium gastri)、マイコバクテリウム・ジェナベンセ (*Mycobacterium genavense*)、
 マイコバクテリウム・ゴルドネ (*Mycobacterium gordonae*)、マイコバクテリウム・グッデ
 イー (*Mycobacterium goodii*)、マイコバクテリウム・ヘモフィラム (*Mycobacterium haemo*
philum)、マイコバクテリウム・ハシカム (*Mycobacterium hassicum*)、マイコバクテリウ
 ム・イントラセルラレ (*Mycobacterium intracellulare*)、マイコバクテリウム・インター
 ジェクタム (*Mycobacterium interjectum*)、マイコバクテリウム・ヘイデルベレンセ (*Myco*
bacterium heidelbergense)、マイコバクテリウム・カンサシー (*Mycobacterium kansasii*)
 、マイコバクテリウム・レンチフラバム (*Mycobacterium lentiflavum*)、ライ菌、マイコ
 バクテリウム・マルモエンセ (*Mycobacterium malmoense*)、マイコバクテリウム・マリナ
 ム (*Mycobacterium marinum*)、マイコバクテリウム・ミクロゲニカム (*Mycobacterium micr*
ogenicum)、マイコバクテリウム・ミクロチ (*Mycobacterium microti*)、マイコバクテリウ
 ム・ムコゲニカム (*Mycobacterium mucogenicum*)、マイコバクテリウム・ネオオーラム (*My*
cobacterium neoaurum)、マイコバクテリウム・ノンクロモゲニカム (*Mycobacterium nonc*
hromogenicum)、マイコバクテリウム・ペレグリナム (*Mycobacterium peregrinum*)、マイ
 コバクテリウム・フレイ (*Mycobacterium phlei*)、マイコバクテリウム・スクロフラセウ
 ム (*Mycobacterium scrofulaceum*)、マイコバクテリウム・シモイデイ (*Mycobacterium shi*

10

20

30

40

50

moidei)、マイコバクテリウム・シミエ (*Mycobacterium simiae*)、マイコバクテリウム・
 スメグマティス (*Mycobacterium smegmatis*)、マイコバクテリウム・スズルガイ (*Mycobact*
erium szulgai)、マイコバクテリウム・テッレ (*Mycobacterium terrae*)、マイコバクテリ
 ウム・サーモレシスタビル (*Mycobacterium thermoresistabile*)、マイコバクテリウム・
 トリプレックス (*Mycobacterium triplex*)、マイコバクテリウム・トリバイアル (*Mycobact*
erium triviale)、結核菌、マイコバクテリウム・ツシエ (*Mycobacterium tusciae*)、マイ
 コバクテリウム・ウルセランス (*Mycobacterium ulcerans*)、マイコバクテリウム・バッセ
 (*Mycobacterium vaccae*)、マイコバクテリウム・ウォリンスキー (*Mycobacterium wolinsk*
yi)、マイコバクテリウム・ゼノピ (*Mycobacterium xenopi*)、マイコプラズマ・ブッカル (
Mycoplasma buccale)、マイコプラズマ・ファウシウム (*Mycoplasma faucium*)、マイコプ
 ラズマ・ファーマンタンス (*Mycoplasma fermentans*)、マイコプラズマ・ゲニタリウム (*My*
coplasma genitalium)、マイコプラズマ・ホミニス (*Mycoplasma hominis*)、マイコプラズ
 マ・リポフィラム (*Mycoplasma lipophilum*)、マイコプラズマ・オラル (*Mycoplasma orale*
)、マイコプラズマ・ペネトランス (*Mycoplasma penetrans*)、マイコプラズマ・ピラム (*My*
coplasma pirum)、肺炎マイコプラズマ、マイコプラズマ・プリマタム (*Mycoplasma prima*
tum)、マイコプラズマ・サリパリウム (*Mycoplasma salivarium*)、マイコプラズマ・スペ
 ルマトフィラム (*Mycoplasma spermatophilum*)、緑膿菌、シュードモナス・アルカリゲネ
 ス、シュードモナス・クロロラフィス (*Pseudomonas chlororaphis*)、蛍光菌、シュードモ
 ナス・ルテオラ (*Pseudomonas luteola*)、シュードモナス・メンドシナ (*Pseudomonas mend*
ocina)、シュードモナス・モンテイリー (*Pseudomonas monteilii*)、
 シュードモナス・オリジハビタンス (*Pseudomonas oryzihabitans*)、シュードモナス・ペ
 ルトシノゲナ (*Pseudomonas pertocinogena*)、シュードモナス・シュードアルカリゲネス (
Pseudomonas pseudocaligenes)、シュードモナス・プチダ (*Pseudomonas putida*)、シュ
 ードモナス・スチュツェリ (*Pseudomonas stutzeri*)、リケッチア・アフリケ (*Rickettsia*
africae)、リケッチア・アカリ (*Rickettsia akari*)、リケッチア・オーストラリス (*Ricke*
ttsia australis)、リケッチア・コノリー (*Rickettsia conorii*)、リケッチア・フェリス
 (*Rickettsia felis*)、リケッチア・ホネイ (*Rickettsia honei*)、リケッチア・ジャポニカ
 (*Rickettsia japonica*)、「リケッチア・モンゴロチモネ (*Rickettsia mongolotimonae*)」
 、発疹チフスリケッチア、リケッチア・リケッチエ (*Rickettsia Rickettsiae*)、リケッチ
 ア・シビリカ (*Rickettsia sibirica*)、リケッチア・スロバカ (*Rickettsia slovacica*)、リ
 ケッチア・チフィ (*Rickettsia typhi*)、サルモネラ・コレレスイス・コレレスイス、(*Sal*
monella choleraesuis choleraesuis)、サルモネラ・コレレスイス・アリゾネ (*Salmonell*
a choleraesuis arizonae)、サルモネラ・コレレスイス・ボンゴリ (*Salmonella cholerae*
suis bongori)、サルモネラ・コレレスイス・ジアリゾネ (*Salmonella choleraesuis diar*
izonae)、サルモネラ・コレレスイス・ハウテネ (*Salmonella choleraesuis houtenae*)、
 サルモネラ・コレレスイス・インディカ (*Salmonella choleraesuis indica*)、サルモネラ
 ・コレレスイス・サラメ (*Salmonella choleraesuis salamae*)、腸炎菌、チフス菌、ネズ
 ミチフス菌、シゲラ・ボイジー (*Shigella boydii*)、シゲラ・ジセンチリエ (*Shigella dys*
entaeriae)、シゲラ・フレクスネリ (*Shigella flexneri*)、シゲラ・ソネイ (*Shigella son*
nei)、黄色ブドウ球菌、スタフィロコッカス・オーリクラリス (*Staphylococcus auricula*
ris)、スタフィロコッカス・カピティス・カピティス (*Staphylococcus capitis capitis*)
 、スタフィロコッカス c . ウレオリティカス (*Staphylococcus c. ureolyticus*)、スタ
 フィロコッカス・カブレ (*Staphylococcus caprae*)、黄色ブドウ球菌、スタフィロコッカ
 ス・コーニー・コーニー (*Staphylococcus cohnii cohnii*)、スタフィロコッカス c . ウ
 レアリティカス (*Staphylococcus c. urealyticus*)、表皮ブドウ球菌、スタフィロコッカ
 ス・エクオラム (*Staphylococcus equorum*)、スタフィロコッカス・ガリナラム (*Staphyloc*
occus gallinarum)、スタフィロコッカス・ヘモリティカス (*Staphylococcus haemolyticu*
s)、スタフィロコッカス・ホミニス・ホミニス (*Staphylococcus hominis hominis*)、スタ
 フィロコッカス h . ノボビオセプティシウス (*Staphylococcus h. novobiosepticus*)、
 スタフィロコッカス・ヘイカス (*Staphylococcus hyicus*)、スタフィロコッカス・インタ

10

20

30

40

50

ーメディウス (*Staphylococcus intermedius*)、スタフィロコッカス・ラグジュネンシス (*Staphylococcus lugdunensis*)、スタフィロコッカス・パステウリ (*Staphylococcus pasteurii*)、スタフィロコッカス・サッカロリティカス (*Staphylococcus saccharolyticus*)、スタフィロコッカス・サブロフフィティカス (*Staphylococcus saprophyticus*)、スタフィロコッカス・シェレイフェリ・シェレイフェリ (*Staphylococcus schleiferi schleiferi*)、スタフィロコッカス・s・コアグランズ (*Staphylococcus s. coagulans*)、スタフィロコッカス・シウリ (*Staphylococcus sciuri*)、スタフィロコッカス・シムランス (*Staphylococcus simulans*)、スタフィロコッカス・ワルネリ (*Staphylococcus warneri*)、スタフィロコッカス・キシロサス (*Staphylococcus xylosum*)、ストレプトコッカス・アガラクチエ (*Streptococcus agalactiae*)、ストレプトコッカス・カニス (*Streptococcus canis*)、ストレプトコッカス・ジスガラクチエ・ジスガタクチエ (*Streptococcus dysgalactiae dysgalactiae*)、ストレプトコッカス・ジスガラクチエ・エキシミリリス (*Streptococcus dysgalactiae equisimilis*)、ストレプトコッカス・エキ・エキ (*Streptococcus equi equi*)、ストレプトコッカス・エキ・ズーエピデミクス (*Streptococcus equi zooepidemicus*)、ストレプトコッカス・イニエ (*Streptococcus iniae*)、ストレプトコッカス・ポルシナス (*Streptococcus porcinus*)、化膿性連鎖球菌、ストレプトコッカス・アンギノサス (*Streptococcus anginosus*)、ストレプトコッカス・コンステラツス・コンステラツス (*Streptococcus constellatus constellatus*)、ストレプトコッカス・コンステラツス・ファリングジス (*Streptococcus constellatus pharyngidis*)、ストレプトコッカス・インターメディウス (*Streptococcus intermedius*)、ストレプトコッカス・ミティス (*Streptococcus mitis*)、ストレプトコッカス・オラリス (*Streptococcus oralis*)、ストレプトコッカス・サンギニス (*Streptococcus sanguinis*)、ストレプトコッカス・クリスタツス (*Streptococcus cristatus*)、ストレプトコッカス・ゴルドニー (*Streptococcus gordonii*)、ストレプトコッカス・パラサンギニス (*Streptococcus parasanguinis*)、ストレプトコッカス・サリバリウス (*Streptococcus salivarius*)、ストレプトコッカス・ベスチブラリス (*Streptococcus vestibularis*)、ストレプトコッカス・クリセチ (*Streptococcus criceti*)、ミュータンス菌、ストレプトコッカス・ラッチ (*Streptococcus rattii*)、ストレプトコッカス・ソブリナス (*Streptococcus sobrinus*)、ストレプトコッカス・アシドミニマス (*Streptococcus acidominimus*)、ストレプトコッカス・ボビス (*Streptococcus bovis*)、ストレプトコッカス・エキナス (*Streptococcus equinus*)、肺炎連鎖球菌、ストレプトコッカス・スイス (*Streptococcus suis*)、ピブリオ・アルギノリティクス (*Vibrio alginolyticus*)、V・カルチャレ (*V. carchariae*)、コレラ菌、C・シンシナティエンシス (*C. cincinnatiensis*)、ピブリオ・ダムセラ (*Vibrio damsela*)、ピブリオ・フルビアリス (*Vibrio fluvialis*)、ピブリオ・フルニシー (*Vibrio furnissii*)、ピブリオ・ホリセ (*Vibrio hollisae*)、ピブリオ・メチニコビー (*Vibrio metschnikovii*)、ピブリオ・ミミクス (*Vibrio mimicus*)、腸炎ピブリオ菌、ピブリオ・バルニフィカス (*Vibrio vulnificus*)、ペスト菌、エルシニア・アルドベ (*Yersinia aldovae*)、エルシニア・ベルコビエリ (*Yersinia bercovieri*)、エンテロコリチカ菌、エルシニア・フレデリクセニー (*Yersinia frederiksenii*)、エルシニア・インターメディア (*Yersinia intermedia*)、エルシニア・クリステンセニー (*Yersinia kristensenii*)、エルシニア・モラレティー (*Yersinia mollaretii*)、エルシニア・シュードツベルキユロシス (*Yersinia pseudotuberculosis*) およびエルシニア・ローデイ (*Yersinia rohdei*) からなる群から選択される細菌によって起こる。

【0129】

本明細書に例示したように、本発明の方法は、前記感染症を患っている（および/または以前に患ったことがある）被験体に由来する免疫グロブリン含有画分を用いて、緑膿菌または結核菌から免疫原性タンパク質を単離するのに有用である。

【0130】

あるいは、ウイルス感染症を患っている（または以前に患ったことがある）被験体に由来する/した生体サンプルに由来する免疫グロブリン含有画分は、そのウイルスから免疫原性タンパク質を決定するのに有用である。例えば、被験体は、例えば、アストロウイルス

10

20

30

40

50

ス科(Astroviridae)、カリチウイルス科、ピコマウイルス科(Picomaviridae)、トガウイルス科、フラビウイルス科、コロナウイルス科(Coronaviridae)、パラミックスウイルス科(Paramyxoviridae)、オルトミクソウイルス科、ブニヤウイルス科、アレナウイルス科、ラプトウイルス科、フィロウイルス科、レオウイルス科、ボルナウイルス科(Bornaviridae)、レトロウイルス科、ポックスウイルス科、ヘルペスウイルス科、アデノウイルス科、パポウイルス科、パルボウイルス科、ヘパドナウイルス科からなる群から選択される科のウイルス(例えば、コクサッキーA-24ウイルスアデノウイルス11、アデノウイルス21、コクサッキーBウイルス、ボルナ病ウイルス、呼吸器合胞体ウイルス、パラインフルエンザウイルス、カリフォルニア脳炎ウイルス、ヒトパピローマウイルス、水痘帯状疱疹ウイルス、コロラドダニ熱ウイルス、単純ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス、パラインフルエンザウイルス1、パラインフルエンザウイルス2、パラインフルエンザウイルス3、デングウイルス、エボラウイルス、パルボウイルスB19コクサッキーA-16ウイルス、HSV-1、A型肝炎ウイルス、B型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス、D型肝炎ウイルス、E型肝炎ウイルス、ヒト免疫不全ウイルス、コクサッキーB1~B5、インフルエンザウイルスA、BまたはC、ラクロスウイルス、ラッサ熱ウイルス、麻疹ウイルスコクサッキーAまたはBウイルス、エコウイルス、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス、HSV-2、流行性耳下腺炎ウイルス、呼吸器合胞体ウイルス、エプスタイン-バーウイルス、ポリオウイルスエンテロウイルス、狂犬病ウイルス、ルビウイルス、痘瘡ウイルス、WEEウイルス、黄熱病ウイルスおよび水痘帯状疱疹ウイルスからなる群から選択されるウイルス)によるウイルス感染症を患っている場合がある。

10

20

【0131】

あるいは、酵母または真菌感染症を患っている(または以前に患ったことがある)被験体に由来する免疫グロブリン含有画分は、その酵母または真菌に由来する免疫原性タンパク質を決定するのに有用である。例えば、宿主に感染する真菌または酵母は、アスペルギルス種、デルマトフィテス(Dermatophytes)、プラストミセス・デルマチチジス、カンジダ種、ヒストプラズマ・カプスラーツム、スポロスリックス・シェンキー(Sporothrix schenckii)、ヒストプラズマ・カプスラーツムおよび黒色真菌からなる群から選択される。

【0132】

本明細書において、用語「寄生生物」または「寄生虫学的感染」とは、単細胞であるか多細胞であるかにかかわらず、別の生物、例えばヒトに感染できる、ウイルス、細菌、真菌または酵母以外の生物を意味すると取られるものとする。このような寄生生物の例としては、例えば、アンシロストマ・セイラニカム(Ancylostoma ceylanicum)、ズビニ鉤虫、回虫、大腸バランチジウム、プラストシスチス・ホミニス(Blastocystis hominis)、肝ジストマ、サイクロスポーラ・カイエタネンシス(Cyclospora cayetanensis)、二核アメーバ、広節裂頭条虫、瓜実条虫、エンセファリトゾーン・インテスチナリス(Encephalitozoon intestinalis)、赤痢アメーバ、ヒトギョウチュウ、肝蛭、ヒトギョウチュウ、肝蛭、肥大吸虫、ランブル鞭毛虫(Giardia intestinalis)、(同義語Giardia lamblia)、異形吸虫、縮小条虫、小形条虫、戦争イソスポーラ、横川吸虫、アメリカ鉤虫、ネコ肝吸虫、ウェステルマン肺吸虫、ビルハルツ住血吸虫、シストソマ・インターカラツム(Schistosoma intercalatum)、日本住血吸虫、マンソン住血吸虫、無鉤条虫、鞭虫、バベシア・ディベルゲンス(Babesia divergens)、熱帯熱マラリア原虫、四日熱マラリア原虫、卵形マラリア原虫、三日熱マラリア原虫、ブラジルリーシュマニアおよびドノバンリーシュマニアからなる群から選択される寄生生物が挙げられる。

30

40

【0133】

本発明はまた、例えば、自己免疫状態に苦しんでいる被験体がそれに対して免疫応答を起こしているタンパク質を同定するのに有用である。「自己免疫状態」とは、被験体の免疫系が、被験体の1種以上の細胞成分、例えば、タンパク質に対して1種以上の特異的抗体を生じていることを意味する。自己免疫状態は自己免疫疾患と、自己免疫応答と関連する疾病または疾患または感染症のそのような態様の双方を包含する。例えば、慢性炎症の場合には、急性臨床増悪を起こしているか、以前に起こしたことがあるCF被験体で観察

50

されるように、被験体の免疫系が、その被験体の炎症性タンパク質に対して特異的抗体を生じることがある。

【0134】

本発明は、自己免疫疾患において、被験体がそれに対して自己免疫応答を起こしているタンパク質またはその断片を同定するのに有用である。例えば、本発明は、関節リウマチ、多発性硬化症、I型糖尿病、炎症性腸疾患、クローン病、潰瘍性大腸炎、全身性エリテマトーデス、乾癬、強皮症、自己免疫甲状腺疾患、中枢神経系脈管炎、および自己免疫筋炎からなる群から選択される自己免疫疾患を患っている被験体において、免疫原性タンパク質またはその断片を同定するのに有用である。

【0135】

さらに、本発明は、前述のように、被験体が疾病の自己免疫要素の際にそれに対して免疫応答を起こしたタンパク質を同定するのに有用である。本明細書に例示したように、このようなアプローチは、炎症状態、例えば、CF被験体の急性臨床増悪を起こしている被験体から、被験体がそれに対して自己免疫応答を起こしている免疫原性タンパク質を同定するのに有用である。

【0136】

本明細書において、用語「炎症状態」とは、被験体のある部分の機能の見た目の1以上の変化、例えば、透過性および血流の増加を伴う血管の拡張、液体（例えば、血漿タンパク質）の滲出、白血球浸潤、腫脹および/または機能喪失などを特徴とする状態を意味すると理解されるものとする。さらに、炎症状態は化学物質、例えば、ヒスタミン、ブラジキニン、セロトニン、炎症性サイトカインおよび血管が炎症性組織中に液体を漏出させるようにし、その結果局所腫脹をもたらすその他のものなどの放出と関連する。一実施例では、炎症状態は肺の炎症状態である。

【0137】

本明細書において、用語「急性臨床増悪」、「急性増悪」、「臨床増悪」、「増悪」、または「増悪状態」は、CF患者との関連では、CFの肺の症状の悪化を意味すると理解されるものとする。

【0138】

本発明のさらなる適用では、本方法を用いて癌を患っている被験体に由来する免疫原性タンパク質を決定する。癌細胞はいくつかのタンパク質またはタンパク質の断片を異常に発現する。したがって、このような異常に発現されたタンパク質または断片に対して抗体応答が起こることが多い。本発明の方法を用いて、癌の診断および/または治療マーカーが同定される。例えば、本発明は、膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、子宮内膜癌、頭頸部癌、白血病、肺癌、リンパ腫、メラノーマ、非小細胞肺癌、卵巣癌、前立腺癌、急性リンパ性白血病、成人急性骨髄性白血病、成人非ホジキンリンパ腫、脳腫瘍、子宮頸癌、小児肉腫、慢性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病、食道癌、ヘアリー細胞白血病、腎臓癌、肝臓癌、多発性骨髄腫、神経芽細胞腫、口腔癌、膵臓癌、中枢神経系原発リンパ腫、皮膚癌および小細胞肺癌からなる群から選択される癌に由来する免疫原性タンパク質を決定するのに有用である。

【0139】

本発明の一実施例は、免疫原性タンパク質またはその断片を含んでなる、1種以上の細胞またはその抽出物で被験体を免疫し、それによって免疫原性タンパク質またはその断片に対する免疫応答を誘発することをさらに含んでなる。この方法は、例えば、感染性生物に由来する免疫原性タンパク質を決定するのに有用である。例えば、被験体を感染性生物のサンプル（例えば、生存しているか死亡しているかにかかわらない生物自身、または生物に由来する抽出物、例えば、タンパク質抽出物）で免疫する。次いで、この被験体に前記サンプルに対する免疫応答を十分な時間生じさせ、本発明の方法を実施して免疫原性タンパク質を同定する。

【0140】

当業者には明らかであろうが、サンプルは、サンプルに対する免疫応答レベルを増強す

10

20

30

40

50

る化合物、例えば、アジュバントの存在下で投与してもよい。アジュバントは当技術分野では公知であり、例えば、フロイント完全または不完全アジュバント、リゾレシチンまたはジニトロフェノールが挙げられる。

【0141】

例えば、被験体をウイルス細胞、細菌細胞、酵母細胞、真菌細胞および寄生生物由来の細胞からなる群から選択される1種以上の細胞で免疫する。適した細胞抽出物は、例えば、ウイルスの抽出物、細菌の抽出物、酵母の抽出物、および真菌の抽出物および寄生生物の抽出物またはその混合物からなる群から選択される。このような感染性生物の実施例は本明細書に記載されている。例えば、本発明者らは、ニワトリをマイコバクテリウム(すなわち、結核菌)の抽出物で免疫することによって、ニワトリが産んだ卵中に、その生物

10

【0142】

本発明の別の形態では、被験体を、例えば、癌細胞で免疫する。

【0143】

免疫グロブリン含有画分の獲得

本発明の方法は、被験体から、および/または被験体由来するか被験体によって産生された生体サンプルから、タンパク質複合体または免疫グロブリン含有画分を得ることを含んでなる。例えば、タンパク質複合体または免疫グロブリン含有画分を、被験体由来するか被験体によって産生されたサンプルを分離または精製することを含んでなり、それによって前記タンパク質複合体または免疫グロブリン含有画分が得られるプロセスによって

20

【0144】

被験体由来するか被験体によって産生されたサンプルを分離または精製し、それによって免疫グロブリン含有画分を得る方法は、当技術分野では公知であり、例えば、エタノール、ポリエチレングリコール、硫酸アンモニウムおよびリン酸カリウムといった離液性(抗カオトロピック)塩を用いる沈殿が挙げられる。

【0145】

あるいは、またはさらに、本質的には、ビュルヌフ(Burnouf)およびラドセビッチ(Radosevich)、ジャーナル・オブ・バイオケミカル・アンド・バイオフィジカル・メソッズ(*Journal of Biochemical and Biophysical Methods*)、49(1~3)、573~86頁、

30

【0146】

免疫グロブリン含有画分の単離または精製を容易にする方法は、サンプルを免疫グロブリンと結合可能な1種以上の化合物と、結合が生じるのに十分な条件下で一定時間接触させ、その化合物を単離することを含んでなる。

【0147】

本発明の方法を実施するために必須ではないものの、固体支持体、マトリックス、または樹脂、例えば、セルロースビーズ、アガロース、ナイロン、磁性粒子、常磁性粒子およびポリマー樹脂からなる群から選択される固体支持体、マトリックス、または樹脂などの上に事前に固定化されている1種以上の化合物により、免疫グロブリン含有画分を得ることが容易になる。このような固定化された化合物によって、タンパク質複合体または免疫グロブリン含有画分のより迅速な単離が容易になり、固体支持体を洗浄して、生体サンプルの、非特異的に結合しているか、結合していない成分、例えば、タンパク質を除去することが可能となる。

40

【0148】

例えば、本質的には、例えば、ドールガスト(Doellegast)およびプラウト(Plout)、イムノケミストリー、13(2)、135~139頁、1976に記載されたように、疎水性クロマトグラフィーによって免疫グロブリン含有画分を生体サンプルから単離または精製

50

する。このような方法には、離液性塩の存在下で免疫グロブリンと結合するマトリックスを利用する。離液性塩を被験体に由来する生体サンプルに加え、このサンプルを前記マトリックスと接触させる。次いで、サンプル中の離液性塩の濃度を段階的に下げることによって前記マトリックスから免疫グロブリンを放出させる。

【0149】

本質的には、ポラス(Porath)ら、F E B S レターズ(FEBS Letters)、185、306頁、1985およびクヌーセン(Knudsen)ら、アナリティカル・バイオケミストリー(Analytical Biochemistry)、201、170頁、1992に記載されたようなチオフィリック吸着クロマトグラフィーも、免疫グロブリン含有画分を生体サンプルから単離するのに有用である。この方法は、遊離メルカプト基を含んでなる1以上のリガンドが結合されているジビニルスルホン活性化アガロースの使用を本質的に含んでなる。これらのリガンドは、硫酸カリウムの存在下で免疫グロブリンと特異的に結合する。このようなりガンドとしては、例えば、2-メルカプトピリジン、2-メルカプトピリミジンおよび2-メルカプトチアゾリンが挙げられる。再度、サンプル中の離液性塩(すなわち、硫酸カリウム)の濃度を下げることによってリガンドから免疫グロブリンを放出させる。

10

【0150】

チオフィリック樹脂は、例えば、BDバイオサイエンス(Biosciences)から市販されている。このようなチオフィリック樹脂の使用では、免疫グロブリン含有サンプルを、例えば、硫酸カリウム、硫酸ナトリウムおよび/または硫酸アンモニウムといった塩と混合する。次いで、サンプルを、サンプル中の免疫グロブリンの結合に十分な条件下で一定時間チオフィリック樹脂と接触させる。サンプルを場合によっては洗浄して、結合していないか非特異的に結合しているタンパク質を除去し、低濃度の塩で溶出することによって免疫グロブリンを樹脂から単離する。チオフィリック樹脂により、例えば、重力流精製またはバッチ流精製による免疫グロブリンの精製が可能となる。

20

【0151】

例えば、米国特許第6,498,016号に記載されたものなどのマトリックスも、免疫グロブリン含有画分を生体サンプルから単離するのに有用である。このようなマトリックスは、固相骨格、例えば、セルロース、アガロース、デキストランベースのビーズまたは有機ポリマーなど、場合によっては、スパーサーエレメント、および芳香族基またはヘテロ芳香族基、好ましくは、ヘテロ芳香族環系と縮合したベンゼン環を含んでなるリガンドを含んでなる。このようなマトリックスは、離液性塩の使用を必要とせず、むしろ中性条件下で免疫グロブリンと結合できる。当技術分野で公知の条件、例えば、マトリックスの低pHのバッファー、例えば、グリシン、pH3での洗浄などを用いて、免疫グロブリンをこのようなマトリックスから溶出するか解離させる。

30

【0152】

組換えまたは合成タンパク質またはペプチドリガンドも、免疫グロブリン含有画分を単離するのに有用である。このようなりガンドは当技術分野では公知であり、例えば、ンゴ(Ngo)およびクッター(Khatter)、アプライド・バイオケミストリー・アンド・バイオテクノロジー(Applied Biochemistry and Biotechnology)30:111~119頁、1999、ベルドリバ(Verdoliva)ら、ジャーナル・オブ・イムノロジカル・メソッズ(Journal of Immunological Methods)271:77~88頁、2002またはカビール(Kabir)、イムノロジカル・インベスティゲーションズ(Immunological Investigations)、31:263~278頁、2002に記載されている。

40

【0153】

あるいは、またはさらに、カプティブ(Kaptive)-M(商標)-セファロースでのアフィニティークロマトグラフィーによって免疫グロブリン含有画分を他の成分と分離する。当業者ならば、IgMは、その有効成分がIgMと結合するペプチドミメティック化合物であるカプティブ-Mと結合するという事は承知している。したがって、この方法を用いることで、IgMとIgMによって結合されている免疫原性タンパク質とを含んでなる画分が単離される。

50

【0154】

あるいは、MBP-セファロースを用いる。当業者ならば、MBPがIgM Fc5 μ 領域上に存在し、結果としてIgMに特異的であるマンノース残基と結合することは承知している。結合の最初のステップは、何らかのタンパク質-タンパク質相互作用(例えば、抗体に結合しているMBP、あるいはまたはさらに、抗体-抗原相互作用)を乱さないよう天然条件下で実施する。IgMと抗原性タンパク質を、抗体と免疫原性タンパク質を結合していない成分として放出する解離バッファー、例えば、高塩濃度を含んでなるバッファー(例えば、HEPES pH7.2中の3M MgCl₂)などを用いてアフィニティマトリックスから溶出する。

【0155】

あるいは、本質的には、スチュアート(Stewart)ら、ボックス・サンギニス(Vox Sangui nis)、83:332~338頁、2002に記載されたように、免疫グロブリン含有画分、例えば、免疫グロブリンG画分を生体サンプルから単離する。この方法は、本質的には、分子量および電荷に基づいてタンパク質を単離するメンブランベースの分取電気泳動技術である。サイズ排除のためにさまざまな孔サイズのポリアクリルアミドメンブランを用い、さらに電気泳動バッファーのpHによりタンパク質がそのpIに応じて荷電される。この方法を用いることで、免疫グロブリンが1ステップまたは2ステッププロセスで単離される。この方法により、免疫グロブリン含有画分を単離するために多量の生体サンプルを処理することが可能となる。

10

【0156】

免疫グロブリン含有画分と結合可能な1種以上の合成リガンドを含んでなるクロマトグラフィー媒体、例えば、アルファ(Alpha)(商標)ミックスド-モードクロマトグラフィー媒体(リゴケム社(LigoChem Inc.)、フェアフィールド、ニュージャージー州)またはリゴセプ(LigoSep)(登録商標)HTLCクロマトグラフィー媒体(リゴケム)なども、免疫グロブリン含有画分のアフィニティ精製に有用である。

20

【0157】

当業者には明らかであろうが、色素リガンドも、免疫グロブリン含有画分または免疫グロブリン含有タンパク質複合体の精製に有用である。このような色素リガンドおよびその使用方法は、例えば、クロニス(Clonis)ら編、リアクティブ・ダイズ・イン・プロテイン・アンド・エンザイム・テクノロジー(Reactive Dyes in Protein and Enzyme Technology)、ロンドン、マクミラン・プレス(MacMillan Press)、1987中のクロニスに記載されている。

30

【0158】

IgYは、例えば、キット、例えば、アフィランド(Afiland)(ベルギー)またはピエルス(Pierce)(イリノイ州、ロックフォード)から入手できるキットを用いて精製する。このようなキットは、IgY画分を卵またはその誘導体またはその抽出物、例えば、卵黄から単離するのに有用であることが好ましい。あるいは、チオフィリック樹脂がIgY含有画分を卵またはその誘導体またはその抽出物から単離するのに有用である。

【0159】

本明細書に例示したように、タンパク質Gおよび/またはタンパク質Aおよび/またはタンパク質Lは、免疫グロブリン含有画分を単離するのに有用である。タンパク質Gを用いて、免疫グロブリン含有画分または免疫グロブリンを含んでなるタンパク質複合体を単離する方法は当技術分野では公知であり、例えば、ビョルク(Bjorck)およびロンバル(Kronvall)、ジャーナル・オブ・イムノロジー(Journal of Immunology)33(2)、969~974頁、1984に記載されている。タンパク質Aを用いて、免疫グロブリン含有画分または免疫グロブリンを含んでなるタンパク質複合体を単離する方法は、当技術分野では公知であり、例えば、ヘルム(Hjelm)ら、FEBレターズ28(1)、73~76頁、1972に記載されている。タンパク質Lを用いて、免疫グロブリン含有画分または免疫グロブリンを含んでなるタンパク質複合体を単離する方法は、当技術分野では公知であり、例えば、アケルストロム(Akerstrom)およびビョルク、ジャーナル・オブ・バイオ

40

50

ロジカル・ケミストリー (Journal of Biological chemistry) 264 (33) 19740
~ 19746 頁、1989 に記載されている。

【0160】

免疫グロブリン含有画分は、例えば、アフィニティークロマトグラフィー、例えば、タンパク質 A および / またはタンパク質 G および / またはタンパク質 L と結合しているマトリックス、固体支持体、または樹脂、例えば、タンパク質 A - セファロースおよび / またはタンパク質 G - セファロースおよび / またはタンパク質 L セファロース (これらの各々は、アマシャム・ファルマシア (Amersham Pharmacia) から入手可能である) あるいはタンパク質 G アガロースおよび / またはタンパク質 A アガロースおよび / またはタンパク質 L アガロース (これらの各々は、シグマ・アルドリッチ (Sigma Aldrich) から入手可能である) あるいはタンパク質 G および / またはタンパク質 A に磁性ビーズを結合させたもの (ニュー・イングランド・バイオラブズ (New England Biolabs) から入手可能) を用いるアフィニティークロマトグラフィーによって精製する。結合の最初のステップは、何らかのタンパク質 - タンパク質相互作用 (例えば、抗体と結合しているタンパク質 A またはタンパク質 G、次いで、これが免疫原性タンパク質と結合する) を乱さないよう天然条件下で実施する。マトリックスは場合によって洗浄して何らかの結合していないか非特異的に結合しているタンパク質を除去する。抗体は、抗体を結合していない成分として放出する解離バッファー、例えば、高塩濃度を含んでなるバッファー (例えば、HEPES pH 7.2 中の 3 M MgCl₂) などを用いて、タンパク質 A、タンパク質 G またはタンパク質 L から溶出する。

10

20

【0161】

本明細書に例示したように、タンパク質 G またはタンパク質 A を用いて免疫グロブリン含有画分を単離する。

【0162】

本明細書において、用語「タンパク質 G」は、タンパク質 G の 1 以上の天然 IgG 結合ドメインを含んでなるタンパク質、天然のもしくは天然に存在するタンパク質 G の IgG 結合ドメインを含んでなるハイブリッドもしくは融合タンパク質、または天然のタンパク質 G の IgG と結合する能力を保持する、天然のもしくは天然に存在するタンパク質 G の突然変異体もしくは変異体、または天然のタンパク質 G の IgG と結合する能力を保持する、天然のもしくは天然に存在するタンパク質 G の断片を含むと取られるものとする。例示目的で、ストレプトコッカスのタンパク質 G のアミノ酸配列を配列番号 1 に示す。

30

【0163】

タンパク質 G の例示的形態はストレプトコッカス種、ランスフィールド (Lancefield) 群 G に由来する。このタンパク質の分子量は約 23 kDa である。タンパク質 G は、種々の種、例えば、ヒトおよびマウスなどに由来する IgG の Fc 部分と結合することが好ましい。

【0164】

本明細書において、用語「タンパク質 A」は、タンパク質 A の 1 以上の天然 IgG 結合ドメインを含んでなるタンパク質、天然のもしくは天然に存在するタンパク質 A の IgG 結合ドメインを含んでなるハイブリッドもしくは融合タンパク質、または天然のタンパク質 A の IgG と結合する能力を保持する、天然のもしくは天然に存在するタンパク質 A の突然変異体もしくは変異体、または天然のタンパク質 A の IgG と結合する能力を保持する、天然のもしくは天然に存在するタンパク質 A の断片を含むと取られるものとする。例示目的で、黄色ブドウ球菌のタンパク質 A のアミノ酸配列を配列番号 2 に示す。

40

【0165】

例えば、タンパク質 A は、およそ 5 つの相同 IgG 結合ドメインを含んでなり、各々は約 60 個のアミノ酸からなる。タンパク質 A の例示的形態は約 5.1 の等電点を有する。

【0166】

一実施例では、タンパク質 A は、免疫グロブリン分子の Fc 領域と結合できる。

【0167】

50

好ましいタンパク質 A は、ウサギ、ブタ、マウス、ラット、ヒツジ、ウマ、ヤギ、ネコ、イヌ、ヒト I g G 1 および / または I g G 2 および / または I g G 4 および / または I g M および / または I g A および / または I g E と結合できる。

【 0 1 6 8 】

本明細書において、用語「タンパク質 L」は、タンパク質 L の 1 以上の天然抗体軽鎖結合ドメインを含んでなるタンパク質、天然のもしくは天然に存在するタンパク質 L の抗体軽鎖結合ドメインを含んでなるハイブリッドもしくは融合タンパク質、または天然のタンパク質 L の抗体軽鎖と結合する能力を保持する、天然のもしくは天然に存在するタンパク質 L の突然変異体もしくは変異体、または天然のタンパク質 L の抗体軽鎖と結合する能力を保持する、天然のもしくは天然に存在するタンパク質 L の断片を含むと取られるものとする。例示的タンパク質 L を配列番号 3 に示す。 10

【 0 1 6 9 】

例示的タンパク質 L はペプトストレプトコッカス・マグナス (peptostreptococcus magnus) に由来する。このようなタンパク質の分子量は、約 3 6 k D a であり、4 つの免疫グロブリン結合ドメインを含む。このような例示的タンパク質 L は、主として免疫グロブリン軽鎖と結合する。

【 0 1 7 0 】

本明細書に記載されるタンパク質 G および / またはタンパク質 A および / またはタンパク質 L は、商業的供給源から得るか、あるいは、従来法によって製造する。商業的供給源は当業者には公知であろう。 20

【 0 1 7 1 】

例えば、タンパク質 G、タンパク質 A および / またはタンパク質 L はアマシャム・ファルマシア、オーストラリア、ニューサウスウェールズ州、キャッスルヒルから入手できる。

【 0 1 7 2 】

あるいは、タンパク質 G またはタンパク質 A またはタンパク質 L はそれぞれ、米国特許第 4 , 9 4 5 , 1 5 7 号、同 6 , 5 5 5 , 6 6 1 号または同 4 , 8 7 6 , 1 9 4 号に記載された方法を用いて単離する。あるいは、組換えタンパク質 G および / またはタンパク質 A および / またはタンパク質 L は、例えば、サムブロック (Sambrook) ら (モレキュラー・クロニング (Molecular Cloning) : ア・ラボラトリー・マニュアル (A Laboratory Manual) 、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリーズ (Cold Spring Harbor Laboratories) 、ニューヨーク、第 2 版 (1 9 8 9) 、I、II および III 全巻中) に記載されるような当技術分野で公知の技術を用いて作製する。例えば、組換えタンパク質 G は、米国特許第 5 , 0 8 2 , 7 7 3 号に記載された方法を用いて作製できる。 30

【 0 1 7 3 】

当業者には明らかであろうが、タンパク質 G、タンパク質 A および / またはタンパク質 L を固体支持体、樹脂またはマトリックスに付着させることにより、免疫グロブリン含有画分または免疫グロブリンまたはその混合物を含んでなるタンパク質複合体のアフィニティー精製が容易になる。タンパク質 G、タンパク質 A および / またはタンパク質 L の付着に適した固体支持体、樹脂またはマトリックスとしては、例えば、遊離またはエステル化型のいずれかの、1 以上のヒドロキシル基を含むポリマー、例えば、アガロース、セルロースエステル (例えば、硝酸セルロース、ジアゾセルロース、酢酸セルロースおよびプロピオン酸セルロース) をはじめとするセルロース、またはアクリルアミドポリマーまたはコポリマー (例えば、ポリアクリルアミドまたはアクリルアミド) など、マイクロタイタープレート、ガラス、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリエチレン、デキストラン、ナイロン、アガー、デンプン、あるいはタンパク質 G、タンパク質 A および / またはタンパク質 L を固定化できる活性化剤の残基と化学的に結合している、疎水性の、微多孔の、皮のない、ポリアミドメンブレンを含んでなる表面積の大きい化学的に活性なメンブレンからなる群から選択される固相支持体が挙げられる。 40

【 0 1 7 4 】

タンパク質 G、タンパク質 A および / またはタンパク質 L は、当業者に公知の方法に従って、固体支持体、樹脂またはマトリックス上に固定化する。例えば、タンパク質 G、タンパク質 A および / またはタンパク質 L を共有結合によってか吸着によってのいずれかで固相にコートするか、結合させる。タンパク質を固相支持体に固定化する方法は、例えば、米国特許第 3,652,761 号、同 3,879,262 号、同 3,986,217 号および同 4,693,985 号に教示されている。例えば、タンパク質 G、タンパク質 A および / またはタンパク質 L をトレシル活性化したか臭化シアン活性化したアガロースまたはマレイミド活性化したアガロース支持体に固定化する。この支持体は、例えば、修飾されるアガロース (特に、A H セファロース、ファルマシア社 (Pharmacia Co.)) を一級アミノ基を含むよう、スルホスクシンイミジル - 4 - (p - マレイミドフェニル) ブチレートを用いて処理することによって調製する。

10

【0175】

固定化したタンパク質 G および / またはタンパク質 A および / またはタンパク質 L は、免疫グロブリンのアフィニティー精製にとって有用である。アフィニティー精製技術は当技術分野では公知であり、例えば、スコープス (Scopes) (プロテイン・プリフィケーション: プリンシプルス・アンド・プラクティス (Protein purification: principles and practice)、第 3 版、スプリングー・ベルラグ (Springer Verlag)、1994 中) に記載されている。アフィニティー精製法は、通常、被験体から単離した生体サンプルまたは被験体に由来するか被験体によって産生されたサンプルを、固定化したタンパク質 G、タンパク質 A および / またはタンパク質 L と接触させることと、(場合によっては) 続いて、洗浄して何らかの結合していないか非特異的に結合しているタンパク質を除去することと、タンパク質 G および / またはタンパク質 A および / またはタンパク質 L と結合している免疫グロブリンを溶出することとを含む。

20

【0176】

あるいは、タンパク質 G および / またはタンパク質 A および / またはタンパク質 L を、例えば、ビオチンなどの分子へ共有結合させる。したがって、このような結合しているタンパク質 G、タンパク質 A および / またはタンパク質 L が関与するアフィニティー精製法では、例えば、固体支持体に結合させてあるストレプトアビジンを用いて、結合しているタンパク質 G および / またはタンパク質 A および / またはタンパク質 L を結合または捕獲する。

30

【0177】

あるいは、タンパク質 G および / またはタンパク質 A および / またはタンパク質 L を、例えば、ダイナビーズ (Dynabead) (登録商標) (ダイナル・バイオテック (Dynal Biotech))、ノルウェー、オスロから入手可能) などの磁性または常磁性ビーズに共有結合させる。被験体に由来するか被験体によって産生される生体サンプルを、このような結合しているタンパク質 G、タンパク質 A および / またはタンパク質 L と接触させ、続いて、サンプルを磁場または常磁場に曝すことによって、免疫グロブリン画分または免疫グロブリンもしくはその混合物を含んでなるタンパク質複合体を単離する。

【0178】

あるいは、タンパク質 G、タンパク質 A および / またはタンパク質 L を被験体に由来する生体サンプルと、前記タンパク質 G、タンパク質 A またはタンパク質 L が免疫グロブリン含有画分と結合するのを可能にする条件下で一定時間接触させる。次いで、このサンプルをタンパク質 G および / またはタンパク質 A および / またはタンパク質 L と特異的に結合する抗体と接触させる。この抗体は、固体支持体または生体サンプルからのタンパク質 G および / またはタンパク質 A および / またはタンパク質 L の単離を容易にする別の手段、例えば、アガロース、プラスチック製固体支持体またはガラス製固体支持体などと結合していることが好ましい。タンパク質 G またはタンパク質 A またはタンパク質 L と特異的に結合するポリクローナル抗体は、例えば、サファイア・バイオサイエンス (Sapphire Bioscience)、オーストラリア、ニューサウスウェールズ州、クローズ・ネストから入手できる。

40

50

【0179】

タンパク質 G またはタンパク質 A またはタンパク質 L のミメティックもまた、免疫グロブリンもしくはその混合物を含んでなるタンパク質複合体またはその免疫グロブリン含有画分を単離するのに有用である。このようなミメティックは当技術分野では公知であり、かつ/または例えば、カビール(Kabir)、イムノロジカル・インベスティゲーションズ(Immunological Investigations); 31、263~78頁、2002またはダウド(Dowd)ら、ネイチャー・バイオテクノロジー(Nature Biotechnology)16:190~5頁、1998に記載されている。例えば、タンパク質 A のペプチドミメティックはアミノ酸配列 E Q Q N A F Y E I L H L P N L N E E Q R (配列番号4)または R T Y R T Y R T Y R T Y K K K G (配列番号5)を含んでなる。

10

【0180】

あるいは、免疫原性タンパク質は、タンパク質チップを用いて生体サンプルから得る。このようなタンパク質チップを作製するには、注目する免疫グロブリンと結合できるタンパク質、例えば、タンパク質 G、タンパク質 A および/またはタンパク質 L などを、固体支持体、例えば、ガラス、ポリカーボネート、ポリテトラフルオロエチレン、ポリスチレン、酸化ケイ素、金属または窒化ケイ素などに結合させる。この固定化は直接(例えば、共有結合、例えば、シッフ塩基形成、ジスルフィド結合またはアミドもしくは尿素結合形成などによって)または間接のいずれかである。タンパク質チップを作製する方法は当技術分野では公知であり、例えば、米国特許出願第20020136821号、同20020192654号、同20020102617号および米国特許第6,391,625号

20

【0181】

免疫グロブリン含有画分の免疫グロブリン結合性化合物への結合

一形態では、本発明の方法は、免疫グロブリン含有画分、または免疫グロブリンを含んでなるタンパク質複合体を、免疫グロブリンを結合するために用いる化合物に結合させる

30

【0182】

免疫グロブリン含有画分を化合物に結合させる手段はヒドラジドを用いることによる。このような方法は、本質的には、オシャネシー(O'Shannessy)およびホフマン(Hoffmann)、バイオテクノロジー・アンド・アプライド・バイオケミストリー(Biotechnology and Applied Biochemistry)9(6)、488~496頁、1987に記載されたように実施する。本質的には、この方法は、当技術分野で公知であり、かつ/または本明細書に記載された方法を用いて免疫グロブリンを単離することと、その免疫グロブリンを過ヨウ素酸ナトリウムで酸化することとを含んでなる。この酸化によって、いずれかのオリゴ糖部分にアルデヒドが形成される。次いで、酸化されたサンプルをヒドラジド誘導体化した固体支持体と接触させる。これによって、酸化された免疫グロブリンと前記固体支持体の間に安定なヒドラゾン結合が形成される。適した固体支持体としては、例えば、アガロース、ガラスビーズ、またはポリスチレン、ポリプロピレンもしくはポリカーボネートビーズまたはマイクロタイプレートが挙げられる。ヒドラゾン結合は低pH範囲でさえも安定であるので、このような方法によって、当技術分野で公知であり、かつ/または本明細書に記載した方法によって免疫グロブリン含有画分から免疫原性タンパク質を解離させることが可能となる。

40

【0183】

本発明の方法の一例示的形態では、免疫グロブリン含有画分またはタンパク質複合体を、免疫グロブリンと結合する化合物に結合させることは、架橋剤を、結合している免疫グ

50

ロブリンを有する1種以上の化合物と、化合物と免疫グロブリン間に共有結合が生じるのに十分な条件下で一定時間接触させることを含んでなる。

【0184】

例えば、光反応性架橋試薬を用いて免疫グロブリンもしくはその混合物を含んでなるタンパク質またはその免疫グロブリン含有画分を免疫グロブリン結合性化合物に結合させる。このような光反応性架橋試薬としては、例えば、アリアルジド（照明すると、アリアルジドが、求核基と結合を形成する反応性中間体を生じる）、フッ化アリアルジド（UV光分解時に反応性ナイトレンを生じる）またはベンゾフェノン誘導体が挙げられる。例えば、適した光反応性架橋試薬は、N-（（2-ピリジルジチオ）エチル）-4-アジドサリチルアミド（PEAS）、4-アジド-2,3,5,6-テトラフルオロベンジルアミン、4-アジド-2,3,5,6-テトラフルオロ安息香酸の反応性誘導体、ベンゾフェノンマレイミドおよびベンゾフェノンイソチオシアネートからなる群から選択される。光反応性架橋試薬を添加した後、サンプルにUV光を、免疫グロブリン結合性化合物とそれに結合される免疫グロブリン画分間に結合が形成するのに十分な条件下で一定時間曝露させる。

10

【0185】

あるいは、適した架橋剤は、例えば、イミドエステル架橋剤、N-ヒドロキシスクシンイミド架橋剤、マレイミド架橋剤、ハロアセチル架橋剤、ヒドラジド架橋剤、およびカルボジイミド架橋剤からなる群から選択される。

【0186】

例えば、イミドエステル架橋剤はアルカリ性pHでアミン基と反応し、アミジン結合の形成をもたらす。ホモ二官能基型イミドエステルは、架橋後にタンパク質の正味の電荷が維持されるのでタンパク質を架橋するのに有用である。適したイミドエステル架橋剤は、ジメチルアジピミデート-2-HCl（DMA）、ジメチルピメリミデート-HCl（DMP）、ジメチルスベリミデート-2HCl（DMS）およびジメチル3,3'-ジチオビスプロピオンイミデート-2HCl（DTBP）からなる群から選択される。

20

【0187】

マレイミドもまた、免疫グロブリン含有画分または免疫グロブリンを含んでなるタンパク質複合体を免疫グロブリン結合性化合物と架橋するのに有用である。マレイミドは、ほぼ中性のpHでスルフィドリル基と特異的に反応する。しかし、マレイミドはまた、スルフィドリル基とよりも低速ではあるが、アミン基とも反応する。マレイミドは反応したスルフィドリル基とともに、通常の生理条件下では切断され得ない安定なチオエステル結合を形成する。適したマレイミド架橋剤の例は、スクシンイミジル4-（N-マレイミドメチル）シクロヘキサン-1-カルボキシレート（SMCC）、スルホ-スクシンイミジル4-（N-マレイミドメチル）シクロヘキサン-1-カルボキシレート（スルホ-SMCC）、m-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル（MBS）、スルホ-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル（スルホ-MBS）、スクシンイミジル4-（p-マレイミドフェニル）-ブチレート（SMBP）、スルホスクシンイミジル4-（p-マレイミドフェニル）-ブチレート（スルホ-SMBP）、ビスマレイミドヘキサン（BMH）、N-（g-マレイミドブチリルオキシ）スクシンイミドエステル（GMBS）およびスルホ-N-（g-マレイミドブチリルオキシ）スクシンイミドエステル（スルホ-GMBS）からなる群から選択される。

30

40

【0188】

あるいは、またはさらに、ハロアセチル架橋剤を用いて、免疫グロブリン含有画分または免疫グロブリンを含んでなるタンパク質複合体を免疫グロブリン結合性化合物と架橋する。よく用いられるハロアセチル架橋剤の大部分は、ヨードアセチル基を含んでなる。生理的pHではこのようなヨードアセチル基のスルフィドリル基との反応は、ヨウ素のチオールでの求核置換によって進行し、これによって安定なチオエステル結合が生じる。本発明の方法に適したハロアセチル架橋剤としては、例えば、N-スクシンイミジル（4-ヨードアセチル）アミノベンゾエート（SIAB）またはスルホ-N-スクシンイミジ

50

ル(4-ヨードアセチル)アミノベンゾエート(スルホ-S I A B)が挙げられる。

【0189】

免疫グロブリン含有画分または免疫グロブリンを含んでなるタンパク質複合体を、免疫グロブリン結合性化合物と架橋するのに有用なピリジルジスルフィド架橋剤は、例えば、1,4-ジ-[3'-2'-ピリジルジチオ-(プロピオンアミド)ブタン](DPDPB)、4-スクシンイミジル-オキシカルボニル-a-(2-ピリジルジチオ)トルエン(SMPT)、スルホスクシンイミジル-6-[a-メチル-a(2-ピリジルジチオ)トルアミド]ヘキサノエート(スルホ-LC-SMPT)、N-スクシンイミジル-(ピロジリジチオ)-プロピオネート、スクシンイミジル6-[3-(2-ピリジルジチオ)-プロピオンアミド]ヘキサノエート(LC-SPDP)、スルホスクシンイミジル6-[3-(2-ピリジルジチオ)-プロピオンアミド]ヘキサノエート(スルホ-LC-SPDP)および3-(2-ピリジルジチオ)-プロピオニルヒドラジド(PDPH)からなる群から選択される。ピリジルジスルフィドは、ジスルフィド結合を得るのに中性pHを使用できるが、弱酸性のpH(例えば、約pH4~pH5の間)で脂肪族チオールと反応する。

10

【0190】

カルボジイミド架橋剤もまた、免疫グロブリン含有画分または免疫グロブリンを含んでなるタンパク質複合体を免疫グロブリン結合性化合物と架橋するのに有用である。カルボジイミドはカルボキシルを一級アミンまたはヒドラジドとカップリングし、これによってアミドまたはヒドラゾン結合が形成される。カルボジイミドは、多数の他の架橋試薬とは異なり、カップリングされる分子間に架橋を形成しない。適したカルボジイミド架橋剤の例は、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミドヒドロクロリド(EDC)、N,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC)および4-(p-アジドサリチルアミド)-ブチルアミンからなる群から選択される。

20

【0191】

本明細書に例示したように、N-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)架橋剤は、免疫グロブリン含有画分または免疫グロブリンを含んでなるタンパク質複合体を免疫グロブリン結合性化合物と結合させるのに有用である。NHS架橋剤は通常、一級アミン、例えば、タンパク質のN末端の-アミン基などと相互作用するが、-アミンもまたNHSエステルと相互作用する。NHS架橋剤が一級アミンと相互作用するか反応してN-ヒドロキシスクシンイミドを放出する場合には、共有アミド結合が形成される。例示目的で、適したNHS架橋剤は、ジスクシンイミジルグルタレート(DSG)、スベリン酸ジスクシンイミジル(DSS)、スベリン酸ビス(スルホスクシンイミジル)(BS₃)、ジチオビス(プロピオン酸スクシンイミジル)(DSP)、3,3'-ジチオビス(プロピオン酸スクシンイミジル)(DTSSP)、エチレングリコビス(コハク酸スクシンイミジル)(EGS)、エチレングリコビス(コハク酸スルホスクシンイミジル)(スルホ-EGS)、ジスクシンイミジルタルタレート(DST)、ジスルホスクシンイミジルタルタレート(スルホ-DST)、ビス[2-(スクシンイミジルオキシ-カルボニルオキシ)エチル]スルホン(BSOCOES)、ビス[2-(スルホスクシンイミジルオキシ-カルボニルオキシ)エチル]スルホン(スルホ-BSOCOES)、スクシンイミジル4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート(SMCC)、スルホスクシンイミジル4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート(スルホ-SMCC)、m-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル(MBS)、m-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスルホスクシンイミドエステル(スルホ-MBS)、スクシンイミジル4-(p-マレイミドフェニル)-ブチレート(SMBP)、スルホ-スクシンイミジル4-(p-マレイミドフェニル)-ブチレート(スルホ-SMBP)、ビスマレイミドヘキサン(BMH)、N-(g-マレイミドブチリルオキシ)スクシンイミドエステル(GMBS)およびN-(g-マレイミドブチリルオキシ)スルホスクシンイミドエステル(スルホ-GMBS)からなる群から選択される。

30

40

50

【0192】

本明細書に例示したように、スベリン酸ジスクシンイミジル(DSS)は、免疫グロブリン含有タンパク質複合体または免疫グロブリン含有画分を免疫グロブリン結合性化合物、例えば、タンパク質Gと架橋するのに有用である。例えば、免疫グロブリン含有画分を被験体に由来する生体サンプル(例えば、血清)から、例えば、タンパク質Gセファロースを用いて単離する。次いで、免疫グロブリン含有画分が結合しているタンパク質Gを適量のDSSと、タンパク質Gと免疫グロブリン含有画分間にアミド結合が形成する条件下で一定時間接触させることによって、結合している免疫グロブリン含有画分をタンパク質Gと架橋する。

【0193】

免疫原性タンパク質の免疫グロブリンからの分離

免疫原性タンパク質またはその断片を同定するので、本発明の一形態では、前記免疫原性タンパク質またはその断片を、抗原抗体相互作用によって結合されている免疫グロブリン含有画分から分離することが望まれる。例えば、免疫グロブリンもしくはその混合物を含んでなるタンパク質複合体またはその免疫グロブリン含有画分を、抗原抗体相互作用を乱す化合物と、抗原抗体相互作用を乱すのに十分な条件下で一定時間接触させることによって、免疫原性タンパク質またはその断片を免疫グロブリン含有画分または免疫グロブリンもしくはその混合物を含んでなるタンパク質複合体から分離する。

【0194】

例えば、免疫原性タンパク質を、結合している免疫グロブリンから解離させ、次いで、さらに解析する。免疫原性タンパク質は、免疫グロブリンによってもはや結合されない、すなわち、免疫グロブリンが免疫原性タンパク質またはその断片と非共有結合(前記のような)を形成しない場合に、その免疫グロブリンから解離されていると考えられる。タンパク質を免疫グロブリン(例えば、抗体)から分離する方法は、当技術分野では公知であり、例えば、スコープス(Scopes)(プロテイン・プリフィケーション:プリンシプルズ・アンド・プラクティス、第3版、スプリングー・ベルラグ、1994中)に記載されている。例えば、免疫グロブリン含有画分または免疫グロブリンもしくはその混合物を含んでなるタンパク質複合体を含んでなるサンプルのpHを変更または改変することによって、免疫原性タンパク質を前記免疫グロブリン含有画分または免疫グロブリンもしくはその混合物を含んでなるタンパク質複合体から分離する。前記サンプルのpHは、例えば、グリシン(例えば、pHが約3である)またはトリエタノールアミン(pHが約11である)を用いて変更する。

【0195】

あるいは、またはさらに、免疫グロブリン含有画分または免疫グロブリンもしくはその混合物を含んでなるタンパク質複合体を含んでなるサンプルの塩濃度を高めることによって(例えば、5M塩化リチウムを用いて)、免疫原性タンパク質を免疫グロブリン含有画分または免疫グロブリンもしくはその混合物を含んでなるタンパク質複合体から分離する。

【0196】

免疫グロブリン含有画分または免疫グロブリンもしくはその混合物を含んでなるタンパク質複合体を含んでなるサンプルをイオン性界面活性剤(例えば、ドデシル硫酸ナトリウム(SDS))で、および/または解離剤(例えば尿素)で、および/またはカオトロピック剤(例えばチオシアネート)で処理することによって、免疫原性タンパク質またはその断片を免疫グロブリン含有画分または免疫グロブリンもしくはその混合物を含んでなるタンパク質複合体から分離する。

【0197】

当業者には明らかであるが、このような方法の組合せもまた、免疫原性タンパク質またはその断片を免疫グロブリン含有画分または免疫グロブリンもしくはその混合物を含んでなるタンパク質複合体から分離するのに有用である。

【0198】

10

20

30

40

50

本発明の例示的一形態では、免疫原性タンパク質を、免疫グロブリン含有画分または免疫グロブリンもしくはその混合物を含んでなるタンパク質複合体から、前記免疫グロブリン含有画分または免疫グロブリンもしくはその混合物を含んでなるタンパク質複合体と結合している前記免疫原性タンパク質を含んでなるサンプルのpHをグリシンで下げることによって解離する。例えば、グリシンは約1.5～約4のpHであり、約1.9のpH～約2.7のpHがより好ましく、約2.3のpH～約2.7のpHが最も好ましい。

【0199】

あるいは、カプリル酸と硫酸アンモニウム沈殿を用いて、免疫原性タンパク質を免疫グロブリン含有画分から単離または解離する。このような試薬を用いることによって、免疫グロブリンまたは免疫原性タンパク質を本質的に含んでなる調製物が得られる。

10

【0200】

免疫グロブリン含有画分を溶解バッファー、例えば、高塩バッファー（例えば、3 M MgCl₂/HEPES pH 7.2）などに溶解させることによって、免疫原性タンパク質またはその断片が結合していない成分として放出される。次いで、免疫原性タンパク質画分および免疫グロブリン含有画分を、例えば、免疫グロブリン成分を結合していない成分として維持するために、溶出剤として、例えば、解離バッファーを用いるサイズ排除クロマトグラフィーによって分離する。

【0201】

あるいは、免疫グロブリン含有画分または免疫グロブリンもしくはその混合物を含んでなるタンパク質複合体を、変性条件下でフリーフロー電気泳動に付す。生体サンプルを清澄化し、免疫グロブリンを溶液中に残す条件下でタンパク質を沈殿させる。次いで、例えば、本質的には、ホフマン(Hoffman)ら、プロテオミクス(Proteomics)1、807～818頁、2001に記載されたように、免疫グロブリン含有画分を沈殿させ、適したバッファーに再溶解させ、連続溶液相等電点電気泳動法によって分離するためのフリーフロー電気泳動(FFE)装置（例えば、オクトパス(Octopus)(商標)、テクカン(Tecan)(商標)）にアプライする。例えば、免疫原性タンパク質またはその断片に対応する画分を得、PD-10または高速脱塩カラム（アマシャム・バイオサイエンス(Amersham Biosciences)）を用いて適したバッファー（例えば、PBS）に交換し、次いで、当技術分野で周知であり、かつ/または本明細書に記載した方法を用いてさらに分析して免疫原性タンパク質の正体を調べる。

20

30

【0202】

免疫原性タンパク質および/または免疫グロブリン含有画分の単離

あるいは、または免疫原性タンパク質を免疫グロブリン含有画分または免疫グロブリンもしくはその混合物を含んでなるタンパク質複合体から分離することに加えて、このような免疫原性タンパク質を、例えば、抗原抗体相互作用によって結合していた、免疫グロブリン含有画分または免疫グロブリンもしくはその混合物を含んでなるタンパク質複合体から単離する。

【0203】

したがって、免疫原性タンパク質またはその断片および/または免疫グロブリン含有画分または免疫グロブリンもしくはその混合物を含んでなるタンパク質複合体の単離は、まず前記タンパク質/画分を分離した後か、前記タンパク質/画分を分離せずにのいずれかで実施する。

40

【0204】

タンパク質を分離する方法は当技術分野では公知であり、例えば、スコープス(プロテイン・プリフィケーション: プリンシプルズ・アンド・プラクティス、第3版、スプリンガー・ベルラグ、1994中)に記載されている。

【0205】

例えば、免疫原性タンパク質を免疫グロブリンから分離し、続いて、未変性ゲル電気泳動を用いて分離する。本明細書において、用語「未変性ゲル電気泳動」とは、タンパク質を変性しない、すなわち、電気泳動されるタンパク質が天然の大きさ、コンホメーション

50

および/または電荷を保持する条件下で実施する電気泳動の何らかの形態を意味すると取られるものとする。したがって、未変性ゲル電気泳動を用いるタンパク質の移動度は、タンパク質の電荷とタンパク質の流体力学的大きさの双方に応じて変わる。このような方法は、未変性ゲル電気泳動がタンパク質の大きさ、形および電荷を維持するだけでなく、この方法がまた、通常相互作用するタンパク質を結合されているままにできるため、免疫原性タンパク質と免疫グロブリンの分離において役立つ。免疫グロブリンは2つの重鎖と2つの軽鎖を含んでなるため、免疫グロブリンの分子量は少なくとも約150kDaであると予想される(IgGの予想分子量に相応して)。したがって、前記の方法を用いて調製したサンプルの電気泳動によって、免疫グロブリン含有画分からの免疫原性タンパク質またはその断片の分離が容易になる。

10

【0206】

例えば、免疫原性タンパク質と免疫グロブリンとを含んでなるサンプルを、当技術分野で公知の技術を用いて一次元未変性ゲル電気泳動を用いて電気泳動する。このような場合、タンパク質は、単にその分子量および電荷によって分離される。したがって、このような方法は、免疫グロブリンをより小さい免疫原性タンパク質またはその断片と分離するのに役立つ。次いで、免疫原性タンパク質を当技術分野で公知であり、かつ/または本明細書に記載の方法を用いて同定する。

【0207】

あるいは、免疫原性タンパク質と免疫グロブリンとを含んでなるサンプルを、未変性二次元ゲル電気泳動を用いて電気泳動する。例えば、タンパク質を等電点電気泳動を用いて一方向に分離する。このような方法を用いて、タンパク質をその等電点、すなわち、そこでのタンパク質の正味の電荷がゼロに等しいpHによって分離する。タンパク質をその等電点によって分離するためには、サンプルを、pH勾配を含んでなるゲルで電気泳動する。このような条件下では、タンパク質はそこでの正味の電荷がゼロに等しい前記勾配上のある位置に移動する。等電点電気泳動に続いて、標準的な未変性ゲル電気泳動を用いて、タンパク質をその質量に従って分離する。したがって、このような方法は、免疫グロブリンを免疫原性タンパク質から分離するのに役立つ。

20

【0208】

あるいは、当技術分野で公知であり、かつ/または本明細書に記載の方法を用いて、免疫原性タンパク質を免疫グロブリンから解離することと、ゲル濾過カラムを用いて、前記免疫原性タンパク質またはその断片と前記免疫グロブリンを分離することとによって、免疫原性タンパク質を免疫グロブリンから単離する。このようなカラムは商業的供給源、例えば、シグマ-アルドリッチまたはアマシャム-ファルマシアなどから入手できる。ゲル濾過法は当技術分野では公知であり、例えば、スコープス(プロテイン・プリフィケーション:プリンシプル・アンド・プラクティス、第3版、スプリングー・ベルラグ、1994中)に記載されている。ゲル濾過クロマトグラフィーはタンパク質をその大きさに基づいて分離する。このような方法は、サンプルを、指定の孔の大きさからなる固体マトリックスを含んでなるカラムと接触させることを含んでなる。十分に分子量の小さいタンパク質はこれらの孔を通過して移動し、含まれ、そうでないものは排除されると考えられている。タンパク質は、このカラムから、排除されたものが含まれたものよりも先に溶出されながら溶出される。したがって、天然の状態の免疫グロブリンは、比較的大きな分子であるので、分子量の小さい免疫原性タンパク質またはその断片よりも先に溶出される。免疫原性タンパク質またはその断片を含んでなるサンプルを回収した後、当技術分野で公知であり、かつ/または本明細書に記載の方法を用いてそのサンプルを解析/同定する。あるいは、電気泳動、例えば、未変性または変性一次元または二次元ゲル電気泳動を用いて免疫原性タンパク質を含んでなるサンプルを分離した後、その免疫原性タンパク質の何らかの解析を行う。

30

40

【0209】

あるいは、免疫原性タンパク質を免疫グロブリンから解離させた後、他のサイズ排除法、例えば、中でも、サイズ排除フィルター(例えば、ミリポア(Millipore)から入手でき

50

るような)を用いる遠心分離、高速液体クロマトグラフィーまたは逆相クロマトグラフィーなどを用いてその免疫グロブリンから単離する。

【0210】

免疫原性タンパク質はまた、あるいは、免疫グロブリンから解離させた後、例えば、密度勾配分画を用いてその免疫グロブリン含有画分または免疫グロブリンもしくはその混合物を含んでなるタンパク質複合体から分離する。密度勾配を用いる分画法は当技術分野で公知である。例えば、超遠心を用いてタンパク質を分離するが、これでは、サンプルを、例えば、5%~20%の範囲の直線的スクロース勾配に加え、次いで遠心分離する。したがって、タンパク質は遠心力、摩擦力および浮力に関係して分離される。免疫グロブリンは比較的大きなタンパク質であるので、このような方法を用いれば免疫原性タンパク質またはその断片から分離される。免疫グロブリンから分離した後、当技術分野で公知であり、かつ/または本明細書に記載の方法を用いて免疫原性タンパク質を解析する。

10

【0211】

本明細書に例示したように、変性電気泳動を用いて免疫原性タンパク質またはその断片を免疫グロブリン含有画分または免疫グロブリンもしくはその混合物を含んでなるタンパク質複合体から単離する。変性電気泳動は、前記のように実施するが、未変性条件化で実施するのではなく、タンパク質を変性させる試薬を、電気泳動ゲルとサンプル調製物中のいずれかまたは双方に含める。したがって、タンパク質サンプルを、例えば、界面活性剤(例えばSDS)、またはその他の変性剤(例えば2-メルカプトエタノール、DTTおよび/または熱)を用いて変性させる。

20

【0212】

例えば、当技術分野で公知であり、例えば、スコープス(プロテイン・プリフィケーション:プリンシプルス・アンド・プラクティス、第3版、スプリンガー・ベルラ格、1994中)に記載された方法を用いて、還元性一次元ゲル電気泳動を用いて免疫原性タンパク質を免疫グロブリンから単離する。この実施形態によれば、タンパク質はその分子量によって分離される。したがって、免疫グロブリンの重鎖および軽鎖の双方と分子量の異なる免疫原性タンパク質またはその断片は、この方法を用いれば容易に検出できる。

【0213】

もう1つの実施形態では、還元性二次元ゲル電気泳動を用いて免疫原性タンパク質を免疫グロブリンから単離する。この実施形態によれば、タンパク質は、例えば、その等電点または正味の電荷および分子量によって分離される。そのようなものとして、この方法は分子量および/または等電点が免疫グロブリン軽鎖または重鎖のものとは異なる免疫原性タンパク質またはその断片を決定するのに役立つ。

30

【0214】

2つの前記の実施形態のいずれかによれば、還元性電気泳動を用いて免疫原性タンパク質を免疫グロブリンから分離した後、当技術分野で公知であり、かつ/または本明細書に記載の方法を用いて免疫原性タンパク質を同定する。

【0215】

免疫グロブリンからの免疫原性タンパク質の解離または分離に関する前記の実施形態のいずれかによれば、単離された免疫原性タンパク質またはその断片を含んでなるサンプルを、さらなる解析の前に場合によっては濃縮することもある。タンパク質を濃縮する方法は当業者には公知であり、例えば、沈殿、凍結乾燥、漏斗管ゲルの使用(ターブッシュ(TerBush)およびノビック(Novick)、ジャーナル・オブ・バイオモレキュラー・テクニクス(Journal of Biomolecular Techniques)、10(3)、1999)、限外濾過または透析が挙げられる。

40

【0216】

免疫グロブリンからの解離を伴わない、免疫原性タンパク質の同定

本発明は、免疫グロブリン含有画分または免疫グロブリンもしくはその混合物を含んでなるタンパク質複合体から単離されていない、免疫原性タンパク質またはその断片の同定を提供する。

50

【0217】

例えば、当技術分野で公知であり、かつ/または本明細書に記載の方法を用いて免疫グロブリン含有画分を被験体由来の生体サンプルから単離し、プロテアーゼを用いてその免疫グロブリンのFc領域を切断する。例えば、パパイン、エラスターゼ、化膿性連鎖球菌由来のSpeBおよびEndoSおよびペプシンからなる群から選択されるプロテアーゼ。パパインとエラスターゼは双方とも、例えば、メルク(Merck)から市販されており、ペプシンはカルザイム・ラボラトリーズ(Calzyme Laboratories)、米国、カリフォルニア州、サンルイスオビスポから市販されている。

【0218】

この実施形態によれば、免疫原性タンパク質は免疫グロブリンの断片に結合されたままであり、この複合体を前記免疫グロブリンのFc領域から分離する。次いで、当技術分野で公知であり、かつ/または本明細書に記載の方法を用いてこのサンプルを解析する。 10

【0219】

あるいは、当技術分野で公知であり、かつ/または本明細書に記載の方法、例えば、非還元性または還元性一次元または二次元ゲル電気泳動などを用いて、免疫原性タンパク質および切断した免疫グロブリンをまず分離し、次いで、解析して免疫原性タンパク質の正体を決定する。

【0220】

免疫原性タンパク質またはその断片の同定

免疫グロブリン含有画分を含むか、免疫グロブリンを切断し、免疫原性タンパク質またはその断片を回収したかにかかわらず、免疫原性タンパク質またはその断片の捕獲および/または分離および/または単離に続いて、その免疫原性タンパク質を解析して前記タンパク質の正体を決定する。タンパク質の正体の決定においてタンパク質を解析する方法は当技術分野では公知であり、例えば、中でも、エドマン(Edman)配列決定、混合ペプチド配列決定、MALDI-TOF、ESIおよびイオントラップ分析をはじめとする質量分析からなる群から選択される方法が挙げられる。 20

【0221】

例えば、エドマン配列決定(本質的には、エドマン、アーカイブス・オブ・バイオケミストリー・アンド・バイオフィジックス(Archives of Biochemistry and Biophysics)、22、475~483頁、1949によって記載されたような)を用いて免疫原性タンパク質の正体を同定して、免疫原性タンパク質のN末端配列を決定し、この配列を既知の配列と比較する。このような方法は、免疫原性タンパク質またはその断片の正体を調べるのに有用である。エドマン配列決定の前に、免疫原性タンパク質またはその断片を夾雑分子、例えば、別のタンパク質などから分離することが好ましい。免疫原性タンパク質の単離に続いて、このタンパク質のアミノ末端を、塩基性条件下でフェニルイソチオシアネートを用いて誘導体化する。例えば、このステップで用いる塩基は非求核試薬、例えば、トリエチルアミンまたはジイソプロピルエチルアミンなどである。このカップリングステップにより、フェニルチオカルバミルペプチドまたはタンパク質が得られる。フェニルチオカルバミルペプチドまたはタンパク質のチオカルボニル機能は中程度の強さの求核試薬であり、酸性条件下で、隣接するペプチド結合のカルボニル炭素を切断する。この切断ステップの結果、末端アミノ酸のアニロチアゾリノンが生じ、最初のペプチドまたはタンパク質は1アミノ酸残基短くなる。末端アミノ酸のアニロチアゾリノンは、ペプチドまたはタンパク質とは異なる溶解特性を有する。そのようなものとして、抽出し、さらなる解析に付すことができる。短くなったペプチドまたはタンパク質は再び裸のアミノ末端を含み、結果として、さらなるカップリング、切断および抽出サイクルに付すことができる。 30 40

【0222】

しかしながら、抽出した末端アミノ酸のアニロチアゾリノンは安定ではない。酸性水性条件下では、アニロチアゾリノンは迅速に再構成し、より安定なフェニルチオヒダントインを形成し、これが解析を受け入れられる。次いで、安定なフェニルチオヒダントインを、例えば、UV吸収検出逆相高速液体クロマトグラフィーによって分析して末端アミノ酸 50

の正体を決定する。

【0223】

免疫原性タンパク質のN末端配列を決定した後、導いた配列が既知の配列と同一であるかどうか、または実質的に同一であるかどうかを調べるため、この配列を配列のデータベースと比較する。このようなデータベースは例えば、NCBIで利用できる。

【0224】

本明細書において、用語「NCBI」とは、米国政府の国立衛生研究所の国立医学図書館(National Library of Medicine)にある米国国立バイオテクノロジー情報センター(National Center for Biotechnology Information)、20894、メリーランド州、ベテスダのデータベースを意味すると取られるものとする。

10

【0225】

2つのアミノ酸配列が、前記の規定の同一性パーセンテージ限界内に収まるかどうかを調べる際には、当業者であれば、アミノ酸配列の並列比較を実施できるということを承知している。このような比較またはアラインメントでは、アラインメントを実施するために用いるアルゴリズムに応じて、同一でない残基の位置づけに相違が生じる。これに関連して、2以上のアミノ酸配列間の同一性および類似性パーセンテージとは、当業者に公知の何らかの標準的なアルゴリズムを用いて決定される、その配列間の、それぞれ同一および類似の残基の数を指すと取られるものとする。特に、アミノ酸同一性および類似性は、例えば、ニードルマン(Needleman)およびブンシュ(Wunsch)のアルゴリズム、ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー(Journal of Molecular Biology)48、443~453頁、1970を利用する、デベロー(Devereaux)ら、ヌクレイック・アシッツ・リサーチ(Nucleic Acids Research)、12、387~395頁、1984のGAPプログラムを用いる、コンピュータ・ジェネティクス・グループ社(Computer Genetics Group, Inc.)、米国、ウィスコンシン州、マディソン、ユニバーシティ・リサーチ・パーク(University Research Park)のソフトウェアを用いて算出する。あるいは、トンプソン(Thompson)ら、ヌクレイック・アシッツ・リサーチ22、4673~4680頁、1994のCLUSTAL Wアルゴリズムを用いて、複数の配列のアラインメントを得るが、これでは、アラインメント中の同一/類似残基の数を最大にし、配列ギャップの数および/または長さを最小にすることが必要であるか望まれる。アミノ酸配列アラインメントはまた、種々のその他の市販の配列解析プログラム、例えば、NCBIで入手できるBLASTプログラムなどを用いても実施できる。

20

30

【0226】

あるいは、デイマー(Damer)ら、ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー(Journal of Biological Chemistry)273、24396~24405頁、1998に記載される混合ペプチド配列決定を用いて免疫原性タンパク質またはその断片を同定する。この実施形態によれば、免疫原性タンパク質を臭化シアンまたはスカトールを用いてペプチドに切断し、これらのペプチドをエドマン配列決定法を用いて配列決定する。

【0227】

本明細書に例示するように、免疫原性タンパク質またはその断片を質量分析を用いて同定する。例えば、電気泳動を用いて免疫原性タンパク質を分離し、場合によっては、免疫原性タンパク質をプロテアーゼで消化し、次いで質量分析を用いて解析する。

40

【0228】

例えば、電気泳動を用いて免疫原性タンパク質を分離した後、このタンパク質を電気泳動を行ったゲル中で消化する。タンパク質、ペプチドまたはポリペプチドのインゲル消化により、他の方法、例えば、エレクトロブロットングなどよりも多くの前記タンパク質をゲルから回収できる。したがって、免疫原性タンパク質の量が増加することにより、前記タンパク質の解析が容易になる。インゲル消化法は当技術分野では公知であり、例えば、シェベンコ(Schevenko)ら、アナリティカル・ケミストリー(Analytical Chemistry)68、850~858頁、1997に記載されている。さらに、タンパク質のインゲル消化を容易にするキットが、例えば、ミリポア(Millipore)、米国、01821、マサチュー

50

セツ州、ピレリカから市販されている。

【0229】

あるいは、またはさらに、免疫原性タンパク質またはそのペプチドを精製し、場合によっては、濃縮し、次いでさらに分析する。例えば、逆相クロマトグラフィーを用いて免疫原性タンパク質またはそのペプチドを精製する。

【0230】

別の例では、免疫原性タンパク質を電気泳動するのではなく、免疫グロブリンから解離させたサンプルを解析に用いる。場合によっては、免疫原性タンパク質をプロテアーゼ、例えば、トリプシンなどで消化することで、免疫原性タンパク質またはその断片のペプチドの解析が容易になる。したがって、精製、および場合によっては濃縮後、このようなサンプルを質量分析によって解析する。

10

【0231】

免疫原性タンパク質またはそのペプチドを精製した後、サンプルをイオン化する。

【0232】

例えば、本質的には、例えば、フェン(Fenn)ら、サイエンス(Science)、246、64~71頁、1989またはウィルム(Wilm)ら、ネイチャー(Nature)、379、466~469頁、1996に記載されたように、エレクトロスプレーイオン化(ESI)を用いてサンプルをイオン化する。ESIのプロセスによって、マイクロキャピラリーチューブを通して、免疫原性タンパク質またはその断片を含んでなるサンプルを質量分析計に入れる。質量分析計のチャンパーおよびマイクロキャピラリーチューブ間の電位差によって、免疫原性タンパク質またはその断片を含んでなるサンプルが細かい霧として前記チューブから出される。この霧の中の液体(すなわち、タンパク質が懸濁されている液体)が蒸発すると、タンパク質またはそのペプチドが脱溶媒和される。したがって、タンパク質またはペプチドがイオンに変換される。

20

【0233】

あるいは、例えば、本質的には、例えば、カラス(Karas)およびヒレンカンプ(Hillenkamp)、アナリティカル・ケミストリー(Analytical Chemistry)60、2299~2301頁、1988によって記載されたように、マトリックス支援レーザー脱離/イオン化(MALDI)を用いてサンプルをイオン化する。例えば、免疫原性タンパク質またはその断片を含んでなるサンプルをマトリックス、例えば、*a*-シアノ-4-ヒドロキシ桂皮酸、3,5ジメトキシ-4-ヒドロキシ桂皮酸(シナピン酸)または2,5ジヒドロキシ安息香酸(ゲンチジン酸)などに加える。次いで、サンプルおよびマトリックスを金属板上にスポットし、レーザーによる照射に付し、分子イオンの形成を促す。当業者には明らかであろうが、この方法の変形、例えば、大気圧MALDIなどが本発明に包含されることは明確である。

30

【0234】

当業者には明らかであろうが、他の形態のイオン化、例えば、大気圧化学イオン化も本発明に包含されることは明確である。

【0235】

タンパク質またはそのペプチドをイオン化した後、これらの分子イオンの質量を解析する。

40

【0236】

例えば、本質的には、パーリングゲーム(Burlingame)ら、アナリティカル・ケミストリー70、675R~716Rおよび本明細書に引用された参考文献に記載されたように、四重極質量分析計または線形四重極を用いて分子イオンの質量を分析する。この方法では、*r f*および*d c*電圧が供給される、4つの金属製ロッドのアレイによって生じた電界を通してイオンを送る。この電圧によってイオンが振動するが、この振動周波数はイオンの*m/z*値に応じて変わる。安定した振動を示すイオン、すなわち、ロッドアセンブリー、振動周波数、*r f*電圧および*d c*電圧から決定される所与の*m/z*値を有するもののみをさらなる解析のために保持する。したがって、これによってペプチドまたはタンパク質の電

50

荷に対する質量の比 (m/z) の分析が容易になる。次いで、これを、例えば、イギリスのヒトゲノムマッピングプロジェクトリソースセンター (UK Human Genome Mapping Project Resource Centre) によって提供されるデータベース検索ソフトウェアなどを用いて分子量のライブラリーと比較する。

【0237】

複数の四重極の組合せを用いて、タンパク質またはペプチドのアミノ酸配列を決定する。

【0238】

あるいは、本質的には、クックス (Cooks) ら、ケミカル・アンド・エンジニアリング・ニュース (Chemical and Engineering News) 69、26、1991 に記載されたように、イオントラップ質量分析計を用いて分子イオンの質量を解析する。この分析形態は、四重極質量分析計の一形態であり、これでは電荷の発生器を線形様式ではなく3次元にアレイする。この実施形態によれば、ある m/z 比の分子イオンが3次元電界にトラップされる。イオントラップ質量分析計はまた、タンデム質量分析 (MS/MS) 実験においてペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質の配列を決定するのに有用である。MS/MS法は当技術分野では公知であり、かつ/または本明細書に記載されている。

【0239】

あるいは、またはさらに、本質的には、イエーツ (Yates)、ジャーナル・オブ・マス・スペクトロメトリー (Journal of Mass Spectrometry) 33、1~19頁、1998 および本明細書に引用した参考文献によって記載されたように、分子イオンの質量を、その飛行時間 (TOF) によって分析する。飛行時間機器は、イオンが飛行管の長さを通過するのに必要な時間を測定することによってその m/z 比を測定する。場合によっては、このような TOF 質量分析計は、飛行管の一方の末端に、前記イオンを反射して飛行管を通過して検出器へと戻すイオンミラーを含む。したがって、イオンミラーは飛行管の長さを増加させる働きをし、これによってこの分析形態の精度が増す。

【0240】

飛行時間分析はまた、ペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質の質量およびひいては推定配列を求めるのに有用である。

【0241】

本質的に米国特許第3,937,955号に記載されるようなフリーエ変換イオンサイクロトロン質量分析計もまた、本発明の方法を用いて単離した免疫原性タンパク質またはその断片の分析および同定に有用である。イオンサイクロトロンは、質量がわかっており、ある速度で磁界を通過して移動するイオンを固定磁界を用いて偏向させる。磁界強度がわかれば、 m/z 比を求めるにはイオンサイクロトロン周波数を測定することで十分である、すなわち、静磁場における質量対電荷比は、イオンサイクロトロン周波数によって独自に求められる。実際、静磁場はイオン質量を周波数アナログに変換する。

【0242】

例示した発明の内容から明らかであるように、質量分析計は、例えば、MS/MSを用いて、ペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質のアミノ酸配列を決定するのに有用である。例えば、注目するイオン (すなわち、イオン化した注目するペプチドまたはタンパク質) を質量分析計のチャンパー (「衝突用チャンパー」) 内を通過させ、ここでイオンがガス、例えば、窒素またはアルゴンなどと相互作用する。このガスとの相互作用によって、例えば、ペプチド主鎖内でイオンのフラグメンテーションが起こる。イオンの切断後、別の断片と一アミノ酸で質量の異なる得られた断片の質量分析をすることで、注目するイオンのアミノ酸配列を決定できる。すなわち、ただ1個のアミノ酸で異なるペプチド間の重量差を求めることによって、各アミノ酸の正体を調べる。ペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質のアミノ酸配列を分析するための質量分析計としては、例えば、三連四重極 (本質的には、ハント (Hunt) ら、プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ジ・ユナイテッド・ステイツ・オブ・アメリカ (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America) 83、

10

20

30

40

50

6233～6237頁、1986に記載されるような)、四重極TOF(本質的には、モリス(Morris)ら、ラピッド・コミュニケーションズ・イン・マス・スペクトロメトリー(Rapid Communications in Mass Spectrometry)10、889～896頁、1996に記載されるような)またはMALDI-QqTOF(本質的には、ロボダ(Loboda)ら、ラピッド・コミュニケーションズ・イン・マス・スペクトロメトリー14、1047～1057頁、2000に記載されるような)がある。

【0243】

次いで、場合によっては、いくつかの重複するイオンの配列をアSEMBルし、その結果、ある領域、またはさらに全ポリペプチドまたはタンパク質の配列を決定する。あるいは、各個々のイオンの配列をさらなる分析に用いる。

10

【0244】

少なくとも免疫原性タンパク質に由来するペプチドの配列を決定した後、この配列を配列のデータベースと比較して、導いた配列が既知の配列と同一であるかどうか、または実質的に同一であるかどうかを調べる。このようなデータベースは、例えば、NCBIまたはEXPASYまたはSwiss-Protで利用できる。さらに、質量分析計はまた、ペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質の質量も調べることができるので、この情報も、例えば、タンパク質質量ライブラリー、例えば、イギリスのヒトゲノムマッピングプロジェクトリソースセンターによって提供されるものなどと比較することによって免疫原性タンパク質を同定するのに有用である。

【0245】

本明細書において、用語「EXPASY」は、バーゼル大学、スイス、4056、バーゼルのスイス生命情報学研究所(Swiss Institute of Bioinformatics)のエキスパート・プロテイン・アナリシス・システムを意味すると取られるものとする。

20

【0246】

本明細書において、用語「Swiss-Prot」は、バーゼル大学、スイス、4056、バーゼルのスイス生命情報学研究所のタンパク質配列データベースを意味すると取られるものとする。

【0247】

生体分子相互作用解析質量分析計(BIA-MS)も、前記免疫グロブリンと結合している免疫原性タンパク質を検出および/または特性決定および/または同定するのに有用である(ネルソン(Nelson)ら、エレクトロフォレシス(Electrophoresis)21、1155～1163頁、2000)。

30

【0248】

あるいは、本発明の方法を用いて単離したタンパク質を、単離したタンパク質と特異的に結合できる抗体またはリガンドを用いて同定する。これについては、抗体および/またはリガンドチップが、タンパク質同定のための迅速解析に有用である。例えば、抗体アレイ(すなわち、380または500種の個別の抗体が、各々2連で、規定の領域に各々固定化されているガラススライド)をクローンテック(Clontech)から入手できる。このようなアレイを使用するためには、本発明の方法を用いて単離した免疫原性タンパク質またはその断片(免疫グロブリン含有画分または免疫グロブリンもしくはその混合物を含んでなるタンパク質複合体と結合しているかどうか)を、検出可能なマーカー、例えば、蛍光標識(例えば、Cy3またはCy5)で標識する。次いで、標識したタンパク質を抗体アレイと、抗原抗体相互作用が生じるのに十分な条件下で一定時間接触させる。次いで、アレイを洗浄し、結合している標識されたタンパク質をいずれも検出する。どの抗体にタンパク質が結合しているかを調べることによって、免疫原性タンパク質の正体を調べる。

40

【0249】

疾病または疾患を引き起こす病原体からの免疫原性タンパク質の同定

本発明はまた、被験体において疾病または疾患を引き起こす病原体の免疫原性タンパク質または免疫原性タンパク質断片の同定法を提供し、これは

(i) 疾病もしくは疾患を患っている被験体または以前に疾病もしくは疾患を患ったこ

50

とのある被験体またはその細胞、組織もしくは器官から、免疫グロブリンもしくはその混合物を含んでなるタンパク質複合体または免疫グロブリン含有画分を得ることと、

(i i) タンパク質複合体または免疫グロブリン含有画分中の免疫グロブリンを、疾病もしくは疾患を引き起こす病原体またはその誘導体を含んでなるサンプルと接触させることと、

(i i i) 抗原抗体相互作用によって前記免疫グロブリンと結合しているタンパク質またはその断片を同定することとを含んでなり、

同定されるタンパク質は、被験体において疾病または疾患を引き起こす病原体の免疫原性タンパク質または免疫原性タンパク質断片である。

10

【 0 2 5 0 】

当業者には明らかであろうが、本方法はまた、場合によっては、被験体からタンパク質複合体または免疫グロブリン含有画分を含んでなるサンプルを得ることを含んでなる。例えば、免疫グロブリン含有画分または免疫グロブリン含有画分もしくはその混合物を含んでなるタンパク質を含んでなるサンプル。適したサンプルは前述されており、本方法について準用されると取られるものとする。

【 0 2 5 1 】

免疫グロブリン含有画分または免疫グロブリンもしくはその混合物を含んでなるタンパク質複合体は、本明細書に記載の方法を用いて、例えば、サンプルを免疫グロブリンと結合可能な1種以上の化合物と、結合が生じるのに十分な条件下で一定時間接触させ、その化合物を単離することによって、被験体またはサンプルから単離するか、または得る。

20

【 0 2 5 2 】

事前に固体支持体、マトリックスまたは樹脂上に固定化した1種以上の免疫グロブリン結合性化合物を用いることで、免疫グロブリンもしくはその混合物を含んでなるタンパク質複合体または免疫グロブリン含有画分とそれに結合しているタンパク質もしくはその断片の単離が容易になる。さらに、このような固定化された免疫グロブリン結合性化合物によって、単離された固定化された化合物を洗浄して何らかの非特異的に結合しているタンパク質または結合していないタンパク質を除去することが容易になる。

【 0 2 5 3 】

例えば、本発明の方法は磁性または常磁性ビーズ上に固定化された1種以上の免疫グロブリン結合性化合物を用いて実施する。このビーズを生体サンプルと接触させることによって、サンプルを磁場または常磁場に曝露し、それによってビーズとそれに結合しているタンパク質を単離することによって、免疫グロブリンもしくはその混合物を含んでなるタンパク質複合体または免疫グロブリン含有画分を単離する。次いで、このビーズを場合によっては洗浄して何らかの非特異的に結合しているタンパク質または結合していないタンパク質を除去する。その結果、このビーズは免疫原性タンパク質を捕獲するのに有用である。

30

【 0 2 5 4 】

あるいは、免疫グロブリン結合性化合物を、例えば、アガロース上に固定化する。アガロースは分子量の大きい、比較的大きな分子であるので、遠心分離によって容易に単離される。したがって、免疫グロブリン結合性化合物が結合しているそのアガロースを、生体サンプル、例えば、本明細書に記載されたサンプルと接触させることによって、免疫グロブリンもしくはその混合物を含んでなるタンパク質複合体または免疫グロブリン含有画分を単離する。次いで、サンプルを遠心分離し、沈殿したアガロースを回収する。場合によっては、アガロースを洗浄して何らかの非特異的に結合しているタンパク質または結合していないタンパク質を除去し、再度回収する。その結果、免疫グロブリンもしくはその混合物を含んでなるタンパク質複合体または免疫グロブリン含有画分が結合しているこのようなアガロースは、その後のサンプルと接触させて免疫原性タンパク質を捕獲することにとって有用である。

40

【 0 2 5 5 】

50

本明細書に例示したように、本発明者らはセファロース上に固定した1種以上の免疫グロブリン結合性化合物(例えば、タンパク質Gまたはタンパク質A)を用いた。免疫グロブリン結合性化合物が結合しているセファロースを、免疫グロブリンもしくはその混合物を含んでなるタンパク質複合体または免疫グロブリン含有画分を含んでなるサンプル(例えば、血清)と、免疫グロブリン結合が生じるのに十分な条件下で一定時間接触させ、次いで、これを用いてカラムを作製する。このカラムにより免疫グロブリン結合性化合物の洗浄および/またはその後のサンプルの、結合している免疫グロブリンもしくはその混合物を含んでなるタンパク質複合体または免疫グロブリン含有画分との接触が容易になる。

【0256】

当技術分野で公知の化合物および/または方法、例えば、前記のものを用いて、免疫グロブリン結合性化合物(例えば、タンパク質Aおよび/またはタンパク質Gおよび/またはタンパク質L)を、免疫グロブリンもしくはその混合物を含んでなるタンパク質複合体または免疫グロブリン含有画分と場合によっては結合させる。

10

【0257】

場合によっては、当技術分野で公知であり、かつ/または前記の方法を用いて、免疫原性タンパク質またはその断片を免疫グロブリン含有画分から分離し、かつ/または単離する。次いで、当技術分野で公知であり、かつ/または前記の方法を用いて、免疫原性タンパク質を同定する。

【0258】

免疫グロブリンもしくはその混合物を含んでなるタンパク質複合体または免疫グロブリン含有画分が由来する被験体は、以前にまたはその時点で疾病または疾患を患っているの、その被験体には前記疾病または疾患を引き起こす病原体に対する抗体が生じている。これらの抗体(免疫グロブリン)により、免疫原性タンパク質またはその断片を疾病または疾患を引き起こす病原体から単離するのが容易になる。

20

【0259】

したがって、前記抗体(タンパク質複合体または免疫グロブリン含有画分の形の)を疾病もしくは疾患を引き起こす病原体またはその抽出物と接触させることによって、それに対して被験体が免疫応答を起こしたタンパク質またはその断片を単離および/または同定する。

【0260】

本明細書において、用語、疾病または疾患を引き起こす病原体の(または、に由来する)「抽出物」とは、前記病原体の1種以上の成分の調製物を意味すると取られるものとする。例えば、用語「抽出物」は前記病原体の細胞溶解物、細胞画分(例えば、細胞壁画分、膜画分、原形質画分、核画分またはミトコンドリア画分)または細胞のタンパク質抽出物(例えば、当技術分野で公知の方法を用いて、細胞を溶解し、画分を含むタンパク質を回収することによって得られる)を包含する。あるいは、またはさらに、用語「抽出物」はまた、病原体に由来する細胞の特定のサブセット(および/またはその抽出物)、例えば、癌由来の細胞集団、または病原菌、例えば、寄生生物由来の細胞集団を包含する。

30

【0261】

本発明の方法は、立体配座抗原(すなわち、タンパク質または断片の三次元構造によって形成された抗原)および/またはリニア抗原によって免疫グロブリンと結合しているタンパク質を同定するのに有用である。例えば、細胞の抽出物は、それに含まれるタンパク質の構造を保つような方法で調製する。すなわち、細胞抽出物是非変性条件下で調製する。このような方法は、立体配座エピトープまたはリニアエピトープのいずれかを同定するのに有用である。

40

【0262】

あるいは、サンプルを変性条件下で調製する。「変性された」または「変性」とは、タンパク質の立体配座エピトープがタンパク質のリニアB細胞エピトープを保持する条件下で破壊されることを意味する。例えば、細胞抽出物を分子内結合を破壊する温度に加熱するか、イオン性界面活性剤(例えば、ドデシル硫酸ナトリウム(SDS))で、および/

50

または解離剤（例えば、尿素またはメルカプトエタノール）で処理する。

【0263】

一実施例では、疾病または疾患は、感染性疾患または疾患、例えば、ウイルス、細菌、酵母、真菌および寄生生物からなる群から選択される病原体（このような感染性病原体は前述されている）による感染によって引き起こされる疾病または疾患である。したがって、このような病原体に感染した被験体は、その病原体に対して免疫応答を起している。免疫グロブリン画分または免疫グロブリンもしくはその混合物を含んでなるタンパク質複合体を、感染性病原体またはそれに由来する抽出物と接触させることによって、その病原体に由来する免疫原性タンパク質を同定する。このような免疫原性タンパク質は、前記病原体の診断および/または治療マーカーとして有用である。

10

【0264】

当業者には明らかであろうが、感染性生物から免疫原性タンパク質を決定するために本発明の方法を用いる場合には、前記感染性病原体の臨床分離株、例えば、細菌の臨床分離株を用いることが有利である場合がある。このような分離株は疾病および/または疾患と関連していることが知られており、感染性病原体が夾雑病原体を実質的に含まないことを確実にするよう培養（および/または単離）されている。

【0265】

本発明者らは、本発明の方法を用い、細菌（すなわち、結核菌）から、前記細菌による感染症を患っている被験体に由来する免疫グロブリン画分を用いて免疫原性タンパク質を同定した。

20

【0266】

本方法はまた、疾病または疾患を引き起こすその他の病原体から免疫原性タンパク質を同定するのに有用である。例えば、本発明の方法は、癌細胞から免疫原性タンパク質を決定するのに有用である。例えば、免疫グロブリン画分または免疫グロブリンもしくはその混合物を含んでなるタンパク質複合体を、癌を患っている被験体から得るか、単離し、その画分または複合体を、その癌を引き起こす細胞またはその抽出物と接触させる。その結果、本発明の方法を用いて同定した免疫原性タンパク質またはその断片は、その癌細胞の診断/予後および/または治療マーカーとして有用である。適した癌細胞の例としては、膀胱癌細胞、乳癌細胞、結腸直腸癌細胞、子宮内膜癌細胞、頭頸部癌細胞、白血病細胞、肺癌細胞、リンパ腫細胞、メラノーマ細胞、非小細胞肺癌細胞、卵巣癌細胞、前立腺癌細胞、急性リンパ性白血病細胞、成人急性骨髄性白血病細胞、成人非ホジキンリンパ腫細胞、脳腫瘍細胞、子宮頸癌細胞、小児肉腫細胞、慢性リンパ性白血病細胞、慢性骨髄性白血病細胞、食道癌細胞、ヘアリー細胞白血病細胞、腎臓癌細胞、肝臓癌細胞、多発性骨髄腫細胞、神経芽細胞腫細胞、口腔癌細胞、膵臓癌細胞、中枢神経系原発リンパ腫細胞、皮膚癌細胞および小細胞肺癌細胞からなる群から選択される癌細胞が挙げられる。

30

【0267】

本明細書に例示したように、本発明は卵巣癌または乳癌を研究して免疫原性タンパク質を同定するのに有用である。

【0268】

自己免疫状態からの免疫原性タンパク質またはその断片の同定

40

本発明は、自己免疫状態から、被験体において免疫応答を誘発可能な免疫原性タンパク質またはその断片を同定する方法をさらに提供し、この方法は

(i) 自己免疫状態に苦しんでいる被験体またはその細胞、組織もしくは器官から免疫グロブリンもしくはその混合物を含んでなるタンパク質複合体または免疫グロブリン含有画分を得ることと、

(ii) タンパク質複合体または免疫グロブリン含有画分中の免疫グロブリンを、自己免疫疾患を患っている被験体に由来するタンパク質を含んでなるサンプルと接触させることと、

(iii) 抗原抗体相互作用によって前記免疫グロブリンと結合しているタンパク質またはその断片を同定すること

50

とを含んでなり、

同定されるタンパク質は、自己免疫状態に由来する、被験体において免疫応答を誘発可能な免疫原性タンパク質またはその断片である。

【0269】

当業者には明らかであろうが、本方法は、場合によっては、被験体からタンパク質複合体または免疫グロブリン含有画分を含んでなるサンプルを獲得することをさらに含んでなる。例えば、免疫グロブリン含有画分またはタンパク質複合体を含んでなるサンプル。適したサンプルおよび免疫グロブリン画分または免疫グロブリンもしくはその混合物を含んでなるタンパク質複合体は前述されており、本方法に準用されると取られるものとする。

【0270】

例えば、橋本病、全身性エリテマトーデス、シューグレン病、抗リン脂質症候群、原発性胆汁性肝硬変、混合性結合組織病、慢性活性肝炎、グレーブス病、I型糖尿病、慢性関節リウマチ、強皮症、重症筋無力症、多発性硬化症および慢性特発性血小板減少性紫斑病からなる群から選択される自己免疫疾患を患っている被験体からサンプルを得る。

【0271】

免疫グロブリン含有画分またはタンパク質複合体は、本明細書に記載の方法を用いて、例えば、サンプルを免疫グロブリンと結合可能な1種以上の化合物と、結合が生じるのに十分な条件下で一定時間接触させ、その化合物を単離することによって、被験体またはサンプルから単離するか、得る。免疫グロブリン含有画分または免疫グロブリンもしくはその混合物を含んでなるタンパク質を単離する方法および/または化合物は、前述されており、本方法に準用されると取られるものとする。

【0272】

場合によっては、免疫グロブリン結合性化合物（例えば、タンパク質Aおよび/またはタンパク質Gおよび/またはタンパク質L）を、当技術分野で公知の化合物および/または方法、例えば、前述したものをを用いてタンパク質複合体または免疫グロブリン含有画分と結合させる。

【0273】

被験体は自己免疫状態に苦しんでいるので、彼らは、自己抗原（例えば、タンパク質またはその断片）を特異的に認識する抗体を産生したか、抗体を生じている。「自己抗原」とは、被験体が、被験体内に生じるか、被験体によって産生される抗原（例えば、タンパク質またはその断片）と結合可能な抗体を生じていることを意味する。このような抗体（免疫グロブリン含有画分または免疫グロブリンもしくはその混合物を含んでなるタンパク質複合体の形態の）は、それに対して被験体が免疫応答を起こしている免疫原性タンパク質またはタンパク質断片を単離および/または同定するのに有用である。このような免疫原性タンパク質または断片は、自己免疫疾患にとって魅力的な治療および/または診断/予後標的に相当する。

【0274】

本発明は、自己免疫疾患から免疫原性タンパク質を単離および/または決定するのに有用である。例えば、自己免疫疾患は関節リウマチ、多発性硬化症、I型糖尿病、炎症性腸疾患、クローン病、潰瘍性大腸炎、全身性エリテマトーデス、乾癬、強皮症、自己免疫甲状腺疾患、中枢神経系脈管炎、および自己免疫筋炎からなる群から選択される。このような疾病または疾患の臨床症状は、1種以上の自己抗原に対する被験体の自己免疫応答によって引き起こされる。例えば、膵島細胞に対する自己免疫応答は、これらの細胞を死滅させ、それによってインスリンの産生が抑制され、I型糖尿病を引き起こす。

【0275】

本発明はまた、疾病または疾患に由来する自己免疫成分から免疫原性タンパク質を単離および/または同定するのに有用である。例えば、炎症状態に苦しんでいる被験体には、炎症応答の成分である1種以上のタンパク質と結合する自己抗体が生じる。

【0276】

したがって、本発明の方法は、それに対してかかる被験体が抗体を生じている免疫原性

10

20

30

40

50

タンパク質またはその断片を決定するのに有用である。例えば、本発明者らは本発明の方法を用いて、嚢胞性繊維症を患う被験体において免疫原性タンパク質を同定している。問題の被験体は急性臨床増悪、例えば、細菌（例えば、黄色ブドウ球菌、緑膿菌、インフルエンザ菌、アスペルギルス・フミガーツス、セパシア菌複合体、ステノトロホモナス・マルチフィラ、アルカリゲネス(アクロモバクター)・キシロソキシダンス、B. グラディオリおよびラルストニア・ピクティーからなる群から選択される細菌）感染によって引き起こされた急性臨床増悪を以前に起こした、かつ/または起こしていた。このような急性臨床増悪は炎症応答を特徴とし、これはいくらかのCF被験体では自己免疫応答の発生と関連があるとわかっている。

【0277】

免疫グロブリン含有画分または免疫グロブリンもしくはその混合物を含んでなるタンパク質複合体を含むサンプルを、免疫原性タンパク質またはその断片を含んでなる生体サンプル、例えば、前述した生体サンプルと接触させる。例えば、このような生体サンプルは自己免疫状態に苦しんでいる被験体、例えば、免疫グロブリン含有画分または免疫グロブリンもしくはその混合物を含んでなるタンパク質複合体を得た、または単離した被験体と同一の自己免疫状態に苦しんでいる被験体から得る。例えば、免疫グロブリン含有画分または免疫グロブリンもしくはその混合物を含んでなるタンパク質複合体と生体サンプルを同一の被験体から得る。

【0278】

本明細書に例示したように、本発明者らは免疫グロブリン含有画分または免疫グロブリンもしくはその混合物を含んでなるタンパク質複合体を、急性臨床増悪を起こしている1以上の被験体から得、このサンプルを急性臨床増悪を起こしている1以上のCF被験体から得た痰サンプルと接触させた。この方法を用いて、急性臨床増悪を起こしているCF被験体がそれに対して免疫応答を起こしているいくつかのタンパク質を単離した。

【0279】

あるいは、サンプルは被験体が免疫応答を起こしていると思われるタンパク質またはその断片を含んでなる細胞またはその抽出物を含んでなる。例えば、I型糖尿病を患っている被験体から得た、免疫グロブリン含有画分または免疫グロブリンもしくはその混合物を含んでなるタンパク質複合体を、臍島細胞またはその抽出物と接触させる。

【0280】

場合によっては、当技術分野で公知であり、かつ/または前述した方法を用いて、免疫原性タンパク質またはその断片を免疫グロブリン含有画分から分離し、かつ/または単離する。次いで、当技術分野で公知であり、かつ/または前述した方法を用いて、免疫原性タンパク質を同定する。

【0281】

免疫原性タンパク質またはその断片を同定するための被験体の免疫化

本発明は被験体において免疫応答を誘発可能な免疫原性タンパク質またはその断片を同定する方法をさらに提供し、この方法は、

(i) 免疫原性タンパク質またはその断片を含んでなる、細胞または細胞抽出物またはその混合物を含んでなるサンプルを事前に投与された被験体に由来するか、被験体によって産生されたサンプルから、免疫グロブリンもしくはその混合物を含んでなるタンパク質複合体または免疫グロブリン含有画分を得ることと、

(ii) タンパク質複合体または免疫グロブリン含有画分を、細胞または細胞抽出物またはその混合物を含んでなるサンプルと接触させることと、

(iii) 抗原抗体相互作用によってタンパク質複合体または免疫グロブリン含有画分中の免疫グロブリンと結合しているタンパク質またはその断片を同定することとを含んでなり、

それによって被験体において免疫応答を誘発可能な免疫原性タンパク質またはその断片を同定する。

【0282】

10

20

30

40

50

場合によっては、本方法は細胞または細胞抽出物を被験体に投与することをさらに含んでなる。例えば、被験体を細胞または細胞抽出物で免疫する。細胞または細胞抽出物を被験体に投与する方法は当技術分野では公知である。例えば、細胞または細胞抽出物を、経口、吸入によって、経皮投与、局所投与によって、または注入（例えば、腹腔内注射、筋肉注射、皮下注射または静脈注射または点滴）によって投与する。本明細書に例示したように、注入によって投与される、細胞または細胞抽出物またはその混合物は、その細胞または細胞抽出物またはその混合物に対する免疫グロブリンの産生を誘導するのに有用である。

【0283】

細胞または細胞溶解物を投与するのに適した被験体は前述されており、例えば、マウス、ラット、ウサギ、ニワトリ、イヌ、ヒツジ (sheep)、ヒツジ (ovine)、ウマおよびヤギからなる群から選択される被験体が挙げられる。本明細書に例示したように、本発明者らは、ニワトリを免疫して細胞抽出物に対する免疫応答を誘導し、その抽出物から免疫原タンパク質を同定した。さらに、実施例に記載したように、マウスは本発明の方法に有用であり、例えば、マウスを細胞または細胞抽出物で免疫し、免疫グロブリンを、例えば、免疫したマウスの血清から単離する。

10

【0284】

当業者には明らかであろうが、細胞または細胞抽出物またはその混合物を、例えば、被験体に投与し、被験体に十分な時間を与え、前記細胞または細胞抽出物またはその混合物と結合する免疫グロブリンを産生させる。場合によっては、1回以上のブースター免疫または投与を組み込んでいる所定のスケジュールに従って、細胞または細胞抽出物を被験体に投与するか、それで免疫する。このようなスケジュールは、細胞または細胞抽出物またはその混合物に対するより強力な抗体（すなわち、免疫グロブリン）応答を引き起こすのに役立つ。

20

【0285】

場合によっては、本発明の方法は、細胞または細胞抽出物またはその混合物中の免疫原性タンパク質と結合可能な免疫グロブリンを産生している被験体を決定することをさらに含んでなる。サンプル中の抗体または免疫グロブリンの存在を調べる方法は当技術分野では公知であり、例えば、中でも、酵素結合免疫吸着測定法 (ELISA)、ラジオイムノアッセイ (RIA) またはその改変、バイオセンサー技術またはエバネッセントファイバー光学技術が挙げられる。

30

【0286】

例えば、標準的な固相 ELISA 形式は、被験体から得た、または被験体によって産生されたサンプル中の細胞または細胞抽出物と結合可能な免疫グロブリンの存在を調べるのに有用である。

【0287】

一形態では、このようなアッセイは、細胞または細胞抽出物を固体マトリックス、例えば、ポリスチレンまたはポリカーボネートマイクロウェルまたはディップスティック、メンブラン、またはガラス製支持体（例えば、ガラススライド）などの上に固定化することを含む。

40

【0288】

被験体由来の、または被験体によって産生されたサンプルを、固定化した生体サンプルと直接接触させると、前記細胞または細胞抽出物と結合可能な免疫グロブリンのいずれかが、前記サンプル中に存在するその標的タンパク質のいずれかと直接結合を形成する。

【0289】

次いで、標識した抗体を用いて、結合された免疫グロブリンを検出する。適した標識としては、例えば、蛍光標識（例えば、FITC またはテキサスレッド）、蛍光半導体ナノ結晶（米国特許第 6,306,610 号に記載されたような）、または酵素（例えば、西洋わさびペルオキシダーゼ (HRP)、アルカリホスファターゼ (AP) または - ガラクトシダーゼが挙げられる。例えば、ニワトリサンプルから捕獲または単離された免疫

50

グロブリンを、抗ニワトリ抗体を用いて検出する。あるいは、二次（検出）抗体と結合する三次標識抗体を使用できる。洗浄して何らかの結合してない抗体を除去した後、標識を蛍光標識の場合には直接、または適した基質、例えば、過酸化水素、TMB、トルイジン、または5-プロモ-4-クロロ-3-インドール-D-ガラクトピラノシド(x-gal)などの添加を介してのいずれかで検出する。適した基質は、用いるリポーター分子に応じて変わるが、当業者には明らかである。

【0290】

適した細胞または細胞抽出物は前述されており、例えば、疾病または疾患を引き起こす病原体、例えば、感染性生物（例えば、ウイルス、細菌、酵母、真菌および寄生生物からなる群から選択される生物）または癌細胞（例えば、卵巣癌細胞もしくは乳癌細胞）が挙げられる。このような病原体は前述されており、本方法に準用されると取られるものとする。

10

【0291】

本発明の方法は、細胞および/または細胞抽出物中またはそれら上の抗原に対して産生されている免疫グロブリンを利用するので、その細胞および/または細胞抽出物の場合によっては、病原体または免疫応答を増強する化合物とともに投与する。例えば、細胞または細胞抽出物を、アジュバントとともに投与して細胞または細胞抽出物に対する免疫応答を増大させる。免疫学的応答を増大させるために用いるアジュバントは、宿主種に応じて変わり、例えば、フロイントのアジュバント（完全または不完全）、水酸化アルミニウムなどの無機ゲル、リゾレシチンなどの表面活性物質、プルロニック・ポリオール、ポリアニオン、ペプチド、オイルエマルジョン、キーホールリンペットヘマシアニンおよびジニトロフェノールが挙げられる。その他の有用である可能性のあるアジュバントとしては、BCG（カルメット-ゲラン桿菌）およびコリネバクテリウム・パルヴムが挙げられる。

20

【0292】

当業者には明らかであろうが、細胞または細胞抽出物は、場合によっては組成物の形態で投与する。例えば、投与する細胞または細胞抽出物を含んでなる適当な組成物は、生理学的に許容されるビヒクルまたは担体中で調製することができる。溶液またはエマルジョンに適した担体としては、例えば、生理食塩水および緩衝媒体をはじめとする、水性またはアルコール性/水性溶液、エマルジョンまたは懸濁液が挙げられる。非経口ビヒクルとしては、例えば、塩化ナトリウム溶液、リンガーのデキストロース、デキストロースと塩化ナトリウム、乳酸化リンガー液または揮発性油が挙げられる。静脈内ビヒクルとしては、種々の添加剤、保存料、または液体、栄養および電解質補給剤などが挙げられる（一般的には、レミングトンズ・ファーマシューティカル・サイエンシズ(Remington's Pharmaceutical Sciences)、第17版、マックパブリッシング社(Mack Publishing Co.)、ペンシルバニア州、1985参照)。吸入には、薬剤を可溶化し、投与に適したディスペンサー（例えば、アトマイザ、噴霧器または加圧型エアロゾルディスペンサー）に入れることができる。前述したように、このような組成物は、場合によっては、アジュバントを含む。

30

【0293】

当業者には明らかであろうが、本方法は場合によっては、被験体に由来するサンプルを得ることをさらに含んでなる。例えば、免疫グロブリン含有画分または免疫グロブリンもしくはその混合物を含んでなるタンパク質を含んでなるサンプル。適したサンプルおよび免疫グロブリン画分または免疫グロブリンもしくはその混合物を含んでなるタンパク質複合体は、前述されており、本方法に準用されると取られるものとする。

40

【0294】

あるいは、タンパク質複合体または免疫グロブリン含有画分を単離するサンプルは、被験体によって産生される。例えば、被験体によって産生されるサンプルとしては、鳥類によって産生される卵、胚または胎児が挙げられる。例えば、本発明者らは、ニワトリを細胞または細胞抽出物で免疫し、そのニワトリが産んだ卵を回収し、卵からその免疫グロブ

50

リンもしくはその混合物を含んでなるタンパク質またはその免疫グロブリン含有画分を単離した。

【0295】

産生されたサンプルから、タンパク質複合体または免疫グロブリン含有画分を単離するのに適した被験体としては、鳥綱のものがある。すべてのトリ類（例えば、中でも、アヒル、ダチョウ、エミュー、シチメンチョウ、ニワトリ）が考慮される。好ましいトリとしては、ニワトリがある。鳥類、例えば、ニワトリにおいて免疫グロブリンを産生する方法は当技術分野では公知であり、例えば、A. A. ベネディクト(Benedict)およびK. ヤマカ(Yamaqa)、コンパラティブ・イムノロジー、(J. J. マーカロニ(Marchaloni)編)、第13章、「イムノグロブリンズ・アンド・アンチボディー・プロダクション・イン・エイビアン・スピーシーズ(Immunoglobulins and Antibody Production in Avian Species)」、335~375頁、ブラックウェル、オックスフォード(1966)に記載されている。

10

【0296】

産卵鶏は、血清中に見られるものと同等またはそれを上回る濃度の免疫グロブリンを卵黄に送り出し（例えば、IgY）(R. パターソン(Patterson)ら、ジャーナル・オブ・イムノロジー(Journal of Immunology)、89:272、1962)、卵は免疫グロブリンもしくはその混合物を含んでなるタンパク質またはその免疫グロブリン含有画分を単離するための魅力的な供給源に相当する。卵から免疫グロブリンを単離する方法は当技術分野では公知であり、通常、例えば、機械的手段または電気泳動を用いて卵白から卵黄を分離することを含んでなる。次いで、場合によっては、卵黄を破壊し、希釈し、前述した方法を用いて、免疫グロブリンもしくはその混合物を含んでなるタンパク質またはその免疫グロブリン含有画分を単離する。当業者には明らかであろうが、このような方法でIgYを単離する。

20

【0297】

あるいは、US SN 20020028917に記載された方法を用いて、免疫グロブリンもしくはその混合物を含んでなるタンパク質またはその免疫グロブリン含有画分を単離する。

【0298】

本明細書に記載された方法を用いて、例えば、サンプルを免疫グロブリン含有画分と結合可能な1種以上の化合物と、結合が生じるのに十分な条件化で一定時間接触させ、結合している免疫グロブリンを含む化合物を単離することによって、被験体または被験体由来するか、被験体によって産生されたサンプルから、免疫グロブリン含有画分またはタンパク質複合体を単離するか、または得る。免疫グロブリン含有画分または免疫グロブリンもしくはその混合物を含んでなるタンパク質を単離する方法および/または化合物は前述されており、本方法に準用されると取られるものとする。

30

【0299】

免疫グロブリン結合性化合物（例えば、タンパク質Aおよび/またはタンパク質Gおよび/またはタンパク質L）は、場合によっては、当技術分野で公知の化合物および/または方法、例えば、前述されたものを用いて、免疫グロブリンもしくはその混合物を含んでなるタンパク質複合体または免疫グロブリン含有画分と結合させる。

40

【0300】

場合によっては、当技術分野で公知であり、かつ/または前述した方法を用いて、免疫原性タンパク質またはその断片を免疫グロブリン含有画分から分離し、かつ/または単離する。次いで、当技術分野で公知であり、かつ/または前述した方法を用いて、免疫原性タンパク質を同定する。

【0301】

本方法は、例えば、疾病または疾患を引き起こす病原体に由来する免疫原性タンパク質を、その疾病または疾患の診断用/予後用または治療用として使用するために、決定するのに有用である。例えば、本方法は、非ヒト動物を免疫された被験体として用いて疾病ま

50

たは疾患を引き起こす病原体に由来する免疫原性タンパク質を決定するのに有用である。

【0302】

あるいは、本方法は被験体において免疫応答を誘発可能なタンパク質またはその断片を含んでなる、何らかの細胞または細胞抽出物から免疫原性タンパク質を同定するのに有用である。例えば、本方法は、被験体がそれに対して自己免疫応答を起こしている癌細胞または細胞から、免疫原性タンパク質を同定するのに有用である。

【0303】

本方法の一実施例では、免疫グロブリンもしくはその混合物を含んでなるタンパク質複合体またはその免疫グロブリン含有画分と接触させる、細胞または細胞抽出物またはその混合物を含んでなるサンプルを、細胞または細胞抽出物を含んでなる被験体から得る。例えば、細胞または細胞抽出物を、疾病または疾患を引き起こす病原体から得、細胞または細胞抽出物またはその混合物を含んでなるサンプルを、疾病または疾患を患っている被験体から得る。したがって、免疫グロブリン画分を、細胞または細胞抽出物で免疫された被験体に由来するか、被験体によって産生されたサンプルから単離し、その免疫グロブリン画分を用いて、細胞または細胞抽出物を含んでなる被験体から免疫原性タンパク質または断片を単離する。免疫した被験体と、細胞または細胞抽出物を含んでなる被験体とは、場合によっては、同一被験体ではない。例えば、免疫グロブリン画分を、細胞または細胞抽出物で免疫したニワトリの卵から単離し、次いで、これを用いて、細胞または細胞抽出物を含んでなるヒト被験体に由来するサンプル中の免疫原性タンパク質を同定する。

10

【0304】

このような方法は、例えば、感染性病原体である、疾病または疾患を引き起こす病原体から免疫原性タンパク質を同定するのに有用である。例えば、感染性病原体は、ウイルス、細菌（例えば、結核菌）、酵母、真菌および寄生生物からなる群から選択される。

20

【0305】

同定された免疫原性タンパク質の数および/または量の増大

本発明の方法は、種々の供給源のいずれか、例えば、疾病または疾患または自己免疫疾患を引き起こす病原体などから免疫原性タンパク質を同定するのに有用である。本発明者らは、反復して、免疫グロブリン画分または免疫グロブリンもしくはその混合物を含んでなるタンパク質複合体から免疫原性タンパク質またはその断片を分離し、免疫グロブリン画分を生体サンプル（例えば、最初に接触させたサンプル）と接触させることによって、同定されるタンパク質の数および/または回収されるタンパク質の量が増大することをさらに見出した。

30

【0306】

したがって、本発明は、

(a) 被験体に由来するサンプルを免疫グロブリンと結合可能な1種以上の化合物と、結合が生じるのに十分な条件下で一定時間接触させ、1種以上の化合物を単離することを含んでなる方法によって、免疫原性タンパク質もしくはその断片またはその細胞、組織もしくは器官に対して免疫応答を起こしている被験体から免疫グロブリンもしくはその混合物を含んでなるタンパク質複合体または免疫グロブリン含有画分を得ることと、

40

(b) タンパク質複合体または免疫グロブリン含有画分中の免疫グロブリンを1種以上の化合物と結合させることと、

(c) 結合している免疫グロブリンから免疫原性タンパク質またはその断片を分離することと、

(d) 免疫原性タンパク質またはその断片を含んでなるサンプルを、結合している免疫グロブリンと接触させることと、

(e) 免疫原性タンパク質またはその断片を、結合している免疫グロブリンから分離することと、

(f) 場合によっては、(d) および (e) を1回以上反復することと、

(g) 免疫グロブリンから分離したタンパク質またはその断片を同定することとを含んでなり、

50

それによって免疫原性タンパク質またはその断片を同定する方法をさらに提供する。

【0307】

もう1つの形態では、本発明の方法は、

(a) 被験体に由来するサンプルを免疫グロブリンと結合可能な1種以上の化合物と、結合が生じるのに十分な条件下で一定時間接触させ、1種以上の化合物を単離することを含んでなる方法によって、免疫原性タンパク質またはその断片に対して免疫応答を起こしている被験体によって産生されたサンプルから、免疫グロブリンもしくはその混合物を含んでなるタンパク質複合体または免疫グロブリン含有画分を得ることと、

(b) タンパク質複合体または免疫グロブリン含有画分中の免疫グロブリンを1種以上の化合物と結合させることと、

(c) 結合している免疫グロブリンから免疫原性タンパク質またはその断片を分離することと、

(d) 免疫原性タンパク質またはその断片を含んでなるサンプルを、結合している免疫グロブリンと接触させることと、

(e) 免疫原性タンパク質またはその断片を、結合している免疫グロブリンから分離することと、

(f) 場合によっては、(d)および(e)を1回以上反復することと、

(g) 免疫グロブリンから分離したタンパク質またはその断片を同定することとを含んでなり、

それによって免疫原性タンパク質またはその断片を同定する方法を提供する。

【0308】

本方法の一形態では、(e)免疫原性タンパク質またはその断片を、結合している免疫グロブリンから分離することを、(d)免疫原性タンパク質またはその断片を含んでなるサンプルを、結合している免疫グロブリンと接触させることの前に実施する。

【0309】

本発明のもう1つの形態では、(d)免疫原性タンパク質またはその断片を含んでなるサンプルを、結合している免疫グロブリンと接触させることを、(e)免疫原性タンパク質またはその断片を、結合している免疫グロブリンから分離することの前に実施する。

【0310】

(d)免疫原性タンパク質またはその断片を含んでなるサンプルを、結合している免疫グロブリンと接触させることと(e)免疫原性タンパク質またはその断片を、結合している免疫グロブリンから分離することを、1種以上の免疫原性タンパク質を同定するのに十分な回数反復することが好ましい。例えば、(d)免疫原性タンパク質またはその断片を含んでなるサンプルを、結合している免疫グロブリンと接触させることと、(e)免疫原性タンパク質またはその断片を、結合している免疫グロブリンから分離することを、1種以上のタンパク質またはその断片を、ゲル電気泳動、例えば、二次元ゲル電気泳動を用いてゲル上で区別するのに十分な回数反復する。

【0311】

本方法の一実施例では、被験体は疾病または疾患を引き起こす病原体に対して免疫応答を起こしている。この実施例によれば、結合している免疫グロブリンと接触させる、免疫原性タンパク質またはその断片を含んでなるサンプルは、疾病もしくは疾患を引き起こす病原体またはその誘導体を含んでなる。

【0312】

例えば、疾病または疾患を引き起こす病原体は感染性病原体、例えば、細菌、例えば、結核菌である。

【0313】

もう1つの実施例では、被験体は自己免疫状態に苦しんでいる。この実施例によれば、結合している免疫グロブリンと接触させる、免疫原性タンパク質またはその断片を含んでなるサンプルは、自己免疫状態に苦しんでいる被験体に由来するタンパク質を含んでなる。

10

20

30

40

50

【0314】

さらにもう1つの実施例では、被験体は、免疫原性タンパク質またはその断片を含んでなる、細胞またはその抽出物またはその混合物を含んでなるサンプルで事前に免疫されている。この実施例によれば、結合している免疫グロブリンと接触させる、免疫原性タンパク質またはその断片を含んでなるサンプルは、細胞またはその抽出物を含んでなる。一形態では、被験体はニワトリである。

【0315】

本方法の例示的形態では、被験体は、疾病または疾患と関連のある病原体、例えば、感染性病原体、例えば、細菌に由来する細胞または細胞抽出物で事前に免疫されている。一実施例では、細菌は結核菌である。

10

【0316】

本明細書に例示したように、免疫原性タンパク質またはその断片と、免疫グロブリンもしくはその混合物を含んでなるタンパク質複合体または免疫グロブリン画分中の免疫グロブリンを分離することを反復するというプロセスを、免疫原性タンパク質が同定されるまで反復する。あるいは、またはさらに、このプロセスを、十分な数の免疫原性タンパク質または免疫原性タンパク質断片が同定されるまで反復する。

【0317】

前述の議論から明らかなように、本発明の方法は、免疫グロブリン画分から免疫原性タンパク質または断片を溶出または分離することと、免疫グロブリン画分を生体サンプルと再度接触させることとを含んでなる。この方法を免疫原性タンパク質を同定するのに必要な回数だけ反復する。例えば、この方法を少なくとも2回、または3回、または4回、または5回、または6回、または7回、または8回または9回反復する。例えば、免疫グロブリン画分から溶出されるか分離された、免疫原性タンパク質または断片を含んでなるサンプルの各々を合わせるか、プールし、それによってサンプル中のタンパク質レベルを高める。場合によっては、本発明のプロセスは、このようなプールされたサンプルを濃縮することをさらに含んでなる。

20

【0318】

サンプルから免疫原性タンパク質または断片を反復して捕獲および溶出することによって、高レベルの前記タンパク質または断片が単離され、これによって免疫原性タンパク質または断片の同定が容易になる。

30

【0319】

さらに、本発明者らは、免疫グロブリンから免疫原性タンパク質を反復して分離することと、免疫グロブリンを、例えば、感染性生物に由来するサンプルと接触させることとによって、感染性生物由来のプロフィールと実質的に似ているタンパク質のプロフィール（例えば、ゲル電気泳動、例えば、2次元ゲル電気泳動を用いて決定されるような）が得られることを見出した。

【0320】

場合によっては、本発明の方法は、例えば、ゲル電気泳動、例えば、二次元ゲル電気泳動によって、抗原抗体相互作用によって免疫グロブリン含有画分と結合していたタンパク質を単離することをさらに含んでなる。したがって、免疫グロブリン画分を生体サンプルと反復して接触させ、結合しているタンパク質を分離するステップを、ゲル電気泳動または二次元ゲル電気泳動を用いて、1種以上の免疫原性タンパク質を区別するのに十分な回数反復することが好ましい。

40

【0321】

本発明の方法を用いて単離されたタンパク質を同定する方法は、当技術分野では公知であり、かつ/または前述されており、例えば、マトリックス支援レーザー脱離/イオン化飛行時間型質量分析(MALDI-TOF MS)がある。

【0322】

本発明者らは、前述のプロセスを用いて、ヒト疾病と関連のある感染性生物から、および自己免疫状態から、いくつかのタンパク質を同定した。

50

【0323】

さらに、本発明者らは、免疫グロブリン画分を生体サンプルと接触させるプロセスを反復することによって、ゲル上に観察され、同定されるタンパク質数と、各タンパク質の量の双方が増加することを示した。本明細書に記載したプロセスが、サンプルから同定される標的タンパク質またはその断片の量および数の増幅において利点を提供することは明確である。

【0324】

本発明の方法を用いて同定されたタンパク質の使用

本発明の方法は免疫原性タンパク質またはタンパク質の断片を同定するのに有用であるので、本方法によって、疾病もしくは疾患の診断/予後に有用な疾病もしくは疾患のマー

10

【0325】

したがって、本発明は状態のマーカ-を同定するプロセスにおける本発明の方法の使用を提供する。

【0326】

さらに、本発明は状態、例えば、疾病または疾患、例えば、感染性疾病または癌または自己免疫状態などの診断における本発明の方法の使用を提供する。

【0327】

例えば、本発明者らは、緑膿菌感染症を患っている被験体において緑膿菌タンパク質 G r o E S に対する抗体が検出可能であり、他方、このような抗体は健常な対照被験体には存在しないことがわかった。

20

【0328】

本発明は、本発明の方法を実施することと、疾病または疾患と関連のある病原体から免疫原性タンパク質を同定することと、前記疾病または疾患を治療するために有効量の化合物を投与することとを含んでなる、治療または予防方法をさらに提供する。

【0329】

あるいは、免疫原性タンパク質またはその断片を、予防的治療の一形態として、例えば、ワクチン組成物中の抗原として用いることもできる。

【0330】

したがって、本発明は、疾病または疾患と関連のある病原体から免疫原性タンパク質または断片を同定する方法を実施することと、免疫原性タンパク質または断片を含んでなるワクチンを製造することとを含んでなるワクチンの製造方法をさらに提供する。

30

【0331】

このようなワクチンは、例えば、アジュバントを含んでなる。適したアジュバントは当技術分野で公知であり、かつ/または本明細書に記載されている。本発明の一形態では、ワクチンは同定された免疫原性タンパク質または断片と、場合によってはアジュバントとを含んでなる組成物である。このような組成物の成分は当技術分野で公知であり、かつ/または本明細書に記載されている。

【0332】

本発明は、

40

(i) 本明細書に記載した方法を用いて免疫原性タンパク質またはその断片を決定することと、

(i i) 状態の診断または予防または治療のための化合物の製造において免疫原性タンパク質またはその断片を用いること

とを含んでなる、状態の診断または治療または予防のための化合物または組成物の製造方法をさらに提供する。

【0333】

例えば、本方法は、免疫原性タンパク質またはその断片を単離するさらなるステップを含んでなる。

【0334】

50

本発明は、イン・シリコ分析法および/または本明細書に記載したスクリーニング法をこのようなスクリーニングで同定された化合物または組成物のパイロットスケール製造または工業規模の製造へ移行するための工業プロセスにおける何らかの使用を明確に包含する。本発明はまた、何らかのこのような製造に関する情報の提供を提供する。したがって、本発明は、免疫原性タンパク質または断片または前記の組成物を同定または決定する方法をさらに提供し、この方法は、

(i) 本明細書に記載された方法を実施し、それによって免疫原性タンパク質または断片を同定することと、

(ii) 場合によっては、タンパク質またはその断片の構造を決定することと、

(iii) タンパク質もしくはその断片またはそのタンパク質もしくはその断片を含んでなる組成物あるいはタンパク質もしくはその断片またはそのタンパク質もしくはその断片を含んでなる組成物の名称または構造を、例えば、書面で、機械可読形式で、またはコンピュータ可読形式などで提供することとを含んでなる。

10

【0335】

当然ながら、公知のタンパク質、断片または組成物については、たとえこれまでにその機能について本発明の提供するスクリーニングを用いて調べられていなくとも、化合物の構造の決定は、前記のステップ(i)に内含されている。これは、スクリーニングを実施する時点で当業者には化合物の名称および/または構造が明らかであるからである。

【0336】

本明細書において、用語「免疫原性タンパク質または断片または組成物を提供すること」とは、その免疫原性タンパク質または断片または組成物を製造するためのいずれかの化学的および/または組換えおよび/または合成手段、あるいは、いずれかの人物または手段によってこれまでに合成されている免疫原性タンパク質または断片または組成物の提供を含むと取られるものとする。

20

【0337】

好ましい実施形態では、本明細書に記載されたスクリーニングによって求められるような、免疫原性タンパク質または断片または組成物あるいは免疫原性タンパク質または断片または組成物の名称または構造を、その用途に応じた指示とともに提供する。

【0338】

本発明は前記の免疫原性タンパク質または断片または組成物を製造するプロセスをさらに提供し、この方法は、

30

前記の免疫原性タンパク質または断片または組成物を同定または決定するプロセスを含んでなり、この方法は、

(i) 本明細書に記載された方法を実施し、それによって状態の診断または治療または予防のための免疫原性タンパク質または断片または組成物を同定または決定することと、

(ii) 場合によっては、免疫原性タンパク質または断片または組成物の構造を決定することと、

(iii) 場合によっては、免疫原性タンパク質または断片または組成物の名称または構造を、例えば、書面で、機械可読形式で、またはコンピュータ可読形式などで提供することと、

40

(iv) 免疫原性タンパク質または断片または組成物を提供することとを含んでなる。

【0339】

好ましい実施形態では、合成されたか製造された免疫原性タンパク質または断片または組成物あるいは免疫原性タンパク質または断片または組成物の名称または構造を、その用途に応じた指示とともに提供する。

【0340】

本発明は、状態の診断、治療または予防のための免疫原性タンパク質または断片または組成物の製造方法をさらに提供し、これは

50

(i) 状態の診断または治療または予防のための候補免疫原性タンパク質または断片または組成物を決定することと、

(i i) 状態の治療または診断のための治療薬または予防薬または診断薬の製造において免疫原性タンパク質または断片または組成物を用いることとを含んでなる。

【0341】

一実施形態では、本方法は候補免疫原性タンパク質または断片または組成物を単離するさらなるステップを含んでなる。あるいは、同定された免疫原性タンパク質または断片または組成物を、状態の診断または治療または予防のための、免疫原性タンパク質または断片または組成物の製造において使用するために製造する。

10

【0342】

本発明を以下の限定するものではない実施例を参照してさらに説明する。

【実施例1】

【0343】

結核被験体の血清における結核菌グルタミンシンセターゼの同定

1.1 サンプル調製

- 80 で保存した 1.5 ml の患者血清を室温で解凍し、次いで、20 mM のリン酸バッファー、pH 7 で予め平衡化しておいたタンパク質 G - S セファロース (アマシャム・バイオサイエンシズ、オーストラリア、ニューサウスウェールズ州、キャッスルヒル) の 2 ml カラムにアプライし、氷上で時折反転させながら 30 分間インキュベートした。この混合物を 4、6000 g で 10 分間回転させ、上清をデカントした。S セファロースペレットを 20 mM のリン酸バッファーで洗浄した。50 mM グリシン pH 2.7 を加えることによって S セファロースに結合している IgG を 20 分間溶出した。前記のように遠心分離した後、上清を廃棄し、グリシンステップを反復した。この 2 回目のグリシン溶出からの上清を回収し - 80 で保存した。

20

【0344】

解凍した溶出物でブラッドフォードタンパク質アッセイを実施し、30 ミリグラムの免疫グロブリン画分をセファクリル (Sphacryl) S - 200 高分解能ゲル濾過カラム (アマシャム・バイオサイエンシズ) にロードする。3000 ~ 140000 MW の範囲の画分を回収し、150000 IgG 画分は排除する。これらの画分をプールし、- 20 で 10 容量の冷アセトンを用いて 48 時間沈殿させ、次いで、4、5000 g で 20 分間遠心分離する。沈殿を 5 M 尿素、2 M チオ尿素、2% CHAPS、2% SB3 - 10 および 40 mM Tris を含有するサンプルバッファー 1 ~ 2 ml に再可溶化し、次いで、同時に 1 時間、5 mM トリブチルホスフィンを用いて還元し、10 mM アクリルアミドを用いてアルキル化する。サンプルを 250 µl アリコートに分注し、- 80 で保存する。

30

【0345】

1.2 サンプルの二次元ゲル電気泳動

サンプルのタンパク質含量は、ブラッドフォードアッセイを用いて推定した。サンプルを、40 mM Tris を 5 mM Tris に置き換えた前記のサンプルバッファーを用いて 2 mg/ml に希釈した。

40

【0346】

IPG ストリップを再水和する前に、サンプルを 21000 x g で 10 分間遠心分離した。上清を回収し、指示染料として 1 ml 当たり 10 µl の 1% オレンジ G (シグマ) を加えた。

【0347】

第1の次元

乾燥した 11 cm の IPG ストリップ (アマシャム - バイオサイエンシズ) を、180 µl のタンパク質サンプルで 16 ~ 24 時間再水和した。再水和したストリップをプロテアン IEF セル (Protean IEF Cell) (バイオラッド、カリフォルニア州、ハーキュリーズ) またはプロテーム・システム (Proteome System) の イソエレクトル IQ (IsoElectrIQ)

50

電気泳動装置で、最大10kVで約140kV時間フォーカスした。次いで、フォーカスしたストリップを尿素/SDS/Tris-HCl/ブROMフェノールブルーバッファー中で平衡化した。

【0348】

第2の次元

平衡化したストリップを6~15%(w/v)のtris-アセテートSDS-PAGEプレキャスト10cm×15cmゲルチップス(GelChips)(プロテオーム・システムス、オーストラリア、シドニー)のローディングウェルに挿入した。ゲル当たり50mAで1.5時間か、追跡用色素がゲルの底部に到達するまで電気泳動を実施した。シプロルビー(SyproRuby)(モレキュラー・プローブス(Molecular probes))を用いてタンパク質を染色した。脱染した後、アルファイメージャー・システム(AlphaImager System)(アルファ・イノテック社(Alpha Innotech Corp.))を用いてゲル画像をスキャンした。次いで、その後の解析におけるタンパク質スポットの可視化を補助するためにクマシーG-250でゲルを染色した。

10

【0349】

ゲル画像の一例を図1に示す。

【0350】

1.3 タンパク質同定

結核感染症を患っている被験体から得た血清サンプルにおいていくつかのタンパク質を観察した。次いで、質量分析を用いてこれらのタンパク質を同定した。

20

【0351】

質量分析の前に、インゲルトリプシン消化によってタンパク質サンプルを調製した。エクサイズ(Xcise)(商標)、切り出し/液体処理ロボット(プロテオーム・システムス、オーストラリア、シドニーおよびシマヅバイオテック、日本、京都)を、モンタージュ・インゲル消化キット(Montage In-Gel Digestion Kit)(プロテオーム・システムスによって開発され、ミリポア、米国、01821、マサチューセッツ州、ビレリカによって流通されている)と関連して用いて、タンパク質ゲル小片を切り出し、脱染し、消化し、脱塩した。一定の大きさを維持し、乾燥を防ぐために、スポットを切断する前には、2-Dゲルを水中でインキュベートした。続いて、2-Dゲルをエクサイズに置き、デジタル画像を獲得し、切断するスポットを選択した。自動的にスポットを切り出した後、ゲル小片を自動液体処理およびインゲル消化に付した。簡単には、各スポットを50mM重炭酸アンモニウム中50%(v/v)アセトニトリル100μlで脱染した。ゲル小片を100%アセトニトリルを加えることによって乾燥させ、5秒後アセトニトリルを除去し、37で残存するアセトニトリルを蒸発させることによってゲルを完全に乾燥させた。乾燥させたゲル小片を5μg/mlの修飾ブタトリプシンを含有する20mM重炭酸アンモニウム(pH7.8)30μlで再水和させ、30で一晩インキュベートすることによってタンパク質分解による消化を行った。

30

【0352】

液体クロマトグラフィー(LC)-エレクトロスプレーイオン化(ESI)MSによるさらなる解析が必要であった場合には、10μlのトリプシンペプチド混合物をきれいなマイクロタイタープレートに取り出した。

40

【0353】

トリプシンペプチドを自動脱塩および濃縮し、次いで、C18ジップチップ(ZipTip)(ミリポア、マサチューセッツ州、ベッドフォード)を用いてMALDI-TOF MSを実施した。90%(v/v)アセトニトリルおよび0.085%(v/v)TFAに溶かした2mg/ml-シアノ-4-ヒドロキシ桂皮酸2μlを用いて、吸着されたペプチドをチップから384位置MALDI-TOFサンプルターゲットプレート(クラトス(Kratos)、英国、マンチェスターまたはブルカー・ダルトニクス(Bruker Daltonics)、ドイツ)上に溶出した。

【0354】

50

消化物を、アキシマ(Axima) - C F R M A L D I - T O F 質量分析計(クラトス、英国、マンチェスター)を正イオンリフレクトロンモードで用いて解析した。波長 337 nm の窒素レーザーを用いてサンプルに照射した。各サンプルスポットに 64 ポイントラスタを適用して、質量範囲 600 Da ~ 4000 Da の自動モードでスペクトルを獲得した。特定の基準を通るスペクトルのみをセーブした。すべてのスペクトルに、自己消化トリプシンピーク質量、 m/z 842.51 Da とスパイクした副腎皮質刺激ホルモン(ACTH)ペプチド、 m/z 2465.117 Da を用いて内部二点較正を行った。ウェブベースのプロテオミック・データ・マネージメント・システム・バイオインフォーマット I Q (BioinformaIQ) (商標) (プロテオーム・システムス) に含まれる、プロテオーム・システムスによって設計されたソフトウェアを用いて、MS スペクトルから同位体ピークを抽出した。 10

【0355】

タンパク質同定は、イオン I Q (IonIQ) データベース検索ソフトウェア(プロテオーム・システム社、オーストラリア、シドニー、ノースライド)を用いてトリプシンペプチドの単一同位体質量(すなわち、ペプチド質量フィンガープリント)をタンパク質データベースからの理論質量とマッチングすることによって実施した。クエリーは非冗長スイスプロット(SwissProt) (リリース 40) および T r E M B L (リリース 20) データベース(2002年6月バージョン)に対して行い、M O W S E スコアリングシステムの変更によってタンパク質の正体をランク付けした。プロピオンアミド・システイン(cys - P A M) またはカルボキシアミドメチル・システイン(cys - C A M) および酸化メチオニン修飾を考慮し、100 ppm の質量許容誤差を認めた。 20

【0356】

ミス切断部位は、ミス切断が行われていない最初の検索の後でのみ考慮した。以下の基準を用いて検索結果を評価した: M O W S E スコア、候補タンパク質をマッチングするペプチドの数および強度、マッチングペプチドによる候補タンパク質配列のカバレッジおよびゲル位置。

【0357】

さらに、またはあるいは、タンパク質を L C - E S I - M S を用いて解析した。タンパク質のトリプシン消化溶液(10 μ l)を、オートサンプラーとポンプからなるサーベイヤー(Surveyor) L C システムを備えた L C Q D e c a イオントラップ質量分析計(サーモフィニガン(ThermoFinnigan)、カリフォルニア州、サンジョセ)を用いるナノフロー L C / M S によって解析した。ペプチドは、C 18 ピコフリット(PicoFrit)カラム(ニュー・オブジェクト型(New objective))に連結させたペップファインダー(PepFinder)キット(サーモ・フィニガン)を用いて分離した。30 ~ 60 分間かけて、0.1% (v/v) ギ酸を含有する水(移動相 A) から 0.1% (v/v) ギ酸を含有する 90% (v/v) アセトニトリル(移動相 B) への勾配溶出を行った。質量分析計は 3 スキャンイベント - 1 つのフルスキャン(400 ~ 2000 amu の範囲)、とそれに続く 2 つのデータ依存 M S / M S スキャンを獲得するようセットした。 30

【0358】

タンパク質は、S E Q U E S T (バイオワークス(BioWorks) 3.1、サーモ・フィニガン)ソフトウェアを用いて同定した。ペプチドは、実験断片イオンの半分より多くが理論イオン値とマッチした M S / M S スペクトルから同定し、それぞれ、2.2、0.2 および 400 より大きい、相互相関(トップ候補ペプチドの生相関スコア)、デルタ相関(上位 2 つの候補ペプチド間の相関の差) および予備スコア(候補ペプチドのランク付けに用いた生スコア) 値を与えた。 40

【0359】

この方法を用いて、T B 被験体の免疫グロブリン画分において 49.7 kDa のタンパク質を同定した。このタンパク質を、M A L D I - T O F M S を用いて解析し、表 1 に示される断片(配列番号 6 ~ 11)を同定した。

【0360】

【表 1】

免疫グロブリン関連タンパク質から同定した断片

ペプトイド番号	配列番号	タンパク質中のペプトイドの部位	配列
1	6	204～221	FEAVKGE CNMGGQEI GFR
2	7	241～255	EIADQHCKSLTFMAK
3	8	305～318	EFTLCYAPTINSYK
4	9	343～351	VVGHGQNI R
5	10	401～419	LPVTLADAAVLFEDSALVR
6	11	436～450	VELAAFNAAVTDWER

10

20

30

【0361】

この情報を用いて配列データベースを検索し、単離したタンパク質スポットは仮定結核菌グルタミンシンセターゼタンパク質（配列番号12）であると予測した。このことが、この方法が感染症または自己免疫疾患などの疾患の診断/予後、治療または予防において特に役立つタンパク質の単離および同定において役立つということを実証するのは明確である。

40

【実施例2】

【0362】

サンプル調製および免疫グロブリン単離の代替法

- 80 で保存した1.5mlの患者血清を室温で解凍し、次いで、20mMのリン酸バッファーpH7で予め平衡化しておいたタンパク質G-セファロース（アマシャム・バイオサイエンシズ）の2mlカラムにアプライし、氷上で時折反転させながら30分間インキュベートした。この混合物を4、6000gで10分間回転させ、上清をデカントした。セファロースペレットを20mMのリン酸バッファーで洗浄した。50mMグリシ

50

ン pH 2.7 を加えることによってセファロースに結合している IgG を 20 分間溶出した。前記のように遠心分離した後、上清を廃棄し、グリシンステップを反復した。この 2 回目のグリシン溶出からの上清を回収し - 80 で保存した。

【0363】

サンプルを調製した後、本質的には実施例 1 に記載したように、二次元電気泳動を用いてタンパク質を分離し、MALDI-TOF MS を用いて免疫原性タンパク質を同定する。

【実施例 3】

【0364】

TB を患っている被験体からの免疫原性タンパク質の単離

10

3.1 サンプル調製

A K T A エクスプローラー (Explorer) (アマシャム・バイオサイエンシズ) に取り付けた 1 ml のタンパク質 A カラムを用いて、結核菌および HIV に感染した患者から得た血清 (1.8 ml) を精製した。簡単には、サンプルを 8.2 ml のイムノピュア (Immunopure) IgG 結合バッファー (ピエルスカatalog番号 21001) に希釈し、次いで、0.22 μm フィルターを通して濾過し、次いでカラムにアプライした。結合している抗体の溶出はイムノピュア・ジェントル Ag / Ab 溶出バッファー (ピエルスカatalog番号 21027) を用いて行った。溶出された画分をプールし (抗原に結合している IgG)、氷上で 3 時間静置し、免疫複合体を解離させた。100,000 分子量カットオフカラム (ミリポア) を通して濾過することによって抗原画分から IgG 画分を分離した。画分とタンパク質 A カラムからのフロースルーの双方を、ベンゾイル化透析膜 (シグマ D-2272) を用いて 4 リットルのリン酸緩衝生理食塩水 pH 7.2 に対して 4 で一晩、次いでさらに 4 リットルに対して 3 時間透析した。すべての画分 (100,000 カットオフカラムからのフロースルーおよび保持物ならびにタンパク質 A カラムからのフロースルー) を、10 割合のアセトン対 1 割合のサンプルという割合で -20 で 1 時間アセトン沈殿させ、次いで、4000 g で 20 分間回転させた。沈殿したサンプルを 5 M 尿素、2 M チオ尿素、2% CHAPS、2% SB3-10 および 40 mM Tris を含有するサンプルバッファーに可溶化し、約 2 mg/ml の最終濃度とし、次いで、同時に 1.5 時間、5 mM トリブチルホスフィンを用いて還元し、10 mM アクリルアミドを用いてアルキル化した。アルキル化反応は DTT を最終濃度 10 mM まで添加してクエンチした。サンプルを 200 μl ロットに分注し、-20 で保存した。

20

30

【0365】

3 画分各々の 200 μl アリコートに 2 μl の 1% オレンジ G 追跡用色素を加え、16,100 rcf で 20 分間遠心分離した。

【0366】

3.2 ゲル電気泳動

第 1 の次元

乾燥アマシャム・バイオサイエンシズ 11 cm p I 3 ~ 10 I P G を、上清を用いて約 24 時間再水和した。

【0367】

再水和したストリップをプロテアン I E F セル (バイオ・ラッド、カリフォルニア州、ハーキュリーズ) またはプロテオーム・システムスのイソエレクトル I Q 電気泳動装置で最大 10 kV で約 109500 ボルト時間フォーカスした。次いで、フォーカスしたストリップを尿素 / SDS / Tris - HCl / プロモフェノールブルーバッファー中で平衡化した。

40

【0368】

第 2 の次元

平衡化したストリップを 6 ~ 15% (w/v) の tris - アセテート SDS - PAGE プレキャスト 10 cm x 15 cm ゲルチップス (プレテオーム・システムス、オーストラリア、シドニー) のローディングウェルに挿入した。ゲル当たり 50 mA で 1.5 時間か

50

、または追跡用色素がゲルの底部に到達するまで電気泳動を実施した。シプロルビー（モレキュラー・プローブス）を用いて保持物およびフロースルー画分からのゲルを染色した。脱染した後、アルファイメージャー・システム（アルファ・イノテック社）を用いてゲル画像をスキャンした。溶出画分からのゲルを、シェフチェンコ（Shevchenko）らのプロトコール（アナリティカル・ケミストリー（Analytical Chemistry）1996年3月1日、68（5）、850～8頁）にしたがって銀で染色した。ゲル画像をUMAXフラットベッドスキャナーを用いてスキャンした。ゲルの一例が図2に示されており、これでは、等電点が約5.28であり、分子量が約43590ダルトンのタンパク質がマークされている。次いで、このタンパク質スポットをさらに解析した。

【0369】

10

3.3 質量分析

質量分析に先立って、インゲルトリプシン消化によってタンパク質サンプルを調製した。溶出画分からタンパク質ゲル小片を手動で切り出し、50 mM NH_4HCO_3 / 50% アセトニトリルで脱染した。96 ウェルマイクロタイタープレートに入れた各ゲル小片にこの溶液100 μl を添加し、振盪プラットフォーム上に20分間置いた。次いで、脱染手順をもう一度反復した。ゲル小片を50 のオープン中で20分間乾燥させた。次いで、25 mM NH_4HCO_3 および0.1% n-オクチル-グリコシドに溶かした0.02 $\mu\text{g} / \mu\text{l}$ トリプシン2.5 μl を各乾燥ゲル小片に加えた。サンプルを氷上に40分間静置した。次いで、各ウェルに25 mM NH_4HCO_3 / 0.1% n-オクチル-グリコシド10 μl を加え、反応物を30 で一晩静置した。各ウェルに15 μl の0.1% TFAを加え、プレートを超音波水浴中で15分間超音波処理した。TFA抽出および超音波ステップを一度反復した。さらに10分間超音波を実施し、トリプシンペプチドを含有するサンプル溶液12 μl を新しいプレートに移した。

20

【0370】

タンパク質をLC-ESI-MSを用いて解析した。タンパク質のトリプシン消化溶液（10 μl ）を、オートサンプラーとポンプからなるサーベイヤーLCシステムを備えたLCQ Decaイオントラップ質量分析計（サーモフィニガン、カリフォルニア州、サンジョセ）を用いるナノフローLC/MSによって解析した。ペプチドは、C18ピコフリットカラム（ニュー・オブジェクティブ）に連結させたペップファインダーキット（サーモ・フィニガン）を用いて分離した。30分間かけて、0.1%（v/v）ギ酸を含有する水（移動相A）から0.1%（v/v）ギ酸を含有する90%（v/v）アセトニトリル（移動相B）への勾配溶出を行った。質量分析計は3スキャンイベント-1つのフルスキャン（400～2000 amuの範囲）、とそれに続く2つのデータ依存MS/MSスキャンを獲得するようセットした。この方法を用いて、これまでに同定したタンパク質スポットのペプチドのマスペクトルを調べた。このようなペプチドのマスペクトルを図3に示す。

30

【0371】

3.4 タンパク質同定

タンパク質は、SEQUEST（バイオワークス3.1、サーモ・フィニガン）ソフトウェアを用いて同定した。ペプチドは、実験断片イオンの半分より多くが理論イオン値とマッチしたMS/MSスペクトルから同定し、それぞれ、2.2、0.2および400より大きい、相互相関（トップ候補ペプチドの生相関スコア）、デルタ相関（上位2つの候補ペプチド間の相関の差）および予備スコア（候補ペプチドのランク付けに用いた生スコア）値を与えた。

40

【0372】

SEQUEST配列決定によりペプチド配列（K）LLDQGQAGDNVGLLLR（配列番号15）（m/z 1682.92）（スイスプロット受託番号P31501）に対してマッチが示された。

【0373】

この方法を用いて、TB被験体において43.59 kDaのタンパク質を同定した。こ

50

のタンパク質をLC-ESI-MSを用いて同定し、結核菌の伸長因子Tuタンパク質(配列番号14)を同定した。

【実施例4】

【0374】

CF被験体からの免疫原性病原体由来タンパク質の同定

嚢胞性繊維症を患っている被験体は、緑膿菌に感染しやすい傾向がある。このような感染症を診断するのに有用であり得る緑膿菌に由来するタンパク質を同定するために、CF被験体から免疫グロブリン画分を単離し、これを用いて感染性細菌に由来する免疫原性タンパク質を同定した。

【0375】

10

4.1 生体サンプル

CF被験体から得た全血サンプルから粗血漿を得る。捕獲カラムから得た用いた粗血漿は、22~37歳の年齢群の4人の増悪CF成人から合わせたものである。予測FEV₁値は、22~65%の間であり、被験体は過去12ヶ月において2~4の増悪を起こしていた。微生物学的試験によって、本研究に用いたすべての成人CF被験体が、肺で成長した多量の緑膿菌を持っていることがわかった。さらに、一人のCF成人には、肺の黄色ブドウ球菌感染もあった。

【0376】

健常な対照およびCF被験体から生理食塩水で誘導した痰を回収し、続いて液化した。得られたサンプルをプールし、アルコール沈殿させ、7M尿素、2Mチオ尿素、2%chaps、10mM trisに再可溶化させた。サンプルを還元し、5mM TBP 10mMアクリルアミドで1時間アルキル化した。続いて、サンプルを100kDaおよび5kDaスピンカラムで回転させ、その後捕獲したタンパク質を2DEアレイによって配置した。

20

【0377】

免疫捕獲に用いる痰：22歳と31歳の2人の増悪CF被験体から痰サンプルをプールした(合計16ml)。それらの予測FEV₁値は14%と51%であり、過去12ヶ月において1~2の増悪の治療を受けていた。微生物学的試験により、両患者の肺に多量の緑膿菌が示された。さらに、2人の患者のうち一方は、多量の黄色ブドウ球菌も含んでいた。プールした痰を30mMのIAAとともにインキュベートし、液化プロトコールに用いた残存するDTTを不活化し、タンパク質G結合セファロースビーズを製造業者(アマシャム・ファルマシア(スウェーデン、アップサラ))によって推奨されるように用いることによってIgGを枯渇させた。

30

【0378】

4.2 緑膿菌に由来するタンパク質の調製

緑膿菌PA01の一晚培養物(200mL ATCC培養物)を遠心分離(4000g、室温で20分間)によってペレットにした。沈殿した細胞を水中で2回洗浄し、溶解バッファーA(50mM Tris-HCl pH7.6、0.1mM EDTA、20%スクロース)+プロテアーゼ阻害剤(1x完全プロテアーゼ阻害剤カクテル、ロシュ・ディアグノティクス(Roche Diagnostics)、スイス、バーゼル)に再懸濁した。細胞を、ブランソン・ソニファイアー(Branson sonifier)、モデル250-450を用いて最大振幅の70%を用いて4x10秒間溶解し、破壊されていない細胞を遠心分離(4000g、10分、4)によってペレットにした。タンパク質のアセトン沈殿の前に、得られた上清を用いて別の遠心分離ステップを実施した。沈殿したタンパク質を10mM PBS pH7.2に再可溶化した。

40

【0379】

膜タンパク質：膜タンパク質を、プロテオプレップ(ProteoPrep)膜抽出キットを本質的には製造業者(プロテオーム・システムス、米国、ウォバーン)によって推奨されるように用いて抽出した。しかし、最後の50mM Tris-HCl、pH7.3洗浄後に得られたペレットは、トライトン-X、15mM Tris-HCl pH7.5および2

50

0 m M D T Tを含有する10 m M P B S p H 7 . 4に再懸濁した。可溶化した後、サンプルを60 m Mヨードアセトアミドとともに室温で2時間インキュベートした。

【0380】

4.3 免疫捕獲カラムの調製

5人の増悪CF患者から得た合計5 mLのプールした血漿(全タンパク質濃度約40 mg / mL)から免疫捕獲カラムを作製した。プールした血漿をタンパク質Gセファロースの50%スラリー10 mLとともにインキュベートすることによってIgGをタンパク質Gセファロースに結合させた。マトリックスを10 m M P B S p H 7 . 4中で洗浄し、DSSを利用して、結合しているIgGを不可逆的に固定化した。

【0381】

4.4 緑膿菌に由来する免疫原性タンパク質の捕獲

捕獲カラムを天然緑膿菌タンパク質抽出物(6.3)とともに一定回転下、4で一晩インキュベートし、続いて、ビーズを遠心分離によって回収した。フロースルーを回収し、その後のインキュベーションステップのために確保した(タンパク質抽出物は、各捕獲において捕獲カラムに3回通した)。回収したビーズを10 m M P B S p H 7 . 4中で3回洗浄し、50 m MグリシンpH2.7を用いて捕獲したタンパク質を溶出した。カラムは、最初50 m MグリシンpH2.7、次いで10 m M P B S p H 7 . 2で広範に洗浄し、その後のインキュベーションステップを続けた。

【0382】

溶出したタンパク質をアルコール沈殿させ(エタノールを1:10の割合で用いて)、続いて、プロテオプレップ・ユニバーサル抽出キット(シグマ、ミズーリ州、セントルイス)の細胞膜および生物膜可溶化試薬(Cellular and Organelle Membrane solubilizing reagent)に再可溶化させた。プロテオプレップ・キットの使用説明書にしたがって、可溶化したタンパク質を、それぞれ最終濃度5 m Mトリ-n-ブチルホフィンおよび10 m Mアクリルアミドを用いて還元し、アルキル化した。

【0383】

4.5 二次元ゲル電気泳動

11センチメートルpH3~10またはpH4~7IPGをアマシャム(スウェーデン、アップサラ)から購入した。等電点電気泳動法をプロテオーム・システムス(マサチューセッツ州、ウォバーン)のイソエレクトルIQ²ユニットを用いて製造業者の使用説明書のとおり実施した。二次元6~15%または14%均質Tris-アセテートゲルチップゲルを製造業者(プロテオーム・システムス、マサチューセッツ州、ウォバーン)によって推奨されるように実施した。配置されたタンパク質を銀染色によって可視化した(シェフチェンコら、アナリティカル・ケミストリー、68、850~858頁、1996)。

【0384】

4.6 MS解析

注目するタンパク質スポットを切り出し、100 m M N H ₄ H C O ₃ : 50%アセトニトリル(ACN)pH8.2中で2回洗浄し、50で30分間脱水した。タンパク質をカタヤマら、ラビッド・コミュニケーションズ・イン・マス・スペクトロメトリー、15、1416~1421頁、2001によって記載されたように消化し、37で3時間消化した。超音波処理によってトリプシンペプチドを抽出し、クスマン(Kusmann)らによって記載されたように精製した。ペプチドは約1.5 μ lのMALDIマトリックス溶液(70%ACN、0.1%TFA、1.5 mg / mL - シアノ-4-ヒドロキシ桂皮酸(シグマ、ミズーリ州、セントルイス))で溶出した。アキシマCFR(クラトス、英国、マンチェスター)を用いるマトリックス支援レーザー脱離/イオン化飛行時間型質量分析(MALDI-TOF MS)またはABI MALDI MS/MS(AMEバイオサイエンス(Biocience)、英国、ロンドン)によってペプチドマスフィンガープリント(PMF)を作製した。

【0385】

10

20

30

40

50

4.7 結果

図4に示したように、免疫捕獲カラムを用いて緑膿菌タンパク質抽出物から6種の免疫原性タンパク質を捕獲した。これらのタンパク質をMSを用いて解析した。トリプシン消化後、ペプチドマスフィンガープリンティングを用いて以下のペプチドを同定した。

【0386】

【表2】

ペプチド質量	理論上の質量	エラー	AA (開始)	AA	MC	ペプチド配列	配列番号
905.488	905.519	-0.031	3	9	0	LRPLHDR	16
943.539	943.508	0.031	38	47	0	GEVAVGTGR	17
1164.742	1164.654	0.088	1	9	1	MKLRPLHDR	18
1180.792	1180.649	0.143	1	9	1	MKLRPLHDR	19
1337.882	1337.697	0.185	65	77	0	VVFGPYSGSNAIK	20
1373.012	1372.841	0.171	3	13	1	LRPLHDRVVIR	21
1383.002	1382.788	0.215	48	60	1	VLDNGEVRALAVK	22
1637.202	1636.889	0.313	21	37	0	TAGGIVLPGSAAEKPNR	23
1737.312	1736.909	0.403	61	77	1	VGDKVVFPGPYSGSNAIK	24

【0387】

その結果、タンパク質を緑膿菌由来タンパク質であると確認した。タンパク質スポット番号6は、緑膿菌GroES(配列番号25)と同定した。

【実施例5】

【0388】

緑膿菌感染症を患っている被験体を調べるための、同定した緑膿菌タンパク質の使用

緑膿菌GroESのアリコートを実施例4に記載した2-D Eアレイから切り出し、H₂Oおよび1mM DTT中で洗浄した。タンパク質を0.1% SDS、50mM Tr

10

20

30

40

50

is - HCl pH 7.9、0.1 mM EDTA、150 mM NaCl および 5 mM DTT 中、4 で激しく振盪することによる 2 晩連続のインキュベーションによって抽出し、沈殿させ、50 μ l の PBS に再可溶化した。6 μ l の抽出したタンパク質のみをニトロセルロースメンブランストリップ (バイオラッド、米国、カリフォルニア州、ハーキュリーズ) にアプライした。メンブランスは使用前に、10 mM Tris - HCl、100 mM NaCl および 0.2% Tween - 20 pH 9.0 中 5% (w/v) スキムミルクを用いてブロッキングした。その後の抗原性標的の位置決定のためにアンカーをメンブランスにアプライした。健常な対照および CF 被験体から得た粗血漿を、0.5% (w/v) スキムミルクを含有する PBST バッファー (10 mM PBS、0.05% (v/v) Tween - 20) で 1:3 希釈し、0.22 μ m PVDF メンブランス (ミリポア) を通して濾過した。ケミカルプリンタ、ChIP (商標) (プロテオーム・システム社、オーストラリア、シドニーおよびシマズ・バイオテック、日本、京都) を用いて、0.15 μ L の 1:3 血漿アリコート の 5 アプリケーションを、固定化した病原性タンパク質、PBS および 100 ng BSA 上に分注した。各スポット位置が 1 人の患者サンプルに相当する、4 または 5 スポット位置を含むグリッドアレイを、メンブランスの標的にプリントした。X および Y 座標はソフトウェアイメージアップ (Image) IQ (商標) バージョン 1.0 (プロテオーム・システム社、オーストラリア、シドニー) を用いて定めた。約 100 μ L の PBST を用いて過剰の血漿タンパク質を洗い流した。結合している抗体を、PBST - M バッファー中 1:50000 の HRP コンジュゲートウサギ抗ヒト IgG (ケミコン・オーストラリア社、オーストラリア、ビクトリア) 0.1 μ l をプリンティングすることによって検出した。次いで、化学発光を検出した。プリントされるグリッドアレイの大きさは固定化した抗原性標的の面積に応じて変わり、本研究では、直径約 5 mm であった。

【0389】

緑膿菌 GroE S に対する、5 人の患者の血清学的免疫応答性を、ケミカルプリンタ、ChIP (商標) を用いて調べた。図 6 に示したように、血清学的に非応答性である健常な対照とは対照的に、スクリーニングした CF 被験体すべてが、病原性タンパク質に関して免疫応答性であり、したがって、このことは、CF 被験体では、これらの病原体がコードするタンパク質の発現は臨床に関連があるということを示す。

【実施例 6】

【0390】

CF の自己免疫応答において認識されるタンパク質の同定

CF 被験体から単離した痰 (実施例 4 に記載した) を、本質的には、実施例 4 に記載したような免疫捕獲実験に用いた。図 5 に示したように、CF 被験体の痰から 14 種のタンパク質を単離した。MS および配列解析を用いて同定したところ、これらのうち 9 種がヒト起源であることがわかった。スポット番号 3 の MS 解析の結果、タンパク質の 39% をカバーする 6 種のマッチングペプチドが同定された。次いで、このタンパク質をヒトカルグラヌリン (calgranulin) B (配列番号 26) と同定した。スポット 1 およびスポット 2 も、ヒトカルグラヌリン B と同定された。これらの結果により、本発明の方法は被験体自身の免疫系によって認識されるタンパク質を同定するのに有用であることが示唆される。

【実施例 7】

【0391】

免疫原性結核菌タンパク質を同定するための、ニワトリの免疫化

7.1 抗体作製

結核菌株 CDC 1551 を、グリセロール - アラニン - 塩 (GAS) 培地で後期対数期 (14 日) に増殖させ、PBS pH 7.4 で洗浄し、照射によって不活化した。次いで、細胞を 8 mM EDTA、プロテアーゼ阻害剤 (ペプスタチン、ロイペプチンおよび PMSF)、DNアーゼおよび RNアーゼを含有する PBS バッファーに再懸濁し (2 g/ml)、その後、フレンチプレスまたはプローブ超音波処理によって約 90% の細胞を破壊する (抗酸性染色法によってモニターする)。細胞溶解物を 3,000 g で遠心分離

して破壊されていない細胞をペレットとし、上清を単離した。BCAタンパク質アッセイを用いて各画分のタンパク質含量を定量し、アリコートをして -80°C で保存する。培養上清を $0.2\ \mu\text{m}$ のフィルターに通し、分子量カットオフが $10,000\ \text{Da}$ のメンブランを用いるアミコン(Amicon)限外濾過によってタンパク質含量を濃縮した。濃縮した物質を、 $0.01\ \text{M}$ 重炭酸アンモニウムに対して透析し、BCAタンパク質アッセイで定量し、分注し、凍結乾燥し、 -80°C で保存する。等量の培養濾液と全細胞抽出物とを合わせ、 $1\ \text{mg}$ /ニワトリの濃度でニワトリに注射した。4回接種した後(1回/月)、卵を回収し、壊して開き、硫酸アンモニウム沈殿によってIgY抗体を回収した。

【0392】

7.2 抗原捕獲カラムの調製

$5 \times 10\ \text{mg}$ の硫酸アンモニウム精製したIgY抗体を用い、ピエルスカルボリンク(CarboLink)(商標)キットを用いて5つのIgY固定化カルボリンク(商標)ゲルを作製した。続いて、各ゲル内のアガロースをプールして総容積 $10\ \text{ml}$ とした。このプールしたカラムを以後IgY捕獲カラムと呼ぶ。

【0393】

7.3 痰または血漿タンパク質のアフィニティー精製

7.3.1 痰タンパク質

中国人のTB被験体から得た $10.8\ \text{ml}$ の痰に最終濃度 $30\ \text{mM}$ のヨードアセトアミドを2時間添加した。 $10.6\ \text{ml}$ のヨードアセトアミド処理した痰を、プールしたIgY捕獲カラムにアプライし、回転しながら4で一晩インキュベートした。残りの $0.2\ \text{ml}$ の痰は -80°C で保存し、後にブラッドフォードタンパク質測定アッセイに用いた。結合しない中国人の痰の抗原(フロースルー)を、カラムを $4000\ \text{g}$ で10分間遠心分離することで回収し、同じIgY捕獲カラムでの連続2晩のインキュベート用に確保した。IgY捕獲カラムを4倍の総容積のPBSで洗浄した。捕獲したタンパク質は $50\ \text{mM}$ グリシン $\text{pH}2.7$ で溶出した。3回の一晩インキュベーションのうちの2回目のためにフロースルーを添加する前に、カラムを3倍の総容積のPBSで再生した。フロースルー、PBSおよびグリシン洗浄液のタンパク質濃度を、ブラッドフォードアッセイを用いて求めた。溶出したタンパク質をアルコール沈殿させ、 $7\ \text{M}$ 尿素、 $2\ \text{M}$ チオ尿素、 2% CHAPSおよび $40\ \text{mM}$ Trisに再懸濁した。可溶化したタンパク質を、それぞれ最終濃度 $5\ \text{mM}$ トリ-n-ブチルホフィンおよび $10\ \text{mM}$ アクリルアミドで還元し、アルキル化した。還元し、アルキル化したタンパク質サンプルを、6倍容積の $7\ \text{M}$ 尿素、 $2\ \text{M}$ チオ尿素、 2% CHAPSおよび $40\ \text{mM}$ Trisを用いて $100\ \text{kDa}$ ミリポア超遠心カラムを通して洗浄した。次いで、 $100\ \text{kDa}$ フロースルーを $5\ \text{kDa}$ ミリポア超遠心カラムにアプライし、 $0.3\ \text{ml}$ に濃縮し、2次元ゲル電気泳動に用いた。

【0394】

7.3.2 血漿タンパク質

$10.6\ \text{ml}$ の中国人血漿を、プールしたIgY捕獲カラムにアプライし、回転しながら4で一晩インキュベートした。結合しない中国人血漿抗原(フロースルー)を、カラムを $4000\ \text{g}$ で10分間遠心分離することで回収し、同じIgY捕獲カラムでの2連続の一晩インキュベート用に確保した。IgY捕獲カラムを4倍の総容積のPBSで洗浄した。捕獲したタンパク質は $50\ \text{mM}$ グリシン $\text{pH}2.7$ で溶出した。3回の一晩インキュベーションのうちの2回目のためにフロースルーを添加する前に、カラムを3倍の総容積のPBSで再生した。フロースルー、PBSおよびグリシン洗浄液のタンパク質濃度を、ブラッドフォードアッセイを用いて求めた。溶出したタンパク質をアルコール沈殿させ、 $7\ \text{M}$ 尿素、 $2\ \text{M}$ チオ尿素、 2% CHAPSおよび $40\ \text{mM}$ Trisに再懸濁した。可溶化したタンパク質を、それぞれ最終濃度 $5\ \text{mM}$ トリ-n-ブチルホフィンおよび $10\ \text{mM}$ アクリルアミドで還元し、アルキル化した。

【0395】

7.4 二次元ゲル電気泳動

$11\ \text{cm}$ センチメートル $\text{pH}3\sim10$ または $\text{pH}4\sim7$ IPGをアマシャム(スウェーデン

10

20

30

40

50

、アップサラ)から購入した。等電点電気泳動法をプロテオーム・システムス(マサチューセッツ州、ウォバーン)のイソエレクトルIQ²ユニットを用いて製造業者の使用説明書のとおり実施した。二次元6~15%または14%均質Tris-アセテートゲルチップゲルを製造業者(プロテオーム・システムス、マサチューセッツ州、ウォバーン)によって推奨されるように実施した。配置されたタンパク質を銀染色によって可視化するか(シェフチェンコら、マス・スペクトロメトリック・シーケンシング・オブ・プロテインズ・シルバー-ステインド・ポリアクリルアミド・ゲルズ(Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels)、68、850~858頁、1996)、またはプロテオーム・システムス(米国、ウォバーン)製のイソエレクトルIQ²ユニットに付随するセミウェットメンブランプロットングカセットを用いることによ

10

【実施例8】

【0396】

免疫原性卵巣癌タンパク質の同定

卵巣癌を患っている何人かの被験体から腫瘍組織と血清の双方を回収する。すべての腫瘍サンプルが上皮起源のものであることを確認する。

【0397】

8.1 腫瘍細胞に由来するタンパク質の調製

細胞を冷PBS中で解離し、ペレットとし、冷PBS中で2回洗浄する。全細胞タンパク質抽出物の調製のために、細胞を抽出バッファー(125mM Tris-HCl、pH6.8、3%SDS、5%2-メルカプトエタノール、1mM PMSFおよび2.5g/mlのロイペプチン、ペプスタチン、アプロチニン、アンチパインおよびキモスタチン)に再懸濁し、超音波処理する。可溶性および不溶性細胞抽出物の調製には、細胞を冷バッファー(10mMリン酸ナトリウムバッファー、pH8.0、140mM NaCl、3mM MgCl₂、1mM DTT、0.5%ノニデットP-40および前記のプロテアーゼ阻害剤)に再懸濁し、氷上で15分間インキュベートし、10,000rpmで5分間遠心分離する。上清を水溶性抽出物として回収し、ペレットを冷バッファー(10mMリン酸ナトリウムバッファー、pH7.5、150mM NaCl、1mM DTT、1.0%ノニデットP-40、0.1%SDS、および前記のプロテアーゼ阻害剤)に再懸濁し、ボルテックスにかけ、次いで、10,000rpmで5分間遠心分離する。得られた上清を不溶性抽出物として回収する。

20

30

【0398】

8.2 免疫捕獲カラムの調製

免疫捕獲カラムを、上皮卵巣癌を患っている5人の被験体から得た約5mLの血清をプールすることによって作製した(全タンパク質濃度約40mg/mL)。プールした血漿を、タンパク質Aセファロースの50%スラリー10mLとともにインキュベートすることによって、免疫グロブリンをタンパク質Aセファロースと結合させる。マトリックスを10mM PBS pH7.4中で洗浄し、本質的には製造業者(ピエルス)によって記載されたように、DSSを利用して、結合している免疫グロブリンを不可逆的に固定化した。作製したカラムを捕獲カラムと呼ぶ。

40

【0399】

8.3 免疫原性タンパク質の単離

捕獲カラムを単離した乳癌タンパク質(実施例7.1に記載した)とともに一定回転下、4で一晩インキュベートする。続いて、ビーズを遠心分離によって回収する。フロースルーを回収してその後のインキュベーションステップのために確保する(タンパク質抽出物は、各捕獲において数回捕獲カラムに通す)。回収したビーズを10mM PBS pH7.4中で3回洗浄し、50mMグリシンpH2.7を用いて捕獲したタンパク質を溶出した。カラムは、最初50mMグリシンpH2.7、次いで10mM PBS pH

50

7.2で広範に洗浄し、その後のインキュベーションステップを続けた。

【0400】

溶出したタンパク質をアルコール沈殿させ、続いて、プロテオプレップ・ユニバーサル抽出キット（シグマ、ミズーリ州、セントルイス）を用い、本質的には製造業者によって記載されたように再可溶化させた。次いで、タンパク質を、それぞれ最終濃度5 mMトリ - n - ブチルホフィンおよび10 mMアクリルアミドを用いて還元し、アルキル化した。

【0401】

8.4 二次元ゲル電気泳動

11センチメートルpH3~10またはpH4~7IPG（アマシャム、スウェーデン、アップサラ）を用いる。等電点電気泳動法をプロテオーム・システムス（マサチューセッツ州、ウォバーン）のイソエレクトルIQ²ユニットを用いて製造業者の使用説明書のとおり実施する。二次元6~15%または14%均質Tris - アセテートゲルチップゲルを製造業者（プロテオーム・システムス、マサチューセッツ州、ウォバーン）によって推奨されるように実施する。配置されるタンパク質を銀染色によって可視化する（シェフチェンコら、マス・スペクトロメトリック・シーケンシング・オブ・プロテインズ・シルバー - ステインド・ポリアクリルアミド・ゲルズ、68、850~858頁、1996）。

【0402】

8.5 MS解析

注目するタンパク質スポットを切り出し、100 mM NH₄HCO₃ : 50%アセトニトリル（ACN）pH8.2中で2回洗浄し、50 で30分間脱水する。タンパク質をカタヤマらによって記載されたように（インブルーメント・オブ・イン - ゲル・ダイジェスチョン・プロトコル・フォー・ペプチド・マス・フィンガープリンティング・バイ・マトリックス - アシステッド・レーザー・デソープション / イオニゼーション・タイム - オブ - フライト・マス・スペクトロメトリー (Improvement of in-gel digestion protocol for peptide mass fingerprinting by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry)) 消化し、37 で3時間消化する。クスマンらによって記載されたように、超音波処理によってトリプシンペプチドを抽出し、精製する。ペプチドは約1.5 μlのMALDIマトリックス溶液（70% ACN、0.1% TFA、1.5 mg/ml - シアノ - 4 - ヒドロキシ桂皮酸（シグマ、ミズーリ州、セントルイス）で溶出する。アキシマCFR（クラトス、英国、マンチェスター）を用いるマトリックス支援レーザー脱離 / イオン化飛行時間型質量分析（MALDI - TOF MS）またはABI MALDI MS / MS（AMEバイオサイエンス、英国、ロンドン）によってペプチドマスフィンガープリント（PMF）を作製する。

【0403】

この方法を用いて、免疫原性タンパク質の断片を同定し、データベースと比較して免疫原性タンパク質を同定する。

【実施例9】

【0404】

免疫原性タンパク質を調べるための、乳癌細胞でのマウスの免疫化

9.1 マウスの免疫化

何個体かのマウスをMCF-7乳癌細胞系で免疫する。MCF-7細胞をフロイントの完全アジュバント（DIFCO製）と1:1の割合で混合し、混合物を乳化する。次いで、このエマルジョンを雌のBalb/Cマウスに皮下注射する。

【0405】

細胞溶液とフロイントの不完全アジュバント（DIFCO製）の乳化混合物（1:1の割合）のブースター免疫を、皮下注射による約2週間間隔の注射によって投与する。3回目のブースターの3日後に、尾静脈から血液サンプルを採取し、直接固相ELISAによって血清中の抗体産生を測定する。

【0406】

10

20

30

40

50

M C F - 7細胞をP B Sで希釈し、得られた溶液をE L I S Aプレートに約2時間吸着させる。次いで、このプレートを、ブロックエース(Blockace)(雪印乳業製)のP B Sでの4倍希釈液によってブロッキングする。プレートを洗浄した後、プレートの各ウェルに、免疫したマウスから得た血清の血清希釈バッファー(5% F B Sを含有するP B S)での種々の希釈液を加え、室温で2時間インキュベートする。

【0407】

プレートを洗浄した後、プレートの各ウェルにアルカリホスファターゼ標識したマウスI g G抗体(I C N / カペル(Cappel)製)を加え、室温で約1時間インキュベートする。

【0408】

次いで、二ナトリウムp - ニトロフェニルホスフェート(シグマ)を、基質反応混合物(0.5mM塩化マグネシウムを含有する9.6%ジエタノールアミンバッファー、pH 9.7)に、約2mg/mlの濃度で溶解し、基質溶液を調製する。プレートを精製水で7回洗浄し、基質溶液を加える。基質溶液と反応させた後、3N NaOHを加えて反応を停止し、405nmの吸光度を測定する。

【0409】

M C F - 7細胞に対して免疫応答を起こしているマウスから血清を抽出し、その血清をプールの。

【0410】

9.2 免疫捕獲カラムの調製

組換え免疫グロブリン結合性タンパク質P A Mタンパク質Aミメティックを用いて、血清サンプルから免疫グロブリンを単離する。

【0411】

P A M (A r g - T h r - T y r)₄ - L y s₂ - L y s - G l y (配列番号5)を、これまでに記載されたように(ファッシナ(Fassina)ら、ジャーナル・オブ・モレキュラー・レコグニション(Journal of Molecular Recognition)9、564頁、1996)、完全自動化ペプチドシンセサイザー431A(パーキン・エルマー(Perkin-Elmer))でFmoc法にしたがって固相ペプチド合成によって製造する。樹脂を切断した後、ペプチドを逆相高速液体クロマトグラフィー(RP-HPLC)によって精製し、アミノ酸解析および飛行時間型マトリックス支援レーザー脱離イオン化(TOF-MALDI)質量分析によって、予測値(2141amu)と同一の分子量であるならばその同一性を確認する。

【0412】

ペプチドをエムフェーズ(Emphaze)マトリックス(ポリアクリルアミド/アズラクトン活性化ゲル)(テクノゲン(TECNOGEN)、イタリア、カゼルタ、ピアナ・ジ・モンテベルナ)と、製造業者のプロトコールによって推奨されるようにカップリングする。10ミリグラムのペプチドを6mlの0.2M NaHCO₃、0.6M クエン酸Na、pH 8.0に溶解し、130mg(1mlに相当)の予め活性化したマトリックスとともにインキュベートする。種々の時点でRP-HPLCによってペプチドの組み込み度をモニタリングすることによって、懸濁液を穏やかな攪拌下、室温で数時間インキュベートする。0.1M Tris、pH 8.5で洗浄し、残存する活性基を不活化した後、最後に、樹脂を100x6.6mm I.D.ガラスカラムに詰める。

【0413】

0.5~1mlの血清(実施例9.1)に相当するサンプルを希釈し、流速60cm/hでバッファーを用いて平衡化したカラムにロードする。結合している画分を、数滴の1M Tris、pH 9.5で直ちに中和し、SDS-PAGEによって特性決定し、ゲル透過解析によってI g G純度を調べ、酵素結合免疫吸着測定法(E L I S A)によって免疫応答性および回収された免疫グロブリンの量を評価する。

【0414】

次いで、カラムに結合している免疫グロブリンを、D P S (ピエルス)を、本質的には製造業者の仕様説明書にしたがって用いて架橋する。

【0415】

10

20

30

40

50

9.3 腫瘍細胞に由来するタンパク質の調製

MCF-7細胞を冷PBSに回収し、ペレットとし、冷PBS中で2回洗浄する。全細胞タンパク質抽出物の調製のために、細胞を抽出バッファー(125mM Tris-HCl、pH6.8、3%SDS、5% 2-メルカプトエタノール、1mM PMSFおよび2.5g/mlのロイペプチン、ペプスタチン、アプロチニン、アンチパインおよびキモスタチン)に再懸濁し、超音波処理する。可溶性および不溶性細胞抽出物の調製には、細胞を冷バッファー(10mM リン酸ナトリウムバッファー、pH8.0、140mM NaCl、3mM MgCl₂、1mM DTT、0.5% ノニデットP-40および前記のプロテアーゼ阻害剤)に再懸濁し、氷上で15分間インキュベートし、10,000rpmで5分間遠心分離する。上清を水溶性抽出物として回収し、ペレットを冷バッファー(10mMリン酸ナトリウムバッファー、pH7.5、150mM NaCl、1mM DTT、1.0% ノニデットP-40、0.1% SDS、および前記のプロテアーゼ阻害剤)に再懸濁し、ボルテックスにかけ、次いで、10,000rpmで5分間遠心分離する。得られた上清を不溶性抽出物として回収する。

10

【0416】

9.4 免疫原性タンパク質の単離

捕獲カラムを、単離したMCF-7タンパク質(実施例9.3に記載した)とともに一定回転下、4で一晩インキュベートする。続いて、ビーズを遠心分離によって回収する。フロースルーを回収し、その後のインキュベーションステップのために確保する(タンパク質抽出物は、各捕獲において数回捕獲カラムに通す)。回収したビーズを10mM PBS pH7.4中で3回洗浄し、50mMグリシンpH2.7を用いて捕獲したタンパク質を溶出する。カラムは、最初50mMグリシンpH2.7、次いで10mM PBS pH7.2で広範に洗浄し、その後のインキュベーションステップを続ける。

20

【0417】

溶出したタンパク質をアルコール沈殿させ、続いて、プロテオプレップ・ユニバーサル抽出キット(シグマ、ミズーリ州、セントルイス)を用い、本質的には製造業者によって記載されたように再可溶化させる。次いで、タンパク質を、それぞれ最終濃度5mMトリ-n-ブチルホフィンおよび10mM アクリルアミドを用いて還元し、アルキル化する。

【0418】

本質的に実施例8に記載したように、回収したタンパク質を単離し、MSを用いて解析する。

30

【実施例10】

【0419】

糖尿病における免疫原性タンパク質の同定

10.1 免疫捕獲カラムの調製

免疫捕獲カラムを、I型糖尿病を患っている何人かの被験体から約5mLの血清をプールすることによって作製する(全タンパク質濃度約40mg/mL)。プールした血漿をタンパク質Gセファロースの50%スラリー10mLとともにインキュベートすることによって、免疫グロブリンをタンパク質Gセファロースに結合させる。マトリックスを10mM PBS pH7.4中で洗浄し、本質的には製造業者(ピエルス)によって記載されたように、SDSを利用して、結合している免疫グロブリンを不可逆的に固定化した。作製したカラムを捕獲カラムと呼ぶ。

40

【0420】

10.2 糖尿病に由来する免疫原性タンパク質の同定

本質的には、ルメルスキー(Lumelsky)ら、サイエンス、292、1389頁、2001に記載されたように、膵島様細胞を作製する。次いで、これらの細胞を溶解し、タンパク質を抽出する。分化細胞を溶解し、プロテオプレップ・ユニバーサル抽出キット(シグマ、ミズーリ州、セントルイス)を用い、本質的には製造業者によって記載されたようにタンパク質を抽出する。

50

【0421】

捕獲カラムを、単離した分化細胞タンパク質とともに、または糖尿病被験体または非糖尿病被験体から単離した血清とともに、一定回転下、4 で一晚インキュベートする。続いて、ビーズを遠心分離によって回収する。フロースルーを回収し、その後のインキュベーションステップのために確保する(タンパク質抽出物は、各捕獲において捕獲カラムに数回通す)。回収したビーズを10 mM PBS pH 7.4 中で3回洗浄し、50 mM グリシン pH 2.7 を用いて捕獲したタンパク質を溶出する。カラムは、最初50 mM グリシン pH 2.7、次いで10 mM PBS pH 7.2 で広範に洗浄し、その後のインキュベーションステップを続ける。

【0422】

溶出したタンパク質をアルコール沈殿させ、続いて、プロテオプレップ・ユニバーサル抽出キット(シグマ、ミズーリ州、セントルイス)を用い、本質的には製造業者によって記載されたように再可溶化させる。次いで、タンパク質を、それぞれ最終濃度5 mM トリ-n-ブチルホフィンおよび10 mM アクリルアミドを用いて還元し、アルキル化する。

【0423】

回収したタンパク質を単離し、本質的には実施例8に記載したようにMSを用いて解析する。

【実施例11】

【0424】

肝炎に由来する免疫原性タンパク質の同定

11.1 C型肝炎ウイルス様粒子の作製

HCV構造タンパク質(遺伝子型1bJ株)の相補DNAを含む組換えバキュロウイルスbvHCV.Sp7の構築を、本質的にはトリアトニ(Triyatni)らジャーナル・オブ・ピロロジー(Journal of Virology)、76、9335~9344頁、2002に記載されたように実施する。トリアトニ上記によって従前に記載されたように、スクロース勾配遠心分離によってHCV-LPを部分精製する。

【0425】

11.2 マウスの免疫化

マウス(6~8週齢)を、20 µgのHCV-LPを用いて各大腿四頭筋に、AS01 Bアジュバント(ガラクソスミスクライン(GalaxoSmithKline))またはCpG10105(コーリー・ファーマシューティカル・グループ(Coley Pharmaceutical Group)のいずれかを含む総容量100 µLで3週間間隔で4回免疫する。

【0426】

酵素結合免疫吸着測定法によって、粒子に対する抗体を産生するマウスを調べる。免疫化前と各免疫化の2週間後の血液サンプルを尾静脈から採取し、酵素結合免疫吸着測定法によって、本質的にはレックマン(Lechmann)ら、ヘパトロジー、34、417~423頁、2001に記載されたようにHCV E1/E2抗体について解析する。

【0427】

11.3 免疫捕獲カラムの作製

抗HCV E1/E2抗体を産生する数個体のマウスから得た血清をほぼプールすることによって免疫捕獲カラムを作製する。免疫グロブリンをPAM-EMPHAZE(実施例9.2に記載したように製造した)に結合させる。結合している免疫グロブリンを、本質的には製造業者(ピエルス)によって記載されたように、DSSを利用して不可逆的に固定化する。作製したカラムを捕獲カラムと呼ぶ。

【0428】

11.4 肝炎に由来する免疫原性タンパク質の同定

捕獲カラムを部分精製したHCV-LPとともに、一定回転下、4 で一晚インキュベートする。フロースルーを回収し、その後のインキュベーションステップのために確保する(タンパク質抽出物は、各捕獲において数回捕獲カラムに通す)。回収したビーズを10 mM PBS pH 7.4 中で3回洗浄し、50 mM グリシン pH 2.7 を用いて捕獲

10

20

30

40

50

したタンパク質を溶出する。カラムは、最初 50 mM グリシン pH 2.7、次いで 10 mM PBS pH 7.2 で広範に洗浄し、その後のインキュベーションステップを続ける。

【0429】

溶出したタンパク質をアルコール沈殿させ、プロテオプレップ・ユニバーサル抽出キット（シグマ、ミズーリ州、セントルイス）を用い、本質的には製造業者によって記載されたように再可溶化する。次いで、タンパク質を、それぞれ最終濃度 5 mM トリ - n - ブチルホフィンおよび 10 mM アクリルアミドで還元し、アルキル化する。

【0430】

回収したタンパク質を単離し、本質的には実施例 8 に記載したように MS を用いて解析する。 10

【図面の簡単な説明】

【0431】

【図 1】結核を患っている被験体の免疫グロブリン画分を用いて単離したタンパク質を示す 2 次元ゲルの写真表示である。

【図 2】本発明の方法を用い、免疫学的画分を用いて単離したタンパク質を示す 2 次元ゲルの写真表示である。タンパク質スポット 3 A と名づけられた注目するタンパク質が強調表示されている。

【図 3】図 1 で同定したタンパク質に由来するトリプシンペプチドのマスペクトルを示すグラフ表示である。 20

【図 4】緑膿菌感染症を患っている CF 被験体に由来する免疫グロブリン含有画分を用いて、緑膿菌から捕獲したタンパク質を示す 2 次元ゲルの写真表示である。

【図 5】増悪状態および緑膿菌感染症に苦しんでいる CF 被験体に由来する免疫グロブリン含有画分を用いて、CF 被験体の痰から捕獲したタンパク質を示す 2 次元ゲルを示す写真表示である。

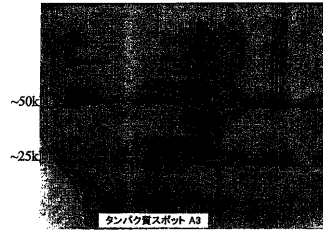
【図 6】4 人の CF 被験体および 3 人の健常な対照被験体の緑膿菌 GroES に対する免疫応答性を示す写真表示である。4 または 5 スポットを含むグリッド中の各スポット位置は、タンパク質に対する単一の被験体の免疫応答性を示し、そこで血漿アリコートが解析される。スポット位置 1 ~ 3 は健常な対照被験体に由来するものである。スポット位置 4 から 7 は CF 被験体に由来するものである。また、患者のサンプルを負の対照（BSA または PBS）に対してスクリーニングすることによって、観察した免疫応答性の特異性も示されている。 30

【図 7】結核菌の細胞抽出物で事前に免疫したニワトリが産んだ卵から得た免疫グロブリン含有画分を用いて、結核を患っている被験体の痰から単離したタンパク質を示す 2 次元ゲルを示す写真表示である。

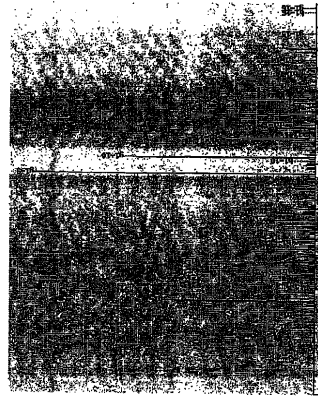
【 図 1 】



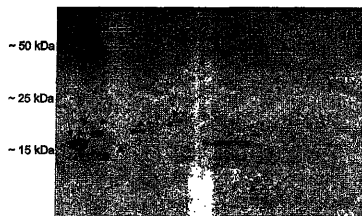
【 図 2 】



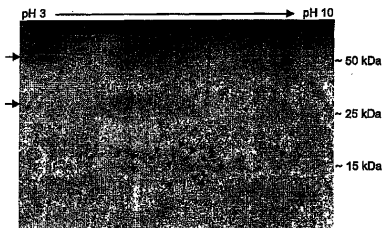
【 図 3 】



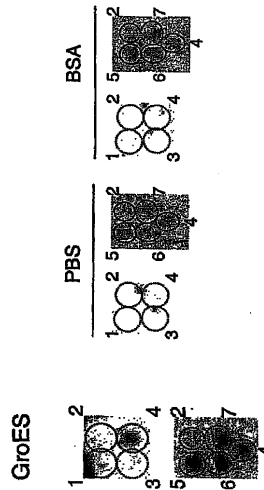
【 図 4 】



【 図 5 】



【 図 6 】



【 図 7 】



【 配列表 】

2007520688000001.xml

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/AU2004/000856
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int. Cl. ⁷ : G01N 33/68; 33/574, 33/564, 33/569 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) WPIDS, CA, JAPIO, Medline (antigen; antibody; complex; mycobacter* or tubercul* or pseudomon*; immunoadsorb* or immunoaffinity or immunocapture; diagnos* or identif* or screen or test; elut*)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5,932,705 A (BERGET et al.) 3 August 1999. Whole document.	43-174, 193-196
X	US 5,116,766 A (MCDONALD) 26 May 1992 Whole document (see, in particular, column 7 line 59 to column 8 line 16; Example 2).	1-42
X	US 6,416,962 B1 (DAS et al.) 9 July 2002 Whole document.	43-70, 128-174, 193-196
X	US 6,245,331 B1 (LAAL et al.) 12 June 2001 Whole document (see, for example, column 21 line 9-37; column 22 lines 31-45).	1-70, 128-174, 193-196
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 6 September 2004		Date of mailing of the international search report 20 SEP 2004
Name and mailing address of the ISA/AU AUSTRALIAN PATENT OFFICE PO BOX 200, WODEN ACT 2606, AUSTRALIA E-mail address: pct@ipaaustralia.gov.au Facsimile No. (02) 6285 3929		Authorized officer JULIE GALE Telephone No : (02) 6283 2272

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/AU2004/000856

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 1999/000671 A2 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF MICHIGAN) 7 January 1999. Whole document.	43-174, 193-198
X	US 5,670,312 A (SANTI) 23 September 1997. Whole document.	43-174, 193-198
X	Kronborg, G. et al., (1992) <i>APMIS</i> , vol. 100, pp 175-180. 'Lipopolysaccharide is present in immune complexes isolated from sputum in patients with cystic fibrosis and chronic <i>Pseudomonas aeruginosa</i> lung infection'. Whole document.	1-174, 193-198
X	Romain F. et al., (1993) <i>Infection and Immunity</i> , vol. 61(2), pp 742-750. 'Identification of a <i>Mycobacterium bovis</i> BCG 45/47-kilodalton antigen complex, an immunodominant target for antibody response after immunization with living bacteria'. Whole document.	43-70, 128-160, 193-196
X	Ranadive S.N. et al., (1986) <i>Clin. Exp. Immunol.</i> , vol. 64, pp 277-284. 'Humoral immune response in tuberculosis: initial characterization by immunoprecipitation of ¹²⁵ Iodine labelled antigens and sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis'. Whole document.	43-70, 128-174, 193-196

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/AU2004/000856

This Annex lists the known "A" publication level patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent Document Cited in Search Report		Patent Family Member			
US 5,932,705	US 4957739	US 5336491			
US 5,116,766	CA 1233115	EP 0109051	US 4783525		
US 6,416,962	US 2003153019				
US 6,245,331	US 6506384				
WO 99/00671	AU 82673/98	CA 2294514	EP 0991945		
	US 6677128				
US 5,670,312	AU 11804/95	CA 2175374	EP 0729517		
	EP 1150121	US 5492807	WO 9514110		
Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001.					
END OF ANNEX					

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/564 (2006.01)	G 0 1 N 33/569	B
G 0 1 N 33/547 (2006.01)	G 0 1 N 33/569	A
	G 0 1 N 33/564	Z
	G 0 1 N 33/547	

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

(74) 代理人 100114465

弁理士 北野 健

(74) 代理人 100130328

弁理士 奥野 彰彦

(72) 発明者 ペダーセン, スザンヌ, カーティン

オーストラリア国 2040 ニュー サウス ウェールズ州 リリーフィールド, キャサリン
ストリート 334

(72) 発明者 コール, ロバート, アラン

オーストラリア国 2065 ニュー サウス ウェールズ州 グリニッチ, ロナルド アベニュー
56, ユニット 2

(72) 発明者 ウェインバーガー, ロン

オーストラリア国 2026 ニュー サウス ウェールズ州 ノース ボンディ, マリベリー
ロード 19

(72) 発明者 スローン, アンドリュー, ジョン

オーストラリア国 2041 ニュー サウス ウェールズ州 バルメイン, ローズベリー プレ
イス 3, ユニット 7

专利名称(译)	蛋白质分离方法		
公开(公告)号	JP2007520688A	公开(公告)日	2007-07-26
申请号	JP2006515556	申请日	2004-06-28
[标]申请(专利权)人(译)	普罗托姆系统知识产权有限公司		
申请(专利权)人(译)	Puroteomu系统知识产权专有限公司		
[标]发明人	ペダーセンズザンヌカーティン コールロバートアラン ウェインバーガーロン スローンアンドリュージュオン		
发明人	ペダーセン,スザンヌ,カーティン コール,ロバート,アラン ウェインバーガー,ロン スローン,アンドリュージュオン		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/545 G01N33/548 G01N33/543 G01N33/569 G01N33/564 G01N33/547 G01N33/574 G01N33/68		
CPC分类号	G01N33/564 G01N33/569 G01N33/6854		
FI分类号	G01N33/53.D G01N33/545.Z G01N33/548.Z G01N33/543.501.J G01N33/569.G G01N33/569.B G01N33/569.A G01N33/564.Z G01N33/547		
代理人(译)	森田浩二 田中玲子 北野 健		
优先权	2003903317 2003-06-27 AU		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供从包含免疫球蛋白或其混合物的蛋白质复合物或含免疫球蛋白的级分中分离和/或鉴定免疫原性蛋白质的方法。

イテリ番号	イテリ番号	イテリ中のイテリの部位	イテリ
1	6	204~221	PEPTIDYLAMINOACIDAMIDES
2	7	241~255	PEPTIDYLAMINOACIDAMIDES
3	8	305~318	PEPTIDYLAMINOACIDAMIDES
4	9	340~351	PEPTIDYLAMINOACIDAMIDES
5	10	401~419	PEPTIDYLAMINOACIDAMIDES
6	11	490~501	PEPTIDYLAMINOACIDAMIDES