

(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2009-279003

(P2009-279003A)

(43) 公開日 平成21年12月3日(2009.12.3)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C12N 15/09 (2006.01)</b>	C12N 15/00 ZNAA	4B024
<b>C07K 4/04 (2006.01)</b>	C07K 4/04	4B064
<b>C12P 21/00 (2006.01)</b>	C12P 21/00 C	4C084
<b>A61K 31/711 (2006.01)</b>	A61K 31/711	4C085
<b>A61K 31/7105 (2006.01)</b>	A61K 31/7105	4C086

審査請求 有 請求項の数 1 O L 外国語出願 (全 30 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2009-175125 (P2009-175125)  
 (22) 出願日 平成21年7月28日 (2009.7.28)  
 (62) 分割の表示 特願2003-522569 (P2003-522569) の分割  
 原出願日 平成14年8月27日 (2002.8.27)  
 (31) 優先権主張番号 60/314,634  
 (32) 優先日 平成13年8月27日 (2001.8.27)  
 (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 ブールバード ウエスト 525  
 (74) 代理人 100072051  
 弁理士 杉村 興作  
 (72) 発明者 デニス マーティン  
 カナダ国 ケベック ジー3エイ 1イー9 セント-オウガスティン-ドゥーデスマウルス リュ ガボウリー 4728-ジー

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 モラクセラ (ブランハメラ) カタラーリスポリペプチド及び対応するDNA断片

(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ヌクレオチド、及び、ポリペプチドに関する。

【解決手段】 モラクセラ・カタラハリス (*Moraxella catarrhalis*) の特定の配列からなる SMC - 1 遺伝子と SMC - 2 の遺伝子、および、該ヌクレオチドを含むベクター、および、ベクターによりトランスフェクトされた宿主。該遺伝子配列からなるポリペプチドとその製造方法。該ペプチドを用いたモラクセラ感染の予防、診断、及び/又は治療方法。

【選択図】 図 1

```

1 ATGGCAGCCG CTACACCA  TGGCTCAA  AGTATTGA  CTACCGTA  TGGTACGCA
61 GATTTGGTA TGGCAGTT  GCCATTGC  ATCCACAT  AGCGAGAC  GATATCGG
121 GCTTCACTGA CAGTCTTG  TGCTGACG  TCGAATAAT  TGCTGATAC  ACCAAATAC
181 AAACCCAA  CTGCTTAG  CTGAGACG  CATCTACAA  GTCATGATG  ZACTGCCAAT
241 GCCTTGGATG GCTTTGAT  TGAAGTAT  ACACAGCG  CAGCCGAG  GACAGCGAT
301 CACGCAATC  AAGGCATC  TCGAGTAG  CAGCTTGG  CCTTTCGG  TAAATGAGC
361 AATCCAAAT  TAAACATC  CAGCTGAG  GATAGACG  ALCACCCCT  TCCGATGAA
421 AACTGACCA  AATTAGCG  AAATCCAT  ATTAGTCC  ATCCAGAC  TCACTGTGT
481 CAGGTGATG  GAAAGACG  AATCCACA  GCAACACA  CAAACCCCC  TACCAACCA
541 AAATGATG  AAATGGTA  TCCGATTG  GAAGATGG  TTTTGTCT  AACTGATAT
601 GGATATTAG  ACGCTCAAC  TTATCCGA  CTGCTGGC  ATGTGATAT  GGAACAAAC
661 GGTCCGCTG  TAAACCTG  TAACTTAT  TTGACACG  AATCCAGCA  AAGCCTTGG
721 TCAATGAG  TCAATGAG  TGAATGAG  GCAATGAT  CAGAGCTGG  CATATATGG
781 ATGCTGAAA  ACTTATGA  CCATACAG  GATCAGAC  GACAGCCAG  AATATGCT
841 TTTCAGACA  CTACATCA  TGTCAAGT  TATCCAGT  AATGATTA  AATGATTA
901 AGCGAATAT  GCTTCAACA  TGTCAAGT  ACCACTGT  CACCCAGAG  ACGAATGG
961 TACTTAGAT  CTGATGAT  TGAATCAT  ACGATACG  GTCGTCAT  GGCAAAAT
1021 ACCACCTTG  GTATCAAAA  AATCTGCT  TTGACTCG  CCAATTTAA  CTTTGGAT
1081 GATCCCTGG  GCTTGTGG  ATTATGAT  CCATCAAG  GATTTGTC  ATCCAGAT
1141 TTGAAATTA  GTACGCTA  TTATGAT  TTGGACAG  AATATGCT  ACCATTAAG
1201 CCAACTGAT  TACTACAG  CAATCTAT  CAGACTGG  AATTTGTA  TCTGACCA
1261 GATTAAGAT  CAGGCTGT  GATCTGCT  TATCTTCA  AAGATCAG  ATATCATAT
1321 AAGACCTTA  GCGAATTA  ATTGATAT  ACATGGAC  CCAAGACT  TATTAATAT
1381 ACACCTTAG  CACATATC  ATCTTTTC  GATCCAAAT  ATTTATGAG  CTTTATGCC
1441 TTGGTGTG  AGATGCTA  GCTAATTA  CCAAGAGCA  TCGGACAG  CTTTGGAT
1501 GAAATGCT  CAGCTGAT  AAGATTGA  GATTTGAC  GTTATGAG  TTTTGGCT
1561 GATGCTGG  CAATACAG  CAAGATAG  CCAATGAC  CCTACCCA  GCTATGCT
1621 AACTATGCT  TGCCTGAT  ATGATGAT  ACAACAGG  GTCCTGAC  GGTGATAT
1681 CATATCTGT  CTTATTTCA  AAAATCAAT  AAGATATC  CTGACAGC  AATTAATAT
1741 GATGATAT  TACCAAT  CAGCAGAT  TATCCACT  TGGCTGCT  GGTATTTG
1801 ACACCAAA  TTAGCTGAC  ACATTAAT  ACCAGTAT  ACGAAGAG  CTTAGCCAG
1861 CAAATATG  CTAAGAAA  TGGTCCAT  TGGATTTG  CACCCAGG  CAGCTTGG
1921 GCTGGCTAT  TTTTGA  AGCGGTGCA  CCAATGGC  TGCATCAG  TACAGTGG
1981 TATCAATAT  TACACCAAG  ATTACAT  ACTTACAG  CTTTAAAG  TCAACAAAT
2041 GTACCAAT  TTAGCATA  AATTCAGC  CTTACAGC  AGCAGCTT  GACAAATC
2101 GATTTTGG  CTACAGCT  CATTAAGT  TACACAGC  TCCACCTGC  AATCAGTAC
2161 GCTTATAT  AATAATGG  CAGGACAG  TTTGAGAG  GATGCGAG  ACGATTTA
2221 TTGATGAT  TCGGTTGG  TATCAATG  AGCGAAGT  ATAGCCAG  AAGCTTGG
2281 TTGGCATG  AAGCGACT  ACACCAA  GACATTTAT  GCTTGTGC  ATCAGTTCA
2341 TTAGAACAA  ATATGAT  GAGCATAT  GAGGACAA  TTTGCTGC  TCAACAAAT
2401 CCAATGAT  TTAGCTAG  TATGCTAA  ABAABAAA  ATCCGCTT  TAAATATC
2461 GATTAAGC  CATATCTG  CCGCCAT  TTTCCATA  ABAATCCCT  GCGATGAT
2521 GATCAACT  AATAGACT  CAATATAT  TATGATG  ATCTTAT  GGGGTAAT
2581 TATGATAT  GCTTTATG  TTTTCAAT  TATGAGAC  GCAATGCT  TCTTTCAAT
2641 CCAATTTAT  CACTGAT  TCGGATAT  GCAGAGAT  GCTTAAAG  TATGCTGG
2701 GCGGCTGT  TGAATGAT  TTTGAGCA  AAGTACTG  GCTATGAT  GCTTCAAT
2761 GCTTGGAC  AATATCTA  A (SEQ ID No. 1)

```

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

下記のポリヌクレオチド：

(a) 配列番号 2 又は 4 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(secondary)ポリペプチドと、少なくとも 70%の同一性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、

(b) 配列番号 2 又は 4 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 次ポリペプチドと、少なくとも 80%の同一性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、

(c) 配列番号 2 又は 4 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 次ポリペプチドと、少なくとも 95%の同一性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、

(d) 配列番号 2 又は 4 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 又は 4 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 又は 4 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 又は 3 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) 上記(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】

下記のポリヌクレオチド：

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

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

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

(d) 配列番号 2 又は 4 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 又は 4 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 又は 4 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 又は 3 から選択された配列からなるポリヌクレオチド、及び

(h) 上記(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。

10

20

30

40

50

## 【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 D N A 配列、又は
  - ( b ) ポリペプチドをコードする D N A 配列の相補鎖
- (ここで、前記ポリペプチドは、配列番号第 2 又は 4 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) ;  
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 D N A 配列、又は
  - ( b ) ポリペプチドをコードする D N A 配列の相補鎖
- (ここで、前記ポリペプチドは、配列番号第 2 又は 4 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) ;  
のいずれかにハイブリダイズする、請求項 1 に記載のポリヌクレオチド。

10

## 【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 D N A 配列、又は
  - ( b ) ポリペプチドをコードする D N A 配列の相補鎖
- (ここで、前記ポリペプチドは、配列番号 2 又は 4 から選択された配列からなる) ;  
のいずれかにハイブリダイズする、請求項 2 に記載のポリヌクレオチド。

20

## 【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 D N A 配列、又は
  - ( b ) ポリペプチドをコードする D N A 配列の相補鎖
- (ここで、前記ポリペプチドは、配列番号 2 又は 4 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由来する、少なくとも 10 の連続するアミノ酸残基からなる) ;  
のいずれかにハイブリダイズする、請求項 1 に記載のポリヌクレオチド。

## 【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 D N A 配列、又は
  - ( b ) ポリペプチドをコードする D N A 配列の相補鎖
- (ここで、前記ポリペプチドは、配列番号 2 又は 4 から選択された配列からなるポリペプチドに由来する、少なくとも 10 の連続するアミノ酸残基からなる) ;  
のいずれかにハイブリダイズする、請求項 2 に記載のポリヌクレオチド。

30

## 【請求項 12】

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

40

## 【請求項 14】

請求項 12 に記載のベクターによりトランスフェクトされた宿主細胞。

## 【請求項 15】

請求項 13 に記載のベクターによりトランスフェクトされた宿主細胞。

## 【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

50

を含む、ポリペプチドの生成方法。

【請求項 18】

下記のポリペプチド：

(a) 配列番号 2、4 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 次ポリペプチドと、少なくとも 70% の同一性を有するポリペプチド

(b) 配列番号 2、4 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 次ポリペプチドと、少なくとも 80% の同一性を有するポリペプチド

(c) 配列番号 2、4 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 次ポリペプチドと、少なくとも 95% の同一性を有するポリペプチド、

(d) 配列番号 2、4 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 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 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上記 (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上記 (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】

下記のポリペプチド：

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

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

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

(d) 配列番号 2 又は 4 から選択された配列からなるポリペプチド、

(e) 配列番号 2 又は 4 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 又は 4 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上記 (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上記 (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 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 又は 4 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。

10

20

30

40

50

## 【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に必要な量を投与する工程を含む、モラクセラ 感染の予防又は治療方法。

## 【請求項 24】

前記宿主が新生児、幼児、又は子供である、請求項 23 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 23 に記載の方法。

## 【請求項 26】

前記宿主が成人である、請求項 23 に記載の方法。

## 【請求項 27】

前記宿主に請求項 22 に記載の組成物を予防又は治療に必要な量を投与する工程を含む、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】

下記の工程；

(a) 宿主から生体サンプルを得る工程、

(b) 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；

からなる、モラクセラ 感染を受けやすい宿主における、モラクセラ 感染の診断方法。

## 【請求項 29】

下記の工程；

(a) 宿主から生体サンプルを得る工程、

(b) 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又はその断片を一つ又はそれ以上、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；

からなる、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 22 に記載の薬剤組成物を使用する方法。

## 【請求項 31】

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を含む、モラクセラ 感染の検出又は診断用のキット。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明はポリペプチドに、より特異的には、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/又は治療に使用可能なモラクセラ (ブランハメラ) カタラーリス (*Moraxella* (*Branhamella*) *catarrhalis*) の SMC-1 及び SMC-2 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 はヒトにおいて気道感染を引き起こすグラム陰性双球菌である。M. カタラーリス は、肺炎球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 及びインフルエンザ菌 (*Haemophilus influenzae*) に次ぐ、現在幼児や子供において中耳炎を引き起こす第 3 の最も代表的な起炎菌であるとして受け入れられている。M. カタラーリス

10

20

30

40

50

はまた、副鼻腔炎、しつこい咳、急性喉頭炎、化膿性角膜炎および新生児（neonatorum）結膜炎を含む、他の何種類かの感染症にも関連している。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0003】

モラクセラ・カタラハリス株のおよそ90%は抗生物質（ラクタマーゼ陽性）に耐性を有し、再発性中耳炎は高死亡率に結びついているから、宿主をM. カタラーリス感染から防御することができるワクチンの開発の必要性がある。M. カタラーリスによる感染は細菌細胞の表面において見出される抗原に対して免疫反応を引き起こす。しかし、これらの表面蛋白質の多くはいまだ特性解析されておらず、他の株による感染から防御する結果となる免疫反応もまた判っていない。

10

【0004】

M. カタラーリスの宿主への感染を予防するワクチンの開発するために、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主として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。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の変動性が非常に高かった。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、細菌表面に晒されているものであった。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。他の研究者もまた、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の保存性が非常に高いが、慢性閉塞性肺疾患の成人においては、このOMP CDに対する免疫反応には変動性が見られる。

20

【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/又は治療に使用可能な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】

（発明の概略）一つの観点において、本発明は、配列番号2、4からなる配列か、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（second）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。

30

【0007】

一つの観点において、本発明は、配列番号2、4なる配列か、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に関する。

【0008】

他の観点においては、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、発現制御部位を機能が発現するように連結し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トランスフェクトされた宿主細胞が提供され、また、前記宿主細胞を発現に適した条件下において培養する工程を含むポリペプチドの作成方法を提供する。

40

【図面の簡単な説明】

【0009】

【図1】M. カタラーリス株ETSUC-2由来のSMC-1遺伝子のDNA配列（配列番号：1）を示したものである。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ETSUC-2由来のSMC-1ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：2）を示したものである。下線部の配列は、35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ETSUC-2由来のSMC-2遺伝子のDNA配列（配列番号：3）

50

を示したものである。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4】M.カタラーリス株ETSUC-2由来のSMC-2ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：4）を示したものである。下線部の配列は、47アミノ酸残基のリーダーペプチドを示す。

【発明を実施するための形態】

【0010】

（本発明の詳細な記載）本発明は、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、精製および単離されたポリヌクレオチドを提供する。

【0011】

一観点において、本発明は、配列番号2、4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(second)ポリペプチドと、少なくとも70%の同一性を有するポリペプチドをコードする、単離されたポリヌクレオチドを提供する。

【0012】

一観点において、本発明は、配列番号2、4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次ポリペプチドと、少なくとも80%の同一性を有するポリペプチドをコードする、単離されたポリヌクレオチドを提供する。

【0013】

一観点において、本発明は、配列番号2、4に示す配列か、又はそれらの断片が若しくは類似体からなる2次ポリペプチドと、少なくとも95%の同一性を有するポリペプチドをコードする、単離されたポリヌクレオチドを提供する。

【0014】

一観点において、本発明は、配列番号2、4に示す配列か、又はそれらの断片が若しくは類似体からなる2次ポリペプチドと、少なくとも98%の同一性を有するポリペプチドをコードする、単離されたポリヌクレオチドを提供する。

【0015】

一観点において、本発明は、配列番号2又は4からなる2次ポリペプチドと、少なくとも70%の同一性を有するポリペプチドをコードする、単離されたポリヌクレオチドを提供する。

【0016】

一観点において、本発明は、配列番号2又は4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。

【0017】

一観点において、本発明は、配列番号2又は4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。

【0018】

一観点において、本発明は、配列番号2又は4からなる2次ポリペプチドに対して、少なくとも98%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。

【0019】

一観点において、本発明は、配列番号2、4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アミノ酸配列からなるポリペプチドに関する。

【0020】

一観点において、本発明は、配列番号2又は4から選択されたアミノ酸配列からなるポリペプチドに関する。

【0021】

一観点において、本発明は、配列番号2、4に示す配列か、又はそれらの断片が若しくは類似体からなるアミノ酸配列により特徴づけられるポリペプチドに関する。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 2 2 】

一観点において、本発明は、配列番号 2 又は 4 からなるアミノ酸配列により特徴づけられるポリペプチドに関する。

## 【 0 0 2 3 】

一観点において、本発明は、配列番号 2、4 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を提供する。

## 【 0 0 2 4 】

一観点において、本発明は、配列番号 2 又は 4 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。

10

## 【 0 0 2 5 】

一観点において、本発明は、配列番号 2、4 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に関する。

## 【 0 0 2 6 】

一観点において、本発明は、配列番号 2 又は 4 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。

## 【 0 0 2 7 】

一態様において、本発明は、下記のポリヌクレオチド：

( a ) 配列番号 2、4 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 次ポリペプチドと、少なくとも 7 0 % 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、

20

( b ) 配列番号 2、4 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 次ポリペプチドと、少なくとも 8 0 % 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 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 次ポリペプチドと、少なくとも 9 5 % 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 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、

30

( e ) 配列番号 2、4 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 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 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 ) 上記 ( 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。

40

## 【 0 0 2 8 】

一態様において、本発明は、下記のポリヌクレオチド：

( a ) 配列番号 2 又は 4 から選択された配列からなる 2 次ポリペプチドと、少なくとも 7 0 % 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 又は 4 から選択された配列からなる 2 次ポリペプチドと、少なくとも 8 0 % 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 又は 4 から選択された配列からなる 2 次ポリペプチドと、少なくとも 9 5 % 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 又は 4 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 又は 4 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

50

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 又は 4 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 又は 3 から選択された配列からなるポリヌクレオチド、  
 (h) 上記 (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、下記のポリポリペプチド：

(a) 配列番号 2、4 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 次ポリペプチドと、少なくとも 70% の同一性を有するポリペプチド、  
 (b) 配列番号 2、4 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 次ポリペプチドと、少なくとも 80% の同一性を有するポリペプチド、  
 (c) 配列番号 2、4 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 次ポリペプチドと、少なくとも 95% の同一性を有するポリペプチド、  
 (d) 配列番号 2、4 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 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 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、上記 (a)、(b)、(c)、(d)、(e) 又は (f) のポリペプチド、  
 (h) 分泌アミノ酸配列が欠失した、上記 (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、下記のポリポリペプチド：

(a) 配列番号 2 又は 4 から選択された配列からなる 2 次ポリペプチドと、少なくとも 70% の同一性を有するポリペプチド、  
 (b) 配列番号 2 は 4 から選択された配列からなる 2 次ポリペプチドと、少なくとも 80% の同一性を有するポリペプチド、  
 (c) 配列番号 2 又は 4 から選択された配列からなる 2 次ポリペプチドと、少なくとも 95% の同一性を有するポリペプチド、  
 (d) 配列番号 2 又は 4 から選択された配列からなるポリペプチド、  
 (e) 配列番号 2 又は 4 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 又は 4 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、上記 (a)、(b)、(c)、(d)、(e) 又は (f) に記載のポリペプチド、  
 (h) 分泌アミノ酸配列が欠失した、上記 (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、本特許出願において述べられた DNA 分子、すなわちポリヌクレオチド及びそれらの相補的な配列であって、突然変異体 (mutant) や、変異体 (variant) 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もの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 RN

10

20

30

40

50

A分子も含まれる。DNAやRNA分子以外にも、本発明には、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を有する抗体が含まれる。

【0032】

さらなる一態様において、本発明のポリペプチドは抗原性を示す。

【0033】

さらなる一態様において、本発明のポリペプチドは免疫原性を示す。

【0034】

さらなる一態様において、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】

さらなる一態様において、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する。

【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実質的に認識せず結合もしない抗体である。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テスト(log rank test)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テスト(Fisher exact test)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有意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、有意ではないとみなされる。

【0038】

本発明の他の観点においては、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る。

【0039】

本発明の断片は、かかる抗原決定部位(epitopic region)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は、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に由来する、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、本発明において、本発明のポリペプチドの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と、約70%の同一性を有する。すなわち、残基の70%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%以上の同一性を

10

20

30

40

50

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個以下、より好ましくは10以下のアミノ酸残基が置換、修飾又は欠失されている。

#### 【0042】

これら置換は、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 (1978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】

異なるアプローチでは、類似体を、例えば効果的なタグを所望のポリペプチドに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、類似性のパーセンテージ又はアミノ酸タイプの保存性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。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個以下、より好ましくは約10個以下のアミノ酸残基が置換、修飾又は欠失されている。

#### 【0046】

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、最適アラインメントを探し出すというものである。最適アラインメントについて、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アラインし、適合値を定める。従って、それぞれ異なる値を有することが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。

#### 【0047】

異なるアプローチでは、類似体又は誘導体は、例えば所望のタンパク質又はポリペプチドに効果的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。

#### 【0048】

10

20

30

40

50

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して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。

【0049】

更なる本発明の観点において、本発明の蛋白質又はポリペプチドの抗原性/免疫原性断片、又はその類似体若しくは誘導体を提供するものである。

【0050】

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の抗原性/免疫原性特性をある程度有することが重要である。

10

【0051】

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。

【0052】

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プトープに、より効果的に似せるようにすることが望ましい。

20

【0053】

さらに、本発明のポリペプチドは、末端のNH<sub>2</sub>基のアシル化により(例えば、アンモニア又は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。

【0054】

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(tandem)又は反転した(inverted)隣接配列を含むポリペプチドも含まれる。

30

【0055】

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。

【0056】

さらなる一態様において、本発明は、配列番号2、4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にも関連する。

40

【0057】

さらなる一態様において、本発明は、配列番号2又は4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。

【0058】

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一つ、すなわち少なくとも一つのエプトープを含むであろう。

【0059】

50

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、又はニトロアシ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。

【0060】

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ろう。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培養物から単離して、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決定し、それによって成熟ポリペプチドの配列を決定する。

10

【0061】

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）を用いず及び/又はリーダーペプチドを用いず、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ーニング遺伝子は、ポリペプチドを大腸菌の細胞質に限定し、その回収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 recombinantDNA”（第2版、第109-143頁））。

20

【0062】

本発明の他の観点によれば、(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、薬学的に受容可能な担体、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、薬学的に受容可能な担体、希釈剤、又はアジュバントを含むワクチン、(iv)宿主に本発明のポリペプチドを免疫反応の惹起に有効な量投与することにより、宿主においてモラクセラに対する免疫反応（例えばモラクセラに対する感染防御免疫）を誘発する方法、及び、特に(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する。

30

【0063】

本発明の他の観点によれば、(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、薬学的に受容可能な担体、希釈剤、又はアジュバントを含む薬剤組成物、(iii)宿主に本発明のポリヌクレオチドを免疫反応の惹起に有効な量投与することにより、宿主においてモラクセラに対する免疫反応（例えばモラクセラに対する感染防御免疫）を誘発する方法、及び、特に(iv)予防又は治療量の本発明のポリヌクレオチドを、必要とする宿主に投与することにより、モラクセラ感染を予防及び/又は治療する方法も提供する。

【0064】

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・レゲンモーター、M.H.V、ピリアンド J.P.、ミューラー S.、ブラウエ 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。

40

【0065】

他の観点によれば、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

50

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)、Ribivax(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(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>、AlNa(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>、AlNH<sub>4</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>、Al(OH)<sub>3</sub>、AlPO<sub>4</sub>、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ISSCOMs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、WO99/24578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Adjuphos(登録商標)を含むものである。

10

20

30

40

50

#### 【0066】

本発明の薬剤組成物は、注射、急速輸液、鼻咽吸込、皮膚吸込により非経口で投与されるか、又は舌下錠又は経口で投与される。

#### 【0067】

「薬剤組成物」という用語は抗体を含む意味である。本発明によれば、モラクセラ感染により仲介されたモラクセラ感染及び/又は疾病と症状の治療又は予防のために、本発明のポリペプチドに対して結合特異性を有する一つ又はそれ以上の抗体を使用する方法もまた提供される。

#### 【0068】

本発明の薬剤組成物は、P.R.ムライ(編集長)、E.J.バロン、M.A.ファレー、F.C.テヴァー及び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、新生児の結膜炎及び侵襲的な疾患の治療又は予防に用いられ、宿主に本発明の組成物を予防又は治療量を投与することよりなる。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】

更なる態様において、本発明はモラクセラ感染に対して感受性を有する宿主において、モラクセラ感染の予防又は治療処理をする方法を提供するものであり、その方法は宿主に本発明の組成物の予防又は治療量を投与することからなる。

#### 【0070】

本出願において使用された様に、「宿主」という用語には哺乳動物が含まれる。更なる態様において、哺乳動物はヒトである。更なる態様において、ヒトは新生児、幼児又は子供である。更なる態様において、ヒトは大人である。

#### 【0071】

ある特定の態様において、薬剤の組成物は、幼児、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】

薬剤組成物は、好ましくは約0.001~100µg/kg(抗原/体重)、より好ましくは、0.01~10µg/kg、最も好ましくは0.1~1µg/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。

#### 【0073】

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

隔を置いて1～3回投与する。

【0074】

別の観点においては、配列番号2、4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る。

【0075】

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、配列番号第1、3に記載のものである。

【0076】

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、厳しい条件下でハイブリダイズし、すなわち少なくとも95%の同一性を有する。さらなる一態様では、同一性は97%以上である。

10

【0077】

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: A Laboratory Manual”第2版(1989年):ニューヨーク、コールド・スプリング・ハーバー;、ニューヨーク、ジョン・ Wiley & Sons出版、ニューヨーク、オースベルF.M.等編(Ausubel F. M. et al., John Wiley & Sons, Inc. N.Y.)“Current protocols in Molecular Biology”(1999年)を参照)。

20

【0078】

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、下記のポリヌクレオチド:

- (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に示す配列、又はそれらの断片か若しくは類似体から選択されたものである)のいずれかとハイブリダイズするポリヌクレオチドを提供する。

30

【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、下記のポリヌクレオチド:

- (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又は4から選択された配列からなるものである)のいずれかとハイブリダイズするポリヌクレオチドを提供する。

40

【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、下記のポリヌクレオチド:

- (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に記載の配列か、又はそれらの断片か若しくは類似体から選択されたポリペプチドに由来する、少なくとも10の連続するアミノ酸残基をからなるものである)のいずれかとハイブリダイズするポリヌクレオチドを提供する。

50

【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、下記のポリヌクレオチド

：

( 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 又は 4 から選択されたポリペプチドに由来する、少なくとも 10 の連続するアミノ酸残基をからなるものである ) のいずれかとハイブリダイズするポリヌクレオチドを提供する。

【 0 0 8 2 】

さらなる一態様において、ポリヌクレオチドは、配列番号 2、4 に記載の本発明のポリペプチドをコードするものである。

【 0 0 8 3 】

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 に記載のものである。

【 0 0 8 4 】

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。

【 0 0 8 5 】

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。

【 0 0 8 6 】

他の観点においては、宿主内で該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。

【 0 0 8 7 】

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 : A Laboratory Manual ” 第 2 版 ( 1989 年 )、ニューヨーク、コールド・スプリング・ハーバー；ニューヨーク、ジョン・ Wiley & ソンズ社、ニューヨーク、オースベル F.M. 等編の “ Current Protocol in Molecular Biology ” ；ニュージョージ、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・ Wiley & ソンズ社出版、Coligan J.E 等編の “ Current Protocol in Immunology ” に記載されたとおりである。

【 0 0 8 8 】

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

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

【 0 0 8 9 】

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をトランスフェクトし、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改変した栄養培養液中で培養する。適したベクターは、選択された宿主内で生存と複製が可能なものであり、かつ染色体性、非染色体性、及び合成 DNA 配列を含み、例えば、細菌性プラスミド、ファージ DNA、バキュロウィルス、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。ポリペプチド配列を、制限酵素を用いてベクターの適切な部位に組込むことが可能であり

10

20

30

40

50

、該ポリペプチドはプロモーター、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、必要に応じてオペレーター（制御要素）からなる発現制御部位と機能が作用するように連結されている。所定の宿主とベクターに適した発現制御部位の個々の構成成分は、確立された分子生物学の原理（サンプローク等の“Molecular Cloning :A Laboratory Manual”第2版（1989年）、ニューヨーク、コールド・スプリング・ハーバー；ニューヨーク、ジョン・ Wiley & Sons社、ニューヨーク、オースベルF.M.等編の“Current Protocol in Molecular Biology”）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<sub>L</sub>プロモーター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、pt rc99a、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・ニダランス；、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。

10

## 【0090】

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回収し、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沈殿、酸抽出、陰イオン又は陽イオン交換クロマトグラフィー、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。

20

## 【0091】

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。前者の場合においては、リーダーは翻訳後プロセッシングを用いて取り除く（米国第4,431,739号、同第4,425,437号、及び同第4,338,397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。

30

## 【0092】

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感染の診断検査に使用することができる。

## 【0093】

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、又はモラクセラに感受性を有する宿主におけるモラクセラ感染の診断において、下記工程：

40

- 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。

## 【0094】

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

50

ブ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。

【0095】

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む、本質的にはそのタンパク質に特異的な抗体が生物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。

【0096】

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プローブの設計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。

【0097】

本発明の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個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。更なる態様において好適な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個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。更なる態様において好適な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個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。更なる態様において好適な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個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。

【0098】

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又はその断片に反応性を示す抗体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。

【0099】

本発明のさらなる観点は、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免疫原として、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定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、かつ任意の免疫グロブリンのクラスに属するものとすることができる。前記抗体又は断片は、動物由来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

10

20

30

40

50

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多数のエピト-プ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。

【0100】

一観点において、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。

【0101】

更なる観点において、本発明は、モラクセラ感染に感受性を有する宿主におけるモラクセラ感染の予防又は治療の処理の方法を提供するものであり、その方法は予防量又治療量の本発明の薬剤組成物を宿主に投与することからなる。

10

【0102】

更なる観点において、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、又はその断片、類似体あるいは誘導体を、DNA免疫化法に使用することができる。それは、注入することによってそれらを複製及び発現可能なベクターに導入し、それによってインビボで抗原性ポリペプチドを製造することができる。例えばポリヌクレオチドを、真核細胞中で機能するCMVプロモーターの制御下でプラスミドベクター中に導入することができる。好ましくはベクターを筋肉注射する。

【0103】

本発明のさらなる観点は、本発明のポリペプチドに対する抗体を、受動免疫のために用いる使用方法であり、そのために本発明のポリペプチドによって誘導された抗体は宿主に、受動免疫を与えるのに十分な量で投与される。人は本出願において述べられた抗体を使用することができるであろう。適切なスクリーニング方法を用いて適切な抗体を決定することができる。その一例として、試験モデルにおいて特定の抗体がモラクセラ感染を受動的に防御する能力を測定することができる。動物モデルの一例は、この中で述べられたマウスのモデルである。その抗体は全抗体あるいはその抗原結合断片であってもよく、如何なる免疫グロブリンクラスに属しても良い。その抗体又は断片は動物由来であってもよく、特異的には哺乳動物由来、更に特異的にはマウス、ラット又はヒト由来であってもよい。それは天然の抗体又はその断片であっても良く、望むならば、組み換え抗体又は抗体断片であってもよい。組み換え抗体又は抗体断片という用語は、分子生物学の技術を用いて製造された抗体又は抗体断片を意味するものである。その抗体又は抗体断片はポリクローナルであり、又は好ましくはモノクローナルである。それはモラクセラペプチドに関連した多くのエピト-プに特異的であっても良いが、好ましくは一つに対して特異的である。

20

30

【0104】

遺伝的な免疫法における本発明のポリヌクレオチドの使用には、好ましくは適切な送達方法又はシステムが採用され、その例には、筋肉へのプラスミドDNAの直接注射 [ フォルフラ, H M G (1992) 1: 363; ターネスら、ワクチン (1999), 17: 2089; レーら、ワクチン (2000), 18: 1893; アルベスら、ワクチン (2001), 19: 788 ]、アジュバントあり又はなしでのプラスミドDNA注射 [ ウルマーら、ワクチン (1999), 18: 18; マックローグリンら、ジャーナル・オブ・コントロールリリース, (1998) 56: 259; ハルティッカーら、ジェーンセラピー (2000) 7: 1171-82; ベンベニスティー及びレシェフ、PNAS USA (1986) 83: 9551; シングら、PNAS USA (2000) 97: 811 ]、特異的な担体と複合したDNAを送ることによる細胞の標的化 [ ワら、ジャーナル・オブ・バイオリジカルケミストリー (1989) 246: 16985; チャピンら、Infect.Immun. (1999) 67: 6434 ]、種々の形のリボソームに複合化された又はカプセルに包まれたプラスミドの注射 [ イシイら、エイズリサーチ・アンド・ヒューマンレトロウイルス (1997) 13:142; ペリエら、ワクチン (2001), 19: 330 1 ]、種々のボンパートメント法によるDNAの投与 [ タンら、ネイチャー (1992) 356: 152; エイセンブラウンら., DAN Cell Biol (1993) 12: 791; チェンら、ワクチン (2001), 19: 2908 ]、生きている (lived) ベクターによるDNA投与 [ チュブレカスら、ジェーン (1997) 190: 191; プショコら、パイロロジー (1997) 23\*: 389; スプレングら、FEMS (2000) 27: 299; ディエトリッチら、ワクチン (2001), 19: 2506 ] がある。

40

50

## 【 0 1 0 5 】

一つの観点によると、本発明は、モラクセラ感染の予防及び/又は治療のための抗体の使用方法を提供する。

## 【 0 1 0 6 】

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する。

## 【 0 1 0 7 】

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。

## 【 0 1 0 8 】

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、本発明が属する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。ここに記載の出版物、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。紛争の際には、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解説を行なうのみであり、それに制限されるものではない。

## 【 実施例 】

## 【 0 1 0 9 】

(例 1)

SMC - 1 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。

## 【 0 1 1 0 】

M. カタラーリス SMC - 1 (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 2400 を使用) により、M. カタラーリス 株の E T S U C - 2 のゲノム DNA から増幅し、その PCR にあたって、制限部位 N c o I (CCATGG) 及び X h o I (CTCGAG) 付加のための伸張した塩基を含む下記オリゴ: R I O S 3 0 (5'- TATGTACCATGGCTGAACTCAATACCA GCCGTTCA -3') および R I O S 3 1 (5'- GGCATGCTCGAGGTAATCATGTCTCCAAGCATTTTG -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、NcoI 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 NcoI 及び XhoI により消化し、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、NcoI - 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) (Hanahan.D による "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 [ 80d lacZ M15 (lacZ YA-argF) U169 endA1 racA1 hsdR17 (r<sub>K</sub>-m<sub>K</sub>+) 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) を形質転換した。SMC-1 遺伝子を含む組換え pET21d(+) プラスミド (rpET21d(+)) から QIAgen キット (カリフォルニア、チャッツワース) 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 - ター配列キット)。

## 【 0 1 1 1 】

10

20

30

40

【表 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

遺伝子	プライマー I.D.	制限部位	ベクター	配列 (SEQ ID No)
SMC-1	RIOS30	<i>Nco</i> I	pET21d (+)	5'- TATGTACCATGGCTGAACT CAATACCAGCCGTTCA -3' (SEQ ID No :5)
SMC-1	RIOS31	<i>Xho</i> I	pET21d (+)	5'-GGCATCCTCCAGGTAA TCATGTCTCCAAGCATTTT G-3' (SEQ ID No :6)
SMC-1	RIOS187	<i>Bgl</i> III	pCMV-GH	5'-GGCAGATCTTGGAACT CAATACCAGCCGTTTC-3' ( SEQ ID No :7)
SMC-1	RIOS188	<i>Sal</i> I	pCMV-GH	5'-ACGCGTCGACTTAGTA ATCATGTCTCCAAGCAT-3 ' (SEQ ID No :8)
SMC-2	RIOS20	<i>Nde</i> I	pET21b (+)	5'-CGTACCAGCACATATG AATAAACAAAACGCCAATC AA-3' (SEQ ID No :9)
SMC-2	RIOS21	<i>Xho</i> I	pET21b (+)	5'-GCCCATCTCGAGTTGC GATTCTGTCTCTGCC-3' ( SEQ ID No :10)
SMC-2	RIOS189	<i>Bam</i> HI	pCMV-GH	5'-CGAGGATCCTAATAAAA CAAAACGCCAATCAAAC-3 ' (SEQ ID No :11)
SMC-2	RIOS190	<i>Hind</i> III	pCMV-GH	5'-CAGAAGCTTTTATTGC GATTCTGTCTCTGCC-3' ( SEQ ID No :12)

## 【0112】

SMC-1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2781bpを含み、6.31の予測pIと104054.84Daの予測分子量を有するアミノ酸残基926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 (ウイ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、35個のアミノ酸残基のシグナルペプチド (MHTAHHRSKYLTTAIRYALFGIASLPFVIPTYA) の存在が示されたが、それは、アラニンとグルタミン残基との間に位置する開裂部位を末端としていた。

## 【0113】

PCR増幅法によりSMC-1 (配列番号: 1) 遺伝子の存在を確認するために、次の3種の別個のM. カタラーリス株: イースト・テネシー州立大学から提供されたM. カタラーリ

スETSU C-2と、ETSU T-25と、ETSU 658の臨床単離株；ラバル大学病院本部感染症研究センターから提供されたM. カタラーリス株M-12を用いた。これらの実験には、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2400）により、オリゴヌクレオチド・プライマーR I O S 3 0及びR I O S 3 1（表1）を用いて、SMC-1（配列番号：1）遺伝子を、前記3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15秒間と、47 で30秒間と、68 で3分のサイクルを5回と、続いて94 で15秒間と、63 で30秒間と、68 で3分のサイクルを30回と、最終伸長期間を68 で5分間で行なった。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3種のM. カタラーリス株の全てのゲノム中に、SMC-1（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。

10

【0114】

【表2】

PCR増幅法によるM.カタラーリス遺伝子の同定

株の同定	PCR増幅による同定	
	SMC-1	SMC-2
ETSU C-2	+	+
ETSU 658	+	+
ETSU T-25	+	+
<u>E. coli</u>	-	-

20

(例2)

【0115】

SMC-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。

30

【0116】

M. カタラーリスのSMC-2（配列番号：3）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2400を使用）により、M. カタラーリス株ETSU C-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）付加のために伸張した塩基を含む下記オリゴ：表1に記載のR I O S 2 0及びR I O S 2 1を用いた。発現ベクターへのSMC-2遺伝子のクローニングとその解読には、実施例1に記載のものと同様の方法を用いた。

【0117】

SMC-2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957bpを含み、5.78の予想pIと35954.10Daの予想分子量を有するアミノ酸残基318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：4）の分析では、47個のアミノ酸残基のシグナルペプチド（VGKIMSKIPMMNEKYFRRQALYWLIAAAIMAGLWLVWLTSSVPAMI）の存在が示されたが、それは、イソロイシ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。

40

【0118】

試験した3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R I O S 2 0とR I O S 2 1を用いてPCR増幅を行なったところ、SMC-2遺伝子の存在が示

50

された。SMC-2遺伝子のPCR増幅には、実施例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)

【0119】

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。

【0120】

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中のサイトメガロウイルス(CMV)プロモーター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する。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。

【0121】

SMC-1(配列番号:1)とSMC-2(配列番号:3)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2400)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)付加のための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ゲル抽出キットを用いてアガロースゲルから精製し、制限酵素(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-GH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ゲル抽出キットを用いてアガロースゲルから精製した。消化したDNA断片を、消化したpCMV-GHベクターに連結させ、CMVポリモーターの制御下で、hGH-SMC-1とhGH-SMC-2の融合ポリペプチドを生成できるようにした。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DH5 [80dlacZ M15 (lacZYA-argF)U169 endA1racA1 hsdR17 (r<sub>K</sub>-m<sub>K</sub>+ )deoR thi-1 supE44 gyrA96 relA1] (ギブコBRL)を形質転換した。組換えpCMVプラスミドをQIAgenキットを用いて精製し、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。

(例4)

【0122】

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。

【0123】

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、50µgの顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)発現プラスミドpCMV-GH-GM-CSF(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)存在下に、SMC-1(配列番号:1)とSMC-2(配列番号:3)遺伝子をコードする組換えpCMV-GHを50µg、2~3週間の間隔をあけて100µlを3回筋肉注射することにより、免疫化した。コントロールとしては、マウスのグループに、50µgのpCMV-GH-GM-CSF存在下に、pCMV-GHを50µg注射した。各免疫注射の実施前と三度目の注射の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タグラベルを付した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タグでラベル化した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、実施例5に示す。

(例5)

【0124】

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。

## 【 0 1 2 5 】

SMC-1 (配列番号: 1) と SMC-2 (配列番号: 3) 遺伝子を組込んだ組換え pET21 プラスミドを用いて、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<sup>+</sup>(lacI<sup>q</sup>)pro] trxB::Kan(DE3) ] (ノヴァゲン) を形質転換した。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 lac プロモーターの制御下にある遺伝子である T7 RNA ポリメラーゼ (DE3 プロファージ上に存在) によって特異的に認識される。形質転換細胞 AD494 (DE3) / rpET21 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-アルドリッチ・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、NaCl 10g/L) 中で 250rpm で攪拌しながら、A<sub>600</sub> 値が 0.5 になるまで、37 °C で培養した。His タグを付した 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 °C で凍結させた。

10

## 【 0 1 2 6 】

His 結合金属キレート樹脂に固定された 2 価のカチオン (Ni<sup>2+</sup>) への His タグ配列 (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) / rpET21 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、PMSF を 1mM 含む溶解緩衝液 (20mL トリス、500mM NaCl、10mM イミダゾール、pH 7.9) 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 (キアゲン) にかけた。His タグでラベルを付した M. カタラーリス 組換えポリペプチドを、250mM のイミダゾールと、500mM の NaCl と、20mM の トリス pH 7.9 で溶出した。4 °C 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。

20

(例 6)

## 【 0 1 2 7 】

His タグを付した M. カタラーリス 組換えポリペプチドとヒト口蓋扁桃中に存在する抗体との反応性を、以下実施例で説明する。

30

## 【 0 1 2 8 】

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、SMC-1 と SMC-2 の His タグを付した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 感染の予防に関与するかもしれない。

## 【 0 1 2 9 】

## 【表 3】

ヒト口蓋扁桃中に存在する抗体と、M. カタラーリス の His タグを付した融合組み換えポリペプチドとの免疫プロットにおける反応性

40

精製した組み換えポリペプチド I. D. <sup>1</sup>	見かけの分子量 (kDa) <sup>2</sup>	ヒト口蓋扁桃中に存在する抗体との免疫プロットにおける反応性 <sup>3</sup>
SMC-1	104	+
SMC-2	36	+

<sup>1</sup> 免疫プロットは、実施例 5 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

50

チドを用いて行なった。

<sup>2</sup> Hisタグを付した組換えポリペプチドの分子量は、SDS-PAGE後に測定した。

<sup>3</sup> 免疫プロットを行うためにヒト口蓋扁桃からの抽出物は希釈を行わなかった。

(例7)

【0130】

M. カタラーリス株表面上にSMC-1とSMC-2ポリペプチドの抗体が接近する可能性を、以下実施例で説明する。

【0131】

細菌を、37℃、8%二酸化炭素ガス中で1%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( $\sim 10^8$  CFU/ml)となるようにした。その後、抗SMC-1又は抗SMC-2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蛍光標識(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、0.25%ホルムアルデヒド含有PBS緩衝液で4℃で18時間固定化した。細胞を遠心し、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・クーラー社、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、SMC-1とSMC-2に特異的な抗体が、試験した均質な(ETSU C-2)M. カタラーリス株上にある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(表4)。分析されたモラクセラ細胞10000個のうちの89%以上が、SMC-1とSMC-2に特異的な血清中に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。加えて、SMC-1とSMC-2に特異的な血清のプール中に存在する抗体は、M. カタラーリスのETSU 658株の表面に結合した(表4)。この株の10000個の細胞の90%以上が特異的な抗体により標識されていることも測定された。これらの観察は、SMC-1とSMC-2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を明確に示している。抗M. カタラーリス抗体は、M. カタラーリス感染の予防に重要な役割を果たすことが明らかになった。

【0132】

10

20

【表 4】

M. カタラーリスの無傷の細胞表面における、SMC-1 及び SMC-2 に特異的な抗体の結合評

価

血清の同定	菌株	蛍光指標 <sup>2</sup>	ラベル化細胞の% <sup>3</sup>
SMC-1 特異的抗体のプール <sup>1</sup>	ETSU C-2	19.8	96.1
	ETSU 658	15.2	93.1
SMC-2 特異的抗体のプール	ETSU C-2	11.0	89.8
	ETSU 658	11.9	90.5
負コントロール血清のプール <sup>4</sup>	ETSU C-2	1.0	1.0
	ETSU 658	1.0	1.0
正のコントロール血清 <sup>5</sup>	ETSU C-2	25.0	97.4
	ETSU 658	19.6	93.3

10

20

<sup>1</sup> 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、マウスに皮下注射した。血清を1/50に希釈した。

<sup>2</sup> 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

。

<sup>3</sup> 分析した10,000細胞のうちの、ラベルを付した細胞%を示す。

30

<sup>4</sup> 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。

<sup>5</sup> 検定には、精製されたM. カタラーリス株ETSU-C2由来の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 8）

【0 1 3 3】

抗SMC-1及びSMC-2マウス血清の殺菌活性を、以下実施例で説明する。

【0 1 3 4】

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<sub>490nm</sub>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 × 10<sup>4</sup>CFU/mlに希釈した。細菌懸濁液25 µlと、熱で不活化した希釈試験用血清50 µl及びHBSS 15 µl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 µl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、免疫化前のマウスから採取した熱不活化血清およびウサギ捕体とインキュベートした細菌を含むものとした。殺菌

40

50

活性は、コントロールと比較して、50%がそれ以上の細菌を殺す結果となる最高血清希釈として測定した。M. カタラーリス株 E T S U 658を用いて血清の殺菌活性を評価した。M. カタラーリス株 E T S U 658に対する殺菌活性は、精製された組み換えSMC-1又はSMC-2ポリペプチド20 µgで5回免疫したマウスから採取した血清において検出した。

(例9)

【0135】

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。

【0136】

10匹の雌の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)の存在下で、アフィニティ精製されたHisタグを付したM.カタラーリス組換えポリペプチド20 µgを、2週間毎に5回、皮下に投与して免疫化するが、又は、コントロールとして、PBS中の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及び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ETSU 658約1x10^6CFUを用いて、マウスに肺内疾患を患わせた。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、投与した量を確認した。マウスは、ペントバルビタール・ナトリウム(Euthanyl(登録商標))の腹腔内投与により感染の5時間後に屠殺した。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測定のための連続希釈でプレーティングすることにより、肺ホモジェネートについて細菌リアソスを測定した。

【図1】

1 ATGCAACACCG CTCATCACCA TCGCTCAAAG ACATATTTGA CTACCCGCTAT TCGTTCAGCA
61 CTATTTTGGTA TCGCAGTTTT GCCATTTGTC ATACCAACTT ATGCGAGAATC CAAATACACAGC
121 CGTTCACACTA CAGTCGTTGG TCGTGCAGCC TCAAAAATAAT TGCCCTGATAC ACCCAATATAC
181 AAACCCCAATA CTGTCCTTAGC CTTAGAGCCG CATCTACAAA GTCATGATGA TACCAACCAAT
241 GCCTTTGATG GCTTTTATTT TGAAGTTATC ACACAGACAG CAGCCGACGA CACACACAGAT
301 CAGCAAAATC AAGGCAATCA TCGKGTGAGC CAGCTGACGC CTTTTCCTAG TAAGTCAGAC
361 AATCCAGATT AAACACGTC CAGCCTGACG GATAGCAATG ATACACCCCT TGCAGTAA
421 AGCTTAGCCA AAACACGTC CAGCCTGACG GATAGCAATG ATACACCCCT TGCAGTAA
481 CAGGGTAATG GATGACAGCC AATCCACCAA GCAACACACA CAACCCGCCC TCATCGTTAT
541 AAATCGATG AAAATGTTAA TCGATATACA GAGATGGTAA TTTTGTCTCA AGCTGATTA
601 GGATATTATG ACCTCAAAAC TTATGCCGAA CTGTCTGGCA ATGTCAATTAT GGAACAACAAC
661 GCTCGCGGTG TAACCCGCTGA TAAGCTTACT TTAGACACCC AAACAGGGCA AGCCACTCGCG
721 TCAGGTCAGT TACAAATTAG TGATGGCGGT GCAAGTGATC ACAGTGTGG CATTATTGGC
781 ATGGCTGAAA ACTTATGATA CCATACAGAT GGTGACAGC CGACCCGACA AGATTTGCTC
841 TTTGCAAGCA CTACATGATA TGCTCAGCTG TATGCCAGTC AAATGGATAA AATAAGCAGT
901 AGCGAATATC GGCTTCAACA TGCTCATGTC ACCACCTGTC CACCCACAGA ACGCAAAATG
961 TACTTAGATA CTGATAGCAT TGATATCAAT ACCGATACAG GTCGTGCTAT CGCCAAAAAT
1021 ACCACCTTGC GTATCAAAA AGTACCTGTC TTTTACCTGC CCTATTTTAA CTTTCCGATC
1081 GATGCTCGTC GCTCTTCTGG ATTTTATTA CAATCAATGG GATTGGTGG ATCGGACAGT
1141 TTTGAAATA GTACGCCCTA TTATCTGAAT TTGGCACCG ATTATGATGC AACCAATTAGC
1201 CCAACTGAT TTACTAAGCC CAATCCTATG CTGACTGGCG AATTTCGTTA TCTGACCCAA
1261 GATTATGAT CAGCGGTTGT GACTGCTGCG TATCTTCCAA AAGATCAGCA ATATCAATAT
1321 AAAGACCGTA CGCGAATACA APTTGAATCAT ACATGGCAAC CCAAGCGTT TGTAAATAT
1381 ACCACTTAGC CACAATATCA ATCTGTTTCT GATGCAAAAT ATTTATGAGA CTTTAAATGCC
1441 TTGGGTTGTT AGATGCTGTA GCTAAATCTA CCAAGACGCA TCGGCAACAG CTTCTTGAT
1501 GAAATGTTCT CAGCTGATTT ABAATTTGAA GATTTTACGC GTTTAGAGCG TTTTGGCTTA
1561 GATGGTCCGC CAATTAAGCA CAAAGATAGA CCAATGACAC GCCTTACACA GGTGAGGTT
1621 AACTATGCTT TCCCTTCCAT ATGGATGGT ACACCCAGCG GTCTTGAAT GGTGAGTAT
1681 CATATTTCTC CCTATTTCAA AAAATCCATT AAAGATAACT CTGACACAGA AAAAGCGGT
1741 GGTAGAAATF TTAACTAATF CACACCCGAT TATCACTGTC TTGCTCTTTG GGGTATTTTG
1801 ACGCAAAAC TTAGCTTAC ACATATATAT ACCAGCTATG ACGAAGCAG CTTAGCCGAC
1861 CAATAATATG TGACACCAAG ATTACACTAT ACTTACACGC CTTTAAAGA TCAACAATAC
1921 GCTGGGCTAT TTTTGAANA AGCGGTTGCA CCAITTTGCA TGATCAAGA TACAGATTAAC
1981 TATCAAGTAC TGACACCAAG ATTACACTAT ACTTACACGC CTTTAAAGA TCAACAATAC
2041 GTACCAAAAT TTGACACAAA AATTGCAAGC CTTAGCTATG AGCAGCTTTT GAACAAATAC
2101 TGGTTTTTGG GTCATGATGC CATTCAAGAT TTACACCCGC TCACGCTCTG ASTCAGCTAC
2161 CGTTATATAG ATAAAATGGG CAGGACACGC TTTGAAGGCG GGATCGCAGA ACAGATTTTA
2221 TTGATGCATA TCCGTTGTTG TATCAAAAGC ACGCAAAAGCT ATAGACAGCA AGCTCTGCTG
2281 TTGGCATGGC AAGCCAGCCT ACAGCAAAA GACAATTTAT GGTTTGATGC ATCAGGTTCA
2341 TTAGAAACA AATATGATTT GAGCAGTATT GTGGCACAAA TTGCTGATGC TCCAAGTATG
2401 CGTAAATAT TTAACTTAGG TATTGTCAA AAAAAGAAA ATGCTGCTTT TAATCAATCA
2461 GCATTATCAG CATATACACT CCCCCCATTT TTTCACATCA ATAAATGCTG CCGTATGATG
2521 GGTCAACTAC AATAGACTTA CACTTGAAT TTTCACATCA ATAAATGCTG CCGTATGATG
2581 TATGAAGATT GCTGTATGG TTGTGCAACT TATGCAAGC GCTATCGTGA TGCTTTCAAT
2641 CCACTTTAT CACTGATAC TCGATGATG TCGAAGTTC GCGAAGTTC GCCTAAAGCG ATCGGTGCGC
2701 GCGGTGCTT TGATGCACT TTTGACGAAA AAGGTACTAG CCTATGATCA GGTTCGAAAT
2761 GCTTGAAGC ATGATTAATA A (SEQ ID NO : 1)

【図2】

1 MHTAHHHRK TYLTTAIRYA LFGIASLPFV IPTYAEINTS RSLTVVGADG SKNLDPTPNT
61 KPTVTLALDA HLQSHDDTAN AFDGDFEVI TQQAABQTS QANQGNHMS QLDAFASKSD
121 PSLNLTARIT DKHUTPSASK SLAKLAENYH IKSDPDHRC QMNMQPIHQ AHTNRPITP
181 KLDENGNPIT RDGIFQAQDY GYDAQTYAE LGSNVMQBN GRRVTADKLT LDTGTGQATA
241 SQVQFSDGG ASDHSAGIIG MAENLVYHTD GQTATAQVA FASTTINAHG YASQMDKISS
301 SEYRLQVVMF TTCPPTEKRW YLDTSDIDIN TDTGALAKN TTLRLIKVEV FYLFPNFFPI
361 DARRSSVPLL PSMGFGASDS FEISTPYLIN LAPPYDAIT PTYFTNRMFM LGSFRYLQ
421 DYSGSVLTAS YLPKQDQYHD KDRSRIQPDH TWQPKQDFTI TTYAQYQSVS DANLSDPNA
481 LGVESAKLNL PRRIQTSFLD ENVSADLRFE DFQRLDGFGL DGRPITTKDR FYARLPLQSV
541 NYRLPRIWVG TPGSLELGGI HNSAYPKKSI KDNSEPEKSG GRIFNQFTAS FYLLRSWGLV
601 TPKLTLTHLY TSYDEDSLAD ONIAKKNRHR SVFAPTVSLD AGLGFEBKGA PFCMHQDTGG
661 YQVTLPRLHY TYTPFKDQHN VPFETKIAQ LSYEQLLANN WFLGHEDRYOD LEAVTANVSY
721 RYLDKMRGRTR PEGQIAEQIL LSHIRVGLND SREYSRSGS LAMQASLQPK DNLWFDASGS
781 PRNNDLSSI VAQIRYRPSD RKLFLGLVYR RKNRFRPNOS ALSAYTASAI PFIMNRMFM
841 GQLQYDYNLD YVMDSLMGLM YEDCCYGLST YARRYRDFRN PHLSPDTAVM ABLVRLNGIGG
901 GRLRLNLSSE KVLGYDQVRN AWRHDY\* (SEQ ID NO : 2)

【図3】

1 GTGGGTAAA TTATGTCAAA AATTCCCATG ATGAATGAAA AGTATTTTGC TCGTACGCA
61 CTTTATTTGT TGATTCGCGC GGCTATCATG GCAGGCTTGT GPTTGTATTG TTGGTTGACC
121 AGCTCCGTAC CAGCAATGAT TAATAAACA AACCCCAATC AAACATGCTC CTATGTTGGC
181 ACATTCGCGA CCACAATCAT AGCGTAAAT GAGCTTGATC ATGTGTGTTA GCCCATGGAT
241 AATTCCGCGC TTGTCGAGCA CTTACGCAAC TATCCACTGC AATTAAAGCA CAAAGTTTAT
301 TTTAATGGTA TTATGCTGTC TTATCAACTT GAGCTGATGG ATGTACACGA CAAAGTTTAT
361 ATCGTGGATT ATCTAAACAG CCGAGAAGAT CGTAAACAT TTGCTTATTG TCGCTTACT
421 GATGCCAATG ATAAATAGCG ATATGACTG ACTTATGGTA AATTACGAG TCCACGTGAT
481 GCAGAACTCT CTTTGCACAC CGTAAATTTT AGACTGCCA AATTACGAG TCCACGTGAT
541 ACCAAATCTC CTGAGTTGGT CCGAGTATG GACTTGGTA AATTACGAG TCCACGTGAT
601 GATTGGCAG ACTTCCAGCC TCGCCGCTT CCGCTGAGG ATTTGGCTGA GCGTGTGATG
661 GTCAAGCGCG CCAAGCCAGC AGTCCGCTT CCGCTGAGG ATTTGGCTGA GCGTGTGATG
721 CAACACAAA TTCCCGACGC AACTGAGTGC GTACAGTGC CACTTGCCTA TTTGCCTATG
781 AACGATACA ATCGTTTGTG TATCAABA GATTCAGTGC GTACAGTGC CACTTGCCTA TTTGCCTATG
841 GCACCAACTG CAGCCACACA GTCCACGAG CAAACAGCGC ATATGATGAC CAAAATGAA
901 ATNTCTAAG CACTCTCAC ACCCAAAAGC CATTCCGCGC AGACGAATC GCAATAA
(SEQ ID NO : 3)

【図4】

1 VQKMSKIPM MNEKYFRQK LYWLIAAAM AGLWLIWLT SVVPAMINKQ NANQTSSYVA
61 TLPTTTTALM ELDRVVKPMD NSALVRLRN YPPEKDKVY FNGISGRYTI ELMADVTEV
121 IVDVLSRSD RINFAFRYPT DANDNKRVLV YGKFTSPAD ABSALQTVN RLPKSIQKT
181 TKISELVAM DNYELQDQV DLADQPRRV RLQATRTETP VKAATPADEB LARLSREARL
241 QTIQSQTES VROPTDLDIQ NDINRLSNQR SQVSSSDELM APTARFQSPQ QTADIVPKNE
301 ISKTAAPTQS HSAETESQ\* (SEQ ID NO : 4)

## 【配列表】

2009279003000001.app

## 【手続補正書】

【提出日】平成21年7月28日(2009.7.28)

## 【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【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、次のポリヌクレオチド、

(a) 配列番号2、4、またはそれらの断片または類似体から選ばれる配列を備える2次ポリペプチドと少なくとも70%の同一性を持つポリペプチドをコード化するポリヌクレオチド、

(b) 配列番号2、4、またはそれらの断片または類似体から選ばれる配列を備える2次ポリペプチドと少なくとも80%の同一性を持つポリペプチドをコード化するポリヌクレオチド、

(c) 配列番号2、4、またはそれらの断片または類似体から選ばれる配列からなる2次ポリペプチドと少なくとも95%の同一性を持つポリペプチドをコード化するポリヌクレオチド、

(d) 配列番号2、4、またはそれらの断片または類似体から選ばれる配列を備えるポリペプチドをコード化するポリヌクレオチド、

(e) 配列番号2、4、またはそれらの断片または類似体から選ばれる配列を備えるポリペプチドのための結合特異性を持つ抗体を生じさせるポリペプチドをコード化するポリヌクレオチド、

(f) 配列番号2、4、またはそれらの断片または類似体から選ばれる配列を備えるポリペプチドのエピトープ関連部分をコード化するポリヌクレオチド、

(g) 配列番号1、3、またはそれらの断片または類似体から選ばれる配列を備えるポリヌクレオチド、および

(h) 上記(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)または(g)における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。

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 48/00	(2006.01)	A 6 1 K 48/00	4 H 0 4 5
A 6 1 K 39/02	(2006.01)	A 6 1 K 39/02	
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 11/14	(2006.01)	A 6 1 P 11/14	
A 6 1 P 11/02	(2006.01)	A 6 1 P 11/02	
A 6 1 P 27/02	(2006.01)	A 6 1 P 27/02	

- (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 リュ 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 リュ マリタン 2401
- (72)発明者 ステファン リウクス  
カナダ国 ケベック ジー1イー 1ジェイ3 ビューポート アヴェニュー 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 - ドウ - 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 AA13 BA31 BA80 CA01 DA06 EA04 GA11 HA08  
4B064 AG31 CA02 CA19 CC24 CE12 DA01  
4C084 AA13 NA14 ZA33 ZA34 ZA62 ZB09  
4C085 AA03 BA15 CC07 DD61  
4C086 AA02 AA10 EA17 EA18 MA01 MA04 NA14 ZA33 ZA34 ZA62  
ZB09  
4H045 AA11 AA30 BA09 CA11 DA86 EA31 FA74 GA26

【外国語明細書】

2009279003000001.pdf

专利名称(译)	莫拉氏菌 (Blanhamera) 卡他性多肽和相应的DNA片段		
公开(公告)号	<a href="#">JP2009279003A</a>	公开(公告)日	2009-12-03
申请号	JP2009175125	申请日	2009-07-28
[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 C07K4/04 C12P21/00 A61K31/711 A61K31/7105 A61K48/00 A61K39/02 A61P37/04 A61P27/16 A61P11/14 A61P11/02 A61P27/02 G01N33/53 A61K38/00 A61K39/00 A61P11/04 A61P31 /00 A61P37/02 C07K14/195 C07K14/21 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15 /31 C12P21/02 G01N33/569		
CPC分类号	A61K39/00 A61P11/02 A61P11/04 A61P11/14 A61P27/02 A61P27/16 A61P31/00 A61P37/02 A61P37 /04 C07K14/212 Y10S435/975		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K4/04 C12P21/00.C A61K31/711 A61K31/7105 A61K48/00 A61K39/02 A61P37 /04 A61P27/16 A61P11/14 A61P11/02 A61P27/02 C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA13 4B024/BA31 4B024/BA80 4B024/CA01 4B024/DA06 4B024/EA04 4B024 /GA11 4B024/HA08 4B064/AG31 4B064/CA02 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/CE12 4B064/DA01 4C084/AA13 4C084/NA14 4C084/ZA33 4C084/ZA34 4C084/ZA62 4C084/ZB09 4C085/AA03 4C085 /BA15 4C085/CC07 4C085/DD61 4C086/AA02 4C086/AA10 4C086/EA17 4C086/EA18 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZA33 4C086/ZA34 4C086/ZA62 4C086/ZB09 4H045/AA11 4H045 /AA30 4H045/BA09 4H045/CA11 4H045/DA86 4H045/EA31 4H045/FA74 4H045/GA26		
优先权	60/314634 2001-08-27 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

解决的问题：提供可用于预防，诊断和/或治疗的多核苷酸和多肽。 解决方案：SMC-1基因和SMC-2基因由卡他莫拉氏菌的特定序列，含有该核苷酸的载体和用该载体转染的宿主组成。 包含基因序列的多肽及其生产方法。 一种使用该肽预防，诊断和/或治疗莫拉氏菌感染的方法。 [选型图]图1

1 ATCCACAGCC CTGATCAGCA TCCGCAAG ACATATTGA CTACCGTAT TCGTTACCA  
21 GATTTGKTA TCCGAGTTT GCCATTATC ATACCAACT ATGGAGACT CAATACAGC  
31 CBTTCAGTGA CAGTCCTTGG TCGTACAGC TAAABAAAT TGCCTGATC ACCAATACC  
41 AAACCCAAAT CTCTTTAGC CTTAGAGGCC CATCTGAAA GTCAATGATG TACTGCCAAT  
51 GCGTTGATG GCTTTGATTT TGAAGTTATC ACACAGCAGG CAGCCGAGCA GACAGCCGAT  
61 CAGGCAATC AAGGCAATCA TCGATGAGC CAGCTGAGC CTTTCTTAG TACTGAGAC  
71 AATCCAGAT TAAACACTTC CAGGCTGAG GATGAGCATG ATACCCCTC TCGCATAAA  
81 AGCTTAGCCA AATGAGCGGA AAATCAGCAT ATGAGTCCG ATCCAGACC TCATCGTTF  
91 CAGGCTATTT GATATGAGC AACCCCGAA GCACAGCAGA CAGACCCCT TCCACCCCA  
101 AAATCTGATG AATAAGGTA TCCGATTACA GAGATGGA TTTTGCCTG AGTGAATAT  
111 GATATATG ACCTGAAAC TTATGCCAA CTCTTGGCA ATGTATTAT GAGCAAAAC  
121 GATGCGGAG TAAACCGTGA TAGCTTACT TTAGACACC AAACAGGGA ACCACTGCG  
131 TCAAGTCAAG TACCAATTAG TGAATGCGT GCAGTGTATC ACAGTGCCTG CATTAATGCG  
141 ATGGCTGAA ACTTGTGATA CCAAGAGAT GATCAAGCAG CAGCCCGCA AGATTTGCT  
151 TTGCAAGCA CTACCACTAA TGTCCAGGTT TATGCAATC AATGATATA AATAAGCAT  
161 AGCGAAATC GCGTTCAGCA TGTGATTTG ACCACTTTC CAGCCAGAA AGCAATGAG  
171 TACTTAAATA CTGATGCAAT TATATGAT ACCGATACAG GTCGAGTAT GCGCAAAAT  
181 ACCACTTGC GTATCAAAA AGTACTGTC TTTTACCTG CCTATTATA CTTCCGATC  
191 GATGCTGCG GCTCTCTGG ATTTTAAEA CAGTAAAGG GATTTGATC ATCCAGAT  
201 TTGAAATA GTACGCCATA TTATGAAAT TTGCAACAG ATTAGATGC ACCATGAG  
211 CCAAGTATAT TTACTAAGCG GAATCCTATG TCGACTGGG AATTCGTTA TCTGACCAG  
221 GATTAATGAT CAGGCTTAT GCTGCTTGG TATCTTCAA AGATGAGCA ATACATGAT  
231 AAAGACCGTA GCGAATACA ATTTGATCAT ACATGCAAC CCAAGCAGTT TGTAAATAT  
241 ACCACTGAG CAGATATCA ATCTGTTCT GATGCCAAT ATTTATCAG CTTCAATGC  
251 TGGGTCTTG AAGATGCTAA GCTAAATCA CCAAGCAGA TCGGCAAG CTTCTGAT  
261 GAATAATCT CAGCTGATTT AAGATTGAA GATTTGAGC GTTTAGAGG TTTGCTTA  
271 GATGCTGAG CATTAGAGA CAAATGAA CCAATGAC GCTTACCAG GCTATGCT  
281 AACTATGCT TGCCCTGAT ATGATGCT ACACCAAGC GTCTGACT GGTGATAT  
291 CATAATCTG CCTATTCAA AAATCCGTT AAGATGACT CTGACAGAA AAGACCGT  
301 GATGATAT CTAACTAAT CAGCCGCTG TATCCACTGC TTGGCTTGG GGTATATG  
311 AAGCAAAAC TTAGCTTAC AATATATAT ACCACTATG ACGAGACAG CTTGAGCAG  
321 GAAATATCG CTAAAGAAA TGGTCCGAT TGGATATG CAGCAAGT CAGCTTGT  
331 GCTGGGCTAT TTTTGAATA AGCGGTGCA CCTTTGGA TGCATAGA TACAGTGC  
341 TATCAGTAC TGACACCAAG ATTAGCTAT ACTTACAGC CTTTAAAGA TCAAGCAT  
351 GATCAAGAT TTGAGAGA AATGTCGCT CTTAGCTAG AGGAGCTTT GACAGAT  
361 TGTGTTTG GTCAAGTCC GATCAAGAT TTACAGCCG TCAACCCTG APTCAGTAC  
371 GFTTATATG ABAATAGGG CAGGACAGC TTTGAGGGG GATTCAGAA AGRATTTA  
381 TTGATGATA TCCGCTTGG TATCAATGAC AGCGAAGCT ATACAGCAG AGCTCTGT  
391 TTGCAATGAG AAGCCAGCTC AAGCCAAA GACAAATTAI GGTITGATG ACTGATCA  
401 TTAAAGAA ATTAGATTT GAGGCAAT GTCACAAA TTTCTATG TCAATGAT  
411 GATATGAT TTAACTAGG TATTGCAA AAGAAAGAA ATCTGCTTT TATCAATCA  
421 GATATGAG CATATACAG CAGCCGCTT TTTCAATCA AATATGCTG GCTATGAT  
431 GATCAATC AATAGACTA CACTAGAT TATGCAAG ATTCCTGAT GGGCTAAAT  
441 TATGAGAT GCTGTTATG TTTGCAATC TATGAGAG CCAATCTGA TCTTCAAT  
451 CCAATTTAT GAGCTGATG TCGATATG GCAAAATTC GGTAAAGT TATCTGCT  
461 GCGGCTCTT TGAATGACT TTTGAGCAA AAGGACTAG CCAATGATCA GCTTCAAA  
471 GCTTGGAGC ATGATTACTA A (SEQ ID NO : 1)