

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2008-289480

(P2008-289480A)

(43) 公開日 平成20年12月4日(2008.12.4)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	4 B O 6 4
C 1 2 P 21/02 (2006.01)	C 1 2 P 21/02 C	4 B O 6 5
C O 7 K 14/195 (2006.01)	C O 7 K 14/195	4 C O 8 4
C O 7 K 19/00 (2006.01)	C O 7 K 19/00	4 C O 8 5

審査請求 有 請求項の数 1 O L (全 38 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2008-126155 (P2008-126155)
 (22) 出願日 平成20年5月13日 (2008.5.13)
 (62) 分割の表示 特願2002-589508 (P2002-589508) の分割
 原出願日 平成14年5月15日 (2002.5.15)
 (31) 優先権主張番号 60/290,653
 (32) 優先日 平成13年5月15日 (2001.5.15)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 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 100147485
 弁理士 杉村 憲司
 (74) 代理人 100072051
 弁理士 杉村 興作
 (74) 代理人 100119530
 弁理士 富田 和幸

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 モラクセラ (ブランハメラ) カタラーリス抗原

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 予防、診断、及び/又は治療に有用であるポリペプチドを提供する。

【解決手段】 ヒトの呼吸器感染症の起炎菌、幼児や子供の中耳炎の起炎菌、肺炎球菌 (Streptococcus pneumoniae) 及びインフルエンザ菌 (Haemophilus influenzae) に次ぐ第3の最も代表的な起炎菌、副鼻腔炎、慢性咳、成人の急性喉頭炎、化膿性角膜炎、新生児 (neonatorum) の結膜炎、及び免疫不全宿主の侵入性疾病を含む、他の何種類かの感染症にも関連があるモラクセラ (ブランハメラ) カタラーリスのポリペプチド。

【選択図】 図1

(配列番号1)

```

1  ATGGACACTG ACATGAAACA TTTAAGAAA CATCGCCTAT CAGCTGCCAT
51  CATTTGCCGT TTATTATCCA TTAGCCCAATC AGTGCAGCA AATACGACAC
101 ACCATCCAC CTRACACAGT ACGAGCCTTA AACTTCCGA TGAATGATT
151 ATTGATAGTA TCAATCAATT GGGTGAAGCTG ACCGTCAATA TTCCAATAC
201 ACAATATTTT CAAACCAACA ACGGTGTGAG CGTTGCTTTT ACGCCATTAC
251 ATGAGCTGCC TATTGTGGAT ATCAGCTTGT ATTTTAATGC AGGGTCAGCG
301 TATGACCATC AGGTGGCAA ATCAGGCCAGC GCTTAACATGG TTGCAACCAT
351 GCTCACCCAA GGAAGTACA GCCTTTCTGA AGATGAGTTT GTTGTGCCA
401 AAGAGCGTCT TGGCATTTGAT TTACCAAGTA CAGCAAAATA GGATACTTA
451 ACTTTATCAT TAGAAGCTTT GTCTGATCAA TCAATTTAA ATCAAGCCGC
501 CGATTTAATG GTCGATGCTG TCACCTCAACC TGCTTTTGA GATAAGACTC
551 TACAACGGAA CAAAATCAG CTCATCACCA GTTAAAACA AAAAAGCAA
601 AACCTTATC ATGTAGCTC TGTTCCTTAT CATCAAGCCG TATATGAAA
651 TCATCCTTAT GCACACGCAA CCACAGGCCA TGAAGATAGT ATTGCCAAA
701 TTGATCGTGA TGAGCTGCTT AATTTTTCGC ATACTTTTAT TAAATGAAAT
751 AATCCGACMC TGTGTATTAC AGGTGATAG ACCGCCAGC AAGCCAAATC
801 ACTTGCCACM CACTGTACCG CCAATTTACC GACAGGCCAG TCGTATAAAA
851 ATACCGTGA TTTGCAAAA CAGTTAAGG CTCCTCATAT CCAATTTCTT
901 CACAACAGTA GTCAAAACCA AATCATCATC GGTCAATCCA CAGTAAAGT
951 ACGCACGGAC AAGCAGGCT GTCAAGATTT CAGCATTTT TCATTAGGTA
1001 ATGAAATTTT GGCAGTGGT GATTTAATG CCAGATTGAT GAAAACCAT
1051 CGAGAGCAAA AAGGCTACAC TTATGGCATT TATGCCGTA TCGAACCGCT
1101 CAGAGCGGT GPTAATTAG TGGTTGATTT TTCAACCAT GGGCATTAAG
1151 CAGCCGATGC CATTPTAGAG ACGCTACACA TCATTAATGA GTCGCTGAAT
1201 GAAGGCATAA CCCAAGAAGA GCTTGAAGTG GTGGTATTGG GCATATAAAA
1251 TGGTTTTCGC AATATTTTTC CAAGCAATGC CAGTATTAT CCGTCAATTG
1301 GTGCTTTATT TGTTCCTGAT TATCCAAAG ATCATCTTAA CCATACGCTC
1351 AATCGCTTGG AATAATGCC GATAAATAGT GTTAATACCG CACTGAACCT
1401 GCGTATCAAG CCTGATGAAT TTATCATCAT CACCGTGGGT AAAACTAAGC
1451 CAAATTTGGA CAAATA
    
```

【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、次の、即ち

(a) 配列番号 2、4、6、8、10、12、14 に示す配列か、又はそれらの断片が若しくは類似体から選択された配列からなる 2 次ポリペプチドに対して、少なくとも 70% 同一性を持つポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、

(b) 配列番号 2、4、6、8、10、12、14 に示す配列か、又はそれらの断片が若しくは類似体から選択された配列からなる 2 次ポリペプチドに対して、少なくとも 80% 同一性を持つポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、

(c) 配列番号 2、4、6、8、10、12、14 に示す配列か、又はそれらの断片が若しくは類似体から選択された配列からなる 2 次ポリペプチドに対して、少なくとも 95% 同一性を持つポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、

(d) 配列番号 2、4、6、8、10、12、14 に示す配列か、又はそれらの断片が若しくは類似体から選択された配列からなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、

(e) 配列番号 2、4、6、8、10、12、14 に示す配列か、又はそれらの断片が若しくは類似体から選択された配列からなるポリペプチドに対して、結合特異性を有する抗体を生成することが可能なポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、

(f) 配列番号 2、4、6、8、10、12、14 に示す配列か、又はそれらの断片が若しくは類似体から選択された配列からなるポリペプチドの一部を有するエピトープをコードするポリヌクレオチド、

(g) 配列番号 1、3、5、7、9、11、13 に示す配列か、又はそれらの断片が若しくは類似体から選択された配列からなるポリヌクレオチド、及び

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

から選ばれるポリヌクレオチドを備える、ポリヌクレオチド。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ポリペプチドに関し、より詳細には モラクセラ (ブランハメラ) カタラーリス (Moraxella (Branhamella) catarrhalis) 感染の予防、診断及び / 又は治療に利用可能である モラクセラ (ブランハメラ) カタラーリス ポリペプチドに関する。

【背景技術】

【0002】

モラクセラ (ブランハメラ) カタラーリス は、グラム陰性双球菌であり、ヒトの呼吸器感染症の起炎菌である。M. カタラーリス は現在、幼児や子供の中耳炎の起炎菌として、肺炎球菌 (Streptococcus pneumoniae) 及びインフルエンザ菌 (Haemophilus influenzae) に次ぐ第 3 の最も代表的な起炎菌と認められている。M. カタラーリス はまた、副鼻腔炎、慢性咳、成人の急性喉頭炎、化膿性角膜炎、新生児 (neonatorum) の結膜炎、及び免疫不全宿主の侵入性疾病を含む、他の何種類かの感染症にも関連がある。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0003】

M. カタラーリス 株の約 90% は抗生物質に耐性があり (ラクトース陽性)、また再発性中耳炎は高死亡率に結びつくため、宿主への M. カタラーリス 感染予防ワクチンの開発が必要とされている。M. カタラーリス 感染は、細菌細胞表面の抗原に対する免疫反応を促す。しかしながら、これら表面蛋白の多くは未だ特徴づけられておらず、他の菌から

の感染予防効果につながるような免疫反応も確認されていない。

【0004】

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

10

【0005】

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

【課題を解決するための手段】

【0006】

(発明の概要)

一態様において、本発明は、配列番号2、4、6、8、10、12、14に示す配列か、又はそれらの断片が若しくは類似体から選択された配列からなる2次ポリペプチドに対して、少なくとも70%の同一性を有するポリペプチドをコードする、単離されたポリヌクレオチドを提供する。

20

【0007】

一態様において、本発明は、配列番号2、4、6、8、10、12、14に示す配列か、又はそれらの断片が若しくは類似体から選択された配列からなるポリペプチドに関する。

【0008】

他の態様においては、本発明のポリヌクレオチドにコードされたポリペプチド、薬剤組成物、発現制御部位と機能が発現するように連結された本発明のポリヌクレオチドを含むベクター、及び前記ベクターを用いて核酸注入 (トランスフェクション、形質移入) された宿主細胞が提供され、また、発現に適した条件下において、前記宿主細胞を培養する工程を含むポリペプチドの作成方法が提供されている。

30

本出願の国際出願日の特許請求の範囲は以下のものである。

[請求項1]

(a) 配列番号2、4、6、8、10、12、14に示す配列か、又はそれらの断片が若しくは類似体から選択された配列からなる2次ポリペプチドに対して、少なくとも70%の同一性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、

(b) 配列番号2、4、6、8、10、12、14に示す配列か、又はそれらの断片が若しくは類似体から選択された配列からなる2次ポリペプチドに対して、少なくとも80%の同一性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、

40

(c) 配列番号2、4、6、8、10、12、14に示す配列か、又はそれらの断片が若しくは類似体から選択された配列からなる2次ポリペプチドに対して、少なくとも95%の同一性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、

(d) 配列番号2、4、6、8、10、12、14に示す配列か、又はそれらの断片が若しくは類似体から選択された配列からなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、

(e) 配列番号2、4、6、8、10、12、14に示す配列か、又はそれらの断片が若しくは類似体から選択された配列からなるポリペプチドに対して、結合特異性を有する

50

抗体を生成することが可能なポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、

(f) 配列番号 2、4、6、8、10、12、14 に示す配列か、又はそれらの断片か若しくは類似体から選択された配列からなるポリペプチドの一部を有するエピトープをコードするポリヌクレオチド、

(g) 配列番号 1、3、5、7、9、11、13 に示す配列か、又はそれらの断片か若しくは類似体から選択された配列からなるポリヌクレオチド、及び

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

から選択されたポリヌクレオチドからなる、単離されたポリヌクレオチド。

[請求項2]

(a) 配列番号 2、4、6、8、10、12、14 から選択された配列からなる 2 次ポリペプチドに対して、少なくとも 70% の同一性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、

(b) 配列番号 2、4、6、8、10、12、14 から選択された配列からなる 2 次ポリペプチドに対して、少なくとも 80% の同一性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、

(c) 配列番号 2、4、6、8、10、12、14 から選択された配列からなる 2 次ポリペプチドに対して、少なくとも 95% の同一性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、

(d) 配列番号 2、4、6、8、10、12、14 から選択された配列からなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、

(e) 配列番号 2、4、6、8、10、12、14 から選択された配列からなるポリペプチドに対して、結合特異性を有する抗体を生成することが可能なポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、

(f) 配列番号 2、4、6、8、10、12、14 から選択された配列からなるポリペプチドの一部を有するエピトープをコードするポリヌクレオチド、

(g) 配列番号 1、3、5、7、9、11、13 から選択された配列からなるポリヌクレオチド、及び

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

から選択されたポリヌクレオチドからなる、単離されたポリヌクレオチド。

[請求項3]

前記ポリヌクレオチドが DNA である、請求項 1 に記載のポリヌクレオチド。

[請求項4]

前記ポリヌクレオチドが DNA である、請求項 2 に記載のポリヌクレオチド。

[請求項5]

前記ポリヌクレオチドが RNA である、請求項 1 に記載のポリヌクレオチド。

[請求項6]

前記ポリヌクレオチドが RNA である、請求項 2 に記載のポリヌクレオチド。

[請求項7]

厳しい条件下において、

(a) ポリペプチドをコードする DNA 配列、又は

(b) ポリペプチドをコードする DNA 配列の相補鎖

(ここで、前記ポリペプチドは、配列番号第 2、4、6、8、10、12、14 に示す配列か、又はそれらの断片か若しくは類似体から選択された配列からなるものである) のいずれかにハイブリダイズする、単離されたポリヌクレオチド。

[請求項8]

厳しい条件下において、

(a) ポリペプチドをコードする DNA 配列、又は

(b) ポリペプチドをコードする DNA 配列の相補鎖

10

20

30

40

50

(ここで、前記ポリペプチドは、配列番号第2、4、6、8、10、12、14に示す配列か、又はそれらの断片か若しくは類似体から選択された配列からなるものである)のいずれかにハイブリダイズする、請求項1に記載の単離されたポリヌクレオチド。

[請求項9]

厳しい条件下において、

(a) ポリペプチドをコードするDNA配列、又は

(b) ポリペプチドをコードするDNA配列の相補鎖

(ここで、前記ポリペプチドは、配列番号2、4、6、8、10、12、14から選択された配列からなるものである)のいずれかにハイブリダイズする、請求項2に記載の単離されたポリヌクレオチド。

10

[請求項10]

厳しい条件下において、

(a) ポリペプチドをコードするDNA配列、又は

(b) ポリペプチドをコードするDNA配列の相補鎖

(ここで、前記ポリペプチドは、配列番号2、4、6、8、10、12、14に示す配列か、又はそれらの断片か若しくは類似体から選択された配列からなるポリペプチドからの、少なくとも10の連続するアミノ酸残基からなるものである)のいずれかにハイブリダイズする、請求項1に記載の単離されたポリヌクレオチド。

[請求項11]

厳しい条件下において、

(a) ポリペプチドをコードするDNA配列、又は

(b) ポリペプチドをコードするDNA配列の相補鎖

(ここで、前記ポリペプチドは、配列番号2、4、6、8、10、12、14から選択された配列からなるポリペプチドからの、少なくとも10の連続するアミノ酸残基からなるものである)のいずれかにハイブリダイズする、請求項2に記載の単離されたポリヌクレオチド。

20

[請求項12]

前記DNAを発現制御部位と機能が発現するように連結された、請求項1に記載のポリヌクレオチドを含むベクター。

[請求項13]

前記DNAを発現制御部位と機能が発現するように連結された、請求項2に記載のポリヌクレオチドを含むベクター。

30

[請求項14]

請求項12に記載のベクターを用いて核酸注入された宿主細胞。

[請求項15]

請求項13に記載のベクターを用いて核酸注入された宿主細胞。

[請求項16]

前記ポリペプチドの発現に適した条件下で、請求項14に記載の宿主細胞を培養する工程を含む、ポリペプチドの生成方法。

[請求項17]

前記ポリペプチドの発現に適した条件下で、請求項15に記載の宿主細胞を培養する工程を含む、ポリペプチドの生成方法。

40

[請求項18]

(a) 配列番号2、4、6、8、10、12、14に示す配列か、又はそれらの断片が若しくは類似体から選択された配列からなる2次ポリペプチドに対して、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、6、8、10、12、14に示す配列か、又はそれらの断片が若しくは類似体から選択された配列からなる2次ポリペプチドに対して、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、6、8、10、12、14に示す配列か、又はそれらの断片が

50

若しくは類似体から選択された配列からなるアミノ酸配列を有する2次ポリペプチドに対して、少なくとも95%の同一性を有するポリペプチド、

(d) 配列番号2、4、6、8、10、12、14に示す配列か、又はそれらの断片が若しくは類似体から選択された配列からなるポリペプチド、

(e) 配列番号2、4、6、8、10、12、14に示す配列か、又はそれらの断片が若しくは類似体から選択された配列からなるポリペプチドに対して、結合特異性を有する抗原を生成することが可能なポリペプチド、

(f) 配列番号2、4、6、8、10、12、14に示す配列か、又はそれらの断片が若しくは類似体から選択された配列からなるポリペプチドの一部を有するエピトープ、

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

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

から選択されたポリペプチドからなる、単離されたポリペプチド。

[請求項19]

(a) 配列番号2、4、6、8、10、12、14から選択された配列からなるアミノ酸配列を有する2次ポリペプチドに対して、少なくとも70%の同一性を有するポリペプチド、

(b) 配列番号2、4、6、8、10、12、14から選択された配列からなるアミノ酸配列を有する2次ポリペプチドに対して、少なくとも80%の同一性を有するポリペプチド、

(c) 配列番号2、4、6、8、10、12、14から選択された配列からなるアミノ酸配列を有する2次ポリペプチドに対して、少なくとも95%の同一性を有するポリペプチド、

(d) 配列番号2、4、6、8、10、12、14から選択された配列からなるポリペプチド、

(e) 配列番号2、4、6、8、10、12、14から選択された配列からなるポリペプチドに対して、結合特異性を有する抗原を生成することが可能なポリペプチド、

(f) 配列番号2、4、6、8、10、12、14から選択された配列からなるポリペプチドの一部を有するエピトープ、

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

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

から選択されたポリペプチドからなる、単離されたポリペプチド。

[請求項20]

配列番号2、4、6、8、10、12、14に示す配列、又はそれらの断片が若しくは類似体から選択された配列を有するポリペプチドを2又はそれ以上含み、キメラポリペプチドを形成するように該ポリペプチドを連結して提供された、キメラポリペプチド。

[請求項21]

配列番号2、4、6、8、10、12、14に示す配列から選択された配列を有するポリペプチドを2又はそれ以上含み、キメラポリペプチドを形成するように該ポリペプチドを連結して提供された、キメラポリペプチド。

[請求項22]

請求項18から21のいずれか1つの請求項に記載のポリペプチドと、薬学的に受容可能な担体、希釈液、又はアジュバントを含む薬剤組成物。

[請求項23]

モラクセラ (*Moraxella*) 感染を受けやすい宿主に、請求項22に記載の組成物を予防又は治療量投薬する工程を含む、モラクセラ感染の予防又は治療方法。

[請求項24]

10

20

30

40

50

前記宿主が新生児、幼児、又は子供である、請求項 2 3 に記載の方法。

[請求項25]

前記宿主が免疫不全宿主である、請求項 2 3 に記載の方法。

[請求項26]

前記宿主が成人である、請求項 2 3 に記載の方法。

[請求項27]

前記宿主に請求項 2 2 に記載の組成物を予防又は治療量投薬する工程を含む、中耳炎、副鼻腔炎、慢性咳、急性喉頭炎、化膿性角膜炎、新生児 (neonatorum) の結膜炎、侵入性疾病の予防又は治療方法。

[請求項28]

(a) 宿主から生体サンプルを得る工程、
 (b) 請求項 1 8 から 2 1 のいずれか 1 つの請求項に記載のポリペプチドに反応性を示す抗体又はその断片を、生体サンプルと共にインキュベートして、混合物を生成する工程、及び
 (c) モラクセラ の存在を示す混合物中で、特異的に結合した抗体又は結合した断片を検出する工程
 を含む、モラクセラ 感染を受けやすい宿主における、モラクセラ 感染診断方法。

[請求項29]

(a) 宿主から生体サンプルを得る工程、
 (b) 請求項 1 8 から 2 1 のいずれか 1 つの請求項に記載のポリペプチドに反応性を示す抗体又はその断片を、生体サンプルと共にインキュベートして、混合物を生成する工程、及び
 (c) モラクセラ の存在を示す混合物中で、特異的に結合した抗体又は結合した断片を検出する工程
 を含む、前記抗体を含むか又は含むと思われる生体サンプルにおける、モラクセラ 抗原に特異的な抗体の検出方法。

[請求項30]

モラクセラ 感染の予防又は治療処理用の薬剤を製造において、請求項 2 2 に記載の薬剤組成物を使用する方法。

[請求項31]

請求項 1 8 から 2 1 のいずれか 1 つの請求項に記載のポリペプチドを含む、モラクセラ 感染の検出又は診断用のキット。

【発明を実施するための最良の形態】

【0009】

本発明は、精製かつ単離されたポリヌクレオチドにおいて、モラクセラ 感染の予防、診断及び / 又は治療に利用可能な、モラクセラ のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを提供する。

【0010】

一態様において、本発明は、配列番号 2、4、6、8、10、12、14 に示す配列か、又はそれらの断片か若しくは類似体から選択された配列からなる 2 次ポリペプチドに対して、少なくとも 70 % の同一性を有するポリペプチドをコードする、単離されたポリヌクレオチドを提供する。

【0011】

一態様において、本発明は、配列番号 2、4、6、8、10、12、14 に示す配列か、又はそれらの断片か若しくは類似体から選択された配列からなる 2 次ポリペプチドに対して、少なくとも 80 % の同一性を有するポリペプチドをコードする、単離されたポリヌクレオチドを提供している。

【0012】

一態様において、本発明は、配列番号 2、4、6、8、10、12、14 に示す配列か、又はそれらの断片か若しくは類似体から選択された配列からなる 2 次ポリペプチドに対

10

20

30

40

50

して、少なくとも95%の同一性を有するポリペプチドをコードする、単離されたポリヌクレオチドを提供している。

【0013】

一態様において、本発明は、配列番号2、4、6、8、10、12、又は14から選択された配列からなる2次ポリペプチドに対して、少なくとも70%の同一性を有するポリペプチドをコードする、単離されたポリヌクレオチドを提供している。

【0014】

一態様において、本発明は、配列番号2、4、6、8、10、12、又は14から選択された配列からなる2次ポリペプチドに対して、少なくとも80%の同一性を有するポリペプチドをコードする、単離されたポリヌクレオチドを提供している。

10

【0015】

一態様において、本発明は、配列番号2、4、6、8、10、12、又は14から選択された配列からなる2次ポリペプチドに対して、少なくとも95%の同一性を有するポリペプチドをコードする、単離されたポリヌクレオチドを提供している。

【0016】

一態様において、本発明は、配列番号2、4、6、8、10、12、14に示す配列か、又はそれらの断片が若しくは類似体から選択された配列からなるポリペプチドに関する。

【0017】

一態様において、本発明は、配列番号2、4、6、8、10、12、又は14を含むアミノ酸配列により特徴付けられたポリペプチドに関する。

20

【0018】

一態様において、本発明は、配列番号2、4、6、8、10、12、14示す配列か、又はそれらの断片が若しくは類似体から選択された配列からなるポリペプチドの一部を有するエピトープをコードするポリヌクレオチドを提供する。

【0019】

一態様において、本発明は、配列番号2、4、6、8、10、12、又は14から選択された配列からなるポリペプチドの一部を有するエピトープをコードするポリヌクレオチドを提供する。

【0020】

一態様において、本発明は、配列番号2、4、6、8、10、12、14示す配列か、又はそれらの断片が若しくは類似体から選択された配列からなるポリペプチドの一部を有するエピトープに関する。

30

【0021】

一態様において、本発明は、配列番号2、4、6、8、10、12、又は14から選択された配列からなるポリペプチドの一部を有するエピトープに関する。

【0022】

一態様において、本発明は、配列番号2、4、6、8、10、12、又は14から選択された配列からなる2次ポリペプチドに対して、少なくとも70%の同一性を有するポリペプチドをコードする、単離されたポリヌクレオチドを提供する。

40

【0023】

一態様において、本発明は、配列番号2、4、6、8、10、12、又は14から選択された配列からなる2次ポリペプチドに対して、少なくとも80%の同一性を有するポリペプチドをコードする、単離されたポリヌクレオチドを提供する。

【0024】

一態様において、本発明は、配列番号2、4、6、8、10、12、又は14から選択された配列からなる2次ポリペプチドに対して、少なくとも90%の同一性を有するポリペプチドをコードする、単離されたポリヌクレオチドを提供する。

【0025】

一態様において、本発明は、配列番号2、4、6、8、10、12、又は14から選択

50

された配列からなる2次ポリペプチドに対して、少なくとも95%の同一性を有するポリペプチドをコードする、単離されたポリヌクレオチドを提供する。

【0026】

一態様において、本発明は、配列番号2、4、6、8、10、12、又は14から選択された配列からなるポリペプチドに関する。

【0027】

一態様において、本発明は、

(a) 配列番号2、4、6、8、10、12、14に示す配列か、又はそれらの断片が若しくは類似体から選択された配列からなる2次ポリペプチドに対して、少なくとも70%の同一性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、

(b) 配列番号2、4、6、8、10、12、14に示す配列か、又はそれらの断片が若しくは類似体から選択された配列からなる2次ポリペプチドに対して、少なくとも80%の同一性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、

(c) 配列番号2、4、6、8、10、12、14に示す配列か、又はそれらの断片が若しくは類似体から選択された配列からなる2次ポリペプチドに対して、少なくとも95%の同一性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、

(d) 配列番号2、4、6、8、10、12、14に示す配列か、又はそれらの断片が若しくは類似体から選択された配列からなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、

(e) 配列番号2、4、6、8、10、12、14に示す配列か、又はそれらの断片が若しくは類似体から選択された配列からなるポリペプチドに対して、結合特異性を有する抗体を生成することが可能なポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、

(f) 配列番号2、4、6、8、10、12、14に示す配列か、又はそれらの断片が若しくは類似体から選択された配列からなるポリペプチドの一部を有するエピトープをコードするポリヌクレオチド、

(g) 配列番号1、3、5、7、9、11、13に示す配列か、又はそれらの断片が若しくは類似体から選択された配列からなるポリヌクレオチド、及び

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

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

【0028】

一態様において、本発明は、

(a) 配列番号2、4、6、8、10、12、14から選択された配列からなる2次ポリペプチドに対して、少なくとも70%の同一性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、

(b) 配列番号2、4、6、8、10、12、14から選択された配列からなる2次ポリペプチドに対して、少なくとも80%の同一性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、

(c) 配列番号2、4、6、8、10、12、14から選択された配列からなる2次ポリペプチドに対して、少なくとも95%の同一性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、

(d) 配列番号2、4、6、8、10、12、14から選択された配列からなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、

(e) 配列番号2、4、6、8、10、12、14から選択された配列からなるポリペプチドに対して、結合特異性を有する抗体を生成することが可能なポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、

(f) 配列番号2、4、6、8、10、12、14から選択された配列からなるポリペプチドの一部を有するエピトープをコードするポリヌクレオチド、

(g) 配列番号1、3、5、7、9、11、13から選択された配列からなるポリヌクレオチド、及び

10

20

30

40

50

(h) (a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)又は(g)のポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチドから選択されたポリヌクレオチドからなる、単離されたポリヌクレオチドを提供する。

【0029】

一態様において、本発明は、

(a) 配列番号2、4、6、8、10、12、14に示す配列か、又はそれらの断片が若しくは類似体から選択された配列からなる2次ポリペプチドに対して、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、6、8、10、12、14に示す配列か、又はそれらの断片が若しくは類似体から選択された配列からなる2次ポリペプチドに対して、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、6、8、10、12、14に示す配列か、又はそれらの断片が若しくは類似体から選択された配列からなる2次ポリペプチドに対して、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、6、8、10、12、14に示す配列か、又はそれらの断片が若しくは類似体から選択された配列からなるポリペプチド、

(e) 配列番号2、4、6、8、10、12、14に示す配列か、又はそれらの断片が若しくは類似体から選択された配列からなるポリペプチドに対して、結合特異性を有する抗体を生成することが可能なポリペプチド、

(f) 配列番号2、4、6、8、10、12、14に示す配列か、又はそれらの断片が若しくは類似体から選択された配列からなるポリペプチドの一部を有するエピトープ、

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

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

から選択されたポリペプチドからなる、単離されたポリペプチドを提供する。

【0030】

一態様において、本発明は、

(a) 配列番号2、4、6、8、10、12、又は14から選択された配列からなる2次ポリペプチドに対して、少なくとも70%の同一性を有するポリペプチド、

(b) 配列番号2、4、6、8、10、12、又は14から選択された配列からなる2次ポリペプチドに対して、少なくとも80%の同一性を有するポリペプチド、

(c) 配列番号2、4、6、8、10、12、又は14から選択された配列からなる2次ポリペプチドに対して、少なくとも95%の同一性を有するポリペプチド、

(d) 配列番号2、4、6、8、10、12、又は14から選択された配列からなるポリペプチド、

(e) 配列番号2、4、6、8、10、12、又は14から選択された配列からなるポリペプチドに対して、結合特異性を有する抗体を生成することが可能なポリペプチド、

(f) 配列番号2、4、6、8、10、12、又は14から選択された配列からなるポリペプチドの一部を有するエピトープ、

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

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

から選択されたポリペプチドからなる、単離されたポリペプチドを提供する。

【0031】

当業者であれば、本発明には、本願に記載のDNA分子、すなわち突然変異体や、変異体や、相同物や、それらポリペプチドの誘導体のような類似体をコードするポリヌクレオチドや、それらの相補的配列が含まれることが理解できよう。また、本発明には、本発明のDNA分子に対応するRNA分子も含まれる。DNAやRNA分子以外にも、本発明に

10

20

30

40

50

は、対応するポリペプチドや、かかるポリペプチドに特異的に結合する単一特異性抗体が含まれる。

【0032】

さらなる一実施例において、本発明のポリペプチドは抗原性を示す。

【0033】

さらなる一実施例において、本発明のポリペプチドは免疫原性を示す。

【0034】

さらなる一実施例において、本発明のポリペプチドは、宿主内で免疫反応を引き起こすことができる。

【0035】

さらなる一実施例において、本発明は、上記の本発明のポリペプチドに対して結合特異性を有する抗体を生成することが可能なポリペプチドにも関連がある。

【0036】

“結合特異性を有する”抗体は、選択されたポリペプチドを認識して結合するけれども、サンプル、例えば生体サンプル内の他の分子を明らかに認識せず結合もしない抗体であり、その生体サンプルには当然にその選択されたペプチドが含まれる。結合特異性は、固相酵素免疫検定法を用いて測定することができるが、それにおいては、選択されたポリペプチドを抗原として使用する。

【0037】

本発明において、生物学の研究上の“予防”とは、生存曲線や、生存率や、生存期間の顕著な増加によって規定されるものである。生存曲線を比較するためのログランク検定や、生存率及び死亡までの日数を比較するためのフィッシャーの正確確率検定を用いた統計分析は、それぞれ、P値を算出して2グループ間に統計上の顕著な相違があるかを判断するのに有用であろう。P値の0.05は、顕著ではないとみなされる。

【0038】

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

【0039】

本発明の断片は、かかる抗原決定部位を1又はそれ以上含むか、あるいはそれらの抗原性/免疫原性特性を維持するのに十分な程、かかる部位に類似したものでなければならない。従って、本発明の断片は、本明細書に記載のポリペプチドや類似体の特定部位と100%の同一性を有するかもしれないので、本発明の断片に関して、同一性の程度はおそらく無関係なものであろう。本発明はさらに、本発明のポリペプチド配列からの、少なくとも10の連続するアミノ酸残基を有する断片を提供する。一態様においては、少なくとも15の連続するアミノ酸残基である。一態様においては、少なくとも20の連続するアミノ酸残基である。

【0040】

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

【0041】

本明細書で用いる、本発明のポリペプチドの“断片”、“類似体”、又は“誘導體”には、アミノ酸残基の1又はそれ以上が、保存されるか又は保存されていないアミノ酸残基（好ましくは保存されたもの）で置換されたポリペプチドが含まれ、それらは天然のものかもしでないし又はそうでないかもしれない。一態様においては、本発明のポリペプチドの誘導體や類似体は、図面に表示の配列か又はそれらの断片に対して、約80%の同一性を有する。すなわち、残基の80%が同一である。他のさらなる態様では、ポリペプチドは80%以上の同一性を有するであろう。他のさらなる態様では、ポリペプチドは85%以上の同一性を有するであろう。他のさらなる態様では、ポリペプチドは90%以上の同

10

20

30

40

50

一性を有するであろう。他のさらなる態様では、ポリペプチドは95%以上の同一性を有するであろう。他のさらなる態様では、ポリペプチドは99%以上の同一性を有するであろう。他のさらなる態様においては、本発明のペプチド類似体の、約20より少ないアミノ酸残基が置換、修飾又は欠失されており、好ましくは10より少ないものがそうである。

【0042】

これら置換基は、ペプチドの二次構造や疎水性度 (hydropathic nature) に最小限の影響しか与えないものである。好ましい置換基は、保存されているとして従来から知られているもの、すなわち、疎水性、大きさ、電荷、又は官能基などの物理的又は化学的特性を共有する置換残基である。前記置換基には、デイホフ.Mが“Atlas of Protein Sequence and Structure 5 (1989年)”中で記載した置換基、又はアルゴス.Pが“EMBO J. (8、第779-785頁、1989年)”中に記載した置換基などが含まれる。例えば、天然のものであろうが又はそうでなかろうが、下記グループ:

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

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

【0043】

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

【0044】

相同性のパーセンテージは、同一性のパーセンテージと、アミノ酸のタイプの類似性や、又は保存のパーセンテージの、合計パーセンテージとして定める。

【0045】

一態様において、本発明のポリペプチドの類似体は、図面に記載の配列又はそれらの断片に対して、約70%の同一性を有する。すなわち、残基の70%が同一である。さらなる一態様において、ポリペプチドは80%以上の同一性を有する。さらなる一態様において、ポリペプチドは85%以上の同一性を有する。さらなる一態様において、ポリペプチドは90%以上の同一性を有する。さらなる一態様において、ポリペプチドは95%以上の同一性を有する。さらなる一態様において、ポリペプチドは99%以上の同一性を有する。さらなる一態様において、本発明のポリペプチドの類似体は、約20より少ないアミノ酸残基、好ましくは10より少ないものが置換、修飾又は欠失されている。

【0046】

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

【0047】

アミノ酸配列を比較するためには、CLUTALプログラムのようなプログラムを用いることができる。このプログラムは、アミノ酸配列を比較して、必要に応じてどちらかの配列にスペースを挿入することにより、最適配列を探し出すというものである。最適配列につい

10

20

30

40

50

て、同一性や相同性を求めることもできる。BLASTxのようなプログラムは、類似配列を最も長くなるように一直線に配列し、適合値を定める。従って、それぞれ異なる値を有するとして見付かったいくらかの類似する部位を、比較することが可能となる。本発明では、両タイプの同一性分析の検討がなされている。

【0048】

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

10

【0049】

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

【0050】

従って、本発明の断片は、本明細書に記載のポリペプチドや類似体の特定部位と100%の同一性を有するかもしれないので、本発明の断片に関して、同一性の程度はおそらく無関係なものであろう。

20

【0051】

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

【0052】

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

【0053】

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

30

【0054】

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

【0055】

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

40

【0056】

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

【0057】

さらなる一態様において、本発明は、配列番号2、4、6、8、10、12、14に示す配列、又はそれらの断片が若しくは類似体から選択された配列を有するポリペプチドを

50

2又はそれ以上含み、キメラポリペプチドを形成するように該ポリペプチドを連結して提供された、キメラポリペプチドにも関連する。

【0058】

さらなる一態様において、本発明は、配列番号2、4、6、8、10、12、14に示す配列から選択された配列からなるポリペプチドを2又はそれ以上含み、キメラポリペプチドを形成するように該ポリペプチドを連結して提供された、キメラポリペプチドにも関連する。

【0059】

好ましくは、本発明のポリペプチドの断片、類似体、又は誘導体は、抗原部位を少なくとも1つ、すなわち抗原決定部位を少なくとも1つ含むものである。

10

【0060】

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

【0061】

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

20

【0062】

ポリペプチドは、組換えポリペプチドの生成や精製を助ける開始コドン（メチオニン又はバリン）やリーダーペプチドの両方又はその一方を用いずに、生成及び/又は使用できることが分かっている。リーダーペプチドをコードする配列を有さないクロン遺伝子は、ポリペプチドを大腸菌の細胞質に限定して、その回復を促すことが分かっている（グリック、G.R.及びパスタ-ナック、J.J.の“Manipulation of gene expression in prokaryotes”（1998年）、ワシントンDC、ASMプレスの“Molecular biotechnology: Principles and applications of recombinant DNA”（第2版、第109-143頁））。

30

【0063】

本発明の他の態様においては、(i)本発明のポリペプチドを担体、希釈剤、又はアジュバントと共に含む組成物、(ii)本発明のポリペプチドと、担体、希釈剤、又はアジュバントを含む薬剤組成物、(iii)本発明のポリペプチドと、担体、希釈剤、又はアジュバントを含むワクチン、(iv)免疫反応の誘引に効果的な免疫量の本発明のポリペプチド、例えばモラクセラに対する免疫反応予防剤を宿主に投与することにより、その宿主内で、モラクセラに対する免疫反応を誘発させる方法、及び、特には(v)予防又は治療量の本発明のポリペプチドを、必要とする宿主に投与することにより、モラクセラ感染を予防及び/又は治療する方法も提供されている。

40

【0064】

本発明の他の態様によれば、(i)本発明のポリヌクレオチドを担体、希釈剤、又はアジュバントと共に含む組成物、(ii)本発明のポリヌクレオチドと、担体、希釈剤、又はアジュバントを含む薬剤組成物、(iii)免疫反応の誘引に効果的な免疫量の本発明のポリヌクレオチド、例えばモラクセラに対する免疫反応予防剤を宿主に投与することにより、その宿主内で、モラクセラに対する免疫反応を誘発させる方法、及び、特には(iv)予防又は治療量の本発明のポリペプチドを、必要とする宿主に投与することにより、モラクセラ感染を予防及び/又は治療する方法も提供されている。

【0065】

50

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

【0066】

他の態様では、薬学的に受容可能なアジュバントの混合物中に、本発明のモラクセラポリペプチドを1又はそれ以上含む薬剤組成物が提供されている。適当なアジュバントは、(1)MF59（登録商標）、SAF（登録商標）、Rib i（登録商標）のような水中油エマルジョン形成物、(2)フロインドの完全な又は不完全なアジュバント、(3)AlK(SO₄)₂、AlNa(SO₄)₂、AlNH₄(SO₄)₂、Al(OH)₃、AlPO₄、シリカ、カオリン等の塩、(4)スティミュロン（登録商標）のようなサポニン誘導体、又はそれらから生成されたISCOMsのような粒子（免疫刺激性複合体）、(5)インターロイキン、インターフェロン、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)カーボンポリヌクレオチドのような他の物質、すなわちポリICやポリAU、解毒コレラ毒素（CTB）と、大腸菌の粘膜免疫の誘発のための熱不安定性毒素を含むものである。アジュバントのより詳細な説明は、M.Z.Iカーン等による総説“Pharmaceutical Research”第11巻、第1号（1994年）の第2-11頁や、グプタ等による他の総説“Vaccine”第13巻、第14号の第1263-1276頁（1995年）や、W099/24578で得ることができる。好ましいアジュバントは、QuilA（登録商標）、QS21（登録商標）、Alhydrogel（登録商標）及びAdjuvophos（登録商標）を含むものである。

【0067】

本発明の薬剤組成物は、注射、急速注入、鼻咽吸込、皮膚吸込により非経口で投与されるか、又は口腔内か経口で投与される。

【0068】

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

【0069】

さらなる一態様において、本発明は、モラクセラ感染を受けやすい宿主に、本発明の予防又は治療量の組成物を投薬する工程を含む、前記宿主のモラクセラ感染の予防又は治療方法を提供する。

【0070】

本発明で用いる“宿主”には、哺乳動物が含まれる。さらなる一態様においては、哺乳動物は人間である。

【0071】

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

【0072】

ある特定の態様において、薬剤の組成物は、成人のような、モラクセラ感染の危険性の

10

20

30

40

50

ある宿主に投与される。

【0073】

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

【0074】

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

【0075】

別の態様においては、配列番号2、4、6、8、10、12、又は14号に示す配列が、又はそれらの断片が若しくは類似体から選択された配列からなるアミノ酸配列により特徴付けられたポリペプチドをコードするポリヌクレオチドが提供されている。

【0076】

一態様において、ポリヌクレオチドは、本発明のポリペプチドをコードするオープン・リーディング・フレーム(ORF)を含むことができる、配列番号第1、3、5、7、9、11、13に記載のものである。

【0077】

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

【0078】

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

【0079】

さらなる一態様において、本発明は、厳しい条件下において、

(a) ポリペプチドをコードするDNA配列、又は

(b) ポリペプチドをコードするDNA配列の相補鎖

(ここで、前記ポリペプチドは、配列番号2、4、6、8、10、12、14に示す配列、又はそれらの断片が若しくは類似体から選択された配列からなるものである)のいずれかをハイブリダイズするポリヌクレオチドを提供する。

【0080】

さらなる一態様において、本発明は、厳しい条件下において、

(a) ポリペプチドをコードするDNA配列、又は

(b) ポリペプチドをコードするDNA配列の相補鎖

(ここで、前記ポリペプチドは、配列番号2、4、6、8、10、12、又は14から選択された配列からなるものである)のいずれかをハイブリダイズするポリヌクレオチドを提供する。

【0081】

さらなる一態様において、本発明は、厳しい条件下において、

(a) ポリペプチドをコードするDNA配列、又は

10

20

30

40

50

(b) ポリペプチドをコードするDNA配列の相補鎖

(ここで、前記ポリペプチドは、配列番号2、4、6、8、10、12、14に記載の配列か、又はそれらの断片が若しくは類似体から選択された配列からなるポリペプチドからの、少なくとも10の連続するアミノ酸残基を含むものである)のいずれかをハイブリダイズするポリヌクレオチドを提供する。

【0082】

さらなる一態様において、本発明は、厳しい条件下において、

(a) ポリペプチドをコードするDNA配列、又は

(b) ポリペプチドをコードするDNA配列の相補鎖

(ここで、前記ポリペプチドは、配列番号2、4、6、8、10、12、又は14から選択された配列からなるポリペプチドからの、少なくとも10の連続するアミノ酸残基を含むものである)のいずれかをハイブリダイズするポリヌクレオチドを提供する。

【0083】

さらなる一態様において、ポリヌクレオチドは、本発明のポリペプチドをコードする、配列番号1、3、5、7、9、11、13に記載の配列、又はそれらの断片が若しくは類似体に記載のものである。

【0084】

さらなる一態様において、ポリヌクレオチドは、本発明のポリペプチドをコードする、配列番号1、3、5、7、9、11、又は13に記載のものである。

【0085】

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

【0086】

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

【0087】

さらなる態様においては、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、又はそれらの断片か、配列か、若しくは誘導体は、DNAの免疫化法に用いることができる。つまり、注入すると複製可能かつ発現可能となるベクターにそれらを組み込んで、インピボで抗原性ポリペプチドを生成することができる。例えば、ポリヌクレオチドは、真核細胞内で活性化するCMVプロモーターの制御下にある、プラスミドベクターに組込むことができる。好ましくは、前記ベクターは、筋肉注射で注入する。

【0088】

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

【0089】

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

10

20

30

40

50

【 0 0 9 0 】

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

【 0 0 9 1 】

組換え体の生成においては、本発明のポリペプチドをコードするベクターを用いて宿主に核酸注入し、その後、プロモーターの活性化か、形質転換細胞の選択か、又は遺伝子の増殖に適するように加減した培養液中でそれ培養する。適したベクターは、選択されたベクター内で生存かつ複製可能であり、かつ染色体性、非染色体性、及び合成DNA配列からなるものであり、例えば、細菌性プラスミド、ファージDNA、バキュロウイルス、イースト菌プラスミド、プラスミドとファージDNAの組み合わせから生成したベクターなどがある。ポリペプチド配列は、発現制限部位に機能が作動するように連結された制限酵素を用いて、プロモーターと、リボソーム結合部位（共通部位又はシャイン・ダルガルノ配列）と、任意にオペレーター（制御要素）から成るベクターの適切な部位に組み込むことができる。所定の宿主とベクターに適する発現制御部位の個々の構成部位は、確立された分子生物学の原理（サンプローク等の“分子クローニング”：ニューヨークのコールド・スプリング・ハーバー“実験マニュアル”第2版（1989年）；ニューヨーク、ジョン・ウイレイ&ソنز、オースベルF.M.等出版の“分子生物学”）に従い、選択することができる。適したプロモーターは、LTR又はSV40プロモーターと、大腸菌ラクトースと、tac又はtrpプロモーターと、ファージラムダP_Lプロモーターとを含むものであるが、それらに制限されない。ベクターは、好ましくは選択マーカー、すなわちアンピシリン抵抗性遺伝子だけでなく、複製起点も組み込んだものである。適した細菌性ベクターは、pET、pQE70、pQE60、pQE-9、pD10、phagescript、psiX174、pbluescript SK、pbsks、pNH8A、pNH16a、pNH18A、pNH46A、ptrc99a、pKK223-3、pKK233-3、pDR540、pRIT5、と真核ベクターpBlueBac111、pWLNEO、pSV2CAT、pOG44、pXT1、pSG、pSVK3、pBPV、pMSG、及びpSVLを含むものである。宿主は細菌性のもの、すなわち大腸菌、枯草菌、ストレプトミセス；カビ、すなわちアスペルギルスニガー、アスペルギルスニダラン；、酵母菌、すなわちサッカロミセス；又は真核性のもの、すなわちCHO、COSとすることができる。

【 0 0 9 2 】

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

【 0 0 9 3 】

ポリペプチドは、リーダー又は分泌配列の有無にかかわらず発現することができる。過去の方法においては、リーダーは翻訳後処理を用いて取り除く（米国第4431739号、同第4425437号、及び同第4338397号）か、又は発現したポリペプチドの精製後に化学的に取り除く。

【 0 0 9 4 】

さらなる観点によれば、本発明のモラクセラポリペプチドは、モラクセラ感染、詳細にはモラクセラカタラーリス感染の診断検査に使用することができる。いくつかの診断方法が可能であるが、例えば、生体サンプルにおけるモラクセラ菌の検査において、下記工程：

- a) 宿主から生体サンプルを得る工程、
- b) 本発明のモラクセラポリペプチドに反応性を示す抗体又はその断片を、生体サンプルと共にインキュベートして、混合物を生成する工程、及び

c) モラクセラの存在を示す混合物中で、特異的に結合した抗体又は結合した断片を検出する工程に従った方法がある。

【0095】

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

a) 宿主から生体サンプルを得る工程、

b) 本発明のモラクセラポリペプチドの1又はそれ以上、あるいはその断片を、生体サンプルと共にインキュベートして、混合物を生成する工程、及び

c) モラクセラに特異的な抗体の存在を示す混合物中で、特異的に結合した抗原又は結合した断片を検出する工程に従い実施することができる。

【0096】

当業者であれば、この診断検査には、酵素結合免疫吸着検定法(ELISA)、放射免疫測定法、又はラテックス凝集反応法のような免疫検査を含んだ、原則としてそのタンパク質に特異的な抗体が菌中に存在するか否かを調べるための、様々な方法があると分かるであろう。

【0097】

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

a) 宿主から生体サンプルを得る工程、

b) 本発明のポリペプチドをコードするDNA配列を有するDNAプローブの1又はそれ以上、又はその断片を、生体サンプルと共にインキュベートして、混合物を生成する工程、及び

c) モラクセラ菌の存在を示す混合物中で、特異的に結合したDNAプローブを検出する工程を含む。

【0098】

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

【0099】

宿主中のモラクセラを検出する他の診断方法は、下記工程：

a) 本発明のポリペプチドに反応性を示す抗体又はその断片に、検出可能なラベルを付す工程、

b) ラベルを付した抗体又はラベルを付した断片を宿主に投与する工程、及び

c) モラクセラの存在を示す宿主中で、特異的に結合したラベルを付した抗体またはラベルを付した断片を検出する工程を含む。

【0100】

他に、モラクセラ抗原に特異的な抗体を含むか、又は含むと思われる生体サンプル内で

10

20

30

40

50

、前記抗体を検出する方法は、下記工程：

a) 宿主から生体サンプルを得る工程、

b) 本発明のモラクセラポリペプチドの1又はそれ以上、あるいはその断片を、生体サンプルと共にインキュベートして、混合物を生成する工程、及び

c) モラクセラに特異的な抗体の存在を示す混合物中で、特異的に結合した抗原又は結合した断片を検出する工程

に従って実施することができる。

【0101】

当業者であれば、この診断検査には、酵素結合免疫吸着検定法(ELISA)、放射免疫測定法、又はラテックス凝集反応法のような免疫検査を含んだ、原則としてそのタンパク質に特異的な抗体が菌中に存在するか否かを調べるための、様々な方法があると分かるであろう。

10

【0102】

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

本発明の検出法は、下記工程：

a) 宿主から生体サンプルを得る工程、

b) 本発明のポリペプチドをコードするDNA配列を有するDNAプローブの1又はそれ以上、又はその断片を、生体サンプルと共にインキュベートして、混合物を生成する工程、及び

20

c) モラクセラ菌の存在を示す混合物中で、特異的に結合したDNAプローブを検出する工程

を含む。

【0103】

一態様において、本発明は、モラクセラ感染の治療及び/又は予防に用いる抗体の使用方法を提供している。

【0104】

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

30

40

【0105】

一態様において、本発明は、モラクセラ感染の予防及び/又は治療に用いる抗体の使用方法を提供している。

【0106】

本発明のさらなる態様は、モラクセラ感染の診断と、特にはその治療に特有の抗体の生成に用いるイムノゲンとして、本発明のモラクセラポリペプチドを使用する方法である。適当な抗体は、適切なスクリーニング法を用いて、例えば試験モデル内においてモラクセラ感染を受動的に防御するある特有の抗体の能力を測ることにより、測定することができる。動物モデルの一例は、本明細書の実施例に記載のマウスモデルである。前記抗体は、

50

完全な抗体であるか、又は抗原に結合性のある断片でもよく、かつ免疫グロブリンの任意の部類に属するものとする事ができる。前記抗体又は断片は、動物のものとする事ができ、詳細には、哺乳動物のもの、より詳細には、マウス、ラット、又はヒトのものとする事ができる。天然の抗体やその断片とする事もでき、あるいは必要に応じて、組換え抗体や抗体の断片とする事もできる。組換え抗体や抗体の断片という用語は、分子生物学の技術を用いて生成された抗体又は抗体の断片を意味する。前記抗体又は抗体の断片は、ポリクローナルか、又は好ましくはモノクローナルのものとする事ができる。それは、モラクセラポリペプチドと結合したエピト - プの数に特有のものでもよいが、好ましくは、1つのものに特有のものとする事ができる。

【0107】

本発明のさらなる態様は、受動免疫に用いる、本発明のポリペプチドを対象とした抗体の使用方法である。本願に記載の抗体を使用することができる。

【0108】

本発明のさらなる態様は、本発明のポリペプチドから生成された抗体の、受動免疫に十分な量を宿主に投与することによる免疫法である。

【0109】

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

【0110】

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

【0111】

別段の定義がない限り、本明細書で使用する技術又は科学用語の全ては、本発明の分野における当業者に通常理解されているものと同様の意味を有する。ここに記載の公報、特許出願、特許、及びその他のここで言及された参考文献の全ては、参考文献としてそのまま盛りこまれる。論争時には、定義も含めて本明細書が支配をする。さらに、材料や方法や実施例は実例であるが、それらに制限されることはない。

【実施例】

【0112】

(例1)

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

【0113】

M. カタラーリス BVH - MC 2 (配列番号: 1) 遺伝子のコード領域を、PCR (カリフォルニア州サンノゼ、パーキンエルマー社のDNA熱サイクル遺伝子増幅PCRシステムを使用) により、M. カタラーリス株のETSUC - 2のゲノムDNAから増幅し、そのPCRにあたって、制限部位NdeI (CATATG) 及びXhoI (CTCGAG) の付加によって伸張した塩基を含む下記オリゴ: DMAR544 (5' - CATCAGTGCAATATGAATACGACACACCATCACACG - 3'); DMAR545 (5' - GAGTTATTCTCGAGTTTGTCCAAATTTGGCTTAGTTTTAC - 3') を用いた。PCR産物を、QIAgen社のQIAquickゲル抽出キットを用いて、その製品使用説明書 (カリフォルニア、チャッツワース) に従って、アガロースゲルから精製し、NdeI及びXhoI (カナダ、ベー・ドゥルフェ、アマシャム ファルマシア バイオテク社) により消化した。pET21b(+)ベクター (ウィスコンシン州、マディソン、ノヴァゲン) をNdeI及びXhoIにより消化し、QIAgen社 (カリフォルニア、チャッツワース) のQIAquickゲル抽出キットを用いて、アガロースゲルから精製した。NdeI - XhoI PCR産物を、NdeI - XhoI pET21b(+)発現ベクターに連結させた。その連結した産物により、シマニス (Simianis) (Hanahaによる "D.DNAクローニング" (1985年)、D.M.グローバー出版、第109 - 135頁) の方法に従い、大腸菌DH5 [80dlacZ M15 (lacZYA-argF)U169 endA1 racA1 hsdR17 (r_K-m_K+)deoR thi-1 supE44 gyra96 relA1] (メリーランド州、ゲーサーズ

10

20

30

40

50

バーグ、ギブコBRL)を形質転換させた。BVH-MC2遺伝子を含む組換えpET21b(+)プラスミド(rpET21b(+))からQIAgenキット(カリフォルニア、チャットワース)を用いて精製し、DNA挿入物の配列決定を行なった(カリフォルニア、フォスターシティ、エー・ビー・アイ、タック・ダイ・デオキシターミネーター配列キット)。

【0114】

【表1-1】

M. カタラーリス遺伝子のPCR増幅法に用いたオリゴヌクレオチドプライマー

表1-1

遺伝子	プライマー番号	制限部位	ベクター	配列
BVH-MC2	DMAR544	NdeI	pET21b(+)	5'-CATCAGTGCATATGAATACGACACACCATCACACG-3' (配列番号 : 15)
BVH-MC2	DMAR545	XhoI	pET21b(+)	5'-GAGTTATICTCGAGTTTGTCCAAATTGGC-TTAGTTTAC-3' (配列番号 : 16)
BVH-MC2	DMAR544a	BglII	pCMV-GH	5'-TCAGTGAGATCTTGAATACGACACACCATC-3' (配列番号 : 17)
BVH-MC2	DMAR545a	SalI	pCMV-GH	5'-GATTTGAGTTGTCGACTTATTTGTCCAAATTG-3' (配列番号 : 18)
BVH-MC3	DMAR592	NdeI	pET21b(+)	5'-CGGAGTGCCATATGAGCTTAATTAATAAATAAATG-3' (配列番号 : 19)
BVH-MC3	BMAR593	XhoI	pET21b(+)	5'-TATAACTCGAGGTTTTGTGCAACAGGTGTG-3' (配列番号 : 20)
BVH-MC3	DMAR592a	BglII	pCMV-GH	5'-CGCTTGAGATCTTGAAGATGTGTATCAGC-GTGC-3' (配列番号 : 21)
BVH-MC3	DMAR593a	HindIII	pCMV-GH	5'-CAATAACAAAGCTTTCAGTTTTGTGCAACAGGTGTG-3' (配列番号 : 22)
BVH-MC4	RIOS71	NdeI	pET21b(+)	5'-AACCGCACATATGTATCGCTTGGTGTCAACCACC-3' (配列番号 : 23)
BVH-MC4	RIOS72	XhoI	pET21b(+)	5'-GGTGACTCGAGGTAATCATCACCACCTAATCGCAC-3' (配列番号 : 24)
BVH-MC4	RIOS71a	BamHI	pCMV-GH	5'-GCAGGATCCTTATCGCTTGGTGTCAACC-3' (配列番号 : 25)

10

20

30

40

【0115】

【表 1 - 2】

表 1 - 2

<u>BVH-MC4</u>	RIOS72a	<i>SalI</i>	pCMV-GH	5'- ATCAATCGGGTCGACTTAGTACTCATCACCA -3' (配列番号 : 26)
<u>BVH-MC5</u>	RIOS59	<i>NdeI</i>	pET21b (+)	5'- AAAGCTTCATATGGCCCAAAGTCAAGAATC- TGCC-3' (配列番号 : 27)
<u>BVH-MC5</u>	RIOS60	<i>XhoI</i>	pET21b (+)	5'- CGATAACTCGAGTTGAACATCAGGCACCTGC -3' (配列番号 : 28)
<u>BVH-MC5</u>	RIOS59a	<i>BglII</i>	pCMV-GH	5'- ACCATTCAAAGAGATCTTGGCCCAAAGTC- AAGAATCTG-3' (配列番号 : 29)
<u>BVH-MC5</u>	RIOS60a	<i>SalI</i>	pCMV-GH	5'- GTTAGACCGAGTCGACTCATTGAACATCAG- GCA-3' (配列番号 : 30)

10

20

【 0 1 1 6 】

BVH-MC2のポリペプチドをコードするオープン・リーディング・フレーム (ORF) は1467 bpを含み、予測pI6.08と予測分子量53754.35Daを有するアミノ酸残基488個のポリペプチドをコードすることが分かった。サブキャン・ソフトウェア (ウィスコンシン配列分析パッケージ; ジェネティクス・コンピューター・グループ) を用いた予測アミノ酸残基配列 (配列番号: 2) の分析では、30個のアミノ酸残基のシグナルペプチド (MDTDMKHLTKHRLSAAIIGVLLFISPSVQA) の存在が示されたが、それは、アラニンとアスパラギン残基との間にある開裂部位を末端としていた。

【 0 1 1 7 】

PCR増幅法によりBVH-MC2 (配列番号: 1) 遺伝子の存在を確認するために、次の4種の別個のM. カタラーリス株: イースト・テネシー州立大学提供のM. カタラーリス ETSU C-2と、ETSU T-25と、ETSU658の臨床単離株; ラバル大学病院本部感染症研究センター提供のM. カタラーリス株M-12を用いた。これら実験には、負のコントロールとして、大腸菌 XL1 - Blue MRF' を用いた。PCR (カリフォルニア州サンノゼ、パーキンエルマー社のDNA熱サイクル遺伝子増幅PCRシステム) により、オリゴヌクレオチド・プライマー D M A R 5 4 4 及び D M A R 5 4 5 (表1) を用いて、BVH-MC2 (配列番号: 1) 遺伝子を、前記4種のM. カタラーリス株のゲノムDNAと、コントロールの大腸菌株から増幅させた。PCRは、94 で30秒間と、51 で30秒間と、72 で1分20秒のサイクルを30回と、最終伸長期間7分を72 で行なった。PCR産物は、1%アガロースゲル中でサイズ分別し、エチジウムブロマイド染色で視覚化した。これらPCR増幅の結果は、表2に示すとおりである。増幅産物の分析から、テストした4種のM. カタラーリス株の全てのゲノム中に、BVH-MC2 (配列番号: 1) 遺伝子が存在することが明らかになった。コントロールである大腸菌 DNAに、前記オリゴヌクレオチド・プライマーを用いた同様のPCR増幅法を行なっても、そのような産物は検出されなかった。

30

40

【 0 1 1 8 】

さらに他の菌からのBVH-MC2遺伝子を配列決定することにより、M. カタラーリス株中においてこの遺伝子が高度に分子保護されていることが明らかになった。菌 ETSU659 (配列番号: 3) と、ETSU T-25 (配列番号: 5) と、M-12 (配列番号: 7) の菌からのM. カタラーリス BVH-MC2 遺伝子のコード部位をそれぞれ、上記オリゴヌクレオチド・プライマーD

50

MAR544及びDMAR545を用いて、PCRにより増幅させた。PCR産物は、QIAgen社のQIAquickゲル抽出キットを用いて、製品使用説明書（カリフォルニア、チャッツワース）に従い、アガロースゲルから精製し、DNA挿入物の配列決定を行なった（カリフォルニア、フォスターシティ、エー・ビー・アイ、タック・ダイ・デオキシターミネーター配列キット）。実験1と同様の方法で、全配列を得ることができた。ETSUC-2（配列番号：2）と、ETSU658（配列番号：4）と、ETSUT-25（配列番号：6）と、ETSUT-25（配列番号：6）と、M-12（配列番号：8）の菌の予想アミノ酸配列は、それぞれ、下記表2、4、6及び8に示す通りである。図15及び16は、M.カタラーリスBVH-MC2について確立された共通ヌクレオチド配列と予想アミノ酸配列をそれぞれ表したものである。BVH-MC2の予想ポリペプチド配列を二つ一組で比較したところ、同一性が100%であることが分かった。この後者の結果は、M.カタラーリスの分離株中でBVH-MC2ポリペプチドが高度に分子保存されていることを明確に示すものである。

10

【0119】

【表2】

PCR増幅法によるM.カタラーリスの同定

株	PCR増幅法による固定			
	<u>BVH-MC2</u>	<u>BVH-MC3</u>	<u>BVH-MC4</u>	<u>BVH-MC5</u>
ETSU C-2	+	+	+	+
ETSU 658	+	+	+	+
ETSU T-25	+	+	+	+
M-12	+	+	+	+
<u>E. coli</u>	-	-	-	-

20

(例2)

【0120】

30

BVH-MC3 遺伝子とそれに対応するポリペプチドのクローニング及び分子特性を、以下実施例で説明する。

【0121】

M.カタラーリスのBVH-MC3（配列番号：9）遺伝子のコード領域を、PCR（カリフォルニア州サンノゼ、パーキンエルマー社のDNA熱サイクル遺伝子増幅PCRシステムを使用）により、M.カタラーリス株のETSUC-2のゲノムDNAから増幅し、そのPCRにあたって、制限部位NdeI（CATATG）及びXhoI（CTCGAG）の付加によって伸張した塩基を含む下記オリゴ：表1に記載のDMAR592及びDMAR593を用いた。BVH-MC3の発現ベクターへのクローニングとその解読には、実験1に記載のものと同様の方法を用いた。

40

【0122】

BVH-MC3のポリペプチドをコードするオープン・リーディング・フレーム（ORF）は1656 bpを含み、予想pI4.68と予想分子量58910.13Daを有するアミノ酸残基551個のポリペプチドをコードすることが分かった。スプキャン・ソフトウェア（ウィスコンシン配列分析パッケージ；ジェネティックス・コンピューター・グループ）を用いた予想アミノ酸残基配列（配列番号：10）の分析では、46個のアミノ酸残基のシグナルペプチド（MSLINKLNER ITPHVLTSIKNQDGDNADKSNLLTAFYTI FAGRLSN）の存在が示されたが、それは、アスパラギンとグルタミン酸残基との間にある開裂部位を末端としていた。

【0123】

試験した4種のM.カタラーリス株（表2）について、オリゴヌクレオチド・プライマーD

50

MAR592及びDMAR593を用いてPCR増幅を行なったところ、BVH-MC3遺伝子の存在が示された。BVH-MC3遺伝子のPCR増幅には、実験1に記載の方法と同様の方法を用いた。これらオリゴヌクレオチド・プライマーを用いた同様のPCR増幅を、コントロール大腸菌DNAについて行なったが、上記のような産物は検出されなかった。

(例3)

【0124】

BVH-MC4遺伝子とそれに対応するポリペプチドのクローニング及び分子特性を、以下実施例で説明する。

【0125】

M.カタラーリスのBVH-MC4(配列番号:11)遺伝子のコード領域を、PCR法(カリフォルニア州サンノゼ、パーキンエルマー社、DNA熱サイクル遺伝子増幅PCRシステム)により、M.カタラーリス株のETSUC-2のゲノムDNAから増幅し、そのPCRにあたって、制限部位NdeI(CATATG)及びXhoI(CTCGAG)の付加によって伸張した塩基を含む下記オリゴ:表1に記載のR10S71及びR10S72を用いた。BVH-MC4の発現ベクターへのクローニングとその解読には、実験1に記載の方法と同様の方法を用いた。

【0126】

BVH-MC4をコードするオープン・リーディング・フレーム(ORF)は1251 bpを含み、予想pI4.84と予想分子量46125.11Daを有するアミノ酸残基416個のポリペプチドをコードすることが分かった。スプキャン・ソフトウェア(ウイスコンシン配列分析パッケージ; ジェネティックス・コンピューター・グループ)を用いた予想アミノ酸残基配列(配列番号:12)の分析では、42個のアミノ酸残基のシグナルペプチド(MDTKHIQQNWLLPDGVADVLFDTDAKQKQESLRDALLFVLTAG)の存在が示されたが、それは、グリシンとチロシン残基との間にある開裂部位を末端としていた。

【0127】

試験した4種のM.カタラーリス株(表2)について、オリゴヌクレオチド・プライマーR10S71及びR10S72を用いてPCR増幅を行なったところ、BVH-MC4遺伝子の存在が示された。BVH-MC4遺伝子のPCR増幅には、実験1に記載の方法と同様の方法を用いた。これらオリゴヌクレオチド・プライマーを用いた同様のPCR増幅を、コントロール大腸菌DNAについて行なったが、上記のような産物は検出されなかった。

(例4)

【0128】

BVH-MC5遺伝子とそれに対応するポリペプチドのクローニングと分子特性を、以下実施例で説明する。

【0129】

M.カタラーリスのBVH-MC5(配列番号:13)遺伝子のコード領域を、PCR法(カリフォルニア州サンノゼ、パーキンエルマー社、DNA熱サイクル遺伝子増幅PCRシステム)により、M.カタラーリス株のETSUC-2のゲノムDNAから増幅し、そのPCRにあたって、制限部位NdeI(CATATG)及びXhoI(CTCGAG)の付加によって伸張した塩基を含む下記オリゴ:表1に記載のR10S59及びR10S60を用いた。BVH-MC5の発現ベクターへのクローニングとその解読には、実験1に記載の方法と同様の方法を用いた。

【0130】

BVH-MC5をコードするオープン・リーディング・フレーム(ORF)は639 bpを含み、予想pI7.45と予想分子量24020.08Daを有するアミノ酸残基212個のポリペプチドをコードすることが分かった。スプキャン・ソフトウェア(ウイスコンシン配列分析パッケージ; ジェネティックス・コンピューター・グループ)を用いた予想アミノ酸残基配列(配列番号:14)の分析では、60個のアミノ酸残基のシグナルペプチド(MNNFVYQLQSFYELNQNVRHTIAQSPKYIQLTVLGLIVMIGIFGWLLAILPTIQKLNA)の存在が示されたが、それは、アラニン残基2つとの間にある開裂部位を末端としていた。

10

20

30

40

50

【 0 1 3 1 】

4種のM.カタラーリス株（表2）について、オリゴヌクレオチド・プライマーR10S59及びR10S60を用いてPCR増幅を行なったところ、BVH-MC5遺伝子の存在が示された。BVH-MC5遺伝子のPCR増幅には、実験1に記載の方法と同様の方法を用いた。これらオリゴヌクレオチド・プライマーを用いた同様のPCR増幅を、コントロール大腸菌DNAについて行なったが、上記のような産物は検出されなかった。

（例5）

【 0 1 3 2 】

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

10

【 0 1 3 3 】

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

【 0 1 3 4 】

BVH-MC2（配列番号：1）、BVH-MC3（配列番号：9）、BVH-MC4（配列番号：11）及びBVH-MC5（配列番号：13）遺伝子の、リーダーペプチド部位を有さないコード領域を、PCR法（カリフォルニア州サンノゼ、パーキンエルマー社、DNA熱サイクル遺伝子増幅PCRシステム）によりM.カタラーリス株のETSUC-2のゲノムDNAから増幅し、そのPCRにあたって、表1に記載の制限部位BamHI（GGATCC）及びBglIII（AGATCT）、SalI（GTCGAC）、又はHindIII（AAGCTT）の付加によって伸張した塩基を含むオリゴヌクレオチド・プライマーを用いた。PCR産物は、QIAgen社のQIAquickゲル抽出キット（カリフォルニア、チャットワース）を用いてアガロースゲルから精製し、制限酵素（カナダ、ペー・ドゥルフェ、アマシャムファルマシアバイオテク社）により消化した。pCMVベクター（テキサス州、ダラス、テキサス大学、生化学部、ステファン・A・ジョンストン博士研究室）をBamHI、BglIII、SalI、又はHindIIIにより消化し、QIAgen社のQIAquickゲル抽出キット（カリフォルニア、チャットワース）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、CMVポリモーターの制御下で、hGH-BVH-MC2、hGH-BVH-MC3、hGH-BVH-MC4、及びhGH-BVH-MC5の融合ポリペプチドを生成できるように、消化したpCMV-GHベクターに連結させた。その連結産物を、シマニスの方法（ハナハン、D. DNAクローニング、1985年、D.M. グローバー出版、pp.109-135）に従って、大腸菌株 [80dlacZ M15 (lacZYA-argF)U169 endA1racA1 hsdR17 (R_K-m_K⁺)deoR thi-1 supE44 gyrA96 relA1]（メリーランド州、ゲーサーズバーグ、ギブコBRL）を形質転換させた。組換えpCMVプラスミドをQIAgenキット（カリフォルニア、チャットワース）を用いて精製し、DNA配列決定により、挿入物のDNAのヌクレオチド配列を確認した。

20

30

（例6）

【 0 1 3 5 】

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

40

【 0 1 3 6 】

雌のBALB/cマウス8匹（カナダ国ケベック州、セントコンスタント、チャールズリバー）のグループに、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）発現プラスミドpCMV-GH-GM-CSF（テキサス州、ダラス、テキサス大学、生化学部、ステファン・A・ジョンストン博士研究室）50µgの存在下に、BVH-MC2（配列番号：1）、BVH-MC3（配列番号：9）、BVH-MC4（配列番号：11）、及びBVH-MC5（配列番号：13）遺伝子をコードする組換えpCMV-GH50µgを、2~3週間の間隔をあけて100µl3回筋肉注射することにより、免疫性を与えた。コントロールとしては、マウスのグループに、pCMV-GH-GM-CSF50µgの存在下に、pCMV-GH50µgを注射した。各免疫注射の実施前と

50

三度目の注射の7日後に、眼窩洞から血液サンプルを採取して、対応するHis標識ラベルを付したM.カタラーリス組換えポリペプチドを皮膜抗原として用いて、ELISA法により、血清の抗体反応を調べた。これらHis標識ラベルを付したM.カタラーリス組換えポリペプチドの生成及び精製法については、実験7に示す。

(例7)

【0137】

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

【0138】

BVH-MC2 (配列番号: 1)、BVH-MC3 (配列番号: 9)、BVH-MC4 (配列番号: 11)、及びBVH-MC5 (配列番号: 13) 遺伝子を組込んだ組換えpET21b(+)を用いて、電気穿孔法(カナダ国ミシサーガ、バイオラッド研究室、ジェーンパルサーIIアパレイタス)により、大腸菌株AD494 (DE3) [ara-leu7697 lacX74 phoA PvuII phoR malF3 F' [lac⁺(lacI^q)pro] trxB::Kan(DE3)] (Wisconsin州マディソン、ノヴァゲン) を形質転換させた。大腸菌のこの菌株において、組換えポリペプチドの発現を制御するT7プロモーターは、イソプロピル-β-D-チオ-ガラクトピラノシド (IPTG) によって誘導が可能であるラクトース・プロモーターの制御下にある遺伝子であるT7RNAポリメラーゼ (DE3 プロファージ上に存在) によって特異的に認識される。形質転換細胞AD494 (DE3) / rpET21b(+) を、1mlにつき100 μgのカルベニシリン (カナダ国オークビル、シグマ-オールドリッチ・カナダ社) を含むLB培養液 (ペプトン10g/L、イースト菌抽出物5g/L、NaCl10g/L) 中で250rpmで攪拌しながら、A₆₀₀値が0.5になるまで、37

で培養した。His標識を付したM.カタラーリス組換えポリペプチドの生成を促進するために、最終濃度1mMのIPTGと共に、細胞をさらに3時間インキュベートした。500ml培養液から誘導された細胞を遠心分離でペレット化して、-70 で凍結させた。

【0139】

His結合金属キレート樹脂に固定された2価のカチオン (Ni²⁺) へのHis標識配列 (連続する6個のヒスチジン残基) の結合特性に基づいたアフィニティー・クロマトグラフィーを用いて、IPTGに誘導されたAD494 (DE3) / rpET21b(+) の可溶性細胞質画分から、組換えポリペプチドの精製を行なった。大略すると、IPTGにより誘導された500mLの培養液から得られたペレット化した細胞を、PMSF1mL を含む溶解緩衝液 (20mLトリス、500mMNaCl、10mMイミダゾール、pH7.9) 中に再び懸濁させ、超音波処理して12000Xgで20分間遠心分離処理して、沈殿物を取り除いた。その上清をNi-NTAアガロースカラム (カナダ国オンタリオ、ミシサーガ、チャゲン) にかけた。His標識ラベルを付したM.カタラーリス組換えポリペプチドを、イミダゾール250mMと、NaCl500mMと、pH7.9のトリス20mLで溶出した。4

でPBSに対して透析して、サンプルから塩とイミダゾールを取り除いた。大腸菌の可溶部分から得られた組換えポリペプチド量は、MicroBCA (イリノイ州、ロックフォード、ピース) で測定した。

(例8)

【0140】

His標識M.カタラーリス組換えポリペプチドを、ヒト口蓋扁桃と、M.カタラーリス抗原調整物による免疫化後のマウスから採取した血清と反応させた場合のその反応性を、以下実施例で説明する。

【0141】

表3に示すように、ヒト口蓋扁桃内に存在する抗体を用いた免疫プロット法において、BVH-MC2、BVH-MC3、及びBVH-MC4のHis標識組換えポリペプチドの存在が認められた。このことは、ヒトは普通にM.カタラーリスと接触し、そのポリペプチドに特異的な抗体を作成することを示している。これらの特別なヒトの抗体は、M.カタラーリス感染の予防に關与するかもしれない。さらに、免疫プロット法から、M.カタラーリス抗原調整物によって免疫化されたマウスから採取され、マウスモデルにおいて著しく肺のクリアランスを促す膜ポリペプチドに富んだ血清も、BNH-MC2のHis標識組換えポリペプチドを認識する抗体を作成することが明らかになった。これらの結果は、このポリペプチドが、マウス

を感染から防御すべくM.カタラーリス抗原の調整物中に存在し、それにより、対応するBVH-MC 2 のHis標識組換えポリペプチドと反応する抗体が誘発されたことを示している。

【 0 1 4 2 】

【表 3】

ヒト口蓋扁桃と、M. カタラーリス抗原調整物による免疫化後のマウスから採集した血清との、免疫プロットの反応性

精製した 組換えポリペプチド I.D. ¹	見かけ上の分子量 (kDa) ²	免疫プロットの反応性	
		ヒト口蓋扁桃 ³	マウス血清 ⁴
<u>BVH-MC2</u>	50	+	-
<u>BVH-MC3</u>	70	+	+
<u>BVH-MC4</u>	40	+	-
<u>BVH-MC5</u>	20	-	-

10

¹免疫プロットは、実験例7に記載のように生成かつ精製されたHis標識組換えポリペプチドを用いて行なった。

20

² His標識組換えポリペプチドの分子量は、SDS-PAGE後に測定した。

³免疫プロットには、ヒト口蓋扁桃の原液を用いた。

⁴膜ポリペプチドに富むM.カタラーリス抗原調整物で免疫化した後にマウス血清を採取し、それをプールして1/500に希釈して免疫プロットを行なった。これらマウスは、M.カタラーリス感染から防御されたものである。

(例9)

【 0 1 4 3 】

30

M.カタラーリス株表面上のBVH-MC 2、BVH-MC 3、BVH-MC 4、及びBVH-MC 5ポリペプチドの抗体への接近の可能性を、以下実施例で説明する。

【 0 1 4 4 】

細菌を、37℃、8%二酸化炭素ガス中で、0.25%デキストロースを含む脳心臓輸液(BHI)培養液中で培養して、OD_{490nm}が0.650(～10⁸CFU/ml)となるようにした。その後、抗BVM-MC 2、抗BVM-MC 3、抗BVM-MC 4、抗BVM-MC 5、又はコントロール血清の希釈物を添加して細胞に結合させ、回転させながら4℃で2時間インキュベートした。サンプルをブロッキング緩衝液(2%ウシ血清アルブミン(BSA)含有リン酸緩衝生理食塩水(PBS))で4回洗浄し、その後、ブロッキング緩衝液で特異的に希釈したヤギ標識(FITC)-結合抗マウスIgG Fc(ガンマ)の断片1mlを加えた。さらに暗室中で回転させながら、室温で60分間インキュベートした後、サンプルをブロッキング緩衝液で4回洗浄し、4℃で18時間、0.25%ホルムアルデヒド含有PBS緩衝液で固定化した。細胞をPBS緩衝液で2回洗浄し、PBS緩衝液0.5ml中に再懸濁させた。細胞は、フローサイトメトリー(ベックマン・コールター社、Epics(登録商標)XL)で分析するまで、4℃の暗室に放置した。フローサイトメトリー分析から、BVM-MC 2、BVM-MC 3、BVM-MC 4、及びBVM-MC 5に特異的な抗体が、試験した同質の(ETSU C-2)(表4)M.カタラーリス株上の、それらに対応する表面エピトープを、効率的に認識することが明らかになった。分析されたモラクセラ細胞10000のうちの70%以上が、特定の血清中において存在する抗体によりラベル化されていることが示された。これら観察では、これらのポリペプチドが、抗体に認識され易い表面に接近可能であることが明確に示されている。抗M.カタラーリス抗体は、M.カタラーリス感

40

50

染の予防に重要な役割を果たすことが明らかになった。

【0145】

【表4】

M. カタラーリス株 ETSU C-2 の無傷の細胞表面における、BVH-MC2、BVH-MC3、BVH-MC

4、及び BVH-MC5 に特異的な抗体の結合評価

血清	蛍光指標 ²	ラベルを付した細胞% ³
<u>BVH-MC2</u> に特異的な血清プール ¹	3.6	72.8
<u>BVH-MC3</u> に特異的な血清プール	7.5	82.8
<u>BVH-MC4</u> に特異的な血清プール	10.9	92.4
<u>BVH-MC5</u> に特異的な血清プール	6.7	77.4
負のコントロール血清のプール ⁴	1	7.4
正のコントロール血清 ⁵	43.8	98.7

10

¹ 精製した組換えポリペプチド 20 μ g と QuilA アジュバント (カナダ国、ホーンビー、シーダーレーン・ラボラトリーズ社) 10 μ g の混合物を 2 週間毎に 5 回、マウスに皮下注射した。血清を 1/50 に希釈した。

20

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

³ 分析した 10,000 細胞のうちの、ラベルを付した細胞%を示す。

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

30

⁵ 検定には、精製された外膜ポリペプチド 20 μ g で免疫化されたマウスから得られた血清を 1/1000 に希釈して、正のコントロールとして用いた。

(例 10)

【0146】

抗 BVH-MC2 マウス血清の細菌活性を、以下実施例で説明する。

【0147】

細菌をチョコレート寒天プレートに載せ、8%二酸化炭素ガス中、37 °C で 18 時間、インキュベートした。その後、OD_{490nm} が 0.25 となるように溶菌緩衝液 (10% ハンクス平衡塩類溶液 (HBSS) 及び 1% カゼイン加水分解物、pH7.3) 中に細菌細胞を再懸濁させ、 8×10^4 CFU/ml に希釈した。細菌懸濁液 25 μ l と、熱で不活化した希釈試験用血清 50 μ l 及び HBSS 15 μ l とを混合して、攪拌 (200rpm) しながら 8% 二酸化炭素中、37 °C で 15 分間インキュベートすることにより、細菌検定を行なった。その後、ウサギの捕体成分含有血清を最終濃度が 10% となるように添加して、その混合物を攪拌 (200rpm) しながら 8% 二酸化炭素中 37 °C で、さらに 60 分間インキュベートした。インキュベート終了時に、チョコレート寒天プレートに検定混合物 10 μ l をのせ、生存細菌数を測定した。そのプレートを 8% 二酸化炭素中、37 °C で 18~24 時間インキュベートした。コントロールは、免疫化前のマウスとウサギ捕体から採取した熱不活化血清と共にインキュベートした細菌を含むものとした。

40

【0148】

溶菌の % は、下記数式を用いて算出した。

50

【 0 1 4 9 】

【 数 1 】

$$100 - \left[\frac{A}{B} \times 100 \right]$$

A:細菌を免疫血清と共にインキュベートした場合のCFU

B:出血前の血清と共にインキュベートした場合のCFU

10

【 0 1 5 0 】

M. カタラーリス株 E T S U 658を用いて、血清の細菌活性を検定した。精製した組換えBVH-MC2ポリペプチド(配列番号:2)による免疫化の後に採取したマウス血清の溶菌のパーセンテージは、71.3であった(表5)。

【 0 1 5 1 】

【 表 5 】

抗BVH-MC2マウス血清の細菌活性評価

血清	細菌濃度	溶菌%
BVH-MC2に特異的な血清プール ¹	1/35	71.3
正のコントロール血清 ²	1/35	92.7

20

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

30

²検定には、精製された外膜ポリペプチド20μgで免疫化されたマウスから得られた血清を1/35に希釈して、正のコントロールとして用いた。

(例11)

【 0 1 5 2 】

抗BVH-MC3マウス血清の細菌活性を、以下実施例で説明する。

【 0 1 5 3 】

細菌をチョコレート寒天プレートに載せ、8%二酸化炭素ガス中で、37℃で18時間、インキュベートした。その後、OD_{490nm}が0.25となるように溶菌緩衝液(10%ハックス平衡塩類溶液(HBSS)及び1%カゼイン加水分解物、pH7.3)中に細菌細胞を再懸濁させ、8×10⁴CFU/mlに希釈した。細菌懸濁液25μlと、熱で不活化した希釈試験用血清50μl及びHBSS15μlとを混合して、攪拌(200rpm)しながら8%二酸化炭素中、37℃で15分間インキュベートして、細菌検定法を行なった。その後、ウサギの捕体成分含有血清を最終濃度が10%となるように添加して、その混合物を攪拌(200rpm)しながら8%二酸化炭素中、37℃でさらに60分間インキュベートした。インキュベートの終了時に、チョコレート寒天プレートに検定混合物10μlをのせ、生存細菌数を測定した。そのプレートを8%二酸化炭素中、37℃で18~24時間インキュベートした。コントロールは、免疫化前のマウスとウサギ捕体から採取した熱不活化血清と共にインキュベートした細菌を含むものとした。M. カタラーリス株 E T S U 658を用いて、血清の細菌活性を検定した。溶菌の%は、下記数式を

40

50

用いて算出した。

【 0 1 5 4 】

【 数 2 】

$$100 - \left[\frac{A}{B} \times 100 \right]$$

A:細菌を免疫血清と共にインキュベートした場合の CFU

B:出血前の血清と共にインキュベートした場合の CFU

10

【 0 1 5 5 】

精製した組換え B V H - M C 3 ポリペプチドで免疫化したマウス 7 匹から採取した血清中には、細菌性抗体が存在することが分かった (表 6)。コントロールのマウスから採取した血清中では、細菌活性は示されなかった (該当データなし)。

【 0 1 5 6 】

【 表 6 】

抗 BVM-MC3 マウス血清の細菌活性評価

20

血清 ¹	溶菌%
S1 ²	33.3
S2	67.9
S3	89.6
S4	66.2
S5	78.0
S6	90.1
S7	37.1
正のコントロール血清	77.3

30

¹精製した組換えポリペプチド 20 μg と QuilA アジュバント (カナダ国、ホーンビー、シーダーレーン・ラボラトリーズ社) 10 μg の混合物を、2 週間毎に 5 回、マウス S1~S7 に皮下注射した。

²BVM-MC3 で免疫化されたマウスから採取した各マウス血清は、1/50 に希釈した。

³検定には、精製された外膜ポリペプチド 20 μg で免疫化されたマウスから得た血清を 1/50 に希釈して、正のコントロールとして用いた。

40

(例 1 2)

【 0 1 5 7 】

精製した組換え B V H - M C 3 ポリペプチドの免疫化により誘発された M. カタラーリス 感染に対するマウスの予防を、以下実施例で説明する。

【 0 1 5 8 】

雌の BALB/c マウス (チャールズリバー) のグループに、10% の QuilA アジュバント (カナダ国、ホーンビー、シーダーレーン・ラボラトリーズ社) の存在下で、アフィニティ

50

精製されたHis標識M.カタラーリス組換えBVH-MC3ポリペプチド20 µgを、2週間毎に5回、皮下に投与して免疫化するか、又は、コントロールとして、PBS中にQuilaアジュバントのみを投与した。血液サンプルは、それぞれ免疫化前の0、14、28、42、56日目と、5度目の注射から14日後(70日目)に、眼窩洞から採取した。1週間後、M.カタラーリス株ETSU658約 1×10^6 CFUを用いて、マウスに肺内疾患を患させた。M.カタラーリス疾患の接種材料をチョコレート寒天にのせ、CFUを測定して、疾患の投与量を確認した。マウスは、ペンタバルビタール・ナトリウム(Euthanyl(登録商標))の腹腔内投与により、感染後5時間で死亡した。無傷の肺を摘出して、組織ホモゲナイザーで均質化した。CFU測定用の連続希釈法により、肺ホモジェネートについて細菌クリアランスを測定した。クリアランス%は、下記数式を用いて算出した。

10

【0159】
【数3】

$$100 - \left[\frac{A}{B} \times 100 \right]$$

A: BVH-MC3ポリペプチドにより免疫化されたマウスについて得られたCFU

B: コントロールマウスについて得られたCFU

20

【0160】

表7に示すように、コントロールグループのマウスと比較して、BVH-MC3ポリペプチドで免疫化したマウスに関して、生存細菌数に54%の減少が見られた。このように、組換えBVH-MC3ポリペプチドによる免疫化は、マウスの肺から、M.カタラーリスの異種菌のクリアランスを急速に促進していた。

【0161】

【表7】

精製した組換え BVH-MC3ポリペプチドにより免疫化されたマウスによる、モラクセラカタラーリスの肺クリアランス

30

コントロール群からの 回収細菌数 (肺ホモジネートCFU/ml) ^a	<u>BVH-MC3</u> 群からの 回収細菌数 (肺ホモジネートCFU/ml) ^b	細菌クリアランス (%) ^c
$2.4 \times 10^5 \pm 1.9 \times 10^5$	$2.4 \times 10^5 \pm 1.9 \times 10^4$	54

^a マウス6匹の平均±標準偏差を示したものである。

^b マウス7匹の平均±標準偏差を示したものである。

^c マウスは細菌 1×10^6 により肺内部に疾患を負わせたものとし、生存細菌は、疾患の5時間後に肺から回収した。クリアランス%は、上記数式を用いて算出した。

40

【図面の簡単な説明】

【0162】

50

【図1】M.カタラーリス株 E T S U C - 2のBVH-MC2遺伝子のDNA配列を示したもの（配列番号：1）であり、前記配列の下線部は、リーダーペプチドのコード領域を示す。

【図2】M.カタラーリス株 E T S U C - 2のBVH-MC2ポリペプチドのアミノ酸配列を示したもの（配列番号：2）であり、下線部の配列は、30のアミノ酸残基のリーダーペプチドを示す。

【図3】M.カタラーリス株 E T S U 658のBVH-MC2遺伝子の部分DNA配列を示したものである（配列番号：3）。

【図4】M.カタラーリス株 E T S U 658のBVH-MC2ポリペプチドの部分アミノ酸配列を示したものである（配列番号：4）。

【図5】M.カタラーリス株 E T S U T 25のBVH-MC2遺伝子の部分DNA配列を示したものである（配列番号：5）。

【図6】M.カタラーリス株 E T S U T 25のBVH-MC2ポリペプチドの部分アミノ酸配列を示したものである（配列番号：6）。

【図7】M.カタラーリス株 E T S U M-12のBVH-MC2遺伝子の部分DNA配列を示したものである（配列番号：7）。

【図8】M.カタラーリス株 E T S U M-12のBVH-MC2ポリペプチドの部分アミノ酸配列を示したものである（配列番号：8）。

【図9】M.カタラーリス株 E T S U C - 2のBVH-MC3遺伝子のDNA配列を示したもの（配列番号：9）であり、前記配列の下線部は、リーダーペプチドのコード領域を示す。

【図10】M.カタラーリス株 E T S U C - 2のBVH-MC3ポリペプチドのアミノ酸配列を示したもの（配列番号：10）であり、下線部の配列は、46のアミノ酸残基のリーダーペプチドを示す。

【図11】M.カタラーリス株 E T S U C - 2のBVH-MC4遺伝子のDNA配列を示したもの（配列番号：11）であり、前記配列の下線部は、リーダーペプチドのコード領域を示す。

【図12】M.カタラーリス株 E T S U C - 2のBVH-MC4ポリペプチドのアミノ酸配列を示したもの（配列番号：12）であり、下線部の配列は、42のアミノ酸残基のリーダーペプチドを示す。

【図13】M.カタラーリス株 E T S U C - 2のBVH-MC5遺伝子のDNA配列を示したもの（配列番号：13）であり、前記配列の下線部は、リーダーペプチドのコード領域を示す。

【図14】M.カタラーリス株 E T S U C - 2のBVH-MC5ポリペプチドのアミノ酸配列を示したもの（配列番号：14）であり、下線部の配列は、60のアミノ酸残基のリーダーペプチドを示す。

【図15A】MacVector配列決定分析ソフトウェア（バージョン6.5）のプログラムClustal Wによる、M.カタラーリス株 E T S U C - 2、E T S U 658、E T S U T-25、及びM 12由来のBVH-MC2遺伝子の部分ヌクレオチド配列を比較したものであり、配列の下部に示す共通ラインにおいて、*と空欄のスペースはそれぞれ、配列間のヌクレオチドが同一な箇所と異なる箇所を示している。

【図15B】MacVector配列決定分析ソフトウェア（バージョン6.5）のプログラムClustal Wによる、M.カタラーリス株 E T S U C - 2、E T S U 658、E T S U T-25、及びM 12由来のBVH-MC2遺伝子の部分ヌクレオチド配列を比較したものであり、配列の下部に示す共通ラインにおいて、*と空欄のスペースはそれぞれ、配列間のヌクレオチドが同一な箇所と異なる箇所を示している。

【図15C】MacVector配列決定分析ソフトウェア（バージョン6.5）のプログラムClustal Wによる、M.カタラーリス株 E T S U C - 2、E T S U 658、E T S U T-25、及びM 12由来のBVH-MC2遺伝子の部分ヌクレオチド配列を比較したものであり、配列の下部に示す共通ラインにおいて、*と空欄のスペースはそれぞれ、配列間のヌクレオチドが同一な箇所と異なる箇所を示している。

【図16】MacVector配列決定分析ソフトウェア（バージョン6.5）のプログラムClustal Wによる、M.カタラーリス株 E T S U C - 2、E T S U 658、E T S U T-25、及びM 12由来のBVH-MC2遺伝子のオープン・リーディング・フレームの一部の予想アミノ酸配列を

10

20

30

40

50

比較したものであり、配列の下部に示す共通ラインにおいて、*の印はそれぞれ、アミノ酸が同一であることを示している。

【 図 1 】

(配列番号1)

1 ATGGACACTG ACATGAACA TTAAAGAAA CAGCGCTAT CAGCTGCCAT
51 CATTGCGGTT TTATATATCA TTAGCCGATC AGTGAAGCA AATAGACAC
101 ACCATCACAC GCTAACCACT AGCGAGCTTA AACTTGGTGA TGATAGTATT
151 ATTGATAGTA TCAATCAATT GGGTGAAGCTG ACCGTCATA TTCCAATATC
201 ACAAATTTTT CAAACCAACA ACCGTGTGAG CCGTCTTTTT ACCCATATAC
251 ATGACCTGCC TATTTGCGAT ATCAGCTGTG ATTTAAATGC AGGCTACAGC
301 TATGACCATC AGGTAGCAA ATCAGCGACG CCTAACATGG TTGCAACCAT
351 GCTACCCCAA GGAACCTGACA GCCTTCTGTA AGATGAGTGT GTTGTGCCA
401 AAGAGCGTCT TGCCATTGAT TTATCAAGTA CACCAATAAA GGAATACCTT
451 ACPTTATCAT TAAGAGCTTT GTCTGATCAA TCATATATTA ATCAAGCCGC
501 CGATTTAATG GTGATGCTG TCACCTAACG TGCTTTTGAAT GATAAGACTC
551 TACAACGCCA CAAAATCTAG CTCATCAACA GTTTAAACA AAAAAAGCAA
601 AACCTTATC ATGTAGCTTC TGTCTCTTAT CATCAAGCCG TATATGAAAA
651 TCATCTTAT GCACAGCAA CCAACAGCGA TGAAGATGAT ATTGCCAAAA
701 TTGATCGTGA TGAGCTGCTT AATTTTGGC ATACTTTTAT TAATGCAAAAT
751 AATGCGACAC TGGTGAATAC AGGTGATATG ACCGCGGAGC AAGCCAAATC
801 ACTGCCAAC CATCTGACCG CCAATATCAC GACGAGCAAG TCGTATAAAA
851 ATACCTTGA TTATGACAAA CCAAGTATAGG CTCGTCTTAT CCAATATTCT
901 CACAACAGTA GTCAACACCA AATCATCATC GGTCTATCCA CCAATAAAGT
951 ACGCACGGAC AAAGCAGGTC GTCAAGAGTTC CAGCGATTTT TCATTAGGTA
1001 ATGAATTTTT GGCAGSTGGT GATTTTATAG CACAGATTAT GAAACCAATT
1051 CGAGAGCAAA AAGCCTATAC TTATGGCATT TATCCCGSTA TGGAAACCGT
1101 CAGAGCAGGT GGTATATTAT TGGTGTGAMT TTCACCCGAT GGGGATAAAG
1151 CAGCCGATGC CATTTTAGAG ACCGTCACACA TCATTAATGA GTCGCTGAAT
1201 GAAGCATATA CCAAGAGAA GCTTAGGTTG GTCGCTTGGC GCAATAAAAA
1251 TGGTTTGGC AATATTTTTT CAAGAGATGC CAGTATCATC CGTGTATG
1301 GTGCTTTATT TGTTCGGCAT TATCCAAAAG ATCACTTAA CCATAGCCTC
1351 AATCGCTTGG AATAATGCCA GATAAATAGT GTTAATACCG CACTGAACTT
1401 CCGTATCAAG CCTGATGAA TTATCATCATC CACCSTGGGT AAAACTAAGC
1451 CAAATTTGGA CAATAA

【 図 2 】

(配列番号2)

1 MDDMKHLTK HRLSAAIIGV LRFISEVQA NTHHHWTLFS SELKLADDSI
51 IDSINQLGEL FVAIPIYQFF QTNVGVVAF TFLHELPTVD TSLYFNAGSA
101 YDHLVKSQT ANNVATMLQI QPDSISEDF VAAKERLIGD FTSTANKNDL
151 TLSLRLSDQ SLNQAADLM VDAVTPAFD DKTLQRKNQK LITSLKQKQK
201 NPYHVASVAY HQAVYEHYH AHATTGDEDS IAKIDRDELL NFWHTFINAN
251 NKTIVTQDM TQQAQKLAN HLFAKLPTK SYRWLDELTK FVKAHHLIF
301 HNSSQTQIII GHPTSKVRTD KAGROEFSDF SLGNLILAGG DFNARLMTKI
351 REQKGYTYGI YGGMERLRAG GNYVVEFSD GDRAADALLE TLHINESLN
401 EGITQBELEL VRLGNKNGFA NIFSSNASTH RVJGALPVAD YPKDHLNHL
451 NRLDNTINS VNTALNLRK DFEFIIITVG KTKPDLK*

【 図 3 】

(配列番号3)

1 GAGCTTAAAC TTGCTGATGA TAGTATTATT GATAGTATCA ATCAATTGGG
51 TGAGCTGACC GTCANTATTC CAAATACACA ATATTTTCAA ACCACAACG
101 GTGTGAGCGT TGCTTTTACG CCAATACATG AGCTGCCTAT TGTCGATATC
151 AGCTGTGPTT TTAATGCAGG GTCAGCTAT GACCATCAGG TTGCAAAIC
201 AGGCACGGCT AACATGGTGT CAACCATGCT CACCACAGGA ACTGACAGCC
251 TTTCTGAAGA TGAGTTTGTG GTCGCCAAG AGCTCTTGG CATTGATTTT
301 ACCAGTACAG CAAATAAGGA TAACCTAECT TTATCATTRA GAAGCTTGTG
351 TGATCATCA TTAATAAATC AAGCCCGCA TTAATGGTC GATGCTCTCA
401 CTCACCTGC TTTTGTGAT AAGCTCTAC AAGCAACAA AATCAGCTC
451 ATCACCAGTT TAAACAAA AAAGCAAAAC CCTTATCATG TAGCTTCTGT
501 TGCTTATCAT CAAGCGTAT ATGAAAATCA TCCTTATGCA CAGCAACCA
551 CAGGATGTA AGTATGPTT GCCAAATGG ATCTGTATGA GCTGCTTAT
601 TTTTGGCATA CTTTATTRA TCCAATAAT GCGACCTGG TGATACAGG
651 TGATATGACC GCGAGCAAG CCAATCACT TGCCAACCAT CTGACCGCCA
701 AATTACCGAC AGCAGCTG TATAAATA CCGTGGATTT GACAAAACCA
751 GTTAGCTTC GCCATGCA TATCTCTAC AAGCATGTC AAGCCAAAT
801 CATCATGGT CACCCACCA GTAAGTATG CAGGACAAA GGAGTCTG
851 AAGAGTTCAG CGATTTTCA TTAGTATG AAATTTGGC AGTGTGTAT
901 TTTAATGCCA GATTGATGAA AACCATTCGA GAGCAAAAAG GCTACCTTA
951 TGGATTTAT GCGGTATGG AAGCTCTAG AGCATGCT AATATGSG
1001 TTGATTTTC AACCGTGC GATAAAGCA CCGATCCAT TTTAGAGAG
1051 CTCACATCA TTAATGATC GCTGATGAA GGCTAACCC AAGAGAGCT
1101 TGAATGGTG CGTTTGGTA ATAAAATGG TTTTGGCAAT ATTTTTCAA
1151 GCAATGCGA TATTCATCT GTCATGCTG CTTTATGCT TCCGATAT
1201 CAAAAGATC ATCTAACCA TAGCTCAAT CCGTGGATA ATGCCAGCT
1251 AAATAGTGT AATACCGAC TGAATGCG TATCAAGCT GATGAATTT

【 図 4 】

(配列番号4)

1 ELKLDSDSI DSINQLGELT VNIPTQYFQ TNNGVSVAF FLHELPIVDI
51 ELYFRAGAY DHVQKQSTA NNVATMLQC TDSLESEFV AAKERLIGD
101 NSTANKNDL LSLRLSDQS LLNQADLMV DAVTQPAFDD KTLQRKNQL
151 ITSLSKQKQN PYHVASVAY QAVYENHPYA HATTGDEDSI AKIDRELLN
201 FWHFTINANN ATLVITGDMT AEQAASLANH LTKLPTGKS YKNTLIDLTKP
251 VKAHHLIHP NSSQTQILI GHPKSVRTDK ASQDFSDFS LGNELLAGD
301 FNRRLMKTIR EQKGYTYVI GGMERLRAG GNYVVEFSD GDRAADALLE
151 LHINESLNE GITQBELEL VRLGNKNGFA NIFSSNASTH RVJGALPVAD
401 PKDHLNHLN RLNDANTINSV NTAALNRKPK DEF

【 図 5 】

(配列番号5)

```

1 GAGCTTAAAC TTGCTGATGA TAGTATTATT GATGATATCA ATCAATTGGG
51 TGAGCTGACC GTCAATATTG CAATATACCA ATATTTTCAA ACCCAACAAG
101 GTGTGAGCGT TGCCTTTACG CCATATCATG AGCTGCCATC TTGCGATATC
151 AGCTTGTATT TTAATGTCAGG GTACAGCGATT GACCACTAGG TTGGCAATTC
201 AGGCAGCGCT AACATGTTGTG CACACATGCT CACCCAAAGG ACTGACAGCC
251 TTTTCTGAAG TGAAGTTTGTG GTCTCCAAAG AGCTGCTTGG CATGTGATTT
301 ACCAGTACAG CAATTAAGGA TAACTTAACT TTATCATTTA GAAGCTTGTG
351 TGATCAATCA TTAATTAATC AAGCCGCGCA TTTAATGTCT GATCGTGTCA
401 CTCACACTGC TTTTGTATGAT AAGACTTACG AACGCAACAA AAATCAGCTC
451 ATCCACGCTG TAAACAARA AAAGCAAAAC CTTTATCATG TAGCTTCTGT
501 TGCCTATCAT CAGCCGCTAT ATGAAAATCA TCCCTATGCA CAGCGAACCA
551 CAGCGGATGA AGATAGTATT TCCAAAATGG ATCGTATGTA GCTGCTTAAAT
601 TTTTGGCATA CTTTATTATA TGCAAAATAT GCGACACTGG TGAATACAGG
651 TGATGAGCC GCGGAGCAG CCBAATATCT TSCCAACCAT CTGACGGCCA
701 AATTACCAGC AGGCAGTCT TATAAAATA CCGTGTGATT GACCAAAACCA
751 GTTAAAGCTC GCCATATCCA TATCTCTCAC AACAGTATCT AAACCAAAAT
801 CATCATCGGT CACCCACCCA GTAAAGTAGC CAGGCAAAA CAGAGTCTGT
851 AAGAGTTGCG CGATTTTCCA TTAGTATATC AAATTTTGGC AGGTGTGAT
901 TTTAATGCCA GATTGATGAA AACCAATGCA GAGCAAAAAG CTTACACTTA
951 TGCCATTATG GCGGCTATGG ACCGCTCAG ACCAGCTGGT AATTAATGTT
1001 TTGAATTTTC AACCGATGGC GATTAAGAGC CCGATGCCAT TTTAGAGAGC
1051 CTCACACTCA TTAATGATCT GCTATATGAA GGCATPACCT AAGAAGAGCT
1101 TGAGTTGGTG CGTTGGSCA ATAAAATGG TTTTGCCTAA ATTTTTCCTA
1151 GCAATGCCAG TATTCATCGT GTCAATGTGT CTTTATTTGT TGCCGATPAT
1201 CCAAAAGATC ATCTTAACCA TAGCTTGGTA ATGCCACGAT
1251 AATAAGTGT AATACGCGAC TGACTTGGC TATCAAGCTT GATGAATTT

```

【 図 7 】

(配列番号7)

```

1 GAGCTTAAAC TTGCTGATGA TAGTATTATT GATGATATCA ATCAATTGGG
51 TGAGCTGACC GTCAATATTG CAATATACCA ATATTTTCAA ACCCAACAAG
101 GGTGAGCGGT TGCCTTTACG CCATATCATG AGCTGCCATC TTGCGATATC
151 AGCTTGTATT TTAATGTCAGG GTACAGCGATT GACCACTAGG TTGGCAATTC
201 AGGCAGCGCT AACATGTTGTG CACACATGCT CACCCAAAGG ACTGACAGCC
251 TTTTCTGAAG TGAAGTTTGTG GTCTCCAAAG AGCTGCTTGG CATGTGATTT
301 ACCAGTACAG CAATTAAGGA TAACTTAACT TTATCATTTA GAAGCTTGTG
351 TGATCAATCA TTAATTAATC AAGCCGCGCA TTTAATGTCT GATCGTGTCA
401 CTCACACTGC TTTTGTATGAT AAGACTTACG AACGCAACAA AAATCAGCTC
451 ATCCACGCTG TAAACAARA AAAGCAAAAC CTTTATCATG TAGCTTCTGT
501 TGCCTATCAT CAGCCGCTAT ATGAAAATCA TCCCTATGCA CAGCGAACCA
551 CAGCGGATGA AGATAGTATT TCCAAAATGG ATCGTATGTA GCTGCTTAAAT
601 TTTTGGCATA CTTTATTATA TGCAAAATAT GCGACACTGG TGAATACAGG
651 TGATGAGCC GCGGAGCAG CCBAATATCT TSCCAACCAT CTGACGGCCA
701 AATTACCAGC AGGCAGTCT TATAAAATA CCGTGTGATT GACCAAAACCA
751 GTTAAAGCTC GCCATATCCA TATCTCTCAC AACAGTATCT AAACCAAAAT
801 CATCATCGGT CACCCACCCA GTAAAGTAGC CAGGCAAAA CAGAGTCTGT
851 AAGAGTTGCG CGATTTTCCA TTAGTATATC AAATTTTGGC AGGTGTGAT
901 TTTAATGCCA GATTGATGAA AACCAATGCA GAGCAAAAAG CTTACACTTA
951 TGCCATTATG GCGGCTATGG ACCGCTCAG ACCAGCTGGT AATTAATGTT
1001 TTGAATTTTC AACCGATGGC GATTAAGAGC CCGATGCCAT TTTAGAGAGC
1051 CTCACACTCA TTAATGATCT GCTATATGAA GGCATPACCT AAGAAGAGCT
1101 TGAGTTGGTG CGTTGGSCA ATAAAATGG TTTTGCCTAA ATTTTTCCTA
1151 GCAATGCCAG TATTCATCGT GTCAATGTGT CTTTATTTGT TGCCGATPAT
1201 CCAAAAGATC ATCTTAACCA TAGCTTGGTA ATGCCACGAT
1251 AATAAGTGT AATACGCGAC TGACTTGGC TATCAAGCTT GATGAATTT

```

【 図 6 】

(配列番号6)

```

1 ELKLLADDSII DSIHQIGELT VNIPIWYQFO TNNVSVAFPT PLHELPIVDI
51 SLYFNAGSAY DHQVKGSGTA NMVATMTGCG TDSLSEDEFV AAKERLIGDF
101 TSTANKNDLT LSLRSLSDQS LMQAADMV DAVTQPAFDD KTLQRNKQL
151 IYSLKQKQN PWHVASVYH QAVYENHPYA HATTGDEDSI AKIDRDELLN
201 FWHFTHANB ATVITGSDAT AGRKSLAHN LPAKLPFGKS FKNLIDLEFP
251 VKARHIIHPH NSSQTOIIG HPTSKVTRTK AGRFESDFDS LGNEILLGSD
301 FNRMLKTRH EQGTYTYGI GEMERLRAG NYVVEFSTG DKAAALLET
351 LHILNESLNE GITQELELV RLGNKNGFAN IFFSNASIRH VIGALFVADY
401 PKDHLNHTLN RLDNATINSV NYALNLRKFP DEF

```

【 図 8 】

(配列番号8)

```

1 ELKLLADDSII DSIHQIGELT VNIPIWYQFO TNNVSVAFPT PLHELPIVDI
51 SLYFNAGSAY DHQVKGSGTA NMVATMTGCG TDSLSEDEFV AAKERLIGDF
101 TSTANKNDLT LSLRSLSDQS LMQAADMV DAVTQPAFDD KTLQRNKQL
151 IYSLKQKQN PWHVASVYH QAVYENHPYA HATTGDEDSI AKIDRDELLN
201 FWHFTHANB ATVITGSDAT AGRKSLAHN LPAKLPFGKS FKNLIDLEFP
251 VKARHIIHPH NSSQTOIIG HPTSKVTRTK AGRFESDFDS LGNEILLGSD
301 FNRMLKTRH EQGTYTYGI GEMERLRAG NYVVEFSTG DKAAALLET
351 LHILNESLNE GITQELELV RLGNKNGFAN IFFSNASIRH VIGALFVADY
401 PKDHLNHTLN RLDNATINSV NYALNLRKFP DEF

```

【 図 9 】

(配列番号9)

```

1 ATGATACAAA AACACATTCA GCAAAATGG CTTCACCTG ATGCTGTGCG
51 ATGATACAAA AACACATTCA GCAAAATGG CTTCACCTG ATGCTGTGCG
101 CCGCATTTTA TACATTTTTT GCAGGAGCGT TGAAGTAAAG AGATGTGTAT
151 CAGCGTCCCA ATGCTTTGCC TGAATATGAG CTTGACCATG GGCATCATCT
201 CCAACTTTTC AAATTTATCG ATCAGCTCAA TGCGTGTG ATGGGTTTGC
251 GTGCGGATAT TACGCCACCA ATTTACCGCA TTGATACGAA ATATGTGTCA
301 CGCACGCCAA TCGCAACCGC AGCAGCTTGT GCTTTGGCAC GCATTAAGGA
351 GCAAGCAGGT GCATTAATCT TACCCTCTTT TATCTGACT CAATGGCTTA
401 AAGAGAAAAA CCGTTGCCA ACTTGGCCOC ATACTTTTAT CCGCAGAGGG
451 TTAATGTCGA TTTTATGAT GCTATATGAA GGCATPACCT AAGAAGAGCT
501 TGCTTTGTG AAGAGCCTG TCAAAACCAAG TCGTGTGACA GAACCACTTC
551 ATCCAGCTGC GGTACACACC CAGTCAAAA CACCAACTCC CCGACATTAC
601 GAAAACAAG AAAAAGCCTC TTTCTTAAA ACCGATTTAC CGATTTATGG
651 ATGTATTATT TTTGAGGCT TGCAGTGCCT TTTGTAGA GCATGTCAAG
701 ACAAAACCAAC ACCTGTGTG GCACTGTGTC GCGACATGAC AGCAGCTGTG
751 GTAGCGGATA ATGCTGTGCA GCGCAGCCCA ACACAACAGC GTGTGCCCCA
801 AGCAGCTGCA ACCCTTACCT TGTCTGTGTA TGAACAGGCT CAGAGCTGTG
851 ACTGCGACCG TGCCTAGACT GATGATGAAG AGCTTGCAGG TCAATCTGCT
901 CGAGCTATTG CTCAGTCTT TGGCTACAA GATTTAACA TTCAAATATC
951 CAATGTACAT ACCGCTACCA TCGCCAGCGC AGAAATCTTA CCGACAAATTT
1001 TGGGTTTAT CATAGCTGTA CCAAAATCA CCGTGTGAT TCAATGATCA
1051 ACSTGACCT TTAATGCAAC CAGCCAGAA GATTPAGCAA AACTGTAGGA
1101 GGTGCTAAA AAATTTTCTC CCGCTGATT TACTGTAGA CAGAGAACTG
1151 AACTGTGAT TAAATCTGCG GTTCCGATA GTATTGAAC ACCGCGTGT
1201 GCTATTGTTG CTTTGGTGA TACCGTGA GAAATGAGA TGGATATTTT
1251 AATCAATGCA TTAATATACC AATATATCA CTTTCTTA CGAAAATTTA
1301 AARTTCCCA AGAAAATAAA GAAATCTGCG ATTTGCTGC CGAAAATTTA
1351 AAGCCAGTGC CTGAAACAC ATTTGCTGAT ATTGCTATA CAGACACTCA
1401 AGCCACACAT GGTATATAC AAGATTTATC AAGATCTGCT CCGCTGCTG
1451 TTAAGAGATA TTTGTATCA AAGGTGTG CTGCTGACG CTTGACACTC
1501 CAAGTGC AA GTTTGATTA TCCAGTGA TCAAATGCTA CCGAACAAGG
1551 TCGCTTCAA AACCGTCTGA TGAAGTTGT ACTTTTCCA GAAGTGAAG
1601 CAATACTCA AGTCCGCTAT CGTGAAGAT CACCAACCC TGTGCAAAA
1651 AACTCA

```

【 図 1 1 】

(配列番号11)

```

1 ATGATACAAA AACACATTCA GCAAAATGG CTTCACCTG ATGCTGTGCG
51 ATGATACAAA AACACATTCA GCAAAATGG CTTCACCTG ATGCTGTGCG
101 CCGCATTTTA TACATTTTTT GCAGGAGCGT TGAAGTAAAG AGATGTGTAT
151 ATAGAGTATA CCGAAGTCT GCTAATAT ATCTGACGAG ATCTTAAAGC
201 CCAACTTTTC AAATTTATCG ATCAGCTCAA TGCGTGTG ATGGGTTTGC
251 GTGCGGATAT TACGCCACCA ATTTACCGCA TTGATACGAA ATATGTGTCA
301 CGCACGCCAA TCGCAACCGC AGCAGCTTGT GCTTTGGCAC GCATTAAGGA
351 TGTCTGTGTT GCGCTGCTCA CAGCTTGTG ATGSGTGTCT GAGATTTTGC
401 GATGATGTA TATCGTGC GAGCTGTGAG TGAATGACT ATGGGCCCA
451 TTGGCAGATG AGATCGGACT AGCCGAGAG ATGCTACAT TGAATTTGG
501 TCAATGCTGT ATTTTGTGAT GCTTGTGCTA GPTGATGCG GTTCAAAATA
551 AAGATGCTGA TGCCTGAT GCGATTTACC ATAAAAGCG CATGCCAAA
601 CTTGCCAAAT GGTGCCAAA TATTTGCCAT AGCCTAACA GCGCAACGCA
651 TGCAACCGAT TTTTGTGAT TGCTAAGCA TACATTAAG CACTGTGCGA
701 CACCAATGCG CGAGCTTTA TTAAGTAAAC TGTCGATAA AGCTGCCAAA
751 GATTAATAAAA TCATCCAGC AGCAATGAG CTTGTACTT TGGCGGACA
801 TACTGAGGCG GTGCTATGA GTGTGATGA TGAATGACT GATTTGTGAG
851 GATATCATTA TCAATCTGG GTGTGATTA ATGCTATT TGGTAAATGA
901 ACCACACAGA CTCAGCTTT GTTACGAGG GGTGCTTTG ATGATATCTC
951 AACTCACAGC GTAGCAAGG GCGCACTGG TTTTACGAT GATATTAATC
1001 GTTCTGTGTA ATTTGTAGG ATCTGAGAG ATACTGTGAT TTTGTTGAT
1051 TACTGATGTT TACTGATGTT TACTGATGTT TACTGATGTT TACTGATGTT
1101 ACAATTAATA AACCTGCAAT CAGTGTGCT TATTGCTAT AGCCCTTTCA
1151 CTTGATGTA TAAGCTAAC CAGATGAGT GTGTTTGGTA TGGGACACG
1201 GATCAAGATA AGCCGATTT GCGGCTGCGA TTAGTTGTTG ATGAGTACTA
1251 A

```

【 図 1 0 】

(配列番号10)

```

1 MSLNKLNER ITHVLTSIK NODGDNADRS NLLTAFYTF AGRLESNEDVY
51 QRANALPDNE LEHGHLNLV AFSVDVSGED QIASLSNQLA DEYHVSPTVA
101 RTAATAAPL ALARIKBQAG ALSVSPSIRT QLAKEENRPL TWAHTLLPAG
151 LFATAATTA EPVTTASAVY KEVFKFSVVT EPVHPAAAT FVKTFAGHY
201 ERKESFPLK TTIPIGLLI FGLAWLLR ACQKTPVVA AVPATTPAV
251 VADNAVQADP TQTGVAQPA TLSLSVDETG QALYSHRAQV GSELAGHIR
301 AALAVQVQGO DLTIQNTNVH TATMBAEYL PAILGLMKGV PNSSVVIHDI
351 TVRFNATTHR DVAKLVEGAK NIIADPTVE ABPELDNTA VADSIETARV
401 AVALGDVVE ENMDELINA DLEPIDEK ELLDAAEKL
451 KAVPEFTLRI IGHDTQGTG EYHQDSESR AAVKEVLYS KGVAAERLNT
501 QGASFYFVA SNATEQGRFO NRIIEFLVQ EGEATLQVGH AEDAPTVAQ
551 N*

```

【 図 1 2 】

(配列番号12)

```

1 MDTKHIOONV LLPQVADVL FTDAQOESL EDALLEVTA HGVLVSPPL
51 IYVTHSLNWN ADEDLKRQTF KFDQLMGRH MGLRADITPO ILRIDSXKYG
101 GERVYCVQV WTLTLCPL GLTDLQLGA EFDIDDIRA HELLIDLAA
151 LADEILGRE MLHVIGHVA IFDRQLQHG VSKMADELI GIYHKKAMPE
201 LAKWQINON SLNSPSDAT FVLAKHTLS SDRTPNAEL LSKLSDKARQ
251 DNITQIABE LATLAHIRA VMSVSIQV ELSGHHYTC VVFNVLGNR
301 TTYQALVIG GRDSDISHS VARGAGSM DINGLEVE LEEPTVLYD
351 YHDLQADAD TKADLTQIK QLQSECHIV KPLVVDKPN QIDGVLRWD
401 DQKPIWAVR LVGD6*

```

【 図 1 3 】

(配列番号13)

```

1 ATGAATAATT TTSNGATCA GTCACAAAGT TTTGGGATG AGCTTAATCA
51 GTCACAAAGT CACACAAATG CTAATACACC CAAATATATA CAGCTAGCG
101 TACTAGGATT GATCGTATG ATCATGSCA TTTTGGTGC GCTACTTGG
151 ATTTAGCAGA GATCTCAA SGTAAASCA CCCCAGATC AAGATCTGC
201 CTAATATGAT TACTGCA TAAATATCA TAAAGCCAG CAGCTTACCC
251 ATCAAGCCA TCAGGCTATA CAAAATAA CACAATGTA AAATCAGCTC
301 AATGCTGTC CAGCCAGC ACGATGAGC ACGATATCG GAATGATAA
351 TACCAAGCA CAGCGGTA ATGCTAGGT GGTGATGCA TCGATCAAG
401 CAGCTGTA CAGCTGTA TACCAAGC TACCAAGC TACCAAGC
451 ACAGGGGATT ATCATGCTT GCGTGTGAG TTTACTAGT TGTCAAGC
501 TAACAGTTG CTGACAGTC ATGATTTGA TCTGAAGCT GTTTGAAAC
551 ATCAGCTGAT GATGATGCT CAGATGAAA CTTTCAAGC AAACAACCG
601 CCAAAACCG TTGCTAGCA GGTGCTGAT GTTCAATGA

```

【 図 1 4 】

(配列番号14)

1 MNPTFOLDS EYELANONR HTYASPKYI QVTLVGLUM IIGTRWLLA
 51 ILEPTKLNIA AQSEALID EPATKYRKA QPDLSHOVI QKNTOLENL
 101 NALPRTAFMS EILIMNTHA QAVNVQVSA SVQAGREMDI YTERPIAVSA
 151 TGDYHALGRW LELSEANHL LVVHDFDKA GLNQKQYQANR
 201 FKPVAAQVVD VQ*

【 図 1 5 A 】

ETSU C-2 1 GAGCTTAAACTTGCATGATAGTATTTAGTAGTATCAATCAATGGG 50
 ETSU 658 1 GAGCTTAAACTTGCATGATAGTATTTAGTAGTATCAATCAATGGG 50
 ETSU T-25 1 GAGCTTAAACTTGCATGATAGTATTTAGTAGTATCAATCAATGGG 50
 M-12 1 GAGCTTAAACTTGCATGATAGTATTTAGTAGTATCAATCAATGGG 50

ETSU C-2 51 TGAGCTGACCGTCAATATTCACAAATACACAATATTTCAAACCAACAAG 100
 ETSU 658 51 TGAGCTGACCGTCAATATTCACAAATACACAATATTTCAAACCAACAAG 100
 ETSU T-25 51 TGAGCTGACCGTCAATATTCACAAATACACAATATTTCAAACCAACAAG 100
 M-12 51 TGAGCTGACCGTCAATATTCACAAATACACAATATTTCAAACCAACAAG 100

ETSU C-2 101 GTGTGAGCGTGTCTTTTACGCCATTACATGAGCTGCCATTGTGCGATATC 150
 ETSU 658 101 GTGTGAGCGTGTCTTTTACGCCATTACATGAGCTGCCATTGTGCGATATC 150
 ETSU T-25 101 GTGTGAGCGTGTCTTTTACGCCATTACATGAGCTGCCATTGTGCGATATC 150
 M-12 101 GTGTGAGCGTGTCTTTTACGCCATTACATGAGCTGCCATTGTGCGATATC 150

ETSU C-2 151 AGCTTGTATTTTAAATGACAGGTCAGCGTATGACCATCAGGTGGCAATC 200
 ETSU 658 151 AGCTTGTATTTTAAATGACAGGTCAGCGTATGACCATCAGGTGGCAATC 200
 ETSU T-25 151 AGCTTGTATTTTAAATGACAGGTCAGCGTATGACCATCAGGTGGCAATC 200
 M-12 151 AGCTTGTATTTTAAATGACAGGTCAGCGTATGACCATCAGGTGGCAATC 200

【 図 1 5 B 】

(続き)

ETSU C-2 201 AGGCACGGCTAACATGGTTGCAACCATGCTACCCAAAGGAAGTACAGCC 250
 ETSU 658 201 AGGCACGGCTAACATGGTTGCAACCATGCTACCCAAAGGAAGTACAGCC 250
 ETSU T-25 201 AGGCACGGCTAACATGGTTGCAACCATGCTACCCAAAGGAAGTACAGCC 250
 M-12 201 AGGCACGGCTAACATGGTTGCAACCATGCTACCCAAAGGAAGTACAGCC 250

ETSU C-2 251 TTTCTGAAGATGAGTTTGTGCTGCCAAAGAGCGTCTTGGCATTGATTTT 300
 ETSU 658 251 TTTCTGAAGATGAGTTTGTGCTGCCAAAGAGCGTCTTGGCATTGATTTT 300
 ETSU T-25 251 TTTCTGAAGATGAGTTTGTGCTGCCAAAGAGCGTCTTGGCATTGATTTT 300
 M-12 251 TTTCTGAAGATGAGTTTGTGCTGCCAAAGAGCGTCTTGGCATTGATTTT 300

ETSU C-2 301 ACCAGTACAGCAAAATAGGATAAATTAACCTTATCATTAAGAAAGCTGTCC 350
 ETSU 658 301 ACCAGTACAGCAAAATAGGATAAATTAACCTTATCATTAAGAAAGCTGTCC 350
 ETSU T-25 301 ACCAGTACAGCAAAATAGGATAAATTAACCTTATCATTAAGAAAGCTGTCC 350
 M-12 301 ACCAGTACAGCAAAATAGGATAAATTAACCTTATCATTAAGAAAGCTGTCC 350

ETSU C-2 351 TGATCAATCATTATTAATCAAGCCCGGATTTAAATGGTGCATGCTGTCA 400
 ETSU 658 351 TGATCAATCATTATTAATCAAGCCCGGATTTAAATGGTGCATGCTGTCA 400
 ETSU T-25 351 TGATCAATCATTATTAATCAAGCCCGGATTTAAATGGTGCATGCTGTCA 400
 M-12 351 TGATCAATCATTATTAATCAAGCCCGGATTTAAATGGTGCATGCTGTCA 400

ETSU C-2 401 CTCACCTGCTTTTATGATAGACTCTACACGCAACAAAATCAGCTC 450
 ETSU 658 401 CTCACCTGCTTTTATGATAGACTCTACACGCAACAAAATCAGCTC 450
 ETSU T-25 401 CTCACCTGCTTTTATGATAGACTCTACACGCAACAAAATCAGCTC 450
 M-12 401 CTCACCTGCTTTTATGATAGACTCTACACGCAACAAAATCAGCTC 450

ETSU C-2 451 ATCCAGGTTTAAACAAAAGAAAGAAACCTTATCATGAGCTCTCTG 500
 ETSU 658 451 ATCCAGGTTTAAACAAAAGAAAGAAACCTTATCATGAGCTCTCTG 500
 ETSU T-25 451 ATCCAGGTTTAAACAAAAGAAAGAAACCTTATCATGAGCTCTCTG 500
 M-12 451 ATCCAGGTTTAAACAAAAGAAAGAAACCTTATCATGAGCTCTCTG 500

ETSU C-2 501 TGCATTATCATCAAGCCGTATATAAATATCATCTTATGACACGCAACCA 550
 ETSU 658 501 TGCATTATCATCAAGCCGTATATAAATATCATCTTATGACACGCAACCA 550
 ETSU T-25 501 TGCATTATCATCAAGCCGTATATAAATATCATCTTATGACACGCAACCA 550
 M-12 501 TGCATTATCATCAAGCCGTATATAAATATCATCTTATGACACGCAACCA 550

ETSU C-2 551 CAGCGGATGAAGTAGTATTGCCAAAATGATCGTGTGAGCTGCTTAA 600
 ETSU 658 551 CAGCGGATGAAGTAGTATTGCCAAAATGATCGTGTGAGCTGCTTAA 600
 ETSU T-25 551 CAGCGGATGAAGTAGTATTGCCAAAATGATCGTGTGAGCTGCTTAA 600
 M-12 551 CAGCGGATGAAGTAGTATTGCCAAAATGATCGTGTGAGCTGCTTAA 600

ETSU C-2 601 TTTTGGCATACTTTTATTAATGCAAAATGCGACACTGGTATTACAGG 650
 ETSU 658 601 TTTTGGCATACTTTTATTAATGCAAAATGCGACACTGGTATTACAGG 650
 ETSU T-25 601 TTTTGGCATACTTTTATTAATGCAAAATGCGACACTGGTATTACAGG 650
 M-12 601 TTTTGGCATACTTTTATTAATGCAAAATGCGACACTGGTATTACAGG 650

ETSU C-2 651 TGATATGACCGCGGACAGCAAAATCCTTGCACCAACTGACCGCCA 700
 ETSU 658 651 TGATATGACCGCGGACAGCAAAATCCTTGCACCAACTGACCGCCA 700
 ETSU T-25 651 TGATATGACCGCGGACAGCAAAATCCTTGCACCAACTGACCGCCA 700
 M-12 651 TGATATGACCGCGGACAGCAAAATCCTTGCACCAACTGACCGCCA 700

ETSU C-2 701 AATTACCAGCAGCGCAAGTCTATAAAAATACCGTGGATTGACAAAACCA 750
 ETSU 658 701 AATTACCAGCAGCGCAAGTCTATAAAAATACCGTGGATTGACAAAACCA 750
 ETSU T-25 701 AATTACCAGCAGCGCAAGTCTATAAAAATACCGTGGATTGACAAAACCA 750
 M-12 701 AATTACCAGCAGCGCAAGTCTATAAAAATACCGTGGATTGACAAAACCA 750

【 図 1 5 C 】

(続き)

ETSU C-2 751 GTTAAAGCTGTCATATCCATATTCCTCACACAGTAGTCAAACCCAAAT 800
 ETSU 658 751 GTTAAAGCTGTCATATCCATATTCCTCACACAGTAGTCAAACCCAAAT 800
 ETSU T-25 751 GTTAAAGCTGTCATATCCATATTCCTCACACAGTAGTCAAACCCAAAT 800
 M-12 751 GTTAAAGCTGTCATATCCATATTCCTCACACAGTAGTCAAACCCAAAT 800

ETSU C-2 801 CATCACTGGTCACTCCACAGTAAAGTACGACGCAAAAGCAGGTGCTC 850
 ETSU 658 801 CATCACTGGTCACTCCACAGTAAAGTACGACGCAAAAGCAGGTGCTC 850
 ETSU T-25 801 CATCACTGGTCACTCCACAGTAAAGTACGACGCAAAAGCAGGTGCTC 850
 M-12 801 CATCACTGGTCACTCCACAGTAAAGTACGACGCAAAAGCAGGTGCTC 850

ETSU C-2 851 AAGAGTTCAGCGATTTTTCATAGGTAATGAAATTTGGCAGGTGGTATG 900
 ETSU 658 851 AAGAGTTCAGCGATTTTTCATAGGTAATGAAATTTGGCAGGTGGTATG 900
 ETSU T-25 851 AAGAGTTCAGCGATTTTTCATAGGTAATGAAATTTGGCAGGTGGTATG 900
 M-12 851 AAGAGTTCAGCGATTTTTCATAGGTAATGAAATTTGGCAGGTGGTATG 900

ETSU C-2 901 TTTAAAGCCAGATTGATGAAAACCAATTCGAGAGCAAAAAGCTCACATTA 950
 ETSU 658 901 TTTAAAGCCAGATTGATGAAAACCAATTCGAGAGCAAAAAGCTCACATTA 950
 ETSU T-25 901 TTTAAAGCCAGATTGATGAAAACCAATTCGAGAGCAAAAAGCTCACATTA 950
 M-12 901 TTTAAAGCCAGATTGATGAAAACCAATTCGAGAGCAAAAAGCTCACATTA 950

ETSU C-2 951 TGGCATTATGCGGATTTGGAACGCCCTCAGACGAGGTGGTAAATATGTTGG 1000
 ETSU 658 951 TGGCATTATGCGGATTTGGAACGCCCTCAGACGAGGTGGTAAATATGTTGG 1000
 ETSU T-25 951 TGGCATTATGCGGATTTGGAACGCCCTCAGACGAGGTGGTAAATATGTTGG 1000
 M-12 951 TGGCATTATGCGGATTTGGAACGCCCTCAGACGAGGTGGTAAATATGTTGG 1000

ETSU C-2 1001 TTGAATTTTCAACCGATGCGGATAAAGCAGCGGATGCGCAATTTAGAGAGC 1050
 ETSU 658 1001 TTGAATTTTCAACCGATGCGGATAAAGCAGCGGATGCGCAATTTAGAGAGC 1050
 ETSU T-25 1001 TTGAATTTTCAACCGATGCGGATAAAGCAGCGGATGCGCAATTTAGAGAGC 1050
 M-12 1001 TTGAATTTTCAACCGATGCGGATAAAGCAGCGGATGCGCAATTTAGAGAGC 1050

ETSU C-2 1051 CTACACATCATTAATGAGTCTGTAATGAAAGGATAAACCAGAAGAGCT 1100
 ETSU 658 1051 CTACACATCATTAATGAGTCTGTAATGAAAGGATAAACCAGAAGAGCT 1100
 ETSU T-25 1051 CTACACATCATTAATGAGTCTGTAATGAAAGGATAAACCAGAAGAGCT 1100
 M-12 1051 CTACACATCATTAATGAGTCTGTAATGAAAGGATAAACCAGAAGAGCT 1100

ETSU C-2 1101 TGAGTGTGCGTTTGGGCAATAAAAATGGTTTGGCAATATTTTTTCAA 1150
 ETSU 658 1101 TGAGTGTGCGTTTGGGCAATAAAAATGGTTTGGCAATATTTTTTCAA 1150
 ETSU T-25 1101 TGAGTGTGCGTTTGGGCAATAAAAATGGTTTGGCAATATTTTTTCAA 1150
 M-12 1101 TGAGTGTGCGTTTGGGCAATAAAAATGGTTTGGCAATATTTTTTCAA 1150

ETSU C-2 1151 GCAATGCCAGTATTCATCGTGTATGGGCTTATTTGTTGCCGATAT 1200
 ETSU 658 1151 GCAATGCCAGTATTCATCGTGTATGGGCTTATTTGTTGCCGATAT 1200
 ETSU T-25 1151 GCAATGCCAGTATTCATCGTGTATGGGCTTATTTGTTGCCGATAT 1200
 M-12 1151 GCAATGCCAGTATTCATCGTGTATGGGCTTATTTGTTGCCGATAT 1200

ETSU C-2 1201 CCAAAGATCATCTTAAACCATAGCTCAATCGCTTGGATAATGCCACGAT 1250
 ETSU 658 1201 CCAAAGATCATCTTAAACCATAGCTCAATCGCTTGGATAATGCCACGAT 1250
 ETSU T-25 1201 CCAAAGATCATCTTAAACCATAGCTCAATCGCTTGGATAATGCCACGAT 1250
 M-12 1201 CCAAAGATCATCTTAAACCATAGCTCAATCGCTTGGATAATGCCACGAT 1250

ETSU C-2 1251 AAATAGTGTAAATACCGACTGAACCTGGCGTATCAAGCCGATGAATTT 1299
 ETSU 658 1251 AAATAGTGTAAATACCGACTGAACCTGGCGTATCAAGCCGATGAATTT 1299
 ETSU T-25 1251 AAATAGTGTAAATACCGACTGAACCTGGCGTATCAAGCCGATGAATTT 1299
 M-12 1251 AAATAGTGTAAATACCGACTGAACCTGGCGTATCAAGCCGATGAATTT 1299

【 図 1 6 】

ETSU C-2 1 ELKLADDSIIDSINQLGELTVNIPNTQYFTNNGVSVAFPHELEIVDI 50
 ETSU 658 1 ELKLADDSIIDSINQLGELTVNIPNTQYFTNNGVSVAFPHELEIVDI 50
 ETSU T-25 1 ELKLADDSIIDSINQLGELTVNIPNTQYFTNNGVSVAFPHELEIVDI 50
 M-12 1 ELKLADDSIIDSINQLGELTVNIPNTQYFTNNGVSVAFPHELEIVDI 50

ETSU C-2 51 SLVFNAGSYDHWQKSGTANMVMMLTQGTDSLSEDFVAAKERLIDF 100
 ETSU 658 51 SLVFNAGSYDHWQKSGTANMVMMLTQGTDSLSEDFVAAKERLIDF 100
 ETSU T-25 51 SLVFNAGSYDHWQKSGTANMVMMLTQGTDSLSEDFVAAKERLIDF 100
 M-12 51 SLVFNAGSYDHWQKSGTANMVMMLTQGTDSLSEDFVAAKERLIDF 100

ETSU C-2 101 TSTANKNLTLSLRSLSDQSLNQAADLMVAVTQPAFDKTLQRNKQL 150
 ETSU 658 101 TSTANKNLTLSLRSLSDQSLNQAADLMVAVTQPAFDKTLQRNKQL 150
 ETSU T-25 101 TSTANKNLTLSLRSLSDQSLNQAADLMVAVTQPAFDKTLQRNKQL 150
 M-12 101 TSTANKNLTLSLRSLSDQSLNQAADLMVAVTQPAFDKTLQRNKQL 150

ETSU C-2 151 IYSLRQKKNQYVHVAVYHQAQVYENHPYAHATGDEDSIAKIDRDELLN 200
 ETSU 658 151 IYSLRQKKNQYVHVAVYHQAQVYENHPYAHATGDEDSIAKIDRDELLN 200
 ETSU T-25 151 IYSLRQKKNQYVHVAVYHQAQVYENHPYAHATGDEDSIAKIDRDELLN 200
 M-12 151 IYSLRQKKNQYVHVAVYHQAQVYENHPYAHATGDEDSIAKIDRDELLN 200

ETSU C-2 201 FWHFTINANNATLVITGDMTAEQAKSLANHLAKLPTGKSYNLDLTKP 250
 ETSU 658 201 FWHFTINANNATLVITGDMTAEQAKSLANHLAKLPTGKSYNLDLTKP 250
 ETSU T-25 201 FWHFTINANNATLVITGDMTAEQAKSLANHLAKLPTGKSYNLDLTKP 250
 M-12 201 FWHFTINANNATLVITGDMTAEQAKSLANHLAKLPTGKSYNLDLTKP 250

ETSU C-2 251 VKARHII PHNSSQTQIIIGHPTSKVTRDKAGROEFSDFSLGNEILLAGGD 300
 ETSU 658 251 VKARHII PHNSSQTQIIIGHPTSKVTRDKAGROEFSDFSLGNEILLAGGD 300
 ETSU T-25 251 VKARHII PHNSSQTQIIIGHPTSKVTRDKAGROEFSDFSLGNEILLAGGD 300
 M-12 251 VKARHII PHNSSQTQIIIGHPTSKVTRDKAGROEFSDFSLGNEILLAGGD 300

ETSU C-2 301 FNARLMTIREBQKTYTYGYGEMERLRAGGNVVFSTDDGKAADALET 350
 ETSU 658 301 FNARLMTIREBQKTYTYGYGEMERLRAGGNVVFSTDDGKAADALET 350
 ETSU T-25 301 FNARLMTIREBQKTYTYGYGEMERLRAGGNVVFSTDDGKAADALET 350
 M-12 301 FNARLMTIREBQKTYTYGYGEMERLRAGGNVVFSTDDGKAADALET 350

ETSU C-2 351 LHIINSLNBTQEBLELVRLGNKGFANIPSSNASHRVIGALPVADY 400
 ETSU 658 351 LHIINSLNBTQEBLELVRLGNKGFANIPSSNASHRVIGALPVADY 400
 ETSU T-25 351 LHIINSLNBTQEBLELVRLGNKGFANIPSSNASHRVIGALPVADY 400
 M-12 351 LHIINSLNBTQEBLELVRLGNKGFANIPSSNASHRVIGALPVADY 400

ETSU C-2 401 PKDHLNHTLNRLDNATINSVNTALNLRKIDPEF 433
 ETSU 658 401 PKDHLNHTLNRLDNATINSVNTALNLRKIDPEF 433
 ETSU T-25 401 PKDHLNHTLNRLDNATINSVNTALNLRKIDPEF 433
 M-12 401 PKDHLNHTLNRLDNATINSVNTALNLRKIDPEF 433

【配列表】

2008289480000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 H 0 4 5
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00	A
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 P 31/04	
A 6 1 P 37/04 (2006.01)	A 6 1 P 37/04	
A 6 1 P 27/16 (2006.01)	A 6 1 P 27/16	
A 6 1 P 11/00 (2006.01)	A 6 1 P 11/00	
A 6 1 P 27/02 (2006.01)	A 6 1 P 27/02	
A 6 1 K 39/02 (2006.01)	A 6 1 K 39/02	

(72)発明者 デニス マーティン
 カナダ国 ケベック ジー3エイ 1イー9 セント・オウガスティン・ドゥ・デスマウルス リ
 ュ ガボウリー 4728 - ジー

(72)発明者 ジョセ アメル
 カナダ国 ケベック ジー1ティー 1エヌ6 シルリー 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 2041

(72)発明者 ステファン リウクス
 カナダ国 ケベック ジー1イー 1ジェイ3 ビューポート アヴェニュー デ ピンサンズ
 869

(72)発明者 ジュリー クチュール
 カナダ国 ケベック ジー3エイ 1エイ4 セント・オウガスティン・ドゥ・デスマウルス ジ
 ーン・チャールズ カンティン 896 シー

Fターム(参考) 4B024 AA01 BA31 CA03 DA06 EA04 GA14
 4B064 AG31 BA14 CA19 CC24 CE12 DA03
 4B065 AA01Y AA26X AB01 BA03 CA24 CA45 CA46
 4C084 AA02 AA03 AA07 BA01 BA02 BA08 BA22 CA04 MA52 MA55
 MA57 MA59 MA63 MA66 NA14 ZA332 ZA342 ZA592 ZB092 ZB352
 4C085 AA03 AA08 BA15 BB11 CC07 CC32 DD62 EE01 GG01 GG08
 GG10
 4H045 AA11 BA10 CA11 DA50 DA86 EA29 EA31 EA52 FA74 GA26
 HA07

专利名称(译)	莫拉氏菌 (Blanhamera) 卡他性杆菌抗原		
公开(公告)号	JP2008289480A	公开(公告)日	2008-12-04
申请号	JP2008126155	申请日	2008-05-13
[标]申请(专利权)人(译)	益得生物医学公司		
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 C12N1/21 C12P21/02 C07K14/195 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N5/10 A61K38/00 A61P31/04 A61P37/04 A61P27/16 A61P11/00 A61P27/02 A61K39/02 G01N33/53 A61K39/00 A61P11 /02 C07K14/21 C12N15/31 G01N33/569		
CPC分类号	A61K39/00 A61P11/00 A61P11/02 A61P11/04 A61P11/14 A61P27/02 A61P27/16 A61P31/04 A61P37 /04 C07K14/212 C07K2319/00		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C12N1/21 C12P21/02.C C07K14/195 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N5/00.A A61K37/02 A61P31/04 A61P37/04 A61P27/16 A61P11/00 A61P27/02 A61K39/02 A61K38/00 A61K38 /02 A61K38/16 C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12N5/00.101 C12N5/10		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/BA31 4B024/CA03 4B024/DA06 4B024/EA04 4B024/GA14 4B064/AG31 4B064 /BA14 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/CE12 4B064/DA03 4B065/AA01Y 4B065/AA26X 4B065/AB01 4B065/BA03 4B065/CA24 4B065/CA45 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA03 4C084/AA07 4C084 /BA01 4C084/BA02 4C084/BA08 4C084/BA22 4C084/CA04 4C084/MA52 4C084/MA55 4C084/MA57 4C084/MA59 4C084/MA63 4C084/MA66 4C084/NA14 4C084/ZA332 4C084/ZA342 4C084/ZA592 4C084/ZB092 4C084/ZB352 4C085/AA03 4C085/AA08 4C085/BA15 4C085/BB11 4C085/CC07 4C085 /CC32 4C085/DD62 4C085/EE01 4C085/GG01 4C085/GG08 4C085/GG10 4H045/AA11 4H045/BA10 4H045/CA11 4H045/DA50 4H045/DA86 4H045/EA29 4H045/EA31 4H045/EA52 4H045/FA74 4H045 /GA26 4H045/HA07		
代理人(译)	杉村健二		
优先权	60/290653 2001-05-15 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

解决的问题：提供可用于预防，诊断和/或治疗的多肽。 解决方案：人类呼吸道感染的呼吸道病原体，婴幼儿中耳炎的呼吸道病原体，肺炎链球菌和流感嗜血杆菌，是最具代表性的第三种呼吸道病原体。 ，还与其他几种感染相关，包括鼻窦炎，慢性咳嗽，成人急性喉炎，化脓性角膜炎，新生儿结膜炎和免疫功能低下的宿主的浸润性疾病 莫拉氏菌 (Blanhamera) 卡他性多肽。 [选型图]图

