

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-73180

(P2004-73180A)

(43) 公開日 平成16年3月11日(2004.3.11)

(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 39/00	A 6 1 K 39/00	H	4 B O 5 0
A 6 1 K 39/02	A 6 1 K 39/00	J	4 B O 6 5
A 6 1 K 39/08	A 6 1 K 39/02		4 C O 8 5
A 6 1 K 39/085	A 6 1 K 39/08		

審査請求 未請求 請求項の数 50 O L (全 68 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2003-140706 (P2003-140706)	(71) 出願人	593141953 ファイザー・インク
(22) 出願日	平成15年5月19日 (2003.5.19)		アメリカ合衆国・ニューヨーク州・ニュー ヨーク・イースト・42nd・ストリート ・235
(62) 分割の表示	特願平10-192466の分割	(74) 代理人	100089705 弁理士 社本 一夫
原出願日	平成10年6月23日 (1998.6.23)	(74) 代理人	100076691 弁理士 増井 忠式
(31) 優先権主張番号	60/050565	(74) 代理人	100075270 弁理士 小林 泰
(32) 優先日	平成9年6月23日 (1997.6.23)	(74) 代理人	100080137 弁理士 千葉 昭男
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100096013 弁理士 富田 博行

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 プラスミノゲン活性化タンパク質をコードするDNA

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 *Streptococcus uberis* 由来プラスミノゲン活性化 (P a u A) タンパク質、および実質的に相同なポリペプチド、ペプチド断片、およびその融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド分子と、本発明のポリヌクレオチド分子によりコードされる P a u A タンパク質、実質的に相同なポリペプチド、ペプチド断片、および融合タンパク質を組換え的に発現するための組成物および方法と、哺乳類の構成種を乳腺炎から保護するための、P a u A タンパク質、実質的に相同なポリペプチド、ペプチド断片、融合タンパク質、または本発明のポリヌクレオチド分子を含むワクチンを提供する。

【解決手段】例えば、SEQ ID NO: 2のアミノ酸位置26からアミノ酸位置286までのアミノ酸配列を含むタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む、単離されたポリヌクレオチド分子とする。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

SEQ ID NO: 2 のアミノ酸位置 26 からアミノ酸位置 286 までのアミノ酸配列を含むタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む、単離されたポリヌクレオチド分子。

【請求項 2】

SEQ ID NO: 1 のヌクレオチド位置 195 からヌクレオチド位置 977 までのヌクレオチド配列を含む、請求項 1 の単離されたポリヌクレオチド分子。

【請求項 3】

前記タンパク質が、SEQ ID NO: 2 のアミノ酸配列を含む、請求項 1 の単離されたポリヌクレオチド分子。 10

【請求項 4】

SEQ ID NO: 1 のヌクレオチド位置 120 からヌクレオチド位置 980 までのヌクレオチド配列を含む、請求項 3 の単離されたポリヌクレオチド分子。

【請求項 5】

SEQ ID NO: 1 のヌクレオチド配列あるいはその縮重した変異体を含む、請求項 4 の単離されたポリヌクレオチド分子。

【請求項 6】

SEQ ID NO: 1 のヌクレオチド位置 195 からヌクレオチド位置 977 までのヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を含む DNA 分子に、0.5 M NaHPO₄、7% ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)、1 mM EDTA 中 65、および 0.2 × SSC / 0.1% SDS 中 42 での洗浄の条件下でハイブリダイズする、単離されたポリヌクレオチド分子であって、(a) 哺乳類のプラスミノゲンをプラスミンに転化するポリペプチドをコードし、または (b) 哺乳類の動物種の一員に投与した場合、乳腺炎に対する防御反応を誘導するポリペプチドをコードし、(c) 哺乳類の動物種の一員に投与した場合、SEQ ID NO: 2 のアミノ酸位置 26 からアミノ酸位置 286 までのアミノ酸配列を含むタンパク質に特異的に結合する抗体の産生を誘導するポリペプチドをコードし、または (d) S. uberis による哺乳動物への感染を検出する診断用試薬として使用することができる、前記ポリヌクレオチド分子。 20

【請求項 7】

SEQ ID NO: 1 のヌクレオチド位置 195 からヌクレオチド位置 977 までのヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を含む DNA 分子に、0.5 M NaHPO₄、7% SDS、1 mM EDTA 中 65、および 0.1 × SSC / 0.1% SDS 中 68 での洗浄の条件下でハイブリダイズする、請求項 6 の単離されたポリヌクレオチド分子。 30

【請求項 8】

SEQ ID NO: 2 のアミノ酸配列を含むタンパク質のペプチド断片をコードするヌクレオチド配列を含み、該ペプチド断片が、SEQ ID NO: 2 のアミノ酸位置 26 からアミノ酸位置 286 までの少なくとも 10 個のアミノ酸残基を含む、単離されたポリヌクレオチド分子。 40

【請求項 9】

SEQ ID NO: 2 のアミノ酸位置 26 からアミノ酸位置 286 までのアミノ酸配列が、SEQ ID NO: 1 のヌクレオチド位置 195 からヌクレオチド位置 977 までのヌクレオチド配列によってコードされる、請求項 8 の単離されたポリヌクレオチド分子。

【請求項 10】

ペプチド断片が、アミノ酸位置 28 から 286、104 から 286、172 から 286、28 から 170、104 から 170、104 から 208、172 から 208、28 から 103、28 から 208、および 149 から 286 からなる群から選択される SEQ ID NO: 2 のアミノ酸サブシーケンスからなる、請求項 8 の単離されたポリヌクレオチ 50

ド分子。

【請求項 1 1】

SEQ ID NO : 2 のアミノ酸位置 2 6 からアミノ酸位置 2 8 6 までのアミノ酸配列を含むタンパク質と融合した融合相手を含む融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む、単離されたポリヌクレオチド分子。

【請求項 1 2】

融合タンパク質が、 - ガラクトシダーゼ融合物、 t r p E 融合物、マルトース結合タンパク質融合物、グルタチオン - S - トランスフェラーゼ (G S T) 融合物、およびポリヒスチジン融合物からなる群から選択される、請求項 1 1 の単離されたポリヌクレオチド分子。

10

【請求項 1 3】

SEQ ID NO : 2 のアミノ酸位置 2 6 からアミノ酸位置 2 8 6 までのタンパク質のアミノ酸配列が、SEQ ID NO : 1 のヌクレオチド位置 1 9 5 からヌクレオチド位置 9 7 7 までのヌクレオチド配列によりコードされる、請求項 1 1 の単離されたポリヌクレオチド分子。

【請求項 1 4】

SEQ ID NO : 2 のアミノ酸配列を含むタンパク質のペプチド断片と融合した融合相手を含む融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含み、該ペプチド断片が、SEQ ID NO : 2 のアミノ酸位置 2 6 からアミノ酸位置 2 8 6 までの少なくとも 1 0 アミノ酸残基を含む、単離されたポリヌクレオチド分子。

20

【請求項 1 5】

融合タンパク質が、 - ガラクトシダーゼ融合物、 t r p E 融合物、マルトース結合タンパク質融合物、グルタチオン - S - トランスフェラーゼ (G S T) 融合物、およびポリヒスチジン融合物からなる群から選択される、請求項 1 4 の単離されたポリヌクレオチド分子。

【請求項 1 6】

SEQ ID NO : 2 のアミノ酸位置 2 6 からアミノ酸位置 2 8 6 までのタンパク質のアミノ酸配列が、SEQ ID NO : 1 のヌクレオチド位置 1 9 5 からヌクレオチド位置 9 7 7 までのヌクレオチド配列によりコードされる、請求項 1 4 の単離されたポリヌクレオチド分子。

30

【請求項 1 7】

ペプチド断片が、アミノ酸位置 2 8 から 2 8 6 、 1 0 4 から 2 8 6 、 1 7 2 から 2 8 6 、 2 8 から 1 7 0 、 1 0 4 から 1 7 0 、 1 0 4 から 2 0 8 、 1 7 2 から 2 0 8 、 2 8 から 1 0 3 、 2 8 から 2 0 8 、 および 1 4 9 から 2 8 6 からなる群から選択される SEQ ID NO : 2 のアミノ酸サブシーケンスからなる、請求項 1 4 の単離されたポリヌクレオチド分子。

【請求項 1 8】

融合相手が G S T である、請求項 1 7 の単離されたポリヌクレオチド分子。

【請求項 1 9】

高度に厳しい条件下において、SEQ ID NO : 1 のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド分子、または SEQ ID NO : 1 のヌクレオチド配列の相補配列であるヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド分子とハイブリッド形成する、オリゴヌクレオチド分子。

40

【請求項 2 0】

SEQ ID NO : 1 3 ~ SEQ ID NO : 2 7 および当該配列の相補配列からなる群から選択されるヌクレオチド配列からなる、請求項 1 9 のオリゴヌクレオチド分子。

【請求項 2 1】

SEQ ID NO : 1 3 ~ SEQ ID NO : 2 7 および当該配列の相補配列からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む、請求項 1 9 のオリゴヌクレオチド分子。

【請求項 2 2】

50

宿主細胞におけるポリヌクレオチド分子の発現を制御する一またはそれ以上の制御因子と機能的に結合している請求項 1 ないし 18 のいずれかのポリヌクレオチド分子を含む、組換え発現ベクター。

【請求項 23】

選択可能なマーカーをさらに含む、請求項 22 の組換え発現ベクター。

【請求項 24】

請求項 23 の組換え発現ベクターにより形質転換された宿主細胞。

【請求項 25】

発現ベクターにコードされるポリヌクレオチドの生成に資する条件下において、請求項 24 の宿主細胞を培養し、および細胞培養物からポリペプチドを回収することを含む、ポリペプチドの製造方法。

10

【請求項 26】

(a) SEQ ID NO: 2 のアミノ酸配列のアミノ酸位置 26 からアミノ酸位置 286 までのアミノ酸配列を含むタンパク質；または (b) (a) のタンパク質と融合した融合相手を含む融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド分子の免疫学的に有効な量と、そして獣医学的に受容できる担体とを含む、そのポリヌクレオチド分子、あるいはそれによってコードされるタンパク質または融合タンパク質が、哺乳類における乳腺炎に対する防御反応を誘導することができる、哺乳類の動物種を乳腺炎から保護するためのワクチン。

【請求項 27】

SEQ ID NO: 2 のアミノ酸位置 26 からアミノ酸位置 286 までのアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド分子が、SEQ ID NO: 1 のヌクレオチド位置 195 からヌクレオチド位置 977 までのヌクレオチド配列を含む、請求項 26 のワクチン。

20

【請求項 28】

ポリヌクレオチド分子が形質転換した宿主細胞内に含まれ、およびそのポリヌクレオチド分子によってコードされたタンパク質が宿主細胞内で発現される、請求項 26 のワクチン。

【請求項 29】

宿主細胞が *E. coli* である、請求項 28 のワクチン。

【請求項 30】

(a) SEQ ID NO: 2 からなるタンパク質のペプチド断片であって、SEQ ID NO: 2 のアミノ酸位置 26 からアミノ酸位置 286 までの少なくとも 10 アミノ酸残基を含むペプチド断片；または (b) (a) のペプチド断片と融合した融合相手を含む融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド分子の免疫学的に有効な量と、そして獣医学的に受容できる担体とを含む、そのポリヌクレオチド分子、あるいはそれによってコードされるタンパク質または融合タンパク質が、哺乳類における乳腺炎に対する防御反応を誘導することができる、哺乳類の動物種を乳腺炎から保護するためのワクチン。

30

【請求項 31】

SEQ ID NO: 2 のアミノ酸位置 26 からアミノ酸位置 286 までのアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド分子が、SEQ ID NO: 1 のヌクレオチド位置 195 からヌクレオチド位置 977 までのヌクレオチド配列を含む、請求項 30 のワクチン。

40

【請求項 32】

ポリヌクレオチド分子が形質転換した宿主細胞内に含まれ、およびそのポリヌクレオチド分子によってコードされたタンパク質が宿主細胞内で発現される、請求項 30 のワクチン。

【請求項 33】

宿主細胞が *E. coli* である、請求項 32 のワクチン。

【請求項 34】

ペプチド断片が、アミノ酸位置 28 から 286、104 から 286、172 から 286、

50

28から170、104から170、104から208、172から208、28から103、28から208、および149から286からなる群から選択されるSEQ ID NO: 2のアミノ酸サブシーケンスからなる、請求項30のワクチン。

【請求項35】

哺乳類の動物種を乳腺炎、および哺乳類を苦しめる可能性のある一またはそれ以上の疾病または病理学的状態から保護するための混合ワクチンであって、(a) SEQ ID NO: 2のアミノ酸位置26からアミノ酸位置286までのアミノ酸配列を含むタンパク質; (b) (a)のタンパク質と融合した融合相手を含む融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド分子を含む免疫学的に有効な量の第一成分、その第一成分中の抗原とは異なり、哺乳類を苦しめる可能性のある疾病および病理学的状態に対する防御反応を誘導することができる抗原を含む免疫学的に有効な量の第二成分、および獣医学的に受容できる担体を含み、そのポリヌクレオチド分子、あるいはそれによってコードされたタンパク質または融合タンパク質が、哺乳類における乳腺炎に対する防御反応を誘導することができる混合ワクチン。

10

【請求項36】

S. uberisにより起因される乳腺炎以外の、哺乳類を苦しめる可能性のある疾病または病理学的状態に病原体として関連する宿主細胞を含む、請求項35の混合ワクチンであって、該宿主細胞はポリヌクレオチド分子によってコードされたタンパク質を生成するため宿主細胞において発現される第一成分のポリヌクレオチド分子で形質転換され、そして該宿主細胞がS. uberisにより起因される乳腺炎以外の疾病または病理学的状態に対する免疫防御反応を誘導することができる、請求項35の混合ワクチン。

20

【請求項37】

宿主細胞が、レプトスピラ属(Leptospira spp.)、カンピロバクター属(Campylobacter spp.)、ブドウ球菌属(Staphylococcus spp.)、連鎖球菌属(Streptococcus spp.)、マイコプラズマ属(Mycoplasma spp.)、クレブシエラ属(Klebsiella spp.)、サルモネラ属(Salmonella spp.)、パステレラ属(Pasteurella spp.)、クロストリジウム属(Clostridium spp.)、E. coli、およびネオスポラ属(Neospora spp.)からなる群から選択される、請求項36の混合ワクチン。

30

【請求項38】

混合ワクチンの第二成分の抗原が、乳腺炎、ウシヘルペスウイルス、ウシ呼吸系発疹ウイルス(bovine respiratory syncytial virus)、ウシウイルス性下痢ウイルス(bovine viral diarrhoea virus)、I型パラインフルエンザウイルス(parainfluenza virus)、II型パラインフルエンザウイルス、III型パラインフルエンザウイルス、レプトスピラ属(Leptospira spp.)、カンピロバクター属(Campylobacter spp.)、ブドウ球菌属(Staphylococcus spp.)、連鎖球菌属(Streptococcus spp.)、マイコプラズマ属(Mycoplasma spp.)、クレブシエラ属(Klebsiella spp.)、サルモネラ属(Salmonella spp.)、ロタウイルス、コロナウイルス、狂犬病、パステレラ属(Pasteurella spp.)、クロストリジウム属(Clostridium spp.)、破傷風トキソイド(Tetanus toxoid)、E. coli、およびネオスポラ属(Neospora spp.)からなる群から選択される疾病、状態、あるいは病原体に対する防御反応を哺乳動物において誘導することができる、請求項35の混合ワクチン。

40

【請求項39】

哺乳類の動物種を乳腺炎、および哺乳類を苦しめる可能性のある一またはそれ以上の疾病または病理学的状態から保護するための混合ワクチンであって、(a) SEQ ID NO: 2のアミノ酸配列からなるタンパク質のペプチド断片であって、SEQ ID N

50

O : 2 のアミノ酸位置 26 からアミノ酸位置 286 までの少なくとも 10 アミノ酸残基を含むペプチド断片 ; または (b) (a) のペプチド断片と融合した融合相手を含む融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド分子を含む免疫学的に有効な量の第一成分、その第一成分中の抗原とは異なり、哺乳類を苦しめる可能性のある疾病および病理学的状態に対する防御反応を誘導することができる抗原を含む免疫学的に有効な量の第二成分、そして獣医学的に受容できる担体を含み、そのポリヌクレオチド分子、あるいはそれによってコードされたペプチド断片または融合タンパク質が、哺乳類における乳腺炎に対する防御反応を誘導することができる混合ワクチン。

【請求項 40】

ペプチド断片が、アミノ酸位置 28 から 286、104 から 286、172 から 286、28 から 170、104 から 170、104 から 208、172 から 208、28 から 103、28 から 208、および 149 から 286 からなる群から選択される SEQ ID NO : 2 のアミノ酸サブシーケンスからなる、請求項 39 の混合ワクチン。

【請求項 41】

S . u b e r i s により起因される乳腺炎以外の、哺乳類を苦しめる可能性のある疾病または病理学的状態に病原体として関連する宿主細胞を含む、請求項 39 の混合ワクチンであって、該宿主細胞はペプチド断片または融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド分子で形質転換され、該ポリペプチド分子はペプチド断片または融合タンパク質を生成するため宿主細胞において発現、そして該宿主細胞が S . u b e r i s により起因される乳腺炎以外の疾病または病理学的状態に対する免疫防御反応を誘導することができる、請求項 39 の混合ワクチン。

【請求項 42】

宿主細胞が、レプトスピラ属 (*Leptospira* spp.)、カンピロバクター属 (*Campylobacter* spp.)、ブドウ球菌属 (*Staphylococcus* spp.)、連鎖球菌属 (*Streptococcus* spp.)、マイコプラズマ属 (*Mycoplasma* spp.)、クレブシエラ属 (*Klebsiella* spp.)、サルモネラ属 (*Salmonella* spp.)、パステレラ属 (*Pasteurella* spp.)、クロストリジウム属 (*Clostridium* spp.)、E . c o l i、およびネオスポラ属 (*Neospora* spp.) からなる群から選択される、請求項 41 の混合ワクチン。

【請求項 43】

混合ワクチンの第二成分の抗原が、乳腺炎、ウシヘルペスウイルス、ウシ呼吸系発疹ウイルス (*bovine respiratory syncytial virus*)、ウシウイルス性下痢ウイルス (*bovine viral diarrhoea virus*)、I 型パラインフルエンザウイルス (*parainfluenza virus*)、II 型パラインフルエンザウイルス、III 型パラインフルエンザウイルス、レプトスピラ属 (*Leptospira* spp.)、カンピロバクター属 (*Campylobacter* spp.)、ブドウ球菌属 (*Staphylococcus* spp.)、連鎖球菌属 (*Streptococcus* spp.)、マイコプラズマ属 (*Mycoplasma* spp.)、クレブシエラ属 (*Klebsiella* spp.)、サルモネラ属 (*Salmonella* spp.)、ロタウイルス、コロナウイルス、狂犬病、パステレラ属 (*Pasteurella* spp.)、クロストリジウム属 (*Clostridium* spp.)、破傷風トキソイド (*Tetanus toxoid*)、E . c o l i、およびネオスポラ属 (*Neospora* spp.) からなる群から選択される疾病、状態、あるいは病原体に対する防御反応を哺乳動物において誘導することができる、請求項 39 の混合ワクチン。

【請求項 44】

(a) SEQ ID NO : 2 のアミノ酸位置 26 からアミノ酸位置 286 までのアミノ酸配列を含むタンパク質 ; または (b) SEQ ID NO : 2 のアミノ酸配列からなるタンパク質のペプチド断片であって、SEQ ID NO : 2 のアミノ酸位置 26 か

らアミノ酸位置 286 までの少なくとも 10 アミノ酸残基を含むペプチド断片；または (c) (a) のタンパク質あるいは (b) のペプチド断片と融合した融合相手を含む融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド分子の免疫学的に有効な量を有する獣医学的に受容できる担体を含むことからなり、そのポリヌクレオチド分子、それによってコードされるタンパク質、ペプチドまたは融合タンパク質が哺乳類における乳腺炎に対する防御反応を誘導することができる、乳腺炎に対する哺乳類動物種の保護のためのワクチンの製造方法。

【請求項 45】

ペプチド断片が、アミノ酸位置 28 から 286、104 から 286、172 から 286、28 から 170、104 から 170、104 から 208、172 から 208、28 から 103、28 から 208、および 149 から 286 からなる群から選択される SEQ ID NO: 2 のアミノ酸サブシーケンスからなる、請求項 44 の方法。

【請求項 46】

SEQ ID NO: 2 のアミノ酸位置 26 からアミノ酸位置 286 までのアミノ酸配列を含むタンパク質をコードするポリヌクレオチド分子を特異的に増幅するのに有用であるポリヌクレオチド分子あるいはオリゴヌクレオチド分子を含む容器を含む、*Streptococcus uberis* による動物の感染を検出するための診断キット。

【請求項 47】

SEQ ID NO: 2 のアミノ酸配列からなるタンパク質のペプチド断片であって、SEQ ID NO: 2 のアミノ酸位置 26 からアミノ酸位置 286 までの少なくとも 10 アミノ酸残基を含み、*Streptococcus uberis* 由来の天然 PauA タンパク質に対して指向された抗体に特異的に結合するペプチド断片を含む第一容器、および抗 PauA タンパク質特異的抗体に対して指向された二次抗体を含む第二容器を含む、*S. uberis* による動物の過去あるいは現在の感染を検出するための診断キット。

【請求項 48】

ペプチド断片が、アミノ酸位置 28 から 286、104 から 286、172 から 286、28 から 170、104 から 170、104 から 208、172 から 208、28 から 103、28 から 208、および 149 から 286 からなる群から選択される SEQ ID NO: 24 のアミノ酸サブシーケンスからなる、請求項 47 の診断キット。

【請求項 49】

アミノ酸位置 28 から 286、104 から 286、172 から 286、28 から 170、104 から 170、104 から 208、172 から 208、28 から 103、28 から 208、および 149 から 286 からなる群から選択される SEQ ID NO: 2 のアミノ酸のサブシーケンスからなるペプチド断片に特異的に結合する一次抗体を含む容器、および一次抗体に特異的に結合する二次抗体を含む二次容器を含む、*Streptococcus uberis* による動物の感染を検出するための診断キット。

【請求項 50】

二次抗体が、検出可能な標識をさらに含む、請求項 49 の診断キット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は動物の健康の分野に属し、疾病のためのワクチン組成と診断法を目標としたものである。より具体的には、本発明は哺乳類における乳腺炎に対するワクチンに関連し、該ワクチンの生産に有用なプラスミノーゲン活性化タンパク質をコードするヌクレオチド配列を持つポリヌクレオチド分子である。

【0002】

【従来技術】

ウシ乳腺炎は乳牛の牛乳生産の著しい減少を引き起こし、酪農産業への厳しい経済的影響という結果を生む。乳腺炎は一またはそれ以上のバクテリア病原菌によって引き起こされる。*Streptococcus* の感染はウシ乳腺炎の全ての臨床ケースの約 30% の

原因であるとみられている。とりわけ、*S. uberis*の感染は、ウシ乳腺炎の全ての臨床ケースの約20%の原因であるとみられている。

【0003】

動物における乳腺炎の予防および治療のための慣用される方法は、衛生的搾乳法および化学的抗体投与方法を使用することを含む。しかしながら、抗体残留物を含む牛乳はしばしば人間の消費にとって安全であるとみなされないという事実により、抗体の使用は制限されており、捨象されるべきである。動物における乳腺炎の治療または予防への特異的アプローチは、感染した動物の牛乳から培養された不活性化された乳腺炎病原菌を含む多価の抗乳腺炎ワクチンの使用を記述したStollleらに対する米国特許第5,198,214号の研究を含む。さらに、Sordilloらに対する米国特許第5,234,684号は、ウシのインターフェロンガンマの動物への投与を含む、乳牛における乳腺炎の治療と予防の方法を記述する。

10

【0004】

*Streptococcus spp.*が泌乳している乳腺へ感染する能力は、バクテリアが分泌物の中で生育することおよびウシの好中球による食作用をまぬがれる能力に依存している(Leigh et al., 1990, Res. Vet. Sci. 49: 85-87)。ウシの牛乳における窒素の大部分はタンパク質の形で存在し(Aston, 1975, Austral. J. Dairy Tech. 30: 55-59)、タンパク質分解の非存在下では、牛乳中での*Streptococci*の成長は遊離アミノ酸の欠如により制限される。このことは、好乳性*Streptococci*の牛乳中での生育のための、細胞外で働くカゼイン分解性タンパク質分解酵素への依存によって強調される。さらに、牛乳中でのバクテリアの生育能力は、乳中のタンパク質を分解して遊離アミノ酸にするカゼイン分解酵素であるプラスミンの存在によって上昇する(Marshall and Bramley, 1984, J. Dairy Res. 51: 17-22)。

20

【0005】

ウシの牛乳は、通常タンパク質分解の性質が不活性の状態にあるが、プラスミノゲン活性化因子の働きによりタンパク質分解されて活性化プラスミンに転化することができるプラスミノゲンを含む。乳腺炎原因菌株である*S. uberis*などの*Streptococcus*は、ウシプラスミノゲンをプラスミンに転化することのできるプラスミノゲン活性化因子を生産するということが示されている。このプラスミノゲン活性化因子の活動は牛乳タンパク質の分解による遊離アミノ酸の放出を生じさせ、遊離アミノ酸は乳腺におけるバクテリアの生育を支持する。この観察から、*Streptococcus*のプラスミノゲン活性化因子に対する免疫に基づく応答、例えば中和抗体の産生は動物を乳腺炎から防御するのに役立つということが提案されている。参考文献として本明細書中に援用された国際特許出願公開WO93/14209は*S. uberis*の培養濾過液からのプラスミノゲン活性化因子(「ストレプトキナーゼ」と呼ばれている)の精製を示し、*Streptococcus spp.*由来のそのようなプラスミノゲン活性化因子に基づく抗乳腺炎ワクチンの組成をさらに教示している。

30

40

【0006】

例えば*Streptococcus*由来のプラスミノゲン活性化因子のような、プラスミノゲン活性化因子をコードするヌクレオチド配列を持つポリヌクレオチド分子の単離は、抗乳腺炎ワクチンの調製を非常に容易にするであろう。

【0007】

【発明の概要】

本発明は、生物学的に活性なプラスミノゲン活性化因子タンパク質(本明細書中では「*Pa u A*タンパク質」と呼ばれ、以前には「*PA*」あるいは「ストレプトキナーゼ」と呼ばれていた)をコードしているヌクレオチド配列を含む単離されたポリヌクレオチド分子を提供する。好ましい態様においては、*Pa u A*タンパク質は例えば哺乳類の種に属する

50

動物の乳腺炎を引き起こす、またはそれに寄与する *Streptococcus* 等のバクテリアから由来する。より好ましい態様においては、*Streptococcus* の種は *S. uberis* または *S. dysgalactiae* である。

【0008】

好ましい態様においては、本発明の単離されたポリヌクレオチド分子は、SEQ ID NO: 2 または SEQ ID NO: 4 の、ほぼアミノ酸位置 26 (Ile) からほぼアミノ酸位置 286 (Pro) までのアミノ酸配列と同じアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含む。限定的でない態様の一例においては、このようなポリヌクレオチド分子は、SEQ ID NO: 1 のほぼヌクレオチド位置 195 からほぼヌクレオチド位置 977 まで、または SEQ ID NO: 3 のほぼヌクレオチド位置 196 からほぼヌクレオチド位置 978 までのヌクレオチド配列をそれぞれ含む。

10

【0009】

さらに好ましい態様においては、本発明の単離ポリヌクレオチド分子は、SEQ ID NO: 2 または SEQ ID NO: 4 のほぼアミノ酸位置 1 (Met) からほぼアミノ酸位置 286 (Pro) までのアミノ酸配列を含むアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含む。限定的でない態様の一例においては、このようなポリヌクレオチド分子は SEQ ID NO: 1 のほぼヌクレオチド位置 120 からほぼヌクレオチド位置 980 のヌクレオチド配列、または、SEQ ID NO: 3 のほぼヌクレオチド位置 121 からほぼヌクレオチド位置 981 のヌクレオチド配列をそれぞれ含む。限定的でないさらなる態様の一例においては、本発明のポリヌクレオチド分子は SEQ ID NO: 1 のヌクレオチド配列または SEQ ID NO: 3 のヌクレオチド配列をそれぞれ含む。

20

【0010】

本発明はさらに、PauA タンパク質をコードする本発明のポリヌクレオチド分子と実質的に相同であるポリヌクレオチド分子を提供する。

【0011】

本発明はさらに、本発明のポリヌクレオチド分子によってコードされる PauA タンパク質と実質的に相同であるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド分子を提供する。

【0012】

本発明はさらに、本発明の PauA タンパク質のペプチド断片あるいは実質的に相同なポリペプチドをコードするヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド分子を提供する。特定のであるが限定的でない態様では、本発明はアミノ酸位置約 28 から約 286、約 104 から約 286、約 172 から約 286、約 28 から約 170、約 104 から約 170、約 104 から約 208、約 172 から約 208、約 28 から約 103、約 28 から約 208、および約 149 から約 286 のアミノ酸からなるグループから選択された、SEQ ID NO: 2 または SEQ ID NO: 4 由来のアミノ酸配列のサブシーケンスからなるペプチド断片をコードするヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド分子を提供する。

30

【0013】

本発明はさらに担体または融合相手と結合した本発明の PauA タンパク質、実質的に相同なポリペプチド、またはペプチド断片を含む融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド分子を提供する。

40

【0014】

本発明はさらに、増幅技術におけるプライマーとして、および特異的な疾病の診断における診断用のプローブとして有用であるオリゴヌクレオチド分子を提供する。限定的でない態様の一例では、本発明のオリゴヌクレオチド分子は、SEQ ID NO: 13 ~ SEQ ID NO: 27 とその相補鎖からなる群から選択されたヌクレオチド配列からなる。限定的でないさらなる態様の一例では、本発明のオリゴヌクレオチド分子は SEQ ID NO: 13 ~ SEQ ID NO: 27 とその相補鎖からなる群から選択されたヌクレオチド配列を含む。

50

【 0 0 1 5 】

本発明はさらに、本発明のポリヌクレオチド分子の組換え発現のための組成物と方法を提供し、そのなかには組換えクローニングベクターおよびポリヌクレオチド分子を含む組換え発現ベクター、および該ベクターで形質転換した宿主細胞株が含まれる。

【 0 0 1 6 】

本発明はさらに、本発明のポリヌクレオチド分子によってコードされた組換え発現による P a u A タンパク質、実質的に相同なポリペプチド、ペプチド断片、または融合タンパク質を提供する。

【 0 0 1 7 】

本発明はさらに、本発明の P a u A タンパク質、実質的に相同なポリペプチド、ペプチド断片または融合タンパク質の類似体および誘導体を提供する。 10

【 0 0 1 8 】

本発明はさらに、哺乳類における乳腺炎に対する防御反応を誘導することができる、免疫学的に効果的な量の本発明の P a u A タンパク質、実質的に相同なポリペプチド、ペプチド断片、融合タンパク質、類似体、誘導体、またはポリヌクレオチド分子、および獣医学的に許容しうる担体を含む、乳腺炎に対して哺乳類の動物種を防御するためのワクチンを提供する。このワクチンは場合によりアジュバントまたは他の免疫調節的な成分を含むことができる。

【 0 0 1 9 】

限定的でない態様の一例では、本発明のワクチンは、乳腺炎、および、場合により、哺乳類を苦しめる可能性のある一又はそれ以上の他の疾病あるいは病理学的状態から哺乳類の動物種を防御するための混合ワクチンであり、この混合ワクチンは、哺乳類における乳腺炎に対する防御反応を誘導することができる、免疫学的に有効な量の本発明の P a u A タンパク質、実質的に相同なポリペプチド、ペプチド断片、融合タンパク質、類似体、誘導体、またはポリヌクレオチド分子を含む第一の成分；哺乳類を苦しめる可能性のある疾病または病理学的な状態に対する防御反応を誘導することのできる抗原を含む、免疫学的に有効な量の第二の成分；および獣医学的に許容しうる担体を含む。 20

【 0 0 2 0 】

本発明はさらに、哺乳類における乳腺炎に対する防御反応を誘導することができる、免疫学的に有効な量の本発明の P a u A タンパク質、実質的に相同なポリペプチド、ペプチド断片、融合タンパク質、類似体、誘導体、またはポリヌクレオチド分子を、獣医学的に許容しうる担体と混合することを含む、乳腺炎から哺乳類の動物種を防護するワクチンを調製する方法を提供する。 30

【 0 0 2 1 】

本発明はさらに、本発明のワクチンを哺乳類へ投与することを含む、哺乳類に属する動物種に乳腺炎に対するワクチンを投与する方法を提供する。

【 0 0 2 2 】

本発明はさらに、本発明の P a u A タンパク質、実質的に相同なポリペプチド、ペプチド断片、融合タンパク質、類似体、または誘導体に特異的に結合する抗体を提供する。

【 0 0 2 3 】

本発明はさらに、ワクチンキットおよび診断用キットを提供する。 40

【 0 0 2 4 】

【 課題を解決するための手段 】

1. プラスミノージェン活性化タンパク質をコードするポリヌクレオチド分子

本発明は、生物学的に活性なプラスミノージェン活性化タンパク質（本明細書中では「 P a u A タンパク質」、以前は「 P A 」または「ストレプトキナーゼ」と呼ばれた）をコードするヌクレオチド配列を含む、単離されたポリヌクレオチド分子を提供する。本明細書中で使用される場合、「生物学的に活性な」という用語は、哺乳類のプラスミノージェンをプラスミンに転化させる能力を指す。本発明のポリヌクレオチド分子によりコードされる P a u A タンパク質は、 P a u A タンパク質を産生するいかなる有機体からも誘導される P 50

a u A タンパク質と同じものでありうるが、哺乳類の動物種における乳腺炎をひきおこす、またはそれに寄与するバクテリアから得ることが好ましい。好ましい態様では、バクテリアの属は *Streptococcus* であり、より好ましくは *S. uberis* または *S. dysgalactiae* であり、そして、P a u A タンパク質はウシのプラスミノーゲンをプラスミンへ転化する能力がある。

【0025】

本明細書中で使用される場合、「ポリヌクレオチド分子」、「コーディング配列」、「ポリヌクレオチド配列」、「オープン・リーディング・フレーム (ORF)」等の用語は、DNA 分子と RNA 分子両方を指し、共に一本鎖または二本鎖のいずれかであり得、適当な調節要素の制御下におかれた際の適当な宿主発現系において、対応する P a u A タンパク質、または P a u A タンパク質に実質的に相同なポリペプチド、または前述した P a u A タンパク質または実質的に相同なポリペプチドのペプチド断片、または融合タンパク質、または類似体へ転写、翻訳 (DNA)、または翻訳 (RNA) されうる。コーディング配列の境界は、一般に 5 (アミノ) 末端の開始コドンと 3 (カルボキシ) 末端の翻訳停止コドンの存在によって決定される。コーディング配列は、原核細胞の配列、cDNA 配列、ゲノム DNA 配列、および化学的に合成された DNA および RNA 配列を含みうるが、それに制限されることはない。本明細書中で使用される場合、「ORF」の用語は本発明の P a u A タンパク質、実質的に相同なポリペプチド、ペプチド断片、融合タンパク質、または類似体をコードするのに必要とされる最小限度のヌクレオチド配列を指し、この配列には介在するいかなる終止コドンも含まない。

10

20

【0026】

S. uberis 株 c 2 1 6 および 9 5 - 1 4 0 由来の天然の P a u A タンパク質の推定アミノ酸配列は、それぞれ SEQ ID NO: 2 と SEQ ID NO: 4 として提示される。SEQ ID NO: 2 と SEQ ID NO: 4 において提示される各々の推定アミノ酸配列の最初の 25 アミノ酸は、各々の p a u A 遺伝子によってコードされるシグナル配列を表すと考えられ、そのシグナル配列は、分泌された (成熟した) P a u A タンパク質を生産するために細胞内プロセシングの過程で除去される。このように、好ましい態様においては、本発明の単離されたポリヌクレオチド分子は、SEQ ID NO: 2 または SEQ ID NO: 4 のほぼアミノ酸位置 26 (I l e) からほぼアミノ酸位置 286 (P r o) までのアミノ酸配列を含む P a u A タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む。

30

【0027】

二つの異なるポリヌクレオチド (DNA) 分子のヌクレオチドコーディング配列 (すなわち第一のものは *S. uberis* 株 c 2 1 6 由来の P a u A タンパク質をコードし、第二のものは *S. uberis* 株 9 5 - 1 4 0 由来の P a u A タンパク質をコードする) は、それぞれ SEQ ID NO: 1 および SEQ ID NO: 3 として示される。SEQ ID NO: 1 のヌクレオチド配列は、ヌクレオチド 120 - 980 由来の ORF を有する。SEQ ID NO: 3 のヌクレオチド配列はヌクレオチド 121 - 981 由来の ORF を有する。ペプチドシグナル配列の除去を考慮に入れると、限定的でない態様の一例では、本発明のポリヌクレオチド分子は、SEQ ID NO: 1 のほぼヌクレオチド位置 195 からほぼヌクレオチド位置 977 の、または SEQ ID NO: 3 のほぼヌクレオチド位置 196 からほぼヌクレオチド位置 978 のヌクレオチド配列をそれぞれ含む。

40

【0028】

さらに好ましい態様においては、本発明のポリヌクレオチド分子は SEQ ID NO: 2 または SEQ ID NO: 4 のほぼアミノ酸位置 1 (M e t) からほぼアミノ酸位置 286 (P r o) のアミノ酸配列を含むアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含む。限定的でないさらなる態様の一例では、本発明のポリヌクレオチド分子は、SEQ ID NO: 1 のほぼヌクレオチド位置 120 からほぼヌクレオチド位置 980 の、または SEQ ID NO: 3 のほぼヌクレオチド位置 121 からほぼヌクレオチド位置 981

50

のヌクレオチド配列をそれぞれ含む。限定的でないさらなる態様の一例では、本発明のポリヌクレオチド分子は、SEQ ID NO: 1のヌクレオチド配列またはSEQ ID NO: 3のヌクレオチド配列をそれぞれ含む。

【0029】

本発明のポリヌクレオチド分子は、本明細書中で提示されるように、SEQ ID NO: 1またはSEQ ID NO: 3のORFに隣接するヌクレオチド配列をさらに含むことができる。

【0030】

本発明はさらに、PauAタンパク質をコードする本発明のポリヌクレオチド分子と実質的に相同な、単離されたポリヌクレオチド分子を提供する。ポリヌクレオチド分子を指すのに本明細書中で用いられる場合、「実質的に相同な」という用語は、(a) SEQ ID NO: 1のヌクレオチド位置195からヌクレオチド位置977、またはSEQ ID NO: 3のヌクレオチド位置196からヌクレオチド位置978のヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド分子と同じPauAタンパク質をコードするが、この実質的に相同なポリヌクレオチド分子は遺伝暗号の縮重による—またはそれ以上のサイレント突然変異を含んでおり；および/または(b) SEQ ID NO: 1のヌクレオチド位置195からヌクレオチド位置977、あるいはSEQ ID NO: 3のヌクレオチド位置196からヌクレオチド位置978のヌクレオチド配列と、少なくとも約70% さらに好ましい場合少なくとも約80%、最も好ましい場合少なくとも約90%同じであり、本発明の実施に有用である；および/または(c) SEQ ID NO: 1のヌクレオチド位置195からヌクレオチド位置977、またはSEQ ID NO: 3のヌクレオチド位置196からヌクレオチド位置978のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を含むDNA分子に、適度に厳しい条件で、すなわち0.5M NaHPO₄、7%ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)1mM EDTA中65でフィルター結合DNAへのハイブリダイゼーション、および0.2xSSC/0.1%SDS中42での洗浄(Ausubel, et al. (eds.), 1989, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, Greene Publishing Associates, Inc., and John Wiley & Sons, Inc., New York, at p. 2.10.3参照)で、ハイブリッド形成し、本発明の実施に有用なヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド分子を指す。好ましい態様においては、実質的に相同なポリヌクレオチド分子は、SEQ ID NO: 1のヌクレオチド位置195からヌクレオチド位置977、または、SEQ ID NO: 3のヌクレオチド位置196からヌクレオチド位置978のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を含むDNA分子に、高度に厳しい条件で、すなわち、0.5M NaHPO₄、7%SDS、1mM EDTA中65でフィルター結合DNAへのハイブリダイゼーションおよび0.1xSSC/0.1%SDS中68の洗浄(Ausubel, et al., 1989, 上記)でハイブリッド形成し、そして本発明の実施に有用である。

【0031】

本明細書中で使用される場合、ポリヌクレオチド分子が(a)生物学的に活性なポリペプチドをコードする、すなわち哺乳類のプラスミノーゲンをプラスミンに転化することができ、または(b)免疫原性のポリペプチドをコードする、すなわち哺乳類の動物種に投与された場合乳腺炎に対する防御反応を誘導することができ、または(c)哺乳類の動物種に投与された場合PauAタンパク質特異的抗体の生産を誘導することができるポリペプチドをコードし、または(d)感染した哺乳動物由来の組織または体液試料中の病原体特異的ポリヌクレオチド分子の存在の検出により、Suberis等の乳腺炎をひき起こす病原体による感染を検出する診断用試薬として使用できる場合に、ポリヌクレオチド分子は「本発明の実施に有用である」。

【0032】

本発明はさらに、本発明のポリヌクレオチド分子によりコードされるPauAタンパク質

10

20

30

40

50

に実質的に相同であるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド分子を提供する。

【0033】

本明細書中でポリペプチドを指すのに使用される場合、「実質的に相同な」という用語は、(a) SEQ ID NO: 2 または SEQ ID NO: 4 のアミノ酸位置約 26 からアミノ酸位置約 286 のアミノ酸配列を含む PauA タンパク質と、少なくとも約 50%、好ましくは少なくとも約 70%、最も好ましくは少なくとも約 80% 同じであり、本発明の実施に有用であり；および/または、(b) そうでなければ SEQ ID NO: 2 または SEQ ID NO: 4 のアミノ酸位置約 26 からアミノ酸位置約 286 のアミノ酸を含む PauA タンパク質と同じであるが、その中で一またはそれ以上のアミノ酸残基が異なるアミノ酸残基に保存的に置換されていて、このような保存的な置換は結果として本発明の実施に有用なポリペプチドを生じ；および/または、(c) そうでなければ SEQ ID NO: 2 または SEQ ID NO: 4 のアミノ酸位置約 26 からアミノ酸位置約 286 のアミノ酸配列を含む PauA タンパク質と同じであるが、その中で一またはそれ以上のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に非保存的に置換されていて、そのような非保存的な置換は結果として本発明の実施に有用なポリペプチドを生ずる、このようなアミノ酸配列を含むポリペプチドを指す。

【0034】

保存的なアミノ酸置換は当該技術分野においてよく知られている。例えば、本発明の天然 PauA タンパク質の一またはそれ以上のアミノ酸残基は、類似の電荷、大きさ、極性を持ったアミノ酸残基に保存的に置換されることが可能であり、結果として生ずるポリペプチドはやはり本発明の実施に有用である。このような置換を生じさせる規則は、とりわけ Dayhof, M. D., 1978, Nat. Biomed. Res. Found., Washington, D. C., Vol. 5, Sup. 3. により記述されたものを含む。より具体的には、保存的なアミノ酸置換は、一般に側鎖で関連しあう一群のアミノ酸の中でおこる置換である。遺伝学的にコードされたアミノ酸は、一般に四つのグループに分けられる。(1) 酸性 = アスパラギン酸、グルタミン酸；(2) 塩基性 = リジン、アルギニン、ヒスチジン；(3) 非極性 = アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン；そして(4) 非電荷極性 = グリシン、アスパラギン、グルタミン、システイン、セリン、スレオニン、チロシンである。フェニルアラニン、トリプトファンおよびチロシンは、また芳香性アミノ酸としても一緒に分類される。いずれかの特定なグループ中での一またはそれ以上の置換、例えば、ロイシンのイソロイシンまたはバリンによる置換、またはアスパラギン酸のグルタミン酸による置換、またはスレオニンのセリンによる置換、または、他のアミノ酸残基の、構造的に関係のあるアミノ酸残基による置換は、結果として生ずるポリペプチドの機能には一般に重要でない効果しかもたらさない。

【0035】

いくつかの特異的な、以下の 6 . 7 節の表 1 に要約したように、S. uberis 株 c 2 1 6 (SEQ ID NO: 2) および 9 5 - 1 4 0 (SEQ ID NO: 4) 由来の PauA タンパク質の推定アミノ酸配列を比較した場合、非保存的なアミノ酸置換の例が観察される。例えば、S. uberis 株 c 2 1 6 由来の PauA のアミノ酸位置 7 3 はアスパラギン酸 (酸性) で、S. uberis 株 9 5 - 1 4 0 由来のものはアスパラギン (中性、極性) である。さらに、S. uberis 株 c 2 1 6 由来の PauA のアミノ酸位置 1 1 5 および 1 2 4 はグルタミン (中性、極性) で、S. uberis 株 9 5 - 1 4 0 由来のものはアルギニン (塩基性) である。さらに、S. uberis 株 c 2 1 6 由来の PauA のアミノ酸位置 2 1 1 はロイシン (非極性) であり、S. uberis 株 9 5 - 1 4 0 由来のものはアルギニン (塩基性) である。さらに、S. uberis 株 c 2 1 6 由来の PauA のアミノ酸位置 2 4 0 はグルタミン (中性、極性) で、S. uberis 株 9 5 - 1 4 0 由来のものはプロリン (非極性) である。さらに、S. uberis 株 c 2 1 6 由来の PauA のアミノ酸位置 2 4 2 はヒスチジン (塩基性) で、S. uberi

s株95-140由来のものはアスパラギン酸（酸性）である。

【0036】

本明細書中で使用される場合、ポリペプチドが（a）生物学的に活性、すなわち哺乳類のプラスミノゲンをプラスミンに転化することができる；または、（b）免疫原性である、すなわち哺乳類の動物種に投与された場合乳腺炎に対する防御反応を誘導することができる；または、（c）哺乳類の動物種に投与された場合抗P a u Aタンパク質特異的抗体の産生を誘導することができ、この抗体は診断用試薬として有用である；または、（d）S . u b e r i sなどの乳腺炎をひきおこす病原体による感染の結果としての、または本発明のワクチンによるワクチン投与の結果としての哺乳類由来の血液または血清中の抗P a u Aタンパク質特異的な抗体の存在を検出するための診断用試薬として用いることが出来る場合に、ポリペプチドが「本発明の実施に有用である」。

【0037】

本発明はさらに、本発明のP a u Aタンパク質または実質的に相同なポリペプチドのペプチド断片をコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド分子を提供する。本明細書中で使用される場合、「ペプチド断片」の用語は、本発明のP a u Aタンパク質または実質的に相同なポリペプチドのアミノ酸配列のサブシーケンスからなるポリペプチドを指し、そのサブシーケンスは全長のP a u Aタンパク質または実質的に相同なポリペプチドより長さが短く、ポリペプチドについて有用性が上で述べられたように、本発明の実施に有用である。このように、P a u Aタンパク質または実質的に相同なポリペプチドの全長が“n”個のアミノ酸残基を有することが示される場合、そのペプチド断片は、n - 1個のアミノ酸残基を有するポリペプチドを含む、P a u Aタンパク質または実質的に相同なポリペプチドの全長より短いいずれかのポリペプチドであり、そこにおいてペプチド断片は本発明の実施に有用である。本発明のペプチド断片は、好ましくは、少なくとも長さが約7から10アミノ酸残基である。好ましい態様では、ペプチド断片はP a u Aタンパク質のエピトープを示すアミノ酸配列を含む。

【0038】

特定のだが限定的でない態様の一例においては、本発明は、アミノ酸位置約28から約286、約104から約286、約172から約286、約28から約170、約104から約170、約104から約208、約172から約208、約28から約103、約28から約208、および約149から約286を含む群から選択された、SEQ ID NO：2またはSEQ ID NO：4由来のアミノ酸のサブシーケンスからなるペプチド断片をコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド分子を提供する。

【0039】

コードされたペプチド断片がP a u Aタンパク質またはその実質的に相同なポリペプチドの一より多くのサブシーケンスを含む場合、このようなペプチド断片をコードするポリヌクレオチド分子は、いくつかのサブシーケンスが、それらが前もって天然のP a u Aタンパク質または実質的に相同なポリペプチド中で隣接していない場合、ペプチド断片の中に一緒に入れられ、互いに隣接して作られるように形成することが可能である。本発明のP a u Aタンパク質の全長または実質的に相同なポリペプチドと比較して、一またはそれ以上の内部アミノ酸残基の欠失を有するポリペプチドは、この定義によりペプチド断片とみなされ、本発明の範囲に含まれる。さらに、本発明のペプチド断片をコードするポリヌクレオチド分子は、サブシーケンスによりコードされるペプチド断片を含む異なるサブシーケンスが、天然のタンパク質または実質的に相同なポリペプチドで見出されるものと比べて、互いに異なる相対的順序を持つように改変されるように形成されることが可能である。好ましい態様においては、ポリヌクレオチド分子は、本発明のP a u Aタンパク質または実質的に相同なポリペプチドの一またはそれ以上のサブシーケンスをコードし、そのサブシーケンスは、哺乳類の動物種において中和抗体が対抗して上昇しうる、P a u Aタンパク質または実質的に相同なポリペプチドの一またはそれ以上のエピトープの領域を表す。本発明はまた、アミノ酸配列のサブシーケンスが互いに改変された全長（n）P a u Aタンパク質または実質的に相同なポリペプチドをコードするポリヌクレオチ

ド分子を含むことも企図する。

【0040】

本発明はさらに、融合タンパク質を形成するようにポリペプチド担体または融合相手と融合した本発明の P a u A タンパク質、実質的に相同なポリペプチド、またはペプチド断片をコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド分子を提供する。本発明のポリヌクレオチド分子によりコードされる融合タンパク質の限定的でない例は、 γ -ガラクトシダーゼ融合物、trpE 融合物、マルトース結合タンパク質融合物、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) 融合物、およびポリヒスチジン融合物 (担体領域) を含む。特定のであるが限定的でない態様の一例では、本発明は本発明のペプチド断片への GST 融合物をコードするポリヌクレオチド分子を提供し、該ペプチド断片は、アミノ酸位置約 28 から約 286、約 104 から約 286、約 172 から約 286、約 28 から約 170、約 104 から約 170、約 104 から約 208、約 172 から約 208、約 28 から約 103、約 28 から約 208、および約 149 から約 286 を含む群から選択された、SEQ ID NO: 2 または SEQ ID NO: 4 由来のアミノ酸サブシーケンスからなる。当該技術分野において既知の方法は、これらの及びその他の融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチド分子を構築するために使用しうる。

10

【0041】

「P a u A ポリペプチド」へのこれに続く全ての言及は、他の指示がなければ、本発明の前述の P a u A タンパク質、実質的に相同なポリペプチド、ペプチド断片および融合タンパク質を含むことを企図する。

20

【0042】

本発明はさらに、本発明の前述のポリヌクレオチド分子のいずれかとハイブリッド形成するか、または本発明の前述のポリヌクレオチド分子のどれかの相補鎖であるヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチド分子とハイブリッド形成するオリゴヌクレオチド分子を提供する。このようなオリゴヌクレオチド分子は、好ましくは、少なくとも長さが約 10 から 15 ヌクレオチドであるが、SEQ ID NO: 1 または SEQ ID NO: 3 のどれかのサブシーケンスの長さまで拡張することができ、そして適度にまたは高度に厳しい条件で、前述のポリヌクレオチド分子の一またはそれ以上とハイブリッド形成することができる。より短いオリゴヌクレオチド分子については、高度に厳しい条件の一例は、 $6 \times SSC / 0.5\%$ ピロリン酸ナトリウム中、14 塩基オリゴヌクレオチドまでならば約 37、17 塩基オリゴヌクレオチドまでならば約 48、20 塩基オリゴヌクレオチドまでならば約 55、23 塩基オリゴヌクレオチドまでならば約 60 での洗浄を含む。より長いオリゴヌクレオチド分子 (すなわち、オリゴヌクレオチド数 100 以上) については、適度におよび高度に厳しい条件の例は、実質的に相同なポリヌクレオチド分子について上に記述されている。ハイブリダイゼーションの条件は、当該技術分野において知られているように、使用される特定のオリゴヌクレオチド分子に従って適当に調整することができる。

30

【0043】

好ましい態様においては、本発明のオリゴヌクレオチド分子は、高度に厳しい条件で、SEQ ID NO: 1 または SEQ ID NO: 3 のヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド分子と、または SEQ ID NO: 1 または SEQ ID NO: 3 のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド分子とハイブリッド形成する。

40

【0044】

限定的でない態様の一例においては、本発明のオリゴヌクレオチド分子は、SEQ ID NO: 13 ~ SEQ ID NO: 27 と該配列の相補鎖からなる群から選択されたヌクレオチド配列からなる。限定的でないさらなる態様の一例では、本発明のオリゴヌクレオチド分子は、SEQ ID NO: 13 ~ SEQ ID NO: 27 と該配列の相補鎖からなる群から選択されたヌクレオチド配列を含む。

50

【0045】

本発明のオリゴヌクレオチド分子は、例えば特異的疾患の診断に使われる、P a u A タンパク質をコードするポリヌクレオチド分子の増幅のプライマーとして、または遺伝子制御に有用なアンチセンス分子をコードする、またはアンチセンス分子として働くことを含む、様々な目的に有用である。遺伝子増幅は、感染した動物由来の組織や哺乳類の乳などの体液試料におけるP a u A タンパク質をコードするポリヌクレオチド分子の存在を検出するのに用いることができる。特異的増幅産物の生産は、バクテリアの感染を示し、一方増幅産物がなければ感染していないことを示す。

【0046】

当該技術分野で知られている他の増幅技術、例えばリガーゼ連鎖反応なども使うことができるが、増幅は、適当に設計されたオリゴヌクレオチド分子をポリメラーゼ連鎖反応（PCR）のような標準的技術と共に用いて行うことができる。例えば、PCRに関しては、適当に設計されたプライマー、増幅すべきヌクレオチド配列を含む鋳型、および適当なPCR酵素および緩衝液を含む混合物を調製し、鋳型の特異的p a u A 関連ポリヌクレオチド配列を増幅するための標準的な手順に従って処理される。

【0047】

本発明のポリヌクレオチド分子およびオリゴヌクレオチド分子の生産と操作は当該技術分野の方法中に存在し、また、様々な中でも特に、Maniatis et al., 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; Ausubel, et al., 1989, Current Protocols In Molecular Biology, Greene Publishing Associates & Wiley Interscience, N.Y.; および Sambrook, et al., 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. に記載された組換え技術に従って行うことができ、これらすべては参考文献として本明細書中に援用される。PCRの作動方法は、これ以外の場所にも記載されているが、Innis, et al., (eds), 1995, PCR Strategies, Academic Press, Inc., San Diego; および Erlich, (ed), 1992, PCR Technology, Oxford University Press, New York に記載されており、これらは参考文献として本明細書中に援用される。

【0048】

2. 組換え発現系2.1. 発現ベクター

本発明はさらに、本発明のポリヌクレオチド分子を含む組換えクローニングベクターおよび組換え発現ベクターを提供する。発現ベクターは、ポリヌクレオチド分子のコーディング配列（本明細書の以降では「P a u A コーディング配列」として指示される）がポリペプチドを生産するためにP a u A コーディング配列の転写と翻訳に必要な一またはそれ以上の制御因子と機能的に結合しているように構築されるのが好ましい。

【0049】

本明細書で使用される場合、「制御因子」という用語は、ポリヌクレオチドコーディング配列の発現を駆動しおよび/または制御するために働く、当該技術分野で既知の誘導性および非誘導性プロモーター、エンハンサー、オペレーターおよび他の因子を含むがそれだけに限定されない。同様に、本明細書で使用される場合、P a u A コーディング配列は、一またはそれ以上の制御因子と「機能的に結合」しており、制御因子が効果的にP a u A コーディング配列の転写またはそのmRNAの翻訳、またはその両方を制御し、そして許容する。

10

20

30

40

50

【0050】

様々な発現ベクター、好ましくはPauAコーディング配列の複製、転写、および翻訳を指向するための必要な制御因子を含む発現ベクターが知られており、PauAコーディング配列の発現に使用することができる。発現ベクターには、バクテリアまたは酵母の形質転換のための、PauAコーディング配列を含む組換えバクテリオファージDNA、プラスミドDNAおよびコスミド発現ベクター；昆虫の細胞の形質転換のためのPauAコーディング配列を含むバキュロウイルス(baculovirus)などの組換えウイルス発現ベクター；およびとりわけ動物細胞の形質転換のためのPauAコーディング配列を含むアデノウイルスまたはワクシニアウイルス(vaccinia virus)などの組換えウイルス発現ベクターなどが含まれる。

10

【0051】

本発明のPauAコーディング配列を含むように設計することができる典型的な原核細胞発現ベクタープラスミドには、多くの中でも特に、pUC8、pUC9、pBR322およびpBR329(Biorad Laboratories, Richmond, CA)、およびpPLおよびpKK223(Pharmacia, Piscataway, NJ)などを含む。

【0052】

適当な制御因子と機能的に結合している特定のコーディング配列を含む発現ベクターを構築する方法は当該技術分野でよく知られており、本発明の実施に用いることができる。これらの方法は、in vitro組換え技術、合成技術およびin vivo遺伝子組換えを含む(Maniatis, et al., 1989, 上記; Ausubel, et al., 1989, 上記; および Sambrook, et al., 1989, 上記に記載された技術等を参照)。

20

【0053】

これらのベクターの制御因子は、その長さおよび特異性において多様でありうる。利用される宿主/ベクター系に従い、適当な転写および翻訳因子のいかなるものも用いられることができる。例えば、哺乳類の細胞系でのクローニングでは、マウスメタロチオネインプロモーター等の、哺乳類細胞のゲノムから単離された、または、ワクシニアウイルス7.5Kプロモーターまたはモロニーマウスサルコーマウイルスのロングターミナルリピート(Moloney murine sarcoma virus long terminal repeat)などの、これらの細胞中で増殖するウイルスから単離されたプロモーターを使用することができる。組換えDNAまたは合成技術により獲得されたプロモーターは、挿入配列の転写のために提供するためにも使用することができる。さらに、特定のプロモーターからの発現は、特定の誘導因子例えばメタロチオネインプロモーターには亜鉛およびカドミウムイオンの存在下で上昇することができる。

30

【0054】

限定的でない転写制御領域またはプロモーターの例は、バクテリアについては、galプロモーター、T7プロモーター、TACプロモーター、左及び右プロモーター、trpおよびlacプロモーター、trp-lac融合プロモーターなどがあり；酵母については、ADH-Iおよび-I Iプロモーターなどの解糖酵素プロモーター、GPKプロモーター、PGIプロモーター、TRPプロモーターがあり；哺乳類細胞ではSV40初期および後期プロモーター、アデノウイルス主要後期プロモーターなどがある。

40

【0055】

特異的開始シグナルもまた、挿入されたPauAコーディング配列の十分な翻訳には必要とされる。これらのシグナルは一般的に、ATG開始コドンおよび隣接した配列を含む。それ自身の開始コドンと隣接配列を含むPauA遺伝子の全体が適当な発現ベクターに挿入された場合、いかなる付加的な翻訳制御シグナルも必要ない。しかしながら、コーディング配列の一部だけが挿入された場合、ATG開始コドンを含む外来性の翻訳制御シグナルが必要とされうる。これらの外来性翻訳制御シグナルおよび開始コドンは、天然および合成の様々な供給源から得ることができる。さらに、挿入部分全体のインフレーム翻訳を

50

保証するために、開始コドンは P a u A コーディング配列の読み枠に合わせておかねなければならない。

【0056】

融合タンパク質発現ベクターは、担体または融合相手と融合した P a u A タンパク質、実質的に相同なポリペプチド、またはペプチド断片を含む融合タンパク質を発現するのに用いられることができる。精製された融合タンパク質は、例えば診断用試薬として用いられるための抗 P a u A タンパク質抗血清を産生するため、P a u A タンパク質の生化学的諸特性の研究のため、生物活性を改変された P a u A 融合タンパク質を設計するため、または発現 P a u A タンパク質の同定または精製を補助するために用いることができる。可能な融合タンパク質発現ベクターは、 - ガラクトシダーゼおよび t r p E 融合物、マルトース結合タンパク質融合物、グルタチオン - S - トランスフェラーゼ (G S T) 融合物、およびポリヒスチジン融合物 (担体領域) をコードする配列を組み込んだベクターを含むが、これだけに限定されない。G S T - ペプチド断片融合物の特異的な例は、上記 5 . 1 節に記載されており、また本発明はこれらのそれぞれをコードするヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチド分子を含む発現ベクターを提供する。このような P a u A 融合タンパク質をコードする発現ベクターを構築するために、当該技術分野で既知の方法を使用することができる。

10

【0057】

P a u A 融合タンパク質は、精製のために有用な領域を含むように設計することができる。例えば、P a u A - マルトース - 結合タンパク質融合物はアミロース樹脂を用いて精製することができ；P a u A - G S T 融合タンパク質はグルタチオン - アガロースビーズを用いて精製することができ；そして P a u A - ポリヒスチジン融合は二価ニッケル樹脂を用いて精製することができる。別の方法では、担体タンパク質またはペプチドに対する抗体を融合タンパク質のアフィニティークロマトグラフィーによる精製に用いることができる。例えば、モノクローナル抗体の標的エピトープをコードするヌクレオチド配列は、発現ベクターのなかに、制御因子と機能的に結合するように設計し、そして発現エピトープが融合タンパク質の P a u A パートナーと融合するように位置することができる。例えば、親水性マーカーペプチドである F L A G^{T M} エピトープタグ (I n t e r n a t i o n a l B i o t e c h n o l o g i e s I n c .) をコードするヌクレオチド配列は、標準的な技術によって発現ベクター中の P a u A パートナーのアミノまたはカルボキシル末端に対応する点に挿入することができる。発現された P a u A - F L A G^{T M} エピトープ融合産物はその後、商業的に入手可能な抗 F L A G^{T M} 抗体を用いて検出し、そしてアフィニティ精製することができる。

20

30

【0058】

発現ベクターはまた、発現された P a u A パートナーが特異的プロテアーゼによる処理により担体領域または融合相手から解放されうるように、特異的プロテアーゼ切断部位をコードするポリリンカー配列を含むように設計することもできる。例えば、融合タンパク質ベクターは、中でも特にトロンピンまたは第 X a 因子などの切断部位をコードする D N A 配列を含むことができる。

【0059】

P a u A コーディング配列の上流および読み枠内にあるシグナル配列が、発現タンパク質の通行および分泌を指向するために、既知の方法により発現ベクターに設計することができる。限定的でないシグナル配列の例は、中でも特に、因子、免疫グロブリン、外膜タンパク質、ペニシリナーゼ、T細胞受容体、および天然 P a u A タンパク質そのもののシグナル配列から由来するシグナル配列などを含む。

40

【0060】

本発明の発現ベクターにより形質転換または感染を受けた宿主細胞の選択において補助するために、発現ベクターは、リポーター遺伝子産物または他の選択マーカーについてのコーディング配列をさらに含むように設計することができる。このようなコーディング配列は、上に記載したように、制御因子コーディング配列と機能的に結合することが好ましい

50

。本発明の実施に有用でありうるリポーター遺伝子は、当該技術分野でよく知られており、クロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ（CAT）、緑色蛍光タンパク質、ホタル・ルシフェラーゼおよびヒト成長ホルモン等を含む。選択マーカーをコードするヌクレオチド配列は当該技術分野でよく知られており、抗体または抗代謝物への抵抗力を与える遺伝子産物または栄養要求に補給する遺伝子産物をコードする配列を含む。このような配列の例は、特にチミジンキナーゼ活性、または、メトトレキセート、アンピシリン、カナマイシン、クロラムフェニコールなどへの抵抗性またはzeocinをコードする配列を含む。

【0061】

2.2. 宿主細胞の形質転換

本発明はさらに、本発明の組換えクローニングまたは発現ベクターにより形質転換された宿主細胞およびそこから由来する細胞株を提供する。本発明の実施に有用な宿主細胞は、原核細胞でも真核細胞でもよい。このような形質転換された宿主細胞は、組換えバクテリオファージDNA、プラスミドDNA、コスミドDNA発現ベクターにより形質転換されたバクテリア、または組換え発現ベクターで形質転換された酵母などの微生物；またはバキュロウイルスなどの組換えウイルス発現ベクターに感染された昆虫細胞；または特にアデノウイルスまたはワクシニアウイルスなどの組換えウイルス発現ベクターに感染された哺乳類細胞などの動物細胞などを含むが、それだけに限定されない。

【0062】

バクテリアの細胞は一般に、宿主細胞として好ましい。E. coliの株、例えばAmerican Type Culture Collection (ATCC) (Rockville, MD, USA; Accession No. 31343)または商業的供給源 (Stratagene) から入手可能なDH5株、またはTAP56またはLW14株 (E. coliのPfizer内部の株) が典型的に用いられる。マウス、ハムスター、乳牛、サル、またはヒトの繊維芽細胞株もまた効果的に用いることができるが、好ましい真核生物の宿主細胞には酵母細胞を含む。本発明の組換えPauAポリペプチドを発現するのに使用することのできる真核生物の宿主細胞の例は、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞 (例えば、ATCC Accession No. CCL61)、およびNIHスイスマウス胚細胞NIH/3T3 (例えば、ATCC Accession No. CRL. 1658) を含む。

【0063】

本発明の組換えベクターは、実質的に均質な細胞培養の一またはそれ以上の宿主細胞に形質転換されるかまたは感染されることが好ましい。ベクターは一般に、既知の技術、例えば、リン酸カルシウム沈殿法、塩化カルシウム法、マイクロインジェクション、エレクトロポレーション、組換え体ウイルスとの接触による感染、リポソーム媒介感染法、DEAE-デキストラン感染法、形質導入法、接合、マイクロ発射衝撃法 (microprojectile bombardment) といった方法に従って宿主細胞に導入される。形質転換体の選択は組換えベクターと連結した抗生物質抵抗性などの選択マーカーを発現する細胞の選択などの標準的方法により行うことができる。

【0064】

ひとたび本発明の組換えベクターが宿主細胞に導入されると、宿主細胞ゲノムまたはエピソームにおけるPauAコーディング配列の融合および保存は、標準的技術、例えばサザンハイブリダイゼーション分析、制限酵素分析、逆転写PCR (rt-PCR) を含むPCR分析、または免疫学的分析によって確認され、期待されるポリペプチド産物を検出することができる。組換えPauAコーディング配列を含むおよび/または発現する宿主細胞は、当該技術分野でよく知られている少なくとも四つの一般的方法により同定することができる。それらは (i) DNA-DNA、DNA-RNA、またはRNA-アンチセンスRNAハイブリダイゼーション； (ii) “マーカー” 遺伝子の機能の存在の検出； (iii) 宿主細胞でのPauA特異的mRNA転写の発現によって測定される転写水準の検定；および (iv) イムノアッセイまたはPauAの生物活性 (すなわち適切な哺乳類

10

20

30

40

50

のプラスミノゲンからプラスミンへの転化)の存在により、測定された成熟 P a u A ポリペプチド産物の存在の検出である。

【0065】

限定的でない例としては、組換え発現 P a u A ポリペプチドの生物活性は、例えば国際特許出願公開 W O 93/14029 において記載されているようなアガロース/スキムミルク重層アッセイを用いた、ウシプラスミノゲンのプラスミンへの転化の検出により検査することができる。簡単にいえば、P a u A 生物活性をモニターするための調製物は、例えば 1 μg タンパク質/ml リン酸緩衝塩類溶液 (P B S) (p H 7.4) などの適当な濃度に希釈され、O x o i d^{T M} スキムミルク (1% w/v, U n i p a t h L t d., H a m p s h i r e, E n g l a n d) およびウシプラスミノゲン (10³ u n i t s / m l) (S i g m a) を含むアガロースシート (P B S 中 1% w/v) のウェルの切れ込みに加えられる。生物活性を持つ P a u A ポリペプチドの存在は、ウシプラスミノゲンからプラスミンへの転化に引き続いて牛乳タンパク質の破壊を示すスキムミルク層における透明区域の形成の観察により検出される。別の方法では、下記の 7.3 節に記載されたような色素分析を使用することができる。

【0066】

2.3. 組換えポリペプチドの発現および性質決定

ひとたび P a u A コーディング配列が安定に適当な宿主細胞に導入されると、形質転換された宿主細胞はクローン的に繁殖され、そして得られた細胞は P a u A ポリペプチドの最大限の生産を誘導する条件下で増殖させ、このような条件は一般的に細胞を高密度まで増殖することを含む。発現ベクターが誘導性プロモーターを含む場合、温度シフト、栄養枯渇、無償性誘導物質 (非代謝性誘導物質) (例えばイソプロピル-D-チオガラクトピラノシド (I P T G) 等の炭水化物の類似体) の付加、過度の代謝副産物の蓄積等の適当な誘導条件が、発現を誘導するのに必要であるものとして用いられる。

【0067】

発現された P a u A ポリペプチドが宿主細胞の内部に保持された場合、細胞は集菌および溶解され、そして産物はタンパク質分解を最小限に抑えるための、当該技術分野で既知の抽出条件下、例えば 4 で、またはプロテアーゼ阻害剤の存在下で、またはその両方の条件で、溶解液から単離され精製される。発現された P a u A ポリペプチドが宿主細胞から分泌されると、枯渇された栄養培地を簡単に収集することができ、生産物をそこから単離することができる。

【0068】

発現された P a u A ポリペプチドは、細胞溶解液または培養培地から、以下の方法、すなわち硫酸アンモニウム沈澱、大きさによる分画、イオン交換クロマトグラフィー、H P L C、密度遠心分離、およびアフィニティクロマトグラフィーのいずれかの組み合わせ (しかしそれだけに制限されない) を含む標準的方法を用いて適当なやり方で、実質的に精製または単離することができる。発現された P a u A ポリペプチドが生物活性、すなわちプラスミノゲンを活性化する能力を示す場合、上述したアガロース/スキムミルク重層アッセイまたは下記の 7.3 節に記載されたクロマトグラフィーアッセイ、などのアッセイの使用、またはプラスミノゲンの活性を検出する他の関連したアッセイにより、調製物の純度の増加を精製過程の各段階で監視されることができる。もし発現されたポリペプチドが生物活性を欠くならば、発現ポリペプチドは、例えば、大きさ、または P a u A ポリペプチドに対する他の特異的な抗体に対する反応性、または融合タグの存在に基づいて検出することができる。

【0069】

このように、本発明はさらに、P a u A ポリペプチドの生産に誘導的な条件下で組換え発現ベクターにより形質転換された宿主細胞を培養しおよび細胞培養からの P a u A ポリペプチドを回収することを含む、P a u A ポリペプチドを調製する方法を提供し、該組換え発現ベクターは、(a) S E Q I D N O : 2 または S E Q I D N O : 4 のアミノ酸位置 26 からアミノ酸位置 286 のアミノ酸配列を含む P a u A タンパク質 ; または (

b) P a u A タンパク質に実質的に相同なポリペプチド；または (c) P a u A タンパク質または実質的に相同なポリペプチドのペプチド断片；または (d) 融合相手と融合した P a u A タンパク質、実質的に相同なポリペプチド、またはペプチド断片を含む融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む、宿主細胞中でのポリヌクレオチド分子の発現を制御する一またはそれ以上の制御因子と機能的に結合しているようなポリヌクレオチド分子を含む。

【 0 0 7 0 】

ひとたび十分な純度の P a u A ポリペプチドが得られると、それは S D S - P A G E、サイズ排除クロマトグラフィー、アミノ酸配列分析、プラスミノゲンからプラスミンへの転換の生物活性などを含む標準的方法によって性質決定することができる。P a u A ポリペプチドのアミノ酸配列は、標準的なペプチド配列決定技術を用いて決定することができる。P a u A ポリペプチドは親水度分析 (例えば H o p p a n d W o o d s , 1 9 8 1 , P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 7 8 : 3 8 2 4 を参照)、または類似のソフトウェアアルゴリズム (a n a l o g o u s s o f t w a r e a l g o r i t h m s) を用いることによりさらに性質決定し、P a u A ポリペプチドの親水性および疎水性領域を同定することができる。構造分析が、特異的二次構造を帯びた P a u A ポリペプチドの領域を同定するために行われることができる。X線結晶分析 (E n g s t r o m , 1 9 7 4 , B i o c h e m . E x p . B i o l . 1 1 : 7 - 3)、コンピューターモデリング (F l e t t e r i c k a n d Z o l l e r (e d s) , 1 9 8 6 , i n : C u r r e n t C o m m u n i c a t i o n s i n M o l e c u l a r B i o l o g y , C o l d S p r i n g H a r b o r L a b o r a t o r y , C o l d S p r i n g H a r b o r , N Y) および核磁気共鳴 (N M R) などの生物物理学的方法が、P a u A タンパク質とその基質の間の相互作用の領域の位置づけおよび研究のために用いることができる。より効果的なワクチン合成物を設計するために、P a u A ポリペプチドの特異的部分だけを含むワクチンを選択するために、または天然 P a u A タンパク質によるプラスミノゲンの活性化を阻止することができる治療学的または薬学的化合物を設計または選択するために、これらの研究から得られた情報を用いることができる。

【 0 0 7 1 】

本発明の実施に有用な P a u A ポリペプチドは、(a) 生物学的に活性、すなわち哺乳類のプラスミノゲンをプラスミンに転化でき；または (b) 免疫原性、すなわち哺乳類の動物種に投与された場合乳腺炎に対する防御反応を誘導することができ；または (c) 哺乳類の動物種に投与された場合、診断用試薬として有用である抗 P a u A タンパク質特異的な抗体の生産を誘導することができ；または (d) S . u b e r i s などの乳腺炎をひきおこす病原体による感染から生じるか、または本発明のワクチンの投与から生じる、哺乳類の血液または血清の試料中における、抗 P a u A タンパク質特異的な抗体の存在を検出するための診断用試薬として用いることができるものである。このようなポリペプチドは、一度調整されると、当該技術分野で既知の慣例的スクリーニング法を用いるだけで同定することができる。例えば、哺乳類のプラスミノゲンをプラスミンに転換する能力はここに記載した生物学的定量法の一つを用いて決定することができる。乳腺炎に対する防御免疫反応を誘導する能力は、S . u b e r i s などの S t r e p t o c o c c u s のいくつかの種によりひきおこされる乳腺炎にかかりやすい哺乳類の種に属する動物に、P a u A ポリペプチドを投与すること、および P a u A 中和抗体の存在、またはワクチン投与を受けた動物の、その後の乳腺炎原病原体の感染に対する抵抗能力の検定により、同定することができる。P a u A タンパク質特異的な抗体の産生を誘導する能力は、マウス、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ウマ、乳牛などのモデル動物に P a u A ポリペプチドを投与すること、および標準的方法によりその動物の血清転換を試験することにより同定することができる。診断用試薬として P a u A ポリペプチドを使用する可能性は、前もって S . u b e r i s などの乳腺炎原因病原体の感染を受けた、または本発明のワクチンを前もって投与された動物の血液または血清の試料に P a u A ポリペプチドをさらすこと、および E L I S A 分

10

20

30

40

50

析などの標準的方法を用いて、試料の P a u A タンパク質特異的抗体の P a u A ポリペプチドへの結合を検出することにより決定することができる。

【0072】

特定のだが限定的でない本発明の実施に有用な P a u A ポリペプチドの例は、S E Q I D N O : 2 または S E Q I D N O : 4 のアミノ酸位置約 26 からアミノ酸位置約 286 の、または、S E Q I D N O : 2 または S E Q I D N O : 4 のアミノ酸位置約 1 からアミノ酸位置約 286 のアミノ酸配列を含むタンパク質を含む。

【0073】

特定のだが限定的でない本発明の実施に有用な P a u A ペプチド断片の例は、アミノ酸位置約 28 から約 286、約 104 から約 286、約 172 から約 286、約 28 から約 170、約 104 から約 170、約 104 から約 208、約 172 から約 208、約 28 から約 103、約 28 から約 208、および約 149 から約 286 からなる群から選択された、S E Q I D N O : 2 または S E Q I D N O : 4 のアミノ酸サブシーケンスからなるペプチド断片を含む。

【0074】

特定のだが限定的でない本発明の実施に有用な融合タンパク質の例は、アミノ酸位置約 28 から約 286、約 104 から約 286、約 172 から約 286、約 28 から約 170、約

104 から約 170、約 104 から約 208、約 172 から約 208、約 28 から約 103、約 28 から約 208、および約 149 から約 286 からなる群から選択された、S E Q I D N O : 2 または S E Q I D N O : 4 のアミノ酸サブシーケンスからなるペプチド断片と融合した G S T を含む G S T 融合タンパク質を含む。

【0075】

本発明はゆえに、精製されたまたは単離された P a u A タンパク質、その実質的に相同なポリペプチド、そのような P a u A タンパク質および実質的に相同なポリペプチドのペプチド断片、および該 P a u A タンパク質、実質的に相同なポリペプチドまたはペプチド断片（総括的に「P a u A ポリペプチド」として本明細書において言及した）を含む融合タンパク質を提供する。

【0076】

3. P a u A の類似体および誘導体

本発明はさらに、前述した P a u A ポリペプチドの類似体および誘導体を提供する。ポリペプチドについて有用性が上記で定義されたように、そのような類似体および誘導体は本発明の実施に有用である。

【0077】

類似体の生産を生ずる操作は遺伝子レベルまたはタンパク質レベルかまたはその両方で起こりうる。遺伝子レベルでは、例えば、P a u A ポリペプチドをコードするクローン化された DNA 分子は、一またはそれ以上の既知の方法により *in vitro* で、P a u A タンパク質の類似体をコードするように改変することができる。このような改変は、エンドヌクレアーゼ消化、翻訳、開始および/または終止配列を創造または破壊する変異、またはコーディング領域に変異を作る変異、またはそのどれかの組み合わせを含むが、それだけに限定されない（例えば、M a n i a t i s , e t a l . , 1989, 上記; A u s u b e l , e t a l . , 1989, 上記; および S a m b r o o k , e t a l . , 1989, 上記を参照）。X線照射または化学的変異原のような変異誘発剤に対する曝露、または *in vitro* での部位特異的変異誘発（例えば H u t c h i n s o n , e t a l . , 1978. J. Biol. Chem. 253: 6551 参照）（しかし、それだけに限定されない）を含む当該技術分野で既知の変異誘発のいかなる技術も使用することができる。

【0078】

P a u A ポリペプチドの操作はタンパク質レベルでも行うことができる。タンパク質の一またはそれ以上の化学的改変は、以下の技術のいずれかの方法を含む、既知の技術を用い

ることにより行うことができる。すなわち、カルバゼート (c a r b a z a t e s) または三次中心 (t e r i t a r y c e n t e r s) を生産するための、天然タンパク質の一またはそれ以上の L - アミノ酸の、対応する D - アミノ酸、アミノ酸類似体、またはアミノ酸模擬体による置換；または例えばトリプシン、キモトリプシン、パパイン、または V 8 プロテアーゼによるタンパク質融解的な (p r o t e i o l y t i c) な切断、または例えば N a B H ₄ または臭化シアンによる処理、またはアセチル化、ホルミル化、酸化または還元などの特異的化学的変化を含むがそれだけに制限されない。

【 0 0 7 9 】

P a u A ポリペプチドは、一またはそれ以上の化学基の結合により誘導することができる。アセチル基、硫黄結合基、グリコシル基、脂質、およびリン酸、および/または、もう一つの P a u A ポリペプチド、または血清アルブミン、キーホールリンペットヘモシアニン、または商業的な活性化された B S A 等の他のタンパク質、またはポリアミノ酸 (例えばポリリジン)、または多糖 (例えば、セファロース、アガロース、または改変または非改変セルロース) 等を含む (しかし、それだけに限定されない。そのような結合は、アミノ酸側鎖および/またはポリペプチドの N 末端または C 末端において共有結合されていることが望ましい。このような結合反応を行う方法は、タンパク質化学分野においてよく知られている。

【 0 0 8 0 】

本発明の実施に有用な誘導体は、ポリエチレングリコールなどの水溶性ポリマーが P a u A ポリペプチドまたはその類似体または他の誘導体に結合し、それにより少なくとも部分的にポリペプチドの免疫原性は残したまま付加的な望ましい性質を提供するものを含む。これらの付加的な望ましい性質は水溶液中の溶解性を増加すること、貯蔵中の安定性を増加すること、タンパク質の分解への抵抗性を増加すること、i n v i v o での半減期を増加することなどを含む。P a u A ポリペプチドへの結合に適した水溶性ポリマーは、ポリエチレングリコールホモポリマー、ポリプロピレングリコールホモポリマー、エチレングリコールとプロピレングリコールのコポリマーを含むがそれだけに限定されない。該ホモポリマーおよびコポリマーは、片方の末端を置換されていないか、またはアルキル基、ポリオキシエチル化されたポリオール、ポリビニルアルコール、多糖、ポリビニルエチルエーテル、および、 - ポリ [2 - ヒドロキシエチル] - D L - アスパルトアミドにより置換されている。ポリエチレングリコールが特に好ましい。タンパク質の水溶性ポリマーの複合体を作る方法は、当該技術分野で既知であり、特に米国特許第 3 , 7 8 8 , 9 4 8 号 ; 米国特許第 3 , 9 6 0 , 8 3 0 号 ; 米国特許第 4 , 0 0 2 , 5 3 1 号 ; 米国特許第 4 , 0 5 5 , 6 3 5 号 ; 米国特許第 4 , 1 7 9 , 3 3 7 号 ; 米国特許第 4 , 2 6 1 , 9 7 3 号 ; 米国特許第 4 , 4 1 2 , 9 8 9 号 ; 米国特許第 4 , 4 1 4 , 1 4 7 号 ; 米国特許第 4 , 4 1 5 , 6 6 5 号 ; 米国特許第 4 , 6 0 9 , 5 4 6 号 ; 米国特許第 4 , 7 3 2 , 8 6 3 号 ; 米国特許第 4 , 7 4 5 , 1 8 0 号 ; 欧州特許 (E P) 第 1 5 2 , 8 4 7 号 ; E P 第 9 8 , 1 1 0 号 ; および日本特許 (J P) 第 5 , 7 9 2 , 4 3 5 号などに記載されており、これらの特許は参考文献として本明細書中に援用されている。

【 0 0 8 1 】

本発明の実用に有用な類似体および誘導体は、P a u A ポリペプチドについて上に記載された方法を使用することにより同定することができる。

【 0 0 8 2 】

4 . 抗乳腺炎ワクチン

本発明はさらに、免疫学的に効果的な量の、(a) S E Q I D N O : 2 または S E Q I D N O : 4 のアミノ酸位置約 2 6 から約 2 8 6 のアミノ酸配列を含む P a u A タンパク質 ; または (b) P a u A タンパク質の実質的に相同なポリペプチド ; または (c) P a u A タンパク質または実質的に相同なポリペプチドのサブシーケンスからなるペプチド断片 ; または (d) 融合相手と融合した P a u A タンパク質、実質的に相同なポリペプチド、またはペプチド断片を含む融合タンパク質 ; (e) P a u A タンパク質、実質的に相同なポリペプチド、ペプチド断片、または融合タンパク質の類似体または誘導体 ; ま

10

20

30

40

50

たは (f) P a u A タンパク質、実質的に相同なポリペプチド、ペプチド断片、融合タンパク質、または類似体をコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド分子を含み、そのタンパク質、実質的に相同なポリペプチド、ペプチド断片、融合タンパク質、類似体、誘導体、またはポリヌクレオチド分子は哺乳類での乳腺炎に対する防護反応を誘導することができる；そしてワクチンはまた獣医学的に許容できる担体を含む、乳腺炎に対して哺乳類に属する動物を防御するためのワクチンを提供する。

【 0 0 8 3 】

限定的でない態様では、本発明のワクチンは、本発明の発現ベクターまたはポリヌクレオチド分子を含む形質転換された宿主細胞を含み、発現ベクターまたはポリヌクレオチド分子は、哺乳類での乳腺炎に対する防御反応を誘導することのできる本発明の P a u A タンパク質、実質的に相同なポリペプチド、ペプチド断片、融合タンパク質、または類似体を生産するために、宿主細胞の中で発現される。宿主細胞は本発明の発現ベクターまたはポリヌクレオチド分子を発現することができるいずれの細胞でもよく、そして哺乳類の動物にワクチン中で投与することができるいかなる細胞でもよい。限定的でない態様では、このような宿主細胞は E . c o l i の宿主細胞である。

10

【 0 0 8 4 】

本明細書中で使用される場合、「免疫学的に効果的な量」という用語は、哺乳類に投与された場合乳腺炎に対する防御反応を誘導することができる、例えば本発明の P a u A タンパク質、実質的に相同なポリペプチド、ペプチド断片、融合タンパク質、類似体、誘導体、またはポリヌクレオチド分子の免疫原的量を指す。

20

【 0 0 8 5 】

「防御反応を誘導することができる」という句は、乳腺炎に対してワクチン投与された哺乳類を防御するのに役立つ、抗体性または細胞性免疫反応のどちらかまたはその両方を含む、ワクチン投与に反応して哺乳動物体内で免疫を基礎とした反応を誘導しまたは増加することを含むように、本明細書中で広く用いられる。本明細書中で使用されている「防御反応」「防御する」という用語は、乳腺炎の完全な予防または乳腺炎の原因病原体による感染の完全な予防に限定されず、ワクチン投与されていない感染された哺乳類と比べた場合に、病原体による感染の程度または速度を幾ばくか減少させ、または牛乳生産のいくらかでも検出できる増加を含む、病原体の感染に起因する疾患の重傷度または症候または症状のいくらかの軽減、または牛乳生産の減少のいかなる検出しうる阻害や遅速を含むことを企図する。

30

【 0 0 8 6 】

本明細書中で使用される場合、「哺乳類に属する動物種」および「哺乳類」という用語は、ウシの種類（乳牛、雄牛）、ヒツジ、ブタ、ヤギ、ウマ、イヌ、およびネコに属する動物を含めた、本発明のワクチンを使用することで乳腺炎に対して防御されうるいずれかの哺乳類の動物種、または哺乳動物の種類を指す。

【 0 0 8 7 】

本発明のワクチン組成物は、標準的緩衝液、担体、安定化剤、希釈剤、防腐剤、および/または可溶化剤を用いた、許容しうる慣習的方法を用いて作成することができ、持続的放出を容易にするように設計することもできる。希釈剤は水、塩類溶液、デキストロース、エタノール、グリセロール等を含むことができる。等張性のための付加物としては、特に塩化ナトリウム、デキストロース、マンニトール、ソルビトール、およびラクトースなどを含むことができる。安定化剤としては特に、アルブミンなどを含む。

40

【 0 0 8 8 】

アジュバントは場合により、ワクチンにおいて用いることができ、限定的でない例として、R I B I アジュバント系 (R i b i i n c)、ミョウバン、水酸化アルミニウムゲル、水中スクアレンなどの水中油乳濁液、フロイントの完全および不完全アジュバントなどの油中水乳濁液、B l o c k コポリマー (C y t R x , A t l a n t a G A)、S A F - M (C h i r o n , E m e r y v i l l e C A)、A M P H I G E N (商標) アジュバント、サポニン、Q u i l A (S u p e r f o s) または Q S - 2 1 (C a m

50

bridge Biotech inc., Cambridge MA)などの他の精製または半精製サポニン画分、モノホスホリル脂質AおよびAvridine脂質-アミンアジュバントを含む。ワクチンはさらに、インターロイキン、インターフェロン、または他の既知のサイトカインなどの一またはそれ以上の免疫調節剤を含むことができる。

【0089】

適当な、獣医学的に許容しうるワクチンビヒクル、担体、および付加物が、知られているかまたは当業者に明らかになるであろう(例えば、参考文献として本明細書中に援用するRemington's Pharmaceutical Science, 18th Ed., 1990, Mack Publishingを参照)。ワクチンは溶液として、または別の方法では投与前に滅菌希釈溶液で再構成されるような凍結乾燥の形で貯蔵される。

10

【0090】

本発明はさらに、免疫原の持続的放出のためのワクチン製剤を提供する。このような持続的放出製剤の例は、例えばポリ(乳酸)や、ポリ(lactic-co-glycolic acid)、メチルセルロース、ヒアルロン酸、コラーゲン等の生物学的適合性のポリマーの合成物と組み合わせた免疫原を含む。薬剤伝達ビヒクルにおける分解可能なポリマーの構造、選択および使用は、本明細書中で参考文献として援用するA. Domb, et al., 1992, Polymers for Advanced Technologies 3: 279-292を含むいくつかの出版物においてレビューされている。薬学的製剤におけるポリマーの選択および使用についてのさらなる手引きは、本明細書中に参考文献として援用するM. Chasin and R. Langer (eds), 1990, "Biodegradable Polymers as Drug Delivery System" in Drug and Pharmaceutical Sciences, Vol. 45, M. Dekker, NYの中に見ることができる。別の方法では、または付加的には、本発明のワクチンのPauAポリペプチド、類似体、誘導体、またはポリヌクレオチドは、投与および効果を改善するためにマイクロカプセル化することができる。抗原のマイクロカプセル化の方法は当該技術分野でよく知られており、参考文献として本明細書中に援用する、米国特許第3,137,631号;米国特許第3,959,457号;米国特許第4,205,060号;米国特許第4,606,940号;米国特許第4,744,933号;米国特許第5,132,117号;および国際公開WO 95/28227に記載されている技術を含む。

20

30

【0091】

リポソームもまた、本発明のPauAポリペプチド、類似体、誘導体、またはポリヌクレオチド分子のいずれかの保存的放出を提供するために用いることができる。リポソーム製剤をいかにして作り、そして使用するかに関する詳細は、特に、米国特許第4,016,100号;米国特許第4,452,747号;米国特許第4,921,706号;米国特許第4,927,637号;米国特許第4,944,948号;米国特許第5,008,050号;米国特許第5,009,956号などにおいて見ることができ、これらすべては本明細書中で参考文献として援用する。

【0092】

限定的でない態様においては、本発明のワクチンは、乳腺炎および場合により一またはそれ以上の、哺乳類を苦しめる可能性がある疾病または病理学的状態に対して哺乳類に属する動物種を防御するための混合ワクチンであることができ、該混合ワクチンは、(a) SEQ ID NO: 2またはSEQ ID NO: 4のアミノ酸位置約26から約286のアミノ酸配列を含むPauAタンパク質;または(b) PauAタンパク質に実質的に相同なポリペプチド;または(c) PauAタンパク質または実質的に相同なポリペプチドのサブシーケンスからなるペプチド断片;または(d) 融合相手と融合したPauAタンパク質、実質的に相同なポリペプチド、ペプチド断片を含む融合タンパク質;または(e) PauAタンパク質、実質的に相同なポリペプチド、ペプチド断片、または融合タンパク質の類似体または誘導体;または(f) PauAタンパク質、実質的に相同なポ

40

50

リペプチド、ペプチド断片、融合タンパク質、または類似体をコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド分子を含む免疫学的に効果的な量の第一成分を含み、このタンパク質、実質的に相同なポリペプチド、ペプチド断片、融合タンパク質、類似体、誘導体、またはポリヌクレオチド分子は哺乳類における乳腺炎に対する防御反応を誘導することができ、哺乳類を苦しめる可能性がある疾病または病理学的状態に対する防御反応を誘導することのできる抗原を含む第二成分および獣医学的に許容しうる担体を含む。

【0093】

混合ワクチンの第二成分の抗原は、乳腺炎または哺乳類を苦しめる可能性がある他の疾病または病理学的状態に対する、または哺乳類に感染することができる病原体に対する防御反応を誘導する能力に基づき、当該技術分野で知られているようなやり方で選択される。特定の哺乳類の種類におけるワクチン組成物において有用であると知られているいかなる免疫原性組成物も混合ワクチンの第二成分に用いることができる。このような免疫原性組成物はウシヘルペスウイルス (*syn. , infectious bovine rhinotracheitis*)、ウシ呼吸系発疹ウイルス (*bovine respiratory syncytial virus*)、ウシウイルス性下痢ウイルス (*bovine viral diarrhoea virus*)、I型、II型、またはIII型パラインフルエンザウイルス (*parainfluenza virus type I, II, or III*)、レプトスピラ属 (*Leptospira spp.*)、カンピロバクター属 (*Campylobacter spp.*)、*S. aureus*などのブドウ球菌属 (*Staphylococcus spp.*)、*S. agalactiae*、*S. dysgalactiae*などの連鎖球菌属 (*Streptococcus spp.*)、マイコプラズマ属 (*Mycoplasma spp.*)、クレブシエラ属 (*Klebsiella spp.*)、サルモネラ属 (*Salmonella spp.*)、口タウイルス、コロナウイルス、狂犬病、*P. heamolytica*、*P. multocida*などのパステレラ属 (*Pasteurella spp.*)、クロストリジウム属 (*Clostridium spp.*)、破傷風トキソイド (*Tetanus toxoid*)、*E. coli*、ネオスポラ属 (*Neospora spp.*)、およびその他の真核寄生生物などに対する防御を提供するものを含むが、それだけに限定されない。

【0094】

第二成分を含む抗原は、キメラ分子または融合タンパク質を作るために第一成分の *Pa u A* ポリペプチド、類似体または誘導体の場合により共有結合することができる。限定的でない態様では、第二成分の抗原は一つのハプテンを含み、そのハプテンの免疫原性は第一成分の *Pa u A* ポリペプチド、類似体、または誘導体に結合することで検出可能なほど増加する。

【0095】

混合ワクチンの第一および第二成分の共有結合した抗原を含むキメラ分子は、当該技術分野で知られた一またはそれ以上の技術を用いて合成することができる。例えば、キメラ分子は、標準的的化学合成法 (例えば *Merrifield, 1985, Science 232: 341-347* を参照) を用いた、商業的に入手可能なペプチド合成機を用いて合成的に生産することができる。別の方法では、個々の成分を個々に合成し、その後化学的結合基を使用することにより一緒に結合することができる。別の方法では、キメラ分子は組換えDNA技術を用いて生産することができ、その技術によると、例えばキメラ分子の異なる抗原をコードするヌクレオチド配列を含む別々のポリヌクレオチド分子が一緒に読み枠に合わせてスプライシングを受け、そしてその後のキメラ分子の単離のために適した、宿主細胞のなかで発現される。本発明のワクチンがポリペプチドではなくポリヌクレオチド分子を含む場合は、スプライシングを受けたポリヌクレオチド分子がワクチン組成物中に用いることができる。このような組換え技術を行うための多くの手引きが *Maniatis, et al., 1989, 上記; Ausubel, et al., 1989, 上記; Sambrook, et al., 1989, 上記; Innis et al. (eds) 1995, 上記; および Erlich, 1992,*

10

20

30

40

50

上記において提供されている。

【0096】

上に記述したように、本発明のワクチンは本発明の発現ベクターまたはポリヌクレオチド分子を含む形質転換された宿主細胞を含むことができ、その場合、哺乳類における乳腺炎に対する防御反応を誘導することができる本発明のPauAタンパク質、実質的に相同なポリペプチド、ペプチド断片、融合タンパク質、類似体を生産するために、発現ベクターまたはポリヌクレオチド分子を宿主細胞の中で発現する。限定的でないさらなる態様では、本発明の混合ワクチンは、病原体として*S. uberis*により引き起こされる乳腺炎以外のいずれかの疾病または病理学的状態と関連する宿主細胞を含み、その疾病または病理学的状態は哺乳類を苦しめる可能性があり、その宿主細胞は本発明の発現ベクターまたはポリヌクレオチド分子をさらに含み、その発現ベクターまたはポリヌクレオチド分子は哺乳類における乳腺炎に対する防御反応を誘導することができる本発明のPauAタンパク質、実質的に相同なポリペプチド、ペプチド断片、融合タンパク質または類似体を生産するために宿主細胞の中で発現され、そしてそのような宿主細胞は*S. uberis*により引き起こされる乳腺炎以外の疾病または病理学的状態に対する免疫防御反応を誘導するのに役立つ。限定的でない態様においては、このような宿主細胞は、レプトスピラ属(*Leptospira* spp.)、カンピロバクター属(*Campylobacter* spp.)、*S. aureus*などのブドウ球菌属(*Staphylococcus* spp.)、*S. agalactiae*、*S. dysgalactiae*などの連鎖球菌属(*Streptococcus* spp.)、マイコプラズマ属(*Mycoplasma* spp.)、クレブシエラ属(*Klebsiella* spp.)、サルモネラ属(*Salmonella* spp.)、*P. haemolytica*、*P. multocida*などのパストレラ属(*Pasteurella* spp.)、クロストリジウム属(*Clostridium* spp.)、*E. coli*、ネオスポラ属(*Neospora* spp.)、および他の真核寄生生物からなるグループから選択される。

10

20

【0097】

本発明はさらに、免疫学的に有効量の(a)SEQ ID NO:2またはSEQ ID NO:4のアミノ酸位置およそ26からアミノ酸位置およそ286のアミノ酸配列を含むPauAタンパク質；または(b)PauAタンパク質に実質的に相同なポリペプチド；または(c)PauAタンパク質または実質的に相同なポリペプチドのサブシーケンスからなるペプチド断片；または(d)融合相手に融合したPauAタンパク質、実質的に相同なポリペプチド、またはペプチド断片；または(e)PauAタンパク質、実質的に相同なポリペプチド、ペプチド断片または融合タンパク質の類似体または誘導體；または(f)PauAタンパク質、実質的に相同なポリペプチド、ペプチド断片または融合タンパク質または類似体をコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド分子であり、これらのタンパク質、実質的に相同なポリペプチド、ペプチド断片または融合タンパク質、類似体、誘導體またはポリヌクレオチドは、哺乳類の乳房炎に対する防御性応答を誘導することができるものであり、これを獣医学的に受容可能な担体を組み合わせることを含む、乳房炎に対して哺乳類の動物種を防御するためのワクチンの製造方法を提供する。

30

【0098】

本発明はさらに、本発明の免疫学的に有効量のワクチンを哺乳動物に投与することを含む、乳房炎に対して哺乳類の動物種をワクチン化する方法を提供する。

40

【0099】

哺乳動物に投与される免疫原の量は、ワクチン化される動物の動物種、年齢、体重、健康状態、および総体的な身体特性のような因子、および投与される特定の免疫またはワクチン組成物によって決定される。各パラメータの最適量の決定は、例えば経験的な研究のような慣用的方法を用いて行うことができる。特にウシ属の動物種に対する本発明のワクチンのPauAポリペプチドの投与に関しては、投与量は、好ましくはポリペプチドにして約0.01 μ gから約100mgまでの範囲であり、より好ましくは約0.1 μ gから約10mgの範囲であり、もっとも好ましくは約1.0 μ gから約1.0mgである。特に

50

ウシ属の動物種に対する本発明のワクチンのポリヌクレオチドの投与に関しては、投与量は、好ましくはポリヌクレオチドにして約0.05 µgから約500 mgまでの範囲であり、より好ましくは約0.5 µgから約50 mgの範囲であり、もっとも好ましくは約5.0 µgから約5 mgである。さらに、ワクチンの一般的な投与体積は、一個体当たり一回投与あたり約50 µlから約50 mlの範囲である。

【0100】

ワクチン予防法もまた、上に記載された因子に基づいて選択することができる。動物は、離乳年齢、またはさらに若い年齢、または繁殖直前または繁殖時、分娩時、乳終了時、または乳房炎が群れの動物種の一頭または複数に最初に発症し始めた時を含む、いかなる適当な時期にもワクチン化することができる。完全な防御を達成するために、追加投与すなわち追加抗原刺激が必要とされる場合がある。適当な免疫防御が達成されたか決定する方法（例えば血清変換を決定することまたは中和アッセイを利用することによる）は、当該技術分野でよく知られている。

10

【0101】

本発明のワクチンは、例えば経口、鼻腔内、筋肉内、乳房内、リンパ節内、腹腔内、静脈内、動脈内、皮下、直腸または腔内投与のような適当な経路、または複数の経路の組み合わせによって投与することができる。当業者にとっては、選択された経路に従ってワクチン組成物を容易に製剤化することが可能であろう。

【0102】

本発明はさらに、免疫学的に有効量の(a) SEQ ID NO: 2またはSEQ ID NO: 4のアミノ酸位置およそ26からアミノ酸位置およそ286のアミノ酸配列を含むPauAタンパク質；または(b) PauAタンパク質に実質的に相同なポリペプチド；または(c) PauAタンパク質または実質的に相同なポリペプチドのサブシーケンスからなるペプチド断片；または(d) 融合相手に融合したPauAタンパク質、実質的に相同なポリペプチド、またはペプチド断片からなる融合タンパク質；または(e) PauAタンパク質、実質的に相同なポリペプチド、ペプチド断片または融合タンパク質の類似体または誘導体；または(f) PauAタンパク質、実質的に相同なポリペプチド、ペプチド断片、融合タンパク質または類似体をコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド分子を含む第一の容器および獣医学的に受容可能な担体または希釈剤からなる第二の容器を含み、これらのタンパク質、ポリペプチド、ペプチド断片、融合タンパク質、類似体、誘導体またはポリヌクレオチド分子は、哺乳類の乳房炎に対する防御性応答を誘導することができる、乳房炎に対して哺乳類の動物種を防御するためのワクチンキットを提供する。

20

30

【0103】

5. 抗PauA抗体の生産

本発明は、本発明のPauAポリペプチド、類似体、または誘導体に結合するポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体を提供する。このような抗体は、天然または組換えPauAポリペプチドを精製するため、または例えば感染哺乳動物由来の組織切片中、若しくは細胞中、組織中、または液体試料中のPauAタンパク質の存在を、例えばELISAまたはウェスタンブロット解析で検出するため、または感染動物中の天然のPauAタンパク質活性を治療的に中和するための親和性試薬として使用できる。

40

【0104】

抗体は、本発明のPauAポリペプチド、類似体または誘導体のいずれに対しても作製され得る。ウシ、ウマ、ウサギ、ヤギ、ヒツジおよびマウスを含む種々の宿主動物を（これらに限定されるものではないが）、抗PauAタンパク質特異的抗体を生産するための既知の方法に従って使用できる。例えば上の5.4節に挙げた種々のアジュバントを、抗体生産を増強するために使用できる。

【0105】

ポリクローナル抗体は免疫化された動物から得られ、標準的な技術を用いて抗PauAポリペプチド特異性を検定することができる。または、PauAポリペプチドに対するモノ

50

クローナル抗体が、培養用の永続的な細胞株によって抗体生産を提供するいずれかの技術を用いて調製することができる。これらには、KohlerおよびMilstein (Nature, 1975, 256: 495-497)によって最初に記載されたハイブリドーマ法; ヒトB細胞ハイブリドーマ法 (Kosbor, et al., 1983, Immunology Today 4: 72; Cote et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 2026-2030); およびEBV-ハイブリドーマ法 (Cole, et al., 1985, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96)が含まれるが、これらに限定されるものではない。または、一本鎖抗体の生産について記載された方法 (例えば米国特許第4,946,778号を参照)を、PauAポリペプチド特異的一本鎖抗体を生産するために採用することができる。これらの開示文献は、本明細書中で参考文献として援用する。 10

【0106】

本発明のPauAポリペプチド、類似体または誘導体に対する特異的な結合部位を含む抗体断片も、本発明の範囲に含まれ、既知の方法によって生産することができる。このような断片には、完全な抗体分子のペプシン消化によって生成することができるF(ab')₂断片、およびF(ab')₂断片のジスルフィド架橋を還元して生成することができるFab断片が含まれるが、これらに限定されるものではない。または、PauAポリペプチド、類似体または誘導体に対する目的の特異性を有するFab断片を迅速に同定するために、Fab発現ライブラリーを構築することができる (Huse, et al., 1989, Science 246: 1275-1281)。 20

【0107】

モノクローナル抗体および抗体断片の生産の方法は、当該技術分野ではよく知られ、さらに他の文献ではHarlow and Lane, 1988, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory; およびJ. W. Goding, 1986, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, Londonに記載されている。上に挙げた開示文献すべては、本明細書中で参考文献として援用する。 30

【0108】

6. アンチセンスオリゴヌクレオチドおよびリボザイム

本発明の範囲にはさらに、PauA mRNAを分解および/またはその翻訳を阻害するために結合して機能するアンチセンスオリゴヌクレオチド、チオリン酸、およびリボザイムを含むオリゴヌクレオチド配列がある。

【0109】

アンチセンスRNA分子およびアンチセンスDNA分子を含むアンチセンスオリゴヌクレオチドは、標的RNAに結合してタンパク質の翻訳を妨げることでmRNAの翻訳を直接的に阻害するように働く。例えば、少なくとも約15塩基でPauAポリペプチドをコードするDNA配列の固有の領域に相補的なアンチセンスオリゴヌクレオチドを、例えば慣用的なフォスホジエステル法によって合成することができる。 40

【0110】

リボザイムは、RNAの特異的な切断を触媒できる酵素的なRNA分子である。リボザイムの作用機構には、リボザイム分子の相補標的RNAに対する配列特異的ハイブリダイゼーション、次にヌクレオチド内溶解性切断が含まれる。PauA mRNA配列のヌクレオチド内溶解性切断を特異的・効率的に触媒するように設計されたハンマーヘッドモチーフ・リボザイム分子も、本発明の範囲に含まれる。

【0111】

可能性のあるRNA標的中の特異的なリボザイム切断部位も、GUA、GUUおよびGUCという配列を含むリボザイム切断部位に対する標的分子をスキャンすることによって先 50

ず同定される。一度同定されると、切断部位を含む標的遺伝子の領域に対応する約15から20リボヌクレオチドの短いRNA配列は、オリゴヌクレオチド配列を不適切にし得る、二次構造のような予想される構造特性について評価することができる。標的候補の適合性もまた、相補的オリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションの容易さを例えばリボヌクレアーゼ防御アッセイを用いて評価することができる。

【0112】

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドおよびリボザイムの両者とも、既知の方法によって調製することができる。これらの方法には、例えば固相フォスホアミド化学合成のような化学合成についての技術が含まれる。または、アンチセンスRNA分子は、RNA分子をコードするDNA配列の*in vitro*または*in vivo*転写によって生成することができる。このようなDNA配列は、T7またはSP6ポリメラーゼプロモーターのような適当なRNAポリメラーゼプロモーターを援用する広範なベクターに導入することができる。

10

【0113】

本発明のオリゴヌクレオチドに対する種々の修飾を、細胞内安定性および半減期を増大させるために導入することができる。可能性のある修飾には、リボヌクレオチドまたはデオキシリボヌクレオチドの隣接配列を分子の5'および/または3'末端に付加すること、またはオリゴヌクレオチド骨格にフォスホジエステル結合ではなく、チオリン酸または2'-O-メチルを使用することが含まれるがこれらに限定されるものでは内。

【0114】

20

7. 診断用キット

本発明はさらに、診断用キットを提供する。限定的でない態様においては、診断用キットは天然のPauAタンパク質に対して指向する抗体に特異的に結合する本発明のPauAタンパク質、実質的に相同なポリペプチド、ペプチド断片、融合タンパク質、類似体、または誘導体を含む第一コンテナ；および抗PauAタンパク質特異的抗体に対して作製された二次抗体を含む第二コンテナを含む。二次抗体は、好ましくは検出可能な標識を含む。このような診断用キットは、現在PauA生産生物（例えば*S. uberis*）に感染している、または以前に感染していた哺乳動物、または本発明のワクチンでワクチン化された後に血清変換を受けた哺乳動物を検出するのに有用である。

【0115】

30

限定的でないさらなる態様においては、本発明の診断用キットは、天然のPauAタンパク質に特異的に結合する本発明の抗体（一次抗体）を含む第一コンテナ；および天然のPauAタンパク質上の異なるエピトープに特異的に結合するか、または一次抗体に特異的に結合する二次抗体を含む第二コンテナを含む。二次抗体は好ましくは検出可能な標識を含む。限定的でないさらなる態様においては、診断用キットは、*S. uberis*のような病原体のPauAタンパク質コーディングポリヌクレオチド分子を特異的に増幅するために有用な本発明のポリヌクレオチド分子またはオリゴヌクレオチド分子を含むコンテナを含む。これらの診断用キットの后者二つは、現在PauA生産生物（例えば*S. uberis*）に感染している動物を検出するために有用である。

【0116】

40

以下の実施例は単なる例示であり、本発明の範囲を限定するためのものではない。

【0117】

【実施例】

実施例1： PauAをコードするDNA分子の同定およびクローニング

1.1. アミノ酸配列分析

*S. uberis*株c216 (Lot No. 053196w)由来のPauAタンパク質を、国際特許出願公開WO 93/14209に記載された方法、すなわち無細胞培養濾過液からの硫酸沈澱、次に分子ふるいクロマトグラフィー、次に16%SDS-PAGEゲル (Novex, San Diego, CA)上での分離、そしてN末端エドマン配列決定法のためのProBlot (Applied Biosystems, 50

Foster City, CA)への電気プロットを使用して精製した。PauAバンドに対応するプロット領域(計算上35kDa)が切り出され、ABI 494タンパク質シーケンサー(Applied Biosystems)によるアミノ酸配列分析が行われた。内部配列決定のため、精製されたPauAは上述のように16%SDS-PAGEゲルで分離し、改変銀染色(Shevchenko, et al., 1996, Anal. Chem. 68:850-858)によって染色した。PauAバンドを切り出し、ゲル切片をDTTで還元し、アクリルアミドでアルキル化し、50%アセトニトリル/NH₄HCO₃中で洗浄し、そして真空乾燥した。ゲル切片は体積50μlで0.1μgの改変トリプシン(Promega, Madison, WI)で処理し、37°Cで一晩インキュベーションした。トリプシン切断由来のペプチドは150μlの60%アセトニトリル/NH₄HCO₃中で超音波処理して二度抽出し、次に1×250mm Vydac C₁₈カラム(Nest Group, Inc., Southboro, MA)上でのRP-HPLCによって分離した。220nm吸光のペプチドのピークが回収され、ABI 494タンパク質シーケンサーによる解析に供された。得られたアミノ酸配列はSEQ ID NO:5からSEQ ID NO:12として示す。Pep-1(SEQ ID NO:5)およびPep-2(SEQ ID NO:6)はN末端配列決定で得られ、一方Pep-3からPep-8(SEQ ID NO:7からSEQ ID NO:12)は精製されたPauAのトリプシン酵素処理の結果得られた。

【0118】

1.2. S. uberisからの染色体DNAの単離

S. uberis系統c216および95-140は、それぞれ100mlの静的脳心臓浸出ブロス(BHI, Difco, Detroit, MI)中において37°Cで24時間保温され、そしてその後回収した(7,700×g、20分)。湿った細胞ペレットは、使用まで-20°Cにて保存された。細胞は、湿った細胞ペレットの5ml Tris-HCl (10 mM)/EDTA (1 mM)(TE)における再懸濁により洗浄し、回収し(2,000×g、15分)、そして2mlのTEに再懸濁した。洗浄された細胞は、65°Cにて20分間加熱処理され、-20°Cにて一晩冷凍され、その後250U ムタノリシン(mutanolysin, Sigma)、100mg リゾチーム(Sigma)、および50μg RNアーゼA(Sigma)の添加、および37°C、105分間のインキュベーションにより溶解された。プロテナーゼK(500μg)(Sigma)が添加され、かつ溶解を完全にするための終濃度2%(w/v)のSDS添加まで、さらに3時間インキュベーションは続行された。溶解された細胞は、37°Cにてさらに30分間インキュベーションし、トリス飽和フェノールにより1回抽出し、そしてフェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール(25:24:1)により2回抽出した。染色体DNAは、2.5倍体積の100%エタノールおよび0.1倍体積の3M NaAc(pH 5.2)の添加、-20°Cにおける24時間の冷却、および遠心分離(15,000×g、15分、4°C)によるペレット化により沈澱させた。DNAは、70%エタノールによりすすぎ、乾燥し、TEに再懸濁し、かつ260nmの吸光度により定量化した。

【0119】

1.3. S. uberis由来pauA遺伝子の部分クローニング

縮重オリゴヌクレオチド(図1)は、精製されたS. uberis PauAのアミノ酸配列を基に設計された。オリゴヌクレオチドRA9(SEQ ID NO:14)は、Pep-1(SEQ ID NO:5)のアミノ酸11-18をコードするpauA遺伝子の部分にハイブリッド形成するように設計された。オリゴヌクレオチドER35(SEQ ID NO:15)およびER36(SEQ ID NO:16)は、Pep-5内部配列(SEQ ID NO:9)のアミノ酸13-5をコードするpauA遺伝子の部分にハイブリッド形成するように設計され、そして縮重の度合において異なっている。

【0120】

pauA 遺伝子断片の PCR 増幅のため、1 × PC2 緩衝液 (Ab Peptides, Inc., St. Louis, MO)、200 μM の各デオキシ-NTP、100 pmol の各プライマー、7.5 U KlenTaq1 (Ab Peptides)、および 0.15 U クローン化 Pfu (Stratagene, La Jolla, CA) 温度安定性ポリメラーゼを含む 50 μl 反応物において、オリゴヌクレオチド RA9 (SEQ ID NO: 14) は、単独で、または、ER35 (SEQ ID NO: 15) または ER36 (SEQ ID NO: 16) と同時に用いられた。DNA 鋳型は、S. uberis 系統 c216 または系統 95-140 より精製された染色体 DNA 500 ng であった。増幅は下記のように行われた：すなわち、変性 (94 にて 5 分)；変性 (95 にて 30 秒)、アニーリング (60 にて 1 分)、および重合 (72 にて 2 分) を 1 サイクルとして 30 サイクル；それに続く 72、7 分間の最終伸長により行う。

10

【0121】

増幅された産物は、2% (w/v) NuSieve GTG アガロースゲル (FMC Bioproducts, Rockland, ME) における分離により可視化された。S. uberis 系統 c216 由来の DNA を鋳型とし、RA9 (SEQ ID NO: 14) のみを用いた反応の結果、明瞭な 640 bp 産物が増幅された。PCR 反応において S. uberis 系統 c216 または系統 95-140 由来の染色体 DNA を鋳型とし、RA9 (SEQ ID NO: 14) を ER35 (SEQ ID NO: 15) または ER36 (SEQ ID NO: 16) と同時に用いた際には、640 bp および 560 bp の 2 つの産物が常に増幅された。このデータは、縮重オリゴヌクレオチド RA9 (SEQ ID NO: 14) が、pauA 領域内部への結合能を有し、そして、その結合部位は Pep-5 (SEQ ID NO: 9) の C-末端側、すなわち ER35 (SEQ ID NO: 15) および ER36 (SEQ ID NO: 16) の標的結合領域へ向けられていることを示唆した。

20

【0122】

S. uberis 系統 c216 由来 DNA および RA9 (SEQ ID NO: 14) (640 bp)、または、RA9 (SEQ ID NO: 14) および ER35 (SEQ ID NO: 15) (640 および 560 bp) を用いた反応により得られた PCR 産物を、さらに解析した。プライマーのペア RA9/ER35 による S. uberis 系統 95-140 由来 DNA の増幅により得られた PCR 反応産物 (640 および 560 bp) も、これらの系統の pauA 領域が類似しているかどうかを決定するために解析された。S. uberis 系統 c216 由来の 640 bp および 560 bp の産物、および S. uberis 系統 95-140 由来の 640 bp の産物は、適切な制限エンドヌクレアーゼ (KpnI (RA9)、または、KpnI および BamHI (RA9/ER35)) による PCR 産物の消化の後に、それぞれ pUC18 にクローニングされた。得られたプラスミドの配列解析により、RA9 (SEQ ID NO: 14) の二次的結合部位は、オリゴヌクレオチド ER35 (SEQ ID NO: 15) の結合部位 (内部 Pep-5 の 3' 末端側 (SEQ ID NO: 9) のアミノ酸 135) に位置することが確認された。さらに、S. uberis 系統 c216 および系統 95-140 より増幅された 640 bp の DNA 断片内部の 360 ヌクレオチド領域の比較は、これら 2 系統由来の部分 pauA 遺伝子の間には、非常に高い (99.2%) ヌクレオチド相同性があることが示された。配列の解析は、pauA の ORF 内部における EcoRI、HindIII、SpeI、および SalI に対する制限エンドヌクレアーゼ部位の存在を示し、従って、特異的な制限断片に位置する pauA 領域全体を得るために設計されるプラスミドゲノムライブラリーの構築における、これらの酵素の利用を排除する。

30

40

【0123】

1.4. プラスミドゲノムライブラリーの構築およびスクリーニング

S. uberis 系統 c216 由来および系統 95-140 由来の 10 μg の染色体 DNA を、それぞれ制限エンドヌクレアーゼ BglII により 37 にて 8 時間消化し、フ

50

エノール/クロロホルム(24:1)により抽出し、そして-20にて保存した。1 μ gのプラスミドベクターDNA(pUC18)は、BamHIによる消化、および提供者(New England Biolabs, Beverly, MA)の推奨するウシ腸管ホスファターゼを用いた脱リン酸化により調製された。線状で脱リン酸化されたベクター(0.5 μ g)は、提供者(Gibco BRL, Gaithersburg, MD)により推奨されるように、5 μ gのBglII消化染色体DNAにライゲーションし、そしてE. coli DH5細胞(Max Efficiency)を形質転換するために利用された。

【0124】

PauA活性の検出を容易にするため、スキムミルク寒天プレートアッセイが用いられた。E. coli中のライブラリスクリーニングのため、プレートアッセイ材料は、脱脂粉乳(1% w/v; Oxoid(登録商標))、ウシプラスミノゲン(0.015 U/ml; Sigma カタログ番号 P-9156)、およびアンピシリン(100 μ g/ml; Sigma)を添加したBHI寒天(Gibco)を含んだ。ライブラリスクリーニングは、pUC18のラクトース・プロモーターを誘導するために、これらのプレートにさらに0.1 mM IPTGを添加したものを用いても行われた。このプレートアッセイでは、対照プレートからプラスミノゲンを除去することにより、非特異的なプロテアーゼ活性とプラスミノゲン依存性のPauA活性とを区別することが可能である。この改変は、ライブラリスクリーニングにおいて得られる、陽性と予想されるクローンに関して、プラスミノゲン依存的なスキムミルクの分解を確認するために用いられた。

【0125】

上述のスキムミルクプレートにおいて分解領域を形成する形質転換E. coli系統DH5の単離株は、さらなる解析のために選択された。図2は、S. uberis系統95-140由来DNAにより形質転換され、上記のように単離株の一例を示す。S. uberis系統c216由来DNAを含む1単離株、および、S. uberis系統95-140由来DNAを含む1単離株が選択され、単一に精製され、そして、個々のコロニーをプラスミノゲンを含まないスキムミルクプレート上で成長させても分解領域を形成できないことにより、それらのプラスミノゲン依存的PauA活性の発現能が確認された。プラスミノゲン依存性は、単離株それぞれを、アンピシリン(100 μ g/ml)を含むLuriaブロス(Difco)において成長させ、その後、濾過しない培養液の上清の一部を、0.015 U/mlウシプラスミノゲンの存在下または非存在下でスキムミルク(1% w/v)を添加したTodd-Hewitt寒天(Becton-Dickinson and Co., Cockeysville, MD)上にスポットすることにより確認された。これらの単離株は、S. uberis系統c216由来PauAを発現する系統Pz318、およびS. uberis系統95-140由来PauAを発現する系統Pz319と表記され、それぞれに対応するプラスミドはpER318およびpER319と表記された。

【0126】

1.5. pauAコード領域の予備的解析

S. uberis系統c216由来PauAをコードする遺伝子の一部分に対応し、PCRにより増幅された640bp内部DNA断片のヌクレオチド配列解析に基づき、ライブラリスクリーニングにより得られたプラスミドの挿入配列の同一性を、PCRにより確認した。従って、pER318およびpER319は、pauA由来プライマーRA9(SEQ ID NO:14)のみ、または、それをER37(SEQ ID NO:17)またはER40(SEQ ID NO:19)と同時に用いたPCRにおける鋳型として用いた。50 μ lの反応混合液は、1xPC2緩衝液、200 μ Mの各dNTP、100pMの各プライマー、7.5 U KlenTaq1、および0.15 U クロニン化Pfuポリメラーゼを含んだ。合成は下記の通り行われた。変性(94にて5分); 変性(95にて30秒)、アニーリング(60にて1分)、および重合(72にて2分)を1サイクルとして30サイクル; それに続く72、7分間の最終伸長によ

り行う。すべての反応において、予想される640bp(RA9による増幅)、500bp(RA9/ER37による増幅)、および300bp(RA9/ER40による増幅)に対応する産物の増幅に成功し、これらのDNA断片は、pauA遺伝子の既知の部分配列により予想されるものであった。このデータは、pER318およびpER319の内部に存在する挿入配列が、機能活性を有するPauAをコードすることができることを強く示唆した。

【0127】

S. uberis系統c216および系統95-140それぞれのpauA領域の構造をより完全に決定するため、プラスミドpER318およびpER319は、Advanced Genetic Analysis Center, St. Paul, MN.において自動DNA配列分析機(ABI Model 377; Applied Biosystems)に供された。オリゴヌクレオチドER40(SEQ ID NO:19)およびER42(SEQ ID NO:21)は、過去に決定された部分pauAヌクレオチド配列に由来し、そしてこの640bp領域より外側の配列決定のために用いられた。640bpの部分遺伝子配列と組み合わせた場合、このさらなる配列決定の結果、pauA ORF全長だけにとどまらず、クローン化されたpauA遺伝子に直接隣接する領域の予備的な配列決定がなされた。さらに、ベクター特異的M13フォワードおよびリバースプライマーが、クローン化S. uberis DNA領域の終点を決定するために用いられた。図3に示されたように、これらの配列解析は、Streptococcus pneumoniae HexAおよびHexBタンパク質に高い相同性を示すタンパク質をコードする遺伝子が、pER318およびpER319にクローン化された挿入配列の内部に存在することを示した。HexAおよびHexBタンパク質は、それぞれ、いくつかの原核生物種およびヒトを含む真核生物種に広く存在するMutSおよびMutL相同物と比較して高度に保存されている。HexAおよびHexBタンパク質は、S. pneumoniaeでの形質転換およびDNA複製の過程におけるミスマッチDNA修復において機能している。興味深いことに、HexAは、E. coliにおいて過剰発現された場合には、優性陰性表現型(dominant negative phenotype)を付与し(Prudhomme, et al., 1991, J. Bacteriol. 173: 7196-7203)、従って自然発生的突然変異率の増加を引き起こす。

【0128】

1.6. S. uberis pauA遺伝子の特異的PCR増幅

PCRにより増幅されたpauAの640bp領域、および、プラスミドpER318およびpER319を用いたこの領域の外側配列の決定の両方による予備的な配列決定の結果は、S. uberis染色体DNAから直接正常のpauA遺伝子の特異的に増幅するための、オリゴヌクレオチド・プライマーの設計のために用いられた。このアプローチは、E. coliにおける正常pauAのクローニングの過程において発生する可能性のある突然変異による、配列エラーの導入を排除する要求に基づくのが好ましい。このことは、他で報告されたように(Estrada, et al., 1992, BioTechnol. 10: 1138-1142)E. coliにおける他の正常ストレプトキナーゼの既知の毒性、および、E. coli中で発現された場合にHexAが示すと報告された優性陰性表現型(ミューター表現型)(Prudhomme, et al., 1991, 上記)の観点から特に考慮されたものである。

【0129】

従って、正常pauA遺伝子に隣接する、オリゴヌクレオチドER45(SEQ ID NO:24)およびER46(SEQ ID NO:25)が、S. uberis系統c216および95-140からPauAをコードする1.18kb領域を特異的に増幅するために用いられた。PCR増幅は、それぞれの系統につき3回行われた。反応混合液は、200ngの精製染色体DNA、1xPC2緩衝液、200μMの各dNTP、100pMolのプライマーER45(SEQ ID NO:24)、100pMolの

プライマー ER46 (SEQ ID NO: 25)、および 7.5 U KlenTaq1、および 0.15 U クローン化 Pfu 温度安定性ポリメラーゼを、100 μ l の最終試料体積中に含んだ。増幅は下記の通り行われた。変性 (94 にて 5 分); 変性 (95 にて 30 秒)、アニーリング (50 にて 1 分)、および重合 (72 にて 2 分) を 1 サイクルとして 30 サイクル; それに続けて、標的である正常 pauA 遺伝子領域の増幅を完結させるための、72、7 分間の最終伸長を行った。増幅に引き続き、3 回の試料それぞれより等量の一部 (70 μ l、2.8 μ g) がプールのし、そしてアガロースゲル電気泳動およびグラスミルク・マトリックス (GeneClean (登録商標)、Bio 101、LaJolla、CA) による抽出により 1.18 kb の産物が精製され、それについて、ABI 自動 DNA 配列決定機 (Lark Technologies Inc.、Houston、TX) によるダイデオキシ終止反応 (Dye Deoxy termination) を用いた直接配列解析が行われた。合成オリゴヌクレオチド・プライマー AP1 (SEQ ID NO: 13)、ER37 (SEQ ID NO: 17)、ER39 (SEQ ID NO: 18)、ER40 (SEQ ID NO: 19)、ER41 (SEQ ID NO: 20)、ER42 (SEQ ID NO: 21)、ER43 (SEQ ID NO: 22)、ER45 (SEQ ID NO: 24)、および ER46 (SEQ ID NO: 25) (図 1) が、S. uberis 系統 c216 および 95-140 由来の増幅産物の両 DNA 鎖の配列決定のため用いられた。S. uberis 系統 c216 由来の 1.18 kb 領域のヌクレオチド配列は、SEQ ID NO: 1 として示されている。S. uberis 系統 95-140 由来の 1.18 kb 領域のヌクレオチド配列は、SEQ ID NO: 3 として示されている。

【0130】

1.7. pauA ORF の分子解析

S. uberis 系統 c216 の pauA ORF は、SEQ ID NO: 1 のヌクレオチド 120 から 980 まで伸長し、これは SEQ ID NO: 2 に示されたように推定 286 アミノ酸のタンパク質をコードし、理論的に約 33,419 ダルトンの分子量を有する。S. uberis 系統 95-140 の pauA ORF は、SEQ ID NO: 3 のヌクレオチド 121 から 981 まで伸長し、これは SEQ ID NO: 4 に示されたように異なる推定 286 アミノ酸のタンパク質をコードする。N-末端配列解析に基づくと、両アミノ酸配列のアミノ酸 1-25 は、天然 PauA の成熟の過程で除去されるようである。上記の 25 アミノ酸からなるペプチド (2,767 Da) が、疎水性でかつ正電荷を有し、これはシグナル配列の特徴である (Von Heijm, 1985, J. Mol. Biol. 184: 99-105) という観察結果は、このことと合致する。予想される両方向転写ターミネーター (図 4) が、系統 c216 の配列 (SEQ ID NO: 1) における、逆方向 pauA および HexA ORF 群の間のヌクレオチド 978-1,088 に位置する。このステム-ループ構造 (stem-loop structure) の基礎を形成すると予想される、逆方向対称的な領域が、ヌクレオチド 1,015 から 1,032 まで、および 1,054 から 1,071 まで伸長する。さらに、ほぼ同一の両方向転写ターミネーターと予想されるものが、系統 95-140 の配列における、逆方向 pauA および HexA ORF 群の間のヌクレオチド 979-1,089 に位置する (SEQ ID NO: 3)。このステム-ループ構造の基礎を形成すると予想される、逆方向対称的な領域は、ヌクレオチド 1,016 から 1,033 まで、および 1,055 から 1,072 まで伸長する。対応する mRNA における、これらのステム-ループ構造の会合に関して算出された自由エネルギーは、約 -19 kcal である (Tinoco, et al., 1973, Nature New Biol. 246: 40-41)。

【0131】

配列解析は、1.18 kb 断片領域内部における S. uberis 系統 c216 および 系統 95-140 の間の高いヌクレオチド相同性を示す。この領域における、ヌクレオチドとコードされるアミノ酸との間の相違点は、下記の表 1 に要約されている。

【0132】

【表1】

表1

DNA 塩基番号	系統		タンパク質	系統	
	c 216	95-140	アミノ酸番号	c 216	95-140
120	-a	T	-b	-	-
336	G	A	73	D	N
463	A	G	115	Q	R
490	A	G	124	Q	R
751	T	G	211	L	R
838	A	C	240	Q	P
843	C	G	242	H	D
896	A	G	-	-	-
982	G	T	-	-	-
1043	C	A	-	-	-
1090	G	A	-	-	-

10

20

a : 1塩基の挿入/欠失が p a u A の A T G 開始コドンのすぐ上流に存在する

b : ヌクレオチドの変化は推定 O R F 内部においては影響がないか、または存在しない。

【0133】

実施例2 : E . c o l i における組換え P a u A の発現

2.1. 発現プラスミドの構築

オリゴヌクレオチド・プライマー E R 4 3 (S E Q I D N O : 2 2) および E R 4 5 (S E Q I D N O : 2 4) (図 1) は、 S . u b e r i s 系統 9 5 - 1 4 0 由来の P a u A タンパク質全長をコードするヌクレオチド配列全体を特異的に増幅するために設計された。この配列は、上述 6 . 7 節に記載された天然の転写ターミネーターと予想される領域、および H e x A 遺伝子の短い 3 ' 部分 (S E Q I D N O : 3 、ヌクレオチド 1 2 1 - 1 , 1 8 1) をも含む。さらに、プライマー E R 4 4 (S E Q I D N O : 2 3) および E R 4 5 (S E Q I D N O : 2 4) が、シグナル配列をコードすると予想される部分 (アミノ酸 1 - 2 5) を欠く、 p a u A 遺伝子の 5 ' 短縮部分を特異的に増幅するために用いられた。この短縮 DNA 断片は、ヌクレオチド 1 9 6 から 1 , 1 8 1 まで伸長する共通 3 ' 領域を含むが、引き続き E . c o l i における発現により、細胞質局在 P a u A タンパク質をコードすると予想される。 P C R 増幅は、それぞれ 1 0 0 μ l 反応物において、 2 0 0 n g の S . u b e r i s 系統 9 5 - 1 4 0 由来の精製染色体 DNA を用いて 3 回行われた。試料はまた、 1 x P C 2 緩衝液、 2 0 0 μ M の各 d N T P 、 1 0 0 p M o l の各プライマー、 7 . 5 U K l e n T a q 1 ポリメラーゼ、および 0 . 1 5 U クローン化 P f u ポリメラーゼを含んだ。増幅条件は、下記の通りであった：変性 (9 4 にて 5 分) ; 変性 (9 5 にて 3 0 秒) 、アニーリング (5 0 にて 1 分) 、および重合 (7 2 にて 2 分) を 1 サイクルとして 3 0 サイクル ; それに続けて、 7 2 、 7 分間の最終伸長を行った。

30

40

【0134】

E R 4 3 (S E Q I D N O : 2 2) および E R 4 5 (S E Q I D N O : 2 4) 、または E R 4 4 (S E Q I D N O : 2 3) および E R 4 5 (S E Q I D N O : 2 4) を用いたいずれかの増幅の後にも、 3 回の試料は、それぞれ反応混合液 7 μ l ずつを

50

合わせ最終体積 21 μ l として個別に保存された。合成 DNA 断片は、1% (w/v) アガロースにおいて分離され、そして 1,001 bp (ER44/ER45) および 1,073 bp (ER43/ER45) 産物が精製された (JetSorb (登録商標), Genomed, Research Triangle Park, NC)。精製された DNA を KpnI および XbaI にて消化した後、約 0.3 μ g の断片は、KpnI および XbaI にて切断され、脱リン酸化された pEA181 ベクター DNA にライゲーションされた。組換えプラスミドは、Hanahan の方法 (1983, J. Mol. Biol. 166:557) により E. coli TAP56 コンピテント細胞 (Pfizer in-house 系統) に形質転換した。細胞は 1ml の SOC 培地 (Gibco BRL) において 30 分にて 75 分間培養した。形質転換体は、温度感受性 cI857 リプレッサーの不活性化に起因する P_L プロモーターの誘導を防止するため、30 分以下にて培養され、維持された。この方法により単離された 2 系統は、組換え PauA の発現を保持していた。系統 Pz330 は、プラスミド pER330 を保持し、それはプライマー ER43/ER45 による染色体 DNA の増幅の結果である pauA 遺伝子全長を発現する。系統 Pz332 は、プラスミド pER332 を保持し、それはプライマー ER44/ER45 による増幅の結果である、短縮 (シグナルペプチドが除去された) pauA 遺伝子を発現する。

10

【0135】

さらなる実施例として、プライマー ER43/ER45 または ER44/ER45 を用いた、S. uberis 系統 95-140 由来染色体 DNA の増幅の結果である PCR 産物は、PstI および XbaI にて消化された後、pUC19 の LacZ ペプチドにイン・フレームでクローニングされた。得られたプラスミドは、pER326 および pER328 と表記されるが、それぞれ全長および短縮型 (シグナルペプチドが除去された) PauA をコードし、そして E. coli DH5 に導入され、それぞれ系統 Pz326 および Pz328 を構成した。

20

【0136】

2.2. 組換え PauA (rPauA) の発現

上述の 7.1 節に記載された 4 系統について、全長組換え PauA タンパク質 (rPauA) (即ち、シグナル配列を含む) (Pz326、Pz330)、またはシグナル配列を欠く rPauA (Pz328、Pz332) のいずれかの発現能が試験された。各系統の一晩前培養液は、アンピシリン (100 mg/L) またはカナマイシン (50 mg/L) を含む Luria プロスのフラスコにおいて振盪培養され、その後新鮮な成長培地にて 1:10 に希釈された。4-6 時間の後に、培養液は 0.5 mM IPTG の添加 (Pz326、Pz328)、または 30 から 42 への温度変化 (Pz330、Pz332) のいずれかにより誘導を受けた。組換えタンパク質の発現誘導は、細胞の回収に先立ち 2 時間行われた。全細胞ペレットが回収され、Laemmli 溶解緩衝液に再懸濁され、そして溶解物は SDS-PAGE およびウエスタン・プロットにより解析された。S. uberis 系統 95-140 の細胞ペレットは、BHI プロス培養液による 22 時間の培養の後に同様に得られ、そして比較のためウエスタン・プロットにより解析された。

30

40

【0137】

誘導前および誘導後の全細胞ペレット試料は、14% ポリアクリルアミドゲルにおいて分離され、そしてクーマシー・ブリリアント・ブルーにより染色されるか (図 5)、または S. uberis 系統 c216 由来の天然 PauA に対して作製されたマウス・モノクローナル抗体 EC-3 によるウエスタン・プロットにより解析された (図 6) (Mab EC-3 の詳細に関しては WO 93/14209 を参照)。示された実施例は、発現に関しては最適化されていないものの、全長およびシグナル配列欠損型 rPauA 双方の有意な生成が、形質転換された E. coli 系統 Pz330 および Pz332 をそれぞれ用いて、42 時間のインキュベーション後に得られた。系統 Pz330 において低い割合で切断型 rPauA が検出されたこと (図 6、レーン 7) から、S. uberis pa

50

u A の異種シグナル配列が、E. coli の分泌装置により認識され、そして切断されることが示唆される。しかしながら、Pz 330 における組換えタンパク質の発現誘導が、細胞増殖に有害であったことから、r Pau A 全長の過剰発現が、異種の宿主である E. coli における通常の分泌過程を阻害した可能性があることが示唆される。

【0138】

2.3. r Pau A の酵素活性

r Pau A の活性は、以下に記載されたように、ウシプラスミノゲンの活性化を測定する発色アッセイを用いて決定された。上述の E. coli 培養液 (Pz 326、Pz 328、Pz 330、Pz 332) および S. uberis 系統 95-140 の全細胞ペレットの一部が解析された。活性は異種宿主において発現される組換えタンパク質の相対量と合致した。最高力価は系統 Pz 332 より得られた (表 2)。

10

【0139】

【表 2】

表 2

系統	OD ₆₅₀ ^a	力価 ^b
S. uberis 95-140	0.274	1.0
Pz 326	0.811	23.3
Pz 328	0.579	5.3
Pz 330	0.240	1.0
Pz 332	0.396	>128

20

a : E L I S A プレートにおける第一希釈試料の吸光度

b : 本文に記載された方法により算出された力価。

【0140】

発色アッセイは、下記の通り行われた。発色アッセイに用いた緩衝試薬は、T T 緩衝液 (0.1% Tween 80、50 mM Tris-HCl、pH 8.0) および Na T 緩衝液 (1.77 M NaCl、52 mM Tris-HCl、pH 7.0) を含む。これらの緩衝液は、室温において安定であり、そして使用に先立ち 1 か月まで保存できると思われる。ウロキナーゼのワーキングストック (Sigma カタログ番号 U-8627) は、水への再溶解により調製され、-70 にて保存された。冷凍ワーキングストックの濃度は 0.51 U/ml であり、そして T T 緩衝液を用いて 1:10 に希釈され、0.051 U/ml の開始濃度とされた。ウシプラスミノゲン (Sigma カタログ番号 P-9156) は、Super Q 水により 1.5 U/ml となるように溶解され、-70 にて保存された。基質は、D-Ile-Phe-Lys p-ニトロアニリド (Sigma カタログ番号 I-6886) および D-Val-Leu-Lys p-ニトロアニリド (Sigma カタログ番号 V-0882; Fluka カタログ番号 94680、Fluka Chemical Corp., Ronkonkoma, NY) を含んだ。これらの基質のワーキングストック溶液は、水への溶解により 1 mg/ml に調製され、-70 にて保存された。

30

40

【0141】

Immulon 2 アッセイプレート (Dynatech Laboratories, Inc., Chantilly, VA) は下記の通り調製された。T T 緩衝液 (20 µl) およびウシプラスミノゲン (20 µl) は、Immulon 2 プレートへ事前に分注された。V 底プレート (Dynatech Laboratories, Inc.) において、T T 緩衝液 (ウェル当り 50 µl) は B-H 列に添加された。培地対照、陽性対照、および試料は、A 列に添加された。試料、培地対照、および陽性対照は、すべてデュプリケートのウェル中で行った。100 µl の対照または 100 µl の試料いずれ

50

かが適切なウェルへ添加され、その後、プレートの後列へ向けて段階的に希釈され、最後の列からは50 μ l捨てた。事前に分注したTT緩衝液およびウシプラスミノゲンを含む、対応するImmulon 2プレートへ、V底プレートの各ウェルから10 μ lを移動した。プレートは蓋をされ、よく混合され、そしてウシプラスミノゲンを活性化させるため、37 にて2時間インキュベーションされた。アッセイ対照は、ウロキナーゼが介在するウシプラスミノゲンの活性化により構成した。

【0142】

基質(D-Val-Lys-p-ニトロアニリド、およびD-Ile-Phe-Lys-p-ニトロアニリド)は室温まで加温された。アッセイ基質は、ストック基質を、NaT緩衝液を用いて400 μ g/mlに希釈すること(1:2.5希釈)により調製され、そして100 μ l/wellのアッセイ基質溶液が添加され、そしてプレートは蓋をされ、混合された。その後プレートは37 にて2分間インキュベーションされた。活性型PauAは、プラスミノゲンのプラスミンへの変換を触媒し、次にそれはp-ニトロアニリドから3量体ペプチドを切断し、これをA₄₀₅により測定する。

10

【0143】

プレートは、SoftMax Pro Ver. 1.2.0ソフトウェア(Molecular Devices Corp.)を用いたELISAプレート読取機(Molecular Devices Corp., Palo Alto, CA)を用いて読み取られた。アッセイプレート試料は、混合され、405 nmにおける吸光度が決定された。妥当な試験は、A₄₀₅が1.30から1.50 O.D.である陽性対照を示す。

20

【0144】

力価(希釈係数の逆数)の算出のため、希釈系列試料は、希釈率を対数軸にとった離散プロット・グラフを用いてグラフ化された。試料が、陽性対照に基づくカットオフ値と交差する点が真の力価として算出された。カットオフ値を決定するため、陽性対照(0.051 U/ml)の平均O.D.の50%が用いられた。例えば、もし試料が0.007においてカットオフ線と交差したとすれば、その希釈係数は1/142.86となり、そしてその力価は142.86と表現されるであろう。さらに、もし試料が0.015においてカットオフ線と交差したとすれば、その希釈係数は1/66.67となり、そしてその力価は66.67であろう。

30

【0145】

実施例3: PauAペプチド断片の酵素学および免疫学的評価

30

3.1. 組換えGST-PauAペプチドの発現

オリゴヌクレオチド・プライマーER74(SEQ ID NO: 26)およびER75(SEQ ID NO: 27)が、コードされるPauAのアミノ酸27-286を含む領域をコードするpauA遺伝子を特異的に増幅するために設計された。この領域は、成熟型(分泌される)PauAのアミノ酸2-261に対応する。PCR合成は、各100 μ l反応物中で250 ngの精製されたS. uberis系統95-140染色体DNAを用いて、2回行われた。試料はまた、1xPC2緩衝液、200 μ Mの各dNTP、100 pMolの各プライマー、7.5 U KlenTaq1ポリメラーゼ、および0.15 U クロニン化Pfuポリメラーゼを含んだ。増幅条件は以下の通りであった: 変性(94 にて5分); 変性(95 にて30秒)、アニーリング(60 にて30秒)、および重合(72 にて1分)を1サイクルとして30サイクル; それに続けて、72、7分間の最終伸長を行った。増幅後に、両試料は混合され、そして815 bp断片が精製された(QiaQuick(登録商標)キット、Qiagen、Santa Clarita, CA)。精製DNAのXhoIおよびNotIによる消化後に、断片はpGEX5x-2またはpGEX5x-3ベクターDNA(Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, NJ)にクローン化された。得られた組換えプラスミドであるpER354およびpER355は、それぞれ、発現ベクターのN-末端にコードされるグルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)コード領域とずれた読み枠に位置する、S. uberis 95-140においてコードされるPau

40

50

Aのアミノ酸27-286コード領域(SEQ ID NO:4を参照)を含んだ。

【0146】

プラスミドpER354は、成熟型PauAのCOOH-末端領域を欠失するように改変されると同時に、ベクターにコードされるGST配列との融合点における読み枠を復元した。成熟型PauA、または成熟型PauAのN-末端断片(即ち、カルボキシル末端欠失型)のいずれかを生成するプラスミドは、XmaIおよびAgeIによりpER345を消化し、GST-PauA融合点におけるフレームの第一の修復により構築され、pER346を作製した。このプラスミドは、コードされるPauAのアミノ酸28-286に翻訳的に融合され、26kDaのGSTペプチドを発現し、そしてその産物は成熟型PauAと表記される。成熟型PauAのCOOH-末端の欠失は、このプラスミドをさら

10

【0147】

プラスミドpER355はさらに、PauAのNH₂-またはCOOH-末端領域のいずれかを欠失するように改変すると同時に、ベクターにコードされるGST配列との融合点における読み枠を復元された。NH₂-末端欠失は、SalIのみ、またはSmaIおよびNruIによるpER355の処理に続いて、GST-PauA融合結合を修復するために再びライゲーションすることにより作製された。得られたプラスミドであるpER358およびpER359は、コードされるPauAのそれぞれアミノ酸104-286および172-286と融合したGSTペプチドを発現する。続いて、PauA内部ペプチド断片を有する2種のプラスミドが、pER358をNruIまたはHindIIIによる処理に続いてNotI消化、Klenow処理、および再ライゲーションすることにより生成された。これらの組換えプラスミドpER366およびpER367は、コードされるPauAのそれぞれアミノ酸104-170および104-208と融合したGSTペプチドを発現する。最後に、短いPauA断片(コードされるPauAのアミノ酸172-208)と融合したGSTを発現することができるプラスミドが、pER359を

20

30

【0148】

【表3】

表3

プラスミドまたは系統 ^a	PauAペプチド断片 ^b	アミノ酸番号 (PauA)	概算分子量 ^c kDa
pER356	28-286	259	30.5
pER363	28-103	76	8.8
pER364	28-170	143	16.7
pER365	28-208	181	21.1
pER358	104-286	183	21.7
pER359	172-286	115	13.7
pER366	104-170	67	7.9
pER367	104-208	105	12.3
pER368	172-208	37	4.3

10

a : 系統表記は、プラスミド番号に先立つ P z を p E R に置換したことを除き、プラスミドと同一である

20

b : アミノ酸番号は、S E Q I D N O : 4 に示された、コードされる P a u A タンパク質のものに対応する

c : 融合タンパク質における P a u A 部分の分子量を示す。G S T は ~ 2 6 k D a である。

【0149】

pER363によりコードされるものを除くすべてのG S T - P a u A 融合タンパク質は、E . c o l i において発現され、そして製造者 (P h a r m a c i a) により推奨される方法によりアフィニティー・クロマトグラフィーにて精製された。pER363によりコードされるタンパク質の発現は、E . c o l i において封入体 (i n c l u s i o n b o d y) 形成を引き起こすため、これらのタンパク質集合体は、続くリゾチームによる細胞分解により精製された。細胞は氷上において10分間インキュベーションされ、次に10倍体積の2 x R I P A / T E T (5 : 4 v / v) が添加された。2 x R I P A は、20 mM T r i s (p H 7 . 4)、0 . 3 M N a C l、2 % デオキシコール酸ナトリウム、および2 % (v / v) I g e p a l C A - 6 3 0 を含む。T E T 緩衝液は、0 . 1 M T r i s (p H 8 . 0)、50 mM E D T A、および2 % (v / v) T r i t o n X - 1 0 0 を含む。懸濁された細胞混合物は、ボルテックスされ、そして氷上において5分間インキュベーションされ、その後懸濁物の粘性がなくなるまで超音波処理された。封入体は遠心分離 (1 5 , 0 0 0 X g、20分間) により回収され、水に再懸濁され、そして - 8 0 にて保存された。

30

【0150】

3.2. タンパク質切断分解による P a u A 断片の生成

約13mlのS . u b e r i s 系統95 - 140から精製した天然P a u A (ロット番号9700710A) (0.55 mg/ml) は、50 mM T r i s に対して、p H 8 . 8、4 にて透析された。停留物は、Y M 1 0 膜および攪拌された細胞 (s t i r r e d c e l l) を用いて ~ 2 . 5 ml にまで濃縮された。タンパク質の終濃度は2 . 6 4 mg/mlであった。この濃縮物は、120Uのトロンピン (B o e h r i n g e r I n g e l h e i m) により室温にて3日間処理され、そしてその消化物は - 2 0 にて冷凍された。消化物からの ~ 16 k D a 断片の精製は、2mlの消化物を注入したS u p e r d e x 7 5 カラム (1 6 / 6 0) (P h a r m a c i a) により達成された。適切な画分がS D S - P A G E 解析に基づき回収され、保存された。2.5mlにおけ

40

50

るタンパク質の終濃度は0.165 mg/mlであった。N-末端配列分析により、16 kDaのペプチドはPauAのカルボキシル末端部分の半分を有することが確認された。得られた配列(KRVEEPIHP)(SEQ ID NO:28)は、Suberis系統95-140においてコードされるPauAのリジン149から開始されていた。従って、このタンパク質分解に由来するペプチドは、PauA¹⁴⁹⁻²⁸⁶と表記される。

【0151】

3.3. PauAペプチド断片の酵素学的活性

表3に記載された9種のGST-PauA融合タンパク質、および上述8.2節に記載されたPauAタンパク質分解断片(PauA¹⁴⁹⁻²⁸⁶)の酵素学的活性は、主として上述7.3節に記載された発色アッセイを用いて、天然PauAと比較された。精製されたGST-PauA²⁸⁻²⁸⁶融合タンパク質(力価=3448)の酵素学的活性は、残存するPauAペプチド断片が酵素活性を欠損していたにもかかわらず、天然PauA(力価=3256)の活性と類似していた。力価を、精製されたタンパク質調製物中に存在するPauA特異的タンパク質量で割ることにより、PauA特異的活性が算出された。この補正が行われた場合、天然PauAに対する特異的活性は5.9発色単位/μgであり、そしてGST-PauA²⁸⁻²⁸⁶の特異的活性は1.4であった。このデータは、組換えにより生成されたGST-PauAは、精製された天然PauAに比べ酵素学的にやや低い活性しか示さないにもかかわらず、前者は実際有意な酵素活性を示すことを示唆する。

【0152】

3.4. マウスにおける免疫反応の特性

3.4.1. PauAペプチド断片によるマウスの免疫化

上述のように調製されたPauAペプチド断片の免疫原性を評価するため、ワクチン化に関するマウスモデル系が用いられた。端的には、10匹の雌Balb/cマウス(16-18g)を含む実験グループが、0、21、および42日目に免疫化された。血液試料は、実験0、21、35、および56日目に得られた。これらの試料由来の血清は、実験グループ毎に収集され、そして固相精製天然PauAに対するELISA反応性、および精製天然PauAの発色活性の血清中和により解析された。

【0153】

天然PauAおよび多様なペプチド断片の製剤は、マウスに対する毒性のないレベルの免疫刺激体としての、Quil A(Supersol)を含む水中スクアレンエマルジョンビヒクル中に存在する。タンパク質は、1回の投与量100μlにつき3-5μg処方され、そして皮下に投与された。対照である、抗原なしのワクチンは、抗原成分なしのビヒクル/免疫刺激体を含むDulbecco's PBS(DPBS; Gibco BRL)から構成された。

【0154】

3.4.2. PauAペプチド断片の免疫原性

上述の免疫化実験により得られた多様なマウス血清は、PauA特異的抗体が産生されたかどうかを決定するため、および産生された抗体の特性を決定するため解析された。PauA特異的IgG ELISAは、PauAタンパク質分解断片(PauA¹⁴⁹⁻²⁸⁶)および各GST-PauA融合タンパク質による免疫化後の血清の特異性を決定するため用いられた。100μlの精製天然PauA(国際特許出願公開WO 93/14209に記載され、かつその中において「ストレプトキナーゼ」と表記された)(PBS中で1.8mg/ml)は、Immulon IIプレート(Dynatech)の各ウェルに添加され、かつ4にて一晩インキュベーションされた。プレートの内容物はデカンテーションされ、かつプレートは吸収乾燥された。プレートは、各ウェルに250μlのPBS溶解(1% PVA/PBS)ポリ(ビニルアルコール)(87-89%加水分解; Aldrich Chemical Company, Inc., Milwaukee, WI)(1% PVA/PBS)を添加することによりによりブロックされ、そ

10

20

30

40

50

して37にて1時間インキュベーションされた。プレートは再びデカンテーションされ、かつ吸収乾燥された。

【0155】

実験血清は、1% PVA/PBS中において1:100に希釈され、その後試料ウェルより100 μ lを順に移動することにより3倍希釈された。陽性対照は、PauA特異的モノクローナル抗体であるEC-3であり、この抗体は、固定化Protein Gを用いてアフィニティー精製されたものであった。このモノクローナル抗体は、1% PVA/PBS中において2 μ g/mlに希釈され、その後100 μ lが適切なウェルへ添加された。陰性対照は、プールされ、1% PVA/PBS中において1:100に希釈された、ワクチン前のマウス血清を含んだ。100 μ lの陰性対照血清が適切なウェルへ添加された。

10

【0156】

実験および対照試料の添加後に、プレートは穏やかに叩かれて混合され、その後37にて1時間静置された。試料ウェルは、自動マイクロプレート洗浄機(モデルEL403; BIO-TEK Instruments, Inc., Winooski, VT)を用いて0.05% Tween 20/PBSにより5回洗浄された。結合した抗体の検出は、1% PVA/PBS中において1:10,000に希釈された、共役抗マウスIgGヤギ抗体(HおよびL鎖、1.0mg/ml、Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, MD)100 μ lの添加により行われた。プレートは穏やかに叩かれて混合され、37にて1時間静置され、そして上述のように洗浄された。100 μ lのABTS(Kirkegaard & Perry)がプレートに添加され、次いで室温にて15分間発色された。プレートは、Thermo Maxプレート読取機(Molecular Devices Corp.)およびSoftMax PRO Ver 1.2プログラム(Molecular Devices Corp.)を用いて、405/490nmにおいて読み取られた。IgG ELISA力価は、陽性対照のOD_{405/490}の50%を与える希釈率の逆数として算出された。

20

【0157】

表4に示されたように、9種のGST-PauA融合タンパク質それぞれを用いたマウスの免疫化の結果、PauA特異的免疫グロブリンGが産生された。GST-PauA²⁸⁻²⁸⁶、GST-PauA¹⁰⁴⁻²⁸⁶、またはGST-PauA²⁸⁻¹⁷⁰のいずれかによる免疫化は、天然PauAにより誘導された場合と同等の、またはそれより高いIgG ELISA力価を誘導した。タンパク質分解由来ペプチドであるPauA¹⁴⁹⁻²⁸⁶は、組換えPauAペプチド断片に比べ、比較的低い力価を示した。3回目の免疫化の後、このペプチド断片は、最も類似した比較ペプチド、すなわちGST-PauA¹⁷²⁻²⁸⁶に比べ約1/10のPauA特異的力価を誘導した。この特定のペプチド(PauA¹⁴⁹⁻²⁸⁶)が、低いIgG応答を誘導するものの、天然PauAの他の断片も、組換えペプチドに関して示された免疫反応に匹敵する免疫反応を誘導できることが予想される。

30

【0158】

40

3.4.3. 血清中和活性

上述の免疫化による血清は、PauAによるウシプラスミノゲンからプラスミンへの変換を妨害できる抗体を含むかどうかを決定するため、さらに解析された。血清中和アッセイは、10%ウシ胎児血清を含むTEA緩衝液(TEA/FBS; Novatech Inc., Grand Island, NE)中において、血清試料を1:50に希釈することにより行われた。1リットルのTEA緩衝液は、3.34gのTris Base、3.54g Tris HCl、5.8g NaCl、1.1g EDTA(4ナトリウム水和物)、42.2g (L)-アルギニン塩酸塩、および1.0ml Tween 80を含んだ。緩衝液のpHは8.0に調整され、その後使用まで室温にて保存された。FBSは、中和アッセイにおいて使用する直前にTEA緩衝液に添加された。TEA/

50

FBS中の血清試料は、その後V底プレート(Dynatech)においてTEA/FBSにより2倍ずつ段階希釈された。25 μ lの試験試料は、その後Immulon IIプレート(Dynatech)に移動された。S. uberisより単離された精製天然PauA(ロット番号9700710A)は、TEA緩衝液中において76 μ g/mlに希釈され、その後事前に分注された血清を含む各ウェルに25 μ lが添加された。プレートは穏やかに叩かれて混合され、37 $^{\circ}$ Cにて1時間静置された。陽性対照は、血清陽性ウシ由来の凍結乾燥されたIgG画分であった。このIgG画分は、水に再溶解され3.8mg/mlとなり、TEA/FBS中において1:50に希釈され、そしてImmulon IIプレートに移動された。25 μ lの陽性対照、およびTEA/FBS中において1:50に希釈された25 μ lのFBSが、適切なウェルに分注された。

10

【0159】

PauA活性の中和は、基質の添加により検出された。基質は、プラスミノゲン(1U/ml; P-9156, Sigma)、クロモザイム(1mg/ml; Boeringer Mannheim, Indianapolis, IN)、およびTEA緩衝液の2:3:1の比率での混合により調製された。この基質の150 μ lが各試料ウェルに添加され、プレートは穏やかに叩かれて混合され、その後37 $^{\circ}$ Cにて90分間インキュベーションされた。プレートは、Thermo Maxプレート読取機およびSoft Max PRO Ver 1.2コンピュータプログラムを用いて、405/490nmにおいて読み取られた。この力価は、陰性対照の50%に相当する希釈率の逆数として算出された。

20

【0160】

中和アッセイの結果は、いくつかのペプチド断片が、天然PauAへ方向づけられる中和反応を誘導することができることを示した。組換えタンパク質GST-PauA²⁸⁻²⁸⁶、GST-PauA¹⁰⁴⁻²⁸⁶、GST-PauA²⁸⁻¹⁷⁰、またはGST-PauA²⁸⁻²⁰⁸のマウスへの投与後に得られた血清は、天然PauAのマウスへの投与により得られた血清と類似した中和力価を示した。従って、マウスに投与した場合、これらのペプチド断片は、天然精製PauAの酵素学的活性を妨害する能力のある抗体の産生を誘導した。

【0161】

【表4】

30

表4

グループa	IgG ELISA				中和アッセイ			
	0日	21日	35日	56日	0日	21日	35日	56日
実験1								
GST-PauA ²⁸⁻²⁸⁶	<100	135	18519	43478	<50	<50	243	357
GST-PauA ¹⁰⁴⁻²⁸⁶	<100	<100	3333	25000	<50	<50	<50	77
GST-PauA ¹⁷²⁻²⁸⁶	<100	<100	465	3226	<50	<50	<50	<50
GST-PauA ²⁸⁻¹⁷⁰	<100	143	11236	20833	<50	<50	58	200
GST-PauA ¹⁰⁴⁻¹⁷⁰	<100	<100	<100	571	<50	<50	<50	<50
GST-PauA ¹⁰⁴⁻²⁰⁸	<100	<100	625	2083	<50	<50	<50	<50
GST-PauA ¹⁷²⁻²⁰⁸	<100	<100	250	1053	<50	<50	<50	<50
天然PauA	<100	<100	9091	23810	<50	<50	77	244
実験2								
GST-PauA ²⁸⁻¹⁰³	<100	<100	345	1724	<50	<50	<50	<50
GST-PauA ²⁸⁻²⁰⁸	<100	<100	10870	9091	<50	<50	91	294
天然PauA	<100	<100	12500	26667	<50	<50	67	500
実験3								
PauA ¹⁴⁹⁻²⁸⁶								
分解物	<100	<100	<100	303	<50	<50	<50	<50
天然PauA	<100	<100	20000	20833	<50	<50	<50	115
GST対照	<100	<100	<100	<100	<50	<50	<50	<50
DPBS								
(アジュバント対照)<100 <100 <100 <100 <50 <50 <50 <50								

10

20

30

40

a : データは3回の異なる実験を要約したものであり、かつ実験により分類されている。2種類の対照(GSTおよびDPBS)は、各実験において含まれ、かつ表の下部に記載されている。

【0162】

全ての特許、特許出願、および上述の参照文献は、本明細書中において、特許参照文献として全てまとめて含まれる。

【0163】

本発明は、発明の個別的側面の一例を提示する目的で記載された、特異的態様により範囲を限定されない。機能的に同等な組成物および手法は、本発明の範囲内に含まれる。

【0164】

【配列表】

【0165】

(2) 配列情報 SEQ ID NO:1:

(1) 配列の特性:

(A) 長さ: 1180 塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: DNA (genomic)

(ix) 特徴:

(A) NAME/KEY: CDS

(B) 存在位置: 120..980

(xi) 配列: SEQ ID NO:1:

GGGCTGCAGA TCCGTTAAAA AATGACATTA ATATCTACTT CAATTTGTTC TAAAATGAAA 60

TTATATTCAC TGCTGTTACA TAACTTTGTG ATTATTTAGG ATAAAATAAG GGAGATTTT 119

ATG AAA AAA TGG TTT TTA ATA TTA ATG CTT TTG GGA ATA TTT GGT TGT 167

Met Lys Lys Trp Phe Leu Ile Leu Met Leu Leu Gly Ile Phe Gly Cys

1 5 10 15

GCT ACT CAA CCA TCA AAG GTT GCA GCA ATA ACC GGT TAT GAT TCC GAC 215

Ala Thr Gln Pro Ser Lys Val Ala Ala Ile Thr Gly Tyr Asp Ser Asp

20 25 30

TAC TAC GCT AGA TAT ATT GAT CCC GAT GAA AAT AAA ATA ACA TTT GCC 263

Tyr Tyr Ala Arg Tyr Ile Asp Pro Asp Glu Asn Lys Ile Thr Phe Ala

35 40 45

ATA AAT GTT GAT GGT TTT GTC GAA GGT AGT AAT CAA GAA ATC CTT ATT 311

Ile Asn Val Asp Gly Phe Val Glu Gly Ser Asn Gln Glu Ile Leu Ile

50 55 60

AGA GGA ATT CAT CAT GTT TTA ACA GAT CAA AAC CAA AAG ATT GTT ACA 359

Arg Gly Ile His His Val Leu Thr Asp Gln Asn Gln Lys Ile Val Thr

65 70 75 80

AAG GCC GAG TTG TTA GAC GCT ATT AGA CAT CAA ATG GTT CTT CTA CAA 407

10

20

30

40

Lys Ala Glu Leu Leu Asp Ala Ile Arg His Gln Met Val Leu Leu Gln

85 90 95

TTG GAT TAT TCC TAT GAA CTA GTC GAC TTT GCG CCT GAT GCA CAA TTA 455

Leu Asp Tyr Ser Tyr Glu Leu Val Asp Phe Ala Pro Asp Ala Gln Leu

100 105 110

TTA ACA CAA GAT CGA CGG CTT TTA TTT GCC AAT CAA AAT TTT GAG GAA 503

Leu Thr Gln Asp Arg Arg Leu Leu Phe Ala Asn Gln Asn Phe Glu Glu

115 120 125

TCC GTA TCA CTT GAA GAT ACT ATT CAA GAA TAC CTT TTA AAA GGG CAT 551

Ser Val Ser Leu Glu Asp Thr Ile Gln Glu Tyr Leu Leu Lys Gly His

130 135 140

GTT ATT CTC AGA AAA CGG GTT GAA GAA CCT ATC ACT CAT CCT ACT GAG 599

Val Ile Leu Arg Lys Arg Val Glu Glu Pro Ile Thr His Pro Thr Glu

145 150 155 160

ACT GCT AAT ATT GAG TAT AAA GTT CAA TTC GCG ACT AAA GAT GGG GAA 647

Thr Ala Asn Ile Glu Tyr Lys Val Gln Phe Ala Thr Lys Asp Gly Glu

165 170 175

TTC CAC CCA CTA CCT ATT TTT GTA GAC TAC GGA GAA AAA CAT ATT GGA 695

Phe His Pro Leu Pro Ile Phe Val Asp Tyr Gly Glu Lys His Ile Gly

180 185 190

GAA AAA TTA ACC TCT GAC GAG TTT CGA AAA ATT GCA GAA GAA AAG CTT 743

Glu Lys Leu Thr Ser Asp Glu Phe Arg Lys Ile Ala Glu Glu Lys Leu

195 200 205

TTG CAA CTC TAC CCT GAC TAT ATG ATT GAT CAA AAA GAA TAT ACT ATC 791

Leu Gln Leu Tyr Pro Asp Tyr Met Ile Asp Gln Lys Glu Tyr Thr Ile

210 215 220

ATT AAA CAC AAT TCT CTT GGT CAA CTT CCA AGA TAT TAT TCT TAT CAA 839

Ile Lys His Asn Ser Leu Gly Gln Leu Pro Arg Tyr Tyr Ser Tyr Gln

225 230 235 240

10

20

30

40

GAT CAT TTC AGC TAC GAA ATT CAA GAT AGG CAA CGT ATC ATG GCT AAG 887

Asp His Phe Ser Tyr Glu Ile Gln Asp Arg Gln Arg Ile Met Ala Lys

245 250 255

GAC CCA AAA TCC GGA AAA GAA CTC GGT GAA ACT CAA AGT ATT GAT AAT 935

Asp Pro Lys Ser Gly Lys Glu Leu Gly Glu Thr Gln Ser Ile Asp Asn

260 265 270

GTT TTT GAG AAA TAC CTT ATT ACC AAA AAA AGT TAT AAA CCT TAAAGGAAGT 987

Val Phe Glu Lys Tyr Leu Ile Thr Lys Lys Ser Tyr Lys Pro

275 280 285

ATCCATTAAA TTTTCTGCA TCACTAAAAA AACACGAGCA TCACTTTCAA AGGGACGGCC 1047

TTCGTTAGTA ACGCTAGTGT TTTTATTTTA TTTTTTCTT TAGATCAAAC AAAACAGTCA 1107

TAGCTTCCAT TGGAGTCATA TTCATGACAT CTA CTCTTTT AAGTCTATTA ATGATATCTA 1167

GAGAGGAATC TCA 1180

10

20

【 0 1 6 6 】

(2) 配列情報 SEQ ID NO:2:

(1) 配列の特性:

(A) 長さ: 286 アミノ酸

(B) 型: アミノ酸

(D) トポロジー: 直鎖状

(11) 配列の種類: タンパク質

(xi) 配列: SEQ ID NO:2:

Met Lys Lys Trp Phe Leu Ile Leu Met Leu Leu Gly Ile Phe Gly Cys

1 5 10 15

Ala Thr Gln Pro Ser Lys Val Ala Ala Ile Thr Gly Tyr Asp Ser Asp

20 25 30

Tyr Tyr Ala Arg Tyr Ile Asp Pro Asp Glu Asn Lys Ile Thr Phe Ala

35 40 45

Ile Asn Val Asp Gly Phe Val Glu Gly Ser Asn Gln Glu Ile Leu Ile

50 55 60

Arg Gly Ile His His Val Leu Thr Asp Gln Asn Gln Lys Ile Val Thr

65 70 75 80

Lys Ala Glu Leu Leu Asp Ala Ile Arg His Gln Met Val Leu Leu Gln

85 90 95

Leu Asp Tyr Ser Tyr Glu Leu Val Asp Phe Ala Pro Asp Ala Gln Leu

100 105 110

Leu Thr Gln Asp Arg Arg Leu Leu Phe Ala Asn Gln Asn Phe Glu Glu

115 120 125

Ser Val Ser Leu Glu Asp Thr Ile Gln Glu Tyr Leu Leu Lys Gly His

130 135 140

Val Ile Leu Arg Lys Arg Val Glu Glu Pro Ile Thr His Pro Thr Glu

145 150 155 160

Thr Ala Asn Ile Glu Tyr Lys Val Gln Phe Ala Thr Lys Asp Gly Glu

165 170 175

10

20

30

40

Phe His Pro Leu Pro Ile Phe Val Asp Tyr Gly Glu Lys His Ile Gly

180 185 190

Glu Lys Leu Thr Ser Asp Glu Phe Arg Lys Ile Ala Glu Glu Lys Leu

195 200 205

Leu Gln Leu Tyr Pro Asp Tyr Met Ile Asp Gln Lys Glu Tyr Thr Ile

210 215 220

Ile Lys His Asn Ser Leu Gly Gln Leu Pro Arg Tyr Tyr Ser Tyr Gln

225 230 235 240

Asp His Phe Ser Tyr Glu Ile Gln Asp Arg Gln Arg Ile Met Ala Lys

245 250 255

Asp Pro Lys Ser Gly Lys Glu Leu Gly Glu Thr Gln Ser Ile Asp Asn

260 265 270

Val Phe Glu Lys Tyr Leu Ile Thr Lys Lys Ser Tyr Lys Pro

275 280 285

10

20

[0 1 6 7]

(2) 配列情報 SEQ ID NO:3:

(1) 配列の特性:

(A) 長さ: 1181 塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: DNA (genomic)

(ix) 特徴:

(A) NAME/KEY: CDS

(B) 存在位置: 121..981

(xi) 配列: SEQ ID NO:3:

GGGCTGCAGA TCCGTAAAA AATGACATTA ATATCTACTT CAATTTGTTC TAAAATGAAA 60

TTATATTCAC TGCTGTTACA TAACTTTGTG ATTATTTAGG ATAAAATAAG GGAGATTTTT 120

ATG AAA AAA TGG TTT TTA ATA TTA ATG CTT TTG GGA ATA TTT GGT TGT 168

Met Lys Lys Trp Phe Leu Ile Leu Met Leu Leu Gly Ile Phe Gly Cys

1 5 10 15

GCT ACT CAA CCA TCA AAG GTT GCA GCA ATA ACC GGT TAT GAT TCC GAC 216

Ala Thr Gln Pro Ser Lys Val Ala Ala Ile Thr Gly Tyr Asp Ser Asp

20 25 30

TAC TAC GCT AGA TAT ATT GAT CCC GAT GAA AAT AAA ATA ACA TTT GCC 264

Tyr Tyr Ala Arg Tyr Ile Asp Pro Asp Glu Asn Lys Ile Thr Phe Ala

35 40 45

ATA AAT GTT GAT GGT TTT GTC GAA GGT AGT AAT CAA GAA ATC CTT ATT 312

Ile Asn Val Asp Gly Phe Val Glu Gly Ser Asn Gln Glu Ile Leu Ile

50 55 60

AGA GGA ATT CAT CAT GTT TTA ACA AAT CAA AAC CAA AAG ATT GTT ACA 360

Arg Gly Ile His His Val Leu Thr Asn Gln Asn Gln Lys Ile Val Thr

65 70 75 80

AAG GCC GAG TTG TTA GAC GCT ATT AGA CAT CAA ATG GTT CTT CTA CAA 408

10

20

30

40

Lys Ala Glu Leu Leu Asp Ala Ile Arg His Gln Met Val Leu Leu Gln
85 90 95

TTG GAT TAT TCC TAT GAA CTA GTC GAC TTT GCG CCT GAT GCA CAA TTA 456
Leu Asp Tyr Ser Tyr Glu Leu Val Asp Phe Ala Pro Asp Ala Gln Leu
100 105 110

TTA ACA CGA GAT CGA CGG CTT TTA TTT GCC AAT CGA AAT TTT GAG GAA 504
Leu Thr Arg Asp Arg Arg Leu Leu Phe Ala Asn Arg Asn Phe Glu Glu
115 120 125

TCC GTA TCA CTT GAA GAT ACT ATT CAA GAA TAC CTT TTA AAA GGG CAT 552
Ser Val Ser Leu Glu Asp Thr Ile Gln Glu Tyr Leu Leu Lys Gly His
130 135 140

GTT ATT CTC AGA AAA CGG GTT GAA GAA CCT ATC ACT CAT CCT ACT GAG 600
Val Ile Leu Arg Lys Arg Val Glu Glu Pro Ile Thr His Pro Thr Glu
145 150 155 160

ACT GCT AAT ATT GAG TAT AAA GTT CAA TTC GCG ACT AAA GAT GGG GAA 648
Thr Ala Asn Ile Glu Tyr Lys Val Gln Phe Ala Thr Lys Asp Gly Glu
165 170 175

TTC CAC CCA CTA CCT ATT TTT GTA GAC TAC GGA GAA AAA CAT ATT GGA 696
Phe His Pro Leu Pro Ile Phe Val Asp Tyr Gly Glu Lys His Ile Gly
180 185 190

GAA AAA TTA ACC TCT GAC GAG TTT CGA AAA ATT GCA GAA GAA AAG CTT 744
Glu Lys Leu Thr Ser Asp Glu Phe Arg Lys Ile Ala Glu Glu Lys Leu
195 200 205

TTG CAA CGC TAC CCT GAC TAT ATG ATT GAT CAA AAA GAA TAT ACT ATC 792
Leu Gln Arg Tyr Pro Asp Tyr Met Ile Asp Gln Lys Glu Tyr Thr Ile
210 215 220

ATT AAA CAC AAT TCT CTT GGT CAA CTT CCA AGA TAT TAT TCT TAT CCA 840
Ile Lys His Asn Ser Leu Gly Gln Leu Pro Arg Tyr Tyr Ser Tyr Pro
225 230 235 240

10

20

30

40

GAT GAT TTC AGC TAC GAA ATT CAA GAT AGG CAA CGT ATC ATG GCT AAG 888

Asp Asp Phe Ser Tyr Glu Ile Gln Asp Arg Gln Arg Ile Met Ala Lys

245 250 255

GAC CCA AAG TCC GGA AAA GAA CTC GGT GAA ACT CAA AGT ATT GAT AAT 936

Asp Pro Lys Ser Gly Lys Glu Leu Gly Glu Thr Gln Ser Ile Asp Asn

260 265 270

GTT TTT GAG AAA TAC CTT ATT ACC AAA AAA AGT TAT AAA CCT TAAATGAAGT 988

Val Phe Glu Lys Tyr Leu Ile Thr Lys Lys Ser Tyr Lys Pro

275 280 285

ATCCATTAAA TTTTCTGCA TCACTAAAAA AACACGAGCA TCACTTTCAA AGGGAAGGCC 1048

TTCGTTAGTA ACGCTAGTGT TTTTATTTTA TTTTTTCTT TAAATCAAAC AAAACAGTCA 1108

TAGCTTCCAT TGGAGTCATA TTCATGACAT CTA CTCTTTT AAGTCTATTA ATGATATCTA 1168

GAGAGGAATC TCA 1181

10

20

[0 1 6 8]

(2) 配列情報 SEQ ID NO:4:

(1) 配列の特性:

(A) 長さ: 286 アミノ酸

(B) 型: アミノ酸

(D) トポロジー: 直鎖状

(11) 配列の種類: タンパク質

(xi) 配列: SEQ ID NO:4:

Met Lys Lys Trp Phe Leu Ile Leu Met Leu Leu Gly Ile Phe Gly Cys

1 5 10 15

Ala Thr Gln Pro Ser Lys Val Ala Ala Ile Thr Gly Tyr Asp Ser Asp

20 25 30

Tyr Tyr Ala Arg Tyr Ile Asp Pro Asp Glu Asn Lys Ile Thr Phe Ala

35 40 45

Ile Asn Val Asp Gly Phe Val Glu Gly Ser Asn Gln Glu Ile Leu Ile

50 55 60

Arg Gly Ile His His Val Leu Thr Asn Gln Asn Gln Lys Ile Val Thr

65 70 75 80

Lys Ala Glu Leu Leu Asp Ala Ile Arg His Gln Met Val Leu Leu Gln

85 90 95

Leu Asp Tyr Ser Tyr Glu Leu Val Asp Phe Ala Pro Asp Ala Gln Leu

100 105 110

Leu Thr Arg Asp Arg Arg Leu Leu Phe Ala Asn Arg Asn Phe Glu Glu

115 120 125

Ser Val Ser Leu Glu Asp Thr Ile Gln Glu Tyr Leu Leu Lys Gly His

130 135 140

Val Ile Leu Arg Lys Arg Val Glu Glu Pro Ile Thr His Pro Thr Glu

145 150 155 160

Thr Ala Asn Ile Glu Tyr Lys Val Gln Phe Ala Thr Lys Asp Gly Glu

165 170 175

10

20

30

40

Phe His Pro Leu Pro Ile Phe Val Asp Tyr Gly Glu Lys His Ile Gly
 180 185 190
 Glu Lys Leu Thr Ser Asp Glu Phe Arg Lys Ile Ala Glu Glu Lys Leu
 195 200 205
 Leu Gln Arg Tyr Pro Asp Tyr Met Ile Asp Gln Lys Glu Tyr Thr Ile
 210 215 220
 Ile Lys His Asn Ser Leu Gly Gln Leu Pro Arg Tyr Tyr Ser Tyr Pro
 225 230 235 240
 Asp Asp Phe Ser Tyr Glu Ile Gln Asp Arg Gln Arg Ile Met Ala Lys
 245 250 255
 Asp Pro Lys Ser Gly Lys Glu Leu Gly Glu Thr Gln Ser Ile Asp Asn
 260 265 270
 Val Phe Glu Lys Tyr Leu Ile Thr Lys Lys Ser Tyr Lys Pro
 275 280 285

10

20

【 0 1 6 9 】

(2) 配列情報 SEQ ID NO:5:

(i) 配列の特性:

(A) 長さ: 18 アミノ酸

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: ペプチド

(v) フラグメント型: 中間部

(ix) 特徴:

(A) NAME/KEY: ペプチド

(B) 存在位置: 1..18

(D) その他の情報: /label= Xaa

/note= "Xaa = Pro or Gly"

(xi) 配列: SEQ ID NO:5:

Ile Thr Xaa Tyr Asp Ser Asp Tyr Tyr Ala Arg Tyr Ile Asp Pro Asp
 1 5 10 15
 Glu Asn

30

40

50

【 0 1 7 0 】

(2) 配列情報 SEQ ID NO:6:

(i) 配列の特性:

(A) 長さ: 31 アミノ酸

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: ペプチド

(v) フラグメント型: 中間部

(xi) 配列: SEQ ID NO:6:

Tyr Ile Asp Pro Asp Glu Asn Lys Ile Thr Phe Ala Ile Asn Val Asp

1 5 10 15

Gly Phe Val Glu Gly Ser Asn Gln Glu Ile Leu Ile Arg Gly Ile

20 25 30

10

20

【 0 1 7 1 】

(2) 配列情報 SEQ ID NO:7:

(i) 配列の特性:

(A) 長さ: 12 アミノ酸

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: ペプチド

(v) フラグメント型: 中間部

(xi) 配列: SEQ ID NO:7:

Ile Val Thr Lys Ala Glu Leu Leu Asp Ala Ile Arg

1 5 10

30

40

【 0 1 7 2 】

(2) 配列情報 SEQ ID NO:8:

(1) 配列の特性:

(A) 長さ: 16 アミノ酸

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: ペプチド

(v) フラグメント型: 中間部

(ix) 特徴:

(A) NAME/KEY: ペプチド

(B) 存在位置: 1..16

(D) その他の情報: /label= Xaa

/note= "Xaa = 不明"

(xi) 配列: SEQ ID NO:8:

Asp Gly Glu Phe His Pro Leu Pro Ile Phe Val Xaa Tyr Xaa Glu Lys

1 5 10 15

10

20

【 0 1 7 3 】

(2) 配列情報 SEQ ID NO:9:

(1) 配列の特性:

(A) 長さ: 13 アミノ酸

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: ペプチド

(v) フラグメント型: 中間部

(xi) 配列: SEQ ID NO:9:

Leu Leu Gln Leu Tyr Pro Asp Tyr Met Ile Asp Gln Lys

1 5 10

30

40

【 0 1 7 4 】

(2) 配列情報 SEQ ID NO:10:

(1) 配列の特性:

(A) 長さ: 19 アミノ酸

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: ペプチド

(v) フラグメント型: 中間部

(xi) 配列: SEQ ID NO:10:

Leu Leu Gln Leu Tyr Pro Asp Tyr Met Ile Asp Gln Lys Glu Tyr Thr

1 5 10 15

Ile Ile Lys

10

【 0 1 7 5 】

(2) 配列情報 SEQ ID NO:11:

(1) 配列の特性:

(A) 長さ: 15 アミノ酸

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: ペプチド

(v) フラグメント型: 中間部

(xi) 配列: SEQ ID NO:11:

Tyr Tyr Ser Tyr Gln Asp His Phe Ser Tyr Glu Ile Gln Asp Arg

1 5 10 15

20

30

【 0 1 7 6 】

(2) 配列情報 SEQ ID NO:12:

(1) 配列の特性:

(A) 長さ: 5 アミノ酸

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: ペプチド

(v) フラグメント型: 中間部

(xi) 配列: SEQ ID NO:12:

Tyr Leu Ile Thr Lys

1 5

10

【 0 1 7 7 】

(2) 配列情報 SEQ ID NO:13:

(1) 配列の特性:

(A) 長さ: 20 塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: DNA (genomic)

(xi) 配列: SEQ ID NO:13:

ATCATATAGT CAGGGTAGAG 20

20

30

【 0 1 7 8 】

(2) 配列情報 SEQ ID NO:14:

(1) 配列の特性:

(A) 長さ: 30 塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: DNA (genomic)

(xi) 配列: SEQ ID NO:14:

CGGGTACCGW TATATTGATC CWGATGARAA 30

40

50

【 0 1 7 9 】

(2) 配列情報 SEQ ID NO:15:

(i) 配列の特性:

(A) 長さ: 34 塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: DNA (genomic)

(xi) 配列: SEQ ID NO:15:

GGGGATCCTT TTGATCAATW GGATAATCWG GATA 34

10

【 0 1 8 0 】

(2) 配列情報 SEQ ID NO:16:

(i) 配列の特性:

(A) 長さ: 34 塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: DNA (genomic)

(xi) 配列: SEQ ID NO:16:

GGGGATCCTT YTGRTCRATW GGRTARTCWG GRTA 34

20

30

【 0 1 8 1 】

(2) 配列情報 SEQ ID NO:17:

(i) 配列の特性:

(A) 長さ: 24 塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: DNA (genomic)

(xi) 配列: SEQ ID NO:17:

GTTACAAAGG CCGAGTTGTT AGAC 24

40

【 0 1 8 2 】

(2) 配列情報 SEQ ID NO:18:

(1) 配列の特性:

(A) 長さ: 25 塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: DNA (genomic)

10

(xi) 配列: SEQ ID NO:18:

GATTGGCAA TAAAAGCCGT CGATC 25

【 0 1 8 3 】

(2) 配列情報 SEQ ID NO:19:

(1) 配列の特性:

(A) 長さ: 22 塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: DNA (genomic)

20

(xi) 配列: SEQ ID NO:19:

CTTCAAGTGA TACGGATTCC TC 22

30

【 0 1 8 4 】

(2) 配列情報 SEQ ID NO:20:

(1) 配列の特性:

(A) 長さ: 20 塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: DNA (genomic)

40

(xi) 配列: SEQ ID NO:20:

GGGGAATTCC ACCCACTACC 20

【 0 1 8 5 】

(2) 配列情報 SEQ ID NO:21:

(1) 配列の特性:

(A) 長さ: 25 塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: DNA (genomic)

10

(xi) 配列: SEQ ID NO:21:

GACGAGTTTC GAAAAATTGC AGAAG 25

【 0 1 8 6 】

(2) 配列情報 SEQ ID NO:22:

(1) 配列の特性:

(A) 長さ: 48 塩基対

20

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: DNA (genomic)

(xi) 配列: SEQ ID NO:22:

GGGCTGCAGT CATATGAAAA AATGGTTTTT AATATTAATG CTTTTGGG 48

30

【 0 1 8 7 】

(2) 配列情報 SEQ ID NO:23:

(1) 配列の特性:

(A) 長さ: 44 塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

40

(ii) 配列の種類: DNA (genomic)

(xi) 配列: SEQ ID NO:23:

GGGCTGCAGT CATATGATAA CCGTTATGA TTCCGACTAC TACG 44

【 0 1 8 8 】

(2) 配列情報 SEQ ID NO:24:

(1) 配列の特性:

(A) 長さ: 21 塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: DNA (genomic)

10

(xi) 配列: SEQ ID NO:24:

GAGATTCCTC TCTAGATATC A 21

【 0 1 8 9 】

(2) 配列情報 SEQ ID NO:25:

(1) 配列の特性:

(A) 長さ: 34 塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: DNA (genomic)

(xi) 配列: SEQ ID NO:25:

GGGCTGCAGA TCCGTTAAAA AATGACATTA ATAT 34

20

30

【 0 1 9 0 】

(2) 配列情報 SEQ ID NO:26:

(1) 配列の特性:

(A) 長さ: 31 塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: DNA (genomic)

(iii) ハイボセティカル: NO

(iv) アンチセンス: NO

(v) 起源:

(A) 生物名: *Streptococcus uberis*

(xi) 配列: SEQ ID NO:26:

GCGGCTCGAG ACCGGTATG ATTCCGACTA C 31

10

20

【 0 1 9 1 】

(2) 配列情報 SEQ ID NO:27:

(1) 配列の特性:

(A) 長さ: 33 塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: DNA (genomic)

(iii) ハイボセティカル: NO

(iv) アンチセンス: NO

(v) 起源:

(A) 生物名: *Streptococcus uberis*

(xi) 配列: SEQ ID NO:27:

GTTGCGGCCG CGGATACTTC ATTTAAGGTT TAT 33

30

40

【 0 1 9 2 】

(2) 配列情報 SEQ ID NO:28:

(i) 配列の特性:

(A) 長さ: 10 アミノ酸

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: ペプチド

(iii) ハイポセティカル: NO

(iv) アンチセンス: NO

(v) フラグメント型: 中間部

(vi) 起源:

(A) 生物名: *Streptococcus uberis*

(xi) 配列: SEQ ID NO:28:

Lys Arg Val Glu Glu Pro Ile Thr His Pro

1 5 10

10

20

【図面の簡単な説明】

【図1】*S. uberis*株c216由来のPauAタンパク質からのペプチド断片に基づいて設計されたオリゴマープローブ(SEQ ID NO:13~SEQ ID NO:25)。小文字のヌクレオチドは染色体DNA配列に対合しない。

【図2】ウシのプラスミノゲンをさらに含むスキムミルクアガロースプレート上で培養した*S. uberis*株95-140由来のpauA遺伝子により形質転換された*E. coli*株DH5の単離。透明区域はプラスミノゲンの活性化によりプラスミンへ転化し、その後が続いておこる牛乳タンパク質の分解によって生じた結果である。

30

【図3】pER318とpER319は、フランキングDNAのHexAとHexB遺伝子とともに挿入を受けた、クローン化されたpauAを示す。

【図4】SEQ ID NO:1のヌクレオチド番号978から1088において、pauA遺伝子のORFに隣接した、*S. uberis*株c216の二方向の末端配列。pauAのORFの終止コドンには下線がひいてある。

【図5】SDS-PAGEで分離され、およびクマシーブリリアントブルーで染色された、誘導前および誘導された全細胞ペレット溶解物のサンプル。レーン1 = 分子量標識(RAINBOW Kaleidoscope pre-stained standards、Biorad Laboratories); 2 = 誘導前株Pz326(プラスミドpER326をシグナル配列とともに含む); 3 = 誘導後株Pz326; 4 = 誘導前株Pz328(プラスミドpER328を含む。シグナル配列を含まない。); 5 = 誘導後株Pz328; 6 = 誘導前株Pz330(プラスミドpER330をシグナル配列とともに含む。); 7 = 誘導後株Pz330; 8 = 誘導前株Pz332(プラスミドpER332を含む。シグナル配列は含まない。); 9 = 誘導後株Pz332; 10 = *S. uberis*株95-140由来の、精製されたPauAタンパク質。

40

【図6】SDS-PAGEで分離され、およびウェスタン・プロット分析された、前誘導および誘導された全細胞溶解物ペレットサンプル。レーンは、レーン10 = *S. uberis*株95-140由来の、全細胞溶解物ペレットである以外は、図5における者と同じである。一次抗体はマウスモノクローナル抗体EC-3であり、二次抗体はBCIPと結

50

合されたヤギ抗マウス抗体である。

【 図 1 】

オリゴヌクレオチド 名称	鎖 センス	SEQ ID No.	配列 (5'-3')
AP-1	-	13	ATCATATAGTCAGGGTAGAG
RA-9	+	14	CR88LaccGWATATATTGATCCMGATGAAA
ER-35	-	15	8888atccTTTTGATCAATWGGATAATCMGGATA
ER-36	-	16	8888atccTTYTGTCRAATWGGRTARTCMGGRTA
ER-37	+	17	GTTACAAGGCCCGAGTGTAGAC
ER-39	-	18	GATTGGCAATAAAAAGCGCTCGATC
ER-40	-	19	CTTCAAAGTGATACGGATTCCCTC
ER-41	+	20	GGGGAATTCACCCACTACC
ER-42	+	21	GACGAGTTTCGAAAAATTGCAGAAG
ER-43	+	22	888ctcgcgctcatalTGAAAAATGGTTTTTAATTAATGCTTTTGGG
ER-44	+	23	888ctcgcgctcatal&ATAACCGGTTATGATTCGGACTACTACG
ER-45	-	24	GAGATTCCTCTCAGATAACA
ER-46	+	25	888ctcgcg&ATCCGTTAAAAAATGACATTAATAT

【 図 2 】



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 K 39/09	A 6 1 K 39/085	
A 6 1 K 39/106	A 6 1 K 39/09	
A 6 1 K 39/108	A 6 1 K 39/106	
A 6 1 K 39/12	A 6 1 K 39/108	
A 6 1 K 39/145	A 6 1 K 39/12	
A 6 1 K 39/205	A 6 1 K 39/145	
A 6 1 K 39/215	A 6 1 K 39/205	
A 6 1 K 39/245	A 6 1 K 39/215	
A 6 1 P 31/00	A 6 1 K 39/245	
C 1 2 N 1/15	A 6 1 P 31/00 1 7 1	
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 9/12	C 1 2 N 9/12	
	C 1 2 N 5/00	A

(74)代理人 100107386

弁理士 泉谷 玲子

(72)発明者 イヴレット・リー・ロージー

アメリカ合衆国コネチカット州06365, プレストン, ルート・164 457

(72)発明者 ロバート・ジョン・ヤンシー, ジュニア

アメリカ合衆国コネチカット州06420, セーラム, ベックウィズ・ヒル・ロード 106

(72)発明者 ジェームズ・アンドリュー・レイ

イギリス国パークシャー アールジー20・7エヌエヌ, ニューバリー, コンプトン, コンプトン
・ラボラトリー, インスティテュート・フォー・アニマル・ヘルス

F ターム(参考) 4B024 AA10 AA11 BA10 BA31 CA01 CA03 CA06 CA07 CA11 DA05
 DA06 EA04 FA02 FA07 FA10 GA11 HA01 HA12 HA15 HA19
 4B050 CC03 CC04 CC05 DD02 EE01 LL10
 4B065 AA01X AA23X AA26X AA29X AA37X AA49Y AA53X AB01 AC14 BA02
 CA29 CA43
 4C085 AA03 AA04 BA12 BA13 BA18 BA21 BA24 BA48 BA55 BA71
 BA78 BB11 EE01 EE03

专利名称(译)	编码纤溶酶原激活蛋白的DNA		
公开(公告)号	JP2004073180A	公开(公告)日	2004-03-11
申请号	JP2003140706	申请日	2003-05-19
[标]申请(专利权)人(译)	美国辉瑞有限公司		
申请(专利权)人(译)	辉瑞公司		
[标]发明人	イヴレットリーロージー ロバートジョンヤンシージュニア ジェームズアンドリュウレイ		
发明人	イヴレット・リー・ロージー ロバート・ジョン・ヤンシー,ジュニア ジェームズ・アンドリュウ・レイ		
IPC分类号	G01N33/50 A61K35/74 A61K39/00 A61K39/02 A61K39/08 A61K39/085 A61K39/09 A61K39/102 A61K39/106 A61K39/108 A61K39/112 A61K39/12 A61K39/145 A61K39/205 A61K39/21 A61K39/215 A61K39/245 A61P15/14 A61P31/00 C07K14/315 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5 /10 C12N9/12 C12N9/64 C12N15/00 C12N15/09 C12N15/31 C12P21/02 C12R1/19 C12R1/46 G01N33 /53		
CPC分类号	A61K39/00 A61P15/14 C07K14/3153 C07K2319/00		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K39/00.H A61K39/00.J A61K39/02 A61K39/08 A61K39/085 A61K39/09 A61K39 /106 A61K39/108 A61K39/12 A61K39/145 A61K39/205 A61K39/215 A61K39/245 A61P31/00.171 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N9/12 C12N5/00.A C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12N5/00. 101 C12N5/10		
F-TERM分类号	4B024/AA10 4B024/AA11 4B024/BA10 4B024/BA31 4B024/CA01 4B024/CA03 4B024/CA06 4B024 /CA07 4B024/CA11 4B024/DA05 4B024/DA06 4B024/EA04 4B024/FA02 4B024/FA07 4B024/FA10 4B024/GA11 4B024/HA01 4B024/HA12 4B024/HA15 4B024/HA19 4B050/CC03 4B050/CC04 4B050 /CC05 4B050/DD02 4B050/EE01 4B050/LL10 4B065/AA01X 4B065/AA23X 4B065/AA26X 4B065 /AA29X 4B065/AA37X 4B065/AA49Y 4B065/AA53X 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065 /CA29 4B065/CA43 4C085/AA03 4C085/AA04 4C085/BA12 4C085/BA13 4C085/BA18 4C085/BA21 4C085/BA24 4C085/BA48 4C085/BA55 4C085/BA71 4C085/BA78 4C085/BB11 4C085/EE01 4C085 /EE03		
代理人(译)	小林 泰 千叶昭夫		
优先权	60/050565 1997-06-23 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

解决的问题：提供一种多核苷酸分子，其包含编码源自乳房链球菌的纤溶酶原激活 (PauA) 蛋白的核苷酸序列，基本上同源的多肽，肽片段及其融合蛋白，以及本发明的多核苷酸分子。用于重组表达PauA蛋白，基本上同源的多肽，肽片段和融合蛋白以及PauA蛋白，薄壁组织的组合物和方法，用于保护哺乳动物成分免于乳腺炎。包含本发明的同源多肽，肽片段，融合蛋白或多核苷酸分子的疫苗。例如，分离的多核苷酸分子包含编码蛋白质的核苷酸序列，所述蛋白质包含从SEQ ID NO：2的氨基酸位置26至氨基酸位置286的氨基酸序列。[选择图]无

表1

DNA 塩基番号	系統		タンパク質		系統	
	c 216	95-140	アミノ酸番号	c 216	95-140	
120	- ^a	T	- ^b	-	-	
336	G	A	73	D	N	
463	A	G	115	Q	R	
490	A	G	124	Q	R	
751	T	G	211	L	R	
838	A	C	240	Q	P	
843	C	G	242	H	D	
896	A	G	-	-	-	
982	G	T	-	-	-	
1043	C	A	-	-	-	
1090	G	A	-	-	-	