

(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2011-512803

(P2011-512803A)

(43) 公表日 平成23年4月28日(2011.4.28)

(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 19/00 (2006.01)	C O 7 K 19/00	4 B O 5 0
C O 7 K 14/195 (2006.01)	C O 7 K 14/195	4 B O 6 5
C 1 2 N 9/20 (2006.01)	C 1 2 N 9/20	4 C O 8 4
C 1 2 N 9/52 (2006.01)	C 1 2 N 9/52	4 H O 4 5
	審査請求 未請求 予備審査請求 未請求	(全 51 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2010-547921 (P2010-547921)	(71) 出願人	510031073
(86) (22) 出願日	平成21年2月27日 (2009. 2. 27)		スピロジーン ビーティーワイ エルティ ーディー
(85) 翻訳文提出日	平成22年10月22日 (2010. 10. 22)		S P I R O G E N E P T Y L T D
(86) 国際出願番号	PCT/AU2009/000248		オーストラリア W. A. , マードック, サウス ストリート, マードック ユニバ ーシティー, キャンパス ドライブ, ビル ディング 1 9 1
(87) 国際公開番号	W02009/105833	(74) 代理人	110000084
(87) 国際公開日	平成21年9月3日 (2009. 9. 3)		特許業務法人アルガ特許事務所
(31) 優先権主張番号	08152093. 4	(74) 代理人	100068700
(32) 優先日	平成20年2月28日 (2008. 2. 28)		弁理士 有賀 三幸
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)	(74) 代理人	100077562
			弁理士 高野 登志雄
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ブラキスピラの新規な配列、免疫原性組成物、その調製方法及び使用

(57) 【要約】

ブラキスピラ・ヒオディセンテリアの新規なポリヌクレオチド及びアミノ酸について記載する。これらの配列は、動物における B . ヒオディセンテリア症の診断に有用であると共に、動物における B . ヒオディセンテリア症の治療的処置又は予防的処置として有用である。また、これらの配列は、他のブラキスピラ種に起因する動物の疾患の診断的、治療的及び / 又は予防的処置にも有用であり得る。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

単離されたポリヌクレオチドであって、

- a. 配列番号 17、19、21 及び 23 から成る群から選択される、毒素分子をコードするヌクレオチド配列、及び / 又は
- b. 配列番号 9、11、13 及び 15 から成る群から選択される、リパーゼ及び / 又はペプチダーゼ分子をコードするヌクレオチド配列、及び / 又は
- c. 配列番号 1、3、5 及び 7 から成る群から選択される、プロテアーゼ分子をコードするヌクレオチド配列を含む単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 2】

更に、

- d. 配列番号 25、27、29 及び 31 から成る群から選択される、溶血素分子をコードするヌクレオチド配列を含む、請求項 1 に記載の単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 3】

請求項 1 又は請求項 2 に記載のポリヌクレオチドと少なくとも 70%、好ましくは少なくとも 80%、より好ましくは少なくとも 90% 相同である配列を含む、単離された DNA 分子。

【請求項 4】

単離されたポリペプチドであって、

- a. 配列番号 18、20、22 及び 24 から成る群から選択される、毒素分子をコードするアミノ酸配列、及び / 又は
- b. 配列番号 10、12、14 及び 16 から成る群から選択される、リパーゼ及び / 又はペプチダーゼ分子をコードするアミノ酸配列、及び / 又は
- c. 配列番号 2、4、6 及び 8 から成る群から選択される、プロテアーゼ分子をコードするアミノ酸配列を含む、前記単離されたポリペプチド。

【請求項 5】

更に、

- d. 配列番号 26、28、30 及び 32 から成る群から選択される、溶血素分子をコードするアミノ酸配列を含む、請求項 4 に記載の単離されたポリペプチド。

【請求項 6】

請求項 4 又は請求項 5 に記載のポリペプチド配列をコードするヌクレオチド配列を含む、単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 7】

請求項 1、2 又は 6 に記載のポリヌクレオチド、又は請求項 2 に記載の DNA 分子を含むプラスミド。

【請求項 8】

発現ベクターである、請求項 7 に記載のプラスミド。

【請求項 9】

請求項 7 又は請求項 8 に記載のプラスミドを含む細胞。

【請求項 10】

請求項 4 又は請求項 5 に記載のポリペプチドと少なくとも 70%、好ましくは少なくとも 80%、より好ましくは少なくとも 90% 相同である配列を含む、単離されたタンパク質。

【請求項 11】

請求項 7 又は請求項 8 に記載のプラスミド、請求項 4 又は請求項 5 に記載のポリペプチド、請求項 9 に記載の細胞、又は請求項 10 に記載のタンパク質を含む免疫原性組成物。

【請求項 12】

請求項 7 又は請求項 8 に記載のプラスミド、請求項 4 又は請求項 5 に記載のポリペプチド、請求項 9 に記載の細胞、又は請求項 10 に記載のタンパク質を含む、ブラキスピラ感染症の予防用ワクチン組成物。

10

20

30

40

50

【請求項 13】

前記ブラキスピラ感染症がブラキスピラ・ヒオディセンテリアによる感染症である、請求項 12 に記載のワクチン組成物。

【請求項 14】

a . 配列番号 18、20、22 及び 24 から成る群から選択される毒素分子、
 b . 配列番号 10、12、14 及び 16 から成る群から選択されるリパーゼ及び / 又はペプチダーゼ分子、
 c . 配列番号 2、4、6 及び 8 から成る群から選択されるプロテアーゼ分子、及び
 d . 配列番号 26、28、30 及び 32 から成る群から選択される溶血素分子、のうちの少なくとも 2 つを含む、請求項 12 又は請求項 13 に記載のワクチン組成物。

10

【請求項 15】

a . 配列番号 18、20、22 及び 24 から成る群から選択される毒素分子、
 b . 配列番号 10、12、14 及び 16 から成る群から選択されるリパーゼ及び / 又はペプチダーゼ分子、
 c . 配列番号 2、4、6 及び 8 から成る群から選択されるプロテアーゼ分子、及び
 d . 配列番号 26、28、30 及び 32 から成る群から選択される溶血素分子、のうちの少なくとも 3 つを含む、請求項 12 から 14 のいずれか 1 項に記載のワクチン組成物。

【請求項 16】

ブラキスピラ感染症を診断する方法であって、

a . ブラキスピラに感染した疑いのある動物からサンプルを得るステップと、
 b . 2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22 及び 24 から成る群から選択されるアミノ酸配列を含む一以上のポリペプチドにサンプルを接触させるステップと、
 c . 抗体 - 抗原複合体の形成を可能とする条件下でサンプルとポリペプチドをインキュベートするステップと、
 d . 一以上のポリペプチドとの抗体 - 抗原複合体が形成されたかどうか確認するステップと、を含み、抗体 - 抗原複合体の形成が、前記動物がブラキスピラに感染していることの指標である方法。

20

【請求項 17】

前記ブラキスピラ感染症がブラキスピラ・ヒオディセンテリアによる感染症である、請求項 16 に記載の方法。

30

【請求項 18】

工程 b が、配列番号 26、28、30 及び 32 から成る群から選択されるアミノ酸配列を更に含む、請求項 16 又は請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

配列番号 2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22 及び 24 から成る群から選択されるアミノ酸配列を含む一以上のポリペプチドを含む、ブラキスピラ感染症の診断用キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

40

【0001】

本発明は、ブラキスピラ・ヒオディセンテリアの新規な遺伝子及びそれによってコードされるタンパク質に関する。本発明は更に、これらの新規な遺伝子及びタンパク質の B . ヒオディセンテリア症の診断や B . ヒオディセンテリアに対するワクチンへの使用、また、B . ヒオディセンテリアを死滅させたり B . ヒオディセンテリアの病原作用を阻害する化合物のスクリーニングへの使用にも関する。また、これらの配列は、他のブラキスピラ種 (B . インターメディア (intermedia) や B . アルビニプリ (alvinipulli)、B . アアルボルギ (aalborgi)、B . イノセンス (innocens)、B . ムルドキイ (murdochii)、B . ピロシコリ (pilosicoli) 等) に起因する動物の疾患の診断的、治療的及び / 又は予防的処置にも有用であり得る。

50

【背景技術】

【0002】

ブタ赤痢は、オーストラリア及び世界中におけるブタの重大な風土病の一種である。ブタ赤痢は接触伝染性粘膜出血性下痢疾患であり、大腸上皮表面の広範囲の炎症や壊死によって特徴付けられる。ブタ赤痢による経済的損失は、主に発育遅延や治療費用、死亡によってもたらされる。1971年、嫌気性スピロヘータ（トレボネーマ・ヒオディセンテリア）が最初にブタ赤痢の原因因子として特定され、最近ではB・ヒオディセンテリアとしてブラキスピラ属に再び帰属された。ブタ赤痢が養豚場で発症した場合、疾患の範囲は、軽度、一過性又は不明瞭なものから重篤、更には致死的なものにもなり得る。個々の養豚場における治療戦略によって臨床徴候が隠される場合もあり、また、一部の養豚場では、ブタ赤痢が気付かれぬか又は疑われるに過ぎないこともあり得る。明らかな疾患が発症しようがしまいが、B・ヒオディセンテリアは、感染ブタや他の保有宿主（例えば、げっ歯動物）、或いは環境に存続し得る。これらの感染源は全て、非感染の群れにブタ赤痢を伝染させる可能性を有する。また、商業用家禽にB・ヒオディセンテリアがコロニー形成することもあるが、これが現場条件で通常どのように生じるかは明らかでない。

10

【0003】

B・ヒオディセンテリアのコロニー形成は、スピロヘータに対する強い免疫学的応答を誘発するため、スピロヘータへの曝露の間接的な証拠は、感染動物の循環血中抗体価を測定することによって得ることができる。この抗体価は、ブタ赤痢から回復した動物においても低レベルで維持されることが報告されている。従って、抗体を検出するための血清学的試験によって、かなりの可能性で、無症状感染や大腸内に検出不能な数のスピロヘータを有する回復したキャリアブタを検出することができる。このような試験は、使い易いキット形態（例えば、酵素結合免疫吸着アッセイ）であれば、特に有益であろう。B・ヒオディセンテリアに対する循環抗体の存在を示すために種々の技法が開発されているが、その例としては、間接蛍光抗体試験や赤血球凝集試験、マイクロ滴定凝集試験、補体結合試験、リポ多糖又は全超音波処理スピロヘータを抗原として用いるELISAが挙げられる。これらの試験は全て、関連する非病原性腸スピロヘータが交差反応性抗体を誘導し得るため、特異性の面で問題を抱えている。これらの試験は、明らかな疾患が存在する群れや高い循環抗体価を検出するには有用であるが、無症状感染の群れや個々の感染ブタを特定する上では問題がある。従って、B・ヒオディセンテリアに対する抗体を検出するための十分に高感度で特異的なアッセイは現在まで得られていない。好適な診断試験の欠如がブタ赤痢のコントロールを妨げている。

20

30

【0004】

ブタ赤痢の制御には数多くの方法が用いられており、抗菌剤を予防的に使用することから、感染した群れの数を十分に減少させたり、感染キャリアブタの再入を防止することまで様々である。これらの選択肢には全て高い費用がかかり、十分に効果的である必要がある場合には、その経過をモニターするのに高度な診断試験を用いることが必要となる。現在、無症状感染の群れや個々の健常なキャリア動物におけるブタ赤痢の検出は大きな問題のままであり、効果的なコントロール手段の遂行を妨げている。ブタ赤痢の確定診断には、伝統的に疾患ブタの糞便や粘膜からのB・ヒオディセンテリアの単離や同定が必要である。これに伴う大きな問題としては、このような嫌気性バクテリアは成長が遅く、偏好性の栄養要求性があることや、ブタの腸の常在菌叢に形態学的に類似したスピロヘータが存在することによる混同が挙げられる。個々の罹患ブタの診断は、糞便由来のスピロヘータを検出するためのポリメラーゼ連鎖反応（PCR）アッセイの開発によって大きく改善された。しかし、残念ながら実際には、PCRの検出限界によって、無症状感染のキャリア動物を検出することはできなかつた。このような診断上の問題のため、群れや個々のブタのレベルでのB・ヒオディセンテリア感染の検出を可能にする簡便で有効な診断ツールの開発が明らかに必要である。

40

【0005】

B・ヒオディセンテリアのコロニー形成後、スピロヘータに対して強い免疫学的応答が

50

誘導され、ブタ赤痢から回復したブタは再感染から防御される。それにもかかわらず、ブタ赤痢を制御するワクチンを開発する試みは殆ど成功していない。その理由としては、群れ単位での防御が十分にできないこと、或いは、費用が掛かり過ぎて商業的に実現可能に生産することが難しいことが挙げられる。バクテリンワクチンによってある程度は防御されるが、バクテリンワクチンはリポ多糖血清型特異的になる傾向があるため、多価のバクテリンを用いることが必要となる。更に、スピロヘータの嗜好性嫌気性成長要求のため、大規模での生産は困難で費用が掛かる。

【0006】

ブタ赤痢用弱毒化生ワクチンの開発が幾つか試みられている。このアプローチは、弱毒化株の場合、コロニー形成が低下するため、免疫刺激が低下する点で不利である。また、ブタ赤痢用生ワクチンの場合、病原性への復帰変異の可能性があるため（特に、B・ヒオディセンテリアにおける遺伝的な調節や構造については殆ど知られていないため）、生産者や獣医の側からもその使用をためらっている。

10

【0007】

組換えサブユニットワクチンの使用は、その生成物が十分に明確であり（申請において必須）、大規模での生産が比較的容易であろうことから、魅力的な選択肢である。現在まで、B・ヒオディセンテリア由来の組換えタンパク質をワクチン候補（38キロダルトンの鞭毛タンパク質）として用いる最初の報告では、ブタにおけるコロニー形成を防ぐことができなかった。この失敗は、具体的には、用いた特定の組換えタンパク質に関係すると共に、薬剤輸送システム及び経路、投与速度、アジュバントの選択等の、より下流側の問題にも関係していると思われる（非特許文献1）。ワクチン接種に用いられる、部分的に保護された組換えB・ヒオディセンテリアタンパク質として最初に報告されたのは、各種病原菌のメチオニン結合リポタンパク質と同一性を有する29.7kDaの外膜リポタンパク質（Bhlp29.7、「BmpB」とも「BlpA」とも称する）であった。このhisタグ組換えBhlp29.7タンパク質をブタのワクチン接種に用いた後、B・ヒオディセンテリアで実験的に攻撃した結果、非ワクチン接種の対照ブタでの発症率が50～70%であったのに対し、ワクチン接種のブタでの発症率が17～40%であった。Bhlp29.7ワクチン接種ブタの発症率が対照ブタに比べて有意に（ $P = 0.047$ ）低かったため、Bhlp29.7はブタ赤痢ワクチン成分としての利用可能性があることが分かった（非特許文献2）。組換えワクチン成分として使用しうるB・ヒオディセンテリア由来の外被タンパク質を同定する他の多くの試みがなされてきたが、どのワクチンも未だに成功していない。B・ヒオディセンテリア由来の潜在的に有用な免疫原性組換えタンパク質を同定するには、よりグローバルなアプローチが必要である。

20

30

【0008】

現在までに、ワクチン接種にDNAを用いた研究が一例のみ報告されている。この研究においては、推定フェリチンをコードするB・ヒオディセンテリアftnA遺伝子を大腸菌プラスミドにクローン化し、プラスミドDNAを用いてパリスティックなワクチン接種（ballistic vaccination）用の金ビーズをコートした。ブタ赤痢のマウスモデルを用いて、DNA及び/又は組換えタンパク質によるワクチン接種の防御特性を確認した。組換えタンパク質によるワクチン接種の場合、フェリチンに対する良好な全身応答が誘導されたが、DNAによるワクチン接種の場合には、検出可能な全身応答が誘導されただけであった。DNAによるワクチン接種後に組換えタンパク質で追加免疫を行った場合、タンパク質で追加免疫した後にのみフェリチンに対する全身免疫応答が誘導された。しかし、試験したどのワクチン接種レジメンの場合にも、マウスにおいてはB・ヒオディセンテリアのコロニー形成や関連する病変に対する防御は得られなかった。興味深いことに、DNAのみでマウスのワクチン接種を行った結果、疾患がかなり悪化した（非特許文献3）。

40

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0009】

【非特許文献1】ガベ（Gabe），J D、チャン（Chang），R J、スロミアニー（Slomian

50

y), R、アンドリュース (Andrews), WH 及びマッカマン (McCaman), MT (1995)、セルプリナ・ヒオディセンテリア B204 からの細胞質外タンパク質の単離、及び 38 キロダルトンの鞭毛タンパク質をコードする flaB1 遺伝子の分子クローニング、*Infection and Immunity* 63: 142 ~ 148

【非特許文献 2】ラ (La), T、フィリップス (Phillips), ND、レイチエル (Reichel), MP 及びハンブソン (Hampson), DJ (2004)、組換え BmpB (ブラキスピラ・ヒオディセンテリアの 29.7 kDa 外膜リポタンパク質) を用いたワクチン接種によるブタ赤痢からのブタの防御、*Veterinary Microbiology* 102: 97 ~ 109

【非特許文献 3】デイヴィス (Davis), A. J., スミス (Smith), S. C. 及びムーア (Moore), R. J. (2005)、ブラキスピラ・ヒオディセンテリア ftnA 遺伝子: 疾患マウスモデルにおける DNA ワクチン接種及び細菌のリアルタイム PCR 定量化、*Current Microbiology* 50: 285 ~ 291

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

本発明者らは、B・ヒオディセンテリア由来の新規な遺伝子及び該遺伝子によってコードされるタンパク質を同定した。本発明者らは更に、この新規な遺伝子及びタンパク質を治療及び診断目的に用いることができることを見出した。また、本発明者らは、B・ヒオディセンテリアに対するワクチンとして、及び/又は B・ヒオディセンテリア感染症の診断に該遺伝子及び/又は該タンパク質を用いることができることを見出した。

【課題を解決するための手段】

【0011】

すなわち、本発明はその一態様において、配列番号 1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21 及び 23 に含まれるヌクレオチド配列を有する新規な B・ヒオディセンテリアポリヌクレオチドを提供する。また、本発明は、配列番号 1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21 及び 23 と相同であり、相同性が 95%、90%、85%、80%、75% 及び 70% であり得るヌクレオチド配列も提供する。また、本発明は、配列番号 1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21 及び 23 のヌクレオチド配列と、該配列と 95%、90%、85%、80%、75% 及び 70% 相同である配列とを含む DNA ワクチン又は DNA 免疫原性組成物も包含する。本発明は更に、配列番号 1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21 及び 23 のヌクレオチド配列と、該配列と 95%、90%、85%、80%、75% 及び 70% 相同である配列とを有する DNA を含む診断アッセイを包含する。

【0012】

本発明の一態様においては、上記ワクチン組成物は、ブラキスピラ・ヒオディセンテリアに関連するブタ赤痢の治療又は予防用の、配列番号 1、3、5 及び 7 から成る群から選択される、プロテアーゼ分子をコードする少なくとも 2 種のポリヌクレオチドを含むワクチン組成物である。

【0013】

本発明の他の態様においては、上記ワクチン組成物は、ブラキスピラ・ヒオディセンテリアに関連するブタ赤痢の治療又は予防用の、配列番号 1、3、5 及び 7 から成る群から選択される、プロテアーゼ分子をコードする少なくとも 3 種のポリヌクレオチドを含むワクチン組成物である。

【0014】

本発明の更に他の態様においては、上記ワクチン組成物は、ブラキスピラ・ヒオディセンテリアに関連するブタ赤痢の治療又は予防用の、配列番号 1、3、5 及び 7 から成る群から選択される、プロテアーゼ分子をコードするポリヌクレオチドから成るワクチン組成物である。

【0015】

10

20

30

40

50

本発明の更なる態様においては、上記ワクチン組成物は、ブラキスピラ・ヒオディセンテリアに関連するブタ赤痢の治療又は予防用の、配列番号 9、11、13 及び 15 から成る群から選択される、リパーゼ及び / 又はペプチダーゼ分子をコードする少なくとも 2 種のポリヌクレオチドを含むワクチン組成物である。

【0016】

本発明の他の態様においては、上記ワクチン組成物は、ブラキスピラ・ヒオディセンテリアに関連するブタ赤痢の治療又は予防用の、配列番号 9、11、13 及び 15 から成る群から選択される、リパーゼ及び / 又はペプチダーゼ分子をコードする少なくとも 3 種のポリヌクレオチドを含むワクチン組成物である。

【0017】

本発明の更に他の態様においては、上記ワクチン組成物は、ブラキスピラ・ヒオディセンテリアに関連するブタ赤痢の治療又は予防用の、配列番号 9、11、13 及び 15 から成る群から選択される、リパーゼ及び / 又はペプチダーゼ分子をコードするポリヌクレオチドから成るワクチン組成物である。

【0018】

本発明の更なる態様においては、上記ワクチン組成物は、ブラキスピラ・ヒオディセンテリアに関連するブタ赤痢の治療又は予防用の、配列番号 17、19、21 及び 23 から成る群から選択される、毒素分子をコードする少なくとも 2 種のポリヌクレオチドを含むワクチン組成物である。

【0019】

本発明の他の態様においては、上記ワクチン組成物は、ブラキスピラ・ヒオディセンテリアに関連するブタ赤痢の治療又は予防用の、配列番号 17、19、21 及び 23 から成る群から選択される、毒素分子をコードする少なくとも 3 種のポリヌクレオチドを含むワクチン組成物である。

【0020】

本発明の更に他の態様においては、上記ワクチン組成物は、ブラキスピラ・ヒオディセンテリアに関連するブタ赤痢の治療又は予防用の、配列番号 17、19、21 及び 23 から成る群から選択される、毒素分子をコードするポリヌクレオチドから成るワクチン組成物である。

【0021】

本発明の他の態様においては、上記ワクチン組成物は、ブラキスピラ・ヒオディセンテリアに関連するブタ赤痢の治療又は予防用の、配列番号 1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21 及び 23 から成る群から選択される少なくとも 1 種のポリヌクレオチドと共に、配列番号 25、27、29 及び 31 から成る群から選択される、溶血素分子をコードする少なくとも 1 種のポリヌクレオチドを含むワクチン組成物である。

【0022】

本発明の他の態様においては、上記ワクチン組成物は、ブラキスピラに関連するブタ赤痢の治療又は予防用の、

(i) 配列番号 1、3、5 及び 7 から成る群から選択される、プロテアーゼ分子をコードする少なくとも 1 種のポリヌクレオチド及び / 又は、

(ii) 配列番号 9、11、13 及び 15 から成る群から選択される、リパーゼ及び / 又はペプチダーゼ分子をコードする少なくとも 1 種のポリヌクレオチド及び / 又は、

(iii) 配列番号 17、19、21 及び 23 から成る群から選択される、毒素分子をコードする少なくとも 1 種のポリヌクレオチド及び / 又は、

(iv) 配列番号 25、27、29 及び 31 から成る群から選択される、溶血素分子をコードする少なくとも 1 種のポリヌクレオチドを含むワクチン組成物である。

【0023】

本発明は更に、配列番号 1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29 及び 31 の配列を有する DNA を含むプラスミドと、配列番号 1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29 及び

10

20

30

40

50

31の配列を有するDNAを含む原核及び/又は真核発現ベクターと、配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29及び31の配列を有するDNAを含むプラスミドを含む細胞とを提供する。

【0024】

また、本発明は、配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30及び32に含まれるアミノ酸配列を有する新規なB・ヒオディセンテリアタンパク質も提供する。また、本発明は、配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30及び32に含まれる配列と95%、90%、85%、80%、75%及び70%相同であるタンパク質も提供する。また、本発明は、配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30及び32に含まれるアミノ酸配列、又は配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30及び32に含まれる配列と95%、90%、85%、80%、75%及び70%相同であるアミノ酸配列を有するタンパク質を含むワクチン又は免疫原性組成物も提供する。

10

【0025】

本発明の一態様においては、上記ワクチン組成物は、ブラキスピラ・ヒオディセンテリアに関連するブタ赤痢の治療又は予防用の、配列番号2、4、6及び8から成る群から選択される少なくとも2種のプロテアーゼポリペプチドを含むワクチン組成物である。

【0026】

本発明の他の態様においては、上記ワクチン組成物は、ブラキスピラ・ヒオディセンテリアに関連するブタ赤痢の治療又は予防用の、配列番号2、4、6及び8から成る群から選択される少なくとも3種のプロテアーゼポリペプチドを含むワクチン組成物である。

20

【0027】

本発明の更に他の態様においては、上記ワクチン組成物は、ブラキスピラ・ヒオディセンテリアに関連するブタ赤痢の治療又は予防用の、配列番号2、4、6及び8のプロテアーゼポリペプチドから成るワクチン組成物である。

【0028】

本発明の一態様においては、上記ワクチン組成物は、ブラキスピラ・ヒオディセンテリアに関連するブタ赤痢の治療又は予防用の、配列番号10、12、14及び16から成る群から選択される少なくとも2種のリパーゼ及び/又はペプチダーゼポリペプチドを含むワクチン組成物である。

30

【0029】

本発明の他の態様においては、上記ワクチン組成物は、ブラキスピラ・ヒオディセンテリアに関連するブタ赤痢の治療又は予防用の、配列番号10、12、14及び16から成る群から選択される少なくとも3種のリパーゼ及び/又はペプチダーゼポリペプチドを含むワクチン組成物である。

【0030】

本発明の更に他の態様においては、上記ワクチン組成物は、ブラキスピラ・ヒオディセンテリアに関連するブタ赤痢の治療又は予防用の、配列番号10、12、14及び16から成る群から選択されるリパーゼ及び/又はペプチダーゼポリペプチドから成るワクチン組成物である。

40

【0031】

本発明の一態様においては、上記ワクチン組成物は、ブラキスピラ・ヒオディセンテリアに関連するブタ赤痢の治療又は予防用の、配列番号18、20、22及び24から成る群から選択される少なくとも2種の毒素ポリペプチドを含むワクチン組成物である。

【0032】

本発明の他の態様においては、上記ワクチン組成物は、ブラキスピラ・ヒオディセンテリアに関連するブタ赤痢の治療又は予防用の、配列番号18、20、22及び24から成る群から選択される少なくとも3種の毒素ポリペプチドを含むワクチン組成物である。

【0033】

50

本発明の更に他の態様においては、上記ワクチン組成物は、ブラキスピラ・ヒオディセンテリアに関連するブタ赤痢の治療又は予防用の、配列番号18、20、22及び24から成る群から選択される毒素ポリペプチドから成るワクチン組成物である。

【0034】

本発明の更なる態様においては、上記ワクチン組成物は、ブラキスピラ・ヒオディセンテリアに関連するブタ赤痢の治療又は予防用の、

(i) 配列番号2、4、6又は8から成る群から選択される少なくとも1種のプロテアーゼポリペプチド及び/又は、

(ii) 配列番号10、12、14又は16から成る群から選択される少なくとも1種のリパーゼ及び/又はペプチダーゼポリペプチド及び/又は、

(iii) 配列番号18、20、22又は24から成る群から選択される少なくとも1種の毒素及び/又は、

(iv) 配列番号26、28、30又は32から成る群から選択される少なくとも1種の溶血素を含むワクチン組成物である。

【0035】

本発明の更なる態様は、配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30及び32に含まれる配列、又は配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30及び32に含まれる配列と95%、90%、85%、80%、75%及び70%相同である配列を有する一以上のタンパク質を含む診断キットを提供することである。

【0036】

本発明の他の態様は、配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30及び32に含まれるアミノ酸配列を有するタンパク質をコードするヌクレオチド配列を提供することである。また、本発明は、配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30及び32に含まれるアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする配列を有するDNAを含むプラスミド、真核及び原核発現ベクター、及びDNAワクチンも包含する。このようなプラスミド及び発現ベクターを含む細胞も本発明に包含される。

【0037】

本発明は、配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30及び32に含まれるアミノ酸配列を有するタンパク質と結合するか、又は配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30及び32に含まれる配列と95%、90%、85%、80%、75%及び70%相同であるタンパク質と結合するモノクローナル抗体を包含する。配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30及び32に含まれるアミノ酸配列を有するタンパク質と結合するか、又は配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30及び32に含まれる配列と95%、90%、85%、80%、75%及び70%相同であるタンパク質と結合するモノクローナル抗体を含む診断キットも本発明に包含される。このような診断キットによって、動物におけるB・ヒオディセンテリアの存在を検出することができる。動物としては哺乳動物や鳥が好ましく、ニワトリ、ガチョウ、アヒル、シチメンチョウ、インコ、イヌ、ネコ、ハムスター、スナネズミ、ウサギ、フェレット、ウマ、雌ウシ、ヒツジ、ブタ、サル及びヒトがより好ましい。

【0038】

また、本発明は、配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29及び31に記載の一以上のヌクレオチド配列、又は該配列と95%、90%、85%、80%、75%及び70%相同である配列を含むDNAワクチンを動物に投与することによって動物におけるB・ヒオディセンテリア感染症を予防又は治療する方法も意図する。また、本発明は、配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30及び32に含まれるアミノ酸配列、又

10

20

30

40

50

は該配列と95%、90%、85%、80%、75%及び70%相同である配列を有する一以上のタンパク質を含むワクチンを動物に投与することによって動物におけるB・ヒオディセンテリア感染症を予防又は治療する方法も包含する。

【0039】

また、本発明は、配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29及び31に記載の一以上のヌクレオチド配列、又は該配列と95%、90%、85%、80%、75%及び70%相同である配列を含む免疫原性組成物を動物に投与することによって動物において免疫応答を発生させる方法も意図する。また、本発明は、配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30及び32に含まれるアミノ酸配列、又は該配列と95%、90%、85%、80%、75%及び70%相同である配列を有する一以上のタンパク質を含む免疫原性組成物を動物に投与することによって動物において免疫応答を発生させる方法も包含する。

10

【発明を実施するための形態】

【0040】

本発明について詳細に説明する前に、本発明は特定の例示された方法に限定されるものではなく、当然のことながら本発明に変更を加えうることを理解されたい。また、本明細書における専門用語は本発明の特定の実施形態を説明する目的のみに用いており、何ら本発明に対する限定を意図するものではなく、本発明は添付した特許請求の範囲によってのみ限定されるものであることも理解されたい。

20

【0041】

本明細書で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願は、上述のものであろうと後述のものであろうと、その全内容を本明細書の一部を構成するものとしてここに援用する。しかし、これら刊行物を援用記載する目的は、該刊行物で報告され、且つ本発明に関連して用い得るプロトコルや試薬、ベクターを説明し開示しようとするものである。本明細書に記載のいずれも、それが先行発明であるという理由をもってその開示に本発明が先行していないことを自認したものと解釈すべきでない。

【0042】

また、本発明の実施においては、特に明記しない限り、当該技術分野の技術範囲内の従来の免疫学的、分子生物学的技法や薬理学を用いる。このような技法は当業者に周知であり、多くの文献に記載されている。例えば、コリガン(Coligan)、ダン(Dunn)、プロー(Ploegh)、シュパイヒャー(Speicher)及びウィングフィールド(Wingfield)、「タンパク質科学における現在のプロトコル」(1999)、I及びII巻(John Wiley & Sons Inc.); サンプルック(Sambrook)ら、「分子クローニング: 実験室マニュアル」(1989)、第2版(Cold Spring Harbor press); 及びプレスコット(Prescott)、ハーレー(Harley)及びクライン(Klein)、「微生物学」(1999)、第4版(WBC McGraw-Hill)を参照のこと。

30

【0043】

特に文脈にて明確に定められない限り、本明細書及び添付の特許請求の範囲で用いる単数形「a」、「an」及び「the」は、複数形の言及も包含することに留意する必要がある。従って、例えば「a gene」の場合は複数の遺伝子を包含することを意味し、また、「an animal」は一以上の動物を意味する等である。特に明記しない限り、本明細書で用いる技術用語及び科学用語は全て、本発明が属する当該技術分野の当業者が通常理解するものと同じ意味を有する。本明細書に記載のものと同様又は類似又は等価な材料や方法のいずれを用いても本発明を実施又は試験することができるが、好ましい材料及び方法については以下に記載する。

40

【0044】

本発明はその最も広い態様において、配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21及び23に含まれるヌクレオチド配列を有する新規なB・ヒオディセ

50

ンテリアポリヌクレオチド、又は該ポリヌクレオチドによってコードされるアミノ酸配列（ポリペプチド）を提供する。

【0045】

「アミノ酸」とは、天然にせよ合成にせよ、アミノ官能性及び酸官能性の両方を有し、天然に存在するアミノ酸のポリマーに含まれ得る全ての分子を包含することを意味する。アミノ酸の例としては、天然に存在するアミノ酸、その類縁体や誘導體、同類物、種々の側鎖を有するアミノ酸類縁体、また、上述のいずれかの全ての立体異性体が挙げられる。

【0046】

動物は、ブラキスピラ（特にB.ヒオディセンテリア）に感染し得る哺乳動物又は鳥であり得る。哺乳動物の例としては、イヌやネコ、ハムスター、スナネズミ、ウサギ、フェレット、ウマ、雌ウシ、ヒツジ、ブタ、サル、ヒトが挙げられる。鳥の例としては、ニワトリやガチョウ、アヒル、シチメンチョウ、インコが挙げられる。あるブラキスピラ種が種々の宿主に感染し得ることは当業者には理解されよう（例えば、ハンブソン（Hampson）ら、2006、新興感染症、12巻（5）、869～870頁参照。尚、その全内容を本明細書の一部を構成するものとしてここに援用する）。従って、本明細書における「動物」は種々の動物を包含するが、特にブタ及び家禽を包含する。

10

【0047】

「保存的残基」とは、ある共通の特性を有するアミノ酸のグループのメンバーであるアミノ酸を意味する。「保存的アミノ酸置換」とは、そのようなグループのアミノ酸の同グループの別のアミノ酸による（概念的又は別の意味の）置換を意味する。個々のアミノ酸間の共通特性を定義する実用的な方法は、同種生物の対応するタンパク質間における正規化したアミノ酸変化頻度を解析することである（シュルツ（Schulz）、G. E. 及びR. H. シンナー（Schinner）、タンパク質構造の原理、Springer-Verlag）。このような解析によると、ある一群のアミノ酸が互いに優先的に置換され、それによる全体的なタンパク質構造に対する影響が互いに殆ど見られない場合に、アミノ酸グループとして定義することができる（シュルツ（Schulz）、G. E. 及びR. H. シンナー（Schinner）、タンパク質構造の原理、Springer-Verlag）。こうして定義されたアミノ酸グループの例としては、(i) Lys、Arg及びHisを含む陽性荷電グループ、(ii) Glu及びAspを含む陰性荷電グループ、(iii) Phe、Tyr及びTrpを含む芳香族グループ、(iv) His及びTrpを含む含窒素環グループ、(v) Val、Leu及びDeを含む大型脂肪族非極性グループ、(vi) Met及びCysを含む弱極性グループ、(vii) Ser、Thr、Asp、Asn、Gly、Ala、Glu、Gln及びProを含む小型残基グループ、(viii) Val、Leu、Ile、Met及びCysを含む脂肪族グループ、及び(ix) Ser及びThrを含む小型水酸基グループが挙げられる。

20

30

【0048】

「融合タンパク質」又は「融合ポリペプチド」とは、当該技術分野で公知のようにキメラタンパク質を意味するが、当該技術分野で公知の方法を用いて構築することができる。融合タンパク質の多くの例においては、2種類の異なるポリペプチド配列が存在するが、ある場合には、更に多くのポリペプチド配列が存在し得る。融合タンパク質をコードするポリヌクレオチド配列は、融合タンパク質を正しく翻訳できるようにインフレームで作動可能に（operably）連結させることができる。融合タンパク質は、同一種又は異種由来のポリペプチド配列を含み得る。種々の実施形態においては、融合ポリペプチドは、第1のポリペプチドに連結した一以上のアミノ酸配列を含有し得る。一を超えるアミノ酸配列が第1のポリペプチドに融合する場合、融合配列は、同一配列の複数のコピーであってもよく、或いは、異なるアミノ酸配列であってもよい。融合ポリペプチドは、第1のポリペプチドのN末端、C末端、又はN及びC末端に融合させることができる。融合タンパク質の例としては、グルタチオンS-トランスフェラーゼタグ（GST-タグ）、ヒスチジンタグ（His-タグ）、免疫グロブリンドメイン又は免疫グロブリン結合ドメインを含有するポリペプチドが挙げられる。

40

50

【0049】

「単離ポリペプチド」とは、ある実施形態においては、組換えDNA又はRNAから調製されるポリペプチド、合成由来又は天然由来のポリペプチド、或いはそれらの組合せであって、(1)天然において通常一緒に見出されるタンパク質と関係していないか、(2)それが通常存在している細胞から分離されているか、(3)同一細胞源由来の他のタンパク質を含まないか、(4)異なる種由来の細胞によって発現されるか、又は(5)天然には存在しないものを意味する。当該単離ポリペプチドは、精製ポリペプチド(修飾されたものを除く)として存在してもよい。

【0050】

「単離核酸」及び「単離ポリヌクレオチド」とは、ゲノムDNA、cDNA、mRNA、tRNA、rRNA、iRNA又は細胞オルガネラ(例えば、ミトコンドリアや葉緑体)から得られるポリヌクレオチドであるか、合成由来のものであって、(1)当該「単離核酸」が天然において存在している細胞と関係がないか、又は(2)天然においては作動可能に連結していないポリヌクレオチドと作動可能に連結されているポリヌクレオチドを意味する。当該単離ポリヌクレオチドは、精製ポリヌクレオチド(修飾されたものを除く)として存在してもよい。

10

【0051】

「核酸」及び「ポリヌクレオチド」とは、ポリマー形態のヌクレオチドであって、リボヌクレオチド、デオキシリボヌクレオチド、又はそれらのいずれかのヌクレオチド種の修飾された形態のことを指す。これらの用語は、同等物として、ヌクレオチド類縁体から得られるRNA又はDNAの類縁体を包含し、また、本明細書に記載の実施形態に適用し得るものとして、一本鎖(例えば、センスやアンチセンス)ポリヌクレオチドや二本鎖ポリヌクレオチドを包含すると理解すべきである。

20

【0052】

「本発明の核酸」及び「本発明のポリヌクレオチド」とは、本発明のポリペプチドをコードする核酸を意味する。本発明のポリヌクレオチドは、本発明の核酸配列；本発明の核酸配列と少なくとも60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%同一であるヌクレオチド配列；ストリンジентな条件下で本発明の核酸配列とハイブリダイズするヌクレオチド配列；本発明のポリペプチドと機能的に同等なポリペプチドをコードするヌクレオチド配列；本発明アミノ酸配列と少なくとも約60%、70%、80%、85%、90%、95%、98%、99%相同であるか又は同一であるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列；本発明のポリペプチドの活性を有し、本発明アミノ酸配列に対して少なくとも約60%、70%、80%、85%、90%、95%、98%、99%以上の相同性又は同一性を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列；1~約2、3、5、7、10、15、20、30、50、75以上のヌクレオチド置換、付加又は欠失によって本発明の核酸配列と異なるヌクレオチド配列(例えば、対立遺伝子バリエーション)；本発明の核酸配列に由来すると共に進化的に関連する核酸；並びに、本発明の上述の及び他の核酸の全てに関する、遺伝コードの縮重に起因するヌクレオチド配列及びそれらの相補的な核酸配列の全部又は一部を含み得る。また、本発明の核酸は、本発明の核酸配列の相同体(例えば、オルソログやパラログ)も包含し、また、特定の生体(例えば、宿主細胞)での発現に対してコドン最適化された変異型の本発明の核酸配列も包含する。

30

40

【0053】

2種の核酸領域間の関係について記載する際の「作動可能に連結」とは、該領域が意図するとおりに機能し得る関係で隣接していることを意味する。コーディング配列と制御配列とを「作動可能に連結」させる場合には、制御配列に適合し得る条件下(例えば、適切な分子(誘導剤やポリメラーゼなど)が当該制御配列に結合した場合)においてコード配列が発現されるように制御(又は調節)配列に連結させる。

【0054】

「ポリペプチド」、「タンパク質」及び「ペプチド」は本明細書においては交換可能に

50

用い、アミノ酸のポリマーを意味する。ポリペプチドの例としては、遺伝子産物や天然に存在するタンパク質、上述のものの相同体、オルソログ、パラログ、断片、その他の同等物、変異体及び類縁体が挙げられる。

【0055】

あるポリペプチドの「ポリペプチド断片」又は「断片」とは、対象となるポリペプチド自体と比べてアミノ酸残基が欠失しているが、残ったアミノ酸配列が通常、対象ポリペプチドの対応する位置と同一であるポリペプチドを意味する。このような欠失は、対象ポリペプチドのアミノ末端又はカルボキシ末端、或いはその両方で起こり得る。断片は通常、少なくとも5、6、8又は10アミノ酸長、少なくとも14アミノ酸長、少なくとも20、30、40又は50アミノ酸長、少なくとも75アミノ酸長、又は少なくとも100、150、200、300、500以上アミノ酸長である。断片は対象ポリペプチドの生物学的活性の一以上を保持し得る。ある実施形態においては、断片は所望の生物学的活性を有するドメインを含み得るが、必要に応じて該ドメインの一側又は両側に付加的アミノ酸を含み、この付加的アミノ酸の数は、5、10、15、20、30、40、50又は最大で100以上の残基となり得る。更に、断片は特定領域の細断片を含み得るが、この細断片は、その由来領域の機能を保持する。他の実施形態においては、断片は免疫原性を有し得る。

10

【0056】

「本発明のポリペプチド」とは、本発明アミノ酸配列又はその同等物や断片を含有するポリペプチドを意味する。本発明のポリペプチドとしては、本発明アミノ酸配列；1～約2、3、5、7、10、15、20、30、50、75以上の保存的アミノ酸置換を有する本発明アミノ酸配列；本発明アミノ酸配列と少なくとも60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%同一であるアミノ酸配列；及びそれらの機能的断片の全部又は一部を含むポリペプチドが挙げられる。また、本発明のポリペプチドは、本発明アミノ酸配列の相同体（例えば、オルソログやパラログ）も包含する。

20

【0057】

また、治療又は予防における有効性や安定性（例えば、エクスピボでの有効期間やインビボでのタンパク質分解耐性等）を高める目的で、本発明のポリペプチドの構造を修飾することも可能である。このような修飾ポリペプチドは、タンパク質の天然に存在する形態の少なくとも一つの活性を保持するように設計される場合には、本明細書で更に詳細に記載するポリペプチドの「機能同等物」と考えられる。このような修飾ポリペプチドは、例えば、アミノ酸置換、欠失又は付加によって作製することができるが、この置換は全部又は一部において、保存的アミノ酸置換で構成してもよい。

30

【0058】

例えば、単発的な保存的アミノ酸置換（例えば、イソロイシンやバリンによるロイシンの置換、グルタミン酸によるアスパラギン酸の置換、セリンによるスレオニンの置換）は、得られる分子の生物学的活性に大きな影響を及ぼさないことが合理的に予想できる。ポリペプチドのアミノ酸配列が変化して機能的相同体が得られるかどうかは、変異ポリペプチドが野生型タンパク質同様の応答を示せるか否かを評価することによって容易に確認することができる。2つ以上の置換が行われたポリペプチドは、同様に容易に試験することができる。

40

【0059】

「精製された」とは、目的の種が主に存在する種である（即ち、組成物において他のいずれの種に比べても豊富に（モル基準で）存在する種である）ことを意味する。「精製画分」とは、存在する全種の内、目的種が少なくとも約50パーセント（モル基準で）を占める組成物である。溶液や分散液において純度や種を確認する際には、その種が溶解又は分散している溶媒やマトリックスは通常そのような確認においては対象とされず、溶解又は分散している種のみ（対象物を含む）が考慮される。一般に、精製組成物は、該組成物に存在する全種の約80%超であるか、存在する全種の約85%超、90%、95%、99%以上を占める一種を有する。目的種を実質的に均質になる（即ち、混入物種が従来の

50

検出方法では組成物中から検出され得ない)まで精製することができるが、この際、組成物は本質的に単一種となる。当業者であれば、本明細書の教示に鑑みて、タンパク質精製のための標準的な技法を用いて本発明のポリペプチドを精製することができる。ポリペプチドの純度は当業者に公知の数多くの方法によって測定できるが、その方法としては例えば、アミノ末端アミノ酸配列解析やゲル電気泳動、質量分析、本明細書に記載の方法が挙げられる。

【0060】

「組換えタンパク質」又は「組換えポリペプチド」とは、組換えDNA技法によって調製されるポリペプチドを意味する。このような技法の一例としては、発現タンパク質をコードするDNAを好適な発現ベクターに挿入し、それを用いて宿主細胞を形質転換して該DNAによってコードされるタンパク質又はポリペプチドを調製する場合が挙げられる。

10

【0061】

「制御配列」とは、本明細書全体を通じて用いる一般的な用語であり、開始シグナルやエンハンサー、レギュレーター、プロモーター等のポリヌクレオチド配列を意味し、それらが作動可能に連結するコード配列や非コード配列の発現に影響を及ぼす上で必要又は所望とされる。制御配列の例は、ゲッデル (Goeddel) ; 遺伝子発現技術: 酵素学における方法、Academic Press、カリフォルニア州サンディエゴ(1990)に記載されており、例えば、SV40の初期プロモーター及び後期プロモーターや、アデノウイルス又はサイトメガロウイルスの最初期プロモーター、lac系、trp系、TAC又はTRC系、T7RNAポリメラーゼによって発現が指示されるT7プロモーター、ファージの主要オペレーター及びプロモーター領域、fdコートタンパク質のための制御領域、3-ホスホグリセリン酸キナーゼ又は他の糖分解酵素のためのプロモーター、酸ホスファターゼ(例えば、Pho5)のプロモーター、酵母接合因子のプロモーター、原核細胞又は真核細胞又はそのウイルスの遺伝子の発現を制御することが知られているバキュロウイルス系や他の配列の多角体プロモーター、及びそれらの種々の組合せが挙げられる。このような制御配列の性質や使用については宿主生物に応じて変化し得る。原核生物においては、このような制御配列は一般に、プロモーター、リボソーム結合部位及び転写終結配列を含む。「制御配列」とは、少なくとも、その存在が発現に影響を及ぼし得る成分を含むことを意味し、また、その存在が有利な付加的成分(例えば、リーダー配列や融合パートナー配列)も含み得る。ある実施形態においては、ポリヌクレオチド配列の転写は、それを発現させようとしている細胞型におけるポリヌクレオチドの発現を制御するプロモーター配列(又は他の制御配列)の制御下にある。また、該ポリヌクレオチドが、天然において当該ポリヌクレオチドの発現を制御する制御配列と同一又は異なる制御配列の制御下にあり得ることも理解できるであろう。

20

30

【0062】

「配列相同性」とは、2種の核酸配列間の塩基の一致の割合、又は2種のアミノ酸配列間のアミノ酸の一致の割合を意味する。配列相同性がパーセンテージで表される場合(例えば、50%)、当該パーセンテージは、他の配列と比較された目的の配列全体における当該一致の割合を示す。一致を最大にするためのギャップ(2種の配列の一方における)があってもよく、通常は15塩基以下のギャップ長が用いられ、より頻繁には6塩基以下のギャップ長が用いられ、更に頻繁には2塩基以下のギャップ長が用いられる。「配列同一性」とは、配列が比較のウィンドウに亘って同一である(即ち、核酸の場合にはヌクレオチド-ヌクレオチド基準、又はポリペプチドの場合にはアミノ酸-アミノ酸基準)ことを意味する。「配列同一性のパーセンテージ」は、2種の最適に整列された配列を比較のウィンドウに亘って比較し、両配列中に同一のアミノ酸又はヌクレオチドが存在する位置の数を確認して一致した位置の数を得て、一致した位置の数を比較ウィンドウ中の位置の全数で割り、得られた結果に100を掛けて算出する。配列同一性を算出する方法は当業者には公知であるが、更に詳細に後述する。

40

【0063】

本明細書において本発明のポリペプチド又は他のタンパク質について用いる「可溶性」

50

とは、細胞培養での発現の際に、発現したポリペプチド又はタンパク質の少なくとも一部が細胞の細胞質画分に残り、ライセートの溶解や遠心分離の際に細胞残渣と共に分画されないことを意味する。ポリペプチドの溶解度は、当該技術分野で公知の種々の方法、例えば、異種アミノ酸配列との融合や、アミノ酸残基の欠失、アミノ酸置換（例えば、配列中の親水性側鎖を有するアミノ酸残基の増加）、化学的修飾（例えば、親水性基の付加）によって向上させることができる。

【0064】

ポリペプチドの溶解度は、当該技術分野で公知の種々の技法、例えば、凝集状態を確認するための動的光散乱や、UV吸収、非凝集物から凝集物を分離するための遠心分離、SDSゲル電気泳動（例えば、可溶性画分中のタンパク質量を可溶性画分と不溶性画分の混合物中のタンパク質量と比較する）によって測定することができる。宿主細胞中で発現した場合、本発明のポリペプチドは、少なくとも約1%、2%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%以上が可溶である（例えば、細胞内で発現したタンパク質量の少なくとも約1%、2%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%以上が細胞質画分で見出される）。ある実施形態においては、本発明のポリペプチドを発現する細胞の1L培養によって、少なくとも約0.1、0.2、0.5、1、2、5、10、20、30、40、50ミリグラム以上の可溶性タンパク質が産生する。例示的实施形態においては、本発明のポリペプチドは少なくとも約10%可溶であり、1Lの細胞培養から少なくとも約1ミリグラムのタンパク質が産生する。

【0065】

「特異的にハイブリダイズする」とは、検出可能で特異的な核酸の結合を意味する。本発明のポリヌクレオチド、オリゴヌクレオチド及び核酸は、非特異的核酸に対する相当量の検出可能な結合を最小限に抑えるハイブリダイゼーション条件及び洗浄条件下で、核酸鎖と選択的にハイブリダイズする。ストリンジентな条件を用いて、当該技術分野で公知であり本明細書に記載の選択的ハイブリダイゼーション条件を得ることができる。一般に、本発明のポリヌクレオチド、オリゴヌクレオチド及び核酸と対象とする核酸配列との間の核酸配列相同性は、少なくとも30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、98%、99%又はそれ以上である。ある例においては、ハイブリダイゼーション及び洗浄条件は、従来のハイブリダイゼーション操作及び本明細書における更なる記載に従ったストリンジентな条件下で行う。

【0066】

「ストリンジентな条件」又は「ストリンジентなハイブリダイゼーション条件」とは、二本鎖を形成するように2種の相補的なポリヌクレオチド鎖間で行う特異的なハイブリダイゼーションを促進する条件を意味する。ストリンジентな条件は、所定のイオン強度及びpHで、所定のポリヌクレオチド二本鎖の融点（ T_m ）より約5℃低くなるように選択することができる。相補的なポリヌクレオチド鎖の長さ及びそのGC量によって二本鎖の T_m が決定され、ひいては、所望のハイブリダイゼーション特異性を得るのに必要なハイブリダイゼーション条件が決まる。 T_m とは、ポリヌクレオチド配列の50%が完全にマッチする相補鎖とハイブリダイズする温度（所定のイオン強度及びpH下）である。ある場合には、特定の二本鎖の T_m とほぼ等しくなるようにハイブリダイゼーション条件のストリンジエンシーを上げることが望ましいこともある。

【0067】

T_m を推定するために種々の技法を用いることができる。通常、理論的最高値である約80~100℃まで、二本鎖内のG-C塩基対が T_m に対して約3℃寄与すると推定される一方、A-T塩基対が約2℃寄与すると推定される。

【0068】

しかし、G-Cスタッキング相互作用、溶媒効果、所望のアッセイ温度等を考慮に入れたより高度な T_m モデルを用いることができる。例えば、次式： $T_d = ((3 \times \#GC) + (2 \times \#AT)) \times 3.7 - 56.2 - \#bp - 5$ （式中、 $\#GC$ 、 $\#AT$ 及び $\#b$

p はそれぞれ、二本鎖の形成に關与するグアニン - シトシン塩基対の数、アデニン - チミン塩基対の数及び全塩基対の数である)を用いて、解離温度 (T_d) が約 60 となるようにプローブを設計することができる。

【0069】

ハイブリダイゼーションは、 $5 \times S S C$ 、 $4 \times S S C$ 、 $3 \times S S C$ 、 $2 \times S S C$ 、 $1 \times S S C$ 又は $0.2 \times S S C$ 中で、少なくとも約 1 時間、2 時間、5 時間、12 時間又は 24 時間行うことができる。ハイブリダイゼーションの温度を例えば、約 25 (室温) から約 45、50、55、60 又は 65 まで上げて反応のストリンジェンシーを調整することができる。また、ハイブリダイゼーション反応にはストリンジェンシーに影響を及ぼす他の試薬を含めてもよく、例えば、50%ホルムアミドの存在下でハイブリダイゼーションを行うと、所定温度でのハイブリダイゼーションのストリンジェンシーが上昇する。

10

【0070】

ハイブリダイゼーション反応に引き続き、単一の洗浄工程、又は二以上の洗浄工程を行ってもよいが、これは同一又は異なる塩濃度や温度で行うことができる。例えば、洗浄の温度を約 25 (室温) から約 45、50、55、60、65 又はそれ以上まで上げてストリンジェンシーを調整することができる。洗浄工程は洗浄剤 (例えば、0.1 又は 0.2% SDS) の存在下で行うことができる。例えば、ハイブリダイゼーションに引き続き、洗浄の 2 工程 (各工程は $2 \times S S C$ 、0.1% SDS 中で約 20 分間) を 65 で行うことができ、必要に応じて、更に洗浄の 2 工程 (各工程は $0.2 \times S S C$ 、0.1% SDS 中で約 20 分間) を 65 で行うことができる。

20

【0071】

ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件の例としては、50%ホルムアミド、10xデンハート液 (0.2% フィコール、0.2% ポリビニルピロリドン、0.2% ウシ血清アルブミン) 及び $200 \mu g / mL$ の変性担体 DNA (例えば、剪断サケ精子 DNA) を含有する溶液中でハイブリダイゼーションを 65 で一晩行った後、洗浄の 2 工程 (各工程は $2 \times S S C$ 、0.1% SDS 中で約 20 分間) を 65 で行い、更に洗浄の 2 工程 (各工程は $0.2 \times S S C$ 、0.1% SDS 中で約 20 分間) を 65 で行うことが挙げられる。

【0072】

ハイブリダイゼーションにおいては、溶液中の 2 種の核酸をハイブリダイズさせてもよく、溶液中の核酸を固体支持体 (例えば、フィルター) に付着させた核酸とハイブリダイズさせてもよい。固体支持体上に 1 種の核酸がある場合には、ハイブリダイゼーションの前にプレハイブリダイゼーション工程を行うことができる。プレハイブリダイゼーションは、ハイブリダイゼーション溶液 (相補的なポリヌクレオチド鎖の非存在下) と同一の溶液及び同一温度で少なくとも約 1 時間、3 時間又は 10 時間行うことができる。

30

【0073】

適切なストリンジェンシー条件は当業者には公知であるか、又は当業者によって実験的に決めることができる。例えば、分子生物学における現在のプロトコル、John Wiley & Sons、N. Y. (1989)、6.3.1-12.3.6; サンプルック (Sambrook) ら、1989、分子クローニング、実験室マニュアル、Cold Spring Harbor Press、N. Y.; S. アグラワル (Agrawal) 編、分子生物学における方法、20 巻; ティーセン (Tijssen) (1993)、生化学及び分子生物学における実験室技法 - 核酸プローブを用いたハイブリダイゼーション (例えば、パート I 第 2 章「ハイブリダイゼーションの原理の概要及び核酸プローブアッセイの戦略」、Elsevier、ニューヨーク; ティバニエンダ (Tibanyenda), N. ら、Eur. J. Biochem. 139: 19 (1984) 及びエベル (Ebel), S. ら、Biochem. 31: 12083 (1992) を参照のこと。

40

【0074】

「ベクター」とは、連結された核酸を輸送することが可能な核酸を意味する。本発明で

50

用いることのできるベクターの1種はエピソーム（即ち、染色体外複製を可能とする核酸）である。他のベクターとしては、連結された核酸の自己複製や発現を可能とするベクターが挙げられる。作動可能に連結された（operatively linked）遺伝子の発現を指示することが可能なベクターを本明細書では「発現ベクター」と称する。一般に、組換えDNA技法で有用な発現ベクターは、プラスミドの形態であることが多いが、「プラスミド」とは、ベクター形態では染色体に結合していない環状二本鎖DNA分子を意味する。プラスミドはベクターの最も一般に用いられる形態であるため、本明細書においては「プラスミド」と「ベクター」は交換可能に用いる。しかしながら、本発明は、同等の機能を有し、今後当該技術分野で知られるようになる他の形態の発現ベクターも包含されることを意図している。

10

【0075】

本発明の核酸を診断試薬として用いて、該核酸が特異的に結合する標的DNA又はRNA配列の有無を検出し、例えば、本発明の核酸の発現レベルを求めることができる。一態様においては、本発明は、サンプル中に本発明の核酸又はその一部が存在することを検出するための方法であって、（a）本発明の核酸の一部と相補的で少なくとも8ヌクレオチド長のオリゴヌクレオチドを用意する工程と、（b）該オリゴヌクレオチドと本発明の核酸又はその一部とのハイブリダイゼーションを可能にする条件下で該オリゴヌクレオチドを少なくとも1種の核酸を含有するサンプルに接触させる工程と、（c）該オリゴヌクレオチドとサンプル中の核酸とのハイブリダイゼーションを検出して、該サンプル中に本発明の核酸又はその一部が存在することを検出する工程とを含む方法を意図する。他の態様においては、本発明は、サンプル中に本発明の核酸又はその一部が存在することを検出するための方法であって、（a）各々が本発明の核酸の配列と相補的で少なくとも8ヌクレオチド長のオリゴヌクレオチドであって、該オリゴヌクレオチドと相補的な配列どうしが、少なくとも10ヌクレオチド離れている、一对の一本鎖オリゴヌクレオチドを用意することと、（b）ハイブリダイゼーション条件下で該オリゴヌクレオチドを少なくとも1種の核酸を含有するサンプルに接触させることと、（c）2種のオリゴヌクレオチドプライマー間のヌクレオチド配列を増幅することと、（d）増幅した配列の存在を検出して、該サンプル中に本発明の核酸又はその一部が存在することを検出することによって行う方法を意図する。

20

【0076】

本発明の他の態様においては、本発明のポリペプチドをコードし、少なくとも1種の制御配列に作動可能に連結するヌクレオチド配列を含む発現ベクターに本発明のポリヌクレオチドを挿入する。当然のことながら、発現ベクターの設計は、形質転換する宿主細胞の選択及び/又は発現が所望されるタンパク質の種類等の要因によって決まり得る。ベクターのコピー数、該コピー数を制御する能力、及びベクターによってコードされる任意の他のタンパク質（例えば、抗菌マーカー）の発現を考慮する必要がある。

30

【0077】

本発明のポリヌクレオチドを含有する発現ベクターを薬剤として用いてB・ヒオディセンテリアに感染した動物を治療することができ、又はワクチンとして（更には薬剤としても）用いて動物をB・ヒオディセンテリアの感染から防ぐことができ、また、動物が感染した場合には疾患の症状や進行を抑制することができる。発現ベクターを薬剤として用いる一方法は、核酸ワクチンを感染の危機にある動物又は感染した動物に投与することである。核酸ワクチン技術については当該技術分野で十分に説明されている。説明の一部は、米国特許第6,562,376号（フーパー（Hooper）ら）、米国特許第5,589,466号（フェルグナー（Felgner）ら）、米国特許第6,673,776号（フェルグナー（Felgner）ら）、及び米国特許第6,710,035号（フェルグナー（Felgner）ら）に見出すことができる。核酸ワクチンは筋肉内注射又は皮内注射することができ、動物へのエレクトロポレーション（WO01/23537（キング（King）ら）、及びWO01/68889（マローネ（Malone）ら）参照）は、脂質組成物を介して（米国特許第5,703,055号（フェルグナー（Felgner）ら）参照）又は当該技術分野で公知の他

40

50

のメカニズムによって行うことができる。

【0078】

また、発現ベクターを細菌にトランスフェクトし、その細菌を標的動物に投与して、発現ベクターに含まれる本発明のヌクレオチドによってコードされるタンパク質に対する免疫応答を誘導することもできる。発現ベクターには、本発明のヌクレオチドが宿主動物内で転写及び翻訳されるように真核発現配列を含有させることができる。或いは、発現ベクターを細菌内で転写した後、宿主動物内で翻訳することもできる。発現ベクターの担体として用いる細菌は、弱毒化されてもなお侵襲的である必要がある。数例を挙げると、弱毒化されてもなお侵襲的である赤痢菌種、サルモネラ菌種、大腸菌種及びエロモナス菌種を用いることができる。このような方法の例は、米国特許第5,824,538号(ブランストロム(Branstrom)ら)、米国特許第5,877,159号(パウエル(Powell)ら)、米国特許第6,150,170号(パウエル(Powell)ら)、米国特許第6,500,419号(ホン(Hone)ら)、及び米国特許第6,682,729号(パウエル(Powell)ら)に見出すことができる。

10

【0079】

或いは、ベクターとして作用するある種のウイルスに本発明のポリヌクレオチドを挿入することもできる。ウイルスベクターは、本発明のタンパク質をウイルスの表面上で発現するか、又は、本発明のポリヌクレオチドがタンパク質に転写、翻訳される動物細胞に該ポリヌクレオチドを輸送されてもよい。ウイルスベクターに感染した動物は、本発明のポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質に対する免疫応答を示し得る。これによって、ウイルスベクターに感染した動物においては、B・ヒオディセンテリアによる感染症を軽減又は予防することができる。ウイルスベクターの例は、米国特許第5,283,191号(モーガン(Morgan)ら)、米国特許第5,554,525号(ゾンダーマイヤー(Sondermeijer)ら)、及び米国特許第5,712,118(マーフィー(Murphy))に見出すことができる。

20

【0080】

本発明のポリヌクレオチドを用いて、培養液中で増殖した細胞内で本発明のポリペプチドの発現及び過剰発現を生じさせることができる(例えば、融合タンパク質やポリペプチド等のタンパク質やポリペプチドを産生させることができる)。

【0081】

本発明は、本発明のポリペプチドを発現させるために組換え遺伝子をトランスフェクトした宿主細胞に関する。宿主細胞はいずれの原核細胞又は真核細胞でもよい。例えば、本発明のポリペプチドは、細菌細胞(例えば、大腸菌)、昆虫細胞(バキュロウイルス)、酵母菌、植物細胞又は哺乳類細胞で発現させることができる。このような例において、宿主細胞がヒト細胞の場合、生被験者内に存在してもしなくてもよい。他の好適な宿主細胞は当業者には公知である。更に、宿主には通常見出されないtRNA分子を宿主細胞に追加して、ポリペプチドの発現を最適化することができる。或いは、ヌクレオチド配列を変化させて宿主細胞内での発現を最適化することもできるが、それでも、産生するタンパク質は元来コードされるタンパク質に対して高い相同性を有するであろう。ポリペプチドの発現を最大限にするのに適した他の方法は当業者には公知であろう。

30

40

【0082】

本発明は更に、本発明のポリペプチドを調製する方法に関する。例えば、本発明のポリペプチドをコードする発現ベクターをトランスフェクトした宿主細胞を適切な条件下で培養し、該ポリペプチドの発現を生じさせることができる。該ポリペプチドを含有する培地と細胞の混合物からポリペプチドを分泌、単離することができる。或いは、ポリペプチドを細胞質保持させて、細胞を回収、溶解し、タンパク質を単離することができる。

【0083】

細胞培養液には宿主細胞、培地及び他の副生物が含まれる。細胞培養に適した培地は当該技術分野ではよく知られている。当該技術分野で公知のタンパク質精製技法(例えば、イオン交換クロマトグラフィーやゲル濾過クロマトグラフィー、限外濾過、電気泳動、本

50

発明のポリペプチドの特定のエピトープに特異的な抗体を用いたイムノアフィニティー精製等)を用いて細胞培地又は宿主細胞から、或いはその両方からポリペプチドを単離することができる。

【0084】

このように、本発明のポリペプチドの全て又は選択部分をコードするヌクレオチド配列を用い、微生物又は真核細胞プロセスによって組換えタンパク質のを調製することができる。ポリヌクレオチド構築物(例えば、発現ベクター)内に配列を連結させることと、宿主(真核生物(酵母菌、鳥、昆虫又は哺乳動物)又は原核生物(細菌細胞))を形質転換又はトランスフェクトすることは標準的な操作である。類似の操作又はその変法を用い、微生物学的方法又は組織培養技術によって本発明の組換えポリペプチドを調製することができる。

10

【0085】

本発明のポリペプチドの発現に適するベクターとしては、次の種類のプラスミド、即ち、原核細胞(例えば、大腸菌)における発現のためのpTrcHis由来プラスミド、pET由来プラスミド、pBR322由来プラスミド、pEMBL由来プラスミド、pEX由来プラスミド、pBTac由来プラスミド、pUC由来プラスミドが挙げられる。プラスミドの調製や宿主生物の形質転換に用いる各種方法は当該技術分野で周知である。原核細胞及び真核細胞の両方に適した他の発現系、及び一般的な組換え手続きについては、分子クローニング、実験室マニュアル、第2版、サンプルック(Sambrook)、フリッチュ(Fritsch)及びマニアティス(Maniatis)編(Cold Spring Harbor Laboratory Press、1989)第16章及び17章を参照のこと。

20

【0086】

目的のポリペプチドのコード配列は、それと異なるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む融合遺伝子の一部として組み込むことができる。本発明は、本発明の核酸と、異種ポリペプチドを含む融合タンパク質をコードするように本発明の核酸のヌクレオチド配列とインフレームで連結させた異種ペプチドをコードする少なくとも1種の異種配列とを含有する単離ポリヌクレオチドを意図する。異種ポリペプチドは、(a)本発明のポリペプチドのC末端、(b)本発明のポリペプチドのN末端、又は(c)本発明のポリペプチドのC末端及びN末端に融合させることができる。ある例においては、異種配列は、融合対象のポリペプチドの検出、単離、可溶化及び/又は安定化を可能にするポリペチドをコードする。更に他の実施形態においては、異種配列は、ポリHisタグやmyc、HA、GST、プロテインA、プロテインG、カルモジュリン結合ペプチド、チオレドキシン、マルトース結合タンパク質、ポリアルギニン、ポリHis-Asp、FLAG、免疫グロブリンタンパク質の一部、経細胞輸送ペプチド等のポリペプチドをコードする。

30

【0087】

融合発現系は、本発明のポリペプチドの免疫原性断片の産生が望ましい場合には有用となり得る。例えば、ロタウイルスのVP6カプシドタンパク質は、モノマー形態又はウイルス粒子の形態で、ポリペプチド部分用免疫学的担体タンパク質として用いることができる。抗体の産生をもたらす本発明のポリペプチド部分に対応する核酸配列を、後期ワクシニアウイルス構造タンパク質のコード配列を含む融合遺伝子構築物に組み込んで、ピリオンの一部としてのタンパク質の一部を含む融合タンパク質を発現する1組の組換えウイルスを作製することができる。B型肝炎表面抗原をこの役割に用いることもできる。同様に、本発明のポリペプチドの一部及びポリオウイルスカプシドタンパク質を含む融合タンパク質をコードするキメラ構築物を作製して免疫原性を高めることができる(例えば、EP公報No:0259149;エヴァンズ(Evans)ら、(1989)Nature339:385;フアン(Huang)ら、(1988)J.Virology62:3855;及びシュリエンガー(Schlienger)ら、(1992)J.Virology66:2参照)。

40

【0088】

融合タンパク質によってタンパク質の発現及び/又は精製を容易にすることができる。例えば、本発明のポリペプチドをグルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)融合タ

50

ンパク質として作製することができる。このようなGST融合タンパク質を用い、例えば、グルタチオンコートマトリックスを使用することによって本発明のポリペプチドの精製を単純化することができる（例えば、分子生物学における現在のプロトコル、アウスベル（Ausubel）ら編（N.Y. : John Wiley & Sons, 1991）参照）。他の実施形態においては、精製リーダー配列、例えば組換えタンパク質の所望の部分のN末端でのポリ（His）/エンテロキナーゼ切断部位配列等をコードする融合遺伝子の使用により、Ni²⁺金属樹脂を用いたアフィニティークロマトグラフィーによる発現融合タンパク質の精製が可能となる。次いで、精製リーダー配列をエンテロキナーゼでの処理によって除去し、精製タンパク質を得ることができる（例えば、ホチュリ（Hochuli）ら、（1987）J. Chromatography 411: 177；及びジャンクネヒト（Janknecht）ら、PNAS USA 88: 8972参照）。

10

20

30

40

50

【0089】

融合遺伝子を作製する技法はよく知られている。本質的に、種々のポリペプチド配列をコードする各種DNA断片の連結は、ライゲーション用のプラント末端又は粘着末端の作製、適切な末端を提供する制限酵素消化、必要に応じた付着末端の充填（filling-in）、望ましくない連結を回避するためのアルカリホスファターゼ処理、及び酵素的連結を用いて、従来技法によって行う。他の実施形態においては、融合遺伝子は、自動DNA合成機を含む従来技法によって合成することができる。或いは、遺伝子断片のPCR増幅は、2種の連続遺伝子断片間の相補的オーバーハングを引き起こすアンカープライマーを用いて実施することができ、続いて該連続遺伝子断片をアニールして、キメラ遺伝子配列を作製することができる（例えば、分子生物学における現在のプロトコル、アウスベル（Ausubel）ら編、John Wiley & Sons: 1992参照）。

【0090】

他の実施形態においては、本発明は、固体表面（例えば、プレート、マイクロタイタープレート、スライド、ビーズ、粒子、球体、フィルム、ストランド、沈殿物、ゲル、シート、チューブ、容器、毛管、パッド、スライス等）上に固定化した本発明の核酸を提供する。本発明の核酸は、アレイの一部としてのチップ上に固定化することができる。アレイには、本明細書に記載の本発明のポリヌクレオチドの1以上を含有させることができる。一実施形態においては、チップには、本発明のポリヌクレオチドと同じ病原性種由来のポリヌクレオチド配列のアレイの一部として本発明のポリヌクレオチドの1以上が含まれる。

【0091】

本発明の好ましい形態においては、本明細書に記載の単離B・ヒオディセンテリアポリペプチドを提供すると共に、該ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列も提供する。B・ヒオディセンテリアポリペプチドは、実質的に精製された形態で提供するのがより望ましい。

【0092】

本発明の好ましいポリペプチドは、天然の全長ポリペプチドの1以上の生物学的特性（例えば、インビボ、インビトロ又は免疫学的特性）を有する。また、非機能性ポリペプチドも、例えば、機能性ポリペプチドのアンタゴニストとして有用となり得るため、本発明の範囲内に包含される。野生型に対する類縁体、断片又は誘導体の生物学的特性は、例えば、生物学的アッセイによって確認することができる。

【0093】

ポリペプチド（類縁体、断片及び誘導体を含む）は、合成によって（例えば、固相又は液相ペプチド合成等の周知の技法を用いて）調製することができる。特に固相合成技法を用いるのが好ましい。或いは、本発明のポリペプチドは、後述するよく知られた遺伝子工学技法を用いて調製することができる。更に他の実施形態においては、ポリペプチドは、生体液（例えば、動物由来の血漿や糞便、血清、尿が挙げられるが、これらに限定されない。また、動物の例としては、ブタやニワトリ、ガチョウ、アヒル、シチメンチョウ、インコ、ヒト、サル、イヌ、ネコ、ウマ、ハムスター、スナネズミ、ウサギ、フェレット、

ウマ、ウシ、ヒツジが挙げられるが、これらに限定されない)から精製(例えば、イムノアフィニティー精製)することができる。

【0094】

B. ヒオディセンテリアポリペプチド類縁体としては、一以上のアミノ酸が他のアミノ酸に置換されているが、その置換によって分子の生物学的活性が実質的に変化しないようなアミノ酸配列を有するポリペプチドが挙げられる。

【0095】

本発明によると、組換え又は化学的合成によって調製した本発明のポリペプチド、及びその断片や他の誘導体又は類縁体(融合タンパク質等)を免疫原として用いて、該ポリペプチドを認識する抗体を調製することができる。

【0096】

ある分子が免疫系の抗原認識分子(例えば、免疫グロブリン(抗体)又はT細胞抗原受容体)と特異的に相互作用し得る場合、該分子は「抗原性」であるという。抗原アミノ酸配列には、少なくとも約5個、好ましくは、少なくとも約10個のアミノ酸が含まれている。分子の抗原部分は、抗体又はT細胞受容体認識に対して免疫優性な部分であり得るか、又は、免疫用担体分子に該抗原部分を接合させて該分子に対する抗体を作製するために用いる部分であり得る。抗原性の分子はそれ自体が免疫原性である(即ち、担体なしで免疫応答を誘発可能である)必要はない。

【0097】

「抗体」とは、特定のエピトープに結合するいずれの免疫グロブリン(抗体及びその断片を含む)をも意味する。「抗体」は、ポリクローナル抗体やモノクローナル抗体、キメラ抗体、米国特許第4,816,397号及び第4,816,567号に更に詳述されたもの、また、抗体の抗原結合部分(例えば、FabやF(ab')₂、F(v)(単鎖抗体を含む))を包含する。従って、本明細書において種々の文法形態で用いる「抗体分子」とは、無傷の免疫グロブリン分子を意図すると共に、抗体結合部位を含む免疫グロブリン分子の免疫学的に活性な部分も意図する。「抗体結合部位」とは、抗原と特異的に結合し、重鎖可変領域、軽鎖可変領域及び超可変領域から成る抗体分子の構造部分である。

【0098】

抗体分子の例としては、無傷の免疫グロブリン分子や、実質的に無傷の免疫グロブリン分子、パラトープを含有する免疫グロブリン分子の部分(例えば、FabやFab'、F(ab')₂、F(v)として当該技術分野で公知の部分)が挙げられるが、このような部分は、本明細書に記載の治療方法に用いるのが好ましい。

【0099】

抗体分子のFab部分及びF(ab')₂部分はそれぞれ、よく知られた方法により実質的に無傷の抗体分子上でのパイン及びペプシンのタンパク質分解反応によって調製される。例えば、米国特許第4,342,566号(テオフィロポロス(Theofilopolous)ら)を参照のこと。Fab'抗体分子もよく知られており、F(ab')₂部分から産生させた後、2種の重鎖部分を連結しているジスルフィド結合をメルカプトエタノールで還元し、その後、得られるタンパク質メルカプタンをヨードアセトアミド等の試薬でアルキル化する。本発明においては、無傷の抗体分子を含む抗体が好ましい。

【0100】

「モノクローナル抗体」は、文法上別の表現形態で記載されることもあるが、特定の抗原との免疫反応が可能な唯一種の抗体結合部位を有する抗体を意味する。よって、モノクローナル抗体は通常、それが免疫反応するいずれの抗原に対しても単一の結合親和性を示す。従って、モノクローナル抗体は、複数の抗体結合部位(各々は異なる抗原に対して免疫特異的である)を有する抗体分子(例えば、二重特異性(キメラ)モノクローナル抗体)を含有し得る。

【0101】

「アジュバント」とは、抗原に対する免疫応答を向上させる化合物又は混合物を意味する。アジュバントは、抗原を徐々に放出する組織デポーとして機能し得ると共に、免疫応

10

20

30

40

50

答を非特異的に向上させるリンパ系アクチベーターとしても機能し得る [フッド (Hood)
ら、 *Immunology*、 384 頁、 第 2 版、 Benjamin / Cummings、
カリフォルニア州メンローパーク (1984)]。多くの場合、アジュバントの非存在下
、抗原のみで一次免疫を行っても、体液性免疫応答や細胞性免疫応答を誘発することは
できないであろう。アジュバントとしては、完全フロイントアジュバントや不完全フロイン
トアジュバント、サポニン、水酸化アルミニウム等の鉱物ゲル、リゾレシチン等の界面活
性物質、プルロニックポリオール類、ポリアニオン類、ペプチド類、油エマルジョン又は
炭化水素エマルジョン、キーホールリンペットヘモニアニン、ジニトロフェノール、潜在
的に有用なヒトアジュバント (BCG (カルメット・ゲラン桿菌) やコリネバクテリウム
・パルバム等) が挙げられるが、これらに限定されない。アジュバントは薬学的に許容し
得るのが好ましい。

10

【 0 1 0 2 】

当該技術分野で公知の種々の操作を用いて本発明のポリペプチドに対するポリクローナ
ル抗体を作製することができる。抗体の調製の際には、種々の宿主動物を注射によって本
発明のポリペプチドで免疫することができる。宿主動物としては、ウサギやマウス、ラッ
ト、ヒツジ、ヤギ等が挙げられるが、これらに限定されない。一実施形態においては、本
発明のポリペプチドを免疫原性担体 (例えば、ウシ血清アルブミン (BSA) やキーホー
ルリンペットヘモニアニン (KLH)) に結合させることができる。宿主種に応じ、種々
のアジュバントを用いて免疫学的応答を向上させることができる。アジュバントとしては
、フロイントアジュバント (完全アジュバントや不完全アジュバント)、水酸化アルミニ
ウム等の鉱物ゲル、リゾレシチン等の界面活性物質、プルロニックポリオール類、ポリ
アニオン類、ペプチド類、油エマルジョン、キーホールリンペットヘモニアニン、ジニ
トロフェノール、潜在的に有用なヒトアジュバント (BCG (カルメット・ゲラン桿菌) や
コリネバクテリウム・パルバム等) が挙げられるが、これらに限定されない。

20

【 0 1 0 3 】

本発明のポリペプチドに対するモノクローナル抗体の調製の際には、培養における連続
細胞系によって抗体分子を作製させるいずれの技法をも用いることができる。このような
技法としては、ケーラー (Kohler) らによって当初開発されたハイブリドーマ技法 (ケー
ラー (Kohler) ら、 (1975) *Nature*、 256 : 495 - 497)、トリオーマ
技法、ヒト B 細胞ハイブリドーマ技法 [コズバー (Kozbor) ら、 (1983) *Immun*
ology Today、 4 : 72]、及びヒトモノクローナル抗体を作製するための E
BV - ハイブリドーマ技法 [コール (Cole) ら、 (1985)、モノクローナル抗体及び
癌治療、 77 ~ 96 頁、 Alan R. Liss, Inc.] が挙げられるが、これらに
限定されない。不死の抗体産生細胞系は、融合以外の技法 (例えば、発癌性 DNA による
B リンパ球の直接形質転換や、エプスタイン・バーウイルスによるトランスフェクション
) によって作製することができる。例えば、米国特許第 4, 341, 761 号、第 4, 3
99, 121 号、第 4, 427, 783 号、第 4, 444, 887 号、第 4, 451, 5
70 号、第 4, 466, 917 号、第 4, 472, 500 号、第 4, 491, 632 号及
び第 4, 493, 890 号を参照のこと。

30

【 0 1 0 4 】

本発明の更なる実施形態においては、最近の技術を用いて無菌動物内でモノクローナル
抗体を作製することができる。本発明によると、ニワトリ又はブタ抗体を用いることが
でき、該抗体は、ニワトリ又はブタハイブリドーマを用いるか、又はインビトロで B 細胞を
EBV ウイルスで形質転換することによって得ることができる。実際、本発明によると、
本発明のポリペプチドに特異的なマウス抗体分子由来の遺伝子を、適切な生物学的活性の
抗体分子由来の遺伝子と共にスプライシングさせて「キメラ抗体」を作製するために開発
された技法 [モリソン (Morrison) ら、 (1984) *J. Bacteriol.*、 159
- 870 ; ノイバーガー (Neuberger) ら、 (1984) *Nature*、 312 : 604
- 608 ; タケダら、 (1985) *Nature*、 314 : 452 - 454] を用いるこ
とができるが、このような抗体は本発明の範囲内である。このようなキメラ抗体は、それ

40

50

自体の免疫応答（特にアレルギー性応答）を誘導することが異種間抗体に比べて遥かに少ないため、該抗体を腸の疾患や障害（後述する）の治療に用いるのに好ましい。

【0105】

本発明によると、一本鎖抗体調製用に記載された技法（米国特許第4,946,778号）を本発明のポリペプチドに特異的な一本鎖抗体の調製に適応させることができる。本発明の更なる実施形態では、Fab発現ライブラリー構築用に記載された技法[フセ(Husse)ら,(1989)Science,246:1275-1281]を用いて、本発明のポリペプチドに対して所望の特異性を有しているモノクローナルFab断片を迅速且つ容易に同定することができる。

【0106】

抗体分子のイディオタイプを含有する抗体断片は公知の技法によって調製することができる。このような断片としては、例えば、抗体分子のペプシン消化によって産生し得るF(ab')₂断片や、F(ab')₂断片のジスルフィド架橋を還元することによって生じ得るFab'断片、抗体分子をパイン及び還元剤で処理することによって生じ得るFab断片が挙げられるが、これらに限定されない。

【0107】

抗体の作製においては、所望の抗体のスクリーニングは、当該技術分野で公知の技法、例えば、ラジオイムノアッセイ、ELISA、「サンドイッチ」イムノアッセイ、イムノラジオメトリックアッセイ、ゲル拡散沈降反応、免疫拡散アッセイ、in situイムノアッセイ（例えば、コロイド金、酵素又は放射性同位体ラベルを用いる）、ウェスタンブロット、沈降反応、凝集アッセイ（例えば、ゲル凝集アッセイや血球凝集アッセイ）、補体固定アッセイ、免疫蛍光アッセイ、プロテインAアッセイ、免疫電気泳動アッセイ等によって行うことができる。一実施形態においては、一次抗体上のラベルを検出することによって抗体結合を検出する。他の実施形態においては、一次抗体への二次抗体又は試薬の結合を検出することによって一次抗体を検出する。更なる実施形態においては、二次抗体を標識する。イムノアッセイにおける結合を検出するための多くの手段が当該技術分野で公知であり、このような手段は本発明の範囲内である。例えば、本発明のポリペプチドの特異的エピトープを認識する抗体を選択するためには、調製したハイブリドーマをアッセイして、該エピトープを含有する本発明のポリペプチドの断片に結合する産物の有無を確認することができる。

【0108】

また、本発明は、本発明のポリペプチド及び/又は本発明のポリペプチドに結合する抗体を用いてB・ヒオディセンテリアの存在を検出する診断及び予後観察方法を包含すると共に、B・ヒオディセンテリア感染症の診断及び予後観察に有用なキットも包含する。

【0109】

診断及び予後観察方法は一般に、ニワトリやブタ等の動物から得た生物学的サンプルを用いて行う。「サンプル」とは、プラキスピラ種（例えば、B・ヒオディセンテリア）又はそのポリヌクレオチドやポリペプチドを含有する疑いのある動物組織や流体のサンプルを意味する。そのような組織や流体の例としては、血漿や血清、糞便物、尿、肺、心臓、骨格筋、胃、腸、インビトロ細胞培養成分が挙げられるが、これらに限定されない。

【0110】

本発明は、サンプル中の本発明のポリペプチドの存在を検出するための方法であって、次の工程、即ち、(a)本発明のポリペプチドに特異的に結合する抗体（好ましくは固体支持体に結合されている）と本発明のポリペプチドを含む反応複合体が形成可能な条件下で、本発明のポリペプチドを含有する疑いのあるサンプルを該抗体に接触させる工程と、(b)該サンプル中の該抗体と本発明のポリペプチドを含む反応複合体の形成を検出する工程とを含み、反応複合体の形成の検出が該サンプル中の本発明のポリペプチドの存在を示す方法を提供する。

【0111】

この方法に用いる抗体は、アフィニティ精製ポリクローナル抗体に由来するのが好まし

10

20

30

40

50

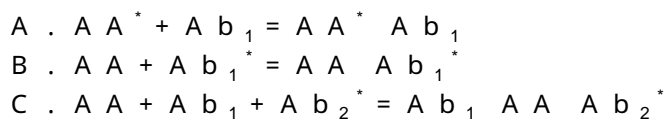
く、モノクローナル抗体に由来するのがより好ましい。更に、本発明で用いる抗体分子は $F a b$ 、 $F a b'$ 、 $F(a b')$ ₂ 又は $F(v)$ 部分又は完全抗体分子の形態であるのが好ましい。

【0112】

上述の方法に基づく B・ヒオディセンテリアを検出するための特に好ましい方法としては、酵素結合免疫吸着アッセイやラジオイムノアッセイ、イムノラジオメトリックアッセイ、免疫酵素アッセイ（モノクローナル抗体及び/又はポリクローナル抗体を用いたサンドイッチアッセイ等）が挙げられる。

【0113】

かかる方法の中で特に有用な3つの方法では、検出可能ラベルで標識された本発明のポリペプチド（又はその断片）、検出可能ラベルで標識された抗体 $A b_1$ 、又は検出可能ラベルで標識された抗体 $A b_2$ を用いる。このような方法を以下の式によって要約する（式中、星印は粒子が標識されていることを示し、「AA」は本発明のポリペプチドを表す）。



【0114】

当業者はこのような手続き及びその応用に精通しており、従って、本発明の範囲内で用い得る。「競合」法 A は米国特許第 3,654,090 号及び第 3,850,752 号に記載されている。方法 B は周知の競合アッセイ技法の典型である。操作 C は「サンドイッチ」法であり、米国特許 RE31,006 及び第 4,016,043 号に記載されている。「二重抗体」法や「DASP」法等の更に他の手続きも知られている。

【0115】

どの例においても、本発明のポリペプチドは一以上の抗体又は結合パートナーと共に複合体を形成し、複合体の一方の構成要素は検出可能ラベルで標識されている。複合体が形成されたという事実、また、必要に応じて複合体の量は、ラベルの検出に適用し得る公知の方法によって確認することができる。

【0116】

上述のことから理解できるように、 $A b_2$ は $A b_1$ と反応する特性を有するといえる。その理由は、ある哺乳動物種で生じた $A b_1$ が他の種で抗体 $A b_2$ を生じさせる抗原として用いられるからである。例えば、抗原としてウサギ抗体を用い、ヤギの体内で $A b_2$ を生じさせることができる。従って、 $A b_2$ はヤギで生じた抗ウサギ抗体となるであろう。本明細書及び特許請求の範囲においては、 $A b_1$ を一次抗体と称し、 $A b_2$ を二次抗体又は抗 $A b_1$ 抗体と称する。

【0117】

このような研究で最も一般に用いられるラベルは放射性元素や酵素、紫外光に曝露されると蛍光を発する化学物質等である。ラベルとして用いることのできる蛍光物質の例としては、フルオレセインやローダミン、オーラミンが挙げられる。特定の検出物質としては、ヤギの体内で調製し、イソチオシアネートによってフルオレセインと結合させた抗ウサギ抗体が挙げられる。好ましい同位体の例としては、³H や ¹⁴C、³²P、³⁵S、³⁶Cl、⁵¹Cr、⁵⁷Co、⁵⁸Co、⁵⁹Fe、⁹⁰Y、¹²⁵I、¹³¹I、¹⁸⁶Re が挙げられる。放射性ラベルは、現在入手可能ないずれの計測手続きによっても検出することができる。多くの酵素を用いることができるが、好ましい酵素の例としては、ペルオキシダーゼや - グルクロニダーゼ、- D - グルコシダーゼ、- D - ガラクトシダーゼ、ウレアーゼ、グルコースオキシダーゼとペルオキシダーゼの組合せ、アルカリホスファターゼが挙げられる。酵素は、カルボジイミドやジイソシアネート、グルタルアルデヒド等の架橋分子との反応によって選択粒子に結合させる。酵素ラベルは、現在利用されている比色法、分光光度法、蛍光分光光度法、電流測定法又はガス測定法のいずれかによって検出することができる。代替の標識物質及び方法の開示例としては、米国特許第 3,654,090 号、第 3,

10

20

30

40

50

850, 752号及び第4, 016, 043号を挙げることができる。

【0118】

また、本発明は、生物学的サンプル中の本発明のポリペプチドに対する抗体を検出する方法であって、(a)本発明のポリペプチド又はその断片を用意する工程と、(b)生物学的サンプルを前記本発明のポリペプチドと共に抗体-抗原複合体が形成可能な条件下でインキュベートする工程と、(c)本発明のポリペプチドを有する抗体-抗原複合体が形成されたかどうかを確認する工程とを用いる方法も提供する。

【0119】

本発明の他の実施形態においては、生物学的サンプル中の本発明のポリペプチドに対する抗体のレベルを評価するためのインビトロ方法であって、(a)上述の方法に従って生物学的サンプル中の反応複合体の形成を検出する工程と、(b)該生物学的サンプル中の本発明のポリペプチドのレベルに対応する、形成された反応複合体の量を評価する工程とを用いる方法を提供する。

10

【0120】

更に、動物宿主におけるB・ヒオディセンテリアに関連する疾患の治療的処置をモニターするためのインビトロ方法であって、該治療的処置を受けている動物宿主から種々の時点で得た一連の生物学的サンプル中の本発明のポリペプチドに対する抗体のレベルを上述のように評価してモニターする方法を提供する。

【0121】

本発明は更に、生物学的サンプル中のB・ヒオディセンテリアの有無を検出するための方法であって、(a)好適なハイブリダイゼーション条件下で生物学的サンプルを本発明のポリヌクレオチドのポリヌクレオチドプローブ又はプライマーに接触させ、(b)該プローブ又はプライマーと該サンプル中の核酸との間に形成された二本鎖を検出することによってB・ヒオディセンテリアの有無を検出する方法を提供する。

20

【0122】

本発明の一実施形態によると、B・ヒオディセンテリアの検出は、公知の技法を用いて生物学的サンプルからポリヌクレオチド配列を直接的に増幅した後、本発明のポリヌクレオチド配列の存在を検出することによって行うことができる。

【0123】

本発明の一形態においては、標的核酸配列をPCRによって増幅した後、上述の具体的方法のいずれかを用いて検出する。ポリヌクレオチド配列の存在を検出するための他の有用な診断技法としては、1)対立遺伝子特異的PCRや、2)一本鎖コンフォメーション解析、3)変性勾配ゲル電気泳動、4)RNアーゼ保護アッセイ、5)大腸菌mutSタンパク質等のヌクレオチドミスマッチを認識するタンパク質の使用、6)対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチド、7)蛍光*in situ*ハイブリダイゼーションが挙げられるが、これらに限定されない。

30

【0124】

上述の方法に加え、従来のプローブ技術によってポリヌクレオチド配列を検出することができる。プローブを用いて所望のポリヌクレオチド配列の存在を検出する場合、分析対象の生物学的サンプル(血液や血清等)を必要に応じて処理し、核酸を抽出することができる。サンプルのポリヌクレオチド配列を種々の方法(例えば、変性や制限消化、電気泳動、ドットプロットング)で調製して標的配列の検出を容易にすることができる。サンプルのポリヌクレオチド配列の標的領域は通常、プローブの標的配列とハイブリッドを形成するよう少なくとも部分的に一本鎖である必要がある。配列が天然に一本鎖である場合には変性は不要である。しかし、配列が二本鎖である場合には、配列を変性することが必要であろう。変性は当該技術分野で公知の種々の技法によって行うことができる。

40

【0125】

サンプルポリヌクレオチド配列及びプローブを、プローブ中の標的配列とサンプル中の所望の推定ポリヌクレオチド配列との安定なハイブリッド形成が促進される条件下でインキュベートする。偽陽性を防止するためには高ストリンジェンシー条件を用いるのが好ま

50

しい。

【0126】

ハイブリッドが得られた場合、そのハイブリッドの検出は通常、標識プローブを用いて行う。或いは、プローブを標識せず、標識されているリガンドとの特異的結合によって直接的又は間接的に検出することができる。好適なラベル及びプローブやリガンドを標識するための方法は当該技術分野で公知であり、例えば、公知の方法（例えば、ニクトランレーションやランダムプライミング、キナーゼ処理）によって取込まれ得る放射性ラベルやビオチン、蛍光基、化学発光基（例えば、ジオキセタン、特に誘発されたジオキセタン）、酵素、抗体等が挙げられる。この基礎的スキームの変更は当該技術分野で公知であり、その例としては、検出対象のハイブリッドを外来性物質から分離し易くする変更及び/又は標識部分からシグナルを増幅する変更が挙げられる。

10

【0127】

また、本発明の所望のポリヌクレオチド配列を検出可能な核酸プローブカクテルを本発明の核酸プローブアッセイに用い得ることも本発明の範囲内で意図される。従って、一例においては、細胞サンプル中の本発明のポリヌクレオチド配列の存在を検出するため、ポリヌクレオチド配列に相補的な一を超えるプローブを用いるが、特に、異なるプローブの数は2、3又は5種類の異なる核酸プローブ配列である。

【0128】

また、本明細書に記載のポリヌクレオチド配列（好ましくはプローブの形態）を固相支持体に固定して、ブラキスピラ種（例えば、B・ヒオディセンテリアやB・インターメディア、B・アルビニプリ、B・アアルボルギ、B・イノセンス、B・ムルドキイ、B・ピロシコリが挙げられるが、これらに限定されない）を検出することもできる。或いは、本明細書に記載のポリヌクレオチド配列が、B・ヒオディセンテリア等のブラキスピラ種由来の複数の異なる遺伝子を同時に検出するのに使用可能なDNA分子ライブラリーの一部を構成することもある。本発明の更に他の形態においては、本明細書に記載のポリヌクレオチド配列を他のポリヌクレオチド配列（例えば、他の細菌やウイルスに由来）と共に固体支持体に固定し、固体支持体に結合したB・ヒオディセンテリア等のブラキスピラ種及び/又は他のポリヌクレオチド配列の存在を識別できるようにすることができる。

20

【0129】

DNA分子の固相化ライブラリーを作製する技法は当該技術分野において説明されている。一般に、多くの先行技術では、例えば、固相基板の種々の別個の位置に種々の配列の順列を形成するマスキング技法を用いた一本鎖核酸分子ライブラリーの合成が記載されている。米国特許第5,837,832号には、非常に大規模な集積技術に基づいてシリコン基板に固定したDNAアレイを製造する改良方法が記載されている。特に、米国特許第5,837,832号には、基板上の空間的に定められた位置に特定のプローブセットを合成するための「タイリング」と称される戦略が記載されており、これは本発明の固定DNAライブラリーを作製するのに用い得る技術である。また、米国特許第5,837,832号には、同じく使用可能な更に初期の技法の参考文献も記載されている。このように、ポリヌクレオチド配列プローブは基板の表面で*in situ*で合成することができる。

30

40

【0130】

或いは、固相基板から離して一本鎖分子を合成し、予め形成した配列の各々を固相基板の別個の位置に付着させることができる。例えば、ピン又は圧電デバイスを備えたロボットデバイスを用いてポリヌクレオチド配列を基板上に直接的にプリントすることができる。

【0131】

ライブラリー配列は通常、固相基板の別個の領域上、又は該領域内に固定される。基板は、基板内部への固定を可能とする多孔質でもよく、又は実質的に非多孔質でもよく、その場合には、ライブラリー配列は通常、基板の表面上に固定される。固相基板はポリペプチドが直接的又は間接的に結合できる如何なる材料から形成されていてもよい。好適な固

50

相基板の例としては、平坦ガラスやシリコンウェハ、マイカ、セラミックス、プラスチック（例えばポリスチレンやポリメタクリレート）等の有機ポリマーが挙げられる。また、ニトロセルロース膜やナイロン膜等の広く入手し得る半透膜を用いることも可能である。半透膜をガラス等のより強固な固体表面に取り付けることができる。必要に応じて、金や白金、他の遷移金属等の金属層で表面をコートすることができる。

【0132】

固相基板は、一般には剛性又は半剛性の表面を有する物質であるのが好ましい。好ましい実施形態においては、基板の少なくとも一表面が実質的に平坦であるが、ある実施形態においては、異なるポリマーの合成領域を例えば、隆起領域やエッチングされた溝によって物理的に分離するのが望ましいこともあり得る。また、固相基板が通常50～100 μmの不連続域でDNA配列を高密度付着させるのに適しているのが好ましく、この場合、10000～40000ドット/cm²の密度となる。

10

【0133】

固相基板をセクションに分割するのが便利である。これは、フォトエッチング等の技法によって、或いは、疎水性インキ（例えば、テフロン（登録商標）ベースのインキ（Cell-line、USA））を塗布することによって行うことができる。

【0134】

ライブラリーの異なる構成要素の各々が設けられた別個の位置は例えば、円形、長方形、楕円形、楔形等の如何なる適切な形状をも有し得る。

20

【0135】

ポリヌクレオチド配列を基板に付着させるには共有結合手段又は非共有結合手段を用いることができる。ポリヌクレオチド配列は、ライブラリー配列が結合している分子の層を介して基板に付着させることができる。例えば、ポリヌクレオチド配列をビオチンで標識し、基板をアビジン及び/又はストレプトアビジンでコートすることができる。ビオチン化ポリヌクレオチド配列を用いるのが便利な点は、固相基板への結合効率を容易に確認できることである。ポリヌクレオチド配列はある種の固相基板に結合しにくい場合があるため、固相基板（例えば、ガラスの場合）と核酸配列との間に化学的界面を設けるのが必要なことが多い。好適な化学的界面の例としてはヘキサエチレングリコールが挙げられる。他の例はポリリジンでコートしたガラスの使用であるが、この場合、ポリリジンを標準的な手続きによって化学的に修飾してアフィニティーリガンドを導入する。カップリング剤を用いて固相基板の表面に分子を付着させるための他の方法は当該技術分野で公知である（例えば、WO98/49557参照）。

30

【0136】

相補的ポリヌクレオチド配列が固定核酸ライブラリーに結合したことは、結合したポリヌクレオチド配列の光学特性値の変化（即ち、臭化エチジウムの使用）等の各種手段やフルオロフォアで標識したポリペプチド等の標識核酸の使用によって確認することができる。ラベルの使用が不要な他の検出技法としては、音響光学法、反射率測定法、偏光解析法、表面プラズモン共鳴法（WO97/49989参照）等の光学的技法が挙げられる。

【0137】

従って、本発明は、少なくとも1種の本発明のポリヌクレオチド（好ましくは、異なる2種以上の本発明のポリヌクレオチド配列）が固定化された固相基板を提供する。

40

【0138】

また、本発明は予防薬又は治療薬として用いることもできるが、これは、ニワトリやブタ等の動物における体液性応答や細胞介在応答を刺激して、ブラキスピラ種（例えば、B・ヒオディセンテリアやB・インターメディア、B・アルビニプリ、B・アアルボルギ、B・イノセンス、B・ムルドキイ、B・ピロシコリが挙げられるが、これらに限定されない）のコロニー形成に対して防御する目的で用いることができる。B・ヒオディセンテリア等のブラキスピラ種による自然感染は、本明細書に記載のタンパク質に対する循環抗体価を高める。従って、本明細書に記載のアミノ酸配列又はその一部は、腸スピロヘータ症に対する防御のために全身的又は経口的に投与する予防薬や治療薬の主成分を構成する可

50

能性を有する。

【0139】

ブラキスピラ種間で配列保存度が高いことは当業者にはよく理解されよう。例えば、後述のように、B・ヒオディセンテリア毒素（H46）と外膜タンパク質（H114）は多くのブラキスピラ種間で類似度が高い。

【0140】

B・ヒオディセンテリアリパーゼ（H46）に対する異種間ヌクレオチド類似度 ブラキスピラ種	ヌクレオチドレベルでの類似度（％）	
	H46	
ブラキスピラ・ヒオディセンテリア	100	10
ブラキスピラ・ピロシコリ	81.9	
ブラキスピラ・インターメディア	95.5	
ブラキスピラ・ムルドキイ	85.9	
ブラキスピラ・アルビニプリ	84.8	

【0141】

B・ヒオディセンテリア毒素（H72）に対する異種間ヌクレオチド類似度 ブラキスピラ種	ヌクレオチドレベルでの類似度（％）	
	H72	
ブラキスピラ・ヒオディセンテリア	100	20
ブラキスピラ・ピロシコリ	83.3	
ブラキスピラ・インターメディア	95.0	
ブラキスピラ・ムルドキイ	87.3	
ブラキスピラ・アルビニプリ	85.8	

【0142】

また、実施例22にも示すように、本発明のヌクレオチド配列及びアミノ酸配列は、B・ヒオディセンテリアだけでなく、種々のブラキスピラ種に亘って交差反応性をもたらすことが可能である。従って、本発明で用いるポリペプチドは、B・ヒオディセンテリアだけでなく、他のブラキスピラ種に対する使用も可能である。

【0143】

従って、一実施形態においては、本発明は、薬学的に許容し得る担体、希釈剤又は賦形剤と治療的有効量で混合される本明細書に記載のアミノ酸配列又はその断片、該アミノ酸配列に結合する抗体、又は本明細書に記載のポリヌクレオチド配列を提供する。

【0144】

本明細書における「治療的有効量」とは、動物宿主の活性、機能及び応答における臨床的に重大な欠陥を少なくとも約15%、好ましくは少なくとも50%、より好ましくは少なくとも90%抑制し、最も好ましくはこのような欠陥を防止するのに十分な量を意味する。或いは、治療的有効量とは、動物宿主の臨床的に重大な状態を改善させるのに十分な量を意味する。

【0145】

「薬学的に許容し得る」とは、生理学的に許容でき、通常、動物に投与した際にアレルギー反応や同様の不都合な反応（例えば、胃の不調等）をもたらさない分子体や組成物を指すのに用いる。「担体」とは、化合物と共に投与される希釈剤、アジュバント、賦形剤又は媒体を意味する。このような薬学的担体としては、滅菌液体、例えば、水や、石油由来、動物由来、植物由来又は合成由来の油を挙げることができ、ピーナツ油や大豆油、鉱油、ゴマ油等が挙げられる。水や生理食塩水溶液、デキストロース水溶液及びグリセロール水溶液が、特に注射液用担体として好ましく用いられる。好適な薬学的担体は、マーチン（Martin）、Remington's Pharmaceutical Sciences、第18版、Mack Publishing Co.、ペンシルバニア州イーストン（1990）に記載されている。

【0146】

10

20

30

40

50

本発明のより具体的な形態においては、治療的有効量の本明細書に記載のアミノ酸配列又はその類縁体、断片又は誘導産物、又はこれらに対する抗体を、薬学的に許容し得る希釈剤、保存剤、可溶化剤、乳化剤、アジュバント及び/又は担体と共に含む医薬組成物が提供される。このような組成物は、種々のバッファー（例えば、Tris-HClやアセテート、ホスフェート）、pH及びイオン強度の希釈剤、洗浄剤や可溶化剤（例えば、Tween 80やポリソルベート80）、抗酸化剤（例えば、アスコルビン酸やメタ亜硫酸ナトリウム）、保存剤（例えば、チメルソールやベンジルアルコール）等の添加剤や増量物質（例えば、ラクトースやマンニトール）を含む。材料はポリ乳酸やポリグリコール酸等のポリマー化合物の粒子状調製物に組み込んでよく、又はリポソームに組み込んでよい。また、ヒアルロン酸を用いることもできる。このような組成物は、本発明のタンパク質及び誘導体の物理的状態、安定性、インビボでの放出速度、及び、インビボでのクリアランス速度に影響を及ぼし得る。例えば、マーチン(Martin)、Remington's Pharmaceutical Sciences、第18版(1990、MacK Publishing Co.、ペンシルバニア州イーストン18042)、1435~1712頁参照(この文献を本明細書の一部を構成するものとしてここに援用する)。組成物は液体形態に調製してもよく、凍結乾燥形態等の乾燥粉末として調製してもよい。

10

【0147】

或いは、本発明のポリヌクレオチドを植物（例えば、トウモロコシ）での発現のために最適化することができる。最適化されたポリヌクレオチドを含有するプラスミドで植物を形質転換することができる。次いで、植物を成長させ、本発明のタンパク質を植物内で発現させるか、又は植物で最適化されたものを発現させる。その後、植物を回収し、本発明のタンパク質を含有する植物の部分を加工して動物用の飼料にする。この動物飼料を動物が食べると、B.ヒオディセンテリアに対する免疫が付与される。このような方法を詳述した先行技術の例は、米国特許第5,914,123号(アルンツェン(Arntzen)ら)、米国特許第6,034,298号(ラム(Lam)ら)及び米国特許第6,136,320号(アルンツェン(Arntzen)ら)に見出すことができる。

20

【0148】

本発明によって提供される医薬組成物が当該技術分野で公知の如何なる手段によっても投与し得ることは理解されるであろう。投与用医薬組成物を注射、経口、肺経路又は鼻腔経路で投与するのが好ましい。本明細書に記載のアミノ酸配列又は該配列由来の抗体は静脈内、動脈内、腹腔内、筋肉内又は皮下への投与経路によって送達されるのがより好ましい。或いは、適切に処方された本明細書に記載のアミノ酸配列又は該配列に由来の抗体は鼻腔又は経口投与によって投与することができる。

30

【0149】

本発明の具体的な実施形態においては、ワクチン組成物は、類似の機能的役割を有する本発明の一以上のポリヌクレオチド配列又はポリペプチド配列をワクチンと組み合わせた「混合ワクチン」であってもよい。例えば、次の4種類の異なる機能グループは、以下の表に示すように組み合わせることができる。

40

【0150】

グループ：プロテアーゼ

遺伝子	ポリヌクレオチド配列	ポリペプチド配列
NAV-H197	配列番号1	配列番号2
NAV-H188	配列番号3	配列番号4
NAV-H185	配列番号5	配列番号6
NAV-H179	配列番号7	配列番号8

【0151】

グループ：リパーゼ/ペプチダーゼ

遺伝子	ポリヌクレオチド配列	ポリペプチド配列
NAV-H191	配列番号9	配列番号10

50

NAV - H 1 8 6	配列番号 1 1	配列番号 1 2
NAV - H 1 8 4	配列番号 1 3	配列番号 1 4
NAV - H 4 6	配列番号 1 5	配列番号 1 6

【0152】

グループ：毒素

遺伝子	ポリヌクレオチド配列	ポリペプチド配列
NAV - H 1 7 7	配列番号 1 7	配列番号 1 8
NAV - H 7 2	配列番号 1 9	配列番号 2 0
NAV - H 6 6	配列番号 2 1	配列番号 2 2
NAV - H 4 0	配列番号 2 3	配列番号 2 4

10

【0153】

グループ：溶血素

遺伝子	ポリヌクレオチド配列	ポリペプチド配列
NAV - H 6 8	配列番号 2 5	配列番号 2 6
NAV - H 4 3	配列番号 2 7	配列番号 2 8
NAV - H 3 3	配列番号 2 9	配列番号 3 0
NAV - H 3 2	配列番号 3 1	配列番号 3 2

【0154】

混合ワクチンの必要条件は、競合（即ち抗原間での）がないことと、免疫対象の被験体に対する適合性が高いことである。免疫化に関連して適用される国際基準によると、混合ワクチンは、別々のワクチン接種で得られるものに匹敵する防御をもたらす必要がある。しかし、抗原を組み合わせることは複雑なプロセスであり、多くの問題や不確実性を伴う。

20

【0155】

混合ワクチンの個々の成分は不活性物質ではないため、種々の成分を組み合わせる単一混合物とした場合、個々の抗原成分の免疫原性に悪影響を及ぼし得る。例えば、電荷や化学残基、洗浄剤、ホルムアルデヒド、イオン濃度等の差に起因して、異なる抗原間の相互作用、又は抗原とこのようなワクチンに通常用いる他の成分との間の相互作用が生じ得る。このような変化は、異なる抗原を互いに接触させるか、又はその抗原をワクチン製剤に通常存在する他の物質と接触させた直後に生じ得る。また、このような変化は、混合後、例えば、貯蔵時や出荷時等に大幅に遅れて生じることもあり得る。しかし、個々の抗原を混合して単一の組合せにした際、該抗原の免疫原性がどの程度影響を受けるか予測することはできない。その結果、ワクチンの一以上の抗原が一以上の疾患に対して不十分な血清防御（seroprotection）をもたらすに過ぎないという状況が生じ、得られる製品が医療業務に適さないことにもなり得る。

30

【0156】

有効な混合ワクチンの製造は複雑であり、ワクチンの個々の成分間の多次元の相互作用に左右され、個々の成分を別々に投与した際に見られる如何なる作用も推定することができない。

【0157】

本発明に係る混合ワクチンは一以上の更なる抗原と組み合わせることができると共に、有効且つ安定に維持できることを見出した。

40

【0158】

本発明のコンテキストにおける「安定」とは、混合ワクチン製剤がその個別の抗原化合物の免疫原性や安定性に関して実質的な損失を伴わずに室温で8日間以上（好ましくは14日間）維持され得ることを意味する。安定性を高めるため、サッカロース等の安定剤をワクチン組成物に添加することができる。サッカロースに代えて又はサッカロースに加えて、他の安定剤（例えば、ヒト血清アルブミンやマンノース、トレハロース、マンニト、ポリゲリン）も安定剤として添加することができる。本発明のワクチンのpH値は5.0～8.0であるのが好ましく、6.0～7.0であるのがより好ましく、6.8～7.

50

8であるのが最も好ましい。

【0159】

本明細書における「有効」とは、本発明の配列を被験体（例えば、哺乳動物）に単回投与又は反復投与した際に特定の疾患に対する防御がもたらされるという事実を意味する。

【0160】

本明細書における「防御をもたらす」とは、本発明の配列を投与した際に、ワクチン接種された被験体において免疫応答が誘導され、その応答によって前記被験体をその後の感染症状から防御することができることを意味する。

【0161】

また、本発明は、B．ヒオディセンテリアに関連する疾患を調節する医薬を製造するための本発明のポリヌクレオチド配列の使用、及びその製造のための本発明に係るアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド配列にハイブリダイズ可能なアンチセンス配列及びリボザイムポリヌクレオチド配列の使用も包含する。

10

【0162】

治療方法に用いるアンチセンス構築物又はリボザイムをコードするポリヌクレオチド配列は、無被覆の核酸構築物として直接的に投与されるのが望ましい。細菌細胞による無被覆核酸構築物の取込みは幾つかの公知のトランスフェクション技法、例えば、トランスフェクション剤の使用を含む技法によって増進される。このような試薬の例としては、カチオン性剤（例えば、リン酸カルシウムやDEAE-デキストラン）及びリポフェクタントが挙げられる。通常、核酸構築物をトランスフェクション剤と混合して組成物を調製する。

20

【0163】

或いは、アンチセンス構築物又はリボザイムを薬学的に許容し得る担体又は希釈剤と混合して医薬組成物を調製することができる。好適な担体及び希釈剤としては、例えば、リン酸緩衝生理食塩水等の等張性生理食塩水溶液が挙げられる。組成物は、非経口、筋肉内、静脈内、皮下、眼内、経口又は経皮的に投与するように処方することができる。本明細書に記載の投与経路は単なる指針に過ぎず、当業者であれば、如何なる特定の動物や病態に関する最適な投与経路や投与量も容易に決めることができるであろう。

【0164】

また、本発明は、B．ヒオディセンテリア等のブラキスピラ種に感染した疑いのある動物をスクリーニングするためのキット、又は動物がB．ヒオディセンテリア等のブラキスピラ種に感染していることを確認するためのキットも包含する。本発明の更なる実施形態においては、専門家が用いるのに適したキットを調製し、感染した疑いのある動物内でのブラキスピラ種（例えば、B．ヒオディセンテリアやB．インターメディア、B．アルビニプリ、B．アアルボルギ、B．イノセンス、B．ムルドキイ、B．ピロシコリが挙げられるが、これらに限定されない）の有無を確認するか、又は、ブラキスピラ種（例えば、B．ヒオディセンテリアやB．インターメディア、B．アルビニプリ、B．アアルボルギ、B．ピロシコリが挙げられるが、これらに限定されない）の感染を定量的に測定することができる。上述の試験技法によると、このようなキットには、本明細書に記載のアミノ酸配列の内の1種が標識されたもの又はその結合パートナー（例えば、該アミノ酸配列に特異的な抗体）を少なくとも含有させ得ると共に、選択された方法（例えば、「競合」や「サンドイッチ」、「DASP」等）に応じた指示書を含むことができる。或いは、このようなキットには、本明細書に記載のポリヌクレオチド配列の内の1種の一部と相補的なポリヌクレオチド配列を少なくとも含有させ得ると共に、その使用説明書を含むことができる。また、このようなキットにはバッファーや安定剤等の周辺試薬も含有させ得る。

30

40

【0165】

従って、ブラキスピラ種（例えば、B．ヒオディセンテリアやB．インターメディア、B．アルビニプリ、B．アアルボルギ、B．イノセンス、B．ムルドキイ、B．ピロシコリが挙げられるが、これらに限定されない）の存在を検出するための検査キットには、次の構成要素、すなわち

50

(a) 本明細書に記載のアミノ酸配列の内の1種又はその特異的結合パートナーを検出可能ラベルに直接的又は間接的に付着させることによって得た所定量の少なくとも1種の標識された免疫化学反応性成分と、

(b) 他の試薬類と、

(c) 前記キットの使用指示書とを含有させ得る。

【0166】

より具体的には、診断用検査キットには、

(a) 一般には固相に結合されて免疫吸着剤を形成するか、或いは好適なタグに結合される既知量の明細書にて上述のアミノ酸配列の1種(又はその結合パートナー)、又は複数数のこのような最終産物等と、

(b) 必要に応じて他の試薬類と、

(c) 前記検査キットの使用指示書とを含有させ得る。

【0167】

更なる変形例においては、検査キットには、

(a) 本明細書に記載のアミノ酸配列の1種を検出可能ラベルに結合させることによって得た標識成分と、

(b) 1種以上の追加的免疫化学試薬であって、その内の少なくとも1種が、

(i) 標識成分(a)に結合可能なりガンド、

(ii) 標識成分(a)の結合パートナーに結合可能なりガンド、

(iii) 測定対象の成分の少なくとも1種に結合可能なりガンド、及び

(iv) 測定対象の成分の少なくとも1種の結合パートナーの少なくとも1種に結合可能なりガンドから成る群から選択されるリガンド又は固定リガンドである追加的免疫化学試薬と、

(c) 本明細書に記載のアミノ酸配列の1種とその特異的結合パートナーとの間の免疫化学反応の1種以上の成分を検出及び/又は測定するプロトコルを実行するための指示書とを含有させ得る。

【0168】

一実施形態においては、本発明は、広く使用されている血清試験用キットと同様の原理を用いた簡単なポイント・オブ・ケアキットを提供して、本発明のポリペプチドに対する動物内の循環抗体を迅速に検出し、医療従事者や獣医がブラキスピラ感染症を迅速に診断し、実証済みで有効的な治療対策や予防対策を迅速に行うことができるようにする。該キットの使用によって、ブラキスピラ感染症を発症する危険性のある動物全てに対するケアの基準が示され得る。

【0169】

また、本発明の方法及びキットによって、ブラキスピラ感染症(状態の変化を含む)を検出又はモニターするための手段も提供される。これは特に早期ブラキスピラ感染症を検出するのに有用である。従って、本発明は、医療従事者や獣医が治療中又は治療後のブラキスピラ感染症の進行(悪化、改善又は変化なし)をモニターするための手段も提供する。通常、医療従事者や獣医は、所定の間隔で動物から一定量の生体サンプルを採取し解析するプロトコルを確立するであろう。通常、サンプルは所定期間中に断続的に得る。断続的サンプリング間の時間は動物の病態によって決まり得るが、サンプリング間隔の範囲は、24時間毎から、数日間、数週間、更には数ヶ月の間隔までとり得る。

【0170】

本発明の方法で用いるポイント・オブ・ケアキットは通常、一以上の捕獲ポリペプチド(capture polypeptides)が付加された媒体を含んでおり、これによって、サンプルが媒体に接触すると捕獲ポリペプチドがサンプルに含まれる循環抗体に曝露される。該キットは取得手段を有しており、この手段は該媒体を含む表面を有する器具(例えば、針やバキューテナー)を含み得る。また、取得手段はサンプルを受け入れるための容器も含むことができ、この場合、該容器は該媒体を含む血清接触表面を有する。他の典型的な実施形態においては、循環抗体と捕獲ポリペプチドの複合体を検出するためのアッセイはELISA

10

20

30

40

50

でもよく、これを用いてサンプル内の本発明のポリペプチドに対する循環抗体の量を求めることができる。他の実施形態においては、取得手段は該媒体を含有するカセットを含む器具であってもよい。

【0171】

本発明のポリペプチドに対する循環抗体を検出するための本発明の方法及びキットの構築は、生体サンプル内の他のタンパク質やリガンドを迅速に検出するための当該技術分野で公知の方法及びキットを適合させて行うことができる。本発明に適合させ得る方法及びキットの例は、米国特許第5,656,503号(1997年8月12日、メイ(May)らに発行)、米国特許第6,500,627号(2002年12月31日、オコンナー(O'Conner)らに発行)、米国特許第4,870,007号(1989年9月26日、スミス-ルイス(Smith-Lewis)に発行)、米国特許第5,273,743号(1993年12月28日、アーレム(Ahlem)らに発行)及び米国特許第4,632,901号(1986年12月30日、ヴァルカーズ(Valkers)らに発行)に記載されているが、これらの文献は全て本明細書の一部を構成するものとしてここに援用する。

10

【0172】

本発明のポリペプチドに対する循環抗体を検出する迅速な一工程方法によって、ブラキスピラ感染症の発症を検出するための時間を短縮することができる。典型的な方法は次の工程、即ち、ブラキスピラ感染症の危険性又は疑いのある動物からサンプルを得る工程と、循環抗体の1種と特異的に結合する一以上の検出用ポリペプチドとサンプルの一部を混合して、サンプル内の循環抗体と検出用ポリペプチドとの結合を開始させる工程と、検出用ポリペプチドとは特異的に結合するが、交差反応しない固定化捕獲抗体(capture antibody)にサンプルと検出用ポリペプチドの混合物を接触させ、検出用ポリペプチドを循環抗体に結合させると共に、循環抗体を捕獲抗体に結合させて検出可能な複合体を形成する工程と、未結合の検出用ポリペプチドと未結合のサンプルを複合体から除去する工程と、複合体中の検出用ポリペプチドを検出する工程とを含み得る。当該技術分野でよく知られているように、検出可能なポリペプチドは、検出可能なマーカー(例えば、放射性ラベルや酵素、生物学的色素、磁気ビーズ、ビオチン)で標識することができる。

20

【実施例】

【0173】

以下の実施例は説明の目的のためであり、これらの実施例によって本発明の範囲が限定されるものではない。

30

【0174】

実施例1：ゲノム配列決定

オーストラリアのB.ヒオディセンテリア(WA1株)のブタ隔離集団に対してショットガン配列決定を行った。この株は十分に特徴付けされており、ブタの実験的感染後に病原性になることが分かっている。このスピロヘータを嫌気性トリプチケースソイブロス培地中で生育させ、臭化セチルトリメチルアンモニウム(CTAB)法を用いて100µgのDNAを抽出し、ゲノムDNAライブラリーの調製に適した高品質の染色体DNAを調製した。GeneMachines Hydroshearを用いてゲノムDNAを剪断し、得られたDNA断片をpSMARTベクターシステム(ルシジェン)の供給元が推奨するプロトコル通りに処理してクローニングを行った。小型挿入(2~3kb)ライブラリー及び中型挿入(3~10kb)ライブラリーを構築し、低コピー型のpSMARTベクターとした。

40

【0175】

実施例2：アノテーション

オーストラリアゲノム研究施設(AGRF)(クイーンズランド州)及びthe Centre for Bioinformatics and Biological Computing(CBBC)(マードック大学)によってB.ヒオディセンテリアの部分ゲノム配列を構築及びアノテートした。CBCBは主要な国際データベースの最新のミラーを用い、大型ゲノム配列における特徴のアノテーションのために最先端のバイオイン

50

フォーマティクスソフトウェア及び戦略を開発した。種々の公有のバイオインフォマティクスツールを用いて、データ解析上の品質保証手続きの一部として該配列を解析及び再解析した。オープンリーディングフレーム (ORF) は、GeneMark や GLIMMER、ORPHEUS、SELFID、GetORF 等の種々のプログラムを用いて予測した。推定 ORF は、BLAST や FASTA 等のサーチを用いて、既存の国際データベースとの相同性 (DNA 及びタンパク質) に基づき解析した。PSI-BLAST や FASTA、MOTIFS、FINDPATTERNS、PHD、SIGNALLP、PSORT 等のプログラムを用いて、予測された ORF の全てを解析し、その細胞局在を確認した。Interpro や Prosite、ProDom、Pfam、Blocks 等のデータベースを用いて、膜貫通ドメインやリーダーペプチド、公知の表面タンパク質に対する相同性、リポタンパク質サイン、外膜アンカーモチーフ、宿主細胞結合ドメイン等の表面関連タンパク質を予測した。系統発生や他の分子進化解析は同定された遺伝子及び他の種を用いて行い、機能の割り当ての補助とした。両方の部分配列決定ゲノムのインシリコ解析によって、入手し得る配列データに存在する予測 ORF 全ての包括的リストが得られた。予測分子量や等電点、疎水性、細胞内局在等の説明的情報について各 ORF を解析し、天然遺伝子産物のインビトロ特性を関連付けることができる。他の病原菌において表面局在化成分及び病原性因子同様のタンパク質をコードする予測遺伝子は、潜在的なワクチン標的として選択した。

10

【0176】

実施例 3 : PCR を用いた遺伝子分布の解析

20

標的遺伝子コード領域の異なる領域にアニールする 1 種又は 2 種のプライマー対を設計し、PCR 検出のために最適化した。B. ヒオディセンテリア標的遺伝子の分布解析は、B. ヒオディセンテリアの 2 3 株 (非病原性であることが分かっている 2 株を含む) に対して行った。分布解析に用いたプライマーセットを表 1 に示す。PCR 解析は、Taq DNA ポリメラーゼを用いて全量 25 μ L にて行った。増幅混合物は、1 x PCR バッファー (1.5 mM の MgCl₂ 含有)、1 U の Taq DNA ポリメラーゼ、0.2 mM の各 dNTP、0.5 μ M のプライマー対、及び 1 μ L の精製染色体鋳型 DNA で構成した。サイクリング条件は、94 で 5 分間の初期鋳型変性工程、次いで、94 で 30 秒間の変性を 30 サイクル、50 で 15 秒間のアニーリング、及び 72 で 1 分間のプライマー伸長とした。PCR 産物は、1 x TAE バッファー (40 mM の Tris - アセテート、1 mM の EDTA) 中 1% (w/v) アガロースゲルにて電気泳動に付し、1 μ g/mL の臭化エチジウム溶液で染色し、紫外 (UV) 光を用いて観察した。

30

【0177】

【表 1】

B. ヒオディセンテリアワクチン候補遺伝子のPCR分布解析に用いるオリゴヌクレオチドプライマー

遺伝子	プライマー名	プライマー配列 (5' - 3')	配列番号
NAV-H32	H32-F4	CATATTTCTGGTGATTCTC	配列番号33
	H32-R564	TTTTTTTGATAAATAAGTTTTTTTATTTG	配列番号34
NAV-H33	H33-F4	TTTAATACTCCTATATTATTAATTATTT	配列番号35
	H33-R396	AAGGAGAATCACCAGAAA	配列番号36
NAV-H40	H40-F16	AAATATGCTTCCATTATAGG	配列番号37
	H40-R1815	ACTTTTAGGAAGAAGTTTAAAC	配列番号38
NAV-H43	H43-F4	GATATAATTATAATAATAGTGTTAATAC	配列番号39
	H43-R1296	TTCAGTGTCTGAATCATTC	配列番号40
NAV-H46	H46-F327	TATGATGGGGCATAGTATGG	配列番号41
	H46-R769	TATCTCCTACAGGGTCTTTTCG	配列番号42
NAV-H66	H66-F17	ATGATAAAGCTTGGGAAGATTATC	配列番号43
	H66-R255	ATAATGTGTTTTACATCCAAC	配列番号44
NAV-H68	H68-F53	TTATGCTCTGTGCTTTATTTTCTGG	配列番号45
	H68-R596	TCTTTTATTATTCCTTCTTTATGCC	配列番号46
NAV-H72	H72-F128	CTATGGCAGAAAACAAAGTC	配列番号47
	H72-R614	GCAGATAAAGATAAATCAAGTC	配列番号48
NAV-H177	H177-F20	AAAGAGCTTGGCAG	配列番号49
	H177-R258	CTTATCATAATGGTATTTACAAGATG	配列番号50
NAV-H179	H179-F420	TGCTATTGCTGATGCTACTAC	配列番号51
	H179-R705	ATTATCTTGATGAGGATGCTTTC	配列番号52
NAV-H184	H184-F314	TAGATAAAGATGATGATGAAAAAAG	配列番号53
	H184-R762	AAATAAACCTAAATAAGCACC	配列番号54
NAV-H185	H185-F294	TGGGTTTAGAATAGGTGCAGG	配列番号55
	H185-R796	ATTTTAATGTTTGTCTTTTTTGC	配列番号56
NAV-H186	H186-F44	TAGAAAAGATGCCTATGCTG	配列番号57
	H186-R718	TTACAAGAGAAAAATAAACCTG	配列番号58
NAV-H188	H188-F293	TGGGGAATCATACAAATAGAAG	配列番号59
	H188-R565	GGCTCATCAAAGGAAGAACC	配列番号60
NAV-H191	H191-F8	ATAATAAAAAAGAAAGAAAAAGAG	配列番号61
	H191-R403	GTCTGTATCCTAATAAAATAGTATG	配列番号62
NAV-H197	H197-F39	TCTTGGGCTTACATTTACTTTG	配列番号63
	H197-R354	TGATTTCTGACTTCTTTTTTTG	配列番号64

10

20

【0178】

実施例4：バイオインフォマティクス

B. ヒオディセンテリアゲノムのショットガン配列決定によって、該ゲノムの73% (予測される2300kbの内2347.8kb)の配列を決定した。これらの配列は171個のコンティグ(平均コンティグサイズは13.7kb)から成る。171個のコンティグから1860個のオープンリーディングフレーム(ORF)が予測される。予測ORFを核酸及びタンパク質データベースに存在する遺伝子と比較することによって、各種における約70%がデータベースに含まれる遺伝子と同一性を有することが分かった。各ゲノムから予測されるORFの残りの30%は公知の同一性を有しなかった。

30

【0179】

実施例5：ワクチン候補

公的データベースに存在する推定病原性関連タンパク質に対して強い同一性を示すORFをワクチン標的として選択した。表2には、ワクチン標的として選択した遺伝子を示すと共に、その遺伝子と他の公知の遺伝子との類似度を示す。

40

【0180】

【表 2】

スイスプロット・データベースから得た類似の細菌タンパク質のアミノ酸配列との類似度に基づくB. ヒオディセンテリア遺伝子の機能

遺伝子	機能	同一性 (アミノ酸)	類似度 (アミノ酸)
NAV-H32	溶血素 ノストック s.p. の溶血性タンパク質 (HlpA) ヌクレオチド配列 配列番号 25 アミノ酸配列 配列番号 26	49/137 (35%)	77/137 (56%)
NAV-H33	溶血素 プレボテラ・インターメディアの溶血性タンパク質 ヌクレオチド配列 配列番号 27 アミノ酸配列 配列番号 28	64/117 (54%)	83/117 (70%)
NAV-H40	毒素 溶解性ムレイントランスグリコシラーゼ (LysM/インペシンド メイン含有) ヌクレオチド配列 配列番号 19 アミノ酸配列 配列番号 20	120/449 (26%)	185/449 (41%)
NAV-H43	溶血素 アナベナ・バリアピリスの溶血素及び関連タンパク質 ヌクレオチド配列 配列番号 29 アミノ酸配列 配列番号 30	150/425 (35%)	242/425 (56%)
NAV-H46	リパーゼ リゾホスホリパーゼ ヌクレオチド配列 配列番号 15 アミノ酸配列 配列番号 16	116/299 (38%)	188/299 (62%)
NAV-H66	毒素 大腸菌の毒素 (YoeB) ヌクレオチド配列 配列番号 21 アミノ酸配列 配列番号 22	42/85 (58%)	60/85 (76%)
NAV-H68	溶血素 デハロコッコイデス s.p. の溶血素関連タンパク質 ヌクレオチド配列 配列番号 31 アミノ酸配列 配列番号 32	121/415 (29%)	204/415 (49%)
NAV-H72	毒素 溶解性ムレイントランスグリコシレート (外膜結合の可能性有り) ヌクレオチド配列 配列番号 23 アミノ酸配列 配列番号 24	51/141 (36%)	6/141 (53%)
NAV-H177	毒素 アクチノバチルス・ブルロニューモニアの毒素 (YoeB) ヌクレオチド配列 配列番号 17 アミノ酸配列 配列番号 18	44/86 (51%)	64/86 (74%)
NAV-H179	プロテアーゼ ATP依存性 ClpXプロテアーゼ ヌクレオチド配列 配列番号 1 アミノ酸配列 配列番号 2	227/388 (58%)	291/388 (75%)
NAV-H184	ペプチダーゼ ヌクレオチド配列 配列番号 9 アミノ酸配列 配列番号 10	148/445 (33%)	241/445 (54%)
NAV-H185	プロテアーゼ 膜関連亜鉛メタロプロテアーゼ ヌクレオチド配列 配列番号 3 アミノ酸配列 配列番号 4	199/455 (43%)	289/455 (63%)
NAV-H186	ペプチダーゼ Zn依存性ペプチダーゼ ヌクレオチド配列 配列番号 11 アミノ酸配列 配列番号 12	132/406 (32%)	234/406 (57%)
NAV-H188	プロテアーゼ アデニル酸シクラーゼ ヌクレオチド配列 配列番号 5 アミノ酸配列 配列番号 6	147/509 (28%)	269/509 (52%)
NAV-H191	リパーゼ ヌクレオチド配列 配列番号 13 アミノ酸配列 配列番号 14	70/223 (31%)	117/223 (52%)
NAV-H197	プロテアーゼ トリプシン様セリンプロテアーゼ ヌクレオチド配列 配列番号 7 アミノ酸配列 配列番号 8	184/445 (41%)	267/445 (60%)

10

20

30

40

【0181】

実施例 6：遺伝子分布

各ORFの全体遺伝子分布を表3にまとめる。計23種のB. ヒオディセンテリア株を解析した。最大2種類のプライマーセットを用いたPCRの累積結果から分布を決定した。ORFの全ては、試験したB. ヒオディセンテリア株の87~100%に存在した。

【0182】

【表 3】

23種類の株のパネルを用いたPCRによって解析したB. ヒオディセンテリアワクチン候補の遺伝子分布

遺伝子	分布 (%)
NAV-H32	91
NAV-H33	91
NAV-H40	100
NAV-H43	91
NAV-H46	100
NAV-H66	100
NAV-H68	91
NAV-H72	87
NAV-H177	91
NAV-H179	100
NAV-H184	100
NAV-H185	100
NAV-H186	100
NAV-H188	100
NAV-H191	100
NAV-H197	100

10

20

【0183】

実施例7：プラスミド抽出

pET-19bプラスミド(ノバジェン)を有する大腸菌JM109クローンをグリセロールストック保存から、100mg/Lのアンピシリンを追加したLuria-Bertani(LB)寒天プレート上にストリークし、37℃で16時間インキュベートした。100mg/Lのアンピシリンを添加した10mLのLB培地に単一コロニーを接種し、振盪させながら培地を37℃で12時間インキュベートした。一晚培養液の全量を5000×gで10分間遠心分離し、細胞に含まれるプラスミドをQIAprep Spin Miniprep Kit(キアゲン)を用い、製造業者の指示に従って抽出した。蛍光計を用いて精製プラスミドを定量し、TE(10mMのTris-HCl、1mMのEDTA、pH8.0)バッファーで希釈してDNA濃度を100μg/mLに調整した。精製pET-19bプラスミドは-20℃で保存した。

30

【0184】

実施例8：ベクター調製

50mMのTris-HCl(pH7.5)、100mMのNaCl、10mMのMgCl₂、0.1mg/mLのウシ血清アルブミン(BSA)及び5UのNdeIとBamHI(ファーマンタス)を含有する全量50μLにて2μgの精製pET-19bプラスミドを37℃で1~4時間消化した。直鎖化されたベクターの確認は、1μLの消化反応物を1×TAEバッファー中1%(w/v)アガロースゲルにて90Vで1時間電気泳動させることによって行った。電気泳動したDNAを1μg/mLの臭化エチジウムで染色し、UV光を用いて観察した。

40

【0185】

直鎖化pET-19bベクターをUltraClean PCR Clean-up Kit(Mo Bio Laboratories)を用い、製造業者の指示に従って精製した。精製した直鎖化ベクターをNanoDrop ND1000分光光度計を用いて定量し、TEバッファーで希釈してDNA濃度を50μg/mLに調整した。直鎖化ベクターは-20℃で保存した。

50

【 0 1 8 6 】

実施例 9 : インサート調製 - プライマー設計

プライマー対の設計は、標的遺伝子のコード領域をできる限り増幅するように行った。全てのプライマー配列は、得られるアンプリコンの直線化 p E T - 1 9 b ベクターへの付着末端連結を可能とする末端制限酵素認識部位を含む。クローニングに用いるプライマー配列を表 4 に示す。A m p l i f y 3 . 0 (ウィスコンシン大学) を用いてプライマーを試験し、理論的アンプリコン配列を p E T - 1 9 b ベクター配列の適切な位置に挿入した。キメラ p E T - 1 9 b 発現カセットの推定翻訳は V e c t o r N T I A d v a n c e バージョン 1 0 (インビトロジェン) を用いて行い、遺伝子インサートが正しいリーディングフレーム内にあるかどうか確認した。

【 0 1 8 7 】

【表 4 - 1】

pET-19bベクターへのB. ヒオディセンテリア遺伝子のクローニングに用いるオリゴヌクレオチドプライマー（見掛け分子量はSDS-PAGEにより決定）

遺伝子	プライマー名	プライマー配列 (5' - 3')	天然タンパク質の 予測MW (Da)	組換えタンパク 質の見掛けMW (kDa)
NAV-H32	H32-F-NdeI	TATGCATATGCTCTGGTGATTCTC CTTTAG (配列番号65)	25, 326	20.5
	H32-R-BamHI	TGCGGATCCTTTTTTGATAAATA AG (配列番号66)		
NAV-H33	H33-F-NdeI	GGAAGATAACATATGTTTAATAC TC (配列番号67)	18, 465	13.9
	H33-R-BamHI	TCCTAGGATCCTATCTAAAGGAG AATCACCAG (配列番号68)		
NAV-H40	H40-F-NdeI	AAATATGCATATGTTATAGGATG CACTTTTGCCTC (配列番号69)	69, 479	61.4
	H40-R-BamHI	CTTTTAGGATCCAGTTTAACAGG ATCTATTGATC (配列番号70)		
NAV-H43	H43-F-NdeI	AATCCATATGGATATAATTATAA TAATAGTGTTAATAC (配列番号71)	51, 176	48.4
	H43-R-BamHI	ATCTGGATCCTATTCAGTGTCTG AATCATTCTTTTCATCAG (配列番号72)		
NAV-H46	H46-F-NdeI	CTTCATATGGAAATGCTTAATAG AGTTTTAATATCAG (配列番号73)	38, 153	32.2
	H46-R-BamHI	AATAGGATCCTATATGAGCATTA AGCCAAGCAATTATC (配列番号74)		
NAV-H66	H66-F-NdeI	ATTTTCATATGATAAAGCTTGGGA AGATTATC (配列番号75)	12, 678	10.9
	H66-R-BamHI	AATTGGATCCATAATGTGTTTTA CATCCAAC (配列番号76)		
NAV-H68	H68-F-NdeI	ATTACATATGGAAATACTACTAG TTTATTTATTTG (配列番号77)	55, 123	50.4
	H68-R-BamHI	CATTGGATCCTGAATCAGATGTC TCTTGATAT (配列番号78)		
NAV-H72	H72-F-NdeI	GATACATATGATACAAAGAATAC ATGCCAGAATAG (配列番号79)	28, 201	24.6
	H72-R-BamHI	ATGTGGATCCCATAGTTTTGAGT TTCTC (配列番号80)		
NAV-H177	H177-F-NdeI	GTTTCATATGAAAGAGCTTGGCA G (配列番号81)	12, 997	10.8
	H177-R-BamHI	ATATGGATCCCTTATCATAATGG TATTTACAAGATG (配列番号82)		

10

20

30

40

【0188】

【表 4 - 2】

NAV-H179	H179-F-NdeI	TTAACATATGGTTCTCTTTGCGG AAGAG (配列番号83)	48,109	54.6	
	H179-R-BamHI	TTAGGATCCCATCAATACCTAAT TTTTCATTAAC (配列番号84)			
NAV-H184	H184-F-NdeI	TTAACATATGTCAGAGAATAGTT TTAAAAATAGAATAAAAG (配列番号85)	53,101	57.2	
	H184-R-BamHI	TTAAGGATCCGAAGCAAATGAAA GTTCTTTAATC (配列番号86)			
NAV-H185	H185-F-NdeI	TTTTTCATATGGCACAACTAATG AATCAGCTATATT (配列番号87)	58,175	67.8	
	H185-R-BamHI	TTAAGGATCCGTTAAGCAGCACC AGAGAATTATAATC (配列番号88)			
NAV-H186	H186-F-NdeI	CTTACATATGGGAACAAGAGTTG TTTTAGAAAAGATG (配列番号89)	49,786	56.1	
	H186-R-BamHI	ACTGGGATCCGACTTGCTTATAT CCTTAGTACCG (配列番号90)			
NAV-H188	H188-F-NdeI	TAATCATATGATGTACAGTCAGG TTATGATAG (配列番号91)	64,413	68.8	
	H188-R-BamHI	ACTGGGATCCTGTACCGACATTC TCTTCAC (配列番号92)			
NAV-H191	H191-F-NdeI	AAAGCATATGGAAGAAAAAAAT CCAAATTGGAAAG (配列番号93)	36,953	37.8	
	H191-R-BamHI	ATACGGATCCAATATATGTTTAC TGTCATAGCCTC (配列番号94)			
NAV-H197	H197-F-NdeI	TTTTTCATATGCTTGGGCTTACAT TTACTTTGGTTGG (配列番号95)	56,670	66.6	
	H197-R-BamHI	ATAAGGATCCCATAAGTCATTCT TGCTCGTTTTATAG (配列番号96)			

10

20

30

【0189】

実施例10：遺伝子インサートの増幅

Taq DNAポリメラーゼ及びPfu DNAポリメラーゼを用いた全量100 μ LにおけるPCRによって、全ての標的遺伝子インサートを増幅した。即ち、増幅混合物は、1 \times PCRバッファー(1.5mMのMgCl₂含有)、2UのTaq DNAポリメラーゼ、0.01UのPfu DNAポリメラーゼ、0.2mMの各dNTP、0.5 μ Mの適切なプライマー対、及び1 μ Lの精製染色体DNAから構成された。染色体DNAは、ゲノム配列決定に用いたのと同じB.ヒオディセンテリア株から調製した。サイクリング条件は、94 $^{\circ}$ Cで5分間の初期鑄型変性ステップ、次いで、94 $^{\circ}$ Cで30秒間の変性を30サイクル、50 $^{\circ}$ Cで15秒間のアニーリング、及び72 $^{\circ}$ Cで1分間のプライマー伸長とした。PCR産物を、1 \times TAEBuffer中1%(w/v)アガロースゲルにて電気泳動し、1 μ g/mLの臭化エチジウム溶液で染色し、UV光を用いて観察した。正しいサイズのPCR産物の存在を確認した後、UltraClean PCR Clean-up Kit(Mo Bio Laboratories)を用いてPCR反応物を精製した。

40

【0190】

実施例11：遺伝子インサートの制限酵素消化

30 μ Lの精製PCR産物の消化は、1UのNdeI及び1UのBamHIを用い、全

50

量 50 μ L にて行った。消化したインサートDNAはUltraClean PCR Clean-up Kit (Molecular Laboratories) を用いて精製した。精製した消化インサートDNAをNanoDrop ND1000分光光度計を用いて定量し、TEバッファーで希釈してDNA濃度を10 μ g/mLに調整した。精製した制限インサートDNAは直ちに用いてベクターとのライゲーションを行った。

【0191】

実施例12：pET-19Bベクターへの遺伝子インサートのライゲーション

連結反応は全て全量20 μ Lにて行った。1UのT4 DNAリガーゼ(ファーマンタス)を含有する30mMのTris-HCl (pH7.8)、10mMのMgCl₂、10mMのDTT及び1mMのATPにて25ngの直線化pTrcHisを等モル量の制限インサートと共に16 で16時間インキュベートした。インサートDNAを含まない同一の連結反応も、ベクター再環状化の陰性対照として行った。

10

【0192】

実施例13：pET-19B連結物の大腸菌JM109細胞への形質転換

コンピテント大腸菌JM109細胞を-80 保存から氷上で解凍した後、5 μ Lの一晚ライゲーション反応物を含有する氷冷1.5mLのマイクロチューブ内に50 μ Lの該細胞を移した。ベンチ上で各チューブの底を穏やかに叩いて混合し、氷上で30分間放置した。次いで、チューブを42 の水浴に45秒間入れて細胞に熱ショックを与えた後、チューブを2分間氷に戻した。形質転換細胞を1mLのLBプロスに回収し、37 で1時間穏やかに混合した。回収した細胞を2500 \times gで5分間収集し、50 μ Lの新しいLBプロスにて再懸濁させた。全量50 μ Lの再懸濁細胞は、100mg/Lのアンプシリンを含有するLB寒天プレート上に滅菌ガラス棒を用いて均一に塗布した。プレートを37 で16時間インキュベートした。

20

【0193】

実施例14：PCRによる大腸菌中の組換えpET-19b構築物の検出

100mg/Lのアンプシリンを含有する新しいLB寒天プレート上に各構築物の12個の単一形質転換体コロニーをストリークし、37 で16時間インキュベートした。各形質転換イベント由来の単一コロニーを50 μ LのTEバッファーにて再懸濁させ、1分間煮沸した。2 μ Lの煮沸した細胞をPCRの鋳型として用いた。増幅混合物は、1 \times PCRバッファー(1.5mMのMgCl₂含有)、1UのTaq DNAポリメラーゼ、0.2mMの各dNTP、0.5 μ MのpET-19b-Fプライマー(5'-GGAA TTGTGAGCGGATAAC-3')及び0.5 μ MのpET-19b-Rプライマー(5'-GCAAAAACCCCTCAAGAC-3')の構成とした。サイクリング条件は、94 で5分間の初期鋳型変性ステップ、次いで、94 で30秒間の変性を30サイクル、60 で15秒間のアニーリング、及び72 で1分間のプライマー伸長とした。PCR産物は、1 \times TAEバッファー中1%(w/v)アガロースゲルにて電気泳動し、1 μ g/mLの臭化エチジウム溶液で染色し、UV光を用いて観察した。

30

【0194】

実施例15：組換えpET-19bプラスミドの精製

連結を完了させたpET-19bプラスミドを有する大腸菌JM109クローンを100mg/Lのアンプシリンを添加した5mLのLBプロスに接種し、このプロス培地を振盪させながら37 で12時間インキュベートした。一晚培養液の全量を5000 \times gで10分間遠心分離し、細胞に含まれるプラスミドをQIAprep Spin Mini prep Kit(キアゲン)を用い、製造業者の指示に従って抽出した。精製した組換えpET-19bプラスミドは-20 で保存した。

40

【0195】

実施例16：組換えpET-19bプラスミドの大腸菌BL21(DE3)細胞への形質転換

コンピテント大腸菌BL21(DE3)細胞を-80 保存から氷上で解凍した後、1 μ Lの組換え精製pET-19bプラスミドを含有する氷冷1.5mLのマイクロチュー

50

ブ内に20 μ Lの該細胞を移した。ベンチ上で各チューブの底を穏やかに叩いて混合し、氷上で30分間放置した。次いで、チューブを42 $^{\circ}$ Cの水浴に45秒間入れて細胞に熱ショックを与えた後、チューブを2分間氷に戻した。形質転換細胞を、1mLのLBブロスに回収し、37 $^{\circ}$ Cで1時間穏やかに混合した。50 μ Lの回収細胞を、100mg/Lのアンピシリンを含有するLB寒天プレート上に滅菌ガラス棒を用いて均一に塗布した。プレートを37 $^{\circ}$ Cで16時間インキュベートした。

【0196】

実施例17：組換えHisタグタンパク質の発現

大腸菌BL21(DE3)中の組換えpET-19bプラスミドの4個の単離コロニーを、100mg/Lのアンピシリン及び1mMのIPTGを含有する10mL遠心チューブ内の3mLのLBブロスに接種し、振盪させながら37 $^{\circ}$ Cで16時間インキュベートした。遠心分離を5000 \times g、4 $^{\circ}$ Cで10分間行って細胞を回収した。上清を廃棄し、各ペレットを300 μ Lの1 \times SDS-PAGE負荷バッファー(250mMのTris-HCl(pH6.0)、8%w/vのSDS、200mMのDTT、40%v/vのグリセロール及び0.04%w/vのプロモフェノールブルー)中に再懸濁した。チューブを5分間煮沸した後、細胞片を遠心分離(10000 \times g、10分間、4 $^{\circ}$ C)しペレット状にした。上清を新しいチューブに移し、解析を行うまで-20 $^{\circ}$ Cで保存した。

【0197】

実施例18：SDS-PAGE

タンパク質のSDS-PAGE解析は不連続Tris-グリシンバッファー系を用いた電気泳動分離で行った。10 μ Lの調製細胞ライセートをポリアクリルアミドゲルのウェル内にロードした。ゲルは濃縮用ゲル(125mMのTris-HCl(pH6.8)、4%w/vのアクリルアミド、0.15%w/vのビスアクリルアミド及び0.1%w/vのSDS)と分離用ゲル(375mMのTris-HCl(pH8.8)、12%w/vのアクリルアミド、0.31%w/vのビスアクリルアミド及び0.1%w/vのSDS)から構成させた。0.1%(v/v)のTEMEDと0.05%(w/v)の新しく調製した硫酸アンモニウム溶液を添加してこれらのゲルを重合させ、ミニプロティアン二重スラブセル(パイオ・ラッド)に流し込んだ。サンプルを室温(RT)、150Vでプロモフェノールブルー色素フロントがゲルの底部に到達するまで反応させた。分子量の推定値を得るため、予め染色した分子量マーカーをサンプルと並行して電気泳動させた。電気泳動後、直ちにゲルをクーマシーブリリアントブルーG250を用いて染色するか、又はウェスタンブロットティング用ニトロセルロース膜にエレクトロブロットした。

【0198】

実施例19：ウェスタンブロット解析

Towbinトランスファーバッファー系を用い、SDS-PAGEゲルから分離したタンパク質をニトロセルロース膜にエレクトロブロットした。ブロットティング後、トランスファーバッファー(25mMのTris、192mMのグリシン、20%v/vのメタノール、pH8.3)中でゲルを15分間平衡化させた。ミニプロティアントランスブロット装置(パイオ・ラッド)を用いてゲル中のタンパク質をニトロセルロース膜に移動させた。製造業者の指示に従ってゲルホルダーを組み立てた後、30V、4 $^{\circ}$ Cで一晩電気移動を行った。分離タンパク質を含有する新しく移動したニトロセルロース膜を、5%(w/v)の脱脂粉乳を含有する10mLのトリス緩衝生理食塩水(TBS; 20mMのTris-HCl、500mMのNaCl、pH7.5)によってRTで1時間ブロッッキングした。膜を0.1%(v/v)Tween20含有TBS(TBST)で洗浄した後、10mLのマウス抗his抗体(TBSTで5000倍希釈)と共に室温で1時間インキュベートした。TBSTで3回、5分間洗浄した後、膜をTBSTで5000倍希釈した10mLのヤギ抗マウスIgG(全分子)-APと共に室温で1時間インキュベートした。アルカリホスファターゼ基質キット(パイオ・ラッド)を用いて膜を発色させた。膜を蒸留水で洗浄することによって発色反応を停止させた。次いで、膜を乾燥し、プレゼンテーション用にスキャンした。

10

20

30

40

50

【0199】

実施例20：組換えHisタグタンパク質の発現及び精製

大腸菌BL21(DE3)中の組換えpET-19bプラスミドの単一コロニーを50 mLの遠心チューブ内の100 mg/Lのアンプシリンを含有する20 mLのLBブロスに接種し、振盪させながら37 °Cで16時間インキュベートした。100 mg/Lのアンプシリンを追加した500 mLのLBブロスを含む2 Lコニカルフラスコに10 mLの一晚培養物を接種し、37 °Cで、細胞の光学密度が600 nmで0.5になるまで(約3~4時間)インキュベートした。次いで、IPTGを最終濃度が1 mMになるまで添加して培養物を誘導し、細胞を振盪させながら37 °Cに戻した。6時間の誘導後、培養物を2個の250 mLの遠心ボトルに移し、ボトルを5000 × g、25 °Cで10分間遠心分離させた。上清を廃棄し、各ペレットを4 mLのNi-NTA天然溶解バッファー(50 mMのNaH₂PO₄、300 mMのNaCl、10 mMのイミダゾール、pH 8.0)で再懸濁させた。再懸濁した細胞をプールし、-20 °Cで一晩保存した。

10

【0200】

細胞浮遊液を-20 °C保存から取り出し、氷上で解凍した。解凍したライセートに5 μLのDNAアーゼI(10 mg/mL)を添加し、氷上で1時間インキュベートした。ライセートを20000 × g、4 °Cで15分間遠心分離した。上清は、総体積1 mLのNi-NTAアガロース樹脂(キアゲン)を含有する10 mLのカラムに移した。回転混合を行いながら、組換えHisタグタンパク質を該樹脂に4 °Cで1時間結合させた。次いで、樹脂を30 mLのNi-NTAネイティブ洗浄バッファー(50 mMのNaH₂PO₄、300 mMのNaCl、20 mMのイミダゾール、pH 8.0)でネイティブ洗浄した後、9 mLのNi-NTAネイティブ溶出バッファー(50 mMのNaH₂PO₄、300 mMのNaCl、250 mMのイミダゾール、pH 8.0)で溶出させた。溶出液の3画分(3 mL)を回収して4 °Cで保存した。30 μLの各溶出液を10 μLの4 × サンプル処理バッファーで処理し、5分間煮沸した。サンプルをSDS-PAGEに付し、クーマシーブリリアントブルーG250で染色した。染色したゲルを蒸留水で1時間平衡化させ、2枚のセルロースシートに挟みRTで一晩乾燥させた。

20

【0201】

実施例21：精製組換えHisタグタンパク質の透析及び凍結乾燥

溶出したタンパク質をプールし、分子量3500 Daカットオフ(MWCO)の水和透析チューブに移した。プールした溶出液のアリコート(200 μL)を採取し、市販のプロテインアッセイ(バイオ・ラッド)を用いて定量した。タンパク質を2 Lの蒸留水に対して4 °Cで攪拌しながら透析した。透析バッファーを12時間間隔で8回交換した。透析したタンパク質を透析チューブから50 mL遠心チューブ(最大容量：40 mL)に移し、該チューブを-80 °Cで一晩置いた。チューブを凍結乾燥機に入れ、凍結乾燥して乾固させた。次いで、凍結乾燥したタンパク質をPBSで再水和して推定濃度を2 mg/mLとし、-20 °Cで保存した。

30

【0202】

実施例22：組換えタンパク質を用いた血清学的解析

10 μgの精製組換えタンパク質を10 mLの炭酸バッファーにて希釈し、96ウェルマイクロタイタープレートの各ウェルに100 μLずつ添加した。4 °Cで一晩タンパク質をコートさせた。プレートのブロックの各ウェルにPBS-BSA(1% w/v)を150 μL添加し、混合しながら室温(RT)で1時間行った後、150 μLのPBST(0.05% v/v)で3回洗浄した。ブタ血清を100 μLのPBST-BSA(0.1% w/v)にて1:800に希釈し、混合しながらRTで2時間インキュベートした。プレートを洗浄した後、PBSTにて1:5000に希釈したヤギ抗ブタIgG(全分子)-HRP(100 μL)を添加した。室温で1時間インキュベートした後、プレートを洗浄し、100 μLのTMB基質を添加した。室温で10分間発色を生じさせた後、50 μLの1 M硫酸を添加して発色を停止させた。各ウェルの光学密度を450 nmで読み取った。給源及び健康状態が異なるブタ由来のプールした血清をこの解析に用いた。健康状態の

40

50

良好な群れ由来のブタ (N 1 - N 3)、過免疫ブタ (M 1 - M 3)、実験的に免疫したブタ (H 1 - H 5)、及び異なる群れ由来の回復したブタ (H 6 - H 1 3)を用いた。

【0203】

表5A及び5Bに示すように、全てのタンパク質はB.ヒオディセンテリア細菌で過免疫したブタ由来の血清と強く反応した (M 1 : 1.5077 ± 0.1635) 一方、B.ピロシコリで過免疫したブタ由来の血清 (M 2 : 1.1646 ± 0.1206) やB.イノセンスで過免疫したブタ由来の血清 (M 3 : 1.2777 ± 0.1626) とはあまり強く反応しなかったが、これは、他のブラキスピラspp.を認識するブタとのある程度の交差反応性を示す。タンパク質は健康状態良好ブタ由来の血清と最も弱く反応し (N 1 - N 3 : 0.2087 ~ 0.4695)、実験的に免疫した急性重篤SD症状を示すブタの場合がこれに続き (H 1 - H 5 : 0.4586 ~ 0.7992)、SDから回復したブタの場合が最も強く反応した (H 6 - H 1 3 : 0.8043 ~ 1.0068)。概して、上述の結果から、これらの毒素タンパク質は全て、自然感染したブタや実験的に感染させたブタにおいて免疫原性であることが分かる。

10

【0204】

【表5A】

健常なブタの血清及び過免疫ブタの血清に対する毒素タンパク質の反応性

タンパク質	ELISA反応性 (吸光度)					
	N1	N2	N3	M1	M2	M3
H32	0.2717	0.3117	0.2952	1.5901	1.3577	1.3059
H33	0.4091	0.2087	0.4378	1.4951	1.1724	1.1682
H40	0.2555	0.4695	0.3649	1.4227	1.0322	1.2454
H43	0.3619	0.4015	0.2229	1.5621	1.1762	1.2901
H46	0.4477	0.4233	0.4080	1.4551	1.0495	1.3666
H66	0.3879	0.3948	0.3532	1.5907	1.1884	1.2712
H68	0.4324	0.3032	0.4305	1.4700	1.3013	1.2538
H72	0.4063	0.3464	0.3994	1.4398	1.1234	1.3686
H177	0.3120	0.2691	0.2416	1.4369	1.0888	1.1734
H184	0.3122	0.4090	0.3337	1.5272	1.1815	1.3018
H186	0.4182	0.2953	0.3807	1.5170	1.0628	1.3069
H191	0.2279	0.4236	0.3064	1.5856	1.2405	1.2804

20

N 1、N 2、N 3 : 良好健康状態ブタ由来のプールした血清 ; M 1 : B.ヒオディセンテリア細菌で過免疫したブタ由来の血清 ; M 2 : B.ピロシコリ細菌で過免疫したブタ由来の血清 ; M 3 : B.イノセンス細菌で過免疫したブタ由来の血清

30

【0205】

【 表 5 B 】

自然感染したブタ及び実験的に感染させたブタの血清に対する毒素タンパク質の反応性

タンパク質	ELISA反応性 (吸光度)												
	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	H13
H32	0.4833	0.6912	0.5262	0.6574	0.7546	0.9813	0.9178	0.9255	0.9175	0.9818	0.8449	0.9348	0.9648
H33	0.5222	0.5676	0.6789	0.7410	0.6260	0.8055	0.9209	0.9399	1.0015	0.9940	0.9935	0.8112	0.9104
H40	0.5420	0.5971	0.7517	0.6687	0.7598	0.9529	0.8589	0.9741	0.9707	0.9547	0.9941	0.8493	0.9247
H43	0.7525	0.7265	0.6551	0.7322	0.6341	0.9296	0.8495	0.9727	0.8595	0.8740	0.8904	0.8561	0.9640
H46	0.5805	0.6675	0.7590	0.4625	0.7028	1.0068	0.8821	0.8777	1.0061	0.8220	0.8861	0.9881	0.9221
H66	0.7491	0.4752	0.5211	0.7666	0.6005	0.9489	0.9014	0.9198	0.9346	0.8687	0.9511	0.8935	0.9807
H68	0.5704	0.4900	0.6527	0.7199	0.6310	0.9498	0.8224	0.8103	0.9700	0.8518	0.9759	0.8348	0.9201
H72	0.7278	0.5590	0.7650	0.6436	0.7045	0.8182	0.8109	0.9585	0.8662	0.9753	0.9535	0.8751	0.8683
H177	0.6225	0.7260	0.6126	0.4586	0.6151	0.8633	0.9477	0.9244	0.8944	0.9351	0.9108	0.9347	0.9111
H184	0.7287	0.7513	0.6898	0.7992	0.7451	0.8312	0.9383	0.8721	0.8894	0.8818	0.9832	0.8301	0.9998
H186	0.5169	0.5928	0.5295	0.7065	0.7003	0.8853	0.9182	0.9092	0.9155	0.9253	0.8836	0.8453	0.8878
H191	0.6753	0.5940	0.6794	0.7840	0.7252	0.8043	0.9727	0.8179	0.8280	0.9880	0.9468	0.9598	0.8049

H1、H2、H3、H4、H5：実験的に感染させた急性重篤なSD臨床徴候を示すブタ由来のプールした血清
H6、H7、H8、H9、H10、H11、H12、H13：SDから回復した商業用ブタ由来のプールした血清

【 0 2 0 6 】

10

20

30

40

50

実施例 23 : 組換え p E T - 1 9 b 構築物の構築

p E T - 1 9 b 発現ベクター内へ種々のインサートをクローニングすることによって、各種サイズの組換え構築物が得られた。p E T - 1 9 b 構築物のヌクレオチド配列決定によって、発現カセットが構築物全ての正しいフレーム内にあることを確認した。p E T - 1 9 b 発現カセットの予測翻訳から、全ての組換え h i s タグタンパク質と天然スピロヘータタンパク質の推定アミノ酸配列は同一であることが分かった。

【 0 2 0 7 】

実施例 24 : 組換えタンパク質の発現及び精製

選択した組換え大腸菌クローンの発現を中規模で行い、マウスのワクチン接種に十分な組換えタンパク質を得た。クローン化した全ての遺伝子から、表 4 に示す天然タンパク質の予測分子量と同等の見掛け分子量のヘキサヒスチジン融合物を有する組換えタンパク質が得られた。組換えタンパク質は全て、抗 h i s 抗体を用いたウェスタンブロッティングにおいて反応性が高かった。h i s タグ組換えタンパク質の精製は、変性条件下でアフィニティークロマトグラフィーによって行った。全ての組換えタンパク質の S D S - P A G E 及びクーマシーブルー染色によって該タンパク質の精製が確認された。

【 0 2 0 8 】

実施例 25 : 精製組換え H i s タグタンパク質を用いたブタのワクチン接種

4 種類の精製組換え h i s タグタンパク質 (各 0 . 5 m g) を全量 1 m L 中にプールした。調製した 4 種類のワクチンは次の通りである。

a) N A V - H 3 2、N A V - H 3 3、N A V - H 4 3 及び N A V - H 6 8 から成る溶血素組換えワクチン

b) N A V - H 4 0、N A V - H 6 6、N A V - H 7 2 及び N A V - H 1 7 7 から成る毒素組換えワクチン

c) N A V - H 4 6、N A V - H 1 8 4、N A V - H 1 8 6 及び N A V - H 1 9 1 から成るリパーゼ/ペプチダーゼ組換えワクチン

d) N A V - H 1 7 9、N A V - H 1 8 5、N A V - H 1 8 8 及び N A V - H 1 9 7 から成るプロテアーゼ組換えワクチン

【 0 2 0 9 】

10 匹の血清陰性ブタ (5 週齢) から成る 4 グループに対し、油中水型アジュバントで乳化しプールした抗原 (2 m g) から成るワクチン (2 m L) を筋肉内注射した。ブタへのワクチン接種は 5 週齢時と 8 週齢時の 2 回、後頸部で筋肉内に行った。1 回目のワクチン接種直前、2 回目のワクチン接種直前、及び 2 回目のワクチン接種の 2 週間後に全てのブタから採決した。血液から血清を調製し、これを用いてワクチンに含まれるタンパク質に対する免疫応答性を測定した。各ワクチンにおいては 4 種類のタンパク質が組合わさっているため、各グループのブタから得た血清は全 4 種類のタンパク質の個々に対して試験した。E L I S A は実施例 2 2 に記載したのと同様に行った。

【 0 2 1 0 】

表 6 に示すように、全てのブタはワクチン接種レジメンに対して強く応答し、抗体レベルは有意に上昇した (1 回目の筋肉内注射後 (1 1 . 6 0 倍 ~ 1 7 . 6 9 倍上昇 : P < 0 . 0 0 1)、2 回目の筋肉内注射後 (2 . 4 1 倍 ~ 2 . 7 8 倍上昇 : P < 0 . 0 0 1))。これらの結果から、ブタにおける上述の毒素タンパク質の免疫原性やブタにおいて高い抗体レベルを誘導するワクチン接種レジメンの有効性が明らかとなった。

【 0 2 1 1 】

10

20

30

40

【表 6】

筋肉内ワクチン接種後のブタにおける毒素タンパク質の免疫原性（全てのELISA値は平均吸光度±標準偏差で示す）

タンパク質	ワクチン接種前	追加免疫前		ワクチン接種後（2週間）	
	ELISA値	ELISA値	増加倍数	ELISA値	増加倍数
H 3 2	0.0721±0.0261	1.0371±0.2187	14.39	2.6219±0.2817	2.53
H 3 3	0.0598±0.0283	1.0015±0.3433	16.75	2.5104±0.3236	2.51
H 4 0	0.0851±0.0222	1.0007±0.2019	11.76	2.5329±0.3949	2.53
H 4 3	0.0727±0.0276	1.0419±0.2801	14.34	2.6357±0.2240	2.53
H 4 6	0.0642±0.0216	0.9950±0.2223	15.51	2.7623±0.2948	2.78
H 6 6	0.0926±0.0240	1.0750±0.2101	11.60	2.6948±0.2723	2.51
H 6 8	0.0768±0.0237	1.0454±0.2731	13.62	2.6750±0.2824	2.56
H 7 2	0.0708±0.0268	1.0108±0.1963	14.27	2.6665±0.3795	2.64
H 1 7 7	0.0724±0.0216	1.0251±0.2169	14.15	2.6791±0.2818	2.61
H 1 8 4	0.0569±0.0212	0.9983±0.1978	17.55	2.5985±0.2409	2.60
H 1 8 6	0.0676±0.0225	1.0783±0.2352	15.96	2.6001±0.3314	2.41
H 1 9 1	0.0598±0.0210	1.0585±0.2455	17.69	2.6283±0.3248	2.48

10

【0212】

実施例 26：精製組換えHisタグタンパク質を用いたワクチン接種によるブタの防御

4種類の精製組換えhisタグタンパク質（各0.5mg）を全量1mL中にプールした。調製した4種類のワクチンは次の通りである。

a) NAV-H32、NAV-H33、NAV-H43及びNAV-H68から成る溶血素組換えワクチン

b) NAV-H40、NAV-H66、NAV-H72及びNAV-H177から成る毒素組換えワクチン

c) NAV-H46、NAV-H184、NAV-H186及びNAV-H191から成るリパーゼ/ペプチダーゼ組換えワクチン

d) NAV-H179、NAV-H185、NAV-H188及びNAV-H197から成るプロテアーゼ組換えワクチン

【0213】

10匹の血清陰性ブタ（5週齢）から成る4グループに対し、油中水型アジュバントで乳化しプールした抗原（2mg）から成るワクチン（2mL）を筋肉内注射した。10匹の血清陰性ブタから成る第5のグループを陰性対照として用い、該アジュバントで乳化したPBSで偽ワクチン接種を行った。全てのブタへのワクチン接種は5週齢時と8週齢時の2回、後頸部で筋肉内に行った。全てのブタに対し、10週齢時に胃管投与によって100mLの活性B・ヒオディセンテリア培養物（ $\sim 10^9$ 個（細胞）/mL）でチャレンジし、実験時（チャレンジ後6週間まで）及び死後検査時にブタ赤痢の臨床徴候を毎日観察した。週に2回、全てのブタに対して直腸スワブを実施し、選択的細菌培養を行った。

【配列表】

2011512803000001.app

30

40

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/AU2009/000248
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int. Cl. C07K 14/195 (2006.01) C07H 21/04 (2006.01) According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) SEARCH CONDUCTED: SEE BELOW Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Blast search on GenomeQuest of the sequences in the claims		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y.	WO 2008 / 017636 A2 (NOVARTIS AG and MURDOCH UNIVERSITY) 14 February 2008 See SEQ. ID. NO.s: 25-30, 36-38, 40, 51-54, 58, 61-62; abstract inter alia See claim 7 inter alia	1-13, 16-19 14-15
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "&" document member of the same patent family "p" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 01 June 2009		Date of mailing of the international search report 09 JUN 2009
Name and mailing address of the ISA/AU AUSTRALIAN PATENT OFFICE PO BOX 200, WODEN ACT 2606, AUSTRALIA E-mail address: pct@ipaaustralia.gov.au Facsimile No. +61 2 6283 7999		Authorized officer GAVIN THOMPSON AUSTRALIAN PATENT OFFICE (ISO 9001 Quality Certified Service) Telephone No : (02) 6283 2240

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/AU2009/000248

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of:
 - a. type of material
 - a sequence listing
 - table(s) related to the sequence listing
 - b. format of material
 - on paper
 - in electronic form
 - c. time of filing/furnishing
 - contained in the international application as filed
 - filed together with the international application in electronic form
 - furnished subsequently to this Authority for the purposes of search
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table(s) relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/AU2009/000248

This Annex lists the known "A" publication level patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent Document Cited in Search Report	Patent Family Member
WO 2008017636	NONE

Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001.

END OF ANNEX

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00	1 0 1
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 P 31/04	1 7 1
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	
A 6 1 K 38/46 (2006.01)	A 6 1 K 37/54	
G 0 1 N 33/569 (2006.01)	G 0 1 N 33/569	A
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/573 (2006.01)	G 0 1 N 33/573	A

(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, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, 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, AO, 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, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(74)代理人 100096736

弁理士 中嶋 俊夫

(74)代理人 100117156

弁理士 村田 正樹

(74)代理人 100111028

弁理士 山本 博人

(72)発明者 ハンプソン, デイビッド ジェイ.

オーストラリア 6 1 1 2 ウェスタン オーストラリア州, ベッドフォーデイル, カラダイン
ロード 4 1 6

(72)発明者 ラ, トム

オーストラリア 6 1 4 9 ウェスタン オーストラリア州, パークウッド, アバーカレン ウェ
イ 4 9

(72)発明者 ベルガード, マッシュー, アイ.

オーストラリア 6 1 5 6 ウェスタン オーストラリア州, アッタデレ, カンピオン クレセン
ト 2 0

(72)発明者 フィリップス, メイリー, ディー.

オーストラリア 6 0 7 6 ウェスタン オーストラリア州, カラムンダ, アルピーネ ロード,
7 0

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA13 BA11 BA31 CA07 DA01 DA02 DA05 DA11 EA04
GA11 HA03
4B050 CC01 CC03 CC08 DD02 LL01 LL03
4B065 AA01X AA01Y AA57X AA87X AB01 AC14 BA02 CA24 CA31 CA33
CA45 CA46
4C084 AA01 AA02 AA13 BA01 BA44 CA04 CA53 DC01 DC02 DC50
NA14 ZB351 ZC611
4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA11 DA83 DA86 DA89 EA31
EA52 FA74 GA26

专利名称(译)	新的Brachyspira序列，免疫原性组合物，制备方法和用途		
公开(公告)号	JP2011512803A	公开(公告)日	2011-04-28
申请号	JP2010547921	申请日	2009-02-27
[标]申请(专利权)人(译)	SPIROGENE		
申请(专利权)人(译)	螺吉恩P茶Yエルティー迪		
[标]发明人	ハンプソンデイビッドジェイ ラトム ベルガードマッシューアイ フィリップスメイリーディー		
发明人	ハンプソン,デイビッド ジェイ. ラ,トム ベルガード,マッシュー,アイ. フィリップス,メイリー,ディー.		
IPC分类号	C12N15/09 C07K19/00 C07K14/195 C12N9/20 C12N9/52 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 A61P31/04 A61K48/00 A61K38/00 A61K38/46 G01N33/569 G01N33/53 G01N33/573		
CPC分类号	C07K14/20 A61K39/00 A61K2039/53 C07K16/1207 G01N33/56911		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K19/00 C07K14/195 C12N9/20 C12N9/52 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.101 A61P31/04.171 A61K48/00 A61K37/02 A61K37/54 G01N33/569.A G01N33/53.D G01N33/573.A		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA13 4B024/BA11 4B024/BA31 4B024/CA07 4B024/DA01 4B024/DA02 4B024 /DA05 4B024/DA11 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA03 4B050/CC01 4B050/CC03 4B050/CC08 4B050/DD02 4B050/LL01 4B050/LL03 4B065/AA01X 4B065/AA01Y 4B065/AA57X 4B065/AA87X 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA31 4B065/CA33 4B065/CA45 4B065 /CA46 4C084/AA01 4C084/AA02 4C084/AA13 4C084/BA01 4C084/BA44 4C084/CA04 4C084/CA53 4C084/DC01 4C084/DC02 4C084/DC50 4C084/NA14 4C084/ZB351 4C084/ZC611 4H045/AA11 4H045 /AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA11 4H045/DA83 4H045/DA86 4H045/DA89 4H045/EA31 4H045/EA52 4H045/FA74 4H045/GA26		
代理人(译)	村田正树		
优先权	2008152093 2008-02-28 EP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

描述了Brachyspira hyodysenteriae的新多核苷酸和氨基酸。这些序列可用于诊断动物中的B.hyodysentericosis，以及动物中的炭疽芽孢杆菌。它可用作猪痢疾病的治疗或预防性治疗。这些序列也可用于诊断，治疗和/或预防由其他Brachyspira物种引起的动物疾病。【选择图】无

ドライマー

遺伝子	プライマー名	プライマー配列 (5' - 3')	配列番号
NAV-H32	H32-F4	CATATTTCTGGTGATTCTC	配列番号 33
	H32-R564	TTTTTTGATAAATAAGTTTTTATTG	配列番号 34
NAV-H33	H33-F4	TTTAATACTCCTATATTATTAATTTT	配列番号 35
	H33-R396	AAGGAGAAATCACCAGAAA	配列番号 36
NAV-H40	H40-F16	AAATATGCTTCATTATAGG	配列番号 37
	H40-R1815	ACTTTTAGGAAGAAGTTAAC	配列番号 38
NAV-H43	H43-F4	GATATAATTATAATAAGTGTAAATAC	配列番号 39
	H43-R1296	TTCAGTGTCTGAATCAITC	配列番号 40
NAV-H46	H46-F327	TATGATGGGGCATAGTATGG	配列番号 41
	H46-R769	TATCTCCTACAGGCTCTTCGG	配列番号 42
NAV-H66	H66-F17	ATGATAAAGCTTGGGAGATTATC	配列番号 43
	H66-R255	ATAATGTGTTTTACATCCAAC	配列番号 44
NAV-H68	H68-F83	TTATGCTCTCTGCTTTATTTCTGG	配列番号 45
	H68-R596	TCCTTTATTATTCCTTCTTTATGCC	配列番号 46
NAV-H72	H72-F128	CTATGGCAGAAAACAAGTC	配列番号 47
	H72-R614	GCAGATAAAGATAAATCAAGTC	配列番号 48
NAV-H177	H177-F20	AAAGAGCTTGGCAG	配列番号 49
	H177-R258	CTTATCATAATGGTATTTACAAGATG	配列番号 50
NAV-H179	H179-F420	TGCTATTGCTGATGCTACTAC	配列番号 51
	H179-R705	ATTA TCTTGATGAGGATGCTTTC	配列番号 52
NAV-H184	H184-F314	TAGATAAAGATGATGAAAAAAG	配列番号 53
	H184-R762	AAATAAACCTAAATAAGCACC	配列番号 54
NAV-H185	H185-F294	TGGGTTTAGAATAGGTGCAGC	配列番号 55
	H185-R796	ATTTTAAATGTTGCTTTTTGTC	配列番号 56
NAV-H186	H186-F44	TAGAAAAGATGCCTATGCTG	配列番号 57
	H186-R718	TTACAAGAGAAAATAAACCTG	配列番号 58
NAV-H188	H188-F293	TGGGGAATCATCAAAATAGAAG	配列番号 59
	H188-R565	GGCTCATCAAGGAAGAACC	配列番号 60
NAV-H191	H191-F8	ATAATAAAAAAGAAAAAGAG	配列番号 61
	H191-R403	GTCGTATCCTAATAAATAGTATG	配列番号 62
NAV-H197	H197-F39	TCCTGGGCTTACATTTACTTTG	配列番号 63
	H197-R354	TGATTTCTGACTTCTTTTTG	配列番号 64