

(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2015-519305
(P2015-519305A)

(43) 公表日 平成27年7月9日(2015.7.9)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 39/102 (2006.01)	A 6 1 K 39/102 Z N A	4 B 0 6 5
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 P 31/04 1 7 1	4 C 0 8 5
A 6 1 P 37/04 (2006.01)	A 6 1 P 37/04	4 H 0 4 5
A 6 1 P 11/14 (2006.01)	A 6 1 P 11/14	
A 6 1 P 11/00 (2006.01)	A 6 1 P 11/00	

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 69 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2015-504672 (P2015-504672)
 (86) (22) 出願日 平成25年4月2日 (2013.4.2)
 (85) 翻訳文提出日 平成26年10月3日 (2014.10.3)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2013/034918
 (87) 国際公開番号 W02013/151979
 (87) 国際公開日 平成25年10月10日 (2013.10.10)
 (31) 優先権主張番号 61/620, 652
 (32) 優先日 平成24年4月5日 (2012.4.5)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 13/796, 653
 (32) 優先日 平成25年3月12日 (2013.3.12)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 503345374
 ベーリンガー インゲルハイム フェトメ
 ディカ インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国 ミズーリ州 64506
 -2002 セント ジョセフ ノース
 ベルト ハイウェイ 2621
 (74) 代理人 100092093
 弁理士 辻居 幸一
 (74) 代理人 100082005
 弁理士 熊倉 禎男
 (74) 代理人 100084663
 弁理士 稲田 篤
 (74) 代理人 100093300
 弁理士 浅井 賢治

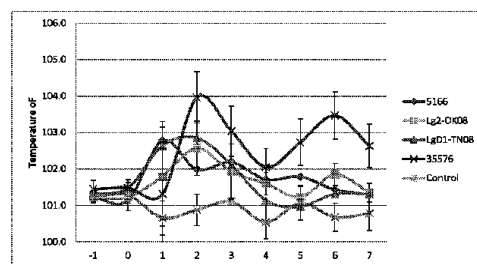
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒストフィルス・ソムニの外膜タンパク質とその方法

(57) 【要約】

本発明は、H.ソムニの外膜タンパク質 (OMP) の免疫学的組成物の他に、抽出方法、呼吸器チャレンジモデル、投与方法並びに診断アッセイ及びキットに関する。

FIG. 1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

少なくとも1つの外膜タンパク質（OMP）ヒストフィルス・ソムニペプチド及び生理学的に許容できるベヒクルを含む免疫原性組成物であって、該OMPヒストフィルス・ソムニペプチドがヒストフィルス・ソムニに対して免疫反応性である、前記免疫原性組成物。

【請求項 2】

生理学的に許容できるベヒクルが、医薬的若しくは獣医的に許容できる担体、アジュバント又は前記の組合せから成る群から選択される、請求項 1 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 3】

PTA-12755、PTA-12756及びそれらの組合せを含む、請求項 1 に記載の免疫原性組成物。

10

【請求項 4】

請求項 1 に記載の免疫原性組成物の対象動物への投与を含む、ヒストフィルス・ソムニ感染に対して免疫応答を惹起する方法。

【請求項 5】

請求項 1 に記載の免疫原性組成物のその必要がある対象動物への投与を含む、ヒストフィルス・ソムニ感染に付随する臨床徴候の発生及び重篤度を軽減する方法であって、該臨床徴候の発生又は重篤度の軽減が、該免疫原性組成物を投与されなかった対象動物と比較して少なくとも10%である、前記方法。

【請求項 6】

臨床徴候が、喘ぎ呼吸又は急迫呼吸、咳、食欲不振、抑うつ又は無気力、鼻及び眼の分泌物放出、並びに死亡率から成る群から選択される、請求項 5 に記載の方法。

20

【請求項 7】

対象動物が、ウシ又はヒツジから成る群から選択される動物である、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 8】

少なくとも1つのOMPヒストフィルス・ソムニペプチドを生理学的に許容できるベヒクルと混合することを含む、請求項 1 に記載の免疫原性組成物を調製する方法。

【請求項 9】

対象動物でヒストフィルス・ソムニ感染症を診断する方法であって、前記方法が、少なくとも1つのOMPヒストフィルス・ソムニペプチドを提供する工程、該ヒストフィルス・ソムニペプチドを該対象動物から得られたサンプルと接触させる工程、及び、該ヒストフィルス・ソムニペプチドと結合できる抗体が該サンプルで検出される場合に、該対象動物がヒストフィルス・ソムニ感染症を有すると認定する工程を含む、前記方法。

30

【請求項 10】

少なくとも1つのOMPヒストフィルス・ソムニペプチド、免疫原性担体、該OMPヒストフィルス・ソムニペプチド及び免疫原性担体を包む容器、印刷された指示一式、並びにワクチンを動物に投与することができるディスペンサーを含むキット。

【請求項 11】

(i) OMPヒストフィルス・ソムニペプチド及び(ii)生理学的に許容できるベヒクルを含む、請求項 1 に記載の免疫原性組成物を調製するためのキットであって、(i)及び(ii)が別々に包装される、前記キット。

40

【請求項 12】

さらにキットの使用についての指示を含む、請求項 11 に記載のキット。

【請求項 13】

さらにディスペンサーを含む、請求項 11 に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ヒストフィルス・ソムニ (*Histophilus somni*) が関与するウシの呼吸器感染症に対して使用されるヒストフィルス・ソムニの外膜タンパク質 (OMP) の免疫学的組

50

成物に関する。

【背景技術】

【0002】

ウシ呼吸器複合症 (Bovine Respiratory Disease Complex; BRDC) は多数の微生物病原体から成り、畜産業に大きな経済的損失をもたらす。予防ワクチン接種及び大流行後の投薬の両方を含む治療コストは年間ほぼ10億ドルと概算される (Griffin, D. 1997. Economic Impact Associated with Respiratory Disease in Beef Cattle. *Vet. Clin. North Am. Anim. Pract.* 13;p367-377)。この経済的影響に付加されるものは、BRDCと診断された動物で認められる出来具合に関係する損失で、それらは一日の平均体重増加、採集時の体重及び肉質等級の相当な低下に関連する (Babcock, A.H. 2010. Epidemiology of Bovine Respiratory Disease and Mortality in Commercial Feedlots. Kansas State University (博士論文))。出来具合の低下に付随する具体的な金銭的損失に関する報告は変動するが (おそらくBRDCの症例の定義が変動することによる)、動物1頭につき40ドル (Fulton, R.W. et al. 2002. Evaluation of Health Status of Calves and the Impact on Feedlot Performances: Assessment of a Retained Ownership Program for Postweaning Calves. *Can. J. Vet. Res.* 66, 173-180) からほぼ300ドル (Duff and Gaylean 2011. Recent Advances in Management of Highly Stressed, Newly Received Feedlot Cattle. *Journal of Animal Science.* 85; p 823-840) と概算される。前記出来具合の低下はまた、動物がBRDCの治療を必要とする回数とともに顕著に増加することが示された (Fulton et al. 2002)。

10

20

【0003】

ヒストフィルス・ソムニ (以前にはヘモフィルス・ソムス (*Haemophilus somnus*)) は、BRDCの主要な寄与因子と同定された (Duff and Gaylean 2011)。パストレラ科 (Pasteurellaceae) ファミリー (Korczak et al. 2004. Phylogeny of the Family Pasteurellaceae based on rpoB sequences. *International Journal of Systemic and Evolutionary Microbiology.* 54; p 1393-1399) に属するこのグラム陰性多形性球杆菌は、ウシ、ヒツジ及び他の反芻動物の上気道及び尿生殖器道の正常な微生物相の部分を形成する (Ward et al. 2006. *Haemophilus somnus* (*Histophilus somni*) in Bighorn Sheep. *Canadian Journal of Veterinary Research.* 70; p. 34-42)。ヒストフィルス・ソムニは、他のウシ病源体 (パストレラ・ムルトシダ (*P. multocida*) 及びマンハイミア・ヘモリチカ (*Mannheimia haemolytica*) (前記はまたともにBRDCに関与する) を含む) の他にヒトの病源体 (ヘモフィルス・デュクレイ (*Haemophilus ducreyi*) 及びヘモフィルス・インフルエンザエ (*Haemophilus influenzae*)) と近縁である (Challacombe et al. 2007. Complete Genome Sequence of *Haemophilus somnus* (*Histophilus somni*) strain 129Pt and Comparison to *Haemophilus ducreyi* 35000HP and *Haemophilus influenzae* Rd. *Journal of Bacteriology* 189(5); p 1890-1898)。

30

臨床症状が出現していない健康なウシの上気道からのH.ソムニの単離率の概算は50%であるが、BRDCと診断された動物はこの細菌のさらに高い単離率を示す (Griffin, D. 2010. Bovine Pasteurellosis and Other Bacterial Infections of the Respiratory Tract. *Veterinary Clinics of North American Food Animal Practice.* 26(1); p57-71)。ストレス条件下又は免疫抑制状態下では、H.ソムニは下気道、心内膜又は中枢神経系でコロニーを形成することがあり、多様な疾患 (例えば肺炎、心内膜炎、関節炎、流産、敗血症及び血栓塞栓性髄膜脳炎 (TEME)) の病因因子と同定された (Ward et al. 2006)。

40

【0004】

屠殺時には、適切な処置 (予防ワクチン接種及び流行時の適切な抗生物質) を受けた動物の15%未満が肺病巣の徴候を示し、さらにこれらの病巣は全肺臓の5%未満を含む (Griffin, D. 2010)。逆に、適切な手当てを受けなかった動物の50%が屠殺時に肺病巣を示し、これらの病巣は全肺臓の15%を含み得る (Griffin, D. 2010)。10,000頭を超える動物のある野外試験では、459頭のウシ (4.6%) が1つの型又は別の型の疾患で死亡した。この実験の死亡数に関して、279頭 (60.8%) が軽度の呼吸器疾患と関係があることが示

50

され、呼吸器感染を示すウシで、226頭（81.0%）がH.ソムニ関連肺炎、胸膜炎又は膿瘍を伴った（Ribble et al. 1988. Efficacy of Immunization of Feedlot Cattle with a Commercial Haemophilus somnus bacterin. Canadian Journal of Veterinary Research. 52; p191-198）。抗生物質処置はH.ソムニ感染に良好に应答できるが、抗生物質耐性野外単離株蔓延の高まりが懸念される（Duff and Gaylean 2011）。ワクチン接種による予防的当てが望ましいであろう。なぜならば、ワクチン接種は後手活動ではなく先手活動であり、はるかに費用効率が高いからである。

【0005】

これまでのところ、多くのH.ソムニワクチンが多様な動物健康管理会社から入手できるが、これらのワクチンのもっぱら殺滅バクテリンで構成され、TEMEを予防する目的で30年前に認可された。これらのバクテリンワクチンの使用はTEMEに対しては有効であったが、フィードロットのウシの呼吸器疾患には効果が不明確であるか負の作用すら示すことが判明した。負の副作用には、IgE誘発アナフィラキシーショック及びウシ呼吸器合胞体ウイルス（BRSV）感染牛のワクチン接種時の相互作用が含まれる（Griffin, D. 2010）。TEME流行の減少並びに1980年代後期に始まった米国でのH.ソムニ関連肺炎の出現及びカナダでの心筋炎の出現は、ワクチン製造のために有効な抗原の更なる究明の要請につながった（O'Toole et al. 2009. Diagnostic Exercise: Myocarditis due to Histophilus somni in Feedlot and Backgrounded Cattle. Veterinary Pathology. 46; p1015-1017）。

H.ソムニ関連肺炎は牛肉産業及び酪農産業にとって経済的に重要な症状である。これまで入手可能であったワクチンの野外における有効性の証拠はほとんどなく、したがって次世代ワクチンの研究の必要性は明らかである。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明は、当業界の欠陥を克服する免疫原性組成物、ワクチン及び関連方法を提供する。該組成物及び方法は、反芻動物（ウシ、ヒツジ及びバイソンを含むが、ただしこれらに限定されない）の呼吸器症状を治療する、ヒストフィルス・ソムニの外膜タンパク質（OMP）を提供する。

本発明はさらに、ヒストフィルス・ソムニを含む、本発明の免疫原性組成物及びワクチンを含む。本明細書に規定する少なくとも1つ以上のOMPヒストフィルス・ソムニポリペプチドを含む本発明の免疫原性組成物は、さらに生理学的に許容できるベヒクル、例えば医薬的若しくは獣医的に許容できる担体、アジュバント又は前記の組合せを含む。

本明細書で提供するOMPヒストフィルス・ソムニポリペプチドのいずれも、又は本明細書で提供するこれらのOMPヒストフィルス・ソムニポリペプチドの1つ以上を含む任意の免疫原性組成物は、医薬品として、好ましくはワクチン又は免疫原性組成物として、もっとも好ましくはヒストフィルス・ソムニ感染に対する対象動物の予防又は治療のために用いることができる。

OMPヒストフィルス・ソムニポリペプチドの2つの代表的単離株はLg2-OK08及びLgD1-TN08を含み、前記は米国菌培養収集所（ATCC；10801 University Boulevard, Manassas, VA20110-2209）にブダベスト条約の条項に基づき2012年3月29日に寄託され、それぞれPTA-12755及びPTA-12756と称される。

【0007】

本明細書で用いられる組成物は公知の注射可能な生理学的に許容できる無菌的溶液を取り込むことができることは、当業者には理解されよう。非経口注射又は輸液用の即席溶液を調製するために、等張な水溶液（例えば食塩水又は血漿タンパク質溶液）を容易に利用できる。さらにまた、本発明の免疫原性及びワクチン組成物は獣医的に許容できる担体、希釈剤、等張剤、安定化剤又はアジュバントを含むことができる。

本発明の方法には、対象動物でヒストフィルス・ソムニ感染に対する免疫応答を惹起する方法が含まれ（ただし前記に限定されない）、前記方法は、本明細書に規定する1つ以上のOMPヒストフィルス・ソムニポリペプチドを含む免疫原性組成物を対象動物に投与す

る工程を含む。好ましくは、該免疫応答はヒストフィルス・ソムニの2つ以上の血清型又は単離株に対して惹起される。本発明の組成物は、ヒストフィルス・ソムニ感染の治療或いはまた予防に用いることができる。好ましくは、そのような免疫応答は、1つ以上のヒストフィルス・ソムニ血清型の感染に付随する1つ以上の臨床徴候の発生又はその重篤度を軽減する。

【0008】

本明細書では、本発明の組成物を投与し得る適切な及び必要がある対象動物(subject)には、ウイルス、微生物、寄生動物、原生動物、細菌又は真菌が関与する感染症、疾患若しくは症状の予防又は治療の必要がある動物及び人間が含まれる。好ましい動物にはウシ及びヒツジが含まれる。もっとも好ましくは、免疫応答はウシで刺激される。

本発明はまた、ヒストフィルス・ソムニ感染に付随する1つ以上の臨床徴候の発生又は重篤度を軽減する方法を提供し、前記方法は、本明細書で提供する1つ以上のOMPヒストフィルス・ソムニペプチド及び好ましくは担体分子を含む、本発明の免疫原性組成物を投与し、それによって本明細書で提供する免疫原性組成物を投与されなかった対象動物と比較して、ヒストフィルス・ソムニ感染症の臨床徴候の発生又は重篤度が、少なくとも10%、好ましくは少なくとも20%、さらに好ましくは少なくとも30%、さらに好ましくは少なくとも50%、さらに好ましくは少なくとも70%、もっとも好ましくは少なくとも100%軽減される工程を含む。そのような臨床徴候には、喘ぎ(labored)呼吸若しくは急迫呼吸、咳、食欲不振、抑うつ若しくは無気力、鼻若しくは眼の分泌物放出、及び死亡率が含まれる。さらに別の特徴にしたがえば、本発明はヒストフィルス・ソムニ感染症の予防方法に

【0009】

本発明はまた、本明細書で提供する免疫原性組成物のいずれかを調製する方法を提供し、前記方法は、本明細書で提供する1つ以上のOMPヒストフィルス・ソムニペプチドと担体分子を、好ましくは該1つ以上のOMPヒストフィルス・ソムニペプチド及び担体分子が互いに共有結合的に結びつくか(covalently coupled)又は複合物を形成する(conjugated)ように混合する工程を含む。そのような複合物は多価でも一価でもよい。多価組成物又はワクチンは、複数のOMPヒストフィルス・ソムニペプチドと1つの担体分子の免疫性複合物(immuno-conjugation)を含む。さらに別の特徴では、本発明は、1つ以上のOMPヒストフィルス・ソムニペプチドを製造する方法を提供し、前記方法は、宿主細胞(好ましくは原核細胞、例えば大腸菌(E. coli))を本明細書で提供するヒストフィルス・ソムニペプチドのいずれかをコードする核酸分子で形質転換する工程を含む。また別には、該宿主細胞は、真核細胞(例えば動物細胞、原生動物細胞、植物細胞又は真菌細胞)であってもよい。好ましくは、該真核細胞は、哺乳動物細胞(例えばCHO、BHK又はCOS)又は真菌細胞(例えばサッカロミセス・セレビスシアエ(Saccharomyces cerevisiae))又は昆虫細胞(例えばSf9)である。

【0010】

本発明の別の特徴は、ヒストフィルス・ソムニに対する免疫応答を誘発する1つ以上のOMPヒストフィルス・ソムニペプチドを製造する方法を提供する。前記方法は、本明細書で開示する1つ以上のヒストフィルス・ソムニペプチドをコードし前記を発現する形質転換された発現ベクターを培養する工程を含む。発現されたタンパク質は当該発現生物によって保持されるか、又は培養媒体中に分泌される。発現は、ヒストフィルス・ソムニに対する免疫応答を誘発することができるOMPヒストフィルス・ソムニペプチドを製造するために十分な条件下で実施される。

本発明の組成物を生成する方法はさらに、1つ以上のOMPヒストフィルス・ソムニペプチド及び担体分子の複合物を生理学的に許容できるベヒクル(例えば医薬的若しくは獣医的に許容できる担体、アジュバント又はその組合せ)とともに混合する工程を含むことができる。ベヒクル、アジュバント又は組合せの選択は、とりわけデリバリールート、個人的な好み及び動物種によって決定されることは当業者には理解されよう。

10

20

30

40

50

【0011】

別の特徴では、本発明は、対象動物でヒストフィルス・ソムニ感染症を診断する方法を提供する。当該方法は、1つ以上のOMPヒストフィルス・ソムニペプチドを提供する工程、該1つ以上のOMPヒストフィルス・ソムニペプチドを該対象動物から得られたサンプルと接触させる工程、及び該1つ以上のOMPヒストフィルス・ソムニペプチドと結合できる抗体が該サンプルで検出される場合に、該対象動物がヒストフィルス・ソムニ感染症を有すると認定する工程を含む。

別の観点では、本発明は、対象動物が以前にヒストフィルス・ソムニ感染に曝露されたこと及びヒストフィルス・ソムニに対し免疫応答を発現できることを確認する方法を提供する。当該方法は、1つ以上のOMPヒストフィルス・ソムニペプチドを提供する工程、該1つ以上のOMPヒストフィルス・ソムニペプチドを該対象動物から得られたサンプルと接触させる工程、及び該1つ以上のOMPヒストフィルス・ソムニペプチドと結合できる抗体が該サンプルで検出される場合に、該対象動物がヒストフィルス・ソムニ感染症を有すると認定する工程を含む。

【0012】

本発明はまた、1つ以上のOMPヒストフィルス・ソムニペプチドを（好ましくは担体分子と一緒に）含む免疫原性組成物、該免疫原性組成物を包む容器、印刷された指示一式、及び該免疫原性組成物を動物に投与することができるディスペンサーを含むキットを提供する。場合によって、該1つ以上のOMPヒストフィルス・ソムニペプチド及び担体分子は複合物として又は別個の化合物として包装され得る。別個に供給されるときは、該1つ以上のOMPヒストフィルス・ソムニペプチド及び担体分子の複合物を形成する手段がまた、印刷された適切な指示と同様に提供される。

本発明はまた動物にワクチン接種するキットを提供し、前記キットは、印刷された指示一式、1つ以上のOMPヒストフィルス・ソムニペプチドを含む本明細書で提供する免疫原性組成物を動物に投与することができるディスペンサーを含み、ここで、OMPヒストフィルス・ソムニペプチドの少なくとも1つが、ヒストフィルス・ソムニ感染が関与する少なくとも1つの疾患に対して動物を効果的に免疫する。好ましくは、該1つ以上のOMPヒストフィルス・ソムニペプチドは本明細書で提供するものから選択される。本発明のキットはさらに、獣医的に許容できる担体、アジュバント又はその組合せを含むことができる。

本発明のキットのディスペンサーは、その内容物を小滴として分配することができ、さらにキットに含まれる該免疫組成物は本明細書で提供するOMPヒストフィルス・ソムニペプチドを含み、動物の鼻内に、経口的に、皮内に又は筋肉内に投与されたとき、ヒストフィルス・ソムニ感染症の少なくとも1つの臨床徴候の重篤度を軽減することができる。好ましくは、臨床徴候の重篤度は、未処置の感染動物と比較して少なくとも10%、好ましくは少なくとも20%、さらに好ましくは少なくとも30%、さらに好ましくは少なくとも50%、さらに好ましくは少なくとも70%、もっとも好ましくは少なくとも100%軽減される。

【0013】

ヒストフィルス・ソムニ関連感染症の治療又は予防方法もまた開示される。前記方法は、有効な量の本発明の免疫原性組成物を対象動物に投与する工程を含み、前記治療又は予防は以下から成る群から選択される：ヒストフィルス・ソムニ感染症の徴候を軽減すること、ヒストフィルス・ソムニ感染症の臨床徴候の重篤度又は発生を軽減すること、対象動物のヒストフィルス・ソムニ感染症による死亡率を低下させること、及び前記の組合せ。

本発明の組成物はさらに、獣医的に許容できる担体、アジュバント又は前記の組合せを含む。そのような組成物はワクチンとして用いることができ、弱毒ワクチン、不活化ワクチン又は前記の組合せを含む。

本明細書で用いられる組成物が公知の注射可能な生理学的に許容できる無菌溶液を含むことは当業者には理解されよう。非経口的な注射又は輸液の即席溶液を調製するために、等張な水溶液、例えば食塩水又は血漿タンパク質溶液を容易に利用できる。さらにまた、本発明の免疫原性及びワクチン組成物は、医薬的若しくは獣医的に許容できる担体、希釈剤、等張剤、安定化剤又はアジュバントを含むことができる。

10

20

30

40

50

本発明の方法はまた、本発明の組成物を獣医的に許容できる担体、アジュバント又は前記の組合せと混合する工程を含むことができる。担体、アジュバント又は組合せの選択は、とりわけデリバリールート、個人的な好み及び動物種によって決定されることは当業者には理解されよう。

【0014】

本発明はまた、動物のヒストフィルス・ソムニ感染症の重篤度を軽減する方法を提供し、前記方法はヒストフィルス・ソムニのOMPを含む組成物を動物に投与する工程を含む。

ヒストフィルス・ソムニが関与する感染症の治療又は予防の方法もまた開示される。前記方法は、有効な量の本発明の免疫原性組成物を対象動物に投与する工程を含み、前記治療又は予防は以下から成る群から選択される：ヒストフィルス・ソムニ感染症の徴候を軽減すること、ヒストフィルス・ソムニ感染症の臨床徴候の重篤度又は発生を軽減すること、対象動物のヒストフィルス・ソムニ感染症による死亡率を低下させること、及び前記の組合せ。

好ましい投与ルートには、鼻内、経口、皮内及び筋肉内が含まれる。飲料水による投与、好ましくは一回投与が好ましい。本発明の組成物はまた2回以上投与し得るとともに他の投与ルートにより投与できることは当業者には理解されよう。例えば、そのような他のルートには皮下、皮内、静脈内、血管内、動脈内、腹腔内、包膜内、気管内、心臓内、肺葉内、脊髄内、肺臓内又は腔内である。所望される治療の持続時間及び有効性に依りて、本発明の組成物は、1回又は数回、さらに間歇的に、例えば日を基準として数日間、数週間又は数カ月間にわたって種々の投薬量で投与され得る。

【0015】

本発明はまた動物にワクチン接種するキットを提供し、前記キットは、印刷された指示一式、動物にワクチンを投与できるディスペンサー、及びヒストフィルス・ソムニが関与する少なくとも1つの疾患に対して動物を効果的に免疫するヒストフィルス・ソムニのOMPの少なくとも1つの単離株を含む。本発明のキットはさらに、獣医的に許容できる担体、アジュバント又はその組合せを含むことができる。

本発明のキットのディスペンサーは、その内容物を小滴として分配することができ、さらにキットに含まれる単離株は、動物の鼻内に、経口的に、皮内に又は筋肉内に投与されたとき、ヒストフィルス・ソムニ感染症の少なくとも1つの臨床徴候の重篤度を軽減することができる。いくつかのキットでは、該単離株はまた、ヒストフィルス・ソムニ感染症の少なくとも1つの臨床徴候の重篤度を軽減することができる。好ましくは、臨床徴候の重篤度は、未処置の感染動物と比較して少なくとも10%軽減される。

本発明の他の目的、特色及び利点は以下の詳細な説明から明白となる。しかしながら、該詳細な説明及び具体的な実施例は本発明の好ましい実施態様を提示するが、前記は単に例示として提供されることは理解されよう。なぜならば、本発明の趣旨及び範囲内で多様な変更及び改変が本詳細な説明から当業者には明らかになるからである。

以下の図は本明細書の部分を構成し、本発明のある種の特徴をさらに提示するために包含される。本発明は、本明細書に提示する具体的な実施態様の詳細な説明と併せてこれらの図面の1つ以上を参照することによってより深く理解し得よう。本出願はカラーで示す少なくとも1枚の図面を含む。カラー図面を含む本特許出願公開公報のコピーは、申請及び必要な料金の支払いにしたがって当局によって提供されるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0016】

【図1】処置グループの平均直腸温度を示すグラフである。基準直腸温度は、チャレンジ1日前、続いてチャレンジ直前(-1日目及び0日目)の両方の観察によって入手した。直腸温度はチャレンジに続いて毎日記録し、最終剖検を7日目に実施するまで継続した。誤差バーは、 ± 0.1 による信頼を示す。

【図2】総肺病変パーセントを示すグラフである。肺関与のパーセンテージは、担当の現場獣医師の各肺葉の観察及び触診によって決定された。合計パーセンテージは、文献記載の方法(Jericho and Langford, 1982)を用いて計算された。誤差バーは ± 0.1 による

10

20

30

40

50

信頼を示す。非チャレンジコントロール動物は病変を示さなかった。全てのチャレンジグループが、チャレンジが成功であると考えするために十分な病変を生じたが、単離株Lg2-OK08が、もっとも強くもっとも一定した病毒性（ビルレンス）を示し、さらに単離株5166よりも有意に強い病変を提示した（ $p=0.08$ ）。

【図3】処置グループの平均直腸温度を示すグラフである。基準直腸温度は、チャレンジ1日前、続いてチャレンジ直前（41日目及び42日目）の両方の観察によって入手した。直腸温度はチャレンジに続いて毎日記録し、最終剖検を49日目に実施するまで継続した。誤差バーは、 $=0.1$ による信頼を示す。

【図4】総肺病変パーセントを示すグラフである。肺関与のパーセンテージは、担当の現場獣医師の各肺葉の観察及び触診によって決定された。合計パーセンテージは、文献記載の方法（Jericho and Langford, 1982）を用いて計算された。誤差バーは $=0.1$ による信頼を示す。OMPワクチンは、非ワクチン接種コントロールと比較したとき肺病変を有意に軽減させた（ $p=0.001$ ）。

【図5】処置グループの平均直腸温度を示すグラフである。基準直腸温度は、チャレンジ1日前、続いてチャレンジ直前（41日目及び42日目）の両方の観察によって入手した。直腸温度はチャレンジに続いて毎日記録し、最終剖検を49日目に実施するまで継続した。誤差バーは、 $=0.1$ による信頼を示す。

【図6】総肺病変を示すグラフである。肺関与のパーセンテージは、担当の現場獣医師の各肺葉の観察及び触診によって決定された。合計パーセンテージは、文献記載の方法（Jericho and Langford, 1982）を用いて計算された。誤差バーは $=0.1$ による信頼を示す。単離株Lg2-OK08（ $p=0.03$ ）及びLgD1-TN08（ $p=0.05$ ）から調製したとき、サルコシル抽出ワクチンは、非ワクチン接種コントロールと比較したとき病変の有意な軽減を生じた。単離株LgD1-TN08のSDS抽出は肺病変の軽減を生じたが、統計的に有意ではなかった（ $p=0.01$ ）。156A2のトリトンX抽出は、コントロールグループと比較したとき病変に相違はなかった。

【図7】処置グループの平均直腸温度を示すグラフである。基準直腸温度は、チャレンジ1日前、続いてチャレンジ直前（41日目及び42日目）の両方の観察によって入手した。直腸温度はチャレンジに続いて毎日記録し、最終剖検を49日目に実施するまで継続した。誤差バーは、 $=0.1$ による信頼区間を示し、44日目から開始しこのチャレンジ期間の最後まで継続してチャレンジコントロールグループと比較したとき、SDS抽出ワクチンの平均直腸温度の有意な低下を表している。

【図8】総肺病変パーセントを示すグラフである。肺関与のパーセンテージは、担当の現場獣医師の各肺葉の観察及び触診によって決定された。合計パーセンテージは、文献記載の方法（Jericho and Langford, 1982）を用いて計算された。誤差バーは $=0.1$ による信頼を示す。サルコシル不溶性ワクチン原型は、非ワクチン接種コントロールと比較したとき肺病変の有意な軽減を生じない処置でしかなかった（ $p=0.11$ ）。サルコシル可溶性物質を含むか又はSDS抽出物質から成るワクチンは観察された病変で有意な軽減を提供した。

【図9】ワクチン免疫期のH.ソムニIgGについてのELISAの結果を示すグラフである。アッセイ間の比較を可能にする各プレートで、2組ずつのサンプルの平均 A_{450} を血清陰性コントロールの平均 A_{450} で割ることによってS:N比を計算した。データは、別々の日に完了させた3アッセイでの2組ずつのサンプルの結果を表す（各サンプルについて6回の繰返し）。誤差バーは $=0.1$ による信頼を示す。

【図10】ワクチン免疫期のH.ソムニIgGについてのELISAの結果を示すグラフである。アッセイ間の比較を可能にする各プレートで、2組ずつのサンプルの平均 A_{450} を血清陰性コントロールの平均 A_{450} で割ることによってS:N比を計算した。データは、別々の日に完了させた3アッセイでの2組ずつのサンプルの結果を表す（各サンプルについて6回の繰返し）。誤差バーは $=0.1$ による信頼を示す。

【図11】ワクチン免疫期のH.ソムニIgGについてのELISAの結果を示すグラフである。アッセイ間の比較を可能にする各プレートで、2組ずつのサンプルの平均 A_{450} を血清陰性コン

10

20

30

40

50

トロールの平均 A_{450} で割ることによってS:N比を計算した。このアッセイのために、個々の動物について各実験日に血清サンプルを試験して ± 0.1 の信頼区間(誤差バーによって表されている)の決定を可能にした。実験4のS:Nは実験2及び3で観察されたものより低かった。これは、これらの実験の試験の間に全試薬及びコントロールサンプルについて凍結ストックを作製したことに起因し得る。

【発明を実施するための形態】

【0017】

本発明は、ウシの呼吸器感染症の治療として使用されるH.ソムニのOMPの免疫学的組成物を提供する。前記組成物は、単離株Lg2-OK08及びLgD1-TN08に由来するヒストフィルス・ソムニの2つの代表的なOMP調製物(ただし前記に限定されない)を含む(前記単離株は、米国菌培養収集所(ATCC; 10801 University Boulevard, Manassas, VA20110-2209)にブダベスト条約の条項の下に2012年3月29日に寄託され、それぞれPTA-12755及びPTA-12756と称される)。

グラム陰性細菌として、H.ソムニは、当該細菌と宿主免疫系との間の最初の相互作用域である外膜を提示する。グラム陰性細菌の外膜は、リン脂質、リポ多糖類(LPS)及びタンパク質から成る。概算によれば、当該外膜の外側の組成は41%LPS及び59%タンパク質であり、一方、内側は53%のリン脂質及び47%のタンパク質を含むと予想される(Nikaido and Nakae 1979. *The Outer Membrane of Gram Negative Bacteria. Advances in Microbial Physiology.* 20; p163-250)。外膜のリン脂質成分は、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルグリセロール及びカルジオリピンを含み、それらは他の細胞膜で認められる二重層を作出する(Nikaido and Nakae 1979)。

【0018】

大半のグラム陰性細菌の外膜は内毒素リポ多糖類(LPS)を含む。LPSの外側部分は病原性及び宿主免疫系との相互作用で重要な役割を果たすが、一方で甚だしい多様性を単一種内においてさえ示し、以前から“O-抗原”と称されている(Nikaido and Nakae 1979)。O-抗原は、“R-核”と称されるより保存された多糖類によって当該膜に連結される。R-核は、8-炭素糖、3-デオキシオクトロン酸、L-グリセロ-D-マンノヘプトース、ホスフェート、エタノールアミンホスフェート、及びエタノールアミンピロホスフェートから成る(Nikaido and Nakae 1979、上掲書)。O-抗原及びR-核に加えて、LPSは典型的には脂質-Aを含む。脂質-Aは、アミド又はエステル結合によって結合した飽和脂肪酸を有するD-グルコサミン(1->6)-D-グルコサミン骨格から成る。

H.ソムニの外膜は、真のLPSを構成するある種の高分子量成分を欠くことが示され、したがってその内毒素はリポオリゴ糖(LOS)と称される(St. Michael et al. 2006. *Structural Analysis of the Lipooligosaccharide-derived Oligosaccharide of Histophilus somni (Haemophilus somnus) strain 8025.* *Carbohydrate Research.* 341; p281-284)。H.ソムニのLOSは、他のグラム陰性細菌のLPSと同様に露出構造において高レベルの多様性を示し、一方、膜結合アンカー領域はより保存される(St. Michael et al. 2006)。

【0019】

最初のLOS精製及び生化学アッセイは、H.ソムニのLOSは、ドデカン、テトラデカン及び3-ヒドロキシテトラデカン脂肪酸、高い割合のヘキソース、3-デオキシ-D-マンノ-オクトロン酸(Kdo)、ホスフェート、少量のヘプトース(L-グリセロ-D-マンノ-ヘプトース)、グルコサミン及び脂質-Aから成ることを示した(Inzana et al. 1988. *Purification and Characterization of Lipooligosaccharides from Four Strains of Haemophilus somnus.* *Infection and Immunity.* 56(11); p2830-2837)。更なる研究によって、H.ソムニは、ホスホエタノールアミン(PEtn)、ホスホコリン(ChoP)及びヘプトース側鎖の様々な提示により生じる、そのLOSの相変動の能力を有することが示された(Inzana et al. 1992. *Phenotypic Phase Variation in Haemophilus somnus Lipooligosaccharide During Bovine Pneumonia and After in vitro Passage.* *Infection and Immunity.* 60(7); p2943-2951; Cox et al. 1998. *Structural Analysis of the Phase-Variable Lipooligosa*

cchride from *Haemophilus somnus* strain 738. *Eur. J. Biochem.* 253; p507-516; El swaifi 2006. The Molecular Characterization of Phosphorylcholine (ChoP) on *Haemophilus somni* Lipooligosaccharide: Contribution of ChoP to Bacterial Virulence and Pathogenesis. Virginia Polytechnic Institute and State University (doctoral dissertation); Howard et al. 2000. Antigenic Diversity of *Haemophilus somnus* Lipooligosaccharide: Phase-Variable Accessibility of the Phosphorylcholine Epitope. *Journal of Clinical Microbiology.* 28(12); p4412-4419)。このことは、N-アセチルノイラミン酸（哺乳動物細胞表面で通例的に見出される）の外膜への取り込みに加えて、H.ソムニに宿主免疫系回避の多様な態様を与える（Inzana et al. 2002. Incorporation of N-Acetyleneuraminic Acid into *Haemophilus somnus* Lipooligosaccharide (LOS): Enhancement of Resistance to Serum and Reduction of LOS Antibody Binding. *Infection and Immunity.* 70(9); p4870-4879）。

10

【0020】

グラム陰性細菌として、その外膜成分は興味を引く免疫学的標的を形成する。ワクチン候補の土台としてOMPを使用することによって、ビルレンスに關与する表面抗原を選択的に標的とする免疫応答を誘発することができよう。OMPワクチンによりもたらされる、標的誘導免疫応答は、H.ソムニの下気道に集落を形成する能力を妨害し、持続的な集落形成に必要な鉄摂取を阻害し、又は多様な態様の免疫回避及び妨害の影響を制限することができる。

H.ソムニのビルレンス機構に関する情報の土台を広げるために多くの研究が実施されてきたが、どのOMP又はOMP組合せが免疫学的に重要であるかの明瞭な最終的提示には至っていない。マウスモデル実験はいくらかの有望性を示したが、宿主動物のワクチン有効性実験はこれまでの文献には見当たらない。本論題の目標は、呼吸器チャレンジに対するOMPワクチン候補の有効性についての理論を立証し、さらに観察される一切の有効性レベルを従来製の製品と比較することである。

20

【0021】

この目標を達成するために、一貫した肺病巣スコアを生じる能力を有するチャレンジモデルを確立した。適切なチャレンジモデルは、未処置コントロール動物の50%以上で総肺提示病巣が15%以上を示す肺病巣を生じることによって、野生型H.ソムニ感染により一貫した肺病巣を生じるはずである。OMPワクチン候補（複数の表面露出抗原を含む）を *in vivo* で試験し、有効性を他のワクチン代替物と比較した。これらの代替物には、従来製の殺滅バクテリア製品及びある種のバイオフィーム形成性欠如改変変異体が含まれる。これらワクチン候補による抗体（IgG）応答をモニターするために、酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）を血清学試験のために開発し、さらにドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）とその後続くウェスタンブロット分析を実施して、特異的な免疫反応性タンパク質が更なる研究のために同定し得るか否かを決定した。

30

【0022】

これらの外膜変異メカニズムはH.ソムニの複雑なゲノムによって促進される。いくつかの単離株は完全に配列が決定され、2.0Mbから2.3Mbの範囲のゲノムサイズを有することが判明した（Challacombe et al. 2007）。非病毒性単離株の既知ゲノムと病毒性の（ビルレントな）単離株のゲノムを比較することによって、病原性についてより良好な理解が達成され得る。H.ソムニ単離株129Ptは健康な動物の尿道から単離され、非病原性であると考えられる。このゲノムの分析は病原性単離株との比較の良好な出発点を提供する。129Ptゲノムは長さが2.0Mbであり、総GC含量は37%であることが判明した。前記単離株はまた5.2kbのpHS129プラスミドを含む。環状の単一染色体ゲノム内で、平均して980bpのオープンリーディングフレームを有する1,844遺伝子のコード配列が同定された。複製起点は塩基1926721に位置する（Challacombe et al. 2007）。ヘモフィルス・デユクレイイ及びヘモフィルス・インフルエンザエとの比較で、これら遺伝子の多くは保存されているが、319がH.ソムニに固有であることが観察された。これらの固有の遺伝子は、LOS合成、炭水化物摂取及び代謝、陽イオン輸送、アミノ酸代謝、ユビキノン及びメナキノン生合成、細胞

40

50

表面付着、補助因子合成並びに電子輸送に必要であることが判明した (Challacombe et al. 2007)。これら固有の遺伝子、続いて発現されるそれらのタンパク質 (特に外膜領域と連結され得るもの) は、ワクチン開発に携わる者には興味深いであろう。

【0023】

病原性H.ソムニ単離株2336は、非病原性129Pt単離株と比較してわずかに大きなゲノムを有し、いくつかの追加遺伝子をコードすることが判明した。該追加遺伝子は、ビルレンス因子、例えば自家輸送因子アドヘシン、糸状ヘマグルチニンホモログ、制限改変 (RM) 系、プロフェージ様配列及びLOS合成タンパク質をコードすることが判明した (Sandal and Inzana 2010. A Genomic Window into the Virulence of *Histophilus*. Trends in Microbiology. 18(2); p90-99)。これら2つの単離株間の病原性における重要な相違をさら

10

に分析することによって、ワクチン開発のより直接的なアプローチが得られよう。
ヘモフィルス亜種 (*Haemophilus* spp.) による下気道の感染の成就及びその後の症状の進行はピリ線毛の存在及び粘着 (Jacques and Paradis 1998. Adhesin-Receptor Interactions in Pasteurellaceae. FEMS Microbiol. Rev. 22; p45-59)、並びにLOSの存在によって促進される (Johnson and Inzana 1986. Loss of Ciliary Activity in Organ Cultures of Rat Trachea Treated with Lipo-oligosaccharide from *Haemophilus influenzae*. J. Med. Microbiol. 22; p265-268)。非病原性単離株として、129Ptは12の大きなアドヘシン分子をコードするが、病原性単離株 (例えば2336) による粘膜表面の集落形成に関与するピリ線毛及びアドヘシンのための多くの遺伝子を欠くことが判明した (Challacombe et al. 2007)。ピリ線毛遺伝子 (前記はまた分泌メカニズムにも必要であり得る) は

20

【0024】

ビルレントなH.ソムニ単離株 (例えば2336) はまた、5' -CAAT-3' の不定数タンデムリピート (VNTR) のスリップ鎖ミスペア形成によってLOSの抗原相の変異を可能にする。この相変異は単離株129Ptでは認められない。これらのVNTRは、グリコシルトランスフェラーゼの開始コドンの下流又はオープンリーディングフレーム (ORF) 内に位置する。この翻訳改変はlob2ABCD遺伝子で認められ、前記改変は、当該細菌のLOS提示を変化させて宿主免疫応答の回避を可能にする。Neu5Acは宿主自身の細胞表面で一般的であるので、LOS中のN-アセチル-5-ノイラミン酸 (Neu5Ac) の存在はまた、細菌が免疫応答からそれ自体

30

を隠すことを可能にする (Sandal and Inzana 2010)。
lic1ABCDがこれまでさらに研究され、glpQ遺伝子と一緒にホスホリルコリン (ChoP) (H.ソムニのLOSで発現される) の相変異を制御することが示された。同様なスリップ鎖ミスペア形成がlic1A遺伝子のタンデムリピート5' -CAAT-3' に沿って生じ、種々の伸長及び切端をもたらし、開始コドンと一緒に一列に並んだORFをシフトさせる。このキナーゼの変異がlic1BCD遺伝子の下流の動作に影響を及ぼすようには思われぬが、宿主の防衛から身を隠すために、表面提示に別の変異を提供し得る。ChoPはまたH.ソムニによる呼吸器での集落形成のための寄与因子であることが示されたが、全身性感染時には集落形成を妨げるように思われた (Elswaifi 2006)。最後に、ChoPは、血小板活性化因子レセプター (PAF-R) との相互作用を介してウシ血小板を凝集させることが示された (Elswaifi 20

40

【0025】

H.ソムニの病原性単離株がNeu5AcをLOSに取り込む能力に関する研究はまた、ビルレンスに関する別のメカニズムも明らかにする (Inzana et al. 2002)。そのようにすることによって、細菌はラクト-N-ネオテトラオースを模倣し、前記はウシ内皮細胞を被覆して免疫系を回避する別の方法を可能にする (Sandal and Inzana 2010)。ChoPの変異及びNeu5Acの取り込みは、抗体結合を妨害すること、精製H.ソムニLOSに特異的なモノクローナル抗体の結合さえも妨害し、回復期血清による殺滅もまた阻害することが示された (Sandal and Inzana 2010)。

さらにまた、H.ソムニはin vitroでバイオフィルムを産生し、in vivoでもそうである

50

うと考えられるが、ただしこれは、典型的な実験室増殖方法によるバイオフィーム表現型に対する人工的迅速選別及び非宿主モデル使用における不正確さのために試験することは困難である (Sandal and others 2009)。多くの細菌がエキソ多糖類 (EPS) 及び線毛の結合によりバイオフィームを形成して細胞表面及び互いと付着する (Costerton 1999)。細菌はバイオフィームの形成を利用して、細胞との付着を維持し、厳しい環境条件からそれ自身を保護する。このフィルムそれ自体は90%までEPSから成り、したがって当該細菌を免疫による検出及び応答から保護する (Costerton 1999)。H.ソムニによって形成されるバイオフィームは、パストレラ科の他のメンバーよりも *in vivo* ではより組織化され濃厚であることが、捜査電子顕微鏡 (SEM) 及び蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション (FISH) によって示された (Sandal and others 2009)。この特徴を改変することは改変生ワクチンへの魅力的なアプローチであり得る。

10

【0026】

新規ワクチンのための戦略はまた外膜中のタンパク質を標的とすることができる。これらOMPのいくつかはその特徴が決定され、いくつかは宿主の血清と免疫反応性を有することが判明した (Sandal and Inzana 2010)。OMPは、細菌がその外部環境と相互作用することを可能にし、それらのいくつかは、いくつかの種にわたって高度に保存されるが、多くは種特異的である。OMPは、鞭毛又は線毛の形で運動性を付与し、膜を通過して代謝物又は老廃物を移動させ、宿主細胞の付着を促進するか、又は免疫回避において重要な他の結合特性を可能にすることができる (Challacombe et al., 2007)。

OMPの単離は、洗剤、有機溶媒、浸透圧ショック又は反復凍結融解による溶解に続いて低速での遠心分離を実施して細胞屑を除去することによって、純培養の細菌細胞の破壊によって達成された (Bollag and others 1996)。OMP含有上清を続いて超遠心分離に付して全ての不溶性成分を除去する。続いて、得られたペレットを10mMのHEPES緩衝液に懸濁し、2% (wt/vol) のN-ラウロイルサルコシン (サルコシル) とインキュベートしてもう1回超遠心分離に付す (Hobb et al., 2009)。そうでなければ、得られたペレットをドデシル硫酸ナトリウム (SDS)、3-(N-モルホリノ)プロパンスルホン酸 (MOPS)、トリス若しくはリン酸緩衝液、カオトロピズム系ロダン化物又は尿素で可溶化し、続いて対象タンパク質にとって適切な方法で精製できる (Rehm 2006)。続いて回復期血清を使用して免疫反応性をウェスタンブロットで試験する (Kania et al., 1990)。

20

【0027】

このようにして記載されるべき免疫学的に重要な第一の潜在的タンパク質の1つは、大半の被検単離株 (多様な病的状態から得られた単離株とともに非病原性単離株を含む) で保存されていることが示された78kDaのタンパク質である (Kania and others 1990)。40 kDaサイズの別のOMPが、TEME関連H.ソムニ単離株8025から単離し、N-末端配列決定に付した。このタンパク質は、H.インフルエンザエ及び大腸菌の両方で見出されるポリンタンパク質と高い相同性を有することが判明した (Tagawa et al., 1993a)。ポリンタンパク質は膜上での溶質の低分子質量拡散を促進することが示された。当該タンパク質が60 又は100 で可溶化されるか否かに応じて、28 - 37kDaの分子量を有する、熱改変性分子量をもつOMPもまた同定された。このタンパク質は、N-末端配列決定によって、他のグラム陰性細菌 (大腸菌及びアクチノバシルス・アクチノミセテムコミタンス (Actinobacillus actinomycetemcomitans) を含む) のOmpAタンパク質と相同であることが示された (Tagawa et al., 1993b)。

30

40

さらに別の研究は、H.ソムニの53の単離株の主なOMPを比較して、病原性の分類がタンパク質プロフィールによって達成できるか否かを決定した。この研究はOMP分子量における大きな変動を示し、被検単離株を4つの別個のグループ及び3つのサブグループに分類できた。しかしながら、これらの分類は種々の単離株に付随する病的状態とは一致しなかった。OMPの分子質量変動は、この研究で同定された主なOMPはH.インフルエンザエの病原性との関与を示すP2タンパク質とN-末端相同性を示すので興味深い (Tagawa et al., 2000)。

【0028】

50

宿主から鉄を獲得するH.ソムニの能力はまた感染成就のために重要なプロセスであり、トランスフェリン結合OMPの相違は宿主特異性及びビルレンスの説明となり得る。パスツレラ科の多くのメンバーは、2つのOMP(トランスフェリン結合タンパク質A及びB)で構成されるレセプター複合体を利用して、宿主から鉄と結合したトランスフェリンを獲得する(Ekins et al., 2004)。Tbp応答性オペロンは、TbpBがTbpAに優先し、典型的には、利用可能な鉄の存在下で第二鉄摂取調節因子(Fur)タンパク質を必要とする抑圧メカニズムによって制御されるように編成される。tbpA遺伝子の対立遺伝子相違は、ビルレント単離株及び非ビルレント単離株と関連した異なるトランスフェリン結合メカニズムをもたらす(Ekins et al., 2004)。TbpA対立遺伝子の存在は、単離株129Ptで観察されたように単成分TbpAレセプターを生じ、一方、tbpA及びtbpB遺伝子の結合は、病原性H.ソムニ単離株2336及び649で同定された二部分から成るレセプター複合体をコードする(Trembay et al., 2006)。

10

fhaB遺伝子(H.ソムニの病原性単離株にのみ存在する)は免疫グロブリン結合タンパク質(lbpA)をコードする。単離株2336は、4つの異なる遺伝子座に分離した4つのfhaBホモログをコードする。lbpAタンパク質は、宿主免疫系の食作用の阻害に関与する大きなエキソタンパク質である(Sandal and Inzana 2010)。lbpAは、IgG1、IgG2及びIgMのFc部分と相互作用する、270、120及び41kDaサイズのサブユニットを有する350kDaタンパク質と記載されている。41kDaサブユニットは、ウシIgG1と反応することが示された唯一の部分である(Yamada et al., 1988)。

【0029】

20

最近の研究は、病毒性及び宿主免疫回避のメカニズムとしての細菌の分泌物による宿主細胞タンパク質の翻訳後改変の重要性を示している。AMPyI化は、スレオニン及びチロシン残基のヒドロキシルタンパク質側鎖にアデノシンーリン酸(AMP)を共有結合により付加する可逆的プロセスである(Woolery et al., 2010)。このプロセスを促進するアデニルトランスフェラーゼ酵素は、全ての種にわたって広く保存されるcAMP(Fic)ドメイン(HPFx(D/E)GN(G/K)R)によって誘発されるフィラメント形成を含む(Xiao et al., 2010)。Ficドメインは真核細胞で天然に認められ、しばしば細胞シグナリングで役割を果たす(Roy and Mukherjee 2009)。しかしながら、原核細胞由来のタンパク質を含むFicドメインは、当該宿主細胞でRho依存GTPアーゼの機能を阻害するように思われる(Worby et al., 2009)。

30

ビルレントなH.ソムニ単離株のlbpAは、2つの連続するFicドメインをC-末端近くに(Roy and Mukherjee 2009)、さらに粘着ドメインをN-末端に含む(Woolery et al., 2010)。このタンパク質は細菌によって宿主細胞に分泌され、宿主細胞のGTPアーゼのAMPyI化及びアクチン細胞骨格の改変を生じるように思われる(Woolery et al., 2010)。アデニル化はスイッチ1チロシン残基で基質としてRhoA、Rac1又はCdc42と一緒に生じる(Xiao et al., 2010)。このメカニズムはまた、ビブリオ・パラヘモリチクス(*Vibrio parahaemolyticus*)のVopSタンパク質についても観察される(VopSは代わりにスレオニン残基をAMPyI化する)。これらの改変は、マクロファージの食作用、食胞の細胞内輸送、免疫エフェクターの転写活性化、順応応答の刺激及びアポトーシスの実行能力の妨害をもたらす(Chimini and Chavrier 2000)。lbpA Ficドメイン誘発細胞傷害は病原性単離株(例えば2336)でのみ観察され、非病原性単離株(例えば129Pt)では認められなかった(Zecarias et al., 2011)。

40

【0030】

lbpAサブユニットワクチンの原型を試験する実験を行い、混ぜ合わされた結果を得た。pET41a及びpET-GSTxを使用して、組換え体lbpAサブユニットA3、A5、及びDR2(第二のFicドメイン)を大腸菌で作製し、5-6週齢NIHスイスウェブスターマウスの前記組換えサブユニットによるワクチン免疫後にH.ソムニ誘発敗血症を予防することに成功した(Geertsema et al., 2008)。lbpA DR2サブユニットもまた、3週間離して2用量を投与したとき、5週齢のホルスタイン牛でH.ソムニによる呼吸器チャレンジに対して防御を示すことが報告された(Geertsema et al., 2011)。この実験から大きな集団へとデータを推論するこ

50

とは、処置グループ（それぞれ5 - 6頭の動物）が小さいので難しい。DR2ワクチン免疫グループは、コントロールグループと比較したとき、総肺病変で統計的に有意な減少（ $p = 0.04$ ）を示したが、この減少は、コントロール動物が11%の肺病変を示しただけであるので生物学的に有意ではないであろう。

【0031】

ワクチン戦略

上首尾のワクチン免疫は宿主内に免疫学的記憶を誘導し、その後の感染に対して迅速な標的誘導応答を可能にする。前記を達成するためにいくつかの戦略があり、各々がそれぞれ固有の利点及び欠点を有する。細菌感染に対するワクチン免疫のための従来技術は、死菌、改変生変異体及びタンパク質系ワクチンの使用を含む。

細菌毒素及びグラム陰性細菌の細胞壁に包埋された細胞表面タンパク質のエピトープを中和する抗原特異性を有するメモリー細胞の増殖が、ワクチン免疫の主要目標である。その後の感染がより軽く凌がれ、個々の宿主がこれを浄化することができるとき、群れの免疫は改善される。適切なワクチンが投与されるとき、病原性生物はなお個々の動物内で小さな問題を引き起こし得るが、広範囲に広がる経済的損失が出現することはほとんどあり得ない。

ワクチンが細胞表面上に存在するすべての可能な病毒性関連抗原を含むことを担保する最速の方法は死菌の使用である。しかしながらこれらの製品は、製造方法及び個々の動物の感受性によりアナフィラキシー反応を誘発することが可能で、複数の生物を含む混合製品ではこれらの事象はより生じやすい（Roth, 2007）。これらのワクチンが畜産に関する疾患の予防で有用であることが証明され、典型的には最も費用効率のよい疾患流行の制御手段であるときに、典型的にはこれらの製品の利点は前記リスクを補って余りある（Babuk, 1994）。

【0032】

ビルレントな単離株の迅速な弱毒化、又は天然の非病毒性単離株の単離は開発コストの低下をもたらすが、一方、製造プロセスの単純性は経常経費を減少させ、製造業者により低価格で消費者に製品を提供させる。しかしながら、野生型の変異又は野外における他の条件が時間の経過にしたがってこれらの製品の有効性を低下させることがあるので、企業が彼らの製品の寿命を保証することは困難である。

有効性の問題は、ワクチンに存在する抗原が野生型の生単離株に対して免疫を付与しないときに生じる。H.ソムニの事例では、*in vivo*で産生されるある種の表面タンパク質及び培養上清タンパク質は、*in vitro*でのワクチン製造時には適切に表出されないということが示された（Griffin, 2010）。これらのタンパク質のいくつかは免疫学的に重要であると考えられ、多様な増殖方法、タンパク質精製手段、又は遺伝子ノックアウト変異体単離株がワクチン有効性を改善できるか否かを決定する研究が進行中である（Tagawa, 1993；Sandal, 2009；Zekarias, 2010）。新規なワクチン単離株がないならば、改善は多様なアジュバントプラットフォームを用いることによって為し得よう。

【0033】

死菌ワクチンでは、生きた病原体は導入されないので、アジュバントが取り込まれて重要な抗原に対する免疫応答を強化する。獣医ワクチンで従来用いられるアジュバントには、アルミニウム塩（カリミヨウバン）、オイルエマルジョン、免疫刺激複合体（ISCOM）、リポソーム、微粒子、非イオン性ブロック共重合体、誘導多糖類、サイトカイン、及び細菌性誘導体が含まれる（Spickler, 2003）。各アジュバントは、その作用様式を決定するそれ自身の特性一式を有し、前記は誘引される免疫応答のタイプに時宜に応じて影響を与えることができる。

粒子状アジュバント（すなわちカリミヨウバン）は、凝集物（より容易に食作用を受ける）を形成することによって抗原提示細胞の作用を改善するために供される（Spickler, 2003）。水酸化アルミニウムは、市場で入手できるいくつかのH.ソムニワクチン（ファイザー（Pfizer）のソムバク（Sommubac）及びBIVIのエリート（Elite）-9HSを含む）のためのアジュバント形として用いられる。アジュバント処方物は専売特許であり、実際の作

用メカニズムの多くが不明であるが、このタイプのアジュバントの一般的理論は、主要組織適合複合体II型 (MHC II) 抗体媒介応答の誘発であろう (Murphy, 2008)。

【0034】

オイルエマルジョンアジュバントは、報告によれば、注射部位に抗原を留めて長期間にわたってより多くの抗原提示細胞を重要抗原に遭遇させることによる“デポット効果”により、MHC II 応答の誘発を促進するであろう (Spickler, 2003)。H.ソムニのためのワクチンにこのタイプのアジュバントを産業的にこれまで使用した製品は存在しないが、オイル系リヒドラゲル(商標) (Rehydrigel(商標))水酸化アルミニウムゲル (Reheis社から市場で入手できる) が、クロストリジウムワクチンで用いられ(前記は混合製品としてH.ソムニと組み合わせることができる)、さらに、フロイントアジュバントが、新規なワクチン候補のために理論を立証する試験に最初に用いられるアジュバントとして通常的に研究で用いられる (Babiuk, 1994)。

H.ソムニは細胞外性細菌病原体であるので、血液細胞によるIgG産生の誘発、補体系の活性化及び内毒素中和を強化できるアジュバントが有利であろう。このような理由から、典型的にはアルミニウム塩及び水中油エマルジョンが用いられる。しかしながら、これらのアジュバントはより新規な技術と比較して劣る傾向があるが、それでもなお、前記は獣医ワクチンでの使用について規制庁によって承認され、かつ全身的毒性の脅威がないので広く用いられる (Aguilar and Rodriguez 2007)。

【0035】

非病毒性の改変された生きた生物を用いるワクチン免疫はアジュバントを必要とせず、さらに抗体誘導免疫応答と同様に細胞媒介免疫応答を生じる能力が高いことが示された (Detmer and Glenting 2006)。これらの製品は、アナフィラキシー反応の頻発を同様に減少させる傾向がある。しかしながら、弱毒単離株又は標的に誘導される欠損変異体の開発は非常に高価であり、別の大きなリスクを伴う。これらの生きた生物はちょうどそれらの野生型対応物のようにふるまい、それらの遺伝情報を当該動物内の他の単離株と交換する能力を保持する。この遺伝的組換えのために、非病毒性ワクチンはビルレンス因子を取り込み、ビルレントな型に復帰できる。これらの生物はちょうど他の任意の単離株のように放出及び拡散され得る。前記任意の他の単離株はそれらが非病毒性のままであるならば群れの免疫に有益であるが、復帰が生じた場合は重大な流行を引き起こし得る (Detmer and Glenting 2006)。このタイプのワクチンは徹底的な安全性試験に付して、規制庁の承認の前にこれらの懸念を減らす必要があるが、復帰の可能性は残る。

【0036】

無細胞タンパク質系ワクチンは、バクテリン製品で認められるアナフィラキシーの発生を低下させながら、改変生ワクチンで認められるビルレント復帰の懸念を払拭する。このタイプのワクチンは、殺滅バクテリンと極めて同じ態様で機能すると予想され、類似するアジュバントと組み合わせてMHCII及び抗体媒介免疫を誘発することができよう。これらの調製物は、ワクチン接種により、免疫学的に重要なタンパク質のより高濃度のデリバリーをもたらし、したがってより多くの指定免疫応答を生じることができる。開発コストは高いが、適切な組換え発現系の製造コストは低く維持できる。このタイプのワクチンにとって重要なことは、野生型感染を確立させる能力の低下に向けて免疫応答を誘発するビルレンス関連タンパク質の重要なエピトープを導入することである (Babiuk, 1994)。

【0037】

本発明の実施には、特段の指示がなければ、分子生物学、微生物学、組換えDNA技術、タンパク質化学及び免疫学の通常の技術が用いられ、前記は当業者の技術範囲内である。そのような技術は文献に完全に記載されている。例えば以下を参照されたい: Sambrook, Fritsch & Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Vols. I, II and III, Second Edition (1989); *DNA Cloning*, Vols. I and II (D. N. Glover ed. 1985); *Oligonucleotide Synthesis* (M. J. Gait ed. 1984); *Nucleic Acid Hybridization* (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. 1984); *Animal Cell Culture* (R. K. Freshney ed. 1986); *Immobilized Cells and Enzymes* (IRL press, 1986); Perbal, B., *A Practical Guide*

10

20

30

40

50

to Molecular Cloning (1984); the series, Methods In Enzymology (S. Colowick and N. Kaplan eds., Academic Press, Inc.); Protein purification methods - a practical approach (E.L.V. Harris and S. Angal, eds., IRL Press at Oxford University Press); and Handbook of Experimental Immunology, Vols. I-IV (D. M. Weir and C. C. Blackwell eds., 1986, Blackwell Scientific Publications).

【 0 0 3 8 】

本発明を詳細に記載する前に、本発明は、特定のDNA、ポリペプチド配列又はプロセスパラメーターに限定されず、したがってもちろん変動し得ることは理解されるべきである。さらにまた、本明細書で用いられる専門用語は単に本発明の具体的な実施態様を記載することを目的とし、これを限定しようとするものではないことも理解されるべきである。本明細書及び添付の特許請求の範囲で用いられているように、単数形“a”、“an”及び“the”は、文脈が明瞭にそうでないことを記載していない場合、複数の対応語を含むことに留意されなければならない。したがって、“an antigen”といえ、2つ以上の抗原の混合物を含み、“an excipient”といえ、2つ以上の賦形剤の混合物を含むというようなものである。

10

A. 定義

特段の規定がなければ、本明細書で用いられる全ての技術用語及び学術用語は、出願時点で本発明が属する分野の業者が一般的に理解する意味と同じ意味を有する。それらの用語の意味及び範囲は明確であるべきであるが、何らかの隠れた不明確さがあれば、ここに提供する定義が一切の辞書の定義又は非本質的定義に優先する。さらにまた、文脈がそうでないことを求めないかぎり、単数用語は複数を含み、複数用語は単数を含む。本明細書では、そうでないと記載されないかぎり“or”の使用は“and/or”を意味する。さらにまた、“including”という用語の使用は、他の形態（例えば“includes”及び“included”）と同様に限定的ではない。本明細書に引用される全ての特許及び刊行物は、参照により本明細書に含まれる。

20

【 0 0 3 9 】

“疾患に対する防御”、“防御免疫”、“機能的免疫”及び類似の語句は、本発明の1つ以上の治療組成物又はその組合せの投与によって生じる、病気又は症状に対する応答を意味し、前記応答は、疾患又は感染に曝露された非免疫対象動物で予想されるよりも少ない有害な影響を生じる。すなわち、該感染の有害な影響の重篤度はワクチン接種動物で低下する。ワクチン接種動物では、感染は減少し、その進行速度は遅くなるか、又は完全に予防されることがある。本明細書では、感染の完全な予防を意味する場合、それは具体的に記載される。完全な予防が記載されていない場合、前記用語は部分的予防を含む。

30

本明細書では、“臨床徴候の発生及び/又は重篤度の低下”又は“臨床症状の緩和”は、野生型の感染と比較して、群内の感染動物数の減少、感染の臨床徴候を示す対象動物数の減少又はゼロ、又は1頭以上の対象動物に存在する任意の臨床徴候の重篤度の緩和が含まれるが、ただしこれらに限定されない。例えば、前記は、病源体負荷、病源体放出の任意の減少、病源体伝播の減少、又は任意の臨床徴候の緩和を指すべきである。好ましくはこれらの臨床徴候は、本発明の治療組成物を投与された1頭以上の対象動物で、該組成物を投与されずかつ感染が成立した対象動物と比較したとき、少なくとも10%減少する。より好ましくは、臨床徴候は、本発明の組成物を投与された対象動物で少なくとも20%、好ましくは30%、より好ましくは少なくとも40%、さらに好ましくは少なくとも50%減少する。

40

【 0 0 4 0 】

本明細書で“防御の増強”という用語は、それぞれ対象動物のワクチン接種グループと対象動物の非ワクチン接種コントロールグループで、感染性因子（好ましくはH.ソムニ）による感染に付随する1つ以上の臨床症状の統計的に有意な緩和を意味するが、ただし前記に限定されない。“臨床症状の統計的に有意な緩和”は、対象動物のワクチン接種グループにおける少なくとも1つの臨床症状の発生頻度が、該感染因子のチャレンジ後に非ワクチン接種コントロールグループよりも少なくとも10%、好ましくは20%、より好ましく

50

は30%、さらに好ましくは50%、さらに好ましくは70%低いことを意味するが、ただし前記に限定されない。

“長期持続防御”は、少なくとも3週間、より好ましくは少なくとも3カ月、さらに好ましくは少なくとも6カ月持続する“改善された有効性”を指すであろう。家畜の場合、長期持続防御は、動物を肉として市場に出す平均年齢まで持続することがもっとも望ましい。

【0041】

“免疫原性又は免疫学的組成物”は、H.ソムニの少なくとも1つのOMP又はその免疫原性部分を含む物質の組成物を指し、前記は、前記組成物に対する細胞性又は抗体媒介免疫応答による免疫学的応答を宿主で誘引する。本発明の好ましい実施態様では、免疫原性組成物は免疫応答を誘発し、より好ましくはヒストフィルス・ソムニ感染の臨床徴候の1つ以上に対する防御免疫を付与する。

本明細書で用いられる“免疫原性”又は“抗原”は、本明細書に記載の免疫学的応答を誘引するポリペプチド又はタンパク質を指す。“免疫原性”ヒストフィルス・ソムニタンパク質又はポリペプチドには、本明細書で同定されるOMPヒストフィルス・ソムニの任意の完全長配列又はそのアナログ若しくは免疫原性フラグメントが含まれる。“免疫原性フラグメント”又は“免疫原性部分”という用語は、OMPヒストフィルス・ソムニのフラグメント又は切端及び/又は置換形を指し、前記は1つ以上のエピトープを含み、したがって本明細書に記載の免疫学的応答を誘引する。一般的には、そのような切端及び/又は置換形又はフラグメントは、完全長のOMPヒストフィルス・ソムニタンパク質由来の少なくとも6つの連続するアミノ酸を含む。より好ましくは、該切端若しくは置換形又はフラグメントは、完全長OMPヒストフィルス・ソムニタンパク質由来の少なくとも15、より好ましくは少なくとも19の連続するアミノ酸を有するであろう。そのようなフラグメントは、当業界で周知の多数のエピトープマッピング技術を用いて同定できる。例えば以下を参照されたい：Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66 (Glenn E. Morris, Ed., 1996) Humana Press, Totowa, New Jersey。例えば線状エピトープは、多数のペプチドを固相で同時合成し(当該ペプチドは該タンパク質分子の部分に一致する)、当該ペプチドが該固相に結合している間に当該ペプチドを抗体と反応させることによって決定できる。そのような技術は当業界では公知であり文献に記載されている。例えば以下を参照されたい：米国特許第4,708,871号；Geysen et al. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3998-4002；及びGeysen et al. (1986) Molec. Immunol. 23:709-715。同様に、構造的エピトープは、アミノ酸の空間的立体配座を、例えばX線結晶学及び二次元核磁気共鳴によって決定することによって容易に同定できる。例えば上掲書(Epitope Mapping Protocols)を参照されたい。合成抗原もまた本定義に含まれ、前記は、例えばポリペプチド、フランキングエピトープ及び他の組換え体又は合成誘導抗原である。例えば以下を参照されたい：Bergmann et al. (1993) Eur. J. Immunol. 23:2777-2781；Bergmann et al. (1996), J. Immunol. 157:3242-3249；Suhrbier, A. (1997), Immunol. and Cell Biol. 75:402-408；及びGardner et al., (1998) 12th World AIDS Conference, Geneva, Switzerland, June 28-July 3, 1998(前記文献の教示及び内容は参照により全て本明細書に含まれる)。

【0042】

“免疫応答”又は“免疫学的応答”は、問題の組成物又はワクチンに対する細胞性及び/又は抗体媒介免疫応答の発生(ただし前記に限定されない)を意味する。通常は、免疫又は免疫学的応答には、以下の1つ以上の作用が含まれる(ただしこれらに限定されない)：抗体、B細胞、ヘルパーT細胞、サブレッサーT細胞及び/又は細胞傷害性T細胞(前記は問題の組成物又はワクチンに含まれる1つの抗原又は複数の抗原に特異的に向かう)の産生又は活性化。好ましくは、宿主は、治療的又は防御的な免疫学的(メモリー)応答を示し、したがって新規な感染に対する耐性が強化されるか及び/又は当該疾患の臨床的重篤度が緩和される。そのような防御は、症状数の減少、症状の重篤度の緩和、又は該病原体の感染に付随する症状の1つ以上の消失、ウイルス血症開始の先送り、ウイルス存続の

低下、全体的ウイルス負荷の低下、及び/又はウイルス排出の減少のいずれかによって示されるであろう。

本明細書では、“特異的に免疫反応性である”は、ヒストフィルス・ソムニ感染に特徴的な抗原を認識するが、厳密なチャレンジコントロールに特徴的な抗原とは反応しない免疫反応性タンパク質又はポリペプチドを指す。

【0043】

本明細書で用いられるように、“医薬的に若しくは獣医的に許容できる担体”には、任意の及び全ての溶媒、分散媒体、コーティング、アジュバント、安定化剤、希釈剤、保存料、抗菌及び抗カビ剤、等張剤、吸収遅延剤などが含まれる。いくつかの好ましい実施態様、特に凍結乾燥された免疫原性組成物を含む実施態様では、本発明で使用される安定化剤には凍結乾燥又はフリーズドライのための安定化剤が含まれる。

いくつかの実施態様では、本発明の免疫原性組成物はアジュバントを含む。本明細書で用いられる“アジュバント”は、水酸化アルミニウム及びリン酸アルミニウム、サポニン、例えばQuil A、QS-21 (Cambridge Biotech Inc., Cambridge MA)、GPI-0100 (Galenic a Pharmaceuticals, Inc., Birmingham, AL)、油中水エマルジョン、水中油エマルジョン、水中油中水エマルジョンを含むことができる。該エマルジョンは、特に以下を基剤にできる：軽流動パラフィン油（欧州局方タイプ）；イソプレノイド油、例えばスクワラン又はスクワレン；アルケン（特にイソブテン又はデセン）のオリゴマー化から生じる油；直鎖アルキル基を含む酸又はアルコールのエステル、より具体的には植物油、エチルオレエート、プロピレングリコールジ-(カプリレート/カプレート)、グリセリルトリ-(カプリレート/カプレート)又はプロピレングリコールジオレエート；分枝脂肪酸又はアルコールのエステル、特にイソステアリン酸エステル。油は乳化剤と一緒に用いられてエマルジョンを形成する。乳化剤は、好ましくは非イオン性界面活性剤、特にソルビタンの、マンニドの（例えばアンヒドロマンニトールオレエート）、グリコールの、ポリグリセロールの、プロピレングリコールの、及びオレイン酸、リシノール酸又はヒドロキシステアリン酸のエステル（前記は場合によってエトキシ化される）、並びにポリオキシプロピレン-ポリオキシエチレンコポリマーブロック、特にプルロニック製品（特にL121）である。以下を参照されたい：Hunter et al., *The Theory and Practical Application of Adjuvants* (Ed. Stewart-Tull, D. E. S.), JohnWiley and Sons, NY, pp51-94, 1995；及びTodd et al., *Vaccine* 15:564-570, 1997。例示的なアジュバントは、SPTエマルジョン（以下の文献の147ページに記載：“Vaccine Design, The Subunit and Adjuvant Approach” edited by M. Powell and M. Newman, Plenum Press, 1995）、及びエマルジョンMF59（上掲書の183ページに記載）である。

【0044】

アジュバントのさらに別の例は、アクリル酸若しくはメタクリル酸のポリマー、並びに無水マレイン酸及びアルケニル誘導体のコポリマーから選択される化合物である。有益なアジュバント化合物は、特に糖又は多価アルコールのポリアルケニルエーテルで架橋されたアクリル酸又はメタクリル酸のポリマーである。これらの化合物はカルボマーという名称によって知られている（Phameuropa Vol. 8, No. 2, June 1996）。当業者はまた米国特許第2,909,462号を参照できる。前記は、ポリヒドロキシル化合物（少なくとも3つの（好ましくは8つを超えない）ヒドロキシル基を有し、少なくとも3つのヒドロキシルの水素原子は不飽和脂肪族ラジカルで置き換えられている）で架橋された前記に記載のアクリル酸ポリマーについて記載している。好ましいラジカルは、2から4つの炭素原子を含むもの、例えばビニル、アリル及び他のエチレン系不飽和基である。前記不飽和ラジカルは、それ自身他の置換基（例えばメチル）を含むことができる。カルボポール（Carbopol；BF Goodrich, Ohio, USA）という名称で販売される製品が特に適切である。それらはアリルシクロース又はアリルペンタエリトロールで架橋される。とりわけ、カルボポール974P、934P及び971Pを挙げることができる。カルボポール971Pの使用がもっとも好ましい。無水マレイン酸とアルケニル誘導体のコポリマーでは、とりわけコポリマーEMA (Monsanto)があり、前記は無水マレイン酸とエチレンのコポリマーである。これらのポリマーの

水への溶解は酸溶液を生じ、前記酸溶液は好ましくは生理学的pHに中和されてアジュバント溶液を提供し、前記溶液に該免疫原性、免疫学的組成物又はワクチン組成物自体が取り込まれるであろう。

【0045】

さらに別の適切なアジュバントには、RIBIアジュバント系 (Ribi Inc.)、ブロックコポリマー (CytRx, Atlanta GA)、SAF-M (Chiron, Emeryville CA)、モノホスホリル脂質A、アブリジン脂質-アミンアジュバント、大腸菌の易熱性内毒素 (組換え又は他の態様による)、コレラ毒素、IMS 1314若しくはムラミルジペプチド、又は、天然若しくは組換えサイトカイン又はそのアナログ、内因性サイトカイン放出刺激物質が含まれるが、ただしこれらに限定されない。

アジュバントは、1用量当たり約100 µgから約10mgの量、好ましくは1用量当たり約100 µgから約10mgの量、より好ましくは1用量当たり約500 µgから約5mgの量、さらに好ましくは1用量当たり約750 µgから約2.5mgの量、もっとも好ましくは1用量当たり約1mgの量で添加し得ると予想される。また別には、アジュバントは、最終製品の体積で約0.01から50%の濃度で、好ましくは約2%から30%の濃度で、より好ましくは約5%から25%の濃度で、さらに好ましくは約7%から22%の濃度で、もっとも好ましくは10%から20%の濃度であり得る。

【0046】

“希釈剤”には、水、食塩水、デキストロース、エタノール、グリセロールなどが含まれ得る。等張剤には、とりわけ塩化ナトリウム、デキストロース、マンニトール、ソルビトール、及びラクトースが含まれ得る。安定化剤には、とりわけアルブミン及びエチレンジアミンテトラ酢酸のアルカリ塩が含まれる。

“単離されて”とは、その天然の状態から“人間の手によって”改変されることを意味する。すなわちそれが天然に存在する場合は、その本来の環境が変更されるか若しくはその本来の環境から取り出されるか又はその両方を意味する。例えば、生きた生物に存在するポリヌクレオチド又はポリペプチドは“単離されて”いないが、その天然の状態と一緒に存在する物質から分離された前記ポリヌクレオチド又はポリペプチドは、当該用語が本明細書で用いられるとおり“単離されて”いる。

“安全性”は、ワクチン接種動物でワクチン接種後に有害な結果が存在しないことを指し、前記有害な結果には、細菌系ワクチンの病毒性への潜在的復帰、臨床的に顕著な副作用 (例えば全身症状又はワクチン投与部位の許容不能な炎症) が含まれる (ただしこれらに限定されない)。

【0047】

本明細書で用いられる“ワクチン免疫”又は“ヒストフィルス・ソムニ”又はその変種は、動物に投与したとき、直接的に又は間接的にヒストフィルス・ソムニに対する免疫応答を動物で誘引するか又は誘引することができる本発明の免疫原性組成物を投与する工程を含むプロセス (ただし前記に限定されない) を意味する。

本発明に関して“死亡率”は、ヒストフィルス・ソムニ感染に付随する死を指し、さらに、該感染が重篤であるので動物を安楽死させて、苦痛を与えないで人道的な終末を提供する状況を含む。

“弱毒化”は病源体の病毒性を軽減させることを意味する。本発明では、“弱毒化”は“非病毒性”と同義である。本発明では、弱毒菌は、標的哺乳動物でヒストフィルス・ソムニ感染症の臨床徴候を引き起こさないが、免疫応答を誘発できるように病毒性を軽減させた細菌であるが、前記用語はまた、非弱毒化ヒストフィルス・ソムニに感染しかつ弱毒菌を投与されていない“コントロールグループ”の動物と比較して、弱毒ヒストフィルス・ソムニに感染した動物で該臨床徴候の発生率又は重篤度が軽減することを意味する。この関係では、“軽減する/軽減させる”とは、上記に規定したコントロールグループと比較して、少なくとも10%、好ましくは25%、さらに好ましくは50%、さらに好ましくは60%、さらに好ましくは70%、さらに好ましくは80%、さらに好ましくは90%、もっとも好ましくは少なくとも100%の軽減を意味する。したがって、弱毒化、非病毒性ヒストフィル

10

20

30

40

50

ス・ソムニ単離株は、改変ヒストフィルス・ソムニ生菌を含む免疫原性組成物への取り込みに適切な細菌である。

【0048】

本明細書では、“有効な用量”は、当該抗原を投与された動物で臨床症状の緩和をもたらす（ただし前記に限定されない）免疫応答を誘引するか又は誘引できる抗原の量を意味する。

本明細書で用いられるように、“有効な量”という用語は、組成物の関係では、動物で感染の発生率を減少若しくはその重篤度を緩和させるか、又は疾患の発生率を減少させる免疫応答を誘発することができる免疫原性組成物の量を意味する。特に、有効な量はコロニー形成単位(CFU)/用量を指す。或いはまた、治療方法に関しては、“有効な量”は、疾患若しくは異常又は前記の1つ以上の症状の重篤度若しくは持続期間を軽減又は緩和し、疾患若しくは異常の進行を予防し、疾患若しくは異常の進行を逆行させ、疾患若しくは異常に付随する1つ以上の症状の再発、発達、開始若しくは進行を予防し、又は別の治療方法若しくは治療薬による予防又は治療を強化若しくは改善するために十分である治療方法の量を指す。

【0049】

“フラグメント”という用語は、ヒストフィルス・ソムニのOMP又はそのようなOMPペプチドをコードする遺伝子のフラグメント又は切端及び/又は置換形を指し、前記は1つ以上のエピトープを含み、したがってヒストフィルス・ソムニに対して免疫学的応答を誘引する。好ましくは、そのようなフラグメントは、本明細書で提供するヒストフィルス・ソムニペプチドのいずれか又はヒストフィルス・ソムニ遺伝子のいずれかのフラグメント又は切端及び/又は置換形である。一般的には、そのような切端及び/又は置換形又はフラグメントは、完全長配列由来の連続する少なくとも6つのアミノ酸を含む。より好ましくは、該切端若しくは置換形又はフラグメントは、完全長配列由来の連続する少なくとも10、より好ましくは少なくとも15、さらに好ましくは少なくとも19のアミノ酸を有する。そのようなフラグメントは、当業界で周知の多数のエピトープマッピング技術を用いて同定できる。例えば以下を参照されたい：Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66 (Glenn E. Morris, Ed., 1996) Humana Press, Totowa, New Jersey。例えば線状エピトープは、多数のペプチドを固相で同時合成し（当該ペプチドは該タンパク質分子の部分に一致する）、当該ペプチドが該固相に結合している間に当該ペプチドを抗体と反応させることによって決定できる。そのような技術は当業界では公知であり文献に記載されている。例えば以下を参照されたい：米国特許第4,708,871号；Geysen et al. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3998-4002；及びGeysen et al. (1986) Molec. Immunol. 23:709-715。同様に、構造的エピトープは、アミノ酸の空間的立体配座を、例えばX線結晶学及び二次元核磁気共鳴によって決定することによって容易に同定できる。例えば上掲書（Epitope Mapping Protocols）を参照されたい。合成抗原もまた本定義に含まれ、前記は、例えばポリペプチド、フランキングエピトープ及び他の組換え体又は合成誘導抗原である。例えば以下を参照されたい：Bergmann et al. (1993) Eur. J. Immunol. 23:2777-2781；Bergmann et al. (1996), J. Immunol. 157:3242-3249；Suhrieber, A. (1997), Immunol. and Cell Biol. 75:402-408；及びGardner et al., (1998) 12th World AIDS Conference, Geneva, Switzerland, June 28-July 3, 1998（前記文献の教示及び内容は参照により全て本明細書に含まれる）。

【0050】

本明細書で用いられる“ヒストフィルス・ソムニに対する免疫反応性”という用語は、該ペプチド又はフラグメントがヒストフィルス・ソムニに対する免疫学的応答を誘引することを意味する。

本明細書で用いられる、“配列相同性”は2つの配列間の関連性を決定する方法を指す。配列相同性を決定するために、2つ以上の配列を最適にアラインメントし、必要な場合にはギャップを導入する。しかしながら、“配列同一性”とは対照的に、配列相同性を決定するときは、保存的アミノ酸置換は一致と数えられる。換言すれば、参照配列に対して

95%の配列相同性を有するポリペプチド又はポリヌクレオチドを得るために、参照配列中のアミノ酸残基又はヌクレオチドの85%、好ましくは90%、さらに好ましくは95%が一致するか又は別のアミノ酸若しくはヌクレオチドによる保存的置換を含む必要があるか、又は、参照配列中の全アミノ酸残基若しくはヌクレオチドの15%まで、好ましくは10%まで、さらに好ましくは5%までの数のアミノ酸若しくはヌクレオチド（保存的置換を含まない）が参照配列に挿入され得る。好ましくは、該ホモログ配列は、少なくとも50、より好ましくは100さらに好ましくは250、さらに好ましくは500ヌクレオチドのストレッチを含む。

“保存的置換”は、全体的機能性が顕著には変化しないような、類似の特徴又は特性（サイズ、疎水性などを含む）を有する別のアミノ酸残基又はヌクレオチドによるアミノ酸残基又はヌクレオチドの置換を指す。

【0051】

当業界で公知のように“配列同一性”は、2つ以上のポリペプチド配列又は2つ以上のポリヌクレオチド配列、すなわち参照配列と該参照細列と比較されるべきある配列間の関係を指す。配列同一性は、ある配列及び参照配列を最適にアラインメントし最高度の配列類似性を達成（そのような配列鎖間の一致によって決定される）した後、当該ある配列と参照配列を比較することによって決定される。そのようなアラインメントに際して、配列同一性は位置毎に確認される。例えば、個々の位置でヌクレオチド又はアミノ酸残基が同一であるならば、該配列は当該位置で“同一”である。続いて、そのような位置同一性を示す総数を参照配列中のヌクレオチド又は残基総数で割り、%配列同一性を得る。配列同一性は公知の方法によって容易に計算できる。前記方法には以下に記載されたものが含まれる（ただしこれらに限定されない）：Computational Molecular Biology, Lesk, A. N., ed., Oxford University Press, New York (1988) ; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, New York (1993) ; Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A.M., and Griffin, H. G., eds., Humana Press, New Jersey (1994) ; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinge, G., Academic Press (1987) ; Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M. Stockton Press, New York (1991) ; 及びCarillo, H., and Lipman, D., SIAM J. Applied Math., 48: 1073, 1988（前記文献の教示は参照により本明細書に含まれる）。

。配列同一性を決定する好ましい方法は、試験される配列間の最大一致を提供するように設計される。配列同一性を決定する方法は、ある配列間の配列同一性を決定する公開コンピュータプログラムで集大成されている。そのようなプログラムの例には以下が含まれる（ただしこれらに限定されない）：GCGプログラムパッケージ（Devereux, J., et al., Nucleic Acids Research, 12(1):387, 1984）、BLASTP、BLASTN及びFASTA（Altschul, S. F. et al., J. Molec. Biol., 215:403-410, 1990。BLASTXプログラムはNCBI及び他の供給源（BLAST Manual, Altschul, S. et al., NCVI NLM NIH Bethesda, MD 20894, Altschul, S. F. et al., J. Molec. Biol., 215:403-410, 1990（前記文献の教示は参照により本明細書に含まれる）から公開されている。これらのプログラムは規定ギャップ重を用いて配列を最適にアラインメントして、ある配列と参照配列との間に最高レベルの配列同一性を提供する。例示すれば、参照ヌクレオチド配列と少なくとも例えば85%、好ましくは90%、より好ましくは95%の“配列同一性”を有するヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドによって、当該あるポリヌクレオチドのヌクレオチド配列は、当該あるポリヌクレオチド配列が該参照ヌクレオチド配列の100ヌクレオチド毎に15まで、好ましくは10まで、より好ましくは5つまで点変異を含み得るという点を除いて、該参照配列と同一であることが意図される。換言すれば、該参照ヌクレオチド配列と少なくとも85%、好ましくは90%、より好ましくは95%の同一性を有するヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドでは、該参照配列のヌクレオチドの15%まで、好ましくは10%まで、より好ましくは5%までが欠失され得るか、別のヌクレオチドで置換され得るか、又は該参照配列の全ヌクレオチドの15%まで、好ましくは10%まで、より好ましくは5%までの数のヌクレオチドが該参照配列に挿入され得る。参照配列のこれらの変異は、該参照ヌクレオチド配列の5

10

20

30

40

50

若しくは3'末端の位置に又はそれら末端位置の間の任意の位置に存在するか、該参照配列内のヌクレオチド間に個々に若しくは該参照配列内の1つ以上の連続するグループ間に分散され得る。同様に、参照アミノ酸配列に対して少なくとも例えば85%、好ましくは90%、さらに好ましくは95%の配列同一性を有するあるアミノ酸配列を有するポリペプチドによって、当該ポリペプチドのあるアミノ酸配列は、当該あるポリペプチド配列が該参照アミノ酸配列の100アミノ酸毎に15まで、好ましくは10まで、より好ましくは5つまでのアミノ酸変異を含み得るという点を除いて、該参照配列と同一であることが意図される。換言すれば、参照アミノ酸配列と少なくとも85%、好ましくは90%、より好ましくは95%の配列同一性を有するあるポリペプチド配列を得るために、該参照配列のアミノ酸残基の15%まで、好ましくは10%まで、より好ましくは5%までが欠失され得るか、別のアミノ酸で置換され得るか、又は該参照配列のアミノ酸残基総数の15%まで、好ましくは10%まで、より好ましくは5%までの数のアミノ酸が該参照配列に挿入され得る。参照配列のこれらの変異は、該参照アミノ酸配列のアミノ末端若しくはカルボキシ末端の位置に又はそれら末端位置の間の任意の位置に存在するか、該参照配列の残基間に個々に若しくは該参照配列内の1つ以上の連続するグループ間に分散され得る。好ましくは、同一ではない残基位置は保存的アミノ酸置換によって相違する。しかしながら、配列同一性を決定するときは、保存的置換は一致には含まれない。

10

【0052】

担体分子

本発明のOMPヒストフィルス・ソムニペプチドと複合物を形成するか又は前記に共有結合される担体分子は、好ましくは上記に記載されたものである。動物で使用される好ましい担体はウシ血清アルブミン及びキーホールリンペットヘモシアニンである。人間で使用される適切なタンパク質担体には、破傷風トキソイド、ジフテリアトキソイド、無細胞百日咳ワクチン(LPFトキソイド)、細菌毒素と抗原的に類似するが変異により非毒性である交差反応性物質(CRM)が含まれる。例えば、文献(Pappenheimer, et al, *Immunochemistry*, 9, 891-906, 1972)にしたがって得られるCRM 197、及び他の細菌性担体、例えば髄膜炎菌の外膜タンパク質を用いることができる。好ましくは、該担体タンパク質自体が免疫原である。

20

本発明のOMPヒストフィルス・ソムニペプチドは、当業界で公知の任意の通常的方法によって該担体と共有結合させることができる。対称性リンカー、例えばアジピン酸ジヒドラジド(Schneersonらが記載(*J. Experimental Medicine*, 152, 361-376, 1980))、又は異種二官能性リンカー、例えばN-スクシンイミジル3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート(Fattomらが記載(*Infection and Immunity*, 56, 2292-2298, 1988))の使用は本発明の範囲内であるが、一切のリンカーの使用を回避しその代わりに本発明のヒストフィルス・ソムニペプチドを直接担体分子に結合させるのが好ましい。そのような結合は、Landiら(*J. Immunology*, 127, 1011-1019, 1981)が記載したように、還元アミノ化の手段によって達成できる。

30

【0053】

平均分子量によって規定される、免疫原性組成物のサイズは多様で、選択されるOMPヒストフィルス・ソムニペプチド及び当該OMPヒストフィルス・ソムニペプチドと担体との結合方法に左右される。したがって、前記は1,000(10^3)ダルトンより小さくても 10^6 ダルトンより大きくてもよい。還元アミノ化による結合方法では、ヒストフィルス・ソムニペプチドの分子量は、通常5,000から500,000、例えば300,000から500,000、又は例えば5,000から50,000ダルトンの範囲内である。

40

担体分子、すなわちペプチド、誘導体及びそのアナログ、並びに本発明のOMPヒストフィルス・ソムニペプチドと特異的に結合するペプチド模倣体は、当業界で公知の多様な方法(固相合成を含む(ただしこれらに限定されない))によって、又は溶液によって製造できる(Nakanishi et al., 1993, *Gene* 137:51-56; Merrifield, 1963, *J. Am. Chem. Soc.* 15:2149-2154; Neurath, H. et al., Eds., *The Proteins*, Vol II, 3d Ed., p. 105-237, Academic Press, New York, N.Y., 1976(前記文献は参照によりその全体が本明

50

細書に含まれる))。

本発明のOMPヒストフィルス・ソムニペプチド又は本発明の抗体若しくはその結合部分は、医薬的又は獣医的担体を含む希釈剤の溶液又は懸濁液によって注射可能な調剤として投与できる。

そのような分子の毒性及び治療的有効性は、標準的な医薬的手順によって細胞培養又は実験動物（例えばLD₅₀（集団の50%の致死用量）決定用）で決定できる。

【0054】

本発明のワクチンは多価でも一価でもよい。多価ワクチンは、複数のOMPヒストフィルス・ソムニペプチドと1つの担体分子との免疫性複合物から製造される。

ある特徴では、OMPヒストフィルス・ソムニペプチド組成物は、有効免疫量の免疫原性複合物を、好ましくは免疫刺激物質及び生理学的に許容できるベヒクルと組み合わせて含む。この関係で用いられる“免疫刺激物質”は、免疫系の活性を強化する能力を有する任意の化合物又は組成物を包含することを意図する。前記免疫刺激物質は、特異的な抗原と組み合わせられる特異的な強化作用であるか、又は単に1つ以上の免疫応答成分の活性で独立した作用を有するか否かに関係しない。免疫刺激化合物には、鉱物ゲル、例えば水酸化アルミニウム；表面活性物質、例えばリソレクチン、プルロニックポリオール；多価陰イオン；ペプチド；オイルエマルジョン；カリミョウバン及びMDPが含まれるが、ただしこれらに限定されない。これらの物質を利用する方法は当業界で公知であり、与えられたワクチンについて刺激物質の最適量を決定することは十分に当業者の能力の範囲内である。2つ以上の免疫刺激物質を与えられた1つの処方物で用いることができる。免疫原はまたリポソームに取り込むか、又は多糖類及び/又はワクチン処方物で使用される他のポリマーと複合物を形成させることができる。

所望の場合は、本組成物は、活性成分を含む1つ以上のユニット調剤形を含み得る、パック又はディスペンサー装置として提示できる。前記パックは、例えば金属又はプラスチック箔を含むことができる（例えばプリスターパック）。該パック又はディスペンサー装置は、投与についての指示（好ましくは哺乳動物、特にブタへの投与についての指示）を含むことができる。医薬又は生物学的製品の製造、使用又は販売を規制する政府機関により指定された形式の注意書きをそのような容器に添えることができる（前記注意書きは、当局による人間への投与に関し製造、使用又は販売の承認を示す）。

【0055】

アジュバント

本明細書で提供する、1つ以上のOMPヒストフィルス・ソムニペプチドを含む免疫原性組成物の免疫原性をさらに増強するために、本組成物は1つ以上のアジュバントを含むことができる。

該アジュバントは以前に記載されたか、又は当業界で公知の任意の技術によって精製できる。好ましい精製技術は、シリカゲルクロマトグラフィー、特に“フラッシュ”（迅速）クロマトグラフィー技術であり、前記はW. Clark Stillら（Organic Chemistry, 43, 2923-2925, 1978）が記載した。しかしながら、他のクロマトグラフィー方法（HPLCを含む）をアジュバントの精製に用いてもよい。結晶化もまたアジュバントの精製に用いることができる。いくつかの事例では、分析純度の生成物を合成から直接入手できるので精製は不要である。

本発明のワクチン組成物は、アジュバント組成物を製造する既知の技術にしたがって、適切な無菌的条件下でアジュバントをOMPヒストフィルス・ソムニペプチドと物理的に混合することによって調製される。OMPヒストフィルス・ソムニペプチドとアジュバントの複合化は、該複合物上の正味の陰性荷電の存在によって促進される（前記は長鎖アルキル化合物アジュバント上に存在する陽性荷電に静電的に引き付けられる）。

アジュバントは、1用量当たり約100 µgから約10mgの量、好ましくは1用量当たり約100 µgから約10mgの量、より好ましくは1用量当たり約500 µgから約5mgの量、さらに好ましくは1用量当たり約750 µgから約2.5mgの量、もっとも好ましくは1用量当たり約1mgの量で添加し得ると予想される。また別には、アジュバントは、最終製品の体積で約0.01から75

10

20

30

40

50

%の濃度で、好ましくは約2%から60%の濃度で、より好ましくは約5%から25%の濃度で、さらに好ましくは約7%から22%の濃度で、もっとも好ましくは10%から20%の濃度であり得る。

【0056】

生理学的に許容できるベヒクル

本発明のワクチン組成物は、他のポリペプチド医薬組成物のために使用される技術と類似の技術を用いて処方できる。したがって、アジュバント及びOMPヒストフィルス・ソムニペプチド（好ましくは担体分子と複合物を形成するか、及び/又はアジュバントと混合される）は、凍結乾燥形で保存され、さらに生理学的に許容できるベヒクル中で投与前に再構成されて懸濁液を形成する。また別に、アジュバント及び複合物はベヒクル中で保存することができる。好ましいベヒクルは、滅菌溶液、特に滅菌緩衝溶液（例えばリン酸緩衝食塩水）である。免疫原性組成物の免疫学的有効性を改善するようにアジュバントとベヒクル中の複合物を結合させる方法はいずれも適切である。

本発明のワクチンの1回分用量の体積は変動し得るが、一般的には、通常のワクチンで一般的に利用される範囲内であろう。1回分用量の体積は、上記に記載の複合物及びアジュバントの濃度で好ましくは約0.1mLから約3mL、好ましくは約0.2mLから約1.5mL、より好ましくは約0.2mLから約0.5mLである。

本発明のワクチン組成物は任意の通常的手段によって投与され得る。

【0057】

処方物

担体分子と結合したOMPヒストフィルス・ソムニペプチドを含む免疫原性複合物を、ヒストフィルス・ソムニの1つ以上の血清型に対する免疫用ワクチンとして用いることができる。生理学的に許容できるベヒクル中に免疫原性複合物を含む本ワクチンは、ヒストフィルス・ソムニによる感染症の治療又は予防のために、動物（好ましくは反芻動物（ウシ又はヒツジを含む））を免疫する方法で有用である。

免疫原性複合物による免疫によって本発明の免疫原性複合物に対して生じる抗体を、ヒストフィルス・ソムニの感染の治療又は予防のために受動免疫及び抗イデオタイプ抗体の生成に用いることができる。

該組成物が投与される対象動物は、好ましくは動物（乳牛、ウマ、ヒツジ、ブタ、家禽（例えばニワトリ）、ヤギ、ネコ、イヌ、ハムスター、マウス及びラットを含むが、ただしこれらに限定されない）であり、もっとも好ましい哺乳動物は乳牛である。別の実施態様では、対象動物は人間である。

本発明の処方物は、1つ以上の免疫原性組成物又は前記に対する抗体の有効免疫量、及び生理学的に許容できるベヒクルを含む。ワクチンは、1つ以上の免疫原性組成物の有効免疫量及び生理学的に許容できるベヒクルを含む。該処方物は投与態様にふさわしいものでなければならない。

所望の場合は、該免疫原性組成物はまた、少量の湿潤剤若しくは乳化剤又はpH緩衝剤を含むことができる。該免疫原性組成物は、流動溶液、懸濁液、エマルジョン、錠剤、ピル、カプセル、持続放出处方物、又は散剤であり得る。経口処方物は、標準的な担体、例えば医薬等級のマニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、セルロース、炭酸マグネシウムなどを含むことができる。

【0058】

有効用量

本明細書に記載する化合物は、ヒストフィルス・ソムニが関与する疾患を治療するために治療的に有効な用量で対象動物に投与できる。投薬量は、該ワクチンを投与される宿主に、複数の要件（例えば宿主のサイズ、体重及び年齢）と同様に左右される。

処方物中で用いられるべき、本発明の免疫原性複合物又は抗体の正確な量は、投与ルート及び対象動物の性質（例えば種、年齢、サイズ、疾患の状態/レベル）に左右され、医師の判断及び対象動物の環境にしたがって標準的な臨床技術により決定されるべきである。有効免疫量は、対象動物のヒストフィルス・ソムニ感染症を治療又は予防するために十

10

20

30

40

50

分な量である。有効な用量はまた、動物モデル試験系から誘導した用量応答曲線から外挿することができ、0.001mg/kgから100mg/kg、より好ましくは約400 µg/kgの用量である。

【0059】

化合物の毒性及び治療的有効性は、例えばLD₅₀（集団の50％に対する致死用量）及びED₅₀（集団の50％で治療的に有効な用量）を決定する標準的な医薬的手順によって細胞培養又は実験動物で決定できる。毒性作用と治療効果との間の用量比は治療インデックスであり、LD₅₀/ED₅₀比として表すことができる。大きな治療インデックスを示す化合物が好ましい。毒性副作用を示す化合物を用いる場合には、罹患組織部位を標的としてそのような化合物で狙い撃ちして、非感染細胞の潜在的損傷を最小限にし、それによって副作用を軽減するデリバリー系を設計するように注意を払わなければならない。

細胞培養アッセイ及び動物実験から得られるデータを、動物、特にウシ又は人間で 사용되는投薬量範囲の定式化に用いることができる。そのような化合物の投薬量は、好ましくはほとんど又はまったく毒性を示さないED₅₀を含む循環濃度範囲内に存在する。投薬量は、用いられる調剤形及び利用される投与ルートに応じて前記範囲内で変動し得る。本発明の方法で用いられるいずれの化合物についても、治療的に有効な用量は最初に細胞培養アッセイから概算できる。細胞培養の決定にしたがい、動物モデルで用量を定式化し、IC₅₀（すなわち症状の1/2最大障害を達成する試験化合物の濃度）を含む循環血漿濃度範囲を決定する。そのような情報を用いて、対象動物での有用な用量をより正確に決定できる。血漿中のレベルは例えば高速液体クロマトグラフィーによって測定できる。

【0060】

組成物の免疫原性は、該組成物による免疫後に被検対象動物の免疫応答を、当業界で公知の任意の免疫アッセイを用いてモニターすることによって決定できる。液性（抗体）応答及び/又は細胞媒介免疫の発生は免疫応答の指標として利用することができる。被検対象動物には、動物、例えばブタ、マウス、ハムスター、イヌ、ネコ、ウサギ、乳牛、ウマ、ヒツジ、家禽（例えばニワトリ、アヒル、ガチョウ及びシチメンチョウ）が含まれ得る。

被検対象動物の免疫応答は例えば以下のような多様なアプローチによって分析できる：公知の技術（例えば酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）、イムノプロット、免疫沈澱など）によってアッセイされる生成免疫血清の該免疫原性複合物に対する反応性、又は該病原体による感染の免疫宿主の防御及び/又は該病原体感染による免疫宿主の症状の緩和（感染症因子のレベル（例えば細菌レベル）をアッセイするための、当業界で公知の任意の方法（例えば該対象動物由来のサンプルを培養することによる）又は当業界で公知の他の技術によって決定される）。感染症因子のレベルはまた、該免疫グロブリンが指向する抗原のレベルを測定することによって決定できる。該感染症因子のレベルの低下又は該感染症の症状の緩和は該組成物が有効であることを示す。

本発明の治療薬は、動物又は人間でのin vivo使用の前に、所望される治療的又は予防的活性についてin vitroで試験することができる。例えば、個々の治療薬の投与が望ましいか否かを決定するために用いることができるin vitroアッセイには、細胞株又は特定の疾患若しくは異常を有する対象動物から培養された細胞に由来する適切な細胞を治療薬に曝露し、或いはまた前記に治療薬を投与して、当該治療薬の当該細胞における効果を観察するin vitro細胞培養アッセイが含まれる。

【0061】

また別には、該治療薬は、該感染症因子による感染に感受性を有するが、該感染症因子に感染しない細胞（対象動物から培養された細胞又は培養細胞株）に該治療薬を接触させ、該細胞を該感染症因子に曝露し、続いて該治療薬に接触させた細胞の感染率が該治療薬に接触させなかった細胞の感染率より低いかなどを決定することによってアッセイできる。

さらにまた、該治療薬は、治療前、治療中又は治療後に適切な時間間隔で動物モデル又は人間で生成される抗体の対抗分子のレベルを測定することによって評価することができる。

る。該分子の量のいずれの変化も又は前記分子が存在しないことも、該対象動物における治療の効果を認定させ得るか又は効果の相関性を示し得る。

本発明の方法及び組成物を用いてOMPヒストフィルス・ソムニに対して動物を免疫した後、当業界で公知の任意の結合アッセイを用いて、生じた抗体と当該特定の分子との間の結合を評価することができる。これらのアッセイはまた、当該特定の抗原に対するより高い親和性又は特異性を示す抗体を選別するために実施することができる。

【0062】

検出方法及び診断方法

本発明のOMPヒストフィルス・ソムニペプチドを使用して得られた抗体又はその結合部分は、ヒストフィルス・ソムニ菌の存在をサンプルで検出するために有用である。本検出方法は、本発明のヒストフィルス・ソムニペプチドに対して得られた単離抗体又はその結合部分を提供する工程、ある量のヒストフィルス・ソムニを含むと思われるサンプルを該単離抗体又はその結合部分に添加する工程、及びヒストフィルス・ソムニと結合した該単離抗体又はその結合部分を含む複合体の存在を検出する工程を含む。

本発明の抗体又はその結合部分はまた、ヒストフィルス・ソムニペプチドの存在をサンプルで検出するために有用である。本検出方法は、ヒストフィルス・ソムニペプチドに対して得られた単離抗体又はその結合部分を提供する工程、ある量のヒストフィルス・ソムニペプチドを含むと思われるサンプルを該単離抗体又はその結合部分に添加する工程、及びヒストフィルス・ソムニと結合した該単離抗体又はその結合部分を含む複合体の存在を検出する工程を含む。

【0063】

結合対のメンバーである特異的分子と結合する免疫グロブリン、特に抗体（及びその機能的に活性なフラグメント）は、本明細書に記載するように、診断薬及び予後薬として用いることができる。多様な実施態様では、本発明は、結合対のメンバーの測定及びそのような測定の臨床応用における使用を提供する。本発明の免疫グロブリンは、例えば生物学的サンプル中の抗原の検出で用いることができ、それによって、該免疫グロブリンが結合する分子の異常レベルについて、及び/又はそのような分子の異常型の存在について対象動物を試験することができる。“異常レベル”とは、該身体の一部に由来するか又は疾患をもたない対象動物に由来する類似のサンプルに存在するレベル、又は前記に存在するレベルに典型的な標準的レベルと比較して増加又は減少していることを意味する。本発明の抗体はまた、診断又は予後技術で使用されるキットに試薬として含まれ得る。

ある特徴では、ヒストフィルス・ソムニペプチドと免疫特異的に結合する本発明の抗体は、ヒストフィルス・ソムニ感染の診断、予後又はスクリーニングのために用いることができる。

【0064】

別の特徴では、本発明は、ヒストフィルス・ソムニ感染又は前記に対する免疫の存在を診断又はスクリーニングする方法を提供し、前記方法は、対象動物に由来するサンプルに対する免疫特異的結合抗体（該抗体はヒストフィルス・ソムニペプチドと免疫特異的に結合する）のレベルを対象動物で測定する工程を含み、前記工程で、該感染症因子をもたない対象動物に由来する類似のサンプルの免疫特異的結合レベルと比較して、前記免疫特異的結合レベルの増加はヒストフィルス・ソムニの存在の指標である。

ヒストフィルス・ソムニペプチド又はそのアンタゴニストの存在を検出する適切なアッセイの例には、ELISA、放射性免疫アッセイ、ゲル拡散沈殿反応アッセイ、免疫核酸アッセイ、凝集アッセイ、蛍光免疫アッセイ、タンパク質A免疫アッセイ又は免疫電気泳動アッセイが含まれるが、ただしこれらに限定されない。

典型的には、該問題の分子の免疫アッセイは、検出可能なように標識した抗体の存在下でサンプル（例えば生物学的液体、組織抽出物、新しく採集した細胞、又は培養細胞溶解物）をインキュベートする工程、及び当業界で公知の多数の任意の技術によって結合抗体を検出する工程を含むであろう。

【0065】

10

20

30

40

50

ある抗体の結合活性は周知の方法にしたがって決定できる。当業者は、日常的な実験を用いて、各測定について動作し得る最適なアッセイ条件を決定できるであろう。

本発明の追加の特徴は、ヒストフィルス・ソムニの検出用又は測定用診断キットに関する。1つ以上の容器に抗ヒストフィルス・ソムニペプチド抗体及び場合によって該抗体に対する標識された結合パートナーを含む、診断で使用されるキットが提供される。また別には、該抗OMPヒストフィルス・ソムニペプチド抗体は標識することができる（検出可能なマーカー、例えば化学発光部分、酵素部分、蛍光部分又は放射性部分により標識できる）。したがって、本発明は、抗OMPヒストフィルス・ソムニペプチド抗体及びコントロール免疫グロブリンを含む診断キットを提供する。具体的な実施態様では、該容器の前述の化合物の1つは検出可能なように標識することができる。キットは場合によってさらに、標準物質又はコントロールとして使用するために、該キットの抗体によって認識される予め定められた量のOMPヒストフィルス・ソムニペプチドを容器中に含む。

10

20

30

40

50

【0066】

対象動物への投与

投与の好ましいルートには、鼻内、経口、皮内及び筋肉内が含まれるが、ただしこれらに限定されない。飲み水での投与が、もっとも好ましくは1回分用量として所望される。本発明の組成物はまた、1用量、2用量又は3用量以上で、同様に他のルートでも投与することができる。例えば、そのような他のルートには皮下、皮内、静脈内、血管内、動脈内、腹腔内、包膜内、気管内、皮内、心臓内、肺葉内、脊髄内、肺臓内又は腔内である。所望される治療の持続時間及び有効性に依りて、本発明の組成物は、1回又は数回、間歇的にも、例えば日を基準として数日間、数週間又は数カ月間にわたって種々の投薬量で投与され得る。

以下の実施例は本発明の好ましい実施態様を示すために含まれている。以下の実施例で開示する技術は本発明者らが発見した代表的な技術であり、本発明の実施で良好に機能し、したがって本発明の実施のための好ましい態様を構成すると考えることができることは、当業者には理解されよう。しかしながら、本開示を考慮して、開示した具体的な実施態様で多くの変更を実施し、さらに本発明の趣旨から外れることなく同様な又は類似の結果を得ることができることは当業者には理解されよう。

【実施例】

【0067】

実施例1：CD牛における呼吸器チャレンジモデルの開発

A. 目的

任意のプロトタイプワクチンを評価するために、適切な病状が非処置動物で出現することを示す良好かつ一貫したチャレンジモデルが要求された。BIVIリサーチアンドデベロップメントラブによる大半の刊行文献及び以前の研究は単離株5166を用いている。前記はカリフォルニア大学サンディエゴ分校（UCSD）からチャレンジ目的で入手されたが、一貫しない結果を生じた。より一貫したモデルを作製するために、最近獲得した野外単離株を5166単離株との比較に用い、どちらが十分な臨床徴候、肺臓病理学及び死亡率を提供し、ワクチンプロトタイプの評価のために更なる実験に供し得るかを確定した。以前の文献にしたがえば、野外で処置を施されなかった野生型感染は平均15%の肺関与を生じる（Griffin, 2009）。この測定を利用し、チャレンジモデルが成功か否かを決定した。

【0068】

B. 材料と方法

細菌単離株

コントロールとして使用するために単離株5166をUCSDから入手した。単離株35576（アイオワ州立大学獣医診断研究室（ISUVDL）から入手）、LgD1-TN08（PTA-12756）、及びLg2-OK08（PTA-12755）を、細菌性肺炎と診断された野外例から回収した。全ての単離株ストックを調製し、クリオビーズ（Cryobeads, Copan Diagnostics）で保存した。増殖は、無菌的な10µLループを用いてコロンビア血液寒天（CBA）プレート（5%ヒツジ血液（Remel）を含む）にストリークし、10%のCO₂とともに37℃で24時間インキュベートすること

によって完了させた。前記プレートから個々のコロニーを選別し、新しいCBAプレートにローン増殖のためにストリークし、再度24時間インキュベートした。細菌ローンを1.0mLの無菌的リン酸緩衝食塩水 (PBS, Gibco) に採集し、300 μ Lを用い、T-150フラスコ中のCBA (Corning) に接種し、無菌的ガラスビーズを用いて拡散させた。より大きな容器を10%のCO₂とともに37℃で再度インキュベートし、続いてチャレンジの日に18時間増殖でガラスビーズを利用して採集し、前記培養を6.0mLの5%ウシ胎児血清 (FBS, SAFC) 含有RPMI 1640培養液/フラスコに移した。以前の研究では、610nmで75%の透光度は約 3.0×10^8 CFU/mLに相関することが示された。この概算値を用い、培養をRPMI 1640で最終濃度 1.0×10^9 CFU/mLに希釈した。

【0069】

ウシ

初乳を止めた67頭のホルスタイン牛を業者 (Dykstra Dairy, Strubble, IA) から入手した。前記は、イヤーノッチによりウシウイルス性下痢ウイルス (BVDV) 持続感染陰性、鼻スワブのq-PCRによりマイコプラズマ・ボビス (*Mycoplasma bovis*) 持続感染陰性と判定され、さらにH.ソムニワクチン接種を全く受けていない。全てのウシが実験の開始前に良好な健康状態であることを、BIVIリサーチファーム (Sioux Center, IA) で現場の担当獣医師が決定した。チャレンジの時点で、ウシは55日齢から71日齢の範囲で、平均は59日齢である。動物は、施設の方法にしたがいその日齢及び体重に適切な1日分の飼料を与えられた。水は各囲いについて利用可能なゴム容器により自由に摂取可能であった。ウシを5グループのそれぞれにランダムに振り分け、さらに10囲いを含む複数のブロックとして編成された個々の囲いにランダムに振り分けた。

チャレンジ

厳密コントロール動物を安楽死させ、チャレンジ前に剖検して、供給元由来の呼吸器病変が存在しないことを確認した。他のコントロールには、H.ソムニを含まない2 x 20.0mL用量の5%FBS含有RPMI 1640培養液を内視鏡により気管内に投与した。実験のための全ての動物に対して、割り当てた単離株から採集したH.ソムニ20.0mLを 1.0×10^9 CFU/mLに希釈し、総概算チャレンジ用量 2.0×10^{10} CFUを、内視鏡により各ウシの気管内に第一分岐部レベルで投与した。前記投与に続いて、20mLの5%FBS含有RPMI 1640培養液で洗浄した。

【0070】

臨床観察

チャレンジ後7日間、臨床徴候及び直腸温度を毎日観察した。全ての身体系統を観察したが、呼吸器ストレスの徴候に特に注意を払った。重篤な呼吸器ジストレスの徴候を示すか、立っていることができなくなるか、及び/又は介助がなければ飼料及び/又は水にたどり着くことができない動物は、人道的理由及び剖検のために安楽死させた。チャレンジ後7日で、残りの全動物を安楽死させて剖検した。剖検時に、肉眼病変及び各肺葉に存在する肺病変のパーセンテージを担当獣医師が記録した。病巣の辺縁の組織及び健全組織から成る肺サンプルを収集した。ウシ毎に2つのサンプルを収集し、検査のために研究室へ配送するときまで氷上に保存した。各ウシの追加サンプルを組織病理学的試験のために10%ホルマリンで固定した。

細菌の回収

プロパンランプで組織の表面を焼き、続いて無菌的に切断して内部面を露出させた。乾燥綿棒を該組織に挿入しサンプルに対して回転させた。この綿棒を5mLのBHIプロスにディップした。前記プロスにはトリス緩衝液及びチアミン-リン酸が文献 (Asmussen and Bau gh, 1981) で提唱されたように補充された。プロスチューブを37℃で24 - 72時間、130rpmで浸透しながらインキュベートした。組織の第二のセットは-70℃で保存した。インキュベーションに続いて、プロス培養を陽性及び陰性コントロールチューブと比較して濁度を基準に増殖について陽性又は陰性を判定した。

【0071】

PCR

感染肺由来培養のH.ソムニの存在を立証するために、各プロス培養から50 μ Lのサン

10

20

30

40

50

ルを採取し、DNA抽出 (Qiagen DNAキット) に付してq-PCRによりH.ソムニDNAの存在について試験した。利用したプライマーは、16S rDNA内の配列に対してH.ソムニ種特異的であった：フォワードプライマー (5' -GAAGGCGATTAGTTTAAGAG-3') 及びリバースプライマー (5' -TTCGGGCACC AAGTRTTCA-3') (Angen et al., 1998)。PCRは、25 μ L体積の96ウェル様式で、バイオラドマスターミックス (Bio-Rad Master Mix)、0.4 μ g/ μ Lウシ血清アルブミン (BSA) 及び各ウェルの反応の有効性を確認するインプロセスコントロールプライマー一式とともにCFX-96サーモサイクラー (Bio-Rad) を用いて実施した。H.ソムニDNAの標準曲線を各プレートで用いた。95.0 で5分間の最初の活性化工程を実施し、続いて95 で15秒の変性工程及び60.0 で30秒のアニーリング/伸長工程の45サイクル、さらに各サイクルの最後にプローブの蛍光のリアルタイム捕捉を実施した。データを捕捉し、バイオラドCFXソフトを用いて分析した。サンプルはデュープリケートで試験し、平均閾サイクル (C_t) を標準物と比較して、各サンプルが陽性か陰性かを決定した。サンプルが1つの陽性ウェル及び1つの陰性ウェルを有する場合には、当該サンプルをトリプリケートで再度試験し、試験ウェルの50%超が示す結果によって最終的に陽性を決定した。

10

組織病理学

10%ホルマリン固定肺サンプルを、組織病理学試験のためにISU-VDL (Ames, IA) へ送った。0 - 4のスコア系を用いた。スコア0は顕微鏡病巣が存在しないことを示し、スコア1は限局性病巣を示し、スコア2は中等度又は多数の限局性病巣を示し、スコア3は重度の又は拡散した顕微鏡病巣を示し、スコア4は重度で拡散した顕微鏡病巣を示す。

20

【0072】

結果

全チャレンジグループが、コントロールグループと本実験の過程を通して比較したとき、平均直腸温度の検出可能な上昇を示した。単離株5166は1日目にもっとも迅速にピーク温度に達するが、単離株35576は観察された最高の直腸温度に2日目に達した。各単離株のチャレンジグループの直腸温度は1日目又は2日目にピーク温度から平均して下降を示した。観察された直腸温度をグループ間で比較したとき、単離株35576のみが、他の単離株の温度上昇よりも有意な温度上昇を示した ($p=0.004$)。本チャレンジ期間の全過程にわたる平均直腸温度は図1にまとめられている。

臨床徴候、例えば抑うつ、食欲不振、急迫呼吸、喘ぎ呼吸、頭を下げる、体移動を嫌がる、眼及び鼻の分泌物放出が全チャレンジ動物で観察された。徴候はチャレンジ後1日目から3日目までもっとも重度でもっとも広く観察された。症状がもっとも重度で最も数多く観察されたのはグループ2 (単離株Lg2-OK08) で、このグループでは、15頭のうち11頭が3日目までに死亡しているのが発見されたか又は人道的理由で安楽死させられた。死亡率は表1にまとめられている。

30

細菌培養及びその後のq-PCR分析は全チャレンジグループにおける高い肺臓回収率を示した。グループ2 (単離株Lg2-OK08) では、肺組織培養で陽性PCRが観察されなかったのはただ1頭だけであった。

【0073】

総肺病変を各動物の剖検時に測定した。赤色から灰白色へ黄色へと変動する肝変による硬化が観察された。病巣は気管支樹に続く。肋骨郭に付着するフィブリンタゲもまた、数頭の動物の胸腔内及び心臓周囲囊の過剰液体とともに観察された。これら動物のうちの数頭は胸膜炎も同様に示した。グループ2 (Lg2-OK08) は36.89% \pm 8.64% ($\sigma=0.1$) の総肺関与を生じた。グループ1 (5166) は22.16% \pm 7.66% ($\sigma=0.1$) の総肺関与を生じた。この相違は統計的に有意である ($p=0.08$)。肺病変は図2にまとめられている。

40

肺組織を病巣の重篤度 (0 - 4スケール) 及びこれらの観察が細菌性肺炎と適合し得るかに関して採点した。グループ間に有意な相違は見つけれなかったが、各単離株によるチャレンジによって肺炎が惹起され得ることが支持される。組織病理学的試験の重篤度スコアは表2にまとめられている。

【0074】

表1：処置グループの死亡率

50

処置	1日目	2日目	3日目	総計
5166	1/15(6.7%)	1/15(6.7%)	1/15(6.7%)	3/15(20.0%)
Lg2-OK08	5/15(33.3%)	1/15(6.7%)	4/15(26.7%)	10/15*(66.7%)
LgD1-TN08	2/15(13.3%)	2/15(13.3%)	2/15(13.3%)	6/15(40.0%)
35576	3/14(21.4%)	0/14(0.0%)	6/14(42.9%)	9/14**(64.3%)
コントロール	0/5(0.0%)	0/5(0.0%)	0/5(0.0%)	0/5(0.0%)

*単離株Lg2-OK08は、5166よりも有意 ($p=0.01$) に高い死亡率をもたらした。

**単離株35576は、5166よりも有意 ($p=0.02$) に高い死亡率をもたらした。

死亡率は、そのような事象が観察されたそれぞれの日の各群の死亡数として報告されている。パーセンテージは当該処置グループの影響を受けた割合を表す。3日目の朝から7日目の最後の剖検まで動物は全く死亡しなかった。

【0075】

C. 結論

本実験の目的は、以前に用いられた単離株5166と比較して、単離株Lg2-OK08、LgD1-TN08及び35576を良好なチャレンジモデルとして用いることができるか否かを決定することであった。単離株Lg2-OK08は、以下を含む臨床所見を提示することで最初の単離株5166よりも優れている：実験の過程を通して同等な平均直腸温度を示し、2日目にはより高いピーク温度を示す；より多くの目に見える臨床徴候；有意に高い死亡率；及び本実験における肺病巣パーセンテージの有意な増加。単離株Lg2-OK08はまた、他の被検単離株（LgD1-TN08又は35576）のどちらよりも一貫した結果をもたらした。全ての被検単離株が細菌性肺炎を生じ、該モデルによって意図される所望の肺病変（15%以上）を提示するが、単離株Lg2-OK08は、他の単離株と比較して最も強い病毒性を示すようである。この単離株は、処置グループ内で一貫して適切な病変形成性を示し、そのより新しい単離ゆえに現在の野生型呼吸器感染をより厳密に反映することができる。したがってLg2-OK08をチャレンジ生物として更なる研究のために利用した。

【0076】

表2：組織病理学実験による重篤度スコア

処置	全体的な組織学的重篤度				
	0	1	2	3	4
5166	2 (13.3%)	1 (6.7%)	5 (33.3%)	5 (33.3%)	2 (13.3%)
Lg2-OK08	1 (6.7%)	2 (13.3%)	5 (33.3%)	5 (33.3%)	2 (13.3%)
LgD1-TN08	3 (20.0%)	1 (6.7%)	7 (46.7%)	4 (26.7%)	0
35576	1 (7.1%)	1 (7.1%)	4 (28.6%)	3 (21.4%)	5 (35.7%)
コントロール	4 (80.0%)	1 (20.0%)	0	0	0

重篤度スコアはISU-VDLの技術スタッフの判定を基準にして割り当てられた。パーセンテージは、提示の顕微鏡病巣の重篤度を示す該当処置グループにおける割合を示す。

スコアは以下のとおりである：0 = 顕微鏡病巣は存在しない；1 = 軽度又は限局性病巣；2 = 中等度又は多数の限局性病巣；3 = 重度の又は拡散した病巣；4 = 重度で拡散した病巣。

【0077】

実施例2：CD牛モデルでのワクチン戦略評価

A. 目的

本実験の目標は、実施例1に記載の呼吸器チャレンジモデルに対して、これまで利用可能なワクチン技術を代表する多様なワクチンプロトタイプの有効性を判定することであった。本実験で精査するワクチンは、死菌、バイオフィーム形成遺伝子に欠損を有する2つの改変生変異体、及びサルコシル抽出によって得られる粗OMP抽出物が含まれる。呼吸器チャレンジの成功を、細菌の回収、H.ソムニ特異的PCR、及び顕微鏡病巣の組織病理学的試験によって確認しながら、野外実験で観察される肺病変に対して再度調べた。ワクチン

10

20

30

40

50

の有効性は、非ワクチン接種コントロールと比較した肺病変の減少を基準に判定した。

【0078】

B. 材料と方法

細菌単離株

H. ソムニ単離株Lg2-OK08 (PTA-12755) をチャレンジと同様にOMP抽出にも用いた。ある種のバイオフィルム形成の特徴を欠く2つの改変生欠損変異体をVATech (Virginia Polytechnic Institute and State University) から入手した。市場で入手できる死菌製品を入手してこれまでの利用可能な方法と該プロトタイプとの有効性の比較として供した。OMP抽出のための単離株Lg2-OK08の増殖は以下の節で記載する。このチャレンジ用単離株の増殖は、改変生ワクチン単離株の増殖と同様に、実施例1に報告した方法とまったく同一の態様で実施した。

10

OMP抽出

OMP抽出方法は文献記載の方法 (Bollag et al., 1996及びRehm, 2006) から改変した。5% ウシ血液 (Remel) を含むCBAプレートにクリオビーズ (Copan Diagnostics) 上で保存した単離株Lg2-OK08 (PTA-12755) を打ち付け、10% CO₂とともに37 °Cで24時間インキュベートした。続いて、コロニーを50mLの円錐チューブ (Corning) 中の10mLの私有ブロス培地 (BIVI) (FBS (SAFC)、酵母抽出物 (BIVI) 及びデキストロース (BIVI) を補充) に移した。このブロスを130rpmで震盪させながら37 °Cで24時間インキュベートした。典型的なH. ソムニ増殖に一致する濁度を、分光光度計を用い610nmで光学密度 (OD) を測定することによって実証し、この最初の培養の1.5mLを、2.8Lの震盪フラスコ中の1.5Lの新しい培養液に接種した。このより大きな培養を130rpmで震盪しながら18時間37 °Cでインキュベートした。前記培養を10,000 x Gで10分間遠心分離して細菌を採集した。続いて、採集細胞を10 x 濃度で10mMの4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニエタンスルホン酸 (HEPES) 緩衝液 (Sigma) (プロテアーゼ阻害剤 (Sigma) を含む) に再懸濁した。続いて、この再懸濁ペレットを3サイクルの凍結融解に付して細胞融解を開始させた。3回目の融解に続いて、培養を3ラウンドの超音波によって更なる細胞溶解に付した。超音波はカップホーンを用い、完全振幅で0.5秒のバーストを1分間実施した。続いて、細胞溶解物を17,000 x Gで20分間遠心分離して細胞屑を除去した。続いて得られた上清を100,000 x Gで1時間、4 °Cで遠心分離し、膜結合タンパク質をペレットにした。この遠心分離ペレットを10 x 濃度で10mMのHEPES (プロテアーゼ阻害剤 (Sigma) 含む) に再懸濁し、続いて2.0%サルコシル (Sigma) で30分間室温にて処理し非タンパク質成分を可溶化した。続いて、前記処理懸濁物を再度100,000 x G、4 °Cで1時間遠心分離してタンパク質をペレットにした。続いて、得られたペレットを10mMのHEPESに再懸濁し、さらに最終濃度1.0mg/mLに希釈した。前記濃度は、BCA総タンパク質アッセイキット (Thermo) によって示された。

20

30

前記抽出プロセスは、生成されるタンパク質総量で予想したほど有効ではないことが示され、最終処理のタンパク質の多くが可溶性分画に留まることもまた観察された。殺滅バクテリンワクチンを投与したウシの血清を用いたこれらの調製物のウェスタンブロットは、これら2つの分画のタンパク質プロファイルはほぼ同一であることを示した。ワクチンのための十分な材料を提供するために、サルコシル処理の不溶性及び可溶性分画の両分画を本ワクチン免疫に用いた。

40

【0079】

ウシ

70頭の初乳停止ホルスタイン牛を業者 (J&R Livestock (アイオワ)) から入手した。前記は、イヤーノッチによりBVDV持続感染陰性、鼻スワブのq-PCRによりM. ボビス持続感染陰性と判定され、さらにH. ソムニワクチン接種を以前に全く受けていない。最初のワクチン接種の時点でウシは41日齢から51日齢の範囲で、チャレンジの時点で平均90日齢であった。全てのウシが実験の開始前に良好な健康状態であることを、BIVIリサーチファーム (Cosby, MO) の現場の担当獣医師が決定した。動物は、施設の方法にしたがいその日齢及び体重に適切な1日分の飼料を与えられた。水は各囲いについて利用可能なゴム容器により自由に摂取可能であった。ウシを5グループのそれぞれにランダムに振り分け、さら

50

に処置に応じて複数のブロックの個々の木枠に振り分けた。コントロール動物は、この実験のワクチン接種期の間、改変生ワクチン接種動物から可能なかぎり離れた木枠に振り分けた。さらにまた、ワクチン免疫期間の間、動物は常に以下と同じ順序に並べた：コントロール、バクテリンワクチン免疫、OMPワクチン免疫、続いて改変生ワクチン免疫。

ワクチン免疫とチャレンジ

ワクチンを本実験の0日目に投与し、続いて3週間後の21日目にブースターを投与した。チャレンジコントロール動物にはPBSのみを投与した。バクテリンワクチン免疫動物には、製造業者のラベルの推奨にしたがい2.0mL用量を皮下（SQ）に投与した。OMPワクチン免疫動物には、1用量当たりフロイント不完全アジュバント（Sigma）中の400 µgのOMP材料をSQで投与した。改変生ワクチン免疫動物には、概算 1.0×10^9 CFU/用量で2.0mL用量を2つの異なるルート（SQ及び鼻内（IN））により投与した。

41日目（チャレンジ1日前）に、動物をランダムに新規な囲い（ストレスサーとして機能する）に再度振り分けた。42日目に、先の実験と同一の方法により5%FBS含有RPMI1640で希釈した単離株Lg2-OK08の 1.0×10^{10} CFUで動物をチャレンジした。全てのチャレンジ後の観察、サンプル採集、試験方法及び安楽終末は実施例1に記載したものと同一であった。ワクチン免疫及びチャレンジスケジュールは表3にまとめられている。

【0080】

表3：実験デザイン

処置グループ							
グループ	動物数/ グループ	ワクチン			チャレンジ		
		物質	用量/ ルート	投与ス ケジュ ール	物質	用量/ ルート	投与ス ケジュ ール
チャレンジ コントロール	11	滅菌 PBS	2.0mLSQ & 2.0mLIN	0日目 及び 21日目	生H. ソムニ 単離株 Lg2- OK08	20.0mLの RPMI1640中 の 1.0×10^{10} CFU/用量 続いて 20.0mLの RPMI1640で 洗浄	42日目
バクテリン	14	市販ワ クチン	2.0mLSQ				
OMP	14	OMP 調製物	2.0mLSQ				
改変生変異体1	14	生培養	2.0mLSQ & 2.0mLIN				
改変生変異体2	14	生培養	2.0mLSQ & 2.0mLIN				

ワクチン接種は本実験の0日目及び21日目に実施した。チャレンジは42日目に実施した。

【0081】

臨床観察

チャレンジ後7日間、臨床徴候及び直腸温度を毎日観察した。全ての身体系統を観察したが、呼吸器ストレスの徴候に特に注意を払った。重篤な呼吸器ジストレスの徴候を示すか、立っていることができなくなるか、及び/又は介助がなければ飼料及び/又は水にたどり着くことができない動物は、人道的理由及び剖検のために安楽死させた。チャレンジ後7日で、残りの全動物を安楽死させて剖検した。剖検時に、肉眼病変及び各肺葉に存在する病巣形成のパーセンテージを担当獣医師が記録した。病巣の辺縁の組織及び健全組織から成る肺サンプルを収集した。ウシ毎に2つのサンプルを収集し、検査のために研究室へ配送するときまで氷上に保存した。各ウシの追加サンプルは組織病理学的試験のために10%ホルマリンで固定した。

細菌の回収

肺組織のスワブを細菌検出に用いた。実験1と同一の方法で、開放火炎上で肺組織を焼き、無菌フードに移し、組織の内部面を無菌的にスワブでふき取ることができるよう

開した。続いてこれらのスワブを増殖媒体に移した。インキュベーション後に濁りが観察されないとき、-70 で保存されてあった第二の肺組織サンプルを続いて融解させた。実験1の手順を繰り返し、第二のスワブを用い、5%ヒツジ血液 (Remel) を含むコロンビア血液寒天 (CBA) プレートをストックした。前記第二のスワブは直接PCRのためにもまた維持された。各プロス培養、寒天プレート及び第二の検査セットのスワブ由来サンプルをそれぞれDNA抽出及びPCR分析に付した。

【 0 0 8 2 】

PCR

感染肺由来培養のH.ソムニの存在を立証するために、各プロス培養から50 µLのサンプルを採取し、DNA抽出 (Qiagen DNAキット) に付してq-PCRによりH.ソムニDNAの存在について試験した。実験1に記載したH.ソムニ16S遺伝子特異的プライマーを用いた。PCRは、25 µL体積の96ウェル様式で、バイオラドマスターミックス、0.4 µg/µLウシ血清アルブミン (BSA) 及び各ウェルの反応の有効性を確認するインプロセスコントロールプライマー一式とともにCFX-96サーモサイクラー (Bio-Rad) を用いて実施した。H.ソムニDNAの標準曲線を各プレートで用いた。95.0 で5分間の最初の活性化工程を実施し、続いて95 で15秒の変性工程及び60.0 で30秒のアニーリング/伸長工程の45サイクル、各サイクルの最後にプローブ蛍光のリアルタイム捕捉を実施した。データを捕捉し、バイオラドCFXソフトを用いて分析した。サンプルはデュプリケートで試験し、平均閾サイクル (C_t) を標準と比較して、各サンプルが陽性か陰性かを決定した。サンプルが1つの陽性ウェル及び1つの陰性ウェルを有する場合には、当該サンプルをトリプリケートで再度試験し、試験ウェルの50%超が示す結果によって最終的に陽性を決定した。

組織病理学

10%ホルマリン固定肺サンプルを、組織病理学試験のためにISU-VDL (Ames, IA) へ輸送した。0 - 4のスコア系を用いた。スコア0は顕微鏡病巣が存在しないことを示し、スコア1は軽度又は限局性病巣を示し、スコア2は中等度又は多数の限局性病巣を示し、スコア3は重度の又は拡散した顕微鏡病巣を示し、スコア4は重度で拡散した顕微鏡病巣を示す。

結果

全てのグループについて直腸温度はチャレンジの翌日に約3度上昇した。バクテリンワクチン接種グループは最高の平均温度を示し、一方、変異体1ワクチン接種動物は最低の平均温度を示した。ワクチンのいずれに関しても直腸温度に有意な低下は存在しなかった。直腸温度は図3にまとめられている。

以前の研究では、肺スワブのプロス培養はインキュベーション24 - 27時間後に濁った。本実験では、この濁りは観察されず、肺組織から生命活性を有する細菌が回収されなかったことを示している。第二のプロス培養セットもまた、37 /130rpm震盪で72時間のインキュベーション後に濁りを示さなかった。しかしながら、CBAプレートは、37 で10%CO₂ 下での24時間インキュベーション後にH.ソムニの典型的なコロニーを示し、非H.ソムニ生物の明白な増殖は認められなかった。表4に示すように、プロス培養の各々についてのPCR分析、平板培養コロニー及び直接スワブはいずれもH.ソムニの存在を示している。

【 0 0 8 3 】

表4：チャレンジ動物よりH.ソムニの検出

細菌検出技術	処置グループ					肺サンプル総計/検出技術
	コントロール	バクテリン	OMP	変異体1	変異体2	
新鮮肺の培養	11/11 (100%)	14/14 (100%)	13/14 (92.9%)	13/14 (92.9%)	13/14 (92.9%)	64/67 (95.5%)
凍結肺の培養	10/11 (91.0%)	10/14 (71.4%)	10/14 (71.4%)	14/14 (100%)	12/14 (85.7%)	56/67 (83.6%)
凍結肺平板培養	11/11 (100%)	11/14 (78.6%)	12/14 (85.7%)	14/14 (100%)	12/14 (85.7%)	60/67 (88.6%)
凍結肺のスワブ	11/11 (100%)	13/14 (92.9%)	13/14 (92.9%)	14/14 (100%)	13/14 (92.9%)	64/67 (95.5%)
総肺サンプル/処置グループ	43/44 (97.8%)	48/56 (85.7%)	48/56 (85.7%)	55/56 (98.2%)	50/56 (89.3%)	

パーセンテージは、16s rRNA遺伝子に特異的なH.ソムニのq-PCRによる検出成功の各グループにおける割合を示す。新鮮プロス培養も凍結プロス培養も、以前には通常的に観察されたH.ソムニの増殖の成功を示す濁りをもたらさなかったが、PCRによって、生命活性をもたないとしても検出可能な微生物が確認され、平板培養は他の夾雑細菌が存在しないことを示した。

【0084】

観察された臨床徴候には、抑うつ、食欲不振、急迫及び/又は喘ぎ呼吸、咳、鼻の分泌物放出、震え、ワクチン注射部位の浮腫が含まれる。全グループについて、臨床徴候はチャレンジ期間を通して持続したが、OMPワクチン接種動物ではチャレンジ後5日間に咳のみが示された。OMPワクチン処置は、コントロールグループと比較したとき、以下の事柄で有意な減少をもたらした：観察される抑うつの発生 ($p=0.06$)、食欲低下を示す日数 ($p=0.02$)、鼻の分泌物放出 ($p=0.03$)、及び観察される臨床徴候の総数 ($p=0.05$)。変異体1ワクチンは、喘ぎ呼吸の発生の減少又は鼻の分泌物放出減少を示さなかった唯一のワクチンであった。

コントロールグループの5頭の動物はチャレンジ期間の終了前に死亡した。市販バクテリングループの2頭の動物、変異体1グループの3頭の動物、及び変異体2グループの3頭の動物もまたチャレンジ期間中に死亡した。OMPワクチンを投与した動物はいずれも剖検前には死亡せず、これは、コントロールと比較したとき有意である ($p=0.02$)。死亡率は表5にまとめられている。

【0085】

表5：処置グループによる死亡率

処置	45日目	46日目	47日目	48日目	総死亡率
コントロール	2/11(18.2%)	1/11(9.1%)	1/11(9.1%)	1/11(9.1%)	5/11(45.5%)
バクテリン	1/14(7.1%)	0/14(0.0%)	1/14(7.1%)	0/14(0.0%)	2/14(14.3%)
OMP	0/14(0.00%)	0/14(0.00%)	0/14(0.00%)	0/14(0.00%)	0/14*(0.00%)
変異体1	2/14(14.3%)	0/14(0.0%)	0/14(0.0%)	1/14(7.1%)	3/14(21.4%)
変異体2	2/14(14.3%)	1/14(7.1%)	0/14(0.0%)	0/14(0.0%)	3/14(21.4%)

*OMPワクチンはコントロールグループよりも有意に低い死亡率を生じた ($p=0.02$)。死亡率は、そのような事象が観察されたそれぞれの日の死亡数として報告される。パーセンテージは当該処置グループの影響を受けた割合を示す。

【0086】

チャレンジコントロールグループと比較したとき、改変生変異単離株の両株が、肺病巣

の平均パーセンテージの低下を示したが（変異体1について24.38%及び変異体2について24.47%）、この相違は統計的に有意であるとは認められなかった。しかしながら、OMPワクチン候補は平均して13%の肺病巣を生じ、前記はコントロールグループで観察された32.4%と比較したとき有意である（ $p=0.001$ ）。市場で入手できる殺滅バクテリアワクチンは、コントロールグループと比較したとき病巣スコアで相違を示さなかった（32.10%）。肺の病理学は図4にまとめられている。

組織学的試験は細菌性肺炎と一致した。当該精査者は、小葉間隔壁がしばしば浮腫、炎症性細胞及びリンパ管の血栓症により拡大/拡張されることを報告した。グループ間に相違は認められず、このデータは確認の目的のためにのみ利用された。

【0087】

C. 結論

問われているワクチンの有効性評価はOMP調製物について有望な結果を提示した。前記結果は、コントロールグループと比較したとき全体的な臨床徴候、パーセント肺病巣及び死亡率の有意な減少を示した。改変候補ワクチンはこれら変数について減少傾向を示したが、本実験では統計的に有意であるとは認められなかった。市場で入手できるバクテリア製品は呼吸器チャレンジに対して有効性を示さなかった。

細菌回収中にブロス培養が濁らなかったのは、培養液又はその成分の1つの特定のロットの人工産物であったかもしれない。濁りの欠如は、PCRにより検出可能なH.ソムニの非存在と相関しなかった。ブロス培養方法は更なる実験では廃止できる。なぜならば、直接スワブ法は同じレベルのH.ソムニ回収を示しつつ処理時間を72時間まで短縮するからである。

OMP候補ワクチンは有望のように見えるが、該OMPワクチンはチャレンジ単離株（BIVI:Lg2-OK08）から作製されること、及びワクチン免疫のために必須のタンパク質量を得るために要求される大培養体積及びタンパク質抽出での超遠心分離の使用のために、OMPのサルコシル調製方法はこれまでのところ大量生産に移行させることができないことは留意されねばならない。製造のために効率的な代替抽出方法（すなわち、フィルター濃縮又は低速遠心分離を用いるより高いタンパク質収量のための方法）を評価する必要がある、さらに異種OMP調製物の有効性が試験されなければならない。

【0088】

実施例3：タンパク質抽出方法を基準にしたOMPワクチンプロトタイプの有効性

A. 目的

実験2で観察された、チャレンジ単離株（Lg2-OK08）のサルコシル抽出OMP調製物の有効性に関して、異種ワクチン調製物を評価することが重要になった。この目的のために単離株LgD1-TN08及び156A2を選択した。実験2で利用したOMP抽出のサルコシル方法は、可溶性及び不溶性分画の両分画について類似するタンパク質プロフィールをもたらす（このプロセスの非効率性を示す）、期待する総タンパク質収量よりも低い収量を提供した。SDS及びトリトン-Xを用いて抽出されたOMPの有効性もまた試験した（サルコシル方法と異なり、前記は大量生産レベルと比較し得る）。

【0089】

B. 材料と方法

細菌単離株

H.ソムニ単離株Lg2-OK08（PTA-12755）、LgD1-TN08（PTA-12756I）及び156A2（BIVI）を本実験で利用した。単離株Lg2-OK08及びLgD1-TN08の培養増殖及びサルコシル抽出は実験2で用いた方法と同一であった。両単離株について、サルコシル方法は比較的少量の総タンパク質を生じること、及び採集タンパク質の大半がサルコシル可溶性分画に留まることが再度認められた。可溶性及び不溶性分画の両分画をワクチン処方物のために用いた。次の節で述べるSDS抽出をLgD1-TN08に用い、トリトンXを156A2に用いた。SDS方法を単離株LgD1-TN08のために実験室スケールで実施し、製造スケールのトリトンX方法を単離株156A2のために用いた（156A2は従来のワクチン製品で用いられる）。

SDS抽出

10

20

30

40

50

中空繊維ろ過を利用して外膜タンパク質を抽出するトリトンXの方法は、BIVI製造施設 (Fort Dodge, IA) によって概略された。簡単に記せば、生培養を0.2 μmのカットオフフィルターを用いて中空繊維ろ過 (HFF) による濃縮に付し、再懸濁し、トリトンXで処理し、続いてその最初の体積に戻した。続いて、前記処理抗原を5kDaカットオフフィルターによる第二ラウンドのHFFに付し、所望のタンパク質荷重に濃縮する。本施設において製造スケールで生成した単離株156A2由来抗原を用いて1つのグループをワクチン免疫した。

第二のグループは、研究用単離株LgD1-TN08由来のSDS抽出材料を用いてワクチン免疫した。この研究室スケールの手順のために、前記単離株のプロス培養を実験2のサルコシル抽出方法について記載したように調製し、0.2 μmのHFFではなく10,000 x Gで10分間の遠心分離によって採集した。続いてペレットを10 x 濃度で10mMのHEPES (プロテアーゼに阻害剤 (Sigma) を含む) に懸濁した。続いて、この懸濁物を1時間60 でインキュベートした。SDSを0.04%の総濃度で添加し、30分間41 でインキュベートした。続いて処理抽出物を9,500 x Gで24分間遠心分離して細胞屑を除去した。続いて10mMのHEPES (プロテアーゼに阻害剤 (Sigma) を含む) を用いて、上清を1 x 濃度に戻し、さらに5kDaフィルターを用いて中空繊維ろ過により20 x に濃縮した。

ウシ

70頭の初乳停止ホルスタイン牛を業者 (J&R Livestock (アイオワ)) から入手した。前記は、イヤノッチによりBVDV持続感染陰性、鼻スワブのq-PCRによりM.ボビス持続感染陰性と判定され、さらにH.ソムニワクチン接種を以前に全く受けていない。最初のワクチン接種の時点でウシは44日齢から54日齢の範囲で、チャレンジの時点で平均92日齢であった。全てのウシが実験の開始前に良好な健康状態であることを、BIVIリサーチファーム (Sioux Center, IA) の現場の担当獣医師が決定した。動物は、施設の手順にしたがいその日齢及び体重に適切な1日分の飼料を与えられた。水は各囲いについて利用可能なゴム容器により自由に摂取できた。ウシを5グループのそれぞれにランダムに振り分け、さらに10囲いを含む複数のブロックとして編成された1つの囲いにランダムに振り分けた。チャレンジ1日前に、全てのウシをランダムに新規な囲い (ストレッサーとして機能する) に再度振り分けた。

ワクチン免疫とチャレンジ

全ワクチンプロトタイプをフロイント不完全アジュバント (Sigma) 中の400 μgタンパク質/用量の濃度で処方した。実験2でOMPワクチンについて実施したように、ワクチンを0日目及び21日目に2.0mLのSQ注射として投与した。囲いへの割り当ての再ランダム化は41日目に実施し、実験2のチャレンジと同一のチャレンジを42日目に実施した。ワクチン免疫及びチャレンジスケジュールは表6にまとめられている。

臨床観察

チャレンジ後7日間、臨床徴候及び直腸温度を毎日観察した。全ての身体系統を観察したが、呼吸器ストレスの徴候に特に注意を払った。重篤な呼吸器ジストレスの徴候を示すが、立っていることができなくなるか、及び/又は介助がなければ飼料及び/又は水にたどり着くことができない動物は、人道的理由及び剖検のために安楽死させた。チャレンジ後7日で、残りの全動物を安楽死させて剖検した。剖検時に、肉眼病変及び各肺葉に存在する病巣形成のパーセンテージを担当獣医師が記録した。病巣の辺縁の組織及び健全組織から成る肺サンプルを収集した。ウシ毎に2つのサンプルを収集し、検査のために研究室へ配送するときまで氷上に保存した。各ウシの追加サンプルは組織病理学的試験のために10%ホルマリンで固定した。

【0090】

表6：実験設計

処置グループ							
グループ	動物数/ グループ	ワクチン			チャレンジ		
		物質	用量/ ルート	投与スケ ジュール	物質	用量/ ルート	投与スケ ジュール
Lg2-OK08 サルコシル	14	OMP 調製物	2.0mL SQ	0日目 及び 21日目	生H. ソムニ 単離株 Lg2- OK08	20.0mLの RPMI1640 中の 1.0×10^{10} CFU/用量、 続いて 20.0mLの RPMI1640で 洗浄	42日目
156A2 トリトンX	15	OMP 調製物	2.0mL SQ				
LgD1-TN08 サルコシル	14	OMP 調製物	2.0mL SQ				
LgD1-TN08 SDS	14	OMP 調製物	2.0mL SQ				
コントロール	14	滅菌PBS	2.0mL SQ				

10

【 0 0 9 1 】

細菌の回収

実施例2で行ったように、剖検後の肺サンプルを-70 で凍結し、さらに加工処理前に融解した。融解サンプルを開放火炎上で焼き、無菌的環境に移し、切開して内部面をスワブでふき取った。前記スワブを用いてCBAプレート (Remel) にストリークした。前記プレートを10%CO₂とともに37 で一晩インキュベートし、外部因子が存在しないことを立証した。続いて前記スワブをDNA抽出及びPCRに付して、H.ソムニの存在を立証した。

20

【 0 0 9 2 】

PCR

感染肺のスワブからH.ソムニの存在を立証するために、前記スワブをDNA抽出 (Qiagen DNAキット) に付し、q-PCRによりH.ソムニDNAの存在について試験した。実験1に記載したH.ソムニ16S遺伝子特異的プライマーを用いた。PCRは、25 µL体積の96ウェル様式で、バイオラドマスターミックス、0.4 µg/µLウシ血清アルブミン (BSA) 及び各ウェルの反応の有効性を立証するインプロセスコントロールプライマー一式とともにCFX-96サーモサイクラー (Bio-Rad) を用いて実施した。H.ソムニDNAの標準曲線を各プレートで用いた。95.0 で5分間の最初の活性化工程を実施し、続いて95 で15秒の変性工程及び60.0 で30秒のアニーリング/伸長工程の45サイクル、各サイクルの最後にプローブ蛍光のリアルタイム捕捉を実施した。データを捕捉し、バイオラドCFXソフトを用いて分析した。サンプルはデュプリケートで試験し、平均閾サイクル (C_t) を標準と比較して、各サンプルが陽性か陰性かを決定した。サンプルが1つの陽性ウェル及び1つの陰性ウェルを有する場合には、当該サンプルをトリプリケートで再度試験し、試験ウェルの50%超が示す結果によって最終的に陽性を決定した。

30

組織病理学

10%ホルマリン固定肺サンプルを、組織病理学試験のためにISU-VDL (Ames, IA) へ輸送した。0-4のスコア系を用いた。スコア0は顕微鏡病巣が存在しないことを示し、スコア1は軽度又は限局性病巣を示し、スコア2は中等度又は多数の限局性病巣を示し、スコア3は重度の又は拡散した顕微鏡病巣を示し、スコア4は重度で拡散した顕微鏡病巣を示す。

40

結果

全グループの直腸温度はチャレンジの次の日 (43日目) に約3度上昇した。最高のピーク温度は、トリトンX抽出単離株156A2でワクチン免疫したグループで観察され、チャレンジの次の日に~40 (~華氏104.0度) に達した。チャレンジコントロールと比較したとき、いくつかのワクチングループについて、顕著な温度の相違がそれぞれの日に観察されたが、これらの観察が防御の指標として生物学的に有意であるようには思われない。なぜならば、これらの相違は、肺病変のパーセンテージの減少が観察されたグループとは無関

50

係に観察されたからである。直腸温度は図5にまとめられている。

凍結融解した肺組織のスワブの直接q-PCRを示した先の実験を考慮すれば、これらのサンプルからH.ソムニを検出し得ることは許容できよう。検出を成功させたサンプル数は、生存能力を有するH.ソムニを培養増殖のために提供するサンプル数のようにこの実験で低かった。前記観察の原因を決定することは本実験の範囲を超えているが、前記は、ワクチン投与による感染の除去の増加を示しているかもしれない。グループ間で有意な相違は認められなかったが、より高レベルの検出及び回収が、ワクチンの有効性を一切欠いたグループで認められた。このパラメーターは更なる実験でも調査が継続されるであろう。H.ソムニの回収は表7に記載されている。

【0093】

表7：チャレンジ動物のH.ソムニの検出

細菌検出技術	処置グループ					総肺サンプル/ 検出技術
	Lg2-OK08: サルコシル	156A2:ト リトンX	LgD1-TN08: サルコシル	LgD1-TN 08:SDS	チャレン ジコント ロール	
凍結肺 平板培養	9/14 (64.3%)	8/15 (53.3%)	5/14 (35.7%)	8/14 (57.1%)	8/13 (61.5%)	38/70 (54.3%)
凍結肺 スワブ	8/11 (72.7%)	13/15 (86.7%)	9/14 (64.3%)	11/14 (78.6%)	11/13 (84.6%)	52/70 (74.3%)
総肺サン プル/処置 グループ	17/25 (68.0%)	21/30 (70.0%)	14/28 (50.0%)	19/28 (67.9%)	19/26 (73.1%)	

【0094】

観察された臨床徴候はチャレンジ後1日から認められ、抑うつ、食欲低下、急迫及び/又は喘ぎ呼吸及び咳を含む。重篤な鼻の分泌物放出がチャレンジ後3日から数頭の動物で認められた。全グループの臨床徴候はチャレンジ期間を通して持続した。任意の個々の徴候又は提示された徴候の総数に関して、グループ間で有意な相違は認められなかった。コントロールグループの3頭の動物がチャレンジ期間の終了前に死亡した。156A2グループの4頭の動物、LgD1-TN08 OMPサルコシルグループの2頭の動物、及びLgD1-TN08 OMP SDSグループの3頭の動物もまたチャレンジ期間の最中に死亡した。Lg2-OK08 OMPサルコシルワクチンを投与された動物はいずれも剖検前に死亡しなかった。チャレンジコントロールと比較していずれの相違も統計的に有意ではなかった。死亡率は表8にまとめられている。

【0095】

表8：処置グループの死亡率

Tx	42日目	43日目	44日目	45日目	46日目	47日目	総死亡率
Lg2-OK08: サルコシル	0/14 (0.00%)	0/14 (0.00%)	0/14 (0.00%)	0/14 (0.00%)	0/14 (0.00%)	0/14 (0.00%)	0/14 (0.00%)
156A2:トリ トンX100	0/15 (0.00%)	1/15 (6.7%)	1/15 (6.7%)	0/15 (0.0%)	1/15 (6.7%)	1/14 (6.7%)	4/14 (26.7%)
LgD1-TN08: サルコシル	0/14 (0.00%)	0/14 (0.00%)	1/14 (7.1%)	1/14 (7.1%)	0/14 (0.0%)	0/14 (0.0%)	2/14 (14.3%)
LgD1-TN08 :SDS	0/14 (0.00%)	1/14 (7.1%)	1/14 (7.1%)	1/14 (7.1%)	0/14 (0.0%)	0/14 (0.0%)	3/14 (21.4%)
チャレンジ コントロール	0/14 (0.00%)	2/13 (15.4%)	0/13 (0.0%)	1/13 (7.7%)	0/13 (0.0%)	0/13 (0.0%)	3/13 (23.1%)

死亡率は、そのような事象が観察されたそれぞれの日の各群の死亡数として報告される。

パーセンテージは当該処置グループの影響を受けた割合を表す。

【0096】

単離株Lg2-OK08 (13.72%、 $p = 0.045$) 及び単離株LgD1-TN08 (14.14%、 $p = 0.037$) の両単離株のサルコシル抽出によって生成されたOMPから成るワクチンは、チャレンジコントロールグループ (28.37%) と比較したとき、総肺病変の有意な減少を示した。単離株LgD1-TN08 (16.22%、 $p = 0.114$) のSDS抽出を用いて生成されたOMPワクチンは、当該グループで観察された平均肺病変の減少で同様な傾向を示した。しかしながら、当該グループ内の変動のために、病巣スコアは、チャレンジコントロールグループと有意に相違するとは認められなかった。トリトンX100によって抽出された156A2抗原 (25.36%、 $p = 0.814$) は、チャレンジコントロールグループと比較したとき肺病変で相違を示さなかった。肺病変のパーセンテージは図6にまとめられている。

10

肺組織の組織学的試験は細菌性肺炎と一致した。気道栓子、浮腫、胸膜炎、壊死及び無気肺もまた全グループの動物で報告されたが、チャレンジコントロールグループで最も重篤であった。ワクチングループにおけるこれらの所見の存在は、この試験のためのサンプルが病巣周辺から採取されたので予期された。前記は個々の動物で観察される全体的な病変の指標を提供せず、チャレンジがまた成功であったことを示していると解されるべきである。

【0097】

C. 結論

チャレンジ単離株と同種 (Lg2-OK08、 $p = 0.045$) 又は異種 (LgD1-TN08、 $p = 0.037$) のH.ソムニ単離株のサルコシル抽出によって調製された材料による2用量ワクチン免疫は、チャレンジコントロール動物と比較したとき総肺病変の有意な減少を示した。異種単離株LgD1-TN08のSDS抽出を用いた同じワクチン免疫スケジュールは総肺病変で同様な減少を示したが、当該グループ内の変動性のために、本実験では有意であるとは認められなかった ($p = 0.114$)。156A2抗原 (トリトンX抽出によって調製) は、コントロールグループと比較したとき総肺病変で相違を示さなかった ($p = 0.814$)。総肺病変は有効性の比較のためにもっとも相関性の高いパラメーターであり続ける。本実験で用いられる400 μg タンパク質/用量は156A2抗原が用いられている実際の市販ワクチンのポテンシー基準より低いことは理解されるべきである。タンパク質濃度を増加させるか、又は通常より免疫能力の高いウシを用いれば、本実験で観察された結果は変化し得よう。

20

30

サルコシル抽出材料から誘導したワクチンは、サルコシル不溶性ペレットとともにサルコシル可溶性上清を一緒に用いて処方された。なぜならばペレットそのもののタンパク質収量がワクチン免疫に不十分であったからである。ウェスタンブロット分析は、類似の分子量を有する免疫反応性タンパク質が両分画に存在することを示した。総タンパク質収量の増加及び不溶性ペレットに蓄積されるタンパク質の量の増加を試みる更なる研究が、このプロセスの有効性の改善のために実施されねばならない。本抽出方法で超音波処理及び遠心分離の方法も可能な改善点であるかもしれない。

【0098】

SDS抽出方法はより効率的であるが、SDS-PAGEで分離しウェスタンブロット分析に付したとき、異なるタンパク質プロフィールをもたらす。サルコシル調製物と類似するバンドを観察することができるが、それらは総調製物中ではるかに希薄で、重要性が未知のいくつかの他のタンパク質もまた観察される。これは、SDS抽出物を投与された動物で観察される肺病変の減少を説明するだけでなく、グループ内で良好な結果が変動することの説明ともなり得る。

40

実験2は、同種のサルコシル抽出ワクチン (Lg2-OK08) を用いたとき、観察される抑うつ、喘ぎ呼吸、総臨床徴候及び死亡率で有意な低下を示したが、これはこの実験では認められなかった。Lg2-OK08のサルコシル抽出物を投与されたグループはこの実験では全く死亡を示さず、このことは以前の観察と一致する。他の全てのグループは、チャレンジ後に14.3% (LgD1-TN08のサルコシル抽出) から26.7% (156A2のトリトンX抽出) の範囲の死亡率を示した。臨床徴候は、これらの実験では従来ワクチン比較の主要なパラメーターで

50

はないが、一貫した臨床徴候及び死亡率をもたらすことは、ワクチンの比較を含む将来のいずれの研究でも有益であろう。

試験した他のパラメーターには直腸温度、培養及びq-PCRによるH.ソムニの回収、並びに注射部位の反応の比較が含まれる。これらのいずれもグループ間で有意な相違を示さなかった。これらの試験の目的が、それらの病巣付随パーセンテージに無関係に該病巣におけるH.ソムニの存在を確認することであるので、同様な回収及びPCR検出を示すことは予想に反することではない。H.ソムニの回収が以前の実験で観察されたものより低かったが、全てのグループについて低いということは、チャレンジがグループ間で一貫していたことを示唆している。実験2は新鮮な肺サンプルの凍結はH.ソムニの回収に影響しないことを示したが、凍結/融解が回収に負の影響を与えることは可能である。したがって、将来の実験では、肺組織の細菌回収を成功させるために可能ならば新鮮な（非凍結）肺のスワブを用いることが推奨される。q-PCRを用いても、存在するかしないかについて結果を定性的に解釈すべきであること、及び C_t 値は検出細菌量の厳密な定量的測定値ではないこと（なぜならばこのアッセイは未だ正当性が立証されたわけではない）を認識することが重要である。

10

【0099】

実施例4：サルコシル及びSDS方法により抽出されたOMP分画の有効性

D. 目的

実験3で、サルコシル抽出OMPワクチンは、呼吸器チャレンジによって引き起こされる肺葉病変の有意な減少を示し続けたが、抽出プロセスそのものは非効率的なままである。細胞溶解を改善する超音波工程並びに可溶性及び不溶性分画の分離を改善する遠心分離工程を改変することによって、より高い総収量及び最終不溶性分画におけるより高いタンパク質濃度の両方が達成された。以前の有効性は、もっぱら不溶性分画から成るワクチンを土台としていたので、これら分画の有効性を別々に試験することが重要であった。さらにまた、SDS抽出方法は実験3で総肺スコアの明白な低下をもたらしたが、これは統計的に有意でないことが見出された。このワクチン候補を再試験することは重要であると考えた。

20

【0100】

E. 材料と方法

細菌単離株

単離株LgD1-TN08を用いて本実験のための全てのワクチンプロトタイプを調製した。本単離株のための培養増殖及びSDS抽出方法は実験3で用いた手順と同一であった。本単離株のためのサルコシル抽出方法への変更は下記で述べる。単離株Lg2-OK08を用いて本実験のためのチャレンジ材料を調製した。チャレンジ材料の増殖、採集、及び調製は全ての先行する実験で用いた手順と同一であった。

30

サルコシル抽出

本実験のためのサルコシル抽出方法は、総タンパク質収量を増加させるために、さらに最終調製物における不溶性タンパク質の分離効率を増加させるために改変された。総タンパク質収量を増加させるために、以前に実施したカップホーンを使用するのではなくて培養に直接挿入したプローブを用いて超音波処理を完了させた。これによって細胞溶解が改善され、17k x Gの遠心分離工程の後でより多くの膜結合タンパク質が上清に遊離した。前記は、BSA総タンパク質アッセイ（Thermo）によって両調製方法の上清でタンパク質濃度を比較することによって確認された（データは示されていない）。不溶性タンパク質分離効率を改善するために、超遠心分離を必要とする全ての工程を、以前に用いられたSW28スイングバケットローターではなく70Ti固定角ローターを用いて実施した。固定角ローターはより効率的な進行を可能にした。これら2つの改変は所望の効果をもたらした。サルコシル不溶性分画のみ又はサルコシル可溶性分画のみを用いて、別個のワクチンを処方するために十分なタンパク質収量が得られた。2つの分画の混合物もまた調製し、以前の実験で用いたワクチン調製物に対する比較を可能にした。

40

【0101】

ウシ

50

68頭の初乳停止ホルスタイン牛を業者（J&R Livestock（アイオワ））から入手した。前記は、イヤーノッチによりBVDV持続感染陰性、鼻スワブのq-PCRによりM.ボビス持続感染陰性と判定され、さらにH.ソムニワクチン接種を以前に全く受けていない。最初のワクチン接種の時点でウシは36日齢から50日齢の範囲で、チャレンジの時点で中央値90日齢であった。全てのウシが実験の開始前に良好な健康状態であることを、BIVIリサーチファーム（Sioux Center, IA）の現場の担当獣医師が決定した。動物は、施設の手順にしたがいその日齢及び体重に適切な1日分の飼料を与えられた。水は各囲いについて利用可能なゴム容器により自由に摂取できた。ウシを5グループのそれぞれにランダムに振り分け、さらに10囲いを含む複数のグループとして編成された1つの囲いにランダムに振り分けた。チャレンジ1日前に、全てのウシをランダムに新規な囲い（ストレッサーとして機能する）に再度振り分けた。

10

ワクチン免疫とチャレンジ

ワクチン接種は、0日目及び21日目に400 µgの総タンパク質を含む2.0mL用量としてSQで投与された。チャレンジコントロールグループには、滅菌PBS（Gibco）及びフロイント不完全アジュバント（Sigma）のみを含む同様な注射を投与した。チャレンジは42日目に実施し、前記は 1.0×10^9 CFU/mLを含むように5%FBS含有RPMI 1640で希釈したH.ソムニ単離株Lg2-OK08の新鮮培養から成り、内視鏡により気管内に20.0mL体積で投与され、続いて20.0mLの5%FBS含有RPMI 1640培養液で洗浄した。ワクチン免疫及びチャレンジスケジュールはグループのサイズ及び投与用量とともに表9にまとめられている。

臨床観察

チャレンジ後7日間、臨床徴候及び直腸温度を毎日観察した。全ての身体系統を観察したが、呼吸器ストレスの徴候に特に注意を払った。重篤な呼吸器ジストレスの徴候を示すか、立っていることができなくなるか、及び/又は介助がなければ飼料及び/又は水にたどり着くことができない動物は、人道的理由及び剖検のために安楽死させた。チャレンジ後7日で、残りの全動物を安楽死させて剖検した。剖検時に、肉眼病変及び各肺葉に存在する病巣形成のパーセンテージを担当獣医師が記録した。病巣の辺縁の組織及び健全組織から成る肺サンプルを収集した。ウシ毎に2つのサンプルを収集し、検査のために研究室へ配送するときまで氷上に保存した。各ウシの追加サンプルは組織病理学的試験のために10%ホルマリンで固定した。

20

【 0 1 0 2 】

表9：実験設計

30

処置グループ							
グループ	動物/ グループ	ワクチン			チャレンジ		
		物質	用量/ ルート	投与 スケ ジュール	物質	用量/ ルート	投与 スケ ジュール
不溶性LgD1 -TN08 OMP	14	サルコシル 不溶性分画	2.0mL SQ	0日目 及び 21日目	生H. ソムニ 単離株 Lg2- OK08	20.0mLの RPMI 1640中の1. 0 x 10 ¹⁰ CF U/用量、 続いて 20.0mLのR PMI1640で 洗浄	42 日目
可溶性LgD1 -TN08 OMP	14	サルコシル 可溶性分画	2.0mL SQ				
可溶性、 不溶性LgD1 -TN08 OMP 混合物	13	サルコシル可 溶性及びサルコ シル不溶性分画	2.0mL SQ				
SDS抽出LgD1 -TN08 OMP	13	SDS抽出	2.0mL SQ				
チャレンジ コントロール	13	滅菌PBS及び フロイント不完全 アジュバント	2.0mL SQ				

10

20

【 0 1 0 3 】

細菌の回収

剖検後肺サンプルを加工処理できるまで4 で保存した。これらのサンプルを開放火炎上で焼き、無菌的環境に移し、切開して内部面をスワブでふき取った。前記スワブを用いてCBAプレート (Remel) にストリークした。前記プレートを10%CO₂とともに37 で一晩インキュベートし、外部因子が存在しないことを立証した。続いて前記スワブをDNA抽出及びPCRに付して、H.ソムニの存在を立証した。

【 0 1 0 4 】

PCR

感染肺のスワブからH.ソムニの存在を立証するために、前記スワブをDNA抽出 (Qiagen DNAキット) に付し、q-PCRによりH.ソムニDNAの存在について試験した。実験1に記載したH.ソムニ16S遺伝子特異的プライマーを用いた。PCRは、25 µL体積の96ウェル様式で、バイオラドマスターミックス、0.4 µg/µLウシ血清アルブミン (BSA) 及び各ウェルの反応の有効性を立証するインプロセスコントロールプライマー式とともにCFX-96サーモサイクラー (Bio-Rad) を用いて実施した。H.ソムニDNAの標準曲線を各プレートで用いた。95.0 で5分間の最初活性化工程を実施し、続いて95 で15秒の変性工程及び60.0 で30秒のアニーリング/伸長工程の45サイクル、各サイクルの最後にプローブ蛍光のリアルタイム捕捉を実施した。データを捕捉し、バイオラドCFXソフトを用いて分析した。サンプルはデュプリケートで試験し、平均閾サイクル (C_t) を標準と比較して、各サンプルが陽性が陰性を決定した。サンプルが1つの陽性ウェル及び1つの陰性ウェルを有する場合には、当該サンプルをトリプリケートで再度試験し、試験ウェルの50%超が示す結果によって最終的に陽性を決定した。

30

40

組織病理学

10%ホルマリンで固定した肺サンプルを組織病理学試験のために評価した。0-4のスコア系を用いた。スコア0は顕微鏡病巣が存在しないことを示し、スコア1は軽度又は限局性病巣を示し、スコア2は中等度又は多数の限局性病巣を示し、スコア3は重度の又は拡散した顕微鏡病巣を示し、スコア4は重度で拡散した顕微鏡病巣を示す。

結果

全ての処置グループの直腸温度は、チャレンジの次の日に約3度上昇するのが再び観察

50

された。非ワクチン接種コントロールグループは、チャレンジ期の過程を通して最高の平均直腸温度を維持するのが観察された。全てのワクチングループは同じ時間枠を通して平均直腸温度の低下を示したが、サルコシル抽出分画の混合物又はSDS抽出物でワクチン免疫したグループでは、それらの平均直腸温度の低下はより著名であり、かつ一貫していた。直腸温度の観察は図7にまとめられている。

新鮮肺組織のH.ソムニの回収は、凍結サンプルが用いられた以前の実験で観察された回収より増加した。処置グループ間で有意な相違は認められなかったが、生存活性のある回収は非ワクチン接種コントロールグループで最高であった。これらの観察は表10にまとめられている。

【0105】

表10：チャレンジ動物のH.ソムニ検出

細菌 検出 技術	処置グループ					総肺サン プル/検出技 術
	LgD1-TN 08:サル コシル (不溶性)	LgD1-TN 08:サル コシル (可溶性)	LgD1-TN 08:サル コシル (混合)	LgD1-TN 08:SDS	チャレンジ コントロール	
新鮮肺 培養	8/13 (61.5%)	6/13 (46.2%)	9/14 (64.3%)	7/14 (50.0%)	9/14 (64.3%)	39/68 (57.4%)
新鮮肺 スワブ PCR	11/13 (84.6%)	12/13 (92.3%)	13/14 (92.9%)	10/14 (71.4%)	14/14 (100.0%)	60/68 (88.2%)
総肺サン プル/処置 グループ	19/26 (73.1%)	18/26 (69.2%)	22/28 (78.6%)	17/28 (60.7%)	23/28 (82.1%)	

パーセンテージは、16s rRNA遺伝子に特異的なq-PCRによるH.ソムニの検出の成功を提供する、各グループにおける割合を示す。

【0106】

表5.3：処置グループの死亡率

Tx	42日目	43日目	44日目	47日目	総死亡率
LgD1-TN08: サルコシル (不溶性)	0/13 (0.00%)	0/13 (0.00%)	1/13 (7.69%)	0/13 (0.00%)	1/13 (7.69%)
LgD1-TN08: サルコシル (可溶性)	0/13 (0.00%)	0/13 (0.00%)	0/13 (0.00%)	0/13 (0.00%)	0/13 (0.00%)
LgD1-TN08: サルコシル (混合)	0/14 (0.00%)	0/14 (0.00%)	2/14 (14.3%)	0/14 (0.00%)	2/14 (14.3%)
LgD1-TN08: SDS	0/14 (0.00%)	0/14 (0.00%)	0/14 (0.00%)	1/14 (7.1%)	1/14 (7.1%)
チャレンジ コントロール	0/14 (0.00%)	1/14 (7.1%)	3/14 (21.4%)	0/14 (0.00%)	4/14 (28.6%)

死亡率は、そのような事象が観察されたそれぞれの日の各グループの死亡数として報告される。パーセンテージは当該処置グループの影響を受けた割合を表す。45、46又は48日目に死亡した動物はいない。

【0107】

以前の実験で観察された共通の臨床徴候には、呼吸困難、咳、抑うつ、及び食欲不振が含まれる。この実験について、これら4つのパラメーターを、該徴候のある1日の重篤度を示す0-3のスケールで標準化した。臨床徴候の最高数及び最高重篤度はコントロールグループで観察された。該スコア系のありきたりの特性のために、統計的に有意な相違はグループ間で認められなかった。

コントロールグループの4頭の動物はチャレンジ期間の終了前に死亡した。サルコシルペレットグループの1頭の動物、サルコシル混合グループの2頭の動物、及びSDSグループの1頭の動物もまたチャレンジ期間の最中に死亡した。サルコシル上清ワクチンを投与したいずれの動物も剖検前には死亡しなかった。チャレンジコントロールグループとの比較における相違はいずれも統計的に有意ではなかった。死亡率は表11に記載される。

【0108】

表11：処置グループの死亡率

Tx	42日目	43日目	44日目	47日目	総死亡率
LgD1-TN08: サルコシル (不溶性)	0/13 (0.00%)	0/13 (0.00%)	1/13 (7.69%)	0/13 (0.00%)	1/13 (7.69%)
LgD1-TN08: サルコシル (可溶性)	0/13 (0.00%)	0/13 (0.00%)	0/13 (0.00%)	0/13 (0.00%)	0/13 (0.00%)
LgD1-TN08: サルコシル (混合)	0/14 (0.00%)	0/14 (0.00%)	2/14 (14.3%)	0/14 (0.00%)	2/14 (14.3%)
LgD1-TN08: SDS	0/14 (0.00%)	0/14 (0.00%)	0/14 (0.00%)	1/14 (7.1%)	1/14 (7.1%)
チャレンジ コントロール	0/14 (0.00%)	1/14 (7.1%)	3/14 (21.4%)	0/14 (0.00%)	4/14 (28.6%)

死亡率は、そのような事象が観察されたそれぞれの日の各グループの死亡数として報告される。パーセンテージは当該処置グループの影響を受けた割合を表す。45、46又は48日目に死亡した動物はいない。

【0109】

本実験のワクチン有効性比較のための予備的パラメーターは依然としてパーセント肺葉病変である。サルコシル不溶性分画でワクチン免疫した1頭の動物は右の上部肺葉を欠くことが発見された。この葉は解剖学的異型により単純に存在しないだけであり、完全なスコアを付与することができなかつたので、この動物を分析から除去した。非ワクチン接種コントロールは31.02%の平均肺病変スコアを有した。肺病変の有意な減少は、サルコシル可溶性上清(19.70%、 $p=0.05$)、サルコシル可溶性及びサルコシル不溶性分画の混合物(17.08%、 $p=0.02$)、又はSDS抽出OMP(8.60%、 $p<0.01$)によるワクチン免疫によって達成された。サルコシル不溶性ペレット材料によるワクチン免疫はわずかな低下を示したが、肺病変の有意な減少は生じなかつた(22.98%、 $p=0.11$)。

サンプルを再び組織病理試験に供した。気道栓子、葉間浮腫、壊死及び無気肺(いずれも細菌性肺炎に一致する)がまた全グループを通して動物で観察されたが、チャレンジグループで最も重篤であり、SDS抽出OMPワクチンで重篤度はもっとも低いと決定された。

【0110】

結論

サルコシル可溶性材料又はSDS使用抽出材料のどちらかを含むOMP材料の2用量ワクチン免疫は、非ワクチン接種コントロールと比較したとき、総肺病変の統計的に有意な減少を提供する。サルコシル不溶性材料のみでワクチン接種を受けた動物は総肺病変の低下を示したが、しかし前記は統計的には有意でないことが判明した。

10

20

30

40

50

q-PCRによるH.ソムニの検出及び肺サンプルの培養による生存活性を有するH.ソムニの回収はともに、実施例3と比較したときこの実験でより顕著であった。

この実験では、肺サンプルは実験室手順の前に凍結するのではなく4 で維持された。検出又は生存性回収で有意な相違はグループ間で認められなかったが、前記はともに非ワクチン接種グループで最高であった。

直腸温度、呼吸困難、咳、抑うつ及び食欲不振を含む臨床徴候は本実験のチャレンジ期間毎日記録された。SDS抽出抗原によるワクチン免疫は、非ワクチン接種コントロールグループと比較して44日目（チャレンジ後2日）から有意に低い直腸温度を示し、49日目の終了までずっと持続した。観察される臨床徴候の存在又は重篤度を比較したとき、他の有意な相違は認められなかった。

前記のデータは、SDS及びサルコシル抽出方法は、H.ソムニによる呼吸器チャレンジに対して効果的な免疫応答を提供するタンパク質を生じること示している。サルコシル不溶性分画の有効性欠如は、以前の実験と同様に本実験で観察された有効性に必要な何らかのものが該可溶性分画に保存されていることを示している。前記が、特異的タンパク質、LOSの非タンパク質成分又はサルコシルそのものであるか否かは不明である。サルコシル分画又はSDS抽出物のどちらかに固有である特異的な免疫反応性タンパク質が同定されたならば、ウェスタンブロット分析が利用されよう。

【0111】

実施例5：ウシの抗H.ソムニ力価をモニターする血清学的ELISA

A. 目的

処置グループ間で予備的パラメーターとして最終的な病理学スコアを比較することは重要であるが、それは、ワクチン免疫及びチャレンジ過程においてどんな免疫応答が動物の体内で実際に生じるのかについての指標を提供しない。MHCII応答が予想されるので、IgG活性の測定は賢明であろう。時間を追って抗体応答の変化を検出できる血清学的ELISAを開発することによって、投与されたワクチンに対する液性応答の重要性を決定できよう。

【0112】

B. 材料と方法

抗原コーティング

これまでの実験ではH.ソムニ単離株Lg2-OK08がチャレンジの目的に用いられてきた。したがって、チャレンジ前に投与されるワクチンによって生じる、前記単離株に対する抗体応答を記録することは重要である。そのために、前記単離株の培養を以前に記載したようにブロスで増殖させた。採集は10,000 x Gで10分間遠心分離し、続いてPBS (Gibco) で3回洗浄して完了させた。前記ペレットをPBSで3 x 濃度にし、さらに10,000 x Gで10分間遠心分離した。最後のPBS洗浄の後で、該培養物を10mMのHEPES (プロテアーゼ阻害剤を含む) に3 x 濃度で再懸濁させた。

血清サンプル

以前の実験の各動物から血清を毎週収集し、各サンプルにつき ~2.0mLの体積で-40 にて保存した。各時点についてグループの各動物の血清100 µLをひとまとめにして、各グループの血清プールを作成した。

ELISA

用いるべき適切な試薬濃度を決定する仮の陽性及び陰性血清サンプルを用いて、実験を完全なものにした（陰性血清に0日目のコントロール動物、及び陽性血清に41日目のLg2-OK08サルコシルOMPワクチン免疫動物）。報告濃度は、読み取り数値が該稀釈曲線の直線部分のデータを表していることを担保する。

Lg2-OK08から誘導した3 x のコーティング抗原（上記のように調製）をカルボネートコーティング緩衝液 (Sigma) で1 : 300に稀釈し、96ウェルメジウム結合マイクロタイタープレート (Greiner) の各ウェルに100 µLで添加し、37 で2時間インキュベートした。未結合抗原を、マイクロタイター洗浄器 (Dynex) を用いてTBS+Tween20 (BIVI) の3回洗浄により洗い流した。ウェルの非使用領域を、250 µLのタンパク質フリーブロッキング緩衝液 (Thremo) を添加して37 で1時間インキュベートし、続いてもう1回の洗浄工程によ

10

20

30

40

50

て封鎖した。各時点の各グループの血清プール（実験2及び3）又は個々の動物の血清（実験4）を続いてブロッキング緩衝液で1：1,600に希釈し、デュプリケートでプレートのウェルに100 µL体積で添加し、さらに37 °Cで1時間インキュベーション続いてもう1回の洗浄工程を実施した。ウサギ抗ウシセイヨウワサビペルオキシダーゼ複合物（Jackson Immuno labs）を続いてブロッキング緩衝液で1：10,000に希釈し、各ウェルに100 µLで添加し、37 °Cで45分間インキュベートし、余分なものを洗い流した。ウェルを以下の基質（Sure blue 1-Componet Substrate (KPL)）を100 µL/ウェルで添加して反応させ、室温で6分間インキュベートし、この時点で1NのHClを100 µL添加して反応を停止させた。吸収は、スペクトラマックス（SpectraMax）M5分光光度計（Molecular Devices）を用い450nmで読み取った。各プレートは陰性血清標準及び陽性血清標準を含み、プレート間の比較を可能にするとともに、無抗原及び無血清コントロールウェルを含み、プレート間のバックグラウンドシグナルが増加しないように担保する。吸収は、各サンプルの平均吸収を陰性血清標準の平均吸収で割ることによって“シグナル対ノイズ”比に変換する。

10

【0113】

C. 結果

実施例 2

この実験で用いた全てのワクチン処置は、ワクチン免疫過程を通してIgG応答の増加をもたらした。市場で入手できるバクテリアでワクチン免疫したグループは最も弱い応答を生じ、一方、改変生欠損変異体でワクチン免疫した動物は最高レベルのIgG応答を生じた。OMPワクチン免疫グループはもっとも迅速にIgG応答を生じた。改変生グループ及びOMPグループのIgG検出レベルは、42日目のチャレンジ時でほぼ同一であった。非ワクチン接種コントロールは抗体産生の検出可能な増加を生じなかったが、28日目に不明供給源による小さな増加が観察された。前記増加はこの実験ではその後観察されなかった。このデータは図9にまとめられている。

20

実施例 3

この実験で用いた全てのワクチンもまた、ワクチン免疫過程を通してIgGの検出可能な増加をもたらした。これらのレベルは14日目にピークに達し、さらに21日目に向けて下降し、続いて同じ日の再ワクチン接種の後で急激に増加した。ピークは再び35日目に観察され、42日目のチャレンジ前に小さな低下を示す。チャレンジ単離株Lg2-OK08由来のサルコシル抽出OMPは最高のIgG応答を生じ、一方、156A2トリトンXワクチンは最低の応答を生じた。単離株LgD1-TN08由来の調製物でワクチン免疫した動物の応答は類似していた。非ワクチン接種動物は、ワクチン免疫過程を通して検出可能なIgGレベルの増加を示さなかった。このデータは図10にまとめられている。

30

実施例 4

この実験のワクチン免疫動物は前の実験と類似する結果をもたらしたが、実験2011034で観察されたピークよりも低かった。SDS抽出グループは最高のIgG応答を生じたが、全てのサルコシル処置は類似する結果をもたらした。非ワクチン接種コントロールグループは、35日目に開始するIgG応答増加を示し、42日目まで持続した。さらに再吟味すれば、この増加は4頭の個々の動物に帰することができる。図11で $\alpha = 0.1$ を有する信頼区間を表す誤差バーは、これらの時点のデータセット内に極端な範囲逸脱個体が存在することを示している。非ワクチン接種動物のこのIgG応答の原因は、このデータだけでは容易には説明できない。

40

【0114】

D. 結論

IgG抗体応答の増加は、全実験についてワクチン免疫グループのワクチン免疫過程を通して観察できる。この応答は、ワクチン接種後2週間に向けて増加し、続いて横ばい又は下降し始めるが、第二のワクチン免疫（21日目に実施される）によって再び増加する。最高の抗体応答レベルは28日目から42日目の間に生じ、35日目に明白なピークを示す。

チャレンジは全ての実験で42日目に実施されたので、前のピークから抗体レベルが下降すればいずれも観察された有効性に影響を及ぼしているかもしれない。実験3で35日目の1

50

56A2トリトンX由来抗原の抗体応答レベルは、サルコシルワクチン免疫グループで42日目に観察されたレベルと類似する。これらの応答が、ワクチン調製物中の重要な防御エpitepに対して生じるならば、より早い時点のチャレンジにより異なる評価が生じ得る。抗体応答が下降ではなく横ばいであるのは心強いが、しかしながら、これは低すぎるワクチン用量、不適切なアジュバント又は極端に若いCD牛の弱い免疫系の人工的産物であるかもしれない。

これらのデータは、他の実験と比較したとき、この最後の実験の弱められた抗体応答を示しているように思われるが、ELISAのためのこの最後の試薬ストックは最初の2つの実験の試験の後で調製されたことに留意する必要がある。これらの試薬はコーティング抗原及びコントロール血清を含み、前記は1回のみ使用のバイアルに適量ずつ分注され、-70 で保存された。これは、時間経過時の抗原の安定性を改善することを意図するが、最初の凍結融解はコーティング抗原の結合親和性を低下させたかもしれない。この理由のために、これらの実験間のシグナル対ノイズ比の直接比較は避けるべきであるが、各実験内で実施される試験を全く同じように処理した試薬によって実施した。

最後の実験の35日目及び42日目の4頭の動物を除いて、抗体検出増加はコントロールグループでは生じない。これらの動物の抗体検出におけるこの増加の理由は今の時点では不明であるが、サンプルの操作ミス、これらの動物のH.ソムニへの早すぎる暴露、又はこれらの動物の別のグラム陰性細菌（H.ソムニと類似する交差反応性表面抗原を有する）への暴露の結果の可能性がある。このアッセイは、確かに、時間経過時の抗体レベルの相違を測定できるように思われるが、このアッセイの特異性は試験する必要がある。このアッセイは普遍化されたIgG応答を測定し、さらにこれらの抗体の特異性を試験することもまた重要であろう。

【0115】

実施例6：免疫反応性タンパク質のウェスタンブロット分析

A. 目的

第6章で述べたELISAはワクチン免疫の過程を通して総IgG応答を測定することができるが、前記はこれら抗体の特異性又はこれら抗体がどのタンパク質に対して生じるかに関する指示を提供しない。ワクチン免疫動物由来の血清を用いて多様なワクチン調製物を精査するウェスタンブロットは、防御を示した調製物中に存在する対応タンパク質のより良好な識別を達成させた。肺病変の減少を示したグループの前記応答を、減少を示さないグループと比較することによって、重要なタンパク質を識別できるはずである。

【0116】

B. 材料と方法

SDS-PAGE

電気泳動を用いて、ワクチン調製物中に存在するタンパク質を分子量によって分離した。1ウェル又は12ウェル構造のNuPAGE 10% Bis-Tris SDSゲル（Invitrogen）を用いた。1ウェルゲルのためには、12.0 µgの総タンパク質を含むサンプルを、還元剤としてβ-メルカプトエタノール（Sigma）を含むSDSローディング緩衝液（Invitrogen）と混合し、400 µL体積でロードした。ラダーウェルに10 µLをロードしたNovexシャープ前染色ラダー（Invitrogen）を用いた。X-セル電気泳動モジュール（Bio-Rad）を用いて、3-(N-モノホリノ)プロパンスルホン酸（MOPS）緩衝液（Invitrogen）で前記ゲルを200Vで50分泳動させた。続いてこれらのゲルを、下記に記載するメンブレントランスファー及びその後のウェスタンブロットングのために用いた。12ウェルゲルのためには、2.0 µgの総タンパク質を含むサンプルを、還元剤としてβ-メルカプトエタノール（Sigma）を含むSDSローディング緩衝液（Invitrogen）と混合し、20 µL体積でロードした。5 µLをロードしたNovexシャープ前染色ラダー（Invitrogen）を比較に用いた。これらのゲルもまた、X-セル電気泳動モジュール（X-cell Electrophoresis Module, Bio-Rad）を用いて、MOPS緩衝液（Invitrogen）で200Vにて50分泳動させた。続いてこれらのゲルを下記に記載するようにクーマシー染色に用いた。

【0117】

10

20

30

40

50

クーマシー染色

12ウェル様式の電気泳動の後で、ゲルをインペリアルブルーゲル染色液 (Imperial Blue Gel Stain, Thermo) に浸漬し、穏やかに揺らしながら1時間染色した。続いて染色液を除去し、前記ゲルをRO水で12時間脱染色した。水は2回交換した (30分後に1回、1時間後に1回)。続いてモデルMイメージ (Bio-Sciences) を用いて、染色ゲルを画像化し分析した。

メンブレントランスファー

1ウェル様式の電気泳動の後で、ゲルをX-セルブロットモジュール (X-cell Blot Module, Bio-Rad) に挿入した。PVDFメンブレン (Invitrogen) への移転は、トランスファー緩衝液 (Invitrogen) にて室温で30V、90分で完了させた。良好に移転できたか否かは、Novex前染色ラダーの目視精査によって決定した。続いてメンブレンを下記に記載するようにウェスタンブロットングに用いた。

ウェスタンブロット

この移転工程の後で、PVDFメンブレンをタンパク質フリーブロッキング緩衝液 (PFBB) (Thermo) 中で、穏やかに震盪しながら室温で30分又は4で一晚インキュベートした。ブロッキング工程の後で、メンブレンを2分間3回、穏やかに震盪しながらトリス緩衝食塩水 (Tween20を含む) (TTBS) (BIVI Central Services調製) を用いて洗浄した。続いて、洗浄メンブレンをミニプレップマルチスクリーンガasket (Mini-Prep Multi-Screen Gasket, Bio-Rad) に移した。このガasketは別個のサンプルによるブローブ精査のために20レーンを提供する。0、21又は35日目の各実験グループの血清プールをPFBBで1:500に希釈し、各ウェルに600 μ L体積でロードした。続いてメンブレンを穏やかに震盪しながら1時間室温でインキュベートした。続いて真空装置によりサンプルをガasketから除去した。続いてメンブレンを残りの工程のためにプラスチック皿に移した。PFBBで1:2500に希釈したウサギ抗ウシIgG (Jackson Immunolabs) を各メンブレンに添加し、穏やかに震盪しながら室温で1時間インキュベートし、続いて追加の洗浄を実施した。TTBSによる最終洗浄の後で、当該基質の製造業者の推奨にしたがいリン酸緩衝食塩水 (PBS) によるさらに2回の洗浄が続いた。Opti-4CN基質 (Bio-Rad) を製造業者の指示にしたがって調製し、前記洗浄メンブレンに添加した。基質を5分間デベロップさせ、バンド形成を最大にしながらバックグラウンドを最少にした。反応の停止にRO水を用いた。デベロップさせたプロットを12時間乾燥させ、続いて画像化してモデルM画像化装置 (Bio-Sciences) を用いて分析した。

【0118】

結果

クーマシー染色ゲルは、プロトタイプワクチン処方物で用いられた多様なOMP調製物分画内に存在する全てのタンパク質を、それらの免疫反応重要性に無関係に提示した。染色は、サルコシル不溶性ペレットで、サイズが35kDaから40kDaの間の高濃度のタンパク質を、約80kDa、60kDa、28kDa及び25kDaの前記より低い濃度のバンドとともに示した。種々の分子量のより多くのバンドが、より低濃度でサルコシル可溶性上清及びSDS抽出分画の両方で観察できる。各分画のプロフィールは様々であるが、各分画は以前に記載した実験の少なくとも1つで病変を減少させることが示された。ウェスタンブロットは、それらタンパク質のどれがこの防御に役割を果たすのかの決定を容易にした。

実施例2

最初の有効性実験では、OMPワクチン候補のみが有意に低い肺病変をもたらした。このワクチンの抗原をSDS-PAGEで分離し、0、21及び35日目の実験グループの血清プールによるウェスタンブロット分析に用いた。この実験のチャレンジコントロールグループは検査したいずれの時点でも抗体応答を示さなかった。全てのワクチングループが80kDa及び18kDaの反応性バンドを生じた。これらのバンドは、コントロールと比較したとき病変の相違を示さなかったグループで観察されたので、それらは免疫学的に重要とは思われない。興味深いものは、OMPワクチングループでのみ観察された35kDa - 40kDa範囲のタンパク質の検出であった。

10

20

30

40

50

実施例3

第二のワクチン実験では、抽出方法及び単離株の比較が実施された。チャレンジコントロールグループはまたワクチン免疫過程を通して抗体応答を生じないことが観察された。同様に、単離株156A2のSDS抽出物（肺病変の減少をもたらさなかった）でワクチン免疫したグループは極めてわずかな抗体応答の増加を示した。単離株Lg2-OK08のサルコシル抽出物、LgD1-TN08のサルコシル抽出物、又はLgD1-NT08のSDS抽出物でワクチン免疫した他のグループは平均肺スコアで類似する減少を示し、さらにまた35kDa - 40kDa範囲のタンパク質に対する高濃度の抗体応答を示した。

【0119】

実施例4

最後の宿主動物有効性実験では、サルコシル抽出物の可溶性及び不溶性分画、これら分画の混合物（以前の実験で用いられた）を試験し、さらにSDS抽出方法を再吟味した。この実験の全てのワクチンは単離株LgD1-Tn08から作製された。この実験のために、ワクチン調製物の各々をSDS-PAGEで分離し、再び0、21及び35日目のこれら実験グループの血清プールを用いブロープ精査した。サルコシル不溶性ペレットによるワクチン免疫は肺病変の軽度の減少をもたらした（前記はコントロールグループに対し統計的に有意とは判定されなかった）。このワクチンは、以前の実験のプロットで観察されたパターンと類似するバンド形成パターンを生じ、重要でないバンドを80kDa及び18kDaを提示することが観察された。しかしながら、前記はまた、以前の実験で免疫学的に重要と思われる35 - 40kDa範囲のバンドを生じる（図7）。IgGレベルの増加が、実験4の35日目及び42日目にコントロール動物の血清プールのELISA試験で観察されたが、ウェスタンプロットはこの結果を反映しないこともまた留意されるべきである。ELISAで検出されたIgGは全細胞コーティング調製物に存在するH.ソムニ抗原と結合したが、これらは該ワクチンに存在するいずれの抗原に対しても特異的ではなかった。

サルコシル可溶性分画を電気泳動で分離し、同じ血清プールでブロープ精査したとき、35 - 40kDa反応性の大半が減少した。一見したところ、高分子量及び低分子量の両方の重要でないタンパク質が観察されるが、しかしながら80kDa及び18kDaのもののように、これらは観察される有効性とは無関係にすべてのワクチングループで共通である。40kDaの分子量を有する、1つのバンドがサルコシル不溶性分画及びSDS抽出ワクチン動物でのみ観察された。繰り返せば、これらのバンドの強度はこの実験のワクチン免疫期の過程を通して増加するのが観察された。

SDS抽出物を同じウェスタンプロット工程に付したとき、35kDa - 40kDa範囲の反応性はまたサルコシル不溶性分画に関して観察されたものと比較したとき減少した。サルコシル可溶性分画と同様に、高分子量又は低分子量のいくつかのタンパク質が、処置グループと無関係に検出された。40kDaから80kDaの間のサイズのいくつかのバンドがSDSワクチン動物で固有であった。SDS分画と同様に、サルコシル可溶性分画のタンパク質（約40kDaのサイズ）が、SDS分画の可溶性分画のプロットで観察されたように反応するのが観察され、前記はその観察された有効性と直接的に関係するかもしれない。

【0120】

C. 結論

ワクチン免疫中にIgG応答をもたらす免疫学的に重要なタンパク質を同定するために設計したウェスタンプロット試験を通して、いくつかの免疫反応性タンパク質が同定された。ワクチンの有効性にかかわらず、全グループで一貫するのは、概算分子量がそれぞれ80kDa及び18kDaのタンパク質であった。抗体がこれらのタンパク質に対して生成されるが、それらは単独で防御性を有するとは思われない。肺病変の有意な減少を生じるワクチンはいずれも、35kDaから40kDa範囲のタンパク質と反応する抗体産生を共有する。しかしながら、サルコシル不溶性材料を含むワクチンをブロープ精査に用いたとき、このバンドの濃度が最も濃いサルコシル不溶性分画は単独では防御を付与しなかった。サルコシル可溶性分画及びSDS抽出方法（前記はともに肺病変の減少に有効であることが観察された）は、サイズが約40kDaの明瞭であるが濃度は濃くないバンドを他の多数の弱いバンドとともに

10

20

30

40

50

生じた（前記バンドはサルコシル不溶性分画では明確には認められない多様な分子量で観察される）。

実施例5

単離株LgD1-TN08由来のSDS抽出OMPを、10%トリクロロ酢酸中において4 で30分インキュベートし、続いて20,000 x Gで5分間遠心分離して沈殿させた。タンパク質ペレットを氷冷アセトンで2回洗浄し、続いて8M尿素、2%CHAPS及び100mMのDTTの溶液を用いて再懸濁した。全てというわけではないが該抽出物のタンパク質がこの懸濁物中で可溶性であり、その後のSDS-PAGE分離及び該抽出物でワクチン免疫した動物の血清を用いるウェスタンブロットによって、3つの免疫学的に関連するタンパク質が回収されることが示された。約41、38及び23kDaの分子量を有するタンパク質バンドを染色したPVDFメンブレンから切り出し、Edman N-末端配列決定のためにアイオワ州立大学タンパク質部門（Iowa State University, Protein Facility）に付託した。続いて、配列決定の結果をBLAST分析に付して以前に配列決定されたタンパク質との相同性を決定した。

配列決定結果は、41kDaタンパク質は、H.ソムニ単離株2336及び129Ptのフィンブラル（fimbral）サブユニット（fimA）と高いN-末端相同性を共有し、おそらく線毛形成及びノ又は分泌メカニズムと密接に関係することを示している。このタンパク質はまた、H.デュクレイ及びH.インフルエンザのpilAタンパク質と相同である。LgD1-TN08単離株のSDS抽出OMPでワクチン免疫した動物の効果的な応答は、このタンパク質に対するIgG応答の誘導と相関性を示している。

38kDaタンパク質はポリンタンパク質ompAと高いN-末端相同性を有することが見出された（前記はパスツレラ科（Pasteurellaceae）ファミリーの多くのメンバーで高度に保存されていることが示された）。繰り返せば、LgD1-TN08単離株のSDS抽出OMPから成るワクチンの有効性は、このタンパク質のIgG応答の誘導と相関性を有している。

23kDaタンパク質はHs_0779と最も密接に関連していた（Hs_0779はH.ソムニ単離株29Ptのゲノムデータのみによって特徴を示された仮説的タンパク質である）。このタンパク質の機能はこれまで記載されていない、このタンパク質に対するIgG応答はLgD1-TN08単離株のSDS抽出OMPでワクチン免疫した動物から観察されたが、この応答はワクチンの有効性にもかかわらず全てのワクチン免疫動物で生じた。

【 0 1 2 1 】

BLASTの結果は以下の通り提供される：

サンプル：Hs_LGD1_061812-1

コメント：概念立証OMPワクチン実験で有効性と相関性を示すことが観察された～41kDaの免疫反応性OMP

配列：E L M I V V A I I G I L A G I A I P Q Y Q L G

BLASTの結果

E-値 = $4e^{-11}$: H.ソムニ2336及び129Ptのフィンブラルサブユニット（fimA）

fimAは、線毛成分の部分又は分泌メカニズムであると考えられている。H.デュクレイ及びH.インフルエンザ並びに多くの他のものによって提示されるpilAと相同である。

サンプル：Hs_LGD1_061812-2

コメント：概念立証OMPワクチン実験で有効性と相関性を示すことが観察された～38kDaの免疫反応性OMP

配列：A P Q A N T F Y A G A ? L

BLASTの結果

E-値 = $1e^{-6}$: ompA

パスツレラ科のポリンで高度に保存される。ポリンは小さな親水性分子のための非特異的チャンネルとして機能する。

サンプル：Hs_LGD1_061812-3

コメント：有効性とは無関係に全てのワクチン免疫動物で観察される～23kDaの免疫反応

性OMP

配列：S I N I A P Q I T E I L A I N G L ? Q ?

BLASTの結果

E-値 = 0.19 : H. ソムニ129Ptの仮説的タンパク質Hs_0779

多くの細菌に共通の保存されたタンパク質、未だ特徴は不明で機能は未知である。

TblastN 8/11

カルシウムトランスポーター

【 0 1 2 2 】

本明細書及び特許請求の範囲で開示した組成物及び方法は全て、本開示を参考にして煩雑な実験を実施することなく実施することができる。本発明の組成物及び方法は好ましい実施態様として記載されてきたが、前記組成物及び方法並びに本明細書に記載の方法の工程又は一連の工程に、本発明の概念、趣旨及び範囲を逸脱することなく複数の変型を適用できることは当業者には明白であろう。より具体的には、化学的及び生理学的に関連する種の薬剤は本明細書に記載した薬剤と置き換えて、同じ又は類似の結果を達成できよう。そのような当業者に明白な類似する全ての代替及び改変は、以下の特許請求の範囲に規定される本発明の趣旨、範囲及び概念内とみなされる。

【 0 1 2 3 】

All references cited in the specification are hereby incorporated by reference.

The following references, to the extent that they provide exemplary procedural or other details supplementary to those set forth herein, are specifically incorporated herein by reference.

Aguilar, J.C. and Rodriguez, E.G. (2007). Vaccine adjuvants revisited. *Vaccine*. 25; p 3752-3762.

Asmussen, M.D. and Baugh, C.L. 1981. Thiamine pyrophosphate (cocarboxylase) as a growth factor for *Haemophilus somnus*. *Journal of Clinical Microbiology*. 14(2); p178-183.

Angen, O., Ahrens, P., and Tegtmeir, C. 1998. Development of a PCR test for identification of *Haemophilus somnus* in pure and mixed cultures. *Veterinary Microbiology*. 63; p39-48.

Babcock, A.H. 2010. Epidemiology of bovine respiratory disease and mortality in commercial feedlots. Kansas State University.

【 0 1 2 4 】

10

20

30

40

Babiuk, L.A. and Potter, A.A. (1994). Veterinary vaccines. *Biotech. Adv.* 12; p 489-523.

Bollag, D.M., Rozycki, M.D., and Edelstein, S.J. (1996). *Protein Methods*. Second Ed. Wiley-Liss & Sons, Inc.; New York.

Challacombe, J.F., Duncan, A.J., Brettin, T.S., Bruce, D., Chertkov, O., Detter, J.C., Han, C.S., Misra, M., Richardson, P., Tapia, R., Thayer, N., Xie, G., and Inzana, T.J. 2007. Complete genome sequence of *Haemophilus somnus* (*Histophilus somni*) strain 129Pt and comparison to *Haemophilus ducreyi* 35000HP and *Haemophilus influenzae* Rd. *Journal of Bacteriology*. 189(5); p 1890-1898. 10

Chimini, G. and Chavrier, P. 2000. Function of Rho family proteins in actin dynamics during phagocytosis and engulfment. *Nat. Cell Biol.* 2; p191-196.

Costerton, J.W. 1999. Introduction to biofilm. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 11; p 217 – 221. 20

Cox, A.D., Howard, M.D., Brisson, J.R., Van Der Zwan, M., Thibault, P., Perry, M.B., and Inzana, T.J. 1998. Structural analysis of the phase-variable lipooligosaccharide from *Haemophilus somnus* strain 738. *Eur. J. Biochem.* 253; p507-516.

Detmer, A. and Glenting, J. Live bacterial vaccines – a review and identification of potential hazards. *Microbial Cell Factories*. 5:23; Bio Med Central <<http://www.microbialcellfactories.com/content/5/1/23>>

Duff, G.C. and Galyean, M.L. 2011. Recent advances in management of highly stressed, newly received feedlot cattle. *Journal of Animal Science*. 85; p823-840. 30

Ekins, A., Bahrami, F., Sijercic, A., Maret, D., and Niven, D.F. 2004. *Haemophilus somnus* possesses two systems for acquisition of transferrin-bound iron. *Journal of Bacteriology*. 186(13); p4407-4411.

Elswaifi, S.F. 2006. The molecular characterization of phosphorylcholine (ChoP) on *Histophilus somni* lipooligosaccharide: Contribution of ChoP to bacterial virulence and pathogenesis. Virginia Polytechnic Institute and State University. 40

Fulton, R.W., Cook, B.J., Step, D.L., Confer, A.W., Saliki, J.T., Payton, M.E., Burge, L.J., Welsh, R.D., Blood, K.S., 2002. Evaluation of health status of calves and the impact on feedlot performance: assessment of a retained ownership program for postweaning calves. *Can. J. Vet. Res.* 66, 173-180.

Geertsema, R.S., Worby, C., Kruger, R.P., Tagawa, Y., Russo, R., Herdman, D.S., Lo, K., Kimball, R.A., Dixon, J., and Corbeil, L.B. 2008. Protection of mice against *H. somni* septicemia by vaccination with recombinant immunoglobulin binding protein subunits. *Vaccine.* 26; p 4506-4512. 10

Geertsema, R.S., Zekarias, B., La Franco Scheuch, L., Worby, C., Russo, R., Gershwin, L.J., Herdman, D.S., Lo, K., and Corbeil, L.B. 2011. IbpA DR2 subunit immunization protects calves against *Histophilus somni* pneumonia. *Vaccine.* 29; 4805-4812.

Griffin, D. 1997. Economic impact associated with respiratory disease in beef cattle. *Vet. Clin. North Am. Anim. Pract.* 13; p367-377. 20

Griffin, D. 2010. Bovine pasteurellosis and other bacterial infections of the respiratory tract. *Veterinary Clinics of North American Food Animal Practice.* 26(1); p57-71

Hobb, R.I., Fields, J.A., Burns, C.M., and Thompson, S.A. 2009. Evaluation of procedures for outer membrane isolation from *Campylobacter jejuni*. *Microbiology.* 155(3); p 979-988.

Howard, M.D., Cox, A.D., Weiser, J.N., Schurig, G.G., and Inzana, T.J. 2000. Antigenic diversity of *Haemophilus somnus* lipooligosaccharide: Phase-variable accessibility of the phosphorylcholine epitope. *Journal of Clinical Microbiology.* 38(12); p4412-4419. 30

Inzana, T.J., Iritani, B., Gogolewski, R.P., Kania, S.A., and Corbeil, L.B. 1988. Purification and characterization of lipooligosaccharides from four strains of *Haemophilus somnus*. *Infection and Immunity.* 56(11); p2830-2837.

Inzana, T.J., Gogolewski, R.P., and Corbeil, L.B. 1992. Phenotypic phase variation in *Haemophilus somnus* lipooligosaccharide during bovine pneumonia and after in vitro passage. *Infection and Immunity.* 60(7); p2943-2951. 40

Inzana, T.J., Glindemann, G., Cox, A.D., Wakarchuk, W., and Howard, M.D. 2002. Incorporation of N-Acetylneuraminic Acid into *Haemophilus somnus* lipooligosaccharide (LOS): Enhancement of resistance to serum and reduction of LOS antibody binding. *Infection and Immunity*. 70(9); p4870-4879.

Jaques, M. and Paradis, S.E. 1998. Adhesin-receptor interactions in *Pasteurellaceae*. *FEMS Microbiol. Rev.* 22; p45-59.

Jericho, K.W.F. and Langford, E.V. 1982. Aerosol vaccination of calves with *Pasteurella haemolytica* against experimental respiratory disease. *Can. J. comp. Med.* 46; p287-292.

Johnson, A.P. and Inzana, T.J. 1986. Loss of ciliary activity in organ cultures of rat trachea treated with lipo-oligosaccharide from *Haemophilus influenzae*. *J. Med. Microbiol.* 22; p265-268.

Kania, S.A., Gogolewski, R.P., and Corbeil, L.B. 1990. Characterization of a 78-kilodalton outer membrane protein of *Haemophilus somnus*. *Infection and Immunity*. 58(1); p237-244.

Korczak, B., Christensen, H., Emler, S., Frey J., and Kuhnert, P. 2004. Phylogeny of the family *Pasteurellaceae* based on *rpoB* sequences. *International Journal of Systemic and Evolutionary Microbiology*. 54; p 1393-1399.

Murphy, K., Travers, P., and Walport, M. (2008). *Janeway's Immunobiology*: 7th Ed. Garland Science; NYC.

Nikaido, H. and Nakae, T. 1979. The outer membrane of gram-negative bacteria. *Advances in Microbial Physiology*. 20; p163-250.

O'Toole, D., Hunter, A.R., and Corbeil, L.B. 2009. Diagnostic exercise: myocarditis due to *Histophilus somni* in feedlot and backgrounded cattle. *Veterinary Pathology*. 46; p 1015-1017.

Rehm, H. 2006. *Protein Biochemistry and Proteomics*. Elsevier Academic Press; New York.

Ribble, C.S., Jim, G.K., and Janzen, E.D. 1988. Efficacy of immunization of feedlot cattle with a commercial *Haemophilus somnus* bacterin. *Canadian Journal of Veterinary Research*. 52: p191-198.

Roth, J.A. 2007. Mechanistic basis for adverse vaccine reactions and vaccine failures. *Advances in Veterinary Medicine*. 41: p681-700.

Roy, C.R. and Mukherjee, S. 2009. Bacterial Fic proteins amp up infection. *Science Signaling*. 2(62), p14. [DOI: 10.1126/scisignal.262.0pe14].

10

Sandal, I., Shao, J.Q., Annadata, S., Apicella, M.A., Boye, M., Jensen, T.K., Saunders, G.K., and Inzana, T.J. 2009. *Histophilus somni* biofilm formation in cardiopulmonary tissue of the bovine host following respiratory challenge. *Microbes and Infection*. 11; p 254-263.

Sandal, I. and Inzana T. 2010. A genomic window into the virulence of *Histophilus*. *Trends in Microbiology*. 18(2): p 90-99.

20

Spickler, A.R. and Roth, J.A. 2003. Adjuvants in veterinary vaccines: Modes of action and adverse effects. *J Vet Intern Med*; 17, p 273-281.

St. Michael, F., Inzana, T.J., and Cox, A.D. 2006. Structural analysis of the lipooligosaccharide-derived oligosaccharide of *Histophilus somni* (*Haemophilus somnus*) strain 8025. *Carbohydrate Research*. 341; p281-284.

Tagawa, Y. et. al. (1993). Antigenic analysis of the major outer membrane protein of *Haemophilus somnus* with monoclonal antibodies. *Infection and Immunity*. 61(5); p 2257-2259.

30

Tagawa, Y., Ishikawa, H., and Yuasa, N. 1993. Purification and partial characterization of the major outer membrane protein of *Haemophilus somni*. *Infection and Immunity*. 61(1); p91-96.

Tagawa, Y. Haritani, M., Ishikawa, H., and Yuasa, N. 1993. Characterization of a heat-modifiable outer membrane protein of *Haemophilus somnus*. *Infection and Immunity*. 61(5); p1750-1755.

40

Tagawa, Y., Bastida-Corcuera, F., and Corbeil, L.B. 2000. Immunological characterization of the major outer membrane protein of *Haemophilus somnus*. *Veterinary Microbiology*. 71; p245-254.

Tremblay, Y.D., Bahrami, F., and Niven, D.F. 2006. Acquisition of haemoglobin-bound iron by *Histophilus somni*. *Vet. Microbiol.* 114; p104-114.

Ward, A.C., Weiser, G.C., Anderson, B.C., Cummings, P.J., Arnold, K.F., and Corbeil, L.B. 2006. *Haemophilus somnus* (*Histophilus somni*) in bighorn sheep. *Canadian Journal of Veterinary Research*. 70; p 34-42. 10

Worby, C.A., Mattoo, S., Kruger, R.P., Corbeil, L.B., Koller, A., Mendez, J.C., Zekarias, B., Lazar, C., and Dixon, J.E. 2009. The Fic domain: a new paradigm for adenylation. *Mol. Cell*. 34(1): 93. Doi:10.1016/j.molcel.2009.03.008.

Woolery, A.R., Luong, P., Broberg, C.A., and Orth, K. 2010. AMPylation: something old is new again. *Frontiers in Microbiology*. 1; doi: 10.3389/fmicb.2010.00113. 20

Xiao, J. Worby, C.A., Mattoo, S., Sankaran, B., and Dixon, J.E. 2010. Structural basis for Fic mediated adenylation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 17(8); p 1004-1010.

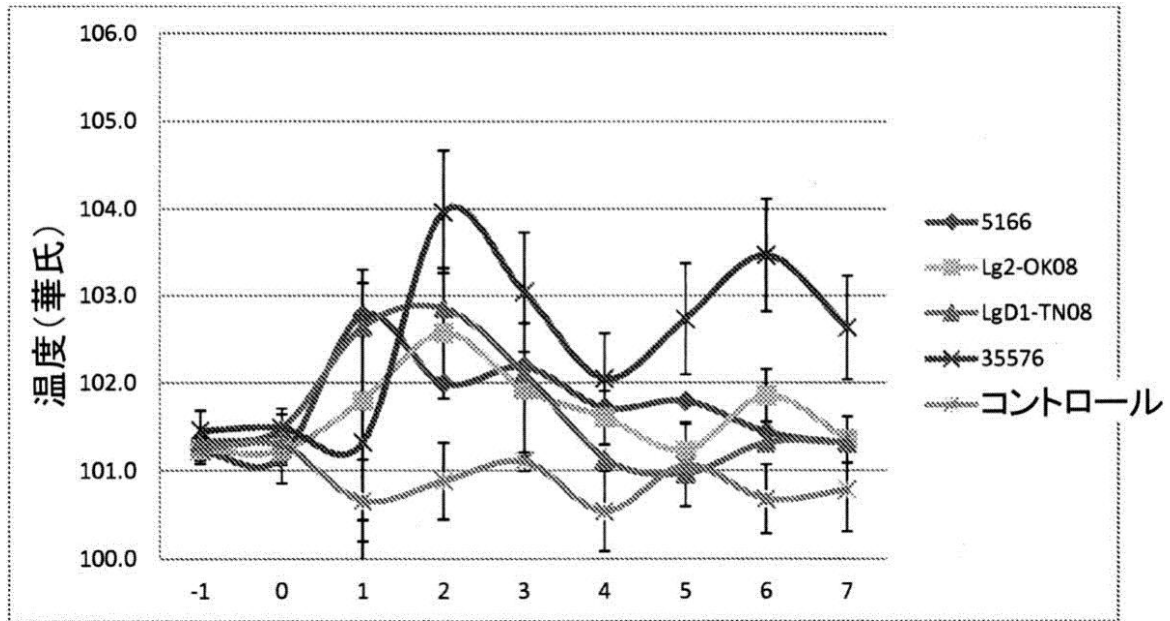
Yarnall, M., Widders, P.R., and Corbeil, L.B. 1988. Isolation and characterization of Fc receptors from *Haemophilus somnus*. *Scand. J. Immunol.* 28; p 129-137

Zekarias, B., Mattoo, S., Worby, C., Lehmann, J., Rosenbusch, R.F., and Corbeil, L.B. 2010. *Histophilus somni* IbpA DR2/Fic in virulence and immunoprotection at the natural host alveolar epithelial barrier. *Infection and Immunity*. 78(5); p 1850-1858. 30

Zekarias, B., O'Toole, D., Lehmann, J., and Corbeil, L.B. 2011. *Histophilus somni* IbpA Fic cytotoxin is conserved in disease strains and most carrier strains from cattle; sheep and bison. *Veterinary Microbiology*. 149 (1-2); p 177-185.

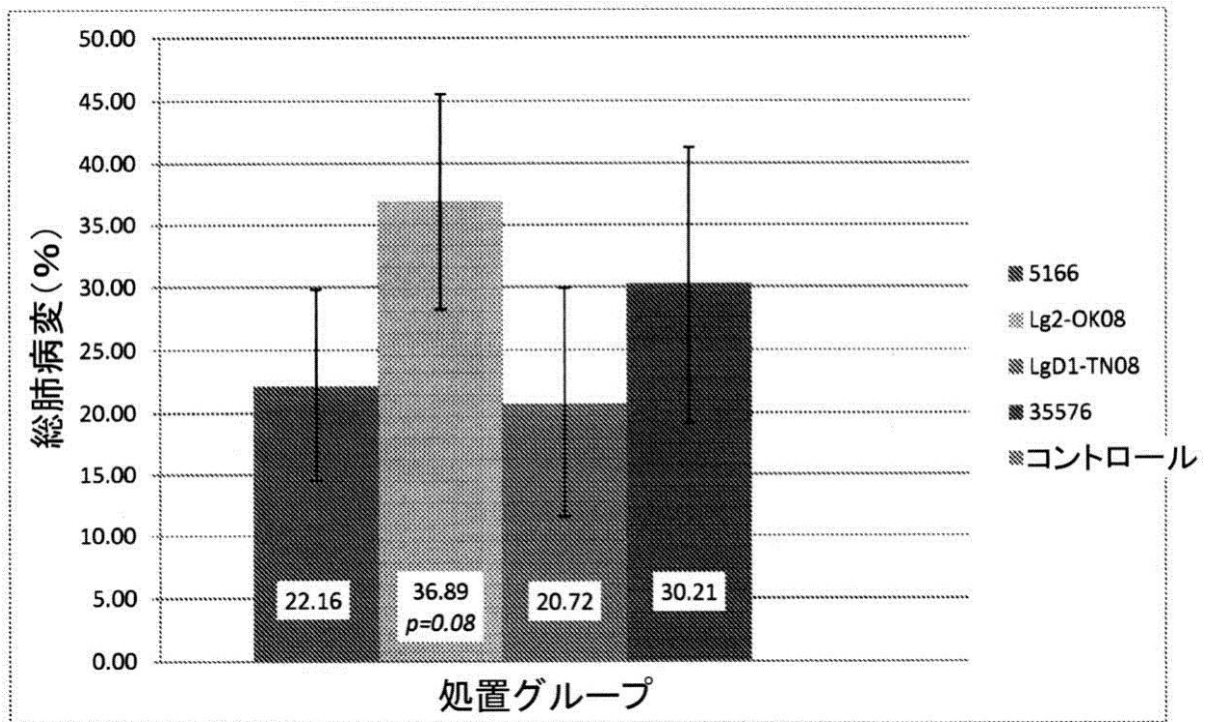
【 図 1 】

FIG. 1



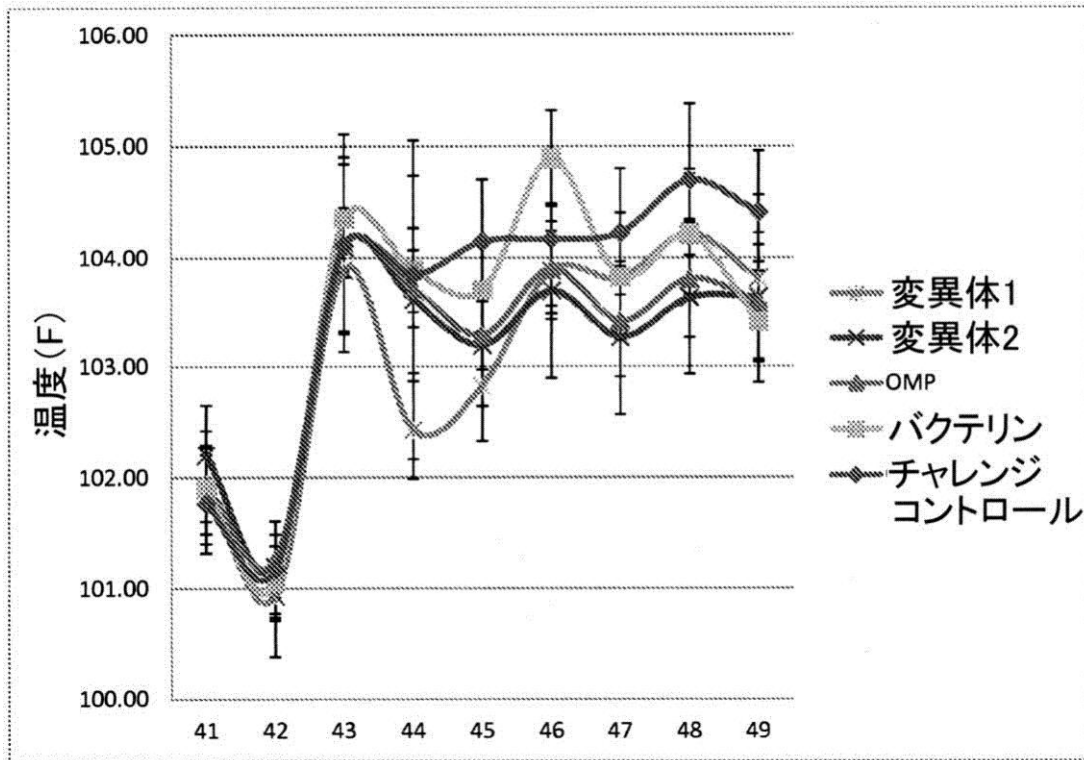
【 図 2 】

FIG. 2



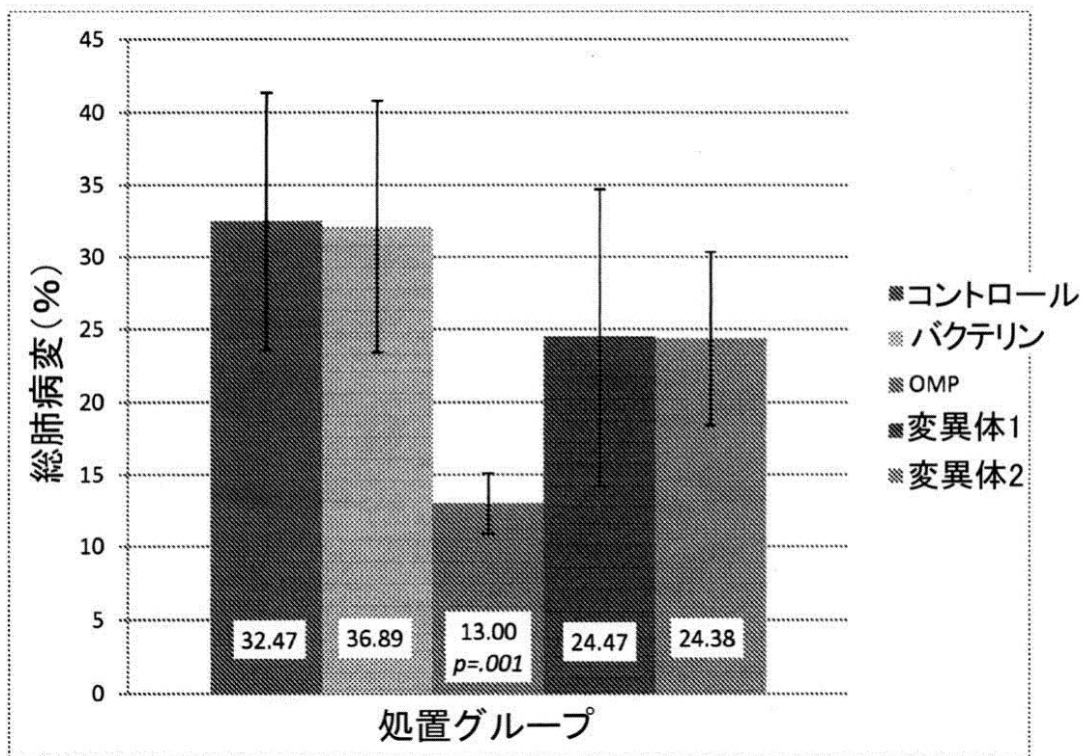
【 図 3 】

FIG. 3



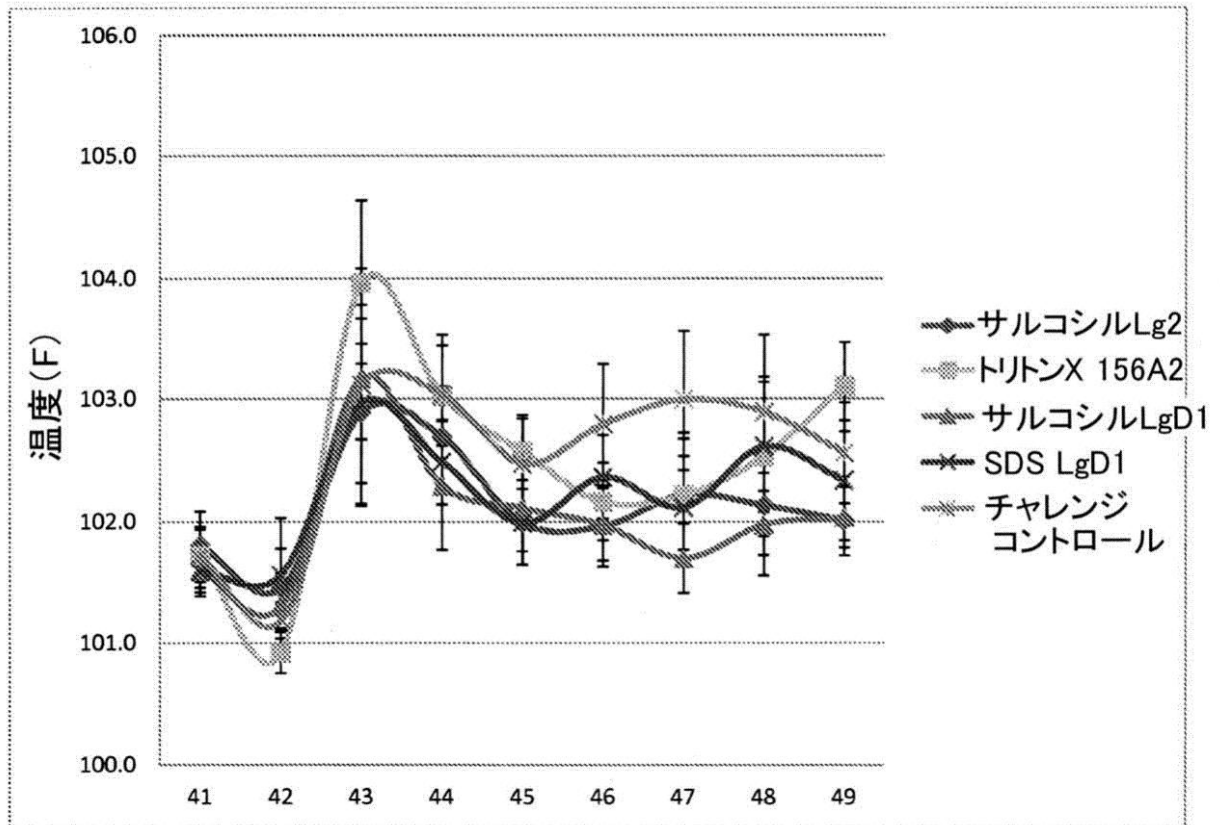
【 図 4 】

FIG. 4



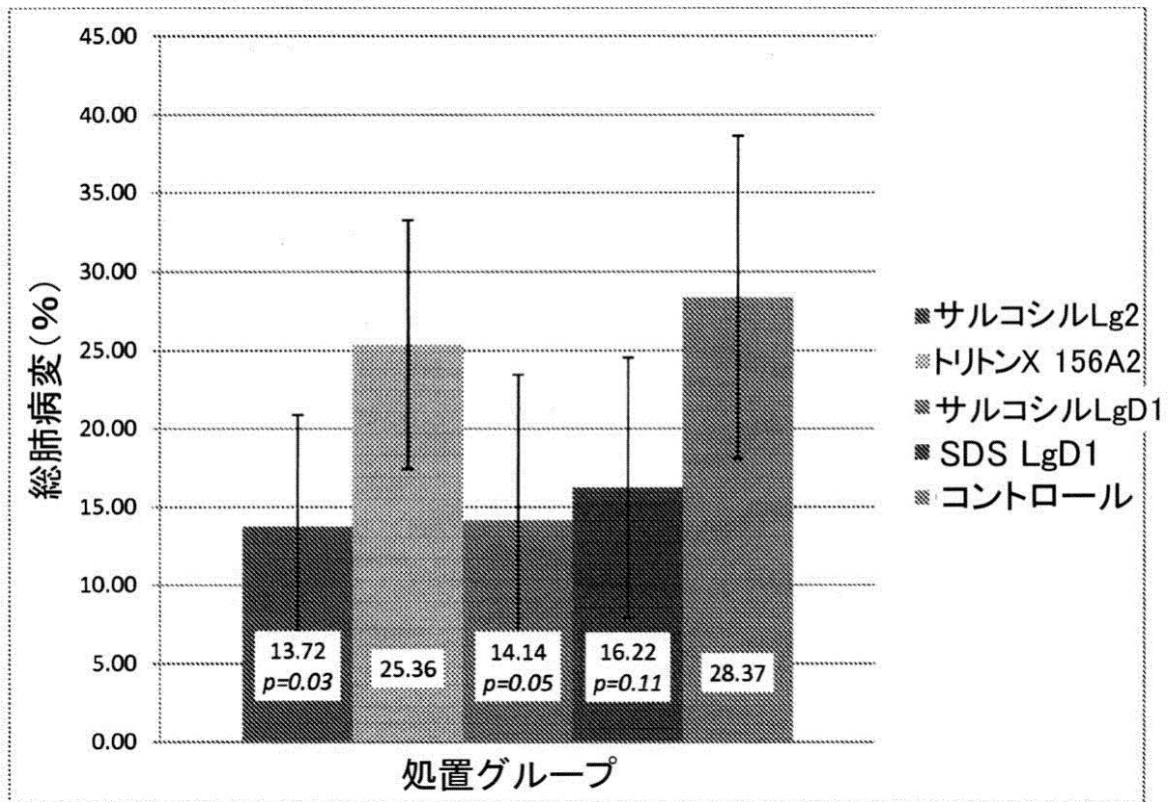
【 図 5 】

FIG. 5



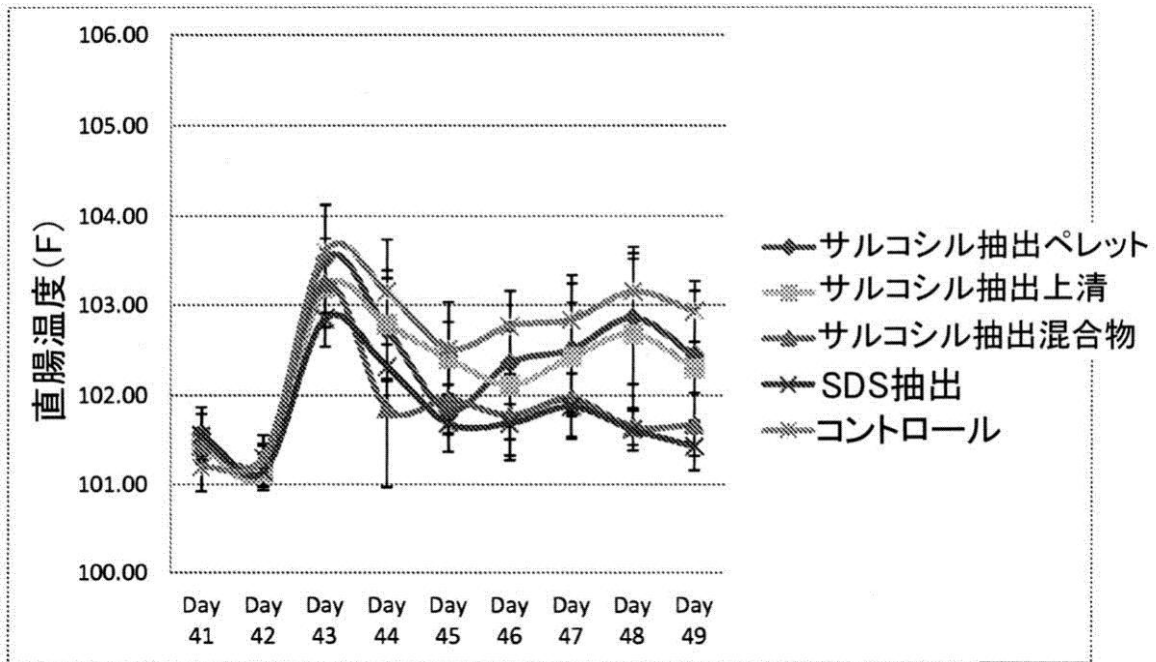
【 図 6 】

FIG. 6



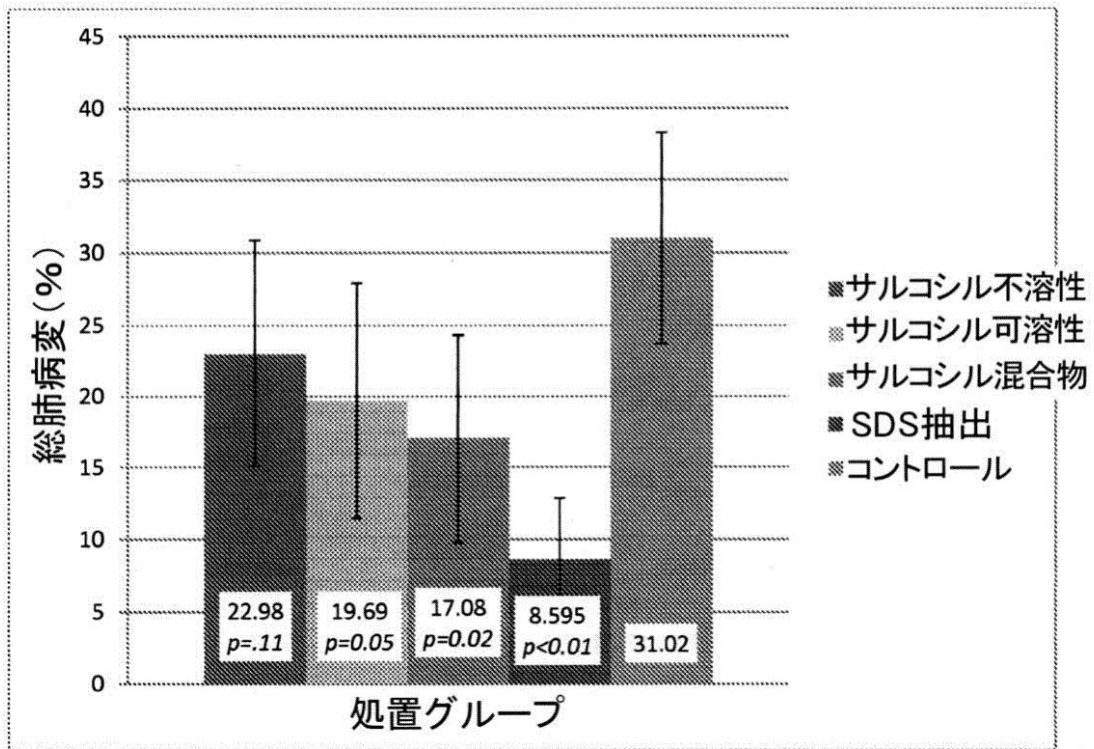
【 図 7 】

FIG. 7



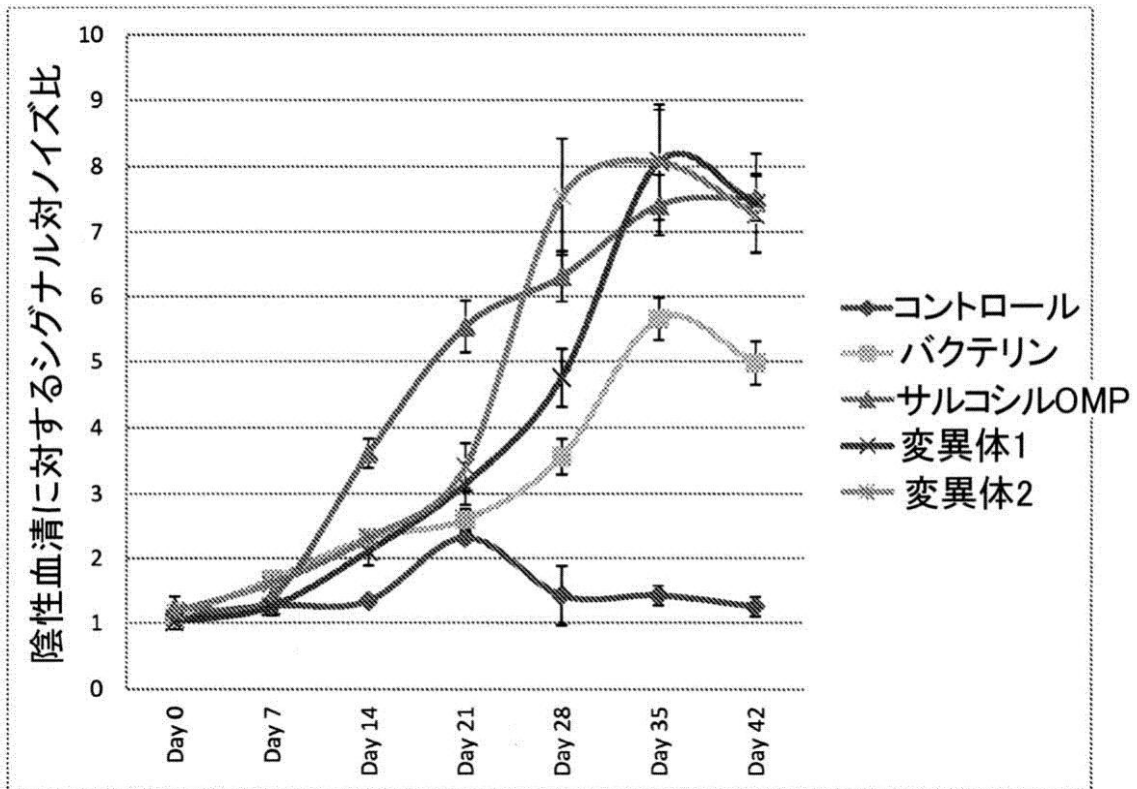
【 図 8 】

FIG. 8

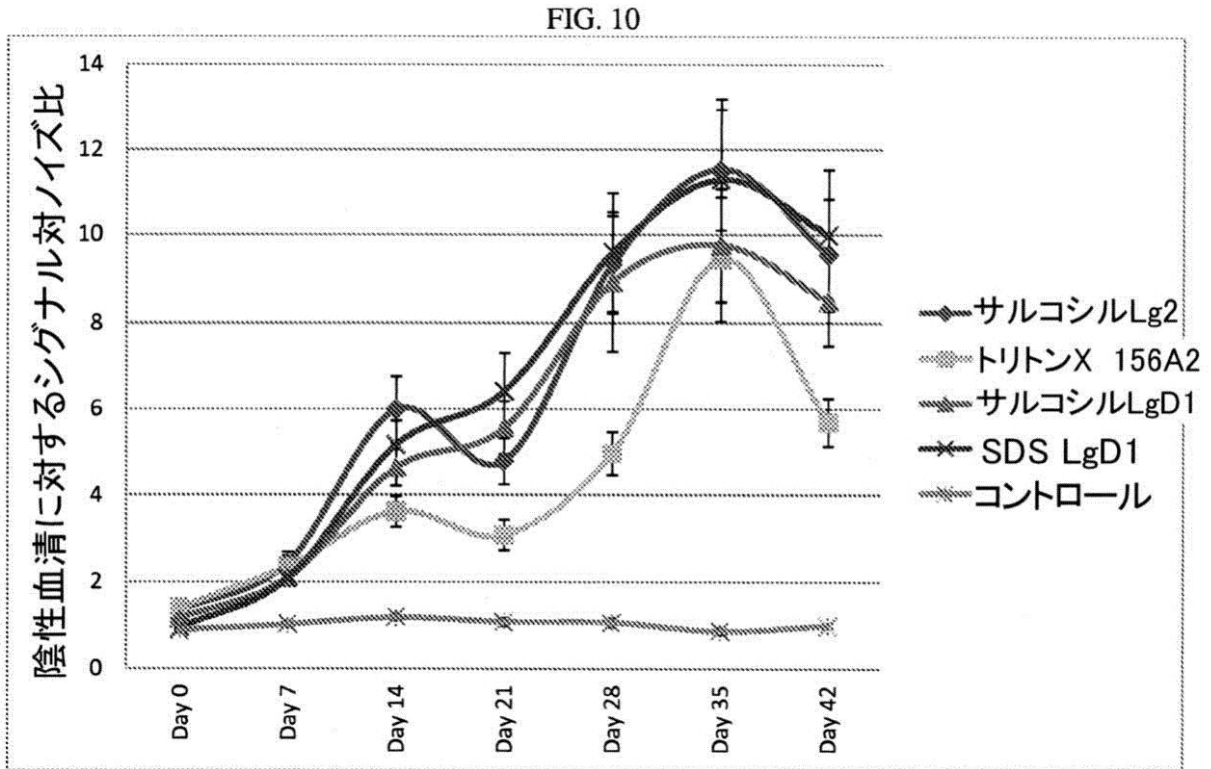


【 図 9 】

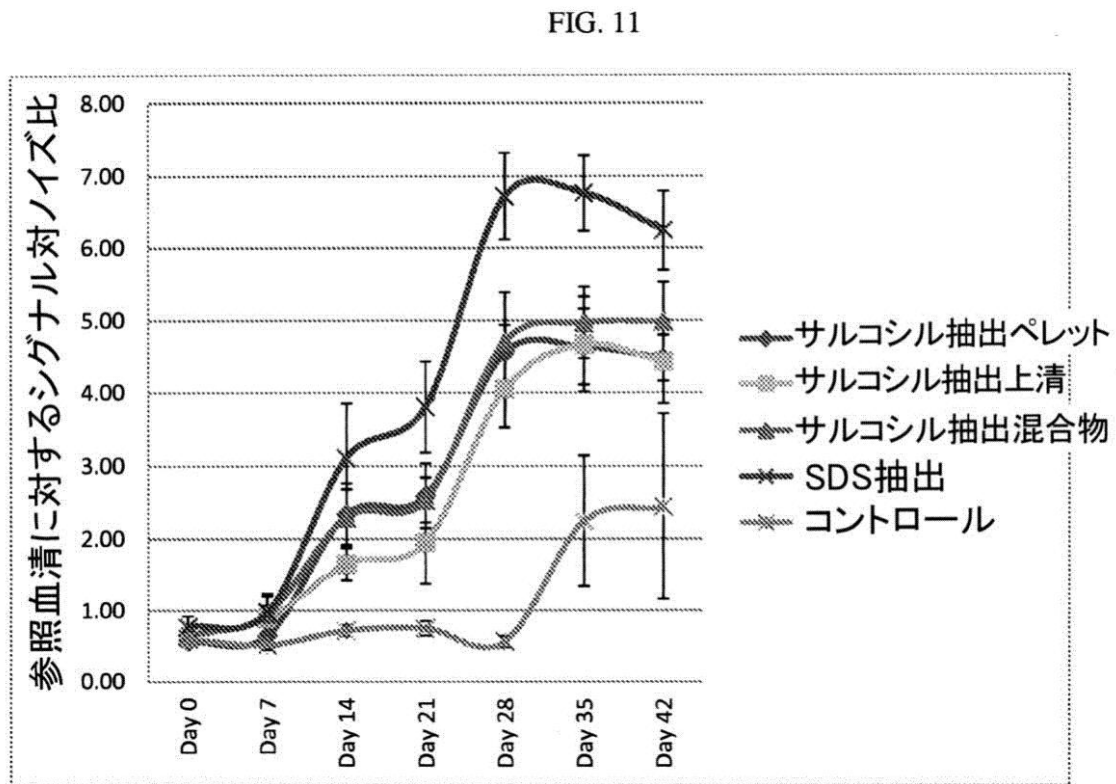
FIG. 9



【 図 1 0 】



【 図 1 1 】



【 配 列 表 】

2015519305000001.app

【 手 続 補 正 書 】

【 提 出 日 】 平 成 27 年 4 月 28 日 (2015.4.28)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

少なくとも1つの外膜タンパク質（OMP）ヒストフィルス・ソムニペプチドを含む免疫原性組成物であって、該OMPヒストフィルス・ソムニペプチドがヒストフィルス・ソムニに対して免疫反応性である、前記免疫原性組成物。

【請求項 2】

さらに生理学的に許容できるベヒクルを含む、請求項 1 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 3】

生理学的に許容できるベヒクルが、医薬的若しくは獣医的に許容できる担体、アジュバント又は前記の組合せから成る群から選択される、請求項 2 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 4】

PTA-12755、PTA-12756及びそれらの組合せを含む、請求項 1 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 5】

請求項 1 に記載の免疫原性組成物の対象動物（ヒトを除く）への投与を含む、ヒストフィルス・ソムニ感染に対して免疫応答を惹起する方法。

【請求項 6】

請求項 1 に記載の免疫原性組成物のその必要がある対象動物（ヒトを除く）への投与を含む、ヒストフィルス・ソムニ感染に付随する臨床徴候の発生及び重篤度を軽減する方法であって、該臨床徴候の発生又は重篤度の軽減が、該免疫原性組成物を投与されなかった対象動物（ヒトを除く）と比較して少なくとも10%である、前記方法。

【請求項 7】

臨床徴候が、喘ぎ呼吸又は急迫呼吸、咳、食欲不振、抑うつ又は無気力、鼻及び眼の分泌物放出、並びに死亡率から成る群から選択される、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

対象動物が、ウシ及びヒツジから成る群から選択される、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 9】

少なくとも1つのOMPヒストフィルス・ソムニペプチドを生理学的に許容できるベヒクルと混合することを含む、請求項 2 に記載の免疫原性組成物を調製する方法。

【請求項 10】

対象動物（ヒトを除く）でヒストフィルス・ソムニ感染症を診断する方法であって、前記方法が、少なくとも1つのOMPヒストフィルス・ソムニペプチドを提供する工程、該ヒストフィルス・ソムニペプチドを該対象動物から得られたサンプルと接触させる工程、及び、該ヒストフィルス・ソムニペプチドと結合できる抗体が該サンプルで検出される場合に、該対象動物がヒストフィルス・ソムニ感染症を有すると認定する工程を含む、前記方法。

【請求項 11】

少なくとも1つのOMPヒストフィルス・ソムニペプチド、免疫原性担体、該OMPヒストフィルス・ソムニペプチド及び免疫原性担体を包む容器、印刷された指示一式、並びにワクチンを動物に投与することができるディスペンサーを含むキット。

【請求項 12】

(i) OMPヒストフィルス・ソムニペプチド及び(ii) 生理学的に許容できるベヒクルを含む、請求項 2 に記載の免疫原性組成物を調製するためのキットであって、(i) 及び(ii) が別々に包装される、前記キット。

【請求項 13】

さらにキットの使用についての指示を含む、請求項 12 に記載のキット。

【請求項 14】

さらにディスペンサーを含む、請求項 12 に記載のキット。

【請求項 15】

ヒストフィルス・ソムニ感染に付随する臨床徴候の発生及び重篤度を軽減するための、請求項 1 に記載の免疫原性組成物。

【請求項 16】

臨床徴候が、喘ぎ呼吸又は急迫呼吸、咳、食欲不振、抑うつ又は無気力、鼻及び眼の分泌物放出、並びに死亡率から成る群から選択される、請求項 15 に記載の免疫原性組成物

。

【請求項 17】

ウシ及びヒツジから成る群から選択される動物に投与するための、請求項 15 に記載の免疫原性組成物。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2013/034918

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. A61K39/102 G01N33/569 ADD.		
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) A61K 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) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 534 256 A (POTTER ANDREW A [CA] ET AL) 9 July 1996 (1996-07-09) abstract column 2, lines 49-64 column 6, lines 36-48 examples 4,5 ----- -/--	1,2,4-8
<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 *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 24 July 2013		Date of mailing of the international search report 09/08/2013
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Noë, Veerle

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2013/034918

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SILVA S V ET AL: "The protective effect of vaccination against experimental pneumonia in cattle with Haemophilus somnus outer membrane antigens and interference by lipopolysaccharide.", CANADIAN JOURNAL OF VETERINARY RESEARCH = REVUE CANADIENNE DE RECHERCHE VÉTÉRINAIRE JUN 1990, vol. 54, no. 3, June 1990 (1990-06), pages 326-330, XP002705635, ISSN: 0830-9000 the whole document	1,2,4-8, 11
X	WO 00/18429 A2 (UNIV CALIFORNIA [US]; CORBEIL LYNETTE B [US]; ZIEGLER ELIZABETH J [US]) 6 April 2000 (2000-04-06) page 1, lines 29-35 page 2, lines 8-10,16-19,29-31 page 3, lines 26-32 page 5, lines 6-14 page 9, lines 5-16 claims 1,9,10	1,2,4,5, 7
X	STEPHENS L R ET AL: "Isolation of Haemophilus somnus antigens and their use as vaccines for prevention of bovine thromboembolic meningoencephalitis.", AMERICAN JOURNAL OF VETERINARY RESEARCH FEB 1984, vol. 45, no. 2, February 1984 (1984-02), pages 234-239, XP008163776, ISSN: 0002-9645 abstract page 235, column 1, paragraph 3 page 237, column 1, last paragraph page 237, column 2, paragraph 3	1,2,4,5, 7,8
X	CAIRNS RUSS ET AL: "Efficacy of an outer membrane complex Haemophilus somnus bacterin in preventing symptoms following Haemophilus somnus challenge", AGRI-PRACTICE, vol. 14, no. 8, 1993, pages 35-37, XP008163774, ISSN: 0745-452X the whole document	1,2,4-8, 10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2013/034918

(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CORBEIL L B ET AL: "Characterization of immunodominant surface antigens of Haemophilus somnus", INFECTION AND IMMUNITY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, USA, vol. 59, no. 12, 1 December 1991 (1991-12-01), pages 4295-4301, XP002137020, ISSN: 0019-9567 abstract page 4300, column 1, paragraph 2 -----	9
A	TAGAWA Y ET AL: "Characterization of a heat-modifiable outer membrane protein of Haemophilus somnus.", INFECTION AND IMMUNITY MAY 1993, vol. 61, no. 5, May 1993 (1993-05), pages 1750-1755, XP002705669, ISSN: 0019-9567 the whole document -----	1-13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2013/034918

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5534256	A	09-07-1996	CA 2099707 A1 03-01-1994
			US 5534256 A 09-07-1996
			US 5985289 A 16-11-1999

WO 0018429	A2	06-04-2000	AU 6160599 A 17-04-2000
			CA 2347278 A1 06-04-2000
			WO 0018429 A2 06-04-2000

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 1/14 (2006.01)	A 6 1 P 1/14	
A 6 1 P 25/24 (2006.01)	A 6 1 P 25/24	
A 6 1 P 3/02 (2006.01)	A 6 1 P 3/02	
A 6 1 P 27/02 (2006.01)	A 6 1 P 27/02	
A 6 1 P 11/02 (2006.01)	A 6 1 P 11/02	
A 6 1 K 39/39 (2006.01)	A 6 1 K 39/39	
C 0 7 K 14/195 (2006.01)	C 0 7 K 14/195	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	N
G 0 1 N 33/569 (2006.01)	G 0 1 N 33/569	F
C 1 2 N 1/20 (2006.01)	C 1 2 N 1/20	E
C 1 2 R 1/00 (2006.01)	C 1 2 N 1/20	E
	C 1 2 R 1:00	

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, T M), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, R S, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, H U, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI , NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC

(74)代理人 100119013

弁理士 山崎 一夫

(74)代理人 100123777

弁理士 市川 さつき

(74)代理人 100137626

弁理士 田代 玄

(72)発明者 リリー ブライス ディーン

アメリカ合衆国 コネチカット州 0 6 8 7 7 - 0 3 6 8 リッジフィールド リッジバリー ロード 9 0 0 ピーオーボックス 3 6 8 ベーリンガー インゲルハイム ユーエスエイ コーポレーション ヴイピー アイピー リーガル内

(72)発明者 ニッテル ジェフリー ピー

アメリカ合衆国 コネチカット州 0 6 8 7 7 - 0 3 6 8 リッジフィールド リッジバリー ロード 9 0 0 ピーオーボックス 3 6 8 ベーリンガー インゲルハイム ユーエスエイ コーポレーション ヴイピー アイピー リーガル内

Fターム(参考) 4B065 AA01X AC20 CA45 CA46

4C085 AA03 BA18 CC07 CC21 DD62 DD86 EE01 FF03 FF24 GG08

4H045 AA10 AA20 AA30 CA11 DA86 EA31

专利名称(译)	Histoplace / Somniの外膜蛋白及其方法		
公开(公告)号	JP2015519305A	公开(公告)日	2015-07-09
申请号	JP2015504672	申请日	2013-04-02
[标]申请(专利权)人(译)	贝林格尔·英格海姆维特梅迪卡有限公司		
申请(专利权)人(译)	勃林格殷格翰胎儿本草公司		
[标]发明人	リリーブライスディーン ニッテルジェフリーピー		
发明人	リリー ブライス ディーン ニッテル ジェフリー ピー		
IPC分类号	A61K39/102 A61P31/04 A61P37/04 A61P11/14 A61P11/00 A61P1/14 A61P25/24 A61P3/02 A61P27/02 A61P11/02 A61K39/39 C07K14/195 G01N33/53 G01N33/569 C12N1/20 C12R1/00		
CPC分类号	A61K39/102 A61K2039/552 A61P1/14 A61P3/02 A61P11/00 A61P11/02 A61P11/14 A61P25/24 A61P27/02 A61P31/04 C07K14/285 G01N33/56911 G01N33/6854 G01N2333/285		
FI分类号	A61K39/102.ZNA A61P31/04.171 A61P37/04 A61P11/14 A61P11/00 A61P1/14 A61P25/24 A61P3/02 A61P27/02 A61P11/02 A61K39/39 C07K14/195 G01N33/53.N G01N33/569.F C12N1/20.E C12R1/00		
F-TERM分类号	4B065/AA01X 4B065/AC20 4B065/CA45 4B065/CA46 4C085/AA03 4C085/BA18 4C085/CC07 4C085/CC21 4C085/DD62 4C085/DD86 4C085/EE01 4C085/FF03 4C085/FF24 4C085/GG08 4H045/AA10 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/CA11 4H045/DA86 4H045/EA31		
代理人(译)	山崎 一夫		
优先权	61/620652 2012-04-05 US 13/796653 2013-03-12 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)	<p>(21) 出願番号 特願2015-504672 (P2015-504672)</p> <p>(86) (22) 出願日 平成25年4月2日 (2013.4.2)</p> <p>(85) 翻訳文提出日 平成26年10月3日 (2014.10.3)</p> <p>(86) 国際出願番号 PCT/US2013/034918</p> <p>(87) 国際公開番号 W02013/151979</p> <p>(87) 国際公開日 平成25年10月10日 (2013.10.10)</p> <p>(31) 優先権主張番号 61/620,652</p> <p>(32) 優先日 平成24年4月5日 (2012.4.5)</p> <p>(33) 優先権主張国 米国 (US)</p> <p>(31) 優先権主張番号 13/796,653</p> <p>(32) 優先日 平成25年3月12日 (2013.3.12)</p> <p>(33) 優先権主張国 米国 (US)</p>	
除了somniの外膜蛋白 (OMP) 的免疫组合物之外, 本发明还涉及提取方法, 呼吸攻击模型, 给药方法, 诊断测定和试剂盒。	<p>(71) 出願人 503345374 ベリンガー インゲルハイム フェトメ ダイカ インコーポレイテッド アメリカ合衆国 ミズーリ州 64506 -2002 セント ジョセフ ノース ベルト ハイウェイ 2621</p> <p>(74) 代理人 100082083 弁理士 辻居 幸一</p> <p>(74) 代理人 100082005 弁理士 熊倉 禎男</p> <p>(74) 代理人 100084663 弁理士 稲田 篤</p> <p>(74) 代理人 100093300 弁理士 浅井 賢治</p>	