

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4413616号
(P4413616)

(45) 発行日 平成22年2月10日(2010.2.10)

(24) 登録日 平成21年11月27日(2009.11.27)

(51) Int.Cl.		F I	
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A
C O 7 K	14/195	(2006.01)	C O 7 K 14/195
C O 7 K	9/00	(2006.01)	C O 7 K 9/00
C O 7 K	19/00	(2006.01)	C O 7 K 19/00
C O 7 K	16/12	(2006.01)	C O 7 K 16/12

請求項の数 37 (全 33 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2003-545623 (P2003-545623)
(86) (22) 出願日	平成14年11月15日(2002.11.15)
(65) 公表番号	特表2005-514011 (P2005-514011A)
(43) 公表日	平成17年5月19日(2005.5.19)
(86) 国際出願番号	PCT/CA2002/001760
(87) 国際公開番号	W02003/043986
(87) 国際公開日	平成15年5月30日(2003.5.30)
審査請求日	平成17年11月15日(2005.11.15)
(31) 優先権主張番号	60/331, 441
(32) 優先日	平成13年11月16日(2001.11.16)
(33) 優先権主張国	米国 (US)

(73) 特許権者	505113687 アイディー バイオメディカル コーポレイション カナダ国, ケベック エイチ7ブイ 3エス8, ラバル, カルティエール プールバード ウエスト 525
(74) 代理人	100072051 弁理士 杉村 興作
(72) 発明者	デニス マーティン カナダ国 ケベック ジー3エイ 1イー9 セント-オウガスティン-ドゥーデスマウルス リュ ガボウリー 4728-ジー

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 モラクセラ (ブランハメラ) カタルハリスのポリペプチド

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

分離されたポリヌクレオチドであって、配列番号2のアミノ酸16からアミノ酸182までで表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドと少なくとも90%のアミノ酸配列同一性を持つポリペプチドをコード化する分離されたポリヌクレオチドであって、コード化ポリペプチドが、配列番号2のアミノ酸16からアミノ酸182までで表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドのための結合特異性を持つ抗体を生じさせる能力を保持する、分離されたポリヌクレオチド。

【請求項2】

コード化ポリペプチドは配列番号2のアミノ酸16からアミノ酸182までからなる、請求項1記載の分離されたポリヌクレオチド。

10

【請求項3】

コード化ポリペプチドは、配列番号2のアミノ酸16からアミノ酸182までで表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドと少なくとも98%のアミノ酸配列同一性を持ち、コード化ポリペプチドは、配列番号2のアミノ酸16からアミノ酸182までで表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドのための結合特異性を持つ抗体を生じさせる能力を保持する、請求項1記載の分離されたポリヌクレオチド。

【請求項4】

コード化ポリペプチドは、配列番号2のアミノ酸16からアミノ酸182までで表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドと少なくとも95%のアミノ酸配列同一性を持ち、

20

配列番号2のアミノ酸16からアミノ酸182までで表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドのための結合特異性を持つ抗体を生じさせる能力を保持する、請求項1記載の分離されたポリヌクレオチド。

【請求項5】

コード化ポリペプチドは配列番号2のアミノ酸16からアミノ酸182までで表されるアミノ酸配列を備える、請求項1記載の分離されたポリヌクレオチド。

【請求項6】

配列番号1のヌクレオチド46からヌクレオチド549までで表されるヌクレオチド配列と少なくとも90%同一なヌクレオチド配列を持つ分離されたポリヌクレオチドであって、分離されたポリヌクレオチドは、配列番号2のアミノ酸16からアミノ酸182までで表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドのための結合特異性を持つ抗体を生じさせる能力を持つポリペプチドをコード化する、分離されたポリヌクレオチド。

10

【請求項7】

配列番号1のヌクレオチド46からヌクレオチド549までで表されるヌクレオチド配列と少なくとも95%同一なヌクレオチド配列を持ち、および分離されたポリヌクレオチドは、配列番号2のアミノ酸16からアミノ酸182までで表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドのための結合特異性を持つ抗体を生じさせる能力を持つポリペプチドをコード化する、請求項6記載の分離されたポリヌクレオチド

【請求項8】

配列番号1のヌクレオチド46からヌクレオチド549までで表されるヌクレオチド配列と97%よりも高い同一性のヌクレオチド配列を持ち、および分離されたポリヌクレオチドは、配列番号2のアミノ酸16からアミノ酸182までで表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドのための結合特異性を持つ抗体を生じさせる能力を持つポリペプチドをコード化する、請求項6記載の分離されたポリヌクレオチド。

20

【請求項9】

ヌクレオチド配列は、配列番号1のヌクレオチド46からヌクレオチド549までで表される配列を持つ、請求項6記載の分離されたポリヌクレオチド。

【請求項10】

コード化ポリペプチドはモラクセラ・カタルハリスに対する免疫反応を誘導する能力を持つ、請求項1～9のいずれか一項記載の分離されたポリヌクレオチド。

30

【請求項11】

分離されたポリヌクレオチドであって、請求項1～10のいずれか一項記載の分離されたポリヌクレオチドの相補物である、分離されたポリヌクレオチド。

【請求項12】

ベクターであって、請求項1乃至10のいずれか一項記載のポリヌクレオチドを備え、前記ポリヌクレオチドが発現調節領域に操作可能に連結されている、ベクター。

【請求項13】

宿主細胞であって、請求項12記載のベクターでトランスフェクトされている、宿主細胞。

【請求項14】

ポリペプチドの製造方法であって、ポリペプチドは請求項1～10のいずれか一項記載の分離されたポリヌクレオチドによってコード化され、前記方法は、請求項13記載の宿主細胞を前記ポリペプチドの発現に適切な条件下で培養する工程を具える、方法。

40

【請求項15】

分離されたポリペプチドであって、配列番号2のアミノ酸16からアミノ酸182までで表されるアミノ酸配列と少なくとも90%同一なアミノ酸配列を持ち、分離されたポリペプチドは、配列番号2のアミノ酸16からアミノ酸182までで表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドのための結合特異性を持つ抗体を生じさせる能力を保持する、分離されたポリペプチド。

【請求項16】

50

分離されたポリペプチドは、配列番号2のアミノ酸16からアミノ酸182までで表されるアミノ酸配列と少なくとも95%同一なアミノ酸配列を備え、および配列番号2のアミノ酸16からアミノ酸182までで表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドのための結合特異性を持つ抗体を生じさせる能力を保持する、請求項15記載の分離されたポリペプチド。

【請求項17】

配列番号2のアミノ酸16からアミノ酸182までからなる、請求項15記載の分離されたポリペプチド。

【請求項18】

分離されたポリペプチドは、配列番号2のアミノ酸16からアミノ酸182までのアミノ酸配列と少なくとも95%同一なアミノ酸配列からなり、配列番号2のアミノ酸16からアミノ酸182までで表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドのための結合特異性を持つ抗体を生じさせる能力を保持する、請求項15記載の分離されたポリペプチド。

10

【請求項19】

配列番号2のアミノ酸16からアミノ酸182までで表されるアミノ酸配列と99%より高く同一なアミノ酸配列を備え、配列番号2のアミノ酸16からアミノ酸182までで表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドのための結合特異性を持つ抗体を生じさせる能力を保持する、請求項15記載の分離されたポリペプチド。

【請求項20】

配列番号2のアミノ酸16からアミノ酸182までで表されるアミノ酸配列を備え、配列番号2のアミノ酸16からアミノ酸182までで表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドのための結合特異性を持つ抗体を生じさせる能力を保持する、請求項15記載の分離されたポリペプチド。

20

【請求項21】

分離されたポリペプチドであって、配列番号2のアミノ酸16からアミノ酸182までで表されるアミノ酸配列の少なくとも20個の隣接するアミノ酸を備え、配列番号2のアミノ酸16からアミノ酸182までからなるポリペプチドのための結合特異性を持つ抗体を生じさせる能力を持つ、分離されたポリペプチド。

【請求項22】

組換え型である、請求項15～21のいずれか一項記載の分離されたポリペプチド。

30

【請求項23】

さらに担体タンパク質が備わり、担体のタンパク質が分離されたポリペプチドに共役するかまたは接合する、請求項22記載の分離されたポリペプチド。

【請求項24】

モラクセラ・カタルハリスに対する免疫反応を誘導する能力を持つ、請求項15～23のいずれか一項記載の分離されたポリペプチド。

【請求項25】

キメラポリペプチドであって、2またはそれよりも多くのポリペプチドを備え、2またはそれよりも多くのポリペプチドは各々配列番号2のアミノ酸16からアミノ酸182までで表されるアミノ酸配列の少なくとも20個の隣接するアミノ酸を備え、2またはそれよりも多くのポリペプチドはキメラのポリペプチドを形成するように連結するのを条件とし、および配列番号2のアミノ酸16からアミノ酸182までからなるポリペプチドのための結合特異性を持つ抗体を生じさせる能力を持つ、キメラポリペプチド。

40

【請求項26】

キメラポリペプチドであって、配列番号2のアミノ酸16からアミノ酸182までで表されるアミノ酸配列の少なくとも20個の隣接するアミノ酸のポリペプチドを備え、配列番号2のアミノ酸16からアミノ酸182までからなるポリペプチドのための結合特異性を持つ抗体を生じさせる能力を持つ、キメラポリペプチド。

【請求項27】

さらに担体タンパク質が備わり、担体タンパク質はキメラポリペプチドに共役するかま

50

たは接合する、請求項 25 または 26 記載のキメラポリペプチド。

【請求項 28】

薬学上の組成物であって、請求項 15 ~ 24 のいずれか一項記載の分離されたポリペプチド、およびリポソームまたは薬学上許容できる担体、希釈剤または補助剤のいずれかでも備える、薬学上の組成物。

【請求項 29】

薬学上の組成物であって、請求項 25 ~ 27 のいずれか一項記載のキメラポリペプチド、およびリポソームまたは薬学上許容できる担体、希釈剤または補助剤のいずれかでも備える、薬学上の組成物。

【請求項 30】

中耳炎、副鼻腔炎、持続性咳、および急性喉頭炎からなる群より選ばれるモラクセラ・カタルハリス感染の治療上のまたは予防上の処置のために適するワクチンを調製するための、請求項 28 または 29 記載の薬学上の組成物。

【請求項 31】

モラクセラ・カタルハリスを生物学的試料において検出するための方法であって、

(a) 生物学的試料を、抗体またはその抗原結合性断片と共にインキュベートする工程であり、抗体またはその抗原結合性断片は、請求項 15 乃至 22 のいずれか一項記載の分離されたポリペプチドのための結合特異性を持ち、混合物を形成する工程、および

(b) 生物学的試料におけるモラクセラ・カタルハリスの存在を示す混合物中の特異的に結合した抗体または結合した抗原結合性断片を検出する工程

を具える、方法。

【請求項 32】

モラクセラ・カタルハリスの抗原のための結合特異性を持つ抗体を生物学的試料において検出するための方法であって、

(a) 請求項 15 乃至 22 のいずれか一項記載の 1 種またはそれよりも多くのポリペプチドを、生物学的試料と共にインキュベートし、混合物を形成する工程、および

(b) 試料におけるモラクセラ・カタルハリス抗原に特異的な抗体の存在を示す混合物中の特異的に結合した抗体を検出する工程

を具える、方法。

【請求項 33】

分離された抗体、またはその抗原結合性断片であって、請求項 15 乃至 21 のいずれか一項記載の分離されたポリペプチドのための結合特異性を持つ、分離された抗体またはその抗原結合性断片。

【請求項 34】

薬学上の組成物であって、請求項 33 記載の抗体、またはその抗原結合性断片、およびリポソームまたは薬学上許容できる担体または希釈剤を備える、薬学上の組成物。

【請求項 35】

薬学上の組成物の使用であって、請求項 28、29、または 34 のいずれか一項記載の薬学上の組成物の、モラクセラ・カタルハリスの感染の予防的または治療上の処置のための薬の製造における、使用。

【請求項 36】

モラクセラ・カタルハリスの感染は、中耳炎、副鼻腔炎、持続性咳、および急性喉頭炎からなる群より選ばれる、請求項 35 記載の使用。

【請求項 37】

分離されたポリペプチドを備えるキットであって、分離されポリペプチドは請求項 15 乃至 21 のいずれか一項記載のものであり、モラクセラ・カタルハリスの感染の検出または診断のための、キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

10

20

30

40

50

発明の分野

本発明は、ポリペプチド、更に特に、モラクセラ（ブランハメラ）カタルハリス〔*Moraxella*(*Branhamella*) *catarrharis*〕のSHB-MC100及びSHB-MC101ポリペプチドに関し、*Moraxella*(*Branhamella*) *catarrharis*の感染の防止、診断及び/又は処置に用いることができる。

【背景技術】

【0002】

発明の背景

Moraxella(*Branhamella*) *catarrharis*はグラム陰性の双球菌であり、ヒトにおいて気道感染を引き起こす。*M. catarrharis*は、現在、*Streptococcus pneumoniae*（肺炎連鎖球菌）及び*Haemophilus influenzae*（インフルエンザ菌）に次ぐ、幼児及び小児における中耳炎の第三の最も一般的な原因として受け入れられている。*M. catarrhalis*は、また、副鼻腔炎、持続性咳、及び急性喉頭炎を包含するいくつかの他の種類の感染に関連している。

【0003】

*M. catarrhalis*株のおよそ90%が抗生物質（ β -ラクタマーゼ陽性）に耐性であり及びその反復性中耳炎が高い罹患率と関連するので、*M. catarrhalis*の感染から個体を保護するワクチンを開発する必要性がある。*M. catarrhalis*による感染は、細菌細胞の表面に見出せる抗原に対する免疫反応を誘導する。しかし、これらの表面タンパク質の多くはまだ特徴付けられておらず、異なる株による感染からの保護をもたらす免疫反応も決定されていない。

【0004】

国際公開第WO 00/78968号パンフレットは、*Moraxella catarrhalis*のゲノムからのヌクレオチド配列を開示する。

【特許文献1】国際公開第WO 00/78968号パンフレット

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

*M. catarrhalis*の感染から個体を保護するワクチンを開発するために、数々の努力が、主として、遍在性表面タンパク質A (UspA)と称される高分子量タンパク質のような外膜タンパク質に集中した。このタンパク質は有望なワクチン候補と考えられ、その理由は、単クローン抗体及び多クローン抗体がネズミの肺-クリアランスモデルにおいて殺菌性及び保護性のあることが示されたからである。しかし、このタンパク質は*M. catarrhalis*の異なる株間で非常に多様であることが示されていた。このタンパク質に加え、他の*M. catarrhalis*のタンパク質は潜在的なワクチン候補として興味を生じさせた。トランスフェリン-結合タンパク質は、保存されたエピトープを所有し、細菌の表面に曝される。しかし、1種の株から別の株までのタンパク質との抗体の交差反応性にある程度の変異(divergence)があった。他の研究者は、また、45-kDaタンパク質のCD(OMP CD)に焦点を合わせた。このタンパク質は*M. catarrhalis*の株間で高度に保存されるが、慢性閉塞性肺疾患を患う成体はOMP CDに対する免疫反応において可変性を示す。

【0006】

したがって、*Moraxella*(*Branhamella*) *catarrhalis*の感染を防止し、診断し及び/又は処置するのに用いることができる*M. catarrhalis*のポリペプチドについて、未だ対処されていない必要性が残っている。

【課題を解決するための手段】

【0007】

発明の概要

1局面によれば、本発明は、配列番号2、4又はその断片又は類似物から選ばれる配列を含む第2のポリペプチドと少なくとも70%の同一性を有するポリペプチドをコード化する分離されたポリヌクレオチドを提供する。

【0008】

10

20

30

40

50

1局面によれば、本発明は、配列番号2、4又はその断片又は類似物から選ばれる配列を含むポリペプチドに関する。

【0009】

他の局面において、本発明のポリヌクレオチドによってコード化されるポリペプチド、薬学組成物、発現調節領域に操作可能に連結される本発明のポリヌクレオチドを含むベクター、並びに前記ベクターを用いてトランスフェクトされる宿主細胞及び前記宿主細胞を発現に適切な条件下で培養することを含むポリペプチドの製造方法を提供する。

【0010】

図面の簡単な記載

図1は、*M. catarrhalis*の株ETSU C-2からのSHB-MC100遺伝子のDNA配列；配列番号1を表す。配列の下線部分はリーダペプチドをコードする領域を表す。

図2は、*M. catarrhalis*の株ETSU C-2からのSHB-MC100ポリペプチドのアミノ酸配列；配列番号2を表す。下線を付けた配列は15個のアミノ酸残基のリーダペプチドを表す。

図3は、*M. catarrhalis*の株ETSU C-2からのSHB-MC101遺伝子のDNA配列；配列番号3を表す。配列の下線部分はリーダペプチドをコードする領域を表す。

図4は、*M. catarrhalis*の株ETSU C-2からのSHB-MC101ポリペプチドのアミノ酸配列；配列番号4を表す。下線を付けた配列は20個のアミノ酸残基のリーダペプチドを表す。

【発明を実施するための最良の形態】

【0011】

発明の詳細な記載

本発明は、精製し及び単離したポリヌクレオチドを提供し、ポリヌクレオチドは、*Moraxella*の感染を防止し、診断し及び/又は処置するのに用いることができる*Moraxella*のポリペプチドをコード化する。

【0012】

1局面によれば、本発明は、配列番号2、4又はその断片又は類似物から選ばれる配列を含む第2のポリペプチドと少なくとも70%の同一性を有するポリペプチドをコード化する分離されたポリヌクレオチドを提供する。

【0013】

1局面によれば、本発明は、配列番号2、4又はその断片又は類似物から選ばれる配列を含む第2のポリペプチドと少なくとも80%の同一性を有するポリペプチドをコード化する分離されたポリヌクレオチドを提供する。

【0014】

1局面によれば、本発明は、配列番号2、4又はその断片又は類似物から選ばれる配列を含む第2のポリペプチドと少なくとも90%の同一性を有するポリペプチドをコード化する分離されたポリヌクレオチドを提供する。

【0015】

1局面によれば、本発明は、配列番号2、4又はその断片又は類似物から選ばれる配列を含む第2のポリペプチドと少なくとも95%の同一性を有するポリペプチドをコード化する分離されたポリヌクレオチドを提供する。

【0016】

1局面によれば、本発明は、配列番号2、4又はその断片又は類似物から選ばれる配列を含む第2のポリペプチドと少なくとも98%の同一性を有するポリペプチドをコード化する分離されたポリヌクレオチドを提供する。

【0017】

1局面によれば、本発明は、配列番号2、4から選ばれる配列を含む第2のポリペプチドと少なくとも70%の同一性を有するポリペプチドをコード化する分離されたポリヌクレオチドを提供する。

【0018】

1局面によれば、本発明は、配列番号2、4から選ばれる配列を含む第2のポリペプチドと少なくとも80%の同一性を有するポリペプチドをコード化する分離されたポリヌクレ

10

20

30

40

50

オチドを提供する。

【0019】

1局面によれば、本発明は、配列番号2又は4から選ばれる配列を含む第2のポリペプチドと少なくとも90%の同一性を有するポリペプチドをコード化する分離されたポリヌクレオチドを提供する。

【0020】

1局面によれば、本発明は、配列番号2又は4から選ばれる配列を含む第2のポリペプチドと少なくとも95%の同一性を有するポリペプチドをコード化する分離されたポリヌクレオチドを提供する。

【0021】

1局面によれば、本発明は、配列番号2又は4から選ばれる配列を含む第2のポリペプチドと少なくとも98%の同一性を有するポリペプチドをコード化する分離されたポリヌクレオチドを提供する。

【0022】

1局面によれば、本発明は配列番号2、4又はその断片又は類似物から選ばれるアミノ酸配列を含むポリペプチドに関する。

【0023】

1局面によれば、本発明は配列番号2又は4から選ばれるアミノ酸配列を含むポリペプチドに関する。

【0024】

1局面によれば、本発明は配列番号2、4又はその断片又は類似物から選ばれるアミノ酸配列を含むアミノ酸配列によって特徴付けられるポリペプチドに関する。

【0025】

1局面によれば、本発明は配列番号2又は4から選ばれるアミノ酸配列を含むアミノ酸配列によって特徴付けられるポリペプチドに関する。

【0026】

1局面によれば、本発明は配列番号2、4又はその断片又は類似物から選ばれる配列を含むポリペプチドのエピトープ関連部分(epitope bearing portion)をコード化するポリヌクレオチドを提供する。

【0027】

1局面によれば、本発明は配列番号2又は4から選ばれる配列を含むポリペプチドのエピトープ関連部分をコード化するポリヌクレオチドを提供する。

【0028】

1局面によれば、本発明は配列番号2、4又はその断片又は類似物から選ばれる配列を含むポリペプチドのエピトープ関連部分に関する。

【0029】

1局面によれば、本発明は配列番号2又は4から選ばれる配列を含むポリペプチドのエピトープ関連部分に関する。

【0030】

1局面によれば、本発明は、分離されたポリヌクレオチドであって、次の：

(a)ポリペプチドをコード化するポリヌクレオチドであって、ポリペプチドが配列番号2、4又はその断片又は類似物から選ばれる配列を含む第2のポリペプチドと少なくとも70%の同一性を有し；

(b)ポリペプチドをコード化するポリヌクレオチドであって、ポリペプチドが配列番号2、4又はその断片又は類似物から選ばれる配列を含む第2のポリペプチドと少なくとも80%の同一性を有し；

(c)ポリペプチドをコード化するポリヌクレオチドであって、ポリペプチドが配列番号2、4又はその断片又は類似物から選ばれる配列を含む第2のポリペプチドと少なくとも95%の同一性を有し；

(d)ポリペプチドをコード化するポリヌクレオチドであって、ポリペプチドが配列番号2

10

20

30

40

50

、4又はその断片又は類似物から選ばれる配列を含み；

(e)ポリペプチドをコード化するポリヌクレオチドであって、ポリペプチドが配列番号2、4又はその断片又は類似物から選ばれる配列を含むポリペプチドのための結合特異性を有する抗体を生じさせ得；

(f)ポリペプチドのエピトープ関連部分をコード化するポリヌクレオチドであって、ポリペプチドが配列番号2、4又はその断片又は類似物から選ばれる配列を含み；

(g)配列番号1、3又はその断片又は類似物から選ばれる配列を含むポリヌクレオチド；

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

から選ばれるポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチドを提供する。

10

【0031】

1局面によれば、本発明は、分離されたポリヌクレオチドであって、次の：

(a)ポリペプチドをコード化するポリヌクレオチドであって、ポリペプチドが配列番号2又は4から選ばれる配列を含む第2のポリペプチドと少なくとも70%の同一性を有し；

(b)ポリペプチドをコード化するポリヌクレオチドであって、ポリペプチドが配列番号2又は4から選ばれる配列を含む第2のポリペプチドと少なくとも80%の同一性を有し；

(c)ポリペプチドをコード化するポリヌクレオチドであって、ポリペプチドが配列番号2又は4から選ばれる配列を含む第2のポリペプチドと少なくとも95%の同一性を有し；

(d)ポリペプチドをコード化するポリヌクレオチドであって、ポリペプチドが配列番号2又は4から選ばれる配列を含み；

20

(e)ポリペプチドをコード化するポリヌクレオチドであって、ポリペプチドが配列番号2又は4から選ばれる配列を含むポリペプチドのための結合特異性を有する抗体を生じさせ得；

(f)ポリペプチドのエピトープ関連部分をコード化するポリヌクレオチドであって、ポリペプチドが配列番号2又は4から選ばれる配列を含み；

(g)配列番号1又は3から選ばれる配列を含むポリヌクレオチド；

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

から選ばれるポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチドを提供する。

【0032】

1局面によれば、本発明は、分離されたポリペプチドであって、次の：

(a)配列番号2、4又はその断片又は類似物から選ばれる配列を含む第2のポリペプチドと少なくとも70%の同一性を有するポリペプチド；

(b)配列番号2、4又はその断片又は類似物から選ばれる配列を含む第2のポリペプチドと少なくとも80%の同一性を有するポリペプチド；

(c)配列番号2、4又はその断片又は類似物から選ばれる配列を含む第2のポリペプチドと少なくとも95%の同一性を有するポリペプチド；

(d)配列番号2、4又はその断片又は類似物から選ばれる配列を含むポリペプチド；

(e)配列番号2、4又はその断片又は類似物から選ばれる配列を含むポリペプチドのための結合特異性を有する抗体を生じさせ得るポリペプチド；

40

(f)配列番号2、4又はその断片又は類似物から選ばれる配列を含むポリペプチドのエピトープ関連部分；

(g)(a)、(b)、(c)、(d)、(e)又は(f)のポリペプチドであってN末端メチオニン残基が欠失しているポリペプチド；

(h)(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)又は(g)のポリペプチドであって分泌性のアミノ酸配列が欠失しているポリペプチド

から選ばれるポリペプチドを含むポリペプチドを提供する。

【0033】

1局面によれば、本発明は、分離されたポリペプチドであって、次の：

(a)配列番号2又は4から選ばれる配列を含む第2のポリペプチドと少なくとも70%の同

50

- 一性を有するポリペプチド；
- (b) 配列番号 2 又は 4 から選ばれる配列を含む第 2 のポリペプチドと少なくとも 80% の同一性を有するポリペプチド；
- (c) 配列番号 2 又は 4 から選ばれる配列を含む第 2 のポリペプチドと少なくとも 95% の同一性を有するポリペプチド；
- (d) 配列番号 2 又は 4 から選ばれる配列を含むポリペプチド；
- (e) 配列番号 2 又は 4 から選ばれる配列を含むポリペプチドのための結合特異性を有する抗体を生じさせ得るポリペプチド；
- (f) 配列番号 2 又は 4 から選ばれる配列を含むポリペプチドのエピトープ関連部分；
- (g) (a)、(b)、(c)、(d)、(e) 又は (f) のポリペプチドであって N 末端メチオニン残基が欠失しているポリペプチド；
- (h) (a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f) 又は (g) のポリペプチドであって分泌性のアミノ酸配列が欠失しているポリペプチド
- から選ばれるポリペプチドを含むポリペプチドを提供する。

10

【 0 0 3 4 】

当業者は、本発明には、DNA 分子、すなわち、本特許出願において本明細書で説明するように、かかるポリペプチドの変異体、変異形、類似体及び誘導体のような類似物をコード化する、ポリヌクレオチド、遺伝子、それらの相同遺伝子群及びそれらの相補的な配列が包含されることを認める。本発明には、また、本発明の DNA 分子に対応する RNA 分子も包含される。DNA 及び RNA 分子に加え、本発明には、対応するポリペプチド及びかかるポリペ

20

【 0 0 3 5 】

更なる具体例において、本発明に従うポリペプチドは抗原性である。

【 0 0 3 6 】

更なる具体例において、本発明に従うポリペプチドは免疫原性である。

【 0 0 3 7 】

更なる具体例において、本発明に従うポリペプチドは宿主において免疫反応を誘発することができる。

【 0 0 3 8 】

更なる具体例において、本発明は、また、上述のような本発明のポリペプチドに対して結合特異性を有する抗体を生じさせることができるポリペプチドに関する。

30

【 0 0 3 9 】

“ 結合特異性を有する ” 抗体は、試料、例えば、生物学的試料において、選定されたポリペプチドを認識し及び結合するが、他の分子を実質的に認識せず及び結合しない抗体である。特異的な結合は、選定されたポリペプチドを抗原として使用する ELISA アッセイを用いて測定することができる。

【 0 0 4 0 】

本発明に従って、生物学的研究における “ 保護 ” は、生存曲線、生存率又は生存期間における著しい上昇によって規定される。生存曲線を比較するための対数順位試験 (Log rank test) を用いる統計的分析、及び生存率及び死亡までの日数を比較するためのフィッシャーの直接確率試験 (Fisher exact test) は、それぞれ、P 値を計算し及び 2 種の群の間の違いが統計的に有意かどうかを決定するのに有用と思われる。0.05 の P 値は有意でないと扱われる。

40

【 0 0 4 1 】

本発明の追加の局面において、本発明のポリペプチド、又はその類似物の抗原性の / 免疫原性の断片を提供する。

【 0 0 4 2 】

本発明の断片は、1 種又はそれより多いかかるエピトープ領域を含むか、又はかかる領域に十分に類似して、それらの抗原性の / 免疫原性の特性を保持する必要がある。したがって、本発明にかかる断片について、同一性の程度はおそらく無関係であり、その理由は

50

、本明細書に記載するように、それらがポリペプチド又はその類似物の特定部分と100%同じであり得るからである。本発明は、更に、本発明のポリペプチド配列からの少なくとも10個の近接する(contiguous)アミノ酸残基を有する断片を提供する。1具体例において、少なくとも15個の近接するアミノ酸残基である。1具体例では、少なくとも20個の近接するアミノ酸残基である。

【0043】

当業者は、本発明のポリペプチドの類似物が、また、本発明との関連での使用、すなわち抗原性の/免疫原性の物質としての使用を見出せることを認める。したがって、例えば、1種又はそれより多い付加、欠失、置換又はその種の他のものを包含するタンパク質又はポリペプチドが本発明によって包含される。

10

【0044】

本明細書で用いるように、本発明のポリペプチドの“断片”、“類似物”又は“誘導体”には、1種又はそれより多いアミノ酸残基を、保存されるか又は保存されないアミノ酸残基で置換し(好ましくは保存される)及び天然であるか又は不自然であってもよいそれらのポリペプチドが包含される。1具体例において、本発明のポリペプチドの誘導体及び類似物は、図面に例示するそれらの配列又はその断片と約70%の同一性を有する。すなわち、それらの残基の70%が同じである。更なる具体例では、ポリペプチドは80%より高い同一性を有する。更なる具体例では、ポリペプチドは85%より高い同一性を有する。更なる具体例で、ポリペプチドは90%より高い同一性を有する。更なる具体例で、ポリペプチドは95%より高い同一性を有する。更なる具体例で、ポリペプチドは99%より高い同一性を有する。更なる具体例においては、本発明のポリペプチドの類似物は、約20個より少ないアミノ酸残基の置換、修飾又は欠失を有し、及びより一層好ましくは10個より少ない。

20

【0045】

更なる具体例においては、ポリペプチドは70%より高い相同性を有する。更なる具体例では、ポリペプチドは75%より高い相同性を有する。更なる具体例では、ポリペプチドは80%より高い相同性を有する。更なる具体例で、ポリペプチドは85%より高い相同性を有する。更なる具体例で、ポリペプチドは90%より高い相同性を有する。更なる具体例で、ポリペプチドは95%より高い相同性を有する。更なる具体例で、ポリペプチドは99%より高い相同性を有する。更なる具体例においては、本発明のポリペプチドの誘導体及び類似物は、約20個より少ないアミノ酸残基の置換、修飾又は欠失を有し、及びより一層好ましくは10個より少ない。好ましい置換は、保存されるようなもので、この技術で既知のもの、すなわち、置換された残基が、疎水性、大きさ、荷電又は官能基のような物理的又は化学的特性を共有する。

30

【0046】

これらの置換は、ポリペプチドの二次構造及び疎水性親水性指標(hydrophobic)の性質に最小限の影響しか有さないものである。好ましい置換は、保存されるとしてこの技術で既知のもの、すなわち、置換された残基が、疎水性、大きさ、荷電又は官能基のような物理的又は化学的特性を共有する。これらには、Dayhoff(デイホフ), M.によるAtlas of Protein Sequence and Structure(タンパク質の配列及び構造のアトラス)5, 1978年に、及びArgos(アルゴス), P.によるEMBO J. 8, 779-785(第779~785頁), 1989年に記載のもののような置換が包含される。例えば、アミノ酸で、天然又は不自然のいずれかで、次の群の1種に属するものは保存的变化を示す:

40

ala, pro, gly, gln, asn, ser, thr, val;

cys, ser, tyr, thr;

val, ile, leu, met, ala, phe;

lys, arg, orn, his;及び

phe, tyr, trp, his。

また、好ましい置換には、相当するL-アミノ酸についてのD-鏡像異性体の置換が包含される。

【0047】

50

代わりの手法において、類似物は、例えば、所望のポリペプチドへの効果的な標識付け (tagging) によって精製をより一層容易にさせる部分を組み合わせた融合タンパク質でよい。“標識(tag)”は、除去する必要がある場合があり、又は融合ポリペプチドがそれ自体有用であるのに十分な抗原性を保持する場合がある。

【0048】

相同性の割合は、アミノ酸の種類の一貫性の割合と類似度又は保存の割合とを加えた合計として定義される。

【0049】

1 具体例においては、本発明のポリペプチドの類似物は、図面に例示するそれらの配列又はその断片と約70%の相同性を有する。更なる具体例においては、ポリペプチドは80%より高い相同性を有する。更なる具体例では、ポリペプチドは85%より高い相同性を有する。更なる具体例で、ポリペプチドは90%より高い相同性を有する。更なる具体例で、ポリペプチドは95%より高い相同性を有する。更なる具体例では、本発明のポリペプチドの類似物は、約20個より少ないアミノ酸残基の置換、修飾又は欠失を有し、及びより一層好ましくは10個より少ない。

10

【0050】

CLUSTAL (クラスタル) プログラムのようなプログラムを用い、アミノ酸配列を比較することができる。このプログラムは、アミノ酸配列を比較し、及び必要に応じていずれかの配列中に空間を挿入することによって最適な配列比較(alignment)を見出す。最適な配列比較のためのアミノ酸の一貫性又は相同性を計算することができる。BLASTxに似ているプログラムは、同様の配列の最も長い伸展(stretch)を整列(aligned)させ、及びそのかみ合い(fit)に値を割り当てる。このようにして、比較を得ることができ、そこで、いくつかの領域の類似度が見出され、それぞれが異なった点数(score)を有する。双方の種類の一貫性分析が本発明において考慮される。

20

【0051】

抗原性のポリペプチドをスクリーニングし、エピトープ領域、すなわち、ポリペプチドの抗原性又は免疫原性を担っているそれらの領域を同定することができることはよく知られている。かかるスクリーニングを実行する方法はこの技術においてよく知られている。したがって、本発明の断片は、1種又はそれより多いかかるエピトープ領域を含むか、又はかかる領域に十分類似しそれらの抗原性/免疫原性の特性を保持する必要がある。

30

【0052】

本発明の追加の局面において、本発明のタンパク質又はポリペプチド、又はその類似物又は誘導体の抗原性/免疫原性の断片を提供する。

【0053】

このように、類似物、誘導体及び断片のために重要なのは、それらが導き出されるタンパク質又はポリペプチドの抗原性/免疫原性の少なくともある程度をそれらが所有することである。

【0054】

また、ポリペプチドの生物学的又は薬学的特性を変える他の化合物、すなわち、半減期を増加させるポリエチレングリコール(PEG)；精製を簡単にするためのリーダ又は分泌アミノ酸配列；プレプロ-及びプロ-配列；及び(多)糖類を融合させたポリペプチドも包含される。

40

【0055】

さらに、アミノ酸領域が多形であると見出されるそれらの状況において、1種又はそれより多い特定のアミノ酸を変えて異なるMoraxellaの株の異なるエピトープをより一層効果的に擬態するのが望ましい場合がある。

【0056】

また、本発明のポリペプチドを、末端-NH₂のアシル化(例えば、アセチル化、又はチオグリコール酸アミド化、末端カルボキシアミド化、例えば、アンモニア又はメチルアミン

50

を用いる)により修飾して、安定性、支持体又は他の分子への連結又は結合のための高められた疎水性を提供することができる。

【0057】

また、ポリペプチドの断片及び類似物のヘテロ及びホモポリペプチド多量体も考えられる。これらの重合体の形態には、例えば、アビジン/ビオチン、グルタルアルデヒド又はジメチルスーパーイミデート(dimethylsuperimidate)のような架橋剤を用いて架橋された1種又はそれより多いポリペプチドが包含される。かかる重合体の形態には、また、組換えDNA技術により生み出される多重シストロンの(multicistronic)mRNAsから生産される2種又はそれより多い直列のか又は逆位の近接配列を含むポリペプチドが包含される。

【0058】

更なる具体例において、本発明は、また、本出願の図面において定義されるような1種又はそれより多いポリペプチド又はその断片又は類似物を含むキメラのポリペプチドに関する。

【0059】

更なる具体例において、本発明は、また、配列番号2、4又はその断片又は類似物から選ばれる配列を有する2種又はそれより多いポリペプチドを含み;これらのポリペプチドがキメラのポリペプチドを形成するように連結されることを条件とするキメラポリペプチドに関する。

【0060】

更なる具体例において、本発明は、また、配列番号2又は4から選ばれる配列を含む2種又はそれより多いポリペプチドを含み、これらのポリペプチドがキメラのポリペプチドを形成するように連結されることを条件とするキメラポリペプチドに関する。

【0061】

好ましくは、本発明のポリペプチドの断片、類似物又は誘導体は、少なくとも1種の抗原性領域、すなわち、少なくとも1種のエピトープを含む。

【0062】

抗原性の重合体の形成(すなわち、合成多量体)を達成するために、ビスハロアセチル基、ニトロアリアルハロゲン化物、又はその種の他のものを有するポリペプチドを用いることができ、そこで、これらの試薬はチオ基に特異的である。したがって、異なるポリペプチドの2種のメルカプト基の間の連結は、単結合であることができ、又は少なくとも2個、代表的には少なくとも4個で、16個以下であるが、通常約14個以下の炭素原子の連結基を構成することができる。

【0063】

特定の具体例において、本発明のポリペプチドの断片及び類似物は、メチオニン(Met)の開始残基(starting residue)を含まない。好ましくは、ポリペプチドはリーダ配列又は分泌配列(シグナル配列)を組み込まれない。本発明のポリペプチドのシグナル部分は確立された分子生物学の技術に従って決定することができる。一般的に、対象のポリペプチドをMoraxellaの培養物から分離し、及び次いで配列決定して、成熟したタンパク質の最初の残基、従って成熟したポリペプチドの配列を決定する。

【0064】

他の具体例において、本発明のポリペプチドは、N-末端リーダペプチド、及び/又は貫膜ドメイン及び/又は外部ループ及び/又は回転を欠くことができる。

【0065】

本発明は、更に、少なくとも70%の同一性、好ましくは80%の同一性、更に好ましくは95%の同一性を有するポリペプチドの実質的にすべての余分な細胞性ドメインの断片を第2のポリペプチドに提供し、第2のポリペプチドは、配列番号2、4又はその断片又は類似物から選ばれる配列を、前記配列の全長にわたり含む。

【0066】

ポリペプチドを生産し及び/又はそれらの開始コドン(メチオニン又はバリン)を用いずに及び/又はそれらのリーダペプチドを用いずに使用して、組換えポリペプチドの生産

10

20

30

40

50

及び精製を助けることができることが理解される。リーダペプチドをコード化する配列を有さないクローニング遺伝子は、ポリペプチドを *E. coli* (大腸菌) の細胞質に限定し、及びそれらの回収を促進することが知られている [Glick(グリック), B. R. 及び Pasternak(パステルナーク), J. J. の “Molecular biotechnology: Principles and applications of recombinant DNA (分子生物学: 組換え DNA の原理及び適用)”, 2nd edition(第2版), ASM Press(ASMプレス社), Washington DC(ワシントン市)所在, p.109-143(第109~143頁)における (1998年) Manipulation of gene expression in prokaryotes (原核生物における遺伝子発現の操作) 参照]。

【0067】

本発明の他の局面によれば、また、(i)本発明のポリペプチドを、担体と共に、希釈剤、補助剤又はリポソームと含有する物質の組成物；(ii)本発明のポリペプチド及び担体、希釈剤、補助剤又はリポソームを含有する薬学組成物；(iii)本発明のポリペプチド及び担体、希釈剤、補助剤又はリポソームを含有するワクチン；(iv)宿主において、免疫原として(immunogenically)効果的な量の本発明のポリペプチドを宿主に投与し、免疫反応、例えば、*Moraxella*への防御免疫反応を誘発することによって、*Moraxella*に対する免疫反応を誘導するための方法；(v)予防的な又は治療上の量の本発明のポリペプチドを必要とする宿主に投与することによって、*Moraxella*の感染を防止し及び/又は処置するための方法；及び(vi)本発明のポリペプチドを対象にする抗体の予防的な又は治療上の量を必要とする宿主に投与することによって、*Moraxella*の感染を防止し及び/又は処置するための方法をも提供する。

【0068】

本発明の他の局面によれば、また、(i)本発明のポリヌクレオチドを、担体と共に、希釈剤、補助剤又はリポソームと含有する物質の組成物；(ii)本発明のポリヌクレオチド及び薬学上許容できる担体、希釈剤、補助剤又はリポソームを含有する薬学組成物；(iii)宿主において、免疫原として効果的な量の本発明のポリヌクレオチドを投与し、免疫反応、例えば、*Moraxella*への防御免疫反応を誘発することによって、*Moraxella*に対する免疫反応を誘導するための方法；及び特に、(iv)予防的な又は治療上の量の本発明のポリヌクレオチドを必要とする宿主に投与することによって、*Moraxella*の感染を防止し及び/又は処置するための方法をも提供する。

【0069】

本発明の他の局面によれば、また、(i)本発明のポリペプチドを、リポソームと共に、担体、希釈剤又は補助剤と含有する物質の組成物；(ii)本発明のポリペプチド及びリポソーム、担体、希釈剤又は補助剤を含有する薬学組成物；(iii)本発明のポリペプチド及びリポソーム、担体、希釈剤又は補助剤を含有するワクチン；(iv)宿主において、免疫原として効果的な量の本発明の薬学組成物を宿主に投与し、免疫反応、例えば、*Moraxella*への防御免疫反応を誘発することによって、*Moraxella*に対する免疫反応を誘導するための方法；及び特に、(v)予防的な又は治療上の量の本発明の薬学組成物を必要とする宿主に投与することによって、*Moraxella*の感染を防止し及び/又は処置するための方法をも提供する。

【0070】

免疫化の前に、本発明のポリペプチドを、また、破傷風毒素、ジフテリア毒素、B型肝炎ウイルス表面抗原、灰白髄炎ウイルスVP1抗原又は任意の他のウイルス又は細菌毒素又は抗原又は任意の適切なタンパク質のような担体タンパク質と対にするか又は接合し、より一層強い免疫反応の発生を刺激することができる。この対合又は接合は化学的にか又は遺伝学的に行うことができる。ペプチド-担体の接合のより一層詳細な説明は、Van Regenmortel(ファン・レーゲンモルテル), M. H. V., Briand(ブライアン) J. P., Muller(ミュラー) S., Plaue(プラウ) S.の《Synthetic Polypeptides as antigens》 in Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology (生化学及び分子生物学における実験技術での《抗原としての合成ポリペプチド》), Vol.19(第19巻)(ed.) Burdou(ブルドー), R. H. 及び Van Knippenberg(ファン・クニッペンバーグ) P. H.(1988年), Els

10

20

30

40

50

evier(エルゼビア社) New York(ニューヨーク)において入手できる。

【0071】

他の局面によれば、1種又はそれより多い本発明のMoraxellaのポリペプチドが薬学的に許容できる補助剤との混合物中に含有される薬学組成物を提供する。適切な補助剤には、(1)MF59TM, SAFTM, RibiTMのような水中油滴エマルジョン製剤；(2)完全又は不完全フロインドアジュバント；(3)塩、すなわち、AlK(SO₄)₂, AlNa(SO₄)₂, AlNH₄(SO₄)₂, Al(OH)₃, AlPO₄, シリカ、カオリン；(4)StimulonTM (スチムロン)のようなサポニン誘導体又はISCOMs (免疫賦活性複合体)のようなそれから生じる粒子；(5)インターロイキン、インターフェロン、マクロファージコロニー刺激因子(M-CSF)、腫瘍壊死因子(TNF)のようなサイトカイン；(6)炭素ポリヌクレオチド、すなわち、ポリIC及びポリAU、解毒したコレラ毒素(CTB)及び粘膜免疫の誘導のためのE. coliの熱に不安定な毒素のような他の物質；(7)リポソームが包含される。補助剤のより一層詳細な説明は、Pharmaceutical Research (薬学研究), vol. 11, No. 1 (1994年) pp2-11(2~11頁)のM.Z.I.Khan(カーン)等による総説において、及びまた、Vaccine (ワクチン), Vol. 13, No. 14, pp1263-1276 (1995年)及び国際公開第W099/24578号パンフレットのGupta(グプタ)等による他の総説においても入手することができる。好ましい補助剤には、QuilATM(クイルA), QS21TM, AlhydrogelTM(アルヒドロゲル)及びAdjuphosTM(アジュホス)が包含される。

10

【0072】

本発明の薬学組成物は、注射、迅速な注入、鼻咽頭吸収、皮膚吸収(dermoabsorption)、又は頬側によって非経口的にか、又は経口によって投与することができる。

20

【0073】

また、用語“薬学組成物”は、抗体を含むことを意味する。本発明に従って、また、本発明のポリペプチドのための結合特異性を有する1種又はそれより多い抗体の使用であって、Moraxellaの感染及び/又はMoraxellaの感染によって媒介される疾病及び症状の処置又は予防のための使用をも提供する。

【0074】

本発明の薬学組成物は、Manual of Clinical Microbiology(臨床微生物学マニュアル), P.R.Murray(マリー)(編集長), E. J. Baron(パロン), M. A. Pfaller(ファラー), F. C. Tenover(テノバー)及びR. H. Yolken(ヨーケン). ASM Press, Washington DC, seventh edition(第7版), 1999年, 1773頁に記載されているように、Moraxellaの感染及び/又はMoraxellaの感染によって媒介される疾病及び症状の予防のために用いられる。

30

【0075】

1具体例において、本発明の薬学組成物は、中耳炎、副鼻腔炎、持続性咳、急性喉頭炎、膿性角膜炎、新生児の結膜炎の処置又は予防のために用いられる。1具体例では、本発明の薬学組成物は、Moraxellaによる感染及び/又はMoraxellaにより媒介される疾病及び症状の処置又は予防のために用いる。更なる具体例においては、感染はMoraxella catarrhalisによって生じる。

【0076】

特定の具体例では、薬学組成物を、幼児、高齢者及び免疫無防備状態の(immunocompromised)宿主のようにMoraxellaの感染の危険性があるそのような宿主に投与する。

40

【0077】

本出願において用いるように、用語“宿主”には哺乳類が包含される。更なる具体例では、哺乳類はヒトである。

【0078】

薬学組成物は、好ましくは、約0.001~100 µg/kg(抗体/体重)、及びより一層好ましくは0.01~10 µg/kg、及び最も好ましくは0.1~1 µg/kgの単位投与形態で、免疫化の間に1~3回、約1~6週の間隔を空ける。

【0079】

薬学組成物は、好ましくは、約0.1 µg~10mg、及びより一層好ましくは1 µg~1mg、及び最も好ましくは10~100 µgの単位投与形態で、免疫化の間に1~3回、約1~6週の間

50

隔を空ける。

【0080】

他の局面によれば、配列番号2、4又はその断片又は類似物を含むアミノ酸配列によって特徴付けられるポリペプチドをコード化するポリヌクレオチドを提供する。

【0081】

1具体例において、ポリヌクレオチドは配列番号1、3に例示するものであり、これには読み取り枠(ORF)が含まれ、本発明のポリペプチドをコード化する。

【0082】

図面に例示するポリヌクレオチドの配列を、縮重コドンで変え、なおまだ、本発明のポリペプチドをコード化させることができることは認められる。したがって、本発明は、更に、本明細書において上述したポリヌクレオチドの配列(又はその相補的配列)で、配列間に70%の同一性を有する配列にハイブリダイズするポリヌクレオチドを提供する。1具体例においては、配列間に少なくとも80%の同一性がある。1具体例では、少なくとも85%の同一性がある。1具体例では、90%の同一性がある。更なる具体例では、ポリヌクレオチドは、厳密な条件、すなわち、少なくとも95%の同一性を有する条件下にハイブリダイズし得る。更なる具体例で、97%より高い同一性である。

10

【0083】

ハイブリデーションのための適切な厳密条件は、この技術の当業者によって容易に決定することができる〔例えば、Sambrook(サムブルック)等の(1989年) Molecular cloning: A Laboratory Manual(分子クローニング: 実験マニュアル), 第2版, Cold Spring Harbor(コールド・スプリング・ハーバー), N.Y.(ニューヨーク州); Current Protocols in Molecular Biology(分子生物学におけるカレントプロトコルズ), (1999年) Ausubel(オースベル) F. M.等編, John Wiley & Sons, Inc. (ジョンワイリーアンドサンズ社), N.Y.参照〕。

20

【0084】

更なる具体例では、本発明は、分離されたポリヌクレオチドであって、
(a)ポリペプチドをコード化するDNA配列又は
(b)ポリペプチドをコード化するDNA配列の相補物(complement)のいずれかに、
厳密な条件下でハイブリダイズし; 前記ポリペプチドが配列番号2、4又はその断片又は類似物から選ばれる配列を含むポリヌクレオチドを提供する。

30

【0085】

更なる具体例では、本発明は、分離されたポリヌクレオチドであって、
(a)ポリペプチドをコード化するDNA配列又は
(b)ポリペプチドをコード化するDNA配列の相補物のいずれかに、
厳密な条件下でハイブリダイズし; 前記ポリペプチドが配列番号2又は4から選ばれる配列を含むポリヌクレオチドを提供する。

【0086】

更なる具体例では、本発明は、分離されたポリヌクレオチドであって、
(a)ポリペプチドをコード化するDNA配列又は
(b)ポリペプチドをコード化するDNA配列の相補物のいずれかに、
厳密な条件下でハイブリダイズし; 前記ポリペプチドが配列番号2、4又はその断片又は類似物から選ばれる配列を含むポリペプチドからの少なくとも10個の近接するアミノ酸残基を含むポリヌクレオチドを提供する。

40

【0087】

更なる具体例では、本発明は、分離されたポリヌクレオチドであって、
(a)ポリペプチドをコード化するDNA配列又は
(b)ポリペプチドをコード化するDNA配列の相補物のいずれかに、
厳密な条件下でハイブリダイズし; 前記ポリペプチドが配列番号2又は4から選ばれる配列を含むポリペプチドからの少なくとも10個の近接するアミノ酸残基を含むポリヌクレオチドを提供する。

50

【 0 0 8 8 】

更なる具体例では、ポリヌクレオチドは配列番号 2、4 に例示する本発明のポリペプチドをコード化するものである。

【 0 0 8 9 】

更なる具体例では、ポリヌクレオチドは本発明のポリペプチドをコード化する配列番号 1、3 に例示するものである。

【 0 0 9 0 】

当業者によって容易に認められるように、ポリヌクレオチドには、DNA及びRNAが包含される。

【 0 0 9 1 】

本発明には、また、本出願において記載したポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチドが包含される。

【 0 0 9 2 】

他の局面によれば、ポリペプチドをコード化するポリヌクレオチドを、宿主細胞中で発現させ及び発現したポリペプチドの生成物を回収することによる組換え技術によって、本発明のポリペプチドを生産する方法を提供する。代わりに、ポリペプチドは、確立された合成化学技術、すなわち、リゲートし十分なポリペプチドを生成するオリゴペプチドの溶液相又は固相の合成（ブロックリゲーション）に従って生産することができる。

【 0 0 9 3 】

ポリヌクレオチド及びポリペプチドの獲得及び評価のための一般的な方法は、以下の参考文献に記載されている： Sambrook等のMolecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989; Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel F.M.等による編集, John Wiley and Sons, Inc. New York; Molecular Cloning to Genetic Engineering(遺伝子工学に対する分子クローニング), White(ホワイト) B. A.による編集, Humana Press(ヒューマナプレス社), Totowa(トトワ), New Jersey(ニュージャージー州), 1997年, 490頁からのPCR Cloning Protocols(PCRクローニングプロトコルズ); Protein Purification, Principles and Practices(タンパク質精製、原理及び実際), Scopes(スコープス) R. K., Springer-Verlag(シュプリンガー出版), New York, 3rd Edition(第3版), 1993年, 380頁; Current Protocols in Immunology(免疫学におけるカレントプロトコルズ), Coligan(コーリガン) J. E.等による編集, John Wiley & Sons Inc., New York.

【 0 0 9 4 】

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

【 0 0 9 5 】

本発明は、本発明の宿主細胞を前記ポリペプチドの発現に適切な条件下に培養することを含むポリペプチドの製造のための方法を提供する。

【 0 0 9 6 】

組換え生産のために、宿主細胞を、本発明のポリペプチドをコード化するベクターでトランスフェクトし、及び次いで、プロモータの活性化、形質転換体の選定又は遺伝子の増幅に適切に修飾した栄養培地中で培養する。適切なベクターは、選定された宿主において生存可能で及び複製可能であり、及び染色体性の、非染色体性の及び合成のDNA配列、例えば、細菌プラスミド、ファージDNA、バキュロウイルス、酵母プラスミド、プラスミド及びファージDNAの組合せから導かれるベクターを包含するものである。ポリペプチド配列は、ベクター中で、適切な部位に、プロモータ、リボゾーム結合部位（コンセンサス領域又はシャイン - ダルガルノの配列）、及び随意にオペレータ（調節要素）を含む発現調節領域にそれが操作可能に連結するように制限酵素を用いて組み込むことができる。所定の宿主及びベクターにとって適切な発現調節領域の個々の成分は、確立された分子生物学の原理に従って選定することができる（Sambrook等のMolecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989; Current Protocols in Molec

10

20

30

40

50

ular Biology, Ausubel F.M.等による編集, John Wiley and Sons, Inc. New York参照)。適切なプロモータには、限定されないが、LTR又はSV40プロモータ、*E. coli*のlac, tac又はtrpプロモータ及びファージラムダP_Lプロモータが包含される。好ましくは、ベクターは、複製起点並びに選択マーカ、すなわち、アンピシリン耐性遺伝子を組み込む。適切な細菌ベクターには、pET, pQE70, pQE60, pQE-9, pD10ファージスクリプト(phagescript), psiX174, pブリースクリプト(pbluescript) SK, pbsks, pNH8A, pNH16a, pNH18A, pNH46A, ptrc99a, pKK223-3, pKK233-3, pDR540, pRIT5及び真核生物のベクターpBlueBac111, pWLNEO, pSV2CAT, pOG44, pXT1, pSG, pSVK3, pBPV, pMSG及びpSVLが包含される。宿主細胞は、細菌、すなわち、*E. coli*, *Bacillus subtilis*(枯草菌), *Streptomyces*(ストレプトマイセス); 真菌、すなわち、*Aspergillus niger*(クロカビ), *Aspergillus nidulans*(アスペルギルス・ニドリンス); 酵母、すなわち、*Saccharomyces*(酵母菌属)又は真核生物、すなわち、CHO, COSでよい。

【0097】

培養中のポリペプチドの発現の際、細胞を代表的に、遠心分離によって収集し、次いで物理的又は化学的手段によって破壊し(発現したポリペプチドが培地中に分泌されない場合)、及び得られる粗抽出物を保持し対象のポリペプチドを単離する。培養培地又は可溶化液からのポリペプチドの精製は、ポリペプチドの特性に基づく確立された技術によって、すなわち、硫酸アンモニウム又はエタノール沈殿、酸抽出、陰イオン又は陽イオン交換クロマトグラフィ、ホスホセルロースクロマトグラフィ、疎水的相互作用クロマトグラフィ、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィ及びレクチンクロマトグラフィを用いることによって達成することができる。最終的な精製はHPLCを用いて達成することができる。

【0098】

ポリペプチドはリーダ配列又は分泌配列を有するか又は有しないで発現させることができる。前者の場合、リーダは、翻訳後の処理(米国特許第4,431,739号;第4,425,437号;及び第4,338,397号明細書参照)を用いて除去するか、又は発現したポリペプチドの精製に次いで化学的に除去することができる。

【0099】

更なる局面によれば、本発明の*Moraxella*のポリペプチドを、*Moraxella*の感染についての、特に*Moraxella*の感染の診断上の試験に用いることができる。

【0100】

*Moraxella*の感染を受け易い宿主における*Moraxella*の感染に対するいくつかの診断上の方法が可能であり、例えば、生物学的試料中の*Moraxella*の生物体の検出は、次の方法:

(a) 宿主から生物学的試料を得ること;

(b) 本発明の*Moraxella*のポリペプチドと反応する抗体又はその断片を生物学的試料と共にインキュベートし混合物を形成すること;及び

(c) *Moraxella*の存在を示す混合物中の特異的に結合した抗体又は結合した断片を検出すること

によることができる。

【0101】

代わりに、*Moraxella*の感染を受け易い宿主における*Moraxella*の感染に対する診断上の方法には、*Moraxella*の抗原に特異的な抗体を含有するか、又は含有する疑いのある生物学的試料中の前記抗体を検出するための方法が包含され、これは、次の:

(a) 宿主から生物学的試料を得ること;

(b) 本発明の1種又はそれより多い*Moraxella*のポリペプチド又はその断片を生物学的試料と共にインキュベートし混合物を形成すること;及び

(c) *Moraxella*に特異的な抗体の存在を示す混合物中の特異的に結合した抗体又は結合した断片を検出すること

のように行うことができる。

【0102】

当業者は、この診断上の試験が、酵素結合免疫吸着検定法(ELISA)、ラジオイムノアッ

10

20

30

40

50

セイ又はラテックス凝集アッセイのような免疫学的試験を含む種々の形態を採用し、本質的にポリペプチドに特異的な抗体が生物体中に存在するかどうかを決定することができることを認識する。

【0103】

本発明のポリペプチドをコード化するDNA配列は、また、Moraxellaを含む疑いのある生物学的試料中のかかる細菌の存在の検出において使用するDNAプローブを設計するのに用いることができる。この発明の検出方法は：

- (a) 宿主から生物学的試料を得ること；
 - (b) 本発明のポリペプチド又はその断片をコード化するDNA配列を有する1種又はそれより多いDNAプローブを生物学的試料と共にインキュベートし混合物を形成すること；及び
 - (c) Moraxellaの細菌の存在を示す混合物中の特異的に結合したDNAプローブを検出すること
- を含む。

10

【0104】

本発明にかかるDNAプローブは、また、循環する(circulating) Moraxella、すなわち、試料中のMoraxellaの核酸を検出するために、例えば、ポリメラーゼ連鎖反応を用い、Moraxellaの感染を診断する方法として用いることができる。プローブは通常の技術を用いて合成することができ、及び固相上に固定化することができるか、又は検出可能なラベルで標識化(label)することができる。この適用のための好ましいDNAプローブは、本発明のMoraxellaのポリペプチドの少なくとも約6個の近接するヌクレオチドに相補的な配列を有するオリゴマである。更なる具体例において、好適なDNAプローブは、本発明のMoraxellaのポリペプチドの少なくとも約15個の近接するヌクレオチドに相補的な配列を有するオリゴマである。更なる具体例では、好適なDNAプローブは、本発明のMoraxellaのポリペプチドの少なくとも約30個の近接するヌクレオチドに相補的な配列を有するオリゴマである。更なる具体例で、好適なDNAプローブは、本発明のMoraxellaのポリペプチドの少なくとも約50個の近接するヌクレオチドに相補的な配列を有するオリゴマである。

20

【0105】

宿主におけるMoraxellaの検出のための他の診断上の方法は：

- (a) 本発明のポリペプチド又はその断片と反応する抗体を検出可能なラベルで標識化すること；
 - (b) 標識化した抗体又は標識化した断片を宿主に投与すること；及び
 - (c) Moraxellaの存在を示す宿主中の特異的に結合した標識化抗体又は標識化断片を検出すること
- を含む。

30

【0106】

更なる局面では、本発明のポリペプチド、又はその断片、類似物又は誘導体をコード化するポリヌクレオチドをDNA免疫化の方法において用いることができる。すなわち、それらは、注入により複製し及び発現することができ、それによって、インビボで抗原性のポリペプチドを生産するベクターに組み込むことができる。例えば、ポリヌクレオチドは、真核細胞中で機能するCMVプロモータの制御下に、プラスミドベクターに組み込むことができる。好ましくは、ベクターを筋肉内に注射する。

40

【0107】

本発明の更なる局面は、本発明のMoraxellaのポリペプチドを、Moraxellaの感染の診断及び特に処置用の特異的な抗体の生産のための免疫原として使用することである。

【0108】

本発明の更なる局面は、本発明のポリペプチドを対象とする抗体を受動的免疫法のために使用することである。本出願に記載した抗体を用いることができる。適切な抗体は、適したスクリーニング方法を用いて、例えば、試験モデルにおいてMoraxellaの感染に対して受動的に保護するための特定の抗体の能力を測定することによって決定することができる。1例の動物モデルは本明細書の例に記載するマウスモデルである。抗体は、抗体全体

50

又はその抗原 - 結合断片でよく、及び任意の免疫グロブリンクラスに属することができる。抗体又は断片は、動物起源、特に哺乳類起源、及びより一層特には、ネズミ、ラット又はヒト起源でよい。それは、天然抗体又はその断片でよく、又は必要ならば、組換え抗体又は抗体断片でよい。組換え抗体又は抗体断片の用語は、分子生物学の技術を用いて生産された抗体又は断片を意味する。抗体又は抗体断片は、ポリクローナルでよく、又は好ましくはモノクローナルでよい。それは、Moraxellaのポリペプチドに関連する多数のエピトープに特異的であることができるが、好ましくは1種について特異的である。

【0109】

遺伝学的免疫化における本発明のポリヌクレオチドの使用は、好ましくは、プラスミドDNAを筋肉内に直接注入すること[Wolf(ウルフ)等、H M G (1992年) 1: 363; Turnes(ターネス)等、Vaccine (1999年), 17 : 2089; Le(レー)等、Vaccine (2000年) 18 : 1893; Alves (アルベス)等、Vaccine (2001年) 19 : 788]、プラスミドDNAを補助剤と一緒に、又は一緒になく注入すること[Ulmer(ウルマー)等、Vaccine (1999年) 18 : 18; MacLaughlin(マクラフリン)等、J. Control Release(ジャーナル・オブ・コントロールド・リリース)(1998年) 56: 259; Hartikka (ハルティカ)等、Gene Ther.(遺伝子治療)(2000年) 7 : 1171-82; Benvenisty(パンヴェニスティ)及びReshef(レシェフ), PNAS USA(全米科学アカデミー会報)(1986年) 83: 9551; Singh(シング)等、PNAS USA (2000年) 97: 811]、特定の担体と複合させたDNAの送達による細胞の標的指向化[Wa(ワー)等、J Biol Chem(ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリ)(1989年) 264: 16985; Chaplin(シャプラン)等、Infect. Immun.(感染及び免疫)(1999年) 67: 6434]、種々の形態のリポソーム中で複合されるか、又は封入されたプラスミドを注入すること[Ishii(イシイ)等、AIDS Research and Human Retroviruses(エイズ研究及びヒトレトロウイルス)(1997年) 13: 142; Perrie(ペリエ)等、Vaccine (2001年) 19: 3301]、照射(bombardment)の異なる方法でDNAを投与すること[Tang(タン)等、Nature(ネイチャー)(1992年) 356: 152; Eisenbraun(アイゼンブラウン)等、DNA Cell Biol(DNA・アンド・セル・バイオロジ)(1993年) 12: 791; Chen(チェン)等、Vaccine (2001年) 19: 2908]、及び生きたベクターでDNAを投与すること[Tubulekas(チューブルカス)等、Gene(ジーン)(1997年) 190: 191; Pushko(プシュコ)等、Virology(ウイルス学)(1997年) 239: 389; Spreng(シュプレング)等、FEMS (2000年) 27 : 299; Dietrich(ディートリック)等、Vaccine (2001年) 19: 2506]のような適切な送達方法又は系を用いる。

【0110】

更なる局面では、本発明は、Moraxellaの感染を受け易い宿主において、Moraxellaの感染の予防的な又は治療上の処置のための方法を提供し、これは、宿主に、予防的な又は治療上の量の本発明の薬学組成物を投与することを含む。

【0111】

更なる具体例において、本発明は、Moraxellaの感染の予防的な又は治療上の処置のための薬の製造における本発明の薬学組成物の使用を提供する。

【0112】

更なる具体例では、本発明は、本発明のポリペプチドを含む、Moraxellaの感染の検出又は診断のためのキットを提供する。

【0113】

他に定めがない限り、本明細書で用いるすべての技術的及び科学的用語は本発明が属する技術の当業者により普通に理解されるのと同じ意味を有する。本明細書に言及するすべての刊行物、特許出願、特許及び他の参考文献は、参考としてそれらのすべてを組み入れる。不一致の場合、本明細書が、定義を含め、制御する。加えて、物質、方法、及び例は説明のためのものに過ぎず、及び制限することを意図しない。

【実施例】

【0114】

例 1

この例はSHB-MC100遺伝子及び対応するポリペプチドのクローニング及び分子的特徴付

けを例示する。

M. catarrhalis SHB-MC100(配列番号1)遺伝子のコード領域を、PCR〔DNA Thermal Cycler GeneAmp PCR system 2400 Perkin Elmer(DNAサーマル・サイクラー・ジーンアンプ・PCRシステム2400パーキンエルマー), San Jose (サンノゼ), CA(カリフォルニア州)所在〕によって、M. catarrhalisの株ETSU C-2のゲノムDNA から、追加の制限酵素認識部位(restriction site)NdeI(CATATG) 及びNotI(GCGGCCGC)のための塩基伸長(base extension)を含む次のオリゴ: DMAR529(5'-GGGACTTCCATATGCAGTCGCAGAACATCAGCCG-3') 及びDMAR530(5'-ATTATATAGCGGCCGCAAGCCAATGCGTGCCATTTTC-3')を用いて増幅させた。PCR生成物をアガロースゲルから、QIAquick gel extraction kit(QIAクイックゲル抽出キット)を製造者の指示に従い用いて精製し〔Qiagen(チエンゲン社)、Chatsworth(チャッツワース)、CA所在〕、及びNdeI及びNotI〔Amersham Pharmacia Biotech, Inc.(アマシャムファルマシアバイオテック社)、Baie d'Urfe(ベーダーフェ)、Canada(カナダ国)所在〕を用いて消化した。pET21b(+)ベクター〔Novagen(ノバゲン社)、Madison(マディソン)、WI(ウイスコンシン州)〕をNdeI及びNotIで消化し、及びアガロースゲルから、QIAquick gel extraction kit(Qiagen)を用いて精製した。NdeI-NotI PCR生成物をNdeI-NotI pET21b(+)発現ベクターにリゲートした。リゲート生成物を、E. coli株DH5 [80dlacZ M15 (lacZYA-argF)U169 endA1 recA1 hsdR17(r_K-m_K+) deoR thi-1 supE44 gyrA96 relA1]〔Gibco BRL(ギブコBRL社)、Gaithersburg(ゲイサーズバーグ)、MD(メリーランド州)〕中に、Simanis(シマニス)〔Hanahan(ハナハン)、D.のDNA Cloning(DNAクローニング)、1985年、D. M. Glover(グラバー)(編)、109-135頁〕の方法に従って転換させた。SHB-MC100遺伝子を含む組換えpET21b(+)プラスミド(rpET21b(+))を、Qiagen kitを用いて精製し、及びDNA挿入断片(insert)を配列決定した〔Taq Dye Deoxy Terminator Cycle Sequencing kit(タック・ダイ・デオキシ・ターミネータ・サイクル・シーケンシング・キット)、ABI(アプライドバイオシステムズ社)、Foster City(フォスターシティ)、CA〕。

【 0 1 1 5 】

10

20

【表1】

M. catarrhalis の遺伝子の PCR 増幅に用いたオリゴヌクレオチドプライマ

遺伝子	プライマ I.D.	制限酵素認 識部位	ベクター	配列	配列 番号
SHB-MC100	DMAR52 9	NdeI	pET21b(+)	5'-GGGACTTCCATATGCAGT CGCAGAACATCAGCCG-3'	5
SHB-MC100	DMAR53 0	NotI	pET21b(+)	5'-ATTATATAGCGGCCGCAA GCCAATGCGTGCCATTTC-3'	6
SHB-MC100	RIOS199	BglII	pCMV-GH	5'-GGCAGATCTTGCAGTCG CAGAACATCAGCCG-3'	7
SHB-MC100	RIOS200	SalI	pCMV-GII	5'-ACGCGTCGACTTAAAGC CAATGCGTGCCATTTC-3'	8
SIIB-MC101	DMAR61 4	NdeI	pET21b(+)	5' -CATTAGTATCCATATG TGTAGCGGTCAAAACGAAC AA-3'	9
SHB-MC101	DMAR61 5	XhoI	pET21b(+)	5' -CAATCTTATCTCGAGTT CAATATTAGTTGGCATAACCT GC-3'	10
SHB-MC101	RIOS197	BamHI	pCMV-GH	5' -CTAGGATCCTTGTAGC GGTCAAAACGAACAA-3'	11
SHB-MC101	RIOS198	HindIII	pCMV-GH	5' -CAGAAGCTTTTATTCAA TATTAGTTGGCATAACCTGC- 3'	12

【0116】

SHB-MC100ポリペプチドをコードする読み取り枠(ORF)が、549-bpを含み、及び予測された11.99のpI及び予測された20828.17 Daの分子量を有する182個のアミノ酸残基のポリペプチドをコード化することが決定された。Spscan software (スプスキャンソフトウェア) [Wisconsin Sequence Analysis Package; Genetics Computer Group(ウィスコンシン・シーケンズ・アナリシス・パッケージ; ジェネティクス・コンピュータ・グループ)]を用いる予測されたアミノ酸残基配列(配列番号: 2)の分析は、15個のアミノ酸残基のシグナルペプチド(VVLGLALLLVHPNLQ)の存在を示し、それは最後に2つのグルタミン残基の間に位置する切断部位が付いている。

【0117】

SHB-MC100(配列番号1)遺伝子のPCR増幅によるその存在の確認のために、次の3種の異なるM. catarrhalisの株を用いた: East Tennessee State University(イースト・テネシー州立大学)によって提供されたM. catarrhalisのETSU C-2, ETSU T-25, 及びETSU 658 臨床分離株。E. coli XL1-Blue MRF'をこれらの実験でネガティブコントロールとして用いた。SHB-MC100(配列番号1)遺伝子を、3種のM. catarrhalisの株、及びコントロールのE. coli株からのゲノムDNAから、オリゴヌクレオチドプライマDMAR529及びDMAR530(表1)を用いてPCR (DNA Thermal Cycler GeneAmp PCR system 2400 Perkin Elmer)によって増幅した。PCRを、94 で15秒、47 で30秒及び72 で90秒の5回のサイクル、次いで94 で15秒、60 で30秒及び72 で90秒の30回のサイクル及び72 で7分の最後の伸長期間(elongation period)で実行した。PCR生成物を1%アガロースゲルにおいて大きさで分画し、及び臭化エチジウム染色により視覚化した。これらのPCR増幅の結果を表2に表す。増幅生成物の分析は、SHB-MC100(配列番号1)遺伝子が試験したすべての3種のM. catarrha

*lis*の株のゲノム中に存在することを明らかにした。コントロールの*E. coli*のDNAを、これらのオリゴヌクレオチドプライマを用いて同じPCR増幅にかけた場合、かかる生成物は検出されなかった。

【0118】

【表2】

PCR増幅による *M. catarrhalis* の遺伝子の同定

株の同定	PCR増幅による同定	
	SHB-MC100	SHB-MC101
ETSU C-2	+	+
ETSU 658	+	+
ETSU T-25	+	+
<i>E. coli</i>	-	-

10

【0119】

例2

この例はSHB-MC101遺伝子及び対応するポリペプチドのクローニング及び分子的特徴付けを例示する。

*M. catarrhalis*のSHB-MC101遺伝子(配列番号3)のコード領域を、PCR(DNA Thermal Cycler GeneAmp PCR system 2400 Perkin Elmer)によって、*M. catarrhalis*の株ETSU C-2から、追加の制限酵素認識部位NdeI (CATATG)及びXhoI (CTCGAG)のための塩基伸長を含む次の表1に示すDMAR614及びDMAR615のオリゴを用いて増幅させた。SHB-MC101遺伝子の発現ベクター中へのクローニング及び配列決定のために用いる方法は、例1に記載した方法と同様である。

20

【0120】

SHB-MC101をコードする読み取り枠(ORF)が、798-bpを含み、及び予測された4.48のpI及び予測された28600.89 Daの分子量を有する265個のアミノ酸残基のポリペプチドをコード化することが決定された。SpScan software(Wisconsin Sequence Analysis Package; Genetics Computer Group)を用いる予測されたアミノ酸残基配列(配列番号4)の分析は、20個のアミノ酸残基のシグナルペプチド(VKFKTFGLMAAIVGTFSISA)の存在を示唆し、それは最後にアラニン及びシステイン残基の間に位置する切断部位が付いている。

30

【0121】

SHB-MC101遺伝子は、オリゴヌクレオチドプライマDMAR614及びDMAR615を用いるPCR増幅の後、試験した3種の*M. catarrhalis*の株中に存在することが示された(表2)。SHB-MC101遺伝子のPCR増幅のために用いる方法は、例1に示した方法と同様である。コントロールの*E. coli*のDNAを、これらのオリゴヌクレオチドプライマを用いて同じPCR増幅にかけた場合、かかる生成物は検出されなかった。

【0122】

例3

この例は、*M. catarrhalis*の遺伝子のCMVプラスミドpCMV-GHにおけるクローニングを例示する。

40

*M. catarrhalis*のポリペプチドのDNAコード領域を、プラスミドベクターpCMV-GH [Tang (タン)等, Nature, 1992年, 356:152]においてサイトメガロウイルス(CMV)プロモータの転写調節下にあるヒト成長ホルモン(hGH)遺伝子の下流の相(phase downstream)に挿入した。CMVプロモータは、*E. coli*細胞中で非機能性のプラスミドであるが、真核細胞中へのプラスミドの投与の際、活性である。また、ベクターはアンピシリン耐性遺伝子を組み込む。

【0123】

SHB-MC100(配列番号1)及びSHB-MC101(配列番号3)の遺伝子のコード領域で、それらの

50

リーダペプチド領域を有しないものを、PCR (DNA Thermal Cycler GeneAmp PCR system 2400 Perkin Elmer)によって、*M. catarrhalis*の株ETSU C-2のゲノムDNAから、表1に記載されている制限酵素認識部位BamHI (GGATCC), BglIII (AGATCT), Sall (GTTCGAC), 又はHindIII (AAGCTT)の付加のための塩基伸長を含むオリゴヌクレオチドプライマを用いて増幅した。PCR生成物をQIAquick gel extraction kit(Qiagen)を用いてアガロースゲルから精製し、及び制限酵素(Amersham Pharmacia Biotech, Inc.)で消化した。pCMV-GHベクター〔Dr. Stephen (シュテファン) A. Johnston (ジョンストン)の研究室, Department of Biochemistry(生化学部門), The University of Texas(テキサス大学), Dallas (ダラス市), Texas (テキサス州)〕をBamHI, BglIII, Sall, 又はHindIIIで消化し、及びQIAquick gel extraction kit(Qiagen)を用いてアガロースゲルから精製した。消化したDNA断片を消化したpCMV-GHベクターにリゲートし、CMVプロモータの制御下にhGH-SHB-MC100及びhGH-SHB-MC101の融合ポリペプチドを作製した。リゲートした生成物を、*E. coli*株DH5 [80dlacZ M15 (lacZYA-argF)U169 endA1 recA1 hsdR17(r_K - m_K +) deoR thi-1 supE44 γ yrA96 relA1](Gibco BRL)中に、Simanisの方法〔Hanahan, D. DNA Cloning, 1985年, D.M. Glover(編), pp. 109-135〕に従って形質転換させた。組換えpCMVプラスミドをQiagenのキットを用いて精製し、及びDNA挿入断片のヌクレオチド配列をDNA配列決定によって確認した。

【0124】

例4

この例は、*M. catarrhalis*のポリペプチド抗原に対する免疫反応を誘発するためのDNAの使用を例示する。

8匹のメスのBALB/cマウス〔Charles River(チャールズリバー), St-Constant(セントコンスタント), Quebec, Canada〕の群を、50 μ gの顆粒球 - マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF) - 発現プラスミドpCMV-GH-GM-CSF(Laboratory of Dr. Stephen A. Johnston, Department of Biochemistry, The University of Texas, Dallas, Texas)の存在下に、SHB-MC100(配列番号1)及びSHB-MC101(配列番号3)の遺伝子をコード化する組換えpCMV-GHの50 μ gで、2又は3週の間隔で100 μ Lの3回の筋肉内注射によって免疫化した。コントロールとして、マウスの群に、50 μ gのpCMV-GH-GM-CSFの存在下の50 μ gのpCMV-GHを注入した。血液試料を、眼窩の洞(orbital sinus)から各免疫化に先立って及び3回目の注射後の7日に収集した。血清抗体応答を、対応するHis-Tag標識化した*M. catarrhalis*の組換えポリペプチドを被覆抗原として用いるELISAによって決定した。これらのHis-tag標識化した*M. catarrhalis*の組換えポリペプチドの生産及び精製を例5において示す。

【0125】

例5

この例は、*M. catarrhalis*の組換えポリペプチドの生産及び精製を例示する。

SHB-MC100(配列番号1)及びSHB-MC101(配列番号3)の遺伝子を有する組換えpET21プラスミドを用い、*E. coli*株BL21(DE3)[F⁻ ompT hsdS_B(r^+ _B m^+ _B) gal dcm (DE3)](Novagen)をエレクトロポレーション〔Gene Pulser II apparatus(ジーン・パルサーII装置), BIO-RAD Labs(バイオラド・ラボラトリーズ社), Mississauga(ミシサーガ), Canada〕によって形質転換した。この*E. coli*株において、組換えポリペプチドの発現を制御するT7プロモータはT7 RNAポリメラーゼ(DE3プロファージ上に存在)によって特異的に認識され、その遺伝子はイソプロピル- β -D-チオ-ガラクトピラノシド(IPTG)によって誘導可能なlacプロモータの制御下にある。形質転換体BL21(DE3)/rpET21を、37 °Cにおいて250rpmで撹拌しながら、1mL当たり100 μ gのカルベニシリン〔Sigma-Aldrich Canada Ltd.(シグマ・アルドリッチ・カナダ社), Oakville(オークビル), Canada所在〕を含有するLBブロス(培養液)(ペプトン10g/L, 酵母抽出物5g/L, NaCl 10g/L)中で、A₆₀₀が0.5の値に達するまで増殖させた。His-標識付けされた*M. catarrhalis*の組換えポリペプチドの生産を誘導するため、細胞を追加の3時間、1mMの終濃度のIPTGの存在下にインキュベートした。500mLの培養物から誘導された細胞を遠心分離によってペレット化し、及び-70 °Cで凍らせた。

【0126】

IPTG-誘導化BL21(DE3)/rpET21b(+)の非溶性(non-soluble)画分からのSHB-MC100のHis-

10

20

30

40

50

標識付けされた組換えポリペプチドの精製を、His結合(His・Bind)金属キレート樹脂上に固定化された2価の陽イオン(Ni^{2+})に結合させるためのHis・Tag配列(6個の連続したヒスチジン残基)の特性に基づくアフィニティークロマトグラフィによって行った。簡潔には、IPTGで誘導した500mLの培養物から得たペレット化細胞を、6Mのグアニジン-HClを含有する溶解緩衝液〔20mM Tris(トリス), 500mM NaCl, 10mMイミダゾール, pH7.9〕中に再懸濁させ、超音波処理し、及び12,000×gで20分間遠心分離して、細片を除いた。上清をNi-NTAアガロース樹脂(Qiagen)と共に45分間4℃でインキュベートした。SHB-MC100のHis-標識付けした組換えポリペプチドを樹脂から6Mのグアニジン-HCl及び250mMのイミダゾール-500mMのNaCl-20mMのTris, pH7.9で溶出させた。塩及びイミダゾールの試料からの除去は、10mMのTris及び0.9%のNaCl, pH7.9に対する一昼夜の4℃での透析によって行った。組換えポリペプチドの量をMicroBCA(マイクロBCA)〔Pierce(ピアス社), Rockford(ロックフォード), Illinois(イリノイ州)〕によって評価した。

【0127】

IPTG-誘導化BL21(DE3)/rpET21b(+)¹の可溶性の細胞質画分からの組換えポリペプチドSHB-MC101の精製は、グアニジン-HClを含まない緩衝液を用いて上述のように行った。

【0128】

例6

この例は、His-標識付けした(tagged)*M. catarrhalis*の組換えSHB-MC100ポリペプチドと、ヒト口蓋扁桃及び*M. catarrhalis*の抗原性調製物(antigenic preparation)で免疫化した後のマウスから収集した血清中に存在する抗体との反応性を例示する。

表3に示すように、SHB-MC100のHis-標識付け組換えポリペプチドは、正常ヒト口蓋扁桃中に存在する抗体によって免疫プロットにおいて認識された。これは、普通に*M. catarrhalis*に接触したヒトが、このポリペプチドに特異的な抗体を発生させることを示す。これらの特定のヒト抗体は、*M. catarrhalis*の感染に対する保護に参与している。加えて、免疫プロットは、また、マウスモデルにおいて有意な肺クリアランスを誘導する膜ポリペプチドの豊富な*M. catarrhalis*の抗原性調製物で免疫化されたマウスから収集した血清もまた、このポリペプチドを認識する抗体を発生させることを明らかにした。これらの結果は、このポリペプチドが、マウスを感染に対して保護し、及びそれが対応するSHB-MC100のHis-標識付け組換えポリペプチドと反応する抗体を誘導する*M. catarrhalis*の抗原性調製物中に存在することを示す。

【0129】

【表3】

ヒト口蓋扁桃及び*M. catarrhalis*のHis-標識付け融合組換えSHB-MC100ポリペプチドを有する*M. catarrhalis*の抗原性調製物で免疫化した後のマウスから収集した血清中に存在する抗体の免疫プロット中での反応性

精製組換えポリペプチド I.D. ¹	見かけ上の(Apparent)分子量(kDa) ²	免疫プロット中での反応性	
		ヒト口蓋扁桃 ³	マウス血清 ⁴
SHB-MC100	25	+	+

¹ 例5に記載したように生産し及び精製したHis-標識付け組換えポリペプチドを用いて免疫プロットを行った。

² His-標識付け組換えポリペプチドの分子量をSDS-PAGE後に評価した。

³ ヒト口蓋扁桃からの抽出物を希釈しないで免疫プロットを行った。

⁴ 膜ポリペプチドの豊富な*M. catarrhalis*の抗原性調製物での免疫化後に収集したマウス

血清をプールし及び1/500に希釈して免疫プロットングを行った。これらのマウスはM. catarrhalisの負荷(challenge)に対して保護された。

【0130】

例7

この例は、SHB-MC100及びSHB-MC101ポリペプチドの抗体のM. catarrhalis株の表面での到達性を例示する。

細菌を、1%のブドウ糖を含有する脳心臓滲出物(BHI)のプロス中で8%のCO₂雰囲気において37℃で増殖させ、0.650のOD_{490nm}を与えた(～10⁸CFU/mL)。次いで、抗-SHB-MC100又は抗-SHB-MC101又はコントロールの血清の希薄物を添加し、及び細胞に結合させ、それらを回転させながら2時間4℃でインキュベートした。試料を、阻止緩衝液(blocking buffer)[2%ウシ血清アルブミン(BSA)を含有するphosphate-buffered saline(リン酸緩衝食塩水)(PBS)]中で4回洗浄し、及び次に阻止緩衝液中で特異的な希釈された1mLのヤギのフルオレッセイン(FITC)-複合化(conjugated)抗-マウスIgG Fc(ガンマ)断片を添加した。暗所で回転させながらの室温で60分間の付加的なインキュベーションの後、試料を4回阻止緩衝液中で洗浄し、及びPBS緩衝液中の0.25%のホルムアルデヒドを用い18時間4℃で固定した。細胞を、フローサイトメトリ[Epics(R)(エピクス)XL; Beckman Coulter, Inc.(ベックマン・クーラー社)]によって分析するまで4℃の暗所で保った。フローサイトメトリの分析は、SHB-MC100-及びSHB-MC101-特異的抗体が、試験されたM. catarrhalisの異種株ETSU 658上のそれらの対応する表面露出されたエピトープを効率的に認識することを明らかにした(表4)。分析されたMoraxellaの10,000個の細胞の70%より多くが、SHB-MC100-及びSHB-MC101-特異的血清中に存在する抗体でラベルされることが決定された。これらの観察は、SHB-MC100及びSHB-MC101のポリペプチドがその表面で接近可能であり、そこで、それらが抗体によって容易に認識され得ることを明確に示す。抗-M. catarrhalis抗体は、M. catarrhalisの感染に対する保護において重要な役割を担うことが示された。

【0131】

【表4】

SHB-MC100-及びSHB-MC101-特異的抗体の M. catarrhalis 株 ETSU-658 の無傷細胞の表面での付着の評価

血清の同定	蛍光指標 ²	ラベル化細胞の% ³
SHB-MC100-特異的血清のプール ¹	10.0	85.9
SHB-MC101-特異的血清のプール	6.1	70.7
陰性コントロール血清のプール ⁴	1.0	1.0
陽性コントロール血清 ⁵	22.5	72.4

¹ マウスを、20µgの精製した組換えポリペプチドと10µgのQuilAアジェバント[Cedarlane Laboratories(シーダレーン・ラボラトリーズ社), Hornby(ホーンビー), Canada所在]とを混合したもので、2週の間隔で5回皮下注入した。血清を1/50に希釈した。

² 蛍光指標を、コントロールマウスの血清について得られた蛍光値によって分けられた免疫血清で細胞をラベルした後に得られた中央(median)蛍光値として計算した。1の蛍光値は、無傷のMoraxella細胞の表面で抗体の結合がなかったことを示した。

³ 分析された10,000個の細胞の中からのラベル化細胞の%である。

⁴ 未免疫の又は見せかけに免疫化した(sham-immunized)マウスから収集した血清を、プールし、1/50に希釈し、及びこのアッセイのための陰性コントロールとして用いた。

⁵ M. catarrhalis株ETSU-658からの精製した外膜ポリペプチドの20µgで免疫化したマウスから得た血清を、1/1000に希釈し、及び陽性コントロールとしてアッセイに用いた。

【 0 1 3 2 】

例 8

この例は抗 - 組換えポリペプチドマウス血清の殺菌活性を例示する。

細菌を、チョコレート寒天プレート上で平板培養し、及び37 °Cの8%CO₂雰囲気中で16時間インキュベートした。次いで、細菌細胞を、溶菌緩衝液[10%のHanks' Balanced Salt Solution(ハンクスの平衡塩類溶液、HBSS)及び1%の加水分解カゼイン、pH7.3]中で0.25のOD_{490nm}まで再懸濁させ、及び8 × 10⁴CFU/mLに希釈した。殺菌性のアッセイは、25 µLの細菌の懸濁液を50 µLの希釈し熱-不活化された試験血清及び15 µLのHBSSと混合すること、及び攪拌(200rpm)しながら15分間37 °Cの8%CO₂でのインキュベーションによって行った。次いで、ラビットの補体含有血清を10%の終濃度まで添加し、及び混合物を攪拌しながら(200rpm)、追加の60分間、37 °C、8%CO₂でインキュベートした。インキュベーション期間の終わりに、生細菌の数をチョコレート寒天プレート上で10 µLのアッセイの混合物を平板培養することによって決定した。プレートを37 °Cの8%CO₂雰囲気中18~24時間インキュベートした。コントロールは、免疫化前のマウスから収集した熱-不活化血清及びラビットの補体と共にインキュベートした細菌からなった。*M. catarrhalis*の株ETSU 658を、血清の殺菌活性を評価するのに用いた。殺菌性の力価は、コントロールと比較した50%又はそれより高い細菌の死滅をもたらす最も高い血清の希釈と定めた。

【 0 1 3 3 】

例 9

この例は、精製した組換えポリペプチドでの免疫化によって誘導される*M. catarrhalis*の感染に対するマウスの保護を例示する。

8匹のメスのBALB/cマウス(Charles River)の群を、10%のQuilAアジュバント(Cedarlane Laboratories Ltd, Hornby, Canada)の存在下に、組換えSHB-MC100又はSHB-MC101ポリペプチドのいずれかの20 µgでか、又は、コントロールとして、PBS中のQuilAアジュバント単独で、2週の間隔の5回、皮下により免疫化した。血液試料を、眼窩の洞から、各免疫化に先立って0、14、28、42、及び56日及び5回目の注射後の14日(70日)に収集した。1週間後、マウスを、およそ1 × 10⁶ CFUの*M. catarrhalis*の異種株ETSU 658で肺内に負荷した。*M. catarrhalis*の負荷接種材料(inoculum)をチョコレート寒天プレート上で平板培養し、CFUを決定し、及び負荷投与量を確認した。マウスを、感染後5時間でペントバルビタールナトリウム[Euthanyl™(コーサネイル)]の腹腔内注入によって殺した。無傷の肺を切除し、及び組織ホモジナイザ中で均質化した。肺のホモジネートを、CFU決定用の連続希釈物の平板培養によって、細菌クリアランスについて評定した。表5に示すように、負荷後(postchallenge)5時間で回収した細菌の数は、コントロール群と比較されたSHB-MC100又はSHB-MC101のポリペプチドのいずれかで免疫化された群について著しく減少した。したがって、組換えSHB-MC100及びSHB-MC101のポリペプチドでの免疫化は、マウスの肺からの*M. catarrhalis*の異種株の急速なクリアランスを促進した。

【 0 1 3 4 】

【表5】

精製した組換えSHB-MC100又はSHB-MC101ポリペプチドのいずれかで免疫化されたマウスによる *Moraxella catarrhalis* の肺のクリアランス

抗原	コントロール群からの細菌回収(肺ホモジネートのCFU/mL) ^a	免疫化群からの細菌回収(肺ホモジネートのCFU/mL) ^b	細菌クリアランス(%) ^c
SHB-MC100	2.4 × 10 ⁵ ± 1.5 × 10 ⁵	4.7 × 10 ⁴ ± 4.7 × 10 ⁴	80.4 ^d
SHB-MC101	2.4 × 10 ⁵ ± 1.5 × 10 ⁵	7.6 × 10 ⁴ ± 8.9 × 10 ⁴	68.3 ^e

10

20

30

40

50

^a 7匹のマウスについての平均 ± 標準偏差。

^b 8匹のマウスについての平均 ± 標準偏差。

^c マウスを、 1×10^6 CFUの細菌で肺内に負荷し、及び生細菌を負荷後5時間の肺から回収した。数値は、免疫化マウスから取り除かれた細菌をコントロールのものと比較した割合である。

^d $P=0.0030$ ；有意性は、マンホイットニーのノンパラメトリック分析を用いて決定した。

^e $P=0.0379$ ；有意性は、マンホイットニーのノンパラメトリック分析を用いて決定した。

【図面の簡単な説明】

【0135】

【図1】SHB-MC100遺伝子のDNA配列；配列番号1を表す。

【図2】SHB-MC100ポリペプチドのアミノ酸配列；配列番号2を表す。

【図3】SHB-MC101遺伝子のDNA配列；配列番号3を表す。

【図4】SHB-MC101ポリペプチドのアミノ酸配列；配列番号4を表す。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Shire Biochem Inc.

<120> POLYPEPTIDES OF MORAXELLA (BRANHAMELLA) CATARRHALIS

<130> 74872-87

<150> US 60/331,441

<151> 2001-11-16

<160> 12

<170> PatentIn version 3.0 10

<210> 1

<211> 549

<212> DNA

<213> Moraxella catarrhalis

<400> 1

gtgggtgctgg	gcttggcatt	gctgcttggt	cacccaatc	tccaacagtc	gcagaacatc	60
agccgcaaca	acaagaacct	ctacaataca	ccaacgctga	agcacaagca	cttcaagagc	120
aagccgccc	cttacaagcc	caagctgccg	agcttgaaat	gcaagctcaa	gaagcacaag	180
cagatgccag	ccatgaaacc	aaggcaactt	ctgccgatgg	tagcggtgtc	ggtagcctac	240
tggcaggtgc	tggcggcaggt	gctgcccag	gttatgttgc	aagcaaagtt	gctggtaatc	300
gtgctgctac	cgctcaagct	tcacaaaccg	cccaaacacc	aacaaccaca	caacaaccag	360
cacaaaataa	ccaacaagcc	accaacagca	atcgccaaag	cctcgctcaa	gccacccaag	420
acaaccgagc	tgccaccact	cgccaaggtt	ttggtgcgac	aggcggtgcg	acaggttcgg	480
cctcatgaag	cgtatcactg	ttgcaccacg	accagattgg	caaagcgaaa	tggaacgcat	540
tgctttaa						549

<210> 2

<211> 182

<212> PRT

<213> Moraxella catarrhalis

<400> 2

Val	Val	Leu	Gly	Leu	Ala	Leu	Leu	Leu	Val	His	Pro	Asn	Leu	Gln	Gln	
1			5						10					15		
Ser	Gln	Asn	Ile	Ser	Arg	Asn	Asn	Lys	Asn	Leu	Tyr	Asn	Thr	Pro	Thr	
		20						25					30			
Leu	Lys	His	Lys	His	Phe	Lys	Ser	Lys	Pro	Pro	Pro	Tyr	Lys	Pro	Lys	
		35					40					45				
Leu	Pro	Ser	Leu	Lys	Cys	Lys	Leu	Lys	Lys	His	Lys	Gln	Met	Pro	Ala	
	50					55					60					
Met	Lys	Pro	Arg	Gln	Leu	Leu	Pro	Met	Val	Ala	Val	Ser	Val	Ala	Tyr	
65				70						75					80	
Trp	Gln	Val	Leu	Arg	Gln	Val	Leu	Arg	Gln	Val	Met	Leu	Gln	Ala	Lys	
			85						90					95		
Leu	Leu	Val	Ile	Val	Leu	Leu	Pro	Leu	Lys	Leu	His	Lys	Pro	Pro	Lys	
		100						105					110			
His	Gln	Gln	Pro	His	Asn	Asn	Gln	His	Lys	Ile	Thr	Asn	Lys	Pro	Pro	
		115					120						125			

30

40

Thr Ala Ile Ala Lys Ala Ser Leu Lys Pro Pro Lys Thr Thr Glu Leu
 130 135 140

Ala Pro Leu Ala Lys Val Leu Val Arg Gln Ala Val Arg Gln Val Arg
 145 150 155 160

Pro His Glu Ala Tyr His Cys Cys Thr Thr Arg Leu Ala Lys Arg
 165 170 175

Asn Gly Thr His Trp Leu
 180

<210> 3
 <211> 798
 <212> DNA
 <213> Moraxella catarrhalis

10

<400> 3
 gtgaaattta aaacatttgg acctatggca gccattggtg gtacatttag tatctcagct 60
 tgtagcggtc aaaacgaaca aagcacaaaa gccagtggtg acaccttgcg tattgcgacc 120
 gaaggcaactt atgcaccatt taactacacc aatccagatg gcagtttggg cggctttgat 180
 gtggatatacg ccaatgcggtt atgcaacaaa atgcaaacgg aatgccaaat cattgcccaa 240
 gattgggacg gtattatacc agcattaaaa acaggttaagt ttgatgccat tgttgcagca 300
 atgtcagtc cccctgagcg tagtgagcag gtggatttta gcgagcctta ttttgtcaac 360
 tctttgggtat ttttggcaaa aaaaggttca aattttgatc cgagcagcac cgatgccatc 420
 aataatgccca aaattgttgc tcagcgttca accatctcaa gtcaatgggtt aaccctaaact 480
 tatccaaaca gcaagccaca gctgtacgat acgctggaca atgcttttat tgatttaggt 540
 aatgagcgtg ctgacgctat gatttctgac aaactgccag cattaacttg gcttagctcg 600
 gacttggggtc aaaattttga gatcaaaggt ggggacatta atatcaatga taaagctccc 660
 attgctgtcg ataaaggcaa taccgcacta ttacaataat tcaatgaggc tttggctgca 720
 atcaaggctg atggcaccta taaacaaatt gtcattaagc actttggtga agcaggtatg 780
 ccaactaata ttgaataa 798

20

<210> 4
 <211> 265
 <212> PRT
 <213> Moraxella catarrhalis

<400> 4
 Val Lys Phe Lys Thr Phe Gly Leu Met Ala Ala Ile Val Gly Thr Phe
 1 5 10 15

Ser Ile Ser Ala Cys Ser Gly Gln Asn Glu Gln Ser Thr Lys Ala Ser
 20 25 30

Gly Asp Thr Leu Arg Ile Ala Thr Glu Gly Thr Tyr Ala Pro Phe Asn
 35 40 45

Tyr Thr Asn Pro Asp Gly Ser Leu Gly Gly Phe Asp Val Asp Ile Ala
 50 55 60

Asn Ala Leu Cys Asn Lys Met Gln Thr Glu Cys Gln Ile Ile Ala Gln
 65 70 75 80

Asp Trp Asp Gly Ile Ile Pro Ala Leu Lys Thr Gly Lys Phe Asp Ala
 85 90 95

Ile Val Ala Ala Met Ser Val Thr Pro Glu Arg Ser Glu Gln Val Asp
 100 105 110

Phe Ser Glu Pro Tyr Phe Val Asn Ser Leu Val Phe Leu Ala Lys Lys
 115 120 125

30

40

Gly Ser Asn Phe Asp Pro Ser Ser Thr Asp Ala Ile Asn Asn Ala Lys
 130 135 140

Ile Val Ala Gln Arg Ser Thr Ile Ser Ser Gln Trp Leu Thr Gln Thr
 145 150 155 160

Tyr Pro Asn Ser Lys Pro Gln Leu Tyr Asp Thr Leu Asp Asn Ala Phe
 165 170 175

Ile Asp Leu Gly Asn Glu Arg Ala Asp Ala Met Ile Ser Asp Lys Leu
 180 185 190

Pro Ala Leu Thr Trp Leu Ser Ser Asp Leu Gly Gln Asn Phe Glu Ile
 195 200 205

Lys Gly Gly Asp Ile Asn Ile Asn Asp Lys Val Ser Ile Ala Val Asp
 210 215 220

Lys Gly Asn Thr Ala Leu Leu Gln Lys Phe Asn Glu Ala Leu Ala Ala
 225 230 235 240

Ile Lys Ala Asp Gly Thr Tyr Lys Gln Ile Val Ile Lys His Phe Gly
 245 250 255

Glu Ala Gly Met Pro Thr Asn Ile Glu
 260 265

10

<210> 5
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Artificial

20

<220>
 <223> Primer

<400> 5
 gggacttcca tatgcagtcg cagaacatca gccg

34

<210> 6
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Primer

30

<400> 6
 attatatagc ggccgcaagc caatgcgtgc catttc

36

<210> 7
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Primer

<400> 7
 ggcagatctt gcagtcgcag aacatcagcc g

31

40

<210> 8		
<211> 33		
<212> DNA		
<213> Artificial		
<220>		
<223> Primer		
<400> 8		
acgcgtcgac ttaaagccaa tgcgtgcat ttc	33	
<210> 9		
<211> 38		
<212> DNA		10
<213> Artificial		
<220>		
<223> Primer		
<400> 9		
catttagtat ccatatgtgt agcggcctaaa acgaacaa	38	
<210> 10		
<211> 39		
<212> DNA		
<213> Primer		
<400> 10		
caatcttatc tcgagttcaa tattagttgg catacctgc	39	20
<210> 11		
<211> 31		
<212> DNA		
<213> Artificial		
<220>		
<223> Primer		
<400> 11		
ctaggatcct tgtagcggtc aaaacgaaca a	31	
<210> 12		
<211> 36		
<212> DNA		30
<213> Artificial		
<220>		
<223> Primer		
<400> 12		
cagaagcttt tattcaatat tagttggcat acctgc	36	

【 図 1 】

Figure 1

```

1 GTGGTGCTGG GCTTGGCATT GCTGCTTGTT CACCCCAATC TCCAAACAGT GCAGAACATC
61 AGCCGCAACA ACAAGAACC CTACAAATCA CCACCGCTGA AGCACAAGCA CTTCAAGAGC
121 AAGCCGCCGC CTTACAAGCC CAAGCTGCCG AGCTTGAAT GCAAGCTCAA GAAGCACAGG
181 CAGATGCCAG CCATGAARCC AAGGCAACTT CTGCCGATGG TAGCGGTGTC GGTAGCCTAC
241 TGGCAGGTGC TCGGCGAGGT GCTGCGGACG GTTAGTGTTC AAGCRAAGTT GCTGCTAATC
301 GTGCTGCTAC CCGTCAAGCT TCAAAACCG CCCAACACC AACRAACCAA CAACACCCAG
361 CACAARNTAA CCACAAAGCC ACCAACAGCA ATCGCCAAAG CTTCCGCTCAA GCCACCCAG
421 ACAACCCGAGC TGGCACCACT CGCCAGGTT TTGCTGCGAC AGGCGGTGCG ACAGGTTCCG
481 CCTCATGAAG CGTATCACTG TTGCACCACG ACCAGATTGG CAAAGCGAAA TGGCACGCAAT
541 TGGCTTTAA (配列番号1)

```

【 図 2 】

Figure 2

```

1 VVLSLALLLV HPMIQGQSNY SRNNQNLNNT PTLKHHKFKS KPPPYKPKLP SLKCKLKKHK
61 QMPKPKRQL LEMVAVSVAY WQVLRQVLRQ VMLQAKLLVI VLLPLKLEKP PKHQPHNQ
121 HKITNKPPTA IAKASLKPFP TTELAPLAKV LVRQAVRQVR PHEAYHCTT TRLAKRNGTH
181 WL* (配列番号2)

```

【 図 3 】

Figure 3

```

1 GTGAAATTTA AAACATTGG ACTTATGGCA GCCATTGTTG GTACATTTAG TATCTCAGCT
61 TGTAGCGGTC AAACGAACA AAGCACAAA GCCAGTGGTG ACACCTTGGC TATTGCGACC
121 GAAGGCACTT ATGCACCATT TAACTACACC AATCCAGATG GCAGTTTGGG CGGCTTTGAT
181 GTGGATATCG CCAATGCGTT ATGCAACAAA ATGCAAAACG AATGCCAAT CATTGCCCAG
241 GATTGGAGCG GTATTATACC AGCATTAAAA ACAGSTAAGT TTGATGCAAT TGTTCGAGCA
301 ATGTCAGTCA CCGTGAAGC TGTGAGCAG GTGGATTTTA GCGAGCCTTA TTTTGTCAAC
361 TCTTTGTGAT TTTTGGCAA AAAGGTTC AATTTGATC CGAGCAGCAC CGATGCCATC
421 AATATGCGCA AAATTGTTGC TCAAGGTTC ACCATCTCAA ATCAATGTT AACCCAACT
481 TATCCAAACA GCAAGCCACA GCTGTACGAT ACGTGGACA ATGCTTTTAT TGATTTAGGT
541 AATGAGCGTG CTGACGCTAT GATTTCTGAC AAACGCGAG CATTAACTTG GCTTAGCTCG
601 GACTTGGGTC AAAATTTTGA GATCAAAGT GGGACATTA ATATCAATGA TAAAGTCTCC
661 ATGCTCTGCG AATAAGCAA TACCCACTA TTAACAAAT TCAATGAGCG TTTGCTTCCA
721 ATCAAGGCTG ATGGCACCTA TAAACAAAT GTCATTAAAG ACTTTGTTGA AGCAGGTATG
781 CCAACTAATA TTGAATA (配列番号3)

```

【 図 4 】

Figure 4

```

1 VKFKTFGLMA AIVGTFSSIA CSGQNEQSTK ASGDTLRIAT BGYAPFNNT NPDGSLGGFD
61 VDIANALCNK MQTECQIIAQ DWGIIIPALK TGRFDALVAA MSVTPERSBQ VDFSEPFYFN
121 SLVFLAKKGS NFDPSSTDAI NNKIVAGRS TISSQWLTQT YPNSKQIYD TLDKAFIDIG
181 NERADAMISD KLPALTWLSS DLGQNFBIKG GDININDKVS IAVDKGNTAL LQKFNEALAA
241 IKADGTYKQI VIKHFGEAGM PTNIE* (配列番号4)

```

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
C 1 2 N	1/15 (2006.01)	C 1 2 N	1/15
C 1 2 N	1/19 (2006.01)	C 1 2 N	1/19
C 1 2 N	1/21 (2006.01)	C 1 2 N	1/21
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/00 A
C 1 2 P	21/02 (2006.01)	C 1 2 P	21/02 C
A 6 1 K	38/00 (2006.01)	A 6 1 K	37/02
A 6 1 P	11/02 (2006.01)	A 6 1 P	11/02
A 6 1 P	11/04 (2006.01)	A 6 1 P	11/04
A 6 1 P	11/14 (2006.01)	A 6 1 P	11/14
A 6 1 P	27/16 (2006.01)	A 6 1 P	27/16
G 0 1 N	33/569 (2006.01)	G 0 1 N	33/569 F
G 0 1 N	33/53 (2006.01)	G 0 1 N	33/53 N

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

審査官 戸来 幸男

- (56)参考文献 国際公開第00/078968(WO, A1)
Microbes Infect., 2000年, vol.2, no.5, p.561-568
Vaccine, 2000年, vol.19, p.S101-107

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C12N 15/00-15/90
C07K 14/00-14/825
UniProt/GeneSeq
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
MEDLINE/CAplus/BIOSIS/WPIDS(STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)
PubMed

专利名称(译)	卡他氏病的莫拉氏菌 (Blanhamera) 多肽		
公开(公告)号	JP4413616B2	公开(公告)日	2010-02-10
申请号	JP2003545623	申请日	2002-11-15
[标]申请(专利权)人(译)	希雷生物化学有限公司		
申请(专利权)人(译)	希雷生物化学公司		
当前申请(专利权)人(译)	艾迪生物医药公司		
[标]发明人	デニスマーティン ジョセアメル バーナードアールプロデュール ステファンリウクス ジュリークチュール		
发明人	デニス マーティン ジョセ アメル バーナード アール プロデュール ステファン リウクス ジュリー クチュール		
IPC分类号	C12N15/09 C07K14/195 C07K9/00 C07K19/00 C07K16/12 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12P21/02 A61K38/00 A61P11/02 A61P11/04 A61P11/14 A61P27/16 G01N33/569 G01N33/53 A61K39/00 A61K39/02 C07H21/04 C07K14/21 C12N15/31 C12N15/74		
CPC分类号	A61K38/00 A61K39/1045 A61P11/02 A61P11/04 A61P11/10 A61P11/14 A61P27/16 C07K14/212 C07K16/12 C07K16/1214 C07K23/19/00 C07K23/19/21 C07K9/00 C07K19/00 C12N5/10 G01N33 /56911 G01N33/53 G01N33/569		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K14/195 C07K9/00 C07K19/00 C07K16/12 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.A C12P21/02.C A61K37/02 A61P11/02 A61P11/04 A61P11/14 A61P27/16 G01N33/569.F G01N33/53.N		
优先权	60/331441 2001-11-16 US		
其他公开文献	JP2005514011A JP2005514011A5 JP2005514011A6		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及一种多肽，更具体地讲，预防莫拉（布兰汉）卡他莫拉菌[莫拉（布兰汉）catarrharis]，诊断的感染的和/或可用于治疗莫拉氏菌（布兰汉）卡他莫拉菌的多肽。

M. catarrhalis の遺伝子の PCR 増幅に用いたオリゴヌクレオチドプライマ

遺伝子	プライマ I.D.	制限酵素認 識部位	ベクター	配列	配列 番号
SHB-MC100	DMAR529	NdeI	pET21b(+)	5'-GGGACTTCCATATGCAGT CGCAGAACATCAGCCG-3'	5
SHB-MC100	DMAR530	NotI	pET21b(+)	5'-ATTATATAGCGGCCGCAA GCCAATGCGTGCCATTTC-3'	6
SHB-MC100	RIOS189	BglII	pCMV-GH	5'-GGCAGATCTTGCAGTCG CAGAACATCAGCCG-3'	7
SHB-MC100	RIOS200	SalI	pCMV-GH	5'-ACGCGTCGACTTAAAGC CAATGCGTGCCATTTC-3'	8
SHB-MC101	DMAR614	NdeI	pET21b(+)	5'-CATTTAGTATCCATATG TGTAGCGGTCAAAACGAAC AA-3'	9
SHB-MC101	DMAR615	XhoI	pET21b(+)	5'-CAATCTTATCTCGAGTT CAATATTAGTTGGCATACT GC-3'	10
SHB-MC101	RIOS187	BamHI	pCMV-GH	5'-CTAGGATCCTTGTAGC GGTCAAAACGAACAA-3'	11
SHB-MC101	RIOS188	HindIII	pCMV-GH	5'-CAGAAGCTTTTATTCAA TATTAGTTGGCATACTGC- 3'	12