

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-531229
(P2004-531229A)

(43) 公表日 平成16年10月14日(2004.10.14)

(51) Int.Cl. ⁷	F 1	テーマコード (参考)
C12N 15/09	C 12 N 15/00	4 B 018
A23L 1/30	A 23 L 1/30	4 B 024
A61K 31/7052	A 61 K 31/7052	4 B 064
A61K 35/64	A 61 K 35/64	4 B 065
A61K 35/72	A 61 K 35/72	4 C 084
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 27 頁) 最終頁に続く
(21) 出願番号	特願2002-561500 (P2002-561500)	(71) 出願人 590002013 ソシエテ デ プロデュイ ネツスル ソ シエテ アノニム スイス国ブベイ, ピー オー ボツクス 353
(86) (22) 出願日	平成14年1月30日 (2002.1.30)	(74) 代理人 100066692 弁理士 浅村 皓
(85) 翻訳文提出日	平成15年7月29日 (2003.7.29)	(74) 代理人 100072040 弁理士 浅村 韶
(86) 國際出願番号	PCT/EP2002/000956	(74) 代理人 100102897 弁理士 池田 幸弘
(87) 國際公開番号	W02002/060932	(74) 代理人 100088926 弁理士 長沼 晉夫
(87) 國際公開日	平成14年8月8日 (2002.8.8)	
(31) 優先権主張番号	01102050.0	
(32) 優先日	平成13年1月30日 (2001.1.30)	
(33) 優先権主張国	歐州特許庁 (EP)	

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ビフィズス菌中のセルピン

(57) 【要約】

本発明は、ビフィズス菌の新規な遺伝子、及びそれによってコードされるポリペプチドに関する。特に、本発明は、セルピンスーパーファミリーに属する遺伝子、及び細菌由来のセルピンの产生にそれを使用することに関する。細菌由来のセルピンのポリヌクレオチド及び/又はポリペプチドを产生するためのベクター、宿主細胞、及び方法も提供する。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

配列番号 1 で示される核酸、又は機能性ポリペプチドをコードするその一部、又はその変異体であって、配列番号 1 に対し約 75%、好ましくは 80%、より好ましくは 85%、さらに好ましくは 90%、さらにより好ましくは 95% の相同性を有する上記変異体。

【請求項 2】

配列番号 2 で示されるポリペプチド、又は前記配列番号 2 に対し約 75%、好ましくは 80%、より好ましくは 85%、さらに好ましくは 90%、さらにより好ましくは 95% の相同性を有する、その機能的な部分若しくは変異体。

【請求項 3】

請求項 1 に記載の核酸を含有するベクター。

【請求項 4】

請求項 1 に記載の核酸の 1 個若しくは複数のコピー、又は請求項 3 に記載のベクターを含有する宿主細胞。

【請求項 5】

請求項 2 に記載のポリペプチドが発現される、請求項 4 に記載の宿主細胞。

【請求項 6】

セリンプロテアーゼ活性が関連する生物学的プロセスに影響を及ぼす分子を同定し、その特性を明らかにし、及び / 又はそれを精製するための、請求項 1 又は請求項 2 のいずれかに記載の核酸又はポリペプチドの使用。

【請求項 7】

セリンプロテアーゼ活性が関与する疾患状態の治療及び診断用の分子を開発するための、請求項 1 又は請求項 2 のいずれかに記載の核酸又はポリペプチドの使用。

【請求項 8】

セリンプロテアーゼ活性が関与する疾患状態の治療及び / 又は予防用の担体を調製するための、請求項 1 に記載の核酸又は請求項 2 に記載のポリペプチドの使用。

【請求項 9】

担体が医薬品、食品、又は栄養補助食品である、請求項 8 に記載の使用。

【請求項 10】

生物学的プロセス又は疾患状態が、血液凝固、線維素溶解、免疫反応、補体の活性化、炎症反応、細胞外マトリックスの代謝回転、細胞移動、プロホルモンの活性化、癌の転移からなる群から選択される、請求項 6 から請求項 9 までのいずれかに記載の使用。

【請求項 11】

請求項 1 に記載の核酸又は請求項 3 に記載のベクターを適切な宿主中で発現させ、得られるポリペプチドを精製することを含む、請求項 2 に記載のポリペプチドの製造方法。

【請求項 12】

請求項 1 に記載の核酸又は請求項 2 に記載のポリペプチドに対する抗体で、微生物を、前記核酸又は前記ポリペプチドの存在についてスクリーニングすること、及び微生物中のセルピンの存在を決定することを含む、プロバイオティックス菌株の検出方法。

【請求項 13】

請求項 1 に記載の核酸によってコードされるセルピンを発現又は過剰発現する微生物の产生方法であって、請求項 1 に記載の核酸で微生物を形質転換すること、及びセルピンポリペプチドをコードする遺伝子を発現させることを含む上記方法。

【請求項 14】

請求項 1 に記載の核酸、請求項 2 に記載のポリペプチド、請求項 3 に記載のベクター、又は請求項 4 若しくは請求項 5 のいずれかに記載の宿主細胞を含有する食品もしくは医薬品。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明は、ビフィズス菌の新規な遺伝子、及びそれによってコードされるポリペプチドに関する。特に、本発明は、セルピンスープーファミリーに属する遺伝子、及び細菌由来のセルピンの产生におけるその使用に関する。細菌由来のセルピンのポリヌクレオチド及び/又はポリペプチドを产生するためのベクター、宿主細胞、及び方法も提供する。

【背景技術】

【0002】

乳酸菌は、その低いpH及び発酵中に生成する産物の作用のために、食材の保存及び調製に長年利用されてきた。また、乳酸菌は、チーズやヨーグルトなどのさまざまな食品の製造にも関わっている。

【0003】

ごく最近、乳酸菌、特に乳酸桿菌及びビフィズス菌は、摂取によりヒトや動物に有益な特性を示す菌株が発見されたことで非常に注目されている。これらの菌株は、一般にプロバイオティックスと呼ばれ、胃管内に広がる厳しい環境条件を生き延びて腸粘膜に少なくとも一時的にコロニーを形成することができ、その菌株を取り込んだ生物に対してプラスの効果をそこでもたらすことが見出された。

【0004】

欧州特許第0 768 375号は、腸内細菌叢中に植え付けることができるこのようなビフィズス菌属のプロバイオティックス菌株を開示している。このビフィズス菌は、宿主の免疫調節を助け、病原菌が腸の細胞に付着するのを拮抗的に排除し、それによって個体の健康維持を助けることが報告されている。

【0005】

また、欧州特許第0 577 903号は、潰瘍の発生原因として知られるヘリオバクターピロリと入れ替わる能力を有する乳酸菌の使用について言及している。

【0006】

また、国際公開第97/00078号は、乳酸桿菌GG (ATCC 53103)と命名された特定の乳酸桿菌菌株をこうしたプロバイオティックスとして開示している。この微生物を、超過敏反応を引き起こす食品の予防や処置に使用することもある。

【0007】

これらのプロバイオティックス菌株が提供し得る有益な特性に関し、これらの菌株の生態、特に宿主との相互作用、腸内のさまざまな環境状態を生き延びる現象、並びに腸粘膜に付着する能力について、より詳細な情報を得ることが求められている。特に、免疫系及び病原体に対する防御の強化にプロバイオティックス菌株が関わっていることはたいへん興味深い。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

したがって、本発明の課題は、ヒト及び/又は動物に有益な諸特性を示す菌株に関するデータを提供し、場合によっては解明することである。

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明者らは、プロバイオティックスのビフィズス菌菌株BL29のゲノムを調べるうち、驚くべきことに、セルピンスープーファミリー(セリンプロテアーゼ阻害剤)に属する遺伝子と中程度の相同意を示す遺伝子を発見した。このような遺伝子タイプの遺伝子は、これまでヒトや植物などの高等生物の細胞中にのみ見られ、細菌細胞には見出されていなかった。

【0010】

その結果、本発明は、配列番号1で示される核酸、又は機能性ポリペプチドをコードするその一部、又はその変異体であって、配列番号1に対し約75%、好ましくは80%、より好ましくは85%、さらに好ましくは90%、さらにより好ましくは95%の相同意を有する上記変異体を提供する。

10

20

20

30

40

50

【0011】

本発明は、別の実施形態によれば、配列番号2で示されるポリペプチド、又はその機能的な部分、又は前記配列番号2に対し約75%、好ましくは80%、より好ましくは85%、さらに好ましくは90%、さらにより好ましくは95%の相同性を有する変異体にも関する。

【発明を実施するための形態】

【0012】

セリンプロテアーゼ阻害剤（セルピン）は、100を超えるメンバーを含むスーパーファミリーを形成する多様なタンパク質群で構成されている。大部分のセルピンは、プロテアーゼ阻害剤として作用し、血液凝固、補体により媒介される溶解、免疫応答、糸球体腎炎、痛覚（pain sensing）、炎症、すい炎、癌、受精調節（regulating fertilization）、細菌感染、ウイルス成熟など個体にとって重要であり、プロテアーゼで活性化される幾つかの生理プロセスの制御に関わっている。セルピンの主要機能はセリンプロテアーゼ活性を中和することと思われるが、これらのポリペプチドが細胞外マトリックスの再構築及び細胞移動にある役割を果たしていることも判明した。

【0013】

セルピンの例は、1-アンチトリプシン、アンチトロンビンIII、プラスミノーゲンアクチベーターインヒビター1（PAI-1）、又はプラスミノーゲンアクチベーターインヒビター2である。

【0014】

これまでに知られているセルピンは徹底した研究の対象となり、これらはすべて共通した特徴的なループを持つと考えられている。それは反応部位ループ（reactive site loop）（RSL）と命名され、同族のセリンプロテアーゼの活性部位に対する認識配列を含む分子の表面から伸びている。各阻害剤の特異性は、セリンプロテアーゼによる阻害剤の潜在的開裂部位に近接するアミノ末端であるアミノ酸の性質によって主に決まると考えられる。このアミノ酸は、Pi部位（Pi site）残基として知られ、セリンプロテアーゼの活性部位中のセリンとアシル結合を形成すると考えられる。

【0015】

セルピンは、標的のプロテアーゼと1:1の化学量論的な複合体を形成する「自殺阻害因子」として作用してプロテアーゼの活性をブロックすると考えられる。最近のデータから、この阻害剤は反応中心で開裂し、アシル-酵素の共有結合複合体としてこの複合体が捕捉される可能性が最も高いことが示された。

【0016】

セルピンは、免疫系や炎症反応を調節し、さらに高等生物の細胞外マトリックスを再構築するなどの精巧な生物学的プロセスに関与しているので、原核生物中にセルピンが存在するとは考えられていなかった。実際、原核細胞から誘導されるセルピンはこれまで報告されていなかった。

【0017】

したがって、本発明者らは、セルピンを含む細菌細胞もあることを初めて発見した。いかなる理論にも拘束されるものではないが、プロバイオティックスの特性、たとえば免疫系の調節、セルピンが由来するビフィズス菌菌株の公知の性質などは、少なくともその一部がこのセルピンの存在に起因していると現時点では考えられる。

【0018】

本明細書では、本発明による核酸は、配列番号1で示されるポリヌクレオチド又は機能性ポリペプチドを生成するその一部又はその変異体を指すものとする。このため、配列番号1で示す核酸は、得られるポリペプチドが生物学的機能を依然として示す限りその末端を切断することができる。また、得られるポリペプチドが依然としてその生物学的機能を発揮できる限り、1個又は複数のヌクレオチドを欠失、付加、又は置換して核酸を修飾することもできる。

【0019】

同様に、本明細書に記載するポリペプチドでも同じことが言える。本発明によるポリペプチドという用語は、配列番号2で示されるポリペプチド、又は機能的なその一部若しくはその変異体を指すものとする。したがって、配列番号2のポリペプチドは、ポリペプチドが生物学的機能を依然として示す限りその末端を切断することができる。また、得られるポリペプチドが依然としてその生物学的機能を発揮できる限り、1個又は複数のアミノ酸を欠失、付加、又は置換してポリペプチドを修飾することもできる。

【0020】

一実施形態によれば、上述の核酸を適切な宿主細胞内に挿入し、そこで発現させることができる。この目的のために、本発明による核酸を適切なベクターに挿入することができ、それによって所望の宿主細胞内で増殖させ、かつ/又は発現させることができ可能になり、そこに挿入することができる。このベクターは安定な増殖を可能にするマーカー遺伝子を含んでいる。

【0021】

また、相同組換え現象、又は宿主の染色体のみに核酸を挿入することが可能な他の技術を使用して、本発明による核酸を宿主のゲノム中に入れることもできる。このような技術は、たとえば欧州特許第93 105 303.7号に記載されており、その内容を参照により本明細書に援用する。

【0022】

本発明による核酸は、遺伝子産物を過剰発現させるべきか、すなわちポリペプチドを収集し精製するために過剰発現させるべきか、あるいは微生物などの担体システムによって個体に送達される程度に発現させるべきかに応じて、内在性もしくは外来のレギュロン、たとえばプロモーターの制御下に置くことができる。好ましくは調節可能でかつ/又は誘導性であり、そのために十分に認知され、容易に実施できる任意の方法によって、レギュロン、たとえばプロモーターをコード分子に作用可能に連結する。

【0023】

次いで、たとえば原核宿主細胞として大腸菌、乳酸桿菌、連鎖球菌、ビフィズス菌、あるいは真核宿主細胞として酵母、昆虫の細胞、CHO、COS細胞などの適切な宿主細胞に、これらの組換え構築体を導入して発現させ、この形質転換もしくは形質導入した宿主細胞を異種遺伝子の発現を可能にする条件下で培養する。本発明によるポリヌクレオチドの遺伝子産物は、真核生物の発現システム中で発現するとグリコシリ化されやすいことは理解されよう。

【0024】

本発明は、別の態様によれば、本発明による核酸の少なくとも1個のコピーを含む組換え微生物も含む。この核酸を、標的物質を個体に送達するために使用する微生物に入れることができる。この点で、プロバイオティックスの細菌は、個体の胃管を通り、宿主の粘膜中に少なくとも一時的に植え付けられるので適している。この場所で、この細菌はそれが由来する本発明のプロバイオティックス菌株BL29に見られるその生物学的機能を発揮する。いかなる理論にも拘束されるものではないが、本発明の核酸の遺伝子産物は、ビフィズス菌株BL29が示す抗炎症作用に関わっていると現時点では考えられる。同様に、本発明の核酸をすでに含んでいる菌株を宿主細胞として使用することもでき、その中に目的とする核酸の追加のコピーを含ませることができる。

【0025】

この宿主細胞は、本発明による核酸の遺伝子産物を発現する。したがって、本発明によるポリペプチドを大規模に合成するのにこの宿主細胞を利用することができる。

【0026】

本発明による「宿主細胞」は、本発明による核酸を適切な細胞に挿入する組換え手段によって得ることができる。しかし、このような種類のポリペプチドを含有するビフィズス菌中のビフィド-セルピン量を増加させるため、ビフィズス菌自体に、対応する遺伝子産物を多量に含む菌株が得られるように一般的な選択の変異技術を施すことができる。

10

20

30

40

50

【0027】

タンパク質は、宿主細胞又は宿主細胞の培養上清から公知の方法によって単離することができる。このような方法は、たとえば、Ausubel I.、Frederick M.、「分子生物学における最新手順 (Current Protocols in Mol. Biol.)」、(1992)、John Wiley and Sons、New Yorkに記載されている。ポリペプチドは、組換え体の產生後、免疫沈降、ゲルろ過、イオン交換クロマトグラフィー、クロマトフォーカシング、等電点電気泳動、選択的沈殿、電気泳動などを含めた公知のタンパク質精製技術を用いたアフィニティーコロマトグラフィーによって精製することができる。

【0028】

さらに、本発明は、たとえば細胞溶解物又はRNA試料の逆転写物などの試料を本発明による核酸分子と共にインキュベートし、厳密な条件下で前記核酸分子と標的核酸分子とのハイブリダイゼーションを測定して核酸分子の存在を決定する、あるいは抗体、好ましくは本発明によるポリペプチドに対して產生されるモノクローナル抗体を使用することを含む、本発明による核酸又はポリペプチドを検出する方法も含む。また、この遺伝子を、PCR法、好ましくは、たとえばRoche Diagnostics GmbH、DEのLightCycler(商標)を用いた定量RT-PCRを使用して定量的に検出することができる。

【0029】

セルピン遺伝子は菌株のプロバイオティックス作用と関係していると考えられるので、さらに本発明の核酸及び/又はポリヌクレオチドを、プロバイオティックス作用を示す別の菌株を探索するのに利用することができる。

【0030】

得られた菌株が適切かどうかを決定するために、前記核酸とこの菌株の1個又は複数の標的核酸とのハイブリダイゼーションの概算量を測定した。このハイブリダイゼーションの概算量は、たとえばハイブリダイゼーションを検出する目視検査によって容易に定性的に測定することができる。たとえば、試料中の標的核酸とハイブリッド形成している標識核酸をゲルを使用して分離する場合、得られるバンドを目視で検査することができる。また、抗体を使用する場合、FACSを利用して定量的に測定することができる。

【0031】

本発明による核酸又はポリペプチドは、セリンプロテアーゼ活性が関連する生物学的プロセスに影響を及ぼす分子を同定し、その特性を明らかにし、かつ/又はそれを精製するために利用することができる。セリンプロテアーゼが関与する生物学的プロセスの例は、血液凝固、線維素溶解、免疫反応、補体の活性化、炎症反応、細胞外マトリックスの代謝回転、細胞移動、プロホルモンの活性化、癌の転移である。

【0032】

また、本発明による核酸又はポリペプチドを、セリンプロテアーゼ活性が関わる疾患状態の治療及び/又は診断に究極的に適した分子を開発するために使用することもできる。本発明のセルピンと標的プロテアーゼとの相互作用を理解すれば、このプロテアーゼの作用薬又は拮抗薬、またセルピンの作用薬又は拮抗薬を考案することができる。上述のように、本発明が対象とする疾患状態の非限定的な例は、不適切な血液凝固、不適切な線維素溶解、免疫反応、補体の活性化、炎症反応、細胞外マトリックスの代謝回転、細胞移動、プロホルモンの活性化、癌の転移である。

【0033】

さまざまなモデルシステムを使用し、構造を研究することによって、本発明のセルピン及びこれが結合するプロテアーゼの機能を制御するのに有用な特定の作用薬及び拮抗薬を開発することが可能になる。これには、本発明のセルピンと相互作用可能なペプチド、変異リガンド、抗体、又は他の分子などが考えられる。

【0034】

本発明による核酸は、一般に、本発明による核酸又はこのような核酸を含むベクターを適

10

20

30

40

50

切な宿主中でポリペプチドの発現に適した条件下で発現させること、及びそのポリペプチドを収集し精製することによって、大量生産用のポリペプチドの合成に利用することができる。

【0035】

以下の実施例は、本発明を説明するものであり、限定するものではない。

【実施例】

【0036】

例1

セルピン遺伝子の単離

蛍光自動シーケンサーで挿入クローンの配列を決定した後に定方向の配列を決定する方法によってビフィズス菌ロングム菌株B L 2 9のゲノム配列を決定し、これらのヌクレオチド（挿入）断片の配列をソフトウェアプログラムで繋ぎ合わせている途上で、オープンリーディングフレームを発見した。これを確認するため、このゲノムの断片を作製し、適切なベクターに連結して増幅し増殖させて、対応する断片の配列を決定した。断片の重複部分及び最終配列、そのヌクレオチド配列を、適切なソフトウェアを利用して評価した。

【0037】

タンパク質及び／又は核酸の配列の相同性を以下のアルゴリズムを用いて評価した。

(1) B L A S T P : アミノ酸の問い合わせ配列をタンパク質のアミノ酸配列データベースと照合する。

(2) B L A S T N : ヌクレオチドの問い合わせ配列をヌクレオチド配列データベースと照合する。

(3) B L A S T X : 全読み枠中の翻訳されるヌクレオチドの問い合わせ配列をタンパク質のアミノ酸配列データベースと照合する。

(4) T B L A S T N : タンパク質のアミノ酸の問い合わせ配列を、読み枠すべてについて動的に翻訳されたヌクレオチド配列データベースと照合する。

【0038】

公知のネズミ由来セルピン - 2 - 抗プラスミンに対する全体の相同性はあまり高くなく約43%であった。それでも本発明によるポリペプチドは、その反応部位ループ(R S L)と約63%の相同性を示した。

【0039】

例2

ビフィズス菌由来のセルピン遺伝子のクローニング及びそのポリペプチドの単離

シグナルペプチドを除去したビフィズス菌由来セルピンと考えられる物質をコードする核酸を、大腸菌発現ベクターp D E S T 17 (Invitrogen Life Technologies)中にクローニングし、対応するタンパク質を、6-Hisで標識した融合タンパク質として大腸菌中で常法により産生させた(Janknecht R等(1991): Proc. Natl. Acad. Sci. USA: 88(20)8972~8976頁)。

【0040】

この6-His標識タンパク質を、Quiaagen社のQ I A - E x p r e s s i o n i s t H a n d b o o kに記載された指示に従って、金属アフィニティクロマトグラフィーによりニッケル-ニトリロ三酢酸マトリックス(Quiaagen社のNi-NTA)上で精製して均質にし、機能研究用の製造、並びにウサギでのポリクローナル抗体の製造に使用した。

【0041】

例3

B L 2 9 中で発現するセルピン様タンパク質の抗炎症活性能

セルピンとしての活性を測定するために、例2で単離したポリペプチドをインビトロでの溶血性のアッセイに使用した。

【0042】

10

20

30

40

50

この目的のため、96ウェルのマイクロタイタープレート中で、ヒトA B血清 (5igm a) の順次2倍希釈液 50 μl を、ヒツジ抗体で活性化した 1.7% ヒツジ赤血球懸濁液 50 μl と混合した。組換えセルピンの抗溶血活性を評価するため、組換えタンパク質 1 μg を各ウェルに添加し、その混合物を 37 ℃ で 1 時間インキュベートした。次いで、このプレートを遠心して無傷の細胞及び細胞片を沈殿物とし、その上清を新しいプレートに移した。ヘモグロビンの放出を 450 nm の吸収として測定することによって溶血活性を推定した。

【0043】

ビフィズス菌のセルピン活性を、ヒト由来のセルピンである 1-アンチトリプシン (5 μg / ウェル) と比較した。蒸留水を正の対照として使用して 100% 赤血球溶解物を得、ヒトの (非働化を完全にするために溶解しない) 非働化 A B 血清を負の対照として使用した。

【0044】

その結果、ビフィズス菌由来の組換えセルピンは、公知のセリンプロテアーゼ阻害剤であるヒト 1-アンチトリプシンとほぼ同程度にヒト赤血球の溶解を阻害することが明らかとなった。

【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
8 August 2002 (08.08.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/060932 A2(51) International Patent Classification⁵: C07K 14/195 (74) Agent: STRAUS, Alexander; Becker, Kurig, Straus, Bavariastr. 7, 80336 Munich (DE).

(21) International Application Number: PCT/EP02/00956

(22) International Filing Date: 30 January 2002 (30.01.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
01102050.0 30 January 2001 (30.01.2001) EP

(71) Applicant (for all designated States except US): SOCIETE DES PRODUITS NESTLE S.A. [C11/C11]; P.O. Box 353, CH-1800 Vevey (CH).

(72) Inventors: and

(75) Inventors/Applicants (for US only): ARIGONI, Fabrizio [CH/CH]; 2, rue Maurice, CH-1204 Geneva (CH); BLUM, Stéphanie [DE/CH]; Av. des Mousquines 13, CH-1005 Lausanne (CH); DELLEY, Michele [CH/CH]; Av. des Boveresses 6, CH-1010 Lausanne (CH); SCHELL, Mark, Alan [US/US]; 320 Idylwood Drive, Athens, GA 30605 (US); SCHIFFERIN, Eduardo [AR/CH]; Chemin de Riant-Mont 17, CH-1023 Crissier (CH).

(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AI, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CI, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI, GM, IIR, IU, ID, IL, IN, IS, JP, KH, KG, KP, KR, KZ, LG, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PI, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KU, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TI, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BP, BJ, CI, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NI, SN, TD, TG).

Published:
— without international search report and to be republished upon receipt of that report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/060932 A2

(54) Title: A SERPIN IN BIFIDOBACTERIA

(57) Abstract: The present invention pertains to a novel gene of Bifidobacteria and to the polypeptides encoded thereby. In particular, the present invention pertains to a gene belonging to the Serpin superfamily and its use in the production of bacterial Serpins. Also provides are vectors host cells, and methods for producing bacterial Serpin nucleotides and/or polypeptides.

A Serpin in Bifidobacteria

- 5 The present invention pertains to a novel gene of Bifidobacteria and to the polypeptides encoded thereby. In particular, the present invention pertains to a gene belonging to the Serpin superfamily and its use in the production of bacterial Serpins. Also provided are vectors, host cells, and methods for producing bacterial Serpin polynucleotides and/or polypeptides.
- 10 Lactic acid bacteria have been utilized for the preservation and preparation of food material for long time taking benefit of the low pH and the action of products generated during the fermentative activity thereof. In addition, Lactic acid bacteria are involved in the production of a variety of different food products, such as cheese or yogurt.
- 15 Quite recently lactic acid bacteria, in particular Lactobacilli and Bifidobacteria, have attracted a great deal of attention in that some strains have been found to exhibit valuable properties to man and animals upon ingestion. These strains, which are generically designated probiotics, have been found to be capable to survive the severe environmental conditions prevailing in the gastric tract and be able to at least transiently colonize the 20 intestinal mucosa, where they bring about positive effects for the living beings having incorporated them.

In EP 0 768 375 such a probiotic strain of the genus *Bifidobacterium* is disclosed, which is capable to become implanted in the intestinal flora. This *Bifidobacterium* is reported to assist 25 in the immuno-modulation of the host, being able to competitively exclude adhesion of pathogenic bacteria to intestinal cells, thus supporting the maintenance of the individual's health.

Further, in EP 0 577 903 reference is made to the use of a lactic acid bacteria having the

ability of replacing *Helicobacter pylori*, the acknowledged cause for the development of ulcer.

Also, in WO 97/00078 a specific lactobacillus strain, termed *Lactobacillus GG* (ATCC 53103), is disclosed as such a probiotic. The microorganism may be employed for preventing or treating food induced hypersensitivity reactions.

In view of the valuable properties these probiotic strains may provide, there is a desire for obtaining more detailed information about the biology of these strains, especially about the interaction with the hosts, the phenomena of surviving different environmental conditions in the gut as well as about the capability to adhere to the intestine's mucosa. In particular the involvement thereof in the enhancement of the immune system and defense against pathogens is of high interest.

Consequently, a problem of the present invention is to provide data about bacterial strains that exhibit properties beneficial for man and/or animals and occasionally elucidate.

In the line of investigating the genome of the probiotic *Bifidobacterium* strain BL29 the present inventors have surprisingly found a gene that shows a moderate homology to genes belonging to the Serpin superfamily (SERine Protease Inhibitors). Genes for such type of genes have so far only been found in cells of higher organisms, such as humans and plants, but not in bacterial cells.

In consequence, the present invention provides for a nucleic acid as identified by SEQ ID. NO. 1 or parts or variants thereof coding for a functional polypeptide, which variants have a homology to the SEQ ID. No. 1 of about 75 %, preferably 80 %, more preferably 85 %, even more preferably 90 % even more preferred 95 %.

According to an alternative embodiment the present invention also pertains to a polypeptide as identified by SEQ ID. NO. 2 or functional parts or variants thereof, which variants have a degree of homology to the said SEQ. ID. No. 2 of about 75 %, preferably 80 %, more preferably 85 %, even more preferably 90 % even more preferred 95 %.

Serine proteinase inhibitors (Serpins) comprise a diverse group of proteins that form a superfamily including more than 100 members. The majority of Serpins act as protease inhibitors and are involved in the regulation of several proteinase-activated physiological processes, 5 important for the individual, such as blood clotting, complement mediated lysis, the immune response, glomerulonephritis, pain sensing, inflammation, pancreatitis, cancer, regulating fertilization, bacterial infection and viral maturation. Though the primary function of Serpins appears to be neutralizing serine proteinase activity, these polypeptides have also been found to play a role in extracellular matrix remodelling and cell migration.

10

Examples for Serpins include, α 1-antitrypsin, antithrombin III, plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1) or plasminogen activator inhibitor 2.

15

The Serpins known so far have been the subject of intensive Research and they all seem to have a common characteristic loop, termed the reactive site loop (RSL), extending from the surface of the molecule containing the recognition sequence for the active site of the cognate serine protease. The specificity of each inhibitor is considered to be determined primarily by the identity of the amino acid that is immediately amino-terminal to the site of potential cleavage of the inhibitor by the serine protease. This amino acid, known as the Pi site residue, 20 is considered to form an acyl bond with the serine in the active site of the serine protease.

25

The Serpins seem to act as "suicide inhibitors" forming a 1 : 1 stoichiometric complex with the target proteinase, thus blocking their activity. According to recent data it has been indicated that the inhibitor is cleaved in the reactive center and that the complex is most likely trapped as a covalent acyl-enzyme complex.

30

Since Serpins are involved in sophisticated biological processes such as modulating the immune system or inflammatory reactions or even remodelling the extracellular matrix of a higher living being their presence in procarcyotes has not been expected. In fact, no Serpin has so far been reported to be derived from procarcyotic cells.

The present inventors are therefore the first to have found that also some bacterial cells may contain Serpins. Without wishing to be bound by any theory it is presently assumed that the probiotic properties, such as modulation of the immune system or the known property of the Bifidobacterial strain, from which it has been derived, may at least in part be due to the 5 presence of the present Serpin.

In the context of this application a nucleic acid according to the present invention shall designate a polynucleotide as identified by SEQ. ID. NO. 1 or parts or variants thereof, that yield a functional polypeptide. To this end, the nucleic acid shown in SEQ ID NO. 1 may be 10 truncated at its ends to an extent, at which the resulting polypeptide still yields the biological function. Likewise, the nucleic acid may also be modified by deleting, adding or replacing one or more nucleotides, with the proviso that the resulting polypeptide still exerts its biological function.

15 Similarly, the same applies to the polypeptide described herein. The term polypeptide according to the present invention shall designate a polypeptide as identified by SEQ. ID. NO. 2 or parts or variants thereof, that are functional. Therefore, the polypeptide of SEQ. ID. NO. 2 may be truncated at its ends to an extent, at which the polypeptide still yields the biological function. Likewise, the polypeptide may also be modified by having one or more 20 amino acids being deleted, added or replaced, with the proviso that the resulting polypeptide still exerts its biological function.

According to an embodiment, the above mentioned nucleic acid may be inserted in a suitable 25 host cell and expressed therein. For this purpose, a nucleic acid according to the present invention may be inserted in a suitable vector, which allows propagation and/or expression in the desired host cell and inserted therein. The vector will contain a marker gene to enable a stable propagation.

Likewise, the nucleic acid according to the present invention may also be included into the 30 genome of the host, using the phenomenon of homologous recombination or other techniques, allowing insertion of a nucleic acid only into the host's chromosome. Such a

technique is e.g. described in EP 93 105 303.7, the contents thereof is incorporated herein by way of reference.

The nucleic acid according to the present invention may be put under the control of an 5 endogeneous or exogeneous regulon, e.g. a promotor, depending on whether the gene product shall be over-expressed, i.e. for collecting and purifying the polypeptide, or expressed to a certain extent to be delivered to an individual via a carrier system, such as a micro-organism. The regulon, e.g. the promoter, is preferably regulatable and/or inducible and will be operably linked with the coding molecule via any of the well-recognized and easily-practised 10 methodologies for so doing.

These recombinant constructs are then introduced for expression into suitable host cells such as, e.g., *E. coli*, *Lactobacilli*, *Streptococci* or *Bifidobacteria* as a prokaryotic host cell or *Saccharomyces cerevisiae*, insect cells, CHO or COS cells as eukaryotic host cells and the 15 transformed or transduced host cells are cultured under conditions which allow expression of the heterologous gene. It will be appreciated that the gene product of the present polynucleotide will be subject to glycosylation upon expression in an eucaryotic expression system.

20 According to another aspect the present invention also comprises recombinant micro-organisms containing at least a copy of the nucleic acid according to the present invention. The nucleic acid may be included in a micro-organism, that is used to deliver the target- substance to the individual. In this respect probiotic bacteria are suitable, since they are able to pass the gastric tract of an individual and get at least transiently implanted into the mucosa 25 of a host. At this location it will exert its biological function as is seen in the present probiotic strain BL29, from which it was derived. Without wishing to be bound by any theory it is presently thought that the gene product of the present nucleic acid is involved in the anti- inflammatory activity displayed by the *Bifidobacterial* strain BL29. Likewise, any bacterial strain, already including a nucleic acid according to the present invention may be used as a 30 host cell, into which additional copies of the target nucleic acid may be included.

The host cell will express the gene product of a nucleic acid according to the present invention. Therefore, the host cells may be utilized for the synthesis of a polypeptide according to the present invention on large scale.

- 5 A "host cell" according to the present invention may be obtained by recombinant means, in that a nucleic acid according to the present invention is inserted in a suitable cell. However, in order to increase the amount of Bifido-Serpin in the Bifidobacteria containing such sort of polypeptides, the Bifidobacteria itself may be subjected to common techniques of mutation or selection such that a strain having an increased amount of the corresponding gene product is obtained.

The isolation of the protein can be carried out according to known methods from the host cell or from the culture supernatant of the host cell. Such methods are described for example by Ausubel I, Frederick M., Current Protocols in Mol. Biol. (1992), John Wiley and Sons, New York. The polypeptide can be purified after recombinant production by affinity chromatography using known protein purification techniques, including immunoprecipitation, gel filtration, ion exchange chromatography, chromatofocussing, isoelectric focussing, selective precipitation, electrophoresis, or the like.

- 10 The invention further comprises a method for detecting a nucleic acid or a polypeptide according to the present invention, comprising incubating a sample, e.g. cell lysates or a reverse transcript of an RNA sample, with either a nucleic acid molecule according to the invention and determining hybridization under stringent conditions of said nucleic acid molecule to a target nucleic acid molecule for determination of presence of a nucleic acid molecule, or using antibodies, preferably monoclonal antibodies raised against the polypeptide according to the present invention. Also a quantitative detection of the gene may be performed by PCR techniques, preferably by the use of quantitative RT-PCR using, e.g., the LightCycler TM of Roche Diagnostics GmbH, DE.
- 15 Since the Serpin gene seems to be associated with probiotic activity of bacterial strains, the present nucleic acid and/or polynucleotide may likewise be utilized for searching for

additional strains exhibiting probiotic activities.

To determine, whether a given bacterial strain may be apt, the approximate amount of hybridization of the nucleic acid with the target nucleic acid or nucleic acids of the bacterial 5 strain is determined. The approximate amount of hybridization may easily be determined qualitatively by e.g. visual inspection upon detecting hybridization. For example, if a gel is used to resolve labelled nucleic acid which hybridizes to target nucleic acid in the sample, the resulting band can be inspected visually. Likewise, as with the use of antibodies FACS may be utilized for a quantitative measurement.

10

The nucleic acid or a polypeptide according to the present invention may be utilized for the identification, characterization and/or purification of molecules affecting biological process associated with the activity of serine proteases. Exemplary biological processes, in which serine proteases are involved comprise blood coagulation, fibrinolysis, immune reactions, 15 complement activation, inflammatory responses extracellular matrix turnover, cell migration and prohormone activation, cancer metastasis.

Likewise, the nucleic acid or polypeptide according to the present invention may also be used 20 for the development of molecules eventually suitable in the treatment and/or diagnosis of disease states, which involve the activity of serine proteases. Once the interaction of the present Serpin with the target proteases has been understood, agonists or antagonists to the proteases, but likewise agonists or antagonists to Serpins may be devised. As mentioned above, non-limiting examples for disease states considered by the present invention are improper blood coagulation, improper fibrinolysis, immune reactions, complement activation, inflammatory responses extracellular matrix turnover, cell migration and 25 prohormone activation, cancer metastasis.

The use of various model systems or structural studies will enable the development of 30 specific agonists and antagonists useful in regulating the function of the present Serpin and the proteases to which it binds. It may be envisaged that these can be peptides, mutated ligands, antibodies or other molecules able to interact with the present Serpin.

The nucleic acid according to the present invention may in general be utilized for the synthesis of the polypeptide for large scale production thereof, by expressing a nucleic acid according to the present invention or a vector containing such a nucleic acid in a suitable host 5 under conditions suitable for the expression of the polypeptide and collecting and purifying the polypeptide.

The following examples illustrate the invention without limiting it thereto.

10 **Example 1**

Isolation of the Serpin gene

In the line of sequencing the genome of the *Bifidobacterium longum* strain BL29 by the method of directed sequencing after fluorescent automated sequencing of the inserts of clones 15 and assembling of these sequences of nucleotide fragments (inserts) by means of software programmes, an open reading frame has been found. To achieve that, fragments of the genome were created, ligated into suitable vectors for amplification and propagation and the corresponding fragments have been sequenced. Overlaps and the final arrangement of the fragments, the nucleotide sequence thereof, were assessed by the aid of appropriate soft- 20 wares.

Protein and/or nucleic acid sequence homologies have been evaluated using the following algorithms:

- 25 (1) BLASTP: Compares an amino acid query sequence against a protein sequence database
- (2) BLASTN: Compares a nucleotide query sequence against a nucleotide sequence database
- 30 (3) BLASTX: Compares a nucleotide query sequence translated in all reading frames against a protein sequence database

- (4) TBLASTN: Compares a protein query sequence against a nucleotide sequence database dynamically translated in all reading frames

A modest overall homology to the known murine Serpin α -2-antiplasmin of about 43 % has 5 been noted. Yet the present polypeptide shows a homology of about 63 % with the reactive site loop (RSL) thereof.

Example 2

Cloning of the Bifidobacterial Serpin gene and isolation of the polypeptide

10

The nucleic acid encoding the putative Bifidobacterial Serpin deleted from its signal peptide, was cloned into the *E. coli* expression vector pDEST 17 (Invitrogen Life Technologies) and the corresponding protein was produced as a 6-His tagged fusion protein in *E. coli* (Janknecht R et al. (1991) : Proc. Natl. Acad. Sci. USA:88(20) pp 8972-8976) according to 15 common techniques.

The 6-His tagged protein was purified to homogeneity by metal affinity chromatography on a nickel-nitrilotriacetic acid matrix (Ni-NTA from Quiagen) according to the instructions described in the QIA-Expressionist Handbook from Quiagen, and used for production of 20 functional studies as well as for production of polyclonal antibodies in rabbits.

Example 3

Potential anti-inflammatory activity of a serpin-like protein, expressed in BL29

25 The polypeptide as isolated in example 2 has been used in a haemolytic assay *in vitro* in order to determine its activity as a Serpin.

To this end, 50 μ l of successive doubling dilution of human AB serum (Sigma) were mixed 30 in a 96 microtiter well plate with 50 μ l of a 1.7 % sheep antibody-activated sheep erythrocyte suspension. To assess anti-haemolytic activity of the recombinant Serpin, 1 μ g of the recombinant protein was added to each well and the mixture was incubated for 1 hr at 37°C. The

plate was then centrifuged to pellet intact cells and cell debris and the supernatant was transferred to a new plate. Haemolytic activity was estimated by measuring haemoglobin release as absorbance at 450 nm.

5 Bifidobacterium Serpin activity was compared to human serpin α 1-antitrypsin (5 μ g/well). Distilled water was used as positive control to obtain 100% erythrocyte lysis and human inactivated AB serum as negative control (no lysis due to complement inactivation).

10 The results clearly indicate that recombinant Serpin from Bifidobacteria inhibited human red blood cell lysis to a similar extent as human α 1-antitrypsin, a known serine-protease inhibitor.

Claims

1. A nucleic acid as identified by SEQ ID. NO. 1 or parts or variants thereof coding for a functional polypeptide, which variants have a homology to the SEQ ID. No. 1 of about 75 %, preferably 80 %, more preferably 85 %, even more preferably 90 % even more preferred 95 %.
2. A polypeptide as identified by SEQ ID. NO. 2 or functional parts or variants thereof, that have a degree of homology to the said SEQ. ID. No. 2 of about 75 %, preferably 80 %, more preferably 85 %, even more preferably 90 % even more preferred 95 %.
3. A vector containing a nucleic acid according to claim 1.
4. A host cell containing one or more copies of a nucleic acid according to claim 1 or a vector according to claim 3.
5. A host cell according to claim 4, wherein a polypeptide according to claim 2 is expressed.
6. Use of a nucleic acid or a polypeptide according to any of the claims 1 or 2 for the identification, characterization and/or purification of molecules affecting a biological process associated with the activity of serine proteases.
7. Use of a nucleic acid or a polypeptide according to any of the claims 1 or 2 for the development of molecules for the treatment and diagnosis of disease states, involving the activity of serine proteases.
8. Use of a nucleic acid according to claim 1 or a polypeptide according to claim 2, for the preparation of a carrier for the treatment and/or prevention of disease states involving the activity of serine proteases.

9. The use according to claim 8, wherein the carrier is a medicament, a food product or a food supplement.
10. The use according to any of the claims 6 to 9, wherein the biological process or the disease states are selected from the group consisting of blood coagulation, fibrinolysis, immune reactions, complement activation, inflammatory responses extracellular matrix turnover, cell migration and prohormone activation, cancer metastasis.
11. A method of producing a polypeptide according to claim 2, which comprises expressing a nucleic acid according to claim 1 or a vector according to claim 3 in a suitable host and purifying the polypeptide obtained.
12. A method for detecting probiotic strains, which comprises screening micro-organisms with a nucleic acid according to claim 1 or an antibody directed to a polypeptide according to claim 2, for the presence of the said nucleic acid or the said polypeptide and determining the presence of a Serpin in the micro-organisms.
13. A method for producing a micro-organism expressing or over-expressing the Serpin encoded by a nucleic acid according to claim 1, which comprises, transforming a micro-organism with a nucleic acid according to claim 1 and expressing the gene encoding the Serpin polypeptide.
14. A food or pharmaceutical product, containing a nucleic acid according to claim 1, a polypeptide according to claim 2, a vector according to claim 3 or a host cell according to any of the claims 4 or 5.

WO 02/060932

PCT/EP02/00956

SEQ. Id. No. 1

Serpin nucleotide

ATGAGCGAGCAACTGATGGAACAGTACCGGTTGCGCGGACAACGCAAATGCCGTAAACCT
TGTATGCCGCCATCGTGAACAGTAGTCTGCTTGCCTGCGCCTGGCGGTATGGTGG
ACGGCCCGCGATGGCAGCGCATTGGTTGCAATATGTTCAAGCGGAAGGCCACGCCGTGCC
ACCCAGCGCGTAGTCACAGCACCGCAACCTTCCCTACCCACCGCACCGGAATTCCCG
GCGATGGAAGCGCGGACCGAGGGCACCAGCAATGTGAACACTCTCTGCTTGTGG
ATGGCGTTGCCATCGCCGCGCAGGGCGCAATGGCACGACCCGCTCGCAACTGAACGAA
CTGCTGGGCTCGGTTGCGTGAACCGATAGCGACTACCAATCGCTGCTAAGTCGATCAAC
GGGCAATATTCGGGGCGAAATCCGAGATGAGCGCCGGAACCTGCTGTGGATTGATGAC
GACTACTCTTCGGCAGATTACCAATCCACCGTCAAGAAAGATGTTCGAGGCCGAAAGTC
ACCACTTACCGTTCGACGATCAGGCCGCCCAAGATGTCGATTGGATTGCCAACGAT
ACGAATGGTTGCGCTAAGCGGAAGATCACGCTCGTGAACCGTGAAGTCGACCCGCAAC
AACACCGTCTATCGGGATGGCCGCTGGAAAGGATCCGTTGCAAGAGCAGTCACCGGCAAC
GGCACCTCCACCGCGAAGCGGGAGATGCTCAGGTGCCGATGATGACCCAGACCTTCAGC
CAAATGGCTACGGCATGATGAGTACAACACTTGCAGCGGGTGGAGATTCCGTTGAC
AACGGCGGCAATCTGGCATCTGCTGCCGGCGAAGGGCATTGACGAGTTGGCGG
GATGCGGAGAAGCTCAGTTGGCGTTGCTACATGCTCGACGGCATCCCTGGCGAGGGC
GCAATGGTTGCGCGCGGACAGTATGCCGCGCTGGCGTCTCGTCAAACCGGTCTG
GTGAACGTCACGCTACCGCATTACCCATGACAGCATGTTGACTCGGAAGGCCACCATC
AAGGCATTGAAAAACTGGGGGTGACCGATGCGTTAGTCAGTCAGGCCGACTTCACC
AAGATGATGACACCCGGTTGCGACGGCGAGAACCTGTATATCGGCTCGATTCTGCAAGGC
ACCGCGCATCGAGGTGAAACGAAAGCGGGCCCAAGGCCATGTCCTCACCAAGGTCGGCGCA
GACTCCGTTAGCGCGCCGGTGGACAACGTCGAGGTTCACGGTGGATGCCCATTCGTAT
TCGTCAGTCACCCGGACGGCATACCAATTTCATCGGTGCCGTCGCCAACCTCGCGGA
GTCGGTGGAGAAAAC

WO 02/060932

PCT/EP02/00956

SEQ. ID. No. 2

Serpine protein Sequence

MetSerGluGlnLeuMetGluGlnTyrArgLeuArgGlyGlnArgLysCysArgAsnAla
CysIleAlaAlaIleValThrValValLeuValLeuAlaValAlaGlyGlyValTrpTrp
ThrAlaGlyAspGlySerAlaLeuValArgAsnMetPheLysProLysAlaThrProAla
ThrGlnProValValAsnSerThrAlaThrPheAlaTyrArgThrAlaProGluPheLeu
AlaMetGluAlaGlyAspArgGlyThrGlyAsnValAsnTyrSerProAlaSerMetTrp
MetAlaLeuAlaIleAlaAlaGlnGlyAlaAsnGlyThrThrArgSerGlnLeuAsnGlu
LeuLeuGlySerGlySerLeuThrAspSerAspTyrGlnSerLeuLeuSerSerIleAsn
GlyGlnTyrSerGlyAlaLysSerGluMetSerAlaAlaAsnSerLeuTrpIleAspAsp
AspTyrSerLeuAlaSerAspTyrGlnSerThrValLysMetPheGluAlaGluVal
ThrThrLeuProPheAspAspGlnAlaAlaAlaLysMetSerAspTrpIleAlaLysHis
ThrAsnGlySerLeuLysProLysIleThrLeuArgAspArgGluValLeuSerIleIle
AsnThrValTyrAlaAspGlyArgTrpLysAspProPheGluGluGlnSerThrGlyAsn
GlyThrPheHisGlyGluAlaGlyAspAlaGlnValProMetMetHisGlnThrPheSer
GlnMetAlaTyrGlyHisAspGluTyrAsnThrTrpGlnArgValGluIleProPheAsp
AsnGlyGlyAsnLeuAlaIleValLeuProAlaGluGlyHisPheAspGluLeuAlaGly
AspAlaGluLysLeuSerTrpAlaPheGlyThrCysSerThrAlaSerLeuGlyGluGly
AlaMetGlyCysAlaAlaAspSerMetProGlyTrpGlyValSerValAsnSerValMet
ValAsnValThrLeuProArgPheThrIleAspSerMetPheAspSerGluAlaThrIle
LysAlaPheGluLysLeuGlyValThrAspAlaPheSerAlaGlyAspAlaAspPheThr
LysMetIleAspThrGlySerHisGlyGluAsnLeuTyrIleGlySerIleLeuGlnGly
ThrArgIleGluValAsnGluAlaGlyAlaLysAlaMetSerPheThrLysValGlyAla
AspSerValSerAlaProValAspAsnValGluPheThrValAspArgProPheLeuTyr
SerTyrValThrProAspGlyIleProLeuPhelleGlyAlaValArgAsnLeuGlyGly
ValGlyGlyGluAsn

【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
8 August 2002 (08.08.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/060932 A3(51) International Patent Classification⁵: C12N 15/31, C07K 1/4195, 14/81, 16/12, G01N 33/50, 33/53, C12Q 1/68, 1/25, A61K 38/55

(21) International Application Number: PCT/EP02/00956

(22) International Filing Date: 30 January 2002 (30.01.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data: 01102050.0 30 January 2001 (30.01.2001) EP

(71) Applicant (for all designated States except US): SOCIETE DES PRODUITS NESTLE S.A. [CH/CH]; P.O. Box 353, CH-1800 Vevey (CH).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): ARIGONI, Fabrizio [CH/CH]; 2, rue Maurice, CH-1204 Geneva (CH); BLUM, Stéphanie [DE/CH]; Av. des Mousquines 13, CH-1005 Lausanne (CH); DELLEY, Michele [CH/CH]; Av. des Bovresses 6, CH-1010 Lausanne (CH); SCHELL, Mark, Alan [US/US]; 320 Idylwood Drive, Athens, GA 30605 (US); SCHIFFRIN, Eduarda [AR/C/H]; Chemin de Riant-Mont 17, CH-1023 Crissier (CH).

(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EH, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GU, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), European patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IT, LU, MC, NL, PT, SI, TR), OAPI patent (BR, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(88) Date of publication of the international search report: 5 June 2003

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



A3

(54) Title: A SURPIN IN BIFIDOBACTERIA

(57) Abstract: The present invention pertains to a novel gene of Bifidobacteria and to the polypeptides encoded thereby. In particular, the present invention pertains to a gene belonging to the Serpin superfamily and its use in the production of bacterial Serpins. Also provides are vectors host cells, and methods for producing bacterial Serpin polypeptides and/or polypeptides.

WO 02/060932

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/EP 02/00956
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC 7 C12N15/31 C07K14/195 C07K14/81 C07K16/12 G01N33/50 G01N33/53 C12Q1/68 C12Q1/25 A61K38/55		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12N C07K G01N C12Q A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EMBL, WPI Data, PAJ, EPO-Internal, CHEM ABS Data, MEDLINE, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category ¹	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>DATABASE SWALL 'Online! EBI; Q9SDDO, 1 May 2000 (2000-05-01) SASAKI ET AL: "similar to serpin - wheat" retrieved from EBI Database accession no. Q9SDDO XP002203432 amino acid sequence shows more than 27% identity to the amino acid sequence of the present application the whole document ---</p> <p>-/-</p>	1-14
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
<small> 1 Special categories of cited documents : * document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubt on priority (claims) or which is cited to establish the publication date of another claim for other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed </small>		
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the International search report	
1 October 2002	25/11/2002	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-3240, Tx: 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3216	Authorized officer: Celler, J	

Form PCT/ISA2/10 (second sheet) (July 1992)

page 1 of 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/EP 02/00956
C(continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	HIROSHI M. ET AL: "Pathogenic mechanisms induced by microbial proteases in microbial infections" BIOLOGICAL CHEMISTRY HOPPE-SEYER, vol. 377, no. 4, 1996, pages 217-226, XP001084685 abstract ----- LETOFFE S. ET AL: "Characterization of a protein inhibitor of extracellular proteases produced by <i>Erwinia chrysanthemi</i> " MOLECULAR MICROBIOLOGY, vol. 3, no. 1, January 1989 (1989-01), pages 79-86, XP001084689 abstract -----	1-14

Form PCT/ISA210 (continuation of second sheet) (July 1992)

page 2 of 2

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 35/74	A 6 1 K 35/74	4 C 0 8 6
A 6 1 K 38/55	A 6 1 P 7/02	4 C 0 8 7
A 6 1 P 7/02	A 6 1 P 29/00	4 H 0 4 5
A 6 1 P 29/00	A 6 1 P 35/04	
A 6 1 P 35/04	A 6 1 P 37/02	
A 6 1 P 37/02	A 6 1 P 43/00	1 0 5
A 6 1 P 43/00	A 6 1 P 43/00	1 1 1
C 0 7 K 14/195	C 0 7 K 14/195	
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10	C 1 2 N 9/99	
C 1 2 N 9/99	C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 P 21/02	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53	M
G 0 1 N 33/569	G 0 1 N 33/569	F
	C 1 2 N 5/00	A
	A 6 1 K 37/64	

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

(72)発明者 アリゴーニ、ファブリツィオ

スイス国 ジュネーブ、リュ モーリス、2

(72)発明者 ブルム、ステファニー

スイス国 ローザンヌ、アブニュ デ ムスキン 13

(72)発明者 デリー、ミシェル

スイス国 ローザンヌ、アブニュ デ ボヴェレス 6

(72)発明者 シエル、マーク、アラン

アメリカ合衆国 ジョージア、アセンズ、アイドルウッド ドライブ 320

(72)発明者 シフリン、エデュアルド

スイス国 クリシエ、シェマン デ リヤン - モン 17

F ターム(参考) 4B018 LB10 MD20 MD87 ME14 MF13

4B024 AA01 AA11 BA50 BA80 CA04 DA05 DA06 EA04 GA11

4B064 AG01 AG21 CA02 CA19 CC24 DA01 DA13

4B065 AA21X AA21Y AA26X AB01 AC14 BA02 CA24 CA44 CA46

4C084 AA02 BA01 BA22 BA23 CA53 DC32 NA14 ZA542 ZB072 ZB112

ZB212 ZB262 ZC202

4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 NA14 ZA54 ZB07 ZB11 ZB21

ZB26 ZC19

4C087 AA01 AA02 BB21 BC11 BC34 BC57 BC60 CA12 NA14 ZA54

ZB07 ZB11 ZB21 ZB26 ZC20

4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 CA11 DA76 EA20 EA50 FA74 GA26

专利名称(译)	双歧杆菌中的Serpin		
公开(公告)号	JP2004531229A	公开(公告)日	2004-10-14
申请号	JP2002561500	申请日	2002-01-30
[标]申请(专利权)人(译)	雀巢制品公司		
申请(专利权)人(译)	兴业德Purodeyui Netsusuru兴业ANONYME		
[标]发明人	アリゴーニファブリツィオ ブルムステファニー デリーミシェル シェルマークアラン シフリンエデュアルド		
发明人	アリゴーニ、ファブリツィオ ブルム、ステファニー デリー、ミシェル シェル、マーク、アラン シフリン、エデュアルド		
IPC分类号	G01N33/53 A23C9/123 A23L1/30 A61K31/7052 A61K35/64 A61K35/74 A61K36/06 A61K38/00 A61K38/55 A61K39/00 A61P1/04 A61P1/12 A61P1/14 A61P7/02 A61P29/00 A61P35/04 A61P37/02 A61P43/00 C07H21/04 C07K14/195 C07K14/81 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/20 C12N1/21 C12N5/10 C12N9/99 C12N15/09 C12N15/31 C12P21/02 C12P21/08 C12Q1/04 C12Q1/37 C12Q1/68 C12R1/01 G01N33/569 A61K35/72		
CPC分类号	A23C9/1234 A23C2220/202 A23Y2300/00 A61K38/00 A61K39/00 A61P1/00 A61P1/04 A61P1/12 A61P1/14 A61P29/00 C07H21/04 C07K14/195 C07K14/8121 C12Q1/37 C12R1/01 G01N2333/8121 G01N2500/00		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A23L1/30.Z A61K31/7052 A61K35/64 A61K35/72 A61K35/74 A61P7/02 A61P29/00 A61P35/04 A61P37/02 A61P43/00.105 A61P43/00.111 C07K14/195 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N9/99 C12P21/02.C G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/569.F C12N5/00.A A61K37/64		
F-TERM分类号	4B018/LB10 4B018/MD20 4B018/MD87 4B018/ME14 4B018/MF13 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA50 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024/DA05 4B024/DA06 4B024/EA04 4B024/GA11 4B064/AG01 4B064/AG21 4B064/CA02 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA21X 4B065/AA21Y 4B065/AA26X 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/BA01 4C084/BA22 4C084/BA23 4C084/CA53 4C084/DC32 4C084/NA14 4C084/ZA542 4C084/ZB072 4C084/ZB112 4C084/ZB212 4C084/ZB262 4C084/ZC202 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZA54 4C086/ZB07 4C086/ZB11 4C086/ZB21 4C086/ZB26 4C086/ZC19 4C087/AA01 4C087/AA02 4C087/BB21 4C087/BC11 4C087/BC34 4C087/BC57 4C087/BC60 4C087/CA12 4C087/NA14 4C087/ZA54 4C087/ZB07 4C087/ZB11 4C087/ZB21 4C087/ZB26 4C087/ZC20 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/CA11 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74 4H045/GA26		
代理人(译)	池田幸		
优先权	2001102050 2001-01-30 EP		
其他公开文献	JP4249483B2		
外部链接	Espacenet		
摘要(译)			

本发明涉及长双歧杆菌属的新型微生物，特别是其基因组序列和编码双歧杆菌NCC2705 (CNCM I-2618) 的多肽的核苷酸序列，所述多肽是分泌的或特异性的或参与代谢的。复制过程，由这些序列编码的多肽以及包括所述序列的载体和分别用这些核苷酸序列和载体转化的细胞或非人类动物。本发明还涉及双歧杆菌基因组的转录基因产物以及检测这些核酸或多肽的方法。本发明最终包括包含NCC2705的核苷酸序列和/或多肽序列的数据载体，并且还涉及含有所述微生物的食品和药物组合物，用于预防和/或治疗由所述双歧杆菌和轮状病毒和致病细菌引起的腹泻。

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
8 August 2002 (08.08.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/060932 A2

(51) International Patent Classification⁷: C07K 14/195 (74) Agent: STRAUS, Alexander; Becker, Kurt, Straus, Davariast, 7, 80336 München (DE).

(21) International Application Number: PCT/EP02/00956

(22) International Filing Date: 30 January 2002 (30.01.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
01/102050.0 30 January 2001 (30.01.2001) EP

(71) Applicant (for all designated States except US): SOCIÉTÉ DES PRODUITS NESTLE S.A. [CH/CH]; P.O. Box 353, CH-1800 Vevey (CH).

(72) Inventors: and

(75) Inventors/Applicants (for US only): ARIGONI, Fabrizio [CH/CH]; 2, rue Maurice, CH-1704 Geneva (CH); BLUM, Stéphanie [DE/CH]; Av. des Masselines 13, CH-1005 Lausanne (CH); DELLEY, Michele [CH/CH]; Av. des Boveresses 6, CH-1010 Lausanne (CH); SCHELL, Mark, Alan [US/US]; 320 Idylwood Drive, Athens, GA 30605 (US); SCHIFFRIN, Eduardo [AR/CH]; Chemin de Riant-Mont 17, CH-1023 Crissier (CH).

(81) Designated States (national): AE, AG, AI, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CT, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, H, GB, GD, GE, GL, GM, HI, HR, IS, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LV, MA, MD, MG, MK, ML, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PT, PT, RO, RU, SD, SI, SG, SI, SK, SL, TI, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (regional): ARIPO patent: (GL, GM, KU, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM, ZW). Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TI, TM). European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR). OAPI patent (BH, BJ, CR, CG, CI, CM, GA, GN, QQ, GW, ML, MR, MU, SN, TD, TG).

Published:
— without international search report and to be republished upon receipt of that report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guide to Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.