(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2016-178944
(P2016-178944A)
(43)公開日　平成28年10月13日(2016.10.13)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	A	4B029
A61K 35/12	(2015.01)	A61K	35/12		4B063
A61K 35/76	(2015.01)	A61K	35/76		4B064
A61K 39/395	(2006.01)	A61K	39/395	D	4B065
A61K 45/00	(2006.01)	A61K	39/395	L	4C076

審査請求 有　請求項の数 1　ＯＬ　外国語出願　（全 136 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2016-132338 (P2016-132338)
(22)出願日　平成28年7月4日 (2016.7.4)
(62)分割の表示　特願2013-502700 (P2013-502700)の分割
原出願日　平成23年3月28日 (2011.3.28)
(31)優先権主張番号　61/454,972
(32)優先日　平成23年3月21日 (2011.3.21)
(33)優先権主張国　米国 (US)
(31)優先権主張番号　61/397,891
(32)優先日　平成22年6月16日 (2010.6.16)
(33)優先権主張国　米国 (US)
(31)優先権主張番号　61/347,362
(32)優先日　平成22年5月21日 (2010.5.21)
(33)優先権主張国　米国 (US)

(71)出願人　510090748
ユニバーシティー　オブ　サザン　カリフォルニア
アメリカ合衆国　カリフォルニア　９００１５，　ロサンゼルス，　サウス　オリーブ　ストリート　１１５０，　スイート　２３００，　ユーエスシー　スティーブンズ　インスティテュート　フォー　イノベーション

最終頁に続く

(54)【発明の名称】バイオフィルムの除去のための組成物および方法

(57)【要約】
【課題】バイオフィルムの除去のための組成物および方法の提供。
【解決手段】本発明は、慢性／再発バイオフィルム疾患に罹患している個体に対するワクチン、または既存の感染症を有する個体に対する治療薬として有用な、単離されたかまたは組換え型のポリペプチドを提供する。これによって、個体の免疫系は、機能的な保護性のバイオフィルムの構築およびびまたは維持に干渉することによってこれらの細菌を予防するかまたは宿主から取り除く抗体を自然に生成する。あるいは、ポリペプチドに対する抗体を、感染症を処置または予防するために投与することができる。機能性バイオフィルムを形成することができない細菌は、宿主の免疫系の残りの部分によってより容易に取り除かれる。
【選択図】なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
明細書に記載された発明。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願への相互参照
この出願は、２０１０年３月２９日に出願された米国仮出願番号６１／３１８，７４３、２０１０年５月２１日に出願された米国仮出願番号６１／３４７，３６２、２０１０年６月１６日に出願された米国仮出願番号６１／３９７，８９１、および２０１１年３月２１日に出願された米国仮出願番号６１／４５４，９７２の米国特許法１１９条（ｅ）項の下での利益を主張し、上記の米国仮出願の各内容は、その全容が参考として本開示に援用される。
【０００２】
政府支援についての陳述
本発明は、国立衛生研究所の国立歯科・頭蓋顔面研究所（ＮＩＤＣＲ）によって与えられたＣｏｎｔｒａｃｔ　Ｎｏ．５Ｒ０１ＤＥ０１３２３０のもとで政府支援によってなされた。政府は本発明において一定の権利を有する。
【０００３】
発明の分野
本発明は、一般には、臨床的または工業的な細菌バイオフィルムを減らし、かつ／または除くための方法および組成物に関する。
【背景技術】
【０００４】
全ての慢性／再発疾患の約３分の２は、哺乳動物の体内のバイオフィルム中で存続する細菌によって引き起こされる。これらのバイオフィルムは、多くの場合主にＤＮＡで構成される外側の「粘液」によって保護された細菌で構成され、自然免疫系および適応免疫系、抗生物質および他の抗菌剤が細菌の内側のバイオフィルムに近づくことを妨げ、体から感染を取り除くことを非常に難しくしている。さらに、バイオフィルムは、多くの場合致死的な結果を伴う将来の急性感染の貯蔵器としての機能を果たし得る。
【０００５】
公知の真正細菌全てにおいてタンパク質のＤＮＡＢＩファミリーからの少なくとも１つのタンパク質が見いだされ、細菌細胞の外側に天然に見いだされる。これらにより、強力な自然免疫応答が引き出されるが、宿主被験体は感染の結果として、ファミリーメンバーに対する特異的な抗体を天然に生じることができない。細菌バイオフィルムに伴う主要な問題は、宿主免疫系および／または抗生物質および他の抗菌薬が、バイオフィルム内に保護された細菌に近づくことができないことである。
【０００６】
バイオフィルムは、工業の場にも存在する。例えば、バイオフィルムは、生産現場からガソリンスタンドの貯蔵タンクまでの広範囲の石油の加工問題に関係づけられる。現場では、硫酸還元性バイオフィルム細菌が硫化水素を産生する（酸油（ｓｏｕｒｅｄ　ｏｉｌ））。加工パイプラインでは、バイオフィルム活性により粘液が発生し、それがフィルターおよび開口部の邪魔になる。バイオフィルムおよびバイオフィルム生物は、パイプラインおよび石油加工装置の腐食も引き起こす。これらの問題は、油またはガスの生産設備全体を通して、汚損および腐食性のバイオフィルム生物が貯蔵タンクの最終製品の表面に見いだされるまで顕在化し得る。
【０００７】
家庭では、バイオフィルムは、微生物の成長を支持する任意の表面の中またはその上、例えば、排水管の中、調理台の上、トイレの中、およびスイミングプールおよびスパの中に見いだされる。

【０００８】
バイオフィルムは、家庭用と工業用の両方の広範囲の水の加工に関係づけられる。バイオフィルムは、加工装置の表面上で成長し、熱伝達の効率低下、またはフィルターおよび膜を塞ぐなど、装置の性能を害する可能性がある。冷却塔充填材上で成長しているバイオフィルムにより、充填材の崩壊を引き起こすのに十分な重量が加わる可能性がある。バイオフィルムは、高度に特殊化されたステンレス鋼でさえも腐食させる。水の加工におけるバイオフィルムにより、例えば、紙加工におけるバイオフィルムの汚染、またはシリコンチップ上への単一の細胞の付着でさえ、最終製品の価値を下げる可能性がある。飲料水の配水系統において成長しているバイオフィルムは、水の美的品質を劣化させる潜在的な病原生物、腐食性の生物体または細菌を有し得る。

【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【０００９】
したがって、バイオフィルムの保護性の関門を突き破って、関連する細菌感染症を処置し、または消滅させ、水系統の表面および内部からバイオフィルムを取り除く必要性がある。本発明は、この必要性を満たし、関連する利点も提供する。
【課題を解決するための手段】
【００１０】
配列表
配列番号１
Ａ１－Ａ２－Ａ３－Ａ４－Ａ５－Ａ６－Ａ７－Ａ８－Ａ９
ここで、Ａ１はＶまたはＩであり；Ａ２は、Ｋ、Ｑ、Ｅ、Ａ、ＶまたはＹのうちの任意の１つであり；Ａ３はＫ、Ｌ、Ｉ、ＶまたはＦのうちの任意の１つであり；Ａ４はＳ、Ｉ、ＲまたはＶのうちの任意の１つであり；Ａ５はＧまたはＳのうちの任意の１つであり；Ａ６はＦであり；Ａ７はＧであり；Ａ８はＮまたはＳまたはＴまたはＫのうちの任意の１つであり；Ａ９はＦである。
【００１１】
配列番号２は、ＶＫＫＳＧＦＧＮＦである。
【００１２】
配列番号３は、Ｂ１－Ｂ２－Ｂ３－Ｂ４－Ｂ５－Ｂ５－Ｂ６－Ｂ７であり、
Ｂ１は存在しない、またはＧまたはＫのうちの任意の１つであり；Ｂ２は存在しない、またはＲ、ＩまたはＫのうちの任意の１つであり；Ｂ３はＮまたはＶであり；Ｂ４はＰまたはＩであり；Ｂ５は、Ｋ、Ｑ、ＳまたはＧのうちの任意の１つであり；Ｂ６は、Ｔ、ＫまたはＳのうちの任意の１つであり；Ｂ７は、Ｇ、Ｋ、ＱまたはＤのうちの任意の１つである。
【００１３】
配列番号４はＮＰ（Ｋ／Ｑ）ＴＧである。
【００１４】
配列番号５　ＧＲＮＰ（Ｋ／Ｑ）ＴＧ
配列番号６　全長の野生型（ｗｔ）８６－０２８ＮＰ　Ｈａｅｍｏｐｈｉｌｕｓ　ｉｎｆｌｕｅｎｚａｅ　ＩｈｆＡ；
Ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＡＡＸ８８４２５．１、２０１１年３月２１日に最終アクセス：
【００１５】
【化１】
MATITKLDIIEYLSDKYHLSK
QDTKNVVENFLEEIRLSLESGQDVKLSGFGNFELRDKSSRPGRNPKTGDVVPVSARR
VVTFKPGQKLRARVEKTK
配列番号７　全長のｗｔ　８６－０２８ＮＰ　Ｈａｅｍｏｐｈｉｌｕｓ　ｉｎｆｌｕｅ

ｎｚａｅ　ＨＵ、Ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＹＰ＿２４８１４２．１、２０１１年３月２１日に最終アクセス：

【００１６】

【化２】

MRFVTIFINHAFNSSQVRLSFAQFLR

QIRKDTFKESNFLFNRRYKFMNKTDLIDAIANAAELNKKQAKAALEATLDAITASLK

EGEPVQLIGFGTFKVNERAARTGRNPQTGAEIQIAASKVPAFVSGKALKDAIK

配列番号８　全長のｗｔ　Ｒ２８４６　Ｈａｅｍｏｐｈｉｌｕｓ　ｉｎｆｌｕｅｎｚａｅ　ＩｈｆＡ、Ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＡＤＯ９６３７５、２０１１年３月２１日に最終アクセス：

【００１７】

【化３】

MATITKLDIIEYLSDKYHLSKQDTKNVVENFL

EEIRLSLESGQDVKLSGFGNFELRDKSSRPGRNPKTGDVVPVSARRVVTFKPGQKLR

ARVEKTK

配列番号９　全長のｗｔ　Ｒｄ　Ｈａｅｍｏｐｈｉｌｕｓ　ｉｎｆｌｕｅｎｚａｅ　ＩｈｆＡ、Ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＡＡＣ２２９５９．１、２０１１年３月２１日に最終アクセス：

【００１８】

【化４】

MATITKLDIIEYLSDKYHLSKQDTK

NVVENFLEEIRLSLESGQDVKLSGFGNFELRDKSSRPGRNPKTGDVVPVSARRVVTF

KPGQKLRARVEKTK;

配列番号１０　全長のｗｔ　Ｅ．ｃｏｌｉ　Ｋ１２　ＩｈｆＡ；Ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＡＡＣ７４７８２．１、２０１１年３月２１日に最終アクセス：

【００１９】

【化５】

MALTKAEMSEYLFDKLGLSKRDAKELVELFFE

EIRRALENGEQVKLSGFGNFDLRDKNQRPGRNPKTGEDIPITARRVVT

FRPGQKLKSRVENASPKDE; DNA Genbank No. NC_000913

配列番号１１　全長のｗｔ　Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ　ＰＡ　０１　ＩｈｆＡ；Ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＡＡＧ０６１２６．１、２０１１年３月２１日に最終アクセス：

【００２０】

【化６】

MGALTKAEIAERLYEELGLNKREA

KELVELFFEEIRQALEHNEQVKLSGFGNFDLRDKRQRPGRNPKTGEEIPITARRVVTF

RPGQKLKARVEAYAGTKS

配列番号１２および１３：（ＩＨＦα）のβ－３部分およびα－３部分、配列番号１２：ＴＦＲＰＧＱおよび配列番号１３：ＫＬＫＳＲＶＥＮＡＳＰＫＤＥ

配列番号１４および１５：（ＩＨＦβ）のβ－３部分およびα－３部分、配列番号１４：ＨＦＫＰＧＫおよび配列番号１５：ＥＬＲＤＲＡＮＩＹＧ

配列番号１６および１７：配列番号６のβ－３部分およびα－３部分、配列番号１６：ＴＦＫＰＧＱおよび配列番号１７：ＫＬＲＡＲＶＥＫＴＫ

配列番号１８および１９：２０１９　Ｈａｅｍｏｐｈｉｌｕｓ　ｉｎｆｌｕｅｎｚａｅ

ＩｈｆＡのβ－３部分およびα－３部分、配列番号１８：ＴＦＫＰＧＱおよび配列番号１９：ＫＬＲＡＲＶＥＮＴＫ
配列番号２０および２１：配列番号８のβ－３部分およびα－３部分、配列番号２０：ＴＦＫＰＧＱおよび配列番号２１：ＫＬＲＡＲＶＥＫＴＫ
配列番号２２および２３：配列番号９のβ－３部分およびα－３部分、配列番号２２：ＴＦＫＰＧＱおよび配列番号２３：ＫＬＲＡＲＶＥＫＴＫ
配列番号２４および２５：配列番号１０のβ－３部分およびα－３部分、配列番号２４：ＴＦＲＰＧＱおよび配列番号２５：ＫＬＫＳＲＶＥＮＡＳＰＫＤＥ
配列番号２６および２７： 配列番号１１のβ－３部分およびα－３部分、配列番号２６：ＴＦＲＰＧＱおよび配列番号２７：ＫＬＫＡＲＶＥＡＹＡＧＴＫＳ
配列番号２８：Ｅ．ｃｏｌｉ ｈｕｐＡ、Ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＡＰ＿００３８１８、２０１１年３月２１日に最終アクセス：

【００２１】

【化７】

MNKTQLIDVIAEKAELSKTQAKAALESTLAAITESLKEGDAVQLVGFGTFK

VNHRAERTGRNPQTGKEIKIAAANVPAFVSGKALKDAVK

配列番号２９：Ｅ．ｃｏｌｉ ｈｕｐＢ、Ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＡＰ＿００１０９０．１、２０１１年３月２１日に最終アクセス：

【００２２】

【化８】

MNKSQLIDKIAAGADISKAAAGRALDAIIASVTESLKEGDDVALVGFG

TFAVKERAARTGRNPQTGKEITIAAAKVPSFRAGKALKDAVN

配列番号３０および３１：配列番号２８のβ－３部分およびα－３部分、配列番号３０：ＡＦＶＳＧＫおよび配列番号３１：ＡＬＫＤＡＶＫ
配列番号３２および３３：配列番号２９のβ－３部分およびα－３部分、配列番号３２：ＳＦＲＡＧＫおよび配列番号３３：ＡＬＫＤＡＶＮ
配列番号３４：ＩＨＦ αのＣ末端の２０アミノ酸：ＴＦＲＰＧＱＫＬＫＳＲＶＥＮＡＳＰＫＤＥ
配列番号３５：ＩＨＦ βのＣ末端の２０アミノ酸：ＫＹＶＰＨＦＫＰＧＫＥＬＲＤＲＡＮＩＹＧ
配列番号３６：ＤＮＡＢＩＩ結合性コンセンサス配列：ＷＡＴＣＡＡＮＮＮＮＴＴＲ、ＷはＡまたはＴであり、Ｎは任意の塩基であり、Ｒはプリンである
配列番号３３７：Ｅ．ｃｏｌｉ ＩＨＦアルファ：ＧＲＮＰＫＴＧＥＤＩＰＩ
配列番号３３８：Ｅ．ｃｏｌｉ ＩＨＦベータ：ＧＲＮＰＫＴＧＤＫＶＥＬ
配列番号３３９：Ｅ．ｃｏｌｉ ＨＵアルファ：ＧＲＮＰＱＴＧＫＥＩＫＩ
配列番号３４０：Ｅ．ｃｏｌｉ ＨＵベータ：ＧＲＮＰＱＴＧＫＥＩＴＩ。

【００２３】

表の説明

表１～５は、示された生物体におけるバイオフィルムの逆転のｉｎ ｖｉｔｒｏバイオアッセイの結果である。

【００２４】

表６は、中耳炎（ＯＭ）のチンチラモデルにおける、中耳内のバイオマスの相対量のスコアリングスキームである。

【００２５】

表７は、ＤＮアーゼを用いて処理した際のバイオフィルムの逆転のｉｎ ｖｉｔｒｏバイオアッセイの結果である。

【００２６】

表８は、本明細書において提供される方法において使用することができる、グラム（＋

）細菌およびグラム（－）細菌によって産生されるＤＮＡ結合性タンパク質の非限定的な要約である。

【００２７】

表９Ａは、本発明の種々の実施形態のＤＮＡ結合性タンパク質の関連する部分の配列アラインメントである。太字は、コンセンサスとの正確な一致を示し、薄い灰色の文字は、保存されたアミノ酸の変化を示し、薄い影付きまたは濃い影付きの配列は、種間にわたって高度に保存されている。アミノ末端および／またはカルボキシ末端における灰色の影付きの未定義の配列は、コンセンサス配列と共有されない未定義のアミノ酸である。表９Ａは、Ｏｂｅｔｏら（１９９４年）Ｂｉｏｃｈｉｍｉｅ　７６巻：９０１～９０８頁において以前公開された情報に基づく。表９Ｂは、１６アミノ酸ペプチドモチーフの、Ｌｉｕら（２００８年）Ｃｅｌｌ　Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．　１０巻（１号）：２６２～２７６頁に対する比較である。

【００２８】

表１０は、示された生物体由来のＤＮＡＢＩＩタンパク質のα部分、β部分、およびＣ末端部分の一覧表である。

特定の実施形態では、例えば以下が提供される：

（項目１）

ＤＮＡＢＩＩポリペプチドまたはＤＮＡＢＩＩタンパク質の微生物ＤＮＡへの結合を阻害するための、該結合と競合するための、または該結合の力価を決定するための方法であって、該ＤＮＡＢＩＩポリペプチドもしくは該ＤＮＡＢＩＩタンパク質または該微生物ＤＮＡを干渉作用剤と接触させて、該ＤＮＡＢＩＩタンパク質または該ＤＮＡＢＩＩポリペプチドの該微生物ＤＮＡへの結合を阻害する工程、該結合と競合する工程、または該結合の力価を決定する工程を含む、方法。

（項目２）

微生物バイオフィルムを阻害、予防または破壊するための方法であって、該バイオフィルムを干渉作用剤と接触させて、該微生物バイオフィルムを阻害、予防または破壊する工程を含む、方法。

（項目３）

前記接触がｉｎ　ｖｉｔｒｏまたはｉｎ　ｖｉｖｏでの接触である、項目１または２に記載の方法。

（項目４）

被験体におけるバイオフィルムを阻害、予防または破壊する方法であって、該被験体に有効量の干渉作用剤を投与して、該微生物バイオフィルムを阻害、予防または破壊する工程を含む、方法。

（項目５）

被験体においてバイオフィルムを生じる微生物感染症を阻害、予防または処置するための方法であって、該被験体に有効量の干渉作用剤を投与して、該被験体において該バイオフィルムを生じる微生物感染症を阻害、予防または処置する工程を含む、方法。

（項目６）

前記干渉作用剤が、

（ａ）単離されたかもしくは組換え型の組込み宿主因子（ＩＨＦ）ポリペプチド、またはそのそれぞれの断片もしくは等価物、

（ｂ）Ｅ．ｃｏｌｉのＵ９３株由来の単離されたかもしくは組換え型のヒストン様タンパク質（ＨＵ）ポリペプチド、またはそのそれぞれの断片もしくは等価物、

（ｃ）表８、表９Ａ、９Ｂ、表１０において同定される単離されたかもしくは組換え型のタンパク質もしくはポリペプチド、または図６において同定されるＤＮＡ結合性ペプチド、またはそのそれぞれの断片もしくは等価物、

（ｄ）配列番号１～３４０の単離されたかもしくは組換え型のポリペプチド、またはそのそれぞれの断片もしくは等価物、

（ｅ）配列番号６～１１、２８、２９、４２～１００、表８の単離されたかもしくは組

換え型のＣ末端のポリペプチド、または表１０において同定される単離されたかもしくは組換え型のＣ末端のポリペプチド、またはそのそれぞれの断片もしくは等価物、
（ｆ）微生物ＤＮＡへの結合について、組込み宿主因子と競合するポリペプチドまたはポリヌクレオチド、
（ｇ）ホリデイジャンクションと似ている４方向ジャンクションポリヌクレオチド、複製フォークと似ている３方向ジャンクションポリヌクレオチド、固有の柔軟性を有するポリヌクレオチド、または屈曲したポリヌクレオチド、
（ｈ）（ａ）～（ｆ）のうちの任意の１つをコードする単離されたかもしくは組換え型のポリヌクレオチド、または配列番号３６の単離されたかもしくは組換え型のポリヌクレオチド、またはそのそれぞれの等価物、またはストリンジェントな条件下で該ポリヌクレオチド、その等価物もしくはその相補物とハイブリダイズするポリヌクレオチド、
（ｉ）（ａ）～（ｆ）のうちの任意の１つを特異的に認識するかもしくは特異的に結合する抗体もしくは抗原結合性断片、または各抗体もしくはその抗原結合性断片の等価物もしくは断片、
（ｊ）（ｉ）の抗体もしくは抗原結合性断片をコードする単離されたかもしくは組換え型のポリヌクレオチド、またはその相補物、あるいは
（ｋ）ＤＮＡＢＩＩタンパク質もしくはＤＮＡＢＩＩポリペプチドの微生物ＤＮＡへの結合と競合する小分子
の群の干渉作用剤である、項目１から５までのいずれか一項に記載の方法。
（項目７）
前記干渉作用剤が、単離されたかもしくは組換え型のＤＮＡＢＩＩポリペプチド、またはそのそれぞれの断片もしくは等価物である、項目１から６までのいずれか一項に記載の方法。
（項目８）
前記ＤＮＡＢＩＩポリペプチドが、ＩＨＦポリペプチドもしくはその断片、ＩＨＦポリペプチドのＣ末端断片、またはそのそれぞれの等価物である、項目７に記載の方法。
（項目９）
前記ＤＮＡＢＩＩポリペプチドが、ＨＵポリペプチドもしくはその断片、ＨＵポリペプチドのＣ末端断片、またはそのそれぞれの等価物である、項目７に記載の方法。
（項目１０）
前記被験体に、抗菌薬、ＤＮアーゼ、抗体、抗原性ペプチドまたはアジュバントのうちの１つまたは複数を有効量で投与する工程をさらに含む、項目４から９までのいずれか一項に記載の方法。
（項目１１）
前記被験体が非ヒト動物またはヒト患者である、項目４から１０までのいずれか一項に記載の方法。
（項目１２）
前記微生物ＤＮＡが、表８において同定される微生物由来である、項目１から１１までのいずれか一項に記載の方法。
（項目１３）
前記作用剤が、局所的投与、経真皮的投与、経皮的投与、舌下投与、直腸投与、膣投与、眼投与、皮下投与、筋肉内投与、腹腔内投与、尿道投与、鼻腔内投与、吸入投与または経口的投与を含む方法によって投与される、項目４から１２までのいずれか一項に記載の方法。
（項目１４）
前記被験体が小児患者であり、前記作用剤が該小児患者のための処方物において投与される、項目４から１２までのいずれか一項に記載の方法。
（項目１５）
免疫応答を必要とする被験体において免疫応答を誘導するか、または受動免疫を必要とする被験体に受動免疫を付与するための方法であって、該被験体に、

（ａ）単離されたかもしくは組換え型の組込み宿主因子（ＩＨＦ）ポリペプチド、またはそのそれぞれの断片もしくは等価物、
（ｂ）Ｅ．ｃｏｌｉのＵ９３株由来の単離されたかもしくは組換え型のヒストン様タンパク質（ＨＵ）ポリペプチド、またはそのそれぞれの断片もしくは等価物、
（ｃ）表８、表９Ａ、表９Ｂ、表１０において同定される単離されたかもしくは組換え型のタンパク質ポリペプチド、または図６において同定されるＤＮＡ結合性ペプチド、またはそのそれぞれの断片もしくは等価物、
（ｄ）配列番号１～３４０の単離されたかもしくは組換え型のポリペプチド、またはその断片もしくは等価物、
（ｅ）配列番号６～１１、２８、２９、４２～１００、表８の単離されたかもしくは組換え型のＣ末端のポリペプチド、または表１０において同定される単離されたかもしくは組換え型のＣ末端のポリペプチド、またはそのそれぞれの断片もしくは等価物、
（ｆ）（ａ）～（ｅ）のうちの任意の１つをコードする単離されたかもしくは組換え型のポリヌクレオチド、または配列番号３６の単離されたかもしくは組換え型のポリヌクレオチド、またはそのそれぞれの等価物、またはストリンジェントな条件下で該ポリヌクレオチド、その等価物もしくはその相補物とハイブリダイズするポリヌクレオチド、
（ｇ）（ａ）～（ｅ）のうちの任意の１つを特異的に認識するかもしくは特異的に結合する抗体もしくは抗原結合性断片、またはそのそれぞれの等価物もしくは断片、
（ｈ）（ｇ）の抗体または抗原結合性断片をコードする、単離されたかまたは組換え型のポリヌクレオチド
（ｉ）（ａ）～（ｅ）のうちの任意の１つでパルスした抗原提示細胞、および
（ｉ）（ａ）～（ｅ）のうちの任意の１つをコードする１種または複数種のポリヌクレオチドがトランスフェクトされた抗原提示細胞
の群のうちの１つまたは複数の作用剤を有効量で投与する工程を含む、方法。
（項目１６）
前記作用剤が、単離されたかもしくは組換え型のＤＮＡＢＩＩポリペプチド、またはその断片もしくは等価物を含む、項目１５に記載の方法。
（項目１７）
前記ＤＮＡＢＩＩポリペプチドが、ＩＨＦポリペプチドもしくはその断片、ＩＨＦポリペプチドのＣ末端断片、またはそのそれぞれの等価物である、項目１６に記載の方法。
（項目１８）
前記ＤＮＡＢＩＩポリペプチドが、ＨＵポリペプチドもしくはその断片、ＨＵポリペプチドのＣ末端断片、またはそのそれぞれの等価物である、項目１６に記載の方法。
（項目１９）
前記被験体に、抗菌薬、ＤＮアーゼ、抗体、抗原性ペプチドまたはアジュバントのうちの１つまたは複数を有効量で投与する工程をさらに含む、項目１５から１８までのいずれか一項に記載の方法。
（項目２０）
前記被験体が非ヒト動物またはヒト患者である、項目１５から１９までのいずれか一項に記載の方法。
（項目２１）
前記単離されたかまたは組換え型のポリヌクレオチドが、表８において同定される微生物に由来する、項目１５から２０までのいずれか一項に記載の方法。
（項目２２）
前記作用剤が、局所的投与、経真皮的投与、経皮的投与、舌下投与、直腸投与、膣投与、眼投与、皮下投与、筋肉内投与、腹腔内投与、尿道投与、鼻腔内投与、吸入投与または経口的投与を含む方法によって投与される、項目１５から２１までのいずれか一項に記載の方法。
（項目２３）
前記被験体が小児患者であり、前記作用剤が該小児患者のための処方物において投与さ

れる、項目１５から２２までのいずれか一項に記載の方法。
（項目２４）
配列番号１～５もしくは１２～２７、３０～３５、１０１～３４０から選択されるアミノ酸配列から本質的になる単離されたかもしくは組換え型のポリペプチド、または図６において同定されるＤＮＡ結合性ペプチド、またはそのそれぞれの断片もしくは等価物。
（項目２５）
配列番号１または２を含む単離されたかまたは組換え型のポリペプチドであって、配列番号６～１１、２８、２９、または４２～１００のいずれでもない、ポリペプチド。
（項目２６）
配列番号３、４、または５を含む単離されたかまたは組換え型のポリペプチドであって、配列番号６～１１、２８、２９、または４２～１００のいずれでもない、ポリペプチド。
（項目２７）
配列番号１２、１４、１６、１８、２０、２２、２４、２６、３０、または３２を含む単離されたかまたは組換え型のポリペプチドであって、配列番号６～１１、２８、２９、または４２～１００のいずれでもない、ポリペプチド。
（項目２８）
配列番号１３、１５、１７、１９、２１、２３、２５、２７、３１、または３３を含む単離されたかまたは組換え型のポリペプチドであって、配列番号６～１１、２８、２９、または４２～１００のいずれでもない、ポリペプチド。
（項目２９）
配列番号１２および１３を含むポリペプチド、
配列番号１４および１５を含むポリペプチド、
配列番号１６および１７を含むポリペプチド、
配列番号１８および１９を含むポリペプチド、
配列番号２０および２１を含むポリペプチド、
配列番号２３および２４を含むポリペプチド、
配列番号２５および２６を含むポリペプチド、
配列番号３０および３１を含むポリペプチド、
配列番号３２および３３を含むポリペプチド、
配列番号３４および３５を含むポリペプチド、
配列番号３３７および３３８を含むポリペプチド、または
配列番号３３９および３４０を含むポリペプチド
の群の単離されたかまたは組換え型のポリペプチドであって、
ＩＨＦアルファ、ＩＨＦベータのうちの任意の１つの野生型、または配列番号６～１１、２８、２９、もしくは４２～１００のいずれでもない、ポリペプチド。
（項目３０）
配列番号１２および１３から本質的になるポリペプチド、
配列番号１４および１５から本質的になるポリペプチド、
配列番号１６および１７から本質的になるポリペプチド、
配列番号１８および１９から本質的になるポリペプチド、
配列番号２０および２１から本質的になるポリペプチド、
配列番号２３および２４から本質的になるポリペプチド、
配列番号２５および２６から本質的になるポリペプチド、
配列番号３０および３１から本質的になるポリペプチド、
配列番号３２および３３から本質的になるポリペプチド、
配列番号３４および３５から本質的になるポリペプチド、
配列番号３３７および３３８から本質的になるポリペプチド、または
配列番号３３９および３４０から本質的になるポリペプチド
の群の単離されたかまたは組換え型のポリペプチドであって、

ＩＨＦアルファ、ＩＨＦベータのうちの任意の１つの野生型、または配列番号６～１１、２８、２９、もしくは４２～１００のいずれでもない、ポリペプチド。
（項目３１）
項目２４から３０までのいずれか一項に記載の単離されたかまたは組換え型のポリペプチドの断片または等価物。
（項目３２）
項目２２から３１までのいずれか一項に記載の単離されたかまたは組換え型のポリペプチドの２つ以上を含む、単離されたかまたは組換え型のポリペプチド。
（項目３３）
項目２４から３２までのいずれかに記載のポリペプチドをコードする単離されたかもしくは組換え型のポリヌクレオチド、またはその相補物。
（項目３４）
項目３３に記載の単離されたかまたは組換え型のポリヌクレオチドを含むベクター。
（項目３５）
項目２４から３２までのいずれか一項に記載の単離されたかもしくは組換え型のポリペプチド、項目３３に記載の単離されたかもしくは組換え型のポリヌクレオチド、または項目３４に記載のベクターを含む、単離された宿主細胞。
（項目３６）
項目２４から３２までのいずれか一項に記載の単離されたかまたは組換え型のポリペプチドを含む、単離された抗原提示細胞であって、該ポリペプチドが該細胞の表面上に存在する、抗原提示細胞。
（項目３７）
樹状細胞である、項目３６に記載の単離された抗原提示細胞。
（項目３８）
項目２４から３２までのいずれか一項に記載の単離されたかもしくは組換え型のポリペプチドを特異的に認識するかもしくは特異的に結合する抗体もしくは抗原結合性断片、または該抗体もしくは該抗原結合性断片をコードする、単離されたかもしくは組換え型のポリヌクレオチド。
（項目３９）
ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、抗体誘導体、ベニア化抗体、二機能性抗体、抗体誘導体、組換えヒト抗体、キメラ抗体、または抗体断片の群より選択される、項目３４に記載の抗体。
（項目４０）
モノクローナル抗体である、項目３９に記載の抗体。
（項目４１）
項目４０に記載の抗体を産生するハイブリドーマ細胞株。
（項目４２）
キャリアと、
（ａ）項目２４から３２までのいずれか一項に記載の単離されたかもしくは組換え型のポリペプチド、
（ｂ）項目３３に記載の単離されたかもしくは組換え型のポリヌクレオチド、
（ｃ）項目３４に記載のベクター、
（ｄ）項目３５から３７までのいずれか一項に記載の単離された宿主細胞、または
（ｅ）項目３８から４０までのいずれか一項に記載の抗体
のうちの１つまたは複数と
を含む、組成物。
（項目４３）
アジュバント、抗原性ペプチドまたは抗菌薬のうちの１つまたは複数をさらに含む、項目４２に記載の組成物。
（項目４４）

前記キャリアが、液体キャリア、薬学的に許容されるキャリア、固相キャリア、薬学的に許容されるポリマー、リポソーム、ミセル、インプラント、ステント、ペースト、ゲル、歯科インプラントまたは医療用インプラントの群より選択される、項目４２または４３に記載の組成物。

（項目４５）

ヒト患者または非ヒト動物に投与するために処方されたものである、項目４２から４４までのいずれか一項に記載の組成物。

（項目４６）

局所的投与、経真皮的投与、経皮的投与、舌下投与、直腸投与、膣投与、眼投与、皮下投与、筋肉内投与、腹腔内投与、尿道投与、鼻腔内投与、吸入投与または経口的投与を含む１種または複数種の方法によって投与するために処方されたものである、項目４２から４４までのいずれか一項に記載の組成物。

（項目４７）

小児患者のために処方されたものである、項目４２から４６までのいずれか一項に記載の組成物。

（項目４８）

（ａ）項目２４から３２までのいずれか一項に記載の単離されたかもしくは組換え型のポリペプチド、

（ｂ）項目３３に記載の単離されたかもしくは組換え型のポリヌクレオチド、

（ｃ）項目３４に記載のベクター、

（ｄ）項目３５から３７までのいずれか一項に記載の単離された宿主細胞、

（ｅ）項目３８から４０までのいずれか一項に記載の抗体、

（ｆ）項目４２に記載の組成物、

（ｇ）単離されたかもしくは組換え型の組込み宿主因子（ＩＨＦ）ポリペプチド、またはそのそれぞれの断片もしくは等価物、

（ｈ）Ｅ．ｃｏｌｉのＵ９３株由来の単離されたかもしくは組換え型のヒストン様タンパク質（ＨＵ）ポリペプチド、またはそのそれぞれの断片もしくは等価物、

（ｉ）表８、表９Ａ、表９Ｂ、表１０において同定される単離されたかもしくは組換え型のタンパク質ポリペプチド、図６において同定されるＤＮＡ結合性ペプチド、またはそのそれぞれの断片もしくは等価物、

（ｊ）配列番号１～３４０の単離されたかもしくは組換え型のポリペプチド、またはそのそれぞれの断片もしくは等価物、

（ｋ）配列番号６～１１、２８、２９、４２～１００、表８の単離されたかもしくは組換え型のＣ末端のポリペプチド、または表１０において同定される単離されたかもしくは組換え型のＣ末端のポリペプチド、またはそのそれぞれの断片もしくは等価物、

（ｌ）微生物ＤＮＡへの結合について組込み宿主因子と競合するポリペプチド、

（ｍ）ホリデイジャンクションと似ている４方向ジャンクションポリヌクレオチド、複製フォークと似ている３方向ジャンクションポリヌクレオチド、固有の柔軟性を有するポリヌクレオチド、または屈曲したポリヌクレオチド、

（ｎ）（ｇ）～（ｌ）のうちの任意の１つをコードする、単離されたかまたは組換え型のポリヌクレオチド、

（ｏ）（ｇ）～（ｌ）のうちの任意の１つを特異的に認識するかもしくは特異的に結合する抗体もしくは抗原結合性断片、またはその等価物もしくは断片、

（ｐ）（ｏ）の抗体または抗原結合性断片をコードする、単離されたかまたは組換え型のポリヌクレオチド、および

（ｑ）ＤＮＡＢＩＩタンパク質またはＤＮＡＢＩＩポリペプチドの微生物ＤＮＡへの結合と競合する小分子

の群のうちの任意の１つまたは複数の作用剤と、

使用説明書と

を含む、キット。

（項目４９）
アジュバント、抗原性ペプチド、ＤＮアーゼ、抗体、または抗菌薬のうちの１つまたは複数をさらに含む、項目４８に記載のキット。
（項目５０）
液体キャリア、薬学的に許容されるキャリア、固相キャリア、薬学的に許容されるポリマー、リポソーム、ミセル、インプラント、ステント、ペースト、ゲル、歯科インプラント、または医療用インプラントの群より選択されるキャリアをさらに含む、項目４８または４９に記載のキット。
（項目５１）
ＤＮＡＢＩＩタンパク質またはＤＮＡＢＩＩポリペプチドおよび微生物ＤＮＡを含有する試料において、ＤＮＡＢＩＩタンパク質またはＤＮＡＢＩＩポリペプチドの微生物ＤＮＡへの結合を調節する作用剤を同定する方法であって、候補作用剤を該試料と接触させる工程、および該タンパク質または該ポリペプチドの該ＤＮＡへの結合についてアッセイする工程を含む、方法。
（項目５２）
前記作用剤が、前記ＤＮＡＢＩＩタンパク質または前記ＤＮＡＢＩＩポリペプチドの前記微生物ＤＮＡへの結合を阻害すること、該結合を予防すること、または該結合の力価を決定することによって該結合を調節する、項目５１に記載の方法。
（項目５３）
（ａ）項目２４から３２までのいずれか一項に記載の単離されたかまたは組換え型のポリペプチド、
（ｂ）項目３３に記載の単離されたかまたは組換え型のポリヌクレオチド、
（ｃ）項目３４に記載のベクター、
（ｄ）項目３５から３７までのいずれか一項に記載の単離された宿主細胞、
（ｅ）項目３８から４０までのいずれか一項に記載の抗体、
（ｆ）項目４２に記載の組成物、
（ｇ）単離されたかもしくは組換え型の組込み宿主因子（ＩＨＦ）ポリペプチド、またはそのそれぞれの断片もしくは等価物、
（ｈ）Ｅ．ｃｏｌｉのＵ９３株由来の単離されたかもしくは組換え型のヒストン様タンパク質（ＨＵ）ポリペプチド、またはそのそれぞれの断片もしくは等価物、
（ｉ）表８、表９Ａ、表９Ｂ、表１０において同定される単離されたかもしくは組換え型のタンパク質ポリペプチド、図６において同定されるＤＮＡ結合性ペプチド、またはそのそれぞれの断片もしくは等価物、
（ｊ）配列番号１～３４０の単離されたかもしくは組換え型のポリペプチド、またはそのそれぞれの断片もしくは等価物、
（ｋ）配列番号６～１１、２８、２９、４２～１００、表８の単離されたかもしくは組換え型のＣ末端のポリペプチド、または表１０において同定される単離されたかもしくは組換え型のＣ末端のポリペプチド、またはそのそれぞれの断片もしくは等価物、
（ｌ）微生物ＤＮＡへの結合について組込み宿主因子と競合するポリペプチド、
（ｍ）ホリデイジャンクションと似ている４方向ジャンクションポリヌクレオチド、複製フォークと似ている３方向ジャンクションポリヌクレオチド、固有の柔軟性を有するポリヌクレオチド、または屈曲したポリヌクレオチド、
（ｎ）（ｇ）～（ｌ）のうちの任意の１つをコードする、単離されたかまたは組換え型のポリヌクレオチド、
（ｏ）（ｇ）～（ｌ）のうちの任意の１つを特異的に認識するかもしく特異的に結合する抗体もしくは抗原結合性断片、またはその等価物もしくは断片、あるいは
（ｐ）（ｏ）の抗体または抗原結合性断片をコードする、単離されたかまたは組換え型のポリヌクレオチド、および
（ｑ）ＤＮＡＢＩＩタンパク質またはＤＮＡＢＩＩポリペプチドの微生物ＤＮＡへの結合と競合する小分子

の群のうちの作用剤の使用。
（項目５４）
前記抗体がモノクローナル抗体またはその断片である、項目６または１５に記載の方法。
（項目５５）
前記モノクローナル抗体またはその断片が、ヒト抗体、ヒト化抗体、組換え抗体、キメラ抗体、ベニア化抗体、修飾抗体または抗体誘導体である、項目５４に記載の方法。
（項目５６）
前記抗体が、ＶＨおよび／またはＶＬのＣＤＲ１領域、ＣＤＲ２領域および／またはＣＤＲ３領域内の保存的アミノ酸変異によって修飾されている、項目５５に記載の方法。
（項目５７）
前記抗体が、システイン残基の数を変更することによって、またはＦｃヒンジ領域内の保存的アミノ酸変異によって修飾されている、項目５５に記載の方法。
（項目５８）
前記モノクローナル抗体またはその断片が化学修飾されている、項目５５に記載の方法。
（項目５９）
前記モノクローナル抗体またはその断片がペグ化されている、項目５８に記載の方法。
（項目６０）
前記モノクローナル抗体またはその断片が、血清タンパク質とコンジュゲートしている、項目５８に記載の方法。
（項目６１）
前記血清タンパク質がヒト血清アルブミンである、項目６０に記載の方法。
（項目６２）
前記モノクローナル抗体またはその断片が、診断薬とコンジュゲートしている、項目５５に記載の方法。
（項目６３）
前記診断薬が、酵素、補欠分子族複合体、蛍光材料、発光材料、生物発光材料、放射性材料、陽電子放出性金属および非放射性常磁性金属イオンからなる群より選択される、項目６２に記載の方法。
（項目６４）
前記酵素が、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、ベータガラクトシダーゼおよびアセチルコリンエステラーゼからなる群より選択される、項目６３に記載の方法。
（項目６５）
前記補欠分子族複合体が、ストレプトアビジン／ビオチンおよびアビジン／ビオチンからなる群より選択される、項目６３に記載の方法。
（項目６６）
前記蛍光材料が、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、ダンシルクロリドおよびフィコエリトリンからなる群より選択される、項目６３に記載の方法。
（項目６７）
前記発光材料がルミノールである、項目６３に記載の方法。
（項目６８）
前記生物発光材料が、ルシフェラーゼ、ルシフェリンおよびエクオリンからなる群より選択される、項目６３に記載の方法。
（項目６９）
前記放射性材料が、^{125}Ｉ、^{131}Ｉ、インジウム１１１、ルテチウム１７１、ビスマス２１２、ビスマス２１３、アスタチン２１１、銅６２、銅６４、銅６７、イットリウム９０、ヨウ素１２５、ヨウ素１３１、リン３２、リン３３、スカンジウム４７、銀１１

１、ガリウム６７、プラセオジム１４２、サマリウム１５３、テルビウム１６１、ジスプロシウム１６６、ホルミウム１６６、レニウム１８６、レニウム１８８、レニウム１８９、鉛２１２、ラジウム２２３、アクチニウム２２５、鉄５９、セレン７５、ヒ素７７、ストロンチウム８９、モリブデン９９、ロジウム１０５、パラジウム１０９、プラセオジム１４３、プロメチウム１４９、エルビウム１６９、イリジウム１９４、金１９８、金１９９および鉛２１１からなる群より選択される、項目６３に記載の方法。

（項目７０）

前記モノクローナル抗体またはその断片が治療剤とコンジュゲートしている、項目５５に記載の方法。

（項目７１）

前記治療剤が抗菌薬である、項目７０に記載の方法。

（項目７２）

前記治療剤が、リボヌクレアーゼ（ＲＮアーゼ）、ＤＮアーゼＩ、アンチセンス核酸、阻害性ＲＮＡ分子、免疫賦活性核酸、アプタマー、リボザイム、三重鎖形成分子および外部ガイド配列からなる群より選択される、項目７０に記載の方法。

（項目７３）

前記モノクローナル抗体またはその断片が、少なくとも１つの追加的な機能分子とコンジュゲートしているかまたは融合している、項目５５に記載の方法。

（項目７４）

前記追加的な機能分子が第２の抗体である、項目７３に記載の方法。

（項目７５）

前記抗体がモノクローナル抗体またはその断片である、項目３８から４０までのいずれか一項に記載の抗体。

（項目７６）

前記モノクローナル抗体またはその断片が、ヒト抗体、ヒト化抗体、組換え抗体、キメラ抗体、ベニア化抗体、修飾抗体または抗体誘導体である、項目７５に記載の抗体。

（項目７７）

ＶＨおよび／またはＶＬのＣＤＲ１領域、ＣＤＲ２領域および／またはＣＤＲ３領域内の保存的アミノ酸変異によって修飾されている、項目７６に記載の抗体。

（項目７８）

システイン残基の数を変更することによって、またはＦｃヒンジ領域内の保存的アミノ酸変異によって修飾されている、項目７６に記載の抗体。

（項目７９）

前記モノクローナル抗体またはその断片が化学修飾されている、項目７６に記載の抗体。

（項目８０）

前記モノクローナル抗体またはその断片がペグ化されている、項目７９に記載の抗体。

（項目８１）

前記モノクローナル抗体またはその断片が、血清タンパク質とコンジュゲートしている、項目７９に記載の抗体。

（項目８２）

前記血清タンパク質がヒト血清アルブミンである、項目８１に記載の抗体。

（項目８３）

前記モノクローナル抗体またはその断片が、診断薬とコンジュゲートしている、項目７６に記載の抗体。

（項目８４）

前記診断薬が、酵素、補欠分子族複合体、蛍光材料、発光材料、生物発光材料、放射性材料、陽電子放出性金属および非放射性常磁性金属イオンからなる群より選択される、項目８３に記載の抗体。

（項目８５）

前記酵素が、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、ベータガラクトシダーゼおよびアセチルコリンエステラーゼからなる群より選択される、項目８４に記載の抗体。
（項目８６）
前記補欠分子族複合体が、ストレプトアビジン／ビオチンおよびアビジン／ビオチンからなる群より選択される、項目８４に記載の抗体。
（項目８７）
前記蛍光材料が、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、ダンシルクロリドおよびフィコエリトリンからなる群より選択される、項目８４に記載の抗体。
（項目８８）
前記発光材料がルミノールである、項目８４に記載の抗体。
（項目８９）
前記生物発光材料が、ルシフェラーゼ、ルシフェリンおよびエクオリンからなる群より選択される、項目８４に記載の抗体。
（項目９０）
前記放射性材料が、^{125}Ｉ、^{131}Ｉ、インジウム１１１、ルテチウム１７１、ビスマス２１２、ビスマス２１３、アスタチン２１１、銅６２、銅６４、銅６７、イットリウム９０、ヨウ素１２５、ヨウ素１３１、リン３２、リン３３、スカンジウム４７、銀１１１、ガリウム６７、プラセオジム１４２、サマリウム１５３、テルビウム１６１、ジスプロシウム１６６、ホルミウム１６６、レニウム１８６、レニウム１８８、レニウム１８９、鉛２１２、ラジウム２２３、アクチニウム２２５、鉄５９、セレン７５、ヒ素７７、ストロンチウム８９、モリブデン９９、ロジウム１０５、パラジウム１０９、プラセオジム１４３、プロメチウム１４９、エルビウム１６９、イリジウム１９４、金１９８、金１９９および鉛２１１からなる群より選択される、項目８４に記載の抗体。
（項目９１）
前記モノクローナル抗体またはその断片が治療剤とコンジュゲートしている、項目７６に記載の抗体。
（項目９２）
前記治療剤が抗菌薬である、項目９１に記載の抗体。
（項目９３）
前記治療剤が、リボヌクレアーゼ（ＲＮアーゼ）、ＤＮアーゼＩ、アンチセンス核酸、阻害性ＲＮＡ分子、免疫賦活性核酸、アプタマー、リボザイム、三重鎖形成分子および外部ガイド配列からなる群より選択される、項目９１に記載の抗体。
（項目９４）
前記モノクローナル抗体またはその断片が、少なくとも１つの追加的な機能分子とコンジュゲートしているかまたは融合している、項目７６に記載の抗体。
（項目９５）
前記追加的な機能分子が第２の抗体である、項目９４に記載の抗体。
（項目９６）
前記抗体がモノクローナル抗体またはその断片である、項目４８に記載のキット。
（項目９７）
前記モノクローナル抗体またはその断片が、ヒト抗体、ヒト化抗体、組換え抗体、キメラ抗体、ベニア化抗体、修飾抗体または抗体誘導体である、項目９６に記載のキット。
（項目９８）
前記抗体が、ＶＨおよび／またはＶＬのＣＤＲ１領域、ＣＤＲ２領域および／またはＣＤＲ３領域内の保存的アミノ酸変異によって修飾されている、項目９７に記載のキット。
（項目９９）
前記抗体が、システイン残基の数を変更することによって、またはＦｃヒンジ領域内の保存的アミノ酸変異によって修飾されている、項目９７に記載のキット。

（項目１００）
前記モノクローナル抗体またはその断片が化学修飾されている、項目９７に記載のキット。
（項目１０１）
前記モノクローナル抗体またはその断片がペグ化されている、項目１００に記載のキット。
（項目１０２）
前記モノクローナル抗体またはその断片が、血清タンパク質とコンジュゲートしている、項目１００に記載のキット。
（項目１０３）
前記血清タンパク質がヒト血清アルブミンである、項目１０２に記載のキット。
（項目１０４）
前記モノクローナル抗体またはその断片が、診断薬とコンジュゲートしている、項目９７に記載のキット。
（項目１０５）
前記診断薬が、酵素、補欠分子族複合体、蛍光材料、発光材料、生物発光材料、放射性材料、陽電子放出性金属および非放射性常磁性金属イオンからなる群より選択される、項目１０４に記載のキット。
（項目１０６）
前記酵素が、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、ベータガラクトシダーゼおよびアセチルコリンエステラーゼからなる群より選択される、項目１０５に記載のキット。
（項目１０７）
前記補欠分子族複合体が、ストレプトアビジン／ビオチンおよびアビジン／ビオチンからなる群より選択される、項目１０５に記載のキット。
（項目１０８）
前記蛍光材料が、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、ダンシルクロリドおよびフィコエリトリンからなる群より選択される、項目１０５に記載のキット。
（項目１０９）
前記発光材料がルミノールである、項目１０５に記載のキット。
（項目１１０）
前記生物発光材料が、ルシフェラーゼ、ルシフェリンおよびエクオリンからなる群より選択される、項目１０５に記載のキット。
（項目１１１）
前記放射性材料が、^{125}Ｉ、^{131}Ｉ、インジウム１１１、ルテチウム１７１、ビスマス２１２、ビスマス２１３、アスタチン２１１、銅６２、銅６４、銅６７、イットリウム９０、ヨウ素１２５、ヨウ素１３１、リン３２、リン３３、スカンジウム４７、銀１１１、ガリウム６７、プラセオジム１４２、サマリウム１５３、テルビウム１６１、ジスプロシウム１６６、ホルミウム１６６、レニウム１８６、レニウム１８８、レニウム１８９、鉛２１２、ラジウム２２３、アクチニウム２２５、鉄５９、セレン７５、ヒ素７７、ストロンチウム８９、モリブデン９９、ロジウム１０５、パラジウム１０９、プラセオジム１４３、プロメチウム１４９、エルビウム１６９、イリジウム１９４、金１９８、金１９９および鉛２１１からなる群より選択される、項目１０５に記載のキット。
（項目１１２）
前記モノクローナル抗体またはその断片が治療剤とコンジュゲートしている、項目９７に記載のキット。
（項目１１３）
前記治療剤が抗菌薬である、項目１１２に記載のキット。
（項目１１４）

前記モノクローナル抗体またはその断片が、少なくとも１つの追加的な機能分子とコンジュゲートしているかまたは融合している、項目９７に記載のキット。
（項目１１５）
前記追加的な機能分子が第２の抗体である、項目１１４に記載のキット。
（項目１１６）
前記抗体がモノクローナル抗体またはその断片である、ワクチンを必要とする被験体にワクチン接種するための、項目５３に記載の使用。
（項目１１７）
前記モノクローナル抗体またはその断片が、ヒト抗体、ヒト化抗体、組換え抗体、キメラ抗体、ベニア化抗体、修飾抗体または抗体誘導体である、項目１１６に記載の使用。
（項目１１８）
前記抗体が、ＶＨおよび／またはＶＬのＣＤＲ１領域、ＣＤＲ２領域および／またはＣＤＲ３領域内の保存的アミノ酸変異によって修飾されている、項目１１７に記載の使用。
（項目１１９）
前記抗体が、システイン残基の数を変更することによって、またはＦｃヒンジ領域内の保存的アミノ酸変異によって修飾されている、項目１１７に記載の使用。
（項目１２０）
前記モノクローナル抗体またはその断片が化学修飾されている、項目１１７に記載の使用。
（項目１２１）
前記モノクローナル抗体またはその断片がペグ化されている、項目１２０に記載の使用。
（項目１２２）
前記モノクローナル抗体またはその断片が、血清タンパク質とコンジュゲートしている、項目１２０に記載の使用。
（項目１２３）
前記血清タンパク質がヒト血清アルブミンである、項目１２２に記載の使用。
（項目１２４）
前記モノクローナル抗体またはその断片が、診断薬とコンジュゲートしている、項目１１７に記載の使用。
（項目１２５）
前記診断薬が、酵素、補欠分子族複合体、蛍光材料、発光材料、生物発光材料、放射性材料、陽電子放出性金属および非放射性常磁性金属イオンからなる群より選択される、項目１２４に記載の使用。
（項目１２６）
前記酵素が、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、ベータガラクトシダーゼおよびアセチルコリンエステラーゼからなる群より選択される、項目１２５に記載の使用。
（項目１２７）
前記補欠分子族複合体が、ストレプトアビジン／ビオチンおよびアビジン／ビオチンからなる群より選択される、項目１２５に記載の使用。
（項目１２８）
前記蛍光材料が、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、ダンシルクロリドおよびフィコエリトリンからなる群より選択される、項目１２５に記載の使用。
（項目１２９）
前記発光材料がルミノールである、項目１２５に記載の使用。
（項目１３０）
前記生物発光材料が、ルシフェラーゼ、ルシフェリンおよびエクオリンからなる群より選択される、項目１２５に記載の使用。

（項目１３１）
前記放射性材料が、^{125}Ｉ、^{131}Ｉ、インジウム１１１、ルテチウム１７１、ビスマス２１２、ビスマス２１３、アスタチン２１１、銅６２、銅６４、銅６７、イットリウム９０、ヨウ素１２５、ヨウ素１３１、リン３２、リン３３、スカンジウム４７、銀１１１、ガリウム６７、プラセオジム１４２、サマリウム１５３、テルビウム１６１、ジスプロシウム１６６、ホルミウム１６６、レニウム１８６、レニウム１８８、レニウム１８９、鉛２１２、ラジウム２２３、アクチニウム２２５、鉄５９、セレン７５、ヒ素７７、ストロンチウム８９、モリブデン９９、ロジウム１０５、パラジウム１０９、プラセオジム１４３、プロメチウム１４９、エルビウム１６９、イリジウム１９４、金１９８、金１９９および鉛２１１からなる群より選択される、項目１２５に記載の使用。
（項目１３２）
前記モノクローナル抗体またはその断片が治療剤とコンジュゲートしている、項目１１７に記載の使用。
（項目１３３）
前記治療剤が抗菌薬である、項目１３２に記載の使用。
（項目１３４）
前記治療剤が、リボヌクレアーゼ（ＲＮアーゼ）、ＤＮアーゼＩ、アンチセンス核酸、阻害性ＲＮＡ分子、免疫賦活性核酸、アプタマー、リボザイム、三重鎖形成分子および外部ガイド配列からなる群より選択される、項目１３２に記載の使用。
（項目１３５）
前記モノクローナル抗体またはその断片が、少なくとも１つの追加的な機能分子とコンジュゲートしているかまたは融合している、項目１１７に記載の使用。
（項目１３６）
前記追加的な機能分子が第２の抗体である、項目１３５に記載の使用。
（項目１３７）
組換え型のポリヌクレオチドの等価物が、ストリンジェントな条件下で該ポリヌクレオチドまたはその相補物とハイブリダイズするポリヌクレオチドを含み、該ストリンジェントな条件が、約２５℃から約３７℃までのインキュベーション温度；約６×ＳＳＣから約１０×ＳＳＣまでのハイブリダイゼーション緩衝液の濃度；約０％から約２５％までのホルムアミド濃度；および約４×ＳＳＣから８×ＳＳＣまでの洗浄溶液を含む、項目１から２３まで、項目５１から５２まで、または項目５４から７４までに記載の方法、項目２４から３３までに記載の単離されたかまたは組換え型のポリペプチド、項目３４に記載のベクター、項目３５から３７までに記載の単離された細胞、項目３８から４０まで、または項目７５から９５までに記載の抗体、項目４１に記載のハイブリドーマ細胞株、項目４２から４７までに記載の組成物、項目４８から５０まで、または項目９６から１１５までに記載のキット、項目５３または項目１１６から１３６までに記載の使用。
（項目１３８）
ＤＮＡＢＩＩポリペプチドもしくはＤＮＡＢＩＩタンパク質の微生物ＤＮＡへの結合を阻害するか、該結合と競合するか、もしくは該結合の力価を決定する作用剤、微生物バイオフィルムを阻害、予防もしくは破壊する作用剤、被験体におけるバイオフィルムを阻害、予防もしくは破壊する作用剤、または被験体においてバイオフィルムを生じる微生物感染症を阻害、予防もしくは処置する作用剤を同定するためのコンピュータ実装方法であって、候補作用剤の三次元構造を、組込み宿主因子（ＩＨＦ）タンパク質の三次元構造と対照して位置決定する工程を含み、ここで、該ＩＨＦタンパク質の該三次元構造は、ＩＨＦおよびＤＮＡの複合体の結晶形から決定された原子構造座標Ｘ、ＹおよびＺに基づき、配列番号４２に示されるＴ４、Ｋ５、Ａ６、Ｅ２８、Ｑ４３、Ｋ４５、Ｓ４７、Ｇ４８、Ｎ５１、Ｒ５５、Ｋ５７、Ｒ６０、Ｒ６３、Ｎ６４、Ｐ６５、Ｋ６６、Ｒ７６、Ｔ８０、Ｒ８２またはＱ８５から選択される２つ以上のＩＨＦアミノ酸、またはそのそれぞれの等価物における該作用剤と該ＩＨＦとの相互作用により、該作用剤が、ＤＮＡＢＩＩポリペプチドもしくはＤＮＡＢＩＩタンパク質の微生物ＤＮＡへの結合を阻害すること、該結合と

競合すること、もしくは該結合の力価を決定すること、微生物バイオフィルムを阻害、予防もしくは破壊すること、バイオフィルムを阻害、予防もしくは破壊すること、またはバイオフィルムを生じる微生物感染症を阻害、予防もしくは処置することが同定される、コンピュータ実装方法。

（項目１３９）

配列番号４２に示されるＴ４、Ｋ５、Ａ６、Ｅ２８、Ｑ４３、Ｋ４５、Ｓ４７、Ｇ４８、Ｎ５１、Ｒ５５、Ｋ５７、Ｒ６０、Ｒ６３、Ｎ６４、Ｐ６５、Ｋ６６、Ｒ７６、Ｔ８０、Ｒ８２またはＱ８５から選択されるＩＨＦアミノ酸の３つ以上、またはそのそれぞれの等価物における前記作用剤と前記ＩＨＦとの相互作用により、該作用剤が、ＤＮＡＢＩＩポリペプチドもしくはＤＮＡＢＩＩタンパク質の微生物ＤＮＡへの結合を阻害すること、該結合と競合すること、もしくは該結合の力価を決定すること、微生物バイオフィルムを阻害、予防もしくは破壊すること、バイオフィルムを阻害、予防もしくは破壊すること、またはバイオフィルムを生じる微生物感染症を阻害、予防もしくは処置することが同定される、項目１３８に記載の方法。

（項目１４０）

前記原子構造座標Ｘ、ＹおよびＺが、Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｄａｔａ　Ｂａｎｋ（ＰＤＢ）受託番号：１ＩＨＦに記載の座標を含む、項目１３８または１３９に記載の方法。

（項目１４１）

少なくとも１つのプロセッサ、

該少なくとも１つのプロセッサに接続されたメモリ、

該メモリおよび該少なくとも１つのプロセッサと通信している記憶媒体

を含むカスタムコンピュータ装置であって、

該記憶媒体は、プロセッサ実行可能命令のセットを含み、該セットは、該プロセッサによって実行されると、該カスタムコンピュータ装置が、ＤＮＡＢＩＩポリペプチドもしくはＤＮＡＢＩＩタンパク質の微生物ＤＮＡへの結合を阻害するか、該結合と競合するか、もしくは該結合の力価を決定する作用剤、微生物バイオフィルムを阻害、予防もしくは破壊する作用剤、被験体におけるバイオフィルムを阻害、予防もしくは破壊する作用剤、または被験体においてバイオフィルムを生じる微生物感染症を阻害、予防もしくは処置する作用剤を同定するように設定され、該設定は、

候補作用剤の三次元構造を、組込み宿主因子（ＩＨＦ）タンパク質の三次元構造と対照して位置決定することを含み、ここで、該ＩＨＦタンパク質の該三次元構造は、ＩＨＦおよびＤＮＡの複合体の結晶形から決定された原子構造座標Ｘ、ＹおよびＺに基づき、配列番号４２に示されるＴ４、Ｋ５、Ａ６、Ｅ２８、Ｑ４３、Ｋ４５、Ｓ４７、Ｇ４８、Ｎ５１、Ｒ５５、Ｋ５７、Ｒ６０、Ｒ６３、Ｎ６４、Ｐ６５、Ｋ６６、Ｒ７６、Ｔ８０、Ｒ８２またはＱ８５から選択される２つ以上のＩＨＦアミノ酸、またはそのそれぞれの等価物における該作用剤と該ＩＨＦとの相互作用により、該作用剤が、ＤＮＡＢＩＩポリペプチドもしくはＤＮＡＢＩＩタンパク質の微生物ＤＮＡへの結合を阻害すること、該結合と競合すること、もしくは該結合の力価を決定すること、微生物バイオフィルムを阻害、予防もしくは破壊すること、バイオフィルムを阻害、予防もしくは破壊すること、またはバイオフィルムを生じる微生物感染症を阻害、予防もしくは処置することが同定される、カスタムコンピュータ装置。

（項目１４２）

ＤＮＡＢＩＩタンパク質またはＤＮＡＢＩＩポリペプチドおよび微生物ＤＮＡを含有する試料において、ＤＮＡＢＩＩタンパク質またはＤＮＡＢＩＩポリペプチドの微生物ＤＮＡへの結合を調節する作用剤を同定する方法であって、候補作用剤を該試料と接触させる工程、および該タンパク質または該ポリペプチドの該ＤＮＡへの結合についてアッセイする工程を含み、ここで、該作用剤は、該ＤＮＡＢＩＩタンパク質または該ＤＮＡＢＩＩポリペプチドの該微生物ＤＮＡへの結合を阻害すること、該結合を予防すること、または該結合の力価を決定することによって該結合を調節する、方法。

（項目１４３）

干渉作用剤を投与することによって処置される可能性があるかまたは該可能性がない微生物感染症を有する患者を同定するための方法であって、該患者から単離され、かつ感染物質を含有する試料におけるＤＮＡＢＩＩポリペプチドまたはＤＮＡＢＩＩタンパク質の存在または非存在を検出する工程を含み、ここで、該ＤＮＡＢＩＩポリペプチドまたは該ＤＮＡＢＩＩタンパク質の存在により、該患者は、該干渉作用剤を投与することによって処置される可能性があると同定され、ＤＮＡＢＩＩポリペプチドまたはＤＮＡＢＩＩタンパク質の非存在により、該患者は、該干渉作用剤を投与することによって処置される可能性がないと同定される、方法。

（項目１４４）

前記ＤＮＡＢＩＩポリペプチドまたは前記ＤＮＡＢＩＩタンパク質の存在により、前記患者は、前記干渉作用剤を投与することによって処置される可能性があると同定される、項目１４３に記載の方法。

（項目１４５）

前記患者に有効量の前記干渉作用剤を投与する工程をさらに含む、項目１４４に記載の方法。

（項目１４６）

前記干渉作用剤が、

（ａ）単離されたかもしくは組換え型の組込み宿主因子（ＩＨＦ）ポリペプチド、またはそのそれぞれの断片もしくは等価物、

（ｂ）Ｅ．ｃｏｌｉのＵ９３株由来の単離されたかもしくは組換え型のヒストン様タンパク質（ＨＵ）ポリペプチド、またはそのそれぞれの断片もしくは等価物、

（ｃ）表８、表９Ａ、表９Ｂ、表１０において同定される単離されたかもしくは組換え型のタンパク質もしくはポリペプチド、または図６において同定されるＤＮＡ結合性ペプチド、またはそのそれぞれの断片もしくは等価物、

（ｄ）配列番号１～３４０の単離されたかもしくは組換え型のポリペプチド、またはそのそれぞれの等価物、またはその断片もしくはそれぞれの断片の等価物

（ｅ）配列番号６～１１、２８、２９、４２～１００、表８の単離されたかもしくは組換え型のＣ末端のポリペプチド、または表１０において同定される単離されたかもしくは組換え型のＣ末端のポリペプチド、またはそのそれぞれの断片もしくは等価物、

（ｆ）微生物ＤＮＡへの結合について組込み宿主因子と競合するポリペプチドまたはポリヌクレオチド、

（ｇ）ホリデイジャンクションと似ている４方向ジャンクションポリヌクレオチド、複製フォークと似ている３方向ジャンクションポリヌクレオチド、固有の柔軟性を有するポリヌクレオチド、または屈曲したポリヌクレオチド、

（ｈ）（ａ）～（ｆ）のうちの任意の１つをコードする単離されたかもしくは組換え型のポリヌクレオチド、または配列番号３６の単離されたかもしくは組換え型のポリヌクレオチド、またはそのそれぞれの等価物、またはストリンジェントな条件下で該ポリヌクレオチドもしくはその相補物とハイブリダイズするポリヌクレオチド、

（ｉ）（ａ）～（ｆ）のうちの任意の１つを特異的に認識するかもしくは特異的に結合する抗体もしくは抗原結合性断片、または各抗体もしくはその抗原結合性断片の等価物もしくは断片、

（ｊ）（ｉ）の抗体または抗原結合性断片をコードする、単離されたかまたは組換え型のポリヌクレオチド、あるいは

（ｋ）ＤＮＡＢＩＩタンパク質またはＤＮＡＢＩＩポリペプチドの微生物ＤＮＡへの結合と競合する小分子

のうちの１つまたは複数である、項目１４５に記載の方法。

【００２９】

発明の概要

細菌の細胞内で、ＤＮＡＢＩＩタンパク質は、結合する際に必然的にＤＮＡ基質を屈曲させるＤＮＡ結合性タンパク質である。同様に、すでに屈曲したコンフォメーションであ

るＤＮＡは、屈曲させるために必要なエネルギーが不必要になるので好ましい基質である。

【００３０】

タンパク質のＤＮＡＢＩＩファミリーは、細菌細胞の外側にバイオフィルムの状態で見いだされる。出願人らは、これらのタンパク質が、実際に、細胞外のＤＮＡに、重要な分岐ジャンクションにおいて結合したことを示した。一態様では、出願人らは、特異的な抗体を産生するポリペプチドおよびタンパク質を用いて宿主を免疫化することにより、ＤＮＡに基づく格子が十分に変更されて、宿主免疫系がバイオフィルムを取り除くことが可能になることを示した。

【００３１】

出願人らは、チンチラ宿主の中耳内のあらかじめ形成した分類不可能なＨａｅｍｏｐｈｉｌｕｓ　ｉｎｆｌｕｅｎｚａバイオフィルムが、ＤＮＡＢＩＩファミリーメンバー（Ｅ．ｃｏｌｉ組込み宿主因子、ＩＨＦ）を用いた種々の方式の免疫化により除去されることも実証した。このチンチラ中耳バイオフィルム動物系は、すでにヒト中耳炎（または中耳感染症）についての優れたモデルとして文書で十分に裏付けられている。

【００３２】

この技術を使用するための方法は簡単である。一実施形態では、本発明のポリペプチドを、慢性／再発バイオフィルム疾患に対する予防として個体にワクチン接種するために、または既存の感染症を有する個体に対する治療薬として使用する。それから、個体の免疫系が、機能的な保護性のバイオフィルムの構築およびまたは維持に干渉することによってこれらの細菌を防ぐ、または宿主から取り除く抗体を自然に生成する。あるいは、ポリペプチドに対する抗体を、感染症を処置または予防するために投与することができる。機能性バイオフィルムを形成することができない細菌は、宿主の免疫系の残りによって容易に取り除かれる。

【００３３】

したがって、一態様では、ＤＮＡＢＩＩポリペプチドまたはＤＮＡＢＩＩタンパク質の微生物ＤＮＡへの結合を阻害する、それと競合する、またはその力価を決定する（ｔｉｔｒａｔｅ）ための方法が、ＤＮＡＢＩＩポリペプチドもしくはＤＮＡＢＩＩタンパク質または微生物ＤＮＡを干渉作用剤と接触させ、それにより、ＤＮＡＢＩＩタンパク質またはＤＮＡＢＩＩポリペプチドの微生物ＤＮＡへの結合を阻害する、それと競合する、またはその力価を決定することを含む、あるいはそれから本質的になる、またはさらにそれからなることによって提供される。接触は、ｉｎ　ｖｉｔｒｏまたはｉｎ　ｖｉｖｏで実施することができる。

【００３４】

別の態様では、微生物バイオフィルムを阻害、予防または破壊するための方法であって、バイオフィルムを干渉作用剤と接触させ、それにより、微生物バイオフィルムを阻害、予防または破壊することを含む、あるいはそれから本質的になる、またはさらにそれからなる方法が提供される。接触は、ｉｎ　ｖｉｔｒｏまたはｉｎ　ｖｉｖｏで実施することができる。

【００３５】

別の態様では、被験体におけるバイオフィルムを阻害、予防または破壊する方法であって、被験体に有効量の干渉作用剤を投与し、それにより、微生物バイオフィルムを阻害、予防または破壊することを含む、あるいはそれから本質的になる、またはさらにそれからなる方法が提供される。

【００３６】

さらなる態様では、被験体においてバイオフィルムを生じる微生物感染症を阻害、予防または処置するための方法が提供される。方法は、被験体に有効量の干渉作用剤を投与し、それにより、被験体においてバイオフィルムを生じる微生物感染症を阻害、予防または処置することを含む、あるいはそれから本質的になる、またはさらにそれからなる。

【００３７】

本明細書に記載の方法に関して、微生物ＤＮＡのＤＮＡＢＩＩタンパク質またはＤＮＡＢＩＩポリペプチドへの結合に干渉する、またはそれを妨害する任意の作用剤は、本発明の範囲内であるものとする。干渉作用剤の非限定的な例としては、

（ａ）単離されたかまたは組換え型の組込み宿主因子（ＩＨＦ）ポリペプチド、またはそのそれぞれの断片もしくは等価物、

（ｂ）Ｅ．ｃｏｌｉのＵ９３株由来の単離されたかまたは組換え型のヒストン様タンパク質（ＨＵ）ポリペプチド、またはそのそれぞれの断片もしくは等価物、

（ｃ）表８、表９Ａ、表９Ｂ、表１０において同定される単離されたかまたは組換え型のタンパク質もしくはポリペプチド、または図６において同定されるＤＮＡ結合性ペプチド、またはそのそれぞれの断片もしくは等価物、

（ｄ）配列番号１～３４０の単離されたかまたは組換え型のポリペプチド、またはそのそれぞれの断片もしくは等価物、

（ｅ）配列番号６～１１、２８、２９、４２～１００、表８の単離されたかまたは組換え型のＣ末端のポリペプチド、または表１０において同定されるＣ末端のポリペプチド、またはそのそれぞれの断片もしくは等価物、

（ｆ）微生物ＤＮＡへの結合について組込み宿主因子と競合するポリペプチドまたはポリヌクレオチド、

（ｇ）ホリデイジャンクションと似ている４方向ジャンクションポリヌクレオチド、複製フォークと似ている３方向ジャンクションポリヌクレオチド、固有の柔軟性を有するポリヌクレオチドまたは屈曲したポリヌクレオチド、

（ｈ）（ａ）～（ｆ）のうちの任意の１つをコードする、単離されたかまたは組換え型のポリヌクレオチド、または配列番号３６の単離されたかまたは組換え型のポリヌクレオチド、またはそのそれぞれの等価物、またはストリンジェントな条件下でポリヌクレオチドまたはその等価物もしくはその相補物とハイブリダイズするポリヌクレオチド、

（ｉ）（ａ）～（ｆ）のうちの任意の１つを特異的に認識する、またはそれに特異的に結合する抗体もしくは抗原結合性断片、または各抗体もしくはその抗原結合性断片の等価物もしくは断片、

（ｊ）（ｉ）の抗体もしくは抗原結合性断片またはその相補物をコードする、単離されたかまたは組換え型のポリヌクレオチド、または

（ｋ）ＤＮＡＢＩＩタンパク質またはＤＮＡＢＩＩポリペプチドの微生物ＤＮＡへの結合と競合する小分子

が挙げられる。

【００３８】

本明細書では、それを必要とする被験体において免疫応答を誘導する、またはそれを必要とする被験体に受動免疫を付与するための方法であって、被験体に、群：

（ａ）単離されたかまたは組換え型の組込み宿主因子（ＩＨＦ）ポリペプチド、またはそのそれぞれの断片もしくは等価物、

（ｂ）Ｅ．ｃｏｌｉのＵ９３株由来の単離されたかまたは組換え型のヒストン様タンパク質（ＨＵ）ポリペプチド、またはそのそれぞれの断片もしくは等価物、

（ｃ）表８、表９Ａ、表９Ｂ、表１０において同定される単離されたかまたは組換え型のタンパク質ポリペプチド、または図６において同定されるＤＮＡ結合性ペプチド、またはそのそれぞれの断片もしくは等価物、

（ｄ）配列番号１～３４０の単離されたかまたは組換え型のポリペプチド、またはその断片もしくは等価物、

（ｅ）配列番号６～１１、２８、２９、４２～１００、表８の単離されたかまたは組換え型のＣ末端のポリペプチド、または表１０において同定されるＣ末端のポリペプチド、またはそのそれぞれの断片もしくは等価物、

（ｆ）（ａ）～（ｅ）のうちの任意の１つをコードする、単離されたかまたは組換え型のポリヌクレオチド、または配列番号３６の単離されたかまたは組換え型のポリヌクレオチド、またはそのそれぞれの等価物、またはストリンジェントな条件下でポリヌクレオチ

ド、その等価物もしくはその相補物とハイブリダイズするポリヌクレオチド、
（ｇ）（ａ）～（ｅ）のうちの任意の１つを特異的に認識する、またはそれに特異的に結合する抗体もしくは抗原結合性断片、またはそのそれぞれの等価物もしくは断片、
（ｈ）（ｇ）の抗体もしくは抗原結合性断片をコードする、単離されたかまたは組換え型のポリヌクレオチド、
（ｉ）（ａ）～（ｅ）のうちの任意の１つでパルスした抗原提示細胞、および
（ｊ）（ａ）～（ｅ）のうちの任意の１つをコードする１種または複数種のポリヌクレオチドでトランスフェクトされた抗原提示細胞
の１つまたは複数の作用剤を有効量で投与することを含む、あるいはそれから本質的になる、またはさらにそれからなる方法も提供される。

【００３９】
そのような免疫応答を必要とする被験体としては、微生物バイオフィルムが生じる感染症の危険性がある、またはそれに罹患している被験体が挙げられる。

【００４０】
本明細書では、上記の方法において使用するための組成物も提供され、その非限定的な例は以下に考察されている。

【００４１】
一態様では、配列番号１～５または１２～２７、３０～３５、１０１～３４０から選択されるアミノ酸配列または図６において同定されるＤＮＡ結合性ペプチドまたはそのそれぞれの断片もしくは等価物を含む、あるいはそれから本質的になる単離されたかまたは組換え型のポリペプチドが提供される。

【００４２】
別の態様では、配列番号１または２を含む、あるいはそれから本質的になる、またはさらにそれからなるが、配列番号６～１１、２８、２９、または４２～１００のいずれでもない単離されたかまたは組換え型のポリペプチドが提供される。

【００４３】
一態様では、配列番号３、４、または５を含む、あるいはそれから本質的になる、またはさらにそれからなるが、配列番号６～１１、２８、２９、または４２～１００のいずれでもない単離されたかまたは組換え型のポリペプチドが提供される。

【００４４】
一態様では、配列番号１２、１４、１６、１８、２０、２２、２４、２６、３０、または３２を含む、あるいはそれから本質的になる、またはさらにそれからなるが、配列番号６～１１、２８、２９、または４２～１００のいずれでもない単離されたかまたは組換え型のポリペプチドが提供される。

【００４５】
一態様では、配列番号１３、１５、１７、１９、２１、２３、２５、２７、３１、または３３を含む、あるいはそれから本質的になる、またはさらにそれからなるが、配列番号６～１１、２８、２９、または４２～１００のいずれでもない単離されたかまたは組換え型のポリペプチドが提供される。

【００４６】
一態様では、配列番号３３７、３３８、３３９、または３４０を含む、あるいはそれから本質的になる、またはさらにそれからなるが、配列番号６～１１、２８、２９、または４２～１００のいずれでもない単離されたかまたは組換え型のポリペプチドが提供される。

【００４７】
一態様では、配列番号１２および１３、または１４および１５、または１６および１７、または１８および１９、または２０および２１、または２２および２３、または２４および２５、または２６および２７、または３０および３１、または３２および３３を含む、あるいはそれから本質的になる、またはさらにそれからなるが、配列番号６～１１、２８、２９、または４２～１００のいずれでもない単離されたかまたは組換え型のポリペプ

チドが提供される。

【００４８】

一態様では、ＤＮＡＢＩＩポリペプチド、ＩＨＦポリペプチド、ＨＵポリペプチド、配列番号６～１１、２８、２９または表８、表１０において同定されるポリペプチドまたはそのそれぞれの断片もしくは等価物からなる群のポリペプチドのＣ末端アミノ酸を少なくとも１０個、あるいは少なくとも１５個、あるいは少なくとも２０個、あるいは少なくとも２５個、あるいは少なくとも３０個含有するＣ末端領域を含む、あるいはそれから本質的になる、またはさらにそれからなる単離されたかまたは組換え型のポリペプチドが提供される。

【００４９】

一態様では、

配列番号１２および１３を含むポリペプチド、

配列番号１４および１５を含むポリペプチド、

配列番号１６および１７を含むポリペプチド、

配列番号１８および１９を含むポリペプチド、

配列番号２０および２１を含むポリペプチド、

配列番号２３および２４を含むポリペプチド、

配列番号２５および２６を含むポリペプチド、

配列番号３０および３１を含むポリペプチド、

配列番号３２および３３を含むポリペプチド、

配列番号３４および３５を含むポリペプチド、

配列番号３３７および３３８を含むポリペプチド、または

配列番号３３９および３４０を含むポリペプチド

からなる群の単離されたかまたは組換え型のポリペプチドであって、ＩＨＦアルファ、ＩＨＦベータのうちの任意の１つの野生型または配列番号６～１１、２８、２９、または４２～１００のいずれでもないポリペプチドが提供される。

【００５０】

一態様では、

配列番号１２および１３から本質的になるポリペプチド、

配列番号１４および１５から本質的になるポリペプチド、

配列番号１６および１７から本質的になるポリペプチド、

配列番号１８および１９から本質的になるポリペプチド、

配列番号２０および２１から本質的になるポリペプチド、

配列番号２３および２４から本質的になるポリペプチド、

配列番号２５および２６から本質的になるポリペプチド、

配列番号３０および３１から本質的になるポリペプチド、

配列番号３２および３３から本質的になるポリペプチド、

配列番号３４および３５から本質的になるポリペプチド、

配列番号３３７および３３８から本質的になるポリペプチド、または

配列番号３３９および３４０から本質的になるポリペプチド、

からなる群の単離されたかまたは組換え型のポリペプチドであって、ＩＨＦアルファ、ＩＨＦベータのうちの任意の１つの野生型または配列番号６～１１、２８、２９、または４２～１００のいずれでもないポリペプチドが提供される。

【００５１】

上で同定された単離されたポリペプチドを、その断片および等価物も含めて、２つ以上、または３つ以上または４つ以上、または多数含む、あるいはそれから本質的になる、またはさらにそれからなる単離されたかまたは組換え型のポリペプチドも提供される。その例としては、配列番号１～４および／または１２～２９、および／または３０～３３、および／または３０～３５、例えば、配列番号１および２、あるいは１および３、あるいは１および４、あるいは２および３、あるいは配列番号１、２および３、あるいは、２、３

および４、あるいは１、３および４または等価のポリペプチドを含む単離されたポリペプチドが挙げられ、その例は表９に示されている。ポリペプチドは任意の方向、例えば、配列番号１、２、および３、または配列番号３、２および１、あるいは配列番号２、１および３、あるいは３、１および２、あるいは１１および１２、あるいは１および１２、あるいは２および１２、あるいは１および１２、あるいは２および１３、あるいは１２、１６および１、あるいは１、１６および１２であってよい。

【００５２】

別の態様では、本発明は、配列番号１または２および３または４を含む単離されたかまたは組換え型のポリペプチド、またはＤＮＡＢＩＩタンパク質の断片、例えば、Ｈａｅｍｏｐｈｉｌｕｓ ｉｎｆｌｕｅｎｚａｅ ＩＨＦα微生物またはＨａｅｍｏｐｈｉｌｕｓ ｉｎｆｌｕｅｎｚａｅ ＩＨＦβ微生物のβ－３断片および／またはα－３断片などに対応するアミノ酸を含む、あるいはそれから本質的になる、またはさらにそれからなるポリペプチドまたは組換え型ポリペプチドを提供し、その非限定的な例としては、配列番号１２～２７、またはポリペプチドのそれぞれの断片もしくは等価物が挙げられ、その例は表９に示されている。一態様では、単離された野生型ポリペプチドが特異的に排除され、例えば、ポリペプチドは表８において同定される配列番号６～１１または野生型配列のいずれでもない。この実施形態では、配列番号１または２、またはＩＨＦα微生物またはＩＨＦβ微生物のβ－３断片および／またはα－３断片に対応するアミノ酸を含む、あるいはそれから本質的になる、またはさらにそれからなり、その非限定的な例として配列番号１２～２７および３０～３３が挙げられるポリペプチド、またはそのそれぞれの等価物は、配列番号３または４またはその断片もしくは等価物の上流またはアミノ末端に位置する。別の態様では、単離されたポリペプチドは、配列番号３または４、またはＩＨＦα微生物またはＩＨＦβ微生物のβ－３断片および／またはα－３断片に対応するアミノ酸を含む、あるいはそれから本質的になる、またはさらにそれからなり、その非限定的な例として配列番号１２～２７が挙げられるポリペプチド、または配列番号１または２、またはその等価物の上流またはアミノ末端に位置するその等価物を含む。

【００５３】

上記の実施形態のいずれにおいても、ポリペプチド、断片またはその等価物のＮ末端またはＣ末端にペプチドリンカーを付加することができる。一態様では、リンカーは、本発明のポリペプチド、例えば、配列番号１～４、２８、２９、３４、または３５または３０～３３、３４、または３５、またはＨａｅｍｏｐｈｉｌｕｓ ｉｎｆｌｕｅｎｚａｅ ＩＨＦα微生物またはＨａｅｍｏｐｈｉｌｕｓ ｉｎｆｌｕｅｎｚａｅ ＩＨＦβ微生物のβ－３断片および／またはα－３断片に対応するアミノ酸を含む、あるいはそれから本質的になる、またはさらにそれからなり、その非限定的な例として配列番号１２～２７が挙げられるポリペプチド、またはそのそれぞれの等価物をつなぐ。「リンカー」または「ペプチドリンカー」とは、ポリペプチド配列のＮ末端またはＣ末端のいずれかに連結したペプチド配列を指す。一態様では、リンカーは約１アミノ酸残基から約２０アミノ酸残基までの長さである、あるいは２アミノ酸残基～約１０アミノ酸残基、約３アミノ酸残基～約５アミノ酸残基の長さである。ペプチドリンカーの例は、Ｇｌｙ－Ｐｒｏ－Ｓｅｒ－Ｌｅｕ－Ｌｙｓ－Ｌｅｕ（配列番号３７）である。

【００５４】

上で同定されたポリペプチドのうちの任意の１つの単離されたかまたは組換え型のポリペプチド、ならびに上で同定された単離されたかまたは組換え型のポリペプチドの２つ以上を含む、あるいはそれから本質的になる、またはさらにそれからなる単離されたかまたは組換え型のポリペプチドの断片または等価物がさらに提供される。

【００５５】

微生物ＤＮＡと、ポリペプチドまたはその断片もしくは等価物の結合に干渉するポリヌクレオチド、例えば、配列番号３６、またはホリデイジャンクションと似ている４方向のジャンクションポリヌクレオチド、複製フォークと似ている３方向のジャンクションポリヌクレオチド、固有の柔軟性を有するポリヌクレオチドまたは屈曲したポリヌクレオチド

；ポリヌクレオチドの発現および／または複製に必要な調節エレメントに作動可能に連結することができる、上記のポリペプチドまたは抗体またはその断片をコードする、単離されたかまたは組換え型のポリヌクレオチドがさらに提供される。ポリヌクレオチドは、ベクター内に含有されてよい。

【００５６】

上記の単離されたかまたは組換え型のポリペプチド、ホリデイジャンクションと似ている４方向のジャンクションポリヌクレオチド、複製フォークと似ている３方向のジャンクションポリヌクレオチド、固有の柔軟性を有するポリヌクレオチドまたは屈曲したポリヌクレオチドを含む、あるいはそれから本質的になる、またはさらにそれからなる単離された宿主細胞；上記の単離されたかまたは組換え型のポリヌクレオチド、または上記のベクターも提供される。

【００５７】

一態様では、細胞は、単離されたかまたは組換え型のポリペプチドを含む単離された抗原提示細胞である。別の態様では、ポリペプチドは、樹状細胞などの細胞の表面上に存在する。別の態様では、抗原提示細胞に、ポリペプチドをコードする１種または複数種のポリヌクレオチドをトランスフェクトする。

【００５８】

ポリペプチドの断片または等価物を含めた、上記の単離されたかまたは組換え型のポリペプチドを特異的に認識し、それに結合する抗体または抗原結合性断片がさらに提供される。抗体の非限定的な例としては、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、抗体誘導体、ベニア化抗体、二機能性抗体（ｄｉａｂｏｄｙ）、キメラ抗体、抗体誘導体、組換えヒト抗体、または抗体断片が挙げられる。特定の態様では、抗体は、モノクローナル抗体である。モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞株がさらに提供される。

【００５９】

本発明は、上で同定された単離されたかまたは組換え型のポリペプチドまたは抗体またはその断片のうちの１つまたは複数をコードする単離されたかまたは組換え型のポリヌクレオチドも提供する。単離されたポリヌクレオチドを含むベクターがさらに提供される。本発明の２つ以上の単離されたポリペプチドの一態様では、単離されたポリヌクレオチドは、ポリシストロニックベクター内に含有されてよい。

【００６０】

本明細書に記載の１つまたは複数の単離されたかまたは組換え型のポリペプチドを含む単離された宿主細胞、または単離されたかまたは組換え型のポリヌクレオチド、またはベクターがさらに提供される。一態様では、単離された宿主細胞は、原核生物の細胞または真核細胞、例えば、樹状細胞などの抗原提示細胞などである。

【００６１】

ポリヌクレオチド、ポリペプチド、抗体、抗原結合性断片、ベクターまたは宿主細胞は、検出可能な標識をさらに含んでよい。

【００６２】

キャリアと、本発明の単離されたかまたは組換え型のポリペプチドのうちの１つまたは複数、本発明の単離されたかまたは組換え型のポリヌクレオチド、本発明のベクター、本発明の単離された宿主細胞、または実施形態の抗体とを含む組成物も提供される。キャリアは、固体支持体、ステントまたは歯科インプラントのような医用デバイス、または薬学的に許容されるキャリアなどの液体のうちの１つまたは複数であってよい。組成物は、アジュバント、抗菌薬または抗原性ペプチドをさらに含んでよい。

【００６３】

組成物は、追加的な生物学的に活性な作用剤をさらに含んでよい。その非限定的な例は、１種の抗菌剤、例えば、他のワクチン構成成分（すなわち、抗原性ペプチド）、例えば、表面抗原、例えば、ＯＭＰ　Ｐ５、ｒｓＰｉｌＡ、ＯＭＰ　２６、ＯＭＰ　Ｐ２、またはＩＶ型Ｐｉｌｉｎタンパク質など（ＪｕｒｃｉｓｅｋおよびＢａｋａｌｅｔｚ（２００

７年）Ｊ．　ｏｆ　Ｂａｃｔｅｒｉｏｌｏｇｙ　１８９巻（１０号）：３８６８～３８７５頁、およびＭｕｒｐｈｙ、ＴＦ、Ｂａｋａｌｅｔｚ、ＬＯおよびＳｍｅｅｓｔｅｒｓ、ＰＲ（２００９年）Ｔｈｅ　Ｐｅｄｉａｔｒｉｃ　Ｉｎｆｅｃｔｉｏｕｓ　Ｄｉｓｅａｓｅ　Ｊｏｕｒｎａｌ、２８巻：Ｓ１２１～Ｓ１２６頁を参照されたい）および複数種の抗菌剤である。

【００６４】

本発明は、上記の抗原性ペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチドを含む宿主細胞を、ポリヌクレオチドの発現に好ましい条件下で成長させること、または培養することによって抗原性ペプチドを作製するための方法も提供する。この方法によって作製されるポリペプチドは、さらにｉｎ　ｖｉｔｒｏまたはｉｎ　ｖｉｖｏで使用するために単離することができる。

【００６５】

上記の組成物および使用説明書を含む診断または処置に使用するためのキットも提供される。本明細書において提供される新しい薬物および／または併用療法のスクリーニングを実施するためのキットも提供される。

【図面の簡単な説明】

【００６６】

【図１Ａ】図１Ａは、ＮＴＨＩの８６－０２８ＮＰ株によりチンチラの中耳において形成され、ＮＴＨＩ　Ｔｆｐピリンタンパク質について標識される（この画像の後景では、白色または明灰色の斑点および小型のクラスターとして現れる）ほか、二本鎖ＤＮＡ（ｄｓＤＮＡ）を標識するためにＤＡＰＩも伴う（この画像の前景では、間欠的な凝集塊を伴う暗灰色の重複鎖および束状物質として現れる）バイオフィルムを示す図である。この図は、ＪｕｒｃｉｓｅｋおよびＢａｋａｌｅｔｚ（２００７年）、Ｊ．　ｏｆ　Ｂａｃｔｅｒｉｏｌｏｇｙ、１８９巻（１０号）：３８６８～３８７５頁から複製した。図１Ｂは、嚢胞性線維症を伴う小児の肺に由来する気管支肺胞洗浄液（ＢＡＬ）に対する免疫標識を示す図である。嚢胞性線維症を伴う小児の肺をＢＡＬにより洗浄し、洗浄液に由来する粒子状物質を凍結させ、スライドガラスに固定して、免疫標識した。凍結させた粒子状物質は、抗ＩＨＦ抗体により免疫標識した。ヒト嚢胞性線維症患者のバイオフィルムにおけるＩＨＦ陽性巣の存在は、ヒト嚢胞性線維症の病因に、ｄｓＤＮＡの頂点にＩＨＦを伴うバイオフィルムが含まれることを例示する。図１Ｃは、副鼻腔の手術時に回収され、ＯＣＴ凍結媒体（Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃから型番１４－３７３－６５で市販されているＯｐｔｉｍａｌ　Ｃｕｔｔｉｎｇ　Ｔｅｍｐｅｒａｔｕｒｅ媒体）中に包埋された、ヒト副鼻腔に由来する分泌物を示す図である。１０μｍの凍結切片を切り出し、抗ＩＨＦ抗体により標識した（灰色のクラスターとして現れる）。試料中のｄｓＤＮＡは、蛍光色素であるＤＡＰＩ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎから市販されている４’，６－ジアミジノ－２－フェニルインドール）で染色した。副鼻腔炎患者のバイオフィルムにおけるＩＨＦ陽性巣の存在は、ヒト副鼻腔炎の病因に、ｄｓＤＮＡの頂点にＩＨＦを伴うバイオフィルムが含まれることを例示する。

【図１Ｂ】図１Ａは、ＮＴＨＩの８６－０２８ＮＰ株によりチンチラの中耳において形成され、ＮＴＨＩ　Ｔｆｐピリンタンパク質について標識される（この画像の後景では、白色または明灰色の斑点および小型のクラスターとして現れる）ほか、二本鎖ＤＮＡ（ｄｓＤＮＡ）を標識するためにＤＡＰＩも伴う（この画像の前景では、間欠的な凝集塊を伴う暗灰色の重複鎖および束状物質として現れる）バイオフィルムを示す図である。この図は、ＪｕｒｃｉｓｅｋおよびＢａｋａｌｅｔｚ（２００７年）、Ｊ．　ｏｆ　Ｂａｃｔｅｒｉｏｌｏｇｙ、１８９巻（１０号）：３８６８～３８７５頁から複製した。図１Ｂは、嚢胞性線維症を伴う小児の肺に由来する気管支肺胞洗浄液（ＢＡＬ）に対する免疫標識を示す図である。嚢胞性線維症を伴う小児の肺をＢＡＬにより洗浄し、洗浄液に由来する粒子状物質を凍結させ、スライドガラスに固定して、免疫標識した。凍結させた粒子状物質は、抗ＩＨＦ抗体により免疫標識した。ヒト嚢胞性線維症患者のバイオフィルムにおけるＩＨＦ陽性巣の存在は、ヒト嚢胞性線維症の病因に、ｄｓＤＮＡの頂点にＩＨＦを伴うバイ

オフィルムが含まれることを例示する。図１Ｃは、副鼻腔の手術時に回収され、ＯＣＴ凍結媒体（Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃから型番１４－３７３－６５で市販されているＯｐｔｉｍａｌ　Ｃｕｔｔｉｎｇ　Ｔｅｍｐｅｒａｔｕｒｅ媒体）中に包埋された、ヒト副鼻腔に由来する分泌物を示す図である。１０μｍの凍結切片を切り出し、抗ＩＨＦ抗体により標識した（灰色のクラスターとして現れる）。試料中のｄｓＤＮＡは、蛍光色素であるＤＡＰＩ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎから市販されている４’，６－ジアミジノ－２－フェニルインドール）で染色した。副鼻腔炎患者のバイオフィルムにおけるＩＨＦ陽性巣の存在は、ヒト副鼻腔炎の病因に、ｄｓＤＮＡの頂点にＩＨＦを伴うバイオフィルムが含まれることを例示する。

【図１Ｃ】図１Ａは、ＮＴＨＩの８６－０２８ＮＰ株によりチンチラの中耳において形成され、ＮＴＨＩ　Ｔｆｐピリンタンパク質について標識される（この画像の後景では、白色または明灰色の斑点および小型のクラスターとして現れる）ほか、二本鎖ＤＮＡ（ｄｓＤＮＡ）を標識するためにＤＡＰＩも伴う（この画像の前景では、間欠的な凝集塊を伴う暗灰色の重複鎖および束状物質として現れる）バイオフィルムを示す図である。この図は、ＪｕｒｃｉｓｅｋおよびＢａｋａｌｅｔｚ（２００７年）、Ｊ．　ｏｆ　Ｂａｃｔｅｒｉｏｌｏｇｙ、１８９巻（１０号）：３８６８～３８７５頁から複製した。図１Ｂは、嚢胞性線維症を伴う小児の肺に由来する気管支肺胞洗浄液（ＢＡＬ）に対する免疫標識を示す図である。嚢胞性線維症を伴う小児の肺をＢＡＬにより洗浄し、洗浄液に由来する粒子状物質を凍結させ、スライドガラスに固定して、免疫標識した。凍結させた粒子状物質は、抗ＩＨＦ抗体により免疫標識した。ヒト嚢胞性線維症患者のバイオフィルムにおけるＩＨＦ陽性巣の存在は、ヒト嚢胞性線維症の病因に、ｄｓＤＮＡの頂点にＩＨＦを伴うバイオフィルムが含まれることを例示する。図１Ｃは、副鼻腔の手術時に回収され、ＯＣＴ凍結媒体（Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃから型番１４－３７３－６５で市販されているＯｐｔｉｍａｌ　Ｃｕｔｔｉｎｇ　Ｔｅｍｐｅｒａｔｕｒｅ媒体）中に包埋された、ヒト副鼻腔に由来する分泌物を示す図である。１０μｍの凍結切片を切り出し、抗ＩＨＦ抗体により標識した（灰色のクラスターとして現れる）。試料中のｄｓＤＮＡは、蛍光色素であるＤＡＰＩ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎから市販されている４’，６－ジアミジノ－２－フェニルインドール）で染色した。副鼻腔炎患者のバイオフィルムにおけるＩＨＦ陽性巣の存在は、ヒト副鼻腔炎の病因に、ｄｓＤＮＡの頂点にＩＨＦを伴うバイオフィルムが含まれることを例示する。

【図２】図２は、チンチラの中耳において形成されたＮＴＨＩバイオフィルム内の二本鎖ＤＮＡ（この画像では、白色鎖として現れる）の免疫組織化学標識を示す図である。ｄｓＤＮＡにより形成される頂点のうち、ほぼ１００％で、ＩＨＦの陽性標識（この３枚のパネルによる画像の中央のパネルでは、点状巣を指し示す矢印により示される）が観察された。Ｂ型ＤＮＡの場合、ＤＮＡ１塩基当たり０．３４ｎｍと仮定すれば、頂点間の平均距離は約６μｍである、または各頂点間約１８ｋｂであった。本発明者らが知る限り、抗ＩＨＦ抗体と交差反応するエピトープを保有するタンパク質は、ＨＵタンパク質およびＩＨＦタンパク質に限られる。したがって、これらの観察に基づけば、ＮＴＨＩバイオフィルムマトリックス内に細胞外ＤＮＡＢＩＩタンパク質が存在するだけでなく、これらのタンパク質が、もっぱら、立体構成において十字構造に類似するｅＤＮＡ鎖上に位置決定されると考えられ（図１Ｂ、下部）、したがってそれはｅＤＮＡの得られた湾曲構造を媒介する役割を果たすことを示唆すると考えられることがより重要であった。

【図３－１】図３は、ＩＨＦを指向する抗体が、チャンバースライドにおいて形成された、確立されたＮＴＨＩバイオフィルムを可逆化したことを示す図である。図３Ａは、非特異的抗体で処置されたバイオフィルムを示す図である。図３Ｂは、ナイーブウサギ血清で処置されたバイオフィルムを示す図である。搭状物（白色～明灰色のクラスター化した領域として現れる）および水チャネル（黒色の空間）に富む、堅調なＮＴＨＩバイオフィルムに注目されたい。図３Ｃは、抗ＩＨＦ抗体で処置したバイオフィルムを示す図である。抗ＩＨＦ抗体による処置後にバイオフィルム構造が根絶されていることに注目されたい。個々のＮＴＨＩ（小型で点状の白色～明灰色の染みとして現れる）およびまばらで短い塔

状物（白色～明灰色の、より稠密にクラスター化した領域として現れる）は残存している。図３Ｄおよび３Ｅは、ＩＨＦを指向する抗体が、確立されたＮＴＨＩバイオフィルムを可逆化することをさらに示す図である。図３（パネルＥ）において示される通り、バイオフィルムは、ナイーブ血清と共にインキュベートされたバイオフィルム（図３、パネルＤ）と比較した場合、三次元構造の劇的な縮小を示した。多連アッセイによるＣＯＭＳＴＡＴ解析を介して、バイオフィルムの高さ、バイオマス、バイオフィルムの厚さという測定されたパラメータは全て、抗ＩＨＦ抗体と共にインキュベートしたところ、平均で８０％を超えて低減された。

【図３－２】図３は、ＩＨＦを指向する抗体が、チャンバースライドにおいて形成された、確立されたＮＴＨＩバイオフィルムを可逆化したことを示す図である。図３Ａは、非特異的抗体で処置されたバイオフィルムを示す図である。図３Ｂは、ナイーブウサギ血清で処置されたバイオフィルムを示す図である。搭状物（白色～明灰色のクラスター化した領域として現れる）および水チャネル（黒色の空間）に富む、堅調なＮＴＨＩバイオフィルムに注目されたい。図３Ｃは、抗ＩＨＦ抗体で処置したバイオフィルムを示す図である。抗ＩＨＦ抗体による処置後にバイオフィルム構造が根絶されていることに注目されたい。個々のＮＴＨＩ（小型で点状の白色～明灰色の染みとして現れる）およびまばらで短い塔状物（白色～明灰色の、より稠密にクラスター化した領域として現れる）は残存している。図３Ｄおよび３Ｅは、ＩＨＦを指向する抗体が、確立されたＮＴＨＩバイオフィルムを可逆化することをさらに示す図である。図３（パネルＥ）において示される通り、バイオフィルムは、ナイーブ血清と共にインキュベートされたバイオフィルム（図３、パネルＤ）と比較した場合、三次元構造の劇的な縮小を示した。多連アッセイによるＣＯＭＳＴＡＴ解析を介して、バイオフィルムの高さ、バイオマス、バイオフィルムの厚さという測定されたパラメータは全て、抗ＩＨＦ抗体と共にインキュベートしたところ、平均で８０％を超えて低減された。

【図４Ａ】図４Ａおよび図４Ｂは、ＮＴＨＩにより形成された、確立されたバイオフィルムを、抗ＩＨＦ抗体で処置したところ、上清中に放出されるＮＴＨＩが結果として増大したことを示すグラフである。チャンバースライド内で１６時間にわたり成長させたＮＴＨＩバイオフィルムを、滅菌媒体（ｓＢＨＩ）で偽処置する、またはナイーブウサギ血清もしくはウサギ抗ＩＨＦ抗体で処置した。６時間後（図４Ａ）または１０時間後（図４Ｂ）に上清を回収し、解析した。抗ＩＨＦ抗体による処置後には、上清中のＮＴＨＩ数が増大したことに注目されたい。抗ＩＨＦ抗体を伴うインキュベーションは、約６時間以内に、チャンバースライド内の媒体に由来する培養物から回収可能な浮遊性細菌の顕著な増大を結果としてもたらし、インキュベーションの１０時間後には顕著な増大が見られた。これらの結果により、バイオフィルムマトリックスからの細菌の放出が示唆された。

【図４Ｂ】図４Ａおよび図４Ｂは、ＮＴＨＩにより形成された、確立されたバイオフィルムを、抗ＩＨＦ抗体で処置したところ、上清中に放出されるＮＴＨＩが結果として増大したことを示すグラフである。チャンバースライド内で１６時間にわたり成長させたＮＴＨＩバイオフィルムを、滅菌媒体（ｓＢＨＩ）で偽処置する、またはナイーブウサギ血清もしくはウサギ抗ＩＨＦ抗体で処置した。６時間後（図４Ａ）または１０時間後（図４Ｂ）に上清を回収し、解析した。抗ＩＨＦ抗体による処置後には、上清中のＮＴＨＩ数が増大したことに注目されたい。抗ＩＨＦ抗体を伴うインキュベーションは、約６時間以内に、チャンバースライド内の媒体に由来する培養物から回収可能な浮遊性細菌の顕著な増大を結果としてもたらし、インキュベーションの１０時間後には顕著な増大が見られた。これらの結果により、バイオフィルムマトリックスからの細菌の放出が示唆された。

【図５】図５は、ＩＨＦによる経皮的な免疫化の結果、中耳において確立されたバイオフィルムが縮小したことを示す図である。中耳骨胞は、残存するバイオフィルムの相対量について、０～４＋のスケールで盲検によりランク付けした。

【図６】図６Ａは、ＩＨＦ－ＩＨＦ二量体において別のＩＨＦと相互作用する、もしくはそれに結合するＩＨＦのアミノ酸残基（上欄の三角形により示される）、またはＤＮＡと相互作用する、もしくはそれに結合するＩＨＦのアミノ酸残基（下欄の三角形により示さ

れる）を示すマップである。ペプチドは、短い垂直のバーにより、３アミノ酸を含有する領域へと分割される。図６Ｂは、ＩＨＦとの微生物ＤＮＡの相互作用を示すグラフである。

【図７】図７は、ウサギ抗ＩＨＦ抗体と共にインキュベートした場合の、Ｓ．ａｕｒｅｕｓ、Ｎ．ｇｏｎｏｒｒｈｏｅａｅ、およびＰ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａにより形成されたバイオフィルムの縮小を、ナイーブウサギ血清と共にインキュベートした場合と比較して示す図である。

【図８】図８は、ｉｎ　ｖｉｔｒｏにおいてＥ．ｃｏｌｉにより形成されたバイオフィルムを、ナイーブ血清または抗ＩＨＦ血清と共にインキュベートすることによる効果を示す図である。バイオフィルムの代表的画像をパネルＡ～Ｆに示し、個々のバイオフィルムの高さをそれぞれの画像の右側に示す一方で、抗ＩＨＦ抗体と共にインキュベートすることによる、バイオフィルムの高さ、バイオマス、および平均の厚さの低減百分率に関する平均値を、各行の末尾の表に示す。パネルＡおよびＢ：親株であるＭＧ１６５５株を示す図である。パネルＣおよびＤ：ＨＵタンパク質を欠損させた、ｈｕｐＡ遺伝子、ｈｕｂＢ遺伝子の二重変異体を示す図である。パネルＥおよびＦ：ＩＨＦタンパク質を欠損させた、ｈｉｍＤ遺伝子、ｈｉｍＡ遺伝子の二重変異体を示す図である。予測される通り、抗ＩＨＦ血清は、親単離株またはＨＵ欠損変異体により誘導されたバイオマスを低減する能力を有するが、ＩＨＦ欠損株により誘導されたバイオマスを低減する能力は有さない。

【図９】図９Ａは、経皮的な送達経路を介するＩＨＦタンパク質で免疫化したところ、チンチラの中耳内に存在するＮＴＨＩ誘導性バイオフィルムのバイオマスを有意に（ｐ＜０．００１）低減する抗体の形成が誘導されたことを示す図である。図９Ｂは、アジュバント単独で免疫化した動物の耳に残存するバイオマスと対比した、ＩＨＦタンパク質＋アジュバントで免疫化した動物の耳に残存するバイオマスの代表的な画像を示す図である。図９Ｂにおける最後の列は、この実験で用いられたスコア付けシステムの最大スコアおよび最小スコアの場合のバイオマスの画像を示す。上の画像が、４＋とスコア付けされるバイオマスを含有する中耳の画像であるのに対し、下の画像は、０とスコア付けされ、バイオマスを示さない健康な中耳である。

【図１０】図１０Ａは、アジュバント単独でＴＣＩを介して免疫化されたチンチラの中耳から回収されたバイオフィルムの凍結切片に対するＨ＆Ｅ染色と対比された、ＩＨＦタンパク質＋アジュバントでＴＣＩを介して免疫化されたチンチラの中耳から回収されたバイオフィルムの凍結切片に対するＨ＆Ｅ染色を示す図である。アジュバント単独で免疫化された動物から回収されたバイオフィルムの外見と比較して、ＩＨＦタンパク質＋アジュバントで免疫化された動物から回収されたバイオフィルムの外見が凝縮され、崩壊していることに注目されたい。パネルＡに示される画像は、２つの代表的なバイオマス間における高さおよび密度の差違を例示するために、同一の倍率で示されている。図１０Ｂは、アジュバント単独で免疫化された動物の中耳に存在する細菌負荷と対比して、ＩＨＦタンパク質＋アジュバントで免疫化された動物の中耳に存在する細菌負荷が有意に（ｐ＜０．０５）低減されたことを示す図である。

【図１１】図１１は、ＩＨＦタンパク質が、チンチラを免疫化するのに用いられる条件下で、ｄｓＤＮＡと共に特異的な複合体を形成することを裏付けた、電気泳動による移動シフトアッセイを示す図である。

【図１２】図１２は、天然のＩＨＦタンパク質＋アジュバントによる経皮的な免疫化が、アジュバント単独（ｐ＜０．０１７）、ｄｓＤＮＡ単独（ｐ＜０．００３）、またはｄｓＤＮＡをすでに結合させたＩＨＦタンパク質＋アジュバント（ｐ＜０．００１）の受け入れと比較して、チンチラの中耳内に存在するバイオマスを有意に低減する抗体の形成を誘導したことを示すグラフである。この結果は、天然のＩＨＦタンパク質にｄｓＤＮＡが結合すると、このＤＮＡＢＩＩファミリーメンバーの防御的エピトープが遮蔽されることを示唆した。

【図１３】図１３は、ＩＨＦタンパク質またはｄｓＤＮＡを結合させたＩＨＦタンパク質による皮下的な免疫化後の血清における抗体によるＩＨＦタンパク質の認識（矢印）を示

す図である。
【図１４】図１４は、個別の最適未満濃度の抗ＩＨＦ血清（１：２００）、および最適未満濃度のＤＮアーゼＩ、次いで、これらの混合による相乗作用（図１４Ａ）、個別の最適未満濃度の抗ＩＨＦ血清（１：１００）、および最適未満濃度の抗外膜タンパク質Ｐ５（ＯＭＰ　Ｐ５）血清、次いで、これらの混合による相乗作用（図１４Ｂ）、または個別の有効希釈率の抗ＩＨＦ抗体（バイオフィルムのデバルキングに関する有効希釈率であり、細菌細胞の死滅を誘導する有効希釈率ではない）、およびアモキシシリン、次いで、これらの混合による相乗作用（図１４Ｃ）を裏付ける図である。これらの状況のそれぞれにおいて、任意の作用剤を抗ＩＨＦ血清と組み合わせた場合、観察されるバイオフィルムをデバルキングし、かつ／または死滅させる効果は、任意の単一の作用剤を単独で用いた場合に注意される効果より大きかった。注：それぞれの画像の下には、バイオフィルムの高さ（ミクロン単位）を示す。
【図１５】図１５は、ナイーブウサギ血清またはウサギ抗ＩＨＦ血清で処置したＥ．ｃｏｌｉ（画像の上行）、ナイーブラット血清またはラット抗ＨＮＳ血清で処置したＥ．ｃｏｌｉ（画像の中行）、ナイーブマウス血清またはマウス抗ＤＰＳ血清で処置したＥ．ｃｏｌｉ（画像の下行）について比較する図である。抗ＩＨＦ血清で処置した後には、バイオマスが顕著に低減されたが、抗ＨＮＳ血清も抗ＤＰＳ血清も、本明細書で用いられるバイオマスの低減を誘導しなかった。抗ＩＨＦ血清による処置は、結果として、バイオフィルムの高さを４８．２％低減し、バイオフィルムの平均の厚さを８１％低減し、バイオマスを６４．５％低減した。これに対し、抗ＨＮＳ血清または抗ＤＰＳ血清による処置は、結果として、バイオフィルムの名目の高さを、それぞれ、０．７％および４．２％低減し、バイオフィルムの平均の厚さを、それぞれ、５．８％および６．４％低減し、バイオマスを、それぞれ、０．３％および－１７．４％低減した。
【図１６】図１６は、バイオフィルム内で構成された場合の宿主生物に由来するＤＮＡの相対的な空間分布、またはバイオフィルム内で構成された場合の細菌に由来するＤＮＡの相対空間分布を裏付けるｉｎ　ｓｉｔｕハイブリダイゼーションを示す図である。各状況において、ＤＮＡは、これらの白黒画像の前景内の明るい白色の領域として現れる。宿主に由来するＤＮＡは、右側上方の画像内でより稠密に標識されていることから、バイオフィルムの外面に重点的に分布していることが示されるのに対し、細菌に由来するＤＮＡは、この４枚のパネルによる合成画像の左側下方の画像内でより稠密に標識されており、それにより、バイオフィルムの内部領域内に密に分布していることが示される。
【発明を実施するための形態】
【００６７】
別段の定義のない限り、本明細書において使用される全ての技術用語および科学用語は、本発明が属する分野の当業者に一般に理解されているものと同じ意味を有する。本明細書で提供されるヌクレオチド配列は全て５’から３’の方向で示されている。本明細書に記載の方法および材料と類似した、またはそれと等しい任意の方法および材料を本発明の実施または試験において使用することができるが、本明細書には、好ましい方法、デバイス、および材料が記載されている。本明細書において引用された技術刊行物および特許公報は全て、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。本明細書における全てが、本発明が先行発明の理由でそのような開示に先立つ権利が与えられないことを容認するものと解釈されるべきではない。
【００６８】
本発明の実施には、別段の指定のない限り、当技術分野の技術の範囲内である、組織培養、免疫学、分子生物学、微生物学、細胞生物学および組換えＤＮＡの従来の技法を使用する。例えば、ＳａｍｂｒｏｏｋおよびＲｕｓｓｅｌｌ編（２００１年）Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｍａｎｕａｌ、第３版；Ａｕｓｕｂｅｌら編（２００７年）Ｃｕｒｒｅｎｔ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ　ｉｎ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙシリーズ；Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｉｎ　Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ（Ａｃａｄｅｍｉｃ　Ｐｒｅｓｓ，　Ｉｎｃ．，Ｎ．Ｙ．）シリーズ；ＭａｃＰｈｅｒｓｏｎら（

１９９１年）ＰＣＲ １：Ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ａｐｐｒｏａｃｈ（ＩＲＬ Ｐｒｅｓｓ ａｔ Ｏｘｆｏｒｄ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｐｒｅｓｓ）；ＭａｃＰｈｅｒｓｏｎら（１９９５年）ＰＣＲ ２：Ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ａｐｐｒｏａｃｈ；ＨａｒｌｏｗおよびＬａｎｅ編（１９９９年）Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ、Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ；Ｆｒｅｓｈｎｅｙ（２００５年）Ｃｕｌｔｕｒｅ ｏｆ Ａｎｉｍａｌ Ｃｅｌｌｓ：Ａ Ｍａｎｕａｌ ｏｆ Ｂａｓｉｃ Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅ、第５版；Ｇａｉｔ編（１９８４年）Ｏｌｉｇｏｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ；米国特許第４，６８３，１９５号；ＨａｍｅｓおよびＨｉｇｇｉｎｓ編（１９８４年）Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄ Ｈｙｂｒｉｄｉｚａｔｉｏｎ；Ａｎｄｅｒｓｏｎ（１９９９年）Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄ Ｈｙｂｒｉｄｉｚａｔｉｏｎ；ＨａｍｅｓおよびＨｉｇｇｉｎｓ編（１９８４年）Ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎ ａｎｄ Ｔｒａｎｓｌａｔｉｏｎ；Ｉｍｍｏｂｉｌｉｚｅｄ Ｃｅｌｌｓ ａｎｄ Ｅｎｚｙｍｅｓ（ＩＲＬ Ｐｒｅｓｓ（１９８６年））；Ｐｅｒｂａｌ（１９８４年）Ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ｇｕｉｄｅ ｔｏ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ；ＭｉｌｌｅｒおよびＣａｌｏｓ編（１９８７年）Ｇｅｎｅ Ｔｒａｎｓｆｅｒ Ｖｅｃｔｏｒｓ ｆｏｒ Ｍａｍｍａｌｉａｎ Ｃｅｌｌｓ（Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ）；Ｍａｋｒｉｄｅｓ編（２００３年）Ｇｅｎｅ Ｔｒａｎｓｆｅｒ ａｎｄ Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ ｉｎ Ｍａｍｍａｌｉａｎ Ｃｅｌｌｓ；ＭａｙｅｒおよびＷａｌｋｅｒ編（１９８７年）Ｉｍｍｕｎｏｃｈｅｍｉｃａｌ Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｃｅｌｌ ａｎｄ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ（Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ、Ｌｏｎｄｏｎ）；およびＨｅｒｚｅｎｂｅｒｇら編（１９９６年）Ｗｅｉｒ’ｓ Ｈａｎｄｂｏｏｋ ｏｆ Ｅｘｐｅｒｉｍｅｎｔａｌ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙを参照されたい。

【００６９】

範囲を含めた全ての数字表示、例えば、ｐＨ、温度、時間、濃度、および分子量は近似であり、１．０または０．１単位で、必要に応じて、またはその代わりに、＋／－１５％、あるいは１０％あるいは５％あるいは２％の変動で（＋）または（－）に変動する。必ずしも明記されているとは限らないが、全ての数字表示に「約」という用語が先行することが理解されるべきである。本明細書に記載の試薬はただ単に例示的なものであり、その等価物が当技術分野で公知であることも、必ずしも明記されているとは限らないが、理解されるべきである。

【００７０】

本明細書および特許請求の範囲において使用される場合、単数形「ａ（１つの）」、「ａｎ（１つの）」および「ｔｈｅ（その）」は、文脈によりそうでないことが明確に規定されない限り、複数の参照対象を含む。例えば、「ポリペプチド」という用語は、複数のポリペプチドを、それらの混合物を含めて包含する。

【００７１】

本明細書で使用される場合、「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ）」という用語は、組成物および方法が、列挙された要素を含むが、他のものを排除しないことを意味するものとする。「から本質的になる（ｃｏｎｓｉｓｔｉｎｇ ｅｓｓｅｎｔｉａｌｌｙ ｏｆ）」は、組成物および方法を定義するために使用される場合、意図された使用のための組合せのための任意の本質的に重要な他の要素を排除することを意味するべきである。したがって、本明細書で定義されている要素から本質的になる組成物は、単離および精製方法由来の微量汚染物質および薬学的に許容されるキャリア、例えば、リン酸緩衝生理食塩水、保存料などを排除しない。「からなる（ｃｏｎｓｉｓｔｉｎｇ ｏｆ）」は、他の成分の微量要素および本発明の組成物を投与するための実質的な方法のステップ以上のものを排除することを意味するべきである。これらの移行用語のそれぞれによって定義される実施形態は、本発明の範囲内である。

【００７２】

「バイオフィルム」とは、時々構造物の表面に接着する微生物の組織化された群集を意味し、有機または無機であり得、それらが分泌および／または放出するＤＮＡなどのポリ

マーと一緒にあり得る。バイオフィルムは、微生物（ｍｉｃｒｏｂｉｏｔｉｃｓ）および抗菌剤に対して非常に耐性である。バイオフィルムは、歯肉組織、歯および修復物に生息し、歯周プラーク疾患としても公知の齲歯および歯周病を引き起こす。バイオフィルムは、慢性中耳感染症も引き起こす。バイオフィルムは、歯科インプラント、ステント、カテーテル線およびコンタクトレンズの表面上にも形成され得る。バイオフィルムは、ペースメーカー、心臓弁置換物、人工関節および他の外科用インプラントの上で成長する。Ｃｅｎｔｅｒｓ ｆｏｒ Ｄｉｓｅａｓｅ Ｃｏｎｔｒｏｌ）は、院内の感染（ｎｏｓｏｃｏｍｉａｌ ｉｎｆｅｃｔｉｏｎ）（院内感染（ｈｏｓｐｉｔａｌ－ａｃｑｕｉｒｅｄ ｉｎｆｅｃｔｉｏｎ））の６５％超はバイオフィルムによって引き起こされると推定している。バイオフィルムは、慢性膣感染症を引き起こし、免疫系が妨げられている人において生命にかかわる全身感染症を導く。バイオフィルムは、多数の疾患にも関与する。例えば、嚢胞性線維症の患者は、抗生物質耐性のバイオフィルムをもたらすことも多いシュードモナス感染を有する。

【００７３】

「を阻害すること、それと競合することまたはその力価を決定すること」という用語は、微生物バイオフィルムの構成成分であるＤＮＡ／タンパク質マトリックスの形成を減らすことを意味する（例えば、図１に示されている通り）。

【００７４】

「ＤＮＡＢＩＩポリペプチドまたはＤＮＡＢＩＩタンパク質」とは、ＤＮＡ結合性ドメインで構成され、したがって、微生物ＤＮＡに対して特異的であるまたは一般的な親和性を有するＤＮＡ結合性のタンパク質またはポリペプチドを意味する。一態様では、ＤＮＡＢＩＩポリペプチドまたはＤＮＡＢＩＩタンパク質は、ＤＮＡに、副溝において結合する。ＤＮＡＢＩＩタンパク質の非限定的な例は、Ｅ．ｃｏｌｉ Ｕ９３株由来の組込み宿主因子（ＩＨＦ）タンパク質およびヒストン様タンパク質（ＨＵ）である。バイオフィルムと関連する可能性がある他のＤＮＡ結合性タンパク質としては、ＤＰＳ（Ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＣＡＡ４９１６９）、Ｈ－ＮＳ（Ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＣＡＡ４７７４０）、Ｈｆｑ（Ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＡＣＥ６３２５６）、ＣｂｐＡ（Ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＢＡＡ０３９５０）およびＣｂｐＢ（Ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿４１８８１３）が挙げられる。

【００７５】

「ＩＨＦ」タンパク質の「組込み宿主因子」は、バクテリオファージがそのＤＮＡを宿主細菌に組み入れるために使用する細菌のタンパク質である。これらは、細胞外の微生物ＤＮＡにも結合する。Ｅ．ｃｏｌｉにおいてＩＨＦタンパク質サブユニットをコードする遺伝子は、ｈｉｍＡ遺伝子（Ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＰＯＡ６Ｘ７．１）およびｈｉｍＤ遺伝子（ＰＯＡ６Ｙ１．１）である。これらの遺伝子に対するホモログは他の生物体において見いだされ、他の生物体由来のこれらの遺伝子に対応するペプチドは、表１０において見いだすことができる。

【００７６】

「ＨＭＧＢ１」は、ＤＮＡの副溝に結合すること、およびそれを歪めることが報告されている高移動性群ボックス（ＨＭＧＢ）１タンパク質であり、干渉作用剤の例である。組換え型の、または単離されたタンパク質およびポリペプチドは、Ａｔｇｅｎｇｌｏｂａｌ、ＰｒｏＳｐｅｃＢｉｏ、Ｐｒｏｔｅｉｎ１およびＡｂｎｏｖａから市販されている。

【００７７】

「ＨＵ」または「Ｅ．ｃｏｌｉ Ｕ９３株由来のヒストン様タンパク質」とは、一般にはＥ．ｃｏｌｉに付随するヘテロ二量体タンパク質のクラスを指す。ＨＵタンパク質は、ＤＮＡジャンクションに結合することが公知である。他の微生物から関連するタンパク質が単離されている。Ｅ．ｃｏｌｉ ＨＵの完全なアミノ酸配列は、Ｌａｉｎｅら（１９８０年）Ｅｕｒ． Ｊ． Ｂｉｏｃｈｅｍ． １０３巻（３号）：４４７～４８１頁によって報告された。ＨＵタンパク質に対する抗体がＡｂｃａｍから市販されている。Ｅ．ｃｏｌｉにおけるＨＵタンパク質サブユニットをコードする遺伝子は、それぞれ配列番号２８

および２９に対応するｈｕｐＡおよびｈｕｐＢである。他の生物体においてこれらの遺伝子に対するホモログが見いだされ、他の生物体由来のこれらの遺伝子に対応するペプチドは、表１０に見いだすことができる。

【００７８】

「表面抗原」または「表面タンパク質」という用語は、細菌細胞などの細胞表面上のタンパク質またはペプチドを指す。表面抗原の例は、外膜タンパク質、例えば、ＯＭＰ　Ｐ５（Ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＹＰ＿００４１３９０７９．１）、ＯＭＰ　Ｐ２（Ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＺＺＸ８７１９９．１）、ＯＭＰ　Ｐ２６（Ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＹＰ＿６６５０９１．１）、ｒｓＰｉｌＡ　または組換え型の可溶性ＰｉｌＡ（Ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＥＦＵ９６７３４．１）およびＩＶ型　Ｐｉｌｉｎ（Ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＹＰ＿００３８６４３５１．１）などである。

【００７９】

「Ｈａｅｍｏｐｈｉｌｕｓ　ｉｎｆｌｕｅｎｚａｅ」という用語は、多くの異なる感染症、例えば、耳感染症、眼感染症、および副鼻腔炎などを引き起こす可能性がある病原性細菌を指す。Ｈａｅｍｏｐｈｉｌｕｓ　ｉｎｆｌｕｅｎｚａｅの多くの異なる株が単離されており、それはＩｈｆＡ遺伝子またはタンパク質を有する。Ｈａｅｍｏｐｈｉｌｕｓ　ｉｎｆｌｕｅｎｚａｅの異なる株のいくつかの非限定的な例としては、Ｒｄ　ＫＷ２０、８６－０２８ＮＰ、Ｒ２８６６、ＰｉｔｔＧＧ、ＰｉｔｔＥＥ、Ｒ２８４６、および２０１９が挙げられる。

【００８０】

「微生物ＤＮＡ」は、バイオフィルムを生じる微生物由来の一本鎖ＤＮＡまたは二本鎖ＤＮＡを意味する。

【００８１】

バイオフィルムを「阻害、予防または破壊すること」とは、バイオフィルムの構造を予防的または治療的に縮小させることを意味する。バイオフィルムの破壊または縮小の例は図５に示されている。

【００８２】

「干渉作用剤」とは、微生物ＤＮＡに対するＩＨＦなどのＤＮＡＢＩＩポリペプチドに対して競合、阻害、予防、滴定のうちの任意の１つまたは複数をする作用剤、または微生物バイオフィルムの破壊もする作用剤を意味する。干渉作用剤は、化学分子または生物分子の任意の１つまたは複数であってよい。例えば、ＩＨＦは、例えば、４方向のジャンクション、シス－白金付加物、ＤＮＡループまたは塩基のバルジを含有するＤＮＡなどのＤＮＡ構造に特異的に結合する、それを屈曲させるまたは歪めることができる。そのような作用剤の例としては、これらに限定することなく、（１）ＩＨＦのＤＮＡ結合活性を阻害する小分子、（２）ＤＮＡへの結合においてＩＨＦと競合する、ポリアミンおよびスペルミンなどの小分子、（３）ＤＮＡへの結合においてＩＨＦと競合する、ＩＨＦのペプチド断片などのポリペプチド、（４）ＩＨＦを対象とする抗体またはその断片、または（５）４方向のポリヌクレオチドまたは屈曲したポリヌクレオチド、またはＩＨＦ－結合性について競合する屈曲したＤＮＡ構造または歪んだＤＮＡ構造を含有する他の種類のポリヌクレオチドが挙げられる。「ＩＨＦの核酸への結合を阻害する小分子」とは、上記の（１）または（２）を指し、ＤＮＡに、副溝において結合する小分子、すなわち、副溝結合性分子を包含する。「４方向のポリヌクレオチド」とは、ＤＮＡの４つの鎖間にホリデイジャンクションとしても公知の４方向のジャンクションを含有するポリヌクレオチドを意味する。

【００８３】

「屈曲したポリヌクレオチド」とは、他の鎖と対にならない１本の鎖上に小さなループを含有する二本鎖ポリヌクレオチドを意味する。いくつかの実施形態では、ループは、１塩基から約２０塩基までの長さ、あるいは２塩基から約１５塩基までの長さ、あるいは約３塩基から約１２塩基までの長さ、あるいは約４塩基から約１０塩基までの長さである、あるいは、約４塩基、５塩基、または６塩基、または７塩基、または８塩基、または９塩

基、または１０塩基を有する。
【００８４】
「ＤＮＡへの結合においてＩＨＦと競合するポリペプチド」とは、屈曲したＤＮＡ構造または歪んだＤＮＡ構造への結合においてＩＨＦと競合するが、ＤＮＡとバイオフィルムを形成しないタンパク質またはペプチドを意味する。例としては、これらに限定することなく、ＩＨＦの１つまたは複数のＤＮＡ結合ドメインを含むＩＨＦの断片、またはその生物学的等価物が挙げられる。ＤＮＡ結合ドメインは図６に示されている。
【００８５】
診断または処置の「被験体」は、細胞または動物、例えば、哺乳動物またはヒトなどである。診断または処置のための非ヒト動物被験体、感染または動物モデルのための非ヒト動物被験体は、例えば、サル、ネズミ科の動物、例えば、ラット、マウス、チンチラなど、イヌ科の動物、例えば、イヌ、ウサギ科の動物、例えば、ウサギなど、家畜、競技動物、および愛玩動物である。
【００８６】
「タンパク質」、「ペプチド」および「ポリペプチド」という用語は、互換的に使用され、それらの最も広範な意味では、２つ以上のサブユニットのアミノ酸、アミノ酸の類似体またはペプチド模倣薬の化合物を指す。サブユニットは、ペプチド結合によって連結されていてよい。別の実施形態では、サブユニットは、他の結合、例えば、エステル結合、エーテル結合などによって連結されていてよい。タンパク質またはペプチドは、少なくとも２つのアミノ酸を含有しなければならず、最大数のアミノ酸に対する制限はなく、タンパク質の配列またはペプチドの配列を含んでよい。本明細書で使用される場合、「アミノ酸」という用語は、天然アミノ酸および／または非天然アミノ酸または合成アミノ酸のいずれかを指し、グリシンおよびＤ光学異性体とＬ光学異性体の両方、アミノ酸の類似体およびペプチド模倣薬を含める。
【００８７】
「Ｃ末端のポリペプチド」とは、少なくとも１０個、あるいは少なくとも１５個、あるいは少なくとも２０個、または少なくとも２５個のＣ末端アミノ酸、あるいはポリペプチドの半分を意味する。別の態様では、９０アミノ酸を含有するポリペプチドについて、Ｃ末端のポリペプチドは、アミノ酸４６～９０を含む。一態様では、この用語は、カルボキシ末端から２０個のＣ末端のアミノ酸を意味する。
【００８８】
「ポリヌクレオチド」および「オリゴヌクレオチド」という用語は互換的に使用され、任意の長さのポリマーの形態のヌクレオチド、デオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチドのいずれか、またはその類似体を指す。ポリヌクレオチドは、任意の三次元構造を有してよく、公知または未知の任意の機能を果たし得る。以下はポリヌクレオチドの非限定的な例である：遺伝子または遺伝子断片（例えば、プローブ、プライマー、ＥＳＴタグまたはＳＡＧＥタグ）、エクソン、イントロン、メッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）、転移ＲＮＡ、リボソームＲＮＡ、ＲＮＡｉ、リボザイム、ｃＤＮＡ、組換えポリヌクレオチド、分岐ポリヌクレオチド、プラスミド、ベクター、任意の配列の単離されたＤＮＡ、任意の配列の単離されたＲＮＡ、核酸プローブおよびプライマー。ポリヌクレオチドは、修飾されたヌクレオチド、例えば、メチル化されたヌクレオチドおよびヌクレオチド類似体などを含んでよい。存在する場合、ヌクレオチド構造の修飾は、ポリヌクレオチドの組立ての前に、またはその後に付与することができる。ヌクレオチドの配列を非ヌクレオチド構成成分で遮ることができる。ポリヌクレオチドは、重合後に、例えば、標識化構成成分とコンジュゲートすることによってさらに修飾することができる。この用語はまた、二本鎖分子と一本鎖分子の両方を指す。別段の指定または要求がない限り、ポリヌクレオチドである本発明の任意の実施形態は、二本鎖の形態と、二本鎖の形態を成すことが公知であるまたは予測される２つの相補的な一本鎖の形態のそれぞれの両方を包含する。
【００８９】
ポリヌクレオチドは、特異的な配列の４つのヌクレオチド塩基：アデニン（Ａ）；シト

シン（Ｃ）；グアニン（Ｇ）；チミン（Ｔ）；およびポリヌクレオチドがＲＮＡである場合はチミンの代わりにウラシル（Ｕ）で構成される。したがって、「ポリヌクレオチド配列」という用語は、ポリヌクレオチド分子のアルファベット表示である。このアルファベット表示は、中央処理装置を有するコンピュータ内のデータベースに入力し、バイオインフォマティクスの適用、例えば、機能ゲノム科学および相同性検索などのために使用することができる。

【００９０】

「単離された」または「組換え型の」という用語は、本明細書において核酸、例えば、ＤＮＡまたはＲＮＡなどに関して使用される場合、それぞれ、巨大分子ならびにポリペプチドの天然の供給源に存在する他のＤＮＡまたはＲＮＡから分離された分子を指す。「単離されたかまたは組換え型の核酸」という用語は、断片として天然に存在せず、自然の状態で見いだされない核酸断片を含むものとする。「単離された」という用語は、本明細書では、他の細胞タンパク質から単離されたポリヌクレオチド、ポリペプチドおよびタンパク質を指すためにも使用され、精製されたポリペプチドと組換え型のポリペプチドの両方を包含するものとする。他の実施形態では、「単離されたかまたは組換え型の」という用語は、細胞、組織、ポリヌクレオチド、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、抗体またはその断片（複数可）が天然で通常付随する構成物、細胞および他の物から分離されていることを意味する。例えば、単離された細胞は、異なる表現型または遺伝子型の組織または細胞から分離された細胞である。単離されたポリヌクレオチドは、そのネイティブな環境または天然の環境、例えば、染色体上では通常付随する３’および５’の連続したヌクレオチドから分離されている。当業者には明らかであるように、天然に存在しないポリヌクレオチド、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、抗体またはその断片（複数可）は、その天然に存在する対応物と区別するために「単離」を必要としない。

【００９１】

明示的な列挙がなくとも、また別段の意図がなければ、本発明がポリペプチド、タンパク質、ポリヌクレオチドまたは抗体に関する場合、本発明の範囲内でその等価物または生物学的等価物が意図されることが推定されるべきである。本明細書で使用される場合、「生物学的なその等価物」は、参照のタンパク質、抗体、断片、ポリペプチドまたは核酸について言及される場合、「その等価物」という用語と同義であるものとし、所望の構造または機能性を依然として維持しながら最小の相同性を有するものを意味する。本明細書において具体的に列挙されていなければ、本明細書で言及されているポリヌクレオチド、ポリペプチドまたはタンパク質はいずれも、その等価物も包含すると考えられる。一態様では、等価なポリヌクレオチドは、ストリンジェントな条件下で本明細書記載の、記載されている方法において使用するためのポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチドの相補物とハイブリダイズするポリヌクレオチドである。別の態様では、等価な抗体または抗原結合性ポリペプチドとは、参照抗体または参照抗原結合性断片と、少なくとも７０％、あるいは少なくとも７５％、あるいは少なくとも８０％、あるいは少なくとも８５％、あるいは少なくとも９０％、あるいは少なくとも９５％の親和性またはそれを超える親和性で結合する抗体または抗原結合性ポリペプチドを意味する。別の態様では、その等価物は、競合ＥＬＩＳＡアッセイにおいて、抗体または抗原結合性断片の、その抗原への結合と競合する。別の態様では、等価物とは、少なくとも約８０％の相同性または同一性、あるいは、少なくとも約８５％、あるいは少なくとも約９０％、あるいは少なくとも約９５％、あるいは９８％の相同性または同一性の百分率を意味し、参照タンパク質、参照ポリペプチドまたは参照核酸と実質的に等しい生物活性を示す。生物学的に等価なポリペプチドの例は表９において提供され、そこでは好ましいアミノ酸配列への保存されたアミノ酸置換が同定されている。

【００９２】

別の配列に対して特定の百分率（例えば、８０％、８５％、９０％、または９５％）の「配列同一性」を有するポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチド領域（または、ポリペプチドまたはポリペプチド領域）は、アラインメントすると、比較されている２つの配列

の塩基（またはアミノ酸）の百分率が同じであることを意味する。アラインメントおよび相同性または配列同一性の百分率は、当技術分野で公知のソフトウェアプログラム、例えば、Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ（Ａｕｓｕｂｅｌら編、１９８７年）付録３０、セクション７．７．１８、表７．７．１に記載のものを使用して決定することができる。アラインメントのために初期状態のパラメータを使用することが好ましい。好ましいアラインメントプログラムは、初期状態のパラメータを使用したＢＬＡＳＴである。具体的には、好ましいプログラムは、以下の初期状態のパラメータを使用したＢＬＡＳＴＮおよびＢＬＡＳＴＰである：遺伝暗号（Ｇｅｎｅｔｉｃ ｃｏｄｅ）＝標準；フィルター（ｆｉｌｔｅｒ）＝なし；鎖（ｓｔｒａｎｄ）＝両方；カットオフ（ｃｕｔｏｆｆ）＝６０；エクスペクト（ｅｘｐｅｃｔ）＝１０；行列（Ｍａｔｒｉｘ）＝ＢＬＯＳＵＭ６２；デスクリプション（Ｄｅｓｃｒｉｐｔｉｏｎｓ）＝５０配列；ソート（ｓｏｒｔ ｂｙ）＝ＨＩＧＨ ＳＣＯＲＥ；データベース（Ｄａｔａｂａｓｅｓ）＝非冗長性、ＧｅｎＢａｎｋ＋ＥＭＢＬ＋ＤＤＢＪ＋ＰＤＢ＋ＧｅｎＢａｎｋ ＣＤＳ ｔｒａｎｓｌａｔｉｏｎｓ＋ＳｗｉｓｓＰｒｏｔｅｉｎ＋ＳＰｕｐｄａｔｅ＋ＰＩＲ。これらのプログラムの詳細は、以下のインターネットアドレスにおいて見いだすことができる：ｎｃｂｉ．ｎｌｍ．ｎｉｈ．ｇｏｖ／ｃｇｉ－ｂｉｎ／ＢＬＡＳＴ。配列同一性および同一性の百分率は、それらをｃｌｕｓｔａｌＷに取り込むことによって決定した（ウェブアドレス：／／ａｌｉｇｎ．ｇｅｎｏｍｅ．ｊｐ／において利用可能、２０１１年３月７日に最終アクセス。

【００９３】

「相同性」または「同一性」または「類似性」とは、２つのペプチド間または２つの核酸分子間の配列類似性を指す。相同性は、比較するためにアラインメントすることができる各配列内の位置を比較することによって決定することができる。比較される配列内の位置が同じ塩基またはアミノ酸によって占有されている場合、それらの分子は、その位置において相同である。配列間の相同性の程度は、それらの配列が共有する、一致するまたは相同である位置の数の関数である。「無関係の」または「非相同な」配列は、本発明の配列の１つと４０％未満の同一性、あるいは２５％未満の同一性を共有する。

【００９４】

「相同性」または「同一性」または「類似性」は、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする２つの核酸分子を指す場合もある。

【００９５】

「ハイブリダイゼーション」とは、１つまたは複数のポリヌクレオチドが反応して、ヌクレオチド残基の塩基間の水素結合によって安定化された複合体を形成する反応を指す。水素結合は、ワトソン・クリック塩基対合、フーグスティーン結合によって、または任意の他の配列特異的な様式で起こり得る。複合体は、二重鎖構造を形成している２つの鎖、多数鎖複合体を形成している３つ以上の鎖、単一の自己ハイブリダイズ性（ｓｅｌｆ－ｈｙｂｒｉｄｉｚｉｎｇ）鎖、またはこれらの任意の組合せを含んでよい。ハイブリダイゼーション反応は、より大規模なプロセスのステップ、例えば、ＰＣＲ反応の開始、またはリボザイムによるポリヌクレオチドの酵素的切断などを構成し得る。

【００９６】

ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件の例としては、約２５℃～約３７℃のインキュベーション温度；約６×ＳＳＣ～約１０×ＳＳＣのハイブリダイゼーション緩衝液の濃度；約０％～約２５％のホルムアミド濃度；および約４×ＳＳＣ～約８×ＳＳＣの洗浄溶液が挙げられる。中程度のハイブリダイゼーション条件の例としては、約４０℃～約５０℃のインキュベーション温度；約９×ＳＳＣ～約２×ＳＳＣの緩衝液の濃度；約３０％～約５０％のホルムアミド濃度；および約５×ＳＳＣ～約２×ＳＳＣの洗浄溶液が挙げられる。高ストリンジェンシー条件の例としては、約５５℃～約６８℃のインキュベーション温度；約１×ＳＳＣ～約０．１×ＳＳＣの緩衝液の濃度；約５５％～約７５％のホルムアミド濃度；および約１×ＳＳＣ、０．１×ＳＳＣの洗浄溶液、または脱イオン水が挙げられる。一般に、ハイブリダイゼーションのインキュベート時間は、５分から２４時

間の間であり、１つ、２つ、またはそれ以上の洗浄ステップを伴い、洗浄インキュベート時間は約１分、２分、または１５分である。ＳＳＣは０．１５ＭのＮａＣｌおよび１５ｍＭのクエン酸緩衝液である。他の緩衝系を用いた同等のＳＳＣを使用することができることが理解される。

【００９７】

本明細書で使用される場合、「発現」とは、ポリヌクレオチドがｍＲＮＡに転写されるプロセスおよび／または転写されたｍＲＮＡがその後、ペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質に翻訳されるプロセスを指す。ポリヌクレオチドがゲノムＤＮＡに由来する場合、発現は、真核細胞におけるｍＲＮＡのスプライシングを含んでよい。

【００９８】

「コードする」という用語は、ポリヌクレオチドに適用される場合、そのネイティブな状態にある場合、または当業者に周知の方法によって操作される場合、転写および／または翻訳してポリペプチドおよび／またはその断片に対するｍＲＮＡを作製することができるポリペプチドを「コードする」と考えられているポリヌクレオチドを指す。アンチセンス鎖は、そのような核酸の相補物であり、それからコード配列を推定することができる。

【００９９】

本明細書で使用される場合、「処置すること（ｔｒｅａｔｉｎｇ）」、「処置（ｔｒｅａｔｍｅｎｔ）」などの用語は、本明細書では、所望の薬理的効果および／または生理的効果を得ることを意味するために使用される。効果は、障害またはその徴候または症状を完全にまたは部分的に予防するという点で予防的であってよい、および／または、障害および／または障害に起因する有害作用に対する部分的または完全な治癒という点で治療的であってよい。

【０１００】

予防するとは、障害または影響の素因がある系または被験体において障害または影響をｉｎ　ｖｉｔｒｏまたはｉｎ　ｖｉｖｏで予防することを意味する。その例は、バイオフィルムを生じることが公知の微生物に感染した系においてバイオフィルムの形成を予防することである。

【０１０１】

「組成物」は、活性薬剤、および不活性な別の化合物または組成物（例えば、検出可能な作用剤またはラベル）または活性な別の化合物または組成物、例えば、アジュバントなどの組合せを意味するものとする。

【０１０２】

「医薬組成物」は、ｉｎ　ｖｉｔｒｏ、ｉｎ　ｖｉｖｏまたはｅｘ　ｖｉｖｏでの診断または処置における使用に適した組成物を成す活性薬剤と不活性または活性なキャリアの組合せを含むものとする。

【０１０３】

「薬学的に許容されるキャリア」とは、本発明の組成物に使用することができる任意の希釈剤、賦形剤、またはキャリアを指す。薬学的に許容されるキャリアとしては、イオン交換体、アルミナ、ステアリン酸アルミニウム、レシチン、血清タンパク質、例えば、ヒト血清アルブミンなど、緩衝物質、例えば、ホスフェートなど、グリシン、ソルビン酸、ソルビン酸カリウム、飽和型の植物脂肪酸の部分的なグリセリド混合物、水、塩または電解質、例えば、硫酸プロタミン、リン酸水素二ナトリウム、リン酸水素カリウム、塩化ナトリウム、亜鉛塩など、コロイド状シリカ、三ケイ酸マグネシウム、ポリビニルピロリドン、セルロースベースの物質、ポリエチレングリコール、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ポリアクリレート、ワックス、ポリエチレン－ポリオキシプロピレン－ブロックポリマー、ポリエチレングリコールおよび羊毛脂が挙げられる。適切な医薬キャリアは、この分野における標準の参照テキストである Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ、Ｍａｃｋ　Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ　Ｃｏｍｐａｎｙ に記載されている。適切な医薬キャリアは、意図された投与形態、すなわち、経口的な錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、シロップ剤などに関して選択すること、および従来の医

薬の慣習と一致することが好ましい。

【０１０４】

本発明の「生物学的に活性な作用剤」または活性薬剤とは、単離されたかまたは組換え型のポリペプチド、単離されたかまたは組換え型のポリヌクレオチド、ベクター、単離された宿主細胞、または抗体、ならびにそれらのうちの１つまたは複数を含有する組成物のうちの１つまたは複数を意味する。

【０１０５】

「投与」は、処置の過程全体を通して、１回用量で、連続的に、または断続的に実施することができる。最も有効な手段および投与量を決定する方法は、当業者に公知であり、療法に使用される組成物、療法の目的、処置されている標的細胞、および処置されている被験体によって変動する。単回投与または多数回の投与は、処置にあたっている医師によって選択された用量のレベルおよびパターンを用いて行うことができる。適切な投薬の処方および作用剤を投与する方法は当技術分野で公知である。投与経路を決定することができ、最も有効な投与経路を決定する方法は当業者に公知であり、処置に使用される組成物、処置の目的、処置されている被験体の健康状態または疾患の病期、および標的細胞または組織によって変動する。投与経路の非限定的な例としては、経口投与、経鼻投与、注射、および局所塗布が挙げられる。

【０１０６】

本発明の作用剤は、療法のために、任意の適切な投与経路によって投与することができる。好ましい経路は、レシピエントの状態および年齢、ならびに処置されている疾患によって変動することも理解されよう。

【０１０７】

「有効量」という用語は、所望の効果を実現するために十分な数量を指す。治療的または予防的な適用に関して、有効量は、問題の状態の種類および重症度ならびに個々の被験体の特性、例えば、全体的な健康、年齢、性別、体重、および医薬組成物に対する寛容性などに左右される。免疫原性組成物に関して、いくつかの実施形態では、有効量は、病原体に対する防御応答をもたらすために十分な量である。他の実施形態では、免疫原性組成物の有効量は、抗原に対する抗体生成をもたらすために十分な量である。いくつかの実施形態では、有効量は、それを必要とする被験体に受動免疫を付与するために必要な量である。免疫原性組成物に関して、いくつかの実施形態では、有効量は、上記の因子に加えて、意図された使用、特定の抗原性化合物の免疫原性の程度、および健康／被験体の免疫系の応答性に左右される。当業者は、これらおよび他の因子に応じて適量を決定することができる。

【０１０８】

ｉｎ　ｖｉｔｒｏでの適用の場合では、いくつかの実施形態では、有効量は、問題の適用のサイズおよび本質に左右される。有効量は、ｉｎ　ｖｉｔｒｏにおける標的および使用されている方法の本質および感度にも左右される。当業者は、これら他の考察に基づいて有効量を決定することができる。有効量は、実施形態に応じて、組成物を１回または複数回投与することを含んでよい。

【０１０９】

「コンジュゲートした部分」という用語は、単離されたキメラポリペプチドに、キメラポリペプチドの残基と共有結合を形成することによって付加することができる部分を指す。部分は、キメラポリペプチドの残基と直接結合させることができる、または、リンカーとの共有結合を形成し、次にリンカーとキメラポリペプチドの残基の共有結合を形成することができる。

【０１１０】

「ペプチドコンジュゲート」とは、１つまたは複数のポリペプチドと別の化学的または生物学的な化合物との共有結合または非共有結合による結びつきを指す。非限定的な例では、ポリペプチドと化学化合物の「コンジュゲーション」により、意図された目的に対するポリペプチドの安定性または効力が改善される。一実施形態では、ペプチドをキャリア

とコンジュゲートし、ここでキャリアは、リポソーム、ミセル、または薬学的に許容されるポリマーである。

【０１１１】

「リポソーム」は、同心脂質二重層からなる顕微鏡レベルの小胞である。構造的に、リポソームは、数百オングストロームから数分の１ミリメートルまでの寸法を有する長い管から球体まで、サイズおよび形状に幅がある。小胞形成性脂質は、外層の脂質組成物をもたらす最終的な複合体の特定の程度の流動性または剛性が実現されるように選択する。これらは、中性（コレステロール）または双極性であり、リン脂質、例えば、ホスファチジルコリン（ＰＣ）、ホスファチジルエタノールアミン（ＰＥ）、ホスファチジルイノシトール（ＰＩ）、およびスフィンゴミエリン（ＳＭ）など、およびこれらに限定されないが、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン（ＤＯＰＥ）を含めた他の種類の双極性の脂質を含み、炭化水素の鎖長は１４～２２の範囲内であり、飽和型であるまたは１つまたは複数のＣ＝Ｃ２重結合を有する。単独で、または他の脂質構成成分と組み合わせて安定なリポソームを作製することができる脂質の例は、リン脂質、例えば、水素化大豆ホスファチジルコリン（ＨＳＰＣ）、レシチン、ホスファチジルエタノールアミン、リゾレシチン、リゾホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルイノシトール、スフィンゴミエリン、セファリン、カルジオリピン、ホスファチジン酸、セレブロシド、ジステアロイルホスファチジルエタン（ｄｉｓｔｅａｒｏｙｌｐｈｏｓｐｈａｔｉｄｙｌｅｔｈａｎ）－オラミン（ＤＳＰＥ）、ジオレオイルホスファチジルコリン（ＤＯＰＣ）、ジパルミトイルホスファチジルコリン（ＤＰＰＣ）、パルミトイルオレオイルホスファチジルコリン（ｐａｌｍｉｔｏｙｌｏｌｅｏｙｌｐｈｏｓｐｈａｔｉｄｙｌｃｈｏｌｉｎｅ）（ＰＯＰＣ）、パルミトイルオレオイルホスファチジルエタノールアミン（ｐａｌｍｉｔｏｙｌｏｌｅｏｙｌｐｈｏｓｐｈａｔｉｄｙｌｅｔｈａｎｏｌａｍｉｎｅ）（ＰＯＰＥ）およびジオレオイルホスファチジルエタノールアミン４－（Ｎ－マレイミド－メチル）シクロヘキサン－１－カルボキシレート（ＤＯＰＥ－ｍａｌ）などである。リポソームに組み入れることができる、脂質を含有する非亜リン酸のさらなるものとしては、ステアリルアミン、ドデシルアミン、ヘキサデシルアミン、ミリスチン酸イソプロピル、ラウリル硫酸トリエタノールアミン、アルキル－アリール硫酸塩、アセチルパルミテート（ａｃｅｔｙｌ　ｐａｌｍｉｔａｔｅ）、グリセロールリシノレエート（ｇｌｙｃｅｒｏｌ　ｒｉｃｉｎｏｌｅａｔｅ）、ヘキサデシルステアレート（ｈｅｘａｄｅｃｙｌ　ｓｔｅｒｅａｔｅ）、両性のアクリルポリマー、ポリエチルオキシレート化（ｐｏｌｙｅｔｈｙｌｏｘｙｌａｔｅｄ）脂肪酸アミド、および上記のカチオン性脂質（ＤＤＡＢ、ＤＯＤＡＣ、ＤＭＲＩＥ、ＤＭＴＡＰ、ＤＯＧＳ、ＤＯＴＡＰ（ＤＯＴＭＡ）、ＤＯＳＰＡ、ＤＰＴＡＰ、ＤＳＴＡＰ、ＤＣ－Ｃｈｏｌ）が挙げられる。負に荷電した脂質としては、小胞を形成することができるホスファチジン酸（ＰＡ）、ジパルミトイルホスファチジルグリセロール（ＤＰＰＧ）、ジオレオイルホスファチジルグリセロール（ＤＯＰＧ）、およびジセチルホスフェート（ｄｉｃｅｔｙｌｐｈｏｓｐｈａｔｅ）が挙げられる。一般には、リポソームは、それらの全体的なサイズおよびラメラ構造の本質に基づいて３つのカテゴリーに分けることができる。Ｎｅｗ　Ｙｏｒｋ　Ａｃａｄｅｍｙ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ　Ｍｅｅｔｉｎｇ、「Ｌｉｐｏｓｏｍｅｓ　ａｎｄ　Ｔｈｅｉｒ　Ｕｓｅ　ｉｎ　Ｂｉｏｌｏｇｙ　ａｎｄ　Ｍｅｄｉｃｉｎｅ」、１９７７年１２月によって展開された３つの分類は、多層状の小胞（ＭＬＶ）、小さな単層の小胞（ＳＵＶ）および大きな単層の小胞（ＬＵＶ）である。生物活性のある作用剤を、本明細書に記載の方法に従って投与するためにそのようなものに封入することができる。

【０１１２】

「ミセル」は、液体コロイド中に分散した界面活性物質分子の凝集体である。典型的な水溶液中ミセルは、周囲の溶媒と接触した親水性の「頭部」領域を有し、ミセルの中心に疎水性の尾部領域が隔離された凝集体を形成する。この種類のミセルは、順相ミセル（水中油ミセル）として公知である。逆ミセルは、頭部基を中心に有し、尾部が突き出している（油中水ミセル）。ミセルは、本明細書に記載のポリヌクレオチド、ポリペプチド、抗

体または組成物を付着させて、標的の細胞または組織への効率的な送達を容易にするために使用することができる。

【０１１３】

「薬学的に許容されるポリマー」という句は、本明細書に記載の１つまたは複数のポリペプチドとコンジュゲートすることができる化合物の群を指す。ポリマーをポリペプチドとコンジュゲートすることにより、ｉｎ　ｖｉｖｏおよびｉｎ　ｖｉｔｒｏでのポリペプチドの半減期を延長することができると考えられる。非限定的な例としては、ポリエチレングリコール、ポリビニルピロリドン、ポリビニルアルコール、セルロース誘導体、ポリアクリレート、ポリメタクリレート、糖、ポリオールならびにそれらの混合物が挙げられる。生物活性のある作用剤は、本明細書に記載の方法に従って投与するために、薬学的に許容されるポリマーとコンジュゲートすることができる。

【０１１４】

「遺伝子送達ビヒクル」は、挿入されたポリヌクレオチドを宿主細胞内に運ぶことができる任意の分子と定義される。遺伝子送達ビヒクルの例は、リポソーム、ミセル、天然ポリマーおよび合成ポリマーを含めた生体適合性ポリマー；リポタンパク質；ポリペプチド；多糖；リポ多糖；人工ウイルス外被；金属粒子；および細菌、またはウイルス、例えば、バキュロウイルス、アデノウイルスおよびレトロウイルスなど、バクテリオファージ、コスミド、プラスミド、真菌のベクター、ならびに、種々の真核生物宿主および原核生物宿主における発現について記載されており、遺伝子療法のために、ならびに単純なタンパク質の発現のために使用することができる、当技術分野で一般に使用される他の組換え型ビヒクルである。

【０１１５】

本発明のポリヌクレオチドは、遺伝子送達ビヒクルを使用して細胞または組織に送達することができる。「遺伝子送達」、「遺伝子移入」、「形質導入」などは、本明細書で使用される場合、導入するために使用する方法に関係なく、外因性のポリヌクレオチド（時には「導入遺伝子」と称される）を宿主細胞に導入することに関する用語である。そのような方法としては、種々の周知の技法、例えば、ベクターに媒介される遺伝子移入（例えば、ウイルス感染症／トランスフェクション、または種々の他のタンパク質ベースまたは脂質ベースの遺伝子送達複合体による）、ならびに、「裸の」ポリヌクレオチドの送達を容易にする技法などが挙げられる（例えば、電気穿孔、「遺伝子銃」送達およびポリヌクレオチドを導入するために使用する種々の他の技法など）。導入したポリヌクレオチドは、宿主細胞内で安定にまたは一過性に維持することができる。安定に維持するためには、一般には、導入したポリヌクレオチドが宿主細胞と適合する複製開始点を含有すること、または、宿主細胞のレプリコン、例えば、染色体外のレプリコン（例えば、プラスミド）または核内染色体またはミトコンドリア染色体などに組み込まれることが必要である。当技術分野で公知であり、また本明細書に記載されている通り、いくつものベクターが、遺伝子の哺乳動物の細胞への移入を媒介することができることが公知である。

【０１１６】

本明細書で使用される場合「ｅＤＮＡ」という用語は、病原性のバイオフィルムに対する構成成分として見いだされる細胞外のＤＮＡを指す。

【０１１７】

「プラスミド」は、染色体ＤＮＡと独立して複製することができる、染色体ＤＮＡから分離される染色体外のＤＮＡ分子である。多くの場合、プラスミドは環状の二本鎖である。プラスミドにより、微生物の集団内に水平に遺伝子移入するための機構がもたらされ、また、一般には、所与の環境状態下で選択的な利点がもたらされる。プラスミドは、競合的な環境的ニッチにおいて天然に存在する抗生物質に対する耐性をもたらす遺伝子を保有してよい、あるいは、産生されるタンパク質は同様の状況の下で毒素としての機能を果たし得る。

【０１１８】

遺伝子工学において使用される「プラスミド」は、「プラスミドベクター」と称される

。そのような使用のための多くのプラスミドが市販されている。複製しようとする遺伝子を、細胞を特定の抗生物質に対して耐性にする遺伝子およびＤＮＡ断片をこの場所に容易に挿入することを可能にするいくつかの一般に使用される制限部位を含有する短い領域である多重クローニング部位（ＭＣＳ、またはポリリンカー）を含有するプラスミドのコピーに挿入する。プラスミドの別の主要な使用は、大量のタンパク質を生産することである。この場合、研究者は、対象の遺伝子を有するプラスミドを含有する細菌を成長させる。細菌はタンパク質を産生してその抗生物質耐性を付与するのと同じように、挿入された遺伝子から大量のタンパク質を産生するように誘導することもできる。これは、遺伝子、または次にそれがコードするタンパク質を大量生産する安価かつ容易なやり方である。

【０１１９】

「酵母人工染色体」または「ＹＡＣ」とは、大きなＤＮＡ断片（１００ｋｂよりも大きく、最大３０００ｋｂ）をクローニングするために使用されるベクターを指す。これは、人工的に構築された染色体であり、酵母細胞において複製および保存されるために必要なテロメア配列、セントロメア配列、および複製開始点配列を含有する。最初の環状のプラスミドを使用して築き、制限酵素を使用することによって直線化し、次いでＤＮＡリガーゼにより、突出末端を使用することによって対象の配列または遺伝子を線形の分子に付加することができる。酵母発現ベクター、例えば、ＹＡＣ、ＹＩｐ（酵母組込みプラスミド）、およびＹＥｐ（酵母エピソームプラスミド）などは、酵母はそれ自体が真核細胞であるので、翻訳後修飾された真核生物のタンパク質産物を得ることができるので非常に有用であるが、ＹＡＣはＢＡＣよりも不安定であり、キメラ的な影響を生じることが見いだされている。

【０１２０】

「ウイルスベクター」は、宿主細胞に送達しようとするポリヌクレオチドを含む、ｉｎ　ｖｉｖｏ、ｅｘ　ｖｉｖｏまたはｉｎ　ｖｉｔｒｏのいずれかで組換えによって作製されるウイルスまたはウイルス粒子と定義される。ウイルスベクターの例としては、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、アルファウイルスベクターなどが挙げられる。感染性のタバコモザイクウイルス（ＴＭＶ）ベースのベクターは、タンパク質の製造に使用することができ、タバコの葉においてＧｒｉｆｆｉｔｈｓｉｎを発現することが報告されている（Ｏ’Ｋｅｅｆｅら（２００９年）Ｐｒｏｃ．　Ｎａｔ．　Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．　ＵＳＡ　１０６巻（１５号）：６０９９～６１０４頁）。アルファウイルスベクター、例えば、セミルキ森林ウイルスベースのベクターおよびシンドビスウイルスベースのベクターなどが、遺伝子療法および免疫療法において使用するために開発されている。Ｓｃｈｌｅｓｉｎｇｅｒ　＆　Ｄｕｂｅｎｓｋｙ（１９９９年）Ｃｕｒｒ．　Ｏｐｉｎ．　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．　５巻：４３４～４３９頁およびＹｉｎｇら（１９９９年）Ｎａｔ．　Ｍｅｄ．　５巻（７号）：８２３～８２７頁を参照されたい。遺伝子移入がレトロウイルスベクターによって媒介される態様では、ベクター構築物とは、レトロウイルスのゲノムまたはその一部、および治療的な遺伝子を含むポリヌクレオチドを指す。

【０１２１】

本明細書で使用される場合、「レトロウイルス媒介性遺伝子移入」または「レトロウイルスの形質導入」は同じ意味を有し、ウイルスが細胞に侵入し、そのゲノムを宿主細胞ゲノム内に組み込むことによって遺伝子または核酸配列が宿主細胞に安定に移入されるプロセスを指す。ウイルスは、その通常の感染機構によって宿主細胞に侵入することができる、または、細胞に侵入するために異なる宿主細胞の表面受容体またはリガンドに結合するように修飾することができる。本明細書で使用される場合、レトロウイルスベクターとは、ウイルスまたはウイルス様の侵入機構によって外因性の核酸を細胞に導入することができるウイルス粒子を指す。

【０１２２】

レトロウイルスは、それらの遺伝情報をＲＮＡの形態で保有する；しかし、ウイルスが細胞に感染すると、ＲＮＡはＤＮＡの形態に逆転写され、感染した細胞のゲノムＤＮＡに

組み込まれる。組み込まれたＤＮＡ形態はプロウイルスと称されている。

【０１２３】

遺伝子移入がＤＮＡウイルスベクター、例えば、アデノウイルス（Ａｄ）またはアデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）などによって媒介される態様では、ベクター構築物とは、ウイルスのゲノムまたはその一部、および導入遺伝子を含むポリヌクレオチドを指す。アデノウイルス（Ａｄ）は、比較的よく特徴付けられたウイルスの均一な群であり、５０を超える血清型を含む。例えば、国際ＰＣＴ特許出願第ＷＯ９５／２７０７１号を参照されたい。Ａｄは、宿主細胞ゲノムへの組込みを必要としない。組換え型のＡｄ由来ベクター、特に野生型ウイルスの組換えおよび生成の潜在性を低下させるものも構築されている。国際ＰＣＴ出願第ＷＯ９５／００６５５号および同第ＷＯ９５／１１９８４号を参照されたい。野生型ＡＡＶは宿主細胞のゲノムへの組込みに高い感染性および特異性を有する。Ｈｅｒｍｏｎａｔ　＆　Ｍｕｚｙｃｚｋａ（１９８４年）Ｐｒｏｃ．　Ｎａｔｌ．　Ａｃａｄ．　Ｓｃｉ．　ＵＳＡ　８１巻：６４６６～６４７０頁およびＬｅｂｋｏｗｓｋｉら（１９８８年）Ｍｏｌ．　Ｃｅｌｌ．　Ｂｉｏｌ．　８巻：３９８８～３９９６頁を参照されたい。

【０１２４】

プロモーターと、ポリヌクレオチドを作動可能に連結することができるクローニング部位の両方を含有するベクターは当技術分野で周知である。そのようなベクターはＲＮＡをｉｎ　ｖｉｔｒｏまたはｉｎ　ｖｉｖｏで転写することができ、Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ（Ｌａ　Ｊｏｌｌａ、ＣＡ）およびＰｒｏｍｅｇａ　Ｂｉｏｔｅｃｈ（Ｍａｄｉｓｏｎ、ＷＩ）などの供給源から市販されている。発現および／またはｉｎ　ｖｉｔｒｏ転写を最適化するために、クローンの５’非翻訳部分および／または３’非翻訳部分を除去、付加または変更して、転写レベルまたは翻訳レベルのいずれかで発現に干渉するまたは発現を低下させる可能性がある余分の潜在的な不適切な代替翻訳開始コドンまたは他の配列を排除することが必要であり得る。あるいは、発現を増強するために、コンセンサスリボソーム結合部位を開始コドンのすぐ５’側に挿入することができる。

【０１２５】

遺伝子送達ビヒクルは、ＤＮＡ／リポソーム複合体、ミセルおよび標的ウイルスタンパク質－ＤＮＡ複合体も包含する。本発明の方法では、ターゲティング抗体またはその断片も含むリポソームを用いることができる。タンパク質トランスフェクションの非限定的な技法により、ポリヌクレオチドを細胞または細胞集団に送達することに加えて、本明細書に記載のタンパク質を細胞または細胞集団に直接導入することができる、あるいは発現を増強し、かつ／または本発明のタンパク質の活性を促進する培養条件が他の非限定的な技法である。

【０１２６】

本明細書で使用される場合、「抗体」、「抗体」および「免疫グロブリン」という用語は、全抗体および任意の抗原結合性断片またはその単鎖を含む。したがって、「抗体」という用語は、免疫グロブリン分子の少なくとも一部分を含む分子を含有する任意のタンパク質またはペプチドを包含する。「抗体」、「抗体」および「免疫グロブリン」という用語は、任意のアイソタイプの免疫グロブリン、これらに限定されないが、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ）$_2$、Ｆｖ、ｓｃＦｖ、ｄｓＦｖ、Ｆｄ断片、ｄＡｂ、ＶＨ、ＶＬ、ＶｈＨ、およびＶ－ＮＡＲドメインを含めた、抗原への特異的な結合を保持する抗体の断片；ミニ抗体（ｍｉｎｉｂｏｄｙ）、二重特異性抗体、三重特異性抗体、四重特異性抗体およびカッパ抗体（ｋａｐｐａ　ｂｏｄｙ）；抗体断片から形成された多特異性の抗体断片および１つまたは複数の単離されたものも包含する。そのようなものの例としては、これらに限定されないが、重鎖または軽鎖の相補性決定領域（ＣＤＲ）またはそのリガンド結合性部分、重鎖または軽鎖の可変領域、重鎖または軽鎖の定常領域、フレームワーク（ＦＲ）領域、または任意のその部分、結合性タンパク質の少なくとも１つの部分、キメラ抗体、ヒト化抗体、単鎖抗体、および抗体の抗原結合性部分を含む融合タンパク質および非抗体タンパク質が挙げられる。免疫グロブリン分子の重鎖および軽鎖の可変領域は、抗原と相

互作用する結合ドメインを含有する。抗体（Ａｂ）の定常領域は、免疫グロブリンの宿主組織への結合を媒介することができる。「抗」という用語は、タンパク質の名称の前に使用される場合、例えば、抗ＩＨＦ、抗ＨＵ、抗ＯＭＰ　Ｐ５は、特定のタンパク質に結合し、かつ／またはそれに対する親和性を有するモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体を指す。例えば、「抗ＩＨＦ」とは、ＩＨＦタンパク質に結合する抗体を指す。特異的な抗体は、それが生じた対象のタンパク質以外のタンパク質に対する親和性を有し得る、またはそれに結合し得る。例えば、抗ＩＨＦは、ＩＨＦタンパク質に対して特異的に生じたが、配列相同性または構造相同性によって関連する他のタンパク質にも結合し得る。

【０１２７】

抗体は、それらが所望の生物活性を示す限りは、ポリクローナル、モノクローナル、多特異性（例えば、二重特異性抗体）、および抗体断片であってよい。抗体は、任意の適切な生物学的な供給源、例えば、マウス、ラット、ヒツジおよびイヌから単離することができる。

【０１２８】

本明細書で使用される場合、「モノクローナル抗体」とは、実質的に同種の抗体集団から得られた抗体を指す。モノクローナル抗体は、そのそれぞれが抗原上の単一の決定因子を対象とするので、高度に特異的である。抗体は、例えば、放射性同位元素、検出可能な産物を生成する酵素、蛍光タンパク質などを用いて検出可能に標識することができる。抗体は、さらに他の部分、例えば、特異的結合対のメンバー、例えば、ビオチン（ビオチン－アビジン特異的結合対のメンバー）などとコンジュゲートすることができる。抗体は、これらに限定されないが、ポリスチレンのプレートまたはビーズなどを含めた固体支持体に結合させることもできる。

【０１２９】

モノクローナル抗体は、当技術分野で公知のハイブリドーマ法または組換えＤＮＡ法を用いて生成することができる。ハイブリドーマは、研究室において、抗体産生リンパ球と非抗体産生癌細胞、通常、骨髄腫またはリンパ腫を融合させることで作製される細胞である。ハイブリドーマは、増殖し、特異的なモノクローナル抗体の連続的なサイプル（ｓｙｐｌｅ）を産生する。抗体を生成または選択するための代替の技法としては、ｉｎ　ｖｉｔｒｏでリンパ球を被験体の抗原に曝露させること、および細胞、ファージ、または同様の系において抗体表出ライブラリーをスクリーニングすることが挙げられる。

【０１３０】

「ヒト抗体」という用語は、本明細書で使用される場合、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列に由来する可変領域および定常領域を有する抗体を含むものとする。本発明のヒト抗体としては、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列にコードされないアミノ酸残基（例えば、ｉｎ　ｖｉｔｒｏでのランダム変異誘発または部位特異的変異誘発によって、またはｉｎ　ｖｉｖｏでの体細胞変異によって導入された変異）を挙げることができる。しかし、「ヒト抗体」という用語は、本明細書で使用される場合、マウスなどの別の哺乳動物種の生殖系列に由来するＣＤＲ配列がヒトフレームワーク配列に移植された抗体を含まないものとする。したがって、本明細書で使用される場合、「ヒト抗体」という用語は、タンパク質の実質的に全ての部分（例えば、ＣＤＲ、フレームワーク、C_Lドメイン、C_Hドメイン（例えば、C_{H1}、C_{H2}、C_{H3}）、ヒンジ、（ＶＬ、ＶＨ））が、ヒトにおいて実質的に非免疫原性であり、軽微な配列の変化または変異のみを伴う抗体を指す。同様に、霊長類（サル、ヒヒ、チンパンジーなど）、げっ歯類（マウス、ラット、ウサギ、モルモット、ハムスター、など）および他の哺乳動物に指定された抗体は、そのような種、亜属、属、サブファミリー、ファミリーに特異的な抗体を示す。さらに、キメラ抗体は、上記の任意の組合せを含む。そのような変化または変異は、場合によって、ヒトまたは他の種において、修飾されていない抗体と比較して、免疫原性を保持する、または免疫原性が低いことが好ましい。したがって、ヒト抗体は、キメラ抗体またはヒト化抗体とは異なる。ヒト抗体は、機能的に再編成されたヒト免疫グロブリン（例えば、重鎖および／または軽鎖）遺伝子を発現することができる非ヒト動物または原核細胞または真核細胞によって作

製することができることが指摘されている。さらに、ヒト抗体が単鎖抗体である場合、ヒト抗体は、ネイティブなヒト抗体においては見いだされないリンカーペプチドを含んでよい。例えば、Ｆｖは、重鎖の可変領域と軽鎖の可変領域をつなぐリンカーペプチド、例えば、２個～約８個のグリシンまたは他のアミノ酸残基などを含んでよい。そのようなリンカーペプチドは、ヒト起源のものであるとみなされる。

【０１３１】

本明細書で使用される場合、ヒト抗体は、抗体が、例えば、ヒト免疫グロブリン遺伝子を保有するトランスジェニックマウスを免疫化することによって、またはヒト免疫グロブリン遺伝子ライブラリーをスクリーニングすることによってヒト免疫グロブリン配列を用いて系から得られる場合、特定の生殖系列配列「に由来する」。ヒト生殖系列免疫グロブリン配列「に由来する」ヒト抗体は、ヒト抗体のアミノ酸配列とヒト生殖系列免疫グロブリンのアミノ酸配列を比較することによって、そのようなものとして同定することができる。選択されたヒト抗体は、一般には、ヒト生殖系列免疫グロブリン遺伝子にコードされるアミノ酸配列と、アミノ酸配列が少なくとも９０％同一であり、他の種（例えば、マウス生殖系列配列）の生殖系列免疫グロブリンアミノ酸配列と比較してヒト抗体をヒトであると同定するアミノ酸残基を含有する。ある場合では、ヒト抗体は、生殖系列免疫グロブリン遺伝子にコードされるアミノ酸配列と、少なくとも９５％、または、少なくとも９６％、９７％、９８％、または９９％までも、アミノ酸配列が同一である。一般には、特定のヒト生殖系列配列に由来するヒト抗体は、ヒト生殖系列免疫グロブリン遺伝子にコードされるアミノ酸配列と１０アミノ酸以下の差異を示す。ある場合では、ヒト抗体は、５以下、または、さらには４以下、３以下、２以下、１以下までの、生殖系列免疫グロブリン遺伝子にコードされるアミノ酸配列とのアミノ酸の差異を示し得る。

【０１３２】

「ヒトモノクローナル抗体」とは、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列に由来する可変領域および定常領域を有する単一の結合特異性を示す抗体を指す。この用語は、組換えヒト抗体も意味する。これらの抗体を作出するための方法は、本明細書に記載されている。

【０１３３】

「組換えヒト抗体」という用語は、本明細書で使用される場合、組換え手段によって調製した、発現させた、創出した、または単離したヒト抗体、例えば、ヒト免疫グロブリン遺伝子についてトランスジェニックまたは染色体導入体（ｔｒａｎｓｃｈｒｏｍｏｓｏｍａｌ）またはそれから調製されるハイブリドーマである動物（例えば、マウス）から単離された抗体、抗体を発現するように形質転換された宿主細胞から、例えば、トランスフェクトーマ（ｔｒａｎｓｆｅｃｔｏｍａ）から単離された抗体、組換え型の、コンビナトリアルなヒト抗体ライブラリーから単離された抗体、およびヒト免疫グロブリン遺伝子配列をスプライシングして他のＤＮＡ配列にすることを伴う任意の他の手段によって調製した、発現させた、創出した、または単離した抗体などの全てを包含する。そのような組換えヒト抗体は、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列に由来する可変領域および定常領域を有する。しかし、ある特定の実施形態では、そのような組換えヒト抗体は、ｉｎ　ｖｉｔｒｏでの変異誘発（または、ヒトＩｇ配列に対する動物トランスジェニックを使用する場合は、ｉｎ　ｖｉｖｏでの体細胞の変異誘発）に供することができ、したがって、組換え型の抗体のＶＨ領域およびＶＬ領域のアミノ酸配列は、ヒト生殖系列のＶＨ配列およびＶＬ配列に由来し、それと関連するが、ｉｎ　ｖｉｖｏでのヒト抗体生殖系列レパートリーに天然に存在しない可能性がある配列である。これらの抗体を作出するための方法は、本明細書に記載されている。

【０１３４】

本明細書で使用される場合、キメラ抗体は、その軽鎖遺伝子および重鎖遺伝子が、一般には、遺伝子工学によって、異なる種に属する抗体可変性領域遺伝子および抗体定常領域遺伝子から構築された抗体である。

【０１３５】

本明細書で使用される場合、「ヒト化抗体」または「ヒト化免疫グロブリン」という用

語は、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小配列を含有するヒト／非ヒトキメラ抗体を指す。ほとんどの場合、ヒト化抗体は、レシピエントの可変領域由来の残基が、所望の特異性、親和性および能力を有する非ヒト種（ドナー抗体）、例えば、マウス、ラット、ウサギなど、または非ヒト霊長類の可変領域由来の残基と交換されているヒト免疫グロブリン（レシピエント抗体）である。ヒト化抗体は、レシピエント抗体またはドナー抗体においては見いだされない残基を含んでよい。ヒト化抗体は、場合によって、一般にはヒト免疫グロブリンの、免疫グロブリン定常領域（Ｆｃ）の少なくとも一部分も含んでよい。非ヒト抗体は、フレームワーク領域、定常領域またはＣＤＲに、ヒト抗体由来の同様に位置づけされたアミノ酸と置換されている１つまたは複数のアミノ酸を含有する。一般に、ヒト化抗体は、同じ抗体の非ヒト化型と比較して、ヒト宿主において生じる免疫応答を低減することが予測される。ヒト化抗体は、抗原結合性または他の抗体機能に対する影響を実質的に有さない保存されたアミノ酸置換を有し得る。保存された置換のグループ分けとしては、グリシン－アラニン、バリン－ロイシン－イソロイシン、フェニルアラニン－チロシン、リジン－アルギニン、アラニン－バリン、セリン－トレオニンおよびアスパラギン－グルタミンが挙げられる。

【０１３６】

「ポリクローナル抗体」または「ポリクローナル抗体組成物」という用語は、本明細書で使用される場合、異なるＢ細胞系に由来する抗体の調製物を指す。これらは、それぞれが異なるエピトープを認識する、特異的な抗原に対して分泌される免疫グロブリン分子の混合物である。

【０１３７】

本明細書で使用される場合、「抗体誘導体」という用語は、例えば、第２の分子に対する抗体を連結するために、アミノ酸の１つまたは複数がアルキル化、ペグ化、アシル化、エステル形成またはアミド形成などによって化学修飾されている全長の抗体または抗体の断片を含む。抗体誘導体としては、これらに限定されないが、ペグ化された抗体、システイン－ペグ化された抗体、およびその変異体が挙げられる。

【０１３８】

本明細書で使用される場合、「標識」という用語は、「標識された」組成物を生成するために、検出しようとする組成物に直接または間接的にコンジュゲートした、直接または間接的に検出可能な化合物または組成物、例えば、Ｎ末端ヒスチジン（ｈｉｓｔａｄｉｎｅ）タグ（Ｎ－Ｈｉｓ）、磁気的に活性な同位元素、例えば、^{115}Ｓｎ、^{117}Ｓｎおよび^{119}Ｓｎ、非放射性同位元素、例えば、^{13}Ｃおよび^{15}Ｎなど、ポリヌクレオチドまたはタンパク質、例えば抗体などを意味する。この用語は、ポリヌクレオチドとコンジュゲートした、挿入配列が発現されるとシグナルをもたらす配列、例えば、緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）なども包含する。標識は、単独で検出可能であってよい（例えば、放射性同位元素標識または蛍光標識）、または、酵素的な標識の場合では、基質である化合物または組成物の検出可能な化学的変質を触媒することができる。標識は、小規模な検出に適していてよい、またはハイスループットなスクリーニングのためにより適していてよい。そのように、適切な標識としては、これらに限定されないが、磁気的に活性な同位元素、非放射性同位元素、放射性同位元素、蛍光色素、化学発光化合物、色素、および酵素を含めたタンパク質が挙げられる。標識は、単に検出することができる、または、数量化することができる。単に検出する反応は、一般には、ただ単にその存在が確認される反応を含み、一方、数量化する反応は、一般には、数量化できる（例えば、数値で報告することができる）値、例えば、強度、偏光、および／または他の性質などを有する反応を含む。発光アッセイまたは蛍光アッセイでは、検出可能な反応を、実際に結合に関与するアッセイの構成成分と結びつけた発光団またはフルオロフォアを使用して直接生成する、または別の構成成分（例えば、レポーターまたは指示薬）と結びつけた発光団またはフルオロフォアを使用して間接的に生成することができる。シグナルを生じる発光標識の例としては、これらに限定されないが、生物発光および化学発光が挙げられる。検出可能な発光反応は、一般には、発光シグナルの変化または出現を含む。発光標識化アッセイの構成成分

のための適切な方法および発光団は、当技術分野で公知であり、例えば、Ｈａｕｇｌａｎｄ，　Ｒｉｃｈａｒｄ　Ｐ．（１９９６年）Ｈａｎｄｂｏｏｋ　ｏｆ　Ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｔ　Ｐｒｏｂｅｓ　ａｎｄ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　Ｃｈｅｍｉｃａｌｓ（第６版）に記載されている。発光プローブの例としては、これらに限定されないが、エクオリンおよびルシフェラーゼが挙げられる。

【０１３９】

本明細書で使用される場合、「免疫コンジュゲート」という用語は、第２の作用剤、例えば、細胞傷害性作用剤、検出可能な作用剤、放射性作用剤、ターゲティング作用剤、ヒト抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、合成抗体、半合成抗体、または多特異性抗体などに結びついたまたは連結した抗体または抗体誘導体を含む。

【０１４０】

適切な蛍光標識の例としては、これらに限定されないが、フルオレセイン、ローダミン、テトラメチルローダミン、エオシン、エリスロシン、クマリン、メチルクマリン、ピレン、マラカイトグリーン（Ｍａｌａｃｉｔｅ　ｇｒｅｅｎ）、スチルベン、ルシファーイエロー、Ｃａｓｃａｄｅ　Ｂｌｕｅ（商標）、およびＴｅｘａｓ　Ｒｅｄが挙げられる。他の適切な光学色素は、Ｈａｕｇｌａｎｄ，　Ｒｉｃｈａｒｄ　Ｐ．（１９９６年）Ｈａｎｄｂｏｏｋ　ｏｆ　Ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｔ　Ｐｒｏｂｅｓ　ａｎｄ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　Ｃｈｅｍｉｃａｌｓ（第６版）に記載されている。

【０１４１】

別の態様では、蛍光標識に官能性をもたせて、細胞または組織の内部または表面上に存在する細胞の構成成分、例えば、細胞表面マーカーなどへの共有結合性の付着を容易にする。これらに限定されないが、イソチオシアネート基、アミノ基、ハロアセチル基、マレイミド、スクシンイミジルエステル、およびハロゲン化スルホニルを含めた適切な官能基は全て、蛍光標識を第２の分子に付着させるために使用することができる。蛍光標識の官能基の選択は、リンカー、作用剤、マーカー、または第２の標識用作用剤のいずれかに付着させる部位に左右される。

【０１４２】

「真核細胞」は、モネラ界を除いた生物界の全てを含む。真核生物は、膜に結合した核によって容易に区別することができる。動物、植物、真菌、および原生生物は、その細胞が内部の膜および細胞骨格によって複雑な構造に組織化された真核生物または生物体である。最も特徴的な膜に結合した構造は核である。特に列挙がなければ、「宿主」という用語は、例えば、酵母、高等植物、昆虫および哺乳動物の細胞を含めた真核生物の宿主を包含する。真核細胞または宿主の非限定的な例としては、サル、ウシ、ブタ、マウス、ラット、鳥類、爬虫類およびヒトが挙げられる。

【０１４３】

「原核細胞」は、通常、核または任意の他の膜に結合した細胞小器官を欠き、２つの界、細菌および古細菌に分けられる。染色体ＤＮＡに加えて、これらの細胞は、エピソームと称される環状のループ内に遺伝情報も含有し得る。細菌細胞は、非常に小さく、およそ動物ミトコンドリアのサイズである（直径約１～２μｍ、長さ１０μｍ）。原核細胞は、３つの主要な形状：ロッド形状、球状、およびスパイラルを特徴とする。真核生物のような精巧な複製プロセスを行う代わりに、細菌細胞は二分裂によって分裂する。例としては、これらに限定されないが、Ｂａｃｉｌｌｕｓ細菌、Ｅ．ｃｏｌｉ細菌、およびＳａｌｍｏｎｅｌｌａ細菌が挙げられる。

【０１４４】

「ネイティブな」または「天然の」抗原は、エピトープを含有する、天然の生物学的な供給源から単離された、かつ被験体において抗原受容体、具体的には、Ｔ細胞抗原受容体（ＴＣＲ）に特異的に結合することができるポリペプチド、タンパク質または断片である。

【０１４５】

「抗原」および「抗原性」という用語は、抗体によって認識される能力を有する、また

は別のように抗体－リガンド対のメンバーとしての機能を果たす分子を指す。「特異的な結合」とは、抗原と免疫グロブリンの重鎖および軽鎖の可変領域の相互作用を指す。抗体－抗原結合は、ｉｎ　ｖｉｖｏまたはｉｎ　ｖｉｔｒｏで起こり得る。当業者は、タンパク質、核酸、脂肪酸、脂質、リポ多糖および多糖を含めた巨大分子は、抗原としての機能を果たす潜在性を有することを理解されよう。当業者は、さらに、抗体リガンドとしての機能を果たす潜在性を有するタンパク質をコードする核酸は、必ず抗原をコードすることを理解されよう。当業者は、さらに、抗原は、全長の分子に限定されず、部分的な分子も含んでよいことを理解されよう。「抗原性」という用語は、抗原の性質を有する分子に対する形容詞的参照である。この用語は、免疫原性である物質、すなわち免疫原、ならびに免疫学的不応答性、またはアネルギーを誘導する物質、すなわちアネルゲン（ａｎｅｒｇｅｎ）を包含する。

【０１４６】

「変化した抗原」は、対応する野生型抗原の一次配列とは異なる一次配列を有する抗原である。変化した抗原は、合成方法または組換え方法によって作出することができ、それらとしては、これらに限定されないが、翻訳の間に、または翻訳後に、例えば、リン酸化、グリコシル化、架橋、アシル化、タンパク質分解性の切断、抗体分子、膜分子または他のリガンドへの連結によって示差的に修飾された抗原性ペプチドが挙げられる（Ｆｅｒｇｕｓｏｎら（１９８８年）Ａｎｎ．　Ｒｅｖ．　Ｂｉｏｃｈｅｍ．　５７巻：２８５～３２０頁）。本発明の合成抗原または変化した抗原は、天然のエピトープと同じＴＣＲに結合するものとする。

【０１４７】

本明細書ではネイティブな抗原または野生型抗原とも称される「自己抗原」は、被験体において、抗原に対する自己免疫寛容に起因して、免疫応答をわずかに誘導する、または全く誘導しない抗原性ペプチドである。自己抗原の例は、黒色腫特異的抗原ｇｐ１００である。

【０１４８】

「主要組織適合性遺伝子複合体」または「ＭＨＣ」という用語は、Ｔ細胞への抗原提示のため、および急速な移植片拒絶のために必要な細胞表面分子をコードする遺伝子の複合体を指す。ヒトでは、ＭＨＣは「ヒト白血球抗原」または「ＨＬＡ」複合体としても公知である。ＭＨＣにコードされるタンパク質は、「ＭＨＣ分子」として公知であり、クラスＩ　ＭＨＣ分子およびクラスＩＩ　ＭＨＣ分子に分類される。クラスＩ　ＭＨＣは、β２－ミクログロブリンと非共有結合的に連結したＭＨＣにおいてコードされるα鎖でできている膜ヘテロ二量体タンパク質を含む。クラスＩ　ＭＨＣ分子は、ほぼ全ての有核細胞によって発現され、ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞への抗原の提示において機能することが示されている。クラスＩ分子は、ヒトにおけるＨＬＡ－Ａ、ＨＬＡ－Ｂ、およびＨＬＡ－Ｃを含む。クラスＩＩ　ＭＨＣ分子は、非共有結合的に結びついたα鎖およびβ鎖からなる膜ヘテロ二量体タンパク質も含む。クラスＩＩ　ＭＨＣ分子は、ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞において機能することが公知であり、ヒトでは、ＨＬＡ－ＤＰ、ＨＬＡ－ＤＱ、およびＨＬＡ－ＤＲを含む。好ましい実施形態では、本発明の組成物およびリガンドは、任意のＨＬＡ型のＭＨＣ分子と複合体を形成し得る。当業者は、ＨＬＡの血清型および遺伝子型に詳しい。ｂｉｍａｓ．ｄｃｒｔ．ｎｉｈ．ｇｏｖ／ｃｇｉ－ｂｉｎ／ｍｏｌｂｉｏ／ｈｌａ　ｃｏｅｆｆｉｃｉｅｎｔ　ｖｉｅｗｉｎｇ　ｐａｇｅ、Ｒａｍｍｅｎｓｅｅ　Ｈ．Ｇ．、Ｂａｃｈｍａｎｎ　Ｊ．、およびＳｔｅｖａｎｏｖｉｃ　Ｓ．ＭＨＣ　Ｌｉｇａｎｄｓ　ａｎｄ　Ｐｅｐｔｉｄｅ　Ｍｏｔｉｆｓ（１９９７年）Ｃｈａｐｍａｎ　＆　Ｈａｌｌ　Ｐｕｂｌｉｓｈｅｒｓ；Ｓｃｈｒｅｕｄｅｒ　Ｇ．Ｍ．Ｔｈ．ら　Ｔｈｅ　ＨＬＡ　ｄｉｃｔｉｏｎａｒｙ（１９９９年）Ｔｉｓｓｕｅ　Ａｎｔｉｇｅｎｓ　５４巻：４０９～４３７頁を参照されたい。

【０１４９】

「抗原提示マトリックス」という用語は、本明細書で使用される場合、抗原にＴ細胞の表面上のＴ細胞抗原受容体が結合することができるように、抗原を提示することができる

１つの分子または複数の分子を意味する。抗原提示マトリックスは、抗原提示細胞（ＡＰＣ）の表面上、ＡＰＣの小胞調製物上にあってよい、または、固体支持体、例えば、ビーズまたはプレートなどの上の合成のマトリックスの形態であってよい。合成の抗原提示マトリックスの例は、Ｐ２－ミクログロブリンと複合体を形成した精製されたＭＨＣクラスＩ分子、そのような精製されたＭＨＣクラスＩ分子の多量体、精製されたＭＨＣクラスＩＩ分子、または固体支持体に付着した機能的なその部分である。

【０１５０】

「抗原提示細胞（ＡＰＣ）」という用語は、１種または複数種の抗原を、免疫系の特異的なエフェクター細胞が認識することができる抗原－ＭＨＣ複合体の形態で提示し、それにより、抗原または提示されている抗原に対する有効な細胞性免疫応答を誘導することができる細胞のクラスを指す。多くの種類の細胞が、Ｔ細胞の認識のためにそれらの細胞表面上に抗原を提示することができ得るが、プロフェッショナルＡＰＣのみが、効率的な量で抗原を提示し、さらにＴ細胞を細胞傷害性Ｔリンパ球（ＣＴＬ）応答のために活性化する能力を有する。ＡＰＣは、インタクトな全細胞、例えば、マクロファージ、Ｂ細胞および樹状細胞など；または、天然に存在する、もしくは合成の他の分子、例えば、β２－ミクログロブリンと複合体を形成した精製されたＭＨＣクラスＩ分子などであってよい。

【０１５１】

「樹状細胞（ＤＣ）」という用語は、種々のリンパ系組織および非リンパ系組織に見いだされる形態学的に類似した細胞型の多様な集団を指す（Ｓｔｅｉｎｍａｎ（１９９１年）Ａｎｎ．　Ｒｅｖ．　Ｉｍｍｕｎｏｌ．　９巻：２７１～２９６頁）。樹状細胞は、最も強力であり、好ましい哺乳動物のＡＰＣを構成する。ＤＣのサブセットは、全てではないが、骨髄前駆細胞に由来し、末梢血中を少数で循環し、未成熟のランゲルハンスの細胞または最終分化した成熟細胞のいずれかとして現れる。ＤＣは、単球に由来し得るが、これらは別個の表現型を保有する。例えば、特定の分化マーカーであるＣＤ１４抗原は樹状細胞においては見いだされないが、単球ごとに非常に高いレベルで発現される。例えば、Ｊｅｒｓｍａｎｎら、（２００５年）Ｉｍｍｕｎｏｌ．　Ｃｅｌｌ　Ｂｉｏｌ．　８３巻：４６２頁を参照されたい。

【０１５２】

また、成熟樹状細胞は食細胞ではないが、単球は、強力に食菌する細胞である。成熟単球および成熟ＤＣは、材料を異なる機構によってエンドサイトーシスで取り込む。単球は食作用によって貪食するが、ＤＣはマクロピノサイトーシスを利用する。したがって、ＤＣは、一般に、単球より小さなサイズのカーゴを貪食する（例えば、ＣｏｎｎｅｒおよびＳｃｈｍｉｄ、（２００３年）Ｎａｔｕｒｅ　４３３巻：３７～４４頁を参照されたい。ＤＣは、他の抗原提示細胞と同様にエンドサトーシス的に活性であり、Ｔ細胞の活性化および増殖に必要なシグナルの全てをもたらすことが示されている（例えば、ＬｅｖｉｎｅおよびＣｈａｉｎ、（１９９２年）ＯＮＡＳ　８９巻（１７号）：８３４２頁を参照されたい。

【０１５３】

「抗原提示細胞動員因子」または「ＡＰＣ動員因子」という用語は、インタクトな全細胞ならびに抗原提示細胞を動員することができる他の分子のどちらも包含する。適切なＡＰＣ動員因子の例としては、インターロイキン４（ＩＬ４）、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（ＧＭ－ＣＳＦ）、Ｓｅｐｒａｇｅｌおよびマクロファージ炎症性タンパク質３アルファ（ＭＩＰ３α）などの分子が挙げられる。これらは、Ｉｍｍｕｎｅｘ、Ｓｃｈｅｒｉｎｇ－ＰｌｏｕｇｈおよびＲ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ（Ｍｉｎｎｅａｐｏｌｉｓ、Ｍｉｎｎ．）から入手可能である。これらは、Ｃｕｒｒｅｎｔ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ　Ｉｎ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ（Ｆ．Ｍ．　Ａｕｓｕｂｅｌら編（１９８７年））に開示されている方法を用いて、組換えによって作製することもできる。上記の因子と同じ生物活性を有するペプチド、タンパク質および化合物は、本発明の範囲内に含まれる。

【０１５４】

「免疫エフェクター細胞」という用語は、抗原に結合することができ、免疫応答を媒介する細胞を指す。それらの細胞としては、これらに限定されないが、Ｔ細胞、Ｂ細胞、単球、マクロファージ、ＮＫ細胞および細胞傷害性Ｔリンパ球（ＣＴＬ）、例えば、ＣＴＬ系、ＣＴＬクローン、および腫瘍、炎症、または他の浸潤物由来のＣＴＬが挙げられる。特定の疾患組織は特異的な抗原を発現し、これらの抗原に特異的なＣＴＬが同定されている。

【０１５５】

「免疫エフェクター分子」という用語は、本明細書で使用される場合、抗原特異的に結合することができる分子を指し、それらとしては、抗体、Ｔ細胞抗原受容体、Ｂ細胞抗原受容体、およびＭＨＣクラスＩ分子およびＭＨＣクラスＩＩ分子が挙げられる。

【０１５６】

「ナイーブな」免疫エフェクター細胞は、その細胞を活性化することができる抗原に曝露されたことがない免疫エフェクター細胞である。ナイーブな免疫エフェクターＴ細胞を活性化するには、抗原：ＭＨＣ複合体の認識と、増殖させ、抗原特異的な武装化エフェクターＴ細胞に分化させるために同時に起こるプロフェッショナルＡＰＣによる共刺激のシグナルの送達の両方が必要である。次いで、活性化されたＴ細胞は、同時刺激シグナルをもたらすことによって免疫学的シナプスを通じて特異的なＢ細胞を活性化し得る。その後、活性化されたＢ細胞は特異的な抗原を対象とする抗体を産生する。ナイーブなＢ細胞は、Ｔ細胞に依存しない機構によって活性化することもできる。これは、抗原が、Ｂ細胞受容体に結合し、同時刺激シグナルを生じることができる場合に起こる。

【０１５７】

「免疫応答」とは、広範には、外来物質に対するリンパ球の抗原特異的な応答を指す。「免疫原」および「免疫原性」という用語は、免疫応答を引き出す能力を持つ分子を指す。免疫原は全て抗原であるが、全ての抗原が免疫原性なのではない。本発明の免疫応答は体液性（抗体活性による）または細胞媒介性（Ｔ細胞の活性化による）であってよい。応答は、ｉｎ　ｖｉｖｏまたはｉｎ　ｖｉｔｒｏで起こり得る。当業者は、タンパク質、核酸、脂肪酸、脂質、リポ多糖および多糖を含めた種々の巨大分子が免疫原性である潜在性を有することを理解されよう。当業者は、さらに、免疫応答を引き出すことができる分子をコードする核酸は必ず免疫原をコードすることを理解されよう。当業者は、さらに、免疫原は、全長の分子に限定されず、部分的な分子を含んでよいことを理解されよう。

【０１５８】

「受動免疫」という用語は、ある対象から別の対象への、抗体の伝達を通じた免疫の伝達を指す。受動免疫は、母親の抗体が胎児に伝達される場合など、天然に起こり得る。受動免疫は、抗体組成物を非免疫の対象に投与する場合など、人工的にも起こり得る。抗体のドナーおよびレシピエントはヒト対象または非ヒト対象であってよい。抗体はポリクローナルまたはモノクローナルであってよく、ｉｎ　ｖｉｔｒｏまたはｉｎ　ｖｉｖｏで生成することができ、また、実施形態に応じて、精製されていてよい、部分的に精製されていてよい、または精製されていなくてよい。本明細書に記載のいくつかの実施形態では、受動免疫は、それを必要とする対象に、特定の抗原を特異的に認識する、またはそれに結合する抗体または抗原結合性断片を投与することによって付与される。いくつかの実施形態では、受動免疫は、特定の抗原を特異的に認識する、またはそれに特異的に結合する抗体または抗原結合性断片をコードする、単離されたかまたは組換え型のポリヌクレオチドを投与することによって付与される。

【０１５９】

本発明に関しては、「リガンド」はポリペプチドである。一態様では、本明細書で使用される「リガンド」という用語は、別の分子上の特定の部位に結合する任意の分子を指す。言い換えれば、リガンドは、免疫エフェクター細胞またはタンパク質に対する抗体またはタンパク質に対するＤＮＡとの応答においてタンパク質の特異性を付与する。一態様では、タンパク質内のリガンド部位が、免疫エフェクター細胞上の相補的な結合部位と直接組み合わさる。

【０１６０】
一態様では、本発明のペプチドまたはリガンドは、免疫エフェクター細胞、例えば、抗体またはＴ細胞受容体（ＴＣＲ）上の抗原性決定因子またはエピトープなどに結合する。リガンドは、本発明の抗原、ペプチド、タンパク質またはエピトープであってよい。
【０１６１】
別の態様では、リガンドは、抗体上の受容体に結合し得る。一実施形態では、本発明のリガンドは長さが約４アミノ酸～約８アミノ酸である。
【０１６２】
別の態様では、リガンドは、ＭＨＣクラスＩ分子上の受容体に結合し得る。一実施形態では、本発明のリガンドは、長さが約７アミノ酸～約１１アミノ酸である。
【０１６３】
さらなる態様では、リガンドは、ＭＨＣクラスＩＩ分子上の受容体に結合し得る。一実施形態では、本発明のリガンドは、約１０アミノ酸～約２０アミノ酸の長さである。
【０１６４】
本明細書で使用される場合、「教育された抗原特異的な免疫エフェクター細胞」という用語は、以前抗原に遭遇した、上で定義された免疫エフェクター細胞である。そのナイーブな対応物と対照的に、教育された抗原特異的な免疫エフェクター細胞の活性化には、共刺激のシグナルが必要ではない。ペプチド：ＭＨＣ複合体が認識されることで十分である。
【０１６５】
「活性化された」とは、Ｔ細胞に関して使用される場合、細胞がもはやG_0相でなく、細胞毒、サイトカイン、および他の関連する、細胞型（例えば、$CD8^+$または$CD4^+$）の特性である膜関連タンパク質のうちの１つまたは複数を産生し始めており、その表面上に特定の抗原を表出している任意の標的細胞を認識し、それに結合し、そのエフェクター分子を放出することができる。
【０１６６】
「交差反応性」という用語は、機能的にオーバーラップしている本発明の化合物を説明するために使用される。より詳細には、ネイティブなリガンドおよび／またはそれにより活性化される免疫エフェクター細胞の免疫原性は、変化したリガンドによって特定の程度まで共有され、したがって、変化したリガンドは、ネイティブなリガンドおよび／またはそれによって活性化される免疫エフェクター細胞と「交差反応性」である。本発明の目的上、交差反応性は多数のレベルで顕在化する：（ｉ）リガンドレベルで、例えば、変化したリガンドをＴＣＲに結合させること、およびネイティブなリガンドＣＴＬを活性化することができる；（ｉｉ）Ｔ細胞レベルで、すなわち、変化した本発明のリガンドは、ＴＣＲに結合し、ネイティブなリガンドを表出している細胞を有効に標的とし、溶解することができるＴ細胞の集団（ネイティブなリガンドＣＴＬ集団とは別個の集団）を活性化する；および（ｉｉｉ）抗体レベルで、例えば、「抗」－変化したリガンド抗体は、ネイティブなリガンドを検出し、認識し、それに結合し、免疫応答におけるエフェクター機構を開始することができ、最終的にネイティブなリガンドを宿主から排除する。
【０１６７】
本明細書で使用される場合、「対象において免疫応答を誘導すること」という用語は、当技術分野ではよく理解されている用語であり、対象に抗原（またはエピトープ）を導入した後、対象に抗原（またはエピトープ）を導入する前の免疫応答（もしあれば）と比較して、少なくとも約２倍、より好ましくは少なくとも約５倍、より好ましくは少なくとも約１０倍、より好ましくは少なくとも約１００倍、さらに好ましくは少なくとも約５００倍、さらに好ましくは少なくとも約１０００倍またはそれ以上の抗原（またはエピトープ）に対する免疫応答の増加を検出または測定することができることを意味する。抗原（またはエピトープ）に対する免疫応答としては、これらに限定されないが、抗原特異的な（またはエピトープ特異的な）抗体の産生、およびその表面上に抗原（またはエピトープ）に特異的に結合する分子を発現している免疫細胞の産生が挙げられる。所与の抗原（また

はエピトープ）に対する免疫応答が誘導されたかどうかを決定する方法は当技術分野で周知である。例えば、抗原特異的な抗体は、これに限定されないが、ＥＬＩＳＡを含めた、当技術分野で公知の種々の免疫測定法のうちの任意のものを用いて検出することができ、例えば、試料中の抗体の、固定した抗原（またはエピトープ）への結合を、検出可能に標識した第２の抗体（例えば、酵素標識したマウス抗ヒトＩｇ抗体）を用いて検出する。

【０１６８】

「同時刺激分子」は、抗原提示細胞の表面上に発現される受容体－リガンド対とＴ細胞の相互作用に関与する。過去数年にわたって蓄積された研究により、静止しているＴ細胞は、サイトカインの遺伝子発現および増殖を誘導するために少なくとも２つのシグナルを必要とすることが、説得力を伴って実証された（Ｓｃｈｗａｒｔｚ（１９９０年）Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４８巻：１３４９～１３５６頁およびＪｅｎｋｉｎｓ（１９９２年）Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｔｏｄａｙ １３巻：６９～７３頁）。１つのシグナルは特異性を付与するシグナルであり、ＴＣＲ／ＣＤ３複合体と適切なＭＨＣ／ペプチド複合体の相互作用によって生じ得る。第２のシグナルは抗原特異的ではなく、「同時刺激」シグナルと称される。このシグナルは、最初に、骨髄由来のアクセサリー細胞、例えば、マクロファージおよび樹状細胞など、いわゆる「プロフェッショナル」ＡＰＣによってもたらされる活性であると定義された。いくつかの分子が同時刺激の活性を増強することが示されている。これらは、熱安定性抗原（ＨＳＡ）（Ｌｉｕら（１９９２年）Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．１７５巻：４３７～４４５頁）、コンドロイチン硫酸修飾ＭＨＣインバリアント鎖（Ｉｉ－ＣＳ）（Ｎａｕｊｏｋａｓら（１９９３年）Ｃｅｌｌ ７４巻：２５７～２６８頁）、細胞内接着分子１（ＩＣＡＭ－１）（Ｖａｎ（１９９２年）Ｃｅｌｌ ７１巻：１０６５～１０６８頁）である。これらの分子はそれぞれ、Ｔ細胞上のそれらの同族のリガンドと相互作用することによって同時刺激を補助すると思われる。同時刺激分子は、必要な同時刺激のシグナル（複数可）を、通常の生理的条件下で媒介して、ナイーブなＴ細胞の完全な活性化を実現する。１つの例示的な受容体－リガンド対は、ＡＰＣの表面上のＢ７同時刺激分子と、Ｔ細胞上のその対抗受容体ＣＤ２８またはＣＴＬＡ－４である（Ｆｒｅｅｍａｎら（１９９３年）Ｓｃｉｅｎｃｅ ２６２巻：９０９～９１１頁；Ｙｏｕｎｇら（１９９２年）Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔ．９０巻：２２９頁およびＮａｂａｖｉら（１９９２年）Ｎａｔｕｒｅ ３６０巻：２６６～２６８頁）。他の重要な同時刺激分子は、ＣＤ４０、ＣＤ５４、ＣＤ８０、およびＣＤ８６である。「同時刺激分子」という用語は、Ｔ細胞の表面上のＴＣＲによって結合したペプチド／ＭＨＣ複合体と一緒に作用すると、ペプチドに結合するＴ細胞の活性化を実現する同時刺激効果をもたらす任意の単一分子または分子の組合せを包含する。したがって、この用語は、Ｂ７、またはＡＰＣなどの抗原提示マトリックス上の他の同時刺激分子（複数可）、その断片（単独で、別の分子（複数可）と複合体を形成して、または融合タンパク質の一部として）を包含し、それは、ペプチド／ＭＨＣ複合体と一緒に、同族のリガンドに結合し、Ｔ細胞の表面上のＴＣＲがペプチドに特異的に結合すると、Ｔ細胞の活性化をもたらす。同時刺激分子は、例えば、Ｂｅｃｋｍａｎ Ｃｏｕｌｔｅｒ，Ｉｎｃ．（Ｆｕｌｌｅｒｔｏｎ、Ｃａｌｉｆ．）を含めた種々の供給源から市販されている。必ずしも明記されていないが、野生型または精製した同時刺激分子（例えば、組換えによって作製されるまたはその変異タンパク質）と類似した生物活性を有する分子は、本発明の主旨および範囲内で使用されることが意図されているものとする。

【０１６９】

本明細書で使用される場合、「固相支持体」または「固体支持体」は互換的に使用され、特定の種類の支持体に限定されない。それどころか、多数の支持体が利用可能であり、当業者に公知である。固相支持体としては、シリカゲル、樹脂、誘導体化プラスチックフィルム、ガラスビーズ、綿、プラスチックビーズ、アルミナゲルが挙げられる。本明細書で使用される場合、「固体支持体」は、合成の抗原提示マトリックス、細胞、およびリポソームも包含する。適切な固相支持体は、所望の最終用途および種々のプロトコールに対する適合性に基づいて選択することができる。例えば、ペプチド合成に関しては、固相支

持体とは、樹脂、例えば、ポリスチレン（例えば、Ｂａｃｈｅｍ　Ｉｎｃ．，Ｐｅｎｉｎｓｕｌａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓなどから得られるＰＡＭ－樹脂）、ＰＯＬＹＨＩＰＥ．ＲＴＭ樹脂（Ａｍｉｎｏｔｅｃｈ、Ｃａｎａｄａから得られる）、ポリアミド樹脂（Ｐｅｎｉｎｓｕｌａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓから得られる）、ポリエチレングリコールをグラフトしたポリスチレン樹脂（ＴｅｎｔａＧｅｌ．ＲＴＭ、Ｒａｐｐ　Ｐｏｌｙｍｅｒｅ、Ｔｕｂｉｎｇｅｎ、Ｇｅｒｍａｎｙ）またはポリジメチルアクリルアミド樹脂（Ｍｉｌｌｉｇｅｎ／Ｂｉｏｓｅａｒｃｈ、Ｃａｌｉｆ．から得られる）などを指し得る。

【０１７０】

固相支持体の例としては、ガラス、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリエチレン、デキストラン、ナイロン、アミラーゼ、天然セルロース、修飾されたセルロース、ポリアクリルアミド、斑糲岩、および磁鉄鉱が挙げられる。キャリアの本質は、いくらかの程度まで可溶性であってよい、または不溶性であってよい。支持材料は、カップリングされた分子が、ポリヌクレオチド、ポリペプチドまたは抗体に結合することができる限りは、実質的にいかなる可能性のある構造的な立体配置を有してもよい。したがって、支持体の立体配置は、ビーズのように球状であってよい、または、試験管の内側表面、またはロッド外面のように円柱状であってよい。あるいは、表面は、例えばシート、試験紙など平らであってよい、あるいはポリスチレンビーズであってよい。当業者は、抗体または抗原に結合する多くの他の適切なキャリアを知っている、または常套的な実験を使用することによってそれらを確認することができるであろう。

【０１７１】

「免疫調節剤」という用語は、本明細書で使用される場合、免疫応答を調節する分子、高分子複合体、または細胞であり、単独、または任意の本明細書に記載の種々の処方物中の本発明の合成の抗原性ペプチド；本発明の合成の抗原性ペプチドを含むポリペプチド；本発明のペプチドまたはポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；ＡＰＣおよび合成の抗原提示マトリックスを含めた、抗原提示マトリックス上のクラスＩ　ＭＨＣ分子またはクラスＩＩ　ＭＨＣ分子に結合した本発明の合成の抗原性ペプチド（同時刺激分子（複数可）の存在下または非存在下で）；別の分子（複数可）または高分子構造と共有結合的に、または非共有結合的に複合体を形成した本発明の合成の抗原性ペプチド；および本発明のペプチドに対して特異的な、教育された抗原特異的な免疫エフェクター細胞を包含する。

【０１７２】

「免疫応答を調節する」という用語は、免疫応答を誘導すること（増大させること、引き出すこと）；および免疫応答を低減すること（抑制すること）を包含する。免疫調節方法（またはプロトコール）は、対象において免疫応答を調節するものである。

【０１７３】

本明細書で使用される場合、「サイトカイン」という用語は、細胞に対する種々の効果を発揮する、例えば、成長または増殖を誘導する多数の因子のうちの任意の１つを指す。本発明の実施において単独でまたは組み合わせて使用することができるサイトカインの非限定的な例としては、インターロイキン２（ＩＬ－２）、幹細胞因子（ＳＣＦ）、インターロイキン３（ＩＬ－３）、インターロイキン６（ＩＬ－６）、インターロイキン１２（ＩＬ－１２）、Ｇ－ＣＳＦ、顆粒球マクロファージ－コロニー刺激因子（ＧＭ－ＣＳＦ）、インターロイキン－１アルファ（ＩＬ－１α）、インターロイキン－１１（ＩＬ－１１）、ＭＩＰ－１１、白血病抑制因子（ＬＩＦ）、ｃ－キットリガンド、トロンボポエチン（ＴＰＯ）およびｆｌｔ３リガンドが挙げられる。本発明は、１種または複数種のサイトカインが培地から特異的に排除される培養条件も包含する。サイトカインは、いくつかのベンダー、例えば、Ｇｅｎｚｙｍｅ（Ｆｒａｍｉｎｇｈａｍ、Ｍａｓｓ．）、Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈ（Ｓｏｕｔｈ　Ｓａｎ　Ｆｒａｎｃｉｓｃｏ、Ｃａｌｉｆ．）、Ａｍｇｅｎ（Ｔｈｏｕｓａｎｄ　Ｏａｋｓ、Ｃａｌｉｆ．）、Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ（Ｍｉｎｎｅａｐｏｌｉｓ、Ｍｉｎｎ．）およびＩｍｍｕｎｅｘ（Ｓｅａｔｔｌｅ、Ｗａｓｈ．）などから市販されている。必ずしも明記されていないが、野生型または精製されたサイトカイン（

例えば、組換えによって作製されるまたはその変異タンパク質）と類似した生物活性を有する分子は、本発明の主旨および範囲内で使用されることが意図されているものとする。

【０１７４】

診断方法および処置方法

ＤＮＡＢＩＩポリペプチドもしくはＤＮＡＢＩＩタンパク質または微生物ＤＮＡを干渉作用剤と接触させ、それにより、ＤＮＡＢＩＩタンパク質またはＤＮＡＢＩＩポリペプチドの微生物ＤＮＡへの結合を阻害する、それと競合する、またはその力価を決定することによって、ＤＮＡＢＩＩポリペプチドまたはＤＮＡＢＩＩタンパク質の微生物ＤＮＡへの結合を阻害する、それと競合する、またはその力価を決定するための方法が提供される。別の態様では、ＤＮＡＢＩＩポリペプチドおよび微生物ＤＮＡを、例えば、互いに密接に接触させるとシグナルを放出する発光分子を用いて検出可能に標識する。接触は、ｉｎ　ｖｉｔｒｏまたはｉｎ　ｖｉｖｏで実施することができる。

【０１７５】

別の態様では、バイオフィルムを干渉作用剤と接触させ、それにより、微生物バイオフィルムを阻害、予防または破壊することによって微生物バイオフィルムを阻害、予防または破壊するための方法が提供される。別の態様では、ＤＮＡＢＩＩポリペプチドおよび微生物ＤＮＡを、例えば、互いに密接に接触させるとシグナルを放出する発光分子を用いて検出可能に標識する。接触は、ｉｎ　ｖｉｔｒｏまたはｉｎ　ｖｉｖｏで実施することができる。

【０１７６】

ｉｎ　ｖｉｔｒｏで実施する場合、方法は、本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチド、抗体、宿主細胞、小分子および組成物と同じ、類似したまたは逆の力を有する干渉作用剤をスクリーニングまたは確認するために有用である。あるいは、方法を使用して、微生物感染症を処置するためにはどの干渉作用剤が最適であるかを同定することができる。例えば、新しい作用剤または併用療法を、例えば、２つの試料にＤＮＡＢＩＩポリペプチドおよび微生物ＤＮＡおよび試験される作用剤を含有させることによってスクリーニングすることができる。第２の試料は、ＤＮＡＢＩＩポリペプチドおよび微生物ＤＮＡおよび活性であることが公知の作用剤、例えば、抗ＩＨＦ抗体または陽性対照としての機能を果たす小分子を含有する。別の態様では、いくつかの試料を準備し、干渉作用剤を、希釈度を増しながら系に加えて、臨床の場で対象を処置することにおいて有効だと思われる最適な用量を決定する。当業者には明らかであるように、ＤＮＡＢＩＩポリペプチドおよび微生物ＤＮＡを含有する陰性対照を準備することができる。別の態様では、ＤＮＡＢＩＩポリペプチドおよび微生物ＤＮＡを、例えば、互いに密接に接触させるとシグナルを放出する発光分子を用いて検出可能に標識する。試料を、作用剤がＤＮＡＢＩＩポリペプチドと微生物ＤＮＡの間の相互作用を阻害する、それと競合するまたはその力価を決定するために有効な時間、同様の条件下で含有し、次いで試料を、発光分子からのシグナルの放出についてアッセイする。試料からシグナルが放出されれば、その作用剤は結合を阻害するために有効ではない。

【０１７７】

別の態様では、ヒト／動物から、感染症を引き起こしている微生物の（例えば細菌などの）単離株を単離し、次いで、それを培養してｉｎ　ｖｉｔｒｏでバイオフィルムとして成長させることができる小型化チャンバースライド系においてｉｎ　ｖｉｔｒｏにおける方法を実施する。例えば、下記の実験番号１を参照されたい。干渉作用剤（例えば、抗ＩＨＦ抗体など）または潜在的な干渉作用剤バイオフィルムを、単独で、または別の作用剤と組み合わせて、潜在的な干渉作用剤または干渉作用剤、例えば、抗ＩＨＦなど（または他の抗体、小分子、作用剤など）の希釈度を増しながら、または増さずに培養物に加えて、対象の感染症が存在する箇所に送達した場合に、その患者を処置することにおいて有効であると思われる最適用量を見いだす。当業者には明らかであるように、陽性対照および陰性対照を同時に実施することができる。

【０１７８】

別の態様では、フローセル中の干渉作用剤（例えば、抗ＩＨＦ抗体など）および／または潜在的な干渉作用剤（単独で、または別の作用剤と組み合わせて）を用いて、ハイスループットなプラットフォームにおいて方法を実施する。干渉作用剤（例えば、抗ＩＨＦ抗体など）または潜在的な干渉作用剤バイオフィルムを、単独で、または別の作用剤と組み合わせて、潜在的な干渉作用剤または干渉作用剤、例えば、抗ＩＨＦなど（または他の抗体、小分子、作用剤など）の希釈度を増しながら、または増さずに培養物に加えて、対象の感染症が存在する箇所に送達した場合に、その患者を処置することにおいて有効であると思われる最適用量を見いだす。バイオフィルム単離体を超音波処理して、微生物ＤＮＡに結合したＩＨＦなどのＤＮＡＢＩＩポリペプチドからバイオフィルム細菌を分離する。ＤＮＡＢＩＩポリペプチド－ＤＮＡ複合体をプラットフォーム上の抗ＩＨＦ抗体によって単離する。次いで、付加したバイオフィルム細菌を同定するために使用するために、微生物ＤＮＡを、例えば、塩洗浄を用いて放出させる。次いで、遊離したＤＮＡを、例えば、ＰＣＲによる配列決定によって同定する。ＤＮＡが遊離されなければ、干渉作用剤（複数可）は、首尾よく機能したまたは微生物ＤＮＡに結合した。ＤＮＡが試料に見いだされれば、作用剤はＤＮＡＢＩＩポリペプチド－微生物ＤＮＡの結合に干渉しなかった。当業者には明らかであるように、陽性対照および／または陰性対照を同時に実施することができる。

【０１７９】

上記の方法は、所与の細菌種が、ある作用剤よりも別の作用剤によるそのバイオフィルムの逆転によく応答する可能性があるので、診断検査としても用いることができ、この急速なハイスループットなアッセイシステムにより、当業者が可能性のある抗ＩＨＦ様作用剤のパネルをアッセイして最も効果的な群を同定することが可能になる。

【０１８０】

これらの方法の利点は、大部分の病院内の臨床的な微生物学研究所にはすでに、液体培地中で（または浮遊状態で（ｐｌａｎｋｔｏｎｉｃａｌｌｙ））成長している細菌を用いてこれらの種類のアッセイ（すなわち、ＭＩＣ値、ＭＢＣ値の決定）を実施する設備が整っていることである。当業者には明らかであるように、細菌は、一般に、疾患を引き起こすときには浮遊状態では成長しない。その代わりに、細菌は、安定なバイオフィルムとして成長し、これらのバイオフィルムは抗生物質、抗体または他の処置法による処置に対して著しくより耐性である。この耐性が、大部分のＭＩＣ／ＭＢＣ値によりｉｎ　ｖｉｖｏにおける効力を正確に予測することができない理由である。したがって、作用剤のどの「用量」がｉｎ　ｖｉｔｒｏで細菌バイオフィルムを逆転させることができるかを決定することにより（上記の通り）、出願人らの前臨床的なアッセイは、個人向けの医学の適用としてさえも、臨床的な効力のより信頼できる予測になる。

【０１８１】

臨床の場に加えて、この方法は、感染症を引き起こす微生物を同定し、かつ／または工業の場において有効な干渉作用剤を確認するために使用することができる。

【０１８２】

上記の方法の別の態様では、感染症が阻害される可能性があるかどうかを決定するために、基礎をなす感染症の成長を阻害することが公知である抗生物質または抗菌薬を逐次的にまたは同時に加える。バイオフィルムの阻害をアッセイするために、欠けている複合体を加える前に干渉作用剤を微生物ＤＮＡまたはＤＮＡＢＩＩポリペプチドに加えることも可能である。

【０１８３】

非ヒト動物、例えば、チンチラなどにおいてｉｎ　ｖｉｖｏで実施する場合、方法は、単独で、または他の作用剤と組み合わせてバイオフィルムを分解するために使用することができる干渉作用剤を同定するための前臨床的なスクリーニングを提供する。この方法の例が下記の実験番号２～７に示されている。

【０１８４】

別の態様では、本明細書では、対象に、有効量の干渉作用剤を投与し、それにより、微

生物バイオフィルムを阻害、予防または破壊することによって対象におけるバイオフィルムを阻害、予防または破壊する方法が提供される。この方法の例が下記の実験番号２～７示されている。

【０１８５】

上記のｉｎ　ｖｉｔｒｏにおける方法およびｉｎ　ｖｉｖｏにおける方法の目的上、干渉作用剤は、

（ａ）単離されたかまたは組換え型の組込み宿主因子（ＩＨＦ）ポリペプチド、またはそのそれぞれの断片もしくは等価物、

（ｂ）Ｅ．ｃｏｌｉのＵ９３株由来の単離されたかまたは組換え型のヒストン様タンパク質（ＨＵ）ポリペプチド、またはそのそれぞれの断片もしくは等価物、

（ｃ）表８、表９Ａ、表９Ｂ、表１０において同定される単離されたかまたは組換え型のタンパク質ポリペプチド、または図６において同定されるＤＮＡ結合性ペプチド、またはそのそれぞれの断片もしくは等価物、

（ｄ）配列番号１～３４０の単離されたかまたは組換え型のポリペプチド、またはそのそれぞれの断片もしくは等価物、

（ｅ）配列番号６～１１、２８、２９、４２～１００、表８の単離されたかまたは組換え型のＣ末端のポリペプチド、または表１０において同定されるＣ末端のポリペプチド、またはそのそれぞれの断片もしくは等価物、

（ｆ）微生物ＤＮＡへの結合について組込み宿主因子と競合するポリペプチド、

（ｇ）ホリデイジャンクションと似ている４方向ジャンクションポリヌクレオチド、複製フォークと似ている３方向ジャンクションポリヌクレオチド、固有の柔軟性を有するポリヌクレオチドまたは屈曲したポリヌクレオチド、

（ｈ）（ａ）～（ｆ）のうちの任意の１つをコードする、単離されたかまたは組換え型のポリヌクレオチド、または配列番号３６の単離されたかまたは組換え型のポリヌクレオチド、またはそのそれぞれの等価物、またはストリンジェントな条件下でポリヌクレオチドまたはその等価物もしくはその相補物とハイブリダイズするポリヌクレオチド、

（ｉ）（ａ）～（ｆ）のうちの任意の１つを特異的に認識する、またはそれに特異的に結合する抗体もしくは抗原結合性断片、または各抗体もしくはその抗原結合性断片の等価物もしくは断片、

（ｊ）（ｉ）の抗体もしくは抗原結合性断片またはその相補物をコードする、単離されたかまたは組換え型のポリヌクレオチド、または

（ｋ）ＤＮＡＢＩＩタンパク質またはＤＮＡＢＩＩポリペプチドの微生物ＤＮＡへの結合と競合する小分子

からなる群のものである。

【０１８６】

本明細書では、それを必要とする対象において免疫応答を誘導するため、またはそれを必要とする対象に受動免疫を付与するための方法であって、対象に、

（ａ）単離されたかまたは組換え型の組込み宿主因子（ＩＨＦ）ポリペプチド、またはそのそれぞれの断片もしくは等価物、

（ｂ）Ｅ．ｃｏｌｉのＵ９３株由来の単離されたかまたは組換え型のヒストン様タンパク質（ＨＵ）ポリペプチド、またはそのそれぞれの断片もしくは等価物、

（ｃ）表８、表９Ａ、表９Ｂ、表１０において同定される単離されたかまたは組換え型のタンパク質ポリペプチド、または図６において同定されるＤＮＡ結合性ペプチド、またはそのそれぞれの断片もしくは等価物、

（ｄ）配列番号１～３４０の単離されたかまたは組換え型のポリペプチド、またはその断片もしくは等価物、

（ｅ）配列番号６～１１、２８、２９、４２～１００、表８の単離されたかまたは組換え型のＣ末端のポリペプチド、または表１０において同定されるＣ末端のポリペプチド、またはそのそれぞれの断片もしくは等価物、

（ｆ）（ａ）～（ｅ）のうちの任意の１つをコードする、単離されたかまたは組換え型

のポリヌクレオチド、または配列番号３６の単離されたかまたは組換え型のポリヌクレオチド、またはそのそれぞれの等価物、またはストリンジェントな条件下でポリヌクレオチド、その等価物もしくはその相補物とハイブリダイズするポリヌクレオチド、
（ｇ）（ａ）～（ｅ）のうちの任意の１つを特異的に認識する、またはそれに特異的に結合する抗体もしくは抗原結合性断片、またはそのそれぞれの等価物もしくは断片、
（ｈ）（ｇ）の抗体もしくは抗原結合性断片をコードする、単離されたかまたは組換え型のポリヌクレオチド、
（ｉ）（ａ）～（ｅ）のうちの任意の１つでパルスした抗原提示細胞、および
（ｊ）（ａ）～（ｅ）のうちの任意の１つをコードする１種または複数種のポリヌクレオチドでトランスフェクトされた抗原提示細胞
の群のうちの１つまたは複数を有効量で投与することを含む、あるいはそれから本質的になる、またはさらにそれからなる方法も提供される。

【０１８７】

特定の一態様では、干渉作用剤は、単離されたかまたは組換え型の組込み宿主因子（ＩＨＦ）ポリペプチドまたはその断片、ＩＨＦポリペプチドのＣ末端断片またはそのそれぞれの等価物である。別の特定の態様では、干渉作用剤は、単離されたかまたは組換え型のＨＵポリペプチドまたはその断片、ＨＵポリペプチドのＣ末端断片、またはそのそれぞれの等価物である。その非限定的な例は、ＩＨＦまたはＨＵのアルファポリペプチドまたはベータポリペプチド；ＩＨＦポリペプチド；Ｍｏｒａｘｅｌｌａ ａｃａｔａｒｒｈａｌｉｓ ＨＵ；Ｅ．ｃｏｌｉ ＨｕｐＡ、ＨｕｐＢ、ｈｉｍＡ、ｈｉｍＤ；Ｅ．ｆａｅｃａｌｉｓ ＨＵ（例えば、Ｖ５８３など）、ＨＭＧＢ１（高移動性群ボックス１（ｈｉｇｈ ｍｏｂｉｌｉｔｙ ｇｒｏｕｐ ｂｏｘ１）、タンパク質のＤＮＡＢＩＩファミリーとＤＮＡ結合性およびＤＮＡ基質特異性は類似しているが、一次アミノ酸配列は類似していないタンパク質；機能的なオルソログおよび表８または表１０において同定されるものである。

【０１８８】

別の態様では、方法は、対象に抗菌薬、抗原性ペプチドまたはアジュバントのうちの１つまたは複数を有効量で投与することをさらに含む、あるいはそれから基本的になる、またはさらにそれからなる。

【０１８９】

抗菌剤の非限定的な例は、別のワクチン構成成分、例えば、表面抗原、例えば、ＯＭＰ Ｐ５、ｒｓＰｉｌＡ、ＯＭＰ ２６、ＯＭＰ Ｐ２、またはＩＶ型Ｐｉｌｉｎタンパク質などである（ＪｕｒｃｉｓｅｋおよびＢａｋａｌｅｔｚ（２００７年）Ｊ．ｏｆ Ｂａｃｔｅｒｉｏｌｏｇｙ １８９巻（１０号）：３８６８～３８７５頁およびＭｕｒｐｈｙ，ＴＦ、Ｂａｋａｌｅｔｚ，ＬＯおよびＳｍｅｅｓｔｅｒｓ，ＰＲ（２００９年）Ｔｈｅ Ｐｅｄｉａｔｒｉｃ Ｉｎｆｅｃｔｉｏｕｓ Ｄｉｓｅａｓｅ Ｊｏｕｒｎａｌ、２８巻：Ｓ１２１～Ｓ１２６頁）。

【０１９０】

本発明の作用剤および組成物は、他の抗菌剤および／または表面抗原と、同時にまたは逐次的に投与することができる。特定の一態様では、投与は、例えば、直接的な注射または吸入による、感染部位への局部的なものである。投与の他の非限定的な例としては、経真皮的に（ｔｒａｎｓｄｅｒｍａｌｌｙ）、尿道に、舌下に、直腸に、膣に、眼に、皮下に、筋肉内に、腹腔内に、鼻腔内に、吸入によってまたは経口的に投与することを含む１種または複数種の方法によるものが挙げられる。

【０１９１】

本発明の方法によって処置することができる微生物感染症および疾患としては、実験番号１および表８において同定される生物体、例えば、Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ａｇａｌａｃｔｉａｅ、Ｎｅｉｓｓｅｒｉａ ｍｅｎｉｎｇｉｔｉｄｉｓ、Ｔｒｅｐｏｎｅｍｅｓ、ｄｅｎｔｉｃｏｌａ、ｐａｌｌｉｄｕｍ）、Ｂｕｒｋｈｏｌｄｅｒｉａ ｃｅｐａｃｉａ）、またはＢｕｒｋｈｏｌｄｅｒｉａ ｐｓｅｕｄｏｍａｌｌｅｉによる感染症が

挙げられる。一態様では、微生物感染症は、Ｈａｅｍｏｐｈｉｌｕｓ ｉｎｆｌｕｅｎｚａｅ（分類不可能）、Ｍｏｒａｘｅｌｌａ ｃａｔａｒｒｈａｌｉｓ、Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅ、Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｐｙｏｇｅｎｅｓ、Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ、Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｔｕｂｅｒｃｕｌｏｓｉｓによるものうちの１つまたは複数である。これらの微生物感染症は、上気道、中気道および下気道に存在し得る（耳炎、副鼻腔炎、気管支炎、同様に、慢性閉塞性肺疾患（ＣＯＰＤ）の増悪、慢性咳、嚢胞性線維症（ＣＦ）の合併症および／または主因ならびに市中感染性肺炎（ＣＡＰ）。したがって、本発明のｉｎ ｖｉｖｏにおける方法を実施することによって、これらの感染症由来のこれらの疾患および合併症も予防または処置することができる。

【０１９２】

感染症は、口腔においても起こる可能性があり（齲歯、歯周炎）、それはＳｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｍｕｔａｎｓ、Ｐｏｒｐｈｙｒｏｍｏｎａｓ ｇｉｎｇｉｖａｌｉｓ、Ａｇｇｒｅｇａｔｉｂａｃｔｅｒ ａｃｔｉｎｏｍｙｃｅｔｅｍｃｏｍｉｔａｎｓＩによって引き起こされる。感染症は、皮膚に局在する可能性もあり（膿瘍、「ブドウ球菌」感染症、膿痂疹、熱傷の二次感染症、ライム病）、それは、Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ ａｕｒｅｕｓ、Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ ｅｐｉｄｅｒｍｉｄｉｓ、Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ ａｅｒｕｇｉｎｏｓａおよびＢｏｒｒｅｌｉａ ｂｕｒｄｏｒｆｅｒｉによって引き起こされる。尿路（ＵＴＩ）の感染症は、一般には、Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉによって引き起こされ、これも処置することができる。胃腸管（ＧＩ）の感染症（下痢、コレラ、胆石、胃潰瘍）は、一般には、Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ ｅｎｔｅｒｉｃａ ｓｅｒｏｖａｒ、Ｖｉｂｒｉｏ ｃｈｏｌｅｒａｅおよびＨｅｌｉｃｏｂａｃｔｅｒ ｐｙｌｏｒｉによって引き起こされる。生殖管の感染症は、一般には、Ｎｅｉｓｓｅｒｉａ ｇｏｎｏｒｒｈｏｅａｅによって引き起こされる。感染症は、Ｅｎｔｅｒｏｃｏｃｃｕｓ ｆａｅｃａｌｉｓによって引き起こされる膀胱の感染症または留置デバイスの感染症であり得る。植え付けられた人工デバイス、例えば、人工股関節または膝置換など、または歯科インプラント、または医用デバイス、例えば、ポンプ、カテーテル、ステント、またはモニタリングシステムなどに関連する感染症は、一般には、種々の細菌によって引き起こされ、本発明の方法によって処置することができる。これらのデバイスは、本明細書に記載の作用剤でコーティングすること、またはそれとコンジュゲートすることができる。したがって、本発明のｉｎ ｖｉｖｏにおける方法を実施することによって、これらの感染症由来のこれらの疾患および合併症も予防または処置することができる。

【０１９３】

Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ａｇａｌａｃｔｉａｅによって引き起こされる感染症も、本発明の方法によって処置することができ、また、それは新生児における細菌性敗血症の主要な原因である。髄膜炎を引き起こす恐れがある、Ｎｅｉｓｓｅｒｉａ ｍｅｎｉｎｇｉｔｉｄｉｓによって引き起こされる感染症も処置することができる。

【０１９４】

したがって、本発明の方法に適用可能な投与経路としては、鼻腔内、筋肉内、尿道、気管内、皮下、皮内、局所塗布、静脈内、直腸、経鼻、経口的、吸入、および他の経腸および非経口的な投与経路が挙げられる。投与経路は、所望であれば組み合わせることができる、または作用剤および／または所望の効果に応じて調整することができる。活性薬剤は、単回投与または複数回投与で投与することができる。送達するために適したこれらの方法および経路の実施形態としては、全身性または局在型の経路が挙げられる。一般に、本発明の方法に適した投与経路としては、これらに限定されないが、直接注射経路、経腸経路、非経口的経路、または吸入による経路が挙げられる。

【０１９５】

吸入による投与以外の非経口的な投与経路としては、これらに限定されないが、局所経路、経皮（ｔｒａｎｓｄｅｒｍａｌ）経路、皮下経路、筋肉内経路、眼窩内経路、嚢内経路、脊髄内経路、胸骨内経路、および静脈内経路、すなわち、消化管を通る経路以外の任

意の投与経路が挙げられる。非経口投与は、阻害剤の全身送達または局所送達をもたらすように行うことができる。全身送達が望まれる場合、投与は、一般には、医薬調製物の侵襲的または全身的に吸収される局所投与または粘膜を通じた投与を伴う。

【０１９６】

本発明の干渉作用剤は、経腸投与によって対象に送達することもできる。経腸投与経路としては、これらに限定されないが、経口的送達および直腸送達（例えば、坐薬を用いる）が挙げられる。

【０１９７】

皮膚または粘膜を通じた活性物質の投与方法としては、これらに限定されないが、適切な医薬調製物の局所塗布、経皮的（ｔｒａｎｓｃｕｔａｎｅｏｕｓ）伝達、経皮的（ｔｒａｎｓｄｅｒｍａｌ）伝達、注射および上皮の投与が挙げられる。経皮的（ｔｒａｎｓｄｅｒｍａｌ）伝達については、吸収促進剤またはイオン泳動が適切な方法である。イオン泳動的な伝達は、その生成物を数日またはそれ以上の期間にわたって、損なわれていない皮膚を通じて電気的なパルスによって連続的に送達する市販の「パッチ」を使用して実現することができる。

【０１９８】

本発明の方法の種々の実施形態では、干渉作用剤は、吸入によって、注射または経口的に、連続的に、毎日、１日当たり少なくとも１回（ＱＤ）、および種々の実施形態では、１日２回（ＢＩＤ）、１日３回（ＴＩＤ）、または、さらには１日４回、投与する。一般には、治療的に有効な１日用量は、少なくとも約１ｍｇ、または少なくとも約１０ｍｇ、または少なくとも約１００ｍｇ、または約２００ｍｇ～約５００ｍｇ、および時には、化合物に応じて、約１ｇ～約２．５ｇと同程度に至るまでである。

【０１９９】

投薬は、本発明の方法に従って、カプセル剤、錠剤、経口用懸濁剤、筋肉内注射用懸濁剤、静脈内注入用懸濁剤、局所塗布用ゲル剤もしくはクリーム剤、または関節内注射用懸濁剤を使用して実現することができる。

【０２００】

本明細書に記載の組成物の投与量、毒性および処置効果は、細胞培養物または実験動物における標準の薬学的手順、例えば、ＬＤ５０（集団の５０％に対して致死的な用量）およびＥＤ５０（集団の５０％において治療的に有効な用量）を決定するための手順によって決定することができる。毒性効果と処置効果の間の用量比は処置指数であり、ＬＤ５０／ＥＤ５０比として表すことができる。高い処置指標を示す組成物が好ましい。毒性の副作用を示す化合物を用いることができるが、感染していない細胞に対する潜在的な損傷を最小限にし、それによって副作用を軽減するために、そのような化合物を患部組織部位にターゲティングする送達系を設計するために注意を払うべきである。

【０２０１】

ヒトにおいて使用するための投与量の範囲を処方するために、細胞培養アッセイおよび動物試験から得られたデータを用いることができる。そのような化合物の投与量は、毒性をほとんど伴わず、または毒性を全く伴わずにＥＤ５０を含む循環濃度の範囲内にあることが好ましい。投与量は、使用する剤形および利用する投与経路に応じて、この範囲内で変動してよい。方法において使用する任意の化合物について、最初に細胞培養アッセイから処置有効量を推定することができる。用量は、動物モデルにおいて、細胞培養において決定される、ＩＣ５０（すなわち、最大半量の症状の阻害が実現される試験化合物の濃度）を含む循環血漿濃度の範囲が実現されるように処方することができる。そのような情報を使用して、ヒトにおける有用な用量をより正確に決定することができる。血漿中のレベルは、例えば、高速液体クロマトグラフィーによって測定することができる。

【０２０２】

いくつかの実施形態では、処置効果または予防効果を実現するために十分な有効量の組成物は、投与当たり体重１キログラム当たり約０．０００００１ｍｇから投与当たり体重１キログラム当たり約１０，０００ｍｇまでにわたる。投与量の範囲は、投与当たり体重

１キログラム当たり約０．０００１ｍｇから投与当たり体重１キログラム当たり約１００ｍｇまでであることが適切である。投与は、初回投与、その後の１回または複数回の「ブースター」投与としてもたらすことができる。ブースター投与は、初回投与の１日後、２日後、３日後、１週間後、２週間後、３週間後、１カ月後、２カ月後、３カ月後、６カ月後または１２カ月後にもたらすことができる。いくつかの実施形態では、ブースター投与は、前の投与に対する対象の応答を評価した後に投与される。

【０２０３】

当業者は、これらに限定されないが、疾患または障害の重症度、以前の処置、対象の全体的な健康および／または年齢、および存在する他の疾患を含めた特定の因子が対象を有効に処置するために必要な投与量およびタイミングに影響を及ぼす可能性があることを理解されたい。さらに、本明細書に記載の処置用組成物を処置有効量で用いた対象の処置は、単一の処置または一連の処置を含んでよい。

【０２０４】

ポリペプチド

本明細書では、本明細書に記載の方法において使用するための干渉作用剤および組成物も提供され、前記干渉作用剤は、

（ａ）単離されたかまたは組換え型の組込み宿主因子（ＩＨＦ）ポリペプチド、またはそのそれぞれの断片もしくは等価物、

（ｂ）Ｅ．ｃｏｌｉのＵ９３株由来の単離されたかまたは組換え型のヒストン様タンパク質（ＨＵ）ポリペプチド、またはそのそれぞれの断片もしくは等価物、

（ｃ）表８、表９Ａ、表９Ｂ、表１０において同定される単離されたかまたは組換え型のタンパク質ポリペプチド、または図６において同定されるＤＮＡ結合性ペプチド、またはそのそれぞれの断片もしくは等価物、

（ｄ）配列番号１～３４０の単離されたかまたは組換え型のポリペプチド、またはその断片もしくは等価物、

（ｅ）配列番号６～１１、２８、２９、４２～１００、表８の単離されたかまたは組換え型のＣ末端のポリペプチド、または表１０において同定されるＣ末端のポリペプチド、またはそのそれぞれの断片もしくは等価物、または

（ｆ）微生物ＤＮＡへの結合について組込み宿主因子と競合するポリペプチドまたはポリヌクレオチド

の群のものである。

【０２０５】

特定の一態様では、干渉作用剤は、単離されたかまたは組換え型のＤＮＡＢＩＩポリペプチド、またはそのそれぞれの断片もしくは等価物である。その非限定的な例は、ＩＨＦまたはＨＵのアルファポリペプチドまたはベータポリペプチド；ＩＨＦ αポリペプチド；Ｍｏｒａｘｅｌｌ ａｃａｔａｒｒｈａｌｉｓ ＨＵ；Ｅ．ｃｏｌｉ ＨｕｐＡ、ＨｕｐＢ、ｈｉｍＡ、ｈｉｍＤ；Ｅ．ｆａｅｃａｌｉｓ ＨＵ（例えば、Ｖ５８３など）、ＨＭＧＢ１および表８において同定されるものである。

【０２０６】

別の態様では、干渉作用剤は、配列番号１～５または１２～２７、３０～３５、１０１～３４０から選択されるアミノ酸配列または図６において同定されるＤＮＡ結合性ペプチドから本質的になる単離されたかまたは組換え型のポリペプチドである。

【０２０７】

別の態様では、単離されたかまたは組換え型のポリペプチドは、配列番号１または２を含む、あるいはそれから本質的になる、またはさらにそれからなるが、配列番号６～１１、２８、２９、または４２～１００のいずれでもない。

【０２０８】

別の態様では、単離されたかまたは組換え型のポリペプチドは、配列番号３、４、または５を含む、あるいはそれから本質的になる、またはさらにそれからなるが、配列番号６～１１、２８、２９、または４２～１００のいずれでもない。

【０２０９】
別の態様では、単離されたかまたは組換え型のポリペプチドは、配列番号１２、１４、１６、１８、２０、２２、２４、２６、３０、または３２を含む、あるいはそれから本質的になる、またはさらにそれからなるが、配列番号６～１１、２８、２９、または４２～１００のいずれでもない。
【０２１０】
別の態様では、単離されたかまたは組換え型のポリペプチドは、配列番号１３、１５、１７、１９、２１、２３、２５、２７、３１、３３、３４、または３５を含む、あるいはそれから本質的になる、またはさらにそれからなるが、配列番号６～１１、２８、２９、または４２～１００のいずれでもない。
【０２１１】
別の態様では、単離されたかまたは組換え型のポリペプチドは、
配列番号１２および１３を含むポリペプチド、
配列番号１４および１５を含むポリペプチド、
配列番号１６および１７を含むポリペプチド、
配列番号１８および１９を含むポリペプチド、
配列番号２０および２１を含むポリペプチド、
配列番号２３および２４を含むポリペプチド、
配列番号２５および２６を含むポリペプチド、
配列番号３０および３１を含むポリペプチド、
配列番号３２および３３を含むポリペプチド、
配列番号３４および３５を含むポリペプチド、
配列番号３３７および３３８を含むポリペプチド、または
配列番号３３９および３４０を含むポリペプチド
からなる群の単離されたかまたは組換え型のポリペプチドを含む、またはそれから本質的になる、またはさらにそれからなるポリペプチドであって、ＩＨＦアルファ、ＩＨＦベータのうちの任意の１つの野生型または配列番号６～１１、２８、２９、または４２～１００のいずれでもない。
【０２１２】
別の態様では、単離されたかまたは組換え型のポリペプチドは、
配列番号１２および１３から本質的になるポリペプチド、
配列番号１４および１５から本質的になるポリペプチド、
配列番号１６および１７から本質的になるポリペプチド、
配列番号１８および１９から本質的になるポリペプチド、
配列番号２０および２１から本質的になるポリペプチド、
配列番号２３および２４から本質的になるポリペプチド、
配列番号２５および２６から本質的になるポリペプチド、
配列番号３０および３１から本質的になるポリペプチド、
配列番号３２および３３から本質的になるポリペプチド、
配列番号３４および３５から本質的になるポリペプチド、
配列番号３３７および３３８から本質的になるポリペプチド、または
配列番号３３９および３４０から本質的になるポリペプチド
からなる群の単離されたかまたは組換え型のポリペプチドであって、ＩＨＦアルファ、ＩＨＦベータのうちの任意の１つの野生型または配列番号６～１１、２８、２９、または４２～１００のいずれでもない。
【０２１３】
本発明の方法において使用するための作用剤として、上記の単離されたかまたは組換え型のポリペプチドの断片または等価物がさらに提供される。断片の例は、Ｃ末端のポリペプチドである。別の態様では、単離されたかまたは組換え型のポリペプチドは、上記の単離されたかまたは組換え型のポリペプチドのうちの２つ以上を含む、あるいはそれから本

質的になる、またはさらにそれからなる。

【０２１４】

例えば、単離されたかまたは組換え型のポリペプチドは、配列番号１～６、１２～２７または３０～３３、または断片もしくは等価なポリペプチドのうちの任意の１つを含む、あるいはそれから本質的になる、またはさらにそれからなる。その例は、表８において同定される、または表９Ａ、表９Ｂまたは表１０に示されている。一態様では、単離された野生型ポリペプチドは排除される、すなわち、ポリペプチドは、配列番号６～１１、２８、２９、または表８において同定されるまたは表９Ａに示されている野生型配列のいずれでもない。

【０２１５】

一態様では、本発明は、配列番号１～６、１２～２７または３０～３５、１～６および１３～３５の群のアミノ酸配列から本質的になる単離されたかまたは組換え型のポリペプチド、またはＨａｅｍｏｐｈｉｌｕｓ　ｉｎｆｌｕｅｎｚａｅ　ＩＨＦαまたはＨａｅｍｏｐｈｉｌｕｓ　ｉｎｆｌｕｅｎｚａｅ　ＩＨＦβのβ－３断片および／またはα－３断片に対応するアミノ酸を含む、あるいはそれから本質的になる、またはさらにそれからなるポリペプチドを提供し、その非限定的な例としては、配列番号１２～２７、またはそのそれぞれの断片もしくは等価物が挙げられる。別の態様では、本発明は、配列番号１～４、またはそのそれぞれの断片もしくは等価物の群のアミノ酸配列を含む、あるいはそれから本質的になる、またはさらにそれからなる単離されたかまたは組換え型のポリペプチド、またはＨａｅｍｏｐｈｉｌｕｓ　ｉｎｆｌｕｅｎｚａｅ　ＩＨＦαまたはＨａｅｍｏｐｈｉｌｕｓ　ｉｎｆｌｕｅｎｚａｅ　ＩＨＦβのβ－３断片および／またはα－３断片に対応するアミノ酸を含む、あるいはそれから本質的になる、またはさらにそれからなるポリペプチドを提供し、その非限定的な例としては、それぞれ独立に、ポリペプチドのアミノ末端および／またはカルボキシル末端に、少なくとも２個、あるいは少なくとも３個、あるいは少なくとも４個、あるいは少なくとも５個、または少なくとも６個、あるいは少なくとも７個、あるいは少なくとも８個、あるいは少なくとも９個あるいは少なくとも１０個のアミノ酸をさらに含む配列番号１２～２７またはその断片もしくは生物学的等価物が挙げられる。一態様では、単離された野生型ＤＮＡ結合性ポリペプチドは排除される、すなわち、ポリペプチドは、配列番号６～１１、２８、２９、または４２～１００または表８に列挙されているもしくは表９Ａに示されている単離された野生型ポリペプチド配列のいずれでもない。

【０２１６】

別の態様では、本発明は、配列番号１または２を単独で、またはＨａｅｍｏｐｈｉｌｕｓ　ｉｎｆｌｕｅｎｚａｅ　ＩＨＦαまたはＨａｅｍｏｐｈｉｌｕｓ　ｉｎｆｌｕｅｎｚａｅ　ＩＨＦβのβ－３断片および／またはα－３断片に対応するアミノ酸を含む、あるいはそれから本質的になる、またはさらにそれからなるポリペプチドと組み合わせて含む、あるいはそれから本質的になる、またはさらにそれからなる単離されたかまたは組換え型のポリペプチドを提供し、その非限定的な例としては、配列番号１２～２７またはそのそれぞれの断片もしくは生物学的等価物が挙げられる。一態様では、単離された野生型ＤＮＡ結合性ポリペプチドは排除される、すなわち、ポリペプチドは、配列番号６～１１、２８、２９、または４２～１００または表８に列挙されているもしくは表９Ａに示されている単離された野生型ポリペプチド配列のいずれでもない。

【０２１７】

さらなる態様では、本発明は、配列番号３または４またはそのそれぞれの断片もしくは等価物を単独で、またはＨａｅｍｏｐｈｉｌｕｓ　ｉｎｆｌｕｅｎｚａｅ　ＩＨＦαまたはＨａｅｍｏｐｈｉｌｕｓ　ｉｎｆｌｕｅｎｚａｅ　ＩＨＦβのβ－３断片および／またはα－３断片に対応するアミノ酸を含む、あるいはそれから本質的になる、またはさらにそれからなるポリペプチドと組み合わせて含む、あるいはそれから本質的になる、またはさらにそれからなる単離されたかまたは組換え型のポリペプチドを提供し、その非限定的な例としては、配列番号１２～２７、および３４～３５またはそのそれぞれの生物学的等

価物が挙げられる。一態様では、単離された野生型ＤＮＡ結合性ポリペプチドは排除される、すなわち、ポリペプチドは、配列番号６～１１、２８、２９、または４２～１００または表８に列挙されているもしくは表９Ａに示されている単離された野生型ポリペプチド配列のいずれでもない。

【０２１８】

本発明は、全部で１４種の単離されたポリペプチドのうち２種以上、または３種以上、４種以上、５種以上、６種以上、７種以上、８種以上、９種以上、１０種以上、１１種以上、１２種以上、１３種以上を含む、あるいはそれから本質的になる、またはさらにそれからなる単離されたかまたは組換え型のポリペプチド、またはそのそれぞれの断片もしくは等価物も提供する。その例としては、配列番号１～４、例えば、配列番号１および２、あるいは１および３、あるいは１および４、あるいは２および３、あるいは配列番号１、２および３、あるいは、２、３および４、あるいは１、３および４を含む単離されたかまたは組換え型のポリペプチドが挙げられる。ポリペプチドは任意の方向、例えば、配列番号１、２、および３または配列番号３、２および１あるいは２、１および３、あるいは、３、１および２であってよい。これらのポリペプチドの生物学的等価物もさらに本発明に含まれるが、その配列は、単離された野生型配列、例えば、表８および９において同定されるものなどを含まない。

【０２１９】

別の態様では、本発明は、配列番号１または２および３または４、またはそのそれぞれの断片もしくは等価物を含む、あるいはそれから本質的になる、またはさらにそれからなるが、配列番号５～１０のいずれでもなく、また、配列番号１１～２６、例えば、１１および１２、あるいは１および１１、あるいは２および１１、あるいは、１および１２、あるいは２および１２、あるいは１１、１２および１、あるいは２、１１および１２のうちの任意の１つまたは複数をさらに含み得る単離されたかまたは組換え型のポリペプチドを提供する。この実施形態では、配列番号１または２は、配列番号３または４の上流またはアミノ末端に位置するが、そのアミノ酸配列は単離された野生型ポリペプチドではなく、例えば、配列番号６～１１、２８および２９のいずれでもない。別の態様では、単離されたポリペプチドは、配列番号１または２の上流またはアミノ末端に位置する配列番号３または４を含む。これらのポリペプチドの断片または生物学的等価物がさらに本発明に含まれるが、その配列は、単離された野生型ポリペプチドを含まない。

【０２２０】

一実施形態では、野生型ポリペプチドまたはＰｅｄｕｌｌａら（１９９６年）ＰＮＡＳ９３巻：１５４１１～１５４１６頁に開示されているものに対して配列同一性を有するポリペプチドまたはタンパク質はいずれも本発明から排除される。

【０２２１】

上記の実施形態のいずれにおいても、ポリペプチドのＮ末端またはＣ末端にペプチドリンカーを付加することができる。「リンカー」または「ペプチドリンカー」とは、ポリペプチド配列のＮ末端またはＣ末端のいずれか連結したペプチド配列を指す。一態様では、リンカーは、約１アミノ酸残基から約２０アミノ酸残基までの長さ、あるいは２アミノ酸残基～約１０アミノ酸残基、約３アミノ酸残基～約５アミノ酸残基の長さである。ペプチドリンカーの例は、Ｇｌｙ－Ｐｒｏ－Ｓｅｒ－Ｌｅｕ－Ｌｙｓ－Ｌｅｕ（配列番号３７）である。他の例としては、Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ；Ｇｌｙ－Ｐｒｏ－Ｓｅｒ－Ｌｅｕ（配列番号３８）；Ｇｌｙ－Ｐｒｏ－Ｓｅｒ；Ｐｒｏ－Ｓｅｒ－Ｌｅｕ－Ｌｙｓ（配列番号３９）；Ｇｌｙ－Ｐｒｏ－Ｓｅｒ－Ｌｅｕ－Ｌｙｓ（配列番号４０）およびＳｅｒ－Ｌｅｕ－Ｌｙｓ－Ｌｅｕ（配列番号４１）が挙げられる。

【０２２２】

本発明の単離されたポリペプチドは、原核宿主細胞および真核宿主細胞から単離された野生型および組換えによって作製されたポリペプチドおよびタンパク質、ならびに変異タンパク質、類似体およびその断片を含むものとし、そのような細胞の例は上記されている。いくつかの実施形態では、この用語は、本明細書に記載の抗体および抗イディオタイプ

抗体も包含する。そのようなポリペプチドは、当技術分野で公知であり、本明細書に簡単に記載されている方法を用いて単離または作製することができる。

【０２２３】

野生型ポリペプチドまたはタンパク質の機能的等価物または変異体、例えば、アミノ酸の保存されたアミノ酸置換を有するものも本発明の範囲内であることが理解される。例えば、表９を参照されたい。他の類似体としては、抗原提示マトリックスとつながったポリペプチドを含み得る本発明のタンパク質またはポリペプチドを含む融合タンパク質が挙げられる。

【０２２４】

別の態様では、ポリペプチドは、検出可能な標識にコンジュゲートしているかまたは連結している。適切な標識は、当技術分野で公知であり、本明細書に記載されている。

【０２２５】

さらなる態様では、検出可能な標識を伴うポリペプチドまたは伴わないポリペプチドを宿主原核生物または真核宿主細胞、例えば、樹状細胞などの表面上に含めることができるまたはそこで発現させることができる。

【０２２６】

タンパク質およびポリペプチドは、当業者に公知のいくつものプロセスによって得られ、そのプロセスとしては、精製、化学合成および組換え方法が挙げられる。ポリペプチドは、調製物、例えば、宿主細胞系などから、抗体を用いた免疫沈降などの方法、および標準の技法、例えば、ゲル濾過、イオン交換、逆相クロマトグラフィー、およびアフィニティークロマトグラフィーなどによって単離することができる。そのような方法体系については、例えば、Ｄｅｕｔｓｃｈｅｒら（１９９９年）Ｇｕｉｄｅ　Ｔｏ　Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ：Ｍｅｔｈｏｄｓ　Ｉｎ　Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ（１８２巻、Ａｃａｄｅｍｉｃ　Ｐｒｅｓｓ）を参照されたい。したがって、本発明は、これらのポリペプチドを得るためのプロセスならびにこれらのプロセスによって得ることができる生成物および得られた生成物も提供する。

【０２２７】

ポリペプチドは、市販の自動ペプチド合成機、例えば、Ｐｅｒｋｉｎ／Ｅｌｍｅｒ／Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ，Ｉｎｃ．、モデル４３０Ａまたは４３１Ａ、Ｆｏｓｔｅｒ　Ｃｉｔｙ、ＣＡ、ＵＳＡによって製造されたものなどを使用した化学合成によっても得ることができる。合成されたポリペプチドは、沈殿させ、さらに、例えば、高速液体クロマトグラフィー（ＨＰＬＣ）によって精製することができる。したがって、本発明は、タンパク質の配列および試薬、例えば、アミノ酸および酵素などをもたらし、アミノ酸を適切な方向および直線配列に連結し合わせることによって本発明のタンパク質を化学的に合成するためのプロセスも提供する。

【０２２８】

あるいは、タンパク質およびポリペプチドは、本明細書に記載の宿主細胞およびベクター系を使用して、例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋら（１９８９年）上記に記載のものなどの周知の組換え方法によって得ることができる。

【０２２９】

本出願は、診断方法において使用するための、検出可能な作用剤とコンジュゲートした本明細書に記載のポリペプチドも提供する。例えば、検出可能に標識したポリペプチドは、カラムに結合させ、抗体を検出し、精製するために使用することができる。検出可能に標識したポリペプチドは、下記の通り、抗体を産生させるための免疫原としても有用である。本発明のポリペプチドは、細胞プロセスを調節する作用剤または薬物をスクリーニングするためのｉｎ　ｖｉｔｒｏアッセイ系において有用である。

【０２３０】

本発明のペプチドを修飾して特性を変更することができることは当業者には周知である。本明細書で使用される場合、「アミノ酸」という用語は、天然アミノ酸および／または非天然アミノ酸または合成アミノ酸のいずれかを指し、グリシンおよびＤ光学異性体また

はＬ光学異性体の両方、およびアミノ酸の類似体およびペプチド模倣薬を含める。３つ以上のアミノ酸のペプチドは、一般に、ペプチド鎖が短ければオリゴペプチドと称される。ペプチド鎖が長ければ、ペプチドは、一般に、ポリペプチドまたはタンパク質と称される。

【０２３１】

本発明のペプチドは、非天然アミノ酸を含むように修飾することができる。したがって、ペプチドは、ペプチドに特別な性質を伝えるために、Ｄ－アミノ酸、Ｄ－アミノ酸とＬ－アミノ酸の組合せ、および種々の「デザイナー」アミノ酸（例えば、ベーター－メチルアミノ酸、Ｃ－アルファ－メチルアミノ酸、およびＮ－アルファ－メチルアミノ酸など）を含んでよい。さらに、特定のカップリングステップにおいて特定のアミノ酸を割り当てることにより、アルファ－ヘリックス、ベータターン、ベータシート、ガンマ－ターンを有するペプチド、および環式のペプチドを生成することができる。一般に、アルファ－ヘリックスの二次構造またはランダムな二次構造が好ましいと考えられている。

【０２３２】

本発明のポリペプチドは、種々の固相キャリア、例えば、インプラント、ステント、ペースト、ゲル、歯科インプラント、もしくは医療用インプラントなど、または液相キャリア、例えば、ビーズ、滅菌溶液または水溶液、薬学的に許容されるキャリア、薬学的に許容されるポリマー、リポソーム、ミセル、懸濁液およびエマルションなどと組み合わせることもできる。非水系の溶媒の例としては、プロピルエチレングリコール、ポリエチレングリコールおよび植物油が挙げられる。ｉｎ　ｖｉｖｏで抗体を調製するためまたは免疫応答を誘導するために使用する場合、キャリアは、特異的な免疫応答を非特異的に増大するために有用なアジュバントも含んでよい。当業者は、アジュバントが必要かどうかを容易に決定し、それを選択することができる。しかし、ただ単に例示する目的で、適切なアジュバントとしては、これらに限定されないが、フロイント完全アジュバントおよびフロイント不完全アジュバント、無機塩類およびポリヌクレオチドが挙げられる。他の適切なアジュバントとしては、モノホスホリルリピドＡ（ＭＰＬ）、Ｅ．ｃｏｌｉの熱に不安定なエンテロトキシンの変異体誘導体、コレラ毒素の変異体誘導体、ＣＰＧオリゴヌクレオチド、およびスクアレンに由来するアジュバントが挙げられる。

【０２３３】

本発明は、本発明のポリペプチド、類似体、変異タンパク質、または断片のうちの任意のものを、単独で、または互いにまたは抗生物質および許容できるキャリアまたは固体支持体のような他の作用剤と組み合わせて含む、あるいはそれから本質的になる、またはさらにそれからなる医薬組成物も提供する。これらの組成物は、本明細書に記載の種々の診断方法および処置方法のために有用である。

【０２３４】

ポリヌクレオチド

本発明は、上で同定された単離されたかまたは組換え型のポリペプチドのうちの１つまたは複数をコードする単離されたかまたは組換え型のポリヌクレオチドおよびそれらのそれぞれの相補鎖も提供する。単離されたかまたは組換え型のポリヌクレオチドを含むベクターがさらに提供され、その例は、当技術分野で公知であり、本明細書に簡単に記載されている。２種以上の単離されたかまたは組換え型のポリヌクレオチドを単一の単位として発現させようとする一態様では、単離されたかまたは組換え型のポリヌクレオチドは、ポリシストロニックベクター内に含有されてよい。ポリヌクレオチドは、ＤＮＡ、ＲＮＡ、ｍＲＮＡまたは干渉ＲＮＡ、例えば、ｓｉＲＮＡ、ｍｉＲＮＡもしくはｄｓＲＮＡなどであってよい。

【０２３５】

別の態様では、本発明は、ＤＮＡの、微生物バイオフィルム内のポリペプチドまたはタンパク質への結合に干渉するポリヌクレオチド、または、ＤＮＡＢＩＩポリヌクレオチドが微生物ＤＮＡに結合することを処置または阻害する、ならびにバイオフィルムの形成および関連する感染症および障害を処置、予防または阻害することができる、ホリデイジャ

ンクションと似ている４方向のジャンクションポリヌクレオチド、複製フォークと似ている３方向のジャンクションポリヌクレオチド、固有の柔軟性を有するポリヌクレオチドまたは屈曲したポリヌクレオチドである干渉作用剤を提供する。当業者は、そのようなポリヌクレオチドを、本明細書において提供される情報および当業者の知見を用いて作出することができる。ＧｏｏｄｍａｎおよびＫａｙ（１９９９年）Ｊ．　Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ　Ｃｈｅｍ．　２７４巻（５２号）：３７００４～３７０１１頁およびＫａｍａｓｈｅｖおよびＲｏｕｖｉｅｒｅ－Ｙａｎｉｖ（２０００年）ＥＭＢＯ　Ｊ．　１９巻（２３号）：６５２７～６５３５頁を参照されたい。

【０２３６】

本発明は、さらに、ＲＮＡ転写のプロモーター、ならびにＤＮＡまたはＲＮＡの複製および／または一過性発現、または安定発現のための他の調節配列に作動可能に連結した単離されたかまたは組換え型のポリヌクレオチドを提供する。本明細書で使用される場合、「作動可能に連結した」という用語は、プロモーターが、ＤＮＡ分子からＲＮＡの転写を導くように位置づけられていることを意味する。そのようなプロモーターの例は、ＳＰ６、Ｔ４およびＴ７である。ある特定の実施形態では、挿入されたポリヌクレオチドを細胞特異的に発現させるために細胞特異的なプロモーターを使用する。プロモーターまたはプロモーター／エンハンサーを含有し、そのプロモーターに作動可能に連結することができる終結コドンおよび選択マーカー配列、ならびにＤＮＡの小片が挿入されたクローニング部位を伴うベクターは、当技術分野で公知であり、市販されている。一般的な方法体系およびクローニング戦略については、Ｇｅｎｅ　Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ（Ｇｏｅｄｄｅｌ編、Ａｃａｄｅｍｉｃ　Ｐｒｅｓｓ，　Ｉｎｃ．（１９９１年））およびそこで引用されている参照文献、ならびに種々の適切なベクターについてのマップ、機能的性質、商業的な供給者およびＧｅｎＥＭＢＬ受託番号の参照を含有するＶｅｃｔｏｒｓ：Ｅｓｓｅｎｔｉａｌ　Ｄａｔａ　Ｓｅｒｉｅｓ（ＧａｃｅｓａおよびＲａｍｊｉ編、Ｊｏｈｎ　Ｗｉｌｅｙ　＆　Ｓｏｎｓ、Ｎ．Ｙ．（１９９４年））を参照されたい。

【０２３７】

一実施形態では、本発明のポリヌクレオチドに由来するポリヌクレオチドは、本明細書に記載の診断的および治療的な有用性を有するポリペプチドまたはタンパク質、ならびに存在する可能性があるまたは存在しない可能性があるタンパク質の転写物を同定するためのプローブをコードする。これらの核酸断片は、例えば、より大きなポリヌクレオチドを制限酵素消化することによって調製し、次いで検出可能なマーカーで標識することができる。あるいは、分子のニックトランスレーションを用いてランダムな断片を生成することができる。そのような断片を調製および標識するための方法体系については、Ｓａｍｂｒｏｏｋら（１９８９年）上記を参照されたい。

【０２３８】

これらの核酸を含有する発現ベクターは、タンパク質およびポリペプチドを作製するための宿主ベクター系を得るために有用である。これらの発現ベクターは宿主生物体において、エピソームとして、または染色体ＤＮＡの不可欠な一部として複製可能でなければならないことが示されている。適切な発現ベクターの非限定的な例としては、プラスミド、酵母ベクター、ウイルスベクターおよびリポソームが挙げられる。アデノウイルスベクターは、ｉｎ　ｖｉｔｒｏおよびｉｎ　ｖｉｖｏのどちらでも発現が高レベルであり、細胞を効率的に形質転換するので、ｉｎ　ｖｉｖｏで遺伝子を組織に導入するために特に有用である。核酸を、適切な宿主細胞、例えば、原核細胞または真核細胞および宿主細胞複製物に挿入する場合、タンパク質は、組換えによって作製することができる。適切な宿主細胞はベクターに左右され、また、適切な宿主細胞としては、公知の方法を用いて構築した哺乳動物細胞、動物細胞、ヒト細胞、サル細胞、昆虫細胞、酵母細胞、および細菌細胞を挙げることができる。Ｓａｍｂｒｏｏｋら（１９８９年）上記を参照されたい。外因性の核酸を細胞に挿入するためのウイルスベクターの使用に加えて、核酸は、当技術分野で公知の方法、例えば、細菌細胞の形質転換；哺乳動物の細胞に対する、リン酸カルシウム沈降を使用したトランスフェクション；またはＤＥＡＥ－デキストラン；電気穿孔；または

マイクロインジェクションなどによって宿主細胞に挿入することができる。方法体系についてはＳａｍｂｒｏｏｋら（１９８９年）上記を参照されたい。したがって、本発明は、タンパク質またはポリペプチドまたは抗体をコードするポリヌクレオチドを含有する宿主細胞、例えば、哺乳動物細胞、動物細胞（ラットまたはマウス）、ヒト細胞、または原核生物細胞、例えば、細菌細胞なども提供する。

【０２３９】

ポリヌクレオチドは、修飾されたヌクレオチド、例えば、メチル化されたヌクレオチドおよびヌクレオチド類似体などを含んでよい。存在する場合、ヌクレオチド構造の修飾は、ポリヌクレオチドの組立ての前に、またはその後に付与することができる。ヌクレオチドの配列を非ヌクレオチド構成成分で遮ることができる。ポリヌクレオチドは、重合後に、例えば、標識化構成成分とコンジュゲートすることによってさらに修飾することができる。この用語はまた、二本鎖分子と一本鎖分子の両方を指す。別段の指定または要求がない限り、ポリヌクレオチドである本発明の任意の実施形態は、二本鎖の形態と、二本鎖の形態を成すことが公知であるまたは予測される２つの相補的な一本鎖の形態のそれぞれの両方を包含する。

【０２４０】

ベクターがｉｎ　ｖｉｖｏまたはｅｘ　ｖｉｖｏでの遺伝子療法のために使用される場合、薬学的に許容されるベクター、例えば、複製能力のないレトロウイルスまたはアデノウイルスベクターなどが好ましい。本発明の核酸を含有する、薬学的に許容されるベクターは、挿入されたポリヌクレオチドを一過性にまたは安定に発現させるためにさらに修飾することができる。本明細書で使用される場合、「薬学的に許容されるベクター」という用語としては、これらに限定されないが、核酸を、分裂している細胞に選択的にターゲティングし、導入する力を有するベクターまたは送達ビヒクルが挙げられる。そのようなベクターの例は、ウイルスタンパク質を産生することができず、感染した宿主細胞におけるベクター伝播が妨げられることによって定義される「複製能力のない」ベクターである。複製能力のないレトロウイルスベクターの例は、ＬＮＬ６（Ｍｉｌｌｅｒら（１９８９年）ＢｉｏＴｅｃｈｎｉｑｕｅｓ　７巻：９８０～９９０頁）である。遺伝子マーカーのレトロウイルス媒介性遺伝子移入のために複製能力のないレトロウイルスを使用する方法体系が確立されている（Ｂｏｒｄｉｇｎｏｎ（１９８９年）ＰＮＡＳ　ＵＳＡ　８６巻：８９１２～８９５２頁；Ｃｕｌｖｅｒ（１９９１年）ＰＮＡＳ　ＵＳＡ　８８巻：３１５５頁；およびＲｉｌｌ（１９９１年）Ｂｌｏｏｄ　７９巻（１０号）：２６９４～２７００頁）。

【０２４１】

本発明は、本発明のポリヌクレオチドを含有し、かつ／または発現する遺伝子改変された細胞も提供する。遺伝子改変された細胞は、上流の調節配列、例えば、プロモーターまたは遺伝子活性化因子などを挿入することによって作製することができる（米国特許第５，７３３，７６１号を参照されたい）。

【０２４２】

ポリヌクレオチドは、検出可能なマーカー、例えば、細胞における核酸および／または遺伝子の発現を検出するための酵素標識または放射性同位元素とコンジュゲートすることができる。検出可能なシグナルを生じることができる蛍光リガンド、放射性リガンド、酵素的リガンドまたは他のリガンド、例えば、アビジン／ビオチンなどを含めた多種多様な適切な検出可能なマーカーが当技術分野で公知である。一態様では、放射性試薬または他の環境的に望ましくない試薬の代わりに、蛍光標識または酵素タグ、例えば、ウレアーゼ、アルカリホスファターゼまたはペルオキシダーゼなどを使用することが望まれる可能性がある。酵素タグの場合では、熱量測定的指示基質を使用して、相補的な核酸含有試料との特異的なハイブリダイゼーションを同定するための、ヒトの眼による、または分光光度的な可視手段をもたらすことができる。したがって、本発明は、さらに、一本鎖のポリヌクレオチドまたはその相補物を、相補的な一本鎖のポリヌクレオチドのハイブリダイゼーションが可能になる条件下で（中程度にストリンジェントなハイブリダイゼーション条件

であることが好ましい）、またはより好ましくは、高度にストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で、標的の一本鎖のポリヌクレオチドと本発明のポリヌクレオチドの一部である標識された一本鎖のポリヌクレオチド（プローブ）を接触させることによって検出するための方法を提供する。ハイブリダイズしたポリヌクレオチド対をハイブリダイズしていない一本鎖のポリヌクレオチドから分離する。ハイブリダイズしたポリヌクレオチド対は、当業者に公知の、例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋら（１９８９年）上記に記載の方法を使用して検出する。

【０２４３】

本発明の態様のポリヌクレオチドは、化学合成、組換えクローニング方法、ＰＣＲ、またはそれらの任意の組合せを用いて得ることができる。化学的なポリヌクレオチド合成の方法は当技術分野で公知であり、本明細書において詳しく記載する必要はない。当業者は、ＤＮＡ合成機を使用することによって、または商業的なサービスを注文することによって所望のポリヌクレオチドを得るために、本明細書において提供される配列データを使用することができる。

【０２４４】

本発明のポリヌクレオチドは、ＰＣＲを用いて単離または複製することができる。ＰＣＲ技術は、米国特許第４，６８３，１９５号；同第４，８００，１５９号；同第４，７５４，０６５号；および同第４，６８３，２０２号の主題であり、また、ＰＣＲ：Ｔｈｅ Ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ Ｃｈａｉｎ Ｒｅａｃｔｉｏｎ（Ｍｕｌｌｉｓら編、Ｂｉｒｋｈａｕｓｅｒ Ｐｒｅｓｓ、Ｂｏｓｔｏｎ（１９９４年））またはＭａｃＰｈｅｒｓｏｎら（１９９１年）および（１９９５年）上記、およびそこに引用されている参考文献に記載されている。あるいは、当業者は、本明細書において提供される配列および商業的なＤＮＡ合成機を使用して、ＤＮＡを複製することができる。したがって、本発明は、本発明のポリヌクレオチドを、ポリヌクレオチドの直線配列、ヌクレオチド、適切なプライマー分子、酵素などの化学物質、およびそれらを複製するための指示をもたらし、ヌクレオチドを、適切な方向に化学的に複製または連結してポリヌクレオチドを得ることによって得るためのプロセスも提供する。別の実施形態では、これらのポリヌクレオチドをさらに単離する。さらに、当業者は、複製し、増幅するために、ポリヌクレオチドを適切な複製ベクターに挿入し、そのベクターを適切な宿主細胞（原核生物または真核生物）に挿入することができる。そうして増幅されたＤＮＡは、当業者に公知の方法によって細胞から単離することができる。この方法によってポリヌクレオチドを得るためのプロセスならびにそうして得られたポリヌクレオチドがさらに本明細書において提供される。

【０２４５】

ＲＮＡは、まず、ＤＮＡポリヌクレオチドを適切な宿主細胞に挿入することによって得ることができる。ＤＮＡは、任意の適切な方法によって、例えば、適切な遺伝子送達ビヒクル（例えば、リポソーム、プラスミドまたはベクター）を使用することによって、または電気穿孔によって送達することができる。細胞が複製され、ＤＮＡがＲＮＡに転写されたら、次いで、当業者に公知の方法、例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋら（１９８９年）上記に記載の方法を用いてＲＮＡを単離することができる。例えば、ｍＲＮＡは、種々の溶菌酵素または化学的な溶液を使用して、Ｓａｍｂｒｏｏｋら（１９８９年）上記に記載の手順に従って単離することができる、または製造者によって提供される添付の説明書に従って、核酸結合性樹脂によって抽出することができる。

【０２４６】

本発明のポリヌクレオチドに対する配列相補性または相同性を示すポリヌクレオチドは、ハイブリダイゼーションプローブとして、または本明細書において同定される特異的なポリヌクレオチドの等価物として有用である。転写物の完全なコード配列は公知であるので、この配列または相同な配列の任意の部分を本発明の方法において用いることができる。

【０２４７】

特異的なハイブリダイゼーションのために「完全に一致する」プローブは必要ないこと

が当技術分野では公知である。プローブ配列の軽微な変化は、ハイブリダイゼーションの特異性に影響を及ぼさない少数の塩基の置換、欠失または挿入によって実現される。一般に、２０％程度の塩基対のミスマッチ（最適にアラインメントした場合）が容認され得る。上述のｍＲＮＡを検出するために有用なプローブは、相同領域と少なくとも約８０％同一であることが好ましい。プローブは、相同な領域とアラインメントした後に、対応する遺伝子配列と８５％同一であることがより好ましい；プローブは９０％の同一性を示すことがさらに好ましい。

【０２４８】

これらのプローブをラジオアッセイ（例えば、サザンブロット分析およびノーザンブロット分析）において用いて、これらの細胞を含有する種々の細胞または組織を検出、予後決定、診断またはモニターすることができる。プローブは、本発明のポリヌクレオチドに対応する遺伝子の発現を検出するためのハイスループットなスクリーニングアッセイにおいて使用するために、固体支持体またはアレイ、例えば、チップなどに付着させることもできる。したがって、本発明は、ハイスループットなスクリーニングにおいて使用するために固体支持体に付着させた、本発明のポリヌクレオチド、またはその等価物、またはその相補物、またはその断片を含むまたはそれに対応するプローブも提供する。

【０２４９】

断片の全体のサイズ、ならびに相補的なひと続きのサイズは、特定の核酸セグメントの意図された使用または適用に左右される。より小さな断片は、一般には、ハイブリダイゼーションの実施形態において使用され、相補領域の長さは変動してよく、例えば、少なくとも５～１０ヌクレオチドから約１００ヌクレオチドの間である、または、検出することが望まれる相補配列に従って全長でさえあってよい。

【０２５０】

ハイブリッドの安定性および選択性を増し、それにより、得られる特定のハイブリッド分子の特異性を改善するために、５～１０ヌクレオチドの長さを超えるひと続きにわたる相補配列を有するヌクレオチドプローブが一般に好ましい。１０ヌクレオチド以上または、５０ヌクレオチド超の長さ、または所望の場合、さらに長い遺伝子相補的なひと続きのポリヌクレオチドを設計することができることがより好ましい。そのような断片は、例えば、化学的な手段によって断片を直接合成することによって、核酸複製（ｒｅｐｒｏｄｕｃｔｉｏｎ）技術、例えば、米国特許第４，６０３，１０２号に記載の２種のプライマーオリゴヌクレオチドを用いたＰＣＲ技術などを適用することによって、または組換え作製のために、選択された配列を組換えベクターに導入することによって、容易に調製することができる。一態様では、プローブは、約５０～７５ヌクレオチドまたはそれ以上、あるいは、５０～１００ヌクレオチドの長さである。

【０２５１】

本発明のポリヌクレオチドは、本明細書に記載の細胞において発現させる遺伝子または遺伝子転写物を検出するためのプライマーとしての機能を果たし得る。この場合、増幅とは、標的配列を妥当な忠実度で複製することができるプライマー依存性のポリメラーゼを使用する任意の方法を意味する。増幅は、天然ＤＮＡポリメラーゼまたは組換えＤＮＡポリメラーゼ、例えば、Ｔ７　ＤＮＡポリメラーゼ、Ｅ．ｃｏｌｉ　ＤＮＡポリメラーゼのクレノウ断片、および逆転写酵素などによって行うことができる。ただ単に例示する目的で、プライマーは、プローブについて示されているのと同じ長さである。

【０２５２】

ポリヌクレオチドを増幅するための１つの方法はＰＣＲであり、ＰＣＲ増幅のためのキットが市販されている。増幅した後、生じたＤＮＡ断片は、当技術分野で公知の任意の適切な方法によって、例えば、アガロースゲル電気泳動した後に、臭化エチジウム染色および紫外線照明を用いて可視化することによって検出することができる。

【０２５３】

有効量の遺伝子送達ベクターまたはビヒクルを細胞に投与するための方法が開発されており、それは当業者に公知であり本明細書に記載されている。細胞における遺伝子発現を

検出するための方法は当技術分野で公知であり、その方法としては、例えば、ＤＮＡマイクロアレイへのハイブリダイゼーション、ｉｎ　ｓｉｔｕハイブリダイゼーション、ＰＣＲ、ＲＮアーゼ保護アッセイおよびノーザンブロット分析などの技法が挙げられる。そのような方法は、細胞における遺伝子の発現を検出し、数量化するために有用である。あるいは、コードされるポリペプチドの発現は、種々の方法によって検出することができる。具体的には、標的ポリペプチドに特異的に応答するポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体を調製することが有用である。そのような抗体は、例えば、免疫組織学的方法、ＥＬＩＳＡ、およびウェスタンブロット法などの技法を用いてポリペプチドを発現している細胞を視覚化するために有用である。これらの技法を使用して、発現されたポリヌクレオチドの発現レベルを決定することができる。

【０２５４】

抗体およびそれらの誘導体

本発明はまた、本発明の方法において用いられる、単離されたポリペプチドを特異的に認識し、かつ／またはそれに結合する抗体も提供する。抗体は、本明細書で説明される各種の抗体のうちのいずれかであることが可能であり、このような抗体の非限定的な例には、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト抗体、ベニア化抗体、ダイアボディー、ヒト化抗体、抗体誘導体、組換えヒト化抗体、またはそれらのそれぞれの誘導体もしくは断片が含まれる。一態様では、断片が、抗体のＣＤＲを含む、あるいはそれから本質的になる、またはさらにそれからなる。一態様では、抗体が、検出可能に標識されている、またはそれにコンジュゲートした検出可能な標識をさらに含む。また、本発明のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞株も提供される。本明細書では、上記の実施形態のうちの１つもしくは複数を含む、あるいはそれから本質的になる、またはさらにそれからなる組成物もさらに提供される。抗体および断片のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドのほか、抗体のポリペプチドおよびそれらの断片を組換えにより産生するまたは化学合成する方法もさらに提供される。抗体のポリペプチドは、真核細胞内で産生することもでき、原核細胞内で産生することもでき、当技術分野において公知であり、本明細書で説明される他の方法を介して産生することもできる。

【０２５５】

抗体は、当技術分野において公知であり、文献中で十分に説明されている従来の技法を用いて産生することができる。ポリクローナル抗体を産生するには、いくつかの方法が存在する。例えば、ポリクローナル抗体は、ニワトリ、ヤギ、モルモット、ハムスター、ウマ、マウス、ラット、およびウサギなどであるがそれらに限定されない適切な哺乳動物を免疫化することにより産生することが典型的である。抗原を哺乳動物に注射すると、これが、Ｂリンパ球を誘導して、この抗原に特異的な免疫グロブリンを産生させる。免疫グロブリンは、哺乳動物の血清から精製することができる。ＩＨＦαおよびＩＨＦβに特異的な抗体は、ＩＨＦαおよびＩＨＦβの異なるエピトープに対応するポリペプチドを注射することにより産生することができる。例えば、ＩＨＦαにはＴＦＲＰＧＱＫＬＫＳＲＶＥＮＡＳＰＫＤＥ（配列番号３４）、およびＩＨＦβにはＫＹＶＰＨＦＫＰＧＫＥＬＲＤＲＡＮＩＹＧ（配列番号３５）など、２０アミノ酸の各サブユニットを用いて、抗体を産生することができる。この方法の変化形には、産生を最適化し、動物を人道的に取り扱うための、アジュバント、投与経路および投与部位、部位１カ所当たりの注射容量および動物１匹当たりの部位数の改変が含まれる。例えば、抗原に対する免疫応答を改善または増強するために、アジュバントを用いることが典型的である。大半のアジュバントは、注射部位における抗原貯留をもたらし、それにより、抗原の排出リンパ節内への緩徐な放出が可能となる。他のアジュバントには、タンパク質抗原分子の濃縮を広大な表面積にわたり促進する界面活性剤、および免疫賦活性分子が含まれる。ポリクローナル抗体を産生するためのアジュバントの非限定的な例には、フロイントによるアジュバント、Ｒｉｂｉアジュバント系、およびＴｉｔｅｒｍａｘが含まれる。ポリクローナル抗体は、当技術分野において公知の方法を用いて産生することができ、それらのうちの一部は、米国特許第７，２７９，５５９号；同第７，１１９，１７９号；同第７，０６０，８００号；同第６，７０

９，６５９号；同第６，６５６，７４６号；同第６，３２２，７８８号；同第５，６８６，０７３号；および同第５，６７０，１５３号において説明されている。

【０２５６】

モノクローナル抗体は、当技術分野において公知であり、文献中で十分に説明されている従来のハイブリドーマ法を用いて産生することができる。例えば、ハイブリドーマは、適切な不死細胞株（例えば、Ｓｐ２／０細胞、Ｓｐ２／０－ＡＧ１４細胞、ＮＳＯ細胞、ＮＳ１細胞、ＮＳ２細胞、ＡＥ－１細胞、Ｌ．５細胞、Ｐ３Ｘ６３Ａｇ８．６５３細胞、Ｓｐ２　ＳＡ３細胞、Ｓｐ２　ＭＡＩ細胞、Ｓｐ２　ＳＳ１細胞、Ｓｐ２　ＳＡ５細胞、Ｕ３９７細胞、ＭＬＡ　１４４細胞、ＡＣＴ　ＩＶ細胞、ＭＯＬＴ４細胞、ＤＡ－１細胞、ＪＵＲＫＡＴ細胞、ＷＥＨＩ細胞、Ｋ－５６２細胞、ＣＯＳ細胞、ＲＡＪＩ細胞、ＮＩＨ　３Ｔ３細胞、ＨＬ－６０細胞、ＭＬＡ　１４４細胞、ＮＡＭＡＩＷＡ細胞、ＮＥＵＲＯ　２Ａ細胞、ＣＨＯ細胞、ＰｅｒＣ．６細胞、ＹＢ２／０細胞などであるがそれらに限定されない骨髄腫細胞株）など、あるいはヘテロ骨髄腫、これらの融合産生物、またはそれらに由来する任意の細胞もしくは融合細胞、あるいは当技術分野において公知の他の任意の適切な細胞株（以下のウェブアドレス、例えば、２００７年１１月２６日に最終アクセスされたａｔｃｃ．ｏｒｇ、ｌｉｆｅｔｅｃｈ．ｃｏｍ．における細胞株を参照されたい）を、単離されたかまたはクローニングされた脾臓細胞、末梢血細胞、リンパ球、扁桃腺細胞、または他の免疫細胞もしくはＢ細胞を含有する細胞、あるいは組換えまたは内因性のウイルス、細菌、藻類、原核生物、両生類、昆虫、爬虫類、魚類、哺乳動物、齧歯動物、ウマ、ヒツジ（ｏｖｉｎｅ）、ヤギ、ヒツジ（ｓｈｅｅｐ）、霊長動物、真核生物のゲノムＤＮＡ、ｃＤＮＡ、ｒＤＮＡ、ミトコンドリアＤＮＡもしくはミトコンドリアＲＮＡ、クロロプラストＤＮＡもしくはクロロプラストＲＮＡ、ｈｎＲＮＡ、ｍＲＮＡ、ｔＲＮＡ、一本鎖核酸、二本鎖核酸、または三本鎖核酸、ハイブリダイズした核酸など、あるいはそれらの任意の組合せの核酸としての内因性核酸または異種核酸としての、重鎖定常配列もしくは重鎖可変配列もしくは重鎖フレームワーク配列もしくは重鎖ＣＤＲ配列または軽鎖定常配列もしくは軽鎖可変配列もしくは軽鎖フレームワーク配列もしくは軽鎖ＣＤＲ配列を発現する他の任意の細胞などであるがそれらに限定されない抗体産生細胞と融合させることにより産生する。抗体産生細胞はまた、対象の抗原で免疫化したヒトまたは他の適切な動物の末梢血、または好ましくは脾臓もしくはリンパ節から得ることもできる。また、他の任意の適切な宿主細胞も、本発明の抗体、指定された断片、またはそれらの変異体をコードする異種核酸または内因性核酸を発現させるのに用いることができる。融合細胞（ハイブリドーマ）または組換え細胞は、選択培養条件または他の適切な公知の方法を用いて単離することができ、限界希釈法、もしくは細胞分取法、または他の公知の方法を介してクローニングすることができる。

【０２５７】

ペプチドライブラリーまたはタンパク質ライブラリー（例えば、バクテリオファージディスプレイライブラリー、リボソームディスプレイライブラリー、オリゴヌクレオチドディスプレイライブラリー、ＲＮＡディスプレイライブラリー、ｃＤＮＡディスプレイライブラリーなどであるがそれらに限定されないライブラリー；例えば、当技術分野において公知の方法を用いる、ＭｏｒｐｈｏＳｙｓ（Ｍａｒｔｉｎｓｒｅｉｄ／Ｐｌａｎｅｇｇ、Ｄｅｌ．）、ＢｉｏＩｎｖｅｎｔ（Ｌｕｎｄ、Ｓｗｅｄｅｎ）、Ａｆｆｉｔｅｃｈ（Ｏｓｌｏ、Ｎｏｒｗａｙ）など、各販売元から市販されているライブラリー）から組換え抗体を選択する方法が含まれるがそれらに限定されない、必須の特異性を有する抗体を産生または単離する他の適切な方法を用いることができる。当技術分野で公知の方法は、特許文献において説明されており、それらのうちの一部には、米国特許第４，７０４，６９２号；同第５，７２３，３２３号；同第５，７６３，１９２号；同第５，８１４，４７６号；同第５，８１７，４８３号；同第５，８２４，５１４号；同第５，９７６，８６２号が含まれる。代替的な方法は、トランスジェニック動物（例えば、ＳＣＩＤマウス；　Ｎｇｕｙｅｎら（１９７７年）、Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．　Ｉｍｍｕｎｏｌ．、４１巻：９０１～９０７頁（１９９７年）；Ｓａｎｄｈｕら（１９９６年）、Ｃｒｉｔ．　Ｒｅｖ．　Ｂｉ

ｏｔｅｃｈｎｏｌ．、１６巻：９５～１１８頁；Ｅｒｅｎら（１９９８年）、Ｉｍｍｕｎｏｌ．、９３巻：１５４～１６１頁）の免疫化に依存し、それにより、当技術分野において公知であり、かつ／または本明細書でも説明されるヒト抗体のレパートリーを産生することが可能である。このような技法には、リボソームディスプレイ（Ｈａｎｅｓら（１９９７年）、Ｐｒｏｃ．　Ｎａｔｌ．　Ａｃａｄ．　Ｓｃｉ．　ＵＳＡ、９４巻：４９３７～４９４２頁；Ｈａｎｅｓら（１９９８年）、Ｐｒｏｃ．　Ｎａｔｌ．　Ａｃａｄ．　Ｓｃｉ．　ＵＳＡ、９５巻：１４１３０～１４１３５頁）、単一細胞による抗体産生法（例えば、選択リンパ球抗体法（「ＳＬＡＭ」）（米国特許第５，６２７，０５２号、Ｗｅｎら（１９８７年）、Ｊ．　Ｉｍｍｕｎｏｌ．、１７巻：８８７～８９２頁；Ｂａｂｃｏｏｋら（１９９６年）、Ｐｒｏｃ．　Ｎａｔｌ．　Ａｃａｄ．　Ｓｃｉ．　ＵＳＡ、９３巻：７８４３～７８４８頁）、ゲルマイクロ液滴法およびフローサイトメトリー法（Ｐｏｗｅｌｌら（１９９０年）、Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．、８巻：３３３～３３７頁；Ｏｎｅ　Ｃｅｌｌ　Ｓｙｓｔｅｍｓ（Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ、Ｍａｓｓ）；Ｇｒａｙら（１９９５年）、Ｊ．　Ｉｍｍ．　Ｍｅｔｈ．、１８２巻：１５５～１６３頁；ならびにＫｅｎｎｙら（１９９５年）、Ｂｉｏ．　Ｔｅｃｈｎｏｌ．、１３巻：７８７～７９０頁）、Ｂ細胞選択法（Ｓｔｅｅｎｂａｋｋｅｒｓら（１９９４年）、Ｍｏｌｅｃ．　Ｂｉｏｌ．　Ｒｅｐｏｒｔｓ、１９巻：１２５～１３４頁）が含まれるがそれらに限定されない。

【０２５８】

本発明の抗体誘導体はまた、本発明の抗体をコードするポリヌクレオチドを、ヤギ、ウシ、ウマ、ヒツジなど、それらのミルク中にこのような抗体を産生するトランスジェニック動物またはトランスジェニック哺乳動物を提供するように、適切な宿主に送達することにより調製することもできる。当技術分野ではこれらの方法が公知であり、例えば、米国特許第５，８２７，６９０号；同第５，８４９，９９２号；同第４，８７３，３１６号；同第５，８４９，９９２号；同第５，９９４，６１６号；同第５，５６５，３６２号；および同第５，３０４，４８９号において説明されている。

【０２５９】

「抗体誘導体」という用語は、抗体または断片の直鎖状ポリペプチド配列に対する翻訳後修飾を包含する。例えば、米国特許第６，６０２，６８４Ｂ１号は、免疫グロブリンのＦｃ領域と等価の領域を包含し、Ｆｃを介する細胞傷害作用が増強されている全抗体分子、抗体断片、または融合タンパク質を含めた抗体の修飾糖形態を産生する方法、およびこのようにして産生された糖タンパク質について説明している。

【０２６０】

本発明の抗体はまた、抗体が抗イディオタイプ応答を引き起こすことを共有結合が予防しないように、任意の種類の分子を抗体に共有結合させることにより修飾した誘導体も包含する。抗体誘導体には、グリコシル化、アセチル化、ペグ化、リン酸化、アミド化、公知の保護基（ｐｒｏｔｅｃｔｉｎｇ／ｂｌｏｃｋｉｎｇ　ｇｒｏｕｐｓ）を介する誘導、タンパク質分解性切断、細胞内リガンドまたは他のタンパク質への結合などにより修飾されている抗体が含まれるがそれらに限定されない。加えて、誘導体は、１つまたは複数の非古典的アミノ酸を含有し得る。

【０２６１】

抗体誘導体はまた、本発明のポリヌクレオチドを送達して、このような抗体、指定された部分、または変異体を、植物部分またはそれらに由来して培養された細胞において産生する、トランスジェニック植物および培養植物細胞（例えば、タバコ、トウモロコシ、およびウキクサであるがこれらに限定されない）を作製することにより調製することもできる。例えば、Ｃｒａｍｅｒら（１９９９年）、Ｃｕｒｒ．　Ｔｏｐ．　Ｍｉｃｒｏｂｏｌ．　Ｉｍｍｕｎｏｌ．、２４０巻：９５～１１８頁、およびこの文献において引用された参考文献は、例えば、誘導性プロモーターを用いる、大量の組換えタンパク質を発現するトランスジェニックのタバコ葉の産生について説明している。トランスジェニックトウモロコシは、他の組換え系で産生されたまたは天然の供給源から精製された哺乳動物タンパク質と等価の生物学的活性を伴う哺乳動物タンパク質を、市販品生産のレベルで発現させ

るのに用いられている。例えば、Ｈｏｏｄら（１９９９年）、Ａｄｖ．　Ｅｘｐ．　Ｍｅｄ．　Ｂｉｏｌ．、４６４巻：１２７～１４７頁、およびこの文献において引用された参考文献を参照されたい。抗体誘導体はまた、タバコの種子および馬鈴薯の塊茎を含め、単鎖抗体（ｓｃＦｖ）などの抗体断片を包含するトランスジェニック植物の種子からも大量に産生されている。例えば、Ｃｏｎｒａｄら（１９９８年）、Ｐｌａｎｔ　Ｍｏｌ．　Ｂｉｏｌ．、３８巻：１０１～１０９頁、およびこの文献において引用された参考文献を参照されたい。したがって、抗体はまた、公知の方法に従いトランスジェニック植物を用いても産生することができる。

【０２６２】

抗体誘導体はまた、例えば、外因性配列を付加して、免疫原性を修飾する、または結合、アフィニティー、オン速度、オフ速度、アビディティー、特異性、半減期、もしくは他の任意の適切な特徴を低減、増強、もしくは修飾することにより産生することもできる。一般に、可変領域および定常領域の非ヒト配列をヒトアミノ酸または他のアミノ酸で置換しながら、非ヒトＣＤＲ配列またはヒトＣＤＲ配列のうちの一部または全部を維持する。

【０２６３】

一般に、ＣＤＲ残基は、抗原の結合への影響に直接的に、かつ、最も実質的に関与している。抗体のヒト化または操作は、米国特許第５，７２３，３２３号；同第５，９７６，８６２号；同第５，８２４，５１４号；同第５，８１７，４８３号；同第５，８１４，４７６号；同第５，７６３，１９２号；同第５，７２３，３２３号；同第５，７６６，８８６号；同第５，７１４，３５２号；同第６，２０４，０２３号；同第６，１８０，３７０号；同第５，６９３，７６２号；同第５，５３０，１０１号；同第５，５８５，０８９号；同第５，２２５，５３９号；および同第４，８１６，５６７号において説明されている方法などであるがそれらに限定されない任意の公知の方法を用いて実施することができる。

【０２６４】

本発明のキメラ抗体、ヒト化抗体、または霊長動物化抗体は、標準的な分子生物学の技法を用いて調製される基準のモノクローナル抗体の配列に基づき調製することができる。重鎖免疫グロブリンおよび軽鎖免疫グロブリンをコードするＤＮＡは、対象のハイブリドーマから得、標準的な分子生物学の技法を用いて、基準以外の（例えば、ヒトの）免疫グロブリン配列を含有するように操作することができる。例えば、キメラ抗体を創出するには、当技術分野において公知の方法（米国特許第４，８１６，５６７号）を用いて、マウス可変領域を、ヒト定常領域に連結することができる。ヒト化抗体を創出するには、当技術分野において公知の方法（米国特許第５，２２５，５３９号、ならびに米国特許第５，５３０，１０１号；同第５，５８５，０８９号；同第５，６９３，７６２号；および同第６，１８０，３７０号）を用いて、マウスＣＤＲ領域を、ヒトフレームワーク内に挿入することができる。同様に、霊長動物化抗体を創出するには、当技術分野において公知の方法（ＷＯ９３／０２１０８およびＷＯ９９／５５３６９）を用いて、マウスＣＤＲ領域を、霊長動物フレームワーク内に挿入することができる。

【０２６５】

当技術分野では、部分ヒト抗体～完全ヒト抗体を作製する技法が公知であり、任意のこのような技法を用いることができる。一実施形態によれば、トランスジェニックマウスにおいて完全ヒト抗体配列を作製し、ヒト重鎖抗体遺伝子およびヒト軽鎖抗体遺伝子を発現させる。異なるクラスの抗体を産生させ得る、複数のこのようなトランスジェニックマウス株が作製されている。所望の抗体を産生しているトランスジェニックマウスに由来するＢ細胞を融合させて、所望の抗体を持続的に産生するためのハイブリドーマ細胞株を作製することができる（例えば、Ｒｕｓｓｅｌら（２０００年）、Ｉｎｆｅｃｔｉｏｎ　ａｎｄ　Ｉｍｍｕｎｉｔｙ、２０００年４月：１８２０～１８２６頁；Ｇａｌｌｏら（２０００年）、Ｅｕｒｏｐｅａｎ　Ｊ．　ｏｆ　Ｉｍｍｕｎ．、３０巻：５３４～５４０頁；Ｇｒｅｅｎ（１９９９年）、Ｊ．　ｏｆ　Ｉｍｍｕｎ．　Ｍｅｔｈｏｄｓ、２３１巻：１１～２３頁；Ｙａｎｇら（１９９９年Ａ）、Ｊ．　ｏｆ　Ｌｅｕｋｏｃｙｔｅ　Ｂｉｏｌｏ

ｇｙ、６６巻：４０１～４１０頁；Ｙａｎｇ（１９９９年Ｂ）、Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓｅａｒｃｈ、５９巻（６号）：１２３６～１２４３頁；Ｊａｋｏｂｏｖｉｔｓ（１９９８年）、Ａｄｖａｎｃｅｄ Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ Ｒｅｖｉｅｗｓ、３１巻：３３～４２頁；ＧｒｅｅｎおよびＪａｋｏｂｏｖｉｔｓ（１９９８年）、Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．、１８８巻（３号）：４８３～４９５頁；Ｊａｋｏｂｏｖｉｔｓ（１９９８年）、Ｅｘｐ．Ｏｐｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔ．Ｄｒｕｇｓ、７巻（４号）：６０７～６１４頁；Ｔｓｕｄａら（１９９７年）、Ｇｅｎｏｍｉｃｓ、４２巻：４１３～４２１頁；Ｓｈｅｒｍａｎ－Ｇｏｌｄ（１９９７年）、Ｇｅｎｅｔｉｃ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ Ｎｅｗｓ、１７巻（１４号）；Ｍｅｎｄｅｚら（１９９７年）、Ｎａｔｕｒｅ Ｇｅｎｅｔｉｃｓ、１５巻：１４６～１５６頁；Ｊａｋｏｂｏｖｉｔｓ（１９９６年）、「Ｗｅｉｒ’ｓ Ｈａｎｄｂｏｏｋ ｏｆ Ｅｘｐｅｒｉｍｅｎｔａｌ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，Ｔｈｅ Ｉｎｔｅｇｒａｔｅｄ Ｉｍｍｕｎｅ Ｓｙｓｔｅｍ」、ＩＶ巻、１９４．１～１９４．７頁；Ｊａｋｏｂｏｖｉｔｓ（１９９５年）、Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｏｐｉｎｉｏｎ ｉｎ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ、６巻：５６１～５６６頁；Ｍｅｎｄｅｚら（１９９５年）、Ｇｅｎｏｍｉｃｓ、２６巻：２９４～３０７頁；Ｊａｋｏｂｏｖｉｔｓ（１９９４年）、Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｂｉｏｌｏｇｙ、４巻（８号）：７６１～７６３頁；Ａｒｂｏｎｅｓら（１９９４年）、Ｉｍｍｕｎｉｔｙ、１巻（４号）：２４７～２６０頁；Ｊａｋｏｂｏｖｉｔｓ（１９９３年）、Ｎａｔｕｒｅ、３６２巻（６４１７号）：２５５～２５８頁；Ｊａｋｏｂｏｖｉｔｓら（１９９３年）、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、９０巻（６号）：２５５１～２５５５頁；および米国特許第６，０７５，１８１号を参照されたい）。

【０２６６】

本発明の抗体はまた、キメラ抗体を創出するように修飾することもできる。キメラ抗体とは、抗体の重鎖および軽鎖の多様なドメインが、複数の種に由来するＤＮＡによりコードされる抗体である。例えば、米国特許第４，８１６，５６７号を参照されたい。

【０２６７】

代替的に、本発明の抗体はまた、ベニア化抗体を創出するように修飾することもできる。ベニア抗体とは、第１の種の抗体が、第２の種において免疫原性とならず、それにより、この抗体の免疫原性を低減するように、１つの種の抗体の外部のアミノ酸残基を、第２の種の外部のアミノ酸残基で慎重に置換または「ベニア化」された抗体である。タンパク質の免疫原性は、主に、その表面の性質に依存するので、別の哺乳動物種の抗体中に通常見いだされる残基とは異なる露出残基を置換することによれば、抗体の免疫原性を低減し得るであろう。このように外部残基を慎重に置換すれば、内部ドメインまたはドメイン間の接合部にはほとんどまたは全く影響が及ばないはずである。したがって、可変領域のフレームワーク残基に限定される変更の結果として、リガンドの結合特性に影響が及ぶことはないはずである。変更するのは抗体の外面または皮膚だけであり、支持残基は攪乱されずに維持されるので、この工程を、「ベニア化」と称する。

【０２６８】

「ベニア化」の手順は、Ｋａｂａｔら（１９８７年）、「Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ」、４版、Ｂｅｔｈｅｓｄａ、Ｍｄ．、Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅｓ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈによりコンパイルされたヒト抗体可変ドメインについての検索可能な配列データ、このデータベースに対する更新、ならびに米国および海外の他の検索可能なデータベース（核酸およびタンパク質両方のデータベース）を活用する。ベニア化抗体を産生するのに用いられる方法の非限定的な例には、ＥＰ５１９５９６、米国特許第６，７９７，４９２号が含まれ、Ｐａｄｌａｎら（１９９１年）、Ｍｏｌ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．、２８巻（４～５号）：４８９～４９８頁においても説明されている。

【０２６９】

「抗体誘導体」という用語はまた、２つの抗原結合部位を伴う小型の抗体断片であって、断片が、同じポリペプチド鎖内の軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）に連結された重鎖可変ドメ

イン（ＶＨ）を含む「ダイアボディー」も包含する（例えば、ＥＰ４０４，０９７；ＷＯ９３／１１１６１；およびＨｏｌｌｉｎｇｅｒら（１９９３年）、Ｐｒｏｃ．　Ｎａｔｌ．　Ａｃａｄ．　Ｓｃｉ．　ＵＳＡ、９０巻：６４４４～６４４８頁を参照されたい）。同じ鎖の２つのドメイン間における対合を可能とするには短すぎるリンカーを用いることにより、これらのドメインは、別の鎖の相補的ドメインと対合し、２つの抗原結合部位を創出することを余儀なくされる（また、１種または複数種のアミノ酸が親抗体の超可変領域内に挿入され、標的抗原に対する結合アフィニティーが、この抗原に対する親抗体の結合アフィニティーの少なくとも約２倍強い抗体変異体について開示する、Ｃｈｅｎらによる米国特許第６，６３２，９２６号も参照されたい）。

【０２７０】

「抗体誘導体」という用語は、操作抗体分子、操作抗体断片、およびｓｃＦｖ、ｄＡｂ、ナノボディー、ミニボディー、ユニボディー、およびアフィボディーなどの操作抗体単一ドメインもさらに包含する（ＨｏｌｌｉｇｅｒおよびＨｕｄｓｏｎ（２００５年）、Ｎａｔｕｒｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈ、２３巻（９号）：１１２６～３６頁；米国特許公開第ＵＳ２００６／０２１１０８８号；ＰＣＴ公開第ＷＯ２００７／０５９７８２号；米国特許第５，８３１，０１２号）。

【０２７１】

「抗体誘導体」という用語は、「直鎖状抗体」もさらに包含する。当技術分野では、直鎖状抗体を作製するための手順が公知であり、Ｚａｐａｔａら（１９９５年）、Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｅｎｇ．、８巻（１０号）：１０５７～１０６２頁においても説明されている。略述すると、これらの抗体は、抗原結合領域の対を形成する、タンデムのＦｄセグメント対（$V_H-C_H1-VH-C_H1$）を含む。直鎖状抗体は、二重特異性の場合もあり、単一特異性の場合もある。

【０２７２】

本発明の抗体は、プロテインＡ精製、硫酸アンモニウム沈殿またはエタノール沈殿、酸抽出、アニオン交換クロマトグラフィーまたはカチオン交換クロマトグラフィー、ホスホセルロースクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、およびレクチンクロマトグラフィーが含まれるがそれらに限定されない公知の方法により、組換え細胞培養物から回収および精製することができる。精製にはまた、高速液体クロマトグラフィー（「ＨＰＬＣ」）も用いることができる。

【０２７３】

本発明の抗体には、天然の精製産生物、化学合成手順の産生物、ならびに、例えば、酵母、高等植物、昆虫、および哺乳動物細胞を含めた真核生物宿主に由来する組換え法、または、代替的に、上記で説明した原核生物宿主に由来する組換え法を介して産生される産生物が含まれる。ＢｉｒｃｈおよびＲａｄｎｅｒ（２００６年）、Ａｄｖ．　Ｄｒｕｇ　Ｄｅｌｉｖｅｒｙ　Ｒｅｖ．、５８巻：６７１～６８５頁では、多くの抗体産生系が説明されている。

【０２７４】

被験抗体が、タンパク質またはポリペプチドと結合すれば、被験抗体と本発明により提供される抗体とは等価である。また、本発明の抗体が、この抗体が通常反応性であるタンパク質またはポリペプチドに結合することを、被験抗体が予防するかどうかを決定することにより、ある抗体が、本発明の抗体と同じ特異性を有するかどうかを、不要な実験なしに決定することも可能である。本発明のモノクローナル抗体による結合の低下により示される通り、被験抗体が、本発明の抗体と競合する場合は、２つの抗体が、同じエピトープまたは近縁のエピトープに結合する可能性が高い。代替的に、本発明の抗体を、それが通常反応性であるタンパク質と共にプレインキュベートして、被験抗体が、抗原に結合するその能力を阻害されるかどうかを決定することができる。被験抗体が阻害されれば、この抗体は、本発明の抗体と同じエピトープ特異性または近縁のエピトープ特異性を有する可能性が極めて高い。

【０２７５】
「抗体」という用語はまた、全ての免疫グロブリンアイソタイプおよび免疫グロブリンサブクラスの抗体を包含することも意図する。モノクローナル抗体の特定のアイソタイプは、最初の融合体から選択することにより直接調製することもでき、Ｓｔｅｐｌｅｗｓｋｉら（１９８５年）、Ｐｒｏｃ．　Ｎａｔｌ．　Ａｃａｄ．　Ｓｃｉ．　ＵＳＡ、８２巻：８６５３頁、またはＳｐｉｒａら（１９８４年）、Ｊ．　Ｉｍｍｕｎｏｌ．　Ｍｅｔｈｏｄｓ、７４巻：３０７頁において説明されている手順を用いてクラススイッチ変異体を単離するためのｓｉｂ選択法を用いることにより、異なるアイソタイプのモノクローナル抗体を分泌する親ハイブリドーマから二次的に調製することもできる。代替的に、組換えＤＮＡ法も用いることができる。

【０２７６】
また、本明細書で説明されるモノクローナル抗体の特異性を伴う他のモノクローナル抗体の単離も、抗イディオタイプ抗体を産生することを介して、当業者により達成され得る（Ｈｅｒｌｙｎら（１９８６年）、Ｓｃｉｅｎｃｅ、２３２巻：１００頁）。抗イディオタイプ抗体とは、対象のモノクローナル抗体において存在する固有の決定基を認識する抗体である。

【０２７７】
本発明の一部の態様では、抗体を検出可能に、または治療的に標識することが有用であろう。適切な標識については、前出で説明されている。当技術分野では、抗体を、これらの作用剤とコンジュゲートする方法が公知である。例示だけを目的として述べると、放射性原子、発色団、フルオロフォアなどの検出可能な部分で抗体を標識することができる。このような標識抗体は、ｉｎ　ｖｉｖｏまたは単離された被験試料における診断法に用いることができる。

【０２７８】
抗体を、低分子量のハプテンに連結することにより、アッセイにおける抗体の感受性を増大させることができる。次いで、第２の反応により、ハプテンを特異的に検出することができる。例えば、アビジンと反応するビオチン、または特定の抗ハプテン抗体と反応し得るジニトロフェノール、ピリドキサール、およびフルオレセインなどのハプテンを用いることが一般的である。ＨａｒｌｏｗおよびＬａｎｅ（１９８８年）、前出を参照されたい。

【０２７９】
ＶＨ　ＣＤＲ　１領域および／もしくはＶＬ　ＣＤＲ　１領域、ＶＨ　ＣＤＲ　２領域および／もしくはＶＬ　ＣＤＲ　２領域、ならびに／またはＶＨ　ＣＤＲ　３領域および／もしくはＶＬ　ＣＤＲ　３領域内のアミノ酸残基を変異させて、抗体の１つまたは複数の結合特性（例えば、アフィニティー）を改善することにより、本発明の抗体の可変領域を修飾することができる。変異は、部位指向性変異誘発またはＰＣＲ媒介変異誘発を介して導入することができ、抗体の結合または対象の他の機能的特性に対する効果は、適切なｉｎ　ｖｉｔｒｏアッセイまたはｉｎ　ｖｉｖｏアッセイにおいて評価することができる。保存的修飾を導入し、ＣＤＲ領域内の１、２、３、４、または５つ以下であることが典型的な残基を変化させることが好ましい。変異は、アミノ酸の置換、付加、または欠失であり得る。

【０２８０】
例えば、１つまたは複数のフレームワーク残基を、対応する生殖細胞系列の配列へと「復帰変異」させることにより、抗体にフレームワーク修飾を施し、免疫原性を低下させることができる。

【０２８１】
加えて、本発明の抗体を操作して、Ｆｃ領域内に、血清半減期、補体の結合、Ｆｃ受容体の結合、および／または抗原依存性細胞傷害作用など、抗体の１つまたは複数の機能的特性を変化させる修飾を包含させることもできる。このような修飾には、軽鎖および重鎖のアセンブリーを容易にする、または抗体の安定性を増大させる、もしくは減少させる、

ヒンジ領域におけるシステイン残基数の変化（米国特許第５，６７７，４２５号）、ならびに抗体の生物学的半減期を短縮する、Ｆｃヒンジ領域におけるアミノ酸の変異（米国特許第６，１６５，７４５号）が含まれるがそれらに限定されない。

【０２８２】

加えて、本発明の抗体は、化学修飾することもできる。例えば、抗体配列内の１つまたは複数のグリコシル化部位を修飾して、抗原に対する抗体のアフィニティーを増大させることにより、抗体のグリコシル化を変化させることができる（米国特許第５，７１４，３５０号；および同第６，３５０，８６１号）。代替的に、抗体依存性細胞介在性細胞傷害作用を増大させるには、グリコシル化機構を変化させた宿主細胞内で抗体を発現させることにより、フコシル残基の量を低減した低フコシル化抗体、またはバイセクティングＧｌｃＮａｃ構造を増大させた抗体を得ることもできる（Ｓｈｉｅｌｄｓ，　Ｒ．　Ｌ．ら、２００２年、Ｊ．　Ｂｉｏｌ．　Ｃｈｅｍ．、２７７巻：２６７３３～２６７４０頁；Ｕｍａｎａら、１９９９年、Ｎａｔ．　Ｂｉｏｔｅｃｈ．、１７巻：１７６～１８０頁）。

【０２８３】

本発明の抗体またはその断片を、１つまたは複数のポリエチレングリコール（ＰＥＧ）基がこの抗体または抗体断片に結合する条件下で、ＰＥＧまたはＰＥＧの反応性エステルもしくはＰＥＧのアルデヒド誘導体と反応させることにより、これらの抗体をペグ化して、生物学的半減期を延長することができる。抗体のペグ化は、反応性のＰＥＧ分子（または類似する反応性の水溶性ポリマー）とのアシル化反応またはアルキル化反応を介して実施することができる。本明細書で用いられる「ポリエチレングリコール」という用語は、モノ（Ｃ１～Ｃ１０）アルコキシポリエチレングリコールもしくはアリールオキシポリエチレングリコールまたはポリエチレングリコールマレイミドなど、他のタンパク質を誘導体化するのに用いられているＰＥＧの形態のいずれかを包含することを意図する。ペグ化される抗体は、非グリコシル化抗体であり得る。当技術分野では、タンパク質をペグ化する方法が公知であり、本発明の抗体に適用することができる（ＥＰ０１５４３１６およびＥＰ０４０１３８４）。

【０２８４】

加えて、抗体の抗原結合領域を、ヒト血清アルブミンなどの血清タンパク質とコンジュゲートする、または融合させることにより、抗体を化学修飾して、結果として得られる分子の半減期を延長することもできる。このような手法は、例えば、ＥＰ０３２２０９４およびＥＰ０４８６５２５において説明されている。

【０２８５】

本発明の抗体またはそれらの断片を、診断薬とコンジュゲートして診断に用い、例えば、疾患の発症または増悪をモニタリングし、所与の処置レジメンの有効性を決定することができる。診断薬の例には、酵素、補欠分子族、蛍光材料、発光材料、生物発光材料、放射性材料、各種の陽電子放射トモグラフィーを用いる陽電子放出性金属、および非放射性常磁性金属イオンが含まれる。検出可能な物質は、抗体またはその断片に直接的に連結またはコンジュゲートすることもでき、当技術分野で公知の技法を用いるリンカーを介して、抗体またはその断片に間接的に連結またはコンジュゲートすることもできる。適切な酵素の例には、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、ベーターガラクトシダーゼ、またはアセチルコリンエステラーゼが含まれる。適切な補欠分子族複合体の例には、ストレプトアビジン／ビオチンおよびアビジン／ビオチンが含まれる。適切な蛍光材料の例には、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、ダンシルクロリド、またはフィコエリトリンが含まれる。発光材料の例には、ルミノールが含まれる。生物発光材料の例には、ルシフェラーゼ、ルシフェリン、およびエクオリンが含まれる。適切な放射性材料の例には、^{125}Ｉ、^{131}Ｉ、インジウム１１１、ルテチウム１７１、ビスマス２１２、ビスマス２１３、アスタチン２１１、銅６２、銅６４、銅６７、イットリウム９０、ヨウ素１２５、ヨウ素１３１、リン３２、リン３３、スカンジウム４７、銀１１１、ガリウム６７、プラセオジム１４２、サマリウム１５３、テルビウム１６１、ジスプロシウ

ム１６６、ホルミウム１６６、レニウム１８６、レニウム１８８、レニウム１８９、鉛２１２、ラジウム２２３、アクチニウム２２５、鉄５９、セレン７５、ヒ素７７、ストロンチウム８９、モリブデン９９、ロジウム１０５、パラジウム１０９、プラセオジム１４３、プロメチウム１４９、エルビウム１６９、イリジウム１９４、金１９８、金１９９、および鉛２１１が含まれる。モノクローナル抗体は、これらの抗体に共有結合する二官能性のキレート化剤を用いることにより、放射性金属イオンと間接的にコンジュゲートすることができる。キレート化剤は、アミン（Ｍｅａｒｅｓら、１９８４年　Ａｎａｌ．　Ｂｉｏｃｈｅｍ．、１４２巻：６８～７８頁）、アミノ酸残基のスルフヒドラール基（Ｋｏｙａｍａ、１９９４年、Ｃｈｅｍ．　Ａｂｓｔｒ．、１２０巻：２１７２６２ｔ頁）、および炭水化物基（Ｒｏｄｗｅｌｌら、１９８６年、ＰＮＡＳ　ＵＳＡ、８３巻：２６３２～２６３６頁；Ｑｕａｄｒｉら、１９９３年、Ｎｕｃｌ．　Ｍｅｄ．　Ｂｉｏｌ．、２０巻：５５９～５７０頁）を介して結合させることができる。

【０２８６】

さらに、本発明の抗体またはそれらの断片は、治療薬とコンジュゲートすることもできる。適切な治療薬には、タキソール、シトカラシンＢ、グラミシジンＤ、臭化エチジウム、エメチン、マイトマイシン、エトポシド、テノポシド、ビンクリスチン、ビンブラスチン、コルヒチン、ドキソルビシン、ダウノルビシン、ジヒドロキシアントラシンジオン、ミトキサントロン、ミトラマイシン、アクチノマイシンＤ、１－デヒドロテストステロン、グルココルチコイド、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロール、およびピューロマイシン、抗代謝剤（メトトレキサート、６－メルカプトプリン、６－チオグアニン、シタラビン、フルダラビン、５－フルオロウラシル、デカルバジン、ヒドロキシウレア、アスパラギナーゼ、ゲムシタビン、クラドリビンなど）、アルキル化剤（メクロレタミン、チオエパ、クロラムブシル、メルファラン、カルムスチン（ＢＳＮＵ）、ロムスチン（ＣＣＮＵ）、シクロホスファミド、ブスルファン、ジブロモマンニトール、ストレプトゾトシン、ダカルバジン（ＤＴＩＣ）、プロカルバジン、マイトマイシンＣ、シスプラチン、および、カルボプラチンなど他の白金誘導体）、抗生薬（ダクチノマイシン（旧称：アクチノマイシン）、ブレオマイシン、ダウノルビシン（旧称：ダウノマイシン）、ドキソルビシン、イダルビシン、ミトラマイシン、マイトマイシン、ミトキサントロン、プリカマイシン、アントラマイシン（ＡＭＣ））、ジフテリア毒素および類縁分子（ジフテリア毒素Ａ鎖、およびその活性断片、ならびにハイブリッド分子など）、リシン毒素（リシン毒素Ａまたは脱グリコシル化リシン毒素Ａ鎖など）、コレラ毒素、志賀様毒素（ＳＬＴ－Ｉ、ＳＬＴ－ＩＩ、ＳＬＴ－ＩＩＶ）、ＬＴ毒素、Ｃ３毒素、志賀毒素、百日咳毒素、破傷風毒素、ダイズボーマン－バークプロテアーゼ阻害剤、Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ属外毒素、アロリン、サポリン、モデクシン、ゲラニン、アブリンＡ鎖、モデクシンＡ鎖、アルファ－サルシン、Ａｌｅｕｒｉｔｅｓ　ｆｏｒｄｉｉタンパク質、ジアンチンタンパク質、Ｐｈｙｔｏｌａｃｃａ　ａｍｅｒｉｃａｎａタンパク質（ＰＡＰＩ、ＰＡＰＩＩ、およびＰＡＰ－Ｓ）、Ｍｏｍｏｒｄｉｃａ　ｃｈａｒａｎｔｉａ阻害剤、クルシン、クロチン、Ｓａｐａｏｎａｒｉａ　ｏｆｆｉｃｉｎａｌｉｓ阻害剤、ゲロニン、マイトゲリン、レストリクトシン、フェノマイシン、エノマイシン毒素、および混合毒素が含まれる。

【０２８７】

追加的な適切なコンジュゲートされた分子には、リボヌクレアーゼ（ＲＮアーゼ）、ＤＮアーゼＩ、アンチセンス核酸、ｓｉＲＮＡ分子などの阻害性ＲＮＡ分子、免疫賦活性核酸、アプタマー、リボザイム、三重鎖形成分子、および外部ガイド配列が含まれる。アプタマーとは、ステムループまたはＧカルテットなど、規定の二次構造および三次構造へとフォールディングされる、１５～５０塩基の範囲の長さの低分子核酸であり、ＡＴＰ（米国特許第５，６３１，１４６号）およびテオフィリン（米国特許第５，５８０，７３７号）などの低分子のほか、逆転写酵素（米国特許第５，７８６，４６２号）およびトロンビン（米国特許第５，５４３，２９３号）などの高分子にも結合し得る。リボザイムとは、化学反応を分子内的にまたは分子間的に触媒することが可能な核酸分子である。リボザイ

ムは、その後に切断される標的基質を認識し、それに結合することにより、核酸基質を切断することが典型的である。三重鎖形成機能を有する核酸分子は、三重鎖を形成することにより二本鎖核酸と相互作用する場合もあり、一本鎖核酸と相互作用する場合もあり、この場合、ＤＮＡの三本鎖は、ワトソン－クリックによる塩基対合およびフーグスティーンによる塩基対合の両方に依存して複合体を形成する。三重鎖分子は、高度なアフィニティーおよび特異性により、標的領域と結合し得る。

【０２８８】

機能性核酸分子は、標的分子により保有される特異的活性のエフェクター、阻害剤、調節剤、および刺激剤として作用する場合もあり、他の分子には依存しない新規の活性を保有する場合もある。利用可能な多数の方法のうちのいずれかを用いて、治療薬を、直接的にまたは間接的に、抗体に連結することができる。例えば、作用剤を、還元した抗体成分のヒンジ領域に、Ｎ－スクシニル－３－（２－ピリジルジチオ）プロピオネート（ＳＰＤＰ）などの架橋形成剤を用いるジスルフィド結合形成を介して結合させることもでき、抗体のＦｃ領域における炭水化物部分を介して結合させることもできる（Ｙｕら、１９９４年、Ｉｎｔ．Ｊ．Ｃａｎｃｅｒ、５６巻：２４４頁；Ｕｐｅｓｌａｃｉｓら、「Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ ａｎｄ ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ」内の「Ｍｏｄｉｆｉｃａｔｉｏｎ ｏｆ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ ｂｙ Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｍｅｔｈｏｄｓ」、Ｂｉｒｃｈら（編）、１８７～２３０頁（Ｗｉｌｅｙ－Ｌｉｓｓ，Ｉｎｃ．、１９９５年）；Ｐｒｉｃｅ、「Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ｐｒｏｄｕｃｔｉｏｎ，ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ ａｎｄ ｃｌｉｎｉｃａｌ ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎ」内の「Ｐｒｏｄｕｃｔｉｏｎ ａｎｄ Ｃｈａｒａｃｔｅｒｉｚａｔｉｏｎ ｏｆ Ｓｙｎｔｈｅｔｉｃ Ｐｅｐｔｉｄｅ－Ｄｅｒｉｖｅｄ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ」、Ｒｉｔｔｅｒら（編）、６０～８４頁（Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｐｒｅｓｓ、１９９５年））。

【０２８９】

治療薬を抗体とコンジュゲートする技法は、周知である（Ａｍｏｎら、「Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ Ａｎｄ Ｃａｎｃｅｒ Ｔｈｅｒａｐｙ」内の「Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ Ｆｏｒ Ｉｍｍｕｎｏｔａｒｇｅｔｉｎｇ Ｏｆ Ｄｒｕｇｓ Ｉｎ Ｃａｎｃｅｒ Ｔｈｅｒａｐｙ」、Ｒｅｉｓｆｅｌｄら（編）、２４３～５６頁（Ａｌａｎ Ｒ．Ｌｉｓｓ，Ｉｎｃ．、１９８５年）；Ｈｅｌｌｓｔｒｏｍら、「Ｃｏｎｔｒｏｌｌｅｄ Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ」（２版）内の「Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ Ｆｏｒ Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ」、Ｒｏｂｉｎｓｏｎら（編）、６２３～５３頁（Ｍａｒｃｅｌ Ｄｅｋｋｅｒ，Ｉｎｃ．、１９８７年）；Ｔｈｏｒｐｅ、「Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ ’８４：Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ Ａｎｄ Ｃｌｉｎｉｃａｌ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ」内の「Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｃａｒｒｉｅｒｓ Ｏｆ Ｃｙｔｏｔｏｘｉｃ Ａｇｅｎｔｓ Ｉｎ Ｃａｎｃｅｒ Ｔｈｅｒａｐｙ：Ａ Ｒｅｖｉｅｗ」、Ｐｉｎｃｈｅｒａら（編）、４７５～５０６頁（１９８５年）；「Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ Ｆｏｒ Ｃａｎｃｅｒ Ｄｅｔｅｃｔｉｏｎ Ａｎｄ Ｔｈｅｒａｐｙ」内の「Ａｎａｌｙｓｉｓ，Ｒｅｓｕｌｔｓ，Ａｎｄ Ｆｕｔｕｒｅ Ｐｒｏｓｐｅｃｔｉｖｅ Ｏｆ Ｔｈｅ Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃ Ｕｓｅ Ｏｆ Ｒａｄｉｏｌａｂｅｌｅｄ Ａｎｔｉｂｏｄｙ ｉｎ Ｃａｎｃｅｒ Ｔｈｅｒａｐｙ」、Ｂａｌｄｗｉｎら（編）、３０３～１６頁（Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ、１９８５年）；およびＴｈｏｒｐｅら、「Ｔｈｅ Ｐｒｅｐａｒａｔｉｏｎ Ａｎｄ Ｃｙｔｏｔｏｘｉｃ Ｐｒｏｐｅｒｔｉｅｓ Ｏｆ Ａｎｔｉｂｏｄｙ－Ｔｏｘｉｎ Ｃｏｎｊｕｇａｔｅｓ」、１９８２年、Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｒｅｖ．、６２巻：１１９～５８頁）。

【０２９０】

本発明の抗体またはそれらの抗原結合領域は、別の抗体または受容体のリガンドなど、別の機能性分子に連結して、少なくとも２種以上の異なる結合部位または標的分子に結合する、二重特異性分子または多重特異性分子を産生することができる。抗体を、別の抗体

、抗体断片、ペプチド、または結合模倣体など、１種または複数種の他の結合分子に連結することは、例えば、化学的連結、遺伝子融合、または非共有結合的会合を介して行うことができる。多重特異性分子は、第１および第２の標的エピトープに加えて、第３の結合特異性をさらに包含し得る。

【０２９１】

当技術分野で公知の方法を用いて、二重特異性分子および多重特異性分子を調製することができる。例えば、二重特異性分子の結合単位を個別に産生し、次いで、これらを互いとコンジュゲートすることができる。結合分子がタンパク質またはペプチドである場合は、各種の連結剤または架橋形成剤を、共有結合的コンジュゲーションに用いることができる。架橋形成剤の例には、プロテインＡ、カルボジイミド、Ｎ－スクシンイミジル－Ｓ－アセチル－チオアセテート（ＳＡＴＡ）、５，５’－ジチオビス（２－ニトロ安息香酸）（ＤＴＮＢ）、ｏ－フェニレンジマレイミド（ｏＰＤＭ）、Ｎ－スクシンイミジル－３－（２－ピリジルジチオ）プロピオネート（ＳＰＤＰ）、およびスルホスクシンイミジル４－（Ｎ－マレイミドメチル）シクロヘキサン－Ｉ－カルボキシレート（スルホ－ＳＭＣＣ）（Ｋａｒｐｏｖｓｋｙら、１９８４年、Ｊ．　Ｅｘｐ．　Ｍｅｄ．、１６０巻：１６８６頁；Ｌｉｕら、１９８５年、Ｐｒｏｃ．　Ｎａｔｌ．　Ａｃａｄ．　Ｓｃｉ．　ＵＳＡ、８２巻：８６４８頁）が含まれる。結合分子が抗体である場合は、２つの重鎖のＣ末端のヒンジ領域をスルフヒドリル結合させることにより、それらをコンジュゲートすることができる。

【０２９２】

本発明の抗体またはそれらの断片は、この抗体が結合して「枯渇」抗体を形成する、細胞に対して毒性である部分に連結することができる。これらの抗体は、ＮＫ細胞を枯渇させることが所望される適用において、特に有用である。

【０２９３】

本発明の抗体はまた、固体支持体に結合させることもでき、これはイムノアッセイまたは標的抗原の精製に特に有用である。このような固体支持体には、ガラス、セルロース、ポリアクリルアミド、ナイロン、ポリスチレン、ポリ塩化ビニル、またはポリプロピレンが含まれるがそれらに限定されない。

【０２９４】

抗体はまた、多くの異なるキャリアにも結合させることができる。したがって、本発明はまた、抗体および活性または不活性な別の物質を含有する組成物も提供する。周知のキャリアの例には、ガラス、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリエチレン、デキストラン、ナイロン、アミラーゼ、天然セルロースおよび修飾セルロース、ポリアクリルアミド、アガロース、およびマグネタイトが含まれる。キャリアの性質は、本発明の目的に応じて、可溶性の場合もあり、不溶性の場合もある。当業者は、モノクローナル抗体を結合させるのに適する他のキャリアについても承知している、または日常的な実験を用いて、このようなキャリアを確認し得るであろう。

【０２９５】

樹状細胞を含めたＡＰＣの単離、培養、および増殖

本発明はまた、本発明の単離されたポリペプチドもしくは単離されたポリヌクレオチドまたはベクターのうちの１つまたは複数を含む、単離された宿主細胞も提供する。一態様では、単離された宿主細胞が、抗原提示細胞（ＡＰＣ）、例えば、樹状細胞などの真核細胞である。別の態様では、単離された宿主細胞が、原核細胞である。一態様では、本発明が、ポリヌクレオチドの発現を促進する条件下で培養される、単離された宿主細胞である。本発明はまた、宿主細胞、発現系、およびこの発現系を介して産生されるポリペプチドも提供する。

【０２９６】

以下は、ＡＰＣを単離するための２つの基本的手法についての簡単な説明である。これらの手法は、（１）血液から骨髄前駆細胞（ＣＤ３４$^{+}$細胞）を単離し、これらを刺激してＡＰＣへと分化させること、または（２）末梢血から、あらかじめ成熟させたＡＰＣを

回収することを伴う。第１の手法では、患者を、ＧＭ－ＣＳＦなどのサイトカインで処置して、末梢血中の循環ＣＤ３４$^{+}$幹細胞数を増大させる。

【０２９７】

ＡＰＣを単離する第２の手法は、すでに血液中を循環している、比較的多数のあらかじめ成熟させたＡＰＣを回収する手法である。ヒト末梢血から成熟させたＡＰＣを単離する従来の技法は、メトリザミド勾配および付着／非付着ステップ（Ｆｒｅｕｄｅｎｔｈａｌら（１９９０年）、ＰＮＡＳ、８７巻：７６９８～７７０２頁）、Ｐｅｒｃｏｌｌ勾配法による分離（Ｍｅｈｔａ－Ｄａｍａｎｉら（１９９４年）、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．、１５３巻：９９６～１００３頁）、および蛍光活性化細胞分取法（Ｔｈｏｍａｓら（１９９３年）、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．、１５１巻：６８４０～５２頁）などの物理的手順の組合せを伴っている。

【０２９８】

多数の細胞を互いから分離する１つの技法は、向流遠心分離法（ＣＣＥ）として公知である。細胞試料を、特別なエルトリエーションローターに入れる。次いで、ローターを、一定速度、例えば、３０００ｒｐｍでスピンさせる。ローターが所望の速度に達したら、加圧空気を用いて、細胞の流速を制御する。エルトリエーター内の細胞は、遠心力と、流速を一定に増大させつつある緩衝液のウォッシュアウト流との下に同時に置かれる。この結果として、大部分は細胞サイズの差違に基づくが、もっぱらそれに基づくわけではない、細胞画分への分離がもたらされる。

【０２９９】

本発明の一態様では、ＡＰＣが、あらかじめ成熟させた樹状細胞または成熟樹状細胞であり、マウス、サル、またはヒトなど、哺乳動物の白血球画分から単離され得る（例えば、ＷＯ９６／２３０６０を参照されたい）。白血球画分は、哺乳動物の末梢血に由来し得る。この方法は、以下のステップ：（ａ）白血球除去法など、当技術分野で公知の方法により、哺乳動物供給源から得た白血球画分を供給するステップ、（ｂ）向流遠心分離法により、ステップ（ａ）の白血球画分を、４つ以上の亜画分へと分離するステップ、（ｃ）樹状細胞をカルシウムイオノフォア、ＧＭ－ＣＳＦ、およびＩＬ－１３、またはＧＭ－ＣＳＦおよびＩＬ－４と接触させることにより、ステップ（ｂ）に由来する１つまたは複数の画分中の単球を樹状細胞へと転換することを刺激するステップ、（ｄ）ステップ（ｃ）に由来する樹状細胞に富む画分を同定するステップ、ならびに（ｅ）好ましくは、約４℃でステップ（ｄ）の濃縮された画分を回収するステップを包含する。樹状細胞に富む画分を同定する１つの方法は、蛍光活性化細胞分取を介する。白血球画分は、組換え型のヒト（ｒｈ）ｒｈＩＬ－１２、ｒｈＧＭ－ＣＳＦ、またはｒｈＩＬ－４など、他のサイトカインの存在下において、カルシウムイオノフォアで処理することができる。白血球画分の細胞を緩衝液中で洗浄し、Ｃａ$^{++}$／Ｍｇ$^{++}$を含まない培地中に懸濁させてから、分離ステップを行うことができる。白血球画分は、白血球除去法により得ることができる。樹状細胞は、以下のマーカー：ＨＬＡ－ＤＲ、ＨＬＡ－ＤＱ、またはＢ７．２のうちの少なくとも１つの存在、および以下のマーカー：ＣＤ３、ＣＤ１６、ＣＤ５６、ＣＤ５７、およびＣＤ１９、ＣＤ２０の同時的な非存在により同定することができる。これらの細胞表面マーカーに対して特異的なモノクローナル抗体は、市販されている。

【０３００】

より具体的に述べると、方法は、濃縮された白血球および血小板のコレクションを白血球除去法により回収し、次いで、これを、向流遠心分離法（ＣＣＥ）によりさらに画分化することを必要とする（Ａｂｒａｈａｍｓｅｎら（１９９１年）、Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ａｐｈｅｒｅｓｉｓ．、６巻：４８～５３頁）。この技法では、細胞を、遠心力と、流速を一定に増大させつつある緩衝液のウォッシュアウト流との下に同時に置く。一定に逆流の流速を増大させる緩衝液により、大部分は細胞サイズに基づく細胞画分への分離がもたらされる。

【０３０１】

ＡＰＣコレクション、および、より具体的に述べると、ＤＣコレクションの品質管理、

ならびにそれらの活性化が培養物中で成功したことの確認は、単球および樹状細胞亜集団の両方のほか、夾雑の可能性があるＴリンパ球をモニタリングする、同時的な多色ＦＡＣＳ解析法に依存する。細胞分取は、ＣＤ３（Ｔ細胞）、ＣＤ１６／ＣＤ５６／ＣＤ５７（ＮＫ細胞／ＬＡＫ細胞）、およびＣＤ１９／ＣＤ２０（Ｂ細胞）を含めた細胞表面マーカーの示差的発現に基づく。ＤＣは、ＤＣと比較して単球において極めて高レベルで発現するＣＤ１４のレベルに部分的に基づき、単球から同定可能である。ＤＣは、それらが血液中を循環するときに、高レベルのＨＬＡ－ＤＲ発現、著明なＨＬＡ－ＤＱおよびＢ７．２（しかし、Ｂ７．１はわずかである、または全く見られない）を示す（加えて、ＤＣは、単球および好中球もまた発現するＬｅｕ　Ｍ７マーカーおよびＬｅｕ　Ｍ９マーカー、ミエロイドマーカーも発現する）。

【０３０２】

死滅細胞を解析するための第３の着色試薬であるヨウ化プロピジウム（ＰＩ）と組み合わせると、全ての細胞亜集団の確実な同定を行うことが可能となる。

【０３０３】

回収時におけるＦＡＣＳ解析の目標は、ＤＣが、予測される画分において豊富であることを確認し、好中球の夾雑をモニタリングし、適切なマーカーが発現していることを確認することである。この、臨床適用に適する、ヒト末梢血に由来する濃縮されたＤＣの迅速なバルクコレクションは、品質管理について上記で説明した解析的ＦＡＣＳ法に絶対的に依存している。必要であれば、この時点で、「カクテル陰性」細胞についての蛍光分取により、成熟ＤＣを単球から即座に分離することができる。単球自体は、培養物中で、ＤＣまたは機能性のＤＣ様細胞へと分化することがなおも可能であるため、ＤＣを単球から常法に従って分離することは必要でない場合がある。

【０３０４】

回収したら、ＤＣに富むＡＰＣ画分／単球によるＡＰＣ画分（通常、１５０～１９０）をプールし、将来の使用のために凍結保存する、または即座に短時間の培養物中に入れる。

【０３０５】

代替的に、他の研究者らは、樹状細胞を上方制御（活性化）し、単球を活性化樹状細胞の表現型へと転換する方法について報告している。この方法は、カルシウムイオノフォアを培養培地に添加して、単球を、活性化樹状細胞へと転換することを伴う。例えば、カルシウムイオノフォアであるＡ２３１８７を、２４～４８時間の培養時間の最初に添加したところ、プールされた「単球およびＤＣ」画分が、一様に活性化され、樹状細胞の表現型へと転換することが結果としてもたらされた：活性化された集団は、一様にＣＤ１４（Ｌｅｕ　Ｍ３）陰性であり、ＨＬＡ－ＤＲ、ＨＬＡ－ＤＱ、ＩＣＡＭ－１、Ｂ７．１、およびＢ７．２を上方制御することが特徴的である。さらに、この活性化バルク集団は、さらに精製された少数ベースでも良好に機能する。

【０３０６】

特定のサイトカインの組合せ（複数可）を用いて、カルシウムイオノフォアにより達成された活性化／転換を増幅（または部分的に置換）することに成功した：これらのサイトカインには、精製されたまたは組換え型のヒト（「ｒｈ」）ｒｈＧＭ－ＣＳＦ、ｒｈＩＬ－２、およびｒｈＩＬ－４が含まれるがそれらに限定されない。各サイトカインは、単独で与えられると、最適な上方制御に不十分である。

【０３０７】

ＡＰＣに対する抗原提示

免疫化を目的として、ポリペプチド（例えば、配列番号１～３３）を、タンパク質／ペプチドとして、またはタンパク質／ペプチドをコードするｃＤＮＡの形態で、抗原提示細胞へと送達することができる。抗原提示細胞（ＡＰＣ）は、樹状細胞（ＤＣ）、単球／マクロファージ、Ｂリンパ球、または必要なＭＨＣ／共賦活化分子を発現する他の細胞型（複数可）からなる可能性がある。以下で説明される方法は、主に、最も強力であり、最も好ましいＡＰＣであるＤＣに焦点を絞る。

【０３０８】
ＡＰＣを、本発明の抗原性タンパク質または抗原性ポリペプチド（複数可）へと曝露することにより、ｉｎ　ｖｉｔｒｏ／ｅｘ　ｖｉｖｏにおいてパルシングを達成する。１～１０μＭの濃度で、約３時間にわたり、タンパク質またはペプチド（複数可）をＡＰＣに添加する。抗原または抗原性ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドによるＡＰＣのトランスフェクションは、カチオン性脂質が含まれるがそれらに限定されない、当技術分野で公知のトランスフェクション剤の存在下において、ＡＰＣを、核酸へと曝露することにより達成する。トランスフェクトまたはパルスされたＡＰＣは、その後、静脈内経路、皮下経路、鼻腔内経路、筋肉内経路、または腹腔内経路などの送達経路を介して、宿主へと投与することができる。

【０３０９】
タンパク質／ペプチド抗原はまた、ｉｎ　ｖｉｖｏにおいて、アジュバントと共に、静脈内経路、皮下経路、鼻腔内経路、筋肉内経路、または腹腔内経路などの送達経路を介して送達することもできる。

【０３１０】
フォスター抗原提示細胞
フォスター抗原提示細胞は、標的細胞として特に有用である。フォスターＡＰＣは、その抗原プロセシング経路において、細胞表面ＭＨＣクラスＩ分子との内因性ペプチドの会合を制限する変異を含有する、Ｔ２と称されるヒト細胞株１７４Ｘ　ＣＥＭ．Ｔ２に由来する（Ｚｗｅｅｒｉｎｋら（１９９３年）、Ｊ．　Ｉｍｍｕｎｏｌ．、１５０巻：１７６３～１７７１頁）。これは、ＭＨＣクラスＩ拘束性ＣＤ８$^{+}$ＣＴＬに対する抗原提示に必要とされる遺伝子であるＴＡＰ１遺伝子、ＴＡＰ２遺伝子、ＬＭＰ１遺伝子、およびＬＭＰ２遺伝子を包含する、ＭＨＣクラスＩＩ領域の大規模なホモ接合性欠失に起因する。事実上、「空の」ＭＨＣクラスＩ分子だけが、これらの細胞表面に提示される。培養培地に添加される外因性ペプチドは、それが対立遺伝子特異的な結合モチーフを含有する限り、これらのＭＨＣ分子に結合する。本明細書では、これらのＴ２細胞を、「フォスター」ＡＰＣと称する。これらを本発明と共に用いて、抗原（複数可）を提示させることができる。

【０３１１】
特異的な組換え型のＭＨＣの対立遺伝子をＴ２細胞に形質導入することにより、ＭＨＣ拘束性プロファイルの方向付けを変化させることが可能となる。アンカー残基が、内因性対立遺伝子への効率的な結合を予防するため、組換え型の対立遺伝子に調整されたライブラリーが、Ｔ２細胞により優先的に提示される。

【０３１２】
ＭＨＣ分子を高レベルで発現させることにより、ＡＰＣが、ＣＴＬに対してより明確に提示される。対象のＭＨＣ対立遺伝子を、Ｔ２細胞において、強力な転写プロモーター（例えば、ＣＭＶプロモーター）を用いて発現させる結果として、より反応性の高いＡＰＣが得られる（細胞表面における反応性ＭＨＣ－ペプチド複合体の濃度が上昇することに起因する可能性が極めて高い）。

【０３１３】
免疫エフェクター細胞の増殖
本発明は、これらのＡＰＣを活用して、抗原特異的免疫エフェクター細胞に富む集団の産生を刺激する。抗原特異的免疫エフェクター細胞は、培養物中で死滅するＡＰＣを代償として増殖する。ナイーブ免疫エフェクター細胞が、他の細胞により訓練される過程については、Ｃｏｕｌｉｅ（１９９７年）、Ｍｏｌｅｃ．　Ｍｅｄ．　Ｔｏｄａｙ、３巻：２６１～２６８頁において本質的に説明されている。

【０３１４】
上記で説明した通りに調製されたＡＰＣを、ナイーブ免疫エフェクター細胞と混合する。これらの細胞は、サイトカイン、例えば、ＩＬ２の存在下で培養し得ることが好ましい。樹状細胞は、ＩＬ１２などの強力な免疫賦活性サイトカインを分泌するため、初回およ

び後続の増殖ラウンドでは、補充のサイトカインを追加する必要はない場合がある。いずれにせよ、培養条件は、抗原特異的免疫エフェクター細胞を、ＡＰＣよりはるかに高速度で増殖（ｅｘｐａｎｄ）（すなわち、増殖（ｐｒｏｌｉｆｅｒａｔｅ））させるような条件とする。抗原特異的細胞集団をさらに増殖させるために、ＡＰＣおよび任意選択のサイトカインの複数回にわたる注入を実施することができる。

【０３１５】

一実施形態では、免疫エフェクター細胞がＴ細胞である。別個の実施形態では、例えば、ＩＬ－２、ＩＬ－１１、またはＩＬ－１３をコードするトランス遺伝子による形質導入を介して、免疫エフェクター細胞を遺伝子改変することができる。当技術分野では、ｉｎ　ｖｉｔｒｏ、ｅｘ　ｖｉｖｏ、およびｉｎ　ｖｉｖｏにおいてトランス遺伝子を導入する方法が公知である。

【０３１６】

抗体による機能解析

本発明の抗体を用いて、本発明のポリペプチドを精製し、生物学的に等価のポリペプチドおよび／またはポリヌクレオチドを同定することができる。本発明の抗体はまた、本発明のポリペプチドの機能を修飾する作用剤を同定するのにも用いることもできる。これらの抗体には、ポリクローナル抗血清、モノクローナル抗体、および当業者が精通しており、上記でも説明した調製物に由来する各種の試薬が含まれる。

【０３１７】

同定された遺伝子によりコードされるタンパク質の活性を中和する抗体もまた、このような中和抗体を、ｉｎ　ｖｉｖｏおよびｉｎ　ｖｉｔｒｏにおける試験系へと添加することにより、ｉｎ　ｖｉｖｏおよびｉｎ　ｖｉｔｒｏにおいて用いて機能を裏付けることができる。このような中和抗体はまた、本発明のポリペプチドの活性を調節するための薬剤としても有用である。

【０３１８】

各種の抗体調製物はまた、同定された遺伝子によりコードされるタンパク質を、被験細胞が、ｉｎ　ｖｉｔｒｏまたはｉｎ　ｖｉｖｏにおいて発現することを裏付けるために、ＥＬＩＳＡアッセイまたはウェスタンブロットなどの分析法においても用いることができる。代謝時におけるプロテアーゼ分解により産生されるこのようなタンパク質の断片はまた、実験試料に由来する試料と共に、適切なポリクローナル抗血清を用いることによっても同定することができる。

【０３１９】

本発明の抗体は、単独でワクチン接種またはワクチン接種の追加投与に用いることもでき、ペプチドもしくはタンパク質ベースのワクチン、または樹状細胞ベースのワクチンと組み合わせてワクチン接種またはワクチン接種の追加投与に用いることもできる。

【０３２０】

組成物

組成物がさらに提供される。組成物は、キャリアと、本発明の単離されたポリペプチド、本発明の単離されたポリヌクレオチド、本発明のベクター、本発明の単離された宿主細胞、低分子、または本発明の抗体のうちの１つまたは複数とを含む。キャリアは、固体支持体または薬学的に許容されるキャリアのうちの１つまたは複数であり得る。組成物は、ワクチンとしての投与に適するアジュバントまたは他の成分をさらに含み得る。一態様では、組成物を、１種または複数種の薬学的に許容される賦形剤、希釈剤、キャリア、および／またはアジュバントと共に処方する。加えて、本発明の組成物についての実施形態は、１種または複数種の薬学的に許容される補助物質と共に処方された、本発明の単離されたポリペプチド、本発明の単離されたポリヌクレオチド、本発明のベクター、低分子、本発明の単離された宿主細胞、または本発明の抗体のうちの１つまたは複数も包含する。

【０３２１】

経口調製物の場合、本明細書で説明される単離されたもしくは組換え型のポリペプチド、本明細書で説明される単離されたもしくは組換え型のポリヌクレオチド、本明細書で説

明されるベクター、本明細書で説明される単離された宿主細胞、低分子、または本明細書で説明される抗体のうちの任意の１つまたは複数を、単独で用いることもでき、錠剤、粉末、顆粒、またはカプセルを作製するのに適切な添加剤と組み合わせた化合物、例えば、ラクトース、マンニトール、トウモロコシデンプン、またはバレイショデンプンなど、従来の添加剤；微晶質セルロース（ｃｒｙｓｔａｌｌｉｎｅ　ｃｅｌｌｕｌｏｓｅ）、セルロース誘導体、アカシアガム、トウモロコシデンプン、またはゼラチンなどの結合剤；トウモロコシデンプン、バレイショデンプン、またはカルボキシメチルセルロースナトリウムなどの崩壊剤；滑石またはステアリン酸マグネシウムなどの潤滑剤；ならびに、所望の場合は、希釈剤、緩衝剤、保湿剤、防腐剤、および芳香剤と組み合わせた化合物を含む、またはこの化合物から本質的になる医薬処方物中で用いることもできる。薬学的に適合性の結合剤および／またはアジュバント材料は、組成物の一部として組み入れることができる。錠剤、丸薬、カプセル、トローチなどは、以下の成分または類似の性質の化合物：微晶質セルロース、トラガカントガム、もしくはゼラチンなどの結合剤；デンプンもしくはラクトースなどの賦形剤；アルギン酸、Ｐｒｉｍｏｇｅｌ、もしくはトウモロコシデンプンなどの崩壊剤；ステアリン酸マグネシウムもしくはＳｔｅｒｏｔｅｓなどの潤滑剤；コロイド性二酸化ケイ素などの流動促進剤；スクロースもしくはサッカリンなどの甘味剤；またはペパーミント、サリチル酸メチル、もしくはオレンジ芳香剤などの芳香剤のうちのいずれかを含有し得る。

【０３２２】

経口投与に適する医薬処方物および単位用量形態は、慢性状態、感染症の処置、および患者が薬物を自己投与する療法において特に有用である。一態様では、処方物が、小児科投与に特異的である。

【０３２３】

本発明は、本発明の単離されたポリペプチド、本発明の単離されたポリヌクレオチド、本発明のベクター、本発明の単離された宿主細胞、または本発明の抗体のうちの１つまたは複数を、水性溶媒、あるいは植物油もしくは他の類似の油、合成脂肪酸グリセリド、高分子脂肪酸のエステル、またはプロピレングリコールなどの非水性溶媒中で、かつ、所望の場合は、可溶化剤、等張剤、懸濁剤、乳化剤、安定化剤および防腐剤、または他の抗菌薬など、従来の添加剤と共に、溶解させる、懸濁させる、または乳化させることにより、本発明に従い注射するための調製物へと処方することができる。このような添加剤の非限定的な例は、表面抗原、例えば、ＯＭＰ　Ｐ５タンパク質、ｒｓＰｉｌＡタンパク質、ＯＭＰ　２６タンパク質、ＯＭＰ　Ｐ２タンパク質、またはＩＶ型ピリンタンパク質（ＪｕｒｃｉｓｅｋおよびＢａｋａｌｅｔｚ（２００７年）、Ｊ．　ｏｆ　Ｂａｃｔｅｒｉｏｌｏｇｙ、１８９巻（１０号）：３８６８～３８７５頁；ならびにＭｕｒｐｈｙ，　ＴＦ、Ｂａｋａｌｅｔｚ，　ＬＯ、およびＳｍｅｅｓｔｅｒｓ，　ＰＲ（２００９年）、Ｔｈｅ　Ｐｅｄｉａｔｒｉｃ　Ｉｎｆｅｃｔｉｏｕｓ　Ｄｉｓｅａｓｅ　Ｊｏｕｒｎａｌ、２８巻：Ｓ１２１～Ｓ１２６頁を参照されたい）など、他のワクチン成分のための抗菌薬（ａｎｔｉｍｉｃｒｏｂｉａｌ　ａｇｅｎｔ）、および抗菌薬（ａｎｔｉｂａｃｔｅｒｉａｌ　ａｇｅｎｔｓ）である。静脈内投与の場合、適切なキャリアには、生理食塩液、静菌水、Ｃｒｅｍｏｐｈｏｒ　ＥＬ（商標）（ＢＡＳＦ、Ｐａｒｓｉｐｐａｎｙ、Ｎ．Ｊ．）、またはリン酸緩衝生理食塩液（ＰＢＳ）が含まれる。いずれの場合にも、非経口投与のための組成物は、無菌でなければならず、シリンジ注射が容易に可能となる程度の流体であるべきである。

【０３２４】

本発明により提供されるエアゾール処方物は、吸入を介して投与することができ、高圧ガスベースの場合もあり、非高圧ガスベースの場合もある。例えば、本発明の医薬処方物の実施形態は、ジクロロジフルオロメタン、プロパン、窒素など、許容される高圧ガスへと処方される本発明の化合物を含む。吸入投与の場合、化合物は、適切な高圧ガス、例えば、二酸化炭素などのガスを含有する高圧容器もしくは高圧分注器、または噴霧器からのエアゾールスプレーの形態で送達することができる。非高圧ガスの非限定的な例は、機械

的な力により（すなわち、指でピストンを押し下げる、または容器の壁面に適用される圧縮力、または壁面自体により加えられる弾性力（例えば、弾性の膀胱を介する）などを介する容器の圧縮により）閉鎖容器から駆出されるポンプスプレーである。

【０３２５】

本発明の坐剤は、本発明の化合物を、乳化ベースまたは水溶性ベースなど、各種のベースのうちのいずれかと混合することにより調製することができる。本発明の化合物によるこの医薬処方物についての実施形態は、坐剤を介して直腸に投与することができる。坐剤は、体温では溶融するが、室温では固化するココアバター、カーボワックス、およびポリエチレングリコールなどの媒体を包含し得る。

【０３２６】

シロップ、エリキシル、および懸濁液など、経口投与または直腸投与のための単位剤形を提供することが可能であり、各用量単位、例えば、茶さじ１杯分、料理用スプーン１杯分、錠剤、または坐剤は、本発明の１つまたは複数の化合物を含有する所定量の組成物を含有する。同様に、注射投与または静脈内投与のための単位剤形は、滅菌水、通常の生理食塩液、または薬学的に許容される別のキャリア中の溶液としての組成物中に本発明の化合物を含み得る。

【０３２７】

本発明の医薬処方物についての実施形態は、本発明の単離されたポリペプチド、本発明の単離されたポリヌクレオチド、本発明のベクター、本発明で用いられる低分子、本発明の単離された宿主細胞、または本発明の抗体のうちの１つまたは複数が、注射用組成物へと処方される医薬処方物を包含する。本発明の注射用医薬処方物は、溶液または懸濁液として調製される、または注射前に液体の媒体中で溶解または懸濁させるのに適する固体形態として調製される。調製物はまた、本発明の医薬処方物についての他の実施形態に従い、乳化させることもでき、有効成分をリポソーム媒体中に封入することもできる。

【０３２８】

ある実施形態では、本発明の単離されたポリペプチド、本発明の単離されたポリヌクレオチド、本発明のベクター、本発明の単離された宿主細胞、または本発明の抗体のうちの１つまたは複数を、持続送達系を介する送達のために処方する。本明細書では、「持続送達系」という用語を、「制御送達系」と互換的に用い、それらのうちの多種多様なデバイスが当技術分野において公知である、カテーテル、注射デバイスなどと組み合わせた持続（例えば、制御）送達デバイス（例えば、ポンプ）を包含する。

【０３２９】

機械的注入ポンプまたは電気機械的注入ポンプもまた、本開示と共に用いるのに適する場合がある。このようなデバイスの例には、例えば、米国特許第４，６９２，１４７号；同第４，３６０，０１９号；同第４，４８７，６０３号；同第４，３６０，０１９号；同第４，７２５，８５２号；同第５，８２０，５８９号；同第５，６４３，２０７号；同第６，１９８，９６６号などで説明されているデバイスが含まれる。一般に、本発明の化合物の送達は、各種の充填式ポンプシステムのうちのいずれかを用いて達成することができる。ポンプは、ある時間にわたり、一定の制御放出をもたらす。一部の実施形態では、本発明の化合物が、薬物不透過性容器内の液体処方物であり、個体に持続的に送達される。

【０３３０】

一実施形態では、薬物送達系が、少なくとも部分的に植え込み式のデバイスである。植え込み式デバイスは、当技術分野で周知の方法およびデバイスを用いて、任意の適切な植え込み部位において植え込むことができる。植え込み部位は、薬物送達デバイスが導入および配置される、対象の体内の部位である。植え込み部位には、皮下（ｓｕｂｄｅｒｍａｌ、ｓｕｂｃｕｔａｎｅｏｕｓ）部位、筋肉内部位または対象の体内の他の適切な部位が含まれるが必ずしもそれらに限定されない。一部の実施形態では、薬物送達デバイスの植え込みおよび除去が簡便であるため、皮下（ｓｕｂｃｕｔａｎｅｏｕｓ）の植え込み部位を用いる。

【０３３１】

本開示で用いるのに適する薬物放出デバイスは、各種の作用方式のうちのいずれかに基づき得る。例えば、薬物放出デバイスは、拡散システムに基づく場合もあり、対流システムに基づく場合もあり、浸食システム（例えば浸食ベースのシステム）に基づく場合もある。例えば、薬物放出デバイスは、電気化学式ポンプ、浸透圧ポンプ、電気浸透圧ポンプ、蒸気圧ポンプ、または浸透圧バースト波マトリックスであることが可能であり、例えば、薬物をポリマー中に組み込み、このポリマーが、薬物含浸性ポリマー材料（例えば、生体分解性の薬物含浸性ポリマー材料）の分解と共時的に薬物処方物を放出するポンプであり得る。他の実施形態では、薬物放出デバイスが、電気拡散システム、電気溶解式ポンプ、気泡ポンプ、圧電ポンプ、加水分解システムなどに基づく。

【０３３２】

機械的注入ポンプまたは電気機械的注入ポンプに基づく薬物放出デバイスもまた、本開示と共に用いるのに適する場合がある。このようなデバイスの例には、例えば、米国特許第４，６９２，１４７号；同第４，３６０，０１９号；同第４，４８７，６０３号；同第４，３６０，０１９号；同第４，７２５，８５２号などで説明されているデバイスが含まれる。一般に、対象の処置法は、各種の充填式の非交換型ポンプシステムのうちのいずれかを用いて達成することができる。ポンプおよび他の対流システムは、それらの、ある時間にわたる一般に一定である程度の高い制御放出のために、一般に好ましい。一部の実施形態では、浸透圧ポンプが、一定である程度の高い制御放出と比較的小型のサイズとを組み合わせた利点のために用いられる（例えば、ＰＣＴ出願公開第ＷＯ　９７／２７８４０号；ならびに米国特許第５，９８５，３０５号および同第５，７２８，３９６号を参照されたい）。本開示で用いるのに適する例示的な浸透圧駆動式デバイスには、米国特許第３，７６０，９８４号；同第３，８４５，７７０号；同第３，９１６，８９９号；同第３，９２３，４２６号；同第３，９８７，７９０号；同第３，９９５，６３１号；同第３，９１６，８９９号；同第４，０１６，８８０号；同第４，０３６，２２８号；同第４，１１１，２０２号；同第４，１１１，２０３号；同第４，２０３，４４０号；同第４，２０３，４４２号；同第４，２１０，１３９号；同第４，３２７，７２５号；同第４，６２７，８５０号；同第４，８６５，８４５号；同第５，０５７，３１８号；同第５，０５９，４２３号；同第５，１１２，６１４号；同第５，１３７，７２７号；同第５，２３４，６９２号；同第５，２３４，６９３号；同第５，７２８，３９６号などにおいて説明されているデバイスが含まれるが必ずしもそれらに限定されない。本開示に適合させ得るさらなる例示的なデバイスは、Ｓｙｎｃｈｒｏｍｅｄ注入ポンプ（Ｍｅｄｔｒｏｎｉｃ）である。

【０３３３】

一部の実施形態では、薬物送達デバイスが、植え込み式デバイスである。薬物送達デバイスは、当技術分野で周知の方法およびデバイスを用いて、任意の適切な植え込み部位において植え込むことができる。本明細書で言及される通り、植え込み部位は、薬物送達デバイスが導入および配置される、対象の体内の部位である。植え込み部位には、皮下（ｓｕｂｄｅｒｍａｌ、ｓｕｂｃｕｔａｎｅｏｕｏｓ）部位、筋肉内部位または対象の体内の他の適切な部位が含まれるが必ずしもそれらに限定されない。

【０３３４】

本発明の化合物に適する賦形剤媒体は、例えば、水、生理食塩液、デキストロース、グリセロール、エタノールなど、およびこれらの組合せである。加えて、所望の場合、媒体は、保湿剤、または乳化剤、またはｐＨ緩衝剤など、微量の補助物質も含有し得る。本開示について考慮するとき、当業者には、このような剤形を調製する方法が公知である、または明らかであろう。例えば、「Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ」、Ｍａｃｋ　Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ　Ｃｏｍｐａｎｙ、Ｅａｓｔｏｎ、Ｐｅｎｎｓｙｌｖａｎｉａ、１７版、１９８５年を参照されたい。いずれにせよ、投与される組成物または処方物は、処置される対象において所望の状態を達成するのに十分な量の化合物を含有する。

【０３３５】

本発明の組成物には、持続放出マトリックスまたは制御放出マトリックスを含む組成物

が含まれる。加えて、本発明の実施形態は、持続放出処方物を用いる他の処置と共に用いることもできる。本明細書で用いられる持続放出マトリックスとは、通常はポリマーである、酵素的加水分解もしくは酸ベースの加水分解、または溶解を介して分解可能な材料から作製されるマトリックスである。体内に挿入されると、マトリックスは、酵素および体液により作用を受ける。持続放出マトリックスは、リポソーム、ポリラクチド（ポリ乳酸）、ポリグリコリド（グリコール酸のポリマー）、ポリラクチド－ｃｏ－グリコリド（乳酸とグリコール酸とのコポリマー）、ポリ無水物、ポリ（オルト）エステル、ポリペプチド、ヒアルロン酸、コラーゲン、硫酸コンドロイチン、カルボン酸、脂肪酸、リン脂質、多糖、核酸、ポリアミノ酸、フェニルアラニン、チロシン、イソロイシンなどのアミノ酸、ポリヌクレオチド、ポリビニルプロピレン、ポリビニルピロリドン、およびシリコーンなどの生体適合性材料から選択することが望ましい。例示的な生体分解性マトリックスには、ポリラクチドマトリックス、ポリグリコリドマトリックス、およびポリラクチド－ｃｏ－グリコリド（乳酸とグリコール酸とのコポリマー）マトリックスが含まれる。

【０３３６】

別の実施形態では、制御放出系により干渉作用剤（ならびに組合せ組成物）を送達する。例えば、本発明の化合物は、静脈内注入、植え込み式浸透圧ポンプ、経皮的パッチ、リポソーム、または他の投与方式を用いて投与することができる。一実施形態では、ポンプを用いることができる（Ｓｅｆｔｏｎ（１９８７年）、ＣＲＣ　Ｃｒｉｔ．　Ｒｅｆ．　Ｂｉｏｍｅｄ．　Ｅｎｇ．、１４巻：２０１頁；Ｂｕｃｈｗａｌｄら（１９８０年）、Ｓｕｒｇｅｒｙ、８８巻：５０７頁；Ｓａｕｄｅｋら（１９８９年）、Ｎ．　Ｅｎｇｌ．　Ｊ．　Ｍｅｄ．、３２１巻：５７４頁）。別の実施形態では、ポリマー材料を用いる。さらに別の実施形態では、制御放出系を、処置標的、すなわち、肝臓の近傍に配置し、それにより、必要用量を全身用量の一部にとどめる。さらに別の実施形態では、制御放出系を、処置標的の近傍に配置し、それにより、必要用量を全身用量の一部にとどめる。他の制御放出系については、Ｌａｎｇｅｒ（１９９０年）、Ｓｃｉｅｎｃｅ、２４９巻：１５２７～１５３３頁により総説されている。

【０３３７】

別の実施形態では、本発明の組成物（ならびに個別または一体の組合せ組成物）に、本明細書で説明される阻害剤を縫合糸、包帯、およびガーゼなどの吸収性材料中に含浸させることにより形成される組成物、または組成物を送達するための手術用ステープル、ジッパー、およびカテーテルなどの固相材料の表面上にコーティングされる組成物が含まれる。本開示を念頭に置く当業者には、この種の他の送達系も容易に明らかであろう。

【０３３８】

本発明は、微生物感染症を処置するために、宿主（例えば、ヒト）に１種または複数種の干渉作用剤を投与するための方法および組成物を提供する。多様な実施形態では、本発明のこれらの方法が、ｉｎ　ｖｉｖｏ法およびｅｘ　ｖｉｖｏ法のほか、全身投与経路および局所投与経路を含め、薬物を送達するのに適する、利用可能なほとんど任意の方法および経路を対象とする。

【０３３９】

スクリーニングアッセイ

本発明は、本明細書で説明されるポリクローナル抗体と等価のモノクローナル抗体などの等価作用剤、ならびに本発明の活性作用剤および医薬組成物の活性、または本発明のポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチド産生物もしくはペプチド産生物の機能を調節する各種の作用剤をスクリーニングする方法を提供する。本発明の目的では、「作用剤」に、単体もしくは複合体の有機分子もしくは無機分子、ペプチド、タンパク質（例えば、抗体）、ポリヌクレオチド（例えば、アンチセンスのポリヌクレオチド）、またはリボザイムが含まれるがそれらに限定されないことを意図する。例えば、ポリペプチドおよびポリヌクレオチドなどのポリマー、および多様なコア構造に基づく合成有機化合物など、多種多様な化合物を合成することができ、これらもまた、「作用剤」という用語に包含される。加えて、植物抽出物または動物抽出物など、各種の天然供給源も、スクリーニン

グのための化合物をもたらし得る。常に明示的に言及されるわけではないが、作用剤は、単独で、または本発明のスクリーニングにより同定される作用剤と同じ生物学的活性もしくは異なる生物学的活性を有する別の作用剤と組み合わせて用いられることを理解されたい。

【０３４０】

一実施形態は、ＤＮＡ－ＤＮＡＢＩＩタンパク質（例えば、ＩＨＦタンパク質）間相互作用と相互作用する、それに結合する、またはそれを阻害することが可能な作用剤をスクリーニングする方法である。本発明は、図６Ｂにおいて、微生物ＤＮＡおよびＩＨＦの三次元構造を示す。したがって、本開示は、また、ＤＮＡ－ＤＮＡＢＩＩ（例えば、ＩＨＦ）間相互作用と相互作用する、それに結合する、またはそれを阻害することが可能な作用剤をデザイン、選択、および合成するための、コンピュータ支援のｉｎ　ｓｉｌｉｃｏにおけるデザインまたはモデリングとしても公知である、バーチャルデザイン法の使用を可能とする。候補作用剤は、本明細書で説明されるバイオフィルムおよび関連する疾患または状態（医学的、職業的、または獣医学的な疾患または状態）を処置するのに有効であり得る。したがって、本開示はまた、ｉｎ　ｓｉｌｉｃｏ法により同定またはデザインされる作用剤も提供する。

【０３４１】

ＩＨＦ－ＤＮＡ複合体の三次元構造を図６Ｂに示すが、Ｘ、Ｙ、およびＺ座標による代表的な構造は、Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｄａｔａ　Ｂａｎｋ受託番号：１ＩＨＦで示されており、関連する詳細は、Ｒｉｃｅら、Ｃｅｌｌ、８７巻：１２９５～１３０６頁（１９９６年）において示されている。ＩＨＦ－ＤＮＡ複合体におけるＩＨＦタンパク質の三次元構造を、スクリーニング法に用いることができる。適切な作用剤は、ＩＨＦ－ＤＮＡ複合体内のＩＨＦタンパク質構造と関連して位置決定され得る作用剤であり、ＤＮＡとの相互作用に関与することが確認されている、少なくとも１つのアミノ酸残基、または、代替的に、２つ、もしくは３つ、もしくは４つ、もしくは５つ、もしくは６つ、もしくは７つ、もしくは８つ、もしくは９つ、もしくは少なくとも１０のアミノ酸残基の相互作用を伴う。

【０３４２】

図６Ａは、Ｅ．ｃｏｌｉのＩＨＦ配列（配列番号４２）を例として用いて、ＩＨＦ－ＤＮＡ間相互作用に関与するアミノ酸残基を例示する。図６Ａの下段の矢印により示されるこのようなアミノ酸残基を、太字および下線を付した文字により示しながら、以下でさらに説明する。すなわち、Ｅ．ｃｏｌｉのＩＨＦについては、ＤＮＡの結合に関与するアミノ酸が、Ｔ４、Ｋ５、Ａ６、Ｅ２８、Ｑ４３、Ｋ４５、Ｓ４７、Ｇ４８、Ｎ５１、Ｒ５５、Ｋ５７、Ｒ６０、Ｒ６３、Ｎ６４、Ｐ６５、Ｋ６６、Ｒ７６、Ｔ８０、Ｒ８２、またはＱ８５である。

【０３４３】

【化９】

MAL**TKA**EMSE YLFDKLGLSK RDAKELV**E**LF FEEIRRALEN GE**Q**V**K**L**SG**FG **N**FDL**R**D**K**N**Q**R
PG**RNPK**TGED IPITA**R**RVV**T** F**R**PG**Q**KLKSR VENASPKDE (**配列番号** 42)

したがって、本開示の一実施形態は、ＤＮＡＢＩＩポリペプチドまたはＤＮＡＢＩＩタンパク質の微生物ＤＮＡへの結合を阻害する、それと競合する、またはその力価を決定する作用剤、微生物バイオフィルムを阻害、予防または破壊する作用剤、対象におけるバイオフィルムを阻害、予防または破壊する作用剤、または対象においてバイオフィルムを生じる微生物感染症を阻害、予防または処置する作用剤を同定するための、コンピュータ実装方法であって、候補作用剤の三次元構造を、組込み宿主因子（ＩＨＦ）とＤＮＡの複合体の結晶形から決定された原子構造座標Ｘ、ＹおよびＺに基づくＩＨＦタンパク質の三次元構造と対照して位置決定することを含み、配列番号４２に示されるＴ４、Ｋ５、Ａ６、Ｅ２８、Ｑ４３、Ｋ４５、Ｓ４７、Ｇ４８、Ｎ５１、Ｒ５５、Ｋ５７、Ｒ６０、Ｒ６３、Ｎ６４、Ｐ６５、Ｋ６６、Ｒ７６、Ｔ８０、Ｒ８２またはＱ８５から選択される２つ以上のＩＨＦアミノ酸、またはそのそれぞれの等価物における作用剤とＩＨＦとの相互作用に

より、作用剤が、ＤＮＡＢＩＩポリペプチドまたはＤＮＡＢＩＩタンパク質の微生物ＤＮＡへの結合を阻害する、それと競合する、もしくはその力価を決定する、微生物バイオフィルムを阻害、予防もしくは破壊する、バイオフィルムを阻害、予防もしくは破壊する、またはバイオフィルムを生じる微生物感染症を阻害、予防もしくは処置することが同定される、コンピュータ実装方法を提供する。

【０３４４】

一態様では、候補作用剤が、ＩＨＦタンパク質のアミノ酸６３、６４、６５、または６６のうちの少なくとも１つ、または２つ、または３つと相互作用する。一態様では、候補作用剤が、ＩＨＦタンパク質のＲ６３、Ｎ６４、Ｐ６５、Ｋ６６のうちの少なくとも１つ、または２つ、または３つと相互作用する。別の態様では、候補作用剤が、ＩＨＦタンパク質のアミノ酸６３または６６のうちの少なくとも１つと相互作用する。別の態様では、候補作用剤が、ＩＨＦタンパク質のＲ６３またはＫ６６のうちの少なくとも１つと相互作用する。

【０３４５】

当技術分野では、正確な位置およびアミノ酸残基が、ＩＨＦ配列に応じて変化することが理解されるであろう。しかし、当業者は、このような位置およびアミノ酸残基を、配列に基づき容易に同定することができる。例えば、ＩＨＦ配列は、表９に例示されるＥ．ｃｏｌｉのＩＨＦ配列（配列番号４２）により配列決定し、ＤＮＡと相互作用する、Ｅ．ｃｏｌｉのＩＨＦにおけるアミノ酸に対応するアミノ酸を明らかにすることができる。同様に、ＩＨＦ－ＤＮＡ複合体におけるこのようなＩＨＦ配列の三次元構造を、スクリーニングに用いることができる。

【０３４６】

本明細書で提供されるコンピュータ実装方法に加え、本開示はまた、カスタムコンピュータシステムであって、本方法を実施するための、例えば、プロセッサ、メモリ、および／またはプログラムのほか、本方法を実行するのに適するコンピュータプログラムまたはコードを保存する、一時的ではないコンピュータ読み取り媒体などのコンピュータ読み取り媒体も包含するカスタムコンピュータシステムも提供する。

【０３４７】

したがって、別の実施形態は、

少なくとも１つのプロセッサ、

少なくとも１つのプロセッサに接続されたメモリ、

メモリおよび少なくとも１つのプロセッサと通信している記憶媒体

を含むカスタムコンピュータ装置であって、

記憶媒体が、プロセッサによって実行されると、カスタムコンピュータ装置が、ＤＮＡＢＩＩポリペプチドまたはＤＮＡＢＩＩタンパク質の微生物ＤＮＡへの結合を阻害する、それと競合する、またはその力価を決定する作用剤、微生物バイオフィルムを阻害、予防または破壊する作用剤、対象におけるバイオフィルムを阻害、予防または破壊する作用剤、または対象においてバイオフィルムを生じる微生物感染症を阻害、予防または処置する作用剤を同定するように設定するプロセッサ実行可能命令のセットを含み、この設定が、

候補作用剤の三次元構造を、組込み宿主因子（ＩＨＦ）とＤＮＡの複合体の結晶形から決定された原子構造座標Ｘ、ＹおよびＺに基づくＩＨＦタンパク質の三次元構造と対照して位置決定することを含み、配列番号４２に示されるＴ４、Ｋ５、Ａ６、Ｅ２８、Ｑ４３、Ｋ４５、Ｓ４７、Ｇ４８、Ｎ５１、Ｒ５５、Ｋ５７、Ｒ６０、Ｒ６３、Ｎ６４、Ｐ６５、Ｋ６６、Ｒ７６、Ｔ８０、Ｒ８２またはＱ８５から選択される２つ以上のＩＨＦアミノ酸、またはそのそれぞれの等価物における作用剤とＩＨＦとの相互作用により、作用剤が、ＤＮＡＢＩＩポリペプチドまたはＤＮＡＢＩＩタンパク質の微生物ＤＮＡへの結合を阻害する、それと競合する、もしくはその力価を決定する、微生物バイオフィルムを阻害、予防もしくは破壊する、バイオフィルムを阻害、予防もしくは破壊する、またはバイオフィルムを生じる微生物感染症を阻害、予防もしくは処置することが同定される、カスタムコンピュータ装置を提供する。

【０３４８】
さらに別の実施形態は、一時的でないコンピュータ媒体であって、プロセッサによって実行されると、ＤＮＡＢＩＩポリペプチドまたはＤＮＡＢＩＩタンパク質の微生物ＤＮＡへの結合を阻害する、それと競合する、またはその力価を決定する作用剤、微生物バイオフィルムを阻害、予防または破壊する作用剤、対象におけるバイオフィルムを阻害、予防または破壊する作用剤、または対象においてバイオフィルムを生じる微生物感染症を阻害、予防または処置する作用剤を同定し、候補作用剤の三次元構造を、組込み宿主因子（ＩＨＦ）とＤＮＡの複合体の結晶形から決定された原子構造座標Ｘ、ＹおよびＺに基づくＩＨＦタンパク質の三次元構造と対照して位置決定することを含み、配列番号４２に示されるＴ４、Ｋ５、Ａ６、Ｅ２８、Ｑ４３、Ｋ４５、Ｓ４７、Ｇ４８、Ｎ５１、Ｒ５５、Ｋ５７、Ｒ６０、Ｒ６３、Ｎ６４、Ｐ６５、Ｋ６６、Ｒ７６、Ｔ８０、Ｒ８２またはＱ８５から選択される２つ以上のＩＨＦアミノ酸、またはそのそれぞれの等価物における作用剤とＩＨＦとの相互作用により、作用剤が、ＤＮＡＢＩＩポリペプチドまたはＤＮＡＢＩＩタンパク質の微生物ＤＮＡへの結合を阻害する、それと競合する、もしくはその力価を決定する、微生物バイオフィルムを阻害、予防もしくは破壊する、バイオフィルムを阻害、予防もしくは破壊する、またはバイオフィルムを生じる微生物感染症を阻害、予防もしくは処置することが同定される、プロセッサ実行可能命令のセットを含む、一時的でないコンピュータ媒体を提供する。

【０３４９】
当技術分野では、ｉｎ　ｓｉｌｉｃｏにおける分子デザインまたは薬物デザインの方法が周知であり、一般には、Ｋａｐｅｔａｎｏｖｉｃ（２００８年）、Ｃｈｅｍ　Ｂｉｏｌ．　Ｉｎｔｅｒａｃｔ．、１７１巻（２号）：１６５～７６頁を参照されたい。略述すると、構造および各種のパラメータの画像がディスプレイ上に示されるように、三次元構造の原子座標をコンピュータに入力する。デザインは、三次元構造を、標的分子の三次元構造と対照して位置決定するステップを伴うことが典型的である。位置決定するステップは、コンピュータのグラフィックインターフェースによる支援を伴い、使用者が制御することもでき、潜在的に良好なマッチを探索するコンピュータアルゴリズムによりさらに誘導させることもできる。位置決定するステップはまた、三次元構造のうちの一方または両方を、任意の次元で動かすことも伴う。

【０３５０】
次いで、結果として得られるデータを、バーチャルの化合物および／または作用剤ライブラリーに入力する。バーチャルライブラリーは、ＤＯＣＫ－４（Ｋｕｎｔｚ、ＵＣＳＦ）など、バーチャルのスクリーニングソフトウェア内に含有されているので、上記で説明したデータは、このようなソフトウェアに入力することができる。候補作用剤は、ＭＤＤＲ（Ｐｒｏｕｓ　Ｓｃｉｅｎｃｅ、Ｓｐａｉｎ）など、バーチャルまたは非バーチャルの薬物候補化合物についての三次元構造データベースを用いて検索することができる。

【０３５１】
候補作用剤と、ＤＮＡおよび／またはＤＮＡＢＩＩタンパク質のうちの一方または両方との所望の相互作用が見いだされれば、この候補作用剤は、ＤＮＡおよび／またはＤＮＡＢＩＩタンパク質に結合し得ることが判明する。相互作用は、定量的相互作用、例えば、相互作用の強度および／または相互作用部位の数の場合もあり、定性的相互作用、例えば、相互作用または相互作用の欠如の場合もある。したがって、方法の出力は、定量的な場合もあり、定性的な場合もある。したがって、一態様では、本開示がまた、ＤＮＡとタンパク質との相互作用を阻害しない作用剤、または、代替的に、ＤＮＡとタンパク質との相互作用を強化する作用剤を同定する方法も提供する。

【０３５２】
低分子化合物などの作用剤の潜在的な阻害効果または結合効果（すなわち、相互作用効果または会合効果）は、実際の合成および試験の前に、コンピュータモデリング法を用いることにより解析することができる。所与の化合物の理論的構造が、この化合物と、バイオフィルム中の微生物ＤＮＡおよび／またはＤＮＡＢＩＩタンパク質との相互作用および

会合が不十分であると示唆する場合は、この作用剤の合成および試験を除外することができる。しかし、コンピュータモデリングが強力な相互作用を示す場合は、この作用剤を合成し、ｉｎ ｖｉｔｒｏまたはｉｎ ｖｉｖｏにおける実験など、各種の方法を用いて、それが相互作用に結合する、またはそれを阻害する能力について調べることができる。本明細書では、作用剤が、単独で、または別の作用剤との組合せで、バイオフィルムを阻害する、またはその力価を決定する能力を調べる方法が開示される。このようにして、作用しない作用剤および化合物の合成を除外することができる。

【０３５３】

当業者は、複数の方法のうちのいずれかを用いて、化学的実体もしくは生物学的実体または断片が、ＤＮＡＢＩＩタンパク質または微生物ＤＮＡと会合する能力についてスクリーニングすることができ、より具体的には、化学的実体もしくは生物学的実体または断片が、特異的な結合部位と会合する能力についてスクリーニングすることができる。次いで、選択された断片または化学的実体を、ＤＮＡまたはＤＮＡＢＩＩポリペプチドの個別の結合部位内の多様な配向性で位置決定することもでき、ドッキングさせることもできる。ドッキングは、ＱＵＡＮＴＡ、ＳＹＢＹＬなどのソフトウェアの後、ＣＨＡＲＭＭおよびＡＭＢＥＲなど、標準的な分子力学の力の場を伴うエネルギーの最小化および分子動態についてのソフトウェアを用いて達成することができる。

【０３５４】

ｉｎ ｓｉｌｉｃｏにおけるデザインにはまた、市販のコンピュータプログラムも利用可能である。例には、限定なしに述べれば、ＧＲＩＤプログラム（Ｏｘｆｏｒｄ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ、Ｏｘｆｏｒｄ、ＵＫ）、ＭＣＳＳプログラム（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｓｉｍｕｌａｔｉｏｎｓ、Ｂｕｒｌｉｎｇｔｏｎ、Ｍａｓｓ．）、ＡＵＴＯＤＯＣＫ（Ｓｃｒｉｐｐｓ Ｒｅｓｅａｒｃｈ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ、Ｌａ Ｊｏｌｌａ、Ｃａｌｉｆ．）、ＤＯＣＫプログラム（Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ ｏｆ Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａ、Ｓａｎ Ｆｒａｎｃｉｓｃｏ、Ｃａｌｉｆ．）、ＧＬＩＤＥプログラム（Ｓｃｈｒｏｄｉｎｇｅｒ Ｉｎｃ．）、ＦｌｅｘＸプログラム（Ｔｒｉｐｏｓ Ｉｎｃ．）、およびＧＯＬＤプログラム（Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ Ｃｒｙｓｔａｌｌｏｇｒａｐｈｉｃ Ｄａｔａ Ｃｅｎｔｒｅ）が含まれる。

【０３５５】

作用剤または化合物が、上記の方法によりデザインまたは選択されたら、この作用剤または化合物が互いと結合し得る効率について、コンピュータによる評価を介して調べ、これを最適化することができる。例えば、有効なＤＮＡＢＩＩ断片は、その結合状態と遊離状態との間で示し得る差違が比較的小さい（すなわち、結合の変形エネルギーが小さい）ことが好ましい。

【０３５６】

デザインまたは選択された化合物は、その結合状態において、好ましくは、標的タンパク質との反発的な静電相互作用を欠くように、コンピュータによりさらに最適化することができる。このような非相補的相互作用（例えば、非相補的静電相互作用）には、電荷間、双極子間、および電荷－双極子間の反発的相互作用が含まれる。とりわけ、作用剤または化合物が、バイオフィルム中のＤＮＡＢＩＩタンパク質および／または微生物ＤＮＡのいずれかの作用物質に結合するとき、作用剤と作用物質との全ての静電相互作用の和が、結合のエンタルピーに中性の寄与または好適な寄与をもたらすことが好ましい。

【０３５７】

当技術分野ではまた、化合物の変形エネルギーおよび静電相互作用を評価するためのコンピュータソフトウェアも利用可能である。例には、限定なしに述べれば、Ｇａｕｓｓｉａｎ ９２［Ｇａｕｓｓｉａｎ，Ｉｎｃ．、Ｐｉｔｔｓｂｕｒｇｈ、Ｐａ．］；ＡＭＢＥＲ［Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ ｏｆ Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａ ａｔ Ｓａｎ Ｆｒａｎｃｉｓｃｏ］；ＱＵＡＮＴＡ／ＣＨＡＲＭＭ［Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｓｉｍｕｌａｔｉｏｎｓ，Ｉｎｃ．、Ｂｕｒｌｉｎｇｔｏｎ、Ｍａｓｓ．］；およびＩｎｓｉｇｈｔ ＩＩ／Ｄｉｓｃｏｖｅｒ［Ｂｉｏｓｙｓｍ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ Ｉｎｃ．、Ｓａｎ Ｄｉｅ

ｇｏ、Ｃａｌｉｆ．］が含まれる。

【０３５８】

上記で説明した通りに、結合剤を最適に選択またはデザインしたら、その結合特性を改善または修飾するために、その原子または側鎖基のうちの一部において、置換をもたらすことができる。一般に、初回の置換は保存的である、すなわち、置換基は、元の基とほぼ同じサイズ、形、疎水性、および電荷を有する。当然ながら、立体構成を変化させることが当技術分野で公知の成分は、回避すべきであることを理解されたい。次いで、上記で詳細に説明した方法と同じコンピュータによる方法を介して、このような置換化合物を、バイオフィルム中のＤＮＡＢＩＩタンパク質および／または微生物ＤＮＡに対する適合効率について解析することができる。

【０３５９】

好ましい一実施形態は、本発明のタンパク質またはポリヌクレオチドと相互作用することが可能な低分子をスクリーニングする方法である。本発明の目的についての一実施形態では、「低分子」が、対象のタンパク質に結合し、それにより、このタンパク質の機能を変化させることが可能な低分子量（ＭＷ）の分子である。低分子のＭＷは、１，０００以下であることが好ましい。当技術分野では、タンパク質の機能を変化させることが可能な低分子をスクリーニングする方法が公知である。例えば、細胞における低分子－タンパク質間相互作用を検出するためのミニチュアアレイアッセイについては、Ｙｏｕら（１９９７年）、Ｃｈｅｍ．　Ｂｉｏｌ．、４巻：９６１～９６８頁により論じられている。

【０３６０】

ｉｎ　ｖｉｔｒｏにおいてスクリーニング法を実施するには、処置される微生物を感染させた適切な細胞培養物または組織をまず供給する。細胞は、密度に依存する制約なしに、指数関数的な増殖を達成するための条件下（温度、増殖培地または培養培地、およびガス（CO_2））で、これに適切な長さの時間にわたり培養する。また、対照として、感染させていない追加的な別個の細胞培養物を維持することも望ましい。

【０３６１】

当業者に明らかである通り、適切な細胞は、マイクロ滴定プレート内で培養することができ、遺伝子型の変化、表現型の変化、または微生物力価の低減に注目することにより、複数の作用剤を同時にアッセイすることができる。

【０３６２】

作用剤が、上記で説明した低分子など、ＤＮＡまたはＲＮＡ以外の組成物である場合は、この作用剤を、細胞培養物に直接添加することもでき、追加用の培養培地に添加することもできる。当業者に明らかである通り、実験により決定され得る「有効」量を添加しなければならない。

【０３６３】

作用剤が、抗体または抗原結合断片である場合は、この作用剤を、競合的ＥＬＩＳＡを実施するための条件下で、本明細書で説明される標的抗原およびポリクローナル抗体と接触させることもでき、これらと共にインキュベートすることもできる。当業者には、このような方法が公知である。

【０３６４】

アッセイはまた、対象において実施することもできる。対象が、ラット、チンチラ、マウス、またはサルである場合、方法は、ヒト患者における作用剤の臨床試験の前に用い得る簡便な動物モデル系を提供する。この系では、疾患または微生物感染症の症状のそれぞれが、同じ感染症を有する処置されていない動物と比較して軽減される、または消失すれば、候補作用剤が潜在的な薬物である。また、比較のためのベースを提供する、健康で処置を受けていない細胞または動物の別個の陰性対照群を有することも有用であり得る。

【０３６５】

作用剤および組成物は、医薬の製造において用いることができ、医薬組成物の有効成分など、従来の手順に従う投与を介して、ヒトおよび他の動物を処置するのに用いることができる。

【０３６６】
組合せ療法
本発明の組成物および関連する方法は、他の療法の投与と組み合わせて用いることができる。これらには、ＤＮアーゼ酵素、抗生薬、抗菌薬、または他の抗体の投与が含まれるがそれらに限定されない。
【０３６７】
一部の実施形態では、方法および組成物が、抗ＤＮＡＢＩＩ抗体と共に相乗作用するデオキシリボヌクレアーゼ（ＤＮアーゼ）酵素を包含する。ＤＮアーゼとは、ＤＮＡ骨格におけるホスホジエステル結合の切断を触媒する任意の酵素である。十字構造だけでなく、ＤＮＡの多様な二次構造も標的とすることが公知であるＤＮアーゼ酵素についての３つの非限定的な例には、ＤＮアーゼＩ、Ｔ４　Ｅｎｄｏ　ＶＩＩ、およびＴ７　Ｅｎｄｏ　Ｉが含まれる。特定の実施形態では、ＤＮアーゼと組み合わせると、バイオフィルムを不安定化させるのに必要とされる抗ＤＮＡＢＩＩ抗体の有効量が低減される。ｉｎ　ｖｉｔｒｏで投与する場合、ＤＮアーゼは、アッセイに直接添加することもでき、この酵素を安定化させることが公知である適切な緩衝液により添加することもできる。ＤＮアーゼの有効単位用量およびアッセイ条件は変化する場合があり、当技術分野で公知の手順に従い最適化することができる。
【０３６８】
他の実施形態では、方法および組成物を、抗生薬および／または抗菌薬と組み合わせることもできる。抗菌薬とは、細菌、真菌、または原虫などの微生物を死滅させるまたはそれらの増殖を阻害する物質である。バイオフィルムは一般に、抗生薬の作用に対して耐性であるが、本明細書で説明される組成物および方法を用いて、バイオフィルムを伴う感染症を、感染症を処置するための従来の療法に対して感作することができる。他の実施形態では、抗生薬または抗菌薬を、本明細書で説明される方法および組成物と組み合わせて用いることにより、抗菌薬および／またはバイオフィルム低減剤の有効量を低減することが可能となる。本発明の方法との組合せに有用な抗菌薬および抗生薬についての一部の非限定的な例には、アモキシシリン、アモキシシリン－クラブラン酸、セフジニール、アジトロマイシン、およびスルファメトキサゾール－トリメトプリムが含まれる。バイオフィルム低減剤と組み合わされる抗菌薬および／または抗生薬の処置有効量は、従来の方法により容易に決定することができる。一部の実施形態では、バイオフィルム低減剤と組み合わされる抗菌薬の用量が、他の細菌感染症、例えば、感染症の病因がバイオフィルムを包含しない細菌感染症において有効であることが示されている平均有効用量である。他の実施形態では、用量が、平均有効用量の０．１、０．１５、０．２、０．２５、０．３０、０．３５、０．４０、０．４５、０．５０、０．５５、０．６０、０．６５、０．７０、０．７５、０．８、０．８５、０．９、０．９５、１．１、１．２、１．３、１．４、１．５、１．６、１．７、１．８、１．９、２．０、２．５、３．０、または５倍である。抗生薬または抗菌薬は、抗ＤＮＡＢＩＩ抗体を添加する前に付加することもでき、それと共時的に付加することもでき、その後で付加することもできる。
【０３６９】
他の実施形態では、方法および組成物を、細菌感染症を処置する抗体と組み合わせることもできる。本明細書で説明される方法および組成物と組み合わせるのに有用な抗体の一例は、非類縁外膜タンパク質（すなわち、ＯＭＰ　Ｐ５タンパク質）を指向する抗体である。この抗体単独による処置は、ｉｎ　ｖｉｔｒｏにおいてバイオフィルムをデバルキングすることがない。この抗体と、バイオフィルム低減剤とによる組合せ療法は、同じ濃度のいずれかの試薬を単独で用いることにより達成され得る効果より大きな効果を結果としてもたらす。バイオフィルム低減剤またはバイオフィルムを縮小させる方法と組み合わせて用いると相乗効果をもたらし得る他の抗体には、抗ｒｓＰｉｌＡ抗体調製物、抗ＯＭＰ２６抗体調製物、抗ＯＭＰ　Ｐ２抗体調製物、および抗全ＯＭＰ抗体調製物が含まれる。
【０３７０】
本明細書で説明される組成物および方法を用いて、バイオフィルムを伴わない細菌感染

症を処置するのには有効であるが、それ以外の、バイオフィルムを伴う細菌感染症を処置するには有効でない、一般的な処置モダリティーに対して、バイオフィルムを伴う細菌感染症を感作することができる。他の実施形態では、本明細書で説明される組成物および方法を、バイオフィルムを伴う細菌感染症を処置するのに有効な処置モダリティーと組み合わせて用い得るが、このような追加的な療法とバイオフィルム低減剤またはバイオフィルム低減法との組合せは、バイオフィルム低減剤または追加的な治療薬の有効量を低減し得るような相乗効果をもたらす。他の場合には、このような追加的な療法とバイオフィルム低減剤またはバイオフィルム低減法との組合せが、処置を増強するような相乗効果をもたらす。処置の増強は、感染症を処置するのに必要とされる時間の長さの短縮により証拠立てることができる。

【０３７１】

追加的な治療的処置は、バイオフィルムを縮小させるのに用いられる方法または組成物の前に付加することもでき、それと共時的に付加することもでき、その後で付加することもでき、同じ処方物中に含有させることもでき、別個の処方物として含有させることもできる。

【０３７２】

キット

本明細書で説明されるｉｎ　ｖｉｔｒｏ法およびｉｎ　ｖｉｖｏ法を実施するのに必要な作用剤および指示書を含有するキットもまた、特許請求される。したがって、本発明は、本発明の干渉するステップを包含し得る方法を実施するためのキットのほか、組織を回収するステップ、および／またはスクリーニングを実施するステップ、および／または結果を解析するステップ、および／または本明細書で規定される有効量の干渉作用剤を投与するステップなど、本発明の方法を実施するための指示書も提供する。これらは、単独で用いることもでき、他の適切な抗菌薬と組み合わせて用いることもできる。

【０３７３】

例えば、キットは、単離されたもしくは組換え型の組込み宿主因子（ＩＨＦ）ポリペプチド、またはそのそれぞれの断片もしくは等価物；表８、表９、表１０において同定される単離されたかまたは組換え型のタンパク質ポリペプチド；図６において同定されるＤＮＡ結合性ペプチド、またはそのそれぞれの断片もしくは等価物；配列番号１～３３の単離されたもしくは組換え型のポリペプチド、またはそのそれぞれの断片もしくは等価物；配列番号５～１１、２８、２９の単離されたもしくは組換え型のＣ末端のポリペプチド、または表８、表１０において同定される単離されたもしくは組換え型のＣ末端のポリペプチド、またはそのそれぞれの断片もしくは等価物；微生物ＤＮＡへの結合について組込み宿主因子と競合するポリペプチド；ホリデイジャンクションと似ている４方向ジャンクションポリヌクレオチド、複製フォークと似ている３方向ジャンクションポリヌクレオチド、固有の柔軟性を有するポリヌクレオチドまたは屈曲したポリヌクレオチド；上記で言及したポリペプチドのうちの任意の１つをコードする、単離されたかまたは組換え型のポリヌクレオチド；上記で言及したポリペプチドのうちの任意の１つを特異的に認識する、またはそれに特異的に結合する抗体、またはその等価物もしくは断片；またはＤＮＡＢＩＩタンパク質またはＤＮＡＢＩＩポリペプチドの微生物ＤＮＡへの結合と競合する小分子の群のうちの任意の１つまたは複数の作用剤と、使用指示書とを含む場合もあり、あるいはそれから本質的になる場合もあり、さらにまたそれからなる場合もある。キットは、アジュバント、抗原性ペプチド、または抗菌薬のうちの１つまたは複数をさらに含み得る。キャリアの例には、液体のキャリア、薬学的に許容されるキャリア、固相のキャリア、薬学的に許容されるキャリア、薬学的に許容されるポリマー、リポソーム、ミセル、インプラント、ステント、ペースト、ゲル、歯科インプラント、または医療用インプラントが含まれる。

【０３７４】

以下の例は、本明細書で開示される本発明を例示することを意図するものであり、これらを限定することを意図するものではない。

【実施例】
【０３７５】
実験
実験１
ＩＨＦ抗体、ＩＨＦタンパク質、ＩＨＦポリペプチドは、Ｎａｓｈ氏から恵与された。例えば、ＧｒａｎｓｔｏｎおよびＮａｓｈ（１９９３年）、Ｊ．　Ｍｏｌ．　Ｂｉｏｌ．、２３４巻：４５～５９頁；Ｎａｓｈら（１９８７年）、Ｊｏｕｒｎａｌ　ｏｆ　Ｂａｃｔｅｒｉｏｌｏｇｙ、１６９巻（９号）：４１２４～４１２７頁；ならびにＲｉｃｅら（１９９６年）、Ｃｅｌｌ、８７巻：１２９５～１３０６頁において説明されている通り、当業者には、これらを産生する方法が周知である。略述すると、ＩＨＦ－αを過剰産生するために、ｈｉｍＡ遺伝子を、細菌プラスミドであるｐＡＤ２８４におけるＰ$_{L}$プロモーターの下流に挿入した。所望のプラスミドを施されたＣ６００ｈｉｍＡ４２株のラムダ溶原菌であるＫ５６０７株の形質転換細胞は、バクテリオファージミュー（１３）を増殖させる能力について、アンピシリン耐性形質転換細胞をスクリーニングすることにより同定した。標準的なＤＮＡ単離法に従い、ｈｉｍＡ$^{+}$形質転換細胞からＤＮＡを調製し、ｈｉｍＡ遺伝子の配向性は、制限酵素切断により決定した。Ｐ^{L}プロモーターによる発現に適正な配向性でｈｉｍＡ遺伝子を有するプラスミドであるｐＰ$_{L}$ｈｉｍＡ－１を、ｃＩ８５７熱誘導性リプレッサーを発現するラムダ潜在プロファージを含有するＮ５２７１株へと形質転換し、Ｋ５７７０株を得た。
【０３７６】
ＩＨＦ－βサブユニットを過剰産生するために、バクテリオファージラムダのＰ$_{L}$プロモーターとのＩＨＦ－サブユニットをコードする配列の融合体を含有するプラスミドであるｐＫＴ２３－ｈｉｐ３２３を用いた。ｐＫＴ２３－ｈｉｐ３２３を、Ｎ５２７１株に導入して、Ｅ４４３株を得た。別のプラスミドの存在下におけるｐＫＴ２３－ｈｉｐ３２３の選択を容易にするために、その選択マーカーを、アンピシリン耐性（ｂｌａ$^{+}$）マーカーから、クロラムフェニコール耐性（ｃａｔ$^{+}$）マーカーへと変更した。ＦｌａｍｍおよびＷｅｉｓｂｅｒｇにより説明されている通りに、ｃａｔ含有断片を、プラスミドｐＢＲ３２５から単離し、ｂｌａマーカーにおける固有のＳｃａＩ部位に挿入した。ライゲーションされたＤＮＡを、ｈｉｐ変異を保有し、温度感受性のＸリプレッサーを合成するＥ４０３株内に導入し、低温でクロラムフェニコール耐性形質転換細胞を選択した。このような形質転換細胞の１つ（Ｅ７３５株）は、ｈｉｐ$^{+}$であり、かつ、アンピシリン感受性であり、したがって、ｐＫＴ２３－ｈｉｐ３２３のｂｌａ　ｃａｔ$^{+}$誘導体（ｐＥ７３５）を保有すると考えられる。
【０３７７】
ＩＨＦのいずれのサブユニットも過剰産生する細胞株を産生するために、Ｅ７３５株を、プラスミドｐＰ$_{L}$ｈｉｍＡ－１で形質転換し、アンピシリン耐性となり、クロラムフェニコール耐性も保持している形質転換細胞（Ｅ７３８株）を選択した。ＩＨＦタンパク質のいずれのサブユニットも過剰産生する第２の細胞株の産生は、ｐｈｅＴ遺伝子およびｈｉｍＡ遺伝子を含有する、平滑末端のＳｓｔＩＩ制限酵素部位を、ｐＫＴ２３－ｈｉｐ２３プラスミド内にライゲーションすることにより作製されたプラスミドであるｐＰ$_{L}$ｈｉｐ　ｈｉｍＡ－５の構築に依存した。これについては、Ｎａｓｈら（１９８７年）、Ｊ．　ｏｆ　Ｂａｃｔｅｒｉｏｌｏｇｙ、１６９巻（９号）：４１２４～４１２７頁においてさらに詳細に説明されている。Ｋ５６０７株のｈｉｍＡ$^{+}$形質転換細胞は、ＨｉｍＡ$^{+}$についてスクリーニングすることにより同定し、制限消化によりプラスミドＤＮＡを解析した。プラスミド構造が明らかである全ての場合において、２コピーのｈｉｍＡ遺伝子が、タンデム直接反復配列としてベクター内にライゲーションされていた。このプラスミドにおける２コピーのｈｉｍＡ遺伝子の存在が、選択により要請されているのかどうかは未知であるが、ｈｉｍＡ変異体を補完するには、プラスミドｐＰ$_{L}$ｈｉｍＡ－１における単一コピーのｈｉｍＡ遺伝子で十分であることを想起するべきである。プラスミドｐＰ$_{L}$ｈｉｐｈｉｍＡ－５を用いて、Ｎ５２７１株を形質転換し、Ｋ５７４６株を得た。

【０３７８】
細胞は、３１℃で振とう水浴させながら、ＴＢＹ培地（１リットル当たり１０ｇのトリプトン、５ｇの酵母抽出物、および５ｇの塩化ナトリウム）中で増殖させた。対数増殖中期（６５０ｎｍにおける光学濃度を約０．６とする）において、細胞を４２℃の水浴へとシフトし、引き続き振とうした。３００ｍｌの培養物を遠心分離し、２０ｍＭのＮａＣｌを含有する０．６～０．９ｍｌのＴＥＧ（２０ｍＭの塩酸トリス（ｐＨ７．４）、１ｍＭのＥＤＴＡナトリウム、１０％のグリセロール）中に懸濁させることが典型的であった。細胞は、各バースト波間に４０秒間ずつを置く、２０秒間ずつ６回にわたる超音波バースト波により破壊した。超音波抽出物の一部は、Ｓｏｒｖａｌｌ　ＳＳ３４ローター内、１５，０００ｒｐｍで２０分間にわたり遠心分離した。超音波抽出物試料は、標準的な分子生物学法に従う硫酸ドデシルナトリウム（ＳＤＳ）ゲル電気泳動により解析した。

【０３７９】
ＩＨＦタンパク質の精製は、以下の通りに行った：３．６リットルの細胞バッチを、３時間にわたり誘導した。その後の全てのステップは、０～４℃で実施した。３．３リットルのバッチに由来する細胞ペレットを、２０ｍＭのＮａＣｌを含有する１０ｍｌのＴＥＧ中に懸濁させて、２９ｍｌの総容量をもたらし、この懸濁液を、それぞれが、９０秒間の間隔を置き、３分間ずつ６回にわたる超音波処理のバースト波を施される２つのバッチにおいて破壊した。超音波抽出物を１５，０００ｒｐｍで２０分間にわたり遠心分離し、１６．９ｍｌの清明な抽出物を得た。ポリミンＰ（ＢＤＨ　Ｃｈｅｍｉｃａｌｓ　Ｌｔｄ）の１０％（容量／容量）溶液（１．１ｍｌ）を、この清明な抽出物へとゆっくり添加し、２０分間にわたり撹拌した後、混合物を、１０，０００ｒｐｍで３０分間にわたり遠心分離した。結果として得られるペレットを、５００ｍＭのＮａＣｌを含有する１０ｍｌのＴＥＧ中に懸濁させ、１５分間にわたり撹拌した後、混合物を、１２，０００ｒｐｍで２０分間にわたり遠心分離した。上清（１０．３ｍｌ）を、３．２ｇの硫酸アンモニウムを添加することにより、５０％の飽和度へと調整し、２０分間にわたり撹拌し、１５，０００ｒｐｍで１５分間にわたり遠心分離した。結果として得られる上清を、１．６４ｇの硫酸アンモニウムを添加することにより、７０％の飽和度へと調整し、２０分間にわたり撹拌し、１５，０００ｒｐｍで１５分間にわたり遠心分離した。結果として得られるペレットを、１ｍｌのＴＧ（１０％のグリセロールを含有する５０ｍＭの塩酸トリス（ｐＨ７．４））中に懸濁させ、２回にわたり交換されるＴＧに対して透析した。透析された物質（２．０ｍｌ）を、ＴＧで平衡化された、１ｍｌのホスホセルロース製カラム（Ｐ１１、Ｗｈａｔｍａｎ，Ｉｎｃ．）（０．５×５．８ｃｍ）へと投入した。カラムを３ｍｌのＴＧで洗浄し、ＴＧ中の２０ｍｌにわたるＫＣｌ直線勾配（０～１．２Ｍ）で展開した。０．５ｍｌの画分を回収し、－２０℃で保存し、ＩＨＦ活性についてアッセイした。

【０３８０】
抗ＩＨＦポリクローナル抗体は、以下の通りに調製した。ウサギに、フロイントによる完全アジュバントを伴う２５０μｇの精製されたＩＨＦを注射した。フロイントによる不完全アジュバントを伴う２５０μのＩＨＦの追加投与による免疫化を、１、７、および１２週間後に施した。ＩＨＦについての免疫ブロット法により決定される通り、初回注射の１３週間後に回収した血清は、高力価のＩＨＦ反応性物質を有した。動物は、数年間にわたり維持し、それらの血清中の抗ＩＨＦ抗体の高力価を維持するために必要な場合は、さらなる追加投与による免疫化を施した。抗体をさらに精製することはなかった。粗血清は、－７０℃で保存した。

【０３８１】
それぞれのサブユニットに特異的な抗体は、それぞれのサブユニットの最もＣ末端側の２０アミノ酸残基に対応する合成ポリペプチド（配列番号３４および３５）を用いることにより産生し、Ｄｉｔｔｏら（１９９４年）、Ｊ．　ｏｆ　Ｂａｃｔｅｒｉｏｌｏｇｙ、１７６巻（１２号）：３７３８～３７４８頁に従いウサギを免疫化した。

【０３８２】
実験２

この実験は、８ウェルのチャンバースライドにおいて確立されたバイオフィルムのｉｎｖｉｔｒｏにおける可逆化モデルについて説明する。この実験で用いられる材料は、チョコレート寒天培地；ｓＢＨＩ（１ｍＬ当たり２ｍｇのヘムおよび１ｍＬ当たり２ｍｇのｂ－ＮＡＤを伴うＢＨＩ）；８ウェルのチャンバースライド（Ｎｕｎｃ＊ Ｌａｂ－Ｔｅｋ＊ Ｆｉｓｈｅｒ、型番１２－５６５－１８）；０．９％の滅菌生理食塩液；ＬＩＶＥ／ＤＥＡＤ ＢａｃＬｉｇｈｔ Ｂａｃｔｅｒｉａｌ Ｖｉａｂｉｌｉｔｙ Ｋｉｔ（Ｆｉｓｈｅｒ、型番ＮＣ９４３９０２３）、およびホルマリンであった。

【０３８３】

１日目には、チョコレート寒天培地上でＮＴＨＩを切り取り、単離した。次いで、ＮＴＨＩを、３７℃および５％CO_2中で２０時間にわたりインキュベートした。翌日、細菌を、５ｍＬの平衡化（３７℃、５％CO_2）されたｓＢＨＩ中に懸濁させ、ｓＢＨＩ中の光学濃度をOD_{490}＝０．６５に調整した。細菌は、平衡化されたｓＢＨＩ中で１：６に希釈した（１ｍＬの細菌懸濁液＋５ｍＬのｓＢＨＩ）。次いで、細菌を、３７℃、５％CO_2中で３時間にわたり、静かにインキュベートした（OD_{490}を、約０．６５とする）。次に、細菌を、平衡化されたｓＢＨＩ中で、再度１：２５００に希釈し、２００ｍＬの細菌懸濁液を、チャンバースライドの各ウェルに添加した。希釈のため、１０μＬの細菌を、エッペンドルフ管内に９９０μＬのｓＢＨＩへと添加し、８μＬの希釈液を、各チャンバー内に１９２μＬずつのｓＢＨＩへと添加し、３７℃、５％CO_2中で静かにインキュベートした。

【０３８４】

３日目、インキュベーションの１６時間後、バイオフィルムを攪乱しないようにウェルの角から培地を吸引することにより、培地を吸引した。次いで、２００ｍＬの平衡化されたｓＢＨＩを各チャンバーに添加し、３７℃、５％CO_2中で８時間にわたり静かにインキュベートした。８時間後、培地を吸引し、２００ｍＬの平衡化されたｓＢＨＩを処置されていない各チャンバーに添加し、ｓＢＨＩ中で１：５０に希釈したウサギ抗ｒｓＰｉｌＡなどの干渉作用剤２００ｍＬ、およびｓＢＨＩ中で１：５０に希釈した２００ｍＬのナイーブウサギ血清（または他の適切な血清対照）を添加した。次いで、これらを、３７℃、５％CO_2中で静かにインキュベートした。

【０３８５】

４日目、インキュベーションの約１６時間後、ｓＢＨＩを吸引し、２００ｍＬの滅菌生理食塩液で２回にわたりバイオフィルムを洗浄した。生理食塩液を吸引し、２００ｍＬのＬｉｖｅ／Ｄｅａｄ色素を添加した。次に、１ｍＬの滅菌１０ｍＭリン酸緩衝生理食塩液中に３ｍＬの成分Ａおよび３ｍＬの成分Ｂを添加した。次いで、これを、室温で１５分間にわたり光から保護して静かにインキュベートした。色素を吸引し、２００ｍＬの滅菌生理食塩液で２回にわたりバイオフィルムを洗浄した。生理食塩液を吸引し、２００ｍＬのホルマリンを添加して、バイオフィルムを固定した。次いで、これを、室温で１５分間にわたり光から保護して静かにインキュベートした。ホルマリンを吸引し、２００ｍＬの滅菌生理食塩液で２回にわたりバイオフィルムを洗浄した。ガスケットを取り外し、スライドガラスにカバースリップを取り付け、カバースリップを、マニキュア液で封印し、乾燥させてから、共焦点顕微鏡で観察した。

【０３８６】

本方法および抗ＩＨＦ抗体を用いて、本出願人らは、副鼻腔炎、気管支炎、中耳炎、および慢性閉塞性肺疾患（ＣＯＰＤ）の増悪において蔓延するＨａｅｍｏｐｈｉｌｕｓ ｉｎｆｌｕｅｎｚａｅにより産生されるバイオフィルムを縮小させた。処置されていないバイオフィルム量は、４．２４μm^3／μm^2であり、平均の厚さは１１．６８μｍであると測定された。処置後、バイオフィルム量は、０．５３μm^3／μm^2へと低減され、平均の厚さも１．３１μｍへと低減された。したがって、これは、平均の厚さにおける８８．８％の低減、およびバイオマスにおける８７．５％の低減を示す。

【０３８７】

Ｅ．ｃｏｌｉのＩＨＦを指向するポリクローナル抗血清は、精製された組込み宿主因子

（ＩＨＦ）を用いる標準的な技法に従い、ウサギにおいて調製した。実験１では、Ｅ．ｃｏｌｉに由来するＩＨＦの発現および精製について説明している。

【０３８８】

本方法および抗ＩＨＦ抗体を用いて、本出願人らは、齲蝕の発症および増悪において蔓延するＳｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｍｕｔａｎｓにより産生されるバイオフィルムを縮小させた。処置されないバイオフィルム量は１．１７μｍ^3／μｍ^{2}であり、平均の厚さは５．４３μｍであると測定された。処置後、バイオフィルム量は、０．１μｍ^3／μｍ^{2}へと低減され、平均の厚さも０．４７μｍへと低減された。したがって、これは、平均の厚さにおける９１．３％の低減、およびバイオマスにおける９１．６％の低減を示す。ｉｎ　ｖｉｔｒｏにおけるバイオフィルムアッセイは、隔日で３回にわたり反復した。最大の高さ、平均の厚さ、およびバイオマスにおける低減百分率を、以下の表１に示す。

【０３８９】

【表１】

表 1

		アッセイ 1	アッセイ 2	アッセイ 3
S. mutans	最大の高さ (μm)	56	24	41
	平均の厚さ (μm)	65	65	67
	バイオマス ($\mu m^3/\mu m^2$)	37	58	66

本方法および抗ＩＨＦ抗体を用いて、本出願人らは、限局性皮膚感染症およびびまん性皮膚感染症、慢性鼻副鼻腔炎、および院内感染において蔓延するＳｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ　ａｕｒｅｕｓにより産生されるバイオフィルムを縮小させた。処置されないバイオフィルム量は０．３μｍ^3／μｍ^{2}であり、平均の厚さは２．２μｍであり、バイオフィルムの高さは１７．５μｍであると測定された。処置後、バイオフィルム量は、０．３μｍ^3／μｍ^{2}へと低減され、平均の厚さも１．１μｍへと低減され、バイオフィルムの高さも８μｍへと低減された。したがって、これは、平均の厚さにおける４８．８％の低減、およびバイオマスにおける２．７％の低減を示す（図７）。

【０３９０】

本方法および抗ＩＨＦ抗体を用いて、本出願人らは、ＣＯＰＤの増悪および中耳炎において蔓延するＭｏｒａｘｅｌｌａ　ｃａｔａｒｒｈａｌｉｓにより産生されるバイオフィルムを縮小させた。処置されないバイオフィルム量は０．７２μｍ^3／μｍ^{2}であり、平均の厚さは１．４８μｍであると測定された。処置後、バイオフィルム量は、０．１３μｍ^3／μｍ^{2}へと低減され、平均の厚さも０．６５μｍへと低減された。したがって、これは、平均の厚さにおける５５．８％の低減、およびバイオマスにおける８２．１％の低減を示す。ｉｎ　ｖｉｔｒｏにおけるバイオフィルムアッセイは、隔日で３回にわたり反復した。最大の高さ、平均の厚さ、およびバイオマスにおける低減百分率を、以下の表２に示す。

【０３９１】

【表２】

表 2

		アッセイ 1	アッセイ 2	アッセイ 3
M. catarrhailis	最大の高さ (μm)	61	33	36
	平均の厚さ (μm)	92	34	84
	バイオマス ($\mu m^3/\mu m^2$)	92	35	92

本方法および抗ＩＨＦ抗体を用いて、本出願人らは、副鼻腔炎、肺炎、および中耳炎に

おいて蔓延するＳｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅにより産生されるバイオフィルムを縮小させた。処置されないバイオフィルム量は０．６４μｍ^3／μｍ^{2}であり、平均の厚さは３．９９μｍであると測定された。処置後、バイオフィルム量は、０．１４μｍ^3／μｍ^{2}へと低減され、平均の厚さも０．８２μｍへと低減された。したがって、これは、平均の厚さにおける７９．５％の低減、およびバイオマスにおける７８．６％の低減を示す。ｉｎ　ｖｉｔｒｏにおけるバイオフィルムアッセイは、隔日で３回にわたり反復した。最大の高さ、平均の厚さ、およびバイオマスにおける低減百分率を、以下の表３に示す。

【０３９２】

【表３】

表 3

		アッセイ 1	アッセイ 2	アッセイ 3
S. pneumoniae	最大の高さ (μm)	49	51	44
	平均の厚さ (μm)	25	64	79
	バイオマス ($\mu m^3/\mu m^2$)	51	61	79

本方法および抗ＩＨＦ抗体を用いて、本出願人らは、嚢胞性線維症、肺炎、皮膚および軟組織における感染症、ならびに医療機器において蔓延するＰｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ａｅｒｕｇｉｎｏｓａにより産生されるバイオフィルムを縮小させた。処置されないバイオフィルム量は７．０μｍ^3／μｍ^{2}であり、平均の厚さは２５．７０μｍであり、バイオフィルムの高さは４０μｍであると測定された。処置後、バイオフィルム量は、３．４μｍ^3／μｍ^{2}へと低減され、平均の厚さも１０．３μｍへと低減され、バイオフィルムの高さも２７．５μｍへと低減された。したがって、これは、平均の厚さにおける６０．１％の低減、およびバイオマスにおける５０．８％の低減を示す（図７）。

【０３９３】

本方法および抗ＩＨＦ抗体を用いて、本出願人らは、淋病において存在するＮｅｉｓｓｅｒｉａ　ｇｏｎｏｒｒｈｏｅａｅにより産生されるバイオフィルムを縮小させた。処置されないバイオフィルム量は９．５μｍ^3／μｍ^{2}であり、平均の厚さは２２．０２μｍであり、バイオフィルムの高さは４０μｍであると測定された。処置後、バイオフィルム量は、０．８μｍ^3／μｍ^{2}へと低減され、平均の厚さも３．４μｍへと低減され、バイオフィルムの高さも２７．５μｍへと低減された。したがって、これは、平均の厚さにおける８４．５％の低減、およびバイオマスにおける９２．１％の低減を示す（図７）。

【０３９４】

本方法および抗ＩＨＦ抗体を用いて、本出願人らは、尿路感染症において蔓延する尿路病原性Ｅ．ｃｏｌｉにより産生されるバイオフィルムを縮小させた。処置されないバイオフィルム量は１．７５μｍ^3／μｍ^{2}であり、平均の厚さは３１．７３μｍであると測定された。処置後、バイオフィルム量は、０．７５μｍ^3／μｍ^{2}へと低減され、平均の厚さも１．６２μｍへと低減された。したがって、これは、平均の厚さにおける９４．９％の低減、およびバイオマスにおける５６．９％の低減を示す。ｉｎ　ｖｉｔｒｏにおけるバイオフィルムアッセイは、隔日で３回にわたり反復した。最大の高さ、平均の厚さ、およびバイオマスにおける低減百分率を、以下の表４に示す。

【０３９５】

【表４】

表 4

UPEC

	アッセイ 1	アッセイ 2	アッセイ 3
最大の高さ (μm)	69	65	76
平均の厚さ (μm)	97	33	95
バイオマス ($\mu m^3/\mu m^2$)	98	96	57

本方法および抗ＩＨＦ抗体を用いて、本出願人らは、皮膚感染症において蔓延するＳｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ　ｅｐｉｄｅｒｍｉｄｉｓにより産生されるバイオフィルムを縮小させた。ｉｎ　ｖｉｔｒｏにおけるバイオフィルムアッセイは、隔日で３回にわたり反復した。最大の高さ、平均の厚さ、およびバイオマスにおける低減百分率を、以下の表５に示す。

【０３９６】

【表５】

表 5

S. epidermidis

	アッセイ 1	アッセイ 2	アッセイ 3
最大の高さ (μm)	42	38	56
平均の厚さ (μm)	62	71	92
バイオマス ($\mu m^3/\mu m^2$)	62	76	88

実験３

中耳の感染症（または中耳炎、ＯＭ）は、世界中で有病率の高い疾患であり、世界中で毎年５０００万～３億３０００万人の小児が罹患している。ＯＭの社会経済的な負荷もまた大きく、米国だけで、毎年５０～６０億ドルの費用が推算されている。ＯＭの主要な病原菌のうちの３つ全てが、ｉｎ　ｖｉｔｒｏおよびｉｎ　ｖｉｖｏのいずれにおいてもバイオフィルムを形成することが公知であり、近年、医師らは、ＯＭの慢性性および再発性が、少なくとも部分的に、中耳腔における細菌バイオフィルムの形成に起因することを理解するようになっている。ＯＭについてのチンチラモデルの１つでは、若年のチンチラに、まずウイルス性の「風邪」を施した１週間後、これらに、生菌による接種物で鼻腔内的に感作した。「私の子供は風邪をひき、１週間後に耳の感染症になりました」というヒトにおける状態と同様に、チンチラもまた、感作の約１週間後に、ウイルス性の上気道感染症を患う一方で、細菌性ＯＭを発症した。細菌の増加が中耳に到達すると（耳管の上行を介して、または中耳腔への直接的な感作後において）、細菌は、堅調なバイオフィルムを形成する。したがって、本出願人らは、本明細書で報告する通り、チンチラモデルを意図し、これをすでに実際に用いて、既存のバイオフィルムを速やかに消失させる結果をもたらすＩＨＦによる免疫化の防御効果を裏付けた。このモデルはまた、抗ＤＮＡＢＩＩ抗体の受動送達を介する、またはＩＨＦもしくは他のＤＮＡＢＩＩファミリーメンバーに結合することが公知である低分子または他の作用剤の送達を介する療法にも有用である。

【０３９７】

チンチラモデルを、ヒトワクチンの開発および前臨床試験に用いるため、ヒト宿主、特に、小児との有意義な免疫学的相応物を確立することが重要である。本出願人らは、ＮＴＨＩに起因する急性中耳炎（ＡＯＭ）を伴う小児から回収された滲出物と、実験によるＮＴＨＩ誘導性ＯＭを伴うチンチラに由来する中耳液とが、ＯＭＰ　Ｐ５の免疫優性領域を類似した階層的な方式で認識することを示した（例えば、Ｎｏｖｏｔｎｙ　ＬＡら（２０００年）、Ｉｎｆｅｃｔ　Ｉｍｍｕｎ．、６８巻（４号）：２１１９～２８頁；Ｎｏｖｏｔｎｙ　ＬＡら（２００７年）、９ｔｈ　Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ　Ｓｙｍｐｏｓｉ

ｕｍ ｏｎ Ｒｅｃｅｎｔ Ａｄｖａｎｃｅｓ ｉｎ Ｏｔｉｔｉｓ Ｍｅｄｉａ、Ｓｔ．Ｐｅｔｅ Ｂｅａｃｈ、ＦＬ；Ｎｏｖｏｔｎｙ ＬＡら（２００２年）、Ｖａｃｃｉｎｅ、２０巻（２９～３０号）：３５９０～９７頁を参照されたい）。本出願人らはまた、実験によるＯＭを伴うチンチラ、自然感染によるＯＭを伴う小児、およびＣＯＰＤが増悪した成人のいずれもが、ＰｉｌＡを示すペプチドを非常に類似した方式で認識することも示した（例えば、Ａｄａｍｓ ＬＤら（２００７年）、１０７ｔｈ Ｇｅｎｅｒａｌ Ｍｅｅｔｉｎｇ、Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｓｏｃｉｅｔｙ ｆｏｒ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌｏｇｙ、２００７年、Ｔｏｒｏｎｔｏ、ＯＮ；Ａｄａｍｓ ＬＤら（２００７年）、９ｔｈ Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ Ｓｙｍｐｏｓｉｕｍ ｏｎ Ｒｅｃｅｎｔ Ａｄｖａｎｃｅｓ ｉｎ Ｏｔｉｔｉｓ Ｍｅｄｉａ、Ｓｔ．Ｐｅｔｅ Ｂｅａｃｈ、ＦＬ．を参照されたい）。したがって、実験によるＯＭを伴うチンチラと、自然感染によるＯＭを伴う小児とは、少なくとも２つの非類縁ＮＴＨＩタンパク質であるアデシンに対して免疫学的に応答するときに類似している。近年、この類似が最終的な試験にかけられたが、そこでは、新規の１１価のプロテインＤ（Ｐｎｅｕｍｏｃｏｃｃｕｓ属多糖によるコンジュゲートワクチン）の前臨床有効性試験を実施するのに、チンチラのＡＶ－ＮＴＨＩ重感染モデルが用いられた。チンチラにおいて得られたデータが３４％の有効性を予測する一方、小児で調べたところでは、Ｈ．ｉｎｆｌｕｅｎｚａｅ誘導性ＯＭに対して得られた有効性が３５．６％であり（例えば、Ｎｏｖｏｔｎｙ ＬＡら（２００６年）、Ｖａｃｃｉｎｅ、２４巻（２２号）：４８０４～１１頁；およびＰｒｙｍｕｌａ Ｒら（２００６年）、Ｌａｎｃｅｔ．、３６７巻（９５１２号）：７４０～８頁を参照されたい）、それにより、ＯＭワクチン候補物質の開発および試験に対するこのモデルの関与性が強く裏付けられた。

【０３９８】

本出願人らは、ＩＨＦを粘膜／全身アジュバントと共に送達する毎週２回のＴＣ的な免疫化を施された後で、チンチラの中耳内に残存する、あらかじめ形成されたバイオフィルムが劇的に縮小することを示した。

【０３９９】

Ｒａｕｓｃｈｅｒ’ｓ Ｃｈｉｎｃｈｉｌｌａ Ｒａｎｃｈ（ＬａＲｕｅ、Ｏｈｉｏ）から４８匹の成体を取り寄せ、７～１０日間にわたり飼育場に馴らしてから、試験を開始した。ＴＢ的な感作［経中耳骨胞的な感作または中耳腔内への直接的な感作］の前に、ベースラインの耳鏡検査および鼓膜聴力検査のほか、限定容量の前採血を実施して、血清を回収した。チンチラに麻酔をかけ、約１０００ｃｆｕを含有する３００μｌのＮＴＨＩ（株番号：８６－０２８ＮＰ）懸濁液を、経中耳骨胞的な感作を介して、中耳腔内に導入した。動物を覚醒させ、ＩＡＣＵＣにより許容されている動物使用についてのプロトコールに従い、有害反応について毎日モニタリングした。研究期間全体にわたり、２～３日間ごとに、ルーチンの耳鏡検査および鼓膜聴力検査を実施した。

【０４００】

感作の４日後（＋４日目）、チンチラに麻酔をかけ、ＣＴスキャンを実施して、中耳内に存在するバイオフィルムを画像化し、免疫化前の画像を得た。滅菌の発熱物質を含まない生理食塩液で湿らせた滅菌ガーゼパッドで拭うことにより、耳介の表面を清浄化し、水分補給した。約２分（耳介を乾燥させるための）後、５０μｌのｄｍＬＴ溶液、ＩＨＦ（実験１による精製されたＥ．ｃｏｌｉのＩＨＦ）＋ｄｍＬＴ溶液、またはＩＨＦタンパク質＋ｒｓＰｉｌＡ＋ｄｍＬＴ溶液を、耳介へと添加し、静かに擦り込む。１コホート当たり３匹ずつのチンチラを屠殺し、組織／試料を回収し（＋４日目、および＋１１日目）、作用機構の決定を開始した。

【０４０１】

感作の１１日後（＋１１日目）、２回目の免疫化であって、耳介を清浄化／水分補給し、免疫原を局所投与する免疫化を、上記で説明した通りに行った。１コホート当たり３匹ずつのチンチラを屠殺し、組織／試料を回収し、作用機構の決定を開始した。

【０４０２】

感作の１８日後（＋１８日目）、チンチラに麻酔をかけ、ＣＴスキャンを実施して、存在するバイオフィルムを同定したほか、免疫化前のＣＴスキャンと比較した。次いで、動物から採血して血清を回収し、安楽死させた。中耳骨胞を切除して、存在する任意の体液を無菌的に回収し、次いで、中耳骨胞を切開して、中耳骨胞内部および存在する任意のバイオフィルムを画像化した。画像を収集し、１ｍｌの滅菌生理食塩液で中耳骨胞を洗浄して、再度画像化した。存在する任意のバイオフィルムと共に、右側中耳骨胞から粘膜を回収し、あらかじめ秤量した試験管内に入れた。これらの組織をホモジナイズし、段階希釈し、プレートに播種して、組織の湿潤重量１ｍｇ当たりのＮＴＨＩのｃｆｕを決定した。左側中耳骨胞には、ＯＣＴ化合物を充填し、組織学的解析のために瞬間凍結させた。

【０４０３】

バイオフィルムが存在する左側中耳腔および右側中耳腔についての画像をスクランブルし、動物１匹当たり２枚ずつの画像を、単一のファイルにコンパイルし、盲検化された評価者にランク付けさせた。各動物の中耳内に残存するバイオマスの相対量を、以下の表６に示すスケールを用いて、盲検化された評価者に、０～４＋のスケールでランク付けさせた。血清、ならびに回収された中耳滲出物に対して、滴定ＥＬＩＳＡ、サイトカインアレイ、およびＢｉａｃｏｒｅ法を実行した。ＯＣＴ包埋した中耳は、免疫組織化学および／または免疫蛍光を用いて、基本的形態および構成（Ｈ＆Ｅ）について、またはＩＨＦの存在について、切片化および染色した。

【０４０４】

【表６】

表 6

スコア	基準
0	バイオマスの証拠が見られない。
1+	バイオマスが、中耳腔の≦25%を満たす。中耳骨胞下部への骨性隔壁の接合部が目視できる。
2+	バイオマスが、中耳腔の>25%～≦50%を満たす。骨性隔壁が中耳骨胞下部とどこで接合するかを目視することができない。
3+	バイオマスが、中耳腔の>50%～≦75%を満たす。バイオマスが、骨性隔壁の全長のうちの>50%を覆う。
4+	バイオマスが、中耳腔の>75%～≦100%を満たす。骨性隔壁は、バイオマスにより覆い隠されており、目視することができない。

ｉｎ ｖｉｖｏにおいて形成されたバイオフィルムの凍結切片についての免疫蛍光イメージングは、以下に従って実施した。切除後、それぞれのチンチラの中耳には、ＯＣＴ包埋化合物（Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、Ｐｉｔｔｓｂｕｒｇｈ、ＰＡ）を充填し、液体窒素により瞬間凍結させた。中耳骨胞内部を形成する骨を除去し、中耳粘膜および既存のバイオフィルムを静置した。次いで、結果として得られるブロックを両断し、バイオフィルムの断面を露出させ、ＯＣＴ内に再度包埋した。Ｍｉｃｒｏｍ ｒｏｔａｒｙ ｃｒｙｏｔｏｍｅを用いて、１０ミクロンの切片系列を切り出し、スライドガラス（Ｍｅｒｃｅｄｅｓ Ｍｅｄｉｃａｌ、Ｓａｒａｓｏｔａ、ＦＬ）に付着させ、－８０℃で保存した。その後、切片を染色して、ｉｎ ｖｉｖｏにおいて形成されたバイオフィルムにおけるＩＨＦの相対的組込みを決定した。略述すると、スライドガラスを空気乾燥させ、低温アセトン中で固定し、次いで、緩衝液（０．０５Ｍのトリス－ＨＣｌ、０．１５ＭのＮａＣｌ、および０．０５％のＴｗｅｅｎ ２０、ｐＨ７．４）中で平衡化させた。

【０４０５】

製造元の指示書に従い、ｉｍａｇｅ－ｉＴ ＦＸ ｓｉｇｎａｌ ｅｎｈａｎｃｅｒ（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｐｒｏｂｅｓ、Ｅｕｇｅｎｅ、ＯＲ）およびＢａｃｋｇｒｏｕｎｄ Ｓｎｉｐｅｒ（ＢｉｏＣａｒｅ Ｍｅｄｉｃａｌ、Ｃｏｎｃｏｒｄ、ＣＡ）により、切

片をブロッキングした。次いで、切片を、加湿したチャンバー内４℃で一晩にわたり、１：２００のウサギ抗ＩＨＦポリクローナル抗体希釈液と共にインキュベートした。スライドガラスをさらにすすぎ、室温で３０分間にわたり、ＡｌｅｘａＦｌｕｏｒ　５９４（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）とコンジュゲートした、ヤギ抗ウサギＩｇＧと共にインキュベートした。対比染色として、切片を、ＤＡＰＩと共にインキュベートし、ＰｒｏＬｏｎｇ　Ｇｏｌｄ　ａｎｔｉｆａｄｅ　ｒｅａｇｅｎｔ（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｐｒｏｂｅｓ、Ｅｕｇｅｎｅ、ＯＲ）を用いてカバースリップを施した。ナイーブのウサギ血清を、陰性対照として用いた。切片は、Ｚｅｉｓｓ　Ａｘｉｏｖｅｒｔ　２００型倒立顕微鏡（Ｃａｒｌ　Ｚｅｉｓｓ　Ｉｎｃ．、Ｔｈｏｒｎｗｏｏｄ、ＮＹ）に取り付けたＺｅｉｓｓ　ＬＳＭ　５１０　Ｍｅｔａ共焦点システムにより観察した。

【０４０６】

組織１ｍｇ当たりの平均ＣＦＵおよびＮＴＨＩの上清１ｍｌ当たりの平均ＣＦＵにおける有意差は、対応のあるｔ検定により決定した。ｐ値≦０．０５を有意であると考えた。コホート間の相対バイオマスにおける有意差は、対応のないｔ検定により評価した。ｐ値≦０．０５を有意であると考えた。

【０４０７】

図９のパネルＡに示す通り、アジュバントだけで免疫化したチンチラの中耳内に残存するバイオマスについての平均スコアは２．８であり、これは、中耳に対する細菌感作の１８日後までに、大半の動物において、疾患が著明に残存し、あらかじめ形成されたバイオマスの消失がなされていないことを示した。これに対し、Ｅ．ｃｏｌｉのＩＨＦタンパク質＋アジュバントで免疫化された動物についての平均スコアは１．５であった。＋２．８の平均スコアを与えられた残留バイオマス、および＋１．５の平均スコアを与えられた残留バイオマスについての代表的な画像を、図９のパネルＢに示す。また、図１０に示す通り、中耳内のバイオマス構成の変化についての組織学的証拠（パネルＡを参照されたい）、ならびにバイオマスをホモジナイズし、チョコレート寒天培地において培養することにより測定した、残存するバイオマス中に存在する細菌負荷の統計学的に有意な低減（パネルＢを参照されたい）の両方により、疾患の消失についてさらに測定した。さらに、単離されたＥ．ｃｏｌｉのＩＨＦタンパク質で免疫化した全ての動物が、局所性および全身性の強力な免疫応答を示し、剖検時に注意された通り、免疫化の結果としての明らかな続発症を示す動物は見られなかった（データは示さない）。

【０４０８】

ｉｎ　ｖｉｔｒｏにおいて抗ＩＨＦ抗体を用いた場合に観察される、バイオフィルムをデバルキングする顕著な有効性、およびまた、ｉｎ　ｖｉｖｏにおいて免疫原として用いた場合に観察される、精製されたＥ．ｃｏｌｉのＩＨＦタンパク質が、進行中のバイオフィルム疾患を消失させ得るポリクローナル抗体の形成を誘導する顕著な有効性は、哺乳動物宿主が、再発性および／または慢性の疾患状態を示す細菌バイオフィルム内でｅＤＮＡと会合するＤＮＡＢＩＩタンパク質に対して有効な免疫応答を天然ではもたらさないのはなぜかについての難問を提起した。それがＤＮＡに結合したときのＩＨＦについて解明された構造を再検討する（Ｒｉｃｅら（１９９６年）、Ｃｅｌｌ、８７巻（７号）：１２９５～１３０６頁）と、タンパク質構造のうちのかなりの部分が、結合したＤＮＡにより閉塞していることが明らかであり、それにより、細菌バイオフィルム内でｅＤＮＡに結合したときの、ＩＨＦおよび／またはＨＵによる防御的エピトープまたは防御的ドメインが閉塞する可能性が示唆された。ＤＮＡが結合していない天然のＩＨＦを免疫原として用いることにより、このような閉塞を克服し、それにより、防御的抗体の産生を促進する機構がもたらされ得ることが仮定された。

【０４０９】

免疫化したときに、ｅＤＮＡが、ＤＮＡＢＩＩファミリーメンバーを指向する防御的抗体の発生を実際に予防し得る一方で、天然タンパク質の使用が有効であるのかどうかを決定するため、第２の大規模コホートによる研究であって、すでに詳述したチンチラ研究を本質的に反復する研究を実施した。

【０４１０】
第２の動物免疫化研究のために、鼓膜聴力検査およびビデオによる耳鏡検査を介して、中耳疾患の証拠を有さないことが示されている２０匹の成体チンチラ（体重を５００～７００ｇとする）を登録し、それぞれ５匹ずつの４コホートに分けた。ここでもまた、全ての動物に、中耳骨胞１個当たり約１０００ＣＦＵのＮＴＨＩ　８６－０２８ＮＰ株を、経中耳骨胞的に感作した。４日後、これらの動物の中耳腔内でバイオフィルムが形成された後、上記で説明した通り、動物を、経皮的な経路（ＴＣＩ）を介して免疫化した。処方物は、１０μｇのｄｍＬＴと混合された１０μｇのＩＨＦ、ＤＮＡにあらかじめ結合させた１０μｇのＩＨＦタンパク質＋ｄｍＬＴ、ＤＮＡ＋ｄｍＬＴ、または１０μｇのｄｍＬＴ単独からなった。

【０４１１】
ＤＮＡにあらかじめ結合させたＩＨＦタンパク質でＴＣＩ的に免疫化する結果として、同じヌクレオタンパク質の複合体を皮下（ＳＱ）的に送達した場合に誘導される免疫応答と同様の免疫応答、およびＩＨＦタンパク質単独により誘導された免疫応答と比較して同様の免疫応答がもたらされるかどうかを決定するため、２匹の成体チンチラを免疫化し、抗血清を産生させた。それぞれの動物にプライミング用量を施した後で、３０日間隔で、２回にわたる同量の追加投与を行った。チンチラ宿主においてその強力なアジュバント特性が示されているために、免疫原を、アジュバントであるモノホスホリル脂質Ａ（ＭＰＬ）（投与１回当たり１０μｇ）（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ、Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ、ＭＯ）と混合した（例えば、Ｂａｋａｌｅｔｚら（１９９９年）、Ｉｎｆｅｃｔ　Ｉｍｍｕｎ．、６７巻（６号）：２７４６～２７６２頁；およびＫｅｎｎｅｄｙら（２０００年）、Ｉｎｆｅｃｔ．　Ｉｍｍｕｎ．、６８巻（５号）：２７５６～２７６５頁を参照されたい）。一方のチンチラは、１０μｇのＩＨＦタンパク質＋ＭＰＬで免疫化し、他方のチンチラには、ＤＮＡに結合させた１０μｇのＩＨＦタンパク質＋ＭＰＬを施した。全ての投与は、２００μｌの総容量でＳＱ的に送達した。最終回の追加投与を施した１５日後、動物から採血して血清を得、ウェスタンブロットおよびＥＬＩＳＡを介して血清をアッセイし、逆数による力価およびＩＨＦタンパク質に対する抗体反応性の特異性の両方を決定した。

【０４１２】
ここでもまた、研究の終了時に、中耳を、疾患の重症度について、０～４＋でスコア付けした。ＩＨＦタンパク質およびＤＮＡが、免疫化のための複合体内に残存していることをより十分に確認するため、公表されている共結晶化研究（例えば、Ｒｉｃｅら（１９９６年）、Ｃｅｌｌ、８７巻（７号）：１２９５～１３０６頁を参照されたい）において用いられている、分子比［ＤＮＡ（１０μＭ）対ＩＨＦタンパク質（５μＭ）の分子比］を２：１とする、バクテリオファージラムダの組換え型の部位であるａｔｔＰに由来する高アフィニティーのＩＨＦ結合部位の合成オリゴヌクレオチドと同一の合成オリゴヌクレオチドを用いた。この合成オリゴヌクレオチド量は、このＤＮＡ標的に結合したＩＨＦタンパク質のK_dを少なくとも３桁上回った。図１１に示す通り、ＩＨＦタンパク質は、電気泳動による移動シフトアッセイにおけるその移動性の低下により示される通り、ｄｓＤＮＡに実際に結合した。

【０４１３】
図１２に示す通り、単離されたＥ．ｃｏｌｉのＩＨＦタンパク質で免疫化された動物は、平均の残留中耳バイオマススコアが０．９であり、アジュバント単独で免疫化された対照（平均バイオマススコア＝２．２）、またはアジュバントと混合されたＤＮＡで免疫化された対照（平均バイオマススコア＝２．８）と比較して、疾患状態の劇的な軽減を示した。興味深いことに、ＩＨＦ－ＤＮＡ複合体で免疫化された動物の中耳はまた、アジュバント単独またはアジュバントと混合されたＤＮＡを施されたコホートと統計学的な有意差を示さない、２．５の平均バイオマススコアをもたらす、著明量の細菌バイオマスを残存させることも示した。この結果は、自然感染による疾患の場合であろうと仮定し得る通り、十分なｅＤＮＡ断片が存在する場合、この状況が、中和抗体の産生に必要な極めて重要

なＩＨＦエピトープの閉塞を結果としてもたらし得ることを強く示唆した。

【０４１４】

観察されたＤＮＡ閉塞の結果が、経皮的な免疫化経路の使用に特異的でないことを確認するため、皮下（ＳＱ）的な免疫化経路を用いて、チンチラ宿主内の抗原提示細胞への抗原の送達を確保する免疫化を反復した。図１３に示す通り、ウェスタンブロットによりアッセイしたところ、単離されたＥ．ｃｏｌｉのＩＨＦタンパク質によるＳＱ的な免疫化が、単離されたＩＨＦに対する強力な免疫応答の産生をもたらしたのに対し、過剰量のＤＮＡにあらかじめ結合させたＥ．ｃｏｌｉのＩＨＦタンパク質による免疫化は、ＩＨＦを認識する検出可能な抗体を誘導できなかった。ＥＬＩＳＡによりアッセイしたところ、単離されたＩＨＦに対する逆数による力価は、オリゴヌクレオチドにあらかじめ結合させたＩＨＦで免疫化した動物の場合が１０００であったのに対し、天然のＩＨＦで免疫化した動物の場合は８０００であった（ＩＨＦに対する、いずれの動物の免疫前の逆数による力価も１００であった）。まとめると、これらの結果は、自然感染による疾患状態において生じるｅＤＮＡとのＩＨＦタンパク質の結合が、防御的な獲得免疫応答の産生に必要なＩＨＦタンパク質のエピトープまたはドメインを遮断する可能性を有するという本発明者らの仮説と符合する。さらに、天然のＩＨＦタンパク質（ＤＮＡが結合していないＩＨＦタンパク質）による免疫化は、本明細書で説明したいずれの前臨床チンチラ研究でも裏付けられた通り、防御的抗体または中和抗体の産生への免疫応答の有効な方向付けを可能とすると考えられた。

【０４１５】

実験４

歯槽骨および歯肉を破壊する歯周炎およびインプラント周囲炎などの炎症性疾患の発症機序には、多数の口内細菌（例えば、Ａｇｇｒｅｇａｔｉｂａｃｔｅｒ ａｃｔｉｎｏｍｙｃｅｔｅｍｃｏｍｉｔａｎｓ、Ｐｏｒｐｈｙｒｏｍｏｎａｓ ｇｉｎｇｉｖａｌｉｓ）が関与している。これらの細菌の病原性についての探索は、有効な動物モデルの欠如により妨げられている。特定の細菌の病原性を探索することの難題の１つは、外因性細菌が、動物の口腔内に導入された場合のバイオフィルムを確立することの困難である。歯周炎の動物モデルは開発されているが、接種された動物の口腔から培養可能な細菌が回収されることはまれである。特定の細菌の病原性を評価し得る有効な動物モデルを開発することは、それらの発症機構を解明することに大きな一助となるであろう。

【０４１６】

加工したチタン製の歯科インプラント（１．２×４．５ｍｍ）の表面を、Al_2O_3によるグリットブラスチング（１００μｍ）、およびＨＣｌによるエッチング（ｐＨ７．８、８０℃で２０分間にわたる）を介して修飾した。加工およびナノテクスチャー処理したインプラントを、Ａｇｇｒｅｇａｔｉｂａｃｔｅｒ ａｃｔｉｎｏｍｙｃｅｔｅｍｃｏｍｉｔａｎｓ（Ａａ）のＤ７Ｓ臨床株を接種したＴＳＢ培地中、３７℃で１～３日間にわたりインキュベートした。インプラント上の細菌バイオフィルムは、ＳＥＭにより解析するほか、共焦点レーザー走査顕微鏡により解析した後、ＬＩＶＥ／ＤＥＡＤ（登録商標）ＢａｃＬｉｇｈｔ（商標）で染色した。Ａａバイオフィルムが確立されたインプラントおよびＡａバイオフィルムが確立されていないインプラントを、雌ラット歯槽骨の上顎の小臼歯領域と門歯領域との間に経粘膜的に設置した。ｉｎ ｖｉｖｏで設置されたインプラントにおけるＡａバイオフィルムの存在を検出するため、２日後に唾液および口腔内のインプラント表面から細菌試料を回収した。Ａａは、培養を介してのほか、ＰＣＲ解析を介しても検出した。植え込みの６週間後に、インプラント周囲の骨組織および粘膜組織についてのマイクロＣＴ解析および組織学解析を実施した。

【０４１７】

培養の１日後、球状形態のＡａ細胞の凝集体が、インプラント全体に散在しているのが見いだされた。２日後、凝集体の数およびサイズは低減され、球状形態を伴う細菌間において、長さの異なるより多くの細胞が観察された。インキュベーションの３日後、凝集体がほとんど消滅する一方で、インプラント表面の大半の領域は、稠密に密生するバイオフ

ィルムを形成する、桿状形態を伴う細菌で覆われていた。インプラントにおける、このような３日間のＡａバイオフィルムに対するＬＩＶＥ／ＤＥＡＤ（登録商標）染色が、バイオフィルムの全細菌のうちの７５～８０％について緑色のシグナルを示したことから、膜の完全性が損なわれていない生細胞が示される。ｉｎ　ｖｉｖｏで設置されたインプラントにおけるＡａバイオフィルムについての微生物学的検出およびＰＣＲによる検出は、インプラント表面に由来する試料については陽性であり、唾液試料ならびに対照インプラントについては陰性であった。臨床検査は、処置されていない対照のインプラントと比較して、Ａａバイオフィルムを伴うインプラント周囲において、著明なインプラント周囲の粘膜炎症を裏付けた。インプラント周囲の骨組織および粘膜組織についてのマイクロＣＴ解析および組織学解析については、保留とする。ナノテクスチャー処理したインプラント表面は、Ａａバイオフィルムの確立に好適であり、インプラント周囲炎の危険性を増大させる。

【０４１８】

実験５

この実験は、ライム病を処置する干渉作用剤についての前臨床試験のためのマウスモデルを提供する。Ｄｒｅｓｓｅｒら、Ｐａｔｈｏｇｅｎｓ、５巻（１２号）、ｅ１００８０号、Ｅｐｕｂ、２００９年１２月４日を参照されたい。ライム病とは、米国において最も一般的なダニ媒介疾患である。報告された症例は、１９９２～２００６年で２倍を超えており、２００８年には、約２９，０００例の新症例が確認されている。流行地域におけるライム病の実際の症例数は、報告される症例数の６～１２倍であり得ると推定されている。人口が都市部から郊外地域および農村地域へと移動し続け、オジロジカ（ダニ種であるＩｘｏｄｅｓ属種を保有する）がこれらの地域を徘徊することが増大しつつあるので、定義上、これらの流行地域は拡大しつつある。ライム病は、スピロヘータである微生物Ｂｏｒｒｅｌｉａ　ｂｕｒｇｄｏｒｆｅｒｉにより引き起こされる。Ｂ．ｂｕｒｇｄｏｒｆｅｒｉは、Ｉｘｏｄｅｓ属種のダニの咬刺を介して伝染し、その後、血流を介して他の組織および器官へと拡散する。

【０４１９】

この動物モデルでは、Ｃ３Ｈ／ＨｅＮマウスに、背側皮下注射および腹腔内注射を介して、または静脈内注射を介してスピロヘータを注射する。感染の約７日後に、組織および器官における微生物負荷を評価し、病態を評価するために、血液検体および生検検体を回収する。本発明の方法および組成物は、感作の後に形成され、疾患の発症機序および慢性性の両方に寄与すると考えられる、結果として生じるＢ．ｂｕｒｇｄｏｒｆｅｒｉのバイオフィルムを縮小させ、かつ／または消失させるための治療的戦略ならびに予防的戦略の両方を開発することを意図する。

【０４２０】

実験６

この実験は、嚢胞性線維症を処置する干渉作用剤についての前臨床試験のためのブタモデルを提供する。Ｓｔｏｌｔｚら（２０１０年）、Ｓｃｉｅｎｃｅ　Ｔｒａｎｓｌａｔｉｏｎａｌ　Ｍｅｄｉｃｉｎｅ、２巻（２９号）：２９ｒａ３１頁を参照されたい。嚢胞性線維症とは、ＣＦ膜貫通コンダクタンス制御因子（ＣＦＴＲと呼ばれる）のアニオンチャネルをコードする遺伝子の変異に起因する常染色体劣性疾患である。このモデルでは、「ＣＦＴＲ」と呼ばれる遺伝子内に欠損を保有するように特異的に飼育され、ＣＦブタと呼ばれているブタが、複数の細菌種による下気道感染を包含する、ＣＦによる肺疾患の顕著な特徴を自発的に発生させる。ブタを干渉作用剤で免疫化することは、１）これらのＣＦブタを、ポリペプチドまたは他の免疫原性作用剤で免疫化し、それにより、肺における細菌性バイオフィルムを根絶する抗体の形成を誘導する（実験１において示した通り、ＩＨＦに対する抗体により、能動的な免疫化の後にチンチラの中耳内に存在するバイオフィルムを根絶した方法と同様に）ことにより、または２）これらの動物の肺に、噴霧化を介して抗ＩＨＦ抗体（または他の干渉作用剤）を送達し、疾患および関連する病態の徴候の改善を評価することにより可能である。

【０４２１】
実験７
本出願人らはまた、結核（ＴＢ）の前臨床モデルも提供する。Ｏｒｄｗａｙら（２０１０年）、Ａｎｔｉ．　Ａｇｅｎｔｓ　ａｎｄ　Ｃｈｅｍｏｔｈｅｒａｐｙ、５４巻：１８２０頁を参照されたい。微生物であるＭｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ｔｕｂｅｒｃｕｌｏｓｉｓは、広がりつつある世界的な大流行の原因である。最新の数字は、毎年約８００万例の新たなＴＢ症例が認められ、毎年約２７０万例がＴＢにより死亡していることを示唆する。ＨＩＶを伴う個体の共感染症としてのこの微生物の役割（ＨＩＶに感染する約４５００万例のうち、約１／３が、Ｍ．ｔｕｂｅｒｃｕｌｏｓｉｓにも共感染していると推定されている）に加えて、単離菌が、複数の薬物に対して高度に耐性となっており、四半世紀超にわたり新規のＴＢ薬が導入されていないことも、特に、問題含みである。この動物モデルでは、ＳＰＦモルモットを、隔離コロニー内に維持し、約２０ｃｆｕのＭ．ｔｕｂｅｒｃｕｌｏｓｉｓ株であるＥｒｄｍａｎ　Ｋ０１桿菌を、それらの肺内に送達するエアゾール化スプレーを介して感染させる。感作の２５、５０、７５、１００、１２５、および１５０日後において、細菌負荷を決定し、組織病理学的評価のために組織を回収すると共に動物を屠殺する。ＴＢの古典的な徴候を発症しないマウスと異なり、このようにして感作されたモルモットは、ヒト疾患の特徴である、中央部に壊死を伴う、十分に組織された肉芽腫を発症する。さらに、ヒトと同様に、モルモットは、原発病変複合体の一部として、排出リンパ節の化膿性肉芽腫性で壊死性の重度のリンパ節炎を発症する。このモデルの使用は、感作の後にこれらの動物の肺内で形成され、疾患の発症機序および慢性性の両方に寄与すると考えられる、結果として生じるＭ．ｔｕｂｅｒｃｕｌｏｓｉｓのバイオフィルムを縮小させ、かつ／または消失させるための治療的戦略ならびに予防的戦略を確認および同定するための前臨床スクリーニングを提供する。
【０４２２】
実験８
カテーテル／留置デバイスによるバイオフィルム感染症については、複数の動物モデルが公知である。Ｏｔｔｏ（２００９年）、Ｎａｔｕｒｅ　Ｒｅｖｉｅｗｓ　Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌｏｇｙ、７巻：５５５頁を参照されたい。通常の皮膚微生物叢であると考えられることが典型的であるが、微生物であるＳｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ　ｅｐｉｄｅｒｍｉｄｉｓは、多くの研究者が重要な日和見病原体であるとみなす微生物となっており、院内感染の原因作用物質の第１にランクされている。第１に、この細菌は、デバイス挿入時にこの一般的な皮膚コロニー形成菌により汚染される、留置医療デバイス上で発生する感染症の大半の原因である。致死性ではないことが典型的であるが、これらのバイオフィルム感染症の処置と関連する困難により、これらのバイオフィルム感染症は、それらの頻度と組み合わさって、重篤な公衆衛生負荷となっている。米国において、血管カテーテルと関連する血流感染症の処置と関連する費用は、今日、Ｓ．ｅｐｉｄｅｒｍｉｄｉｓに起因するものだけで、毎年２０億ドルに上る。Ｓ．ｅｐｉｄｅｒｍｉｄｉｓに加えて、Ｅ．ｆａｅｃａｌｉｓおよびＳ．ａｕｒｅｕｓもまた、留置医療デバイスにおいて見いだされる汚染菌である。カテーテルに関連するＳ．ｅｐｉｄｅｒｍｉｄｉｓ感染症については、ウサギ、マウス、モルモット、およびラットを含めて複数の動物モデルが存在し、これらの全てが、発症機序の分子的機構を研究するのに用いられ、予防および／または治療薬の研究に役立っている。ラットの頸静脈カテーテルは、Ｅ．Ｆａｅｃａｌｉｓ、Ｓ．ａｕｒｅｕｓ、およびＳ．ｅｐｉｄｅｒｍｉｄｉｓによるバイオフィルムの形成に干渉する療法を評価するのに用いられている。バイオフィルムの縮小は、３つの方法：（ｉ）カテーテルを超音波処理し、ＣＦＵを計算する方法、（ｉｉ）カテーテルをスライスする、または単純にプレート上に置き、スコア付けする方法、（ｉｉｉ）バイオフィルムをクリスタルバイオレットまたは別の色素で染色し、溶出させ、ＣＦＵの代用物としてのＯＤを測定する方法で測定されることが多い。
【０４２３】
実験９

本明細書で説明される方法を用いて、ヒトおよび動物において免疫応答を誘発することができる。アルミニウム塩およびリポソームなどであるがそれらに限定されないアジュバントの存在下で、免疫原性組成物を、ヒト対象および動物対象に投与することができる。当業者はまた、任意の数の薬学的に許容されるアジュバントも用い得ることを理解するであろう。免疫原性組成物は、筋肉内に、皮下的に、鼻腔内に、または他の任意の適切な経路を介して、ヒト対象または動物対象に投与することができる。免疫原性組成物は、選択された投与方式と符合する形で調製することができる。免疫原性組成物は、ポリペプチド、核酸、またはそれらの組合せの形態をとることが可能であり、全長抗原を含む場合もあり、部分抗原を含む場合もある。それに加えて、またはその代わりに、免疫原性組成物は、特定の抗原でパルスしたＡＰＣの形態をとる場合もあり、特定の抗原をコードする１種または複数腫のポリヌクレオチドでトランスフェクトしたＡＰＣの形態をとる場合もある。投与は、免疫原性組成物の単回投与を含む場合もあり、初回投与の後、１回または複数回の追加投与を行う場合もある。追加投与は、初回投与の１日後、２日後、３日後、１週間後、２週間後、３週間後、１カ月後、２カ月後、３カ月後、６カ月後、もしくは１２カ月後、または他の任意の時点において施すことができる。追加投与は、対象の抗体力価を評価した後で投与することもできる。

【０４２４】

実験１０

本明細書で説明される方法を用いて、非免疫対象に受動免疫を付与することができる。所与の抗原に対する受動免疫は、特定の抗原を特異的に認識する、またはそれに特異的に結合する抗体または抗原結合断片の導入を介して付与される。抗体のドナーおよびレシピエントは、ヒト対象の場合もあり、非ヒト対象の場合もある。それに加えて、またはその代わりに、抗体組成物は、特定の抗原を特異的に認識する、またはそれに特異的に結合する抗体または抗原結合断片をコードする、単離されたかまたは組換え型のポリヌクレオチドを含み得る。

【０４２５】

受動免疫は、免疫原性組成物の投与がレシピエント対象に対して危険性をもたらす場合、レシピエント対象が免疫障害対象である場合、またはレシピエント対象が即時的な免疫を必要とする場合に付与することができる。免疫原性組成物は、選択された投与方式と符合する形で調製することができる。組成物は、全抗体、抗原結合断片、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、ｉｎ　ｖｉｖｏにおいて産生される抗体、ｉｎ　ｖｉｔｒｏにおいて産生される抗体、精製された抗体もしくは部分的に精製された抗体、または全血清を含み得る。投与は、抗体組成物の単回投与を含む場合もあり、初回投与の後、１回または複数回の追加投与を行う場合もある。追加投与は、初回投与の１日後、２日後、３日後、１週間後、２週間後、３週間後、１カ月後、２カ月後、３カ月後、６カ月後、もしくは１２カ月後、または他の任意の時点において施すことができる。追加投与は、対象の抗体力価を評価した後で投与することもできる。

【０４２６】

実験１１

ＤＮＡＢＩＩファミリーのメンバーは、遺伝子転写を含め、複数のヌクレオタンパク質系に対して高度に多機能的であり、さらに、このため、不可欠であることが多い。これに対し、ＨＵ変異体およびＩＨＦ変異体はいずれも、実験室のＥ．ｃｏｌｉ株において産生されており、広範に研究されている。ＩＨＦタンパク質およびＨＵタンパク質が、ｅＤＮＡの形成においていかなる役割を果たしているのかを決定するために、Ｅ．ｃｏｌｉのＭＧ１６５５株またはそのＨＵ欠損誘導体およびＩＨＦ欠損誘導体により形成されるバイオフィルムを、抗ＩＨＦ抗体（ＧｒａｎｓｔｏｎおよびＮａｓｈ（１９９３年）、Ｊ．　Ｍｏｌ．　Ｂｉｏｌ．、２３４巻：４５～５９頁において説明される通りに調製される）と共にインキュベートした。図８に示す通り、親単離株であるＭＧ１６５５株が、ｉｎ　ｖｉｔｒｏにおいて堅調なバイオフィルムを生じた（パネルＡ）のに対し、ＨＵ変異体株およびＩＨＦ変異体株のいずれにより生じたバイオフィルムもそれほど堅調ではなかった（

それぞれ、パネルＣおよびＥ）。ＨＵ欠損変異体により生じたバイオフィルムの高さは、野生型のバイオフィルムの高さの約１／２であり、ＩＨＦ欠損株により生じたバイオフィルムの高さは、親単離株の高さの約２／３であった。この結果は、いずれのタンパク質も、Ｅ．ｃｏｌｉによるバイオフィルムの細胞外多糖（ＥＰＳ）の産生および／または完全性に関与していることを示唆した。抗ＩＨＦ抗体で処置した後、野生型の単離株により形成されるバイオフィルムは、顕著なデバルキング、および平均の高さにおける５８．１％の低減百分率、バイオマスにおける７３．１％の低減百分率、平均の厚さにおける８７％の低減を示したのに対し（パネルＢ）、ＨＵ変異体により形成されたバイオフィルムは、高さの低減を示さず、バイオマスにおける３０．９％の低減、平均の厚さにおける３７．２％の低減を示すに過ぎなかった（パネルＤ）。これに対し、ＩＨＦ変異体により形成されるバイオフィルムに対しては、高さの低減の点でも効果が観察されず（－３．４％の低減）、バイオマスの低減の点でも効果が観察されず（－２０．５％の低減）、平均の厚さの点でも効果が観察されなかった（－１９．８％の低減）（パネルＦ）。まとめると、これらのデータは、このＥ．ｃｏｌｉ株については、ＩＨＦが、抗ＩＨＦ抗体を用いることにより標的とし得る唯一の構造的エレメントである可能性が高いことを示した。現在のところ認められているのは、ｉｎ　ｖｉｖｏにおいて形成された、バイオフィルムにおいて高度に構造化されて織り込まれたｅＤＮＡだけであるので、それぞれの個別の変異体による、残りのＤＮＡＢＩＩファミリーメンバーの発現、および結果として得られるＤＮＡ構造における任意の変化を確認するには、ｉｎ　ｖｉｖｏにおける免疫蛍光解析が待たれる。

【０４２７】

実験１２

ｉｎ　ｖｉｔｒｏおよびｉｎ　ｖｉｖｏにおける本出願では、抗ＩＨＦ抗体および免疫原としてのＩＨＦの使用のいずれもが、それぞれ、バイオフィルムをデバルキングし、かつ／またはバイオフィルム疾患を消失させるのに有用性を示すことが裏付けられたが、また、抗ＩＨＦ抗体によるＮＴＨＩバイオフィルムのデバルキングも、他の処置モダリティーと共に用いた場合、相乗作用を可能とし得るかどうかは未知であった。この目的で、最適未満濃度の抗ＩＨＦ抗体を、３つの固有の試薬のそれぞれのうちの１つと共に用いた場合において、あらかじめ形成されたＮＴＨＩバイオフィルムの構造的不安定化の増大を誘導する能力を評価した。これらの３つの試薬には、１）ｉｎ　ｖｉｔｒｏにおいてＮＴＨＩバイオフィルムの分解が可能であることが公知であるＤＮＡ分解酵素（ＤＮアーゼＩ）（しかし、ここでは、最適未満濃度で用いる）、２）単独で用いた場合に、あらかじめ形成されたＮＴＨＩバイオフィルムを不安定化させなかった、ＮＴＨＩの外膜タンパク質に対する抗血清（抗ＯＭＰ　Ｐ５抗血清）（データは示さない）、ならびに３）慢性ＯＭおよび／または再発性ＯＭを伴う小児における第一選択薬として用いられることが典型的であるが、バイオフィルム群落内に存在する細菌に対する有効性は限定されている抗生薬（アモキシリン）を包含する。

【０４２８】

図１４Ａは、最適未満であることが示されている濃度のＤＮアーゼによるＮＴＨＩバイオフィルムの処置がそれほどの効果を及ぼさないことを示す（図１４Ａ　ＩＩを参照されたい）。同様に、抗ＩＨＦ抗体の１：２００の希釈液も、あらかじめ形成されたＮＴＨＩバイオフィルムに対してほとんど効果を及ぼさなかった（図１４Ａ　ＩＩＩを参照されたい）。しかし、これに対して、これらの２つの試薬を併せて用いたところ、バイオフィルムは顕著に縮小された（図１４Ａ　ＩＶを参照されたい）。この実験を３回にわたり反復したところ、本発明者らは、バイオフィルムに対する最も顕著なデバルキングの相乗効果は、高さの低減として測定されることを見いだした。以下の表７は、これらの結果を示す。

【０４２９】

【表７】

表 7

		DNアーゼ	抗 IHF	DNアーゼ＋抗 IHF	
最大の高さ	(μm)	3.9	37.3	51.0	アッセイ 1
最大の高さ	(μm)	-11.5	16.4	37.7	アッセイ 2
最大の高さ	(μm)	-1.6	19.4	38.7	アッセイ 3

この結果に対する１つの簡単な説明は、バイオフィルムの外面から遠い位置でＤＮＡＢＩＩタンパク質の力価が決定されているので、ｅＤＮＡが、ＤＮアーゼの作用をより受けやすくなるということであった。

【０４３０】

図１４Ｂは、あらかじめ形成されたＮＴＨＩバイオフィルムにおける抗ＯＭＰ　Ｐ５抗血清による処置の結果を示す。この抗血清は、単離されたＮＴＨＩ株のＯＭＰ　Ｐ５タンパク質と強く反応性であり（データは示さない）、さらに、単離ＯＭＰ　Ｐ５タンパク質による能動的な免疫化は、チンチラモデルにおける実験によるＯＭに対して著明な防御を媒介するのに有効である（例えば、２５．Ｂａｋａｌｅｔｚら（１９９７年）、Ｖａｃｃｉｎｅ、１５巻（９号）：９５５～９６１頁；Ｂａｋａｌｅｔｚら（１９９９年）、Ｉｎｆｅｃｔ　Ｉｍｍｕｎ、６７巻（６号）：２７４６～２７６２頁；Ｋｅｎｎｅｄｙら（２０００年）、Ｉｎｆｅｃｔ　Ｉｍｍｕｎ、６８巻（５号）：２７５６～２７６５頁；Ｋｙｄ　ＪＭら（２００３年）、Ｉｎｆｅｃｔ　Ｉｍｍｕｎ、７１巻（８号）：４６９１～４６９９頁；Ｎｏｖｏｔｎｙ　ＬＡら（２０００年）、Ｉｎｆｅｃｔ　Ｉｍｍｕｎ、６８巻（４号）：２１１９～２１２８頁；Ｎｏｖｏｔｎｙ　ＬＡら（２００２年）、Ｖａｃｃｉｎｅ、２０巻（２９～３０号）：３５９０～３５９７頁；およびＮｏｖｏｔｎｙ　ＬＡら（２００３年）、Ｊ　Ｉｍｍｕｎｏｌ、１７１巻（４号）：１９７８～１９８３頁を参照されたい）が、この抗血清は、１：５０の希釈率で用いる場合、ｉｎ　ｖｉｔｒｏで形成されたＮＴＨＩバイオフィルムの構造的完全性の変化を誘導しない（図１４Ｂ　ＩＩを参照されたい）。同様に、これらのバイオフィルムを、最適希釈率未満の抗ＩＨＦ抗血清（ここでは、１：１００の希釈率で用いる）と共にインキュベートした場合に観察された効果もわずかなものであった（図１４Ｂ　Ｉを参照されたい）。しかし、抗Ｐ５抗血清および抗ＩＨＦ抗血清を組み合わせて用いたところ、２つの抗血清を単独で用いた場合の合計を上回る高さのバイオフィルムが結果として低減された（図１４Ｂ　ＩＩＩを参照されたい）ことから、相乗効果が示される。したがって、抗ＩＨＦ抗体を用いてＮＴＨＩのＥＰＳマトリックスを不安定化させると、これを用いなければｅＤＮＡならびに恐らくＥＰＳの他の成分により覆い隠される、標的とされる細菌細胞の表面タンパク質（例えば、ＯＭＰ　Ｐ５タンパク質）の露出を結果としてもたらすことから、なおも未知である機構による免疫を介する細菌の除去が可能となることが結論付けられた。

【０４３１】

最後に、図１４Ｃは、アモキシシリンによる、あらかじめ形成されたＮＴＨＩバイオフィルムの処置の結果を示す。６４μｇ／ｍｌの濃度で用いた場合、アモキシシリンは、細菌細胞を限定的に死滅させる証拠にもかかわらず、あらかじめ形成されたＮＴＨＩバイオフィルムの構成に対して測定可能な効果を及ぼさなかった（図１４Ｃ　ＩＩを参照されたい）。１：５０の希釈率におけるＩＨＦ抗血清で処置したところ、すでに示した通り（図１４Ｃ　ＩＩＩを参照されたい）、バイオフィルムの高さが実質的に低減された。しかし、興味深いことに、２つの試薬を同時に用いたところ、バイオフィルムの高さが劇的に低減される（図１４Ｃ　ＩＶを参照されたい）だけでなく、生存を示す色素を用いると、画像化されたバイオフィルム内の赤色チャネルの蛍光が優越することにより注意される通り、バイオフィルム中に残存する細菌の大半は今や死滅していることも示された。この結果は、抗ＩＨＦ抗体によるバイオフィルムのデバルキングが、浮遊性のＮＴＨＩに対してアッセイした場合に有効であることが公知のアモキシシリン濃度に対する感受性により近い条

件を創出するのに十分な程度に細菌を露出させる可能性が高いことを示した。この結果は、残存するバイオフィルムマトリックス内の細菌のアモキシシリンの作用に対する物理的な曝露を増大させることを介する可能性もあり、かつ／または、本発明者らがかつて示した通り、細菌の浮遊相への放出を増大させることにより、抗ＩＨＦ抗体に曝露することを介して、バイオフィルムのデバルキング時に生じる可能性もある（図４を参照されたい）。

【０４３２】

実験１３

本出願人らは、経皮的な免疫化による抗ＩＨＦ抗体の誘導が、チンチラの中耳におけるＮＴＨＩ誘導性バイオフィルムを消失させるのに有効であることを示した。また、ＴＣＩ的な免疫化およびＳＱ的な免疫化のいずれの後でも示される通り、抗ＩＨＦ抗体がｅＤＮＡに結合すると、防御的エピトープが遮蔽されると考えられるので、天然のＩＨＦタンパク質の使用が防御的免疫応答の誘導に不可欠であることも示された。しかしながら、広範な防御効果を有する可能性が高いワクチン候補物質の合理的なデザインには、実のところ、明らかでない可能性もあり、必ずしも連続していない可能性もある、このタンパク質の免疫優勢エピトープおよび／または防御性エピトープについての詳細な理解が必要とされる。現在のワクチン候補物質のデザイン戦略は、それらの手法においてより還元主義的であり、アビディティーが高度な抗体および防御的な抗体の誘導に絶体的に必要な、標的とされるタンパク質の部分だけを同定し、用いることを目的とすることが多い。この目的で、エピトープマッピングを行い、最も有効な免疫原を決定する。

【０４３３】

エピトープマッピングは、Ｎｏｖｏｔｎｙら（２００９年）、Ｖａｃｃｉｎｅ、２８巻：（１号）：２７９～２８９頁において説明される通りに、以下の手順に従って実施することができる。免疫血清を産生するためには、アジュバントであるモノホスホリル脂質Ａ（ＭＰＬ、Ｃｏｒｉｘａ）と共混合して投与される、１０μｇの天然のＩＨＦタンパク質、ＩＨＦαのＣ末端の２０アミノ酸のポリペプチド、ＩＨＦβのＣ末端の２０アミノ酸のポリペプチド、もしくはＴＢＰ－ＤＮＡＢＩＩタンパク質のアミノ酸６０～７６のポリペプチドを皮下（ＳＱ）注射することにより、またはＭＰＬ単独（アジュバントだけの対照コホート）により、チンチラを非経口的に免疫化することができる。同一の追加投与を、２１日間の間隔で２回にわたり送達することができる。血清のための血液は、最終回の免疫化投与を受けた１０日後に回収することができる。チンチラ抗血清に対して、酵素免疫測定アッセイ（ＥＬＩＳＡ）およびウェスタンブロット法を実施することができる。ＥＬＩＳＡの場合、血清は、送達した免疫原（ウェル１個当たり０．２μｇのタンパク質）に対して、９６ウェルプレートフォーマットでアッセイすることができる。力価は、血清を除く全ての成分を含有する対照ウェルより０．１大きいＯＤ４５０値をもたらす血清希釈率の逆数として定義することができる。ＥＬＩＳＡアッセイは、最低３回にわたり実施することができ、結果は、幾何平均として報告する。ウェスタンブロット法は、１：１００に希釈した免疫血清を用いて、それぞれの免疫原１μｇずつに対して実施することができ、ＨＲＰ－プロテインＡ（Ｚｙｍｅｄ、Ｓｏｕｔｈ Ｓａｎ Ｆｒａｎｃｉｓｃｏ、ＣＡ）により検出することができる。発色は、ＣＮ／ＤＡＢ基質（Ｐｉｅｒｃｅ、Ｒｏｃｋｆｏｒｄ、ＩＬ）によった。

【０４３４】

ＮＴＨＩのＩＨＦタンパク質をエピトープマッピングするために、５残基が重複する、一連の２０マーの合成ペプチドを合成することができる。全ての合成ペプチドの合成、精製、および配列確認は、標準的な技法に従い実施することができる（例えば、Ｂａｋａｌｅｔｚ ＬＯ．ら（１９９７年）、Ｉｎｆｅｃｔ． Ｉｍｍｕｎ．、７１巻（８号）：４６９１～９頁；およびＢａｋａｌｅｔｚ ＬＯ．ら（２００１年）、Ｖａｃｃｉｎｅ、６８巻（４号）：２１１９～２８頁を参照されたい）。アミノ酸解析および質量分析を用いて、それぞれのペプチドの純度、組成、およびアミノ酸配列を確認することができる。

【０４３５】

合成ペプチドと血清中に存在する抗体との相互作用の解析については、説明される通りにＢｉａｃｏｒｅ　３０００装置を用いて検討することができ、全ての試薬は、Ｂｉａｃｏｒｅ（Ｕｐｐｓａｌａ、Ｓｗｅｄｅｎ）から購入することができる。略述すると、ペプチドを酢酸ナトリウム緩衝液中に懸濁させてから、アミン結合化学反応を用いて、活性化させた試薬グレードのＣＭ５センサーチップの表面に固定化することができる。相互作用を解析するためには、１５μｌの血清（ＨＢＳ－ＥＰ緩衝液および１ｍｌ当たり１ｍｇのカルボキシメチルデキストラン中で１：２に希釈された）を、５μｌ／分の流速で、センサーチップ表面を介して注射することができる。それぞれの試料中の抗原特異的抗体および免疫原特異的抗体の相対量は、それぞれの試料を注射する５秒前およびそれぞれの試料を注射した４５秒後に得られる共鳴単位（ＲＵ）の差違として計算することができる。試料間におけるセンサーチップ表面の再生は、２５ｍＭのＮａＯＨにより行うことができる。血清中に存在する抗体との相互作用が最も強力な合成ペプチドが、ｉｎ　ｖｉｖｏにおいてアビディティーの高い防御的抗体を誘導することが可能な防御的エピトープの最も有望な候補物質であり得る。

【０４３６】

ウサギポリクローナル抗血清は、エピトープマッピングによる免疫原性の最も高いペプチドに対して産生することができる。この抗血清を用いて、カラムクロマトグラフィーを介して、中和抗体を非中和抗体からアフィニティー精製することができる。そのようにするためには、ウサギポリクローナル抗血清およびチンチラポリクローナル抗血清の両方（後者は防御性であることが示されている）を用いることができる。それぞれの血清に、天然のＩＨＦを結合させたカラム上、またはＤＮＡとあらかじめ混合したＩＨＦを結合させたカラム上を流過させる前ならびに流過させた後に血清をアッセイすることができる。ＤＮＡ－ＩＨＦ複合体には結合しない抗体だけを中和抗体とする。次いで、ＮＴＨＩバイオフィルムをデバルキングする相対的能力についての本発明者らによるｉｎ　ｖｉｔｒｏにおけるバイオフィルムアッセイにより、ならびに、特異性および力価を決定するためのＥＬＩＳＡアッセイ、ウェスタンブロットアッセイ、およびバイオセンサーアッセイを介して、全ての流過物および溶出させた抗血清を、元の抗血清プールに照らしてアッセイした。追加的な試験として、エピトープを標的とするワクチン候補物質をカラムに結合させて、これらにより、今や中和抗体であることが分かった抗体を取り出し得るかどうかを決定することができる。

【０４３７】

本発明を、上記の実施形態と共に説明してきたが、前出の説明および例は、本発明の例示を目的とするものであり、本発明の範囲の限定を目的とするものではないことを理解されたい。本発明の範囲内にある他の態様、利点、および改変は、本発明が関連する技術分野における当業者には明らかであろう。

【０４３８】

別段に定義しない限り、本明細書で用いられる技術用語および科学用語は、本発明が属する技術分野における当業者により一般的に理解される意味と同じ意味を有する。本明細書で提示される全てのヌクレオチド配列は、５’から３’への方向で示される。

【０４３９】

本明細書において例示的に説明された本発明は、本明細書で具体的に開示されていない、１つまたは複数の任意の要素、１つまたは複数の任意の限定が存在しない場合にも、適切に実施することができる。したがって、例えば、「～を含む」、「～を包含する」、「～を含有する」などの用語は、外延的に、かつ限定なしに読まれるものとする。加えて、本明細書で用いられる用語および表現は、説明を目的として用いられるものであり、限定を目的として用いられるものではなく、示され、かつ、説明される特徴またはその部分の任意の等価物を除外する、このような用語および表現の使用を意図するものではなく、特許請求される本発明の範囲内にある多様な改変が可能であると認識される。

【０４４０】

したがって、本発明は、好ましい実施形態により具体的に開示されているが、本明細書

で開示される任意選択の特徴、改変、改善、および変更も当業者により回復される場合があり、このような改変、改善、および変更は、本発明の範囲内にあるものと考えられることを理解されたい。本明細書で提示される材料、方法、および例は、好ましい実施形態を示すものであり、例示的なものであり、本発明の範囲に対する限定として意図されるものではない。

【０４４１】

本明細書では、本発明について、広範かつ一般的に説明してきた。本一般的な開示の範囲内に収まる、より狭い範囲内にある種類、および亜属の群分けのそれぞれもまた、本発明の一部を形成する。これは、除外される材料が、本明細書で具体的に列挙されているかどうかにかかわらず、属から任意の対象物を除外する条件または否定的限定を伴う本発明の一般的な説明を包含する。

【０４４２】

加えて、本発明の特徴または態様が、マーカッシュ群との関係で説明される場合、当業者は、本発明がまた、それにより、マーカッシュ群の任意の個別のメンバーまたはマーカッシュ群のメンバーの亜群との関係でも説明されることを認識するであろう。

【０４４３】

本明細書で言及される全ての刊行物、特許出願、特許、および他の参考文献は、それぞれが参照により個別に組み込まれるのと同程度に、参照によりそれらの全体において明示的に組み込まれる。齟齬が生じた場合は、定義を含め、本明細書に従う。

【０４４４】

【表８－１】

表 8

グラム陽性菌:HUだけを有する。グラム陰性菌:全部がHUを有し、一部はまたIHFも有する。

細菌株	略号	タンパク質の名称(複数可)	
S. sobrinus 6715	*Ss*	1310	(HU) (完全には配列決定されていない)
S. pyogenes MGAS10270	*Spyog*	Spy1239	(HU)
S. gordonii Challis NCTC7868	*Sg*	SGO_0701	(HlpA)
S. agalactiae (**B群** Strep)2603V/R	GBS	SAG_0505	(Hup)
S. mutans UA159	*Sm*	Smu_589	(HU)
S. pneumoniae R6	*Spneu*	spr1020	(HU)
S. gallolyticus UCN34 (*S. bovis*)	*Sgall*	YP_003430069	(HlpA)
S. aureus MW2	*Sa*	MW1362	(HU)
S. epidermidis RP62A	*Se*	SERP1041	(Hup)
E. coli K12-MG1655	*Ec*	b1712	(HimA)
		b0912	(HimD)
			(HupA)
			(HupB)
H. influenza KW20 Rd	*Hi*	HI1221	(HimA)
		HI1313	(HimD)
		HI0430	(HupA)

【０４４５】

【表８－２】

Salmonella enteric serovar typhi CT18	*Salm*	Sty1771	(HimA)	
		Sty0982	(HimD)	
Aggregatibacter actinomycetemcomitans D11S-1	*Aa*	YP_003255965	(IHFアルファ)	
		YP_003256209	(IhfB)	
		YP_003255304	(HU)	
P. gingivalis W83	*Pg*	PG_0121	(Hup-1)	
		PG_1258	(Hup-2)	
N. gonorrhoeae FA1090 (Oklahoma)	*Ng*	NGO603	(IHFβ)	
		NGO030	(IHFα)	
N. meningitides MC58	*Nm*	NMB_0729	(HimA)	
		NMB 1302	(HimA)	
P. aeruginosa	*Pa*	PA3161	(HimD)	
		PA1804	(HupB)	
		PA2758	(HimA)	
H. pylori 26695	*Hp*	Hp0835	(Hup)	
B. burgdorferi B31	*Bb*	BB_0232	(Hbb)	
Moraxella catarrhalis RH4	*Mc*	YP_003626307	(HimA)	
		YP_003627027	(HimD)	
		YP_003626775	(HupB)	

【０４４６】

【表８－３】

表8(続き)

V. cholera El Tor N16961	*Vc*	VC_0273	(HupA)	
		VC_1914	(HipB)	
		VC_1919	(HupB)	
		VC_1222	(HimA)	
Burkholderia cenocepacia HI2424	*Bc*	Bcen2424_1048	(IHFB)	
		Bcen2424_1481	(IHFA)	
Burkholderia pseudomallei 668	*Bp*	BURPS668_2881	(IHFB)	
		BURPS668_1718	(IHFA)	
Mycobacterium tuberculosis CDC1551	*Mtb*	MT_3064	(HU)	
Mycobacterium smegmatis MC2	*Ms*	MSMEG_2389	(Hup)	
Treponema denticola ATCC 35405	*Td*	TDE_1709	(HU)	
Treponema palladium Nichols	*Tp*	TP_0251	**(DNA結合タンパク質II)**	
Prevotella melaninogenica ATCC 25845	*Pm*	PREME0022_2103	(HupB)	
		PREME0022_0268	(HupA)	
Prevotella intermedia 17	*Pi*	PREME0022_0341	(Hup)	
		PREME0022_0340	(HimA)	
		PIN_A0704	(Hup)	
		PIN_A1504	(Hup-2)	
		PIN_0345	(HimA)	
		PIN_0343	**(仮説的タンパク質)**	
Bordetella pertusis Tohama 1	*Bpert*	BP2572	(IhfA)	

【０４４７】

【表８－４】

	(HupB)	(hup)
	(IhfB)	
	BP3530	Ef1550
	BP0951	
Ef		
Enterococcus faecalis V583		

【０４４８】

【表９－１】

9A	9A（続き）

配列番号42～72:それぞれ、出現の順に示す

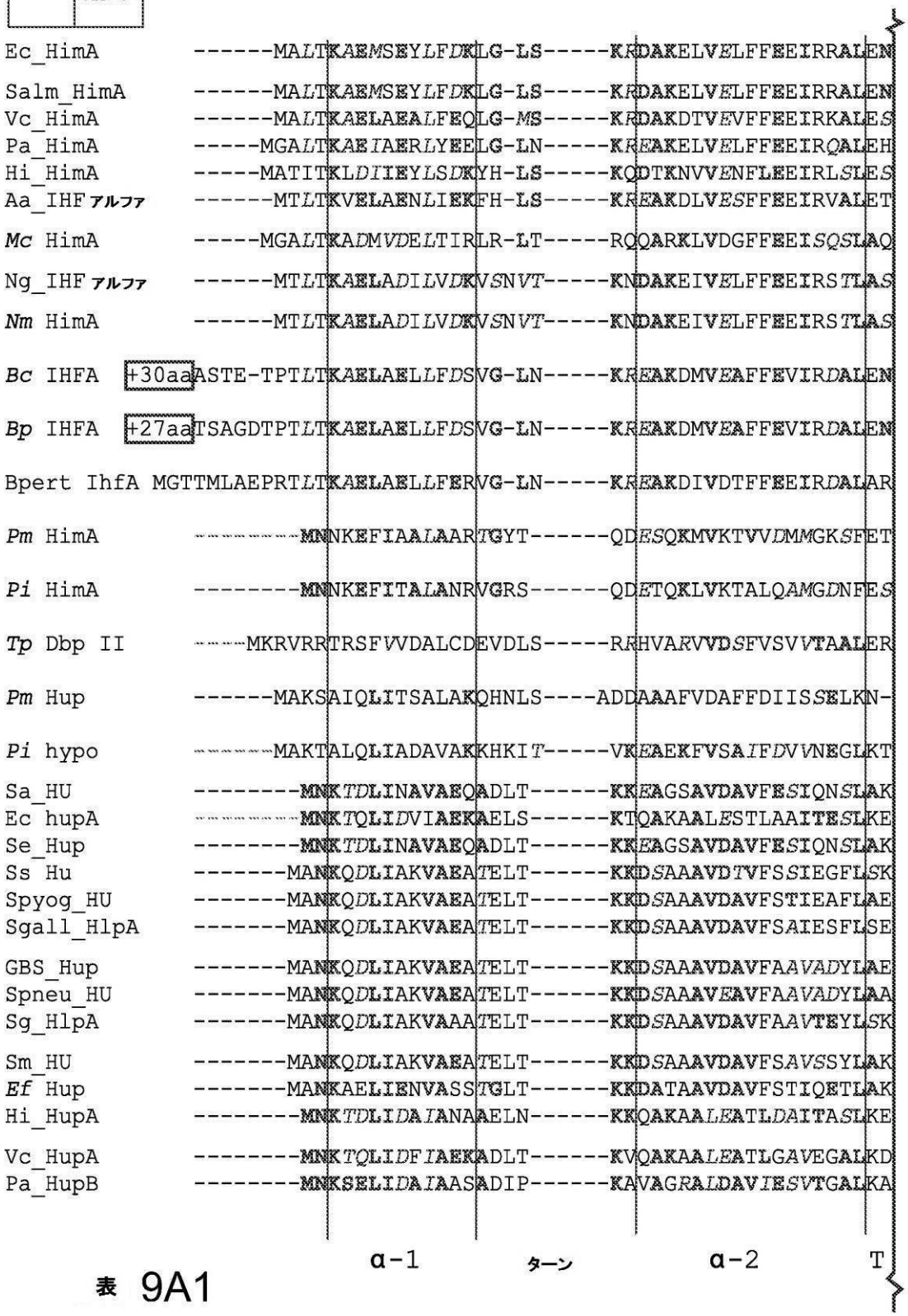


表 9A1

【０４４９】

【表９－２】

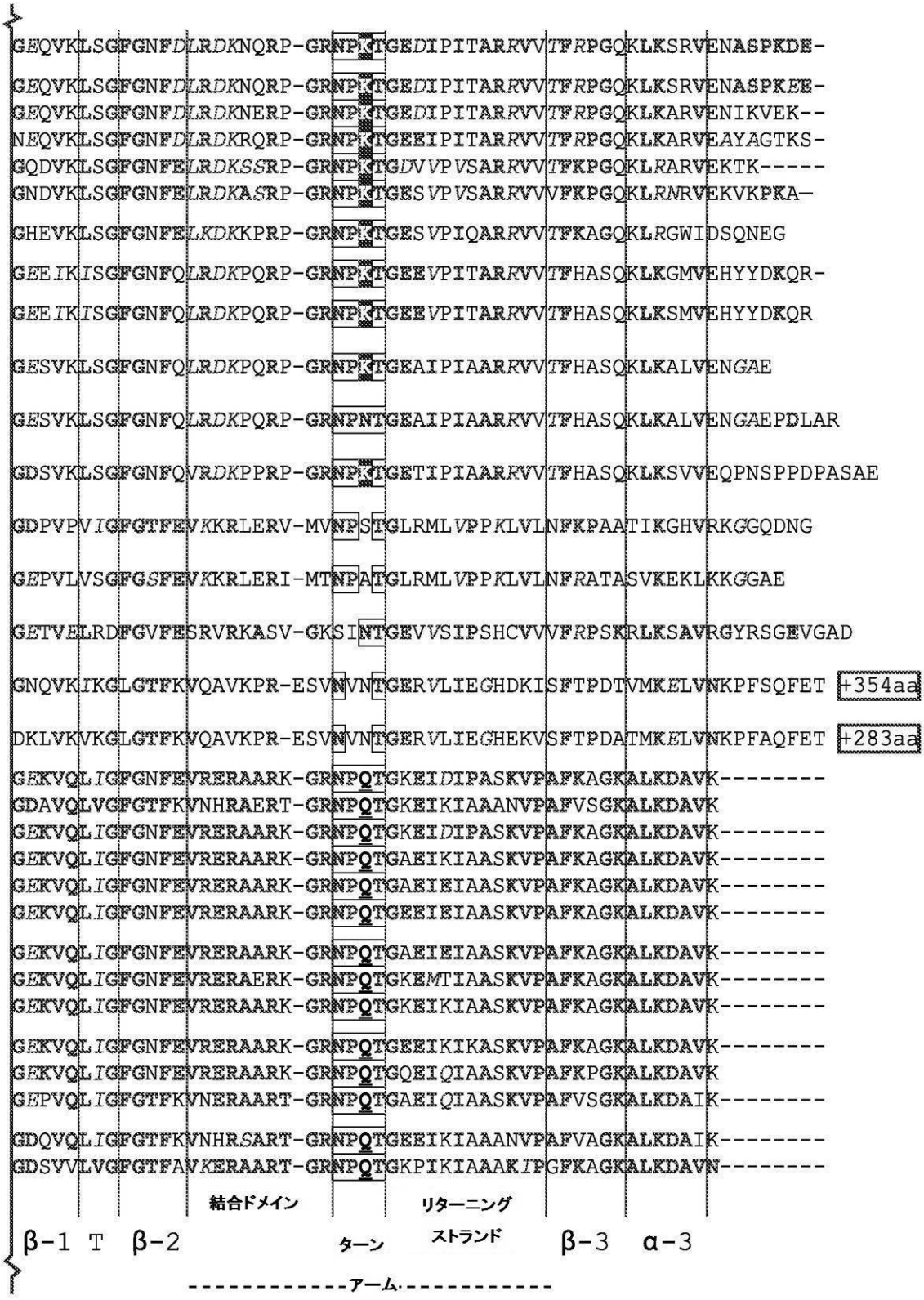


表 9A1 （続き）

【０４５０】

【表９－３】

9A2	9A2（続き）

配列番号73～76：それぞれ、出現の順に示す

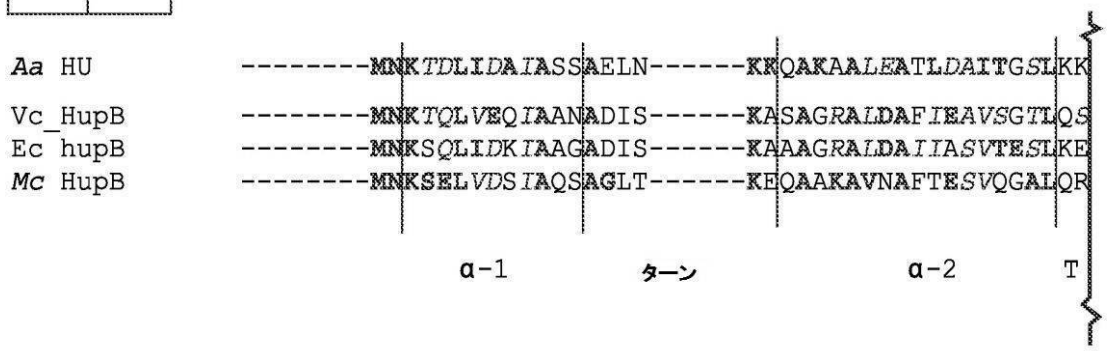


表 9A2

【０４５１】

【表９－４】

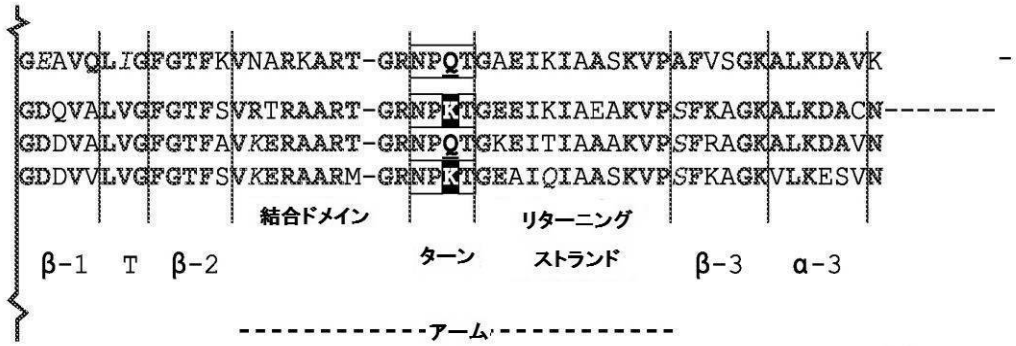


表 9A2（続き）

【０４５２】

【表９－５】

9A3	9A3 (続き)

配列番号77～100:それぞれ、出現の順に示す

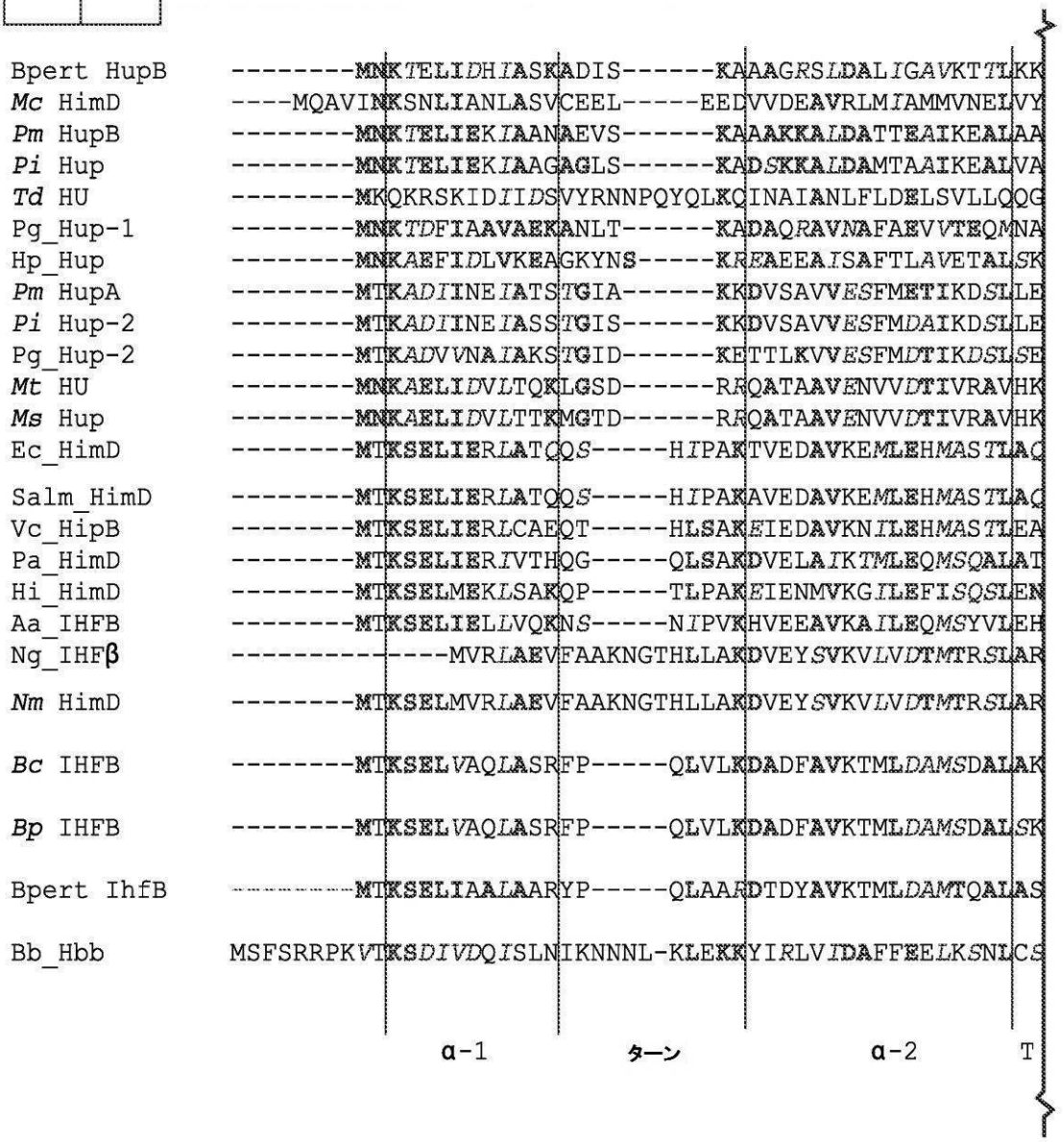


表 9A3

【０４５３】

【表９－６】

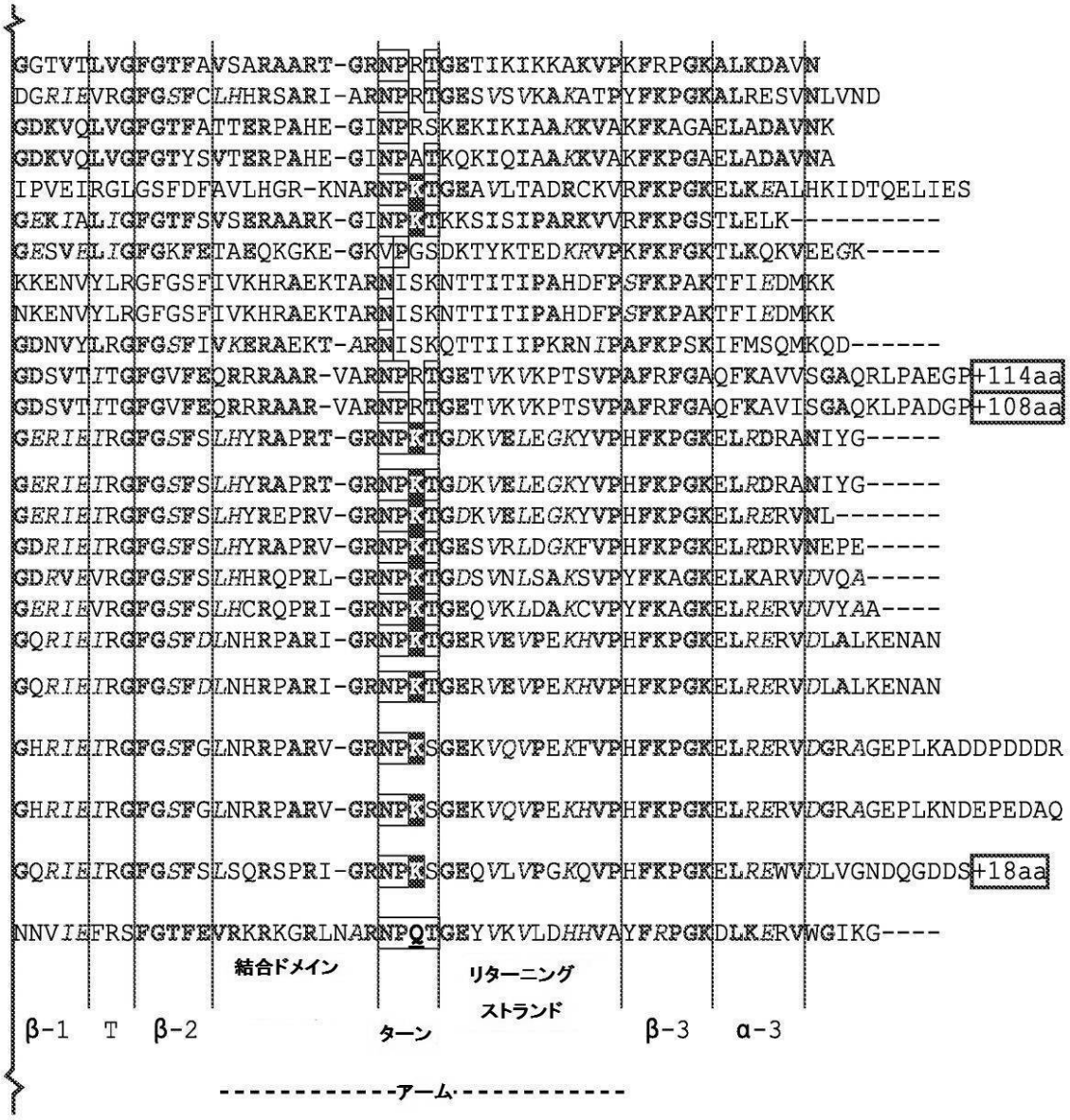


表 9A3（続き）

【０４５４】

【表９－７】

配列番号101～128：それぞれ、出現の順に示す

Liuらによる16アミノ酸のペプチドモチーフとの比較

Strep **内部** HU	EVRERAARK-GRNPQTG
Ec_HimA	*DLRDK*NQRP-GRNPKTG
Salm_HimA	*DLRDK*NQRP-GRNPKTG
Vc_HimA	*DLRDK*NERP-GRNPKTG
Pa_HimA	*DLRDK*RQRP-GRNPKTG
Hi_HimA	*ELRDKSS*RP-GRNPKTG
Aa_IHF**アルファ**	*ELRDKAS*RP-GRNPKTG
Mc HimA	*ELKDK*KPRP-GRNPKTG
Ng_IHF**アルファ**	*QLRDK*PQRP-GRNPKTG
Nm HimA	*QLRDK*PQRP-GRNPKTG
Bc IHFA	*QLRDK*PQRP-GRNPKTG
Bp IHFA	*QLRDK*PQRP-GRNPNTG
Bpert IhfA	*QVRDK*PPRP-GRNPKTG
Pm HimA	*EVKK*RLERV-MVNPSTG
Pi HimA	*EVKK*RLERI-MTNPATG
Tp Dbp II	*ESRVRKA*SV-GKSINTG
Pm Hup	*KVQAVKP*R-ESVNVNTG
Pi hypo	*KVQAVKP*R-ESVNVNTG
Sa_HU	EVRERAARK-GRNPQTG
Ec_hupA	KVNHRAERT-GRNPQTG
Se_Hup	EVRERAARK-GRNPQTG
Ss_Hu	EVRERAARK-GRNPQTG
Spyog_HU	EVRERAARK-GRNPQTG
Sgall_HlpA	EVRERAARK-GRNPQTG
GBS_Hup	EVRERAARK-GRNPQTG
Spneu_HU	EVRERAERK-GRNPQTG
Sg_HlpA	EVRERAARK-GRNPQTG
Sm_HU	EVRERAARK-GRNPQTG

表 9B

【０４５５】

【表９－８】

配列番号129～139：それぞれ、出現の順に示す

Ef Hup	EVRERAARK-GRNPQTG
Hi_HupA	KVNERAART-GRNPQTG
Vc_HupA	KVNHRSART-GRNPQTG
Bpert HupB	AVSARAART-GRNPKTG
Pa_HupB	AVKERAART-GRNPQTG
Aa HU	SVRTRAART-GRNPKTG
Pm HupB	ATTERPAHE-GINPRSK
Pi Hup	SVTERPAHE-GINPATK
Td HU	FAVLHGR-KNARNPKTG
Pg_Hup-1	SVSERAARK-GINPKTK
Hp_Hup	ETAEQKGKE-GKVPGSD

表 9B（続き）

【０４５６】
【表９－９】

配列番号140～159：それぞれ、出現の順に示す
Liuらによる16アミノ酸のペプチドモチーフとの比較

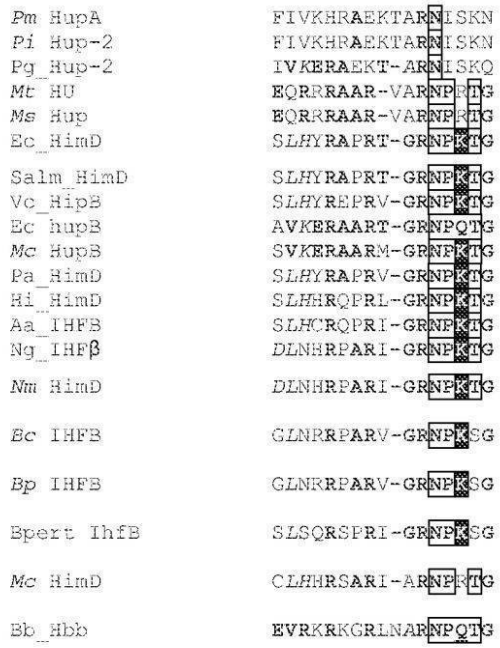


表 9B（続き）

【０４５７】

【表１０－１】

表10(配列番号160～336:それぞれ、出現の順に示す)

細菌株、タンパク質の名称	β3 配列	α3 配列	C 末端20アミノ酸
S. pyogenes MGAS10270, HU	AFKAGK	ALKDAVK	IAASKVPAFKAGKALKDAVK
S. gallolyticus UCN34 (*S. bovis*), HlpA	AFKAGK	ALKDAVK	IAASKVPAFKAGKALKDAVK
S. sobrinus 6715 HU	AFKAGK	ALKDAVK	IAASKVPAFKAGKALKDAVK
S. agalactiae (**B群** Strep)2603V/R Hup	AFKAGK	ALKDAVK	IAASKVPAFKAGKALKDAVK
S. pneumoniae R6 HU	AFKAGK	ALKDAVK	IAASKVPAFKAGKALKDAVK
S. gordonii Challis NCTC7868, HlpA	AFKAGK	ALKDAVK	IAASKVPAFKAGKALKDAVK
S. mutans UA159, HU	AFKAGK	ALKDAVK	IKASKVPAFKAGKALKDAVK
Enterococcus faecalis V583, Hup	AFKPGK	ALKDAVK	IAASKVPAFKPGKALKDAVK
S. aureus MW2, HU	AFKAGK	ALKDAVK	IPASKVPAFKAGKALKDAVK
S. epidermidis RP62A Hup	AFKAGK	ALKDAVK	IPASKVPAFKAGKALKDAVK
H. influenza KW20 Rd HupA	AFVSGK	ALKDAIK	IAASKVPAFVSGKALKDAIK
Aggregatibacter actinomycetemcomitans D11S-1 HU	AFVSGK	ALKDAVK	IAASKVPAFVSGKALKDAVK
V. cholera E1 Tor N16961, HupA	AFVAGK	ALKDAIK	IAAANVPAFVAGKALKDAIK
E. coli K12-MG1655 hupA	AFVSGK	ALKDAVK	IAAANVPAFVSGKALKDAVK
P. aeruginosa HupB	GFKAGK	ALKDAVN	IAAAKIPGFKAGKALKDAVN
E. coli K12-MG1655 hupB	SFRAGK	ALKDAVN	IAAAKVPSFRAGKALKDAVN
V. cholera E1 Tor N16961 HupB	SFKAGK	ALKDACN	IAEAKVPSFKAGKALKDACN
Bordetella pertusis Tohama 1 HupB	KFRPGK	ALKDAVN	IKKAKVPKFRPGKALKDAVN
Prevotella melaninogenica ATCC 25845 HupB	KFKAGA	ELADAVNK	AAKKVAKFKAGAELADAVNK
Prevotella intermedia 17 Hup	KFKPGA	ELADAVNA	AAKKVAKFKPGAELADAVNA
Moraxella catarrhalis RH4 HupB	SFKAGK	VLKESVN	IAASKVPSFKAGKVLKESVN
P. gingivalis W83 Hup-1	RFKPGS	TLELK	ISIPARKVVREKPGSTLELK
H. pylori 2669 Hup	KFKPGK	TLKQKVEEGK	KRVPKFKPGKTLKQKVEEGK
Prevotella melaninogenica ATCC 25845 HupA	SFKPAK	TFIEDMKK	PAHDFPSFKPAKTFIEDMKK
Prevotella intermedia 17 Hup-2	SFKPAK	TFIEDMKK	PAHDFPSFKPAKTFIEDMKK
P. gingivalis W83 Hup-2	AFKPSK	IFMSQMKQD	KRNIPAFKPSKLFMSQMKQD
Mycobacterium tuberculosis CDC1551 HU	AFRPGA	QFKAVVSGAQRLPAEGPAVKRG	AKRPATKAPAKKATARRGRK
Mycobacterium smegmatis MC2 Hup	AFRPGA	QFKAVISGAQKLPADGPAVKRG	TKAPAKKAAAKKAPAKKGRR
Prevotella melaninogenica ATCC 25845 HimA	NFKPAA	TIKGHVRKGGQDNG	NFKPAATIKGHVRKGGQDNG
Prevotella intermedia 17 HimA	NFRATA	SVKEKLKKGGAE	VLNFRATASVKEKLKKGGAE
E. coli K12-MG1655 HimA	TFRPGQ	KLKSRVENASPKDE	TFRPGQKLKSRVENASPKDE
Salmonella enteric serovar typhi CT18 HimA	TFRPGQ	KLKSRVENASPKEE	TFRPGQKLKSRVENASPKEE
V. cholera E1 Tor N1696 HimA	TFRPGQ	KLKARVENIKVEK	VTFRPGQKLKARVENIKVEK
P. aeruginosa HimA	TFRPGQ	KLKARVEAYAGTKS	TFRPGQKLKARVEAYAGTKS
Burkholderia cenocepacia HI2424 IHFA	TFHASQ	KLKALVENGAE	RVVTFHASQKLKALVENGAE
Burkholderia pseudomallei 668 IHFA	TFHASQ	KLKALVENGAEPDLAR	HASQKLKALVENGAEPDLAR
Bordetella pertusis Tohama 1 IhfA	TFHASQ	KLKSVVEQPNSPPDPASAE	QKLKSVVEQPNSPPDPASAE
N. gonorrhoeae FA1090 (Oklahoma) IHFα	TFHASQ	KLKGMVEHYYDKQR	TFHASQKLKGMVEHYYDKQR
N. meningitides MC58 HimA	TFHASQ	KLKSMVEHYYDKQR	TFHASQKLKSMVEHYYDKQR

【０４５８】

【表１０－２】

表10(続き)

H. influenza KW20 Rd HimA	TFKPGQ	KLRARVEKTK	RRVVTFKPGQKLRARVEKTK
Aggregatibacter actinomycetemcomitans D11S-1 HimA	VFKPGQ	KLRNRVEKVKPKA	VVFKPGQKLRNRVEKVKPKA
Moraxella catarrhalis RH4 HimA	TFKAGQ	KLRGWIDSQNEG	VVTFKAGQKLRGWIDSQNEG
Treponema pallidium Nichols **DNA結合タンパク質** _II	VFRPSK	RLKSAVRGYRSGEVGAD	PSKRLKSAVRGYRSGEVGAD
Prevotella melaninogenica ATCC 25845 Hup	SFTPDT	VMKELVNKPFSQFETVVINDGV	MQAGDTMKVPKVELRPEYRK
Prevotella intermedia 17 **仮説的**	SFTPDA	TMKELVNKPFAQFETVVLNDGV	SAGDTMKVPKVELRPQYRTK
E. coli K12-MG1655 HimD	HFKPGK	ELRDRANIYG	KYVPHFKPGKELRDRANIYG
*Salmonella enteric serovar typhi CT18 b*HimD	HFKPGK	ELRDRANIYG	KYVPHFKPGKELRDRANIYG
V. cholera E1 Tor N1696 HipB	HFKPGK	ELRERVNL	EGKYVPHFKPGKELRERVNL
P. aeruginosa HimD	HFKPGK	ELRDRVNEPE	KFVPHFKPGKELRDRVNEPE
H. influenza KW20 Rd HimD	YFKAGK	ELKARVDVQA	KSVPYFKAGKELKARVDVQA
Aggregatibacter actinomycetemcomitans D11S-1 IHFB	YFKAGK	ELRERVDVYAA	CVPYFKAGKELRERVDVYAA
N. gonorrhoeae FA1090 (Oklahoma) IHFβ	HFKPGK	ELRERVDLALKENAN	FKPGKELRERVDLALKENAN
N. meningitides MC58 HimD	HFKPGK	ELRERVDLALKENAN	FKPGKELRERVDLALKENAN
Burkholderia cenocepacia HI2424 IHFB	HFKPGK	ELRERVDGRAGEPLKADDPDDDR	ERVDGRAGEPLKADDPDDDR
Burkholderia pseudomallei 668 IHFB	HFKPGK	ELRERVDGRAGEPLKNDEPEDAQ	ERVDGRAGEPLKNDEPEDAQ
Bordetella pertusis Tohama 1 IhfB	HFKAGK	ELREWVDLVGNDQGDDSSNGSS	DSSNGSSDPLQSVMDMHAMH
Moraxella catarrhalis RH4 HimD	YFKPGK	ALRESVNLVND	ATPYFKPGKALRESVNLVND
B. burgdorferi B31 Hbb	YFRPGK	DLKERVWGIKG	HVAYFRPGKDLKERVWGIKG
Treponema denticola ATCC 35405 HU	RFKPGK	ELKEALHKIDTQELIES	PGKELKEALHKIDTQELIES

【図１Ａ】

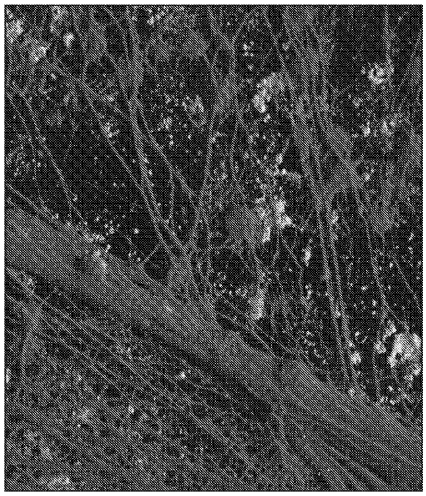


FIG. 1A

【図１Ｂ】

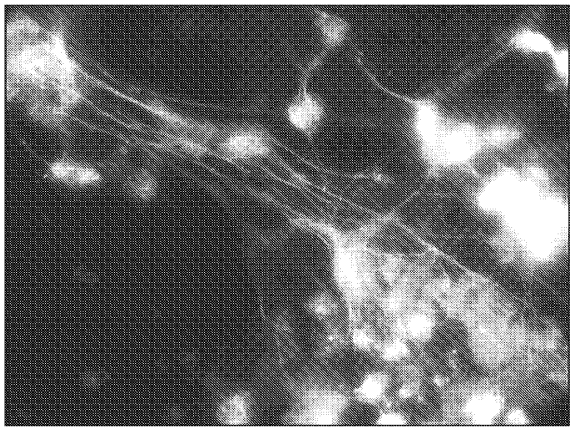


FIG. 1B

【図１Ｃ】

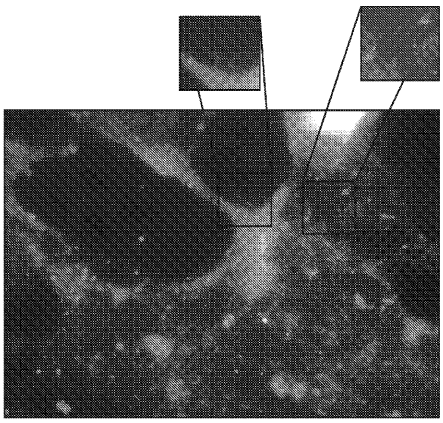


FIG. 1C

【図２】

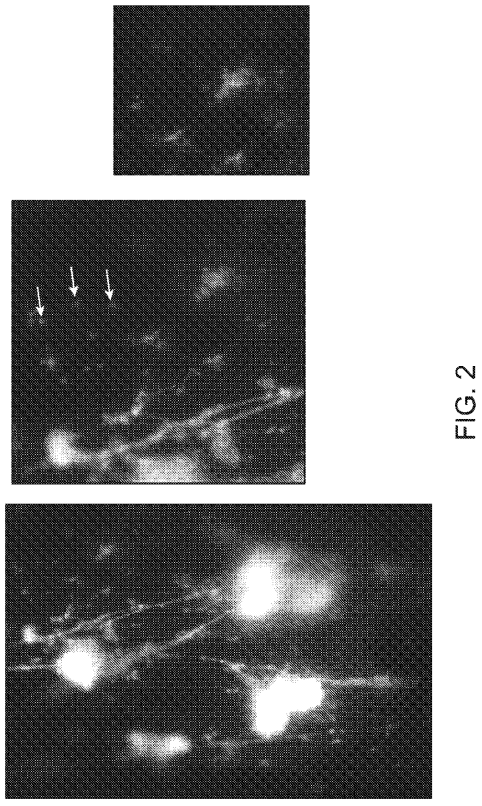
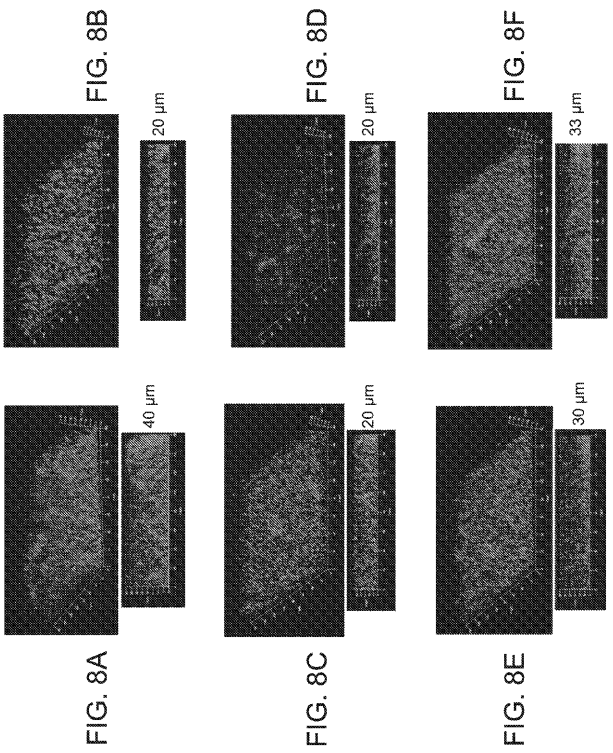
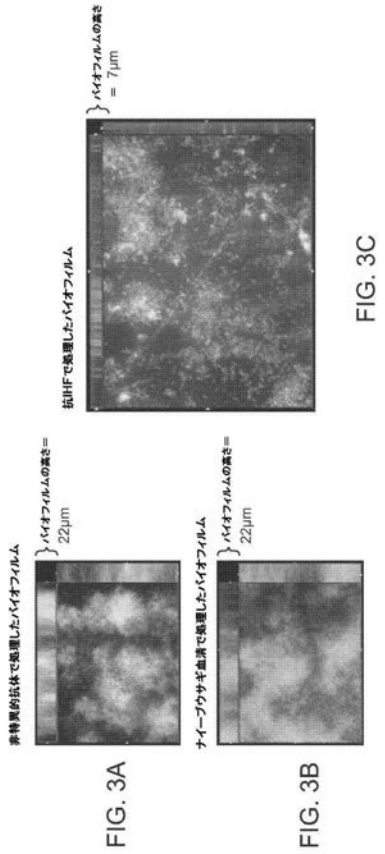


FIG. 2

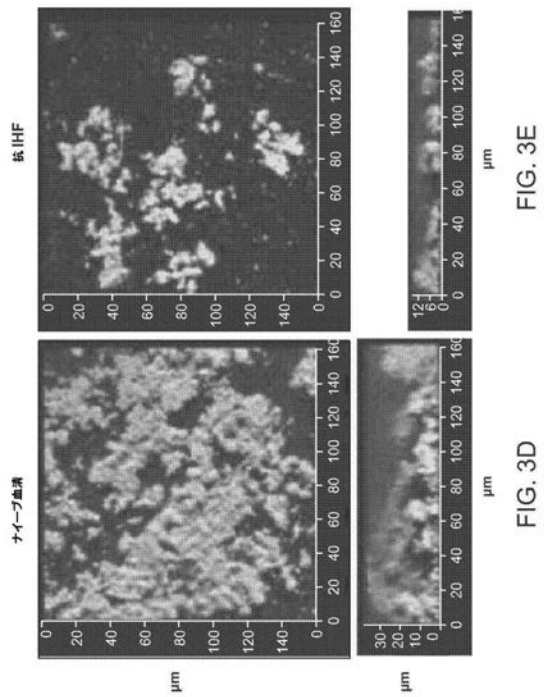
【図８】



【図３－１】



【図３－２】



【図４Ａ】

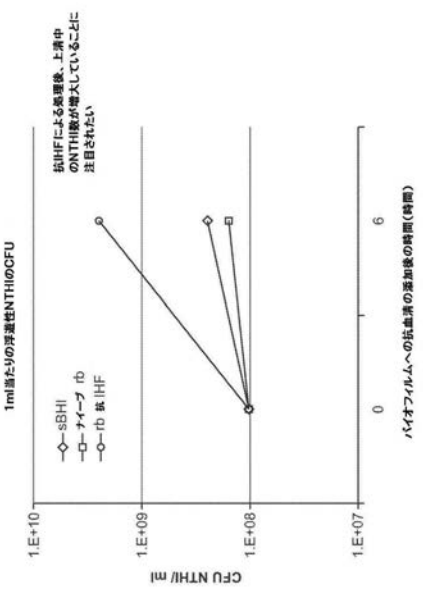


FIG. 4A

【図４Ｂ】

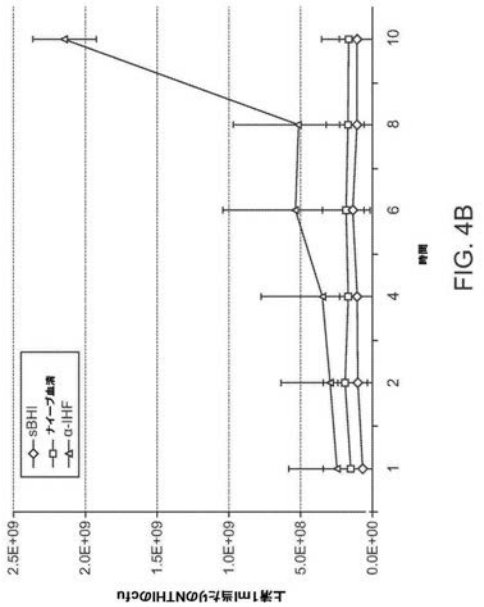


FIG. 4B

【図５】

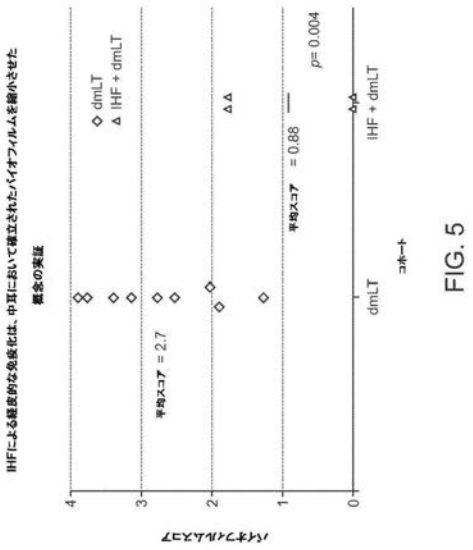


FIG. 5

【図６】

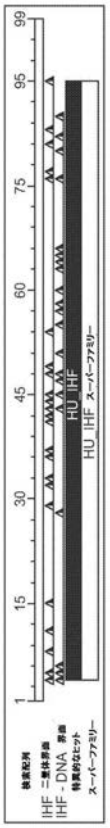


FIG. 6A

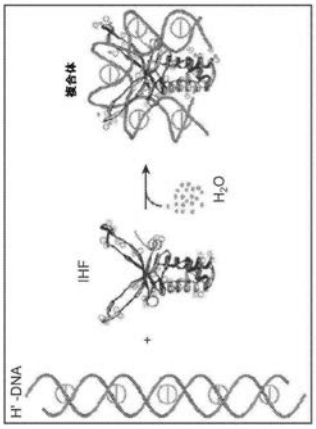


FIG. 6B

【図７】

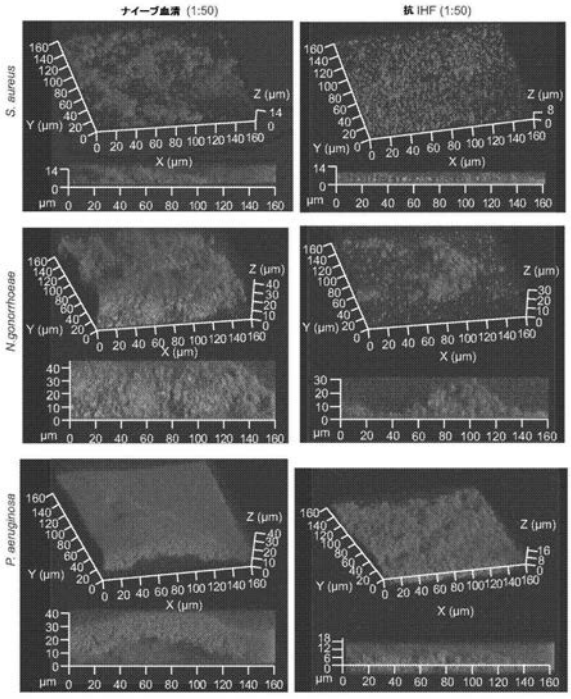


FIG. 7

【図９】

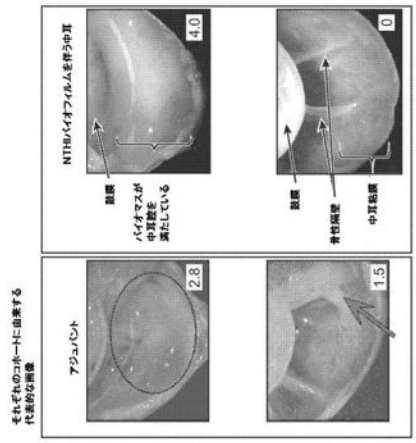


FIG. 9B

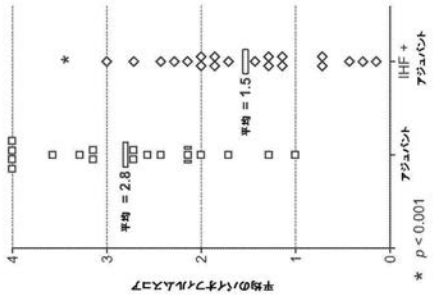


FIG. 9A

【図１０】

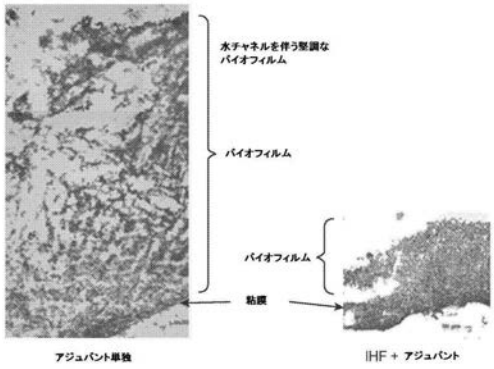


FIG. 10A

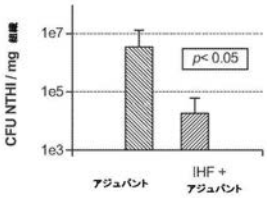


FIG. 10B

【図１１】

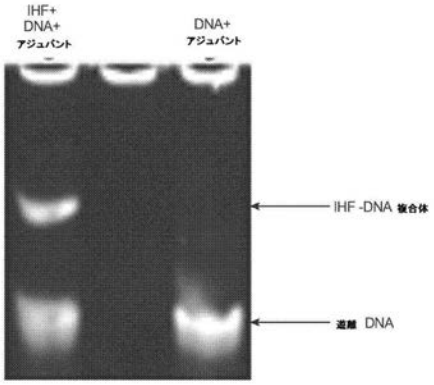
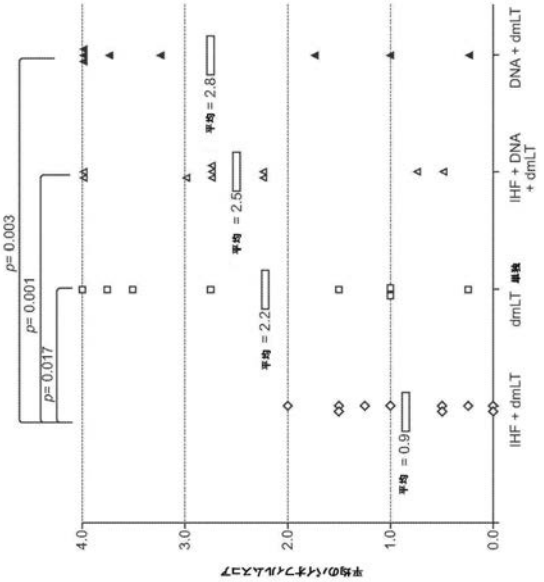


FIG. 11

【図１２】

FIG. 12



【図１３】

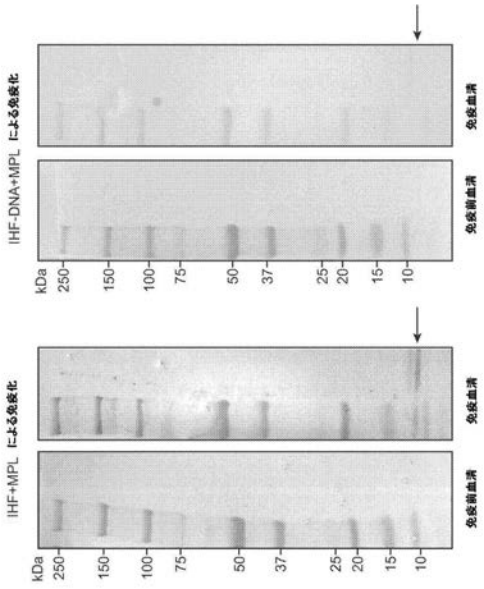


FIG. 13

【図１４】

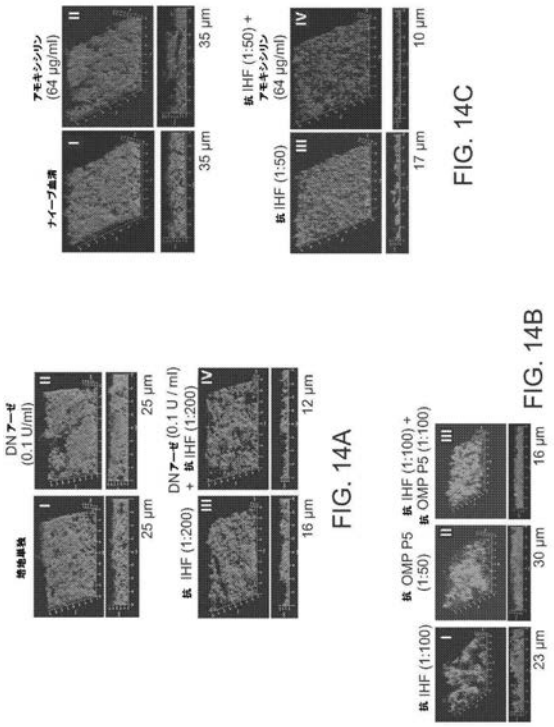


FIG. 14C

FIG. 14A

FIG. 14B

【図１５】

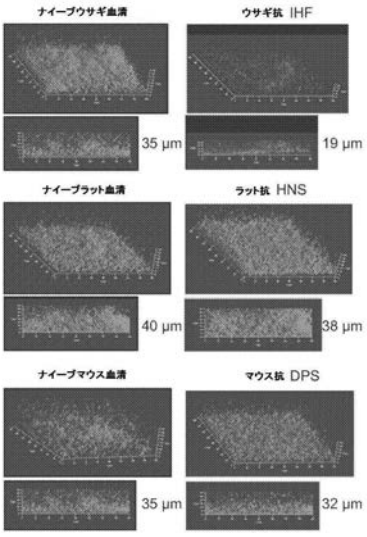


FIG. 15

【図１６】

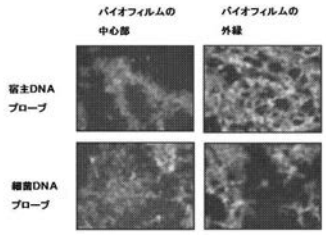


FIG. 16

【配列表】
2016178944000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI			テーマコード（参考）
A61K 47/34		*(2006.01)*	A61K	39/395	R	4C084
A61K 47/42		*(2006.01)*	A61K	45/00		4C085
A61K 47/48		*(2006.01)*	A61K	47/34		4C087
A61K 48/00		*(2006.01)*	A61K	47/42		4H045
A61K 49/00		*(2006.01)*	A61K	47/48		
A61K 51/00		*(2006.01)*	A61K	48/00		
A61P 31/04		*(2006.01)*	A61K	49/00	A	
A61P 31/12		*(2006.01)*	A61K	49/02	A	
A61P 37/04		*(2006.01)*	A61P	31/04		
C12Q 1/68		*(2006.01)*	A61P	31/12		
C12Q 1/04		*(2006.01)*	A61P	37/04		
C07K 14/245		*(2006.01)*	C12Q	1/68	ZNAZ	
C12N 1/15		*(2006.01)*	C12Q	1/04		
C12N 1/19		*(2006.01)*	C07K	14/245		
C12N 1/21		*(2006.01)*	C12N	1/15		
C12N 5/10		*(2006.01)*	C12N	1/19		
C07K 16/12		*(2006.01)*	C12N	1/21		
C12N 5/16		*(2006.01)*	C12N	5/10		
C12N 15/02		*(2006.01)*	C07K	16/12		
C12Q 1/66		*(2006.01)*	C12N	5/16		
C12M 1/00		*(2006.01)*	C12N	15/00	C	
G01N 33/53		*(2006.01)*	C12Q	1/66		
G01N 33/15		*(2006.01)*	C12M	1/00	A	
C12P 21/08		*(2006.01)*	G01N	33/53	D	
			G01N	33/15	Z	
			C12P	21/08		

(31)優先権主張番号 61/318,743
(32)優先日 平成22年3月29日(2010.3.29)
(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 512246178
ザ リサーチ インスティチュート アット ネイションワイド チルドレンズ ホスピタル
アメリカ合衆国 オハイオ ４３２０５－２６９６， コロンバス， チルドレンズ ドライブ ダブリュー５９１ ７００， センター フォー マイクロバイアル パソジェネシス
(74)代理人 100078282
弁理士 山本 秀策
(74)代理人 100113413
弁理士 森下 夏樹
(74)代理人 100181674
弁理士 飯田 貴敏
(74)代理人 100181641
弁理士 石川 大輔
(74)代理人 230113332
弁護士 山本 健策
(72)発明者 スティーブン ディー. グッドマン
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９００８９－２５６１， ロサンゼルス， マクリントック

アベニュー　３７４０，　イーイービー　１３１，　ユニバーシティー　オブ　サザン　カリフォルニア　気付
(72)発明者　ローレン　オー．　バカレッツ
アメリカ合衆国　オハイオ　４３２０５－２６９６，　コロンバス，　チルドレンズ　ドライブ　ダブリュー５９１　７００，　ザ　リサーチ　インスティチュート　アット　ネイションワイド　チルドレンズ　ホスピタル，　センター　フォー　マイクロバイアル　パソジェネシス　気付

Ｆターム(参考)
4B029 AA07 AA27 BB17 BB20 FA15
4B063 QA01 QA18 QA19 QQ03 QQ06 QQ08 QQ42 QQ79 QR32 QR48 QR72 QR75 QR77 QS02 QS07 QS33 QS39 QX01 QX07
4B064 AG27 CA19 CA20 DA01 DA15
4B065 AA26X AA26Y AA90X AA90Y AB01 AB04 AC14 BA02 CA23 CA24 CA25 CA44 CA46
4C076 AA01 AA06 AA11 AA17 AA19 AA24 AA30 AA31 AA36 AA53 AA72 BB01 BB02 BB15 BB16 BB22 BB24 BB25 BB28 BB29 BB30 BB31 CC06 CC07 CC32 EE23 EE41 EE59 FF63
4C084 AA13 AA17 MA13 MA16 MA17 MA22 MA24 MA28 MA31 MA32 MA35 MA37 MA41 MA43 MA52 MA57 MA58 MA59 MA60 MA63 MA66 MA67 NA14 ZB09 ZB32
4C085 AA13 AA14 AA25 CC02 CC07 CC23 DD62 EE01 EE03 EE06 GG03 GG04 GG06 GG08 GG10 HH03 HH07 HH11 HH13 KA04 KA27 KA28 KA29 KB07 KB08 KB11 KB15 KB18 LL20
4C087 AA01 AA02 BB65 BC83 CA04 CA12 MA13 MA16 MA17 MA23 MA24 MA28 MA31 MA32 MA35 MA37 MA41 MA43 MA52 MA57 MA58 MA59 MA60 MA63 MA66 MA67 NA14 ZB09 ZB32
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA41 BA50 CA11 CA40 DA76 DA86 EA22 EA31 EA52 FA72 FA74

【外国語明細書】
2016178944000001.pdf

专利名称(译)	用于去除生物膜的组合物和方法		
公开(公告)号	JP2016178944A	公开(公告)日	2016-10-13
申请号	JP2016132338	申请日	2016-07-04
[标]申请(专利权)人(译)	南加利福尼亚大学 该研究所在全国儿童医院		
申请(专利权)人(译)	南加州大学 该研究所在全国儿童医院		
[标]发明人	スティーブンディーグッドマン ローレンオーバカレッツ		
发明人	スティーブン ディー. グッドマン ローレン オー. バカレッツ		
IPC分类号	C12N15/09 A61K35/12 A61K35/76 A61K39/395 A61K45/00 A61K47/34 A61K47/42 A61K47/48 A61K48/00 A61K49/00 A61K51/00 A61P31/04 A61P31/12 A61P37/04 C12Q1/68 C12Q1/04 C07K14/245 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C07K16/12 C12N5/16 C12N15/02 C12Q1/66 C12M1/00 G01N33/53 G01N33/15 C12P21/08 A61K38/16		
CPC分类号	A61K38/164 A61K39/0258 A61K39/102 A61K39/40 C07K14/195 C07K14/21 C07K14/245 C07K14/285 C07K16/1203 C07K16/1214 C07K16/1217 C07K16/1232 C07K16/1242 C07K16/1271 C07K16/1275 C07K2317/14 C07K2317/34 C07K2317/76 A61K2300/00 A61P31/00 A61P31/04 A61P31/12 A61P37/04 G01N33/56911 G01N2800/26 G01N2800/52 Y02A50/474 A61K2039/505		
FI分类号	C12N15/00.A A61K35/12 A61K35/76 A61K39/395.D A61K39/395.L A61K39/395.R A61K45/00 A61K47/34 A61K47/42 A61K47/48 A61K48/00 A61K49/00.A A61K49/02.A A61P31/04 A61P31/12 A61P37/04 C12Q1/68.ZNA.Z C12Q1/04 C07K14/245 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C07K16/12 C12N5/16 C12N15/00.C C12Q1/66 C12M1/00.A G01N33/53.D G01N33/15.Z C12P21/08 A61K47/50 A61K47/68 A61K49/00 A61K49/06 A61K49/08 A61K51/00 A61K51/00.200 A61K51/02.200 A61K51/10.200 C12N15/13 C12N15/31 C12Q1/68 C12Q1/68.ZZN.A		
F-TERM分类号	4B029/AA07 4B029/AA27 4B029/BB17 4B029/BB20 4B029/FA15 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ06 4B063/QQ08 4B063/QQ42 4B063/QQ79 4B063/QR32 4B063/QR48 4B063/QR72 4B063/QR75 4B063/QR77 4B063/QS02 4B063/QS07 4B063/QS33 4B063/QS39 4B063/QX01 4B063/QX07 4B064/AG27 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/DA01 4B064/DA15 4B065/AA26X 4B065/AA26Y 4B065/AA90X 4B065/AA90Y 4B065/AB01 4B065/AB04 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA23 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C076/AA01 4C076/AA06 4C076/AA11 4C076/AA17 4C076/AA19 4C076/AA24 4C076/AA30 4C076/AA31 4C076/AA36 4C076/AA53 4C076/AA72 4C076/BB01 4C076/BB02 4C076/BB15 4C076/BB16 4C076/BB22 4C076/BB24 4C076/BB25 4C076/BB28 4C076/BB29 4C076/BB30 4C076/BB31 4C076/CC06 4C076/CC07 4C076/CC32 4C076/EE23 4C076/EE41 4C076/EE59 4C076/FF63 4C084/AA13 4C084/AA17 4C084/MA13 4C084/MA16 4C084/MA17 4C084/MA22 4C084/MA24 4C084/MA28 4C084/MA31 4C084/MA32 4C084/MA35 4C084/MA37 4C084/MA41 4C084/MA43 4C084/MA52 4C084/MA57 4C084/MA58 4C084/MA59 4C084/MA60 4C084/MA63 4C084/MA66 4C084/MA67 4C084/NA14 4C084/ZB09 4C084/ZB32 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/AA25 4C085/CC02 4C085/CC07 4C085/CC23 4C085/DD62 4C085/EE01 4C085/EE03 4C085/EE06 4C085/GG03 4C085/GG04 4C085/GG06 4C085/GG08 4C085/GG10 4C085/HH03 4C085/HH07 4C085/HH11 4C085/HH13 4C085/KA04 4C085/KA27 4C085/KA28 4C085/KA29 4C085/KB07 4C085/KB08 4C085/KB11 4C085/KB15 4C085/KB18 4C085/LL20 4C087/AA01 4C087/AA02 4C087/BB65 4C087/BC83 4C087/CA04 4C087/CA12 4C087/MA13 4C087/MA16 4C087/MA17 4C087/MA23 4C087/MA24 4C087/MA28 4C087/MA31 4C087/MA32 4C087/MA35 4C087/MA37 4C087/MA41 4C087/MA43 4C087/MA52 4C087/MA57 4C087/MA58 4C087/MA59 4C087/MA60 4C087/MA63 4C087/MA66 4C087/MA67 4C087/NA14 4C087/ZB09 4C087/ZB32 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045		

	/AA30 4H045/BA41 4H045/BA50 4H045/CA11 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA22 4H045/EA31 4H045/EA52 4H045/FA72 4H045/FA74
代理人(译)	夏木森下 饭田TakashiSatoshi 石川大介 山本健作
优先权	61/454972 2011-03-21 US 61/397891 2010-06-16 US 61/347362 2010-05-21 US 61/318743 2010-03-29 US
外部链接	Espacenet

摘要(译)

要解决的问题：提供用于去除生物膜的组合物和方法。解决方案：本发明提供了可用于接种患有慢性/复发性生物膜疾病的个体或作为具有现有感染的那些的治疗剂的分离的或重组的多肽。个体的免疫系统然后将通过干扰功能性保护性生物膜的构建和/或维持而自然产生抗体，所述抗体通过干扰宿主防止或清除这些细菌。或者，可施用针对多肽的抗体以治疗或预防感染。不能形成功能性生物膜的细菌更容易被宿主免疫系统的其余部分清除。选择图：无

	アッセイ1	アッセイ2	アッセイ3
最大の高さ (μm)	56	24	41
平均の厚さ (μm)	65	65	67
バイオマス ($\mu m^3/\mu m^2$)	37	58	66