

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A) (11)特許出願公表番号

特表2003 - 511074

(P2003 - 511074A)

(43)公表日 平成15年3月25日 (2003.3.25)

(51) Int. Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マコード* (参考)
C 1 2 N 15/09	ZNA	A 6 1 K 31/14	4 B 0 2 4
A 6 1 K 31/14		31/436	4 B 0 6 3
31/436		35/74	4 B 0 6 5
35/74		39/02	4 C 0 8 4
38/00		39/07	4 C 0 8 5
審査請求 未請求 予備審査請求 (全 63数) 最終頁に続く			

(21)出願番号 特願2001 - 530483(P2001 - 530483)

(86)(22)出願日 平成12年10月9日(2000.10.9)

(85)翻訳文提出日 平成14年4月8日(2002.4.8)

(86)国際出願番号 PCT/GB00/03866

(87)国際公開番号 W001/027280

(87)国際公開日 平成13年4月19日(2001.4.19)

(31)優先権主張番号 9923858.6

(32)優先日 平成11年10月9日(1999.10.9)

(33)優先権主張国 イギリス(GB)

(71)出願人 ニュウテック ファーマ パブリック リミテッド カンパニー
イギリス国 マンチェスター エム13 9ダ
ヴリュエル オクスフォード ロード マ
ンチェスター ロイヤル インファーマリ
ー クリニカル サイエンスズ ビルディ
ング (番地なし)

(72)発明者 バーニー・ジェームズ・ピーター
イギリス チェシャー エスケ-9 7ピー
ワイ オールダーリー エッジ グレイス
トーク ドライヴ 1

(74)代理人 弁理士 鈴木 弘男

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 抗菌組成物

(57)【要約】

【課題】

【解決手段】 本発明は抗菌組成物、特にBurkholderia cepaciaに作用を及ぼす組成物、ならびにかかる組成物のための診断試験とかかる組成物の使用に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列番号2の配列を有する多剤排出ポンプ又はそれと少なくとも85%の相同性を有する多剤排出ポンプ。

【請求項2】 配列番号2の配列と少なくとも90、95又は99%の相同性を有する請求項1に記載の多剤排出ポンプ。

【請求項3】 *Burkholderia*又はシュードモナス(*Pseudomonas*)属の生物によって発現される、上記請求項のいずれか1項に記載の多剤排出ポンプ。

【請求項4】 クレブシエラ(*Klebsiella*)、エンテロバクター(*Enterobacter*)、セラチア(*Serratia*)、サルモネラ(*Salmonella*)又は赤痢菌(*Shigella*)属の生物によって発現される、請求項1又は2のいずれか1項に記載の多剤排出ポンプ。

【請求項5】 上記請求項のいずれか1項に記載の多剤排出ポンプをコードするヌクレオチド配列。

【請求項6】 配列番号1の配列を有する請求項5に記載のヌクレオチド配列。

【請求項7】 中又は高ストリンジェンシー条件下で請求項5又は6のいずれか1項のヌクレオチド配列の補体にハイブリダイズする核酸分子。

【請求項8】 ヒト又は動物の身体の治療又は診断の方法において使用するための、請求項1又は2のいずれか1項に記載の多剤排出ポンプ。

【請求項9】 当該多剤排出ポンプを発現する生物による感染の治療のための薬剤の製造における、請求項1又は2のいずれか1項に記載の多剤排出ポンプ又はその免疫原性断片の使用。

【請求項10】 配列番号11から20のいずれか1つの配列を有する請求項9に記載の多剤排出ポンプの免疫原性断片の使用。

【請求項11】 薬剤がワクチンである、請求項9又は10のいずれか1項に記載の多剤排出ポンプ又はその免疫原性断片の使用。

【請求項12】 当該多剤排出ポンプを発現する生物による感染の治療のための薬剤の製造における、請求項1又は2のいずれか1項に記載の多剤排出ポン

プの阻害因子の使用。

【請求項13】 テトラサイクリン及びキノロンから成る群から選択される抗生物質と組み合わせた、請求項12に記載の多剤排出ポンプの阻害因子の使用。

【請求項14】 キノロンがナリジクス酸である、請求項13に記載の多剤排出ポンプの阻害因子の使用。

【請求項15】 当該多剤排出ポンプを発現する生物による感染の治療において同時に、別途に又は連続的に使用するための、請求項1又は2のいずれか1項に記載の多剤排出ポンプの阻害因子と少なくとも1つの抗生物質の混合製剤。

【請求項16】 当該多剤排出ポンプを発現する生物に対する消毒薬の製造における、請求項1又は2のいずれか1項に記載の多剤排出ポンプの阻害因子の使用。

【請求項17】 第四アンモニウム消毒薬を含む少なくとも1つの消毒薬と組み合わせた、請求項16に記載の多剤排出ポンプの阻害因子の使用。

【請求項18】 請求項1又は2のいずれか1項に記載の多剤排出ポンプの阻害因子と少なくとも1つの抗生物質を含む抗菌組成物。

【請求項19】 抗生物質(単数又は複数)がテトラサイクリン及びキノロンから成る群のいずれかから選択される、請求項18に記載の抗菌組成物。

【請求項20】 キノロンがナリジクス酸である請求項19に記載の抗菌組成物。

【請求項21】 請求項1又は2のいずれか1項に記載の多剤排出ポンプの阻害因子と少なくとも1つの消毒薬を含む抗菌組成物。

【請求項22】 消毒薬(単数又は複数)が第四アンモニウム消毒薬を含む請求項21に記載の抗菌組成物。

【請求項23】 請求項1又は2のいずれか1項に記載の多剤排出ポンプの阻害因子が、抗体又はその抗原結合断片を含む、請求項12から22のいずれか1項に記載の抗菌組成物の使用。

【請求項24】 抗体又はその抗原結合断片が、配列番号11から20のいずれか1つの配列を持つポリペプチドに対して特異的である、請求項23に記載

の抗菌組成物の使用。

【請求項25】 消毒する表面に、請求項21から24のいずれか1項に記載の抗菌組成物を適用することを含む消毒の方法。

【請求項26】 細菌における多剤耐性を検出する方法であって、

(i) 細菌において請求項1、2、5、6又は7のいずれかに記載の多剤排出ポンプ又はそれをコードするヌクレオチド配列の存在を測定する段階と、

(ii) 段階(i)の結果を細菌における多剤耐性の存在又は不在と関連づける段階とを含む方法。

【請求項27】 多剤排出ポンプの存在を、多剤排出ポンプに特異的な結合物質に細菌を接触させ、結合物質 - 多剤排出ポンプ結合反応を検出することによって測定する、請求項26に記載の方法。

【請求項28】 結合物質が多剤排出ポンプに対して特異的な抗体又はその抗原結合断片を含む、請求項26に記載の方法。

【請求項29】 抗体又はその抗原結合断片が、配列番号11から20のいずれか1つの配列を有するポリペプチドに対して特異的である、請求項28に記載の方法。

【請求項30】 多剤排出ポンプをコードするヌクレオチド配列の存在を、多剤排出ポンプをコードするヌクレオチド配列にハイブリダイズするヌクレオチド配列又はその転写産物に細菌を接触させ、ヌクレオチド配列 - ヌクレオチド配列ハイブリダイゼーション反応を検出することによって測定する、請求項26に記載の方法。

【請求項31】 多剤排出ポンプをコードするヌクレオチド配列の存在を、多剤排出ポンプをコードするヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列又はその転写産物に細菌を接触させ、ヌクレオチド配列 - ヌクレオチド配列結合反応を検出することによって測定する、請求項26に記載の方法。

【請求項32】 請求項1又は2のいずれか1項に記載の多剤排出ポンプの存在によって与えられる多剤耐性を持つ細菌の存在を検出する方法であって、

(i) 患者からサンプルを採取する段階と、

(ii) サンプルにおいて請求項1、2、5、6又は7のいずれか1項に記載

の多剤排出ポンプ又はそれをコードするヌクレオチド配列の存在を測定する段階と、

(i i i) 段階 (i i) の結果を多剤耐性を持つ細菌の存在又は不在と関係づける段階とを含む方法。

【請求項 3 3】 多剤排出ポンプの存在を、多剤排出ポンプに特異的な結合物質にサンプルを接触させ、結合物質 - 多剤排出ポンプ結合反応を検出することによって測定する、請求項 3 2 に記載の方法。

【請求項 3 4】 結合物質が多剤排出ポンプに対して特異的な抗体又はその抗原結合断片を含む、請求項 3 3 に記載の方法。

【請求項 3 5】 抗体又はその抗原結合断片が、配列番号 1 1 から 2 0 のいずれか 1 つの配列を持つポリペプチドに対して特異的である、請求項 3 4 に記載の方法。

【請求項 3 6】 多剤排出ポンプをコードするヌクレオチド配列の存在を、多剤排出ポンプをコードするヌクレオチド配列にハイブリダイズするヌクレオチド配列又はその転写産物に細菌を接触させ、ヌクレオチド配列 - ヌクレオチド配列ハイブリダイゼーション反応を検出することによって測定する、請求項 3 2 に記載の方法。

【請求項 3 7】 多剤排出ポンプをコードするヌクレオチド配列の存在を、多剤排出ポンプをコードするヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列又はその転写産物に細菌を接触させ、ヌクレオチド配列 - ヌクレオチド配列結合反応を検出することによって測定する、請求項 3 2 に記載の方法。

【請求項 3 8】 サンプルが血液、血清、気管支吸引液又は痰を含む、請求項 3 2 から 3 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 3 9】 請求項 1 8、1 9、2 0、2 3 又は 2 4 に記載の抗菌組成物を患者に投与することを含む、請求項 1 又は 2 のいずれか 1 項に記載の多剤排出ポンプを発現する生物による患者の感染の治療方法。

【請求項 4 0】 患者が嚢胞性線維症患者である請求項 3 6 に記載の感染の治療方法。

【請求項 4 1】 配列番号 1 1 から 2 0 のいずれか 1 つの配列を有し、エピ

トープを表示するポリペプチド。

【請求項42】 請求項1又は2のいずれか1項に記載の多剤排出ポンプを当該生物に導入することを含む、生物に抗生物質耐性を与えるための方法。

【請求項43】 請求項1又は2のいずれか1項に記載の多剤排出ポンプを導入した生物。

【請求項44】 配列番号1から4、7から22のいずれか1つに従った分子の配列を含むデータ担体。

【請求項45】 配列番号1から4、7から22のいずれか1つに従った配列を分析する方法であって、次の1つ又はそれ以上を含む方法：当該配列ともう1つ別の配列の配列同一性又は相同性の度合を調べる、配列の二次構造を調べる、構造の分子量を調べる、及び配列の免疫学的及び化学的特徴を調べる。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、抗菌組成物、特に*Burkholderia cepacia*に影響を及ぼす組成物、ならびにその診断試験とその使用に関する。

【0002】

【技術分野】

*Burkholderia cepacia*はタマネギの軟腐病の主要原因である。まれに健常者においても病原性であるが、過去15年以上にわたって、嚢胞性線維症(CF)及び慢性肉芽腫症を有する個人での肺感染により一般的に結びつく重要な日和見病原体とみなされてきた(Jarvis, W. R.ら、1987、*Eur. J. Epidemiol.*, 3:233-36)。CF患者は環境からこの細菌によってコロニー形成され、最近のデータでヒトからヒトへの伝播の証拠が明らかにされた(Sajjan, U. S.ら、1992、*J. Clin. Invest.*, 89:648-56; Govan, J. R. W.ら、1993、*Lancet*, 342:15-19)。これは、病院及び社会環境の両方においてコロニー形成個人を非コロニー形成個人から隔離するための厳しい措置をもたらすことになった。

【0003】

*B. cepacia*による気道のコロニー形成は臨床的予後の悪化に結びつく：コロニー形成個人の20%までが「*B. cepacia*症候群」、すなわち迅速で致命的な予後の悪化をもたらす発熱を伴った肺炎に罹患する(Isles, A.ら、1984、*J. Pediatr.*, 104:206-210; LiPuma, J. J.ら、1990、*Lancet*, 336:527-532)。

【0004】

*B. cepacia*は環境中に存続することが示されており、クロルヘキシジンのような消毒薬に耐性である(Sobel, J. D.ら、1982、*American J. Med.*, 73:183-186)。この微生物にコロニー形成された患者の治療は、臨床的に最も広く使用可能な抗生物質に対して内因性耐性

があるため、厄介である (Pitt, T. L. ら、1996、J. Med. Microbiol., 44(3):203-210)。B. cepaciaの耐性の機序は四重構造である。第一に、リポ多糖類と孔を形成する外膜蛋白質の変化によると考えられる、細胞外壁の選択的透過性が起こる (Nelson, J. W. ら、1994、FEMS Immunol. Med. Micro., 8:89-98)。B. cepaciaにおけるこのタイプの機序がクロラムフェニコール耐性を与えることが明らかにされた (Burns, J. L. ら、1989、Antimicrob. Agents and Chemotherapy, 33:136-141)。第二に、薬剤の細胞内標的が薬剤に対してもはや感受性でないように変化しうる、例えば蛋白質標的の変化やリボソーム感受性の低下である。第三には、抗生物質の不活性化、例えば最も強力で広域スペクトルの抗生物質を加水分解することができるカルベペナーゼを含めたβ-ラクタマーゼの産生がある (Simpson, I. N. ら、1995、J. Antimicrob. Chemother., 32:339-341)。B. cepaciaにおける耐性の主な機序の1つは、薬剤排除ポンプを通しての能動排出であると考えられている (Burns, J. L. ら、1996、Antimicrob. Agents and Chemotherapy, 40(2):307-313)。しかし、これはまだ証明されておらず、薬剤排除ポンプは同定されていない。hdrABと称されるABC輸送体の存在が以前に示唆されたが (Journal of Antimicrobial Chemotherapy Volume 44, 補遺A、1999年7月)、配列又はその同一性の指示は与えられなかった。

【0005】

B. cepaciaにおいて、重要な促進因子スーパーファミリーの成員である、すなわちABC輸送体蛋白質ではなく (Higgins, C. F., 1992, Annu. Rev. Cell Biol., 8:67-113)、また重金属耐性/細胞分裂ファミリーの成員でもない (Saier, M. H. Jr. ら、1994、Mol. Microbiol., 11:1841-1847)、新規多剤排除ポンプが同定された (Dinh, T. ら、1994、J. Bacter

iol., 176:3825-3831; Marger, M.D. と Saier, M.H., 1993, Trends Biochem. Sci., 18:13-20)。これは、抗生物質や他の分子を排出するように働き、それ故生物に薬剤耐性を与えるのを助ける。ポンプを阻害することは、例えば抗生物質の排出を妨げ、抗生物質が生物に作用を及ぼす(例えば死滅させる)ことを可能にする。従って、ポンプとその阻害は *B. cepacia* を制御するための新しい方法を提供する。特に、新しいクラスの抗菌組成物ならびに消毒薬の創造を可能にする。

【0006】

Burnieら(1995、FEMS Immunology and Medical Microbiology, 10:157-164)は、*B. cepacia* における28kDaのポーリンを開示している。これは本発明の多剤排出ポンプとは別個のものであり、本発明の多剤排出ポンプは異なる種類の蛋白質であって、49kDaの予想分子量を持つ。

【0007】

本発明によれば、配列番号2の配列を持つ多剤排出ポンプ(本文中以下では *bcrA* と称する)又はそれと少なくとも85%の相同性を持つ多剤排出ポンプが提供される。

【0008】

2つのアミノ酸又は核酸配列の間でのパーセント同一性又は相同性を決定するには、至適比較のために配列を整列する。それ故、例えば、2つの配列の一方又は両方にギャップを導入することができ、比較のためには非相同(異なる)配列は無視することができる。好ましい実施形態では、比較のために整列される第一配列の長さは、整列した領域内の、第二配列の長さの少なくとも30%、好ましくは少なくとも40%、より好ましくは少なくとも50%、さらに好ましくは60%、そしてさらに一層好ましくは少なくとも70%、80%又は90%である。次に、対応するアミノ酸位置又はヌクレオチド位置のアミノ酸残基又はヌクレオチドを比較する。第一配列内の位置が、第二配列内の対応する位置と同じアミノ酸残基又はヌクレオチド残基で占められているときには、分子はその位置にお

いて同一である。2つの配列間のパーセント同一性は、配列が共有する同一位置数の関数である（適宜に、整列を至適化するために導入したギャップの数と長さを考慮に入れて）。ポリペプチド配列については、ポリペプチドの構造又は機能には影響を及ぼさずに、1個のアミノ酸を同様の特徴を持つもう1つ別のアミノ酸に置換することができる。そのような保存的置換は表現型の上ではサイレントである可能性が高い。保存的置換として典型的に認められるのは、脂肪族アミノ酸Ala、Val、Leu及びIleの間での相互の置換、ヒドロキシル残基SerとThrの交換、酸性残基AspとGluの交換、アミノ酸残基AsnとGlnの間での置換、塩基性残基LysとArgの交換、及び芳香族残基Phe、Tyr間での置換である。表現型上はサイレントである可能性が高い保存的アミノ酸置換は、Bowieら、1990、Science 247:1306-1310に述べられている。アミノ酸配列を整列するとき、配列間の相同性のスコア（「類似性」とも称される）を与えるために保存的アミノ酸置換を考慮に入れることができる。

【0009】

好ましい実施形態では、配列の比較とパーセント同一性及び/又はパーセント相同性の決定は数学的アルゴリズムを用いて行うことができる（例えば、Lesk, A.M. (編集)、1988、コンピュータ分子生物学(Computational Molecular Biology)、Oxford University Press, New York; Griffin, A.M. & Griffin, H.G. (編集)、1994、配列DATAのコンピュータ解析(Computer Analysis of Sequence DATA)、Human Press, New Jersey; von Heinje, G., 1987、分子生物学における配列分析(Sequence Analysis in Molecular Biology)、Academic Press, New York; 及びGribnikov, M. & Devereaux, J. (編集)、1991、配列分析プライマー(Sequence Analysis Primer)、M. Stockton Press, New York参照)。配列整列のための適当なアルゴリズムはGCGソフトウェアパ

ッページに組み込まれている (<http://www.gcg.com>で入手可能)。さらに、本発明の核酸又はポリペプチド配列は、例えば他のファミリーの成員又は関連配列を同定するためにデータベースを検索する際の質問配列として使用することができる。例えば、そのような検索はBLASTIN (核酸配列) 又はBLASTP (アミノ酸配列) プログラム (バージョン2.0 - Altschul, S.F.ら、1990、J. Mol. Biol. 215:403-410; バージョン2.1 - Altschul, S.F.ら、1997、Nucleic Acids Research 25:3389-3402) を用いて実施できる。好ましい実施形態では、NCBIウェブサイト (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) で入手可能な、デフォルト検索とスコアリングパラメータと共に、ギャップ導入したBasic BLAST検索 (バージョン2.1) を使用して、配列を整列し、同一性と相同性のスコアを得る。

【0010】

配列データベースに関して実施された検索は、最も類似する既知遺伝子は、MFS遺伝子ファミリーに属する多剤耐性排出ポンプをコードするオペロンの一部である、大腸菌からのemrB遺伝子と黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) からのqacA遺伝子であることを示した (Lomovskaya, O. と Lewis, K., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci., 89:8938-8942; Rouch, D.A.ら、1990、Mol. Microbiol., 4(12):2051-2062)。これら2つの遺伝子はそれぞれ48.8%と20.1%相同である。さらに本発明の遺伝子と84.8%の相同性を持つ命名されていない遺伝子が *Burkholderia pseudomallei* において同定された。個の蛋白質 (AF110185) は、deShazer, D.ら (1999, J. Bacteriology, 181(15):4661-4664) の中で、プロテアーゼ、リパーゼ及びホスホリパーゼCの分泌に必要なII型分泌経路のための「一般分泌経路 (general secretory pathway)」蛋白質として開示されている。

【0011】

配列番号2を持つ蛋白質の相同体は、他の生物中に存在するもの又はbcraのような既存遺伝子の修飾によって生成されたものであると考えられる。例えば、相同体は保存された置換を持つことがあり、あるいはアミノ酸の付加又は欠失を持つ場合もある。特に、相同体は配列番号2の配列と少なくとも90%、例えば少なくとも95又は99%の相同性を持ちうる。蛋白質エンジニアリングの分野は当業者に周知であり、当業者は、多剤排出ポンプとしてのその機能性を保持しながら、本発明の蛋白質を容易に修飾することができるであろう。相同体は、配列の相違を生じさせる修飾、又は配列に影響を及ぼさない修飾、又はその両方によって作製することができる。修飾は、ポリペプチドの化学的誘導体化、例えばアセチル化又はカルボキシル化を含みうる。他の修飾は、例えばポリペプチドの合成、プロセッシングの際のグリコシル化、又は例えばグリコシル化に影響を及ぼす酵素（哺乳類のグリコシル化酵素など）によるさらなるプロセッシングの際のグリコシル化を含む。他の修飾は、アミノ酸、例えばホスホチロシン、ホスホセリン及びホスホトレオニンのリン酸化を含む。他の修飾は、天然に生じるL-アミノ酸ではなくD-アミノ酸の使用、及び -又は -アミノ酸のような非天然に生じる又は合成アミノ酸の使用を含む。

【0012】

配列番号2の配列を有する多剤排出ポンプ内のポリペプチド断片配列も本発明の範囲内である。そのような断片は、多剤排出ポンプの機能にとって不可欠のアミノ酸配列を含みうる。同じ機能を持つ断片配列の変異体は、配列番号2の多剤排出ポンプ内の対応する断片配列と10%、20%、50%又は100%のアミノ酸相同性を持ちうる。

【0013】

多剤排出ポンプは、Burkholderia又はシュードモナス(Pseudomonas)属の生物によって発現されうる。下記の実験は、当該蛋白質がBurkholderia cepaciaにおいて発現されることを示しており、当該蛋白質とその相同多剤排出ポンプが一連の密接に関連する生物において発現されることが予想できる。特にBurkholderia cepacia

は慣例的に *Pseudomonas cepacia* として分類されており、*Burkholderia* と *Pseudomonas* 属の生物の類似性により、当該蛋白質とその相同多剤排出ポンプは *Pseudomonas* 属の生物において発現されると予想される。当該蛋白質とその相同多剤排出ポンプを発現する他の属の生物は、クレブシエラ属 (*Klebsiella*)、エンテロバクター属 (*Enterobacter*)、セラチア属 (*Serratia*)、サルモネラ属 (*Salmonella*) 及び赤痢菌属 (*Shigella*) である。

【0014】

また、本発明によれば多剤排出ポンプをコードするヌクレオチド配列が提供される。ヌクレオチド配列は配列番号1の配列を持ちうる。本発明はまた、同じ蛋白質をコードするが異なるコドンを使用するヌクレオチド配列にも及ぶ。

【0015】

また、中又は高ストリンジェンシー条件下で上述したヌクレオチド配列の補体にハイブリダイズする核酸分子が提供される。ハイブリダイゼーション条件は、Sambrookら(1989、分子クローニング(*Molecular Cloning*)、第2版、Cold Spring Harbor Laboratory Press)のp.1.101-1.110及び11.45-11.61で詳細に論じられている。使用できるハイブリダイゼーション条件の一例は、5X SSC、0.5% SDS、1.0mM EDTA (pH0.8)の前洗浄液を使用し、5X SSCを用いて55℃でひと晩ハイブリダイゼーションさせることを含む。本発明の範囲内の核酸配列をハイブリダイズすることは、プローブ、プライマー又はDNA断片を含む。

【0016】

また本発明によれば、ヒト又は動物の身体の治療又は診断の方法において使用するための本発明による多剤排出ポンプが提供される。そのような第一の医学的用途は、本発明の蛋白質に関してこれまでに示唆又は開示されていない。

【0017】

また、本発明による多剤排出ポンプを発現する生物による感染の治療のための薬剤の製造における、本発明による多剤排出ポンプ又はその免疫原性断片の使用

が提供される。

【0018】

本発明の多剤排出ポンプは、それを発現する生物の外部に部分的に露出されているので、免疫原性エピトープを表示するであろう。これらのエピトープはエピトープマッピング (Geysen, H. M. ら、1987、Journal of Immunological Methods, 102:259-274; Geysen, H. M. ら、1988、J. Mol. Recognit., 1(1):32-41; Jung, G. と Beck-Sickinger, A. G., 1992, Angew. Chem. Int. Ed. Eng., 31:367-486) を用いて容易に決定しうる。ひとたびエピトープ (すなわち免疫原性断片) が同定されれば、それを薬剤の製剤に使用することができる。ポンプ表示エピトープの断片を使用する以外に、同じエピトープを表示するが異なる配列を持つミモトープが使用できる。これらは、例えばエピトープに対して特異的な抗体を使用して、Geysen (前出) が述べたようにして容易に作製しうる。その代わりに、PCRを使用して、エピトープマッピングを可能にする免疫原性断片を合成することもできる (Gupta, S. ら、1999、Biotechniques, 27(2):328-332)。

【0019】

表2からわかるように、14の膜内外らせんが同定された。それらは膜の外側に露出されていないので、エピトープを表示することができない。同様に、実験 (下記) は、当該蛋白質の最初の46個のアミノ酸は全くエピトープを表示しないことを示した。それ故、免疫原性断片は当該蛋白質の他の部分からの配列を含むと考えられる。

【0020】

本発明者は、BcrA蛋白質によって表示される多くのエピトープを同定することに成功した。そしてこれらは本発明のもう1つの局面を形成する。これらのエピトープは、配列番号11から20の配列を持つポリペプチドによって表示される。それ故本発明により、配列番号11から20のいずれかの配列を有し、エピトープを表示するポリペプチドが提供される。ここではBcrA蛋白質の「免

疫原性断片」とは、配列番号11から20のポリペプチドを指すとみなされる。

【0021】

例えば、本発明の蛋白質又は免疫原性断片はワクチンの製造において使用しうる。ワクチンにおいて使用される蛋白質又は免疫原性断片は、配列番号11から20のいずれかの配列に相同な免疫原性配列（すなわち同じ抗体によって認識される変異体）及びもう1つ別の配列に融合した免疫原性配列（配列番号11から20のいずれか及びそれに相同な免疫原性配列）を含む非相同配列を含む。当該蛋白質又は免疫原性断片は、特に、嚢胞性線維症患者での、それらを発現する生物によって引き起こされる感染の治療のためのワクチンの製造において使用しうる。また、本発明の多剤排出ポンプ又はその免疫原性断片を患者に投与することを含む、患者において、特に嚢胞性線維症の患者において本発明の多剤排出ポンプを発現する生物によって引き起こされる感染を治療する方法が提供される。患者に投与するためのそのようなワクチンは、製薬上許容される担体、希釈剤又は賦形剤、又は例えば適切なアジュバントをさらに含む形態で提供されうる。そのような化合物は当業者には容易に明らかであろう。

【0022】

本発明による薬剤はまた、適当な担体、希釈剤又は賦形剤を含みうる（例えばレミントンの製薬科学（Remington's Pharmaceutical Sciences）及び米国薬局方、1984、Mack Publishing Company, Easton, PA, USA参照）。患者に投与される薬剤の正確な用量は当業者には容易に明らかであり、簡単な用量 - 反応実験を用いて容易に決定できる。

【0023】

また、本発明による多剤排出ポンプを発現する生物による感染を治療するための薬剤の製造における、本発明による多剤排出ポンプの阻害因子の使用が提供される。また、少なくとも1つの抗生物質、例えばテトラサイクリン及び/又はキノロンを一緒に使用することもできる。キノロン抗生物質はナリジクス酸でありうる。本発明による多剤排出ポンプの阻害因子を含む薬剤と少なくとも1つの抗生物質の患者への投与は、同時又は連続的でありうる。また、本発明による多剤

排出ポンプを発現する生物による感染の治療において同時に、別途に又は連続的に使用するための、本発明による多剤排出ポンプの阻害因子と少なくとも1つの抗生物質、例えばテトラサイクリン及び/又はキノロンの混合製剤が提供される。

【0024】

また、本発明による多剤排出ポンプを発現する生物のための消毒薬の製造における、本発明による多剤排出ポンプの阻害因子の使用が提供される。また、少なくとも1つの第四アンモニウム消毒薬、例えばクロルヘキシジンと一緒に使用することもできる。上述したように、*B. cepacia*及び本発明による多剤排出ポンプを発現する他の生物は環境において存続性でありうる。これまでに報告された実験は、例えば*Burkholderia*と*Pseudomonas*が消毒薬溶液中で生存することができ、例えば第四アンモニウム化合物に耐性であることを示した。それ故本発明は、そのような生物による感染の治療に限定されず、それらに対して有効な消毒薬にも及ぶ。特に、本発明による多剤排出ポンプを発現する生物に対して有効なそのような消毒薬は、第四アンモニウム殺菌性化合物と共に本発明による多剤排出ポンプの阻害因子を含みうる。

【0025】

本発明によって提供される1つの特別な利点は、多剤排出ポンプを阻害することにより、さもなければ排出ポンプを発現する生物に対して無効であるか又は効果が限られている既存の抗生物質及び消毒薬を、当該生物に対して有効にする又は高い効果を持つようにすることができることである。それ故、既存の抗菌及び殺菌性組成物に比較的簡単な改変を加えることにより、それらを排出ポンプを発現する生物に対して有効にする又はそれらの効果を高めることができる。

【0026】

従ってまた、本発明によれば、本発明に従った多剤排出ポンプの阻害因子と少なくとも1つの抗生物質を含む抗菌組成物が提供される。また、そのような抗菌組成物を患者に投与することを含む、本発明による多剤排出ポンプを発現する生物による患者の感染を治療する方法が提供される。抗生物質のクラスは広い範囲のものであるが、本発明の多剤排出ポンプの阻害因子と組み合わせて、前記多剤

排出ポンプを発現する微生物を阻害する（すなわち成長又は生殖を妨げる又は死滅させる）一般的傾向を示す。特に、テトラサイクリンのクラスの成員（例えばテトラサイクリン）及びキノロンのクラスの成員（例えばナリジクス酸）が特に有効である。また、本発明に従った多剤排出ポンプの阻害因子と少なくとも1つの抗生物質を含むキットが提供される。キットは、本発明による多剤排出ポンプを発現する生物による患者の感染の治療において使用できる。

【0027】

また、本発明による多剤排出ポンプの阻害因子と少なくとも1つの消毒薬、例えば第四アンモニウム消毒薬を含む抗菌組成物が提供される。また、消毒する品目（例えば表面）にそのような抗菌組成物を適用することを含む、消毒の方法が提供される。

【0028】

本発明において使用される阻害因子は、本発明の多剤ポンプによる薬剤の排出を阻害する上で有効なあらゆるものを含みうる。例えば、阻害因子は排出ポンプに共有結合して、薬剤の通過を妨げることができる。その代わりに、阻害因子は、例えば転写、翻訳又は翻訳後のレベルでポンプの合成を妨げる又は下方調節するように作用しうる。特に、阻害因子は排出ポンプに対して特異的な抗体及びその抗原結合断片を含む。抗体及びその抗原結合断片の製造、合成及び使用は当業者には容易に明らかであろう（Harlow, E. と Lane, D. 「抗体の使用：実験室マニュアル（Using Antibodies: A Laboratory Manual）」、Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1998）。抗体又は抗原断片は、本発明のエピトープのいずれか、すなわち配列番号11から20のいずれかに対して特異的でありうる。

【0029】

また本発明によれば、次の段階を含む、細菌における多剤耐性を検出する方法が提供される：

(i) 細菌において本発明による多剤排出ポンプ又はそれをコードするヌクレオチド配列の存在を測定する段階、

(i i) 段階 (i) の結果を細菌における多剤耐性の存在又は不在と相関づける段階。

【 0 0 3 0 】

多剤排出ポンプの存在は、多剤排出ポンプに特異的な結合物質に細菌を接触させ、結合物質 - 多剤排出ポンプ結合反応を検出することによって測定できる。結合物質は、例えば多剤排出ポンプに対して特異的な抗体又はその抗原結合断片を含みうる。その代わりに、ポンプに特異的に結合することができる他のあらゆる成分を含みうる。

【 0 0 3 1 】

多剤排出ポンプをコードするヌクレオチド配列の存在は、多剤排出ポンプをコードするヌクレオチド配列にハイブリダイズするヌクレオチド配列又はその転写産物に細菌を接触させ、ヌクレオチド配列 - ヌクレオチド配列ハイブリダイゼーション反応を検出することによって測定できる。また、多剤排出ポンプをコードするヌクレオチド配列の存在は、多剤排出ポンプをコードするヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列又はその転写産物に細菌を接触させ、ヌクレオチド配列 - ヌクレオチド配列結合反応を検出することによっても測定できる。従って、多剤排出ポンプをコードする遺伝子の存在を検出することができる。これは、しかしながら、検出可能な結果を生じるためには、試験するサンプルが比較的多量の細菌を含むことを必要とする。その代わりとして、mRNAを検出することができるであろう。ポンプをコードする遺伝子が転写されれば（これは細菌において薬剤耐性を生じさせるために必要である）、mRNAが検出可能となるはずであり、mRNAはポンプをコードするヌクレオチド配列よりも多量に存在するはずである。

【 0 0 3 2 】

また、次の段階を含む、本発明による多剤排出ポンプの存在によって与えられる多剤耐性を持つ細菌の存在を検出する方法が提供される：

(i) 患者からサンプルを採取する段階、

(i i) サンプルにおいて本発明による多剤排出ポンプ又はそれをコードするヌクレオチド配列の存在を測定する段階、

(i i i) 段階 (i i) の結果を多剤耐性を持つ細菌の存在又は不在と相関づける段階。

【 0 0 3 3 】

多剤排出ポンプの存在は、多剤排出ポンプに特異的な結合物質にサンプルを接触させ、結合物質 - 多剤排出ポンプ結合反応を検出することによって測定できる。結合物質は、例えば多剤排出ポンプに対して特異的な、例えば本発明のエピトープのいずれかに対して特異的な抗体又はその抗原結合断片を含みうる。多剤排出ポンプをコードするヌクレオチド配列の存在は、多剤排出ポンプをコードするヌクレオチド配列にハイブリダイズするヌクレオチド配列又はその転写産物に細菌を接触させ、ヌクレオチド配列 - ヌクレオチド配列ハイブリダイゼーション反応を検出することによって測定できる。また、多剤排出ポンプをコードするヌクレオチド配列の存在は、多剤排出ポンプをコードするヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列又はその転写産物に細菌を接触させ、ヌクレオチド配列 - ヌクレオチド配列結合反応を検出することによって測定できる。

【 0 0 3 4 】

そのようないずれかの方法において使用する患者サンプルは、例えば血液、血清、気管支吸引液又は痰を含みうる。

【 0 0 3 5 】

また本発明によれば、本発明による抗菌組成物、すなわち本発明による多剤排出ポンプの阻害因子と少なくとも1つの抗生物質を含む抗菌組成物を患者に投与することを含む、本発明による多剤排出ポンプを発現する生物による患者の感染を治療する方法が提供される。

【 0 0 3 6 】

そのような治療方法は、多剤耐性菌による感染を特に生じやすい嚢胞性線維症患者のために特に有用であり、従って患者は嚢胞性線維症患者でありうる。

【 0 0 3 7 】

また本発明により、配列番号11から20のいずれかの配列を有し、エピトープを表示するポリペプチドが提供される。また、エピトープを表示する配列番号11から20のいずれか1つの配列に相同な免疫原性配列(すなわち同じ抗体に

よって認識される変異体)及びもう1つ別の配列に融合した免疫原性配列(エピトープを表示する配列番号11から20のいずれか1つ及びそれに相同な免疫原性配列)を含む非相同配列が提供される。

【0038】

また本発明によれば、本発明による多剤排出ポンプを当該生物に導入することを含む、生物に抗生物質耐性を与えるための方法が提供される。また、本発明による多剤排出ポンプを導入された生物が提供される。

【0039】

さらに本発明によれば、配列番号1から4、7から22のいずれか1つによる分子の配列を含むデータ担体が提供される。データ担体は、機器による読み取りが可能な担体、例えばコンピュータディスク又はCDでありうる。

【0040】

また、次の1つ又はそれ以上を含む、配列番号1から4、7から22のいずれか1つによる配列を分析する方法が提供される：当該配列ともう1つ別の配列の配列同一性又は相同性の度合を調べる、配列の二次構造を調べる、構造の分子量を調べる、及び配列の免疫学的及び化学的特徴を調べる。本発明の核酸及び蛋白質配列を分析するための方法は、当該技術において既知の方法、例えば、Lesk, A.M. (編集)、1988(前出); Griffin, A.M. & Griffin, H.G. (編集)、1994(前出); von Heinje, G., 1987(前出); 及びGribskov, M. & Devereaux, J. (編集)、1991(前出)の中で述べられている方法を含む。

【0041】

また、配列番号1から4、7から22のいずれか1つが組み込まれたデータベースが提供される。さらに、配列番号1から4、7から22のいずれか1つを分析するためのコンピュータ装置が提供される。

【0042】

多剤排出ポンプの1つの形態だけを例示として示す下記の説明から、本発明がさらに明らかになるであろう。

【0043】

【実験】

実験材料及び方法

プラスミドからの細菌株

B. cepacia J2315 Edinburghを嚢胞性線維症患者から入手した。*B. cepacia*に関して痰の反復培養陽性である嚢胞性線維症を有する感染患者から血清を採取した。同一性を確認するため微生物培養と生化学的同定を実施した。

【0044】

DNAの分離及び ZAPIIライブラリーの調製

Goldbang, N.ら(1996, *J. Clin. Pathol.*, 49: 861-863)に従ってDNAを分離し、制限して、*Sau 3a*酵素による部分消化を生じさせた。*Clontech Laboratories Inc.*, Cambridge, Englandからのプロトコールに従って3-5 kbのインサートサイズ範囲で ZAPIIライブラリーを調製した。

【0045】

抗体スクリーニング

*B. cepacia*による胸部感染の患者から血清を採取し、抗体スクリーニングのために使用した。*Escherichia coli* XL1-Blue細胞を、 $c. 3000 \text{ pfu} / 85 \text{ mm}$ プレートの割合でL肉汁寒天(バクト-トリプトン10 g/L、酵母抽出物5 g/L、NaCl 10 g/L、マルトース2 g/L、バクト-寒天15 g/L)上で ZAPIIファージに感染させた。これを42 °Cで3時間インキュベートした。プラークをニトロセルロースフィルター(0.45 µmの孔サイズ; *Sartorius AG*, *Goettingen*, *Germany*)に移し、37 °Cで2時間、10 mMイソプロピル-Dチオガラクトピラノシド(IPTG)で含浸させた。これらのフィルターを緩衝食塩水(150 mM NaCl、10 mM Tris)中3%のウシ血清アルブミン(BSA; *Sigma*)により4 °Cでひと晩遮断した。BSA 3%で100倍に希釈した血清をフィルターに加え、室温で2時間インキュベートして、フィルターを洗浄液(150 mM NaCl, Tween 20 0.05%)中

で30分間洗ったあと、BSA3%で1000倍に希釈した第二抗体、アルカリホスファターゼ複合抗ヒトIgG(Sigma)を加えた。室温で1時間後、再びフィルターを洗って、等量のナフトールASMXリン酸(蒸留水中0.4mg/ml、Sigma)及びファストレッドTR塩(0.2M Tris pH8.2中6mg/ml)で染色した(ファストレッド染色)。陽性プラークを、SM(100mM NaCl、50mM Tris-HCl、pH7.5、10mM MgSO₄、ゼラチン0.001%)200μl及びクロロホルム2-3滴が入った1.5ml試験管に移した。上記を繰り返してプラークを精製した。これは、その後配列となる陽性プラークの同定を導き、当該蛋白質のアミノ酸46から始まり、カルボキシ末端まで続くオープンリーディングフレームを生成した。

【0046】

データベースの検索によりこれは完全配列でないことが明らかになったため、分子の完全なアミノ酸末端を同定するためにさらなるクローニングが必要となった。このため、ライブラリーを再スクリーニングできるようにポリメラーゼ連鎖反応によってジゴキシゲニン標識プローブを作製した。このためのプライマーは、EMRC(配列番号4)アミノ末端とEMRN(配列番号3)カルボキシ末端であった。

【0047】

ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)由来のジゴキシゲニン標識プローブの合成：
精製pMKCプラスミドDNAの2μlアリコート、プライマーEMRC及びEMRN(表1参照)各々100pmol/μl、各々のジゴキシゲニン-11-ウリジン-5'-ホスフェート標識dNTP(Boehringer Mannheim)200μM及び5U Taqポリメラーゼ(Perkin Elmer)を含む、10mM Tris-HCl(pH8.8)、50mM KCl、1.5mM MgCl₂(Perkin Elmer)中100μlの最終反応容量で、PCRのために使用した。反応混合物を94℃で5分間初期変性に供し、GeneAmp 9600熱循環器(Roche Diagnostic Systems)で次のようにPCRを行った：94℃で1分間、55℃で3

0秒間、及び72で1分間。30サイクル終了後、反応物を7分間72に保持し、その後4に冷却した。鋳型DNAを含まない対照試験管を包含した。

【0048】

増幅産物を、0.5 µg/mlのエチジウムブロミドを含む、1X Tris-酢酸(TAE)緩衝液中1.0%(w/v)アガロースゲル100mlでのゲル電気泳動によって分離した。分子マーカー(Goldbang, N.ら、1996、前出のEcoRI/HindIII消化したDNA)を含め、80Vで1時間の電気泳動によってPCR産物を分離した。

【0049】

培地及び試薬

NZY肉汁(リットル当り)：

NaCl 5g、MgSO₄·7H₂O 2g、酵母抽出物5g及びNZアミン(カゼイン加水分解産物)10gを脱イオン水に加えて最終容量1リットルとした。NaOHでpHを7.5に調整し、15lb./sq.in.で15分間オートクレーブに入れて滅菌した。

【0050】

NZY寒天(リットル当り)：

NaCl 5g、MgSO₄·7H₂O 2g、酵母抽出物5g、NZアミン(カゼイン加水分解産物)10g及び寒天15gを脱イオン水に加えて最終容量1リットルとした。NaOHでpHを7.5に調整し、15lb./sq.in.で15分間オートクレーブに入れて滅菌した。寒天を放置して冷却し、その後ペトリ皿に注ぎ入れた。

【0051】

NZY上層寒天(リットル当り)：

NZY肉汁1リットルに0.7%(w/v)アガロースを加え、15lb./sq.in.で15分間オートクレーブに入れて滅菌した。使用する前に、上層寒天を融解し、48に冷却した。

【0052】

LB-カナマイシン寒天(リットル当り)：

NaCl 10 g、トリプトン10 g、酵母抽出物5 g及び寒天20 gを脱イオン水に加えて最終容量1リットルとした。NaOHでpHを7.5に調整し、15 l b. / s q. i n. で15分間オートクレーブに入れて滅菌した。寒天を55℃まで冷却させた後、フィルター滅菌したカナマイシン50 mgを加え、その後ペトリ皿に注ぎ入れた。

【0053】

20X SSC (リットル当り) :

NaCl 175.3 gとクエン酸ナトリウム88.2 gを脱イオン水800 mlに溶解した。NaOHを用いてpHを7.0に調整し、脱イオン水で容量を1リットルにして、その後15 l b. / s q. i n. で15分間オートクレーブに入れて滅菌した。

【0054】

50X Tris - 酢酸緩衝液 (TAE) :

tris塩基242 gを氷酢酸57.1 ml及び0.5 M EDTA (pH 8.0) 100 mlに加え、脱イオン水で容量を1リットルにして、15 l b. / s q. i n. で15分間オートクレーブに入れて滅菌した。

【0055】

酢酸ナトリウム - pH 5.2 :

$\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 4.08 gを蒸留水8 mlに溶解し、希酢酸でpHを5.2に調整して、容量を10 mlとし、溶液を15 l b. / s q. i n. で15分間オートクレーブに入れて滅菌した。

【0056】

B. cepaciaゲノムライブラリーのスクリーニング

平板培養の調製 :

0.2% (w/v) マルトースと10 mM MgSO_4 を補足したNZアミン及び酵母抽出物 (NZY) 肉汁に1個の大腸菌 XL1-Blue MRFコロニーを接種し、37℃でひと晩増殖させた。4500 x gで15分間の遠心分離によって細菌培養を採集し、0.5の光学密度 (OD) (600 nm) になるようにペレットを氷冷10 mM MgSO_4 に懸濁した。懸濁した細菌培養200

μl を10 - 2希釈したバクテリオファージライブラリーに加え、37 で15分間インキュベートした。NZY上層寒天3ml (48)を加え、感染細胞をNZY寒天平板に注いで、37 でひと晩インキュベートした。

【0057】

ナイロン膜のオーバーレイ：

ブランクを含む各々の寒天平板をナイロン膜で2分間おおった。膜を1.5M NaCl、0.5M NaOH中で2分間変性し、次いで1.5M NaCl、0.5M Tris-HCl (pH8.0)で5分間中和したあと、0.2M Tris-HCl (pH7.5) 2x塩性クエン酸ナトリウム(SSC)緩衝液中で手早く洗った。膜を短時間Whatman(RTM)3MM紙にプロットし、Stratalinker(RTM)UV架橋剤セットを使用して120,000 μJ のUVエネルギーで30秒間、DNAを膜に架橋した。転移物の寒天平板を4 で保存した。

【0058】

ナイロン膜のハイブリダイゼーション：

ナイロン膜を、ハイブリダイゼーション緩衝液(5xSSC、1%(w/v)遮断試薬(10%滅菌遮断溶液から加える)、0.1%(w/v)N-ラウロイルサルコシン、0.02%(w/v)ドデシル硫酸ナトリウム(SDS))中68 でプレハイブリダイズした。2時間後、ハイブリダイゼーション緩衝液を、最終濃度500ng/mlのジゴキシゲニン標識プローブを含む新鮮ハイブリダイゼーション緩衝液に交換し、68 でひと晩インキュベートした。フィルターを2xSSC、0.1%SDS中で2x5分間室温で洗い、その後0.1xSSC、0.1%SDS中で2x15分間、68 で洗った。

【0059】

免疫学的検出：

DIG DNA Detection Kit(Boehringer Mannheim)を使用して陽性クローンを検出した。膜を、0.3%(w/v)トウイン20を含む洗浄緩衝液(0.1Mマレイン酸、0.15M NaCl (pH7.5))で手早く洗ったあと、遮断溶液(最終濃度1%(w/v)の遮

断試薬を含む0.1Mマレイン酸、0.15M NaCl (pH7.5) 100ml中で30分間インキュベートした。膜を遮断溶液20ml中で150mU/mlの抗ジゴキシゲニン - AP複合体に移し、30分間インキュベートした。洗浄緩衝液(0.1Mマレイン酸、0.15M NaCl (pH7.5) 100ml中で2x15分間洗って非結合抗体 - 複合体を除去した。100mM Tris-HCl、100mM NaCl、50mM MgCl₂ (pH9.5) を含む緩衝液中で2分間膜を平衡させたあと、色基質溶液(100mM Tris-HCl、100mM NaCl、50mM MgCl₂ (pH9.5) 10mlに対してNBT/NCIP保存溶液(Boehringer Mannheim) 200μl) 10mlと共に暗所でインキュベートした。ひと晩インキュベートしたあと、100mM Tris-HCl、1mM EDTA (pH8.0) を含む緩衝液50ml中で膜を洗って反応を停止した。呈色反応を除いて、すべての段階を振とう下で実施した。陽性分離菌を二次及び三次スクリーニングによってさらに精製した。

【0060】

ZAP発現ベクターの単一クローン切り出し：

(i) 切り出したpBK-CMVファージミドベクターの調製

0.2% (w/v) マルトースを補足した大腸菌 XL1-Blue MRF、及びNZY肉汁中の大腸菌 XLOLRの培養を別々に37℃でひと晩増殖させた。細菌培養を4500xgで15分間遠心分離して採集し、1.0のOD(600nm)になるように氷冷10mM MgSO₄に懸濁した。Falcon 2059ポリプロピレン試験管に、OD 1.0(600nm)の大腸菌 XL1-Blue MRF 200μl、ファージ株250μl (>1x10⁵ファージ粒子)及びExAssistヘルパーファージ(>1x10⁶pfu/ml) 1μlを加え、37℃で15分間インキュベートした。NZY肉汁3mlを加え、反応混合物を振とう下に37℃で3時間インキュベートした。反応混合物を65から70℃に20分間加熱したあと、4500xgで15分間遠心分離した。上清(繊維状ファージ粒子としてパッケージングされた切り出しpBK-CMVファージミドベクターを含む)を新鮮Falcon 2059ポリプロピレ

ン試験管中に傾瀉し、4 で保存した。

【0061】

(ii) 切り出したファージミドベクターの平板培養

OD (600 nm) 1.0 の新鮮増殖した X L O L R 細胞 200 μ l を 10 μ l と 100 μ l のファージ上清に加え、37 で15分間インキュベートした。N Z Y 肉汁 300 μ l を加え、反応混合物をさらに45分間インキュベートした。各々の反応混合物からの細胞混合物 200 μ l を L B - カナマイシン寒天平板に植え付け (50 μ g / ml)、37 でひと晩インキュベートした。平板を4 で保存し、単一精製コロニーのグリセロール株を作製して、-80 で保存した。

【0062】

(iii) Wizard (RTM) Plus SV Midiprep DNA 精製

Wizard (RTM) Plus SV Midiprep DNA 精製キット (Promega) を使用して、DNA インサートを含むプラスミド DNA を精製した。100 μ g / ml のアンピシリンを補足した N Z Y 肉汁 50 ml に単一大腸菌コロニー (p B K - C M V プラスミドとインサートを含む) を接種し、37 でひと晩増殖させた。細菌培養を 4500 \times g で15分間遠心分離して採集し、ペレットを Wizard (RTM) Plus SV ミディプレップ細胞懸濁液 3 ml に懸濁した。Wizard (RTM) Plus SV ミディプレップ細胞溶解液 3 ml を加えて細胞を溶解した。溶解産物を氷上で30分間放置したあと、強く振とうして、14000 \times g で30分間、4 で遠心分離した。清澄化した溶解産物を Wizard (RTM) Plus SV ミディプレップ 30 懸濁樹脂 10 ml に加え、Wizard (RTM) Plus SV ミディプレップミディカラムに移した。真空を適用して樹脂 / DNA をミディカラム内に吸引し、カラムを Wizard (RTM) Plus SV ミディプレップミディカラム洗浄液 15 ml で2回洗浄して、30秒間乾燥した。ミディカラムを 1.5 ml エッペンドルフに移し、マイクロセントリフュージにおいて 10000 \times g で2分間遠心分離して、残留カラム洗浄液を除去した。65 から 70

のヌクレアーゼ不含有水300 μ lを用いて10000 \times gで20秒間遠心分離してプラスミドDNAを溶出した。10000 \times gで5分間遠心分離して微細な樹脂を除去した。

【0063】

Gene Quant (Pharmacia Biotech)を用いてDNA濃度を算定し、0.5 μ g/mlのエチジウムブロミドで染色した1 \times TEA中1% (w/v) アガロースゲル上でのゲル電気泳動によって純度を確認した。

【0064】

ABI DNA配列決定:

最終反応容量10 μ l中、50ng/kbのプラスミドDNAとインサートを、1.6pmolの適切なプライマー(表1参照)及びd-ローダミンビッグ-ダイターミネーター混合物4 μ l (Applied Biotechnologies)に加えた。反応混合物を96で4分間初期変性に供し、その後GeneAmp 9600熱循環器 (Roche Diagnostic Systems)で次のようにして部分的に増幅した: 96で30秒間、50で15秒間、60で4分間。25サイクルの完了後、反応混合物をヌクレアーゼ不含有水で100 μ lにした。2.5容の氷冷95%エタノールと3M酢酸ナトリウム3 μ l (pH5.2)を加えてDNAを沈殿させ、室温で30分間インキュベートした。反応混合物を18000 \times gで15分間遠心分離し、上清を除去して、氷冷70%エタノール250 μ lをDNAペレットに加え、室温で30分間インキュベートした。反応混合物を18000 \times gで15分間遠心分離し、上清を除去して、ペレットを空気にさらして乾燥させた。ABI 377 PrismでDNAを配列決定した。

【0065】

BcrA蛋白質のエピトープマッピング

BcrA蛋白質(配列番号2)の誘導アミノ酸配列をカバーする一連の重複ノナペプチドを、Geysenら(1987、Journal of Immunological Methods, 102:259-274)が述べたように

してエピトープスキャンニングキット (Cambridge Research Biochemicals, Cambridge, UK) からの試薬を用いてポリエチレンピン上で合成した。次にかかるペプチドをELISA (酵素結合免疫ソルベント検定法) のベースとして使用して、B. cepaciaに感染したCF患者からの血清において特異性抗体を検出した。生じたELISA吸光度の値を使用してエピトープが位置する場所を決定する。

【0066】

合成スケジュールの作製：

B. cepacia BcrA蛋白質 (配列番号2) の518個のアミノ酸残基をChiron Developmentソフトウェアプログラム (Chiron Technologies) に入力した。これらの配列から、BcrA蛋白質を各々が9個のアミノ酸の長さを持つ一連の連続する重複ペプチドとして表わすことができる合成スケジュールを作製した。各ペプチドは1個のアミノ酸だけがその前のペプチドと異なった、すなわちペプチド1はアミノ酸1から9、から成り、ペプチド2はアミノ酸2から10、から成る、等々であった。bcrA遺伝子の長さ全体をカバーするまでこれを続けた。

【0067】

ペプチドの合成：

標準的なマイクロタイター形式に配置したポリエチレンピン上にペプチドを合成した。ペプチドの合成は、Chiron Technologiesの非開裂性ペプチド合成マニュアルからの方法に従って実施した。

【0068】

アミノ酸：

使用したアミノ酸は、9-フルオレオニルメトキシカルボニル (Fmoc) 基 (Sigma, Calbiochem) で保護されたアミノ基を持つ活性エステルであった。ペプチドを1個のアミノ酸/ピン/日の割合で合成した。

【0069】

Fmocの脱保護と洗浄：

Fmoc保護基の除去を次のように実施した：ポリプロピレンピンのブロック

を、ジメチルホルムアミド(DMF)(BDH Chemicals Ltd.)中20%ピペリジンを含む浴に室温で20分間液浸した。ブロックを取り出し、DMF浴中で2分間洗った。過剰のDMFを払い落とし、ピンを2分間メタノール(BDH Chemicals Ltd.)浴に液浸した。この洗浄段階を3回反復し、毎回新鮮なメタノール浴を使用した。ブロックを酸不含フュームカップボードで30分間空気乾燥した。

【0070】

カップリングのためのアミノ酸の調製：

アミノ酸を計量して最終濃度100mMとし、スケジュールで規定されたようにDMF中定容の1-ヒドロキシベンゾトリアゾール(HOBT)(Sigma Chemical Co.)に溶解した。

【0071】

カップリング反応：

スケジュールで規定されたように、Fmocアミノ酸エステル100 μ lをポリプロピレンマイクロタイタープレートのウェルに分配した。脱保護したピンのブロックをウェルに入れ、清潔なプラスチックバッグに密閉して、室温でひと晩放置した。

【0072】

カップリング後のブロックのプロセッシング：

ピンのブロックをアミノ酸溶液から取り出し、攪拌しながら室温で5分間メタノール浴に入れた。2分間放置して空気乾燥したあと、ブロックを5分間DMF浴に入れた。

【0073】

すべてのアミノ酸が結合し、すべてのペプチドがピン上で合成されるまで、脱保護、洗浄、カップリング及び洗浄の段階を継続した。

【0074】

側鎖の脱保護：

ピンのブロックをトリフルオロ酢酸、アニソール及びエタンジチオールの混合物(Sigma Chemical Co.)(19:1:1 v/v)中に室

温で3時間入れて、側鎖の機能を保護するためのすべての保護基を除去した。次にブロックを10分間メタノールに完全に液浸し、その後メタノール/水(1:1 v/v)中0.5%氷酢酸(BDH Chemicals Ltd.)に1時間浸漬した。ブロックをさらに2回メタノール浴に2分間液浸し、その後酸不含フュームカップボードでひと晩空気乾燥した。

【0075】

CF患者からの血清の採集:

17名のCF患者から各々1つずつ、合計17の血清をWythenshawe Hospital, Manchester, UKの嚢胞性線維症ユニットにおいて採集した。第1群の血清(n=5)は*Pseudomonas aeruginosa*(緑膿菌)及び*Burkholderia cepacia*に感染したCF患者から採取し、第2群の血清(n=4)は*P. aeruginosa*に感染したCF患者から採集し、第3群の血清(n=2)は*P. aeruginosa*あるいは*Burkholderia cepacia*のいずれの感染徴候もないCF患者から採集し、第4A群の血清(n=4)は、*B. cepacia*に感染しているが良好であるCF患者から採集し、第4B群の血清(n=2)は、良好でなく、入院した*B. cepacia*感染CF患者から採集した。

【0076】

ELISA試験:

遮断段階:リン酸緩衝食塩水(PBS)中3%ウシ血清アルブミン(BSA)(Sigma Chemical Co.)150µlをFalcon 3912 Microtitre Plateの各々のウェルに分配した。ピンのブロックをウェルに入れ、100rpmの振とう台上に室温で1時間放置した。

【0077】

被験血清の添加:PBS中3%BSAでの被験血清の1:500希釈150µlをマイクロタイタープレートに分配した。ピンをウェルに入れ、4でひと晩インキュベートした。

【0078】

洗浄段階:インキュベーション後、0.01M PBS(pH7.2)浴でピ

ンを4×10分間洗った。洗浄と洗浄の間にピンを振とうし、プロットして過剰の洗浄液を除去した。

【0079】

免疫グロブリンG (Ig G) の添加：洗浄後、PBS中3%BSAで1：2000希釈したホースラディッシュペルオキシダーゼ複合ヤギ抗ヒト免疫グロブリンG (Ig G) (Sigma Chemical Co.) 100 μ lを含むマイクロタイタープレートにピンを入れた。ピンを100rpmの振とう台上で室温で1時間インキュベートした。

【0080】

洗浄段階：基質反応の前に、0.01M PBS (pH 7.2) 浴でピンを4×10分間洗った。洗浄と洗浄の間にピンを振とうし、プロットして過剰の洗浄液を除去した。

【0081】

基質反応：0.5mg/mlの2,2'-アジノ-ビス(3-エチルベンズチアゾリン-6-スルホン酸 (ABTS) (Sigma Chemical Co.) をクエン酸緩衝液 (pH 4.0) 100mlに溶解した。この緩衝液に0.01% (v/v) 過酸化水素 (Sigma Chemical Co.) を加えた。150 μ lをマイクロタイタープレートに分配した。ピンをウエルに入れ、100rpmの振とう台上に室温で30分間放置した。ウエルからピンを取り出して反応を停止した。Titer tek MultiskanR Plus Microplate Readerを用いて405nmの波長でマイクロタイタープレートを読み取った。

【0082】

ピンからの抗体の除去：

0.01M PBS / 1% (w/v) SDS及び0.1% (w/v) 尿素 (Sigma Chemical Co.) の溶液を含むDecon Ultrasonic Bath (Decon Laboratories) において60で20分間音波処理して、結合抗体をピンから除去した。音波処理後、60に加熱した水中で2×30秒間ピンを洗い、次に水 (60) 中でさらに1時間洗

った。煮沸メタノールを含む浴にピンを30秒間入れ、その後少なくとも30分間空気乾燥した。ここでピンは次の血清を試験するための状態となった。

【0083】

吸光度データの収集：

すべての血清を試験したあと、各ペプチドについて405nmでの吸光度の値を照合し、エピトープのアミノ酸配列を確認した。エピトープは、第3群と第4群についての値の分析及び他の群との比較によって決定した。ペプチドは、第4A群と第3群間の吸光度値の差が0.8以上である一連のペプチド(3個又はそれ以上のアミノ酸残基の)として定義した。

【0084】

エピトープマッピングの結果(表3)は、配列番号11から17を持つ蛋白質によって表示される7つのエピトープを同定した。蛋白質によって表示される別の4つの推定エピトープは配列番号7から10を持つ。

【0085】

ファージ抗体ディスプレイライブラリー及びscFvの調製

ファージ抗体ディスプレイライブラリー及びscFvを基本的に以前に述べられたようにして(参照してここに組み込まれる、Burnierら、2000、Infection & Immunity 68:3200-3209)作製した。簡単に述べると、Ficollでリンパ球を分離し、次いでチオシアン酸グアニジニウム抽出して、オリゴ(dT)-セルロースカラム(Quick Prep mRNA; Pharmacia, St Albans, United Kingdom)で精製することによって患者の末梢血20mlからmRNAを調製した。鳥類の骨髄芽球細胞症ウイルス逆転写酵素(HT Biotechnology, Cambridge, United Kingdom)を使用してヒトIgG H鎖の4つのサブクラスすべてについての定常領域プライマー(HuIgG1-4)で一本鎖cDNA合成を実施した。H鎖の可変ドメイン遺伝子をファミリーベースの正(HuJH1-6)及び逆(HuVH1-1a-6a)プライマーでの一次PCRによって増幅した(上述したすべてのIgGプライマー配列は、参照してここに組み込まれる、Marks, J.D.ら、1991

、J. Mol. Biol. 222: 581-597の中で提供される)。Sfi1制限部位をVH3a逆生成産物の上流に導入したのち、L鎖可変ドメイン遺伝子の種々のプールと共に構築した。後者はまたリンカー断片(Gly₄Ser₃)及び下流のNot1部位も導入した。Sfi1及びNot1制限酵素部位を使用することにより、産物を均一方向でファージミドベクターにクローニングした。ライゲートしたベクターをエレクトロポレーションによって大腸菌TG1に導入し、ヘルパーファージM13K07(Pharmacia)でファージを救援した。

【0086】

パニングのためのペプチド:

抗原特異的scFvを濃縮するために、エピトープマッピングによって示されたエピトープの4つを表わす15merペプチドに対してファージライブラリーをパンした: エピトープ2(配列番号12)とエピトープ3(配列番号13)が組み込まれているペプチド1: A I I S F G F M A F F G S V V(配列番号18); エピトープ4(配列番号14)が組み込まれているペプチド2: S V V I F P L W Q T V M G Y T(配列番号19); 及びエピトープ5(配列番号15)が組み込まれているペプチド3: H R L D R M V A S F A F H R(配列番号20)。ペプチド(10ng/ml)又は精製トランスポーター(1mg/ml)で被覆した免疫試験管においてパニングを実施した。結合ファージを対数期大腸菌TG1で溶出した。M13K07で救援したあと、ファージをさらに3回ペプチドに対してパンした。BstN1(New England Biolabs, Hitchin, United Kingdom)DNAフィンガープリンティングを使用して、連続的ラウンドのパニング後の特異的scFvの濃縮を確認した。

【0087】

pBAD-TOPOへのbcrAのクローニング

抗生物質感受性試験を実施する前に、pBAD-TOPO(Invitrogen)を用いてTOP10大腸菌にbcrA遺伝子をクローニングした。

【0088】

初期増幅：

10mM Tris-HCl (pH 8.8)、50mM KCl、1.5mM MgCl₂ 中 最終反応容量 25 μl として精製 BcrA プラスミド DNA 1 μl (約 1 μg DNA) を含み、また各々のデオキシヌシド三リン酸 200 μM、BcrA 正プライマー (5' CGA CGT CGC GGT GCC GAC GAT - 配列番号 21) 及び BcrA 逆プライマー (5' ATG CCC CAT CGC CGG CCC CGC - 配列番号 22) の各々 25 pmol / μl、及び Taq DNA ポリメラーゼ 5 U (Boehringer Mannheim) を含む PCR 混合物を用いて、GeneAmp 9600 Thermal Cycler (Roche Diagnostic Systems) において bcrA 遺伝子の増幅を実施した。熱サイクルの条件は、94 で 5 分間の初期変性に続いて、94 で 1 分間、50 で 1 分間及び 72 で 1 分間の 30 サイクルであった。増幅後、サンプルを 72 で インキュベートし、その後 4 に 保持した。0.5 μg / ml のエチジウムブロミドを含む、Tris 酢酸緩衝液中 1% アガロースでのゲル電気泳動によって増幅産物を分割した。バンドをゲルから切り出し、65 に 10 分間加熱して融解した。

【0089】

pBAD-TOPO への bcrA のクローニングと TOP10 大腸菌への形質転換：

新鮮 PCR 産物 3 μl を最終反応容量 5 μl 中の BAD-TOPO 1 μl に加え、室温で 5 分間 インキュベートした。pBAD-TOPO クローニング反応物 2 μl を One Shot Chemically Competent TOP10 大腸菌のバイアルに加えて、30 分間 インキュベートした。次に細胞に 42 で熱ショックを与えたあと、氷上で 2 分間 インキュベートした。SOC 培地 250 μl を加えた後、細胞を 37 で 1 時間 水平に インキュベートし、あらかじめ加温しておいた LB アンピシリン (100 μg / ml) プレートに形質転換株を塗布し、37 でひと晩 インキュベートした。

【0090】

陽性クローンの分析：

陽性クローンをPCRによって分析した。10mM Tris-HCl (pH 8.8)、50mM KCl、1.5mM MgCl₂中最終反応容量25μlとして、Qiagen Mini Prep Protocol (Qiagen)を用いて陽性クローンから抽出した精製プラスミドDNA 1μlを含み、各々のデオキシヌシド三リン酸200μM、25pmol/μlの内部正及びベクター逆プライマー、及びTaq DNAポリメラーゼ5U (Boehringer Mannheim)を含むPCR混合物を用いて、GeneAmp 9600 Thermal Cycler (Roche Diagnostic Systems)において増幅を実施した。熱サイクルの条件は、94 で5分間の初期変性に続いて、94 で1分間、50 で1分間及び72 で1分間の30サイクルであった。増幅後、サンプルを72 でインキュベートし、その後4に保持した。0.5μg/mlのエチジウムブロミドを含む、Tris酢酸緩衝液中1%アガロースでのゲル電気泳動によって増幅産物を分割した。陽性クローンからグリセロール株を作製した。

【0091】

PCR産物の発現:

各々の形質転換株について、100μg/mlのアンピシリンを含むLB 2mlを単一大腸菌コロニーに接種し、振とうしながら37 でひと晩インキュベートした。このひと晩の培養0.1mlを100μg/mlのアンピシリンを含むLB 10mlに加えた。20、2、0.2及び0.002%L-アラビノースを加えて蛋白質発現を誘導し、振とうしながら37 で4時間インキュベートした。5000×Gで10分間遠心分離して培養をペレット化し、10%SDS 450μl及び10mM DTT 50μl (酸化形)に懸濁した。懸濁したペレットをプロセッシングのために必要なときまで-20 で保存した。

【0092】

SDS-PAGE分析:

細菌サンプルを100 で15分間煮沸した。煮沸したサンプル12μlをSDS-PAGE (SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動) サンプル緩衝液3μlに加え、100 で5分間煮沸した。10μlをNOVEXゲル上で泳動し

、200Vで35分間移動させて、その後25Vで1時間PVDFにプロットした。

【0093】

ウエスタンブロット法：

最初にTween-20を含むPBS中2%粉乳(MPBST)において37で1時間ブロットを遮断した。ブロットを洗浄緩衝液(0.9%(w/v)NaCl、0.01%Tween-20)中で2x10分間洗った。MPBST中抗V5エピトープ(Invitrogen)の1:5000希釈において室温で1時間ブロットをインキュベートし、その後洗浄緩衝液中で3x10分間洗った。MPBST中抗マウスアルカリホスファターゼ複合体(Sigma)の1:5000希釈と共に室温で1時間ブロットをインキュベートし、洗浄緩衝液中で3x10分間洗った。BCIP/NBT(Sigma)1錠を水10mlに<10分間加えて呈色反応を誘導した。

【0094】

マイクロタイター肉汁希釈法によるMICの測定

bcrAを担う又は担わない(±)TOP10大腸菌を、bcrA遺伝子のインデューサーとして0.002%L-アラビノースの存在下にRPMI培地(Sigma)で 2×10^4 cfu/mlの濃度に増殖させた(bcrA+はpBAD-TOPOベクターに関して選択するために100µg/mlのアンプシリンの存在下で増殖させた)。TOP10大腸菌±bcrA 100µlを96穴マイクロタイタープレート(Sigma)に分配して、最終濃度 1×10^4 cfu/mlとした。抗生物質の2倍階段希釈を500-0.24µg/mlの濃度範囲で各々のウェルに加えた。プレートを37で24時間インキュベートし、増殖の度合又は増殖なしをスコアリングした。

【0095】

ナリジクス酸に対するファージ活性の実証

TOP10大腸菌+bcrAを、bcrA遺伝子のインデューサーとして0.002%L-アラビノースの存在下に100µg/mlのアンプシリン(pBAD-TOPOベクターに関して選択するため)RPMI培地(Sigma)で

2 x 10⁴ c f u / m l の濃度に増殖させた。TOP10 大腸菌 + b c r A 100 μ l を、1 x 10⁴ c f u / m l の最終濃度で、希釈しないファージと1 : 10希釈したファージの存在下で(下記の表参照)96穴マイクロタイタープレート(Sigma)に分配した。ナリジクス酸の2倍階段希釈を128 - 0.25 μ g / m l の濃度範囲で各々のウエルに加えた。培地だけを含む対照を作製した。プレートを37 °Cで24時間インキュベートした。6つのファージクローンを試験した。

【0096】

【実験結果】

b c r A 遺伝子の配列決定

3500 bp配列のDNAを同定し、配列決定した。クローニングした配列内に、b c r Aコード配列(配列番号1)を含む単一のオープンリーディングフレームが存在した。

【0097】

b c r A 蛋白質の構造と位置

b c r A配列は、49 k Dの推定分子量を持つ518個のアミノ酸残基の、B c r A(配列番号2)と称される蛋白質をコードする単一のオープンリーディングフレームを含んだ。

【0098】

B c r A 蛋白質と関連排出ポンプの配列の比較

B c r Aアミノ酸配列を大腸菌のe m r B遺伝子及びS . a u r e u sのq a c A遺伝子のコード産物と整列した。「アライン(align)」検索(<http://www.hgsc.bcm.tmc.edu/searchlauncher>)を用いた同一性照合の結果は、B c r AがE m r B蛋白質と48.8%の相同性を持ち、Q a c A蛋白質と20.1%の相同性を持つことを示した。また、B r c AはB u r k h o l d e r i a p s e u d o m a l l e iのA F 110185蛋白質と84.8%の相同性を持つことが認められた。実験室データは、B c r Aが抗生物質ポンプであることを示している。B c r Aアミノ酸配列において既知のA T P結合部位は認められず、従ってb c r A遺伝子はA T P

結合カセット(ABC)トランスポーターファミリーには属さず、排出ポンプのMFSファミリーに属することが確認された。

【0099】

BcrA蛋白質のエピトープマッピング

第3群患者(*B. cepacia*あるいは*Pseudomonas aeruginosa*のいずれの感染徴候もないCF患者)からの血清と比較して、第4A群患者(*Burkholderia cepacia*に感染しているが良好なCF患者)からの血清と著明な反応性を示すノナーペプチドを表3に示す。エピトープマッピング実験から7つのエピトープを同定した、すなわち、エピトープ1:VISSYS(配列番号11)、エピトープ2:ISFGFMA(配列番号12)、エピトープ3:MAFFGS(配列番号13)、エピトープ4:QTVMGYT(配列番号14)、エピトープ5:LRMVASF(配列番号15)、エピトープ6:FFVPMTT(配列番号16)及びエピトープ7:LLHLSAI(配列番号17)。

【0100】

ファージ抗体ディスプレイライブラリー及びscFv

ペプチド1から3(配列番号18から20)の各々が異なる優性フィンガープリントを持つ2つのファージを産生した。これらは標識ファージ1から6(ペプチド1に対して反応性のファージ1及び2、ペプチド2に対して反応性のファージ3及び4、ペプチド3に対して反応性のファージ5及び6)であった。ファージは、2から4コピーからの最終パニングでの数が異なっていた。TOP10大腸菌にクローニングして、bcrA遺伝子に対するファージ活性を評価した。

【0101】

TOP10 大腸菌におけるbcrA遺伝子の発現

ウエスタン分析は、bcrA遺伝子がTOP10大腸菌にクローニングされ、約46kDaの見かけ分子量で発現されることを確認した(結果は示していない)。

【0102】

TOP10 大腸菌においてbcrAによって与えられる抗生物質耐性

TOP10 大腸菌 \pm bcrA に対する抗生物質、テトラサイクリン、クロルヘキシジン、ナリジクス酸及びシプロフロキサシンの最小阻止濃度 (MIC) 値を表4に示す。TOP10 大腸菌における bcrA 遺伝子によってクロルヘキシジンとシプロフロキサシンに対する耐性は与えられなかった。これに対し、テトラサイクリンについては MIC の2段階の差、そしてナリジクス酸については MIC の3段階の差が TOP10 大腸菌 \pm bcrA において認められた (表4)。

【0103】

ナリジクス酸耐性に対するファージ活性

パニング実験から得た6つの TOP10 大腸菌 \pm bcrA ファージクローン (ペプチド1 [配列番号18] に対して反応性のファージ1及び2; ペプチド2 [配列番号19] に対して反応性のファージ3及び4; ペプチド3 [配列番号20] に対して反応性のファージ5及び6) を、ナリジクス酸に対する活性に関して試験した (表5)。対照ファージの MIC ($16 \mu\text{g}/\text{ml}$) と比較して、6つのファージのうちの4つが活性を示した。活性はファージ1 (ペプチド1 (配列番号18) に対して反応性を示した) に関して最も著明であった。

【0104】

【考察】

細菌において、多剤耐性 (mdr) ポンプは *Staphylococcus aureus* (黄色ブドウ球菌) で初めて報告された (Lomovskaya, O. と Lewis, K., 1992, 前出)。簡単な mdr ポンプは *Escherichia coli* (大腸菌) (emrB) 及び *Bacillus subtilis* (枯草菌) (bmr) においても報告されている (Neyfakh, A. A., 1992, *Antimicrobial Agents. Chemother.*, 36: 484-485)。Burkholderia cepacia の bcrA 遺伝子はこの膜トランスロカーゼのファミリーに属し、抗生物質及び他の小分子から細胞を保護しうる。

【0105】

bcrA 遺伝子の翻訳されたアミノ酸配列は大腸菌の Emr B 蛋白質及び S .

aureusのQacA蛋白質と高い相同性を示す。実験室データは、bcrA遺伝子が膜トランスロカーゼをコードし、多剤排出ポンプのMFSファミリーに属することを示している。

【0106】

BcrA蛋白質は、膜にまたがる10の α -らせんを持つ内在性膜トランスロカーゼの典型的構造を有している。BcrA蛋白質は同じファミリーの他の成員と相同性を示す。かかる蛋白質は治療上及び診断上有用な標的であり、ワクチンとして能動免疫において、それに対して特異的な抗体を含む受動免疫薬剤のソースとして、及びそれに対して作用する治療上及び診断上有用な化合物の分離において使用することができる。

【0107】

【表1】

選択したPCRプライマーの特徴

オリゴヌクレオチド名	配列	特徴
EMRN	配列番号3	bcrA遺伝子の5'末端に位置する
EMRC	配列番号4	bcrA遺伝子の3'末端に位置する
M13正(-20)	配列番号5	ベクタープライマー
M13逆	配列番号6	ベクタープライマー
BcrA正	配列番号21	bcrA遺伝子の5'末端に位置する
BcrA逆	配列番号22	bcrA遺伝子の3'末端に位置する

オリゴヌクレオチドプライマーはすべて、標準的ホスホルアミダイト化学を用いて逆相HPLC (Genosys Biotechnologies Ltd) によって合成した。

【0108】

【表2】

BcrA蛋白質の膜内外ドメイン

らせん	開始	終了	スコア	確実性
1	16	36	1.877	確実
2	41	61	1.089	確実
3	64	84	1.478	確実
4	92	112	1.918	確実
5	120	140	0.925	推定
6	144	164	2.109	確実
7	175	195	1.236	確実
8	213	233	1.581	確実
9	245	265	0.914	推定
10	284	304	2.352	確実
11	313	333	1.640	確実
12	379	399	1.973	確実
13	411	431	0.764	推定
14	488	508	1.884	確実

TopPred 2 (von Heijne, G., 1992, J. Mol. Biol., 225:287-494)を使用したBcrA蛋白質の候補膜スパンニングセグメント。各々が20個のアミノ酸の長さである10の α -らせんの各々を列挙している。疎水性と膜内に存在する確率に基づいて各々の α -らせんにスコアを割り当てる。スコアから、その配列が膜スパンニング α -らせんである確率を与える。

【0109】

【表3】

B c r A 蛋 白 質 の ペ プ チ ド マ ッ ピ ン グ か ら の E L I S A 結 果

ペプチド	配列番号	第1群	第2群	第3群	第4A群	第4B群
62	1(配列番号11)	0.950 ± 0.36	0.965 ± 0.36	0.393 ± 0.08	1.284 ± 0.261	0.624 ± 0.375
63	1(配列番号11)	0.906 ± 0.38	1.074 ± 0.56	0.377 ± 0.04	1.297 ± 0.337	0.672 ± 0.412
64	1(配列番号11)	0.838 ± 0.36	1.071 ± 0.43	0.356 ± 0.04	1.232 ± 0.251	0.704 ± 0.405
284	2(配列番号12)	0.981 ± 0.39	1.075 ± 0.36	0.423 ± 0.05	1.220 ± 0.304	0.675 ± 0.419
285	2(配列番号12)	0.825 ± 0.38	1.017 ± 0.35	0.375 ± 0.02	1.141 ± 0.358	0.667 ± 0.338
286	2(配列番号12)	0.786 ± 0.37	0.915 ± 0.32	0.341 ± 0.02	1.149 ± 0.404	0.718 ± 0.460
288	3(配列番号13)	0.931 ± 0.28	1.199 ± 0.43	0.467 ± 0.02	1.595 ± 0.697	0.714 ± 0.451
289	3(配列番号13)	0.915 ± 0.32	1.022 ± 0.32	0.432 ± 0.02	1.313 ± 0.408	0.669 ± 0.434
290	3(配列番号13)	0.859 ± 0.39	1.103 ± 0.45	0.373 ± 0.04	1.034 ± 0.274	0.679 ± 0.421
291	3(配列番号13)	0.898 ± 0.36	1.178 ± 0.39	0.373 ± 0.03	1.108 ± 0.302	0.636 ± 0.285
302	4(配列番号14)	0.899 ± 0.28	1.151 ± 0.37	0.452 ± 0.04	1.250 ± 0.143	0.570 ± 0.342
303	4(配列番号14)	0.956 ± 0.32	1.135 ± 0.38	0.451 ± 0.01	1.247 ± 0.141	0.654 ± 0.381
304	4(配列番号14)	0.971 ± 0.31	1.113 ± 0.31	0.492 ± 0.03	1.399 ± 0.415	0.579 ± 0.347
339	5(配列番号15)	1.002 ± 0.35	1.168 ± 0.37	0.430 ± 0.06	1.222 ± 0.203	0.644 ± 0.337
340	5(配列番号15)	1.111 ± 0.43	1.256 ± 0.44	0.545 ± 0.04	1.382 ± 0.210	0.727 ± 0.451
341	5(配列番号15)	0.946 ± 0.32	1.112 ± 0.35	0.481 ± 0.01	1.352 ± 0.328	0.651 ± 0.330
384	6(配列番号16)	0.961 ± 0.28	1.066 ± 0.31	0.475 ± 0.05	1.189 ± 0.276	0.644 ± 0.278
385	6(配列番号16)	0.997 ± 0.26	1.202 ± 0.36	0.498 ± 0.08	1.545 ± 0.390	0.713 ± 0.437
386	6(配列番号16)	0.807 ± 0.30	1.004 ± 0.20	0.415 ± 0.03	1.152 ± 0.684	0.627 ± 0.350
486	7(配列番号17)	1.035 ± 0.25	1.144 ± 0.25	0.520 ± 0.04	1.243 ± 0.369	0.690 ± 0.379
487	7(配列番号17)	0.958 ± 0.38	1.059 ± 0.33	0.447 ± 0.05	1.223 ± 0.250	0.666 ± 0.389
488	7(配列番号17)	0.897 ± 0.40	0.924 ± 0.31	0.338 ± 0.03	1.296 ± 0.542	0.648 ± 0.362

第1群:Pseudomonas aeruginosa(緑膿菌)及びBurkholderia cepaciaに感染したCF患者(n=6)
第2群:Pseudomonas aeruginosaに感染したCF患者(n=4)
第3群:Pseudomonas aeruginosa及びBurkholderia cepaciaのいずれにも感染していないCF患者(n=2)
第4A群:Burkholderia cepaciaに感染したCF患者(良好)(n=4)
第4B群:これまで良好でなく、現在入院しているBurkholderia cepaciaに感染したCF患者(n=2)

【0111】

【表5】

ナリジクス酸へのTOP10 E. coli+berAの耐性に対するフェージクローン活性

フェージ	ナリジクス酸のMIC(μ g/ml)
フェージなし(berA+)	16
フェージ対照	16
1	2
2	16
3	8
4	16
5	8
6	4

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> NeuTec Pharma plc

<120> Antimicrobial Compositions

<130> M99/0582/PCT

<140>

<141>

<160> 22

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1554

<212> DNA

<213> Burkholderia cepacia

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1554)

<400> 1

atg tcc gcc acc acg gca tcc gcc gcg tcc cct gcc gcc gaa ccg gcg 48

Met Ser Ala Thr Thr Ala Ser Ala Ala Ser Pro Ala Ala Glu Pro Ala

1 5 10 15

ccg ctg tcc ggc gcc gcc ctc gcg ctg ctc acc gtc ggg ctc gcg ctc 96

Pro Leu Ser Gly Gly Ala Leu Ala Leu Leu Thr Val Gly Leu Ala Leu

20 25 30

ggc acg ttc atg gaa gtg ctc gac acg tcg atc ggc gac gtc gcg gtg 144

Gly Thr Phe Met Glu Val Leu Asp Thr Ser Ile Gly Asp Val Ala Val

35 40 45

cgc acg att ttg tgc agc ctc ggc gtc gcg acc agc gaa ggc acg tgg 192
 Pro Thr Ile Leu Cys Ser Leu Gly Val Ala Thr Ser Glu Gly Thr Trp
 50 55 60

gtg att tcs tgc/ tat tgc gtc gcg tcc gcg atc gcg gtg ccg ctg acg 240
 Val Ile Xaa Ser Tyr Ser Val Ala Ser Ala Ile Ala Val Pro Leu Thr
 65 70 75 80

ggc tgg ctt gcc cgg cgc gtc ggc gaa gtg cgg ctg ttc acc ctg tgc 288
 Gly Trp Leu Ala Arg Arg Val Gly Glu Val Arg Leu Phe Thr Leu Ser
 85 90 95

gtg ctc gcg ttc acg atc gcg tgc gcg ctc tgt ggc ctc gca ttg aac 336
 Val Leu Ala Phe Thr Ile Ala Ser Ala Leu Cys Gly Leu Ala Leu Asn
 100 105 110

ttc gag acg ctg atc gcg ttt cgg ctg ctg cag ggc ctc gtg tgc ggg 384
 Phe Glu Thr Leu Ile Ala Phe Arg Leu Leu Gln Gly Leu Val Ser Gly
 115 120 125

ccg atg gtg ccg ctg tgc cag acg atc ctg atg cgc agc tat ccg ccc 432
 Pro Met Val Pro Leu Ser Gln Thr Ile Leu Met Arg Ser Tyr Pro Pro
 130 135 140

gcg aag cgc ggg ctc gcg ctc ggc tta tgg gcg atg acg gtg atc gtc 480
 Ala Lys Arg Gly Leu Ala Leu Gly Leu Trp Ala Met Thr Val Ile Val
 145 150 155 160

gcg ccg atc ttc ggc ccg ctg ctc ggc ggc tgg atc agc gac aac tac 528
 Ala Pro Ile Phe Gly Pro Leu Leu Gly Gly Trp Ile Ser Asp Asn Tyr
 165 170 175

acg tgg ccg tgg atc ttc tac atc aat ctg ccg atc ggg att ttc tcc 576
 Thr Trp Pro Trp Ile Phe Tyr Ile Asn Leu Pro Ile Gly Ile Phe Ser
 180 185 190

gcg acc tgc gcg ttc ttc ctg ctg ggc cgc gag acg aag acg acg aaa 624

Ala Thr Cys Ala Phe Phe Leu Leu Gly Arg Glu Thr Lys Thr Thr Lys	
195	200
205	
cag cgg atc gac gcg gtc ggg ctc acg ctg ctc gtg atc ggc gtg tcg	672
Gln Arg Ile Asp Ala Val Gly Leu Thr Leu Leu Val Ile Gly Val Ser	
210	215
220	
tgc ctg cag atg atg ctc gac ctc ggc aag gac cgc gac tgg ttc agc	720
Cys Leu Gln Met Met Leu Asp Leu Gly Lys Asp Arg Asp Trp Phe Ser	
225	230
235	240
tcg tcg ttc atc gtt cgc gct cgc ctg atc gcg gtc gtg tcg ctc gcg	768
Ser Ser Phe Ile Val Arg Ala Arg Leu Ile Ala Val Val Ser Leu Ala	
245	250
255	
ttc atg ctc gtc tgg gaa gcg acc gag aag gag ccg gtg gtc gac cta	816
Phe Met Leu Val Trp Glu Ala Thr Glu Lys Glu Pro Val Val Asp Leu	
260	265
270	
cgc ctg ttc aag gat cgc aac ttt gct cgg cgc gct atc atc tcg ttc	864
Arg Leu Phe Lys Asp Arg Asn Phe Ala Arg Arg Ala Ile Ile Ser Phe	
275	280
285	
ggc ttc atg gcg ttc ttc ggc tcg gtc gtg atc ttc ccg ctg tgg cag	912
Gly Phe Met Ala Phe Phe Gly Ser Val Val Ile Phe Pro Leu Trp Gln	
290	295
300	
acc gtg atg ggc tac acg gcc ggc aag gca ctt ccg gcg acc gcg ccg	960
Thr Val Met Gly Tyr Thr Ala Gly Lys Ala Leu Pro Ala Thr Ala Pro	
305	310
315	320
gtt ggg ctg ctc gcg ctc gtg ctg tcg ccg ctg atc ggc cgc aac atg	1008
Val Gly Leu Leu Ala Leu Val Leu Ser Pro Leu Ile Gly Arg Asn Met	
325	330
335	
cac cgg ctc gac ctg cgg atg gtc gcg agc ttc gcc ttt cat cgt gtt	1056
His Arg Leu Asp Leu Arg Met Val Ala Ser Phe Ala Phe His Arg Val	

340	345	350	
tcg cga tcg tat cgg tta tgg aac tcg acg ttt acg ctc gac gtg ttt			1104
Ser Arg Ser Tyr Arg Leu Trp Asn Ser Thr Phe Thr Leu Asp Val Phe			
355	360	365	
ttc aac cac gtg atc ctg ccg cgg ctc gtg cag ggg atc ggc gtc gcg			1152
Phe Asn His Val Ile Leu Pro Arg Leu Val Gln Gly Ile Gly Val Ala			
370	375	380	
tgc ttc ttc gtg ccg atg acg acg atc acg ctg tcg agc atc ccc gac			1200
Cys Phe Phe Val Pro Met Thr Thr Ile Thr Leu Ser Ser Ile Pro Asp			
385	390	395	400
gag cgg ctg gcg agc gcc tcg ggc ctg tcg aac ttc ctg cgt acg ctg			1248
Glu Arg Leu Ala Ser Ala Ser Gly Leu Ser Asn Phe Leu Arg Thr Leu			
405	410	415	
tcg ggc gcg atc ggc acc gcg gtc agc tcg acg ttc tgg gag aac gac			1296
Ser Gly Ala Ile Gly Thr Ala Val Ser Ser Thr Phe Trp Glu Asn Asp			
420	425	430	
gcg atc tac cac cac gcg cgg ctc gcc gaa tcg gtg agc gtc tat gcg			1344
Ala Ile Tyr His His Ala Arg Leu Ala Glu Ser Val Ser Val Tyr Ala			
435	440	445	
cag aac acg acc gac tat cag ggc gcg ctg gcg cag ctc ggc gtc gtg			1392
Gln Asn Thr Thr Asp Tyr Gln Gly Ala Leu Ala Gln Leu Gly Val Val			
450	455	460	
ggc cag acc gcg aac gcg caa ctg aac cag atc gtc acg caa gca ggg			1440
Gly Gln Thr Ala Asn Ala Gln Leu Asn Gln Ile Val Thr Gln Ala Gly			
465	470	475	480
ctt cat gat ggc gac caa cga ctt ctt cac ctg tcg gcg atc gtg ttc			1488
Leu His Asp Gly Asp Gln Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Ile Val Phe			
485	490	495	

gtc gcg ctc gcg gcg ctc gtg tgg atc acg aag ccg aag aag ggc gcg 1536
 Val Ala Leu Ala Ala Leu Val Trp Ile Thr Lys Pro Lys Lys Gly Ala
 500 505 510

ggg ccg gcg atg ggg cat 1554
 Gly Pro Ala Met Gly His
 515

<210> 2

<211> 518

<212> PRT

<213> Burkholderia cepacia

<400> 2

Met Ser Ala Thr Thr Ala Ser Ala Ala Ser Pro Ala Ala Glu Pro Ala
 1 5 10 15

Pro Leu Ser Gly Gly Ala Leu Ala Leu Leu Thr Val Gly Leu Ala Leu
 20 25 30

Gly Thr Phe Met Glu Val Leu Asp Thr Ser Ile Gly Asp Val Ala Val
 35 40 45

Pro Thr Ile Leu Cys Ser Leu Gly Val Ala Thr Ser Glu Gly Thr Trp
 50 55 60

Val Ile Xaa Ser Tyr Ser Val Ala Ser Ala Ile Ala Val Pro Leu Thr
 65 70 75 80

Gly Trp Leu Ala Arg Arg Val Gly Glu Val Arg Leu Phe Thr Leu Ser
 85 90 95

Val Leu Ala Phe Thr Ile Ala Ser Ala Leu Cys Gly Leu Ala Leu Asn
 100 105 110

Phe Glu Thr Leu Ile Ala Phe Arg Leu Leu Gln Gly Leu Val Ser Gly

115	120	125
Pro Met Val Pro Leu Ser Gln Thr Ile Leu Met Arg Ser Tyr Pro Pro		
130	135	140
Ala Lys Arg Gly Leu Ala Leu Gly Leu Trp Ala Met Thr Val Ile Val		
145	150	155
Ala Pro Ile Phe Gly Pro Leu Leu Gly Gly Trp Ile Ser Asp Asn Tyr		
	165	170
		175
Thr Trp Pro Trp Ile Phe Tyr Ile Asn Leu Pro Ile Gly Ile Phe Ser		
	180	185
		190
Ala Thr Cys Ala Phe Phe Leu Leu Gly Arg Glu Thr Lys Thr Thr Lys		
195	200	205
Gln Arg Ile Asp Ala Val Gly Leu Thr Leu Leu Val Ile Gly Val Ser		
210	215	220
Cys Leu Gln Met Met Leu Asp Leu Gly Lys Asp Arg Asp Trp Phe Ser		
225	230	235
		240
Ser Ser Phe Ile Val Arg Ala Arg Leu Ile Ala Val Val Ser Leu Ala		
	245	250
		255
Phe Met Leu Val Trp Glu Ala Thr Glu Lys Glu Pro Val Val Asp Leu		
	260	265
		270
Arg Leu Phe Lys Asp Arg Asn Phe Ala Arg Arg Ala Ile Ile Ser Phe		
275	280	285
Gly Phe Met Ala Phe Phe Gly Ser Val Val Ile Phe Pro Leu Trp Gln		
290	295	300
Thr Val Met Gly Tyr Thr Ala Gly Lys Ala Leu Pro Ala Thr Ala Pro		
305	310	315
		320

Val Gly Leu Leu Ala Leu Val Leu Ser Pro Leu Ile Gly Arg Asn Met
 325 330 335

His Arg Leu Asp Leu Arg Met Val Ala Ser Phe Ala Phe His Arg Val
 340 345 350

Ser Arg Ser Tyr Arg Leu Trp Asn Ser Thr Phe Thr Leu Asp Val Phe
 355 360 365

Phe Asn His Val Ile Leu Pro Arg Leu Val Gln Gly Ile Gly Val Ala
 370 375 380

Cys Phe Phe Val Pro Met Thr Thr Ile Thr Leu Ser Ser Ile Pro Asp
 385 390 395 400

Glu Arg Leu Ala Ser Ala Ser Gly Leu Ser Asn Phe Leu Arg Thr Leu
 405 410 415

Ser Gly Ala Ile Gly Thr Ala Val Ser Ser Thr Phe Trp Glu Asn Asp
 420 425 430

Ala Ile Tyr His His Ala Arg Leu Ala Glu Ser Val Ser Val Tyr Ala
 435 440 445

Gln Asn Thr Thr Asp Tyr Gln Gly Ala Leu Ala Gln Leu Gly Val Val
 450 455 460

Gly Gln Thr Ala Asn Ala Gln Leu Asn Gln Ile Val Thr Gln Ala Gly
 465 470 475 480

Leu His Asp Gly Asp Gln Arg Leu Leu His Leu Ser Ala Ile Val Phe
 485 490 495

Val Ala Leu Ala Ala Leu Val Trp Ile Thr Lys Pro Lys Lys Gly Ala
 500 505 510

Gly Pro Ala Met Gly His

515

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: PCR Primer

<400> 3

cccgatcggc agattgatgt

20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: PCR Primer

<400> 4

gacgtcgcgg tgccgacgat

20

<210> 5

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: PCR Primer

<400> 5

ttcacaggaa acag

14

<210> 6

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: PCR Primer

<400> 6

ttcacaggaa acag

14

<210> 7

<211> 5

<212> PRT

<213> Burkholderia cepacia

<400> 7

Pro Leu Leu Gly Gly

1 5

<210> 8

<211> 5

<212> PRT

<213> Burkholderia cepacia

<400> 8

Pro Leu Leu Arg Gly

1 5

<210> 9

<211> 3

<212> PRT
<213> Burkholderia cepacia

<400> 9
Leu Asp Leu
1

<210> 10
<211> 3
<212> PRT
<213> Burkholderia cepacia

<400> 10
Asp Leu Arg
1

<210> 11
<211> 6
<212> PRT
<213> Burkholderia cepacia

<400> 11
Val Ile Ser Ser Tyr Ser
1 5

<210> 12
<211> 7
<212> PRT
<213> Burkholderia cepacia

<400> 12
Ile Ser Phe Gly Phe Met Ala
1 5

<210> 13
<211> 6
<212> PRT
<213> Burkholderia cepacia

<400> 13
Met Ala Phe Phe Gly Ser
1 5

<210> 14
<211> 7
<212> PRT
<213> Burkholderia cepacia

<400> 14
Gln Thr Val Met Gly Tyr Thr
1 5

<210> 15
<211> 7
<212> PRT
<213> Burkholderia cepacia

<400> 15
Leu Arg Met Val Ala Ser Phe
1 5

<210> 16
<211> 7
<212> PRT
<213> Burkholderia cepacia

<400> 16
Phe Phe Val Pro Met Thr Thr

1 5

<210> 17
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Burkholderia cepacia

<400> 17
 Leu Leu His Leu Ser Ala Ile
 1 5

<210> 18
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Burkholderia cepacia

<400> 18
 Ala Ile Ile Ser Phe Gly Phe Met Ala Phe Phe Gly Ser Val Val
 1 5 10 15

<210> 19
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Burkholderia cepacia

<400> 19
 Ser Val Val Ile Phe Pro Leu Trp Gln Thr Val Met Gly Tyr Thr
 1 5 10 15

<210> 20
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Burkholderia cepacia

<400> 20

His Arg Leu Asp Leu Arg Met Val Ala Ser Phe Ala Phe His Arg
1 5 10 15

<210> 21

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: PCR primer

<400> 21

cgacgtcgcg gtgccgacga t 21

<210> 22

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: PCR primer

<400> 22

atgccccatc gccggccccg c 21

【國際調查報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

				International Application No PCT/GB 00/03866	
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER					
IPC 7	C12N15/31	C12Q1/18	C12Q1/68	C07K14/21	C07K16/12
	G01N33/53	A61K38/16	A61K39/104	A61K39/40	
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC					
B. FIELDS SEARCHED					
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)					
IPC 7	C07K	C12N	C12Q	G01N	A61K
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched					
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)					
EMBL, EPO-Internal, BIOSIS, MEDLINE					
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT					
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages				Relevant to claim No.
X	COHN ET AL.: "Verapamil-tobramycin synergy in Pseudomonas cepacia but not Pseudomonas aeruginosa in vitro" CHEMOTHERAPY, vol. 41, no. 5, 1995, pages 330-333, XP000982639 page 330, right-hand column -page 331, left-hand column page 331, right-hand column, last paragraph table 1 --- -/--				12-22, 25, 39, 40, 43
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.			<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents:			*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance			*X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone		
E earlier document but published on or after the international filing date			*Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.		
L document which may throw doubts on priority claims or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)			*&* document member of the same patent family		
C document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means					
P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed					
Date of the actual completion of the international search			Date of mailing of the international search report		
5 March 2001			14/03/2001		
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040. Tx. 31 651 epo nl. Fax: (+31-70) 340-3016			Authorized officer van Klompenburg, W		

Form: PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/GB 00/03866

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>DESHAZER ET AL.: "Molecular characterization of genetic loci required for secretion of exoproducts in Burkholderia pseudomallei" JOURNAL OF BACTERIOLOGY, vol. 181, no. 15, pages 4661-4664, XP002162016 cited in the application -& DATABASE EMBL 'Online! EBI; ACC.NO: AF110185, DESHAZER ET AL.: XP002162017 orff abstract</p>	1,3,5,7, 8,26-38, 41-45
A	<p>WO 96 33285 A (MICROCIDE PHARMACEUTICALS INC ;CHAMBERLAND SUZANNE (US); HECKER SC) 24 October 1996 (1996-10-24) page 8, line 13 -page 11, line 11; claims 1-79; figures 1-4; examples 1,5,7,9</p>	1-45
A	<p>US 5 698 178 A (GOLDENBERG DAVID M) 16 December 1997 (1997-12-16) column 4, line 64 -column 5, line 10; claims 1,4; examples 6-8</p>	10-29, 32-35, 38-41
A	<p>HANCOCK: "Resistance mechanisms in Pseudomonas aeruginosa and other nonfermentative gram-negative bacteria" CLINICAL INFECTIOUS DISEASES, vol. 27, no. s1, 1998, pages s93-s99, XP000982642 page S95, left-hand column page S97, right-hand column -page S98, left-hand column; table I</p>	1-45
A	<p>NEYFAKH A A: "THE MULTIDRUG EFFLUX TRANSPORTER OF BACILLUS SUBTILIS IS A STRUCTURAL AND FUNTIONAL HOMOLOG OF THE STAPHYLOCOCCUS NORA PROTEIN" ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY,US,AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, WASHINGTON, DC, vol. 36, no. 2, February 1992 (1992-02), pages 484-485, XP000913664 ISSN: 0066-4804 figure 1</p>	44,45

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/GB 00/03866

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9633285 A	24-10-1996	US 5989832 A	23-11-1999
		AU 715654 B	10-02-2000
		AU 5713496 A	07-11-1996
		CA 2217865 A	24-10-1996
		EP 0823942 A	18-02-1998
		JP 11503913 T	06-04-1999
US 5698178 A	16-12-1997	US 5686578 A	11-11-1997
		AU 3202195 A	04-03-1996
		CA 2195556 A	15-02-1996
		EP 0778849 A	18-06-1997
		JP 10506881 T	07-07-1998
		WO 9604313 A	15-02-1996

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マコ-ト' (参考)	
A 6 1 K	39/02	A 6 1 K	39/104	4 C 0 8 6
	39/07		39/108	4 C 0 8 7
	39/104		39/112	4 C 2 0 6
	39/108		45/00	4 H 0 4 5
	39/112	A 6 1 P	25/00	
	45/00		31/04	
A 6 1 P	25/00		43/00	1 1 1
	31/04	C 0 7 K	14/195	
	43/00	C 1 2 N	1/15	
C 0 7 K	14/195		1/19	
C 1 2 N	1/15		1/21	
	1/19	C 1 2 Q	1/02	
	1/21		1/68	A
	5/10	G 0 1 N	33/53	D
C 1 2 Q	1/02			M
	1/68		33/566	
G 0 1 N	33/53		33/569	F
	33/566	C 1 2 N	15/00	Z N A A
	33/569	A 6 1 K	37/02	
		C 1 2 N	5/00	A

(81)指定国 E P (A T , B E , C H , C Y ,
 D E , D K , E S , F I , F R , G B , G R , I E , I
 T , L U , M C , N L , P T , S E) , O A (B F , B J
 , C F , C G , C I , C M , G A , G N , G W , M L ,
 M R , N E , S N , T D , T G) , A P (G H , G M , K
 E , L S , M W , M Z , S D , S L , S Z , T Z , U G
 , Z W) , E A (A M , A Z , B Y , K G , K Z , M D ,
 R U , T J , T M) , A E , A G , A L , A M , A T ,
 A U , A Z , B A , B B , B G , B R , B Y , B Z , C
 A , C H , C N , C R , C U , C Z , D E , D K , D M
 , D Z , E E , E S , F I , G B , G D , G E , G H ,
 G M , H R , H U , I D , I L , I N , I S , J P , K
 E , K G , K P , K R , K Z , L C , L K , L R , L S
 , L T , L U , L V , M A , M D , M G , M K , M N ,
 M W , M X , M Z , N O , N Z , P L , P T , R O , R
 U , S D , S E , S G , S I , S K , S L , T J , T M
 , T R , T T , T Z , U A , U G , U S , U Z , V N ,
 Y U , Z A , Z W

(72)発明者 マシューズ・ルース・クリスティーン
 イギリス チェシャー エスケ-9 7ピ
 -ワイ オールダーリー エッジ グレイ
 スト-ク ドライヴ 1

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA13 BA31 BA80 CA04
CA09 DA06 EA04 GA11 GA19
HA03 HA14 HA19
4B063 QA01 QA18 QQ03 QQ42 QQ79
QR32 QR38 QR55 QR75 QR80
QR82 QS20 QS25 QS34 QS39
QX01 QX07
4B065 AA01Y AA26X AA29Y AA41Y
AA46Y AA48Y AB01 AC14
BA02 CA25 CA45
4C084 AA02 AA06 AA07 AA17 AA19
BA01 BA02 BA23 CA03 CA53
CA56 DA41 DC50 MA02 NA05
NA14 ZA011 ZA012 ZB311
ZB312 ZB351 ZB352 ZC021
ZC022
4C085 AA02 AA03 BA15 BA19 BA21
BA24 DD21 DD61 EE01
4C086 AA01 AA02 CB09 MA02 MA04
NA05 ZA01 ZB31 ZB35 ZC02
4C087 AA01 AA02 BC31 BC32 BC34
BC35 BC37 BC38 BC40 MA02
NA05 NA14 ZA01 ZB31 ZB35
ZC02
4C206 AA01 AA02 FA41 MA02 MA03
MA04 NA05 ZA01 ZB31 ZB35
ZC02
4H045 AA10 AA30 BA10 CA11 DA86
EA29 EA31 EA52 FA74

专利名称(译)	抗菌组成物		
公开(公告)号	JP2003511074A	公开(公告)日	2003-03-25
申请号	JP2001530483	申请日	2000-10-09
[标]申请(专利权)人(译)	牛科技制药公共有限公司		
申请(专利权)人(译)	牛科技制药公共有限公司		
[标]发明人	バーニー・ジェームズ・ピーター マシュー・ブルース・クリスティーン		
发明人	バーニー・ジェームズ・ピーター マシュー・ブルース・クリスティーン		
IPC分类号	G01N33/53 A61K31/14 A61K31/436 A61K35/74 A61K38/00 A61K39/00 A61K39/02 A61K39/07 A61K39/104 A61K39/108 A61K39/112 A61K45/00 A61P25/00 A61P31/04 A61P43/00 C07K14/195 C07K14/21 C07K16/12 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12N15/31 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/566 G01N33/569		
CPC分类号	A61K38/00 A61K39/00 A61P25/00 A61P31/00 A61P31/04 C07K14/21 C07K16/1214 C07K2317/34 C07K2317/622 Y02A50/476		
FI分类号	A61K31/14 A61K31/436 A61K35/74.D A61K39/02 A61K39/07 A61K39/104 A61K39/108 A61K39/112 A61K45/00 A61P25/00 A61P31/04 A61P43/00.111 C07K14/195 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12Q1/02 C12Q1/68.A G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 G01N33/569.F C12N15/00.ZNA.A A61K37/02 C12N5/00.A		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA13 4B024/BA31 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/DA06 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/GA19 4B024/HA03 4B024/HA14 4B024/HA19 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ03 4B063/QQ42 4B063/QQ79 4B063/QR32 4B063/QR38 4B063/QR55 4B063/QR75 4B063/QR80 4B063/QR82 4B063/QS20 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QS39 4B063/QX01 4B063/QX07 4B065/AA01Y 4B065/AA26X 4B065/AA29Y 4B065/AA41Y 4B065/AA46Y 4B065/AA48Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA25 4B065/CA45 4C084/AA02 4C084/AA06 4C084/AA07 4C084/AA17 4C084/AA19 4C084/BA01 4C084/BA02 4C084/BA23 4C084/CA03 4C084/CA53 4C084/CA56 4C084/DA41 4C084/DC50 4C084/MA02 4C084/NA05 4C084/NA14 4C084/ZA011 4C084/ZA012 4C084/ZB311 4C084/ZB312 4C084/ZB351 4C084/ZB352 4C084/ZC021 4C084/ZC022 4C085/AA02 4C085/AA03 4C085/BA15 4C085/BA19 4C085/BA21 4C085/BA24 4C085/DD21 4C085/DD61 4C085/EE01 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/CB09 4C086/MA02 4C086/MA04 4C086/NA05 4C086/ZA01 4C086/ZB31 4C086/ZB35 4C086/ZC02 4C087/AA01 4C087/AA02 4C087/BC31 4C087/BC32 4C087/BC34 4C087/BC35 4C087/BC37 4C087/BC38 4C087/BC40 4C087/MA02 4C087/NA05 4C087/NA14 4C087/ZA01 4C087/ZB31 4C087/ZB35 4C087/ZC02 4C206/AA01 4C206/AA02 4C206/FA41 4C206/MA02 4C206/MA03 4C206/MA04 4C206/NA05 4C206/ZA01 4C206/ZB31 4C206/ZB35 4C206/ZC02 4H045/AA10 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA11 4H045/DA86 4H045/EA29 4H045/EA31 4H045/EA52 4H045/FA74		
代理人(译)	铃木 弘男		
优先权	1999023858 1999-10-09 GB		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

[问题] 本发明涉及抗菌组合物，特别是作用于洋葱伯克霍尔德氏菌的组合物，以及此类组合物的诊断测试和此类组合物的用途。

選択したPCRプライマーの特徴

オリゴヌクレオチド名	配列	特徴
EMRN	配列番号 3	bcrA 遺伝子の 5' 末端に位置する
EMRC	配列番号 4	bcrA 遺伝子の 3' 末端に位置する
M13 正 (-20)	配列番号 5	ベクタープライマー
M13 逆	配列番号 6	ベクタープライマー
BcrA 正	配列番号 21	bcrA 遺伝子の 5' 末端に位置する
BcrA 逆	配列番号 22	bcrA 遺伝子の 3' 末端に位置する

オリゴヌクレオチドプライマーはすべて、標準的ホスホルアミダイト化学を用いて逆相H