

(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2005-514052

(P2005-514052A)

(43) 公表日 平成17年5月19日(2005.5.19)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	Z N A A 4 B O 2 4
A 6 1 K 39/09	A 6 1 K 39/09	4 B O 5 0
A 6 1 K 39/39	A 6 1 K 39/39	4 B O 6 3
A 6 1 K 39/395	A 6 1 K 39/395	D 4 B O 6 5
A 6 1 P 11/00	A 6 1 K 39/395	R 4 C O 8 5
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 48 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2003-559417 (P2003-559417)	(71) 出願人	501231864
(86) (22) 出願日	平成14年12月16日 (2002.12.16)		チルドレンズ ホスピタル アンド レジ オナル メディカル センター
(85) 翻訳文提出日	平成16年8月23日 (2004.8.23)		アメリカ合衆国 ワシントン 98105 -0371シアトル サンド ポイント
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/040340		ウェイ ノースイースト 4800
(87) 国際公開番号	W02003/059252	(74) 代理人	100100549
(87) 国際公開日	平成15年7月24日 (2003.7.24)		弁理士 川口 嘉之
(31) 優先権主張番号	60/344, 605	(74) 代理人	100090516
(32) 優先日	平成13年12月21日 (2001.12.21)		弁理士 松倉 秀実
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100089244
			弁理士 遠山 勉

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 B群連鎖球菌の新規の細胞表面プロテアーゼの使用

(57) 【要約】

本発明は、G B S 感染を予防するためのワクチンとしての、C s p A と呼ばれる B 群連鎖球菌 (G B S) の新規の細胞表面プロテアーゼタンパク質の使用に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 2 を有する B 群連鎖球菌 (Streptococcus) の CspA プロテアーゼをコードするアミノ酸配列を含むポリペプチド配列、その類似体、ホモログ、誘導体、免疫学的関連ポリペプチド、または少なくとも 1 つの免疫原性エピトープを含有するそれらのフラグメントを薬学的有効量含むワクチンであって、該量は、薬学的に許容可能な賦形剤と組合せたときに感受性哺乳類における B 群連鎖球菌または関連細菌の感染を予防するか、または該感染の重篤度を改善するのに有効な量であるワクチン。

【請求項 2】

アジュバントをさらに含む請求項 1 記載のワクチン。

10

【請求項 3】

前記哺乳類はヒトである請求項 1 記載のワクチン。

【請求項 4】

前記哺乳類はウシである請求項 1 記載のワクチン。

【請求項 5】

配列番号 2 を有する B 群連鎖球菌の CspA プロテアーゼ、その類似体、ホモログ、誘導体、免疫学的関連ポリペプチドまたはフラグメントが、プレ-プロドメインまたはその類似体、ホモログ、誘導体、フラグメントまたはそれらの多量体である、請求項 1 記載のワクチン。

【請求項 6】

配列番号 2 を有する B 群連鎖球菌の CspA プロテアーゼ、その類似体、ホモログ、誘導体、免疫学的関連ポリペプチドまたはフラグメントが、プロテアーゼドメインまたはその類似体、ホモログ、誘導体、フラグメントまたはそれらの多量体である請求項 1 記載のワクチン。

20

【請求項 7】

配列番号 2 を有する B 群連鎖球菌の CspA プロテアーゼ、その類似体、ホモログ、誘導体、免疫学的関連ポリペプチドまたはフラグメントが、A ドメインまたはその類似体、ホモログ、誘導体、フラグメントまたはそれらの多量体である、請求項 1 記載のワクチン。

【請求項 8】

配列番号 2 を有する B 群連鎖球菌の CspA プロテアーゼ、その類似体、ホモログ、誘導体、免疫学的関連ポリペプチドまたはフラグメントが、細胞壁スペーサードメインまたはその類似体、ホモログ、誘導体、フラグメントまたはそれらの多量体である、請求項 1 記載のワクチン。

30

【請求項 9】

配列番号 2 を有する B 群連鎖球菌の CspA プロテアーゼ、その類似体、ホモログ、誘導体、免疫学的関連ポリペプチドまたはフラグメントが、細胞壁アンカードメインまたはその類似体、ホモログ、誘導体、フラグメントまたはそれらの多量体である、請求項 1 記載のワクチン。

【請求項 10】

配列番号 2 を有する B 群連鎖球菌の CspA プロテアーゼをコードするアミノ酸配列を含むポリペプチド配列、その類似体、ホモログ、誘導体、免疫学的関連ポリペプチド、または少なくとも 1 つの免疫原性エピトープを含有するフラグメントをコードする DNA 配列を含むポリヌクレオチド配列を薬学的有効量含むワクチンであって、該量は、薬学的に許容可能な賦形剤と組合せたときに感受性哺乳類における B 群連鎖球菌または関連細菌の感染を予防するか、または該感染の重篤度を改善するのに有効な量であるワクチン。

40

【請求項 11】

前記 DNA 配列は配列番号 1 から選択される請求項 10 記載のワクチン。

【請求項 12】

配列番号 2 を有する B 群連鎖球菌の CspA プロテアーゼをコードするアミノ酸配列を含むポリペプチド配列、その類似体、ホモログ、誘導体、免疫学的関連ポリペプチド、また

50

は少なくとも1つの免疫原性エピトープを含有するフラグメントをコードするDNA配列を含むポリヌクレオチド配列であって、前記DNA配列は配列番号1から選択されるポリヌクレオチド配列。

【請求項13】

配列番号1を有するcspAの少なくとも約6個連続したヌクレオチドと相補的な配列を有するオリゴマーを含む精製されたポリヌクレオチド配列。

【請求項14】

請求項13記載の精製されたポリヌクレオチド配列を含むプローブ。

【請求項15】

請求項13記載の精製されたポリヌクレオチド配列を含むプライマー。

10

【請求項16】

B群連鎖球菌または関連細菌の感染に対する感受性哺乳類の防御方法であって、該哺乳類に、請求項1～11のいずれか1項に記載のワクチンを薬学的有効量投与することを含む方法。

【請求項17】

B群連鎖球菌または関連細菌の感染に対する感受性哺乳類の防御のための薬剤の調製のための請求項1～11のいずれか1項に記載のワクチンの使用。

【請求項18】

CspAプロテアーゼ、その免疫学的関連ポリペプチドおよびそれらのフラグメントの製造方法であって、

20

(a) 前記ポリペプチドまたはフラグメントをコードするDNA配列及び該DNA配列に作動可能に連結された1つまたは複数の発現制御配列を含有するベクターでトランスフェクトされた単細胞宿主生物体を培養する工程と、

(b) 実質的に純粋なポリペプチドまたはフラグメントを回収する工程とを包含する方法。

【請求項19】

請求項18記載の精製されたベクター。

【請求項20】

請求項18記載の単細胞宿主生物体。

【請求項21】

30

CspAと免疫学的に反応性であるかまたはCspAと特異的に結合する精製された抗CspA抗体。

【請求項22】

B群連鎖球菌または関連細菌の感染に対する感受性哺乳類の防御方法であって、薬学的有効量の精製された抗CspA抗体を前記哺乳類に投与することを含み、該量は感受性哺乳類におけるB群連鎖球菌または関連細菌の感染を予防するか、または該感染の重篤度を改善するのに有効な量である方法。

【請求項23】

B群連鎖球菌または関連細菌の感染に対する感受性哺乳類の防御のための薬剤の調製のための精製された抗CspA抗体の使用。

40

【請求項24】

生物学的試料中のB群連鎖球菌または関連細菌の検出方法であって、

(a) 患者から前記生物学的試料を単離する工程と、

(b) 精製された抗CspA抗体またはそのフラグメントを前記生物学的試料とともにインキュベートして、混合物を形成させる工程と、

(c) 前記混合物中の、B群連鎖球菌または関連細菌の存在を示す特異的に結合した抗体またはフラグメントを検出する工程と

を包含する方法。

【請求項25】

生物学的試料中のB群連鎖球菌または関連細菌に特異的な抗体の検出方法であって、

50

(a) 患者から生物学的試料を単離すること、
 (b) 配列番号 2 を有するポリペプチドまたはそのフラグメントを前記生物学的試料とともにインキュベートして、混合物を形成させること、および
 (c) 前記混合物中の、B 群連鎖球菌または関連細菌の存在を示す特異的に結合したポリペプチドを検出すること
 を包含する方法。

【請求項 26】

生物学的試料中の B 群連鎖球菌または関連細菌の検出方法であって、

(a) 患者から生物学的試料を単離する工程と、
 (b) 配列番号 1 を有する DNA プロブまたはそのフラグメントを前記生物学的試料とともにインキュベートして、混合物を形成させる工程と、
 (c) 前記混合物中の B 群連鎖球菌または関連細菌の存在を示す特異的に結合した DNA プロブを検出する工程と
 を包含する方法。 10

【請求項 27】

C s p A 遺伝子に C s p A プロテアーゼの発現を破壊する突然変異を含む弱毒化 B 群連鎖球菌微生物。

【請求項 28】

薬学的有効量の請求項 27 記載の弱毒化 B 群連鎖球菌微生物を含むワクチンであって、該量は、薬学的に許容可能な賦形剤と組合せたときに感受性哺乳類における B 群連鎖球菌感染を予防するか、または該感染の重篤度を改善するのに有効な量であるワクチン。 20

【請求項 29】

B 群連鎖球菌または関連細菌の感染に対する感受性哺乳類の防御方法であって、該哺乳類に、請求項 28 に記載のワクチンを薬学的有効量投与することを包含する方法。

【請求項 30】

B 群連鎖球菌感染に対する感受性哺乳類の防御のための薬剤の調製のための請求項 28 に記載のワクチンの使用。

【請求項 31】

C s p A の一部分を免疫学的に模倣するペプチドの単離方法であって、 30
 (a) 前記 C s p A と反応性である防御抗体を同定する工程と、
 (b) フェージを有するフェージディスプレイライブラリを前記工程 (a) で同定された 1 つまたは複数の防御抗体と接触させる工程と、
 (c) 前記 1 つまたは複数の防御抗体と結合する提示されたペプチドを有する 1 つまたは複数のフェージを単離する工程と、
 (d) 前記工程 (c) で単離された全てのフェージに関して、前記抗体が結合したペプチドまたはペプチドフラグメントを選択する工程と
 を包含する方法。

【請求項 32】

G B S に対する免疫防御的応答を誘導する模倣ペプチドであって、C s p A と特異的に結合する抗体と特異的に結合する模倣ペプチド。 40

【請求項 33】

G B S に対する免疫防御的応答を誘導する模倣ペプチドであって、C s p A と特異的に結合する抗体と特異的に結合するペプチドと、薬学的に許容可能な担体とを含むワクチン。

【請求項 34】

G B S に対する免疫防御的応答を誘導する模倣ペプチドであって、C s p A と特異的に結合する抗体と特異的に結合するペプチドと、薬学的に許容可能な担体とを含むワクチンを、患者に免疫刺激量投与することを包含する患者の治療方法。

【請求項 35】

G B S に対する患者の防御のための薬剤の調製のための、G B S に対する免疫防御的応答 50

を誘導する模倣ペプチドの使用であって、該ペプチドはC s p Aと特異的に結合する抗体と特異的に結合することを特徴とする使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

[発明の分野]

本発明は、G B S感染を予防するためのワクチンとしての、C s p Aと呼ばれるB群連鎖球菌の新規の細胞表面プロテアーゼタンパク質の使用に関する。

【0002】

米国合衆国政府は、本発明における支払済みライセンスならびに、限られた状況において、合衆国国立衛生研究所により授与された補助金番号A I 3 0 0 6 8の条件により規定されるような妥当な条件で他者にライセンスするよう特許権者に求める権利を有する。 10

【0003】

[発明の背景]

ストレプトコッカスアガラクチエ (*Streptococcus agalactiae*) としても知られているB群連鎖球菌 (G B S) は、種々の症状の原因である。特にG B Sは、早発性新生児感染を引き起こす。

【0004】

この感染は通常は胎内で開始し、乳児に重症の敗血症、肺炎および髄膜炎を引き起こし、これは治療されない場合には致死的であり、そして治療された場合でも10~20%の死亡率を伴う。 20

【0005】

後発性新生児感染

この感染は、年齢約3ヶ月までの出生後早い時期に起こる。それは敗血症を引き起こし、90%の症例で髄膜炎を併発する。その他の局在性感染、例えば骨髄炎、敗血症性関節炎、膿瘍および眼内炎なども起こる。

【0006】

成人感染

これらは、増加の傾向があり、そして出産したばかりの女性、高齢者および免疫無防備状態者に最も高頻度で起こる。それらは、敗血症、および骨髄炎、敗血症性関節炎、膿瘍および眼内炎などの局在性感染症を特徴とする。 30

【0007】

尿路感染

G B Sは、尿路感染の一因であり、妊娠に際しては、全感染の10%を占める。

【0008】

獣医学的感染

G B Sは、ウシの慢性乳腺炎を引き起こす。これは次に、乳汁産生低減をもたらし、したがって経済的に少なからぬ重要性を有する。

【0009】

G B S感染は、抗生物質で治療され得る。しかしながら免疫感作が好ましい。したがって治療的有効ワクチンとして用いられ得る免疫原を開発するのが望ましい。 40

【0010】

[発明の概要]

本発明は、B群連鎖球菌 (G B S) 感染を予防するためのワクチンとしての、C s p Aと呼ばれるG B Sの新規の細胞表面プロテアーゼタンパク質の使用に関する。

【0011】

[好ましい実施形態の詳細な説明]

全てのB群連鎖球菌血清型により発現される新規のセリンプロテアーゼ様遺伝子 (c s p A) は連鎖球菌病毒性にとって重要である。

B群連鎖球菌 (G B S) は、重要なヒト病原体である。本試験において、その莢膜 (ca 50

psular)多糖のほかに宿主防御からGBSを保護し得るメカニズムを確認しようと試みた。細胞表面関連タンパク質(cspA)をコードする遺伝子(図1;配列番号1)は、高病毒性III型GBS単離物COH1から特性化された。その配列(図2;配列番号2)は、それが乳酸菌の連鎖球菌C5aペプチダーゼおよびカゼイナーゼと相同のサブチリシン様細胞外セリンプロテアーゼである、ということを示した。野生型株は、ヒトフィブリノーゲンの鎖を切断したが、一方、cspA変異体TOH121は、フィブリノーゲンを切断できなかった。COH1をフィブリノーゲンとともにインキュベートした場合、凝集物が見られたが、変異株を同様に処理した場合はそうならなかった。これは、フィブリノーゲン切断の生成物が強力な接着特性を有し、フィブリンと類似し得る、ということを示した。cspA遺伝子は、サザンブロッティングにより示されたように、9つの荚膜血清型の全てからの代表的臨床単離物に存在した。LD₅₀分析により測定した場合、cspA⁻変異体は、GBS感染の新生仔ラット敗血症モデルにおいて10分の1の病毒性であった。さらにcspA⁻変異体は、in vitroでのヒト好中球によるオプソニン食菌性死滅に対して、野生型株より有意に感受性であった。合わせて考えると、CspAによるフィブリノーゲンの切断は、オプソニン食菌性死滅から細菌を保護することによりGBS感染の致死率を増大し得る、ということの結果を示す。

10

【0012】

序論

B群連鎖球菌(GBS)は、重篤な新生児細菌感染の主因であり(Baker, C.J. Edwards, M.S. 1995 in: Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infant J.S. Remington & J.O. Klein, eds. Philadelphia: W.B. Saunders 980-1054)、新生児における敗血症および肺炎の最も一般的な原因である。GBSは、分娩後子宮内膜炎の有意の病因でもある。さらに、近年のデータは、成人、特に免疫無防備者における侵襲性感染の、増加している原因としてGBSを関連づけている(Farley, M.M. et al. 1993 N Engl J Med 328: 1807-1811)。

20

【0013】

細菌病原体は、非免疫宿主における細菌感染に対する防御の重要な最前線である先天性免疫系と闘うための様々な防御機構を進化させてきた。補体ならびに食細胞、例えば多形核白血球(PMN)およびマクロファージは、先天性免疫において主要な役割を演じる。多数のグラム陰性細菌、例えばエルシニアおよび緑膿菌(*Pseudomonas aeruginosa*)の抗食菌作用メカニズム(Ernst, J. 2000 Cellular Microbiology 2: 379-386)は、十分解析されている。しかしながら、グラム陽性病原体がどのようにして食菌メカニズムを免れるかについては、多くが依然として理解されていない。肺炎連鎖球菌(*Streptococcus pneumoniae*)株は、型特異的荚膜抗体の非存在下で、この細菌を補体沈着に耐性にさせる多糖荚膜を合成する(Dillard, J.P. et al. 1995 J Exp Med 181: 973-983)。さらに肺炎連鎖球菌株は、補体媒介性宿主防御の回避において機能し得るC3結合タンパク質を産生する(Cheng, Q. et al. 2000 Biochemistry 39: 5450-5457)。院内感染の主因であるエンテロコッカスフェカリス(*Enterococcus faecalis*)は、オプソニン食菌性死滅に対する耐性を提供する荚膜多糖を合成することが近年報告された(Hancock, L.E. & Gilmore, M.S. 2002 PNAS USA 99: 1574-1579)。A群連鎖球菌(GAS)株は、この免疫経路を回避するために多数のメカニズム、例えばMタンパク質(Ashbaugh, C. et al. 1998 J Clin Invest 102: 550-560)およびヒアルロン酸荚膜(Wessels, M.R. et al. 1991 PNAS USA 88: 8317-8321)を利用する。

30

40

【0014】

GBS荚膜は、GBSの最も明確に定義された病毒因子である。荚膜(capsule)は、型特異的荚膜抗体の非存在下で代替的補体経路の抑制を介して、C3によるオプソニン作用からGBSを保護する(Rubens, C.E. et al. 1987 PNAS USA 84: 7208-7212)。しかしながらGBSは、それをオプソニン食菌作用に対して耐性にさせる付加的因子を発現し得る。表面局在性連鎖球菌タンパク質はヒト補体H因子を結合し、そしてGBS-H因子複合体は補体活性をダウンレギュレートする能力を保有する、ということを経年の報告は

50

示した (Areschoug, T. et al. 2002 J Biol Chem 277: 12642-12648)。

【0015】

本発明は、オプソニン食菌性作用の回避により G B S 生存を促す新規の表面局在性セリンプロテアーゼ様遺伝子 (c s p A) である c s p A の同定を記載する。C s p A は、病原性連鎖球菌の C 5 a プロテアーゼ (Bohnsack, J.F. et al. 1991 Biochim Biophys Acta 1079: 222-228) ならびに非病原性グラム陽性球菌により発現されるカゼイナーゼ (Fernandez-Espla, M.D. et al. 2000 Appl Environ Microbiol 66: 4772-4778) を含むプロテアーゼの一ファミリーとの相同性を示す。驚くべきことに、C s p A は *in vitro* で C 5 a に対する酵素活性を有さず、c s p A 遺伝子の存在はカゼイン分解に必要でない、ということの本発明者らは観察した。しかしながら c s p A 遺伝子はヒトフィブリノーゲンの G B S による切断に必要であり、このことは、C s p A がプロテアーゼとして活性であることを示す。c s p A を発現できなかった変異体は、感染の新生仔ラットモデルにおける G B S 病毒性を有意に低減し、オプソニン食菌作用に対する感受性増大を示した。C s p A は、抗食菌性表面因子として G B S 病原において重要な役割を演じる新規の表面局在性プロテアーゼである、という証拠を本発明者らの知見は提供する。

10

【0016】

細菌株

C O H 1 は、元々は敗血症新生児の血液から単離された高被包性 (encapsulated) I I I 型 G B S である (Martin, T.R. et al. 1988 J Infect Dis 157: 91-100)。この研究に用いられたその他の G B S 臨床株は、以下のものを包含した：1 a 型 B 5 2 3 株 (Tamura, G.S. & Rubens, C.E. 1995 Mol Microbiol 15: 581-589)、A 9 0 9 株 (Tamura, G.S. & Rubens, C.E. 1995 Mol Microbiol 15: 581-589)、C h a n S 5 ; I b 型 D K 1 4 株、D K 1 5 株、8 0 - 4 8 1 株 ; I I 型 7 8 - 4 7 1 株 (Chmouryguina, I. et al. 1996 Infect Immun 64: 2387-2390) および D K 2 3 株 (Tamura, G.S. & Rubens, C.E. 1995 Mol Microbiol 15: 581-589) ; I I I 型 C O H 3 1 株 (Rubens, C.E. et al. 1987 PN AS USA 84: 7208-7212)、D 1 3 6 C 株 (Tamura, G.S. & Rubens, C.E. 1995 Mol Microbiol 15: 581-589)、M 7 8 1 株 (Tamura, G.S. & Rubens, C.E. 1995 Mol Microbiol 15: 581-589) ; I V 型 C N C T C 1 / 8 2 株 (Tamura, G.S. & Rubens, C.E. 1995 Mol Microbiol 15: 581-589)、V 型 B 2 0 1 株および C N C T C 1 0 / 8 4 株 (Tamura, G.S. & Rubens, C.E. 1995 Mol Microbiol 15: 581-589) ; V I 型 N T 6 株 (Tamura, G.S. & Rubens, C.E. 1995 Mol Microbiol 15: 581-589) ; V I I 型 8 7 - 6 0 3 株 ; V I I I 型 J M 9 株 (ミネソタ大学の Pat Ferrieri 氏の御好意により提供された)。C O H 1 - 1 3 は、C O H 1 の非莢膜性 T n 9 1 6 E 変異体である (Rubens, C.E. et al. 1993 Mol Microbiol 8: 843-855)。

20

30

【0017】

培地、化学物質および細菌株の培養

ルリアブロスおよびトッド - ヒューイトブロス (T H B) 中で、それぞれ大腸菌 (E. coli) および G B S を増殖させた。選択のための抗生物質の濃度を以下に示す：アンピシリン (Amp ; 7 5 μ g / m l)、エリスロマイシン (Erm ; 大腸菌用 4 0 0 μ g / m l および G B S 用 1 0 μ g / m l) またはクロラムフェニコール (Cam ; 1 0 μ g / m l)。ヒト血漿中での G B S の培養のために、同意後の健常ヒトドナーから、血漿を採取した。G B S を T H B 中で 0 . 6 の O D₆₀₀ に増殖させ、等容積の P B S で 2 回洗浄し、約 1 0 0 0 C F U / m l の濃度で血漿中に再懸濁した。次に 6 時間以上、増殖をモニタリングし、二重反復で希釈液をプレート化して、倍加時間を算定した。

40

【0018】

D N A および R N A 法

クローニング、シーケンシング、サザンブロットティング、ノーザンブロットティングおよび P C R 増幅に関する標準手法を利用した (Sambrook J.E. et al. 1989 Molecular Cloning: a Laboratory Manual Cold Spring Harbor, N.Y. Cold Spring Harbor Laboratory)。Yim の方法 (Yim, H.H. & Rubens, C.E. 1997 Biotechniques 23: 229-231) により、

50

R N A を単離した。メーカーの推奨 (Roche Molecular Bichemicals, Indianapolis, Indiana, USA) 通りに、ノーザンブロット手法のためにアンチセンス D I G 標識プローブを利用した。

【0019】

c s p A 遺伝子座の同定およびクローニング

まず、c s p A オープンリーディングフレームの一部分を、C O H 1 株の T n 9 1 6 E 変異体からのトランスポゾン挿入部位の分析により単離し、それを全 c s p A 遺伝子をクローン化するためのプローブとして用いた。C O H 1 ゲノム D N A のサザン分析を用いて、c s p A を保有する互いに重複する C l a I および X b a I 制限フラグメント (図 3) を同定し、標準技法を用いて p B S K S - (Stratagene; La Jolla, California, USA) 中にクローン化した。上記のプローブを用いてコロニーブロットにより、所望の G B S 挿入物を保持する大腸菌 D H 5 クローンを同定した。C l a I フラグメント (プラスミド p T H 2 を含有する T O H 3 7) または X b a I フラグメント (プラスミド p T H 5 を含有する T O H 5 0) を含有するクローンをさらに分析した。プラスミド p T H 5 上に存在するクローン化 c s p A 遺伝子は、野生型同質遺伝子型株 C O H 1 の染色体 c s p A 配列と比較して、自発性突然変異を含有する。この突然変異は、L e u - 1 1 2 1 で翻訳を成熟前に終結すると予測される。

10

【0020】

G B S における c s p A : : e r m 突然変異の構築

c s p A の対立遺伝子置換突然変異誘発を実施するために、本発明者らは、28 で複製するが、37 では複製しない広域宿主範囲プラスミドである p V E 6 0 0 7 に c s p A をサブクローニングした (Maguin, E. et al. 1992 J. Bacteriol 174: 5633-5638)。c s p A の 5 . 4 k b P C R 産物を C O H 1 ゲノム D N A から増幅して、B a m H I および X b a I で消化し、B a m H I / X b a I 消化 p V E 6 0 0 7 中にクローン化して、中間プラスミド p T H 1 9 を生じた。H i n d I I I 部位に隣接される約 3 . 6 k b の c s p A (C s p A ペプチド残基 3 2 3 ~ 1 5 3 6 に対応する) 配列を、その後、p C E R 1 0 0 0 からの e r m^r 遺伝子 (Rubens, C.E. & Heggen, L.M. 1988 Plasmid 20: 137-142) で置換した。最終構築物 p T H 2 1 を既報 (Framson, P.E. et al. 1997 Appl Environ Microbiol 63: 3539-3547) に記載のとおり C O H 1 中に形質転換させた。e r m^r エレメントによる c s p A の置換を保有する菌株を、(Yim, H.H. & Rubens, C.E. 1998 Methods in Cell Science 20: 13-20) に記載されたように、プラスミドを救済することにより得て、T O H 1 2 1 と名づけた。サザンブロッティングにより、染色体 T O H 1 2 1 上の所望の突然変異の存在を確認した。

20

30

【0021】

表現型および L D₅₀ 病毒性検定

細胞関連 I I I 型 G B S 莢膜 (Chaffin, D.O. et al. 2000 J Bacteriol 182: 4466-4477)、-ヘモリシン、C A M 因子 (Nizet, V. et al. 1996 Infect Immun 64: 3818-3826)、ヒアルロニダーゼ (Richman, P.G. & Baer, H. 1980 Aml Biochem 109: 376-381) およびヒプリカーゼ発現の分析を、(Ferrieri, P. et al. 1973 Infect Immun 7: 747-752) の記載どおりに実施した。カゼインザイモグラムゲル (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA、G B S 培養上清またはムタノリシン抽出物を使用) 中で T H B + 5 % ミルク寒天プレート上で一晚 G B S を増殖させることによるか、または静止期全細胞 G B S を精製プロテアーゼ検定等級カゼイン (Sigma, St. Louis, MO) とともにインキュベートすることにより、カゼイナーゼ活性を検定した。A 5 4 9 細胞単一層 (I I 型肺上皮細胞) の接着および侵襲検定を、(Winram, S.B. et al. 1998 Methods in Cell Science 20: 191-201) の記載どおりに実施した。個々の菌株の C 5 a プロテアーゼ活性を、ゼラチン被覆組織培養ウエルへのヒト P M S の C 5 a 刺激性接着を抑制する G B S の能力により、(Bohnsack, J.F. et al. 1991 Biochem J 273: 635-640) の記載どおりに決定した。同質遺伝子型 c s p A⁺ / - 株の病毒性を、前に記載された (Jones, A.L. et al. 2000 Molecular Microbiology 37: 1444-1455) ように L D₅₀ 分析により、致死 G B

40

50

S 感染の新生仔ラットモデルを用いて比較した；ウィルコクソン符号順位和検定を用いて、 LD_{50} データに関する統計学的分析を実施した。州、政府および中央政府の指針に従って、全動物を保持した。

【0022】

組換え C s p A - G S T 融合タンパク質産生および C s p A 抗体の生成

免疫原として用いるために、C s p A - G S T 融合タンパク質を構築した。クローニングのために B a m H I および S a l I 部位を組入れる以下のプライマー T C G G A T C C G C T A C T G C T C T A G T T (配列番号 3)、T T A A G T C G A C G T A A T G A T G C C T T G C T C T A (配列番号 4) を用いて、C O H 1 染色体 D N A から、推定触媒ドメインを欠く C s p A の C 末端部分を増幅した。プラスミド p G E X - 4 T - 3 (Amersham-Pharmacia Biosciences, Piscataway, NJ) を B a m H I および S a l I で消化し、同じく B a m H I および S a l I で消化された P C R 産物と結合させた。C s p A - G S T 融合タンパク質は封入体 (inclusion body) を形成した。可溶化、S D S - P A G E 後、C s p A をポリアクリルアミドゲルから切り出して、(Harlow, E. & Lane, D. 1988 . Antibodies, a Laboratory Manual Cold Spring Harbor , N.Y. Cold Spring Harbor Laboratory Press p. 68) の記載どおりにフラグメント化した。この調製物を用いて、融合タンパク質に対する抗体 (A b) を欠くことが前に示されているニュージーランドシロウサギを免疫感作した。

10

【0023】

C s p A のウエスタンブロット分析

浸透圧ショック手法 (Tanaka, T. & Weisblum, B. 1975 J Bacteriol 121: 354-362) により T O H 5 0 (プラスミド p T H 5 を保有する大腸菌 D H 5 ; 上記参照) のペリプラズムから C s p A を放出させた。ムタノリシンによる処理により G B S 細胞表面関連タンパク質を抽出し、S D S - P A G E に供した (Bohnsack, J.F. et al. 2000 Infect Immun 68: 5018-5025) 。タンパク質をイモビロン (Immobilon) - P (Millipore Inc., Bedford, Massachusetts, USA) に移行させた。第一抗体および第二ホースラディッシュペルオキシダーゼ結合抗体を、それぞれ 1 : 5 0 0 および 1 : 1 0 0 0 の希釈液で用いた。スーパーシグナル (SuperSignal) 試薬 (Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, Illinois, USA) を、ウエスタンブロットの化学発光検出のために利用した。

20

【0024】

フィブリノーゲン分解検定

フィブロネクチンおよびプラスミノゲンを欠失させた精製ヒトフィブリノーゲンを、Enzyme Research Laboratories (South Bend, IN) から購入した。フィブリノーゲン分解を検定するために、G B S 菌株 C O H 1 および T O H 1 2 1 を増殖させて静止期にして、リン酸塩緩衝化生理食塩水で 1 回洗浄し、20 倍に濃縮して、P B S 中に再懸濁した。次にフィブリノーゲンを、0 . 6 3 m g / m l の濃度で添加した。フィブリノーゲン / 細胞懸濁液を、ゆっくり回転させながら 3 7 ° でインキュベートした。16 時間後、G B S 細胞を遠心分離により除去した。大型フォーマット (1 8 . 5 × 2 0 c m) の 1 0 % アクリルアミドゲルを用いた S D S - P A G E により、上清を分析し、フィブリノーゲン鎖の種を解析した。

30

40

【0025】

フィブリノーゲン鎖種の M A L D I - T O F M S

M A L D I - T O F M S (マトリックス支援レーザー脱離 / イオン化飛行時間型質量分析計) により、2 つの鎖種の同一性を確認した。上記と同様にフィブリノーゲン鎖を S D S - P A G E により分離し、上部および下部移動種をクーマシー染色ゲルから切り出した。ゲル薄片を、50 % メタノール中で一晩脱染色した。メタノールを除去し、アセトニトリルを添加してゲル薄片を覆い、混合物を 10 分間インキュベートした。アセトニトリルを真空下で蒸発させた。トリプシン (シーケンシング等級、Promega, Madison, WI から) を脱水ゲルフラグメントに添加し、4 ° で 4 5 分間インキュベートし、次に 3 7 ° で一晩インキュベートした。一晩インキュベーション後、トリプシン溶液を除去し、ゲル

50

薄片を200 μ lの5%蟻酸、50%アセトニトリルで2回抽出した。トリプシン溶液を抽出溶液とともにプールし、真空下で蒸発させた。10 μ lの5%アセトニトリル、0.5%酢酸を添加し、0.6 μ lを標的上にスポットした。この後、BIFLEX III質量分析計(Bruker, Billerica, MA)を用いて、質量スペクトルを得た。

【0026】

オプソニン食作用検定

前に記載された(Baltimore, R.S. et al. 1977 J Immunol 118: 673-678)ように、非免疫ヒトから同意後に得られた血清および好中球を用いて、オプソニン食作用検定を実施した。全試料を三重反復で試験し、対照は熱不活性化血清(56、30分間)を有する試料、およびPMNを有さない試料を包含した。

10

【0027】

cspAの同定

多数の因子がGBSの病毒性に関与すると思われる(Jones, A.L. et al. 2000 Molecular Microbiology 37: 1444-1455)。新規の病毒性因子を同定するために、GBSにおける病毒性低減を示すトランスポゾン変異体を同定するためのスクリーニングを実施した。高病毒性III型GBS単離物COH1のTn916 E変異体のスクリーニングにおいて、細胞表面関連プロテアーゼと相同性を有する遺伝子を、本発明者らは同定した。本発明者らがcspAと呼ぶORF(図3)は、1,571アミノ酸タンパク質をコードし、ズブチラーゼファミリーのいくつかの細胞外セリンプロテアーゼと相同性を有する。CspAの最大類似性(51.2%同一性および58.3%類似性)はPrtsに対してであったが、これは、ストレプトコッカスサーモフィラスにより産生される細胞外カゼイナーゼである。次に高い類似性は、A群連鎖球菌ゲノム配列(Ferretti, J.J. et al. 2001 PNAS USA 98: 4658-4663)からの推定細胞外プロテアーゼ(39%同一性および55%類似性)に対してであった。第三に高い類似性(45%類似性および36%同一性)は、ScpA(Chen, C.C. & Cleary, P.P. 1989 Infect Immun 57: 1740-1745)およびScpB(Bohnsack, J.F. et al. 1991 Biochem J 273: 635-640)に対してであったが、これらはそれぞれA群連鎖球菌およびB群連鎖球菌における走化性因子C5aのタンパク質分解性不活性化に関与する。さらにCspAは、prtb、prthおよびprtP遺伝子によりコードされる乳酸菌のいくつかのカゼイナーゼと類似であった(36%類似性および27%同一性)(Siezen, R.J. 1999 Antonie Van Leeuwenhoek 76: 139-155)。

20

30

【0028】

CspAの配列は、それが細胞外被関連プロテアーゼ(CEP)ファミリーの機能および構造ドメインを共有する、ということを示す(Siezen, R.J. 1999 Antonie Van Leeuwenhoek 76: 139-155)。CEPプロテアーゼは、広範な細菌に見出されるズブチリシン様セリンプロテアーゼのサブファミリーである。CEPタンパク質ファミリーの特性の優れた包括的レビューは、(Siezen, R.J. 1999 Antonie Van Leeuwenhoek 76: 139-155)に見出される。セリンプロテアーゼのこのファミリーの触媒性機能に必要なモチーフは、CspA中の配列番号2の残基168~179(アスパラギン酸モチーフ;VAIIDSGLDTNH)、配列番号2の238~248(ヒスチジンモチーフ;HG MHVTSIAATA)および配列番号2の565~575(セリンモチーフ;GTSMASPHVAG)に存在する。これは、CspAがプロテアーゼとして機能することを示す。

40

【0029】

カゼイナーゼの一般的特徴は、それらがプレ-プロ酵素として合成され、そして細胞膜を通して移動後、プロ-ペプチド配列の自己触媒的切断により活性化される、という点である(Siezen, R.J. 1999 Antonie Van Leeuwenhoek 76: 139-155)。残基1~143に及ぶ推定プレ-プロドメインがCspA中に同定され(Siezen, R.J. 1999 Antonie Van Leeuwenhoek 76: 139-155)、このことは、CspAがプレ-プロ酵素としても合成され得るし、同様に自己触媒的成熟を受け得ることを示す。

【0030】

cspAおよびscpBの不活性化

50

C s p A の機能分析を促すために、c s p A の対立遺伝子置換突然変異誘発を実施した。c s p A の一部分を欠失させ、それをエリスロマイシン耐性遺伝子で置き換えることにより、c s p A : : e r m 対立遺伝子を保有するプラスミドを作製した(上記参照)。この構築物を用いて、上で詳述したように、C O H 1 (高病毒性、I I I 型 G B S 臨床単離体)の野生型 c s p A 対立遺伝子を置き換えた。単クローン T O H 1 2 1 をさらなる試験のために選択し、この菌株の染色体上の c s p A : : e r m 突然変異の存在をサザンブロットニングにより立証した。G B S C 5 a プロテアーゼ活性を評価するための対照を提供するために(下記参照)、G B S C 5 a ペプチダーゼ遺伝子である s c p B 中にカナマイシン耐性因子挿入を保有する変異体を C O H 1 遺伝子バックグラウンド中に導入し、これを T O H 9 7 と呼んだ。c s p A : : e r m および s c p B : : k a n 突然変異の両方を保有する二重変異体を構築し、これを T O H 1 4 4 と呼んだ。サザンブロットニングは、2つの s c p B : : k a n 変異体に関する所望の突然変異の存在を確認するためにも用いた。

10

【0031】

c s p A 遺伝子は単シストロン性オペロンとして転写される

c s p A の近位の領域の転写機構を本発明者らは解析した。c s p A の隣の D N A 領域の解析は、c s p A の 5 ' および 3 ' の両方に存在する O R F を明示した(図3)。s b l A (B 群連鎖球菌球面リポタンパク質)と呼ばれる遺伝子は、c s p A の 5 ' に存在し、c s p A と逆転写方向に配向された。予測産物は、ディノコッカスラジオリヂウス(D *einococcus radiodurans*)からの A z l C と 33% の同一性を共有する(White, O. et al. 1999 Science 286: 1571-1577)。A z l C タンパク質の正確な生物学的機能は、一般に不明である(Belitsky, B.R. et al. 1997 J Bacteriol 179: 5448-5457)。c s p A に隣接し、同一方向に配向されるのは、2構成成分調節系の応答レギュレーターおよびセンサータンパク質と同一性を有する産物をコードする2つの推定遺伝子(s b r A および s b s A と呼ばれる)である(Stock, J.B. et al. 1989 Microbiol Rev 53: 450-490)。考え得るプロモーター配列は、c s p A および s b r A 間の非コード配列の 233 b p に位置し、このことは、s b r A および s b s A が c s p A のものとは異なるプロモーターから転写されることを示唆する。

20

【0032】

c s p A 領域の転写機構を解析するために、異なる増殖段階(初期対数期、中期対数期および静止期)での T H B 増殖 C O H 1 から R N A を単離し、c s p A コード領域に対して内部のプロンプを用いて、ノーザン分析を実施した(図4A)。4.7 k b の転写物サイズに対応する独立したバンドが、異なる増殖段階で細胞中に存在した(図4A: レーン1、2 および 3)。プロンプ特異性に関する対照を、T O H 1 2 1 菌株を用いて実施した。この菌株に関しては、予測どおり、ハイブリダイズ産物は観察されなかった。最大発現は、初期対数期に観察された(O.D.₆₀₀ = 0.3; レーン1)。c s p A のコード領域が約 4.7 k b であるため、これらの観察は、c s p A が単シストロン性転写体上に発現されることを示唆する。

30

【0033】

c s p A 転写体が単シストロン性である、という本発明者らの仮説を確認するために、c s p A に対して 3 ' に位置する遺伝子に関するノーザンブロット分析を実施した。c s p A 変異体 T O H 1 2 1 の表現型(下記参照)は、c s p A 突然変異の、隣接 s b r A および s b s A 遺伝子への極性作用に起因するものではない、ということ立証することは重要であった(図3)。R N A を中期対数期における C O H 1 および T O H 1 2 1 から単離し、s b r A のコード領域の内部のプロンプとハイブリダイズさせた(図3参照)。s b r A - ハイブリダイズ産物は、2.4 k b 未満に対応する分子量でスミアとして移動した。同様の量のハイブリダイズ物質が、C O H 1 および T O H 1 2 1 の両方において観察された(図4B)。c s p A および s b r A プロンプは別個の転写体とハイブリダイズしたが、これは、c s p A が隣接遺伝子とは独立して転写され、そして c s p A が単シストロンとして転写されることを示唆する。さらに類似量の各転写体が C O H 1 および T O H

40

50

121において観察されたが、これは、TOH121におけるcspA突然変異が隣接sbrA遺伝子の発現に及ぼす極性作用を発揮しない、ということを確認する(図4B)。

【0034】

CspAは表面結合性、細胞壁固定タンパク質である

CspAがプロテアーゼとして機能することを予測するほかに、CspAの配列は、それが分泌され、その後細胞表面に固定される、ということを示唆する。CspAのアミノ末端内の35残基シグナルペプチドを、SIGSEQを用いて同定した(von Heijne, G. 1986 Nucleic Acid Research 14: 4683-4690; 図3)。グラム陽性表面関連タンパク質(Navarre, W.W. & Schneewind, O. 1994 Mol Microbiol 14: 115-121)に特徴的な古典的C末端細胞壁付着部位配列(LPKTG、配列番号2のアミノ酸1536~1540)が、アミノ酸1536~1540に配置されていた(図3および配列番号2)。CspAが表面付着タンパク質であるという仮説を調べるために、ウエスタンブロット分析によりCspAの細胞内局在化を本発明者らは決定した。大腸菌から発現されるGST-CspA融合タンパク質(上記参照)に対して抗体を産生し、抗体を用いてCspAの存在に関してGBSの異なる細胞分画を試験した。大腸菌TOH50株(プラスミドpTH5を保有する; 上記参照)のペリプラズム抽出物(上記参照)は、GST-CspAに対して産生された抗体と強く反応した。プラスミドpTH5は、(野生型同質遺伝子型株のcspA遺伝子と比較して)Leu-1121で翻訳を成熟前に終結するCspAコード領域中の突然変異を含有する。これは、野生型CspAと比較して、TOH50抽出物に関して観察された、より低い分子量を説明する。COH1の培養上清からのタンパク質は、10倍に濃縮した場合でも、抗体と反応しなかった。これに対比して、COH1およびTOH97(cspA⁺、scpB⁻)の両方からのムタノリシン抽出表面タンパク質のウエスタンブロットは、分子量142および80kDaの2つのタンパク質バンドを明示した(図5)。SDS-PAGE上のCOH1由来CspAの移動は、それが成熟CspA(153kDa)に関する配列分析により予測されたよりも低分子量(142kDa)に対応したので、変則的であった。交差反応バンドは、cspA変異体(TOH121およびTOH144)に関しては142kDa位置で観察されなかったが、このことは、抗体がGBSからの野生型CspAと反応することを確認する。CspAの配列分析の結果をウエスタンブロットデータと合わせて考察すると、CspAが表面局在性タンパク質であることが示される。

【0035】

CspAはC5aプロテアーゼとして機能しない

CspAがGBSのC5aペプチダーゼであるScpBと強い類似性を有するとした場合、CspAはC5aプロテアーゼとしても活性であり得る、と本発明者らは仮定した。前に記載された(Bohnsack, J.F. et al. 1991 Biochim Biophys Acta 1079: 222-228)機能検定を用いて、C5aアーゼ活性を本発明者らは測定した(図6)。要するに、GBSを組換えヒトC5aとともに予備インキュベートし、精製ヒトPMNを添加し、そしてゼラチン被覆プラスチックへのC5a刺激性PMN接着を測定した。COH1(wt、scpB⁺)は陽性対照として役立ち、そしてTOH97(scpB⁻)および別のscpB⁻株GW(Bohnsack, J.F. et al. 2000 Infect Immun 68: 5018-5025)は陰性対照として役立った。TOH121(scpB⁺、cspA⁻)およびTOH144(scpB⁻、cspA⁻)を対照と比較することにより、GBS C5aプロテアーゼ(ScpB)の存在下および非存在下で、cspA突然変異の作用を測定した。COH1またはTOH121を伴うC5aの予備インキュベーションはC5a活性を無効にし、そしてそれらの菌株のC5aプロテアーゼ活性は類似した(図6)。これに対比して、菌株GW、TOH97およびTOH144のC5aプロテアーゼ活性は低く、互いに著しい違いはなかった。よって、このCspAの不活性化は、この機能検定で評価した場合、C5a活性に及ぼす検出可能な作用を有するとは思われなかった。C5aプロテアーゼ活性は、機能性ScpBの存在と相関しただけであった。上記の結果を合わせて考えると、CspAがC5aプロテアーゼとして機能しないという結論と一致する。

【0036】

G B S 表現型特性の評価

そのいくつかが G B S 病毒性決定因子であることが既知であるいくつかの G B S 表現型特性の発現を、本発明者らは評価した。c s p A 変異体は、ヘモリシン、C A M P 因子、ヒップリカーゼおよびヒアルロニダーゼを野生型 G B S と同様に発現した。これらの菌株は、競合的 E L I S A により測定した場合と等しい量の I I I 型莢膜も発現した (C O H 1 に関しては 72.7 ± 15.8 および T O H 1 2 1 に関しては $82.9 \pm 26.3 \mu\text{g} / \text{mg}$ 乾燥重量)。A 5 4 9 上皮細胞単一層の侵襲は、A 5 4 9 細胞を侵襲する総入力細菌のパーセンテージとして表した場合、C O H 1 に関しては $1.2\% \pm 0.3\%$ および T O H 1 2 1 に関しては $1.3\% \pm 0.2\%$ であった。

10

【0037】

C s p A と相同であるプロテアーゼの多くは、細菌増殖に重要である。例えば乳酸菌からのカゼイナーゼは、栄養源としてのカゼインペプチドの利用前に、細胞外カゼインの分解に関与する。G B S は多数のアミノ酸に関して栄養要求性であるため、それは外因性アミノ酸に頼らねばならない。したがって本発明者らは、c p s A 変異体の増殖特徴を、異なる増殖培地中の野生型株と比較した。菌株の増殖は、試験した全ての培地、例えば R P M I + 5% カザミノ酸および T H B 中で比較可能であった。ヒト血漿中の増殖を比較したところ、2つの菌株は、C O H 1 および T O H 1 2 1 に関してそれぞれ 0.522 時間および 0.598 時間の2倍化時間を示した。これは、C s p A が、少なくとも試験した実験条件下では栄養排除において一役を果たさない、ということを示した。

20

【0038】

G B S のカゼイナーゼ活性

カゼイナーゼとして機能する P r t S に対する C s p A の高い類似性のために、カゼイン分解に関して C O H 1 および T O H 1 2 1 の全細胞を、本発明者らは試験した。全 G B S 細胞をカゼインとともにインキュベートし、混合物を遠心分離して、S D S - P A G E を上清に関して実施し、クーマシー染色ゲルの定量によりインタクトなカゼインの量を測定した。用いた実験条件下では非常に少ないカゼイン分解しか観察されず、2つの菌株を用いた実験は同様の結果を生じた (図7)。

【0039】

c s p A 遺伝子はヒトフィブリノーゲンの切断に必要である

C s p A は、推定表面局在化タンパク質として、宿主因子をタンパク質分解する、と本発明者らは仮定した。したがってプロテアーゼとして機能する C s p A の能力を試験するために、種々の宿主タンパク質を分解する c s p A 変異体および野生型株の能力を、本発明者らは比較した。精製ヒトフィブロネクチン、精製補体構成成分 C 3 および精製ヒトフィブリノーゲンを本発明者らは試験した。分解を評価するために、C O H 1 および T O H 1 2 1 の全細菌および/またはムタノリシン抽出表面タンパク質を試験基質とともにインキュベートし、そしてクーマシー染色 S D S - P A G E ゲルを評価することによるか、またはウエスタンブロッティングにより、分解を評価した。試験基質の切断における差異は、変異体および野生型株を比較した場合、フィブリノーゲンを除く基質に関しては観察されなかった。

30

40

【0040】

ヒトフィブリノーゲンは野生型株により切断されたが、c s p A 変異体 T O H 1 2 1 によっては切断されなかった。フィブリノーゲンは、ジスルフィド結合により一緒に共有結合される非同一サブユニット、および の二量体である (Doolittle, R.F. 1987 In: Haemostasis and Thrombosis A.L.a.T. Bloom, D.P. ed. London, England, Churchill Livingstone Co.)。新鮮なヒト血漿から単離されたフィブリノーゲンに関して、S D S - P A G E は、二本のバンドにフィブリノーゲンのサブユニットを分離する、ということの本発明者らに見出した。S D S - P A G E ゲルから両方の推定バンドを切り出して、M A L D I - T O F 質量分析によりそれらを同定した。ヒトフィブリノーゲンのフラグメントの配列と整合するペプチドを、両推定バンドから得た。フィブリノーゲン配列

50

の28%が、得られたトリプシン分解ペプチドにカバーされた。二本バンドの低バンドは、C末端27アミノ酸が除去された *in vivo* 切断産物である (Cottrell, B.A. & Doolittle, R.F. 1976 *Biochem Biophys Res Commun* 71: 754-761)。野生型および *CspA* 変異体をフィブリノーゲン切断に関して比較した場合、*SDS-PAGE* は、*COH1* がサブユニットの小さい種 (二本のうちの低バンドに対応する) を切断するが、一方、変異体は用いた条件下ではフィブリノーゲンを切断しない、ということを示した (図8)。変異体および野生型を一緒に一晩インキュベートした場合、野生型株は、変異株と比較して非常に顕著な可視集合体を形成する、ということにも本発明者らは留意した。これらの集合体は、野生型株を *PBS* 単独中でインキュベートした対照においては観察されなかった。

10

【0041】

CspA は新生仔ラットモデルにおける病毒性に不可欠である

細胞外プロテアーゼは、グラム陰性およびグラム陽性細菌の両方における病毒性に関連づけられてきた。*CspA* が病毒性に関与するか否かを確定するために、*TOH121* (*cspA*⁻) と同質遺伝子型野生型株 *COH1* の LD_{50} を、本発明者らは比較した。各株の10倍希釈系列の液を、腹腔内注射により24~48時間新生仔ラット中に導入した。5つの別個の致死性実験を実施した。平均 LD_{50} 値は、*COH1* および *TOH121* に関してそれぞれ、 2.9×10^3 および 2.9×10^4 cfu/動物であった ($P=0.0431$ 、ウィルコクソン符号順位和検定による)。これらの結果は、*cspA* 遺伝子の突然変異は新生児敗血症モデルにおける *GBS* の病毒性を有意に減弱するというを示した。

20

【0042】

CspA はオプソニン食作用の回避を促す

莢膜多糖の発現は *cspA* 突然変異により影響を受けなかったため (上記参照)、*CspA* は、おそらくは新規のメカニズムにより、非免疫宿主における先天性免疫クリアランスを *GBS* に回避させ得る、と本発明者らは仮定した。オプソニン食作用は細菌クリアランスのための重要なメカニズムであり、好中球が血流からの *GBS* の排除において主要な役割を果たす (Nizet, V. et al. 2000 *In: Streptococcal Infections: Clinical Aspects, Microbiology, and Molecular Pathogenesis* New York: Oxford University Press 180-221)。*TOH121* の弱毒化された病毒性は、*COH1* と比較した場合、食作用性クリアランスに対する感受性増大の結果である可能性がある、と本発明者らは仮定した。新鮮な *PMN* をヒトドナーから単離し、プール化ヒト血清を補体の供給源として用いて、*COH1* に予備吸収させて、細菌に対して向けられる抗体を除去した。検定を4回反復し、代表的実験の結果を図7に示す。*PMN* 死滅に対して非常に感受性であることが既知である *COH1* の非被包性変異体である *COH1-13* (Rubens, C.E. et al. 1993 *Mol Microbiol* 8: 843-855) を、対照として包含した。各菌株の増殖指数 (GI) を、出力 cfu/ml を入力 cfu/ml で割ることで算定した。検定中の *COH1* 増殖は、1回以上の二倍化に対応した ($GI=2.2$; 図9)。これに対比して、陰性対照株 *COH1-13* は、1時間インキュベーション中にヒト *PMN* により顕著に死滅した ($GI=0.04$)。*TOH121* は、*COH1* および *COH1-13* 間の中間である感受性を示した ($GI=0.81$)。3つの菌株は全て、熱不活性化血清の存在下で、そして *PMN* の非存在下で増殖して、2~4の増殖指数を生じた (図9)。本発明者らはまた、4つの実験の結果を平均して、野生型の増殖指数に対する変異体の増殖指数の比として結果を表したが、これは 0.46 ($P<0.001$ 、スチューデント *t* 検定による) であった。これらの知見は、莢膜多糖に関して観察されたのと同程度ではないものの、*CspA* が非免疫オプソニン化および *PMN* による死滅への耐性を促すということを示す (Rubens, C.E. et al. 1993 *Mol Microbiol* 8: 843-855)。

30

40

【0043】

cspA 遺伝子は *GBS* 血清型中に広く分布する

CspA は病毒性に関与するため、他の *GBS* 血清型における *cspA* の出現を本発明

50

者らは調べた。9つの血清型の各々からの代表的菌株から単離されたGBSゲノムDNAを用いて、サザンブロットを実施した。16～18菌株からの一本鎖DNAフラグメントはcspAプローブとハイブリダイズし、各血清型の少なくとも1つの代表からのDNAはプローブとハイブリダイズした。したがってcspA遺伝子は、今日までに発見されたほとんどのその他の防御GBS抗原と異なり、実験した全ての血清型の間で出現する。

【0044】

要約すると、GASおよびGBSのC5aアーゼ、ならびにセリンプロテアーゼのズブチラーゼファミリーの他の成員との広範な相同性を有する新規のGBSプロテアーゼを、本発明者らは同定した。検査した全GBS血清型が、cspA遺伝子を保有した。cspAの突然変異は、新生仔ラット敗血症モデルにおけるGBS病毒性を弱毒化し、食作用に対する耐性を低減した。プロテアーゼは、ヒトフィブリノーゲン切断に必要である。GBS疾患の病態へのこの新規のセリンプロテアーゼ様遺伝子の関与を防止することは、新生児およびその他の免疫無防備個体の重症感染を引き起こすこの有意の病原体を防御するためのワクチンの基礎であると意図される。

【0045】

【表1】

菌株またはプラスミド	関連特徴	参考文献または供給源
ストレプトコッカス・アガラクチ		
COH1	敗血症を有する新生児からのIII型GBS単離物；高病毒性；野生型参照株	(Martin, T. R. et al. 1988 J Infect Dis 157:91-100)
TOH121	COH1のscpA::erm誘導体；Erm ^R	本研究
TOH97	COH1のscpB::kan誘導体；Kan ^R	(Beckmann, C. et al. 2002 Infection & Immunity 70)
TOH144	TOH121のscpB::Kam誘導体 (cspA::erm)；Erm ^R 、Kan ^R	本研究
大腸菌		
DH5α	一般的クローニング菌株	ATCC
TOH50	プラスミドpTH5を保有するDH5α	本研究
プラスミド		
PBSKS ⁻	一般的クローニングベクター	Stratagene (La Jolla, CA, USA)
pVE6007	大腸菌-GBSシャトルベクター；温度感受性複製；pWVの複製起点；Cm ^R	(Maguin, E. et al. 1992 J Bacteriol 174:5633-5638)
pTH2	cspAのClaI DNAフラグメントを保有するPBSKS；Amp ^R	本研究
pTH5	cspAを含むXbaI DNAフラグメントを保有するPBSKS；Amp ^R	本研究
pTH21	cspAの挿入的突然変異誘発に用いられるプラスミド；pVE6007の誘導体；Cm ^R ；Erm ^R	本研究

【0046】

GBS感染を予防するためのワクチンとしてのCspAと呼ばれるB群連鎖球菌(GBS)の新規の細胞表面プロテアーゼタンパク質の使用

本発明の一態様によれば、B群連鎖球菌のCspAプロテアーゼ、ならびにその類似体、ホモログ、誘導体および少なくとも1つの免疫原性エピトープを含有するフラグメントを本発明者らは提供する。本明細書中では、「CspAプロテアーゼ」とは、配列番号2のアミノ酸配列を有する天然に生じるタンパク質である。本発明のCspAプロテアーゼは天然由来のものであってもよく、あるいは組換えDNA技術または慣用的化学合成技術により得られるものであってもよい。

【0047】

本明細書中では、「免疫原性」とは、免疫応答を誘発する能力を有することを意味する。本発明の新規のCspAプロテアーゼは、B群連鎖球菌感染に対する防御的免疫応答を誘発する能力により特性化される。

【0048】

本発明は特に、配列番号2の推定アミノ酸配列、ならびにその類似体、ホモログ、誘導体および少なくとも1つの免疫原性エピトープを含有するフラグメントを有する約172 kDaのB群連鎖球菌のCspAプロテアーゼを提供する。

【0049】

本明細書中では、CspAプロテアーゼの「類似体」とは、該類似体タンパク質の全体的機能および免疫特性が保存される限りにおいて、CspAプロテアーゼアミノ酸配列(配列番号2)中の1つまたは複数のアミノ酸残基が別のアミノ酸残基により置換されたB群連鎖球菌タンパク質である。このような類似体は天然物であってもよく、あるいは合成によりまたは組換えDNA技術により、例えばcspAプロテアーゼ配列の突然変異誘発により産生されるものであってもよい。CspAプロテアーゼの類似体は、CspAプロテアーゼと反応する抗体を誘導し得る少なくとも1つの抗原を保有する。このような類似体は、CspAタンパク質と少なくとも80%の全体的相同性(すなわち類似性)または同一性、例えば80~99%の相同性(すなわち類似性)または同一性、あるいはその中の任意の範囲の相同性または同一性を有し得る。

【0050】

相同性%は、例えばGAPコンピュータープログラム、バージョン6.0(University of Wisconsin Genetics Computer Group(UWGCG)から入手可能)を用いて配列情報を比較することにより、決定することができる。GAPプログラムは、スミスとウォーターマン(Smith and Waterman)(Adv Appl Math 1981 2: 482)により修正されたような、ニードルマンとブンシュ(Needleman and Wunsch)(J Mol Biol 1970 48: 443)のアラインメント法を利用する。要するにGAPプログラムは、類似する並べられた記号(即ちヌクレオチドまたはアミノ酸)の数を2つの配列のうち短い方の中の記号の総数で割ったものとして類似性を定義する。GAPプログラムに関する好ましいデフォルトパラメーターとしては以下のものが挙げられる:(1)ユニタリ比較行列(同一性に関して1の値および非同一性に関して0を含有)およびグリブスコフとバーゲス(Gribskov and Burgess)(Nucl Acids Res 1986 14: 6745)の計量比較行列(Schwartz and Dayhoff eds. (Atlas of Protein Sequence and Structure, National Biomedical Research Foundation, Washington, D.C. 1979, pp. 353-358)により記載されている);(2)各ギャップに関する3.0のペナルティーおよび各ギャップにおける各記号に関する付加的な0.10のペナルティー;ならびに(3)末端ギャップに関するペナルティーなし。

【0051】

本明細書中では、CspAプロテアーゼの「ホモログ」とは、アガラクチエ以外の連鎖球菌種または連鎖球菌以外の属からのタンパク質であって、該ホモログタンパク質の全体的機能および免疫特性が保存される限りにおいて、CspAプロテアーゼアミノ酸配列(配列番号2)中の1つまたは複数のアミノ酸残基が別のアミノ酸残基により置換されたタンパク質である。このようなホモログは天然物であってもよいし、あるいは合成的にまたは組換えDNA技術により産生されたものであってもよい。CspAプロテアーゼのホモログは、CspAプロテアーゼと反応する抗体を誘導し得る少なくとも1つの抗原を保有する。このようなホモログは、CspAタンパク質と少なくとも80%の全体的相同性(すなわち類似性)または同一性、例えば80~99%の相同性(すなわち類似性)または同一性、あるいはその中の任意の範囲の類似性または同一性を有し得る。

【0052】

さらにまた、相同性%は、例えばGAPコンピュータープログラム、バージョン6.0(University of Wisconsin Genetics Computer Group(UWGCG)から利用可能)を用いて配列情報を比較することにより、決定することができる。GAPプログラムは、スミスとウォーターマン(Smith and Waterman)(Adv Appl Math 1981 2: 482)により修正されたような、ニードルマンとブンシュ(Needleman and Wunsch)(J Mol Biol 1970 48: 443)のアラインメント法を利用する。要するにGAPプログラムは、類似する並べられた記号(即ちヌクレオチドまたはアミノ酸)の数を2つの配列のうち短い方の中の記号の

10

20

30

40

50

総数で割ったものとして類似性を定義する。GAPプログラムに関する好ましいデフォルトパラメーターとしては以下のものが挙げられる：(1) ユニタリ比較行列(同一性に関して1の値および非同源性に関して0を含有)およびグリブスコフとバーゲス(Gribskov and Burgess) (Nucl Acids Res 1986 14: 6745)の計量比較行列(Schwartz and Dayhoff eds. (Atlas of Protein Sequence and Structure, National Biomedical Research Foundation, Washington, D.C. 1979, pp. 353-358)に記載されている)；(2) 各ギャップに関する3.0のペナルティーおよび各ギャップにおける各記号に関する付加的な0.10のペナルティー；ならびに(3) 末端ギャップに関するペナルティーなし。

【0053】

本明細書中では、「誘導体」とは、1つまたは複数の物理的、化学的または生物学的特性が変更されたポリペプチドである。このような変更としては、アミノ酸置換、修飾、付加または欠失；脂質化、グリコシル化またはリン酸化のパターンにおける変更；ポリペプチド中に存在するアミノ酸残基のフリーのアミノ、カルボキシルまたはヒドロキシル側鎖と他の有機および非有機分子との反応；ならびに一次、二次または三次構造の変化を生じ得るその他の変更が挙げられるが、これらに限定されない。

【0054】

本発明の「フラグメント」は、少なくとも1つの免疫原性エピトープを有する。「免疫原性エピトープ」は、免疫応答を惹起するに際して助けとなるエピトープである。本発明の好ましいフラグメントは、感染を予防するか、または感染の重症度を改善するのに十分な免疫応答を惹起する。図10および図11を参照すると、多配列アラインメント、二次構造予測およびデータベース相同性検索法を用いて、ストレプトコッカスアガラクチエの遺伝子cspAによりコードされる多ドメイン、細胞-エンベローププロテアーゼが、他の配列と比較されている。この比較分析は、この細胞-エンベローププロテアーゼ中の多数の異なるドメインの予測をもたらした。これらのドメインとしては、N末端から出発して、分泌および活性化に関するプレ-プロドメイン、セリンプロテアーゼドメイン(より小さな挿入ドメインを伴う)、未知であるが調節機能を有すると思われる大型中間ドメインA、螺旋スパーサドメイン、親水性細胞壁スパーサーまたは接着ドメイン、ならびに細胞壁アンカードメインが挙げられる。CspAプロテアーゼの好ましいフラグメントは、プレ-プロドメイン(残基1~143)、プロテアーゼドメイン(144~638)、Aドメイン(639~1076)、細胞壁スパーサドメイン(1077~1535)および細胞壁アンカードメイン(1536~1571)、そして上記のドメインのうちのいずれかの内部のペプチドエピトープから成るより小型のフラグメントを包含する。

【0055】

上記のGST-CspA融合物を作製するためのタンパク質のアミノ末端の主要部分の除去は、エピトープ提示を最大限にしながら、プロテアーゼ活性を排除するように計画された。CspAセリンプロテアーゼに関する触媒ドメインは、おそらくはaa168~575間に位置し、他の既知のセリンプロテアーゼと共通の3つのモチーフを含有する(上記参照)。理論的には、3つのモチーフのうち1つまたは複数における突然変異またはおそらくこの領域内の他の場所における突然変異は、プロテアーゼ機能を無効にするかまたは活性触媒部位の立体配置を変更して、プロテアーゼ活性に影響を与えることができる。あるいは他のセリンプロテアーゼと同様に、これらの酵素もaa1~143からの「プレ-プロ」ドメインを含有し、その「活性」型へのタンパク質の成熟を妨げる突然変異が、プロテアーゼ活性を排除し得る。当該タンパク質の置換突然変異またはより大きな欠失も可能性がある。実施例に記載されるように、GST-CspA融合タンパク質に対して産生された抗体は防御的である。したがってこのデータは、タンパク質のアミノ末端の主要部分の除去ならびにおそらくはプロテアーゼ活性の排除が、抗原性に制限的な影響を及ぼすということを示す。

【0056】

本発明のさらなる態様において、CspAプロテアーゼと免疫学的に関連したポリペプチドを本発明者らは提供する。本明細書中で用いる場合、「免疫学的に関連した」ポリペ

プチドは、以下の1つまたは複数の特性を特徴とする：

(a) B群連鎖球菌細胞による哺乳類宿主の感染により生成される抗体と免疫学的に反応性であり、この抗体はC s p Aプロテアーゼと免疫学的に反応性である；

(b) C s p Aプロテアーゼと免疫学的に反応性である抗体を誘導し得る；

(c) C s p Aプロテアーゼを用いた哺乳類の免疫感作により誘導される抗体と免疫学的に反応性である。自明のこととして、C s p Aプロテアーゼの類似体、ホモログおよび誘導體は、免疫学的に関連したポリペプチドである。さらに全ての免疫学的に関連したポリペプチドは、少なくとも1つのC s p Aプロテアーゼ抗原を含有する。したがって「C s p Aプロテアーゼ抗原」は、C s p Aプロテアーゼそれ自体の中に、または免疫学的に関連したポリペプチド中に見出され得る。

10

【0057】

本明細書中では、「関連細菌」とは、C s p Aプロテアーゼと反応する抗体を惹起し得る抗原を保有する細菌である。関連細菌の例としては、A群連鎖球菌が挙げられる。

【0058】

当業者には、特定の類似体、ホモログ、誘導體、免疫学的関連ポリペプチドまたはフラグメントが疾患の予防または治療に有用であるか否かを、過度の実験をすることなく決定し得ると理解される。有用なポリペプチドおよびフラグメントは、C s p Aプロテアーゼと免疫反応性である抗体を惹起する。好ましくは有用なポリペプチドおよびフラグメントは、致死細菌感染に対する防御的免疫応答を惹起する能力を示す。

【0059】

本発明のポリペプチドの多量体も含まれる。これらの多量体としては、例えば架橋剤、例えばアビジン/ビオチン、グルタルアルデヒドまたはジメチルスベリミデートで架橋された1つまたは複数のポリペプチドが挙げられる。このような多量体としては、組換えDNA技術により生成される多シストロン性mRNAから産生される2つまたはそれ以上のタンデムまたは逆連続タンパク質配列を含有するポリペプチドも挙げられる。

20

【0060】

本発明は、実質的に純粋なC s p Aプロテアーゼおよび免疫学的関連ポリペプチドを提供する。「実質的に純粋な」という用語は、本発明によるポリペプチドおよびそれらをコードするDNA配列が細菌起源の他のタンパク質を実質的に含有しないということを意味する。実質的に純粋なタンパク質調製物は、種々の慣用的方法により得ることができる。

30

【0061】

別の態様において、本発明は、配列番号1を有するB群連鎖球菌のC s p AプロテアーゼをコードするDNA配列を初めて提供する。

【0062】

本発明のDNA配列としては、C s p Aプロテアーゼのポリペプチド類似体およびホモログをコードするDNA配列、免疫学的関連ポリペプチドをコードするDNA配列、上記のDNA配列のいずれかと縮重性であるDNA配列、ならびに上記のDNA配列のいずれかのフラグメントも挙げられる。一旦ポリペプチドが同定され、単離されれば、慣用的DNAシーケンシング技法を用いて本発明のポリペプチドのいずれかのDNA配列を当業者は決定し得るということは容易に理解される。

40

【0063】

本発明のポリペプチドは、種々の方法、例えば慣用的分離法、例えばイオン交換およびゲルクロマトグラフィーおよび電気泳動を用いて、適切な細胞抽出物からのタンパク質分画化により、あるいは組換えDNA法の使用により、調製され得る。組換えDNA法の使用は、本発明による実質的に純粋なポリペプチドの調製に特に適している。

【0064】

したがって本発明のさらなる態様によれば、C s p Aプロテアーゼ、免疫学的関連ポリペプチドおよびそのフラグメントの製造方法であって、(1)上記のポリペプチドまたはそのフラグメントをコードするDNA配列ならびにDNA配列に作動可能的に連結された1つまたは複数の発現制御配列を含有するベクターで形質転換された単細胞宿主生物体を

50

培養し、そして(2)実質的に純粋なポリペプチドまたはフラグメントを回収する工程を包含する方法を本発明者らは提供する。

【0065】

当該技術分野で既知であるように、宿主中でトランスフェクト遺伝子を好発現させるためには、遺伝子は、選定された発現宿主中で機能性である転写および翻訳発現制御配列と作動的に連結されねばならない。好ましくは発現制御配列および当該遺伝子は、細菌選択マーカおよび複製の起点をさらに含む発現ベクター中に組み込まれる。発現宿主が真核生物細胞である場合、発現ベクターは、真核生物発現宿主において有用な発現マーカをさらに含むべきである。

【0066】

本発明のポリペプチドをコードするDNA配列は、シグナル配列をコードするものであってもよいし、しないものであってもよい。発現宿主が真核生物宿主である場合、成熟タンパク質が真核生物宿主から分泌されるようにシグナル配列がコードされるのが、一般的に好ましい。

【0067】

アミノ末端メチオニン、本発明の発現ポリペプチド上に存在してもよいし、存在しなくてもよい。末端メチオニンが発現宿主により切断されない場合、それは、所望により、標準技法で化学的に除去され得る。

【0068】

本発明のDNA配列の発現に際しては、広範な種々の発現宿主/ベクターの組合せを用いることができる。真核生物宿主のための有用な発現ベクターとしては、例えばSV40、ウシ乳頭腫ウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、サイトメガロウイルスおよびレトロウイルスからの発現制御配列を含むベクターが挙げられる。細菌宿主のための有用な発現ベクターとしては、pBluescript、pGEX2T、pUCベクター、colE1、pCR1、pBR322、pMB9およびそれらの誘導体などの大腸菌由来のものを含む細菌プラスミド、RP4などの広宿主域プラスミド、例えばGT10およびGT11、NM989などのファージの多数の誘導体を含むファージDNA、ならびにM13および糸状一本鎖DNAファージなどのその他のDNAファージ、が挙げられる。酵母細胞のための有用な発現ベクターとしては、2μプラスミドおよびその誘導体が挙げられる。昆虫細胞のための有用なベクターとしては、pVL941が挙げられる。

【0069】

さらに、広範な種々の発現制御配列のいずれかが、本発明のDNA配列を発現させるためにこれらのベクター中に用いられ得る。有用な発現制御配列としては、上記の発現ベクターの構造遺伝子に関連した発現制御配列が挙げられる。有用な発現制御配列の例としては、例えばSV40またはアデノウイルスの初期および後期プロモーター、lac系、trp系、TACまたはTRC系、T3およびT7プロモーター、ファージの主要オペレーターおよびプロモーター、fdコートタンパク質の制御領域、3-ホスホグリセレートキナーゼまたはその他の解糖酵素のためのプロモーター、例えばPho5などの酸性ホスファターゼのプロモーター、酵母接合系のプロモーター、ならびに原核生物または真核生物細胞またはそれらのウイルスの遺伝子の発現を制御することが知られているその他の構成性および誘導性プロモーター配列、ならびにそれらの種々の組合せが挙げられる。T7 RNAポリメラーゼプロモーター10は、大腸菌におけるCspAプロテアーゼの発現に特に有用である。

【0070】

上記のベクターで形質転換された宿主細胞は、本発明のさらなる態様を構成する。広範な種々の単細胞宿主細胞は、本発明のDNA配列を発現するのに有用である。これらの宿主としては、大腸菌、シュドモナス、バチルス、ストレプトミセス、真菌、酵母などの真核生物および原核生物宿主、スポドプテラフルギペルダ(SF9)などの昆虫細胞、CHOおよびマウス細胞などの動物細胞、COS1、COS7、BSC1、BSC40およ

10

20

30

40

50

び B M T 1 0 などのアフリカミドリザル細胞、ヒト細胞、および組織培養された植物細胞が挙げられる。好ましい宿主生物体としては、例えば大腸菌および枯草菌 (*B. subtilis*) などの細菌、ならびに組織培養された哺乳類細胞が挙げられる。

【 0 0 7 1 】

もちろん、全てのベクターおよび発現制御配列が、本発明の D N A 配列を発現するために等しく良好に機能するというわけではないと理解されるべきである。同一発現系を有する宿主が全て、等しく良好に機能するわけではない。しかしながら、これらのベクター、発現制御配列および宿主の中から、当業者は過度の実験なしで、かつ本発明の範囲を逸脱することなく、選択し得る。例えば、ベクターの選択に際しては、ベクターはの中で複製しなければならないため、宿主が考慮されねばならない。ベクターのコピー数、そのコピー数を制御する能力、ならびにベクターによりコードされる任意のその他のタンパク質の発現、例えば抗生物質マーカーの発現も、考慮されるべきである。発現制御配列の選択に際しては、種々の因子も考慮されるべきである。例えば、特に考え得る二次構造に関しては、例えば配列の相対的強さ、その制御可能性、および本発明の D N A 配列との適合性が挙げられる。単細胞宿主は、選択されるベクターとの適合性、本発明の D N A 配列によりコードされる産物の毒性、それらの分泌特徴、タンパク質を正しくフォールディングする能力、それらの発酵または培養要件、ならびに本発明の D N A 配列によりコードされる産物の精製の容易性などについて考慮して選択されるべきである。これらのパラメーターの中で、発酵時または大規模動物培養において、本発明の D N A 配列を発現する種々のベクター / 発現制御配列 / 宿主の組合せを当業者は選択し得る。

10

20

【 0 0 7 2 】

本発明の D N A 配列によりコードされるポリペプチドは、発酵または細胞培養から単離され、そして慣用的方法、H P L C、F P L C等を用いた順相または逆相クロマトグラフィーなどの液体クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー（例えば無機リガンドまたはモノクローナル抗体を用いる）、サイズ排除クロマトグラフィー、免疫感作金属キレートクロマトグラフィー、ゲル電気泳動等のいずれかを用いて精製され得る。本発明の範囲を逸脱することなく、最も適切な単離および精製技法を、当業者は選択し得る。

【 0 0 7 3 】

さらに本発明のポリペプチドは、いくつかの化学的方法のいずれかにより生成されるものであってもよい。例えばそれらは、R. B. Merrifield (J Am Chem Soc 1963 83: 2149-54) により最初に記載された固相合成技術を用いて調製されるか、あるいはそれらは溶液中での合成により調製されるものであってもよい。ペプチド合成技法の要約は、E. Gross & H. J. Meinhofer, 4 The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology; Modern Techniques Of Peptide And Amino Acid Analysis, John Wiley & Sons, (1981); および M. Bodanszky, Principles Of Peptide Synthesis, Springer-Verlag (1984)に見出される。

30

【 0 0 7 4 】

本発明の好ましい組成物および方法は、免疫原性強化を示すポリペプチドを含む。このようなポリペプチドは、ネイティブ形態のポリペプチドまたはそのフラグメントが、意図されたレシピエントにおけるその免疫原性特徴が強化されるように改変または処置された場合に、結果的に生じ得る。本明細書中に開示されたポリペプチドの免疫原性を実質的に増大するために、多数の技法が利用可能であり、当業者に知られており、過度の実験なしで用いられる。例えばポリペプチドは、ジニトロフェノール基またはアルサニル酸とのカップリングにより、または熱および / または S D S を用いた変性により、修飾されてもよい。特にポリペプチドが化学的に合成される小型ポリペプチドである場合、それらを免疫原性担体とカップリングするのが望ましい。カップリングは、もちろん、適切に機能するポリペプチドまたは担体の能力を妨害すべきでない。カップリング戦略におけるいくつかの一般的考察のレビューに関しては、Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, ed. E. Harlow and D. Lane (1988)を参照されたい。有用な免疫原性担体は、当該技術分野で既知である。このような担体の例は、カギアナカサガイヘモシア

40

50

ニン (K L H) ; ウシ血清アルブミン (B S A) および卵白アルブミンなどのアルブミン、 P P D (ツベルクリンの精製タンパク質誘導体) ; 赤血球 ; 破傷風毒素 ; コレラ毒素 ; アガロースビーズ ; 活性炭 ; またはベントナイトである。

【 0 0 7 5 】

本明細書中に開示されたポリペプチドの脂質化状態を変更するためのアミノ酸配列の修飾も、それらの免疫原性および生化学的特性を増大するために用いられ得る一方法である。例えばポリペプチドまたはそのフラグメントは、脂質部分の付加を指図するシグナル配列を伴って発現されてもよいし、または伴わずに発現されてもよい。

【 0 0 7 6 】

本発明によれば、例えばネイティブポリペプチドをコードする D N A の *i n v i t r o* 操作とその後の修飾 D N A の発現、誘導化 D N A 配列の化学合成、あるいは発現アミノ酸配列の化学的または生物学的操作などの種々の方法により、ポリペプチドの誘導体を調製し得る。

【 0 0 7 7 】

例えば異なる天然アミノ酸、アミノ酸誘導体または非ネイティブアミノ酸を用いた 1 つまたは複数のアミノ酸の置換により、誘導体を産生し得る。この場合、保存的置換が好ましい。例えばヒスチジンを 3 - メチルヒスチジンに置換してもよいし、プロリンを 4 - ヒドロキシプロリンに置換してもよいし、リシンを 5 - ヒドロキシリシンに置換してもよい。

【 0 0 7 8 】

保存性の低いアミノ酸置換を引き起こすことにより、例えば電荷、配座およびその他の生物学的特性における変化を引き起こすことにより、所望の誘導体を生じさせることも可能である。このような置換としては、例えば疎水性残基を親水性残基にする置換、別の残基をシステインまたはプロリンにする置換、かさ高い側鎖を有する残基を小さい側鎖を有する残基にする置換、あるいは陰性電荷を有する残基を陽性電荷を有する残基にする置換が挙げられる。所定の置換の結果が確実に予測できない場合、誘導体は、本明細書中に開示された方法に従って容易に検定されて、所望の特徴の存在または非存在を決定することができる。

【 0 0 7 9 】

ポリペプチドはまた、安定性の増大、精製の促進または多量体ワクチンの製造という目的で調製され得る。このような技法の 1 つは、その他の B 群連鎖球菌または非 B 群連鎖球菌配列を含む融合タンパク質としてポリペプチドを発現することである。好ましくは、例えば融合タンパク質をコードする核酸分子を構築し、その分子で宿主細胞を形質転換し、融合タンパク質を発現するよう細胞を誘導し、そして細胞培養から融合タンパク質を回収することにより、本発明のポリペプチドを含む融合タンパク質が D N A レベルで産生される。あるいは融合タンパク質は、既知の方法に従って遺伝子発現後に産生され得る。

【 0 0 8 0 】

本発明のポリペプチドは、遺伝子組み換え、または化学的合成によって産生される、大型多量体分子の一部であってもよい。このような多量体は、アミノ酸以外の部分、例えば脂質および炭化水素に融合または結合されたポリペプチドを含むものであってもよい。

【 0 0 8 1 】

本発明のポリペプチドは、抗体の産生のため、そして疾患に対する防御的応答の誘導のために特によく適している。したがって本発明の別の態様において、C s p A プロテアーゼと免疫学的に反応性である抗体またはそのフラグメントを、本発明者らは提供する。本発明の抗体は、C s p A プロテアーゼまたは免疫学的関連ポリペプチドを用いた免疫感作により誘導されるか、あるいは C s p A プロテアーゼまたは免疫学的関連ポリペプチドとの反応性により同定される。本発明の抗体は、天然 B 群連鎖球菌の感染時に動物において普通に誘導され、そして誘導された動物から除去されていないかまたは動物内で変更されていない抗体を含むことは意図されないと理解されるべきである。

【 0 0 8 2 】

10

20

30

40

50

本発明の抗体は、インタクト免疫グロブリン分子、またはF(v)、Fab、Fab'およびF(ab')₂のような公知のフラグメントを含むインタクト抗原結合部位を含有するフラグメントであり得る。抗体は、遺伝子操作によって作製されてもよいし、合成的に作製してもよい。抗体またはフラグメントは、動物起源のもの、特に哺乳類起源のもの、さらにネズミ、ラットまたはヒト起源のものであり得る。それは天然抗体またはフラグメントであってもよいし、あるいは所望により、組換え抗体またはフラグメントであってもよい。抗体または抗体フラグメントは、ポリクローナル抗体であってもよいが、好ましくはモノクローナル抗体である。それらは、いくつかのエピトープに特異的であってもよいが、好ましくは1つのものに特異的である。当業者は、ナイーブ動物を免疫感作するために用いた場合にB群連鎖球菌またはB群連鎖球菌関連細菌感染に対する防御を付与する能力に関してスクリーニングされ得るその他のモノクローナル抗体を産生するために本発明のポリペプチドを用いてもよい。一旦所定のモノクローナル抗体が防御を付与することが見出されれば、その抗体により認識される特定のエピトープが次に同定され得る。ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体の産生方法は、当業者に既知である。このような方法のレビューに関しては、Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, ed. E. Harlow and D. Lane (1988)およびD.E. Yelton et al. 1981 Ann Rev Biochem 50: 657-80を参照されたい。本発明のポリペプチドとの免疫反応性の決定は、当該技術分野において既知のいくつかの方法のいずれかにより、例えばイムノプロット検定およびELISAによりなされる。

10

【0083】

20

本発明の抗体は、異なる種(例えばマウスとヒト)の免疫グロブリン配列から形成されるハイブリッド分子であってもよいし、または同一種からの免疫グロブリン軽鎖および重鎖配列の一部から形成される分子でもであってもよい。それは多結合特異性を有する分子、例えば、当業者に既知の複数の技法、例えばハイブリッドハイブリドーマの生成; ジスルフィド交換; 化学的架橋; 2つのモノクローナル抗体間のペプチドリンカーの付加; 特定細胞株中への2組の免疫グロブリン重鎖および軽鎖の導入等のいずれか1つの方法により調製される二機能性抗体であってもよい。

【0084】

本発明の抗体はまた、ヒトモノクローナル抗体であってもよく、例えば、不死化ヒト細胞、SCID-huマウスまたは「ヒト」抗体を産生し得るその他の非ヒト動物、あるいはクローン化ヒト免疫グロブリン遺伝子の発現により産生されるものであってもよい。

30

【0085】

要するに、本発明の教示を提供される当業者は、本発明の抗体の生物学的特性を変更するために用いられ得る種々の方法、例えば所定の抗体分子の安定性または半減期、免疫原性、毒性、親和性または収量を増大または低減させる方法、あるいは特定用途により適したものにさせ得る任意の他の方法を利用可能である。

【0086】

本発明のポリペプチド、DNA配列および抗体は、疾患を予防、治療、および診断するための予防用、治療用および診断用の組成物中において有用である。

【0087】

40

本発明のポリペプチドおよび抗体を免疫原およびワクチンとして用いるためには、標準免疫学的技法が用いられ得る。特に、任意の適切な宿主は、モノクローナル抗体または多価抗体を生成するために、あるいは疾患に対する防御的免疫学的応答の発現を誘導するために、薬学的有効量のポリペプチドを注射され得る。

【0088】

本明細書中で用いる場合、ポリペプチドまたは抗体の「薬学的有効量」とは、患者に投与した場合に、B群連鎖球菌または関連細菌感染を予防するか、または当該感染を改善するのに有効である免疫応答を引き出す量である。

【0089】

本発明のポリペプチドまたは抗体の投与は、任意の標準手法により達成され得る。この

50

ような技法の詳細な考察に関しては、Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, ed. E. Harlow and D. Lane (1988)を参照されたい。好ましくは、ポリペプチドが用いられる場合、それは薬学的に許容可能なアジュバント、例えば完全または不完全フロイントアジュバント、R I B I (ムラミルジペプチド)またはI S C O M (免疫刺激性複合体)とともに投与される。例えば組成物は、油中水型エマルションまたは水酸化アルミニウムをアジュバントとして含み、筋肉内投与される。ワクチン組成物は、一度にまたは一連の治療の間に、患者に投与され得る。投与および投薬レジメンの最も有効な方式は、免疫原性のレベル、治療に用いられる特定の組成物および/またはアジュバント、予測される感染の重症度および経過、以前の治療、患者の健康状態および免疫感作に対する応答、ならびに処置医の判断によって決まる。例えば免疫適格患者では、ポリペプチドの免疫原性が高いほど、投薬量および免疫感作に必要な回数は少ない。同様に、投薬量および必要な治療時間は、ポリペプチドがアジュバントとともに投与される場合には、低下される。

10

【0090】

一般に投薬は、患者あたり約0.01~10mg、好ましくは0.1~1.0mgのCspA抗原の、好ましくはアジュバントを伴う、初回注射と、その後の、1回またはおそらくは複数回の追加免疫注射から成る。好ましくは追加免疫は、初回注射の約1ヶ月後および6ヶ月後に投与される。

【0091】

本発明のポリペプチドのいずれかは、薬学的に許容可能な塩の形態で用いられ得る。本発明のポリペプチドと塩を生成し得る適切な酸および塩基は当業者に既知であり、例としては、無機および有機の酸および塩基が挙げられる。

20

【0092】

B群連鎖球菌または関連細菌により引き起こされる疾患に対する防御を付与する能力、あるいはこのような感染の重症度を改善する能力に関して、本発明のポリペプチドおよび抗体をスクリーニングするために、複数の動物モデルが用いられ得ると当業者は認識する。B群連鎖球菌または関連細菌による感染に感受性である任意の動物が有用である。例えばBalb/cマウスは、能動的免疫防御スクリーニングのための動物モデルであり、そして重症複合型免疫不全マウスは、受動スクリーニングのための動物モデルである。したがってこれらの動物モデルに特定のポリペプチドまたは抗体を投与することにより、そのポリペプチドまたは抗体が本明細書中に特許請求された方法および組成物に有用であるかを、過度の実験なしに当業者は決定し得る。

30

【0093】

本発明の別の実施形態によれば、B群連鎖球菌または関連細菌感染の重症度を予防または改善するのに十分な方法で、薬学的有効量の本発明のポリペプチドのいずれかを含むワクチンで患者をある期間、治療する工程を包含する方法を本発明者らは記載する。

【0094】

本発明はさらに、組換えベクターからのこのような当該免疫原またはエピトープをコードする遺伝子が、適切に構築された哺乳類発現系を用いた免疫感作を通じて投与される「遺伝的免疫感作」を提供する。その例としては、ポックスウイルス、ヘルペスウイルス、アデノウイルス、アルファウイルスを用いるストラテジー、ならびに単体または処方されたDNAを用いた免疫原が挙げられるが、これらに限定されない。このような組換えベクターを構築するための技術は、当該技術分野においては既知である。これらの免疫感作媒体のための方法およびこの分野の知識に関しては、特にHormaecheおよびKahn、PerkusおよびPaoletti、Shiver et al.(全てConcepts in Vaccine Development, Kaufman, S.H.E., ed., Walter deGruyter, New York, 1996)に記載されており、そしてベクターは、Viruses in Human Gene Therapy, Vos, J.-M.H., ed., Chapman and Hall, Carolina Academic Press, New York, 1995に、そしてRecombinant Vector in Vaccine Development, Brown, F., ed., Karger, New York, 1994に記載されている。

40

【0095】

50

本発明のポリペプチド、DNA配列および抗体は、診断方法および病原性生物体の検出のためのキットに関する基礎も形成し得る。いくつかの診断方法が可能である。例えば、本発明は、生物学的試料中のB群連鎖球菌または関連細菌の検出方法であって、

(a) 患者から生物学的試料を単離する工程と

(b) 本発明の抗体またはそのフラグメントを生物学的試料とともにインキュベートして混合物を生成させる工程と、

(c) B群連鎖球菌または関連細菌の存在を示す混合物中の特異的結合抗体またはフラグメントを検出する工程と
を包含する方法を提供する。

【0096】

あるいは、本発明は、生物学的試料中のB群連鎖球菌または関連細菌に特異的な抗体の検出方法であって、

(a) 患者から生物学的試料を単離すること、

(b) 本発明のポリペプチドまたはそのフラグメントを生物学的試料とともにインキュベートして混合物を生成させること、および

(c) B群連鎖球菌または関連細菌に特異的な抗体の存在を示す混合物中の特異的結合ポリペプチドを検出すること
を包含する方法を提供する。

【0097】

これらの診断試験は、酵素免疫測定法(ELISA)、ラジオイムノアッセイまたはラテックス凝集試験を含めたいくつかの形態をとり得ると当業者は認識する。

【0098】

診断薬は、使用説明書およびその他の適切な試薬、好ましくはポリペプチドまたは抗体が結合されている場合の検出手段も含むキット中に含入される。例えばポリペプチドまたは抗体は、それが抗体に結合された場合のポリペプチドの検出、あるいはそれがB群連鎖球菌または関連細菌に結合された場合の抗体の検出を可能にする検出手段で標識されていてもよい。検出手段は、例えばフルオレセインイソシアネート(FIC)、フルオレセインイソチオシアネート(FITC)等の蛍光標識剤、例えばホースラディッシュペルオキシダーゼ(HRP)、グルコースオキシダーゼ等の酵素、例えば ^{125}I または ^{51}Cr 等のガンマ線放射を生じる放射性元素、あるいは試験溶液中に存在する電子との遭遇時にガンマ線を生じるポジトロンを発する ^{11}C 、 ^{15}O または ^{13}N などの放射性元素、であってもよい。結合は、他の方法によっても、例えばアビジン-ビオチン複合体を介しても検出され得る。検出手段の連結は、当該技術分野で既知である。例えばハイブリドーマにより産生されるモノクローナル抗体分子は、培地中の放射性同位元素含有アミノ酸の組入れにより代謝標識され得るか、あるいはポリペプチドは、活性化官能基を介して検出手段と接合されるかまたは結合され得る。

【0099】

本発明のDNA配列を用いて、生物学的試料中のB群連鎖球菌または関連細菌の存在を検出するために用いるDNAプローブを設計し得る。本発明のプローブによる検出方法は、

(a) 患者から生物学的試料を単離する工程と、

(b) 本発明のDNA配列を有するDNAプローブを生物学的試料とともにインキュベートして、混合物を生成する工程と、

(c) B群連鎖球菌または関連細菌の存在を示す混合物中の特異的結合DNAプローブを検出する工程と
を包含する。

【0100】

本発明のDNAプローブは、B群連鎖球菌または関連細菌感染の診断方法として、例えばポリメラーゼ連鎖反応を用いて、試料中に循環する核酸を検出するためにも用いられ得る。プローブは慣用的技法を用いて合成され、そして固相上に固定され得るか、または検

10

20

30

40

50

出可能標識で標識され得る。本出願のための好ましいDNAプローブは、cspA（配列番号1）の少なくとも約6個連続したヌクレオチドと相補的な配列を有するオリゴマーである。

【0101】

本発明のポリペプチドは、例えば抗原カラム上での抗体のイムノアフィニティー精製により、タンパク質上に存在するエピトープに対する抗体を精製するためにも用いられ得る。

【0102】

本発明の抗体または抗体フラグメントは、例えば抗原カラム上での抗体のイムノアフィニティー精製により、本発明の実質的に純粋なタンパク質を調製するために用いられ得る。

10

【0103】

ヒトに使用するためのワクチンを処方するために、適切なCspA抗原が、本明細書中に記載されたポリペプチドから選択され得る。例えば、免疫原性エピトープを含有するCspAポリペプチドまたはそのフラグメントに基づいて、当業者はワクチンを設計し得る。分子生物学方法の使用は、実質的に純粋な組換え抗原の調製に特に適している。

【0104】

ワクチン組成物は、種々の形態をとり得る。これらの例としては、例えば固体、半固体および液体剤形、例えば粉末、溶液または懸濁液、ならびにリポソームが挙げられる。本発明のCspA抗原が、ヒトに投与されると、防御的免疫応答を引き出すという本発明者の教示に基づいて、本発明の組成物は、破傷風およびジフテリアなどの他のタンパク質およびポリペプチドでヒトを免疫感作するために用いられるものと類似する。したがって本発明の組成物は、好ましくは薬学的に許容可能なアジュバント、例えば不完全フロイントアジュバント、水酸化アルミニウム、ムラミルペプチド、油中水型エマルジョン、リポソーム、ISCOMまたはCTB、あるいはコレラ毒素からの無毒性Bサブユニットを含む。最も好ましくは、組成物は油中水型エマルジョンまたは水酸化アルミニウムをアジュバントとして含む。

20

【0105】

組成物は、いくつかの薬学的に許容可能な態様、例えば筋内、皮内、皮下、腔内または局所投与のいずれかで、患者に投与される。好ましくはワクチンは筋内投与される。

30

【0106】

一般に投薬は、患者あたり約0.01~10mgの、好ましくは0.1~1.0mgのCspA抗原の、好ましくはアジュバントを伴う初回注射と、その後の1回または複数回の追加免疫注射から成る。好ましくは追加免疫は、初回注射の約1ヵ月後および6ヵ月後に投与される。

【0107】

連鎖球菌ワクチン開発に関する重要な考察は、粘膜免疫の問題である。理想的粘膜ワクチンは、1回または2~3回の用量として、経口的にまたは鼻腔内に安全に摂取され、そして全身免疫とともに適切な表面上に防御的抗体を誘導する。粘膜ワクチン組成物は、アジュバント、不活性粒状担体または組換え生ベクターを含み得る。

40

【0108】

本発明の抗CspA抗体は、B群連鎖球菌または関連細菌に感染したヒトの受動免疫療法および免疫予防のために有用である。このような受動免疫感作のための剤形およびレジメンは、他の受動免疫療法のものと同様である。

【0109】

弱毒化微生物体を基礎にしたワクチンの調製は、当業者に既知である。ワクチン組成物は、必要な場合または望ましい場合には、適切な担体またはアジュバント、例えばミョウバンとともに処方され、治療に用いられて、B群連鎖球菌またはその他の関連微生物体に対する有効な免疫感作を提供する。ワクチン処方物の調製は、熟練者には明らかである。

【0110】

50

別の態様では、本発明は、C s p Aの一部を免疫学的に模倣するペプチドの単離方法であって、

(1) 前記C s p Aと反応性である防御抗体を同定する工程と、

(2) ファージを有するファージ提示ライブラリを工程1で同定された1つまたは複数の上記防御抗体と接触させる工程と、

(3) 1つまたは複数の防御抗体を結合する提示ペプチドを有する1つまたは複数のファージを単離する工程と、

(4) 工程3で単離された全ての上記ファージに関して、抗体が結合したペプチドまたはペプチドフラグメントを選択する工程と

を包含する方法に関する。

10

【0111】

C s p Aを「免疫学的に模倣する」ペプチドは、C s p Aに対する抗体応答を惹起する物質である。ペプチドは、好ましくは5アミノ酸より大きいが、任意の長さのペプチドが本発明の範囲内である。

【0112】

本発明の範囲内の防御抗体は、G B S感染に対して防御するかまたはG B S感染の作用を改善することが示された抗体である。当該技術分野で既知である任意の殺菌検定を用いて、本発明の防御抗体を同定し得る。さらに防御抗体は、実験室動物、一般的にマウスが致死量の細菌を注射される致死量曝露検定の使用により、同定され得る。次に抗体が投与され、マウス生存が決定される。死亡を防御し得る抗体は、防御的であるとみなされる。

20

【0113】

「接触させる」とは、本明細書中で用いる場合、当該技術分野においてルーチンの方法により容易に測定され得るように、抗体/抗原結合を起こさせるのに十分な時間の間のインキュベーションを指す。

【0114】

「ファージ提示ライブラリ」とは、本明細書中で用いる場合、抗体により結合され得る位置で7~15アミノ酸のランダムアミノ酸配列を発現する多重度のファージを指す。

【0115】

本発明の実施に際して特に好ましいのは、Burritt等(Burritt, J.B. et al. 1996 Anal. Biochem. 238: 1)の方法により生成されるファージ提示ライブラリである。ファージは、当業者により示される通常の意味を有する(例えばSambrook, J.E. et al. 1989 Molecular Cloning: a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor N.Y. Cold Spring Harbor Laboratory)。

30

【0116】

「C s p Aに特異的な抗体」という語句は、C s p Aと構造的に関連しない物質に対してこれらの抗体が示す平均非選択的親和性よりも高い親和性で物質C s p Aを結合するモノクローナルまたはポリクローナル抗体を指す。全てのアイソタイプの抗体、即ちI g G、I g A、I g M、I g DおよびI g Eが用いられ得る。

【0117】

「1つまたは複数の抗体を結合する・・・1つまたは複数のファージを単離する」という語句は、抗体と構造的に無関連の抗原との間の親和性より高い親和性を有する抗体を結合するファージをファージ提示ライブラリから物理的に除去することを意味する。

40

【0118】

単離のための任意の方法が本発明の実施に際して用いられるが、好ましい方法は、当該技術分野で既知であるアフィニティー精製である。ファージ提示ライブラリからファージを単離する特に好ましい手段は、C s p Aと構造的に無関連の抗原に特異的な抗体で被覆された臭化シアン活性化セファロース4 Bビーズを用いて、反復的にライブラリを一次予備吸収することである。反復予備吸収後、C s p Aに特異的な1つまたは複数の抗体で被覆された臭化シアン活性化セファロース4 Bビーズとともに、ライブラリを一晩インキュベートする。このインキュベーション後、これらの同一ビーズを広範に洗浄し、次に2つ

50

の別個のプール中に溶離する、すなわち、0.1 M グリシン、pH 2.2 を用いた溶離により、一次プールが形成され、0.5 M の NH_4OH 、pH 7 を用いた溶離により二次プールが形成される。次に、最も好ましくは大腸菌株中で、溶離プールを増幅する。溶離後、各プールをカラムに再適用して、同一のインキュベーションおよび洗浄手法を用い、最初のプールを生成するために用いられた同一物質で（最後に）溶離する。この方法を、各プールに関して、最も好ましくは3回、反復する。最後に、プラークのイムノプロットを用いて、選択抗体との結合に関してファージを試験する。この最終回を通過したファージをクローン化し、高力価を増幅し、最も好ましくは2.5% ポリエチレングリコールを用いた沈降により精製する。

【0119】

「提示ペプチド」とは、ファージ提示ライブラリを作り上げる個々のファージの各々の間でランダムに変わりうる7~15アミノ酸のアミノ酸配列を有するペプチドを指す。

【0120】

この方法により一旦ペプチドが単離されれば、それらはワクチン中に用いられ得る。ワクチンは、ペプチドそれ自体を含むものでもよいし、あるいはペプチドは担体に接合されたものでもよいし、そうでなければ調合されたものでもよい。担体は、好ましくはT細胞を活性化し、動員し、それによりT細胞依存性抗体産生を増大し得る、T依存性抗原を指す。しかしながら、強力な免疫原性担体は、本発明の範囲内であるものの、担体はそれ自体強力な免疫原性である必要はない。多コピー担体も、本発明の範囲内である。多コピーペプチドも本発明の範囲内であり、担体の1つまたは複数のコピーと非接合であるかまたは接合される。ペプチドのフラグメントおよび誘導體も本発明の範囲内であり、必ずしも同一に再生されなくてもよく、単独でもよくまたは組合せてもよく、担体の1つまたは複数のコピーと非接合でも接合されていてもよい。ペプチドまたはその一部の単一または多コピーを含有する融合タンパク質も、本発明の範囲内である。さらなる実施形態では、融合タンパク質のDNAを発現する微生物体は、本発明の範囲内である。さらに別の実施形態では、任意のおよび全てのこれらの物質をコードするDNAは、本発明の範囲内である。

【0121】

好ましい実施形態では、担体はタンパク質、ペプチド、T細胞アジュバントまたは免疫応答を強化し得る任意のその他の化合物である。タンパク質は、ウイルス、細菌、寄生生物、動物および真菌タンパク質からなる群から選択され得るが、これらに限定されない。さらに好ましい実施形態では、担体は、アルブミン（例えばウシ血清アルブミン（BSA））、カギアナカサガイヘモシアニン（KLH）、卵白アルブミン（OVA）、破傷風毒素、ジフテリア毒素または細菌外膜タンパク質であり、これらは全て生化学品または薬品の供給会社から入手可能であるかまたは標準方法により調製され得る（Cruse, J.M. et al. 1989 Contrib. Microbiol. Immunol. 10: 1）。担体として機能し得るその他のタンパク質は、免疫学の分野における熟練者には既知である。

【0122】

単離されたペプチドは、さらなる調合剤のあるなしによらず、免疫原性であってもよいし、あるいは免疫原性が、調合剤から生じてもよい。免疫原性の測定方法は、当業者に既知であり、主として、血清抗体の測定、例えば構築物の注射後の種々の時間での量、結合活性およびアイソタイプ分布の測定を包含する。より大きな免疫原性は、抗体の高力価および/または寿命増大により反映され得る。免疫原性は、有害物質または生物体による曝露に対する防御を誘発する能力によっても測定され得る。免疫原性は、*in vitro* 殺細菌検定を用いて、ならびに新生仔および/または免疫欠損マウスを免疫感作する能力によっても測定され得る。免疫原性は、治療される患者集団において、または患者集団の免疫応答を模倣する集団において測定され得る。

【0123】

所定の物質の免疫原性を決定するための特に好ましい手段は、物質による免疫感作の前および後に、マウスの血清をまず採取することである。この後、CspAとの免疫感作後

10

20

30

40

50

血清結合の強度は、E L I S A を用いて決定され、免疫感作前血清に関して得られた E L I S A 結果に対して比較される。

【 0 1 2 4 】

薬学的に許容可能な担体は、水および油などの滅菌液体、例えば、落花生油、大豆油、鉱油、ゴマ油等の石油、動物、植物または合成起源のものであってもよい。水は、薬学的組成物が静脈注射される場合、好ましい担体である。生理食塩溶液、ならびにデキストロスおよびグリセロール水溶液も、液体担体として、特に注射溶液のため用いられ得る。適切な薬学的担体は、Martin, E.W., Remington's Pharmaceutical Sciencesに記載されている(この記載内容は、参照により具体的に本明細書中に含まれる)。これらの担体は、免疫アジュバントも含有し、その例としてはミョウバン、アルミニウム化合物(リン酸塩および水酸化物)およびムラミルジペプチド誘導体が挙げられるが、これらに限定されない。

10

【 0 1 2 5 】

本発明は、免疫刺激量のワクチンの投与による患者の治療にも関する。患者は、治療が有益であり得る任意の被験者を指し、例としては、哺乳類、特にヒト、ウマ、ウシ、イヌおよびネコ、ならびにその他の動物、例えばヒヨコが挙げられる。免疫刺激量とは、疾患の予防、改善または治療のための患者の免疫応答を刺激し得るワクチンの量を指す。もちろん、上記のように、免疫刺激は、抗体やそれが調合されるアジュバントの形態に起因し得る。

【 0 1 2 6 】

本発明のワクチンは任意の経路により投与され得るが、好ましくは局所的に、粘膜的にまたは経口的に投与される。その他の投与方法は当業者に熟知されており、例としては、静脈内、筋内、腹腔内、体内、関節内、鞘内、腔内、鼻腔内、経口の投与および皮下注射が挙げられる。

20

【実施例 1】

【 0 1 2 7 】

序論

組換え C s p A タンパク質に対して産生されるウサギ抗体が、その後 G B S で曝露される新生仔ラットに受動免疫を付与し得るか否かを決定するために、実験を実施した。

【 0 1 2 8 】

30

方法

上記のように発現され、精製された組換え C s p A - グルタチオン S - トランスフェラーゼ融合タンパク質でニュージーランドシロウサギを免疫感作し、その後、ウサギを全採血することにより、C s p A に対する抗体を作製した。腹腔内注射によって 5 0 μ l の抗 C s p A 熱不活性化高度免疫血清(希釈なし、P B S 中に 1 / 5、1 / 1 0 および 1 / 2 0 に希釈)を投与することにより、2 4 ~ 4 8 時齢の Sprague-Dawley ラット仔の受動免疫感作を実行した。対照として、5 0 μ l の正常ウサギ前免疫血清を投与した。注射後、仔ラットを 2 時間の母ラットに戻して、血清をピーク循環させた。高病毒性 I I I 型 G B S 単離物 C O H 1 を、曝露株として用いた。C O H 1 を O D₆₀₀ = 0 . 6 (光学濃度)に増殖させ、最初の培養容積と等しい容積のリン酸塩緩衝化生理食塩水(P B S)の中で 1 回洗浄し、回収して、次に最終 O D₆₀₀ = 0 . 3 5 (約 1 × 1 0⁸ C F U / m l)となるように P B S 中に再懸濁した。懸濁液を 1 / 1 0 0 0 まで希釈し、5 0 μ l (約 1 8 7 0 個の細菌)の懸濁液を用いて、皮下注射によりラット仔に曝露した。ラット仔を、7 2 時間、死亡に関してモニタリングした。3 6 時間目に、各試験群の 2 匹の動物を屠殺し、脾臓を取り出して、P B S 中でホモジナイズした。その結果生じた懸濁液の希釈液をトッド・ヒューイット寒天にプレート化して、G B S の存在に関して試験し、夾雑物が存在しないことを検証した。全実験を 2 回実行し、1 回は高度免疫血清の希釈を実施し、かつ 1 回は希釈を実施しなかった。

40

【 0 1 2 9 】

結果

50

第一実験では、非希釈高度免疫血清を用いて、抗C s p A血清で予防接種した群において、20匹のラットのうち12匹が死亡し、正常ウサギ抗血清（同一ウサギからの前免疫血清）で予防接種した対照群では、20匹のうち19匹が死亡した。第二実験では、高度免疫血清の希釈液を調製し、非希釈抗血清で処置した動物14匹のうち9匹が死亡し、抗血清の1/5希釈液で処置した動物14匹のうち7匹が死亡し、抗血清の1/10希釈液で処置した動物14匹のうち6匹が死亡し、抗血清の1/20希釈液で処置した動物14匹のうち8匹が死亡し、かつ正常ウサギ抗血清で処置した動物14匹のうち12匹が死亡した。

【0130】

結論

両実験において、抗C s p A血清による受動免疫感作は、G B S曝露に対する防御を提供した。抗血清の希釈液を投与した実験では、抗C s p A血清の1/5希釈液による処置を施された動物は、G B Sによる曝露からの最大防御を示した。要約すると、抗C s p A - G S T血清はその後の致死性G B S曝露に対して新生仔ラットにおいて防御的であったことを、これらの実験は示す。

10

【実施例2】

【0131】

序論

新生仔におけるG B S感染に対する防御メカニズムは、母親からの防御的I g G免疫グロブリンの経胎盤移入に依存する(Lin, F.C. et al. 2001 J Infect Dis 184: 1022-1028)。したがって候補G B Sワクチンは、I g G応答を引き起こすことのできるものでなければならない。次に、対応するI g G抗体が、致死用量のG B Sによる曝露に対する防御を付与する能力に関して、動物受動防御モデルで試験される。

20

【0132】

実施例1に記されたように、C S Pタンパク質を発現させ、精製し、ウサギ抗血清を産生するために用いた。次にプロテインAアフィニティークロマトグラフィーを用いて、I g G抗体を精製した。B群連鎖球菌(G B S)タンパク質C S P(C S P)に対して産生された抗血清からの精製I g Gを、ラット仔防御モデルにおける2つの場合に関して試験した。細胞全体(W C)G B Sに対して産生された抗血清からの精製I g Gを、陽性対照として用いた。

30

【0133】

方法

細菌株

これらの試験において曝露株として用いられるG B S株(タイプ1 a / c A 9 0 9)を、National Collection of Type Culturesから入手した(N C T C参照番号1 1 0 7 8、バッチ番号3)。

【0134】

動物

妊娠雌Sprague Dawleyラット(約70日齢)を、Charles River (Margate, Kent, UK)から入手した。到着時に、Gold Flake木屑寝床(Lillico Attlee, Aylesford, Kent)を敷き詰めた個々の換気ケージ中に、12時間明/暗周期(08:00に点灯)下で、35~55%の相対湿度で 21 ± 1 で、動物を収容した。全動物が水道水およびR M 3 P餌(Special Diet Services Ltd., Witham, Essex, UK)を自由に摂取した。UK Home officeにより発行されている、Scientific Proceduresに用いられる動物の収容およびケアに関する実施コード(Code of Practice for the Housing and Care of Animals)に従って、動物を収容し、保持した。Animals (Scientific Procedures) Act 1986下で授与されたプロジェクト認可の権限下で、全実験を実行した。

40

【0135】

候補タンパク質に対して産生されるウサギ抗血清からのI g G精製

実施例1に上記したようにして、C S Pタンパク質に対するウサギ抗血清を産生した。

50

全ての場合に、標準手法を用いたプロテインAアフィニティークロマトグラフィーを用いて、IgGを精製した。

【0136】

純化ラット仔防御モデルにおけるGBSによる致死曝露に対する精製IgG抗血清の防御作用

ラット仔防御モデルを用いて、精製IgG試料を試験した。精製IgG、または陰性対照としてのPBS50μlによる腹腔内免疫感作の5～7時間後、約 5×10^4 CFU/GBS50μlを、各ラット仔に皮下投与した。各実験で投与した細菌の実際の量を、生育数の測定により決定した。ラット仔をGBS曝露後63～68.5時間モニタリングし、極端な不快を示す動物を屠殺した。終点の判定基準を下記に示す。以前の実験において、免疫前対照血清はラット仔の生存に作用を及ぼさないことが示されたため、PBSを陰性対照として用いた。

10

【0137】

屠殺したラット仔の数およびそれらの死亡時期を記録した。

【0138】

動物モデル終点判定基準

一次検査臨床徴候：

終点を確定するために用いた判定基準を以下に示すが、それはプロジェクト認可の一部を構成する：

接種部位の発赤

全身性紅斑

皮下出血

頭部および四肢の蒼白

体温低下（触ると冷たい）

20

【0139】

二次検査臨床徴候：

筋緊張増大 / 背側への凸屈曲

実質的皮下出血。

【0140】

一次検査徴候のいずれかの発症を、健康不良を発症の指標と解釈し、検査の頻度を増やした。2つまたはそれ以上の一次検査徴候に加えて二次検査徴候のいずれかを認めた場合、終点到達したと決定し、動物を類別して間引いた。

30

【0141】

各試験においてラット仔に投与される実際の曝露GBS用量の定量

各試験に関して、50μl容積でラット仔に投与されるGBSの用量を、血液寒天プレート上に広げた接種物の希釈液から算定した。37℃で一晩のプレートのインキュベーション後にコロニー数を記録し、結果をまとめた。全ての場合に、投与したGBSの用量は、50μl容積中の 5×10^4 CFUと定めた値より高かった（表2）。

【0142】

【表2】

40

表2. 各動物試験において各仔に投与したGBSのCFU数。約 1×10^2 または 1×10^3 CFU/mLの連続希釈で血液寒天プレート上で計数されたコロニー数から、CFUを算定した。

試験番号	投与GBS細胞数/仔/50μL用量
1	6.8×10^4
2	9.5×10^4
5	9.2×10^4
6	8.5×10^4

【0143】

結果

50

50 μ L 中約 5×10^4 CFU の濃度の GBS A909 株による曝露のラット仔に及ぼす作用 (試験 1 および試験 2)

これらの試験において、GBS の A909 株によりラット仔を曝露したときの効果を評価した。GBS 用量を各ラット仔に皮下投与した。GBS 曝露後 68.5 時間までの間、仔をモニタリングし、極端な苦痛を示す動物を、上記と同様に屠殺した。

【0144】

【表 3】

表3. GBSのA909株による曝露後に屠殺されたラット仔の数。生存した仔の数を、試験1では曝露後64時間まで、試験2では68.5時間まで、モニタリングした。

試験	用量	ラット仔の総数	屠殺された仔の総数	曝露に対して生存した仔 (%)
1	6.8×10^4	28	22	21
2	9.5×10^4	26	20	23
2	9.5×10^4	27	26	4

10

【0145】

これらの試験からの結果は、約 5×10^4 CFU の用量での GBS A909 による曝露後に生存した仔のパーセンテージは 4% ~ 23% であった、ということを示す。これらの結果は、同一の場合に同一曝露量で実行された実験における生存率について、ずれがあることを示す。

【0146】

GBS 曝露に対する精製 CPS および WC GBS IgG の防御作用 (試験 5)
この試験では、CSP および細胞全体 (WC) A909 GBS に対して産生された抗血清から精製した IgG の、GBS A909 株に曝露したラット仔における防御効果を、PBS 溶液と比較した。屠殺動物数を、下記の表 4 に示すように種々の時間間隔で記録し、各群における仔の総数のパーセンテージとして表した。

20

【0147】

【表 4】

表 4. 9. 2×10^4 CFU / $50 \mu\text{L}$ の GBS A909 株による曝露の 5 ~ 7 時間前に、PBS 溶液 (陰性対照) または WC A909 (陽性対照) に対する精製 IgG 抗血清、ならびに CSP (試験抗血清) を接種後、屠殺されたラット仔の数。生存した仔の数を、GBS 曝露後、63 時間の期間に亘ってモニタリングした。

精製 IgG が 産生されたタ ンパク質	ラット仔 の総数	GBS 曝露後 14 ~ 63 時間に屠殺されたラット仔の数							63 時間後に屠殺 された仔の総数	63 時間後に生 存した仔 (%)		
		14	15.5	18.5	21.5	23.5	39	42			45.5	63
PBS	30	7	3	5	3	1	0	0	0	0	19	37
WC GBS	30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100
CSP	30	4	4	0	0	0	5	1	0	0	14	53

10

20

30

40

50

この試験からの結果は、防御的免疫感作を施されなかったラット仔群（PBS溶液陰性対照群）の37%が生存した、ということを示す。抗GBS細胞全体血清から精製されたIgGを投与された群（陽性対照）における生存パーセンテージは、100%であった。抗Csp血清から精製されたIgGを投与された群における生存パーセンテージは、53%であった。

【0149】

GBS曝露に対する精製CSPおよびWC GBS IgGの防御作用（試験6）

この試験では、CSPおよび細胞全体A909GBS（WC）に対して産生された抗血清から精製したIgGの防御作用をPBSと比較した。細胞全体A909に対して産生された抗血清から精製したIgGを、非希釈IgGと比較した場合の防御のレベルを評価するために1/5希釈液で試験した。各実験群には30匹のラット仔が存在し、GBS接種後63時間の期間中に屠殺されたラット仔の数を記録した。表5に示したように屠殺動物を種々の時間間隔に分類し、照合して、各実験群に用いた仔の総数のパーセンテージとして表した。

10

【0150】

【表 5】

【表 5】

表 5. 8. 5×10^4 CFU / $50 \mu\text{L}$ の GBS の A909 株による曝露の 5 ~ 7 時間前に、PBS 溶液 (陰性対照) または 1 : 5 WC A909、WC A909、もしくは CSP に対する精製 IgG 抗血清を接種した後、屠殺されたラット仔の数。生存した仔の数を、GBS 曝露後、63 時間の期間に亘ってモニタリングした。

精製 IgG が 産生されたタ ンパク質	ラット 仔の総 数	GBS 曝露後 15 ~ 63 時間に屠殺されたラット仔の数											63 時間後に 屠殺された仔 の総数	63 時間後に生 存した仔 (%)	
		15	16.5	19	22.5	24	24	39	41	43.5	45.5	47.5			63
PBS	30	11	3	3	2	2	2	1	0	0	0	0	0	24	20
1 : 5 WC GBS	30	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	2	93	
WC GBS	30	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	93	
CSP	30	4	1	1	0	1	2	0	0	0	0	0	9	70	

この試験からの結果は、PBSを摂取したラット仔における生存パーセンテージは20%であり、抗WC IgGを摂取した群における生存パーセンテージは、1倍濃度およびPBSで1/5に希釈した場合とも、93%であった、ということを示す。抗CSPにより生じた生存パーセンテージは、群内の動物の70%を防御した。

【0152】

Cspデータの統計学的分析

各場合に試験した仔の総数を30匹と仮定して、一般化線形モデルを、各実験において各群で生存する仔の数に適合させた。二項式誤差構造およびロジットリンクを仮定して、Genstat統計学的パッケージを用いてモデルを適合させた。Csp処置群および陰性対照PBS処置群間の生存の確率を比較した。この分析の結果は、5.6という確率比概算を生じ、95%信頼限界は2.7~11.9であったが、これは5%有意レベルで統計学的に有意である。このことは、CSP処置群における生存の確率が陰性対照群における生存の確率の5.6倍大きいことを、そしてこの比が95%の信頼度で2.7~11.9である、ということの意味する。

【0153】

考察

死滅全細胞GBS調製物は、それらが惹起する防御免疫応答の大多数が血清型特異的であるので、ワクチン候補としての有用性が限られている。これに対比して、CSP抗原は、今日までに試験された全てのGBS株によりコードされる。これらの試験は、CSPタンパク質に対して産生される精製IgGが、GBS疾患の受動防御ラット仔モデルにおいて統計学的に有意の防御作用を有する、ということを示した。

【0154】

分かり易く且つ理解し易くするために、本発明を多少詳細に記載してきたが、本発明の真の範囲を逸脱することなく、形式および詳細における種々の変更がなされ得る、と当業者は理解するであろう。上記に言及された図面、表、付表、特許、特許出願および出版物は全て、その記載内容が参照により本明細書中に取り込まれる。

【図面の簡単な説明】

【0155】

【図1A】CspAの全ヌクレオチドコード配列である。

【図1B】CspAの全ヌクレオチドコード配列である。

【図1C】CspAの全ヌクレオチドコード配列である。

【図2】CspAの全アミノ酸コード配列である。

【図3】III型B群連鎖球菌(GBS)におけるcspA領域の地図である。矢印は、同定されたオープンリーディングフレーム(ORF)およびそれらの転写方向を示す。制限エンドヌクラーゼ認識部位の表示は、C、ClaI; X、XbaIおよびH、HindIIIである。遺伝子座をシーケンシングするために用いられたプラスミド挿入物は、地図の上に示されている。2342位および5983位の5'末端および3'末端のHindIII部位は、内部cspAコード配列をermと入れ替えるために用いた。sbxAは、既知タンパク質と同一性を有さない202アミノ酸の産物をコードする。sbtAの337アミノ酸産物は、多数のtRNAシンセターゼのC末端コード領域と有意の同一性を共有する。ORF地図の下に示されているのは、CspAの予測される配列中で同定されたタンパク質モチーフである(Siezen, R.J. 1999 Antonie Van Leeuwenhoek 76: 139-155); シグナル配列(SS; 残基1~35)、プレ-プロドメイン(36~143)、プロテアーゼドメイン(144~638)、Aドメイン(639~1076)、細胞壁スペーサードメイン(1077~1535)および細胞壁アンカードメイン(CWA; 1536~1571)。RGDモチーフ(D'Souza, S.E. et al. 1991 Trends Biochem Sci 16: 246-250)は、プロテアーゼドメインおよび446位に存在する。Aドメインの機能は未知であるが、それはプロテアーゼドメインの調節または基質特異性に関与しているかもしれない(Siezen, R.J. 1999 Antonie Van Leeuwenhoek 76: 139-155)。

【図4】COH1およびTOH121におけるcspA発現のノーザンプロット分析を示

す。各菌株からの等量のRNA (5 μ g) を用いて、標準のノーザンブロットを実施した。A. cspAプローブを用いて検出されたブロット。レーン1、THB中でOD₆₀₀ = 0.3に増殖したCOH1; レーン2、COH1 OD = 0.6; レーン3、COH1 OD = 1.7; レーン4、TOH121 OD = 0.3; レーン5、TOH121 OD = 1.7。B. sbrAプローブを用いて検出されたブロット。レーン1、COH1 OD = 0.6; レーン2、TOH121 OD = 0.6。RNAサイズ標準の移動を、右側に示す(kb)。

【図5】抗CspA血清を用いた大腸菌およびGBS株におけるCspA発現のウエスタンブロット分析を示す。レーン1、pBSを含有する大腸菌DH5からのペリプラズム抽出物(陰性対照); レーン2、pTH5 (pBSKS (Stratagene, La Jolla, CA, USA) 中のcspAを含むXbaIフラグメント) を有する大腸菌DH5からのペリプラズム抽出物。ペリプラズム抽出物中のCspAの下方への移動は、翻訳を未成熟で終結するpTH5における突然変異のためである、ということに留意(下記参照); レーン3~6、COH1 (レーン3)、TOH121 (cspA⁻; レーン4)、TOH97 (scpB⁻; レーン5) およびTOH144 (cspA⁻ scpB⁻; レーン6) からのムタノリシン抽出GBS表面タンパク質。分子量マーカーを左側に示す。

【図6】C5aプロテアーゼ活性に関する機能検定を示す。各GBS株を組換えヒトC5aとともにインキュベートした後のゼラチン被覆組織培養ウエルへのヒト多形核白血球(PMN)による接着%を示す(Bohnsack, J.F. et al. 1991 Biochem J 273: 635-640)。対照として、緩衝液単独(「緩衝液」)または100 ng/mlの非処理C5a(「C5a」)を細菌を伴わずにインキュベートした後、PMNに曝露した。試験したGBS株は、COH1 (陽性対照; cspA⁺, scpB⁺)、GW (陰性対照、C5aアーゼ活性を欠くIII型GBS株(Bohnsack, J.F. et al. 2000 Infect Immun 68: 5018-5025))、TOH97 (陰性対照; cspA⁻, scpB⁻)、TOH121 (cspA⁻, scpB⁺)、TOH144 (cspA⁻, scpB⁻)であった。

【図7】カゼイナーゼ活性検定を示す。GBS株COH1をトッド-ヒューイトブロス (THB) 中で増殖させて定常期にして、リン酸塩緩衝化生理食塩水(PBS)中で洗浄し、20倍に濃縮して、PBS中に再懸濁した。プロテアーゼ検定等級カゼイン (Sigma, St. Louis, MO) の飽和溶液を調製し、0.2 mlの細菌を0.3 mlのカゼインと混合した。PBSを用いた偽反応液(細菌なし)も調製した。混合物を37°Cで24時間インキュベートし、アリコートで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)のために取り出した。分子量マーカーを左側に示す。レーン1、PBS対照; レーン2、0時間インキュベーション後のCOH1; レーン3、24時間インキュベーション後のCOH1。分子量マーカーの移動(kDa)を左側に示す。

【図8】フィブリノーゲン分解検定を示す。GBS株COH1 (wt) およびTOH121 (cspA⁻) をTHB中で定常期まで増殖させた。細胞を等容積のPBS中で1回洗浄し、20倍に濃縮した。次にフィブリノーゲンを添加して、濃度を0.61 μ g/mlとした。懸濁液を37°Cで一晩(16時間)徐々に回転しながらインキュベートし、遠心分離により細菌を除去し、3 μ gの総フィブリノーゲンを含有する上清を、以下のようにSDS-PAGEにより分析した: レーン1、0時間インキュベーション後のCOH1; レーン2、0時間インキュベーション後のTOH121; レーン3、16時間インキュベーション後のCOH1; レーン4、16時間インキュベーション後のTOH121。図の左側の矢印は、CspAによりタンパク質分解されるフィブリノーゲンのフラグメントの小種の移動位置を意味する。分子量マーカーの移動(kDa)を右側に示す。

【図9】PMNによるGBS株のオプソニン食作用を示す。GBS株COH1、TOH121 および非被包性変異体COH1-13を、PMNによるオプソニン食作用に対する耐性に関して比較した。細菌(1 \times 10⁶) およびヒトPMN (3 \times 10⁶) を、補体供給源(GBS Abを除去するためにCOH1で予備吸収させた)としての10%ヒト血清中で37°Cで1時間インキュベートした。増殖指数を、出力コロニー形成単位(CFU) / mlを入力CFU / mlで割って算定した。4つのうちの代表的実験1つを示す。対照

10

20

30

40

50

を試験株 T O H 1 2 1 に対して、熱不活性血清 (「 H I S 」) を用い、 P M N なし (「 - P M N 」) で実施した。

【 図 1 0 】 C s p A のドメインの残基数と番号である。

【 図 1 1 】 C s p A プロテアーゼ中の予測されるドメインの模式図である。 P P = プレ - プロドメイン ; P R = プロテアーゼドメイン ; I = 挿入ドメイン ; A = A - ドメイン ; H = 螺旋ドメイン ; W = 細胞壁ドメイン ; A N = アンカードメイン (黒色小点は L P X T G モチーフを示す、配列番号 2 のアミノ酸 1 5 3 6 ~ 1 5 4 0) 。

【 配列表 】

SEQUENCE LISTING

<110> Children's Hospital & Regional Medical Center, Seattle, U.S.A.
Rubens, Craig E.
Harris, Theresa

10

<120> Use of a Novel Cell Surface Protease
Protein of Group B Streptococcus (GBS), called CspA, as a
Vaccine to Prevent GBS Infection

<130> CHMED.003 VPC

<150> US 60/344,605
<151> 2001-12-21

<160> 4

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

20

<210> 1
<211> 4716
<212> DNA
<213> Streptococcus agalactiae

<400> 1
atgaacacaa aacagcggtt ttcaatcogg aaatataagt taggtgcogt atctgtactt 60
ttgggaacc tatttttttt aggcgggtat acaaatgtag ctgctgattc tgtcataaat 120
aagccatctg atattgcagt tgaacagcaa gtaaaagaca gtccaacgag catagcaaat 180
gaacaccta ctaacaacac gtcacagcc cttgcgtcaa cagctcaaga caatcttgtt 240
acaaggcta ataataatag tccaacagaa acacaaccag taactgagcc tcaactctca 300
gcaaccgaga cattttcccc agcogcaaat caaccgggtg aaagcaactc agaagtttct 360
aaaaactcct taaccaaca aaatttagca gtcaaacctc caccagctat ttctaagaa 420
accctcaaaa acattgatag taataaaatt atcactgtcc ccaaaagtat gaacacagc 480
tacaaggag agggaaactg tgtagcaatt attgactcag gactagatac caatcacgat 540
gctctccaat taatgatctc gacaaaagca aaataccaaa acgaacagca aatgaatgct 600
gctaaggcaa aagctgggat aaactatgga aatgggtata acaacaagt aatctttgtt 660
cacaactatg ttgatgtcaa tacagagcta aaagaggtga aaagcacttc tcatgggatg 720
cagtaacca gtatogcaac agctaatoct agcaagaaag atacaaatga ataatctat 780
ggtgttgcct ctgaagcaca agtaatggtt atgagagtct tctctgatga aaaaagagga 840
actggaccag ccctttatgt taaagctatt gaagatgcoo ttaaaactog tctgatagc 900
attaatttaa gtttaggtgg agctaattggc tctttagtta atgcogatga ccgacttata 960
aaagctttag agatggctag actcogctggc gtttctgttg ttatagcagc aggtaacgac 1020
ggtacatttg ggagtggagc atcaaagcct tctgtctttt atcctgatta tggtttagtt 1080
ggtagtcct caacagctcg tgaggccatt totgtagcat catataataa tacaaccactg 1140
gtaataaag tcttcaacat tatcggatta gaaaacaaca aaaatctcaa caacggatta 1200
gctgcttatg cagatcctaa agttagtgat aagacctttg aagtagggaa gcaatatgat 1260
tatgttttcg taggaaaagg aaacgacaat gattataagg acaaaaacttt aaatggtaaa 1320
atcgocctaa ttgaacgtgg agatattact tttacaaaaa aagtcgtcaa cgtattaat 1380
cacgggtgctg tgggagctat tatctttaat aacaagctg gagaagctaa tctaacaatg 1440
agtttagatc ctgaagcaag cgtatttcct gccattttta ctcaaaaaga gtttgagat 1500
gttttagcta aaaaacaacta taaaattgta tttacaata tcaaaaataa acaagccaac 1560
cctaattgca gtgtctatc tgaactttca agctggggat taacagcaga cggacaatta 1620
aaacctgact tatctgctcc tggaggctct atttacgcc ctatcaatga taatgaatat 1680
gatatgatga gtgggacaag tatggctctc ccccatgtcg ctgggtgctac tgccttagtt 1740
aaacaatact tattgaaaga acatccagaa cttaaaaaag gtgacattga aagaactgtc 1800
aaataccttc ttatgagtac tgctaaagca cacctaaaca aagatacagg cgtttacacc 1860
tcaccacgcc aacaaggagc aggtattatc gatgtocgag cagcagttca gacaggatta 1920
taccaactg gtggggaaaa caactatggt agcgttacct taggaaatat taaagataaa 1980
atttcccttg atgtttagtt tcataatctc aataaagttg caaaaagattt acactataca 2040
acctatttaa atactgatca agttaaagat ggctttgtca cattagctcc tcaacaactt 2100
ggtacattta cagggaaaac gataccgatt gaaccagggc aaactaaaac gattacaatt 2160
gatatagatg tttcgaataa ccatgacatg ttaaaaaaag taatgcaaaa cggctatttc 2220

30

40

```

ctagaagcgt acgtacggtt tacagaccct gttgatggtg gggaaagttct tagtattcct 2280
tatgtttgat ttaagggaga attccaaaaac ttagaagttt tagaaaaatc catttataag 2340
cttgttgcta acaagaaaaa gggattttat ttocaaccga acaaaacaaa ogaagtcct 2400
ggttcagaag attatactgc cttaatgact acaagttcag agcctatcta ctcaacagac 2460
ggtagctagtc ctatccaatt gaaagccttg ggaagctata agtctataga tggaaaatgg 2520
atottacaac tagagcaaaa aggcagcct catctagcca ttccacctaa tgatgaccaa 2580
aatcaagatg ccggtgcact gaaaggtggt ttcttacgta atttcaataa ttttaagacc 2640
aaagtctatc gtcagatga tgtaatttta caaaaaaccac tatgggtaag tgctccocaa 2700
gcaggagata aaaattacta cagcggaaat actgaaaatc caaaatctac atttttatat 2760
gacacagaat ggaaggaac cactactgat ggtattcctt tagaagatgg aaaatacaaa 2820
taogttttaa catactactc tgatgtccct ggctctaagc cacaacaaat ggtatttgat 2880
atcactttgg atagacaagc tcctacacta acaacagcaa ctatgacaa agatagacgt 2940
atcctcaaag ctgctcctgc agtagaacac ggggaatctg gtatccttag agaacaagtt 3000
ttttacttaa aaaaagataa agatgggtcat tataatagcg tcttacgtca aaaaggagaa 3060
gacggtatcc ttggtgaaga taacaagata tttatcaaac aagaaaagga tggtagcttt 3120
attctaccta aagaggttaa tgatttctct catgtctact acactgttga agattatgca 3180
ggcaatctag tgtcagcaaa actcgaagat ttgatcaata ttggcaataa aaatggttta 3240
gtaaaccgta aagtgttttag ccctgagctt aacagtaatg tccgatattga tttctcttac 3300
tctgtcaaaag atgacaaaagg taatgtcctc aaaaagcaac atcacgggaa agacctcaat 3360
ttactgaaat tgcttttgg tactatatacg ttgacctat tottatacga tgaggaaacga 3420
gcaaatctaa tcagtcocaa aagtgtcact gtaactatct ctgaaaaaga tagccttaa 3480
gacgtcttat ttaaagttaa cttactcaag aaagcagcct tactcgttga atttgacaag 3540
ctttttacca aaggagcaac agtccagttg gttactaaga caaatactgt tgttgatcta 3600
ccaaaagcaa ctattctcc tactgactat ggtaaaaaca tacctgtagg agactatcgt 3660
ttaaaccgta cgctgcctag tgggtatagc actttagaga acttagatga tttacttgta 3720
tccgtaaaag aaggtcaagt aaatctaaca aaattgacgc tgattaataa agctcctcta 3780
attaatgccc tagcagaaca aactgacatt atttccaac ctgtgtttta taatgctgga 3840
actcacttaa aaaataatta cctagcctaatt cttgaaaagg caaaaacttt aattaaaaat 3900
agagtggaac aaacaagtat tgataatgct attgctgctt tgagagaaag tccccaagct 3960
cttaaccgta aagaaacaga tacttcttta ctggcaaaag ctattttagc tgaacagaa 4020
atcaagggaa actatcaatt tgttaatgct agtccattaa gccaatcaac ttatatcaat 4080
caagtccaat tggcgaaaaa tctttotaca aaacctaacg tcaactcaatc agaagtagac 4140
aaagccttag aaaatcttga tattgctaaa aatcaattaa atgggtcatga aactgattac 4200
tctggtttac accatattgat aattaaagca aatgtttctga aacaaacatc atctaaatat 4260
cagaagcca tcgaatttgc taaagaaaat tataataacc ttatcaagaa agcagaattg 4320
ctgctttcca atagacaagc tacacaagct caagttgaag agttattaaa ccaaataaaa 4380
gcaaccgaac aagaacttga tggtcgcat agagtttctt ccgcagagaa ttatagtcaa 4440
toactcaatg ataatgactc tctcaatacc acacctatca atccgcaaaa tcagccocag 4500
gcgttgatat tcaaaaaagg catgactaaa gaaagtgagg ttgctcagaa gcgtgtctta 4560
ggggtgacta gccaaaccga taatcaaaag ataaagacaa acaagcttcc taaaacaggg 4620
gaaagcactc ctaaaataac ctatacaata ttgctattta gtctctctat gctaggtctg 4680
gcaacaatca aactaaagtc tatcaaaaga gaataa 4716

```

10

20

```

<210> 2
<211> 1571
<212> PRT
<213> Streptococcus agalactiae

```

```

<400> 2
Met Asn Thr Lys Gln Arg Phe Ser Ile Arg Lys Tyr Lys Leu Gly Ala
1 5 10 15
Val Ser Val Leu Leu Gly Thr Leu Phe Phe Leu Gly Gly Ile Thr Asn
20 25 30
Val Ala Ala Asp Ser Val Ile Asn Lys Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
35 40 45
Gln Gln Val Lys Asp Ser Pro Thr Ser Ile Ala Asn Glu Thr Pro Thr
50 55 60
Asn Asn Thr Ser Ser Ala Leu Ala Ser Thr Ala Gln Asp Asn Leu Val
65 70 75 80
Thr Lys Ala Asn Asn Ser Pro Thr Glu Thr Gln Pro Val Thr Glu
85 90 95
Pro His Ser Gln Ala Thr Glu Thr Phe Ser Pro Ala Ala Asn Gln Pro
100 105 110
Val Glu Ser Thr Gln Glu Val Ser Lys Thr Pro Leu Thr Lys Gln Asn

```

30

40

625					630					635				640
Tyr	Leu	Thr	Gly	Gly	Glu	Asn	Asn	Tyr	Gly	Ser	Val	Thr	Leu	Gly
				645					650					655
Ile	Lys	Asp	Lys	Ile	Ser	Phe	Asp	Val	Thr	Val	His	Asn	Ile	Asn
				660					665					670
Val	Ala	Lys	Asp	Leu	His	Tyr	Thr	Thr	Tyr	Leu	Asn	Thr	Asp	Gln
				675					680					685
Lys	Asp	Gly	Phe	Val	Thr	Leu	Ala	Pro	Gln	Gln	Leu	Gly	Thr	Phe
				690					695					700
Gly	Lys	Thr	Ile	Arg	Ile	Glu	Pro	Gly	Gln	Thr	Lys	Thr	Ile	Thr
				705					710					715
Asp	Ile	Asp	Val	Ser	Lys	Tyr	His	Asp	Met	Leu	Lys	Lys	Val	Met
				720					725					730
Asn	Gly	Tyr	Phe	Leu	Glu	Gly	Tyr	Val	Arg	Phe	Thr	Asp	Pro	Val
				735					740					745
Gly	Gly	Glu	Val	Leu	Ser	Ile	Pro	Tyr	Val	Gly	Phe	Lys	Gly	Glu
				750					755					760
Gln	Asn	Leu	Glu	Val	Leu	Glu	Lys	Ser	Ile	Tyr	Lys	Leu	Val	Ala
				765					770					775
Lys	Glu	Lys	Gly	Phe	Tyr	Phe	Gln	Pro	Lys	Gln	Thr	Asn	Glu	Val
				780					785					790
Gly	Ser	Glu	Asp	Tyr	Thr	Ala	Leu	Met	Thr	Thr	Ser	Ser	Glu	Pro
				800					805					810
Tyr	Ser	Thr	Asp	Gly	Thr	Ser	Pro	Ile	Gln	Leu	Lys	Ala	Leu	Gly
				815					820					825
Tyr	Lys	Ser	Ile	Asp	Gly	Lys	Trp	Ile	Leu	Gln	Leu	Glu	Gln	Lys
				830					835					840
Gln	Pro	His	Leu	Ala	Ile	Ser	Pro	Asn	Asp	Asp	Gln	Asn	Gln	Asp
				845					850					855
Val	Ala	Leu	Lys	Gly	Val	Phe	Leu	Arg	Asn	Phe	Asn	Asn	Leu	Arg
				860					865					870
Lys	Val	Tyr	Arg	Ala	Asp	Asp	Val	Asn	Leu	Gln	Lys	Pro	Leu	Trp
				875					880					885
Ser	Ala	Pro	Gln	Ala	Gly	Asp	Lys	Asn	Tyr	Tyr	Ser	Gly	Asn	Thr
				890					900					905
Asn	Pro	Lys	Ser	Thr	Phe	Leu	Tyr	Asp	Thr	Glu	Trp	Lys	Gly	Thr
				910					915					920
Thr	Asp	Gly	Ile	Pro	Leu	Glu	Asp	Gly	Lys	Tyr	Lys	Tyr	Val	Leu
				925					930					935
Tyr	Tyr	Ser	Asp	Val	Pro	Gly	Ser	Lys	Pro	Gln	Gln	Met	Val	Phe
				940					945					950
Ile	Thr	Leu	Asp	Arg	Gln	Ala	Pro	Thr	Leu	Thr	Thr	Ala	Thr	Tyr
				955					960					965
Lys	Asp	Arg	Arg	Ile	Phe	Lys	Ala	Arg	Pro	Ala	Val	Glu	His	Gly
				970					975					980
Ser	Gly	Ile	Phe	Arg	Glu	Gln	Val	Phe	Tyr	Leu	Lys	Lys	Asp	Lys
				985					990					995
Gly	His	Tyr	Asn	Ser	Val	Leu	Arg	Gln	Lys	Gly	Glu	Asp	Gly	Ile
				1000					1005					1010
Val	Glu	Asp	Asn	Lys	Val	Phe	Ile	Lys	Gln	Glu	Lys	Asp	Gly	Ser
				1015					1020					1025
Ile	Leu	Pro	Lys	Glu	Val	Asn	Asp	Phe	Ser	His	Val	Tyr	Tyr	Thr
				1030					1035					1040
Glu	Asp	Tyr	Ala	Gly	Asn	Leu	Val	Ser	Ala	Lys	Leu	Glu	Asp	Leu
				1045					1050					1055
Asn	Ile	Gly	Asn	Lys	Asn	Gly	Leu	Val	Asn	Val	Lys	Val	Phe	Ser
				1060					1065					1070
Glu	Leu	Asn	Ser	Asn	Val	Asp	Ile	Asp	Phe	Ser	Tyr	Ser	Val	Lys
				1075					1080					1085
Asp	Lys	Gly	Asn	Val	Ile	Lys	Lys	Gln	His	His	Gly	Lys	Asp	Leu
				1090					1095					1100
Leu	Leu	Lys	Leu	Pro	Phe	Gly	Thr	Tyr	Thr	Phe	Asp	Leu	Phe	Leu
				1105					1110					1115
Asp	Glu	Glu	Arg	Ala	Asn	Leu	Ile	Ser	Pro	Gln	Ser	Val	Thr	Val
				1120					1125					1130
														1135
														1140

10

20

30

40

1140 1145 1150
 Ile Ser Glu Lys Asp Ser Leu Lys Asp Val Leu Phe Lys Val Asn Leu
 1155 1160 1165
 Leu Lys Lys Ala Ala Leu Leu Val Glu Phe Asp Lys Leu Leu Pro Lys
 1170 1175 1180
 Gly Ala Thr Val Gln Leu Val Thr Lys Thr Asn Thr Val Val Asp Leu
 1185 1190 1195 1200
 Pro Lys Ala Thr Tyr Ser Pro Thr Asp Tyr Gly Lys Asn Ile Pro Val
 1205 1210 1215
 Gly Asp Tyr Arg Leu Asn Val Thr Leu Pro Ser Gly Tyr Ser Thr Leu
 1220 1225 1230
 Glu Asn Leu Asp Asp Leu Leu Val Ser Val Lys Glu Gly Gln Val Asn
 1235 1240 1245
 Leu Thr Lys Leu Thr Leu Ile Asn Lys Ala Pro Leu Ile Asn Ala Leu
 1250 1255 1260
 Ala Glu Gln Thr Asp Ile Ile Ser Gln Pro Val Phe Tyr Asn Ala Gly
 1265 1270 1275 1280
 Thr His Leu Lys Asn Asn Tyr Leu Ala Asn Leu Glu Lys Ala Gln Thr
 1285 1290 1295
 Leu Ile Lys Asn Arg Val Glu Gln Thr Ser Ile Asp Asn Ala Ile Ala
 1300 1305 1310
 Ala Leu Arg Glu Ser Arg Gln Ala Leu Asn Gly Lys Glu Thr Asp Thr
 1315 1320 1325
 Ser Leu Leu Ala Lys Ala Ile Leu Ala Glu Thr Glu Ile Lys Gly Asn
 1330 1335 1340
 Tyr Gln Phe Val Asn Ala Ser Pro Leu Ser Gln Ser Thr Tyr Ile Asn
 1345 1350 1355 1360
 Gln Val Gln Leu Ala Lys Asn Leu Leu Gln Lys Pro Asn Val Thr Gln
 1365 1370 1375
 Ser Glu Val Asp Lys Ala Leu Glu Asn Leu Asp Ile Ala Lys Asn Gln
 1380 1385 1390
 Leu Asn Gly His Glu Thr Asp Tyr Ser Gly Leu His His Met Ile Ile
 1395 1400 1405
 Lys Ala Asn Val Leu Lys Gln Thr Ser Ser Lys Tyr Gln Asn Ala Ser
 1410 1415 1420
 Gln Phe Ala Lys Glu Asn Tyr Asn Asn Leu Ile Lys Lys Ala Glu Leu
 1425 1430 1435 1440
 Leu Leu Ser Asn Arg Gln Ala Thr Gln Ala Gln Val Glu Glu Leu Leu
 1445 1450 1455
 Asn Gln Ile Lys Ala Thr Glu Gln Glu Leu Asp Gly Arg Asp Arg Val
 1460 1465 1470
 Ser Ser Ala Glu Asn Tyr Ser Gln Ser Leu Asn Asp Asn Asp Ser Leu
 1475 1480 1485
 Asn Thr Thr Pro Ile Asn Pro Pro Asn Gln Pro Gln Ala Leu Ile Phe
 1490 1495 1500
 Lys Lys Gly Met Thr Lys Glu Ser Glu Val Ala Gln Lys Arg Val Leu
 1505 1510 1515 1520
 Gly Val Thr Ser Gln Thr Asp Asn Gln Lys Ile Lys Thr Asn Lys Leu
 1525 1530 1535
 Pro Lys Thr Gly Glu Ser Thr Pro Lys Ile Thr Tyr Thr Ile Leu Leu
 1540 1545 1550
 Phe Ser Leu Ser Met Leu Gly Leu Ala Thr Ile Lys Leu Lys Ser Ile
 1555 1560 1565
 Lys Arg Glu
 1570

10

20

30

<210> 3
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> primer

40

<400> 3
tcggatccgc tactgctcta gtt

23

<210> 4
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 4
ttaagtgcgac gtaatgatgc cttgctcta

29

【 図 1 A 】

C s p A 配列 - 完全コード配列

ATGAACACAAAAACAGCGTTTTCATCCGGAAATATAAGITAGGTGCCGTAT
CTGTACITTTGGGAACCCATTTTITTTAGGCGGTATCAAAAATGTAGCTGCT
GATCTGTGTCATAAATAGCCATCTGATATTGACGTTGAAACAGCAAGTAAAG
ACAGTCCAACGAGCATAGCAAATGAGACACACTAACAACACGTCATCAGC
CCTTGGCTCAACAGCTCAAGACAATCTTTGTTCAAAAGGCTAATAATATAGT
CCAAACAGAAACACAACCAAGTAACTGAGCCTCACTCTCAAGCCACCGAGACAT
TTTCCACAGCCGCAAAATCAACCGGTTGAAAGCACTCAAGAAAGTTTCTAAAC
TCCITTAACCAAACAATAATGAGCAGTCAACCTACACCAGCTATTTCTAAAG
AAACCCCTCAAAACATTGATAGTAAATAAATATCACTGCCCAAAGTATG
GAACACAGGCTACAAAGGAGAGGGAACCTGTTGAGCAATTAITGACTCAGGA
CTAGATACCAATCAGGATGCTCCCAATTAATGATTCGACAAAAGCAAAAT
ACCAAAACGAACAGCAAAATGAATGCTGCTAAAGCAAAAGCTGGTATAAAT
ATGGAAAATGGTATAACAACAAAGTAACTCTTGGTCAACACTATGTTGATG
CAATACAGAGCTAAAAGAGGTGAAAAGCACTTCTCATGGTATGCAACGTAACC
AGTATCGCAACAGCTAATCCTAGCAAGAAAGATACAAATGAATTAATCTATG
GTGTTGCTCCTGAAAGCAAGTAAATGTTATGAGAGTCTTCTCTGATGAAAA
AGAGGAACTGGACCAAGCCCTTTATGTTAAAGCTATTGAAGATGCCGTTAAAC
TCGGTCTGATAGCAITAAITTAAGITTAGGTGGAGCTAATGGCTCTTATGTT
AATGCCGATGACCGCAITTAATAAAGCTTTAGAGATGGCTAGACTCGTGGCG
TTTCGTGTTTATAGCAGCAGGTAAACGACGGTACATTTGGGAGTGGGAGCATC
AAAGCCCTTCTGCTTTTACCTGATATGTTTATGTTTGGTGTGCTCCATCAACAG
CTCGTGAGGCCATTTCTGTAGCATCATATAATAATACAACACTGGTTAATAAA
GTCTCAACATTATCGGATTAGAAAACAACAATAAATCTCAACAACGGATTAG
CTGCTTATGCAATCTCAAAAGTTAAGTAAAGACCTTTGAAAGTAAAGGAAAGCA
ATATGATTAATGTTTTCGTAGGAAAGAAAGCAACGACCAATGATATAAGGACAA
ACTTTAAATGGTAAATTCGCCCTTAATGAAAGTGGAGATTAATCTTTTCAAA
AAAAGTCGCAACACCTAATAACCGGTGCTGTGGAGCTATTATCTTAAATA
AACAAGCTGGAGAACTAATAACAATAGATGATCCTGAGCAAGCAAGCGC
TATTCCTGCCATTTTACTCAAAAAGAGTGGAGATGTTTATGCTAATAAACA
ACTATAAATGTTATTAACAATCAAAAATAAACAAGCCAAACCTTAATG
AGGTGCTTATCTGACTTTTCAAGCTGGGATTAACAGCAGACGGACAATTA
AAACCTGACTTATCTGCTCTGGAGGCTTATTACGCCGCTATCAATGATA
TGAATATGATATGATGAGTGGGACAAGTATGGCTTCTCCCATGCTGCTGGTG
CTACTGCTCTAGTAAACAATCTATTGAAAGAACATCCAGAATCTTAAAA
AGGTGACATGAAAGAACTGCTCAATAACCTCTTATGAGTACTGCTAAGCA
CACTAACAAGATACAGGCCCTTACACCTCACCGCAACAACAAGGACA
GGTATTATCGATGTCGACGACGAGTTCAGACAGGATTAATACCTAACGTGGT
GGGAAAACAACATGAGTGGGTTACATTAAGGAAATATAAAGATAAAATTC
CTTGTATGTTACTGTTCAATATCAATAAAGTTGCAAAAGATTTACACTATA
CAACCTATTTAAATACATGATCAAGTTAAAGATGGCTTGTCCATTAAGCTCT
CAACAACCTTGGTACATTTACAGGAAAACGATACGGATTAACACCAAGGCAAA

A

【 図 1 B 】

CTAAAACGATTACAATTGATATAGATGTTTCGAAATACCATGACATGTTAAA
AAAAGTAATGCCAAACGGCTATTTCTAGAAAGGCTACGTACGTTTACAGAC
CCTGTTGATGGTGGGGAAGTCTTAGTATTCCTTATGTTGGAATTAAGGGAGA
ATCCAAAACCTTAGAAGTTTTAGAAAAATCCATTTATAAGCTTGTGCTAACA
AAGAAAAGGGATTTTATTTCCAACCGAAAACAACAACAGCAAGTTCCTGGTTC
AGAAAGATTATACTGCTTAATGACTACAAAGTTCAGAGCCATCTACTCAACA
GACGGTACTAGTCTATCCAAITGAAAGCCCTTGGGAAGCTATAAGTCTATAG
ATGGAAAATGGATCTTACAACCTAGAGCAAAAAGGCCACCTCATCTAGCCAT
TTCACCTAATGATGACCAAAAATCAAGATGCCGTTGCACTGAAAAGGTTTCT
TACGTAATTTCAATAATTAAGAGCCAAAGTCTATCGTGCAGATGATGTTAAT
TTACAAAAACCCTATGGGTAAAGTCTCCCAAGCAGGAGATAAAAATTA
ACAGCGGAAATACTGAAAATCCAAAATCTACATTTTATATGACACAGAAAT
GAAAAGGAAACCACTACTGATGGTATTCCTTTAGAAAGATGAAAATACAAATAC
GTTTAAACATACTACTCTGATGTCCTGGCTTAAGCCCAACAACAAATGGTAT
TGATATCACTTTGGATAGACAAGCTCTACACTAACAAACAGCAACTTATGAC
AAAGATAGACGATCTTCAAAGCTGCTGCACTGAGTAAACAGCGGAAATGCT
GTATCTTTAGAGAAACAAGTTTTTACTTAAAAAAGATAAAGATGGTCATTAT
AATAGCGTCTTACGTCAAAAGGAGAAGACGGTATCTGTTGAAAGATAACA
AAGTATTTTCAAAACAAGAAAAGGATGGTAGCTTTATTTCTACCTAAAAGAGT
TAATGATTTCTCTCATGTCTACTACACTGTTGAAAGATTAAGCAGGCAATCTAG
TGTCAGCAAAAACCGAAGATTTGATCAATATGGCAATAAAAATGGTATTCT
AAACGTCAAAAGTGTAGCCCTGAGCTTAAACAGTAAATGTCGATTTGATTTCT
CTTACTCTGTCAAAGATGACAAAAGGTAATGCTCAAAAAGCAACATCACGG
GAAAGACCTCAATTTACTGAAATGGCTTTTGGTACCTATACGTTGACCTAT
TCTTATACGATGAGGAAACGACCAATCAATCAGTCCCAAAAGTGTCACTGT
AACTATTTCTGAAAAAGATAGCCCTTAAAGACGCTTATTTAAAGTAACTAC
TCAAGAAAAGCAGCCCTTACTCGTTGAAITTTGACAAAGCTTTTACAAAAGGAGC
AACAGTCCAGTGGTACTAAGCAAAATCTGTTGTTGATCTACAAAAGCA
ACTTATCTCTACTGACTATGGTAAAAACATACTCTGAGGAGACTATCGCTT
AAACGTAACCGTCCGCTAGTGGGTAATGACCTTATGAGCAACTTATGATGATTA
CTTGTATCCGTA AAAAGAGGTAAGTAAATCTAACAAAATTTGACGCTGATTA
ATAAGCTCCTCAATTAATGCCCTAGCAGAAAACACTGACATTTTCCCAA
ACTGTGTTTTATAATGCTGGAACTCACTTAAAAAATAAATACCTAGCTAATCT
TGA AAAAGGCACAACTTAAATTA AAAATAGAGTGGAAACAAAGTATGAT
AATGCTTATGCTGCTTTGAGAGAAAAGTCCCAAGCTCTTAAACGGTAAAGAAA
CAGATACTTCTTACTGGCAAAAGCTATTTAGCTGAAACAGAAATCAAGGG
AAACTCAATTTGTTAATGCTAGTCCATTAAGCAATCAACTTATATCAATC
AGTCCAAATGGGCAAAAATCTTCAAAAACCTTAAAGCTCACTCAATCAGA
AGTAGACAAAAGCTTAGAAAATCTTGATTTGCTAAAAATCAATTAATGTTG
CATGAAAAGTACTTACTGTTTACACCATATGATAATTAAGCAAAATGTTCT
GAAAACAAACATCTATAATATCAGAACCCAGCTCACTTCCCAATAGACAAGCTA
TATAATAACCTTATCAAGAAAAGCAGAAATTTGCTGCTTTCCCAATAGACAAGCTA
CACAAGCTCAAGTTGAAGAGTTATTAACCAAAATAAAGCAACCGCAACAAG
AACTGTGTTGCTCGGATAGAGTTTCTCCGACAGAAATTAAGTCAATCACT

B

【 図 1 C 】

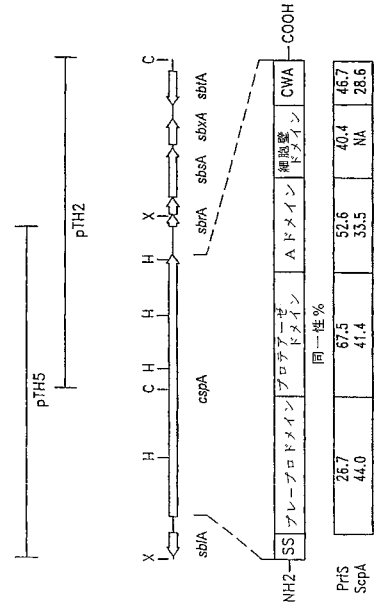
AATGATAATGACTCTCTCAATACCAACACCTATCAATCCGCCAAATCAGCCCC
 AGCGGTGATATTCAAAAAAGGCATGACTAAAGAAAGTGGAGTTGCTCAGAA
 GCGTCTTAGGGGTGACTAGCCAAACCGATAATCAAAAGATAAAGACAAAC
 AAGCTTCTAAAAAGGGGAAAGCACTCTCTAAAAAATACCTATACAATATGCG
 TATTTAGTCTCTATGCTAGGTCTGGCAACAATCAAACCTAAAGTCTATCAAA
 AGAGAAATAA

C

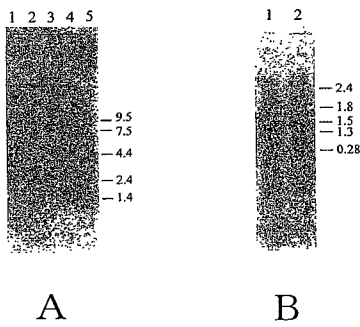
【 図 2 】

CspAタンパク質配列

MNTKQRFSSIRKYYKLGAVSVLLGLTFLLGGITNVAADSIVNKPSDIAVEQQ
 VKDSPTSIANETPTNNTSSALASTAQDNLVTKANNSTPETQVTFEPHSQ
 ATEFTSPAANQFVBSYQVSKTPLTKQNLAVKFPFAISKETPQNIDSNKI
 ITVPKVVWNTGYKGGTVVAIDSGLDTNHDLQLNDSTKAKYQNEQQMNA
 AKAKAGINYGKWNKVFPHNYVDVNIETKEVKSTSHGMHVTSIATANP
 SKKDTNELIYGVAPFAQVMFMRVFSDKRGTPALYVKAIEDAVKLGADS
 INLSLGGANGSLVNADDRLIKALEMARLAGVSVVIAAGNDGTFGSGASKP
 SALYPPDYGLVGSFSTAREAISVASVYNNITLVNKVFNIIGLENNKLNNGL
 AAYADPKVSDKTFEVGKQYDYVVFVKGNDNDYKDKTLNGKIALIEKGDIT
 FTKKVNVNAINHGAVGAIFFNKAAGEANLIMSLEPEASAIPTQKEFGD
 VLAKNKYKIVFNKIKQANFNAGVLSDFSSWGLTADGQKPDLSAPGGS
 IYAAINDNEYDMMSGTSMASPHVAGATALVKQYLLKEHPKELKKGDIERTV
 KYLLMSTAKAHLNNDTGAAYTSPRQQGAGIHDVAAAQVQGLYLTGGENNYG
 SVTLGNKDKISFDVTVHNINKVAKDLHYTYLNTDQVKDGFVTLAPQQL
 GTFTGKTIREPGQTKITIIDVSKYHDMKKVMPNGYFLGQVYRFTDF
 VDGGEVLSIPYVGFKGEFQNLVLEKSIYKLVANKEKGFYQPKQTNEVP
 GSEDTYALMTSSSEFYSTDTGTSPIQLKALGSYKSIDGKWILQLEKGGQP
 HLAISPNDQNDQDAVALKGVFLRNFNLRKAVYRADDVNLQKPLWVSAPQ
 AGDKNYYSNGTENPKSTFLYDTEWKGTITDGIPLDGGKYKYVLYTYSDVP
 GSKPQQMVFDITLDRQAPLTTATYDKDRIFKARPAVHGBSGIFREQV
 FYLKKDKDGHVNSVLRQKGEDGILVEDNKVFKQEKDGSFILPKEVNDPS
 HVYYYTVEYAGNLVSAKLEDLINIGNKNGLVNVRVFSPELNSVNDIDFSY
 SVKDDKGNVTKQHHGKDLMLLKLPLFGTYTDFLFLYDEERANLISPSQSVT
 VIHEKDSLKDVLKFNLLKKAALLVEFDKLLPKGATVQLVTKTNTVVDL
 PKATYSPDYGKNFVGDYRLNVTLPSPGYSTLENLDDLVSVKGEQVNL
 KLTILNKAPLINALABQTDIISQPVFYNAAGTHLKNYLANLEKAQTLIKN
 RVBQTSIDNAIALRBSRQALNGKETDTSLLAKAILAETEKGNVQYVNA
 SPLSQSTYINQVQLAKNLLQKPNVTQSEVDKALENLDAKNQLNGHETDY
 SGLHIMIKANVLKQTSKYQNASQFAKENYNNLKKAEILLNRRQATQA
 QVEELLNQIKATEQELDGRDRVSSAENYSQSLNNDNLSLNTIPNFPNQ
 ALIFKKGMTKESEVAQKRVLGVTSQTDNQKIKTNKLPKTGESTPKIYTI
 LLFSLMLGLATIRLKSIRKRE



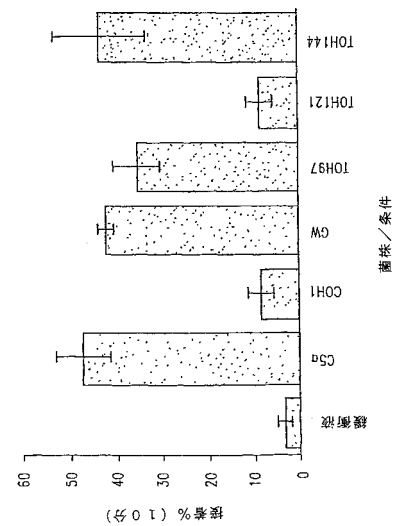
【 図 4 】



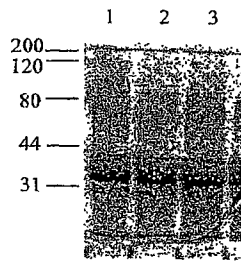
【 図 5 】



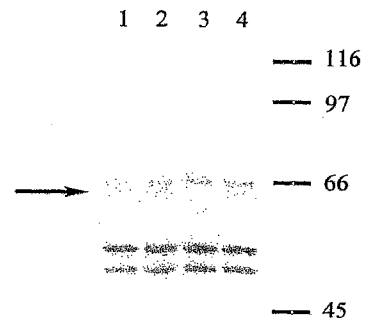
【 図 6 】



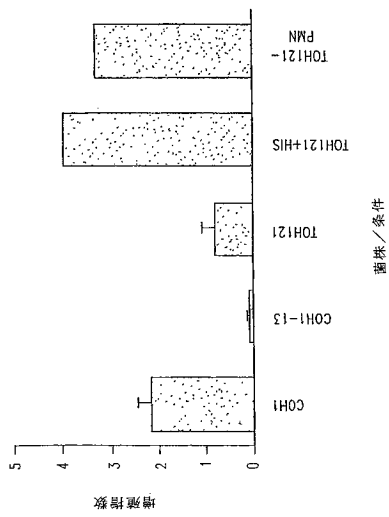
【 図 7 】



【 図 8 】



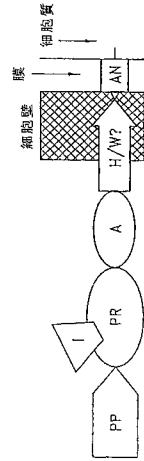
【 図 9 】



【 図 10 】

CspA	
残基	番号
PP	1-143
PR	144-638
A	639-1076
H/W	1077-1535
AN	1536-1571

【 図 1 1 】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/40340
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) :Please See Extra Sheet. US CL :Please See Extra Sheet. 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) U.S. : 424/234.1, 244.1; 530/387.1; 536/23.7, 24.32, 24.33; 435/7.1, 6, 320.1; 252.3 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) WEST, DIALOG, SF ALLSCIENCE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	BOHNSACK et al. Genetic Polymorphisms of Group B Streptococcus sppB Alter Functional Activity of a Cell-Associated Peptidase That Inactivates C5a. Infect. Immun. Sept. 2000. Vol. 68, No. 9, pages 5018-5025, see entire document.	1-35
A	FERNANDEZ-ESPLA et al. Streptococcus thermophilus Cell Wall-Anchored Proteinase: Release, Purification, and Biochemical and Genetic Characterization. Applied and Environmental Microbiology. Vol. 60, No. 11, pages 4772-4778, see entire document.	1-35
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input 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 document published on or after the international filing date "L" document which may throw doubt 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 "W" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 26 MARCH 2003		Date of mailing of the international search report 11 JUL 2003
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 305-2280		Authorized officer <i>Jennifer L. Roberts</i> JENNIFER GRASER Telephone No. (703) 305-0196

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US02/40340

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER:

IPC (7):

A61K 39/02, 39/09; C07K 18/00; C07H 21/04; G01N 33/53; C12Q 1/68; C12N 15/00, 1/20

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER:

US CL :

424/234.1, 244.1; 530/387.1; 536/23.7, 24.32, 24.33; 455/7.1, 6, 320.1; 252.3

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 13/02	A 6 1 P 11/00	4 H 0 4 5
A 6 1 P 15/14	A 6 1 P 13/02	1 0 5
A 6 1 P 19/02	A 6 1 P 15/14	1 7 1
A 6 1 P 25/00	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P 27/02	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 31/04	A 6 1 P 27/02	
C 0 7 K 16/40	A 6 1 P 31/04	
C 1 2 N 1/15	C 0 7 K 16/40	
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 5/10	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 9/48	C 1 2 N 9/48	
C 1 2 Q 1/14	C 1 2 Q 1/14	
C 1 2 Q 1/68	C 1 2 Q 1/68	A
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53	M
G 0 1 N 33/566	G 0 1 N 33/566	
G 0 1 N 33/569	G 0 1 N 33/569	C
	C 1 2 N 5/00	A

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

(72)発明者 ルーベンス, クレイグ, イー.

アメリカ合衆国 ワシントン 9 8 0 2 1 ボセル サウスイースト 2 4 3 ード プレース 2
5 1 6

(72)発明者 ハリス, テレサ

アメリカ合衆国 ワシントン 9 8 0 0 8 ベルヴェ ノースイースト ウェスト レイク サマ
ミッシュ パークウェイ 1 0 8 6

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA14 BA31 CA02 GA25 HA12
4B050 CC03 DD02 FF16 LL01 LL03
4B063 QA18 QQ03 QQ06 QQ08 QQ44 QQ96 QR55 QS32
4B065 AB01 BA02 BA14 CA33 CA45 CA46
4C085 AA03 AA13 AA14 BA14 BB11 BB22 BB41 BB43 BB44 CC03
CC05 CC07 CC22 CC23 EE01 EE06 FF01 FF24 GG01 GG02
GG03 GG06 GG08 GG10
4H045 AA11 AA30 CA11 DA75 EA31 EA54

专利名称(译)	使用B族链球菌的新型细胞表面蛋白酶		
公开(公告)号	JP2005514052A	公开(公告)日	2005-05-19
申请号	JP2003559417	申请日	2002-12-16
申请(专利权)人(译)	儿童医院和商业中心莱医学中心		
[标]发明人	ルーベンスクレイグイー ハリステレサ		
发明人	ルーベンス, クレイグ, イー. ハリス, テレサ		
IPC分类号	G01N33/53 A61K39/00 A61K39/09 A61K39/39 A61K39/395 A61P11/00 A61P13/02 A61P15/14 A61P19/02 A61P25/00 A61P27/02 A61P31/04 C07K2/00 C07K14/315 C07K16/40 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N9/48 C12N9/52 C12N15/09 C12Q1/14 C12Q1/68 G01N33/566 G01N33/569		
CPC分类号	A61K39/00 A61K39/09 A61K2039/505 A61K2039/53 A61P11/00 A61P13/02 A61P15/14 A61P19/02 A61P25/00 A61P27/02 C07K14/315 C12N9/52		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K39/09 A61K39/39 A61K39/395.D A61K39/395.R A61P11/00 A61P13/02.105 A61P15/14.171 A61P19/02 A61P25/00 A61P27/02 A61P31/04 C07K16/40 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N9/48 C12Q1/14 C12Q1/68.A G01N33/53.M G01N33/566 G01N33/569.C C12N5/00.A		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA14 4B024/BA31 4B024/CA02 4B024/GA25 4B024/HA12 4B050/CC03 4B050/DD02 4B050/FF16 4B050/LL01 4B050/LL03 4B063/QA18 4B063/QQ03 4B063/QQ06 4B063/QQ08 4B063/QQ44 4B063/QQ96 4B063/QR55 4B063/QS32 4B065/AB01 4B065/BA02 4B065/BA14 4B065/CA33 4B065/CA45 4B065/CA46 4C085/AA03 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BA14 4C085/BB11 4C085/BB22 4C085/BB41 4C085/BB43 4C085/BB44 4C085/CC03 4C085/CC05 4C085/CC07 4C085/CC22 4C085/CC23 4C085/EE01 4C085/EE06 4C085/FF01 4C085/FF24 4C085/GG01 4C085/GG02 4C085/GG03 4C085/GG06 4C085/GG08 4C085/GG10 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/CA11 4H045/DA75 4H045/EA31 4H045/EA54		
代理人(译)	川口义行 远山 勉		
优先权	60/344605 2001-12-21 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及称为CspA的B族链球菌 (GBS) 的新型细胞表面蛋白酶蛋白作为预防GBS感染的疫苗的用途。

菌株またはプラスミド Strain or Plasmid	関連特徴 Associated Features	参考文献または供給源 Reference or Source
COH1	敗血症を有する新生児からのIII型GBS単離物; 高病毒性; 野生型参照株	(Martin, T. R. et al. 1988 J Infect Dis 157:91-100)
TOH121	COH1のs c p A : : e r m誘導体; E r m ^R	本研究
TOH97	COH1のs c p B : : k a n誘導体; K a n ^R	(Beckmann, C. et al. 2002 Infection & Immunity 70)
TOH144	TOH121のs c p B : : K a m誘導体 (c s p A : : e r m); E r m ^R , K a n ^R	本研究
大腸菌		
DH5 α	一般的クローニング菌株	ATCC
TOH50	プラスミドpTH5を保有するDH5 α	本研究
プラスミド		
PBSKS ⁻	一般的クローニングベクター	Stratagene (La Jolla, CA, USA)
pVE6007	大腸菌-GBSシャトルベクター; 温度感受性複製; pWVの複製起点; C m ^R	(Maguin, E. et al. 1992 J Bacteriol 174:5633-5638)
pTH2	c s p AのC l a I DNAフラグメントを保有するpBSKS; A m p ^R	本研究
pTH5	c s p Aを含むX b a I DNAフラグメントを保有するpBSKS; A m p ^R	本研究
pTH21	c s p Aの挿入的突然変異誘発に用いられるプラスミド; pVE6007の誘導体; C m ^R ; E r m ^R	本研究