

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A) (11)特許出願公表番号

特表2003 - 506044

(P2003 - 506044A)

(43)公表日 平成15年2月18日(2003.2.18)

| (51) Int. Cl ⁷ | 識別記号 | F I | テ-マコード (参考) |
|---------------------------|------|----------------|---------------|
| C 1 2 N 15/09 | ZNA | A 6 1 K 39/00 | H 4 B 0 2 4 |
| A 6 1 K 38/00 | | 39/395 | N 4 B 0 6 4 |
| 39/00 | | 48/00 | 4 B 0 6 5 |
| 39/395 | | A 6 1 P 31/04 | 171 4 C 0 8 4 |
| 48/00 | | C 0 7 K 14/195 | 4 C 0 8 5 |

審査請求 未請求 予備審査請求 (全 77数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 514126(P2001 - 514126)

(86)(22)出願日 平成12年7月31日(2000.7.31)

(85)翻訳文提出日 平成14年2月1日(2002.2.1)

(86)国際出願番号 PCT/EP00/07360

(87)国際公開番号 W001/009334

(87)国際公開日 平成13年2月8日(2001.2.8)

(31)優先権主張番号 9918208.1

(32)優先日 平成11年8月3日(1999.8.3)

(33)優先権主張国 イギリス(GB)

(71)出願人 スミスクライン ビーチャム バイオロジカルズ ソシエテ アノニム
ベルギー国 リキセンザール ビー 1330
ルー デ ランスティテユート 89

(72)発明者 トナード, ジョエル
ベルギー国 リキセンザール ビ - 1330
ル - デ ランスティテユート 89, スミスクライン ビーチャム バイオロジカルズ
ソシエテ アノニム

(74)代理人 弁理士 平木 祐輔 (外 2 名)

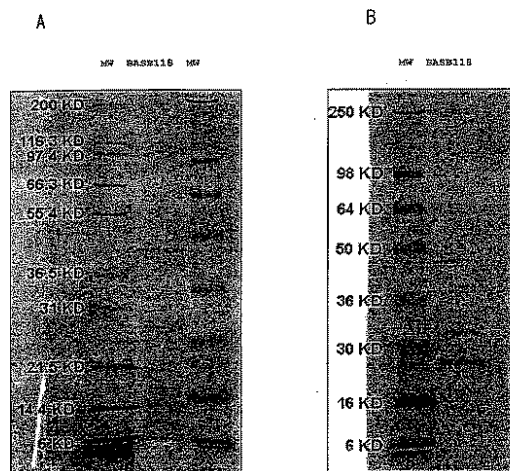
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 モラクセラ・カタラーリス (*Moraxella catarrhalis*) 由来のBASB118 ポリペプチドおよびポリヌクレオチド

(57)【要約】

本発明はBASB118ポリペプチドおよびBASB118ポリヌクレオチドをコードするポリヌクレオチドならびに組換え技術による該ポリペプチドの生産方法を提供する。さらに本発明は、診断上、予防上、および治療上の用途も提供する。

A SDS-ポリアクリルアミドゲルにより分離した組換え精製BASB118のクマシー染色。
B 抗HIS抗体を用いた精製BASB118のウエスタンブロット。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列番号2に示すアミノ酸配列に対して、配列番号2の全長にわたって少なくとも85%の同一性を有するアミノ酸配列を含んでなる、単離されたポリペプチド。

【請求項2】 アミノ酸配列が配列番号2に示すアミノ酸配列に対して少なくとも95%の同一性を有する、請求項1に記載の単離されたポリペプチド。

【請求項3】 配列番号2に示すアミノ酸配列を含んでなる、請求項1に記載のポリペプチド。

【請求項4】 配列番号2に示す単離されたポリペプチド。

【請求項5】 請求項1～4のいずれか1項に記載のポリペプチドの免疫原性断片であって、該免疫原性断片の免疫原活性が配列番号2に示すポリペプチドの免疫原活性と実質的に同一である、上記断片。

【請求項6】 ポリペプチドがさらに大きな融合タンパク質の一部である、請求項1～5のいずれか1項に記載のポリペプチド。

【請求項7】 請求項1～6のいずれか1項に記載のポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチド。

【請求項8】 配列番号2に示すアミノ酸配列に対して、配列番号2の全長にわたって少なくとも85%の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を含んでなる単離されたポリヌクレオチド、またはその単離されたポリヌクレオチドに相補的なヌクレオチド配列からなる単離されたポリヌクレオチド。

【請求項9】 配列番号2に示すポリペプチドをコードするヌクレオチド配列に対して、そのコード領域全体にわたって少なくとも85%の同一性を有するヌクレオチド配列を含んでなる単離されたポリヌクレオチド、またはその単離されたポリヌクレオチドに相補的なヌクレオチド配列からなる単離されたポリヌクレオチド。

【請求項10】 配列番号1に示すヌクレオチド配列に対して、配列番号1の全長にわたって少なくとも85%の同一性を有するヌクレオチド配列を含んでなる単離されたポリヌクレオチド、またはその単離されたポリヌクレオチドに相補

的なヌクレオチド配列からなる単離されたポリヌクレオチド。

【請求項11】 同一性が配列番号1に示す配列に対して少なくとも95%である、請求項7～10のいずれか1項に記載の単離されたポリヌクレオチド。

【請求項12】 配列番号2に示すポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含んでなる単離されたポリヌクレオチド。

【請求項13】 配列番号1に示すポリヌクレオチドを含んでなる単離されたポリヌクレオチド。

【請求項14】 ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で、配列番号1に示す配列またはその断片を有する標識化プローブを用いて適当なライブラリーをスクリーニングすることによって得られる、配列番号2に示すポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含んでなる、単離されたポリヌクレオチド。

【請求項15】 請求項7～14のいずれか1項に記載の単離されたポリヌクレオチドを含む、発現ベクターまたは組換え生存微生物。

【請求項16】 請求項15に記載の発現ベクターを含む宿主細胞、または配列番号2に示すアミノ酸配列に対して少なくとも85%の同一性を有するアミノ酸配列を含んでなる単離されたポリペプチドを発現している該宿主細胞の細胞画分または膜。

【請求項17】 配列番号2に示すアミノ酸配列に対して少なくとも85%の同一性を有するアミノ酸配列を含んでなるポリペプチドの生産方法であって、請求項16に記載の宿主細胞を該ポリペプチドを産生するのに十分な条件下で培養し、その培養培地から該ポリペプチドを回収することを含んでなる、上記方法。

【請求項18】 請求項7～14のいずれか1項に記載のポリヌクレオチドの発現方法であって、宿主細胞を該ポリヌクレオチドの少なくとも1つを含む発現ベクターで形質転換し、該宿主細胞を該ポリヌクレオチドのいずれか1つを発現させるのに十分な条件下で培養することを含む、上記方法。

【請求項19】 有効量の請求項1～6のいずれか1項に記載のポリペプチドおよび製薬上許容される担体を含むワクチン組成物。

【請求項20】 有効量の請求項7～14のいずれか1項に記載のポリヌク

レオチドおよび製薬上有効な担体を含むワクチン組成物。

【請求項21】 少なくとも1種の他のモラクセラ・カタラーリス(*Moraxella catarrhalis*)抗原を含む、請求項19または20に記載のワクチン組成物。

【請求項22】 請求項1～6のいずれか1項に記載のポリペプチドまたは免疫学的断片に対して免疫特異的な抗体。

【請求項23】 モラクセラ・カタラーリス(*Moraxella catarrhalis*)に感染した疑いのある動物由来の生物学的サンプル中に存在する、請求項1～6のいずれか1項に記載のポリペプチドまたは該ポリペプチドに対して免疫特異的な抗体を同定することを含む、モラクセラ・カタラーリス感染の診断方法。

【請求項24】 動物において免疫応答を誘発するのに使用する医薬の調製における、免疫学的に有効な量の請求項1～6のいずれか1項に記載のポリペプチドを含む組成物の使用。

【請求項25】 動物において免疫応答を誘発するのに使用する医薬の調製における、免疫学的に有効な量の請求項7～14のいずれか1項に記載のポリヌクレオチドを含む組成物の使用。

【請求項26】 請求項1～6のいずれか1項に記載のポリペプチドに対して誘導された少なくとも1種の抗体および適当な製薬学的担体を含む、モラクセラ・カタラーリス感染症に罹患したヒトの治療に有用な治療用組成物。

【発明の詳細な説明】**【0001】****発明の分野**

本発明は、ポリヌクレオチド(本明細書中で「BASB118ポリヌクレオチド」と呼ぶ)、それによりコードされるポリペプチド(本明細書中で「BASB118」または「BASB118ポリペプチド」と呼ぶ)、組換え物質およびその生産方法に関する。別の態様において、本発明は、細菌感染に対するワクチンを含む、前記ポリペプチドおよびポリヌクレオチドの使用方法に関する。更なる態様では、本発明は特定の病原体の感染を検出するための診断アッセイに関する。

【0002】**発明の背景**

モラクセラ・カタラーリス(*Moraxella catarrhalis*; *M. catarrhalis*) (カタル球菌(*Branhamella catarrhalis*)とも称される)はヒト上気道から頻繁に単離されるグラム陰性細菌である。この細菌は、乳児および小児における中耳炎、ならびに高齢者における肺炎を主なものとするいくつかの病状の原因である。それはまた、副鼻腔炎、院内感染、およびまれな侵襲性疾患の原因でもある。

【0003】

中耳炎は、症例数の点でもその可能性のある後遺症の点でも重要な小児期の疾患である。米国においては毎年350万以上の症例が記録され、小児の80%が、3歳になる前に少なくとも1度は耳炎を起こした経験があると推定されている(Klein, J0(1994) Clin. Inf. Dis 19:823)。処置せずに放置したり慢性化したりすると、この疾患は一過性(中耳内に体液が蓄積する場合)または永久的(聴覚神経が損傷を受ける場合)であり得る聴覚障害を起こす可能性がある。乳児においては、そのような聴覚障害は言語学習遅延の原因にもなり得る。

【0004】

中耳炎を患っている小児の中耳からは、主として3種の細菌が単離される。ストレプトコッカス・ニューモニエ(*Streptococcus pneumoniae*; *S. pneumoniae*)、分類不能型インフルエンザ菌(*Haemophilus influenzae*) (NTHi)、およびM.カタラーリスである。これらは症例の60~90%に存在している。最近の研究の概説で

は、中耳炎の症例の内、*S.ニューモニエ*と*NTHi*がどちらも約30%、*M.カタラーリス*が約15%であることが示されている (Murphy, TF (1996) *Microbiol. Rev.* 60:267)。その他の細菌も中耳から単離されることがあるが (インフルエンザ菌B型、*S.ピオゲネス*(*S. pyogenes*)等)、頻度はずっと低い (症例の2%以下)。

【0005】

中耳にみられる病原菌についての疫学的データは、上気道でのコロニー形成が耳炎の発症に対する絶対的必要条件であることを示す。しかしながら、疾患が引き起こされるには、その他の事象も必要になる (Dickinson, DPら (1988) *J. Infect. Dis.* 158:205、Faden, HLら (1991) *Ann. Otorhinol. Laryngol.* 100:612)。それらは、エウスタキオ管を経た中耳への細菌の移動を誘発し、続いて炎症性経過を開始させるために、とても重大である。それら要因は今日まで分かっていない。ウイルス感染後の免疫系の一時的な異常が、例えば気道のコロニー形成に対する抑制不能を引き起こす可能性が仮定されている (Faden, HLら (1994) *J. Infect. Dis.* 169:1312)。別の説明は、環境因子への曝露によって、一部の小児でより重大なコロニー形成が引き起こされるというものである。というのも、中耳の病原菌が継続的に存在しているため、そのような小児はそれに引き続いて中耳炎を起こしやすくなるのである (Murphy, TF (1996) *Microbiol. Rev.* 60:267)。

【0006】

*M.カタラーリス*に対する免疫応答は十分に特徴付けられていない。幼児の鼻咽頭から、0～2歳まで追跡して経時的に単離した株の分析によって、幼児がしばしば新しい株を獲得しまた排除していることが示される。このことは、この細菌に対する有効な免疫応答が、コロニー形成された小児によって備えられることを示している (Faden, HLら (1994) *J. Infect. Dis.* 169:1312)。

【0007】

調べた大部分の成人で、殺菌性抗体が確認されている (Chapman, AJら (1985) *J. Infect. Dis.* 151:878)。*M.カタラーリス*の株には、血清の殺菌活性に対する耐性能力にばらつきが存在する。一般に、罹患個体からの単離株は、単にコロニー形成した個体由来のものを上回る耐性がある (Hol, Cら (1993) *Lancet* 341

:1281, Jordan, KLら (1990) Am. J. Med. 88 (増補5A):28S)。従って血清耐性は、細菌のビルレンスの1つとして考えることができる。オプソニン化活性が中耳炎から回復しつつある小児の血清中に見出される。

【0008】

ヒトにおけるこれらの様々な免疫応答により標的とされるその抗原は、OMP B1、UspA1およびUspA2 (Chen D.ら (1999), Infect. Immun. 67:1310)を除いては同定されていない。このOMP B1は、発現が鉄により調節される84kDaのタンパク質であり、肺炎を患っている患者の血清 (Sethi. S.ら (1995) infect. Immun. 63:1516) またはUspA1およびUspA2の血清 (Chen D.ら (1999), Infect. Immun. 67:1310)により認められる。

【0009】

M.カタラーリスの表面上に存在するその他の2～3の膜タンパク質が、生化学的手法を用いて、または防御免疫の誘導における潜在的関連性に対して、特徴付けられている (概説としては、Murphy, TF (1996) Microbiol. Rev. 60:267を参照のこと)。マウス肺炎モデルにおいて、それらのうちの一部 (UspA、CopB) に対して産生された抗体の存在が、肺感染のより速い浄化に有利にはたらく。別のポリペプチド (OMP CD) はM.カタラーリス株間で高度に保存され、また緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) のポーリンとの相同性を示し、動物モデルで本細菌に対する有効性が示されている。

【0010】

モラクセラ・カタラーリスの感染頻度は過去数十年の間に劇的に上昇している。これは、複数の抗生物質に耐性な株の出現および免疫系が弱められた人口数の増大を原因とする。幾つかのまたは全ての標準的な抗生物質に耐性であるモラクセラ・カタラーリス株が単離されることは、もはや珍しいことではない。この現象は、新たな抗菌剤、ワクチン、薬剤のスクリーニング法、およびこれらの生物用の診断試験に対する、今までに経験したことの無い医薬の要求および需要を生み出した。

【0011】

発明の概要

本発明は、BASB118、特にBASB118ポリペプチドおよびBASB118ポリヌクレオチド、組換え物質およびその生産方法に関する。別の態様において、本発明は、特に微生物性疾患の予防および治療を含む、前記ポリペプチドおよびポリヌクレオチドの使用方法に関する。更なる態様では、本発明は、微生物感染に関連する疾患およびかかる感染に関連する症状を検出するための診断アッセイ、例えば、BASB118ポリヌクレオチドもしくはポリペプチドの発現または活性を検出するためのアッセイに関する。

【0012】

開示された発明の精神および範囲内での種々の変更および修飾は、後述の説明を読むことにより、また本開示内容の他の部分を読むことにより、当業者には容易に明らかとなる。

【0013】

発明の説明

本発明は、以下により詳細に記載するように、BASB118ポリペプチドおよびポリヌクレオチドに関する。特に、本発明は、モラクセラ・カタラーリスのBASB118のポリペプチドおよびポリヌクレオチドに関する。これはリポタンパク質の特徴であるシグナル配列を含むリポタンパク質の特徴を有し、それゆえに表面で発現されると考えられる。本発明は特に、それぞれ配列番号1および配列番号2に示す、ヌクレオチド配列およびアミノ酸配列を有するBASB118に関する。後述の配列表に「DNA」として列挙した配列は、当業者であればかかる配列を一般にリボポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに有効に使用し得ることが理解されることから、本発明の1実施形態の例示にすぎないことが理解されよう。

【0014】

ポリペプチド

本発明の1態様において、本明細書中で「BASB118」および「BASB118ポリペプチド」と呼ぶモラクセラ・カタラーリスのポリペプチド、そして生物学上、診断上、予防上、臨床上または治療上有用なその変異体、ならびにそれらを含む組成物が提供される。

【0015】

さらに、本発明は、

(a) 配列番号2に示すアミノ酸配列に対して少なくとも85%の同一性、好ましくは少なくとも90%の同一性、より好ましくは少なくとも95%の同一性、最も好ましくは少なくとも97~99%の同一性を有するかまたは完全に同一であるアミノ酸配列を含んでなる単離されたポリペプチド、

(b) 配列番号1に示すポリヌクレオチド配列に対して、それぞれその配列番号1に示す全長にわたって少なくとも85%の同一性、好ましくは少なくとも90%の同一性、より好ましくは少なくとも95%の同一性、より一層好ましくは少なくとも97~99%の同一性を有するかまたは完全に同一であるポリヌクレオチド配列を含む単離されたポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチド、

(c) 配列番号2のアミノ酸配列に対して少なくとも85%の同一性、好ましくは少なくとも90%の同一性、より好ましくは少なくとも95%の同一性、より一層好ましくは少なくとも97~99%の同一性を有するかまたは完全に同一であるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含む単離されたポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチド、を提供する。

【0016】

配列番号2に示すBASB118ポリペプチドは、モラクセラ・カタラーリスのMc2931株(ATCC 43617)から得たBASB118ポリペプチドである。

【0017】

また本発明は、BASB118ポリペプチドの免疫原性断片、すなわち配列番号2に示すアミノ酸配列を含むBASB118ポリペプチドと同一または実質的に同一の免疫原活性を有する該ポリペプチドの連続した部分、を提供する。すなわち、前記断片(必要であれば、担体に結合されている)は、BASB118ポリペプチドを認識する免疫応答を引き出すことができる。こうした免疫原性断片には、例えば、N末端のリーダー配列、および/または膜貫通ドメインおよび/またはC末端のアンカードメインを欠くBASB118ポリペプチドが含まれる。好ましい態様において、本発明のBASB118の免疫原性断片は、配列番号2の全長にわたる配列番号2のポリペプチド配列に対して少なくとも85%の同一性、好ましくは少なくとも90%の同一性、より好ましくは少なくとも95%の同一性、最も好ましくは少なくと

も97～99%の同一性を有するポリペプチドの実質的に全ての細胞外ドメインを含む。

【0018】

断片は、本発明の任意のポリペプチドの任意のアミノ酸配列と部分的には完全に同一であるが全てが同一ではないアミノ酸配列を有するポリペプチドである。BASB118ポリペプチドに関して言えば、断片は「フリースタンディング」であっても、または該断片がその部分または領域を形成するより大きなポリペプチド中に、最も好ましくは単一のより大きなポリペプチド中の単一の連続した領域として含まれていてもよい。

【0019】

好ましい断片は、例えば、配列番号2のアミノ酸配列またはその変異体の部分(例えば、アミノ末端および/もしくはカルボキシ末端アミノ酸配列を含む連続した一連の残基)を有するトランケーションポリペプチドを含む。宿主細胞により、または宿主細胞内で生産される本発明のポリペプチドの分解形態も好ましい。さらに好ましいのは、ヘリックスおよびヘリックス形成領域、シートおよびシート形成領域、ターンおよびターン形成領域、コイルおよびコイル形成領域、親水性領域、疎水性領域、両親媒性領域、両親媒性領域、フレキシブル領域、表面形成領域、基質結合領域、および高抗原性指数(high antigenic index)領域を含む断片などの、構造的および機能的特性により特徴付けられる断片である。

【0020】

さらに好ましい断片には、配列番号2のアミノ酸配列に由来する少なくとも15、20、30、40、50もしくは100個の連続したアミノ酸を有するアミノ酸配列を含む単離されたポリペプチド、または配列番号2のアミノ酸配列から末端切断された(truncated)もしくは欠失した少なくとも15、20、30、40、50もしくは100個の連続したアミノ酸のアミノ酸配列を含む単離されたポリペプチド、を含む。

【0021】

本発明のポリペプチドの断片を使用して、ペプチド合成により対応する全長ポ

リペプチドを生産することができる。従って、これらの断片を中間体として使用して、本発明の全長ポリペプチドを生産することができる。

【0022】

特に、数個、5～10個、1～5個、1～3個、1～2個または1個のアミノ酸が任意の組合せで置換、欠失または付加されている変異体が好ましい。

【0023】

本発明のポリペプチドまたは免疫原性断片は「成熟」タンパク質の形であっても、前駆体または融合タンパク質等のより大きいタンパク質の一部であってもよい。しばしば、追加のアミノ酸配列を含めることが有利であり、このようなアミノ酸配列には、分泌またはリーダー配列、プロ配列、多重ヒスチジン残基のような精製に役立つ配列、または組換え体生産の間の安定性を確保する付加的配列が含有される。さらに、外来ポリペプチドまたは脂質テイル(lipid tail)またはポリヌクレオチド配列の追加により最終的な分子の免疫原としての可能性を高めることも考慮される。

【0024】

1つの態様において、本発明は、本発明のポリペプチドまたはその断片と、各種サブクラス(IgG、IgM、IgA、IgE)の免疫グロブリンのH鎖またはL鎖の定常領域の様々な部分と、を含んでなる遺伝子工学的に作製された可溶性融合タンパク質に関する。免疫グロブリンとしてはヒトIgG、特にIgG1のH鎖の定常部が好ましく、その場合は融合がヒンジ領域で起こる。特定例では、血液凝固因子Xaで開裂され得る開裂配列を組み込むことで、Fc部分を簡単に除去できる。

【0025】

さらに、本発明は、これら融合タンパク質の遺伝子工学的作製方法、ならびに薬物スクリーニング、診断および治療におけるそれらの使用に関する。また、本発明の更なる態様はこのような融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドに関する。融合タンパク質技術の例は国際特許出願 W094/29458 およびW094/22914に見いだせる。

【0026】

前記タンパク質を化学的に結合するかまたは組換え融合タンパク質として発現させることにより、発現系において該タンパク質が非融合タンパク質に比べて増大されたレベルで産生される。融合パートナーはTヘルパーエピトープ、好ましくはヒトにより認識されるTヘルパーエピトープの提供を助ける(免疫学的融合パートナー)か、または前記タンパク質の、元の組換えタンパク質より高い産生量での発現を助ける(発現エンハンサー)ことができる。好ましくは、前記融合パートナーは免疫学的融合パートナーおよび発現エンハンサーパートナーの両方である。

【0027】

融合パートナーには、ヘモフィルス・インフルエンザ(*Haemophilus influenzae*)由来のプロテインDおよびインフルエンザウイルス由来の非構造タンパク質NS1(赤血球凝集素)が含まれる。別の融合パートナーはLytAとして知られるタンパク質である。好ましくは、該分子のC末端部分を使用する。LytAは、N-アセチル-L-アラニンアミダーゼであるアミダーゼLytA(LytA遺伝子によりコードされる[Gene. 43(1986) page 265-272])、すなわちペプチドグリカン骨格内の特定の結合を特異的に分解する自己分解酵素を合成するストレプトコッカス・ニューモニア(*Streptococcus pneumoniae*)から得られる。前記LytAタンパク質のC末端ドメインは、コリン、またはDEAE等の数種のコリン類似体に対する親和性に関与している。この性質を融合タンパク質の発現に有用な大腸菌(*E. coli*)C-LytA発現プラスミドの開発に利用した。そのアミノ末端に前記C-LytA断片を含有するハイブリッドタンパク質の精製については、*Biotechnology*:10. (1992) page 795-798に記載されている。前記LytA分子のC末端に見出され、残基178から始まる反復部分(例えば残基188~305)を使用することができる。

【0028】

また、前記ポリペプチドの変異体、すなわち保存的アミノ酸置換(ある残基が性質の似ている他の残基により置換される)により基準ポリペプチドと相違しているポリペプチドも本発明に含まれる。典型的なこうした置換は、Ala, Val, Leu および Ileの間; Ser とThr の間; 酸性残基 AspとGlu の間; Asn とGln の間; 塩基性残基 LysとArg の間; または芳香族残基 PheとTyr の間で起こる。

【0029】

本発明のポリペプチドは任意の適当な方法で生産することができる。このようなポリペプチドには、単離された天然のポリペプチド、組換え的に生産されたポリペプチド、合成的に生産されたポリペプチド、またはこれらの方法の組合せにより生産されたポリペプチドが含まれる。こうしたポリペプチドを生産するための手段は当技術分野でよく理解されている。

【0030】

本発明のポリペプチドはモラクセラ・カタラーリス由来であることが最も好ましいが、好ましくは同じ分類学上の属に含まれるその他の生物から得ることができる。また、本発明のポリペプチドは、例えば同じ分類学上の科または綱の生物から得ることもできる。

【0031】

ポリヌクレオチド

本発明の目的は、BASB118ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、特に本明細書中でBASB118と呼ぶポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを提供することにある。

【0032】

本発明の特に好ましい実施形態では、前記ポリヌクレオチドは、配列番号1に示した配列を含むBASB118ポリペプチドをコードする領域を含み、これには全長遺伝子またはその変異体が含まれる。

【0033】

配列番号1で示されるBASB118ポリヌクレオチドは、モラクセラ・カタラーリスのMc2931株(ATCC 43617)に由来するBASB118ポリヌクレオチドである。

【0034】

本発明の更なる態様では、BASB118ポリペプチドおよびポリヌクレオチド、特にモラクセラ・カタラーリスのBASB118ポリペプチドおよびポリヌクレオチドをコードする、ならびに/または発現する単離された核酸分子が提供され、これには例えば、プロセッシングされていないRNA、リボザイムRNA、mRNA、cDNA、ゲノムDNA、B-およびZ-DNAが含まれる。本発明の更なる実施

形態には、生物学上、診断上、予防上、臨床上または治療上有用なポリヌクレオチドおよびポリペプチド、およびその変異体、ならびにそれらを含む組成物が含まれる。

【0035】

本発明の別の態様は、配列番号2の推定アミノ酸配列を有するBASB118ポリペプチドをコードする、少なくとも1つの全長遺伝子を含む単離されたポリヌクレオチド、および該ポリヌクレオチドと密接に関連するポリヌクレオチドならびにその変異体に関する。

【0036】

本発明の別の特に好ましい実施形態としては、配列番号2のアミノ酸配列を含むかまたは該配列からなるモラクセラ・カタラーリス由来のBASB118ポリペプチド、またはその変異体がある。

【0037】

本明細書中で提供される情報を用いると、配列番号1に示すポリヌクレオチド配列等の、BASB118ポリペプチドをコードする本発明のポリヌクレオチドは、標準的なクローニング法およびスクリーニング法、例えばモラクセラ・カタラーリスのカトリン(Catlin)細胞を出発物質として用いて細菌から染色体DNA断片をクローニングおよび配列決定し、次いで全長クローンを得る方法等により得ることができる。例えば、配列番号1に示すポリヌクレオチド配列等の本発明のポリヌクレオチド配列を得るためには、典型的には大腸菌またはある他の適当な宿主内のモラクセラ・カタラーリスカトリンの染色体DNAクローンのライブラリーを、放射性標識したオリゴヌクレオチド、好ましくは部分配列由来の17マー以上の長さのものでプローブする。その後、該プローブのDNAと同一のDNAを担持するクローンを、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件を用いて識別することができる。従って、ハイブリダイゼーションにより同定された個々のクローンを、元のポリペプチドまたはポリヌクレオチド配列から設計した配列決定用プライマーを用いて配列決定することにより、その後ポリヌクレオチド配列を両方向に伸長して全長遺伝子配列を決定することが可能である。そうした配列決定は、例えばプラスミドクローンから調製した変性二本鎖DNAを用いて都

合よく実施する。適当な技術はManiatis,T., Fritsch,E.F.およびSambrookら、MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL,第2版; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York(1989)に記載されている(特にScreening By Hybridization 1.90 およびSequencing Denatured Double-Stranded DNA Templates 13.70を参照されたい)。また、直接ゲノムDNA配列決定を行って全長遺伝子配列を得ることもできる。本発明の具体例である配列番号1に示した各ポリヌクレオチドは、モラクセラ・カタラーリス由来のDNAライブラリー中に見出された。

【0038】

さらに、配列番号1に示すDNA配列は、当業者に周知のアミノ酸残基の分子量値を用いて算出しうる推定分子量を有する、配列番号2に示すアミノ酸配列の概数のアミノ酸残基を有するタンパク質をコードするオープンリーディングフレームを含有する。

【0039】

配列番号1に示すポリヌクレオチド(配列番号1のヌクレオチド番号1の開始コドンとヌクレオチド番号1159で始まる終結コドンとの間)は、配列番号2のポリペプチドをコードする。

【0040】

更なる態様において、本発明は、下記(a)または(b)のポリヌクレオチド配列を含む、または下記(a)または(b)のポリヌクレオチド配列からなる、単離されたポリヌクレオチドを提供する；

(a) 配列番号1に示すポリヌクレオチド配列に対して、それぞれその配列番号1に示す全長にわたって少なくとも85%の同一性、好ましくは少なくとも90%の同一性、より好ましくは少なくとも95%の同一性、より一層好ましくは少なくとも97~99%の同一性を有するかもしくは完全に同一であるポリヌクレオチド配列、または

(b) 配列番号2のアミノ酸配列に対して、それぞれその配列番号2の全長にわたって少なくとも85%の同一性、好ましくは少なくとも90%の同一性、より好ましくは少なくとも95%の同一性、より一層好ましくは少なくとも97~9

9%の同一性もしくは100%きっかりの同一性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列。

【0041】

モラクセラ・カタラーリス以外の種に由来する相同体およびオーソログ体を含む本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、配列番号1に示す配列もしくはその断片からなるもしくはそれらを含む標識されたプローブまたは検出可能なプローブを用いて、ストリンジェントな条件下で(例えば、45~65度の範囲の温度および0.1~1%のSDS濃度を用いて)適当なライブラリーをスクリーニングし、該ポリヌクレオチド配列を含む全長遺伝子および/またはゲノムクローンを単離する各工程を含んでなる方法により得られる。

【0042】

本発明は、配列番号1中のコード配列(オープンリーディングフレーム)に対して、その全長にわたり同一であるポリヌクレオチド配列を提供する。また、本発明により、成熟ポリペプチドもしくはその断片のコード配列単独、ならびに別のコード配列(例えば、リーダーまたは分泌配列、プレ-またはプロ-またはプレプロ-タンパク質配列をコードする配列)をそのリーディングフレーム内に有する成熟ポリペプチドもしくはその断片のコード配列が提供される。また、本発明のポリヌクレオチドは、例えば、限定するものではないが、少なくとも1つの5'および3'非コード配列、例えば、転写されるが翻訳されない配列、終結シグナル(例えば、rho依存性およびrho非依存性終結シグナル)、リボソーム結合部位、Kozak配列、mRNA安定化配列、イントロン、ならびにポリアデニル化シグナル、を含む少なくとも1つの非コード領域を含有していてもよい。また、このポリヌクレオチド配列は、追加のアミノ酸をコードする追加のコード配列を含んでいてもよい。例えば、融合ポリペプチドの精製を容易にするマーカー配列がコードされ得る。本発明の特定の実施形態では、マーカー配列は、pQEベクター(Qiagen, Inc.)により提供されかつGentzら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:821-824(1989)に記載されるような、ヘキサ-ヒスチジンペプチド、またはHAペプチドタグ(Wilsonら, Cell 37:767(1984))であり、いずれもそれらに融合させたポリペプチド配列を精製する際に有用でありうる。また、本発明のポリヌクレオ

チドは、限定するものではないが、構造遺伝子および該遺伝子その自然状態において関連する遺伝子発現制御配列を含むポリヌクレオチドを含む。

【0043】

配列番号2のBASB118ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列は、配列番号1に示すそれぞれのヌクレオチド番号1～1158中に含まれるポリペプチドコード配列と同一であってもよい。あるいは、遺伝子コードの重複性(縮重)の結果、やはり配列番号2のポリペプチドをコードする配列であってもよい。

【0044】

本明細書中で使用する用語「ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド」は、本発明のポリペプチド、特に細菌のポリペプチド、より特定的には配列番号2に示すアミノ酸配列を有するモラクセラ・カタラーリスのポリペプチドBASB118、をコードする配列を含むポリヌクレオチドを包含する。また、この用語は、前記ポリペプチドをコードする単一の連続領域または不連続領域(例えば、組み込まれたファージ、組み込まれた挿入配列、組み込まれたベクター配列、組み込まれたトランスポゾン配列により、またはRNAエディティングもしくはゲノムDNA再構成により分断されたポリヌクレオチド)を、やはりコード配列および/または非コード配列を含有しうる追加の領域と共に含むポリヌクレオチドを包含する。

【0045】

本発明はさらに、配列番号2の推定アミノ酸配列を有するポリペプチドの変異体をコードする、本明細書中に記載されたポリヌクレオチドの変異体に関する。本発明のポリヌクレオチドの断片を使用して、例えば、本発明の全長ポリヌクレオチドを合成することができる。

【0046】

更にとりわけ好ましい実施形態としては、配列番号2のBASB118ポリペプチドのアミノ酸配列を有するBASB118変異体をコードするポリヌクレオチドであって、数個、2～3個、5～10個、1～5個、1～3個、2個、1個、または0個のアミノ酸残基が任意の組合せで置換、修飾、欠失および/または付加されているポリヌクレオチドがある。これらのうち特に好ましいのは、BASB118ポリペプ

チドの特性および活性を変更しないサイレント置換、付加および欠失である。

【0047】

本発明の更に好ましい実施形態としては、配列番号2に示すアミノ酸配列を有するBASB118ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに対して、その全長にわたり、少なくとも85%の同一性を有するポリヌクレオチド、ならびにかかるポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチドがある。あるいは、BASB118ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドおよびそれに対する相補的ポリヌクレオチドに対して、その全長にわたり、少なくとも90%の同一性を有する領域を含んでなるポリヌクレオチドが、最高に好ましい。これに関して、上記同様に、その全長にわたり、少なくとも95%の同一性を有するポリヌクレオチドが特に好ましい。更に、少なくとも95%の同一性を有するポリヌクレオチドのうち少なくとも97%の同一性を有するものが一層好ましく、これらのうち少なくとも98%および少なくとも99%の同一性を有するものが特に一層好ましく、少なくとも99%の同一性を有するものが最も好ましいものである。

【0048】

好ましい実施形態としては、配列番号1に示すDNAによりコードされる成熟ポリペプチドと実質的に同一の生物学的機能または活性を保持しているポリペプチドをコードしているポリヌクレオチドがある。

【0049】

本発明の特定の好ましい実施形態に従って、特にストリンジェントな条件下で、配列番号1に示すポリヌクレオチド等のBASB118ポリヌクレオチド配列にハイブリダイズするポリヌクレオチドが提供される。

【0050】

更に、本発明は、本明細書中で提供されるポリヌクレオチド配列にハイブリダイズするポリヌクレオチドに関する。これに関して、本発明は特に、ストリンジェントな条件下で本明細書中に記載のポリヌクレオチドにハイブリダイズするポリヌクレオチドに関する。本明細書中で使用する場合、用語「ストリンジェントな条件」および「ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件」とは、配列間に少なくとも95%の同一性、および好ましくは少なくとも97%の同一性が

ある場合にのみハイブリダイゼーションが生じることを意味する。ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件の特定の具体例は、50%ホルムアミド、5×SSC (150mM NaCl, 15mM クエン酸三ナトリウム)、50mMリン酸ナトリウム (pH7.6)、5×Denhardt溶液、10% デキストラン硫酸および20 μg/mlの変性し切断したサケ精子DNAを含有する溶液中42 で一夜インキュベートし、次いでハイブリダイゼーション支持体を0.1×SSC 中約65 で洗浄することである。ハイブリダイゼーションおよび洗浄条件は周知であり、Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第2版, Cold Spring Harbor, N.Y., (1989)中、特に第11章に例示されている。また、溶液ハイブリダイゼーションを、本発明により提供されるポリヌクレオチド配列と共に使用することができる。

【0051】

また、本発明は、配列番号1に示すポリヌクレオチド配列またはその断片の配列を有するプローブを用いて、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で完全な前記遺伝子を含有する適当なライブラリーを配列番号1に示すポリヌクレオチド配列についてスクリーニングし、前記ポリヌクレオチド配列を単離することにより得られるポリヌクレオチド配列からなる、または該ポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドを提供する。かかるポリヌクレオチドを得るために有用な断片には、例えば、本明細書中の他の箇所において十分に記載したプローブおよびプライマーが含まれる。

【0052】

本発明のポリヌクレオチドアッセイに関して本明細書中の他の箇所において論じたように、例えば、本発明のポリヌクレオチドをRNA、cDNAおよびゲノムDNAに対するハイブリダイゼーションプローブとして使用して、BASB118をコードする完全長cDNAおよびゲノムクローンを単離したり、BASB118遺伝子に対して高い同一性、特に高い配列同一性を有する別の遺伝子のcDNAおよびゲノムクローンを単離することができる。このようなプローブはたいてい少なくとも15個のヌクレオチド残基または塩基対を含む。好ましくは、このようなプローブは少なくとも30個のヌクレオチド残基または塩基対を有し、少なくとも50個のヌクレオチド残基または塩基対を有していてもよい。特に好ましいプロ

ープは少なくとも20個のヌクレオチド残基または塩基対を有し、かつ30個未満のヌクレオチド残基または塩基対を有するものである。

【0053】

BASB118遺伝子のコード領域を配列番号1に示すDNA配列を用いてスクリーニングすることにより単離し、オリゴヌクレオチドプローブを合成することができる。次いで、本発明の遺伝子の配列に相補的な配列を有する標識オリゴヌクレオチドを使用してcDNA、ゲノムDNAまたはmRNAのライブラリーをスクリーニングし、該ライブラリーのどのメンバーに前記プローブがハイブリダイズするかを決定することができる。

【0054】

完全長DNAを得るための、または短鎖DNAを伸長させるための、当業者に周知で利用可能な方法がいくつかあり、例えば、cDNA末端高速増幅法(RACE)に基づいた方法がある(例えば、Frohmanら、PNAS USA 85, 8998-9002, 1988を参照のこと)。例えばMarathon™技術(Clontech Laboratories Inc.)により例示されるような、上記技法の最近の改良により、より長いcDNAの検索が大いに簡便化された。Marathon™技術では、所定の組織より抽出されたmRNAからcDNAを作製し、各末端に「アダプター」配列を連結する。続いて、遺伝子特異的およびアダプター特異的なオリゴヌクレオチドプライマーの組合せを用いて核酸増幅(PCR)を行い、前記DNAの「欠失」5'末端を増幅する。次に、「ネステッド(nested)」プライマー、すなわち増幅産物の内部にアニールするように設計されたプライマー(典型的には、アダプター配列のさらに3'側にアニールするアダプター特異的プライマーおよび選択された遺伝子配列のさらに5'側にアニールする遺伝子特異的プライマー)を用いてPCR反応を繰り返す。その後、この反応の産物をDNA塩基配列決定により解析し、この産物を既存のDNAに直接結合して完全な配列とするか、または5'プライマー設計用の新たな配列情報を用いて別の全長PCRを行うことにより、全長DNAを構築することができる。

【0055】

本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチドを、本明細書中でポリヌクレオ

チドアッセイについてさらに論じたように、例えば、疾患(特にヒトの疾患)用の治療薬および診断薬を発見するための、研究試薬ならびに材料として使用することができる。

【0056】

配列番号1～8の配列に由来するオリゴヌクレオチドである本発明のポリヌクレオチドを本明細書中に記載した方法、好ましくはPCRにおいて使用して、本発明で同定されたポリヌクレオチドの全体または部分が感染組織中の細菌にて転写されるか否かを確認することができる。また、病原体が到達した感染段階および感染型を診断する際にそのような配列が有用であることは理解されよう。

【0057】

また、本発明は、成熟タンパク質に追加のアミノもしくはカルボキシ末端アミノ酸を、または(例えば、成熟形態が2以上のポリペプチド鎖を有する場合は)該成熟タンパク質内部に追加のアミノ酸を付け加えたポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを提供する。そのような配列は、タンパク質を前駆体から成熟形態にプロセッシングする際に何らかの役割を果たし、タンパク質の輸送を可能とし、タンパク質の半減期を延長するかまたは短縮し、あるいは特にアッセイまたは生産のためのタンパク質の操作を容易にすることができる。in vivoの場合は一般に、前記の追加のアミノ酸を細胞内酵素により前記成熟タンパク質から除去することができる。

【0058】

本発明の各々どのポリヌクレオチドについても、それに相補的なポリヌクレオチドが提供される。これらの相補的なポリヌクレオチドは、それらが相補性を示す各ポリヌクレオチドに対して十分に相補的であることが好ましい。

【0059】

前駆体タンパク質は、そのポリペプチドの成熟形態が1以上のプロ配列に融合されている場合、該ポリペプチドの不活性形態であってもよい。プロ配列が除去されると、通常そのような不活性前駆体は活性化される。前記プロ配列のいくつかまたは全ては、活性化の前に除去され得る。一般に、そのような前駆体はプロタンパク質と呼ばれる。

【0060】

ヌクレオチドを示す標準的な記号A、G、C、T/Uに加えて、用語「N」を本発明の特定のポリヌクレオチドを記載する際に使用することもできる。「N」は4種のDNAまたはRNAヌクレオチドのうちの任意のものが、DNAまたはRNA配列中のその示された位置にみられることを意味する。ただし、隣接するヌクレオチド位置と組み合わせて用いられる場合や正しいリーディングフレームで読まれる場合には、Nはそのようなリーディングフレーム内に早期終結コドンを生じる効果を有する核酸ではないことが好ましい。

【0061】

まとめると、本発明のポリヌクレオチドは成熟タンパク質、成熟タンパク質にリーダー配列を付け加えたもの(プレタンパク質とも呼ばれる)、プレタンパク質のリーダー配列ではない1以上のプロ配列を有する成熟タンパク質の前駆体、またはプレプロタンパク質(通常はポリペプチドの活性形態および成熟形態を生産するプロセッシング工程の間に除去される1以上のプロ配列、およびリーダー配列を有する、プロタンパク質の前駆体)をコードするものであってよい。

【0062】

本発明の態様に従うと、本発明のポリヌクレオチドの治療または予防目的での使用、特に遺伝子的免疫感作(genetic immunization)における使用が提供される。

【0063】

遺伝子的免疫感作における本発明のポリヌクレオチドの使用では、好ましくは、プラスミドDNAの筋内への直接注射(Wolffら、Hum Mol Genet(1992)1:363, Manthorpeら、Hum. Gene Ther.(1983)4:419)、特定のタンパク質担体と複合体化させたDNAの送達(Wuら、J Biol Chem.(1989)264:16985)、DNAとリン酸カルシウムとの共沈殿(BenvenistyおよびReshef, PNAS USA, (1986)83:9551)、DNAの種々の形態のリポソームへの封入(Kanedaら、Science(1989)243:375)、粒子撃ち込み(particle bombardment)(Tangら、Nature(1992)356:152, Eisenbraunら、DNA Cell Biol(1993)12:791)ならびにクローン化レトロウイルスベクターを用いたin vivo感染(Seegerら、PNAS USA(1984)81:5849)等の適切な送達方法を使

用する。

【0064】

ベクター、宿主細胞、発現系

本発明は、本発明のポリヌクレオチドを含むベクター、本発明の該ベクターにより遺伝子操作された宿主細胞ならびに組換え法による本発明のポリペプチドの生産に関する。本発明のDNA構築物から誘導されたRNAを用いてこの種のタンパク質を生産するために、無細胞翻訳系を使用することもできる。

【0065】

本発明の組換えポリペプチドは、当業者に周知の手法により、発現系を含む遺伝子操作された宿主細胞から調製することができる。従って、更なる態様において、本発明は、本発明のポリヌクレオチドを含む発現系、かかる発現系を用いて遺伝子操作された宿主細胞、ならびに組換え法による本発明のポリペプチドの生産に関する。

【0066】

本発明のポリペプチドの組換え生産のために、宿主細胞を遺伝子操作して発現系もしくはその部分または本発明のポリヌクレオチドを組み込むことができる。ポリヌクレオチドの宿主細胞への導入は、例えば、Davisら、BASIC METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY (1986) および Sambrookら、MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989) などの多くの標準的な実験室マニュアルに記載された方法、例えば、リン酸カルシウムトランスフェクション、DEAE-デキストラン媒介トランスフェクション、トランスベクション(transvection)、マイクロインジェクション、カチオン性脂質媒介トランスフェクション、エレクトロポレーション、形質導入、スクレーパーディング(scrape loading)、弾丸導入(ballistic introduction)および感染などによって行うことができる。

【0067】

適当な宿主の代表的な例として、細菌細胞(例: ストレプトコッカス、スタフィロコッカス、エンテロコッカス、大腸菌、ストレプトミセス、シアノバクテリア、枯草菌、ナイセリア・マニンギチジス(*Neisseria meningitidis*)およびモラ

クセラ・カタラーリス)、真菌細胞(例:酵母であるクルベロミセス(*Kluveromyces*)、サッカロミセス、また担子菌、カンジダ・アルビカンス(*Candida albicans*)およびアスペルギルス)、昆虫細胞(例:ショウジョウバエS2、スポドプテラSf9)、動物細胞(例:CHO、COS、HeLa、C127、3T3、BHK、293、CV-1およびBowesメラノーマ細胞)および植物細胞(例:裸子植物または被子植物の細胞)が挙げられる。

【0068】

多種多様な発現系を使用して、本発明のポリペプチドを生産することができる。そのようなベクターとして、特に、染色体、エピソームおよびウイルス由来のベクター、例えば、細菌プラスミド由来、バクテリオファージ由来、トランスポゾン由来、酵母エピソーム由来、挿入因子由来、酵母染色体エレメント由来、ウイルス(例:バキュロウイルス、SV40のようなパポバウイルス、ワクシニアウイルス、アデノウイルス、鶏痘ウイルス、仮性狂犬病ウイルス、ピコルナウイルス、レトロウイルスおよびアルファウイルス)由来のベクター、ならびにこれらの組合せに由来するベクター、例えば、コスミドやファージミドのようなプラスミドとバクテリオファージの遺伝的要素に由来するものがある。発現系構築物は発現を調節するだけでなく発現を起こさせる制御領域を含んでいてもよい。一般的に、宿主内でポリヌクレオチドを維持し、増やすかもしくは発現するのに適した系もしくはベクター、および/またはポリペプチドを発現するのに適した系もしくはベクターはどれもこの点に関して発現のために使用しうる。例えば、Sambrookら、MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL (前掲)に記載されるような、周知で日常的に用いられる種々の技法のいずれかにより、適当なDNA配列を発現系に挿入することができる。

【0069】

真核細胞における組換え発現系の場合、翻訳されたタンパク質を小胞体の内腔に、細胞周辺腔に、または細胞外の環境に分泌させるために、適当な分泌シグナルを発現されるポリペプチドに組み込むことができる。これらのシグナルは該ポリペプチドに対して内因性であっても、異種シグナルであってもよい。

【0070】

組換え細胞培養物から本発明のポリペプチドを回収し精製するには、硫酸アンモニウムまたはエタノール沈殿、酸抽出、アニオンまたはカチオン交換クロマトグラフィー、ホスホセルロースクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィーおよびレクチンクロマトグラフィーを含めた周知の方法を用いることができる。最も好ましくは、イオン金属アフィニティークロマトグラフィー(ion metal affinity chromatography: IMAC)が精製に用いられる。ポリペプチドが細胞内合成、単離および/または精製中に変性されるときは、タンパク質を再生させるための周知の技法を用いて、活性のあるコンフォメーションを復元することが可能である。

【0071】

また、前記発現系はウイルスまたは細菌等の組換え生存微生物であってもよい。目的とする遺伝子を組換え生存ウイルスまたは細菌のゲノム内に挿入することができる。この生存ベクターを用いての接種またはin vivo感染により、抗原のin vivo発現および免疫応答の誘導がもたらされる。この目的のために使用するウイルスおよび細菌としては、例えば、ポックスウイルス(例えば、ワクシニアウイルス、鶏痘ウイルス、カナリア痘ウイルス)、アルファウイルス(シンドビスウイルス、セムリキ森林ウイルス、ヴェネズエラウマ脳炎ウイルス)、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ピコルナウイルス(ポリオウイルス、ライノウイルス)、ヘルペスウイルス(水痘-帯状ヘルペスウイルス等)、リステリア、サルモネラ、シゲラ、ナイセリア、BCG、がある。これらのウイルスおよび細菌は有毒であっても、または生ワクチンを得るために種々の方法により弱毒化されていてもよい。そのような生ワクチンもまた、本発明の一部を成すものである。

【0072】

診断アッセイ、予後アッセイ、血清型判別(serotyping)アッセイおよび変異アッセイ

また、本発明は、本発明のBASB118ポリヌクレオチドおよびポリペプチドの診断用試薬としての使用に関する。真核生物(特に哺乳動物、とりわけヒト)におけるBASB118ポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチドの検出により、疾患、

疾患の段階または薬剤に対する感染生物の応答を診断するための診断方法が提供される。真核生物(特に哺乳動物、とりわけヒト、特にBASB118遺伝子もしくはタンパク質を含む生物に感染した、または感染した可能性のあるヒト)を、種々の周知の技法および本明細書中で示す方法により核酸レベルまたはアミノ酸レベルで検出することができる。

【0073】

予後、診断または他の分析用のポリペプチドおよびポリヌクレオチドは、感染したと思われる個体および/または感染した個体の生体材料から得ることができる。これらのいずれかの供給源に由来するポリヌクレオチド、特にDNAまたはRNAを検出のために直接使用してもよいし、分析前にPCRまたは他の増幅法を使って酵素的に増幅してもよい。また、RNA(特にmRNA)、cDNAおよびゲノムDNAを同様の方法で使用することもできる。増幅を用いて、個体に存在する感染生物または常在生物の種および系統を、該生物の選択したポリヌクレオチドの遺伝子型の分析により特徴付けることができる。欠失および挿入は、近縁の生物(好ましくは同じ属で異なる種の生物または同じ種で異なる系統の生物)から選択された基準配列の遺伝子型と比較したときの増幅産物のサイズの変化により検出できる。点突然変異は増幅DNAを標識したBASB118ポリヌクレオチド配列とハイブリダイズさせることで同定できる。完全にもしくは有意にマッチした配列と、不完全にもしくはより有意にミスマッチである二重鎖とは、DNAまたはRNAそれぞれについて、DNアーゼまたはRNアーゼ消化により、または融解温度もしくは再生キネティクスの差を検出することにより区別できる。また、ポリヌクレオチド配列の差異は、基準配列と比較した場合のゲルでのポリヌクレオチド断片の電気泳動の移動度の変化により検出できる。これは変性剤を用いても用いなくても実施できる。また、ポリヌクレオチドの差異は、直接DNAまたはRNA塩基配列決定によっても検出できる(例えば、Myersら, Science 230:1242(1985)を参照のこと)。特定位置での配列変化はヌクレアーゼプロテクションアッセイ(例えば、RNアーゼ、V1およびS1プロテクションアッセイ)または化学的開裂法によっても確認できる(Cottonら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:4397-4401(1985)を参照のこと)。

【0074】

別の実施形態において、BASB118ヌクレオチド配列またはその断片を含むオリゴヌクレオチドプローブのアレイを構築して、例えば、遺伝的突然変異、血清型、分類学的な分類または同定の効率的なスクリーニングを実施することができる。アレイ技法は周知であって一般に適用可能であり、これを使用して遺伝子発現、遺伝的連鎖、および遺伝的多様性を含む分子遺伝学における疑問に取り組むことができる（例えば、Cheeら, Science, 274:610 (1996)を参照のこと）。

【0075】

かくして、別の態様において、本発明は、

(a) 本発明のポリヌクレオチド（好ましくは、配列番号1に示すヌクレオチド配列）もしくはその断片、

(b) (a) のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列、

(c) 本発明のポリペプチド（好ましくは、配列番号2のポリペプチド）もしくはその断片、または

(d) 本発明のポリペプチド（好ましくは、配列番号2のポリペプチド）に対する抗体、
を含む、診断用キットに関する。

【0076】

このようなキットにおいて、(a)、(b)、(c)または(d)が実質的な構成成分であることが理解されよう。このようなキットは疾患または疾患への罹りやすさなどを診断するうえで有用である。

【0077】

本発明はまた、診断薬としての本発明のポリヌクレオチドの使用に関する。疾病または病原性に関連した、本発明のポリヌクレオチド、好ましくは配列番号1に示すポリヌクレオチド変異型の検出は、該ポリヌクレオチドの過少発現、過剰発現または改変した発現により生ずる疾病、疾病の進行の予後、疾病のステージの決定、またはその疾病への罹りやすさの診断に追加しうる、またはその診断を下しうる診断用ツールを提供するだろう。該ポリヌクレオチドに突然変異がある生物、特に感染症の生物を、本明細書の他に記載されているさまざまな技法によ

りポリヌクレオチドレベルで検出することができる。

【0078】

また本発明のポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチドにおいて突然変異または多型性(対立遺伝子変異)を有する生物由来の細胞を、種々の技法によってポリヌクレオチドレベルまたはポリペプチドレベルで検出することができ、それにより例えば血清型別にすることができる。例えば、RT-PCRを使用して、RNAにおける突然変異を検出することができる。特に好ましくは、RT-PCRを、例えばGeneScanなどの自動検出システムと組み合わせて使用する。RNA、cDNAまたはゲノムDNAもまた同じ目的でPCRに使用することができる。例えば、BASB118ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに相補的なPCRプライマーを使用して、突然変異を同定し、解析することができる。

【0079】

更に本発明は、5'末端および/または3'末端から取り除いた1、2、3または4個のヌクレオチドを有するプライマーを提供する。これらのプライマーは特に、生体材料などの個体由来のサンプルから単離したBASB118 DNAおよび/またはRNAを増幅するのに使用しうる。該プライマーを使用して感染した個体から単離されたポリヌクレオチドを増幅することができ、次いでそのポリヌクレオチドは、ポリヌクレオチド配列の解明のための種々の技法に付すことができる。このようにして、ポリヌクレオチド配列における突然変異を検出し、かつ使用して、感染症または該感染症のステージもしくは進行を診断および/または予後判定するか、あるいは該感染因子を血清型に分ける、および/または分類することができる。

【0080】

本発明は更に、疾患、好ましくは細菌感染症、より好ましくはモラクセラ・カタラーリスにより引き起こされる感染症を診断する方法を提供する。該方法には、生体材料などの個体由来のサンプルから、配列番号1に示す配列を有するポリヌクレオチドの発現レベルの上昇を測定することが含まれる。BASB118ポリヌクレオチドの発現の増加または低下は、当業界で公知のポリヌクレオチドの定量法、例えば増幅、PCR、RT-PCR、RNaseプロテクション、ノーザンブロットティング、分光測定法、その他のハイブリダイゼーション法などの方法のいずれか1つに

より測定することができる。

【0081】

更に、正常な対照組織サンプルと比較した場合のBASB118ポリペプチドの過剰発現を検出するための本発明の診断アッセイを使用して、例えば感染症の有無を検出しうる。宿主から得られたサンプル中（生体材料など）のBASB118ポリペプチドのレベルを測定するのに使用しうるアッセイ法は当業者によく知られている。こうしたアッセイ法として、ラジオイムノアッセイ、競合結合アッセイ、ウエスタンブロット分析、抗体サンドイッチアッセイ、抗体検出、ELISAアッセイなどがある。

【0082】

本発明のポリヌクレオチドは、ポリヌクレオチドアレイ、好ましくは高密度アレイまたはグリッドの構成成分として使用することができる。これらの高密度アレイは、診断用途および予後判定の用途に特に有用である。例えば、それぞれが異なる遺伝子を含み、更に本発明のポリヌクレオチドを含むスポットの1セットを、生体サンプルから得たまたは生体サンプルから誘導したプローブを利用して、ハイブリダイゼーションまたは核酸増幅などにより、プロービングすることを使用することができ、それによって個体中の特定のポリヌクレオチド配列または関連配列の存在を決定することができる。そのような配列の存在は、病原体の存在、特にモラクセラ・カタラーリスの存在を示し得るものであり、疾患もしくは疾患の進行を診断および/または予後判定するのに有用でありうる。配列番号1に示すポリヌクレオチド配列のいくつかの変異体を含むグリッドが好ましい。また、配列番号2のポリペプチド配列をコードするポリヌクレオチド配列のいくつかの変異体を含むグリッドが好ましい。

【0083】

抗体

本発明のポリペプチドおよびポリヌクレオチド、もしくはそれらの変異体、またはそれらを発現する細胞は、該ポリペプチドまたはポリヌクレオチドにそれぞれ免疫特異的な抗体を製造するための免疫原として使用することができる。用語「免疫特異的」とは、本発明のポリペプチドに対する抗体の親和性が、従来技術

の関連した他のポリペプチドに対する親和性よりも実質的に高いことを意味する。

【0084】

本発明の特定の好ましい実施形態において、BASB118ポリペプチドまたはポリヌクオチドに対する抗体が提供される。

【0085】

本発明のポリペプチドまたはポリヌクレオチドに対して生成された抗体は、慣用のプロトコルを用いて、動物（好ましくはヒト以外）に本発明のポリペプチドおよび/もしくはポリヌクレオチド、またはそのどちらかもしくは両方のエピトープ含有断片、どちらかもしくは両方の類似体、あるいはどちらかもしくは両方を発現する細胞を投与することにより得ることができる。モノクローナル抗体の調製には、連続細胞系の培養物により抗体を産生させる当技術分野で公知の任意の技法を用いることができる。例を挙げると、Kohler, G.およびMilstein, C.の方法（Nature 256:495-497(1975)）、Kozborらの方法（Immunology Today 4:72(1983)）およびColeらの方法（Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, pg77-96, Alan R. Liss, Inc.(1985)）など種々の方法がある。

【0086】

本発明のポリペプチドまたはポリヌクレオチドに対する一本鎖抗体を産生するために、一本鎖抗体の調製法（米国特許第4,946,778号）も適用することができる。また、本発明のポリペプチドまたはポリヌクレオチドに免疫特異的なヒト化抗体を発現させるために、トランスジェニックマウスまたは他の生物もしくは他の哺乳動物などの動物を利用することができる。

【0087】

あるいは、ファージディスプレイ法を利用して、抗BASB118の保持についてスクリーニングしたヒト由来のリンパ球のPCR増幅したv遺伝子のレパートリー、あるいは天然ライブラリー（McCaffertyら、(1990)Nature 348, 552-554；Marksら、(1992)Biotechnology 10, 779-783）のいずれかから、本発明のポリペプチドに対し結合活性を有する抗体遺伝子を選択することができる。これらの抗体の親和性を、例えば、チェーンシャuffling（chain shuffling：Clacksonら、(1991

)Nature 352:628)により改良することもできる。

【0088】

前述の抗体を用いて、本発明のポリペプチドまたはポリヌクレオチドを発現するクローンを単離または同定したり、例えばアフィニティークロマトグラフィーでそのポリペプチドまたはポリヌクレオチドを精製することもできる。

【0089】

従ってその中でも、BASB118ポリペプチドまたはBASB118ポリヌクレオチドに対する抗体を使用して、感染症、特に細菌感染症を治療しうる。

【0090】

ポリペプチド変異体には、抗原的に、エピトープ的にまたは免疫学的に本発明の特定の態様を形作る等価変異体が含まれる。

【0091】

好ましくは、前記抗体またはその変異体を改変し、個体におけるその免疫原性がより低くなるようにする。例えば、該個体がヒトである場合、該抗体は「ヒト化」されているのが最も好ましく、その際、ハイブリドーマ化された抗体の相補性決定領域は、例えばJonesら(1986)Nature 321, 522-525、またはTempestら(1991)Biotechnology 9, 266-273に記載のようにヒトモノクローナル抗体中に導入される。

【0092】

アンタゴニストおよびアゴニスト - アッセイおよび分子

また本発明のポリペプチドおよびポリヌクレオチドを用いて、例えば、細胞、無細胞調製物、化学ライブラリーおよび天然産物混合物中の、小分子基質とリガンドとの結合を評価することができる。これらの基質およびリガンドは、天然基質およびリガンドであってもよいし、または構造的もしくは機能的にミメティックであってもよい。例えば、Coliganら、Current Protocols in Immunology 1(2): 5章(1991)を参照のこと。

【0093】

スクリーニング法では、本発明のポリペプチドもしくはポリヌクレオチド、または該ポリペプチドもしくはポリヌクレオチドを担持する細胞もしくは膜、また

は該ポリペプチドの融合タンパク質、への候補化合物の結合を、該候補化合物に直接または間接的に結合される標識を用いて簡単に測定できる。あるいは、スクリーニング法では標識した競合物質との競合を用いることもある。さらに、こうしたスクリーニング法では、該候補化合物が該ポリペプチドもしくはポリヌクレオチドの活性化または抑制により生ずるシグナルを結果的にもたらすか否かを、該ポリペプチドもしくはポリヌクレオチドを含有する細胞に適した検出系を用いて試験することができる。一般的には、既知のアゴニストの存在下で活性化のインヒビターをアッセイして、アゴニストによる活性化に該候補化合物の存在が与える影響を観察する。アゴニストまたはインヒビターの不在下で、該候補化合物が該ポリペプチドもしくはポリヌクレオチドの活性化を抑制するか否かを調べることによる反アゴニストまたはインヒビターのスクリーニング法では、場合によっては、構成的に活性のあるポリペプチドならびに / または構成的に発現されるポリペプチドおよびポリヌクレオチドが用いられる。さらに、これらのスクリーニング法は、候補化合物と本発明のポリペプチドもしくはポリヌクレオチドを含む溶液とを混ぜ合わせて混合物をつくり、この混合物中のBASB118ポリペプチドおよび / もしくはポリヌクレオチド活性を測定し、そしてこの混合物のBASB118ポリペプチドおよび / もしくはポリヌクレオチド活性をスタンダードと比較する各ステップを単に含む。本発明のポリペプチド、ならびに系統学的におよび / または機能的に関連するポリペプチドのアンタゴニストを同定するためのハイスループットスクリーニングアッセイでは、上記のようなFc部分とBASB118ポリペプチドから作製されるような融合タンパク質も使用することができる(D. Bennettら, J. Mol. Recognition, 852-58 (1995) およびK. Johansonら, J. Biol. Chem., 270(16):94599471 (1995)を参照のこと)。

【0094】

また、本発明のポリペプチドに結合するおよび / または該ポリペプチドと相互作用するポリヌクレオチド、ポリペプチドおよび抗体を用いて、細胞内でのmRNAおよび / またはポリペプチドの産生に及ぼす添加化合物の作用を検出するためのスクリーニング法を組み立てることができる。例えば、当業界で公知の標準方法によりモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体を用いて、ポリペプチドの

分泌レベルまたは細胞結合レベルを測定するためのELISAアッセイを構築することができ、これは適切に操作された細胞または組織からのポリペプチドの産生を抑制または増強する物質（それぞれアンタゴニストまたはアゴニストともいう）の探索に用いることができる。

【0095】

本発明はまた、BASB118ポリペプチドもしくはポリヌクレオチドの作用を増強する（アゴニスト）もしくはブロックする（アンタゴニスト）化合物、特に静菌性および/もしくは殺菌性の化合物を同定するための、該化合物のスクリーニング法を提供する。該スクリーニング法は、ハイスループット技術を伴いうる。例えば、アゴニストまたはアンタゴニストについてスクリーニングするために、BASB118ポリペプチドおよび該ポリペプチドの標識基質もしくはリガンドを含有する、合成反応混合物、細胞構成成分（膜、細胞エンベロップ、もしくは細胞壁）またはそれらの任意の調製物を、BASB118のアゴニストもしくはアンタゴニストでありうる候補分子の不在下または存在下でインキュベートする。該候補分子の、BASB118ポリペプチドを作動させるまたは拮抗阻害する能力は、標識リガンドの結合が減少すること、または該基質からの産物の生成が減少することに反映される。むやみに結合する、すなわちBASB118ポリペプチドの作用を誘導することなく結合する分子は、最も有望な、有効なアンタゴニストである。十分に結合する分子、および場合により基質からの産物の生成速度を上昇させる分子、シグナル伝達を増強する分子、または化学チャネル活性を増加させる分子は、アゴニストである。場合により、基質からの産物の生成、シグナル伝達、または化学チャネル活性の速度もしくはレベルの検出を、レポーター系を用いて強化させることができる。この点において有効でありうるレポーター系には、限定するものではないが、産物に変換される比色用標識基質、BASB118ポリヌクレオチドもしくはポリペプチド活性の変化に反応するレポーター遺伝子、および当技術分野で公知の結合アッセイが含まれる。

【0096】

BASB118アゴニストについてのアッセイの他の例は、競合阻害アッセイに適切な条件下で、BASB118と、BASB118結合分子、組換えBASB118結合分子、天然基質

もしくはリガンド、または基質もしくはリガンドミメティックを有する潜在的なアゴニストとを結合させる、競合アッセイである。BASB118を、放射性または比色用化合物などで標識することができ、それにより結合分子に結合したまたは生成物に変換されたBASB118分子数を正確に決定して、潜在的なアンタゴニストの有効性を評価しうる。

【0097】

潜在的なアンタゴニストには他に、本発明のポリヌクレオチドおよび/もしくはポリペプチドに結合し、それによりその活性または発現を抑制または無効にする、有機小分子、ペプチド、ポリペプチドおよび抗体が含まれる。潜在的なアンタゴニストはまた、BASB118誘導性活性を誘導することなく、結合分子などの結合分子の同じ部位に結合し、それによりBASB118ポリペプチドおよび/もしくはポリヌクレオチドが結合するのを排除してBASB118ポリペプチドおよび/もしくはポリヌクレオチドの作用または発現を妨害する、有機小分子、ペプチド、非常に近縁なタンパク質または抗体などのポリペプチドでありうる。

【0098】

潜在的なアンタゴニストには、前記ポリペプチドの結合部位に結合しかつその部位を占有して、それにより細胞性結合分子に結合するのを妨害することにより正常な生物学的活性を妨げる小分子が含まれる。小分子の例としては、限定するものではないが、有機小分子、ペプチドまたはペプチド様分子が含まれる。他の潜在的なアゴニストには、アンチセンス分子（これらの分子についての記載は、Okano, J. Neurochem. 56: 560(1991); Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression, CRC Press, Boca Raton, FL(1988)を参照のこと）が含まれる。好ましい潜在的なアンタゴニストには、BASB118に関連した化合物およびBASB118の変異体が含まれる。

【0099】

更なる態様において、本発明は、本発明のポリペプチドまたはその断片と、各種サブクラス（IgG、IgM、IgA、IgE）の免疫グロブリンのH鎖またはL鎖の定常領域の様々な部分と、を含む遺伝子工学的に作製された可溶性融合タンパク質に関する。免疫グロブリンとしてはヒトIgG、特にIgG1のH鎖の定常部が好ましく、そ

の場合は融合がヒンジ領域で起こる。特定の実施形態では、血液凝固Xa因子で切断され得る切断配列を組み込むことで、Fc部分を簡単に除去できる。さらに、本発明は、これら融合タンパク質の遺伝子工学的作製方法、ならびに薬物スクリーニング、診断および治療におけるそれらの使用に関する。また本発明の更なる態様は、このような融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドに関する。融合タンパク質技術の例は、国際特許出願 W094/29458 およびW094/22914に記載されている。

【0100】

本明細書に示したポリヌクレオチド配列のそれぞれは、抗菌性化合物の発見および開発に使用することができる。コード化タンパク質は発現の際に、抗菌薬のスクリーニングの標的として使用されうる。それに加えて、それぞれのmRNAのコード化タンパク質またはシャイン・ダルガルノもしくはその他の翻訳促進配列のアミノ末端領域をコードするポリヌクレオチド配列を使用して、アンチセンス配列を構築し、目的のコード化配列の発現を制御することができる。

【0101】

また本発明は、病原体（1種または複数種）と、感染の続発症の原因となる真核生物（好ましくは哺乳動物）宿主との間の最初の物理的相互作用を妨害するための、本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチド、アゴニストまたはアンタゴニストの使用を提供する。特に、本発明の分子を使用して、細菌（特にグラム陽性菌および/またはグラム陰性菌）の、留置デバイス上の真核生物（好ましくは哺乳動物）細胞外マトリックスタンパク質または創傷内の細胞外マトリックスタンパク質への付着を妨害すること、真核生物（好ましくは哺乳動物）の細胞外マトリックスタンパク質と組織損傷を媒介する細菌性BASB118タンパク質との間の細菌性付着をブロックすること、および/または、留置デバイスの移植またはその他の外科的手法以外により開始される感染症の病理発生の正常進行をブロックすること、ができる。

【0102】

更に本発明の他の態様により、BASB118アゴニストおよびアンタゴニスト、好ましくは静菌性または殺菌性のアゴニストおよびアンタゴニストが提供される。

【0103】

本発明のアンタゴニストおよびアゴニストを使用して、例えば、疾病を予防し、阻害し、および/または治療しうる。

【0104】

更なる態様において本発明は、本発明のポリペプチドのミモトープ (mimotope) に関する。ミモトープは、天然ペプチドと (配列的または構造的に) 十分に類似しているペプチド配列であり、該天然ペプチドを認識する抗体により認識され得るか、あるいは適切な担体に結合した場合に該天然ペプチドを認識する抗体を生じさせることができる。

【0105】

ペプチドミモトープは、特定の目的のために、選択されたアミノ酸の付加、欠失または置換によって設計することができる。従って、該ペプチドは、タンパク質担体への結合を容易にするために改変しても良い。例えば、いくつかの化学結合法については、末端システインを含有させることが好ましい。更に、タンパク質担体に結合させたペプチドについては、該ペプチドの結合末端から遠い位置に疎水性末端を含有させて、該ペプチドの非結合末端が担体タンパク質の表面に結合したままにすることが好ましい。それにより、インタクトな天然分子の場合にみられるようなペプチドのコンホメーションと最も近似しているコンホメーションで該ペプチドを提示する。例えば、該ペプチドは、N末端システインおよびC末端疎水性アミド化テールを含有するように改変しうる。あるいは、1以上のアミノ酸のD立体異性体の付加または置換を行うことにより、例えば該ペプチドの安定性を向上させる、有益な誘導体を作製しうる。

【0106】

あるいは、ファージディスプレイ法 (EP 0 552 267 B1) などの技法を利用して、それ自体が本発明のポリペプチドに結合する能力のある抗体を用いてペプチドミモトープを同定することができる。この方法により、天然ペプチドの構造を模擬した多数のペプチド配列が生成され、またそれゆえ該配列は、抗天然ペプチド抗体に結合する能力を有するが、該配列自体が該天然ポリペプチドと有意な配列相同性を共有する必要はない。

【0107】

ワクチン

本発明の別の態様は、個体、特に哺乳動物、好ましくはヒトにおいて免疫学的応答を誘導する方法に関するものであり、この方法は、抗体および/またはT細胞免疫応答を生じさせて該個体を感染、具体的には細菌感染、最も具体的にはモラクセラ・カタラーリス(*Moraxella catarrhalis*)感染から防御するのに十分なBASB118ポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチドまたはその断片もしくは変異体を該個体に接種することを含んでなる。また、そのような免疫学的応答によって細菌複製を遅延させる方法も提供する。本発明のさらに別の態様は、個体において免疫学的応答を誘導する方法であって、BASB118ポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチド、またはその断片もしくは変異体を *in vivo* 発現させるためにBASB118ポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチドまたはその断片もしくは変異体の発現を指令する核酸ベクター、配列またはリボザイムを該個体に送達することにより、免疫学的応答を誘導して(例えば、抗体および/またはT細胞免疫応答(例えばサイトカイン産生T細胞または細胞傷害性T細胞を含む)を生じさせて)該個体、好ましくはヒトを疾病から防御する(この疾病がすでに該個体において確立されていようがいまいが防御する)ことを含んでなる方法に関する。遺伝子投与は、例えば、遺伝子を粒子またはその他のものにコーティングしてそれを所望の細胞に高速で射入することにより行われる。そのような核酸ベクターは、DNA、RNA、リボザイム、改変型核酸、DNA/RNAハイブリッド、DNA-タンパク質複合体またはRNA-タンパク質複合体を含み得る。

【0108】

本発明のさらなる態様は、免疫学的応答を誘導する能力を有している個体、好ましくはヒトに導入した場合に、そのような個体においてBASB118ポリヌクレオチドおよび/または該ポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチドに対して免疫学的応答を誘導する免疫学的組成物に関するものであり、該組成物は、組換えBASB118ポリヌクレオチドおよび/または該ポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチドを含むか、および/または本発明の該BASB118ポリヌクレオチド、該ポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチド、またはその他のポ

リペプチドの抗原をコードし、発現するDNAおよび/またはRNAを含む。この免疫学的応答は、治療または予防に使用し得るものであり、抗体免疫および/または細胞性免疫、例えばCTLもしくはCD4+T細胞から生ずる細胞性免疫のような形態をとり得る。

【0109】

BASB118ポリペプチドまたはその断片は、補助タンパク質(co-protein)または化学成分(それ自体抗体を産生してもしなくてもよいが、第1のタンパク質を安定化させ、抗原性および/または免疫原性、好ましくは防御特性を有する融合タンパク質または改変タンパク質を産生させ得る)と融合してもよい。したがって、融合組換えタンパク質は、好ましくは、抗原性補助タンパク質(例えば、インフルエンザ菌(*Haemophilus influenzae*)由来のリポタンパク質D、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)もしくは β -ガラクトシダーゼ)、またはタンパク質を可溶化して、その産生および精製を容易にする任意のその他の比較的大きい補助タンパク質をさらに含む。さらに、補助タンパク質は、該タンパク質を投与される生物の免疫系に全身性刺激(*generalized stimulation*)をもたらすという意味でアジュバントとして作用し得る。補助タンパク質は、第1のタンパク質のアミノ末端またはカルボキシ末端に結合され得る。

【0110】

本発明のワクチン組成物において、BASB118ポリペプチドおよび/もしくはポリヌクレオチド、またはこれらの断片、ミモトープ(*mimotope*)もしくは変異体もまた、例えば生存細菌ベクターなどの上述の生存組換えベクターなどのベクター中に存在してもよい。

【0111】

BASB118ポリペプチドに対する非生存ベクターもまた適切であり、その例としては、細菌外膜小胞または「ブレップ(*bleb*)」が挙げられる。OMブレップはグラム陰性細菌の二重膜の外膜に由来するものであり、多くのグラム陰性細菌(*C. trachomatis*および*C. psittaci*を含む)中に認められている(Zhou, Lら、1998、*FEMS Microbiol. Lett.* 163:223-228)。ブレップを産生することが報告されている細菌性病原体の例を挙げると、百日咳菌(*Bordetella pertussis*)、ライム病菌(*B*

orrelia burgdorferi)、マルタ熱菌(*Brucella melitensis*)、ブルセラ・オビス(*Brucella ovis*)、大腸菌(*Escherichia coli*)、インフルエンザ菌(*Haemophilus influenzae*)、レジオネラ・ニューモフィラ菌(*Legionella pneumophila*)、モラクセラ・カタラーリス菌、淋菌(*Neisseria gonorrhoeae*)、髄膜炎(*Neisseria meningitidis*)、緑膿菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、およびエルジニア・エンテロコリチカ(*Yersinia enterocolitica*)などがあるが、これらが全てではない。

【0112】

ブレップは、天然の立体構造のままの外膜タンパク質を提示するという利点を有しており、ワクチンに特に有用である。また、外膜において1種以上の分子の発現が改変されるように細菌を操作して、ブレップをワクチンの用途のために改善することができる。従って、例えば、外膜上にある所望の免疫原性タンパク質(BASB118ポリペプチドなど)の発現を導入またはアップレギュレーションすることができる(例えば、プロモーターの改変などによる)。これに代えて、またはこれに加えて、関係のない外膜分子(非保護抗原または免疫優性であるが、可変的タンパク質であるものなど)または有害な外膜分子(例えば、LPSなどの毒性分子、または自己免疫応答を誘導する可能性のあるものなど)の発現をダウンレギュレーションすることもできる。これらの手法は、下記により詳細に論述する。

【0113】

BASB118遺伝子の非コード隣接領域は、該遺伝子の発現において重要な制御エレメントを含有する。この制御は、転写レベルおよび翻訳レベルの双方で起こる。該遺伝子のオープンリーディングフレームの上流または下流のどちらかにあるこの領域の配列はDNA配列決定により得ることができる。この配列情報により、異なるプロモーターエレメント、終結配列、誘導性配列エレメント、リプレッサー、相変異を担うエレメント、シャイン-ダルガルノ(shine-dalgarno)配列、制御に関与する二次構造を有する可能性のある領域、ならびに他の種類の制御モチーフまたは配列などの、潜在的制御モチーフの決定が可能になる。

【0114】

該配列情報により、BASB118遺伝子の天然の発現を調節することができる。該遺伝子発現のアップレギュレーションは、プロモーター、シャイン-ダルガルノ

配列、潜在的リプレッサーもしくはオペレーターエレメント、または関連のある他のあらゆるエレメントを改変することによって起こり得る。同様に、発現のダウンレギュレーションは、同様な種類の改変により達成することができる。あるいは、相変異配列を変化させることにより、遺伝子の発現を相変異制御下に置くこともでき、また、この制御下からはずすこともできる。他の手法では、遺伝子の発現を、発現制御を可能とする1種以上の誘導性エレメントの制御下に置くこともできる。このような制御の例としては、温度シフトによる誘導、選択的炭化水素またはその誘導體、微量元素、ビタミン、補助因子、金属イオンなどのような誘導性基質を添加することによる誘導などが挙げられるが、限定はされない。

【0115】

上述のような改変は、種々の手段により導入することができる。遺伝子発現に關与する配列の改変は、無作為的突然変異誘発の後に所望の表現形を選択することにより、*in vivo*で実施することができる。別の手法は、対象の領域を単離して無作為的突然変異誘発、または部位特異的置換、挿入もしくは欠失により改変することである。その後、改変された領域は、相同組換えにより細菌ゲノムに導入され、そして遺伝子発現に対する作用を測定することができる。他の手法では、対象の領域の配列を知得することにより、天然の制御配列の全部または一部を置換もしくは欠失させることができる。この場合、目的とする制御領域は、単離され、他の遺伝子に由来する制御領域、異なる遺伝子に由来する制御エレメントの組合せ、合成制御領域もしくは他の任意の制御領域を含有するか、または、野生型制御配列の選択された一部を欠失するように改変される。その後、これらの改変配列はゲノムへの相同組換えを経て細菌に導入されうる。遺伝子発現のアップレギュレーションに用いられ得る好ましいプロモーターの例としては、*porA*、*porB*、*lbpB*、*tbpB*、*p110*、*lst*、*hpuAB*(髄膜炎菌または淋菌に由来)；*ompCD*、*copB*、*lbpB*、*ompE*、*UspA1*；*UspA2*；*TbpB*(モラクセラ・カタラーリス菌に由来)；*p1*、*p2*、*p4*、*p5*、*p6*、*lpD*、*tbpB*、*D15*、*Hia*、*Hmw1*、*Hmw2*(インフルエンザ菌に由来)が挙げられるが、これが全てというわけではない。

【0116】

ある実施例では、遺伝子発現は、強力なプロモーターでプロモーターを置き換

えることにより調節することができる（遺伝子の上流配列を単離し、in vitroで該配列を改変し、そして相同組換えにより再度ゲノムに組込む）。アップレギュレーションは、細菌ならびに細菌から脱した（または細菌により作られる）外膜小胞の双方において得られる。

【0117】

他の実施例では、上述の手法を用いて特性がワクチンの適用にとって改善されている組換え細菌株を産生することができる。これらは、弱毒化した株、選択された抗原の発現の増大した株、免疫応答の障害となる遺伝子をノックアウトした（または該遺伝子の発現を減少させた）株、免疫優性タンパク質の発現が調節された株、外膜小胞の離脱が改変された株などを含むが、これらに限定はしない。

【0118】

従って、外膜に位置するBASB118タンパク質の発現レベルを改変する異種制御エレメントを含有する、BASB118遺伝子の改変された上流領域をも本発明は提供する。BASB118遺伝子の上流の配列を、本発明のかかる態様の上流領域は含む。該上流領域は一般的には、BASB118遺伝子の直ぐ上流の位置から始まり、ATGの開始コドンから遺伝子の上流約1000bpまでの位置まで続く。多シストロン性配列（オペロン）に位置する遺伝子の場合、上流領域は対象の遺伝子の直ぐ前で始ってもよく、またはオペロン内の最初の遺伝子の前で始ってもよい。好ましくは、本発明のかかる態様における改変された上流領域は、ATGの500～700bp上流の位置に異種プロモーターを含有する。

【0119】

従って、本発明は、改変された細菌ブレップにあるBASB118ポリペプチドを提供する。本発明はさらに、非生存膜に基づいたブレップベクターの産生が可能な改変された宿主細胞も提供する。本発明はさらに、異種制御エレメントを含有する改変された上流領域を有するBASB118遺伝子を含む核酸ベクターを提供する。

【0120】

さらに、本発明の宿主細胞および細菌性ブレップを提供するための方法も本発明において提供される。

【0121】

また本発明は、本発明のポリペプチドおよび/またはポリヌクレオチドならびに免疫刺激性DNA配列(例えば、Sato, Yら, Science 273:352(1996)に記載されているものなど)を含む組成物、特にワクチン組成物、ならびに方法を提供する。

【0122】

また、本発明は、細菌細胞表面タンパク質の非可変領域をコードすることが分かっている既知のポリヌクレオチドまたはその特定の断片を、モラクセラ・カタラーリスに感染した動物モデルでのそのような遺伝子による免疫感作実験に用いられるポリヌクレオチド構築物において使用する方法も提供する。そのような実験は、予防または治療的免疫応答を生起させ得るタンパク質エピトープを同定するのに特に有用である。この手法により、その後、哺乳動物、特にヒトにおける細菌感染、特にモラクセラ・カタラーリス感染の予防剤または治療的処置の開発のために、感染しないことまたは感染を除去することに成功している動物の必須の器官に由来する特定価のモノクローナル抗体の調製が可能になると考えられる。

【0123】

また本発明は、本発明の免疫原性組換えポリペプチドおよび/またはポリヌクレオチドならびに製薬上許容される担体などの適当な担体を含むワクチン製剤も提供する。このポリペプチドおよびポリヌクレオチドは胃の中で分解される可能性があるため、どちらも非経口的に(例えば、皮下、筋肉内、静脈内または皮内注射により)投与することが好ましい。非経口投与に適した製剤としては、酸化防止剤、緩衝剤、静菌性化合物およびこの製剤を受容者の体液、好ましくは血液と等張にする溶質を含みうる水性および非水性の無菌注射液、並びに懸濁化剤または増粘剤を含みうる水性および非水性の無菌懸濁液がある。こうした製剤は1回量容器または数回量容器(例えば、密閉アンプルおよびバイアル)で提供することができ、また、使用直前に無菌の液状担体を添加するだけでよい凍結乾燥状態で保管することもできる。

【0124】

また、本発明のワクチン製剤は該製剤の免疫原性を増強するためのアジュバン

ト系を含んでいてもよい。好ましくは、前記アジュバント系は優先的にTH1型の応答を生じさせる。

【0125】

免疫応答は極端な2つのカテゴリー(体液性または細胞媒介性免疫応答[慣例では、それぞれ抗体による、および細胞エフェクターによる防御機構によって特徴付けられている])に大まかに区別することができる。これらの応答カテゴリーは、TH1型免疫応答(細胞性応答)およびTH2型免疫応答(体液性応答)と呼ばれている。

【0126】

極端なTH1型免疫応答は、抗原特異的でハプロタイプ拘束性細胞傷害性Tリンパ球の生成およびナチュラルキラー細胞の応答により特徴付けられる。マウスではTH1型応答はIgG2aサブタイプの抗体の生成により特徴付けられることが多いが、ヒトではこれらはIgG1型抗体に相当する。TH2型免疫応答はマウスIgG1、IgAおよびIgMを含む広範囲の免疫グロブリンアイソタイプの生成により特徴付けられる。

【0127】

これらの2タイプの免疫応答の発生を陰で駆動している力はサイトカインであると考えられる。高濃度のTH1型サイトカインは所与の抗原に対して細胞媒介性免疫応答を好んで誘導する傾向があるが、高濃度のTH2型サイトカインは前記抗原に対して体液性免疫応答を好んで誘導する傾向がある。

【0128】

TH1およびTH2型免疫応答の区別は絶対的なものではない。実際、ある人は、主にTH1であるとか、主にTH2であると記載されるような免疫応答を支持している。しかしながら、多くの場合、MosmannおよびCoffmanによりマウスCD4+ve T細胞クローンについて記載された内容(Mosmann, T.R. およびCoffmann, R.L. (1989) TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. Annual Review of Immunology, 7, p145-173)から、サイトカインのファミリーを考慮するのが都合がよい。慣例上、TH1型応答はTリンパ球によるINF- およびIL-2サイトカイン産生と関連している。TH1型免疫

応答の誘導に直接関わることの多い他のサイトカインは、IL-12等のT細胞によっては産生されない。対照的に、TH2型応答はIL-4、IL-5、IL-6およびIL13の分泌に関連している。

【0129】

特定のワクチンアジュバントがTH1またはTH2型のいずれかのサイトカイン応答の刺激にとりわけ適していることが知られている。慣例上、ワクチン接種または感染後の免疫応答におけるTH1：TH2平衡の最良の指標としては、抗原再刺激後のin vitroでのTリンパ球によるTH1もしくはTH2サイトカイン産生の直接測定、および/または抗原特異的抗体応答のIgG1：IgG2a比の測定が挙げられる。

【0130】

従って、TH1型アジュバントは、抗原によりin vitroで再刺激された際に優先的に単離されたT細胞集団を刺激して高濃度のTH1型サイトカインを産生し、CD8+細胞傷害性Tリンパ球の発生およびTH1型アイソタイプに関連した抗原特異的免疫グロブリン応答を促進するものである。

【0131】

TH1細胞応答を優先的に刺激し得るアジュバントは、国際特許出願番号W094/00153およびW095/17209に記載されている。

【0132】

3脱-0-アシル化モノホスホリルリピドA(3D-MPL)はそうしたアジュバントの1つである。これはGB2220211(Ribi)により知られている。化学的には、該アジュバントは3脱-0-アシル化モノホスホリルリピドAと4、5または6アシル化鎖との混合物であり、Ribi Immunochem. Montanaにより製造される。3脱-0-アシル化モノホスホリルリピドAの好ましい形態は、欧州特許第0 689 454 B1号(SmithKline Beecham Biologicals SA)に開示されている。

【0133】

好ましくは、3D-MPLの粒子は、0.22ミクロンの膜を通り抜けて滅菌ろ過されるのに十分な程度小さい(欧州特許第0 689 454号)。3D-MPLは投与量あたり10µg～100µg、好ましくは25～50µgの範囲で存在する。この場合、抗原は通常投与量あたり2～50µgの範囲で存在する。

【0134】

別の好ましいアジュバントは、QS21(Quillaja Saponaria Molinaの樹皮から得た、Hplc精製した毒性の無い画分)を含む。任意でこれを3脱-0-アシル化モノホスホリルリピドA(3D-MPL)と、場合により担体と共に混合することもできる。

【0135】

QS21の製造方法は米国特許第5,057,540号に開示されている。

【0136】

QS21を含有する反応性の無いアジュバント製剤は以前に記載されている(W096/33739)。QS21およびコレステロールを含むそうした製剤は、抗原と共に製剤する場合には良好なTH1刺激性アジュバントであることが示されている。

【0137】

TH1細胞応答の優先的刺激物質である別のアジュバントとしては、免疫調節性の(immunomodulatory)オリゴヌクレオチド、例えばW096/02555に開示されている非メチル化CpG配列が挙げられる。

【0138】

また、前述したもののような異なるTH1刺激アジュバントの組み合わせも、TH1細胞応答の優先的な刺激物質であるアジュバントを提供する際に考慮される。例えば、QS21を3D-MPLと共に製剤化することができる。通常、QS21:3D-MPL比は1:10~10:1であり、好ましくは1:5~5:1であり、多くの場合は実質的に1:1である。最適な共働作用のために好ましい範囲は、2.5:1~1:1の3D-MPL:QS21である。

【0139】

好ましくは、本発明のワクチン組成物中に担体も存在する。前記担体は水中油型エマルジョンであっても、リン酸アルミニウムまたは水酸化アルミニウム等のアルミニウム塩であってもよい。

【0140】

好ましい水中油型エマルジョンは代謝可能な油、例えばスクアレン、 α -トコフェロールおよびTween80を含む。特に好ましい態様では本発明のワクチン組成物中の抗原をそのようなエマルジョン中でQS21および3D-MPLと組み合わせる。更に、前記水中油型エマルジョンはスパン85および/またはレシチンおよび/また

はトリカプリリン(tricaprylin)を含んでいてもよい。

【0141】

通常、ヒトへの投与の場合は、QS21および3D-MPLは投与量あたり1~200 μ gの範囲内、例えば10~100 μ g、好ましくは10~50 μ gの範囲内でワクチン中に存在する。通常、水中油型エマルジョンは、2~10%のスクアレン、2~10%の α -トコフェロールおよび0.3~3%のTween80を含む。好ましくは、スクアレン： α -トコフェロール比は1以下であり、これによってより安定なエマルジョンが提供される。また、スパン85は1%という濃度で存在する。幾つかの場合、本発明のワクチンが更に安定化剤を含むことが有益であろう。

【0142】

毒性の無い水中油型エマルジョンは、好ましくは、毒性の無い油(例えばスクアレンもしくはスクアレン)、乳化剤(例えばTween80)を水性担体中に含む。前記水性担体は、例えば、リン酸緩衝化生理食塩水でありうる。

【0143】

水中油型エマルジョン中にQS21、3D-MPLおよび α -トコフェロールを含む特に有効なアジュバント製剤はW095/17210に記載されている。

【0144】

また本発明は、本発明のワクチン製剤を他の抗原、特に癌、自己免疫疾患および関連病態の治療に有用な抗原と組み合わせて含む多価ワクチン組成物を提供する。そのような多価ワクチン組成物は前記のTH1誘導性アジュバントを含みうる。

。

【0145】

本発明は、特定のBASB118ポリペプチドおよびポリヌクレオチドに関して記載されているが、本発明はその天然のポリペプチドおよびポリヌクレオチドの断片、ならびに組換えポリペプチドまたはポリヌクレオチドの免疫原性に実質的に影響を及ぼさない付加、欠失または置換をもつ類似のポリペプチドおよびポリヌクレオチドを含むものと理解されるべきである。

【0146】

組成物、キットおよび投与

本発明のさらなる態様では、細胞または多細胞生物に投与するためのBASB118ポリヌクレオチドおよび/またはBASB118ポリペプチドを含む組成物が提供される。

【0147】

また本発明は、本明細書で検討したポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチドまたはそのアゴニストまたはアンタゴニストを含む組成物にも関する。本発明のポリペプチドおよびポリヌクレオチドは、細胞、組織または生物に使用するために、非滅菌担体または滅菌担体(例えば個体への投与に適した製薬用担体など)とともに用いてもよい。そのような組成物は、例えば、培地添加剤または治療有効量の本発明のポリペプチドおよび/またはポリヌクレオチドならびに製薬上許容される担体または賦形剤を含む。かかる担体としては、限定するものではないが、生理食塩水、緩衝化生理食塩水、デキストロース、水、グリセロール、エタノールおよびそれらの組み合わせが挙げられ得る。製剤は投与の様式に適合させるべきである。本発明はさらに、本発明の上記組成物の1種以上の成分を充填した容器を1以上含んでなる診断用および製剤用のパックおよびキットに関する。

【0148】

本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチドおよびその他の化合物は、単独で用いてもよく、治療用化合物などのその他の化合物とともに用いてもよい。

【0149】

医薬組成物は、任意の有効で都合のよい様式、例えば、特に局所投与、経口投与、肛門投与、腔内投与、静脈内投与、腹腔内投与、筋肉内投与、皮下投与、鼻腔内投与、または経皮経路での投与によって投与し得る。

【0150】

治療または予防において、活性剤は注射可能な組成物として、例えば無菌水性分散液、好ましくは等張液として、個体に投与し得る。

【0151】

更なる態様においては、本発明は、治療に有効な量のポリペプチドおよび/またはポリヌクレオチド(例えば可溶性形態の本発明のポリペプチドおよび/また

はポリヌクレオチド)、アゴニストペプチド/アンタゴニストペプチド、または低分子化合物を、製薬上許容し得る担体または賦形剤と組み合わせて含む医薬組成物を提供する。そのような担体には、生理食塩水、緩衝化生理食塩水、デキストロース、水、グリセロール、エタノールおよびそれらの組合せが含まれるが、これらに限定されるものではない。本発明はさらに、前述の本発明の組成物の1種以上の成分を充填した容器を1以上含んでなる医薬用パックおよびキットに関するものである。本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチドおよび他の化合物は、単独で用いてもよく、または治療用化合物等の他の化合物と組み合わせて用いてもよい。

【0152】

医薬組成物は投与経路、例えば全身または経口による投与経路に適合させることができる。全身投与に適した形態は、注入(注射)、典型的には静注である。皮下、筋肉内または腹腔内のような他の注入経路も使用できる。全身投与の別の手段には、胆汁酸塩、フシジン酸、その他の界面活性剤などの浸透剤を用いた経粘膜および経皮投与がある。さらに、本発明のポリペプチドまたは他の化合物を腸溶剤またはカプセル剤として製剤化し得るのであれば、経口投与も可能である。これらの化合物を軟膏、ペースト、ゲル、溶液、粉末などの剤形で局所に投与しても、かつ/または局在化させてもよい。

【0153】

哺乳動物、特にヒトへの投与の場合、活性剤の日用量は0.01mg/kg~10mg/kg、典型的には約1mg/kgであると予想される。医師は、任意の状況において、個体に最も適した実際の投与量(これは特定の個体の年齢、体重および応答により様々である)を決定するであろう。上記の投与量は、平均的な場合の代表例である。もちろん、より高いか低い投与量範囲にメリットがあるような場合もあり得る。そのような場合も本発明の範囲に含まれる。

【0154】

必要な投与量範囲は、ペプチドの選択、投与経路、製剤の性質、患者の状態の性質、そして治療する医師の判断に左右される。しかし、適当な投与量は患者の体重1kgあたり0.1~100 μ gの範囲である。

【0155】

ワクチン組成物は、注射可能な形態であるのが都合がよい。通常のアジュバントを用いることにより免疫応答を高めることができる。ワクチン接種に適した単位投与量は、0.5~5マイクログラム/kgの抗原であり、そのような投与量を1~3週間間隔で1~3回投与するのが好ましい。前記の投与量範囲で本発明の化合物を用いた場合、適当な個体への投与を不可能とするような有害な中毒作用は観察されない。

【0156】

しかしながら、入手可能な化合物が多様であること、投与経路の効率が異なることを考慮すれば、必要とされる投与量は広範に変動することが予測される。例えば、経口投与は静注による投与よりも高い投与量を必要とすると予想されよう。こうした投与量レベルの変動は、当業界でよく理解されているような、標準的経験的な最適化手順を用いて調整することができる。

【0157】

配列データベース、有形媒体(tangible medium)における配列、およびアルゴリズム

ポリヌクレオチドおよびポリペプチドの配列は、その2次元構造および3次元構造を決定し、類似の相同性をもつ別の配列を同定する際の価値ある情報源を提供する。これらの手法は、コンピュータ読み取り可能媒体中に配列を保存し、次いで既知の巨大分子構造プログラムにおいて、またはGCGプログラムパッケージなどの公知の検索ツールにより配列データベースを検索するためにその保存データを用いることで、最大限促進される。

【0158】

また、本発明は、文字配列または列、特に遺伝子配列またはコード化タンパク質配列の解析方法も提供する。好ましい配列解析方法としては、例えば、同一性および類似性解析などの配列相同性解析法、DNA、RNAおよびタンパク質構造解析法、配列のアセンブリ方法、分岐解析法、配列モチーフ解析法、オープンリーディングフレーム決定法、核酸塩基呼出し(calling)法、コドン使用頻度解析法、核酸塩基トリミング(trimming)法、および配列決定クロマトグラムピーク解析法

が挙げられる。

【0159】

相同性確認を行うためのコンピュータに基づく方法であって、コンピュータ読み取り可能媒体中に本発明のポリヌクレオチドの配列を含む第1ポリヌクレオチド配列を提供する工程、および該第1ポリヌクレオチド配列を少なくとも1つの第2のポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列と比較して相同性を確認する工程を含む上記方法を提供する。

【0160】

相同性確認を行うためのコンピュータに基づく方法であって、コンピュータ読み取り可能媒体中に本発明のポリペプチドの配列を含む第1ポリペプチド配列を提供する工程および該第1ポリペプチド配列を少なくとも1つの第2のポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列と比較して相同性を確認する工程を含む上記方法も提供される。

【0161】

限定するものではないが、特許および特許出願のような本明細書で引用した刊行物および参考文献は、あたかも各刊行物または参考文献がそれぞれ本明細書に参照により組み込まれることが具体的にかつ個別に指摘されているように、その全内容が参照により本明細書に組み込まれる。本出願が優先権を主張している任意の特許出願も、刊行物および参考文献について上記したように、その全内容が参照により本明細書に組み込まれる。

【0162】

定義

当技術分野で知られた「同一性」とは、場合によっては、ポリペプチド配列またはポリヌクレオチド配列の比較により決定された、2以上のかかる配列間の類縁性のことである。当技術分野ではまた、「同一性」は、場合によっては、ポリペプチド配列またはポリヌクレオチド配列の鎖間の一致度(match)により決定された、このような配列間の配列類縁性の程度を意味する。「同一性」は公知の方法により難なく算出することができ、こうした方法として、例えば Computational Molecular Biology, Lesk, A.M.編, Oxford University Press, New York, 1

988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D.W. 編, Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A.M. and Griffin, H.G. 編, Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J. 編, M Stockton Press, New York, 1991; および Carillo, H. and Lipman, D., SIAM J. Applied Math., 48: 1073 (1988) に記載された方法があるが、これらに限らない。同一性を決定するための方法は、検討する配列間で最大級のマッチングが得られるように設計される。同一性を決定する方法は一般に入手可能なコンピュータプログラムに編集されている。2配列間の同一性を決定するためのコンピュータプログラム法としては、GCGプログラムパッケージにおけるGAPプログラム(Devereux, J.ら, Nucleic Acids Research 12(1):387 (1984))、BLASTP、BLASTN(Altschul, S.F.ら, J. Molec. Biol. 215:403-410 (1990)) ならびにFASTA(PearsonおよびLipman Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85; 2444-2448(1988))があるが、これらに限らない。BLASTプログラムファミリーはNCBI および他のソースから一般に入手可能である (BLAST Manual, Altschul, S.ら, NCBI NLM NIH Bethesda, MD 20894; Altschul, S.ら, J. Mol. Biol. 215: 403-410 (1990))。公知のSmith Watermanアルゴリズムも同一性の決定に使用することができる。

【0163】

ポリペプチド配列を比較するためのパラメーターは次のものを含む：

アルゴリズム：Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48: 443-453 (1970)

比較マトリックス：BLOSSUM62、Hentikoff and Hentikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 10915-10919 (1992)

ギャップペナルティ：8

ギャップ長ペナルティ：2

これらのパラメーターを用いて有効なプログラムは Genetics Computer Group (Madison WI) から「gap」プログラムとして一般に入手可能である。前記のパラメーターはペプチド比較のためのデフォルトパラメーター(default paramet

er) である (末端ギャップのペナルティーは無し)。

【0164】

ポリヌクレオチド配列を比較するためのパラメーターは次のものを含む：

アルゴリズム：Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48: 443-453 (1970)

比較マトリックス：マッチ = +10、ミスマッチ = 0

ギャップペナルティー：50

ギャップ長ペナルティー：3

これらのパラメーターを用いて有用であるプログラムは Genetics Computer Group (Madison WI) から「gap」プログラムとして公に入手可能である。これらは核酸比較のためのデフォルトパラメーターである。

【0165】

ポリヌクレオチドとポリペプチドについての「同一性」の好ましい意味は、場合によっては、下記の(1)および(2)に示される。

【0166】

(1) ポリヌクレオチドの実施形態は、配列番号1に示す基準配列に対して少なくとも50、60、70、80、85、90、95、97または100%の同一性を有するポリヌクレオチド配列を含む単離されたポリヌクレオチドをさらに含む。ここで、該ポリヌクレオチド配列は、配列番号1に示す基準配列と同一であるか、または該基準配列に対して、一定の整数個までのヌクレオチド変異を含んでいてもよい。そのような変異は少なくとも1個のヌクレオチドの欠失、置換(トランジションおよびトランスバージョンを含む)または挿入よりなる群から選択され、こうした変異は基準ヌクレオチド配列の5'もしくは3'末端位置、またはこれらの末端位置の間のどこに存在してもよく、基準配列中のヌクレオチドの間に個々に、または基準配列内に1以上の連続するグループとして散在する。そのようなヌクレオチド変異の数は、配列番号1に示すヌクレオチドの総数に、同一性%を示す整数を100で割った値を掛け、次いでその積を配列番号1に示すヌクレオチドの総数から差し引くことにより、すなわち、次式：

$$n_n = x_n - (x_n \cdot y)$$

により求めることができる。式中、 n_n はヌクレオチド変異の数であり、 x_n は

配列番号1に示すヌクレオチドの総数であり、 y は50%については0.50、60%については0.60、70%については0.70、80%については0.80、85%については0.85、90%については0.90、95%については0.95、97%については0.97または100%については1.00であり、 \cdot は掛算演算子の記号であり、さらに x_n と y の非整数の積は、その積を x_n から引く前に、最も近似する整数に切り下げる。配列番号2のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列の改変は、そのコード配列にナンセンス、ミスセンスまたはフレームシフト突然変異を生じさせ、それにより、こうした変異後に該ポリヌクレオチドによりコードされたポリペプチドを改変させることができる。

【0167】

例として、本発明のポリヌクレオチド配列は、配列番号1に示す基準配列と同一である、すなわち基準配列に対して100%の同一性を有し得るか、または同一性%が100%未満となるように該基準配列に対して一定の整数個までの核酸変異を含んでいてもよい。そのような変異は少なくとも1個の核酸の欠失、置換(トランジションおよびトランスバージョンを含む)または挿入よりなる群から選択され、こうした変異は基準ポリヌクレオチド配列の5'もしくは3'末端位置、またはこれらの末端位置の間どこに存在してもよく、基準配列中の核酸の間に個々に、または基準配列内に1以上の連続するグループとして散在する。所定の同一性%についての核酸変異の数は、配列番号1に示す核酸の総数に、同一性%値を示す整数を100で割った値を掛け、次いでその積を配列番号1に示す核酸の総数から差し引くことにより、すなわち、次式：

$$n_n - x_n \cdot y$$

により求めることができる。式中、 n_n は核酸変異の数であり、 x_n は配列番号1に示す核酸の総数であり、 y は例えば70%については0.70、80%については0.80、85%については0.85などであり、 \cdot は掛算演算子の記号であり、さらに x_n と y の非整数の積は、その積を x_n から引く前に、最も近似する整数に切り下げる。

【0168】

(2) ポリペプチドの実施形態は、配列番号2のポリペプチド基準配列に対して

少なくとも50、60、70、80、85、90、95、97または100%の同一性を有するポリペプチドを含む単離されたポリペプチドをさらに含む。ここで、該ポリペプチド配列は、配列番号2の基準配列と同一であるか、または該基準配列に対して、一定の整数個までのアミノ酸変異を含んでいてもよい。そのような変異は少なくとも1個のアミノ酸の欠失、置換（保存的および非保存的置換を含む）または挿入よりなる群から選択され、こうした変異は基準ポリペプチド配列のアミノまたはカルボキシ末端位置、またはこれらの末端位置の間のどこに存在してもよく、基準配列中のアミノ酸の間に個々に、または基準配列内に1以上の連続するグループとして散在する。そのようなアミノ酸変異の数は、配列番号2に示すアミノ酸の総数に、同一性%を示す整数を100で割った値を掛け、次いでその積を配列番号2に示すアミノ酸の総数から差し引くことにより、すなわち、次式：

$$n_a - x_a \cdot y$$

により求めることができる。式中、 n_a はアミノ酸変異の数であり、 x_a は配列番号2に示すアミノ酸の総数であり、 y は50%については0.50、60%については0.60、70%については0.70、80%については0.80、85%については0.85、90%については0.90、95%については0.95、97%については0.97または100%については1.00であり、 \cdot は掛算演算子の記号であり、さらに x_a と y の非整数の積は、その積を x_a から引く前に、最も近似する整数に切り下げる。

【0169】

例として、本発明のポリヌクレオチド配列は、配列番号2の基準配列と同一である、すなわち基準配列に対して100%の同一性を有し得るか、または同一性%が100%未満となるように該基準配列に対して一定の整数個までのアミノ酸変異を含んでいてもよい。そのような変異は少なくとも1個のアミノ酸の欠失、置換（保存的および非保存的置換を含む）または挿入よりなる群から選択され、こうした変異は基準ポリペプチド配列のアミノもしくはカルボキシ末端位置、またはこれらの末端位置の間のどこに存在してもよく、基準配列中のアミノ酸の間に個々に、または基準配列内に1以上の連続するグループとして散在する。所定の同一性%についてのアミノ酸変異の数は、配列番号2に示すアミノ酸の総数に、同一性%値を示す整数を100で割った値を掛け、次いでその積を配列番号2に示す

アミノ酸の総数から差し引くことにより、すなわち、次式：

$$n_a - x_a \cdot y$$

により求めることができる。式中、 n_a はアミノ酸変異の数であり、 x_a は配列番号2に示すアミノ酸の総数であり、 y は例えば70%については0.70、80%については0.80、85%については0.85などであり、 \cdot は掛算演算子の記号であり、さらに x_a と y の非整数の積は、その積を x_a から引く前に、最も近似する整数に切り下げる。

【0170】

「個体」は、本明細書で生物に関して用いられる場合、多細胞真核生物、例えば限定するものではないが、後生動物、哺乳動物、ヒツジ(ovid)、ウシ(bovid)、サル(simian)、霊長類、ヒトなどを意味する。

【0171】

「単離された」とは、天然の状態から「人間の手によって」改変されたことを意味し、すなわち「単離された」組成物または物質が天然に存在するのであれば、それはそのもとの環境から変化しているか分離されており、またはその両方である。例えば、生存している生物の体内に自然界で存在するポリヌクレオチドまたはポリペプチドは「単離された」ものではないが、その天然状態の共存物質から分離されたポリヌクレオチドまたはポリペプチドは、本明細書中で用いられるように、「単離された」ものである。さらに、形質転換、遺伝子操作または任意のその他の組換え法により生物に導入されるポリヌクレオチドまたはポリペプチドは、該生物（生物は生きていても生きていなくてもよい）中に存在しているとしても「単離された」ものである。

【0172】

「ポリヌクレオチド」とは、一般に任意のポリリボヌクレオチドまたはポリデオキシリボヌクレオチドを指し、これは一本鎖および二本鎖の領域を含む、修飾されていないRNAもしくはDNA、または修飾されたRNAもしくはDNAであり得る。

【0173】

「変異体」とは、基準のポリヌクレオチドまたはポリペプチドと異なるが、不

可欠な性質を保持しているポリヌクレオチドまたはポリペプチドのことである。典型的なポリヌクレオチドの変異体は基準ポリヌクレオチドとヌクレオチド配列の点で相違する。この変異体のヌクレオチド配列の変化は、基準ポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドのアミノ酸配列を変更しても、しなくてもよい。ヌクレオチドの変化は、以下で述べるように、基準配列によりコードされるポリペプチドのアミノ酸の置換、欠失、付加、融合および末端切断(トランケーション)をもたらす。典型的なポリペプチドの変異体は基準ポリペプチドとアミノ酸配列の点で相違する。一般的には、基準ポリペプチドの配列と変異体の配列が全般的によく類似しており、多くの領域で同一となるような相違に限られる。変異体と基準ポリペプチドは任意に組み合わせた1以上の置換、欠失、付加によりアミノ酸配列が相違してよい。置換または挿入されるアミノ酸残基遺伝子コードによりコードされるものであっても、なくてもよい。ポリヌクレオチドまたはポリペプチドの変異体は対立遺伝子変異体のように天然に存在するものでも、天然に存在することが知られていない変異体であってもよい。ポリヌクレオチドおよびポリペプチドの天然に存在しない変異体は、突然変異誘発法または直接合成により作製することができる。

【0174】

「疾患」は、細菌による感染によって引き起こされるか、該感染に関連した任意の疾病を意味する。そのような疾患としては例えば、乳児および小児における中耳炎、高齢者における肺炎、副鼻腔炎、院内感染および侵襲性疾患、聴覚障害、中耳内の体液蓄積、聴覚神経損傷、言語学習遅発、上気道の感染および中耳の炎症を伴う慢性中耳炎、が挙げられる。

【0175】

実施例

下記の実施例は、特に詳細に記載した場合を除き、当業者によく知られた常用の標準的方法により行った。これらの実施例は説明のためのものであり、本発明を限定するものではない。

【0176】

実施例1：モラクセラ・カタラーリスATCC 43617株由来のBASB118遺伝子のDNA

配列決定

モラクセラ・カタラーリスATCC 43617株 (MC2931株とも呼ばれている)由来のBASB118遺伝子のDNA配列を配列番号1に示す。BASB118ポリヌクレオチド配列の翻訳産物は配列番号2に示す。

【0177】

実施例2：組換えBASB118を発現するプラスミドの構築

A：BASB118のクローニング

EcoRI とSalI の制限酵素部位をMC-Lip10-Fn/t-RI (5' - AGG CAG AGG GAA TT C ATG CAT AAA AGT TAT CCT ACT AGT A -3') [配列番号3]の順方向増幅プライマー、および MC-Lip10RCh/t-Sal (5' -AGG CAG AGG GTC GAC TTA ATG GTG ATG GTG ATG GTG GCT TAA TCG GTG ACG CTT GGC GGT CG -3') [配列番号4] 逆方向増幅プライマーにそれぞれ導入し、成熟BASB118タンパク質がC末端に (His)6アフィニティークロマトグラフィータグを含む融合タンパク質として発現され得るように、PCR産物を大腸菌発現プラスミドpTL22中に指向性クローニングした。BASB118 PCR産物を増幅反応液から、シリカゲルを用いたスピncラム (QiaGen) を製造元の指示どおりに用いて精製した。クローニングに必要なEcoRI とSalI末端を作製するために、続いて精製したPCR産物をEcoRI とSalI制限酵素で製造者(Life Technologies)の推奨するとおりに順に消化した。最初の制限酵素消化に続いて、該PCR産物を上述のとおりスピncラムを通して脱塩して精製し、滅菌水で溶出した後に2回目の制限酵素消化を行った。消化したDNA断片を再度シリカゲルに基づくスピncラムを用いて精製した後、pTL22プラスミドと連結させた。

【0178】

B：発現ベクターの作製

発現プラスミドpTL22をライゲーション用に調製するために、該プラスミドを、EcoRIおよびSalIの両方で同様に完全消化し、次いで自己ライゲーションを防ぐために製造者の指示する通りウシ腸管ホスファターゼ (CIP、5'末端1pmol当り約0.02単位、Life Technologies) で処理した。調製ベクターに対して、消化した断片を約5倍のモル過剰で使用して、ライゲーション反応液を設定した。標準的な約20µlのライゲーション反応液(約16、約16時間)は、当技術分野で

周知の方法を用いて、T4 DNAリガーゼ（約2.0単位/反応、Life Technologies）を使用して行った。このライゲーションのアリコート（約5 μ l）を使用して、当技術分野で周知の方法に従ってエレクトロコンピテントJM109細胞を形質転換した。約1.0mlのLBブロス中、37 $^{\circ}$ Cで約2～3時間の増殖時間に続いて、形質転換した細胞をアンピシリン(100 μ g/ml)を含むLB寒天プレート上に播いた。抗生物質は、選択のために含ませた。プレートを37 $^{\circ}$ Cで約16時間、一晚培養した。個々のApRコロニーを滅菌済つまようじで拾い、それを用いて新鮮なLB ApRプレートに「パッチ」接種し、また同様に約1.0mlのLB AnRブロス培養液に接種した。パッチプレートおよびブロス培養液を両方とも、標準的なインキュベーター（プレートの場合）または振とうさせたウォーターバス中で、37 $^{\circ}$ Cにて一晚培養した。全細胞に基づくPCR解析を用いて、形質転換体がBASB118 DNAインサートを含むことを確認した。ここで、約1.0mlのLB Apブロス一晚培養液を1.5mlポリプロピレンチューブに移し、Beckmann微量遠心機中で遠心分離することにより（約3分間、室温、約12,000 \times g）細胞を回収した。この細胞ペレットを約200 μ lの無菌水に懸濁し、その約10 μ lアリコートを使用して、BASB118順方向および逆方向増幅プライマーを含む最終容量約50 μ lのPCR反応液を設定した。PCR反応液の成分の最終濃度は、Taqポリメラーゼ約5.0単位を使用したこと以外は、本質的には実施例2で指定されたものと同じであった。初めの95 $^{\circ}$ Cの変性ステップを3分間に増やして、細菌細胞の熱破壊とプラスミドDNAの放出が確実に起こるようにした。ABI Model 9700 サーマルサイクラーを使用し、32サイクル、3ステップの熱増幅プロファイル（すなわち95 $^{\circ}$ C、45秒間、55～58 $^{\circ}$ C、45秒間、72 $^{\circ}$ C、1分間）によって、溶解した形質転換体サンプル由来のBASB118断片を増幅した。熱増幅に続き、該反応液の約20 μ lアリコートをアガロースゲル電気泳動（Tris-酢酸-EDTA(TAE)バッファー中、0.8% アガロース）により分析した。ゲル電気泳動およびエチジウムブロマイド染色の後、DNA断片をUV照射により可視化した。DNA分子サイズスタンダード（1kbラダー、Life Technologies）を被験サンプルに並べて電気泳動し、PCR産物のサイズを見積もるのに用いた。予想されるサイズのPCR産物を生成する形質転換体を、BASB118発現構築体を含有する菌株として同定した。次に発現プラスミド含有株を組換えBASB118の誘導性発現について解析した。

【0179】

C: PCR-陽性形質転換体の発現解析

上記で同定された各PCR-陽性形質転換体について、パッチプレートから得た細胞を、アンピシリン(100 µg/ml)を含有する約5.0mlのLBブロスに接種し、37 °Cで振とう(約250rpm)しながら一晩培養した。一晩の種培養液(約1.0ml)のアリコートをし、125mlエーレンマイヤーフラスコに入れた約25mlのLB Apブロスに接種し、培養液の濁度がO.D.600値約0.5に達するまで、すなわち中間対数期(mid-log phase)に達するまで(通常約1.5~2.0時間)、37 °Cで振とう(約250rpm)しながら増殖させた。この時点でその培養液のおよそ半分(約12.5ml)を第2の125mlフラスコに移し、さらに最終濃度1.0mMになるようIPTG(無菌水中に調製した1.0Mストック、Sigma)を添加することにより組換えBASB118タンパク質の発現を誘導した。IPTG誘導した培養液および誘導しなかった培養液の両方を、さらに4時間、37 °Cで振とうしながら培養し続けた。誘導時間後、誘導した培養液および誘導しなかった培養液の両方のサンプル(約1.0ml)を取り出し、微量遠心機での室温にて約3分間の遠心分離によって細胞を回収した。それぞれの細胞ペレットを約50 µlの無菌水に懸濁し、次いで2-メルカプトエタノールを含有する等量の2×Laemmli SDS-PAGEサンプルバッファーと混合して、沸騰しているウォーターバス中に約3分間置いてタンパク質を変性させた。IPTG誘導した粗細胞溶解物および誘導しなかった粗細胞溶解物の両方を等量ずつ(約15 µl)、2回反復して12%Tris/グリシンポリアクリルアミドゲル(1mm厚 Mini-gels, Novex)にロードした。誘導および非誘導溶解物サンプルを、標準SDS/Tris/グリシン泳動バッファー(BioRad)を使用し、慣用条件下で予め染色した分子量マーカー(SeeBlue, Novex)と共に電気泳動した。電気泳動後、一方のゲルをクーマシーブリリアントブルーR250(BioRad)で染色し、次いで脱色することで、新規のBASB118 IPTG誘導性タンパク質が可視化された。第2のゲルは、BioRad Mini-Protean II プロテイング装置およびTowbinのメタノール(20%)トランスファーバッファーを使用して、PVDF膜(0.45のミクロン孔サイズ, Novex)上に、4 °Cにて約2時間かけてエレクトロブロットした。膜のブロッキングおよび抗体インキュベーションを、当技術分野で周知の方法に従って実施した。モノクローナル抗RGS(His)3抗体、

続いてHRPに結合させた第2のウサギ抗マウス抗体(QiaGen)を用いて、BASB118組換えタンパク質の発現および正体(identity)を確認した。抗His抗体の反応パターンを、ABT不溶性基質を用いるか、またはAmersham ECL 化学発光システムを用いたHyperfilmを使用して、可視化することができた。

【0180】

実施例3：組換えBASB118の生産

菌株

モラクセラ・カタラーリス由来のBASB118をコードするプラスミド(pTLZ2)を含有する大腸菌JM109の組換え体発現株を使用して、組換えタンパク質精製の細胞マスを生産した。この発現株を、100 µg/mlのアンピシリン(Ap)を含有するLB寒天プレート上で培養し、pTLZ2が確実に保持されるようにした。-80 °Cで凍結保存するために、この株を前記と同濃度の抗生物質を含有するLBブロス中で増殖させて、その後30% (w/v) グリセロールを含有する等量のLBブロスと混合した。

【0181】

培地

組換えタンパク質生産のために使用した発酵培地は、100 µg/mlのApを含有する2X YTブロス(Difco)からなるものであった。消泡剤(Antifoam 204, Sigma)を発酵槽(fermentor)用の培地に0.25ml/Lの濃度で添加した。BASB118組換えタンパク質の発現を誘導するために、IPTG(イソプロピル β-D-チオガラクトピラノシド)を前記発酵槽に添加した(最終濃度1mM)。

【0182】

発酵

50ml実容量(working volume)を含む500mlの種用のエーレンマイヤーフラスコに、急速解凍した凍結培養物0.3mlまたは選択寒天プレート培養物から得た数個のコロニーを接種し、150rpmでサンプル台を振とうしながら 37 ± 1 °Cにて約12時間培養した(Innova 2100, New Brunswick Scientific)。次に、この種培養物を用いて、2X YTブロスならびに両方のAp抗生物質を含む5L実容量の発酵槽に接種した。この発酵槽(Bioflo 3000, New Brunswick Scientific)を、Rushtonインペラー中で 37 ± 1 °C、0.2~0.4 VVMの空気散布、250rpmにて作動させた。フラスコ

種培養物中でも発酵槽中でも、pHは調整しなかった。発酵中、前記発酵槽におけるpHは6.5～7.3の範囲で上下した。培養物が中間対数増殖期(O.D.600で約0.7単位)に達した時に、前記発酵槽にIPTG(滅菌水中で調製した1.0Mストック)を添加した。細胞を、2～4時間誘導した後、28RS Heraeus(Sepatech)またはRC5C超高速遠心機(Sorvall Instruments)のいずれかを用いる遠心分離により回収した。細胞ペーストを、処理するまで-20 で保存した。

【0183】

化学薬品および材料

バイオテクノロジー等級またはそれ以上の等級のイミダゾール、塩酸グアニジン、トリス(ヒドロキシメチル)、およびEDTA(エチレンジアミン四酢酸)は全てAmresco Chemical (Solon, Ohio)から入手した。トリトンX-100(t-オクチルフェノキシポリエトキシ-エタノール)、トリトンX-114、およびリン酸ナトリウム(一塩基のもの(monobasic))は試薬等級またはそれ以上の等級であり、Sigma Chemical Company (St.Louis, Missouri)から入手した。氷酢酸および塩酸はMallinckrodt Baker Inc. (Phillipsburg, New Jersey)から入手した。メタノールはFisher Scientific (Fairlawn, New Jersey)から入手した。Pefabloc(登録商標)SC(4-(2-アミノエチル)-ベンゼンスルホニルフルオリド)、完全プロテアーゼインヒビターカクテル錠剤(Complete protease inhibitor cocktail tablet)、およびPMSF(フェニルメチル - スルホニルフルオリド)はRoche Diagnostics Corporation (Indianapolis, Indiana)から入手した。ベスタチン、ペプスタチンA、およびE-64プロテアーゼインヒビターはCalbiochem (La Jolla, California)から入手した。ダルベッコリン酸緩衝化生理食塩水(1×PBS)はQuality Biological, Inc. (Gaithersburg, Maryland)から入手した。ダルベッコリン酸緩衝化生理食塩水(10×PBS)はBio Whittaker (Walkersville, Maryland)から入手した。BSAを含まないペンタHis抗体はQiaGen (Valencia, California)から入手した。ペルオキシダーゼ結合AffiniPureヤギ抗マウスIgGはJackson Immuno Research (West Grove, Penn.)から入手した。AEC単一溶液(AEC single solution)はZymed (South San Francisco, California)から入手した。他の全ての化学物質は試薬等級またはそれ以上の等級であった。

【0184】

Ni-キレートリングセファロースファーストフロウ(Ni-chelating Sepharose Fast Flow)樹脂はPharmacia (Sweden, California)から入手した。既製のトリス-グリシン4~20%および10~20%ポリアクリルアミドゲル、全ての泳動用バッファーおよび溶液、SeeBlue前染色スタンダード、MultiMark多着色スタンダードならびにPVDFトランスファー膜はNovex (San Diego, California)から入手した。SDS-PAGE銀染色キットはDaiichi Pure Chemicals Company Limited (Tokyo, Japan)から入手した。クーマシー染色液はBio-Rad Laboratories (Hercules, California)から入手した。Acrodisc(登録商標)PF 0.2 μ mシリンジフィルターはPall Gelman Sciences (Ann Arbor, Michigan)から入手した。GD/X 25mm使い捨てシリンジフィルターはWhatman Inc. (Clifton, New Jersey)から入手した。透析チューブ8,000 MWC0はBioDesign Inc. (Od New York, Carmal New York)から入手した。BCAタンパク質アッセイ試薬およびSnake Skin透析チューブ3,500 MWC0はPierce Chemical Co. (Rockford, Illinois)から入手した。

【0185】

実施例4： 大腸菌からの組換えBASB118の精製抽出・精製

細胞ペーストを室温にて30~60分かけて解凍した。細胞ペーストを破壊後、抽出液を1%TritonX-114含有氷冷PBSで分画した。

【0186】

細胞の破片を除去し、抽出液を37 に保温して遠心により相を分画した。

【0187】

次いで対象の画分を、10%グリセロールおよび0.05%トリトンX-100を含有するPBS(pH7.5)で平衡化させたニッケル-キレートリングセファロースファーストフロウ樹脂に通した。タンパク質は、200mMのイミダゾールを含有する同じバッファーで溶出させた。溶出したタンパク質を含む画分を、4倍量の50mM Trisバッファー(pH 7.5、2mM EDTA、10mM 塩化ナトリウム、0.05% Triton X100含有)により希釈し、DEAE-セファロース FF樹脂を通過させ、通過画分を回収した。分析により、調製物は7種類の主要な混入タンパク質を含んでいることが示された。

従って、サンプルを再び、PBS(pH7.5、10% グリセロールおよび0.05% Triton X100含有)により平衡化したニッケル-キレートングセファローズFF樹脂に通した。タンパク質は、200mM イミダゾールを含む同じバッファー中に溶出した。この調製物をPBS(pH 7.4、0.1% Triton X100含有)に対して透析し、次いで3 kDカットオフ攪拌セル上で濃縮した。

【0188】

図1-Aに示すように、精製BASB118タンパク質は、SDS-PAGE解析において、5本の主要なバンドと2本の付加的なバンドとして現れた。5本の主要なバンドは、6-ヒスチジンモチーフに対して誘起したマウスモノクローナル抗体に対して反応性を有していた(図1-B)。純度はおよそ50%程度と推定された。

【0189】

生化学的特性解析

SDS-PAGEおよびウェスタンブロット解析

組換え精製BASB118タンパク質を4~20%ポリアクリルアミドゲル上で分画し、以前に記載されたように(Thebaineら、1979, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 76:4350-4354)、100Vで1時間電気泳動することによりPVDF膜に移した。次に、このPVDF膜を5%の脱脂粉乳を含有する25mlのダルベッコリン酸緩衝化生理食塩水で前処理した。その後の全てのインキュベーションは、この前処理バッファーを用いて行った。

【0190】

PVDF膜を、予備免疫血清、免疫血清または抗His免疫血清の1:500希釈物25mlと共に室温にて1時間インキュベートした。次に、PVDF膜を洗浄バッファー(20mM トリスバッファー、pH7.5、150mM 塩化ナトリウムおよび0.05% Tween20を含む)で2回洗浄した。PVDF膜をペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ウサギまたは抗マウスIgG(Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA)の1:5000希釈物25mlと共に室温にて30分インキュベートした。次に、このPVDF膜を洗浄バッファーで4回洗浄し、Zymed(San Francisco, CA)から供給された3-アミノ-9-エチルカルバゾールおよび過酸化尿素を用いて各々10分間発色させた。

【0191】

実施例5：組換えBASB118に対する抗血清の生産

2羽のウサギに前記精製組換えBASB118タンパク質をワクチン接種することにより、該BASB118タンパク質に対する多価抗血清を生産した。一回の注射あたり約10 µgのBASB118タンパク質をおよそ21日間隔で皮下で注射することにより、各動物を全部で3回免疫した。最初の免疫前(「前採血」)および49日目と56日目に動物から採血した。

【0192】

抗BASB118タンパク質の力価を、精製組換えBASB118タンパク質(4 µg/ウェル)を用いるELISAにより測定した。力価は、XL Fitソフトウェアを用いて4-パラメーターロジスティックモデル(4-parameter logistic model)により算出した中間点力価(mid-point titer)として定義した。免疫後の力価はウサギ血清に対して1:2000であった。

【0193】

実施例6：免疫学的特性解析：BASB118の表面露出

ホルマリンで死滅させたモラクセラ・カタラーリス14,358,216,2926株(20 µg/ウェル)の完全な細胞を用いるELISAにより、抗BASB118タンパク質の力価を測定した。力価は、SoftMax Proソフトウェアを用いて4-パラメーターロジスティックモデルにより算出した中間点力価として定義した。

【0194】

ウサギ免疫血清を用いて得られた力価(それぞれ、1:312、1:1290、1:284、1:513)は、BASB118タンパク質がモラクセラ・カタラーリス細胞の表面で検出されることを示した。

【0195】

実施例7：免疫学的特性解析：殺菌活性

抗BASB118抗体の補体介在性細胞傷害活性を、上述のように調製されたBASB118タンパク質抗血清のワクチンとしての可能性を調べるために試験した。モラクセラ・カタラーリスを補体を介して殺傷することにおける免疫前血清および抗BASB118抗血清の活性を測定した。

【0196】

モラクセラ・カタラーリスの株をMueller Hintonプレート上で24時間36℃で増殖させた。数個のコロニーを125mlフラスコ中のBHI 15mlに添加した。培養物をA620が0.4になるまで200rpmで約4時間増殖させた。1回の洗浄工程の後、ペレットをHBSSに懸濁し、該菌株を1mlあたり28500CFUになるように希釈した。

【0197】

50µlの免疫前血清および抗BASB118血清(56℃で30分間不活性化したもの)を96ウェルプレートの1つめのウェルに入れ、同じ列の他のウェルにHBSSの2倍連続希釈物を入れていった。続いて、生きているモラクセラ・カタラーリス25µlを加え、該混合物を室温で15分間インキュベートした。生後間もないウサギの補体(Pel freez, clinical systems, Brown Deer, WI, USA)を予め毒性試験において決めておいた有効な希釈倍率で各ウェルに添加した。

【0198】

マイクロプレートは、カバーをかけて37℃で200rpmにて1時間インキュベートした。

【0199】

各試験には、補体対照(活性のある補体供給源または不活性化した補体供給源を含有するが血清を含まないウェル)、陽性対照(殺菌性抗体を既知の力価で含むウェル)、培養対照(血清および補体を含まないウェル)、および血清対照(補体を含まないウェル)が含まれる。

【0200】

ウサギの抗血清の殺菌性力価(同種の株の50%を殺す)は、<1:35(免疫前)および>1:300(免疫)であった。

【0201】

実施例8： BASB118ワクチンの効力；マウスにおけるM.カタラーリスの肺クリアランスの促進

このマウスモデルは、ワクチン接種後のマウスへの標準的な鼻孔内チャレンジに続いての、M.カタラーリスの肺への侵入を分析することに基づく。

【0202】

1群6匹のBALB/cマウス(雌、6週齢)に、10µgの用量に相当する100µlのワ

クチンを皮下投与して免疫し、2週間後に追加免疫する。追加免疫の1週間後にマウスを、麻酔下で左の鼻孔内へ50 μ lの細菌懸濁液(5×10^5 CFU/50 μ l)を注入してチャレンジする(マウスはケタミンとキシラジン麻酔薬を組み合わせで麻酔した; 0.24mgのキシラジン(Rompun)および0.8mgのケタミン(Imalgene)/100 μ l)。チャレンジの4時間後にマウスを殺し、肺を無菌的に切除して個々にホモジナイズする。肺当たりのCFUのlog10加重平均数は、ホモジネートの5回連続希釈物20 μ lをプレートした後のMueller-Hinton寒天プレート上で生育したコロニーを計数して測定する。肺当たりのCFUのlog10加重平均数の相加平均および標準偏差を、各群について算出する。

【0203】

結果は、分散の均等性(BrownおよびForsythe検定により検査)および正規性(Shapiro-Wilk検定により検査)を推定した後で一元配置分散分析を適用して統計的に分析する。群間の差はDunnett検定、Turkey'sのスチューデント範囲検定(HSD)およびStudent-Newman-Keuls検定により解析した。

【0204】

この実験においては、マウスの群を、AIP04に吸着させたBASB118(100 μ gのAIP04上の10 μ gのBASB118)、またはAIP04に吸着させたM.カタラーリス株ATCC 43617の死滅させた全細胞(kwc)調製物(100 μ gのAIP04上に 5×10^8 細胞)、または抗原を含まない100 μ gのAIP04のいずれかを用いて接種した。続いてマウスを、 5×10^5 CFUの生存しているM.カタラーリス株ATCC 43617細菌でチャレンジした。

【0205】

チャレンジの4時間後に、肺あたりのCFUのlog10加重平均数と標準偏差を算出した。偽免疫マウスは、チャレンジの4時間後に5.66(+/- 0.18) log10 CFU/肺を有していた。

【0206】

kwc調製物は、対照群と比較して有意な肺クリアランスを誘導した(1.3 logの差)。BASB118ワクチンは対照群と比較して肺クリアランスにおいて0.43 logの差を誘導し、対照と有意に異なっていた。

【0207】

寄託物

モラクセラ・カタラーリスのカトリン株を含む寄託物をAmerican Type Culture Collection(「ATCC」)に1997年6月21日に寄託し、受託番号43617を得た。この寄託物は、カタル球菌(*Branhamella catarrhalis*)(FroschおよびKolle)として記載され、慢性気管支炎を患っている炭坑夫の経気管吸引液から得たM.カタラーリス分離株から構築した、凍結乾燥した1.5~2.9kbのインサートライブラリーである。この寄託物は、Antimicrob. Agents Chemother. 21:506-508 (1982)に記載されている。

【0208】

該モラクセラ・カタラーリス株の寄託物は、本明細書では「寄託株」または「寄託株のDNA」と称する。

【0209】

該寄託株は、完全長BASB118遺伝子を含む。

【0210】

pQE30に挿入されたモラクセラ・カタラーリスDNAからなるベクターpMC-ORF1/2の寄託物を、American Type Culture Collection(ATCC)に1999年2月12日に寄託し、受託番号207118を指定された。

【0211】

万一本明細書の配列の記述と矛盾する場合、寄託株/クローンに含まれるポリヌクレオチドの配列、ならびにそれによってコードされる任意のポリペプチドのアミノ酸配列が優先される。

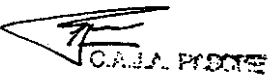
【0212】

寄託株の寄託は、特許手続上の微生物の寄託の国際的承認に関するブダペスト条約の条項に基いてなされたものである。この寄託株は、変更できず、特許発行の際には無制限または無条件に一般に公開される。寄託株は、単に当業者の便宜のために提供されるものであり、寄託が米国特許法第112条で要求されるような実施可能要件を満たす上で必要であるということを承認するものではない。

【0213】

INDICATIONS RELATING TO A DEPOSITED MICROORGANISM

(PCT Rule 13bis)

| | |
|--|--|
| A. The indications made below relate to the microorganism referred to in the description on page 62 lines 1-31. | |
| B. IDENTIFICATION OF DEPOSIT Further deposits are identified on an additional sheet <input type="checkbox"/> | |
| Name of depositary institution AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION | |
| Address of depositary institution (including postal code and country) 10801 UNIVERSITY BLVD, MANASSAS, VIRGINIA 20110-2209, UNITED STATES OF AMERICA | |
| Date of deposit 21 June 1997 and 12 February 1999 | Accession Number 43617 and 207118 |
| C. ADDITIONAL INDICATIONS (leave blank if not applicable) This information is continued on an additional sheet <input type="checkbox"/> | |
| In respect of those designations where a European Patent is sought, a sample of the deposited microorganisms will be made available until the publication of the mention of the grant of the European Patent or until the date on which the application has been refused or withdrawn, only by issue of such a sample to an expert nominated by the person requesting the sample | |
| D. DESIGNATED STATES FOR WHICH INDICATIONS ARE MADE (if the indications are not for all designated States) | |
| E. SEPARATE FURNISHING OF INDICATIONS (leave blank if not applicable) | |
| The indications listed below will be submitted to the international Bureau later (specify the general nature of the indications e.g., "Accession Number of Deposit") | |
| For receiving Office use only | For International Bureau use only |
| <input checked="" type="checkbox"/> This sheet was received with the international application | <input type="checkbox"/> This sheet was received by the International Bureau on: |
| Authorized officer  | Authorized officer |

Form PCT/RO/134 (July 1992)

【 0 2 1 4 】

配列情報

BASB118ポリヌクレオチドおよびポリペプチド配列

配列番号 1

ATCC43617株に由来するモラクセラ・カタラーリスBASB118のポリヌクレオチド配列

ATGCATAAAATGTATCCTACTAGTATTTTATTGTGTGCCGTGGTTTTGTGTCAGGCTGTGAT
 GCAGTCAAGCAGACCATCACAGACAAACCTACGCTCAGCGATGCCCAAATCACCAAATTA
 ATCCCCAAGCGTGTCAATAACGCCAAGCTATGGGCAACTGATATTGGCGATATTTTGTGAT
 GAATTATCACTACCGAAAACCGCACAAAATATCTGTACCGCTATCGCTGTCATTGACCAA
 GAATCAAATTTTCATGCCGATCCCAGCGTCCCAAACCTAGGCAATGCTGCCCTAAAAGCC
 ATTGATGACAAGCTAGAAGATAAACTTGGTAAAAATATGGCAGGCGTATTTTCGCAACATG
 CTTGAGACACGCCCAACGCCAAAAACAACCTTCATCAAACAAATCAAAGCTGTA AAAACC
 GAAAAACAGCTTGATGAGCTATACCGAGAGATTTTGTATTATTTACCAGAACCCTATAAA
 ATAGCCCCTTTAACCAACATCACAAAACCTCTCAGGACAAGGCATTGATGAACGCATCAAC
 CCTGTCAACACTTGTTCTATGCAGGTACATATCGACTACGCACGAGCACATCGCCGT
 GCCAGCATGAGCGATCGGGATTTGCGTGCCGATTTATACACACGCTATGGCGGGCTTTAT
 TACGGCATAACATCGATTAATGGTATATCAGGCAAATATGACAAGCCTTTATACCGTTTT
 GCTGATTATAATTCGGGTATGTATTCAAGCCGAAATGCTGCCTTTCAGCAGCGGATCGCT
 ACTTTAAGTGGTGAAAGCTTAGCCATTGATGGAGATTTATTGCTTTATAAAGATGGCAGC
 CCCATAAGCAAATATCCTCTACCGAAACTGCCGCCATCGCTTACTTGCTACCGCATCA
 AAACCCATCAACGCACAACAAATCCGATCTGATTTAAAAAAGAAAAAAGCTCGTATTTT
 GAAAAACCATCACTTATCGTGCGGTGAATGATATGTTTGCCAGTAAATTTGGGCGAGAG
 CCTACTTATGCCATTATGCCAAAAGTTGTCATTTTCAGGGCCCAAGCTTAGCCGAGACTTT
 GATACCAATTTGGTTTGCCACCCGTGTCAATGAACGCTATCAAACCTGCATCACGACCGCC
 AAGCGTCACCGATTAAGCTAA

配列番号 2

配列番号 1 に示すポリヌクレオチドから推定されるモラクセラ・カタラーリスBA

SB118ポリペプチド配列

MHKMYPTSILLCAVVLSGCDAVKQFITDKPTLSDAQITKLI PKRVNNAKLWATDIGDIFD
 ELSLPKTAQNICTAIAVIDQESNFHADPSVNLGNAALKAI DDKLEDKLGKNMAGVFRNM
 LETRPTPKNNFIKQIKAVKTEKQLDELYREIFDYFTRTYKIAPLNTITKLSGQIDERIN
 PVTTLGSMQVHIDYARAHRRASMSDRDLRADLYTRYGGLYYGIHRLMVYQANYDKPLYRF
 ADYNSGMYSRNAAFQORIATLSGESLAIDGDLLEYKDGSPISKISSTETAAILLATAS
 KPINAQQIRSDFKKEKTRDFEKTITYRAVNDMFASKFGREPTYAIMPKVVISGPKLSRDF
 DTNWFATRVNERYQTCITTAKRHRLS

配列番号 3

AGG CAG AGG GAA TTC ATG CAT AAA ATG TAT CCT ACT AGT A

配列番号 4

AGG CAG AGG GTC GAC TTA ATG GTG ATG GTG ATG GTG GCT TAA TCG
 GTG ACG CTT GGC GGT CG

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> SmithKline Beecham Biologicals SA

<120> Novel Compounds

<130> BM45409

<160> 4

<170> FastSEQ for Windows Version 3.0

<210> 1

<211> 1161

<212> DNA

<213> *Moraxella catarrhalis*

<400> 1

```

atgcataaaa tgtatcctac tagtatttta ttgigtgccg tggttttgtc aggctgtgat      60
gcagtcgaagc agaccatcac agacaaaacct acgctcagcg atgcccaaat caccaaatta    120
atccccaaagc gtgtcaataa cgccaagcta tgggcaactg atattggcga tatttttgat    180
gaattatcac  taccgaaaac cgacaaaat  atctgtaccg ctatcgctgt cattgaccaa    240
gaatcaaatt  ttcattgccg tcccagcgtc ccaaacttag gcaatgctgc cctaaaagcc    300
attgatgaca agctagaaga taaacttggg aaaaatatgg caggcgtatt tcgcaacatg    360
cttgagacac gcccaacgcc aaaaaacaac ttcattcaaac aaatcaaagc tgtaaaaacc    420
gaaaaacagc ttgatgagct ataccgagag atttttgatt attttaccag aacctataaa    480
atagcccctt taaccaacat cacaaaaactc tcaggacaag qcattgatga acgcatcaac    540
cctgtcacia cacttggttc tatgcaggta catatcgact acgacagagc acatcgccgt    600
gccagcatga gcgatcggga tttgcgtgcc gatttataca cacgctatgg cgggctttat    660
tacggcatac atcgattaat ggtatatcag gcaaattatg acaagccttt ataccgtttt    720
gctgattata attcgggtat gtattcaagc cgaaatgctg cctttcagca ggggatcgct    780
actttaagtg gtgaaagcct agccattgat ggagatttat tgctttataa agatggcagc    840
cccataagca aaatatcctc taccgaaact gccgccatcg ctttacttgc taccgcatca    900
aaacccatca acgcacaaca aatccgatct gattttaaaa aagaaaaaac tcgtgatttt   960
gaaaaaacca tcacttatcg tgcggtgaat gatatgtttg ccagtaaatt tgggagagag   1020
cctactttat ccattatgcc aaaagttgtc atttcagggc ccaagcttag ccgagacttt   1080
gataccaatt ggttttgccac ccgtgtcaat gaacgctatc aaacctgcat cagcaccgcc   1140
aagcgtcacc gattaagcta a                                     1161

```

<210> 2

<211> 386
 <212> PRT
 <213> *Moraxella catarrhalis*

<400> 2

```

Met His Lys Met Tyr Pro Thr Ser Ile Leu Leu Cys Ala Val Val Leu
  1              5              10              15
Ser Gly Cys Asp Ala Val Lys Gln Thr Ile Thr Asp Lys Pro Thr Leu
      20              25              30
Ser Asp Ala Gln Ile Thr Lys Leu Ile Pro Lys Arg Val Asn Asn Ala
      35              40              45
Lys Leu Trp Ala Thr Asp Ile Gly Asp Ile Phe Asp Glu Leu Ser Leu
      50              55              60
Pro Lys Thr Ala Gln Asn Ile Cys Thr Ala Ile Ala Val Ile Asp Gln
  65              70              75              80
Glu Ser Asn Phe His Ala Asp Pro Ser Val Pro Asn Leu Gly Asn Ala
      85              90              95
Ala Leu Lys Ala Ile Asp Asp Lys Leu Glu Asp Lys Leu Gly Lys Asn
      100             105             110
Met Ala Gly Val Phe Arg Asn Met Leu Glu Thr Arg Pro Thr Pro Lys
      115             120             125
Asn Asn Phe Ile Lys Gln Ile Lys Ala Val Lys Thr Glu Lys Gln Leu
      130             135             140
Asp Glu Leu Tyr Arg Glu Ile Phe Asp Tyr Phe Thr Arg Thr Tyr Lys
  145             150             155             160
Ile Ala Pro Leu Thr Asn Ile Thr Lys Leu Ser Gly Gln Gly Ile Asp
      165             170             175
Glu Arg Ile Asn Pro Val Thr Thr Leu Gly Ser Met Gln Val His Ile
      180             185             190
Asp Tyr Ala Arg Ala His Arg Arg Ala Ser Met Ser Asp Arg Asp Leu
      195             200             205
Arg Ala Asp Leu Tyr Thr Arg Tyr Gly Gly Leu Tyr Tyr Gly Ile His
      210             215             220
Arg Leu Met Val Tyr Gln Ala Asn Tyr Asp Lys Pro Leu Tyr Arg Phe
  225             230             235             240
Ala Asp Tyr Asn Ser Gly Met Tyr Ser Ser Arg Asn Ala Ala Phe Gln
      245             250             255
Gln Arg Ile Ala Thr Leu Ser Gly Glu Ser Leu Ala Ile Asp Gly Asp
      260             265             270
Leu Leu Leu Tyr Lys Asp Gly Ser Pro Ile Ser Lys Ile Ser Ser Thr
      275             280             285

```

Glu Thr Ala Ala Ile Ala Leu Leu Ala Thr Ala Ser Lys Pro Ile Asn
 290 295 300
 Ala Gln Gln Ile Arg Ser Asp Phe Lys Lys Glu Lys Thr Arg Asp Phe
 305 310 315 320
 Glu Lys Thr Ile Thr Tyr Arg Ala Val Asn Asp Met Phe Ala Ser Lys
 325 330 335
 Phe Gly Arg Glu Pro Thr Tyr Ala Ile Met Pro Lys Val Val Ile Ser
 340 345 350
 Gly Pro Lys Leu Ser Arg Asp Phe Asp Thr Asn Trp Phe Ala Thr Arg
 355 360 365
 Val Asn Glu Arg Tyr Gln Thr Cys Ile Thr Thr Ala Lys Arg His Arg
 370 375 380
 Leu Ser
 385

<210> 3
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> primer

<400> 3
 aggcagaggg aattcatgca taaaatgtat cctactagta

40

<210> 4
 <211> 62
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> primer

<400> 4
 aggcagaggg tcgacttaat ggtgatggtg atggtggctt aatcgggtgac gcttgccggt
 cg

60

62

【図面の簡単な説明】

【図1】

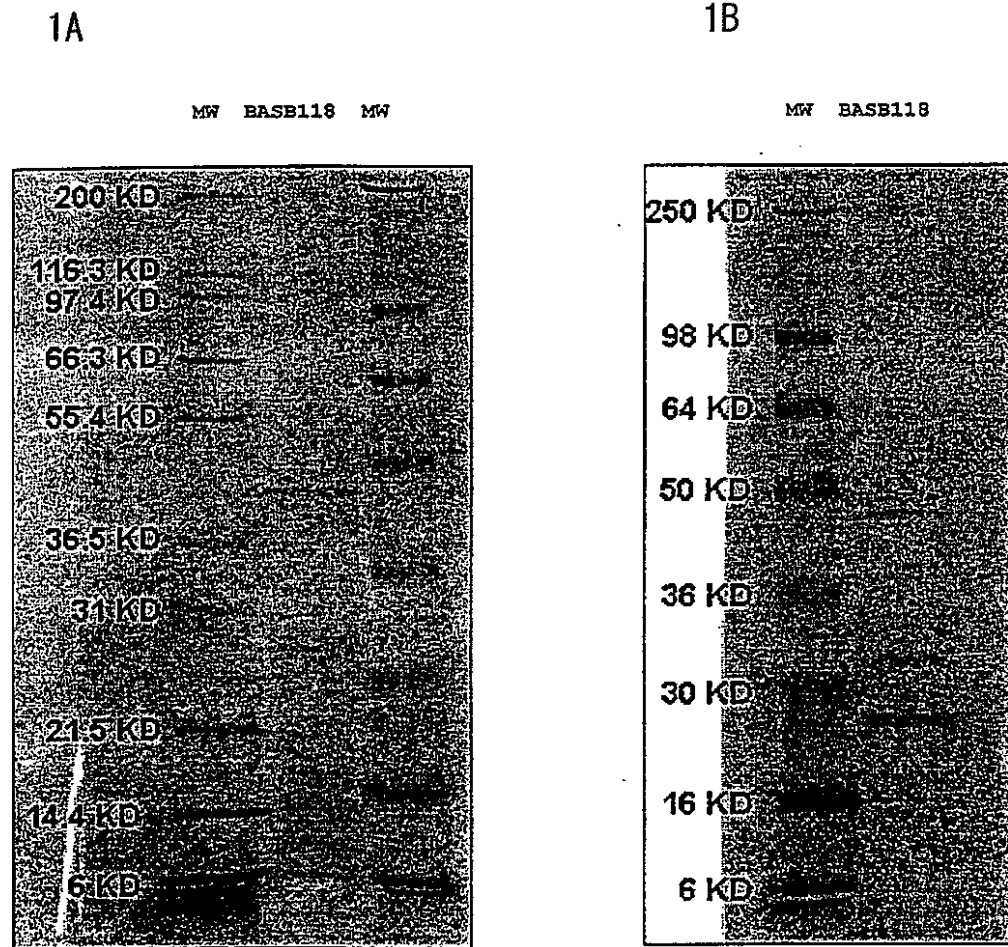
1A：精製BASB118のSDS-ポリアクリルアミドゲルのクマシー染色。

1B：精製BASB118のウエスタンブロット(抗His抗体)。

【図1】

1A SDS-ポリアクリルアミドゲルにより分離した組換え精製BASB118のクマシー染色。

1B 抗His抗体を用いた精製BASB118のウエスタンブロット。



【國際調查報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

| | | International Application No. PCT/EP 00/07360 |
|--|---|--|
| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N15/31 C07K14/21 C07K16/12 A61K39/02 A61K39/395 A61K48/00 G01N33/569 | | |
| 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) IPC 7 C07K C12N A61K G01N | | |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched | | |
| Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| A | US 5 725 862 A (MURPHY TIMOTHY F) 10 March 1998 (1998-03-10) column 3, line 20 - line 55 column 11, line 14 - column 14, line 32 column 15, line 58 - column 24, line 33 claims 1-16 | 1-26 |
| A | WO 97 13785 A (CONNAUGHT LAB ; YANG YAN PING (CA); KLEIN MICHEL H (CA); MYERS LISA) 17 April 1997 (1997-04-17) claims 1-40; figure 5 page 5, line 8 - page 9, line 15 | 1-26 |
| -/-- | | |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. | | <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex. |
| * Special categories of cited documents: *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *Z* document member of the same patent family | | |
| Date of the actual completion of the international search 30 November 2000 | | Date of mailing of the international search report 13/12/2000 |
| Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5918 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016 | | Authorized officer van Klompenburg, W |

1

Form PCT/ISA/210 (second sheet) July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/EP 00/07360

| C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|--|--|-----------------------|
| Category | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| A | MURPHY ET AL: "Studies of the outer membrane proteins of Branhamella catarrhalis" AMERICAN JOURNAL OF MEDICINE, XX, XX, vol. 88, no. SUPPL. 05A, 14 May 1990 (1990-05-14), pages 41S-45S, XP002079419 ISSN: 0002-9343 figure 1; table 2 --- | 1-26 |
| A | US 5 550 223 A (DUCHENE MICHAEL ET AL) 27 August 1996 (1996-08-27) column 1, line 19 - line 25 examples 2-5 --- | 1-26 |
| A | BOOTSMA ET AL.: "Molecular characterization of the BRO beta-lactamase of Moraxella (Branhamella) catarrhalis" ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, vol. 40, no. 4, April 1996 (1996-04), pages 966-972, XP002154256 abstract page 971 ----- | 1-26 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

International Application No
PCT/EP 00/07360

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|--|------------------|-------------------------|------------------|
| US 5725862 A | 10-03-1998 | US 5712118 A | 27-01-1998 |
| | | US 5556755 A | 17-09-1996 |
| | | AU 701340 B | 28-01-1999 |
| | | AU 7959394 A | 18-04-1995 |
| | | CA 2172728 A | 06-04-1995 |
| | | EP 0737085 A | 16-10-1996 |
| | | FI 961407 A | 21-05-1996 |
| | | JP 9503210 T | 31-03-1997 |
| | | WO 9509025 A | 06-04-1995 |
| | | WO 9713785 A | 17-04-1997 |
| AU 7208296 A | 30-04-1997 | | |
| CA 2234409 A | 17-04-1997 | | |
| EP 0866803 A | 30-09-1998 | | |
| JP 11500744 T | 19-01-1999 | | |
| US 5550223 A | 27-08-1996 | DE 3829616 A | 15-03-1990 |
| | | AU 625740 B | 16-07-1992 |
| | | AU 4098489 A | 05-04-1990 |
| | | DK 431489 A | 02-03-1990 |
| | | EP 0357024 A | 07-03-1990 |
| | | FI 894062 A | 02-03-1990 |
| | | JP 2163088 A | 22-06-1990 |
| | | PT 91599 A, B | 30-03-1990 |

フロントページの続き

| (51)Int.Cl. ⁷ | 識別記号 | F I | テーム(参考) |
|--------------------------|-------|---------------|-----------|
| A 6 1 P 31/04 | 1 7 1 | C 0 7 K 16/12 | 4 H 0 4 5 |
| C 0 7 K 14/195 | | 19/00 | |
| | | C 1 2 N 1/15 | |
| | | 1/19 | |
| C 1 2 N 1/15 | | 1/21 | |
| | | C 1 2 P 21/02 | C |
| | | G 0 1 N 33/53 | N |
| | | 33/569 | F |
| C 1 2 P 21/02 | | C 1 2 N 15/00 | Z N A A |
| G 0 1 N 33/53 | | 5/00 | A |
| 33/569 | | A 6 1 K 37/02 | |

(81)指定国 E P (A T , B E , C H , C Y ,
 D E , D K , E S , F I , F R , G B , G R , I E , I
 T , L U , M C , N L , P T , S E) , O A (B F , B J
 , C F , C G , C I , C M , G A , G N , G W , M L ,
 M R , N E , S N , T D , T G) , A P (G H , G M , K
 E , L S , M W , M Z , S D , S L , S Z , T Z , U G
 , Z W) , E A (A M , A Z , B Y , K G , K Z , M D ,
 R U , T J , T M) , A E , A G , A L , A M , A T ,
 A U , A Z , B A , B B , B G , B R , B Y , B Z , C
 A , C H , C N , C R , C U , C Z , D E , D K , D M
 , D Z , E E , E S , F I , G B , G D , G E , G H ,
 G M , H R , H U , I D , I L , I N , I S , J P , K
 E , K G , K P , K R , K Z , L C , L K , L R , L S
 , L T , L U , L V , M A , M D , M G , M K , M N ,
 M W , M X , M Z , N O , N Z , P L , P T , R O , R
 U , S D , S E , S G , S I , S K , S L , T J , T M
 , T R , T T , T Z , U A , U G , U S , U Z , V N ,
 Y U , Z A , Z W

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA13 BA31 CA04 DA06
 HA17
 4B064 AG31 BA14 BH09 CA19 CE02
 CE07 CE08 CE11 DA08 DA15
 4B065 AA01Y AB01 CA24 CA44
 CA46
 4C084 AA02 AA03 AA06 AA07 AA13
 BA01 BA02 BA22 CA53 NA14
 ZB352
 4C085 AA03 AA14 DD62
 4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10
 CA11 DA75 DA86 EA22 EA29
 EA52 FA74

| | | | |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译) | BASB 118多肽和多克隆抗体来自粘膜炎莫拉氏菌 (Moraxellacatarrhalis) | | |
| 公开(公告)号 | JP2003506044A | 公开(公告)日 | 2003-02-18 |
| 申请号 | JP2001514126 | 申请日 | 2000-07-31 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 史克必成生物兴业ANONYME | | |
| 申请(专利权)人(译) | 史克必成生物兴业ANONYME | | |
| [标]发明人 | トナードジョエル | | |
| 发明人 | トナード,ジョエル | | |
| IPC分类号 | G01N33/53 A61K38/00 A61K39/00 A61K39/395 A61K48/00 A61P31/04 C07K14/195 C07K14/21 C07K16/12 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12N15/31 C12P21/02 G01N33/569 | | |
| CPC分类号 | C07K14/212 A61K39/00 A61K48/00 | | |
| FI分类号 | A61K39/00.H A61K39/395.N A61K48/00 A61P31/04.171 C07K14/195 C07K16/12 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.C G01N33/53.N G01N33/569.F C12N15/00.ZNA.A C12N5/00.A A61K37/02 | | |
| F-TERM分类号 | 4B024/AA01 4B024/AA13 4B024/BA31 4B024/CA04 4B024/DA06 4B024/HA17 4B064/AG31 4B064/BA14 4B064/BH09 4B064/CA19 4B064/CE02 4B064/CE07 4B064/CE08 4B064/CE11 4B064/DA08 4B064/DA15 4B065/AA01Y 4B065/AB01 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA03 4C084/AA06 4C084/AA07 4C084/AA13 4C084/BA01 4C084/BA02 4C084/BA22 4C084/CA53 4C084/NA14 4C084/ZB352 4C085/AA03 4C085/AA14 4C085/DD62 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA11 4H045/DA75 4H045/DA86 4H045/EA22 4H045/EA29 4H045/EA52 4H045/FA74 | | |
| 优先权 | 1999018208 1999-08-03 GB | | |
| 外部链接 | Espacenet | | |

摘要(译)

本发明提供了BASB118多肽，编码BASB118多肽的多核苷酸以及通过重组技术生产该多肽的方法。 本发明进一步提供诊断，预防和治疗用途。