

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2009-538116

(P2009-538116A)

(43) 公表日 平成21年11月5日 (2009.11.5)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
C 1 2 N 1/20 (2006.01)	C 1 2 N 1/20 Z	4 B O 6 3
C O 7 K 16/12 (2006.01)	C O 7 K 16/12	4 B O 6 4
C O 7 K 14/315 (2006.01)	C O 7 K 14/315	4 B O 6 5
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	4 C O 8 4
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 90 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2008-554887 (P2008-554887)
 (86) (22) 出願日 平成19年2月16日 (2007.2.16)
 (85) 翻訳文提出日 平成20年10月15日 (2008.10.15)
 (86) 国際出願番号 PCT/IB2007/001948
 (87) 国際公開番号 W02007/116322
 (87) 国際公開日 平成19年10月18日 (2007.10.18)
 (31) 優先権主張番号 60/774, 450
 (32) 優先日 平成18年2月17日 (2006.2.17)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 504389991
 ノバルティス アーゲー
 スイス国 ツェーハー 4 0 0 2 パーゼル,
 リヒトシュトラッセ 3 5
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74) 代理人 100062409
 弁理士 安村 高明
 (74) 代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹
 (72) 発明者 コヴァッチ, アントネロ
 イタリア国 イー 5 3 1 0 0 シエナ,
 ヴィア フィオレンティーナ 1, ノバルティス
 ヴァクシンズ アンド ダイアグノスティクス アジ

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 細菌抗原の精製

(57) 【要約】

グラム陽性細菌 (Streptococcus pneumoniae が含まれる) 由来の線毛および線毛様構造を単離する方法ならびにかかる単離された線毛を含む組成物を示す。これらの組成物は、抗体の産生および免疫刺激のための免疫原性組成物として有用である。Streptococcus pneumoniae を阻害する方法および Streptococcus pneumoniae のインヒビターを同定する方法も示す。上記線毛は、肺炎球菌および他のグラム陽性細菌の病原性で役割を果たし、特に、グラム陽性細菌感染の処置方法およびこれに対する免疫化で有用である。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

単離された連鎖球菌性の線毛。

【請求項 2】

前記線毛が、*Streptococcus pneumoniae* 線毛である、請求項 1 に記載の線毛。

【請求項 3】

前記線毛が、RrgB タンパク質を含む、請求項 2 に記載の線毛。

【請求項 4】

分子量が、 2×10^6 Da $\sim$ 3×10^6 Da である、請求項 1 または請求項 2 に記載の線毛。 10

【請求項 5】

酵素消化または機械的剪断によって細胞から分離された、請求項 1 または請求項 2 に記載の線毛。

【請求項 6】

前記機械的剪断が、超音波処理を含む、請求項 5 に記載の線毛。

【請求項 7】

細菌細胞を実質的に含まない、請求項 1 または請求項 2 に記載の線毛。

【請求項 8】

請求項 1 または請求項 2 に記載の 1 つ以上の線毛を含む、免疫原性組成物。 20

【請求項 9】

線毛を産生する細菌細胞を酵素消化または機械的剪断に供する工程および該細胞から該線毛を単離する工程を含む、請求項 1 または請求項 2 に記載の線毛を産生する方法。

【請求項 10】

グラム陽性細菌の線毛を単離する方法であって、該方法は、

グラム陽性細菌の線毛を産生する細菌細胞を酵素消化または機械的剪断に供する工程；
および

該細胞から該線毛を単離する工程；

を含む、方法。 30

【請求項 11】

Streptococcus pneumoniae 線毛を単離する方法であって、該方法は、

Streptococcus pneumoniae 線毛を産生する細菌細胞を酵素消化または機械的剪断に供する工程；および

該細胞から該線毛を単離する工程；

を含む、方法。

【請求項 12】

前記機械的剪断が、超音波処理を含む、請求項 10 または請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

前記酵素消化が、ムタノリシンを使用して行う、請求項 10 または請求項 11 に記載の方法。 40

【請求項 14】

前記単離する工程が、1 つ以上の密度勾配遠心分離またはクロマトグラフィ工程を含む、請求項 10 または請求項 11 に記載の方法。

【請求項 15】

前記単離する工程が、多分散性を減少させる工程を含む、請求項 10 または請求項 11 に記載の方法。

【請求項 16】

グラム陽性線毛に特異的に結合する、抗体。

【請求項 17】

Streptococcus pneumoniae 線毛に特異的に結合する、抗体。

【請求項 18】

前記抗体が、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、単鎖抗体、または Fab フラグメントからなる群から選択される、請求項 16 または請求項 17 に記載の抗体。

【請求項 19】

前記抗体が、標識されている、請求項 16 または請求項 17 に記載の抗体。

【請求項 20】

前記標識が、酵素、放射性同位体、造影剤、毒素、またはフルオロフォアである、請求項 19 に記載の抗体。

10

【請求項 21】

前記抗体が、Rrg A、Rrg B、および Rrg C からなる群から選択される非複合体化線毛タンパク質への該抗体の結合と比較して、線毛複合体に優先的に結合する、請求項 17 に記載の抗体。

【請求項 22】

前記抗体が、非複合体化 Rrg A、非複合体化 Rrg B、または非複合体化 Rrg C に特異的に結合しない、請求項 17 に記載の抗体。

【請求項 23】

グラム陽性細菌に対する免疫応答を誘導する方法であって、該方法は、有効量のグラム陽性細菌の線毛を被験体に投与する工程を含む、方法。

20

【請求項 24】

Streptococcus pneumoniae に対する免疫応答を誘導する方法であって、該方法は、有効量の *Streptococcus pneumoniae* 線毛を被験体に投与する工程を含む、方法。

【請求項 25】

前記線毛が、単離されている、請求項 23 または請求項 24 に記載の方法。

【請求項 26】

前記被験体が、ヒトである、請求項 23 または請求項 24 に記載の方法。

【請求項 27】

被験体におけるグラム陽性細菌感染を検出する方法であって、該方法は、該被験体由来のサンプルをグラム陽性細菌の線毛に対する抗体の存在についてアッセイする工程を含む、方法。

30

【請求項 28】

前記抗体が、線毛成分と比較して線毛複合体に優先的に結合する、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 29】

被験体における *Streptococcus pneumoniae* 感染を検出する方法であって、該方法は、該被験体由来のサンプルを *Streptococcus pneumoniae* 線毛に対する抗体の存在についてアッセイする工程を含む、方法。

40

【請求項 30】

前記抗体が、線毛成分と比較して、線毛複合体に優先的に結合する、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 31】

前記サンプルが、血清である、請求項 27 ~ 請求項 30 のいずれかに記載の方法。

【請求項 32】

前記被験体が、ヒトである、請求項 27 ~ 請求項 30 のいずれかに記載の方法。

【請求項 33】

被験体におけるグラム陽性細菌感染を検出する方法であって、該方法は、サンプルを請求項 16 に記載の抗体と接触させる工程および該サンプルの成分への該抗体の結合を検出する工程を含む、方法。

50

【請求項 3 4】

被験体における *Streptococcus pneumoniae* 感染を検出する方法であって、該方法は、サンプルを請求項 1 7 に記載の抗体と接触させる工程および該サンプルの成分への該抗体の結合を検出する工程を含む、方法。

【請求項 3 5】

グラム陽性細菌感染を有する被験体を処置する方法であって、該方法は、グラム陽性細菌の線毛に特異的に結合する有効量の薬剤を該被験体に投与する工程を含む、方法。

【請求項 3 6】

Streptococcus pneumoniae 感染を有する被験体を処置する方法であって、該方法は、*Streptococcus pneumoniae* 線毛に特異的に結合する有効量の薬剤を被験体に投与する工程を含む、方法。

10

【請求項 3 7】

前記薬剤が、抗体である、請求項 3 5 または請求項 3 6 に記載の方法。

【請求項 3 8】

前記抗体が、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、単鎖抗体、または Fab フラグメントからなる群から選択される、請求項 3 7 に記載の方法。

【請求項 3 9】

前記抗体が、細胞へのグラム陽性細菌の付着を遮断する、請求項 3 8 に記載の方法。

【請求項 4 0】

前記抗体が、細胞への *Streptococcus pneumoniae* の付着を遮断する、請求項 3 9 に記載の方法。

20

【請求項 4 1】

細胞が、上皮細胞である、請求項 3 9 または請求項 4 0 に記載の方法。

【請求項 4 2】

前記上皮細胞が、肺上皮細胞または鼻咽頭上皮細胞である、請求項 4 1 に記載の方法。

【請求項 4 3】

前記抗体が、Rrg A、Rrg B、および Rrg C からなる群から選択される非複合体化線毛タンパク質への該抗体の結合と比較して、線毛複合体に優先的に結合する、請求項 3 7 に記載の方法。

30

【請求項 4 4】

前記抗体が、非複合体化 Rrg A、非複合体化 Rrg B、または非複合体化 Rrg C に特異的に結合しない、請求項 3 7 に記載の方法。

【請求項 4 5】

前記抗体が、コントロールと比較して、A 5 4 9 肺上皮細胞への *Streptococcus pneumoniae* の付着を測定するアッセイにおいて、測定された該細胞へ *Streptococcus pneumoniae* の付着の少なくとも 5 0 % を遮断する、請求項 3 8 に記載の方法。

【請求項 4 6】

前記抗体が、コントロールと比較して、A 5 4 9 肺上皮細胞への *Streptococcus pneumoniae* の付着を測定するアッセイにおいて、測定された該細胞へ *Streptococcus pneumoniae* の付着の少なくとも 5 0 % を遮断する、請求項 4 1 に記載の方法。

40

【請求項 4 7】

前記被験体が、ヒトである、請求項 3 5 または請求項 3 6 に記載の方法。

【請求項 4 8】

Streptococcus pneumoniae 感染を有する被験体の処置過程を決定する方法であって、該方法は、

被験体由来のサンプルを *Streptococcus pneumoniae* 線毛に対する抗体の存在についてアッセイする工程；および

50

該抗体の有無に基づいて処置過程を選択する工程；
を含む、方法。

【請求項 49】

前記抗体の存在が検出されない場合に、抗生物質製剤を前記被験体に投与する工程をさらに含む、請求項 48 に記載の方法。

【請求項 50】

前記抗体の存在が検出された場合に、抗炎症薬を前記被験体に投与する工程をさらに含む、請求項 48 に記載の方法。

【請求項 51】

前記被験体が、ヒトである、請求項 48 に記載の方法。

10

【請求項 52】

30 個までのアミノ酸の置換、挿入、または欠失を有する *Streptococcus pneumoniae* 線毛タンパク質のアミノ酸配列を含むポリペプチドを含む、単離された線毛または線毛様多量体。

【請求項 53】

20 個までのアミノ酸の置換、挿入、または欠失を有する、請求項 52 に記載の線毛または線毛様多量体。

【請求項 54】

10 個までのアミノ酸の置換、挿入、または欠失を有する、請求項 52 に記載の線毛または線毛様多量体。

20

【請求項 55】

5 個までのアミノ酸の置換、挿入、または欠失を有する、請求項 52 に記載の線毛または線毛様多量体。

【請求項 56】

前記アミノ酸の置換、挿入、または欠失がアミノ酸置換である、請求項 52 ~ 請求項 55 のいずれか 1 項に記載の線毛または線毛様多量体。

【請求項 57】

前記アミノ酸置換が、保存的アミノ酸置換である、請求項 56 に記載のポリペプチド。

【請求項 58】

前記タンパク質が、Rrg A、Rrg B、または Rrg C である、請求項 52 に記載の線毛または線毛様多量体。

30

【請求項 59】

細胞中に抗 *Streptococcus pneumoniae* 線毛抗体を発現させる方法であって、該方法は、該細胞中で抗 *Streptococcus pneumoniae* 線毛抗体をコードする核酸を発現させる工程を含む、方法。

【請求項 60】

前記抗 *Streptococcus pneumoniae* 線毛抗体が、非複合体化 Rrg A、非複合体化 Rrg B、または非複合体化 Rrg C に特異的に結合しない、請求項 59 に記載の方法。

【請求項 61】

Streptococcus pneumoniae を含むサンプルから *Streptococcus pneumoniae* を精製する方法であって、該方法は、

40

a) 固体支持体に結合した請求項 17 に記載の抗体を含むアフィニティマトリックスを提供する工程；

b) 該サンプルを該アフィニティマトリックスと接触させてアフィニティマトリックス - *Streptococcus pneumoniae* 複合体を形成する工程；

c) 該アフィニティマトリックス - *Streptococcus pneumoniae* 複合体を該サンプルの残りから分離する工程；および

d) *Streptococcus pneumoniae* を該アフィニティマトリックスから放出させる工程；

50

を含む、方法。

【請求項 6 2】

Streptococcus pneumoniae に細胞毒性薬または診断薬を送達する方法であって、該方法は、

a) 請求項 1 7 に記載の抗体またはそのフラグメントに結合体化した細胞毒性薬または診断薬を提供する工程；および

b) *Streptococcus pneumoniae* を抗体 - 薬剤結合体またはフラグメント - 薬剤結合体に曝露する工程；

を含む、方法。

【請求項 6 3】

Streptococcus pneumoniae 活性のモジュレーターを同定する方法であって、該方法は、*Streptococcus pneumoniae* 感染に感受性を示す細胞を候補化合物および *Streptococcus pneumoniae* と接触させる工程、ならびに *Streptococcus pneumoniae* 活性が阻害されたかどうかを決定する工程を含み、ここで、該 *Streptococcus pneumoniae* 活性の阻害が、*Streptococcus pneumoniae* インヒビターを示す、方法。

【請求項 6 4】

前記 *Streptococcus pneumoniae* 活性が、A549 肺上皮細胞への *Streptococcus pneumoniae* の付着である、請求項 5 9 の方法。

【請求項 6 5】

Streptococcus pneumoniae 線毛結合のモジュレーターを同定する方法であって、該方法は、*Streptococcus pneumoniae* 線毛結合に感受性を示す動物細胞を候補化合物および *Streptococcus pneumoniae* 線毛を有する細菌細胞と接触させる工程、ならびに該動物細胞への該細菌細胞の結合が阻害されるかどうかを決定する工程を含み、ここで、結合活性の阻害が、*Streptococcus pneumoniae* 線毛結合のインヒビターを示す、方法。

【請求項 6 6】

前記動物細胞が、単離動物細胞または培養動物細胞である、請求項 6 5 に記載の方法。

【請求項 6 7】

Streptococcus pneumoniae 線毛結合のモジュレーターを同定する方法であって、該方法は、*Streptococcus pneumoniae* 線毛結合に感受性を示す細胞を候補化合物および *Streptococcus pneumoniae* 線毛と接触させる工程、ならびに該細胞への線毛の結合が阻害されるかどうかを決定する工程を含み、ここで、結合活性の阻害が、*Streptococcus pneumoniae* 線毛結合のインヒビターを示す、方法。

【請求項 6 8】

Streptococcus pneumoniae 線毛結合のモジュレーターを同定する方法であって、該方法は、*Streptococcus pneumoniae* 線毛結合に感受性を示す細胞を候補化合物および *Streptococcus pneumoniae* 線毛タンパク質またはその細胞結合フラグメントと接触させる工程、ならびに該細胞への該線毛タンパク質またはそのフラグメントの結合が阻害されるかどうかを決定する工程を含み、ここで、結合活性の阻害が、*Streptococcus pneumoniae* 線毛結合のインヒビターを示す、方法。

【請求項 6 9】

Streptococcus pneumoniae 線毛を単離する方法であって、該方法は、

Streptococcus pneumoniae 線毛を産生する *Streptococcus pneumoniae* 細胞を超音波処理または溶菌酵素での消化に供する工

10

20

30

40

50

程；

非細胞成分を分離する工程；および

Streptococcus pneumoniae 線毛を単離する工程；
を含む、方法。

【請求項 70】

前記溶菌酵素が、ムタノリシンである、請求項 69 に記載の方法。

【請求項 71】

前記非細胞成分が、密度勾配遠心分離を使用して分離される、請求項 69 に記載の方法。

【請求項 72】

前記 *Streptococcus pneumoniae* 線毛を産生する *Streptococcus pneumoniae* 細胞が、*Streptococcus pneumoniae* TIGR 4 細胞である、請求項 69 に記載の方法。

10

【請求項 73】

前記方法が、核酸をヌクレアーゼで分解する工程をさらに含む、請求項 69 に記載の方法。

【請求項 74】

前記方法が、ゲル濾過クロマトグラフィを使用してサイズにより前記 *Streptococcus pneumoniae* 線毛を分離することによって多分散性を減少させる工程をさらに含む、請求項 69 に記載の方法。

【請求項 75】

前記線毛が、3つのプロトフィラメントを含む、請求項 1～請求項 7 のいずれかに記載の線毛。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願への相互参照

この出願は、2006年2月17日に提出された米国仮出願第60/774,450号（この内容は、その全体が参考として本明細書に援用される）の利益を主張する。

【0002】

発明の分野

30

本発明は、グラム陽性細菌（*Streptococcus pneumoniae* が含まれる）から得た線毛、線毛を産生および単離する方法、ならびにグラム陽性細菌に対する免疫応答を誘導するための線毛の使用に関する。本発明はまた、とりわけ、グラム陽性細菌感染を検出する方法、グラム陽性細菌感染を処置する方法、および基質へのグラム陽性細菌の線毛の結合を同定する方法を提供する。線毛に結合する抗体も提供する。

【背景技術】

【0003】

背景

グラム陽性細菌である *Streptococcus pneumoniae*（肺炎球菌としても公知）は、世界規模での罹患率および死亡率の主な原因であり、HIV、マラリア、および結核症と並ぶ四大感染症の1つである（非特許文献1、非特許文献2、非特許文献3、非特許文献4、非特許文献5）。これは、中耳炎、副鼻腔炎、および院外感染性肺炎などの気道感染の主な原因であるが、敗血および髄膜炎などの浸潤性疾患における重要な病原体でもある。肺炎球菌が破壊的病原体であるにもかかわらず、託児所に預けられた健康な児童にも広範に無害に定着する（非特許文献6、非特許文献7）。肺炎球菌疾患の主な病原性因子は多糖莢膜であり、この莢膜によって肺炎球菌は少なくとも90種の異なる血清型に分類される（非特許文献8）。CbpA（コリン結合タンパク質A）およびニューモリシンなどの他の遺伝因子は、病原性に重要であると記載されている（非特許文献9、非特許文献10、非特許文献11）。

40

【0004】

50

肺炎球菌による感染により、最初の上咽頭への定着によって誘発される浸潤性疾患を発症するが、接着機構は十分に理解されていない。莢膜発現が上気道の首尾のよい定着に不可欠であるにもかかわらず、被包肺炎球菌の *in vitro* 接着は、非被包非病原性誘導体よりもはるかに低い（非特許文献4）。これらの所見により、*in vivo* で肺炎球菌は、厚い莢膜を産生するにもかかわらず、接着性を示す（非特許文献5）。

【0005】

ジフテリア菌（非特許文献12、非特許文献13）、放線菌属（非特許文献14）、ならびに最近のA群連鎖球菌（GAS）およびB群連鎖球菌（GBS）（非特許文献15、非特許文献16）などの他のグラム陽性細菌では、電子顕微鏡法によって線毛様表面構造が同定されており、遺伝的および生化学的に特徴づけられている（非特許文献12、非特許文献13、非特許文献15、非特許文献16）。放線菌属では、1型線毛遺伝子は歯および粘膜の表面への接着を媒介する（非特許文献17）。しかし、病原性連鎖球菌属における線毛の感染症における生理学的役割および機能に関する機能的データが必要である。

【0006】

グラム陽性線毛は、特定のソルターゼ（sortase）によってアセンブリされる特定のアミノ酸モチーフを含む共有結合性架橋サブユニットタンパク質を含むトランスペプチダーゼ反応によって形成される伸長されたポリマーである。ソルターゼはまた、ペプチドグリカン細胞壁への線毛の共有結合性付着を担う。

【非特許文献1】Bruyn, G. A. W. および van Furth, R., Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 1991年、第10巻、p. 897 - 910

【非特許文献2】Ryan, M. W. および Antonelli, P. J., Laryngoscope, 2000年、第110巻、p. 961 - 964

【非特許文献3】Cutts, F. T., Zaman, S. M., Enwere, G., Jaffar, S., Levine, O. S., Okoko, C. Oluwalana, A., Vaughan, S., Obaro, A., Leach, A. R., Lancet, 2005年、第365巻、p. 1139 - 1146

【非特許文献4】Swiatlo, E., Champalin, F. R., Holman, S. C., Wilson, W. W. および Watt, J. M., Infect. Immun., 2002年、第70巻、p. 412 - 415

【非特許文献5】Sandgren, A., Albiger, B., Orihuela, C., Tuomanen, E., Normark, S. および Henriques - Normark, B., J. Infect. Dis., 2005年、第192巻、p. 791 - 800

【非特許文献6】Henriques Normark, B., Christensson, B., Sandgren, A., Noreen, B., Sylvan, S., Burman, L. G. および Olsson - Liljequist, B., Microb. Drug Resist., 2003年、第9巻、p. 337 - 344

【非特許文献7】Nunes, S., Sa-Leao, R., Carrico, J., Alves, C. R., Mato, R., Avo, A. B., Saldanha, J., Almeida, J. S., Sanches, I. S. および de Lencastre, H., J. Clin. Microbiol., 2005年、第43巻、p. 1285 - 1293

【非特許文献8】Henrichsen, J., J. Clin. Microbiol., 1995年、第33巻、p. 2759 - 2762

【非特許文献9】Lau, G. W., Haataja, S., Lonetto, M., Kensit, S. E., Marra, A., Bryant, A. P., McDevitt, D., Morrison, D. A. および Holden, D. W., Mol. Microbiol., 2001年、第40巻、p. 555 - 571

【非特許文献10】Rosenow, C., Ryan, P., Weiser, J. N., J

10

20

30

40

50

Johnson, S., Fontan, P., Ortgqvist, A. および Masure, H. R., Mol. Microbiol., 1997年、第25巻、p. 819 - 829

【非特許文献11】Tuomanen, E., Current Opin. Biol., 1999年、第2巻、p. 35 - 39

【非特許文献12】Ton-That, H., Marraffini, L. A. および Schneewind, O., Mol. Microbiol., 2004年、第53巻、p. 251 - 261

【非特許文献13】Ton-That, H. および Schneewind, O., Mol. Microbiol., 2003年、第50巻、p. 1429 - 1438

【非特許文献14】Kelstrup, J., Theilade, J. および Fejerskov, O., Scand. J. Dent. Res., 1979年、第87巻、p. 415 - 423

【非特許文献15】Mora, M., Bensi, G., Capo, S., Falugi, F., Zingaretti, C., Manetti, A. G. O., Maggi, T., Taddei, A. R., Grandi, G. および Telford, J. L., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2005年、第102巻、p. 15641 - 15646

【非特許文献16】Lauer, P., Rinaudo, C. D., Soriani, M., Margarit, L., Mainone, D., Rosini, R., Taddei, A. R., Mora, M., Rappuoli, R., Grandi, G. および Telford, J. L., Science, 2005年、第309巻、p. 105

【非特許文献17】Li, T., Khah, M. K., Slavnic, S., Johansson, I. および Stroemberg, N., Infect Immun., 2001年、第69巻、p. 7224 - 7233

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0007】

発明の概要

本開示は、特に、グラム陽性細菌である *Streptococcus pneumoniae* 由来の線毛の単離および特徴づけを説明する。線毛は、肺炎球菌および他のグラム陽性細菌の病原性で役割を果たし、特に、グラム陽性細菌感染の処置方法およびこれに対する免疫化で有用である。

【0008】

いくつかの態様では、単離グラム陽性細菌線毛（例えば、*Streptococcus pneumoniae* 線毛、A群連鎖球菌（GAS）線毛、またはB群連鎖球菌（GBS）線毛）を開示する。いくつかの実施形態では、線毛は、肺炎球菌 RrgA タンパク質、肺炎球菌 RrgB タンパク質、および肺炎球菌 RrgC タンパク質（例えば、配列番号2、配列番号4、または配列番号6のアミノ酸配列を有するポリペプチドまたはそのプロセシング形態）の少なくとも1つを含む。いくつかの実施形態では、単離された線毛の分子量は $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^7$ Da であるか、いくつかの実施形態では、 $2 \times 10^6 \sim 3 \times 10^6$ Da である。いくつかの実施形態では、単離された線毛のフィラメント長は、約 $0.1 \sim 2 \mu\text{m}$ （例えば、約0.1、0.2、0.5、1、1.5、または $2 \mu\text{m}$ ）である。いくつかの実施形態では、単離された線毛の直径は、約10 nm（例えば、約8、9、10、11、または12 nm）である。いくつかの実施形態では、単離された線毛は、3つのプロトフィラメントを含む。

【0009】

いくつかの実施形態では、線毛は、酵素消化（例えば、ペプチドグリカン加水分解酵素（例えば、ムタノリシン、リソスタフィン、およびリゾチーム）などの1つ以上の溶菌酵素）によって細胞から分離される。いくつかの実施形態では、線毛を、機械的剪断（例え

ば、超音波処理)によって細胞から分離する。いくつかの実施形態では、線毛を、S r t A 活性の減少または阻害によって細胞から分離する。いくつかの実施形態では、線毛を、細胞壁の完全性を妨害する化合物(例えば、抗生物質)での細胞の処理によって細胞から分離する。いくつかの実施形態では、線毛は、細菌細胞を実質的に含まない。いくつかの実施形態では、線毛は、ペプチドグリカンを実質的に含まない。いくつかの実施形態では、グラム陽性細菌線毛(例えば、肺炎球菌線毛)を産生する細菌細胞を酵素消化または機械的剪断に供する工程および細胞から線毛を単離する工程を含む、単離グラム陽性細菌線毛(例えば、肺炎球菌線毛)の産生方法を開示する。

【0010】

いくつかの態様では、1つ以上の単離グラム陽性細菌線毛(例えば、肺炎球菌線毛)を含む免疫原性組成物を開示する。

10

【0011】

いくつかの態様では、グラム陽性細菌線毛を産生する細菌細胞(例えば、グラム陽性細菌細胞またはグラム陽性線毛を産生するように形質転換された細菌細胞)から線毛を分離する工程および細胞から線毛を単離する工程を含む、グラム陽性細菌線毛(例えば、肺炎球菌、G A S、またはG B Sの線毛)を単離する方法を開示する。いくつかの実施形態では、線毛を、酵素消化(例えば、ペプチドグリカン加水分解酵素(例えば、ムタノリシン、リソスタフィン、およびリゾチーム)などの1つ以上の溶菌酵素を使用)によって細胞から分離する。いくつかの実施形態では、線毛を、機械的剪断(例えば、超音波処理)によって細胞から分離する。いくつかの実施形態では、線毛を、S r t A 活性の減少または阻害によって細胞から分離する。いくつかの実施形態では、線毛を、細胞壁の完全性を妨害する化合物(例えば、抗生物質)での細胞の処理によって細胞から分離する。いくつかの実施形態では、単離は、密度勾配遠心分離の使用を含む。いくつかの実施形態では、単離は、単離は、多分散性の減少(例えば、ゲル濾過クロマトグラフィを使用したサイズによる成分の単離など)を含む。いくつかの実施形態では、単離は、1つ以上のクロマトグラフィ工程(例えば、ゲル濾過クロマトグラフィ、イオン交換クロマトグラフィ、逆相クロマトグラフィ、またはアフィニティクロマトグラフィ)を含む。いくつかの実施形態では、本方法は、さらに、1つ以上の濃縮工程を含む。

20

【0012】

いくつかの態様では、単離グラム陽性細菌線毛(例えば、肺炎球菌線毛)に特異的に結合する抗体を開示する。いくつかの実施形態では、抗体は、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、単鎖抗体、またはF a bフラグメントである。いくつかの実施形態では、抗体は、例えば、酵素、放射性同位体、毒素、造影剤(例えば、金粒子)、またはフルオロフォアで標識されている。いくつかの実施形態では、抗体は、線毛を作製する各タンパク質への抗体の結合と比較して、単離細菌線毛またはそのフラグメントに優先的に結合する。いくつかの実施形態では、抗体は、R r g A、R r g B、およびR r g Cからなる群から選択される非複合体化線毛タンパク質への抗体の結合と比較して線毛複合体に優先的に結合する。いくつかの実施形態では、抗体は、非複合体化R r g A、非複合体化R r g B、または非複合体化R r g Cに特異的に結合しない。

30

40

【0013】

いくつかの態様では、有効量のグラム陽性細菌線毛(例えば、肺炎球菌線毛(例えば、単離肺炎球菌線毛))を被験体(例えば、ヒトまたは非ヒト動物)に投与する工程を含む、グラム陽性細菌(例えば、肺炎球菌)に対する免疫応答を誘導する方法を開示する。

【0014】

いくつかの態様では、グラム陽性細菌線毛(例えば、肺炎球菌線毛)の存在を証明するために被験体由来のサンプル(例えば、血清または唾液)をアッセイする工程を含む、被験体(例えば、ヒト)におけるグラム陽性細菌感染(例えば、肺炎球菌感染)を検出する方法を開示する。いくつかの実施形態では、グラム陽性細菌線毛(例えば、肺炎球菌線毛)の存在は、グラム陽性細菌線毛(例えば、肺炎球菌線毛)に対する抗体の存在によって

50

証明される。いくつかの実施形態では、抗体は、非複合体化線毛タンパク質（例えば、R r g A、R r g B、およびR r g C）への抗体の結合と比較して、線毛複合体に優先的に結合する。いくつかの実施形態では、抗体は、非複合体化線毛タンパク質（例えば、R r g A、R r g B、またはR r g C）に特異的に結合しない。

【0015】

いくつかの態様では、サンプルをグラム陽性細菌線毛（例えば、肺炎球菌線毛）に特異的に結合する薬剤（例えば、抗体）と接触させる工程およびサンプル成分への薬剤の結合を検出する工程を含む、被験体におけるグラム陽性細菌感染（例えば、肺炎球菌感染）を検出する方法を開示する。いくつかの実施形態では、抗体は、非複合体化線毛タンパク質（例えば、R r g A、R r g B、およびR r g C）への抗体の結合と比較して、線毛複合体に優先的に結合する。いくつかの実施形態では、抗体は、非複合体化線毛タンパク質（例えば、R r g A、R r g B、またはR r g C）に特異的に結合しない。

10

【0016】

いくつかの態様では、有効量のグラム陽性線毛に特異的に結合する薬剤を被験体に投与する工程を含む、グラム陽性細菌（例えば、肺炎球菌）感染を有するか有すると疑われる被験体（例えば、ヒト被験体）を処置する方法を開示する。いくつかの実施形態では、薬剤は、抗体（例えば、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、単鎖抗体、またはF a bフラグメント）である。いくつかの実施形態では、薬剤（例えば、抗体）は、宿主細胞などの細胞へのグラム陽性細菌の付着または結合を遮断する。細胞は、上皮細胞（例えば、肺上皮細胞または鼻咽頭上皮細胞）であり得る。いくつかの実施形態では、抗体は、線毛を作製する各タンパク質への抗体の結合と比較して、単離細菌線毛またはそのフラグメントに優先的に結合する。いくつかの実施形態では、薬剤（例えば、抗体）は、1つ以上の肺炎球菌線毛タンパク質（例えば、R r g A、R r g B、またはR r g C（例えば、配列番号2、4、または6のアミノ酸配列を有する1つ以上のポリペプチドまたはその任意のプロセシング形態））に特異的に結合する。いくつかの実施形態では、薬剤（例えば、抗体）は、配列番号4のアミノ酸残基316～419を有するポリペプチドに特異的に結合する。いくつかの実施形態では、薬剤（例えば、抗体）は、付着アッセイで測定したところ、コントロールと比較して、A549肺上皮細胞への肺炎球菌の付着を少なくとも50%遮断する。

20

【0017】

いくつかの態様では、被験体由来のサンプルをグラム陽性線毛への抗体の存在についてアッセイする工程および抗体の有無に基づいて処置過程を選択する工程を含む、グラム陽性細菌（例えば、肺炎球菌）感染を有するか有すると疑われる被験体（例えば、ヒト被験体）の処置過程を決定する方法を開示する。本方法は、抗体の存在が検出されない場合に抗生物質製剤を被験体に投与する工程をさらに含む。本方法は、抗体の存在が検出された場合に抗炎症薬で被験体を処置する工程も含むことができる。

30

【0018】

50個まで（例えば、40、30、20、10、または5まで）のアミノ酸の置換、挿入、または欠失を有するグラム陽性（例えば、肺炎球菌）線毛タンパク質のアミノ酸配列を含むポリペプチドを含む単離グラム陽性線毛も開示する。いくつかの実施形態では、アミノ酸置換は、保存的アミノ酸置換である。いくつかの実施形態では、グラム陽性線毛タンパク質は、R r g A（例えば、配列番号2）、R r g B（例えば、配列番号4）、またはR r g C（例えば、配列番号6）である。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、2つまたはそれを超える配列番号2、4、または6のアミノ酸配列またはその任意の免疫原性フラグメントを含む。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号2、4、および6のアミノ酸配列またはその全ての免疫原性フラグメントを含む。単離グラム陽性線毛の免疫原性フラグメント（例えば、R r g A、R r g B、およびR r g Cなどの肺炎球菌線毛タンパク質を含む免疫原性フラグメント）（例えば、配列番号2、4、および6の免疫原性フラグメント）も開示する。有効量の単離グラム陽性線毛を被験体（例えば、ヒト被験体）に投与する工程を含む、グラム陽性細菌（例えば、肺炎球菌）に対する免疫

40

50

応答を誘導する方法も開示する。宿主細胞を1つ以上の線毛産生に十分な核酸で形質転換して線毛を産生し、宿主細胞から線毛を単離することによる単離グラム陽性線毛を産生する方法も開示する。

【0019】

いくつかの態様では、細胞中で抗グラム陽性線毛をコードする核酸を発現する工程を含む、細胞中で抗グラム陽性（例えば、肺炎球菌）線毛抗体を発現する方法を開示する。

【0020】

いくつかの態様では、固体支持体に結合したグラム陽性線毛に特異的に結合する抗体を含むアフィニティマトリックスを提供する工程、サンプルをアフィニティマトリックスと接触させてアフィニティマトリックス/グラム陽性細菌複合体を形成する工程、サンプルの残りにアフィニティマトリックス/グラム陽性細菌複合体を分離する工程、およびアフィニティマトリックスからグラム陽性細菌を放出させる工程を含む、グラム陽性細菌を含むサンプルからグラム陽性（例えば、肺炎球菌）細菌を精製する方法を開示する。

10

【0021】

いくつかの態様では、グラム陽性（例えば、肺炎球菌）線毛に特異的に結合する抗体またはそのフラグメントに結合体化した細胞毒性薬または診断薬を準備する工程、および抗体-薬剤結合体またはフラグメント-薬剤結合体に細菌を曝露する工程を含む、グラム陽性細菌（例えば、肺炎球菌）に細胞毒性薬または診断薬を送達する方法を開示する。

【0022】

いくつかの態様では、肺炎球菌感染に感受性を示す細胞（例えば、HEP2細胞、CHO細胞、HeLa細胞、またはA549肺上皮細胞）を候補化合物および肺炎球菌と接触させる工程ならびに肺炎球菌活性（例えば、細胞（例えば、A549肺上皮細胞）への付着）が阻害されるかどうかを決定する工程を含み、ここで、肺炎球菌活性の阻害が肺炎球菌インヒビターを示す、肺炎球菌のモジュレーターを同定する方法を開示する。

20

【0023】

いくつかの態様では、グラム陽性線毛結合に感受性を示す動物細胞を候補化合物およびグラム陽性線毛を有する細菌細胞と接触させる工程ならびに動物細胞への細菌細胞の結合が阻害されるかどうかを決定する工程を含み、ここで、結合活性の阻害がグラム陽性線毛結合のインヒビターを示す、グラム陽性（例えば、肺炎球菌）線毛結合のモジュレーターを同定する方法を開示する。

30

【0024】

いくつかの態様では、グラム陽性線毛結合に感受性を示す細胞を候補化合物およびグラム陽性線毛と接触させる工程ならびに細胞への線毛の結合が阻害されるかどうかを決定する工程を含み、ここで、結合活性の阻害がグラム陽性線毛結合のインヒビターを示す、グラム陽性（例えば、肺炎球菌）線毛結合のモジュレーターを同定する方法を開示する。

【0025】

いくつかの態様では、グラム陽性線毛結合に感受性を示す細胞を候補化合物およびグラム陽性線毛タンパク質またはその細胞結合フラグメントと接触させる工程ならびに細胞への線毛タンパク質またはそのフラグメントの結合が阻害されるかどうかを決定する工程を含み、ここで、結合活性の阻害がグラム陽性線毛結合のインヒビターを示す、グラム陽性（例えば、肺炎球菌）線毛結合のモジュレーターを同定する方法を開示する。

40

【0026】

いくつかの態様では、グラム陽性線毛結合に感受性を示すタンパク質（例えば、細胞外基質タンパク質またはそのグラム陽性線毛結合フラグメント）を候補化合物およびグラム陽性線毛、グラム陽性線毛タンパク質、またはそのフラグメントと接触させる工程ならびに2つのタンパク質またはそのフラグメントの間の結合が阻害されるかどうかを決定する工程を含み、ここで、結合活性の阻害がグラム陽性線毛結合のインヒビターを示す、グラム陽性（例えば、肺炎球菌）線毛結合のモジュレーターを同定する方法を開示する。

【0027】

単離グラム陽性細菌線毛（例えば、肺炎球菌線毛）を含む薬学的組成物、免疫原性組成

50

物、およびワクチン組成物も開示する。グラム陽性細菌感染の治療または予防のための免疫原性組成物またはワクチン組成物の調製のためのグラム陽性（例えば、肺炎球菌）線毛（または上記の任意のポリペプチドまたは核酸）の使用も開示する。薬物で使用するためのグラム陽性（例えば、肺炎球菌）線毛（または上記の任意のポリペプチドまたは核酸）も開示する。グラム陽性細菌感染の治療または防止で使用するためのグラム陽性（例えば、肺炎球菌）線毛（または上記の任意のポリペプチドまたは核酸）も開示する。

【0028】

肺炎球菌線毛に特異的に結合する薬剤（例えば、抗体）を含む薬学的組成物も開示する。肺炎球菌感染の治療薬または予防薬の調製のための肺炎球菌線毛に特異的に結合する薬剤（例えば、抗体）の使用も開示する。薬物で使用するものかかかる薬物も開示する。グラム陽性細菌感染の治療または防止で使用するものかかかる薬物も開示する。

10

【0029】

肺炎球菌線毛を産生する肺炎球菌（例えば、肺炎球菌 T I G R 4）から線毛を分離する工程および肺炎球菌線毛を単離する方法を含む、*Streptococcus pneumoniae* 線毛を単離する方法も開示する。いくつかの実施形態では、線毛を、酵素消化（例えば、ペプチドグリカン加水分解酵素（例えば、ムタノリシン、リソスタフィン、およびリゾチーム）などの1つ以上の溶菌酵素）によって肺炎球菌細胞から分離する。いくつかの実施形態では、線毛を、機械的剪断（例えば、超音波処理）によって肺炎球菌細胞から分離する。いくつかの実施形態では、線毛を、*SrtA* 活性の減少または阻害によって肺炎球菌細胞から分離する。いくつかの実施形態では、線毛を、細胞壁の完全性を妨害する化合物（例えば、抗生物質）での細胞の処理によって肺炎球菌細胞から分離する。いくつかの実施形態では、本方法は、ヌクレアーゼで核酸を分解する工程を含む。いくつかの実施形態では、本方法は、ゲル濾過クロマトグラフィーを使用してサイズにより肺炎球菌線毛を分離することによって多分散性を減少させる工程を含む。いくつかの実施形態では、本方法は、1つ以上のクロマトグラフィー工程（例えば、ゲル濾過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、またはアフィニティクロマトグラフィー）を含む。いくつかの実施形態では、肺炎球菌線毛を産生する肺炎球菌細胞は、肺炎球菌 T I G R 4 よりも多くの線毛を発現する。

20

【0030】

他で定義しない限り、本明細書中で使用される全ての技術用語および科学用語は、本発明に属する当業者によって一般的に理解される意味を有する。本明細書中に記載の方法および材料と類似するか等価な方法および材料を、本発明の実施または試験で使用することができるにもかかわらず、適切な方法および材料を以下に記載する。本明細書中で言及した全ての刊行物、特許出願、特許、および他の引例は、その全体が参考として援用される。矛盾する場合、本明細書（定義が含まれる）に従う。さらに、材料、方法、および実施例は、例示のみを目的とし、本発明を制限することを意図しない。

30

【0031】

本発明の1つ以上の実施形態の詳細を、添付の図面および以下の説明に記載する。本発明の他の特徴、目的、および利点は、説明および図面ならびに以下のさらなる実施形態から明らかであろう。

40

【発明を実施するための最良の形態】

【0032】

詳細な説明

出願人は、グラム陽性細菌である *Streptococcus pneumoniae*（肺炎球菌としても公知）由来の線毛を単離し、特徴づけた。これらの線毛は肺炎球菌 T I G R 4（臨床株、荚膜血清型 4 単離物）によって発現されると同定し、そのゲノムを、The Institute for Genomic Research（ワールドワイドウェブサイト tigr.org を参照のこと）によって配列決定した。これらの線毛は、病原性アイランドの *rlrA* アイレットによってコードされ、*rlrA* アイレットは、全てではないがいくつかの肺炎球菌単離物中に存在する。線毛は、肺上皮細胞への肺炎球

50

菌接着およびマウス感染モデルにおける定着に重要であることが示されている。同様に、線毛はまた、マウスにおける肺炎および菌血症の発症に影響を及ぼすことも示されている。さらに、線毛発現肺炎球菌は、非線毛化同質遺伝子変異体よりも全身感染中により高い腫瘍壊死因子 (TNF) 応答を誘発し、線毛が宿主炎症反応で役割を果たすことを示す。したがって、この開示は、とりわけ、グラム陽性細菌 (例えば、肺炎球菌) の線毛および線毛タンパク質組成物ならびにグラム陽性細菌 (例えば、肺炎球菌) 感染に対する処置方法および免疫化方法におけるその使用を特徴とする。

【0033】

Streptococcus pneumoniae 線毛

肺炎球菌線毛は、肺炎球菌 TIGR 4 中に存在する *rlrA* アイレットによってコードされ、このアイレットは3つのソルターゼおよび LPXTG モチーフを含むタンパク質をコードする3つの I 遺伝子 (*rrgA*、*rrgB*、および *rrgC*) を含む。*RrgA*、*RrgB*、および *RrgC* タンパク質に対する抗体で標識した免疫金は、肺炎球菌表面上の伸長したフィラメント構造を検出した。抗 *RrgA* は、細菌細胞表面を標識することが示され、*RrgA* が線毛構造を細胞壁に繫留することが示唆された。抗 *RrgB* は、全線毛に遍在することが示されたのに対して、抗 *RrgC* は線毛の先端に集中していた。線毛遺伝子の欠失によって線毛染色が排除されたのに対して、線毛オペロンの負の制御因子 (*mgrA*) の欠失により、細胞表面上の線毛量が増加した。肺炎球菌線毛の細胞表面上の配置により、抗原として魅力的になる。

【0034】

肺炎球菌 TIGR 4 から線毛を均一またはほぼ均一に単離し、その分子量範囲は $2 \times 10^6 \sim 3 \times 10^6$ Da であった。精製線毛は、約 $1 \mu\text{m}$ 超および直径 10 nm までの伸長フィラメントとして存在した。免疫金標識により、単離された線毛中の *RrgB* および *RrgC* タンパク質の両方が検出された。

【0035】

rrgA 核酸配列の例 (TIGR 注釈番号 *sp0462*) をここに提供する：

【0036】

10

20

【化 1】

ATGCTTAACAGGGAGACACACATGAAAAAGTAAGAAAGATATTTTCAGAAAGGCAGTT
 GCAGGACTGTGCTGTATATCTCAGTTGACAGCTTTTTCTTCGATAGTTGCTTTAGCA
 GAAACGCCCTGAAACCAAGTCCAGCGATAGGAAAAGTAGTGATTAAGGAGACAGGCGAA
 GGAGGAGCGCTTCTAGGAGATGCCGCTTTTGAGTTGAAAAACAATACGGATGGCACA
 ACTGTTTCGCAAAGGACAGAGGCGCAAACAGGAGAAGCGATATTTTCAAACATAAAA
 CCTGGGACATACACCTTGACAGAAGCCCAACCTCCAGTTGGTTATAAACCTCTACT
 AAACAATGGACTGTTGAAGTTGAGAAGAATGGTCGGACGACTGTCCAAGGTGAACAG
 GTAGAAAATCGAGAAGAGGCTCTATCTGACCAGTATCCACAAACAGGGACTTATCCA
 GATGTTCAAACACCTTATCAGATTATTAAGGTAGATGGTTCCGAAAAAACGGACAG
 CACAAGGCGTTGAATCCGAATCCATATGAACGTGTGATTCCAGAAGGTACACTTTCA
 AAGAGAATTTATCAAGTGAATAATTTGGATGATAACCAATATGGAATCGAATTGACG
 GTTAGTGGGAAAACAGTGTATGAACAAAAAGATAAGTCTGTGCGCGTGGATGTGCTT
 ATCTTGCTCGATAACTCAAATAGTATGAGTAACATTTCGAAACAAGAATGCTCGACGT
 GCGGAAAGAGCTGGTGAGGCGACACGTTCTCTTATTGATAAAATTACATCTGATTCA
 GAAAATAGGGTAGCGCTTGTGACTTATGCTTCCACTATCTTTGATGGGACCGAGTTT
 ACAGTAGAAAAAGGGTAGCAGATAAAAAACGGAAGCGATTGAATGATTCTCTTTTT
 TGGAATTATGATCAGACGAGTTTACAACCAATACCAAAGATTATAGTTATTTAAAG
 CTGACTAATGATAAGAAATGACATTGTAGAATTAAAAAATAAGGTACCTACCGAGGCA
 GAAGACCATGATGGAATAGATTGATGTACCAATTCCGGTGCCACTTTTACTCAGAAA
 GCTTTGATGAAGGCAGATGAGATTTTGACACAACAAGCGAGACAAAATAGTCAAAAA
 GTCATTTTCCATATTACGGATGGTGTCCCAACTATGTGCTATCCGATTAAATTTTAAT
 CATGCTACGTTTGCTCCATCATATCAAAATCAACTAAATGCATTTTTTAGTAAATCT
 CCTAATAAAGATGGAATACTATTAAGTGATTTTATTACGCAAGCAACTAGTGGAGAA
 CATACAATTGATACGCGAGATGGGCAAAGTTACCAGATGTTTACAGATAAGACAGTT
 TATGAAAAAGGTGCTCCTGCAGCTTCCCAAGTTAAACCTGAAAAATATTCTGAAATG
 AAGGCGGCTGGTTATGCAGTTATAGGCGATCCCAATTAATGGTGGATATATTGGCTT
 AATTGGAGAGAGAGTATTCTGGCTTATCCGTTTAATTCTAATACTGCTAAAATTACC
 AATCATGGTGACCTACAAGATGGTACTATAACGGGAATATTGCTCCTGATGGGTAT
 GATGCTTTTACGGTAGGTATTGGTATTAAACGGAGATCCTGGTACGGATGAAGCAACG
 GCTACTAGTTTTATGCAAAGTATTTCTAGTAAACCTGAAAACTATACCAATGTTACT
 GACACGACAAAAATATTGGAACAGTTGAATCGTTATTTCCACACCATCGTAAC TGAA
 AAGAAATCAATTGAGAATGGTACGATTACAGATCCGATGGGTGAGTTAATTGATTG
 CAATTGGGCACAGATGGAAGATTTGATCCAGCAGATTACACTTTAACTGCAAACGAT
 GGTAGTGCCTTGGAGAATGGACAAGCTGTAGGTGGTCCACAAAATGATGGTGGTTG
 TTAATAAATGCAAAGTGCTCTATGATACGACTGAGAAAAGGATTCTGTGTAACAGGT
 CTGTACCTTGGAACGGATGAAAAAGTTACGTTGACCTACAAATGTTGTTTGAATGAT
 GAGTTTGTAAGCAATAAATTTTATGATACCAATGGTCCGAACAACTTACATCCTAAG
 GAAGTAGAACAGAACACAGTGCAGGCTTCCCGATTCTTAAGATTCTGTGATGTGCGG
 AAGTATCCAGAAATCACAATTTCAAAGAGAGAAAAAATTTGGTGACATTGAGTTTATT
 AAGGTCAATAAAAAATGATAAAAAACCACTGAGAGGTGCGGTCTTTAGTCTTCAAAAA
 CAACATCCGGATTATCCAGATATTTATGGAGCTATTGATCAAAATGGCACTTATCAA
 AATGTGAGAACAGGTGAAGATGGTAAGTTGACCTTTAAAAATCTGTGATGAGGAAA
 TATCGATTATTTGAAAATTTCTGAACCAGCTGGTTATAAACCCGTTCAAAATAAGCCT
 ATCGTTGCCTTCCAAATAGTAAATGGAGAAGTCAGAGATGTGACTTCAATCGTTCCA
 CAAGATATACAGCGGGTTACGAGTTTACGAATGATAAGCACTATATTACCAATGAA
 CCTATTCTTCCAAAGAGAGAATATCCTCGAAGTGGTGGTATCGGAATGTTGCCATTCT
 TATCTGATAGGTTGCATGATGATGGGAGGAGTTCTATTATACACACGGAACATCCG
 TAA (配列番号:1)

10

20

30

R r g A アミノ酸配列の例 (T I G R 注釈番号 S P 0 4 6 2) をここに提供する :
 【 0 0 3 7 】

【化 2】

MLNRETHMKKVRKIFQKAVAGLCCISQLTAFSSIVALAETPETSPAIGKVVIKETGE
 GGALLGDAVFELKNNTDGTTVSQRTAEQTGEAIFSNIKPGTYTLTEAQPPVGYKPS
 KQWTVVEVEKNGRTTVQGEQVENREALSQYPTGTYPDVQTPYQIIKVDGSEKNGQ
 HKALNPNPYERVIEGTLISKRIYQVNNLDDNQVGIELTVSGKTVYEQDKSVPLDVV
 ILLDNSNSMSNIRNKNARRAERAGEATRSIDKITSDSENVALVTYASTIFDGTEF
 TVEKGVADKNGKRLNDSLFWNVDQTSFTTNTKDYSYLKLTNDKNDIVELKNKVPTEA
 EDHDCNRLMYQFGATFTQKALMKADEILTQARQNSQKVI FHTDGVPTMSYPINFN
 HATFAPSYQNQLNAFFSKSPNKDGILLSDFITQATSGEHTIVRGDQSYQMFTDKTV
 YEKGAPAAFPVKPEKYSEMKAAGYAVIGDPINGGYIWLNWRESILAYPFNSNTAKIT
 NHGDPTRWYYNGNIAPDGYDVFTVGIGINGDPGTDEATATSEFMQSISSEKPNYTNVT
 DTTKILEQLNRYFHTIVTEKKSIENGITIDPMGELIDLQLGTDGRFPADYTLTAND
 GSRLENGQAVGGPQNDGGLLKNKAVLYDTTEKRIRVTGLYLGTDEKVTLTYNVRLND
 EFVSNKFYDTNGRTTLHPKEVEQNTVRDFPIPKIRDVRKYPEITISKEKKLGDIETI
 KVNKNDKKPLRGAVFSLQKQHPDYPDIYGALDQNGTYQNVRTGEDGKLTFFKNLSGK
 YRLFENSEPAGYKPVQNKPIVAFQIVNGEVRDVTISIVPQDIPAGYEFTNDKHYITNE
 PIPPKREYFRTGGIGMLPFYLIGMMMGGVLLYTRKHP (配列番号:2)

10

R r g A は、上記の配列番号 2 中の下線に示すソルターゼ基質モチーフ Y P X T G (配列番号 8) を含む。2 つの推定 C n a タンパク質 B 型ドメイン (D e i v a n a y a g a m ら, 2000, Structure, 8:67-78) を、配列番号 2 のアミノ酸残基 62~132 および 751~824 で同定した。推定フォンウィルブランド因子 A 型ドメインを同定した (Sadler, 1998, Annu. Rev. Biochem., 67:395-424; Ponting ら, 1999, J. Mol. Biol., 289:729-4226-579)。このフォンウィルブランド因子 A 型ドメインは、肺炎球菌線毛の細胞接着または細胞シグナル伝達特性の媒介に関与し得る。

20

【0038】

r r g B 核酸配列の例 (T I G R 注釈番号 s p 0 4 6 3) を、ここに提供する:

【0039】

【化 3 - 1】

ATGAAATCAATCAACAAATTTTAAACAATGCTTGCTGCCTTATTACTGACAGCGAGT
 AGCCTGTTTTTCAGCTGCAACAGTTTTCGCGCTGGGACGACAACAACATCTGTTACC
 GTTCATAAACTATTTGGCAACAGATGGGGATATGGATAAAATTGCAAATGAGTTAGAA
 ACAGGTAACATATGCTGGTAATAAAAGTGGGTGTTCTACCTGCAAATGCAAAAGAAATT
 GCCGGTGTATGTTTCGTTTGGACAAATACTAATAATGAAATTATTGATGAAAAATGGC
 CAAACTCTAGGAGTGAATATTGATCCACAAACATTTAAACTCTCAGGGGCAATGCCG
 GCAACTGCAATGAAAAAATTAACAGAAGCTGAAGGAGCTAAATTTAACACGGCAAAT
 TTACCAGCTGCTAAGTATAAAATTTATGAAATTCACAGTTTATCAACTTATGTCGGT
 GAAGATGGAGCAACCTTAACAGGTTCTAAAGCAGTTCCAATTGAAATTGAATTACCA
 TTGAACGATGTTGTGGATGCGCATGTGTATCCAAAAATACAGAAGCAAAGCCAAAA
 ATTGATAAAGATTTCAAAGGTAAAGCAAATCCAGATACACCACGTGTAGATAAAGAT
 ACACCTGTGAACCAAGTTGGAGATGTTGTAGAGTACGAAATGTTACAAAAATT
 CCAGCACTTGCTAATTATGCAACAGCAAACCTGGAGCGATAGAATGACTGAAGGTTTG
 GCATTCAACAAAGGTACAGTGAAAGTAACTGTTGATGATGTTGCACTTGAAGCAGGT
 GATTATGCTCTAACAGAAGTAGCAACTGGTTTGGATTTGAAATTAACAGATGCTGGT
 TTAGCTAAAGTGAATGACCAAAACGCTGAAAAAATGTGAAATCACTTATTCGGCA
 ACATTGAATGACAAAGCAATTGTAGAAGTACCAGAATCTAATGATGTAACATTTAAC

30

【0040】

40

【化 3 - 2】

TATGGTAATAATCCAGATCACGGGAATACTCCAAAGCCGAATAAGCCAAATGAAAAC
 GGCGATTTGACATTGACCAAGACATGGGTTGATGCTACAGGTGCACCAATTCGGGCT
 GGAGCTGAAGCAACGTTTCGATTTGGTTAATGCTCAGACTGGTAAAGTTGTACAAACT
 GTAACTTTGACAACAGACAAAAATACAGTTACTGTTAACGGATTGGATAAAAAATACA
 GAATATAAATTCGTTGAACGTAGTATAAAAAGGGTATTTCAGCAGATTATCAAGAAATC
 ACTACAGCTGGAGAAATTCGTGTCAAGAACTGGAAAGACGAAAATCCAAAACCACTT
 GATCCAACAGAGCCAAAAGTTGTTACATATGGTAAAAAGTTTGTCAAAGTTAATGAT
 AAAGATAATCGTTTAGCTGGGGCAGAAATTTGTAATTGCAAATGCTGATAATGCTGGT
 CAATATTTAGCACGTAAAGCAGATAAAGTGAGTCAAGAAGAGAAGCAGTTGGTTGTT
 ACAACAAAGGATGCTTTAGATAGAGCAGTTGCTGCTTATAACGCTCTTACTGCACAA
 CAACAAACTCAGCAAGAAAAAGAGAAAGTTGACAAAGCTCAAGCTGCTTATAATGCT
 GCTGTGATTGCTGCCAACAATGCATTTGAATGGGTGGCAGATAAGGACAATGAAAAT
 GTTGTGAAATTAGTTTCTGATGCACAAGGTCGCTTTGAAATTACAGGCCTTCTTGCA
 GGTACATATTACTTAGAAGAAACAAAACAGCCTGCTGGTTATGCATTACTAAGTAGC
 CGTCAGAAATTTGAAGTCACTGCAACTTCTTATTCAGCGACTGGACAAGGCATTGAG
 TATACTGCTGGTTTCAAGGTAAAGATGACGCTACAAAAGTAGTCAACAAAAAATCACT
 ATCCCACAAACGGGTGGTATTGGTACAATTATCTTTGCTGTAGCGGGGGCTGCGATT
 ATGGGTATTGTCAGTGTACGCATATGTTAAAAACAACAAAGATGAGGATCAACTTGCT
 TAA (配列番号:3)

10

R r g B アミノ酸配列の例 (T I G R 注釈番号 S P 0 4 6 3) を、ここに提供する :

【 0 0 4 1】

【化 4】

MKSINKFLTMLAALLLTASSLFSAATVFAAGTTTTSVTVHKLATDGDMDKIANELE
 TGNYAGNKVGVLPANAKEIAGVMFVWNTNNEIIDENGQTLGVNIDPQTFKLSGAMP
 ATAMKKLLEAEGAKFNTANLPAAKYKIYEIHSLSYVGEDGATLTGSKAVPIEIELP
 LNDVVDHAVYPKNTEAKPKIDKDFKGGKANPDTPRVDKDTFVNHQVGDVVEYEIVTKI
 PALANYATANWSDRMTEGLAFNKGTVKVTVDVALEAGDYALTEVATGFDLKLTDAG
 LAKVNDQNAEKTIVKITYSATLNDKAIVEVPESENDVTFNYGNPDHGNTPKPNKPEN
 GDLTLTKTWVDATGAPIPAGAEATFDLVNAQTGKVVQTVTLTDDKNTVTVNGLDKNT
 EYKFVERSIKGYSAQYQEIITTAGETIAVKNWKNENPKPLDPTPEKVVYTGKFKVKNVND
 KDNRLAGAEFVIANADNAGQYLARKADKVSQEEKQLVVTTKDALDRAVAAYNALTAQ
 QQTQKEKEKVDKAQAAVNAVIAANNAFEWVADKDNENVVKLVSDAQGRFEITGLLA
 CTYYLEETKQAPAGYALLTSRQKFVTTATSYSATGQIEYTAGSGKDDATKVVNKKIT
 IPQTGGIGITIIFAVAGAAIMGLIAYVYVKNKDEQDLA (配列番号:4)

20

R r g B は、上記の配列番号 4 中の下線に示すソルターゼ基質モチーフ I P X T G (配
 列番号 9) を含む。推定 C a n タンパク質 B 型ドメイン (D e i v a n a y a g a m 5 ,
 2 0 0 0 , S t r u c t u r e , 8 : 6 7 - 7 8) を、配列番号 4 のアミノ酸残基 4 6 1
 ~ 6 0 5 で同定した。

30

【 0 0 4 2】

r r g C 核酸配列の例 (T I G R 注釈番号 s p 0 4 6 4) を、ここに提供する :

【 0 0 4 3】

【化 5 - 1】

ATGATTAGTCGTATCTTCTTTGTTATGGCTCTGTGTTTTTCTCTTGTATGGGGTGCA
 CATGCAGTCCAAGCGCAAGAAGATCACACGTTGGTCTTGCAATTGGAGAACTATCAG
 GAGGTGGTTAGTCAATTGCCATCTCGTGATGGTCATCGGTTGCAAGTATGGAAGTTG
 GATGATTTCGTATTCCTATGATGATCGGGTGCAAAATGTAAGAGACTTGCAATTCGTGG
 GATGAGAATAAACTTTCTTCTTCAAAAAGACTTCGTTTGAGATGACCTTCCTTGAG
 AATCAGATTGAAGTATCTCATATTCCAAATGGTCTTTACTATGTTTCGCTCTATTATC

40

【 0 0 4 4】

【化 5 - 2】

CAGACGGATGCGGTTTCTTATCCAGCTGAATTTCTTTTTGAAATGACAGATCAAACG
 GTAGAGCCTTTGGTCATTGTAGCGAAAAAACAGATACAATGACAACAAAGGTGAAG
 CTGATAAAGGTGGATCAAGACCACAATCGCTTGGAGGGTGTGGGCTTTAAATTGGTA
 TCAGTAGCAAGAGATGTTTCTGAAAAAGAGGTTCCCTTGATTGGAGAATACCGTTAC
 AGTTCTTCTGGTCAAGTAGGGGAGAACTCTCTATACTGATAAAAAATGGAGAGATTTTT
 GTGACAAATCTTCTCTTGGGAACTATCGTTTTCAAGGAGGTGGAGCCACTGGCAGGC
 TATGCTGTACGACGCTGGATACGGATGTCCAGCTGGTAGATCATCAGCTGGTGACG
 ATTACGGTTGTCAATCAGAAATTACCACGTGGCAATGTTGACTTTATGAAGGTGGAT
 GGTCCGACCAATACCTCTCTTCAAGGGGCAATGTTCAAAGTCATGAAAGAAGAAAGC
 GGACACTATACTCCTGTTCTTCAAAATGGTAAGGAAGTAGTTGTAACATCAGGGAAA
 GATGGTGGTTTCCGAGTGGAAGGTCTAGAGTATGGGACATACTATTTATGGGAGCTC
 CAAGCTCCAACCTGGTTATGTTCAATTAACATCGCTGTTTCTTTACAATCGGGAAA
 GATACTCGTAAGGAACCTGGTAACAGTGGTTAAAAATAACAAGCGACCACGGATTGAT
 GTGCCAGATACAGGGGAAGAAACCTTGTATATCTTGATGCTTGTGCCATTTTGTGTTG
 TTTGGTAGTGGTTATTATCTTACGAAAAAACCAATAACTGA (配列番号:5)

10

R r g C アミノ酸配列の例 (T I G R 注釈番号 S P 0 4 6 4) を、ここに提供する：
 【 0 0 4 5 】

【化 6】

MISRIFFVMALCFSLVWGAHAVQAQEDHTLVQLQENYQEVVSQLP SRDGHRLQVWKL
 DDSYSYDDRQIVRDLHSDENKLSSFKTSFEMTFLENQIEVSHIPNGLYYVRSII
 QTDVSYPAEFLFEMTDQTVPLVIVAKKTDMTTKVKLIKVDQDHRNLEGVGFKL
 SVARDVSEKEVPLIGEYRYSSTGQVGRITLYTDKNGEIFVTNLPLGNRYRFEVEPLAG
 YAVTTLDTDVQLVDHQLVTITVVNQKLPRGNVDFMKVDGRNTSLQGAMFKVMKEES
 GHYTPVLQNGKEVVVTSKGDRFRVEGLEYGTYLWELQAPTGYVQLTSPVSTIGK
 DTRKELVTVVKNKRPRIDVDPDTGEETLYILMLVAILLFGSGYYLTKKPNN
 (配列番号:6)

20

2つの推定 C a n タンパク質 B 型ドメイン (D e i v a n a y a g a m ら , 2 0 0 0 ,
 S t r u c t u r e , 8 : 6 7 - 7 8) を、配列番号 6 のアミノ酸残基 1 6 3 ~ 2 5 1 お
 よび 2 7 3 ~ 3 5 2 で同定した。R r g C は、上記配列番号 6 中の下線に示すソルターゼ
 基質モチーフ V P X T G (配列番号 1 0) を含む。

【 0 0 4 6 】

他のグラム陽性細菌線毛

本明細書中に記載の方法および組成物を、任意のグラム陽性細菌由来の線毛と共に使用
 することができる。公知および推定される線毛タンパク質は、G A S (例えば、連鎖球菌
 化膿性連鎖球菌) (M o r a ら , 2 0 0 5 , P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U
 S A , 1 0 2 : 1 5 6 4 1 - 6) 、 G B S (例えば、ストレプトコッカス・アガラクチア
) (L a u e r ら , 2 0 0 5 , S c i e n c e , 3 0 9 : 1 0 5 ; W O 2 0 0 6 / 0 7
 8 3 1 8) 、 ア ク チ ノ ミ セ ス ・ ネ ス ル ン デ ィ (A c t i n o m y c e t e s n a e s l
 u n d i i) (Y e u n g ら , 1 9 9 8 , I n f e c t . I m m u n . , 6 6 : 1 4 8 2
 - 9 1) , ジ フ テ リ ア 菌 (T o n - T h a t ら , 2 0 0 3 , M o l . M i c r o b i o l
 . , 5 0 : 1 4 2 9 - 3 8 ; T o n - T h a t a n d S c h n e e w i n d , 2 0 0
 4 , T r e n d s . M i c r o b i o l . , 1 2 : 2 2 8 - 3 4) 、 ウ エ ル シ ュ 菌 、 お よ
 び フェカリス菌で同定されている。

30

40

【 0 0 4 7 】

他のグラム陽性細菌の線毛を、本明細書中に記載の方法および組成物で使用するこ
 ができる。かかるグラム陽性細菌には、連鎖球菌属 (例えば、肺炎球菌、S . アガラクチア
 、化膿性連鎖球菌、ブタ連鎖球菌、S . ブーエピデミカス、緑色連鎖球菌、ミュータンス
 菌、S . ゴルドニ、腺疫菌) 、バチルス属 (例えば、炭疽菌、セレウス菌、枯草菌) 、リ
 ステリア属 (例えば、L . イノキュア (L . i n n o c u a) 、 L . モノサイトゲネス)
 、ブドウ球菌属 (例えば、黄色ブドウ球菌、表皮ブドウ球菌、S . カブラエ (S . c a p
 r a e) 、腐性ブドウ球菌、S . ルジュネンシス (S . l u g d u n e n s i s) 、 S .
 シュレイフェリ (S . s c h l e i f e r i)) 、腸球菌属 (例えば、フェカリス菌、フ
 ェシウム菌) 、乳酸桿菌属、ラクトコッカス属 (例えば、L . ラクティス) 、ロイコノス

50

トック属（例えば、*L. mesenteroides*）、ペクチナタス属、ペディオコッカス属、アセトバクテリウム属、クロストリジウム属（例えば、ボツリヌス菌、*C. ディフィシル*、ウエルシュ菌、破傷風菌）、ルミノコッカス属（例えば、*R. アルプス*）、ヘリオバクテリウム属、ヘリオスピリillum属（*Heliospirillum*）、およびスプロムサ属（*Sppromusa*）などのグラム陽性細菌門ならびに放線菌属（例えば、*A. ネスルンディ*）、コリネバクテリウム属（例えば、ジフテリア菌、*C. エフィシエンス*（*C. efficiens*））、アルスロバクター属、ピフィドバクテリウム属（例えば、*B. ロングム*（*B. longum*））、フランキア属、ミクロコッカス属、ミクロモノスポラ属、マイコバクテリウム属（例えば、結核菌、ライ菌、*M. ボビス*、*M. アフリカヌム*、ネズミ型結核菌）、ノカルジア属（例えば、*N. アステロイデス*）、プロピオニバクテリウム属（*Propionibacterium*）、およびストレプトマイセス属（例えば、*S. ソマリエンシス*、*S. アベルミチリス*（*S. avermitilis*））、*S. セリカラー*）などの放線菌門が含まれるが、これらに限定されない。

【0048】

単離された線毛

グラム陽性線毛タンパク質（例えば、*RrgA*、*RrgB*、および *RrgC*）またはそのフラグメントもしくは変異型（variant）を含む単離グラム陽性（例えば、肺炎球菌）線毛および他の線毛様構造を、本明細書中に記載の方法で、被験体における抗体の産生および／または免疫応答の刺激のための免疫原性組成物として使用することができる。グラム陽性線毛タンパク質の変異型を含む線毛を、本明細書中に記載の方法で、被験体における抗体の産生および／または免疫応答の刺激のための免疫原性組成物として使用することもできる。グラム陽性タンパク質のアミノ酸配列（例えば、配列番号2、4、または6）と少なくとも80%（例えば、85%、90%、95%、98%、または99%）の配列が同一なグラム陽性（例えば、肺炎球菌）線毛様ポリペプチドも新規の方法で有用である。さらに、50まで（例えば、1、3、5、10、15、20、25、30、または40）のアミノ酸が置換、欠失、または置換されたグラム陽性線毛のポリペプチドは、本明細書中に記載の組成物および方法で有用であろう。

【0049】

2つのアミノ酸配列間の同一率の決定を、BLAST2.0プログラムを使用して行うことができる。このプログラムは、ncbi.nlm.nih.gov/BLASTで公的に利用可能である。ギャップ無しのアラインメントおよびデフォルトパラメータ（*BL**OSUM* 62行列、ギャップ存在コスト（*gap existence cost*）11、残基あたりのギャップコスト1、およびλ比0.85）を使用して配列比較を行った。BLASTプログラムで使用した数学アルゴリズムは、*Altschul*, 1997, *Nucleic Acids Research*, 25:3389-3402に記載されている。

【0050】

本明細書中で使用する場合、「保存的アミノ酸置換」は、アミノ酸ファミリー内のポリペプチド中のアミノ酸の置換を意味する。アミノ酸ファミリーは当該分野で認識されており、アミノ酸側鎖の物理的および化学的性質に基づいている。ファミリーには、以下が含まれる：塩基性側鎖を有するアミノ酸（例えば、リジン、アルギニン、およびヒスチジン）；酸性側鎖を有するアミノ酸（例えば、アスパラギン酸およびグルタミン酸）；無電荷極性側鎖を有するアミノ酸（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、およびシステイン）；非極性側鎖を有するアミノ酸（例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、およびトリプトファン）；分岐側鎖を有するアミノ酸（例えば、トレオニン、バリン、およびイソロイシン）；および芳香族側鎖を有するアミノ酸（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、およびヒスチジン）。アミノ酸は、1つを超えるファミリーに属し得る。

10

20

30

40

50

【 0 0 5 1 】

いくつかの実施形態では、本発明の免疫原性組成物は、オリゴマー（線毛）形態で処方または精製することができるグラム陽性（例えば、肺炎球菌）線毛を含む。いくつかの実施形態では、オリゴマー形態は、ハイパーオリゴマー（hyperoligomer）である。いくつかの実施形態では、本発明の免疫原性組成物は、オリゴマー（線毛）形態で単離されたグラム陽性線毛タンパク質を含む。グラム陽性線毛タンパク質を含むオリゴマーまたはハイパーオリゴマーの線毛構造を、免疫原性組成物で使用するために精製するかそうでなければ処方することができる。

【 0 0 5 2 】

1つ以上の肺炎球菌線毛タンパク質の読み取り枠のポリヌクレオチド配列を、置換したORFのフラグメントをコードするポリヌクレオチド配列と置換することができる。あるいは、1つ以上の肺炎球菌線毛タンパク質の読み取り枠を、置換したORFと配列相同性を有する配列と置換することができる。

10

【 0 0 5 3 】

1つ以上のグラム陽性（例えば、肺炎球菌）線毛のタンパク質配列は、典型的には、LPXTGモチーフ（LPXTG（配列番号11）など）または他のソルターゼ基質モチーフを含む。肺炎球菌線毛タンパク質のLPXTGソルターゼ基質モチーフを、一般に、式： $X_1X_2X_3X_4G$ （式中、アミノ酸位置1のXは、L、V、E、Y、I、またはQであり、アミノ酸位置2のXは、アミノ酸位置1のXがLの場合にPであり、アミノ酸位置2のXは、アミノ酸位置1のXがEまたはQである場合にVであり、アミノ酸位置2のXは、アミノ酸位置1の位置がVである場合にVまたはPであり、アミノ酸位置3のXは、任意のアミノ酸残基であり、アミノ酸位置4のXは、アミノ酸位置1のXがV、E、またはQである場合にTであり、アミノ酸位置4のXは、アミノ酸位置1のXがLである場合にT、S、またはAである）で示すことができる。LPXTGモチーフのいくつかの例には、YPXTG（配列番号8）、IPXTG（配列番号9）、LPXSG（配列番号57）、VVXTG（配列番号12）、EVXTG（配列番号13）、VPXTG（配列番号10）、QVXTG（配列番号14）、LPXAG（配列番号15）、QVPTG（配列番号16）、およびFPXTG（配列番号17）が含まれる。

20

【 0 0 5 4 】

1つ以上のグラム陽性（例えば、肺炎球菌）線毛タンパク質配列は、線毛モチーフ配列を含み得る。線毛モチーフ配列のいくつかの例には、WLQDVHVYPKHQXXXXXXK（配列番号58）、WNYNVVAYPKNTXXXXXXK（配列番号59）、WLYDVNVFPKNGXXXXXXK（配列番号60）、WIYDVHVYPKNEXXXXXXK（配列番号61）、WNYNVHVYPKNTXXXXXXK（配列番号62）、FLSEINIIYPKNVXXXXXXK（配列番号63）、およびDVVDADVYPKNTXXXXXXK（配列番号64）が含まれる。コンセンサス線毛モチーフ配列の例は、 $(W/F/E/D) - X - X - X - (V/I/A) - X - (V/I/A) - (Y/F) - P - K - (N/H/D) - XXXXXXXX - (K/L)$ （配列番号65）またはWXXXVXVYPK（配列番号76）である。線毛モチーフの保存内部リジンは、ソルターゼ反応で求核試薬として作用することができる。

30

40

【 0 0 5 5 】

1つ以上のグラム陽性（例えば、肺炎球菌）線毛タンパク質配列は、Eボックスモチーフ配列を含む。Eボックスモチーフ配列のいくつかの例には、FCLVETATASGY（配列番号66）、FCLKETKAPAGY（配列番号67）、YVLVETEAPTGF（配列番号68）、YCLVETKAPYGY（配列番号69）、YKCLKETKAPYGY（配列番号70）、YPIITEEVAPSGY（配列番号71）、YRLFENSEAPAGY（配列番号72）、YYLWELQAPTGY（配列番号73）、およびYYLEETKQAPAGY（配列番号74）が含まれる。Eボックスモチーフコンセンサス配列の例は、 $(Y/F) - X - (L/I) - X - E - T - X - (A/Q/T) - (P/A) - X - G - (Y/F)$ （配列番号75）またはLXET（配列番号77）である。

50

【0056】

本明細書中に記載のグラム陽性（例えば、肺炎球菌）線毛は、グラム陽性細菌（例えば、肺炎球菌）が上皮細胞に接着して侵入する能力に影響を及ぼし得る。線毛はまた、グラム陽性細菌（例えば、肺炎球菌）が上皮細胞層を介して移動する能力に影響を及ぼし得る。好ましくは、1つ以上のグラム陽性線毛は、上皮細胞表面に結合するか、そうでなければ会合することができる。グラム陽性線毛はまた、フィブリノゲン、フィブロネクチン、またはコラーゲンに結合または会合することができる。

【0057】

グラム陽性（例えば、肺炎球菌）ソルターゼタンパク質は、LPXTG含有表面タンパク質の分泌および繫留に關与すると考えられている。肺炎球菌ソルターゼタンパク質は、rrgA、rrgB、およびrrgC遺伝子と同一の病原性アイレットで見出される遺伝子（srtB、srtC、およびsrtD）によってコードされる。本明細書中に記載の方法で有用なソルターゼタンパク質およびソルターゼタンパク質の変異型を、グラム陽性細菌から得ることができる。

【0058】

グラム陽性（例えば、肺炎球菌）線毛タンパク質を、膜結合型トランスペプチダーゼ（ソルターゼなど）によって細菌細胞に共有結合することができる。ソルターゼは、好ましくは、LPXTGモチーフのトレオニン残基とグリシン残基との間の表面タンパク質を切断するように機能することができる。次いで、ソルターゼは、トレオニンのカルボキシル基と細胞壁前駆体（脂質II）との間のアミド結合の形成を補助することができる。次いで、前駆体を、細菌壁合成のトランスグリコシル化およびトランスペプチド化反応を介してペプチドグリカンに組み込むことができる。Comfortら、Infection & Immunity（2004）72（5）：2710 - 2722を参照のこと。

【0059】

いくつかの実施形態では、本発明は、グラム陽性（例えば、肺炎球菌）線毛タンパク質（例えば、RrgA、RrgB、またはRrgC（例えば、配列番号2、4、または6））を含むオリゴマーの線毛様構造を含む組成物を含む。オリゴマーの線毛様構造は、多数の線毛タンパク質単位を含むことができる。いくつかの実施形態では、オリゴマーの線毛様構造は、2つまたはそれを超える線毛タンパク質を含む。いくつかの実施形態では、オリゴマーの線毛様構造は、少なくとも2つ（例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90、100、120、140、150、200、またはそれを超える）オリゴマー単位を含むハイパーオリゴマー線毛様構造を含み、ここで、各サブユニットは線毛タンパク質またはそのフラグメントを含む。オリゴマーサブユニットを、線毛モチーフ内の保存リジンを通じて共有結合することができる。オリゴマーサブユニットを、LPXTGモチーフ、好ましくは、トレオニンまたはセリンアミノ酸残基をそれぞれ介して共有結合することができる。いくつかの実施形態では、オリゴマーの線毛様構造は、単離された線毛である。

【0060】

本発明のオリゴマーの線毛様構造に組み込むべきグラム陽性（例えば、肺炎球菌）線毛タンパク質またはそのフラグメントは、いくつかの実施形態では、線毛モチーフ含むであろう。

【0061】

オリゴマー線毛を、単独または本発明の組み合わせ中で使用することができる。いくつかの実施形態では、本発明は、オリゴマー形態の肺炎球菌線毛を含む。いくつかの実施形態では、線毛はハイパーオリゴマー形態である。

【0062】

線毛の精製方法

線毛を、細胞からの線毛の分離（例えば、機械的剪断または酵素消化および分離した線毛の単離による）によって、グラム陽性線毛または線毛様構造（例えば、肺炎球菌，A群

10

20

30

40

50

連鎖球菌およびB群連鎖球菌由来の線毛などの連鎖球菌線毛)を発現する細菌細胞などの細胞から精製することができる。

【0063】

線毛精製に適切な細菌細胞には、1つ以上のグラム陽性線毛タンパク質(肺炎球菌 RrgA、RrgB、および RrgC (例えば、配列番号2、4、および6)など)で形質転換された線毛化グラム陽性細菌株、非線毛化グラム陽性細菌、および1つ以上のグラム陽性線毛タンパク質(肺炎球菌 RrgA、RrgB、および RrgC (例えば、配列番号2、4、および6)など)で形質転換されたグラム陰性細胞または他の細胞が含まれる。典型的には、線毛精製のために使用される細胞は、所望の線毛型(例えば、内因性線毛または異種線毛)のみを産生するであろう。異種線毛の酸性のために、細胞を、例えば、変異または組換えDNA法によって内因性線毛を産生しないように変化させることができる。典型的には、精製に有用な線毛産生グラム陽性細菌細胞は、細胞表面上で線毛が発現するように1つ以上の適合性ソルターゼを発現するであろう。

【0064】

グラム陽性細菌細胞からの線毛の分離を、典型的には、機械的剪断、酵素消化、SrtA活性の減少もしくは阻害、または細胞壁の完全性を妨害する化合物での処理によって行う。機械的剪断は物理的に細胞から線毛を除去することができるのに対して、他の方法は、(例えば、細胞壁または線毛成分の分解によって)線毛の付着点を排除することができる。細胞からの線毛の分離後、線毛および細胞を、例えば、遠心分離によって分離することができる。

【0065】

機械的剪断法の実例には、超音波処理、ガラスビーズ剪断、および混合が含まれる。超音波処理法は、例えば、Yamaguchiら, 2004, Current Microbiol., 49:59-65で考察されている。ガラスビーズ剪断法は、例えば、Levesqueら, 2001, J. Bacteriol., 183:2724-32で考察されている。一般的機械的剪断法は、例えば、Wolfgangら, 1998, Mol. Microbiol., 29:321-30; Trachtenbergら, 2005, J. Mol. Biol., 346:665-676; Pargeら, 1990, J. Biol. Chem., 265:2278-85; Isaacsonら, 1981, J. Bacteriol., 146:784-9; Korhonenら, 1980, Infect. Immun., 27:569-75; Hahnら, 2002, J. Mol. Biol., 323:845-57; St. Gemeら, 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93:11913-18; Weberら, 2005, J. Bacteriol., 187:2458-68; および Muら, 2002, J. Bacteriol., 184:4868-74で考察されている。

【0066】

酵素消化に適切な酵素の実例には、ムタノリシン、リソスタフィン、およびリゾチームなどの細胞壁分解酵素が含まれる。酵素消化方法は、例えば、Benderら, 2003, J. Bacteriol., 185:6057-66; Ton-Thatら, 2004, Mol. Microbiol., 53:251-61; および Ton-Thatら, 2003, Mol. Microbiol., 50:1429-38で考察されている。被験体への線毛の下流投与(downstream administration)のために、多数の酵素を使用して、望ましくない宿主反応を引き起こし得る細胞壁成分を除去することができる。

【0067】

SrtA活性を阻害または減少する方法の実例には、SrtAの機能喪失型遺伝子座の導入、内因性SrtA遺伝子の欠失、SrtA発現を減少させる核酸(例えば、アンチセンスまたはmiRNA)の発現、およびSrtA活性を阻害する化合物での細胞の処理によるSrtA活性の減少が含まれる(例えば、Marraffiniら, Microbiol. Mol. Biol. Rev., 70:192-221, 2006を参照のこ

10

20

30

40

50

と)。

【0068】

ソルターゼAインヒビターの例には、メタンチオスルホン酸塩(例えば、MTSETおよびメタンチオスルホン酸(2-スルホナトエチル))(Ton-That and Schneewind, J. Biol. Chem., 274:24316-24320, 1999)、p-ヒドロキシメルクリ安息香酸、グリコシルステロール β -シトステロール-3-O-グルコピラノール(Kimら, Biosci. Biotechnol. Biochem., 67:2477-79, 2003)、塩化ベルベリン(Kimら, Biosci. Biotechnol. Biochem., 68:421-24, 2004)、ペプチジルジアゾメタン(LPAT-CHN₂)(Scottら, Biochem. J., 366:953-58, 2002)、ペプチジルクロロメタン(LPAT-CH₂Cl)、ペプチジルビニルスルホン(LPAT-SO₂(Ph))(Conollyら, J. Biol. Chem., 278:34061-65, 2003)、ビニルスルホン(例えば、ジ-、エチル-、メチル-、およびフェニルビニルスルホン)(Frankelら, J. Am. Chem. Soc., 126:3404-3405, 2004)、ホスフィン酸基に置換されたトレオニン残基を有するLPXTGモチーフペプチド(例えば、LPE Ψ {PO₂H-CH₂}G)(Krugerら, Bioorg. Med. Chem., 12:3723-29, 2004)、置換(Z)-ジアリール-アクリロニトリル(Ohら, J. Med. Chem., 47:2418-21, 2004)、および種々の薬用植物の抽出物(Kimら, Biosci. Biotechnol. Biochem., 66:2751-54, 2002)が含まれる。

10

20

【0069】

細胞壁の完全性を妨害する化合物の非限定的な例には、グリシン、抗生物質(ペニシリン(例えば、メチシリン、アモキシシリン、アンピシリン)、セファロsporin(例えば、セファレキシン、セフプロキシル(cefprozil)、セフェピム)、糖ペプチド(例えば、バンコマイシン、テイコブラニン、ラモブラニン)、およびシクロセリンが含まれる。

【0070】

分離線毛を、例えば、密度勾配遠心分離の使用により、密度によって他の成分から分離することができる。例えば、線毛を、ショ糖密度勾配での遠心分離によって分離することができる。

30

【0071】

典型的には、グラム陽性線毛を含むサンプルは、線毛中に存在する線毛タンパク質サブユニット数の相違によって異なる分子量のポリマーを含むであろう。多分散性を減少させるために、グラム陽性線毛を含むサンプルを、サイズによって分離することができる。例えば、ゲル濾過カラムまたはサイズ排除カラムを使用することができる。限外濾過膜を使用して、グラム陽性線毛の多分散性を減少させることができる。

【0072】

グラム陽性線毛を、アフィニティークロマトグラフィなどのアフィニティ法を使用して単離することもできる。グラム陽性線毛に特異的に結合するタンパク質(例えば、線毛成分に特異的に結合する抗体または線毛に優先的に結合する抗体)を、固体担体(例えば、クロマトグラフィ担体)に固定し、グラム陽性線毛を含むサンプルを固定した結合タンパク質に曝露することができる。かかるアフィニティ単離方法を使用して、グラム陽性線毛を発現する細胞の調製物を単離、精製、または富化することもできる。

40

【0073】

グラム陽性線毛を、当該分野で公知の任意の他のタンパク質精製方法(例えば、沈殿、カラムクロマトグラフィ法、およびサンプルの濃縮)を使用して単離することもできる。単離は、例えば、ゲル濾過クロマトグラフィ、イオン交換クロマトグラフィ、逆相クロマトグラフィ、またはアフィニティークロマトグラフィを含むことができる。さらなる方法は、例えば、Ruffoloら, 1997, Infect. Immun., 65:339-

50

43に記載されている。タンパク質の精製方法は、例えば、Scopes, R. K., Protein Purification: Principles and Practice, 3rd. ed., 1994, Springer, N. Y. に詳述されている。

【0074】

精製中の画分中のグラム陽性線毛の存在を、電気泳動（例えば、ポリアクリルアミドゲル電気泳動）、グラム陽性線毛に特異的に結合する作用因子（agent）（例えば、線毛タンパク質に対する抗体または線毛に優先的に結合する抗体）の結合の測定、および／またはタンパク質または細胞結合などの線毛の活性の測定によって追跡することができる。

【0075】

抗体

本発明のグラム陽性（例えば、肺炎球菌）線毛を使用して、グラム陽性線毛またはグラム陽性線毛タンパク質に特異的な抗体を調製することもできる。いくつかの実施形態では、抗体は、グラム陽性線毛タンパク質のオリゴマー形態またはハイパーオリゴマー形態に特異的に（例えば、優先的に）結合する。本発明はまた、多くの範囲の血清型および株単離物から防御するために選択したグラム陽性線毛タンパク質に特異的な抗体の組み合わせも含む。

【0076】

本発明のグラム陽性（例えば、肺炎球菌）線毛特異的抗体は、化学的手段または物理的手段によってグラム陽性線毛ポリペプチドのエピトープに結合または会合することができる1つ以上の生物学的部分を含む。本発明の抗体には、単離された線毛タンパク質と比較してグラム陽性線毛に優先的に結合する抗体が含まれる。本発明は、ポリクローナル調製物およびモノクローナル調製物の両方から得た抗体ならびに以下の抗体を含む：ハイブリッド（キメラ）抗体分子（例えば、Winterら（1991）Nature 349: 293-299および米国特許第4,816,567号を参照のこと）、F(ab')₂およびF(ab)フラグメント、Fv分子（非共有結合性ヘテロ二量体（例えば、Inbarら（1972）Proc Natl Acad Sci USA 69: 2659-2662およびEhrlichら（1980）Biochem 19: 4091-4096を参照のこと）、単鎖Fv分子（sFv）（例えば、Houstonら（1988）Proc Natl Acad Sci USA 85: 5897-5883を参照のこと）、二量体および三量体の抗体フラグメント構築物、ミニボディ（例えば、Packら（1992）Biochem 31: 1579-1584; Cumberら（1992）J Immunology 149B: 120-126を参照のこと）、ヒト化抗体分子（例えば、Riechmannら（1988）Nature 332: 323-327; Verhoeyanら（1988）Science 239: 1534-1536; 1994年9月21日公開の英国特許公報第GB2,276,169号）、ならびにかかる分子から得た任意の機能的フラグメント（かかるフラグメントは親抗体分子の免疫学的結合特性を保持している）。本発明は、さらに、ファージディスプレイなどの非従来の過程によって得た抗体を含む。

【0077】

本発明の抗体は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体k、組換え抗体（例えば、キメラ抗体またはヒト化抗体）、全ヒト抗体、非ヒト抗体（例えば、マウス抗体）、または単鎖抗体であり得る。かかる抗体の作製方法は公知である。いくつかの場合、抗体は、エフェクター機能を有し、補体を固定することができる。抗体を、毒素、レポーター基、または造影剤にカップリングすることもできる。

【0078】

いくつかの実施形態では、本発明のグラム陽性線毛タンパク質特異的抗体は、モノクローナル抗体である。モノクローナル抗体には、均一な抗体集団を有する抗体組成物が含まれる。モノクローナル抗体をマウスハイブリドーマから得ることができ、同様に、ヒトモノクローナル抗体をマウス抗体よりもむしろヒトを使用して得ることができる。例えば、

10

20

30

40

50

Cote, ら. Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, 1985, p77を参照のこと。

【0079】

ヒト被験体への反復投与（例えば、治療上の処置）を含む適用（およびいくつかの診断への適用）のためには、キメラ、ヒト化（例えば、完全ヒト）抗体が望ましい。

【0080】

抗体を、グラム陽性細菌（例えば、肺炎球菌）感染の予防または治療上の処置で使用することもできる。抗体は、宿主細胞におけるグラム陽性細菌の付着またはいくつかの活性を遮断することができる。さらに、抗体を使用して、毒素または抗体などの治療薬をグラム陽性細菌細胞に送達させることができる。

10

【0081】

抗体を診断に適用して、例えば、生体サンプル中のグラム陽性線毛またはグラム陽性線毛タンパク質の有無を検出することができる。抗線毛または線毛タンパク質抗体を診断で使用して、例えば、所与の治療計画の有効性を決定するための臨床試験手順の一部として組織中のタンパク質レベルをモニタリングすることができる。検出可能な物質（すなわち、抗体標識）への抗体のカップリング（すなわち、例えば、直接または間接的な物理的結合）によって検出を容易にすることができる。検出可能な物質の例には、種々の酵素、補欠分子族、蛍光物質、造影剤、発光物質、生体発光物質、放射性物質が含まれる。適切な酵素の例には、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 β -ガラクトシダーゼ、およびアセチルコリンエステラーゼが含まれ、適切な補欠分子族複合体の例には、ストレプトアビジン/ビオチンおよびアビジン/ビオチンが含まれ、適切な蛍光物質の例には、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、ダンシルクロリド、またはフィコエリトリンが含まれ、造影剤の例には、電子顕微鏡法に有用な高電子密度物質（金粒子など）または磁気共鳴画像法に有用な磁気活性物質（magnetically active material）（超磁性鉄粒子など）が含まれ、発光物質の例には、ルミノールが含まれ、生体発光物質の例には、ルシフェラーゼ、ルシフェリン、およびエクオリンが含まれ、適切な放射性物質の例には、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{35}S 、および ^3H が含まれる。かかる診断抗体を、例えば、患者由来のサンプルの試験によって感染患者中の線毛化グラム陽性細菌（例えば、肺炎球菌）の存在を検出する方法で 사용할 ことができる。次いで、処置過程を、線毛化グラム陽性細菌の有無に基づいて選択することができる。例えば、非線毛化グラム陽性細菌に感染した患者を抗生物質で処置することができるのに対して、線毛化グラム陽性細菌に感染した患者を線毛結合化合物（抗体および/または抗炎症薬（例えば、IL-6または抗TNF抗体などの抗TNF薬）など）で処置することもできる。

20

30

【0082】

スクリーニングアッセイ

いくつかの態様では、本発明は、グラム陽性（例えば、肺炎球菌）線毛またはグラム陽性線毛タンパク質の活性（例えば、結合）を阻害する1つ以上の化合物（例えば、抗体、タンパク質、ペプチド、ペプチド模倣物、ペプトイド、無機小分子、非核酸有機小分子、核酸（例えば、アンチセンス核酸、siRNA、オリゴヌクレオチド、または合成オリゴヌクレオチド）または他の薬物）から同定されたモジュレーター（すなわち、候補化合物または薬剤）の同定方法（本明細書中で「スクリーニングアッセイ」ともいう）を提供する。上述のように同定された化合物を使用して、治療プロトコールにおけるグラム陽性細菌結合または付着の活性を調整するか、グラム陽性線毛の生物学的機能を推敲することができる。

40

【0083】

いくつかの実施形態では、グラム陽性（例えば、肺炎球菌）線毛、グラム陽性線毛タンパク質、またはその部分に結合することができる化合物を同定するための試験化合物のスクリーニングを提供する。グラム陽性線毛またはグラム陽性線毛タンパク質に結合する化

50

合物を、グラム陽性線毛に関連する活性（付着、感染、または炎症反応など）を調整する能力について試験することができる。

【0084】

本明細書中に記載の方法で使用される試験化合物を、当該分野で公知の組み合わせライブラリー法（生物学的ライブラリー、ペプチドライブラリー（ペプチドの機能性を有するが、新規の非ペプチド骨格を有し、酵素分解に耐性を示すが、生物活性を保持する分子のライブラリー）（例えば、Zuckermannら, 1994, J. Med. Chem., 37: 2678 - 2685を参照のこと）、空間的にアドレス可能な並行固相または液相ライブラリー（spatially addressable parallel solid phase or solution phase libraries）

10

、逆重畳積分を必要とする合成ライブラリー法、「1ビーズ1化合物（one-bead one-compound）」ライブラリー法、およびアフィニティークロマトグラフィ選択を使用した合成ライブラリー法が含まれる）における任意の多数のアプローチを使用して得ることができる。生物学的ライブラリーおよびペプチドライブラリーアプローチはペプチドライブラリーに制限される一方で、他の4つのアプローチはペプチド、非ペプチドオリゴマー、または化合物の小分子ライブラリーに適用可能である（Lam, 1997, Anticancer Drug Des., 12: 145）。

【0085】

分子ライブラリーの合成方法の例を、当該分野、例えば、DeWittら（1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 6909; Erbら, 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91: 11422; Zuckermannら, 1994, J. Med. Chem., 37: 2678; Choら, 1993, Science, 261: 1303; Carrellら, 1994, Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 33: 2059; Carrellら, 1994, Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 33: 2061; およびGallopら, 1994, J. Med. Chem., 37: 1233）に見出すことができる。

20

【0086】

化合物のライブラリーは、溶液中（例えば、Houghten, 1992, Biotechniques, 13: 412 - 421）、またはビーズ上（Lam, 1991, Nature, 354: 82 - 84）、チップ上（Fodor, 1993, Nature, 364: 555 - 556）、細菌上（Ladnerの米国特許第5, 223, 409号）、胞子上（Ladnerの米国特許第5, 223, 409号）、プラスミド上（Cullら, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 1865 - 1869）、またはファージ上（Scott and Smith, 1990, Science, 249: 386 - 390; Devlin, 1990, Science, 249: 404 - 406; Cwirllaら, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 6378 - 6382; Felici, 1991, J. Mol. Biol., 222: 301 - 310; およびLadner supra）に存在することができる。

30

【0087】

いくつかの実施形態では、アッセイは、グラム陽性（例えば、肺炎球菌）線毛、グラム陽性線毛タンパク質、またはその生物学的に活性な部分を発現する細胞（例えば、細菌細胞）を試験化合物と接触させ、試験化合物がグラム陽性線毛またはグラム陽性線毛タンパク質活性を調整する能力を、例えば、細胞結合のモニタリングによって決定する細胞ベースのアッセイである。細胞は、例えば、哺乳動物起源であり得る（例えば、マウス、ラット、またはヒト起源）。細胞は、上皮細胞（例えば、A549肺上皮細胞）であり得る。

40

【0088】

リガンドまたは基質（例えば、細胞またはタンパク質（フィブリノゲン、フィブロネクチン、またはコラーゲンなど））へのグラム陽性（例えば、肺炎球菌）線毛またはグラム陽性線毛タンパク質の結合活性を調整する試験化合物の能力を、グラム陽性線毛またはグラム陽性線毛タンパク質への化合物（例えば、基質）の結合を複合体中の標識化合物（例

50

えば、基質)の検出によって決定することができるように、例えば、化合物(例えば、基質)を放射性同位体または酵素標識にカップリングすることによって評価することができる。あるいは、グラム陽性線毛またはグラム陽性線毛タンパク質を、放射性同位体または酵素標識にカップリングして、複合体中の基質へのグラム陽性線毛またはグラム陽性線毛タンパク質の結合を調整する試験化合物の能力をモニタリングすることができる。例えば、化合物(例えば、グラム陽性線毛またはグラム陽性線毛タンパク質結合パートナー)を、放射性同位体(例えば、 ^{125}I 、 ^{35}S 、 ^{14}C 、または ^3H)で直接または間接的に標識し、放射線放出の直接的計数またはシンチレーションカウンティングによって放射性同位体を検出することができる。あるいは、化合物を、例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、またはルシフェラーゼで酵素標識し、酵素標識を、適切な基質の生成物への変換の決定によって検出することができる。

10

【0089】

任意の相互作用物を使用するか使用しないで化合物がグラム陽性(例えば、肺炎球菌)線毛またはグラム陽性線毛タンパク質と相互作用する能力を評価することができる。例えば、マイクロフィジオメーターを使用して、化合物またはグラム陽性線毛またはグラム陽性線毛タンパク質のいずれも標識することなく化合物とグラム陽性線毛またはグラム陽性線毛タンパク質との相互作用を検出することができる(McConnellら, 1992, Science 257: 1906-1912)。本明細書中で使用される場合、「マイクロフィジオメーター」(例えば、Cytosensor(登録商標))は、光電的にアドレス可能な電位差測定センサ(light-addressable potentiometric sensor)(LAPS)を使用した細胞がその環境を酸性化する速度を測定する分析機器である。この酸性化速度の変化を、化合物とグラム陽性線毛またはグラム陽性線毛タンパク質との間の相互作用の指標として使用することができる。

20

【0090】

いくつかの実施形態では、無細胞アッセイを提供する。このアッセイは、グラム陽性(例えば、肺炎球菌)線毛、グラム陽性線毛タンパク質、またはその生物学的に活性な部分を試験化合物と接触させ、試験化合物がグラム陽性線毛、グラム陽性線毛タンパク質、またはその生物学的に活性な部分に結合する能力を評価する。一般に、新規のアッセイで使用するべきグラム陽性線毛またはグラム陽性線毛タンパク質の生物学的に活性な部分には、グラム陽性線毛またはグラム陽性線毛タンパク質分子との相互作用に關与するフラグメントが含まれる。

30

【0091】

無細胞アッセイは、標的遺伝子タンパク質と試験化合物との反応混合物を2つの成分が相互作用して結合し、それにより、除去および/または検出できる複合体を形成するのに十分な条件および時間で調製する工程を含む。

【0092】

2分子間の相互作用を、例えば、蛍光エネルギー移動(FET)を使用して検出することもできる(例えば、Lakowiczらの米国特許第5,631,169号およびStavrianopoulosらの米国特許第4,868,103号を参照のこと)。第1の「ドナー」分子上のフルオロフォア標識を選択し、その結果、その放射された蛍光エネルギーが第2の「アクセプター」分子上の蛍光標識によって吸収され、それにより、吸収されたエネルギーによって蛍光を発する。あるいは、「ドナー」タンパク質分子は、トリプトファン残基の天然の蛍光エネルギーを簡潔に使用することができる。「アクセプター」分子標識を「ドナー」の標識と区別することができるように、異なる波長の光を放射する標識を選択する。標識間のエネルギー移動効率が分子を分離する距離に関連するので、分子間の空間的關係を評価することができる。分子間で結合が起こる状況では、アッセイにおける「アクセプター」分子標識の蛍光放射は最大であるべきである。FET結合事象を、当該分野で周知の標準的な蛍光検出手段(例えば、蛍光光度計)によって都合良く測定することができる。

40

【0093】

50

いくつかの実施形態では、グラム陽性（例えば、肺炎球菌）線毛またはグラム陽性（例えば、肺炎球菌）線毛タンパク質が標的分子（例えば、フィブリノゲン、フィブロネクチン、コラーゲンポリペプチド、またはそのフラグメント）に結合する能力を、リアルタイム生体分子相互作用分析（BIA）を使用して決定することができる（例えば、Sjlanderら、1991、Anal. Chem., 63: 2338 - 2345およびSzaboら、1995、Curr. Opin. Struct. Biol., 5: 699 - 705）。「表面プラズモン共鳴」または「BIA」は、いかなる相互作用物（例えば、BIACore）の標識も行うことなくリアルタイムで生体特異的相互作用を検出する。結合表面での質量の変化（結合事象を示す）によって表面付近の光の屈折率（表面プラズモン共鳴（SPR）の光学的現象）が変化し、それにより、生体分子間のリアルタイム反応の表示として使用することができる検出可能なシグナルが得られる。

10

【0094】

いくつかの実施形態では、標的遺伝子産物または試験物質を固相に繫留する。固相に繫留された標的遺伝子産物／試験化合物複合体を、反応終了時に検出することができる。標的遺伝子産物を固体表面上に繫留し、繫留していない試験化合物を、本明細書中で考察した検出可能な標識で直接または間接的に標識することができる。

【0095】

複数の標的遺伝子産物を、他の名称でも公知のタンパク質マイクロアレイテクノロジー（タンパク質チップテクノロジーおよび固相タンパク質アレイテクノロジーが含まれる）を使用して固相上に繫留することができる。タンパク質アレイテクノロジーは当業者に周知であり、固定された基板上で同定されたペプチドまたはタンパク質のアレイを得ること、ペプチドに標的分子または生体構成要素を結合すること、およびかかる結合を評価すること（これらに限定されない）に基づく。例えば、G. MacBeath and S. L. Schreiber, "Printing Proteins as Microarrays for High-Throughput Function Determination," Science 289 (5485): 1760 - 1763, 2000を参照のこと。マイクロアレイ基板には、ガラス、シリカ、アルミノケイ酸塩、ホウケイ酸塩、金属酸化物（アルミナおよび酸化ニッケル）、種々のクレイ、ニトロセルロース、またはナイロンが含まれるが、これらに限定されない。マイクロアレイ基板を、基板上でプローブ（例えば、ペプチド）の合成を増強するための化合物でコーティングする。基板上的カップリング剤またはカップリング基を使用して、第1のアミノ酸を基板に共有結合することができる。種々のカップリング剤またはカップリング基は、当業者に公知である。ペプチドプローブを、基板上的所定のグリッド中で直接合成することができる。あるいは、ペプチドプローブを基板の上にスポットすることができ、かかる場合に、基板を基板へのプローブの結合を増強する化合物でコーティングすることができる。これらの実施形態では、好ましくは、インクジェットまたは圧電性送達などの接触プリント様式または非接触様式で基板にプローブを適用するためのコンピュータ制御のロボットを使用して、予め合成したプローブを正確な所定の体積およびグリッドパターンで基板に適用する。プローブを、基板に共有結合することができる。いくつかの実施形態では、1つ以上のコントロールペプチドまたはタンパク質分子を、基盤に付着させる。コントロールペプチドまたはタンパク質分子により、ペプチドまたはタンパク質の質および結合特性、試薬の特性および有効性、ハイブリッド形成の成功、ならびに分析の閾値および成功などの要因を決定可能である。

20

30

40

【0096】

いくつかの実施形態では、一方または両方のタンパク質の非複合体化形態からの複合体化形態を容易にし、アッセイの自動化に対応するために、グラム陽性（例えば、肺炎球菌）線毛もしくはグラム陽性線毛タンパク質、抗線毛もしくは線毛タンパク質抗体、またはグラム陽性線毛結合タンパク質（例えば、抗体）を固定することが望ましい。候補化合物の存在下または非存在下でのグラム陽性線毛またはグラム陽性線毛タンパク質への試験化合物の結合またはグラム陽性線毛またはグラム陽性線毛タンパク質と標的分子との相互作

50

用を、反応物を含めるのに適切な任意の容器で行うことができる。かかる容器の例には、マイクロタイタプレート、試験管、微量遠心管が含まれる。1つの実施形態では、一方または両方のタンパク質がマトリックスに結合可能なドメインを付加した融合タンパク質を提供することができる。例えば、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ/線毛タンパク質融合タンパク質またはグルタチオン-S-トランスフェラーゼ/標的融合タンパク質を、グルタチオンセファロース（商標）ビーズ（Sigma Chemical, St. Louis, Mo.）またはグルタチオン誘導マイクロタイタプレート上に吸着し、次いで、試験化合物または試験化合物と非吸着標的タンパク質、グラム陽性線毛、またはグラム陽性線毛タンパク質のいずれかと組み合わせ、混合物を複合体形成を誘導する条件下（例えば、塩およびpHについての生理学的条件下）でインキュベーションすることができる。インキュベーション後、ビーズまたはマイクロタイタプレートを洗浄して非結合成分を除去し、ビーズの場合はマトリックスを固定し、複合体を上記のように直接または間接的に決定する。あるいは、複合体をマトリックスから解離し、グラム陽性線毛またはグラム陽性線毛タンパク質の結合または活性レベルを標準的技術を使用して決定する。

【0097】

グラム陽性（例えば、肺炎球菌）線毛、グラム陽性線毛タンパク質、または結合標的をマトリックスに固定するための他の技術は、ビオチンおよびストレプトアビジンの結合体化の使用を含む。ビオチン化グラム陽性線毛、グラム陽性線毛タンパク質、または標的分子を、当該分野で公知の技術（例えば、Pierce Chemicals, Rockford, ILのビオチン化キット）を使用してビオチン-NHS（N-ヒドロキシスクシンイミド）から調製し、ストレプトアビジンコーティングした96ウェルプレート（Pierce Chemical）のウェル中に固定することができる。

【0098】

アッセイを行うために、非固定成分を、繫留成分を含むコーティング表面に添加する。反応完了後、形成された任意の複合体が個チャ表面上に固定されたままであるような条件下で未反応成分を除去する（例えば、洗浄による）。固体表面上に繫留した複合体を、多数の方法で検出することができる。事前に固定していない成分を予め標識する場合、表面上に固定された標識の検出は複合体が形成したことを示す。事前に固定していない成分を予め標識しない場合、間接的標識を使用して（例えば、固定化成分に特異的な標識抗体を使用して）、表面上に繫留した複合体を検出することができる（それにより、抗体を、例えば、標識抗Ig抗体で直接または間接的に標識することができる）。

【0099】

いくつかの実施形態では、グラム陽性（例えば、肺炎球菌）線毛またはグラム陽性（例えば、肺炎球菌）線毛タンパク質または結合標的に特異的に結合するが、グラム陽性線毛またはグラム陽性線毛タンパク質のその標的への結合を妨害しない抗体を使用してこのアッセイを行う。かかる抗体を、プレートのウェルに誘導体化し、非結合標的、グラム陽性線毛、またはグラム陽性線毛タンパク質を、抗体結合体化によってウェルに捕捉することができる。かかる複合体の検出方法は、GST固定化複合体のための上記の検出方法に加えて、グラム陽性線毛、グラム陽性線毛タンパク質、または標的分子に反応性を示す抗体を使用した複合体の免疫検出およびグラム陽性線毛、グラム陽性線毛タンパク質、または標的分子に関連する酵素活性の検出に依存する酵素結合アッセイを含む。

【0100】

いくつかの実施形態では、無細胞アッセイを液相で行うことができる。かかるアッセイでは、多数の標準的な技術（分画遠心法（例えば、Rivasら, 1993, Trends Biochem. Sci., 18: 284-287）、クロマトグラフィ（ゲル濾過クロマトグラフィ、イオン交換クロマトグラフィ）、電気泳動（例えば、Ausubelら, eds., 1999, Current Protocols in Molecular Biology, J. Wiley: New York.）、および免疫沈降（例えば、Ausubelら, eds., 1999, Current Protocols in Molecular Biology, J. Wiley: New York）が含ま

れるが、これらに限定されない)のいずれかによって反応生成物を未反応成分から分離する。かかる樹脂およびクロマトグラフィ技術は、当業者に公知である(例えば、Heegaard, 1998, J. Mol. Recognit., 11:141-148およびHageら, 1997, J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl., 699:499-525)。さらに、上記のように蛍光エネルギー移動も都合良く使用して、複合体を溶液からさらに精製することなく結合を検出することができる。

【0101】

いくつかの実施形態では、アッセイは、グラム陽性(例えば、肺炎球菌)線毛またはグラム陽性(例えば、肺炎球菌)線毛タンパク質またはその生物学的に活性な部分をグラム陽性線毛またはグラム陽性線毛タンパク質に結合する化合物(例えば、タンパク質)と接触させてアッセイ混合物を形成する工程、アッセイ混合物を試験化合物と接触させる工程、および試験化合物が細胞または化合物へのグラム陽性線毛またはグラム陽性線毛タンパク質の結合に影響を及ぼす能力を決定する工程を含む。

10

【0102】

いくつかの実施形態では、肺炎球菌線毛を発現する細菌細胞の結合のアッセイは、肺炎球菌線毛を発現する細菌細胞をA549肺上皮細胞とインキュベーションする工程、洗浄して非接着性細菌細胞を除去する工程、および接着性細菌細胞を検出する工程を含む。細菌接着を、当該分野の任意の手段(例えば、接着性細菌細胞への抗体の結合または上皮細胞の溶解および会合した細菌細胞の計数)によって測定することができる。HEP2細胞、CHO細胞、またはHeLa細胞を、肺炎球菌線毛を発現する細菌細胞の結合アッセイで使用する個ともできる。

20

【0103】

免疫原性組成物

グラム陽性(例えば、肺炎球菌)線毛を含む本発明の免疫原性組成物は、1つ以上の抗原性作用因子(antigenic agent)をさらに含むことができる。抗原の例には、以下に列挙の抗原が含まれる。さらに、本発明の組成物を使用して、任意の以下に列挙の微生物または関連微生物に起因する感染を治療または防止することができる。免疫原性組成物で使用するための抗原には、1つ以上の下記の抗原または1つ以上の下記の抗原由来の抗原が含まれるが、これらに限定されない。

30

【0104】

細菌抗原

髄膜炎菌(*N. meningitides*):髄膜炎菌血清群A、C、W135、Y、および/またはB由来のタンパク質抗原(1~7)、髄膜炎菌血清群B由来の外膜小胞(OMV)調製物(8、9、10、11)、髄膜炎菌血清群A、B、C、W135、および/またはY由来の糖抗原(LPSが含まれる)(血清群C由来の少糖など)(PCT/US99/09346;PCT IB98/01665;およびPCT IB99/00103を参照のこと);

Streptococcus pneumoniae:糖抗原またはタンパク質抗原、特に、*Streptococcus pneumoniae*由来の糖または以下のタンパク質または抗原ペプチド:Ph tD(BVH-11-2、SP1003、spr0907)(Adamouら, Infect. Immun., 69:949-53, 2001; Hamelら, Infect. Immun., 72:2659-70, 2004)、Ph tE(BVH-3、SP1004、spr0908)(Adamouら, Infect. Immun., 69:949-53, 2001; Hamelら, Infect. Immun., 72:2659-70, 2004)、Ph tB(PhpA、BVH-11、SP1174、spr1060)(Adamouら, Infect. Immun., 69:949-53, 2001; Zhangら, Infect. Immun., 69:3827-36, 2001; Hamelら, Infect. Immun., 72:2659-70, 2004)、Ph tA(BVH-11-3、SP1175、spr1061)(Adamouら, Infect. Immun., 69:949-53, 2001; Witzemann

40

50

ら, Infect. Immun., 69:1593-98, 2001; Zhang ら, Infect. Immun., 69:3827-36, 2001; Hamel ら, Infect. Immun., 72:2659-70, 2004)、NanA (SP1693、spr1536) (Tong ら, Infect. Immun., 73:7775-78, 2005)、SP1872 (spr1687) (Brown ら, Infect. Immun., 69:6702-06, 2001)、PspC (CbpA、SP2190、spr1995) (Ogunniyi ら, Infect. Immun., 69:5997-6003, 2001)、PspA (SP0177、spr0121、spr1274) (Briles ら, Vaccine, 19:S87-S95, 2001); SP0498 (spr0440)、LytB (SP0965、spr0867) (Wizemann ら, Infect. Immun., 69:1593-98, 2001)、AliB (SP1527、spr1382)、PpmA (SP0981、spr0884) (Overweg ら, Infect. Immun., 68:4180-4188, 2000)、LytC (SP1573、spr1431) (Wizemann ら, Infect. Immun., 69:1593-98, 2001)、PsaA (Briles ら, Vaccine, 19:S87-S95, 2001)、PdB (Ogunniyi ら, Infect. Immun., 69:5997-6003, 2001)、RPhp (Zhang ら, Infect. Immun., 69:3827-36, 2001)、PiuA (Jomaa ら, Vaccine, 24:5133-39, 2006)、PiaA (Jomaa ら, Vaccine, 24:5133-39, 2006)、6PGD (Danielly ら, Clin. Exp. Immunol., 144:254-263, 2006)、または PppA (Green ら, Infect. Immun., 73:981-89, 2005);

10

20

ストレプトコッカス・アガラクチア：特に、B群連鎖球菌抗原；

化膿性連鎖球菌：特に、A群連鎖球菌抗原；

フェカリス菌またはフェシウム菌：特に、三糖類反復または米国特許第6,756,361号に記載の他の腸球菌由来の抗原；

ピロリ菌：Cag、Vac、Nap、HopX、HopY、および/またはウレアーゼ抗原が含まれる；

百日咳菌：百日咳菌ホロ毒素(PT)および百日咳菌由来の線維状赤血球凝集素(FHA)、また、任意選択的に、パータクチンおよび/または凝集原2および3抗原との組み合わせなど；

30

黄色ブドウ球菌：任意選択的に非毒性組換え緑膿菌外毒素A(StaphVAX(商標)に結合体化した黄色ブドウ球菌5型および8型莢膜多糖または表面タンパク質インベysin(ロイコシジン、キナーゼ、ヒアルロニダーゼ)、食細胞貪食を阻害する表面因子(莢膜、タンパク質A)、カロテノイド、カタラーゼ酸性、タンパク質A、凝固酵素、凝固因子、および/または真核細胞膜を溶解する膜損傷毒素(任意選択的に解毒されている)(ヘモリシン、ロイコトキシン、ロイコシジン)由来の抗原が含まれる；

表皮ブドウ球菌：特に、表皮ブドウ球菌粘液関連抗原(SAA)；

腐性ブドウ球菌：(尿路感染の原因菌)特に、腐性ブドウ球菌抗原の160kDa血球凝集素；

40

緑膿菌：特に、内毒素A、Wzzタンパク質、緑膿菌LPS、さらに、PAO1(O5血清型)から単離したLPS、および/または外膜タンパク質(外膜タンパク質F(OPrF)が含まれる)(Infect Immun., 2001 May; 69(5): 3510-3515)；

炭疽菌(炭疽菌)：A成分由来の炭疽菌抗原(任意選択的に解毒)(致死因子(LF)および浮腫因子(EF))(共に防御抗原(PA)として公知の共通のB成分を有することができる)など；

カタル球菌：(呼吸器)(外膜タンパク質抗原(HMW-OMP)、C抗原、および/またはLPSが含まれる)；

ペスト菌(ペスト)：F1莢膜抗原(Infect Immun., 2003 Jan

50

; 71 (1) : 374 - 383)、LPS (Infect Immun. 1999 October; 67 (10) : 5395)、ペスト菌V抗原 (Infect Immun. 1997 November; 65 (11) : 4476 - 4482) など;

エンテロコリチカ菌 (胃腸病原体) : 特に、LPS (Infect Immun. 2002 August; 70 (8) : 4414) ;

偽結核菌 : 胃腸病原体抗原 ;

結核菌 : リポタンパク質、LPS、BCG抗原、抗原85Bの融合タンパク質 (Ag 85B)、および/または任意選択的にカチオン性脂質小胞中に処方されたESAT-6 (Infect Immun. 2004 October; 72 (10) : 6148)、結核菌 (Mtb) イソシトレートデヒドロゲナーゼ関連抗原 (Proc Natl Acad Sci USA. 2004 Aug 24; 101 (34) : 12652)、および/またはMPT51抗原 (Infect Immun. 2004 July; 72 (7) : 3829) など;

レジオネラ・ニューモフィラ (レジオネラ症) : 任意選択的に破壊asd遺伝子を有する細胞株由来のL・ニューモフィラ抗原 (Infect Immun. 1998 May; 66 (5) : 1898) ;

リケッチア属 : (外膜タンパク質 (外膜タンパク質Aおよび/またはB (OmpB) (Biochim Biophys Acta. 2004 Nov 1; 1702 (2) : 145) が含まれる)、LPS、および表面タンパク質抗原 (SPA) (J Autoimmun. 1989 Jun; 2 Suppl : 81) が含まれる) ;

大腸菌 : (腸幹毒素原性大腸菌 (ETEC)、凝集付着性大腸菌 (EAggEC)、均一付着性大腸菌 (DAEC)、腸管病原性大腸菌 (EPEC)、および/または腸管出血性大腸菌 (EHEC) 由来の抗原が含まれる) ;

コレラ菌 : (プロテインナーゼ抗原、LPS、特にコレラ菌IIのリボ多糖、O1 Inaba O特異的多糖、コレラ菌O139、IEM108ワクチンの抗原 (Infect Immun. 2003 Oct; 71 (10) : 5498 - 504)、および/または閉鎖毒素 (Zot) が含まれる) ;

チフス菌 (チフス熱) : (莢膜多糖、好ましくは結合体 (Vi、すなわち、vax-TyVi) が含まれる) ;

ネズミチフス菌 (胃腸炎) : ネズミチフス菌由来の抗原は、微生物および癌療法 (血管形成の阻害およびflkの調整が含まれる) が意図される ;

リステリア菌 (免疫不全患者または高齢者における全身感染、胎児の感染) : L・モノサイトゲネス由来の抗原を、本発明の結合体/関連組成物の細胞質内送達のためのキャリア/ベクターとして使用することが好ましい ;

ジンジバリス菌 : 特に、ジンジバリス菌外膜タンパク質 (OMP) ;

破傷風 : 好ましくは、本発明の組成物との結合体化でのキャリアタンパク質として使用される破傷風毒素 (TT) 抗原など ;

ジフテリア : ジフテリアトキソイド (例えば、CRM₁₉₇) など、さらに、ADPリボシル化を調整するか、阻害するか、関連することができる抗原は、本発明の組成物との組み合わせ/同時投与/結合体化が意図され、ジフテリアトキソイドをキャリアタンパク質として使用することができる ;

ライム病ボレリア (ライム病) : P39およびP13に関連する抗原 (膜内在性タンパク質、Infect Immun. 2001 May; 69 (5) : 3323 - 3334)、VlsE抗原変異タンパク質 (J. Clin. Microbiol. 1999 December; 37 (12) : 3997) など ;

インフルエンザ菌B型 : これに由来する糖抗原など ;

クレブシエラ属 : OMP (OMP Aが含まれる) または任意選択的に破傷風トキソイドに結合体化した多糖など ;

淋菌 (Neisseria gonorrhoeae) : Por (またはポリン) タンパク質 (PorBなど) (Zhuら, Vaccine (2004) 22 : 660 - 66

10

20

30

40

50

9を参照のこと)、トランスフェリン結合タンパク質(TbpAおよびTbpBなど)(Priceら, Infection and Immunity (2004) 71(1): 277-283)、不透明タンパク質(opacity protein)(Opaなど)、還元修飾タンパク質(reduction-modifiable protein)(Rmp)、および外膜小胞(OMV)調製物(Planteら, J Infectious Disease (2000) 182: 848-855)を参照のこと、例えば、WO99/24578号、WO99/36544号、WO99/57280号、WO02/079243も参照のこと)が含まれる、

クラミジア・ニューモニエ：特に、C・ニューモニエタンパク質抗原；

クラミジア・トラコーマチス：血清型A、B、BaおよびC(トラコーマ(失明の原因))、血清型L₁、L₂、およびL₃(性病性リンパ肉芽腫症)、および血清型D~K由来の抗原が含まれる；

梅毒トレポネーマ(梅毒)：特に、TmpA抗原；および

軟性下疳菌(軟性下疳の原因菌)：(外膜タンパク質(DsrA)が含まれる)。

【0105】

特に参照しない場合、本発明のさらなる細菌抗原は、上記の任意の莢膜抗原、多糖抗原、またはタンパク質抗原であり得る。さらなる細菌抗原には、外膜小胞(OMV)調製物も含まれ得る。さらに、抗原には、任意の上記細菌の生きている、弱毒化、および/または精製バージョンが含まれる。本発明の細菌または微生物由来の抗原は、グラム陰性またはグラム陽性および好気性または嫌気性であり得る。

【0106】

さらに、任意の上記細菌由来の糖(多糖、LPS、LOS、または少糖)を、別の薬剤または抗原(キャリアタンパク質(例えば、CRM₁₉₇)など)に結合体化することができる。米国特許第5,360,897号およびCan J Biochem Cell Biol. 1984 May; 62(5): 270-5に示すように、かかる結合体化は、タンパク質上のアミノ基への糖上のカルボニル部分の還元的アミノ化によって影響を受ける直接結合体化であり得る。あるいは、糖を、スクシンアミドまたはBioconjugate Techniques, 1996およびCRC, Chemistry of Protein Conjugation and Cross-Linking, 1993に記載の他の結合などのリンカーによって結合体化することができる。

【0107】

ウイルス抗原

インフルエンザ：血球凝集素(HA)および/またはノイラミニダーゼ(NA)表面タンパク質を含む全ウイルス粒子(弱毒化)、分割物(split)、またはサブユニットが含まれ、インフルエンザ抗原は、ニワトリ胚に由来し得るか、細胞培養で増殖させることができ、そして/またはインフルエンザ抗原は、特に、インフルエンザA型、B型、および/またはC型に由来する。

【0108】

呼吸器合胞体ウイルス(RSV)：(RSVのA2株のFタンパク質(J Gen Virol. 2004 Nov; 85(Pt 11): 3229)および/またはG糖タンパク質が含まれる)；

パラインフルエンザウイルス(PIV)：(好ましくは血球凝集素、ノイラミニダーゼ、および/または融合糖タンパク質を含むPIV1型、2型、および3型が含まれる)；

ポリオウイルス：(ピコルナウイルス科由来の抗原、好ましくはポリオウイルス抗原(OPVなど)、好ましくはIPVが含まれる)；

麻疹：(任意選択的にプロトリンと組み合わせた麻疹ウイルス(MV)成分抗原またはMMRワクチン中に存在する抗原が含まれる)；

ムンプス：(MMRワクチン中に存在する抗原が含まれる)；

風疹：(MMRワクチン中に存在する抗原およびトガウイルス科(デングウイルスが

10

20

30

40

50

含まれる)由来の他の抗原が含まれる);

狂犬病:凍結乾燥不活化ウイルス(RabAvert(商標))など;

フラビウイルス科のウイルス:黄熱病ウイルス、日本脳炎ウイルス、デングウイルス(1型、2型、3型、または4型)、ダニ媒介脳炎ウイルス、およびウエストナイルウイルス(およびこれら由来の抗原)など;

カリシウイルス科:カリシウイルス科由来の抗原;

HIV:(HIV-1またはHIV-2株抗原(gag(gp24gagおよびp55gag)、env(gp160およびgp41)、pol、tat、nef、rev、vpu、ミニタンパク質(miniprotein)、(好ましくは、p55gagおよびgp140v欠失)など)および単離物HIV_{IIIB}、HIV_{SF2}、HIV_{LA V}、HIV_{LA1}、HIV_{MN}、HIV-1_{CM235}、HIV-1_{US4}、HIV-2由来の抗原;特に、サル免疫不全ウイルス(SIV)が含まれる);

ロタウイルス:(VP4、VP5、VP6、VP7、VP8タンパク質(Protein Expr Purif. 2004 December; 38(2): 205)、および/またはNSP4が含まれる);

ペスチウイルス:古典的ブタ発熱ウイルス(classical porcine fever virus)、ウシウイルス性下痢症ウイルス、および/またはボーダー病ウイルス由来の抗原など;

バルボウイルス:バルボウイルスB19など;

コロナウイルス:(SARSウイルス抗原、特に、スパイクタンパク質または由来するプロテアーゼならびにWO04/92360号に含まれる抗原が含まれる);

A型肝炎ウイルス:不活化ウイルスなど;

B型肝炎ウイルス:表面および/またはコア抗原(sAg)ならびにプレ表面配列(presurface sequences)(pre-S1およびpre-S2(以前は、pre-Sと呼ばれていた))、ならびに上記の組み合わせ(sAg/pre-S1、sAg/pre-S2、sAg/pre-S1/pre-S2、およびpre-S1/pre-S2など)(例えば、AHBV Vaccines - Human Vaccines and Vaccination, pp. 159-176;および米国特許第4,722,840号、同第5,098,704号、同第5,324,513号;Beamesら, J. Virol. (1995) 69: 6833-6838, Birnbaumら, J. Virol. (1990) 64: 3319-3330;およびZhouら, J. Virol. (1991) 65: 5457-5464を参照のこと)など;

C型肝炎ウイルス:E1、E2、E1/E2(Houghtonら, Hepatology (1991) 14: 381を参照のこと)、NS345ポリタンパク質、NS345-コアポリタンパク質、コア、および/または非構造領域由来のペプチド(国際公開番号WO89/04669号;WO90/11089号;およびWO90/14436号)など;

デルタ肝炎ウイルス(HDV):デルタ肝炎ウイルス由来の抗原特に、HDV由来のδ抗原(例えば、米国特許第5,378,814号を参照のこと);

E型肝炎ウイルス(HEV);E型肝炎ウイルス由来の抗原;

G型肝炎ウイルス(HGV);G型肝炎ウイルス由来の抗原;

水痘帯状疱疹ウイルス(Varicella zoster virus):水痘帯状疱疹ウイルス(VZV)由来の抗原(J. Gen. Virol. (1986) 67: 1759);

エプスタイン・バーウイルス:EBV由来の抗原(Baerら, Nature (1984) 310: 207);

サイトメガロウイルス:CMV抗原(gBおよびgH(Cytomegaloviruses (J. K. McDougall, ed., Springer-Verlag 1990) pp. 125-169)が含まれる);

単純ヘルペスウイルス:(HSV-1またはHSV-2株由来の抗原および糖タンパ

10

20

30

40

50

ク質 g B、g D、および g H (McGeochら, J. Gen. Virol. (1988) 69: 1531 および 米国特許第 5, 171, 568 号) が含まれる);

ヒトヘルペスウイルス: 他のヒトヘルペスウイルス (HHV 6 および HHV 7) 由来の抗原; および

HPV: (ヒトパピローマウイルス (HPV) に関連するか由来する抗原 (例えば、1 つ以上の E 1 ~ E 7、L 1、L 2、およびその融合物) が含まれる) (特に、本発明の組成物は、L 1 主要キャプシドタンパク質を含むウイルス様粒子 (VLP) を含むことができ、さらに、HPV 抗原は、1 つ以上の HPV 血清型 6、11、16、および / または 18 から防御する)。

【0109】

10

Vaccines, 4th Edition (Plotkin and Orenstein ed. 2004); Medical Microbiology 4th Edition (Murrayら ed. 2002); Virology, 3rd Edition (W.K. Joklik ed. 1988); Fundamental Virology, 2nd Edition (B.N. Fields and D.M. Knipe, eds. 1991) (本発明の組成物との結合体化で意図される) に含まれる抗原、組成物、方法、および微生物をさらに提供する。

【0110】

さらに、抗原には、任意の上記細菌の生きている、弱毒化、成分、および / または精製バージョンが含まれる。

20

【0111】

真菌抗原

ワクチンに関連する本明細書中で使用するための真菌抗原には、トリコフィトン・メンタグロフィトに起因する白癬 (trichophytosis) の予防および治療のための米国特許第 4, 229, 434 号および同第 4, 368, 191 号; 動物 (モルモット、ネコ、ウサギ、ウマ、および子羊など) における皮膚系状菌感染の予防のための広範な皮膚系状菌ワクチンについての米国特許第 5, 277, 904 号および同第 5, 284, 652 号 (これらの抗原は、有効量の死滅した T. エクイヌム (T. equinum)、T. メンタグロフィト (T. mentagrophytes) (変種グラニュラレ (var. granulare))、M. カニス、および / または M. ギブセウムを含み、任意選択的にアジュバントと組み合わせる); 有効量の均質化ホルムアルデヒド死滅真菌 (すなわち、ミクロスポルム・カニス培養物を含むキャリア) を含む白癬ワクチンについての米国特許第 5, 453, 273 号および同第 6, 132, 733 号; ピシウム感染症 (pythiosis) の細胞外タンパク質および細胞内タンパク質を含む米国特許第 5, 948, 413 号に記載の真菌抗原が含まれる。抗真菌ワクチン内で同定されたさらなる抗原には、Ringvac bovis LTF-130 および Bioveta が含まれる。

30

【0112】

さらに、本明細書中で使用される真菌抗原は、皮膚系状菌 (Dermatophytes) (エピダーモフィトン・フロクスム (Epidermophyton floccusum)、ミクロスポルム・オドウニ (Microsporum audouinii)、ミクロスポルム・カニス、ミクロスポルム・ジストルトゥム (Microsporum distortum)、ミクロスポルム・エクイヌム (Microsporum equinum)、ミクロスポルム・ギブスム (Microsporum gypsum)、ミクロスポルム・ナヌム (Microsporum nanum)、トリコフィトン・コンセントリクム (Trichophyton concentricum)、トリコフィトン・エクイヌム (Trichophyton equinum)、トリコフィトン・ガリナエ (Trichophyton gallinae)、トリコフィトン・ギブセウム (Trichophyton gypsum)、トリコフィトン・メグニニ (Trichophyton megnini)、トリコフィトン・メンタグロフィト (Trichophyton mentagrophytes)、トリコフィトン・キンケアヌム (T

40

50

richophyton quinckeanum)、トリコフィトン・ルブルム (*Trichophyton rubrum*)、トリコフィトン・ショエンレイニ (*Trichophyton schoenleini*)、トリコフィトン・トンスランス (*Trichophyton tonsurans*)、トリコフィトン・ベルコスム (*Trichophyton verrucosum*)、*T. ベルコスム* 変種 *アルBUM*、変種 *ジスコイデス* (*var. discoides*)、変種 *オクラセウム* (*var. ochraceum*)、トリコフィトン・ビオラセウム (*Trichophyton violaceum*)、および/またはトリコフィトン・ファビホルム (*Trichophyton faviforme*) が含まれる) に由来し得る。

【0113】

抗原として使用するか、本発明の組成物との結合体化における抗原の誘導における真菌病原体は、アスペルギルス・フミガーツス、アスペルギルス・フラバス、クロコウジカビ、アスペルギルス・ニデュランス、アスペルギルス・テレウス、アスペルギルス・シドウィ (*Aspergillus sydowi*)、アスペルギルス・フラバタス (*Aspergillus flavatus*)、アスペルギルス・グラウクス (*Aspergillus glaucus*)、ブラストシゾマイセス・カピタツス (*Blastoschizomyces capitatus*)、カンジダ・アルビカンス、カンジダ・エノラーゼ (*Candida enolase*)、カンジダ・トロピカリス、カンジダ・グラブラタ、カンジダ・クルセイ (*Candida krusei*)、カンジダ・パラブシローシス、カンジダ・ステラトイデア (*Candida stellatoidea*)、カンジダ・クセイ (*Candida kusei*)、カンジダ・パラクセイ (*Candida parakwsei*)、カンジダ・ルシタニエ (*Candida lusitaniae*)、カンジダ・シュードトロピカリス、カンジダ・ギリールモンディ (*Candida guilliermondi*)、クラドスポリウム・カリオニイ (*Cladosporium carrionii*)、コクシジオイデス・イミチス、ブラストミセス・デルマティディス (*Blastomyces dermatidis*)、クリプトコッカス・ネオフォルマンズ、ジオトリカム・クレバタム (*Geotrichum clavatum*)、ヒストプラズマ・カプスラーツム、南アメリカ分芽菌、ニューモシスチス・カリニ、ピチウム・インシディオスム (*Pythium insidiosum*)、ピチロスポルム・オーバーレ (*Pityrosporum ovale*)、出芽酵母 (*Sacharomyces cerevisiae*)、サッカロマイセス・ブラウディ、サッカロマイセス・プロンベ (*Saccharomyces pombe*)、セドスポリウム・アピオスベルム (*Scedosporium apiospermum*)、スポロトリクス・シエンキイ (*Sporothrix schenckii*)、トリコスボロン・ベイゲリイ (*Trichosporon beigeli*)、トキシプラズマ・ゴンディ、ペニシリウム・マルネフェイ (*Penicillium marneffei*)、マラセジア属、フォンセカヤ属 (*Fonsecaea* spp.)、ワンギエラ属 (*Wangiella* spp.)、スポロトリクス属 (*Sporothrix* spp.)、バシジオボラス属、コニディオボラス属、リゾプス属、ケカビ属、アブシディア属、モルチエレラ属、クスダマカビ属、およびサクセネア属 (*Saksenaea* spp.) を含む。

【0114】

抗原が由来し得る他の真菌には、アルテルナリア属、カーブラリア属、ヘルミントスポリウム属、フザリウム属、アスペルギルス属、アオカビ属、モノリニア属 (*Monolinia* spp.)、リゾクトニア属、ペシロマイセス属、ピトマイセス属 (*Pithomyces* spp.)、およびクラドスポリウム属が含まれる。

【0115】

真菌抗原の産生過程は、当該分野で周知である (米国特許第 6,333,164 号を参照のこと)。いくつかの実施形態では、可溶化画分を抽出し、細胞壁が実質的または少なくとも部分的に除去された真菌細胞から得ることができる不溶性画分から分離し、過程が、生きている真菌細胞を得る工程、細胞壁が実質的または少なくとも部分的に除去された

10

20

30

40

50

真菌細胞を得る工程、細胞壁が実質的または少なくとも部分的に除去された真菌細胞を破裂させる工程、不溶性画分を得る工程、および不溶性画分から可溶性画分を抽出および分離する工程を含むという点で特徴づける。

【0116】

S T D 抗原

いくつかの実施形態では、本発明の組成物および方法を実施することができる微生物（細菌、ウイルス、および/または真菌）には、性感染症（S T D）を引き起こすものおよび/または本発明の標的または抗原組成物であり得る抗原の表面上に示されるものが含まれる。本発明のいくつかの実施形態では、組成物を、ウイルスまたは細菌のS T D由来の抗原と組み合わせる。細菌またはウイルス由来の抗原を、本発明の組成物と併せて投与して、特に、少なくとも1つの以下のS T Dから防御することができる：クラミジア、陰部ヘルペス、肝炎（特に、H C V）、陰部疣贅、淋病、梅毒、および/または軟性下疳（例えば、W O O O / 1 5 2 5 5を参照のこと）。

10

【0117】

いくつかの実施形態では、本発明の組成物を、S T Dの防止または治療のために抗原と同時に投与する。

【0118】

S T Dに関連する以下のウイルス由来の抗原（上記にさらに詳述している）を、本発明の組成物と同時に投与する：肝炎（特にH C V）、H P V、H I V、またはH S V。

20

【0119】

さらに、S T Dに関連する以下の細菌由来の抗原（上記にさらに詳述している）を、本発明の組成物と同時に投与する：淋菌（*Neisseria gonorrhoeae*）、肺炎クラミジア、トラコーマクラミジア、梅毒トレポネーマ、または軟性下疳菌。

呼吸器抗原

いくつかの実施形態では、グラム陽性（例えば、肺炎球菌）線毛抗原は、呼吸器抗原であり、特に、呼吸器ウイルスの感染および/または感染の1つ以上の症状の軽減または防止による、呼吸器病原体（ウイルス、細菌または真菌（呼吸器合胞体ウイルス（R S V）、P I V、S A R Sウイルス、インフルエンザ、炭疽菌など）が含まれる）による感染の防止および/または処置方法のための免疫原性組成物で使用される。本明細書中に記載の抗原（呼吸器ウイルス、細菌、または真菌由来の抗原など）を含む組成物を、本発明の組成物と併せて、特定の呼吸器微生物に曝されているリスクがあるか、呼吸器微生物に曝されていたか、呼吸器ウイルス、細菌、または真菌に感染している個体に投与する。本発明の組成物を、呼吸器病原体の抗原と同時にまたは同一の処方物中で同時投与することができる。組成物の投与により、呼吸器感染の1つ以上の症状の発生率および/または重症度が軽減される。

30

【0120】

小児/高齢者抗原

いくつかの実施形態では、本発明の組成物を、小児抗原（*pediatric antigen*）などの小児科集団の治療のための1つ以上の抗原と併せて使用する。いくつかの実施形態では、小児科集団中の被験体の年齢は、約3歳未満、約2歳未満、または約1歳未満である。いくつかの実施形態では、（本発明の組成物と併せた）小児抗原を、少なくとも1、2、または3年間にわたって複数回投与する。

40

【0121】

いくつかの実施形態では、本発明の組成物を、高齢者抗原（*geriatric antigen*）など的高齢者集団（*geriatric population*）の治療のための1つ以上の抗原と併せて使用する。いくつかの実施形態では、高齢者集団中の被験体の年齢は、50、55、60、65、70、または75歳を超える。

【0122】

他の抗原

本発明の組成物と併せて使用するための他の抗原には、院内感染（病院）関連抗原が含

50

まれる。

【0123】

いくつかの実施形態では、本発明の組成物と併せて寄生虫抗原を意図する。寄生虫抗原の例には、疾患（マラリアおよび／またはライム病が含まれるが、これらに限定されない）を引き起こす成分由来の抗原が含まれる。

【0124】

いくつかの実施形態では、本発明の組成物と併せた抗原は、蚊媒介性疾患に関連し、そして／または有効である。いくつかの実施形態では、本発明の組成物と併せた抗原は、脳炎に関連し、そして／または有効である。いくつかの実施形態では、本発明の組成物と併せた抗原は、神経系感染に関連し、そして／または有効である。

10

【0125】

いくつかの実施形態では、本発明の組成物と併せた抗原は、血液または体液を介して伝播し得る抗原である。

【0126】

抗原処方物

本発明のいくつかの態様では、本方法は、(a)(i)水、(ii)界面活性剤、(iii)有機溶媒、および(iv)ポリ(α-ヒドロキシ酸)、ポリヒドロキシ酪酸、ポリカプロラクトン、ポリオルソエステル、ポリ酸無水物、およびポリシアノアクリレートからなる群から選択される生分解性ポリマーを含む混合物の分散によって乳濁液を準備する工程（ポリマーは、典型的には、混合物中に有機溶媒に対して約1%～約30%の濃度で存在する一方で、界面活性剤は、典型的には、混合物中に界面活性剤：ポリマーの重量比で約0.00001：1～約0.1：1（より典型的には、約0.0001：1～約0.1：1、または約0.005：1～約0.1：1）で存在する）、(b)乳濁液から有機溶媒を除去する工程、および(c)微粒子表面上の抗体を吸着する工程を含む。いくつかの実施形態では、生分解性ポリマーは、有機溶媒に対して約3%～約10%の濃度で存在する。

20

【0127】

いくつかの実施形態では、本明細書中で使用するための微粒子を、滅菌可能、非毒性、および生分解性の材料から形成することができる。かかる材料には、ポリ(α-ヒドロキシ酸)、ポリヒドロキシ酪酸、ポリカプロラクトン、ポリオルソエステル、ポリ酸無水物、PACA、およびポリシアノアクリレートが含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、本発明と共に使用するための微粒子は、ポリ(α-ヒドロキシ酸)、特に、ポリ(ラクチド)(「PLA」)またはD,L-ラクチドとグリコリドまたはグリコール酸とのコポリマー（ポリ(D,L-ラクチド-コ-グリコリド)(「PLG」または「PLGA」)など)またはD,L-ラクチドとカプロラクトンとのコポリマーに由来する。微粒子は、種々の分子量の任意の種々の高分子出発物質に由来し得、コポリマーの場合、種々のラクチド：グリコリド比のPLGであり、その選択は、同時投与される高分子に一部依存して、概して選択可能である。これらのパラメーターを、以下により完全に考察する。

30

【0128】

さらなる抗原には、外膜小胞(OMV)調製物も含まれ得る。

40

【0129】

Bosmaら, Appl. Env. Microbiol., 72:880-889, 2006（その内容全体が本明細書中で参考として援用される）に記載のように、抗原を、種々のグラム陽性細菌のペプチドグリカンに吸着させて、グラム陽性エンハンサーマトリックス(gram-positive enhancer matrix)(GEM)粒子を作製することもできる。この方法は、酸処理細胞の細胞壁ペプチドグリカンへのLysMモチーフ(Buistら, J. Bact., 177:1554-63, 1995; Bateman and Bycroft, J. Mol. Biol., 299:1113-19, 2000)の非共有結合に依存する。簡潔に述べれば、1つ以上のLysMモチーフ

50

フに結合した（例えば、非共有結合または共有結合した（例えば、融合タンパク質としてか結合体化による））ポリペプチド抗原を、酸処理したグラム陽性細菌に添加する。抗原ペプチドは抗親和性で結合し、これを、免疫原性組成物中で使用することができる。これらの方法で使用した酸の例には、トリクロロ酢酸（例えば、0.1%～10%）、酢酸（例えば、5.6M）、HCl（例えば、0.01M）、乳酸（例えば、0.72M）、およびギ酸（例えば、0.56M）が含まれる。

【0130】

さらなる処方方法および抗原（特に、腫瘍抗原）は、米国特許出願番号09/581,772号に記載されている。

【0131】

10

抗原の引例

以下の引例は、それぞれがその全体が参考として具体的に援用され、本発明の組成物と併せて有用な抗原を含む。

【0132】

【数1】

国際特許出願 WO99/24578

国際特許出願 WO99/36544.

国際特許出願 WO99/57280.

国際特許出願 WO00/22430.

20

Tettelin ら (2000) Science 287:1809-1815.

国際特許出願 WO96/29412.

Pizza ら (2000) Science 287:1816-1820.

PCT WO 01/52885.

Bjune ら (1991) Lancet 338(8775).

Fuskasawa ら (1999) Vaccine 17:2951-2958.

【0133】

30

【 数 2 】

- Rosenqist ら (1998) Dev. Biol. Strand 92:323-333.
 Costantino ら (1992) Vaccine 10:691-698.
 Costantino ら (1999) Vaccine 17:1251-1263.
 Watson (2000) Pediatr Infect Dis J 19:331-332.
 Rubin (2000) Pediatr Clin North Am 47:269-285,v.
 Jedrzejewski (2001) Microbiol Mol Biol Rev 65:187-207.
- GB0016363.4;WO 02/02606; PCT IB/01/00166
 の優先権を主張する2001年7月3日出願の国際特許出願
- Kalman ら (1999) Nature Genetics 21:385-389.
 Read ら (2000) Nucleic Acids Res 28:1397-406.
 Shirai ら (2000) J. Infect. Dis 181(Suppl 3):S524-S527.
- 国際特許出願 WO99/27105.
 国際特許出願 WO00/27994.
 国際特許出願 WO00/37494.
 国際特許出願 WO99/28475.
- Bell (2000) Pediatr Infect Dis J 19:1187-1188.
 Iwarson (1995) APMIS 103:321-326.
 Gerlich ら (1990) Vaccine 8 Suppl:S63-68 & 79-80.
 Hsu ら (1999) Clin Liver Dis 3:901-915.
 Gastofsson ら (1996) N. Engl. J. Med. 334:349-355.
 Rappuoli ら (1991) TIBTECH 9:232-238.
 Vaccines (1988) 編 Plotkin & Mortimer. ISBN 0-7216-1946-0.
 Del Giudice ら (1998) Molecular Aspects of Medicine 19:1-70.
- 国際特許出願 WO93/018150.
 国際特許出願 WO99/53310.
 国際特許出願 WO98/04702.
- Ross ら (2001) Vaccine 19:135-142.
 Sutter ら (2000) Pediatr Clin North Am 47:287-308.
 Zimmerman および Spann(1999) Am Fam Physician 59:113-118, 125-126.
 Dreensen (1997) Vaccine 15 Suppl"S2-6.
 MMWR Morb Mortal Wkly rep 1998 Jan 16:47(1):12, 9.

10

20

30

【 0 1 3 4 】

40

【数 3】

McMichael (2000) Vaccine 19 Suppl 1:S101-107.

Schuchat (1999) Lancet 353(9146):51-6.

GB 特許出願 0026333.5, 0028727.6 および 0105640.7.

Dale (1999) Infect Dis Clin North Am 13:227-43, viii.

Ferretti ら (2001) PNAS USA 98: 4658-4663.

Kuroda ら (2001) Lancet 357(9264):1225-1240; 1218-1219 ページも参照

Ramsay ら (2001) Lancet 357(9251):195-196.

Lindberg (1999) Vaccine 17 Suppl 2:S28-36.

Buttery および Moxon (2000) J R Coil Physicians Long 34:163-168.

Ahmad および Chapnick (1999) Infect Dis Clin North Am 13:113-133, vii.

Goldblatt (1998) J. Med. Microbiol. 47:663-567.

欧州特許 0 477 508

米国特許第 5,306,492

国際特許出願 WO98/42721

Conjugate Vaccines (Cruse ら 編) ISBN 3805549326, 特に vol. 10:48-114.

Hermanson (1996) Bioconjugate Techniques ISBN: 012323368 & 012342335X.

欧州特許出願 0372501.

欧州特許出願 0378881.

欧州特許出願 0427347.

国際特許出願 WO93/17712.

国際特許出願 WO98/58668.

欧州特許出願 0471177.

国際特許出願 WO00/56360.

国際特許出願 WO00/67161.

融合タンパク質

本発明で使用されるグラム陽性（例えば、肺炎球菌）タンパク質は、それぞれ個別のポリペプチドとして組成物中に存在する。いくつかの実施形態では、少なくとも2つ（すなわち、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、または18）の抗原を、線毛サブユニットを含む単一のポリペプチド鎖（「ハイブリッド」または「融合」ポリペプチド）として発現する。かかる融合ポリペプチドは、以下の2つの主な利点を付与する。第1に、単独で不安定であり得るか不十分に発現し得るポリペプチドを、問題を克服する適切な融合パートナーの付加によって補助することができる。第2に、商業的製造を、共に抗原的に有用である2つのポリペプチドを産生するためにたった1つの発現および精製しか必要がないように簡潔にする。

【0135】

融合ポリペプチドは、1つ以上のグラム陽性（例えば、肺炎球菌）線毛ポリペプチド配列を含むことができる。したがって、本発明は、第1のアミノ酸配列および第2のアミノ酸配列を含む1つ以上の融合ペプチドを含み、第1および第2のアミノ酸配列は、グラム陽性線毛タンパク質またはそのフラグメントから選択される。いくつかの実施形態では、融合ポリペプチド中の第1および第2のアミノ酸配列は、同一タンパク質の異なるエピートープを含む。

【0136】

いくつかの実施形態では、本発明は、2、3、4、5、6、7、8、9、または10個の抗原由来のアミノ酸配列を含むハイブリッド（または融合物）を提供する。いくつかの実施形態では、本発明は、2、3、4、または5個の抗原由来のアミノ酸配列を含むハイブリッドを提供する。

【0137】

異なるハイブリッドポリペプチドを、単一の処方物中に混合することができる。かかる組成物内で、グラム陽性（例えば、肺炎球菌）線毛配列は、1つを超えるハイブリッドポリペプチドおよび/または非ハイブリッドポリペプチド中に存在し得る。いくつかの実施形態では、抗原は、ハイブリッドまたは非ハイブリッドのいずれかとして存在するが、両方では存在しない。

10

【0138】

ハイブリッドポリペプチドを、式： $\text{NH}_2 - \text{A} - \{ - \text{X} - \text{L} - \}_n - \text{B} - \text{COOH}$ （式中、Xは、グラム陽性（例えば、肺炎球菌）線毛タンパク質またはそのフラグメントのアミノ酸配列であり、Lは、任意選択的なリンカーアミノ酸配列であり、Aは、任意選択的なN末端アミノ酸配列であり、Bは、任意選択的なC末端アミノ酸配列であり、nは、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、または15である）で示すことができる。

【0139】

-X-部分がその野生型形態のリーダーペプチド配列である場合、これを、ハイブリッドタンパク質中に含めても省略してもよい。いくつかの実施形態では、ハイブリッドタンパク質のN末端に存在する-X-部分のリーダーペプチド（すなわち、 X_1 のリーダーペプチド）が保持されるが、 $\text{X}_2 \dots \text{X}_n$ のリーダーペプチドが省略されることを除き、リーダーペプチドを欠失する。これは、全リーダーペプチドの欠失および部分-A-としての X_1 のリーダーペプチドの使用と等価である。

20

【0140】

$\{ - \text{X} - \text{L} - \}$ の場合の各nについて、リンカーアミノ酸配列-L-は、存在しても存在しなくても良い。例えば、 $n = 2$ の場合、ハイブリッドは、 $\text{NH}_2 - \text{X}_1 - \text{L}_1 - \text{X}_2 - \text{L}_2 - \text{COOH}$ 、 $\text{NH}_2 - \text{X}_1 - \text{X}_2 - \text{COOH}$ 、 $\text{NH}_2 - \text{X}_1 - \text{L}_1 - \text{X}_2 - \text{COOH}$ 、 $\text{NH}_2 - \text{X}_1 - \text{X}_2 - \text{L}_2 - \text{COOH}$ などであり得る。リンカーアミノ酸配列-L-は、典型的には、短いであろう（例えば、20以下のアミノ酸（すなわち、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、1））。例は、クローニングを容易にする短いペプチド配列、ポリグリシンリンカー（すなわち、 Gly_n （式中、 $n = 2、3、4、5、6、7、8、9$ 、またはそれを超える）を含む）、およびヒスチンタグ（すなわち、 His_n （式中、 $n = 3、4、5、6、7、8、9、10$ 、またはそれを超える））を含む。他の適切なリンカーアミノ酸配列は、当業者に明らかである。有用なリンカーは、GSGGGG（配列番号53）（ $\text{Gly} - \text{Ser}$ ペプチドがBamHI制限部位から形成され、それにより、クローニングおよび操作を補助し、 $(\text{Gly})_4$ テトラペプチドが典型的なポリグリシンリンカーである）である。

30

【0141】

いくつかの実施形態では、-A-は、任意選択的なN末端アミノ酸配列である。これは、典型的には、短いであろう（例えば、40またはそれ未満のアミノ酸（すなわち、39、38、37、36、35、34、33、32、31、30、29、28、27、26、25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、1））。例には、タンパク質輸送を指示するためのリーダー配列またはクローニングまたは精製を容易にするための短いペプチド（例えば、ヒスチンタグ（すなわち、 His_n （式中、 $n = 3、4、5、6、7、8、9、10$ 、またはそれを超える）））が含まれる。他の適切なN末端アミノ酸配列は、当業者に明らかである。 X_1 がそれ自体のN末端メチオニンを欠く場合、いくつかの実施形態では、-A-はN末端メチオニンが得られるオリゴペプチド（例えば、1、2、3

40

50

、4、5、6、7、または8個のアミノ酸を有する)である。

【0142】

いくつかの実施形態では、-B-は、任意選択的なC末端アミノ酸配列である。これは、典型的には、短いであろう(例えば、40またはそれ未満のアミノ酸(すなわち、39、38、37、36、35、34、33、32、31、30、29、28、27、26、25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、1))。例には、タンパク質輸送を指示するための配列、クローニングまたは精製を容易にするための短いペプチド(例えば、ヒスチジンタグ(すなわち、His_n(式中、n=3、4、5、6、7、8、9、10、またはそれを超える))、またはタンパク質安定性を増強する配列が含まれる。他の適切なC末端アミノ酸配列は、当業者に明らかである。

10

【0143】

いくつかの実施形態では、nは2または3である。

【0144】

免疫原性組成物および薬物

いくつかの実施形態では、本発明の組成物は、免疫原性組成物である。いくつかの実施形態では、組成物は、ワクチン組成物である。いくつかの実施形態では、組成物のpHは、6と8との間であり、いくつかの実施形態では、約7である。緩衝液の使用によってpHを維持することができる。組成物は、滅菌および/または無発熱物質であり得る。組成物は、ヒトに関して等張であり得る。いくつかの実施形態では、組成物は、滅菌注射用組成物である。

20

【0145】

本発明のワクチンは、予防用(すなわち、感染を防止する)または治療用(すなわち、感染を処置する)のいずれかであり得る。したがって、本発明は、動物に治療または予防量の本発明の組成物を投与する工程を含む、かかるグラム陽性細菌(例えば、肺炎球菌)感染に感受性を示す動物におけるグラム陽性細菌(例えば、肺炎球菌)感染の治療的または予防的処置方法を提供する。例えば、本発明は、動物に治療または予防量の本発明の組成物を投与する工程を含む、連鎖球菌感染に感受性を示す動物における肺炎球菌感染の治療的または予防的処置方法を含む。

【0146】

本発明はまた、薬物として本明細書中に記載の組成物を使用するための本発明の組成物を提供する。いくつかの実施形態では、薬物は、哺乳動物における免疫応答を誘発する(すなわち、免疫原性組成物である)。いくつかの実施形態では、薬物はワクチンである。

30

【0147】

本発明はまた、哺乳動物における免疫応答を惹起するための薬物の製造における本発明の組成物の使用を提供する。いくつかの実施形態では、薬物はワクチンである。

【0148】

本発明はまた、本発明の組成物の1つ以上の容器を含むキットを提供する。組成物は、個別の抗原であり得る場合、液体形態または凍結乾燥であり得る。組成物のための適切な容器には、例えば、ボトル、バイアル、シリンジ、および試験管が含まれる。容器を、種々の材料(ガラスまたはプラスチックが含まれる)から形成することができる。容器は、滅菌アクセスポートを有することができる(例えば、容器は、静脈注射用液用バッグまたは皮下注射針によって突き刺すことができるストッパーを有するバイアルであり得る)。組成物は、1つ以上のグラム陽性(例えば、肺炎球菌)線毛または線毛タンパク質を含む第1の成分を含むことができる。いくつかの実施形態では、グラム陽性線毛または線毛タンパク質は、オリゴマー形態またはハイパーオリゴマー形態である。

40

【0149】

キットは、薬学的に許容可能な緩衝液(リン酸緩衝化生理食塩水、リンゲル液、またはデキストロース溶液など)を含む第2の容器をさらに含むことができる。最終使用者に有用な他の材料(他の緩衝液、希釈剤、フィルター、針、およびシリンジが含まれる)も含

50

むことができる。キットはまた、別の活性成分 (a c t i v e a g e n t) (例えば、抗生物質) を有する第 2 または第 3 の容器を含むことができる。

【 0 1 5 0 】

キットはまた、グラム陽性細菌 (例えば、肺炎球菌) に対する免疫の誘導またはグラム陽性細菌感染の処置についての書面での指示を含む添付文書を含むことができる。添付文書は、非承認の添付文書または食品医薬品局 (F D A) もしくは他の規制機関によって承認された添付文書であり得る。

【 0 1 5 1 】

本発明はまた、本発明の免疫原性組成物を予め充填した送達デバイスを提供する。

【 0 1 5 2 】

本発明はまた、有効量の本発明の組成物を投与する工程を含む、哺乳動物において免疫応答を誘導する方法を提供する。免疫応答は、いくつかの実施形態では、防御的であり、抗体および / または細胞媒介免疫を含む。この免疫応答は、好ましくは、持続性 (例えば、中和) 抗体 1 つ以上のグラム陽性 (例えば、肺炎球菌) 抗原への曝露の際に迅速に応答することができるおよび細胞性免疫を誘導するであろう。本方法は、追加免疫応答を惹起することができる。

【 0 1 5 3 】

本発明は、有効量の本発明の免疫原性組成物、本発明のワクチン、または本発明の免疫原性組成物を認識する抗体を哺乳動物に投与する工程を含む、哺乳動物におけるグラム陽性細菌 (例えば、肺炎球菌) 感染を中和する方法を提供する。

【 0 1 5 4 】

いくつかの実施形態では、哺乳動物はヒトである。ワクチンが予防用である場合、ヒトは、男性または女性 (出産適齢期またはティーンエイジャーのいずれか) であり得る。あるいは、ヒトは、高齢者 (例えば、50、55、60、65、70、または75を超える) であってよく、糖尿病または癌などの基礎疾患を有し得る。いくつかの実施形態では、ヒトは、妊婦または高齢者である。

【 0 1 5 5 】

いくつかの実施形態では、これらの使用および方法は、グラム陽性細菌 (例えば、肺炎球菌) によって生じる疾患の防止および / または治療のためのものである。組成物は、他の連鎖球菌細菌に対しても有効であり得る。組成物は、他のグラム陽性細菌に対しても有効であり得る。

【 0 1 5 6 】

治療上の処置の 1 つのチェック方法は、1 つ以上の本発明の組成物の投与後にグラム陽性 (例えば、肺炎球菌) 細菌感染をモニタリングする工程を含む。組成物中のグラム陽性 (例えば、肺炎球菌) 抗原に対する免疫応答を、組成物の投与にモニタリングすることができる。

【 0 1 5 7 】

本発明の免疫原性組成物の成分タンパク質の免疫原性の 1 つの制限されない評価方法は、タンパク質を組換え的に発現し、免疫プロットによって血清または粘液の分泌をスクリーニングすることである。タンパク質と患者の血清との間の陽性反応は、患者が問題のタンパク質に対する免疫応答を以前に開始していた (すなわち、タンパク質が免疫原である) ことを示す。この方法を使用して、免疫優性タンパク質および / またはエピトープを同定することもできる。

【 0 1 5 8 】

治療上の処置の有効性の別の制限されないチェック方法は、本発明の組成物の投与後にグラム陽性細菌 (例えば、肺炎球菌) 感染をモニタリングする工程を含む。予防上の処置の有効性の 1 つのチェック手段は、組成物の投与後の本発明の組成物中のグラム陽性 (例えば、肺炎球菌) 抗原に体する全身性 (I g G 1 および I g G 2 a 産生レベルのモニタリングなど) および粘膜性 (I g A 産生レベルのモニタリングなど) の免疫応答をモニタリングする工程を含む。典型的には、グラム陽性細菌血清特異的抗体応答を、免疫化後であ

10

20

30

40

50

るが攻撃誘発前に決定する。

【0159】

本発明のワクチン組成物を、いくつかの実施形態では、宿主（例えば、ヒト）への投与前に、*in vitro*および*in vivo*動物モデルで評価することができる。

【0160】

本発明の免疫原性組成物の有効性を、免疫原性組成物でのグラム陽性細菌（例えば、肺炎球菌）感染の動物モデル（例えば、モルモットまたはマウス）の攻撃誘発によって*in vivo*で決定することもできる。免疫原性組成物は、攻撃誘発血清型と同一の血清型に由来しても由来しなくても良い。いくつかの実施形態では、免疫原性組成物は、攻撃誘発血清型と同一の血清型から誘導することができる。いくつかの実施形態では、免疫原性組成物および/または攻撃誘発血清型は、グラム陽性（例えば、肺炎球菌）血清型から誘導可能である。

10

【0161】

*in vivo*有効性モデルには、(i)ヒトグラム陽性細菌（例えば、肺炎球菌）血清型を使用するマウス感染モデル、(ii)マウス適合グラム陽性細菌（例えば、肺炎球菌）株（マウスにおいて特に毒性のある株など）を使用したマウスモデルであるマウス疾患モデル、および(iii)ヒトグラム陽性細菌（例えば、肺炎球菌）単離物を使用した霊長類モデルが含まれるが、これらに限定されない。

【0162】

免疫応答は、TH1免疫応答およびTH2応答の一方または両方であり得る。

20

【0163】

免疫応答は、改良されているか、増強されているか、変化した免疫応答であり得る。

【0164】

免疫応答は、全身性免疫応答および粘膜性免疫応答であり得る。

【0165】

いくつかの実施形態では、免疫応答は、増強された全身および/または粘膜応答である。

【0166】

増強された全身および/または粘膜免疫は、増強されたTH1および/またはTH2免疫応答を反映する。いくつかの実施形態では、増強された免疫応答には、IgG1および/またはIgG2aおよび/またはIgAの産生の増加が含まれる。

30

【0167】

いくつかの実施形態では、粘膜免疫応答はTH2免疫応答である。いくつかの実施形態では、粘膜免疫応答には、IgA産生の増加が含まれる。

【0168】

活性化されたTH2細胞は、抗体産生を増強し、したがって、細胞外感染に対する応答で有益である。活性化されたTH2細胞は、1つ以上のIL-4、IL-5、IL-6、およびIL-10を分泌することができる。TH2免疫応答は、さらなる防御のためにIgG1、IgE、IgA、および記憶B細胞を産生することができる。

【0169】

TH2免疫応答には、TH2免疫応答に関連する1つ以上のサイトカイン（IL-4、IL-5、IL-6、およびIL-10など）の増加またはIgG1、IgE、IgA、および記憶B細胞の産生の増加の1つ以上が含まれ得る。いくつかの実施形態では、増強されたTH2免疫応答には、IgG1産生の増加が含まれるであろう。

40

【0170】

TH1免疫応答には、CTLの増加、TH1免疫応答に関連する1つ以上のサイトカイン（IL-2、IFN- γ 、およびTNF β など）の増加、活性化マクロファージの増加、NK活性の増加、またはIgG2産生の増加の1つ以上が含まれ得る。いくつかの実施形態では、増強されたTH1免疫応答には、IgG2産生の増加が含まれるであろう。

【0171】

50

本発明の免疫原性組成物、特に、1つ以上の本発明のグラム陽性（例えば、肺炎球菌）線毛抗原を、単独または任意選択的にTh1および/またはTh2応答を誘発することができる免疫調節薬と共に他の抗原と組み合わせて使用することができる。

【0172】

本発明の組成物を、一般に、患者に直接投与するであろう。一定の組成物には一定の経路が好ましく、その結果、より有効な免疫応答、好ましくはCMI応答が得られるか、副作用を誘導する可能性が低くなるか、投与がより容易になり得る。非経口注射（例えば、皮下、腹腔内、皮内、静脈内、筋肉内、または組織の間質腔）、直腸、経口（例えば、錠剤、噴霧）、腔内、局所、経皮（例えば、WO99/27961号を参照のこと）、経皮（例えば、WO02/074244号およびWO02/064162号を参照のこと）、鼻腔内（例えば、WO03/028760号を参照のこと）、眼内、耳腔内、肺内、または他の粘膜投与によって直接送達することができる。

10

【0173】

いくつかの実施形態では、本発明を使用して、全身免疫および/または粘膜免疫を誘発することができる。

【0174】

いくつかの実施形態では、免疫原性組成物は、中和抗体応答を誘発する1つ以上のグラム陽性（例えば、肺炎球菌）線毛抗原および細胞性免疫応答を誘発する1つ以上のグラム陽性（例えば、肺炎球菌）線毛抗原を含む。いくつかの実施形態では、中和抗体応答は、初期グラム陽性細菌感染を防止または阻害する一方で、増強されたTh1細胞応答を誘発することができる細胞性免疫応答は感染のさらなる拡大を防止する。免疫原性組成物は、1つ以上のグラム陽性線毛抗原および1つ以上の非線毛グラム陽性抗原（例えば、細胞質抗原）を含むことができる。いくつかの実施形態では、免疫原性組成物は、1つ以上のグラム陽性表面抗原などおよび1つ以上の他の抗原（Th1細胞応答を誘発することができる細胞質抗原など）を含む。

20

【0175】

投薬処置（Dosage treatment）は、単回投与計画または複数回投与計画であり得る。複数回投与計画を、一次免疫計画および/または追加免疫計画で実施することができる。複数回投与計画では、種々の用量を、同一または異なる経路（例えば、非経口一次投与および粘膜追加免疫、粘膜一次投与および非経口追加免疫など）で投与することができる。

30

【0176】

本発明の組成物を、種々の形態で調製することができる。例えば、組成物を、注射液（溶液または懸濁液のいずれか）として調製することができる。注射前の溶液、懸濁液、液体ビヒクルに適切な固体形態も調製することができる（例えば、凍結乾燥組成物）。組成物を、局所投与のために、例えば、軟膏、クリーム、または粉末として調製することができる。組成物を、経口投与のために、例えば、錠剤またはカプセル、噴霧、またはシロップ（任意選択的に、風味づけした）として調製することができる。組成物を、例えば、肺投与のために、微粉末または噴霧を使用した吸入物質（inhaler）として調製することができる。組成物を、座剤またはペッサリーとして調製することができる。組成物を、鼻腔内、耳腔内、または眼内投与のために、例えば、点滴薬として調製することができる。組成物を、組み合わせた組成物が患者への投与直前に再構成されるようにデザインされたキット形態であり得る。かかるキットは、液体形態の1つ以上の抗体および1つ以上の凍結乾燥抗体を含むことができる。

40

【0177】

ワクチンとして使用される免疫原性組成物は、免疫学的有効量の抗原および任意の他の成分（抗体など）（必要に応じて）を含む。「免疫学的有効量」は、単回投与または一連の投与の一部のいずれかでのその抗体への投与が治療または防止に有効であるか、重要な免疫応答を増加させるか、臨床症状を防止または減少させることを意味する。この量は、治療を受ける個体の結構状態および身体の状態、年齢、治療を受ける個体（例えば、非ヒト

50

霊長類、霊長類など)の分類群、個体の免疫応答が抗体を合成する能力、所望の防御の程度、ワクチンの処方、担当医による医学的状態の評価および他の関連する要因によって変化する。量は、日常的試験によって決定することができる比較的広い範囲内にあるであろうと予想される。

【0178】

組成物のさらなる成分

本発明の組成物は、典型的には、上記成分に加えて、1つ以上の「薬学的に許容可能なキャリア」を含み、このキャリアには、キャリア自体が組成物を投与する個体に有害な抗体の産生を誘導しない任意のキャリアが含まれる。適切なキャリアは、典型的には、タンパク質、多糖、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、高分子アミノ酸、アミノ酸コポリマー、および脂質凝集体(油性液滴またはリポソームなど)などの巨大でゆっくり代謝される高分子である。かかるキャリアは、当業者に周知である。ワクチンは、水、生理食塩水、グリセロールなどの希釈剤も含むことができる。さらに、湿潤剤または乳化剤、およびpH緩衝化剤などの補助剤が存在することができる。薬学的に許容可能な賦形剤の徹底的な考察は、Gennaro(2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th ed., ISBN: 0683306472で利用可能である。

10

【0179】

アジュバント

本発明のワクチンを、他の免疫調節薬と併せて投与することができる。特に、組成物は、通常、1つ以上のアジュバントを含むであろう。本発明と共に使用するアジュバントには、1つ以上の下記のアジュバントが含まれるが、これらに限定されない。

20

【0180】

A. ミネラル含有組成物

本発明でアジュバントとしての使用に適切なミネラル含有組成物には、アルミニウム塩およびカルシウム塩などのミネラル塩が含まれる。本発明は、水酸化物(例えば、オキシヒドロキシド)、リン酸塩(例えば、ヒドロキシリン酸塩、正リン酸塩)、硫酸塩などのミネラル塩(例えば、chapters 8 & 9 of Vaccine Design... (1995) eds. Powell & Newman, ISBN: 030644867X, Plenum, を参照のこと)、または異なるミネラル化合物と任意の適切な形態を取る化合物(例えば、ゲル、結晶、無定形など)との混合物(例えば、任意選択的に過剰なリン酸塩を含むリン酸塩とヒドロキシドアジュバントとの混合物)が含まれ、塩への吸着が好ましい。ミネラル含有組成物を、菌属塩粒子として処方することもできる(WO00/23105号)。

30

【0181】

Al³⁺の用量が0.2mg/用量と1.0mg/用量との間であるように、アルミニウム塩を本発明のワクチンに含めることができる。

【0182】

B. 油性乳濁液

本発明のアジュバントとしての使用に適切な油性乳濁液組成物は、スクアレン-水乳濁液(MF59(マイクロフルイダイザー(microfluidizer)を使用してサブミクロン粒子に処方した5%スクアレン、0.5%Tween(商標)80、および0.5%Span(商標)85)など)を含む。WO90/14837号を参照のこと。Podda, "The adjuvanted influenza vaccines with novel adjuvants: experience with the MF59-adjuvanted vaccine", Vaccine(2001)19:2673-2680; Frey, "Comparison of the safety, tolerability, and immunogenicity of a MF59-adjuvanted influenza vaccine and a non-adjuvanted influenza vaccine in non

40

50

- elderly adults", Vaccine (2003) 21: 4234-4237 も参照のこと。MF59を、FLUAD (商標) インフルエンザウイルス3価サブユニットワクチン中のアジュバントとして使用する。

【0183】

いくつかの実施形態では、組成物中で使用するためのアジュバントは、サブミクロン水中油滴型乳濁液である。いくつかの実施形態では、本明細書中で使用するためのサブミクロン水中油滴型乳濁液は、任意選択的に種々の量のMTP-PEを含むスクアレン/水乳濁液(4~5%w/v スクアレン、0.25~1.0%w/v Tween (商標) 80 (ポリオキシエチレンソルビタンモノオレアート)、および/または0.25~1.0% Span (商標) 85 (ソルビタントリオレアート)、および、任意選択的に、N-アセチルムラミル-L-アラニル-D-イソグルタミンル-L-アラニン-2-(1'-2'-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ヒドロキシホスホリルオキシ(hydroxyphosphoryloxy))-エチルアミン(MTP-PE)を含むサブミクロン水中油滴型乳濁液など(例えば、「MF59」として公知のサブミクロン水中油滴型乳濁液(国際公開番号WO90/14837号; 米国特許第6,299,884号および同第6,451,325号(その全体が本明細書中で参考として援用される); およびOttら, "MF59-Design and Evaluation of a Safe and Potent Adjuvant for Human Vaccines" in Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach (Powell, M.F. and Newman, M.J. eds:) Plenum Press, New York, 1995, pp. 277-296)である。MF59は、4~5%w/vスクアレン(例えば、4.3%)、0.25~0.5%w/v Tween 80 (商標)、および0.5%w/v Span 85 (商標)を含み、任意選択的に、種々の量のMTP-PEを含み、Model 110 Yマイクロフルイダイザー(Microfluidics, Newton, MA.)などのマイクロフルイダイザーを使用してサブミクロン粒子に処方する。例えば、MTP-PEは、約0~500μg/用量、約0~250μg/用量、および約0~100μg/用量の量で存在し得る。本明細書中で使用する場合、用語「MF59-0」は、MTP-PEを欠く上記サブミクロン水中油滴型乳濁液をいう一方で、用語「MF59-MTP」は、MTP-PEを含む処方物を示す。例えば、「MF59-100」は、100μg MTP-PE/用量などを含む。MF69(本明細書中で使用するための別のサブミクロン水中油滴型乳濁液)は、4.3%w/vスクアレン、0.25%w/v Tween 80 (商標)、および0.75%w/v Span 85 (商標)、および任意選択的にMTP-PEを含む。さらに別のサブミクロン水中油滴型乳濁液は、MF75であり、SAFとしても公知であり、10%スクアレン、0.4% Tween 80 (商標)、5%プルロニックブロック重合体L121、およびthr-MDPを含み、これもサブミクロン乳濁液に微小流動化(microfluidized)されている。MF75-MTPは、MTP(100~400μg MTP-PE/用量など)を含むMF75処方物を示す。

【0184】

組成物中で使用するためのサブミクロン水中油滴型乳濁液、その作製方法、および免疫賦活剤(ムラミルペプチドなど)は、国際公開番号WO90/14837号ならびに米国特許第6,299,884号および同第6,451,325号(その全体が本明細書中で参考として援用される)に詳述されている。

【0185】

フロイント完全アジュバント(CFA)およびフロイント不完全アジュバント(IFA)を、本発明でアジュバントとして使用することもできる。

【0186】

C. サポニン処方物

サポニン処方物を、本発明でアジュバントとして使用することもできる。サポニンは、ステロールグリコシドおよびトリテルペノイドグリコシドの異種群であり、広範な植物種

の樹皮、葉、幹、根、およびさらに花に見出される。キラヤ (*Quillaja saponaria* Molina) 樹皮由来のサポニンは、アジュバントとして広く研究されている。スミラック・オルナタ (*Smilax ornata*) (サルサパリラ (*sarsapilla*))、シュッコンカスミソウ (ブライダルベール (*brides veil*))、サポナリア・オフィシアナリス (*Saponaria officinalis*) (サボンソウ根 (*soap root*)) 由来のサポニンはまた、市販されている。サポニンアジュバント処方物には、精製処方物 (QS 21) および脂質処方物 (ISCOM など) が含まれる。

【0187】

サポニン組成物は、高速薄層クロマトグラフィ (HP-LC) および逆相高速液体クロマトグラフィ (RP-HPLC) を使用して精製されている。これらの技術を使用した特定の精製画分は、同定されている (QS 7、QS 17、QS 18、QS 21、QH-A、QH-B、および QH-C が含まれる)。好ましくは、サポニンは QS 21 である。QS 21 の産生方法は、米国特許第 5,057,540 号に開示されている。サポニン処方物は、コレステロールなどのステロールも含むことができる (WO 96/33739 号を参照のこと)。

10

【0188】

サポニンとコレステロールとの組み合わせを使用して、免疫賦活複合体 (ISCOM) と呼ばれる固有の粒子を形成することができる。ISCOM は、典型的には、ホスファチジルエタノールアミンまたはホスファチジルコリンなどのリン脂質も含む。任意の公知のサポニンを、ISCOM で使用することができる。いくつかの実施形態では、ISCOM は、1つ以上の Quil A、QHA、および QHC を含む。ISCOM は、欧州特許第 0109942 号、WO 96/11711 号、および WO 96/33739 号にさらに記載されている。任意選択的に、ISCOMs は、さらなる界面活性剤を欠くことができる。WO 00/07621 号を参照のこと。

20

【0189】

サポニンベースのアジュバントの開発についての概説を、Barr, R., "ISCOMs and other saponin based adjuvants", *Advanced Drug Delivery Reviews* (1998) 32:247-271 に見出すことができる。Sjolander, R., "Uptake and adjuvant activity of orally delivered saponin and ISCOM vaccines", *Advanced Drug Delivery Reviews* (1998) 32:321-338 も参照のこと。

30

【0190】

D. ビロソームおよびウイルス様粒子 (VLP)

ビロソームおよびウイルス様粒子 (VLP) を、本発明でアジュバントとして使用することもできる。これらの構造は、一般に、任意選択的にリン脂質と組み合わせるか配合したウイルス由来の1つ以上のタンパク質を含む。これらは、一般に、非病原性、非複製性であり、一般に、未変性のウイルスゲノムを含まない。ウイルスタンパク質を、組換え的に産生するか、全ウイルスから単離することができる。ビロソームまたは VLP の使用に適切なこれらのウイルスタンパク質には、インフルエンザウイルス (HA または NA)、B 型肝炎ウイルス (コアまたはキャプシドタンパク質など)、E 型肝炎ウイルス、麻疹ウイルス、シンドビス・ウイルス、ロタウイルス、口蹄疫ウイルス、レトロウイルス、ノーウォークウイルス、ヒト乳頭腫ウイルス、HIV、RNA-ファージ、Q β -ファージ (コートタンパク質)、GA-ファージ、fr-ファージ、AP205 ファージ、および Ty (レトロトランスポゾン Ty タンパク質 pl など) 由来のタンパク質が含まれる。VLP は、WO 03/024480 号、WO 03/024481 号、および Niikura, R., "Chimeric Recombinant Hepatitis E Virus-Like Particles as an Oral Vaccine Vehicle Presenting Foreign Epitopes", *Virolog*

40

50

y (2002) 293:273-280; Lenzら, "Papillomavirus-Like Particles Induce Acute Activation of Dendritic Cells", Journal of Immunology (2001) 5246-5355; Pinto, ら., "Cellular Immune Responses to Human Papillomavirus (HPV) - 16 L1 Healthy Volunteers Immunized with Recombinant HPV - 16 L1 Virus-Like Particles", Journal of Infectious Diseases (2003) 188:327-338; および Gerberら, "Human Papillomavirus Virus-Like Particles Are Efficient Oral Immunogens when Coadministered with Escherichia coli Heat-Labile Enterotoxin Mutant R192G or CpG", Journal of Virology (2001) 75(10):4752-4760 にさらに考察されている。ピロソームは、例えば、Gluckら, "New Technology Platforms in the Development of Vaccines for the Future", Vaccine (2002) 20:B10-B16 でさらに考察されている。免疫増強再構成インフルエンザピロソーム (IRIV) を、鼻腔内3価INFL EXAL (商標) 製品 (Mischler & Metcalfe (2002) Vaccine 20 Suppl 5:B17-23) および INFLUVAC PLUS (商標) 製品におけるサブユニット抗原送達系として使用する。

【0191】

E. 細菌または微生物誘導体

いくつかの実施形態では、本発明での使用に適切なアジュバントには、以下などの細菌または微生物誘導体が含まれる。

【0192】

(1) 腸内細菌リポ多糖 (LPS) の非毒性誘導体

かかる誘導体には、モノホスホリル脂質 A (MPL) および 3-O-脱アシル化 MPL (3dMPL) が含まれる。3dMPL は、3-O-脱アシル化モノホスホリル脂質 A と 4、5、または 6 つのアシル化鎖との混合物である。3-O-脱アシル化ホスホリル脂質 A の「小粒子」形態の非限定的な例は、欧州特許第 0 689 454 号に開示されている。3dMPL のかかる「小粒子」は、0.22 ミクロン膜で濾過滅菌するのに十分に小さい (欧州特許第 0 689 454 号を参照のこと)。他の非毒性 LPS 誘導体には、モノホスホリル脂質 A 模倣物 (アミノアルキルグルコサミニドリン酸誘導体など (例えば、RC-529)) が含まれる。Johnsonら (1999) Bioorg Med Chem Lett 9:2273-2278 を参照のこと。

【0193】

(2) 脂質 A 誘導体

脂質 A 誘導体には、OM-174 などの大腸菌由来の脂質 A の誘導体が含まれる。OM-174 は、例えば、Meraldiら, "OM-174, a New Adjuvant with a Potential for Human Use, Induces a Protective Response with Administered with the Synthetic C-Terminal Fragment 242-310 from the circumsporozoite protein of Plasmodium berghei", Vaccine (2003) 21:2485-2491; および Pajak, ら., "The Adjuvant OM-174 induces both the migration and maturation of murine dendritic cells in vivo", Vaccine (2003) 21:836-842 に記載されている。

【0194】

10

20

30

40

50

(3) 免疫賦活性オリゴヌクレオチド

本発明でのアジュバントとしての使用に適切な免疫賦活性オリゴヌクレオチドには、CpGモチーフ（非メチル化シトシンおよびその後にはグアノシンを含み、リン酸結合によって結合した配列）を含むヌクレオチド配列が含まれる。回文配列またはポリ（dG）配列を含む細菌二本酸RNAまたはオリゴヌクレオチドも免疫賦活性を示した。

【0195】

CpGは、ホスホチオアート修飾などのヌクレオチド修飾物／アナログを含むことができ、二本鎖または一本鎖であり得る。任意選択的に、グアノシンを、2'-デオキシ-7-デアザグアノシンに置換することができる。可能なアナログ置換の例については、Kandimalla, ら., "Divergent synthetic nucleotide motif recognition pattern: design and development of potent immunomodulatory oligodeoxyribonucleotide agents with distinct cytokine induction profiles", *Nucleic Acids Research* (2003) 31(9): 2393-2400; WO 02/26757号およびWO 99/62923号を参照のこと。CpGオリゴヌクレオチドのアジュバント効果は、Krieg, "CpG motifs: the active ingredient in bacterial extracts?", *Nature Medicine* (2003) 9(7): 831-835; McCluskie, ら., "Parenteral and mucosal prime-boost immunization strategies in mice with hepatitis B surface antigen and CpG DNA", *FEMS Immunology and Medical Microbiology* (2002) 32: 179-185; WO 98/40100号; 米国特許第6,207,646号; 米国特許第6,239,116号、および米国特許第6,429,199でさらに考察されている。

【0196】

CpG配列は、TLR9（モチーフGTCGTT（配列番号54）またはTTCGTT（配列番号55）など）に指向し得る。Kandimalla, ら., "Toll-like receptor 9: modulation of recognition and cytokine induction by novel synthetic CpG DNAs", *Biochemical Society Transactions* (2003) 31(part 3): 654-658を参照のこと。CpG配列は、TH1免疫応答の誘導に特異的であり得るか（CpG-A ODNなど）、B細胞応答の誘導により特異的であり得る（CpG-B ODNなど）。CpG-AおよびCpG-B ODNは、Blackwell, ら., "CpG-A-Induced Monocyte IFN-gamma-Inducible Protein-10 Production is Regulated by Plasmacytoid Dendritic Cell Derived IFN-alpha", *J. Immunol.* (2003) 170(8): 4061-4068; Krieg, "From A to Z on CpG", *TRENDS in Immunology* (2002) 23(2): 64-65およびWO 01/95935号で考察されている。好ましくは、CpGはCpG-A ODNである。

【0197】

いくつかの実施形態では、5'末端が受容体認識に利用しやすいようにCpGオリゴヌクレオチドを構築する。任意選択的に、2つのCpGオリゴヌクレオチド配列をその3'末端で結合して、「イムノマー（immunomer）」を形成することができる。例えば、Kandimalla, ら., "Secondary structures in CpG oligonucleotides affect immunostimulatory activity", *BBRC* (2003) 306: 948-953; K

10

20

30

40

50

andimala, R., "Toll-like receptor 9: modulation of recognition and cytokine induction by novel synthetic CpG DNAs", *Biochemical Society Transactions* (2003) 31 (part 3): 664 - 658; Bhagat R., "CpG penta- and hexadeoxyribonucleotides as potent immunomodulatory agents" *BBRC* (2003) 300: 853 - 861 および WO 03/035836 号を参照のこと。

【0198】

(4) ADP - リボシル化毒素およびその解毒誘導体

細菌 ADP - リボシル化毒素およびその解毒誘導体を、本発明でアジュバントとして使用することができる。いくつかの実施形態では、タンパク質は、大腸菌に由来する（すなわち、大腸菌熱不安定性エンテロトキシン（「LT」）、コレラ（「CT」）、または百日咳（「PT」）。粘膜アジュバントとしての解毒 ADP - リボシル化毒素の使用は、WO 95/17211 号に記載されており、非経口アジュバントとしての使用は WO 98/42375 号に記載されている。いくつかの実施形態では、アジュバントは、LT - K63、LT - R72、および LTR192G などの解毒 LT 変異体である。ADP - リボシル化毒素およびその解毒誘導体、特に、LT - K63 および LT - R72 のアジュバントとしての使用は、以下の引例に見出すことができ、それぞれ、その全体が本明細書中で参考として具体的に援用される：Beignon, R., "The LTR72 Mutant of Heat-Labile Enterotoxin of *Escherichia coli* Enhances the Ability of Peptide Antigens to Elicit CD4+ T Cells and Secrete Gamma Interferon after Coapplication onto Bare Skin", *Infection and Immunity* (2002) 70(6): 3012 - 3019; Pizza, R., "Mucosal vaccines: non toxic derivatives of LT and CT as mucosal adjuvants", *Vaccine* (2001) 19: 2534 - 2541; Pizza, R., "LTK63 and LTR72, two mucosal adjuvants ready for clinical trials" *Int. J. Med. Microbiol* (2000) 290(4-5): 455 - 461; Scharton-Kersten R., "Transcutaneous Immunization with Bacterial ADP-Ribosylating Exotoxins, Subunits and Unrelated adjuvants", *Infection and Immunity* (2000) 68(9): 5306 - 5313; Ryan R., "Mutants of *Escherichia coli* Heat-Labile Toxin Act as Effective Mucosal Adjuvants for Nasal Delivery of an Acellular Pertussis Vaccine: Differential Effects of the Nontoxic AB Complex and Enzyme Activity on Th1 and Th2 Cells" *Infection and Immunity* (1999) 67(12): 6270 - 6280; Partidos R., "Heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli* and its site-directed mutant LTK63 enhance the proliferative and cytotoxic T-cell responses to intranasally co-immunized synthetic peptides", *Immunol. Lett.* (1999) 67(3): 209 - 216; Peppoloni R., "Mutants of the *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin as safe an

10

20

30

40

50

d strong adjuvants for intranasal delivery of vaccines", Vaccines (2003) 2 (2): 285 - 293; and Pineira, (2002) "Intranasal immunization with influenza vaccine and a detoxified mutant of heat labile enterotoxin from Escherichia coli (LTK63)" J. Control Release (2002) 85 (1 - 3): 263 - 270。アミノ酸置換についての多数の引例は、好ましくは、Domenighiniら, Mol. Microbiol. (1995) 15 (6): 1165 - 1167 (その全体が本明細書中で参考として具体的に援用される)に記載のADP - リボシル化毒素のAおよびBサブユニットのアラインメントに基づく。

10

【0199】

F. 生体接着剤および粘膜接着剤

生体接着剤および粘膜接着剤を、本発明でアジュバントとして使用することもできる。適切な生体接着剤には、エステル化ヒアルロン酸ミクロスフィア (Singhら (2001) J. Cont. Rel. 70: 267 - 276) または粘膜接着剤 (ポリ (アクリル酸)、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、多糖、およびカルボキシメチルセルロースの架橋誘導体など) が含まれる。キトサンおよびその誘導体も、本発明でアジュバントとして使用することもできる。例えば、WO 99 / 27960号を参照のこと。

20

【0200】

G. 微粒子

微粒子を、本発明でアジュバントとして使用することもできる。微粒子 (すなわち、直径 100 nm ~ 150 μm、直径 200 nm ~ 30 μm、および直径 500 nm ~ 10 μm の粒子) を、生分解性且つ非毒性の材料 (例えば、ポリ (α - ヒドロキシ酸)、ポリヒドロキシ酪酸、ポリオルソエステル、ポリ酸無水物、ポリカプロラクトンなど) から形成した。材料は、任意選択的に負電荷の表面 (例えば、SDS を使用) または正電荷の表面 (例えば、CTAB などのカチオン性界面活性剤を使用) を有する用に処理したポリ (ラクチド - コ - グリコリド) が好ましい。

【0201】

H. リポソーム

アジュバントとしての使用に適切なりポソーム処方物の例は、米国特許第 6,090,406号、米国特許第 5,916,588号、および欧州特許第 0626169号に記載されている。

30

【0202】

I. ポリオキシエチレンエーテル処方物およびポリオキシエチレンエステル処方物

いくつかの実施形態では、本発明での使用に適切なアジュバントには、ポリオキシエチレンエーテルおよびポリオキシエチレンエステルが含まれる。WO 99 / 52549。かかる処方物には、さらに、オクトキシノールと組み合わせたポリオキシエチレンソルビタンエステル界面活性剤 (WO 01 / 21207号) および少なくとも1つのさらなる非イオン性界面活性剤 (オクトキシノールなど) と組み合わせたポリオキシエチレンアルキルエーテルまたはエステル界面活性剤 (WO 01 / 21152号) が含まれる。

40

【0203】

いくつかの実施形態では、ポリオキシエチレンエーテルは、以下の群から選択される: ポリオキシエチレン - 9 - ラウリルエーテル (ラウレス (laureth) 9)、ポリオキシエチレン - 9 - ステオリルエーテル (steoryl ether)、ポリオキシエチレン (polyoxyethylene) - 8 - ステオリルエーテル、ポリオキシエチレン - 4 - ラウリルエーテル、ポリオキシエチレン - 35 - ラウリルエーテル、およびポリオキシエチレン - 23 - ラウリルエーテル。

【0204】

J. ポリホスファゼン (PCPP)

50

PCPP処方物は、例えば、Andrianovら、"Preparation of hydrogel microspheres by coacervation of aqueous polyphosphazene solutions", Biomaterials (1998) 19 (1-3): 109-115およびPayneら、"Protein Release from Polyphosphazene Matrices", Adv. Drug. Delivery Review (1998) 31 (3): 185-196に記載されている。

【0205】

K・ムラミルペプチド

本明細書中でのアジュバントとしての使用に適切なムラミルペプチドの例には、N - アセチル - ムラミル - L - スレオニル - D - イソグルタミン (thr - MDP)、N - アセチル - ノルムラミル - 1 - アラニル - d - イソグルタミン (nor - MDP)、N - アセチルムラミル - 1 - アラニル - d - イソグルタミン - 1 - アラニン - 2 - (1' - 2' - ジバルミトイル - sn - グリセロ - 3 - ヒドロキシホスホリルオキシ) - エチルアミン MTP - PE) が含まれる。

10

【0206】

L・イミダゾキノロン化合物

本明細書中でのアジュバントとしての使用に適切なイミダゾキノロン化合物の例には、イミクアモド (Imiquamod) およびそのホモログ (Stanley, "Imiquimod and the imidazoquinolones: mechanism of action and therapeutic potential" Clin Exp Dermatol (2002) 27 (7): 571-577およびJones, "Resiquimod 3M", Curr Opin Investig Drugs (2003) 4 (2): 214-218にさらに記載されている) が含まれるが、これらに限定されない。

20

【0207】

本発明はまた、上記で同定したアジュバントの組み合わせを含む組成物を提供する。例えば、以下のアジュバント組成物は、本発明で使用する事ができるアジュバント組成物の非限定的な例である。

【0208】

30

(1) サポニンおよび水中油滴型乳濁液 (WO99/11241号) ;

(2) サポニン (例えば、QS21) + 非毒性LPS誘導体 (例えば、3dMPL) (WO94/00153を参照のこと) ;

(3) サポニン (例えば、QS21) + 非毒性LPS誘導体 (例えば、3dMPL) + コレステロール ;

(4) サポニン (例えば、QS21) + 3dMPL + IL-12 (任意選択的に、+ ステロール) (WO98/57659号) ;

(5) 3dMPLと、例えば、QS21および/または水中油滴型乳濁液との組み合わせ (欧州特許出願番号0835318号、同第0735898号、および同第0761231号を参照のこと) ;

40

(6) 10%スクアレン、0.4%Tween80、5%ブルロニックブロック重合体L121、およびthr-MDPを含み、サブミクロン乳濁液に微小流動化されているか、ボルテックスしてより大きな粒子サイズの乳濁液を生成したSAF。

【0209】

(7) 2%スクアレン、0.2%Tween80、およびモノホスホリル脂質A (MPL)、トレハロースジミコラート (TDM)、および細胞壁骨格 (CWS) からなる群から選択される1つ以上の細菌細胞壁成分 (好ましくは、MPL + CWS (Detox (商標)) を含むRibi (商標) アジュバント系 (RAS) (Ribi Immunochem) ;

(8) 1つ以上のミネラル塩 (アルミニウム塩など) + LPSの非毒性誘導体 (3dP

50

M L など)。

【0210】

(9) 1つ以上のミネラル塩(アルミニウム塩など) + 免疫賦活性オリゴヌクレオチド(ヌクレオチド配列(C p Gモチーフが含まれる)など)。組み合わせ番号(9)は、好ましいアジュバント組み合わせである。

【0211】

M . ヒト免疫調節薬

本明細書中でのアジュバントとしての使用に適切なヒト免疫調節薬には、サイトカイン(インターロイキン(例えば、IL - 1、IL - 2、IL - 4、IL - 5、IL - 6、IL - 7、IL - 12など)、インターフェロン(例えば、インターフェロン - γ)、マクロファージコロニー刺激因子、および腫瘍壊死因子など)が含まれる。

10

【0212】

いくつかの実施形態では、アルミニウム塩およびMF 59は、注射用インフルエンザワクチンとの使用に好ましいアジュバントである。いくつかの実施形態では、細菌毒素および生体接着剤は、粘膜送達ワクチン(鼻ワクチンなど)との使用に好ましいアジュバントである。

【0213】

本発明の免疫原性組成物を、抗生物質治療計画と組み合わせて投与することができる。いくつかの実施形態では、抗生物質を、本発明の抗原または1つ以上の本発明の抗原を含む組成物の投与前に投与する。

20

【0214】

いくつかの実施形態では、抗生物質を、1つ以上の本発明の抗原または1つ以上の本発明の抗原を含む組成物の投与後に投与する。連鎖球菌感染の治療での使用に適切な抗生物質の例には、ペニシリンもしくはその誘導体またはクリンダマイシンなどが含まれるが、これらに限定されない。

【0215】

本発明を、以下の実施例(これらに制限されない)によってさらに説明する。

【実施例】

【0216】

実施例1 . 材料と方法

30

肺炎球菌変異体の構築

これらの背景で作製した肺炎球菌株および欠失変異体を、表1に記載する。PCRライゲーション変異誘発(23)を使用して、T4およびST162^{19F}のノックアウト変異体を作製した。標的遺伝子の上流および下流のフラグメントを、特異的プライマー対を使用して増幅した。ApaI部位を使用して上流フラグメントを構築し、BamHI部位を使用して下流フラグメントを構築した。欠失遺伝子座の構築およびスクリーニングのために使用したプライマーを、表2に列挙する。PCR産物(1,000bp)を、対応する制限酵素を使用して消化し、精製し、ermカセット(1,306bp)(GenBank受入番号AB057644)またはApaI部位およびBamHI部位を含むKan-rpsLカセット(Janus)(24)(1,368bp)とライゲーションした。次いで、(25)に記載のように、ライゲーション混合物をレシピエント肺炎球菌株に形質転換し、エリスロマイシン(1μg/ml)またはカナマイシン(400μg/ml)のいずれかを含む血液寒天培地にプレートした。PCRおよび配列決定によって正確な挿入を確認した。

40

【0217】

【表 1】

表1. 使用した肺炎球菌株

株	関連する特徴	供給源
T4	4型TIGR4株	tigr.org
T4Δ(<i>rlrA</i>)	<i>rlrA::erm</i> (Em ^R)	本発明
T4Δ(<i>rrgA-srtD</i>)	<i>rrgABC-srtBCD::erm</i> (Em ^R)	本発明
T4Δ(<i>mgrA</i>)	<i>mgrA::erm</i> (Em ^R)	本発明
T4Δ(<i>rrgA-srtD, mgrA</i>)	<i>(rrgABC-srtBCD::erm)::(mgrA::km-rpsL)</i> (Em ^R , Km ^R)	本発明
T4Δ(<i>rrgA-srtD</i>)▽(<i>rrgA-srtD</i>)	(<i>rrgABC-srtBCD::erm</i> (Em ^R))を、(<i>rrgABC-srtBCD-Km</i>) (Km ^R)に置換したT4Δ(<i>rrgA-srtD</i>)	本発明 および (24)
T4R	T4中 ϕ cps4AのCm ^R 不活化	(27, 28)
T4RΔ(<i>rrgA-srtD</i>)	T4R中の <i>rrgABC-srtBCD::erm</i> (Em ^R)	本発明
ST162 ^{19F}	19F型の臨床分離菌(マウスにおける優れた生着菌)	(5)
ST162 ^{19F} Δ(<i>rrgA-srtD</i>)	<i>rrgABC-srtBCD::erm</i> (Em ^R)	本発明
ST162 ^{19F} Δ(<i>mgrA</i>)	<i>mgrA::erm</i> (Em ^R)	本発明
ST162 ^{19F} Δ(<i>rrgA-srtD, mgrA</i>)	<i>rrgABC-srtBCD::erm</i> (Em ^R), <i>mgrA::km-rpsL</i> (Km ^R)	本発明
D39	<i>rlrA</i> アイレットを各2型株	(29)
D39▽(<i>rrgA-srtD</i>)	<i>rlrA</i> アイレットIS167::マゼラン5 (Spc ^R , Sm ^R)	本発明
D39▽(<i>rrgA-srtD</i>)Δ(<i>rlrA</i>)	<i>rlrA</i> アイレットIS167::マゼラン5 <i>rlrA::マゼラン2</i> (Spc ^R , Cm ^R , Sm ^R)	本発明

Em^R、エリスロマイシン耐性; Km^R、カナマイシン耐性; Spc^R、スペクチノマイシン耐性; Sm^R、ストレプトマイシン耐性; Cm^R、クロラムフェニコール耐性

【 0 2 1 8 】

【表 2 - 1】

表2. 変異体作製のために使用したプライマーおよび制限酵素

遺伝子	名称	制限酵素	配列 (5'→3')
ermカセット	ErmF	ApaI	TTTTTGGGCCCTTCGTGTTTCGTGCTGACTTGC (配列番号:18)
	ErmR	BamHI	TTTTTGGATCCGATGTTGCTGATTAAGACGAGC (配列番号:19)
	ErmstartR		AACTTCCTTTTACGTTTCCGCC (配列番号:20)
	ErmstutF		ACCGAAAGACAGACGAGCC (配列番号:21)

【 0 2 1 9 】

10

20

30

【表 2 - 2】

Kan-rpsL カセット	Kan-Bam	BamHI	TTGGATCCCTTTAAATACTGTAGAAAAGA GGA (配列番号 :22)
	Kan-Apa	ApaI	TTGGGCCCTAAAACAATTCATCCAGTAAA AT (配列番号 :23)
	Dam406	BamHI	TCTATGCCTATTCCAGAGGAAATGGATCG GATC (配列番号 :24)
	Dam351	ApaI	CTAGGGCCCTTTCCTTATGCTTTTGGAC (配列番号 :25)
	Dam407		AGGAGACATTCCCTCCGTATCT (配列番号:26)
	Dam352		CAAGAGCACAGCGTGGTGCT (配列番号:27)
T4Δ(<i>rrgA-srtD</i>)	RrgA P1		CAAGGTCCAAACCTACTGAAC (配列番号:28)
	RrgA P2	ApaI	GCGGGCCCCTGAGATATACAGCACAGTCC (配列番号 :29)
	SrtD P3	BamHI	CGGGATCCCTGGCATTCTGGGAATCCTG (配列番号 :30)
	SrtD P4		CGTTTCAAGTGCTATCACTGTTC (配列番号: 31)
T4Δ(<i>mgrA</i>)	MgrA P1		ATATAACATGAACAGTTGGGTTCTTG (配列番号 :32)
	MgrA P2	ApaI	ATATAGGGCCCAACCTCTTGCAATTATAC CACA (配列番号 :33)
	MgrA P3	BamHI	ATATAGGATCCCGCTTTGAACTGTACCTC AA (配列番号 :34)
	MgrA P4		ATATACAGTAACTGTCTCATCCAAATC (配列番号 :35)
	MgrA C1		ATATACTGCTTCAATCCATTAGTTATTTC (配列番号 :36)
	MgrA C2		ATATATTGATTGTAAAAATTCCATCTATAG (配列番号 :37)
T4Δ(<i>rrgA-srtD</i>) ▽(<i>rrgA-srtD</i>)	Rev1	BamHI	TTGGATCCCTTATTTCCCTCGTAGTAAACGT (配列番号 :38)
	Rev2	ApaI	TTGGGCCCAAAGAAATGAAAGGAAAGCT AAGG (配列番号 :39)
ST162 ^{19F} Δ(<i>rrgA-srtD</i>)	RrgA P1		CAAGGTCCAAACCTACTGAAC (配列番号 :40)
	RrgA P2	ApaI	GCGGGCCCCTGAGATATACAGCACAGTCC (配列番号 :41)
	SrtD P3	BamHI	CGGGATCCCTGGCATTCTGGGAATCCTG (配列番号 :42)
	SrtD P4		CGTTTCAAGTGCTATCACTGTTC (配列番号 :43)
	SrtD C2		GCCCCATCTTGCCCTCACTGCG (配列番号 :44)

【表 2 - 3】

ST162 ^{19F} Δ(<i>mgrA</i>)	MgrA P1		ATATAACATGAACAGTTGGGTTCTTG (配列番号 :45)
	MgrA P2	Apal	ATATAGGGCCCAACCTCTTGCAATTATAC CACA (配列番号 :46)
	MgrA P3	BamHI	ATATAGGATCCCGCGTTTGAAGTGTACCTC AA (配列番号 :47)
	MgrA P4		ATATACAGTAACTGTCTCATCCAAATC (配列番号 :48)
	MgrA C1		ATATACTGCTTCAATCCATTAGTTATTTC (配列番号 :49)
	MgrA C2		ATATATTGATTGTAAAAATTCCATCTATAG (配列番号 :50)
D39▽(<i>rrgA-srt</i>) Δ(<i>rlrA</i>)	RLRAFR		CGCGGATCCAAAGGAGAATCATCATGCTA AACAAATACATTGA (配列番号 :51)
	RLRARX		CCCTCTAGATTATAACAAATAGTGAGCCT T (配列番号 :52)

10

r l r A アイレットを含む D 3 9 (血清型 2 株) の挿入変異体を作製するために、相補 D 3 9 細胞を、CH 1 5 5 (r l r A アイレットに隣接する 1 つの I S 1 1 6 7 エレメント中にマゼラン 5 トランスポゾン挿入を有する血清型 4 肺炎球菌株) 由来のゲノム DNA で形質転換した。スペクチノマイシンへのプレーティングによって二重組換え事象を選択し、PCR によってアイレットの存在を確認した。D 3 9 (r r g A - s r t D) の r l r A 変異誘導体を生産するために、変異血清型 4 株中の変異領域を、プライマー対 R L R A F R / R L R A R X を使用して PCR 増幅し、精製したアンプリコンを必要な血清型 2 バックグラウンドに形質転換した。組換え事象を、クロラムフェニコールへのプレーティングによって r l r A について選択し、PCR によって確認した。

20

R r g A、R r g B、および R r g C のクローニング、発現、および精製

標準的な組換え DNA 技術を使用して、全発現プラスミドを構築した。p E T 2 1 b + を、I n v i t r o g e n から購入した。P f u T u r b o T a q (商標) (R o c h e) を使用したゲノム DNA での 2 5 増幅サイクルで PCR を行った。PCR 産物を、精製し、消化し、ベクターにライゲーションし、大腸菌 T O P O 1 0 に形質転換し、その後大腸菌 B L R (D E 3) にサブクローニングした。製造者の説明書に従って、組換えタンパク質を発現し、形質転換細菌から精製した。

30

【 0 2 2 1 】

動物血清

精製組換え R r g A、R r g B、および R r g C を、C e n t r i c o n Y M - 3 0 スピナラム (M i l l i p o r e) を使用して濃縮し、その後これを使用して、B A L B / c マウス (2 0 μ g) およびニュージーランド白ウサギ (1 0 0 μ g) を免疫化した。

【 0 2 2 2 】

ネガティブ染色

ネガティブ染色のために、細菌を血液寒天上で 1 6 時間まで成長させ、コロニーを 0 . 1 5 M カコジル酸ナトリウム緩衝液中に再懸濁した。4 μ l のアリコートをし、F o r m v a r (商標) 補助フィルム (s u p p o r t i n g f i l m) でコーティングしたグリッドに 5 分間添加した。過剰な溶液を濾紙で吸い取り、グリッドを 0 . 5 % 酢酸ウラニル水で 5 秒間染色し、風乾した。サンプルを、T e c n a i (商標) 1 0 電子顕微鏡 (P h i l l i p s) で 8 0 k V にて試験した。

40

【 0 2 2 3 】

免疫電子顕微鏡法

肺炎球菌を、液体 T H Y 培地中で一晩成長させた。1 m l の O D ₆₀₀ が 0 . 5 の細菌懸濁液を、4 で 3 , 0 0 0 r p m にて遠心分離し、5 0 0 μ l の濾過滅菌 P B S に再懸

50

濁した。20 μ l のサンプルを、Formvar (商標) コーティングしたニッケルグリッドに添加し、5 分間静置した。その後、グリッドを 1 % パラホルムアルデヒド / P B S 中で固定し、1 : 1 0 のマウスポリクローナル抗体 : R r g A、R r g B、または R r g C を含むブロッキング緩衝液 (1 % 正常ウサギ血清、1 % B S A、1 $\times$ P B S) とインキュベーションした。サンプルを、ブロッキング緩衝液中にて 5 分で 5 回洗浄し、金結合体二次抗体と 1 : 2 0 でインキュベーションした (ヤギ抗マウス I g G、5 n m 金粒子、ヤギ抗ウサギ I g G、1 0 n m)。サンプルを、ブロッキング緩衝液中にて 5 分間で 5 回洗浄し、1 % パラホルムアルデヒド / P B S 中で 3 0 分間固定した。サンプルを、蒸留水にて 5 分間で 5 回洗浄し、乾燥させた。グリッドを、酢酸ウラニル水溶液で 1 5 分間染色し、T e c n a i (商標) 高分解能 (h i g h - f i e l d) 透過型電子顕微鏡で処理した。

10

【 0 2 2 4 】

ウェスタンブロッティング

細菌を、血液寒天プレート上で 1 6 時間まで成長させた。細菌 (湿重量 3 0 m g) を、4 0 0 単位のムタノリシン (S i g m a) を含む 1 m l の 5 0 m M T r i s - H C l (p H 6 . 8) 中に再懸濁し、3 7 $^{\circ}$ C で 2 時間インキュベーションした。3 サイクルの凍結融解後、細胞デブリを、1 3 , 0 0 0 r p m で 1 5 分間の遠心分離によって除去した。5 0 μ l の上清を N u P a g e (商標) サンプル緩衝液およびメルカプトエタノールにて 7 0 $^{\circ}$ C で 1 0 分間処理し、1 0 μ l を、4 ~ 1 2 % または 3 ~ 8 % N u P a g e N o v e x (商標) B i s - T r i s G e l (I n v i t r o g e n) 上にロードした。エレクトロブロッティングおよび 5 0 0 倍希釈した R r g B 抗体 (マウス免疫血清) での検出を、供給者の説明書にしたがって行った。

20

【 0 2 2 5 】

A 5 4 9 接着アッセイ

対数増殖中期 (O D ₆₀₀ = 0 . 3 ~ 0 . 4) まで成長させた肺炎球菌細胞を、A 5 4 9 細胞と、5 % C O ₂ / 9 5 % 空気雰囲気下にて 3 7 $^{\circ}$ C で 3 0 ~ 4 0 分間インキュベーションし、P B S (p H 7 . 4) で 3 回洗浄して非接着細菌を除去した。接着細菌および / または内在化細菌を列挙するために、2 0 0 μ l の 0 . 2 5 % トリプシン / 1 m M E D T A での処理によって上皮細胞をウェルから剥離し、8 0 0 μ l の氷冷 0 . 0 2 5 % T r i t o n (商標) X - 1 0 0 の添加によって溶解した。適切な希釈物を血液寒天プレート上にプレートし、真核細胞に接着した細菌を計数した。各株についての接着細菌の力価を入力力価と比較し、接着性細菌の比率を決定した。

30

【 0 2 2 6 】

蛍光顕微鏡法のために、A 5 4 9 単層を、2 4 ウェル組織培養プレート中のカバーガラス上で成長させた。カバーガラス上の感染細胞層を、3 % パラホルムアルデヒド中で固定し、3 0 ~ 4 0 分のインキュベーションおよび P B S での洗浄後に抗体で標識した。細菌を抗莢膜抗体で標識し、上皮細胞を透過処理後にローダミン結合体化ファロイジンでの F - アクチンの染色によって視覚化した。全実験を、四連で行い、各実験を異なる日に 3 回繰り返した。

40

【 0 2 2 7 】

マウス攻撃誘発

T 4 および S T 1 6 2 ¹⁹F およびその各同質遺伝子変異体を、血液寒天プレート上で 5 % C O ₂ 下にて 3 7 $^{\circ}$ C で 1 6 時間成長させた。コロニーをプレートから直接採取し、P B S 中で O D ₆₂₀ = 0 . 5 まで再懸濁するか、半合成 C + Y 培地に接種し、鼻腔内接種のためには対数増殖中期 (O D ₆₂₀ = 0 . 5) まで成長させ、腹腔内接種のためには O D ₆₂₀ = 0 . 2 まで成長させた。適切に希釈して所望の濃度を得た。(5) に記載のように、6 ~ 8 週齢の C 5 7 B L / 6 マウスを、T 4、S T 1 6 2 ¹⁹F、およびその変異体の鼻腔内および i . p . 細菌攻撃誘発のために使用した。D 3 9 およびその同質遺伝子変異体を、適切な抗生物質を補足した T H Y プロス中で成長させた。6 ~ 1 0 週齢の雌 C D 1 (U K) マウス (C h a r l e s R i v e r L a b o r a t o r i e s) を、1

50

$\times 10^7$ 細菌での鼻腔内攻撃誘発のために使用した。

【0228】

競合実験のために、変異体および野生型細菌を、1:1の比で混合した。エリスロマイシン、ストレプトマイシン、および/またはクロラムフェニコール血液寒天プレート上での選択によって、野生型cfuと比較した変異体cfuの出力を決定した。in vivo競合指数(CI)を、変異体対野生型出力cfuを変異体対野生型入力cfuで割った比として計算した。

【0229】

血清中のi.p.攻撃誘発後のTNFおよびIL-6を、市販のELISAキット(BD Biosciences)の使用によって割り出した。

10

【0230】

統計分析

GraphPad PRISM(商標)バージョン4の使用によって、統計的有意性についてデータを分析した。連続型変数を、t検定またはノンパラメトリックマン-ホイットニー検定の使用によって比較した。統計的有意性を、 $P < 0.05$ と定義した。

【0231】

FACS分析

肺炎球菌(T4、ST162^{19F}、T4Δ(mgrA)、およびT4Δ(rrgA-srtD))の分離菌を、THY液体培地中で5%CO₂下にて37℃で一晩成長させた。サンプルを希釈し、OD₆₂₀ = 0.250 (1×10^8 / ml)まで成長させた。細菌培養物を3,000rpmで遠心分離し、1×PBS中に再懸濁した。15μlの細菌懸濁液を、96ウェルプレートに添加した。5μlの20%正常ウサギ血清を、3,200倍希釈の一次抗体(抗RrgB、PI抗RrgB、Nm抗961)と共に各ウェルに添加した。サンプルを氷上で30分間インキュベーションし、その後150μlのブロッキング緩衝液(1%BSA/PBS)をウェルに添加した。96ウェルプレートを、2,500rpmにて4℃で5分間遠心分離した。フィコエリトリン(Jackson ImmunoResearch)で標識した抗マウス二次抗体を、最終濃度1:100で添加し、混合物を氷上で30分間インキュベーションした。次いで、150μlのブロッキング緩衝液を添加し、サンプルを上記のように遠心分離した。サンプルを、200μlの1%パラホルムアルデヒド/PBS中に再懸濁し、FACSCaliber(商標)(Beckton Dickinson)で分析した。

20

30

【0232】

T4Δ(rrgA-srtD)の復帰変異体の作製

カナマイシンカセットと共にノックアウト遺伝子を再導入することによって、rlrAアイレットをT4Δ(rrgA-srtD)に再導入した。カナマイシンカセットを、PCRライゲーション変異誘発によって野生型T4株中の標的遺伝子の下流に最初に組み込んだ。これらの変異体由来の染色体DNAを使用してノックアウトを形質転換し、野生型表現型を修復した。第1の工程では、プライマーKan-ApaおよびKan-Bamを使用してカナマイシンカセットをJanus(Sungら, 2001, Appl. Environ. Microbiol., 67:5190-6)から増幅し、ApaIおよびBamHI末端を有するPCR産物を作製した。標的部位の蒸留および下流のフラグメントを、T4Δ(rrgA-srtD)変異体のためのプライマーpilI-rev-1-4を使用して増幅した。フラグメントの上流をApaI部位を使用して構築し、下流フラグメントをBamHI部位を使用して構築した。全フラグメントを、対応する制限エンドヌクレアーゼを使用して消化し、等モル量の上流フラグメント、下流フラグメント、およびカナマイシンフラグメントを使用してライゲーションを行った。T4への形質転換後、形質転換体を、200mg/Lカナマイシンを含む血液寒天プレート上で選択した。コントロールPCRによって正確な構築の確認後、これらの形質転換体由来の染色体DNAを使用して、T4Δ(rrgA-srtD)を形質転換した。カナマイシン含有プレート上で再度選択を行い、エリスロマイシン感受性および線毛発現のチェックによって変異体を確

40

50

認した。

【0233】

実施例2．肺炎球菌における線毛様構造の透過電子顕微鏡法による証拠

透過電子顕微鏡法およびネガティブ染色により、血液寒天プレート上および(C+Y)または(THY)培地中で16時間まで培養した肺炎球菌が線毛様構造を発現することが見出された。これらの構造は、多遺伝子座配列型ST205の高浸潤性血清型4クローンに属するT4株(TIGR4)および多遺伝子座配列型162を有する19F型の臨床分離菌(ST162^{19F}株)で見出された(図1A)。この19Fクローンは、ヒトにおける輸送(carriage)および浸潤性疾患の両方に関連し、C57BL/6マウスおよびBALB/cマウスの気道の有効な生着菌であることが示されている(5)。T4

10

【0234】

実施例3．肺炎球菌ゲノム中のrlrAアイレットは線毛様構造をコードする

ジフテリア菌由来のspaABCオペロン(12)とB群連鎖球菌由来の接着アイレット1(16)との比較により、T4ゲノム内の推定線毛遺伝子のクラスターが明らかとなった(図2)。線毛遺伝子は、前に記載したStreptococcus pneumoniae rlrA病原性アイレット中に存在する(18、19)。肺炎球菌rlrAアイレットは7つの遺伝子からなり、そのうちのrrgA、rrgB、およびrrgCは、宿主の細胞外基質の成分に結合する接着マトリックス分子を認識する微生物表面成分(MS

20

。

【0235】

抗血清を、大腸菌中で発現したRrgA、RrgB、およびRrgCタンパク質に対して惹起し、T4によって発現した線毛の免疫金標識で使用した。RrgB抗体は、線毛ポリマー全体に遍在していた(図1のE~G)。RrgB特異的抗体を使用したFACS分析により、T4およびST162^{19F}のそれぞれ84%および90%が線毛構造を発現することが明らかとなった。mgrA変異誘導体では、ほとんど全て(99%)の細菌が線毛化した。FACS分析で測定したところ、rlrAアイレットを欠く細胞は線毛を持たなかった。

40

【0236】

T4およびST162^{19F}で認められた線毛構造の重合体の性質を検証するために、これらの株およびその各rrgA-srtD欠失誘導体の全抽出物を、ムタノリシンで処理し、4~12%(図3A)および3~8%(図3B)のポリアクリルアミド勾配ゲルで分離し、抗血清特異的RrgBを使用して免疫プロットングした。100kDa未満~

50

1, 000 kDa 超の範囲の高分子量 (HMW) ポリマーのリーダーが認められ、これは、ジフテリア菌において前に記載のリーダーに類似していた (12、13)。等量のタンパク質抽出物をゲルにロードしたにもかかわらず、RrgB 抗体によって染色されたバンドは、その対応する野生型株よりも mgrA 変異体でより強く、より高い比率の肺炎球菌が mgrA 変異体バックグラウンド中で線毛構造を発現したという透過電子顕微鏡法および FACS 分析由来のデータを支持する。予想通り、T4 および ST162^{19F} 中の rrgA-srtD の欠失変異体は、それぞれ、RrgB 反応性バンドを示さなかった (図3)。しかし、線毛アイレットが欠失変異体 T4Δ (rrgA-srtD) に再導入された場合、RrgB 抗血清を使用したウェスタンブロット分析では、野生型 T4 株に類似の HMW ポリマーが検出された。ウェスタンブロッティングの使用により、透過電子顕微鏡法の使用によって常に検出できるわけではないが、液体培地中およびプレート上の両方で培養された肺炎球菌株中に線毛が存在することが認められ、線毛が以前に見出されなかった理由が示唆された。

【0237】

実施例 4 . rlrA アイレットは、肺上皮細胞への肺炎球菌接着に重要である

血清型 2 の D39 株は、非被包誘導体 R6 と同様に、rlrA アイレットを欠く (図2)。T4 由来の完全な rlrA アイレットを、D39 (D39 (rrgA-srtD)) に導入した。抗 RrgB を使用したウェスタンブロッティングに基づいて HMW ポリマーのリーダーによって証明されるように、この D39 のアイレット挿入変異体は線毛を発現した (図3B)。D39 (rrgA-srtD) 中の線毛発現は、正の制御因子 rlrA に依存したが、これは、HMW ポリマーが D39 (rrgA-srtD) の rlrA 変異誘導体で検出されなかったためである (図3B)。D39、D39 (rrgA-srtD)、および D39 (rrgA-srtD)Δ (rlrA) を使用して、A549 肺上皮細胞への接着を研究した (図4)。線毛発現 D39 (rrgA-srtD) のみがこれらの細胞に結合した (図4)。この結合は、線毛発現 T4 の結合に類似していたのに対して、T4 の rlrA 変異体は A549 細胞への検出可能な結合を示さなかった。

【0238】

実施例 5 . rlrA アイレットはマウスモデルにおける病原性に影響を及ぼす

肺炎球菌の定着および浸潤性疾患における線毛の役割を調査するために、株 T4 および T4Δ (rrgA-srtD) 株を、マウス感染モデルで使用した。天然の感染経路を最小にするために、6~8 週齢の C57BL/6 マウスに、高用量 (5×10^6 コロニー形成単位 (cfu)) および中用量 (5×10^5 cfu) の肺炎球菌を接種した。死後の動物における鼻咽頭 - 気管洗浄の実施によって定着を評価した。変異体に感染したマウスの生存率がより高いことによって明らかのように、非線毛化変異体は、野生型株よりも病原性が低かった (図5A および 5B)。この病原性の欠損を、rlrA アイレットの再導入によって修復することができる。

【0239】

個別に投与した野生型および変異肺炎球菌は、類似の程度にマウスに定着することができる (マン・ホイットニー U 検定では有意ではない、 $P > 0.05$)。しかし、同数の野生型および変異 T4 細菌を共に鼻腔内に投与した場合、大部分のマウスで、上気道、肺、および血液中で、線毛欠損変異体は野生型によって打ち負かされた (図5C~E)。鼻咽頭輸送および肺炎についての競合実験において、2 型 D39 株、アイレット挿入誘導体 D39 (rrgA-srtD)、および rlrA 変異体 D39 (rrgA-srtD)Δ (rlrA) も使用した。非線毛化野生型 D39 は、線毛化アイレット挿入変異体 D39 (rrgA-srtD) に打ち負かされたのに対して、rlrA を欠く変異体はそうではなかった (図5F)。本データは、肺炎球菌線毛が、定着、肺炎、および浸潤性疾患で役割を果たすことを証明する。

【0240】

実施例 6 . rlrA アイレットは宿主炎症反応で役割を果たす

肺炎球菌感染の結果は、宿主の炎症反応に影響を受ける。炎症反応は、細菌クリアラン

10

20

30

40

50

スを促進することができ、同様に、局所損傷（肺炎）または全身損傷（その最も重篤な系チアが敗血症性ショックである）に寄与し得る。本発明者らは、マウスに *i.p.* 投与した場合、多様な肺炎球菌クローンが異なる炎症誘発性サイトカイン応答を引き起こすことを最近示した（26）。ここで線毛を産生することを示した血清型 6B 株、T4、および ST162^{19F} 株の全てが、*i.p.* 攻撃誘発後に高い TNF 応答を惹起した（5）。対照的に、異なるクローン型の血清型^{19F} 株（ST425^{19F}）は、マウスの上気道の定着に有効ではなく、低 TNF 応答を惹起した（5）。これは、血清型 1 および血清型 7F 分離菌についても真であり（5、22）、これらの分離菌は、比較的軽度の浸潤性疾患に関連し、ヒトが死亡しない浸潤性クローン型に属する（22）。これらのクローンを、PCR、配列決定、およびサザンブロットハイブリッド形成によって *rlrA* 線毛アイレットの存在について分析した。結果は、*rlrA* アイレット陽性肺炎球菌株（それぞれ、4 型および 19F の ST205⁴ および ST162^{19F}）が高サイトカイン応答を誘発するのに対して、*rlrA* アイレット陰性株（それぞれ、7F 型および 1 型の ST191^{7F}、ST228¹、および ST306¹）低 TNF 応答を誘導することを証明した（5）。したがって、肺炎球菌線毛アイレットの有無によって TNF 応答の相違を説明することができる。この可能性を直接試験するために、線毛化野生型および線毛を欠く *rrgA-srtD* 欠失変異体でのマウスの *i.p.* 攻撃誘発後の浸潤性肺炎球菌感染中の炎症反応を測定した。より高い感染用量での 2 つの欠失変異体内の感染も行い、低 TNF 応答が血流中のより少ない細菌数に起因しないことを裏付けた。T4 および ST162^{19F} バックグラウンドの線毛欠失変異体は、その各野生型株と比較して、有意に低い TNF 応答（図 6）および IL-6 応答（図 7）を示した。細菌数に対する TNF 値のプロッティングにより、線毛化肺炎球菌に対する TNF 応答が同数の非線毛化肺炎球菌よりも有意に高いことを証明した（図 6C および D）。さらに、T4Δ(*rrgA-srtD*) への *rlrA* アイレットの再導入により、線毛化 T4 の高 TNF 応答が修復された。

【0241】

これらの結果は、肺炎球菌が細菌細胞から突出した線毛様構造を産生することを証明する。肺炎球菌線毛は、*rlrA* 線毛アイレットによってコードされ、いくつかの肺炎球菌株で見出されるが、全てでは見出されない。被包肺炎球菌では、線毛は、培養上皮細胞への接着ならびに感染マウスモデルにおける定着および浸潤性疾患に寄与する。線毛発現は、宿主の炎症反応を増大させる。肺炎球菌は、異なる感染段階でその宿主と相互作用するための種々の機構を使用する。線毛の発現は、初期細菌接着を容易にし、上咽頭の定着を促進することができる。同時に、これらの構造を発現する細菌は粘膜炎症を誘発する傾向があり、それによってクリアランスを促進することができるが、炎症によって粘膜バリアが損傷する場合、潜在的に組織に肺炎球菌を進入させ得る。

【0242】

実施例 7. *Streptococcus pneumoniae* 線毛の精製

肺炎球菌 TIGR4 グリセロールストック（-80）を、5% 脱線維ヒツジ血液を補足したトリプシンダイズ寒天上で成長させた（5% CO₂ 中にて 37 で一晚）。新鮮な細菌を使用して、新規の寒天プレートに接種し、5% CO₂ 中にて 37 で約 12 時間培養した。約 10 プレートの採取した細菌を、35 ml PBS で 1 回洗浄し、プロテアーゼインヒビターカクテルセット（Calbiochem）を含む 2 ml プロトプラスト緩衝液 PPB（10 mM MgCl₂、50 mM リン酸ナトリウム（pH 6.3）、20% スクロース）中に再懸濁した。約 450 U のムタノリシンを含む 100 mM リン酸ナトリウム（pH 6.3）を、懸濁液の半分にそれぞれ添加し、顕微鏡法によってプロトプラスト形成が検出されるまで、穏やかに振盪しながら 37 で約 5 ~ 8 時間インキュベーションした。消化線毛物質を含む上清を、ショ糖密度勾配（25 ~ 56% の 10 mM MgCl₂ を含む 50 mM リン酸ナトリウム（pH 6.3））にロードし、38,000 rpm にて 4 で 20 時間運転した（図 10A）。全てのさらなる工程を、プロテアーゼインヒビターを含む緩衝液を使用して、4で行った。さらに、エンゾナーゼ（商標）ヌクレアーゼ（Novagen）を添加して、DNA および RNA 夾雑物を除去した。回収した

勾配画分を、抗 R r g B 抗体を使用して、線毛物質について試験した。線毛含有画分をプールし、10 mM MgCl₂、50 mM リン酸ナトリウム (pH 6.3) に対して約 1 日間透析して、スクロースを除去した。

【0243】

多分散性を減少させるために、さらなるクロマトグラフィ工程を追加した。必要に応じて、プールした線毛調製物を、Superose (商標) 6 10/300 GL カラム (Amersham Biosciences) にロードする前に濃縮した (図 10 B)。ゲル濾過によって、異なる分子量の物質を含む線毛を分離した。精製線毛画分を、電子顕微鏡法、ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気得動、および抗体特異的形態 R r g B を使用した免疫ブロッティングに基づいて均一であることを判断した (図 10 C)。サンプルを、さらなる使用まで -80 または液体窒素中で保存した。

10

【0244】

高分子量の精製線毛は、 $2 \times 10^6 \sim 3 \times 10^6$ Da の範囲の分子量を示した。SDS の存在下での線毛の熱処理によってより小さな分子に解離し、ポリアクリルアミド - SDS ゲル上に低分子量バンドのラダーが得られた。精製線毛のエドマン分解により、シグナル配列 (AGTTTTSVTVHXL; 配列番号 56) の切断によって産生された R r g B タンパク質の推定 N 末端に対応する配列が同定された (図 11 A)。線毛トリプシンペプチド配列のアミノ酸配列分析により、アミノ酸配列 LAGAEFVIANADNAGQYLAR (配列番号 7) を有する肺炎球菌 TIGR4 R r g B タンパク質のフラグメントが同定された (図 11 B)。陰性染色された (1% PTA) 免疫金標識精製線毛調製津に対して電子顕微鏡法による調査を行った。長さ 1 μ m および直径約 10 nm までの伸長した管状フィラメントが認められ、これは、全細菌で検出されたものに類似していた。単一の線毛フィラメントに加えて、強固に固められた各構造の束状構造が認められた。精製 R r g B および R r g C に対する抗血清は、免疫金 EM (図 15) およびウェスタン分析 (図 10 C) 下で単離された線毛と反応した。抗 R r g A、抗 R r g B、および抗 R r g C の金標識パターンを、図 16 に示す。

20

【0245】

実施例 8 . 線毛タンパク質 R r g A および R r g B は *in vitro* で会合する

線毛タンパク質 R r g A、R r g B、および R r g C を、実施例 1 に記載のように精製した。精製タンパク質調製物を、室温、37、65、および 95 で 5 分間インキュベーションした。インキュベーションした調製物を、変性ポリアクリルアミドゲルで泳動した。高分子量複合体は R r g A および R r g B 調製物で認められたが、R r g C - His 調製物では認められなかった (図 9 A)。高分子量複合体中の R r g A および R r g B を、ウェスタンブロッティングによって確認した (図 9 B)。高分子量複合体は、サイズ排除クロマトグラフィによって R r g A および R r g B 調製物中でも検出された (図 9 C)。

30

【0246】

実施例 9 . 線毛に対して調製した抗血清は感染を防御する

マウスに精製線毛に対する抗血清 (抗線毛)、同一条件下で線毛を産生した細菌から精製した調製物に対する抗血清 (抗 Δ 線毛)、または整理食塩水コントロール (ctrl) を投与したこと以外は、実施例 1 に記載のように、マウスを T4 細菌で i.p. 攻撃誘発した。並行実験では、マウスに、10 倍希釈した同一の抗血清を投与した。動物を、10 日間にわたって死亡率について観察し、攻撃誘発から 24 時間後に細菌負荷を測定した。非希釈抗線毛血清で処置した全マウスは、細菌負荷が検出レベル未満であり、10 倍希釈の血清での処置により、依然としていくらかの防御が得られた (図 12 A)。希釈および非希釈抗線毛血清は共に、整理食塩水コントロールと比較して死亡率の有意な減少が認められた (図 12 B)。さらに、線毛に対して調製した血清は、抗 Δ 線毛血清よりも菌血症および死亡率に対する防御がより高かった (図 12 A ~ B)。この実施例は、精製線毛に特異的な血清が動物モデルにおいて肺炎球菌感染に対して有意な防御を示したことを証明する。

40

50

【0247】

実施例10．精製線毛および線毛タンパク質は細胞外基質成分に結合する

細胞外成分へのRrgA、RrgB、RrgC、精製線毛、および偽精製線毛の結合を、ELISAによって決定した。細胞外基質成分であるムチンI、ビトロネクチン、ラクトフェリン、コラーゲンIおよびIV、ラミニン、フィブロネクチン、およびフィブリノゲンへの線毛成分の結合を測定した。簡潔に述べれば、Maxisorp（商標）96ウェル平底プレート（Nunc, Roskilde, Denmark）を、37℃で1時間コーティングし、その後に2μg/ウェルのムチンI、ビトロネクチン、ラクトフェリン、コラーゲンIおよびIV、およびフィブリノゲン、ならびに1μg/ウェルのラミニンおよびフィブロネクチンを含むリン酸緩衝化生理食塩水（pH7.4）（PBS）と4℃で一晩インキュベーションした。BSAコーティングプレートを、ネガティブコントロールとして使用した。コーティングしたウェルを、PBS/0.05%Tween（商標）20で3回洗浄し、200μlの1%BSAにて37℃で2時間ブロッキングした。プレートを、PBS/0.05%Tween（商標）20で3回洗浄した。タンパク質サンプル（RrgA、RrgB、およびRrgC）を、最初にPBSで0.4μg/μlに希釈した。200μlのタンパク質溶液、25μl線毛調製物（PBSで全体積を200μlにする）、および各コントロールを、コーティング・ブロッキングプレートに移し、サンプルをPBSで2倍に連続希釈した。プレートを、37℃で2時間および4℃で一晩インキュベーションした。プレートを、PBS/0.05%Tween（商標）20で3回洗浄し、一次マウス抗Rrg抗体（10,000倍希釈）と37℃で2時間インキュベーションした：RrgA、RrgB、およびRrgCコーティングプレートを、抗RrgA、抗RrgB、および抗RrgCとそれぞれインキュベーションし、線毛コーティングプレートを抗RrgB抗体とインキュベーションした。さらなる3回の洗浄工程後、アルカリホスファターゼ結合体化ヤギ抗マウスIgG（Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.）との37℃で2時間のインキュベーション後に抗原特異的IgGが明らかとなった。

10

20

【0248】

コラーゲンI、ラクトフェリン、ラミニン、フィブロネクチン、およびフィブリノゲンへの有意な結合が認められた（図13）。全ての場合、RrgAで最も強い結合が認められ、より低いレベルでRrgCおよびRrgBが続いた。精製線毛は、より弱いが検出可能な結合を示した。本実施例は、細胞外基質成分への精製線毛および単離された線毛タンパク質の結合が証明され、接着/定着における線毛の機能が示唆される。

30

【0249】

実施例11．精製線毛は、in vitroでのサイトカイン応答を誘導する

末梢血単核球（PBMC）および単球を、in vitroで精製線毛調製物および線毛を発現しないT4から精製した偽調製物と接触させた。線毛と応答した細胞によるサイトカインの産生を、ELISAによって測定した。精製線毛は、Δ線毛コントロールと比較して、炎症性サイトカインであるTNF-α、IL-12p40、およびIL-6の産生を誘導した（図14）。TLR2、7、8、および9については誘導は認められなかった。

40

【0250】

実施例12．精製線毛の電子顕微鏡分析

5μlの精製線毛調製物を、薄いカーボンフィルムでコーティングした300メッシュの銅グリッド上においた。次いで、グリッドを、5μlの1%PTA（リンタンゲステン酸）の添加によってネガティブ染色した。過剰な液体を吸い取った。

【0251】

FEI200電子顕微鏡を使用して、グリッドを観察した。加速電圧100kVおよび低用量条件下での50000倍の名目上の倍率で画像を記録した。線毛は、伸長した可動性の構造として認められた（図18）。

【0252】

50

電子顕微鏡をスキャニングし、画像を I M A G I C 5 形式 (i m a g i c 5 . d e) に変換した。同一の線毛部分を、E M A N ソフトウェアの使用による四角いボックス (3 0 0 × 3 0 0 ピクセル) の使用によってデジタル化したネガから選別した。全てのボックス化したコレクションの間で、同一の成長方向および類似の直径の直鎖状の線毛のみを処理した。

【 0 2 5 3 】

第 1 の分析では、ボックス化した線毛の密度を反転し、高域および低域をフィルタリングし、同一直径のモデルシリンダーの投影と整列させた (図 1 8)。自己相関関数を使用して回転整列を適用し、その後、シリンダー軸のみに対して垂直に並進整列を行った。

【 0 2 5 4 】

平均のフィラメント軸にわたる密度プロフィールを計算し、グラフで示した。密度プロフィールは、線毛が小型で中央に穴のない中身の詰まった構造であり、全構造の計算された平均直径が 1 1 . 5 n m であることを強く示した (図 1 8)。類似の直径 (1 1 n m) を、整列した柄状のセグメントへの無作為な回転角の割り当てによって得られた回転によって対称な三次元塊 (v o l u m e) から計算した (図 1 9)。さらに、塊は、線毛表面が滑らかではないことを示した (図 1 8 ~ 1 9)。

【 0 2 5 5 】

1 3 n m 反復の強い構造特性を示す予め整列させたいくつかの柄状セグメントを、軸平均化によってさらに整列させて、より強いシグナルを有する改良された 2 D 画像を作成した (図 2 0)。

【 0 2 5 6 】

2 D 画像 (3 D 構造の投影) (図 2 1 ~ 2 2) は、線毛が、平均直径が 1 0 . 5 ~ 1 1 . 0 n m でピッチが 1 3 . 2 n m のコイルドコイル構造に配置された少なくとも 3 つの「プロトフィラメント」によって作製されることを明確に示す (図 2 3)。ノード位置の線毛の直径は 6 . 8 n m であり、各々の単一の「プロトフィラメント」の直径は 3 . 5 n m である (図 2 3)。

【 0 2 5 7 】

(参照文献) これらは、その全体が参考として援用される。

10

20

【化 7】

1. Bruyn, G. A. W. および van Furth, R. (1991) *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 10, 897–910.
2. Ryan, M. W. および Antonelli, P. J. (2000) *Laryngoscope* 110, 961–964.
3. Cutts, F. T., Zaman, S. M., Enwere, G., Jaffar, S., Levine, O. S., Okoko, C. Oluwalana, A., Vaughan, S., Obaro, A., Leach, A., および (2005) *Lancet* 365, 1139–1146.
4. Swiatlo, E., Champlin, F. R., Holman, S. C., Wilson, W. W. および Watt, J. M. (2002) *Infect. Immun.* 70, 412–415.
5. Sandgren, A., Albiger, B., Orihuela, C., Tuomanen, E., Normark, S. および Henriques-Normark, B. (2005) *J. Infect. Dis.* 192, 791–800. 10
6. Henriques Normark, B., Christensson, B., Sandgren, A., Noreen, B., Sylvan, S., Burman, L. G. および Olsson-Liljequist, B. (2003) *Microb. Drug Resist.* 9, 337–344.
7. Nunes, S., Sá-Leão, R., Carriço, J., Alves, C. R., Mato, R., Avô, A. B., Saldanha, J., Almeida, J. S., Sanches, I. S. および de Lencastre, H. (2005) *J. Clin. Microbiol.* 43, 1285–1293.
8. Henrichsen, J. (1995) *J. Clin. Microbiol.* 33, 2759–2762.
9. Lau, G. W., Haataja, S., Lonetto, M., Kensit, S. E., Marra, A., Bryant, A. P., McDevitt, D., Morrison, D. A. および Holden, D. W. (2001) *Mol. Microbiol.* 40, 555–571.
10. Rosenow, C., Ryan, P., Weiser, J. N., Johnson, S., Fontan, P., Ortqvist, A. および Masure, H. R. (1997) *Mol. Microbiol.* 25, 819–829. 20
11. Tuomanen, E. (1999) *Current Opin. Biol.* 2, 35–39.
12. Ton-That, H., Marraffini, L. A. および Schneewind, O. (2004) *Mol. Microbiol.* 53, 251–261.
13. Ton-That, H. および Schneewind, O. (2003) *Mol. Microbiol.* 50, 1429–1438.
14. Kelstrup, J., Theilade, J. および Fejerskov, O. (1979) *Scand. J. Dent. Res.* 87, 415–423.
15. Mora, M., Bensi, G., Capo, S., Falugi, F., Zingaretti, C., Manetti, A. G. O., Maggi, T., Taddei, A. R., Grandi, G. および Telford, J. L. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 15641–15646.
16. Lauer, P., Rinaudo, C. D., Soriani, M., Margarit, I., Mainone, D., Rosini, R., Taddei, A. R., Mora, M., Rappuoli, R., Grandi, G. および Telford, J. L. (2005) *Science* 309, 105.
17. Li, T., Khah, M. K., Slavnic, S., Johansson, I. および Strömberg, N. (2001) *Infect Immun.* 69, 7224–7233. 30
18. Hava, D. L., Hemsley, C. J. および Camilli, A. (2003) *J. Bacteriol.* 185, 413–421.
19. Hava, D. L. および Camilli, A. (2002) *Mol. Microbiol.* 45, 1389–1406.
20. Schwarz-Linek, U., Hook, M. および Potts, J. R. (2004) *Mol. Microbiol.* 52, 631–641.
21. Hemsley, C., Joyce, E., Hava, D. L., Kawale, A. および Camilli, A. (2003) *J. Bacteriol.* 185, 6640–6647.

【 0 2 5 8 】

【化 8】

22. Sjöström, K., Spindler, K., Örtqvist, Å., Kalin, M., Sandgren, A. および Henriques Normark, B. (2006) Clin. Infect. Dis., in press.
23. Lau, P. C. Y., Sung, C. K., Lee, J. H., Morrison, D. A. および Cvitkovitch, G. D. (2002) J. Microbiol. Methods 49, 193–205.
24. Sung, C. K., Li, H., Claverys, J. P. および Morrison, D. A. (2001) Appl. Environ. Microbiol. 67, 5190–5196.
25. Bricker, A. L. および Camilli, A. (1999) FEMS Microbiol. Lett. 172, 131–135.
26. Albiger, B., Sandgren, A., Katsuragi, H., Meyer-Hoffert, U., Beiter, K., Wartha, F., Hornef, M., Normark, S. および Henriques Normark, B. (2005) Cell. Microbiol. 7, 1603–1615.
27. Fernebro, J., Andersson, I., Sublett, J., Morfeldt, E., Novak, R., Tuomanen, E., Normark, S. および Henriques Normark, B. (2004) J. Infect. Dis. 189, 328–338.
28. Gosink, K. K., Mann, E. R., Guglielmo, C., Tuomanen, E. I. および Masure, H. R. (2000) Infect. Immun. 68, 5690–5695.
29. Iannelli, F., Pearce, B. J. および Pozzi, G. (1999) J. Bacteriol. 181, 2652–2654.

10

他の実施形態

多数の本発明の実施形態が記載されている。それにもかかわらず、本発明の精神および範囲を逸脱することなく、種々の修正形態を実施することができると理解されるであろう。

20

【図面の簡単な説明】

【0259】

【図1】図1。(A)細菌表面上に豊富な線毛を示す肺炎球菌T4株のネガティブ染色。(B)線毛を示さない変異株T4Δ(rrgA-srtD)のネガティブ染色。(C)豊富な線毛を示すT4Δ(mgrA)変異体のネガティブ染色。(D)細菌表面上に線毛を示さないT4Δ(rrgA-srtD, mgrA)変異体のネガティブ染色。(E)抗RrgAの使用によるT4の免疫金標識。(F)抗RrgB(5nm)および抗RrgC(10nm)でのT4の免疫金染色。抗RrgBは、全線毛に遍在していた(バー、200nm)。(G)抗RrgB(5nm)および抗RrgC(10nm)で二重標識したT4線毛の高倍率画像。矢印で示すように、抗RrgCによる線毛の特異的標識を示す(バー、100nm)。(H)抗RrgBおよび抗RrgCによって検出可能な表面上の視覚可能な線毛が認められない欠失変異体肺炎球菌T4Δ(rrgA-srtD)の免疫金標識(バー、200nm)。

30

【図2】図2。血清型4のT4株(TIGR4)中のrlrAアイレット(islet)のゲノム構成および利用可能な配列由来の実験株R6との比較。19F株であるST162^{19F}は、全部で98%の配列が同一な類似の構成を共有するのに対して、非被包株R6およびその子孫D39は、線毛-アイレット陰性株である。挿入配列(IS1167)は、陽性株(トランスポザーゼの1つがフレームシフト(fs)している)中の遺伝子座に隣接しているのに対して、RUPエレメント(肺炎球菌中の反復単位)は絨毛-アイレット陰性株で同定される。遺伝子座のサイズおよびその相対的G+C含量を示す。負の制御因子mgrAの位置を示す。ストレプトコッカス・アガラクチアおよびジフテリア菌における線毛構造をコードするアイレットのゲノム構成を比較として含む。

40

【図3】図3。(A)4~12%ポリアクリル勾配ゲルを使用したウェスタンブロット。RrgB抗血清は線毛を発現する株(T4、T4Δ(mgrA)、ST162^{19F}、およびST162^{19F}Δ(mgrA))における高分子量(HMW)ポリマーのラダーを検出するのに対して、線毛を欠く変異株(T4Δ(rrgA-srtD)、T4Δ(rrgA-srtD, mgrA)、およびST162^{19F}Δ(rrgA-srtD))はHMWポリマーを持たない。mgrA変異体は、各野生型と比較した場合、強度が増加する。(B)アイレットを欠くD39、rlrAアイレットが導入された変異D39(D39

50

(*rrgA* - *srtD*))、およびその *r1rA* 欠失誘導体 (*D39* (*rrgA* - *srtD*) Δ (*r1rA*)) についての 4 ~ 12 % 勾配ゲルを使用した *RrgB* 抗血清でのウェスタンブロット。

【図 4 A】図 4。(A) *A549* 肺上皮細胞の単層への *D39* および *D39* (*rrgA* - *srtD*) ならびに *D39* (*rrgA* - *srtD*) Δ (*r1rA*) の接着。(B ~ D) *D39* (B)、*D39* (*rrgA* - *srtD*) (C)、および *D39* (*rrgA* - *srtD*) Δ (*r1rA*) の免疫蛍光顕微鏡法。(D) *A549* 肺上皮細胞への接着。抗莢膜抗体 (緑色) での肺炎球菌の標識およびローダミンでの上皮 F - アクチンの視覚化 (赤色) を示す。

【図 4 B】図 4。(A) *A549* 肺上皮細胞の単層への *D39* および *D39* (*rrgA* - *srtD*) ならびに *D39* (*rrgA* - *srtD*) Δ (*r1rA*) の接着。(B ~ D) *D39* (B)、*D39* (*rrgA* - *srtD*) (C)、および *D39* (*rrgA* - *srtD*) Δ (*r1rA*) の免疫蛍光顕微鏡法。(D) *A549* 肺上皮細胞への接着。抗莢膜抗体 (緑色) での肺炎球菌の標識およびローダミンでの上皮 F - アクチンの視覚化 (赤色) を示す。

【図 4 C】図 4。(A) *A549* 肺上皮細胞の単層への *D39* および *D39* (*rrgA* - *srtD*) ならびに *D39* (*rrgA* - *srtD*) Δ (*r1rA*) の接着。(B ~ D) *D39* (B)、*D39* (*rrgA* - *srtD*) (C)、および *D39* (*rrgA* - *srtD*) Δ (*r1rA*) の免疫蛍光顕微鏡法。(D) *A549* 肺上皮細胞への接着。抗莢膜抗体 (緑色) での肺炎球菌の標識およびローダミンでの上皮 F - アクチンの視覚化 (赤色) を示す。

【図 4 D】図 4。(A) *A549* 肺上皮細胞の単層への *D39* および *D39* (*rrgA* - *srtD*) ならびに *D39* (*rrgA* - *srtD*) Δ (*r1rA*) の接着。(B ~ D) *D39* (B)、*D39* (*rrgA* - *srtD*) (C)、および *D39* (*rrgA* - *srtD*) Δ (*r1rA*) の免疫蛍光顕微鏡法。(D) *A549* 肺上皮細胞への接着。抗莢膜抗体 (緑色) での肺炎球菌の標識およびローダミンでの上皮 F - アクチンの視覚化 (赤色) を示す。

【図 5 A】図 5。(A ~ E) 線毛化 (*piliated*) *T4* およびその同質遺伝子非線毛化欠失変異体 *T4* Δ (*rrgA* - *srtD*) での *C57BL/6* マウスの鼻腔内攻撃誘発。(A および B) 5×10^6 c f u (高用量、A) または 5×10^5 c f u (中用量、B) での接種後のマウスの生存率。カプラン・マイヤー対数順位検定の使用によって生存率を分析した。(C ~ E) *in vivo* 競合感染実験。*T4* およびその同質遺伝子変異体 *T4* Δ (*rrgA* - *srtD*) を、鼻腔内感染前に 1 : 1 の比率で混合した。競合指数 (*competitive index*) (*CI*) を下記のように計算し、各サークルは各競合実験組における各マウスについての *CI* を示す。1 未満の *CI* は、野生型株と比較した場合に変異体が競合的に不利であることを示す。 10^{-4} 未満の *CI* 値を 10^{-4} に設定した。全マウスが定着した。(C) 高用量攻撃誘発後の定着、肺炎、および菌血症の *CI* (*n* = 20)。20 匹のマウスのうち、14 匹のみが肺炎 (肺から回収された細菌として定義) を示し、14 匹が菌血症を示した。(D) 中用量での攻撃誘発後の定着における *CI* (*n* = 10)。10 匹のうち、たった 5 匹が肺炎を示し、1 匹が菌血症を示した。(E) 低用量での攻撃誘発後の定着における *CI* (*n* = 10)。10 匹のうち、たった 4 匹が肺炎を示し、菌血症を発症しなかった。(F) 野生型 *D39* およびその同質遺伝子線毛アイレット挿入誘導体 *D39* (*rrgA* - *srtD*) または不活化 *r1rA* 遺伝子を有する *D39* (*rrgA* - *srtD*) Δ (*r1rA*) での混合感染後の定着および肺炎における *CI*。1 を超える *CI* は、*D39* (*rrgA* - *srtD*) 中の *r1rA* アイレットの存在による病原性の増幅を示す。

【図 5 B】図 5。(A ~ E) 線毛化 (*piliated*) *T4* およびその同質遺伝子非線毛化欠失変異体 *T4* Δ (*rrgA* - *srtD*) での *C57BL/6* マウスの鼻腔内攻撃誘発。(A および B) 5×10^6 c f u (高用量、A) または 5×10^5 c f u (中用量、B) での接種後のマウスの生存率。カプラン・マイヤー対数順位検定の使用によって生存

率を分析した。(C~E) *in vivo* 競合感染実験。T4 およびその同質遺伝子変異体 T4 Δ (*rrgA* - *srtD*) を、鼻腔内感染前に 1 : 1 の比率で混合した。競合指数 (competitive index) (CI) を下記のように計算し、各サークルは各競合実験組における各マウスについての CI を示す。1 未満の CI は、野生型株と比較した場合に変異体が競合的に不利であることを示す。 10^{-4} 未満の CI 値を 10^{-4} に設定した。全マウスが定着した。(C) 高用量攻撃誘発後の定着、肺炎、および菌血症の CI ($n = 20$)。20 匹のマウスのうち、14 匹のみが肺炎 (肺から回収された細菌として定義) を示し、14 匹が菌血症を示した。(D) 中用量での攻撃誘発後の定着における CI ($n = 10$)。10 匹のうち、たった 5 匹が肺炎を示し、1 匹が菌血症を示した。(E) 低用量での攻撃誘発後の定着における CI ($n = 10$)。10 匹のうち、たった 4 匹が肺炎を示し、菌血症を発症しなかった。(F) 野生型 D39 およびその同質遺伝子線毛アイレット挿入誘導体 D39 (*rrgA* - *srtD*) または不活化 *rlrA* 遺伝子を有する D39 (*rrgA* - *srtD*) Δ (*rlrA*) での混合感染後の定着および肺炎における CI。1 を超える CI は、D39 (*rrgA* - *srtD*) 中の *rlrA* アイレットの存在による病原性の増幅を示す。

【図 5 C】図 5。(A~E) 線毛化 (*piliated*) T4 およびその同質遺伝子非線毛化欠失変異体 T4 Δ (*rrgA* - *srtD*) での C57BL/6 マウスの鼻腔内攻撃誘発。(A および B) 5×10^6 cfu (高用量、A) または 5×10^5 cfu (中用量、B) での接種後のマウスの生存率。カプラン・マイヤー対数順位検定の使用によって生存率を分析した。(C~E) *in vivo* 競合感染実験。T4 およびその同質遺伝子変異体 T4 Δ (*rrgA* - *srtD*) を、鼻腔内感染前に 1 : 1 の比率で混合した。競合指数 (competitive index) (CI) を下記のように計算し、各サークルは各競合実験組における各マウスについての CI を示す。1 未満の CI は、野生型株と比較した場合に変異体が競合的に不利であることを示す。 10^{-4} 未満の CI 値を 10^{-4} に設定した。全マウスが定着した。(C) 高用量攻撃誘発後の定着、肺炎、および菌血症の CI ($n = 20$)。20 匹のマウスのうち、14 匹のみが肺炎 (肺から回収された細菌として定義) を示し、14 匹が菌血症を示した。(D) 中用量での攻撃誘発後の定着における CI ($n = 10$)。10 匹のうち、たった 5 匹が肺炎を示し、1 匹が菌血症を示した。(E) 低用量での攻撃誘発後の定着における CI ($n = 10$)。10 匹のうち、たった 4 匹が肺炎を示し、菌血症を発症しなかった。(F) 野生型 D39 およびその同質遺伝子線毛アイレット挿入誘導体 D39 (*rrgA* - *srtD*) または不活化 *rlrA* 遺伝子を有する D39 (*rrgA* - *srtD*) Δ (*rlrA*) での混合感染後の定着および肺炎における CI。1 を超える CI は、D39 (*rrgA* - *srtD*) 中の *rlrA* アイレットの存在による病原性の増幅を示す。

【図 5 D】図 5。(A~E) 線毛化 (*piliated*) T4 およびその同質遺伝子非線毛化欠失変異体 T4 Δ (*rrgA* - *srtD*) での C57BL/6 マウスの鼻腔内攻撃誘発。(A および B) 5×10^6 cfu (高用量、A) または 5×10^5 cfu (中用量、B) での接種後のマウスの生存率。カプラン・マイヤー対数順位検定の使用によって生存率を分析した。(C~E) *in vivo* 競合感染実験。T4 およびその同質遺伝子変異体 T4 Δ (*rrgA* - *srtD*) を、鼻腔内感染前に 1 : 1 の比率で混合した。競合指数 (competitive index) (CI) を下記のように計算し、各サークルは各競合実験組における各マウスについての CI を示す。1 未満の CI は、野生型株と比較した場合に変異体が競合的に不利であることを示す。 10^{-4} 未満の CI 値を 10^{-4} に設定した。全マウスが定着した。(C) 高用量攻撃誘発後の定着、肺炎、および菌血症の CI ($n = 20$)。20 匹のマウスのうち、14 匹のみが肺炎 (肺から回収された細菌として定義) を示し、14 匹が菌血症を示した。(D) 中用量での攻撃誘発後の定着における CI ($n = 10$)。10 匹のうち、たった 5 匹が肺炎を示し、1 匹が菌血症を示した。(E) 低用量での攻撃誘発後の定着における CI ($n = 10$)。10 匹のうち、たった 4 匹が肺炎を示し、菌血症を発症しなかった。(F) 野生型 D39 およびその同質遺伝子線毛アイレット挿入誘導体 D39 (*rrgA* - *srtD*) または不活化 *rlrA* 遺伝子を

有する D39 (rrgA - srtD) Δ (rlrA) での混合感染後の定着および肺炎における CI。1 を超える CI は、D39 (rrgA - srtD) 中の rlrA アイレットの存在による病原性の増幅を示す。

【図 5 E】図 5。(A ~ E) 線毛化 (piliated) T4 およびその同質遺伝子非線毛化欠失変異体 T4 Δ (rrgA - srtD) での C57BL/6 マウスの鼻腔内攻撃誘発。(A および B) 5×10^6 cfu (高用量、A) または 5×10^5 cfu (中用量、B) での接種後のマウスの生存率。カプラン・マイヤー対数順位検定の使用によって生存率を分析した。(C ~ E) in vivo 競合感染実験。T4 およびその同質遺伝子変異体 T4 Δ (rrgA - srtD) を、鼻腔内感染前に 1 : 1 の比率で混合した。競合指数 (competitive index) (CI) を下記のように計算し、各サークルは各競合実験組における各マウスについての CI を示す。1 未満の CI は、野生型株と比較した場合に変異体が競合的に不利であることを示す。 10^{-4} 未満の CI 値を 10^{-4} に設定した。全マウスが定着した。(C) 高用量攻撃誘発後の定着、肺炎、および菌血症の CI (n = 20)。20 匹のマウスのうち、14 匹のみが肺炎 (肺から回収された細菌として定義) を示し、14 匹が菌血症を示した。(D) 中用量での攻撃誘発後の定着における CI (n = 10)。10 匹のうち、たった 5 匹が肺炎を示し、1 匹が菌血症を示した。(E) 低用量での攻撃誘発後の定着における CI (n = 10)。10 匹のうち、たった 4 匹が肺炎を示し、菌血症を発症しなかった。(F) 野生型 D39 およびその同質遺伝子線毛アイレット挿入誘導体 D39 (rrgA - srtD) または不活化 rlrA 遺伝子を有する D39 (rrgA - srtD) Δ (rlrA) での混合感染後の定着および肺炎における CI。1 を超える CI は、D39 (rrgA - srtD) 中の rlrA アイレットの存在による病原性の増幅を示す。

【図 5 F】図 5。(A ~ E) 線毛化 (piliated) T4 およびその同質遺伝子非線毛化欠失変異体 T4 Δ (rrgA - srtD) での C57BL/6 マウスの鼻腔内攻撃誘発。(A および B) 5×10^6 cfu (高用量、A) または 5×10^5 cfu (中用量、B) での接種後のマウスの生存率。カプラン・マイヤー対数順位検定の使用によって生存率を分析した。(C ~ E) in vivo 競合感染実験。T4 およびその同質遺伝子変異体 T4 Δ (rrgA - srtD) を、鼻腔内感染前に 1 : 1 の比率で混合した。競合指数 (competitive index) (CI) を下記のように計算し、各サークルは各競合実験組における各マウスについての CI を示す。1 未満の CI は、野生型株と比較した場合に変異体が競合的に不利であることを示す。 10^{-4} 未満の CI 値を 10^{-4} に設定した。全マウスが定着した。(C) 高用量攻撃誘発後の定着、肺炎、および菌血症の CI (n = 20)。20 匹のマウスのうち、14 匹のみが肺炎 (肺から回収された細菌として定義) を示し、14 匹が菌血症を示した。(D) 中用量での攻撃誘発後の定着における CI (n = 10)。10 匹のうち、たった 5 匹が肺炎を示し、1 匹が菌血症を示した。(E) 低用量での攻撃誘発後の定着における CI (n = 10)。10 匹のうち、たった 4 匹が肺炎を示し、菌血症を発症しなかった。(F) 野生型 D39 およびその同質遺伝子線毛アイレット挿入誘導体 D39 (rrgA - srtD) または不活化 rlrA 遺伝子を有する D39 (rrgA - srtD) Δ (rlrA) での混合感染後の定着および肺炎における CI。1 を超える CI は、D39 (rrgA - srtD) 中の rlrA アイレットの存在による病原性の増幅を示す。

【図 6】図 6。全身宿主炎症応答における rlrA 線毛アイレットの役割。マウスを、高攻撃誘発用量 ($5 \times 10^6 \sim 2 \times 10^7$ cfu) の T4、ST162^{19F}、その同質遺伝子変異体 T4 Δ (rrgA - srtD)、および ST162^{19F} Δ (rrgA - srtD) で攻撃誘発し、感染 6 時間後に屠殺した。(A) 高用量 i.p. 攻撃誘発後の血中の細菌増殖。各マウス由来の結果を示す。横線は中央値を示し、マン・ホイットニー U 検定による分析では、有意差は認められない ($P > 0.05$)。(B) 血清 TNF 応答。データを、平均および SEM として示す。マン・ホイットニー U 検定によって有意差が得られた (*、 $P < 0.0001$; *、 $P < 0.001$)。(C および D) T4 および T4 Δ (rrgA - srtD) (C) または ST162^{19F} および ST162^{19F} Δ (r

r g A - s r t D) (D) での接種後の細菌レベルに 관련된 各マウスの T N F 応答。

【図 7】図 7。図 6 に示す i . p . 攻撃誘発についての I L - 6 応答の分析。血中での細菌成長を図 6 A に示す。(A) 感染 6 時間後の血清 I L - 6 応答。データを、平均および S E M として示す(マン・ホイットニー U 検定; *、 $P < 0.0001$)。(B) T 4 および T 4 Δ (r r g A - s r t D) 接種後の細菌レベルに 관련된 各マウスについての I L - 6 応答。

【図 8】図 8 は、肺炎球菌 T 4 線毛の構造タンパク質 R r g A、R r g B、および R r g C の分析である。8 A は、グラム陽性線毛タンパク質中に見出された推定モチーフの略図である。8 B は、肺炎球菌 (T 4) 中の予想される線毛および E ボックスモチーフ (存在する場合) の配列を示す。基準としてコリネバクテリウム属の線毛および E ボックスモチーフを示す (T o n - T h a t r a , 2 0 0 4 , M o l . M i c r o b i o l . , 5 3 : 2 5 1 - 2 6 1 ; T o n - T h a t a n d S c h n e e w i n d , 2 0 0 4 , T r e n d s M i c r o b i o l . , 1 2 : 2 2 8 - 3 4 ; S c o t t a n d Z a h n e r ; 2 0 0 6 , M o l . M i c r o b i o l . , 6 2 : 3 2 0 - 3 3 0) 。 8 C は、肺炎球菌 T 4 の R r g A、R r g B、および R r g C で見出されたモチーフのまとめである。8 A および 8 C、S : N 末端シグナルペプチド、P : 線毛モチーフ、E : E ボックス、C : 細胞壁選別シグナルモチーフ、M : 疎水性ストレッチ (h y d r o p h o b i c s t r e t c h) および荷電テール。

【図 9 A】図 9 A は、精製された R r g A および R r g B タンパク質の自己会合を示す、クーマシーブルーで染色したポリアクリルアミドゲルを示す。

【図 9 B】図 9 B は、精製された R r g A および R r g B タンパク質の自己会合を示す、免疫プロットを示す。

【図 9 C】図 9 C は、精製された R r g A、R r g B、および R r g C タンパク質のサイズ排除クロマトグラフィの一連の軌跡を示す。R r g A および R r g B についてより高い分子量の複合体が認められた。

【図 10 A】図 10 A は、ショ糖密度勾配による高分子量で未変性の肺炎球菌 T 4 線毛の精製を示す線グラフを示す。

【図 10 B】図 10 B は、サイズ排除クロマトグラフィによる高分子量で未変性の肺炎球菌 T 4 線毛の精製を示す軌跡を示す。

【図 10 C】図 10 C は、高分子量で未変性の肺炎球菌 T 4 線毛の精製結果を示すポリアクリルアミドゲルを示す。左側のゲルは、銀染色の結果を示す。右側のゲルは、R r g B に特異的に結合する抗体での免疫プロットを示す。

【図 11 A】図 11 A は、R r g B の推定アミノ酸配列と比較した線毛タンパク質の N 末端アミノ酸配列 (下線) を決定するためのエドマン分析の結果を示す。線毛タンパク質の N 末端は、推定シグナルペプチド切断部位 (/) に対応する。

【図 11 B】図 11 B は、精製された高分子量線毛のトリプシン消化の質量分析の結果を示す。高分子量の線毛 (S D S - P A G E ゲルから単離) のトリプシンペプチド配列 (斜体) は、推定 R r g B アミノ酸配列 (太字) と適合する。

【図 12 A】図 12 は、H M W 線毛 (5 0 μ l / マウス) に対する抗血清で免疫化し (I P)、2 6 0 C F U の T 4 / マウスで攻撃誘発した (I P) B A L B / c マウスの菌血症および死亡率を示す。T 4 Δ 線毛調製物は、ネガティブコントロールとしての機能を果たした。A . 攻撃誘発から 2 4 時間後の菌血症。円 = 単一動物の血液 1 m l あたりの C F U 値 ; 横棒 = 各群の相乗平均 ; 点線 = 検出限界 (すなわち、点線未満で血液サンプル中に C F U は検出されなかった) 。 B . 死亡率の経過。菱形 = 単一の動物の生存日数、横棒 = 各群の生存日数の中央値、 ; 破線 = 観察終点 (すなわち、終点で生存している破線を超えた動物) 。 c t r l = 対応するアジュバント + 生理食塩水のみを投与したマウス ; 抗線毛 = 精製 H M W 線毛に対する抗血清 ; 抗 Δ 線毛 = 精製コントロール (T 4 Δ 線毛) に対する抗血清 ; * = $P < 0.05$ および * * = $P < 0.01$ (対応するコントロール群との比較) 。

【図 12 B】図 12 は、H M W 線毛 (5 0 μ l / マウス) に対する抗血清で免疫化し (I

10

20

30

40

50

P)、260CFUのT4/マウスで攻撃誘発した(IP)BALB/cマウスの菌血症および死亡率を示す。T4Δ線毛調製物は、ネガティブコントロールとしての機能を果たした。A. 攻撃誘発から24時間後の菌血症。円=単一動物の血液1mlあたりのCFU値; 横棒=各群の相乗平均; 点線=検出限界(すなわち、点線未満で血液サンプル中にCFUは検出されなかった)。B. 死亡率の経過。菱形=単一の動物の生存日数、横棒=各群の生存日数の中央値、; 破線=観察終点(すなわち、終点で生存している破線を超えた動物)。control=対応するアジュバント+生理食塩水のみを投与したマウス; 抗線毛=精製HMW線毛に対する抗血清; 抗Δ線毛=精製コントロール(T4Δ線毛)に対する抗血清; * = $P < 0.05$ および ** = $P < 0.01$ (対応するコントロール群との比較)。

10

【図13-1】図13は、BSAおよび細胞外基質タンパク質であるムチンI、ヒアルロン酸、ピトロネクチン、コンドロイチン硫酸、ラクトフェリン、コラーゲンIおよびIV、ラミニン、フィブロネクチン、およびフィブリノゲンへの精製組換えタンパク質(BSA、RrgA、RrgB、RrgC)および未変性線毛の結合結果を示す一連のグラフを示す。BSAをネガティブコントロールとして使用した。結合を、ELISAによって405nmの吸光度で定量した。

【図13-2】図13は、BSAおよび細胞外基質タンパク質であるムチンI、ヒアルロン酸、ピトロネクチン、コンドロイチン硫酸、ラクトフェリン、コラーゲンIおよびIV、ラミニン、フィブロネクチン、およびフィブリノゲンへの精製組換えタンパク質(BSA、RrgA、RrgB、RrgC)および未変性線毛の結合結果を示す一連のグラフを示す。BSAをネガティブコントロールとして使用した。結合を、ELISAによって405nmの吸光度で定量した。

20

【図14】図14は、精製された線毛およびΔ線毛コントロール調製物にてin vitroで攻撃誘発された末梢血単核球(PBMC)および単球による炎症性サイトカインTNF-α、IL-12p40、およびIL-6の誘導を示す一連の棒グラフを示す。

【図15】図15は、RrgBに特異的な抗体で標識されたStreptococcus pneumoniae細菌免疫金の電子顕微鏡写真を示す。

【図16】図16は、RrgA(15nm金粒子に結合体化)、RrgB(5nm金粒子に融合)、およびRrgC(10nm金粒子に融合)に特異的な抗体で標識した精製線毛免疫金調製物の電子顕微鏡写真を示す。RrgBは、線毛の主成分である。RrgAおよびRrgCは、線毛の長さに沿って見出され、RrgAはしばしばクラスター中に見出される。

30

【図17】図17は、リンタングステン酸(PTA)でネガティブ染色し、5000倍で観察した精製線毛の電子顕微鏡写真を示す。

【図18】図18は、平均線毛直径を決定するための線毛構造分析の概略図である。

【図19】図19は、線毛体積を決定するための線毛構造分析の概略図である。

【図20】図20は、線毛電子顕微鏡写真の平均化およびフィルタリングによる線毛の改良された二次元描写の作製方法の概略図である。

【図21】図21は、3つのプロトフィラメントで構成されるらせん構造を示す線毛の回転二次元図の概略図である。

40

【図22】図22は、2つの位置での線毛構造にわたる密度プロファイルの決定の概略図である。

【図23】図23は、線毛構造モデルを示す。線毛は、少なくとも3つの「プロトフィラメント」によって作製されており、これらがコイルドコイル構造に配置され、平均直径が10.5~11.0nmであり、ピッチが13.2nmである。節での線毛の直径は6.8nmであり、1つ1つの「プロトフィラメント」の直径は3.5nmである。

【図 1 A】

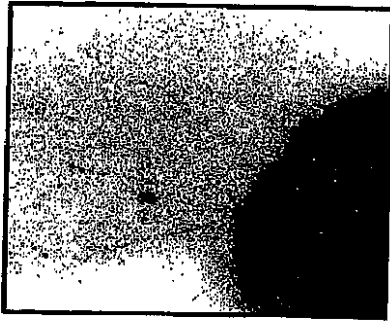


FIG. 1A

【図 1 C】

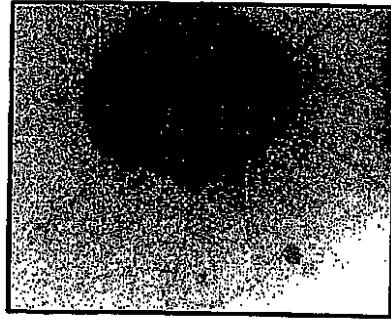


FIG. 1C

【図 1 B】

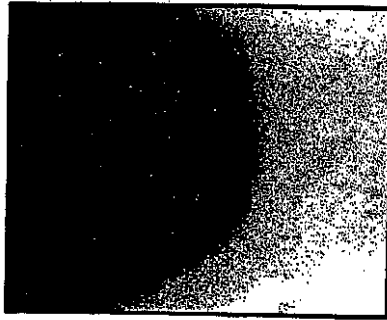


FIG. 1B

【図 1 D】

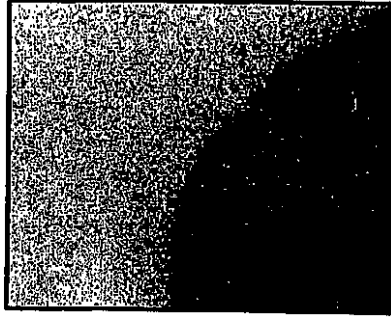


FIG. 1D

【図 1 E】

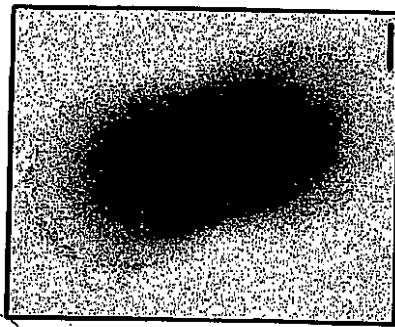


FIG. 1E

【図 1 G】

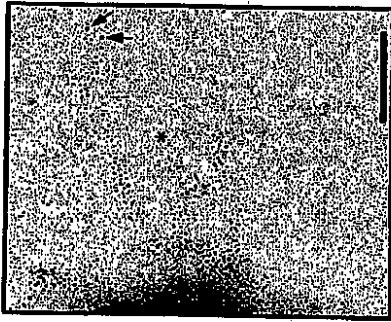


FIG. 1G

【図 1 F】

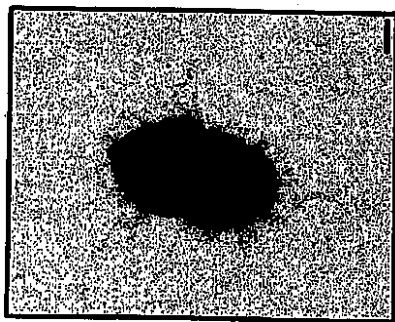


FIG. 1F

【図 1 H】

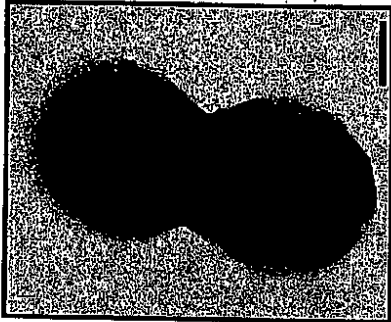
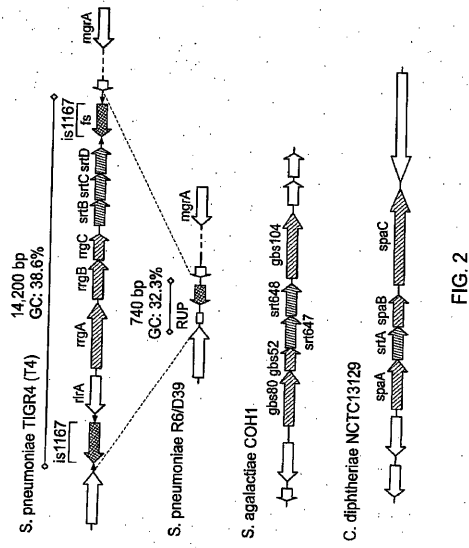
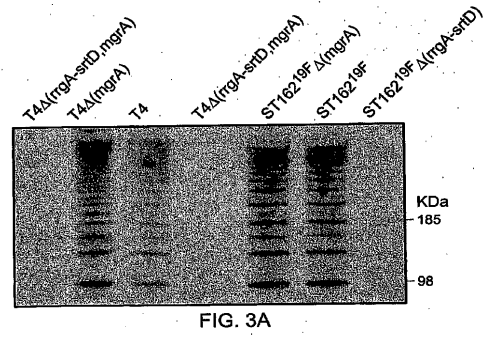


FIG. 1H

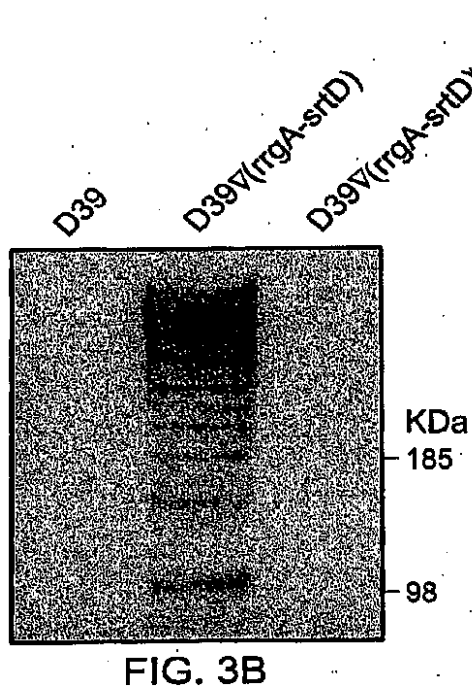
【 図 2 】



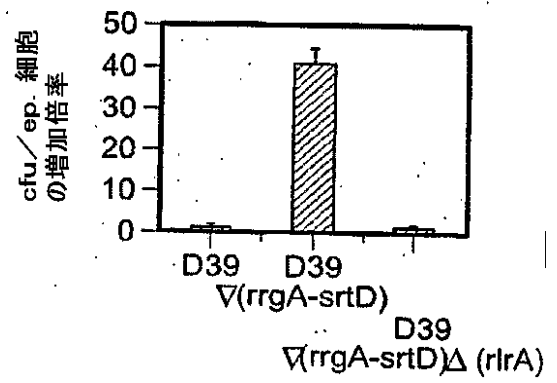
【 図 3 A 】



【 図 3 B 】



【 図 4 A 】



【図 4 B】



FIG. 4B

【図 4 C】



FIG. 4C

【図 4 D】

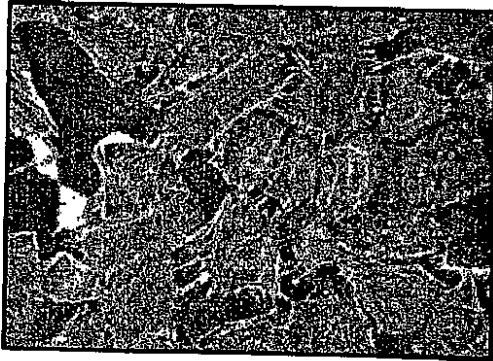


FIG. 4D

【図 5 A】

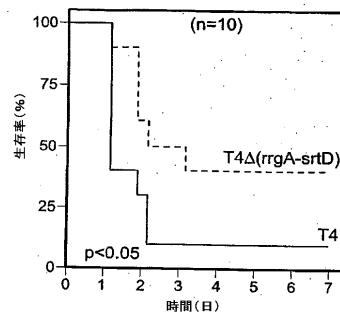


FIG. 5A

【図 5 B】

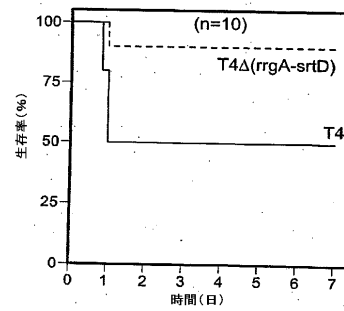


FIG. 5B

【図 5 C】

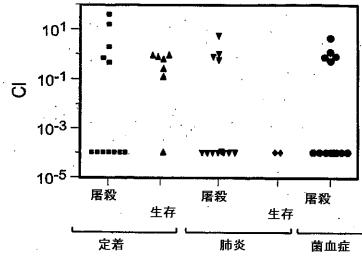


FIG. 5C

【図 5 D】

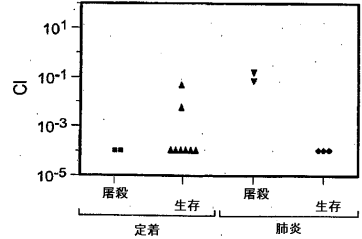


FIG. 5D

【図 5 E】

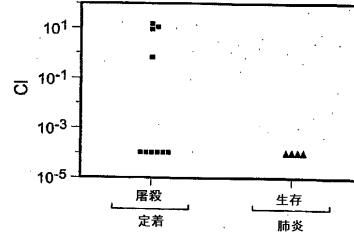


FIG. 5E

【図 5 F】

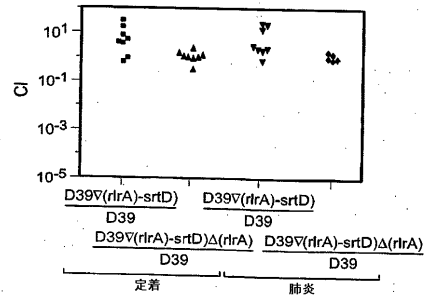
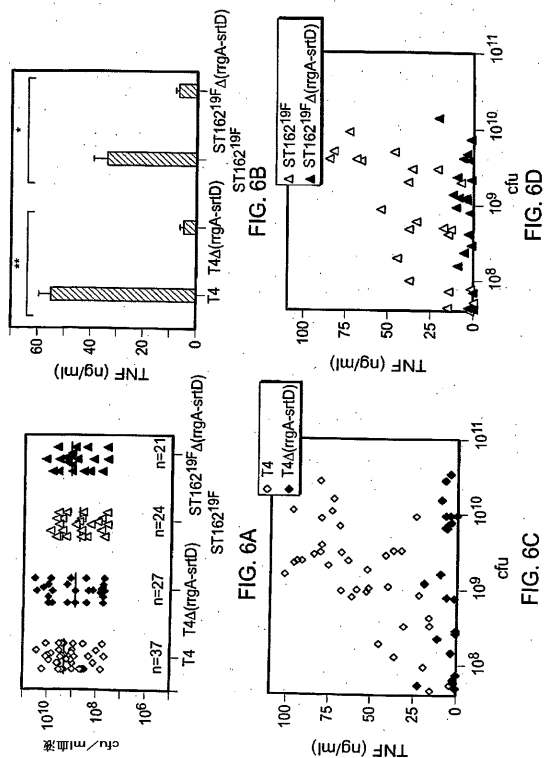


FIG. 5F

【図 6】



【図 7 A】

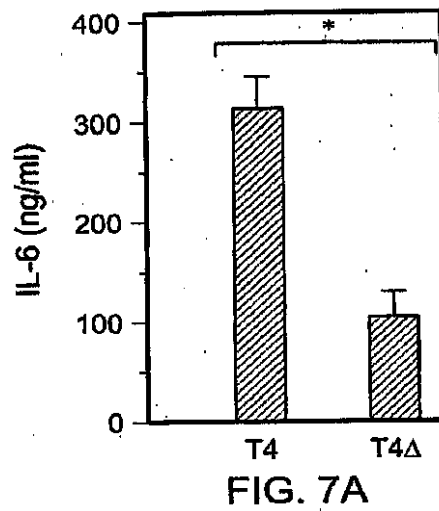


FIG. 7A

【図 7 B】

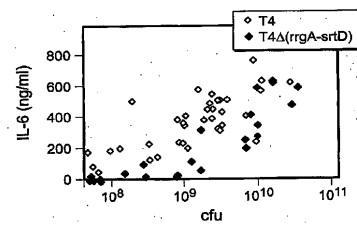


FIG. 7B

【図 8】

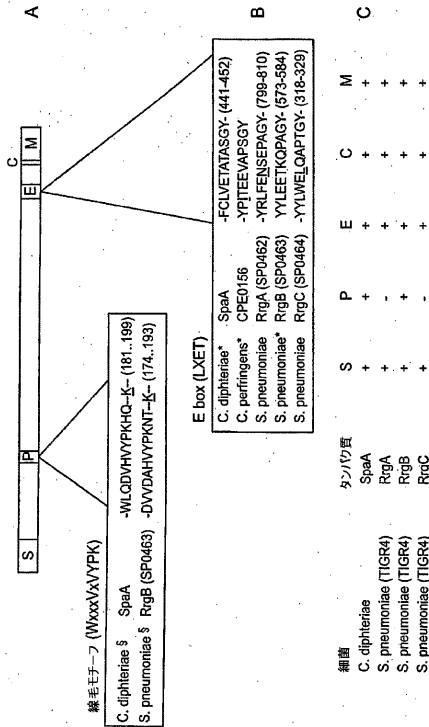
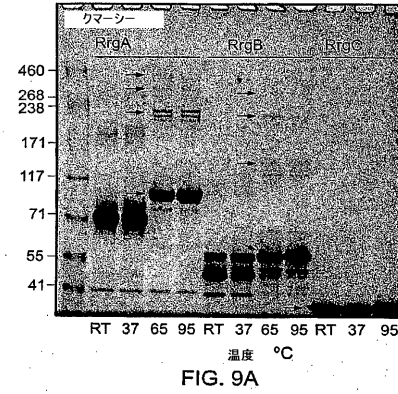
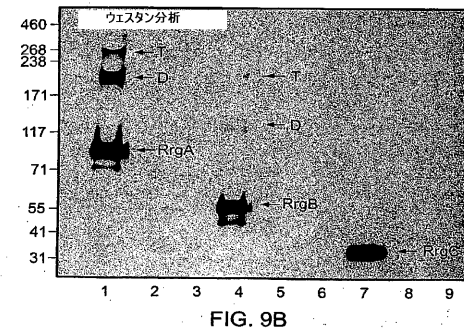


FIG. 8

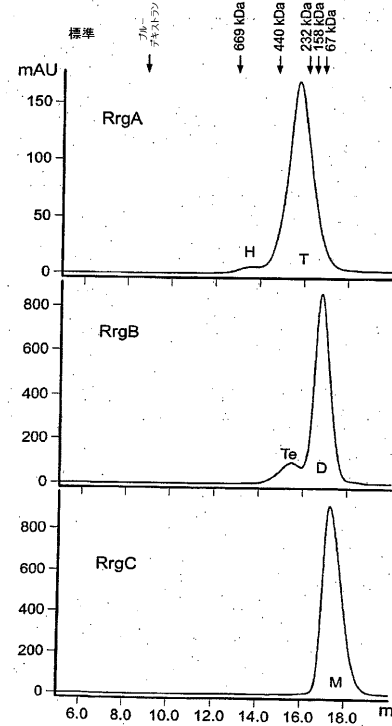
【図 9 A】



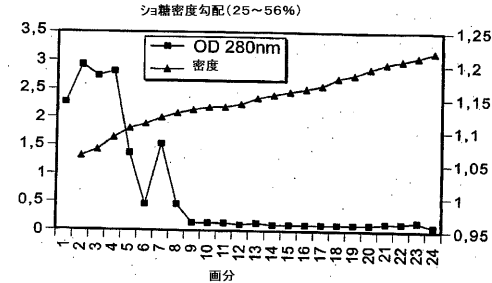
【図 9 B】



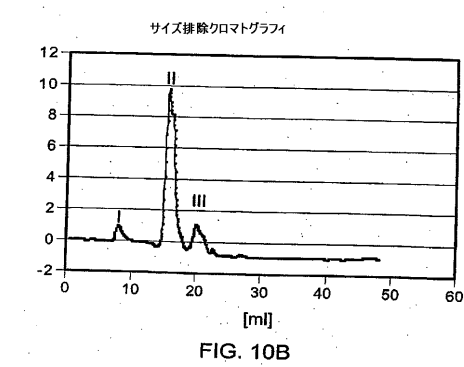
【図 9 C】



【図 10 A】



【図 10 B】



【図 10C】

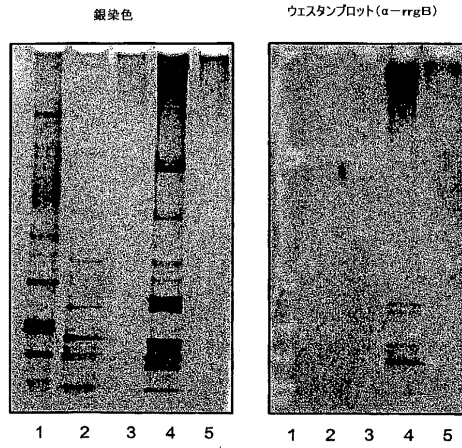


FIG. 10C

【図 11A】

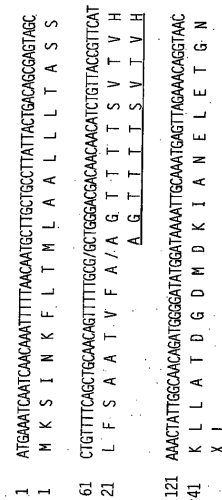


FIG. 11A

【図 11B】

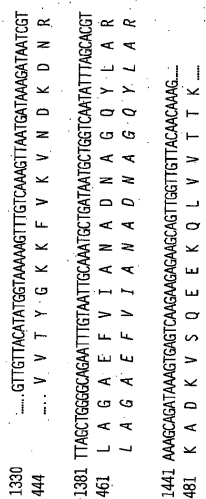


FIG. 11B

【図 12A】

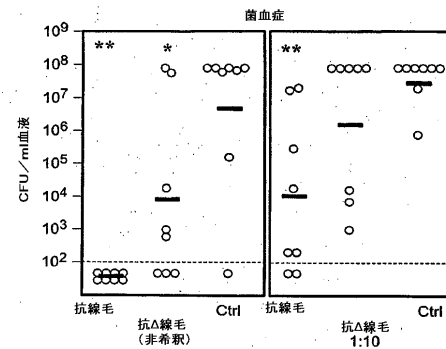


FIG. 12A

【図 12B】

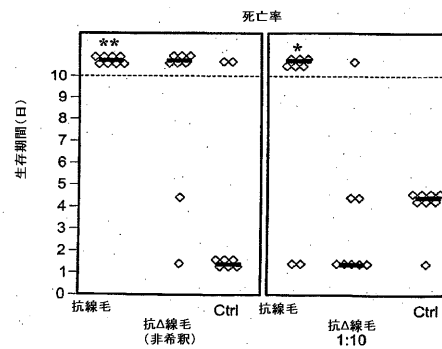
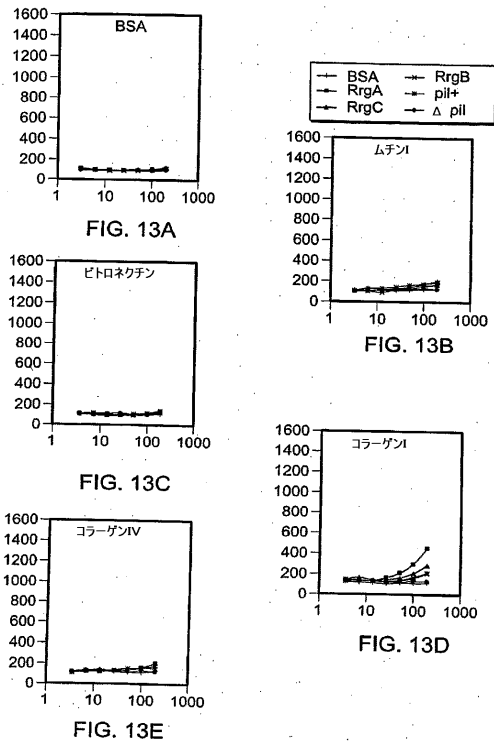
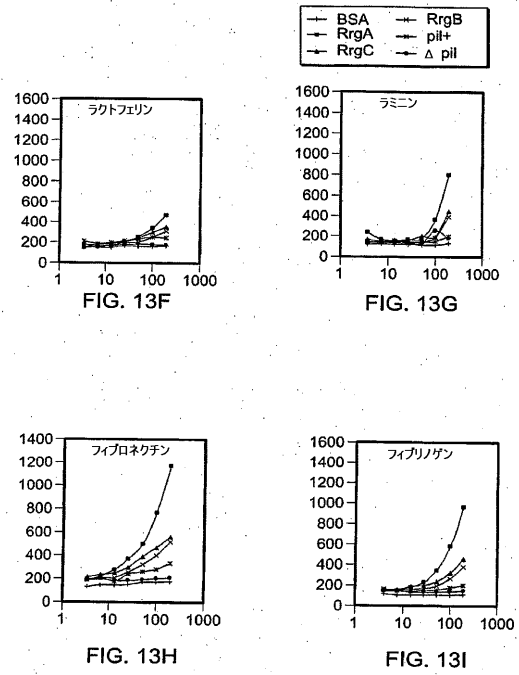


FIG. 12B

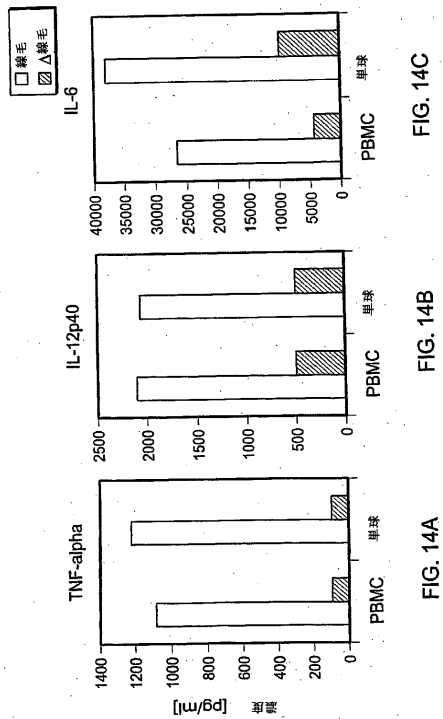
【図 13 - 1】



【図 13 - 2】



【図 14】



【図 15】

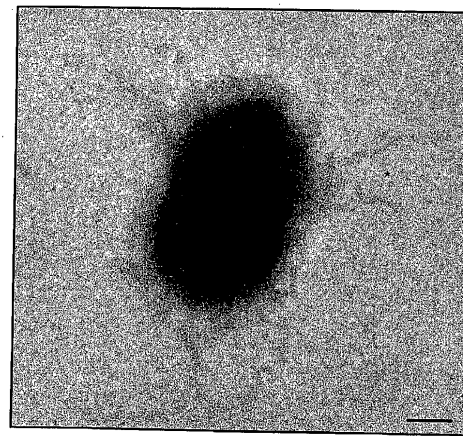


FIG. 15

【図 16】

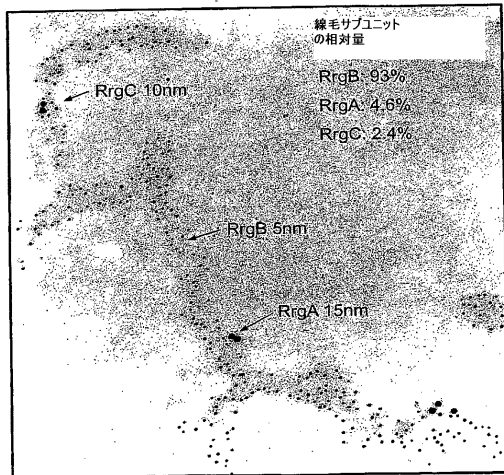


FIG. 16

【図 17】

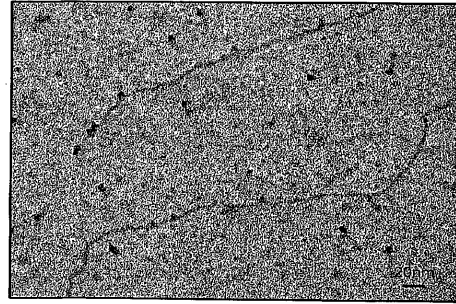


FIG. 17

【図 18】

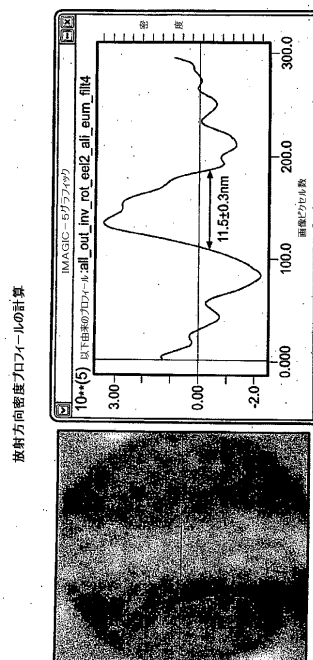


FIG. 18

【図 19】

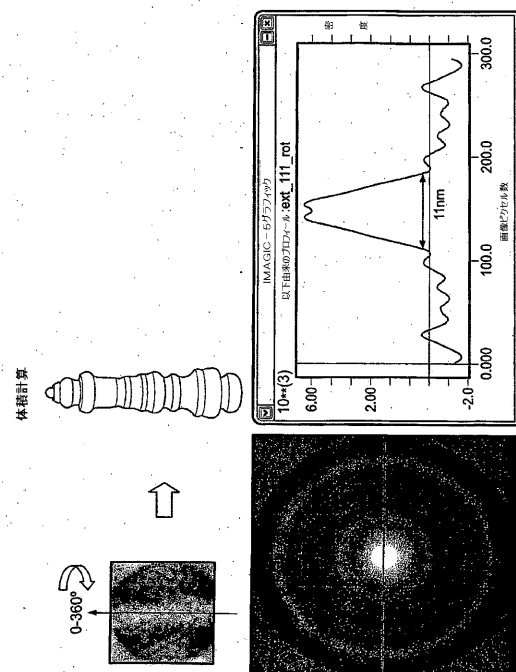


FIG. 19

【図 20】

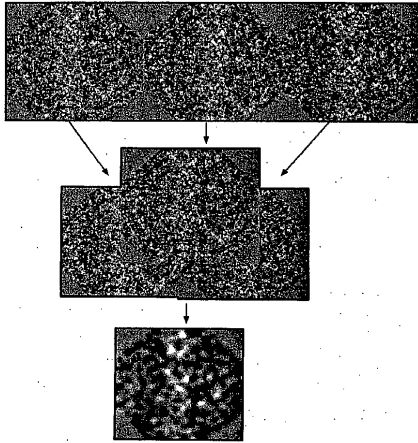


FIG. 20

【図 21】

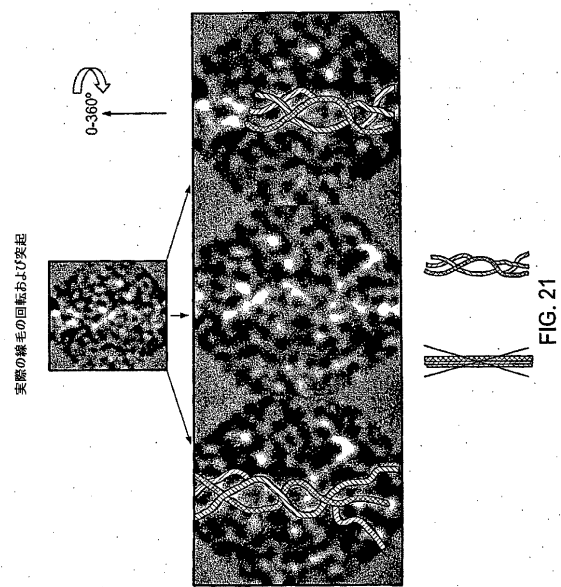


FIG. 21

【図 22】

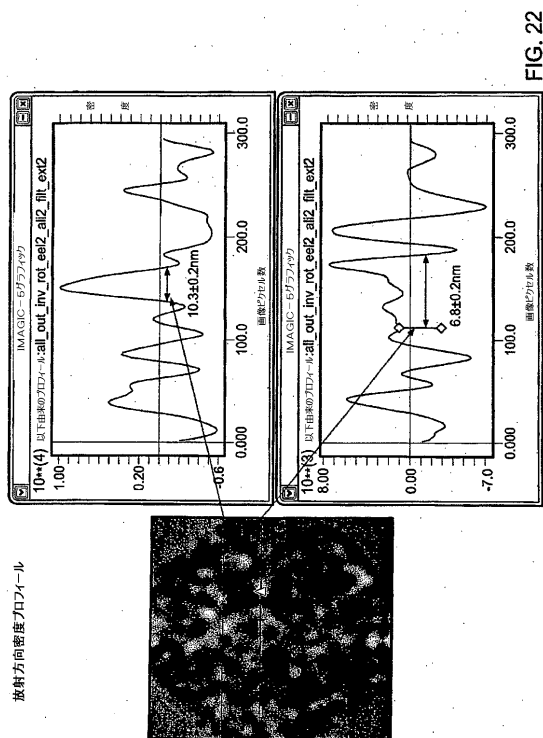


FIG. 22

放射方向密度プロファイル

【図 23】

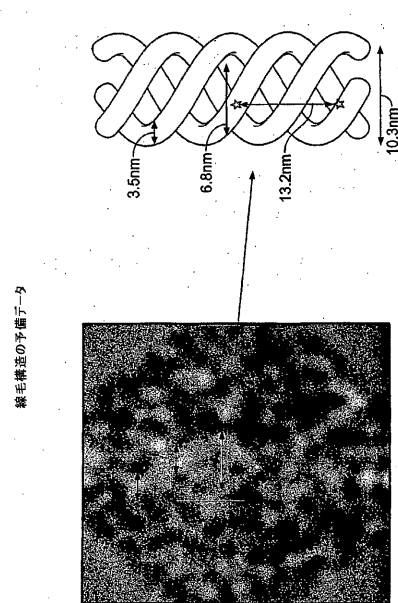


FIG. 23

【手続補正書】

【提出日】平成20年11月5日(2008.11.5)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】追加

【補正の内容】

【配列表】

2009538116000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2007/001948

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K14/315

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)
C07K

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)

EPO-internal, BIOSIS, Sequence Search, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BAROCCHI M A ET AL: "A pneumococcal pilus influences virulence and host inflammatory responses" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, vol. 103, no. 8, 15 February 2006 (2006-02-15), pages 2857-2862, XP002466451 Epub ahead of print ISSN: 0027-8424 the whole document ----- -/-	1-75

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

E earlier document but published on or after the international filing date

L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

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

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

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.

Z document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

28 January 2008

Date of mailing of the international search report

14/02/2008

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

NIEBUHR-EBEL, K

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/IB2007/001948

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MORA MARIROSA ET AL: "Group A Streptococcus produce pilus-like structures containing protective antigens and Lancefield T antigens" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, vol. 102, no. 43, October 2005 (2005-10), pages 15641-15646, XP002466452 ISSN: 0027-8424 abstract page 15641, right-hand column, paragraph 1 - page 15642, left-hand column, last line figures 2,3 page 15645, right-hand column, paragraph 1; table 1 page 15646, right-hand column, last paragraph	1,4-10, 12-16, 18-20, 23, 25-28, 31-35, 37-39, 41,42, 44,47, 49-51, 59,60, 63,64,75
X	LAUER PETER ET AL: "Genome analysis reveals pili in Group B Streptococcus." SCIENCE (NEW YORK, N.Y.) 1 JUL 2005, [Online] vol. 309, no. 5731, 1 July 2005 (2005-07-01), page 105, XP002466453 ISSN: 1095-9203 + 3 pgs supporting online material Retrieved from the Internet: URL: http://www.sciencemag.org/cgi/data/309/5731/105/DC1/1 [retrieved on 2008-01-28] page 105, middle column, paragraph 2 - right-hand column, last paragraph figure 1	1,4-10, 12-16, 18-20, 23, 25-28, 31-35, 37-39, 41,42, 44,47, 49-51, 59,60, 63,64,75
A	HAVA DAVID L ET AL: "Transcriptional regulation in the Streptococcus pneumoniae rlrA pathogenicity islet by rlrA." JOURNAL OF BACTERIOLOGY, vol. 185, no. 2, January 2003 (2003-01), pages 413-421, XP002466454 ISSN: 0021-9193 abstract page 413, left-hand column, paragraph 2 - page 414, left-hand column, paragraph 1 figure 1 ----- -/--	1-75

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/IB2007/001948

Q(Continuation), DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	LEVESQUE CELINE ET AL: "Streptococcus salivarius fimbriae are composed of a glycoprotein containing a repeated motif assembled into a filamentous nondissociable structure" JOURNAL OF BACTERIOLOGY, vol. 183, no. 9, May 2001 (2001-05), pages 2724-2732, XP002466455 ISSN: 0021-9193 the whole document	1-75
A	US 6 312 944 B1 (RUSSELL HAROLD [US] ET AL) 6 November 2001 (2001-11-06) "Pneumococcal fimbrial protein A" the whole document	1-75
P,X	LEMIEUX JULIANNA ET AL: "RrgA and RrgB are components of a multisubunit pilus encoded by the Streptococcus pneumoniae rlrA pathogenicity islet" INFECTION AND IMMUNITY, vol. 74, no. 4, April 2006 (2006-04), pages 2453-2456, XP002466456 ISSN: 0019-9567 the whole document	1-75
P,X	GIANFALDONI CLAUDIA ET AL: "Streptococcus pneumoniae pilus subunits protect mice against lethal challenge" INFECTION AND IMMUNITY, vol. 75, no. 2, February 2007 (2007-02), pages 1059-1062, XP002466457 ISSN: 0019-9567 the whole document	1-75

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

International Application No. PCT/IB2007/001948

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box II.1

Although claims 35-47 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

Although claims 48-51 are directed to a diagnostic method practised on the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

Continuation of Box II.1

Claims Nos.: -

method of treatment of the human/animal body /methods of diagnostics

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/IB2007/001948**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: —
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers allsearchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search reportcovers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/IB2007/001948

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 6312944	B1	06-11-2001	NONE

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 45/00 (2006.01)		A 6 1 K 45/00		4 C 0 8 5
A 6 1 K 39/395 (2006.01)		A 6 1 K 39/395	D	4 H 0 4 5
A 6 1 P 31/04 (2006.01)		A 6 1 K 39/395	R	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)		A 6 1 P 31/04		
G 0 1 N 33/569 (2006.01)		G 0 1 N 33/53	N	
G 0 1 N 30/88 (2006.01)		G 0 1 N 33/569	F	
C 1 2 P 21/08 (2006.01)		G 0 1 N 30/88	E	
		C 1 2 P 21/08		

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

(72) 発明者 ヒラーリングマン, マルクス
イタリア国 イ - 5 3 1 0 0 シエナ, ヴィア フィオレンティーナ 1, ノバルティス ヴァクシンズ アンド ダイアグノスティクス エセ・エレ・エレ.

(72) 発明者 ファーレンジ, イラリア
イタリア国 イ - 5 3 1 0 0 シエナ, ヴィア フィオレンティーナ 1, ノバルティス ヴァクシンズ アンド ダイアグノスティクス エセ・エレ・エレ.

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA13 BA31 BA50 CA04 CA09 DA06 EA04 GA11 HA01
HA14 HA15
4B063 QA18 QQ20 QR75 QR77 QR80 QS24
4B064 AG27 CA10 CA20 CC24 DA01 DA15
4B065 AA26X AA49Y AA90X AB01 AB04 AC14 BA02 BD01 BD14 BD15
BD44 CA24 CA25 CA44 CA46
4C084 AA17 NA14 ZB351
4C085 AA13 AA14 AA16 BA14 CC07 EE01
4H045 AA11 AA20 AA30 BA41 CA11 DA76 DA86 EA29 EA52 FA71
FA74

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2009538116A5	公开(公告)日	2010-04-08
申请号	JP2008554887	申请日	2007-02-16
[标]申请(专利权)人(译)	瑞士商诺华公司		
申请(专利权)人(译)	诺华公司		
[标]发明人	コヴァッチアントネロ ヒラーリングマンマルクス ファーレンジイラリア		
发明人	コヴァッチ, アントネロ ヒラーリングマン, マルクス ファーレンジ, イラリア		
IPC分类号	C12N15/09 C12N1/20 C07K16/12 C07K14/315 C12Q1/02 A61K45/00 A61K39/395 A61P31/04 G01N33/53 G01N33/569 G01N30/88 C12P21/08		
CPC分类号	C07K14/3156 A61K39/00 C07K16/1267 C07K16/1275		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C12N1/20.Z C07K16/12 C07K14/315 C12Q1/02 A61K45/00 A61K39/395.D A61K39/395.R A61P31/04 G01N33/53.N G01N33/569.F G01N30/88.E C12P21/08		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA13 4B024/BA31 4B024/BA50 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/DA06 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA01 4B024/HA14 4B024/HA15 4B063/QA18 4B063/QQ20 4B063/QR75 4B063/QR77 4B063/QR80 4B063/QS24 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA15 4B065/AA26X 4B065/AA49Y 4B065/AA90X 4B065/AB01 4B065/AB04 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/BD01 4B065/BD14 4B065/BD15 4B065/BD44 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA17 4C084/NA14 4C084/ZB351 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/AA16 4C085/BA14 4C085/CC07 4C085/EE01 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA41 4H045/CA11 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA29 4H045/EA52 4H045/FA71 4H045/FA74		
代理人(译)	夏木森下		
优先权	60/774450 2006-02-17 US		
其他公开文献	JP2009538116A		

摘要(译)

提出了从革兰氏阳性细菌（包括肺炎链球菌）和包含这种分离的菌毛的组合物中分离菌毛和菌毛样结构的方法。这些组合物可用作免疫原性组合物，用于产生抗体和免疫刺激。还提供了抑制肺炎链球菌的方法，以及鉴定肺炎链球菌抑制剂的方法。