

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2006-348036

(P2006-348036A)

(43) 公開日 平成18年12月28日(2006.12.28)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 39/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/00 Z N A H	4 B O 2 4
A 6 1 K 39/39 (2006.01)	A 6 1 K 39/39	4 B O 6 4
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	4 C O 8 4
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 P 31/04	4 C O 8 5
C O 7 K 14/205 (2006.01)	C O 7 K 14/205	4 H O 4 5
審査請求 有 請求項の数 51 書面 (全 25 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2006-190939 (P2006-190939)	(71) 出願人	506238581
(22) 出願日	平成18年6月13日 (2006.6.13)		リカン・リミテッド
(62) 分割の表示	特願平8-503770の分割		アイルランド国, ダブリン・2, ストーク
原出願日	平成7年7月3日 (1995.7.3)		ス・プレイス・1
(31) 優先権主張番号	940538	(74) 代理人	100098062
(32) 優先日	平成6年7月1日 (1994.7.1)		弁理士 梅田 明彦
(33) 優先権主張国	アイルランド (IE)	(72) 発明者	ケレハー, ダーモット
(31) 優先権主張番号	950249		アイルランド国, カウンティ・ダブリン,
(32) 優先日	平成7年4月6日 (1995.4.6)		ダン・レイエア, ケリーズ・アヴェニュー
(33) 優先権主張国	アイルランド (IE)		・2
		(72) 発明者	ウインドル, ヘンリー
			アイルランド国, ダブリン・4, メリオン
			・ヴィレッヂ・63

最終頁に続く

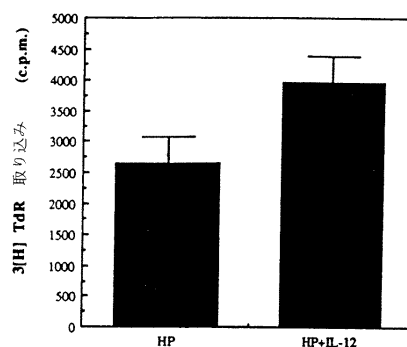
(54) 【発明の名称】 ヘリコバクタータンパク質およびワクチン

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】ヘリコバクター・ピロリ関連疾患の治療または予防ワクチンの提供。

【解決手段】*H. pylori* 陰性個体においてそれに対する免疫反応性が検出される少なくとも1つのヘリコバクタータンパク質、特にヘリコバクター・ピロリタンパク質を含むワクチン。ヘリコバクタータンパク質は好ましくは30 kDa以下であり、ワクチンは特に24~25 kDaおよび/または18~19 kDaのタンパク質を含む。ワクチンはアジュバントとしてインターロイキン(12)を含んでもよい。

【選択図】図8



IL-12の存在又は不存在下でのHPに対するPBMC応答

Fig 8

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

H . p y l o r i 陰性個体においてそれに対する免疫反応性が検出される少なくとも一つのヘリコバクタータンパク質、その誘導体、フラグメント、前駆体または変異体を含むワクチン。

【請求項 2】

免疫反応性が抗体をベースとする請求項 1 記載のワクチン。

【請求項 3】

タンパク質がヘリコバクター・ピロリタンパク質である請求項 1 または 2 のワクチン。

【請求項 4】

タンパク質が単一のタンパク質または 30 kDa 以下の分子量を有するタンパク質の混合物である請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載のワクチン。

10

【請求項 5】

タンパク質が 29 kDa 以下の分子量を有する請求項 4 記載のワクチン。

【請求項 6】

タンパク質が 28 kDa 以下の分子量を有する請求項 4 または 5 記載のワクチン。

【請求項 7】

タンパク質が 27 kDa 以下の分子量を有する請求項 4 ~ 6 のいずれかに記載のワクチン。

【請求項 8】

24 ~ 25 kDa のタンパク質、その誘導体、フラグメント、前駆体または変異体を含む請求項 1 ~ 7 のいずれかに記載のワクチン。

20

【請求項 9】

24 ~ 25 kDa のタンパク質が配列番号 1 に記載の N 末端アミノ酸配列またはその一部を有する請求項 8 記載のワクチン。

【請求項 10】

24 ~ 25 kDa のタンパク質が配列番号 A に記載の内部アミノ酸配列またはその一部を有する請求項 8 または 9 記載のワクチン。

【請求項 11】

タンパク質が 18 ~ 19 kDa のタンパク質、その誘導体、フラグメント、前駆体または変異体を含む請求項 1 ~ 10 のいずれかに記載のワクチン。

30

【請求項 12】

18 ~ 19 kDa のタンパク質が配列番号 2 に記載の N 末端アミノ酸配列またはその一部を有する請求項 11 記載のワクチン。

【請求項 13】

18 ~ 19 kDa のタンパク質が配列番号 3 に記載の内部アミノ酸配列またはその一部を有する請求項 11 または 12 記載のワクチン。

【請求項 14】

18 ~ 19 kDa のタンパク質が配列番号 6 に記載の N 末端アミノ酸配列またはその一部を有する請求項 11 ~ 13 のいずれかに記載のワクチン。

40

【請求項 15】

医薬的に許容できる担体を含む請求項 1 ~ 14 のいずれかに記載のワクチン。

【請求項 16】

薬理学的に適当なアジュバントと組み合わせた請求項 1 ~ 15 のいずれかに記載のワクチン。

【請求項 17】

アジュバントがインターロイキン 12 である請求項 16 記載のワクチン。

【請求項 18】

アジュバントが熱ショックタンパク質である請求項 16 または 17 記載のワクチン。

【請求項 19】

50

少なくとも1つの他の医薬品を含む請求項1～17のいずれかに記載のワクチン。

【請求項20】

医薬品が抗生物質である請求項19記載のワクチン。

【請求項21】

抗生物質がメトロニダゾール、アモキシシリン、テトラサイクリンまたはエリスロマイシン、クラリスロマイシンまたはタニダゾールの一つ以上から選択される請求項20記載のワクチン。

【請求項22】

医薬品がビスマス塩のような抗菌剤を含む請求項19～21のいずれかに記載のワクチン。

10

【請求項23】

経口投与のための形態にある請求項1～22のいずれかに記載のワクチン。

【請求項24】

鼻腔内投与のための形態にある請求項1～22のいずれかに記載のワクチン。

【請求項25】

静脈内投与のための形態にある請求項1～22のいずれかに記載のワクチン。

【請求項26】

筋肉内投与のための形態にある請求項1～22のいずれかに記載のワクチン。

【請求項27】

ペプチドデリバリーシステムを含む請求項1～22のいずれかに記載のワクチン。

20

【請求項28】

ヘリコバクター・ピロリ感染またはヘリコバクター・ピロリ関連疾患を治療または予防するための請求項1～27のいずれかに記載のワクチン。

【請求項29】

H. pylori 陰性個体においてそれに対する免疫反応性が検出されるヘリコバクタータンパク質、その誘導体、フラグメント、前駆体または変異体。

【請求項30】

免疫反応性が抗体をベースとする請求項29記載のヘリコバクタータンパク質。

【請求項31】

ヘリコバクター・ピロリタンパク質である請求項29または30記載のヘリコバクタータンパク質。

30

【請求項32】

タンパク質が30 kDa以下の分子量を有する請求項31記載のヘリコバクター・ピロリタンパク質。

【請求項33】

タンパク質が29 kDa以下の分子量を有する請求項32記載のヘリコバクター・ピロリタンパク質。

【請求項34】

タンパク質が28 kDa以下の分子量を有する32または33記載のヘリコバクター・ピロリタンパク質。

40

【請求項35】

タンパク質が27 kDa以下の分子量を有する請求項32～34のいずれかに記載のヘリコバクター・ピロリタンパク質。

【請求項36】

タンパク質が24～25 kDaのタンパク質、その誘導体、フラグメント、前駆体または変異体である請求項31～35のいずれかに記載のヘリコバクター・ピロリタンパク質。

【請求項37】

24～25 kDaのタンパク質が配列番号1に記載のN末端アミノ酸配列またはその一部を有する請求項36記載のヘリコバクター・ピロリタンパク質。

【請求項38】

50

24 ~ 25 kDa のタンパク質が配列番号 4 に記載の内部アミノ酸配列またはその一部を有する請求項 36 または 37 記載のヘリコバクター・ピロリタンパク質。

【請求項 39】

タンパク質が 18 ~ 19 kDa のタンパク質、その誘導体、フラグメント、前駆体または変異体である請求項 32 ~ 35 のいずれかに記載のヘリコバクター・ピロリタンパク質。

【請求項 40】

18 ~ 19 kDa のタンパク質が配列番号 2 に記載の N 末端アミノ酸配列またはその一部を有する請求項 38 記載のヘリコバクター・ピロリタンパク質。

【請求項 41】

18 ~ 19 kDa のタンパク質が配列番号 3 に記載の内部アミノ酸配列またはその一部を有する請求項 39 または 40 記載のヘリコバクター・ピロリタンパク質。 10

【請求項 42】

18 ~ 19 kDa のタンパク質が配列番号 6 に記載の N 末端アミノ酸配列またはその一部を有する請求項 39 ~ 41 のいずれかに記載のヘリコバクター・ピロリタンパク質。

【請求項 43】

ヘリコバクター・ピロリ関連疾患の治療または予防用薬剤の製造のための、請求項 28 ~ 42 のいずれかに記載の一つ以上のヘリコバクタータンパク質の使用。

【請求項 44】

請求項 28 ~ 42 のいずれかに記載のタンパク質様物質に対するモノクローナルもしくはポリクローナル抗体またはそのフラグメント。 20

【請求項 45】

請求項 28 ~ 42 のいずれかに記載のワクチンで動物を免疫化することにより得られる精製抗体または血清。

【請求項 46】

免疫学的に有効な量の請求項 36 ~ 38 および / または 39 ~ 42 のヘリコバクター・ピロリタンパク質、インターロイキン 12 のようなアジュバント、および抗生物質を含む、ヘリコバクター・ピロリ関連疾患の治療または予防のためのワクチン。

【請求項 47】

アジュバントとしてのインターロイキン 12 と組み合わせた、免疫学的に有効な量のヘリコバクター、そのサブユニット、フラグメント、誘導体、前駆体または変異体を含む、H . p y l o r i に対するワクチン。 30

【請求項 48】

ヘリコバクターがヘリコバクター・ピロリである請求項 47 記載のワクチン。

【請求項 49】

抗生物質を含む請求項 47 または 48 記載のワクチン。

【請求項 50】

抗菌剤を含む請求項 47 ~ 49 のいずれかに記載のワクチン。

【請求項 51】

ヘリコバクターワクチンにおけるアジュバントとしてのインターロイキン 12 の使用。

【発明の詳細な説明】 40

【技術分野】

【0001】

本発明は、ヘリコバクター・ピロリ関連疾患の治療または予防のためのワクチンまたは治療組成物およびそのワクチンに使用するタンパク質に関する。

【背景技術】

【0002】

ヘリコバクター・ピロリは、40 歳以下の集団の約 30 % において胃の生検に広く見出されている生物であり、年齢がそれより増加するにつれその発生率も上がる。この生物は、ヒトの慢性胃炎の原因因子である（例えば、Marshall & Warren 1984¹ ; Blaser , 1990² ）。疫学的研究により、H . p y l o r i は胃炎と 50

関連して見出されることが非常に多いことが示されてきた。血清学的探索により、現在または過去に感染した証拠がランダムに選択した給血者集団の30～50%に見出されることが示されてきた。十二指腸潰瘍疾患に対する直接の因果関係の証明は決定的なものではない。しかしながら、この生物は十二指腸潰瘍の患者の95%に見出される。さらに、この生物を除去すれば、潰瘍が迅速に癒されることになる（例えば、Rauws & Tytgat, 1990³）。これらのデータは、H. pyloriが十二指腸潰瘍の進展における最有力の因子であることの強力な証拠である。これらの症状の発病にH. pyloriが関与しているさらなる証拠が、ノトバイオートの子豚を用いた研究（Lambertら、1987⁴）およびヒトボランティアでのKochの必要条件の遂行（Marshallら、1985⁵；Morris & Nicholson, 1987⁶）により、提供された。 10

【0003】

さらに、今では、H. pyloriが胃癌の病因であることを暗示する強力な状況証拠がある（例えば、Jiangら、1987⁷；Lambertら、1986⁸；Crabtreeら、1992⁹；1993¹⁰；Formanら、1990¹¹，1991¹²；Nomuraら、1991¹³；Parsonnetら、1991¹⁴）。つい最近、FormanをリーダーとするEurogast研究グループ（1993¹⁵）は、H. pyloriの血清陽性と胃癌の死亡率および発生率との有意な関係を明らかにした。実際のところ、今や、H. pyloriによる感染が上部胃腸罹患率とかなり比例していることを暗示する説得力のある一連の文献がある。H. pyloriが誘導する胃十二指腸疾患の病因機構としていくつかの仮説が示唆されており、その中に、細胞毒の生産や上皮の機構の破壊というもの（例えば、Blaser, 1992¹⁶）がある。しかしながら、興味深いことに、多くの感染者は、病原体が持続的に存在するにも拘わらず、自覚症状がない（Taylor & Blaser, 1991¹⁷）。 20

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0004】

本発明により、H. pylori陰性個体においてそれに対する免疫反応性が検出される少なくとも一つのヘリコバクタータンパク質、その誘導体、フラグメント、前駆体または変異体を含むワクチンが提供される。好ましくは、免疫反応性は抗体をベースとする。 30

【0005】

本発明の好ましい態様において、タンパク質はヘリコバクター・ピロリタンパク質である。

【0006】

本発明の好ましい態様において、タンパク質は、30 kDa以下、とりわけ29 kDa以下、特に28 kDa以下、そして理想的には27 kDa以下の分子量を有する。

【0007】

本発明の特に好ましい態様において、ワクチンは24～25 kDaのタンパク質、その誘導体、フラグメント、前駆体または変異体を含む。

【0008】

24～25 kDaのタンパク質は、配列番号2に記載のN末端アミノ酸配列、またはその一部を有することをさらに特徴とする。 40

【0009】

24～25 kDaのタンパク質は、配列番号4に記載の内部アミノ酸配列、またはその一部を有することをさらに特徴とする。

【0010】

本発明の特に好ましい態様において、ワクチンは18～19 kDaのタンパク質、その誘導体、フラグメント、前駆体または変異体を含む。

【0011】

最も好ましくは、18～19 kDaのタンパク質は、配列番号1に記載のN末端アミノ 50

酸配列、またはその一部を有する。

【0012】

また、18～19 kDaのタンパク質は、配列番号3に記載の内部アミノ酸配列、またはその一部を含む。

【0013】

本発明の特に好ましい態様において、18～19 kDaのタンパク質は、配列番号6に記載のN末端配列、またはその一部を有する。

【0014】

ワクチンは、医薬的に許容できる担体を含んでもよい。

【0015】

ワクチンは、インターロイキン12、熱ショックタンパク質またはその両者のような適当なアジュバントと組み合わせてもよい。

【0016】

ワクチンは、抗生物質および/または抗菌剤（例えば、ピスマス塩）のような少なくとも一つの他の医薬品を含んでもよい。典型的には、この抗生物質は、メトロニダゾール、アモキシシリン、テトラサイクリン、エリスロマイシン、クラリスロマイシンまたはタニダゾールの一つ以上から選択される。

【0017】

ワクチンは、経口、鼻腔内、静脈内または筋肉内投与のための形態であってもよい。

【0018】

ワクチンはペプチドデリバリーシステムを含んでもよい。

【0019】

ワクチンは、理想的には、ヘリコバクター・ピロリ感染またはヘリコバクター・ピロリ関連疾患の治療または予防のためのものである。

【0020】

本発明のもう一つの見地によれば、H. pylori陰性個体においてそれに対する免疫反応性が検出されるヘリコバクタータンパク質、その誘導体、フラグメント、前駆体または変異体が提供される。好ましくは、免疫反応性は抗体をベースとする。

【0021】

好ましくは、ヘリコバクター・ピロリはヘリコバクター・ピロリタンパク質である。

【0022】

本発明の好ましい態様において、タンパク質は、30 kDa以下、とりわけ29 kDa以下、特に28 kDa以下、そして理想的には27 kDa以下の分子量を有する。

【0023】

本発明の特に好ましい態様において、ヘリコバクター・ピロリタンパク質は24～25 kDaのタンパク質、その誘導体、フラグメント、前駆体または変異体である。

【0024】

24～25 kDaのヘリコバクター・ピロリタンパク質は、配列番号2に記載のN末端アミノ酸配列、またはその一部を含むことを特徴とする。

【0025】

24～25 kDaのヘリコバクター・ピロリタンパク質は、配列番号4に記載の内部アミノ酸配列、またはその一部を含むことをさらに特徴とする。

【0026】

本発明のもう一つの好ましい態様において、ヘリコバクター・ピロリは18～19 kDaのタンパク質、その誘導体、フラグメント、前駆体または変異体である。

【0027】

18～19 kDaのヘリコバクター・ピロリは、配列番号1に記載のN末端アミノ酸配列、またはその一部を含むことを特徴とする。

【0028】

18～19 kDaのヘリコバクター・ピロリは、配列番号3に記載の内部アミノ酸配列

10

20

30

40

50

、またはその一部を含むことをさらに特徴とする。

【0029】

18～19 kDaのヘリコバクター・ピロリは、配列番号6に記載のN末端アミノ酸配列を含むことをさらに特徴とする。

【0030】

本発明は、また、免疫学的に有効な量の一つ以上の本発明のヘリコバクタータンパク質を宿主に投与することを含む、宿主におけるヘリコバクター・ピロリ関連疾患の治療または予防方法を提供する。

【0031】

好ましくは、ヘリコバクター・ピロリタンパク質は、少なくとも一つの他の医薬と組み合わせて投与される。 10

【0032】

好ましい態様において、医薬は抗生物質である。

【0033】

理想的には、抗生物質は、メトロニダゾール、アモキシシリン、テトラサイクリンまたはエリスロマイシン、クラリスロマイシン、タニダゾールの一つ以上から選択される。

【0034】

典型的には、医薬はビスマス塩のような抗菌剤を含む。

【0035】

本発明の好ましい態様において、アジュバントがヘリコバクタータンパク質と組み合わせて投与される。好ましくは、アジュバントはインターロイキン12、熱ショックタンパク質またはその両者である。 20

【0036】

本発明は、また、ヘリコバクター・ピロリ関連疾患の治療または予防用薬剤の製造のための、一つ以上の本発明のヘリコバクタータンパク質の使用を提供する。

【0037】

本発明は、さらに、本発明のタンパク質様物質に対するモノクローナルもしくはポリクローナル抗体またはそのフラグメント、および本発明のワクチンで動物を免疫化することにより得られる精製抗体または血清を提供する。

【0038】

本発明は、また、ヘリコバクター関連疾患、特にヘリコバクター・ピロリ関連疾患の治療または予防における上記血清および抗体の使用を提供する。 30

【0039】

本発明は、また、免疫学的に有効な量の本発明の24～25 kDaのヘリコバクター・ピロリタンパク質および/または18～19 kDaのヘリコバクター・ピロリタンパク質、アジュバント（例えば、インターロイキン12）、および抗生物質を含む、ヘリコバクター・ピロリ関連疾患の治療または予防のためのワクチンを提供する。

【0040】

ワクチンは、ビスマス塩のような抗菌剤を含んでもよい。

【0041】

本発明は、また、18～19 kDaのタンパク質、24～25 kDaまたは他のいずれかのH. pyloriサブユニットと組み合わせたインターロイキン12のアジュバント療法としての使用を含む。 40

【0042】

従って、もう一つの見地において、本発明は、アジュバントとしてのインターロイキン12と組み合わせた免疫学的に有効な量のヘリコバクター、そのサブユニット、フラグメント、誘導体、前駆体または変異体を含む、H. pyloriに対するワクチンを提供する。好ましくは、ヘリコバクターはヘリコバクター・ピロリである。

【0043】

本発明の一つの態様において、ワクチンは抗生物質を含み、その代わりにあるいはさら 50

に抗菌剤を含んでもよい。

【発明を実施するための最良の形態】

【0044】

本発明者らは、感染および未感染のヒトの両者における *H. pylori* に対する免疫反応性の普及を検討し、未感染のヒトがその B 細胞および T 細胞系の両方において *H. pylori* に対する高い応答性を示すことを見出した。特に、*H. pylori* に対する T 細胞免疫応答は、この生物について陰性のヒトにおいてより強いようである。この点に関して、本発明者らは、マクロファージによる微生物の殺傷に極めて重要であるサイトカイン - インターフェロンの分泌について検討した。T 細胞がこの生物に晒されたとき、*H. pylori* に感染した患者の T 細胞による - インターフェロンの分泌は、未感染者による分泌よりもかなり少なかった (Fanら、1993¹⁸)。従って、これらのデータは、*H. pylori* 陰性であるヒトがこの生物に晒されて、この生物を排除した可能性があることを示唆している。さらに、この生物に対する応答は、*H. pylori* 陽性の患者におけるよりもこの群のヒトにおいてかなり強い。

10

【0045】

“*H. pylori* 陰性の個体ないしはヒト” という用語は、急速ウレアーゼ試験法 (rapid urease testing)、組織学的検討または胃生検の培養の一つ以上のような技術により測定したときに *H. pylori* の胃コロニー形成の証拠を示さない、*H. pylori* に対して免疫反応性を有する個体ないしはヒトを意味する。

【0046】

20

第2の成分は、*H. pylori* 陰性の個体における *H. pylori* に対する抗体反応に関する。簡単に言うと、本発明者らは、*H. pylori* 陰性のヒトの大多数が2つの *H. pylori* タンパク質に対する検出可能な抗体を有することを感度の高い検出系を用いて明らかにした。詳細には、これらのタンパク質は MW 18 ~ 19 および 24 ~ 25 kDa のものである。かくして、これらの抗原に対する強力な免疫応答により、この生物に対する保護免疫が得られることが提案される。さらに、本発明者らは、これらのタンパク質を部分的に配列決定した。

【0047】

多くの場合、*H. pylori* に対する抗体が ELISA により検出される。

【0048】

30

ELISA をベースとする検出系の設計に固有の制約は、この閾値以下のすべての試料は陰性であるとみなされるようなカットオフポイントを確立することの制約である。明らかに、多くの血清陽性なヒトはこの状況で検出されないでいるために、この生物と過去に接触したことがあることを評価することは軽んじられる。この方法において、本発明者らは、ウェスタンブロットティングを用いて、健常人および *H. pylori* 感染者の両方における *H. pylori* に対する全身的な応答の抗原特異性を研究し、*H. pylori* 陰性のヒトにおいて血清陽性であることは、以前から示されてきたものよりもはるかに多いことを示した。さらに、本発明者らは、24 ~ 25 kDa タンパク質に対する抗体が *H. pylori* 陰性のヒトの大多数で検出可能であることを明らかにした。これらのことは、本発明者らがいわゆる増強化学発光 (Enhanced Chemiluminescence) を改良した技術を用いて見つけた。ウェスタンブロット分析上での増強化学発光により、未感染者の大多数は、*H. pylori* に特異的で他の微生物上に存在しない抗原を認識する抗体を持っていることがわかった。これらの抗原のうち、認識される最も共通性の高いものは、*H. pylori* に特異的であると思われる 24 ~ 25 kDa のタンパク質である。従って、これらのデータは、24 ~ 25 kDa のタンパク質またはそのサブユニットで免疫化することにより、この生物に未感染であるか、あるいは、この生物が抗細菌処理により排除されたヒトに保護免疫を与えることができることを示唆している。第2のタンパク質はまた、*H. pylori* 陰性のヒトの大きなサブグループで 18 ~ 19 kDa に同定された。同様に、このタンパク質またはそのサブユニットで免疫化すると、保護免疫を与えることができる。

40

50

【0049】

本発明者らは、*H. pylori*に対する抗体を検出するための新規なアッセイを開発した。このアッセイは、ウェスタンブロッティングと増強化学発光（ECL）を使用する。このアッセイを用いて、本発明者らは、急速ウレアーゼ試験のようなルーチン試験法で *H. pylori* について陰性であるヒトの約75%が実際に *H. pylori* に対する検出可能な抗体を獲得していることを明らかにした（第1図）。

【0050】

さらに、これらの抗体は *C. jejuni* または *E. coli* によって吸収されず、このことは、これが特異的な抗体応答であることを示唆している（第2図）。特に注目すべきことは、本発明者らが、ECLウェスタンブロッティングを用いて、これらの抗体により認識される抗原の分子量による特性決定を行ったことである。未感染者からの血清は *H. pylori* 上の一連の抗原を認識する。認識される最も共通性の高い抗原は、急速ウレアーゼ試験法においてこの生物について陰性であるヒトの70%以上で認識される24~25 kDaのタンパク質である。従って、このことは、この24~25 kDaのタンパク質が、この生物について陰性であるヒトにおける強力な免疫応答を引き起こす免疫優性な抗原であるかもしれないことを示唆している。*H. pylori* 陰性の小児における有意な抗体応答を引き起こす第2のタンパク質は18~19 kDaに同定された。これらのタンパク質については、さらにN末端および内部配列決定により特性決定したが、それは付録にまとめてある。

【0051】

最後に、マクロファージにより産生されたサイトカインであるいわゆるインターロイキン12は、抗原に対する応答においてγインターフェロンの産生を有意に増強する可能性がある。以前に述べたように、抗原特異的インターフェロンの産生は *H. pylori* 陽性のヒトについて減少している。25 kDaのタンパク質を用いる免疫化の計画にIL-12を加えると、γインターフェロン応答を増強することにより、*H. pylori* に対する宿主の免疫化を高めることが予想される。

【0052】

材料 すべての抗体は、Dako Ltd., High Wycombe, Bucks., U.K. から得た。すべての他の化学薬品および溶媒は、Sigma Chemical Company Ltd., Poole, Dorset, United Kingdom または BDH Chemicals Ltd., Poole, Dorset, United Kingdom から得た。

【0053】

SDS-PAGE 不連続SDS-PAGEは、本質的に Laemmli (1970)¹⁹ に記載されているように行った。全部で5mgのアセトン沈殿 *H. pylori* タンパク質を各ウェルに置いた。ゲルはクーマシーブルーR-250で染色するか、イムノブロッティング用の処理を行った。広範囲の分子量マーカーをBio-Rad Laboratories, 3300 Regatta Blvd., Richmond, CA 94804 から購入した。分子質量はkDaで表す。

【0054】

ウェスタンブロッティング 本質的に Towbin ら、(1979) に記載のように、SDS-PAGEゲル(30% T / 2.67% C)からのタンパク質を半乾燥ブロッティング装置(LKB/Pharmacia)を用いてPVDF膜に電気ブロットした(0.8 mA / cm²、1時間)。増強化学発光と組み合わせた、1/5, 000希釈の抗ヒトIgG(ホースラデッシュペルオキシダーゼ結合)を用いて、一次抗体(ヒト血清; 1/50~1/100希釈)を検出した。ブロットを脂肪不含の乾燥脱脂乳(5%、w/v)とTween-20(0.05%、v/v)を含有するPBS中で洗浄した。ブロットをKodak X-OMAT Sフィルムに1~10秒間感光した。感光したフィルムをKodak LX-24現像機において現像し、Kodak 歯科用X線固定機において固定した。

10

20

30

40

50

【0055】

血清 血清試料は、Research Centre, Our Ladies Hospital for Sick Children, Crumlin, Dublinから得た。すべての被験者は胃腸病学的疾患以外の医学的症状のために看護されていた。さらに、血液試料は、ランダムに選択した小児のコホート(群)(Harcourt Street Childrens Hospital, Dublin)またはSt. James's Hospital, Dublinで胃腸病学ユニットに通っている成人から得た。すべての患者には急速ウレアーゼ(CLO試験)が行われた。患者は、急速ウレアーゼ試験における陽性または陰性の応答に基づいて、H. pylori陽性または陰性と定義された。

10

【0056】

抗H. pylori抗血清 抗H. pylori抗血清は、B. Drumm教授とM. Clyne博士から好意により無償で提供されたものである。ニュージーランド白ウサギにおいて、常法の免疫化および追加免疫化手法を用いて、全H. pyloriに対する抗血清を作製した。

【0057】

タンパク質の測定 タンパク質は、Markwellら(1978)²⁰の方法により、タンパク質標準としてウシ血清アルブミンを用いて測定した。

【0058】

血清の吸収 細菌の懸濁液を患者血清と一緒に2時間室温で穏やかに攪拌しながらインキュベートすることにより、E. coliまたはC. jejuniのいずれかで抗血清を吸収させた。細菌は懸濁液から遠心(12,000x g、3分間)により取り除いた。

20

【0059】

細菌株および増殖条件 この研究に使用した臨床単離物であるH. pyloriは、St. James's Hospital, Dublinの胃腸病学診察室に通っている患者から得た洞生検から単離した。H. pyloriは、微好気性条件下で4日間7%溶解ウマ血液寒天上で37℃で増殖させた。PMSF(1mM)、EDTA(1mM)、およびロイペプチン(50μg/ml)を含有する氷冷リン酸緩衝生理食塩水(pH7.5)に細胞を回収した。この細胞を使用前にこの緩衝液中で遠心(10,000x g、5分間、4℃)により2回洗浄した。C. jejuniは、C. jejuni腸炎の患者の大便からの臨床単離物であり、インキュベーション温度が42℃であった他は正確に上記の方法で2日間増殖させた。この研究に用いたE. coliの株は市販の(Gibco)NTCC11637であり、College Dublin大学薬学部のCiaran Cronin博士が好意で提供してくれた。

30

【0060】

ヘリコバクター・ピロリからの2つの新規な抗原の同定および部分精製に用いた方法

方法
ウェスタンブロッティング。SDS-PAGEゲル(30% T/2.67% C)からのタンパク質を半乾燥ブロッティング装置(LKB/Pharmacia)を用いてPVDF膜に電気ブロットした(0.8mA/cm²、1時間)。増強化学発光(以下を参照のこと)と組み合わせて、1/5,000希釈の抗ヒトIgG(ホースラデッシュペルオキシダーゼ結合)を用いて、一次抗体(ヒト血清;1/50~1/100希釈)を検出した。ブロットを脂肪不含の乾燥脱脂乳(5%、w/v)とTween-20(0.05%、v/v)を含有するリン酸緩衝生理食塩水(pH7.5)において洗浄した。ブロットをKodak X-OMAT Sフィルムに1~10秒間感光した。感光したフィルムをKodak LX-24現像機において現像し、Kodak歯科用X線固定機において固定した。

40

【0061】

増強化学発光(EL)

色素原を使用したときに見られるよりも検出感度が高くなる(約10倍)ことが報告さ

50

れているという主な理由により、検出試薬として色素原基質を採用する常套の手法の代わりに、ウェスタンブロッティングにおいて抗体を検出するために化学発光を使用することにした。酸化ルミノールは可視光を放射し、この光放出の強度は化学増強剤（例えば、ヨードフェノール）の存在下で1000倍増加する。この方法を以下に記載する。

【0062】

基質	濃度 / 量
ルミノール	1.2 mM (0.1 M Tris (50 ml)、pH 8.8 中)
4 - ヨードフェノール	0.4 mM (使用前に DMSO に溶解)
過酸化水素	17 μ l の 30% (v/v) 溶液

上記の混合物中で1分間プロットをインキュベートし、その後、上記のようにX線フィルムに感光させた。 10

【0063】

18および25 kDaのタンパク質の部分精製

両タンパク質を491型Prep-Cell (Bio-Rad) 上で分取連続溶出ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) を用いて分子量を基準として全ヘリコバクター・ピロリから部分精製した (第2図)。この方法により、溶液の形態の分取量のタンパク質を定量的に精製することができる。

【0064】

精製方法

25 mg の H. pylori を氷冷アセトンで沈殿させ、アセトン中で1回洗浄し、その後、この沈殿を3.8 ml の SDS-PAGE 試料緩衝液 (62 mM Tris、pH 6.8; グリセロール (10%, v/v); SDS (2%, v/v); 2-メルカプトエタノール (5%, v/v); ブロムフェノールブルー (0.002%, v/v) に可溶化した。試料の作製は、非常に些細な変更はあるものの、公表されている電気泳動法に従った。 20

【0065】

ローディング: 試料緩衝液中のタンパク質混合物を12.5%ポリアクリルアミドチューブゲル (30% T / 2.67% C) にローディングした。チューブゲルの大きさは、28 mm 内径; 上部表面 3.6 cm²; 濃縮用ゲル 2 cm; 分解ゲル 10 cm であった。 30

【0066】

ランニング条件: 電気泳動を40 mA (定電流) で一晩室温で行った。画分 (1 ml) を0.1 ml / 分で回収した。各画分 (5 μ l) の試料を分析 SDS-PAGE につけ、各タンパク質の純度と抗原性を評価した。個々の免疫原性のタンパク質を単離して特性決定する試みにおいて、目的の分子質量領域内のすべての画分を SDS-PAGE (純度を評価するため) とウェスタンブロッティング (抗原性を評価するため) の両方でスクリーニングした。この手法の分離度は、ひとたび最適な電気泳動条件が確立されれば単一のタンパク質の純粋な調製品が得られるという程度である。予備最適化プロトコルには、低分子量タンパク質が高精度で分離されるのに都合のよいように設定された条件下で H. pylori タンパク質の混合物を電気泳動することが必要であった。選択されたタンパク質の部分精製を達成するために用いられる最終の電気泳動条件は方法のセクションで詳細に述べる。これらの厳密な条件を用いることにより、18 kDa のタンパク質が11~14 ml の間に溶出し、25 kDa のタンパク質が16~20 ml の間に溶出した。一連の低分子量マーカータンパク質 (範囲: 14.5 kDa ~ 66 kDa; コード: Sigma SDS-7) を用いた分析 SDS-PAGE により、このタンパク質の分子量を測定し、ウェスタンブロッティングでこれらのタンパク質が相対的免疫原であることを確認した。 40

【0067】

第1図は、急速ウレアーゼ試験法で H. pylori について陰性のヒトにおける H. pylori に対する抗体応答のウェスタンプロット分析を示す。ウェスタンブロッティ 50

ングは、増強化学発光検出系を用いて前述のように行った。急速ウレアーゼ試験法で *H. pylori* 陰性であるヒトにおいて、広範囲の *H. pylori* タンパク質に対する抗体が見られた。抗体が検出された最も共通性の高い抗原は 25 kDa のタンパク質であった。第3図は、25 kDa および 18 kDa のタンパク質の分取 SDS ゲル溶出プロフィールを示す。これらのタンパク質は、付録にまとめてあるように、N 末端および内部配列決定によりさらに特性決定してある。

【0068】

実施例 1

CLO 陰性の成人

同様に、19 人の成人血清のコホートを抗 *H. pylori* IgG 抗体に対してスクリーニングした。これらの被験者の各々は CLO 陰性であり、さらに 83 % は *H. pylori* に対する検出可能な抗体 (IgG) を有していた (第1図)。まとめると、これらのデータは、多くが過去に *H. pylori* と接触していたことを示唆している。抗体が検出された最も共通性の高い抗原は 25 kDa のものであった。

【0069】

CLO 陰性の小児

H. pylori に対する全身の体液性免疫応答 (IgG) を 2 群の小児においても研究した。これらの被験者はいずれもいかなる形態の抗 *H. pylori* 治療を受けたことがない。しかしながら、ほとんどすべての場合、これらの小児は *H. pylori* に対して特異的な抗体応答を示した。第一のコホート研究は、CLO 試験で *H. pylori* について陰性の 20 人の小児 (年齢: 4 ~ 15 歳) からなっていた。これらのうち、75 % が *H. pylori* に対する検出可能な IgG 抗体を有していた (第4図)。

【0070】

第二のコホートの小児 (n = 20) は無症候で、病院では胃腸疾患以外の症状を呈していた。しかし、13 / 18 (72 %) は、いくつかの *H. pylori* 特異的抗原に対する検出可能な IgG 抗体を有していた。しかしながら、この応答の強度から、これらのデータは、*H. pylori* 陽性のヒトについて観察されたかなり強い応答と比較したとき、抗体応答が過去におけるこの細菌との接触による可能性が高いことを示唆している。

【0071】

実施例 2

他の細菌との交差反応性

多くの細菌は共通の抗原決定基を有しているので、*H. pylori* とこれに非常に近い *C. jejuni*、さらに *E. coli* との間の交差反応性の程度を 2 つのコンプリメンタリーな (Complementary) 方法を用いて検討した。まず始めに、抗 *H. pylori* ポリクローナル抗血清が *C. jejuni* および *E. coli* の両方にある抗原を認識する能力をウェスタンブロッティングにより検討した (第2図)。

【0072】

抗 *H. pylori* 抗血清は *E. coli* および *C. jejuni* の両方にあるいくつかの抗原決定基を認識した。詳細には、この抗血清は、*C. jejuni* にある分子質量 72、50、40、36、および 25 kDa のタンパク質並びに *E. coli* にある分子質量 200、116、45、および 38 kDa のタンパク質を認識する (第5図)。これらのうち、3 つのタンパク質 (*C. jejuni* 由来の 70、25 kDa のもの、および *E. coli* 由来の 200 kDa のもの) だけが抗 *H. pylori* 抗血清との顕著な交差反応性を示す。従って、観察された交差反応性が広いものでないことは明らかである。第二に、吸収実験により、この交差反応性の抗原認識はあまり重要ではないことが示された。*H. pylori* および *C. jejuni* の臨床単離物、さらに市販の *E. coli* 株で吸収された血清試料は、血清反応性が *H. pylori* での吸収により消失しうが、*C. jejuni* または *E. coli* での吸収によっては消失しえないことが明らかとなった (第2図)。第2図は代表的な実験である。吸収の研究は、ここに示した結果と同様の結果を示した本研究においてスクリーニングした血清試料の約半分について行った。

10

20

30

40

50

この18および25 kDaのタンパク質は、試験したすべての臨床株の他にH. pylori対照株NTCC 11637および11638においても検出された。

【0073】

第3図に示したような分取連続溶出電気泳動により24～26 kDaのタンパク質を部分精製し、精製した24～26 kDaタンパク質のウェスタンブロットを未感染者からの血清で釣り上げることににより、この24～26 kDaのタンパク質の抗原性を確認した(第6図)。第6図に示した例は、このブロットをH. pyloriに未感染のヒトからの血清とともにインキュベートした代表的な実験である。明らかに、この血清試料は24～26 kDaのタンパク質を特異的に認識する抗体を含有しており、さらに、この実験の結果は、この抗原調製品においてはこのタンパク質が高度に純化されており、この調製品には他の免疫原性タンパク質が存在しないことを示している。18～20 kDaのタンパク質についても同様の結果が得られた。

10

【0074】

実施例3

全無傷ヘリコバクター・ピロリのビオチン化

寒天増殖H. pyloriをリン酸緩衝生理食塩水(pH 7.3)中に回収して、この緩衝液で2回洗浄してから、表面露出タンパク質をビオチン化した。細菌(～2 mg/ml)をPBS(1 ml)中に再懸濁し、37℃に予備加温した。その後、ビオチン-X-NHS(スルホサクシンイミジル-6(ビオチンアミド)-ヘキサノエート; Calbiochem)を最終濃度1 mMまで添加し、使用の直前に調製した。10分間37℃で混合した後、1.5 M Tris-Cl(pH 8)を最終濃度10 mMまで添加することにより標識化反応を停止させた。この懸濁液を遠心(10,000 g、1分間)により氷冷PBS中で3回洗浄した。標識化と洗浄操作の後にこの細菌を光学顕微鏡で観察して検討したところ、細胞がまだ無傷で運動性であることがわかった。

20

【0075】

ビオチン化タンパク質の分析

ビオチン化したH. pyloriを分析および分取SDS-PAGE、次いでウェスタンブロットティングにかけ、ビオチン化タンパク質を同定した。ウェスタンブロットをExtravidin-peroxidase(Sigma)で発色させた。H. pyloriタンパク質へのビオチンエステルのかなりの程度の取り込みが観察された(第7図)。さらに、18～24 kDaの領域のタンパク質がいくつかの他のタンパク質と同じようにビオチン化されることは明らかであり(第1表)、このことは、これらのタンパク質がこの細菌の表面に存在することを示している。

30

【0076】

【表 1】

第 1 表

ビオチン化タンパク質

見かけの分子量

1	13,800
2	15,600
3	16,600
4*	17,700
5	20,500
6*	23,500
7	26,400

10

20

【0077】

方法の記載

ヘリコバクター・ピロリに対する T 細胞免疫応答

チミジン取り込みアッセイを用いて、H. pylori に対する T リンパ球増殖応答について検討した。簡単に説明すると、フィコール - ハイパック勾配上での密度勾配遠心分離法によりリンパ球を単離した。リンパ球を 96 ウェルマイクロタイタープレートに 10^5 細胞 / ウェルの密度で 10 % ウシ胎児血清を含有する RPMI 1640 培地に蒔いた。H. pylori の超音波および照射処理した調製品を $3 \mu\text{g} / \text{ml}$ の濃度で添加した。対照ウェルには培地だけを添加した。さらに、インターロイキン 12 (R & D suppliers) を $500 \text{ pg} / \text{ml}$ の濃度で添加した。その後、細胞を 5 % CO_2 インキュベーター中で 4 日間 37 で培養した。4 日目に、力価測定したチミジン $1 \mu\text{Ci} / \text{ml}$ を添加し、培養をさらに 24 時間続けてから、多数自動試料回収機を用いて回収を行った。追加の実験においては、上記のような H. pylori 調製品の存在および不存在下で、CD3 T 細胞レセプター結合複合体に対する OKT3 抗体を用いて、細胞を刺激した。これらの検討において、インターロイキン 12 を同様に添加した。インターロイキン 10 に対する抗体をいくつかの実験において添加した。

30

【0078】

実施例 4

H. pylori に対する T 細胞応答はインターロイキン 12 により有意に増大する

40

方法論のところで記載したように、H. pylori に対するリンパ球増殖応答を検討した患者のコホートにおいて、インターロイキン 12 は H. pylori の末梢血単核細胞集団の増殖を高めた ($n = 12$, $p < .05$) (第 8 図)。これらのデータは、明らかに、インターロイキン 12 が H. pylori 免疫原性に対してアジュバント性を有することを示している。

【0079】

インターロイキン 12 は H. pylori により誘導された T 細胞応答の抑制を抑える。

【0080】

H. pylori 抗原調製品は、T 細胞マイトジェン OKT3 により誘導された増殖を有意に抑制する。この抑制は、インターロイキン 10 (これは、細胞増殖に関与する T へ

50

ルパー 1 細胞経路を抑制することが知られている T ヘルパー 2 細胞により生産されるサイトカインである。) に対する抗体を用いることにより解除することができた。従って、これらのデータは、H. pylori により誘導された T 細胞増殖の抑制がインターロイキン 10 により T ヘルパー 2 経路を通じて達成されることを示唆している。インターロイキン 12 も H. pylori により誘導された T 細胞応答の抑制を解除し、増殖応答をベースラインの OK T 3 誘導応答以上に有意に増大させたが、このことは、このサイトカインが H. pylori T ヘルパー 2 経路の作用を抑えることができることを示唆している。

【0081】

第 8 図は、インターロイキン 12 の存在および不存在下での H. pylori に対する応答におけるリンパ球のチミジン取り込みを説明する。インターロイキン 12 は、H. pylori に応答して末梢血単核細胞の増殖を有意に高めた。

10

【0082】

第 9 図は、抗インターロイキン 10 または組換えインターロイキン 12 とともにあるいはなしでの、H. pylori の存在および不存在下での末梢血単核細胞のチミジン取り込みを説明する。インターロイキン 12 と抗インターロイキン 10 のどちらも、リンパ球増殖の H. pylori 誘導抑制を有意に解除した。

【0083】

インターロイキン 12 はアジュバントとしても、H. pylori タンパク質、その誘導体またはフラグメントのいずれかとともに使用できることが理解されよう。その使用は、先に言及した特定の 25 kDa または 18 kDa のタンパク質に限定されるものではない。インターロイキン 12 は、例えば、消化性ペプチドや胃の酵素 / またはウレアーゼにより、このインターロイキンが in vivo で放出されるように、H. pylori ユニットと結合するのかもしれない。

20

【0084】

24 ~ 25 kDa および 18 ~ 19 kDa の分子質量について言及してきたが、この分子質量は 24 ~ 26 kDa および 17 ~ 19 kDa の範囲にあるかもしれないことが当業者により理解されよう。H. Felis や H. mustelii のような他の関連生物も動物モデルにおいて胃の疾患を生じしめるかもしれない。

【0085】

ヘリコバクター種からのタンパク質間の交差反応性は、個々の細菌種からの抗原が通常の宿主ではない動物における保護を与えることができることを意味しているのかもしれない。

30

【0086】

抗体がヘリコバクター・ピロリ陰性の個体において検出される有力な抗原は 18 ~ 19 および 24 ~ 25 kDa の抗原である。従って、30 kDa 以下、好ましくは 29 kDa 以下、理想的には 28 kDa 以下、好ましくは 27 kDa 以下のすべての抗原を含有する抗原調製品を使用したり、これらの抗原を免疫優性の抗原中で純化して、推定のワクチンに使用する。

【0087】

サイトカインであるインターロイキン 12 はアジュバントとして作用して H. pylori の免疫原性を高めるようである。特に、それは、H. pylori の 30 kDa 以下のタンパク質画分、とりわけ 18 kDa および 25 kDa タンパク質画分の免疫原性を高める。

40

【0088】

インターロイキン 12 をアジュバントとしても H. pylori タンパク質、その誘導体またはフラグメントとともに使用できるかもしれないことが理解されよう。その使用は、先に言及した特定の 25 kDa または 18 kDa のタンパク質に限定されるものではない。インターロイキン 12 は、例えば、消化性ペプチドや胃の酵素 / またはウレアーゼにより、このインターロイキンが in vivo で放出されるように、H. pylori ユ

50

ニットと結合するのかもしれない。

【0089】

24 ~ 25 kDa および 18 ~ 19 kDa の分子質量について言及してきたが、この分子質量は 24 ~ 26 kDa および 17 ~ 19 kDa の範囲にあるかもしれないことが当業者により理解されよう。H. Felis や H. mustelii のような他の関連生物も動物モデルにおいて胃の疾患を生じしめるかもしれない。

【0090】

ヘリコバクター種からのタンパク質間の交差反応性は、個々の細菌種からの抗原が通常の宿主ではない動物における保護を与えることができることを意味しているのかもしれない。

10

【0091】

抗体がヘリコバクター・ピロリ陰性の個体において検出される有力な抗原は 18 ~ 19 および 24 ~ 25 kDa の抗原である。従って、30 kDa 以下、好ましくは 29 kDa 以下、理想的には 28 kDa 以下、好ましくは 27 kDa 以下のすべての抗原を含有する抗原調製品を使用したり、これらの抗原を免疫優性の抗原中で純化して、推定のワクチンに使用する。

【0092】

ヘリコバクター・ピロリからの2つの抗原の部分配列決定

N末端配列分析

精製した 18 および 24 kDa のタンパク質を、12.5% ポリアクリルアミドゲルから、それぞれ、PVDf および ProBlott に電気ブロットした。0.1% アミドブラック (1% 酢酸、40% メタノール中) で15秒間染色し、次いで蒸留脱イオン水を数回取り替えて脱染することにより、これらのタンパク質を膜の上に見いだした。この膜をよく風乾し、Matsuda et al. (1989²¹) に記載のようにエドマン分解法を用いて配列分析するために提供した。

20

【0093】

25 および 18 kDa のタンパク質の N 末端アミノ酸配列を、それぞれ、配列番号 1 および 2 に記載する。

【0094】

ペプチドマッピング

Lischwe および Ochs (1982)²² の N - クロロサクシンイミドペプチドマッピング法を少々変更して用いた。ゲルを 0.1% クーマシーブルー R 250 (50% メタノール、10% 酢酸中) で簡単に染色することにより目的のバンドを SDS - PAGE ゲル (12.5% T) 上に見だし、次いで、解剖用メスの刃で切り出した。ゲル片に存在するタンパク質を酢酸 / 尿素 / 水 (1 : 1 : 1, v / v / v) 中の N - クロロサクシンイミド (15 mM) で 30 分間 20 ° で消化した。その後、処理したゲル片を水を数回取り替えて洗浄し、Lischwe および Ochs が記載したとおりに SDS - PAGE 試料緩衝液で平衡化した。最後に、このゲル片を 15% ポリアクリルアミド SDS - PAGE ゲルの試料ウェルに置き、電気泳動した。電気泳動に続き、ウェスタンブロッティングにより分離ペプチドを PVDf または ProBlott のいずれかに移した。膜を酢酸 (1%) およびメタノール (40%) 中の 0.1% アミドブラックで染色することにより、ペプチドを視覚化した。水でよく洗浄した後、ペプチドをさらなる変更なしに配列決定するために提供した。

30

40

【0095】

すべての SDS - PAGE 電気泳動操作の間、メルカプト酢酸 (2 mM) を上部電極に含ませた。この移動性チオールは、フリーラジカル捕捉剤としてふるまうので、N - ブロッキングを防止する。

【0096】

18 および 25 kDa のタンパク質からの内部ペプチドのアミノ酸配列を、それぞれ配列番号 3 および 4 に記載する。

50

【 0 0 9 7 】

ヘリコバクター・ピロリ染色体DNAの抽出

記載される (Silhavyら, 1984, 遺伝子融合を用いた実験 (Experiments with gene fusions). C. S. H. publications) ように、染色体DNAを抽出した。

【 0 0 9 8 】

縮重プライマーを用いた18~19 kDaタンパク質遺伝子の配列の増幅

縮重DNA配列を配列番号2および3に記載のアミノ酸配列から推定した。2段階の重ね合わせ (nested) PCR反応のために、4つの縮重プライマーをこれらの配列から設計した。続くこのフラグメントのクローニングのために、Eag1制限酵素部位を各プライマーに構築した。3つ以上の塩基がある部位で可能な場合には、すべての可能な塩基が含まれているときにその部位がプライマーの3' (3プライム) 末端から4つ以下の塩基である場合を除き、すべての可能な塩基の代わりにイノシンを組み入れた。また、このEag1部位のすぐ隣の位置ではイノシンを避けた。

10

【 0 0 9 9 】

遺伝子p18用の縮重プライマー

【 0 1 0 0 】

【 化 1 】

1. GAARA CGGCC GARAT IYTIA ARCA Y TICA RGC

2. TCYTC GGCCG TYTCY TCIGT NGCY

3. RATIY TCGGC CGYYI CARGC IGAYG C

4. ATYTC GGCCG TIGCY TTRTG NAC

20

【 0 1 0 1 】

外部のセットのプライマー (プライマー1 & 2) を用いて、18~19 kDaタンパク質遺伝子p18のゲノムDNAを以下のようにして増幅した。試料を94に3分間加熱してDNAを変性させ、次いで、94で30秒間、56で40秒間、そして72で30秒間の35サイクルで処理した。2.5 mM MgCl₂および0.2 mM dNTPの存在下、50 μlの反応容積で、100 pmolの各プライマーを使用した。この反応物1 μlを重ね合わせ反応の基質として使用した。この反応は、外部のプライマーを内部のプライマー (プライマー3 & 4) に置き換え、濃度2.0 mMのMgCl₂を用いた以外は、概要を説明した上記の反応と同じであった。反応産物を電気泳動したところ、大きさが約120 bp (分子サイズラダーで判定して) と評価される、2%アガロースゲル上のはっきりと目に見えるバンドが得られた。

30

【 0 1 0 2 】

増幅DNA配列の配列決定

18~19 kDaタンパク質遺伝子に対応する重ね合わせPCRフラグメントをEag1で消化し、これをBluescriptベクター (Stratagene) 中のユニークなEag1部位に連結することにより、このフラグメントをクローニングした。E. coli細胞を (標準的な方法に従って) 形質転換し、プラスミドDNAをアルカリ溶解法 (Sambrookら, 1989, Molecular cloning: A laboratory manual 2nd. Ed., CSH publications) を用いて回収し、次いで、RNAase消化工程、フェノール/クロロホルム抽出および2.5 M酢酸アンモニウムおよび2容のエタノールを用いて沈殿を行った。正 (forward) および逆 (reverse) ユニバーサルシーケンシングプライマーを用いて、2つの独立のプラスミドDNA単離物の配列決定を行った。p18遺伝子由来の挿入DNAを正および逆方向で配列決定した。配列決定は、ABI自動シーケンサーおよびGenpak PCRをベースとする蛍光ジデオキシ鎖終結末端シーケンシングキットを用いて行った。

40

50

【 0 1 0 3 】

内部のPCRプライマーの末端間の塩基の配列は、次の通りである。

【 0 1 0 4 】

【 化 2 】

GATCGTGTATTATTTATGAAAGTGCATAACTTCCATTGGAATGTGAAAGGCAC
CGATTTTTTCAAT

【 0 1 0 5 】

この塩基配列は配列番号5に記載のアミノ酸配列に翻訳される。

10

【 0 1 0 6 】

この配列（配列番号5）は、配列番号2に記載の18kDaタンパク質N末端アミノ酸配列と配列番号3に記載の18kDaタンパク質内部アミノ酸配列の両方と重ねて、配列番号6に記載の拡大N末端アミノ酸配列とする。

【 0 1 0 7 】

記載した特定の態様における多くの変更が容易にわかるであろう。従って、本発明は細部において変更可能なこれまでに記載した態様に限定されることはない。

【 0 1 0 8 】

参考文献リスト

1. Marshall, B. J. および Warren, J. R. (1984). 胃炎および消化性潰瘍患者の胃における未同定湾曲バチルス (Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration.) *Lancet* 1, 1311 - 1314. 20
2. Blaser M. J. (1990). ヘリコバクター・ピロリおよび胃十二指腸炎症の病因論 (Helicobacter pylori and the pathogenesis of gastroduodenal inflammation.) *J. Infect. Dis.* 161, 626 - 633.
3. Rauws, E. A. J. および Tytgat, G. N. J. (1990). ヘリコバクター・ピロリの撲滅により十二指腸潰瘍は治癒する (Eradication of Helicobacter pylori cures duodenal ulcer) : *Lancet* 1, 1233 - 1235. 30
4. Lambert, J. R., Borromeo, M., Pinkard, K. J., Turner, H., Chapman, C. B. および Smith, M. L. (1987). カンピロバクター・ピロリを有するノトバイオートの豚のコロニー形成 - 動物モデルか? (Colonisation of gnotobiotic pigs with Campylobacter pylori - an animal model?) *J. Infect. Dis.* 155, 1344. 40
5. Marshall, B. J., Armstrong, J. A., McGechie, D. B. および Glancy, R. J. (1985). カンピロバクター・ピロリに対する Koch の必要条件を満たす試み (Attempt to fulfill Koch's postulates for pyloric Campylobacter.) *Med. J. Aust.* 142, 436 - 439.
6. Morris, A. および Nicholson, G. (1987). カンピロバクター・ピロリの取り込みにより胃炎が生じたり、絶食状態の胃の pH が上がる (Ingestion of Campylobacter pylori causes gastritis and raises fasting gastric pH.) *Am. J. Gastroenterol.* 82, 192 - 199.
7. Jiang, S. J., Liu, W. Z., Zhang, D. Z., Shi, Y., Xiao, S. D., Zhang, Z. N. および Liu, D. Y. (1987). 慢性 50

- 胃炎、消化性潰瘍および胃癌におけるカンピロバクター様生物 (Campylobacter-like organisms in chronic gastritis, peptic ulcer and gastric carcinoma.) Scand. J. Gastroenterol. 22, 553-558.
8. Lambert, J. R., Dunn, K. A., Eaves, E. R., Korman, M. G. および Hansky, J. (1986). ヒト上部胃腸管の疾患におけるカンピロバクター・ピロリディス (Campylobacter floridis in diseases of the human upper gastrointestinal tract.) Gastroenterology 90, 1509.
9. Crabtree, J. E., Figura, N., Taylor, J. D., Bugnoli, M., Armellini, D. および Tompkins, D. S. (1992). 120 kDa のタンパク質の発現とヘリコバクター・ピロリにおける細胞毒性 (Expression of 120 kDa protein and cytotoxicity in Helicobacter pylori.) J. Clin. Pathol. 45, 733-734. 10
10. Crabtree, J. E., Wyatt, J. I., Sobala, G. M., Miller, G., Tompkins, D. S., Primrose, J. M. および Morgan, A. G. (1993). 胃癌におけるヘリコバクター・ピロリに対する全身性および粘膜性体液性応答 (Systemic and mucosal humoral responses to Helicobacter pylori in gastric cancer.) Gut 34, 1339-1343. 20
11. Forman, D., Sitas, F. および Newell, D. G. (1990). 中国の村落におけるヘリコバクター・ピロリ抗体の普及と胃癌致死率の地理的な関連 (Geographic association of Helicobacter pylori antibody prevalence and gastric cancer mortality in rural China.) Int. J. Cancer 46, 608-611.
12. Forman, D., Newell, D. G., Fullerton, F., Yarnell, J. W. G., Stacey, A. G., Wald, N. および Sitas, F. (1991). ヘリコバクター・ピロリによる感染と胃癌の危険性との関連: 見込みのある調査からの証拠 (Association between infection with Helicobacter pylori and risk of gastric cancer: evidence from a prospective investigation.) EMJ 302, 1302-1305. 30
13. Nomura, A., Stemmermann, G. N., Chyou, P.-H., Kato, I., Perez-Perez, G. I. および Blaser, M. J. (1991). ハワイの日系アメリカ人のなかでのヘリコバクター・ピロリ感染と胃癌 (Helicobacter pylori infection and gastric carcinoma amongst Japanese Americans in Hawaii.) N. Engl. J. Med. 325, 1132-1136. 40
14. Parsonnet, J., Friedman, G. D., Vanderstee, D. P., Chang, Y., Vogelmann, J. H., Orentreich, N. および Sibley, R. K. (1991). ヘリコバクター・ピロリ感染と胃癌の危険性 (Helicobacter pylori infection and the risk of gastric carcinoma.) N. Engl. J. Med. 325, 1127-1131.
15. Forman, D. (1993). ヘリコバクター・ピロリ感染と胃癌との国際的関連性 (An international association between Helicobacter pylori infection and gastric cancer.) The EUROGAST Study Group. Lanc 50

et 341, 1359 - 1362.

16. Blaser, M. J. (1992). ヘリコバクター・ピロリ誘導炎症の病因論の仮説と博物学 (Hypothesis on the pathogenesis and natural history of *Helicobacter pylori*-induced inflammation.) *Gastroenterology* 102, 720 - 727.

17. Taylor, D. N. および Blaser, M. J. (1991). ヘリコバクター・ピロリ感染の疫学 (Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection.) *Epidemiol. Rev.* 13, 42 - 59.

18. Fan, X. J., Chua, A. Shahi, C. N., McDevitt, J., Keeling, P. W. N. および Kelleher, D. (1994). ヘリコバクター・ピロリのコロニー形成に対する胃のTリンパ球の応答 (Gastric T lymphocyte responses to *Helicobacter pylori* colonisation.) *Gut* 35, 1379 - 1384.

19. Laemmli, U. K. (1970). *Nature* 227, 680 - 685.

20. Markwell, M. A. K., Haas, S. M., Bieber, L. L. および Tolbert, N. E. (1987) *Analytical Biochemistry*, 87, 206 - 210.

21. Matsudaira, P. T. (1989). マイクロシーケンシングのためのタンパク質およびペプチド精製の実用ガイド (A practical guide to protein and peptide purification for microsequencing.) Academic Press, San Diego.

22. Lischwe, M. A. および Ochs, D. (1982). ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲルにおけるN-クロロサクシンイミド/尿素およびを用いた部分ペプチドマッピングおよびペプチド銀染色の新しい方法 (A new method for partial peptide mapping using N-chlorosuccinimide/urea and peptide silver staining in sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels.) *Analytical Biochemistry* 127, 453 - 457.

【図面の簡単な説明】

【0109】

【図1】 抗H. pylori IgG抗体の存在についてスクリーニングした成人血清 (CLO陰性)。この図は、CLO陰性のヒトから得られた血清で釣り上げたH. pyloriのウェスタンブロットを示す。すべての血清は、脂肪不含の乾燥脱脂乳 (5%、w/v) を含有するPBSにおいて1:100に希釈した。タンパク質はSDS-PAGEゲルからPVDF膜に移した。抗原抗体複合体は、増強させた化学発光検出系を用いて洗浄膜上で検出した。各トラックは異なる血清試料を表す。

【図2】 第2図：吸収血清：H. pyloriについて陰性の二人のヒトからの血清を全C. jejuni (トラックA)、H. pylori (トラックB)、またはE. coli (トラックC) のいずれかで吸収させた。

【図3】 第3図：18および25 kDaのタンパク質の部分精製：両タンパク質を491型Prep-Cell (Bio-Rad) 上で分取連続溶出SDS-PAGEを用いて分子量を基準として全ヘリコバクター・ピロリから精製した。

【図4】 抗H. pylori IgG抗体の存在についてスクリーニングしたCLO陰性の小児から得られた血清。この図は、CLO陰性の小児から得られた血清で釣り上げたH. pyloriのウェスタンブロットを示す。すべての血清は、脂肪不含の乾燥脱脂乳

10

20

30

40

50

(5 %、w / v) を含有する P B S において 1 : 5 0 に希釈した。各トラックは異なる血清試料を表す。

【図 5】 抗 *H. pylori* 抗血清により認識された *C. jejuni* および *E. coli* 上の抗原。この図は、ウサギ抗 *H. pylori* 抗血清で釣り上げた *H. pylori* (トラック A)、*C. jejuni* (トラック B)、および *E. coli* (トラック C) のウェスタンブロットを示す。各細菌 (5 μ g) を S D S - P A G E、次いでイムノブロッティングにかけた。

【図 6】 *H. pylori* について陰性のヒトからの血清を用いて明らかにした精製 25 k D a タンパク質のウェスタンブロット。精製 25 k D a タンパク質を S D S - P A G E およびウェスタンブロッティングにかけた。このブロットを *H. pylori* に未感染の被験者から得られた血清で釣り上げた。

【図 7】 ヘリコバクター・ピロリの表面に存在するタンパク質のビオチン化。寒天増殖 *H. pylori* をリン酸緩衝生理食塩水 (p H 7 . 3) 中に回収し、この緩衝液中で 2 回洗浄してから表面露出タンパク質をビオチン化した。細菌 (~ 2 m g / m l) を P B S (1 m l) に再懸濁し、37 に予備加温した。その後、ビオチン - X - N H S (スルホサクシンイミジル - 6 (ビオチンアミド) - ヘキサノエート ; C a l b i o c h e m) を最終濃度 1 m M まで添加し、使用の直前に調製した。10 分間 37 で混合した後、1 . 5 M T r i s - C l (p H 8) を最終濃度 10 m M まで添加することにより標識化反応を停止させた。この懸濁液を氷冷 P B S 中で遠心 (10 , 000 g、1 分) することにより 3 回洗浄した。標識化と洗浄操作の後に細菌を光学顕微鏡により観察して検討したところ、細胞がまだ無傷で運動性であることがわかった。ビオチン化した *H. pylori* を分析 S D S - P A G E、次いでウェスタンブロッティングにかけ、ビオチン化タンパク質を同定した。ウェスタンブロットを E x t r a v i d i n - p e r o x i d a s e (S i g m a) で発色させた。

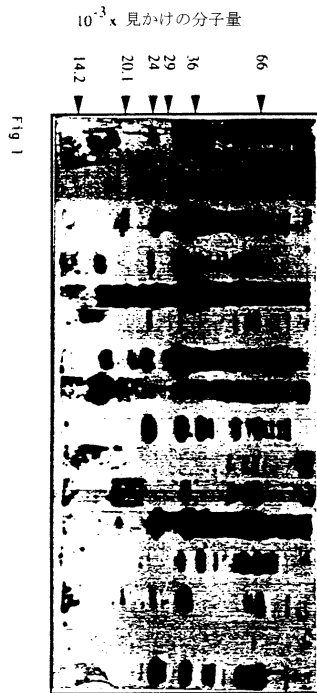
【図 8】 インターロイキン 12 の存在および不存在下での *H. pylori* に対する応答におけるリンパ球のチミジン取り込みを説明する。

【図 9】 抗インターロイキン 10 または組換えインターロイキン 12 とともにあるいはなしでの、*H. pylori* の存在および不存在下での末梢血単核細胞のチミジン取り込みを説明する。

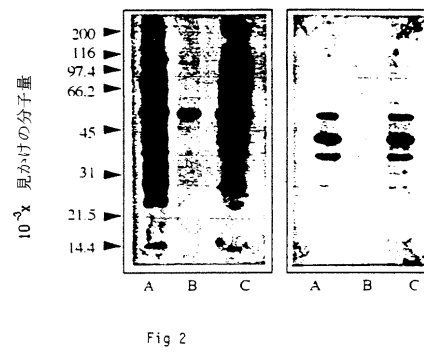
10

20

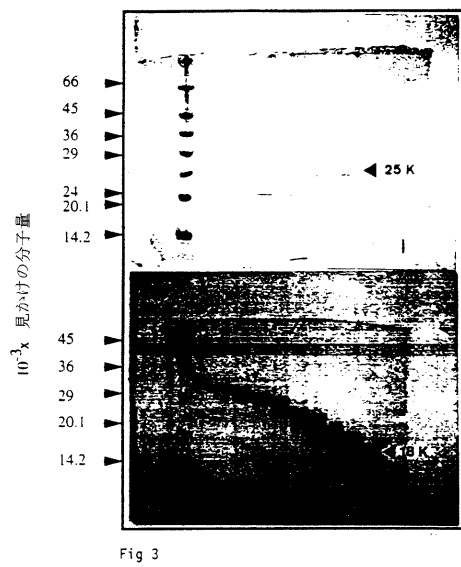
【図 1】



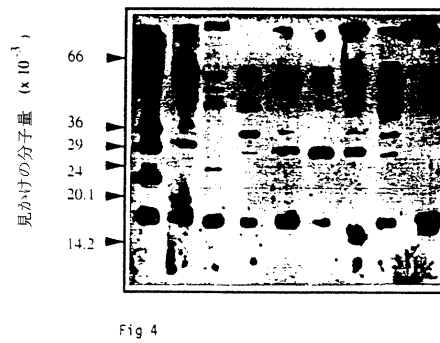
【図 2】



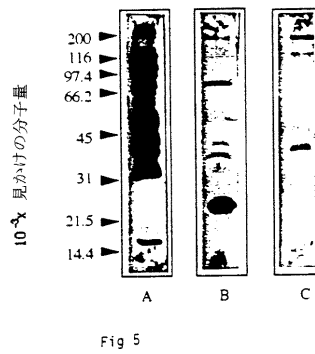
【図 3】



【図 4】



【図 5】



【図 6】

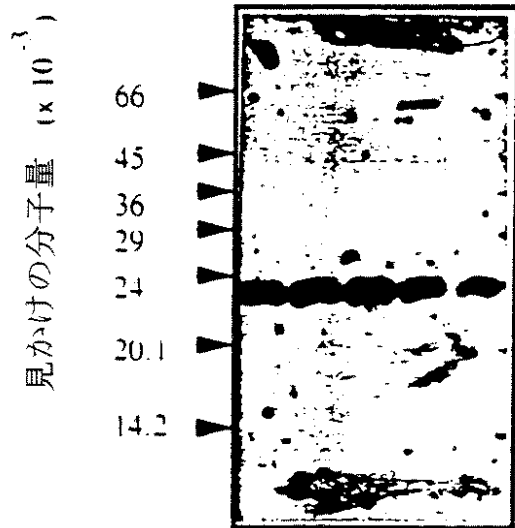


Fig 6

【図 7】

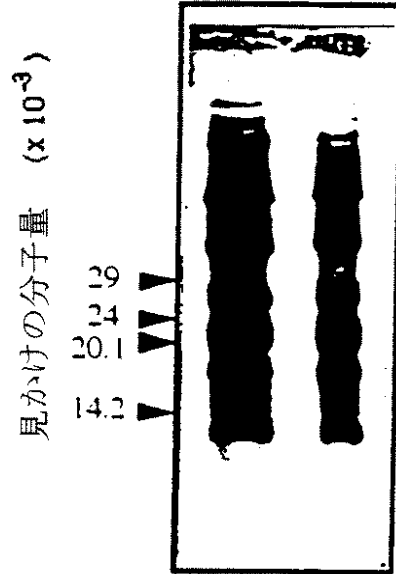
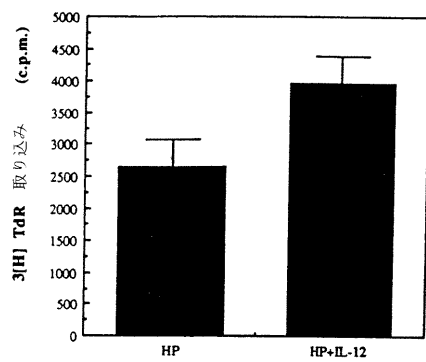


Fig 7

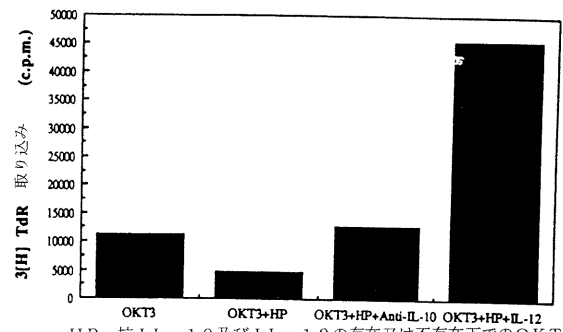
【図 8】



IL-12の存在又は不存在下でのHPに対するPBMC応答

Fig 8

【図 9】



HP、抗IL-10及びIL-12の存在又は不存在下でのOKT3に対するPBMC応答

Fig 9

【配列表】

2006348036000001.xml

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 0 7 K 16/12 (2006.01)	C 0 7 K 16/12	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	A
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	

(72)発明者 バーン, ウィリアム
 アイルランド国, カウンティ・ダブリン, マウント・メリオン, マザー・ロード・ノース・6

(72)発明者 マクマナス, ロス
 アイルランド国, ダブリン・2, メリオン・スクエアー・5 8

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA31 BA50 CA03 DA06 EA04 GA11 HA03
 4B064 AG27 CA10 CA20 CE12 DA01
 4C084 AA19 MA02 MA17 MA52 MA55 MA59 MA66 NA05 ZB351 ZC611
 4C085 AA03 AA38 BB11 CC04 CC05 DD22 DD23 EE01 EE03 EE06
 FF13 GG01 GG02 GG03 GG08
 4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 CA11 DA76 DA86 EA31 FA72 FA74
 GA26 GA30

专利名称(译)	螺杆菌蛋白和疫苗		
公开(公告)号	JP2006348036A	公开(公告)日	2006-12-28
申请号	JP2006190939	申请日	2006-06-13
[标]申请(专利权)人(译)	李康有限公司		
申请(专利权)人(译)	哥斯达黎加有限公司		
[标]发明人	ケレハーダーモット ウインドルヘンリー バーンウィリアム マクマナスロス		
发明人	ケレハー,ダーモット ウインドル,ヘンリー バーン,ウィリアム マクマナス,ロス		
IPC分类号	A61K39/00 A61K39/39 A61K45/00 A61P31/04 C07K14/205 C07K16/12 C12N15/09 C12P21/08 A61K38/00 A61K31/415 A61K31/43 A61K31/65 A61K31/70 A61K33/24 A61K35/14 A61K39/02 A61K39/395 A61P1/00 A61P1/04 A61P35/00 C07K14/47 C07K14/54 G01N33/53 G01N33/569		
CPC分类号	A61K39/00 A61K39/105 A61K2039/55516 A61K2039/55538 A61P1/00 A61P1/04 C07K14/205 C07K16/121 G01N33/56922 G01N2333/205		
FI分类号	A61K39/00.ZNA.H A61K39/39 A61K45/00 A61P31/04 C07K14/205 C07K16/12 C12N15/00.A C12P21/08 A61K39/00.HZN.A		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/BA31 4B024/BA50 4B024/CA03 4B024/DA06 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA03 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CE12 4B064/DA01 4C084/AA19 4C084/MA02 4C084/MA17 4C084/MA52 4C084/MA55 4C084/MA59 4C084/MA66 4C084/NA05 4C084/ZB351 4C084/ZC611 4C085/AA03 4C085/AA38 4C085/BB11 4C085/CC04 4C085/CC05 4C085/DD22 4C085/DD23 4C085/EE01 4C085/EE03 4C085/EE06 4C085/FF13 4C085/GG01 4C085/GG02 4C085/GG03 4C085/GG08 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA11 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA31 4H045/FA72 4H045/FA74 4H045/GA26 4H045/GA30		
优先权	19940538 1994-07-01 IE 19950249 1995-04-06 IE		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：为幽门螺杆菌相关疾病提供治疗或预防性疫苗。一种疫苗，其包含至少一种幽门螺杆菌阴性个体中检测到免疫反应性的幽门螺杆菌蛋白质，特别是幽门螺杆菌蛋白质。幽门螺杆菌蛋白优选小于30kDa，并且疫苗特别包含24-25kDa和/或18-19kDa的蛋白。疫苗可包括白介素（12）作为佐剂。[选择图]图8

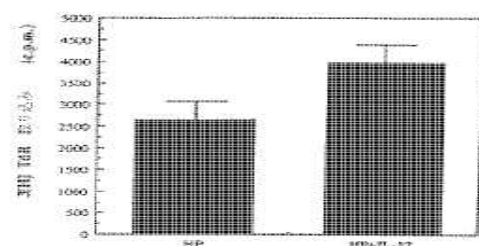


図 1. 2 の存在又は不存在下での H. pylori に対する B 細胞応答

Fig. 1

