

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2009-34107

(P2009-34107A)

(43) 公開日 平成21年2月19日(2009.2.19)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
C O 7 K 14/11 (2006.01)	C O 7 K 14/11	4 C O 8 5
C O 7 K 19/00 (2006.01)	C O 7 K 19/00	4 H O 4 5
A 6 1 K 39/102 (2006.01)	A 6 1 K 39/102	
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 P 31/04	

審査請求 有 請求項の数 16 O L (全 17 頁)

(21) 出願番号	特願2008-226372 (P2008-226372)	(71) 出願人	508236099
(22) 出願日	平成20年9月3日(2008.9.3)		コーテックス インターナショナル リミテッド
(62) 分割の表示	特願平9-504247の分割		オーストラリア国, ウェスタン オーストラリア 6000, パース, 220 セント ジョージズ テラス, レベル 2
原出願日	平成8年6月27日(1996.6.27)	(74) 代理人	100072349
(31) 優先権主張番号	9513074.6		弁理士 八田 幹雄
(32) 優先日	平成7年6月27日(1995.6.27)	(72) 発明者	キド, ジェネル
(33) 優先権主張国	英国 (GB)		オーストラリア国, エーシーティー 26 17, マッケラー, バギー クレセント 6
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 インフルエンザ菌由来のOMP 26抗原

(57) 【要約】

【課題】 インフルエンザ菌の外膜由来の新規な抗原性タンパク質を提供する。

【解決手段】 インフルエンザ菌の外膜タンパク質である、S D S - P A G E によって測定される際の分子量が26 k D aであるタンパク質を提供する。このようなタンパク質をコード化するD N A配列、さらにはこのタンパク質からなるワクチンやインフルエンザ菌による感染に対する被験者の免疫方法もまた提供される。本発明はまた、呼吸器感染症または中耳炎の予防または処置方法、さらにはインフルエンザ菌の検出方法、およびこのような方法に使用されるキットをも含むものである。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

インフルエンザ菌の外膜タンパク質である、S D S - P A G E によって測定される際の分子量が 2 6 k D a であるタンパク質。

【請求項 2】

図 1 に示されるアミノ酸配列、またはこれと実質的に相同性のある配列を有する、請求の範囲第 1 項に記載のタンパク質。

【請求項 3】

N - 末端アミノ酸としての 2 4 番目のアミノ酸から始まる図 1 に示されるアミノ酸配列、またはこれと実質的に相同性のある配列を有する、請求の範囲第 1 項に記載のタンパク質。

10

【請求項 4】

図 1 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 7 0 % の相同性を有するアミノ酸配列を有する、請求の範囲第 2 項または第 3 項に記載のタンパク質。

【請求項 5】

請求の範囲第 1 項から第 4 項のいずれかに記載のタンパク質の抗原性部分または領域であるタンパク質またはペプチド。

【請求項 6】

請求の範囲第 1 項から第 4 項のいずれかに記載のタンパク質の抗原性部分または領域からなるタンパク質。

20

【請求項 7】

融合タンパク質である、請求の範囲第 6 項に記載のタンパク質。

【請求項 8】

請求の範囲第 1 項から第 7 項のいずれかに記載のタンパク質をコードする核酸配列。

【請求項 9】

D N A 配列である、請求の範囲第 8 項に記載の核酸配列。

【請求項 1 0】

図 1 に示される配列である、請求の範囲第 9 項に記載の D N A 配列。

【請求項 1 1】

請求の範囲第 1 項から第 7 項のいずれかに記載のタンパク質、および必要であれば一以上の担体および / またはアジュバントからなるワクチン配合物。

30

【請求項 1 2】

インフルエンザ菌に対するワクチンの調製における請求の範囲第 1 項から第 7 項のいずれかに記載のタンパク質の使用。

【請求項 1 3】

請求の範囲第 1 1 項に記載のワクチンを被験者に投与することからなる、インフルエンザ菌による感染に対する被験者の免疫方法。

【請求項 1 4】

請求の範囲第 1 1 項に記載のワクチンを被験者に投与する段階からなる、呼吸器感染症または中耳炎の予防または処置方法。

40

【請求項 1 5】

インフルエンザ菌による感染の診断における請求の範囲第 1 項から第 7 項のいずれかに記載のタンパク質の使用。

【請求項 1 6】

請求の範囲第 1 項から第 7 項のいずれかに記載のタンパク質からなるインフルエンザ菌による感染の診断に使用されるキット。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0 0 0 1】**

本発明は、インフルエンザ菌 (*H a e m o p h i l u s i n f l u e n z a e*) の新

50

規な抗原、これよりなるワクチンおよび治療や診断におけるこの使用に関するものである。

【背景技術】

【0002】

インフルエンザ菌 (*H. influenzae*) は、桿状のグラム陰性の好気性の従属栄養細菌である (非特許文献 1)。また、インフルエンザ菌は、急性呼吸器感染症の病原体であり、慢性気管支炎や中耳炎の患者中にも検出される。

【非特許文献 1】Krieg and Holt (ed), *Bergey's Manual of Systemic Bacteriology*, pp 563 (1984)

【発明の開示】

【0003】

我々は、NTHI 由来の単一の 26 kDa の外膜タンパク質 (OMP 26 と称する) を同定、単離し、さらに、驚くべきことに、このタンパク質は、免疫原として使用されると、NTHi の同種及び異種株による感染に対して防御免疫反応を誘導できることを発見した。このタンパク質は、P5 と同様の SDS-PAGE による分子量を有するが、P5 タンパク質とは明らかに異なることが分かった。

【0004】

外膜タンパク質 P5 は、インフルエンザ菌株をサブタイプに分けるのに使用される SDS-PAGE ゲル上の 2 本の低分子量バンドのうちの 1 本であり、25 ~ 27 kDa の見かけ上の分子量を有する。この P5 タンパク質は熱可変性 (heat-modifiable) であることから、β-メルカプトエタノールの存在下で 100 °C で 30 分間加熱した後は 30 kDa の見かけ上の分子量を示す。近年、フィンブリンタンパク質と称する、NTHi によって発現される他のタンパク質の特性が明らかにされ、前記 P5 と同様の分子量特性、熱可変性及び 92 % の配列の相同性を有することが示された。タンパク質、OMP 26 は、P5 またはフィンブリンタンパク質について説明したような配列の相同性または熱可変特性を示さない。

【0005】

したがって、第一の概念によると、本発明は、インフルエンザ菌の外膜タンパク質である、SDS-PAGE によって測定される際の分子量が 26 kDa であるタンパク質を提供するものである。このタンパク質を、OMP 26 と称する。

【0006】

特に、本発明のタンパク質は、図 1 に示されるアミノ酸配列、またはそれと実質的に相同性のある配列を有する。別の実施態様によると、本発明のタンパク質は、24 番目のアミノ酸から始まる図 1 に示されるアミノ酸配列、またはそれと実質的に相同性のある配列を有する。初めの 23 アミノ酸は、「シグナル」配列を構成し、この配列を排除したタンパク質も同様に使用できると考えられる。本発明のタンパク質は、免疫原であり、このため、インフルエンザ菌による感染に対して保護する免疫反応を誘導することが可能である。

【0007】

本発明の明細書において、OMP 26 と「実質的に相同性のある」タンパク質とは、40 %、50 %、60 %、70 %、80 %、90 %、95 % または 99 % の相同性を有することである。好ましくは、タンパク質は、少なくとも 70 % の相同性を有し、より好ましくは少なくとも 80 % の相同性を有し、さらにより好ましくは少なくとも 90 % の相同性を有し、および最も好ましくは少なくとも 95 % の相同性を有する。当業者は、相同性を表す割合 (%) は一つの因子でしかないと考えるであろう。重要なのは、タンパク質がその抗原性効果を維持することである。したがって、本明細書でいう抗原活性を維持していれば、例えば、40 % という比較的低い相同性を有するタンパク質であってもよい。

【0008】

加えて、「保存的 (conservative)」または「半保存的 (semi-conservative)」変更はその基本的な活性を変えずにタンパク質のアミノ酸配列

10

20

30

40

50

になされることは当該分野で既知である。例えば、グリシン、バリン、ロイシン及びイソロイシン等のアミノ酸は、すべて脂肪族側鎖を有するものであるが、これらのアミノ酸はしばしばタンパク質の生物学的な活性を実質的に変化させずに相互に置換される。同様に、フェニルアラニン、チロシン及びトリプトファン等のアミノ酸は、すべて芳香族側鎖を有するものであるが、これらのアミノ酸が相互に置換されてもよい。本明細書で記載される抗原性効果を保持するこのようなタンパク質は本発明の概念に含まれる。

【0009】

また、OMP 26の抗原性部分または領域を用いることによって、インフルエンザ菌に対する保護効果を誘導することも可能である。このような抗原性部分または領域もまた、本発明の概念に含まれる。

10

【0010】

第二の概念によると、本発明は、本発明のタンパク質、上記したようなその変異体または抗原性部分若しくは領域をコードする核酸配列、好ましくはDNAを提供するものである。特に、本発明は、OMP 26をコードする図1に示されるDNA配列を提供するものである。当業者は、遺伝コードの縮重により、タンパク質のアミノ酸配列には変化を起こさずにDNA配列に保存的変更を行うことが可能であることを認識するであろう。したがって、このようなDNA配列もまた、本発明の概念に含まれる。好ましくは、本発明の核酸は、プラスミド等のベクターの一部を形成してもよい。

【0011】

本明細書において、本発明のタンパク質はインフルエンザ菌に対する免疫反応を刺激する。したがって、第三の概念によると、本発明は、本明細書に記載される本発明のタンパク質、および必要であれば一以上の担体および/またはアジュバントからなるワクチン配合物を提供するものである。

20

【0012】

第四の概念によると、本発明は、インフルエンザ菌に対するワクチンの調製における、本明細書に記載される本発明のタンパク質の使用を提供するものである。

【0013】

本発明のワクチン組成物は、インフルエンザ菌による感染に対して被験者を免疫するのに使用できる。したがって、第五の概念によると、本発明は、本発明のワクチン組成物を被験者に投与することからなる、インフルエンザ菌による感染に対して被験者を免疫する方法を提供するものである。本発明のワクチン組成物は、全身性免疫(systemic immunity)および/または粘膜性免疫(mucosal immunity)を生じさせるのに使用できる。

30

【0014】

第六の概念によると、本発明は、本発明のワクチン組成物を被験者に投与する段階からなる呼吸器感染症または中耳炎の予防または処置方法を提供するものである。

【0015】

他の概念によると、本発明は、以下を提供するものである：

(a) インフルエンザ菌による感染の診断における、本明細書で定義される本発明のタンパク質の使用；および

40

(b) 本明細書で定義される本発明のタンパク質からなるインフルエンザ菌による感染の診断に使用されるキット。

【0016】

本発明の各概念の好ましい態様は、必要であれば変更を加えて(mutatis mutandis)、各他の概念について同様に好ましい。

【実施例】

【0017】

本発明を以下の実施例を参照しながら説明するが、本発明は下記実施例に何等制限されるものではない。

【0018】

50

下記実施例は以下の図面を参照する：

図 1 は、OMP 26 をコードする DNA 配列および上記 DNA 配列から誘導されるアミノ酸配列を示すものである；

図 2 は、OMP 26 およびより高分子量の他の 2 種のタンパク質の SDS - PAGE 分析を示すものである；

図 3 は、OMP 26 (a) の初めの 25 アミノ酸残基の N - 末端配列を示すものであり、また、この配列とパスツレラ ムルトシダ (P. multocida) 及びエルシニア シュードツベルクローシス (Y. pseudotuberculosis) のタンパク質との比較をも示す；

図 4 は、生菌で感染させてから 4 時間後の気管支洗浄液中に回収された NTHI - I 菌を示すものである；

図 5 は、OMP 26 で免疫されたラットの血清中の Ig G サブクラスの OMP 26 に特異的なレベルを示すものである；

図 6 は、血清における OMP 26 に特異的な抗体の検出用の免疫プロット (Immunoblot) を示すものである；および

図 7 は、OMP 26 - 免疫および非免疫ラットの MLN から単離されたリンパ球の抗原に特異的な増殖を示すものである。

【0019】

下記実施例において、データは、平均 ± 平均の標準誤差として表わした。肺のクリアランスデータ、全食細胞数、及び微分細胞数データ (differential cell count data) は、分散分析の一方方向分析 (one-way analysis of variance) によってグループ間を統計学的な有意性で比較した後、多重比較分析 (multiple-comparison analysis) を目的としてタッキー試験 (Tukey's test) (マッキントッシュシスタット (Macintosh Systat)) を行った。抗体データは非対 t - 検定 (unpaired t-test) によってグループ間の有意性を評価し、リンパ球の増殖データは変動 (variance) の完全要因分析 (fully factorial analysis) (マッキントッシュシスタット (Macintosh Systat)) によって評価した。2 個の変数 (variable) 間の直線的な相関は、ピアソン相関計数 (Pearson correlation coefficient) を用いて測定した (マッキントッシュシスタット (Macintosh Systat))。

【0020】

実施例 1

(i) タンパク質の精製

26 kDa のタンパク質 (OMP 26) を、分離用電気泳動によって NTHI - I 株から精製した。100 寒天培地の一晚培養したものからの細菌をプレートを掻き取ることで集めて、10, 000 × g で 4 で 10 分間遠心することにより 2 回洗浄した。この外膜成分を緩衝化ツITTER ジェント 3 - 14 界面活性剤 (buffered Zwittergent 3 - 14 detergent) で抽出し、さらにエタノール沈殿することにより、未精製の外膜調製物を得た。この外膜抽出物を凍結乾燥し、最小量の蒸留水中に再懸濁し、さらに、4 倍容のドデシル硫酸ナトリウム (SDS) 還元緩衝液 (62.5 mM トリス (Tris), [pH 6.8], 10% [vol/vol] グリセロール、2% [wt/vol] SDS、5% [vol/vol] β - メルカプトエタノール、1.2 × 10⁻³ % [wt/vol] ブロモフェノブルー (bromophenol blue)) 中に溶解した。この SDS - 調製物を、電気泳動カラムの濃縮用ゲル上にのせる前に、少なくとも 30 分間、37 でインキュベートした。OMP 26 を分離用 (preparative) ポリアクリルアミド電気泳動 (PAGE) を用いて精製した。3.7 mm (内径 [i.d.]) カラム内で 10 ml 4% T - 0.36% C アクリルアミド / BIS (4% T - 0.36% C acrylamide / BIS) (N, N' - メチレンビスアクリルアミド) 濃縮用ゲルが重合された 60 ml 14 T - 1.4

10

20

30

40

50

2 % C アクリルアミド / B I S (1 4 T - 1 . 4 2 % C a c r y l a m i d e / B I S) 分離用ゲルを用いたバイオ - ラッド モデル 4 9 1 プレップ セル (B i o - R a d M o d e l 4 9 1 P r e p C e l l) を使用して、分離用 S D S - P A G E を行い、O M P 2 6 を精製した。カラムから溶出させた画分を凍結乾燥によって濃縮し、分析用 S D S - P A G E によってタンパク質含量を分析した。このような条件を用いて単離された、O M P 2 6 は、S D S を含んでいたもので、次に、この S D S をリン酸カリウム及び沈殿によって除去した。O M P 2 6 を含む画分を溜め、透析した後、タンパク質濃度を測定した。

【 0 0 2 1 】

1 0 ~ 1 5 % 勾配 (g r a d i e n t 1 0 - 1 5 % a c r y l a m i d e g e l) または 1 2 . 5 % 均質アクリルアミドゲル (h o m o g e n o u s 1 2 . 5 % a c r y l a m i d e g e l) のいずれかを用いた分析用 S D S - P A G E によって、タンパク質の分析同定を行い、銀染色した。タンパク質濃度を、ピアスマイクロ B C A アッセイ (P i e r c e m i c r o B C A a s s a y) を用いて測定した。L O S の存在を、S D S - P A G E ミニゲルの銀染色および E - T O X A T E カプトガニ細胞分解産物試験 (E - T O X A T E L i m u l u s l y s a t e t e s t) によるアッセイによって評価した。

【 0 0 2 2 】

結果

O M P 2 6 は、2 6 ~ 3 0 k D a の間の分子量を有する 3 種のタンパク質の群から良好に分離された。図 2 は、このタンパク質と他の 2 つのタンパク質との位置関係を示すものであり、銀染色されたゲルから、得られた調製物が高純度を有することが示される。このタンパク質の熱可変特性の評価を、タンパク質サンプルを β - メルカプトエタノールの存在下で 1 0 0 で 3 0 分間加熱することによって、行った。3 0 分後、煮沸されたタンパク質サンプルは同様の分子量を有したまま移動することが分かった (図 2) 。他の近隣のタンパク質バンドの一つが熱可変性 P 5 であるかどうかを決定するために、この分子量範囲を有する 3 種のタンパク質すべてを β - メルカプトエタノールの存在下で 3 0 分間煮沸したところ、熱可変特性を示すタンパク質は存在しなかった (図 2) 。L O S 混入物の存在に関するタンパク質の評価を E - T O X A T E アッセイキット (E - T O X A T E a s s a y k i t) を用いて行ったところ、1 m g タンパク質当たり 0 . 6 μ g 未満のエンドトキシンが存在することが分かった。

【 0 0 2 3 】

(i i) N - 末端アミノ酸配列決定用の O M P 2 6 の調製

O M P 2 6 を、タンパク質バンドを S D S - P A G E ゲルから P V D F 膜に移すことによって、N - 末端アミノ酸配列分析用に調製した。このタンパク質サンプルを、配列を分析してもらうために、英国、クルウィド、ディーサイド、ニューテック スクエアー、テクベース 1 (T e c h b a s e 1 , N e w t e c h S q u a r e , D e e s i d e , C l w y d , U n i t e d K i n g d o m) 所在のコーテックス ダイアグノスティック (C o r t e c s D i a g n o s t i c) に送った。

【 0 0 2 4 】

アミノ酸配列の同定

N - 末端アミノ酸配列を P V D F に移したタンパク質バンドから得た。初めの 2 5 ペプチドに関するアミノ酸配列分析を図 3 に示す。この配列分析から、H i b P 5 またはフィンブリントタンパク質の N - 末端配列との配列の相同性は見られない。この N - 末端アミノ酸配列は、パスツレラ ムルトシダ (P a s t e u r e l l a m u l t o c i d a) 由来の 2 1 . 4 k D a のタンパク質とは 5 6 % の相同性をおよびエルシニア シュードツベルクローシス (Y e r s i n i a p s e u d o t u b e r c u l o s i s) 由来の 1 9 k D a の外膜タンパク質とは 4 4 % の配列の相同性を示した。

【 0 0 2 5 】

(i i i) 免疫化および細菌の感染 (c h a l l e n g e)

特定の病原体フリーの (p a t h o g e n - f r e e) オスのラットを、1日目にパイエル板内 (i n t r a - P e y e r ' s p a t c h) (I P P) に免疫化し、14日目に気管内に (I T) ブーストし (b o o s t)、さらに最後に21日目に生菌を感染させた (c h a l l e n g e)。動物をハロタンで鎮静化させ、尾静脈を介した抱水クロラルによる静脈内麻酔を容易にした。小腸を腹部の正中線を切開することにより露出させ、抗原を27ゲージの針を用いて各パイエル板に漿膜下に注入した。免疫化タンパク質 (O M P 2 6) を、1:1の割合の不完全フロインドアジュバント (I F A) 及びリン酸緩衝溶液 (P B S) 中に1ml当たり200または800 μ gのタンパク質を乳化させることにより調製し、10または40 μ gのタンパク質の全接種量をそれぞれ各動物に投与した。ラットの2コントロール群は、(i) 未処理及び偽免疫化 (s h a m - i m m u n i s e d) 群 (I F A 及び P B S で免疫) の混合、および (i i) 同種の N T H I 株の死菌で免疫したポジティブ群から構成された。ラットを、I P P 免疫化してから14日目に I T ブーストした (I T b o o s t)。O M P 2 6 を免疫したラットに、10 μ g の O M P 2 6 を I T ブーストした。非免疫群には50 μ l の P B S を投与し、また、死菌免疫群には50 μ l の死菌 (菌数: $10^{10} / \text{ml}$) を投与した。動物に、1回目の免疫化から21日目に生菌 (菌数: $5 \times 10^8 / \text{ml}$) を4時間感染させた (c h a l l e n g e)。異種株である、N T H I - I I もまた、菌の感染に使用した。菌を、1リットル寒天培地当たり50ml脱線維素ウマ血液を添加した脳 - 心臓浸出物寒天培地上で5% C O ₂ 中で37℃で一晩生育させ、回収し、洗浄し、所定の濃度まで P B S 中に再懸濁した。菌を気管内カニューレを介して肺中に導入し、4時間後、ラットを安楽死させた。血液を収集し、血清のアリコート抗体分析用に - 20℃ で貯蔵した。肺を5 $\times$ 2ml の P B S でフラッシュすることによって洗浄し、集めた洗浄液 (B A L) について菌数を測定した。肺洗浄後、肺を除去し、均質化し、菌数を測定した。サイトスピンスライド (c y t o s p i n s l i d e) を、肺の洗浄液における微分細胞数 (d i f f e r e n t i a l c e l l c o u n t) の測定用に調製した。肺の洗浄液中に存在する全細胞数を、メチレンブルーで染色し血球計算器を用いてカウントすることによって、算出した。

【0026】

結果

O M P 2 6 で免疫し21日目に N T H I - I 同種株の生菌で感染させたラットは、有意な細菌のクリアランスを示した ($P < 0.005$)。10 μ g の O M P 2 6 で免疫しかつブーストした (b o o s t) ラットは、4時間後では非免疫群に比べて肺中に92%細菌が少なく、また、I P P 免疫により40 μ g の O M P 2 6 が投与されさらに10 μ g の O M P 2 6 をブーストされたラットは96%細菌が少なく、これは死菌を免疫したラットで観察された95%のクリアランスと同等であった (図4)。

【0027】

また、O M P 2 6 で免疫したラットに、異種の型別不能な株である、N T H I - I I 由来の生菌を感染させた。表1の結果から、O M P 2 6 による免疫は異なる株による肺への感染においても有意に ($P < 0.005$) 菌を浄化した (c l e a r) が示される。免疫群は、4時間後では B A L において非免疫群に比べて93%細菌が少ないことから、細菌のクリアランス速度は同種株による感染の場合の速度に匹敵することが示された。また、O M P 2 6 による免疫により、非免疫群と比較した場合、免疫群の肺のホモジネート中に存在する菌数も減少した。N T H I - I I (異種株) を感染させたラット由来の肺のホモジネートは、非免疫肺に比べて有意に細菌が少なかった。しかしながら、差の度合いは、肺で80%であり、肺では89%のクリアランスであるのに比べて B A L では93%のクリアランスであり、さらに、N T H I - I (同種株) を感染させた群では B A L において87%のクリアランスであった。N T H I - I に関する本実験におけるクリアランスの割合 (%) は、一般 (一般的な接種材料は $0.6 \sim 1.4 \times 10^{10}$ C F U / ml の範囲であった) よりもかなりより多くの菌を含む生菌の接種材料のため、従来の実験とは異なるものであった。

【0028】

より数多くの食細胞がOMP 26で免疫された動物のBAL中に存在し、これはこれらの動物における向上した菌のクリアランスと相関していた(表2)。免疫群における細胞のレクリートメント(recruitment)の増加は、同種及び異種菌による感染の場合で同様であった。しかしながら、感染してから4時間後では、微分細胞数は免疫群と非免疫群で有意に異なっておらず(表2)、この際、双方の群ともマクロファージに対するPMNの割合は同様の割合を示した：

【0029】

表 1: 同種及び異種型別不能なインフルエンザ菌による感染による
OMP26－免疫後の肺のクリアランス

【 表 1 】

ラット群 ^c	感染してから4時間後に回収されたインフルエンザ菌($\log_{10}$ CFU) ^a (クリアランス(%))	
	感染させたインフルエンザ菌株 ^b	
	NTHI－I(同種)	NTHI－II(異種)
非免疫	BAL	7. 01±0. 11
	肺	6. 28±0. 07
OMP26で免疫	BAL	6. 69±0. 05
	肺	5. 15±0. 16(93%) *
		6. 01±0. 19(80%) *

- a 値は、10 μ gのOMP26によるPPP免疫してから21日目にNTHI－IまたはNTHI－II株のいずれか由来の生菌を4時間感染させたラットに関するBALまたは肺のホモジネートにおける平均±SEMで表す。
- b 感染接種材料における生菌の濃度(一連の希釈液を播種することによって測定した際の)は、NTHI－Iで10. 38($\log_{10}$)CFU/mlであり、NTHI－IIで10. 17($\log_{10}$)CFU/mlであった。
- c NTHI－Iによる感染に関して1群当たりn=4
非免疫群に関してn=4 ; およびOMP26で免疫しNTHI－IIによる感染に関してはn=6
- * 非免疫群と比較した際に、 $P<0. 001$ 。

【表 2】

表 2: 5種の型別不能なインフルエンザ菌で肺に感染してから4時間後のBALにおける食細胞数

ラット群	NTHI-Iで感染 (同種)	NTHI-IIで感染 (異種)	BALのサイトスピンスライド*調製物からの微分細胞数 (%)		
	BALにおける全細胞数($\times 10^6$)		PMN	マクロファージ	その他
非免疫	15.9 $\pm$ 1.1	17.5 $\pm$ 3.0	95.8	2.2	2
OMP26で免疫	26.1 $\pm$ 1.1 ⁿ	28.2 $\pm$ 1.6 ⁿ	95	2.7	2.1

ⁿ 非免疫群と比較した際に、 $P < 0.001$ 。

【0031】

(iv) OMPS 26 に特異的な ELISA

ポリソルブマイクロタイターウェル (polysorb microtiter well) を、IgG、IgG_{2a}、IgA 及び IgM のアッセイを目的とした場合 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度の；および IgG₁、IgG_{2b}、IgG_{2c}、及び IgE のアッセイを目的とした場合 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度の、精製した OMP 26 で被覆した。プレートをインキュベーション段階間に 0.05% ツイーン 20 (Tween 20) を含む PBS で 5 回洗浄した。ウェルを、60 分間、PBS - 0.05% ツイーン 20 (Tween 20) における 5% スキムミルクで遮断した。ウェルを血清 ($1/25 \sim 1/3200$) と共に 90 分間インキュベートした、または BAL ($1/2 \sim 1/6$) サンプルを分析用遮断緩衝液で連続的に希釈した。使用した複合免疫グロブリン (conjugated immunoglobulin) は、ヤギ抗ウサギ IgG ($1/2000$)、IgA ($1/100$

10

20

30

40

50

0)、及びIgM(1/4000)(Fc特異的);マウス抗ウサギIgG₁(1/500)、IgG_{2a}(1/1000)、IgG_{2b}(1/500)、及びIgG_{2c}(1/500)であった。さらに、ウェルを90分間複合免疫グロブリンと共にインキュベートした。次に、プレートを発色させた。

【0032】

結果

OMP26で免疫したラットの、さらには4種の異なるインフルエンザ菌株由来の死菌で予め免疫したラットの、血清及びBALサンプル中の、OMP26に特異的な抗体を測定した。OMP26で免疫したラットの血清では、IgG、IgA及びIgMに関する高いOMP26に特異的な抗体力価が、およびOMP26で免疫したラットのBALでは、IgG及びIgAに関する高いOMP26に特異的な抗体力価が、それぞれ、検出され、さらに、40µgのより高い免疫投与量を投与した群で最高レベルが観察された(表3)。血清中のOMP26に特異的なIgG、IgA及びIgM、およびBAL中のIgG及びIgAの検出可能なレベルもまた、異なるインフルエンザ菌株で予め免疫したラットで観察された(表3)が、これらの群で観察されたレベルはOMP26で免疫された群のレベルに比べて有意に低かった。OMP26ラット群の血清について、IgEのELISAもまた行ったが、OMP26に特異的なIgEのレベルは検出されなかった(データは示さず)。

10

【0033】

OMP26に特異的なIgGのサブクラス(subclass)を測定した結果、OMP26に特異的なIgG₁は40µgの免疫化以降のみ検出可能であったが、有意なレベルのIgG_{2a}及びIgG_{2b}のサブクラスが10µg及び40µgのOMP26免疫群双方で検出されたことが示された(図5)。IgG_{2a}及びIgG_{2b}のレベルは双方とも、IPP接種材料中のOMP26の濃度が10µg~40µgと増加するに従って有意に(P<0.05)増加した。IgG_{2c}もまた測定したが、有意なレベルのこのサブクラスのOMP26に特異的な抗体は検出できなかった。(データ示さず)。

20

【0034】

【表 3】

表 3: OMP26またはインフルエンザ死菌による免疫化後の血清及び気管支肺胞洗浄における OMP26に特異的な抗体の比較

		OMP26に対する抗体 (ELISA力価 ^a)					
		血清			気管支肺胞洗浄		
群 ^b	n	IgG	IgA	IgM	IgG	IgA	IgM
非免疫	7	n.d. ^d	n.d.	10.5 ± 1.6	n.d.	n.d.	n.d.
10 μg OMP26	5	1209 ± 255 ^e	936 ± 161 ^e	30.5 ± 4 ^e	4.3 ± 1.0 ^e	6.1 ± 1.9 ^e	n.d.
40 μg OMP26	5	2806 ± 405 ^e	2440 ± 410 ^e	142.5 ± 30.6 ^e	8.3 ± 1.9 ^e	29.1 ± 7.9 ^e	n.d.
NTHI-I ^c	4	58 ± 17 ^e	37 ± 4 ^e	39.1 ± 0.8 ^e	0.5 ± 0.1	1.2 ± 0.5	n.d.
NTHI-II ^c	4	22 ± 4 ^e	26 ± 5 ^e	39.3 ± 5.0 ^e	0.6 ± 0.1	0.4 ± 0.1	n.d.
HI-CD ^c	4	18 ± 1 ^e	20 ± 1 ^e	42.2 ± 3.1 ^e	0.6 ± 0.1	0.8 ± 0.3	n.d.
Hib-II ^c	4	27 ± 4 ^e	38 ± 3 ^e	34.4 ± 2.3 ^e	0.6 ± 0.1	1.6 ± 0.4	n.d.

^a 抗体力価は、材料及び方法で記載したのと同様にして算出した。

^b ラットを、0日目にPPを介して免疫し、14日目にITブーストをし、21日目に生菌を感染させた。

血清及びBALサンプルを材料及び方法で記載したのと同様にして調製した。

^c ラットを、示されるインフルエンザ菌株由来の死菌で免疫し、同種株由来の生菌を感染させた。

^d n.d. は、P5に特異的な抗体がサンプルの最低希釈率で検出できなかったことを示す。

^e 非免疫群と比較してP<0.05。

10

20

30

40

50

【0035】

(v) 免疫プロット

SDS-PAGEで分離したタンパク質を電気泳動によりニトロセルロース(0.2 μmポアサイズ)に移した。OMP26、NTHI-I、NTHI-II、さらにはHI-CD、及びHib-IIで免疫した群由来のラットの血清をTTBS-5%(w/v)ス

キムミルク粉末で10倍に希釈し、1次抗体として使用した。TTBS-5%スキムミルクにおける西洋ワサビペルオキシダーゼ複合ヤギ抗ウサギIgG(horseradish peroxidase conjugated goat anti-rat IgG)(Fcに特異的)の500倍希釈液を2次抗体として使用した。

【0036】

結果

非免疫、OMP26-免疫及びインフルエンザ菌-(4株)免疫ラットの血清中に存在する抗体によるOMP26の認識に関する免疫ブロット分析から、このタンパク質は、各免疫群の血清中に存在する抗体によっては認識されるが、非免疫群の血清中に存在する抗体によっては認識されないことが示された(図6)。これから、抗体反応の交差反応性がNTHI-I株から精製されたOMP26による研究に使用されたインフルエンザ菌株による免疫化によって生じることが示される。

10

【0037】

(vi) 抗原に特異的なリンパ球アッセイ

腸間膜リンパ節(MLN)から得られたリンパ球を 10^6 細胞/mlの濃度で培養した。抗原(OMP26)を連続して10倍希釈率で培養液中に懸濁し、濾過滅菌した。細胞懸濁液及び抗原を、最終容積を0.2ml/ウェルになるように、平底マルチウェル(flat-bottomed multiwell)プレートに3連で添加した。リンパ球の増殖を4日間の培養の最後の8時間の $[^3\text{H}]$ チミジンの取り込みによって評価した。結果を3連のウェルの幾何平均からバックグラウンドを引くことによって算出し、全処置群の幾何平均+/-標準誤差とした。

20

【0038】

結果

OMP26-免疫及び非免疫ラットのMLN由来のリンパ球について抗原に特異的な増殖反応を評価した。OMP26-免疫群由来の細胞はインビトロにおいて培養物中のOMP26に対して有意に応答したが、非免疫ラット由来の細胞は有意な増殖を示さなかった(図7A)。また、OMP26で免疫したラットのリンパ球をインフルエンザ菌株のOMP抽出物と共に培養し、交差反応の応答性を評価した。有意な増殖応答性がNTHI-I、NTHI-II及びHI-CD株由来のOMP抽出物ではOMP26免疫群由来のリンパ球において検出されたが、Hib-II株由来の抽出物では有意な増殖が観察されなかった(図7B~E)。

30

【0039】

実施例2-OMP26のクローニング及び配列決定

DNAをNTHIから抽出した。OMP26をコード化するDNAの領域を同定し、遺伝子(バイオモレキュラー レソース ファシリティー(Biomolecular Resource Facility)、ジョン カーティン スクール オブ メディカル リサーチ(John Curtin School of Medical Research)、キャンベラ、エーティーシー(Canberra, ACT)、オーストラリアで合成)を認識するように設計されたプライマーを用いた標準的なPCR法によって増幅した。分析して正確な産物を良好に認識した後、PCR DNA産物を抽出した。

40

【0040】

2個のプラスミドを調製した。一方のDNA産物はシグナルペプチド及び成熟OMP26産物をコード化する領域を含み、他方は最終的な成熟OMP26(リーダーシグナルペプチドを含まない)をコード化する領域を含んだ。これらのPCR DNA産物を、OMP26+シグナルペプチドでは制限酵素HindIIIでおよび成熟OMP26ではNspBII+HindIIIで消化した。消化されたDNAを回収し、これを、OMP26+シグナルペプチドまたはOMP26成熟タンパク質で、それぞれ、プラスミドpQE30またはpQE31(ギアゲン ジーエムビーエッチ(GiaGen GmbH)、ヒルデン(Hilden), ドイツ)中にSmaI及びHindIIIで連結した。次に、これらのプラスミドを精製し、沈殿させて、バイオモレキュラー レソース ファシリティ

50

ー (Biomolecular Resource Facility)、ジョン カーティン スクール オブ メディカル リサーチ (John Curtin School of Medical Research)、キャンベラ (Canberra)、オーストラリアのダイ デオキシ - ターミネーター法 (dye deoxy-terminator procedure) によって配列決定を行った。

【0041】

結果

図 1 に示される配列は、成熟OMP26 + シグナルペプチドを表すものである。このシグナルペプチド配列は、初めの23個のアミノ酸を含む。外膜上のNTHiによって発現される最終産物は24番目のアミノ酸で始まる。

10

【図面の簡単な説明】

【0042】

【図1】OMP26をコードするDNA配列および上記DNA配列から誘導されるアミノ酸配列を示すものである。

【図2】OMP26およびより高分子量の他の2種のタンパク質のSDS-PAGE分析を示すものである。

【図3】OMP26(a)の初めの25アミノ酸残基のN-末端配列を示すものであり、また、この配列とパスツレラ ムルトシダ (P. multocida) 及びエルシニア シュードツベルクローシス (Y. pseudotuberculosis) のタンパク質との比較をも示す。

20

【図4】生菌で感染させてから4時間後の気管支洗浄液中に回収されたNTHI-I菌を示すものである。

【図5】OMP26で免疫されたラットの血清中のIgGサブクラスのOMP26に特異的なレベルを示すものである。

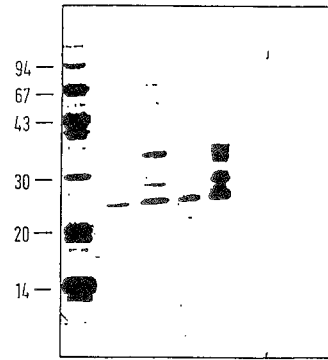
【図6】血清におけるOMP26に特異的な抗体の検出用の免疫プロット (Immunoblot) を示すものである。

【図7】OMP26-免疫および非免疫ラットのMLNから単離されたリンパ球の抗原に特異的な増殖を示すものである。

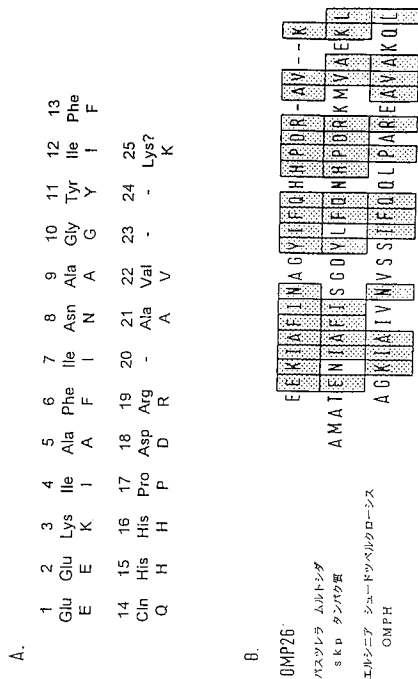
【図 1】

10	20	30	40	50
1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890
ATGAAAAACA	TCGCAAAAGT	AACCGCACTT	GCTTTAGGTA	TTGCACITGC
M K N I	A K V T A L	A L G I	A L A	
100	110	120	130	140
TTCAGGCTAT	GCTTCGCTG	AAGAAAAAT	TGCTTTCATT	AATGCAGGTT
S G Y A S A E	E K I A F I	N A G Y		
150	160	170	180	190
ATATTTTTC	ACATCAACCA	GATGCCAAG	CGGTAGCAGA	TAAACTTGAT
I F O H H P	D R Q A V A D	K L D		
200	210	220	230	240
GCTGAATTTA	AACCTGTAGC	TGAGAAATTA	GCAGCAAGCA	AAAAAGAAGT
A E F K P V A	E K L A A S K	K E V		
250	260	270	280	290
TGATGATAAA	ATTGCTGCTG	CTCGTAAAAA	AGTAGAAGCA	AAAGTTGCGG
D K K I A A A	R K K V E A	K V A A		
300	310	320	330	340
CTTAGAAAA	AGATGCACCT	CGCTTACGTC	AAGCTGATAT	TCAAAAACGC
L E K D A P	R L R Q A D I	Q K R		
350	360	370	380	390
CAAGAAGAAA	TTAATAAATT	AGGTGGGCTG	GAAGATCGTG	AATTACAAAA
Q E E I N K L	G A A E D A E	L Q K		
400	410	420	430	440
ATTAATGCAA	GAACAAGATA	AAAAAGTTCA	AGAATTCCAA	GCTCAAAATG
L M Q E Q D K	X V Q E F Q	A Q N E		
450	460	470	480	490
AAAAACGTC	AGCTGAAGAA	CGTGGTAAAT	TATTAGATAG	CATTCAAAC
K R Q A E E	R G K L L D S	I Q T		
500	510	520	530	540
GCGACAATA	ATTAGCAAG	AGCAAAAGGT	TATACTTATG	TGCTTGATGC
A T N N L A R	A K G Y T Y V	L D A		
550	560	570	580	590
AAATTCAAGT	GTATTTGCGG	TAGAGGGTAA	AGATATTACT	GAAGAAGTAT
N S V V F A V	E G K D I T	E E V L		
600	610	620	630	640
TAAATCTAT	CCCTGCTTCT	GAAAAAGCAC	AAGAGAAAAA	ATAATAGGTT
K S I P A S	E K A Q E K K	X X V		

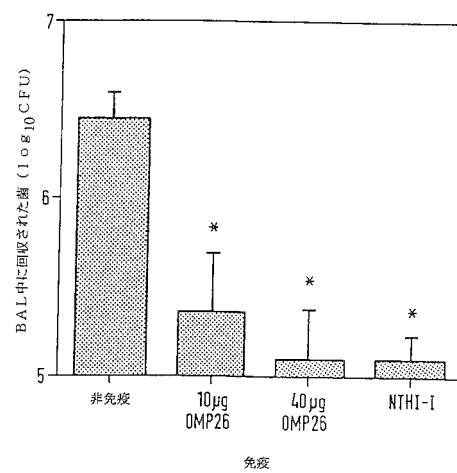
【図 2】



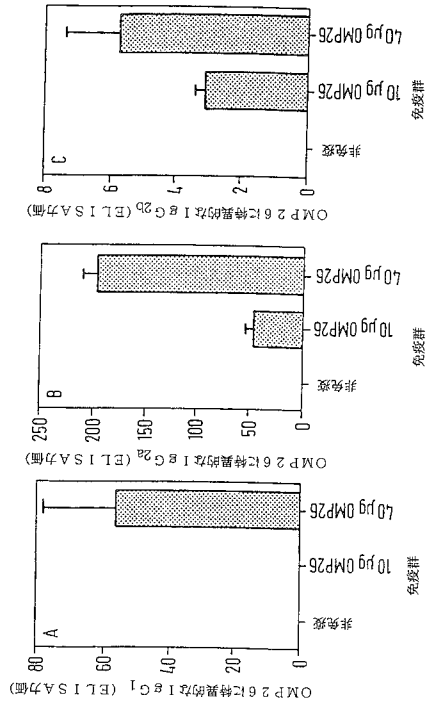
【図 3】



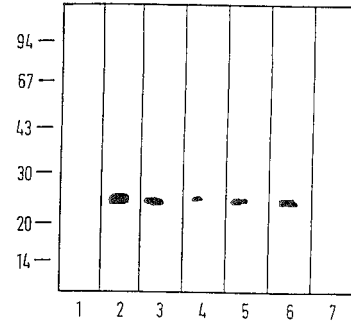
【図 4】



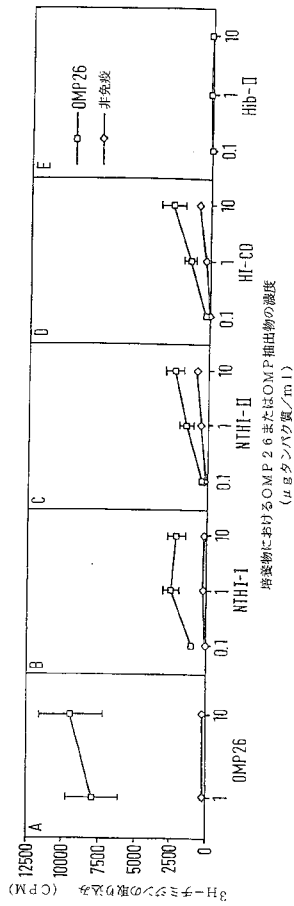
【図5】



【図6】



【図7】



フロントページの続き

(72)発明者 クリップス, アラン

オーストラリア国, エーシーティー 2 6 0 5, カーティン, ジェニング ストリート 2 5

(72)発明者 スミス, クリストファー, ジョン

イギリス国, クルウイド エルエル 7 7 0 ティーイー, ルアルト, トレイメイアーチオン レイ
ン, イスフリン

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 AA14 BA31 CA01 CA09 CA11 CA20 GA11 HA01
HA11

4C085 AA03 BA18 BB11 CC05 DD22 EE06 FF03

4H045 AA11 AA30 BA10 BA41 CA01 DA86 EA20 EA31 EA50 FA71

需要解决的问题：提供一种来自流感嗜血杆菌外膜的新型抗原蛋白。提供了通过SDS-PAGE测量的分子量为26kDa的蛋白质，其是流感嗜血杆菌的外膜蛋白。还提供了编码这种蛋白质的DNA序列，以及包含该蛋白质的疫苗和免疫受试者免受流感嗜血杆菌感染的方法。本发明还包括预防或治疗呼吸道感染或中耳炎的方法，检测流感嗜血杆菌的方法，以及用于这种方法的试剂盒。【选择图】无

表 1. 同種及び異種型別不能なインフルエンザ菌による感染による OMP26-抗原後の菌のクリアランス

ラジカル	還元してから4時間後、水中に回収されたラジカルエチルラジカルの濃度 (log ₁₀ CFU/l) ^a (クワアラス(%)		
	還元させたラジカルエチルラジカルの濃度		
	NTH-I (I濃度)	NTH-II (II濃度)	NTH-III (III濃度)
水質良好	7.01±0.11	6.28±0.07	
汚水	7.76±0.05	6.69±0.05	
0.025% 塩酸	6.16±0.15 (8%) *	5.16±0.16 (9%) *	
0.025% 塩酸	6.81±0.17 (90%) *	6.01±0.19 (90%) *	

値は、 $10\mu\text{g}$ OMP/26L による PP 受動から 21 日に NTH-1 または NTH-1 (株) のいずれかによる土壌汚染調査値と 4 号土壌汚染調査値とを比較した。

図 10 示すように、 $\log_{10} \text{NTHI}$ と $\log_{10} \text{FU}$ の間に正の相関関係が認められる。これは、 $\log_{10} \text{NTHI}$ と $\log_{10} \text{FU}$ の両方とも、 $\log_{10} \text{NTHI}$ の値が大きいほど、 $\log_{10} \text{FU}$ の値も大きい傾向にあることを示している。これは、 $\log_{10} \text{NTHI}$ と $\log_{10} \text{FU}$ の両方とも、 $\log_{10} \text{NTHI}$ の値が大きいほど、 $\log_{10} \text{FU}$ の値も大きい傾向にあることを示している。これは、 $\log_{10} \text{NTHI}$ と $\log_{10} \text{FU}$ の両方とも、 $\log_{10} \text{NTHI}$ の値が大きいほど、 $\log_{10} \text{FU}$ の値も大きい傾向にあることを示している。

・ NTHI-1 による感染に関して1講堂あたり $n=4$

未免疫群に関して $n=4$ 、およびOMP26で免疫しNTHI-IIIによる感染に関しては $n=6$

* 未免疫群と比較した際に、 $P<0.001$ 。