

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2009-29825

(P2009-29825A)

(43) 公開日 平成21年2月12日(2009.2.12)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 39/104 (2006.01)	A 6 1 K 39/104	4 C 0 8 5
C 0 7 K 14/21 (2006.01)	C 0 7 K 14/21 Z N A	4 H 0 4 5
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	

審査請求 有 請求項の数 18 O L (全 13 頁)

(21) 出願番号	特願2008-243780 (P2008-243780)	(71) 出願人	508188868
(22) 出願日	平成20年9月24日 (2008.9.24)		ザ・ユニバーシティ・オブ・キャンベラ
(62) 分割の表示	特願平10-531741の分割		The University of C anberra
原出願日	平成10年1月26日 (1998.1.26)		オーストラリア、オーストラリアン・キャ ピタル・テリトリー、ベルコネン、ブルー ス、キリナリ・ストリート
(31) 優先権主張番号	9701489.8	(74) 代理人	100081422
(32) 優先日	平成9年1月24日 (1997.1.24)		弁理士 田中 光雄
(33) 優先権主張国	英国 (GB)	(74) 代理人	100084146
			弁理士 山崎 宏
		(74) 代理人	100116311
			弁理士 元山 忠行
		(74) 代理人	100122301
			弁理士 富田 憲史

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗原

(57) 【要約】

【課題】 ピー・アエルギノーザの新規抗原、ならびにその用途を見出す。

【解決手段】 配列番号：2 (X a a - E - E - K - T - P - L - T - T - A - A - X a a - A - P - V - V - X a a - N - A) に記載のN末端配列を有する、請求項1に記載のタンパク質抗原、それを用いるピー・アエルギノーザの検出、ならびにそれを用いる主体の免疫応答の誘発。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

S D S - P A G E で測定したとき、60 k D a から 65 k D a の範囲の分子量を有するピー・アエルギノーザ由来の外膜タンパク質抗原であって、配列番号：2 に記載の下記の N 末端配列：

Xaa-Glu-Glu-Lys-Thr-Pro-Leu-Thr-Thr-Ala-Ala-Xaa-Ala-Pro-Val-Val-Xaa-Asn-Ala

[式中、Xaa は不明アミノ酸を表す]

を有するタンパク質抗原。

【請求項 2】

請求項 1 に記載のタンパク質を含む抗原組成物。

10

【請求項 3】

一つ以上の他のピー・アエルギノーザ抗原をさらに含むものである、請求項 2 に記載の抗原組成物。

【請求項 4】

ピー・アエルギノーザの検出及び / 又は診断に使用するための、請求項 1 に記載のタンパク質、あるいは請求項 2 又は請求項 3 に記載の抗原組成物。

【請求項 5】

ピー・アエルギノーザを検出する方法であって、

(a) 請求項 1 に記載のタンパク質、あるいは請求項 2 又は請求項 3 に記載の抗原組成物をテストすべき試料と接触させる工程、及び

20

(b) ピー・アエルギノーザに対する抗体の存在を検出する工程、を含んで成る方法。

【請求項 6】

膿疱性線維症を患う主体におけるピー・アエルギノーザを検出する方法であって、

(a) 請求項 1 に記載のタンパク質、あるいは請求項 2 又は請求項 3 に記載の抗原組成物をその主体から得た生物試料と接触させる工程、及び

(b) ピー・アエルギノーザに対する抗体の存在を検出する工程、を含んで成る方法。

【請求項 7】

該試料が粘液の試料である請求項 5 又は請求項 6 に記載の方法。

30

【請求項 8】

該粘液が唾液である請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

検出がインピトロで行われるものである、請求項 5 ~ 請求項 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 10】

ピー・アエルギノーザの検出における、請求項 1 に記載のタンパク質、あるいは請求項 2 又は請求項 3 に記載の抗原組成物の使用。

【請求項 11】

検出がイン・ピトロで行われるものである、請求項 10 記載の使用。

40

【請求項 12】

請求項 1 に記載のタンパク質、あるいは請求項 2 又は請求項 3 に記載の抗原組成物を含んで成る、ピー・アエルギノーザの検出及び / 又は診断に使用するためのキット。

【請求項 13】

請求項 1 に記載のタンパク質、あるいは請求項 2 又は請求項 3 に記載の抗原組成物を含んで成る、主体の免疫応答を引き出すことができる組成物。

【請求項 14】

該組成物がワクチン組成物である請求項 13 記載の組成物。

【請求項 15】

さらに一つ以上のアジュバントを含んで成る請求項 13 又は 14 に記載の組成物。

50

【請求項 16】

請求項 1 に記載のタンパク質、あるいは請求項 2 又は請求項 3 に記載の抗原組成物の、医薬における使用。

【請求項 17】

請求項 1 に記載のタンパク質、あるいは請求項 2 又は請求項 3 に記載の抗原組成物の、免疫原組成物の調製における使用。

【請求項 18】

該免疫組成物がワクチンである請求項 17 記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

【0001】

本発明はシュードモナス アエルギノーザ (*Pseudomonas aeruginosa*) 由来の新規な抗原、医薬、特にワクチンの調製におけるその使用及び診断におけるその使用に関する。

【背景技術】

【0002】

ピー・アエルギノーザは桿状をしたグラム陰性の好気性かつ運動性の細菌である。それは易感染性主体中で重大な罹病率及び死亡率を惹き起こす環境的に普遍的に存在する細胞外の日和見病原体である。嚢胞性線維症、火傷、慢性気管支炎、気管支拡張症及び癌を患う主体では感染が特に重要である。

【0003】

20

ピー・アエルギノーザの成分について、免疫応答の同定、ワクチン候補の検索及び診断テストのための適当な成分の探索に関心が集中した。ピー・アエルギノーザの外膜はリポポリサッカライド内毒素、ホスホリピド及びタンパク質などの毒素を含んでいる。ピー・アエルギノーザの種々の外膜タンパク質 (Opr) はアルファベットによる命名システムで命名されてきた。幾つかのタンパク質がこのスキームにより特徴付けられてきたが、それらの一部のものの発現は一過性に過ぎず、栄養素の利用可能性、培養条件及び抗生物質の存在などに大きく左右される。今日、F、H2 及び I と呼ばれる 3 種の主要な Opr がピー・アエルギノーザのすべての株に共通な抗原として認識されておりそしてすべての株で高いコピー数で発現される。

【発明の開示】

30

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

ピー・アエルギノーザの新規抗原、ならびにその用途を見出すことが本発明の課題であった。

【課題を解決するための手段】

【0005】

本発明者らはピー・アエルギノーザの外膜調製物から一つのタンパク質を今回同定し、Pa60 と命名した。このタンパク質のアミノ-末端配列はこれまでに特性が解明された他のタンパク質のどれとも配列相同性を示さない (ゲンバンク・データの調査)。このタンパク質は抗原性であり、ピー・アエルギノーザのクリアランス (浄化値) の上昇をもたらす保護的免疫応答を誘発することができる。

40

【発明の効果】

【0006】

本発明によれば、ピー・アエルギノーザの新規抗原性タンパク質が提供され、これを用いてピー・アエルギノーザを検出することができ、対象における保護的免疫応答を誘発することもできる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0007】

このようにして、本発明は第 1 の側面で、ピー・アエルギノーザ由来のタンパク質抗原であって、SDS-PAGE で測定したとき約 60 kDa から約 65 kDa の範囲の分子

50

量を持つタンパク質抗原を提供する。

【0008】

好ましい態様では、このタンパク質は配列番号：1に記載の下記のN-末端配列：
 ? - E - E - K - ? - ? - L - ? - ? - ? - ? - ? - ? - V - V - ? - N - A、
 を持っており、そして、好ましくは配列番号：2に記載の下記のN末端配列：
 ? - E - E - K - T - P - L - T - T - A - A - ? - A - P - V - V - ? - N - A。
 を持っている。

?は不明のアミノ酸を表し、X a aとも表示される。

【0009】

この全タンパク質の一部又は断片はそれ自体抗原であり得る。従って、第2の側面では本発明は本発明のタンパク質の抗原性断片を提供する。特に、この抗原性断片は上記のようなN-末端配列を含むものである。

10

【0010】

熟練者はその抗原性をなお維持させながらこの断片の配列に一部変更を加えることが可能であることを認めるであろう。この断片及び/又はこの断片の変異体 (variants) を抗原性についてテストするには熟練者に良く知られた方法を使用することができる。このような変異体も本発明の一部を構成する。

【0011】

本発明の抗原性タンパク質又はその断片は精製調製物又は単離調製物として単独で提供することも、あるいは他のピー．アエルギノーザの抗原性タンパク質との混合物の一部として提供することもできる。

20

【0012】

従って、第3の側面において本発明は、本発明のタンパク質の一つ以上及び/又はその抗原性断片の一つ以上を含む抗原組成物を提供する。このような組成物はピー．アエルギノーザの検出及び/又は診断に使用することができる。一つの態様では、この組成物は付加的なピー．アエルギノーザ抗原の一つ以上を含んでいる。

【0013】

第4の側面では、本発明はピー．アエルギノーザを検出及び/又は診断する方法であって、

(a) 本発明の抗原性タンパク質、又はその抗原性断片、又は抗原組成物をテスト対象である試料と接触させる工程、及び

30

(b) ピー．アエルギノーザに対する抗体の存在を検出する工程、
 を含む方法を提供する。

【0014】

特に、本発明のタンパク質、その抗原性断片又は抗原組成物はIgG抗体を検出するために使用することができる。テスト対象の試料としては、生物試料、例えば、血液又は唾液の試料が適当である。

【0015】

第5の側面では、本発明はピー．アエルギノーザの検出及び/又は診断における本発明の抗原性タンパク質、その抗原性断片又は抗原性組成物の使用を提供する。その検出及び/又は診断はイン・ビトロで行うことが好ましい。

40

【0016】

本発明の抗原性タンパク質、その抗原性断片又は抗原組成物はピー．アエルギノーザのイン・ビトロにおける検出及び/又は診断に使用するためのキットの一部として提供することができる。こうして、第6の側面では、本発明はピー．アエルギノーザの検出及び/又は診断に使用するためのキットであって、本発明の抗原性タンパク質、その抗原性断片又は抗原組成物を含むキットを提供する。

【0017】

さらに、本発明の抗原性タンパク質又はその抗原性断片はピー．アエルギノーザに対する免疫応答を誘発するために使用することができる。こうして、さらなる側面で、本発明

50

は医薬品における本発明の抗原、その断片又は本発明の抗原性組成物の使用を提供する。

【0018】

一層さらなる側面では、本発明は主体において免疫応答を惹き出すことができる組成物であって、本発明のタンパク質又はその抗原性断片の一つ以上を含む組成物を提供する。この組成物はワクチン組成物であることが適当であり、必要があれば一つ以上の適当なアジュバントを含んでもよい。このようなワクチン組成物は予防的なワクチン組成物でも治療的なワクチン組成物であってもよい。

【0019】

本発明のワクチン組成物は一つ以上のアジュバントを含むことができる。当技術分野で良く知られたアジュバントの例としては、水酸化アルミニウムなどの無機ゲルやフロイントの不完全アジュバントなどの油中水エマルションが挙げられる。他の有用なアジュバントは熟練者に良く知られている。

【0020】

一層さらなる側面では、本発明は、

(a) 免疫原性組成物、好ましくはワクチンの調製における、本発明のタンパク質又はその抗原性断片の一つ以上の使用、

(b) 主体に免疫応答を誘発させるための、このような免疫原性組成物の使用、及び

(c) 主体におけるピー・アエルギノーザ感染の治療又は予防方法であって、本発明のタンパク質、抗原性断片の少なくとも一つ又は抗原組成物の有効量を、好ましくはワクチンとして、主体に投与する工程を含む方法、

を提供する。

【0021】

本発明の各側面の好ましい特性は必要な変更を加えて他の側面のそれぞれにも成り立つ。

【0022】

本発明は下記の実施例を参照してここに記述されるが、これらの実施例はいかなる意味でも本発明を制限するものと解すべきではない。

【0023】

実施例は図1を参照する。図1は、Pa60のSDS-PAGE分析を示す。

【実施例1】

【0024】

実施例1：タンパク質の精製

シュードモナス アエルギノーザ細菌、株385 (Pa385) を100枚の寒天平板の一晚培養物から平板をこすって収穫し、その後、4 で 10,000 × g、10分の遠心分離により2回洗浄した。緩衝化両性3-14洗剤での外膜成分の抽出及びエタノール沈澱により外膜の粗調製物を得た。

【0025】

この外膜抽出物を凍結乾燥しそして出発緩衝液 (20mM トリス、pH 8.5) に再懸濁した。この調製物をQ2 カラム (バイオラド) と塩化ナトリウム勾配を用いるアニオン交換クロマトグラフィーにかけてタンパク質を溶出させた。カラムから溶出した画分を分析用SDS-PAGEでタンパク質含量をまず測定した。これからPa60の溶出プロフィールを決定した。このプロフィールは引き続き行うクロマトグラフィー処理からPa60を含む画分を集めてさらに精製することを可能とした。これらの画分を蒸留水に対して透析し、凍結乾燥し、最少量の蒸留水に再懸濁し、そしてさらにドデシル硫酸ナトリウム (SDS) 還元性緩衝液 (62.5mM トリス、pH 6.8、10% (v/v) グリセロール、2% (w/v) SDS、5% (v/v) -メルカプトエタノール、 1.2×10^{-3} % (w/v) プロモフェノール・ブルー) の4倍容量中に溶解した。このSDS調製物を37 で少なくとも30分間インキュベートした後、電気泳動カラムのスタッピングゲルの上に載せた。

【0026】

Pa60は調製用ポリアクリルアミド電気泳動 (PAGE) を用いて精製した。調製用

10

20

30

40

50

S D S - P A G E はバイオラド・モデル 4 9 1 プレップ・セルを用い、9 % T - 1 . 4 2 % C アクリルアミド / ビス (N , N ' - メチレン - ビスアクリルアミド) 分離用ゲルと 2 8 m m (内径) カラム中で重合させた 1 0 m l の 4 % T - 0 . 3 6 % C アクリルアミド / ビス・スタッピングゲルとを用いて行った。このカラムから溶出した画分を凍結乾燥により濃縮し、分析用 S D S - P A G E によりタンパク質含量を分析した。この条件を用いて単離した P a 6 0 は S D S を含んでおり、これは引き続いて行ったリン酸カリウム沈澱により除去した。P a 6 0 を含む画分をプールし、透析した後、タンパク質濃度を測定した。

【 0 0 2 7 】

このタンパク質の分析的同定は、勾配 1 0 ~ 1 5 % か又は均一な 1 2 . 5 % かのアクリルアミドゲル及びクーマシー染色又は銀染色を用いる分析用 S D S - P A G E により実施した。タンパク質濃度はピアス・マイクロ・B C A 検定を用いて測定した。

10

【 0 0 2 8 】

結果

P a 6 0 は、上記の方法により、他のピー・アエルギノーザ・タンパク質からの分離に成功した。図 1 はこのタンパク質の S D S - P A G E 上の位置を示す。

【 実施例 2 】

【 0 0 2 9 】

実施例 2 : P a 6 0 の N - 末端の配列決定

N - 末端アミノ酸分析を行うため、P a 6 0 は S D S - P A G E ゲルからこのタンパク質を含む領域を切り取ることにより調製した。このゲル部分をオーストラリア国、キャンベラにある、オーストラリアン・ナショナル・ユニバーシティのバイオモレキュラー・リソース・ファシリティー及びオーストラリア国、NSW、ノース ライドにあるマクオリー・ユニバーシティの M U C A B ・サービシーズの両方に送付した。

20

【 0 0 3 0 】

結果

一つの N - 末端アミノ酸配列が得られ、その最初の 1 9 個のアミノ酸のうちの 1 6 個が同定された。残りの残基については、可能性がある (possible) アミノ酸が同定された。確度が高い同定 (probable identification) については不確実さが残る。

30

【 0 0 3 1 】

配列 :

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
確定		E	E	K			L			
確度が高い					T	P		T	T	A
可能性がある	S				A	L/S		A	I/D	W

	11	12	13	14	15	16	17	18	19
確定					V	V		N	A
確度が高い	A		A	P					
可能性がある	F/L	G/S	N	D					

40

【 0 0 3 2 】

これは配列番号 : 1 に記載の下記の確定したアミノ酸を持つ一つの配列を提供する。

1 - 2 - 3 - 4 - 5 - 6 - 7 - 8 - 9 - 10 - 11 - 12 - 13 - 14 - 15 - 16 - 17 - 18 -
 ? - E - E - K - ? - ? - L - ? - ? - ? - ? - ? - ? - ? - V - V - ? - N -
 19
 A

【 0 0 3 3 】

確度の高いアミノ酸を含めると、配列番号 : 2 に記載の下記の配列が得られる。

50

1 - 2 - 3 - 4 - 5 - 6 - 7 - 8 - 9 - 10 - 11 - 12 - 13 - 14 - 15 - 16 - 17 - 18 -
 ? - E - E - K - T - P - L - T - T - A - A - ? - A - P - V - V - ? - N -
 19
 A

? は不明のアミノ酸を表し、X a aとも表示される。

【実施例 3】

【0034】

実施例 3：免疫処置後のラットモデルにおける細菌のクリアランス

S P F (specific pathogen free) 雄ラットに、第 1 日目にパイアー斑内 (intra-Peyer's patch (IPP)) 免疫処置を行い、そして生細菌のチャレンジを 14 日目に行った。これらの動物を麻酔で鎮静化した。腹部中央線切開により小腸を露出させ、27 - ゲージの針を用いてパイアー斑のそれぞれにこの抗原を漿膜下に注射した。この免疫処置用のタンパク質 (Pa60) をフロイントの不完全アジュバント (IFA) とリン酸緩衝化食塩水 (PBS) の 1 : 1 比の中に ml 当たり 200 又は 800 μ g のタンパク質を乳化させることにより調製し、そして各動物に総接種量それぞれ 10 又は 40 μ g のタンパク質を投与した。動物は免疫処置後 14 日目に生細菌 (細菌数 5×10^8 CFU) で 4 時間チャレンジした。細菌はニュートリエント・アガー平板上で 5% CO₂ 中、37 で一晩生育させ、回収し、洗浄し、そして PBS 中に所望の濃度で再懸濁した。細菌は気管内カニューレにより肺内に導入し、そして 4 時間後にそのラットを安楽死させた。血液を集め、血清の部分標本を抗体分析のため - 20 で貯蔵した。肺を 5 x 2 ml の PBS で灌流することにより洗浄し、そして貯めた洗浄液 (BAL) について細菌の数を測定した。肺洗浄に続いて、その肺を切除し、ホモジナイズして、細菌の数を測定した。肺洗浄中の細胞百分率数を測定するため、サイトスピンスライド (cytospin slides) を調製した。肺洗浄中に存在する総細胞数はトリパン・ブルーでの染色及び血球計を用いるカウントにより計算した。

【0035】

結果

Pa60 で免疫化されそして Pa385 相当株の生細菌で 14 日目にチャレンジされたラットは細菌クリアランスの上昇を示した。10 μ g 又は 40 μ g の Pa60 で免疫化されたラットは両方とも、4 時間後に BAL と肺の両方で回収された細菌の数は非 - 免疫グループよりも少なかった (表 1)。

【0036】

Pa60 で免疫化された動物の BAL 中にはより多くの数の食細胞が存在し、これらの動物における細菌クリアランスの上昇と相関していた (表 2)。

【表 1】

表 1：Pa60 での免疫化及びピー・アエルギノーザ (株 385) でのチャレンジ後の肺のクリアランス

ラットグループ	n ^a	チャレンジ後 4 時間で回収された ピー・アエルギノーザ (\log_{10} CFU) ^a	
		BAL	肺ホモジネート
非 - 免疫	5	7.63 \pm 0.11	8.66 \pm 0.18
10 μ g Pa60	6	6.95 \pm 0.07	8.43 \pm 0.09
40 μ g Pa60	4	7.19 \pm 0.07	8.37 \pm 0.19

10

20

30

40

50

【表 2】

表 2：細菌チャレンジ後のBAL中における食細胞の細胞数

動物グループ	BAL中の総食細胞
非-免疫	$1.2 (\pm 0.3) \times 10^6$
10 μ g Pa60	$4.3 (\pm 1.2) \times 10^6$
40 μ g Pa60	$7.4 (\pm 1.7) \times 10^6$

10

【実施例 4】

【0037】

実施例 4：臨床診断的研究

メルボルンのロイヤル・チルドレンズ・ホスピタルから膿疱性線維症と診断された子供達から、この研究のための試料が提供された。気管支肺胞洗浄 (BAL) と血清を幼児で診断された時からの患者から 3 ~ 4 年の期間にわたって集めた。これらの試料はピー・アエルギノーザの臨床状態に基づいてグループに分けられた。

20

【0038】

グループ 1：膿疱性線維症でない対照 (喘音を持つ子供達の年齢に合わせる)、

グループ 2：ピー・アエルギノーザについては陰性、

グループ 3：上部呼吸器でピー・アエルギノーザを単離、下部呼吸器ではピー・アエルギノーザは陰性、

グループ 4：下部呼吸器ではピー・アエルギノーザは浄化 (次の BAL 試料では陰性)、そして

グループ 5：連続した BAL 試料中でピー・アエルギノーザが陽性。

【0039】

BAL 試料及び血清試料中の Pa60 に対する抗体を測定するため、酵素結合イムノソルベント検定法 (ELISA) を使用した。ポリソルブ・マイクロタイター・ウエルを 1 μ g/ml の濃度の精製 Pa60 で被覆した。このプレートはインキュベーションの各工程の間に 0.05% のトウィーン 20 を含む PBS で 5 回洗浄した。このウエルを PBS - 0.05% トウィーン 20 中のスキムミルクで 60 分間ブロックした。ウエルを分析のためブロッキング緩衝液で希釈した血清試料又は BAL 試料と共に 90 分間インキュベートした。使用した複合免疫グロブリンはラビット・抗 - ヒト IgG、IgA 及び IgM であった。ウエルは複合免疫グロブリンと共に 90 分間インキュベートした。ついでこのプレートを発色させた。ヒト IgG、IgA 及び IgM は抗体を定量するために使用した。

30

【0040】

結果

ピー・アエルギノーザ感染が発生すると、抗体タイターの増加が観察された。膿疱性線維症でない対照グループ及び非感染の膿疱性線維症患者は Pa60 に対するタイターが無視できるほどであった。Pa60 に対する IgG のタイターの増加が、特に、BAL から連続的にピー・アエルギノーザが培養された患者 (グループ 5) で観察された。この BAL では IgA タイターの有意の増加が観察された。

40

【表 3】

表 3：膿疱性線維症の子供及び膿疱性線維症でない子供からの血清及び気管支肺胞洗浄における P a 6 0 - 特異的抗体

患者	血清*			BAL*		
	IgG	IgA	IgM	IgG	IgA	IgM
グループ 1	1.74	0.11	0.67	0.03	0.05	0.02
グループ 2	1.40	2.34	2.10	0.03	0	0.02
グループ 3	7.08 ±8.4	10.9 ±18	2.03 ±2.5	0.03 ±0.01	0.21 ±0.13	0.03 ±0.01
グループ 4	18.9 ±21.9	0.56 ±0.6	1.46 ±2.07	0.02 ±0.01	0.12 ±0.04	0.01 ±0.01
グループ 5	54.5 ±76	7.5 ±12.5	6.2 ±0.5	0.03 ±0.01	0.81 ±0.30	0.03 ±0.01

10

20

【実施例 5】

【0041】

実施例 5：P a 6 0 でラットを粘膜免疫化した後シュードモナス・アエルギノーザで肺にチャレンジ。

小腸のパイアー斑 (IPP) に $10 \mu\text{g}$ の P a 6 0 を投与して D A ラットを P a 6 0 で免疫化した。この P a 6 0 はフロイントの不完全アジュバントで乳化して送達した。IPP 後 14 日目に、免疫化したラット全てにリン酸緩衝化食塩水中の P a 6 0 の $10 \mu\text{g}$ で気管内 (IT) ブーストを行った。IT ブースト後 7 日目に、免疫グループと未処置対照グループに IT を介して 5×10^8 CFU のピー・アエルギノーザ生菌を投与してチャレンジした。チャレンジ後 4 時間でこのラットを殺しそして分析用に試料を集めた。

30

【0042】

結果

細菌のクリアランス

【表 4】

表 4. 気管支肺胞洗浄 (BAL) 及び肺組織中での細菌回収

グループ	n ⁺	細菌回収 (log ₁₀ CFU) *	
		BAL	肺
非-免疫	5	7.92 ± 0.11	9.01 ± 0.15
10 μg P a 6 0	5	6.34 ± 0.08	7.58 ± 0.08

40

* データは平均値 ± S. E. M. として表した。

+ 動物の数。

【0043】

14 日目に IT ブーストを行った IPP 免疫化ラットは、BAL 及び肺組織の両方から

50

ピー・アエルギノーザを有意にクリア（浄化）した。

【 0 0 4 4 】

感染に対する白血球の補強

【表 5】

表 5. BALにおける白血球のカウント

グループ	n	白血球数* $\times 10^6$
非-免疫	5	6.8 ± 1.4
10 μ g Pa60	5	36.0 ± 5.0

10

* データは平均値 ± S. E. M. を表す。

【 0 0 4 5 】

Pa60で免疫化したラットは、細菌チャレンジの後、より急速に肺に白血球を補強した。BAL中で回収された白血球のほとんど全ては多形核好中球（PMNs）か又はマクロファージであった。気管支肺胞空間への白血球の初期補強は細菌のクリアランスと関連した。

20

【 0 0 4 6 】

抗体応答

【表 6】

表 6. Pa60で粘膜免疫化した後の血清中の抗体

グループ	n	血清中の抗体		
		IgG*	IgA*	IgM *
非-免疫	5	0	0	14.8 ± 0.56
10 μ g Pa60	5	1310 ± 119	10 ± 2	100 ± 59

30

* IgG、IgA及びIgMはイライザ・ユニット（ELISA unit）として表した。

【 0 0 4 7 】

Pa60に対する血清抗体が免疫化したラット中で検出された。IgG、IgA及びIgMの有意のタイターが認められた。

40

【表 7】

表 7. Pa 60 で粘膜免疫化した後のBAL中の抗体

BAL中の抗体				
グループ	n	IgG*	IgA*	IgM*
非-免疫	5	1.5 ± 0.2	0	0.5 ± 0.02
10 μg Pa60	5	21.3 ± 2.6	7.8 ± 4.2	0.8 ± 0.3

10

* IgG、IgA及びIgMはイライザ・ユニットとして表した。

【0048】

Pa 60 に対する抗体は免疫化した動物のBAL中で検出された。

Pa 60 に特異的なIgGとIgAの両方で有意のタイターが認められた。

【産業上の利用可能性】

【0049】

本発明は、診断試薬の製造の分野、免疫療法の医薬の分野、感染の研究の分野などに利用できる。 20

【図面の簡単な説明】

【0050】

【図 1】 図 1 は、Pa 60 のSDS-PAGE分析を示す。

【図 1】

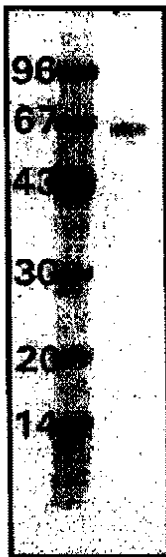


FIG. 1

【配列表】

2009029825000001.app

フロントページの続き

- (72)発明者 アラン・ウィリアム・クリップス
オーストラリア国、エイシーティー 2601、キャンベラ、ユニバーシティ オブ キャンベラ
、ファカルティ オブ アプライド サイエンス
- (72)発明者 ジャネル・キッド
オーストラリア国、エイシーティー 2601、キャンベラ、ユニバーシティ オブ キャンベラ
、ファカルティ オブ アプライド サイエンス
- (72)発明者 マーガレット・ダンクリー
オーストラリア国、ニューカッスル 2300、キング アンド ワット ストリート、デイビッド
マディソン ビルディング、レベル 4、オーストレイリアン インスティテュート オブ
ミュコサル イミュノロジー
- (72)発明者 ロバート・リューリン・克蘭シー
オーストラリア国、ニューカッスル 2300、ワット ストリート、ロイヤル ニューカッスル
ホスピタル、ユニバーシティ オブ ニューカッスル、デパートメント オブ パソロジー
- Fターム(参考) 4C085 AA03 BA19 CC07 CC21 DD23 DD34 DD41 DD84
4H045 AA11 AA30 CA11 DA86 EA31 EA52 EA54 FA74

专利名称(译)	抗原		
公开(公告)号	JP2009029825A	公开(公告)日	2009-02-12
申请号	JP2008243780	申请日	2008-09-24
[标]申请(专利权)人(译)	堪培拉大学 堪培拉UNIV		
申请(专利权)人(译)	堪培拉大学		
[标]发明人	アランウイリアムクリップス ジャーネルキッド マーガレットダンクリー ロバートリュウリンクランシー		
发明人	アラン・ウイリアム・クリップス ジャーネル・キッド マーガレット・ダンクリー ロバート・リュウリン・クランシー		
IPC分类号	A61K39/104 C07K14/21 G01N33/53 G01N33/569 A61K39/00 A61P31/04 A61P37/00		
CPC分类号	C07K14/21 A61K39/00 Y10S435/975 Y10S530/825		
FI分类号	A61K39/104 C07K14/21.ZNA G01N33/53.N G01N33/569.F		
F-TERM分类号	4C085/AA03 4C085/BA19 4C085/CC07 4C085/CC21 4C085/DD23 4C085/DD34 4C085/DD41 4C085/DD84 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/CA11 4H045/DA86 4H045/EA31 4H045/EA52 4H045/EA54 4H045/FA74		
代理人(译)	田中，三夫 山崎 宏 富田健二		
优先权	1997001489 1997-01-24 GB		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：寻找铜绿假单胞菌的新抗原及其用途。 解决方案：根据权利要求1的蛋白质抗原，其具有SEQ ID NO：2 (Xaa-EEKTPLTTAA-Xaa-APVV-Xaa-NA) 中描述的N-末端序列，使用蛋白质抗原检测铜绿假单胞菌，诱导受试者的免疫反应。 【选择图】无

ラットグループ	n ¹	チャレンジ後4時間で回収された ヒ- アエルギノーザ (log ₁₀ CFU) ^a	
		BAL	肺ホモジネート
非-免疫	5	7.63±0.11	8.66±0.18
10μg Pa60	6	6.95±0.07	8.43±0.09
40μg Pa60	4	7.19±0.07	8.37±0.19