

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4397233号
(P4397233)

(45) 発行日 平成22年1月13日(2010.1.13)

(24) 登録日 平成21年10月30日(2009.10.30)

(51) Int.Cl.		F I	
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A
C 0 7 K	14/195	(2006.01)	C 0 7 K 14/195
C 0 7 K	19/00	(2006.01)	C 0 7 K 19/00
A 6 1 K	38/00	(2006.01)	A 6 1 K 37/02
A 6 1 P	31/00	(2006.01)	A 6 1 P 31/00

請求項の数 9 (全 26 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2003-522569 (P2003-522569)
(86) (22) 出願日	平成14年8月27日(2002.8.27)
(65) 公表番号	特表2005-507653 (P2005-507653A)
(43) 公表日	平成17年3月24日(2005.3.24)
(86) 国際出願番号	PCT/CA2002/001315
(87) 国際公開番号	W02003/018052
(87) 国際公開日	平成15年3月6日(2003.3.6)
審査請求日	平成17年8月26日(2005.8.26)
(31) 優先権主張番号	60/314,634
(32) 優先日	平成13年8月27日(2001.8.27)
(33) 優先権主張国	米国 (US)

前置審査

(73) 特許権者	505113687
	アイディー バイオメディカル コーポレイション
	カナダ国, ケベック エイチ7ブイ 3エス8, ラバル, カルティエール プールバード ウエスト 525
(74) 代理人	100072051
	弁理士 杉村 興作
(74) 代理人	100114292
	弁理士 来間 清志
(74) 代理人	100119530
	弁理士 富田 和幸

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 モラクセラ (ブランハメラ) カタラーリスポリペプチド及び対応するDNA断片

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

分離されたポリペプチドであって、次の、すなわち

(a) 配列番号2または4で表されるアミノ酸配列と90%よりも高く同一なアミノ酸配列を備えるポリペプチドであり、モラクセラ・カタラーリスに対する免疫反応を引き出すことができる、ポリペプチド、

(b) 配列番号2または4で表されるアミノ酸配列と少なくとも95%同一なアミノ酸配列を備えるポリペプチドであり、モラクセラ・カタラーリスに対する免疫反応を引き出すことができる、ポリペプチド、

(c) 配列番号2または4で表されるアミノ酸配列を備えるポリペプチドであり、モラクセラ・カタラーリスに対する免疫反応を引き出すことができる、ポリペプチド、

(d) 配列番号2または4で表されるアミノ酸配列における1または数個のアミノ酸残基の付加、欠失、および/または置換によって修飾されたアミノ酸配列を備えるポリペプチドであり、モラクセラ・カタラーリスに対する免疫反応を引き出すことができる、ポリペプチド、

(e) N末端のメチオニン残基が欠失した(a)、(b)、(c)、または(d)のポリペプチドであり、モラクセラ・カタラーリスに対する免疫反応を引き出すことができる、ポリペプチド、および

(f) 分泌性アミノ酸配列が欠失した(a)、(b)、(c)、または(d)のポリペプチドであり、モラクセラ・カタラーリスに対する免疫反応を引き出すことができる、ポリ

10

20

ペプチド

から選ばれる、ポリペプチド。

【請求項 2】

配列番号 2 で表されるアミノ酸配列と 90% よりも高く同一なアミノ酸配列を備え、モラクセラ・カタラーリスに対する免疫反応を引き出すことができる、請求項 1 記載の分離されたポリペプチド。

【請求項 3】

キメラポリペプチドであって、2 またはそれよりも多くの抗原性ポリペプチド断片を備え、2 またはそれよりも多くの抗原性ポリペプチド断片は各々配列番号 2 または 4 で表されるアミノ酸配列からの少なくとも 20 個の隣接するアミノ酸を備え、2 またはそれよりも多くの抗原性ポリペプチド断片は、キメラポリペプチドを形成するために連結されることを条件とし、および 2 またはそれよりも多くの抗原性ポリペプチド断片は、モラクセラ・カタラーリスに対する免疫反応を引き出すことができる、キメラポリペプチド。

10

【請求項 4】

キメラポリペプチドであって、配列番号 2 で表されるアミノ酸配列からの少なくとも 20 個の隣接するアミノ酸を備える 1 種の抗原性ポリペプチド断片を含み、および抗原性ポリペプチド断片はモラクセラ・カタラーリスに対する免疫反応を引き出すことができる、キメラポリペプチド。

【請求項 5】

さらに、担体タンパク質を備え、担体タンパク質は、キメラポリペプチドに共役するか、または接合する、請求項 3 または 4 記載のキメラポリペプチド。

20

【請求項 6】

ポリペプチドまたはキメラポリペプチドの免疫原組成物の製造における使用であって、請求項 1 または 2 記載の分離されたポリペプチドまたは請求項 3 乃至 5 のいずれか 1 項記載のキメラポリペプチドの、モラクセラ・カタラーリスに対する免疫反応を誘導するための使用。

【請求項 7】

モラクセラ・カタラーリスを生物学的試料において検出するための方法であって、次の、すなわち

(a) (i) 抗体またはその抗原結合性断片であり、請求項 1 または 2 記載の分離されたポリペプチドのための結合特異性を持つもの、および (ii) 生物学的試料を、混合物を形成するためにインキュベーションする工程、および

30

(b) モラクセラ・カタラーリスの存在を生物学的試料において指し示す混合物における特異的に結合した抗体又は結合した抗原結合性断片を検出する工程を具える、方法。

【請求項 8】

モラクセラ・カタラーリスの抗原に対して特異的な抗体を、前記抗体を含有するか、または含有すると疑われる生物学的試料において検出するための方法であって、次の、すなわち

(a) 請求項 1 または 2 記載の 1 種またはそれよりも多くのポリペプチドを、生物学的試料と共に、混合物を形成するためにインキュベーションする工程、および

40

(b) ポリペプチドに対して混合物において特異的に結合する抗体を検出し、モラクセラ・カタラーリスの抗原に対して特異的な抗体の存在を指し示す工程を具える、方法。

【請求項 9】

キットであって、請求項 1 または 2 記載のポリペプチドを具え、モラクセラ・カタラーリス感染の検出または診断のためのキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

50

本発明はポリペプチドに、より特異的には、モラクセラ（ブランハメラ）カタラーリス感染の予防、診断及び/又は治療に使用可能なモラクセラ（ブランハメラ）カタラハリス（*Moraxella (Branhamella) catarrhalis*）のSMC-1及びSMC-2ポリペプチドに関する。

【背景技術】

【0002】

モラクセラ（ブランハメラ）カタラーリスはヒトにおいて気道感染を引き起こすグラム陰性双球菌である。M. カタラーリスは、肺炎球菌（*Streptococcus pneumoniae*）及びインフルエンザ菌（*Haemophilus influenzae*）に次ぐ、現在幼児や子供において中耳炎を引き起こす第3の最も代表的な起炎菌であるとして受け入れられている。M. カタラーリスはまた、副鼻腔炎、しつこい咳、急性喉頭炎、化膿性角膜炎および新生児（*neonatorum*）結膜炎を含む、他の何種類かの感染症にも関連している。

10

【0003】

モラクセラ・カタラハリス株のおよそ90%は抗生物質（ラクタマーゼ陽性）に耐性を有し、再発性中耳炎は高死亡率に結びついているから、宿主をM. カタラーリス感染から防御することができるワクチンの開発の必要性がある。M. カタラーリスによる感染は細菌細胞の表面において見出される抗原に対して免疫反応を引き起こす。しかし、これらの表面蛋白質の多くはいまだ特性解析されておらず、他の株による感染から防御する結果となる免疫反応もまた判っていない。

【0004】

M. カタラーリスの宿主への感染を予防するワクチンの開発するために、主に、偏在性表面タンパク質A（UspA）という名の高分子・質量タンパクのような外膜タンパク質に主として努力がなされてきた。このタンパク質は、マウスの肺-クリアランスモデルにおいて、モノクローナル抗体とポリクローナル抗体の両方が殺菌及び防御作用を示したため、ワクチンとして有望視された。しかしながら、このタンパク質は、他のM. カタラーリスの株との間での変動性が非常に高かった。このタンパク質の他にも、別のM. カタラーリスタンパク質もワクチンの候補として関心を集めており、保存エピトープを有するトランスフェリン結合タンパクは、細菌表面に晒されているものであった。しかしながら、ある株から他の株への、同タンパク質による抗体交叉反応の程度には開きがあった。他の研究者もまた、45KDaのタンパク質CD（OMP CD）に焦点を当てていた。このタンパク質は、M. カタラーリスの株の中での保存性が非常に高いが、慢性閉塞性肺疾患の成人において、このOMP CDに対する免疫反応には変動性が見られる。

20

30

【0005】

それ故に、モラクセラ（ブランハメラ）カタラーリス感染の予防、診断及び/又は治療に使用可能なM. カタラーリスポリペプチドの解明が、依然必要とされている。

【発明の概要】

【0006】

一つの観点において、本発明は、配列番号2、4からなる配列か、又はそれらの断片が若しくは類似体から選択された配列からなる2次（second）ポリペプチドに対して、少なくとも70%の同一性を有するポリペプチドをコードする、単離されたポリヌクレオチドを提供する。

40

【0007】

一つの観点において、本発明は、配列番号2、4なる配列か、又はそれらの断片が若しくは類似体から選択された配列からなるポリペプチドに関する。

【0008】

他の観点においては、本発明のポリヌクレオチドにコードされたポリペプチド、薬剤組成物、発現制御部位を機能が発現するように連結した本発明のポリヌクレオチドを含むベクター、及び前記ベクターを用いてトランスフェクトされた宿主細胞が提供され、また、前記宿主細胞を発現に適した条件下において培養する工程を含むポリペプチドの作成方法を提供する。

【発明の詳細な説明】

50

【 0 0 0 9 】

本発明は、モラクセラ感染の予防、診断及び/又は治療に利用可能な、モラクセラのポリペプチドをコードする、精製および単離されたポリヌクレオチドを提供する。

【 0 0 1 0 】

一観点において、本発明は、配列番号 2、4 に示す配列か、又はそれらの断片が若しくは類似体から選択された配列からなる 2 次 (second) ポリペプチドと、少なくとも 70% の同一性を有するポリペプチドをコードする、単離されたポリヌクレオチドを提供する。

【 0 0 1 1 】

一観点において、本発明は、配列番号 2、4 に示す配列か、又はそれらの断片が若しくは類似体から選択された配列からなる 2 次ポリペプチドと、少なくとも 80% の同一性を有するポリペプチドをコードする、単離されたポリヌクレオチドを提供する。

10

【 0 0 1 2 】

一観点において、本発明は、配列番号 2、4 に示す配列か、又はそれらの断片が若しくは類似体からなる 2 次ポリペプチドと、少なくとも 95% の同一性を有するポリペプチドをコードする、単離されたポリヌクレオチドを提供する。

【 0 0 1 3 】

一観点において、本発明は、配列番号 2、4 に示す配列か、又はそれらの断片が若しくは類似体からなる 2 次ポリペプチドと、少なくとも 98% の同一性を有するポリペプチドをコードする、単離されたポリヌクレオチドを提供する。

【 0 0 1 4 】

一観点において、本発明は、配列番号 2 又は 4 からなる 2 次ポリペプチドと、少なくとも 70% の同一性を有するポリペプチドをコードする、単離されたポリヌクレオチドを提供する。

20

【 0 0 1 5 】

一観点において、本発明は、配列番号 2 又は 4 からなる 2 次ポリペプチドに対して、少なくとも 80% の同一性を有するポリペプチドをコードする、単離されたポリヌクレオチドを提供する。

【 0 0 1 6 】

一観点において、本発明は、配列番号 2 又は 4 からなる 2 次ポリペプチドに対して、少なくとも 95% の同一性を有するポリペプチドをコードする、単離されたポリヌクレオチドを提供する。

30

【 0 0 1 7 】

一観点において、本発明は、配列番号 2 又は 4 からなる 2 次ポリペプチドに対して、少なくとも 98% の同一性を有するポリペプチドをコードする、単離されたポリヌクレオチドを提供する。

【 0 0 1 8 】

一観点において、本発明は、配列番号 2、4 に示す配列か、又はそれらの断片が若しくは類似体から選択されたアミノ酸配列からなるポリペプチドに関する。

【 0 0 1 9 】

一観点において、本発明は、配列番号 2 又は 4 から選択されたアミノ酸配列からなるポリペプチドに関する。

40

【 0 0 2 0 】

一観点において、本発明は、配列番号 2、4 に示す配列か、又はそれらの断片が若しくは類似体からなるアミノ酸配列により特徴づけられるポリペプチドに関する。

【 0 0 2 1 】

一観点において、本発明は、配列番号 2 又は 4 からなるアミノ酸配列により特徴づけられるポリペプチドに関する。

【 0 0 2 2 】

一観点において、本発明は、配列番号 2、4 に示す配列か、又はそれらの断片が若しくは類似体から選択された配列からなるポリペプチドの一部を有するエピトープをコードす

50

るポリヌクレオチドを提供する。

【0023】

一観点において、本発明は、配列番号2又は4から選択された配列からなるポリペプチドの一部を有するエピトープをコードするポリヌクレオチドを提供する。

【0024】

一観点において、本発明は、配列番号2、4に示す配列か、又はそれらの断片が若しくは類似体から選択された配列からなるポリペプチドの一部を有するエピトープに関する。

【0025】

一観点において、本発明は、配列番号2又は4から選択された配列からなるポリペプチドの一部を有するエピトープに関する。

【0026】

一態様において、本発明は、下記のポリヌクレオチド：

(a) 配列番号2、4に示す配列か、又はそれらの断片が若しくは類似体から選択された配列からなる2次ポリペプチドと、少なくとも70%の同一性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、

(b) 配列番号2、4に示す配列か、又はそれらの断片が若しくは類似体から選択された配列からなる2次ポリペプチドと、少なくとも80%の同一性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、

(c) 配列番号2、4に示す配列か、又はそれらの断片が若しくは類似体から選択された配列からなる2次ポリペプチドと、少なくとも95%の同一性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、

(d) 配列番号2、4に示す配列か、又はそれらの断片が若しくは類似体から選択された配列からなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、

(e) 配列番号2、4に示す配列か、又はそれらの断片が若しくは類似体から選択された配列からなるポリペプチドに対して、結合特異性を有する抗体を生成することが可能なポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、

(f) 配列番号2、4に示す配列か、又はそれらの断片が若しくは類似体から選択された配列からなるポリペプチドの一部を有するエピトープをコードするポリヌクレオチド、

(g) 配列番号1、3に示す配列か、又はそれらの断片が若しくは類似体から選択された配列からなるポリヌクレオチド、及び

(h) 上記(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)又は(g)のポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチド、

から選択されたポリヌクレオチドからなる、単離されたポリヌクレオチドを提供する。

【0027】

一態様において、本発明は、下記のポリヌクレオチド：

(a) 配列番号2又は4から選択された配列からなる2次ポリペプチドと、少なくとも70%の同一性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、

(b) 配列番号2又は4から選択された配列からなる2次ポリペプチドと、少なくとも80%の同一性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、

(c) 配列番号2又は4から選択された配列からなる2次ポリペプチドと、少なくとも95%の同一性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、

(d) 配列番号2又は4から選択された配列からなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、

(e) 配列番号2又は4から選択された配列からなるポリペプチドに対して、結合特異性を有する抗体を生成することが可能なポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、

(f) 配列番号2又は4から選択された配列からなるポリペプチドの一部を有するエピトープをコードするポリヌクレオチド、

(g) 配列番号1又は3から選択された配列からなるポリヌクレオチド、

(h) 上記(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)又は(g)のポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチド、

10

20

30

40

50

から選択されたポリヌクレオチドからなる、単離されたポリヌクレオチドを提供する。

【0028】

一態様において、本発明は、下記のポリポリペプチド：

(a) 配列番号2、4に示す配列か、又はそれらの断片が若しくは類似体から選択された配列からなる2次ポリペプチドと、少なくとも70%の同一性を有するポリペプチド、

(b) 配列番号2、4に示す配列か、又はそれらの断片が若しくは類似体から選択された配列からなる2次ポリペプチドと、少なくとも80%の同一性を有するポリペプチド、

(c) 配列番号2、4に示す配列か、又はそれらの断片が若しくは類似体から選択された配列からなる2次ポリペプチドと、少なくとも95%の同一性を有するポリペプチド、

(d) 配列番号2、4に示す配列か、又はそれらの断片が若しくは類似体から選択された配列からなるポリペプチド、

(e) 配列番号2、4に示す配列か、又はそれらの断片が若しくは類似体から選択された配列からなるポリペプチドに対して、結合特異性を有する抗体を生成することが可能なポリペプチド、

(f) 配列番号2、4に示す配列か、又はそれらの断片が若しくは類似体から選択された配列からなるポリペプチドの一部を有するエピトープ、

(g) N末端のメチオニン残基が欠失した、上記(a)、(b)、(c)、(d)、(e)又は(f)のポリペプチド、

(h) 分泌アミノ酸配列が欠失した、上記(a)、(b)、(c)、(d)、(e)又は(f)に記載のポリペプチド、

から選択されたポリペプチドからなる、単離されたポリペプチドを提供する。

【0029】

一態様において、本発明は、下記のポリポリペプチド：

(a) 配列番号2又は4から選択された配列からなる2次ポリペプチドと、少なくとも70%の同一性を有するポリペプチド、

(b) 配列番号2又は4から選択された配列からなる2次ポリペプチドと、少なくとも80%の同一性を有するポリペプチド、

(c) 配列番号2又は4から選択された配列からなる2次ポリペプチドと、少なくとも95%の同一性を有するポリペプチド、

(d) 配列番号2又は4から選択された配列からなるポリペプチド、

(e) 配列番号2又は4から選択された配列からなるポリペプチドに対して、結合特異性を有する抗体を生成することが可能なポリペプチド、

(f) 配列番号2又は4から選択された配列からなるポリペプチドの一部を有するエピトープ、

(g) N末端のメチオニン残基が欠失した、上記(a)、(b)、(c)、(d)、(e)又は(f)に記載のポリペプチド、

(h) 分泌アミノ酸配列が欠失した、上記(a)、(b)、(c)、(d)、(e)又は(f)に記載のポリペプチド、

から選択されたポリペプチドからなる、単離されたポリペプチドを提供する。

【0030】

当業者であれば、本発明には、本特許出願において述べられたDNA分子、すなわちポリヌクレオチド及びそれらの相補的な配列であって、突然変異体(mutant)や、変異体(variant)や、相同物や、それらポリペプチドの誘導体のような類似体をコードするものが含まれることが理解できよう。また、本発明には、本発明のDNA分子に対応するRNA分子も含まれる。DNAやRNA分子以外にも、本発明には、対応するポリペプチドや、かかるポリペプチドに特異的に結合する単一特異性を有する抗体が含まれる。

【0031】

さらなる一態様において、本発明のポリペプチドは抗原性を示す。

【0032】

さらなる一態様において、本発明のポリペプチドは免疫原性を示す。

【 0 0 3 3 】

さらなる一態様において、本発明のポリペプチドは、宿主内で免疫反応を引き起こすことができる。

【 0 0 3 4 】

さらなる一態様において、本発明は、上記の本発明のポリペプチドに対して結合特異性を有する抗体を生成することが可能なポリペプチドにも関連する。

【 0 0 3 5 】

“ 結合特異性を有する ” 抗体は、選択されたポリペプチドを認識して結合するけれども、サンプル、例えば生体サンプル内の他の分子を実質的に認識せず結合もしない抗体である。結合特異性は、固相酵素免疫検定法を用いて測定することができるが、それにおいては、選択されたポリペプチドを抗原として使用する。

10

【 0 0 3 6 】

本発明において、生物学の研究上の“ 予防 ” とは、生存曲線や、生存率や、生存期間の顕著な増加によって規定されるものである。生存曲線を比較するためのロジランクテスト (log rank test) や、生存率及び死亡までの日数を比較するためのフィッシャーの正確確率テスト (Fisher exact test) を用いた統計分析は、それぞれ、P 値を算出して 2 グループ間に統計上の有意な相違があるかを判断するのに有用であろう。P 値の 0 . 0 5 は、有意ではないとみなされる。

【 0 0 3 7 】

本発明の他の観点においては、本発明のポリペプチドの抗原性 / 免疫原性を有する断片や、それらの類似体が提供される。

20

【 0 0 3 8 】

本発明の断片は、かかる抗原決定部位 (epitopic region) を 1 又はそれ以上含むか、あるいはそれらの抗原性 / 免疫原性特性を維持するのに十分な程、かかる部位に類似したものでなければならない。従って、本発明の断片は、本明細書に記載のポリペプチドや類似体の特定部位と 1 0 0 % の同一性を有するかもしれないので、本発明の断片に関しては、同一性の程度はおそらく無関係なものであろう。本発明はさらに、本発明のポリペプチド配列に由来する、少なくとも 1 0 の連続するアミノ酸残基を有する断片を提供する。一態様においては、少なくとも 1 5 の連続するアミノ酸残基である。一態様においては、少なくとも 2 0 の連続するアミノ酸残基である。

30

【 0 0 3 9 】

当業者であれば、本発明において、本発明のポリペプチドの類似体が利用可能であること、すなわち抗原性 / 免疫原性を有する材料として利用可能であることが理解できよう。従って、本発明には、例えば付加、欠失、又は置換等を 1 又はそれ以上含むタンパク質やポリペプチドが含まれる。

【 0 0 4 0 】

本明細書で用いる、本発明のポリペプチドの“ 断片 ”、“ 類似体 ”、又は“ 誘導體 ”には、アミノ酸残基の 1 又はそれ以上が、保存されるか又は保存されていないアミノ酸残基 (好ましくは保存されたもの) で置換されたポリペプチドが含まれ、それらは天然のものかもしでないし又はそうでないかもしれない。一態様においては、本発明のポリペプチドの誘導體や類似体は、図面に表示の配列か又はそれらの断片と、約 7 0 % の同一性を有する。すなわち、残基の 7 0 % が同一である。他のさらなる態様では、ポリペプチドは 8 0 % 以上の同一性を有するであろう。他のさらなる態様では、ポリペプチドは 8 5 % 以上の同一性を有するであろう。他のさらなる態様では、ポリペプチドは 9 0 % 以上の同一性を有するであろう。他のさらなる態様では、ポリペプチドは 9 5 % 以上の同一性を有するであろう。他のさらなる態様においては、本発明のペプチド類似体の、約 2 0 個以下、より好ましくは 1 0 以下のアミノ酸残基が置換、修飾又は欠失されている。

40

【 0 0 4 1 】

これら置換は、ペプチドの二次構造や疎水性度 (hydrophobic nature) に最小限の影響

50

しか与えないものである。好ましい置換は、保存されているとして従来から知られているもの、すなわち、疎水性、大きさ、電荷、又は官能基などの物理的又は化学的特性を共有する置換残基である。前記置換基には、デイホフ.Mが“Atlas of Protein Sequence and Structure 5 (1978年)”中で記載した置換基、又はアルゴス.Pが“EMBO J.8. 第779-785頁、1989年)”中に記載した置換基などが含まれる。例えば、天然のものであろうが又はそうでなかるうが、下記グループ:

ala、 pro、 gly、 gln、 asn、 ser、 thr、 val;
 cys、 ser、 tyr、 thr;
 val、 ile、 leu、 met、 ala、 phe;
 lys、 arg、 orn、 his; 及び、
 phe、 tyr、 trp、 his

10

の1つに属するアミノ酸は、保存的置換を代表するものである。好ましい置換基は、対応するL-アミノ酸のD-光学異性体の置換基も含む。

【0042】

異なるアプローチでは、類似体を、例えば効果的なタグを所望のポリペプチドに付けることによって、精製をより簡単にするための部分を組み込んだ融合ポリペプチドとすることができる。“タグ”は、取り除く必要があるかもしれないし、又は融合ポリペプチド自体が使用に十分な抗原性を維持する場合もあるかもしれない。

【0043】

相同性のパーセンテージは、同一性のパーセンテージと、類似性のパーセンテージ又はアミノ酸タイプの保存性の合計パーセンテージとして定める。

20

【0044】

一態様において、本発明のポリペプチドの類似体は、図面に記載の配列又はそれらの断片に対して、約70%の同一性を有する。さらなる一態様において、ポリペプチドは80%以上の同一性を有する。さらなる一態様において、ポリペプチドは85%以上の同一性を有する。さらなる一態様において、ポリペプチドは90%以上の同一性を有する。さらなる一態様において、ポリペプチドは95%以上の同一性を有する。さらなる一態様において、ポリペプチドは99%以上の同一性を有する。さらなる一態様において、本発明のポリペプチドの類似体は、約20個以下、より好ましくは約10個以下のアミノ酸残基が置換、修飾又は欠失されている。

30

【0045】

アミノ酸配列を比較するためには、CLUTALプログラムのようなプログラムを用いることができる。このプログラムは、アミノ酸配列を比較して、必要に応じてどちらかの配列にスペースを挿入することにより、最適アラインメントを探し出すというものである。最適アラインメントについて、同一性や相同性を求めることもできる。BLASTxのようなプログラムは、類似配列を最も長くなるようにアラインし、適合値を定める。従って、それぞれ異なる値を有することが見付かったいくらかの類似する部位を比較することが可能となる。本発明では、両タイプの同一性分析の検討がなされている。

【0046】

異なるアプローチでは、類似体又は誘導体は、例えば所望のタンパク質又はポリペプチドに効果的にタグを付けることによって、精製をより簡単にするための部分を組み込んだ融合ポリペプチドとすることができる。“タグ”は、取り除く必要があるかもしれないし、又は融合ポリペプチドが使用に十分な抗原性を維持する場合があるかもしれない。

40

【0047】

抗原決定部位、すなわちポリペプチドの抗原性又は免疫原性を担う抗原決定部位を特定して抗原性ポリペプチドを選別できることは既知である。かかる選別を行なう方法は、従来から知られている。従って、本発明の断片は、かかる抗原決定部位を1又はそれ以上含むか、又はそれらの抗原性/免疫原性特性を維持できる程十分にかかる部位に類似していなければならない。

【0048】

50

更なる本発明の観点において、本発明の蛋白質又はポリペプチドの抗原性/免疫原性断片、又はその類似体若しくは誘導体を提供するものである。

【0049】

従って、類似体、誘導体、及び断片としては、それらが、少なくともそれらの誘導前のタンパク質又はポリペプチドの抗原性/免疫原性特性をある程度有することが重要である。

【0050】

また、ポリペプチドの生物学上又は薬学上の特性を変える他の化合物、すなわち半減期を長期化するポリエチレングリコール (PEG)、精製を簡略化するリーダー又は分泌アミノ酸配列、プレプロ及びプロ配列、及び(ポリ) サッカリドと融合されたポリペプチドも含まれる。

10

【0051】

さらに、アミノ酸部位が多型性であると分かっている場合には、特定のアミノ酸 1 又はそれ以上を変えて、異なる モラクセラ 株の異なるエピトープに、より効果的に似せるようにすることが望ましい。

【0052】

さらに、本発明のポリペプチドは、末端の NH₂ 基のアシル化により (例えば、アンモニウム又はメチルアミンを用いた、アセチル化、又はチオグリコール酸アミド化、末端カルボキシル基のアミド化により) 修飾して、安定性を与え、かつ、担体や他の分子への結合又は連結に関する疎水性を高めることができる。

20

【0053】

また、ポリペプチドの断片及び類似体の、ヘテロ及びホモポリペプチドマルチマーについても検討する。これらのポリマー型のものには、例えば、アビジン/ビオチン、グルタルアルデヒド、又はジメチルスーパーイミドイトなどの架橋剤によって架橋された、1 又はそれ以上のポリペプチドが含まれる。それらポリマー型のものには、組換え DNA 技術によって生み出された、マルチシストロニック (multicistronic) mRNA から生成された 2 つ又はそれ以上の直列 (tandem) 又は反転した (inverted) 隣接配列を含むポリペプチドも含まれる。

【0054】

さらなる一態様において、本発明は、本願の図面に記載のポリペプチド、又はそれらの断片が若しくは類似体を 1 又はそれ以上含むキメラポリペプチドにも関連する。

30

【0055】

さらなる一態様において、本発明は、配列番号 2、4 に示す配列、又はそれらの断片が若しくは類似体から選択された配列を有するポリペプチドを 2 又はそれ以上含み、キメラポリペプチドを形成するように該ポリペプチドを連結して提供された、キメラポリペプチドにも関連する。

【0056】

さらなる一態様において、本発明は、配列番号 2 又は 4 に示す配列から選択された配列からなるポリペプチドを 2 又はそれ以上含み、キメラポリペプチドを形成するように該ポリペプチドを連結して提供された、キメラポリペプチドにも関連する。

40

【0057】

好ましくは、本発明のポリペプチドの断片、類似体、又は誘導体は、抗原部位を少なくとも一つ、すなわち少なくとも一つのエピトープを含むであろう。

【0058】

抗原性ポリマー (すなわち合成マルチマー) の形成を完成させるために、ポリペプチドには、ビスハロアセチル基を有するものか、又はニトロアリルハロゲン化物等を用いることができるが、ここで試薬は、チオ基に対して特異性を有するものである。従って、異なるポリペプチドの 2 つのメルカプト基間の連結は 1 重結合であるかもしれないし、又は炭素数が少なくとも 2、典型的には炭素数が少なくとも 4、そして炭素数が多くても 16 の結合基から成るものであるかもしれないけれども、通常炭素数は 14 以下である。

50

【 0 0 5 9 】

ある特定の態様においては、本発明のポリペプチド断片及び類似体は、メチオニン (Met) やバリン (Val) のような開始残基を含まない。好ましくは、ポリペプチドは、リーダー又は分泌配列 (シグナル配列) を組み込まないものである。本発明のポリペプチドのシグナル部分は、確立された分子生物学技術に従い、判断することができる。通常は、興味のあるポリペプチドをモラクセラ培養物から単離して、続いて配列決定を行ない、成熟タンパク質の最初の残基を決定し、それによって成熟ポリペプチドの配列を決定する。

【 0 0 6 0 】

ポリペプチドは、組換えポリペプチドの生成や精製を助ける開始コドン (メチオニン又はバリン) を用いず及び / 又はリーダーペプチドを用いず、生成及び / 又は使用できることが分かっている。リーダーペプチドをコードする配列を有さないクローニング遺伝子は、ポリペプチドを大腸菌の細胞質に限定し、その回収を促すことが分かっている (グリック, G.R. 及びパスタ - ナック, J.J. の “Manipulation of gene expression in prokaryotes” (1998年)、ワシントンDC、ASMプレスの “Molecular biotechnology: Principles and applications of recombinant DNA” (第2版、第109 - 143頁))。

【 0 0 6 1 】

本発明の他の観点によれば、(i) 本発明のポリペプチドを担体、希釈剤、又はアジュバントと共に含む組成物、(ii) 本発明のポリペプチドと、薬学的に受容可能な担体、希釈剤、又はアジュバントを含む薬剤組成物、(iii) 本発明のポリペプチドと、薬学的に受容可能な担体、希釈剤、又はアジュバントを含むワクチン、(iv) 宿主に本発明のポリペプチドを免疫反応の惹起に有効な量投与することにより、宿主においてモラクセラに対する免疫反応 (例えばモラクセラに対する感染防御免疫) を誘発する方法、及び、特に (V) 予防又は治療量の本発明のポリペプチドを、必要とする宿主に投与することにより、モラクセラ感染を予防及び / 又は治療する方法も提供する。

【 0 0 6 2 】

本発明の他の観点によれば、(i) 本発明のポリヌクレオチドを担体、希釈剤、又はアジュバントと共に含む組成物、(ii) 本発明のポリヌクレオチドと、薬学的に受容可能な担体、希釈剤、又はアジュバントを含む薬剤組成物、(iii) 宿主に本発明のポリヌクレオチドを免疫反応の惹起に有効な量投与することにより、宿主においてモラクセラに対する免疫反応 (例えばモラクセラに対する感染防御免疫) を誘発する方法、及び、特に (iv) 予防又は治療量の本発明のポリヌクレオチドを、必要とする宿主に投与することにより、モラクセラ感染を予防及び / 又は治療する方法も提供する。

【 0 0 6 3 】

本発明のポリペプチドは、免疫化の前に、テタナス毒素、ジフテリア毒素、B型肝炎ウイルス表面抗原、ポリオウイルスVP1抗原や、他のウイルス性が細菌性の毒素、抗原、又は、任意の適当なタンパク質のような運搬体タンパク質に結合又は共役させて、より強い免疫反応を促すこともできる。この結合又は共役は、化学的に又は遺伝子学的に行なうことができる。ペプチド-担体の共役は、ヴァン・レゲンモートル, M. H. V.、ピリアンド J. P.、ミューラー S.、プラウエ S による生化学及び分子生物学の実験技術の “Synthetic Polypeptides as antigens” 第19巻 (1998年、ニューヨーク、エルゼビアのバードウ R. H. 及びヴァン・ニッペンベルグ P. H. 出版) でより詳細な説明を得ることができる。

【 0 0 6 4 】

他の観点によれば、薬学的に受容可能なアジュバントの混合物中に、本発明のモラクセラポリペプチドを1又はそれ以上含む薬剤組成物が提供されている。適当なアジュバントは、(1) MF59 (登録商標)、SAF (登録商標)、Rib i (登録商標) のような水中油エマルジョン形成物、(2) フロインドの完全な又は不完全なアジュバント、(3) $AlK(SO_4)_2$ 、 $AlNa(SO_4)_2$ 、 $AlNH_4(SO_4)_2$ 、 $Al(OH)_3$ 、 $AlPO_4$ 、シリカ、カオリン等の塩、(4) ステイミュロン (登録商標) のようなサポニン誘導体、又はそれらから生成された ISCOMs のような粒子 (免疫刺激性複合体)、(5) インターロイキン、インターフェ

10

20

30

40

50

ロン、マクロファージコロニー刺激因子 (M - C S F)、腫瘍壊死因子 (T N F) のようなサイトカイン、(6) カーボンポリヌクレオチドのような他の物質、すなわちポリICやポリAU、解毒コレラ毒素 (C T B) と、大腸菌の粘膜免疫の誘発のための熱不安定性毒素を含むものである。アジュバントのより詳細な説明は、M.Z.Iカーン等による総説 "Pharmaceutical Research" 第11巻、第1号 (1994年) の第2 - 11頁や、グプタ等による他の総説 "Vaccine" 第13巻、第14号の第1263 - 1276頁 (1995年) や、W099 / 24578で得ることができる。好ましいアジュバントは、QuiIA (登録商標)、QS21 (登録商標)、Alhydrogel (登録商標) 及びAdjuphos (登録商標) を含むものである。

【0065】

本発明の薬剤組成物は、注射、急速輸液、鼻咽吸込、皮膚吸込により非経口で投与されるか、又は舌下錠又は経口で投与される。

10

【0066】

「薬剤組成物」という用語は抗体を含む意味である。本発明によれば、モラクセラ感染により仲介されたモラクセラ感染及び/又は疾病と症状の治療又は予防のために、本発明のポリペプチドに対して結合特異性を有する一つ又はそれ以上の抗体を使用する方法もまた提供される。

【0067】

本発明の薬剤組成物は、P.R.ムライ (編集長)、E.J.バロン、M.A.ファレー、F.C.テノヴァー及びR.H.ヨルクンの "Manual of Clinical Microbiology" (ASMプレス、ワシントンD.C.) 第7版 (1999年) の第1773頁に記載のように、モラクセラ感染の予防及び/又はモラクセラ感染により生じた疾病及び症状に対して用いられる。一態様においては、本発明の薬剤組成物は、中耳炎、副鼻腔炎、慢性咳、急性喉頭炎、化膿性角膜炎、新生児の結膜炎及び侵襲的な疾患の治療又は予防に用いられ、宿主に本発明の組成物を予防又は治療量を投与することよりなる。一態様においては、本発明のワクチンの組成物は、モラクセラ感染の治療又は予防及び/又はモラクセラ感染により生じた疾病及び症状に対して用いられる。さらなる態様においては、モラクセラ感染はモラクセラカタラーリスである。

20

【0068】

更なる態様において、本発明はモラクセラ感染に対して感受性を有する宿主において、モラクセラ感染の予防又は治療処理をする方法を提供するものであり、その方法は宿主に本発明の組成物の予防又は治療量を投与することからなる。

30

【0069】

本出願において使用された様に、「宿主」という用語には哺乳動物が含まれる。更なる態様において、哺乳動物はヒトである。更なる態様において、ヒトは新生児、幼児又は子供である。更なる態様において、ヒトは大人である。

【0070】

ある特定の態様において、薬剤の組成物は、幼児、高齢者、及び免疫不全宿主のような、モラクセラ感染の危険性のある宿主に投与される。

【0071】

薬剤組成物は、好ましくは約0.001 ~ 100 µg / kg (抗原 / 体重)、より好ましくは、0.01 ~ 10 µg / kg、最も好ましくは0.1 ~ 1 µg / kgの投薬形態を単位として、免疫化の間に約1 ~ 6週間の間隔をおいて1 ~ 3回投与する。

40

【0072】

薬剤組成物は、好ましくは約0.1 µg ~ 10 mg、より好ましくは1 µg ~ 1 mg、最も好ましくは10 ~ 100 µgを投与形態の単位として、免疫化の間に約1 ~ 6週間の間隔をおいて1 ~ 3回投与する。

【0073】

別の観点においては、配列番号2、4に示す配列か、又はそれらの断片か若しくは類似体から選択された配列からなるアミノ酸配列により特徴付けられたポリペプチドをコードするポリヌクレオチドが提供される。

【0074】

50

一態様において、ポリヌクレオチドは、本発明のポリペプチドをコードするオープン・リーディング・フレーム（ORF）を含む、配列番号第1、3に記載のものである。

【0075】

図中に示されたポリヌクレオチド配列は、縮重コドンで変化を受けるかもしれないけれども、それでもなお、本発明のポリペプチドをコードする、ということが理解できるであろう。従って、本発明はさらに、上記のポリヌクレオチド配列（又は、それらの相補配列）とハイブリダイズするポリヌクレオチドにおいて、配列間の同一性が70%であるものを提供する。一態様では、配列間の同一性は少なくとも80%である。一態様では、配列間の同一性は少なくとも85%である。一態様では、配列間の同一性は少なくとも90%である。さらなる一態様では、ポリヌクレオチドは、厳しい条件下でハイブリダイズし、すなわち少なくとも95%の同一性を有する。さらなる一態様では、同一性は97%以上である。

10

【0076】

ハイブリダイゼーションにとって最適の厳しい条件は、当業者であれば直ちに分かる（例えば、サンプローク等（Sambrook et al.）の“Molecular cloning : A Laboratory Manual”第2版（1989年）：ニューヨーク、コールド・スプリング・ハーバー；、ニューヨーク、ジョン・ウイレイ&ソنز出版、ニューヨーク、オースベルF.M.等編（Ausubel F. M. et al., John Wiley & Sons, Inc. N.Y.）“Current protocols in Molecular Biology”（1999年）を参照）。

【0077】

さらなる一態様において、本発明は、厳しい条件下において、下記のポリヌクレオチド：

20

- (a) ポリペプチドをコードするDNA配列、又は
 - (b) ポリペプチドをコードするDNA配列の相補鎖
- （ここで、前記ポリペプチドは、配列番号2、4に示す配列、又はそれらの断片が若しくは類似体から選択されたものである）のいずれかとハイブリダイズするポリヌクレオチドを提供する。

【0078】

さらなる一態様において、本発明は、厳しい条件下において、下記のポリヌクレオチド：

30

- (a) ポリペプチドをコードするDNA配列、又は
 - (b) ポリペプチドをコードするDNA配列の相補鎖
- （ここで、前記ポリペプチドは、配列番号2又は4から選択された配列からなるものである）のいずれかとハイブリダイズするポリヌクレオチドを提供する。

【0079】

さらなる一態様において、本発明は、厳しい条件下において、下記のポリヌクレオチド：

- (a) ポリペプチドをコードするDNA配列、又は
 - (b) ポリペプチドをコードするDNA配列の相補鎖
- （ここで、前記ポリペプチドは、配列番号2、4に記載の配列か、又はそれらの断片が若しくは類似体から選択されたポリペプチドに由来する、少なくとも10の連続するアミノ酸残基をからなるものである）のいずれかとハイブリダイズするポリヌクレオチドを提供する。

40

【0080】

さらなる一態様において、本発明は、厳しい条件下において、下記のポリヌクレオチド：

- (a) ポリペプチドをコードするDNA配列、又は
 - (b) ポリペプチドをコードするDNA配列の相補鎖
- （ここで、前記ポリペプチドは、配列番号2又は4から選択されたポリペプチドに由来する、少なくとも10の連続するアミノ酸残基をからなるものである）のいずれかとハイブ

50

リサイズするポリヌクレオチドを提供する。

【0081】

さらなる一態様において、ポリヌクレオチドは、配列番号2、4に記載の本発明のポリペプチドをコードするものである。

【0082】

さらなる一態様において、ポリヌクレオチドは、本発明のポリペプチドをコードする、配列番号1、3に記載のものである。

【0083】

当業者であれば直ちに分かるように、ポリヌクレオチドにはDNAとRNAの両方が含まれる。

【0084】

本発明には、本願に記載のポリポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチドも含まれる。

【0085】

他の観点においては、宿主内で該ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを発現させて、その発現ポリペプチド生成物を回収することによる、組換え技術を用いた本発明のポリペプチドの生成方法が提供されている。別の方法としては、ポリペプチドは、確立された合成化学技術に基づいて、すなわち液相合成法又は固相合成法により、連結させて全ポリペプチドを生成する(ブロック・ライゲーション)ことにより、生成することができる。

【0086】

ポリヌクレオチド及びポリペプチドを入手及び鑑定するための通常の方法は、以下の参考文献：サンプローク等の“Molecular Cloning :A Laboratory Manual”第2版(1989年)、ニューヨーク、コールド・スプリング・ハーバー；ニューヨーク、ジョン・ウィレイ&ソنز社、ニューヨーク、オースベルF.M.等編の“Current Protocol in Molecular Biology”；ニュージョージー、トトワ、ヒューマンプレス、ホワイト B . A . 出版の“PCR Cloning Protocols, from Molecular Cloning to Genetic Engineering”(1997年)の490頁；ニューヨーク、シュプリンガー、スコープス R . K . (Scopes R.K.) 出版の“Protein Purification, Principles and Practices”第3版(1993年)の380頁；ニューヨーク、ジョン・ウィレイ&ソنز社出版、Coligan J.E等編の“Current Protocol in Immunology”に記載されたとおりである。

【0087】

本発明は本発明のポリヌクレオチドを含むベクターでトランスフェクトされた宿主細胞を提供する。

本発明は、前記ポリペプチドの発現に適した条件下において、本発明の宿主細胞を培養する工程を含む、ポリペプチドの生成方法を提供する。

【0088】

組換え体の生成においては、本発明のポリペプチドをコードするベクターを用いて宿主をトランスフェクトし、その後、プロモーターの活性化か、形質転換細胞の選択か、又は遺伝子の増殖に適するように改変した栄養培養液中で培養する。適したベクターは、選択された宿主内で生存と複製が可能なものであり、かつ染色体性、非染色体性、及び合成DNA配列を含み、例えば、細菌性プラスミド、ファージDNA、バキュロウィルス、イースト菌プラスミド、プラスミドとファージDNAの組み合わせから生成したベクターなどがある。ポリペプチド配列を、制限酵素を用いてベクターの適切な部位に組込むことが可能であり、該ポリペプチドはプロモーター、リボソーム結合部位(共通部位又はシャイン・ダルガルノ配列)と、必要に応じてオペレーター(制御要素)からなる発現制御部位と機能が作動するように連結されている。所定の宿主とベクターに適した発現制御部位の個々の構成成分は、確立された分子生物学の原理(サンプローク等の“Molecular Cloning :A Laboratory Manual”第2版(1989年)、ニューヨーク、コールド・スプリング・ハーバー；ニューヨーク、ジョン・ウィレイ&ソنز社、ニューヨーク、オースベルF.M.等編の“Curr

10

20

30

40

50

ent Protocol in Molecular Biology”) に従い、選択することができる。適したプロモーターは、LTR又はSV40プロモーターと、大腸菌ラクトースと、tac又はtrpプロモーターと、ファージラムダP_Lプロモーターとを含むものであるが、それらに制限されない。ベクターは、好ましくは選択マーカー、すなわちアンピシリン抵抗性遺伝子だけでなく、複製起点も組込んだものである。適した細菌性ベクターは、pET、pQE70、pQE60、pQE-9、pD10、phagescript、psiX174、pbluescript SK、pbsks、pNH8A、pNH16a、pNH18A、pNH46A、ptrc99a、pKK223-3、pKK233-3、pDR540、pRIT5、と真核ベクターpBlueBac111、pWLNEO、pSV2CAT、pOG44、pXT1、pSG、pSVK3、pBPV、pMSG、及びpSVLを含むものである。宿主は細菌性のもの、すなわち大腸菌、枯草菌、ストレプトミセス；カビ、すなわちアスペルギルス・ニガー、アスペルギルス・ニダランス；、酵母菌、すなわちサッカロミセス；又は真核性のもの、すなわちCHO、COSとすることができる。

10

【0089】

培養液中にポリペプチドが発現すれば、細胞を通常遠心分離で回収し、その後（発現したポリペプチドが媒体中に分泌されていなければ）物理的又は化学的手法を用いて破碎し、その結果生じた粗抽出物を保持して興味の対象であるポリペプチドを単離する。培養液又は溶解液からのポリペプチドの精製は、ポリペプチドの特性に応じて確立された技術を用い、すなわち硫酸アンモニウム又はエタノール沈殿、酸抽出、陰イオン又は陽イオン交換クロマトグラフィー、ホスホセルロース・クロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、ヒドロキシルアパタイト・クロマトグラフィー、及びレクチン・クロマトグラフィーを用いて行なうことができる。最終精製は、HPLCを用いて行なうことができる。

20

【0090】

ポリペプチドは、リーダー又は分泌配列の有無にかかわらず発現することができる。前者の場合においては、リーダーは翻訳後プロセッシングを用いて取り除く（米国第4,431,739号、同第4,425,437号、及び同第4,338,397号）か、又は発現したポリペプチドの精製後に化学的に取り除く。

【0091】

さらなる観点によれば、本発明のモラクセラポリペプチドは、モラクセラ感染、詳細にはモラクセラ感染の診断検査に使用することができる。

【0092】

いくつかの診断方法が可能であるが、例えば、生体サンプルにおけるモラクセラ菌の検査において、又はモラクセラに感受性を有する宿主におけるモラクセラ感染の診断において、下記工程：

30

- a) 宿主から生体サンプルを得る工程、
- b) 本発明のモラクセラポリペプチドに反応性を示す抗体又はその断片を、生体サンプルと共にインキュベートして、混合物を生成する工程、及び
- c) モラクセラの存在を示す混合物中で、特異的に結合した抗体又は結合した断片を検出する工程

に従った方法がある。

【0093】

その他には、モラクセラ抗原に特異的な抗体を含むか、又は含むと思われる生体サンプル内における、前記抗体の検出方法は、下記工程：

40

- a) 宿主から生体サンプルを得る工程、
- b) 本発明のモラクセラポリペプチドの1又はそれ以上、あるいはその断片を、生体サンプルと共にインキュベートして、混合物を生成する工程、及び
- c) モラクセラに特異的な抗体の存在を示す混合物中で、特異的に結合した抗原又は結合した断片を検出する工程、

に従い実施することができる。

【0094】

当業者であれば、この診断検査には、酵素結合免疫吸着検定法（ELISA）、放射免疫測

50

定法、又はラテックス凝集反応法のような免疫検査を含む、本質的にはそのタンパク質に特異的な抗体が生物中に存在するか否かを調べるための、様々な方法があると分かるであろう。

【0095】

本発明のポリペプチドをコードするDNA配列は、モラクセラを含むと思われる生体サンプル中の、同菌の存在有無の検出に用いるDNAプローブの設計にも用いることができる。

本発明の検出法は、下記工程：

- a) 宿主から生体サンプルを得る工程、
- b) 本発明のポリペプチドをコードするDNA配列を有するDNAプローブの1又はそれ以上、又はその断片を、生体サンプルと共にインキュベートして、混合物を生成する工程、及び
- c) モラクセラ菌の存在を示す混合物中で、特異的に結合したDNAプローブを検出する工程、を含む。

10

【0096】

本発明のDNAプローブも、例えばポリメラーゼ連鎖反応を用いた、循環モラクセラ、すなわちサンプル中のモラクセラ核酸の検出に、モラクセラ感染の診断方法として用いることができる。そのプローブは、従来技術を用いて合成することができ、固相に固定するか、又は検出可能なラベルを付すことができる。本願の好ましいDNAプローブは、本発明のモラクセラペプチドの少なくとも約6個の連続するヌクレオチドに相補的な配列からなるオリゴマーである。更なる態様において好適なDNAプローブは、本発明のモラクセラペプチドの少なくとも約15個の連続するヌクレオチドに相補的な配列からなるオリゴマーである。更なる態様において好適なDNAプローブは、本発明のモラクセラペプチドの少なくとも約30個の連続するヌクレオチドに相補的な配列からなるオリゴマーである。更なる態様において好適なDNAプローブは、本発明のモラクセラペプチドの少なくとも約50個の連続するヌクレオチドに相補的な配列からなるオリゴマーである。

20

【0097】

宿主中のモラクセラを検出する他の診断方法は、下記工程：

- a) 本発明のポリペプチド又はその断片に反応性を示す抗体に検出可能なラベルを付す工程、
 - b) ラベルを付した抗体又はラベルを付した断片を宿主に投与する工程、及び
 - c) モラクセラの存在を示す宿主中で、特異的に結合したラベルを付した抗体またはラベルを付した断片を検出する工程：
- を含む。

30

【0098】

本発明のさらなる観点は、モラクセラ感染の診断と、特にはその治療に特有の抗体の生成に用いる免疫原として、本発明のモラクセラポリペプチドを使用する方法である。適当な抗体は、適切なスクリーニング法を用いて、例えば試験モデル内においてモラクセラ感染を受動的に防御するある特定の抗体の能力を測ることにより、測定することができる。動物モデルの一例は、本明細書の実施例に記載のマウスモデルである。前記抗体は、完全な抗体であるか、又は抗原に結合性のある断片でもよく、かつ任意の免疫グロブリンのクラスに属するものとするすることができる。前記抗体又は断片は、動物由来のものとする⁴⁰ことができ、詳細には、哺乳動物のもの、より詳細には、マウス、ラット、又はヒトのものとする⁴⁰ことができる。天然の抗体やその断片とすることもでき、あるいは必要に応じて、組換え抗体や抗体の断片とすることもできる。組換え抗体や抗体の断片という用語は、分子生物学の技術を用いて生成された抗体又は抗体の断片を意味する。前記抗体又は抗体の断片は、ポリクローナルか、又は好ましくはモノクローナルのものとする⁴⁰ことができる。それは、モラクセラポリペプチドと結合した多数のエピト - プに特有のものでもよいが、好ましくは、1つのものに特有のものとする⁴⁰ことができる。

【0099】

一観点において、本発明は、モラクセラ感染の予防及び/又は治療に用いる抗体の使用⁵⁰方法を提供している。

50

【 0 1 0 0 】

更なる観点において、本発明は、モラクセラ感染に感受性を有する宿主におけるモラクセラ感染の予防又は治療の処理の方法を提供するものであり、その方法は予防量又治療量の本発明の薬剤組成物を宿主に投与することからなる。

【 0 1 0 1 】

更なる観点において、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、又はその断片、類似体あるいは誘導体を、DNA免疫化法に使用することができる。それは、注入することによってそれらを複製及び発現可能なベクターに導入し、それによってインビボで抗原性ポリペプチドを製造することができる。例えばポリヌクレオチドを、真核細胞中で機能するCMVプロモーターの制御下でプラスミドベクター中に導入することができる。好ましくはベクターを筋肉注射する。

10

【 0 1 0 2 】

本発明のさらなる観点は、本発明のポリペプチドに対する抗体を、受動免疫のために用いる使用方法であり、そのために本発明のポリペプチドによって誘導された抗体は宿主に、受動免疫を与えるのに十分な量で投与される。人は本出願において述べられた抗体を使用することができるであろう。適切なスクリーニング方法を用いて適切な抗体を決定することができる、その一例として、試験モデルにおいて特定の抗体がモラクセラ感染を受動的に防御する能力を測定することができる。動物モデルの一例は、この中で述べられたマウスのモデルである。その抗体は全抗体あるいはその抗原結合断片であってもよく、如何なる免疫グロブリンクラスに属しても良い。その抗体又は断片は動物由来であってもよく、特異的には哺乳動物由来、更に特異的にはマウス、ラット又はヒト由来であってもよい。それは天然の抗体又はその断片であってもよく、望むならば、組み換え抗体又は抗体断片であってもよい。組み換え抗体又は抗体断片という用語は、分子生物学の技術を用いて製造された抗体又は抗体断片を意味するものである。その抗体又は抗体断片はポリクローナルであり、又は好ましくはモノクローナルである。それはモラクセラペプチドに関連した多くのエピトープに特異的であっても良いが、好ましくは一つに対して特異的である。

20

【 0 1 0 3 】

遺伝的な免疫法における本発明のポリヌクレオチドの使用には、好ましくは適切な送達方法又はシステムが採用され、その例には、筋肉へのプラスミドDNAの直接注射 [フォルブラ, H M G (1992) 1: 363; ターネスら、ワクチン (1999), 17: 2089; レーら、ワクチン (2000), 18: 1893; アルベスら、ワクチン (2001), 19: 788], アジュバントあり又はなしでのプラスミドDNA注射 [ウルマーら、ワクチン (1999), 18: 18; マックローグリンら、ジャーナル・オブ・コントロールリリース, (1998) 56: 259; ハルティッカら、ジェーンセラピー (2000) 7: 1171-82; ベンベニスティー及びレシェフ, PNAS USA (1986) 83: 9551; シングら、PNAS USA (2000) 97: 811], 特異的な担体と複合したDNAを送ることによる細胞の標的化 [ワら、ジャーナル・オブ・バイオロジカルケミストリー (1989) 246: 16985; チャピンら、Infect.Immun. (1999) 67: 6434], 種々の形の리포ソームに複合化された又はカプセルに包まれたプラスミドの注射 [イシイら、エイズリサーチ・アンド・ヒューマンレトロウイルス (1997) 13:142; ペリエら、ワクチン (2001), 19: 330 1], 種々のボンパートメント法によるDNAの投与 [タンら、ネーチャー (1992) 356: 152 ; エイセンブラウンら., DAN Cell Biol (1993) 12: 791; チェンら、ワクチン (2001), 19: 2908], 生きている (lived) ベクターによるDNA投与 [チュプレカスら、ジェーン (1997) 190: 191; プショコら、バイロロジー (1997) 23*: 389; スプレングら、FEMS (2000) 27: 299; ディエトリッチら、ワクチン (2001), 19: 2506] がある。

30

40

【 0 1 0 4 】

一つの観点によると、本発明は、モラクセラ感染の予防及び/又は治療のための抗体の使用方法を提供する。

【 0 1 0 5 】

さらなる態様において、本発明は、モラクセラ感染の予防又は治療用の薬剤の製造における、本発明の薬剤組成物の使用方法を提供する。

50

【 0 1 0 6 】

さらなる態様において、本発明は、本発明のポリペプチドを含む、モラクセラ感染の検出又は診断用のキットを提供している。

【 0 1 0 7 】

別段の定義がない限り、本明細書で使用する技術又は科学用語の全ては、本発明が属する分野における当業者に通常理解されているものと同様の意味を有する。ここに記載の出版物、特許出願、特許、及びその他のここで言及された参考文献の全ては、参考文献としてそのまま盛りこまれる。紛争の際には、定義も含めて本明細書が支配をする。さらに、材料や方法や実施例は解説を行なうのみであり、それに制限されるものではない。

【 実施例 1 】

【 0 1 0 8 】

SMC - 1 遺伝子とそれに対応するポリペプチドのクローニング及び分子特性を、以下実施例で説明する。

【 0 1 0 9 】

M. カタラーリス SMC - 1 (配列番号: 1) 遺伝子のコード領域を、PCR (カリフォルニア州サンノゼ、パーキンエルマー社のDNA熱サイクル遺伝子増幅PCRシステム2400を使用)により、M. カタラーリス株のETSUC - 2のゲノムDNAから増幅し、そのPCRにあたって、制限部位NcoI (CCATGG)及びXhoI (CTCGAG)付加のための伸張した塩基を含む下記オリゴ: RIO S 3 0 (5'- TATGTACCATGGCTGAACTCAATACCA GCCGTTCA -3') およびRIO S 3 1 (5'- GGCATGCTCGAGGTAATCATGTCTCCAAGCATTTTG -3') を用いた。PCR産物を、QIAgen社のQIAquickゲル抽出キットを用いて、その製品使用説明書 (カリフォルニア、チャッツワース) に従って、アガロースゲルから精製し、NcoI及びXhoI (カナダ、ペー・ドゥルフェ、アマシャム ファルマシア パイオテク社) により消化した。pET21b(+)ベクター (ウィスコンシン州、マディソン、ノヴァゲン) をNcoI及びXhoIにより消化し、QIAquickゲル抽出キットを用いて、アガロースゲルから精製した。NdeI - XhoI PCR産物を、NcoI - XhoI pET21b(+)発現ベクターに連結させた。その連結した産物により、シマニス (Simianis) (Hanahan.Dによる“DNAクローニング” (1985年)、D. M. グローバー出版、第109 - 135頁) の方法に従い、大腸菌DH5 [80dlacZ M15 (lacZYA-argF)U169 endA1 racA1 hsdR17 (r_K-m_K+)deoR thi-1 supE44 gyrA96 relA1] (メリーランド州、ゲーサーズパーク、ギブコBRL) を形質転換した。SMC-1遺伝子を含む組換えpET21d(+)プラスミド (rpET21d(+)) からQIAgenキット (カリフォルニア、チャッツワース) を用いて精製し、DNA挿入物の配列決定を行なった (カリフォルニア、フォスターシティ、エー・ピー・アイ、タック・ダイ・デオキシターミネ - ター配列キット)。

【 0 1 1 0 】

10

20

30

【表 1】

M. カタラーリス遺伝子のPCR増幅法に用いたオリゴヌクレオチドプライマー

遺伝子	プライマー I.D.	制限部位	ベクター	配列 (SEQ ID No)
SMC-1	RIOS30	<i>Nco</i> I	pET21d (+)	5'- TATGTACCATGGCTGAACT CAATACCAGCCGTTCA -3' (SEQ ID No : 5)
SMC-1	RIOS31	<i>Xho</i> I	pET21d (+)	5'-GGCATGCTCGAGGTAA TCATGTCTCCAAGCATTTT G-3' (SEQ ID No : 6)
SMC-1	RIOS187	<i>Bgl</i> II	pCMV-GH	5'-GGCAGATCTTTGGA CAATACCAGCCGTTTC-3' (SEQ ID No : 7)
SMC-1	RIOS188	<i>Sal</i> I	pCMV-GH	5'-ACGCGTCGACTTAGTA ATCATGTCTCCAAGCAT-3' ' (SEQ ID No : 8)
SMC-2	RIOS20	<i>Nde</i> I	pET21b (+)	5'-CGTACCAGCACATATG AATAAACAAAACGCCAATC AA-3' (SEQ ID No : 9)
SMC-2	RIOS21	<i>Xho</i> I	pET21b (+)	5'-GCCCATCTCGAGTTGC GATTCTGTCTCTGCC-3' (SEQ ID No : 10)
SMC-2	RIOS189	<i>Bam</i> HI	pCMV-GH	5'-CGAGGATCCTAATAAA CAAACGCCAATCAAAC-3' ' (SEQ ID No : 11)
SMC-2	RIOS190	<i>Hind</i> III	pCMV-GH	5'-CAGAAGCTTTTATTGC GATTCTGTCTCTGCC-3' (SEQ ID No : 12)

【0111】

SMC-1のポリペプチドをコードするオープン・リーディング・フレーム (ORF) は2781bp を含み、6.31の予測pIと104054.84Daの予測分子量を有するアミノ酸残基926個のポリペプチドをコードすることが分かった。スプキャン・ソフトウェア (ウイスコンシン配列分析パッケージ; ジェネティクス・コンピューター・グループ) を用いた予測アミノ酸残基配列 (配列番号: 2) の分析では、35個のアミノ酸残基のシグナルペプチド (MHTAHHRSKYLTIAIRYALFGIASLPFVIPTYA) の存在が示されたが、それは、アラニンとグルタミン残基との間に位置する開裂部位を末端としていた。

【0112】

PCR増幅法によりSMC-1 (配列番号: 1) 遺伝子の存在を確認するために、次の3種の別個のM. カタラーリス株: イースト・テネシー州立大学から提供されたM. カタラーリス ETSU C-2と、ETSU T-25と、ETSU 658の臨床単離株; ラバル大学病院本部感染症研究セ

10

20

30

40

50

ンターから提供されたM. カタラーリス株M-12を用いた。これらの実験には、負のコントロールとして、大腸菌XL1 - Blue MRF'を用いた。PCR(カリフォルニア州サンノゼ、パーキンエルマー社のDNA熱サイクル遺伝子増幅PCRシステム2400)により、オリゴヌクレオチド・プライマーR I O S 3 0及びR I O S 3 1(表1)を用いて、SMC-1(配列番号: 1) 遺伝子を、前記3種のM. カタラーリス株のゲノムDNAと、コントロールの大腸菌株から増幅させた。PCRは、94 で15秒間と、47 で30秒間と、68 で3分のサイクルを5回と、続いて94 で15秒間と、63 で30秒間と、68 で3分のサイクルを30回と、最終伸長期間を68 で5分間で行なった。PCR産物は、1%アガロースゲル中でサイズ分別し、エチジウムプロマイド染色で視覚化した。これらPCR増幅の結果は、表2に示すとおりである。増幅産物の分析から、テストした3種のM. カタラーリス株の全てのゲノム中に、SMC-1(配列番号: 1) 遺伝子が存在することが明らかになった。コントロールである大腸菌 DNAに、前記オリゴヌクレオチド・プライマーを用いた同様のPCR増幅法を行なっても、そのような産物は検出されなかった。

10

【0113】

【表2】

PCR増幅法によるM. カタラーリス遺伝子の同定

株の同定	PCR増幅による同定	
	SMC-1	SMC-2
ETSU C-2	+	+
ETSU 658	+	+
ETSU T-25	+	+

20

【実施例2】

【0114】

SMC-2 遺伝子とそれに対応するポリペプチドのクローニング及び分子特性を、以下実施例で説明する。

【0115】

M. カタラーリスのSMC-2 (配列番号: 3) 遺伝子のコード領域を、PCR(カリフォルニア州サンノゼ、パーキンエルマー社のDNA熱サイクル遺伝子増幅PCRシステム2400を使用)により、M. カタラーリス株ETSU C-2のゲノムDNAから増幅し、そのPCRにあたって、制限部位NdeI(CATATG)及びXhoI(CTCGAG)付加のために伸張した塩基を含む下記オリゴ: 表1に記載のR I O S 2 0及びR I O S 2 1を用いた。発現ベクターへのSMC-2遺伝子のクローニングとその解読には、実施例1に記載のものと同様の方法を用いた。

30

【0116】

SMC-2のポリペプチドをコードするオープン・リーディング・フレーム(ORF)は957bpを含み、5.78の予想pIと35954.10Daの予想分子量を有するアミノ酸残基318個のポリペプチドをコードすることが分かった。スプキャン・ソフトウェア(ウイスコンシン配列分析パッケージ; ジェネティックス・コンピューター・グループ)を用いた予想アミノ酸残基配列(配列番号: 4)の分析では、47個のアミノ酸残基のシグナルペプチド(VGKIMSKIPMMNEKYFRRQALYWLIAAAIMAGLWLVWLTSSVPAMI)の存在が示されたが、それは、イソロイシンとアスパラギン残基との間にある開裂部位を末端としていた。

40

【0117】

試験した3種のM. カタラーリス株(表2)について、オリゴヌクレオチド・プライマーR I O S 2 0とR I O S 2 1を用いてPCR増幅を行なったところ、SMC-2遺伝子の存在が示された。SMC-2遺伝子のPCR増幅には、実施例1に記載の方法と同様の方法を用いた。これらオリゴヌクレオチド・プライマーを用いた同様のPCR増幅を、コントロール大腸菌DNAについて行なったが、上記のような産物は検出されなかった。

50

【実施例 3】

【0118】

CMVプラスミドpCMV-GHにおけるM.カタラーリス遺伝子のクローニングを、以下実施例で説明する。

【0119】

M.カタラーリスポリペプチドのDNAコード領域を、プラスミドベクターpCMV-GH中のサイトメガロウイルス (CMV) プロモーター転写調節下にあるヒト成長ホルモン (hGH) 遺伝子の下流相に挿入した (タング等の "Nature" (1992年) 356:152)。CMVプロモーターは、大腸菌細胞内では機能しないプラスミドであるけれども、真核細胞へのプラスミド投与により活性化する。前記ベクターは、アンピシリン耐性遺伝子も組込んだものとした。

10

【0120】

SMC-1(配列番号:1)とSMC-2(配列番号:3)の、リーダーペプチド部位を有さないコード領域を、PCR法(カリフォルニア州サンノゼ、パーキンエルマー社、DNA熱サイクル遺伝子増幅PCRシステム2400)によりM.カタラーリス株のETSUC-2のゲノムDNAから増幅し、そのPCRにあたって、表1に記載の制限部位BamHI(GGATCC)及びBglII(AGATCT)、SalI(GTCGAC)、又はHindIII(AAGCTT)付加のための伸張した塩基を含むオリゴヌクレオチド・プライマーを用いた。PCR産物は、QIAgen社のQIAquickゲル抽出キットを用いてアガロースゲルから精製し、制限酵素(アマシャムファルマシアバイオテク社)により消化した。pCMV-GHベクター(テキサス州、ダラス、テキサス大学、生化学部、ステファン・A・ジョンストン博士研究室)をBamHI、BglII、SalI、又はHindIIIにより消化し、QIAgen社のQIAquickゲル抽出キットを用いてアガロースゲルから精製した。消化したDNA断片を、消化したpCMV-GHベクターに連結させ、CMVポリモーターの制御下で、hGH-SMC-1とhGH-SMC-2の融合ポリペプチドを生成できるようにした。その連結産物を、シマニスの方法(ハナハン、D. DNAクローニング、1985年、D.M.グローバー出版、pp.109-135)に従って、大腸菌株DH5 [80dlacZ M15 (lacZYA-argF)U169 endA1racA1 hsdR17 (r_K-m_K+)deoR thi-1 supE44 gyrA96 relA1] (ギブコBRL)を形質転換した。組換えpCMVプラスミドをQIAgenキットを用いて精製し、DNA配列決定により、挿入物のDNAのヌクレオチド配列を確認した。

20

【実施例 4】

【0121】

M.カタラーリスポリペプチド抗原に対して免疫反応を誘発するDNAの使用法を、以下実施例で説明する。

30

【0122】

雌のBALB/cマウス8匹(カナダ国ケベック州、セントコンスタント、チャールズリバー)のグループに、50µgの顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)発現プラスミドpCMV-GH-GM-CSF(テキサス州、ダラス、テキサス大学、生化学部、ステファン・A・ジョンストン博士研究室)存在下に、SMC-1(配列番号:1)とSMC-2(配列番号:3)遺伝子をコードする組換えpCMV-GHを50µg、2~3週間の間隔をあけて100µlを3回筋肉注射することにより、免疫化した。コントロールとしては、マウスのグループに、50µgのpCMV-GH-GM-CSF存在下に、pCMV-GHを50µg注射した。各免疫注射の実施前と三度目の注射の7日後に、眼窩洞から血液サンプルを採取して、対応するHisタグラベルを付したM.カタラーリス組換えポリペプチドを皮膜抗原として用いて、ELISA法により血清の抗体反応を調べた。これらHisタグでラベル化したM.カタラーリス組換えポリペプチドの生成及び精製法については、実施例5に示す。

40

【実施例 5】

【0123】

M.カタラーリス組換えポリペプチドの生成及び精製法を、以下実施例で説明する。

【0124】

SMC-1(配列番号:1)とSMC-2(配列番号:3)遺伝子を組込んだ組換えpET21プラスミドを用いて、電気穿孔法(カナダ国ミシサーガ、バイオラッド研究室、ジェーンバル

50

サーIIアパレイタス)により、大腸菌株AD494 (DE3) [ara-leu7697 lacX74 phoA PvuII phoR malF3 F' [lac⁺(lacI^q)pro] trxB::Kan(DE3)] (ノヴァゲン)を形質転換した。大腸菌のこの菌株において、組換えポリペプチドの発現を制御するT7プロモーターは、イソプロピル-β-D-チオ-ガラクトピラノシド (IPTG) によって誘導が可能であるlacプロモーターの制御下にある遺伝子であるT7 RNAポリメラーゼ (DE3プロファージ上に存在) によって特異的に認識される。形質転換細胞AD494 (DE3) / rpET21を、1mlにつき100 μgのカルベニシリン (カナダ国オークビル、シグマ-アルドリッチ・カナダ社) を含むLB培養液 (ペプトン10g/L、イースト菌抽出物5g/L、NaCl 10g/L) 中で250rpmで攪拌しながら、A₆₀₀値が0.5になるまで、37℃で培養した。Hisタグを付したM.カタラーリス組換えポリペプチドの生成を促進するために、最終濃度1mMのIPTGと共に、細胞をさらに3時間インキュベートした。500ml培養液から誘導された細胞を遠心分離でペレット化して、-70℃で凍結させた。

10

【0125】

His結合金属キレート樹脂に固定された2価のカチオン (Ni²⁺) へのHisタグ配列 (連続する6個のヒスチジン残基) の結合特性に基づいたアフィニティー・クロマトグラフィーを用いて、IPTGに誘導されたAD494 (DE3) / rpET21の可溶性細胞質画分から、組換えポリペプチドの精製を行なった。大略すると、IPTGにより誘導された500mLの培養液から得られたペレット化した細胞を、PMSFを1mM含む溶解緩衝液 (20mLトリス、500mMNaCl、10mMイミダゾール、pH7.9) 中に再び懸濁させ、超音波処理して12000Xgで20分間遠心分離処理して、沈殿物を取り除いた。その上清をNi-NTAアガロースカラム (キアゲン) にかけた。Hisタグでラベルを付したM.カタラーリス組換えポリペプチドを、250mMのイミダゾールと、500mMのNaClと、20mMのトリスpH7.9で溶出した。4℃でPBSに対して透析して、サンプルから塩とイミダゾールを取り除いた。大腸菌の可溶部分から得られた組換えポリペプチド量は、MicroBCA (イリノイ州、ロックフォード、ピース) で測定した。

20

【実施例6】

【0126】

Hisタグを付したM.カタラーリス組換えポリペプチドとヒト口蓋扁桃中に存在する抗体との反応性を、以下実施例で説明する。

【0127】

表3に示すように、ヒト口蓋扁桃内に存在する抗体を用いた免疫プロット法において、SMC-1とSMC-2のHisタグを付した組換えポリペプチドの存在が認められた。このことは、ヒトは普通にM.カタラーリスと接触し、そのポリペプチドに特異的な抗体を作成することを示している。これらの特別なヒトの抗体は、M.カタラーリス感染の予防に関与するかもしれない。

30

【0128】

【表3】

ヒト口蓋扁桃中に存在する抗体と、M.カタラーリスのHisタグを付した融合組み換えポリペプチドとの免疫プロットにおける反応性

精製した組み換えポリペプチド I. D. ¹	見かけの分子量 (kDa) ²	ヒト口蓋扁桃中に存在する抗体との免疫プロットにおける反応性 ³
SMC-1	104	+
SMC-2	36	+

40

¹免疫プロットは、実施例5に記載のように生成かつ精製されたHis標識組換えポリペプチドを用いて行なった。

² Hisタグを付した組換えポリペプチドの分子量は、SDS-PAGE後に測定した。

50

³免疫プロットを行うためにヒト口蓋扁桃からの抽出物は希釈を行わなかった。

【実施例 7】

【0129】

M. カタラーリス株表面上にSMC-1とSMC-2ポリペプチドの抗体が接近する可能性を、以下実施例で説明する。

【0130】

細菌を、37℃、8%二酸化炭素ガス中で1%デキストロースを含む脳心臓輸液（BHI）培養液中で培養して、OD_{490nm}が0.650（～10⁸ CFU/ml）となるようにした。その後、抗SMC-1又は抗SMC-2又はコントロール血清の希釈物を添加して細胞に結合させ、回転させながら4℃で2時間インキュベートした。サンプルをブロッキング緩衝液（2%ウシ血清アルブミン（BSA）含有リン酸緩衝生理食塩水（PBS））で4回洗浄し、その後、ブロッキング緩衝液で特異的に希釈したヤギ蛍光標識（FITC）-結合抗マウスIgG Fc（ガンマ）の断片1mlを加えた。さらに暗室中で回転させながら、室温で60分間インキュベートした後、サンプルをブロッキング緩衝液で4回洗浄し、0.25%ホルムアルデヒド含有PBS緩衝液で4℃で18時間固定化した。細胞を遠心し、PBS緩衝液0.5ml中に再懸濁させた。細胞は、フローサイトメトリー（ベックマン・クーラー社、Epics（登録商標）XL）で分析するまで、4℃の暗室に放置した。フローサイトメトリー分析から、SMC-1とSMC-2に特異的な抗体が、試験した均質な（ETSU C-2）M. カタラーリス株上にあるそれらに対応する表面エピトープを、効率的に認識することが明らかになった（表4）。分析されたモラクセラ細胞10000個のうちの89%以上が、SMC-1とSMC-2に特異的な血清中に存在する抗体によりラベル化されていることが示された。加えて、SMC-1とSMC-2に特異的な血清のプール中に存在する抗体は、M. カタラーリスのETSU 658株の表面に結合した（表4）。この株の10000個の細胞の90%以上が特異的な抗体により標識されていることも測定された。これらの観察は、SMC-1とSMC-2ポリペプチドが、抗体に認識され易い表面に接近可能であることを明確に示している。抗M. カタラーリス抗体は、M. カタラーリス感染の予防に重要な役割を果たすことが明らかになった。

【0131】

【表 4】

M. カタラーリスの無傷の細胞表面における、SMC-1 及び SMC-2 に特異的な抗体の結合評価

血清の同定	菌株	蛍光指標 ²	ラベル化細胞の% ³
SMC-1 特異的抗体のプール ¹	ETSU C-2	19.8	96.1
	ETSU 658	15.2	93.1
SMC-2 特異的抗体のプール	ETSU C-2	11.0	89.8
	ETSU 658	11.9	90.5
負コントロール血清のプール ⁴	ETSU C-2	1.0	1.0
	ETSU 658	1.0	1.0
正のコントロール血清 ⁵	ETSU C-2	25.0	97.4
	ETSU 658	19.6	93.3

¹精製した組換えポリペプチド20µgとQuilAアジュバント（カナダ国、ホーンビー、シーダーレーン・ラボラトリーズ社）10µgの混合物を2週間毎に5回、マウスに皮下注射し

10

20

30

40

50

た。血清を1/50に希釈した。

²免疫血清で細胞にラベルを付けた後に得られた蛍光値の中央値を、コントロールのマウス血清について得られた蛍光値で割って算出したものを、蛍光指標とした。蛍光値の1は、無傷のモラクセラ細胞の表面に結合された抗体が存在しないことを示したものである。

³分析した10,000細胞のうちの、ラベルを付した細胞%を示す。

⁴この検定には、免疫化されていないマウス又は見せかけ上免疫化されたマウスから採取した血清をプールして1/50に希釈したものを、負のコントロールとして用いた。

⁵検定には、精製されたM. カタラーリス株ETSU-C2由来の精製された外膜ポリペプチド20 µgで免疫化されたマウスから得られた血清を1/1000に希釈して、正のコントロールとして用いた。

【実施例 8】

【0132】

抗SMC-1及びSMC-2マウス血清の殺菌活性を、以下実施例で説明する。

【0133】

細菌をチョコレート寒天プレートに載せ、8%二酸化炭素ガス中、37 °Cで18時間、インキュベートした。その後、OD_{490nm}が0.25となるように溶菌緩衝液（10%ハンクス平衡塩類溶液（HBSS）及び1%カゼイン加水分解物、pH7.3）中に細菌細胞を再懸濁させ、8×10⁴CFU/mlに希釈した。細菌懸濁液25 µlと、熱で不活化した希釈試験用血清50 µl及びHBSS 15 µlとを混合して、攪拌（200rpm）しながら8%二酸化炭素中、37 °Cで15分間インキュベートすることにより、細菌検定を行なった。その後、ウサギの捕体成分含有血清を最終濃度が10%となるように添加して、その混合物を攪拌（200rpm）しながら8%二酸化炭素中37 °Cで、さらに60分間インキュベートした。インキュベート終了時に、チョコレート寒天プレートに検定混合物10 µlをのせ、生存細菌数を測定した。そのプレートを8%二酸化炭素中、37 °Cで18~24時間インキュベートした。コントロールは、免疫化前のマウスから採取した熱不活化血清およびウサギ捕体とインキュベートした細菌を含むものとした。殺菌活性は、コントロールと比較して、50%がそれ以上の細菌を殺す結果となる最高血清希釈として測定した。M. カタラーリス株 E T S U 658を用いて血清の殺菌活性を評価した。M. カタラーリス株 E T S U 658に対する殺菌活性は、精製された組み換えSMC-1又はSMC-2ポリペプチド20 µgで5回免疫したマウスから採取した血清において検出した。

【実施例 9】

【0134】

免疫化により誘発されたM. カタラーリス感染に対するマウスの予防を、以下実施例で説明する。

【0135】

10匹の雌のBALB/cマウス（チャールズリバー）のグループに、10%のQuiIAアジュバント（カナダ国、ホーンビー、シーダーレーン・ラボラトリーズ社）の存在下で、アフィニティ精製されたHisタグを付したM.カタラーリス組換えポリペプチド20 µgを、2週間毎に5回、皮下に投与して免疫化するが、又は、コントロールとして、PBS中のQuiIAアジュバントのみを投与した。血液サンプルは、それぞれ免疫化前の0、14、28、42及び56日目と、5度目の注射から14日後（70日目）に、眼窩洞から採取した。1週間後、M.カタラーリス株ETSU 658約1×10⁶CFUを用いて、マウスに肺内疾患を患させた。M.カタラーリス疾患の接種材料をチョコレート寒天にのせ、CFUを測定して、投与した量を確認した。マウスは、ペントバルビタール・ナトリウム（Euthanyl（登録商標））の腹腔内投与により感染の5時間後に屠殺した。無傷の肺を摘出して、組織ホモゲナイザーで均質化した。CFU測定のための連続希釈でプレーティングすることにより、肺ホモジェネートについて細菌クリアランスを測定した。

【図面の簡単な説明】

【0136】

【図1】図1は、M. カタラーリス株 E T S U C - 2 由来のSMC-1遺伝子のDNA配列（配列番

10

20

30

40

50

号：1) を示したものである。前記配列の下線部は、リーダーペプチドのコード領域を示す。

【図2】図2は、M. カタラーリス株 E T S U C - 2 由来の SMC-1 ポリペプチドのアミノ酸配列 (配列番号：2) を示したものである。下線部の配列は、35 アミノ酸残基のリーダーペプチドを示す。

【図3】図3は、M. カタラーリス株 E T S U C - 2 由来の SMC-2 遺伝子の DNA 配列 (配列番号：3) を示したものである。前記配列の下線部は、リーダーペプチドのコード領域を示す。

【図4】図4は、M. カタラーリス株 E T S U C - 2 由来の SMC-2 ポリペプチドのアミノ酸配列 (配列番号：4) を示したものである。下線部の配列は、47 アミノ酸残基のリーダーペプチドを示す。

10

【図1】

Figure 1

```

1 ATGCACACCG CTCATCAGCA TCGCTCAAG ACATATTTGA CTACCGCTAT TCGTACGCA
61 CTATTGGTA TCGCCAGTTC GCCATTGTC ATACCAACTT ATSCAGACT CAATACAGC
121 COTTCACTGA CAGTCOTTGG TCGTACAGC TCAAAAATT TCGTGTATC ACCAATACC
181 AAACCAATTA CTGTCTTACG CTTCAGGCG CATTACAAA GTCAGATGA TACTGCAAT
241 GCCTTTGATG GCTTTGATTT TGAATTTAC ACACACAGC CAGCGAGCA GAAACGAGT
301 CAAGCAATC AAGCAATTA TCAATGAGC CAGCTTGAOC CCTTCTGAT TAAGTACAG
361 AATCAAGTT TAACCACTG CAGGCTGAG GATAAGCATG ATACACCTC TCGCAGTAA
421 AGCTTAGCCA AATTAGCGA AAATACACT ATTAAGTCCG ATCCAGACG TCTCTGTTT
481 CAGGATATG GATGCAAGC AATCCAGCA GCAAGACCA CAAAGCCOC TCCAGCCCA
541 AAACATGAT AATATGTA TCGTATGCA GAAGATGGA TTTTGTCCA AGCTGATAT
601 GATATATAT ACCTCCAA CTTAGCCGAA TGTCTGGCA AATGATTTT GAGCAAAAC
661 GGTGCGCGT TAACCTGCA TAGCTTACT ATAGCACCC AAACAGGCA AGCCACTGC
721 TCAAGTCAAG TACAATTTG TATGCGCGT CAAAGTATC ACAATGCTG CATTTATGG
781 ATGGCTAAA ACTTATATA CCAATACAGT GTCAGACAG CAGCCGACA AATGTTGCT
841 TTTGCAACA CTACACTGA TGTCCAGCT TATCCACTG AATGATATA AATPAGCGT
901 AGCAATATC GCTTCCACA TGCATGATC ACCACTGTC CACCCAGCA ACCCAATGG
961 TACTTAGATA CTGATAGAT TGAATGAT ACCGATACAG GTCCGCTAT GCGCAAAAT
1021 ACCACTTGC GTATCAAAA AGTACTGTC TTTACTCGC CTAATTTAA CTTTCCGATC
1081 GATGCTGTC GCTCTCTCG ATTTTATTA CCAACAAAG GATTTGGTC ATCGACAGT
1141 TTTGAAITA GTAGCGCTA TTAATGAT TCGCACAG ATTAATGATC AACCACTAG
1201 CCACTGAT TACTACAGC CATTCCTG CTGCTGCGC AATTCGTTA TCGACCAAA
1261 GATTTACTC CAGGCGGTT GACTCTTCC NATCTCCCA AATATCAGA ATATCAAT
1321 AAGAACCGTA CCGAATACA ATTTGATC ACATGCAAC CAAAGAGAT TGAATAAAT
1381 ACCACTTGC CCAATACA ATCTGTTCT GATGCGAAT ATTTATAGA CTTTAAATGCC
1441 TGGGTTGTT AGATGCTAA GCTAATCTA CCAAGACGA TCGGACAGC CTTCTAGAT
1501 GAAATGCT CACTGATTT AATGTTGAA GATTTGAGC GTTTCAGCG TTTGCTTAA
1561 GATGCTGCT CATTAACA CAAATGGA CCAATGAGC GCTTACACA GCTATGCTG
1621 AACTATGCT TSCCTGCAAT AATGATGAT ACACCGAGC GTCTTAACT GGTGATTT
1681 CAATATCTG CCAATTTCA AAAATCCAT AATGATGAT CTGACAGCA AAAAGCGGT
1741 GTAGAAAT TTAACCAAT CAGACCGAT TATCCACTG TCGCTCTTG GGGTATTTG
1801 ACCCAACAC TTAGCTGAC AATGATAT ACCACTATG ACAGACAGC CTRAGCCGC
1861 CAATATGCT CTAGAAA TGTGCGCAT TCGATATTG CACCAAGCT CACTGCTG
1921 GCGCGCTAT TTTTGBAA AGCGGTGCA CCAATTTGC TCAATAGA TCAAGTGGC
1981 TATCAAGTC TACACCAAG ATTAACAT ACTTACAGC CTTTAAAGA TCAACCAAT
2041 GTACCAAA TTAGACAAA AATTCAGT TTAGACTATG AGCACTTT TACACAAAC
2101 TGGTTTTGG GTATGATGC CATTCAGAT TTAGACGCG TCAAGCTGC AGTCACTAC
2161 GCTTATATG AFAAATGCG CAGACAGC TTTAGGCGC GATTCGCGA ACGATTTTA
2221 TTAGAAAT TCGTATTGG TACTATGAC ACAGCAACT ATGCGCGC AGCTCTGCT
2281 TCGCTTGC ATCCAGCT AGCGAAA TCGGATATG CCAATTTAT GATTTGATC
2341 TTAGACAAA ATTAATGAT TCGGCAAAA TCGCTATG TCGGATGAT
2401 GATGATAT TTAGCTAG TATGTCAA AGAAAAGA ATCTGCTTT TACTCAATC
2461 GATATACAG CATACTGCG CCGCCGAT TTTCAATCA AATATGCTG GCGATATG
2521 GTCACACTC AATAGACTA CACTATGAT TATGCTGCT ATTTTCTG GGGCTAAT
2581 TATGAAAT GCTTATTGG TACTATGAC ACAGCAACT ATGCGCGC AGCTCTGCT
2641 CCACTTAT CACTGATC TCGGATATG CCAAGATTC GCTTAAAGC ATCAAGTCA
2701 GCGCTGCT TGAATGAT TTAGGCAAA AAGTACTAG CCAATATCA GCTTCAAT
2761 GCTTGGAGC ATGATACTA A (SEQ ID No : 1)

```

【図2】

Figure 2

```

1 MHTMHRK TYLTAIRYA LEGIASLPEV IPTYARWTS RSLVVGAD S KNLDFPNT
61 KNTVLALDA HLQSHDDCAN AFDGFDFEVI TQQAACSTG QANQNHQMS QLDAPASKD
121 NPSLNTARLT DKHDTSPASK SLAKLAENYH LKSDPDAHC QOMMQPIHQ ATRNRPTTP
181 KLDEKNPIT EDGIFAQADY GYDAQTYAE LSGNVMJON GRVITADKLT LPTQTGATA
241 SQQVQSDGG ASDHSAGIIO MAENLAVYHD GQTATAQDVV FASPTTINAG YASGMRTIS
301 SEYRLQHVWF TCCPPIERW YLDTSDILN TDTGRLALAN TLRLKRVFV FFLPVPFPI
361 DARSBQFLP SWSGFAQSDS FEIYFYLM LADYDANTT PPTPTNEM LIQSERVLQ
421 DYSGVYFAS YLPHDQVYH KDRSRIQFH TWQPFQDKI TTYAQVQVS DANYLSDFNA
481 LGVSAKLNH PRRTGSLD ENVSADLRF DFQRLDGLI DGRPTIDRDR PYRLSGLV
541 NYRLPRLWG TSGLELGLI HNSAYKESI KDNSEPKRS GRIFQPTAS PYLLSNGVL
601 TPKLSELELY TSVDSDSLD QHAKKXGHE SVFAPVSLD AGLPFAKAG PPMQPIQGG
661 YQVLEFLHY TYPFQDQW VWFSTKIQ LSTEGLLNH WFLGHERIQ LRAVFPVBY
721 RYDKGRTFR FEGIAEQLI LSHLRYND SEYSRSDS LAWQASLQPK DNLWPDASS
781 FRYVLYSEI VAGIYVPSD RKLNLGIY RRRNRFNS ALSAYTSAI FPIINRNM
841 GQLQYDNLV YVDSMLGLI YEDCCYGLI YARRVDFAP FHLSPDTAV AVRLNIGIG
901 GRLNRLSE KVLQDQVNH AWRHDY* (SEQ ID No : 2)

```

【図3】

Figure 3

```

1 GGGGTAAA TTAGTCAA AATCCCAAG ATGAATGAA AGTATTTCC TCGTACGCA
61 CTATTGGT TGAATGCGC GGTATCAAG CAGGCTTGT GGTTCATTT TGTGTAACC
121 AACTCCATC CAGCAATGAT TAATAACA AAGCCGATC AATCACTCC CTATTTCCG
181 AACTTCGCA CCAATACAC AGCTTAAAT GACTTGAAT ATGTTGTTA GCCCATGAT
241 AATCCGAC CTGCGSAGA CTACCAAC TATCCACTG AATTTAAGA CAAATGAT
301 TTAATGTA TTAGTGGTC TTAATCAAT GACTGATG AATTTAAGA AATGATG
361 ATCGGAT TATTAACAG CCGAGAGAT CATAAAT TGTCTTAT TCGTACT
421 GATCCCAAT ATAAAGCG ATATGACTG ACTTATGTA AATTACAG TCAACTGAT
481 CAGAACTG CTTTGCAC CTAATTTT AGACTGCA AATCACTG ACBAAGC
541 ACCAAATCT CTGATGCT CCGCTAAT GACTTAAAT ATGTTGCTA AGATGCTG
601 GATTTGCG ACTTCCGCG TCGCCAGT GCGCTGAG CAGCGGAC GCAATGAT
661 GTCAGCGC CACCGCAC AGATGAGA TTAGCAGC TTAGCGCTA GCTTCAAT
721 CAAACAAA TTTCCAGCA AACTGATG CAGCAGAG CACTGAT TGAATCCA
781 AACTATCA ATCCTTTC TATCAAGA TCTGACTG CACTTACAG TTTGCTATG
841 GACCAACT CAGCCGACA GTCACGCG CAAACGCG ATATGATC CAABAAGA
901 ATACTAAT GACTGAC ACACCAAG CACTGCGC AGACACTG CAAATA
(SEQ ID No : 3)

```

【図4】

Figure 4

```

1 VKRMSKPM MNRKPRQA LKWLIAAHL AGLMLVHLT GSVPMINKQ NAKQISVVA
61 TLPFTTALN LLHVVWEPD NKAIVLRLN YPEPFDKIV ENHISQYTL ELMDHTENV
121 LVYVLRSD ENFVAPYAT DANDNRYVL TYGKTFPAD ABSALQVNF RLPKSVIQT
181 TKISLWVM DNVLQGVV DLADPQFRV RLQARTETP VKAATPADB LARLSERAL
241 QTQISQVBS VROPTDLDI NDINRLENR QVSSSDLEPM APTARFQSP QPADIVERNE
301 IKGTAFTQS HSARTBSQ* (SEQ ID No : 4)

```

【配列表】

0004397233000001.xml

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 P 37/04	(2006.01)	A 6 1 P 37/04	
G 0 1 N 33/53	(2006.01)	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/569	(2006.01)	G 0 1 N 33/53	N
		G 0 1 N 33/569	F

- (72)発明者 デニス マーティン
カナダ国 ケベック ジー3エイ 1イー9 セント-オウガスティン-ドゥ-デスマウルス リ
ュ ガボウリー 4728-ジー
- (72)発明者 ジョセ アメル
カナダ国 ケベック ジー1ティー 1エヌ6 シルリー リュ マリタン 2401
- (72)発明者 バーナード アール プロデュール
カナダ国 ケベック ジー1ティー 1エヌ6 シルリー リュ マリタン 2401
- (72)発明者 ステファン リウクス
カナダ国 ケベック ジー1イー 1ジェイ3 ビューポート アヴェニュー デ ピンサンズ
869
- (72)発明者 ジュリー クチュール
カナダ国 ケベック ジー3エイ 1エイ4 セント-オウガスティン-ドゥ-デスマウルス ジ
ーン-チャールズ カンティン896 シー

審査官 清水 晋治

- (56)参考文献 国際公開第00/078968(WO, A1)
Vaccine. 2000, Vol.19, Suppl.1, p.S101-S107

(58)調査した分野(Int.Cl., D B名)

C12N 15/00-15/90
C07K 14/00-19/00
C12Q 1/68
PubMed
SwissProt/PIR/GeneSeq
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

专利名称(译)	莫拉氏菌 (Branhamella) 卡他性多肽和相应的DNA片段		
公开(公告)号	JP4397233B2	公开(公告)日	2010-01-13
申请号	JP2003522569	申请日	2002-08-27
[标]申请(专利权)人(译)	希雷生物化学有限公司		
申请(专利权)人(译)	希雷生物化学公司		
当前申请(专利权)人(译)	艾迪生物医药公司		
[标]发明人	デニスマーティン ジョセアメル バーナードアールプロデュール ステファンリウクス ジュリークチュール		
发明人	デニス マーティン ジョセ アメル バーナード アール プロデュール ステファン リウクス ジュリー クチュール		
IPC分类号	C12N15/09 C07K14/195 C07K19/00 A61K38/00 A61P31/00 A61P37/04 G01N33/53 G01N33/569 A61K39/00 A61P11/02 A61P11/04 A61P27/02 A61P27/16 A61P37/02 C07K14/21 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/31 C12P21/02		
CPC分类号	A61K39/00 A61P11/02 A61P11/04 A61P11/14 A61P27/02 A61P27/16 A61P31/00 A61P37/02 A61P37/04 C07K14/212 Y10S435/975		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K14/195 C07K19/00 A61K37/02 A61P31/00 A61P37/04 G01N33/53.D G01N33/53.N G01N33/569.F		
代理人(译)	克利马清		
审查员(译)	清水慎		
优先权	60/314634 2001-08-27 US		
其他公开文献	JP2005507653A JP2005507653A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及粘膜莫拉氏菌 (Branhamella) 的多肽，其可用于预防，诊断和/或治疗目的。

M. カタラーリス遺伝子のPCR増幅法に用いたオリゴヌクレオチドプライマー

遺伝子	プライマー I.D.	制限部位	ベクター	配列 (SEQ ID No)
SMC-1	RIOS30	<i>Nco</i> I	pET21d (+)	5'- TATGTACCAATGGCTGAAC CAATACCAAGCCCTTCA -3' (SEQ ID No : 5)
SMC-1	RIOS31	<i>Xho</i> I	pET21d (+)	5'-GGCATGCTCGAGGTAA TCATGCTCCAAGCATTT G-3' (SEQ ID No : 6)
SMC-1	RIOS187	<i>Bgl</i> II	pCMV-GH	5'-GGCAGATCTTGGAAC CAATACCAAGCCCTTC-3' (SEQ ID No : 7)
SMC-1	RIOS188	<i>Sph</i> I	pCMV-GH	5'-ACCCCTCGACTTGTGTA ATCATGCTCCAAGCAT-3' (SEQ ID No : 8)
SMC-2	RIOS20	<i>Nde</i> I	pET21b (+)	5'-CGTACCAGCACATATG AATAAACAAAACGCCAATC AA-3' (SEQ ID No : 9)
SMC-2	RIOS21	<i>Xho</i> I	pET21b (+)	5'-GCCCATCTCGAGTTGC GATCTCTCTCTGCC-3' (SEQ ID No : 10)
SMC-2	RIOS189	<i>Bam</i> HI	pCMV-GH	5'-CGAGATCTTAATAAA CAAAACGCCAATCAAAC-3' (SEQ ID No : 11)
SMC-2	RIOS190	<i>Hind</i> III	pCMV-GH	5'-CAGAAGCTTTTATTGC GATCTCTCTCTGCC-3' (SEQ ID No : 12)