

(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2010-501078

(P2010-501078A)

(43) 公表日 平成22年1月14日(2010.1.14)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>GO 1 N 33/569 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/569 Z N A F	4 H O 4 5
<b>GO 1 N 33/53 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/53 S	
<b>CO 7 K 14/315 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/53 D	
<b>CO 7 K 16/12 (2006.01)</b>	CO 7 K 14/315	
	CO 7 K 16/12	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 43 頁)

(21) 出願番号 特願2009-524813 (P2009-524813)  
 (86) (22) 出願日 平成19年8月17日 (2007. 8. 17)  
 (85) 翻訳文提出日 平成21年4月14日 (2009. 4. 14)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2007/076172  
 (87) 国際公開番号 W02008/022299  
 (87) 国際公開日 平成20年2月21日 (2008. 2. 21)  
 (31) 優先権主張番号 60/822, 715  
 (32) 優先日 平成18年8月17日 (2006. 8. 17)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)  
 (31) 優先権主張番号 60/827, 348  
 (32) 優先日 平成18年9月28日 (2006. 9. 28)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)  
 (31) 優先権主張番号 60/917, 178  
 (32) 優先日 平成19年5月10日 (2007. 5. 10)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

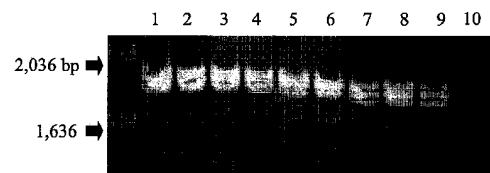
(71) 出願人 506385335  
 ザ ユーイービー リサーチ ファウンデーション  
 アメリカ合衆国 アラバマ 35294-0117, バーミングハム, 3アール  
 ディー アベニュー サウス 1530,  
 エービー 770  
 (74) 代理人 100078282  
 弁理士 山本 秀策  
 (74) 代理人 100062409  
 弁理士 安村 高明  
 (74) 代理人 100113413  
 弁理士 森下 夏樹

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 肺炎球菌性肺炎の診断

(57) 【要約】

Streptococcus pneumoniae に対して免疫反応を惹起する組成物および方法について記載する。より詳細には、本開示は、PcpAのフラグメントおよびその変異体を含む免疫原性PcpAポリペプチド、ならびに該ポリペプチドをコードする核酸に関する。本開示はまた、免疫原性ポリペプチドを製造および使用する方法にも関する。さらに、被検体から生物学的サンプルを採取し、侵襲の過程で選択的に発現する1種または複数種の肺炎球菌抗原 (PcpAまたはそのフラグメントなど) を検出することで、被検体における肺炎球菌感染症 (肺炎など) を診断する方法も提供する。



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

被検体の肺炎球菌性肺炎を診断する方法であって、

a) 被検体から生物学的サンプルを採取することと；

b) 前記生物学的サンプルにおいて侵襲性疾患の過程で選択的に発現する 1 種または複数種の肺炎球菌抗原の存在を検出することと

を含み、前記抗原の存在から前記被検体の肺炎球菌性肺炎が示唆される、方法。

## 【請求項 2】

被検体の肺炎球菌性肺炎を診断する方法であって、

a) 被検体から生物学的サンプルを採取することと；

b) 前記生物学的サンプルにおいて低濃度の  $Mn^{2+}$  の存在下で発現する 1 種または複数種の肺炎球菌抗原の存在を検出することと

を含み、前記抗原の存在から前記被検体の肺炎球菌性肺炎が示唆される、方法。

10

## 【請求項 3】

前記生物学的サンプルは、生物学的流体である、請求項 1 または 2 に記載の方法。

## 【請求項 4】

前記生物学的流体は、血液、血清、痰、肺洗浄液および尿からなる群から選択される、請求項 3 に記載の方法。

## 【請求項 5】

前記生物学的サンプルは、前記被検体の鼻腔由来ではない、請求項 1 または 2 に記載の方法。

20

## 【請求項 6】

前記被検体は、菌血症ではない、請求項 1 または 2 に記載の方法。

## 【請求項 7】

前記生物学的サンプルにおいて C 多糖体の存在を検出するステップをさらに含む、請求項 1 または 2 に記載の方法。

## 【請求項 8】

前記生物学的サンプルの  $PcpA$  と C 多糖体の比を判定することをさらに含む、請求項 7 に記載の方法。

## 【請求項 9】

X の比から前記被検体の肺炎球菌性肺炎が示唆される、請求項 8 に記載の方法。

30

## 【請求項 10】

前記抗原は、定着の過程で発現しない、請求項 1 または 2 に記載の方法。

## 【請求項 11】

前記抗原は、低濃度の  $Mn^{2+}$  の存在下で発現する、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 12】

前記検出ステップは、免疫学的方法を用いて行われる、請求項 1 または 2 に記載の方法。

## 【請求項 13】

前記検出ステップは、ELISA を用いて行われる、請求項 1 または 2 に記載の方法。

40

## 【請求項 14】

前記抗原は、 $PcpA$  である、請求項 1 ~ 13 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 15】

前記抗原は、 $PcpA$ 、 $PsaA$ 、 $PsaB$ 、 $PsaC$ 、 $rrgA$ 、 $rrgB$ 、 $rrgC$  および  $srtB$  からなる群から選択される、請求項 1 ~ 13 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 16】

前記抗原は、 $pfl$ 、 $septation\ ring\ formation$  レギュレーター  $EzrA$ 、 $SecA$  サブユニット、 $StpK$ 、 $galT$ 、 $ORF00431$ 、 $ORF00767$ 、 $prtA$  および  $psrP$  からなる群から選択される、請求項 1 ~ 13 のい

50

れか1項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(関連する出願への相互参照)

本願は、2006年8月17日に出願された米国特許出願第60/822,715号、2006年9月28日に出願された同第60/827,348号、および2007年5月10日に出願された同第60/917,178号に対する優先権を主張し、米国特許出願第60/822,715号、同第60/827,348号、および同第60/917,178号は、その全体が本明細書中に参考として援用される。

10

【0002】

(連邦政府により助成された研究に関する申告)

本発明は、国立衛生研究所からの助成金第R01 AI053749号、同第R01 AI21548号、および同第T32 HL 07553号のもと政府の支援によりなされた。政府は、本発明に一定の権利を有し得る。

【背景技術】

【0003】

*Streptococcus pneumoniae* はかなり広範囲に存在するヒト病原体であり、肺、中枢神経系(CNS: central nervous system)、中耳および鼻道(nasal tract)などのいくつかの器官に感染する場合がある。感染すると、気管支炎、肺炎、髄膜炎、副鼻腔感染症および敗血症など様々な症状を引き起こす。*S. pneumoniae* は、ヒトの細菌性髄膜炎の主な原因であり、抗生物質による処置を行っても死亡率および罹患率が高いことと関係がある(非特許文献1)。

20

【0004】

現在、2種類の肺炎球菌ワクチンが利用できる。1つは23種の莢膜多糖類からなる成人用ワクチンで、この23種を合わせると、肺炎球菌感染症の原因となる菌の約90%の莢膜型を占める。しかしながら、このワクチンは、小児、すなわち、肺炎球菌感染症に対する感受性が高い年齢群には免疫原性がない。成人にあっては、このワクチンは、菌血症性の肺炎に対して有効性が約60%であることが明らかになってはいるものの、年齢または基礎的な医学的状态が原因で肺炎球菌感染症の危険性が高まると、成人でも有効性が低下する(非特許文献2;非特許文献3)。このワクチンは、最も一般的な感染形態である非菌血症性の肺炎球菌性肺炎に対して効果的であることが明らかにされていない。

30

【0005】

利用可能なもう1つのワクチンは、2歳未満の小児の菌血症性肺炎球菌感染症に対して有効な7価コンジュゲートワクチンである。このワクチンは、肺炎に対する有効性も証明されている(非特許文献4;非特許文献5)。このワクチンは、7種のコンジュゲートを製造する必要があるため製造が複雑であることから、高価なものになっている(小児1人当たり約\$200)。さらに、非ワクチン型*Streptococcus pneumoniae* が非常に多い発展途上国世界の感染症をカバーするのにあまり役に立たない(非特許文献6;非特許文献7)。このワクチンは、中耳炎および定着に対しては侵襲性疾患に対してほど効かない。また、7価コンジュゲートワクチンを使用すると定着が促進され、ワクチンに含まれる7多糖類でない莢膜型の菌による疾患が増加することも明らかになっている(非特許文献8;非特許文献9;非特許文献10)。故に、*Streptococcus pneumoniae* の効果的な処置剤が依然として求められている。また、*Streptococcus pneumonoia e* に利用できる診断アッセイも限られている。

40

【0006】

肺炎を診断する標準的な手順は、臨床症状、X線で観察される肺の硬化および*Streptococcus pneumoniae* に対する血液培養の陽性反応を基礎にしてい

50

る。残念ながら、多くの被検体の血液には肺炎球菌が含まれていないため、この方法では、肺炎球菌性肺炎の患者の75～85パーセントが見逃される。細胞壁多糖を検出する抗原検出アッセイはより感度ではあるが、肺炎球菌は被検体の鼻道に存在しても肺または血液には存在しない場合があるため、多くの偽陽性が生じるという問題がある。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0007】

【非特許文献1】Quagliarello et al, (1992) N. Eng. J. Med. 327: 864 - 872

【非特許文献2】Fedson, and Musher. 2004. 「Pneumococcal Polysaccharide Vaccine,」 pp. 529 - 588. In Vaccines, S. A. Plotkin and W. A. Orenstein (eds.), W. B. Saunders and Co., Philadelphia, PA

【非特許文献3】Shapiro et al., N. Engl. J. Med. 325: 1453 - 1460 (1991)

【非特許文献4】Black et al, Pediatr. Infect. Dis. 21: 810 - 5 (2002)

【非特許文献5】Black et al., Arch. Pediatr. 11(7): 843 - 53 (2004)

【非特許文献6】Di Fabio et al., Pediatr. Infect. Dis. J. 20: 959 - 967 (2001)

【非特許文献7】Mulholland, Trap. Med. Int. Health 10: 497 - 500 (2005)

【非特許文献8】Bogaert et al., Lancet Infect. Dis. 4: 144 - 154 (2004)

【非特許文献9】Eskola et al., N. Engl. J. Med. 344: 403 - 409 (2001)

【非特許文献10】Mbellle et al., J. Infect. Dis. 180: 1171 - 1176 (1999)

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0008】

Streptococcus pneumoniaeを診断するための組成物および方法について説明する。より詳細には、本開示は、PcpAのフラグメントおよびその変異体ならびにポリペプチドをコードする核酸など、抗原性PcpAポリペプチドに関する。本開示はさらに、侵襲性疾患においては産生されるが、鼻腔定着においては産生されない任意の肺炎球菌抗原の抗原ポリペプチドを製造および使用方法に関する。さらに、被検体から生物学的サンプルを採取し、侵襲の過程で選択的に発現する1種または複数種の肺炎球菌抗原(PcpAまたはそのフラグメントなど)を検出することで、被検体の肺炎球菌感染症(肺炎など)を診断する方法も提供する。こうした組成物および方法を用いれば、肺炎球菌感染症を診断するように設計された現在入手可能な組成物および方法と比べ、有効性および効率が向上し、費用が削減される。

【図面の簡単な説明】

【0009】

【図1】図1は、PCRによるpcpAの確認を示す。様々なS. pneumoniae株のゲノムDNAをPCR解析した。プライマー対(BGP1(配列番号45)およびBGP2(配列番号46))を用いてPcpAのN末端部分(LRR領域を含む)をコードする核酸を増幅した。レーン1は、TIGR4;レーン2は、L82013;レーン3は、D1091B;レーン4は、BG12730;レーン5は、TJ0893;レーン6は

、R6；レーン7は、BG10752；レーン8は、V175；レーン9は、EF3030；レーン10は、陰性対照（鋳型DNAなし）である。

【図2】図2は、低Mn<sup>2+</sup>条件下でのPcpAの存在に関するウエスタンブロット解析を示す。バクテリアを中間対数期まで低Mn<sup>2+</sup>培地で培養し、全細胞タンパク質サンプルを調製した。サンプルをSDS-PAGEで分離し、ニトロセルロースに転写して、rPcpAポリクローナル抗血清でプローブした。レーン1は、JEN11（pcpA-ミュータント）；レーン2は、JEN7（pcpAの構成的ミュータント）；レーン3は、D1091B；レーン4は、EF5668；レーン5は、BG10752；レーン6は、V175；レーン7は、L82013；レーン8は、BG12730；レーン9は、TJ0893である。

10

【図3A】図3は、肺炎のマウスモデルにおいて、rPcpA免疫により得られる、鼻腔定着に対してではなく肺感染に対する保護作用が、アジュバント単独の場合と比較して統計学的に有意であったことを示す。CBA/Nマウスに、水酸化アルミニウムに吸着したrPcpAまたは水酸化アルミニウムを単独で皮下免疫した。軽麻酔下でマウスにEF3030を $5 \times 10^6$  CFU鼻腔内チャレンジした。感染から7日後、マウスを屠殺し、肺ホモジネート（図3A）および鼻洗浄液（図3B）の細菌数を判定した。水平線は、Log<sub>10</sub> CFUの中央値を示す。（\*\*：p = 0.0019、マンホイットニー）。

【図3B】図3は、肺炎のマウスモデルにおいて、rPcpA免疫により得られる、鼻腔定着に対してではなく肺感染に対する保護作用が、アジュバント単独の場合と比較して統計学的に有意であったことを示す。CBA/Nマウスに、水酸化アルミニウムに吸着したrPcpAまたは水酸化アルミニウムを単独で皮下免疫した。軽麻酔下でマウスにEF3030を $5 \times 10^6$  CFU鼻腔内チャレンジした。感染から7日後、マウスを屠殺し、肺ホモジネート（図3A）および鼻洗浄液（図3B）の細菌数を判定した。水平線は、Log<sub>10</sub> CFUの中央値を示す。（\*\*：p = 0.0019、マンホイットニー）。

20

【図4A】図4は、肺炎のマウスモデルにおいて、rPcpA免疫により得られる他のS.pneumoniae荚膜血清型に対する保護作用が、アジュバント単独の場合に対して統計学的に有意であることを示す。マウスに、TJ0893株、血清型14株（図4A）（\*\*：p = 0.0209）；L82016株、血清型6B（図4B）（\*\*：p = 0.0193）；またはEF9303株、血清型23F（図4C）（\*\*：p = 0.0388、マンホイットニー）をチャレンジした。水平線は、Log<sub>10</sub> CFUの中央値を示す。

30

【図4B】図4は、肺炎のマウスモデルにおいて、rPcpA免疫により得られる他のS.pneumoniae荚膜血清型に対する保護作用が、アジュバント単独の場合に対して統計学的に有意であることを示す。マウスに、TJ0893株、血清型14株（図4A）（\*\*：p = 0.0209）；L82016株、血清型6B（図4B）（\*\*：p = 0.0193）；またはEF9303株、血清型23F（図4C）（\*\*：p = 0.0388、マンホイットニー）をチャレンジした。水平線は、Log<sub>10</sub> CFUの中央値を示す。

【図4C】図4は、肺炎のマウスモデルにおいて、rPcpA免疫により得られる他のS.pneumoniae荚膜血清型に対する保護作用が、アジュバント単独の場合に対して統計学的に有意であることを示す。マウスに、TJ0893株、血清型14株（図4A）（\*\*：p = 0.0209）；L82016株、血清型6B（図4B）（\*\*：p = 0.0193）；またはEF9303株、血清型23F（図4C）（\*\*：p = 0.0388、マンホイットニー）をチャレンジした。水平線は、Log<sub>10</sub> CFUの中央値を示す。

40

【図5】図5は、pcpA不活性化の欠如がS.pneumoniaeの鼻腔内定着に与える作用を示す。マウスにEF3030またはその誘導体JEN18を $10^6$  CFU鼻腔内チャレンジした。感染から7日後、マウスを屠殺し、鼻洗浄液の細菌数を判定した。水平線は、Log<sub>10</sub> CFU/Noseの中央値を示す。

【図6】図6は、致死性の敗血症のマウスモデルにおいて、rPcpA免疫により得られ

50

る保護作用がアジュバント単独の場合に対して統計学的に有意であることを示す。CBA/Nマウスに、水酸化アルミニウムに吸着したrPcpAまたは水酸化アルミニウムを単独で皮下免疫した。マウスにTIGR4を300CFU静脈内チャレンジし、生存時間を21日間モニターした。水平線は、生存時間の中央値を示す。( \*\* : P = 0.0067、マンホイットニー)。生存しているマウスを安楽死させ、検査したが、その血液中にS.pneumoniaeを検出できなかった。

【図7】図7は、敗血症のマウスモデルにおけるTIGR4およびそのpcpA不活化誘導体JEN11のビルレンスを示す。マウスにTIGR4またはJEN11を300CFU静脈内チャレンジし、生存時間を21日間モニターした。水平線は、生存時間の中央値を示す。( \*\* : P = 0.0299、マンホイットニー)。

【図8】図8は、肺炎のマウスモデルにおいて、rPcpAの粘膜免疫によりアジュバント単独の場合と比較して保護作用が得られることを示す。CBA/NマウスにrPcpAとコレラ毒素Bサブユニット(CTB)、またはCTBを単独で鼻腔内免疫した。軽麻酔下で、マウスにEF3030を $5 \times 10^6$ CFU鼻腔内チャレンジした。感染から7日後、マウスを屠殺し、ホモジナイズした肺中の細菌数を判定した。水平線は、Log10CFUの中央値を示す。( \* : P = 0.0001、マンホイットニー)。

【図9】図9は、ヒト肺上皮細胞へのpcpA+TIGR4株およびpcpA-TIGR4株(それぞれTIGR4およびJEN11)の付着を示す。A549ヒト肺上皮細胞の単層を、高マンガ(高Mn<sup>2+</sup>)または低マンガ(低Mn<sup>2+</sup>)の増殖条件下で増幅させておいたpcpA+TIGR4株およびpcpA-TIGR4株 $10^6$ CFUと150分間インキュベートした。この上皮細胞を洗浄し、溶解させた。各ライセート中の付着肺炎球菌の数を血液寒天プレートの定量プレーティングで判定した。回収Log10CFUとは、実験の終了時に肺上皮細胞に関連した肺炎球菌の数をいう。( \*\* : P = 0.0022、マンホイットニー)。

【図10】図10は、pcpA+TIGR4株およびpcpA-TIGR4株がヒト鼻上皮細胞に付着しなかったことを示す。Detroit562ヒト鼻上皮細胞の単層を、高マンガ(高Mn<sup>2+</sup>)または低マンガ(低Mn<sup>2+</sup>)増殖条件下で増幅させておいたpcpA+TIGR4株およびpcpA-TIGR4株 $10^6$ CFUと150分間インキュベートした。次に、この細胞を洗浄し、溶解させた。ライセート中の肺炎球菌の数を血液寒天プレートの定量プレーティングで判定した。回収Log10CFUとは、実験の終了時の肺炎球菌の数をいう。

【図11】図11は、A549細胞への肺炎球菌の付着が、PcpAに対する抗体により阻害されることを示す。A549ヒト肺上皮細胞の単層を、抗体なし、1/100に希釈したPcpA抗体または1/50に希釈したPcpA抗体を用いて高マンガ(高Mn<sup>2+</sup>)または低マンガ(低Mn<sup>2+</sup>)で増幅させたpcpA+TIGR4株およびpcpA-TIGR4株 $10^6$ CFUとインキュベートした。この細胞を洗浄し、溶解させた。ライセート中の肺炎球菌の数を血液寒天プレートの定量プレーティングで判定した。

【図12】図12は、PcpAに対するウサギ血清による敗血症に対する保護作用を示す。完全フロインドアジュバントに加えた100μgのrPcpAでウサギを免疫して、続いて2週間および4週後に完全フロインドアジュバントに加えた100μgのrPcpAでウサギを免疫してウサギ血清を調製した。最終ブーストから2週間後に血清を採取し、ドットプロットアッセイを行ったところPcpAに対する抗体を含むことが示された。免疫の開始前に免疫前血清も採取しておいた。2つの群を用いてウサギ抗血清の希釈液が致死性の肺炎球菌感染症を防止できるかどうかマウスを検査した。TIGR4の静脈内チャレンジの1時間前にマウスの3つの群に1/10、1/100または1/1000に希釈した免疫血清を0.1mL腹腔内投与した。2匹のマウスに1/10免疫前(非免疫)ウサギ血清を投与し、2匹のマウスに希釈液(PBS)のみを投与した。マウスを500時間または死亡時まで観察した。1/10免疫血清を投与したマウス2匹は、実験を通して生存した。他のマウスはすべて、チャレンジ後40~60時間後に死亡した。

【図13】図13は、PcpAおよびニューモリシン(PLY)による肺感染に対する保

10

20

30

40

50

護作用を示す。マウスに5  $\mu$ gのrPcpA、5  $\mu$ gのニューモリシン(Ply)または5  $\mu$ gのrPcpAと5  $\mu$ gのPlyを3回免疫した。最初に2回の注射ではalumを用い、3回目の注射はタンパク質単独で行った。使用したPlyは、野生型Plyであった。マウスをイソフルラン(ミンラド, パッファロー, ニューヨーク州)で麻酔(anesthetized)し、40  $\mu$ L容量に加えた莢膜型19F株EF3030を $5 \times 10^6$  CFU鼻腔内チャレンジした。この手順の結果、肺感染症および鼻腔定着が起きる。7日後、マウスを屠殺し、ホモジナイズした肺をプレーティングした。CFUを観察したところ、PcpAまたはPlyのどちらかを免疫しても保護作用のレベルは同等であった。PcpAとPlyで免疫したマウスにおいては、保護作用が対照マウスよりも100倍超、PlyまたはPcpA単独の場合よりも10倍高まった。

10

【発明を実施するための形態】

【0010】

本明細書は、PcpAの免疫原性フラグメントおよび変異体、さらにはそのフラグメントおよび変異体の製造方法および使用方法について記載する。PcpAは、当初Streptococcus pneumoniaeのコリン結合タンパク質(CBP: choline binding protein)として同定されたが、CBPタンパク質であるPspAおよびPspCとは異なり(Sanchez-Beato et al., FEMS Microbiol. Lett. 164: 207-214 (1998))、PcpAの突然変異は、(1)変異株と野生株を競合させる競合モデルでマウスの肺、菌血症および鼻咽頭においてビルレンスを低下させる(Hava and Camilli, Mol Microbiol. 45: 1389-1406 (2002)); (2)肺でのセプシスに関する非競合的な比較においてビルレンスおよび細菌負荷を低下させる(Johnston et al., Infect. Immun. 74: 1171-1180 (2006)); (3)CBA/CaHN-Btkxid/Jマウスにおいて敗血症の原因となるS. pneumoniaeの侵襲性株TIGR4(莢膜型4)の能力を低下させる; および(4)野生株と競合して肺での定着を低下させることが明らかになっている。本開示は、PcpAに免疫原性があること、特にPcpAのフラグメントおよび変異体に免疫原性があるという最初の証拠を提供する。また、本開示は、PcpAがS. pneumoniaeの肺への侵襲(すなわち、肺感染)には重要であるが、S. pneumoniaeの鼻道での定着には重要でないという最初の証拠も提供する。

20

30

【0011】

免疫原性ポリペプチドは、(シグナル配列の存在下または非存在下での)全長PcpAアミノ酸配列、そのフラグメントおよびその変異体を含む。全長PcpAには、Streptococcus pneumoniae株B6由来のGenBank受託番号CAB04758、S. pneumoniae株TIGR4由来のGenBank受託番号NP\_346554およびS. pneumoniae株R6由来のGenBank受託番号NP\_359536がある。

【0012】

任意に、PcpAの免疫原性ポリペプチドは、1つまたは複数のロイシンに富んだ領域(LLR: leucine rich region)を含む。こうしたLLRは、天然型PcpAに存在し、あるいは、このLLRの天然型LLRに対する配列同一性は、たとえば、80%、85%、90%または95%など、約60~約99%である。成熟PcpAタンパク質(すなわち、シグナルペプチドが存在しないタンパク質)のLLRは、配列番号1、2、または41内で確認できる。

40

【0013】

PcpAの免疫原性ポリペプチドは任意に、天然型成熟PcpAタンパク質に一般に存在するコリン結合性のアンカー配列が認められない。天然型のコリン結合性アンカー配列は、成熟PcpAタンパク質の配列番号47である。より詳細には、免疫原性ポリペプチドは、1つまたは複数のアミノ酸置換を持ち、かつ天然型PcpAに対して配列同一性が約60~約99%、すなわち任意の同一性が80%、85%、90および95%などである、

50

天然型 P c p A の N 末端領域を含む。N 末端領域は、1 つまたは複数の保存的アミノ酸置換の存在下または非存在下およびシグナル配列の存在下または存在下で配列番号 1、2、3、4、または 41 のアミノ酸配列を含んでもよい。N 末端領域は、配列番号 1、2、3、4、または 41 に対する配列同一性が約 60 ~ 約 99 % (あるいは任意の同一性が 80 ~ 99 %) のアミノ酸配列を含んでもよい。

#### 【0014】

配列番号 1、2、3、4、または 41 の免疫原性フラグメントは、配列番号 1、2、3、4、または 41 のアミノ酸残基を 5、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190 および 191 個、すなわち 5 ~ 191 個の任意の数のアミノ酸残基を含む。こうしたフラグメントの例として、たとえば、LEKIEDRAFD (配列番号 5)、FSELEEIELP (配列番号 6)、ASLEYIGTSA (配列番号 7)、FSFSQKLKLL (配列番号 8)、TFSSSSKLEL (配列番号 9)、ISHEAFANLS (配列番号 10)、NLEKLTLPKS (配列番号 11)、VKTLGSLNLF (配列番号 12)、LTTSLNMLML (配列番号 13)、LTTSLKHVDV (配列番号 14)、RGMIVASVDG (配列番号 15)、EEGNE SFASVDG (配列番号 16)、VSFQSKTQLI (配列番号 17)、VLFSKDKTQLI (配列番号 18)、YYP SQKNDES (配列番号 19)、YKTPKETKEL (配列番号 20)、ASYSFNKN SY (配列番号 21)、LKKLELNEGL (配列番号 22)、QKIGTF AFAD (配列番号 23)、EKIGTF AFAD (配列番号 24)、ATKLEEISLP (配列番号 25)、AIKLEEISLP (配列番号 26)、NSLETIERLA (配列番号 27)、FYGNLELKE LIL (配列番号 28) を含むアミノ酸が挙げられる。

#### 【0015】

任意に、P c p A の免疫原性ポリペプチドは、LRR が無い。LRR が認められない免疫原性ポリペプチドとして、配列番号 29、配列番号 30 および配列番号 31 または 5 個以上のアミノ酸残基を含む配列番号 29、30 または 31 のいずれかの任意の免疫原性フラグメントがある。配列番号 30 および 31 は、P c p A のロイシンに富んだ領域の C 末端側に残基を含む。

#### 【0016】

本明細書に記載の免疫原性ポリペプチドの変異体は、1 つまたは複数の保存的アミノ酸置換を含んでもよい。免疫原性ポリペプチドの変異体は、配列番号 1 ~ 31、および 41 またはこれらの任意のフラグメントに対する配列同一性が約 60 ~ 約 99 % (すなわち、任意の同一性が 60 ~ 99 %) のアミノ酸配列を含む。変異体の選択については、本明細書に教示する方法を用いてその免疫原性能の観点から行う。

#### 【0017】

本明細書に記載の P c p A の免疫原性ポリペプチドは、P c p A のフラグメントおよびそのフラグメントの変異体を含む。P c p A フラグメントの変異体は、アミノ酸配列の改変を含んでもよい。たとえば、アミノ酸配列の改変としては、置換、挿入または欠失による変化がある。変異体が免疫原性ポリペプチドである限り、置換、欠失、挿入またはこれらの任意の組み合わせを単一の変異体内で組み合わせても構わない。挿入は、アミノおよび/またはカルボキシル末端融合のほか、単一または複数のアミノ酸残基の配列内挿入を含む。挿入は一般に、アミノまたはカルボキシル末端融合の挿入よりも、たとえば、1 ~ 4 残基程度の小さな挿入になる。欠失は、1 つまたは複数のアミノ酸残基をタンパク質配列から除去するものである。タンパク質分子内の任意の 1 部位で約 2 ~ 6 残基以下を欠失させるのが一般的である。こうした変異体については通常、タンパク質をコードする DNA のヌクレオチドの部位特異的突然変異誘発により作成して、それにより変異体をコードする DNA を製造し、その後、組換え細胞培養で DNA を発現させる。既知の配列を持つ DNA の所定の部位で置換突然変異を製造する技法はよく知られており、M13 プライマー突然変異誘発および PCR 突然変異誘発があるが、これに限定されるものではない。ア

ミノ酸置換は一般に単一残基であるが、いくつかの異なる位置で同時に行ってもよい。置換変異体は、少なくとも1つの残基を除去し、その代わりに別の残基を挿入する変異体である。こうした置換は通常、以下の表1に準じて製造され、保存的置換と呼ばれる。一方、これ以外のものも当業者にはよく知られている。

【0018】

【表1】

表1. 保存的アミノ酸置換

当初の残基	置換の例	当初の残基	置換の例
Arg	Lys	Leu	Ile, Val
Asn	Gln	Lys	Arg, Gln
Asp	Glu	Met	Leu, Ile
Cys	Ser	Phe	Met, Leu, Tyr
Gln	Asn	Ser	Thr
Glu	Asp	Thr	Ser
Gly	Pro	Trp	Tyr
His	Gln	Tyr	Trp, Phe
Ile	Leu, Val	Val	Ile, Leu

10

20

本明細書で使用する場合、変異体は、pcpA相同遺伝子内の1つまたは複数の部位で多型性を示す、別の株に由来する天然型pcpAの対立遺伝子を含んでもよい。変異体は、従来の分子生物学的技法により製造することができる。本明細書では、変異体について天然型pcpAと比較した配列同一性との関連で記載する。当業者であれば、2つのポリペプチドまたは核酸の配列同一性の判定方法を容易に理解できる。たとえば、同一性が最高レベルになるように2つの配列を整列させた後、配列同一性を算出してもよい。アライメントについては、使用するアライメントプログラムの個々のアルゴリズムによってある程度異なる。これには、たとえば、Smith and Waterman Adv. Appl. Math. 2: 482 (1981)の局所的相同性アルゴリズム、Needleman and Wunsch, J. Mol. Biol. 48: 443 (1970)の相同性アライメントアルゴリズム、Pearson and Lipman, PNAS USA 85: 2444 (1988)の類似性検索法による、これらのアルゴリズムのコンピュータインプリメンテーション(Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI)のGAP、BESTFIT、FASTAおよびTFASTA)による、BLASTおよびBLAST2.0ならびにAltschul et al, Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402, 1977; Altschul, et al, J. Mol. Biol. 215: 403-410, 1990; Zuker, M. Science 244: 48-52, 1989; Jaeger et al. PNAS USA 86: 7706-7710, 1989 and Jaeger et al. Methods Enzymol. 183: 281-306, 1989に記載のアルゴリズムが挙げられる。これらの各参考文献については、少なくともアライメントに関連する材料および同一性の計算に関して参照によって援用する。一般に、これらの方法のどれを用いてもよいが、場合によってこうした様々な方法による結果が異なる可能性があることが理解されるであろう。配列同一性を、たとえば、95%とする場合、その同一性は、受け入れられた計算方法の少なくとも1つで検出可能なものでなければならない。

30

40

【0019】

本明細書に記載の免疫原性ポリペプチドは、1種または複数種のアミノ酸アナログまた

50

は非天然型立体異性体を含んでもよい。こうしたアミノ酸アナログおよび立体異性体については、tRNA分子に目的のアミノ酸を組み込み、たとえば、アンバーコドンを利用してそのアナログアミノ酸を部位特異的にペプチド鎖に挿入する遺伝子コンストラクトを設計することで容易にポリペプチド鎖に導入することができる(少なくともアミノ酸アナログに関する材料について参照によってすべて本明細書に援用するThorson et al., *Methods in Molec. Biol* 77:43-73(1991), Zoller, *Current Opinion in Biotechnology*, 3:348-354(1992); Ibbá, *Biotechnology & Genetic Engineering Reviews* 13:197-216(1995), Cahill et al., *TIBS*, 14(10):400-403(1989); Benner, *TIB Tech*, 12:158-163(1994); Ibbá and Hennecke, *Bio/technology*, 12:678-682(1994)を参照)。ペプチドには似ているものの天然のペプチド結合を介して連結されていない免疫原性フラグメントを製造してもよい。たとえば、アミノ酸またはアミノ酸アナログの結合は、 $\text{CH}_2\text{NH}-$ 、 $- \text{CH}_2\text{S}-$ 、 $- \text{CH}_2- \text{CH}_2-$ 、 $- \text{CH}=\text{CH}-$ (シスとトランス)、 $- \text{COCH}_2-$ 、 $- \text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2-$ および $- \text{CHH}_2\text{SO}-$ (これらおよび他のものについては、Spatola, A. F. *Peptide backbone modifications: A structure-activity analysis of peptides containing amide bond surrogates, conformational constraints, and related backbone modifications.* In *Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides, and Proteins*, pp. 267-357. Weinstein, B. editor, Marcel Dekker, New York, N.Y. (1983); Morley, *Trends in Pharm. Sci*, 1(2):463-468(1980); Hudson, et al., *Int J Pept Prot Res* 14:177-185(1979)( $- \text{CH}_2\text{NH}-$ ,  $\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ); Spatola et al. *Life Sci* 38:1243-1249(1986)( $- \text{CH}_2\text{H}_2-\text{S}$ ); Hann, *Journal of the Chemical Society: Perkin Transactions 1* pp. 307-314(1982)( $- \text{CH}-\text{CH}-$ , cis and trans); Almquist et al., *J. Med. Chem.* 23:1392-1398(1980)( $- \text{COCH}_2-$ ); Jennings-White et al., *Tetrahedron Lett* 23:2533(1982)( $- \text{COCH}_2-$ ); Szelke, et al. に対する欧州特許第0045665号明細書(1982)( $- \text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2-$ ); Holladay et al., *Tetrahedron. Lett* 24:4401-4404(1983)( $- \text{C}(\text{OH})\text{CH}_2-$ ); および Hruby *Life Sci* 31:189-199(1982)( $- \text{CH}_2-\text{S}-$ )で確認することができ、少なくとも結合に関する材料について、これらの各々を参照によって本明細書に援用する)を含んでもよい。

#### 【0020】

アミノ酸アナログおよび立体異性体は、多くの場合、製造がより経済的であること、化学的安定性の強化、薬理学的特性(半減期、吸収、効力、有効性など)の改良、特異性(広範な生物活性など)の変化およびその他など、特性を改良できるか、望ましい特性を持っている。たとえば、Dアミノ酸は天然ペプチダーゼにより認識されないため、D-アミノ酸を用いてより安定なペプチドを得ることができる。コンセンサス配列の1種または複数種のアミノ酸と同じタイプのD-アミノ酸との網羅的な置換(L-リジンの代わりにD-リジンなど)を用いてより安定なペプチドを得ることができる。システイン残基を用いて2つ以上のペプチドを一緒に環化または結合させてもよい。これは、ペプチドを特定の

コンフォメーションに限定するのに有益な場合がある。(参照によって本明細書に援用する Rizo and Gierasch Ann. Rev. Biochem. 61:387 (1992) を参照)。

#### 【0021】

本明細書は、PcpAの免疫原性ポリペプチドおよび薬学的に許容されるキャリアを含む組成物について記載する。任意に、この組成物は、アジュバントをさらに含む。免疫原性ポリペプチドを含む組成物は、たとえば、免疫原性StaphylococcusポリペプチドもしくはPspA、NanA、PsaA、ニューモリシン、PspC、PotDの免疫原性フラグメントまたはこれらの任意の組み合わせなど、他の免疫原性ポリペプチドの組み合わせを含んでもよい。

10

#### 【0022】

任意に、本明細書に記載の組成物は、粘膜表面への投与に好適である。この組成物は、たとえば、点鼻薬、ネブライザー溶液またはエアロゾル吸入剤であってもよい。したがって、組成物は、容器内であってもよく、容器は、鼻噴霧器、ネブライザーまたは吸入器であってもよい。

#### 【0023】

薬学的に許容されるキャリアとは、生物学的またはその他の点で望ましい、すなわち、任意の好ましからぬ生物学的作用を引き起こしたり、それを含む医薬組成物の他の成分のいずれとも有害な相互作用を起こしたりせずに、PcpAの免疫原性フラグメントと一緒に被検体に投与できる材料をいう。当業者によく知られているように、キャリアについては当然ながら、被検体において活性成分の任意の分解および任意の有害な副作用を最小限にとどめるように選択することになる。

20

#### 【0024】

好適なキャリアおよびその製剤については、Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21<sup>st</sup> Edition, David B. Troy, ed., Lippincott Williams & Wilkins (2005)に記載されている。一般に、製剤に適切な量の薬学的に許容される塩を用いて製剤を等張にする。薬学的に許容されるキャリアの例として、滅菌水、生理食塩液、リンゲル溶液のような緩衝液およびデキストロース溶液があるが、これに限定されるものではない。溶液のpHは通常、約5~約8または約7~約7.5である。他のキャリアとして、免疫原性PcpAポリペプチドを含む固体疎水性ポリマーの半透性マトリックスなどの徐放性製剤がある。マトリックスは、たとえば、薄膜、リポソームまたは微小粒子のような形状製品の形をとる。たとえば、投与される組成物の投与経路および濃度に応じて、ある種のキャリアがより好ましくなる場合があることが当業者には明らかであろう。キャリアは、ヒトまたは他の被検体へのPcpA免疫原性フラグメントの投与に好適なものである。

30

#### 【0025】

医薬組成物は、免疫原性ポリペプチドの他にキャリア、増粘剤、希釈薬、緩衝剤、防腐剤、界面活性剤、アジュバント、免疫賦活薬を含んでもよい。さらに、医薬組成物は、抗菌剤、抗炎症剤および麻酔薬など1種または複数種の活性成分を含んでもよい。

40

#### 【0026】

アジュバントは、アルミニウム塩などの金属塩を含み、アジュバント活性を持つ安全な賦形剤を与えるものとして当該技術分野において周知である。こうしたアジュバントの作用機序には、投与から最大3週間注射部位にとどまることができるような抗原デポーの形成、さらに抗原提示細胞に取り込まれやすい抗原/金属塩複合体の形成があると考えられる。抗原の吸着には、アルミニウムばかりでなく、亜鉛、カルシウム、セリウム、クロム、鉄およびベリリウム(beryllium)の塩など他の金属塩も用いられている。アルミニウムの水酸化物およびリン酸塩が、最も一般的である。アルミニウム塩、抗原および他の免疫賦活薬を含む製剤または組成物は、当該技術分野において公知である。免疫賦活薬の例として、3-デ-O-アシル化モノホスホリル脂質A(3D-MPL)が挙げられ

50

る。

【0027】

アジュバントおよび/または免疫賦活薬を、ポリペプチド組成物と同時に、組成物の投与の直前に、あるいは投与後に投与してもよい。任意に、組成物は、アジュバントをさらに含む。アジュバント製剤は、たとえば、粘膜誘導部位を標的にする薬を含む。アジュバントは任意に、以下に限定されるものではないが、サイトカイン、ケモカイン、成長因子、血管形成因子、アポトーシス阻害剤およびこれらの組み合わせなどの群から選択されてもよい。サイトカインをアジュバントとして選択する場合、サイトカインは、以下に限定されるものではないが、IL-1、IL-3、IL-2、IL-5、IL-6、IL-12、IL-15およびIL-18などのインターロイキン；トランスフォーミング増殖因子（TGF-β：transforming growth factor-beta）；顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF：granulocyte macrophage colony stimulating factor）；インターフェロン（IFN-γ：interferon-gamma）；またはアジュバント活性を持つ他の任意のサイトカインなどの群から選択されてもよい。また、本発明の組成物および方法にアジュバント活性または他の生物活性を持つサイトカインの一部またはサイトカインのミュータントもしくは模倣体（またはこれらの組み合わせ）を用いてもよい。

10

【0028】

ケモカインをアジュバントとして用いる場合、ケモカインは任意に、以下に限定されるものではないが、リンホタクチン、RANTES、LARC、PARC、MDC、TARC、SLCおよびFKNなどの群から選択してもよい。アポトーシス阻害剤をアジュバントとして選択した場合、アポトーシス阻害剤は任意に、以下に限定されるものではないが、カスパーゼ8の阻害剤およびその組み合わせなどの群から選択してもよい。血管形成因子をアジュバントとして選択した場合、血管形成因子は任意に、以下に限定されるものではないが、塩基性線維芽細胞増殖因子（FGF：fibroblast growth factor）、血管内皮細胞増殖因子（VEGF：vascular endothelial growth factor）、ヒアルロンタン（HA：hyaluronan）フラグメントおよびこれらの組み合わせなどの群から選択してもよい。

20

【0029】

実質的に無毒の生物活性アジュバントの他の例としては、ホルモン、酵素、成長因子またはこれらの生物活性部分が挙げられる。そうしたホルモン、酵素、成長因子またはこれらの生物活性部分は、たとえば、ヒト、ウシ、ブタ、ヒツジ（ovine）、イヌ、ネコ、ウマまたはトリ由来であってもよく、腫瘍壊死因子（TNF：tumor necrosis factor）、プロラクチン、上皮増殖因子（EGF：epidermal growth factor）、顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF：granulocyte colony stimulating factor）、インスリン様成長因子（IGF（insulin-like growth factor）-1）、ソマトロピン（成長ホルモン）もしくはインスリン、またはその受容体が免疫系の細胞に発現する他の任意のホルモンもしくは成長因子であってもよい。

30

40

【0030】

さらに、アジュバントは、たとえば、コレラ毒素（CT：cholera toxin）、E.coli易熱性毒素（LT：heat-labile toxin）、Clostridium difficileトキシンAおよび百日咳毒素（PT：pertussis toxin）またはこれらの組み合わせ、サブユニット、トキシド、キメラまたはミュータントのような細菌毒素も含む。たとえば、天然のコレラ毒素サブユニットB（CTB：cholera toxin subunit B）の精製調製物を用いても構わない。フラグメント、ホモログ、誘導體およびこうしたトキシンのいずれかの融合物も好適なものであるが、アジュバント活性を保持していることが条件となる。アジュバントの好適なミュータントまたは変異体は、たとえば、国際公開第95/17211号パン

50

フレット (Arg - 7 - Lys CTミュータント)、国際公開第96/6627号パンフレット (Arg - 192 - Gly LTミュータント) および国際公開第95/34323号パンフレット (Arg - 9 - Lys および Glu - 129 - Gly PTミュータント) に記載されている。本方法および組成物で使用できるさらなるLTミュータントには、たとえば、Ser - 63 - Lys ミュータント、Ala - 69 - Gly ミュータント、Glu - 110 - Asp ミュータント および Glu - 112 - Asp ミュータントがある。さらに他のアジュバントとして、RH3リガンド; CpGモチーフオリゴヌクレオチド; たとえば、E. coli、Salmonella Minnesota、Salmonella typhimurium または Shigella exseri などの細菌性モノホスホリルリピドA (MPLA: monophosphoryl lipid A) ; サポニン (QS21 など) またはポリラクチドグリコリド (PLGA: polylactide glycolide) ミクロスフェアなどを用いてもよい。他に考えられるアジュバントとして、デフェンシンおよびCpGモチーフがある。

10

**【0031】**

本明細書に記載の免疫原性ポリペプチドの製造方法および使用方法とそうした方法に有用な組成物とを提供する。このポリペプチドについては、標準的な分子生物学的技法および発現系を用いて作製することができる。(たとえば、Molecular Cloning; A Laboratory Manual, Third Edition by Sambrook et al, Cold Spring Harbor Press, 2001を参照)。たとえば、免疫原性ポリペプチドをコードするpcpA遺伝子のフラグメントを単離してもよく、免疫原性ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを、市販されている任意の発現ベクター (pBR322ベクターおよびpUCベクター (ニューイングランドバイオラボイック (New England Biolabs, Inc.) , イプスウィッチ (Ipswich), マサチューセッツ州) など) または発現/精製ベクター (GST融合ベクター (ファイザーインク (Pfizer, Inc.) , ピスカタウェイ (Piscataway), ニュージャージー州) など) にクローニングしてから、好適な原核生物、ウイルスまたは真核生物の宿主に発現させてもよい。その後、従来の手段により、あるいは、市販の発現/精製系の場合は製造者の指示に従って精製を行えばよい。

20

**【0032】**

本明細書は、配列番号1~31、および41のいずれか1つをコードする配列を含む核酸を提供する。本明細書は、全長PcpAタンパク質またはそのフラグメントをコードする配列番号32および33を含む核酸を提供する。また、配列番号32および33の縮重変異体およびこうした縮重変異体のフラグメントも提供する。

30

**【0033】**

配列番号1および2またはそのフラグメントをコードする核酸であって、それぞれ配列番号34および配列番号35またはその縮重変異体もしくはフラグメントを含む、核酸について記載する。

**【0034】**

配列番号3および4またはそのフラグメントをコードする核酸は、それぞれ配列番号36および37またはその縮重変異体もしくはフラグメントを含むが、これに限定されるものではない。

40

**【0035】**

配列番号42またはその縮重変異体もしくはフラグメントを含む、配列番号41またはそのフラグメントをコードする核酸について記載する。

**【0036】**

配列番号29またはそのフラグメントをコードする例示的核酸は、配列番号38またはその縮重変異体もしくはフラグメントを含む。

**【0037】**

さらに詳しくは、本明細書は、配列番号32~38、および42またはこれらの縮重変

50

異体として示される配列のいずれか1つを含む核酸を提供する。

【0038】

さらに、配列番号32~38、および42または配列番号32~38、および42の相補体またはその配列もしくは相補体の任意のフラグメントを含むヌクレオチド配列を持つハイブリダイゼーションプローブの全部または任意の部分と高ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする配列を含む単離された核酸も提供する。ハイブリダイズしている核酸のハイブリダイズしている部分の長さは一般に、少なくとも15(15、20、25、30、40またはそれ以上など)ヌクレオチドである。ハイブリダイズしている部分は、ハイブリダイズする配列部分と少なくとも80%(85%、90%または95%など)同一である。ハイブリダイズしている核酸は、たとえば、クローニングプローブ、プライマー(PCRプライマーなど)または診断プローブとして有用である。核酸二本鎖またはハイブリッドの安定性については、プローブが標的DNAから解離する温度である融解温度すなわち $T_m$ で表す。この融解温度を用いて必要なストリンジェント条件を決める。プローブと同一ではないが、プローブと関連があり実質的に同一である配列を同定する場合、まず特定の塩濃度(SSC(saline sodium citrate)またはSSEP(saline sodium phosphate EDTA)など)を用いて相同ハイブリダイゼーションのみが起こる最低温度を確立することが有用である。1%のミスマッチで $T_m$ が1度低下すると想定する場合、それに合わせてハイブリダイゼーション反応の最終の洗浄温度を下げる(たとえば、同一性が95%を超える配列を探索する場合、最終洗浄温度を5度下げる)。実際のミスマッチ1%当たりの $T_m$ の変化は、0.5~1.5度である可能性がある。高ストリンジェントな条件では、5xSSC/5xデンハルト溶液/1.0%SDSにおいて68度でハイブリダイズし、0.2xSSC/0.1%SDSで室温にて洗浄を行う。中ストリンジェントな条件では、3xSSCで42度にて洗浄する。塩濃度および温度を変動させてプローブと標的核酸との同一性の最適レベルを達成してもよい。こうした条件に関するさらなるガイダンスは、当該技術分野において容易に入手することができ、たとえば、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Third Edition by Sambrook et al., Cold Spring Harbor Press, 2001に記載されている。

10

20

30

【0039】

したがって、前述のペプチド配列、その変異体およびフラグメントをコードできる核酸を開示することが理解されよう。この核酸には、個々のタンパク質配列に関係するすべての縮重配列、すなわち、特定のタンパク質配列をコードする配列を持つすべての核酸ばかりでなく、本開示のタンパク質配列の変異体および誘導体をコードする縮重核酸など、すべての核酸が含まれることになる。したがって、本明細書には1つ1つの核酸配列をすべて書き出していない場合もあるが、実際には、本開示のタンパク質配列により、ありとあらゆる配列が開示および記載されていることが理解されよう。

【0040】

また、本明細書に記載の核酸を含むベクターも開示する。したがって、免疫原性ポリペプチド(配列番号1~31、もしくは41またはそのフラグメントもしくは変異体など)をコードする核酸を含むベクターを提供する。このベクターは、配列番号32~38、および42またはその縮重変異体またはフラグメントの核酸配列のうちどれを含んでもよい。任意に、ベクターの核酸は、発現調節配列(プロモーターまたはエンハンサーまたはその両方など)に作動的に連結されている。好適な発現ベクターは、当業者によく知られており、ノバゲンインク(Novagen, Inc.)、マディソン、ウィスコンシン州;インビトロジェンコーポレーション(Invitrogen Corporation)、カールズバッド、カリフォルニア州;およびプロメガコーポレーション、マディソン、ウィスコンシン州など様々な供給源で市販されている。

40

【0041】

さらに、ベクターを含む培養細胞も提供する。培養細胞は、ベクターをトランスフェク

50

トした培養細胞でも細胞の子孫でもよく、その細胞に免疫原性ポリペプチドが発現する。好適な細胞株は当業者に公知であり、たとえば、アメリカンタイプカルチャーコレクション(ATCC: American Type Culture Collection)から市販されている。

【0042】

トランスフェクト細胞を、免疫原性ポリペプチドを作製する方法に用いてもよい。この方法では、任意に発現配列の制御下、免疫原性ポリペプチドが発現する条件下でベクターを含む細胞を培養する。標準的なタンパク質精製法を用いて細胞または培地から免疫原性ポリペプチドを単離することができる。

【0043】

免疫原性ポリペプチドについては、比較的大きなポリペプチドまたはタンパク質を普通に酵素的に切断して作製してもよいし、タンパク質化学的技法で2つ以上のペプチドまたはポリペプチドを連結して作製してもよい。たとえば、ペプチドまたはポリペプチドを、Fmoc(9-フルオレニルメチルオキシカルボニル)化学反応あるいはBoc(tert-ブチルオキシカルボニル)化学反応(アプライドバイオシステムズインク(Applyed Biosystems, Inc.), フォスターシティ, カリフォルニア州)のどちらかにより、現在利用できる実験機器を用いて化学的に合成することができる。ペプチド縮合反応、ネイティブ化学ライゲーション、固相化学反応または酵素的ライゲーションにより、2つのフラグメントをそのカルボキシルおよびアミノ末端でペプチド結合により共有結合で結合させて、免疫原性PcpAポリペプチドを形成してもよい。(その中に記載されている方法についてすべてを参照によって本明細書に援用するSynthetic Peptides: A User Guide, Grant, ed., W. H. Freeman and Co., New York, N. Y. (1992); Principles of Peptide Synthesis, Bodansky and Trost, eds. Springer-Verlag Inc., New York, N. Y. (1993); Abrahmsen L et al., Biochemistry, 30: 4151 (1991); Dawson et al. Science, 266: 776-779 (1994); Solid Phase Peptide Synthesis, 2<sup>nd</sup> Edition, Stewart, ed., Pierce Chemical Company, Rockford, IL, (1984)を参照)

【0044】

1種または複数種のポリペプチドを含む免疫原性ポリペプチドおよび組成物を用いて抗体を作製してもよい。したがって、被検体のPcpAに特異的な抗体を作製する方法は、本明細書に記載の免疫原性PcpAフラグメントを被検体に投与することを含む。さらに、本明細書は、PcpAポリペプチドに結合する抗体およびPcpAポリペプチドに結合する抗体フラグメントも提供する。

【0045】

抗体は、ポリクローナル抗体でもモノクローナル抗体でもよく、完全ヒト抗体またはヒト化抗体でもよく、天然抗体および一本鎖抗体を含む。抗体は、免疫原性PcpAポリペプチドを被検体に投与してインビボで作製してもよい。抗体の作製には、ハイブリドーマ法を用いたモノクローナル抗体の製造が含まれる。ハイブリドーマ法については、当該技術分野において周知であり、その中に記載されている方法について参照によってその全体を援用するKohler and Milstein, Nature, 256: 495 (1975) および Harlow and Lane. Antibodies, A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Publications, New York, (1988)に記載されている。

【0046】

一本鎖抗体の製造方法は、当業者によく知られている。たとえば、米国特許第5,359,046号明細書(その方法に関して参照によってその全体を本明細書に援用する)を

10

20

30

40

50

参照されたい。一本鎖抗体を作製するには、短いペプチドリンカーを用いて重鎖と軽鎖の可変ドメインを一緒に融合し、それにより単一分子上に抗原結合部位を再構成する。抗原結合性または結合の特異性を大きく阻害することなく、一方の可変ドメインのC末端が他方の可変ドメインのN末端に15～25アミノ酸ペプチドまたはリンカーにより連結される一本鎖抗体可変フラグメント(scFv)が開発されている。重鎖と軽鎖が適切な立体配座配向で一緒に結合できるようにリンカーを選択する。たとえば、リンカーに関する材料について参照によって本明細書に援用するHuston, J. S., et al. *Methods in Enzym.* 203: 46-121 (1991)を参照されたい。

#### 【0047】

PcpAポリペプチドに対する完全ヒト抗体およびヒト化抗体を本明細書に記載の方法に用いてもよい。ヒト化抗体は、そのレシピエントの相補性決定領域(CDR: complementary determining region)由来の残基が、所望の特異性、親和性および能力を持つマウス、ラットまたはウサギなど非ヒト種(ドナー抗体)のCDR由来の残基で置換されているヒト免疫グロブリン(レシピエント抗体)を含む。ヒト免疫グロブリンのFvフレームワーク残基は、対応する非ヒト残基で置換されている場合もある。免疫によりヒト抗体の完全なレパートリー(すなわち、完全ヒト抗体)を産生することができるトランスジェニックアニマル(マウスなど)を用いてもよい。生殖系列変異のキメラマウスにおいて抗体重鎖の結合領域(J(H))遺伝子を同系接合的に欠損させると、内因性抗体の産生が完全に阻害される。そうした生殖系列ミュータントマウスにヒト生殖系列免疫グロブリン遺伝子アレイを転移すれば、抗原チャレンジによりヒト抗体が産生される(たとえば、Jakobovits et al., *PNAS USA*, 90: 2551-255 (1993); Jakobovits et al., *Nature*, 362: 255-258 (1993); Bruggemann et al., *Year in Immunol.*, 7: 33 (1993)を参照)。また、ファージディスプレイライブラリーでヒト抗体を作製してもよい(Hoogenboom et al., *J. Mol. Biol.*, 227: 381 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222: 581 (1991))。CoteらおよびBoernerらの技法には、ヒトモノクローナル抗体の調製方法について記載されている(Cole, et al., 「The EBV-hybridoma technique and its application to human lung cancer.」 *In, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Volume 27, Reisfeld and Sell, eds., pp. 77-96, Alan R. Liss, Inc., New York, N.Y., (1985); Boerner et al., J. Immunol., 147(1): 86-95 (1991)*)。こうした参考文献については、その中に記載されている方法のため参照によってその全体を援用する。

#### 【0048】

本明細書で使用する場合、抗体フラグメントは、ハイブリッドフラグメントを含むF(ab')<sub>2</sub>フラグメント、Fab'フラグメントおよびFabフラグメントを含む。こうした抗体フラグメントは、特定のPcpAポリペプチドに対する結合能を保持している。各方法を用いて(ab)発現ライブラリーを構築(たとえば、Huse, et al., *Science* 246: 1275-1281を参照)すれば、PcpAポリペプチドに対する所望の特異性を持つモノクローナルF(ab)フラグメントを迅速かつ効果的に同定することができる。ポリペプチドのイディオタイプを含む抗体フラグメントについては、当該技術分野において公知の技法で作製することができ、(i)抗体分子のペプシン消化により作製されるF(ab')<sub>2</sub>フラグメント; (ii)F(ab')<sub>2</sub>フラグメントのジスルフィド架橋の還元により作製されるFabフラグメント; (iii)抗体分子をパインおよび還元剤で処理して作製されるF(ab)フラグメントおよび(iv)F(v)フラグメントがあるが、これに限定されるものではない。

#### 【0049】

10

20

30

40

50

本明細書は、被検体において肺炎球菌感染症の危険性を低下させる方法であって、P c p Aの免疫原性フラグメントまたはその組成物を被検体に投与することを含む、方法を記載する。肺炎球菌感染症には、たとえば、髄膜炎、中耳炎、肺炎、敗血症または溶血性尿毒症がある。したがって、本明細書に記載の方法より、こうした感染症の任意の1つまたは複数の危険性が低下する。この方法は、第2の免疫原性フラグメントを投与するステップをさらに含んでもよい。第2の免疫原性フラグメントは、P s p A由来でも、N a n A由来でも、P s a A由来でも、ニューモリシン由来でも、P s p C由来でも、これらのいずれの組み合わせ由来でもよい。第2の免疫原性フラグメントについては、P c p Aの免疫原性フラグメントと同時、その前、あるいはその後投与してもよい。

【0050】

P c p Aポリペプチドまたはそのフラグメントを含む組成物は、経口投与、非経口投与（静脈内など）、筋肉内投与、腹腔内投与、経皮投与、または鼻腔投与もしくは呼吸器系の任意の部分への投与などの局所投与することができる。本明細書で使用する場合、呼吸器系への投与とは、エアロゾル化または挿管を介した噴霧機構または飛沫機構による送達など、外鼻孔の一方もしくは両方あるいは口を介して組成物を鼻部および鼻道に送達することをいう。

【0051】

組成物およびP c p Aポリペプチドまたはフラグメントの正確な必要量は、被検体の種、年齢、体重および全身状態、使用するポリペプチドおよびその投与方法によって被検体ごとに異なるであろう。したがって、組成物の正確な量をすべて明らかにすることができるとは限らない。しかしながら、当業者であれば、本明細書の記載を考慮して適切な量を決定できる。さらに、たとえば、最初のレジメンおよびブーストレジメンにおいて、P c p Aポリペプチドまたはフラグメントの反復投与を用いてもよい。

【0052】

肺炎および敗血症に対する防御免疫を惹起する際、P s p Aとニューモリシンを組み合わせると、どちらかのタンパク質単独の場合より有効性が高まる（Briles et al., J. Infect. Immun., 188:339-48 (2003); Ogunniyi et al., Infect. Immun., 68:3028-33 (2000)）。したがって、P c p Aまたは免疫原性フラグメントを含む組成物は任意に、P c p A、P s p A、N a n A、P s a A、ニューモリシン、P s p C、P h t E、P h t Bの第2の免疫原性フラグメントまたはそれらのいずれの組み合わせを含んでもよい。これらの参考文献については、その中に教示されているタンパク質の組み合わせ方法および投与方法のため参照によってその全体を本明細書に援用する。

【0053】

本明細書に記載の組成物を組み合わせる際は、前述の処理のどれを用いてもよい。組み合わせる場合は、同時に（concomitantly）（混合剤などとして）、分離されているが同時に（simultaneously）（同じ被検体に異なる静脈ラインなどを介して）あるいは連続的に（化合物または薬の1つを最初に投与してから第2の化合物または薬を投与するなど）投与してもよい。したがって、組み合わせという語は、2種以上の薬を同時（concomitant）投与、同時（simultaneous）投与または連続投与することをいう。

【0054】

さらに、被検体の肺炎球菌性肺炎を診断する方法も提供する。菌血症は、肺炎球菌性肺炎を診断する上での「基準（gold standard）」であるが、肺炎球菌性肺炎で菌血症である患者は4人に1人未満と考えられ、したがって、ワクチン試験または診断には有益でない。肺炎球菌性肺炎患者を正確に診断できる割合が高まれば、それに合わせて試験の規模、処置、したがってその費用が軽減されるであろう。C多糖体の検出を基礎とする抗原検出アッセイには、同時に解決できない2つの問題がある。1つは、このアッセイは、多くの場合、非菌血症性肺炎の患者を検出するには感度が十分でない。もう1つの問題は、コロニー形成が見られる一部の人を検出するには感度は十分であるが、S . p

10

20

30

40

50

*neumoniae*に感染した人を検出するには感度が十分でない。したがって、こうしたアッセイの感度を高めても、非菌血症性の患者の診断が大きく改善される可能性は低い。C多糖体を標的抗原として用いる場合、C多糖体は、*S. pneumoniae*の侵襲よりも*S. pneumoniae*のコロニー形成により一層高レベルで産生されるため特に問題がある。

#### 【0055】

肺炎球菌ワクチンの有効性を判定し正確に診断を行い、処置をモニターするには、どの被検体が肺炎球菌性肺炎であり、どの患者がそうでないかを知る必要がある。肺炎を診断する標準的な手順は、X線または他の診断法および*Streptococcus pneumoniae*に対する血液培養の陽性反応によるものである。これらの判断基準を満たす被検体は、肺炎球菌性肺炎であると想定される。残念ながら、肺炎で同時に菌血症でもある患者は15~25%にすぎないため、この方法では、肺炎球菌性肺炎の患者の75~85パーセントが見逃される(Fedson, et al., Vaccine 17: Supplement 1: S11-18 (1999); Ostergaard and Andersen, Chest 104: 1400-1407 (1993))。

10

#### 【0056】

この問題を解決する1つのアプローチは、尿中の細胞壁多糖を検出する抗原検出アッセイを用いるものである。このアッセイは極めて感度が高いが、残念ながら偽陽性が成人で12%、小児では最大60%になる。これは、肺または血液中において肺炎球菌疾患でない患者でも肺炎球菌による鼻腔定着が原因でアッセイ標的が尿中に存在する場合があることによる。

20

#### 【0057】

PcpA発現を検出して肺炎球菌性肺炎を診断する方法を提供する。肺炎球菌の世界の主要な貯蔵庫は、ヒトの鼻腔保菌である。感染症に感染するのは通常、保菌者からであり、鼻腔保菌が常に感染症に先行する。肺炎球菌の下気道、副鼻腔および中耳への伝染には鼻咽頭定着が必須であると考えられる。*Streptococcus pneumoniae*に発現するPcpAは、鼻咽頭での高マンガンの(Mn<sup>2+</sup>)状態に反応してレギュレーターPsaRにより抑制される(Johnston, et al., Infect. Immun. 74: 1171-1180 (2006))。したがって、PcpAが産生される肺炎球菌の表面に存在するのは、この生物体が位置を鼻咽頭からマンガンの濃度が低い肺に移行した場合に限られる。これは、以下に限定されるものではないが、表面抗原A(PsaA)、PsaB、PsaC、rrgA(グラム陽性アンカーファミリータンパク質)、rrgB(グラム陽性アンカーファミリータンパク質)、rrgC、srtB、ピルバートホルマーアセチルトランスフェラーゼ(pfl: pyruvate formate acetyltransferase)、septation ring formationレギュレーターEzrA、SecAサブユニット(前駆タンパク質トランスロカゼ)、StpK(セリン/トレオニンプロテインキナーゼ)、ガラクトース-1-リン酸ウリジルトランスフェラーゼ(galT)、ORF00431ソルターゼB、ORF00767、prtA(ppmAとも呼ばれるセリンプロテアーゼサブチリシン(subtilysin)ファミリータンパク質)およびpsrP(細胞壁表面アンカーファミリータンパク質)など他の肺炎球菌抗原にも当てはまる。こうしたタンパク質の核酸およびアミノ酸の配列は知られており、[www.genbank.org](http://www.genbank.org)および[www.tigr.org](http://www.tigr.org)で確認することができる。

30

40

したがって、肺および血液のみで産生され鼻腔では産生されない肺炎球菌抗原を検出する方法を提供する。PcpAは、肺および血液などの低Mn<sup>2+</sup>濃度(0.1μM)の領域でのみ産生される(Johnston, et al., Infect. Immun. 74: 1171-1180 (2006))。故に、PcpAは、肺および血液中の肺炎球菌のみが産生し、粘膜表面の肺炎球菌は産生しない。このため、本明細書に記載の方法により粘膜表面上の肺炎球菌の定着は検出されないと考えられ、それ故、偽陽性は生じない。低Mn<sup>2+</sup>濃度の領域のみで産生される肺炎球菌抗原を検出することで、肺炎の被検体だ

50

けを診断することになる。したがって、本開示は、肺炎または髄膜炎のような他の肺炎球菌感染症の被検体の診断に有利な方法を提供する。

【0058】

したがって、被検体の肺炎球菌性肺炎を診断する方法であって、被検体から生物学的サンプルを採取することと、侵襲性疾患の過程で生物学的サンプルにおいて選択的に発現する1種または複数種の肺炎球菌抗原の存在を検出することとを含み、抗原の存在から被検体の肺炎球菌性肺炎が示唆される、方法を提供する。さらに、被検体における肺炎球菌性肺炎の方法であって、被検体から生物学的サンプルを採取することと、生物学的サンプルにおいて高濃度のMn<sup>2+</sup>の存在下で発現する1種または複数種の肺炎球菌抗原の存在を検出することとを含み、抗原の存在から被検体の肺炎球菌性肺炎が示唆される、方法も提供する。被検体は、菌血症であってもよいし、菌血症でなくてもよい。好ましくは、定着の過程で抗原は発現していないか、大量に発現していない。

10

【0059】

本明細書で使用する場合、検査に供す生物学的サンプルとは、ヒトなどの被検体から得られたサンプルをいい、任意の生物学的液体、好ましくは体液などがあるが、これに限定されるものではない。体液の例として、全血、血清、尿、唾液、組織の浸潤物、胸水、肺胞洗浄液、気管支肺胞洗浄液および同種のものがあるが、これに限定されるものではない。生物学的液体は、細胞培地でも培養細胞の上清でもよい。たとえば、サンプルは、血液サンプルでも血清サンプルでもよい。任意に、生物学的サンプルは、被検体の鼻腔由来ではない。

20

【0060】

また、記載の方法は、生物学的サンプルのC多糖体の存在を検出するステップを含んでもよい。さらに、生物学的サンプルのPcpAとC多糖体の比を判定してもよい。

【0061】

任意に、侵襲性疾患の過程でのみ発現するPcpAなどの抗原と、定着の過程でのみ発現するノイラミニダーゼA(NanA)などの抗原との体液中の比を判定する。これは、ほぼすべての定着において、わずかながら侵襲の可能性がある一方、ほぼすべての肺炎球菌性肺炎(pneumonia)において一定の定着もあるため重要な場合がある。定着の被検体では、NanAなどの定着抗原の濃度に対してPcpAなどの侵襲抗原の濃度の比が低くなる。肺炎球菌性肺炎の被検体の場合、この比が高くなるはずである。限定的であることを意図するものではないが、たとえば、PcpA:NanAの比が2:1である場合、被検体は肺炎球菌性肺炎であることが示唆される一方、PcpA:NanAの比が1:2である場合、被検体は肺炎球菌性肺炎でないことが示唆される。侵襲のマーカーになり得る他の抗原の例として、SmrCおよびPhoUが挙げられ、この抗原は、肺炎および敗血症の両方に必須であるが、定着にはほとんど関与していないことが他の研究者により明らかになっている。主に定着の過程で発現する抗原の例として、定着には決定的に重要であるのに対し、侵襲性疾患にはほとんど関与していないNanAが挙げられるが、これに限定されるものではない。(Lau et al Mol. Micro. 40:555-571(2001), Hava et al Mol Micro 50:1103-1110(2003), Hava et al Mol. Micro 45:1389-1406(2002), Orihuela, et al J. Infect. Dis. 190:1661-1669(2004))。

30

40

【0062】

本明細書で使用する場合、侵襲性疾患の過程で選択的に発現する肺炎球菌抗原とは、低Mn<sup>2+</sup>濃度の領域で発現する抗原をいう。こうした抗原は、粘膜表面における肺炎球菌の定着の過程ではほとんど、あるいはまったく発現しない。侵襲性疾患の過程で選択的に発現する肺炎球菌抗原という語句は、PcpAなどの肺炎球菌抗原のレベルもいい、検査対象の被検体の生物学的サンプルにおけるそのレベルは、対照サンプルよりも少なくとも1.5倍高い。本明細書を通じて、対照と比較して高くなる、増加する、増強するまたは上昇するとは、対照を上回ることをいう。たとえば、対照レベルは、刺激の非存在下での

50

対照サンプルの発現レベルであっても、活性レベルであってもよい。本明細書で使用する場合、対照サンプルは、肺炎球菌性肺炎でない被検体由来のサンプルを含む。侵襲性疾患において選択的に発現する、あるいは低濃度  $Mn^{2+}$  の存在下で発現する抗原には、PcpA、PsaA、PsaB、PsaC、rrgA、rrgB、rrgC、srtB、pfl、septation ring formationレギュレーターEzrA、SecAサブユニット、StpK、galT、ORF00431、ORF00767、prtAおよびpsrPがあるが、これに限定されるものではない。任意に、記載の方法で検出する肺炎球菌抗原の1つは、PcpAである。

#### 【0063】

サンプルの発現レベルの判定に使用できるアッセイ技法は、当業者によく知られている。そうしたアッセイ方法として、ラジオイムノアッセイ、逆転写PCR (RT-PCR: reverse transcription-polymerase chain reaction) アッセイ、免疫組織化学アッセイ、in situハイブリダイゼーションアッセイ、競合結合アッセイ、ウエスタンブロット解析、ELISAアッセイおよびプロテオミクスアプローチ、二次元ゲル電気泳動 (2D電気泳動) および質量分析またはタンパク質相互作用プロファイリングなどの非ゲルベースアプローチが挙げられる。さらに、アッセイには、ラジオイムノアッセイ、酵素イムノアッセイ (EIA: enzyme immunoassay)、酵素結合免疫吸着測定 (ELISA: enzyme linked immunosorbent assay)、サンドイッチイムノアッセイ、沈降反応、ゲル内拡散反応、免疫拡散アッセイ、凝集アッセイ、補体結合アッセイ、免疫放射線アッセイ、蛍光イムノアッセイ、プロテインAイムノアッセイおよび免疫電気泳動アッセイなどの技法を用いた競合および非競合アッセイ系があるが、これに限定されるものではない。イムノアッセイ法の例については、米国特許第4,845,026号明細書および同第5,006,459号明細書を参照されたい。

#### 【0064】

診断方法については、抗原の結合パートナー、たとえば、抗体を検出可能な部分で標識し、これを用いてサンプル中の抗原を検出してもよい。抗体については直接標識しても、間接的に標識してもよい (検出可能な部分で標識された二次または三次抗体によるなど)。以下に限定されるものではないが、放射性同位元素、蛍光標識および酵素-基質標識など、多数の標識を入手することができる。放射性同位元素には、たとえば、 $^{35}S$ 、 $^{14}C$ 、 $^{125}I$ 、 $^3H$ および $^{131}I$ がある。蛍光標識には、たとえば、希土類キレート (ユーロピウムキレート)、フルオレセインおよびその誘導体、ローダミンおよびその誘導体、ダンシル、リサミン、フィコエリトリンおよびテキサスレッドがある。たとえば、標識を、Current Protocols in Immunology, Volumes 1 and 2, Coligen et al., Ed., Wiley-Interscience, New York, N.Y., Pubs., (1991)に開示されている技法を用いて抗原の結合パートナーにコンジュゲートしても構わない。

#### 【0065】

酵素-基質標識を用いる場合、酵素は、様々な技法を用いて測定することができる発色基質の化学的变化を触媒することが好ましい。たとえば、酵素は、分光光度的に測定できる基質の色の变化を触媒してもよい。あるいは、酵素は、基質の蛍光または化学発光を変化させても構わない。化学発光基質は、化学反応により電子的に励起され、その後、(たとえば、ケミルミノメーターを用いて) 測定可能な光を放射することができるか、蛍光受容体にエネルギーを供与する。酵素標識の例として、ルシフェラーゼ (ホタルルシフェラーゼおよび細菌ルシフェラーゼなど)、ルシフェリン、2,3-ジヒドロフタラジンジオン、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ、ウレアーゼ、西洋わさびペルオキシダーゼ (HRPO: horseradish peroxidase) などのペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、-ガラクトシダーゼ、グルコアミラーゼ、リゾチーム、サッカライドオキシダーゼ (グルコースオキシダーゼ、ガラクトースオキシダーゼおよびグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ)、複素環オキシダーゼ (ウリカーゼおよびキサンチンオキシ

10

20

30

40

50

ダーゼなど)、ラクトペルオキシダーゼ、マイクロペルオキシダーゼおよび同種のものが挙げられる。酵素のコンジュゲート技法は、O'Sullivan et al., Methods for the Preparation of Enzyme-Antibody Conjugates for use in Enzyme Immunoassay, in Methods in Enzymol. (ed J. Langone & H. Van Vunakis), Academic press, New York, 73:147-166 (1981)に記載されている。酵素-基質の組み合わせの例として、たとえば、西洋わさびペルオキシダーゼ(HRP)と基質としての水素ペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ(AP: alkaline phosphatase)と発色基質としてのパラニトロフェニルリン酸および -D-ガラクトシダーゼ(-D-Gal)と発色基質(p-ニトロフェニル -D-ガラクトシダーゼなど)または蛍光発色基質4-メチルウンベリフェリル -D-ガラクトシダーゼが挙げられる。

#### 【0066】

ELISAアッセイの際、抗原に特異的な抗体を商業的供給源からすぐに入手できない場合、抗体を調製する。さらに、抗原に特異的に結合するレポーター抗体を調製するのが一般的である。レポーター抗体は、放射性試薬、蛍光試薬または酵素試薬、たとえば、西洋わさびペルオキシダーゼ酵素またはアルカリホスファターゼなどの検出可能な試薬に結合する。ELISAを行うには、抗原に特異的な抗体を、たとえば、ポリスチレンディッシュなどの、抗体に結合する固体支持体上でインキュベートする。次に、ディッシュ上の任意の遊離タンパク質結合部位を、ウシ血清アルブミンなどの非特異的タンパク質とインキュベートして被覆する。次に、解析対象のサンプルをディッシュ内でインキュベートし、この間に抗原はポリスチレンディッシュに結合した特異的な抗体に結合する。非結合サンプルを緩衝液で洗い流す。抗原に対して特異的で、西洋わさびペルオキシダーゼなどの検出可能な試薬に結合したレポーター抗体をディッシュに入れると、抗原に結合した任意の抗体にレポーター抗体が結合する。次いで、結合しなかったレポーター抗体を洗い流す。次に、比色用基質を含むペルオキシダーゼ活性用の試薬をディッシュに加える。抗体に結合して固定化したペルオキシダーゼにより着色反応産物が生成される。一定の時間における発色量は、サンプル中に存在する抗原量に比例する。定量結果については一般に、標準曲線を参照して得る。

#### 【0067】

また、競合アッセイを用いてもよい。この場合、抗原に特異的な抗体が固体支持体に結合しており、標識抗原および被検体または対照から得られたサンプルを固体支持体に通す。固体支持体に結合する検出標識の量は、サンプル中の抗原量に相関することが多い。

#### 【0068】

プロテオミクスアプローチのうち2D電気泳動法は、当業者によく知られた手法である。ほとんどの場合、ポリアクリルアミドゲル上で様々な特徴ごとにタンパク質を連続分離して、血清などのサンプルから個々のタンパク質を単離することができる。最初に、電流を用いてタンパク質をサイズ別に分離する。電流はすべてのタンパク質に均一に作用し、そのため比較的小さいタンパク質は、比較的大きなタンパク質よりもゲル上でより大きく移動する。第2次元では一次元に対して垂直に電流を流し、サイズではなく各タンパク質が持つ固有の電荷に基づきタンパク質を分離する。配列が異なるのにサイズと電荷がともに同一であるタンパク質はないため、2D分離の結果、四角のゲルに各タンパク質が固有のスポットを占める。化学プローブもしくは抗体プローブあるいはその後のタンパク質マイクロシーケンシングにより各スポットを解析すれば、サンプル中の個々のタンパク質の相対存在量およびタンパク質の種類を明らかにすることができる。

#### 【0069】

任意に、生物学的サンプルから遺伝子サンプルを採取してもよい。遺伝子サンプルは、核酸、好ましくはRNAおよび/またはDNAを含む。たとえば、遺伝子の発現を判定する際には、mRNAを生物学的サンプルから採取でき、次の解析のためmRNAをcDNAに逆転写してもよい。あるいは、遺伝子の発現の判定にmRNA自体を用いる。

## 【0070】

当該技術分野において公知の任意の技法を用いて生物学的サンプルから遺伝子サンプルを採取することができる(Ausubel et al. Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley & Sons, Inc., New York, 1999); Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., ed. by Sambrook, Fritsch, and Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1989); Nucleic Acid Hybridization (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. 1984))。DNAまたはRNA精製技法を用いて全細胞から核酸を精製してもよい。また、PCRまたはサブクローニングが必要なインビボ技法を用いて遺伝子サンプルを増幅させても構わない。生物学的サンプルの細胞からmRNAを単離して遺伝子サンプルを採取し、RNAをDNAに逆転写してcDNAを得てもよい(Khan et al. Biochem. Biophys. Acta 1423: 17-28, 1999)。

10

## 【0071】

遺伝子サンプルを採取したならば、たとえば、PcpAなどの肺炎球菌抗原をコードしている1種または複数種の特定の遺伝子の有無について解析することができる。したがって、アッセイすることができる肺炎球菌抗原は、PcpA、PsaA、PsaB、PsaC、rrgA、rrgB、rrgC、srtB、pfl、septation ring formationレギュレーターEzrA、SecAサブユニット、StpK、galT、ORF00431、ORF00767、prtAおよびpsrPまたはこれらの任意の組み合わせを含むが、これに限定されるものではない。解析については、以下に限定されるものではないが、シーケンシング、PCR、RT-PCR、定量PCR、制限断片長多型、ハイブリダイゼーション技法、ノーザンブロット、マイクロアレイ技法、DNAマイクロアレイ技法および同種のものなど当該技術分野において公知の任意の技法を用いて行ってよい。遺伝子サンプル中の遺伝子(単数または複数)の発現レベルを判定する際は、特性が解明されている公知の遺伝子またはハウスキーピング遺伝子など、別の遺伝子の発現と比較して発現レベルを補正してもよい。たとえば、逆転写PCR(RT-PCR)を用いて、数千もの他のmRNA種からなる複雑な混合物において特定のmRNA集団の存在を検出することができる。RT-PCRでは、最初に酵素である逆転写酵素を用いてmRNA種を相補DNA(cDNA)に逆転写し、次に、標準的なPCR反応と同様にcDNAを増幅する。したがって、RT-PCRを行えば、増幅により単一種のmRNAの存在が明らかになる。

20

30

## 【0072】

固体支持体上に配置(すなわち、グリッド化)したクローンまたはオリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションを用いて、その遺伝子の発現の検出および発現レベルの定量の両方を行ってもよい。このアプローチでは、抗原をコードしているcDNAを基板に固定する。この基板は、以下に限定されるものではないが、ガラス、ニトロセルロース、ナイロンまたはプラスチックなど、好適なタイプであればどのようなものでもよい。抗原をコードしているDNAの少なくとも一部を基板に結合させ、次に目的のサンプルから単離したRNAでもRNAのコピーである相補DNA(cDNA)でもよいアナライトとインキュベートする。基板に結合したDNAとアナライトとのハイブリダイゼーションについては、以下に限定されるものではないが、アナライトの放射性標識もしくは蛍光標識またはこのハイブリッドを検出するように設計された第2の分子など、複数の手段で検出および定量することができる。遺伝子の発現レベルの定量は、アナライトのシグナル強度と既知の標準シグナルから決定した強度とを比較して行うことができる。標準シグナルについては、標的遺伝子のインビトロ転写、収量の定量、およびその後その材料を用いて標準曲線を作成することで得られる。

40

## 【0073】

単数形a、anおよびtheは、本明細書および添付の特許請求の範囲に使用する場合

50

、文脈上明らかに他の意味に解すべき場合を除き、複数の対象を含むという点に留意しなければならない。したがって、たとえば、抗原性フラグメントという場合、抗原性フラグメントの混合物を含み、薬学的キャリアまたはアジュバントという場合、そうしたキャリアまたはアジュバントの2種以上の混合物を含む。

【0074】

本明細書で使用する場合、被検体とは、個体をいう。したがって、被検体は、ネコおよびイヌなどの飼育慣らされた動物、家畜（ウシ、ウマ、ブタ、ヒツジ（sheep）およびヤギなど）、実験動物（マウス、ウサギ、ラット、モルモットなど）およびトリを含んでもよい。一態様では、被検体は、霊長類またはヒトなどの哺乳動物である。

【0075】

任意の（optional）または任意に（optionally）とは、その後に記載した事象または状況が起こることもあるが、起こらないこともあり、そう記載することで、その事象または状況が起こる場合と、それが起こらない場合が含まれることを意味する。たとえば、任意に組成物は組み合わせを含んでもよいといった場合、組み合わせとは、組成物が異なる分子の組み合わせを含んでもよいし、組み合わせを含まなくてもよいため、こう記載することで、組み合わせが存在する場合と組み合わせが存在しない場合（すなわち、組み合わせの個々の構成物）とが含まれる。

【0076】

本明細書では、範囲を、約を前置した1つの特定の値からおよび/または約を前置したもう1つの特定の値までと表すことができる。このように範囲を表す場合、1つの特定の値からおよび/またはもう1つの特定の値までは別の態様である。同様に、先行詞約を用いて値を近似値として表す場合、特定の値は別の態様を形成することを理解されたい。さらに、各範囲の端点はもう一方の端点との関連でも他の端点と切り離しても意味があることを理解されたい。

【0077】

本明細書では、ある状態に対する一定の処置（肺炎球菌感染症の防止など）との関連で防止する（prevent）、防止している（preventing）、および防止（prevention）という語を用いる場合、処置した患者がその状態を臨床的に観察できるレベルでまったく発症しないか、処置を受けない場合と比べて発症が遅くなる、および/またはその程度が軽くなることをいう。こうした語は、患者がその状態をまったく経験しない状況のみに限定されるものではない。たとえば、一定の状態を発現させると予想された刺激に患者を曝露しているさなかに処置を施して、その結果、本来予想されるよりも患者の状態の症状が減少および/または緩和する場合、その処置は状態を防止したと言えよう。処置の結果、患者が感染症の軽い症状しか明確に示さずに、その感染症が防止される場合があっても、これは、感染している微生物が細胞にまったく侵入しなかったことを意味するものではない。

【0078】

同様に、感染症の危険性との関連で本明細書において使用する場合、所定の処置により軽減する、軽減している（reducing）、および軽減（reduction）（肺炎球菌感染症の危険性の軽減など）とは、処置（免疫原性ポリペプチドの投与など）を行わない感染症発症の対照レベルまたは基準レベルと比較して被検体の感染症の発症が遅くなる、またはその程度が軽くなることをいう。感染症の危険性が軽減された結果、患者が感染の軽い症状しか明確に示さずに、感染症の症状が遅延する場合があっても、これは、感染している微生物が細胞にまったく侵入しなかったことを意味するものではない。

【0079】

当然のことながら、開示されている方法および組成物は、他に記載がない限り、特定の合成方法、特定の解析技法または特定の試薬に限定されるものではなく、したがって、異なってもよい。また、本明細書に使用する用語は、特定の実施形態を記載するためのものにすぎず、限定的であることを意図するのではないことは言うまでもない。

【0080】

10

20

30

40

50

本発明の多くの実施形態について記載してきた。しかしながら、様々な改変が可能であることが理解されるであろう。さらに、ある特徴またはステップについて記載する場合、組み合わせについて明示的に記載していなくても、本明細書の他の任意の特徴またはステップと組み合わせてもよい。したがって、他の実施形態も、特許請求の範囲内にある。

【実施例】

【0081】

(実施例1)

PcpAは、肺感染症および致死性の敗血症に対する保護作用を惹起する。

【0082】

材料および方法。

10

【0083】

菌種、培地および増殖条件。本研究では、*S. pneumoniae*株TIGR4およびEF3030ならびにその誘導体を用いた。他に記載がない限り、0.5%酵母エキスを含むトッドヒューイト(Todd-Hewitt)ブロス(THY)または血液寒天プレートで肺炎球菌を37℃で増殖させた。適切な場合、エリスロマイシンを濃度0.3μg/mlで培地に加えた。*S. pneumoniae*(表2)の臨床分離株および主要なクローン群の分離株(表3)を用いた。

【0084】

【表2】

表2. *Streptococcus pneumoniae*の臨床分離株

20

菌株	莢膜型	PcpAファミリー	由来	参考文献
R6	D39(2型)の非莢膜変異体	1	ニューヨーク	(Belanger et al., <i>J. Bacteriol.</i> 186:8164-71 (2004); Ottolenghi and Hotchkiss, <i>Science</i> 132:1257-8 (1960))
TIGR4*	4	2	ノルウェー	Ren et al., <i>Infect. Immun.</i> 71:75-85 (2003); Roach et al., <i>PNAS</i> 102:9577-82 (2005)
BG12730*	6	2/3	ガンビア	Shaper et al., <i>Infect. Immun.</i> 72:5031-40 (2004)
BG10752*	9	1	アラバマ	本研究
TJ0893*	14	2	ミシシッピ	Wu et al., <i>J. Infect. Dis.</i> 175:839-46 (1997)
V175*	18	2	テネシー	Robinson et al., <i>J. Infect. Dis.</i> 183:1501-7 (2001)
L82013*	19	2	アラスカ	Briles et al., <i>Infect. Immun.</i> 188:339-48 (2003)
EF3030*	19F	1	スウェーデン	Briles et al., <i>Infect. Immun.</i> 188:339-48 (2003); Briles et al., <i>Infect. Immun.</i> 73:6945-51 (2005); Johnston et al., <i>Infect. Immun.</i> 74:1171-80 (2006)
EF9303*	23F	不明	スウェーデン	Wu et al., <i>Microb. Pathog.</i> 23:127-37 (1997)
L82016*	6B	1	米国	Briles et al., <i>Infect. Immun.</i> 60:111-6 (1992); Briles et al., <i>Infect. Immun.</i> 188:339-48 (2003)
D-1091B*	23	1	不明	本研究

30

40

(\*)当初の患者分離株から10継代を超えて分離されていない臨床菌株。R6は、1920年代に患者から分離された菌株D39由来であった。

50

【 0 0 8 5 】

【 表 3 】

表 3. 主要なクローン群の *Streptococcus pneumoniae*

菌株	荚膜型	由来	特徴	参考文献
MA-14	14	英国	世界的な <i>Erm<sup>r</sup></i> クローン； MLST 配列型 9	(1)
MB-23F	23F	英国	疾患不明； MLST 配列型 8 1	(1)
MC-6B	6B	スペイン	疾患不明； MLST 配列型 9 0	(3, 4)
MD-6B	6B	アラスカ	疾患不明； MLST 配列型 1 3 8	(2)
ME-19	19	テネシー	キャリッジクローン； MLST 配列型 2 3 6	(2)
MF-6A	6A	テネシー	キャリッジクローン； MLST 配列型不明	(2)
MG-1	1	英国	主要な侵襲性クローン； MLST 配列型 2 2 7	(1)
MI-7F	7F	ノルウェー	主要な侵襲性クローン； MLST 配列型 1 9 1	(1)
MJ-35	35	テネシー	キャリッジクローン； MLST 配列型 6 5	(2)
MK-22	22	テネシー	主要な侵襲性クローン； MLST 配列型不明	(2)
ML-11	11	テネシー	キャリッジクローン； MLST 配列型 6 2	(2)
MM-14	14	テネシー	主要な侵襲性クローン； MLST 配列型 1 2 4	(2)
MN-23F	23	テネシー	キャリッジクローン； MLST 配列型 3 7	(2)

10

20

30

40

- Enright, M. C., and B. G. Spratt. 1998. A multilocus sequence typing scheme for *Streptococcus pneumoniae*: identification of clones associated with serious invasive disease. *Microbiology* 144:3049-60.
- Robinson, D. A., K. M. Edwards, K. B. Waites, D. E. Briles, M. J. Crain, and S. K. Hollingshead. 2001. Clones of *Streptococcus pneumoniae* Isolated from Nasopharyngeal Carriage and Invasive Disease in Young Children in Central Tennessee. *J Infect Dis* 183:1501-7.
- Hakenbeck, R., T. Briese, L. Chalkley, H. Ellerbrok, R. Kalliokoski, C. Latorre, M. Leinonen, and C. Martin. 1991. Antigenic variation of penicillin-binding proteins from penicillin-resistant clinical strains of *Streptococcus pneumoniae*. *J Infect Dis* 164:313-319.
- Hakenbeck, R., T. Briese, L. Chalkley, H. Ellerbrok, R. Kalliokoski, C. Latorre, M. Leinonen, and C. Martin. 1991. Variability of penicillin-binding proteins from penicillin-sensitive *Streptococcus pneumoniae*. *J Infect Dis* 164:307-312.

これらの研究に使用した臨床菌株は、過去 25 年以内に単離されたものである。あり得べき PcpA の多様性を調べるため、*Streptococcus pneumoniae* ゲノム多様性プロジェクト (Genome Diversity Project) (<http://genome.Microbio.uab.edu/strep/info>) で用いた菌株の群から分離株を選択した。

【 0 0 8 6 】

菌株の構築の間、1.5% 寒天を含むルリア - ベルターニ (LB: Luria - Bertani) プロスまたは LB プレートで増殖させた *Escherichia coli* TOP 10 細胞 (インピトロジェン, カールズバッド, カリフォルニア州) 内でプラスミ

50

ドを維持した。増殖培地に、pCR2.1系、pCR4系およびpET-20b系プラスミドにはアンピシリン(50 µg/ml)を、pJY4164系プラスミドにはエリスロマイシン(400 µg/ml)を加えた。

【0087】

高マンガン培地でのバクテリアの増殖にはTHY培地を用いた。低マンガン条件での増殖では、マンガンを除去したTHYを調製した。製造者の指示に従ってオートクレーブ処理の前にChellex-100(2% w/v)(シグマアルドリッチ(Sigma Aldrich), セントルイス, ミズーリ州)を加えてTHY培地を調製した。オートクレーブ処理後、このTHY/Chellex混合物を室温で一晩攪拌し、続いて濾過滅菌した。使用前にZnCl<sub>2</sub>、MgCl<sub>2</sub>、CaCl<sub>2</sub>およびFeSC<sub>4</sub>をそれぞれ1 mMの濃度まで加え、MnSO<sub>4</sub>を0.1 µMの濃度まで加えた。増殖を600 nmにおける光学密度でモニターした。

10

【0088】

菌株の構築。本研究に用いたE. coli株、プラスミドおよびプライマーを示す(表4)。突然変異誘発を用いて親株TIGR4およびEF3030のpcpAを不活化した。変異株の構築については、以前に行われて記載されている(Johnston, et al, Infect. Immun. 74: 1171-80 (2006))。

【0089】

【表 4】

表 4. 本研究に使用した他の菌株およびプラスミド

菌株、プラスミド またはプライマー	関連する特徴または配列および遺伝子	参考文献	
<b>菌株</b>			
<i>S. pneumoniae</i> JEN7	TIGR4 <i>psaR::Erm</i> ( <i>pcpA</i> 構成的ミュータント)	Johnston, et al., Infect. Immun. 74:1171-80 (2006)	10
Jen11	TIGR4 <i>pcpA::Erm</i>	Johnston, et al., Infect. Immun. 74:1171-80 (2006)	
<i>E. coli</i> TOP10 Rosetta (DE3) pLysS	一般的なクローニング株 発現株	Invitrogen, Carlsbad, CA Novagen, Madison, WI	
<b>プラスミド</b>			
pCR2.1	3.9 kb, Amp <sup>r</sup> , Kan <sup>r</sup>	Invitrogen, Carlsbad, CA	
pCR4	3.9 kb, Amp <sup>r</sup> , Kan <sup>r</sup>	Invitrogen, Carlsbad, CA	
pET-20b	3.7 kb, Amp <sup>r</sup> , C-term his-tag	Novagen, Madison, WI	
pDG-1	<i>pcpA</i> フラグメントを含む pCR4; Amp <sup>r</sup>	本研究	
pJM-1	<i>pcpA</i> フラグメントを含む pET-20b; Amp <sup>r</sup>	本研究	
pJ035	412 bp 内部 <i>pcpA</i> th フラグメントを含む pCR2.1; Amp <sup>r</sup>	本研究	
<b>プライマー<sup>a</sup></b>			
DTG-16	cgcgatccATATGTCCTAATGAACC (配列番号 39); <i>pcpA</i> F	本研究	20
DTG-12	gcgctcgagTTCCTTTAATGAATCTAAGACGC CACTTAGGAAGAAGGAC (配列番号 40); <i>pcpA</i> R	本研究	
JWJ28	AAC TGT TCA AGT GGG TAA TGG (配列番号 43); <i>pcpA</i> F	Johnston, et al., Infect. Immun. 74:1171-80 (2006)	
JWJ29	TGA ACT TGA GGA AAA GGT TAG C (配列番号 44); <i>pcpA</i> R	Johnston, et al., Infect. Immun. 74:1171-80 (2006)	
BGP1	ATGAAAAAACTACAATATTATCATTAAC TACAGCTGCG (配列番号 45); <i>pcpA</i> F	本研究	
BGP2	CCATAAACCTTTGTCTTTAACCACAACCA ACTAC (配列番号 46); <i>pcpA</i> R	本研究	

<sup>a</sup> プライマーは、*S. pneumoniae* TIGR4 (2) の全ゲノム配列をベースにした。小文字は、制限エンドヌクレアーゼ部位を作製するために用いたミスマッチを示す。配列はすべて 5' から 3' 方向に示す。

組換え PcpA の発現および精製。本研究に使用した菌株、プラスミドおよびプライマーを表 2 に示す。プライマー DTG-16 (5' - CGCGGATCCATATGTCCTCTAATGAACC - 3' (配列番号 39)) および DTG-12 (5' - GCGCTCGAGTTCTTTAATGAATCTAAGACGCCACTTAGGAAGAAGGAC - 3' (配列番号 40)) を、菌株 TIGR4 における pcpA の 1126 bp フラグメントを増幅するように設計した。このプライマーはそれぞれ、操作された制限エンドヌクレアーゼ部位 BamHI および XhoI を含む。3.0 mM の MgCl<sub>2</sub>、12.5 μM の dNTP、各プライマー 50 ピコモルおよび Taq DNA ポリメラーゼ 2.5 ユニットを含むカクテル (総容量 50 μl) において反応を 30 サイクル繰り返した。1 サイクルは、94 °C、1 分; 55 °C、1 分; 72 °C、5 分であった。最初に、この増幅させた遺伝子フラグメントを T-テイルド (T-tailed) 法で pTOPO4 (インビトロジェン、カルズバッド、カリフォルニア州) にクローニングし、プラスミド pLMG を形成した。

【0090】

このフラグメントを、TOPO TA クローニングキット (インビトロジェン、カルズバッド、カリフォルニア州) にクローニングし、プラスミド pLMG を形成した。

ズバッド，カリフォルニア州）を用いて p C R 4 にクローニングした。B a m H I および X h o I（プロメガ（P r o m e g a），マディソン，ウィスコンシン州）を用いてエンドヌクレアーゼ消化により、精製したプラスミドをスクリーニングした。得られたプラスミド p D G - 1 に p c p A フラグメントが挿入されていることをアガロースゲル電気泳動、P C R 解析および D N A シークエンシングをすべて用いて確認した。p D G - 1 のインサートを p E T - 2 0 b 発現ベクター（ノバゲン（N o v a g e n），マディソン，ウィスコンシン州）にサブクローニングした。得られたプラスミド p J M - 1 をタンパク質製造のため E . c o l i 株 R o s e t t a B l u e（D E 3）p L y s S（ノバゲン，マディソン，ウィスコンシン州）に形質転換した。この株は、誘導性 U V 5 プロモーターの制御下にある T 7 プロモーターの染色体コピーを含む。I P T G の誘導により、アミノ酸 1 9 ~ 3 9 1 を含む切断タンパク質を発現させる。この過剰発現した切断タンパク質を、精製しやすくするため C - カルボキシ末端ヒスチジンタグを用いてノバゲン H I S - B I N D（登録商標）精製キット（ノバゲン，マディソン，ウィスコンシン州）で精製を行った。その後クーマシーブルー（C o m a s s i e B l u e）染色で S D S - P A G E 解析を行ったところ、約 4 1 k D a の単一バンドが見られた。

10

【 0 0 9 1 】

以下は、クローニングし発現させた r P c p A タンパク質の完全な配列である。下線を引いた部分はクローニングベクター由来である。

【 0 0 9 2 】

【化 1】

20

MDIGINSDPYVPNEPILADTPSSEVIKETKVGSIHQNNIKYKVLTVEGNI  
 GTVQVGNGVTPVEFEAGQDGKPFITPTKITVGDKVFTVTEVASQAFSYPDET  
 GRIVYYPSSITIPSSIKKIQQKGFHGSKAKTIIFDKGSQLEKIEDRAFDFSELEEIE  
 LPASLEYIGTSAFSSQKLKLLTFSSSSKLELISHEAFANLSNLEKLLPKSVKT

【 0 0 9 3 】

【化 2】

LGSNLFRLTTSKLVHDVEEGNESFASVDGVLFSKDKTQLIYYPSQKNDESYKT  
 PKETKELASYSFNKNSYLKLELNEGLEKIGTFADFADAIKLEEISLPNSLETIER  
 LAFYGNLELKEILPNNVKNFGKHVMNGLPKLKS LTIGNNINSLPSFFLSGVLD  
SLKELEHHHHHHH (配列番号 41)

30

抗 P c p A ポリクローナル抗体の作製。精製した r P c p A を用いてニュージーランドホワイトウサギ（N e w Z e a l a n d W h i t e R a b b i t）（マートルズラビティー（M y r t l e ' s R a b b i t y），トンプソンステーション（T h o m p s o n S t a t i o n），テネシー州）に皮下免疫し、抗 P c p A ポリクローナル血清を得た。このウサギに 1 m l の完全フロインドアジュバントに加えた 1 0 0 μ g の r P c p A を総容量 2 m l 皮下注射した。2 週間後、完全フロインドアジュバントに加えた 1 0 0 μ g の r P c p A で第 2 のブーストを行い、第 2 のブーストから 2 週間後、不完全フロインドアジュバントに加えた 1 0 0 μ g の P c p A で第 3 のブーストを行った。最終ブーストから 2 週間後、麻酔下でウサギは心臓穿刺により採血した。その血液を凝固させ、遠心分離により血清を得て - 8 0 で保存した。

40

【 0 0 9 4 】

P C R による S . p n e u m o n i a e 株における p c p A の確認。P C R プライマー対 B G P - 1 と B G P - 2 を用い種々の S . p n e u m o n i a e 株における p c p A の有無を点検した。プライマー対を、T I G R 4 株における p c p A の 1 4 1 6 b p の N 末端フラグメントを増幅するように設計した。その後、P C R 産物を T . A . E .（T r i s A c e t a t e E D T A）アガロースゲルで分離し、臭化エチジウムで染色して増

50

幅したバンドの正確なサイズを調べた。

【0095】

S. pneumoniae 細胞の分画。Yother および White が記載した方法 (Yother and White, J. Bacteriol 176: 2976-85 (1994)) をわずかに変更してプロトプラストを作製した。MTHY で増殖させた対数期細胞をペレットにし、PBS (phosphate-buffered saline) で洗浄した。次いで、この細胞を 0.5 ml の 2% 塩化コリンに再懸濁し、そのチューブを数回反転させた。次いで、細胞をペレットにし、上清を取り除き、-20 で保存した (コリン溶出画分)。細胞をペレットにし、300 μl のプロトプラスト緩衝液 (20% スクロース、5 mM のトリス [pH 7.4]、2.5 mM の MgSO<sub>4</sub>) で 1 回洗浄した。次いで、このペレットを 1 ml のプロトプラスト緩衝液に再懸濁してから、培養ペレット 1 ml 当たり 5 U のムタノリシン (シグマアルドリッチ, セントルイス, ミズーリ州) を加えた。この懸濁液を室温で一晩インキュベートした。細胞を 6000 rpm で 10 分間の遠心分離によりペレットにし、上清を -20 で保存する (細胞壁画分)。次いで、このプロトプラストを 1 ml のプロトプラスト緩衝液で洗浄した。顕微鏡検査によりプロトプラストの形成を確認した。このプロトプラストをペレットにし、0.3 ~ 1 ml の dH<sub>2</sub>O に溶解して、これを -20 で保存する (細胞膜/細胞質画分)。PcpA が存在するかどうかウエスタンブロット解析により各画分のサンプルを調べる。

10

【0096】

S. pneumoniae の抗体染色。高または低マンガン培地で増殖させた中間対数期細胞 (OD<sub>600</sub> 0.6) をペレットにし、PBS で洗浄して、1% ウシ血清アルブミンを含む PBS (PBSB) に再懸濁し、室温で 20 分インキュベートした。細胞をペレットにし、PBSB または PBSB で 1:100 になるように希釈した抗 PcpA 血清に再懸濁し、37 で 30 分間インキュベートした。インキュベーションに続いて PBS で 2 回洗浄した。次いで、細胞を、PBSB で希釈したヤギ抗ウサギ免疫グロブリン G (重鎖と軽鎖) - フルオレセインイソチオシアナート (サザンバイオテクノロジーアソシエーツインク (Southern Biotechnology Associates, Inc.), バーミングハム, アラバマ州) と 4 で 30 分間インキュベートした。次に、この細胞を PBS で 2 回洗浄し、0.01 mM の親油性膜色素 TMA-DPH (インビトロジェン, カールズバッド, カリフォルニア州) を含む 4% ホルムアルデヒド PBS 溶液に再懸濁した。その後、細菌細胞を Olympus IX 70 顕微鏡を用いて落射蛍光観察で検査した。

20

30

【0097】

ウエスタンブロット。細菌培養を THY および MTHY で中間対数期 OD<sub>600</sub> 0.6 まで増殖させた。同量の菌株をそれぞれリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で 2 回洗浄し、硫酸ドデシルナトリウム - ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) サンプル緩衝液を含む PBS で再懸濁して、5 分間煮沸した。サンプルおよび着色タンパク質標準物質 (インビトロジェン, カールズバッド, カリフォルニア州) を製造者の指示に従い NuPAGE 10% ビス - トリスゲル (インビトロジェン, カールズバッド, カリフォルニア州) に流し、モルホリンエタンスルホン酸 (MES: morpholine ethanesulfonic acid) - SDS 泳動用緩衝液 (インビトロジェン, カールズバッド, カリフォルニア州) で電気泳動により分離した。次に、Trans-Blot SD semidry transfer cell (バイオラッド (Bio-Rad), ハーキュリーズ (Hercules), カリフォルニア州) を用いてタンパク質をニトロセルロース膜にトランスファーした。このブロットを、PBSB で 1:1000 に希釈した抗 PcpA ポリクローナル抗体でプローブした。ヤギ抗ウサギ免疫グロブリン G (重鎖と軽鎖) - アルカリホスファターゼおよびストレプトアビジン - アルカリホスファターゼ (サザンバイオテクノロジーアソシエーツインク, バーミングハム, アラバマ州) を二次抗体として用いた。Sigma Fast ニトロブルーテトラゾリウム - 5 - プロモ - 4 - クロロ - 3 - インドリルホスファート (NBT-BCIP) 錠剤 (シグマアルドリッチ

40

50

、スイス)を用いて比色検出を行った。

【0098】

マウスの全身免疫。最初に、6～8週齢のCBA/CaHNBtkxid/J(CBA/N)マウス(ジャクソンラブズ(Jackson Labs),バーハーバー,メイン州)に、2 $\mu$ gの水酸化アルミニウムをアジュバントとして10 $\mu$ gのrPcpAを総容量200 $\mu$ l皮下注射した。2週間後、水酸化アルミニウムを用いて10 $\mu$ gのrPcpAで第2のブーストを行った。2週間後、水酸化アルミニウムを用いずに10 $\mu$ gのrPcpAを含む第3のブーストを行った。次に、このマウスを2週間放置しておき、その後S.pneumoniaeをチャレンジした。感染の24時間前にマウスを採血した。

【0099】

敗血症のマウスモデル。前述の感染症の全身モデルを用いて肺炎球菌のビルレンスを調べた(Coats, et al., Vaccine 23:4257-62(2005); Ren et al., Infect. Immun. 71:75-85(2003))。6～8週齢のCBA/Nマウスに、乳酸加リンゲルで希釈したバクテリアを300CFU(colony-forming unit)静脈内注射した。マウスを21日間モニターした。触っても反応しなくなり、体温が正常未満まで低下したときマウスを瀕死状態としてスコア化し、その日時を記録した。瀕死状態のマウスをすべてCO<sub>2</sub>麻酔で安楽死させた。

【0100】

肺炎のマウスモデル。以前に記載されているように肺に感染させた(Balachandran et al., Infect. Immun. 70:2526-34(2002); Briles et al., J. Infect. Dis. 188:339-48(2003); Takashima et al., Infect. Immun. 65:257-260(1997))。6～8週齢のCBA/Nマウスをイソフルラン(ミンラド(MinRAD), バッファロー, ニューヨーク州)で麻酔し、5 $\times$ 10<sup>6</sup>個のバクテリアを含む40 $\mu$ lの乳酸加リンゲル溶液の懸濁液をマウスの外鼻孔に導入し、誤嚥性肺炎を誘発した。7日後、マウスを屠殺した。屠殺したマウスの鼻腔を、以前に記載されているように50 $\mu$ lの乳酸加リンゲルで洗浄した(Wu et al., J. Infect. Dis. 175:839-46(1997))。鼻洗浄液を連続希釈し、ゲンタマイシン(4 $\mu$ g/ml)を含む血液寒天培地に蒔いた。肺を摘出し、2mlの乳酸加リンゲルが入ったストマッカーバッグに入れ、ホモジナイズし、連続希釈して、3倍連続希釈液に加えたゲンタマイシンを含む血液寒天培地に蒔いた。

【0101】

鼻咽頭定着のマウスモデル：以前に記載されているように鼻腔内接種を行った(Balachandran et al., Infect. Immun. 70:2526-34(2002); Wu et al., J. Infect. Dis. 175:839-46(1997))。6～8週齢のCBA/Nマウスに、麻酔なしで10 $\mu$ lの乳酸加リンゲル液に加えた10<sup>6</sup>個のバクテリアを鼻腔内感染させた。次に、感染マウスを屠殺し、その鼻腔を50 $\mu$ lのリンゲル溶液で洗浄した。この鼻洗浄液を連続希釈し、ゲンタマイシンを含む血液寒天培地に蒔いた。キャンドルジャーで37 $^{\circ}$ Cにて一晩インキュベーションした後、血液寒天プレートから目視可能な数を判定した。

【0102】

統計解析。インスタット(Instat)(グラフパッドソフトウェアインク(GraphPad Software Inc.), サンディエゴ, カリフォルニア州)を用いて統計解析を行った。マンホイットニー(Mann-Whitney)の2標本順位検定を用いて、対照と実験群との瀕死状態になるまでの時間またはCFUの回収数を比較した。p値が0.05未満の場合に統計学的に有意と判定した。

【0103】

結果

S.pneumoniaeの臨床的に重要な菌株にはpcpAが存在する。pcpAの

10

20

30

40

50

LRR領域をはさんだプライマー（BGP1とBGP2）を用いてPCRにより、pcpAの存在を調べた。調査対象の23株（表2および表3）それぞれで約1500bpフラグメントが得られた。これら菌株のうち8つは、過去25年以内に単離されている臨床菌株で、7価コンジュゲートワクチンがカバーする7種によく見られる莢膜型の代表的な菌株である（図1）。残りの12株は、ゲノム多様性プロジェクト（<http://genome.microbio.uab.edu/strep/info/>）の一環として構築された一連の菌株から選択された*S. pneumoniae*のセットである。このプロジェクトは、*S. pneumoniae*の幅広い多様性をカバーするため一連の菌株を選択している。これら12株については、MLSTデータに基づき広く多岐にわたるように選択した。4株は重篤な侵襲性疾患の患者由来、5株は無症候性保菌者由来で、2株については疾患/定着が不明であり、1株は世界的な抗生物質耐性クローン由来であった。これらの菌株は、世界の様々な領域における12種の莢膜型の典型である。

10

#### 【0104】

すべての菌株でpcpAの発現を検査するため、低（ $0.1 \mu\text{M}$ ）マンガで菌株を増殖させた。全細胞タンパク質サンプルを、低マンガ培地で培養した中間対数期細胞から調製した。（表2および表3）に示したすべての菌株を検査したが、7価ワクチンに含まれる莢膜型に相当する菌株のみを示してある（図2）。全細胞タンパク質サンプルをSDS-PAGEにより分離し、ニトロセルロースにトランスファーした。このプロットを抗pcpAポリクローナル抗血清でプローブすると、これら莢膜（capsular）血清型4、6、9、14、18、19、23の野生株それぞれで約62kDaのバンドが検出された（図2）。この62kDaバンドは、pcpA不活化ミュータントJEN11では存在しなかった一方、7種の典型的な菌株では存在した。また、全細胞タンパク質サンプルについては、同じ菌株を高マンガ培地で増殖させた菌株からも調製したが、抗pcpA抗血清によりバンドは検出されなかった。PCR解析とウエスタンブロットデータの組み合わせから、表2および表3に示す*S. pneumoniae*株すべてでpcpAが存在することが明らかになった。

20

#### 【0105】

pcpAは、低マンガ条件下で*S. pneumoniae*の表面に露出している。マンガは、レギュレーターPsaRの作用を介してpcpA遺伝子の転写をコントロールしていることが研究で明らかになっている（Johnston et al, Infect. Immun. 74: 1171-80 (2006)）。本明細書に記載のとおり、マンガ依存性制御は、*S. pneumoniae*表面上のpcpAの存在に直接影響を与え、表面pcpAは、莢膜を持つ肺炎球菌上でも抗体に接触できる。

30

#### 【0106】

細胞分画を行って、pcpAが*S. pneumoniae*の細胞壁または細胞膜/サイトゾルと関係があるどうか判定した。これら細胞画分のウエスタンブロット解析から、pcpAは大部分が低マンガ培地で増殖させたバクテリアの*S. pneumoniae*の細胞壁に存在することが明らかになった。pcpAの小さな画分は、細胞膜/サイトゾルとの関連性が認められたが、これは、おそらくpcpAがまだバクテリアの表面に運ばれていないのであろう。

40

#### 【0107】

細胞分画ばかりでなく、野生型*S. pneumoniae*株TIGR4由来の対数期細胞を、高または低マンガ培地で増殖させ、抗pcpAポリクローナル抗血清、続いてフルオレセインイソチオシアナート（FITC: fluorescein isothiocyanate）コンジュゲート抗ウサギ免疫グロブリンで染色した。具体的には、TIGR4を中間対数期まで高または低Mn<sup>2+</sup>培地で培養した。バクテリアを、抗pcpAウサギ血清とインキュベートし、続いてFITCコンジュゲート抗ウサギIg抗体とインキュベートした。次に、細胞を、膜色素TMA-DPHを含む4%ホルムアルデヒドで固定した。その後、この標識バクテリアを免疫蛍光顕微鏡により調べた。pcpAに対する抗体は、低マンガで増幅させたバクテリアの染色に関与できるが、高マンガで増幅さ

50

せたバクテリアには関与できない。

【0108】

こうした結果から、PcpAは、インビトロでの低マンガン条件下で培養した野生型 *S. pneumoniae* の表面に露出していることが明らかになる。これは、PcpAが宿主内の肺および血液などの低マンガン部位に感染しているバクテリアに発現し、表面に露出していることを示唆している。PcpAがこのように露出していることで感染において細菌と宿主上皮との間のPcpA-リガンド相互作用が亢進される。こうした結果からは、マンガン濃度によるPcpA産生の制御を大部分の肺炎球菌に一般化できることも示唆される。

【0109】

rPcpAを免疫すると、抗体が惹起され、肺および全身性感染症に対して保護作用が与えられるが、鼻咽頭定着には大きな作用を及ぼさない。感染症研究に使用する前、マウスを、水酸化アルミニウムを含むrPcpAで免疫するか、水酸化アルミニウムを単独投与した。マウスの2つの群についてELISA (enzyme linked immunosorbent assay) により全Ig (H+L) を定量した。免疫マウスの血清中の抗体特異的PcpAの幾何平均レベルは、 $0.465 (\pm 0.119) \mu\text{g/ml}$ 、これに対してアジュバントを単独投与したマウスでは平均 $0.002 (\pm 0.002) \mu\text{g/ml} (\pm \text{SEM})$ であった。これは、免疫経路が、rPcpAに対する免疫反応を惹起させるのに有効であったことを示唆している。

【0110】

免疫によりマウスが肺炎から保護されるかどうかを調べるため、免疫マウスおよびalumのみのマウスを軽麻酔し、外鼻孔にEF3030株を $5 \times 10^6$  CFU接種した。この手順では、限局性肺炎が認められたが、菌血症は認められなかった。したがって、このモデルにおける保護作用は肺炎自体とは関係があるものの、敗血症全般には無関係である可能性がある。感染から7日後、マウスをすべて屠殺した。ホモジナイズした肺組織および鼻洗浄液の細菌数を判定した。回収したCFUの中央値によれば、rPcpAで免疫したマウスの肺ホモジネートから回収した肺炎球菌数は、アジュバントを単独投与した場合に比べて1/100未満であった(図3A) ( $P = 0.002$ )。こうした結果から、rPcpAの免疫により、*S. pneumoniae* による肺感染症に対する保護作用を惹起できることが示唆される。マウスの鼻洗浄液から回収した細菌数については、rPcpAで免疫した場合とアジュバントを単独投与した場合とで有意な差はなかった(図3B)。

【0111】

次に、*S. pneumoniae* の他の菌株 (TJ0893、血清型14; EF9303、血清型23F; およびL82016、血清型6B) による限局性肺感染に対して皮下免疫が保護作用を与えるかどうかを判定した。rPcpAを皮下免疫すると、アジュバントを単独免疫したマウスと比較して、各菌株に対して有意な保護作用が惹起された(図5)。

【0112】

最適な鼻腔定着にはPcpAの発現は必要ない。免疫を行っても肺炎モデルに使用したマウスの鼻洗浄液から回収したバクテリア数に影響がなかったため、鼻咽頭保菌のモデルを用いてpcpA不活性化の作用を調べた。このモデルでは、肺炎モデルのマウスの鼻洗浄液から収集した間接的な観察結果とは異なり、鼻腔保菌に対するPcpAの任意の作用を直接観察できる。マウスに、事前に麻酔せずにEF3030株またはそのpcpA不活化ミュータントJEN18株のどちらかを $10^6$  CFU接種した。感染から7日後、このマウスを屠殺し、鼻洗浄液を採取して、肺炎球菌を検出するためプレーティングした。EF3030またはJEN18を接種したマウスの鼻洗浄液から回収したバクテリア数には、どちらも有意な差はなかった(図5)。

【0113】

インタクトなpcpAの遺伝子が存在しても、あるいは、rPcpAの皮下免疫を行っ

10

20

30

40

50

ても、マウスの鼻洗浄液に回収された肺炎球菌数に影響がないということは、鼻咽頭のマンガン濃度 ( $36 \mu\text{M}$ ) が *pcpA* 転写を抑制するほど十分に高いことと整合する。こうした条件下では、鼻咽頭における *psaR* により *pcpA* 転写が阻止されると考えられる。したがって、この宿主部位では *pcpA* に対する免疫がバクテリアにほとんど作用しないことが予想されよう。

#### 【0114】

*pcpA* および *pcpA* に対する免疫は、全身性感染症のマウスモデルにおけるビルレンスに作用する。敗血症を防止する *pcpA* に対する免疫能を評価するため、*CBA/N* マウスに、水酸化アルミニウムに加えた *pcpA* を、または対照として水酸化アルミニウムを単独で皮下免疫し、静脈内に莢膜型 4、*TIGR4 S. pneumoniae* をチャレンジした。マウスに菌血症および敗血症を発症させやすくするため、*EF3030* ではなくこの菌株を用いた。免疫した動物に、*TIGR4 S. pneumoniae* を  $300 \text{CFU}$  静脈内 (*IV*) 注射した。生存状況を 21 日間モニターした。*pcpA* 免疫を受けたマウスが瀕死状態になるまでの経過時間中央値は、アジュバントを単独投与したマウスと比べて 43.5 時間伸びた (図 6)。*pcpA* で免疫したマウスの 26 パーセントが生存した一方、水酸化アルミニウム単独で免疫マウスはすべて死亡した。この生存の差は統計学的に有意であった ( $P = 0.007$ )。

10

#### 【0115】

静脈内接種後にマウスを瀕死状態にさせる肺炎球菌の能力に対する *pcpA* の不活性化の作用。*pcpA* を不活性化すると、肺炎マウスモデルおよび肺 - 敗血症モデルのビルレンスが低下した。本明細書に記載のように、未感染のマウスに *TIGR4* またはその *pcpA* 不活化ミュータント *JEN11* を  $300 \text{CFU}$  感染させて、静脈内チャレンジ後の全身性感染症に対する *pcpA* 不活性化の作用を調べた。*pcpA* ミュータントに感染したマウスが瀕死状態になるまでの経過時間中央値は、野生型バクテリアで感染させた場合と比べて 31.5 時間の伸びた ( $P = 0.0299$ ) (図 7)。これは、全身性疾患を発症させる *S. pneumoniae* の能力には *pcpA* が関与していることを示唆している。

20

#### 【0116】

(実施例 2)

*pcpA* の粘膜免疫は肺感染を防止する。

30

#### 【0117】

図 8 に示すように、*pcpA* の粘膜免疫は、菌株 *EF3030* による肺感染症を防止する。*CBA/N* マウスに  $5 \mu\text{g}$  の *pcpA* およびアジュバントとしてコレラ毒素 B サブユニット (*CTB*) を鼻腔内免疫した。免疫後マウスを脱血し、次に、菌株 *EF3030* を  $5 \times 10^6 \text{CFU}$  鼻腔内チャレンジした。図 8 は、感染から 7 日後の肺ホモジネートにおけるバクテリアの  $\log \text{CFU}$  を示す。

#### 【0118】

粘膜免疫による保護作用は、皮下免疫の場合よりも若干高まることが観察された。こうしたデータと実施例 1 から、少なくとも粘膜経路または皮下経路の投与を用いれば、肺炎および敗血症に対する保護作用が得られることが示唆される。*pcpA* を粘膜免疫しても、この菌株による鼻腔定着を防止できない。*pcpA* は定着の過程で発現しないため、鼻腔定着を防止できないことが予想される。

40

#### 【0119】

(実施例 3)

*pcpA* の皮下または鼻腔内免疫により惹起される抗体。

#### 【0120】

*pcpA* で免疫したマウスから得られた血清について、*pcpA* に対する抗体のレベルを調べた。*CBA/N* マウスに、0 日目および 14 日目にアジュバントとして水酸化アルミニウムまたはコレラ毒素 B サブユニット (*CTB*) のどちらかを皮下 (*SC*) 免疫し、21 日目に *pcpA* を単独で皮下 (*SC*) 免疫した。35 日目にマウスを採血し、血清中

50

の抗体レベルを判定した。判定には、P s p Aでコートしたマイクロ滴定プレートと反応する既知濃度のP s p A抗体で観察される光学密度（OD）を標準として用いた。対照として、別のマウス群を希釈液およびアジュバントのみで免疫した。I g G抗体反応は、鼻腔内（I N）免疫よりもS C免疫で観察された方が1.3倍大きかった（表5）。

【0121】

【表5】

表5. P c p Aで免疫したマウスにおけるP c p Aに対する抗体

		Ig(H+L)	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgA
r P c p A の投与経路	群	平均 $\mu\text{g/ml}$ ( $\pm$ SEM)				
S.C.	rPcpA+ アジュバント (n=10)	0.465(0.159)	1.768(0.378)	0.123(0.041)	0.125(0.048)	<0.001
S.C.	アジュバント 単独 (n=10)	0.002(0.002)	0.007(0.007)	<0.001	0.002(0.001)	<0.001
I.N.	rPcpA+ アジュバント (n=10)	0.356(0.159)	0.151(0.085)	0.118(0.057)	0.093(0.033)	<0.001
I.N.	アジュバント 単独 (n=10)	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

10

20

このタイプのアッセイにはつきものであるが、サブクラスの量の合計が全I gの量にならなかった。これは、抗I g G血清がI g Gサブクラスのすべてを等しく認識するとは限らないことを示唆している。

【0122】

（実施例4）

肺細胞への付着にはP c p Aが必要である。

【0123】

P c p Aは、形質転換肺上皮細胞A 5 4 9細胞株（図9）への付着には必要であるが、形質転換ヒト鼻上皮細胞D e t r o i t 5 6 2系（図10）への付着には必要ない。A 5 4 9肺上皮細胞への付着には、P c p Aを産生するように肺炎球菌が低M n <sup>2+</sup>において増幅する必要があることも観察された。こうした研究のため肺炎球菌を、トッドヒューイットおよび酵母培地（高M n <sup>2+</sup>）、あるいはC h e l e x - 1 0 0（シグマ（S i g m a））に通して0.1  $\mu\text{m}$ のM n S O <sub>4</sub>および1mMのZ n C l <sub>2</sub>、M g C l <sub>2</sub>、C a C l <sub>2</sub>およびF e S O <sub>4</sub>で再構成したトッドヒューイットおよび酵母培地（低M n <sup>2+</sup>）で増殖させた。（B r i l e s e t a l . , J . I n f e c t . D i s , 1 8 8 : 3 3 9 - 4 8 ( 2 0 0 3 ) ）。D e t r o i t 5 6 2またはA 5 4 9細胞の単層を、T I G R 4（p c p A+）またはJ E N 1 1（p c p A - T I G R 4株）1 0 <sup>6</sup> C F Uと1 5 0分

30

40

【0124】

肺炎球菌のA 5 4 9細胞への付着は、P c p Aに対する抗体で阻害される（図11）。こうしたデータは、肺炎球菌の肺上皮細胞への付着がP c p A依存性であることを示唆している。

【0125】

（実施例5）

受動防御モデル。

50

## 【0126】

PcpAによる能動免疫が肺感染に対する保護作用を惹起できることから、PcpAに対する抗体がマウスを肺感染から受動的に保護できるかどうかを判定した。しかしながら、肺炎モデルでは受動防御はまだ観察されていない。第2の受動免疫研究では、PcpAに対するウサギ免疫血清を用いて、TIGR4株による静脈内(IV)敗血症に対する受動防御を判定した。検査対象の最高濃度(1/10)の血清ではマウス2匹の死を予防できることが観察された(図12)。非免疫血清では、同じ濃度でも防止することができなかった。こうしたデータから、受動免疫は、予防が困難な場合がある菌株、TIGR4株を予防できると考えられる(Roche et al, Infect, Immun, 71: 4498 - 505 (2003))。

10

## 【0127】

## (実施例6)

PcpAおよびニューモリシンによる保護作用

ニューモリシン(Ply)は、肺感染に対してある程度の保護作用を惹起し得るもう1つのタンパク質である(Briles et al., J. Infect. Dis. 188: 339 - 48 (2003))。ニューモリシンおよびPcpAはともに、タンパク質ベースの肺炎球菌ワクチンの候補物質であるため、この2つのタンパク質について、免疫源として併用した場合、どちらかを単独で使用するよりも肺感染に対する保護作用が高まるかどうかを判定した。マウスにPcpA 5 $\mu$ g、ニューモリシン 5 $\mu$ gまたはPcpA 5 $\mu$ gとニューモリシン 5 $\mu$ gを3回免疫した。最初の2回の注射ではalumを用い、3回目の注射ではタンパク質単独で行った。今回使用したニューモリシンは、野生型ニューモリシンであった。図13は、ニューモリシンが肺感染に対して、PcpAが惹起するのと類似の保護作用を惹起することを示す。PcpAとニューモリシンを組み合わせると、ニューモリシン単独の場合よりも保護作用が著しく高まった。こうしたデータから、PcpAおよびニューモリシンを併用することで保護作用が得られることが示唆される。

20

## 【0128】

## (実施例7)

他の肺炎球菌に対する交差防御。

## 【0129】

PcpAが交差防御を惹起するかどうかを判定するため、上述の方法を用いて実施例1~2に記載した以外の菌株を検査してもよい。敗血症の研究の場合、TIGR4の他にWU2、A66、BG7322、EF6796、D39などの菌株が検査対象となる。これらの菌株の莢膜型は、3、3、6B、6Aおよび2である。肺感染を調べるには、限局性肺感染のマウスモデルでうまく行く菌株を用いる。こうした菌株として、EF9309、TG0893、L82016、BG7322およびEF6796が挙げられる。これらの莢膜型は、23F、14、6B、6Bおよび6Aである。

30

## 【0130】

## (実施例8)

マウスにおけるPcpAの存在。

非近交系CD1マウスまたはCBAマウスに、定着状態モデル、肺炎モデルおよび致死性の敗血症モデルの肺炎球菌を感染させる。肺洗浄液、鼻洗浄液、血液および尿から生物学的サンプルを採取する。接種から6日後に定着状態および肺炎のマウスからサンプルを採取する。鼻腔内接種後の敗血症マウスからは、感染から2または3日後にサンプルを採取する。限局性肺炎にはEF3030(19F型)、TJ0893、14型およびEF9393(23型)を用いる。これらの菌株は、マウスに麻酔かけた状態で40 $\mu$ lのリングル注射液に加えた5 $\times$ 10<sup>5</sup>CFUを鼻腔内投与すると限局性肺炎を引き起こす。10 $\mu$ lのリングルに加えた同数のCFUを麻酔なしでマウスに鼻腔内投与すると、肺にはコロニー形成が見られるが、CFUが200~300を超えることはない。肺炎に続いて敗血症を発症させるには、マウスにL82016株(6B型)およびTIGR4株(4型)を

40

50

投与する。定着モデルにこれらの株を用いてもよい。

【0131】

マウスを手に取り、採取用チューブ上に維持してマウスの尿を採取する。さらに、このマウスをイソフルラン (Attane; ミナードインク (Minrad Inc)) で麻酔し、心臓穿刺により採血して血清を採取する。次にCO<sub>2</sub>を過剰投与してマウスを安楽死させ、テイルピンチで検査して意識がないことを確認する。次に気管を切断し、0.5 mlのリングル溶液を気管から (though) 入れ鼻部から出して鼻洗浄液を採取する。同様に、肺を0.5 mlのリングル液で洗浄して肺洗浄液を採取する。各マウスの洗浄した鼻組織および肺組織を0.5 ml量でホモジナイズする。

【0132】

マウスの疾患を確認するため各マウスから採取したサンプルをそれぞれ血液寒天プレートでのプレティングにより定量し、個々の液体サンプルまたは組織抽出物に生存肺炎球菌があれば、その数を判定する。

【0133】

各サンプルについてELISAキャプチャーアッセイを用いて段階希釈でPcpA含量をアッセイする。全肺炎球菌のPcpA、肺炎球菌フラグメントのPcpAまたはインビボでの肺炎球菌の自己溶菌過程で放出される遊離タンパク質としてのPcpAを検出する。肺洗浄液または肺ホモジネートにおいては、限局性または敗血性の肺感染マウスからPcpAが観察される一方、これらの菌株による定着に見られるCFU数が限局性肺炎と同等であっても、コロニー形成マウスからはPcpAが観察されない。コロニー形成が見られるマウスまたは肺感染のマウスの鼻洗浄液では、ほとんど、あるいはまったくPcpAが観察されない。

【0134】

(実施例9)

ヒトのPcpAの存在。

【0135】

被検体由来の生物学的サンプルをキャプチャーELISAでアッセイする。マイクロタイタプレート表面上でPcpAを捕獲する抗体と交差反応しないように、サンドイッチの最高レベルでの抗体検出に使用するAPコンジュゲート抗体を前吸収させる。これを行う1つのやり方は、抗PcpAの第2層の検出に、第1層に使用したのと同種の抗体を用いることである。たとえば、プレートを、捕獲試薬としてウサギ抗PcpAでコートし、マウス抗PcpAを用いて結合PcpAを検出して、その後、市販のウサギ抗マウス試薬を用いてPcpAに対するマウス抗体を検出する場合、この抗体と最初にプレートのコートに使用したウサギIgとは反応しないはずである。別のアプローチとしては、APコンジュゲートIgG特異的MAbを用いてアッセイを開発してもよい。

【0136】

このアッセイの陽性対照は、既知の濃度の組換えrPcpAである。rPcpAの濃度の決定後、これを1%BSAで希釈し、小分けにして-80で凍結保存する。第2の陽性対照は、PcpAを含むように低Mn<sup>2+</sup>条件で増幅させた肺炎球菌のライセートである。このライセートを小分けにして-80で凍結保存する。標準物質はPcpAを既知の濃度で含んでいるため、タンパク質アッセイに基づきアッセイの正確な感度が分かり、検査対象の各液体中のPcpAがナノグラム濃度で判定される。アッセイの陰性対照として、a) 採取した血清の代わりに通常のウサギ血清を使用すること、b) 検出血清の代わりに通常のマウス血清を使用すること、c) PcpAをまったく含まない溶液 (非感染マウスまたはヒト由来のサンプル) およびd) 抗マウスIgとAPがコンジュゲートしていないウサギ抗体が挙げられる。全肺炎球菌のPcpA、肺炎球菌フラグメントのPcpAまたはインビボでの肺炎球菌の自己溶菌過程で放出される遊離タンパク質としてのPcpAを検出する。生物学的サンプル中にPcpAが観察されれば、被検体が肺炎であることが示唆される。コロニー形成が見られる被検体の鼻洗浄液では、ほとんど、あるいはまったくPcpAが観察されない。

10

20

30

40

50

【 0 1 3 7 】

( 実施例 1 0 )

定着抗原と侵襲抗原の比を用いた肺炎の診断。

【 0 1 3 8 】

たとえば、PcpAなどの侵襲抗原の濃度と、たとえば、NanAなどの定着抗原の濃度との比を判定することで肺炎を診断してもよい。NanAの検出については、NanAに対する抗体を用いてキャプチャーELISAにより行う。PcpA：NanAが高率であれば肺炎に関係している一方、PcpA：NanAが低率であれば肺炎とは関係していない。たとえば、PcpA：NanAの比が2：1であれば、被検体における肺炎球菌性肺炎が示唆されるのに対し、PcpA：NanAの比が1：2であれば、被検体は肺炎球菌性肺炎ではないことが示唆される。このアプローチは、場合によっては定着が関係している軽微な侵襲の過程で産生される抗原に起因する偽陽性を完全に排除するのに役立つ可能性がある(Briles et al. Infect. Immun. 73 : 6945 - 6951 (2005))。

10

【 0 1 3 9 】

本明細書に引用する刊行物および刊行物に記載の材料については、その全体を参照によって本明細書に明確に援用する。

【 図 1 】

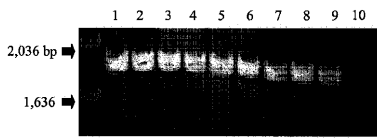


FIG. 1

【 図 2 】

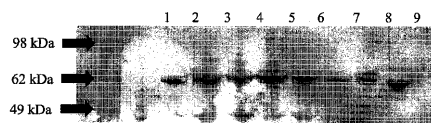


FIG. 2

【 図 3 A 】

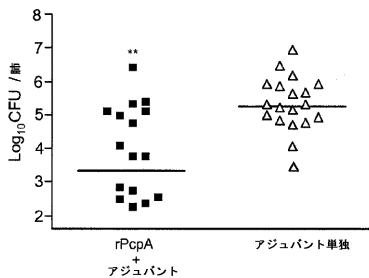


FIG. 3A

【 図 3 B 】

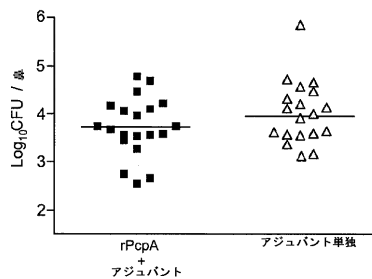


FIG. 3B

【 図 4 A 】

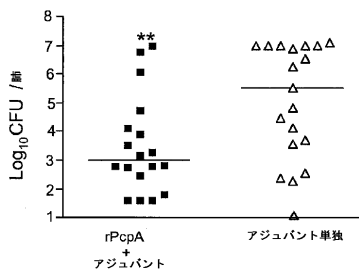


FIG. 4A

【 図 4 B 】

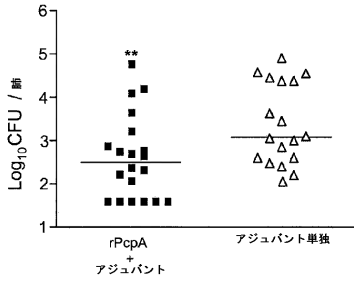


FIG. 4B

【 図 5 】

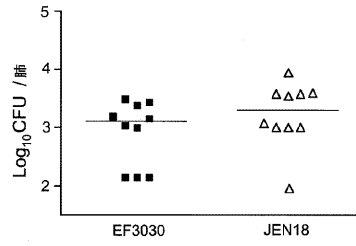


FIG. 5

【 図 4 C 】

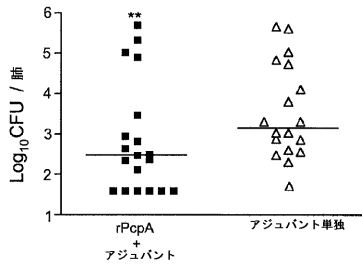


FIG. 4C

【 図 6 】

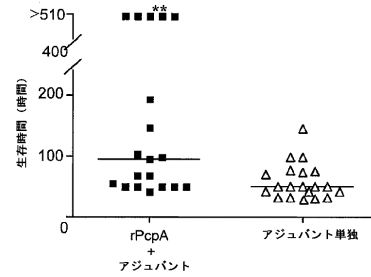


FIG. 6

【 図 7 】

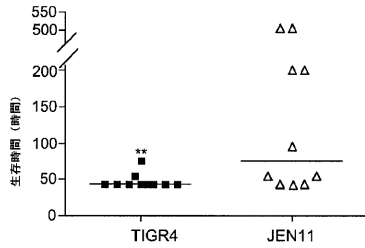


FIG. 7

【 図 9 】

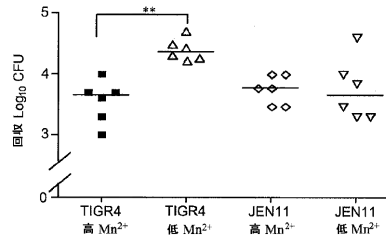


FIG. 9

【 図 8 】

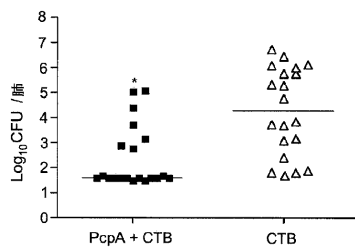


FIG. 8

【 図 10 】

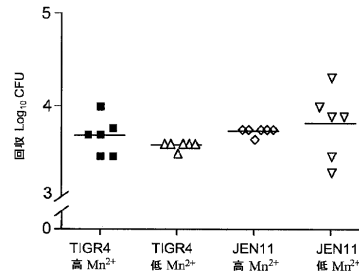


FIG. 10

【 図 1 1 】

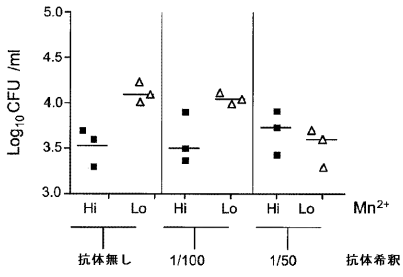


FIG. 11

【 図 1 3 】

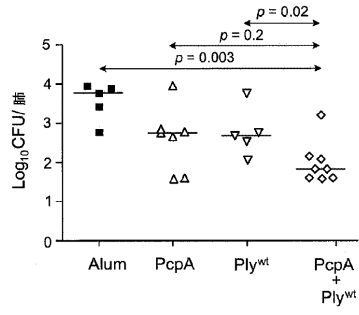


FIG. 13

【 図 1 2 】

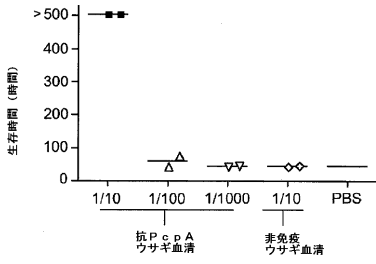


FIG. 12

【 配列表 】

2010501078000001.app

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. <b>PCT/US2007/076172</b>
---

**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.: 1-16  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Although the subject matter of claims 1-13 directed to a diagnosing method and is subject matter which the International Searching Authority is not required to search under PCT Article 17(2)(a)(I) and Rule 39(iv), the search has been carried out. The subject matter of claims 14-16 directed to a diagnosing method and is subject matter which the International Searching Authority is not required to search under PCT Article 17(2)(a)(I) and Rule 39(iv).
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.: 14-16  
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 all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers 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

International application No.

PCT/US2007/076172

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US06500613B1	31.12.2002	US2004077847A1	22.04.2004
		US2004077847AA	22.04.2004
		US6500613BA	31.12.2002
		US7078042BB	18.07.2006
US06217884B1	17.04.2001	US2003105307A1	05.06.2003
		US2003105307AA	05.06.2003
		US2003204074AA	30.10.2003
		US6217884BA	17.04.2001
		US6773880BB	10.08.2004
		US7045132BB	16.05.2006
US06245335B1	12.06.2001	US2003175293A1	18.09.2003
		US2003175293AA	18.09.2003
		US6245335BA	12.06.2001
		US6784164BB	31.08.2004
US06784164B2	31.08.2004	US2003175293A1	18.09.2003
		US2003175293AA	18.09.2003
		US2005048590A1	03.03.2005
		US2005048590AA	03.03.2005
		US6784164BB	31.08.2004

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

**PCT/US2007/076172**

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US06592876B1	15.07.2003	AT322279E	15.04.2006
		AU199672392B2	01.04.1997
		AU199923626A1	01.07.1999
		AU236269A1	01.07.1999
		AU703434B2	25.03.1999
		AU7239296A1	01.04.1997
		CA2232033AA	20.03.1997
		DE69636017C0	18.05.2006
		EP00946188B1	05.04.2006
		EP01477185A2	17.11.2004
		EP946188A1	06.10.1999
		EP946188A4	02.05.2003
		EP946188B1	05.04.2006
		FI980561A	13.05.1998
		FI980561A0	13.03.1998
		JP11513371T2	16.11.1999
		JP11513371	16.11.1999
		NO981169A	15.05.1998
		NO981169A0	16.03.1998
		US2004077847A1	22.04.2004
		US2004077847AA	22.04.2004
		US6500613BA	31.12.2002
		US6592876BA	15.07.2003
		US7078042BB	18.07.2006
		WO9709994A1	20.03.1997

## フロントページの続き

(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, MT, 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, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, 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, 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 ブリレス, デイビッド イー.

アメリカ合衆国 アラバマ 35222, バーミンガム, リンウッド ロード 760

(72)発明者 ホリングシェード, スーザン ケー.

アメリカ合衆国 アラバマ 35205, バーミンガム, 32エヌディー ストリート サウス 1008

Fターム(参考) 4H045 AA30 BA10 CA11 DA75 DA86 EA52 FA74

专利名称(译)	肺炎球菌肺炎的诊断		
公开(公告)号	<a href="#">JP2010501078A</a>	公开(公告)日	2010-01-14
申请号	JP2009524813	申请日	2007-08-17
[标]申请(专利权)人(译)	UAB研究基金会		
申请(专利权)人(译)	该Yuebi研究基金会		
[标]发明人	ブリレスデイビッドイー ホリングシェードスーザンケー		
发明人	ブリレス, デイビッド イー. ホリングシェード, スーザン ケー.		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/53 C07K14/315 C07K16/12		
CPC分类号	A61K2039/575 C07K14/3156 A61P11/00 A61P13/00 A61P13/12 A61P25/00 A61P27/16 A61P31/00 A61P31/04 G01N33/56944 G01N2400/10		
FI分类号	G01N33/569.ZNA.F G01N33/53.S G01N33/53.D C07K14/315 C07K16/12		
F-TERM分类号	4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA11 4H045/DA75 4H045/DA86 4H045/EA52 4H045/FA74		
代理人(译)	夏木森下		
优先权	60/822715 2006-08-17 US 60/827348 2006-09-28 US 60/917178 2007-05-10 US		
其他公开文献	JP5081243B2 JP2010501078A5		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

描述了用于引发针对肺炎链球菌的免疫应答的组合物和方法。更具体地，本公开涉及包含PcpA片段及其变体的免疫原性PcpA多肽，以及编码所述多肽的核酸。本公开还涉及制备和使用免疫原性多肽的方法。此外，通过从受试者收集生物样品并检测在侵袭过程中选择性表达的一种或多种肺炎球菌抗原（如PcpA或其片段），肺炎球菌感染还提供了用于诊断疾病（例如肺炎）的方法。

