

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2003 - 47489

(P2003 - 47489A)

(43)公開日 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 39/02	4 B 0 2 4
A 6 1 K 39/02		45/00	4 B 0 6 3
45/00		A 6 1 P 11/00	4 B 0 6 5
A 6 1 P 11/00		31/10	4 C 0 8 4
31/10		C 0 7 K 14/195	4 C 0 8 5

審査請求 有 請求項の数 60 O L (全 71数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2002 - 153105(P2002 - 153105)
(62)分割の表示 特願平11 - 301672の分割
(22)出願日 平成11年10月22日(1999.10.22)
(31)優先権主張番号 60/105285
(32)優先日 平成10年10月22日(1998.10.22)
(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 397067152
ファイザー・プロダクツ・インク
アメリカ合衆国コネチカット州グロトン市
イースタン・ポイント・ロード
(72)発明者 ロバート ジェラード アンケンバウアー
アメリカ合衆国,コネチカット 06340,グロ
トン,イースタン ポイント ロード,ファ
イザー インコーポレイティド
(74)代理人 100077517
弁理士 石田 敬 (外4名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 アクチノバチルス・プレウロニウモニアからのタンパク質

(57)【要約】

【課題】 ブタ肺病原体の重要な1つであるアクチノバチルス・プレウロニウモニア (APP) からブタを保護するためのタンパク質に関する。

【解決手段】 APP から単離された5種の新規低分子量タンパク質 (“Omp20”, “OmpW”, “Omp27”, “OmpA1”, 及び “OmpA2”) を共有する新規抗原性タンパク質、それをコードするDNA分子、前記タンパク質を含んで成る、APP に対するワクチンに関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 配列番号 4 のアミノ酸残基 22 ~ アミノ酸残基 215、配列番号 6 のアミノ酸残基 28 ~ アミノ酸残基 258、配列番号 8 のアミノ酸残基 20 ~ アミノ酸残基 364、及び配列番号 10 のアミノ酸残基 20 ~ アミノ酸残基 369 から成る群から選択されたアミノ酸配列を有する実質的に精製されたタンパク質。

【請求項 2】 配列番号 4、6、8 及び 10 から成る群から選択されたアミノ酸配列を有する請求項 1 記載のタンパク質。

【請求項 3】 (1) 配列番号 4 のアミノ酸残基 22 ~ アミノ酸残基 215、配列番号 6 のアミノ酸残基 28 ~ アミノ酸残基 258、配列番号 8 のアミノ酸残基 20 ~ アミノ酸残基 364、及び配列番号 10 のアミノ酸残基 20 ~ アミノ酸残基 369 から成る群から選択されたアミノ酸配列に対しておよそ 70% 以上の配列同一性を有し；

(2) 配列番号 4 のアミノ酸残基 22 ~ アミノ酸残基 215、配列番号 6 のアミノ酸残基 28 ~ アミノ酸残基 258、配列番号 8 のアミノ酸残基 20 ~ アミノ酸残基 364、又は配列番号 10 のアミノ酸残基 20 ~ アミノ酸残基 369 のアミノ酸配列から、1 ~ 複数個のアミノ酸の保存的アミノ酸置換により異り；そして

(3) 動物に投与した場合に A P P - 特異的抗体を誘導するのに使用し得る；アミノ酸配列を有する、実質的に精製されたタンパク質。

【請求項 4】 (1) 配列番号 4、6、8 及び 10 から成る群から選択されたアミノ酸配列に対しておよそ 70% 以上の配列同一性を有し；

(2) 配列番号：4、6、8 又は 10 のアミノ酸配列から、1 ~ 複数個のアミノ酸の保存的アミノ酸置換により異り；そして

(3) 動物に投与した場合に A P P - 特異的抗体を誘導するのに使用し得る；アミノ酸配列を有する、実質的に精製されたポリペプチド。

【請求項 5】 (a) 配列番号 4 のアミノ酸残基 22 ~ アミノ酸残基 215、配列番号 6 のアミノ酸残基 28 ~ アミノ酸残基 258、配列番号 8 のアミノ酸残基 20 ~ アミノ酸残基 364、及び配列番号 10 のアミノ酸残基 20 ~ アミノ酸残基 369 から成る群から選択されたアミノ酸配列を有するポリペプチドのペプチドフラグメントである実質的に精製されたポリペプチド。

【請求項 6】 配列番号 4、6、8 及び 10 から成る群から選択されたアミノ酸配列を有するポリペプチドのペプチドフラグメントである請求項 5 記載のポリペプチド。

【請求項 7】 配列番号 4 のアミノ酸残基 1 ~ アミノ酸残基 21、配列番号 6 のアミノ酸残基 1 ~ アミノ酸残基 27、配列番号 8 のアミノ酸残基 1 ~ アミノ酸残基 9、及び配列番号 10 のアミノ酸残基 1 ~ アミノ酸残基

19 から成る群から選択されたアミノ酸配列を有する請求項 6 記載のポリペプチド。

【請求項 8】 キャリヤー又は融合パートナーに連結された、(a) 配列番号 4 のアミノ酸残基 22 ~ アミノ酸残基 215、配列番号 6 のアミノ酸残基 28 ~ アミノ酸残基 258、配列番号 8 のアミノ酸残基 20 ~ アミノ酸残基 364、及び配列番号 10 のアミノ酸残基 20 ~ アミノ酸残基 369 から成る群から選択されたアミノ酸配列を有するポリペプチド；又は (b) 前記 (a) のポリペプチドのペプチドフラグメント、を有する融合タンパク質。

【請求項 9】 前記融合パートナーが、保護ペプチド、
- ガラクトシダーゼ、trpE、マルトース - 結合タンパク質、グルタチオン - S - トランスフェラーゼ及びポリヒスチジンから成る群から選択される請求項 8 記載の融合タンパク質。

【請求項 10】 前記融合パートナーが、アミノ酸配列 Met-Asn-Thr-Thr-Thr-Thr-Thr-Thr-Ser-Arg (配列番号 96) を含んで成る保護ペプチドである請求項 9 記載の融合タンパク質。

【請求項 11】 (a) 配列番号 4 のアミノ酸残基 22 ~ アミノ酸残基 215、配列番号 6 のアミノ酸残基 28 ~ アミノ酸残基 258、配列番号 8 のアミノ酸残基 20 ~ アミノ酸残基 364、及び配列番号 10 のアミノ酸残基 20 ~ アミノ酸残基 369 から成る群から選択されたアミノ酸配列を有するポリペプチド；

(b) 前記 (a) のポリペプチドのペプチドフラグメント；あるいは (c) キャリヤー又は融合パートナーに連結された、前記 (a) のポリペプチド又は (b) のペプチドフラグメントを含んで成る融合タンパク質、の類似体又は誘導体。

【請求項 12】 配列番号 4 のアミノ酸残基 22 ~ アミノ酸残基 215、配列番号 6 のアミノ酸残基 28 ~ アミノ酸残基 258、配列番号 8 のアミノ酸残基 20 ~ アミノ酸残基 364、及び配列番号 10 のアミノ酸残基 20 ~ アミノ酸残基 369 から成る群から選択されたアミノ酸配列を含んで成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成る単離されたポリヌクレオチド分子。

【請求項 13】 配列番号 3 の nt 439 ~ nt 1023 のヌクレオチド配列を含んで成る、配列番号 4 のアミノ酸残基 22 ~ アミノ酸残基 215 のアミノ酸配列をコードする請求項 12 記載の単離されたポリヌクレオチド分子。

【請求項 14】 配列番号 4 のアミノ酸配列をコードする請求項 12 記載の単離されたポリヌクレオチド分子。

【請求項 15】 配列番号 3 の nt 376 ~ nt 1023 のヌクレオチド配列を含んで成る請求項 14 記載の単離されたポリヌクレオチド分子。

【請求項 16】 配列番号 3 のヌクレオチド配列を含ん

で成る請求項 15 記載の単離されたポリヌクレオチド分子。

【請求項 17】 配列番号 5 の nt 238 ~ nt 933 のヌクレオチド配列を含んで成る、配列番号 6 のアミノ酸残基 28 ~ アミノ酸残基 258 のアミノ酸配列をコードする請求項 12 記載の単離されたポリヌクレオチド分子。

【請求項 18】 配列番号 6 のアミノ酸配列をコードする請求項 12 記載の単離されたポリヌクレオチド分子。

【請求項 19】 配列番号 5 の nt 157 ~ nt 933 のヌクレオチド配列を含んで成る請求項 18 記載の単離されたポリヌクレオチド分子。

【請求項 20】 配列番号 5 のヌクレオチド配列を含んで成る請求項 19 記載の単離されたポリヌクレオチド分子。

【請求項 21】 配列番号 7 の nt 671 ~ nt 1708 のヌクレオチド配列を含んで成る、配列番号 8 のアミノ酸残基 20 ~ アミノ酸残基 364 のアミノ酸配列をコードする請求項 12 記載の単離されたポリヌクレオチド分子。

【請求項 22】 配列番号 8 のアミノ酸配列をコードする請求項 12 記載の単離されたポリヌクレオチド分子。

【請求項 23】 配列番号 7 の nt 614 ~ nt 1708 のヌクレオチド配列を含んで成る請求項 22 記載の単離されたポリヌクレオチド分子。

【請求項 24】 配列番号 7 のヌクレオチド配列を含んで成る請求項 23 記載の単離されたポリヌクレオチド分子。

【請求項 25】 配列番号 9 の nt 254 ~ nt 1306 のヌクレオチド配列を含んで成る、配列番号 10 のアミノ酸残基 20 ~ アミノ酸残基 369 のアミノ酸配列をコードする請求項 12 記載の単離されたポリヌクレオチド分子。

【請求項 26】 配列番号 10 のアミノ酸配列をコードする請求項 12 記載の単離されたポリヌクレオチド分子。

【請求項 27】 配列番号 9 の nt 197 ~ nt 1306 のヌクレオチド配列を含んで成る請求項 26 記載の単離されたポリヌクレオチド分子。

【請求項 28】 配列番号 9 のヌクレオチド配列を含んで成る請求項 27 記載の単離されたポリヌクレオチド分子。

【請求項 29】 配列番号 4 のアミノ酸残基 22 ~ アミノ酸残基 215、配列番号 6 のアミノ酸残基 28 ~ アミノ酸残基 258、配列番号 8 のアミノ酸残基 20 ~ アミノ酸残基 364、及び配列番号 10 のアミノ酸残基 20 ~ アミノ酸残基 369 から成る群から選択されたアミノ酸配列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成るポリヌクレオチド分子の相補体に対して高ストリンジェント条件下でハイブリダイズし；且つ、動物に投与した場合に A P P - 特異的抗体の生産を

誘導するために使用することができるポリペプチドをコードし、又は A P P に感染したブタからの流体サンプルもしくは組織サンプル中の A P P - 特異的ポリヌクレオチド分子の存在を検出する診断剤として使用することができる、単離されたポリヌクレオチド分子。

【請求項 30】 配列番号 4 のアミノ酸残基 22 ~ アミノ酸残基 215、配列番号 6 のアミノ酸残基 28 ~ アミノ酸残基 258、配列番号 8 のアミノ酸残基 20 ~ アミノ酸残基 364、及び配列番号 10 のアミノ酸残基 20 ~ アミノ酸残基 369 から成る群から選択されたアミノ酸配列を含んで成るポリペプチドをコードするヌクレオチド配列の実質的な部分であるヌクレオチド配列から成る単離されたポリヌクレオチド分子。

【請求項 31】 配列番号 4 のアミノ酸残基 1 ~ アミノ酸残基 21、配列番号 6 のアミノ酸残基 1 ~ アミノ酸残基 27、配列番号 8 のアミノ酸残基 1 ~ アミノ酸残基 19、及び配列番号 10 のアミノ酸残基 1 ~ アミノ酸残基 19 から成る群から選択されたアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド分子の相補体に対して高緊縮条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド分子の実質的な部分であり；且つ、動物に投与した場合に A P P - 特異的抗体の生産を誘導するために使用することができるポリペプチドをコードし、又は A P P に感染したブタからの流体サンプルもしくは組織サンプル中の A P P - 特異的ポリヌクレオチド分子の存在を検出する診断剤として使用することができる、ヌクレオチド配列から成る単離されたポリヌクレオチド分子。

【請求項 32】 配列番号 4 のアミノ酸残基 1 ~ アミノ酸残基 21、配列番号 6 のアミノ酸残基 1 ~ アミノ酸残基 27、配列番号 8 のアミノ酸残基 1 ~ アミノ酸残基 19、及び配列番号 10 のアミノ酸残基 1 ~ アミノ酸残基 19 から成る群から選択されたアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含んで成る単離されたポリヌクレオチド分子。

【請求項 33】 前記ヌクレオチド配列が、配列番号 3 の nt 376 ~ nt 438、配列番号 5 の nt 157 ~ nt 237、配列番号 7 の nt 614 ~ nt 670、及び配列番号 1 の nt 197 ~ nt 253 から成る群から選択される請求項 32 記載の単離されたポリヌクレオチド分子。

【請求項 34】 キャリヤー又は融合パートナーに連結された、(a) 配列番号 4 のアミノ酸残基 22 ~ アミノ酸残基 215、配列番号 6 のアミノ酸残基 28 ~ アミノ酸残基 258、配列番号 8 のアミノ酸残基 20 ~ アミノ酸残基 364、及び配列番号 10 のアミノ酸残基 20 ~ アミノ酸残基 369 から成る群から選択されたアミノ酸配列を有するポリペプチド；又は前記 (a) のポリペプチドのペプチドフラグメント、を含んで成る融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含んで成る単離されたポリヌクレオチド分子。

【請求項 35】 前記融合パートナーが、保護ペプチ

ド、 - ガラクトシダーゼ、 trpE、 マルトース - 結合タンパク質、 グルタチオン - S - トランスフェラーゼ及びポリヒスチジンから成る群から選択される請求項34記載の単離されたポリヌクレオチド分子。

【請求項36】 前記融合パートナーが、アミノ酸配列 Met-Asn-Thr-Thr-Thr-Thr-Thr-Thr-Ser-Arg (配列番号96) を含んで成る保護ペプチドである請求項35記載の単離されたポリヌクレオチド分子。

【請求項37】 配列番号3, 5, 7もしくは9から選択されたヌクレオチド配列から成るポリヌクレオチド分子、又は配列番号3, 5, 7もしくは9から選択されたヌクレオチド配列の相補体であるヌクレオチド配列から成るポリヌクレオチド分子、に対して高い緊縮条件下でハイブリダイズすることができ、且つ、APPに感染したブタからの流体サンプル又は組織サンプル中のAPP - 特異的ポリヌクレオチド分子の存在の検出に使用することができる、オリゴヌクレオチド分子。

【請求項38】 配列番号15~47及び49~93から成る群から選択されたヌクレオチド配列を含んで成る請求項37記載のオリゴヌクレオチド分子。

【請求項39】 請求項12~36のいずれか1項に記載のポリヌクレオチド分子を含んで成る組換えベクター。

【請求項40】 配列番号3のnt439~nt1023のヌクレオチド配列を含んで成るポリヌクレオチド分子を含んで成る請求項39記載の組換えベクター。

【請求項41】 株Pz418(ATCC 98928)の宿主細胞に存在するプラスミドpER418と同じであるプラスミドである請求項40記載の組換えベクター。

【請求項42】 配列番号5のnt238~nt933のヌクレオチド配列を含んで成るポリヌクレオチド分子を含んで成る請求項39記載の組換えベクター。

【請求項43】 株Pz417(ATCC 98927)の宿主細胞に存在するプラスミドpER417と同じであるプラスミドである請求項42記載の組換えベクター。

【請求項44】 配列番号7のnt671~nt1708のヌクレオチド配列を含んで成るポリヌクレオチド分子を含んで成る請求項39記載の組換えベクター。

【請求項45】 株Pz419(ATCC 98929)の宿主細胞に存在するプラスミドpER419と同じであるプラスミドである請求項44記載の組換えベクター。

【請求項46】 配列番号9のnt254~nt1306のヌクレオチド配列を含んで成るポリヌクレオチド分子を含んで成る請求項39記載の組換えベクター。

【請求項47】 株Pz420(ATCC 98930)の宿主細胞に存在するプラスミドpER420と同じであるプラスミドである請求項46記載の組換えベクター。

【請求項48】 請求項39記載の組換えベクターを含んで成る、形質転換された宿主細胞。

【請求項49】 アクチノバチルス・プレウロニウモニ

ア(APP)に対するワクチンであって、(a)配列番号4のアミノ酸残基22~アミノ酸残基215、配列番号6のアミノ酸残基28~アミノ酸残基258、配列番号8のアミノ酸残基20~アミノ酸残基364、及び配列番号10のアミノ酸残基20~アミノ酸残基369から成る群から選択されたアミノ酸配列を含んで成るポリペプチド；(b)前記(a)のポリペプチドのペプチドフラグメント；(c)キャリアー又は融合パートナーに連結された、前記(a)のポリペプチド、又は(b)のペプチドフラグメントを含んで成る、融合タンパク質；(d)前記(a)のポリペプチド、又は(b)のペプチドフラグメント又は(c)の融合タンパク質の類似体又は誘導体；あるいは(e)前記(a)のポリペプチド、(b)のペプチドフラグメント、(c)の融合タンパク質、又は(d)の類似体もしくは誘導体をコードするポリヌクレオチド分子から成る群から選択された、ブタにおけるAPPに対しての保護応答を誘発し、又はその誘発に寄与することができる、免疫学的有効量の抗原；及び獣医学的に許容できるキャリアー又は希釈剤を含んで成るワクチン。

【請求項50】 免疫調節成分をさらに含んで成る請求項49記載のワクチン。

【請求項51】 前記免疫調節成分がアジュバントである請求項50記載のワクチン。

【請求項52】 ブタを苦しめる疾病又は病理学的状態に対する保護応答を誘発し、又はその誘発に寄与することができる、第一の抗原としての前記の抗原とは異なる第二の抗原の免疫学的有効量を含んで成る、請求項49に記載のワクチン。

【請求項53】 APPに対してブタを保護することができるワクチンの調製方法であって、(a)配列番号4のアミノ酸残基22~アミノ酸残基215、配列番号6のアミノ酸残基28~アミノ酸残基258、配列番号8のアミノ酸残基20~アミノ酸残基364、及び配列番号10のアミノ酸残基20~アミノ酸残基369から成る群から選択されたアミノ酸配列を含んで成るポリペプチド；(b)前記(a)のポリペプチドのペプチドフラグメント；(c)キャリアー又は融合パートナーに連結された、(a)のポリペプチド又は(b)のペプチドフラグメントを含んで成る、融合タンパク質；(d)前記(a)のポリペプチド、又は(b)のペプチドフラグメント又は(c)の融合タンパク質の類似体又は誘導体；あるいは(e)前記(a)のポリペプチド、(c)のペプチドフラグメント、(d)の融合タンパク質又は(e)の類似体又は誘導体をコードするポリヌクレオチド分子から成る群から選択された、ブタにおけるAPPに対しての保護応答を誘発し、又はその誘発に寄与することができる、免疫学的有効量の本発明の抗原と、ブタへの投与のために適切な形で、獣医学的に許容できるキャリアー又は希釈剤とを組合すことを含んで成る方法。

【請求項54】 APP に対してブタを予防接種するための方法であって、請求項49記載のワクチンをブタに投与することを含んで成る方法。

【請求項55】 APP に対してブタを予防接種するためのワクチンキットであって、免疫学的有効量の請求項49記載の1又は複数の抗原を含んで成る容器を含んで成るキット。

【請求項56】 獣医学的に許容できるキャリアー又は希釈剤を含んで成る第2容器をさらに含んで成る請求項55記載のキット。

【請求項57】 配列番号4のアミノ酸残基22～アミノ酸残基215、配列番号6のアミノ酸残基28～アミノ酸残基258、配列番号8のアミノ酸残基20～アミノ酸残基364、及び配列番号10のアミノ酸残基20～アミノ酸残基369から成る群から選択されたアミノ酸配列を含んで成るポリペプチドに特異的に結合する単離された抗体。

【請求項58】 診断用キットであって、APP 抗原に対して向けられたブタ抗体に特異的に結合するであろう、

(a) 配列番号4のアミノ酸残基22～アミノ酸残基215、配列番号6のアミノ酸残基28～アミノ酸残基258、配列番号8のアミノ酸残基20～アミノ酸残基364、及び配列番号10のアミノ酸残基20～アミノ酸残基369から成る群から選択されたアミノ酸配列を含んで成るポリペプチド；(b) 前記(a)のポリペプチドのペプチドフラグメント；(c) キャリヤー又は融合パートナーに連結された、(a)のポリペプチド又は(c)のペプチドフラグメント、を含んで成る融合タンパク質；(d) 前記(a)のポリペプチド、(b)のペプチドフラグメント又は(c)の融合タンパク質を含んで成る第1容器；並びにブタ抗体に対して向けられた第2抗体を含んで成る第2容器、を含んで成るキット。

【請求項59】 診断用キットであって、配列番号4のアミノ酸残基22～アミノ酸残基215、配列番号6のアミノ酸残基28～アミノ酸残基258、配列番号8のアミノ酸残基20～アミノ酸残基364、及び配列番号10のアミノ酸残基20～アミノ酸残基369から成る群から選択されたアミノ酸配列を含んで成るAPP タンパク質に結合する一次抗体を含んで成る第1容器；並びにAPP タンパク質上の異なったエピトープに結合し、又は前記一次抗体に対して向けられる第2抗体を含んで成る第2容器を含んで成るキット。

【請求項60】 診断用キットであって、APP - 特異的ポリヌクレオチド分子に対して特異的にハイブリダイズするか、又は前記分子を増幅することができる請求項12～36のいずれか1項に記載のポリヌクレオチド分子又は請求項37に記載のオリゴヌクレオチド分子を含んで成る容器を含んで成るキット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 1. 発明の分野

本発明は、動物健康の分野に関し、そしてアクチノバチルス・プレウロニウモニア(*Actinobacillus pleuropneumoniae*) に対してブタを保護するワクチンに向けられる。より詳しくは、本発明は、A. プレウロニウモニアの複数の血清型により共有される新規の抗原性タンパク質、前記タンパク質をコードするDNA分子、前記タンパク質を含んで成る、APP に対するワクチン、及び診断用試薬に向けられる。

10 【0002】

【従来の技術】 2. 発明の背景

A. プレウロニウモニア(この後、“APP” と称する) は、最も重要なブタ肺病原体の1つとして認識されているグラム陰性コクバチルス(*cocobacillus*)である(Shope, R.E., 1964, *J. Exp. Med.* 119: 357-368; Sebulny, T.N.K. 及びSaunders, J.R., 1983, *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 182: 1331-1337)。地理的分布において異なる12種の異なった血清型が認識されている(Sebulny, T.N.K. and Saunders, J.R., 1983, 上記; Nielsen, R., 1985, *Proc. Am. Assoc. Swine Pract.* 18-22; Nielsen, R., 1986, *Acta. Vet. Scand.* 27: 453-455)。

【0003】 APP に対するワクチン接種に対する免疫応答は、主に血清型 - 特異的であり、このことは、ワクチン - 誘発された免疫性が血清型 - 特異的莢膜(*capsular*) 抗原に向けられていることを示す(MacInnes, J.I. and Rosendal, S., 1988, *Can. Vet. J.* 29: 572-574; Fedorka-Cray, P.J., など., 1994, *Comp. Cont. Educ. Pract. Vet.* 16: 117-125; Nielsen, R., 1979, *Nord. Vet. Med.* 31: 407-413; Rosendal, S., など., 1986, *Vet. Microbiol.* 12: 229-240)。

【0004】 対照的に、いずれか1種の血清型に対する天然の免疫性は、他の血清型により引き起こされる疾病からの有意な保護を付与すると思われ、このことは、天然の暴露が共有される抗原に対して交差反応免疫性を誘発することを示している(Sebulny, T.N.K. and Saunders, J.R., 1983, 上記; MacInnes, J.I. and Rosendal, S., 1988, above; Fedorka-Cray, P.J., など., 1994, 上記; Nielsen, R., 1979, 上記; 及びRosendal, S., など., 1986, 上記)。

【0005】 交差反応性に寄与する次のようなビルレンス因子が、可能なワクチン候補体として提案されて来た: 外毒素(Apx)(Nakai, T., など., 1983, *Am. J. Vet. Res.* 44: 344-347; Frey, J. など., 1993, *J. Gen. Microbiol.* 139: 1723-1728; Fedorka-Cray, P.J., など., 1993, *Vet. Microbiol.* 37: 85-100); 莢膜抗原(Rosendal, S., など., 1986, above); 外膜タンパク質(OMP)(Denee, H. and Potter, A., 1989, *Infect. Immune* 57: 798-804; Niven, D.F., など., 1989, *Mol. Microbiol.* 3: 1083-1089; Gonzalez, G., など., 199

0, *Mol. Microbiol.* 4 : 1173-1179 ; Geriach, G.F., など., 1992, *Infect. Immun.* 60 : 3253-3261) ; 及びリポポリサッカライド(LPS)(Fenwick, B.W. and Osborn, B., 1986, *Infect. Immun.* 54 : 575-582)。

【0006】しかしながら、そのような化合物により誘発される交差 - 反応性 / 交差 - 保護のパターンは、すべての12種のAPP血清型を満たしていない。さらに、APPからの単離された個々の成分、又は個々の成分の組合せによる免疫化は、いくつかの異種血清型による攻撃からの保護を付与するのに、これまでは失敗している(未公開の観察)。従って、天然の感染により誘発される交差 - 保護応答は特定の血清型群に制限されることが推定される。

【0007】あるいは、天然の感染の後に観察される交差 - 保護を担当する抗原のいくつかはまだ同定されていない。APP抗原に関するほとんどの研究は、抗体を用いての回復期(convalescent)血清中に検出される免疫優性抗原の特徴化に集中して来た。そのようなアプローチは、一次応答対二次応答を示す抗体特異性間の可能な差異の同定も、又は病原体との二次遭遇に対する保護を担当するかも知れない感染での優性特異性の同定も可能にしていない。

【0008】病原体への二次暴露が存在する場合に宿主が疾病からうまくのがれることができよう、一次感染の間、リンパ球は教育される(educated)ことが一般的に許容される(Mackay, C.R., 1993, *Adv. Immunol.* 53 : 217-240)。この活性を担当する記憶細胞(抗原を経験したT及びBリンパ球)は、長時間持続し、そして抗原との適切な続く遭遇に従って、再活性可能にある。未経験の細胞に比較して、それらは一般的により早い応答時間、特殊化された組織局在化、及びより効果的な抗原認識及びエフェクター機能を示す(Mackay, C.R., 1993, above ; Linton, P. and Klinman, N.R., 1992, *Sem. Immunol.* 4 : 3-9 ; Meeusen, E.N.T., など., 1991, *Eur. J. Immunol.* 21 : 2269-2272)。

【0009】二次応答の生成の間、特定の抗原に应答することができる前駆体細胞の頻度は、一次応答の間に示される頻度よりも高い。二次応答に続く記憶細胞サブセットの密集パターンはまた、未経験細胞のパターンとは異なっている。未経験細胞は二次リンパ細胞のパターンとは異なっている。未経験細胞は二次リンパ組織に対して比較的均質に移動するが、しかしそれらは非リンパ組織に対しては良好に進行しなかった。これに対して、記憶細胞は異種密集性(heterogeneous trafficking)を示し、そして多くの場合、移動は一定の二次リンパ組織及び非リンパ部位に制限されることが示されている(Mackay, C.R., 1993, 上記 ; Gray, D., 1993, *Ann. Rev. Immunol.* 11 : 49-77 ; Picker, L.S., など., 1993, *J. Immunol.* 150 : 1122-1136)。

【0010】げっ歯動物及び羊の両者における研究は、

腸からのリンパ球が腸とは反対方向に選択的に移動し、そして皮膚又はリンパ節からの細胞はその皮膚又はリンパ節とは反対方向に選択的に移動することを示した(Gray, D., 1993, 上記 ; Picker, L.S., など., 1993, 上記)。従って、病原体との二次遭遇に基づいて、細胞 - 介在性免疫性及び抗体分泌のための特定のエフェクター細胞が感染部位及びリンパ節の方により効果的に進むことができる(Meeusen, E.N.T., など., 1991, 上記)。結果的に、浸潤性リンパ球は、急速に増殖し、そしてそれらの特異性は再感染の初期段階の間、卓越しているであろう。

【0011】再感染の後、初期の組織及び排出するリンパ節からの局部B細胞の回収は、より狭い特異性範囲を有する抗体を獲得するいくつかの研究を可能にした(Meeusen, E.N.T. and Brandon, M., 1994, *J. Immunol. Meth.* 172 : 71-76)。そのような抗体は、いくつかの病原体に対しての可能性ある保護抗原を同定するために都合良く使用されて来た(Meeusen, E.N.T. and Brandon, M., 1994, 上記 ; Meeusen, E.N.T. and Brandon, M., 1994, *Eur. J. Immunol.* 24 : 469-474 ; Bowies, V. M., など., 1995, *Immunol.* 84 : 669-674)。

【0012】本明細書に開示される発明は、このアプローチの変法に基づいており、ここでは、同種及び異種APP攻撃の後に誘発される局部記憶応答に関連する抗体 - 分泌性細胞(ASC)プローブが回収された。異種攻撃の後、気管支リンパ節(BLN)培養物から得られた抗体は、すべての12種のAPP血清型に存在するまだ認識されていない4種のタンパク質を認識した。個々のタンパク質についての部分アミノ酸配列が得られており、そしてそれらをコードする5種の新規のAPPタンパク質及びポリヌクレオチド分子の同定を可能にするPCRプライマーを生成するために使用された。

【0013】3. 発明の要約

本発明は、APPから単離された5種の新規の低分子量タンパク質を提供し、それらは、本明細書においては、“Omp20”、“OmpW”、“Omp27”、“OmpA1”、及び“OmpA2”と称す。それらの“APPタンパク質”及びそれらをコードするポリヌクレオチド分子は、APPに対してブタを保護するためのワクチンにおける抗原性成分として、又はAPPにより感染される又は感染されているか、又は本発明のワクチンによりワクチン接種されているブタに同定するための診断試薬としても有用である。

【0014】Omp20のアミノ酸配列は、株Pz416(ATCC 98926)の宿主細胞に存在するプラスミドpER416のOmp20 - コードORFによりコードされ、そしてその推定されるアミノ酸配列は、アミノ酸残基1~19のシグナル配列を含んで成る配列番号2として表わされる。OmpWのアミノ酸配列は、株Pz418(ATCC 98928)の宿主細胞に存在するプラスミドpER418のOmpW - コードORFによりコードされ、そしてその推定されるアミノ酸配列は、アミノ酸残

基1~21のシグナル配列を含んで成る配列番号4として表わされる。Omp27のアミノ酸配列は、株Pz417(ATCC 98927)の宿主細胞に存在するプラスミドpER417のOmp27 - コードORFによりコードされ、そしてその推定されるアミノ酸配列は、アミノ酸残基1~7のシグナル配列を含んで成る配列番号6として表わされる。

【0015】OmpA1のアミノ酸配列は、株Pz419(ATCC 98929)の宿主細胞に存在するプラスミドpER419のOmpA1 - コードORFによりコードされ、そしてその推定されるアミノ酸配列は、アミノ酸残基1~19のシグナル配列を含んで成る配列番号8として表わされる。OmpA2のアミノ酸配列は、株Pz420(ATCC 98930)の宿主細胞に存在するプラスミドpER420のOmpA2 - コードORFによりコードされ、そしてその推定されるアミノ酸配列は、アミノ酸残基1~19のシグナル配列を含んで成る配列番号10として表わされる。実質的に純粋な形でこれらのAPPタンパク質の個々が、本発明により供給される。

【0016】本発明はさらに、本発明の前記APPタンパク質のいずれかに対して相同である実質的に精製されたポリペプチドを供給する。本発明はさらに、本発明のAPPタンパク質又は相同ポリペプチドのいずれかのペプチドフラグメントを供給する。本発明はさらに、キャリアー又は融合パートナーに連結された、本発明のAPPタンパク質、相同ポリペプチド、又はペプチドフラグメントを含んで成る融合タンパク質を供給する。本発明はさらに、本発明のAPPタンパク質、相同ポリペプチド、ペプチドフラグメント又は融合タンパク質の類似体及び誘導体を供給する。

【0017】本発明はさらに、シグナル配列と共に又はそれを伴わないで、APPタンパク質、すなわちOmp20をコードするヌクレオチド配列を含んで成る単離されたポリヌクレオチド分子を供給する。好ましい態様においては、本発明の単離されたOmp20 - コードポリペプチド分子は、約nt 329~約nt 790の配列番号1のヌクレオチド配列を含んで成る。より好ましい態様においては、本発明の単離されたOmp20 - コードポリヌクレオチド分子は、約nt 272~約nt 790の配列番号1のヌクレオチド配列を含んで成る。

【0018】本発明はさらに、シグナル配列と共に又はそれを伴わないで、APPタンパク質、すなわちOmpWをコードするヌクレオチド配列を含んで成る単離されたポリヌクレオチド分子を供給する。好ましい態様においては、本発明の単離されたOmpW - コードポリペプチド分子は、約nt 439~約nt 1023の配列番号3のヌクレオチド配列を含んで成る。より好ましい態様においては、本発明の単離されたOmpW - コードポリヌクレオチド分子は、約nt 376~約nt 1023の配列番号3のヌクレオチド配列を含んで成る。

【0019】本発明はさらに、シグナル配列と共に又はそれを伴わないで、APPタンパク質、すなわちOmp27を

コードするヌクレオチド配列を含んで成る単離されたポリヌクレオチド分子を供給する。好ましい態様においては、本発明の単離されたOmp27 - コードポリペプチド分子は、約nt 238~約nt 933の配列番号5のヌクレオチド配列を含んで成る。より好ましい態様においては、本発明の単離されたOmp27 - コードポリヌクレオチド分子は、約nt 157~約nt 933の配列番号5のヌクレオチド配列を含んで成る。

【0020】本発明はさらに、シグナル配列と共に又はそれを伴わないで、APPタンパク質、すなわちOmpA1をコードするヌクレオチド配列を含んで成る単離されたポリヌクレオチド分子を供給する。好ましい態様においては、本発明の単離されたOmpA1 - コードポリペプチド分子は、約nt 671~約nt 1708の配列番号1のヌクレオチド配列を含んで成る。より好ましい態様においては、本発明の単離されたOmpA1 - コードポリヌクレオチド分子は、約nt 614~約nt 1708の配列番号1のヌクレオチド配列を含んで成る。

【0021】本発明はさらに、シグナル配列と共に又はそれを伴わないで、APPタンパク質、すなわちOmpA2をコードするヌクレオチド配列を含んで成る単離されたポリヌクレオチド分子を供給する。好ましい態様においては、本発明の単離されたOmpA2 - コードポリペプチド分子は、約nt 254~約nt 1306の配列番号9のヌクレオチド配列を含んで成る。より好ましい態様においては、本発明の単離されたOmpA2 - コードポリヌクレオチド分子は、約nt 197~約nt 1306の配列番号9のヌクレオチド配列を含んで成る。

【0022】本発明はさらに、本発明の前記ポリヌクレオチド分子のいずれかに対して相同である単離されたポリヌクレオチド分子を供給する。本発明はさらに、本発明のAPPタンパク質のいずれかに対して相同であ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成る単離されたポリヌクレオチド分子を供給する。本発明はさらに、本発明の前記ポリヌクレオチド分子のいずれかの実質的部分であるヌクレオチド配列から成る単離されたポリヌクレオチド分子を供給する。非制限的態様において、本発明のポリヌクレオチド分子の実質的部分は、本発明のAPPタンパク質又は相同ポリペプチドのペプチドフラグメントをコードする。本発明はさらに、キャリアー又は融合パートナーに連結される、本発明のAPPタンパク質、相同ポリペプチド、又はペプチドフラグメントを含んで成る融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含んで成るポリヌクレオチド分子を供給する。

【0023】本発明はさらに、本発明のポリヌクレオチド分子のいずれかを増幅するためのプライマーとして、又は診断用試薬として有用であるオリゴヌクレオチド分子を供給する。そのようなオリゴヌクレオチド分子の特定の非制限的態様は、配列番号15~47及び49~93のいずれかから成る群から選択されたヌクレオチド配

列を有するオリゴヌクレオチド分子を包含する。

【0024】本発明はさらに、本発明のポリヌクレオチド分子のいずれかをクローニングし、そして発現するための組成物及び方法、本発明のポリヌクレオチド分子を含んで成る組換えクローニングベクター及び組換え発現ベクター、前記ベクターのいずれかにより形質転換された宿主細胞、及びそれらに由来する細胞系を提供する。本発明はさらに、本発明のポリヌクレオチド分子によりコードされる、組換え的に発現されたAPP タンパク質、相同ポリペプチド、ペプチドフラグメント、又は融合タンパク質を提供する。

【0025】本発明はさらに、ブタにおいてAPP に対する保護応答を誘発し、又はその誘発に寄与することができる本発明のAPP タンパク質、相同ポリペプチド、ペプチドフラグメント、融合タンパク質、類似体、誘導体、又はポリヌクレオチド分子から成る群から選択された、免疫学的有効量の本発明の1又は複数の抗原；及び獣医学的に許容できるキャリアー又は希釈剤を含んで成る、APP に対してブタを保護するためのワクチンを提供する。本発明のワクチンはさらに、アジュバント又は他の免疫調節成分を含むことができる。

【0026】非制限的態様においては、本発明のワクチンは、APP 及び任意には、1又は複数の他の疾病又は病理学的状態に対してブタを保護するための組合せワクチンであり得、この組合せワクチンは、ブタにおいてAPP に対する保護応答を誘発し、又はその誘発に寄与することができる本発明のAPP タンパク質、相同ポリペプチド、ペプチドフラグメント、融合タンパク質、類似体、誘導体、又はポリヌクレオチド分子から成る群から選択された、免疫学的有効量の本発明の1又は複数の抗原を含んで成る第1成分；ブタを苦しめる疾病又は病理学的状態に対する保護応答を誘発し、又はその誘発に寄与することができる、免疫学的有効量の異なる抗原を含んで成る第2成分；及び獣医学的に許容できるキャリアー又は希釈剤を有する。

【0027】本発明の方法はさらに、APP に対してブタを保護することができるワクチンを調製するための方法を提供し、ここで前記方法は、ブタにおいてAPP に対する保護応答を誘発し、又はその誘発に寄与することができる本発明のAPP タンパク質、相同ポリペプチド、ペプチドフラグメント、融合タンパク質、類似体、誘導体、又はポリヌクレオチド分子から成る群から選択された、免疫学的有効量の本発明の1又は複数の抗原との獣医学的に許容できるキャリアー又は希釈剤とを、ブタへの投与のために適切な形で、組合すことを含んで成る。本発明はさらに、ブタに本発明のワクチンを投与することを含んで成る、APP に対してブタを予防接種する方法を提供する。

【0028】本発明はさらに、APP に対してブタを予防接種するためのワクチン用キットを提供し、ここで前記

キットは、ブタにおいてAPP に対する保護応答を誘発し、又はその誘発に寄与することができる本発明のAPP タンパク質、相同ポリペプチド、ペプチドフラグメント、融合タンパク質、類似体、誘導体、又はポリヌクレオチド分子から成る群から選択された、免疫学的有効量の本発明の1又は複数の抗原を含んで成る容器を含んで成る。前記キットはさらに、獣医学的に許容できるキャリアー又は希釈剤を含んで成る第2容器を含むことができる。本発明はさらに、本発明のAPP タンパク質に対して特異的に結合する抗体を提供する。

【0029】本発明はさらに、診断用キットも提供する。非制限的態様においては、その診断用キットは、APP タンパク質に対して向けられた、ブタ用抗体に対して特異的に結合するであろう本発明のAPP タンパク質、相同ポリペプチド、ペプチドフラグメント、融合タンパク質、類似体又は誘導体を含んで成る第1容器；及びブタ用抗-APP 抗体に対して向けられた第2抗体を含んで成る第2容器を含んで成る。前記第2抗体は好ましくは、検出できるラベルを含んで成る。そのような診断用キットは、APP により現在感染されているか、又は前に感染されたことがあり、又は本発明のワクチンによる予防接種の結果として血清転換されているブタを検出するために有用である。

【0030】異なる非制限的態様においては、診断用キットは、本発明のAPP タンパク質に結合する第1抗体を含んで成る第1容器；及びAPP タンパク質上の異なるエピトープに結合するか、又は前記第1抗体に結合する第2抗体を含んで成る第2容器を含んで成る。前記第2抗体は好ましくは、検出できるラベルを含んで成る。異なる非制限的態様においては、診断用キットは、本発明のAPP 特異的ポリヌクレオチド分子を特異的に増幅するために有用である本発明のポリペプチド分子又はオリゴヌクレオチド分子を含んで成る容器を含んで成る。それらの後者の2種の診断用キットは、APP により現在、感染されているブタを検出するために有用である。

【0031】4. 図面の説明

図1：APP 血清型-5により攻撃され、そしてAPP 血清型-7により異種的に再攻撃されたブタNo. 803 からの(a)血清、及び(b)気管支リンパ節(BLN)組織外植体上清液に存在する抗体のウェスタンブロット分析。24又は48時間のインキュベーションの後に集められたすべてのBLN 組織外植体上清液は、APP タンパク質を特異的に認識した抗体を含んだ、BLN 組織外植体上清液からの抗体は、APP 血清型-1、5及び7に存在するいくつかの低分子量タンパク質を強調した。

【0032】図2：12種の異なるAPP 血清型の個々からの完全な細菌細胞抗原に対するブタNo. 803 からのBLN 組織外植体上清液に存在する抗体の交差-反応性のウェスタンブロット分析であって、これは、異種再攻撃により誘発された抗体により認識される少なくとも3

種の低分子量タンパク質がすべての12種のAPP血清型に存在したことを示す。この特定のBLN上清液に存在する抗体はまた、他のタンパク質バンドによっても認識される。

【0033】図3：低分子量タンパク質に対するブタNo. 803からのBLN組織外植体上清液における抗体の反応性が細菌細胞上清液(Sups)よりもむしろ、細胞ペレット(細胞)に存在するタンパク質に対して制限されることを示すウェスタンブロット分析。

図4：APP血清型-7から精製されたタンパク質に対するブタNo. 803からの(a)BLN組織外植体上清液及び(b)血清の反応性の、連続流動電気泳動によるウェスタンブロット分析。それぞれ、約19~20、約23、約27及び約29kDaの分子量を有する4種のタンパク質バンドが、この方法を用いて同定された。

【0034】図5：APP OmpA1及びAPP OmpA2タンパク質の推定されるアミノ酸配列の列挙。それらの2種のタンパク質は、73.1%のアミノ酸同一性を共有する。

図6：ビブリオ・コレラエ(Vibrio cholerae)からのOmpWタンパク質及びAPPからのOmpWタンパク質のアミノ酸配列の列挙。それらの2種のタンパク質は、44.9%のアミノ酸同一性を共有する。

【0035】5. 発明の特定の記載

5.1. 複数のAPP血清型により共有される新規タンパク質

Omp20のアミノ酸配列は、株Pz416(ATCC 98926)の宿主細胞に存在するプラスミドpER416のOmp20 - コードORFによりコードされる。Omp20の推定されるアミノ酸配列は、配列番号2として示される。

【0036】配列番号2で示されるタンパク質の最初の19個のアミノ酸はシグナル配列を示し、そして本発明は、配列番号2のアミノ酸残基20~172(すなわち、シグナル配列を欠いている)のみを有するOmp20タンパク質、及び配列番号2の配列(すなわち、シグナル配列を含む)を有するOmp20タンパク質を包含する。従って、本発明は、配列番号2のおよそアミノ酸残基20~およそアミノ酸残基172のアミノ酸配列を含んで成る実質的に精製されたタンパク質を提供する。本発明はさらに、配列番号2のアミノ酸配列を含んで成る実質的に精製されたタンパク質も供給する。

【0037】OmpWのアミノ酸配列は、株Pz418(ATCC 98928)の宿主細胞に存在するプラスミドpER418のOmpW - コードORFによりコードされる。OmpWの推定されるアミノ酸配列は、配列番号4として示される。配列番号4で示されるタンパク質の最初の21個のアミノ酸はシグナル配列を示し、そして本発明は、配列番号4のアミノ酸残基22~215(すなわち、シグナル配列を欠いている)のみを有するOmpWタンパク質、及び配列番号4の配列(すなわち、シグナル配列を含む)を有するOmpWタンパク質を包含する。従って、本発明は、配列番号4のお

よそアミノ酸残基22~およそアミノ酸残基215のアミノ酸配列を含んで成る実質的に精製されたタンパク質を供給する。本発明はさらに、配列番号4のアミノ酸配列を含んで成る実質的に精製されたタンパク質も供給する。

【0038】Omp27のアミノ酸配列は、株Pz417(ATCC 98927)の宿主細胞に存在するプラスミドpER417のOmp27 - コードORFによりコードされる。Omp27の推定されるアミノ酸配列は、配列番号6として示される。配列番号6で示されるタンパク質の最初の27個のアミノ酸はシグナル配列を示し、そして本発明は、配列番号6のアミノ酸残基28~258(すなわち、シグナル配列を欠いている)のみを有するOmp27タンパク質、及び配列番号6の配列(すなわち、シグナル配列を含む)を有するOmp27タンパク質を包含する。従って、本発明は、配列番号6のおよそアミノ酸残基28~およそアミノ酸残基258のアミノ酸配列を含んで成る実質的に精製されたタンパク質を供給する。本発明はさらに、配列番号6のアミノ酸配列を含んで成る実質的に精製されたタンパク質も供給する。

【0039】OmpA1のアミノ酸配列は、株Pz419(ATCC 98929)の宿主細胞に存在するプラスミドpER416のOmpA1 - コードORFによりコードされる。OmpA1の推定されるアミノ酸配列は、配列番号8として示される。配列番号8で示されるタンパク質の最初の19個のアミノ酸はシグナル配列を示し、そして本発明は、配列番号8のアミノ酸残基20~364(すなわち、シグナル配列を欠いている)のみを有するOmpA1タンパク質、及び配列番号8の配列(すなわち、シグナル配列を含む)を有するOmpA1タンパク質を包含する。従って、本発明は、配列番号8のおよそアミノ酸残基20~およそアミノ酸残基364のアミノ酸配列を含んで成る実質的に精製されたタンパク質を供給する。本発明はさらに、配列番号8のアミノ酸配列を含んで成る実質的に精製されたタンパク質も供給する。

【0040】OmpA2のアミノ酸配列は、株Pz420(ATCC 98930)の宿主細胞に存在するプラスミドpER416のOmpA2 - コードORFによりコードされる。OmpA2の推定されるアミノ酸配列は、配列番号10として示される。配列番号10で示されるタンパク質の最初の19個のアミノ酸はシグナル配列を示し、そして本発明は、配列番号10のアミノ酸残基20~369(すなわち、シグナル配列を欠いている)のみを有するOmpA2タンパク質、及び配列番号10の配列(すなわち、シグナル配列を含む)を有するOmpA2タンパク質を包含する。従って、本発明は、配列番号10のおよそアミノ酸残基20~およそアミノ酸残基369のアミノ酸配列を含んで成る実質的に精製されたタンパク質を供給する。本発明はさらに、配列番号10のアミノ酸配列を含んで成る実質的に精製されたタンパク質も供給する。

【0041】本発明のAPP タンパク質、すなわちOmp20、OmpW、Omp27、OmpA1、及びOmpA2は、それらの電気泳動移動度に基づいて、それぞれ約19～20、約23、約27、約29、及び約29kDaの分子量；及びシグナル配列を有さないそれらの推定されるアミノ酸配列に基づいて、それぞれ約20、約23、約27、約35及び約35kDaの分子量を有する。

【0042】本発明は、本発明のAPP タンパク質に対して相同であるポリペプチドを提供する。ポリペプチドを言及するために本明細書において使用される場合、用語“相同”とは、配列番号2、4、6、8及び10から成るアミノ酸配列の群から選択されたアミノ酸配列、又は1又は複数のアミノ酸残基が異なったアミノ酸残基により保存的に置換されている、それらの天然のシグナル配列を有さない前記群のアミノ酸配列と同じアミノ酸を有するポリペプチドを言及し、ここで前記相同ポリペプチドは、いづれか標準のアミノ酸分析アルゴリズム（たとえば、GENBANKのBlastPアルゴリズムの1つ）により決定される場合、配列番号2、4、6、8及び10から成るアミノ酸配列の群から選択されたアミノ酸配列を有するポリペプチドに対して、約70%、より好ましくは約80%、及び最も好ましくは約90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有し、そしてその得られる相同ポリペプチドは、本発明の実施において有用である。

【0043】保存性アミノ酸置換は当業界において良く知られている。そのような置換を行なうための規則は、中でも、Dayhof, M.D., 1978, Nat. Biomed. Res. Found., Washington, D.C., Vol. 5, Sup. 3により記載される規則を包含する。より特定には、保存性アミノ酸置換は、それらの側鎖の酸度、極性又は嵩高性に関係しているアミノ酸ファミリー内で一般的に起こる置換である。遺伝的にコードされたアミノ酸は一般的に次の4種のグループに分けられる：(1)酸性=アスパラギン酸、グルタミン酸；(2)塩基性=リシン、アルギニン、ヒスチジン；(3)非極性=アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン；及び(4)荷電されていない極性=グリシン、アスパラギン、グルタミン、システイン、セリン、トレオニン、チロシン。フェニルアラニン、トリプトファン、及びチロシンはまた、芳香族アミノ酸として分類される。

【0044】いづれかの特定のグループ内での1又は複数の置換、たとえばイソロイシン又はバリンによるロイシンの、グルタミン酸によるアスパラギン酸の、セリンによるトレオニンの、又は構造的に関係するアミノ酸残基、たとえば側鎖の類似する酸度、極性、嵩高度、又はそのいくつかの組合せでの類似性を有するアミノ酸残基によるいづれか他のアミノ酸残基の置換は一般的に、ポリペプチドの機能又は免疫原性に対して有意な効果を有さないであろう。

【0045】本明細書において使用される場合、ポリペプチドは、“本発明の実施において有用であり”、ここで前記ポリペプチドは、(a)免疫原性であり、すなわち、APPに対してブタにおける保護応答を誘発するのに単独で、又はAPPに対してブタにおける保護応答の誘発に寄与する本発明の他の抗原と組合して、ワクチン組成物に使用され得；又は(b)哺乳類種のメンバーに投与される場合、診断試薬として有用であるAPP-特異的抗体の生成を誘発するために使用され得；又は(c)APPによる感染又は本発明のワクチンによる予防接種のいづれかに起因するブタからの血液又は血清サンプルにおける抗-APP抗体の存在を検出するために診断試薬として使用され得る。

【0046】本発明はさらに、本発明のAPP タンパク質又は相同ポリペプチドのペプチドフラグメントを供給する。本明細書において使用される場合、“ペプチドフラグメント”とは、シグナル配列を有するか又は有さない、その対応する十分な長さのAPP タンパク質の完全なアミノ酸配列よりも少ないアミノ酸配列から成るポリペプチド、又はそのアミノ酸配列の少なくとも約10個、より好ましくは少なくとも約20個及び最も好ましくは少なくとも約30個のアミノ酸残基の副配列を含んで成る前記ポリペプチドの相同ポリペプチドを意味し、そしてポリペプチドについての有用性が上記に定義されるように、本発明の実施において有用な前記ポリペプチド及びその相同体を意味する。

【0047】本発明のペプチドフラグメントは、本発明の十分な長さのタンパク質又は相同ポリペプチドの1以上の副配列を含むことができる。たとえば、十分な長さのAPP タンパク質又は相同ポリペプチドからの複数の異なった副配列は、それらがAPP タンパク質又は相同ポリペプチドにおいて非連続性である場合、一緒にされ、そしてペプチドフラグメントにおいてお互い接触せしめられ得る。好ましい態様においては、本発明のペプチドフラグメントは、抗体が生ぜしめられ得る、APPタンパク質又は相同ポリペプチドの1又は複数のエピトープ、又はエピトープの複数のコピーを表わす1又は複数の副配列を含んで成る。

【0048】非制限的な態様において、本発明は、APP タンパク質の天然のシグナル配列を含んで成る、本発明のAPP タンパク質のペプチドフラグメントを供給する。好ましい態様において、ペプチドフラグメントは、配列番号2のおよそアミノ酸残基1～およそアミノ酸残基19(Omp20)、配列番号4のおよそアミノ酸残基1～およそアミノ酸残基21(OmpW)、配列番号6のおよそアミノ酸残基1～およそアミノ酸残基27(Omp27)、配列番号8のおよそアミノ酸残基1～およそアミノ酸残基19(Omp1)、及び配列番号10のおよそアミノ酸残基1～およそアミノ酸残基19(OmpA1)から成る群から選択されたアミノ酸配列から成る。

【0049】そのようなシグナル配列、及びそれらをコードするポリヌクレオチド分子は、種々の目的のために、たとえば、APP 又は他の細菌宿主細胞において発現される組換えタンパク質の細胞密集を方向づけるために、又は感染された動物からの流体又は組織サンプルにおけるAPP - 特異的ポリヌクレオチド分子を検出するための診断用プローブとして有用である。

【0050】本発明はさらに、十分な長さのAPP タンパク質又は相同ポリペプチドを提供し、ここでその副配列は、ポリペプチドの抗原性を高め、変更し、又は他方では、改良するために、天然の分子に見出される副配列に比較して、お互いに対して異なった相対的順序で配置されている。本明細書において使用される場合、用語“抗原”、“抗原性”及び同様のものは、体液性及び/又は細胞性抗原 - 特異的応答を生成するために宿主の免疫システムを刺激する1又は複数のエピトープを含む分子を意味する。この用語はまた、“免疫原”とも互換的に使用され得る。本明細書において使用される場合、用語“エピトープ”又は“エピトープ領域”とは、特定の抗体分子が結合する抗原又はハプテン上の部位を意味する。この用語はまた、“抗原決定基”とも互換的に使用される。

【0051】本発明はさらに、ポリペプチドについての有用性が上記で定義されたように、本発明の実施において有用である、キャリアー又は融合パートナーに連結された、本発明のAPP タンパク質パートナー（天然のシグナル配列を有するか、又は有さない）、その相同ポリペプチド、又はペプチドフラグメントを含んで成る融合タンパク質を提供する。融合パートナーの例については下記セクション5.4.1を参照のこと。

【0052】融合タンパク質は、種々の理由のために、たとえば組換え的に発現されたAPPタンパク質の安定性を高めるために、APP ワクチンにおける抗原性成分として、特定のAPP タンパク質パートナーに対しての抗血清を高めるために、APP タンパク質パートナーの生化学的性質を研究するために、異なった又は増強された抗原性を有するAPP タンパク質を構築するために、診断用試薬として作用せしめるために、又はたとえば、下記セクション5.4.1に記載されるように、発現されたAPP タンパク質の同定又は精製において助けになるために有用である。

【0053】本発明の融合タンパク質はさらに、特定のプロテアーゼ切断部位を含むよう、標準的技法を用いて構築され得、その結果、特定のAPP タンパク質パートナーが特定のプロテアーゼによる処理により、キャリアー又は融合パートナーから放たれ得る。たとえば、本発明の融合タンパク質は、中でも、トロンピン又は第X a因子切断部位を含むことができる。

【0054】本発明はさらに、本発明のAPP タンパク質、相同ポリペプチド、ペプチドフラグメント又は融合

タンパク質の類似体及び誘導体を提供し、ここでそのような類似体及び誘導体は、ポリペプチドについての有用性が上記で定義されたように、本発明の実施において有用である。類似体の生成をもたらす操作は、類似体が調製される特定のポリペプチドの生物学的又は免疫学的特徴を改良し、又は他方では変えるために、遺伝子レベルで又はタンパク質レベルで、又は両レベルで実施され得る。

【0055】たとえば、遺伝子レベルでは、本発明のAPP タンパク質をコードするクローン化されたDNA分子が、そのタンパク質の類似体をコードするよう、1又は複数の既知の方法により修飾され得る。そのような修飾は、エンドヌクレアーゼ消化、及び翻訳、開始、又は終結配列を創造し、又は破壊し、又はコード領域における変動を創造する突然変異、又はその組合せを包含するが、但しそれらだけには限定されない。

【0056】そのような技法は、中でも次の文献に記載される：Maniatisなど., 1989, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY ; Ausubelなど., 1989, *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates & Wiley Interscience, NY ; Sambrookなど., 1989, *Molecular Cloning : A Laboratory Manual, 2d ed.*, ColdSpring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY ; Innis など., (eds), 1995, *PCR Strategies*, Academic Press, Inc., San Diego ; 及びErlich(ed), 1992, *PCR Technology*, Oxford University Press, New York (それらの開示は引用により本明細書中に組込まれる)。

【0057】これに代って又はこれに加えて、本発明の類似体は、タンパク質レベルでは、本発明のAPP タンパク質又は他のポリペプチドの修飾により調製され得る。タンパク質の1又は複数の化学的修飾は、既知の技法、たとえば次の技法（但し、それらだけには限定されない）を用いて実施され得る：カルバゼート又は三次中心を生成するために、タンパク質の1又は複数のL - アミノ酸のその対応するD - アミノ酸、アミノ酸類似体又はアミノ酸擬似物によ置換；又は特定の化学的修飾、たとえばトリプシン、キモトリプシン、パパイン又はV8プロテアーゼによるタンパク質分解、又はNaBH₄ 又は臭化シアンによる処理、又はアセチル化、ホルミル化、酸化又は還元、等。

【0058】本発明のAPP タンパク質又は他のポリペプチドは、1又は複数の次の化学基の接合により誘導体化され得る：アセチル基、硫黄架橋基、グリコシル基、脂質、及びホスフェート、及び/又は本発明の第2のAPP タンパク質又は他のポリペプチド、又は他のタンパク質、たとえば結成アルブミン、キーホールリンペット（アカ貝）ヘモシアニン、又は市販の活性化されたBSA、又はポリアミノ酸（たとえばポリリシン）、又はポ

リサッカライド(たとえば、セファロース、アガロース又は変性された又は変性されていないセルロース)。そのような接合は好ましくは、APP タンパク質のアミノ酸側鎖及び/又はN-末端又はC-末端で存在する。そのような接合反応を実施するための方法は、タンパク質化学の分野においては、良く知られている。

【0059】本発明の実施において有用な誘導体はまた、水溶性ポリマー、たとえばポリエチレングリコールが本発明のAPP タンパク質又は他のポリペプチド、又はその類似体に接合されている誘導体を包含し、それにより、APP タンパク質の免疫原性を少なくとも一部、保持し、又は改良すると共に、追加の所望する性質を提供する。それらの追加の所望する性質は、たとえば、水溶液における高められた溶解性、貯蔵における高められた安定性、タンパク質分解性劣化に対する高められた耐性、及び高められたインビボ半減期を包含する。

【0060】本発明のAPP タンパク質又は他のポリペプチドへの接合のために適切な水溶性ポリマーは、次のものを包含するが、但しそれらだけには限定されない：ポリエチレングリコールホモポリマー、ポリプロピレングリコールホモポリマー、エチレングリコールとプロピレングリコールとのコポリマー(ここで前記ホモポリマー及びコポリマーは未置換であり、又はアルキル基により一端で置換されている)、ポリオキシエチル化されたポリオール、ポリビニルアルコール、ポリサッカライド、ポリビニルエチルエーテル、及び、-ポリ〔2-ヒドロキシエチル〕-DL-アスパルタミド。ポリエチレングリコールは特に好ましい。

【0061】ポリペプチドの水溶性ポリマー接合体を製造するための方法は、当業界において知られており、そして中でも、次の特許に記載されている：アメリカ特許第3,788,948号；第3,960,830号；第4,002,531号；第4,055,635号；第4,179,337号；第4,261,973号；第4,412,989号；第4,414,147号；第4,415,665号；第4,609,546号；第4,732,863号；第4,745,180号；ヨーロッパ特許(EP)第152,847号；EP第98,110号；及び日本特許(JP)第5,792,435号(それらは引用により本明細書に組込まれる)。

【0062】“APP タンパク質”及び同様のものに関するすべての続く言及は、特にことわらない限り、上記で定義されたように、本発明のAPP タンパク質、相同ポリペプチド、ペプチドフラグメント、融合タンパク質、類似体及び誘導体を包含するつもりである。

【0063】5.2.新規APP タンパク質をコードするポリヌクレオチド分子

本発明はさらに、APP タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含んで成る単離されたポリヌクレオチド分子を提供する。本明細書において使用される場合、用語“ポリヌクレオチド分子”、“ポリヌクレオチド配列”、“コード配列”、“オープンリーディングフレー

ム(ORF)”、及び同様のものは、1又は複数の原核配列、cDNA配列、ゲノムDNA配列(エキソン及びイントロンを包含する)、又は化学的に合成されたDNA及びRNA配列を包含することができ、そしてセンス及びアンチセンス鎖の両者を含むことができる、一本鎖又は二本鎖のいずれかであり得るDNA及びRNA分子の両者を言及するつもりである。

【0064】本明細書において使用される場合、用語“ORF”とは、いづれの介在性終結コドンも有さない本発明の特定のAPP タンパク質をコードすることを必要とされる最小ヌクレオチド配列を言及する。ポリヌクレオチドコード配列の境界は一般的に、5'(アミノ)末端での開始コドンの存在、及び3'(カルボキシ)末端での翻訳停止の存在により決定される。

【0065】下記に開示されるポリヌクレオチド分子及びオリゴヌクレオチド分子の生成及び操作は、当業者の範囲内であり、そして中でも、次の文献に記載される組換え技法に従って実施され得る：Maniatisなど., 1989、上記；Ausubelなど., 1989、上記；Sambrookなど., 1989、上記；Innisなど., 1995、上記；及びErlich, 1992、上記。

【0066】5.2.1.Omp20をコードするポリヌクレオチド分子

配列番号1からのヌクレオチド配列、及びその選択され、且つ実質的な部分についての下記言及はまた、特にことわらない限り、株Pz416(ATCC 98926)の宿主細胞に存在するプラスミドpER416のその対応するOmp20-関連ヌクレオチド配列を言及するつもりである。さらに、配列番号2に示されるアミノ酸配列及びそのペプチドフラグメントについての言及はまた、特にことわらない限り、プラスミドpER416のOmp20-関連ヌクレオチド配列によりコードされるその対応するアミノ酸配列を言及するつもりである。

【0067】本発明は、APP タンパク質、すなわちOmp20をコードするヌクレオチド配列を、シグナル配列と共に又はそれを伴わないで含んで成る単離されたポリヌクレオチド分子を提供する。好ましい態様においては、本発明の単離されたOmp20-コードポリヌクレオチド分子は、約nt 329~約nt 790の配列番号1のヌクレオチド配列を含んで成る。より好ましい態様においては、本発明の単離されたOmp20-コードポリヌクレオチド分子は、約nt 272~約nt 790の配列番号1のヌクレオチド配列を含んで成る。非制限的態様においては、本発明の単離されたOmp20-コードポリヌクレオチド分子は、配列番号1のヌクレオチド配列を含んで成る。

【0068】本発明はさらに、本発明のAPP Omp20-コードポリヌクレオチド分子に対して相同である単離されたポリヌクレオチド分子を提供する。用語“相同”とは、Omp20-コードポリヌクレオチド分子を言及するために使用される場合、(a)nt 329~nt 790の配列

番号 1 のヌクレオチド配列と同じアミノ酸配列をコードするが、しかし遺伝子コードの縮重に従ってヌクレオチド配列に対する 1 又は複数のサイレント変化を包含し；又は (b) 中位いの緊縮条件、すなわち 65 で、0.5M の NaHPO_4 、7% ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)、1 mM の EDTA におけるフィルター結合された DNA へのハイブリダイゼーション、及び 42 で、 $0.2 \times \text{SSC}/0.1\%$ SDS による洗浄 (Ausubel など. (eds.), 1989, *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 1, Green Publishing Associates, Inc., and John Wiley & Sons, Inc., New York, p 2.10.3 を参照のこと) 下で、配列番号 2 のアミノ酸残基 20 ~ 172 をコードするヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチド分子の補体にハイブリダイズするヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチド分子を意味し、そして本発明の実施において有用である。

【0069】好ましい態様においては、相同ポリヌクレオチド分子は、高い緊縮条件、すなわち 65 で、0.5M の NaHPO_4 、7% SDS、1 mM の EDTA におけるフィルター結合された DNA へのハイブリダイゼーション、及び 68 で $0.1 \times \text{SSC}/0.1\%$ SDS による洗浄 (Ausubel など., 1989、上記) 下で、配列番号 2 のアミノ酸残基 20 ~ 172 をコードするヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチド分子の補体にハイブリダイズし、そして本発明の実施において有用である。より好ましい態様においては、相同ポリヌクレオチド分子は、高い緊縮条件下で、nt 329 ~ nt 790 の配列番号 1 のヌクレオチド配列から成るポリヌクレオチド分子の補体にハイブリダイズし、そして本発明の実施において有用である。

【0070】本明細書において使用される場合、ポリヌクレオチド分子は、次の場合、“本発明の実施において有用である”：(a) ポリヌクレオチド分子が APP に対してブタにおいて保護応答を、単独で誘発するか、又はその誘発に 1 又は複数の他の抗原と組合して寄与するようワクチン組成物に使用され得るポリペプチドをコードする場合；又は (b) ポリヌクレオチド分子が APP に対してブタにおいて保護応答を、単独で誘発するか、又はその誘発に 1 又は複数の他のポリヌクレオチド分子又は 1 又は複数の他の抗原と組合して寄与するよう DNA ワクチン組成物に直接的に使用される場合；又は (c) ポリヌクレオチド分子が、哺乳類種のメンバーに投与される場合、診断試薬として有用である APP - 特異的抗体の生成を誘発するために使用され得るポリペプチドをコードする場合；又は (d) ポリヌクレオチド分子がブタからの血液又は血清サンプルにおける APP - 特異的抗体の存在を検出するために診断試薬として使用され得るポリペプチドをコードする場合；又は (e) ポリヌクレオチド分子が APP - 感染されたブタからの流体又は組織サンプルにおける APP - 特異的ポリヌクレオチド分子の存在を検出するために診断試薬として使用される場合。

【0071】本発明はさらに、“相同ポリペプチド”に

ついて上記セクション 5.1 において定義されるように、本発明の Omp20 タンパク質に対して相同であ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成る単離されたポリヌクレオチド分子を提供する。

【0072】本発明はさらに、本発明の前記 Omp20 - 関連ポリヌクレオチド分子のいずれかの実質的部分であるヌクレオチド配列から成るポリヌクレオチド分子を提供する。本明細書において使用される場合、Omp20 - 関連ポリヌクレオチド分子の“実質的部分”とは、特定の十分な長さの Omp20 - 関連ポリヌクレオチド分子の完全なヌクレオチド配列よりも少ない配列から成るが、しかしその特定の十分な長さの Omp20 関連ポリヌクレオチド分子のヌクレオチド配列の少なくとも約 10%、そしてより好ましくは少なくとも約 20% を含んで成り、そしてポリヌクレオチド分子についての“有用性”が上記で定義されているように、本発明の実施において有用であるポリヌクレオチド分子を意味する。非制限的な態様においては、Omp20 - 関連ポリヌクレオチド分子の実質的部分は、用語“ペプチドフラグメント”として上記で定義されたように、本発明の上記 Omp20 - 関連タンパク質又はポリペプチドのいずれかのペプチドフラグメントをコードする。

【0073】本発明はさらに、配列番号 2 のおよそアミノ酸残基 1 ~ およそアミノ酸残基 19 の生来の Omp20 シグナル配列をコードするヌクレオチド配列を含んで成るポリペプチドを提供する。好ましくは非制限的な態様においては、Omp20 シグナル配列 - コードポリヌクレオチド分子は配列番号 1 の約 nt 272 ~ 約 nt 328 を含んで成る。本発明はさらに、キャリアー又は融合パートナーに融合される、Omp20 タンパク質、相同ポリペプチド、又はペプチドフラグメントを含んで成る融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含んで成るポリヌクレオチド分子を提供する。

【0074】5.2.2. OmpW をコードするポリヌクレオチド分子

配列番号 3 からのヌクレオチド配列、及びその選択され、且つ実質的部分についての下記言及はまた、特にことわらない限り、株 Pz418 (ATCC 98928) の宿主細胞に存在するプラスミド pER418 のその対応する OmpW - 関連ヌクレオチド配列を言及するつもりである。さらに、配列番号 4 に示されるアミノ酸配列及びそのペプチドフラグメントについての言及はまた、特にことわらない限り、プラスミド pER418 の OmpW - 関連ヌクレオチド配列によりコードされるその対応するアミノ酸配列を言及するつもりである。

【0075】本発明は、APP タンパク質、すなわち OmpW をコードするヌクレオチド配列を、シグナル配列と共に又はそれを伴わないで含んで成る単離されたポリヌクレオチド分子を提供する。好ましい態様においては、本発明の単離された OmpW - コードポリヌクレオチド分子は、

約nt 439 ~ 約nt 1023の配列番号3のヌクレオチド配列を含んで成る。より好ましい態様においては、本発明の単離されたOmpW - コードポリヌクレオチド分子は、約nt 376 ~ 約nt 1023の配列番号3のヌクレオチド配列を含んで成る。非制限的態様においては、本発明の単離されたOmpW - コードポリヌクレオチド分子は、配列番号3のヌクレオチド配列を含んで成る。

【0076】本発明はさらに、本発明のAPP OmpW - コードポリヌクレオチド分子に対して相同である単離されたポリヌクレオチド分子を提供する。用語“相同”とは、OmpW - コードポリヌクレオチド分子を言及するために使用される場合、(a) nt 439 ~ nt 1023の配列番号3のヌクレオチド配列と同じアミノ酸配列をコードするが、しかし遺伝子コードの縮重に従ってヌクレオチド配列に対する1又は複数のサイレント変化を包含し；又は(b) 中位いの緊縮条件、すなわち65 で、0.5MのNaHPO₄、7%ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)、1mMのEDTAにおけるフィルター結合されたDNAへのハイブリダイゼーション、及び42 で、0.2 × SSC/0.1% SDSによる洗浄(Ausubel など、(eds.))、上記)下で、配列番号4の

アミノ酸残基22 ~ 215をコードするヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチド分子の補体にハイブリダイズするヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチド分子を意味し、そして本発明の実施において有用である。

【0077】好ましい態様においては、相同ポリヌクレオチド分子は、高い緊縮条件、すなわち65 で、0.5MのNaHPO₄、7% SDS、1mMのEDTAにおけるフィルター結合されたDNAへのハイブリダイゼーション、及び68 で0.1 × SSC/0.1% SDSによる洗浄(Ausubel など、1989、上記)下で、配列番号4のアミノ酸残基22 ~ 215をコードするヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチド分子の補体にハイブリダイズし、そして本発明の実施において有用である。より好ましい態様においては、相同ポリヌクレオチド分子は、高い緊縮条件下で、nt 439 ~ nt 1023の配列番号3のヌクレオチド配列から成るポリヌクレオチド分子の補体にハイブリダイズし、そして本発明の実施において有用である。

【0078】本発明はさらに、“相同ポリペプチド”について上記において定義されるように、本発明のOmpWタンパク質に対して相同であ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成る単離されたポリヌクレオチド分子を提供する。本発明はさらに、本発明の前記OmpW - 関連ポリヌクレオチド分子のいずれかの実質的部分であるヌクレオチド配列から成るポリヌクレオチド分子を提供する。

【0079】本明細書において使用される場合、OmpW - 関連ポリヌクレオチド分子の“実質的部分”とは、特定の十分な長さのOmpW - 関連ポリヌクレオチド分子の完全なヌクレオチド配列よりも少ない配列から成るが、しかしその特定の十分な長さのOmpW - 関連ポリヌクレオチド

分子のヌクレオチド配列の少なくとも約10%、及びより好ましくは少なくとも約20%を含んで成り、そしてポリヌクレオチド分子についての“有用性”が上記で定義されているように、本発明の実施において有用であるポリヌクレオチド分子を意味する。非制限的態様においては、OmpW - 関連ポリヌクレオチド分子の実質的部分は、用語“ペプチドフラグメント”として上記で定義されたように、本発明の上記OmpW - 関連タンパク質又はポリペプチドのいずれかのペプチドフラグメントをコードする。

【0080】本発明はさらに、配列番号4のおよそアミノ酸残基1 ~ およそアミノ酸残基21の生来のOmpWシグナル配列をコードするヌクレオチド配列を含んで成るポリペプチドを提供する。好ましくは非制限的態様においては、OmpWシグナル配列 - コードポリヌクレオチド分子は配列番号3の約nt 376 ~ 約nt 438を含んで成る。本発明はさらに、キャリアー又は融合パートナーに融合される、OmpWタンパク質、相同ポリペプチド、又はペプチドフラグメントを含んで成る融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含んで成るポリヌクレオチド分子を提供する。

【0081】5 . 2 . 3 . Omp27 をコードするポリヌクレオチド分子

配列番号5からのヌクレオチド配列、及びその選択され、且つ実質的部分についての下記言及はまた、特にことわらない限り、株Pz417(ATCC 98927)の宿主細胞に存在するプラスミドpER417のその対応するOmp27 - 関連ヌクレオチド配列を言及するつもりである。さらに、配列番号6に示されるアミノ酸配列及びそのペプチドフラグメントについての言及はまた、特にことわらない限り、プラスミドpER417のOmp27 - 関連ヌクレオチド配列によりコードされるその対応するアミノ酸配列を言及するつもりである。

【0082】本発明は、APP タンパク質、すなわちOmp27をコードするヌクレオチド配列を、シグナル配列と共に又はそれを伴わないで含んで成る単離されたポリヌクレオチド分子を提供する。好ましい態様においては、本発明の単離されたOmp27 - コードポリヌクレオチド分子は、約nt 238 ~ 約nt 933の配列番号5のヌクレオチド配列を含んで成る。より好ましい態様においては、本発明の単離されたOmp27 - コードポリヌクレオチド分子は、約nt 157 ~ 約nt 933の配列番号5のヌクレオチド配列を含んで成る。非制限的態様においては、本発明の単離されたOmp27 - コードポリヌクレオチド分子は、配列番号5のヌクレオチド配列を含んで成る。

【0083】本発明はさらに、本発明のAPP Omp27 - コードポリヌクレオチド分子に対して相同である単離されたポリヌクレオチド分子を提供する。用語“相同”とは、Omp27 - コードポリヌクレオチド分子を言及するために使用される場合、(a) nt 238 ~ nt 933の配列

番号 5 のヌクレオチド配列と同じアミノ酸配列をコードするが、しかし遺伝子コードの縮重に従ってヌクレオチド配列に対する 1 又は複数のサイレント変化を包含し；又は (b) 中位いの緊縮条件、すなわち 65 で、0.5M の NaHPO_4 、7%ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)、1 mM の EDTA においてのフィルター結合された DNA へのハイブリダイゼーション、及び 42 で、 $0.2 \times \text{SSC}/0.1\%$ SDS による洗浄 (Ausubel など. (eds.))、上記) 下で、配列番号 6 のアミノ酸残基 28 ~ 258 をコードするヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチド分子の補体にハイブリダイズするヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチド分子を意味し、そして本発明の実施において有用である。

【0084】好ましい態様においては、相同ポリヌクレオチド分子は、高い緊縮条件、すなわち 65 で、0.5M の NaHPO_4 、7% SDS、1 mM の EDTA においてのフィルター結合された DNA へのハイブリダイゼーション、及び 68 で $0.1 \times \text{SSC}/0.1\%$ SDS による洗浄 (Ausubel など.、1989、上記) 下で、配列番号 6 のアミノ酸残基 28 ~ 258 をコードするヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチド分子の補体にハイブリダイズし、そして本発明の実施において有用である。より好ましい態様においては、相同ポリヌクレオチド分子は、高い緊縮条件下で、nt 238 ~ nt 933 の配列番号 5 のヌクレオチド配列から成るポリヌクレオチド分子の補体にハイブリダイズし、そして本発明の実施において有用である。本発明はさらに、“相同ポリペプチド”について上記において定義されるように、本発明の Omp27 タンパク質に対して相同であ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成る単離されたポリヌクレオチド分子を提供する。

【0085】本発明はさらに、本発明の前記 Omp27 - 関連ポリヌクレオチド分子のいずれかの実質的部分であるヌクレオチド配列から成るポリヌクレオチド分子を提供する。本明細書において使用される場合、Omp27 - 関連ポリヌクレオチド分子の“実質的部分”とは、特定の十分な長さの Omp27 - 関連ポリヌクレオチド分子の完全なヌクレオチド配列よりも少ない配列から成るが、しかしその特定の十分な長さの Omp27 - 関連ポリヌクレオチド分子のヌクレオチド配列の少なくとも約 10%、及びより好ましくは少なくとも約 20% を含んで成り、そしてポリヌクレオチド分子についての“有用性”が上記で定義されているように、本発明の実施において有用であるポリヌクレオチド分子を意味する。非制限的な態様においては、Omp27 - 関連ポリヌクレオチド分子の実質的部分は、用語“ペプチドフラグメント”として上記で定義されたように、本発明の上記 Omp27 - 関連タンパク質又はポリペプチドのいずれかのペプチドフラグメントをコードする。

【0086】本発明はさらに、配列番号 6 のおよそアミ

ノ酸残基 1 ~ およそアミノ酸残基 27 の生来の Omp27 シグナル配列をコードするヌクレオチド配列を含んで成るポリペプチドを提供する。好ましくは非制限的な態様においては、Omp27 シグナル配列 - コードポリヌクレオチド分子は配列番号 5 の約 nt 157 ~ 約 nt 237 を含んで成る。本発明はさらに、キャリアー又は融合パートナーに融合される、Omp27 タンパク質、相同ポリペプチド、又はペプチドフラグメントを含んで成る融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含んで成るポリヌクレオチド分子を提供する。

【0087】5 . 2 . 4 . OmpA1 をコードするポリヌクレオチド分子

配列番号 7 からのヌクレオチド配列、及びその選択され、且つ実質的な部分についての下記言及はまた、特にことわらない限り、株 Pz419(ATCC 98929) の宿主細胞に存在するプラスミド pER419 のその対応する OmpA1 - 関連ヌクレオチド配列を言及するつもりである。さらに、配列番号 8 に示されるアミノ酸配列及びそのペプチドフラグメントについての言及はまた、特にことわらない限り、プラスミド pER419 の OmpA1 - 関連ヌクレオチド配列によりコードされるその対応するアミノ酸配列を言及するつもりである。

【0088】本発明は、APP タンパク質、すなわち OmpA1 をコードするヌクレオチド配列を、シグナル配列と共に又はそれを伴わないで含んで成る単離されたポリヌクレオチド分子を提供する。好ましい態様においては、本発明の単離された OmpA1 - コードポリヌクレオチド分子は、約 nt 671 ~ 約 nt 1708 の配列番号 7 のヌクレオチド配列を含んで成る。より好ましい態様においては、本発明の単離された OmpA1 - コードポリヌクレオチド分子は、約 nt 614 ~ 約 nt 1708 の配列番号 7 のヌクレオチド配列を含んで成る。非制限的な態様においては、本発明の単離された OmpA1 - コードポリヌクレオチド分子は、配列番号 7 のヌクレオチド配列を含んで成る。

【0089】本発明はさらに、本発明の APP OmpA1 - コードポリヌクレオチド分子に対して相同である単離されたポリヌクレオチド分子を提供する。用語“相同”とは、OmpA1 - コードポリヌクレオチド分子を言及するために使用される場合、(a) nt 671 ~ nt 1708 の配列番号 7 のヌクレオチド配列と同じアミノ酸配列をコードするが、しかし遺伝子コードの縮重に従ってヌクレオチド配列に対する 1 又は複数のサイレント変化を包含し；又は (b) 中位いの緊縮条件、すなわち 65 で、0.5M の NaHPO_4 、7%ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)、1 mM の EDTA においてのフィルター結合された DNA へのハイブリダイゼーション、及び 42 で、 $0.2 \times \text{SSC}/0.1\%$ SDS による洗浄 (Ausubel など. (eds.))、上記) 下で、配列番号 8 のアミノ酸残基 20 ~ 364 をコードするヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチド分子の補体にハイブリダイズするヌクレオチド配列を有するポリヌクレオ

チド分子を意味し、そして本発明の実施において有用である。

【0090】好ましい態様においては、相同ポリヌクレオチド分子は、高い緊縮条件、すなわち65 で、0.5MのNaHPO₄, 7% SDS, 1mMのEDTAにおけるフィルター結合されたDNAへのハイブリダイゼーション、及び68で0.1×SSC/0.1% SDSによる洗浄(Ausubelなど., 1989、上記)下で、配列番号8のアミノ酸残基20~364をコードするヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチド分子の補体にハイブリダイズし、そして本発明の実

10 施において有用である。より好ましい態様においては、相同ポリヌクレオチド分子は、高い緊縮条件下で、nt671~nt1708の配列番号7のヌクレオチド配列から成るポリヌクレオチド分子の補体にハイブリダイズし、そして本発明の実施において有用である。

【0091】本発明はさらに、“相同ポリペプチド”について上記において定義されるように、本発明のOmpA1タンパク質に対して相同であ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成る単離されたポリヌクレオチド分子を提供する。本発明はさらに、本発明の前記

20 OmpA1 - 関連ポリヌクレオチド分子のいずれかの実質的部分であるヌクレオチド配列から成るポリヌクレオチド分子を提供する。本明細書において使用される場合、OmpA1 - 関連ポリヌクレオチド分子の“実質的部分”とは、特定の十分な長さのOmpA1 - 関連ポリヌクレオチド分子の完全なヌクレオチド配列よりも少ない配列から成るが、しかしその特定の十分な長さのOmpA1 関連ポリヌクレオチド分子のヌクレオチド配列の少なくとも約10%、及びより好ましくは少なくとも約20%を含んで成り、そしてポリヌクレオチド分子についての“有用性”

30 が上記で定義されているように、本発明の実施において有用であるポリヌクレオチド分子を意味する。非制限的な態様においては、OmpA1 - 関連ポリヌクレオチド分子の実質的部分は、用語“ペプチドフラグメント”として上記で定義されたように、本発明の上記OmpA1 - 関連タンパク質又はポリペプチドのいずれかのペプチドフラグメントをコードする。

【0092】本発明はさらに、配列番号8のおよそアミノ酸残基1~およそアミノ酸残基19の生来のOmpA1シグナル配列をコードするヌクレオチド配列を含んで成る

40 ポリペプチドを提供する。好ましくは非制限的な態様においては、OmpA1シグナル配列 - コードポリヌクレオチド分子は配列番号7の約nt614~約nt670を含んで成る。本発明はさらに、キャリアー又は融合パートナーに融合される、OmpA1タンパク質、相同ポリペプチド、又はペプチドフラグメントを含んで成る融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含んで成るポリヌクレオチド分子を提供する。

【0093】5.2.5. OmpA2 をコードするポリヌクレオチド分子

配列番号9からのヌクレオチド配列、及びその選択され、且つ実質的な部分についての下記言及はまた、特にことわらない限り、株Pz420(ATCC 98930)の宿主細胞に存在するプラスミドpER420のその対応するOmpA2 - 関連ヌクレオチド配列を言及するつもりである。さらに、配列番号10に示されるアミノ酸配列及びそのペプチドフラグメントについての言及はまた、特にことわらない限り、プラスミドpER420のOmpA2 - 関連ヌクレオチド配列によりコードされるその対応するアミノ酸配列を言及するつもりである。

【0094】本発明は、APPタンパク質、すなわちOmpA2をコードするヌクレオチド配列を、シグナル配列と共に又はそれを伴わないで含んで成る単離されたポリヌクレオチド分子を提供する。好ましい態様においては、本発明の単離されたOmpA2 - コードポリヌクレオチド分子は、約nt254~約nt1306の配列番号9のヌクレオチド配列を含んで成る。より好ましい態様においては、本発明の単離されたOmpA2 - コードポリヌクレオチド分子は、約nt197~約nt1306の配列番号9のヌクレオチド配列を含んで成る。非制限的な態様においては、本発明の単離されたOmpA2 - コードポリヌクレオチド分子は、配列番号9のヌクレオチド配列を含んで成る。

【0095】本発明はさらに、本発明のAPP OmpA2 - コードポリヌクレオチド分子に対して相同である単離されたポリヌクレオチド分子を提供する。用語“相同”とは、OmpA2 - コードポリヌクレオチド分子を言及するために使用される場合、(a)nt254~nt1306の配列番号9のヌクレオチド配列と同じアミノ酸配列をコードするが、しかし遺伝子コードの縮重に従ってヌクレオチド配列に対する1又は複数のサイレント変化を包含し;又は(b)中位いの緊縮条件、すなわち65 で、0.5MのNaHPO₄, 7%ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)、1mMのEDTAにおけるフィルター結合されたDNAへのハイブリダイゼーション、及び42で、0.2×SSC/0.1% SDSによる洗浄(Ausubelなど、上記)下で、配列番号10のアミノ酸残基20~369をコードするヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチド分子の補体にハイブリダイズするヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチド分子を意味し、そして本発明の実施において有用である。

【0096】好ましい態様においては、相同ポリヌクレオチド分子は、高い緊縮条件、すなわち65 で、0.5MのNaHPO₄, 7% SDS, 1mMのEDTAにおけるフィルター結合されたDNAへのハイブリダイゼーション、及び68で0.1×SSC/0.1% SDSによる洗浄(Ausubelなど., 1989、上記)下で、配列番号10のアミノ酸残基20~369をコードするヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチド分子の補体にハイブリダイズし、そして本発明の実施において有用である。より好ましい態様においては、相同ポリヌクレオチド分子は、高い緊縮条件下で、

50 nt254~nt1306の配列番号9のヌクレオチド配列

から成るポリヌクレオチド分子の補体にハイブリダイズし、そして本発明の実施において有用である。本発明はさらに、“相同ポリペプチド”について上記において定義されるように、本発明のOmpA2 タンパク質に対して相同であ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成る単離されたポリヌクレオチド分子を提供する。

【0097】本発明はさらに、本発明の前記OmpA2 - 関連ポリヌクレオチド分子のいずれかの実質的部分であるヌクレオチド配列から成るポリヌクレオチド分子を提供する。本明細書において使用される場合、OmpA2 - 関連ポリヌクレオチド分子の“実質的部分”とは、特定の十分な長さのOmpA2 - 関連ポリヌクレオチド分子の完全なヌクレオチド配列よりも少ない配列から成るが、しかしその特定の十分な長さのOmpA2 関連ポリヌクレオチド分子のヌクレオチド配列の少なくとも約10%、及びより好ましくは少なくとも約20%を含んで成り、そしてポリヌクレオチド分子についての“有用性”が上記で定義されているように、本発明の実施において有用であるポリヌクレオチド分子を意味する。非制限的な態様においては、OmpA2 - 関連ポリヌクレオチド分子の実質的な部分は、用語“ペプチドフラグメント”として上記で定義されたように、本発明の上記OmpA2 - 関連タンパク質又はポリペプチドのいずれかのペプチドフラグメントをコードする。

【0098】本発明はさらに、配列番号10のおよそアミノ酸残基1~およそアミノ酸残基19の生来のOmpA2 シグナル配列をコードするヌクレオチド配列を含んで成るポリペプチドを提供する。好ましくは非制限的な態様においては、OmpA2 シグナル配列 - コードポリヌクレオチド分子は配列番号9の約nt 197~約nt 253を含んで成る。本発明はさらに、キャリアー又は融合パートナーに融合される、OmpA2 タンパク質、相同ポリペプチド、又はペプチドフラグメントを含んで成る融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含んで成るポリヌクレオチド分子を提供する。

【0099】5.3. オリゴヌクレオチド分子

本発明は、さらに、本発明の前記ポリヌクレオチド分子のいずれかにハイブリダイズし、又は本発明の前記ポリヌクレオチド分子のいずれかの相補体であるヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチド分子にハイブリダイズするオリゴヌクレオチド分子を提供する。そのようなオリゴヌクレオチド分子は好ましくは、少なくとも約10~15個の長さのヌクレオチドであるが、しかし配列番号1, 3, 5, 7又は9のいずれかの副配列、又はその相同ポリヌクレオチド分子の長さまで及び、そして高い緊縮条件下で、前記1又は複数のポリヌクレオチド分子にハイブリダイズすることができる。

【0100】より短いオリゴヌクレオチド分子に関しては、高い緊縮条件の例は、約14個の塩基のオリゴヌク

レオチドに関して、約37、約17個の塩基のオリゴヌクレオチドに関して、約48、約20個の塩基のオリゴヌクレオチドに関して、約55、及び約23個の塩基のオリゴヌクレオチドに関して約60の温度での6×SSC/0.5%ピロリン酸ナトリウム溶液による洗浄を包含する。より長いオリゴヌクレオチド分子(すなわち約100nt以上)に関して、高い緊縮条件の例は、上記セクション5.2に提供されている。他の適切なハイブリダイゼーション条件は、使用される特定のオリゴヌクレオチド及びポリヌクレオチド分子に依存して、当業界において知られているようにして決定され、そして調節され得る。

【0101】好ましい態様においては、本発明のオリゴヌクレオチド分子は、高い緊縮条件下で、配列番号1, 3, 5, 7、又は9から選択されたヌクレオチド配列から成るポリヌクレオチド分子に、又は配列番号1, 3, 5, 7又は9から選択されたヌクレオチド配列の補体であるヌクレオチド配列から成るポリヌクレオチド分子にハイブリダイズする。非制限的な態様においては、本発明のオリゴヌクレオチド分子は、配列番号15~47及び49~93から成る群から選択されたヌクレオチド配列、及び前記配列の補体を含んで成る。非制限的な態様においては、オリゴヌクレオチド分子は、配列番号15~47及び49~93から成る群から選択されたヌクレオチド配列及び前記配列の補体を含んで成る。

【0102】本発明のオリゴヌクレオチド分子は、種々の目的のために、たとえば示差疾病診断への使用のためにAPP タンパク質 - コードポリヌクレオチド分子の増幅におけるプライマーとして、又は遺伝子調節において有用なアンチセンスをコードするために又はアンチセンスとして作用するために有用である。増幅は、組織又は流体サンプル、たとえば感染された動物の粘膜又は気管支においてAPP タンパク質をコードするポリヌクレオチド分子の存在を検出するために使用され得る。特定の増幅生成物の生成はAPP 細菌感染の診断の維持を助けると共に、増幅される生成物の欠失はそのような感染の欠失を示すことができる。本明細書に開示されるオリゴヌクレオチド分子はまた、アクチノバチルス他の種又は株、又は他の細菌から相同遺伝子を単離するためにも使用され得る。

【0103】増幅は、当業界において知られている他の増幅技法、たとえばリガーゼ鎖反応が使用され得るが、標準技法、たとえば“ポリメラーゼ鎖反応(PCR)により、適切に企画されたオリゴヌクレオチド分子を用いて実施され得る。たとえば、PCRに関しては、適切に企画されたプライマー、増幅されるべきヌクレオチド配列を含む鋳型、及び当業界において知られている適切なPCR酵素及び緩衝液を含んで成る混合物が、鋳型の特定のAPP - 関連ポリヌクレオチド配列を増幅するために、標準のプロトコールに従って調製され、そして処理され

る。PCRを実施するための方法は、中でも、Innis など. (eds), 1995、上記；及びErlich (ed), 1992、上記に記載されている。

【0104】5.4. 組換え発現システム

5.4.1. クローニング及び発現ベクター

本発明はさらに、本発明のポリヌクレオチド分子のいずれかをクローニングし、そして発現するための組成物、本発明のポリヌクレオチド分子を含んで成る組換えクローニングベクター及び組換え発現ベクター、前記いずれかのベクターにより形質転換された宿主細胞、及びそれ 10
に由来する細胞系を提供する。本発明の組換えベクター、特に発現ベクターは、ポリヌクレオチド分子のコード配列（この後、“APPコード配列”と称する）が、ポリペプチドを生成するためにAPPコード配列の転写及び翻訳のために必要な1又は複数の調節要素と作用可能に関連して存在するよう、好ましくは構成される。

【0105】本明細書において使用される場合、用語“調節要素”とは、ポリヌクレオチドコード配列の発現を駆動し、そして/又は調節するよう作用する当業界において知られている、誘導性及び非誘導性プロモーター、エンハンサー、オペレーター及び他の要素をコードするヌクレオチド配列を包含するが、但し、それらだけには限定されない。また、本明細書において使用される場合、APPコード配列は、1又は複数の調節要素と“作用可能に関連して”存在し、ここで前記調節要素はコード配列の転写又はそのmRNAの翻訳、又は両者を効果的に調節し、そして可能にする。

【0106】適切な調節要素と作用可能に関連して、特定のコード配列を含む組換えベクターを構成するための方法、たとえばインビトロ組換え技法、合成技法、及び 30
インビボ遺伝子組換え技法は、当業界において良く知られている。たとえば、Maniatisなど., 1989、上記；Ausubelなど., 1989、上記；Sambrookなど., 1989、上記；Innisなど., 1995、上記；及びErlich, 1992、上記を参照のこと。

【0107】本発明のAPPコード配列のいずれか、たとえばAPPコード配列を含む組換えバクテリオファージDNA、プラスミドDNA及びコスミドDNA発現ベクターを発現するために使用され得る種々の発現ベクターは当業界において知られている。本発明のAPPコード配列を含む 40
よう構築され得る典型的な原核発現ベクタープラスミドは、中でも、pUC8、pUC9、pBR322及びpBR329 (Biorad Laboratories, Richmond, CA)、pPL及びpKK223 (Pharmacia, Piscataway, NJ)、pQE50(Qiagen, Chatsworth, CA)、及びpGEXシリーズのプラスミド(Pharmacia)を包含する。本発明のAPPコード配列を含むよう構築され得る典型的な真核発現ベクターは、エクジソン-誘発性哺乳類発現システム(Invitrogen, Carlsbad, CA)、サイトメガロウイルスプロモーター-エンハンサーに基づくシステム (Promega, Madison, WI ; Stratagene, La Joll 50

a, CA ; Invitrogen)、バキュロウイルス-に基づく発現システム(Promega)、及び植物-に基づく発現システムを包含する。

【0108】それらの及び他のベクターの調節要素は、それらの強さ及び特異性において変化することができる。使用される宿主/ベクターシステムに依存して、多くの適切な転写及び翻訳要素のいずれかが使用され得る。たとえば、哺乳類細胞系においてクローニングする場合、哺乳類細胞のゲノムから単離されたプロモーター、たとえばマウスメタロチオネインプロモーター、又はそれらの細胞において増殖するウイルスから単離されたプロモーター、たとえばワクシニア ウィルス7.5Kプロモーター又はMoloney ネズミ肉腫ウィルスの長い末端反復体を使用され得る。組換えDNA又は合成技法により得られたプロモーターもまた、挿入されたコード配列の転写を付与するために使用され得る。

【0109】さらに、一定のプロモーターからの発現は、特定のインデューサー、たとえばメタロチオネインプロモーターのための亜鉛及びカドニウムイオンの存在下で高められ得る。転写調節領域又はプロモーターの非制限的例は、細菌に関しては、-galプロモーター、T7プロモーター、TACプロモーター、左及び右プロモーター、trp及びlacプロモーター、trp-lac融合プロモーター、等；酵母に関しては、解糖酵素プロモーター、たとえばADH-I及びIIプロモーター、GPKプロモーター、PGIプロモーター、TRPプロモーター、等；及び哺乳類細胞に関しては、SV40初期及び後期プロモーター、アデノウイルス主要後期プロモーターを包含する。

【0110】特定の開始シグナルがまた、挿入されたコード配列の十分な翻訳のために必要とされる。それらのシグナルは典型的には、ATG開始コドン及び隣接する配列を包含する。それ自体の開始コドン及び隣接する配列を含む本発明のAPPコード配列が適切な発現ベクター中に挿入されている場合、追加の翻訳制御シグナルは必要とされない。しかしながら、APPコード配列の一部のみが挿入されている場合、ATG開始コドンを包含する外因性翻訳制御シグナルが必要とされる。それらの外因性翻訳制御シグナル及び開始コドンは、天然及び合成の種々の源から得られる。さらに、開始コドンは、完全な挿入体のイン-フレーム翻訳を確保するために、コード領域のオープンリーディングフレームと整合して存在すべきである。

【0111】キャリアー又は融合パートナーに融合される本発明のAPP-関連ポリペプチドのいずれかを含んで成る融合タンパク質を発現するであろう発現ベクターがまた構成され得る。そのような融合タンパク質は、種々の目的のために、たとえば組換え的に発現されたAPPタンパク質の安定性を高めるために、APPタンパク質に対する抗血清を高めるために、APPタンパク質の生化学的性質を研究するために、変更された免疫学的性質を示す

APP タンパク質を構築するために、又は組換え的に発現されたAPP タンパク質の同定又は精製を助けるために使用され得る。

【0112】可能な融合タンパク質発現ベクターは、保護ペプチド、たとえば下記セクション 8.2 に記載されるもの、並びに - ガラクトシダーゼ及び *trpE* 融合体、マルトース - 結合タンパク質融合体、グルタチオン - S - トランスフェラーゼ(GST) 融合体、及びポリヒスチジン融合体(キャリアー領域)をコードする配列を組込んでいるベクターを包含するが、但しそれらだけに 10 には限定されない。それらの及び他の融合タンパク質をコードする発現ベクターを構成するために使用され得る方法は、当業界において良く知られている。

【0113】融合タンパク質は、発現されたタンパク質の精製を助けるために有用である。非制限的な態様においては、たとえばAPP タンパク質 - マルトース - 結合融合タンパク質はアミロース樹脂を用いて精製され得；AP 10 P タンパク質 - GST 融合タンパク質はグルタチオン - アガロースビーズを用いて精製され得；そしてAPP タンパク質 - ポリヒスチジン融合タンパク質は二価のニッケル 20 樹脂を用いて精製され得る。他方では、キャリアータンパク質又はペプチドに対する抗体は、融合タンパク質のアフィニティークロマトグラフィー精製のために使用され得る。

【0114】たとえば、モノクローナル抗体の標的エピトープをコードするヌクレオチド配列が調節要素と作用可能に関連して発現ベクター中に構築され、そして位置決定され、その結果、発現されたエピトープが本発明の APP タンパク質に融合される。非制限的な例においては、親水性マーカーペプチドである、FLAGTMエピトープ 30 標識(International Biotechnologies Inc.)をコードするヌクレオチド配列は、APP タンパク質のアミノ又はカルボキシル末端に対応する点で発現ベクター中に標準技法により挿入され得る。次に、発現されたポリペプチド - FLAGTMエピトープ融合生成物が検出され、そして市販の抗 - FLAGTM抗体を用いてアフィニティー精製され得る。

【0115】本発明の発現ベクターはまた、特定のプロテアーゼ切断部位をコードするポリリンカー配列を含むよう構築され得、その結果、発現されたAPP タンパク質 40 は、特定のプロテアーゼによる処理によりキャリアー領域又は融合パートナーから開放され得る。たとえば、融合タンパク質ベクターは、中でも、トロンピン又は第 Xa 因子切断部位をコードするヌクレオチド配列を含むことができる。

【0116】APP コード配列から上流に及び前記配列とオープンリーディングフレームを整合して存在するシグナル配列は、発現されたAPP ポリペプチドの密集及び分泌を方向づけるために、既知の方法により発現ベクター中に構築され得る。シグナル配列の非制限的例は、本明 50

細書に開示されるような本発明のAPP タンパク質に対して生来である配列、並びに - 因子、免疫グロブリン、外層膜タンパク質、ペニシリナーゼ及び T - 細胞受容体からのシグナル配列を包含する。

【0117】本発明の組換えベクターにより形質転換された又はトランスフェクトされた宿主細胞の選択を助けるために、ベクターは、レポーター遺伝子生成物又は他の選択マーカーのためのコード配列をさらに含んで成るよう構築され得る。そのようなコード配列は好ましくは、上記のように、調節要素と作用可能に関係して存在する。本発明の実施において有用であるレポーター遺伝子は、当業界において良く知られており、そして中でも、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(CAT)、緑色蛍光タンパク質、ホタル、ルシフェラーゼ及びヒト成長ホルモンをコードする遺伝子を包含する。選択マーカーをコードするヌクレオチド配列は、当業界において良く知られており、そして抗生物質又は抗 - 代謝物に対して耐性を付与する遺伝子生成物をコードし、又は栄養要求必要条件を供給する、それらの配列を包含する。そのような配列の例は、中でも、チミジン キナーゼ活性、又はメトトレキセート、アンピシリン、カナマイシン、クロラムフェニコール、ゼオシン、テトラサイクリン、及びカルベニシリンに対する耐性をコードするそれらの配列を包含する。

【0118】特定の非制限的な態様においては、本発明は、American Type Culture Collection(ATCC)に寄託されている宿主に存在する、下記セクションに記載されるように構成された次のプラスミドクローニングベクターを供給する：株Pz416(ATCC 98926)の宿主細胞に存在し、そしてOmp20のORFを含んで成るプラスミドpER416；株Pz418(ATCC 98928)の宿主細胞に存在し、そしてOmpWのORFを含んで成るプラスミドpER418；株Pz417(ATCC 98927)の宿主細胞に存在し、そしてOmp27のORFを含んで成るプラスミドpER417；株Pz419(ATCC 98929)の宿主細胞に存在し、そしてOmpA1のORFを含んで成るプラスミドpER419；及び株Pz420(ATCC 98930)の宿主細胞に存在し、そしてOmpA2のORFを含んで成るプラスミドpER420。

【0119】5.4.2. 宿主細胞の形質転換
本発明はさらに、本発明のポリヌクレオチド分子又は組換えベクターにより形質転換された宿主細胞、及びそれらに由来する細胞系を提供する。本発明の実施において有用な宿主細胞は、原核細胞か又は真核細胞のいずれかであり得る。そのような形質転換された宿主細胞は、微生物、たとえば組換えバクテリオファージDNA、プラスミドDNA又はコスミドDNA 発現ベクターにより形質転換された細菌細胞；又は組換え発現ベクターにより形質転換された酵母細胞；又は動物細胞、たとえば組換えウィルス発現ベクター、たとえばバキュロウィルスにより感染された昆虫細胞、又は組換えウィルスベクター、たと

えばアデノウイルス又はワクシニアウイルスにより感染された哺乳類細胞を包含するが、但しそれらだけでは限定されない。

【0120】細菌細胞は一般的に、宿主細胞として好ましい。E. コリ株、たとえばGibcoBRL, Life Technologies(Gaithersburg, MD) から入手できる株DH5、又は下記に記載されるようなE. コリ株LW14が典型的には使用され得る。真核宿主細胞、たとえば酵母細胞、及び哺乳類細胞、たとえばマウス、ハムスター、ブタ、牛、サル又はヒト細胞系からの細胞がまた、効果的に使用され得る。本発明の組換えタンパク質を発現するために使用され得る真核宿主細胞の例は、Chinese Hamster Ovary (CHO) 細胞 (たとえば、ATCC受託番号(CL61)及びNIH Swiss Mouse Embryo Cell NIH/3T3(たとえばATCC受託番号CRL1658)を包含する。

【0121】本発明の組換えベクターは好ましくは、実質的に均質な細胞培養物中の1又は複数の宿主細胞中に形質転換され、又はトランスフェクトされる。ベクターは一般的に、既知技法、たとえばリン酸カルシウム沈殿、塩化カルシウム処理、マイクロインジェクション、エレクトロポレーション、組換えされたウイルスとの接触によるトランスフェクション、リポソーム介在性トランスフェクション、DEAE-デキストラン トランスフェクション、トランスダクション、接合、又は微小発射物衝撃により、宿主細胞中に導入される。形質転換体の選択は、標準方法により、たとえば組換えベクターに関する選択マーカー、たとえば耐抗生物質性を発現する細胞を選択することによって実施され得る。

【0122】ベクターが宿主細胞中に導入されると、宿主細胞ゲノムにおける、又はエピソーム的に、APP コード配列の組み込み及び維持が、予測されるタンパク質生成物を検出するために、標準の技法、たとえばサザンハイブリダイゼーション分析、制限酵素分析、PCR 分析、たとえば逆転写酵素PCR(rt-PCR)、又は免疫学的アッセイにより確かめられ得る。APP コード配列を含み、そして/又は発現する宿主細胞は、当業界において良く知られている次の少なくとも4種の一般的なアプローチのいずれかにより同定され得る：(i) DNA-DNA, DNA-RNA 又は RNA - アンチセンスRNA ハイブリダイゼーション；(ii) “マーカー” 遺伝子機能の存在の検出；(iii) 宿主細胞におけるAPP - 特異的mRNA転写体の発現により測定されるような転写のレベルの評価；及び(iv) たとえばイムノアッセイにより測定されるような成熟APP タンパク質生成物の存在の検出。

【0123】5.4.3. 組換えポリペプチドの発現
APP コード配列が適切な宿主細胞中に安定して導入されると、形質転換された宿主細胞はクローン的に増殖し、そしてその得られる細胞がAPP タンパク質の最大生成の助けとなる条件下で増殖せしめられる。そのような条件は、典型的には、そのような細胞を高密度に増殖するこ

とを包含する。発現ベクターが誘発性プロモーターを含む場合、適切な誘発条件、たとえば温度シフト、栄養物の消耗、無償性誘発物質(たとえば炭水化物の類似体、たとえばイソプロピル - D - チオガラクトピラノシド(IPTG))の添加、過剰の代謝副生成物の蓄積、又は同様のことが、発現を誘発するために、必要により使用される。

【0124】組換え的に発現されたAPP タンパク質が宿主細胞の内部に保持される場合、細胞は収穫され、そして溶解され、そしてAPP タンパク質がその溶解物から、タンパク質分解を最小にするために当業界において知られている抽出条件；たとえば4 で、又はプロテアーゼインヒビターの存在下で、又は両者の存在下で、実質的に精製され、又は単離される。組換え的に発現されたAPP タンパク質が宿主細胞から分泌される場合、消費された栄養培地が単純に集められ、そしてAPP ポリペプチドがそれから実質的に精製され、そして単離される。

【0125】組換え的に発現されたAPP タンパク質は、標準の方法、たとえば次の方法のいずれかの組合せを用いて、細胞溶解物又は培養培地から部分的又は実質的に精製され又は単離され得る：硫酸アンモニウム沈殿、サイズ分別、イオン交換クロマトグラフィー、HPLC、密度遠心分離、及びアフィニティークロマトグラフィー。本発明のAPP ポリペプチドの高まる純度は、たとえばサイズ、又はAPP ポリペプチドに対して特異的な抗体との反応性に基づいて、又は融合標識の存在により決定され得る。

【0126】本発明の実施に、たとえばワクチン組成物への使用のためには、APP タンパク質は、培養流体中に分泌されるような精製されていない状態で、又は宿主細胞又は細胞溶解物に存在するものとして、又は実質的に精製された又は単離された形で使用され得る。本明細書において使用される場合、APP タンパク質は“実質的に精製され”、ここで前記タンパク質は、特定の調製物におけるタンパク質の約20%重量%以上を構成する。また、本明細書において使用される場合、APP タンパク質は“単離され”、ここで前記タンパク質は特定の調製物におけるタンパク質の少なくとも約80%重量%を構成する。

【0127】従って、本発明は、本発明のAPP タンパク質、相同ポリペプチド、ペプチドフラグメント又は融合タンパク質の調製方法を提供し、ここで前記方法は、組換え発現ベクターにより形質転換された宿主細胞を培養し、ここで前記組換え発現ベクターは、次のものをコードするヌクレオチド配列を含んで成るポリヌクレオチド分子を含んで成り：(a) 生来のシグナル配列を伴って、又は伴わないで、配列番号2, 4, 6, 8又は10のアミノ酸配列を含んで成るAPP タンパク質；又は(b) 前記(a)のAPP タンパク質に対して相同であるポリペプチド；あるいは(c) 前記(a)のAPP タンパ

ク質、又は (b) の相同ポリペプチドのペプチドフラグメント；あるいは (d) 融合パートナーに融合された、(a) の APP タンパク質、(b) の相同ポリペプチド、又は (c) のペプチドフラグメント、を含んで成る融合タンパク質；前記ポリヌクレオチド分子は、APP タンパク質、相同ポリペプチド、ペプチドフラグメント又は融合タンパク質の生成の助けとなる条件下で、宿主細胞におけるポリヌクレオチド分子の発現を制御する 1 又は複数の調節要素と作用可能に関連して存在し；そして前記細胞培養物から APP タンパク質、相同ポリペプチド、ペ

【0128】本発明の APP タンパク質が十分な純度で得られると、それは標準の方法、たとえば SDS-PAGE、サイズ排除クロマトグラフィー、アミノ酸配列分析、血清学的反応性、等により特徴づけられ得る。APP タンパク質のアミノ酸配列は、標準のペプチド配列決定技法を用いて決定され得る。APP タンパク質はさらに、親水性分析（たとえば、Hopp and Woods, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78 : 3824 を参照のこと）、又は類似ソフトウェアアルゴリズムを用いて、特徴づけられ、疎水性及び親水性領域が同定され得る。

【0129】構造分析は、特定の二次構造を仮定する APP タンパク質の領域を同定するために実施され得る。生物物理学的方法、たとえば X-線結晶学 (Engstrom, 1974, Biochem. Exp. Biol. 11 : 7-13)、コンピューターモデリング (Fletterick and Zoller (eds.), 1986, Current Communications in Molecular Biology, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY)、核磁気共鳴 (NMR) 及び質量分光法がまた、タンパク質を特徴づけるために使用され得る。それらの研究から得られる情報は、たとえばより効果的なワクチン組成物を企画するために、又は APP タンパク質の特定部分のみを含んで成るワクチンを選択するために使用され得る。

【0130】本発明の実施において有用である APP タンパク質は、(a) 免疫原性であり、すなわちブタに投与される場合、APP に対する保護応答を単独で誘発することができ、又はその誘発に、他の APP タンパク質又は他の APP - 関連抗原と組合して寄与することができ；あるいは (b) 哺乳類種のメンバーに投与される場合、抗 - APP 抗体の生成を誘発することができ；あるいは (c) APP による感染、又は本発明のワクチンによる予防接種に起因するブタからの血液又は血清サンプルにおける抗 - APP 抗体の存在を検出するために診断用試薬として使用され得るポリペプチドである。

【0131】そのようなタンパク質は、調製されると、当業界において知られている通常のスクリーニング方法を用いて同定され得る。たとえば、APP に対する免疫応答を誘発し、又はその誘発に寄与する能力は、ブタに APP タンパク質を単独で、又は他の APP タンパク質又は

他の APP - 関連抗原と組合して投与し、そして APP - 中和抗体のその得られる誘発について、又は予防接種されていない対照と比較して、APP による続く攻撃を耐える予防接種された動物のその得られる能力について試験することによって同定され得る。

【0132】APP - 特異的抗体の生成を誘発する能力は、モデル動物、たとえばマウス、ブタ、羊、ヤギ、馬、牛、等に APP タンパク質を投与し、そして標準の技法を用いて、APP - 特異的抗体の存在について動物の血清を試験することによって同定され得る。診断用試薬として APP タンパク質を使用する能力は、APP により前に又は現在、感染されているか、又は本発明のワクチンにより前もって予防接種されている動物の血液又は血清サンプルに APP タンパク質を暴露し、そして前記サンプルからの APP タンパク質又は APP - 特異的抗体への結合性を、標準の技法、たとえば ELISA アッセイを用いて検出することによって、決定され得る。

【0133】5.5. APP ワクチン

本発明は、次の 1 又は複数の成分の免疫学的有効量：

(a) その生来のシグナル配列を伴って、又は伴わないで、配列番号 2, 4, 6, 8 又は 10 から成る群から選択されたアミノ酸配列を含んで成る APP タンパク質；

(b) 前記 (a) の APP タンパク質に対して相同であるポリペプチド；(c) 前記 (a) の APP タンパク質の副配列又は (b) の相同ポリペプチドから成るペプチドフラグメント；(d) 融合パートナーに融合された、

(a) の APP タンパク質、(b) の相同ポリペプチド、又は (c) のペプチドフラグメント；(e) 前記 (a) の APP タンパク質、(b) の相同ポリペプチド、(c) のペプチドフラグメント、又は (d) の融合タンパク質の類似体又は誘導体；あるいは (f) 前記 (a) の APP タンパク質、(b) の相同ペプチド、(c) のペプチドフラグメント、(d) の融合タンパク質又は (e) の類似体又は誘導体；ここで前記 APP タンパク質、相同ポリペプチド、ペプチドフラグメント、融合タンパク質、類似体、誘導体又はポリヌクレオチド分子は、ブタにおいて APP に対しての保護応答を、単独で、又は 1 又は複数の他のそのような抗原と組合わせて、誘発し、又はその誘発に寄与することができ；及び獣医学的に許容できるキャリアーを含んで成る、APP に対してブタを保護するためのワクチンを提供する。本明細書において使用される場合、用語“免疫学的有効量”とは、1 回の投与の後又は複数回の投与の後、APP の 1 又は複数の血清型に対してのブタにおける保護免疫応答を誘発することができ、又はその誘発に寄与することができるその抗原の量を意味する。

【0134】用語“保護免疫応答を誘発することができる”とは、APP に対して予防接種された動物を保護するよう作用する予防接種にตอบสนองしてブタにおけるいづれかの免疫に基づく応答、たとえば抗体又は細胞介在性免疫

応答を誘発し、又は高めるために本明細書において広く使用される。用語“保護免疫応答”、“保護する”、及び同様のものは、本明細書において使用される場合、APP - 関連のブタ肺炎の絶対的な予防又はAPP によるブタの感染の絶対的な予防に限定されるものではなく、しかし病原体による感染の程度又は速度のいずれかの低下、又は疾病の重症度又は病原体による感染に起因するいずれかの徴候又は症状のいずれかの低下、たとえば肺病理学におけるいずれかの検出できる低下を、予防接種されていない、感染された対照動物において生じる症状に比較して言及することを意図する。

【0135】本発明のワクチン組成物は、標準の緩衝液、キャリアー、安定剤、希釈剤、保存剤及び溶解剤を用いて、許容された慣例に従って配合され得、そしてまた、持効性を促進するためにも配合され得る。希釈剤は、水、塩溶液、デキストロース、エタノール、グリセロール及び同様のものを包含することができる。等張性のための添加剤は、中でも塩化ナトリウム、デキストロース、マンニトール、ソルビトール、及びラクトースを包含することができる。安定剤は、中でも、アルブミン

【0136】アジュバントは任意には、ワクチンに使用され得る。アジュバントの非制限的例は、RIBIアジュバントシステム(Ribi Inc.)、みょうばん、水酸化アルミニウムゲル、水中油エマルジョン、油中水エマルジョン、たとえばフロイント完全及び不完全アジュバント、ブロックコポリマー(CytRx, Atlanta GA)、SFA-M(Chiron, Emeryville CA)、AMPHIGEN登録商標アジュバント、サポニン、QuilA、QS-21(Cambridge Biotech Inc., Cambridge MA)、又は他のサポニン画分、SEAM-1、モノホスホリル脂質A、アピリジン脂質 - アミンアジュバント、E・コリ(組換え体又は他)からの熱不安定性エンテロトキシン、コレラトキシン、又はムラミルジペプチドを包含する。ワクチンはさらに、1又は複数の免疫調節剤、たとえばインターロイキン、インターフェロン、又は他のサイトカインを含むことができる。

【0137】適切な獣医学的に許容できるワクチンピークル、キャリアー、及び添加剤は、知られており、又は当業者に明らかであろう。たとえば、Remington's Pharmaceutical Science, 18th Ed., 1990, Mack Publishing (引用により本明細書に組込まれる)を参照のこと。ワクチンは、溶液で、又は他方では、投与前、無菌希釈剤溶液により再構成され得る凍結乾燥された形で貯蔵され得る。

【0138】本発明はさらに、抗原の持効性開放のためのワクチン配合物を提供する。そのような持効性開放配合物の例は、生物適合性ポリマー、たとえばポリ(乳酸)、ポリ(乳酸-コ-グリコール酸)、メチルセルロース、ヒアルロン酸、コラーゲン及び同様のものの複合材料と組合しての抗原を包含する。薬物供給ピークルに

おける分解性ポリマーの構造、選択及び使用は、いくつかの出版物、たとえばA.Domb など., 1992, Polymers for Advanced Technologies 3 : 279-292 (引用により本明細書に組込まれる)に再考されている。

【0139】医薬製剤におけるポリマーの選択及び使用についての追加の手引きは、M. Chasin and R. Langer (eds.), 1990, "Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems", Drugs and the Pharmaceutical Science, Vol. 45, M. Dekker, NY (これもまた、引用により本明細書に組込まれる)によるテキストに見出され得る。他方では、又はさらに、抗原は、投与性及び効能を改良するためにマイクロカプセル封入され得る。抗原をマイクロカプセル封入するための方法は、当業界において良く知られており、そして中でも、アメリカ特許第3,137,631号;第3,959,457号;第4,205,060号;第4,606,940号;第4,744,933号;第5,132,117号;国際特許公開W095/28227(それらのすべては、引用により本明細書に組込まれる)に記載される技法を包含する。

【0140】リポソーム及びリポソーム誘導体(たとえば蝸牛状物(cochleate)、小胞(vesicles)がまた、抗原の持効性を提供するために使用され得る。リポソーム配合物をいかにして製造し、そして使用するかに関する詳細は、中でも、アメリカ特許第4,016,100号;第4,452,747号;第4,921,706号;第4,927,637号;第4,944,948号;第5,008,050号;及び第5,007,956号(それらのすべては、引用により本明細書に組込まれる)に見出され得る。

【0141】非制限的な態様においては、本発明のワクチンは、APP、及び任意には、ブタを苦しめる1又は複数の他の疾病又は病理学的状態に対してブタを保護するための組合せワクチンであり得、ここで前記組合せワクチンは、ブタにおいてAPP に対して保護応答を誘発することができ、又はその誘発に寄与することができる本発明のAPP タンパク質、相同ポリペプチド、ペプチドフラグメント、融合タンパク質、類似体、誘導体又はポリヌクレオチド分子から成る群から選択された、免疫学的有効量の本発明の抗原を含んで成る第1成分;ブタを苦しめる疾病又は病理学的状態に対する保護応答を誘発することができ、又はその誘発に寄与することができる、第1成分における抗原とは異なる、免疫学的有効量の抗原を含んで成る第2成分;及び獣医学的に許容できるキャリアー又は希釈剤を含んで成る。

【0142】組合せワクチンの第2成分は、APP、又は当業界において知られているように、ブタを苦しめる他の病原体、疾病、又は病理学的状態に対する保護応答を誘発し、又はその誘発に寄与するその能力に基づいて選択される。ブタのためのワクチン組成物において有用であることが現在知られているか、又は未来において決定されるべきいずれかの免疫原性組成物がその組合せワクチンの第2成分に使用され得る。

【0143】そのような免疫原性組成物は、アクチノバチルス・スイス(*Actinobacillus suis*)、パステウレラ・ムルトシダ(*Pasteurella multocida*)、サルモネラ・コレラスイス(*Salmonella cholerosuis*)、ストレプトコカス・スイス(*Streptococcus suis*)、エリシペロスリックス・ルシオパチアエ(*Erysipelothrix rhusipathiae*)、レプトスピラ sp. (*Leptospira* sp.)、スタフィロコカス・ヒカス(*Staphylococcus hyicus*)、ハエモフィラス・パラスイス(*Haemophilus parasuis*)、ボルデテラ・ブロンキセプチカ(*Bordetella bronchiseptica*)、マイコプラズマ・ハイプネウモ・ニアエ(*Mycoplasma hyopneumoniae*)、ラウソニア・イントラセルラリス(*Lawsonia intracellularis*)、エスシュリシア・コリ(*Escherichia coli*)、ブタ生殖及び呼吸症候群ウイルス、ブタ、インフルエンザウイルス、感染性胃腸炎ウイルス、脳心筋炎ウイルス、コロナウイルス、仮性狂犬病ウイルス、及びサーコウイルス(*circovirus*)に対して保護性を提供するものを包含するが、但しそれらだけには限定されない。非制限的な例においては、その組合せワクチンは、本発明の1又は複数のAPP タンパク質を含む成分、及び1又は複数の他APP 細菌成分、たとえばAPXI、APXII 及びOmlAの組合せを含んで成る。

【0144】第2成分を含んで成る抗原は、任意には、キメラ分子を生成するために、第1成分の抗原に共有結合され得る。非制限的な態様においては、第2成分の抗原は、ハプテンを含んで成り、その免疫原性は、第1成分の抗原への接合により検出できるほどに高められる。組合せワクチンの第1及び第2成分の共有結合される抗原を含んで成るキメラ分子は、当業界において知られている1又は複数の技法を用いて合成され得る。

【0145】たとえば、キメラ分子は、標準の化学的合成方法を利用して、市販のペプチド合成機を用いて合成的に生成され得る(たとえば、Merrifield, 1985, Science232 : 341-347 を参照のこと)。他方では、別の抗原が別々に合成され、そして次に、当業界において知られているように、化学結合基により一緒に連結され得る。他方では、キメラ分子は組換えDNA 技法を用いて生成され得、それにより、たとえばキメラ分子の異なった抗原をコードする配列を有する別のポリヌクレオチド分子と一緒にスプライシングされ、そしてキメラ融合ポリペプチドの続く単離のために、適切な形質転換された宿主細胞において発現される。

【0146】本発明のワクチンがポリペプチドよりもむしろポリヌクレオチド分子を含む場合、そのスプライシングされたポリヌクレオチド分子はワクチン組成物にそれ自体使用され得る。そのような組換え技法を実施するための十分な手引きは、中でも、Maniatisなど., 1989、上記; Ausubel など., 1989、上記; Sambrookなど., 1989、上記; Innis など., 1995、上記; 及びFritschy, 1992、上記に提供される。

【0147】本発明はさらに、APP に対してブタを保護するためのワクチンの調製方法を提供し、ここで前記方法は、ブタにおいてAPP に対する保護応答を誘発することができ、又はその誘発に寄与することができる本発明のAPP タンパク質、相同ポリペプチド、ペプチドフラグメント、融合タンパク質、類似体、誘導体又はポリヌクレオチド分子から成る群から選択された、免疫学的有効量の本発明の1又は複数の抗原と、獣医学的に許容できるキャリアー又は希釈剤とを、ブタへの投与のために適切な形で組合すことを含んで成る。

【0148】本発明はさらに、ブタへの本発明のワクチンを投与することを含んで成る、APP に対してブタを予防接種する方法を提供する。投与される抗原の量は、予防接種される動物の年齢、体重、健康及び一般的な物理的特徴のような要因、及び投与される特定のワクチン組成物に依存する。個々のパラメーターのための最適な用量の決定は、経験的研究の観点から通常の方法を用いて行なわれ得る。投与されるAPP タンパク質の量は、約0.1 µg ~ 約10 mg、より好ましくは約10 µg ~ 約1 mg、及び最も好ましくは約25 µg ~ 約0.1 mgのポリペプチドであろう。DNA ワクチンに関しては、ポリヌクレオチド分子の量は、好ましくは約0.05 µg ~ 約500 mg、より好ましくは約0.5 µg ~ 約50 mgの範囲であろう。さらに、ワクチンの典型的な用量は、約0.5 ml ~ 約5 ml / 用量 / 動物の範囲であろう。

【0149】動物はいつれか適切な時期、たとえば生後1週間以内で、又は乳離れの時期で、又は交配の直前又はその時期で、又はAPP 感染が動物集団の1又は複数のメンバーに最初に出現し始める時期で予防接種され得る。補充の投与、又は追加免疫は、十分な保護を達成するために必要とされ得る。適切な免疫保護が動物において達成されているかどうかを決定するための方法は、当業界において良く知られており、そしてたとえばセロコンバージョンの決定を包含する。ワクチンは、いつれか適切な経路、たとえば経口、鼻腔内、筋肉内、リンパ節内、経皮内、腹腔内、皮下、直腸又は腔内投与により、又はそれらの経路の組合せにより投与され得る。当業者は、選択される経路に従ってワクチン組成物を容易に配合することができるであろう。

【0150】本発明はさらに、APP により引き起こされる感染又は疾病に対してブタを予防接種するためのワクチン用キットを提供し、ここで前記キット、ブタにおいてAPP に対する保護応答を誘発でき、又はその誘発に寄与することができる本発明のAPP タンパク質、相同ポリペプチド、ペプチドフラグメント、融合タンパク質、類似体、誘導体又はポリヌクレオチド分子から成る群から選択された、免疫学的有効量の1又は複数の本発明の抗原を含んで成る第1容器を含んで成る。前記キットは任意には、獣医学的に許容できるキャリアー又は希釈剤を含んで成る第2容器をさらに含むことができる。ワクチ

ン組成物は、溶液で、又は第 2 容器のキャリアー又は希釈剤を用いて再構成されるべき凍結乾燥された形で第 1 容器において貯蔵され得る。

【0151】5.6. 抗-APP 抗体

本発明はさらに、本発明の APP タンパク質に結合する単離された抗体を提供する。そのような抗体は、種々の目的のために、たとえば APP タンパク質を精製するための親和性試薬として、又はたとえば ELISA 又はウェスタンブロットアッセイの使用により、APP - 感染された動物から集められた細胞、組織又は流体サンプルにおける APP タンパク質の存在を検出するために、又は APP 感染を予防し、制御し、又は処理するための治療剤として有用である。

【0152】本発明の APP タンパク質に対する抗体は、本発明の適切な抗原を、ブタ、牛、馬、ウサギ、ヤギ、羊、及びマウスから選択された宿主動物に投与することによって、既知方法に従って生ぜしめられ得る。種々のアジュバント、たとえば上記に記載されるアジュバントが、抗体生成を増強するために使用され得る。本発明の抗体は、ポリクローナル又はモノクローナル抗体のいずれかであり得る。ポリクローナル抗体は、免疫化された動物の血清から調製され、そして単離され、そして標準の技法を用いて、抗-APP タンパク質特異性について試験され得る。

【0153】他方では、APP タンパク質に対するモノクローナル抗体は、培養における連続した細胞系による抗体分子の生成を提供するいずれかの技法を用いて、調製され、そして単離され得る。それらは、Kohler and Milstein (Nature, 1975, 256 : 495-497) により最初に記載されるハイブリドーマ技法；ヒト B - 細胞ハイブリドーマ技法 (Koskor など., 1983, Immunology Today 4 : 72 ; Cote など., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80 : 2026-2030)；及び EBV - ハイブリドーマ技法 (Cole など., 1985, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96) を包含するが、但しそれらだけには限定されない。他方では、一本鎖抗体の生成について記載する技法 (たとえば、アメリカ特許第 4,946,778 号を参照のこと) が、APP タンパク質 - 特異的一本鎖抗体を生成するために適合され得る。

【0154】本発明の APP タンパク質のための特異的結合部位を含む抗体フラグメントもまた、本発明の範囲内に包含される。そのようなフラグメントは、損なわれていない抗体分子のペプシン消化により生成され得る F(ab')₂ フラグメント、及び F(ab')₂ フラグメントのジスルフィド橋を還元することによって生成され得る Fab フラグメントを包含するが、但し、それらだけには限定されない。他方では、Fab 及び/又は scFv 発現ライブラリーが、本発明の APP タンパク質に対する所望する特異性を有するフラグメントの急速な同定を可能にするために構成され得る (たとえば、Huse など., 1989, Science 2

46 : 1275-1281 を参照のこと)。

【0155】モノクローナル抗体及び抗体フラグメントの生成及び単離のための技法は、当業界においてよく知られており、そして中でも次の文献にさらに記載される : Harlow and Lane, 1988, *Antibodies : A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 及び in J.W. Goding, 1986, *Monoclonal Antibodies : Principles and Practice*, Academic Press, London. 上記引用されるすべての出版物は、引用により本明細書中に組込まれる。

【0156】5.7. 診断用キット

本発明はさらに、診断用キットを提供する。非制限的態様においては、本発明の診断キットは、APP タンパク質に対して向けられた抗体に対して特異的に結合することができる本発明の APP タンパク質、相同ポリペプチド、ペプチドフラグメント、融合タンパク質、類似体、又は誘導体を含んで成る第 1 容器；及びブタ抗体に対して向けられた第 2 抗体を含んで成る第 2 容器を含んで成る。第 2 抗体は好ましくは、検出できるラベルを含んで成る。そのような診断キットは、APP により現在感染されているか、又はすでに感染されたことがあるか、又は本発明のワクチンによる予防接種の結果としてセロコンバートされているブタを検出するために有用である。

【0157】もう一つの態様においては、本発明は、APP タンパク質に対して結合する第一抗体を含んで成る第 1 容器；及び APP タンパク質上の異なったエピトープに結合し、又は前記一次抗体に対して向けられる第二抗体を含んで成る第 2 容器を含んで成る診断用キットを提供する。第二抗体は好ましくは、検出できるラベルを含んで成る。他の態様においては、診断用キットは、APP - 特異的ポリヌクレオチド分子に特異的にハイブリダイズするか、又はそれを増幅することができる本発明のポリヌクレオチド分子又はオリゴヌクレオチド分子を含んで成る容器を含んで成る。それらの後者の 2 種の診断用キットは、APP により現在、感染されているブタを検出するために有用である。

【0158】5.8. アンチセンスオリゴヌクレオチド及びリボザイム

本発明はさらに、APP タンパク質コードの mRNA に結合し、分解し、そして/又は阻害する。アンチセンスオリゴヌクレオチド、ホスホロチオエート、及びリボザイムを包含するオリゴヌクレオチド分子を提供する。アンチセンス RNA 分子及びアンチセンス DNA 分子を包含するアンチセンスオリゴヌクレオチドは、標的化された mRNA に結合することによって mRNA の翻訳を直接的に阻止するよう作用し、そしてそれにより、タンパク質翻訳を妨げる。たとえば、少なくとも約 15 個の、及び APP タンパク質をコードする mRNA 転写体配列のユニーク領域に対して相補的なアンチセンスオリゴヌクレオチドが、たとえば従来のホスホジエステル技法により合成され得る。

【0159】リボザイムは、RNA の特定の分解を触媒することができる酵素性RNA 分子である。リボザイム作用の機構は、相補的標的RNA へのリボザイム分子の配列特異的ハイブリダイゼーション、続くエンドヌクレオチド分解性切断を包含する。APPタンパク質mRNA配列のエンドヌクレオチド分解性切断を特異的且つ効果的に触媒する構築されたハンマーヘッドモチーフリボザイム分子はまた、本発明の範囲内である。

【0160】いづれかの可能性あるRNA 標的物内の特定のリボザイム切断部位は、最初に、次の配列：GUA, GUU 及びGUC を包含するリボザイム切断部位のための標的分子を走査することによって同定される。同定されると、切断部位を含む標的遺伝子の領域に対応する約15~20個のリボヌクレオチドの短いDNA 配列が、オリゴヌクレオチド配列を不適切にする予測される構造特徴、たとえば二次構造のために評価され得る。候補体標的物の適合性がまた、たとえばリボヌクレアーゼ保護アッセイを用いて、相補的オリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションへのそれらの接近性を試験することによっても評価され得る。

【0161】本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド及びリボザイムの両者は、既知の方法により調製され得る。それらは、化学合成、たとえば固相ホスホラミジット化合物合成のための技法を包含する。他方では、アンチセンスRNA 分子は、RNA 分子をコードするDNA 配列のインビトロ又はインビボ転写により生成され得る。そのようなDNA 配列は、適切なRNA ポリメラーゼプロモーター、たとえばT7又はSP6 ポリメラーゼプロモーターを組込む広範囲の種類のパクター中に組込まれ得る。

【0162】本発明のオリゴヌクレオチドに対する種々の修飾が、細胞内安定性及び半減期を高める手段として導入され得る。可能な修飾は、分子の5'及び/又は3'末端へのフランキング配列、又はリボヌクレオチド又はデオキシリボヌクレオチドの付加、又はオリゴヌクレオチド主鎖内のホスホジエステラーゼ連鎖よりもむしろホスホロチオエート又は2'-O-メチルの使用を包含するが、但しそれらだけには限定されない。次の例は、例示的であって、本発明の範囲を限定するものではない。

【0163】

【実施例】6.例：新規APP タンパク質の同定

次の実験の結果は、APP 血清型 - 5 により前に攻撃されたブタがAPP 血清型 - 7 により異種的に再攻撃された場合に誘発される局所抗体応答の特異性を示す。抗体特異性は、これまで認識されていないAPP タンパク質を同定するために使用され、それらのタンパク質のうち3種 (Omp20, OmpW, Omp27) が、すべての12種のAPP 血清型に存在することが、ウェスタンブロット分析により示された。2種の追加の新規タンパク質 (OmpA1, OmpA2) が、タンパク質画分単離及び濃縮に従って同定され

た(下記、セクション6.1.6.を参照のこと)。

【0164】6.1.材料及び方法

6.1.1.細菌攻撃

ブタ攻撃材料を調製するために使用されるAPP 血清型 - 5 培養物 (株K-17) を、Dr. R.A. Schulz, Avaca, IA, USA から得た。ブタ攻撃材料を調製するために使用されるAPP 血清型 - 7 培養物 (株WF-83) を、Dr. E. Jones, Swedeland, PA, USAから得た。

【0165】臨床学的に健康な生後7~8週目の接種のブタを、APP 感染のこれまでの病歴を有さないネバラスカ州のブタから得、そしてIACUC ガイドラインに従って、Pfizer Animal Health, Lincoln, NE での分離用施設に収容した。動物は、研究の開始の前、それらの健康状態を決定するために獣医により試験された。2週間の順化に続いて、約1ml/50ポンド体重の割合で投与される、100mg/mlのテラゾール、50mg/mlのキシラジン及び50mg/mlのカテミンの組合せを用いて、ブタに麻酔をし、そして 2.6×10^6 cfu のAPP 血清型 - 5を鼻腔内接種した。

【0166】一次攻撃の後78日で、臨床学的APP 疾病を示したが、しかし回復した生存するブタの6匹に対して、再び上記のように麻酔をした。それらの6匹のブタの第1及び第2のブタを、 1×10^7 cfu のAPP 血清型 - 5により鼻腔内再攻撃し、(同種再攻撃)；それらのブタの第3及び第4のブタを、 1×10^6 cfu のAPP血清型 - 7により鼻腔内再攻撃し、(異種再攻撃)；そして第5及び第6のブタを、細菌増殖培地のみ(対照)により鼻腔内接種した。

【0167】すべてのブタを、再攻撃の48時間後に殺害し、それらの血清及び器官を集め、そして器官からの組織片を、下記セクション6.1.2及び6.1.3に記載のようにして、24又は48時間、インビトロで培養した。組織外植片培養物からの抗体 - 含有上清液を用いて、同種再攻撃又は1回の攻撃(対照)により誘発される記憶抗体プロファイルと異種再攻撃により誘発される記憶抗体プロファイルとを比較した。組織外植片によりインビトロで生成される抗体の特異性を、すべての12種のAPP 血清型を表わす完全な細菌細胞調製物のパネルに対して、ウェスタンブロット分析により決定した。この分析は、同種再攻撃又は1回の攻撃(対照)に続く抗体プロファイルとは異なる、異種再攻撃に続く抗体プロファイルの存在を示した。

【0168】ウェスタンブロットのための材料を調製するために使用されるAPP 血清型 - 1 (株4074)、血清型 - 2 (株226)、血清型 - 3 (株1421)、血清型 - 4 (株M62)、血清型 - 5 (株K-17)、血清型 - 6 (株Femo FE 171D)、血清型 - 7 (株WF-83)、血清型 - 8 (株405)、血清型 - 9 (株CVJ-13261)、血清型 - 10 (株13039)、血清型 - 11 (株56153)及び血清型 - 12 (株8329)対照培養物は、Dr. B. Fenwick, Kans

as State University, Manhattan, KS, USA から得られた。

【0169】6.1.2. 組織収集

血清サンプルを、再攻撃の前、及び検死の前（再攻撃の48時間後）再びブタから得た。ブタを、静脈内ペイントバルビタールの過剰用量により再攻撃の48時間後、安楽死せしめた。肺を除き、そしてAPP 感染に寄与する特徴的な大まかな病巣について試験し、そして完全な肉眼での試験をすべての主要器官に対して行なった。肺、リンパ節（腸間膜、膝窩、気管支）、Peyer パッチ及び扁桃の組織サンプルを集め、70%エタノールにより洗浄し、そしてRPMI輸送媒体（10mMのHEPES, 5%のFBS, 50U/mlのペニシリン及び50µg/mlのストレプトマイシンにより補充されたRPMI媒体（Gibco/BRL, Grand Island, NY））により3度すすいだ。

【0170】洗浄の後、組織を、10mlの輸送媒体を含む50mlの遠心分離管に入れ、そして実験において処理されるまで氷上に配置した（収集の3時間以内）。追加の組織サンプルを、後でのmRNA単離及び免疫組織化学のために、液体窒素において凍結し、又は組織病理学のためにホルスリンに固定した。肺組織のサンプルをまた、細菌同定のために、University of Nebraska-Lincoln診断実験室に提出した。

【0171】6.1.3. 組織外植片培養物

組織を、約5mlの輸送媒体を含む個々のペトリ皿に配置した。約2×2mmの小さな組織片を、解剖用メス及び/又はハサミによりオリジナルサンプルから切断し、そして2mlの洗浄媒体（10mMのHEPES 及び及び50µg/mlのゲンタマイシンにより補充された、Ca²⁺及びMg²⁺を含まないハクス溶液（HBSS））を含む12-又は24-ウェルプレート（Costar, Cambridge, MA）の個々のウェルに配置した。組織片を洗浄媒体によりすすぎ、そして洗浄媒体を含むもう1つのウェルに移した。

【0172】この洗浄/すすぎ操作を4度くり返し、そして次に、組織片を、10%のFBS, 10mMのHEPES, 2mMのグルタミン、50µg/mlのゲンタマイシン、62µg/mlのアンホテリシンB、40µg/mlのナトリウムデノキシコレート、50U/mlのペニシリン及び50µg/mlのストレプトマイシンにより補充されたRPMI培地を含むウェルに移した。プレートを、5% CO₂の湿潤されたチャンバーにおいて、38.5で24又は48時間インキュベートした。

【0173】6.1.4. ウェスタンブロット分析

組織外植片上清液における回収された抗体の特異性を、次のようにしてウェスタンブロットにより試験した。12APP 血清型の個々の代表的な単離物をそれぞれ別々に増殖し、上清液を試験するために完全な細菌細胞抗原を生成した。個々の株を、10µg/mlのニコチンアミドアデニンジヌクレオチド（NAD）により補充された最少培地-3（MM3）（1.8%のBacterin HP

媒体、1.7%の乳酸、0.3%のグリセロール、0.05MのHEPES、0.011MのL-グルタミン酸（-ナトリウム塩）、5×10⁻⁵Mのニコチンアミド及び0.2%のカサミノ酸）において、37で5~6時間、約0.5~0.6のOD₆₀₀まで、180rpmで攪拌しながら培養した（1%の種子）。

【0174】細胞を12,000×gでの10分間の遠心分離によりペレット化し、培地を分析のために除去し、そしてペレットを5mlのダルベッコリン酸緩衝溶液（DPBS）に再懸濁した。タンパク質アッセイの前、その再懸濁されたペレットを-20で凍結し、そして次に、融解し、いづれかの損なわれていない細菌細胞を溶菌した。個々の分離物のタンパク質濃度を、BCA Protein Assay Reagent Kit（Pierce, Rockford, IL）を用いて決定した。APP 抗原調製物（5µg/レーン）を、4~20%のトリス-グリシンゲル（Novex, San Diego, CA）上に負荷し、そしてタンパク質を、室温で、20mAの一定の電流を用いて、電気泳動により分離した。

【0175】分離されたタンパク質を、単一乾燥グラッファイトエレクトロプロッター（Milliblot, Millipore, Seattle, WA）を用いて、ProBlotTM膜（Applied Biosystems, Foster City, CA）に移した。移行は、室温で30分間、200mAの一定電流を用いて実施された。移行の完結後、膜を、緩衝液A（50mMのトリスHCl, 150mMのNaCl, pH7.4、及び5%（w/v）の脱脂粉乳）と共に室温で一晩インキュベートすることによってブロックした。

【0176】次に、そのブロック用緩衝液をデカントし、そして緩衝液A中、血清（1:100の希釈度）又は組織外植片培養上清液（1:3の希釈度）により置換し、そして膜を室温で1時間、インキュベートし、続いて、緩衝液B（0.2%（v/v）のTriton X-100を含む緩衝液A）により10分間の洗浄及び緩衝液Aにより2回の10分間の洗浄を行なった。洗浄の完結後、膜を、緩衝液Aにより1:1000に希釈された、ホスファターゼ接合されたヤギ抗-ブタ抗体（Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, MD）と共に室温で1時間インキュベートした。次に、膜を緩衝液Aにより10分間、洗浄し、そして5-プロモ-4-クロロ-3-インドリル-ホスフェート/ニトロブルーテトラゾリウム（BCIP/NBT）基質系（Kirkegaard & Perry Laboratories）と共に15分間インキュベートした。

【0177】6.1.5. APP 血清型-7膜の調製

APP 血清型-7のアリコートを、10µg/mlの-NADにより補充されたMM3中に接種し（1%）、そして37で一晩培養した（180rpm）。一晩の培養物の一部を、新鮮な培地中に接種し（細菌接種物は合計体積の3%であった）、そして5~6時間、又は24Klett単位の培養物密度までインキュベートした。細胞を、4,500rpmで40分間、10での遠心分離によりペレット化し、上清液を

除去し、そしてペレットを、50 mMのトリス - HCl (pH8.0) 5ml 及び1 mMのPMSF (フェニルメチルスルホニルフルオリド) の最終濃度をもたらすために十分なPMSFと共に50 mMのトリス - HCl (pH8.0) 5 mlに再懸濁した。

【0178】細菌細胞を、40K PSI 圧力セルにおいて16,000ポンド/インチ² 下でFrench Press (Sim Aminco., Rochester, NY) を用いて溶菌した。破壊された細胞を1,000 × g で15分間、遠心分離し、大きな細菌残骸を除去した。全粗膜を、45,000rpm で60分間、18 での遠心分離により集めた。上清液を捨て、ペレットを50 mMのトリス - HCl (pH8.0) に再懸濁し、そしてタンパク質をBradford Standard Protein Assay を用いて決定した。

【0179】3 mlの体積における15 mgの粗膜に、100 mMのPMSF 30 μl 及び2.5 %サルコシル (sarkosyl) 750 μl を添加し、そして全体積を十分に混合した。氷上での30分間のインキュベーションの後、膜を、200,000 × g で15分間、10 での遠心分離によりペレット化した。上清液を、ペレット化された膜画分から除去し、そしてペレットを50 mMのトリス - HCl / 200 mMのNaCl (pH8.0) 溶液3 mlに再懸濁した。APP 血清型 - 7の膜抗原を表わしたこの膜調製物を、-20 度で貯蔵した。

【0180】6.1.6. 膜タンパク質分別及び精製 N - 末端配列決定のためのAPP タンパク質の精製を、BioRad Model 491 PrepCell (BioRad, Richmond, CA) を用いて、連続 - 溶出SDS-PAGEを通して行なった。10 mlの体積 (4.5 mgの合計タンパク質) のAPP 血清型 - 7膜タンパク質画分を、等体積の非還元性サンプル緩衝液 (125 mMのトリス - HCl, pH6.8, 4%のSDS, 20%のグリセロール、及び0.1%のプロムフェノールブルー) と共に混合した。このタンパク質 - 緩衝液混合物を5分間、煮沸し、そして3%の積重ね用 / 15%の分離用 SDS - ポリアクリルアミドゲルに適用した。サンプルを20 mAの一定電流 (初期電圧175 ~ 250 V、最終電圧200 ~ 300 V) で、72時間、電気泳動した。

【0181】約800 × 5 mlの画分を、1 ml / 分の流速で、その実験を通して集め、そしてA₂₆₀ での分光測光によりタンパク質含有率について分析した。10番目ごとの画分を、SDS-PAGE及び銀染色 (Bio-Rad, Richmond, CA) により分析した。分子量により決定されるように、推定上、同じタンパク質を含む画分をプールし、そして4 度で貯蔵した。プールされたサンプルを脱塩し、そしてN - 末端配列決定のために濃縮した。脱塩は、プールされたサンプルのアリコート、10 mlの層体積を有するPresto™脱塩カラム (Pierce, Rockford, IL) に適用することによって実施された。

【0182】個々のタンパク質プールのアリコート3 mlを別々のカラムに適用し、そしてddH₂O により溶出し、10 × 2 mlの画分を得た。これを、30 mlが脱塩される

まで、個々のタンパク質プールのために10度くり返した。ウェスタンブロット分析により決定される場合、脱塩されたタンパク質の大部分は、画分No. 2に見出された。従って、個々の10回の溶出からの第2画分を、それぞれ個々のタンパク質のためにプールした。得られる20 mlのサンプルを凍結乾燥せしめ、そしてN - 末端配列決定のために、0.5 mlのddH₂O に再懸濁した。N - 末端配列は、Pfizer Central Research Molecular Science Sequence Facility で得られた。

【0183】6.2. 結果

6.2.1. 再攻撃後の臨床学的徴候及び病理学的発見
ブタは、同種 (血清型 - 5) 又は異種 (血清型 - 7) の再攻撃の後、臨床学的疾病のいづれの徴候も示さなかった。病理学的試験は、動物が、再攻撃に続く急性APP 感染と一致する肺病巣を進行しなかったことを確かめた。しかしながら、血清型 - 7により再攻撃された動物の気管支リンパ節は、血清型 - 5により再攻撃された動物又は対照動物からのリンパ節に比較して、出血性であり、そして拡大された。

【0184】6.2.2. 再攻撃により誘発される抗体の特異性

血清及び組織外植片上清液に存在する抗体の特異性を、上記のようにして、ウェスタンブロット分析により評価した。24又は48時間のインキュベーションの後に集められたすべての組織由来の上清液は、APP タンパク質を特異的に認識する抗体を含んだ。一般的に、血清型 - 5抗原に対する反応性は、血清型 - 7又は血清型 - 1の抗原に対する反応性よりも高かった。しかしながら、ほとんどの組織由来の上清液の反応性は、血清の反応性よりも弱く、そしてスペクトルにおいては、狭かった (図1a)。

【0185】一般的に、組織外植片上清液の反応性は、特定のパターンを有さなかった。それにもかかわらず、1つの特定の動物 (No. 803、血清型 - 7により異種的に再攻撃された) からの組織外植片上清液のウェスタンブロット反応性のパターンは、強く、そしてAPP 血清型 - 1、- 5、及び - 7に存在するいくつかの低分子量タンパク質を強調した (図1b)。この上清液は、APP 血清型 - 5より始め、攻撃されたブタにおいて、APP 血清型 - 7による異種再攻撃により誘発される二次 (記憶) 抗体応答の交差反応性の程度をさらに特徴づけるために抗体源として使用された。

【0186】ブタNo. 803からのBLN 組織外植片上清液における抗体の交差反応性の程度を、12種の異なったAPP 血清型の個々から調製された完全な細菌細胞抗原を用いて、ウェスタンブロット分析により評価した。この分析は、抗体により認識される3種の低分子量タンパク質がすべての12種の血清型に存在したことを示した (図2)。このBLN組織外植片上清液に存在する抗体はまた、他のタンパク質バンドも認識した。

【0187】外毒素ApxII (Nakai, 1983、上記を参照のこと)に対応する、血清型 - 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8 及び9に存在する高分子量バンド、及び血清型 2, 5, 8 及び10に存在するもう一つのタンパク質バンドは、第2の最とも交差反応性のパターンを表わした。APP 細胞ペレット及び上清液のウェスタンブロット分析は、低分子量タンパク質に対する、BLN組織外植片上清液における抗体の反応性が、細胞ペレットに存在するタンパク質に制限されることを示し(図3)、このことは、そのタンパク質が細菌細胞に関係し、そして分泌されないことを示す。

【0188】6.2.3. 交差反応性抗体により認識されるタンパク質

低分子量タンパク質を上記のようにして精製し、次のものを用いてウェスタンブロット分析により同定されるような興味あるタンパク質を含む部分精製された調製物を生成する：(a)分析No. 803 からのBLN 組織外植片上清液；又は(b)ブタNo. 803 からの血清(図4)。膜タンパク質の分別に基づいて、それぞれ約19~2

表1

低分子量APPタンパク質のN-末端アミノ酸配列

ペプチド (配列番号)	およそ の分子量 (kDa)	タンパク 質の名称	配列 ¹ (NH ₂ ~ COOH)
Pep-1 (11)	19-20	Omp20	Ala-Pro-Val-Gly-Asn-Thr-Phe-Thr-Gly-Val-(Lys)-Val-(Tyr)-Val-Asp-Leu-Thr-Xaa-Val-Ala
Pep-2 (12)	23	OmpW	His-Gln-Ala-Gly-Asp-Val-Ile-Phe-Arg-Ala-Gly-Ala-Ile-Gly-Val-Ile-Ala-Asn-Ser-Ser-Ser-Asp-Tyr-(Gln)-Thr-(Gln)-Ala-Asp-Val-(Asn/Val)-Leu-Asp-Val-Asn-Asn
Pep-3 (13)	27	Omp27	Ala-Glu-Ile-Gly-Leu-Gly-(Gly)-Ala-Arg-Glu-(Ser)-(Ser)-Ile-Tyr-Tyr-(Ser)-Lys-His-Lys-Val-Ala-Thr-Asn-Pro-Phe-Leu-Ala-Leu-Asp-Leu
Pep-4 (14)	29	OmpA	Ala-(Asp/Glu)-Pro-Glu-Asn-Thr-Phe-Tyr-Pro-Gly-Ala-Lys-Val-Xaa-Xas-(Ser)-Xaa-(Phe)-(His)

【0191】1 : Xaa は、特定位置でのアミノ酸残基が決定され得なかったことを示す。

7. 例：APP タンパク質をコードするDNA の分子クローニング

7.1. 染色体DNA の単核及びゲノムライブラリーの構成

12種のAPP 血清型の個々からのゲノムDNA を、ヘキサデシルトリメチルアンモニウムブロミド (CTAB) - プロテイナーゼK方法 (Ausubel など., 1988, Curr. Protocols Mol. Biol. Wiley Interscience, NY)、又はDNA Isolator Genomic DNA Isolation Reagent (Genosys Biotechnologies, Inc., The Woodlands, Texas)のいずれかにより、別々に単離した。APP DNA をTE緩衝液(10mMのトリス - HCl, pH8.0, 1mMのEDTA)に、1µg/ml以下で溶解し、そしてUV分光計により定量化し

*0、約23、約27及び約29kDa の分子量を有する4種のタンパク質バンドが、この方法を用いて同定された。

【0189】前記4種のバンドにおけるタンパク質のN-末端配列分析は、下記表1に示されるように、一次配列及び推定上の残基(括弧内)を示し、そして本明細書においては、“Pep-1”(配列番号11)、“Pep-2”(配列番号12)、“Pep-3”(配列番号13)及び“Pep-4”(配列番号14)と命名した。時おり、第2シグナルが観察され、そしてたぶん、少々の汚染物の存在によるものであった(データは示されていない)。表1に示される部分N-末端配列を用いてプローブ及びプライマーを企画し、交差反応性APP タンパク質をコードする一次DNA 配列を得た。配列相同性の比較は、異種再攻撃の後、誘発される優性の局所抗体応答により認識される前記4種のタンパク質がこれまでAPP に関して記載されたことがなかったことを示した。

【0190】

【表1】

た。

【0192】Omp20, OmpW, Omp27及びOmpAをコードするAPP 遺伝子配列のクローニングを促進するために、いくつかのゲノムライブラリーを構成した。それらのライブラリーを、供給者により実質的に推薦されるようにして、制限されたDNA フラグメントの5'及び3'末端への既知の配列(Vectorette II™, Genosys Biotechnologies, Inc., The Woodlands, TX)の連結により特別に修飾した。従って、Vectoretteライブラリーを、APP7-1(血清型7、継代1)からの染色体DNA 2µgを、制限エンドヌクレアーゼBamHI, BglII, HindIII, EcoRI, DraI、又はHpaIにより37℃で一晩、別々に消化することによって構成した。

【0193】次に、反応を、追加の新鮮な制限酵素により封じ、そして2mMのATP, 2mMのDTT に最終濃度を調

節した。Vectorette末端化を、T4 DNAリガーゼ(400 U)及び3 pモルの適切な適合性Vectoretteリンカー(BamHI Vectorette: BamHI, BglIII; HindIII Vectorette: HindIII; EcoRI Vectorette: EcoRI; プラントVectorette: DraI, HpaI)の添加により実施した。その混合物を20 で、60分間、3サイクル、インキュベートし; 37 で30分間で、その末端化反応を完結し; そして次に、dH₂Oにより200 µlに調節し、そして-20 で貯蔵した。

【0194】7.2. Omp20 の分子クローニング Vectoretteライブラリーのスクリーニングを実施し、Omp20及びフランキング領域をコードするDNAフラグメントを得た。変性オリゴヌクレオチドER49(配列番号39)を、このタンパク質のN-末端アミノ酸配列に基づいて企画した(表1, Pep-1(配列番号11), aa1-9)。

【0195】Omp20 遺伝子のフラグメントのPCR 増幅のために、オリゴヌクレオチドER49(配列番号39)を、1×PCR 緩衝液II(Perkin Elmer)、1.5mMのMgCl₂、200 µMの個々のデオキシ-NTP、100pモルの個々のプライマー、及び2.5UのAmpliAq Gold(Perkin Elmer)熱安定性ポリメラーゼを含む反応物50 µlにおいて、Vectorette特異的プライマーER70(配列番号48)と組合して使用した。複数回の単一反応を、DNA 鋳型としてVectoretteライブラリー5 µlを用いて、実施した。増幅は次の通りに実施された: 変性(95 , 9分); 35サイクルの変性(95 , 30秒); アニリング(55 , 1分); 及び重合(72 , 3分); 続いた最終延長(72 , 7分)。

【0196】増幅された生成物を、1.2%アガロースゲル(Sigma)上での分離により可視化した。433-bpの生成物は、EcoRI Vectoretteライブラリーの増幅に起因した。フラグメントを、pGEM登録商標-T Easy PCRクローニングベクター(Promega, Madison, WI)中にクローン化し、そして配列決定した。配列の分析は、N-末端アミノ酸配列(Pep-1)に基づいてOmp20を部分的にコードするようなフラグメントの同一性を確かめた。

【0197】この部分遺伝子の新しく同定された配列に基づいて、特定のプライマーER67(配列番号46)及びER68(配列番号47)を企画し、上記のようなPCR 増幅によるVectoretteライブラリーの第2回目スクリーニングにより、追加の5'及び3'フランキング配列を得た。ER68(配列番号47)及びER70(配列番号48)を用いてのPCRによるEcoRI, HindIII, DraI、及びHpaI Vectoretteライブラリーのスクリーニングは、DraI Vectoretteライブラリーからの約600bpのフラグメントの成功した増幅をもたらした。このフラグメントを、配列決定し、Omp20遺伝子の3'末端を決定した。

【0198】ユニークな生成物はER67(配列番号46) 50

及びER70(配列番号48)を用いてのそれらのライブラリーのスクリーニングの間、観察されなかったため、追加の特定のプライマーER71(配列番号49)、ER72(配列番号50)、ER76(配列番号52)及びER77(配列番号53)を企画し、ER47結合部位の5'側に位置するDNAフラグメントを得た。多くのVectorette DNAライブラリーからの増幅によるそのような“ゲノムウォーキング(genome walking)”を、ORFの外側の境界、すなわち翻訳開始及び停止コドン及びフランキングヌクレオチド配列が特徴づけられるまで、反復した。一般的に、PCR生成物は、配列分析の前、直接的にクローン化され、又はpGEM登録商標-T Easy PCRクローニングベクター中にクローン化された。

【0199】7.3. Omp27 の分子クローニング Omp27のためのVectoretteライブラリーのスクリーニングを、上記Omp20についての記載のようにして実質的に実施した。但し、精製されたOmp27タンパク質(表1, Pep-3(配列番号13), aa13-24)のN-末端アミノ酸配列に基づいて企画された変性オリゴヌクレオチドER50(配列番号40)を使用した。上記のようなVectoretteライブラリーのPCR増幅に続いて、152-bpのフランキングを、Pep-3(配列番号13)のN-末端アミノ酸配列に基づいてOmp27の一部をコードすることを確かめた。

【0200】BamH2, BglIII, HindIII, EcoRI, HpaI、及びDraI Vectoretteライブラリー及び特定のプライマーER88(配列番号64)及びER89(配列番号65)を用いての第2回目のゲノムウォーキングは、DraIライブラリーからの約2kbのフラグメント、及びHindIIIライブラリーからの約1.5kbのフラグメントのPCR増幅をもたらした。それらのDNAフラグメントを、pGEM登録商標-T Easy PCRクローニングベクター中にクローン化し、それぞれ、Omp27遺伝子の5'及び3'側のヌクレオチド配列の誘導体化を可能にした。

【0201】7.4. OmpA1 及びOmpA2 の分子クローニング

精製された29kDaのタンパク質(表1, Pep-4(配列番号14))から得られたN-末端アミノ酸配列を用いて、APP染色体DNAからの29kDaのタンパク質をコードする遺伝子の直接的なPCR増幅への使用のための変性N-末端プライマーRA22(配列番号73)及びRA34(配列番号77)を企画した。

【0202】Pep-4の配列を、GenBankタンパク質データベース(Altschulなど., 1990, J. Mol. Biol. 215: 403-10)に対して、Blastpコンピュータープログラム比較(National Center for Biotechnology Information)を用いて分析し、そして次のいくつかの異なったコ-バクテリアのOmpAタンパク質との相同性を示すことを見出した: パステウレラ・ムルトシタ(Pasteurella multocida)、P.ハエモリチカ(P. haemolytica)、ハエモ

フィラス・ドクレイ (*Haemophilus ducreyi*)、*H. ソムナス* (*H. somnus*)、*H. インフルエンザ* (*H. influenzae*)、*アクチノバチルス・アクチノマイセテムコミタンス* (*Actinobacillus actinomycetemcomitans*)、*E. コリ*、*シゲラ* (*Shigella*) 及び *サルモネラ* (*Salmonella*)。パステウレラセアエ (*Pasteurellaceae*) からの OmpA - 関連タンパク質の N - 末端配列を一例に並べ、次のコンセンサス配列を生成した: Ala-Pro-Gln-Ala/Glu-Asn-Thr-Phe-Tyr-Ala/Val-Gly-Ala-Lys-Ala (配列番号 94)。

【0203】それらの一列配列を分析し、そしてそれを用いて、いくつかの追加の N - 末端変性プライマーを企画した。オリゴヌクレオチドプライマー RA53 (配列番号 81)、RA54 (配列番号 82)、RA55 (配列番号 83)、RA56 (配列番号 84) 及び RA57 (配列番号 85) はお互いオーバーラップし、そしてこのコンセンサス配列のそれぞれ、aa4-11, aa5-12, aa3-10, aa1-8、及び aa1-7 をコードする領域に結合するよう企画された。

【0204】他の変性オリゴヌクレオチドプライマーを、OmpA - 関連タンパク質の C - 末端領域の一列配列に従って企画した。この一列配列は、アミノ酸配列 Cys-Leu-Ala-Pro-Asp-Arg-Arg-Val-Glu-Ile (配列番号 95) を包含する C - 末端近くの高く保存された領域を示した。RA49 (配列番号 78) 及び RA50 (配列番号 79) 逆方向プライマーを、OmpA のこの領域における負の DNA 鎖に結合せしめるよう企画した。

【0205】それらの逆方向プライマーを、二次元マトリックスに適用し、このマトリックスにおいては、RA49 (配列番号 78) 及び RA50 (配列番号 79) が、組合された Klen Taq1 及び Pfu ポリメラーゼを用いて、HotStart 50™管 (Molecular Bioproducts Inc., San Diego, CA) において、RA22 (配列番号 73)、RA34 (配列番号 77)、RA53 (配列番号 81)、RA54 (配列番号 82)、RA55 (配列番号 83)、RA56 (配列番号 84) 及び RA57 (配列番号 85) と、それぞれ対のように組合された。

【0206】次の文献は、“ホットスタート”方法を記載する: D'Aquila など., 1991, NuCl, Acids Res. 19: 3749; 及び Horton など., 1994, Biotechniques 16: 42-43。PCR のサイクルプログラムは“タッチダウン PCR”プロトコートの变法であり、そして次の通りに実施された: 変性 (94℃, 5分); 30 サイクルの変性 (94℃, 30秒)、アニーリング (59℃, 30秒) の初期サイクル、次に、追加のサイクル当たり - 0.1℃、及び重合 (72℃, 1分); 続いての最終延長 (72℃, 1.5分)。次の文献が“タッチダウン PCR”プロトコールを記載する: Roux, 1994, BioTechniques, 16: 812-814; 及び Hecker and Roux, 1996, BioTechniques 20: 478-485。

【0207】生成される PCR 生成物の中で、約 950 - bp のバンドを、個々が前方向プライマー RA34 (配列番号 77)、RA53 (配列番号 81)、RA56 (配列番号 84) 又は RA57 (配列番号 85) と対のように組合される場合、RA49 (配列番号 78) 又は RA50 (配列番号 79) のいずれかとの反応から生成した。それらの DNA フラグメントを、pGEM登録商標 - T Easy PCR クローニングベクター中にクローン化し、そして配列決定した。それらの配列決定されたフラグメントの分析は、2種の変異体配列の存在を示した。

【0208】RA49 (配列番号 78) / RA57 (配列番号 85)、及び RA50 (配列番号 79) / RA56 (配列番号 84) に由来する生成物は、変異体 A1 を示し、そして部分的にコードされたタンパク質を“OmpA1”と命名した。RA50 (配列番号 79) / RA34 (配列番号 77)、及び RA50 (配列番号 79) / RA53 (配列番号 81) に由来する生成物は、変異体 A2 を表わし、そして部分的にコードされたタンパク質を、“OmpA2”と命名した。

【0209】2種の類似するが、まだ異なっている OmpA 部分 DNA 配列を、前記 Vectorette ライブラリーの適用によりゲノムウォーキングを通して、完全な ORF 及びフランキング 5' 及び 3' 配列を含むよう延長した。部分 OmpA1 及び OmpA2 DNA 配列の一列配列は、それらの密接に関連する遺伝子配列を区別することができる特定のオリゴヌクレオチドプライマーの企画を可能にした。それぞれ、OmpA1 の 5' 又は 3' 領域、すなわち ER55 (配列番号 41)、ER58 (配列番号 42) に対して特異的な、及び OmpA2、すなわち ER59 (配列番号 43)、ER62 (配列番号 44) に対して特異的な、外側に面する異なったプライマーを用いて、上記のような Vectorette ライブラリーをプローブした。

【0210】約 1100, 400, 450 及び 280 - bp のユニークフラグメントが、それぞれ、ER70 (配列番号 48) 及び、ER55 (配列番号 41)、ER58 (配列番号 42)、ER59 (配列番号 43)、又は ER62 (配列番号 44) のいずれかによりプローブされる場合、EcoRI Vectorette ライブラリーから得られた。得られるフラグメントの配列の分析は、OmpA1 及び OmpA2 ORF 両者のエンドポイント及びフランキング領域の決定を可能にした。

【0211】7.5. OmpW の分子クローニング
精製された 23 kDa のタンパク質 (表 1, Pep-2 (配列番号 12)) から得られた N - 末端アミノ酸を用いて、RA20 (配列番号 72)、すなわち Pep-2 のアミノ酸 1 - 8 に対応する変性オリゴヌクレオチドプライマーを企画した。

【0212】精製された APP DNA を、“遺伝子ウォーキング PCR”方法の变法において鋳型として使用した。単一 PCR プライマー RA20 (配列番号 72) を、組合された KlenTaq1 (Ab Pentides, Inc., St. Louis, MO) 及び Pfu (Stratagene, Inc., La Jolla, CA) ポリメラー

ゼとの“ホットスタート”反応に使用した。PCRのためのサイクルプログラムは、“タッチダウンPCR”プロトコールの変法であり、そして次の通りに実施された：変性（94℃，5分）；40サイクルの変性（94℃，1分）、アニーリング（63℃，2分の初期サイクル、次に、追加のサイクル当たり-0.2℃及び-2秒）、及び重合（72℃，15分）；続いての最終延長（72℃，10分）。

【0213】生成される多くのPCR生成物の中で、約220-bpの生成物を得、そしてpGEM登録商標-T Easy PCRクローニングベクター中にクローン化した。このプラスミド挿入体の配列分析は、クローン化されたPCR生成物が、Pep-2（配列番号12）のN-末端アミノ酸配列に基づいて、23kDaのタンパク質の一部に対応するアミノ酸をコードしたことを確かめた。

【0214】この新しく同定された配列に基づいて、特定のプライマー、すなわちRA23（配列番号74）を、下流の配列の増幅のために生成した。APP血清型-7 DNAのゲノムミニライブラリーを、Taq[®]I又はHinPII（両者とも、5'-CGオーバーハングを創造する）による制限消化により構成した。このDNAをBspDI-切断されたpUC21又はpUC128中に連結し、そしてE. coli DH5 α を形質転換し、ゲノムライブラリーを生成した。

【0215】それらのプラスミド-ホモゲノムライブラリーのMini-prepsを、“ホットスタート”方法を用いて“遺伝子ウォーキングPCR”における鋳型として使用した。ベクター特異的M13前方向及びM13逆方向配列決定プライマーに加えて、その特定のプライマーRA23（配列番号74）を、組合されたKlen Taq及びPfuポリメラーゼと共に使用した。PCRのためのサイクルプログラムは次の通りに実施された：変性（94℃，5分）；32サイクルの変性（94℃，30秒）、アニーリング（63℃，30秒の初期サイクル、次にサイクル当たり-0.2℃）、及び重合（72℃，30秒）；続いての最終延長（72℃，7分）。

【0216】生成される多くのPCR生成物の中で、0.8kbの生成物及び1.4kbの生成物を、pGEM登録商標-T Easy PCRクローニングベクター中にクローン化し、そして配列決定した。その得られる配列、及び上記で得られた配列の分析及び一例配列は、成熟タンパク質の配列を生成した。OmpW遺伝子の5'フランキンク領域の配列を得るために、特定のプライマーRA24（配列番号75）及びRA26（配列番号76）を、上記のようにして、多くのVectoretteライブラリーをプローブするために使用した。

【0217】増幅を次の通りに実施した：変性（95℃，9分）；40サイクルの変性（95℃，30秒）、アニーリング（60℃，1分）及び重合（72℃，3分）；続いての最終延長（72℃，7分）。特定の60

0及び700-bpの生成物は、それぞれ、HpaI及びDraI Vectoretteライブラリーのプロービングに起因した。その700-bpの生成物を、5'-フランキンク領域を包含するヌクレオチド配列を得るために直接的に配列決定し、そして23kDaのタンパク質のN-末端をコードしていた。予測されるAPP 23kDaタンパク質と予測されるピブリオコレラOmpWタンパク質との間の部分的な類似性のために、APP遺伝子フラグメントを、“OmpW”と命名した。

【0218】7.6. APPタンパク質をコードする遺伝子の分子分析

7.6.1. DNAの特異的PCR増幅

上記のように、新規APPタンパク質のクローニング及び予備的な配列決定からの結果を用いて、APP血清型-7染色体DNAから直接的に、損なわれていないOmp20, Omp27, OmpA1, OmpA2及びOmpW遺伝子の特異的増幅のためのオリゴヌクレオチドプライマーを企画した。このアプローチは、E. coliにおける遺伝子フラグメントのクローニングの間に生じる可能性ある突然変異のために、配列決定人工物の導入を排除する所望に基づいて選択された。

【0219】従って、上記の損なわれていないAPP遺伝子を端に有するオリゴヌクレオチドは、染色体DNAからのそれらの領域を特別に増幅するために使用された。個々の遺伝子増幅のために利用される5'及び3'プライマー対は次の通りであった：Omp20のためには、プライマーはER80（配列番号56）及びER81（配列番号57）であり；Omp27のためには、プライマーはER95（配列番号69）及びER96（配列番号70）であり；OmpA1のためには、プライマーはER84（配列番号60）及びER86（配列番号62）であり；OmpA2のためには、プライマーはER87（配列番号63）及びER66（配列番号45）であり；そしてOmpWのためには、プライマーはER82（配列番号58）及びER83（配列番号59）である。

【0220】PCR反応を三重反復して実施し、そしてそれは、260ngの精製された染色体DNA，1 \times PC2緩衝液（Ab Peptides, Inc.），200 μ Mの個々のdNTP，100pモルの個々のプライマー，7.5UのKlen Taq1及び0.15Uのクローン化されたPfu熱安定性ポリメラーゼを、100 μ lの最終サンプル体積において含んだ。増幅のため条件は、変性（94℃，5分）、続いて30サイクルの変性（95℃，30秒）、アニーリング（65℃，30秒）、及び重合（72℃，2分）から成った。

【0221】最終延長（72℃，7分）は、標的の損なわれていない遺伝子領域の増幅を完結せしめた。増幅に続いて、三重反復サンプルの個々をプールし、そして特定の生成物を、ABI自動DNA配列決定機（Applied Biosystems, Foster City, CA）に基づいてDyeDeoxy終結反応を用いての直接的な配列分析の前、アガロースゲル電気

泳動及び回転クロマトグラフィー (QIAquick™, QIAGEN Inc., Santa Clarita, CA) による抽出により精製した。合成オリゴヌクレオチドプライマーを用いて、APP 血清型 - 7 からの増幅された生成物の両 DNA 鎖を配列決定した。APP タンパク質遺伝子を配列決定するために使用されるプライマーは、下記表 2 に示されている。

【0222】Omp20 の ORF のヌクレオチド配列は、nt 272 ~ 790 の配列番号 1 に示される。OmpW の ORF のヌクレオチド配列は、nt 376 ~ 1023 の配列番号 3 に示される。Omp27 の ORF のヌクレオチド配列は、nt 157 ~ 933 の配列番号 5 に示される。OmpA1 の ORF のヌクレオチド配列は、nt 614 ~ 1708 の配列番号 7 に示される。OmpA2 の ORF のヌクレオチド配列は、nt 197 ~ 1306 の配列番号 9 に示される。

【0223】

【表 2】

表 2

APP 遺伝子	プライマー	(配列番号)
Omp20	ER79	(55)
	ER80	(56)
	ER81	(57)
	AP19.1	(15)
	AP19.2	(16)
	AP19.3	(17)
	AP19.4	(18)
AP19.5	(19)	
Omp27	ER88	(64)
	ER89	(65)
	ER91	(66)
	ER94	(68)
	ER95	(69)
	ER96	(70)
OmpA1	ER84	(60)
	ER85	(61)
	ER86	(62)
	AP21.1	(24)
	AP21.2	(25)
	AP21.3	(26)
	AP21.4	(27)
	AP21.5	(28)
	AP21.6	(29)
	AP21.7	(30)
AP21.8	(31)	
AP21.9	(32)	
OmpA2	ER66	(45)
	ER87	(63)
	AP22.1	(33)
	AP22.2	(34)
	AP22.3	(35)
	AP22.4	(36)
	AP22.5	(37)
AP22.6	(38)	
OmpW	ER82	(58)
	ER83	(59)
	AP20.1	(20)
	AP20.2	(21)
	AP20.3	(22)
AP20.4	(23)	

【0224】7.6.2. APP 血清型 - 7 OmpA1 及び OmpA2 タンパク質の類似性

OmpA1 タンパク質 (配列番号 8) 及び OmpA2 タンパク質 (配列番号 10) のアミノ酸配列を、それぞれ配列番号 7 及び 9 から推定し、そしてそれらの類似性を比較するために一列配列した。推定される OmpA1 タンパク質は、

364 個の長さのアミノ酸であり、これは推定される OmpA2 タンパク質よりも 5 個のアミノ酸が短い。図 5 に示される APP タンパク質の一列配列は、2 種のタンパク質が 73.1% (270/369) のアミノ酸同一性を共有することを示す。

【0225】7.6.3. ビブリオコレラ OmpW と APP 血清型 - 7 OmpW との比較

2.3 kDa の APP OmpW タンパク質をコードする ORF のヌクレオチド配列 (配列番号 3) から推定されるアミノ酸配列 (配列番号 4) は、ビブリオコレラについて記載される OmpW タンパク質に最も類似することが決定された (Jalajakumari, M.B., など., 1990, Nucleic Acids Res. 18 (8) : 2180)。それらの 2 種のタンパク質のアミノ酸配列を、Clustal W (ver 1.4) Multiple Sequence Alignment Algorithm (Thompson, J.D., など., 1994, Nucleic Acids Res., 22 : 4673-4680) を用いて一列配列した。この比較は、それぞれ、215 及び 216 の長さの残基を有する APP OmpW 及び V. コレラが 44.9% (97/216) のアミノ酸同一性を共有することを示した。この一列配列されたタンパク質は、図 6 に示される。

【0226】7.7. サザンブロットハイブリダイゼーション

異なった APP 血清型間で Omp20, OmpW, Omp27, OmpA1 及び OmpA2 タンパク質をコードする DNA 配列の保存性が、異なった血清型からの APP DNA に対するプローブとして 5 種の異なったコード配列の個々を用いてサザンブロットハイブリダイゼーション分析を実施することによって決定された。プローブは、PCR DIG™ Probe Synthesis Kit (Boehringer Mannheim, Inc., Indianapolis, Indiana) により、製造業者の説明書に従って生成された。たとえば、OmpW プローブは、次の態様で構成された。

【0227】OmpW コード配列を包含する PCR 生成物を、OmpW 特異的プライマー、及び APP 血清型 - 7 DNA を用いて生成した。APP 血清型 - 7 ゲノム DNA (0.2 µg)、1 µM の MW3 プライマー (配列番号 71)、1 µM のプライマー RA52 (配列番号 80)、7.5 U の KlenTaq1 ポリメラーゼ (Ab Peptides, Inc.)、0.075 U の Pfu ポリメラーゼ (Stratagene)、1 × KlenTaq1 緩衝液及び 0.2 mM の dNTP を、50 µl の体積において 40 組合した。PCR を次の通りに実施した：変性 (94 °C, 5 分)；35 サイクルの変性 (94 °C, 30 秒)、アニーリング (58 °C, 30 秒) 及び重合 (72 °C, 1 分)；及び最終延長 (72 °C, 7 分)。

【0228】約 650 - bp の OmpW PCR 生成物を、JETsor b™ キット (GENUMED, Inc., Research Triangle Park, NC) を用いて、アガロースゲル電気泳動に従って精製した。精製された DNA を、Low Mass DNA Ladder™ 質量標準 (GIBCO/BRL, Gaithersburg, MD) を用いて定量化した。ジゴキシゲニル - ラベルされたプローブを、製造業者の説明書に従って、PCR DIG™ Probe Synthesis Kit

を用いて、上記のようにして生成された24 pgのOmpW PCR生成物のPCR増幅により生成し、そしてPCR-生成されたプローブを、精製しないで-20で貯蔵した。

【0229】APP血清型1, 2, 5, 7, 8及び9の個々から得られた、EcoRI-消化されたAPPゲノムDNA(1.5 µg)を、アガロースゲル電気泳動により分離した。DNAプロフィールを、製造業者の説明書に従って、Turboblotter™ Kit (Schleicher & Schuell, Inc., Keene, New Hampshire) によるアルカリトランスファーを用いて、Hybond-N 0.45 µMのナイロン膜 (Amersham, Inc. Cleveland, OH) にトランスファーした。DNAを、自動-架橋設定(120 mJ/cm²)で、Stratalinker™ UV Cross-Linker(Stratagene)を用いて、UV照射により前記膜に共有結合せしめた。プロットを乾燥せしめ、そして室温で貯蔵した。

【0230】ナイロンDNAプロットを、複数のAPP血清型におけるプローブ配列の検出のためのハイブリダイゼーションを可能にするためにプローブの存在下でインキュベートした。プロットを、過剰(0.2 ml/cm²)の1×Prehybridization Solution(GIBCO/BRL)を用いて、68で2.5時間、プレ-ハイブリダイズした。プローブ-ハイブリダイゼーション溶液を、500 µlの1×Hybridization Solution(GIBCO/BRL)に5.4 µlの精製されていないジゴキシゲニン-ラベルされたプローブを添加し、そして100で10分間、煮沸することによって調製した。

【0231】プローブを0に1分間冷却し、そして次に、十分な1×Hybridization Solutionに添加し、合計0.025 ml/cm²のプロットを付与した。プロットを、このプローブ-ハイブリダイゼーション溶液混合物において、68で16時間、ハイブリダイズせしめた。緊縮洗浄を次の通りに、プロットに対して実施した：(i) 過剰(0.2 ml/cm²)の2×SSC/0.1% SDSによる25で5分間の2回の洗浄；(ii) 過剰(0.2 ml/cm²)の0.1×SSC/0.1% SDSによる68で15分間の2回の洗浄。次に、プロットを、DIG™ High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II、及びDIG™ Wash and Block Buffer Set (Boehringer Mannheim, Inc., Indianapolis, Indiana) による化学発光法を用いて、製造業者の説明書に従って展開せしめた。

【0232】プローブを、試験されるすべてのAPP血清型(血清型1, 2, 5, 7, 8及び9)におけるDNAによるハイブリダイズされた、Omp20, OmpW, Omp27, OmpA1、及びOmpA2に対して上記のようにして生成した。検出されるEcoRIバンドのサイズは、OmpA1及びOmpA2に関してすべての血清型を通して同一であったが、しかしOmp20, OmpW及びOmp27に関しては保存されなかった。

【0233】個々の血清型においてOmp20プローブによりハイブリダイズされるEcoRIフラグメントのサイズは次の通りであった：血清型1, 2, 7及び9は5.8 kb

のフラグメントを付与し；血清型-5は6.1 kbのフラグメントを付与し；血清型-8は5.0 kbのフラグメントを付与した。個々の血清型においてOmpWプローブによりハイブリダイズされるEcoRIフラグメントのサイズは次の通りであった：血清型-1は1.5 kbのフラグメントを付与し；血清型-2は1.1 kbのフラグメントを付与し；血清型-5は1.0 kbのフラグメントを付与し；血清型-7は0.9 kbのフラグメントを付与し；血清型-8は1.05 kbのフラグメントを付与し；そして血清型-9は1.2 kbのフラグメントを付与した。

【0234】個々の血清型においてOmp27プローブによりハイブリダイズされるEcoRIフラグメントのサイズは次の通りであった：血清型-1, 2及び9は約9.5 kbのフラグメントを付与し；血清型-5, 7及び8は約10.5 kbのフラグメントを付与した。OmpA1プローブによりハイブリダイズされるEcoRIフラグメントのサイズは、すべての血清型において2.3 kbであった。0.55 kb及び0.85 kbの弱いハイブリダイズするフラグメントをまた検出した。OmpA2プローブによりハイブリダイズされるEcoRIフラグメントのサイズは、すべての血清型において0.85 kbであった。0.55 kb及び2.3 kbの弱いハイブリダイズするフラグメントをまた検出した。

【0235】8.例：組換えAPPタンパク質の発現

8.1. 宿主株

組換えタンパク質発現のために使用されるE.コリ宿主は、E.コリLW14であった。この株の遺伝子型は、-I N(rrnD-rrnE)1galE::Tn10。1857 H1bioである。この株は、Smith Kline Beecham Pharmaceuticals, King of Prussia, PA, USAにより供給され、そして30でプロモーターからの発現を阻害する感温性リプレッサー。/857を含む。42で、このリプレッサーは不活性化され、そしてプロモーターからの発現が可能にされ、高レベルの転写及びタンパク質合成が生成される。E.コリLW14は、30で増殖された。

【0236】8.2. プラスミド発現ベクター

組換えタンパク質合成のために使用される発現ベクターは、pEA181であり、これは他方では、pEA181KanRBS3とも称す。このベクターは6.766 kbのサイズであり、耐カナマイシン性(Kan)をコードし、そして強いプロモーターP_Lを含む。このベクターは、最適化されたリボソーム-結合部位のすぐ下流にNdeI部位を含む；このNdeI部位の存在は最適な発現のためのタンパク質のMet開始コドンの正確な配置を可能にする。ベクターはまた、不良に発現されたタンパク質の増強された発現を可能にするためにNS1リーダー融合タンパク質をコードする。このベクターは、Smith Kline Beecham Pharmaceuticalsにより供給された(また、アメリカ特許第4,925,799号及びRosenbergなど., 1983, Meth. Enzymol. 101: 123-138も参照のこと)。

【0237】5種のAPP タンパク質の個々のコード配列を、Met開始コドン(ATG)をオーバーラップするNdeI部位(CATATG)を生成するよう企画された5'特異的プライマー、及びpEA181における3'XbaI部位中へのクローニングのために企画された3'特異的プライマーを用いて、PCRにより増幅した。それぞれのPCR生成物を、始めに、pGEM登録商標-T Easy PCRクローニングベクター(Promega Corp)中にクローン化し、そして市販のコンピテントE・コリDH5 (MAX EfficiencyDH5 Competent Cells, GIBCO/BRL)を形質転換した。

【0238】PCR生成物をそれらのプラスミドクローンから、NdeI-XbaI又はNdeI-SpeIフラグメントとして切り出し、そしてNdeI/XbaI切断のpEA181をクローン化した。強いプロモーターP_Lの存在のために、pEA181誘導体は、感温性リプレッサーC₁₈₅₇の活性によりベクターからの発現を抑制するE・コリLW14のみを形質転換することができた。形質転換及びpEA181及びその誘導体を担持する形質転換体の増殖は、30で行なわれた。E・コリLW14は、凍結されたコンピテント細胞の調製のためのHanahanの方法によりコンピテントにされた

(Hanahan, 1985, DNA Cloning: A Practical Approach (Glover, D., ed.) Vol 1, pp. 109-135, IRL Press, Oxford, England)。

【0239】E・コリLW14における成熟OmpWの発現に関する困難性のために、増強されたタンパク質合成を可能にするリーダーペプチドを使用した。“保護ペプチド”又は“pp”と称するこのリーダーペプチドは、Sungなど., 1986, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 561-565; Sungなど., 1987, Meth. Enzymol. 153: 385-389; 及びアメリカ特許第5,460,954号(それらは引用により本明細書中に組込まれる)からの情報に基づけば、タンパク質加水分解から組換えタンパク質を保護する。

【0240】アミノ酸配列Met-Asn-Thr-Thr-Thr-Thr-Thr-Thr-Ser-Arg(配列番号96)から成る保護ペプチドが、APPコード配列から上流の保護ペプチドコード配列を含むようにPCRプライマーを企画することによって、APPタンパク質の個々のN-末端に融合された。そのようなプライマーによる別のAPPコード配列の増殖は、成熟(すなわち、生来のシグナル配列を欠いている)APPタンパク質における最初のアミノ酸に融合されるN-末端保護ペプチドをコードする配列を生成した。NdeI部位は、保護ペプチドにおけるMetコドンに位置し、その結果、それはpEA181のNdeI部位中に凍結され得た。

【0241】保護ペプチド-APPタンパク質コード配列の増幅のためのプライマー対は、次の通りであった: OmpWに関しては、MW3(配列番号71)及びRA52(配列番号80); OmpA1に関しては、RA78(配列番号88)及びRA71(配列番号87); OmpA2に関しては、RA78(配列番号88)及びRA69(配列番号86); Omp20に関しては、ER78(配列番号54)及びER73(配列番号5

1); 及びOmp27に関しては、ER92(配列番号67)及びER94(配列番号68)。

【0242】8.3.組換えタンパク質の発現

それぞれの成熟APPタンパク質OmpA1, OmpA2, Omp20, OmpW及びOmp27と共に保護ペプチド融合体をコードするpEA181誘導体を担持するE・コリLW14形質転換体を、30でLB K_m⁵⁰(50µg/mlのカナマイシンスルフェートを含むLuriaブイヨン)において一晚、増殖した。その培養物を、2×YT K_m⁵⁰培地(50µg/mlのカナマイシンスルフェートを含む、1.6%トリプトン、1%酵母抽出物、0.5% NaCl、及び1.25mMのNaOH溶液)中に1:100で希釈し、そして30で、A₆₀₀が0.8~1.0になるまで、増殖した。次に、培養物を水浴インキュベーターにおいて42に移し、そして3~4時間インキュベートした。

【0243】2×YT K_m⁵⁰培地において増殖し、そしてpp-OmpA1, pp-OmpA2又はpp-OmpWのいずれかを発現する5lの発酵物からのE・コリLW14形質転換体の湿潤細胞を、遠心分離により収穫した。細胞を0.1Mのトリス-HCl(pH8.0)に懸濁し、そして高圧ホモジナイザーにより溶解した。封入体を遠心分離により集め(12,000RCF, 30分)、そして2×RIPA/TET(5:4)により1度又は2度、洗浄した。2×RIPAは、20mMのトリス(pH7.4)、0.3MのNaCl、2.0%のナトリウムデオキシコレート及び2%(v/v)のLgepal CA-630TM(Sigma)である。TETは、0.1Mのトリス(pH8.0)、50mMのEDTA及び2%(v/v)Triton X-100を含む。封入体を、5Mのグアニジン-塩酸に溶解し、2.5Mのグアニジン-塩酸塩において1.4mg/ml以上のタンパク質に調節し、そしてフィルター殺菌した(0.2µm)。この調製物を、下記のように、予防接種のために使用した。

【0244】2×YT K_m⁵⁰培地において増殖され、そしてpp-Omp20を発現する、5lの発酵物からのE・コリLW14形質転換体の湿潤細胞を、遠心分離により収穫した。細胞を、リゾチームを含む、25%スクロース-50mMのトリス-HCl(pH8.0)溶液に懸濁し(50mlの培養物に関しては、細胞は0.5mlのスクロース緩衝液に分散された;各mlのスクロース緩衝液に関しては、10mg/mlでのリゾチーム溶液0.125mlが添加された)、そして音波処理した。封入体を遠心分離(12,000RCF, 30分)により集めし、上記のような2×RIPA/TETにより洗浄し、遠心分離により再び集め、そしてpH11での0.1Mのグリシン及びZwittergent 3-14(Calbiochem)溶液により洗浄した。pHを7.0に調節し、そして封入体を遠心分離(12,000RCF, 30分)により集め、3.5Mのグアニジン塩酸塩に溶解し(最終タンパク質濃度、6.36mg/ml)、そしてフィルター殺菌(0.2µm)した。この調製物を、下記のように、予防接種試験のために使用した。

【0245】上記のようにして2×YT K_m⁵⁰培地において増殖され、そしてpp-Omp27を発現する、1600mlの発酵物からのE. コリLW14形質転換体の湿潤細胞を、遠心分離により収穫した。細胞を、上記のように、リゾチームを含む、25%スクロース-50mMのトリス-HCl (pH8.0)溶液に懸濁し、音波処理し、上記のように2×RIPA/TETにより洗浄し、そして遠心分離により集めた。封入体を遠心分離(12,000RCF, 30分)により集め、5Mのグアニジン塩酸塩に溶解し(最終タンパク質濃度、2.46mg/ml)、そしてフィルター殺菌(0.2μm)した。この調製物を、下記のように予防接種試験のために使用した。

【0246】9.例:組換えAPP タンパク質の免疫学的特徴化

9.1.材料及び方法

9.1.1.ウェスタンブロットのためのAPP 完全細胞抗原の調製及び定量化

完全な細菌細胞抗原を、上記セクション6.1.4に記載のようにして調製した。但し、HP増殖培地を、MM3培地の代わりに用い、そして細胞を、5mlのDPBSの代わりに10mlのDPBSに懸濁した。個々の調製物のタンパク質濃度を、BCA Protein Assay Kit(Pierce)を用いて決定した。手短に言及すると、個々のサンプルを、脱イオン化された、無菌の蒸留水(ddH₂O)により1/10, 1/20, 1/40及び1/80に希釈した。BSA(タンパク質標準)を、200~800μg/mlの範囲の濃度に希釈した。20μlの体積のサンプル又は標準を、96-ウェルマイクロタイタープレート1~におけるウェルに三重反復して添加し、そして試薬Aに1/50に希釈された試薬Bの溶液200μlを個々のウェルに添加した。プレートを、37°Cで30分間インキュベートした。サンプルの吸光度を560nmで測定した。個々のサンプルについてのタンパク質濃度を、BSA標準曲線を用いて、外挿により計算した。

【0247】9.1.2.抗体

ウェスタンブロットのために使用される二次抗体は、アルカリホスファターゼ接合のヤギ抗-ブタIgG(H+L)及びヤギ抗-マウスIgG(H+L)(Kirkegaard and Perry Laboratories)を含んだ。それらの抗体は、ウェスタンブロット分析により、血清又は上清液サンプルにおけるAPPタンパク質-特異的抗体を可視化するために使用された。両抗体を、使用前、希釈緩衝液(PBS, 0.05% Tween 20.5%脱脂乳粉末)により1/1000に希釈した。

【0248】9.1.3.予防接種プロトコール

セクション8.3に記載のようにして調製された、組換え的に発現されたタンパク質調製物を、DPBSに希釈し、80μg/mlにし、そして次に、2倍に濃縮されたSEAM-1アジュバント(80μg/mlのQuilA, 16μg/mlのコレステロール、5%のスクアレン、1%のSpan 85, 0.1%のビタミンAアセテート、0.1%のエタノー

ル及び0.01%の4メロゾール)により1:1に組合した。雄のCF1マウスに、組換えタンパク質10μg, QuilA 10μg及びコレステロール2μgを含むタンパク質/アジュバント調製物0.25mlをs.c.注射した。負(アジュバント)の対照のグループは、1:1でアジュバントと共混合されたDPBS 0.25mlを受けた。マウスは、一時予防接種の後、20~22日で、同じタンパク質調製物により2度目の予防接種を受けた。2度目の予防接種後2週間で、動物をCO₂により麻酔し、そして気管支動脈又は心臓穿刺により採血した。血清を個々の血液サンプルから分離し、そして同じグループ内のマウスからの血清プールを-20°Cで貯蔵した。

【0249】9.1.4.ウェスタンブロット分析

10μgのタンパク質に対応する体積のAPP 完全細菌細胞溶解物(APP 血清型1, 2, 5, 7, 又は9からの; セクション9.1.1に記載のようにして調製された)を、水と共に混合し、10μlの最終体積にし、そして2μlの5×還元サンプル緩衝液(Pierce)を添加した。類似する態様で、組換えタンパク質(上記セクション8.3を参照のこと)(タンパク質負荷は不定であった)のアリコートをもた調製した。サンプルを100°Cで5分間加熱し、そして全体積を、14%トリス-グリシンゲル(Novex)を含む、1.5mmの厚さの15-ウエルの別々のウェル中に負荷した。予備染色された、広範囲の分子量マーカー(5μl/ウェル)(BioRad)がまた、個々のゲルに含まれた。選択されたゲルにおける分離されたタンパク質をクーマシーブルーにより染色した。

【0250】SDS-PAGEにより分離されたタンパク質を、200mAの一定の電流で、1.5時間、PVDF膜(BioRad)にトランスファーした。プロットを、(i)ブロッキング緩衝液(5%脱脂乳粉末及びPBS中、0.05% Tween 20)において直接的にインキュベートし;又は(ii)室温で乾燥せしめ、必要まで、-20°Cで凍結貯蔵し、次にメタノールに再水和化し、水によりすすぎ、そして続いて、ブロッキング緩衝液においてインキュベートした。膜を、軽く攪拌しながら、ブロッキング緩衝液(希釈緩衝液としても使用される)において一晩インキュベートした。ブロッキング緩衝液を除去し、そして希釈された血清又は上清液サンプルを前記膜に添加し、続いて、室温で1時間、インキュベートした。

【0251】試験サンプルの除去の後、膜をPBST(0.05%のTween 20を含むPBS)により、それぞれ5~10分間、3度洗浄した。アルカリホスファターゼ-接合された抗-ネズミ又は抗-ブタIgG(H+L)抗体を希釈し、洗浄された膜に添加し、そして室温で1時間インキュベートした。膜をPBSTにより洗浄し、そして基質BCIP/NBT(Kirkegaard and Perry Laboratories)を前記膜に添加し、そして軽く攪拌しながら、適切な色の反応が進行す

るまで、インキュベートした。次に、膜を水によりすすぎ、反応を停止し、そして室温で乾燥せしめた。

【0252】9.2.結果

新規APP タンパク質の抗原性特徴を、次の3種の方法を用いて決定した。第1の方法は、ブタ抗体プローブ、すなわちAPP 血清型 - 1 又は血清型 - 5、又は血清型 - 5、続く血清型 - 7 による再攻撃により実験的に感染された動物から得られた回復期ブタ血清又はASC 上清液を、組換え発現されたAPP タンパク質を含むウェスタンブロットにおける免疫学的プローブとして使用した (表3)。第2の方法は、APP 抗原(完全な細菌細胞ペレット)を含むウェスタンブロットをプローブするために組換え発現されたAPP タンパク質により免疫化されたマウスから得られた血清を使用した(表4)。第3の方法は、組換え発現されたAPP タンパク質を含むウェスタンブロットをプローブするために組換え発現されたAPP タンパク質により免疫化されたマウスからの血清を使用した(表6)。個々の方法の結果は、下記に記載される。

【0253】9.2.1.APP 血清型に対して生成されたブタ抗体プローブによる組換えAPP タンパク質の認識抗体プローブ(血清又はASC 上清液)を、APP 血清型 - 1、又は血清型 - 5のいずれかによる実験的な攻撃、又は血清型 - 5による攻撃、続く血清型 - 7による再攻撃に続いてブタから得た。血清は、新規APP タンパク質を同定するために使用された(図1~4)。表3は、ウェスタンブロットによる組換え発現されたAPP タンパク質と抗体プローブとの反応性を要約する。血清型 - 5による攻撃及び血清型 - 7による再攻撃に続いて生成されたASC プローブは、OmpW、OmpA1、OmpA2及びOmp20 組換えタンパク質を認識した。ASC プローブは、組換えOmp27とは免疫学的に反応しなかった。

【0254】対照的に、血清型 - 1、又は血清型 - 5により攻撃され、又は血清型 - 5により攻撃され、続いて血清型 - 7により再攻撃された動物に由来する血清は、単に、OmpA1 及びOmpA2 組換えタンパク質を認識した。攻撃されていない対照ブタ(No. 780)から得られたASC プローブは、組換え発現されたタンパク質のいずれとも反応しなかった。しかしながら、追加の攻撃されていない対照ブタ(No. 779)は、すべての組換え発現されたタンパク質と反応した。さらに、攻撃されていない対照ブタ(No. 1421)からの血清は、OmpA1 及びOmpA2 と反応した。それらの後者の2匹の動物は、APP により潜在的に感染されていると思われる。

【0255】9.2.2.組換えAPP タンパク質に対して生成されたマウス抗血清によるAPP タンパク質の認識組換え発現されたAPP タンパク質により免疫化されたマウスからの抗血清を、細菌細胞ペレットからのAPP 抗原を含むウェスタンブロットをプローブするために使用した。結果は表4に要約される。組換えpp-OmpW、又は

pp-OmpA1、又はpp-OmpA2により免疫化されたマウスは、特定のAPP タンパク質の予測される分子量と一致する特定のバンドを認識した血清抗体を生成した。しかしながら、組換えOmp20 又はOmp27 のいずれかにより免疫化されたマウスからの血清は、試験されたいずれかの血清型において、特定の生来のタンパク質と特異的に反応しなかった。

【0256】9.2.3.組換えAPP タンパク質に対して生成されたマウス抗血清による組換えAPP タンパク質の認識

組換え発現された新規タンパク質により免疫化されたマウスからの抗血清を、組換えAPP タンパク質を含むウェスタンブロットをプローブするために使用した。結果は表5に要約される。組換えOmpWにより免疫化されたマウスの血清は、GST 又はpp融合タンパク質のいずれかとして、組換えOmpW、OmpA1 及びOmpA2 タンパク質を認識した。組換えOmpA1 又はOmpA2 のいずれかにより免疫化されたマウスからの血清は、OmpA1 及びOmpA2 免疫原と強く反応した。

【0257】組換えOmp20 により免疫化されたマウスからの血清は、組換えOmp20 と強く反応し、そして組換えOmpA1 及びOmpA2 とは、いくらか低く反応した。対照的に、組換えOmp27 により予防接種されたマウスからの血清は、組換えOmp27 を認識しなかったが、しかし組換えOmpA1 及びOmpA2 とは反応した。PBS により予防接種された対照マウスからの血清は、組換えOmpA1 及びOmpA2 とはひじょうに弱く反応し、そして組換えOmpW、Omp20 又はOmp27 を認識しなかった。

【0258】要約すると、APP により実験的に感染されたブタは、OmpW、OmpA1、OmpA2及びOmp20 組換えタンパク質を認識した局部抗体(ASC プローブ)を生成し、ところが血清抗体は、ウェスタンブロットにより示されるように(表3)、組換えOmpA1 及びOmpA2 とは反応した。従って、血清は、ASC プローブよりも、免疫学的反応性に関して、より一層制限されると思われる。血清もASC プローブも、組換え発現されたOmp27 を認識しなかった。Omp27 は、アッセイの変性のために、ウェスタンブロットアッセイにおいては、たぶん認識されない。

【0259】組換えOmpW、OmpA1 及びOmpA2 の免疫学的特徴化は、それらのタンパク質が、血清型1, 2, 5, 7, 8及び9に見出される生来のタンパク質(予測される分子量に基づく)を認識し(表4)、そしてそれらのタンパク質の組換え的に誘導された形を認識する(表5)血清抗体を誘発することができ、そして組換えOmp20 がまた認識されることを示す。

【0260】組換えOmp20 又はOmp27 により免疫化されたマウスからの血清を、インビトロ増殖されたAPP 血清型1, 2, 5, 7, 8、及び9に由来する完全な細菌細胞抗原を含むウェスタンブロットをプローブするために使用した(表4)。それらの血清は、試験されるAPP

血清型のいづれにおいても、それらの生来の形と一致するバンドを認識しなかった。Omp20 及びOmp27 はたぶん、インビボでのみ発現されるAPP の抗原を表わし、そして従って、実験室において調製された細菌細胞ペレットには存在しないであろう。他方では、それらの2種の*

表3

組換えAPPタンパク質に対するブタ回復期血清及びASC上清液の反応性

Ab源 ⁽²⁾	動物番号 No.	APP攻撃 ⁽³⁾	組換えタンパク質 ⁽¹⁾				
			OmpW	OmpA1	OmpA2	Omp20	Omp27
血清	1157	血清型1	- ⁽⁴⁾	+	+	-	-
血清	642	血清型5	-	+	+	-	-
血清	803	血清型5 & 7	-	+	+	-	-
血清	1421	ナシ	-	+	+	-	-
ASC プローブ	803	血清型5 & 7	+	+	+	+	-
ASC プローブ	808	血清型5 & 7	+	+	+	+	-
ASC プローブ	779	ナシ	+	+	+	+	ND ⁽⁵⁾
ASC プローブ	780	ナシ	-	-	-	-	ND

【0262】1：組換えタンパク質の個々は、保護ペプチド(pp)を含み、生来のシグナル配列を欠いており、そして封入体(IB)に由来した。
 2：1/125に希釈された血清、又は1/4に希釈されたASCプローブが、組換えタンパク質の個々に対して特異的な抗体について試験された。
 3：動物は示されるAPP 血清型により攻撃された。動物No. 803 及び808 は、血清型 - 5 により攻撃され、感染*

表4

*タンパク質は、ウェスタンブロット方法により変性されており、そして特定抗体に認識できなくされている。

【0261】

【表3】

からの回復を可能にされ、そして次に、血清型 - 7 により再攻撃された。

4：(+)は示された組換えタンパク質に対応するバンドの存在を示し；(-)は、血清又はASC プローブが特定の組換えタンパク質と反応しなかった事を示す。

5：ND = 測定されなかった。

【0263】

【表4】

APP全細胞調製物に対する、組換えAPPタンパク質により免疫化されたマウスからの血清の反応性

免疫原 ⁽²⁾	APP抗原 ⁽¹⁾					
	血清型-1	血清型-2	血清型-5	血清型-7	血清型-8	血清型-8
OmpW-GST ⁽³⁾	+ ⁽⁴⁾	+	+	+	+	+
pp-OmpW	+	+	+	+	+	+
pp-OmpA1	+	+	+	+	+	+
pp-OmpA2	+	+	+	+	+	+
pp-Omp20	-	-	-	-	-	-
pp-Omp27	-	-	-	-	-	-
PBS	-	-	-	-	-	-

【0264】1：完全な細菌細胞調製物(レーン、当たり10µg)におけるタンパク質を、SDS-PAGEにより分離し、PVDF膜にトランスファーし、そしてマウス血清(1/50)によりプローブした。
 2：マウスを、組換えAPP タンパク質調製物又はPBS(対照)のいづれかにより2度、s.c.免疫化した。

3：マウス免疫化のために使用されるすべての組換えAPP タンパク質は、溶解された封入体調製物であった。すべてのAPP タンパク質は保護ペプチドを含んだが、但しOmpW-GST融合タンパク質又はpp-OmpW 融合タンパク質のいづれかとして利用されるOmpWを除く。

50 4：(+)は動物を免疫化するために使用される組換え

タンパク質に対応するバンドの存在を示し；(-)は特定バンドの不在を示す。 * 【0265】

表5 【表5】

組換えAPPタンパク質に対する、組換えAPPタンパク質により免疫化されたマウスからの血清の反応性

免疫原 ⁽²⁾	抗原 ⁽¹⁾				
	OmpW ⁽³⁾	OmpA1	OmpA2	Omp20	Omp27
OmpW-GST ⁽⁴⁾	+ ⁽⁵⁾	+	+	-	ND ⁽⁶⁾
pp-OmpW	+	+	+	-	ND
pp-OmpA1	-	++	++	-	ND
pp-OmpA2	-	++	++	-	ND
pp-Omp20	-	+	+	++	ND
pp-Omp27	-	+	+	-	-
PBS		+/-	+/-	-	-

【0266】1：SDS-PAGEにより分離された組換えタンパク質が、PVDF膜にトランスファーされ、そしてマウス血清(1/50)によりブローブされた。

2：マウスは、組換えタンパク質調製物又はPBS(対照)により2度、s.c.免疫化された。

3：SDS-PAGEゲルにおける組換えAPPタンパク質の個々は、保護ペプチド(pp)を含み、そして生来のシグナル配列を欠いた。

4：マウス免疫化のために使用されるすべての組換えAPPタンパク質は、溶解された封入体調製物からであった。すべてのタンパク質は保護ペプチドを含んだが、但しOmpW-GST融合タンパク質又はpp-OmpW融合タンパク質のいずれかとして利用されるOmpWは除かれ、そしてすべてのタンパク質は生来のシグナル配列を欠いた。

【0267】5：(+)は、試験血清が特定の組換えタンパク質と反応したことを示し；(-)は、特定のバンドの不在を示し；PBS対照に関して、(+/-)は、それらのバンドが見えたが、しかし免疫化された動物からの血清に比較して、ひじょうに弱いことを示す。(++)はひじょうに強い免疫反応性を示す。

6：ND=測定されなかった。

【0268】10.例：種々の抗原組合せの効能を試験するための動物研究

10.1.材料及び方法

50匹の明らかに健康な雑種のブタ(生後、約6.5週)を、APP疾病又は予防接種の病歴を有さない動物群から得た。動物は、10匹のブタからそれぞれ成る5つのグループに、同腹子により、又はApxII細胞溶解性中和抗体力価によりランダムに割当てられた(98%の動物は、研究の開始の前、1:200の血清中和力価を有した)。ブタは、研究の開始の前、1週間、順化された。

【0269】動物は、生後約7.5週目である10日目、2mlの適切なワクチン(ppを有し、そしてシグナル配列を有さないAPPタンパク質)又はプラセボを、筋肉内経路(IM:左の首の筋肉)により予防接種された。3週間後、動物は、2回目の2mlの用量(IM:左の首の筋肉)により追加免疫化された。表6は、5つのグループのブタの第1及び第2予防接種のために使用されるワクチンを同定する。

【0270】

【表6】

76
表6

ワクチングループ	ワクチン成分
A	75 μ g pp-OmpW 75 μ g pp-OmpA1 75 μ g pp-OmpA2 75 μ g pp-Omp20 75 μ g pp-Omp27 75 μ g rApxI 75 μ g rApxII 75 μ g rOmpA (5) 500 μ gのQuilA/200 μ gのコレステロールをアジュバントとして使用
B	75 μ g rApxI 75 μ g rApxII 75 μ g rOmpA (5) 500 μ gのQuilA/200 μ gのコレステロールをアジュバントとして使用
C	75 μ g pp-OmpW 75 μ g pp-OmpA1 75 μ g pp-OmpA2 75 μ g pp-Omp20 75 μ g pp-Omp27 500 μ gのQuilA/200 μ gのコレステロールをアジュバントとして使用
D	市販のワクチン（血清型1、5及び7を含む全細胞APPバクテリア）、及び Emulsigen（登録商標）アジュバント
E	500 μ gのQuilA/200 μ gのコレステロールをアジュバントとして含むリン酸緩衝溶液

【0271】すべてのブタは、予防接種の後、約1時間、嘔吐、うつ病、下痢、運動失調 - 協調不能、高められた呼吸、及び震えについて観察された。さらに、毎日の観察は、最初及び2回目の予防接種に続いて、3日間行なわれた。直腸温度を、予防接種の1日前、予防接種の直前、予防接種の6時間後及び予防接種の1日後に記載された。

【0272】2回目の予防接種の2週間後、ブタは、非免疫ブタにおいて約50%の死亡率を引き起こすAPP 血清型 - 1 (ATCC株27088) の生存ビルレント培養物により鼻腔内攻撃された。1.5 $\times 10^7$ cfu/ml を含む培養物 1.0 ml (0.5 ml / 外鼻孔) の用量が使用された。すべての動物は、1.0 ml / 50ポンドの体重の速度で、1 ml 当たり 50 mg のテラゾール、50 mg のキシラジン及

び 50 mg のケタミンの組合せから成る i . m . 注射により、攻撃の前、麻酔された。

【0273】10.2.結果

有意な体温の上昇は、本発明の組換えタンパク質による第1回又は第2回目の予防接種の後、見出されなかった。有意な後 - ワクチン部位反応は、すべての他のグループに比較して、市販のワクチンを受けた動物に観察された(表7)。新規のAPP タンパク質のみを受けた動物(グループC)は、後 - ワクチン部位反応を示さず、そして新規のAPP タンパク質及びApxI/ApxII/OmpA (5) の組合せの第2回目の予防接種を受けた1匹の動物のみが、後 - ワクチン部位反応を示した。

【0274】

【表7】

表7

ワクチングループ	第1の予防接種部位 反応 (cm ³)* (%影響された動物)	第2の予防接種部位 反応 (cm ³)* (%影響された動物)
A	0 (0)	2 (10)
B	2 (10)	17 (30)
C	0 (0)	0 (0)
D	16 (30)	68 (70)
E	0 (0)	0 (0)

* 番号はグループ平均を表わす。

【0275】新規APP タンパク質及びApxI/ApxII/OmpA (5)のすべてにより予防接種されたグループAは、市販のワクチンを含めて、いづれの他のグループよりも低い死亡率を有した(30% vs.60%) (表8)。肺損傷の量(%外傷率)はまた、グループB, C及び対照に比較して、グループAにおいては低かったが、しかし市販のワクチンを受けた動物(グループD)において見られる肺損傷には類似した。

【0276】

【表8】

表8

ワクチングループ	平均損傷 (%)	死亡率 (%)
A	5.8	3.0
B	7.3	7.0
C	6.7	7.0
D	5.5	6.0
E	7.3	6.0

【0277】それらの結果は、本発明の新規APP タンパク質と毒素抗原との組合せから成るワクチンが異種APP

表9

タンパク質	5'プライマー (配列番号)	3'プライマー (配列番号)	構造体 の名称	株の 名称	ATCC 受託番号
Omp20	ER218 (89)	ER73 (61)	pER416	Pz416	98926
Omp27	ER219 (90)	ER94 (68)	pER417	Pz417	98927
OmpW	ER220 (91)	RA52 (80)	pER418	Pz418	98928
OmpA1	ER221 (92)	RA71 (87)	pER419	Pz419	98929
OmpA2	ER222 (93)	RA69 (86)	pER420	Pz420	98930

【0280】上記に引用されるすべての特許、特許出願及び出版物は、引用により本明細書に組込まれる。本発明は、記載される特定の態様により範囲を限定されるも

攻撃に対しての保護を付与することを示しており、この保護は、市販のワクチンの保護に等しいか又は卓越している。

【0278】11.例: プラスミド及び寄託材料の調製
American Type Culture Collection(ATCC)への寄託のために個々のAPP タンパク質をコードする別々のプラスミド構造体を調製した。個々の構造体は、その生来のシグナル配列と共に、特定のAPP タンパク質をコードする全ORFを含んだ。ORFは、ラクトースプロモーターに対して反対方向に、pCR2.1TopoのTAクローニング部位において挿入された。ORFは、下記表9に列挙されるプライマーを用いて、APP 血清型-7ゲノムDNAからのPCRにより得られた。宿主細胞及びベクターの両者は、Invitrogen(Carlsbad, CA)から入手できる。5'プライマーはすべて、それぞれのORFのATG開始コドンで開始する。上記のようにして調製、そして下記表9に列挙される菌株は、1998年10月15日、10801 University Blvd, Manassas, VA, 20110, USAのATCCに寄託され、そして下記列挙される受託番号を割り当てられた。

20 【0279】

【表9】

のではなく、それらの態様は、本発明の個々の観点を単に例示するためのものである。機能的に同等の組成物及び方法は、本発明の範囲内である。

【 0 2 8 1 】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Pfizer Products Inc.
 <120> NOVEL PROTEINS FROM ACTIN
 OBACILLUS PLEUROPNEUMONIAE
 <130> PC9854A
 <140>
 <141>
 <160> 96
 <170> PatentIn Ver. 2.0
 <210> 1
 <211> 1018
 <212> DNA
 <213> Actinobacillus pleuropneumoniae
 <220>
 <221> CDS
 <222> (272)..(787)
 <400> 1
 ggttgaaaa caccttatga agtttacttc aaaa
 aatcgt tgcacttggg ttgacaattc 60
 aagactaaaa atgaccgggc gtgagctaaa accg
 catgac cgtactgtgg atgtgacgat 120
 tcgtcgtatt cgtaaacct ttgaagatca ccct
 aataca ccggaaatca ttgtaacct 180
 tcatggtgaa ggttaccgtt tttgcggcga gtta
 gagtag taattaaacg cctataagcg 240
 tttagcatct tctttctaaa aaggacattt t at
 g aaa aat tta aca gtt tta 292
 Met Lys Asn Leu Thr
 Val Leu
 1 5
 gca tta gca ggt tta ttc tct gcg tcg gca
 ttt gcc gca ccg gtc gga 340
 Ala Leu Ala Gly Leu Phe Ser Ala Ser Ala
 Phe Ala Ala Pro Val Gly
 10 15 20
 aat acc ttt acc ggc gta ggc gta ggc gtt
 gat ctc acc acg gta aaa 388
 Asn Thr Phe Thr Gly Val Gly Val Gly Val
 Asp Leu Thr Thr Val Lys
 25 30 35
 tat aaa gtg gac ggt gtg aaa ggt aaa caa
 tca acc ggt cct gcg tta 436
 Tyr Lys Val Asp Gly Val Lys Gly Lys Gln
 Ser Thr Gly Pro Ala Leu
 40 45 50 55
 gtc gta gat tac ggt atg gat tac ggt gac
 aat ttt gtc ggt gtt gta 484
 Val Val Asp Tyr Gly Met Asp Tyr Gly Asp
 Asn Phe Val Gly Val Val
 60 65 70

【 0 2 8 2 】

【 0 2 8 3 】

140 145 150
 tta aga aaa agc ggt gct aaa tta aaa ggt
 aat gaa ttt act gcg aac 772
 Leu Arg Lys Ser Gly Ala Lys Leu Lys Gly
 Asn Glu Phe Thr Ala Asn
 155 160 165
 cta ggt tac cgt ttc taattatttt tccctta
 tga caagcggctcg tttcttgcaa 827
 Leu Gly Tyr Arg Phe
 170
 aaaatttgcg aaaaacgacc gcttattttt ttat
 taatac tttatttact gagccatttt 887
 †200gc2acg gttagaaaac cgctgcagt cgca
 †201a1172ttcaaagc ctgcgcttg 947
 †202a188tg tcggacactt cacgaaatgc gccc
 †210caacctgobacttttccaptatccpn007
 †200gaatttt g
 <400> 21018
 Met Lys Asn Leu Thr Val Leu Ala Leu Ala
 Gly Leu Phe Ser Ala Ser
 1 5 10 15
 Ala Phe Ala Ala Pro Val Gly Asn Thr Phe
 Thr Gly Val Gly Val Gly
 20 25 30
 Val Asp Leu Thr Thr Val Lys Tyr Lys Val
 Asp Gly Val Lys Gly Lys
 35 40 45
 Gln Ser Thr Gly Pro Ala Leu Val Val Asp
 Tyr Gly Met Asp Tyr Gly
 50 55 60
 Asp Asn Phe Val Gly Val Val Gln Gly Lys
 Val Lys Val Gly Ser Thr
 65 70 75 80
 Lys Val Phe Ser Asp Val Lys Gln Lys Thr
 Lys Tyr Thr Val Ala Tyr
 85 90 95
 Gln Gln Gly Tyr Arg Val Ala Ser Asp Leu
 Leu Pro Tyr Val Lys Val
 100 105 110
 Asp Val Ala Gln Ser Lys Val Gly Asp Thr
 Asn Phe Thr Gly Tyr Gly
 <212> DNA15 120 125
 †213GlyAlaGlyAlaLysLysPheVal Ser
 SerAsn Val Glu Val Gly
 <220>30 135 140
 Asn Val Tyr Thr Arg Ser Asn Leu Arg Lys
 Ser Tyr Lys Lys
 †460> 3 150 155 1
 †00aacgcata aagtaaatgt gccggttcaa tgta
 GtyAsnacccttcttccatcttccatccgLeuGly Tyr
 †00ggtcttc tgcaagggt tcttgcaatt tggg
 agtaaa tttttcgaaatctcatatttt 120 170

tactcctaaa tttcattaat ctgtatcgag caga
 atttat accgcttcaa cgttttaata 180
 aatggagcta gtcgaactta tttcaagtga aaat
 gtgaaa aagatcgcaa aaaataaatt 240
 agtacctcgt tgtaggtact aaaatggcgt atat
 ttgatt cttgtcaata aaagttagcc 300
 gaattgttct tagaatgtta ttaacgtaac gaat
 tggtta cttttttatt ttaagaaaa 360
 tattaagagg tcaaa atg aaa aaa gca gta tt
 a gcg gca gta tta ggc ggt 411
 Met Lys Lys Ala Val Leu Ala Al
 a Val Leu Gly Gly
 1 5 10
 gcg tta tta gcg ggt tcg gca atg gca cat
 caa gcg ggc gat gtg att 459
 Ala Leu Leu Ala Gly Ser Ala Met Ala His
 Gln Ala Gly Asp Val Ile
 15 20 25
 ttc cgt gcc ggt gcg atc ggt gtg att gca
 aat tca agt tcg gat tat 507
 Phe Arg Ala Gly Ala Ile Gly Val Ile Ala
 Asn Ser Ser Ser Asp Tyr
 30 35 40
 caa acc ggg gcg gac gta aac tta gat gta
 aat aat aat att cag ctt 555
 Gln Thr Gly Ala Asp Val Asn Leu Asp Val
 Asn Asn Asn Ile Gln Leu
 45 50 55 60
 ggt tta acc ggt acc tat atg tta agt gat
 aat tta ggt ctt gaa tta 603
 Gly Leu Thr Gly Thr Tyr Met Leu Ser Asp
 Asn Leu Gly Leu Glu Leu
 65 70 75
 tta gcg gca aca ccg ttt tct cac aaa atc
 acc ggt aag tta ggt gca 651
 Leu Ala Ala Thr Pro Phe Ser His Lys Ile
 Thr Gly Lys Leu Gly Ala
 80 85 90
 aca gat tta ggc gaa gtg gca aaa gta aaa
 cat ctt ccg ccg agc ctt 699
 Thr Asp Leu Gly Glu Val Ala Lys Val Lys
 His Leu Pro Pro Ser Leu
 95 100 105
 tac tta caa tat tat ttc ttt gat tct aat
 gcg aca gtt cgt cca tac 747
 Tyr Leu Gln Tyr Tyr Phe Phe Asp Ser Asn
 Ala Thr Val Arg Pro Tyr
 110 82 115 120
 gtt ggt gcc ggt tta aac tat act cgc ttt
 ttc agt gct gaa agt tta 795
 Val Gly Ala Gly Leu Asn Tyr Thr Arg Phe
 Phe Ser Ala Glu Ser Leu

agt aat gtt aat gga gcc gaa att gga ttg
 gga gga gcc cgt gag agt 270
 Ser Asn Val Asn Gly Ala Glu Ile Gly Leu
 Gly Gly Ala Arg Glu Ser
 25 30 35
 agt att tac tat tct aaa cat aaa gta gca
 aca aat ccc ttt tta gca 318
 Ser Ile Tyr Tyr Ser Lys His Lys Val Ala
 Thr Asn Pro Phe Leu Ala
 40 45 50
 ctt gat ctt tct tta ggt aat ttt tat atg
 aga ggg act gca gga att 366
 Leu Asp Leu Ser Leu Gly Asn Phe Tyr Met
 Arg Gly Thr Ala Gly Ile
 55 60 65 70
 agc gaa ata gga tat gaa caa tct ttc act
 gac aat ttc agc gta tca 414
 Ser Glu Ile Gly Tyr Glu Gln Ser Phe Thr
 Asp Asn Phe Ser Val Ser
 75 80 85
 ctg ttt gtt aac cca ttt gat ggt ttt tca
 att aaa gga aaa gac ttg 462
 Leu Phe Val Asn Pro Phe Asp Gly Phe Ser
 Ile Lys Gly Lys Asp Leu
 90 95 100
 tta cct gga tat caa agt att caa act cgc
 aaa act caa ttt gcc ttt 510
 Leu Pro Gly Tyr Gln Ser Ile Gln Thr Arg
 Lys Thr Gln Phe Ala Phe
 105 110 115
 ggt tgg gga tta aat tat aat ttg gga ggt
 tta ttc ggc tta aat gat 558
 Gly Trp Gly Leu Asn Tyr Asn Leu Gly Gly
 Leu Phe Gly Leu Asn Asp
 120 125 130
 act ttt ata tcc ttg gaa gga aaa agc gga
 aaa cgt ggt gcg agt agt 606
 Thr Phe Ile Ser Leu Glu Gly Lys Ser Gly
 Lys Arg Gly Ala Ser Ser
 135 140 145 1
 50
 aat gtc agc tta ctt aaa tcg ttt aat atg
 acg aaa aat tgg aaa gtt 654
 Asn Val Ser Leu Leu Lys Ser Phe Asn Met
 Thr Lys Asn Trp Lys Val
 155 160 165
 tca cca tat att ggc tca agt tat tat tca
 tct aaa ~~gat~~ aca gat tat 702
 Ser Pro Tyr Ile Gly Ser Ser Tyr Tyr Ser
 Ser Lys Tyr Thr Asp Tyr
 170 175 180
 tac ttt ggt att aaa caa tcc gaa tta ggt

<210> 6
 <211> 258
 <212> PRT
 <213> Actinobacillus pleuropneumoniae
 <400> 6
 Met Lys His Ser Lys Phe Lys Leu Phe Lys
 Tyr Tyr Leu Ile Ser Phe
 1 5 10 15
 Pro Phe Ile Thr Phe Ala Ser Asn Val Asn
 Gly Ala Glu Ile Gly Leu
 20 25 30
 Gly Gly Ala Arg Glu Ser Ser Ile Tyr Tyr
 Ser Lys His Lys Val Ala
 35 40 45
 Thr Asn Pro Phe Leu Ala Leu Asp Leu Ser
 Leu Gly Asn Phe Tyr Met
 50 55 60
 Arg Gly Thr Ala Gly Ile Ser Glu Ile Gly
 Tyr Glu Gln Ser Phe Thr
 65 70 75 80
 Asp Asn Phe Ser Val Ser Leu Phe Val Asn
 Pro Phe Asp Gly Phe Ser
 85 90 95
 Ile Lys Gly Lys Asp Leu Leu Pro Gly Tyr
 Gln Ser Ile Gln Thr Arg
 100 105 110
 Lys Thr Gln Phe Ala Phe Gly Trp Gly Leu
 Asn Tyr Asn Leu Gly Gly
 115 120 125
 Leu Phe Gly Leu Asn Asp Thr Phe Ile Ser
 Leu Glu Gly Lys Ser Gly
 130 135 140
 Lys Arg Gly Ala Ser Ser Asn Val Ser Leu
 Leu Lys Ser Phe Asn Met
 145 150 155 1
 60 85
 Thr Lys Asn Trp Lys Val Ser Pro Tyr Ile
 Ser Tyr Tyr Ser
 <211> 1922 165 170 175
 Tyr Thr Asp Tyr Tyr Phe Gly Ile
 Leu Ser Ile Gln Thr Arg
 180 185 190
 Lys Ile Thr Ser Val Tyr Lys Pro Lys
 Tyr Ala Thr His
 <222> (6105)..(1705) 200 205
 Ile Asn Thr Asp Tyr Ala Phe Thr
 AaggAaactAaucGtttttGlycatgttgca acgc
 caat2c0ttgcagagaa attaatac5g 60 220
 aagt\$acaaalaaagcTaptAsagbysaTccgSecacys
 GtgcTgectyaaatogaaacGgttttac 120
 225cgtgata tcaacgatg230atccgtaac catc 235 2

【 0 2 8 7 】

cgtggttata tgacggatat gaaacgtatt tcat
 cgcaag gttaattaa aattaatcaa 240
 aagcctactt cgcaagaagt gggctttttg ttat
 tcaagc cgcttaccgc tatcaatggt 300
 aagtgatatg cataatagct tataaattat aagt
 tgtttt aagcaaatat atctctatcg 360
 gtaagtaaaa aattaattgt agatcattaa aaaa
 cggata aaaaaatcta ttttttgagt 420
 gaattacgca taaaaaatga tctaaattat aggt
 ttagtt gtatttttca atttttat 480
 ggtagaatac aactgtaata aaagcttaat tatt
 ttgaga tacacataaa ataatttacg 540
 gctttattca ttatcccttt taggttaggg attt
 gtcttt aatagatgac gataaattta 600
 gaggatcatc aaa atg aaa aaa tca tta gtt
 gct tta aca gta tta tcg 649
 Met Lys Lys Ser Leu Val Ala Leu
 Thr Val Leu Ser
 1 5 10
 gct gca gcg gta gct caa gca gcg cca caa
 caa aat act ttc tac gca 697
 Ala Ala Ala Val Ala Gln Ala Ala Pro Gln
 Gln Asn Thr Phe Tyr Ala
 15 20 25
 ggt gcg aaa gca ggt tgg gcg tca ttc cat
 gat ggt atc gaa caa tta 745
 Gly Ala Lys Ala Gly Trp Ala Ser Phe His
 Asp Gly Ile Glu Gln Leu
 30 35 40
 gat tca gct aaa aac aca gat cgc ggt aca
 aaa tac ggt atc aac cgt 793
 Asp Ser Ala Lys Asn Thr Asp Arg Gly Thr
 Lys Tyr Gly Ile Asn Arg
 45 50 55 60
 aat tca gta act tac ggc gta ttc ggc ggt
 tac caa att tta aac caa 841
 Asn Ser Val Thr Tyr Gly Val Phe Gly Gly
 Tyr Gln Ile Leu Asn Gln
 65 70 75
 gac aaa tta ggt tta gcg gct gaa tta ggt
 tat gac tat ttc ggt cgt 889
 Asp Lys Leu Gly Leu Ala Ala Glu Leu Gly
 Tyr Asp Tyr Phe Gly Arg
 80 85 90
 gtg cgc ggt tct gaa aaa cca aac ggt aaa
 gcg gac aag aaa act ttc 937
 Val Arg Gly Ser Glu Lys Pro Asn Gly Lys
 Ala Asp Lys Lys Thr Phe
 95 100 105
 cgt cac gct gca cac ggt gcg aca atc gca
 tta aaa cct agc tac gaa 985
 Arg His Ala Ala His Gly Ala Thr Ile Ala

Gly Gln Gly Ala Val Pro Val Ala Ala Pro
Ala Val Glu Thr Lys Asn
225 230 235
ttc gca ttc agc tct gac gta tta ttc gca
ttc ggt aaa tca aac tta 1369
Phe Ala Phe Ser Ser Asp Val Leu Phe Ala
Phe Gly Lys Ser Asn Leu
240 245 250
aaa ccg gct gcg gca aca gca tta gat gca
atg caa acc gaa atc aat 1417
Lys Pro Ala Ala Ala Thr Ala Leu Asp Ala
Met Gln Thr Glu Ile Asn
255 260 265
aac gca ggt tta tca aat gct gcg atc caa
gta aac ggt tac acg gac 1465
Asn Ala Gly Leu Ser Asn Ala Ala Ile Gln
Val Asn Gly Tyr Thr Asp
270 275 280
cgt atc ggt aaa gaa gct tca aac tta aaa
ctt tca caa cgt cgt gcg 1513
Arg Ile Gly Lys Glu Ala Ser Asn Leu Lys
Leu Ser Gln Arg Arg Ala
285 290 295 3
00
gaa aca gta gct aac tac atc gtt tct aaa
ggt gct ccg gca gct aac 1561
Glu Thr Val Ala Asn Tyr Ile Val Ser Lys
Gly Ala Pro Ala Ala Asn
305 310 315
gta act gca gta ggt tac ggt gaa gca aac
cct gta acc ggc gca aca 1609
Val Thr Ala Val Gly Tyr Gly Glu Ala Asn
Val Val Thr Gly Ala Thr
<212> PRT 320 325 330
tgc aca aac gac tca aac ggt tgc gca gca tta
atg gac tgc tta gca ccg 1657
Cys Asp Lys Val Lys Gly Arg Lys Ala Leu
Met Asn Cys Ser Ala Val Ala Leu Thr Val
Leu Ser 335 Ala Ala Val 340 345
gat cgt cgt gtt gaa gtt caa gtt caa ggt
ata aca gaa gta aca atg Gln Thr Phe
Asp Arg Gly Ala Lys Gln Val Gln Gly
Thr Lys Glu Val Thr Met 25 30
Gly 350 Ala Ser Phe His 355 Gly Ile Glu 360
Gat Leu Asp Ser Thr Ala Val Gln Thr Val
ccctct tgc ttttca agcaagagg 4065 45
AsatTtttAspgAtgcAtytThaalygTgcGactCle
AsocAggtgtsntSeatVatgTgrrttatg 1825
ataaaa0ctt cataactttt att55cttat agat 60
GaaatygaaatBbagGlytBapctTtG1885le Leu
AsocAaccAsptCysTLeagGlycaaatgcaa caaa
a65 70 1922 75 80

【 0 2 8 8 】

His Gly Ala Thr Ile Ala Leu Lys Pro Ser
 Tyr Glu Val Leu Pro Asp
 115 120 125
 Leu Asp Val Tyr Gly Lys Val Gly Ile Ala
 Leu Val Asn Asn Thr Tyr
 130 135 140
 Lys Thr Phe Asn Ala Ala Gln Glu Lys Val
 Lys Thr Arg Arg Phe Gln
 145 150 155 1
 60
 Ser Ser Leu Ile Leu Gly Ala Gly Val Glu
 Tyr Ala Ile Leu Pro Glu
 165 170 175
 Leu Ala Ala Arg Val Glu Tyr Gln Trp Leu
 Asn Asn Ala Gly Lys Ala
 180 185 190
 Ser Tyr Ser Thr Leu Asn Arg Met Gly Ala
 Thr Asp Tyr Arg Ser Asp
 195 200 205
 Ile Ser Ser Val Ser Ala Gly Leu Ser Tyr
 Arg Phe Gly Gln Gly Ala
 210 215 220
 Val Pro Val Ala Ala Pro Ala Val Glu Thr
 Lys Asn Phe Ala Phe Ser
 225 230 235 2
 40
 Ser Asp Val Leu Phe Ala Phe Gly Lys Ser
 Asn Leu Lys Pro Ala Ala
 245 250 255
 Ala Thr Ala Leu Asp Ala Met Gln Thr Glu
 Ile Asn Asn Ala Gly Leu
 87 260 265 270
 Ser Asn Ala Ala Ile Gln Val Asn Gly Tyr
~~271~~ 275
 <211> 13295 280 285
 G202A1BNSer Asn Leu Lys Leu Ser Gln Arg
 A203A1AcC1noTbac1VulsAphaeuropne
 umon200 295 300
 A200Tyr Ile Val Ser Lys Gly Ala Pro Ala
 A221As6D3al Thr Ala Val
 302> (197)..(1303) 310 315 3
 2000> 9
 61gtatatactyaagacaggaasagptogaaatthacaly
 Aaaatgartaaysaapalysgaatgtagt 60
 ttcttttt atcct325ta attaactctc ttt330
 LystctyaagtgaagsalgaheattaaAla20ys Leu
 AcaaaotAspgatgcagaaagcggctgctga agtg
 attttg tttta340at cgatgacaat 18045 350
 6taggggaacnaVaaalatlglaaahabyacaltdag
 ThrgWettta gca gta tta tca 232
 355 Met Lys Ly360er Leu Val Ala Le
 u Ala Val Leu Ser

【 0 2 8 9 】

ggt gcg aaa gtt ggt caa tca tca ttt cac
 cac ggt gtt aac caa tta 328
 Gly Ala Lys Val Gly Gln Ser Ser Phe His
 His Gly Val Asn Gln Leu
 30 35 40
 aaa tct ggt cac gat gat cgt tat aat gat
 aaa aca cgt aag tat ggt 376
 Lys Ser Gly His Asp Asp Arg Tyr Asn Asp
 Lys Thr Arg Lys Tyr Gly
 45 50 55 60
 atc aac cgt aac tct gta act tac ggt gta
 ttc ggc ggt tac caa atc 424
 Ile Asn Arg Asn Ser Val Thr Tyr Gly Val
 Phe Gly Gly Tyr Gln Ile
 65 70 75
 tta aac caa aac aat ttc ggt tta gcg act
 gaa tta ggt tat gat tac 472
 Leu Asn Gln Asn Asn Phe Gly Leu Ala Thr
 Glu Leu Gly Tyr Asp Tyr
 80 85 90
 tac ggt cgt gta cgt ggt aac gat ggt gaa
 ttc cgt gca atg aaa cac 520
 Tyr Gly Arg Val Arg Gly Asn Asp Gly Glu
 Phe Arg Ala Met Lys His
 95 100 105
 tct gct cac ggt tta aac ttt gcg tta aaa
 cca agc tac gaa gta tta 568
 Ser Ala His Gly Leu Asn Phe Ala Leu Lys
 Pro Ser Tyr Glu Val Leu
 110 115 120
 cct gac tta gac gtt tac ggt aaa gta ggt
 gtt gcg gtt gtt cgt aac 616
 Pro Asp Leu Asp Val Tyr Gly Lys Val Gly
 Val Ala Val Val Arg Asn
 125 130 135 1
 40
 gac tat aaa tcc tat ggt gca gaa aac act
 aac gaa cca aca gaa aaa 664
 Asp Tyr Lys Ser Tyr Gly Ala Glu Asn Thr
 Asn Glu Pro Thr Glu Lys
 145 150 155
 ttc cat aaa tta aaa gca tca act att tta
 ggt gca ggt gtt gag tac 712
 Phe His Lys Leu Lys Ala Ser Thr Ile Leu
 Gly Ala Gly Val Glu Tyr
 160 165 170
 gca att ctt cct gaa tta gcg gca cgt gtt
 gaa tac caa tac tta aac 760
 Ala Ile Leu Pro Glu Leu Ala Ala Arg Val
 Glu Tyr Gln Tyr Leu Asn
 175 180 185
 aaa gcg ggt aac tta aat aaa gca tta gtt

Gly Gln Gly Ala Val Ala Pro Val Val Glu
 Pro Glu Val Val Thr Lys
 225 230 235 2

40
 Asn Phe Ala Phe Ser Ser Asp Val Leu Phe
 Asp Phe Gly Lys Ser Ser
 245 250 255

Leu Lys Pro Ala Ala Ala Thr Ala Leu Asp
 Ala Ala Asn Thr Glu Ile
 260 265 270

Ala Asn Leu Gly Leu Ala Thr Pro Ala Ile
 Gln Val Asn Gly Tyr Thr
 275 280 285

Asp Arg Ile Gly Lys Glu Ala Ser Asn Leu
 Lys Leu Ser Gln Arg Arg
 290 295 300

Ala Glu Thr Val Ala Asn Tyr Leu Val Ser
 Lys Gly Gln Asn Pro Ala
 305 89 310 315 3

【 0 2 9 1 】

20
 Asn Val Thr Ala Val Gly Tyr Gly Glu Ala
 Asn Pro Val Thr Gly Ala
 <212> PRT 325 330 335

~~213> SITE~~ Val Lys Phe Gly Arg Lys Ala
 Leu Ile Ala Cys Leu Ala
 <220> 340 345 350

~~221> SITE~~ Arg Val Glu Val Gln Val Gln
~~222> SITE~~ Asn Val Ala
 <223> Xaa=unknown amino acid 360 365

~~400> 11~~
 Ala Pro Val Gly Asn Thr Phe Thr Gly Val
 Lys Val Tyr Val Asp Leu
 1 5 10 15

【 0 2 9 2 】

Thr Xaa Val Ala
 <210> 12 20
 <211> 35
 <212> PRT
 <213> Actinobacillus pleuropneumoniae
 <220>
 <221> SITE
 <222> (30)
 <223> Xaa=Asn or Val
 <400> 12

His Gln Ala Gly Asp Val Ile Phe Arg Ala
 Gly Ala Ile Gly Val Ile
 1 5 10 15

Ala Asn Ser Ser Ser Asp Tyr Gln Thr Gln
 Ala Asp Val Xaa Leu Asp
 20 25 30

【 0 2 9 3 】

Val Asn Asn
 35

<210> 13
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Actinobacillus pleuropneumoniae
 <400> 13
 Ala Glu Ile Gly Leu Gly Gly Ala Arg Glu
 Ser Ser Ile Tyr Tyr Ser
 1 90 5 10 15
【 0 2 9 4 】 Lys His Lys Val Ala Thr Asn Pro Phe Leu
~~Asp Leu~~
 <211> 19 20 25 30
 <212> PRT
 <213> Actinobacillus pleuropneumoniae
 <220>
 <221> SITE
 <222> (2)
 <223> Xaa=Asp or Glu
 <220>
 <221> SITE
 <222> (14)
 <223> Xaa=unknown amino acid
 <220>
 <221> SITE
 <222> (15)
 <223> Xaa=unknown amino acid
 <220>
 <221> SITE
 <222> (17)
 <223> Xaa=unknown amino acid
 <400> 14
 Ala Xaa Pro Glu Asn Thr Phe Tyr Pro Gly
 Ala Lys Val Xaa Xaa Ser
 1 5 10 15
【 0 2 9 5 】 ~~Xaa~~His
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial
 Sequence: Primer
 <400> 15
【 0 2 9 6 】 aaaaatttgc gaaaaacgac
 <210> 16 20
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial
 Sequence: Primer

<400> 16
 acttctacac~~at~~ tacttgatac
【 0 2 9 7 】 20
 <210> 17
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial
 Sequence: Primer
 <400> 17
【 0 2 9 8 】 tccgtatgtc aaagtcgatg
 <210> 18 20
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial
 Sequence: Primer
 <400> 18
【 0 2 9 9 】 taaacaatca accggtcctg
 <210> 19 20
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial
 Sequence: Primer
 <400> 19
【 0 3 0 0 】 ttaccttgta caacaccgac
 <210> 20 20
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial
 Sequence: Primer
 <400> 20
【 0 3 0 1 】 aaaagcagta ttagcggcag
 <210> 21 20
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial
 Sequence: Primer
 <400> 21
【 0 3 0 2 】 ttgatgtgcc attgccgaac
 <210> 22 20
 <211> 20

<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial
Sequence: Primer
<400> 22 92
【 0 3 0 3 】 gttttaaact ttcagcactg
<210> 23 20
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial
Sequence: Primer
<400> 23
【 0 3 0 4 】 agttcgtcca tacgttggtg
<210> 24 20
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial
Sequence: Primer
<400> 24
【 0 3 0 5 】 aatatatctc tatcgtaag
<210> 25 20
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial
Sequence: Primer
<400> 25
【 0 3 0 6 】 ctaaacctat aatttagatc
<210> 26 20
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial
Sequence: Primer
<400> 26
【 0 3 0 7 】 tgtttccgca cgacgttgtg
<210> 27 20
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial
Sequence: Primer
<400> 27

- 【 0 3 0 8 】** aagtaac~~gg~~ttacacggac
 20
 <210> 28
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial
 Sequence: Primer
 <400> 28
- 【 0 3 0 9 】** atcaaccgta attcagtaac
 <210> 29 20
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial
 Sequence: Primer
 <400> 29
- 【 0 3 1 0 】** atagtcataa cctaattcag
 <210> 30 20
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial
 Sequence: Primer
 <400> 30
- 【 0 3 1 1 】** gtatgggtgc aactgactac
 <210> 31 20
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial
 Sequence: Primer
 <400> 31
- 【 0 3 1 2 】** aacacgtgcc gctaattcag
 <210> 32 20
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial
 Sequence: Primer
 <400> 32
- 【 0 3 1 3 】** tgcttgagct accgctgcag
 <210> 33 20
 <211> 20
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial
 Sequence: Primer
 <400> 33 94
【 0 3 1 4 】 gcgaaagttg gtcaatcatc
 <210> 34 20
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial
 Sequence: Primer
 <400> 34
【 0 3 1 5 】 ataacgatca tcgtgaccag
 <210> 35 20
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial
 Sequence: Primer
 <400> 35
【 0 3 1 6 】 tgcgtctaaa gctgttgctg
 <210> 36 20
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial
 Sequence: Primer
 <400> 36
【 0 3 1 7 】 atcaagctta aaaccagcag
 <210> 37 20
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial
 Sequence: Primer
 <400> 37
【 0 3 1 8 】 ctataaatcc tatggtgcag
 <210> 38 20
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial
 Sequence: Primer
 <400> 38
 tgcacctaaa atagttgatg
 20

95

【0319】

<210> 39
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial
 Sequence: Primer
 <400> 39

【0320】

ggggatccgc dccdgtggh aatacntta cngg
 <210> 40 34
 <211> 43
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial
 Sequence: Primer
 <400> 40

【0321】

ggggatccat ytattatwsw aaacataaag tdgc
 dtttaa4tcc 43
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial
 Sequence: Primer
 <400> 41

【0322】

ggggatccgt acccgatct gtgttttag
 <210> 42 30
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial
 Sequence: Primer
 <400> 42

【0323】

ggggatccgg tgctccgca gctaacg
 <210> 43 27
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial
 Sequence: Primer
 <400> 43

【0324】

ggggatccat acttagtgt ttatcatta taac
 g210> 44 35
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

- <220>
 <223> Description of Artificial
 Sequence: Primer
 <400> 44 96
【 0 3 2 5 】 ggggatccgg tcaaaaccct gcaaacg
 <210> 45 27
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial
 Sequence: Primer
 <400> 45
【 0 3 2 6 】 ttgcccggg ctcttttatt gatttaagtt act
 <210> 46 33
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial
 Sequence: Primer
 <400> 46
【 0 3 2 7 】 gactaacgca ggaccggttg attg
 <210> 47 24
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial
 Sequence: Primer
 <400> 47
【 0 3 2 8 】 ggggatccgt ggggtcggaa tatacgcgca g
 <210> 48 31
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial
 Sequence: Primer
 <400> 48
【 0 3 2 9 】 caacgtggat ccgaattcaa gcttc
 <210> 49 25
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial
 Sequence: Primer
 <400> 49
【 0 3 3 0 】 gtcaccgtaa tccataccgt aatg
 24

<210> 50
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial
 Sequence: Primer
 <400> 50 97
【 0 3 3 1 】 gattgtttac ctttcacacc gtccac
 <210> 51 26
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial
 Sequence: Primer
 <400> 51
【 0 3 3 2 】 tcaccggga aaaatatcta gaaacgg
 <210> 52 27
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial
 Sequence: Primer
 <400> 52
【 0 3 3 3 】 ccgtggtgag atcaacgcct acgcctac
 <210> 53 28
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial
 Sequence: Primer
 <400> 53
【 0 3 3 4 】 ctttcacac cgtccacttt atattttacc gtgg
~~tttt~~ <210> 54 38
 <211> 68
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial
 Sequence: Primer
 <400> 54
【 0 3 3 5 】 gcgcatatga acaccaccac caccaccacc tctc
 gtgcac cggtcggaaa tacctttacc 60
~~gttttt~~ a55
 <211> 68
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<210> 61
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial
 Sequence: Primer
 <400> 61 99
【 0 3 4 2 】 cgcataaaaa atgatctaaa ttatagg
 <210> 62 27
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial
 Sequence: Primer
 <400> 62
【 0 3 4 3 】 ggggaattca acgattttgc ttgc
 <210> 63 24
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial
 Sequence: Primer
 <400> 63
【 0 3 4 4 】 gaattcttgc tcgtttgaat tagaag
 <210> 64 26
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial
 Sequence: Primer
 <400> 64
【 0 3 4 5 】 ggtaatTTTT atagagagg gactg
 <210> 65 25
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial
 Sequence: Primer
 <400> 65
【 0 3 4 6 】 caaacagtga tacgctgaaa ttgtc
 <210> 66 25
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>

- <223> Description of Artificial
 Sequence: Primer
 <400> 66 100
【 0 3 4 7 】 gcaacacaca taggtattaa tactg
 <210> 67 25
 <211> 66
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial
 Sequence: Primer
 <400> 67
【 0 3 4 8 】 gcgcatatga acaccaccac caccaccacc tctc
 gtgccg aaattggatt gggaggagcc 60
 e~~g~~tgag68
 <211>6628
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial
 Sequence: Primer
 <400> 68
【 0 3 4 9 】 gtattctctc tagaatattc tattttag
 <210> 69 28
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial
 Sequence: Primer
 <400> 69
【 0 3 5 0 】 gccacatgaa gaattattat ttgagct
 <210> 70 27
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial
 Sequence: Primer
 <400> 70
【 0 3 5 1 】 acgtgaaaaa taatctcttg ataat
 <210> 71 25
 <211> 60
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial
 Sequence: Primer
 <400> 71
【 0 3 5 2 】 cgccatatga acaccaccac caccaccacc tctc
 gtcac agcgggaga tgtgatttc 60

<210> 72
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial
 Sequence: Primer
 <400> 72 101
【 0 3 5 3 】 caycargcdg ghgatgdat ytt
 <210> 73 23
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial
 Sequence: Primer
 <400> 73
【 0 3 5 4 】 gcdgadccdg araayacdt yta
 <210> 74 23
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial
 Sequence: Primer
 <400> 74
【 0 3 5 5 】 accggtacct atatgtaag tg
 <210> 75 22
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial
 Sequence: Primer
 <400> 75
【 0 3 5 6 】 ataggtaccg gtaaacc aa gc
 <210> 76 22
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial
 Sequence: Primer
 <400> 76
【 0 3 5 7 】 gttgccgcta ataattcaag acc
 <210> 77 23
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>

<223> Description of Artificial
Sequence: Primer
<400> 77 102
【 0 3 5 8 】 aayacnttyt ayccdggngc naa
<210> 78 23
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial
Sequence: Primer
<400> 78
【 0 3 5 9 】 nacdckdckr tcnggngcna rrca
<210> 79 24
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial
Sequence: Primer
<400> 79
【 0 3 6 0 】 datytcnacd ckdckrtcng g
<210> 80 21
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial
Sequence: Primer
<400> 80
【 0 3 6 1 】 cgctctagag atttttaca aaaaaaggg
<210> 81 30
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial
Sequence: Primer
<400> 81
【 0 3 6 2 】 gmnaayacnt tytaygyngg ngc
<210> 82 23
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial
Sequence: Primer
<400> 82
【 0 3 6 3 】 aayacnttyt aygynggngc naar
<210> 83 24

<211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial
 Sequence: Primer
 <400> 83 103
【 0 3 6 4 】 cargmnaaya cnttytaygy ngg
 <210> 84 23
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial
 Sequence: Primer
 <400> 84
【 0 3 6 5 】 gcncncarg mnaayacntt yta
 <210> 85 23
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial
 Sequence: Primer
 <400> 85
【 0 3 6 6 】 cgcgcnccnc argmnaayac ntt
 <210> 86 23
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial
 Sequence: Primer
 <400> 86
【 0 3 6 7 】 cggtcgactg atttaagtta ctaaacc
 <210> 87 29
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial
 Sequence: Primer
 <400> 87
【 0 3 6 8 】 cggtcgacgg gttactaatt taactttag
 <210> 88 29
 <211> 67
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial
 Sequence: Primer

<400> 88
 gcgtcgacca tatgaacacc accaccacca ccac
 ctctcg tgc**004**caaa caaatactt 60
【 0 3 6 9 】 tytacgc
 <210> ~~679~~
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial
 Sequence: Primer
 <400> 89
【 0 3 7 0 】 atgaaaaatt taacagtttt agcattagca gg
 <210> 90 32
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial
 Sequence: Primer
 <400> 90
【 0 3 7 1 】 atgaaacata gcaaattcaa attatttaa tatt
~~a210~~> 91 38
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial
 Sequence: Primer
 <400> 91
【 0 3 7 2 】 atgaaaaaag cagtattagc ggcagtatta gg
 <210> 92 32
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial
 Sequence: Primer
 <400> 92
【 0 3 7 3 】 atgaaaaaat cattagttgc ttaacagta ttat
~~e210~~> 93 36
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial
 Sequence: Primer
 <400> 93
【 0 3 7 4 】 atgaaaaaat cattagttgc ttagcagta ttat
~~e210~~> 94 36

<211> 13
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial
 Sequence:N-terminal
 consensus sequence of OmpA-related
 proteins from
 Pasteurellaceae

<220>
 <221> SITE
 <222> (4)
 <223> Xaa=Ala or Glu

<220>
 <221> SITE
 <222> (9)
 <223> Xaa=Ala or Val

<400> 94 105

【 0 3 7 5 】 Ala Pro Gln Xaa Asn Thr Phe Tyr Xaa Gly

Ala

<211> 10 5 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial
 Sequence:C-terminal
 consensus sequence of OmpA-related
 proteins from
 Pasteurellaceae

<400> 95

【 0 3 7 6 】 Cys Leu Ala Pro Asp Arg Arg Val Glu Ile

<210> 96

<211> 10 5 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial
 Sequence:protective
 peptide

<400> 96

Met Asn Thr Thr Thr Thr Thr Thr Ser Arg

106

【図面の簡単な説明】

【図 1】これは、APP 血清型 - 5 により攻撃され、そして APP 血清型 - 7 により再攻撃されたブタからの (A) 血清及び (B) 気管支リンパ節 (BLN) 組織外植体上清液に存在する抗体のウェスタンブロットを示す。

【図 2】これは、12種の異なった APP 血清型からの細菌細胞抗原に対するブタからの BLN 組織外植体上清液に存在する抗体の交差反応性のウェスタンブロット分析を示す。

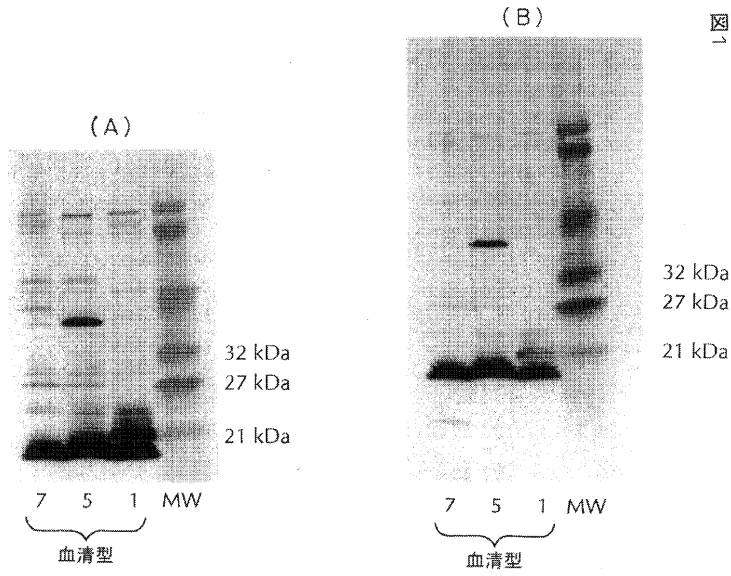
【図 3】これは、低分子量タンパク質に対するブタからの BLN 組織外植体上清液及び細胞ペレット (細胞) に存在する抗体の反応性のウェスタンブロット分析を示す。

【図 4】これは、APP 血清型 - 7 に対するブタからの (A) BLN 組織外植体上清液、及び (B) 血清の反応性の電気泳動によるウェスタンブロット分析を示す。

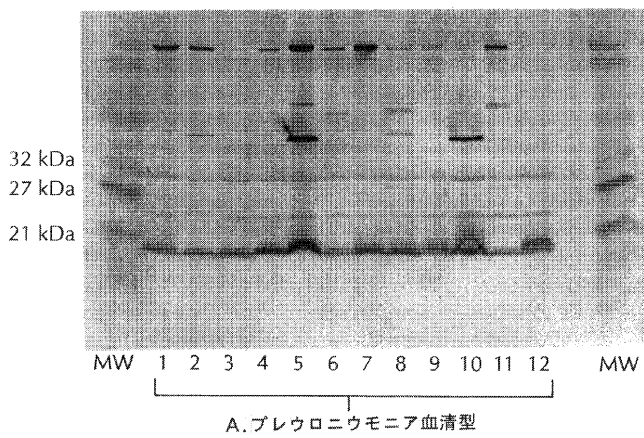
【図 5】これは、APP OmpA1 及び APP OmpA2 タンパク質の推定されるアミノ酸配列の列挙を示す。

【図6】こけは、ビブリオコレラからのOmpWタンパク質及びAPPからのOmpWタンパク質のアミノ酸配列の列挙を*示す。

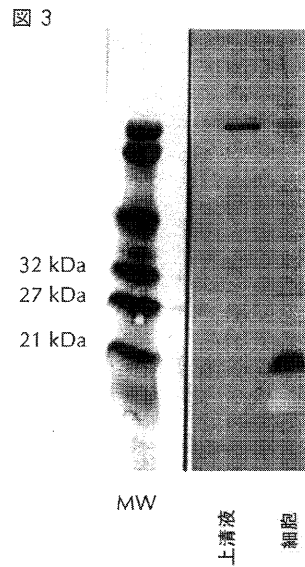
【図1】



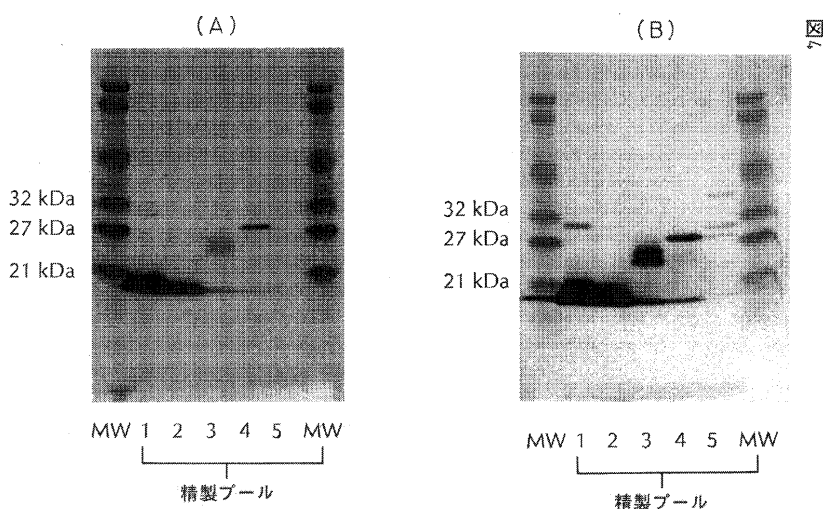
【図2】



【図3】



【図4】



【図5】

☒
5

```

App_OmpA1 MKKSLVALTVLSAAAVAQAAPQONTFYAGAKAGWASFHDGIEQLDS---AKNTDRGTTYG
App_OmpA2 MKKSLVALAVLSAAAVAQAAPQONTFYAGAKVQSSFFHHGVNQLKSGHDDRYNDKTRKYG
*****

App_OmpA1 INRNSVTYGVFGGYQILNQDKLGLAAELGYDYFGRVRGSEKPNGKADKKTFRHAAHGATI
App_OmpA2 INRNSVTYGVFGGYQILNQNNFGLATELGYDYGRVRGND---G--EFRAMKSHAHGLNF
*****

App_OmpA1 ALKPSYEVLPDLVDYGVKGLALVNNYKTF---NAAQEKVTRRFQSSLILGAGVEYAIL
App_OmpA2 ALKPSYEVLPDLVDYGVGVAVVRNDYKSYGAENTNEPTEKFKLKASTILGAGVEYAIL
*****

App_OmpA1 PELAAARVEYQWLNAG---KASYTLNRMGATDYRSDISSVSAGLSYRFGQAV-PVAAP
App_OmpA2 PELAAARVEYQYLNKAGNLNKALVRSQTQDVFQYAPDIHSVTAGLSYRFGQAVPVVEP
*****

App_OmpA1 AVETKNFAFSSDVLFAFGKSNLKPAAATALDAMQTEINNAGLSNAAIQVNGYTDTRIGKEA
App_OmpA2 EVVTKNFAFSSDVLFDGKSSLKPAATALDAANTEIANLGLATPAIQVNGYTDTRIGKEA
*****

App_OmpA1 SNLKLQRRRAETVANYIVSKGAPAAVAVCYGEANPVTGATCDKVKGRKALIACLAPDR
App_OmpA2 SNLKLQRRRAETVANYLVSKGQNPANVAVCYGEANPVTGATCDKVKGRKALIACLAPDR
*****

App_OmpA1 RVEVQVQGTKEVIM
App_OmpA2 RVEVQVQGANVAM
*****

```

【図6】

☒
5

```

VC_OmpW MKQTIICLAVLA-ALLAAPVFAHQEGDFIVRAGIASVVPNDSSDKVLTNQSELAVNANTHL
App_OmpW MKKAVLAAVLGGALLAGSAMAHQAGDVI FRAGAIGVIANSSSDYQTAGDVNLDVNNIQL
**...

VC_OmpW GLTLGYMFTDNISFEVLARTPFESHKISTSGGELGSLGDIGETKHLPTTFMVQYIFGEANS
App_OmpW GLTGTVMLSDNLGLLELLAATPFESHKITGKLG-ATDLGEVAKVKHLPFSLYLQYFFDSNA
**...

VC_OmpW TNRPYVGAGLNYTTFDFESFNSTGTNNALSDLKLDSDWGLAANVGFYMLNDSWFLNAYV
App_OmpW TVRPYVGAGLNYTRFFSAESLKPQLVQNLRVKHSVAP--IANLGVVVKLTDNLSFNAAA
*****

VC_OmpW WYANIETATYKA-GADAKSTDVEINPWVFIAGGYKF
App_OmpW WYTRIKTTADYDVPGLGHVSTPITLDPVVLFSGISYKF
**...

```

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マコード ⁸ (参考)	
C 0 7 K	14/195	C 0 7 K	16/12	4 H 0 4 5
	16/12		19/00	
	19/00	C 1 2 N	1/15	
C 1 2 N	1/15		1/19	
	1/19		1/21	
	1/21	C 1 2 Q	1/68	A
	5/10	C 1 2 N	15/00	Z N A A
C 1 2 Q	1/68		5/00	A
(72)発明者	メアリー ジョー バーシュ アメリカ合衆国, コネチカット 06340, グロトン, イースタン ポイント ロード, ファイザー インコーポレイティド	(72)発明者	リン マリー ウォーレン ステュワート アメリカ合衆国, コネチカット 06340, グロトン, イースタン ポイント ロード, ファイザー インコーポレイティド	
(72)発明者	マニュエル キャンボス アメリカ合衆国, コネチカット 06340, グロトン, イースタン ポイント ロード, ファイザー インコーポレイティド	(72)発明者	ブライアン トーマス スーター アメリカ合衆国, ネブラスカ 68521, リンカーン, ウエスト コーンハスカー ハイウェイ 601, ファイザー インコーポレイティド	
(72)発明者	ロビン リー キーチ アメリカ合衆国, コネチカット 06340, グロトン, イースタン ポイント ロード, ファイザー インコーポレイティド	F タ-ム(参考)	4B024 AA01 AA11 BA31 BA61 CA02 DA06 EA04 GA11 HA01 4B063 QA01 QA18 QA19 QQ02 QQ42 QQ79 QR32 QR48 QR51 QR55 QS33 QS34 4B065 AA01Y AA26X AB01 BA02 CA24 CA26 CA27 CA44 CA46 4C084 AA19 MA02 NA14 ZA592 ZB072 ZB352 4C085 AA03 BA15 BB11 CC05 CC07 DD22 EE01 GG01 4H045 AA10 AA11 AA30 BA10 CA11 DA75 DA86 EA20 EA50 FA74	
(72)発明者	エブレット リー ロージー アメリカ合衆国, コネチカット 06340, グロトン, イースタン ポイント ロード, ファイザー インコーポレイティド			

专利名称(译)	来自Actinobacillus pleuoniomonias的蛋白质		
公开(公告)号	JP2003047489A	公开(公告)日	2003-02-18
申请号	JP2002153105	申请日	2002-05-27
[标]申请(专利权)人(译)	美国辉瑞有限公司		
申请(专利权)人(译)	辉瑞产品公司		
[标]发明人	ロバートジェラードアンケンパウアー メアリージョーパーシュ マニユエルキャンボス ロビンリーキーチ エブレットリーロージー リンマリーウォーレンステュワート ブライアントーマススーター		
发明人	ロバート ジェラード アンケンパウアー メアリー ジョー パーシュ マニユエル キャンボス ロビン リー キーチ エブレット リー ロージー リン マリー ウォーレン ステュワート ブライアントーマス スーター		
IPC分类号	C12N15/09 A61K39/00 A61K39/02 A61K39/395 A61K45/00 A61K48/00 A61P11/00 A61P31/00 A61P31/04 A61P31/10 C07K14/195 C07K14/285 C07K16/12 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/12 C12Q1/68 G01N33/53 G01N33/566 G01N33/569		
CPC分类号	A61K39/00 A61K2039/52 A61P11/00 A61P31/00 A61P31/04 A61P31/10 A61P37/02 C07K14/285 G01N33/56911		
FI分类号	A61K39/02 A61K45/00 A61P11/00 A61P31/10 C07K14/195 C07K16/12 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12Q1/68.A C12N15/00.ZNA.A C12N5/00.A C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12N5/00.101 C12N5/10 G01N33/569.F		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA31 4B024/BA61 4B024/CA02 4B024/DA06 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA01 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ42 4B063/QQ79 4B063/QR32 4B063/QR48 4B063/QR51 4B063/QR55 4B063/QS33 4B063/QS34 4B065/AA01Y 4B065/AA26X 4B065/AB01 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA26 4B065/CA27 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA19 4C084/MA02 4C084/NA14 4C084/ZA592 4C084/ZB072 4C084/ZB352 4C085/AA03 4C085/BA15 4C085/BB11 4C085/CC05 4C085/CC07 4C085/DD22 4C085/EE01 4C085/GG01 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA11 4H045/DA75 4H045/DA86 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74		
优先权	60/105285 1998-10-22 US		
其他公开文献	JP3699421B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种保护猪免受胸膜肺炎放线杆菌（APP）侵害的蛋白质，该菌是猪肺中的重要病原体之一。解决方案：一种新颖的抗原蛋白，具有从APP分离的五个新颖的低分子量蛋白（“Omp20”，“OmpW”，“Omp27”，“OmpA1”和“OmpA2”）并对其进行编码 DNA分子，一种针对APP的疫苗，包含所述蛋白质。

ペプチド (配列番号)	およそ の分子量 (kDa)	タンパク 質の名称	配列 ¹ (NH ₂ ~ COOH)
Pep-1 (11)	19-20	Omp20	Ala-Pro-Val-Gly-Asn-Thr-Phe-Thr-Gly-Val-(Lys)- Val-(Tyr)-Val-Asp-Leu-Thr-Xaa-Val-Ala
Pep-2 (12)	23	OmpW	His-Gln-Ala-Gly-Asp-Val-Ile-Phe-Arg-Ala-Gly-Ala- Ile-Gly-Val-Ile-Ala-Asn-Ser-Ser-Ser-Asp-Tyr-(Gln)- Thr-(Gln)-Ala-Asp-Val-(Asn/Val)-Leu-Asp-Val-Asn- Asn
Pep-3 (13)	27	Omp27	Ala-Glu-Ile-Gly-Leu-Gly-(Gly)-Ala-Arg-Glu-(Ser)- (Ser)-Ile-Tyr-Tyr-(Ser)-Lys-His-Lys-Val-Ala-Thr- Asn-Pro-Phe-Leu-Ala-Leu-Asp-Leu
Pep-4 (14)	29	OmpA	Ala-(Asp/Glu)-Pro-Glu-Asn-Thr-Phe-Tyr-Pro-Gly- Ala-Lys-Val-Xaa-Xaa-(Ser)-Xaa-(Phe)-(His)