

(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2007-527706

(P2007-527706A)

(43) 公表日 平成19年10月4日(2007.10.4)

(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 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	4 B O 6 3
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 B O 6 5
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 C O 8 5
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 A	4 H O 4 5
	審査請求 有 予備審査請求 未請求	(全 28 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2006-525752 (P2006-525752)	(71) 出願人	506196247 インターベツト・インターナショナル・ペ ー・ペー
(86) (22) 出願日	平成16年9月8日(2004.9.8)		
(85) 翻訳文提出日	平成18年4月25日(2006.4.25)		
(86) 国際出願番号	PCT/EP2004/009995		オランダ国、5831・アー・エヌ・ボツ クスメール、ウイム・ドウ・コルベルスト ラート・35
(87) 国際公開番号	W02005/026200	(74) 代理人	100062007 弁理士 川口 義雄
(87) 国際公開日	平成17年3月24日(2005.3.24)	(74) 代理人	100114188 弁理士 小野 誠
(31) 優先権主張番号	03077861.7	(74) 代理人	100140523 弁理士 渡邊 千尋
(32) 優先日	平成15年9月12日(2003.9.12)	(74) 代理人	100119253 弁理士 金山 賢教
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ローソニア・イントラセルラーリスサブユニットワクチン

## (57) 【要約】

本発明は例えば新規 *Lawsonia intracellularis* 蛋白質をコードする核酸配列に関する。本発明は更にこれらの配列を含む DNA フラグメント、組換え DNA 分子及び生きた組換えキャリアーに関する。本発明は更に前記核酸配列、DNA フラグメント、組換え DNA 分子及び生きた組換えキャリアーを含む宿主細胞に関する。更に、本発明はこれらのヌクレオチド配列によりコードされる蛋白質と、ワクチン製造のためのその使用に関する。本発明は更に *Lawsonia intracellularis* 感染の防除用ワクチンとその製造方法に関する。最後に、本発明は *Lawsonia intracellularis* DNA の検出、*Lawsonia intracellularis* 抗原の検出及び *Lawsonia intracellularis* に対する抗体の検出用診断試験に関する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

*Lawsonia intracellularis* 蛋白質をコードする核酸配列又は前記蛋白質の免疫原性フラグメントをコードする前記核酸配列の一部であって、前記核酸配列又は前記その一部が配列番号 1 に記載の核酸配列に対して少なくとも 90%、好ましくは 92%、より好ましくは 94%、更に好ましくは 96% の同一性をもつ前記核酸配列又はその一部。

## 【請求項 2】

*Lawsonia intracellularis* 蛋白質をコードする核酸配列又は前記蛋白質の免疫原性フラグメントをコードする前記核酸配列の一部であって、前記核酸配列又は前記その一部が配列番号 3 に記載の核酸配列に対して少なくとも 90%、好ましくは 92%、より好ましくは 94%、更に好ましくは 96% の同一性をもつ前記核酸配列又はその一部。

10

## 【請求項 3】

*Lawsonia intracellularis* 蛋白質をコードする核酸配列又は前記蛋白質の免疫原性フラグメントをコードする前記核酸配列の一部であって、前記核酸配列又は前記その一部が配列番号 5 に記載の核酸配列に対して少なくとも 90%、好ましくは 92%、より好ましくは 94%、更に好ましくは 96% の同一性をもつ前記核酸配列又はその一部。

## 【請求項 4】

*Lawsonia intracellularis* 蛋白質をコードする核酸配列又は前記蛋白質の免疫原性フラグメントをコードする前記核酸配列の一部であって、前記核酸配列又は前記その一部が配列番号 7 に記載の核酸配列に対して少なくとも 90%、好ましくは 92%、より好ましくは 94%、更に好ましくは 96% の同一性をもつ前記核酸配列又はその一部。

20

## 【請求項 5】

*Lawsonia intracellularis* 蛋白質をコードする核酸配列又は前記蛋白質の免疫原性フラグメントをコードする前記核酸配列の一部であって、前記核酸配列又は前記その一部が配列番号 9 に記載の核酸配列に対して少なくとも 90%、好ましくは 92%、より好ましくは 94%、更に好ましくは 96% の同一性をもつ前記核酸配列又はその一部。

30

## 【請求項 6】

*Lawsonia intracellularis* 蛋白質をコードする核酸配列又は前記蛋白質の免疫原性フラグメントをコードする前記核酸配列の一部であって、前記核酸配列又は前記その一部が配列番号 11 に記載の核酸配列に対して少なくとも 90%、好ましくは 92%、より好ましくは 94%、更に好ましくは 96% の同一性をもつ前記核酸配列又はその一部。

## 【請求項 7】

請求項 1 から 6 に記載の核酸配列を含む DNA フラグメント。

## 【請求項 8】

機能的に連結されたプロモーターの制御下に請求項 1 から 6 に記載の核酸配列又は請求項 7 に記載の DNA フラグメントを含む組換え DNA 分子。

40

## 【請求項 9】

請求項 1 から 6 に記載の核酸配列、請求項 7 に記載の DNA フラグメント又は請求項 8 に記載の組換え DNA 分子を含む生きた組換えキャリアー。

## 【請求項 10】

請求項 1 から 6 に記載の核酸配列、請求項 7 に記載の DNA フラグメント、請求項 8 に記載の組換え DNA 分子又は請求項 9 に記載の生きた組換えキャリアーを含む宿主細胞。

## 【請求項 11】

配列番号 2 に記載のアミノ酸配列に対して少なくとも 90%、好ましくは 92%、より

50

好ましくは94%、更に好ましくは96%相同のアミノ酸配列を含む *Lawsonia intracellularis* 蛋白質、又は前記蛋白質の免疫原性フラグメント。

【請求項12】

配列番号4に記載のアミノ酸配列に対して少なくとも90%、好ましくは92%、より好ましくは94%、更に好ましくは96%相同のアミノ酸配列を含む *Lawsonia intracellularis* 蛋白質、又は前記蛋白質の免疫原性フラグメント。

【請求項13】

配列番号6に記載のアミノ酸配列に対して少なくとも90%、好ましくは92%、より好ましくは94%、更に好ましくは96%相同のアミノ酸配列を含む *Lawsonia intracellularis* 蛋白質、又は前記蛋白質の免疫原性フラグメント。

10

【請求項14】

配列番号8に記載のアミノ酸配列に対して少なくとも90%、好ましくは92%、より好ましくは94%、更に好ましくは96%相同のアミノ酸配列を含む *Lawsonia intracellularis* 蛋白質、又は前記蛋白質の免疫原性フラグメント。

【請求項15】

配列番号10に記載のアミノ酸配列に対して少なくとも90%、好ましくは92%、より好ましくは94%、更に好ましくは96%相同のアミノ酸配列を含む *Lawsonia intracellularis* 蛋白質、又は前記蛋白質の免疫原性フラグメント。

【請求項16】

配列番号12に記載のアミノ酸配列に対して少なくとも90%、好ましくは92%、より好ましくは94%、更に好ましくは96%相同のアミノ酸配列を含む *Lawsonia intracellularis* 蛋白質、又は前記蛋白質の免疫原性フラグメント。

20

【請求項17】

ワクチンで使用するための請求項11から16に記載の *Lawsonia intracellularis* 蛋白質。

【請求項18】

*Lawsonia intracellularis* 感染の防除用ワクチンの製造における請求項11から16に記載の *Lawsonia intracellularis* 蛋白質の使用。

【請求項19】

請求項1から6に記載の核酸配列、請求項7に記載のDNAフラグメント、請求項8に記載の組換えDNA分子、請求項9に記載の生きた組換えキャリアー、請求項10に記載の宿主細胞又は請求項11から16に記載の蛋白質と、医薬的に許容可能なキャリアーを含むことを特徴とする *Lawsonia intracellularis* 感染の防除用ワクチン。

30

【請求項20】

アジュバントを含むことを特徴とする請求項19に記載のワクチン。

【請求項21】

ブタに対して病原性のウイルスもしくは微生物に由来する付加抗原又は前記抗原をコードする遺伝情報を含むことを特徴とする請求項19又は20に記載のワクチン。

40

【請求項22】

前記ブタに対して病原性のウイルスもしくは微生物が仮性狂犬病ウイルス、ブタインフルエンザウイルス、ブタパルボウイルス、伝染性胃腸炎ウイルス、ロタウイルス、大腸菌、*Erysipelothrix rhusiopathiae*、*Bordetella bronchiseptica*、*Salmonella choleraesuis*、*Haemophilus parasuis*、*Pasteurella multocida*、*Streptococcus suis*、*Mycoplasma hyopneumoniae*及び *Actinobacillus pleuropneumoniae* から構成される群から選択されることを特徴とする請求項21に記載のワクチン。

【請求項23】

50

請求項 11 から 16 に記載の蛋白質に対する抗体を含むことを特徴とする *Lawsonia intracellularis* 感染の防除用ワクチン。

【請求項 24】

請求項 1 から 6 に記載の核酸配列、請求項 7 に記載の DNA フラグメント、請求項 8 に記載の組換え DNA 分子、請求項 9 に記載の生きた組換えキャリアー、請求項 10 に記載の宿主細胞、請求項 11 から 16 に記載の蛋白質、又は請求項 11 から 16 に記載の蛋白質に対する抗体と、医薬的に許容可能なキャリアーを混合する段階を含む請求項 19 から 23 に記載のワクチンの製造方法。

【請求項 25】

請求項 1 から 6 に記載の核酸配列、又は少なくとも 12、好ましくは 15、より好ましくは 18 ヌクレオチド長のそのフラグメントを含むことを特徴とする *Lawsonia intracellularis* に特異的な DNA の検出用診断試験。

【請求項 26】

請求項 11 から 16 に定義された蛋白質又はそのフラグメントを含むことを特徴とする *Lawsonia intracellularis* に対する抗体の検出用診断試験。

【請求項 27】

請求項 11 から 16 に定義された蛋白質又はそのフラグメントに対する抗体を含むことを特徴とする *Lawsonia intracellularis* の抗原材料の検出用診断試験。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は例えば新規 *Lawsonia intracellularis* 蛋白質をコードする核酸配列；これらの配列を含む DNA フラグメント、組換え DNA 分子及び生きた組換えキャリアー；前記核酸配列、DNA フラグメント、組換え DNA 分子及び生きた組換えキャリアーを含む宿主細胞；これらのヌクレオチド配列によりコードされる蛋白質とワクチン製造のためのその使用；*Lawsonia intracellularis* 感染の防除用ワクチンとその製造方法；並びに *Lawsonia intracellularis* DNA の検出、*Lawsonia intracellularis* 抗原の検出及び *Lawsonia intracellularis* に対する抗体の検出用診断試験に関する。

【背景技術】

【0002】

ブタ増殖性腸炎 (PPE ないし PE) は近代養豚業で世界的に重要な疾患になっている。この疾患は成長中の集団の 15% ~ 50% を冒し、既定問題集団における個体動物の 30% までを冒す。今日の年間経済損失は罹病したブタ 1 頭当たり 5 ~ 10 米ドルの飼料と施設の追加時間費用に相当すると推定されている。PPE は多様な臨床徴候 (死亡、動物の蒼白及び貧血、水様性暗赤色又は茶赤色下痢、沈鬱、食欲低下及び運動失調、成長遅延及び FCR 増加) からなる慢性及び急性症状である。しかし、一貫して 2 つの特徴がある。第 1 の特徴は検死でしか目に見えない病変であり、小腸及び結腸粘膜の肥厚である。第 2 の特徴は患部腸の腸細胞における細胞質内小型湾曲細菌の存在である。これらの細菌は現在 PPE の病因物質として認められ、*Lawsonia intracellularis* と呼ばれている。

【0003】

長年にわたり、*Lawsonia intracellularis* はサル、ウサギ、フェレット、ハムスター、キツネ、ウマ、及びダチョウやエミュに至る他の多様な動物を含むほぼ全動物に寄生することが認められている。*Lawsonia intracellularis* は鞭毛をもつグラム陰性菌であり、真核腸細胞のみで増殖し、無細胞培養は報告されていない。細胞中で生存増殖するためには、*Lawsonia intracellularis* は分裂中のクリプト細胞に侵入しなければならない。この細菌は細胞

膜と結合し、液胞を通過して腸細胞に迅速に侵入する。その後、迅速（3時間以内）に分裂し、分裂した細菌は細胞質内で自由に繁殖及び増殖する。この細菌が感染細胞の成熟を阻み、有糸分裂を続けさせ、未成熟クリプト細胞を形成させるメカニズムはまだ解明されていない。

【0004】

*Lawsonia intracellularis* 感染とこの疾患の治療及び防除に関する現在の研究は *Lawsonia intracellularis* を無細胞培地で培養できないという事実により阻まれている。*Lawsonia intracellularis* をラット腸細胞で同時培養するのに成功したという報告はあるが、*Lawsonia intracellularis* の防除用不活化ワクチンが明らかに必要とされているにも拘わらず、このようなワクチンの開発には至っていない。

10

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本発明の目的は *Lawsonia intracellularis* 感染の防除用ワクチンを提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0006】

驚くべきことに、*Lawsonia intracellularis* は単独又は組み合わせで *Lawsonia intracellularis* に対する防御免疫を誘導することが可能な6種の新規蛋白質を産生することが今回判明した。

20

【0007】

これらの新規蛋白質を以下、31.0 kD、24.8 kD、76.7 kD、56.8 kD、28.8 kD及び31.4 kD蛋白質と言う。

【0008】

新規蛋白質のアミノ酸配列を配列番号2、4、6、8、10及び12に示す。これらの蛋白質をコードする遺伝子を配列決定し、その核酸配列を配列番号1、3、5、7、9及び11に示す。

【0009】

多数の異なる核酸配列が同一蛋白質をコードし得ることは当分野で周知である。この現象はアミノ酸をコードする各三重項の2番目と特に3番目の塩基のゆらぎとして一般に知られている。この現象の結果、同一蛋白質をコードする2種の核酸には約30%の不均一性が生じる。従って、約70%の配列相同性をもつ2種の核酸配列は同一蛋白質をコードすることができる。

30

【発明を実施するための最良の形態】

【0010】

従って、1態様は *Lawsonia intracellularis* 蛋白質をコードする核酸配列と、前記蛋白質の免疫原性フラグメントをコードする前記核酸配列の部分に関し、前記核酸配列又はその部分は配列番号1の核酸配列に対して少なくとも90%の相同性をもつ。

40

【0011】

好ましくは、この *Lawsonia intracellularis* 蛋白質をコードする核酸配列又は前記核酸配列の部分は配列番号1の核酸配列に対して少なくとも92%、好ましくは94%、より好ましくは95%の相同性をもつ。98%又は100%の相同性が更に好ましい。

【0012】

ヌクレオチド相同性は [www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2sea/bl2.html](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2sea/bl2.html) で入手可能なサブプログラム「BLASTN」を選択することによりコンピュータープログラム「BLAST 2 SEQUENCES」を使用して決定することができる。

50

## 【0013】

このプログラムの1参考文献はTatiana A. Tatusova, Thomas L. Madden FEMS Microbiol. Letters 174:247-250 (1999)である。使用するパラメータは以下のデフォルトパラメータである。マッチのリワード: +1。ミスマッチのペナルティ: -2。オープンギャップ: 5。伸長ギャップ: 2。ギャップx\_ドロップオフ: 50。

## 【0014】

所定核酸配列が本発明の核酸配列であるかどうかを決定するための別のアプローチはこの所定核酸配列が配列番号1 (又は配列番号3、5、7、9又は11、下記参照)に記載のヌクレオチド配列とストリンジент条件下でハイブリダイズするか否かに関する。

10

## 【0015】

核酸配列が配列番号1、又は当然のことながら配列番号3、5、7、9及び11に記載のヌクレオチド配列とストリンジент条件下でハイブリダイズするならば、その配列は本発明の核酸配列であるとみなされる。

## 【0016】

ストリンジент条件の定義はMeinkothとWahl (1984. Hybridization of nucleic acids immobilized on solid supports. Anal. Biochem. 138:267-284.)の式:

$$T_m = [81.5 + 16.6 (\log M) + 0.41 (\%GC) - 0.61 (\% \text{ホルムアミド}) - 500 / L] - 1 / 1\% \text{ミスマッチ}$$

(式中、Mは1価カチオンのモル濃度であり、%GCはDNA中のグアノシン及びシトシンヌクレオチドの百分率であり、Lは塩基対におけるハイブリッドの長さである)に従う。

20

## 【0017】

ストリンジент条件は核酸配列又はそのフラグメントが最大10%のミスマッチをもつ場合にも配列番号1、3、5、7、9又は11のいずれかに記載の核酸配列とハイブリダイズする条件である。

## 【0018】

本態様は配列番号3の核酸配列に対して少なくとも90%の相同性をもつ、Lawsonia intracellularis蛋白質をコードする核酸配列と、前記蛋白質の免疫原性フラグメントをコードする前記核酸配列の部分にも関する。

30

## 【0019】

好ましくは、このLawsonia intracellularis蛋白質をコードする核酸配列又は前記核酸配列の部分は配列番号3の核酸配列に対して少なくとも92%、好ましくは94%、より好ましくは96%の相同性をもつ。98%又は100%の相同性が更に好ましい。

## 【0020】

本態様は配列番号5の核酸配列に対して少なくとも90%の相同性をもつ、Lawsonia intracellularis蛋白質をコードする核酸配列と、前記蛋白質の免疫原性フラグメントをコードする前記核酸配列の部分にも関する。

40

## 【0021】

好ましくは、このLawsonia intracellularis蛋白質をコードする核酸配列又は前記核酸配列の部分は配列番号5の核酸配列に対して少なくとも92%、好ましくは94%、より好ましくは96%の相同性をもつ。98%又は100%の相同性が更に好ましい。

## 【0022】

本態様は配列番号7の核酸配列に対して少なくとも90%の相同性をもつ、Lawsonia intracellularis蛋白質をコードする核酸配列と、前記蛋白質の免疫原性フラグメントをコードする前記核酸配列の部分にも関する。

50

## 【0023】

好ましくは、この *Lawsonia intracellularis* 蛋白質をコードする核酸配列又は前記核酸配列の部分は配列番号7の核酸配列に対して少なくとも92%、好ましくは94%、より好ましくは96%の相同性をもつ。98%又は100%の相同性が更に好ましい。

## 【0024】

本態様は配列番号9の核酸配列に対して少なくとも90%の相同性をもつ、*Lawsonia intracellularis* 蛋白質をコードする核酸配列と、前記蛋白質の免疫原性フラグメントをコードする前記核酸配列の部分にも関する。

## 【0025】

好ましくは、この *Lawsonia intracellularis* 蛋白質をコードする核酸配列又は前記核酸配列の部分は配列番号9の核酸配列に対して少なくとも92%、好ましくは94%、より好ましくは96%の相同性をもつ。98%又は100%の相同性が更に好ましい。

## 【0026】

本態様は配列番号11の核酸配列に対して少なくとも90%の相同性をもつ、*Lawsonia intracellularis* 蛋白質をコードする核酸配列と、前記蛋白質の免疫原性フラグメントをコードする前記核酸配列の部分にも関する。

## 【0027】

好ましくは、この *Lawsonia intracellularis* 蛋白質をコードする核酸配列又は前記核酸配列の部分は配列番号11の核酸配列に対して少なくとも92%、好ましくは94%、より好ましくは96%の相同性をもつ。98%又は100%の相同性が更に好ましい。

## 【0028】

本発明は新規 *Lawsonia intracellularis* 蛋白質をコードする核酸配列を開示するので、これらの蛋白質を十分な量で獲得することが今回初めて可能になった。これは例えば前記蛋白質をコードする遺伝子を発現させるための発現システムを使用することにより実施することができる。

## 【0029】

従って、より好ましい態様では、本発明は本発明の核酸配列を含むDNAフラグメントに関する。このようなDNAフラグメントは例えば本発明の核酸配列をクローニングするプラスミドとすることができる。このようなDNAフラグメントは例えば下記のようにDNAの量を増加するためにプライマー用として有用である。

## 【0030】

核酸配列の発現の必須要件は核酸配列をプロモーターの制御下におくように適切なプロモーターが核酸配列に機能的に連結されていることである。当業者に自明の通り、プロモーターの選択は蛋白質発現用宿主細胞として使用される細胞で遺伝子転写を誘導することが可能な任意真核、原核又はウイルスプロモーターに及ぶ。従って、本態様の更に好ましい形態は機能的に連結されたプロモーターの制御下のおかれた本発明のDNAフラグメント又は核酸配列を含む組換えDNA分子に関する。これは例えば標準分子生物学技術により得られる (*Maniatis / Sambrook (Sambrook, J. Molecular cloning: a laboratory manual, 1989. ISBN 0-87969-309-6)*)。機能的に連結されたプロモーターは連結相手の核酸配列の転写を制御することが可能なプロモーターである。

## 【0031】

このようなプロモーターは *Lawsonia* プロモーターとすることができ、例えば、プロモーターが発現に使用される細胞中で機能的であるという条件で31.0kD、24.8kD、76.7D、56.8kD、28.8kD又は31.4kD遺伝子をコードする遺伝子の *in vivo* 発現に関与するプロモーターである。更に異種プロモーターでもよい。宿主細胞が細菌である場合には、使用することができる有用な発現制御配列とし

10

20

30

40

50

てはTrpプロモーター及びオペレーター (Goeddelら, Nucl. Acids Res., 8, 4057, 1980)、lacプロモーター及びオペレーター (Changら, Nature, 275, 615, 1978)、外膜蛋白質プロモーター (Nakamura, K. and Inouge, M., EMBO J., 1, 771-775, 1982)、バクテリオファージプロモーター及びオペレーター (Remaut, E.ら, Nucl. Acids Res., 11, 4677-4688, 1983)、 $\lambda$ -アミラーゼ (枯草菌)プロモーター及びオペレーター、終結配列並びに選択宿主細胞に適合可能な他の発現強化及び制御配列が挙げられる。

#### 【0032】

宿主細胞が酵母である場合には、有用な発現制御配列としては例えば接合因子が挙げられる。昆虫細胞には、バキュロウイルスの多核体又はp10プロモーターを使用することができる (Smith, G. E.ら, Mol. Cell. Biol. 3, 2156-65, 1983)。宿主細胞が哺乳動物起源の場合には、有用な発現制御配列の例としてはSV-40プロモーター (Berman, P. W.ら, Science, 222, 524-527, 1983) 又はメタロチオネインプロモーター (Brinster, R. L., Nature, 296, 39-42, 1982) 又は熱ショックプロモーター (Voellmyら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 4949-53, 1985) が挙げられる。

#### 【0033】

細菌、酵母、真菌、昆虫及び哺乳動物細胞発現システムは非常によく使用されるシステムである。このようなシステムは当分野で周知であり、一般に入手可能であり、例えばClontech Laboratories, Inc. 4030 Fabian Way, Palo Alto, California 94303-4607, 米国から市販されている。これらの発現システムに次いで寄生虫系発現システムが非常に魅力的な発現システムである。このようなシステムは例えば仏国特許出願公開第2714074号やUSNTIS公開US 08/043109 (Hoffman, S. and Rogers, W.: 公開日1993年12月1日) に記載されている。

#### 【0034】

本態様の更に好ましい形態は本発明の31.0 kD、24.8 kD、76.7 D、56.8 kD、28.8 kD及び31.4 kD蛋白質もしくはその免疫原性フラグメントをコードする核酸配列、本発明のDNAフラグメント又は本発明の組換えDNA分子を含む生きた組換えキャリアー (LRC) に関する。このようなキャリアーは例えば細菌及びウイルスである。これらのLRCは付加遺伝情報 (この場合には本発明の31.0 kD、24.8 kD、76.7 D、56.8 kD、28.8 kD及び31.4 kD蛋白質又はその免疫原性フラグメントをコードする核酸配列) をクローニングした微生物又はウイルスである。このようなLRCを感染させた動物はキャリアーの免疫原に対してだけでなく、その遺伝コードを付加的にLRCにクローニングする蛋白質 (例えば31.0 kD、24.8 kD、76.7 D、56.8 kD、28.8 kD及び31.4 kD蛋白質) の免疫原性部分に対しても免疫応答を発生する。細菌LRCの1例としては、当分野で公知の弱毒サルモネラ株を有利に使用することができる。

#### 【0035】

生きた組換えキャリアー寄生虫は例えばVermeulen, A. N. (Int. J.ourn. Parasitol. 28: 1121-1130 (1998)) により記載されている。

#### 【0036】

また、核酸配列をターゲット細胞に導入する手段としてLRCウイルスを使用することもできる。生きた組換えキャリアーウイルスはベクターウイルスとも言う。ベクターとして使用されることが多いウイルスはワクシニアウイルス (Panicaliら; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79: 4927 (1982))、ヘルペスウイルス (E. P. A. 0473210A2)、及びレトロウイルス (Valerio, D.

10

20

30

40

50

ら; in Baum, S. J., Dicke, K. A., Lotzova, E. and Pluznik, D. H. (Eds.), *Experimental Haematology today - 1988*. Springer Verlag, New York: pp. 92 - 99 (1989))である。

【0037】

挿入した本発明の核酸配列の発現を宿主動物で誘導することが可能な選択細菌、寄生虫又はウイルスのゲノムに組換え核酸配列を導入するためには当分野で周知の *in vivo* 相同組換え技術を使用することができる。

【0038】

最後に、本発明の本態様の別の形態は機能的に連結されたプロモーターの制御下に本発明の蛋白質をコードする核酸配列、前記核酸配列を含むDNAフラグメント又は前記核酸配列を含む組換えDNA分子を含む宿主細胞に関する。この形態は更に、本発明の31.0kD、24.8kD、76.7D、56.8kD、28.8kD及び31.4kD蛋白質又はそのフラグメントをコードする核酸配列を含む生きた組換えキャリアを含む宿主細胞にも関する。

10

【0039】

宿主細胞は細菌起源の細胞とすることができ、例えば大腸菌、枯草菌及び *Lactobacillus* 種を pBR322 等の細菌系プラスミド、又は pGEX 等の細菌発現ベクター、又はバクテリオファージと組み合わせる。宿主細胞は真核起源でもよく、例えば酵母細胞と酵母特異的ベクター分子の組み合わせや、高等真核細胞では昆虫細胞 (*Luckow*ら; *Bio-technology* 6: 47 - 55 (1988)) とベクター又は組換えバキュロウイルスの組み合わせ、植物細胞と例えばTiプラスミド系ベクター又は植物ウイルスベクター (*Barton, K. A.*ら; *Cell* 32: 1033 (1983)) の組み合わせ、HeLa細胞、チャニーズハムスター卵巣細胞 (CHO) 又はネコ腎由来細胞等の哺乳動物細胞と適当なベクター又は組換えウイルスの組み合わせが挙げられる。

20

【0040】

本発明の別の態様は本発明の新規蛋白質及びその免疫原性フラグメントに関する。

【0041】

免疫原性フラグメントの概念については下記に定義する。

30

【0042】

本態様の1形態は例えば配列番号2に記載のアミノ酸配列に対して少なくとも90%の配列相同性をもつ *Lawsonia intracellularis* 蛋白質と、前記蛋白質の免疫原性フラグメントに関する。

【0043】

1好適形態では、本態様は配列番号2に記載のアミノ酸配列に対して少なくとも92%、好ましくは94%、より好ましくは96%の配列相同性をもつ前記 *Lawsonia intracellularis* 蛋白質と、前記蛋白質の免疫原性フラグメントに関する。

【0044】

98%又は100%の相同性が更に好ましい。

40

【0045】

蛋白質相同性は [www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/bl2.html](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/bl2.html) で入手可能なサブプログラム「BLASTP」を選択することによりコンピュータープログラム「BLAST 2 SEQUENCES」を使用して決定することができる。

【0046】

このプログラムの1参考文献は *Tatiana A. Tatusova, Thomas L. Madden FEMS Microbiol. Letters* 174: 247 - 250 (1999) である。使用するマトリックスは「*blosum62*」である。使

50

用するパラメーターは以下のデフォルトパラメーターである。オープンギャップ：11。  
伸長ギャップ：1。ギャップ×\_ドロップオフ：50。

【0047】

本態様の別の形態は例えば配列番号4に記載のアミノ酸配列に対して少なくとも90%  
相同のアミノ酸配列をもつ *Lawsonia intracellularis* 蛋白質と、前記蛋白質の免疫原性フラグメントに関する。

【0048】

1好適形態は配列番号4に記載のアミノ酸配列に対して少なくとも92%、好ましくは  
94%、より好ましくは96%の配列相同性をもつ前記 *Lawsonia intrac*  
*e l l u l a r i s* 蛋白質と、前記蛋白質の免疫原性フラグメントに関する。

10

【0049】

98%又は100%の相同性が更に好ましい。

【0050】

本態様の別の形態は例えば配列番号6に記載のアミノ酸配列に対して少なくとも90%  
相同のアミノ酸配列をもつ *Lawsonia intracellularis* 蛋白質と、前記蛋白質の免疫原性フラグメントに関する。

【0051】

1好適形態は配列番号6に記載のアミノ酸配列に対して少なくとも92%、好ましくは  
94%、より好ましくは96%の配列相同性をもつ前記 *Lawsonia intrac*  
*e l l u l a r i s* 蛋白質と、前記蛋白質の免疫原性フラグメントに関する。

20

【0052】

98%又は100%の相同性が更に好ましい。

【0053】

本態様の別の形態は例えば配列番号8に記載のアミノ酸配列に対して少なくとも90%  
相同のアミノ酸配列をもつ *Lawsonia intracellularis* 蛋白質と、前記蛋白質の免疫原性フラグメントに関する。

【0054】

1好適形態は配列番号8に記載のアミノ酸配列に対して少なくとも92%、好ましくは  
94%、より好ましくは96%の配列相同性をもつ前記 *Lawsonia intrac*  
*e l l u l a r i s* 蛋白質と、前記蛋白質の免疫原性フラグメントに関する。

30

【0055】

98%又は100%の相同性が更に好ましい。

【0056】

本態様の別の形態は例えば配列番号10に記載のアミノ酸配列に対して少なくとも90  
%相同のアミノ酸配列をもつ *Lawsonia intracellularis* 蛋白質  
と、前記蛋白質の免疫原性フラグメントに関する。

【0057】

1好適形態は配列番号10に記載のアミノ酸配列に対して少なくとも92%、好ましく  
は94%、より好ましくは96%の配列相同性をもつ前記 *Lawsonia intra*  
*c e l l u l a r i s* 蛋白質と、前記蛋白質の免疫原性フラグメントに関する。

40

【0058】

98%又は100%の相同性が更に好ましい。

【0059】

本態様の別の形態は例えば配列番号12に記載のアミノ酸配列に対して少なくとも90  
%相同のアミノ酸配列をもつ *Lawsonia intracellularis* 蛋白質  
と、前記蛋白質の免疫原性フラグメントに関する。

【0060】

1好適形態は配列番号12に記載のアミノ酸配列に対して少なくとも92%、好ましく  
は94%、より好ましくは96%の配列相同性をもつ前記 *Lawsonia intra*  
*c e l l u l a r i s* 蛋白質と、前記蛋白質の免疫原性フラグメントに関する。

50

## 【0061】

98%又は100%の相同性が更に好ましい。

## 【0062】

当然のことながら、本発明の特定蛋白質には、個々の *Lawsonia intracellularis* 株間に天然変異が存在し得る。これらの変異としては全長配列のアミノ酸変異又は前記配列中の1もしくは複数のアミノ酸の欠失、置換、挿入、逆位もしくは付加が挙げられる。生物及び免疫活性を本質的に変化させないアミノ酸置換は例えば *Neurathra* により "The Proteins" Academic Press New York (1979) に記載されている。同族アミノ酸間のアミノ酸置換又は進化において頻発する置換は特に Ser/Ala、Ser/Gly、Asp/Gly、Asp/Asn、Ile/Val (Dayhof, M.D., Atlas of protein sequence and structure, Nat. Biomed. Res. Found., Washington D.C., 1978, vol. 5, suppl. 3 参照) である。他のアミノ酸置換としては Asp/Glu、Thr/Ser、Ala/Gly、Ala/Thr、Ser/Asn、Ala/Val、Thr/Phe、Ala/Pro、Lys/Arg、Leu/Ile、Leu/Val 及び Ala/Glu が挙げられる。この情報に基づき、Lipman と Pearson は相同蛋白質間の機能的類似度を決定する迅速で高感度な蛋白質比較法を開発した (Science, 227, 1435-1441, 1985)。得られる蛋白質がその免疫反応性を維持する限り、本発明の典型的態様のこのようなアミノ酸置換と、欠失及び/又は挿入をもつ変異も本発明の範囲に含まれる。これは、本発明の *Lawsonia intracellularis* 蛋白質が異なるフィールド単離株から単離した場合に同一免疫特徴をもつ同一蛋白質でありながら約90%の相同性でよいことを説明するものである。*Lawsonia intracellularis* 感染又は少なくとも前記感染の臨床徴候に対する免疫応答を誘導することが可能な蛋白質を提供する本発明の所定蛋白質のアミノ酸配列の前記変異は「免疫原性に本質的に影響を与えない」とみなされる。

## 【0063】

蛋白質を例えばワクチン接種目的又は抗体生産に使用する場合には、全長蛋白質を使用する必要はない。単独又は例えば K L H 等のキャリアーと結合して該当蛋白質に対する免疫応答を誘導することが可能な該当蛋白質のフラグメント、即ち所謂免疫原性フラグメントを使用することも可能である。「免疫原性フラグメント」とは宿主に免疫応答を誘導する能力を維持している全長蛋白質のフラグメント、即ち B 又は T 細胞エピトープを含むフラグメントを意味する。現在、抗原フラグメント(決定基)をコードする DNA フラグメントを容易に同定するための各種技術が入手可能である。Geysen ら (特許出願 WO 84/03564、特許出願 WO 86/06487、米国特許第 4,833,092 号、Proc. Natl. Acad. Sci. 81:3998-4002 (1984), J. Imm. Meth. 102, 259-274 (1987)) により記載されている方法、即ち所謂 PEPSCAN 法は蛋白質の免疫学的に重要な領域であるエピトープの検出方法として、実施し易く、迅速な確立方法である。この方法は世界中で使用されており、それ自体当業者に周知である。この(経験的)方法は B 細胞エピトープの検出に特に適している。また、任意蛋白質をコードする遺伝子の配列が分かっているならば、コンピュータアルゴリズムにより、現在公知のエピトープとの配列及び/又は構造一致に基づいて特定蛋白質フラグメントを免疫学的に重要なエピトープとして指定することができる。これらの領域の決定は Hopp と Woods (Proc. Natl. Acad. Sci. 78:38248-3828 (1981)) による親水性基準と、Chou と Fasman (Advances in Enzymology 47:45-148 (1987)) 及び米国特許第 4,554,101 号) による二次構造側面の組み合わせに基づく。T 細胞エピトープも Berzofsky の両親媒性基準 (Science 235, 1059-1062 (1987)) 及び米国特許出願 NTIS US 07/005,885) を使用してコンピュータにより配列から同様に予測することができる。概要は一般原理について Sh 50

an Lu, Tibtech 9:238-242 (1991)、マラリアエピトープについて Goodra, Science 235:1059-1062 (1987)、総論について Lu, Vaccine 10:3-7 (1992)、HIVエピトープについて Berzowsky, The FASEB Journal 5:2412-2418 (1991) に夫々記載されている。

【0064】

従って、本発明の更に別の態様の1形態は *Lawsonia intracellularis* 感染に対してブタを防御することが可能なワクチンであって、医薬的に許容可能なキャリアーと共に上記のような本発明の1種以上の蛋白質又はその免疫原性フラグメントを含むワクチンに関する。

10

【0065】

本発明の更に別の態様はワクチン用としての本発明の蛋白質に関する。

【0066】

更に別の態様は *Lawsonia intracellularis* 感染の防除用ワクチンの製造における本発明の蛋白質の使用に関する。

【0067】

本発明のワクチンの製造方法の1例は感染腸壁から採取した粘膜スクレーピングから得られた細菌から本発明の蛋白質又はその免疫原性フラグメントを生化学的に精製する方法である。しかし、この方法は非常に時間のかかるワクチン製造方法である。

【0068】

従って、本発明の蛋白質又はその免疫原性フラグメントをコードする遺伝子の発現産物をワクチンで使用するほうが著しく簡便である。本発明では31.0 kD、24.8 kD、76.7 kD、56.8 kD、28.8 kD及び31.4 kD蛋白質をコードする遺伝子の核酸配列を示す。これらの遺伝子の発現産物に基づくこのようなワクチンは下記のように本発明の1種以上の蛋白質又は本発明のその免疫原性フラグメントを医薬的に許容可能なキャリアーと混合することにより容易に製造することができる。

20

【0069】

あるいは、本発明のワクチンは本発明の蛋白質又は本発明のその免疫原性フラグメントを発現することが可能な上記のような生きた組換えキャリアーを含むことができる。例えば腸上皮又は例えば呼吸器上皮に感染するサルモネラキャリアー又はウイルスキャリアーに基づくこのようなワクチンは *Lawsonia intracellularis* の自然感染方法によく似ているという点でサブユニットワクチンよりも有利である。更に、組換えキャリアーは免疫に必要な量が非常に少量ですむのでその自己増殖も利点である。

30

【0070】

上記全ワクチンは能動的ワクチン接種に利用され、即ち宿主の免疫系は本発明の1種以上の蛋白質又はその免疫原性フラグメントによりトリガされ、これらの蛋白質に対する抗体を生産する。

【0071】

あるいは、このような抗体は例えばウサギで生産することもできるし、下記のように抗体産生細胞株から得ることもできる。その後、このような抗体を宿主動物に投与することができる。このワクチン接種方法即ち受動的ワクチン接種は動物が既に感染しており、自然免疫応答をトリガさせる時間がない場合の選択ワクチン接種である。これは免疫能の低下した動物にワクチン接種するのに好適な方法でもある。投与した *Lawsonia intracellularis* に対する抗体はこれらの場合には細菌と直接結合することができる。これは *Lawsonia intracellularis* 増殖をすぐに低下又は停止させるという利点がある。

40

【0072】

従って、本発明の本態様の他の1形態は本発明の6種の *Lawsonia intracellularis* 蛋白質のいずれかに対する抗体を含むワクチンに関する。

【0073】

50

ワクチンは本発明の蛋白質又はその免疫原性フラグメントを含む上記宿主細胞に基づくことができる。

【0074】

効率的な代替ワクチン接種方法は該当抗原をコードするDNAの直接ワクチン接種である。蛋白質をコードするDNAの直接ワクチン接種は多種多様の蛋白質で成功している。(例えばDonnellyら, *The Immunologist* 2:20-26(1993)参照)。

【0075】

このワクチン接種方法は*Lawsonia intracellularis*感染に対するブタのワクチン接種に非常に魅力的な方法である。

10

【0076】

従って、本発明の本態様の更に他の形態は本発明の蛋白質又は本発明のその免疫原性フラグメントをコードする核酸配列を含むワクチンと、前記核酸配列を含むDNAフラグメントを含むワクチンに関する。

【0077】

本態様の更に他の形態は本発明の組換えDNA分子を含むワクチンに関する。

【0078】

DNAワクチンは例えば無針注射器を使用して皮内投与により容易に投与することができる。この投与方法はDNAをワクチン接種対象動物の細胞に直接送達する。1~100 µgのマイクログラム範囲の量のDNAで非常に良好な結果が得られる。

20

【0079】

別の態様では、本発明のワクチンは他のブタ病原生物及びウイルスに由来する1種以上の抗原、又は前記抗原をコードする遺伝情報を更に含む。

【0080】

このような生物及びウイルスは仮性狂犬病ウイルス、ブタインフルエンザウイルス、ブタバルボウイルス、伝染性胃腸炎ウイルス、ロタウイルス、大腸菌、*Erysipelothrix rhusiopathiae*、*Bordetella bronchiseptica*、*Salmonella choleraesuis*、*Haemophilus parasuis*、*Pasteurella multocida*、*Streptococcus suis*、*Mycoplasma hyopneumoniae*及び*Actinobacillus pleuropneumoniae*から構成される群から選択することが好ましい。

30

【0081】

本発明の全ワクチンは医薬的に許容可能なキャリアーを含有する。医薬的に許容可能なキャリアーは例えば滅菌水又は滅菌生理的塩類溶液とすることができる。より複雑な形態では、キャリアーは例えば緩衝液とすることができる。

【0082】

ワクチンの製造方法は本発明の蛋白質又はその免疫原性フラグメントと医薬的に許容可能なキャリアーを混合する段階を含む。

【0083】

本発明のワクチンは1好適形態では更にアジュバントを含有する。アジュバントは一般に非特異的に宿主の免疫応答を誘発する物質を含む。多種多様なアジュバントが当分野で公知である。アジュバントの例としてはフロイント完全及び不完全アジュバント、ビタミンE、非イオン性ブロックポリマー、ムラミルジペプチド、*Quill A*(登録商標)、鉱油(例えば*Bayol*(登録商標)又は*Markol*(登録商標))、植物油、及び*Carbopol*(登録商標)(ホモポリマー)、又は*Dilvac*(登録商標)*Forte*が挙げられる。ワクチンは更に所謂「ピークル」を添加することができる。ピークルはポリペプチドが共有結合せずに付着する化合物である。多くの場合に使用されるピークル化合物は例えば水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウム、酸化アルミニウム、シリカ、カオリン、及びベントナイトである。

40

50

## 【0084】

抗原がビークルに部分的に埋込められるこのようなビークルの特殊形態が所謂 I S C O M ( E P 1 0 9 . 9 4 2 , E P 1 8 0 . 5 6 4 , E P 2 4 2 . 3 8 0 ) である。

## 【0085】

更に、ワクチンは1種以上の適当な表面活性化合物又は乳化剤(例えばSpan又はTween)を添加することができる。

## 【0086】

多くの場合には、例えば分解し易いポリペプチドを分解しないようにするため、ワクチンの保存期間を延ばすため、又は凍結乾燥効率を改善するために、ワクチンを安定剤と混合する。有用な安定剤は例えばSPGA(Bovarnikら; J. Bacteriology 59:509(1950))、炭水化物(例えばソルビトール、マンニトール、トレハロース、澱粉、スクロース、デキストラン又はグルコース)、蛋白質(例えばアルブミン又はカゼイン又はその分解物)、及び緩衝液(例えばアルカリ金属リン酸塩)である。

## 【0087】

更に、生理的に許容可能な希釈剤にワクチンを懸濁してもよい。

## 【0088】

言うまでもなく、本発明では他のアジュバント添加、ビークル化合物もしくは希釈剤の添加、乳化又はポリペプチドの安定化方法も実施される。

## 【0089】

本発明のワクチンは1~100 $\mu$ gの量を投与すると非常に適切であるが、これ以下の量も原則として使用できる。100 $\mu$ gを越える用量は免疫学的には非常に適切であるが、商業的理由からあまり魅力的ではない。

## 【0090】

上記LRウイルス及び細菌等の生きた弱毒組換えキャリアーに基づくワクチンは感染中に自己増殖するので著しく低用量で投与することができる。従って、非常に適切な量は夫々細菌とウイルスで10<sup>3</sup>CFU/PFU~10<sup>9</sup>CFU/PFUである。

## 【0091】

多数の投与方法を適用することができる。感染が消化管感染であるので、経口投与が非常に魅力的な投与方法である。1好適経口投与方法は胃の高酸性環境を通過後にしか崩壊しない当分野で公知であり且つ頻用されているカプセルにワクチンをパッケージングする方法である。また、胃のpHを一時的に上昇させるための当分野で公知の化合物とワクチンを混合してもよい。

## 【0092】

例えばワクチンの筋肉内投与による全身投与も適切である。この経路を採用する場合には、全身投与について当分野で公知の標準手順が適切である。

## 【0093】

疾患に対する防御の観点から、Lawsonia intracellularis感染の迅速で正確な診断が重要である。

## 【0094】

従って、本発明の別の目的はLawsonia intracellularis感染の検出に適した診断ツールを提供することである。

## 【0095】

Lawsonia intracellularisの検出用診断試験は例えば被験動物から単離した細菌DNAと31.0kD、24.8kD、76.7D、56.8kD、28.8kD及び31.4kD蛋白質をコードする遺伝子のコーディング配列に基づく特異的プローブ又はPCRプライマーとの反応に基づく。Lawsonia intracellularis DNAが動物に存在するならば、例えば特異的PCRプライマーと特異的に結合した後、PCR反応で増幅される。その後、PCR反応産物はDNAゲル電気泳動で容易に検出することができる。

10

20

30

40

50

## 【0096】

DNAは被験動物の消化管から採取したスワブ中に存在する微生物から最も簡単に単離することができる。標準PCR教科書には*Lawsonia intracellularis* DNAとの選択的PCR反作用プライマーの長さを決定するための方法が記載されている。少なくとも12ヌクレオチド長のヌクレオチド配列をもつプライマーを使用することが多いが、>15、より好ましくは>18ヌクレオチドのプライマーのほうが多少選択性が高い。特に、少なくとも20、好ましくは少なくとも30ヌクレオチド長のプライマーが非常に一般に適用可能である。PCR技術はDieffenbach & Drexler; PCR primers, a laboratory manual. ISBN 0-87969-447-5 (1995)に詳細に記載されている。

10

## 【0097】

従って、*Lawsonia intracellularis* 蛋白質をコードする核酸配列又は少なくとも12、好ましくは15、より好ましくは18、更に好ましくは好適度の昇順で20、22、25、30、35もしくは40ヌクレオチド長の前記核酸配列の部分であって、配列番号1又は3に記載の核酸配列に対して少なくとも90%の相同性をもつ核酸配列又はその部分も本発明に含まれる。このような核酸配列はこれらの配列によりコードされるDNAの量を増加するためにPCR反応でプライマーとして使用することができる。こうして、例えば上記のように組織中の*Lawsonia*の検出用診断ツールとして使用するために特定ヌクレオチド配列を迅速に増幅することが可能になる。

## 【0098】

別のDNA試験はスワブから得られた細胞材料の増殖後に慣用DNA精製した後に31.0kD、24.8kD、76.7D、56.8kD、28.8kD及び31.4kD蛋白質に特異的な放射性又は色素標識DNAフラグメントと慣用方法によりハイブリダイズさせる。PCR反応とハイブリダイゼーション反応はどちらも当分野で周知であり、例えばManiatis/Sambrook (Sambrook, J.ら, Molecular cloning: a laboratory manual. ISBN 0-87969-309-6)に記載されている。

20

## 【0099】

従って、本発明の1態様は*Lawsonia intracellularis* DNAの検出用診断試験に関する。前記試験は31.0kD、24.8kD、76.7D、56.8kD、28.8kD及び31.4kD蛋白質をコードするDNAに特異的な本発明の核酸配列又はそのフラグメントを含む。前記DNAに特異的なフラグメントは他の細菌のDNAよりも*Lawsonia intracellularis* DNA (例えば上記のような少なくとも12ヌクレオチド長のプライマー)に対する相同性が高いため、同等条件下で*Lawsonia intracellularis* DNAと良好に結合するフラグメントを意味する。

30

## 【0100】

血清中の*Lawsonia intracellularis* 抗体の検出用診断試験は例えば本発明の31.0kD、24.8kD、76.7D、56.8kD、28.8kD及び31.4kD蛋白質又はその抗原フラグメントをELISAプレートのウェルの壁にコーティングする単純なサンドイッチELISA試験とすることができる。前記抗体の検出方法は例えば31.0kD、24.8kD、76.7D、56.8kD、28.8kD及び31.4kD蛋白質又はその抗原フラグメントを被験哺乳動物に由来する血清の存在下でインキュベーションした後に例えば該当哺乳動物抗体に対する標識抗体の存在下でインキュベーションする。その後、発色反応により*Lawsonia intracellularis* に対する抗体の有無を判定することができる。診断試験システムの別例は例えば本発明の31.0kD、24.8kD、76.7D、56.8kD、28.8kD及び31.4kD蛋白質又はその抗原フラグメントを含むウェスタンブロットを被験哺乳動物の血清の存在下でインキュベーションした後にブロットを分析する。

40

## 【0101】

50

従って、本発明の別の態様は *Lawsonia intracellularis* に対する抗体の検出用診断試験に関する。前記試験は本発明の蛋白質又はそのフラグメントを含む。

【0102】

更に、本発明は血清中の *Lawsonia intracellularis* に対する抗体の検出方法に関し、前記方法は本発明の 31.0 kD、24.8 kD、76.7 D、56.8 kD、28.8 kD 及び 31.4 kD 蛋白質又はその抗原フラグメントの存在下で血清をインキュベーションすることを含む。

【0103】

*Lawsonia intracellularis* 抗原の特異的 31.0 kD、24.8 kD、76.7 D、56.8 kD、28.8 kD 及び 31.4 kD 蛋白質の抗原材料の検出に基づき、従って *Lawsonia intracellularis* 感染の検出に適した診断試験は例えば標準 ELISA 試験とすることができる。前記試験の 1 例では、31.0 kD、24.8 kD、76.7 D、56.8 kD、28.8 kD 及び 31.4 kD 蛋白質に対する抗体を ELISA プレートのウェルの壁にコーティングする。被験材料の存在下でインキュベーション後に、標識抗 *Lawsonia intracellularis* 抗体をウェルに添加する。その後、発色反応により *Lawsonia intracellularis* に由来する抗原材料の存在を検出する。

【0104】

従って、本発明の更に別の態様は *Lawsonia intracellularis* の抗原材料の検出用診断試験に関する。前記試験は本発明の蛋白質又はそのフラグメントに対する抗体を含む。

【0105】

上記特徴をもつ本発明のポリペプチド又はその免疫原性フラグメントは抗体を生産するために使用することができ、抗体はポリクローナル、単一特異的又はモノクローナル（又はその誘導体）のいずれでもよい。ポリクローナル抗体が所望される場合には、ポリクローナル血清の作製及び処理技術は当分野で周知である（例えば、Mayer and Walter, eds. *Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology*, Academic Press, London, 1987）。

【0106】

本発明のポリペプチド（又は本発明のその変異体又はフラグメント）に反応性のモノクローナル抗体は同様に当分野で公知の技術により近交系マウスに免疫することにより作製することができる（Kohler and Milstein, *Nature*, 256, 495 - 497, 1975）。

【0107】

本発明の抗体の大規模製造方法も当分野で公知である。このような方法は本発明の蛋白質をコードする遺伝情報（のフラグメント）をファージディスプレイ用繊維状ファージにクローニングする。このような技術は例えば <http://aximtl.imt.uni-marburg.de/~rek/aepphage.html> の “Antibody Engineering Page” に “filamentous phage display” の項目で記載されており、更に Cortese, R. ら, (1994) *Trends Biotechnol.* 12: 262 - 267、Clackson, T. & Wells, J. A. (1994) *Trends Biotechnol.* 12: 173 - 183、Marks, J. D. ら, (1992) *J. Biol. Chem.* 267: 16007 - 16010、Winter, G. ら, (1994) *Annu. Rev. Immunol.* 12: 433 - 455、及び Little, M. ら, (1994) *Biotechnol. Adv.* 12: 539 - 555 の各論文に記載されている。その後、ファージを使用してラクダ重鎖抗体を発現するラクダ発現ライブラリーをスクリーニングする。（Muyldermans, S. and Lauwereys, M., *Journ. Molec*

. Recogn. 12:131-140 (1999) 及び Ghahroudi, M. A. ら, FEBS Letters 414:512-526 (1997)。所望抗体を発現するライブラリーに由来する細胞を複製した後、抗体の大規模発現に使用することができる。

#### 【0108】

本発明の更に別の態様は *Lawsonia intracellularis* に由来する抗原材料の検出方法に関し、前記方法は本発明の 31.0 kD、24.8 kD、76.7 kD、56.8 kD、28.8 kD 及び 31.4 kD 蛋白質又はその抗原フラグメントに対する抗体の存在下に体液の組織である血清をインキュベーションすることを含む。

#### 【0109】

最後に、本発明の 1 態様は *Lawsonia intracellularis* 蛋白質をコードする核酸配列又は少なくとも 20、好ましくは好適度の昇順で 25、30、35 もしくは 40 ヌクレオチド長の前記核酸配列の部分に関し、前記核酸配列又はその部分は配列番号 1、3、5、7、9 又は 11 に記載の核酸配列に対して少なくとも 90% の相同性をもつ。このような核酸配列はこれらの配列によりコードされる DNA の量を増加するために PCR 反応でプライマーとして使用することができる。こうして、例えば上記のように組織中の *Lawsonia* の検出用診断ツールとして使用するために特定ヌクレオチド配列を迅速に増幅することが可能になる。

#### 【実施例 1】

#### 【0110】

感染ブタ回腸からの *L. intracellularis* の単離

PE で死亡したブタから *L. intracellularis* 感染回腸を抽出し、組織病理試験と抗酸性 Ziehl-Neelsen 染色により感染を確認し、-80 で保存した。解凍後、感染腸壁から採取した粘膜スクレーピングから *L. intracellularis* 菌を単離した。Lawson ら (Vet. Microbiol. 10:303-323 (1985)) により記載されているように回腸スクレーピングをオムニミキサーで PBS 中にて繰り返しホモジナイズし、細胞内細菌を遊離させた。細胞破片を除去するための低速遠心後に得られた上清を 5.0、3.0、1.2、及び 0.8 µm フィルター (Millipore) で濾過した。次に濾液を 8000 g で 30 分間遠心し、*L. intracellularis* 菌の小ペレットを得た。Percoll グラジエントを使用してこれらの細菌を更に精製した。精製した細菌を PCR (Jones ら, J. Clin. Microbiol. 31:2611-2615 (1993)) により同定し、位相差顕微鏡により単離細菌の純度 (>95%) を試験し、汚染性細菌又は内臓破片の有無を調べた。

#### 【0111】

細菌株及びプラスミド

ベクター pLysS rare を含む大腸菌宿主株 BL21 star (DE3) とプラスミド pET22b は Novagen (Madison, Wisconsin, 米国) から購入した。pET-HIS1 (1) は Schaller ら, Microbiology 145:2105-2116 (1999) に記載されているように構築した。大腸菌株 TOP10F' は Invitrogen (Groningen, オランダ) から購入した。30% グリセロールを加えた全細菌株のストックを -70 で保存した。*Lawsonia intracellularis* 細胞は上記のように感染回腸材料から単離した。

#### 【0112】

培地、緩衝液及び抗生物質

Luria Bertani プロス (LB) は常法に従って調製した。LB プレートは常法に従って LB 培地 + 1.5% 寒天を電子レンジで融解させることにより調製した。溶液を 45 まで冷却後にプレートを注ぎ、必要に応じてアンピシリン (ACS-Dophar, Raamsdonksveer, オランダ) を加えた。イソプロピル-D-チオガラクトピラノシド (IPTG) は Biosynth Ag (Staad, スイス) か

10

20

30

40

50

ら購入した。

【0113】

PCR増幅

PCR増幅はGeneamp 9700 PCRシステム(Applied Biosystems, California, 米国)を使用して実施した。PCRはExpand High Fidelity PCR System(Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, ドイツ)を使用して実施した。PCR混合物は52 U/ml Expand High Fidelity Enzyme Mix, Expand HF緩衝液に2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 16 mM dNTP(Promega, Wisconsin, 米国), プライマー20 pmole及び鋳型としてLawsonia intracellularisの染色体DNA 15 ngを加えた。DNAの増幅に使用した全プライマーは表1に示す。

10

【0114】

DNA単離

高純度Lawsonia染色体DNAを得るために、Biorad染色体DNA単離キット(Biorad, Veenendaal, オランダ)を製造業者の指示に従って使用してDNAを調製した。

【0115】

DNAシーケンシング

DNAはABI 310自動シーケンサー(Perkin Elmer, California, 米国)で配列決定した。シーケンシング混合物はPCR産物100 ng、terminator ready reaction mix(Perkin Elmer, California, 米国)2 µl、プライマー2.4 pmole、緩衝液(200 mM Tris-HCl, pH 8.5; 5 mM MgCl<sub>2</sub>)6 µlに蒸留水を加えて20 µlとした。この混合物をGeneamp 9700でサイクルにかけた。プログラムは10秒96、5秒50及び2分60を25サイクルとした。シーケンシングサイクル産物をDye-Exカラム(Qiagen Inc., California, 米国)で製造業者の指示に従って精製し、ABI 310自動シーケンサーで試験した。ABI 310 Collection Software version 1.0.4(Perkin Elmer, California, 米国)を使用して配列結果を集め、Sequence Analysis version 3.1(Perkin Elmer, California, 米国)で分析した。アラインメントはSequence Navigator version 1.0.1(Perkin Elmer, California, 米国)を使用して行った。配列分析はSequencer 4.1.4(GeneCodes Ann Arbor, CA, 米国)を使用して実施した。

20

30

【0116】

ライゲーション及び形質転換

ライゲーションはライゲーション酵素(Gibco BRL Life Technologies Inc., 米国)1単位を加えた1×ライゲーション緩衝液中で16にて一晩実施した。ライゲーション反応物1 µlを熱ショックにより大腸菌コンピテント細胞に形質転換した。BL21 star(DE3)大腸菌コンピテント細胞とTOP10F'大腸菌コンピテント細胞は緩衝液TFB1(30 mM KOAc, 100 mM RbCl, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 50 mM MnCl<sub>2</sub>, 15%グリセロール)とTFB2(10 mM RbCl, 75 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM MES, 15%グリセロール)を使用してManiatis/Sambrookの方法によりコンピテントにした。10 mM MgSO<sub>4</sub>と20 mMグルコースを補充したSOC培地中で37にて1時間回復後に、適当な抗生物質を加えたLBプレートに細胞をプレーティングした。

40

【0117】

10×HIS融合蛋白質の発現

pLysS rareと発現ベクターを含む大腸菌株BL21 star(DE3)をアン

50

ピシリン含有LB 5 ml 中で37、200 rpmで一晩増殖させた。一晩培養液をアンピシリン含有LB 50 ml で100倍に希釈した。Novaspec II スペクトロフォトメーター (Pharmacia, Woerden, オランダ) で測定したOD<sub>600</sub> が0.5に達するまでこの培養液を同一条件下で増殖させた。この時点 (t = 0) で培養液に終濃度1 mMまでのIPTGを加えて誘導し、引き続き3時間 (t = 3) 増殖を続けた。100 µl サンプルを分析用に採取した。pLysSrareを含む大腸菌株BL21 star (DE3) を同一条件下で増殖及び誘導し、陰性対照としてサンプルを採取した。サンプルをSDS page後にCoomassie Brilliant Blue染色により下記のように分析した。残りの培養液を5,000 rpmで遠心し、ペレットを後期使用時まで-20 で保存した。

10

## 【0118】

ポリアクリルアミドゲル電気泳動とウェスタンブロット

SDS-PAGEはNuPAGE電気泳動システム (Novex, San Diego, 米国) からの4-12% Bis-Trisゲルを使用して実施した。分離前にサンプルをβ-メルカプトエタノールの存在下でサンプル緩衝液 (サンプル: 緩衝液 = 2:1) と共に5分間煮沸した。ゲルはCoomassie Brilliant Blueで染色するか又は標準半乾燥ウェスタンブロット法によりImmobulon-P-membrane (Millipore, Bedford, 米国) にブロットした。n-GNE (水: 油 = 45:55) 中で全細胞調製物に対してニワトリ抗Lawsoniaポリクローナル血清を調製した。血清E2-839はL. intracellularis感染に典型的な臨床徴候と死後病変を生じたブタから入手した。血清はベクターpLysSrareを含むBL21 star (DE3) からの等容量粗細胞抽出液を使用して4で4時間予備吸着させた。

20

## 【0119】

## 【表1】

遺伝子	フォワードプライマー	リバースプライマー	PCR産物サイズ
11	CATGCCATGGATAGTAATAATGATTCAATGATTA	CGCGGATCCTTATTTTGGAGATGTTGACA	750 bp
3	CATGCCATGGCTAAAAAATTACTCTTTACTTC	CGCGGATCCGAAAGGCCAGAGGGTATCCA	692 bp
5	CATGCCATGGCTTCGATCAATACACTTTTCGG	CGCGGATCCCTGTTTTAAAGAAAGTAAAG	2117 bp
7	CATGCCATGGCTAGGGTTACCCACCAATCAAT	CGCGGATCCAATGTATTTTGTAAATTTA	1577 bp
9	CATGCCATGGCTATTTTCATTAATAATTCATC	CGCGGATCCCGCCAGAATACGCTGTGTTG	779 bp
1	CATGCCATGGCTTCTTTGGTCATTAACAACAA	CGCGGATCCGCCACTAATGAGTTGGCTTG	884 bp

30

表1. Lawsonia intracellularis遺伝子の増幅及びクローニングに使用したプライマー

## 【0120】

## 【表2】

遺伝子	T7発現ベクター	クローニング部位	分子量計算値	プラスミド
seq id 11	pET22b	NcoI BamHI	30.7 kDa	pET 31.4
seq id 3	pETHIS1	NcoI BamHI	26.4 kDa	pET 24.8
seq id 5	pETHIS1	NcoI BamHI	78.3 kDa	pET 76.7
seq id 7	pETHIS1	NcoI BamHI	58.4 kDa	pET 56.8
seq id 9	pETHIS1	NcoI BamHI	28.8 kDa	pET 28.8
seq d 1	pETHIS1	NcoI BamHI	32.6 kDa	pET 31.0

40

表2. Lawsonia intracellularis遺伝子をクローニングしたプラスミドの概要

## 【0121】

結果

T7発現ベクターにおけるLawsonia遺伝子のクローニング

50

表 1 に示すプライマーを使用して *Lawsonia* 遺伝子を PCR 増幅した。得られた PCR 産物を制限酵素 *NcoI* 及び *BamHI* で消化した。消化した PCR 産物を次に表 2 に示すように同一の 2 種類の制限酵素で予め切断しておいた pET22b 又は pET-HIS1 にライゲーションした。ライゲーション混合物を大腸菌 TOP10F に形質転換し、37℃ で一晩インキュベーションした。コロニー PCR を使用して推定形質転換細胞が正しいプラスミドであるかどうかをチェックした。この結果、6 個の異なる発現プラスミドが得られた。これらのプラスミドをヌクレオチド配列分析によりチェックした処、配列はクローニングストラテジーにより予想された通りであった。

#### 【0122】

大腸菌における T7 プロモーターからの *Lawsonia* 遺伝子の発現

10

表 2 に示す全プラスミドについて組換え蛋白質産生を試験した。プラスミドを BL21 star (DE3) pLysSrare に形質転換し、誘導を実施した。誘導培養液を SDS-PAGE ゲル電気泳動と CBB 染色により分析した (図 1)。全 6 種の遺伝子は 大腸菌 BL21 star (DE3) pLysSrare で十分な発現を生じた。発現レベルは 150 µg/ml に達した。

#### 【0123】

ウェスタンブロットにより発現産物の分析

*Lawsonia* 全細胞をワクチン接種したニワトリの血清と、*L. intracellularis* 感染に典型的な臨床徴候と死後病変を示したブタに由来する血清を使用して発現産物をウェスタンブロットにより分析した (図 2)。組換え *Lawsonia* 蛋白質はニワトリ及びブタ血清により陽性であることが確認された。

20

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0124】

【図 1】大腸菌 BL21 STAR / pLysSRARE における *Lawsonia intracellularis* 遺伝子の過剰発現の NuPAGE 分析。レーン 1, 分子量マーカー; レーン 2, pET76.7 T=0; レーン 3, pET76.7 T=3; レーン 4, pET56.8 T=0; レーン 5, pET56.8 T=3; レーン 6, pET24.8 T=0; レーン 7, pET24.8 T=3; レーン 8, pET28.8 T=0; レーン 9, pET28.8 T=3; レーン 10, pET31.0 T=0; レーン 11, pET31.0 T=3; レーン 12, pET31.4 T=0; レーン 13, pET31.4 T=3; レーン 14, T=3, 発現ベクターなし。矢印は発現産物の位置を示す。

30

【図 2】大腸菌 BL21 STAR / pLysSRARE における *Lawsonia intracellularis* 遺伝子の発現産物のウェスタンブロット。レーン 1, pET31.4; レーン 2, pET28.8; レーン 3, pET31.0; レーン 4, pET24.8; レーン 5, pET76.7; レーン 6, pET56.8; レーン 7, 発現ベクターなし。矢印は発現産物の位置を示す。

【 図 1 】

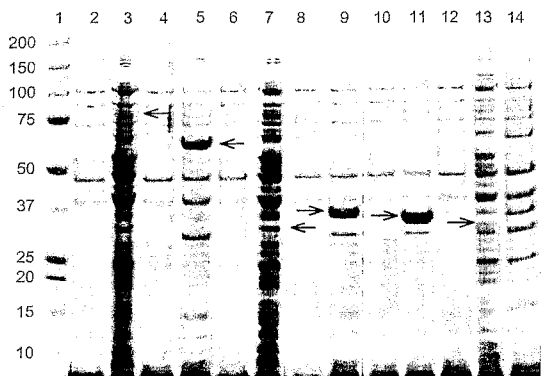


Figure 1

【 図 2 】

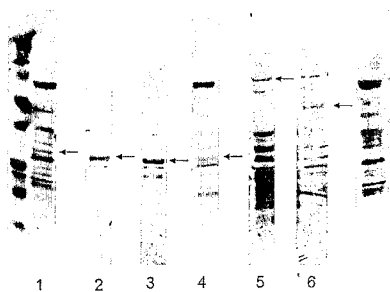


Figure 2

【 配列表 】

[2007527706000001.xml](#)

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP2004/009995

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
IPC 7	C07K14/195	C12N15/31 C07K16/12 C12Q1/68 A61K39/02
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
IPC 7 C12N A61K C07K C12Q		
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, EMBL, BIOSIS, Sequence Search		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE EMBL [Online] 24 October 2002 (2002-10-24), GEBHART C.J. ET AL.: "Genomic Sequence Survey of Lawsonia intracellularis, the causative agent of proliferative enteropathy, identifies numerous genes of relevance to diagnosis, virulence and immunoprophylaxis" XP002269209 retrieved from EMBL accession no. BH795495 Sequence data	3,7
Y	WO 02/26250 A (UNIV ARIZONA) 4 April 2002 (2002-04-04) the whole document	1-27
	----- -/--	
<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	"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 document 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	Date of mailing of the international search report	
3 December 2004	7 - 04 2005	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 661 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer  Hix, R	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/EP2004/009995
---

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EP 1 219 711 A (AKZO NOBEL NV) 3 July 2002 (2002-07-03) the whole document -----	1-27
A	WO 00/69903 A (AGRICULTURE VICTORIA SERV PTY ;HASSE DETLEF (AU); PANACCIO MICHAEL) 23 November 2000 (2000-11-23) the whole document -----	
A	US 5 885 823 A (KNITTEL JEFFREY P ET AL) 23 March 1999 (1999-03-23) the whole document -----	
A	EP 1 094 070 A (PFIZER PROD INC) 25 April 2001 (2001-04-25) the whole document -----	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/EP2004/009995**Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
  
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
  
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
  
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:  
1 and 11 completely and claims 7 to 10, 17 to 27 partially

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/ EP2004/ 009995

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1 and 11 completely and claims 7 to 10, 17 to 27 partially.

Nucleic acid sequence encoding a Lawsonia intracellularis protein or a part of said nucleic acid sequence that encodes an immunogenic fragment of said protein said nucleic acid sequence, or said part thereof having at least 90% homology with the nucleic acid sequence as depicted in SEQ ID NO: 1, protein that is at least 90% homologous to SEQ ID NO: 2, live recombinant carrier, host cell, vaccine comprising said nucleic acid, use of said protein in the manufacture of a vaccine and method of preparing said vaccine, diagnostic tests involving said nucleic acid or proteins.

---

2. claims: 2 and 12 completely and claims 7 to 10, 17 to 27 partially.

Nucleic acid sequence encoding a Lawsonia intracellularis protein or a part of said nucleic acid sequence that encodes an immunogenic fragment of said protein said nucleic acid sequence, or said part thereof having at least 90% homology with the nucleic acid sequence as depicted in SEQ ID NO: 3, protein that is at least 90% homologous to SEQ ID NO: 4, live recombinant carrier, host cell, vaccine comprising said nucleic acid, use of said protein in the manufacture of a vaccine and method of preparing said vaccine, diagnostic tests involving said nucleic acid or proteins.

---

3. claims: 3 and 13 completely and claims 7 to 10, 17 to 27 partially.

Nucleic acid sequence encoding a Lawsonia intracellularis protein or a part of said nucleic acid sequence that encodes an immunogenic fragment of said protein said nucleic acid sequence, or said part thereof having at least 90% homology with the nucleic acid sequence as depicted in SEQ ID NO: 5, protein that is at least 90% homologous to SEQ ID NO: 6, live recombinant carrier, host cell, vaccine comprising said nucleic acid, use of said protein in the manufacture of a vaccine and method of preparing said vaccine, diagnostic tests involving said nucleic acid or proteins.

---

4. claims: 4 and 14 completely and claims 7 to 10, 17 to 27 partially.

International Application No. PCT/ EP2004/ 009995

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Nucleic acid sequence encoding a *Lawsonia intracellularis* protein or a part of said nucleic acid sequence that encodes an immunogenic fragment of said protein said nucleic acid sequence, or said part thereof having at least 90% homology with the nucleic acid sequence as depicted in SEQ ID NO: 7, protein that is at least 90% homologous to SEQ ID NO: 8, live recombinant carrier, host cell, vaccine comprising said nucleic acid, use of said protein in the manufacture of a vaccine and method of preparing said vaccine, diagnostic tests involving said nucleic acid or proteins.

---

5. claims: 5 and 15 completely and claims 7 to 10, 17 to 27 partially.

Nucleic acid sequence encoding a *Lawsonia intracellularis* protein or a part of said nucleic acid sequence that encodes an immunogenic fragment of said protein said nucleic acid sequence, or said part thereof having at least 90% homology with the nucleic acid sequence as depicted in SEQ ID NO: 9, protein that is at least 90% homologous to SEQ ID NO: 10, live recombinant carrier, host cell, vaccine comprising said nucleic acid, use of said protein in the manufacture of a vaccine and method of preparing said vaccine, diagnostic tests involving said nucleic acid or proteins.

---

6. claims: 6 and 16 completely and claims 7 to 10, 17 to 27 partially.

Nucleic acid sequence encoding a *Lawsonia intracellularis* protein or a part of said nucleic acid sequence that encodes an immunogenic fragment of said protein said nucleic acid sequence, or said part thereof having at least 90% homology with the nucleic acid sequence as depicted in SEQ ID NO: 11, protein that is at least 90% homologous to SEQ ID NO: 12, live recombinant carrier, host cell, vaccine comprising said nucleic acid, use of said protein in the manufacture of a vaccine and method of preparing said vaccine, diagnostic tests involving said nucleic acid or proteins.

---

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP2004/009995

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0226250	A	04-04-2002	AU 9315101 A	08-04-2002
			CA 2423588 A1	04-04-2002
			EP 1324768 A2	09-07-2003
			HU 0303655 A2	01-03-2004
			JP 2004529854 T	30-09-2004
			WO 0226250 A2	04-04-2002
EP 1219711	A	03-07-2002	EP 1219711 A2	03-07-2002
			AU 9737101 A	27-06-2002
			CA 2365494 A1	20-06-2002
			HU 0105379 A2	28-01-2003
			JP 2003000276 A	07-01-2003
			PL 351277 A1	01-07-2002
WO 0069903	A	23-11-2000	WO 0069903 A1	23-11-2000
			AU 4385800 A	05-12-2000
			BR 0011292 A	26-02-2002
			CA 2372095 A1	23-11-2000
			EP 1177212 A1	06-02-2002
			JP 2003501013 T	14-01-2003
			MX PA01011670 A	14-10-2003
			NZ 515332 A	30-01-2004
US 5885823	A	23-03-1999	US 5714375 A	03-02-1998
			AT 289069 T	15-02-2005
			AU 717045 B2	16-03-2000
			AU 6262796 A	24-12-1996
			BG 64292 B1	31-08-2004
			BG 102130 A	30-09-1998
			BR 9608338 A	05-01-1999
			CA 2222643 A1	12-12-1996
			CN 1167146 A	10-12-1997
			CN 1519311 A	11-08-2004
			CZ 9703899 A3	15-07-1998
			DE 69634334 D1	17-03-2005
			DE 843818 T1	28-11-2002
			EP 1403643 A1	31-03-2004
			EP 0843818 A1	27-05-1998
			ES 2173055 T1	16-10-2002
			HU 9900884 A2	28-07-1999
			ID 17131 A	04-12-1997
			JP 11507225 T	29-06-1999
			NZ 319994 A	28-01-2000
			PL 325872 A1	17-08-1998
			PL 187849 B1	29-10-2004
PL 187850 B1	29-10-2004			
RO 118885 B1	30-12-2003			
WO 9639629 A1	12-12-1996			
EP 1094070	A	25-04-2001	EP 1094070 A2	25-04-2001
			JP 2001169787 A	26-06-2001
			JP 2004229667 A	19-08-2004
			US 2003021802 A1	30-01-2003
			US 2003202983 A1	30-10-2003
			US 6605696 B1	12-08-2003

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
<b>C 1 2 Q 1/06 (2006.01)</b>	C 1 2 Q 1/06	
<b>C 1 2 Q 1/68 (2006.01)</b>	C 1 2 Q 1/68	A
<b>C 0 7 K 14/195 (2006.01)</b>	C 0 7 K 14/195	
<b>A 6 1 K 39/02 (2006.01)</b>	A 6 1 K 39/02	
<b>A 6 1 K 39/00 (2006.01)</b>	A 6 1 K 39/00	H
<b>A 6 1 P 31/04 (2006.01)</b>	A 6 1 P 31/04	1 7 1
<b>A 6 1 P 1/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 1/00	1 7 1
<b>G 0 1 N 33/53 (2006.01)</b>	G 0 1 N 33/53	N
<b>G 0 1 N 33/569 (2006.01)</b>	G 0 1 N 33/569	D
		F

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(74) 代理人 100103920  
弁理士 大崎 勝真

(74) 代理人 100124855  
弁理士 坪倉 道明

(72) 発明者 パーメイ, パウル  
オランダ国、エヌ・エル - 5 8 4 5 ・ ベー・カー・セント・アントニス、レーペルストラート・3

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA80 CA03 CA07 CA09 CA20 DA06 EA04 FA02  
GA11 GA19 HA11 HA13 HA14 HA17  
4B063 QA01 QA18 QA19 QQ02 QQ03 QQ06 QQ08 QQ43 QQ53 QR08  
QR32 QR35 QR39 QR42 QR48 QR55 QR56 QR62 QS16 QS25  
QS33 QS34 QX01 QX02  
4B065 AA01X AA01Y AA26X AA58X AA72X AA87X AB01 AC14 BA02 BD14  
CA24 CA43 CA45 CA46  
4C085 AA03 BA07 CC07 CC24 DD62 DD88 EE06 GG01  
4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA11 DA86 EA29 EA52 FA74  
GA26

专利名称(译)	细胞内劳索尼亚亚单位疫苗		
公开(公告)号	<a href="#">JP2007527706A</a>	公开(公告)日	2007-10-04
申请号	JP2006525752	申请日	2004-09-08
[标]申请(专利权)人(译)	英特维特国际股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	Intabetsuto国米Nashiyo INTERNACIONAL - 基于 - 基于		
[标]发明人	バーメイパウル		
发明人	バーメイ,パウル		
IPC分类号	C12N15/09 C12N1/21 C12N1/19 C12N1/15 C12N5/10 C12Q1/06 C12Q1/68 C07K14/195 A61K39/02 A61K39/00 A61P31/04 A61P1/00 G01N33/53 G01N33/569		
CPC分类号	A61K39/00 A61P1/00 C07K14/195		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C12N1/21 C12N1/19 C12N1/15 C12N5/00.A C12Q1/06 C12Q1/68.A C07K14/195 A61K39/02 A61K39/00.H A61P31/04.171 A61P1/00.171 G01N33/53.N G01N33/53.D G01N33/569.F		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA80 4B024/CA03 4B024/CA07 4B024/CA09 4B024/CA20 4B024/DA06 4B024/EA04 4B024/FA02 4B024/GA11 4B024/GA19 4B024/HA11 4B024/HA13 4B024/HA14 4B024/HA17 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ03 4B063/QQ06 4B063/QQ08 4B063/QQ43 4B063/QQ53 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR39 4B063/QR42 4B063/QR48 4B063/QR55 4B063/QR56 4B063/QR62 4B063/QS16 4B063/QS25 4B063/QS33 4B063/QS34 4B063/QX01 4B063/QX02 4B065/AA01X 4B065/AA01Y 4B065/AA26X 4B065/AA58X 4B065/AA72X 4B065/AA87X 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/BD14 4B065/CA24 4B065/CA43 4B065/CA45 4B065/CA46 4C085/AA03 4C085/BA07 4C085/CC07 4C085/CC24 4C085/DD62 4C085/DD88 4C085/EE06 4C085/GG01 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA11 4H045/DA86 4H045/EA29 4H045/EA52 4H045/FA74 4H045/GA26		
代理人(译)	小野 诚 金山 贤教 Masarushin大崎		
优先权	2003077861 2003-09-12 EP		
其他公开文献	JP4773962B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

本发明涉及例如编码新的细胞内劳森氏菌蛋白的核酸序列。本发明还涉及包含这些序列的DNA片段，重组DNA分子和活重组载体。本发明进一步涉及包含所述核酸序列，DNA片段，重组DNA分子和活重组载体的宿主细胞。此外，本发明涉及由这些核苷酸序列编码的蛋白质及其在疫苗生产中的用途。本发明还涉及细胞内罗森氏菌的方法控制用于疫苗及其制备感染。最后，本发明是胞内劳森氏菌的DNA，所述的胞内劳森氏菌抗原的检测和劳森氏菌的检测用于检测抗细胞内抗体的诊断试验。

