

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2018-86029

(P2018-86029A)

(43) 公開日 平成30年6月7日(2018.6.7)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	2 G 0 4 5
C 1 2 Q 1/68 (2018.01)	C 1 2 Q 1/68 Z N A Z	4 B 0 6 3
C 0 7 K 7/06 (2006.01)	C 0 7 K 7/06	4 B 0 6 4
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 B 0 6 5
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 C 0 7 6

審査請求 有 請求項の数 1 O L 外国語出願 (全 136 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2018-38392 (P2018-38392)
 (22) 出願日 平成30年3月5日 (2018.3.5)
 (62) 分割の表示 特願2013-502700 (P2013-502700) の分割
 原出願日 平成23年3月28日 (2011.3.28)
 (31) 優先権主張番号 61/454,972
 (32) 優先日 平成23年3月21日 (2011.3.21)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 61/397,891
 (32) 優先日 平成22年6月16日 (2010.6.16)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 61/347,362
 (32) 優先日 平成22年5月21日 (2010.5.21)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 510090748
 ユニバーシティー オブ サザン カリフォルニア
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 90015, ロサンゼルス, サウス オリーブ ストリート 1150, スイート 2300, ユーエスシー スティーブンス インスティテュート フォー イノベーション

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 バイオフィルムの除去のための組成物および方法

(57) 【要約】

【課題】 バイオフィルムの除去のための組成物および方法の提供。

【解決手段】 本発明は、慢性 / 再発バイオフィルム疾患に罹患している個体に対するワクチン、または既存の感染症を有する個体に対する治療薬として有用な、単離されたかまたは組換え型のポリペプチドを提供する。これによって、個体の免疫系は、機能的な保護性のバイオフィルムの構築およびまたは維持に干渉することによってこれらの細菌を予防するかまたは宿主から取り除く抗体を自然に生成する。あるいは、ポリペプチドに対する抗体を、感染症を処置または予防するために投与することができる。機能性バイオフィルムを形成することができない細菌は、宿主の免疫系の残りの部分によってより容易に取り除かれる。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

図面に記載された発明。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願への相互参照

この出願は、2010年3月29日に提出された米国仮出願番号61/318,743、2010年5月21日に提出された米国仮出願番号61/347,362、2010年6月16日に提出された米国仮出願番号61/397,891、および2011年3月21日に提出された米国仮出願番号61/454,972の米国特許法119条(e)項の下での利益を主張し、上記の米国仮出願の各内容は、その全容が参考として本開示に援用される。

10

【0002】

政府支援についての陳述

本発明は、国立衛生研究所の国立歯科・頭蓋顔面研究所(NIDCR)によって与えられたContract No. 5R01DE013230のもとで政府支援によってなされた。政府は本発明において一定の権利を有する。

【0003】

発明の分野

本発明は、一般には、臨床的または工業的な細菌バイオフィルムを減らし、かつ/または除くための方法および組成物に関する。

20

【背景技術】

【0004】

全ての慢性/再発疾患の約3分の2は、哺乳動物の体内のバイオフィルム中で存続する細菌によって引き起こされる。これらのバイオフィルムは、多くの場合主にDNAで構成される外側の「粘液」によって保護された細菌で構成され、自然免疫系および適応免疫系、抗生物質および他の抗菌剤が細菌の内側のバイオフィルムに近づくことを妨げ、体から感染を取り除くことを非常に難しくしている。さらに、バイオフィルムは、多くの場合致命的な結果を伴う将来の急性感染の貯蔵器としての機能を果たし得る。

30

【0005】

公知の真正細菌全てにおいてタンパク質のDNABIIファミリーからの少なくとも1つのタンパク質が見いだされ、細菌細胞の外側に天然に見いだされる。これらにより、強力な自然免疫応答が引き出されるが、宿主被験体は感染の結果として、ファミリーメンバーに対する特異的な抗体を天然に生じることができない。細菌バイオフィルムに伴う主要な問題は、宿主免疫系および/または抗生物質および他の抗菌薬が、バイオフィルム内に保護された細菌に近づくことができないことである。

【0006】

バイオフィルムは、工業の場にも存在する。例えば、バイオフィルムは、生産現場からガソリンスタンドの貯蔵タンクまでの広範囲の石油の加工問題に関係づけられる。現場では、硫酸還元性バイオフィルム細菌が硫化水素を産生する(酸油(soured oil))。加工パイプラインでは、バイオフィルム活性により粘液が発生し、それがフィルターおよび開口部の邪魔になる。バイオフィルムおよびバイオフィルム生物は、パイプラインおよび石油加工装置の腐食も引き起こす。これらの問題は、油またはガスの生産設備全体を通して、汚損および腐食性のバイオフィルム生物が貯蔵タンクの最終製品の表面に見いだされるまで顕在化し得る。

40

【0007】

家庭では、バイオフィルムは、微生物の成長を支持する任意の表面の中またはその上、例えば、排水管の中、調理台の上、トイレの中、およびスイミングプールおよびスパの中に見いだされる。

50

【0008】

バイオフィームは、家庭用と工業用の両方の広範囲の水の加工に関係づけられる。バイオフィームは、加工装置の表面上で成長し、熱伝達の効率低下、またはフィルターおよび膜を塞ぐなど、装置の性能を害する可能性がある。冷却塔充填材上で成長しているバイオフィームにより、充填材の崩壊を引き起こすのに十分な重量が加わる可能性がある。バイオフィームは、高度に特殊化されたステンレス鋼でさえも腐食させる。水の加工におけるバイオフィームにより、例えば、紙加工におけるバイオフィームの汚染、またはシリコンチップ上への単一の細胞の付着でさえ、最終製品の価値を下げる可能性がある。飲料水の配水システムにおいて成長しているバイオフィームは、水の美的品質を劣化させる潜在的な病原生物、腐食性の生物体または細菌を有し得る。

10

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

したがって、バイオフィームの保護性の関門を突き破って、関連する細菌感染症を処置し、または消滅させ、水システムの表面および内部からバイオフィームを取り除く必要がある。本発明は、この必要性を満たし、関連する利点も提供する。

【課題を解決するための手段】

【0010】

配列表

配列番号1

A 1 - A 2 - A 3 - A 4 - A 5 - A 6 - A 7 - A 8 - A 9

ここで、A 1はVまたはIであり；A 2は、K、Q、E、A、VまたはYのうちの任意の1つであり；A 3はK、L、I、VまたはFのうちの任意の1つであり；A 4はS、I、RまたはVのうちの任意の1つであり；A 5はGまたはSのうちの任意の1つであり；A 6はFであり；A 7はGであり；A 8はNまたはSまたはTまたはKのうちの任意の1つであり；A 9はFである。

20

【0011】

配列番号2は、V K K S G F G N Fである。

【0012】

配列番号3は、B 1 - B 2 - B 3 - B 4 - B 5 - B 5 - B 6 - B 7であり、
B 1は存在しない、またはGまたはKのうちの任意の1つであり；B 2は存在しない、またはR、IまたはKのうちの任意の1つであり；B 3はNまたはVであり；B 4はPまたはIであり；B 5は、K、Q、SまたはGのうちの任意の1つであり；B 6は、T、KまたはSのうちの任意の1つであり；B 7は、G、K、QまたはDのうちの任意の1つである。

30

【0013】

配列番号4はNP (K / Q) TGである。

【0014】

配列番号5 GRNP (K / Q) TG

配列番号6 全長の野生型 (wt) 86 - 028NP Haemophilus influenzae IHfA ; Genbank 受託番号 : AAX88425.1、2011年3月21日に最終アクセス :

40

【0015】

【化1】

MATITKLDIHEYLSDKYHLSK

QDTKNVVENFLEEIRLSLESGQDVKLSGFGNFELRDKSSRPGRNPKTGDVVPVSARR

VVTFKPGQKLRARVEKTK

配列番号7 全長のwt 86 - 028NP Haemophilus influenzae HU、Genbank 受託番号 : YP__248142.1、2011年3月2

50

1日に最終アクセス：

【0016】

【化2】

MRFVTIFINHAFNSSQVRLSFAQFLR

QIRKDTFKESNFLFNRRYKFMNKTDLIDAIANAELNKKQAKAALEATLDAITASLK

EGEPVQLIGFGTFKVNARAARTGRNPQTGAIEIQIAASKVPAFVSGKALKDAIK

配列番号8 全長のwt R2846 Haemophilus influenzae I h f A、Genbank受託番号：ADO96375、2011年3月21日に最終アクセス：

【0017】

【化3】

MATITKLDIIEYLSDKYHLSKQDTKNVVENFL

EEIRLSLESGQDVKLSGFGNFELRDKSSRPGRNPKTGDVVPVSARRVVTFKPGQKLR

ARVEKTK

配列番号9 全長のwt Rd Haemophilus influenzae I h f A、Genbank受託番号：AAC22959.1、2011年3月21日に最終アクセス：

【0018】

【化4】

MATITKLDIIEYLSDKYHLSKQDTK

NVVENFLEEIRLSLESGQDVKLSGFGNFELRDKSSRPGRNPKTGDVVPVSARRVVTF

KPGQKLRARVEKTK;

配列番号10 全長のwt E.coli K12 I h f A; Genbank受託番号：AAC74782.1、2011年3月21日に最終アクセス：

【0019】

【化5】

MALTKAEMSEYLFDKLGLSKRDAKELVELFFE

EIRRALENGEQVKLSGFGNFDLRDKNQRPGRNPKTGEDIPITARRVVT

FRPGQKLKSRVENASPKDE; DNA Genbank No. NC_000913

配列番号11 全長のwt P.aeruginosa PA 01 I h f A; Genbank受託番号：AAG06126.1、2011年3月21日に最終アクセス：

【0020】

【化6】

MGALTKAEIAERLYEELGLNKREA

KELVELFFEEIRQALEHNEQVKLSGFGNFDLRDKRQRPGRNPKTGEEIPITARRVVT

RPGQKLRARVEAYAGTKS

配列番号12および13：(IHF)の-3部分および-3部分、配列番号12：TFRPGQおよび配列番号13：KLSRVENASPKDE

配列番号14および15：(IHF)の-3部分および-3部分、配列番号14：HFKPGKおよび配列番号15：ELRDRANIYG

配列番号16および17：配列番号6の-3部分および-3部分、配列番号16：TFKPGQおよび配列番号17：KLRARVEKTK

配列番号18および19：2019 Haemophilus influenzae I h f Aの-3部分および-3部分、配列番号18：TFKPGQおよび配列番号

10

20

30

40

50

19 : K L R A R V E N T K

配列番号20および21 : 配列番号8の - 3部分および - 3部分、配列番号20 :

T F K P G Q および配列番号21 : K L R A R V E K T K

配列番号22および23 : 配列番号9の - 3部分および - 3部分、配列番号22 :

T F K P G Q および配列番号23 : K L R A R V E K T K

配列番号24および25 : 配列番号10の - 3部分および - 3部分、配列番号24 :

T F R P G Q および配列番号25 : K L K S R V E N A S P K D E

配列番号26および27 : 配列番号11の - 3部分および - 3部分、配列番号26 :

T F R P G Q および配列番号27 : K L K A R V E A Y A G T K S

配列番号28 : E . c o l i h u p A、Genbank 受託番号 : A P _ 0 0 3 8 1

8、2011年3月21日に最終アクセス :

【0021】

【化7】

MNKTQLIDVIAEKAELSKTQAKAALESTLAAITESLKEGDAVQLVGFQTFK

VNHRAERTGRNPQTGKEIKIAAANVPAFVSGKALKDAVK

配列番号29 : E . c o l i h u p B、Genbank 受託番号 : A P _ 0 0 1 0 9

0 . 1、2011年3月21日に最終アクセス :

【0022】

【化8】

MNKSQIDKIAAGADISKAAAGRALDAIIASVTESLKEGDDVALVGFQ

TFAVKERAARTGRNPQTGKEITIAAAKVPSFRAGKALKDAVN

配列番号30および31 : 配列番号28の - 3部分および - 3部分、配列番号30 :

A F V S G K および配列番号31 : A L K D A V K

配列番号32および33 : 配列番号29の - 3部分および - 3部分、配列番号32 :

S F R A G K および配列番号33 : A L K D A V N

配列番号34 : I H F のC末端の20アミノ酸 : T F R P G Q K L K S R V E N A

S P K D E

配列番号35 : I H F のC末端の20アミノ酸 : K Y V P H F K P G K E L R D R

A N I Y G

配列番号36 : D N A B I I 結合性コンセンサス配列 : W A T C A A N N N N T T R、

WはAまたはTであり、Nは任意の塩基であり、Rはプリンである

配列番号337 : E . c o l i I H F アルファ : G R N P K T G E D I P I

配列番号338 : E . c o l i I H F ベータ : G R N P K T G D K V E L

配列番号339 : E . c o l i H U アルファ : G R N P Q T G K E I K I

配列番号340 : E . c o l i H U ベータ : G R N P Q T G K E I T I。

【0023】

表の説明

表1~5は、示された生物体におけるバイオフィルムの逆転の *in vitro* バイオ
アッセイの結果である。

【0024】

表6は、中耳炎(OM)のチンチラモデルにおける、中耳内のバイオマスの相対量のス
コアリングスキームである。

【0025】

表7は、DNアーゼを用いて処理した際のバイオフィルムの逆転の *in vitro* バ
イオアッセイの結果である。

【0026】

表8は、本明細書において提供される方法において使用することができる、グラム(+)
細菌およびグラム(-)細菌によって産生されるDNA結合性タンパク質の非限定的な

10

20

30

40

50

要約である。

【 0 0 2 7 】

表 9 A は、本発明の種々の実施形態の DNA 結合性タンパク質の関連する部分の配列アラインメントである。太字は、コンセンサスとの正確な一致を示し、薄い灰色の文字は、保存されたアミノ酸の変化を示し、薄い影付きまたは濃い影付きの配列は、種間にわたって高度に保存されている。アミノ末端および/またはカルボキシ末端における灰色の影付きの未定義の配列は、コンセンサス配列と共有されない未定義のアミノ酸である。表 9 A は、Obetoら(1994年) *Biochimie* 76巻:901~908頁において以前公開された情報に基づく。表 9 B は、16アミノ酸ペプチドモチーフの、Liura(2008年) *Cell Microbiol.* 10巻(1号):262~276頁に

10

【 0 0 2 8 】

表 1 0 は、示された生物体由来の DNA B I I タンパク質の 部分、 部分、および C 末端部分の一覧表である。

特定の実施形態では、例えば以下が提供される：

(項目 1)

DNA B I I ポリペプチドまたは DNA B I I タンパク質の微生物 DNA への結合を阻害するための、該結合と競合するための、または該結合の力価を決定するための方法であって、該 DNA B I I ポリペプチドもしくは該 DNA B I I タンパク質または該微生物 DNA を干渉作用剤と接触させて、該 DNA B I I タンパク質または該 DNA B I I ポリペ

20

(項目 2)

微生物バイオフィルムを阻害、予防または破壊するための方法であって、該バイオフィルムを干渉作用剤と接触させて、該微生物バイオフィルムを阻害、予防または破壊する工程を含む、方法。

(項目 3)

前記接触が *in vitro* または *in vivo* での接触である、項目 1 または 2 に記載の方法。

(項目 4)

被験体におけるバイオフィルムを阻害、予防または破壊する方法であって、該被験体に有効量の干渉作用剤を投与して、該微生物バイオフィルムを阻害、予防または破壊する工程を含む、方法。

30

(項目 5)

被験体においてバイオフィルムを生じる微生物感染症を阻害、予防または処置するための方法であって、該被験体に有効量の干渉作用剤を投与して、該被験体において該バイオフィルムを生じる微生物感染症を阻害、予防または処置する工程を含む、方法。

(項目 6)

前記干渉作用剤が、

(a) 単離されたかもしくは組換え型の組込み宿主因子 (I H F) ポリペプチド、またはそのそれぞれの断片もしくは等価物、

(b) *E. coli* の U 9 3 株由来の単離されたかもしくは組換え型のヒストン様タンパク質 (H U) ポリペプチド、またはそのそれぞれの断片もしくは等価物、

(c) 表 8、表 9 A、9 B、表 1 0 において同定される単離されたかもしくは組換え型のタンパク質もしくはポリペプチド、または図 6 において同定される DNA 結合性ペプチド、またはそのそれぞれの断片もしくは等価物、

(d) 配列番号 1 ~ 3 4 0 の単離されたかもしくは組換え型のポリペプチド、またはそのそれぞれの断片もしくは等価物、

(e) 配列番号 6 ~ 1 1、2 8、2 9、4 2 ~ 1 0 0、表 8 の単離されたかもしくは組換え型の C 末端のポリペプチド、または表 1 0 において同定される単離されたかもしくはは

40

50

組換え型の C 末端のポリペプチド、またはそのそれぞれの断片もしくは等価物、

(f) 微生物 DNA への結合について、組込み宿主因子と競合するポリペプチドまたはポリヌクレオチド、

(g) ホリデイジャンクションと似ている 4 方向ジャンクションポリヌクレオチド、複製フォークと似ている 3 方向ジャンクションポリヌクレオチド、固有の柔軟性を有するポリヌクレオチド、または屈曲したポリヌクレオチド、

(h) (a) ~ (f) のうちの任意の 1 つをコードする単離されたかもしくは組換え型のポリヌクレオチド、または配列番号 36 の単離されたかもしくは組換え型のポリヌクレオチド、またはそのそれぞれの等価物、またはストリンジェントな条件下で該ポリヌクレオチド、その等価物もしくはその相補物とハイブリダイズするポリヌクレオチド、

(i) (a) ~ (f) のうちの任意の 1 つを特異的に認識するかもしくは特異的に結合する抗体もしくは抗原結合性断片、または各抗体もしくはその抗原結合性断片の等価物もしくは断片、

(j) (i) の抗体もしくは抗原結合性断片をコードする単離されたかもしくは組換え型のポリヌクレオチド、またはその相補物、あるいは

(k) DNA B I I タンパク質もしくは DNA B I I ポリペプチドの微生物 DNA への結合と競合する小分子

の群の干渉作用剤である、項目 1 から 5 までのいずれか一項に記載の方法。

(項目 7)

前記干渉作用剤が、単離されたかもしくは組換え型の DNA B I I ポリペプチド、またはそのそれぞれの断片もしくは等価物である、項目 1 から 6 までのいずれか一項に記載の方法。

(項目 8)

前記 DNA B I I ポリペプチドが、I H F ポリペプチドもしくはその断片、I H F ポリペプチドの C 末端断片、またはそのそれぞれの等価物である、項目 7 に記載の方法。

(項目 9)

前記 DNA B I I ポリペプチドが、H U ポリペプチドもしくはその断片、H U ポリペプチドの C 末端断片、またはそのそれぞれの等価物である、項目 7 に記載の方法。

(項目 10)

前記被験体に、抗菌薬、DNアーゼ、抗体、抗原性ペプチドまたはアジュバントのうちの 1 つまたは複数を有効量で投与する工程をさらに含む、項目 4 から 9 までのいずれか一項に記載の方法。

(項目 11)

前記被験体が非ヒト動物またはヒト患者である、項目 4 から 10 までのいずれか一項に記載の方法。

(項目 12)

前記微生物 DNA が、表 8 において同定される微生物由来である、項目 1 から 11 までのいずれか一項に記載の方法。

(項目 13)

前記作用剤が、局所的投与、経真皮的投与、経皮的投与、舌下投与、直腸投与、膣投与、眼投与、皮下投与、筋肉内投与、腹腔内投与、尿道投与、鼻腔内投与、吸入投与または経口的投与を含む方法によって投与される、項目 4 から 12 までのいずれか一項に記載の方法。

(項目 14)

前記被験体が小児患者であり、前記作用剤が該小児患者のための処方物において投与される、項目 4 から 12 までのいずれか一項に記載の方法。

(項目 15)

免疫応答を必要とする被験体において免疫応答を誘導するか、または受動免疫を必要とする被験体に受動免疫を付与するための方法であって、該被験体に、

(a) 単離されたかもしくは組換え型の組込み宿主因子 (I H F) ポリペプチド、また

10

20

30

40

50

はそのそれぞれの断片もしくは等価物、

(b) E . c o l i の U 9 3 株由来の単離されたかもしくは組換え型のヒストン様タンパク質 (H U) ポリペプチド、またはそのそれぞれの断片もしくは等価物、

(c) 表 8、表 9 A、表 9 B、表 1 0 において同定される単離されたかもしくは組換え型のタンパク質ポリペプチド、または図 6 において同定される D N A 結合性ペプチド、またはそのそれぞれの断片もしくは等価物、

(d) 配列番号 1 ~ 3 4 0 の単離されたかもしくは組換え型のポリペプチド、またはその断片もしくは等価物、

(e) 配列番号 6 ~ 1 1、2 8、2 9、4 2 ~ 1 0 0、表 8 の単離されたかもしくは組換え型の C 末端のポリペプチド、または表 1 0 において同定される単離されたかもしくは組換え型の C 末端のポリペプチド、またはそのそれぞれの断片もしくは等価物、

(f) (a) ~ (e) のうちの任意の 1 つをコードする単離されたかもしくは組換え型のポリヌクレオチド、または配列番号 3 6 の単離されたかもしくは組換え型のポリヌクレオチド、またはそのそれぞれの等価物、またはストリンジェントな条件下で該ポリヌクレオチド、その等価物もしくはその相補物とハイブリダイズするポリヌクレオチド、

(g) (a) ~ (e) のうちの任意の 1 つを特異的に認識するかもしくは特異的に結合する抗体もしくは抗原結合性断片、またはそのそれぞれの等価物もしくは断片、

(h) (g) の抗体または抗原結合性断片をコードする、単離されたかまたは組換え型のポリヌクレオチド

(i) (a) ~ (e) のうちの任意の 1 つでパルスした抗原提示細胞、および

(i) (a) ~ (e) のうちの任意の 1 つをコードする 1 種または複数種のポリヌクレオチドがトランスフェクトされた抗原提示細胞の群のうちの 1 つまたは複数の作用剤を有効量で投与する工程を含む、方法。

(項目 1 6)

前記作用剤が、単離されたかもしくは組換え型の D N A B I I ポリペプチド、またはその断片もしくは等価物を含む、項目 1 5 に記載の方法。

(項目 1 7)

前記 D N A B I I ポリペプチドが、I H F ポリペプチドもしくはその断片、I H F ポリペプチドの C 末端断片、またはそのそれぞれの等価物である、項目 1 6 に記載の方法。

(項目 1 8)

前記 D N A B I I ポリペプチドが、H U ポリペプチドもしくはその断片、H U ポリペプチドの C 末端断片、またはそのそれぞれの等価物である、項目 1 6 に記載の方法。

(項目 1 9)

前記被験体に、抗菌薬、D N アーゼ、抗体、抗原性ペプチドまたはアジュバントのうちの 1 つまたは複数を実効量で投与する工程をさらに含む、項目 1 5 から 1 8 までのいずれか一項に記載の方法。

(項目 2 0)

前記被験体が非ヒト動物またはヒト患者である、項目 1 5 から 1 9 までのいずれか一項に記載の方法。

(項目 2 1)

前記単離されたかまたは組換え型のポリヌクレオチドが、表 8 において同定される微生物に由来する、項目 1 5 から 2 0 までのいずれか一項に記載の方法。

(項目 2 2)

前記作用剤が、局所的投与、経真皮的投与、経皮的投与、舌下投与、直腸投与、膣投与、眼投与、皮下投与、筋肉内投与、腹腔内投与、尿道投与、鼻腔内投与、吸入投与または経口的投与を含む方法によって投与される、項目 1 5 から 2 1 までのいずれか一項に記載の方法。

(項目 2 3)

前記被験体が小児患者であり、前記作用剤が該小児患者のための処方物において投与される、項目 1 5 から 2 2 までのいずれか一項に記載の方法。

10

20

30

40

50

(項目24)

配列番号1~5もしくは12~27、30~35、101~340から選択されるアミノ酸配列から本質的になる単離されたかもしくは組換え型のポリペプチド、または図6において同定されるDNA結合性ペプチド、またはそのそれぞれの断片もしくは等価物。

(項目25)

配列番号1または2を含む単離されたかまたは組換え型のポリペプチドであって、配列番号6~11、28、29、または42~100のいずれでもない、ポリペプチド。

(項目26)

配列番号3、4、または5を含む単離されたかまたは組換え型のポリペプチドであって、配列番号6~11、28、29、または42~100のいずれでもない、ポリペプチド

10

(項目27)

配列番号12、14、16、18、20、22、24、26、30、または32を含む単離されたかまたは組換え型のポリペプチドであって、配列番号6~11、28、29、または42~100のいずれでもない、ポリペプチド。

(項目28)

配列番号13、15、17、19、21、23、25、27、31、または33を含む単離されたかまたは組換え型のポリペプチドであって、配列番号6~11、28、29、または42~100のいずれでもない、ポリペプチド。

(項目29)

配列番号12および13を含むポリペプチド、
配列番号14および15を含むポリペプチド、
配列番号16および17を含むポリペプチド、
配列番号18および19を含むポリペプチド、
配列番号20および21を含むポリペプチド、
配列番号23および24を含むポリペプチド、
配列番号25および26を含むポリペプチド、
配列番号30および31を含むポリペプチド、
配列番号32および33を含むポリペプチド、
配列番号34および35を含むポリペプチド、
配列番号337および338を含むポリペプチド、または
配列番号339および340を含むポリペプチド

20

30

の群の単離されたかまたは組換え型のポリペプチドであって、IHFアルファ、IHFベータのうちの任意の1つの野生型、または配列番号6~11、28、29、もしくは42~100のいずれでもない、ポリペプチド。

(項目30)

配列番号12および13から本質的になるポリペプチド、
配列番号14および15から本質的になるポリペプチド、
配列番号16および17から本質的になるポリペプチド、
配列番号18および19から本質的になるポリペプチド、
配列番号20および21から本質的になるポリペプチド、
配列番号23および24から本質的になるポリペプチド、
配列番号25および26から本質的になるポリペプチド、
配列番号30および31から本質的になるポリペプチド、
配列番号32および33から本質的になるポリペプチド、
配列番号34および35から本質的になるポリペプチド、
配列番号337および338から本質的になるポリペプチド、または
配列番号339および340から本質的になるポリペプチド

40

の群の単離されたかまたは組換え型のポリペプチドであって、IHFアルファ、IHFベータのうちの任意の1つの野生型、または配列番号6~11、

50

28、29、もしくは42～100のいずれでもない、ポリペプチド。

(項目31)

項目24から30までのいずれか一項に記載の単離されたかまたは組換え型のポリペプチドの断片または等価物。

(項目32)

項目22から31までのいずれか一項に記載の単離されたかまたは組換え型のポリペプチドの2つ以上を含む、単離されたかまたは組換え型のポリペプチド。

(項目33)

項目24から32までのいずれかに記載のポリペプチドをコードする単離されたかもしくは組換え型のポリヌクレオチド、またはその相補物。

10

(項目34)

項目33に記載の単離されたかまたは組換え型のポリヌクレオチドを含むベクター。

(項目35)

項目24から32までのいずれか一項に記載の単離されたかもしくは組換え型のポリペプチド、項目33に記載の単離されたかもしくは組換え型のポリヌクレオチド、または項目34に記載のベクターを含む、単離された宿主細胞。

(項目36)

項目24から32までのいずれか一項に記載の単離されたかまたは組換え型のポリペプチドを含む、単離された抗原提示細胞であって、該ポリペプチドが該細胞の表面上に存在する、抗原提示細胞。

20

(項目37)

樹状細胞である、項目36に記載の単離された抗原提示細胞。

(項目38)

項目24から32までのいずれか一項に記載の単離されたかもしくは組換え型のポリペプチドを特異的に認識するかもしくは特異的に結合する抗体もしくは抗原結合性断片、または該抗体もしくは該抗原結合性断片をコードする、単離されたかもしくは組換え型のポリヌクレオチド。

(項目39)

ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、抗体誘導体、ペニシリン化抗体、二機能性抗体、抗体誘導体、組換えヒト抗体、キメラ抗体、または抗体断片の群より選択される、項目34に記載の抗体。

30

(項目40)

モノクローナル抗体である、項目39に記載の抗体。

(項目41)

項目40に記載の抗体を産生するハイブリドーマ細胞株。

(項目42)

キャリアと、

(a)項目24から32までのいずれか一項に記載の単離されたかもしくは組換え型のポリペプチド、

(b)項目33に記載の単離されたかもしくは組換え型のポリヌクレオチド、

40

(c)項目34に記載のベクター、

(d)項目35から37までのいずれか一項に記載の単離された宿主細胞、または

(e)項目38から40までのいずれか一項に記載の抗体

のうちの1つまたは複数と

を含む、組成物。

(項目43)

アジュバント、抗原性ペプチドまたは抗菌薬のうちの1つまたは複数をさらに含む、項目42に記載の組成物。

(項目44)

前記キャリアが、液体キャリア、薬学的に許容されるキャリア、固相キャリア、薬学的

50

に許容されるポリマー、リポソーム、ミセル、インプラント、ステント、ペースト、ゲル、歯科インプラントまたは医療用インプラントの群より選択される、項目 4 2 または 4 3 に記載の組成物。

(項目 4 5)

ヒト患者または非ヒト動物に投与するために処方されたものである、項目 4 2 から 4 4 までのいずれか一項に記載の組成物。

(項目 4 6)

局所的投与、経真皮的投与、経皮的投与、舌下投与、直腸投与、膣投与、眼投与、皮下投与、筋肉内投与、腹腔内投与、尿道投与、鼻腔内投与、吸入投与または経口的投与を含む 1 種または複数種の方法によって投与するために処方されたものである、項目 4 2 から 4 4 までのいずれか一項に記載の組成物。

10

(項目 4 7)

小児患者のために処方されたものである、項目 4 2 から 4 6 までのいずれか一項に記載の組成物。

(項目 4 8)

(a) 項目 2 4 から 3 2 までのいずれか一項に記載の単離されたかもしくは組換え型のポリペプチド、

(b) 項目 3 3 に記載の単離されたかもしくは組換え型のポリヌクレオチド、

(c) 項目 3 4 に記載のベクター、

(d) 項目 3 5 から 3 7 までのいずれか一項に記載の単離された宿主細胞、

20

(e) 項目 3 8 から 4 0 までのいずれか一項に記載の抗体、

(f) 項目 4 2 に記載の組成物、

(g) 単離されたかもしくは組換え型の組込み宿主因子 (IHF) ポリペプチド、またはそのそれぞれの断片もしくは等価物、

(h) E. coli の U93 株由来の単離されたかもしくは組換え型のヒストン様タンパク質 (HU) ポリペプチド、またはそのそれぞれの断片もしくは等価物、

(i) 表 8、表 9 A、表 9 B、表 10 において同定される単離されたかもしくは組換え型のタンパク質ポリペプチド、図 6 において同定される DNA 結合性ペプチド、またはそのそれぞれの断片もしくは等価物、

(j) 配列番号 1 ~ 340 の単離されたかもしくは組換え型のポリペプチド、またはそのそれぞれの断片もしくは等価物、

30

(k) 配列番号 6 ~ 11、28、29、42 ~ 100、表 8 の単離されたかもしくは組換え型の C 末端のポリペプチド、または表 10 において同定される単離されたかもしくは組換え型の C 末端のポリペプチド、またはそのそれぞれの断片もしくは等価物、

(l) 微生物 DNA への結合について組込み宿主因子と競合するポリペプチド、

(m) ホリデイジャンクションと似ている 4 方向ジャンクションポリヌクレオチド、複製フォークと似ている 3 方向ジャンクションポリヌクレオチド、固有の柔軟性を有するポリヌクレオチド、または屈曲したポリヌクレオチド、

(n) (g) ~ (l) のうちの任意の 1 つをコードする、単離されたかまたは組換え型のポリヌクレオチド、

40

(o) (g) ~ (l) のうちの任意の 1 つを特異的に認識するかもしくは特異的に結合する抗体もしくは抗原結合性断片、またはその等価物もしくは断片、

(p) (o) の抗体または抗原結合性断片をコードする、単離されたかまたは組換え型のポリヌクレオチド、および

(q) DNA B I I タンパク質または DNA B I I ポリペプチドの微生物 DNA への結合と競合する小分子

の群のうちの任意の 1 つまたは複数の作用剤と、

使用説明書と

を含む、キット。

(項目 4 9)

50

アジュバント、抗原性ペプチド、DNAアーゼ、抗体、または抗菌薬のうちの1つまたは複数を含み、項目48に記載のキット。

(項目50)

液体キャリア、薬学的に許容されるキャリア、固相キャリア、薬学的に許容されるポリマー、リポソーム、ミセル、インプラント、ステント、ペースト、ゲル、歯科インプラント、または医療用インプラントの群より選択されるキャリアをさらに含む、項目48または49に記載のキット。

(項目51)

DNA B I I タンパク質またはDNA B I I ポリペプチドおよび微生物DNAを含有する試料において、DNA B I I タンパク質またはDNA B I I ポリペプチドの微生物DNAへの結合を調節する作用剤を同定する方法であって、候補作用剤を該試料と接触させる工程、および該タンパク質または該ポリペプチドの該DNAへの結合についてアッセイする工程を含む、方法。

10

(項目52)

前記作用剤が、前記DNA B I I タンパク質または前記DNA B I I ポリペプチドの前記微生物DNAへの結合を阻害すること、該結合を予防すること、または該結合の力価を決定することによって該結合を調節する、項目51に記載の方法。

(項目53)

(a) 項目24から32までのいずれか一項に記載の単離されたかまたは組換え型のポリペプチド、

20

(b) 項目33に記載の単離されたかまたは組換え型のポリヌクレオチド、

(c) 項目34に記載のベクター、

(d) 項目35から37までのいずれか一項に記載の単離された宿主細胞、

(e) 項目38から40までのいずれか一項に記載の抗体、

(f) 項目42に記載の組成物、

(g) 単離されたかもしくは組換え型の組込み宿主因子(IHF)ポリペプチド、またはそのそれぞれの断片もしくは等価物、

(h) E. coliのU93株由来の単離されたかもしくは組換え型のヒストン様タンパク質(HU)ポリペプチド、またはそのそれぞれの断片もしくは等価物、

(i) 表8、表9A、表9B、表10において同定される単離されたかもしくは組換え型のタンパク質ポリペプチド、図6において同定されるDNA結合性ペプチド、またはそのそれぞれの断片もしくは等価物、

30

(j) 配列番号1~340の単離されたかもしくは組換え型のポリペプチド、またはそのそれぞれの断片もしくは等価物、

(k) 配列番号6~11、28、29、42~100、表8の単離されたかもしくは組換え型のC末端のポリペプチド、または表10において同定される単離されたかもしくは組換え型のC末端のポリペプチド、またはそのそれぞれの断片もしくは等価物、

(l) 微生物DNAへの結合について組込み宿主因子と競合するポリペプチド、

(m) ホリデイジャンクションと似ている4方向ジャンクションポリヌクレオチド、複製フォークと似ている3方向ジャンクションポリヌクレオチド、固有の柔軟性を有するポリヌクレオチド、または屈曲したポリヌクレオチド、

40

(n) (g)~(l)のうちの任意の1つをコードする、単離されたかまたは組換え型のポリヌクレオチド、

(o) (g)~(l)のうちの任意の1つを特異的に認識するかもしくは特異的に結合する抗体もしくは抗原結合性断片、またはその等価物もしくは断片、あるいは

(p) (o)の抗体または抗原結合性断片をコードする、単離されたかまたは組換え型のポリヌクレオチド、および

(q) DNA B I I タンパク質またはDNA B I I ポリペプチドの微生物DNAへの結合と競合する小分子の群のうちの作用剤の使用。

50

(項目54)

前記抗体がモノクローナル抗体またはその断片である、項目6または15に記載の方法。

(項目55)

前記モノクローナル抗体またはその断片が、ヒト抗体、ヒト化抗体、組換え抗体、キメラ抗体、ペニア化抗体、修飾抗体または抗体誘導体である、項目54に記載の方法。

(項目56)

前記抗体が、VHおよび/またはVLのCDR1領域、CDR2領域および/またはCDR3領域内の保存的アミノ酸変異によって修飾されている、項目55に記載の方法。

(項目57)

前記抗体が、システイン残基の数を変更することによって、またはFcヒンジ領域内の保存的アミノ酸変異によって修飾されている、項目55に記載の方法。

(項目58)

前記モノクローナル抗体またはその断片が化学修飾されている、項目55に記載の方法。

(項目59)

前記モノクローナル抗体またはその断片がペグ化されている、項目58に記載の方法。

(項目60)

前記モノクローナル抗体またはその断片が、血清タンパク質とコンジュゲートしている、項目58に記載の方法。

(項目61)

前記血清タンパク質がヒト血清アルブミンである、項目60に記載の方法。

(項目62)

前記モノクローナル抗体またはその断片が、診断薬とコンジュゲートしている、項目55に記載の方法。

(項目63)

前記診断薬が、酵素、補欠分子族複合体、蛍光材料、発光材料、生物発光材料、放射性材料、陽電子放出性金属および非放射性常磁性金属イオンからなる群より選択される、項目62に記載の方法。

(項目64)

前記酵素が、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、ベータガラクトシダーゼおよびアセチルコリンエステラーゼからなる群より選択される、項目63に記載の方法。

(項目65)

前記補欠分子族複合体が、ストレプトアビジン/ビオチンおよびアビジン/ビオチンからなる群より選択される、項目63に記載の方法。

(項目66)

前記蛍光材料が、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、ダンシルクロリドおよびフィコエリトリンからなる群より選択される、項目63に記載の方法。

(項目67)

前記発光材料がルミノールである、項目63に記載の方法。

(項目68)

前記生物発光材料が、ルシフェラーゼ、ルシフェリンおよびエクオリンからなる群より選択される、項目63に記載の方法。

(項目69)

前記放射性材料が、 ^{125}I 、 ^{131}I 、インジウム111、ルテチウム171、ビスマス212、ビスマス213、アスタチン211、銅62、銅64、銅67、イットリウム90、ヨウ素125、ヨウ素131、リン32、リン33、スカンジウム47、銀111、ガリウム67、プラセオジウム142、サマリウム153、テルビウム161、ジスプ

10

20

30

40

50

ロシウム 166、ホルミウム 166、レニウム 186、レニウム 188、レニウム 189、鉛 212、ラジウム 223、アクチニウム 225、鉄 59、セレン 75、ヒ素 77、ストロンチウム 89、モリブデン 99、ロジウム 105、パラジウム 109、プラセオジウム 143、プロメチウム 149、エルビウム 169、イリジウム 194、金 198、金 199 および鉛 211 からなる群より選択される、項目 63 に記載の方法。

(項目 70)

前記モノクローナル抗体またはその断片が治療剤とコンジュゲートしている、項目 55 に記載の方法。

(項目 71)

前記治療剤が抗菌薬である、項目 70 に記載の方法。

10

(項目 72)

前記治療剤が、リボヌクレアーゼ (RNアーゼ)、DNアーゼ I、アンチセンス核酸、阻害性 RNA 分子、免疫賦活性核酸、アプタマー、リボザイム、三重鎖形成分子および外部ガイド配列からなる群より選択される、項目 70 に記載の方法。

(項目 73)

前記モノクローナル抗体またはその断片が、少なくとも 1 つの追加的な機能分子とコンジュゲートしているかまたは融合している、項目 55 に記載の方法。

(項目 74)

前記追加的な機能分子が第 2 の抗体である、項目 73 に記載の方法。

(項目 75)

前記抗体がモノクローナル抗体またはその断片である、項目 38 から 40 までのいずれか一項に記載の抗体。

20

(項目 76)

前記モノクローナル抗体またはその断片が、ヒト抗体、ヒト化抗体、組換え抗体、キメラ抗体、ペニア化抗体、修飾抗体または抗体誘導体である、項目 75 に記載の抗体。

(項目 77)

VH および / または VL の CDR 1 領域、CDR 2 領域および / または CDR 3 領域内の保存的アミノ酸変異によって修飾されている、項目 76 に記載の抗体。

(項目 78)

システイン残基の数を変更することによって、またはFcヒンジ領域内の保存的アミノ酸変異によって修飾されている、項目 76 に記載の抗体。

30

(項目 79)

前記モノクローナル抗体またはその断片が化学修飾されている、項目 76 に記載の抗体。

(項目 80)

前記モノクローナル抗体またはその断片がペグ化されている、項目 79 に記載の抗体。

(項目 81)

前記モノクローナル抗体またはその断片が、血清タンパク質とコンジュゲートしている、項目 79 に記載の抗体。

(項目 82)

前記血清タンパク質がヒト血清アルブミンである、項目 81 に記載の抗体。

40

(項目 83)

前記モノクローナル抗体またはその断片が、診断薬とコンジュゲートしている、項目 76 に記載の抗体。

(項目 84)

前記診断薬が、酵素、補欠分子族複合体、蛍光材料、発光材料、生物発光材料、放射性材料、陽電子放出性金属および非放射性常磁性金属イオンからなる群より選択される、項目 83 に記載の抗体。

(項目 85)

前記酵素が、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、ベータガラクト

50

シダーゼおよびアセチルコリンエステラーゼからなる群より選択される、項目 8 4 に記載の抗体。

(項目 8 6)

前記補欠分子族複合体が、ストレプトアビジン/ビオチンおよびアビジン/ビオチンからなる群より選択される、項目 8 4 に記載の抗体。

(項目 8 7)

前記蛍光材料が、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、ダンシルクロリドおよびフィコエリトリンからなる群より選択される、項目 8 4 に記載の抗体。

(項目 8 8)

前記発光材料がルミノールである、項目 8 4 に記載の抗体。

(項目 8 9)

前記生物発光材料が、ルシフェラーゼ、ルシフェリンおよびエクオリンからなる群より選択される、項目 8 4 に記載の抗体。

(項目 9 0)

前記放射性材料が、 ^{125}I 、 ^{131}I 、インジウム 1 1 1、ルテチウム 1 7 1、ビスマス 2 1 2、ビスマス 2 1 3、アスタチン 2 1 1、銅 6 2、銅 6 4、銅 6 7、イットリウム 9 0、ヨウ素 1 2 5、ヨウ素 1 3 1、リン 3 2、リン 3 3、スカンジウム 4 7、銀 1 1 1、ガリウム 6 7、プラセオジウム 1 4 2、サマリウム 1 5 3、テルビウム 1 6 1、ジスプロシウム 1 6 6、ホルミウム 1 6 6、レニウム 1 8 6、レニウム 1 8 8、レニウム 1 8 9、鉛 2 1 2、ラジウム 2 2 3、アクチニウム 2 2 5、鉄 5 9、セレン 7 5、ヒ素 7 7、ストロンチウム 8 9、モリブデン 9 9、ロジウム 1 0 5、パラジウム 1 0 9、プラセオジウム 1 4 3、プロメチウム 1 4 9、エルビウム 1 6 9、イリジウム 1 9 4、金 1 9 8、金 1 9 9 および鉛 2 1 1 からなる群より選択される、項目 8 4 に記載の抗体。

(項目 9 1)

前記モノクローナル抗体またはその断片が治療剤とコンジュゲートしている、項目 7 6 に記載の抗体。

(項目 9 2)

前記治療剤が抗菌薬である、項目 9 1 に記載の抗体。

(項目 9 3)

前記治療剤が、リボヌクレアーゼ (RNアーゼ)、DNアーゼ I、アンチセンス核酸、阻害性 RNA 分子、免疫賦活性核酸、アプタマー、リボザイム、三重鎖形成分子および外部ガイド配列からなる群より選択される、項目 9 1 に記載の抗体。

(項目 9 4)

前記モノクローナル抗体またはその断片が、少なくとも 1 つの追加的な機能分子とコンジュゲートしているかまたは融合している、項目 7 6 に記載の抗体。

(項目 9 5)

前記追加的な機能分子が第 2 の抗体である、項目 9 4 に記載の抗体。

(項目 9 6)

前記抗体がモノクローナル抗体またはその断片である、項目 4 8 に記載のキット。

(項目 9 7)

前記モノクローナル抗体またはその断片が、ヒト抗体、ヒト化抗体、組換え抗体、キメラ抗体、ベニア化抗体、修飾抗体または抗体誘導体である、項目 9 6 に記載のキット。

(項目 9 8)

前記抗体が、VH および / または VL の CDR 1 領域、CDR 2 領域 および / または CDR 3 領域内の保存的アミノ酸変異によって修飾されている、項目 9 7 に記載のキット。

(項目 9 9)

前記抗体が、システイン残基の数を変更することによって、またはFcヒンジ領域内の保存的アミノ酸変異によって修飾されている、項目 9 7 に記載のキット。

(項目 1 0 0)

10

20

30

40

50

前記モノクローナル抗体またはその断片が化学修飾されている、項目 97 に記載のキット。

(項目 101)

前記モノクローナル抗体またはその断片がペグ化されている、項目 100 に記載のキット。

(項目 102)

前記モノクローナル抗体またはその断片が、血清タンパク質とコンジュゲートしている、項目 100 に記載のキット。

(項目 103)

前記血清タンパク質がヒト血清アルブミンである、項目 102 に記載のキット。

10

(項目 104)

前記モノクローナル抗体またはその断片が、診断薬とコンジュゲートしている、項目 97 に記載のキット。

(項目 105)

前記診断薬が、酵素、補欠分子族複合体、蛍光材料、発光材料、生物発光材料、放射性材料、陽電子放出性金属および非放射性常磁性金属イオンからなる群より選択される、項目 104 に記載のキット。

(項目 106)

前記酵素が、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、ベータガラクトシダーゼおよびアセチルコリンエステラーゼからなる群より選択される、項目 105 に記載のキット。

20

(項目 107)

前記補欠分子族複合体が、ストレプトアビジン/ビオチンおよびアビジン/ビオチンからなる群より選択される、項目 105 に記載のキット。

(項目 108)

前記蛍光材料が、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、ダンシルクロリドおよびフィコエリトリンからなる群より選択される、項目 105 に記載のキット。

(項目 109)

前記発光材料がルミノールである、項目 105 に記載のキット。

30

(項目 110)

前記生物発光材料が、ルシフェラーゼ、ルシフェリンおよびエクオリンからなる群より選択される、項目 105 に記載のキット。

(項目 111)

前記放射性材料が、 ^{125}I 、 ^{131}I 、インジウム 111、ルテチウム 171、ビスマス 212、ビスマス 213、アスタチン 211、銅 62、銅 64、銅 67、イットリウム 90、ヨウ素 125、ヨウ素 131、リン 32、リン 33、スカンジウム 47、銀 111、ガリウム 67、プラセオジウム 142、サマリウム 153、テルビウム 161、ジスプロシウム 166、ホルミウム 166、レニウム 186、レニウム 188、レニウム 189、鉛 212、ラジウム 223、アクチニウム 225、鉄 59、セレン 75、ヒ素 77、ストロンチウム 89、モリブデン 99、ロジウム 105、パラジウム 109、プラセオジウム 143、プロメチウム 149、エルビウム 169、イリジウム 194、金 198、金 199 および鉛 211 からなる群より選択される、項目 105 に記載のキット。

40

(項目 112)

前記モノクローナル抗体またはその断片が治療剤とコンジュゲートしている、項目 97 に記載のキット。

(項目 113)

前記治療剤が抗菌薬である、項目 112 に記載のキット。

(項目 114)

前記モノクローナル抗体またはその断片が、少なくとも 1 つの追加的な機能分子とコン

50

ジュゲートしているかまたは融合している、項目 97 に記載のキット。

(項目 115)

前記追加的な機能分子が第 2 の抗体である、項目 114 に記載のキット。

(項目 116)

前記抗体がモノクローナル抗体またはその断片である、ワクチンを必要とする被験体にワクチン接種するための、項目 53 に記載の使用。

(項目 117)

前記モノクローナル抗体またはその断片が、ヒト抗体、ヒト化抗体、組換え抗体、キメラ抗体、ペニア化抗体、修飾抗体または抗体誘導體である、項目 116 に記載の使用。

(項目 118)

前記抗体が、VH および / または VL の CDR 1 領域、CDR 2 領域および / または CDR 3 領域内の保存的アミノ酸変異によって修飾されている、項目 117 に記載の使用。

(項目 119)

前記抗体が、システイン残基の数を変更することによって、またはFcヒンジ領域内の保存的アミノ酸変異によって修飾されている、項目 117 に記載の使用。

(項目 120)

前記モノクローナル抗体またはその断片が化学修飾されている、項目 117 に記載の使用。

(項目 121)

前記モノクローナル抗体またはその断片がペグ化されている、項目 120 に記載の使用。

(項目 122)

前記モノクローナル抗体またはその断片が、血清タンパク質とコンジュゲートしている、項目 120 に記載の使用。

(項目 123)

前記血清タンパク質がヒト血清アルブミンである、項目 122 に記載の使用。

(項目 124)

前記モノクローナル抗体またはその断片が、診断薬とコンジュゲートしている、項目 117 に記載の使用。

(項目 125)

前記診断薬が、酵素、補欠分子族複合体、蛍光材料、発光材料、生物発光材料、放射性材料、陽電子放出性金属および非放射性常磁性金属イオンからなる群より選択される、項目 124 に記載の使用。

(項目 126)

前記酵素が、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、ベータガラクトシダーゼおよびアセチルコリンエステラーゼからなる群より選択される、項目 125 に記載の使用。

(項目 127)

前記補欠分子族複合体が、ストレプトアビジン/ビオチンおよびアビジン/ビオチンからなる群より選択される、項目 125 に記載の使用。

(項目 128)

前記蛍光材料が、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、ダンシルクロリドおよびフィコエリトリンからなる群より選択される、項目 125 に記載の使用。

(項目 129)

前記発光材料がルミノールである、項目 125 に記載の使用。

(項目 130)

前記生物発光材料が、ルシフェラーゼ、ルシフェリンおよびエクオリンからなる群より選択される、項目 125 に記載の使用。

(項目 131)

10

20

30

40

50

前記放射性材料が、¹²⁵I、¹³¹I、インジウム111、ルテチウム171、ビスマス212、ビスマス213、アスタチン211、銅62、銅64、銅67、イットリウム90、ヨウ素125、ヨウ素131、リン32、リン33、スカンジウム47、銀111、ガリウム67、プラセオジウム142、サマリウム153、テルビウム161、ジスプロシウム166、ホルミウム166、レニウム186、レニウム188、レニウム189、鉛212、ラジウム223、アクチニウム225、鉄59、セレン75、ヒ素77、ストロンチウム89、モリブデン99、ロジウム105、パラジウム109、プラセオジウム143、プロメチウム149、エルビウム169、イリジウム194、金198、金199および鉛211からなる群より選択される、項目125に記載の使用。

(項目132)

10

前記モノクローナル抗体またはその断片が治療剤とコンジュゲートしている、項目117に記載の使用。

(項目133)

前記治療剤が抗菌薬である、項目132に記載の使用。

(項目134)

前記治療剤が、リボヌクレアーゼ(RNアーゼ)、DNアーゼI、アンチセンス核酸、阻害性RNA分子、免疫賦活性核酸、アプタマー、リボザイム、三重鎖形成分子および外部ガイド配列からなる群より選択される、項目132に記載の使用。

(項目135)

前記モノクローナル抗体またはその断片が、少なくとも1つの追加的な機能分子とコンジュゲートしているかまたは融合している、項目117に記載の使用。

20

(項目136)

前記追加的な機能分子が第2の抗体である、項目135に記載の使用。

(項目137)

組換え型のポリヌクレオチドの等価物が、ストリンジェントな条件下で該ポリヌクレオチドまたはその相補物とハイブリダイズするポリヌクレオチドを含み、該ストリンジェントな条件が、約25 から約37 までのインキュベーション温度；約6×SSCから約10×SSCまでのハイブリダイゼーション緩衝液の濃度；約0%から約25%までのホルムアミド濃度；および約4×SSCから8×SSCまでの洗浄溶液を含む、項目1から23まで、項目51から52まで、または項目54から74までに記載の方法、項目24から33までに記載の単離されたかまたは組換え型のポリペプチド、項目34に記載のベクター、項目35から37までに記載の単離された細胞、項目38から40まで、または項目75から95までに記載の抗体、項目41に記載のハイブリドーマ細胞株、項目42から47までに記載の組成物、項目48から50まで、または項目96から115までに記載のキット、項目53または項目116から136までに記載の使用。

30

(項目138)

DNA B I I ポリペプチドもしくはDNA B I I タンパク質の微生物DNAへの結合を阻害するか、該結合と競合するか、もしくは該結合の力価を決定する作用剤、微生物バイオフィルムを阻害、予防もしくは破壊する作用剤、被験体におけるバイオフィルムを阻害、予防もしくは破壊する作用剤、または被験体においてバイオフィルムを生じる微生物感染症を阻害、予防もしくは処置する作用剤を同定するためのコンピュータ実装方法であって、候補作用剤の三次元構造を、組込み宿主因子(IHF)タンパク質の三次元構造と対照して位置決定する工程を含み、ここで、該IHFタンパク質の該三次元構造は、IHFおよびDNAの複合体の結晶形から決定された原子構造座標X、YおよびZに基づき、配列番号42に示されるT4、K5、A6、E28、Q43、K45、S47、G48、N51、R55、K57、R60、R63、N64、P65、K66、R76、T80、R82またはQ85から選択される2つ以上のIHFアミノ酸、またはそのそれぞれの等価物における該作用剤と該IHFとの相互作用により、該作用剤が、DNA B I I ポリペプチドもしくはDNA B I I タンパク質の微生物DNAへの結合を阻害すること、該結合と競合すること、もしくは該結合の力価を決定すること、微生物バイオフィルムを阻害、予

40

50

防もしくは破壊すること、バイオフィルムを阻害、予防もしくは破壊すること、またはバイオフィルムを生じる微生物感染症を阻害、予防もしくは処置することが同定される、コンピュータ実装方法。

(項目139)

配列番号42に示されるT4、K5、A6、E28、Q43、K45、S47、G48、N51、R55、K57、R60、R63、N64、P65、K66、R76、T80、R82またはQ85から選択されるIHFアミノ酸の3つ以上、またはそのそれぞれの等価物における前記作用剤と前記IHFとの相互作用により、該作用剤が、DNABIIポリペプチドもしくはDNABIIタンパク質の微生物DNAへの結合を阻害すること、該結合と競合すること、もしくは該結合の力価を決定すること、微生物バイオフィルムを阻害、予防もしくは破壊すること、バイオフィルムを阻害、予防もしくは破壊すること、またはバイオフィルムを生じる微生物感染症を阻害、予防もしくは処置することが同定される、項目138に記載の方法。

10

(項目140)

前記原子構造座標X、YおよびZが、Protein Data Bank (PDB) 受託番号: 1IHFに記載の座標を含む、項目138または139に記載の方法。

(項目141)

少なくとも1つのプロセッサ、
該少なくとも1つのプロセッサに接続されたメモリ、
該メモリおよび該少なくとも1つのプロセッサと通信している記憶媒体を含むカスタムコンピュータ装置であって、
該記憶媒体は、プロセッサ実行可能命令のセットを含み、該セットは、該プロセッサによって実行されると、該カスタムコンピュータ装置が、DNABIIポリペプチドもしくはDNABIIタンパク質の微生物DNAへの結合を阻害するか、該結合と競合するか、もしくは該結合の力価を決定する作用剤、微生物バイオフィルムを阻害、予防もしくは破壊する作用剤、被験体におけるバイオフィルムを阻害、予防もしくは破壊する作用剤、または被験体においてバイオフィルムを生じる微生物感染症を阻害、予防もしくは処置する作用剤を同定するように設定され、該設定は、

20

候補作用剤の三次元構造を、組込み宿主因子(IHF)タンパク質の三次元構造と対照して位置決定することを含み、ここで、該IHFタンパク質の該三次元構造は、IHFおよびDNAの複合体の結晶形から決定された原子構造座標X、YおよびZに基づき、配列番号42に示されるT4、K5、A6、E28、Q43、K45、S47、G48、N51、R55、K57、R60、R63、N64、P65、K66、R76、T80、R82またはQ85から選択される2つ以上のIHFアミノ酸、またはそのそれぞれの等価物における該作用剤と該IHFとの相互作用により、該作用剤が、DNABIIポリペプチドもしくはDNABIIタンパク質の微生物DNAへの結合を阻害すること、該結合と競合すること、もしくは該結合の力価を決定すること、微生物バイオフィルムを阻害、予防もしくは破壊すること、バイオフィルムを阻害、予防もしくは破壊すること、またはバイオフィルムを生じる微生物感染症を阻害、予防もしくは処置することが同定される、カスタムコンピュータ装置。

30

40

(項目142)

DNABIIタンパク質またはDNABIIポリペプチドおよび微生物DNAを含有する試料において、DNABIIタンパク質またはDNABIIポリペプチドの微生物DNAへの結合を調節する作用剤を同定する方法であって、候補作用剤を該試料と接触させる工程、および該タンパク質または該ポリペプチドの該DNAへの結合についてアッセイする工程を含み、ここで、該作用剤は、該DNABIIタンパク質または該DNABIIポリペプチドの該微生物DNAへの結合を阻害すること、該結合を予防すること、または該結合の力価を決定することによって該結合を調節する、方法。

(項目143)

干渉作用剤を投与することによって処置される可能性があるかまたは該可能性がない微

50

生物感染症を有する患者を同定するための方法であって、該患者から単離され、かつ感染物質を含有する試料におけるDNA B I IポリペプチドまたはDNA B I Iタンパク質の存在または非存在を検出する工程を含み、ここで、該DNA B I Iポリペプチドまたは該DNA B I Iタンパク質の存在により、該患者は、該干渉作用剤を投与することによって処置される可能性があると同定され、DNA B I IポリペプチドまたはDNA B I Iタンパク質の非存在により、該患者は、該干渉作用剤を投与することによって処置される可能性がないと同定される、方法。

(項目144)

前記DNA B I Iポリペプチドまたは前記DNA B I Iタンパク質の存在により、前記患者は、前記干渉作用剤を投与することによって処置される可能性があると同定される、項目143に記載の方法。

10

(項目145)

前記患者に有効量の前記干渉作用剤を投与する工程をさらに含む、項目144に記載の方法。

(項目146)

前記干渉作用剤が、

(a) 単離されたかもしくは組換え型の組込み宿主因子(IHF)ポリペプチド、またはそのそれぞれの断片もしくは等価物、

(b) E. coliのU93株由来の単離されたかもしくは組換え型のヒストン様タンパク質(HU)ポリペプチド、またはそのそれぞれの断片もしくは等価物、

20

(c) 表8、表9A、表9B、表10において同定される単離されたかもしくは組換え型のタンパク質もしくはポリペプチド、または図6において同定されるDNA結合性ペプチド、またはそのそれぞれの断片もしくは等価物、

(d) 配列番号1~340の単離されたかもしくは組換え型のポリペプチド、またはそのそれぞれの等価物、またはその断片もしくはそれぞれの断片の等価物

(e) 配列番号6~11、28、29、42~100、表8の単離されたかもしくは組換え型のC末端のポリペプチド、または表10において同定される単離されたかもしくは組換え型のC末端のポリペプチド、またはそのそれぞれの断片もしくは等価物、

(f) 微生物DNAへの結合について組込み宿主因子と競合するポリペプチドまたはポリヌクレオチド、

30

(g) ホリデイジャンクションと似ている4方向ジャンクションポリヌクレオチド、複製フォークと似ている3方向ジャンクションポリヌクレオチド、固有の柔軟性を有するポリヌクレオチド、または屈曲したポリヌクレオチド、

(h) (a)~(f)のうちの任意の1つをコードする単離されたかもしくは組換え型のポリヌクレオチド、または配列番号36の単離されたかもしくは組換え型のポリヌクレオチド、またはそのそれぞれの等価物、またはストリンジェントな条件下で該ポリヌクレオチドもしくはその相補物とハイブリダイズするポリヌクレオチド、

(i) (a)~(f)のうちの任意の1つを特異的に認識するかもしくは特異的に結合する抗体もしくは抗原結合性断片、または各抗体もしくはその抗原結合性断片の等価物もしくは断片、

40

(j) (i)の抗体または抗原結合性断片をコードする、単離されたかまたは組換え型のポリヌクレオチド、あるいは

(k) DNA B I Iタンパク質またはDNA B I Iポリペプチドの微生物DNAへの結合と競合する小分子

のうちの1つまたは複数である、項目145に記載の方法。

【0029】

発明の概要

細菌の細胞内で、DNA B I Iタンパク質は、結合する際に必然的にDNA基質を屈曲させるDNA結合性タンパク質である。同様に、すでに屈曲したコンフォメーションであるDNAは、屈曲させるために必要なエネルギーが不必要になるので好ましい基質である

50

。

【0030】

タンパク質のDNA BIIファミリーは、細菌細胞の外側にバイオフィルムの状態で見いだされる。出願人は、これらのタンパク質が、実際に、細胞外のDNAに、重要な分岐ジャンクションにおいて結合したことを示した。一態様では、出願人は、特異的な抗体を産生するポリペプチドおよびタンパク質を用いて宿主を免疫化することにより、DNAに基づく格子が十分に変更されて、宿主免疫系がバイオフィルムを取り除くことが可能になることを示した。

【0031】

出願人は、チンチラ宿主の中耳内のあらかじめ形成した分類不可能なHaemophilus influenzaeバイオフィルムが、DNA BIIファミリーメンバー（E.coli組込み宿主因子、IHF）を用いた種々の方式の免疫化により除去されることも実証した。このチンチラ中耳バイオフィルム動物系は、すでにヒト中耳炎（または中耳感染症）についての優れたモデルとして文書で十分に裏付けられている。

10

【0032】

この技術を使用するための方法は簡単である。一実施形態では、本発明のポリペプチドを、慢性/再発バイオフィルム疾患に対する予防として個体にワクチン接種するために、または既存の感染症を有する個体に対する治療薬として使用する。それから、個体の免疫系が、機能的な保護性のバイオフィルムの構築およびまたは維持に干渉することによってこれらの細菌を防ぐ、または宿主から取り除く抗体を自然に生成する。あるいは、ポリペプチドに対する抗体を、感染症を処置または予防するために投与することができる。機能性バイオフィルムを形成することができない細菌は、宿主の免疫系の残りによって容易に取り除かれる。

20

【0033】

したがって、一態様では、DNA BIIポリペプチドまたはDNA BIIタンパク質の微生物DNAへの結合を阻害する、それと競合する、またはその力価を決定する（titerate）ための方法が、DNA BIIポリペプチドもしくはDNA BIIタンパク質または微生物DNAを干渉作用剤と接触させ、それにより、DNA BIIタンパク質またはDNA BIIポリペプチドの微生物DNAへの結合を阻害する、それと競合する、またはその力価を決定することを含む、あるいはそれから本質的になる、またはさらにそれからなることによって提供される。接触は、in vitroまたはin vivoで実施することができる。

30

【0034】

別の態様では、微生物バイオフィルムを阻害、予防または破壊するための方法であって、バイオフィルムを干渉作用剤と接触させ、それにより、微生物バイオフィルムを阻害、予防または破壊することを含む、あるいはそれから本質的になる、またはさらにそれからなる方法が提供される。接触は、in vitroまたはin vivoで実施することができる。

【0035】

別の態様では、被験体におけるバイオフィルムを阻害、予防または破壊する方法であって、被験体に有効量の干渉作用剤を投与し、それにより、微生物バイオフィルムを阻害、予防または破壊することを含む、あるいはそれから本質的になる、またはさらにそれからなる方法が提供される。

40

【0036】

さらなる態様では、被験体においてバイオフィルムを生じる微生物感染症を阻害、予防または処置するための方法が提供される。方法は、被験体に有効量の干渉作用剤を投与し、それにより、被験体においてバイオフィルムを生じる微生物感染症を阻害、予防または処置することを含む、あるいはそれから本質的になる、またはさらにそれからなる。

【0037】

本明細書に記載の方法に関して、微生物DNAのDNA BIIタンパク質またはDNA

50

B I I ポリペプチドへの結合に干渉する、またはそれを妨害する任意の作用剤は、本発明の範囲内であるものとする。干渉作用剤の非限定的な例としては、

(a) 単離されたかまたは組換え型の組込み宿主因子 (I H F) ポリペプチド、またはそのそれぞれの断片もしくは等価物、

(b) E . c o l i の U 9 3 株由来の単離されたかまたは組換え型のヒストン様タンパク質 (H U) ポリペプチド、またはそのそれぞれの断片もしくは等価物、

(c) 表 8、表 9 A、表 9 B、表 1 0 において同定される単離されたかまたは組換え型のタンパク質もしくはポリペプチド、または図 6 において同定される D N A 結合性ペプチド、またはそのそれぞれの断片もしくは等価物、

(d) 配列番号 1 ~ 3 4 0 の単離されたかまたは組換え型のポリペプチド、またはそのそれぞれの断片もしくは等価物、

(e) 配列番号 6 ~ 1 1、2 8、2 9、4 2 ~ 1 0 0、表 8 の単離されたかまたは組換え型の C 末端のポリペプチド、または表 1 0 において同定される C 末端のポリペプチド、またはそのそれぞれの断片もしくは等価物、

(f) 微生物 D N A への結合について組込み宿主因子と競合するポリペプチドまたはポリヌクレオチド、

(g) ホリデイジャンクションと似ている 4 方向ジャンクションポリヌクレオチド、複製フォークと似ている 3 方向ジャンクションポリヌクレオチド、固有の柔軟性を有するポリヌクレオチドまたは屈曲したポリヌクレオチド、

(h) (a) ~ (f) のうちの任意の 1 つをコードする、単離されたかまたは組換え型のポリヌクレオチド、または配列番号 3 6 の単離されたかまたは組換え型のポリヌクレオチド、またはそのそれぞれの等価物、またはストリンジェントな条件下でポリヌクレオチドまたはその等価物もしくはその相補物とハイブリダイズするポリヌクレオチド、

(i) (a) ~ (f) のうちの任意の 1 つを特異的に認識する、またはそれに特異的に結合する抗体もしくは抗原結合性断片、または各抗体もしくはその抗原結合性断片の等価物もしくは断片、

(j) (i) の抗体もしくは抗原結合性断片またはその相補物をコードする、単離されたかまたは組換え型のポリヌクレオチド、または

(k) D N A B I I タンパク質または D N A B I I ポリペプチドの微生物 D N A への結合と競合する小分子
が挙げられる。

【 0 0 3 8 】

本明細書では、それを必要とする被験体において免疫応答を誘導する、またはそれを必要とする被験体に受動免疫を付与するための方法であって、被験体に、群：

(a) 単離されたかまたは組換え型の組込み宿主因子 (I H F) ポリペプチド、またはそのそれぞれの断片もしくは等価物、

(b) E . c o l i の U 9 3 株由来の単離されたかまたは組換え型のヒストン様タンパク質 (H U) ポリペプチド、またはそのそれぞれの断片もしくは等価物、

(c) 表 8、表 9 A、表 9 B、表 1 0 において同定される単離されたかまたは組換え型のタンパク質ポリペプチド、または図 6 において同定される D N A 結合性ペプチド、またはそのそれぞれの断片もしくは等価物、

(d) 配列番号 1 ~ 3 4 0 の単離されたかまたは組換え型のポリペプチド、またはその断片もしくは等価物、

(e) 配列番号 6 ~ 1 1、2 8、2 9、4 2 ~ 1 0 0、表 8 の単離されたかまたは組換え型の C 末端のポリペプチド、または表 1 0 において同定される C 末端のポリペプチド、またはそのそれぞれの断片もしくは等価物、

(f) (a) ~ (e) のうちの任意の 1 つをコードする、単離されたかまたは組換え型のポリヌクレオチド、または配列番号 3 6 の単離されたかまたは組換え型のポリヌクレオチド、またはそのそれぞれの等価物、またはストリンジェントな条件下でポリヌクレオチド、その等価物もしくはその相補物とハイブリダイズするポリヌクレオチド、

10

20

30

40

50

(g)(a)～(e)のうちの任意の1つを特異的に認識する、またはそれに特異的に結合する抗体もしくは抗原結合性断片、またはそのそれぞれの等価物もしくは断片、

(h)(g)の抗体もしくは抗原結合性断片をコードする、単離されたかまたは組換え型のポリヌクレオチド、

(i)(a)～(e)のうちの任意の1つでパルスした抗原提示細胞、および

(j)(a)～(e)のうちの任意の1つをコードする1種または複数種のポリヌクレオチドでトランスフェクトされた抗原提示細胞

の1つまたは複数の作用剤を有効量で投与することを含む、あるいはそれから本質的になる、またはさらにそれからなる方法も提供される。

【0039】

そのような免疫応答を必要とする被験体としては、微生物バイオフィルムが生じる感染症の危険性がある、またはそれに罹患している被験体が挙げられる。

【0040】

本明細書では、上記の方法において使用するための組成物も提供され、その非限定的な例は以下に考察されている。

【0041】

一態様では、配列番号1～5または12～27、30～35、101～340から選択されるアミノ酸配列または図6において同定されるDNA結合性ペプチドまたはそのそれぞれの断片もしくは等価物を含む、あるいはそれから本質的になる単離されたかまたは組換え型のポリペプチドが提供される。

【0042】

別の態様では、配列番号1または2を含む、あるいはそれから本質的になる、またはさらにそれからなるが、配列番号6～11、28、29、または42～100のいずれでもない単離されたかまたは組換え型のポリペプチドが提供される。

【0043】

一態様では、配列番号3、4、または5を含む、あるいはそれから本質的になる、またはさらにそれからなるが、配列番号6～11、28、29、または42～100のいずれでもない単離されたかまたは組換え型のポリペプチドが提供される。

【0044】

一態様では、配列番号12、14、16、18、20、22、24、26、30、または32を含む、あるいはそれから本質的になる、またはさらにそれからなるが、配列番号6～11、28、29、または42～100のいずれでもない単離されたかまたは組換え型のポリペプチドが提供される。

【0045】

一態様では、配列番号13、15、17、19、21、23、25、27、31、または33を含む、あるいはそれから本質的になる、またはさらにそれからなるが、配列番号6～11、28、29、または42～100のいずれでもない単離されたかまたは組換え型のポリペプチドが提供される。

【0046】

一態様では、配列番号337、338、339、または340を含む、あるいはそれから本質的になる、またはさらにそれからなるが、配列番号6～11、28、29、または42～100のいずれでもない単離されたかまたは組換え型のポリペプチドが提供される。

【0047】

一態様では、配列番号12および13、または14および15、または16および17、または18および19、または20および21、または22および23、または24および25、または26および27、または30および31、または32および33を含む、あるいはそれから本質的になる、またはさらにそれからなるが、配列番号6～11、28、29、または42～100のいずれでもない単離されたかまたは組換え型のポリペプチドが提供される。

10

20

30

40

50

【 0 0 4 8 】

一態様では、DNA B I I ポリペプチド、I H F ポリペプチド、H U ポリペプチド、配列番号 6 ~ 1 1、2 8、2 9 または表 8、表 1 0 において同定されるポリペプチドまたはそのそれぞれの断片もしくは等価物からなる群のポリペプチドの C 末端アミノ酸を少なくとも 1 0 個、あるいは少なくとも 1 5 個、あるいは少なくとも 2 0 個、あるいは少なくとも 2 5 個、あるいは少なくとも 3 0 個含有する C 末端領域を含む、あるいはそれから本質的になる、またはさらにそれからなる単離されたかまたは組換え型のポリペプチドが提供される。

【 0 0 4 9 】

一態様では、

配列番号 1 2 および 1 3 を含むポリペプチド、

配列番号 1 4 および 1 5 を含むポリペプチド、

配列番号 1 6 および 1 7 を含むポリペプチド、

配列番号 1 8 および 1 9 を含むポリペプチド、

配列番号 2 0 および 2 1 を含むポリペプチド、

配列番号 2 3 および 2 4 を含むポリペプチド、

配列番号 2 5 および 2 6 を含むポリペプチド、

配列番号 3 0 および 3 1 を含むポリペプチド、

配列番号 3 2 および 3 3 を含むポリペプチド、

配列番号 3 4 および 3 5 を含むポリペプチド、

配列番号 3 3 7 および 3 3 8 を含むポリペプチド、または

配列番号 3 3 9 および 3 4 0 を含むポリペプチド

からなる群の単離されたかまたは組換え型のポリペプチドであって、I H F アルファ、I H F ベータのうちの任意の 1 つの野生型または配列番号 6 ~ 1 1、2 8、2 9、または 4 2 ~ 1 0 0 のいずれでもないポリペプチドが提供される。

【 0 0 5 0 】

一態様では、

配列番号 1 2 および 1 3 から本質的になるポリペプチド、

配列番号 1 4 および 1 5 から本質的になるポリペプチド、

配列番号 1 6 および 1 7 から本質的になるポリペプチド、

配列番号 1 8 および 1 9 から本質的になるポリペプチド、

配列番号 2 0 および 2 1 から本質的になるポリペプチド、

配列番号 2 3 および 2 4 から本質的になるポリペプチド、

配列番号 2 5 および 2 6 から本質的になるポリペプチド、

配列番号 3 0 および 3 1 から本質的になるポリペプチド、

配列番号 3 2 および 3 3 から本質的になるポリペプチド、

配列番号 3 4 および 3 5 から本質的になるポリペプチド、

配列番号 3 3 7 および 3 3 8 から本質的になるポリペプチド、または

配列番号 3 3 9 および 3 4 0 から本質的になるポリペプチド、

からなる群の単離されたかまたは組換え型のポリペプチドであって、I H F アルファ、I H F ベータのうちの任意の 1 つの野生型または配列番号 6 ~ 1 1、2 8、2 9、または 4 2 ~ 1 0 0 のいずれでもないポリペプチドが提供される。

【 0 0 5 1 】

上で同定された単離されたポリペプチドを、その断片および等価物も含めて、2 つ以上、または 3 つ以上または 4 つ以上、または多数含む、あるいはそれから本質的になる、またはさらにそれからなる単離されたかまたは組換え型のポリペプチドも提供される。その例としては、配列番号 1 ~ 4 および / または 1 2 ~ 2 9、および / または 3 0 ~ 3 3、および / または 3 0 ~ 3 5、例えば、配列番号 1 および 2、あるいは 1 および 3、あるいは 1 および 4、あるいは 2 および 3、あるいは配列番号 1、2 および 3、あるいは、2、3 および 4、あるいは 1、3 および 4 または等価のポリペプチドを含む単離されたポリペプ

10

20

30

40

50

チドが挙げられ、その例は表9に示されている。ポリペプチドは任意の方向、例えば、配列番号1、2、および3、または配列番号3、2および1、あるいは配列番号2、1および3、あるいは3、1および2、あるいは11および12、あるいは1および12、あるいは2および12、あるいは1および12、あるいは2および13、あるいは12、16および1、あるいは1、16および12であってよい。

【0052】

別の態様では、本発明は、配列番号1または2および3または4を含む単離されたかまたは組換え型のポリペプチド、またはDNA B I Iタンパク質の断片、例えば、*Haemophilus influenzae* IHF 微生物または*Haemophilus influenzae* IHF 微生物の - 3断片および/または - 3断片などに対応するアミノ酸を含む、あるいはそれから本質的になる、またはさらにそれからなるポリペプチドまたは組換え型ポリペプチドを提供し、その非限定的な例としては、配列番号12~27、またはポリペプチドのそれぞれの断片もしくは等価物が挙げられ、その例は表9に示されている。一態様では、単離された野生型ポリペプチドが特異的に排除され、例えば、ポリペプチドは表8において同定される配列番号6~11または野生型配列のいずれでもない。この実施形態では、配列番号1または2、またはIHF 微生物またはIHF 微生物の - 3断片および/または - 3断片に対応するアミノ酸を含む、あるいはそれから本質的になる、またはさらにそれからなり、その非限定的な例として配列番号12~27および30~33が挙げられるポリペプチド、またはそのそれぞれの等価物は、配列番号3または4またはその断片もしくは等価物の上流またはアミノ末端に位置する。別の態様では、単離されたポリペプチドは、配列番号3または4、またはIHF 微生物またはIHF 微生物の - 3断片および/または - 3断片に対応するアミノ酸を含む、あるいはそれから本質的になる、またはさらにそれからなり、その非限定的な例として配列番号12~27が挙げられるポリペプチド、または配列番号1または2、またはその等価物の上流またはアミノ末端に位置するその等価物を含む。

【0053】

上記の実施形態のいずれにおいても、ポリペプチド、断片またはその等価物のN末端またはC末端にペプチドリナーを付加することができる。一態様では、リンカーは、本発明のポリペプチド、例えば、配列番号1~4、28、29、34、または35または30~33、34、または35、または*Haemophilus influenzae* IHF 微生物または*Haemophilus influenzae* IHF 微生物の - 3断片および/または - 3断片に対応するアミノ酸を含む、あるいはそれから本質的になる、またはさらにそれからなり、その非限定的な例として配列番号12~27が挙げられるポリペプチド、またはそのそれぞれの等価物をつなぐ。「リンカー」または「ペプチドリナー」とは、ポリペプチド配列のN末端またはC末端のいずれかに連結したペプチド配列を指す。一態様では、リンカーは約1アミノ酸残基から約20アミノ酸残基までの長さである、あるいは2アミノ酸残基~約10アミノ酸残基、約3アミノ酸残基~約5アミノ酸残基の長さである。ペプチドリナーの例は、Gly - Pro - Ser - Leu - Lys - Leu (配列番号37)である。

【0054】

上で同定されたポリペプチドのうちの任意の1つの単離されたかまたは組換え型のポリペプチド、ならびに上で同定された単離されたかまたは組換え型のポリペプチドの2つ以上を含む、あるいはそれから本質的になる、またはさらにそれからなる単離されたかまたは組換え型のポリペプチドの断片または等価物がさらに提供される。

【0055】

微生物DNAと、ポリペプチドまたはその断片もしくは等価物の結合に干渉するポリヌクレオチド、例えば、配列番号36、またはホリデイジャンクションと似ている4方向のジャンクションポリヌクレオチド、複製フォークと似ている3方向のジャンクションポリヌクレオチド、固有の柔軟性を有するポリヌクレオチドまたは屈曲したポリヌクレオチド；ポリヌクレオチドの発現および/または複製に必要な調節エレメントに作動可能に連結

10

20

30

40

50

することができる、上記のポリペプチドまたは抗体またはその断片をコードする、単離されたかまたは組換え型のポリヌクレオチドがさらに提供される。ポリヌクレオチドは、ベクター内に含有されてよい。

【0056】

上記の単離されたかまたは組換え型のポリペプチド、ホリデイジャンクションと似ている4方向のジャンクションポリヌクレオチド、複製フォークと似ている3方向のジャンクションポリヌクレオチド、固有の柔軟性を有するポリヌクレオチドまたは屈曲したポリヌクレオチドを含む、あるいはそれから本質的になる、またはさらにそれからなる単離された宿主細胞；上記の単離されたかまたは組換え型のポリヌクレオチド、または上記のベクターも提供される。

10

【0057】

一態様では、細胞は、単離されたかまたは組換え型のポリペプチドを含む単離された抗原提示細胞である。別の態様では、ポリペプチドは、樹状細胞などの細胞の表面上に存在する。別の態様では、抗原提示細胞に、ポリペプチドをコードする1種または複数種のポリヌクレオチドをトランスフェクトする。

【0058】

ポリペプチドの断片または等価物を含めた、上記の単離されたかまたは組換え型のポリペプチドを特異的に認識し、それに結合する抗体または抗原結合性断片がさらに提供される。抗体の非限定的な例としては、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、抗体誘導體、ベニア化抗体、二機能性抗体(dia body)、キメラ抗体、抗体誘導體、組換えヒト抗体、または抗体断片が挙げられる。特定の態様では、抗体は、モノクローナル抗体である。モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞株がさらに提供される。

20

【0059】

本発明は、上で同定された単離されたかまたは組換え型のポリペプチドまたは抗体またはその断片のうちの1つまたは複数コードする単離されたかまたは組換え型のポリヌクレオチドも提供する。単離されたポリヌクレオチドを含むベクターがさらに提供される。本発明の2つ以上の単離されたポリペプチドの一態様では、単離されたポリヌクレオチドは、ポリシストロニックベクター内に含有されてよい。

【0060】

本明細書に記載の1つまたは複数の単離されたかまたは組換え型のポリペプチドを含む単離された宿主細胞、または単離されたかまたは組換え型のポリヌクレオチド、またはベクターがさらに提供される。一態様では、単離された宿主細胞は、原核生物の細胞または真核細胞、例えば、樹状細胞などの抗原提示細胞などである。

30

【0061】

ポリヌクレオチド、ポリペプチド、抗体、抗原結合性断片、ベクターまたは宿主細胞は、検出可能な標識をさらに含んでよい。

【0062】

キャリアと、本発明の単離されたかまたは組換え型のポリペプチドのうちの1つまたは複数、本発明の単離されたかまたは組換え型のポリヌクレオチド、本発明のベクター、本発明の単離された宿主細胞、または実施形態の抗体とを含む組成物も提供される。キャリアは、固体支持体、ステントまたは歯科インプラントのような医用デバイス、または薬学的に許容されるキャリアなどの液体のうちの1つまたは複数であってよい。組成物は、アジュバント、抗菌薬または抗原性ペプチドをさらに含んでよい。

40

【0063】

組成物は、追加的な生物学的に活性な作用剤をさらに含んでよい。その非限定的な例は、1種の抗菌剤、例えば、他のワクチン構成成分(すなわち、抗原性ペプチド)、例えば、表面抗原、例えば、OMP P5、rsPilA、OMP 26、OMP P2、またはIV型Pilinタンパク質など(JurcisekおよびBakaletz(2007年) J. of Bacteriology 189巻(10号): 3868~387

50

5頁、およびMurphy、TF、Bakaletz、LOおよびSmeesters、PR(2009年)The Pediatric Infectious Disease Journal、28巻:S121~S126頁を参照されたい)および複数種の抗菌剤である。

【0064】

本発明は、上記の抗原性ペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチドを含む宿主細胞を、ポリヌクレオチドの発現に好ましい条件下で成長させること、または培養することによって抗原性ペプチドを作製するための方法も提供する。この方法によって作製されるポリペプチドは、さらにin vitroまたはin vivoで使用するために単離することができる。

10

【0065】

上記の組成物および使用説明書を含む診断または処置に使用するためのキットも提供される。本明細書において提供される新しい薬物および/または併用療法のスクリーニングを実施するためのキットも提供される。

【図面の簡単な説明】

【0066】

【図1A】図1Aは、NTHIの86-028NP株によりチンチラの中耳において形成され、NTHI Tfpピリントパク質について標識される(この画像の後景では、白色または明灰色の斑点および小型のクラスターとして現れる)ほか、二本鎖DNA(dsDNA)を標識するためにDAPIも伴う(この画像の前景では、間欠的な凝集塊を伴う暗灰色の重複鎖および束状物質として現れる)バイオフィルムを示す図である。この図は、JurcisekおよびBakaletz(2007年)、J. of Bacteriology、189巻(10号):3868~3875頁から複製した。図1Bは、嚢胞性線維症を伴う小児の肺に由来する気管支肺胞洗浄液(BAL)に対する免疫標識を示す図である。嚢胞性線維症を伴う小児の肺をBALにより洗浄し、洗浄液に由来する粒子状物質を凍結させ、スライドガラスに固定して、免疫標識した。凍結させた粒子状物質は、抗IHF抗体により免疫標識した。ヒト嚢胞性線維症患者のバイオフィルムにおけるIHF陽性巣の存在は、ヒト嚢胞性線維症の病因に、dsDNAの頂点にIHFを伴うバイオフィルムが含まれることを例示する。図1Cは、副鼻腔の手術時に回収され、OCT凍結媒体(Fisher Scientificから型番14-373-65で市販されているOptimal Cutting Temperature媒体)中に包埋された、ヒト副鼻腔に由来する分泌物を示す図である。10μmの凍結切片を切り出し、抗IHF抗体により標識した(灰色のクラスターとして現れる)。試料中のdsDNAは、蛍光色素であるDAPI(Invitrogenから市販されている4',6-ジアミジノ-2-フェニルインドール)で染色した。副鼻腔炎患者のバイオフィルムにおけるIHF陽性巣の存在は、ヒト副鼻腔炎の病因に、dsDNAの頂点にIHFを伴うバイオフィルムが含まれることを例示する。

20

30

【図1B】図1Aは、NTHIの86-028NP株によりチンチラの中耳において形成され、NTHI Tfpピリントパク質について標識される(この画像の後景では、白色または明灰色の斑点および小型のクラスターとして現れる)ほか、二本鎖DNA(dsDNA)を標識するためにDAPIも伴う(この画像の前景では、間欠的な凝集塊を伴う暗灰色の重複鎖および束状物質として現れる)バイオフィルムを示す図である。この図は、JurcisekおよびBakaletz(2007年)、J. of Bacteriology、189巻(10号):3868~3875頁から複製した。図1Bは、嚢胞性線維症を伴う小児の肺に由来する気管支肺胞洗浄液(BAL)に対する免疫標識を示す図である。嚢胞性線維症を伴う小児の肺をBALにより洗浄し、洗浄液に由来する粒子状物質を凍結させ、スライドガラスに固定して、免疫標識した。凍結させた粒子状物質は、抗IHF抗体により免疫標識した。ヒト嚢胞性線維症患者のバイオフィルムにおけるIHF陽性巣の存在は、ヒト嚢胞性線維症の病因に、dsDNAの頂点にIHFを伴うバイオフィルムが含まれることを例示する。図1Cは、副鼻腔の手術時に回収され、OCT凍

40

50

結媒体 (Fisher Scientific から型番 14-373-65 で市販されている Optimal Cutting Temperature 媒体) 中に包埋された、ヒト副鼻腔に由来する分泌物を示す図である。10 μm の凍結切片を切り出し、抗 I H F 抗体により標識した (灰色のクラスターとして現れる)。試料中の ds DNA は、蛍光色素である D A P I (Invitrogen から市販されている 4', 6 - ジアミジノ - 2 - フェニルインドール) で染色した。副鼻腔炎患者のバイオフィルムにおける I H F 陽性巣の存在は、ヒト副鼻腔炎の病因に、ds DNA の頂点に I H F を伴うバイオフィルムが含まれることを例示する。

【図 1 C】図 1 A は、N T H I の 86-028 N P 株によりチンチラの中耳において形成され、N T H I T f p ピリントタンパク質について標識される (この画像の後景では、白色または明灰色の斑点および小型のクラスターとして現れる) ほか、二本鎖 DNA (ds DNA) を標識するために D A P I も伴う (この画像の前景では、間欠的な凝集塊を伴う暗灰色の重複鎖および束状物質として現れる) バイオフィルムを示す図である。この図は、Jurcisek および Bakaletz (2007 年)、J. of Bacteriology、189 巻 (10 号) : 3868 ~ 3875 頁から複製した。図 1 B は、嚢胞性線維症を伴う小児の肺に由来する気管支肺胞洗浄液 (BAL) に対する免疫標識を示す図である。嚢胞性線維症を伴う小児の肺を BAL により洗浄し、洗浄液に由来する粒子状物質を凍結させ、スライドガラスに固定して、免疫標識した。凍結させた粒子状物質は、抗 I H F 抗体により免疫標識した。ヒト嚢胞性線維症患者のバイオフィルムにおける I H F 陽性巣の存在は、ヒト嚢胞性線維症の病因に、ds DNA の頂点に I H F を伴うバイオフィルムが含まれることを例示する。図 1 C は、副鼻腔の手術時に回収され、O C T 凍結媒体 (Fisher Scientific から型番 14-373-65 で市販されている Optimal Cutting Temperature 媒体) 中に包埋された、ヒト副鼻腔に由来する分泌物を示す図である。10 μm の凍結切片を切り出し、抗 I H F 抗体により標識した (灰色のクラスターとして現れる)。試料中の ds DNA は、蛍光色素である D A P I (Invitrogen から市販されている 4', 6 - ジアミジノ - 2 - フェニルインドール) で染色した。副鼻腔炎患者のバイオフィルムにおける I H F 陽性巣の存在は、ヒト副鼻腔炎の病因に、ds DNA の頂点に I H F を伴うバイオフィルムが含まれることを例示する。

【図 2】図 2 は、チンチラの中耳において形成された N T H I バイオフィルム内の二本鎖 DNA (この画像では、白色鎖として現れる) の免疫組織化学標識を示す図である。ds DNA により形成される頂点のうち、ほぼ 100% で、I H F の陽性標識 (この 3 枚のパネルによる画像の中央のパネルでは、点状巣を指し示す矢印により示される) が観察された。B 型 DNA の場合、DNA 1 塩基当たり 0.34 nm と仮定すれば、頂点間の平均距離は約 6 μm である、または各頂点間約 18 kb であった。本発明者らが知る限り、抗 I H F 抗体と交差反応するエピトープを保有するタンパク質は、H U タンパク質および I H F タンパク質に限られる。したがって、これらの観察に基づけば、N T H I バイオフィルムマトリックス内に細胞外 DNA B I I タンパク質が存在するだけでなく、これらのタンパク質が、もっぱら、立体構成において十字構造に類似する e DNA 鎖上に位置決定されると考えられ (図 1 B、下部)、したがってそれは e DNA の得られた湾曲構造を媒介する役割を果たすことを示唆すると考えられることがより重要であった。

【図 3 - 1】図 3 は、I H F を指向する抗体が、チャンバースライドにおいて形成された、確立された N T H I バイオフィルムを可逆化したことを示す図である。図 3 A は、非特異的抗体で処置されたバイオフィルムを示す図である。図 3 B は、ナイーブウサギ血清で処置されたバイオフィルムを示す図である。搭状物 (白色 ~ 明灰色のクラスター化した領域として現れる) および水チャネル (黒色の空間) に富む、堅調な N T H I バイオフィルムに注目されたい。図 3 C は、抗 I H F 抗体で処置したバイオフィルムを示す図である。抗 I H F 抗体による処置後にバイオフィルム構造が根絶されていることに注目されたい。個々の N T H I (小型で点状の白色 ~ 明灰色の染みとして現れる) およびまばらで短い塔状物 (白色 ~ 明灰色の、より稠密にクラスター化した領域として現れる) は残存している

10

20

30

40

50

。図3Dおよび3Eは、IHFを指向する抗体が、確立されたNTHIバイオフィルムを可逆化することをさらに示す図である。図3(パネルE)において示される通り、バイオフィルムは、ナイーブ血清と共にインキュベートされたバイオフィルム(図3、パネルD)と比較した場合、三次元構造の劇的な縮小を示した。多連アッセイによるCOMSTAT解析を介して、バイオフィルムの高さ、バイオマス、バイオフィルムの厚さという測定されたパラメータは全て、抗IHF抗体と共にインキュベートしたところ、平均で80%を超えて低減された。

【図3-2】図3は、IHFを指向する抗体が、チャンバースライドにおいて形成された、確立されたNTHIバイオフィルムを可逆化したことを示す図である。図3Aは、非特異的抗体で処置されたバイオフィルムを示す図である。図3Bは、ナイーブウサギ血清で処置されたバイオフィルムを示す図である。搭状物(白色~明灰色のクラスター化した領域として現れる)および水チャネル(黒色の空間)に富む、堅調なNTHIバイオフィルムに注目されたい。図3Cは、抗IHF抗体で処置したバイオフィルムを示す図である。抗IHF抗体による処置後にバイオフィルム構造が根絶されていることに注目されたい。個々のNTHI(小型で点状の白色~明灰色の染みとして現れる)およびまばらで短い塔状物(白色~明灰色の、より稠密にクラスター化した領域として現れる)は残存している。図3Dおよび3Eは、IHFを指向する抗体が、確立されたNTHIバイオフィルムを可逆化することをさらに示す図である。図3(パネルE)において示される通り、バイオフィルムは、ナイーブ血清と共にインキュベートされたバイオフィルム(図3、パネルD)と比較した場合、三次元構造の劇的な縮小を示した。多連アッセイによるCOMSTAT解析を介して、バイオフィルムの高さ、バイオマス、バイオフィルムの厚さという測定されたパラメータは全て、抗IHF抗体と共にインキュベートしたところ、平均で80%を超えて低減された。

【図4A】図4Aおよび図4Bは、NTHIにより形成された、確立されたバイオフィルムを、抗IHF抗体で処置したところ、上清中に放出されるNTHIが結果として増大したことを示すグラフである。チャンバースライド内で16時間にわたり成長させたNTHIバイオフィルムを、滅菌媒体(sBHI)で偽処置する、またはナイーブウサギ血清もしくはウサギ抗IHF抗体で処置した。6時間後(図4A)または10時間後(図4B)に上清を回収し、解析した。抗IHF抗体による処置後には、上清中のNTHI数が増大したことに注目されたい。抗IHF抗体を伴うインキュベーションは、約6時間以内に、チャンバースライド内の媒体に由来する培養物から回収可能な浮遊性細菌の顕著な増大を結果としてもたらし、インキュベーションの10時間後には顕著な増大が見られた。これらの結果により、バイオフィルムマトリックスからの細菌の放出が示唆された。

【図4B】図4Aおよび図4Bは、NTHIにより形成された、確立されたバイオフィルムを、抗IHF抗体で処置したところ、上清中に放出されるNTHIが結果として増大したことを示すグラフである。チャンバースライド内で16時間にわたり成長させたNTHIバイオフィルムを、滅菌媒体(sBHI)で偽処置する、またはナイーブウサギ血清もしくはウサギ抗IHF抗体で処置した。6時間後(図4A)または10時間後(図4B)に上清を回収し、解析した。抗IHF抗体による処置後には、上清中のNTHI数が増大したことに注目されたい。抗IHF抗体を伴うインキュベーションは、約6時間以内に、チャンバースライド内の媒体に由来する培養物から回収可能な浮遊性細菌の顕著な増大を結果としてもたらし、インキュベーションの10時間後には顕著な増大が見られた。これらの結果により、バイオフィルムマトリックスからの細菌の放出が示唆された。

【図5】図5は、IHFによる経皮的な免疫化の結果、中耳において確立されたバイオフィルムが縮小したことを示す図である。中耳骨胞は、残存するバイオフィルムの相対量について、0~4+のスケールで盲検によりランク付けした。

【図6】図6Aは、IHF-IHF二量体において別のIHFと相互作用する、もしくはそれに結合するIHFのアミノ酸残基(上欄の三角形により示される)、またはDNAと相互作用する、もしくはそれに結合するIHFのアミノ酸残基(下欄の三角形により示される)を示すマップである。ペプチドは、短い垂直のバーにより、3アミノ酸を含有する

10

20

30

40

50

領域へと分割される。図 6 B は、I H F との微生物 D N A の相互作用を示すグラフである。

【図 7】図 7 は、ウサギ抗 I H F 抗体と共にインキュベートした場合の、*S. aureus*、*N. gonorrhoeae*、および *P. aeruginosa* により形成されたバイオフィルムの縮小を、ナープウサギ血清と共にインキュベートした場合と比較して示す図である。

【図 8】図 8 は、*in vitro* において *E. coli* により形成されたバイオフィルムを、ナープ血清または抗 I H F 血清と共にインキュベートすることによる効果を示す図である。バイオフィルムの代表的画像をパネル A ~ F に示し、個々のバイオフィルムの高さをそれぞれの画像の右側に示す一方で、抗 I H F 抗体と共にインキュベートすることによる、バイオフィルムの高さ、バイオマス、および平均の厚さの低減百分率に関する平均値を、各行の末尾の表に示す。パネル A および B : 親株である M G 1 6 5 5 株を示す図である。パネル C および D : H U タンパク質を欠損させた、*hupA* 遺伝子、*hubB* 遺伝子の二重変異体を示す図である。パネル E および F : I H F タンパク質を欠損させた、*himD* 遺伝子、*himA* 遺伝子の二重変異体を示す図である。予測される通り、抗 I H F 血清は、親単離株または H U 欠損変異体により誘導されたバイオマスを低減する能力を有するが、I H F 欠損株により誘導されたバイオマスを低減する能力は有さない。

【図 9】図 9 A は、経皮的な送達経路を介する I H F タンパク質で免疫化したところ、チンチラの中耳内に存在する N T H I 誘導性バイオフィルムのバイオマスを有意に ($p < 0.001$) 低減する抗体の形成が誘導されたことを示す図である。図 9 B は、アジュバント単独で免疫化した動物の耳に残存するバイオマスと対比した、I H F タンパク質 + アジュバントで免疫化した動物の耳に残存するバイオマスの代表的な画像を示す図である。図 9 B における最後の列は、この実験で用いられたスコア付けシステムの最大スコアおよび最小スコアの場合のバイオマスの画像を示す。上の画像が、4 + とスコア付けされるバイオマスを含む中耳の画像であるのに対し、下の画像は、0 とスコア付けされ、バイオマスを示さない健康な中耳である。

【図 10】図 10 A は、アジュバント単独で T C I を介して免疫化されたチンチラの中耳から回収されたバイオフィルムの凍結切片に対する H & E 染色と対比された、I H F タンパク質 + アジュバントで T C I を介して免疫化されたチンチラの中耳から回収されたバイオフィルムの凍結切片に対する H & E 染色を示す図である。アジュバント単独で免疫化された動物から回収されたバイオフィルムの外見と比較して、I H F タンパク質 + アジュバントで免疫化された動物から回収されたバイオフィルムの外見が凝縮され、崩壊していることに注目されたい。パネル A に示される画像は、2 つの代表的なバイオマス間における高さおよび密度の差を例示するために、同一の倍率で示されている。図 10 B は、アジュバント単独で免疫化された動物の中耳に存在する細菌負荷と対比して、I H F タンパク質 + アジュバントで免疫化された動物の中耳に存在する細菌負荷が有意に ($p < 0.05$) 低減されたことを示す図である。

【図 11】図 11 は、I H F タンパク質が、チンチラを免疫化するのに用いられる条件下で、*dsDNA* と共に特異的な複合体を形成することを裏付けた、電気泳動による移動シフトアッセイを示す図である。

【図 12】図 12 は、天然の I H F タンパク質 + アジュバントによる経皮的な免疫化が、アジュバント単独 ($p < 0.017$)、*dsDNA* 単独 ($p < 0.003$)、または *dsDNA* をすでに結合させた I H F タンパク質 + アジュバント ($p < 0.001$) の受け入れと比較して、チンチラの中耳内に存在するバイオマスを有意に低減する抗体の形成を誘導したことを示すグラフである。この結果は、天然の I H F タンパク質に *dsDNA* が結合すると、この D N A B I I ファミリーメンバーの防御的エピトープが遮蔽されることを示唆した。

【図 13】図 13 は、I H F タンパク質または *dsDNA* を結合させた I H F タンパク質による皮下免疫化後の血清における抗体による I H F タンパク質の認識 (矢印) を示す図である。

10

20

30

40

50

【図14】図14は、個別の最適未満濃度の抗IHF血清(1:200)、および最適未満濃度のDNアーゼI、次いで、これらの混合による相乗作用(図14A)、個別の最適未満濃度の抗IHF血清(1:100)、および最適未満濃度の抗外膜タンパク質P5(OMP P5)血清、次いで、これらの混合による相乗作用(図14B)、または個別の有効希釈率の抗IHF抗体(バイオフィルムのデバルキングに関する有効希釈率であり、細菌細胞の死滅を誘導する有効希釈率ではない)、およびアモキシシリン、次いで、これらの混合による相乗作用(図14C)を裏付ける図である。これらの状況のそれぞれにおいて、任意の作用剤を抗IHF血清と組み合わせた場合、観察されるバイオフィルムをデバルキングし、かつ/または死滅させる効果は、任意の単一の作用剤を単独で用いた場合に注意される効果より大きかった。注:それぞれの画像の下には、バイオフィルムの高さ(ミクロン単位)を示す。

10

【図15】図15は、ナイーブウサギ血清またはウサギ抗IHF血清で処置したE. coli(画像の上行)、ナイーブラット血清またはラット抗HNS血清で処置したE. coli(画像の中行)、ナイーブマウス血清またはマウス抗DPS血清で処置したE. coli(画像の下行)について比較する図である。抗IHF血清で処置した後は、バイオマスが顕著に低減されたが、抗HNS血清も抗DPS血清も、本明細書で用いられるバイオマスの低減を誘導しなかった。抗IHF血清による処置は、結果として、バイオフィルムの高さを48.2%低減し、バイオフィルムの平均の厚さを81%低減し、バイオマスを64.5%低減した。これに対し、抗HNS血清または抗DPS血清による処置は、結果として、バイオフィルムの名目の高さを、それぞれ、0.7%および4.2%低減し、バイオフィルムの平均の厚さを、それぞれ、5.8%および6.4%低減し、バイオマスを、それぞれ、0.3%および-17.4%低減した。

20

【図16】図16は、バイオフィルム内で構成された場合の宿主生物に由来するDNAの相対的な空間分布、またはバイオフィルム内で構成された場合の細菌に由来するDNAの相対空間分布を裏付けるin situハイブリダイゼーションを示す図である。各状況において、DNAは、これらの白黒画像の前景内の明るい白色の領域として現れる。宿主に由来するDNAは、右側上方の画像内でより稠密に標識されていることから、バイオフィルムの外面に重点的に分布していることが示されるのに対し、細菌に由来するDNAは、この4枚のパネルによる合成画像の左側下方の画像内でより稠密に標識されており、それにより、バイオフィルムの内部領域内に密に分布していることが示される。

30

【発明を実施するための形態】

【0067】

別段の定義のない限り、本明細書において使用される全ての技術用語および科学用語は、本発明が属する分野の当業者に一般に理解されているものと同じ意味を有する。本明細書で提供されるヌクレオチド配列は全て5'から3'の方向で示されている。本明細書に記載の方法および材料と類似した、またはそれと等しい任意の方法および材料を本発明の実施または試験において使用することができるが、本明細書には、好ましい方法、デバイス、および材料が記載されている。本明細書において引用された技術刊行物および特許公報は全て、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。本明細書における全てが、本発明が先行発明の理由でそのような開示に先立つ権利が与えられないことを容認するものと解釈されるべきではない。

40

【0068】

本発明の実施には、別段の指定のない限り、当技術分野の技術の範囲内である、組織培養、免疫学、分子生物学、微生物学、細胞生物学および組換えDNAの従来技法を使用する。例えば、SambrookおよびRussell編(2001年)Molecular Cloning: A Laboratory Manual、第3版; Ausubelら編(2007年)Current Protocols in Molecular Biologyシリーズ; Methods in Enzymology(Academic Press, Inc., N.Y.)シリーズ; MacPhersonら(1991年)PCR 1: A Practical Approach(IRL Pre

50

ss at Oxford University Press); MacPhersonら(1995年)PCR 2: A Practical Approach; HarlowおよびLane編(1999年)Antibodies, A Laboratory Manual; Freshney(2005年)Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique、第5版; Gait編(1984年)Oligonucleotide Synthesis; 米国特許第4,683,195号; HamesおよびHiggins編(1984年)Nucleic Acid Hybridization; Anderson(1999年)Nucleic Acid Hybridization; HamesおよびHiggins編(1984年)Transcription and Translation; Immobilized Cells and Enzymes (IRL Press(1986年)); Perbal(1984年)A Practical Guide to Molecular Cloning; MillerおよびCalos編(1987年)Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (Cold Spring Harbor Laboratory); Makrides編(2003年)Gene Transfer and Expression in Mammalian Cells; MayerおよびWalker編(1987年)Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology (Academic Press, London); およびHerzenbergら編(1996年)Weir's Handbook of Experimental Immunologyを参照されたい。

【0069】

範囲を含めた全ての数字表示、例えば、pH、温度、時間、濃度、および分子量は近似であり、1.0または0.1単位で、必要に応じて、またはその代わりに、+/-15%、あるいは10%あるいは5%あるいは2%の変動で(+)または(-)に変動する。必ずしも明記されているとは限らないが、全ての数字表示に「約」という用語が先行することが理解されるべきである。本明細書に記載の試薬はただ単に例示的なものであり、その等価物が当該技術分野で公知であることも、必ずしも明記されているとは限らないが、理解されるべきである。

【0070】

本明細書および特許請求の範囲において使用される場合、単数形「a(1つの)」、「an(1つの)」および「the(その)」は、文脈によりそうでないことが明確に規定されない限り、複数の参照対象を含む。例えば、「ポリペプチド」という用語は、複数のポリペプチドを、それらの混合物を含めて包含する。

【0071】

本明細書で使用される場合、「含む(comprising)」という用語は、組成物および方法が、列挙された要素を含むが、他のものを排除しないことを意味するものとする。「から本質的になる(consisting essentially of)」は、組成物および方法を定義するために使用される場合、意図された使用のための組合せのための任意の本質的に重要な他の要素を排除することを意味するべきである。したがって、本明細書で定義されている要素から本質的になる組成物は、単離および精製方法由来の微量汚染物質および薬学的に許容されるキャリア、例えば、リン酸緩衝生理食塩水、保存料などを排除しない。「からなる(consisting of)」は、他の成分の微量要素および本発明の組成物を投与するための実質的な方法のステップ以上のものを排除することを意味するべきである。これらの移行用語のそれぞれによって定義される実施形態は、本発明の範囲内である。

【0072】

「バイオフィルム」とは、時々構造物の表面に接着する微生物の組織化された群集を意味し、有機または無機であり得、それらが分泌および/または放出するDNAなどのポリマーと一緒にあり得る。バイオフィルムは、微生物(microbiotics)および

抗菌剤に対して非常に耐性である。バイオフィームは、歯肉組織、歯および修復物に生息し、歯周ブランク疾患としても公知の齲歯および歯周病を引き起こす。バイオフィームは、慢性中耳感染症も引き起こす。バイオフィームは、歯科インプラント、ステント、カテーテル線およびコンタクトレンズの表面上にも形成され得る。バイオフィームは、ペースメーカー、心臓弁置換物、人工関節および他の外科用インプラントの上で成長する。Centers for Disease Control) は、院内の感染 (nosocomial infection) (院内感染 (hospital-acquired infection)) の 65% 超はバイオフィームによって引き起こされると推定している。バイオフィームは、慢性腔感染症を引き起こし、免疫系が妨げられている人において生命にかかわる全身感染症を導く。バイオフィームは、多数の疾患にも関与する。例えば、嚢胞性線維症の患者は、抗生物質耐性のバイオフィームをもたらすことも多いシュードモナス感染を有する。

10

【0073】

「を阻害すること、それと競合することまたはその力価を決定すること」という用語は、微生物バイオフィームの構成成分である DNA / タンパク質マトリックスの形成を減らすことを意味する (例えば、図 1 に示されている通り)。

【0074】

「DNABII ポリペプチドまたは DNABII タンパク質」とは、DNA 結合性ドメインで構成され、したがって、微生物 DNA に対して特異的であるまたは一般的な親和性を有する DNA 結合性のタンパク質またはポリペプチドを意味する。一態様では、DNABII ポリペプチドまたは DNABII タンパク質は、DNA に、副溝において結合する。DNABII タンパク質の非限定的な例は、E. coli U93 株由来の組込み宿主因子 (IHF) タンパク質およびヒストン様タンパク質 (HU) である。バイオフィームと関連する可能性がある他の DNA 結合性タンパク質としては、DPS (Genbank 受託番号: CAA49169)、H-NS (Genbank 受託番号: CAA47740)、Hfq (Genbank 受託番号: ACE63256)、CbpA (Genbank 受託番号: BAA03950) および CbpB (Genbank 受託番号: NP_418813) が挙げられる。

20

【0075】

「IHF」タンパク質の「組込み宿主因子」は、バクテリオファージがその DNA を宿主細菌に組み入れるために使用する細菌のタンパク質である。これらは、細胞外の微生物 DNA にも結合する。E. coli において IHF タンパク質サブユニットをコードする遺伝子は、himA 遺伝子 (Genbank 受託番号: POA6X7.1) および himD 遺伝子 (POA6Y1.1) である。これらの遺伝子に対するホモログは他の生物体において見いだされ、他の生物体由来のこれらの遺伝子に対応するペプチドは、表 10 において見いだすことができる。

30

【0076】

「HMGB1」は、DNA の副溝に結合すること、およびそれを歪めることが報告されている高移動性群ボックス (HMGB) 1 タンパク質であり、干渉作用剤の例である。組換え型の、または単離されたタンパク質およびポリペプチドは、AtgenGlobal、ProSpecBio、Protein1 および Abnova から市販されている。

40

【0077】

「HU」または「E. coli U93 株由来のヒストン様タンパク質」とは、一般には E. coli に付随するヘテロ二量体タンパク質のクラスを指す。HU タンパク質は、DNA ジャンクションに結合することが公知である。他の微生物から関連するタンパク質が単離されている。E. coli HU の完全なアミノ酸配列は、Laine ら (1980 年) Eur. J. Biochem. 103 巻 (3 号): 447 ~ 481 頁によって報告された。HU タンパク質に対する抗体が Abcam から市販されている。E. coli における HU タンパク質サブユニットをコードする遺伝子は、それぞれ配列番号 28 および 29 に対応する hupA および hupB である。他の生物体においてこれらの遺伝

50

子に対するホモログが見いだされ、他の生物体由来のこれらの遺伝子に対応するペプチドは、表10に見いだすことができる。

【0078】

「表面抗原」または「表面タンパク質」という用語は、細菌細胞などの細胞表面上のタンパク質またはペプチドを指す。表面抗原の例は、外膜タンパク質、例えば、OMP P5 (Genbank 受託番号: YP_004139079.1)、OMP P2 (Genbank 受託番号: ZZX87199.1)、OMP P26 (Genbank 受託番号: YP_665091.1)、rsPilA または組換え型の可溶性PilA (Genbank 受託番号: EFU96734.1) およびIV型 Pilin (Genbank 受託番号: YP_003864351.1) などである。

10

【0079】

「Haemophilus influenzae」という用語は、多くの異なる感染症、例えば、耳感染症、眼感染症、および副鼻腔炎などを引き起こす可能性がある病原性細菌を指す。Haemophilus influenzaeの多くの異なる株が単離されており、それはIhfA遺伝子またはタンパク質を有する。Haemophilus influenzaeの異なる株のいくつかの非限定的な例としては、Rd KW20、86-028NP、R2866、PittGG、PittEE、R2846、および2019が挙げられる。

【0080】

「微生物DNA」は、バイオフィルムを生じる微生物由来の一本鎖DNAまたは二本鎖DNAを意味する。

20

【0081】

バイオフィルムを「阻害、予防または破壊すること」とは、バイオフィルムの構造を予防的または治療的に縮小させることを意味する。バイオフィルムの破壊または縮小の例は図5に示されている。

【0082】

「干渉作用剤」とは、微生物DNAに対するIHFなどのDNABIIポリペプチドに対して競合、阻害、予防、滴定のうちの任意の1つまたは複数をする作用剤、または微生物バイオフィルムの破壊もする作用剤を意味する。干渉作用剤は、化学分子または生物分子の任意の1つまたは複数であってよい。例えば、IHFは、例えば、4方向のジャンクション、シス-白金付加物、DNAループまたは塩基のバルジを含有するDNAなどのDNA構造に特異的に結合する、それを屈曲させるまたは歪めることができる。そのような作用剤の例としては、これらに限定することなく、(1) IHFのDNA結合活性を阻害する小分子、(2) DNAへの結合においてIHFと競合する、ポリアミンおよびスペルミンなどの小分子、(3) DNAへの結合においてIHFと競合する、IHFのペプチド断片などのポリペプチド、(4) IHFを対象とする抗体またはその断片、または(5) 4方向のポリヌクレオチドまたは屈曲したポリヌクレオチド、またはIHF-結合性について競合する屈曲したDNA構造または歪んだDNA構造を含有する他の種類のポリヌクレオチドが挙げられる。「IHFの核酸への結合を阻害する小分子」とは、上記の(1) または(2)を指し、DNAに、副溝において結合する小分子、すなわち、副溝結合性分子を包含する。「4方向のポリヌクレオチド」とは、DNAの4つの鎖間にホリデイジャンクションとしても公知の4方向のジャンクションを含有するポリヌクレオチドを意味する。

30

40

【0083】

「屈曲したポリヌクレオチド」とは、他の鎖と対にならない1本の鎖上に小さなループを含有する二本鎖ポリヌクレオチドを意味する。いくつかの実施形態では、ループは、1塩基から約20塩基までの長さ、あるいは2塩基から約15塩基までの長さ、あるいは約3塩基から約12塩基までの長さ、あるいは約4塩基から約10塩基までの長さである、あるいは、約4塩基、5塩基、または6塩基、または7塩基、または8塩基、または9塩基、または10塩基を有する。

50

【 0 0 8 4 】

「DNAへの結合においてIHFと競合するポリペプチド」とは、屈曲したDNA構造または歪んだDNA構造への結合においてIHFと競合するが、DNAとバイオフィルムを形成しないタンパク質またはペプチドを意味する。例としては、これらに限定することなく、IHFの1つまたは複数のDNA結合ドメインを含むIHFの断片、またはその生物学的等価物が挙げられる。DNA結合ドメインは図6に示されている。

【 0 0 8 5 】

診断または処置の「被験体」は、細胞または動物、例えば、哺乳動物またはヒトなどである。診断または処置のための非ヒト動物被験体、感染または動物モデルのための非ヒト動物被験体は、例えば、サル、ネズミ科の動物、例えば、ラット、マウス、チンチラなど、イヌ科の動物、例えば、イヌ、ウサギ科の動物、例えば、ウサギなど、家畜、競技動物、および愛玩動物である。

10

【 0 0 8 6 】

「タンパク質」、「ペプチド」および「ポリペプチド」という用語は、互換的に使用され、それらの最も広範な意味では、2つ以上のサブユニットのアミノ酸、アミノ酸の類似体またはペプチド模倣薬の化合物を指す。サブユニットは、ペプチド結合によって連結されていてよい。別の実施形態では、サブユニットは、他の結合、例えば、エステル結合、エーテル結合などによって連結されていてよい。タンパク質またはペプチドは、少なくとも2つのアミノ酸を含有しなければならず、最大数のアミノ酸に対する制限はなく、タンパク質の配列またはペプチドの配列を含んでよい。本明細書で使用される場合、「アミノ酸」という用語は、天然アミノ酸および/または非天然アミノ酸または合成アミノ酸のいずれかを指し、グリシンおよびD光学異性体とL光学異性体の両方、アミノ酸の類似体およびペプチド模倣薬を含める。

20

【 0 0 8 7 】

「C末端のポリペプチド」とは、少なくとも10個、あるいは少なくとも15個、あるいは少なくとも20個、または少なくとも25個のC末端アミノ酸、あるいはポリペプチドの半分を意味する。別の態様では、90アミノ酸を含有するポリペプチドについて、C末端のポリペプチドは、アミノ酸46~90を含む。一態様では、この用語は、カルボキシ末端から20個のC末端のアミノ酸を意味する。

【 0 0 8 8 】

「ポリヌクレオチド」および「オリゴヌクレオチド」という用語は互換的に使用され、任意の長さのポリマーの形態のヌクレオチド、デオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチドのいずれか、またはその類似体を指す。ポリヌクレオチドは、任意の三次元構造を有してよく、公知または未知の任意の機能を果たし得る。以下はポリヌクレオチドの非限定的な例である：遺伝子または遺伝子断片（例えば、プローブ、プライマー、ESTタグまたはSAGEタグ）、エクソン、イントロン、メッセンジャーRNA（mRNA）、転移RNA、リボソームRNA、RNAi、リボザイム、cDNA、組換えポリヌクレオチド、分岐ポリヌクレオチド、プラスミド、ベクター、任意の配列の単離されたDNA、任意の配列の単離されたRNA、核酸プローブおよびプライマー。ポリヌクレオチドは、修飾されたヌクレオチド、例えば、メチル化されたヌクレオチドおよびヌクレオチド類似体などを含んでよい。存在する場合、ヌクレオチド構造の修飾は、ポリヌクレオチドの組立ての前に、またはその後付与することができる。ヌクレオチドの配列を非ヌクレオチド構成成分で遮ることができる。ポリヌクレオチドは、重合後に、例えば、標識化構成成分とコンジュゲートすることによってさらに修飾することができる。この用語はまた、二本鎖分子と一本鎖分子の両方を指す。別段の指定または要求がない限り、ポリヌクレオチドである本発明の任意の実施形態は、二本鎖の形態と、二本鎖の形態を成すことが公知であるまたは予測される2つの相補的な一本鎖の形態のそれぞれの両方を包含する。

30

40

【 0 0 8 9 】

ポリヌクレオチドは、特異的な配列の4つのヌクレオチド塩基：アデニン（A）；シトシン（C）；グアニン（G）；チミン（T）；およびポリヌクレオチドがRNAである場

50

合はチミンの代わりにウラシル（U）で構成される。したがって、「ポリヌクレオチド配列」という用語は、ポリヌクレオチド分子のアルファベット表示である。このアルファベット表示は、中央処理装置を有するコンピュータ内のデータベースに入力し、バイオインフォマティクスの適用、例えば、機能ゲノム科学および相同性検索などのために使用することができる。

【0090】

「単離された」または「組換え型の」という用語は、本明細書において核酸、例えば、DNAまたはRNAなどに関して使用される場合、それぞれ、巨大分子ならびにポリペプチドの天然の供給源に存在する他のDNAまたはRNAから分離された分子を指す。「単離されたかまたは組換え型の核酸」という用語は、断片として天然に存在せず、自然の状態で見いだされない核酸断片を含むものとする。「単離された」という用語は、本明細書では、他の細胞タンパク質から単離されたポリヌクレオチド、ポリペプチドおよびタンパク質を指すためにも使用され、精製されたポリペプチドと組換え型のポリペプチドの両方を包含するものとする。他の実施形態では、「単離されたかまたは組換え型の」という用語は、細胞、組織、ポリヌクレオチド、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、抗体またはその断片（複数可）が天然で通常付随する構成物、細胞および他の物から分離されていることを意味する。例えば、単離された細胞は、異なる表現型または遺伝子型の組織または細胞から分離された細胞である。単離されたポリヌクレオチドは、そのネイティブな環境または天然の環境、例えば、染色体上では通常付随する3'および5'の連続したヌクレオチドから分離されている。当業者には明らかであるように、天然に存在しないポリヌクレオチド、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、抗体またはその断片（複数可）は、その天然に存在する対応物と区別するために「単離」を必要としない。

10

20

【0091】

明示的な列挙がなくとも、また別段の意図がなければ、本発明がポリペプチド、タンパク質、ポリヌクレオチドまたは抗体に関する場合、本発明の範囲内でその等価物または生物学的等価物が意図されることが推定されるべきである。本明細書で使用される場合、「生物学的なその等価物」は、参照のタンパク質、抗体、断片、ポリペプチドまたは核酸について言及される場合、「その等価物」という用語と同義であるものとし、所望の構造または機能性を依然として維持しながら最小の相同性を有するものを意味する。本明細書において具体的に列挙されていなければ、本明細書で言及されているポリヌクレオチド、ポリペプチドまたはタンパク質はいずれも、その等価物も包含すると考えられる。一態様では、等価なポリヌクレオチドは、ストリンジェントな条件下で本明細書記載の、記載されている方法において使用するためのポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチドの相補物とハイブリダイズするポリヌクレオチドである。別の態様では、等価な抗体または抗原結合性ポリペプチドとは、参照抗体または参照抗原結合性断片と、少なくとも70%、あるいは少なくとも75%、あるいは少なくとも80%、あるいは少なくとも85%、あるいは少なくとも90%、あるいは少なくとも95%の親和性またはそれを超える親和性で結合する抗体または抗原結合性ポリペプチドを意味する。別の態様では、その等価物は、競合ELISAアッセイにおいて、抗体または抗原結合性断片の、その抗原への結合と競合する。別の態様では、等価物とは、少なくとも約80%の相同性または同一性、あるいは、少なくとも約85%、あるいは少なくとも約90%、あるいは少なくとも約95%、あるいは98%の相同性または同一性の百分率を意味し、参照タンパク質、参照ポリペプチドまたは参照核酸と実質的に等しい生物活性を示す。生物学的に等価なポリペプチドの例は表9において提供され、そこでは好ましいアミノ酸配列への保存されたアミノ酸置換が同定されている。

30

40

【0092】

別の配列に対して特定の百分率（例えば、80%、85%、90%、または95%）の「配列同一性」を有するポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチド領域（または、ポリペプチドまたはポリペプチド領域）は、アラインメントすると、比較されている2つの配列の塩基（またはアミノ酸）の百分率が同じであることを意味する。アラインメントおよび

50

相同性または配列同一性の百分率は、当技術分野で公知のソフトウェアプログラム、例えば、*Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubelら編、1987年)付録30、セクション7.7.18、表7.7.1に記載のものを使用して決定することができる。アラインメントのために初期状態のパラメータを使用することが好ましい。好ましいアラインメントプログラムは、初期状態のパラメータを使用したBLASTである。具体的には、好ましいプログラムは、以下の初期状態のパラメータを使用したBLASTNおよびBLASTPである：遺伝暗号 (Genetic code) = 標準；フィルター (filter) = なし；鎖 (strand) = 両方；カットオフ (cutoff) = 60；エクスペクト (expect) = 10；行列 (Matrix) = BLOSUM62；デスクリプション (Descriptions) = 50配列；ソート (sort by) = HIGH SCORE；データベース (Databases) = 非冗長性、GenBank+EMBL+DDBJ+PDB+GenBank CDS translations+SwissProtein+SPupdate+PIR。これらのプログラムの詳細は、以下のインターネットアドレスにおいて見いだすことができる：ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST。配列同一性および同一性の百分率は、それらをclustalWに取り込むことによって決定した (ウェブアドレス：[/align.genome.jp/](http://align.genome.jp/)において利用可能、2011年3月7日に最終アクセス。

10

【0093】

「相同性」または「同一性」または「類似性」とは、2つのペプチド間または2つの核酸分子間の配列類似性を指す。相同性は、比較するためにアラインメントすることができる各配列内の位置を比較することによって決定することができる。比較される配列内の位置が同じ塩基またはアミノ酸によって占有されている場合、それらの分子は、その位置において相同である。配列間の相同性の程度は、それらの配列が共有する、一致するまたは相同である位置の数の関数である。「無関係の」または「非相同な」配列は、本発明の配列の1つと40%未満の同一性、あるいは25%未満の同一性を共有する。

20

【0094】

「相同性」または「同一性」または「類似性」は、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする2つの核酸分子を指す場合もある。

【0095】

「ハイブリダイゼーション」とは、1つまたは複数のポリヌクレオチドが反応して、ヌクレオチド残基の塩基間の水素結合によって安定化された複合体を形成する反応を指す。水素結合は、ワトソン・クリック塩基対合、フーグスティーン結合によって、または任意の他の配列特異的な様式で起こり得る。複合体は、二重鎖構造を形成している2つの鎖、多数鎖複合体を形成している3つ以上の鎖、単一の自己ハイブリダイズ性 (self-hybridizing) 鎖、またはこれらの任意の組合せを含んでよい。ハイブリダイゼーション反応は、より大規模なプロセスのステップ、例えば、PCR反応の開始、またはリボザイムによるポリヌクレオチドの酵素的切断などを構成し得る。

30

【0096】

ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件の例としては、約25 ~ 約37のインキュベーション温度；約6×SSC ~ 約10×SSCのハイブリダイゼーション緩衝液の濃度；約0% ~ 約25%のホルムアミド濃度；および約4×SSC ~ 約8×SSCの洗浄溶液が挙げられる。中程度のハイブリダイゼーション条件の例としては、約40 ~ 約50のインキュベーション温度；約9×SSC ~ 約2×SSCの緩衝液の濃度；約30% ~ 約50%のホルムアミド濃度；および約5×SSC ~ 約2×SSCの洗浄溶液が挙げられる。高ストリンジェンシー条件の例としては、約55 ~ 約68のインキュベーション温度；約1×SSC ~ 約0.1×SSCの緩衝液の濃度；約55% ~ 約75%のホルムアミド濃度；および約1×SSC、0.1×SSCの洗浄溶液、または脱イオン水が挙げられる。一般に、ハイブリダイゼーションのインキュベート時間は、5分から24時間の間であり、1つ、2つ、またはそれ以上の洗浄ステップを伴い、洗浄インキュベート

40

50

時間は約1分、2分、または15分である。SSCは0.15MのNaClおよび15mMのクエン酸緩衝液である。他の緩衝系を用いた同等のSSCを使用することができることが理解される。

【0097】

本明細書で使用される場合、「発現」とは、ポリヌクレオチドがmRNAに転写されるプロセスおよび/または転写されたmRNAがその後、ペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質に翻訳されるプロセスを指す。ポリヌクレオチドがゲノムDNAに由来する場合、発現は、真核細胞におけるmRNAのスプライシングを含んでよい。

【0098】

「コードする」という用語は、ポリヌクレオチドに適用される場合、そのネイティブな状態にある場合、または当業者に周知の方法によって操作される場合、転写および/または翻訳してポリペプチドおよび/またはその断片に対するmRNAを作製することができるポリペプチドを「コードする」と考えられているポリヌクレオチドを指す。アンチセンス鎖は、そのような核酸の相補物であり、それからコード配列を推定することができる。

10

【0099】

本明細書で使用される場合、「処置すること(treating)」、「処置(treatment)」などの用語は、本明細書では、所望の薬理的効果および/または生理的効果を得ることを意味するために使用される。効果は、障害またはその徴候または症状を完全にまたは部分的に予防するという点で予防的であってよい、および/または、障害および/または障害に起因する有害作用に対する部分的または完全な治癒という点で治療的であってよい。

20

【0100】

予防するとは、障害または影響の素因がある系または被験体において障害または影響をin vitroまたはin vivoで予防することを意味する。その例は、バイオフィルムを生じることが公知の微生物に感染した系においてバイオフィルムの形成を予防することである。

【0101】

「組成物」は、活性薬剤、および不活性な別の化合物または組成物(例えば、検出可能な作用剤またはラベル)または活性な別の化合物または組成物、例えば、アジュバントなどの組合せを意味するものとする。

30

【0102】

「医薬組成物」は、in vitro、in vivoまたはex vivoでの診断または処置における使用に適した組成物を成す活性薬剤と不活性または活性なキャリアの組合せを含むものとする。

【0103】

「薬学的に許容されるキャリア」とは、本発明の組成物に使用することができる任意の希釈剤、賦形剤、またはキャリアを指す。薬学的に許容されるキャリアとしては、イオン交換体、アルミナ、ステアリン酸アルミニウム、レシチン、血清タンパク質、例えば、ヒト血清アルブミンなど、緩衝物質、例えば、ホスフェートなど、グリシン、ソルビン酸、ソルビン酸カリウム、飽和型の植物脂肪酸の部分的なグリセリド混合物、水、塩または電解質、例えば、硫酸プロタミン、リン酸水素二ナトリウム、リン酸水素カリウム、塩化ナトリウム、亜鉛塩など、コロイド状シリカ、三ケイ酸マグネシウム、ポリビニルピロリドン、セルロースベースの物質、ポリエチレングリコール、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ポリアクリレート、ワックス、ポリエチレン-ポリオキシプロピレン-ブロックポリマー、ポリエチレングリコールおよび羊毛脂が挙げられる。適切な医薬キャリアは、この分野における標準の参照テキストであるRemington's Pharmaceutical Sciences、Mack Publishing Companyに記載されている。適切な医薬キャリアは、意図された投与形態、すなわち、経口的な錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、シロップ剤などに関して選択すること、および従来の医薬の慣習と一致することが好ましい。

40

50

【0104】

本発明の「生物学的に活性な作用剤」または活性薬剤とは、単離されたかまたは組換え型のポリペプチド、単離されたかまたは組換え型のポリヌクレオチド、ベクター、単離された宿主細胞、または抗体、ならびにそれらのうちの1つまたは複数を含む組成物のうちの1つまたは複数を含む。

【0105】

「投与」は、処置の過程全体を通して、1回用量で、連続的に、または断続的に実施することができる。最も有効な手段および投与量を決定する方法は、当業者に公知であり、療法に使用される組成物、療法の目的、処置されている標的細胞、および処置されている被験体によって変動する。単回投与または多数回の投与は、処置にあっている医師によって選択された用量のレベルおよびパターンを用いて行うことができる。適切な投薬の処方および作用剤を投与する方法は当技術分野で公知である。投与経路を決定することができ、最も有効な投与経路を決定する方法は当業者に公知であり、処置に使用される組成物、処置の目的、処置されている被験体の健康状態または疾患の病期、および標的細胞または組織によって変動する。投与経路の非限定的な例としては、経口投与、経鼻投与、注射、および局所塗布が挙げられる。

10

【0106】

本発明の作用剤は、療法のために、任意の適切な投与経路によって投与することができる。好ましい経路は、レシピエントの状態および年齢、ならびに処置されている疾患によって変動することも理解されよう。

20

【0107】

「有効量」という用語は、所望の効果を実現するために十分な数量を指す。治療的または予防的な適用に関して、有効量は、問題の状態の種類および重症度ならびに個々の被験体の特性、例えば、全体的な健康、年齢、性別、体重、および医薬組成物に対する寛容性などに左右される。免疫原性組成物に関して、いくつかの実施形態では、有効量は、病原体に対する防御応答をもたらすために十分な量である。他の実施形態では、免疫原性組成物の有効量は、抗原に対する抗体生成をもたらすために十分な量である。いくつかの実施形態では、有効量は、それを必要とする被験体に受動免疫を付与するために必要な量である。免疫原性組成物に関して、いくつかの実施形態では、有効量は、上記の因子に加えて、意図された使用、特定の抗原性化合物の免疫原性の程度、および健康/被験体の免疫系の応答性に左右される。当業者は、これらおよび他の因子に応じて適量を決定することができる。

30

【0108】

*in vitro*での適用の場合では、いくつかの実施形態では、有効量は、問題の適用のサイズおよび本質に左右される。有効量は、*in vitro*における標的および使用されている方法の本質および感度にも左右される。当業者は、これら他の考察に基づいて有効量を決定することができる。有効量は、実施形態に応じて、組成物を1回または複数回投与することを含んでよい。

【0109】

「コンジュゲートした部分」という用語は、単離されたキメラポリペプチドに、キメラポリペプチドの残基と共有結合を形成することによって付加することができる部分を指す。部分は、キメラポリペプチドの残基と直接結合させることができる、または、リンカーとの共有結合を形成し、次にリンカーとキメラポリペプチドの残基の共有結合を形成することができる。

40

【0110】

「ペプチドコンジュゲート」とは、1つまたは複数のポリペプチドと別の化学的または生物学的な化合物との共有結合または非共有結合による結びつきを指す。非限定的な例では、ポリペプチドと化学化合物の「コンジュゲーション」により、意図された目的に対するポリペプチドの安定性または効力が改善される。一実施形態では、ペプチドをキャリアとコンジュゲートし、ここでキャリアは、リボソーム、ミセル、または薬学的に許容され

50

るポリマーである。

【0111】

「リポソーム」は、同心脂質二重層からなる顕微鏡レベルの小胞である。構造的に、リポソームは、数百オングストロームから数分の1ミリメートルまでの寸法を有する長い管から球体まで、サイズおよび形状に幅がある。小胞形成性脂質は、外層の脂質組成物をもたらす最終的な複合体の特定の程度の流動性または剛性が実現されるように選択する。これらは、中性（コレステロール）または双極性であり、リン脂質、例えば、ホスファチジルコリン（PC）、ホスファチジルエタノールアミン（PE）、ホスファチジルイノシトール（PI）、およびスフィンゴミエリン（SM）など、およびこれらに限定されないが、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン（DOPE）を含めた他の種類の双極性の脂質を含み、炭化水素の鎖長は14～22の範囲内であり、飽和型であるまたは1つまたは複数のC=C二重結合を有する。単独で、または他の脂質構成成分と組み合わせて安定なリポソームを作製することができる脂質の例は、リン脂質、例えば、水素化大豆ホスファチジルコリン（HSPC）、レシチン、ホスファチジルエタノールアミン、リゾレシチン、リゾホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルイノシトール、スフィンゴミエリン、セファリン、カルジオリピン、ホスファチジン酸、セレブロシド、ジステアロイルホスファチジルエタン（distearoyl phosphatidylethanolamine）-オラミン（DSPE）、ジオレオイルホスファチジルコリン（DOPC）、ジパルミトイルホスファチジルコリン（DPPC）、パルミトイルオレオイルホスファチジルコリン（palmitoyl oleoyl phosphatidylcholine）（POPC）、パルミトイルオレオイルホスファチジルエタノールアミン（palmitoyl oleoyl phosphatidylethanolamine）（POPE）およびジオレオイルホスファチジルエタノールアミン4-（N-マレイミド-メチル）シクロヘキサン-1-カルボキシレート（DOPE-mal）などである。リポソームに組み入れることができる、脂質を含有する非亜リン酸のさらなるものとしては、ステアリルアミン、ドデシルアミン、ヘキサデシルアミン、ミリスチン酸イソプロピル、ラウリル硫酸トリエタノールアミン、アルキル-アリアル硫酸塩、アセチルパルミテート（acetyl palmitate）、グリセロールリシノレート（glycerol ricinoleate）、ヘキサデシルステアレート（hexadecyl stearate）、両性のアクリルポリマー、ポリエチルオキシレート化（polyethyl oxylated）脂肪酸アミド、および上記のカチオン性脂質（DDAB、DODAC、DMRIE、DMTAP、DOGS、DOTAP（DOTMA）、DOSPA、DPTAP、DSTAP、DC-Chol）が挙げられる。負に荷電した脂質としては、小胞を形成することができるホスファチジン酸（PA）、ジパルミトイルホスファチジルグリセロール（DPPG）、ジオレオイルホスファチジルグリセロール（DOPG）、およびジセチルホスフェート（dicytlyl phosphate）が挙げられる。一般には、リポソームは、それらの全体的なサイズおよびラメラ構造の本質に基づいて3つのカテゴリーに分けることができる。New York Academy Sciences Meeting、「Liposomes and Their Use in Biology and Medicine」、1977年12月によって展開された3つの分類は、多層状の小胞（MLV）、小さな単層の小胞（SUV）および大きな単層の小胞（LUV）である。生物活性のある作用剤を、本明細書に記載の方法に従って投与するためにそのようなものに封入することができる。

【0112】

「ミセル」は、液体コロイド中に分散した界面活性物質分子の凝集体である。典型的な水溶液中ミセルは、周囲の溶媒と接触した親水性の「頭部」領域を有し、ミセルの中心に疎水性の尾部領域が隔離された凝集体を形成する。この種類のミセルは、順相ミセル（水中油ミセル）として公知である。逆ミセルは、頭部基を中心に有し、尾部が突き出している（油中水ミセル）。ミセルは、本明細書に記載のポリヌクレオチド、ポリペプチド、抗体または組成物を付着させて、標的の細胞または組織への効率的な送達を容易にするため

10

20

30

40

50

に使用することができる。

【0113】

「薬学的に許容されるポリマー」という句は、本明細書に記載の1つまたは複数のポリペプチドとコンジュゲートすることができる化合物の群を指す。ポリマーをポリペプチドとコンジュゲートすることにより、*in vivo*および*in vitro*でのポリペプチドの半減期を延長することができると考えられる。非限定的な例としては、ポリエチレングリコール、ポリビニルピロリドン、ポリビニルアルコール、セルロース誘導体、ポリアクリレート、ポリメタクリレート、糖、ポリオールならびにそれらの混合物が挙げられる。生物活性のある作用剤は、本明細書に記載の方法に従って投与するために、薬学的に許容されるポリマーとコンジュゲートすることができる。

10

【0114】

「遺伝子送達ビヒクル」は、挿入されたポリヌクレオチドを宿主細胞内に運ぶことができる任意の分子と定義される。遺伝子送達ビヒクルの例は、リボソーム、ミセル、天然ポリマーおよび合成ポリマーを含めた生体適合性ポリマー；リポタンパク質；ポリペプチド；多糖；リポ多糖；人工ウイルス外被；金属粒子；および細菌、またはウイルス、例えば、バキュロウイルス、アデノウイルスおよびレトロウイルスなど、バクテリオファージ、コスミド、プラスミド、真菌のベクター、ならびに、種々の真核生物宿主および原核生物宿主における発現について記載されており、遺伝子療法のために、ならびに単純なタンパク質の発現のために使用することができる、当技術分野で一般に使用される他の組換え型ビヒクルである。

20

【0115】

本発明のポリヌクレオチドは、遺伝子送達ビヒクルを使用して細胞または組織に送達することができる。「遺伝子送達」、「遺伝子移入」、「形質導入」などは、本明細書で使用される場合、導入するために使用する方法に関係なく、外因性のポリヌクレオチド（時には「導入遺伝子」と称される）を宿主細胞に導入することに関する用語である。そのような方法としては、種々の周知の技法、例えば、ベクターに媒介される遺伝子移入（例えば、ウイルス感染症/トランスフェクション、または種々の他のタンパク質ベースまたは脂質ベースの遺伝子送達複合体による）、ならびに、「裸の」ポリヌクレオチドの送達を容易にする技法などが挙げられる（例えば、電気穿孔、「遺伝子銃」送達およびポリヌクレオチドを導入するために使用する種々の他の技法など）。導入したポリヌクレオチドは、宿主細胞内で安定にまたは一過性に維持することができる。安定に維持するためには、一般には、導入したポリヌクレオチドが宿主細胞と適合する複製開始点を含むこと、または、宿主細胞のレプリコン、例えば、染色体外のレプリコン（例えば、プラスミド）または核内染色体またはミトコンドリア染色体などに組み込まれることが必要である。当技術分野で公知であり、また本明細書に記載されている通り、いくつものベクターが、遺伝子の哺乳動物の細胞への移入を媒介することができることが公知である。

30

【0116】

本明細書で使用される場合「eDNA」という用語は、病原性のバイオフィルムに対する構成成分として見いだされる細胞外のDNAを指す。

【0117】

「プラスミド」は、染色体DNAと独立して複製することができる、染色体DNAから分離される染色体外のDNA分子である。多くの場合、プラスミドは環状の二本鎖である。プラスミドにより、微生物の集団内に水平に遺伝子移入するための機構がもたらされ、また、一般には、所与の環境状態下で選択的な利点もたらされる。プラスミドは、競争的な環境的ニッチにおいて天然に存在する抗生物質に対する耐性をもたらず遺伝子を保有してよい、あるいは、産生されるタンパク質は同様の状況の下で毒素としての機能を果たし得る。

40

【0118】

遺伝子工学において使用される「プラスミド」は、「プラスミドベクター」と称される。そのような使用のための多くのプラスミドが市販されている。複製しようとする遺伝子

50

を、細胞を特定の抗生物質に対して耐性にする遺伝子およびDNA断片をこの場所に容易に挿入することを可能にするいくつかの一般に使用される制限部位を含有する短い領域である多重クローニング部位(MCS、またはポリリンカー)を含有するプラスミドのコピーに挿入する。プラスミドの別の主要な使用は、大量のタンパク質を生産することである。この場合、研究者は、対象の遺伝子を有するプラスミドを含有する細菌を成長させる。細菌はタンパク質を産生してその抗生物質耐性を付与するのと同じように、挿入された遺伝子から大量のタンパク質を産生するように誘導することもできる。これは、遺伝子、または次にそれがコードするタンパク質を大量生産する安価かつ容易なやり方である。

【0119】

「酵母人工染色体」または「YAC」とは、大きなDNA断片(100kbよりも大きく、最大3000kb)をクローニングするために使用されるベクターを指す。これは、人工的に構築された染色体であり、酵母細胞において複製および保存されるために必要なテロメア配列、セントロメア配列、および複製開始点配列を含有する。最初の環状のプラスミドを使用して築き、制限酵素を使用することによって直線化し、次いでDNAリガーゼにより、突出末端を使用することによって対象の配列または遺伝子を線形の分子に付加することができる。酵母発現ベクター、例えば、YAC、YIp(酵母組込みプラスミド)、およびYEp(酵母エピソームプラスミド)などは、酵母はそれ自体が真核細胞であるので、翻訳後修飾された真核生物のタンパク質産物を得ることができるので非常に有用であるが、YACはBACよりも不安定であり、キメラ的な影響を生じることが見いだされている。

10

20

【0120】

「ウイルスベクター」は、宿主細胞に送達しようとするポリヌクレオチドを含む、*in vivo*、*ex vivo*または*in vitro*のいずれかで組換えによって作製されるウイルスまたはウイルス粒子と定義される。ウイルスベクターの例としては、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、アルファウイルスベクターなどが挙げられる。感染性のタバコモザイクウイルス(TMV)ベースのベクターは、タンパク質の製造に使用することができ、タバコの葉においてGriffiths *in* を発現することが報告されている(O'Keefeら(2009年) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 106巻(15号): 6099~6104頁)。アルファウイルスベクター、例えば、セシルキ森林ウイルスベースのベクターおよびシンドビスウイルスベースのベクターなどが、遺伝子療法および免疫療法において使用するために開発されている。Schlesinger & Dubensky(1999年) *Curr. Opin. Biotechnol.* 5巻: 434~439頁およびYingら(1999年) *Nat. Med.* 5巻(7号): 823~827頁を参照されたい。遺伝子移入がレトロウイルスベクターによって媒介される態様では、ベクター構築物とは、レトロウイルスのゲノムまたはその一部、および治療的な遺伝子を含むポリヌクレオチドを指す。

30

40

【0121】

本明細書で使用される場合、「レトロウイルス媒介性遺伝子移入」または「レトロウイルスの形質導入」は同じ意味を有し、ウイルスが細胞に侵入し、そのゲノムを宿主細胞ゲノム内に組み込むことによって遺伝子または核酸配列が宿主細胞に安定に移入されるプロセスを指す。ウイルスは、その通常の感染機構によって宿主細胞に侵入することができる、または、細胞に侵入するために異なる宿主細胞の表面受容体またはリガンドに結合するように修飾することができる。本明細書で使用される場合、レトロウイルスベクターとは、ウイルスまたはウイルス様の侵入機構によって外因性の核酸を細胞に導入することができるウイルス粒子を指す。

【0122】

レトロウイルスは、それらの遺伝情報をRNAの形態で保有する；しかし、ウイルスが細胞に感染すると、RNAはDNAの形態に逆転写され、感染した細胞のゲノムDNAに組み込まれる。組み込まれたDNA形態はプロウイルスと称されている。

50

【0123】

遺伝子移入がDNAウイルスベクター、例えば、アデノウイルス（Ad）またはアデノ随伴ウイルス（AAV）などによって媒介される態様では、ベクター構築物とは、ウイルスのゲノムまたはその一部、および導入遺伝子を含むポリヌクレオチドを指す。アデノウイルス（Ad）は、比較的よく特徴付けられたウイルスの均一な群であり、50を超える血清型を含む。例えば、国際PCT特許出願第WO95/27071号を参照されたい。Adは、宿主細胞ゲノムへの組込みを必要としない。組換え型のAd由来ベクター、特に野生型ウイルスの組換えおよび生成の潜在性を低下させるものも構築されている。国際PCT出願第WO95/00655号および同第WO95/11984号を参照されたい。野生型AAVは宿主細胞のゲノムへの組込みに高い感染性および特異性を有する。Hermonat & Muzyczka (1984年) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81巻: 6466~6470頁およびLebkowskiら (1988年) Mol. Cell. Biol. 8巻: 3988~3996頁を参照されたい。

10

【0124】

プロモーターと、ポリヌクレオチドを作動可能に連結することができるクローニング部位の両方を含有するベクターは当技術分野で周知である。そのようなベクターはRNAをin vitroまたはin vivoで転写することができ、Stratagene (La Jolla, CA) およびPromega Biotech (Madison, WI) などの供給源から市販されている。発現および/またはin vitro転写を最適化するために、クローンの5'非翻訳部分および/または3'非翻訳部分を除去、付加または変更して、転写レベルまたは翻訳レベルのいずれかで発現に干渉するまたは発現を低下させる可能性がある余分の潜在的な不適切な代替翻訳開始コドンまたは他の配列を排除することが必要であり得る。あるいは、発現を増強するために、コンセンサスリボソーム結合部位を開始コドンのすぐ5'側に挿入することができる。

20

【0125】

遺伝子送達ビヒクルは、DNA/リボソーム複合体、ミセルおよび標的ウイルスタンパク質-DNA複合体も包含する。本発明の方法では、ターゲティング抗体またはその断片も含むリボソームを用いることができる。タンパク質トランスフェクションの非限定的な技法により、ポリヌクレオチドを細胞または細胞集団に送達することに加えて、本明細書に記載のタンパク質を細胞または細胞集団に直接導入することができる、あるいは発現を増強し、かつ/または本発明のタンパク質の活性を促進する培養条件が他の非限定的な技法である。

30

【0126】

本明細書で使用される場合、「抗体」、「抗体」および「免疫グロブリン」という用語は、全抗体および任意の抗原結合性断片またはその単鎖を含む。したがって、「抗体」という用語は、免疫グロブリン分子の少なくとも一部分を含む分子を含有する任意のタンパク質またはペプチドを包含する。「抗体」、「抗体」および「免疫グロブリン」という用語は、任意のアイソタイプの免疫グロブリン、これらに限定されないが、Fab、Fab'、F(ab)₂、Fv、scFv、dsFv、Fd断片、dAb、VH、VL、VhH、およびV-NARDメインを含めた、抗原への特異的な結合を保持する抗体の断片；ミニ抗体 (minibody)、二重特異性抗体、三重特異性抗体、四重特異性抗体およびカッパ抗体 (kappa body)；抗体断片から形成された多特異性の抗体断片および1つまたは複数の単離されたものも包含する。そのようなものの例としては、これらに限定されないが、重鎖または軽鎖の相補性決定領域 (CDR) またはそのリガンド結合性部分、重鎖または軽鎖の変異領域、重鎖または軽鎖の定常領域、フレームワーク (FR) 領域、または任意のその部分、結合性タンパク質の少なくとも1つの部分、キメラ抗体、ヒト化抗体、単鎖抗体、および抗体の抗原結合性部分を含む融合タンパク質および非抗体タンパク質が挙げられる。免疫グロブリン分子の重鎖および軽鎖の変異領域は、抗原と相互作用する結合ドメインを含有する。抗体 (Ab) の定常領域は、免疫グロブリンの宿主

40

50

組織への結合を媒介することができる。「抗」という用語は、タンパク質の名称の前に使用される場合、例えば、抗 I H F、抗 H U、抗 O M P P 5 は、特定のタンパク質に結合し、かつ/またはそれに対する親和性を有するモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体を指す。例えば、「抗 I H F」とは、I H F タンパク質に結合する抗体を指す。特異的な抗体は、それが生じた対象のタンパク質以外のタンパク質に対する親和性を有し得る、またはそれに結合し得る。例えば、抗 I H F は、I H F タンパク質に対して特異的に生じたが、配列相同性または構造相同性によって関連する他のタンパク質にも結合し得る。

【0127】

抗体は、それらが所望の生物活性を示す限りは、ポリクローナル、モノクローナル、多特異性（例えば、二重特異性抗体）、および抗体断片であってよい。抗体は、任意の適切な生物学的な供給源、例えば、マウス、ラット、ヒツジおよびイヌから単離することができる。

10

【0128】

本明細書で使用される場合、「モノクローナル抗体」とは、実質的に同種の抗体集団から得られた抗体を指す。モノクローナル抗体は、そのそれぞれが抗原上の単一の決定因子を対象とするので、高度に特異的である。抗体は、例えば、放射性同位元素、検出可能な産物を生成する酵素、蛍光タンパク質などを用いて検出可能に標識することができる。抗体は、さらに他の部分、例えば、特異的結合対のメンバー、例えば、ビオチン（ビオチン-アビジン特異的結合対のメンバー）などとコンジュゲートすることができる。抗体は、これらに限定されないが、ポリスチレンのプレートまたはビーズなどを含めた固体支持体に結合させることもできる。

20

【0129】

モノクローナル抗体は、当技術分野で公知のハイブリドーマ法または組換え DNA 法を用いて生成することができる。ハイブリドーマは、研究室において、抗体産生リンパ球と非抗体産生癌細胞、通常、骨髄腫またはリンパ腫を融合させることで作製される細胞である。ハイブリドーマは、増殖し、特異的なモノクローナル抗体の連続的なサイプル (s y p l e) を産生する。抗体を生成または選択するための代替の技法としては、i n v i t r o でリンパ球を被験体の抗原に曝露させること、および細胞、ファージ、または同様の系において抗体表出ライブラリーをスクリーニングすることが挙げられる。

【0130】

「ヒト抗体」という用語は、本明細書で使用される場合、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列に由来する可変領域および定常領域を有する抗体を含むものとする。本発明のヒト抗体としては、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列にコードされないアミノ酸残基（例えば、i n v i t r o でのランダム変異誘発または部位特異的変異誘発によって、または i n v i v o での体細胞変異によって導入された変異）を挙げることができる。しかし、「ヒト抗体」という用語は、本明細書で使用される場合、マウスなどの別の哺乳動物種の生殖系列に由来する C D R 配列がヒトフレームワーク配列に移植された抗体を含まないものとする。したがって、本明細書で使用される場合、「ヒト抗体」という用語は、タンパク質の実質的に全ての部分（例えば、C D R、フレームワーク、C_Lドメイン、C_Hドメイン（例えば、C_{H1}、C_{H2}、C_{H3}）、ヒンジ、（V_L、V_H））が、ヒトにおいて実質的に非免疫原性であり、軽微な配列の変化または変異のみを伴う抗体を指す。同様に、霊長類（サル、ヒヒ、チンパンジーなど）、げっ歯類（マウス、ラット、ウサギ、モルモット、ハムスター、など）および他の哺乳動物に指定された抗体は、そのような種、亜属、属、サブファミリー、ファミリーに特異的な抗体を示す。さらに、キメラ抗体は、上記の任意の組合せを含む。そのような変化または変異は、場合によって、ヒトまたは他の種において、修飾されていない抗体と比較して、免疫原性を保持する、または免疫原性が低いことが好ましい。したがって、ヒト抗体は、キメラ抗体またはヒト化抗体とは異なる。ヒト抗体は、機能的に再編成されたヒト免疫グロブリン（例えば、重鎖および/または軽鎖）遺伝子を発現することができる非ヒト動物または原核細胞または真核細胞によって作製することができることが指摘されている。さらに、ヒト抗体が単鎖抗体である場合、ヒ

30

40

50

ト抗体は、ネイティブなヒト抗体においては見いだされないリンカーペプチドを含んでよい。例えば、Fvは、重鎖の可変領域と軽鎖の可変領域をつなぐリンカーペプチド、例えば、2個～約8個のグリシンまたは他のアミノ酸残基などを含んでよい。そのようなリンカーペプチドは、ヒト起源のものであるとみなされる。

【0131】

本明細書で使用される場合、ヒト抗体は、抗体が、例えば、ヒト免疫グロブリン遺伝子を保有するトランスジェニックマウスを免疫化することによって、またはヒト免疫グロブリン遺伝子ライブラリーをスクリーニングすることによってヒト免疫グロブリン配列を用いて系から得られる場合、特定の生殖系列配列「に由来する」。ヒト生殖系列免疫グロブリン配列「に由来する」ヒト抗体は、ヒト抗体のアミノ酸配列とヒト生殖系列免疫グロブリンのアミノ酸配列を比較することによって、そのようなものとして同定することができる。選択されたヒト抗体は、一般には、ヒト生殖系列免疫グロブリン遺伝子にコードされるアミノ酸配列と、アミノ酸配列が少なくとも90%同一であり、他の種（例えば、マウス生殖系列配列）の生殖系列免疫グロブリンアミノ酸配列と比較してヒト抗体をヒトであると同定するアミノ酸残基を含有する。ある場合では、ヒト抗体は、生殖系列免疫グロブリン遺伝子にコードされるアミノ酸配列と、少なくとも95%、または、少なくとも96%、97%、98%、または99%までも、アミノ酸配列が同一である。一般には、特定のヒト生殖系列配列に由来するヒト抗体は、ヒト生殖系列免疫グロブリン遺伝子にコードされるアミノ酸配列と10アミノ酸以下の差異を示す。ある場合では、ヒト抗体は、5以下、または、さらには4以下、3以下、2以下、1以下までの、生殖系列免疫グロブリン遺伝子にコードされるアミノ酸配列とのアミノ酸の差異を示し得る。

10

20

【0132】

「ヒトモノクローナル抗体」とは、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列に由来する可変領域および定常領域を有する単一の結合特異性を示す抗体を指す。この用語は、組換えヒト抗体も意味する。これらの抗体を作出するための方法は、本明細書に記載されている。

【0133】

「組換えヒト抗体」という用語は、本明細書で使用される場合、組換え手段によって調製した、発現させた、創出した、または単離したヒト抗体、例えば、ヒト免疫グロブリン遺伝子についてトランスジェニックまたは染色体導入体(transchromosomal)またはそれから調製されるハイブリドーマである動物(例えば、マウス)から単離された抗体、抗体を発現するように形質転換された宿主細胞から、例えば、トランスフェクターマ(transfectoma)から単離された抗体、組換え型の、コンビナトリアルなヒト抗体ライブラリーから単離された抗体、およびヒト免疫グロブリン遺伝子配列をスプライシングして他のDNA配列にすることを伴う任意の他の手段によって調製した、発現させた、創出した、または単離した抗体などの全てを包含する。そのような組換えヒト抗体は、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列に由来する可変領域および定常領域を有する。しかし、ある特定の実施形態では、そのような組換えヒト抗体は、in vitroでの変異誘発(または、ヒトIg配列に対する動物トランスジェニックを使用する場合は、in vivoでの体細胞の変異誘発)に供することができ、したがって、組換え型の抗体のVH領域およびVL領域のアミノ酸配列は、ヒト生殖系列のVH配列およびVL配列に由来し、それと関連するが、in vivoでのヒト抗体生殖系列レパートリーに天然に存在しない可能性がある配列である。これらの抗体を作出するための方法は、本明細書に記載されている。

30

40

【0134】

本明細書で使用される場合、キメラ抗体は、その軽鎖遺伝子および重鎖遺伝子が、一般には、遺伝子工学によって、異なる種に属する抗体可変性領域遺伝子および抗体定常領域遺伝子から構築された抗体である。

【0135】

本明細書で使用される場合、「ヒト化抗体」または「ヒト化免疫グロブリン」という用語は、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小配列を含有するヒト/非ヒトキメラ抗体を指

50

す。ほとんどの場合、ヒト化抗体は、レシピエントの可変領域由来の残基が、所望の特異性、親和性および能力を有する非ヒト種（ドナー抗体）、例えば、マウス、ラット、ウサギなど、または非ヒト霊長類の可変領域由来の残基と交換されているヒト免疫グロブリン（レシピエント抗体）である。ヒト化抗体は、レシピエント抗体またはドナー抗体においては見いだされない残基を含んでよい。ヒト化抗体は、場合によって、一般にはヒト免疫グロブリンの、免疫グロブリン定常領域（Fc）の少なくとも一部分も含んでよい。非ヒト抗体は、フレームワーク領域、定常領域またはCDRに、ヒト抗体由来の同様に位置づけられたアミノ酸と置換されている1つまたは複数のアミノ酸を含有する。一般に、ヒト化抗体は、同じ抗体の非ヒト化型と比較して、ヒト宿主において生じる免疫応答を低減することが予測される。ヒト化抗体は、抗原結合性または他の抗体機能に対する影響を実質的に有さない保存されたアミノ酸置換を有し得る。保存された置換のグループ分けとしては、グリシン - アラニン、バリン - ロイシン - イソロイシン、フェニルアラニン - チロシン、リジン - アルギニン、アラニン - バリン、セリン - トレオニンおよびアスパラギン - グルタミンが挙げられる。

10

【0136】

「ポリクローナル抗体」または「ポリクローナル抗体組成物」という用語は、本明細書で使用される場合、異なるB細胞系に由来する抗体の調製物を指す。これらは、それぞれが異なるエピトープを認識する、特異的な抗原に対して分泌される免疫グロブリン分子の混合物である。

20

【0137】

本明細書で使用される場合、「抗体誘導体」という用語は、例えば、第2の分子に対する抗体を連結するために、アミノ酸の1つまたは複数がアルキル化、ペグ化、アシル化、エステル形成またはアミド形成などによって化学修飾されている全長の抗体または抗体の断片を含む。抗体誘導体としては、これらに限定されないが、ペグ化された抗体、システイン - ペグ化された抗体、およびその変異体が挙げられる。

【0138】

本明細書で使用される場合、「標識」という用語は、「標識された」組成物を生成するために、検出しようとする組成物に直接または間接的にコンジュゲートした、直接または間接的に検出可能な化合物または組成物、例えば、N末端ヒスタジン（histidine）タグ（N-His）、磁氣的に活性な同位元素、例えば、 ^{115}Sn 、 ^{117}Sn および ^{119}Sn 、非放射性同位元素、例えば、 ^{13}C および ^{15}N など、ポリヌクレオチドまたはタンパク質、例えば抗体などを意味する。この用語は、ポリヌクレオチドとコンジュゲートした、挿入配列が発現されるとシグナルをもたらす配列、例えば、緑色蛍光タンパク質（GFP）なども包含する。標識は、単独で検出可能であってよい（例えば、放射性同位元素標識または蛍光標識）、または、酵素的な標識の場合では、基質である化合物または組成物の検出可能な化学的変質を触媒することができる。標識は、小規模な検出に適している、またはハイスループットなスクリーニングのためにより適している。そのように、適切な標識としては、これらに限定されないが、磁氣的に活性な同位元素、非放射性同位元素、放射性同位元素、蛍光色素、化学発光化合物、色素、および酵素を含めたタンパク質が挙げられる。標識は、単に検出することができる、または、数量化することができる。単に検出する反応は、一般には、ただ単にその存在が確認される反応を含み、一方、数量化する反応は、一般には、数量化できる（例えば、数値で報告することができる）値、例えば、強度、偏光、および/または他の性質などを有する反応を含む。発光アッセイまたは蛍光アッセイでは、検出可能な反応を、実際に結合に關与するアッセイの構成成分と結びつけた発光団またはフルオロフォアを使用して直接生成する、または別の構成成分（例えば、レポーターまたは指示薬）と結びつけた発光団またはフルオロフォアを使用して間接的に生成することができる。シグナルを生じる発光標識の例としては、これらに限定されないが、生物発光および化学発光が挙げられる。検出可能な発光反応は、一般には、発光シグナルの変化または出現を含む。発光標識化アッセイの構成成分のための適切な方法および発光団は、当技術分野で公知であり、例えば、Hauglan

30

40

50

d, Richard P. (1996年) Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals (第6版)に記載されている。発光プローブの例としては、これらに限定されないが、エウオリンおよびルシフェラーゼが挙げられる。

【0139】

本明細書で使用される場合、「免疫コンジュゲート」という用語は、第2の作用剤、例えば、細胞傷害性作用剤、検出可能な作用剤、放射性作用剤、ターゲティング作用剤、ヒト抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、合成抗体、半合成抗体、または多特異性抗体などに結びついたまたは連結した抗体または抗体誘導体を含む。

【0140】

適切な蛍光標識の例としては、これらに限定されないが、フルオレセイン、ローダミン、テトラメチルローダミン、エオシン、エリスロシン、クマリン、メチルクマリン、ピレン、マラカイトグリーン (Malachite green)、スチルベン、ルシファーイエロー、Cascade Blue (商標)、および Texas Red が挙げられる。他の適切な光学色素は、Haugland, Richard P. (1996年) Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals (第6版)に記載されている。

【0141】

別の態様では、蛍光標識に官能性をもたせて、細胞または組織の内部または表面上に存在する細胞の構成成分、例えば、細胞表面マーカーなどへの共有結合性の付着を容易にする。これらに限定されないが、イソチオシアネート基、アミノ基、ハロアセチル基、マレイミド、スクシンイミジルエステル、およびハロゲン化スルホニルを含めた適切な官能基は全て、蛍光標識を第2の分子に付着させるために使用することができる。蛍光標識の官能基の選択は、リンカー、作用剤、マーカー、または第2の標識用作用剤のいずれかに付着させる部位に左右される。

【0142】

「真核細胞」は、モネラ界を除いた生物界の全てを含む。真核生物は、膜に結合した核によって容易に区別することができる。動物、植物、真菌、および原生生物は、その細胞が内部の膜および細胞骨格によって複雑な構造に組織化された真核生物または生物体である。最も特徴的な膜に結合した構造は核である。特に列举がなければ、「宿主」という用語は、例えば、酵母、高等植物、昆虫および哺乳動物の細胞を含めた真核生物の宿主を包含する。真核細胞または宿主の非限定的な例としては、サル、ウシ、ブタ、マウス、ラット、鳥類、爬虫類およびヒトが挙げられる。

【0143】

「原核細胞」は、通常、核または任意の他の膜に結合した細胞小器官を欠き、2つの界、細菌および古細菌に分けられる。染色体DNAに加えて、これらの細胞は、エピソームと称される環状のループ内に遺伝情報も含有し得る。細菌細胞は、非常に小さく、およそ動物ミトコンドリアのサイズである (直径約1~2 μm、長さ10 μm)。原核細胞は、3つの主要な形状：ロッド形状、球状、およびスパイラルを特徴とする。真核生物のような精巧な複製プロセスを行う代わりに、細菌細胞は二分裂によって分裂する。例としては、これらに限定されないが、Bacillus細菌、E. coli細菌、およびSalmonella細菌が挙げられる。

【0144】

「ネイティブな」または「天然の」抗原は、エピトープを含有する、天然の生物学的な供給源から単離された、かつ被験体において抗原受容体、具体的には、T細胞抗原受容体 (TCR) に特異的に結合することができるポリペプチド、タンパク質または断片である。

【0145】

「抗原」および「抗原性」という用語は、抗体によって認識される能力を有する、または別のよう抗体-リガンド対のメンバーとしての機能を果たす分子を指す。「特異的な

10

20

30

40

50

結合」とは、抗原と免疫グロブリンの重鎖および軽鎖の可変領域の相互作用を指す。抗体-抗原結合は、*in vivo*または*in vitro*で起こり得る。当業者は、タンパク質、核酸、脂肪酸、脂質、リポ多糖および多糖を含めた巨大分子は、抗原としての機能を果たす潜在性を有することを理解されよう。当業者は、さらに、抗体リガンドとしての機能を果たす潜在性を有するタンパク質をコードする核酸は、必ず抗原をコードすることを理解されよう。当業者は、さらに、抗原は、全長の分子に限定されず、部分的な分子も含んでよいことを理解されよう。「抗原性」という用語は、抗原の性質を有する分子に対する形容詞的参照である。この用語は、免疫原性である物質、すなわち免疫原、ならびに免疫学的不応答性、またはアネルギーを誘導する物質、すなわちアネルゲン(anerg en)を包含する。

10

【0146】

「変化した抗原」は、対応する野生型抗原の一次配列とは異なる一次配列を有する抗原である。変化した抗原は、合成方法または組換え方法によって作出することができ、それらとしては、これらに限定されないが、翻訳の間に、または翻訳後に、例えば、リン酸化、グリコシル化、架橋、アシル化、タンパク質分解性の切断、抗体分子、膜分子または他のリガンドへの連結によって示差的に修飾された抗原性ペプチドが挙げられる(Fergusonら(1988年)Ann. Rev. Biochem. 57巻:285~320頁)。本発明の合成抗原または変化した抗原は、天然のエピトープと同じTCRに結合するものとする。

20

【0147】

本明細書ではネイティブな抗原または野生型抗原とも称される「自己抗原」は、被験体において、抗原に対する自己免疫寛容に起因して、免疫応答をわずかに誘導する、または全く誘導しない抗原性ペプチドである。自己抗原の例は、黒色腫特異的抗原gp100である。

【0148】

「主要組織適合性遺伝子複合体」または「MHC」という用語は、T細胞への抗原提示のため、および急速な移植片拒絶のために必要な細胞表面分子をコードする遺伝子の複合体を指す。ヒトでは、MHCは「ヒト白血球抗原」または「HLA」複合体としても公知である。MHCにコードされるタンパク質は、「MHC分子」として公知であり、クラスI MHC分子およびクラスII MHC分子に分類される。クラスI MHCは、2-ミクログロブリンと非共有結合的に連結したMHCにおいてコードされる鎖でできている膜ヘテロ二量体タンパク質を含む。クラスI MHC分子は、ほぼ全ての有核細胞によって発現され、CD8⁺T細胞への抗原の提示において機能することが示されている。クラスI分子は、ヒトにおけるHLA-A、HLA-B、およびHLA-Cを含む。クラスII MHC分子は、非共有結合的に結びついた鎖および鎖からなる膜ヘテロ二量体タンパク質も含む。クラスII MHC分子は、CD4⁺T細胞において機能することが公知であり、ヒトでは、HLA-DP、HLA-DQ、およびHLA-DRを含む。好ましい実施形態では、本発明の組成物およびリガンドは、任意のHLA型のMHC分子と複合体を形成し得る。当業者は、HLAの血清型および遺伝子型に詳しい。bimas.dcr.t.nih.gov/cgi-bin/molbio/hla_coefficient_viewing_page、Rammensee H. G.、Bachmann J.、およびStevanovic S. MHC Ligands and Peptide Motifs(1997年)Chapman & Hall Publishers; Schreuder G. M. Th.ら The HLA dictionary(1999年)Tissue Antigens 54巻:409~437頁を参照されたい。

30

40

【0149】

「抗原提示マトリックス」という用語は、本明細書で使用される場合、抗原にT細胞の表面上のT細胞抗原受容体が結合することができるように、抗原を提示することができる1つの分子または複数の分子を意味する。抗原提示マトリックスは、抗原提示細胞(AP

50

C)の表面上、APCの小胞調製物上にあつてよい、または、固体支持体、例えば、ビーズまたはプレートなどの上の合成のマトリックスの形態であつてよい。合成の抗原提示マトリックスの例は、P2-ミクログロブリンと複合体を形成した精製されたMHCクラスI分子、そのような精製されたMHCクラスI分子の多量体、精製されたMHCクラスI分子、または固体支持体に付着した機能的なその部分である。

【0150】

「抗原提示細胞(APC)」という用語は、1種または複数種の抗原を、免疫系の特異的なエフェクター細胞が認識することができる抗原-MHC複合体の形態で提示し、それにより、抗原または提示されている抗原に対する有効な細胞性免疫応答を誘導することができる細胞のクラスを指す。多くの種類の細胞が、T細胞の認識のためにそれらの細胞表面上に抗原を提示することができ得るが、プロフェッショナルAPCのみが、効率的な量で抗原を提示し、さらにT細胞を細胞傷害性Tリンパ球(CTL)応答のために活性化する能力を有する。APCは、インタクトな全細胞、例えば、マクロファージ、B細胞および樹状細胞など；または、天然に存在する、もしくは合成の他の分子、例えば、2-ミクログロブリンと複合体を形成した精製されたMHCクラスI分子などであつてよい。

10

【0151】

「樹状細胞(DC)」という用語は、種々のリンパ系組織および非リンパ系組織に見いだされる形態学的に類似した細胞型の多様な集団を指す(Steinman(1991年)Ann. Rev. Immunol. 9巻:271~296頁)。樹状細胞は、最も強力であり、好ましい哺乳動物のAPCを構成する。DCのサブセットは、全てではないが、骨髄前駆細胞に由来し、末梢血中を少数で循環し、未成熟のランゲルハンスの細胞または最終分化した成熟細胞のいずれかとして現れる。DCは、単球に由来し得るが、これらは別個の表現型を保有する。例えば、特定の分化マーカーであるCD14抗原は樹状細胞においては見いだされないが、単球ごとに非常に高いレベルで発現される。例えば、Jersmannら、(2005年)Immunol. Cell Biol. 83巻:462頁を参照されたい。

20

【0152】

また、成熟樹状細胞は食細胞ではないが、単球は、強力に食菌する細胞である。成熟単球および成熟DCは、材料を異なる機構によってエンドサイトーシスで取り込む。単球は食作用によって貪食するが、DCはマクロピノサイトーシスを利用する。したがって、DCは、一般に、単球より小さなサイズのカーゴを貪食する(例えば、ConnerおよびSchmid、(2003年)Nature 433巻:37~44頁を参照されたい。DCは、他の抗原提示細胞と同様にエンドサイトーシス的に活性であり、T細胞の活性化および増殖に必要なシグナルの全てをもたらすことが示されている(例えば、LevineおよびChain、(1992年)ONAS 89巻(17号):8342頁を参照されたい。

30

【0153】

「抗原提示細胞動員因子」または「APC動員因子」という用語は、インタクトな全細胞ならびに抗原提示細胞を動員することができる他の分子のどちらも包含する。適切なAPC動員因子の例としては、インターロイキン4(IL4)、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)、Sepragelおよびマクロファージ炎症性タンパク質3アルファ(MIP3)などの分子が挙げられる。これらは、ImmuneX、Schering-PloughおよびR&D Systems(Minneapolis、Minn.)から入手可能である。これらは、Current Protocols In Molecular Biology(F. M. Ausubelら編(1987年))に開示されている方法を用いて、組換えによって作製することもできる。上記の因子と同じ生物活性を有するペプチド、タンパク質および化合物は、本発明の範囲内に含まれる。

40

【0154】

「免疫エフェクター細胞」という用語は、抗原に結合することができ、免疫応答を媒介

50

する細胞を指す。それらの細胞としては、これらに限定されないが、T細胞、B細胞、単球、マクロファージ、NK細胞および細胞傷害性Tリンパ球（CTL）、例えば、CTL系、CTLクローン、および腫瘍、炎症、または他の浸潤物由来のCTLが挙げられる。特定の疾患組織は特異的な抗原を発現し、これらの抗原に特異的なCTLが同定されている。

【0155】

「免疫エフェクター分子」という用語は、本明細書で使用される場合、抗原特異的に結合することができる分子を指し、それらとしては、抗体、T細胞抗原受容体、B細胞抗原受容体、およびMHCクラスI分子およびMHCクラスII分子が挙げられる。

【0156】

「ナイーブな」免疫エフェクター細胞は、その細胞を活性化することができる抗原に曝露されたことがない免疫エフェクター細胞である。ナイーブな免疫エフェクターT細胞を活性化するには、抗原：MHC複合体の認識と、増殖させ、抗原特異的な武装化エフェクターT細胞に分化させるために同時に起こるプロフェッショナルAPCによる共刺激のシグナルの送達の両方が必要である。次いで、活性化されたT細胞は、同時刺激シグナルをもたらすことによって免疫学的シナプスを通じて特異的なB細胞を活性化し得る。その後、活性化されたB細胞は特異的な抗原を対象とする抗体を産生する。ナイーブなB細胞は、T細胞に依存しない機構によって活性化することもできる。これは、抗原が、B細胞受容体に結合し、同時刺激シグナルを生じることができる場合に起こる。

【0157】

「免疫応答」とは、広範には、外来物質に対するリンパ球の抗原特異的な応答を指す。「免疫原」および「免疫原性」という用語は、免疫応答を引き出す能力を持つ分子を指す。免疫原は全て抗原であるが、全ての抗原が免疫原性なのではない。本発明の免疫応答は体液性（抗体活性による）または細胞媒介性（T細胞の活性化による）であってよい。応答は、*in vivo*または*in vitro*で起こり得る。当業者は、タンパク質、核酸、脂肪酸、脂質、リポ多糖および多糖を含めた種々の巨大分子が免疫原性である潜在性を有することを理解されよう。当業者は、さらに、免疫応答を引き出すことができる分子をコードする核酸は必ず免疫原をコードすることを理解されよう。当業者は、さらに、免疫原は、全長の分子に限定されず、部分的な分子を含んでよいことを理解されよう。

【0158】

「受動免疫」という用語は、ある対象から別の対象への、抗体の伝達を通じた免疫の伝達を指す。受動免疫は、母親の抗体が胎児に伝達される場合など、天然に起こり得る。受動免疫は、抗体組成物を非免疫の対象に投与する場合など、人工的にも起こり得る。抗体のドナーおよびレシピエントはヒト対象または非ヒト対象であってよい。抗体はポリクローナルまたはモノクローナルであってよく、*in vitro*または*in vivo*で生成することができ、また、実施形態に応じて、精製されていてよい、部分的に精製されていてよい、または精製されていないことよい。本明細書に記載のいくつかの実施形態では、受動免疫は、それを必要とする対象に、特定の抗原を特異的に認識する、またはそれに結合する抗体または抗原結合性断片を投与することによって付与される。いくつかの実施形態では、受動免疫は、特定の抗原を特異的に認識する、またはそれに特異的に結合する抗体または抗原結合性断片をコードする、単離されたかまたは組換え型のポリヌクレオチドを投与することによって付与される。

【0159】

本発明に関しては、「リガンド」はポリペプチドである。一態様では、本明細書で使用される「リガンド」という用語は、別の分子上の特定の部位に結合する任意の分子を指す。言い換えれば、リガンドは、免疫エフェクター細胞またはタンパク質に対する抗体またはタンパク質に対するDNAとの応答においてタンパク質の特異性を付与する。一態様では、タンパク質内のリガンド部位が、免疫エフェクター細胞上の相補的な結合部位と直接組み合わせる。

【0160】

10

20

30

40

50

一態様では、本発明のペプチドまたはリガンドは、免疫エフェクター細胞、例えば、抗体またはT細胞受容体(TCR)上の抗原性決定因子またはエピトープなどに結合する。リガンドは、本発明の抗原、ペプチド、タンパク質またはエピトープであってよい。

【0161】

別の態様では、リガンドは、抗体上の受容体に結合し得る。一実施形態では、本発明のリガンドは長さが約4アミノ酸～約8アミノ酸である。

【0162】

別の態様では、リガンドは、MHCクラスI分子上の受容体に結合し得る。一実施形態では、本発明のリガンドは、長さが約7アミノ酸～約11アミノ酸である。

【0163】

さらなる態様では、リガンドは、MHCクラスII分子上の受容体に結合し得る。一実施形態では、本発明のリガンドは、約10アミノ酸～約20アミノ酸の長さである。

【0164】

本明細書で使用される場合、「教育された抗原特異的な免疫エフェクター細胞」という用語は、以前抗原に遭遇した、上で定義された免疫エフェクター細胞である。そのナイーブな対応物と対照的に、教育された抗原特異的な免疫エフェクター細胞の活性化には、共刺激のシグナルが必要ではない。ペプチド：MHC複合体が認識されることで十分である。

【0165】

「活性化された」とは、T細胞に関して使用される場合、細胞がもはやG₀相でなく、細胞毒、サイトカイン、および他の関連する、細胞型(例えば、CD8⁺またはCD4⁺)の特性である膜関連タンパク質のうちの1つまたは複数を産生し始めており、その表面上に特定の抗原を表出している任意の標的細胞を認識し、それに結合し、そのエフェクター分子を放出することができる。

【0166】

「交差反応性」という用語は、機能的にオーバーラップしている本発明の化合物を説明するために使用される。より詳細には、ネイティブなリガンドおよび/またはそれにより活性化される免疫エフェクター細胞の免疫原性は、変化したりガンドによって特定の程度まで共有され、したがって、変化したりガンドは、ネイティブなリガンドおよび/またはそれによって活性化される免疫エフェクター細胞と「交差反応性」である。本発明の目的上、交差反応性は多数のレベルで顕在化する：(i)リガンドレベルで、例えば、変化したりガンドをTCRに結合させこと、およびネイティブなリガンドCTLを活性化することができる；(ii)T細胞レベルで、すなわち、変化した本発明のリガンドは、TCRに結合し、ネイティブなリガンドを表出している細胞を有効に標的とし、溶解することができるT細胞の集団(ネイティブなリガンドCTL集団とは別個の集団)を活性化する；および(iii)抗体レベルで、例えば、「抗」-変化したりガンド抗体は、ネイティブなリガンドを検出し、認識し、それに結合し、免疫応答におけるエフェクター機構を開始することができ、最終的にネイティブなリガンドを宿主から排除する。

【0167】

本明細書で使用される場合、「対象において免疫応答を誘導すること」という用語は、当技術分野ではよく理解されている用語であり、対象に抗原(またはエピトープ)を導入した後、対象に抗原(またはエピトープ)を導入する前の免疫応答(もしあれば)と比較して、少なくとも約2倍、より好ましくは少なくとも約5倍、より好ましくは少なくとも約10倍、より好ましくは少なくとも約100倍、さらに好ましくは少なくとも約500倍、さらに好ましくは少なくとも約1000倍またはそれ以上の抗原(またはエピトープ)に対する免疫応答の増加を検出または測定することができることを意味する。抗原(またはエピトープ)に対する免疫応答としては、これらに限定されないが、抗原特異的な(またはエピトープ特異的な)抗体の産生、およびその表面上に抗原(またはエピトープ)に特異的に結合する分子を発現している免疫細胞の産生が挙げられる。所与の抗原(またはエピトープ)に対する免疫応答が誘導されたかどうかを決定する方法は当技術分野で周

10

20

30

40

50

知である。例えば、抗原特異的な抗体は、これに限定されないが、E L I S Aを含めた、当技術分野で公知の種々の免疫測定法のうちの任意のものを用いて検出することができ、例えば、試料中の抗体の、固定した抗原（またはエピトープ）への結合を、検出可能に標識した第2の抗体（例えば、酵素標識したマウス抗ヒトI g抗体）を用いて検出する。

【0168】

「同時刺激分子」は、抗原提示細胞の表面上に発現される受容体 - リガンド対とT細胞の相互作用に關与する。過去数年にわたって蓄積された研究により、静止しているT細胞は、サイトカインの遺伝子発現および増殖を誘導するために少なくとも2つのシグナルを必要とすることが、説得力を伴って実証された（S c h w a r t z（1990年）S c i e n c e 248巻：1349～1356頁およびJ e n k i n s（1992年）I m m u n o l . T o d a y 13巻：69～73頁）。1つのシグナルは特異性を付与するシグナルであり、T C R / C D 3複合体と適切なM H C / ペプチド複合体の相互作用によって生じ得る。第2のシグナルは抗原特異的ではなく、「同時刺激」シグナルと称される。このシグナルは、最初に、骨髄由来のアクセサリー細胞、例えば、マクロファージおよび樹状細胞など、いわゆる「プロフェッショナル」A P Cによってもたらされる活性であると定義された。いくつかの分子が同時刺激の活性を増強することが示されている。これらは、熱安定性抗原（H S A）（L i u ら（1992年）J . E x p . M e d . 175巻：437～445頁）、コンドロイチン硫酸修飾M H Cインバリアント鎖（I i - C S）（N a u j o k a s ら（1993年）C e l l 74巻：257～268頁）、細胞内接着分子1（I C A M - 1）（V a n（1992年）C e l l 71巻：1065～1068頁）である。これらの分子はそれぞれ、T細胞上のそれらの同族のリガンドと相互作用することによって同時刺激を補助すると思われる。同時刺激分子は、必要な同時刺激のシグナル（複数可）を、通常の生理的条件下で媒介して、ナイーブなT細胞の完全な活性化を実現する。1つの例示的な受容体 - リガンド対は、A P Cの表面上のB 7同時刺激分子と、T細胞上のその対抗受容体C D 2 8またはC T L A - 4である（F r e e m a n ら（1993年）S c i e n c e 262巻：909～911頁；Y o u n g ら（1992年）J . C l i n . I n v e s t . 90巻：229頁およびN a b a v i ら（1992年）N a t u r e 360巻：266～268頁）。他の重要な同時刺激分子は、C D 4 0、C D 5 4、C D 8 0、およびC D 8 6である。「同時刺激分子」という用語は、T細胞の表面上のT C Rによって結合したペプチド / M H C複合体と一緒に作用すると、ペプチドに結合するT細胞の活性化を実現する同時刺激効果をもたらす任意の単一分子または分子の組合せを包含する。したがって、この用語は、B 7、またはA P Cなどの抗原提示マトリックス上の他の同時刺激分子（複数可）、その断片（単独で、別の分子（複数可）と複合体を形成して、または融合タンパク質の一部として）を包含し、それは、ペプチド / M H C複合体と一緒に、同族のリガンドに結合し、T細胞の表面上のT C Rがペプチドに特異的に結合すると、T細胞の活性化をもたらす。同時刺激分子は、例えば、B e c k m a n C o u l t e r , I n c .（F u l l e r t o n , C a l i f .）を含めた種々の供給源から市販されている。必ずしも明記されていないが、野生型または精製した同時刺激分子（例えば、組換えによって作製されるまたはその変異タンパク質）と類似した生物活性を有する分子は、本発明の主旨および範囲内で使用されることが意図されているものとする。

【0169】

本明細書で使用される場合、「固相支持体」または「固体支持体」は互換的に使用され、特定の種類の支持体に限定されない。それどころか、多数の支持体が利用可能であり、当業者に公知である。固相支持体としては、シリカゲル、樹脂、誘導体化プラスチックフィルム、ガラスビーズ、綿、プラスチックビーズ、アルミナゲルが挙げられる。本明細書で使用される場合、「固体支持体」は、合成の抗原提示マトリックス、細胞、およびリポソームも包含する。適切な固相支持体は、所望の最終用途および種々のプロトコールに対する適合性に基づいて選択することができる。例えば、ペプチド合成に関しては、固相支持体とは、樹脂、例えば、ポリスチレン（例えば、B a c h e m I n c . , P e n i n

10

20

30

40

50

sula Laboratories などから得られる PAM - 樹脂)、POLYHIPE . RTM 樹脂 (Aminotech、Canada から得られる)、ポリアミド樹脂 (Peninsula Laboratories から得られる)、ポリエチレングリコールをグラフトしたポリスチレン樹脂 (TentaGel . RTM、Rapp Polymere、Tubingen、Germany) またはポリジメチルアクリルアミド樹脂 (Milligen / Biosearch、Calif. から得られる) などを指し得る。

【0170】

固相支持体の例としては、ガラス、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリエチレン、デキストラン、ナイロン、アミラーゼ、天然セルロース、修飾されたセルロース、ポリアクリルアミド、斑糲岩、および磁鉄鉱が挙げられる。キャリアの本質は、いくらかの程度まで可溶性であってよい、または不溶性であってよい。支持材料は、カップリングされた分子が、ポリヌクレオチド、ポリペプチドまたは抗体に結合することができる限りは、実質的にいかなる可能性のある構造的な立体配置を有してもよい。したがって、支持体の立体配置は、ビーズのように球状であってよい、または、試験管の内側表面、またはロッド外面のように円柱状であってよい。あるいは、表面は、例えばシート、試験紙など平らであってよい、あるいはポリスチレンビーズであってよい。当業者は、抗体または抗原に結合する多くの他の適切なキャリアを知っている、または常套的な実験を使用することによってそれらを確認することができるであろう。

10

【0171】

「免疫調節剤」という用語は、本明細書で使用される場合、免疫応答を調節する分子、高分子複合体、または細胞であり、単独、または任意の本明細書に記載の種々の処方物中の本発明の合成の抗原性ペプチド；本発明の合成の抗原性ペプチドを含むポリペプチド；本発明のペプチドまたはポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；APC および合成の抗原提示マトリックスを含めた、抗原提示マトリックス上のクラス I MHC 分子またはクラス II MHC 分子に結合した本発明の合成の抗原性ペプチド（同時刺激分子（複数可）の存在下または非存在下で）；別の分子（複数可）または高分子構造と共有結合的に、または非共有結合的に複合体を形成した本発明の合成の抗原性ペプチド；および本発明のペプチドに対して特異的な、教育された抗原特異的な免疫エフェクター細胞を包含する。

20

【0172】

「免疫応答を調節する」という用語は、免疫応答を誘導すること（増大させること、引き出すこと）；および免疫応答を低減すること（抑制すること）を包含する。免疫調節方法（またはプロトコール）は、対象において免疫応答を調節するものである。

30

【0173】

本明細書で使用される場合、「サイトカイン」という用語は、細胞に対する種々の効果を発揮する、例えば、成長または増殖を誘導する多数の因子のうちの任意の1つを指す。本発明の実施において単独でまたは組み合わせて使用することができるサイトカインの非限定的な例としては、インターロイキン2 (IL - 2)、幹細胞因子 (SCF)、インターロイキン3 (IL - 3)、インターロイキン6 (IL - 6)、インターロイキン12 (IL - 12)、G - CSF、顆粒球マクロファージ - コロニー刺激因子 (GM - CSF)、インターロイキン - 1 アルファ (IL - 1)、インターロイキン - 11 (IL - 11)、MIP - 11、白血病抑制因子 (LIF)、c - キットリガンド、トロンボポエチン (TPO) および flt3 リガンドが挙げられる。本発明は、1種または複数種のサイトカインが培地から特異的に排除される培養条件も包含する。サイトカインは、いくつかのベンダー、例えば、Genzyme (Framingham, Mass.)、Genentech (South San Francisco, Calif.)、Amgen (Thousand Oaks, Calif.)、R&D Systems (Minneapolis, Minn.) および Immunex (Seattle, Wash.) などから市販されている。必ずしも明記されていないが、野生型または精製されたサイトカイン（例えば、組換えによって作製されるまたはその変異タンパク質）と類似した生物活性を有

40

50

する分子は、本発明の主旨および範囲内で使用されることが意図されているものとする。

【0174】

診断方法および処置方法

DNA B I I ポリペプチドもしくはDNA B I I タンパク質または微生物DNAを干渉作用剤と接触させ、それにより、DNA B I I タンパク質またはDNA B I I ポリペプチドの微生物DNAへの結合を阻害する、それと競合する、またはその力価を決定することによって、DNA B I I ポリペプチドまたはDNA B I I タンパク質の微生物DNAへの結合を阻害する、それと競合する、またはその力価を決定するための方法が提供される。別の態様では、DNA B I I ポリペプチドおよび微生物DNAを、例えば、互いに密接に接触させるとシグナルを放出する発光分子を用いて検出可能に標識する。接触は、*in vitro*または*in vivo*で実施することができる。

10

【0175】

別の態様では、バイオフィルムを干渉作用剤と接触させ、それにより、微生物バイオフィルムを阻害、予防または破壊することによって微生物バイオフィルムを阻害、予防または破壊するための方法が提供される。別の態様では、DNA B I I ポリペプチドおよび微生物DNAを、例えば、互いに密接に接触させるとシグナルを放出する発光分子を用いて検出可能に標識する。接触は、*in vitro*または*in vivo*で実施することができる。

【0176】

*in vitro*で実施する場合、方法は、本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチド、抗体、宿主細胞、小分子および組成物と同じ、類似したまたは逆の力を有する干渉作用剤をスクリーニングまたは確認するために有用である。あるいは、方法を使用して、微生物感染症を処置するためにはどの干渉作用剤が最適であるかを同定することができる。例えば、新しい作用剤または併用療法を、例えば、2つの試料にDNA B I I ポリペプチドおよび微生物DNAおよび試験される作用剤を含有させることによってスクリーニングすることができる。第2の試料は、DNA B I I ポリペプチドおよび微生物DNAおよび活性であることが公知の作用剤、例えば、抗IHF抗体または陽性対照としての機能を果たす小分子を含有する。別の態様では、いくつかの試料を準備し、干渉作用剤を、希釈度を増しながら系に加えて、臨床の場で対象を処置することにおいて有効だと思われる最適な用量を決定する。当業者には明らかであるように、DNA B I I ポリペプチドおよび微生物DNAを含有する陰性対照を準備することができる。別の態様では、DNA B I I ポリペプチドおよび微生物DNAを、例えば、互いに密接に接触させるとシグナルを放出する発光分子を用いて検出可能に標識する。試料を、作用剤がDNA B I I ポリペプチドと微生物DNAの間の相互作用を阻害する、それと競合するまたはその力価を決定するために有効な時間、同様の条件下で含有し、次いで試料を、発光分子からのシグナルの放出についてアッセイする。試料からシグナルが放出されれば、その作用剤は結合を阻害するために有効ではない。

20

30

【0177】

別の態様では、ヒト/動物から、感染症を引き起こしている微生物の(例えば細菌などの)単離株を単離し、次いで、それを培養して*in vitro*でバイオフィルムとして成長させることができる小型化チャンバースライド系において*in vitro*における方法を実施する。例えば、下記の実験番号1を参照されたい。干渉作用剤(例えば、抗IHF抗体など)または潜在的な干渉作用剤バイオフィルムを、単独で、または別の作用剤と組み合わせて、潜在的な干渉作用剤または干渉作用剤、例えば、抗IHFなど(または他の抗体、小分子、作用剤など)の希釈度を増しながら、または増さずに培養物に加えて、対象の感染症が存在する箇所へ送達した場合に、その患者を処置することにおいて有効であると思われる最適用量を見いだす。当業者には明らかであるように、陽性対照および陰性対照を同時に実施することができる。

40

【0178】

別の態様では、フローセル中の干渉作用剤(例えば、抗IHF抗体など)および/また

50

は潜在的な干渉作用剤（単独で、または別の作用剤と組み合わせて）を用いて、ハイスループットなプラットフォームにおいて方法を実施する。干渉作用剤（例えば、抗IHF抗体など）または潜在的な干渉作用剤バイオフィルムを、単独で、または別の作用剤と組み合わせて、潜在的な干渉作用剤または干渉作用剤、例えば、抗IHFなど（または他の抗体、小分子、作用剤など）の希釈度を増しながら、または増さずに培養物に加えて、対象の感染症が存在する箇所へ送達した場合に、その患者を処置することにおいて有効であると思われる最適用量を見いだす。バイオフィルム単離体を超音波処理して、微生物DNAに結合したIHFなどのDNABIIポリペプチドからバイオフィルム細菌を分離する。DNABIIポリペプチド-DNA複合体をプラットフォーム上の抗IHF抗体によって単離する。次いで、付加したバイオフィルム細菌を同定するために使用するために、微生物DNAを、例えば、塩洗浄を用いて放出させる。次いで、遊離したDNAを、例えば、PCRによる配列決定によって同定する。DNAが遊離されなければ、干渉作用剤（複数可）は、首尾よく機能したまたは微生物DNAに結合した。DNAが試料に見いだされれば、作用剤はDNABIIポリペプチド-微生物DNAの結合に干渉しなかった。当業者には明らかであるように、陽性対照および/または陰性対照を同時に実施することができる。

10

20

30

40

50

【0179】

上記の方法は、所与の細菌種が、ある作用剤よりも別の作用剤によるそのバイオフィルムの逆転によく応答する可能性があるので、診断検査としても用いることができ、この急速なハイスループットなアッセイシステムにより、当業者が可能性のある抗IHF様作用剤のパネルをアッセイして最も効果的な群を同定することが可能になる。

【0180】

これらの方法の利点は、大部分の病院内の臨床的な微生物学研究所にはすでに、液体培地中で（または浮遊状態で（*planktonically*））成長している細菌を用いてこれらの種類のアッセイ（すなわち、MIC値、MBC値の決定）を実施する設備が整っていることである。当業者には明らかであるように、細菌は、一般に、疾患を引き起こすときには浮遊状態では成長しない。その代わりに、細菌は、安定なバイオフィルムとして成長し、これらのバイオフィルムは抗生物質、抗体または他の処置法による処置に対して著しくより耐性である。この耐性が、大部分のMIC/MBC値により*in vivo*における効力を正確に予測することができない理由である。したがって、作用剤のどの「用量」が*in vitro*で細菌バイオフィルムを逆転させることができるかを決定することにより（上記の通り）、出願人らの前臨床的なアッセイは、個人向けの医学の適用としてさえも、臨床的な効力のより信頼できる予測になる。

【0181】

臨床の場に加えて、この方法は、感染症を引き起こす微生物を同定し、かつ/または工業の場において有効な干渉作用剤を確認するために使用することができる。

【0182】

上記の方法の別の態様では、感染症が阻害される可能性があるかどうかを決定するために、基礎をなす感染症の成長を阻害することが公知である抗生物質または抗菌薬を逐次的にまたは同時に加える。バイオフィルムの阻害をアッセイするために、欠けている複合体を加える前に干渉作用剤を微生物DNAまたはDNABIIポリペプチドに加えることも可能である。

【0183】

非ヒト動物、例えば、チンチラなどにおいて*in vivo*で実施する場合、方法は、単独で、または他の作用剤と組み合わせてバイオフィルムを分解するために使用することができる干渉作用剤を同定するための前臨床的なスクリーニングを提供する。この方法の例が下記の実験番号2～7に示されている。

【0184】

別の態様では、本明細書では、対象に、有効量の干渉作用剤を投与し、それにより、微生物バイオフィルムを阻害、予防または破壊することによって対象におけるバイオフィル

ムを阻害、予防または破壊する方法が提供される。この方法の例が下記の実験番号 2 ~ 7 示されている。

【0185】

上記の *in vitro* における方法および *in vivo* における方法の目的上、干渉作用剤は、

(a) 単離されたかまたは組換え型の組込み宿主因子 (IHF) ポリペプチド、またはそのそれぞれの断片もしくは等価物、

(b) *E. coli* の U93 株由来の単離されたかまたは組換え型のヒストン様タンパク質 (HU) ポリペプチド、またはそのそれぞれの断片もしくは等価物、

(c) 表 8、表 9 A、表 9 B、表 10 において同定される単離されたかまたは組換え型のタンパク質ポリペプチド、または図 6 において同定される DNA 結合性ペプチド、またはそのそれぞれの断片もしくは等価物、

(d) 配列番号 1 ~ 340 の単離されたかまたは組換え型のポリペプチド、またはそのそれぞれの断片もしくは等価物、

(e) 配列番号 6 ~ 11、28、29、42 ~ 100、表 8 の単離されたかまたは組換え型の C 末端のポリペプチド、または表 10 において同定される C 末端のポリペプチド、またはそのそれぞれの断片もしくは等価物、

(f) 微生物 DNA への結合について組込み宿主因子と競合するポリペプチド、

(g) ホリデイジャンクションと似ている 4 方向ジャンクションポリヌクレオチド、複製フォークと似ている 3 方向ジャンクションポリヌクレオチド、固有の柔軟性を有するポリヌクレオチドまたは屈曲したポリヌクレオチド、

(h) (a) ~ (f) のうちの任意の 1 つをコードする、単離されたかまたは組換え型のポリヌクレオチド、または配列番号 36 の単離されたかまたは組換え型のポリヌクレオチド、またはそのそれぞれの等価物、またはストリンジェントな条件下でポリヌクレオチドまたはその等価物もしくはその相補物とハイブリダイズするポリヌクレオチド、

(i) (a) ~ (f) のうちの任意の 1 つを特異的に認識する、またはそれに特異的に結合する抗体もしくは抗原結合性断片、または各抗体もしくはその抗原結合性断片の等価物もしくは断片、

(j) (i) の抗体もしくは抗原結合性断片またはその相補物をコードする、単離されたかまたは組換え型のポリヌクレオチド、または

(k) DNA BII タンパク質または DNA BII ポリペプチドの微生物 DNA への結合と競合する小分子からなる群のものである。

【0186】

本明細書では、それを必要とする対象において免疫応答を誘導するため、またはそれを必要とする対象に受動免疫を付与するための方法であって、対象に、

(a) 単離されたかまたは組換え型の組込み宿主因子 (IHF) ポリペプチド、またはそのそれぞれの断片もしくは等価物、

(b) *E. coli* の U93 株由来の単離されたかまたは組換え型のヒストン様タンパク質 (HU) ポリペプチド、またはそのそれぞれの断片もしくは等価物、

(c) 表 8、表 9 A、表 9 B、表 10 において同定される単離されたかまたは組換え型のタンパク質ポリペプチド、または図 6 において同定される DNA 結合性ペプチド、またはそのそれぞれの断片もしくは等価物、

(d) 配列番号 1 ~ 340 の単離されたかまたは組換え型のポリペプチド、またはその断片もしくは等価物、

(e) 配列番号 6 ~ 11、28、29、42 ~ 100、表 8 の単離されたかまたは組換え型の C 末端のポリペプチド、または表 10 において同定される C 末端のポリペプチド、またはそのそれぞれの断片もしくは等価物、

(f) (a) ~ (e) のうちの任意の 1 つをコードする、単離されたかまたは組換え型のポリヌクレオチド、または配列番号 36 の単離されたかまたは組換え型のポリヌクレオ

10

20

30

40

50

チド、またはそのそれぞれの等価物、またはストリンジェントな条件下でポリヌクレオチド、その等価物もしくはその相補物とハイブリダイズするポリヌクレオチド、

(g)(a)~(e)のうちの任意の1つを特異的に認識する、またはそれに特異的に結合する抗体もしくは抗原結合性断片、またはそのそれぞれの等価物もしくは断片、

(h)(g)の抗体もしくは抗原結合性断片をコードする、単離されたかまたは組換え型のポリヌクレオチド、

(i)(a)~(e)のうちの任意の1つでパルスした抗原提示細胞、および

(j)(a)~(e)のうちの任意の1つをコードする1種または複数種のポリヌクレオチドでトランスフェクトされた抗原提示細胞

の群のうちの1つまたは複数を有効量で投与することを含む、あるいはそれから本質的になる、またはさらにそれからなる方法も提供される。

10

【0187】

特定の一態様では、干渉作用剤は、単離されたかまたは組換え型の組込み宿主因子(IHF)ポリペプチドまたはその断片、IHFポリペプチドのC末端断片またはそのそれぞれの等価物である。別の特定の一態様では、干渉作用剤は、単離されたかまたは組換え型のHUポリペプチドまたはその断片、HUポリペプチドのC末端断片、またはそのそれぞれの等価物である。その非限定的な例は、IHFまたはHUのアルファポリペプチドまたはベータポリペプチド; IHFポリペプチド; *Moraxella acatarhalis* HU; *E. coli* HupA、HupB、himA、himD; *E. faecalis* HU(例えば、V583など)、HMGB1(高移動性群ボックス1(*high mobility group box 1*))、タンパク質のDNABIIファミリーとDNA結合性およびDNA基質特異性は類似しているが、一次アミノ酸配列は類似していないタンパク質; 機能的なオルソログおよび表8または表10において同定されるものである。

20

【0188】

別の態様では、方法は、対象に抗菌薬、抗原性ペプチドまたはアジュバントのうちの1つまたは複数を有効量で投与することをさらに含む、あるいはそれから基本的になる、またはさらにそれからなる。

【0189】

抗菌剤の非限定的な例は、別のワクチン構成成分、例えば、表面抗原、例えば、OMP P5、rsPilA、OMP 26、OMP P2、またはIV型Pilinタンパク質などである(*Jurcisek*および*Bakaletz*(2007年)*J. of Bacteriology* 189巻(10号): 3868~3875頁および*Murphy, TF, Bakaletz, LO*および*Smeesters, PR*(2009年)*The Pediatric Infectious Disease Journal*、28巻: S121~S126頁)。

30

【0190】

本発明の作用剤および組成物は、他の抗菌剤および/または表面抗原と、同時にまたは逐次的に投与することができる。特定の一態様では、投与は、例えば、直接的な注射または吸入による、感染部位への局所的なものである。投与の他の非限定的な例としては、経真皮的に(*transdermally*)、尿道に、舌下に、直腸に、膣に、眼に、皮下に、筋肉内に、腹腔内に、鼻腔内に、吸入によってまたは経口的に投与することを含む1種または複数種の方法によるものが挙げられる。

40

【0191】

本発明の方法によって処置することができる微生物感染症および疾患としては、実験番号1および表8において同定される生物体、例えば、*Streptococcus agalactiae*、*Neisseria meningitidis*、*Treponemes*、*denticola*、*pallidum*)、*Burkholderia cepacia*)、または*Burkholderia pseudomallei*による感染症が挙げられる。一態様では、微生物感染症は、*Haemophilus influenzae*

50

ae (分類不可能)、Moraxella catarrhalis、Streptococcus pneumoniae、Streptococcus pyogenes、Pseudomonas aeruginosa、Mycobacterium tuberculosisによるものうちの1つまたは複数である。これらの微生物感染症は、上気道、中気道および下気道に存在し得る(耳炎、副鼻腔炎、気管支炎、同様に、慢性閉塞性肺疾患(COPD)の増悪、慢性咳、嚢胞性線維症(CF)の合併症および/または主因ならびに市中感染性肺炎(CAP)。したがって、本発明のin vivoにおける方法を実施することによって、これらの感染症由来のこれらの疾患および合併症も予防または処置することができる。

【0192】

感染症は、口腔においても起こる可能性があり(齲歯、歯周炎)、それはStreptococcus mutans、Porphyromonas gingivalis、Aggregatibacter actinomycetemcomitans Iによって引き起こされる。感染症は、皮膚に局在する可能性もあり(膿瘍、「ブドウ球菌」感染症、膿痂疹、熱傷の二次感染症、ライム病)、それは、Staphylococcus aureus、Staphylococcus epidermidis、Pseudomonas aeruginosaおよびBorrelia burgdorferiによって引き起こされる。尿路(UTI)の感染症は、一般には、Escherichia coliによって引き起こされ、これも処置することができる。胃腸管(GI)の感染症(下痢、コレラ、胆石、胃潰瘍)は、一般には、Salmonella enterica serovar、Vibrio choleraeおよびHelicobacter pyloriによって引き起こされる。生殖管の感染症は、一般には、Neisseria gonorrhoeaeによって引き起こされる。感染症は、Enterococcus faecalisによって引き起こされる膀胱の感染症または留置デバイスの感染症であり得る。植え付けられた人工デバイス、例えば、人工股関節または膝置換など、または歯科インプラント、または医用デバイス、例えば、ポンプ、カテーテル、ステント、またはモニタリングシステムなどに関連する感染症は、一般には、種々の細菌によって引き起こされ、本発明の方法によって処置することができる。これらのデバイスは、本明細書に記載の作用剤でコーティングすること、またはそれとコンジュゲートすることができる。したがって、本発明のin vivoにおける方法を実施することによって、これらの感染症由来のこれらの疾患および合併症も予防または処置することができる。

【0193】

Streptococcus agalactiaeによって引き起こされる感染症も、本発明の方法によって処置することができ、また、それは新生児における細菌性敗血症の主要な原因である。髄膜炎を引き起こす恐れがある、Neisseria meningitidisによって引き起こされる感染症も処置することができる。

【0194】

したがって、本発明の方法に適用可能な投与経路としては、鼻腔内、筋肉内、尿道、気管内、皮下、皮内、局所塗布、静脈内、直腸、経鼻、経口的、吸入、および他の経腸および非経口的な投与経路が挙げられる。投与経路は、所望であれば組み合わせることができる、または作用剤および/または所望の効果に応じて調整することができる。活性薬剤は、単回投与または複数回投与で投与することができる。送達するために適したこれらの方法および経路の実施形態としては、全身性または局在型の経路が挙げられる。一般に、本発明の方法に適した投与経路としては、これらに限定されないが、直接注射経路、経腸経路、非経口的経路、または吸入による経路が挙げられる。

【0195】

吸入による投与以外の非経口的な投与経路としては、これらに限定されないが、局所経路、経皮(transdermal)経路、皮下経路、筋肉内経路、眼窩内経路、嚢内経路、脊髄内経路、胸骨内経路、および静脈内経路、すなわち、消化管を通る経路以外の任意の投与経路が挙げられる。非経口投与は、阻害剤の全身送達または局所送達をもたらす

10

20

30

40

50

ように行うことができる。全身送達が望まれる場合、投与は、一般には、医薬調製物の侵襲的または全身的に吸収される局所投与または粘膜を通じた投与を伴う。

【0196】

本発明の干渉作用剤は、経腸投与によって対象に送達することもできる。経腸投与経路としては、これらに限定されないが、経口的送達および直腸送達（例えば、坐薬を用いる）が挙げられる。

【0197】

皮膚または粘膜を通じた活性物質の投与方法としては、これらに限定されないが、適切な医薬調製物の局所塗布、経皮的（transcutaneous）伝達、経皮的（transdermal）伝達、注射および上皮の投与が挙げられる。経皮的（transdermal）伝達については、吸収促進剤またはイオン泳動が適切な方法である。イオン泳動的な伝達は、その生成物を数日またはそれ以上の期間にわたって、損なわれていない皮膚を通じて電氣的なパルスによって連続的に送達する市販の「パッチ」を使用して実現することができる。

10

【0198】

本発明の方法の種々の実施形態では、干渉作用剤は、吸入によって、注射または経口的に、連続的に、毎日、1日当たり少なくとも1回（QD）、および種々の実施形態では、1日2回（BID）、1日3回（TID）、または、さらには1日4回、投与する。一般には、治療的に有効な1日用量は、少なくとも約1mg、または少なくとも約10mg、または少なくとも約100mg、または約200mg～約500mg、および時には、化合物に応じて、約1g～約2.5gと同程度に至るまでである。

20

【0199】

投薬は、本発明の方法に従って、カプセル剤、錠剤、経口用懸濁剤、筋肉内注射用懸濁剤、静脈内注入用懸濁剤、局所塗布用ゲル剤もしくはクリーム剤、または関節内注射用懸濁剤を使用して実現することができる。

【0200】

本明細書に記載の組成物の投与量、毒性および処置効果は、細胞培養物または実験動物における標準の薬学的手順、例えば、LD50（集団の50%に対して致死的な用量）およびED50（集団の50%において治療的に有効な用量）を決定するための手順によって決定することができる。毒性効果と処置効果の間の用量比は処置指数であり、LD50/ED50比として表すことができる。高い処置指標を示す組成物が好ましい。毒性の副作用を示す化合物を用いることができるが、感染していない細胞に対する潜在的な損傷を最小限にし、それによって副作用を軽減するために、そのような化合物を患部組織部位にターゲティングする送達系を設計するために注意を払うべきである。

30

【0201】

ヒトにおいて使用するための投与量の範囲を処方するために、細胞培養アッセイおよび動物試験から得られたデータを用いることができる。そのような化合物の投与量は、毒性をほとんど伴わず、または毒性を全く伴わずにED50を含む循環濃度の範囲内にあることが好ましい。投与量は、使用する剤形および利用する投与経路に応じて、この範囲内で変動してよい。方法において使用する任意の化合物について、最初に細胞培養アッセイから処置有効量を推定することができる。用量は、動物モデルにおいて、細胞培養において決定される、IC50（すなわち、最大半量の症状の阻害が実現される試験化合物の濃度）を含む循環血漿濃度の範囲が実現されるように処方することができる。そのような情報を使用して、ヒトにおける有用な用量をより正確に決定することができる。血漿中のレベルは、例えば、高速液体クロマトグラフィーによって測定することができる。

40

【0202】

いくつかの実施形態では、処置効果または予防効果を実現するために十分な有効量の組成物は、投与当たり体重1キログラム当たり約0.000001mgから投与当たり体重1キログラム当たり約10,000mgまでにわたる。投与量の範囲は、投与当たり体重1キログラム当たり約0.0001mgから投与当たり体重1キログラム当たり約100

50

mgまでであることが適切である。投与は、初回投与、その後の1回または複数回の「ブースター」投与としてもたすことができる。ブースター投与は、初回投与の1日後、2日後、3日後、1週間後、2週間後、3週間後、1カ月後、2カ月後、3カ月後、6カ月後または12カ月後にもたすことができる。いくつかの実施形態では、ブースター投与は、前の投与に対する対象の応答を評価した後に投与される。

【0203】

当業者は、これらに限定されないが、疾患または障害の重症度、以前の処置、対象の全体的な健康および/または年齢、および存在する他の疾患を含めた特定の因子が対象を有効に処置するために必要な投与量およびタイミングに影響を及ぼす可能性があることを理解されたい。さらに、本明細書に記載の処置用組成物を処置有効量で用いた対象の処置は、単一の処置または一連の処置を含んでよい。

10

【0204】

ポリペプチド

本明細書では、本明細書に記載の方法において使用するための干渉作用剤および組成物も提供され、前記干渉作用剤は、

(a) 単離されたかまたは組換え型の組込み宿主因子 (IHF) ポリペプチド、またはそのそれぞれの断片もしくは等価物、

(b) *E. coli* の U93 株由来の単離されたかまたは組換え型のヒストン様タンパク質 (HU) ポリペプチド、またはそのそれぞれの断片もしくは等価物、

(c) 表 8、表 9 A、表 9 B、表 10 において同定される単離されたかまたは組換え型のタンパク質ポリペプチド、または図 6 において同定される DNA 結合性ペプチド、またはそのそれぞれの断片もしくは等価物、

20

(d) 配列番号 1 ~ 340 の単離されたかまたは組換え型のポリペプチド、またはその断片もしくは等価物、

(e) 配列番号 6 ~ 11、28、29、42 ~ 100、表 8 の単離されたかまたは組換え型の C 末端のポリペプチド、または表 10 において同定される C 末端のポリペプチド、またはそのそれぞれの断片もしくは等価物、または

(f) 微生物 DNA への結合について組込み宿主因子と競合するポリペプチドまたはポリヌクレオチド

の群のものである。

30

【0205】

特定の一態様では、干渉作用剤は、単離されたかまたは組換え型の DNA BII ポリペプチド、またはそのそれぞれの断片もしくは等価物である。その非限定的な例は、IHF または HU のアルファポリペプチドまたはベータポリペプチド; IHF ポリペプチド; *Moraxella catarrhalis* HU; *E. coli* HupA、HupB、himA、himD; *E. faecalis* HU (例えば、V583 など)、HMG B1 および表 8 において同定されるものである。

【0206】

別の態様では、干渉作用剤は、配列番号 1 ~ 5 または 12 ~ 27、30 ~ 35、101 ~ 340 から選択されるアミノ酸配列または図 6 において同定される DNA 結合性ペプチドから本質的になる単離されたかまたは組換え型のポリペプチドである。

40

【0207】

別の態様では、単離されたかまたは組換え型のポリペプチドは、配列番号 1 または 2 を含む、あるいはそれから本質的になる、またはさらにそれからなるが、配列番号 6 ~ 11、28、29、または 42 ~ 100 のいずれでもない。

【0208】

別の態様では、単離されたかまたは組換え型のポリペプチドは、配列番号 3、4、または 5 を含む、あるいはそれから本質的になる、またはさらにそれからなるが、配列番号 6 ~ 11、28、29、または 42 ~ 100 のいずれでもない。

【0209】

50

別の態様では、単離されたかまたは組換え型のポリペプチドは、配列番号 12、14、16、18、20、22、24、26、30、または32を含む、あるいはそれから本質的になる、またはさらにそれからなるが、配列番号6～11、28、29、または42～100のいずれでもない。

【0210】

別の態様では、単離されたかまたは組換え型のポリペプチドは、配列番号13、15、17、19、21、23、25、27、31、33、34、または35を含む、あるいはそれから本質的になる、またはさらにそれからなるが、配列番号6～11、28、29、または42～100のいずれでもない。

【0211】

別の態様では、単離されたかまたは組換え型のポリペプチドは、配列番号12および13を含むポリペプチド、配列番号14および15を含むポリペプチド、配列番号16および17を含むポリペプチド、配列番号18および19を含むポリペプチド、配列番号20および21を含むポリペプチド、配列番号23および24を含むポリペプチド、配列番号25および26を含むポリペプチド、配列番号30および31を含むポリペプチド、配列番号32および33を含むポリペプチド、配列番号34および35を含むポリペプチド、配列番号337および338を含むポリペプチド、または配列番号339および340を含むポリペプチドからなる群の単離されたかまたは組換え型のポリペプチドを含む、またはそれから本質的になる、またはさらにそれからなるポリペプチドであって、IHFアルファ、IHFベータのうちの任意の1つの野生型または配列番号6～11、28、29、または42～100のいずれでもない。

【0212】

別の態様では、単離されたかまたは組換え型のポリペプチドは、配列番号12および13から本質的になるポリペプチド、配列番号14および15から本質的になるポリペプチド、配列番号16および17から本質的になるポリペプチド、配列番号18および19から本質的になるポリペプチド、配列番号20および21から本質的になるポリペプチド、配列番号23および24から本質的になるポリペプチド、配列番号25および26から本質的になるポリペプチド、配列番号30および31から本質的になるポリペプチド、配列番号32および33から本質的になるポリペプチド、配列番号34および35から本質的になるポリペプチド、配列番号337および338から本質的になるポリペプチド、または配列番号339および340から本質的になるポリペプチドからなる群の単離されたかまたは組換え型のポリペプチドであって、IHFアルファ、IHFベータのうちの任意の1つの野生型または配列番号6～11、28、29、または42～100のいずれでもない。

【0213】

本発明の方法において使用するための作用剤として、上記の単離されたかまたは組換え型のポリペプチドの断片または等価物がさらに提供される。断片の例は、C末端のポリペプチドである。別の態様では、単離されたかまたは組換え型のポリペプチドは、上記の単離されたかまたは組換え型のポリペプチドのうちの2つ以上を含む、あるいはそれから本質的になる、またはさらにそれからなる。

10

20

30

40

50

【0214】

例えば、単離されたかまたは組換え型のポリペプチドは、配列番号1～6、12～27または30～33、または断片もしくは等価なポリペプチドのうちの任意の1つを含む、あるいはそれから本質的になる、またはさらにそれからなる。その例は、表8において同定される、または表9A、表9Bまたは表10に示されている。一態様では、単離された野生型ポリペプチドは排除される、すなわち、ポリペプチドは、配列番号6～11、28、29、または表8において同定されるまたは表9Aに示されている野生型配列のいずれでもない。

【0215】

一態様では、本発明は、配列番号1～6、12～27または30～35、1～6および13～35の群のアミノ酸配列から本質的になる単離されたかまたは組換え型のポリペプチド、または*Haemophilus influenzae* IHF または*Haemophilus influenzae* IHF の-3断片および/または-3断片に対応するアミノ酸を含む、あるいはそれから本質的になる、またはさらにそれからなるポリペプチドを提供し、その非限定的な例としては、配列番号12～27、またはそのそれぞれの断片もしくは等価物が挙げられる。別の態様では、本発明は、配列番号1～4、またはそのそれぞれの断片もしくは等価物の群のアミノ酸配列を含む、あるいはそれから本質的になる、またはさらにそれからなる単離されたかまたは組換え型のポリペプチド、または*Haemophilus influenzae* IHF または*Haemophilus influenzae* IHF の-3断片および/または-3断片に対応するアミノ酸を含む、あるいはそれから本質的になる、またはさらにそれからなるポリペプチドを提供し、その非限定的な例としては、それぞれ独立に、ポリペプチドのアミノ末端および/またはカルボキシル末端に、少なくとも2個、あるいは少なくとも3個、あるいは少なくとも4個、あるいは少なくとも5個、または少なくとも6個、あるいは少なくとも7個、あるいは少なくとも8個、あるいは少なくとも9個あるいは少なくとも10個のアミノ酸をさらに含む配列番号12～27またはその断片もしくは生物学的等価物が挙げられる。一態様では、単離された野生型DNA結合性ポリペプチドは排除される、すなわち、ポリペプチドは、配列番号6～11、28、29、または42～100または表8に列挙されているもしくは表9Aに示されている単離された野生型ポリペプチド配列のいずれでもない。

【0216】

別の態様では、本発明は、配列番号1または2を単独で、または*Haemophilus influenzae* IHF または*Haemophilus influenzae* IHF の-3断片および/または-3断片に対応するアミノ酸を含む、あるいはそれから本質的になる、またはさらにそれからなるポリペプチドと組み合わせて含む、あるいはそれから本質的になる、またはさらにそれからなる単離されたかまたは組換え型のポリペプチドを提供し、その非限定的な例としては、配列番号12～27またはそのそれぞれの断片もしくは生物学的等価物が挙げられる。一態様では、単離された野生型DNA結合性ポリペプチドは排除される、すなわち、ポリペプチドは、配列番号6～11、28、29、または42～100または表8に列挙されているもしくは表9Aに示されている単離された野生型ポリペプチド配列のいずれでもない。

【0217】

さらなる態様では、本発明は、配列番号3または4またはそのそれぞれの断片もしくは等価物を単独で、または*Haemophilus influenzae* IHF または*Haemophilus influenzae* IHF の-3断片および/または-3断片に対応するアミノ酸を含む、あるいはそれから本質的になる、またはさらにそれからなるポリペプチドと組み合わせて含む、あるいはそれから本質的になる、またはさらにそれからなる単離されたかまたは組換え型のポリペプチドを提供し、その非限定的な例としては、配列番号12～27、および34～35またはそのそれぞれの生物学的等価物が挙げられる。一態様では、単離された野生型DNA結合性ポリペプチドは排除され

10

20

30

40

50

る、すなわち、ポリペプチドは、配列番号 6 ~ 11、28、29、または 42 ~ 100 または表 8 に列挙されているもしくは表 9 A に示されている単離された野生型ポリペプチド配列のいずれでもない。

【0218】

本発明は、全部で 14 種の単離されたポリペプチドのうち 2 種以上、または 3 種以上、4 種以上、5 種以上、6 種以上、7 種以上、8 種以上、9 種以上、10 種以上、11 種以上、12 種以上、13 種以上を含む、あるいはそれから本質的になる、またはさらにそれからなる単離されたかまたは組換え型のポリペプチド、またはそのそれぞれの断片もしくは等価物も提供する。その例としては、配列番号 1 ~ 4、例えば、配列番号 1 および 2、あるいは 1 および 3、あるいは 1 および 4、あるいは 2 および 3、あるいは配列番号 1、2 および 3、あるいは、2、3 および 4、あるいは 1、3 および 4 を含む単離されたかまたは組換え型のポリペプチドが挙げられる。ポリペプチドは任意の方向、例えば、配列番号 1、2、および 3 または配列番号 3、2 および 1 あるいは 2、1 および 3、あるいは、3、1 および 2 であってよい。これらのポリペプチドの生物学的等価物もさらに本発明に含まれるが、その配列は、単離された野生型配列、例えば、表 8 および 9 において同定されるものなどを含まない。

10

【0219】

別の態様では、本発明は、配列番号 1 または 2 および 3 または 4、またはそのそれぞれの断片もしくは等価物を含む、あるいはそれから本質的になる、またはさらにそれからなるが、配列番号 5 ~ 10 のいずれでもなく、また、配列番号 11 ~ 26、例えば、11 および 12、あるいは 1 および 11、あるいは 2 および 11、あるいは、1 および 12、あるいは 2 および 12、あるいは 11、12 および 1、あるいは 2、11 および 12 のうちの任意の 1 つまたは複数をさらに含み得る単離されたかまたは組換え型のポリペプチドを提供する。この実施形態では、配列番号 1 または 2 は、配列番号 3 または 4 の上流またはアミノ末端に位置するが、そのアミノ酸配列は単離された野生型ポリペプチドではなく、例えば、配列番号 6 ~ 11、28 および 29 のいずれでもない。別の態様では、単離されたポリペプチドは、配列番号 1 または 2 の上流またはアミノ末端に位置する配列番号 3 または 4 を含む。これらのポリペプチドの断片または生物学的等価物がさらに本発明に含まれるが、その配列は、単離された野生型ポリペプチドを含まない。

20

【0220】

一実施形態では、野生型ポリペプチドまたは *Pedullia* (1996年) PNAS 93巻: 15411 ~ 15416 頁に開示されているものに対して配列同一性を有するポリペプチドまたはタンパク質はいずれも本発明から排除される。

30

【0221】

上記の実施形態のいずれにおいても、ポリペプチドの N 末端または C 末端にペプチドリリンカーを付加することができる。「リンカー」または「ペプチドリリンカー」とは、ポリペプチド配列の N 末端または C 末端のいずれかが連結したペプチド配列を指す。一態様では、リンカーは、約 1 アミノ酸残基から約 20 アミノ酸残基までの長さ、あるいは 2 アミノ酸残基 ~ 約 10 アミノ酸残基、約 3 アミノ酸残基 ~ 約 5 アミノ酸残基の長さである。ペプチドリリンカーの例は、Gly - Pro - Ser - Leu - Lys - Leu (配列番号 37) である。他の例としては、Gly - Gly - Gly; Gly - Pro - Ser - Leu (配列番号 38); Gly - Pro - Ser; Pro - Ser - Leu - Lys (配列番号 39); Gly - Pro - Ser - Leu - Lys (配列番号 40) および Ser - Leu - Lys - Leu (配列番号 41) が挙げられる。

40

【0222】

本発明の単離されたポリペプチドは、原核宿主細胞および真核宿主細胞から単離された野生型および組換えによって作製されたポリペプチドおよびタンパク質、ならびに変異タンパク質、類似体およびその断片を含むものとし、そのような細胞の例は上記されている。いくつかの実施形態では、この用語は、本明細書に記載の抗体および抗イデオタイプ抗体も包含する。そのようなポリペプチドは、当技術分野で公知であり、本明細書に簡単

50

に記載されている方法を用いて単離または作製することができる。

【0223】

野生型ポリペプチドまたはタンパク質の機能的等価物または変異体、例えば、アミノ酸の保存されたアミノ酸置換を有するものも本発明の範囲内であることが理解される。例えば、表9を参照されたい。他の類似体としては、抗原提示マトリックスとつながったポリペプチドを含み得る本発明のタンパク質またはポリペプチドを含む融合タンパク質が挙げられる。

【0224】

別の態様では、ポリペプチドは、検出可能な標識にコンジュゲートしているかまたは連結している。適切な標識は、当技術分野で公知であり、本明細書に記載されている。

10

【0225】

さらなる態様では、検出可能な標識を伴うポリペプチドまたは伴わないポリペプチドを宿主原核生物または真核宿主細胞、例えば、樹状細胞などの表面上に含めることができるまたはそこで発現させることができる。

【0226】

タンパク質およびポリペプチドは、当業者に公知のいくつかのプロセスによって得られ、そのプロセスとしては、精製、化学合成および組換え方法が挙げられる。ポリペプチドは、調製物、例えば、宿主細胞系などから、抗体を用いた免疫沈降などの方法、および標準の技法、例えば、ゲル濾過、イオン交換、逆相クロマトグラフィー、およびアフィニティークロマトグラフィーなどによって単離することができる。そのような方法体系については、例えば、Deutscherら(1999年) Guide To Protein Purification: Methods In Enzymology (182巻、Academic Press)を参照されたい。したがって、本発明は、これらのポリペプチドを得るためのプロセスならびにこれらのプロセスによって得ることができる生成物および得られた生成物も提供する。

20

【0227】

ポリペプチドは、市販の自動ペプチド合成機、例えば、Perkin/Elmer/Applied Biosystems, Inc.、モデル430Aまたは431A、Foster City, CA, USAによって製造されたものなどを使用した化学合成によっても得ることができる。合成されたポリペプチドは、沈殿させ、さらに、例えば、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)によって精製することができる。したがって、本発明は、タンパク質の配列および試薬、例えば、アミノ酸および酵素などをもたらし、アミノ酸を適切な方向および直線配列に連結し合わせることによって本発明のタンパク質を化学的に合成するためのプロセスも提供する。

30

【0228】

あるいは、タンパク質およびポリペプチドは、本明細書に記載の宿主細胞およびベクター系を使用して、例えば、Sambrookら(1989年)上記に記載のものなどの周知の組換え方法によって得ることができる。

【0229】

本出願は、診断方法において使用するための、検出可能な作用剤とコンジュゲートした本明細書に記載のポリペプチドも提供する。例えば、検出可能に標識したポリペプチドは、カラムに結合させ、抗体を検出し、精製するために使用することができる。検出可能に標識したポリペプチドは、下記の通り、抗体を産生させるための免疫原としても有用である。本発明のポリペプチドは、細胞プロセスを調節する作用剤または薬物をスクリーニングするための*in vitro*アッセイ系において有用である。

40

【0230】

本発明のペプチドを修飾して特性を変更することができることは当業者には周知である。本明細書で使用される場合、「アミノ酸」という用語は、天然アミノ酸および/または非天然アミノ酸または合成アミノ酸のいずれかを指し、グリシンおよびD光学異性体またはL光学異性体の両方、およびアミノ酸の類似体およびペプチド模倣薬を含める。3つ以

50

上のアミノ酸のペプチドは、一般に、ペプチド鎖が短ければオリゴペプチドと称される。ペプチド鎖が長ければ、ペプチドは、一般に、ポリペプチドまたはタンパク質と称される。

【0231】

本発明のペプチドは、非天然アミノ酸を含むように修飾することができる。したがって、ペプチドは、ペプチドに特別な性質を伝えるために、D-アミノ酸、D-アミノ酸とL-アミノ酸の組合せ、および種々の「デザイナー」アミノ酸（例えば、ベータ-メチルアミノ酸、C-アルファ-メチルアミノ酸、およびN-アルファ-メチルアミノ酸など）を含んでよい。さらに、特定のカップリングステップにおいて特定のアミノ酸を割り当てることにより、アルファ-ヘリックス、ベータターン、ベータシート、ガンマ-ターンを有するペプチド、および環式のペプチドを生成することができる。一般に、アルファ-ヘリックスの二次構造またはランダムな二次構造が好ましいと考えられている。

10

【0232】

本発明のポリペプチドは、種々の固相キャリア、例えば、インプラント、ステント、ペースト、ゲル、歯科インプラント、もしくは医療用インプラントなど、または液相キャリア、例えば、ビーズ、滅菌溶液または水溶液、薬学的に許容されるキャリア、薬学的に許容されるポリマー、リポソーム、ミセル、懸濁液およびエマルションなどと組み合わせることもできる。非水系の溶媒の例としては、プロピルエチレングリコール、ポリエチレングリコールおよび植物油が挙げられる。in vivoで抗体を調製するためまたは免疫応答を誘導するために使用する場合、キャリアは、特異的な免疫応答を非特異的に増大するために有用なアジュバントも含んでよい。当業者は、アジュバントが必要かどうかを容易に決定し、それを選択することができる。しかし、ただ単に例示する目的で、適切なアジュバントとしては、これらに限定されないが、フロイント完全アジュバントおよびフロイント不完全アジュバント、無機塩類およびポリヌクレオチドが挙げられる。他の適切なアジュバントとしては、モノホスホリルリピドA (MPL)、E. coliの熱に不安定なエンテロトキシンの変異体誘導体、コレラ毒素の変異体誘導体、CPGオリゴヌクレオチド、およびスクアレンに由来するアジュバントが挙げられる。

20

【0233】

本発明は、本発明のポリペプチド、類似体、変異タンパク質、または断片のうちの任意のものを、単独で、または互いにまたは抗生物質および許容できるキャリアまたは固体支持体のような他の作用剤と組み合わせて含む、あるいはそれから本質的になる、またはさらにそれからなる医薬組成物も提供する。これらの組成物は、本明細書に記載の種々の診断方法および処置方法のために有用である。

30

【0234】

ポリヌクレオチド

本発明は、上で同定された単離されたかまたは組換え型のポリペプチドのうちの1つまたは複数をコードする単離されたかまたは組換え型のポリヌクレオチドおよびそれらのそれぞれの相補鎖も提供する。単離されたかまたは組換え型のポリヌクレオチドを含むベクターがさらに提供され、その例は、当技術分野で公知であり、本明細書に簡単に記載されている。2種以上の単離されたかまたは組換え型のポリヌクレオチドを単一の単位として発現させようとする一態様では、単離されたかまたは組換え型のポリヌクレオチドは、ポリシストロニックベクター内に含有されてよい。ポリヌクレオチドは、DNA、RNA、mRNAまたは干渉RNA、例えば、siRNA、miRNAもしくはdsRNAなどであってよい。

40

【0235】

別の態様では、本発明は、DNAの、微生物バイオフィーム内のポリペプチドまたはタンパク質への結合に干渉するポリヌクレオチド、または、DNABIIポリヌクレオチドが微生物DNAに結合することを処置または阻害する、ならびにバイオフィームの形成および関連する感染症および障害を処置、予防または阻害することができる、ホリデイジャンクションと似ている4方向のジャンクションポリヌクレオチド、複製フォークと似てい

50

る3方向のジャンクションポリヌクレオチド、固有の柔軟性を有するポリヌクレオチドまたは屈曲したポリヌクレオチドである干渉作用剤を提供する。当業者は、そのようなポリヌクレオチドを、本明細書において提供される情報および当業者の知見を用いて作出することができる。GoodmanおよびKay(1999年)J. Biological Chem. 274巻(52号):37004~37011頁およびKamashevおよびRouviere-Yaniv(2000年)EMBO J. 19巻(23号):6527~6535頁を参照されたい。

【0236】

本発明は、さらに、RNA転写のプロモーター、ならびにDNAまたはRNAの複製および/または一過性発現、または安定発現のための他の調節配列に作動可能に連結した単離されたかまたは組換え型のポリヌクレオチドを提供する。本明細書で使用される場合、「作動可能に連結した」という用語は、プロモーターが、DNA分子からRNAの転写を導くように位置づけられていることを意味する。そのようなプロモーターの例は、SP6、T4およびT7である。ある特定の実施形態では、挿入されたポリヌクレオチドを細胞特異的に発現させるために細胞特異的なプロモーターを使用する。プロモーターまたはプロモーター/エンハンサーを含有し、そのプロモーターに作動可能に連結することができる終結コドンおよび選択マーカ配列、ならびにDNAの小片が挿入されたクローニング部位を伴うベクターは、当技術分野で公知であり、市販されている。一般的な方法体系およびクローニング戦略については、Gene Expression Technology(Goeddel編、Academic Press, Inc.(1991年))およびそこで引用されている参考文献、ならびに種々の適切なベクターについてのマップ、機能的性質、商業的な供給者およびGenEMBL受託番号の参照を含有するVectors:Essential Data Series(GacesaおよびRamji編、John Wiley & Sons, N.Y.(1994年))を参照されたい。

【0237】

一実施形態では、本発明のポリヌクレオチドに由来するポリヌクレオチドは、本明細書に記載の診断的および治療的な有用性を有するポリペプチドまたはタンパク質、ならびに存在する可能性があるまたは存在しない可能性があるタンパク質の転写物を同定するためのプローブをコードする。これらの核酸断片は、例えば、より大きなポリヌクレオチドを制限酵素消化することによって調製し、次いで検出可能なマーカで標識することができる。あるいは、分子のニックトランスレーションを用いてランダムな断片を生成することができる。そのような断片を調製および標識するための方法体系については、Sambrookら(1989年)上記を参照されたい。

【0238】

これらの核酸を含有する発現ベクターは、タンパク質およびポリペプチドを作製するための宿主ベクター系を得るために有用である。これらの発現ベクターは宿主生物体において、エピソームとして、または染色体DNAの不可欠な一部として複製可能でなければならないことが示されている。適切な発現ベクターの非限定的な例としては、プラスミド、酵母ベクター、ウイルスベクターおよびリポソームが挙げられる。アデノウイルスベクターは、*in vitro*および*in vivo*のどちらでも発現が高レベルであり、細胞を効率的に形質転換するので、*in vivo*で遺伝子を組織に導入するために特に有用である。核酸を、適切な宿主細胞、例えば、原核細胞または真核細胞および宿主細胞複製物に挿入する場合、タンパク質は、組換えによって作製することができる。適切な宿主細胞はベクターに左右され、また、適切な宿主細胞としては、公知の方法を用いて構築した哺乳動物細胞、動物細胞、ヒト細胞、サル細胞、昆虫細胞、酵母細胞、および細菌細胞を挙げることができる。Sambrookら(1989年)上記を参照されたい。外因性の核酸を細胞に挿入するためのウイルスベクターの使用に加えて、核酸は、当技術分野で公知の方法、例えば、細菌細胞の形質転換;哺乳動物の細胞に対する、リン酸カルシウム沈降を使用したトランスフェクション;またはDEAE-デキストラン;電気穿孔;またはマイクロインジェクションなどによって宿主細胞に挿入することができる。方法体系につ

10

20

30

40

50

いては *Sambrook*ら(1989年)上記を参照されたい。したがって、本発明は、タンパク質またはポリペプチドまたは抗体をコードするポリヌクレオチドを含有する宿主細胞、例えば、哺乳動物細胞、動物細胞(ラットまたはマウス)、ヒト細胞、または原核生物細胞、例えば、細菌細胞なども提供する。

【0239】

ポリヌクレオチドは、修飾されたヌクレオチド、例えば、メチル化されたヌクレオチドおよびヌクレオチド類似体などを含んでよい。存在する場合、ヌクレオチド構造の修飾は、ポリヌクレオチドの組立ての前に、またはその後付与することができる。ヌクレオチドの配列を非ヌクレオチド構成成分で遮ることができる。ポリヌクレオチドは、重合後に、例えば、標識化構成成分とコンジュゲートすることによってさらに修飾することができる。この用語はまた、二本鎖分子と一本鎖分子の両方を指す。別段の指定または要求がない限り、ポリヌクレオチドである本発明の任意の実施形態は、二本鎖の形態と、二本鎖の形態を成すことが公知であるまたは予測される2つの相補的な一本鎖の形態のそれぞれの両方を包含する。

10

【0240】

ベクターが *in vivo* または *ex vivo* での遺伝子療法のために使用される場合、薬学的に許容されるベクター、例えば、複製能力のないレトロウイルスまたはアデノウイルスベクターなどが好ましい。本発明の核酸を含有する、薬学的に許容されるベクターは、挿入されたポリヌクレオチドを一過性にまたは安定に発現させるためにさらに修飾することができる。本明細書で使用される場合、「薬学的に許容されるベクター」という用語としては、これらに限定されないが、核酸を、分裂している細胞に選択的にターゲティングし、導入する力を有するベクターまたは送達ビヒクルが挙げられる。そのようなベクターの例は、ウイルスタンパク質を産生することができず、感染した宿主細胞におけるベクター伝播が妨げられることによって定義される「複製能力のない」ベクターである。複製能力のないレトロウイルスベクターの例は、*LNL6* (*Miller*ら(1989年)*BioTechniques* 7巻:980~990頁)である。遺伝子マーカーのレトロウイルス媒介性遺伝子移入のために複製能力のないレトロウイルスを使用する方法体系が確立されている(*Bordignon*(1989年)*PNAS USA* 86巻:8912~8952頁;*Culver*(1991年)*PNAS USA* 88巻:3155頁;および *Rill*(1991年)*Blood* 79巻(10号):2694~2700頁)。

20

30

【0241】

本発明は、本発明のポリヌクレオチドを含有し、かつ/または発現する遺伝子改変された細胞も提供する。遺伝子改変された細胞は、上流の調節配列、例えば、プロモーターまたは遺伝子活性化因子などを挿入することによって作製することができる(米国特許第5,733,761号を参照されたい)。

【0242】

ポリヌクレオチドは、検出可能なマーカー、例えば、細胞における核酸および/または遺伝子の発現を検出するための酵素標識または放射性同位元素とコンジュゲートすることができる。検出可能なシグナルを生じることができる蛍光リガンド、放射性リガンド、酵素的リガンドまたは他のリガンド、例えば、アビジン/ビオチンなどを含めた多種多様な適切な検出可能なマーカーが当技術分野で公知である。一態様では、放射性試薬または他の環境的に望ましくない試薬の代わりに、蛍光標識または酵素タグ、例えば、ウレアーゼ、アルカリホスファターゼまたはペルオキシダーゼなどを使用することが望まれる可能性がある。酵素タグの場合では、熱量測定的指示基質を使用して、相補的な核酸含有試料との特異的なハイブリダイゼーションを同定するための、ヒトの眼による、または分光光度的な可視手段をもたらすことができる。したがって、本発明は、さらに、一本鎖のポリヌクレオチドまたはその相補物を、相補的な一本鎖のポリヌクレオチドのハイブリダイゼーションが可能になる条件下で(中程度にストリンジентなハイブリダイゼーション条件であることが好ましい)、またはより好ましくは、高度にストリンジентなハイブリダ

40

50

イゼーション条件下で、標的の一本鎖のポリヌクレオチドと本発明のポリヌクレオチドの一部である標識された一本鎖のポリヌクレオチド（プローブ）を接触させることによって検出するための方法を提供する。ハイブリダイズしたポリヌクレオチド対をハイブリダイズしていない一本鎖のポリヌクレオチドから分離する。ハイブリダイズしたポリヌクレオチド対は、当業者に公知の、例えば、Sambrookら（1989年）上記に記載の方法を使用して検出する。

【0243】

本発明の態様のポリヌクレオチドは、化学合成、組換えクローニング方法、PCR、またはそれらの任意の組合せを用いて得ることができる。化学的なポリヌクレオチド合成の方法は当技術分野で公知であり、本明細書において詳しく記載する必要はない。当業者は、DNA合成機を使用することによって、または商業的なサービスを注文することによって所望のポリヌクレオチドを得るために、本明細書において提供される配列データを使用することができる。

10

【0244】

本発明のポリヌクレオチドは、PCRを用いて単離または複製することができる。PCR技術は、米国特許第4,683,195号；同第4,800,159号；同第4,754,065号；および同第4,683,202号の主題であり、また、PCR: The Polymerase Chain Reaction (Mullisら編、Birkhauser Press、Boston (1994年))またはMacPhersonら（1991年）および（1995年）上記、およびそこに引用されている参考文献に記載されている。あるいは、当業者は、本明細書において提供される配列および商業的なDNA合成機を使用して、DNAを複製することができる。したがって、本発明は、本発明のポリヌクレオチドを、ポリヌクレオチドの直線配列、ヌクレオチド、適切なプライマー分子、酵素などの化学物質、およびそれらを複製するための指示をもたらし、ヌクレオチドを、適切な方向に化学的に複製または連結してポリヌクレオチドを得ることによって得るためのプロセスも提供する。別の実施形態では、これらのポリヌクレオチドをさらに単離する。さらに、当業者は、複製し、増幅するために、ポリヌクレオチドを適切な複製ベクターに挿入し、そのベクターを適切な宿主細胞（原核生物または真核生物）に挿入することができる。そうして増幅されたDNAは、当業者に公知の方法によって細胞から単離することができる。この方法によってポリヌクレオチドを得るためのプロセスならびにそうして得られたポリヌクレオチドがさらに本明細書において提供される。

20

30

【0245】

RNAは、まず、DNAポリヌクレオチドを適切な宿主細胞に挿入することによって得ることができる。DNAは、任意の適切な方法によって、例えば、適切な遺伝子送達ビヒクル（例えば、リポソーム、プラスミドまたはベクター）を使用することによって、または電気穿孔によって送達することができる。細胞が複製され、DNAがRNAに転写されたら、次いで、当業者に公知の方法、例えば、Sambrookら（1989年）上記に記載の方法を用いてRNAを単離することができる。例えば、mRNAは、種々の溶菌酵素または化学的な溶液を使用して、Sambrookら（1989年）上記に記載の手順に従って単離することができる、または製造者によって提供される添付の説明書に従って、核酸結合性樹脂によって抽出することができる。

40

【0246】

本発明のポリヌクレオチドに対する配列相補性または相同性を示すポリヌクレオチドは、ハイブリダイゼーションプローブとして、または本明細書において同定される特異的なポリヌクレオチドの等価物として有用である。転写物の完全なコード配列は公知であるので、この配列または相同な配列の任意の部分を本発明の方法において用いることができる。

【0247】

特異的なハイブリダイゼーションのために「完全に一致する」プローブは必要ないことが当技術分野では公知である。プローブ配列の軽微な変化は、ハイブリダイゼーションの

50

特異性に影響を及ぼさない少数の塩基の置換、欠失または挿入によって実現される。一般に、20%程度の塩基対のミスマッチ（最適にアラインメントした場合）が容認され得る。上述のmRNAを検出するために有用なプローブは、相同領域と少なくとも約80%同一であることが好ましい。プローブは、相同な領域とアラインメントした後に、対応する遺伝子配列と85%同一であることがより好ましい；プローブは90%の同一性を示すことがさらに好ましい。

【0248】

これらのプローブをラジオアッセイ（例えば、サザンブロット分析およびノーザンブロット分析）において用いて、これらの細胞を含有する種々の細胞または組織を検出、予後決定、診断またはモニターすることができる。プローブは、本発明のポリヌクレオチドに対応する遺伝子の発現を検出するためのハイスループットなスクリーニングアッセイにおいて使用するために、固体支持体またはアレイ、例えば、チップなどに付着させることもできる。したがって、本発明は、ハイスループットなスクリーニングにおいて使用するために固体支持体に付着させた、本発明のポリヌクレオチド、またはその等価物、またはその相補物、またはその断片を含むまたはそれに対応するプローブも提供する。

10

【0249】

断片の全体のサイズ、ならびに相補的なひと続きのサイズは、特定の核酸セグメントの意図された使用または適用に左右される。より小さな断片は、一般には、ハイブリダイゼーションの実施形態において使用され、相補領域の長さは変動してよく、例えば、少なくとも5~10ヌクレオチドから約100ヌクレオチドの間である、または、検出することが望まれる相補配列に従って全長でさえあってよい。

20

【0250】

ハイブリッドの安定性および選択性を増し、それにより、得られる特定のハイブリッド分子の特異性を改善するために、5~10ヌクレオチドの長さを超えるひと続きにわたる相補配列を有するヌクレオチドプローブが一般に好ましい。10ヌクレオチド以上または、50ヌクレオチド超の長さ、または所望の場合、さらに長い遺伝子相補的なひと続きのポリヌクレオチドを設計することができることがより好ましい。そのような断片は、例えば、化学的手段によって断片を直接合成することによって、核酸複製（reproduction）技術、例えば、米国特許第4,603,102号に記載の2種のプライマーオリゴヌクレオチドを用いたPCR技術などを適用することによって、または組換え作製のために、選択された配列を組換えベクターに導入することによって、容易に調製することができる。一態様では、プローブは、約50~75ヌクレオチドまたはそれ以上、あるいは、50~100ヌクレオチドの長さである。

30

【0251】

本発明のポリヌクレオチドは、本明細書に記載の細胞において発現させる遺伝子または遺伝子転写物を検出するためのプライマーとしての機能を果たし得る。この場合、増幅とは、標的配列を妥当な忠実度で複製することができるプライマー依存性のポリメラーゼを使用する任意の方法を意味する。増幅は、天然DNAポリメラーゼまたは組換えDNAポリメラーゼ、例えば、T7 DNAポリメラーゼ、E. coli DNAポリメラーゼのクレノウ断片、および逆転写酵素などによって行うことができる。ただ単に例示する目的で、プライマーは、プローブについて示されているのと同じ長さである。

40

【0252】

ポリヌクレオチドを増幅するための1つの方法はPCRであり、PCR増幅のためのキットが市販されている。増幅した後、生じたDNA断片は、当技術分野で公知の任意の適切な方法によって、例えば、アガロースゲル電気泳動した後に、臭化エチジウム染色および紫外線照明を用いて可視化することによって検出することができる。

【0253】

有効量の遺伝子送達ベクターまたはビヒクルを細胞に投与するための方法が開発されており、それは当業者に公知であり本明細書に記載されている。細胞における遺伝子発現を検出するための方法は当技術分野で公知であり、その方法としては、例えば、DNAマイ

50

クアレイへのハイブリダイゼーション、*in situ*ハイブリダイゼーション、PCR、RNアーゼ保護アッセイおよびノーザンブロット分析などの技法が挙げられる。そのような方法は、細胞における遺伝子の発現を検出し、数量化するために有用である。あるいは、コードされるポリペプチドの発現は、種々の方法によって検出することができる。具体的には、標的ポリペプチドに特異的に応答するポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体を調製することが有用である。そのような抗体は、例えば、免疫組織学的方法、ELISA、およびウェスタンブロット法などの技法を用いてポリペプチドを発現している細胞を視覚化するために有用である。これらの技法を使用して、発現されたポリヌクレオチドの発現レベルを決定することができる。

【0254】

抗体およびそれらの誘導体

本発明はまた、本発明の方法において用いられる、単離されたポリペプチドを特異的に認識し、かつ/またはそれに結合する抗体も提供する。抗体は、本明細書で説明される各種の抗体のうちのいずれかであることが可能であり、このような抗体の非限定的な例には、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト抗体、ベニア化抗体、ダイアポディー、ヒト化抗体、抗体誘導体、組換えヒト化抗体、またはそれらのそれぞれの誘導体もしくは断片が含まれる。一態様では、断片が、抗体のCDRを含む、あるいはそれから本質的になる、またはさらにそれからなる。一態様では、抗体が、検出可能に標識されている、またはそれにコンジュゲートした検出可能な標識をさらに含む。また、本発明のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞株も提供される。本明細書では、上記の実施形態のうちの1つもしくは複数を含む、あるいはそれから本質的になる、またはさらにそれからなる組成物もさらに提供される。抗体および断片のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドのほか、抗体のポリペプチドおよびそれらの断片を組換えにより産生するまたは化学合成する方法もさらに提供される。抗体のポリペプチドは、真核細胞内で産生することもでき、原核細胞内で産生することもでき、当技術分野において公知であり、本明細書で説明される他の方法を介して産生することもできる。

【0255】

抗体は、当技術分野において公知であり、文献中で十分に説明されている従来の技法を用いて産生することができる。ポリクローナル抗体を産生するには、いくつかの方法が存在する。例えば、ポリクローナル抗体は、ニワトリ、ヤギ、モルモット、ハムスター、ウマ、マウス、ラット、およびウサギなどであるがそれらに限定されない適切な哺乳動物を免疫化することにより産生することが典型的である。抗原を哺乳動物に注射すると、これが、Bリンパ球を誘導して、この抗原に特異的な免疫グロブリンを産生させる。免疫グロブリンは、哺乳動物の血清から精製することができる。IHF およびIHf に特異的な抗体は、IHF およびIHf の異なるエピトープに対応するポリペプチドを注射することにより産生することができる。例えば、IHF にはTFRPGQKLKSRVENASPKDE (配列番号34)、およびIHf にはKYVPHFKPGKELRDRANIYG (配列番号35)など、20アミノ酸の各サブユニットを用いて、抗体を産生することができる。この方法の変化形には、産生を最適化し、動物を人道的に取り扱うための、アジュバント、投与経路および投与部位、部位1カ所当たりの注射容量および動物1匹当たりの部位数の改変が含まれる。例えば、抗原に対する免疫応答を改善または増強するために、アジュバントを用いることが典型的である。大半のアジュバントは、注射部位における抗原貯留をもたらし、それにより、抗原の排出リンパ節内への緩徐な放出が可能となる。他のアジュバントには、タンパク質抗原分子の濃縮を広大な表面積にわたり促進する界面活性剤、および免疫賦活性分子が含まれる。ポリクローナル抗体を産生するためのアジュバントの非限定的な例には、フロイントによるアジュバント、Ribiaアジュバント系、およびTiternaが含まれる。ポリクローナル抗体は、当技術分野において公知の方法を用いて産生ことができ、それらのうちの一部は、米国特許第7,279,559号；同第7,119,179号；同第7,060,800号；同第6,709,659号；同第6,656,746号；同第6,322,788号；同第5,686

10

20

30

40

50

、073号；および同第5,670,153号において説明されている。

【0256】

モノクローナル抗体は、当技術分野において公知であり、文献中で十分に説明されている従来のハイブリドーマ法を用いて産生することができる。例えば、ハイブリドーマは、適切な不死細胞株（例えば、Sp2/0細胞、Sp2/0-AG14細胞、NS0細胞、NS1細胞、NS2細胞、AE-1細胞、L.5細胞、P3X63Ag8.653細胞、Sp2 SA3細胞、Sp2 MAI細胞、Sp2 SS1細胞、Sp2 SA5細胞、U397細胞、MLA 144細胞、ACT IV細胞、MOLT4細胞、DA-1細胞、JURKAT細胞、WEHI細胞、K-562細胞、COS細胞、RAJI細胞、NIH 3T3細胞、HL-60細胞、MLA 144細胞、NAMAIWA細胞、NEURO 2A細胞、CHO細胞、PerC.6細胞、YB2/O細胞などであるがそれらに限定されない骨髓腫細胞株）など、あるいはヘテロ骨髓腫、これらの融合産生物、またはそれらに由来する任意の細胞もしくは融合細胞、あるいは当技術分野において公知の他の任意の適切な細胞株（以下のウェブアドレス、例えば、2007年11月26日に最終アクセスされたatcc.org、lifetech.comにおける細胞株を参照されたい）を、単離されたかまたはクローニングされた脾臓細胞、末梢血細胞、リンパ球、扁桃腺細胞、または他の免疫細胞もしくはB細胞を含有する細胞、あるいは組換えまたは内因性のウイルス、細菌、藻類、原核生物、両生類、昆虫、爬虫類、魚類、哺乳動物、齧歯動物、ウマ、ヒツジ(ovine)、ヤギ、ヒツジ(sheep)、霊長動物、真核生物のゲノムDNA、cDNA、rDNA、ミトコンドリアDNAもしくはミトコンドリアRNA、クロロプラストDNAもしくはクロロプラストRNA、hnRNA、mRNA、tRNA、一本鎖核酸、二本鎖核酸、または三本鎖核酸、ハイブリダイズした核酸など、あるいはそれらの任意の組合せの核酸としての内因性核酸または異種核酸としての、重鎖定常配列もしくは重鎖可変配列もしくは重鎖フレームワーク配列もしくは重鎖CDR配列または軽鎖定常配列もしくは軽鎖可変配列もしくは軽鎖フレームワーク配列もしくは軽鎖CDR配列を発現する他の任意の細胞などであるがそれらに限定されない抗体産生細胞と融合させることにより産生する。抗体産生細胞はまた、対象の抗原で免疫化したヒトまたは他の適切な動物の末梢血、または好ましくは脾臓もしくはリンパ節から得ることもできる。また、他の任意の適切な宿主細胞も、本発明の抗体、指定された断片、またはそれらの変異体をコードする異種核酸または内因性核酸を発現させるのに用いることができる。融合細胞（ハイブリドーマ）または組換え細胞は、選択培養条件または他の適切な公知の方法を用いて単離することができ、限界希釈法、もしくは細胞分取法、または他の公知の方法を介してクローニングすることができる。

【0257】

ペプチドライブラリーまたはタンパク質ライブラリー（例えば、バクテリオファージディスプレイライブラリー、リボソームディスプレイライブラリー、オリゴヌクレオチドディスプレイライブラリー、RNAディスプレイライブラリー、cDNAディスプレイライブラリーなどであるがそれらに限定されないライブラリー；例えば、当技術分野において公知の方法を用いる、MorphoSys (Martinsreid/Planege, Del.), BioInvent (Lund, Sweden), Affitech (Oslo, Norway) など、各販売元から市販されているライブラリー) から組換え抗体を選択する方法が含まれるがそれらに限定されない、必須の特異性を有する抗体を産生または単離する他の適切な方法を用いることができる。当技術分野で公知の方法は、特許文献において説明されており、それらのうちの一部には、米国特許第4,704,692号；同第5,723,323号；同第5,763,192号；同第5,814,476号；同第5,817,483号；同第5,824,514号；同第5,976,862号が含まれる。代替的な方法は、トランスジェニック動物（例えば、SCIDマウス；Nguyenら(1977年)、Microbiol. Immunol., 41巻：901~907頁(1997年)；Sandhuら(1996年)、Crit. Rev. Biotechnol., 16巻：95~118頁；Erenら(1998年)、Immun

10

20

30

40

50

ol.、93巻：154～161頁)の免疫化に依存し、それにより、当技術分野において公知であり、かつ/または本明細書でも説明されるヒト抗体のレパトリーを産生することが可能である。このような技法には、リボソームディスプレイ(Hanesら(1997年)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、94巻：4937～4942頁；Hanesら(1998年)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、95巻：14130～14135頁)、単一細胞による抗体産生法(例えば、選択リンパ球抗体法(「SLAM」)(米国特許第5,627,052号、Wenら(1987年)、J. Immunol.、17巻：887～892頁；Babcoockら(1996年)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、93巻：7843～7848頁)、ゲルマイクロ液滴法およびフローサイトメトリー法(Powellら(1990年)、Biotechnol.、8巻：333～337頁；One Cell Systems(Cambridge, Mass)；Grayら(1995年)、J. Imm. Meth.、182巻：155～163頁；ならびにKennyら(1995年)、Bio. Technol.、13巻：787～790頁)、B細胞選択法(Steenbakkersら(1994年)、Molec. Biol. Reports、19巻：125～134頁)が含まれるがそれらに限定されない。

【0258】

本発明の抗体誘導体はまた、本発明の抗体をコードするポリヌクレオチドを、ヤギ、ウシ、ウマ、ヒツジなど、それらのミルク中にこのような抗体を産生するトランスジェニック動物またはトランスジェニック哺乳動物を提供するように、適切な宿主に送達することにより調製することもできる。当技術分野ではこれらの方法が公知であり、例えば、米国特許第5,827,690号；同第5,849,992号；同第4,873,316号；同第5,849,992号；同第5,994,616号；同第5,565,362号；および同第5,304,489号において説明されている。

【0259】

「抗体誘導体」という用語は、抗体または断片の直鎖状ポリペプチド配列に対する翻訳後修飾を包含する。例えば、米国特許第6,602,684B1号は、免疫グロブリンのFc領域と等価の領域を包含し、Fcを介する細胞傷害作用が増強されている全抗体分子、抗体断片、または融合タンパク質を含めた抗体の修飾糖形態を産生する方法、およびこのようにして産生された糖タンパク質について説明している。

【0260】

本発明の抗体はまた、抗体が抗イデオタイプ応答を引き起こすことを共有結合が予防しないように、任意の種類の子を抗体に共有結合させることにより修飾した誘導体も包含する。抗体誘導体には、グリコシル化、アセチル化、ペグ化、リン酸化、アミド化、公知の保護基(protecting/blocking groups)を介する誘導、タンパク質分解性切断、細胞内リガンドまたは他のタンパク質への結合などにより修飾されている抗体が含まれるがそれらに限定されない。加えて、誘導体は、1つまたは複数の非古典的アミノ酸を含有し得る。

【0261】

抗体誘導体はまた、本発明のポリヌクレオチドを送達して、このような抗体、指定された部分、または変異体を、植物部分またはそれらに由来して培養された細胞において産生する、トランスジェニック植物および培養植物細胞(例えば、タバコ、トウモロコシ、およびウキクサであるがこれらに限定されない)を作製することにより調製することもできる。例えば、Cramerら(1999年)、Curr. Top. Microbiol. Immunol.、240巻：95～118頁、およびこの文献において引用された参考文献は、例えば、誘導性プロモーターを用いる、大量の組換えタンパク質を発現するトランスジェニックのタバコ葉の産生について説明している。トランスジェニックトウモロコシは、他の組換え系で産生されたまたは天然の供給源から精製された哺乳動物タンパク質と等価の生物学的活性を伴う哺乳動物タンパク質を、市販品生産のレベルで発現させるのに用いられている。例えば、Hoodら(1999年)、Adv. Exp. Me

d. Biol., 464巻:127~147頁、およびこの文献において引用された参考文献を参照されたい。抗体誘導体はまた、タバコの種子および馬鈴薯の塊茎を含め、単鎖抗体(scFv)などの抗体断片を包含するトランスジェニック植物の種子からも大量に産生されている。例えば、Conradら(1998年)、Plant Mol. Biol., 38巻:101~109頁、およびこの文献において引用された参考文献を参照されたい。したがって、抗体はまた、公知の方法に従いトランスジェニック植物を用いても産生することができる。

【0262】

抗体誘導体はまた、例えば、外因性配列を付加して、免疫原性を修飾する、または結合、アフィニティー、オン速度、オフ速度、アビディティー、特異性、半減期、もしくは他の任意の適切な特徴を低減、増強、もしくは修飾することにより産生することもできる。一般に、可変領域および定常領域の非ヒト配列をヒトアミノ酸または他のアミノ酸で置換しながら、非ヒトCDR配列またはヒトCDR配列のうちの一部または全部を維持する。

10

【0263】

一般に、CDR残基は、抗原の結合への影響に直接的に、かつ、最も実質的に関与している。抗体のヒト化または操作は、米国特許第5,723,323号;同第5,976,862号;同第5,824,514号;同第5,817,483号;同第5,814,476号;同第5,763,192号;同第5,723,323号;同第5,766,886号;同第5,714,352号;同第6,204,023号;同第6,180,370号;同第5,693,762号;同第5,530,101号;同第5,585,089号;同第5,225,539号;および同第4,816,567号において説明されている方法などであるがそれらに限定されない任意の公知の方法を用いて実施することができる。

20

【0264】

本発明のキメラ抗体、ヒト化抗体、または霊長動物化抗体は、標準的な分子生物学の技法を用いて調製される基準のモノクローナル抗体の配列に基づき調製することができる。重鎖免疫グロブリンおよび軽鎖免疫グロブリンをコードするDNAは、対象のハイブリドーマから得、標準的な分子生物学の技法を用いて、基準以外の(例えば、ヒトの)免疫グロブリン配列を含有するように操作することができる。例えば、キメラ抗体を創出するには、当技術分野において公知の方法(米国特許第4,816,567号)を用いて、マウス可変領域を、ヒト定常領域に連結することができる。ヒト化抗体を創出するには、当技術分野において公知の方法(米国特許第5,225,539号、ならびに米国特許第5,530,101号;同第5,585,089号;同第5,693,762号;および同第6,180,370号)を用いて、マウスCDR領域を、ヒトフレームワーク内に挿入することができる。同様に、霊長動物化抗体を創出するには、当技術分野において公知の方法(WO93/02108およびWO99/55369)を用いて、マウスCDR領域を、霊長動物フレームワーク内に挿入することができる。

30

【0265】

当技術分野では、部分ヒト抗体~完全ヒト抗体を作製する技法が公知であり、任意のこのような技法を用いることができる。一実施形態によれば、トランスジェニックマウスにおいて完全ヒト抗体配列を作製し、ヒト重鎖抗体遺伝子およびヒト軽鎖抗体遺伝子を発現させる。異なるクラスの抗体を産生させ得る、複数のこのようなトランスジェニックマウス株が作製されている。所望の抗体を産生しているトランスジェニックマウスに由来するB細胞を融合させて、所望の抗体を持続的に産生するためのハイブリドーマ細胞株を作製することができる(例えば、Russellら(2000年)、Infection and Immunity、2000年4月:1820~1826頁;Gallicoら(2000年)、European J. of Immun., 30巻:534~540頁;Green(1999年)、J. of Immun. Methods、231巻:11~23頁;Yangら(1999年A)、J. of Leukocyte Biology、66巻:401~410頁;Yang(1999年B)、Cancer Rese

40

50

arch、59巻(6号):1236~1243頁; Jakobovits(1998年)、Advanced Drug Delivery Reviews、31巻:33~42頁; GreenおよびJakobovits(1998年)、J. Exp. Med.、188巻(3号):483~495頁; Jakobovits(1998年)、Exp. Opin. Invest. Drugs、7巻(4号):607~614頁; Tsudaら(1997年)、Genomics、42巻:413~421頁; Sherman-Gold(1997年)、Genetic Engineering News、17巻(14号); Mendezら(1997年)、Nature Genetics、15巻:146~156頁; Jakobovits(1996年)、「Weir's Handbook of Experimental Immunology, The Integrated Immune System」、IV巻、194.1~194.7頁; Jakobovits(1995年)、Current Opinion in Biotechnology、6巻:561~566頁; Mendezら(1995年)、Genomics、26巻:294~307頁; Jakobovits(1994年)、Current Biology、4巻(8号):761~763頁; Arbonesら(1994年)、Immunity、1巻(4号):247~260頁; Jakobovits(1993年)、Nature、362巻(6417号):255~258頁; Jakobovitsら(1993年)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、90巻(6号):2551~2555頁; および米国特許第6,075,181号を参照されたい)。

10

20

【0266】

本発明の抗体はまた、キメラ抗体を創出するように修飾することもできる。キメラ抗体とは、抗体の重鎖および軽鎖の多様なドメインが、複数の種に由来するDNAによりコードされる抗体である。例えば、米国特許第4,816,567号を参照されたい。

【0267】

代替的に、本発明の抗体はまた、ベニア化抗体を創出するように修飾することもできる。ベニア抗体とは、第1の種の抗体が、第2の種において免疫原性とならず、それにより、この抗体の免疫原性を低減するように、1つの種の抗体の外部のアミノ酸残基を、第2の種の外部のアミノ酸残基で慎重に置換または「ベニア化」された抗体である。タンパク質の免疫原性は、主に、その表面の性質に依存するので、別の哺乳動物種の抗体中に通常見いだされる残基とは異なる露出残基を置換することによれば、抗体の免疫原性を低減し得るであろう。このように外部残基を慎重に置換すれば、内部ドメインまたはドメイン間の接合部にはほとんどまたは全く影響が及ばないはずである。したがって、可変領域のフレームワーク残基に限定される変更の結果として、リガンドの結合特性に影響が及ぶことはないはずである。変更するのは抗体の外面または皮膚だけであり、支持残基は攪乱されずに維持されるので、この工程を、「ベニア化」と称する。

30

【0268】

「ベニア化」の手順は、Kabataら(1987年)、「Sequences of Proteins of Immunological Interest」、4版、Bethesda, Md.、National Institutes of Healthによりコンパイルされたヒト抗体可変ドメインについての検索可能な配列データ、このデータベースに対する更新、ならびに米国および海外の他の検索可能なデータベース(核酸およびタンパク質両方のデータベース)を活用する。ベニア化抗体を産生するのに用いられる方法の非限定的な例には、EP519596、米国特許第6,797,492号が含まれ、Padlanら(1991年)、Mol. Immunol.、28巻(4~5号):489~498頁においても説明されている。

40

【0269】

「抗体誘導体」という用語はまた、2つの抗原結合部位を伴う小型の抗体断片であって、断片が、同じポリペプチド鎖内の軽鎖可変ドメイン(VL)に連結された重鎖可変ドメイン(VH)を含む「ダイアボディー」も包含する(例えば、EP404,097; WO

50

93/11161; および Hollingerら (1993年)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、90巻: 6444~6448頁を参照されたい)。同じ鎖の2つのドメイン間における対合を可能とするには短すぎるリンカーを用いることにより、これらのドメインは、別の鎖の相補的ドメインと対合し、2つの抗原結合部位を創出することを余儀なくされる(また、1種または複数種のアミノ酸が親抗体の超可変領域内に挿入され、標的抗原に対する結合アフィニティーが、この抗原に対する親抗体の結合アフィニティーの少なくとも約2倍強い抗体変異体について開示する、Chenらによる米国特許第6,632,926号も参照されたい)。

【0270】

「抗体誘導体」という用語は、操作抗体分子、操作抗体断片、および scFv、dAb、ナノボディー、ミニボディー、ユニボディー、およびアフィボディーなどの操作抗体単一ドメインもさらに包含する(HolligerおよびHudson(2005年)、Nature Biotech、23巻(9号): 1126~36頁; 米国特許公開第US2006/0211088号; PCT公開第WO2007/059782号; 米国特許第5,831,012号)。

10

【0271】

「抗体誘導体」という用語は、「直鎖状抗体」もさらに包含する。当技術分野では、直鎖状抗体を作製するための手順が公知であり、Zapataら(1995年)、Protein Eng.、8巻(10号): 1057~1062頁においても説明されている。略述すると、これらの抗体は、抗原結合領域の対を形成する、タンデムのFdセグメント対($V_H - C_H1 - V_H - C_H1$)を含む。直鎖状抗体は、二重特異性の場合もあり、単一特異性の場合もある。

20

【0272】

本発明の抗体は、プロテインA精製、硫酸アンモニウム沈殿またはエタノール沈殿、酸抽出、アニオン交換クロマトグラフィーまたはカチオン交換クロマトグラフィー、ホスホセルロースクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、およびレクチンクロマトグラフィーが含まれるがそれらに限定されない公知の方法により、組換え細胞培養物から回収および精製することができる。精製にはまた、高速液体クロマトグラフィー(「HPLC」)も用いることができる。

30

【0273】

本発明の抗体には、天然の精製産生物、化学合成手順の産生物、ならびに、例えば、酵母、高等植物、昆虫、および哺乳動物細胞を含めた真核生物宿主に由来する組換え法、または、代替的に、上記で説明した原核生物宿主に由来する組換え法を介して産生される産生物が含まれる。BirchおよびRadner(2006年)、Adv. Drug Delivery Rev.、58巻: 671~685頁では、多くの抗体産生系が説明されている。

【0274】

被験抗体が、タンパク質またはポリペプチドと結合すれば、被験抗体と本発明により提供される抗体とは等価である。また、本発明の抗体が、この抗体が通常反応性であるタンパク質またはポリペプチドに結合することを、被験抗体が予防するかどうかを決定することにより、ある抗体が、本発明の抗体と同じ特異性を有するかどうかを、不要な実験なしに決定することも可能である。本発明のモノクローナル抗体による結合の低下により示される通り、被験抗体が、本発明の抗体と競合する場合は、2つの抗体が、同じエピトープまたは近縁のエピトープに結合する可能性が高い。代替的に、本発明の抗体を、それが通常反応性であるタンパク質と共にプレインキュベートして、被験抗体が、抗原に結合するその能力を阻害されるかどうかを決定することができる。被験抗体が阻害されれば、この抗体は、本発明の抗体と同じエピトープ特異性または近縁のエピトープ特異性を有する可能性が極めて高い。

40

【0275】

50

「抗体」という用語はまた、全ての免疫グロブリンアイソタイプおよび免疫グロブリンサブクラスの抗体を包含することも意図する。モノクローナル抗体の特定のアイソタイプは、最初の融合体から選択することにより直接調製することもでき、Steplewskiら(1985年)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、82巻：8653頁、またはSpiraら(1984年)、J. Immunol. Methods、74巻：307頁において説明されている手順を用いてクラススイッチ変異体を単離するためのsib選択法を用いることにより、異なるアイソタイプのモノクローナル抗体を分泌する親ハイブリドーマから二次的に調製することもできる。代替的に、組換えDNA法も用いることができる。

【0276】

また、本明細書で説明されるモノクローナル抗体の特異性を伴う他のモノクローナル抗体の単離も、抗イディオタイプ抗体を産生することを介して、当業者により達成され得る(Herlynら(1986年)、Science、232巻：100頁)。抗イディオタイプ抗体とは、対象のモノクローナル抗体において存在する固有の決定基を認識する抗体である。

【0277】

本発明の一部の態様では、抗体を検出可能に、または治療的に標識することが有用であろう。適切な標識については、前出で説明されている。当技術分野では、抗体を、これらの作用剤とコンジュゲートする方法が公知である。例示だけを目的として述べると、放射性原子、発色団、フルオロフォアなどの検出可能な部分で抗体を標識することができる。このような標識抗体は、in vivoまたは単離された被験試料における診断法に用いることができる。

【0278】

抗体を、低分子量のハプテンに連結することにより、アッセイにおける抗体の感受性を増大させることができる。次いで、第2の反応により、ハプテンを特異的に検出することができる。例えば、アビジンと反応するビオチン、または特定の抗ハプテン抗体と反応し得るジニトロフェノール、ピリドキサル、およびフルオレセインなどのハプテンを用いることが一般的である。HarlowおよびLane(1988年)、前出を参照されたい。

【0279】

VH CDR 1領域および/もしくはVL CDR 1領域、VH CDR 2領域および/もしくはVL CDR 2領域、ならびに/またはVH CDR 3領域および/もしくはVL CDR 3領域内のアミノ酸残基を変異させて、抗体の1つまたは複数の結合特性(例えば、アフィニティー)を改善することにより、本発明の抗体の可変領域を修飾することができる。変異は、部位指向性変異誘発またはPCR媒介変異誘発を介して導入することができ、抗体の結合または対象の他の機能的特性に対する効果は、適切なin vitroアッセイまたはin vivoアッセイにおいて評価することができる。保存的修飾を導入し、CDR領域内の1、2、3、4、または5つ以下であることが典型的な残基を変化させることが好ましい。変異は、アミノ酸の置換、付加、または欠失であり得る。

【0280】

例えば、1つまたは複数のフレームワーク残基を、対応する生殖細胞系列の配列へと「復帰変異」させることにより、抗体にフレームワーク修飾を施し、免疫原性を低下させることができる。

【0281】

加えて、本発明の抗体を操作して、Fc領域内に、血清半減期、補体の結合、Fc受容体の結合、および/または抗原依存性細胞傷害作用など、抗体の1つまたは複数の機能的特性を変化させる修飾を包含させることもできる。このような修飾には、軽鎖および重鎖のアセンブリーを容易にする、または抗体の安定性を増大させる、もしくは減少させる、ヒンジ領域におけるシステイン残基数の変化(米国特許第5,677,425号)、なら

10

20

30

40

50

びに抗体の生物学的半減期を短縮する、Fcヒンジ領域におけるアミノ酸の変異（米国特許第6,165,745号）が含まれるがそれらに限定されない。

【0282】

加えて、本発明の抗体は、化学修飾することもできる。例えば、抗体配列内の1つまたは複数のグリコシル化部位を修飾して、抗原に対する抗体のアフィニティーを増大させることにより、抗体のグリコシル化を変化させることができる（米国特許第5,714,350号；および同第6,350,861号）。代替的に、抗体依存性細胞介在性細胞傷害作用を増大させるには、グリコシル化機構を変化させた宿主細胞内で抗体を発現させることにより、フコシル残基の量を低減した低フコシル化抗体、またはバイセクティングGlcNAc構造を増大させた抗体を得ることもできる（Shields, R. L.ら、2002年、J. Biol. Chem.、277巻：26733～26740頁；Umanaら、1999年、Nat. Biotech.、17巻：176～180頁）。

10

【0283】

本発明の抗体またはその断片を、1つまたは複数のポリエチレングリコール（PEG）基がこの抗体または抗体断片に結合する条件下で、PEGまたはPEGの反応性エステルもしくはPEGのアルデヒド誘導体と反応させることにより、これらの抗体をペグ化して、生物学的半減期を延長することができる。抗体のペグ化は、反応性のPEG分子（または類似する反応性の水溶性ポリマー）とのアシル化反応またはアルキル化反応を介して実施することができる。本明細書で用いられる「ポリエチレングリコール」という用語は、モノ（C1～C10）アルコキシポリエチレングリコールもしくはアリーロキシポリエチレングリコールまたはポリエチレングリコールマレイミドなど、他のタンパク質を誘導体化するのに用いられているPEGの形態のいずれかを包含することを意図する。ペグ化される抗体は、非グリコシル化抗体であり得る。当技術分野では、タンパク質をペグ化する方法が公知であり、本発明の抗体に適用することができる（EP0154316およびEP0401384）。

20

【0284】

加えて、抗体の抗原結合領域を、ヒト血清アルブミンなどの血清タンパク質とコンジュゲートする、または融合させることにより、抗体を化学修飾して、結果として得られる分子の半減期を延長することもできる。このような手法は、例えば、EP0322094およびEP0486525において説明されている。

30

【0285】

本発明の抗体またはそれらの断片を、診断薬とコンジュゲートして診断に用い、例えば、疾患の発症または増悪をモニタリングし、所与の処置レジメンの有効性を決定することができる。診断薬の例には、酵素、補欠分子族、蛍光材料、発光材料、生物発光材料、放射性材料、各種の陽電子放射トモグラフィーを用いる陽電子放出性金属、および非放射性常磁性金属イオンが含まれる。検出可能な物質は、抗体またはその断片に直接的に連結またはコンジュゲートすることもでき、当技術分野で公知の技法を用いるリンカーを介して、抗体またはその断片に間接的に連結またはコンジュゲートすることもできる。適切な酵素の例には、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、ベータ-ガラクトシダーゼ、またはアセチルコリンエステラーゼが含まれる。適切な補欠分子族複合体の例には、ストレプトアビジン/ビオチンおよびアビジン/ビオチンが含まれる。適切な蛍光材料の例には、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、ダンシルクロリド、またはフィコエリトリンが含まれる。発光材料の例には、ルミノールが含まれる。生物発光材料の例には、ルシフェラーゼ、ルシフェリン、およびエクオリンが含まれる。適切な放射性材料の例には、¹²⁵I、¹³¹I、インジウム111、ルテチウム171、ビスマス212、ビスマス213、アスタチン211、銅62、銅64、銅67、イットリウム90、ヨウ素125、ヨウ素131、リン32、リン33、スカンジウム47、銀111、ガリウム67、プラセオジウム142、サマリウム153、テルビウム161、ジスプロシウム166、ホルミウム166、レニウム186、レニウム188、レニウム189、鉛2

40

50

12、ラジウム223、アクチニウム225、鉄59、セレン75、ヒ素77、ストロンチウム89、モリブデン99、ロジウム105、パラジウム109、プラセオジウム143、プロメチウム149、エルビウム169、イリジウム194、金198、金199、および鉛211が含まれる。モノクローナル抗体は、これらの抗体に共有結合する二官能性のキレート化剤を用いることにより、放射性金属イオンと間接的にコンジュゲートすることができる。キレート化剤は、アミン(Mearnsら、1984年 Anal. Biochem.、142巻：68~78頁)、アミノ酸残基のスルフィド基(Koyama、1994年、Chem. Abstr.、120巻：217262t頁)、および炭水化物基(Rodwellら、1986年、PNAS USA、83巻：2632~2636頁；Quadriら、1993年、Nucl. Med. Biol.、20巻：559~570頁)を介して結合させることができる。

【0286】

さらに、本発明の抗体またはそれらの断片は、治療薬とコンジュゲートすることもできる。適切な治療薬には、タキソール、シトカラシンB、グラミシジンD、臭化エチジウム、エメチン、マイトマイシン、エトポシド、テノポシド、ピンクリスチン、ピンブラスチン、コルヒチン、ドキシソルピシン、ダウノルピシン、ジヒドロキシアントラシンジオン、ミトキサントロン、ミトラマイシン、アクチノマイシンD、1-デヒドロテストステロン、グルココルチコイド、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロール、およびピューロマイシン、抗代謝剤(メトトレキサート、6-メルカプトプリン、6-チオグアニン、シタラビン、フルダラビン、5-フルオロウラシル、デカルバジン、ヒドロキシウレア、アスパラギナーゼ、ゲムシタビン、クラドリピンなど)、アルキル化剤(メクロレタミン、チオエパ、クロラムブシル、メルファラン、カルムスチン(BSNU)、ロムスチン(CCNU)、シクロホスファミド、ブスルファン、ジプロモマンニトール、ストレプトゾトシン、ダカルバジン(DTIC)、プロカルバジン、マイトマイシンC、シスプラチン、および、カルボプラチンなど他の白金誘導体)、抗生薬(ダクチノマイシン(旧称：アクチノマイシン)、プレオマイシン、ダウノルピシン(旧称：ダウノマイシン)、ドキシソルピシン、イダルピシン、ミトラマイシン、マイトマイシン、ミトキサントロン、プリカマイシン、アントラマイシン(AMC))、ジフテリア毒素および類縁分子(ジフテリア毒素A鎖、およびその活性断片、ならびにハイブリッド分子など)、リシン毒素(リシン毒素Aまたは脱グリコシル化リシン毒素A鎖など)、コレラ毒素、志賀様毒素(SLT-I、SLT-II、SLT-IV)、LT毒素、C3毒素、志賀毒素、百日咳毒素、破傷風毒素、ダイズボーマン-パークプロテアーゼ阻害剤、Pseudomonas属外毒素、アロリン、サポリン、モデクシン、ゲラニン、アプリンA鎖、モデクシンA鎖、アルファ-サルシン、Aleurites fordiiタンパク質、ジアンチンタンパク質、Phytolacca americanaタンパク質(PAPI、PAPII、およびPAP-S)、Momordica charantia阻害剤、クルシン、クロチン、Sapaonarialis officinalis阻害剤、ゲロニン、マイトゲリン、レストリクトシン、フェノマイシン、エノマイシン毒素、および混合毒素が含まれる。

【0287】

追加的な適切なコンジュゲートされた分子には、リボヌクレアーゼ(RNアーゼ)、DNアーゼI、アンチセンス核酸、siRNA分子などの阻害性RNA分子、免疫賦活性核酸、アプタマー、リボザイム、三重鎖形成分子、および外部ガイド配列が含まれる。アプタマーとは、ステムループまたはGカルテットなど、規定の二次構造および三次構造へとフォールディングされる、15~50塩基の範囲の長さの低分子核酸であり、ATP(米国特許第5,631,146号)およびテオフィリン(米国特許第5,580,737号)などの低分子のほか、逆転写酵素(米国特許第5,786,462号)およびトロンピン(米国特許第5,543,293号)などの高分子にも結合し得る。リボザイムとは、化学反応を分子内的にまたは分子間的に触媒することが可能な核酸分子である。リボザイムは、その後切断される標的基質を認識し、それに結合することにより、核酸基質を切

10

20

30

40

50

断することが典型的である。三重鎖形成機能を有する核酸分子は、三重鎖を形成することにより二本鎖核酸と相互作用する場合もあり、一本鎖核酸と相互作用する場合もあり、この場合、DNAの三本鎖は、ワトソン-クリックによる塩基対合およびフーグスティーンによる塩基対合の両方に依存して複合体を形成する。三重鎖分子は、高度なアフィニティおよび特異性により、標的領域と結合し得る。

【0288】

機能性核酸分子は、標的分子により保有される特異的活性のエフェクター、阻害剤、調節剤、および刺激剤として作用する場合もあり、他の分子には依存しない新規の活性を保有する場合もある。利用可能な多数の方法のうちのいずれかを用いて、治療薬を、直接的にまたは間接的に、抗体に連結することができる。例えば、作用剤を、還元した抗体成分のヒンジ領域に、N-スクシニル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート(SPD P)などの架橋形成剤を用いるジスルフィド結合形成を介して結合させることもでき、抗体のFc領域における炭水化物部分を介して結合させることもできる(Yura, 1994年, Int. J. Cancer, 56巻:244頁; Upešlacisら, 「Monoclonal antibodies: principles and applications」内の「Modification of Antibodies by Chemical Methods」、Birchら(編)、187~230頁(Wiley-Liss, Inc., 1995年); Price, 「Monoclonal antibodies: Production, engineering and clinical application」内の「Production and Characterization of Synthetic Peptide-Derived Antibodies」、Ritterら(編)、60~84頁(Cambridge University Press, 1995年))。

10

20

【0289】

治療薬を抗体とコンジュゲートする技法は、周知である(Amonら, 「Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy」内の「Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy」、Reisfeldら(編)、243~56頁(Alan R. Liss, Inc., 1985年); Hellsstromら, 「Controlled Drug Delivery」(2版)内の「Antibodies For Drug Delivery」、Robinsonら(編)、623~53頁(Marcel Dekker, Inc., 1987年); Thorpe, 「Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications」内の「Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review」、Pincheraら(編)、475~506頁(1985年); 「Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy」内の「Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody in Cancer Therapy」、Baldwinら(編)、303~16頁(Academic Press, 1985年); およびThorpeら, 「The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates」、1982年, Immunol. Rev., 62巻:119~58頁)。

30

40

【0290】

本発明の抗体またはそれらの抗原結合領域は、別の抗体または受容体のリガンドなど、別の機能性分子に連結して、少なくとも2種以上の異なる結合部位または標的分子に結合する、二重特異性分子または多重特異性分子を産生することができる。抗体を、別の抗体、抗体断片、ペプチド、または結合模倣体など、1種または複数種の他の結合分子に連結

50

することは、例えば、化学的連結、遺伝子融合、または非共有結合的会合を介して行うことができる。多重特異性分子は、第1および第2の標的エピトープに加えて、第3の結合特異性をさらに包含し得る。

【0291】

当技術分野で公知の方法を用いて、二重特異性分子および多重特異性分子を調製することができる。例えば、二重特異性分子の結合単位を個別に産生し、次いで、これらを互いとコンジュゲートすることができる。結合分子がタンパク質またはペプチドである場合は、各種の連結剤または架橋形成剤を、共有結合的コンジュゲーションに用いることができる。架橋形成剤の例には、プロテインA、カルボジイミド、N-スクシンイミジル-S-アセチル-チオアセテート(SATA)、5,5'-ジチオビス(2-ニトロ安息香酸)(DTNB)、o-フェニレンジマレイミド(OPDM)、N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート(SPDP)、およびスルホスクシンイミジル4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサ-N-カルボキシレート(スルホ-SMCC)(Karpovskiyら、1984年、J. Exp. Med.、160巻:1686頁; Liuら、1985年、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、82巻:8648頁)が含まれる。結合分子が抗体である場合は、2つの重鎖のC末端のヒンジ領域をスルフヒドリル結合させることにより、それらをコンジュゲートすることができる。

10

【0292】

本発明の抗体またはそれらの断片は、この抗体が結合して「枯渇」抗体を形成する、細胞に対して毒性である部分に連結することができる。これらの抗体は、NK細胞を枯渇させることが所望される適用において、特に有用である。

20

【0293】

本発明の抗体はまた、固体支持体に結合させることもでき、これはイムノアッセイまたは標的抗原の精製に特に有用である。このような固体支持体には、ガラス、セルロース、ポリアクリルアミド、ナイロン、ポリスチレン、ポリ塩化ビニル、またはポリプロピレンが含まれるがそれらに限定されない。

【0294】

抗体はまた、多くの異なるキャリアにも結合させることができる。したがって、本発明はまた、抗体および活性または不活性な別の物質を含有する組成物も提供する。周知のキャリアの例には、ガラス、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリエチレン、デキストラン、ナイロン、アミラーゼ、天然セルロースおよび修飾セルロース、ポリアクリルアミド、アガロース、およびマグネタイトが含まれる。キャリアの性質は、本発明の目的に応じて、可溶性の場合もあり、不溶性の場合もある。当業者は、モノクローナル抗体を結合させるのに適する他のキャリアについても承知している、または日常的な実験を用いて、このようなキャリアを確認し得るであろう。

30

【0295】

樹状細胞を含めたAPCの単離、培養、および増殖

本発明はまた、本発明の単離されたポリペプチドもしくは単離されたポリヌクレオチドまたはベクターのうちの一つまたは複数を含む、単離された宿主細胞も提供する。一態様では、単離された宿主細胞が、抗原提示細胞(APC)、例えば、樹状細胞などの真核細胞である。別の態様では、単離された宿主細胞が、原核細胞である。一態様では、本発明が、ポリヌクレオチドの発現を促進する条件下で培養される、単離された宿主細胞である。本発明はまた、宿主細胞、発現系、およびこの発現系を介して産生されるポリペプチドも提供する。

40

【0296】

以下は、APCを単離するための2つの基本的手法についての簡単な説明である。これらの手法は、(1)血液から骨髓前駆細胞(CD34⁺細胞)を単離し、これらを刺激してAPCへと分化させること、または(2)末梢血から、あらかじめ成熟させたAPCを回収することを伴う。第1の手法では、患者を、GM-CSFなどのサイトカインで処置

50

して、末梢血中の循環CD34⁺幹細胞数を増大させる。

【0297】

A PCを単離する第2の手法は、すでに血液中を循環している、比較的多数のあらかじめ成熟させたA PCを回収する手法である。ヒト末梢血から成熟させたA PCを単離する従来の技法は、メトリザミド勾配および付着/非付着ステップ(Freudenthalら(1990年)、PNAS、87巻:7698~7702頁)、Percoll勾配法による分離(Mehra-Damaniら(1994年)、J. Immunol.、153巻:996~1003頁)、および蛍光活性化細胞分取法(Thomasら(1993年)、J. Immunol.、151巻:6840~52頁)などの物理的手順の組合せを伴っている。

10

【0298】

多数の細胞を互いから分離する1つの技法は、向流遠心分離法(CCE)として公知である。細胞試料を、特別なエルトリエーションローターに入れる。次いで、ローターを、一定速度、例えば、3000rpmでスピンさせる。ローターが所望の速度に達したら、加圧空気を用いて、細胞の流速を制御する。エルトリエーター内の細胞は、遠心力と、流速を一定に増大させつつある緩衝液のウォッシュアウト流との下に同時に置かれる。この結果として、大部分は細胞サイズの差違に基づくが、もっぱらそれに基づくわけではない、細胞画分への分離がもたらされる。

【0299】

本発明の一態様では、A PCが、あらかじめ成熟させた樹状細胞または成熟樹状細胞であり、マウス、サル、またはヒトなど、哺乳動物の白血球画分から単離され得る(例えば、WO96/23060を参照されたい)。白血球画分は、哺乳動物の末梢血に由来し得る。この方法は、以下のステップ:(a)白血球除去法など、当技術分野で公知の方法により、哺乳動物供給源から得た白血球画分を供給するステップ、(b)向流遠心分離法により、ステップ(a)の白血球画分を、4つ以上の画分へと分離するステップ、(c)樹状細胞をカルシウムイオノフォア、GM-CSF、およびIL-13、またはGM-CSFおよびIL-4と接触させることにより、ステップ(b)に由来する1つまたは複数の画分中の単球を樹状細胞へと転換することを刺激するステップ、(d)ステップ(c)に由来する樹状細胞に富む画分を同定するステップ、ならびに(e)好ましくは、約4でステップ(d)の濃縮された画分を回収するステップを包含する。樹状細胞に富む画分を同定する1つの方法は、蛍光活性化細胞分取を介する。白血球画分は、組換え型のヒト(rh)rhIL-12、rhGM-CSF、またはrhIL-4など、他のサイトカインの存在下において、カルシウムイオノフォアで処理することができる。白血球画分の細胞を緩衝液中で洗浄し、Ca⁺⁺/Mg⁺⁺を含まない培地中に懸濁させてから、分離ステップを行うことができる。白血球画分は、白血球除去法により得ることができる。樹状細胞は、以下のマーカー:HLA-DR、HLA-DQ、またはB7.2のうちの少なくとも1つの存在、および以下のマーカー:CD3、CD16、CD56、CD57、およびCD19、CD20の同時的な非存在により同定することができる。これらの細胞表面マーカーに対して特異的なモノクローナル抗体は、市販されている。

20

30

【0300】

より具体的に述べると、方法は、濃縮された白血球および血小板のコレクションを白血球除去法により回収し、次いで、これを、向流遠心分離法(CCE)によりさらに画分化することを必要とする(Abrahamsenら(1991年)、J. Clin. Apheresis.、6巻:48~53頁)。この技法では、細胞を、遠心力と、流速を一定に増大させつつある緩衝液のウォッシュアウト流との下に同時に置く。一定に逆流の流速を増大させる緩衝液により、大部分は細胞サイズに基づく細胞画分への分離がもたらされる。

40

【0301】

A PCコレクション、および、より具体的に述べると、DCコレクションの品質管理、ならびにそれらの活性化が培養物中で成功したことの確認は、単球および樹状細胞亜集団

50

の両方のほか、夾雑の可能性のあるＴリンパ球をモニタリングする、同時的な多色ＦＡＣＳ解析法に依存する。細胞分取は、ＣＤ３（Ｔ細胞）、ＣＤ１６／ＣＤ５６／ＣＤ５７（ＮＫ細胞／ＬＡＫ細胞）、およびＣＤ１９／ＣＤ２０（Ｂ細胞）を含めた細胞表面マーカーの示差的発現に基づく。ＤＣは、ＤＣと比較して単球において極めて高レベルで発現するＣＤ１４のレベルに部分的に基づき、単球から同定可能である。ＤＣは、それらが血液中を循環するときに、高レベルのＨＬＡ－ＤＲ発現、著明なＨＬＡ－ＤＱおよびＢ７．２（しかし、Ｂ７．１はわずかである、または全く見られない）を示す（加えて、ＤＣは、単球および好中球もまた発現するＬｅｕ　Ｍ７マーカーおよびＬｅｕ　Ｍ９マーカー、ミエロイドマーカーも発現する）。

【０３０２】

死滅細胞を解析するための第３の着色試薬であるヨウ化プロピジウム（ＰＩ）と組み合わせると、全ての細胞亜集団の確実な同定を行うことが可能となる。

【０３０３】

回収時におけるＦＡＣＳ解析の目標は、ＤＣが、予測される画分において豊富であることを確認し、好中球の夾雑をモニタリングし、適切なマーカーが発現していることを確認することである。この、臨床適用に適する、ヒト末梢血に由来する濃縮されたＤＣの迅速なバルクコレクションは、品質管理について上記で説明した解析的ＦＡＣＳ法に絶対的に依存している。必要であれば、この時点で、「カクテル陰性」細胞についての蛍光分取により、成熟ＤＣを単球から即座に分離することができる。単球自体は、培養物中で、ＤＣまたは機能性のＤＣ様細胞へと分化することがなほも可能であるため、ＤＣを単球から常法に従って分離することは必要でない場合がある。

【０３０４】

回収したら、ＤＣに富むＡＰＣ画分／単球によるＡＰＣ画分（通常、１５０～１９０）をプールし、将来の使用のために凍結保存する、または即座に短時間の培養物中に入れる。

【０３０５】

代替的に、他の研究者らは、樹状細胞を上方制御（活性化）し、単球を活性化樹状細胞の表現型へと転換する方法について報告している。この方法は、カルシウムイオノフォアを培養培地に添加して、単球を、活性化樹状細胞へと転換することを伴う。例えば、カルシウムイオノフォアであるＡ２３１８７を、２４～４８時間の培養時間の最初に添加したところ、プールされた「単球およびＤＣ」画分が、一様に活性化され、樹状細胞の表現型へと転換することが結果としてもたらされた：活性化された集団は、一様にＣＤ１４（Ｌｅｕ　Ｍ３）陰性であり、ＨＬＡ－ＤＲ、ＨＬＡ－ＤＱ、ＩＣＡＭ－１、Ｂ７．１、およびＢ７．２を上方制御することが特徴的である。さらに、この活性化バルク集団は、さらに精製された少数ベースでも良好に機能する。

【０３０６】

特定のサイトカインの組合せ（複数可）を用いて、カルシウムイオノフォアにより達成された活性化／転換を増幅（または部分的に置換）することに成功した：これらのサイトカインには、精製されたまたは組換え型のヒト（「rh」）rhGM-CSF、rhIL-2、およびrhIL-4が含まれるがそれらに限定されない。各サイトカインは、単独で与えられると、最適な上方制御に不十分である。

【０３０７】

ＡＰＣに対する抗原提示

免疫化を目的として、ポリペプチド（例えば、配列番号１～３３）を、タンパク質／ペプチドとして、またはタンパク質／ペプチドをコードするｃＤＮＡの形態で、抗原提示細胞へと送達することができる。抗原提示細胞（ＡＰＣ）は、樹状細胞（ＤＣ）、単球／マクロファージ、Ｂリンパ球、または必要なＭＨＣ／共賦活化分子を発現する他の細胞型（複数可）からなる可能性がある。以下で説明される方法は、主に、最も強力であり、最も好ましいＡＰＣであるＤＣに焦点を絞る。

【０３０８】

10

20

30

40

50

A P Cを、本発明の抗原性タンパク質または抗原性ポリペプチド（複数可）へと曝露することにより、*in vitro/ex vivo*においてパルスングを達成する。1～10 μMの濃度で、約3時間にわたり、タンパク質またはペプチド（複数可）をA P Cに添加する。抗原または抗原性ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドによるA P Cのトランスフェクションは、カチオン性脂質が含まれるがそれらに限定されない、当技術分野で公知のトランスフェクション剤の存在下において、A P Cを、核酸へと曝露することにより達成する。トランスフェクトまたはパルスされたA P Cは、その後、静脈内経路、皮下経路、鼻腔内経路、筋肉内経路、または腹腔内経路などの送達経路を介して、宿主へと投与することができる。

【0309】

タンパク質/ペプチド抗原はまた、*in vivo*において、アジュバントと共に、静脈内経路、皮下経路、鼻腔内経路、筋肉内経路、または腹腔内経路などの送達経路を介して送達することもできる。

【0310】

フォスター抗原提示細胞

フォスター抗原提示細胞は、標的細胞として特に有用である。フォスターA P Cは、その抗原プロセッシング経路において、細胞表面M H CクラスI分子との内因性ペプチドの会合を制限する変異を含有する、T 2と称されるヒト細胞株174X C E M . T 2に由来する（Z we e r i n kら（1993年）、J . I m m u n o l .、150巻：1763～1771頁）。これは、M H CクラスI拘束性C D 8⁺ C T Lに対する抗原提示に必要とされる遺伝子であるT A P 1遺伝子、T A P 2遺伝子、L M P 1遺伝子、およびL M P 2遺伝子を包含する、M H CクラスII領域の大規模なホモ接合性欠失に起因する。事実上、「空の」M H CクラスI分子だけが、これらの細胞表面に提示される。培養培地に添加される外因性ペプチドは、それが対立遺伝子特異的な結合モチーフを含有する限り、これらのM H C分子に結合する。本明細書では、これらのT 2細胞を、「フォスター」A P Cと称する。これらを本発明と共に用いて、抗原（複数可）を提示させることができる。

【0311】

特異的な組換え型のM H Cの対立遺伝子をT 2細胞に形質導入することにより、M H C拘束性プロファイルの方向付けを変化させることが可能となる。アンカー残基が、内因性対立遺伝子への効率的な結合を予防するため、組換え型の対立遺伝子に調整されたライブラリーが、T 2細胞により優先的に提示される。

【0312】

M H C分子を高レベルで発現させることにより、A P Cが、C T Lに対してより明確に提示される。対象のM H C対立遺伝子を、T 2細胞において、強力な転写プロモーター（例えば、C M Vプロモーター）を用いて発現させる結果として、より反応性の高いA P Cが得られる（細胞表面における反応性M H C - ペプチド複合体の濃度が上昇することに起因する可能性が極めて高い）。

【0313】

免疫エフェクター細胞の増殖

本発明は、これらのA P Cを活用して、抗原特異的免疫エフェクター細胞に富む集団の産生を刺激する。抗原特異的免疫エフェクター細胞は、培養物中で死滅するA P Cを代償として増殖する。ナイーブ免疫エフェクター細胞が、他の細胞により訓練される過程については、C o u l i e（1997年）、M o l e c . M e d . T o d a y、3巻：261～268頁において本質的に説明されている。

【0314】

上記で説明した通りに調製されたA P Cを、ナイーブ免疫エフェクター細胞と混合する。これらの細胞は、サイトカイン、例えば、I L 2の存在下で培養し得ることが好ましい。樹状細胞は、I L 1 2などの強力な免疫賦活性サイトカインを分泌するため、初回および後続の増殖ラウンドでは、補充のサイトカインを追加する必要はない場合がある。いず

10

20

30

40

50

れにせよ、培養条件は、抗原特異的免疫エフェクター細胞を、APCよりはるかに高速度で増殖 (expand) (すなわち、増殖 (proliferate)) させるような条件とする。抗原特異的細胞集団をさらに増殖させるために、APCおよび任意選択のサイトカインの複数回にわたる注入を実施することができる。

【0315】

一実施形態では、免疫エフェクター細胞がT細胞である。別個の実施形態では、例えば、IL-2、IL-11、またはIL-13をコードするトランス遺伝子による形質導入を介して、免疫エフェクター細胞を遺伝子改変することができる。当技術分野では、in vitro、ex vivo、およびin vivoにおいてトランス遺伝子を導入する方法が公知である。

10

【0316】

抗体による機能解析

本発明の抗体を用いて、本発明のポリペプチドを精製し、生物学的に等価のポリペプチドおよび/またはポリヌクレオチドを同定することができる。本発明の抗体はまた、本発明のポリペプチドの機能を修飾する作用剤を同定するのに用いることもできる。これらの抗体には、ポリクローナル抗血清、モノクローナル抗体、および当業者が精通しており、上記でも説明した調製物に由来する各種の試薬が含まれる。

【0317】

同定された遺伝子によりコードされるタンパク質の活性を中和する抗体もまた、このような中和抗体を、in vivoおよびin vitroにおける試験系へと添加することにより、in vivoおよびin vitroにおいて用いて機能を裏付けることができる。このような中和抗体はまた、本発明のポリペプチドの活性を調節するための薬剤としても有用である。

20

【0318】

各種の抗体調製物はまた、同定された遺伝子によりコードされるタンパク質を、被験細胞が、in vitroまたはin vivoにおいて発現することを裏付けるために、ELISAアッセイまたはウェスタンブロットなどの分析法においても用いることができる。代謝時におけるプロテアーゼ分解により産生されるこのようなタンパク質の断片はまた、実験試料に由来する試料と共に、適切なポリクローナル抗血清を用いることによっても同定することができる。

30

【0319】

本発明の抗体は、単独でワクチン接種またはワクチン接種の追加投与に用いることもでき、ペプチドもしくはタンパク質ベースのワクチン、または樹状細胞ベースのワクチンと組み合わせてワクチン接種またはワクチン接種の追加投与に用いることもできる。

【0320】

組成物

組成物がさらに提供される。組成物は、キャリアと、本発明の単離されたポリペプチド、本発明の単離されたポリヌクレオチド、本発明のベクター、本発明の単離された宿主細胞、低分子、または本発明の抗体のうちの1つまたは複数とを含む。キャリアは、固体支持体または薬学的に許容されるキャリアのうちの1つまたは複数であり得る。組成物は、ワクチンとしての投与に適するアジュバントまたは他の成分をさらに含み得る。一態様では、組成物を、1種または複数種の薬学的に許容される賦形剤、希釈剤、キャリア、および/またはアジュバントと共に処方する。加えて、本発明の組成物についての実施形態は、1種または複数種の薬学的に許容される補助物質と共に処方された、本発明の単離されたポリペプチド、本発明の単離されたポリヌクレオチド、本発明のベクター、低分子、本発明の単離された宿主細胞、または本発明の抗体のうちの1つまたは複数も包含する。

40

【0321】

経口調製物の場合、本明細書で説明される単離されたもしくは組換え型のポリペプチド、本明細書で説明される単離されたもしくは組換え型のポリヌクレオチド、本明細書で説明されるベクター、本明細書で説明される単離された宿主細胞、低分子、または本明細書

50

で説明される抗体のうちの任意の1つまたは複数、単独で用いることもでき、錠剤、粉末、顆粒、またはカプセルを作製するのに適切な添加剤と組み合わせた化合物、例えば、ラクトース、マンニトール、トウモロコシデンプン、またはバレイショデンプンなど、従来の添加剤；微晶質セルロース（*crystalline cellulose*）、セルロース誘導体、アカシアガム、トウモロコシデンプン、またはゼラチンなどの結合剤；トウモロコシデンプン、バレイショデンプン、またはカルボキシメチルセルロースナトリウムなどの崩壊剤；滑石またはステアリン酸マグネシウムなどの潤滑剤；ならびに、所望の場合は、希釈剤、緩衝剤、保湿剤、防腐剤、および芳香剤と組み合わせた化合物を含む、またはこの化合物から本質的になる医薬処方物中で用いることもできる。薬学的に適合性の結合剤および/またはアジュバント材料は、組成物の一部として組み入れることができる。錠剤、丸薬、カプセル、トローチなどは、以下の成分または類似の性質の化合物：微晶質セルロース、トラガカントガム、もしくはゼラチンなどの結合剤；デンプンもしくはラクトースなどの賦形剤；アルギン酸、Primogel、もしくはトウモロコシデンプンなどの崩壊剤；ステアリン酸マグネシウムもしくはSterotesなどの潤滑剤；コロイド性二酸化ケイ素などの流動促進剤；スクロースもしくはサッカリンなどの甘味剤；またはペパーミント、サリチル酸メチル、もしくはオレンジ芳香剤などの芳香剤のうちのいずれかを含有し得る。

10

【0322】

経口投与に適する医薬処方物および単位用量形態は、慢性状態、感染症の処置、および患者が薬物を自己投与する療法において特に有用である。一態様では、処方物が、小児科投与に特異的である。

20

【0323】

本発明は、本発明の単離されたポリペプチド、本発明の単離されたポリヌクレオチド、本発明のベクター、本発明の単離された宿主細胞、または本発明の抗体のうちの1つまたは複数、水性溶媒、あるいは植物油もしくは他の類似の油、合成脂肪酸グリセリド、高分子脂肪酸のエステル、またはプロピレングリコールなどの非水性溶媒中で、かつ、所望の場合は、可溶化剤、等張剤、懸濁剤、乳化剤、安定化剤および防腐剤、または他の抗菌薬など、従来の添加剤と共に、溶解させる、懸濁させる、または乳化させることにより、本発明に従い注射するための調製物へと処方することができる。このような添加剤の非限定的な例は、表面抗原、例えば、OMP P5タンパク質、rsPilAタンパク質、OMP 26タンパク質、OMP P2タンパク質、またはIV型ピリンタンパク質（JurcisekおよびBakaletz（2007年）、*J. of Bacteriology*、189巻（10号）：3868～3875頁；ならびにMurphy, TF、Bakaletz, LO、およびSmeesters, PR（2009年）、*The Pediatric Infectious Disease Journal*、28巻：S121～S126頁を参照されたい）など、他のワクチン成分のための抗菌薬（*antimicrobial agent*）、および抗菌薬（*antibacterial agents*）である。静脈内投与の場合、適切なキャリアには、生理食塩液、静菌水、Cremophor EL（商標）（BASF、Parsippany、N.J.）、またはリン酸緩衝生理食塩液（PBS）が含まれる。いずれの場合にも、非経口投与のための組成物は、無菌でなければならず、シリンジ注射が容易に可能となる程度の流体であるべきである。

30

40

【0324】

本発明により提供されるエアゾール処方物は、吸入を介して投与ことができ、高圧ガスベースの場合もあり、非高圧ガスベースの場合もある。例えば、本発明の医薬処方物の実施形態は、ジクロロジフルオロメタン、プロパン、窒素など、許容される高圧ガスへと処方される本発明の化合物を含む。吸入投与の場合、化合物は、適切な高圧ガス、例えば、二酸化炭素などのガスを含有する高圧容器もしくは高圧分注器、または噴霧器からのエアゾールスプレーの形態で送達することができる。非高圧ガスの非限定的な例は、機械的な力により（すなわち、指でピストンを押し下げる、または容器の壁面に適用される圧

50

縮力、または壁面自体により加えられる弾性力（例えば、弾性の膀胱を介する）などを介する容器の圧縮により）閉鎖容器から駆出されるポンプスプレーである。

【0325】

本発明の坐剤は、本発明の化合物を、乳化ベースまたは水溶性ベースなど、各種のベースのうちのいずれかと混合することにより調製することができる。本発明の化合物によるこの医薬処方物についての実施形態は、坐剤を介して直腸に投与することができる。坐剤は、体温では溶融するが、室温では固化するココアバター、カーボワックス、およびポリエチレングリコールなどの媒体を包含し得る。

【0326】

シロップ、エリキシル、および懸濁液など、経口投与または直腸投与のための単位剤形を提供することが可能であり、各用量単位、例えば、茶さじ1杯分、料理用スプーン1杯分、錠剤、または坐剤は、本発明の1つまたは複数の化合物を含有する所定量の組成物を含有する。同様に、注射投与または静脈内投与のための単位剤形は、滅菌水、通常の生理食塩液、または薬学的に許容される別のキャリア中の溶液としての組成物中に本発明の化合物を含み得る。

10

【0327】

本発明の医薬処方物についての実施形態は、本発明の単離されたポリペプチド、本発明の単離されたポリヌクレオチド、本発明のベクター、本発明で用いられる低分子、本発明の単離された宿主細胞、または本発明の抗体のうちの1つまたは複数が、注射用組成物へと処方される医薬処方物を包含する。本発明の注射用医薬処方物は、溶液または懸濁液として調製される、または注射前に液体の媒体中で溶解または懸濁させるのに適する固体形態として調製される。調製物はまた、本発明の医薬処方物についての他の実施形態に従い、乳化させることもでき、有効成分をリポソーム媒体中に封入することもできる。

20

【0328】

ある実施形態では、本発明の単離されたポリペプチド、本発明の単離されたポリヌクレオチド、本発明のベクター、本発明の単離された宿主細胞、または本発明の抗体のうちの1つまたは複数、持続送達系を介する送達のために処方する。本明細書では、「持続送達系」という用語を、「制御送達系」と互換的に用い、それらのうちの多種多様なデバイスが当技術分野において公知である、カテーテル、注射デバイスなどと組み合わせた持続（例えば、制御）送達デバイス（例えば、ポンプ）を包含する。

30

【0329】

機械的注入ポンプまたは電気機械的注入ポンプもまた、本開示と共に用いるのに適する場合がある。このようなデバイスの例には、例えば、米国特許第4,692,147号；同第4,360,019号；同第4,487,603号；同第4,360,019号；同第4,725,852号；同第5,820,589号；同第5,643,207号；同第6,198,966号などで説明されているデバイスが含まれる。一般に、本発明の化合物の送達は、各種の充填式ポンプシステムのうちのいずれかを用いて達成することができる。ポンプは、ある時間にわたり、一定の制御放出をもたらす。一部の実施形態では、本発明の化合物が、薬物不透過性容器内の液体処方物であり、個体に持続的に送達される。

40

【0330】

一実施形態では、薬物送達系が、少なくとも部分的に植え込み式のデバイスである。植え込み式デバイスは、当技術分野で周知の方法およびデバイスを用いて、任意の適切な植え込み部位において植え込むことができる。植え込み部位は、薬物送達デバイスが導入および配置される、対象の体内の部位である。植え込み部位には、皮下（subdermal、subcutaneous）部位、筋肉内部位または対象の体内の他の適切な部位が含まれるが必ずしもそれらに限定されない。一部の実施形態では、薬物送達デバイスの植え込みおよび除去が簡便であるため、皮下（subcutaneous）の植え込み部位を用いる。

【0331】

本開示で用いるのに適する薬物放出デバイスは、各種の作用方式のうちのいずれかに基

50

づき得る。例えば、薬物放出デバイスは、拡散システムに基づく場合もあり、対流システムに基づく場合もあり、浸食システム（例えば浸食ベースのシステム）に基づく場合もある。例えば、薬物放出デバイスは、電気化学式ポンプ、浸透圧ポンプ、電気浸透圧ポンプ、蒸気圧ポンプ、または浸透圧パースト波マトリックスであることが可能であり、例えば、薬物をポリマー中に組み込み、このポリマーが、薬物含浸性ポリマー材料（例えば、生体分解性の薬物含浸性ポリマー材料）の分解と共時的に薬物処方物を放出するポンプであり得る。他の実施形態では、薬物放出デバイスが、電気拡散システム、電気溶解式ポンプ、気泡ポンプ、圧電ポンプ、加水分解システムなどに基づく。

【0332】

機械的注入ポンプまたは電気機械的注入ポンプに基づく薬物放出デバイスもまた、本開示と共に用いるのに適する場合がある。このようなデバイスの例には、例えば、米国特許第4,692,147号；同第4,360,019号；同第4,487,603号；同第4,360,019号；同第4,725,852号などで説明されているデバイスが含まれる。一般に、対象の処置法は、各種の充填式非交換型ポンプシステムのうちのいずれかを用いて達成することができる。ポンプおよび他の対流システムは、それらの、ある時間にわたる一般に一定である程度の高い制御放出のために、一般に好ましい。一部の実施形態では、浸透圧ポンプが、一定である程度の高い制御放出と比較的小型のサイズとを組み合わせた利点のために用いられる（例えば、PCT出願公開第WO 97/27840号；ならびに米国特許第5,985,305号および同第5,728,396号を参照されたい）。本開示で用いるのに適する例示的な浸透圧駆動式デバイスには、米国特許第3,760,984号；同第3,845,770号；同第3,916,899号；同第3,923,426号；同第3,987,790号；同第3,995,631号；同第3,916,899号；同第4,016,880号；同第4,036,228号；同第4,111,202号；同第4,111,203号；同第4,203,440号；同第4,203,442号；同第4,210,139号；同第4,327,725号；同第4,627,850号；同第4,865,845号；同第5,057,318号；同第5,059,423号；同第5,112,614号；同第5,137,727号；同第5,234,692号；同第5,234,693号；同第5,728,396号などにおいて説明されているデバイスが含まれるが必ずしもそれらに限定されない。本開示に適合させ得るさらなる例示的なデバイスは、Synchromed注入ポンプ（Medtronic）である。

【0333】

一部の実施形態では、薬物送達デバイスが、植え込み式デバイスである。薬物送達デバイスは、当技術分野で周知の方法およびデバイスを用いて、任意の適切な植え込み部位において植え込むことができる。本明細書で言及される通り、植え込み部位は、薬物送達デバイスが導入および配置される、対象の体内の部位である。植え込み部位には、皮下（subdermal、subcutaneous）部位、筋肉内部位または対象の体内の他の適切な部位が含まれるが必ずしもそれらに限定されない。

【0334】

本発明の化合物に適する賦形剤媒体は、例えば、水、生理食塩液、デキストロース、グリセロール、エタノールなど、およびこれらの組合せである。加えて、所望の場合、媒体は、保湿剤、または乳化剤、またはpH緩衝剤など、微量の補助物質も含有し得る。本開示について考慮するとき、当業者には、このような剤形を調製する方法が公知である、または明らかであろう。例えば、「Remington's Pharmaceutical Sciences」、Mack Publishing Company、Easton、Pennsylvania、17版、1985年を参照されたい。いずれにせよ、投与される組成物または処方物は、処置される対象において所望の状態を達成するのに十分な量の化合物を含有する。

【0335】

本発明の組成物には、持続放出マトリックスまたは制御放出マトリックスを含む組成物が含まれる。加えて、本発明の実施形態は、持続放出处方物を用いる他の処置と共に用い

10

20

30

40

50

ることできる。本明細書で用いられる持続放出マトリックスとは、通常はポリマーである、酵素的加水分解もしくは酸ベースの加水分解、または溶解を介して分解可能な材料から作製されるマトリックスである。体内に挿入されると、マトリックスは、酵素および体液により作用を受ける。持続放出マトリックスは、リポソーム、ポリラクチド（ポリ乳酸）、ポリグリコリド（グリコール酸のポリマー）、ポリラクチド-co-グリコリド（乳酸とグリコール酸とのコポリマー）、ポリ無水物、ポリ（オルト）エステル、ポリペプチド、ヒアルロン酸、コラーゲン、硫酸コンドロイチン、カルボン酸、脂肪酸、リン脂質、多糖、核酸、ポリアミノ酸、フェニルアラニン、チロシン、イソロイシンなどのアミノ酸、ポリヌクレオチド、ポリビニルプロピレン、ポリビニルピロリドン、およびシリコンなどの生体適合性材料から選択することが望ましい。例示的な生体分解性マトリックスには、ポリラクチドマトリックス、ポリグリコリドマトリックス、およびポリラクチド-co-グリコリド（乳酸とグリコール酸とのコポリマー）マトリックスが含まれる。

10

【0336】

別の実施形態では、制御放出系により干渉作用剤（ならびに組合せ組成物）を送達する。例えば、本発明の化合物は、静脈内注入、植え込み式浸透圧ポンプ、経皮的パッチ、リポソーム、または他の投与方式を用いて投与することができる。一実施形態では、ポンプを用いることができる（Sef-ton（1987年）、CRC Crit. Ref. Biomed. Eng.、14巻：201頁；Buchwaldら（1980年）、Surgery、88巻：507頁；Saudekら（1989年）、N. Engl. J. Med.、321巻：574頁）。別の実施形態では、ポリマー材料を用いる。さらに別の実施形態では、制御放出系を、処置標的、すなわち、肝臓の近傍に配置し、それにより、必要用量を全身用量の一部にとどめる。さらに別の実施形態では、制御放出系を、処置標的の近傍に配置し、それにより、必要用量を全身用量の一部にとどめる。他の制御放出系については、Langer（1990年）、Science、249巻：1527～1533頁により総説されている。

20

【0337】

別の実施形態では、本発明の組成物（ならびに個別または一体の組合せ組成物）に、本明細書で説明される阻害剤を縫合糸、包帯、およびガーゼなどの吸収性材料中に含浸させることにより形成される組成物、または組成物を送達するための手術用ステープル、ジッパー、およびカテーテルなどの固相材料の表面上にコーティングされる組成物が含まれる。本開示を念頭に置く当業者には、この種の他の送達系も容易に明らかであろう。

30

【0338】

本発明は、微生物感染症を処置するために、宿主（例えば、ヒト）に1種または複数種の干渉作用剤を投与するための方法および組成物を提供する。多様な実施形態では、本発明のこれらの方法が、in vivo法およびex vivo法のほか、全身投与経路および局所投与経路を含め、薬物を送達するのに適する、利用可能なほとんど任意の方法および経路を対象とする。

【0339】

スクリーニングアッセイ

本発明は、本明細書で説明されるポリクローナル抗体と等価のモノクローナル抗体などの等価作用剤、ならびに本発明の活性作用剤および医薬組成物の活性、または本発明のポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチド産生物もしくはペプチド産生物の機能を調節する各種の作用剤をスクリーニングする方法を提供する。本発明の目的では、「作用剤」に、単体もしくは複合体の有機分子もしくは無機分子、ペプチド、タンパク質（例えば、抗体）、ポリヌクレオチド（例えば、アンチセンスのポリヌクレオチド）、またはリボザイムが含まれるがそれらに限定されないことを意図する。例えば、ポリペプチドおよびポリヌクレオチドなどのポリマー、および多様なコア構造に基づく合成有機化合物など、多種多様な化合物を合成することができ、これらもまた、「作用剤」という用語に含まれる。加えて、植物抽出物または動物抽出物など、各種の天然供給源も、スクリーニングのための化合物をもたらす得る。常に明示的に言及されるわけではないが、作用剤は、

40

50

単独で、または本発明のスクリーニングにより同定される作用剤と同じ生物学的活性もしくは異なる生物学的活性を有する別の作用剤と組み合わせて用いられることを理解されたい。

【0340】

一実施形態は、DNA-DNABIIタンパク質（例えば、IHFタンパク質）間相互作用と相互作用する、それに結合する、またはそれを阻害することが可能な作用剤をスクリーニングする方法である。本発明は、図6Bにおいて、微生物DNAおよびIHFの三次元構造を示す。したがって、本開示は、また、DNA-DNABII（例えば、IHF）間相互作用と相互作用する、それに結合する、またはそれを阻害することが可能な作用剤をデザイン、選択、および合成するための、コンピュータ支援の*in silico*におけるデザインまたはモデリングとしても公知である、バーチャルデザイン法の使用を可能とする。候補作用剤は、本明細書で説明されるバイオフィームおよび関連する疾患または状態（医学的、職業的、または獣医学的な疾患または状態）を処置するのに有効であり得る。したがって、本開示はまた、*in silico*法により同定またはデザインされる作用剤も提供する。

10

【0341】

IHF-DNA複合体の三次元構造を図6Bに示すが、X、Y、およびZ座標による代表的な構造は、Protein Data Bank受託番号：1IHFで示されており、関連する詳細は、Riceら、Cell、87巻：1295～1306頁（1996年）において示されている。IHF-DNA複合体におけるIHFタンパク質の三次元構造を、スクリーニング法に用いることができる。適切な作用剤は、IHF-DNA複体内のIHFタンパク質構造と関連して位置決定され得る作用剤であり、DNAとの相互作用に参与することが確認されている、少なくとも1つのアミノ酸残基、または、代替的に、2つ、もしくは3つ、もしくは4つ、もしくは5つ、もしくは6つ、もしくは7つ、もしくは8つ、もしくは9つ、もしくは少なくとも10のアミノ酸残基の相互作用を伴う。

20

【0342】

図6Aは、E. coliのIHF配列（配列番号42）を例として用いて、IHF-DNA間相互作用に参与するアミノ酸残基を例示する。図6Aの下段の矢印により示されるこのようなアミノ酸残基を、太字および下線を付した文字により示しながら、以下でさらに説明する。すなわち、E. coliのIHFについては、DNAの結合に参与するアミノ酸が、T4、K5、A6、E28、Q43、K45、S47、G48、N51、R55、K57、R60、R63、N64、P65、K66、R76、T80、R82、またはQ85である。

30

【0343】

【化9】

MAL**TKA**EMSE YLFDKLGLSK RDAKELV**ELF** FEEIRRALEN GE**QVKLSG**FG **NFDLRDKNQ**R
PGR**NP**KTGED IPITAR**RVVT** FR**PGQ**KLKSR VENASPKDE (配列番号 42)

したがって、本開示の一実施形態は、DNABIIポリペプチドまたはDNABIIタンパク質の微生物DNAへの結合を阻害する、それと競合する、またはその力価を決定する作用剤、微生物バイオフィームを阻害、予防または破壊する作用剤、対象におけるバイオフィームを阻害、予防または破壊する作用剤、または対象においてバイオフィームを生じる微生物感染症を阻害、予防または処置する作用剤を同定するための、コンピュータ実装方法であって、候補作用剤の三次元構造を、組込み宿主因子（IHF）とDNAの複合体の結晶形から決定された原子構造座標X、YおよびZに基づくIHFタンパク質の三次元構造と対照して位置決定することを含み、配列番号42に示されるT4、K5、A6、E28、Q43、K45、S47、G48、N51、R55、K57、R60、R63、N64、P65、K66、R76、T80、R82またはQ85から選択される2つ以上のIHFアミノ酸、またはそのそれぞれの等価物における作用剤とIHFとの相互作用により、作用剤が、DNABIIポリペプチドまたはDNABIIタンパク質の微生物DN

40

50

Aへの結合を阻害する、それと競合する、もしくはその力価を決定する、微生物バイオフィルムを阻害、予防もしくは破壊する、バイオフィルムを阻害、予防もしくは破壊する、またはバイオフィルムを生じる微生物感染症を阻害、予防もしくは処置することが同定される、コンピュータ実装方法を提供する。

【0344】

一態様では、候補作用剤が、IHFタンパク質のアミノ酸63、64、65、または66のうちの少なくとも1つ、または2つ、または3つと相互作用する。一態様では、候補作用剤が、IHFタンパク質のR63、N64、P65、K66のうちの少なくとも1つ、または2つ、または3つと相互作用する。別の態様では、候補作用剤が、IHFタンパク質のアミノ酸63または66のうちの少なくとも1つと相互作用する。別の態様では、候補作用剤が、IHFタンパク質のR63またはK66のうちの少なくとも1つと相互作用する。

10

【0345】

当技術分野では、正確な位置およびアミノ酸残基が、IHF配列に応じて変化することが理解されるであろう。しかし、当業者は、このような位置およびアミノ酸残基を、配列に基づき容易に同定することができる。例えば、IHF配列は、表9に例示されるE. coliのIHF配列(配列番号42)により配列決定し、DNAと相互作用する、E. coliのIHFにおけるアミノ酸に対応するアミノ酸を明らかにすることができる。同様に、IHF-DNA複合体におけるこのようなIHF配列の三次元構造を、スクリーニングに用いることができる。

20

【0346】

本明細書で提供されるコンピュータ実装方法に加え、本開示はまた、カスタムコンピュータシステムであって、本方法を実施するための、例えば、プロセッサ、メモリ、および/またはプログラムのほか、本方法を実行するのに適するコンピュータプログラムまたはコードを保存する、一時的ではないコンピュータ読み取り媒体などのコンピュータ読み取り媒体も包含するカスタムコンピュータシステムも提供する。

【0347】

したがって、別の実施形態は、
 少なくとも1つのプロセッサ、
 少なくとも1つのプロセッサに接続されたメモリ、
 メモリおよび少なくとも1つのプロセッサと通信している記憶媒体
 を含むカスタムコンピュータ装置であって、
 記憶媒体が、プロセッサによって実行されると、カスタムコンピュータ装置が、DNABIIPolipeptidまたはDNABIITanpak質の微生物DNAへの結合を阻害する、それと競合する、またはその力価を決定する作用剤、微生物バイオフィルムを阻害、予防または破壊する作用剤、対象におけるバイオフィルムを阻害、予防または破壊する作用剤、または対象においてバイオフィルムを生じる微生物感染症を阻害、予防または処置する作用剤を同定するように設定するプロセッサ実行可能命令のセットを含み、この設定が、
 候補作用剤の三次元構造を、組込み宿主因子(IHF)とDNAの複合体の結晶形から決定された原子構造座標X、YおよびZに基づくIHFタンパク質の三次元構造と対照して位置決定することを含み、配列番号42に示されるT4、K5、A6、E28、Q43、K45、S47、G48、N51、R55、K57、R60、R63、N64、P65、K66、R76、T80、R82またはQ85から選択される2つ以上のIHFアミノ酸、またはそのそれぞれの等価物における作用剤とIHFとの相互作用により、作用剤が、DNABIIPolipeptidまたはDNABIITanpak質の微生物DNAへの結合を阻害する、それと競合する、もしくはその力価を決定する、微生物バイオフィルムを阻害、予防もしくは破壊する、バイオフィルムを阻害、予防もしくは破壊する、またはバイオフィルムを生じる微生物感染症を阻害、予防もしくは処置することが同定される、カスタムコンピュータ装置を提供する。

30

40

【0348】

50

さらに別の実施形態は、一時的でないコンピュータ媒体であって、プロセッサによって実行されると、DNA B I IポリペプチドまたはDNA B I Iタンパク質の微生物DNAへの結合を阻害する、それと競合する、またはその力価を決定する作用剤、微生物バイオフィルムを阻害、予防または破壊する作用剤、対象におけるバイオフィルムを阻害、予防または破壊する作用剤、または対象においてバイオフィルムを生じる微生物感染症を阻害、予防または処置する作用剤を同定し、候補作用剤の三次元構造を、組み込み宿主因子(IHF)とDNAの複合体の結晶形から決定された原子構造座標X、YおよびZに基づくIHFタンパク質の三次元構造と対照して位置決定することを含み、配列番号42に示されるT4、K5、A6、E28、Q43、K45、S47、G48、N51、R55、K57、R60、R63、N64、P65、K66、R76、T80、R82またはQ85から選択される2つ以上のIHFアミノ酸、またはそのそれぞれの等価物における作用剤とIHFとの相互作用により、作用剤が、DNA B I IポリペプチドまたはDNA B I Iタンパク質の微生物DNAへの結合を阻害する、それと競合する、もしくはその力価を決定する、微生物バイオフィルムを阻害、予防もしくは破壊する、バイオフィルムを阻害、予防もしくは破壊する、またはバイオフィルムを生じる微生物感染症を阻害、予防もしくは処置することが同定される、プロセッサ実行可能命令のセットを含む、一時的でないコンピュータ媒体を提供する。

【0349】

当技術分野では、*in silico*における分子デザインまたは薬物デザインの方法が周知であり、一般には、Kapetanovic(2008年)、Chem Biol Interact、171巻(2号):165~76頁を参照されたい。略述すると、構造および各種のパラメータの画像がディスプレイ上に示されるように、三次元構造の原子座標をコンピュータに入力する。デザインは、三次元構造を、標的分子の三次元構造と対照して位置決定するステップを伴うことが典型的である。位置決定するステップは、コンピュータのグラフィックインターフェースによる支援を伴い、使用者が制御することもでき、潜在的に良好なマッチを探索するコンピュータアルゴリズムによりさらに誘導させることもできる。位置決定するステップはまた、三次元構造のうち的一方または両方を、任意の次元で動かすことも伴う。

【0350】

次いで、結果として得られるデータを、バーチャルの化合物および/または作用剤ライブラリーに入力する。バーチャルライブラリーは、DOCK-4(Kuntz、UCSF)など、バーチャルのスクリーニングソフトウェア内に含有されているので、上記で説明したデータは、このようなソフトウェアに入力することができる。候補作用剤は、MDDR(Prous Science、Spain)など、バーチャルまたは非バーチャルの薬物候補化合物についての三次元構造データベースを用いて検索することができる。

【0351】

候補作用剤と、DNAおよび/またはDNA B I Iタンパク質のうち的一方または両方との所望の相互作用が見いだされれば、この候補作用剤は、DNAおよび/またはDNA B I Iタンパク質に結合し得ることが判明する。相互作用は、定量的相互作用、例えば、相互作用の強度および/または相互作用部位の数の場合もあり、定性的相互作用、例えば、相互作用または相互作用の欠如の場合もある。したがって、方法の出力は、定量的な場合もあり、定性的な場合もある。したがって、一態様では、本開示がまた、DNAとタンパク質との相互作用を阻害しない作用剤、または、代替的に、DNAとタンパク質との相互作用を強化する作用剤を同定する方法も提供する。

【0352】

低分子化合物などの作用剤の潜在的な阻害効果または結合効果(すなわち、相互作用効果または会合効果)は、実際の合成および試験の前に、コンピュータモデリング法を用いることにより解析することができる。所与の化合物の理論的構造が、この化合物と、バイオフィルム中の微生物DNAおよび/またはDNA B I Iタンパク質との相互作用および会合が不十分であると示唆する場合は、この作用剤の合成および試験を除外することがで

10

20

30

40

50

きる。しかし、コンピュータモデリングが強力な相互作用を示す場合は、この作用剤を合成し、*in vitro*または*in vivo*における実験など、各種の方法を用いて、それが相互作用に結合する、またはそれを阻害する能力について調べることができる。本明細書では、作用剤が、単独で、または別の作用剤との組合せで、バイオフィルムを阻害する、またはその力価を決定する能力を調べる方法が開示される。このようにして、作用しない作用剤および化合物の合成を除外することができる。

【0353】

当業者は、複数の方法のうちのいずれかを用いて、化学的実体もしくは生物学的実体または断片が、DNA B I Iタンパク質または微生物DNAと会合する能力についてスクリーニングすることができ、より具体的には、化学的実体もしくは生物学的実体または断片が、特異的な結合部位と会合する能力についてスクリーニングすることができる。次いで、選択された断片または化学的実体を、DNAまたはDNA B I Iポリペプチドの個別の結合部位内の多様な配向性で位置決定することもでき、ドッキングさせることもできる。ドッキングは、QUANTA、SYBYLなどのソフトウェアの後、CHARMMおよびAMBERなど、標準的な分子力学の力の場を伴うエネルギーの最小化および分子動態についてのソフトウェアを用いて達成することができる。

10

【0354】

*in silico*におけるデザインにはまた、市販のコンピュータプログラムも利用可能である。例には、限定なしに述べれば、GRIDプログラム(Oxford University, Oxford, UK)、MCSSプログラム(Molecular Simulations, Burlington, Mass.)、AUTODOCK(Scripps Research Institute, La Jolla, Calif.)、DOCKプログラム(University of California, San Francisco, Calif.)、GLIDEプログラム(Schrodinger Inc.)、FlexXプログラム(Tripos Inc.)、およびGOLDプログラム(Cambridge Crystallographic Data Centre)が含まれる。

20

【0355】

作用剤または化合物が、上記の方法によりデザインまたは選択されたら、この作用剤または化合物が互いと結合し得る効率について、コンピュータによる評価を介して調べ、これを最適化することができる。例えば、有効なDNA B I I断片は、その結合状態と遊離状態との間で示し得る差違が比較的小さい(すなわち、結合の変形エネルギーが小さい)ことが好ましい。

30

【0356】

デザインまたは選択された化合物は、その結合状態において、好ましくは、標的タンパク質との反発的な静電相互作用を欠くように、コンピュータによりさらに最適化することができる。このような非相補的相互作用(例えば、非相補的静電相互作用)には、電荷間、双極子間、および電荷-双極子間の反発的相互作用が含まれる。とりわけ、作用剤または化合物が、バイオフィルム中のDNA B I Iタンパク質および/または微生物DNAのいずれかの作用物質に結合するとき、作用剤と作用物質との全ての静電相互作用の和が、結合のエンタルピーに中性の寄与または好適な寄与をもたらすことが好ましい。

40

【0357】

当技術分野ではまた、化合物の変形エネルギーおよび静電相互作用を評価するためのコンピュータソフトウェアも利用可能である。例には、限定なしに述べれば、Gaussian 92[Gaussian, Inc., Pittsburgh, Pa.]; AMBER[University of California at San Francisco]; QUANTA/CHARMM[Molecular Simulations, Inc., Burlington, Mass.]; および Insight II/Discover[Biosym Technologies Inc., San Diego, Calif.]が含まれる。

50

【0358】

上記で説明した通りに、結合剤を最適に選択またはデザインしたら、その結合特性を改善または修飾するために、その原子または側鎖基のうちの一部において、置換をもたらすことができる。一般に、初回の置換は保存的である、すなわち、置換基は、元の基とほぼ同じサイズ、形、疎水性、および電荷を有する。当然ながら、立体構成を変化させることが当技術分野で公知の成分は、回避すべきであることを理解されたい。次いで、上記で詳細に説明した方法と同じコンピュータによる方法を介して、このような置換化合物を、バイオフィーム中のDNA B I Iタンパク質および/または微生物DNAに対する適合効率について解析することができる。

【0359】

好ましい一実施形態は、本発明のタンパク質またはポリヌクレオチドと相互作用することが可能な低分子をスクリーニングする方法である。本発明の目的についての一実施形態では、「低分子」が、対象のタンパク質に結合し、それにより、このタンパク質の機能を変化させることが可能な低分子量(MW)の分子である。低分子のMWは、1,000以下であることが好ましい。当技術分野では、タンパク質の機能を変化させることが可能な低分子をスクリーニングする方法が公知である。例えば、細胞における低分子-タンパク質間相互作用を検出するためのミニチュアアレイアッセイについては、Y o u r a (1997年)、Chem. Biol.、4巻:961~968頁により論じられている。

【0360】

*in vitro*においてスクリーニング法を実施するには、処置される微生物を感染させた適切な細胞培養物または組織をまず供給する。細胞は、密度に依存する制約なしに、指数関数的な増殖を達成するための条件下(温度、増殖培地または培養培地、およびガス(CO₂))で、これに適切な長さの時間にわたり培養する。また、対照として、感染させていない追加的な別個の細胞培養物を維持することも望ましい。

【0361】

当業者に明らかである通り、適切な細胞は、マイクロ滴定プレート内で培養することができ、遺伝子型の変化、表現型の変化、または微生物力価の低減に注目することにより、複数の作用剤を同時にアッセイすることができる。

【0362】

作用剤が、上記で説明した低分子など、DNAまたはRNA以外の組成物である場合は、この作用剤を、細胞培養物に直接添加することもでき、追加用の培養培地に添加することもできる。当業者に明らかである通り、実験により決定され得る「有効」量を添加しなければならない。

【0363】

作用剤が、抗体または抗原結合断片である場合は、この作用剤を、競合的ELISAを実施するための条件下で、本明細書で説明される標的抗原およびポリクローナル抗体と接触させることもでき、これらと共にインキュベートすることもできる。当業者には、このような方法が公知である。

【0364】

アッセイはまた、対象において実施することもできる。対象が、ラット、チンチラ、マウス、またはサルである場合、方法は、ヒト患者における作用剤の臨床試験の前に用い得る簡便な動物モデル系を提供する。この系では、疾患または微生物感染症の症状のそれぞれが、同じ感染症を有する処置されていない動物と比較して軽減される、または消失すれば、候補作用剤が潜在的な薬物である。また、比較のためのベースを提供する、健康で処置を受けていない細胞または動物の別個の陰性対照群を有することも有用であり得る。

【0365】

作用剤および組成物は、医薬の製造において用いることができ、医薬組成物の有効成分など、従来の手順に従う投与を介して、ヒトおよび他の動物を処置するのに用いることができる。

【0366】

10

20

30

40

50

組合せ療法

本発明の組成物および関連する方法は、他の療法の投与と組み合わせる用いることができる。これらには、DNアーゼ酵素、抗生薬、抗菌薬、または他の抗体の投与が含まれるがそれらに限定されない。

【0367】

一部の実施形態では、方法および組成物が、抗DNA B I I抗体と共に相乗作用するデオキシリボヌクレアーゼ(DNアーゼ)酵素を包含する。DNアーゼとは、DNA骨格におけるホスホジエステル結合の切断を触媒する任意の酵素である。十字構造だけでなく、DNAの多様な二次構造も標的とすることが公知であるDNアーゼ酵素についての3つの非限定的な例には、DNアーゼI、T4 Endo V I I、およびT7 Endo I 10
が含まれる。特定の実施形態では、DNアーゼと組み合わせると、バイオフィルムを不安定化させるのに必要とされる抗DNA B I I抗体の有効量が低減される。in vitroで投与する場合、DNアーゼは、アッセイに直接添加することもでき、この酵素を安定化させることが公知である適切な緩衝液により添加することもできる。DNアーゼの有効単位用量およびアッセイ条件は変化する場合があります、当技術分野で公知の手順に従い最適化することができる。

【0368】

他の実施形態では、方法および組成物を、抗生薬および/または抗菌薬と組み合わせることもできる。抗菌薬とは、細菌、真菌、または原虫などの微生物を死滅させるまたはそれらの増殖を阻害する物質である。バイオフィルムは一般に、抗生薬の作用に対して耐性 20
であるが、本明細書で説明される組成物および方法を用いて、バイオフィルムを伴う感染症を、感染症を処置するための従来の療法に対して感作することができる。他の実施形態では、抗生薬または抗菌薬を、本明細書で説明される方法および組成物と組み合わせる用いることにより、抗菌薬および/またはバイオフィルム低減剤の有効量を低減することが可能となる。本発明の方法との組合せに有用な抗菌薬および抗生薬についての一部の非限定的な例には、アモキシシリン、アモキシシリン-クラバン酸、セフジニール、アジトロマイシン、およびスルファメトキサゾール-トリメトプリムが含まれる。バイオフィルム低減剤と組み合わせられる抗菌薬および/または抗生薬の処置有効量は、従来の方法により容易に決定することができる。一部の実施形態では、バイオフィルム低減剤と組み合わせられる抗菌薬の用量が、他の細菌感染症、例えば、感染症の病因がバイオフィルムを包含 30
しない細菌感染症において有効であることが示されている平均有効用量である。他の実施形態では、用量が、平均有効用量の0.1、0.15、0.2、0.25、0.30、0.35、0.40、0.45、0.50、0.55、0.60、0.65、0.70、0.75、0.8、0.85、0.9、0.95、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.5、3.0、または5倍である。抗生薬または抗菌薬は、抗DNA B I I抗体を添加する前に付加することもでき、それと共時的に付加することもでき、その後で付加することもできる。

【0369】

他の実施形態では、方法および組成物を、細菌感染症を処置する抗体と組み合わせることもできる。本明細書で説明される方法および組成物と組み合わせるのに有用な抗体の一例は、非類縁外膜タンパク質(すなわち、OMP P5タンパク質)を指向する抗体である。この抗体単独による処置は、in vitroにおいてバイオフィルムをデバルキングすることがない。この抗体と、バイオフィルム低減剤とによる組合せ療法は、同じ濃度のいずれかの試薬を単独で用いることにより達成され得る効果より大きな効果を結果としてもたらす。バイオフィルム低減剤またはバイオフィルムを縮小させる方法と組み合わせると相乗効果をもたらす得る他の抗体には、抗rsP i l A抗体調製物、抗OMP 26抗体調製物、抗OMP P2抗体調製物、および抗全OMP抗体調製物が含まれる。 40

【0370】

本明細書で説明される組成物および方法を用いて、バイオフィルムを伴わない細菌感染症を処置するには有効であるが、それ以外の、バイオフィルムを伴う細菌感染症を処置 50

するには有効でない、一般的な処置モダリティーに対して、バイオフィルムを伴う細菌感染症を感作することができる。他の実施形態では、本明細書で説明される組成物および方法を、バイオフィルムを伴う細菌感染症を処置するのに有効な処置モダリティーと組み合わせて用い得るが、このような追加的な療法とバイオフィルム低減剤またはバイオフィルム低減法との組合せは、バイオフィルム低減剤または追加的な治療薬の有効量を低減し得るような相乗効果をもたらす。他の場合には、このような追加的な療法とバイオフィルム低減剤またはバイオフィルム低減法との組合せが、処置を増強するような相乗効果をもたらす。処置の増強は、感染症を処置するのに必要とされる時間の長さの短縮により証拠立てることができる。

【0371】

追加的な治療的処置は、バイオフィルムを縮小させるのに用いられる方法または組成物の前に付加することもでき、それと共時的に付加することもでき、その後で付加することもでき、同じ処方物中に含有させることもでき、別個の処方物として含有させることもできる。

【0372】

キット

本明細書で説明される *in vitro* 法および *in vivo* 法を実施するのに必要な作用剤および指示書を含むキットもまた、特許請求される。したがって、本発明は、本発明の干渉するステップを包含し得る方法を実施するためのキットのほか、組織を回収するステップ、および/またはスクリーニングを実施するステップ、および/または結果を解析するステップ、および/または本明細書で規定される有効量の干渉作用剤を投与するステップなど、本発明の方法を実施するための指示書も提供する。これらは、単独で用いることもでき、他の適切な抗菌薬と組み合わせて用いることもできる。

【0373】

例えば、キットは、単離されたもしくは組換え型の組込み宿主因子 (IHF) ポリペプチド、またはそのそれぞれの断片もしくは等価物；表 8、表 9、表 10 において同定される単離されたかまたは組換え型のタンパク質ポリペプチド；図 6 において同定される DNA 結合性ペプチド、またはそのそれぞれの断片もしくは等価物；配列番号 1 ~ 33 の単離されたもしくは組換え型のポリペプチド、またはそのそれぞれの断片もしくは等価物；配列番号 5 ~ 11、28、29 の単離されたもしくは組換え型の C 末端のポリペプチド、または表 8、表 10 において同定される単離されたもしくは組換え型の C 末端のポリペプチド、またはそのそれぞれの断片もしくは等価物；微生物 DNA への結合について組込み宿主因子と競合するポリペプチド；ホリデイジャンクションと似ている 4 方向ジャンクションポリヌクレオチド、複製フォークと似ている 3 方向ジャンクションポリヌクレオチド、固有の柔軟性を有するポリヌクレオチドまたは屈曲したポリヌクレオチド；上記で言及したポリペプチドのうちの任意の 1 つをコードする、単離されたかまたは組換え型のポリヌクレオチド；上記で言及したポリペプチドのうちの任意の 1 つを特異的に認識する、またはそれに特異的に結合する抗体、またはその等価物もしくは断片；または DNA B I I タンパク質または DNA B I I ポリペプチドの微生物 DNA への結合と競合する小分子の群のうちの任意の 1 つまたは複数の作用剤と、使用指示書とを含む場合もあり、あるいはそれから本質的になる場合もあり、さらにまたそれからなる場合もある。キットは、アジュバント、抗原性ペプチド、または抗菌薬のうちの 1 つまたは複数を含み得る。キャリアの例には、液体のキャリア、薬学的に許容されるキャリア、固相のキャリア、薬学的に許容されるキャリア、薬学的に許容されるポリマー、リポソーム、ミセル、インプラント、ステント、ペースト、ゲル、歯科インプラント、または医療用インプラントが含まれる。

【0374】

以下の例は、本明細書で開示される本発明を例示することを意図するものであり、これらを限定することを意図するものではない。

【実施例】

10

20

30

40

50

【0375】

実験

実験1

IHF抗体、IHFタンパク質、IHFポリペプチドは、Nash氏から恵与された。例えば、GranstonsおよびNash(1993年)、J. Mol. Biol.、234巻:45~59頁;Nashら(1987年)、Journal of Bacteriology、169巻(9号):4124~4127頁;ならびにRiceら(1996年)、Cell、87巻:1295~1306頁において説明されている通り、当業者には、これらを産生する方法が周知である。略述すると、IHF-を過剰産生するために、himA遺伝子を、細菌プラスミドであるpAD284におけるP_Lプロモーターの下流に挿入した。所望のプラスミドを施されたC600himA42株のラムダ溶原菌であるK5607株の形質転換細胞は、バクテリオファージミュー(13)を増殖させる能力について、アンピシリン耐性形質転換細胞をスクリーニングすることにより同定した。標準的なDNA単離法に従い、himA⁺形質転換細胞からDNAを調製し、himA遺伝子の配向性は、制限酵素切断により決定した。P_Lプロモーターによる発現に適正な配向性でhimA遺伝子を有するプラスミドであるpP_LhimA-1を、cI857熱誘導性リプレッサーを発現するラムダ潜在プロファージを含有するN5271株へと形質転換し、K5770株を得た。

10

【0376】

IHF-サブユニットを過剰産生するために、バクテリオファージラムダのP_LプロモーターとのIHF-サブユニットをコードする配列の融合体を含有するプラスミドであるpKT23-hip323を用いた。pKT23-hip323を、N5271株に導入して、E443株を得た。別のプラスミドの存在下におけるpKT23-hip323の選択を容易にするために、その選択マーカーを、アンピシリン耐性(bla⁺)マーカーから、クロラムフェニコール耐性(cat⁺)マーカーへと変更した。FlammおよびWeisbergにより説明されている通りに、cat含有断片を、プラスミドpBR325から単離し、blaマーカーにおける固有のScaI部位に挿入した。ライゲーションされたDNAを、hip変異を保有し、温度感受性のXリプレッサーを合成するE403株内に導入し、低温でクロラムフェニコール耐性形質転換細胞を選択した。このような形質転換細胞の1つ(E735株)は、hip⁺であり、かつ、アンピシリン感受性であり、したがって、pKT23-hip323のbla-cat⁺誘導体(pE735)を保有すると考えられる。

20

30

【0377】

IHFのいずれのサブユニットも過剰産生する細胞株を産生するために、E735株を、プラスミドpP_LhimA-1で形質転換し、アンピシリン耐性となり、クロラムフェニコール耐性も保持している形質転換細胞(E738株)を選択した。IHFタンパク質のいずれのサブユニットも過剰産生する第2の細胞株の産生は、pheT遺伝子およびhimA遺伝子を含有する、平滑末端のSstII制限酵素部位を、pKT23-hip323プラスミド内にライゲーションすることにより作製されたプラスミドであるpP_LhiphimA-5の構築に依存した。これについては、Nashら(1987年)、J. of Bacteriology、169巻(9号):4124~4127頁においてさらに詳細に説明されている。K5607株のhimA⁺形質転換細胞は、HimA⁺についてスクリーニングすることにより同定し、制限消化によりプラスミドDNAを解析した。プラスミド構造が明らかである全ての場において、2コピーのhimA遺伝子が、タンDEM直接反復配列としてベクター内にライゲーションされていた。このプラスミドにおける2コピーのhimA遺伝子の存在が、選択により要請されているのかどうかは未知であるが、himA変異体を補完するには、プラスミドpP_LhimA-1における単一コピーのhimA遺伝子で十分であることを想起するべきである。プラスミドpP_LhiphimA-5を用いて、N5271株を形質転換し、K5746株を得た。

40

【0378】

50

細胞は、31 で振とう水浴させながら、TBY培地（1リットル当たり10gのトリプトン、5gの酵母抽出物、および5gの塩化ナトリウム）中で増殖させた。対数増殖中期（650nmにおける光学濃度を約0.6とする）において、細胞を42の水浴へとシフトし、引き続き振とうした。300mlの培養物を遠心分離し、20mMのNaClを含有する0.6~0.9mlのTEG（20mMの塩酸トリス（pH7.4）、1mMのEDTAナトリウム、10%のグリセロール）中に懸濁させることが典型的であった。細胞は、各バースト波間に40秒間ずつを置く、20秒間ずつ6回にわたる超音波バースト波により破壊した。超音波抽出物の一部は、Sorvall SS34ローター内、15,000rpmで20分間にわたり遠心分離した。超音波抽出物試料は、標準的な分子生物学法に従う硫酸ドデシルナトリウム（SDS）ゲル電気泳動により解析した。

10

【0379】

IHFタンパク質の精製は、以下の通りに行った：3.6リットルの細胞バッチを、3時間にわたり誘導した。その後の全てのステップは、0~4 で実施した。3.3リットルのバッチに由来する細胞ペレットを、20mMのNaClを含有する10mlのTEG中に懸濁させて、29mlの総容量をもたらし、この懸濁液を、それぞれが、90秒間の間隔を置き、3分間ずつ6回にわたる超音波処理のバースト波を施される2つのバッチにおいて破壊した。超音波抽出物を15,000rpmで20分間にわたり遠心分離し、16.9mlの清明な抽出物を得た。ポリミンP（BDH Chemicals Ltd）の10%（容量/容量）溶液（1.1ml）を、この清明な抽出物へとゆっくり添加し、20分間にわたり攪拌した後、混合物を、10,000rpmで30分間にわたり遠心分離した。結果として得られるペレットを、500mMのNaClを含有する10mlのTEG中に懸濁させ、15分間にわたり攪拌した後、混合物を、12,000rpmで20分間にわたり遠心分離した。上清（10.3ml）を、3.2gの硫酸アンモニウムを添加することにより、50%の飽和度へと調整し、20分間にわたり攪拌し、15,000rpmで15分間にわたり遠心分離した。結果として得られる上清を、1.64gの硫酸アンモニウムを添加することにより、70%の飽和度へと調整し、20分間にわたり攪拌し、15,000rpmで15分間にわたり遠心分離した。結果として得られるペレットを、1mlのTG（10%のグリセロールを含有する50mMの塩酸トリス（pH7.4））中に懸濁させ、2回にわたり交換されるTGに対して透析した。透析された物質（2.0ml）を、TGで平衡化された、1mlのホスホセルロース製カラム（P11、Whatman, Inc.）（0.5×5.8cm）へと投入した。カラムを3mlのTGで洗浄し、TG中の20mlにわたるKCl直線勾配（0~1.2M）で展開した。0.5mlの画分を回収し、-20 で保存し、IHF活性についてアッセイした。

20

30

【0380】

抗IHFポリクローナル抗体は、以下の通りに調製した。ウサギに、フロイントによる完全アジュバントを伴う250μgの精製されたIHFを注射した。フロイントによる不完全アジュバントを伴う250μgのIHFの追加投与による免疫化を、1、7、および12週間後に施した。IHFについての免疫プロット法により決定される通り、初回注射の13週間後に回収した血清は、高力価のIHF反応性物質を有した。動物は、数年間にわたり維持し、それらの血清中の抗IHF抗体の高力価を維持するために必要な場合は、さらなる追加投与による免疫化を施した。抗体をさらに精製することはなかった。粗血清は、-70 で保存した。

40

【0381】

それぞれのサブユニットに特異的な抗体は、それぞれのサブユニットの最もC末端側の20アミノ酸残基に対応する合成ポリペプチド（配列番号34および35）を用いることにより産生し、Dittoら（1994年）、J. of Bacteriology、176巻（12号）：3738~3748頁に従いウサギを免疫化した。

【0382】

実験2

この実験は、8ウェルのチャンバースライドにおいて確立されたバイオフィルムのin

50

*in vitro*における可逆化モデルについて説明する。この実験で用いられる材料は、チョコレート寒天培地；sBHI（1 mL当たり2 mgのヘムおよび1 mL当たり2 mgのb-NADを伴うBHI）；8ウェルのチャンバースライド（Nunc* Lab-Tek* Fisher、型番12-565-18）；0.9%の滅菌生理食塩液；LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit（Fisher、型番NC9439023）、およびホルマリンであった。

【0383】

1日目には、チョコレート寒天培地上でNTHIを切り取り、単離した。次いで、NTHIを、37 °Cおよび5% CO₂中で20時間にわたりインキュベートした。翌日、細菌を、5 mLの平衡化（37 °C、5% CO₂）されたsBHI中に懸濁させ、sBHI中の光学濃度をOD₄₉₀ = 0.65に調整した。細菌は、平衡化されたsBHI中で1:6に希釈した（1 mLの細菌懸濁液 + 5 mLのsBHI）。次いで、細菌を、37 °C、5% CO₂中で3時間にわたり、静かにインキュベートした（OD₄₉₀を、約0.65とする）。次に、細菌を、平衡化されたsBHI中で、再度1:2500に希釈し、200 mLの細菌懸濁液を、チャンバースライドの各ウェルに添加した。希釈のため、10 μLの細菌を、エッペンドルフ管内に990 μLのsBHIへと添加し、8 μLの希釈液を、各チャンパー内に192 μLずつのsBHIへと添加し、37 °C、5% CO₂中で静かにインキュベートした。

10

【0384】

3日目、インキュベーションの16時間後、バイオフィルムを攪乱しないようにウェルの角から培地を吸引することにより、培地を吸引した。次いで、200 mLの平衡化されたsBHIを各チャンパーに添加し、37 °C、5% CO₂中で8時間にわたり静かにインキュベートした。8時間後、培地を吸引し、200 mLの平衡化されたsBHIを処置されていない各チャンパーに添加し、sBHI中で1:50に希釈したウサギ抗*rspA*などの干渉作用剤200 mL、およびsBHI中で1:50に希釈した200 mLのナイーブウサギ血清（または他の適切な血清対照）を添加した。次いで、これらを、37 °C、5% CO₂中で静かにインキュベートした。

20

【0385】

4日目、インキュベーションの約16時間後、sBHIを吸引し、200 mLの滅菌生理食塩液で2回にわたりバイオフィルムを洗浄した。生理食塩液を吸引し、200 mLのLive/Dead色素を添加した。次に、1 mLの滅菌10 mMリン酸緩衝生理食塩液中に3 mLの成分Aおよび3 mLの成分Bを添加した。次いで、これを、室温で15分間にわたり光から保護して静かにインキュベートした。色素を吸引し、200 mLの滅菌生理食塩液で2回にわたりバイオフィルムを洗浄した。生理食塩液を吸引し、200 mLのホルマリンを添加して、バイオフィルムを固定した。次いで、これを、室温で15分間にわたり光から保護して静かにインキュベートした。ホルマリンを吸引し、200 mLの滅菌生理食塩液で2回にわたりバイオフィルムを洗浄した。ガスを取出し、スライドガラスにカバースリップを取り付け、カバースリップを、マニキュア液で封印し、乾燥させてから、共焦点顕微鏡で観察した。

30

【0386】

本方法および抗IHF抗体を用いて、本出願人らは、副鼻腔炎、気管支炎、中耳炎、および慢性閉塞性肺疾患（COPD）の増悪において蔓延するHaemophilus influenzaeにより産生されるバイオフィルムを縮小させた。処置されていないバイオフィルム量は、4.24 μm³ / μm²であり、平均の厚さは11.68 μmであると測定された。処置後、バイオフィルム量は、0.53 μm³ / μm²へと低減され、平均の厚さも1.31 μmへと低減された。したがって、これは、平均の厚さにおける88.8%の低減、およびバイオマスにおける87.5%の低減を示す。

40

【0387】

E. coliのIHFを指向するポリクローナル抗血清は、精製された組込み宿主因子（IHF）を用いる標準的な技法に従い、ウサギにおいて調製した。実験1では、E. c

50

o l i に由来する I H F の発現および精製について説明している。

【 0 3 8 8 】

本方法および抗 I H F 抗体を用いて、本出願人らは、齲蝕の発症および増悪において蔓延する *Streptococcus mutans* により産生されるバイオフィルムを縮小させた。処置されないバイオフィルム量は $1.17 \mu\text{m}^3 / \mu\text{m}^2$ であり、平均の厚さは $5.43 \mu\text{m}$ であると測定された。処置後、バイオフィルム量は、 $0.1 \mu\text{m}^3 / \mu\text{m}^2$ へと低減され、平均の厚さも $0.47 \mu\text{m}$ へと低減された。したがって、これは、平均の厚さにおける 91.3% の低減、およびバイオマスにおける 91.6% の低減を示す。i n v i t r o におけるバイオフィルムアッセイは、隔日で3回にわたり反復した。最大の高さ、平均の厚さ、およびバイオマスにおける低減百分率を、以下の表 1 に示す。

10

【 0 3 8 9 】

【表 1】

表 1

		アッセイ 1	アッセイ 2	アッセイ 3
<i>S. mutans</i>	最大の高さ (μm)	56	24	41
	平均の厚さ (μm)	65	65	67
	バイオマス ($\mu\text{m}^3 / \mu\text{m}^2$)	37	58	66

20

本方法および抗 I H F 抗体を用いて、本出願人らは、限局性皮膚感染症およびびまん性皮膚感染症、慢性鼻副鼻腔炎、および院内感染において蔓延する *Staphylococcus aureus* により産生されるバイオフィルムを縮小させた。処置されないバイオフィルム量は $0.3 \mu\text{m}^3 / \mu\text{m}^2$ であり、平均の厚さは $2.2 \mu\text{m}$ であり、バイオフィルムの高さは $17.5 \mu\text{m}$ であると測定された。処置後、バイオフィルム量は、 $0.3 \mu\text{m}^3 / \mu\text{m}^2$ へと低減され、平均の厚さも $1.1 \mu\text{m}$ へと低減され、バイオフィルムの高さも $8 \mu\text{m}$ へと低減された。したがって、これは、平均の厚さにおける 48.8% の低減、およびバイオマスにおける 2.7% の低減を示す (図 7)。

【 0 3 9 0 】

本方法および抗 I H F 抗体を用いて、本出願人らは、C O P D の増悪および中耳炎において蔓延する *Moraxella catarrhalis* により産生されるバイオフィルムを縮小させた。処置されないバイオフィルム量は $0.72 \mu\text{m}^3 / \mu\text{m}^2$ であり、平均の厚さは $1.48 \mu\text{m}$ であると測定された。処置後、バイオフィルム量は、 $0.13 \mu\text{m}^3 / \mu\text{m}^2$ へと低減され、平均の厚さも $0.65 \mu\text{m}$ へと低減された。したがって、これは、平均の厚さにおける 55.8% の低減、およびバイオマスにおける 82.1% の低減を示す。i n v i t r o におけるバイオフィルムアッセイは、隔日で3回にわたり反復した。最大の高さ、平均の厚さ、およびバイオマスにおける低減百分率を、以下の表 2 に示す。

30

【 0 3 9 1 】

【表 2】

表 2

		アッセイ 1	アッセイ 2	アッセイ 3
<i>M. catarrhalis</i>	最大の高さ (μm)	61	33	36
	平均の厚さ (μm)	92	34	84
	バイオマス ($\mu\text{m}^3 / \mu\text{m}^2$)	92	35	92

40

本方法および抗 I H F 抗体を用いて、本出願人らは、副鼻腔炎、肺炎、および中耳炎において蔓延する *Streptococcus pneumoniae* により産生されるバ

50

イオフィルムを縮小させた。処置されないバイオフィルム量は $0.64 \mu\text{m}^3 / \mu\text{m}^2$ であり、平均の厚さは $3.99 \mu\text{m}$ であると測定された。処置後、バイオフィルム量は、 $0.14 \mu\text{m}^3 / \mu\text{m}^2$ へと低減され、平均の厚さも $0.82 \mu\text{m}$ へと低減された。したがって、これは、平均の厚さにおける 79.5% の低減、およびバイオマスにおける 78.6% の低減を示す。in vitro におけるバイオフィルムアッセイは、隔日で3回にわたり反復した。最大の高さ、平均の厚さ、およびバイオマスにおける低減百分率を、以下の表3に示す。

【0392】

【表3】

表 3

	アッセイ 1	アッセイ 2	アッセイ 3
<i>S. pneumoniae</i>			
最大の高さ (μm)	49	51	44
平均の厚さ (μm)	25	64	79
バイオマス ($\mu\text{m}^3 / \mu\text{m}^2$)	51	61	79

本方法および抗 IHF 抗体を用いて、本出願人らは、嚢胞性線維症、肺炎、皮膚および軟組織における感染症、ならびに医療機器において蔓延する *Pseudomonas aeruginosa* により産生されるバイオフィルムを縮小させた。処置されないバイオフィルム量は $7.0 \mu\text{m}^3 / \mu\text{m}^2$ であり、平均の厚さは $25.70 \mu\text{m}$ であり、バイオフィルムの高さは $40 \mu\text{m}$ であると測定された。処置後、バイオフィルム量は、 $3.4 \mu\text{m}^3 / \mu\text{m}^2$ へと低減され、平均の厚さも $10.3 \mu\text{m}$ へと低減され、バイオフィルムの高さも $27.5 \mu\text{m}$ へと低減された。したがって、これは、平均の厚さにおける 60.1% の低減、およびバイオマスにおける 50.8% の低減を示す (図7)。

【0393】

本方法および抗 IHF 抗体を用いて、本出願人らは、淋病において存在する *Neisseria gonorrhoeae* により産生されるバイオフィルムを縮小させた。処置されないバイオフィルム量は $9.5 \mu\text{m}^3 / \mu\text{m}^2$ であり、平均の厚さは $22.02 \mu\text{m}$ であり、バイオフィルムの高さは $40 \mu\text{m}$ であると測定された。処置後、バイオフィルム量は、 $0.8 \mu\text{m}^3 / \mu\text{m}^2$ へと低減され、平均の厚さも $3.4 \mu\text{m}$ へと低減され、バイオフィルムの高さも $27.5 \mu\text{m}$ へと低減された。したがって、これは、平均の厚さにおける 84.5% の低減、およびバイオマスにおける 92.1% の低減を示す (図7)。

【0394】

本方法および抗 IHF 抗体を用いて、本出願人らは、尿路感染症において蔓延する尿路病原性 *E. coli* により産生されるバイオフィルムを縮小させた。処置されないバイオフィルム量は $1.75 \mu\text{m}^3 / \mu\text{m}^2$ であり、平均の厚さは $31.73 \mu\text{m}$ であると測定された。処置後、バイオフィルム量は、 $0.75 \mu\text{m}^3 / \mu\text{m}^2$ へと低減され、平均の厚さも $1.62 \mu\text{m}$ へと低減された。したがって、これは、平均の厚さにおける 94.9% の低減、およびバイオマスにおける 56.9% の低減を示す。in vitro におけるバイオフィルムアッセイは、隔日で3回にわたり反復した。最大の高さ、平均の厚さ、およびバイオマスにおける低減百分率を、以下の表4に示す。

【0395】

10

20

30

40

【表 4】

表 4

		アッセイ 1	アッセイ 2	アッセイ 3
UPEC	最大の高さ (μm)	69	65	76
	平均の厚さ (μm)	97	33	95
	バイオマス (μm ³ /μm ²)	98	96	57

本方法および抗 I H F 抗体を用いて、本出願人らは、皮膚感染症において蔓延する *Staphylococcus epidermidis* により産生されるバイオフィルムを縮小させた。in vitro におけるバイオフィルムアッセイは、隔日で 3 回にわたり反復した。最大の高さ、平均の厚さ、およびバイオマスにおける低減百分率を、以下の表 5 に示す。

【0396】

【表 5】

表 5

		アッセイ 1	アッセイ 2	アッセイ 3
<i>S. epidermidis</i>	最大の高さ (μm)	42	38	56
	平均の厚さ (μm)	62	71	92
	バイオマス (μm ³ /μm ²)	62	76	88

実験 3

中耳の感染症（または中耳炎、OM）は、世界中で有病率の高い疾患であり、世界中で毎年 5000 万～3 億 3000 万人の小児が罹患している。OM の社会経済的な負荷もまた大きく、米国だけで、毎年 50～60 億ドルの費用が推算されている。OM の主要な病原菌のうちの 3 つ全てが、in vitro および in vivo のいずれにおいてもバイオフィルムを形成することが公知であり、近年、医師らは、OM の慢性性および再発性が、少なくとも部分的に、中耳腔における細菌バイオフィルムの形成に起因することを理解するようになってきている。OM についてのチンチラモデルの 1 つでは、若年のチンチラに、まずウイルス性の「風邪」を施した 1 週間後、これらに、生菌による接種物で鼻腔内に感作した。「私の子供は風邪をひき、1 週間後に耳の感染症になりました」というヒトにおける状態と同様に、チンチラもまた、感作の約 1 週間後に、ウイルス性の上気道感染症を患う一方で、細菌性 OM を発症した。細菌の増加が中耳に到達すると（耳管の上行を介して、または中耳腔への直接的な感作後において）、細菌は、堅調なバイオフィルムを形成する。したがって、本出願人らは、本明細書で報告する通り、チンチラモデルを意図し、これをすでに実際に用いて、既存のバイオフィルムを速やかに消失させる結果をもたらす I H F による免疫化の防御効果を裏付けた。このモデルはまた、抗 D N A B I I 抗体の受動送達を介する、または I H F もしくは他の D N A B I I ファミリーメンバーに結合することが公知である低分子または他の作用剤の送達を介する療法にも有用である。

【0397】

チンチラモデルを、ヒトワクチンの開発および前臨床試験に用いるため、ヒト宿主、特に、小児との有意義な免疫学的相応物を確立することが重要である。本出願人らは、N T H I に起因する急性中耳炎（A O M）を伴う小児から回収された滲出物と、実験による N T H I 誘導性 O M を伴うチンチラに由来する中耳液とが、O M P P 5 の免疫優性領域を類似した階層的な方式で認識することを示した（例えば、Novotny LA ら（2000 年）、Infect Immun.、68 巻（4 号）：2119～28 頁；Novotny LA ら（2007 年）、9th International Symposi

10

20

30

40

50

um on Recent Advances in Otitis Media, St. Pete Beach, FL; Novotny LA (2002年)、Vaccine、20巻(29~30号): 3590~97頁を参照されたい)。本出願人はまた、実験によるOMを伴うチンチラ、自然感染によるOMを伴う小児、およびCOPDが増悪した成人のいずれもが、PilAを示すペプチドを非常に類似した方式で認識することも示した(例えば、Adams LD (2007年)、107th General Meeting, American Society for Microbiology、2007年、Toronto, ON; Adams LD (2007年)、9th International Symposium on Recent Advances in Otitis Media, St. Pete Beach, FL. を参照されたい)。したがって、実験によるOMを伴うチンチラと、自然感染によるOMを伴う小児とは、少なくとも2つの非類縁NTHIタンパク質であるアデシンに対して免疫学的に応答するとき類似している。近年、この類似が最終的な試験にかけられたが、そこでは、新規の11価のプロテインD (Pneumococcus属多糖によるコンジュゲートワクチン)の前臨床有効性試験を実施するのに、チンチラのAV-NTHI重感染モデルが用いられた。チンチラにおいて得られたデータが34%の有効性を予測する一方、小児で調べたところでは、H. influenzae誘導性OMに対して得られた有効性が35.6%であり(例えば、Novotny LA (2006年)、Vaccine、24巻(22号): 4804~11頁; およびPrymula R (2006年)、Lancet.、367巻(9512号): 740~8頁を参照されたい)、それにより、OMワクチン候補物質の開発および試験に対するこのモデルの関与性が強く裏付けられた。

【0398】

本出願人は、IHFを粘膜/全身アジュバントと共に送達する毎週2回のTC的な免疫化を施された後で、チンチラの中耳内に残存する、あらかじめ形成されたバイオフィルムが劇的に縮小することを示した。

【0399】

Rauscher's Chinchilla Ranch (LaRue, Ohio) から48匹の成体を取り寄せ、7~10日間にわたり飼育場に馴らしてから、試験を開始した。TB的な感作[経中耳骨胞的な感作または中耳腔内への直接的な感作]の前に、ベースラインの耳鏡検査および鼓膜聴力検査のほか、限定容量の前採血を実施して、血清を回収した。チンチラに麻酔をかけ、約1000cfuを含有する300 μ lのNTHI(株番号: 86-028NP)懸濁液を、経中耳骨胞的な感作を介して、中耳腔内に導入した。動物を覚醒させ、IACUCにより許容されている動物使用についてのプロトコルに従い、有害反応について毎日モニタリングした。研究期間全体にわたり、2~3日間ごとに、ルーチンの耳鏡検査および鼓膜聴力検査を実施した。

【0400】

感作の4日後(+4日目)、チンチラに麻酔をかけ、CTスキャンを実施して、中耳内に存在するバイオフィルムを画像化し、免疫化前の画像を得た。滅菌の発熱物質を含まない生理食塩液で湿らせた滅菌ガーゼパッドで拭うことにより、耳介の表面を清浄化し、水分補給した。約2分(耳介を乾燥させるための)後、50 μ lのdmLT溶液、IHF(実験1による精製されたE. coliのIHF)+dmLT溶液、またはIHFタンパク質+rsPilA+dmLT溶液を、耳介へと添加し、静かに擦り込む。1コホート当たり3匹ずつのチンチラを屠殺し、組織/試料を回収し(+4日目、および+11日目)、作用機構の決定を開始した。

【0401】

感作の11日後(+11日目)、2回目の免疫化であって、耳介を清浄化/水分補給し、免疫原を局所投与する免疫化を、上記で説明した通りに行った。1コホート当たり3匹ずつのチンチラを屠殺し、組織/試料を回収し、作用機構の決定を開始した。

【0402】

10

20

30

40

50

感作の18日後(+18日目)、チンチラに麻酔をかけ、CTスキャンを実施して、存在するバイオフィルムを同定したほか、免疫化前のCTスキャンと比較した。次いで、動物から採血して血清を回収し、安楽死させた。中耳骨胞を切除して、存在する任意の体液を無菌的に回収し、次いで、中耳骨胞を切開して、中耳骨胞内部および存在する任意のバイオフィルムを画像化した。画像を収集し、1mlの滅菌生理食塩液で中耳骨胞を洗浄して、再度画像化した。存在する任意のバイオフィルムと共に、右側中耳骨胞から粘膜を回収し、あらかじめ秤量した試験管内に入れた。これらの組織をホモジナイズし、段階希釈し、プレートに播種して、組織の湿潤重量1mg当たりのNTHIのcfuを決定した。左側中耳骨胞には、OCT化合物を充填し、組織学的解析のために瞬間凍結させた。

【0403】

バイオフィルムが存在する左側中耳腔および右側中耳腔についての画像をスクランブルし、動物1匹当たり2枚ずつの画像を、単一のファイルにコンパイルし、盲検化された評価者にランク付けさせた。各動物の中耳内に残存するバイオマスの相対量を、以下の表6に示すスケールを用いて、盲検化された評価者に、0~4+のスケールでランク付けさせた。血清、ならびに回収された中耳滲出物に対して、滴定ELISA、サイトカインアレイ、およびBiacore法を実行した。OCT包埋した中耳は、免疫組織化学および/または免疫蛍光を用いて、基本的形態および構成(H&E)について、またはIHFの存在について、切片化および染色した。

【0404】

【表6】

表6

スコア	基準
0	バイオマスの証拠が見られない。
1+	バイオマスが、中耳腔の $\leq 25\%$ を満たす。中耳骨胞下部への骨性隔壁の接合部が目視できる。
2+	バイオマスが、中耳腔の $>25\% \sim \leq 50\%$ を満たす。骨性隔壁が中耳骨胞下部とどこで接合するかを目視することができない。
3+	バイオマスが、中耳腔の $>50\% \sim \leq 75\%$ を満たす。バイオマスが、骨性隔壁の全長のうちの $>50\%$ を覆う。
4+	バイオマスが、中耳腔の $>75\% \sim \leq 100\%$ を満たす。骨性隔壁は、バイオマスにより覆い隠されており、目視することができない。

in vivoにおいて形成されたバイオフィルムの凍結切片についての免疫蛍光イメージングは、以下に従って実施した。切除後、それぞれのチンチラの中耳には、OCT包埋化合物(Fisher Scientific, Pittsburgh, PA)を充填し、液体窒素により瞬間凍結させた。中耳骨胞内部を形成する骨を除去し、中耳粘膜および既存のバイオフィルムを静置した。次いで、結果として得られるブロックを両断し、バイオフィルムの断面を露出させ、OCT内に再度包埋した。Microm rotary cryotomeを用いて、10ミクロンの切片系列を切り出し、スライドガラス(Mercedes Medical, Sarasota, FL)に付着させ、-80で保存した。その後、切片を染色して、in vivoにおいて形成されたバイオフィルムにおけるIHFの相対的組込みを決定した。略述すると、スライドガラスを空気乾燥させ、低温アセトン中で固定し、次いで、緩衝液(0.05Mのトリス-HCl、0.15MのNaCl、および0.05%のTween 20、pH7.4)中で平衡化させた。

【0405】

製造元の指示書に従い、image-iTFX signal enhancer(Molecular Probes, Eugene, OR)およびBackground Sniper(BioCare Medical, Concord, CA)により、切

片をブロッキングした。次いで、切片を、加湿したチャンバー内4 で一晩にわたり、1 : 200のウサギ抗IHFポリクローナル抗体希釈液と共にインキュベートした。スライドガラスをさらにすすぎ、室温で30分間にわたり、AlexaFluor 594 (Invitrogen)とコンジュゲートした、ヤギ抗ウサギIgGと共にインキュベートした。対比染色として、切片を、DAPIと共にインキュベートし、ProLong Gold antifade reagent (Molecular Probes, Eugene, OR)を用いてカバースリップを施した。ナイーブのウサギ血清を、陰性対照として用いた。切片は、Zeiss Axiovert 200型倒立顕微鏡 (Carl Zeiss Inc., Thornwood, NY)に取り付けたZeiss LSM 510 Meta共焦点システムにより観察した。

10

【0406】

組織1mg当たりの平均CFUおよびNTHIの上清1ml当たりの平均CFUにおける有意差は、対応のあるt検定により決定した。p値 0.05を有意であると考えた。コホート間の相対バイオマスにおける有意差は、対応のないt検定により評価した。p値 0.05を有意であると考えた。

【0407】

図9のパネルAに示す通り、アジュバントだけで免疫化したチンチラの中耳内に残存するバイオマスについての平均スコアは2.8であり、これは、中耳に対する細菌感作の18日後までに、大半の動物において、疾患が著明に残存し、あらかじめ形成されたバイオマスの消失がなされていないことを示した。これに対し、E. coliのIHFタンパク質+アジュバントで免疫化された動物についての平均スコアは1.5であった。+2.8の平均スコアを与えられた残留バイオマス、および+1.5の平均スコアを与えられた残留バイオマスについての代表的な画像を、図9のパネルBに示す。また、図10に示す通り、中耳内のバイオマス構成の変化についての組織学的証拠 (パネルAを参照されたい)、ならびにバイオマスをホモジナイズし、チョコレート寒天培地において培養することにより測定した、残存するバイオマス中に存在する細菌負荷の統計学的に有意な低減 (パネルBを参照されたい)の両方により、疾患の消失についてさらに測定した。さらに、単離されたE. coliのIHFタンパク質で免疫化した全ての動物が、局所性および全身性の強力な免疫応答を示し、剖検時に注意された通り、免疫化の結果としての明らかな続発症を示す動物は見られなかった (データは示さない)。

20

30

【0408】

in vitroにおいて抗IHF抗体を用いた場合に観察される、バイオフィルムをデバルキングする顕著な有効性、およびまた、in vivoにおいて免疫原として用いた場合に観察される、精製されたE. coliのIHFタンパク質が、進行中のバイオフィルム疾患を消失させ得るポリクローナル抗体の形成を誘導する顕著な有効性は、哺乳動物宿主が、再発性および/または慢性の疾患状態を示す細菌バイオフィルム内でeDNAと会合するDNABIIタンパク質に対して有効な免疫応答を天然ではもたらさないのはなぜかについての難問を提起した。それがDNAに結合したときのIHFについて解明された構造を再検討する (Riceら (1996年)、Cell、87巻 (7号) : 1295 ~ 1306頁)と、タンパク質構造のうちのかなりの部分が、結合したDNAにより閉塞していることが明らかであり、それにより、細菌バイオフィルム内でeDNAに結合したときの、IHFおよび/またはHUによる防御的エピトープまたは防御的ドメインが閉塞する可能性が示唆された。DNAが結合していない天然のIHFを免疫原として用いることにより、このような閉塞を克服し、それにより、防御的抗体の産生を促進する機構もたらされ得ることが仮定された。

40

【0409】

免疫化したときに、eDNAが、DNABIIファミリーメンバーを指向する防御的抗体の発生を実際に予防し得る一方で、天然タンパク質の使用が有効であるのかどうかを決定するため、第2の大規模コホートによる研究であって、すでに詳述したチンチラ研究を本質的に反復する研究を実施した。

50

【0410】

第2の動物免疫化研究のために、鼓膜聴力検査およびビデオによる耳鏡検査を介して、中耳疾患の証拠を有さないことが示されている20匹の成体チンチラ（体重を500～700gとする）を登録し、それぞれ5匹ずつの4コホートに分けた。ここでもまた、全ての動物に、中耳骨胞1個当たり約1000CFUのNTHI 86-028NP株を、経中耳骨胞的に感作した。4日後、これらの動物の中耳腔内でバイオフィームが形成された後、上記で説明した通り、動物を、経皮的な経路（TCI）を介して免疫化した。処方物は、10 μ gのdmLTと混合された10 μ gのIHF、DNAにあらかじめ結合させた10 μ gのIHFタンパク質+dmLT、DNA+dmLT、または10 μ gのdmLT単独からなった。

10

【0411】

DNAにあらかじめ結合させたIHFタンパク質でTCI的に免疫化する結果として、同じヌクレオタンパク質の複合体を皮下（SQ）的に送達した場合に誘導される免疫応答と同様の免疫応答、およびIHFタンパク質単独により誘導された免疫応答と比較して同様の免疫応答がもたらされるかどうかを決定するため、2匹の成体チンチラを免疫化し、抗血清を産生させた。それぞれの動物にプライミング用量を施した後で、30日間隔で、2回にわたる同量の追加投与を行った。チンチラ宿主においてその強力なアジュバント特性が示されているために、免疫原を、アジュバントであるモノホスホリル脂質A（MPL）（投与1回当たり10 μ g）（Sigma-Aldrich、St. Louis、MO）と混合した（例えば、Bakaletzら（1999年）、*Infect Immun.*、67巻（6号）：2746～2762頁；およびKennedyら（2000年）、*Infect Immun.*、68巻（5号）：2756～2765頁を参照されたい）。一方のチンチラは、10 μ gのIHFタンパク質+MPLで免疫化し、他方のチンチラには、DNAに結合させた10 μ gのIHFタンパク質+MPLを施した。全ての投与は、200 μ lの総容量でSQ的に送達した。最終回の追加投与を施した15日後、動物から採血して血清を得、ウェスタンブロットおよびELISAを介して血清をアッセイし、逆数による力価およびIHFタンパク質に対する抗体反応性の特異性の両方を決定した。

20

【0412】

ここでもまた、研究の終了時に、中耳を、疾患の重症度について、0～4+でスコア付けした。IHFタンパク質およびDNAが、免疫化のための複体内に残存していることをより十分に確認するため、公表されている共結晶化研究（例えば、Riceら（1996年）、*Cell*、87巻（7号）：1295～1306頁を参照されたい）において用いられている、分子比[DNA（10 μ M）対IHFタンパク質（5 μ M）の分子比]を2：1とする、バクテリオファージラムダの組換え型の部位であるattPに由来する高アフィニティーのIHF結合部位の合成オリゴヌクレオチドと同一の合成オリゴヌクレオチドを用いた。この合成オリゴヌクレオチド量は、このDNA標的に結合したIHFタンパク質の K_d を少なくとも3桁上回った。図11に示す通り、IHFタンパク質は、電気泳動による移動シフトアッセイにおけるその移動性の低下により示される通り、dsDNAに実際に結合した。

30

40

【0413】

図12に示す通り、単離された*E. coli*のIHFタンパク質で免疫化された動物は、平均の残留中耳バイオマススコアが0.9であり、アジュバント単独で免疫化された対照（平均バイオマススコア＝2.2）、またはアジュバントと混合されたDNAで免疫化された対照（平均バイオマススコア＝2.8）と比較して、疾患状態の劇的な軽減を示した。興味深いことに、IHF-DNA複合体で免疫化された動物の中耳はまた、アジュバント単独またはアジュバントと混合されたDNAを施されたコホートと統計学的な有意差を示さない、2.5の平均バイオマススコアをもたらす、著明量の細菌バイオマスを残存させることも示した。この結果は、自然感染による疾患の場合であろうと仮定し得る通り、十分なeDNA断片が存在する場合、この状況が、中和抗体の産生に必要な極めて重要

50

な I H F エピトープの閉塞を結果としてもたらし得ることを強く示唆した。

【 0 4 1 4 】

観察された D N A 閉塞の結果が、経皮的な免疫化経路の使用に特異的でないことを確認するため、皮下 (S Q) 的な免疫化経路を用いて、チンチラ宿主内の抗原提示細胞への抗原の送達を確保する免疫化を反復した。図 1 3 に示す通り、ウェスタンブロットによりアッセイしたところ、単離された E . c o l i の I H F タンパク質による S Q 的な免疫化が、単離された I H F に対する強力な免疫応答の産生をもたらしたのに対し、過剰量の D N A にあらかじめ結合させた E . c o l i の I H F タンパク質による免疫化は、I H F を認識する検出可能な抗体を誘導できなかった。E L I S A によりアッセイしたところ、単離された I H F に対する逆数による力価は、オリゴヌクレオチドにあらかじめ結合させた I H F で免疫化した動物の場合が 1 0 0 0 であったのに対し、天然の I H F で免疫化した動物の場合は 8 0 0 0 であった (I H F に対する、いずれの動物の免疫前の逆数による力価も 1 0 0 であった) 。まとめると、これらの結果は、自然感染による疾患状態において生じる e D N A との I H F タンパク質の結合が、防御的な獲得免疫応答の産生に必要な I H F タンパク質のエピトープまたはドメインを遮断する可能性を有するという本発明者らの仮説と符合する。さらに、天然の I H F タンパク質 (D N A が結合していない I H F タンパク質) による免疫化は、本明細書で説明したいずれの前臨床チンチラ研究でも裏付けられた通り、防御的抗体または中和抗体の産生への免疫応答の有効な方向付けを可能とすると考えられた。

10

【 0 4 1 5 】

20

実験 4

歯槽骨および歯肉を破壊する歯周炎およびインプラント周囲炎などの炎症性疾患の発症機序には、多数の口内細菌 (例えば、A g g r e g a t i b a c t e r a c t i n o m y c e t e m c o m i t a n s 、 P o r p h y r o m o n a s g i n g i v a l i s) が関与している。これらの細菌の病原性についての探索は、有効な動物モデルの欠如により妨げられている。特定の細菌の病原性を探索することの難題の 1 つは、外因性細菌が、動物の口腔内に導入された場合のバイオフィルムを確立することの困難である。歯周炎の動物モデルは開発されているが、接種された動物の口腔から培養可能な細菌が回収されることはまれである。特定の細菌の病原性を評価し得る有効な動物モデルを開発することは、それらの発症機構を解明することに大きな一助となるであろう。

30

【 0 4 1 6 】

加工したチタン製の歯科インプラント (1 . 2 x 4 . 5 m m) の表面を、A l O ₃ によるグリットブラッシング (1 0 0 μ m) 、および H C l によるエッチング (p H 7 . 8 、 8 0 で 2 0 分間にわたる) を介して修飾した。加工およびナノテクスチャー処理したインプラントを、A g g r e g a t i b a c t e r a c t i n o m y c e t e m c o m i t a n s (A a) の D 7 S 臨床株を接種した T S B 培地中、3 7 で 1 ~ 3 日間にわたりインキュベートした。インプラント上の細菌バイオフィルムは、S E M により解析するほか、共焦点レーザー走査顕微鏡により解析した後、L I V E / D E A D (登録商標) B a c L i g h t (商標) で染色した。A a バイオフィルムが確立されたインプラントおよび A a バイオフィルムが確立されていないインプラントを、雌ラット歯槽骨の上顎の小白歯領域と門歯領域との間に経粘膜的に設置した。i n v i v o で設置されたインプラントにおける A a バイオフィルムの存在を検出するため、2 日後に唾液および口腔内のインプラント表面から細菌試料を回収した。A a は、培養を介してのほか、P C R 解析を介しても検出した。植え込みの 6 週間後に、インプラント周囲の骨組織および粘膜組織についてのマイクロ C T 解析および組織学解析を実施した。

40

【 0 4 1 7 】

培養の 1 日後、球状形態の A a 細胞の凝集体が、インプラント全体に散在しているのが見いだされた。2 日後、凝集体の数およびサイズは低減され、球状形態を伴う細菌間において、長さの異なるより多くの細胞が観察された。インキュベーションの 3 日後、凝集体がほとんど消滅する一方で、インプラント表面の大半の領域は、稠密に密生するバイオフィ

50

ィルムを形成する、桿状形態を伴う細菌で覆われていた。インプラントにおける、このような3日間のAaバイオフィルムに対するLIVE/DEAD(登録商標)染色が、バイオフィルムの全細菌のうちの75~80%について緑色のシグナルを示したことから、膜の完全性が損なわれていない生細胞が示される。in vivoで設置されたインプラントにおけるAaバイオフィルムについての微生物学的検出およびPCRによる検出は、インプラント表面に由来する試料については陽性であり、唾液試料ならびに対照インプラントについては陰性であった。臨床検査は、処置されていない対照のインプラントと比較して、Aaバイオフィルムを伴うインプラント周囲において、著明なインプラント周囲の粘膜炎症を裏付けた。インプラント周囲の骨組織および粘膜組織についてのマイクロCT解析および組織学解析については、保留とする。ナノテクスチャー処理したインプラント表面は、Aaバイオフィルムの確立に好適であり、インプラント周囲炎の危険性を増大させる。

10

【0418】

実験5

この実験は、ライム病を処置する干渉作用剤についての前臨床試験のためのマウスモデルを提供する。Dresserら、Pathogens、5巻(12号)、e1000680号、Epub、2009年12月4日を参照されたい。ライム病とは、米国において最も一般的なダニ媒介疾患である。報告された症例は、1992~2006年で2倍を超えており、2008年には、約29,000例の新症例が確認されている。流行地域におけるライム病の実際の症例数は、報告される症例数の6~12倍であり得ると推定されている。人口が都市部から郊外地域および農村地域へと移動し続け、オジロジカ(ダニ種であるIxodes属種を保有する)がこれらの地域を徘徊することが増大しつつあるので、定義上、これらの流行地域は拡大しつつある。ライム病は、スピロヘータである微生物Borrelia burgdorferiにより引き起こされる。B. burgdorferiは、Ixodes属種のダニの咬刺を介して伝染し、その後、血流を介して他の組織および器官へと拡散する。

20

【0419】

この動物モデルでは、C3H/HeNマウスに、背側皮下注射および腹腔内注射を介して、または静脈内注射を介してスピロヘータを注射する。感染の約7日後に、組織および器官における微生物負荷を評価し、病態を評価するために、血液検体および生検検体を回収する。本発明の方法および組成物は、感作の後に形成され、疾患の発症機序および慢性性の両方に寄与すると考えられる、結果として生じるB. burgdorferiのバイオフィルムを縮小させ、かつ/または消失させるための治療的戦略ならびに予防的戦略の両方を開発することを意図する。

30

【0420】

実験6

この実験は、嚢胞性線維症を処置する干渉作用剤についての前臨床試験のためのブタモデルを提供する。Stoltzら(2010年)、Science Translational Medicine、2巻(29号):29ra31頁を参照されたい。嚢胞性線維症とは、CF膜貫通コンダクタンス制御因子(CFTRと呼ばれる)のアニオンチャネルをコードする遺伝子の変異に起因する常染色体劣性疾患である。このモデルでは、「CFTR」と呼ばれる遺伝子内に欠損を保有するように特異的に飼育され、CFブタと呼ばれているブタが、複数の細菌種による下気道感染を包含する、CFによる肺疾患の顕著な特徴を自発的に発生させる。ブタを干渉作用剤で免疫化することは、1)これらのCFブタを、ポリペプチドまたは他の免疫原性作用剤で免疫化し、それにより、肺における細菌性バイオフィルムを根絶する抗体の形成を誘導する(実験1において示した通り、IHFに対する抗体により、能動的な免疫化の後にチンチラの中耳内に存在するバイオフィルムを根絶した方法と同様に)ことにより、または2)これらの動物の肺に、噴霧化を介して抗IHF抗体(または他の干渉作用剤)を送達し、疾患および関連する病態の徴候の改善を評価することにより可能である。

40

50

【0421】

実験7

本出願人らはまた、結核(TB)の前臨床モデルも提供する。Ordwayら(2010年)、*Anti. Agents and Chemotherapy*、54巻:1820頁を参照されたい。微生物である*Mycobacterium tuberculosis*は、広がりつつある世界的な大流行の原因である。最新の数字は、毎年約800万例の新たなTB症例が認められ、毎年約270万例がTBにより死亡していることを示唆する。HIVを伴う個体の共感染症としてのこの微生物の役割(HIVに感染する約4500万例のうち、約1/3が、*M. tuberculosis*にも共感染していると推定されている)に加えて、単離菌が、複数の薬物に対して高度に耐性となっており、四半世紀超にわたり新規のTB薬が導入されていないことも、特に、問題含みである。この動物モデルでは、SPFモルモットを、隔離コロニー内に維持し、約20cfuの*M. tuberculosis*株であるErdman K01桿菌を、それらの肺内に送達するエアゾール化スプレーを介して感染させる。感作の25、50、75、100、125、および150日後において、細菌負荷を決定し、組織病理学的評価のために組織を回収すると共に動物を屠殺する。TBの古典的な徴候を発症しないマウスと異なり、このようにして感作されたモルモットは、ヒト疾患の特徴である、中央部に壊死を伴う、十分に組織された肉芽腫を発症する。さらに、ヒトと同様に、モルモットは、原発病変複合体の一部として、排出リンパ節の化膿性肉芽腫性で壊死性の重度のリンパ節炎を発症する。このモデルの使用は、感作の後にこれらの動物の肺内で形成され、疾患の発症機序および慢性性の両方に寄与すると考えられる、結果として生じる*M. tuberculosis*のバイオフィルムを縮小させ、かつ/または消失させるための治療的戦略ならびに予防的戦略を確認および同定するための前臨床スクリーニングを提供する。

10

20

【0422】

実験8

カテーテル/留置デバイスによるバイオフィルム感染症については、複数の動物モデルが公知である。Otto(2009年)、*Nature Reviews Microbiology*、7巻:555頁を参照されたい。通常 of 皮膚微生物叢であると考えられることが典型的であるが、微生物である*Staphylococcus epidermidis*は、多くの研究者が重要な日和見病原体であるとみなす微生物となっており、院内感染の原因作用物質の第1にランクされている。第1に、この細菌は、デバイス挿入時にこの一般的な皮膚コロニー形成菌により汚染される、留置医療デバイス上で発生する感染症の大半の原因である。致死性ではないことが典型的であるが、これらのバイオフィルム感染症の処置と関連する困難により、これらのバイオフィルム感染症は、それらの頻度と組み合わせ、重篤な公衆衛生負荷となっている。米国において、血管カテーテルと関連する血流感染症の処置と関連する費用は、今日、*S. epidermidis*に起因するものだけで、毎年20億ドルに上る。*S. epidermidis*に加えて、*E. faecalis*および*S. aureus*もまた、留置医療デバイスにおいて見いだされる汚染菌である。カテーテルに関連する*S. epidermidis*感染症については、ウサギ、マウス、モルモット、およびラットを含めて複数の動物モデルが存在し、これらの全てが、発症機序の分子的機構を研究するのに用いられ、予防および/または治療薬の研究に役立っている。ラットの頸静脈カテーテルは、*E. Faecalis*、*S. aureus*、および*S. epidermidis*によるバイオフィルムの形成に干渉する療法を評価するのに用いられている。バイオフィルムの縮小は、3つの方法:(i)カテーテルを超音波処理し、CFUを計算する方法、(ii)カテーテルをスライスする、または単にプレート上に置き、スコア付けする方法、(iii)バイオフィルムをクリスタルバイオレットまたは別の色素で染色し、溶出させ、CFUの代用物としてのODを測定する方法で測定されることが多い。

30

40

【0423】

実験9

50

本明細書で説明される方法を用いて、ヒトおよび動物において免疫応答を誘発することができる。アルミニウム塩およびリポソームなどであるがそれらに限定されないアジュバントの存在下で、免疫原性組成物を、ヒト対象および動物対象に投与することができる。当業者はまた、任意の数の薬学的に許容されるアジュバントも用い得ることを理解するであろう。免疫原性組成物は、筋肉内に、皮下的に、鼻腔内に、または他の任意の適切な経路を介して、ヒト対象または動物対象に投与することができる。免疫原性組成物は、選択された投与方式と符合する形で調製することができる。免疫原性組成物は、ポリペプチド、核酸、またはそれらの組合せの形態をとることが可能であり、全長抗原を含む場合もあり、部分抗原を含む場合もある。それに加えて、またはその代わりに、免疫原性組成物は、特定の抗原でパルスしたA P Cの形態をとる場合もあり、特定の抗原をコードする1種または複数腫のポリヌクレオチドでトランスフェクトしたA P Cの形態をとる場合もある。投与は、免疫原性組成物の単回投与を含む場合もあり、初回投与の後、1回または複数回の追加投与を行う場合もある。追加投与は、初回投与の1日後、2日後、3日後、1週間後、2週間後、3週間後、1カ月後、2カ月後、3カ月後、6カ月後、もしくは12カ月後、または他の任意の時点において施すことができる。追加投与は、対象の抗体力価を評価した後で投与することもできる。

10

【0424】

実験10

本明細書で説明される方法を用いて、非免疫対象に受動免疫を付与することができる。所与の抗原に対する受動免疫は、特定の抗原を特異的に認識する、またはそれに特異的に結合する抗体または抗原結合断片の導入を介して付与される。抗体のドナーおよびレシピエントは、ヒト対象の場合もあり、非ヒト対象の場合もある。それに加えて、またはその代わりに、抗体組成物は、特定の抗原を特異的に認識する、またはそれに特異的に結合する抗体または抗原結合断片をコードする、単離されたかまたは組換え型のポリヌクレオチドを含み得る。

20

【0425】

受動免疫は、免疫原性組成物の投与がレシピエント対象に対して危険性をもたらず場合、レシピエント対象が免疫障害対象である場合、またはレシピエント対象が即時的な免疫を必要とする場合に付与することができる。免疫原性組成物は、選択された投与方式と符合する形で調製することができる。組成物は、全抗体、抗原結合断片、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、*in vivo*において産生される抗体、*in vitro*において産生される抗体、精製された抗体もしくは部分的に精製された抗体、または全血清を含み得る。投与は、抗体組成物の単回投与を含む場合もあり、初回投与の後、1回または複数回の追加投与を行う場合もある。追加投与は、初回投与の1日後、2日後、3日後、1週間後、2週間後、3週間後、1カ月後、2カ月後、3カ月後、6カ月後、もしくは12カ月後、または他の任意の時点において施すことができる。追加投与は、対象の抗体力価を評価した後で投与することもできる。

30

【0426】

実験11

DNA B I Iファミリーのメンバーは、遺伝子転写を含め、複数のヌクレオタンパク質系に対して高度に多機能的であり、さらに、このため、不可欠であることが多い。これに対し、H U変異体およびI H F変異体はいずれも、実験室のE . c o l i株において産生されており、広範に研究されている。I H Fタンパク質およびH Uタンパク質が、e D N Aの形成においていかなる役割を果たしているのかを決定するために、E . c o l iのM G 1 6 5 5株またはそのH U欠損誘導体およびI H F欠損誘導体により形成されるバイオフィルムを、抗I H F抗体(G r a n s t o nおよびN a s h (1 9 9 3年)、J . M o l . B i o l .、2 3 4巻：4 5 ~ 5 9頁において説明される通りに調製される)と共にインキュベートした。図8に示す通り、親単離株であるM G 1 6 5 5株が、*in vitro*において堅調なバイオフィルムを生じた(パネルA)のに対し、H U変異体株およびI H F変異体株のいずれにより生じたバイオフィルムもそれほど堅調ではなかった(

40

50

それぞれ、パネルCおよびE)。HU欠損変異体により生じたバイオフィルムの高さは、野生型のバイオフィルムの高さの約1/2であり、IHF欠損株により生じたバイオフィルムの高さは、親単離株の高さの約2/3であった。この結果は、いずれのタンパク質も、E.coliによるバイオフィルムの細胞外多糖(EPS)の産生および/または完全性に関与していることを示唆した。抗IHF抗体で処置した後、野生型の単離株により形成されるバイオフィルムは、顕著なデバルキング、および平均の高さにおける58.1%の低減百分率、バイオマスにおける73.1%の低減百分率、平均の厚さにおける87%の低減を示したのに対し(パネルB)、HU変異体により形成されたバイオフィルムは、高さの低減を示さず、バイオマスにおける30.9%の低減、平均の厚さにおける37.2%の低減を示すに過ぎなかった(パネルD)。これに対し、IHF変異体により形成されるバイオフィルムに対しては、高さの低減の点でも効果が観察されず(-3.4%の低減)、バイオマスの低減の点でも効果が観察されず(-20.5%の低減)、平均の厚さの点でも効果が観察されなかった(-19.8%の低減)(パネルF)。まとめると、これらのデータは、このE.coli株については、IHFが、抗IHF抗体を用いることにより標的とし得る唯一の構造的エレメントである可能性が高いことを示した。現在のところ認められているのは、in vivoにおいて形成された、バイオフィルムにおいて高度に構造化されて織り込まれたeDNAだけであるので、それぞれの個別の変異体による、残りのDNABIファミリーメンバーの発現、および結果として得られるDNA構造における任意の変化を確認するには、in vivoにおける免疫蛍光解析が待たれる。

10

20

【0427】

実験12

in vitroおよびin vivoにおける本出願では、抗IHF抗体および免疫原としてのIHFの使用のいずれもが、それぞれ、バイオフィルムをデバルキングし、かつ/またはバイオフィルム疾患を消失させるのに有用性を示すことが裏付けられたが、また、抗IHF抗体によるNTHIバイオフィルムのデバルキングも、他の処置モダリティーと共に用いた場合、相乗作用を可能とし得るかどうかは未知であった。この目的で、最適未満濃度の抗IHF抗体を、3つの固有の試薬のそれぞれのうちの1つと共に用いた場合において、あらかじめ形成されたNTHIバイオフィルムの構造的不安定化の増大を誘導する能力を評価した。これらの3つの試薬には、1) in vitroにおいてNTHIバイオフィルムの分解が可能であることが公知であるDNA分解酵素(DNアーゼI)(しかし、ここでは、最適未満濃度で用いる)、2) 単独で用いた場合に、あらかじめ形成されたNTHIバイオフィルムを不安定化させなかった、NTHIの外膜タンパク質に対する抗血清(抗OMP P5抗血清)(データは示さない)、ならびに3) 慢性OMおよび/または再発性OMを伴う小児における第一選択薬として用いられることが典型的であるが、バイオフィルム群落内に存在する細菌に対する有効性は限定されている抗生薬(アモキシリン)を包含する。

30

【0428】

図14Aは、最適未満であることが示されている濃度のDNアーゼによるNTHIバイオフィルムの処置がそれほどの効果を及ぼさないことを示す(図14A IIを参照されたい)。同様に、抗IHF抗体の1:200の希釈液も、あらかじめ形成されたNTHIバイオフィルムに対してほとんど効果を及ぼさなかった(図14A IIIを参照されたい)。しかし、これに対して、これらの2つの試薬を併せて用いたところ、バイオフィルムは顕著に縮小された(図14A IVを参照されたい)。この実験を3回にわたり反復したところ、本発明者らは、バイオフィルムに対する最も顕著なデバルキングの相乗効果は、高さの低減として測定されることを見いだした。以下の表7は、これらの結果を示す。

40

【0429】

【表 7】

表 7

	DNアーゼ	抗 IHF	DNアーゼ+ 抗 IHF	
最大の高さ (μm)	3.9	37.3	51.0	アッセイ 1
最大の高さ (μm)	-11.5	16.4	37.7	アッセイ 2
最大の高さ (μm)	-1.6	19.4	38.7	アッセイ 3

この結果に対する1つの簡単な説明は、バイオフィルムの外面から遠い位置でDNA B I Iタンパク質の力価が決定されているので、eDNAが、DNアーゼの作用をより受けやすくなるということであった。

10

【0430】

図14Bは、あらかじめ形成されたNTHIバイオフィルムにおける抗OMP P5抗血清による処置の結果を示す。この抗血清は、単離されたNTHI株のOMP P5タンパク質と強く反応性であり(データは示さない)、さらに、単離OMP P5タンパク質による能動的な免疫化は、チンチラモデルにおける実験によるOMに対して著明な防御を媒介するのに有効である(例えば、25. Bakaletzら(1997年)、Vaccine、15巻(9号):955~961頁; Bakaletzら(1999年)、Infect Immun、67巻(6号):2746~2762頁; Kennedyら(2000年)、Infect Immun、68巻(5号):2756~2765頁; Kyd JMら(2003年)、Infect Immun、71巻(8号):4691~4699頁; Novotny LAら(2000年)、Infect Immun、68巻(4号):2119~2128頁; Novotny LAら(2002年)、Vaccine、20巻(29~30号):3590~3597頁; およびNovotny LAら(2003年)、J Immunol、171巻(4号):1978~1983頁を参照されたい)が、この抗血清は、1:50の希釈率で用いる場合、in vitroで形成されたNTHIバイオフィルムの構造的完全性の変化を誘導しない(図14B IIを参照されたい)。同様に、これらのバイオフィルムを、最適希釈率未満の抗IHF抗血清(ここでは、1:100の希釈率で用いる)と共にインキュベートした場合に観察された効果もわずかなものであった(図14B Iを参照されたい)。しかし、抗P5抗血清および抗IHF抗血清を組み合わせて用いたところ、2つの抗血清を単独で用いた場合の合計を上回る高さのバイオフィルムが結果として低減された(図14B IIIを参照されたい)ことから、相乗効果が示される。したがって、抗IHF抗体を用いてNTHIのEPSマトリックスを不安定化させると、これを用いなければeDNAならびに恐らくEPSの他の成分により覆い隠される、標的とされる細菌細胞の表面タンパク質(例えば、OMP P5タンパク質)の露出を結果としてもたらすことから、なおも未知である機構による免疫を介する細菌の除去が可能となることが結論付けられた。

20

30

【0431】

最後に、図14Cは、アモキシシリンによる、あらかじめ形成されたNTHIバイオフィルムの処置の結果を示す。64 μg/mlの濃度で用いた場合、アモキシシリンは、細菌細胞を限定的に死滅させる証拠にもかかわらず、あらかじめ形成されたNTHIバイオフィルムの構成に対して測定可能な効果を及ぼさなかった(図14C IIを参照されたい)。1:50の希釈率におけるIHF抗血清で処置したところ、すでに示した通り(図14C IIIを参照されたい)、バイオフィルムの高さが実質的に低減された。しかし、興味深いことに、2つの試薬を同時に用いたところ、バイオフィルムの高さが劇的に低減される(図14C IVを参照されたい)だけでなく、生存を示す色素を用いると、画像化されたバイオフィルム内の赤色チャネルの蛍光が優越することにより注意される通り、バイオフィルム中に残存する細菌の大半は今や死滅していることも示された。この結果は、抗IHF抗体によるバイオフィルムのデバルキングが、浮遊性のNTHIに対してアッセイした場合に有効であることが公知のアモキシシリン濃度に対する感受性により近い条

40

50

件を創出するのに十分な程度に細菌を露出させる可能性が高いことを示した。この結果は、残存するバイオフィルムマトリックス内の細菌のアモキシシリンの作用に対する物理的な曝露を増大させることを介する可能性もあり、かつ/または、本発明者らがかつて示した通り、細菌の浮遊相への放出を増大させることにより、抗IHF抗体に曝露することを介して、バイオフィルムのデバルキング時に生じる可能性もある(図4を参照されたい)。

【0432】

実験13

本出願人らは、経皮的な免疫化による抗IHF抗体の誘導が、チンチラの中耳におけるNTHI誘導性バイオフィルムを消失させるのに有効であることを示した。また、TCI 10
 的免疫化およびSQ的な免疫化のいずれの後でも示される通り、抗IHF抗体がeDNAに結合すると、防御的エピトープが遮蔽されると考えられるので、天然のIHFタンパク質の使用が防御的免疫応答の誘導に不可欠であることも示された。しかしながら、広範な防御効果を有する可能性が高いワクチン候補物質の合理的なデザインには、実のところ、明らかでない可能性もあり、必ずしも連続していない可能性もある、このタンパク質の免疫優勢エピトープおよび/または防御性エピトープについての詳細な理解が必要とされる。現在のワクチン候補物質のデザイン戦略は、それらの手法においてより還元主義的であり、アビディティーが高度な抗体および防御的な抗体の誘導に絶体的に必要な、標的とされるタンパク質の部分だけを同定し、用いることを目的とすることが多い。この目的で、エピトープマッピングを行い、最も有効な免疫原を決定する。 20

【0433】

エピトープマッピングは、Novotnyら(2009年)、Vaccine、28巻 : (1号) : 279~289頁において説明される通りに、以下の手順に従って実施することができる。免疫血清を産生するためには、アジュバントであるモノホスホリル脂質A (MPL、Corixa)と共混合して投与される、10 μ gの天然のIHFタンパク質、IHFのC末端の20アミノ酸のポリペプチド、IHFのC末端の20アミノ酸のポリペプチド、もしくはTBP-DNABIタンパク質のアミノ酸60~76のポリペプチドを皮下(SQ)注射することにより、またはMPL単独(アジュバントだけの対照コホート)により、チンチラを非経口的に免疫化することができる。同一の追加投与を、21日間の間隔で2回にわたり送達することができる。血清のための血液は、最終回の免疫化投与を受けた10日後に回収することができる。チンチラ抗血清に対して、酵素免疫測定アッセイ(ELISA)およびウェスタンブロット法を実施することができる。ELISAの場合、血清は、送達した免疫原(ウェル1個当たり0.2 μ gのタンパク質)に対して、96ウェルプレートフォーマットでアッセイすることができる。力価は、血清を除く全ての成分を含有する対照ウェルより0.1大きいOD450値をもたらす血清希釈率の逆数として定義することができる。ELISAアッセイは、最低3回にわたり実施することができる。結果は、幾何平均として報告する。ウェスタンブロット法は、1:100に希釈した免疫血清を用いて、それぞれの免疫原1 μ gずつに対して実施することができる。HRP-プロテインA(Zymed、South San Francisco、CA)により検出することができる。発色は、CN/DAB基質(Pierce、Rockford、IL)によった。 30

【0434】

NTHIのIHFタンパク質をエピトープマッピングするために、5残基が重複する、一連の20マーの合成ペプチドを合成することができる。全ての合成ペプチドの合成、精製、および配列確認は、標準的な技法に従い実施することができる(例えば、Bakalietz LO.ら(1997年)、Infect. Immun.、71巻(8号) : 4691~9頁;およびBakalietz LO.ら(2001年)、Vaccine、68巻(4号) : 2119~28頁を参照されたい)。アミノ酸解析および質量分析を用いて、それぞれのペプチドの純度、組成、およびアミノ酸配列を確認することができる。 40

【0435】

10

20

30

40

50

合成ペプチドと血清中に存在する抗体との相互作用の解析については、説明される通りに Biacore 3000 装置を用いて検討することができ、全ての試薬は、Biacore (Uppsala, Sweden) から購入することができる。略述すると、ペプチドを酢酸ナトリウム緩衝液中に懸濁させてから、アミン結合化学反応を用いて、活性化させた試薬グレードの CM5 センサーチップの表面に固定化することができる。相互作用を解析するためには、15 μ l の血清 (HBS-EP 緩衝液および 1 ml 当たり 1 mg のカルボキシメチルデキストラン中で 1 : 2 に希釈された) を、5 μ l / 分の流速で、センサーチップ表面を介して注射することができる。それぞれの試料中の抗原特異的抗体および免疫原特異的抗体の相対量は、それぞれの試料を注射する 5 秒前およびそれぞれの試料を注射した 45 秒後に得られる共鳴単位 (RU) の差違として計算することができる。試料間におけるセンサーチップ表面の再生は、25 mM の NaOH により行うことができる。血清中に存在する抗体との相互作用が最も強力な合成ペプチドが、*in vivo* においてアビディティーの高い防御的抗体を誘導することが可能な防御的エピトープの最も有望な候補物質であり得る。

10

20

30

40

50

【0436】

ウサギポリクローナル抗血清は、エピトープマッピングによる免疫原性の最も高いペプチドに対して産生することができる。この抗血清を用いて、カラムクロマトグラフィーを介して、中和抗体を非中和抗体からアフィニティー精製することができる。そのようにするためには、ウサギポリクローナル抗血清およびチンチラポリクローナル抗血清の両方 (後者は防御性であることが示されている) を用いることができる。それぞれの血清に、天然の IHF を結合させたカラム上、または DNA とあらかじめ混合した IHF を結合させたカラム上を流過させる前ならびに流過させた後に血清をアッセイすることができる。DNA-IHF 複合体には結合しない抗体だけを中和抗体とする。次いで、NTHI バイオフィルムをデバルキングする相対的能力についての本発明者らによる *in vitro* におけるバイオフィルムアッセイにより、ならびに、特異性および力価を決定するための ELISA アッセイ、ウェスタンブロットアッセイ、およびバイオセンサーアッセイを介して、全ての流過物および溶出させた抗血清を、元の抗血清プールに照らしてアッセイした。追加的な試験として、エピトープを標的とするワクチン候補物質をカラムに結合させて、これらにより、今や中和抗体であることが分かった抗体を取り出し得るかどうかを決定することができる。

【0437】

本発明を、上記の実施形態と共に説明してきたが、前出の説明および例は、本発明の例示を目的とするものであり、本発明の範囲の限定を目的とするものではないことを理解されたい。本発明の範囲内にある他の態様、利点、および改変は、本発明が関連する技術分野における当業者には明らかであろう。

【0438】

別段に定義しない限り、本明細書で用いられる技術用語および科学用語は、本発明が属する技術分野における当業者により一般的に理解される意味と同じ意味を有する。本明細書で提示される全てのヌクレオチド配列は、5' から 3' への方向で示される。

【0439】

本明細書において例示的に説明された本発明は、本明細書で具体的に開示されていない、1 つまたは複数の任意の要素、1 つまたは複数の任意の限定が存在しない場合にも、適切に実施することができる。したがって、例えば、「~を含む」、「~を包含する」、「~を含有する」などの用語は、外延的に、かつ限定なしに読まれるものとする。加えて、本明細書で用いられる用語および表現は、説明を目的として用いられるものであり、限定を目的として用いられるものではなく、示され、かつ、説明される特徴またはその部分の任意の等価物を除外する、このような用語および表現の使用を意図するものではなく、特許請求される本発明の範囲内にある多様な改変が可能であると認識される。

【0440】

したがって、本発明は、好ましい実施形態により具体的に開示されているが、本明細書

で開示される任意選択の特徴、改変、改善、および変更も当業者により回復される場合があり、このような改変、改善、および変更は、本発明の範囲内にあるものと考えられることを理解されたい。本明細書で提示される材料、方法、および例は、好ましい実施形態を示すものであり、例示的なものであり、本発明の範囲に対する限定として意図されるものではない。

【0441】

本明細書では、本発明について、広範かつ一般的に説明してきた。本一般的な開示の範囲内に収まる、より狭い範囲内にある種類、および垂属の群分けのそれぞれもまた、本発明の一部を形成する。これは、除外される材料が、本明細書で具体的に列挙されているかどうかにかかわらず、属から任意の対象物を除外する条件または否定的限定を伴う本発明の一般的な説明を包含する。

10

【0442】

加えて、本発明の特徴または態様が、マーカッシュ群との関係で説明される場合、当業者は、本発明がまた、それにより、マーカッシュ群の任意の個別のメンバーまたはマーカッシュ群のメンバーの垂群との関係でも説明されることを認識するであろう。

【0443】

本明細書で言及される全ての刊行物、特許出願、特許、および他の参考文献は、それぞれが参照により個別に組み込まれるのと同程度に、参照によりそれらの全体において明示的に組み込まれる。齟齬が生じた場合は、定義を含め、本明細書に従う。

【0444】

20

【表 8 - 1】

表 8

グラム陽性菌：HUだけを有する。グラム陰性菌：全部がHUを有し、一部はまたHFも有する。

細菌株	略号	タンパク質の名称(複数可)	(HU) (完全には配列決定されていない)
<i>S. sobrinus</i> 6715	Ss	1310	(HU)
<i>S. pyogenes</i> MGAS10270	Spvog	Spv1239	(HU)
<i>S. gordonii</i> Challis NCTC7868	Sg	SGO_0701	(HlpA)
<i>S. agalactiae</i> (B群 Strep)2603V/R	GBS	SAG_0505	(Hup)
<i>S. mutans</i> UA159	Sm	Smu_589	(HU)
<i>S. pneumoniae</i> R6	Spneu	spr1020	(HU)
<i>S. gallolyticus</i> UCN34 (<i>S. bovis</i>)	Sgall	YP_003430069	(HlpA)
<i>S. aureus</i> MW2	Sa	MW1362	(HU)
<i>S. epidermidis</i> RP62A	Se	SERP1041	(Hup)
<i>E. coli</i> K12-MG1655	Ec	b1712	(HimA)
		b0912	(HimD)
			(HupA)
			(HupB)
<i>H. influenzae</i> KW20 Rd	Hi	HI1221	(HimA)
		HI1313	(HimD)
		HI0430	(HupA)

10

20

30

40

【 0 4 4 5 】

【表 8 - 2】

Salmonella enteric serovar typhi CT18	Salm	Sty1771	(HimA)
		Sty0982	(HimD)
Aggregatibacter actinomycetemcomitans D11S-1	Aa	YP_003255965	(IHF 7N77)
		YP_003256209	(IhFB)
P. gingivalis W83	Pg	YP_003255304	(HU)
		PG_0121	(Hup-1)
		PG_1258	(Hup-2)
N. gonorrhoeae FA1090 (Oklahoma)	Ng	NGO603	(IHF3)
		NGO030	(IHFα)
N. meningitides MC58	Nm	NMB_0729	(HimA)
		NMB_1302 PA3161	(HimA) (HimD)
P. aeruginosa	Pa	PA1804	(HupB)
H. pylori 26695	Hp	PA2758	(HimA)
		Hp0835	(Hup)
B. burgdorferi B31	Bb	BB_0232	(Hbb)
		YP_003626307	(HimA)
Moraxella catarrhalis RH4	Mc	YP_003627027	(HimD)
		YP_003626775	(HupB)

【 0 4 4 6 】

10

20

30

【表 8 - 3】

表8(続き)

<i>V. cholera</i> El Tor N16961	Vc	VC_0273	(HupA)
		VC_1914	(HipB)
		VC_1919	(HupB)
		VC_1222	(HimA)
<i>Burkholderia cenocepacia</i> HI2424	Bc	Bcen2424_1048	(IHFB)
		Bcen2424_1481	(IHFA)
<i>Burkholderia pseudomallei</i> 668	Bp	BURPS668_2881	(IHFB)
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> CDC1551	MTb	BURPS668_1718	(IHFA)
		MT_3064	(HU)
<i>Mycobacterium smegmatis</i> MC2	Ms	MSMEG_2389	(Hup)
<i>Treponema denticola</i> ATCC 35405	Td	TDE_1709	(HU)
<i>Treponema palladium</i> Nichols	Tp	TP_0251	(DNA結合タンパク質II)
<i>Prevotella melaninogenica</i> ATCC 25845	Pm	PREME0022_2103	(HupB)
		PREME0022_0268	(HupA)
<i>Prevotella intermedia</i> 17	Pi	PREME0022_0341	(Hup)
		PREME0022_0340	(HimA)
		PIN_A0704	(Hup)
		PIN_A1504	(Hup-2)
<i>Bordetella pertussis</i> Tohama 1	Bpert	PIN_0345	(HimA)
		PIN_0343	(仮説的タンパク質)
		BP2572	(Ihfa)

【 0 4 4 7 】

10

20

30

40

【表 8 - 4】

BP3530 (HupB)
BP0951 (HfB)
Ef1550 (hup)

Ef

Enterococcus faecalis V583

10

20

30

【 0 4 4 8 】

【表 9 - 1】

9A	9A (続き)
----	------------

配列番号42~72:それぞれ、出現の順に示す

Ec_HimA	-----MALTKAEMSEYLFDKLG-LS-----	KDAKELVELFFEEIRRALEN	
Salm_HimA	-----MALTKAEMSEYLFDKLG-LS-----	KDAKELVELFFEEIRRALEN	
Vc_HimA	-----MALTKAELAEALFEQLG-MS-----	KDAKDTVEVFFEEIRKALES	
Pa_HimA	-----MGALTKAEIAERLYEELG-LN-----	KREAKELVELFFEEIRQALEH	
Hi_HimA	-----MATITKLDITIEYLSDKYH-LS-----	KQDTKNVVENFLEEIRLSLES	10
Aa_IHF アルファ	-----MTLTKVELAENLIEKFH-LS-----	KREAKDLVESFFEEIRVALET	
Mc_HimA	-----MGALTKADMVDELTIRLR-LT-----	RQARKLVDGFFEEISQSLAQ	
Ng_IHF アルファ	-----MTLTKAELADILVDKVSNTV-----	KNDAKEIVELFFEEIRSTLAS	
Nm_HimA	-----MTLTKAELADILVDKVSNTV-----	KNDAKEIVELFFEEIRSTLAS	
Bc_IHFA	+30aa ASTE-TPTLTKAELAEELLFDSVG-LN----	KREAKDMVEAFFEVIRDALEN	
Bp_IHFA	+27aa TSAGDTPTLTKAELAEELLFDSVG-LN----	KREAKDMVEAFFEVIRDALEN	
Bpert_IhfA	MGTTMLAEPRTLTKAELAEELLFERVG-LN----	KREAKDIVDTFFEEIRDALAR	20
Pm_HimA	-----MNNKEFIAAALARTGYT-----	QDESQKMVKTVVDMGKSFET	
Pi_HimA	-----MNNKEFITALANRVGRS-----	QDETQKLVKTALQAMGDNFES	
Tp_Dbp II	-----MKRVRRTSRFVVDALCDEV DLS-----	RKHVARVVD SFVSVVTAALER	
Pm_Hup	-----MAKSAIQLITSALAKQHNS-----	ADDAAAFVDAFFDIISSELKN-	
Pi_hypo	-----MAKTALQLIADAVAKKHKIT-----	VKEAEKFVSAIFDVVNEGLKT	
Sa_HU	-----MNKTDLINAVAEQADLT-----	KKEAGSAVDAVFESIQLNSLAK	
Ec_hupA	-----MNKTQLIDVIAEKAELS-----	KTQAKAALESTLAAITESLKE	30
Se_Hup	-----MNKTDLINAVAEQADLT-----	KKEAGSAVDAVFESIQLNSLAK	
Ss_Hu	-----MANKQDLIAKVAEATELT-----	KKDSAAAVDTVFS SIEGFLSK	
Spyog_HU	-----MANKQDLIAKVAEATELT-----	KKDSAAAVDAVFSTIEAFLAE	
Sgall_HlpA	-----MANKQDLIAKVAEATELT-----	KKDSAAAVDAVFAAVTEYLSK	
GBS_Hup	-----MANKQDLIAKVAEATELT-----	KKDSAAAVDAVFAAVADYLAE	
Spneu_HU	-----MANKQDLIAKVAEATELT-----	KKDSAAAVEAVFAAVADYLAA	
Sg_HlpA	-----MANKQDLIAKVAEATELT-----	KKDSAAAVDAVFAAVTEYLSK	
Sm_HU	-----MANKQDLIAKVAEATELT-----	KKDSAAAVDAVFS AVSSYLAK	
Ef_Hup	-----MANKAELIENVASSTGLT-----	KKDATAAVDAVFSTIQETLAK	
Hi_HupA	-----MNKTDLIDAIANAELN-----	KKQAKAALEATLDAITASLKE	
Vc_HupA	-----MNKTQLIDFIAEKADLT-----	KVQAKAALEATLGAVEGALKD	40
Pa_HupB	-----MNKSELIDAIASADIP-----	KAVAGRALDAVIESVTGALKA	

表 9A1

【 0 4 4 9 】

【表 9 - 2】

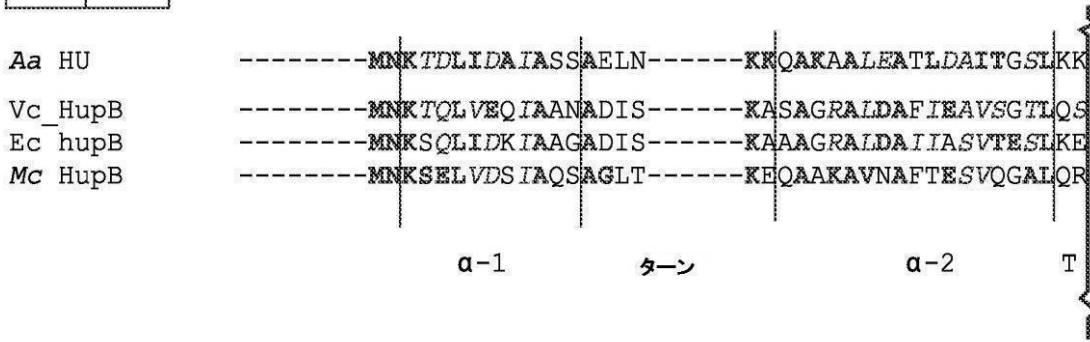
GEQVKLSGFGNFDLRDKNORP-GRNP	ITGEDIPITARRVV	TFRPGOKLKS	RVENASPKDE-	
GEQVKLSGFGNFDLRDKNORP-GRNP	ITGEDIPITARRVV	TFRPGOKLKS	RVENASPKEE-	
GEQVKLSGFGNFDLRDKNERP-GRNP	ITGEDIPITARRVV	TFRPGOKL	KARVENIKVEK--	
NEQVKLSGFGNFDLRDKRORP-GRNP	ITGEEIPITARRVV	TFRPGOKL	KARVEAYAGTKS-	
GQDVKLSGFGNFELRDKSSRP-GRNP	ITGDVVPVSARRVV	TFKPGOKL	RARVEKTK-----	
GNDVKLSGFGNFELRDKASRP-GRNP	ITGESVPVSARRVV	VFKPGOKL	RNRVEKVKPKA-	
GHEVKLSGFGNFELKDKKPRP-GRNP	ITGESVPIQARRVV	TFKAGOKL	RGWIDSONEG	
GEEIKISGFGNFQLRDKPQRP-GRNP	ITGEEVPITARRVV	TFHASOKL	KGMVEHYDYKQR-	10
GEEIKISGFGNFQLRDKPQRP-GRNP	ITGEEVPITARRVV	TFHASOKL	KSMVEHYDYKQR	
GESVKLSGFGNFQLRDKPQRP-GRNP	ITGEAIPIAARRVV	TFHASOKL	KALVENGAE	
GESVKLSGFGNFQLRDKPQRP-GRNP	ITGEAIPIAARRVV	TFHASOKL	KALVENGAEPLAR	
GDSVKLSGFGNFQVRDKPPRP-GRNP	ITGETIPIAARRVV	TFHASOKL	KSVEQPNSPPDPASAE	
GDPVPVIGFGTFEVKKRLERV-MVNP	STGLRMLVPPKLV	NFKPAATIK	GHVRKGGQDNG	
GEPVLVSGFGSFEVKKRLERI-MTNP	ATGLRMLVPPKLV	NFRATASV	KEKLGKGGAE	20
GETVELRDFGVFESRVRKASV-GKS	INTGEVVSIPSHCVV	VFRPSKRL	KSAVRGYRSGEVGD	
GNQVKIKGLGTFKQAVKPR-ESV	VNITGERV	LIEGHDKIS	SFTPDTVMKELVNKPF	SQFET +354aa
DKLVKVKGLGTFKQAVKPR-ESV	VNITGERV	LIEGHEKVS	SFTPDATMKELVNKPF	QAQFET +283aa
GEKVQLIGFGNFEVRERAARK-GRNP	POTGKEIDIPASKVPAFKAGK	KALKDAVK	-----	
GDAVQLVGFGTFFKNHRAERT-GRNP	POTGKEIKIAANVPAFVSGK	KALKDAVK	-----	
GEKVQLIGFGNFEVRERAARK-GRNP	POTGKEIDIPASKVPAFKAGK	KALKDAVK	-----	
GEKVQLIGFGNFEVRERAARK-GRNP	POTGAEIKIAASKVPAFKAGK	KALKDAVK	-----	
GEKVQLIGFGNFEVRERAARK-GRNP	POTGAEIEIAASKVPAFKAGK	KALKDAVK	-----	30
GEKVQLIGFGNFEVRERAARK-GRNP	POTGEEIEIAASKVPAFKAGK	KALKDAVK	-----	
GEKVQLIGFGNFEVRERAARK-GRNP	POTGAEIEIAASKVPAFKAGK	KALKDAVK	-----	
GEKVQLIGFGNFEVRERAERK-GRNP	POTGKEMTIAASKVPAFKAGK	KALKDAVK	-----	
GEKVQLIGFGNFEVRERAARK-GRNP	POTGKEIKIAASKVPAFKAGK	KALKDAVK	-----	
GEKVQLIGFGNFEVRERAARK-GRNP	POTGEEKIKASKVPAFKAGK	KALKDAVK	-----	
GEKVQLIGFGNFEVRERAARK-GRNP	POTGOEIQIAASKVPAFKPGK	KALKDAVK	-----	
GEPVQLIGFGTFFKNERAART-GRNP	POTGAEIQIAASKVPAFVSGK	KALDAIK	-----	
GDOVQLIGFGTFFKNHRSART-GRNP	POTGEEIKIAANVPAFVAGK	KALDAIK	-----	
GDSVVLVGFGTFAVKERAART-GRNP	POTGKPIKIAAAKIPGFKAGK	KALDAVN	-----	
	結合ドメイン	リターニング		
	β-1 T β-2	ターン	ストランド	β-3 α-3
	-----アーム-----			

表 9A1 (続き)

【表 9 - 3】

9A2	9A2 (続き)
-----	-------------

配列番号73~76:それぞれ、出現の順に示す

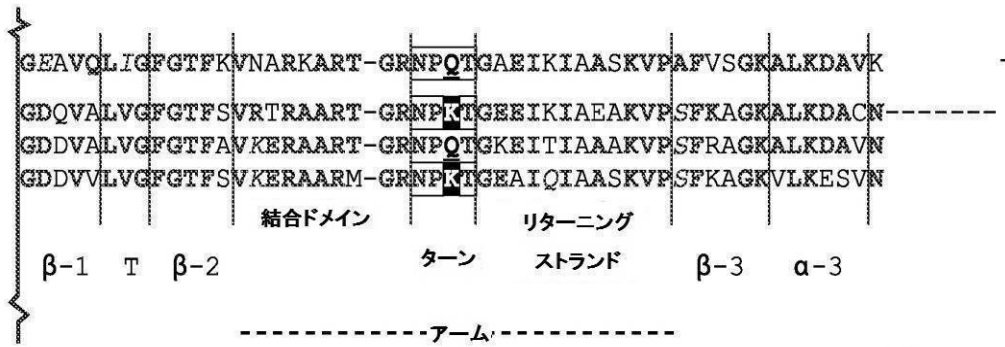


10

表 9A2

【 0 4 5 1 】

【表 9 - 4】



20

表 9A2 (続き)

30

【 0 4 5 2 】

【表 9 - 5】

9A3	9A3 (続き)
-----	-------------

配列番号77~100:それぞれ、出現の順に示す

Bpert HupB	-----MNK TELIDHIASKADIS-----KAAAGRSIDALIGAVKTTLKK	
Mc HimD	---MQAVINKSNLIANLASVCEEL---EEDVVDEAVRLMIAMMVNELVY	
Pm HupB	-----MNK TELIEKIAANA EVS-----KAAAKKALDATTEAIKEALAA	
Pi Hup	-----MNK TELIEKIAAGAGLS-----KADSKKALDAMTAAIKEALVA	
Td HU	-----MKQKRSKIDIIDSVYRNNPQYQLKQINAIANLFLDEL SVLLQQG	10
Pg_Hup-1	-----MNK TDFIAAVA EKANLT-----KADAQRAVNAFAEVVTEQNA	
Hp_Hup	-----MNKAEFIDL VKEAGKYNS-----KREAE EAI SAFTLAVETALSK	
Pm HupA	-----MTKADIINEIATSTGIA-----KKDVS AVVESFMEFIKDSLLE	
Pi Hup-2	-----MTKADIINEIASS TGIS-----KKDVS AVVESFMDAIKDSLLE	
Pg_Hup-2	-----MTKADVNAIAKSTGID-----KETTLLKVVESFMDTIKDSLSE	
Mt HU	-----MNKAE LIDVLTQKLGSD-----RQATAAVENVVDTIVRAVHK	
Ms Hup	-----MNKAE LIDVLTTKMGTD-----RQATAAVENVVDTIVRAVHK	
Ec_HimD	-----MTKSELIERLATQOS-----HIPAKTVEDAVKEMLEHMASTLAC	
Salm_HimD	-----MTKSELIERLATQOS-----HIPAKAVEDAVKEMLEHMASTLAC	
Vc_HipB	-----MTKSELIERLCAEQT-----HLSAKETIEDAVKNILEHMASTLEA	
Pa_HimD	-----MTKSELIERIVTHQG-----QLSARDVELAIKTMLEQMSQALAI	20
Hi_HimD	-----MTKSELMEKLSAKOP-----TLPAREIENMVKGILEFISQSIEN	
Aa_IHFB	-----MTKSELIELLVQKNS-----NIPVKHVEEAVKAI LEQMSYVLEH	
Ng_IHFB	-----MVR LAEVFAAKNGTHLLAKDVEYSVKVLVDTMTRSLAR	
Nm_HimD	-----MTKSELMVRLAEVFAAKNGTHLLAKDVEYSVKVLVDTMTRSLAR	
Bc_IHFB	-----MTKSELVAQLASRFP-----QLVLKDADFAVKTMLDAMSDALAK	
Bp_IHFB	-----MTKSELVAQLASRFP-----QLVLKDADFAVKTMLDAMSDALSK	
Bpert_IhfB	-----MTKSELIAAL AARYP-----QLAARDTDYAVKTMLDAMTQALAS	
Bb_Hbb	MSFSRRPKVTKSDIVDQISLNIKNNNL-KLEKKYIRLVIDAFFEELKSNLCS	30

a-1 ターン a-2 T

表 9A3

【表 9 - 7】

配列番号101~128:それぞれ、出現の順に示す

Liuらによる16アミノ酸のペプチドモチーフとの比較

<i>Strep</i> 内部 HU	EVRERAARK-GRNPQTG	
<i>Ec</i> HimA	DLRDKNQRF-GRNPKTG	
<i>Salm</i> HimA	DLRDKNQRF-GRNPKTG	
<i>Vc</i> HimA	DLRDKNERF-GRNPKTG	
<i>Fa</i> HimA	DLRDKRQRF-GRNPKTG	
<i>Hi</i> HimA	ELRDKSSRF-GRNPKTG	10
<i>Aa</i> IHFアルファ	ELRDKASRF-GRNPKTG	
<i>Mc</i> HimA	ELKDKKRF-GRNPKTG	
<i>Ng</i> IHFアルファ	QLRDKPQRF-GRNPKTG	
<i>Nm</i> HimA	QLRDKPQRF-GRNPKTG	
<i>Bc</i> IHFA	QLRDKPQRF-GRNPKTG	
<i>Bp</i> IHFA	QLRDKPQRF-GRNPKTG	
<i>Bpert</i> Ihfa	QVRDKPPRF-GRNPKTG	
<i>Pm</i> HimA	EVKKRLERV-MVNESTG	
<i>Pi</i> HimA	EVKKRLERI-MTNEATG	
<i>Tp</i> Dbp II	ESRVRKASV-GKSIKTG	20
<i>Pm</i> Hup	KVQAVKPR-ESVNVMTG	
<i>Pi</i> hypo	KVQAVKPR-ESVNVMTG	
<i>Sa</i> HU	EVRERAARK-GRNPQTG	
<i>Ec</i> hupA	KVNHRART-GRNPQTG	
<i>Se</i> Hup	EVRERAARK-GRNPQTG	
<i>Ss</i> Hu	EVRERAARK-GRNPQTG	
<i>Spyog</i> HU	EVRERAARK-GRNPQTG	
<i>Sgall</i> HlpA	EVRERAARK-GRNPQTG	
<i>GBS</i> Hup	EVRERAARK-GRNPQTG	
<i>Spneu</i> HU	EVRERAARK-GRNPQTG	
<i>Sg</i> HlpA	EVRERAARK-GRNPQTG	
<i>Sm</i> HU	EVRERAARK-GRNPQTG	30

表 9B

【 0 4 5 5 】

【表 9 - 8】

配列番号129~139:それぞれ、出現の順に示す

<i>Ef</i> Hup	EVRERAARK-GRNPQTG	
<i>Hi</i> HupA	KVNERAART-GRNPQTG	40
<i>Vc</i> HupA	KVNHRART-GRNPQTG	
<i>Bpert</i> HupB	AVSARAART-GRNPQTG	
<i>Fa</i> HupB	AVKERAART-GRNPQTG	
<i>Aa</i> HU	SVRTAART-GRNPKTG	
<i>Pm</i> HupB	ATTERPAHE-GINPRSK	
<i>Pi</i> Hup	SVTERPAHE-GINPAIK	
<i>Td</i> HU	FAVLHGR-KNARNEKIG	
<i>Pg</i> Hup-1	SVSERAARK-GINPKIK	
<i>Hp</i> Hup	ETAEQKKE-GKVEGSD	

表 9B (続き)

【 0 4 5 6 】

【 表 9 - 9 】

配列番号140~159:それぞれ、出現の順に示す
Liuらによる16アミノ酸のペプチドモチーフとの比較

<i>Pm</i> HupA	FIVK H R A E K T A R N I S K N
<i>Pi</i> Hup-2	FIVK H R A E K T A R N I S K N
<i>Pg</i> Hup-2	I V K R A E K T - A R N I S K Q
<i>Mt</i> HU	E Q R R R A A R - V A R N P E T G
<i>Ms</i> Hup	E Q R R R A A R - V A R N P E T G
<i>Ec</i> HimD	S L H Y R A P R T- G R N P K T G
<i>Salm</i> HimD	S L H Y R A P R T- G R N P K T G
<i>Vc</i> HipB	S L H Y R E P R V- G R N P K T G
<i>Ec</i> hupB	A V K R A A R T - G R N P Q T G
<i>Mc</i> HupB	S V K R A A R M - G R N P K T G
<i>Pa</i> HimD	S L H Y R A P R V- G R N P K T G
<i>Hi</i> HimD	S L H R Q P R L - G R N P K T G
<i>Aa</i> IHFB	S L H R Q P R L - G R N P K T G
<i>Ng</i> IHFβ	D L N H R P A R I- G R N P K T G
<i>Nm</i> HimD	D L N H R P A R I- G R N P K T G
<i>Ec</i> IHFB	G L N R R P A R V- G R N P K S G
<i>Bp</i> IHFB	G L N R R P A R V- G R N P K S G
<i>Epert</i> IhfB	S L S Q R S P R I- G R N P K S G
<i>Mc</i> HimD	C L H H R S A R I- A R N P K T G
<i>Eb</i> Hbb	E V R K R K G R L N A R N P Q T G

10

20

表 9B (続き)

【 0 4 5 7 】

【表 10 - 1】

表10(配列番号160~336:それぞれ、出現の順に示す)

【 0 4 5 8 】

細菌株、タンパク質の名称	β3 配列	α3 配列	C 末端20アミノ酸
<i>S. pyogenes</i> MGAS10270, HU	AFKAGK	ALKDAVK	IAASKVPAFKAGKALKDAVK
<i>S. gallolyticus</i> UCN34 (<i>S. bovis</i>), HlpA	AFKAGK	ALKDAVK	IAASKVPAFKAGKALKDAVK
<i>S. sobrinus</i> 6715 HU	AFKAGK	ALKDAVK	IAASKVPAFKAGKALKDAVK
<i>S. agalactiae</i> (B群) 2603V/R Hup	AFKAGK	ALKDAVK	IAASKVPAFKAGKALKDAVK
<i>S. pneumoniae</i> R6 HU	AFKAGK	ALKDAVK	IAASKVPAFKAGKALKDAVK
<i>S. gordonii</i> Challis NCTC7868, HlpA	AFKAGK	ALKDAVK	IAASKVPAFKAGKALKDAVK
<i>S. mutans</i> UA159, HU	AFKAGK	ALKDAVK	IAASKVPAFKAGKALKDAVK
<i>Enterococcus faecalis</i> V583, Hup	AFKAGK	ALKDAVK	IAASKVPAFKAGKALKDAVK
<i>S. aureus</i> MW2, HU	AFKAGK	ALKDAVK	IAASKVPAFKAGKALKDAVK
<i>S. epidermidis</i> RP62A Hup	AFKPGK	ALKDAVK	IPASKVPAFKAGKALKDAVK
<i>H. influenzae</i> Kw20 Rd HupA	AFKAGK	ALKDAVK	IPASKVPAFKAGKALKDAVK
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> D1LS-1 HU	AFVSGK	ALKDAIK	IAASKVPAFVSGKALKDAIK
<i>V. cholera</i> El Tor N16961, HupA	AFVAGK	ALKDAIK	IAAANVPAFVSGKALKDAIK
<i>E. coli</i> K12-MG1655 hupA	AFVSGK	ALKDAVK	IAAANVPAFVSGKALKDAIK
<i>P. aeruginosa</i> HupB	GFKAGK	ALKDAVN	IAAAKIFGFKAGKALKDAVN
<i>E. coli</i> K12-MG1655 hupB	SFRAGK	ALKDAVN	IAAAKVPFRGKALKDAVN
<i>V. cholera</i> El Tor N16961 HupB	SFKAGK	ALKDACH	IAEAKVFSFKAGKALKDACH
<i>Bordetella pertusis</i> Tohama 1 HupB	KFRPGK	ALKDAVN	IKKAKVPFRGKALKDAVN
<i>Prevotella melaninogenica</i> ATCC 25845 HupB	KFKAGA	ELADAVNK	AAKKVAKFKAGAEELADAVNK
<i>Prevotella intermedia</i> 17 Hup	KFKPGA	ELADAVNA	AAKKVAKFKPGAEELADAVNA
<i>Moraxella catarrhalis</i> RH4 HupB	SFKAGK	VLKESVN	IAASKVPSFKAGKVLKESVN
<i>P. gingivalis</i> W83 Hup-1	RFKPGS	TLELK	ISIPARKVVRFRPGSTLELK
<i>H. pylori</i> 2669 Hup	KFKPGK	TLKQKVEEGK	KRVPKFKPGKTLKQKVEEGK
<i>Prevotella melaninogenica</i> ATCC 25845 HupA	SFKPAK	TFIEDMKK	PAHDFPSFKPAKTFIEDMKK
<i>Prevotella intermedia</i> 17 Hup-2	SFKPAK	TFIEDMKK	PAHDFPSFKPAKTFIEDMKK
<i>P. gingivalis</i> W83 Hup-2	AFKPSK	IFMSQMKQD	KRNIPAFKPSKIFMSQMKQD
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> CDC1551 HU	AFRPGA	QFKAVSVGAQRLLPAEGPAVKRRG	AKRPATKAPAKKATARRGRK
<i>Mycobacterium smegmatis</i> MC2 Hup	AFRPGA	QFKAVSVGAQRLLPADGPAVKRRG	TKAPAKKAAKAPAKKGRR
<i>Prevotella melaninogenica</i> ATCC 25845 Hima	NFKPAA	TIKGVKRGQDNG	NFKPAAIKGVKRGQDNG
<i>Prevotella intermedia</i> 17 Hima	NFRATA	SVKBLKKGGAE	VLNFRATASVKEKLLKKGGAE
<i>E. coli</i> K12-MG1655 Hima	TFRPGQ	KLKSRVENASPKDE	TFRPGQKLKSRVENASPKDE
<i>Salmonella enteric</i> serovar typhi CT18 Hima	TFRPGQ	KLKSRVENASPKDE	TFRPGQKLKSRVENASPKDE
<i>V. cholera</i> El Tor N1696 Hima	TFRPGQ	KLKRVENIKVEK	VTFRPGQKLKRVENIKVEK
<i>P. aeruginosa</i> Hima	TFRPGQ	KLKARVEAYAGTKS	TFRPGQKLKARVEAYAGTKS
<i>Burkholderia cenocepacia</i> HI2424 IHFA	TFHASQ	KLKALVENGAEP	TVVTFHASQKLKALVENGAEP
<i>Burkholderia pseudomallei</i> 668 IHFA	TFHASQ	KLKALVENGAEPDLAR	HASQKLKALVENGAEPDLAR
<i>Bordetella pertusis</i> Tohama 1 Ihfa	TFHASQ	KLKSVVEQNSPPDFASAE	QKLSVVEQNSPPDFASAE
<i>N. gonorrhoeae</i> FA1090 (Oklahoma) IHFA	TFHASQ	KLKGMVEHYDKQR	TFHASQKLKGMVEHYDKQR
<i>N. meningitidis</i> MC58 Hima	TFHASQ	KLKSMVEHYDKQR	TFHASQKLKSMVEHYDKQR

10

20

30

40

【表 10 - 2】

表10(続き)

<i>H. influenzae</i> KW20 Rd HimA	TFKPGQ	KLRARVEKTK	RRVVFQKQKLRARVEKTK
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> D11S-1 Hima	VFKPGQ	KLRNVEKVKPKA	VVFKPGQKLRNVEKVKPKA
<i>Moraxella catarrhalis</i> RH4 Hima	TFKAGQ	KLRGWDSQNEG	VVTFKAGQKLRGWDSQNEG
<i>Treponema palladium</i> Nichols DNA結合タンパク質_II	VFRPSK	RLKSAVRGYSGEVGAD	PSKRLKSAVRGYSGEVGAD
<i>Prevotella melaninogenica</i> ATCC 25845 Hup	SFTPDI	VMKELVNKPFQFETVVINDGV	MQAGDTMKVPKVELRPEYRK
<i>Prevotella intermedia</i> 17 仮説的	SFTPDA	TMKELVNKPFQFETVVINDGV	SAGDTMKVPKVELRPEYRK
<i>E. coli</i> K12-MG1655 HimD	HFKPGK	ELDRRANIYG	KYVPHFKPGKELDRANIYG
<i>Salmonella enteric</i> serovar typhi CT18 bHimD	HFKPGK	ELDRRANIYG	KYVPHFKPGKELDRANIYG
<i>V. cholera</i> El Tor N1696 HipB	HFKPGK	ELRERVNL	EGKYVPHFKPGKELRERVNL
<i>P. aeruginosa</i> HimD	HFKPGK	ELDRVNEPE	KFVPHFKPGKELDRVNEPE
<i>H. influenzae</i> KW20 Rd HimD	YFKAGK	ELKARVDVOA	KSVPYFKAGKELKARVDVOA
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> D11S-1 IHFB	YFKAGK	ELRERVDVYAA	CVPYFKAGKELRERVDVYAA
<i>N. gonorrhoeae</i> FA1090 (Oklahoma) IHFβ	HFKPGK	ELRERVDLALKENAN	EKPGKELRERVDLALKENAN
<i>N. meningitidis</i> MC58 HimD	HFKPGK	ELRERVDLALKENAN	EKPGKELRERVDLALKENAN
<i>Burkholderia cenocepacia</i> HI2424 IHFB	HFKPGK	ELRERVDGRAGEPLKADDDDDR	ERYDGRAGEPLKADDDDDR
<i>Burkholderia pseudomallei</i> 668 IHFB	HFKPGK	ELRERVDGRAGEPLKNDPEDAQ	ERYDGRAGEPLKNDPEDAQ
<i>Bordetella pertussis</i> Tohama 1 Ihfb	HFKAGK	ELREWVDIVGNDQDDSSNGSS	DSNGSSDPLQSVMDMHAMH
<i>Moraxella catarrhalis</i> RH4 HimD	YFKPGK	ALRESVNLVND	ATPYFKPGKALRESVNLVND
<i>B. burgdorferi</i> B31 Hbb	YFRPGK	DLKERVWGKIG	HVAYFRPGKDLKERVWGKIG
<i>Treponema denticola</i> ATCC 35405 HU	RFKPGK	ELKEALHKIDTQELLES	PGKELKEALHKIDTQELLES

10

20

30

40

【 図 1 A 】

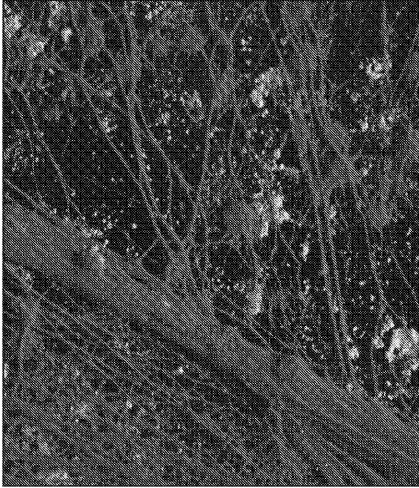


FIG. 1A

【 図 1 B 】

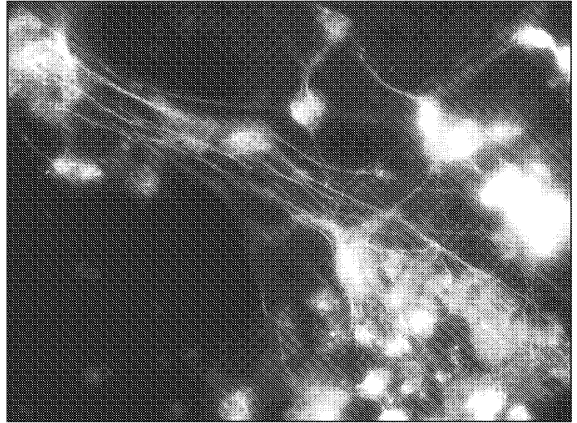


FIG. 1B

【 図 1 C 】

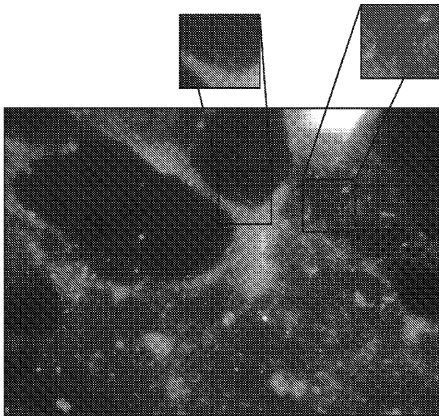


FIG. 1C

【 図 2 】

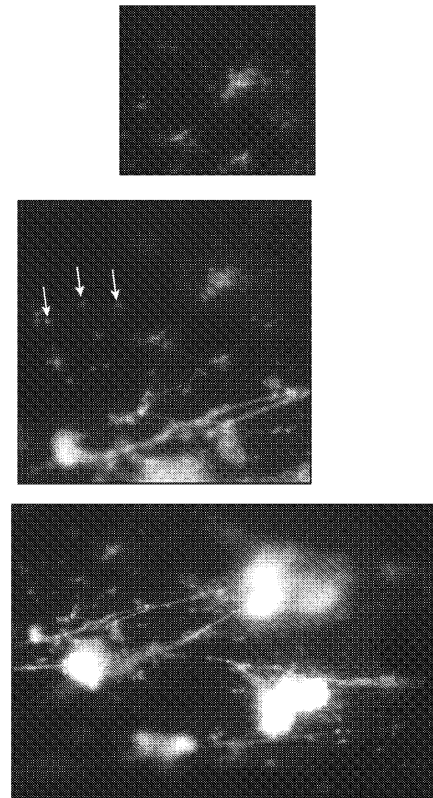


FIG. 2

【 図 3 - 1 】

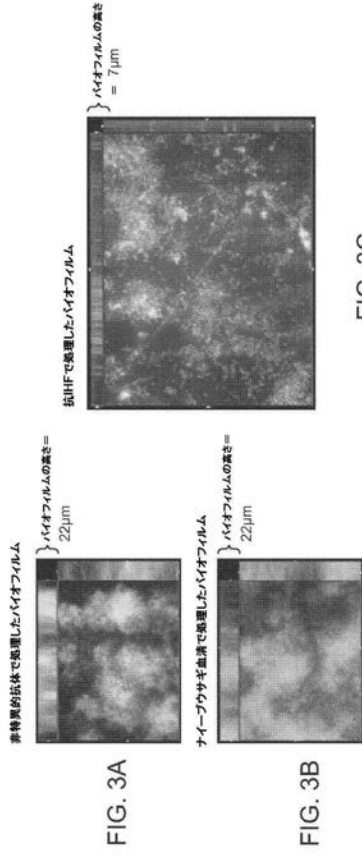


FIG. 3C

【 図 3 - 2 】

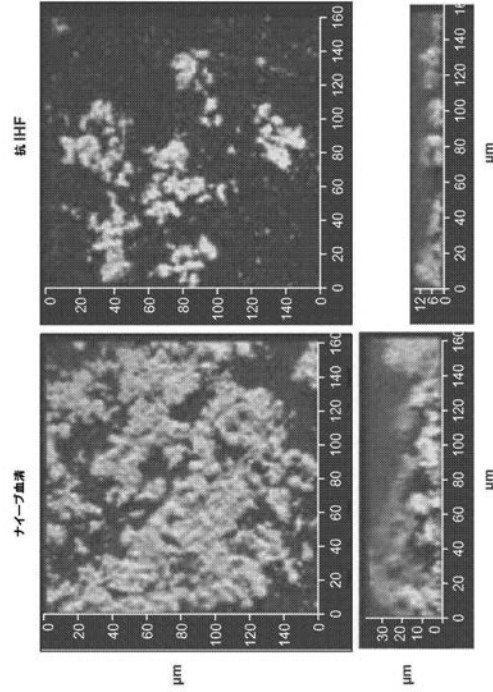


FIG. 3D

FIG. 3E

【 図 4 A 】

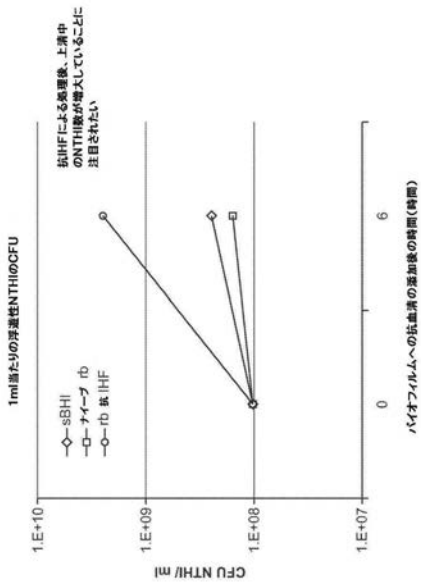


FIG. 4A

【 図 4 B 】

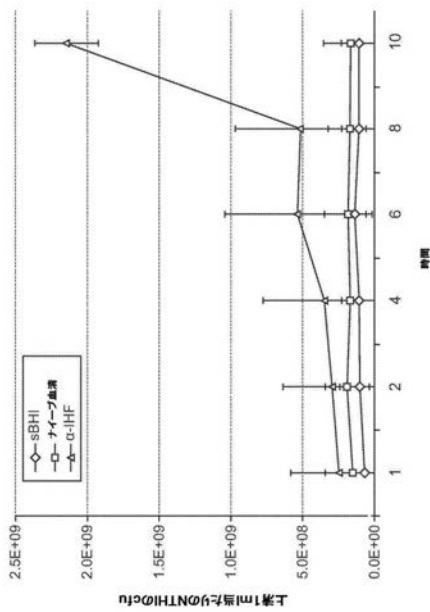


FIG. 4B

【 図 5 】

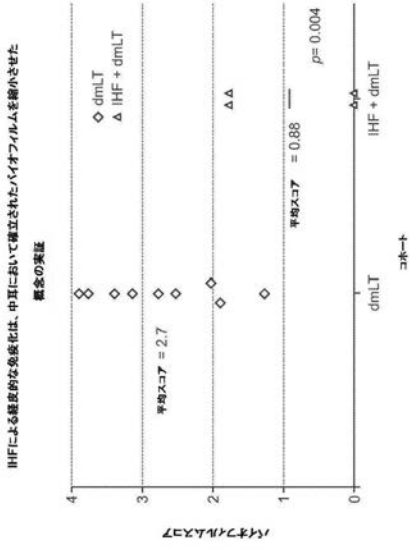


FIG. 5

【 図 6 】

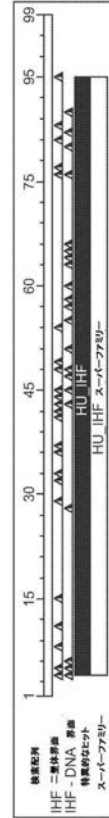


FIG. 6A

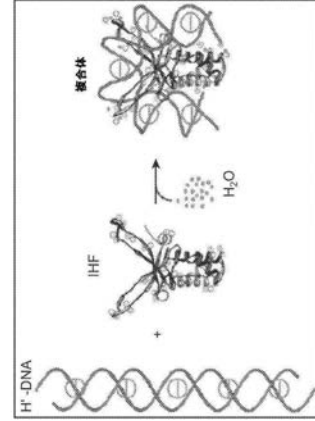


FIG. 6B

【 図 7 】

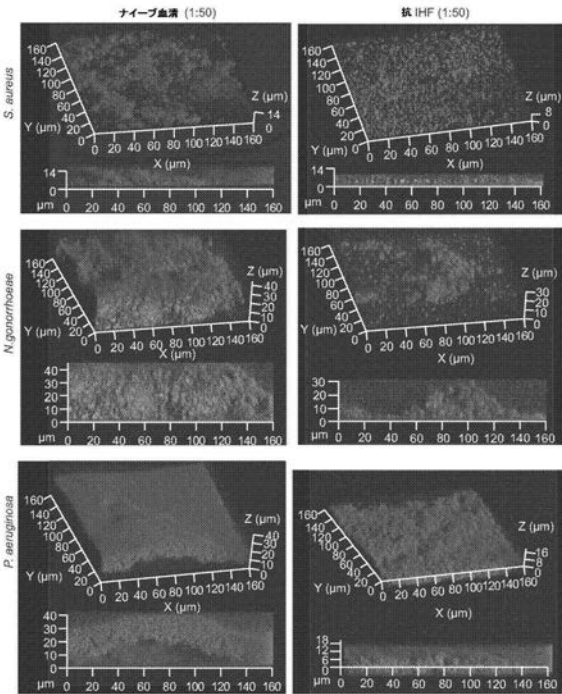
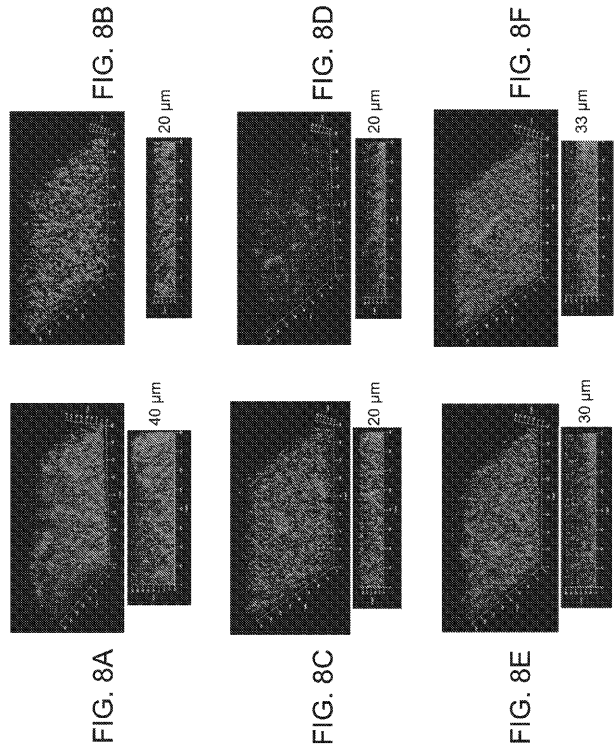


FIG. 7

【 図 8 】



【 図 9 】

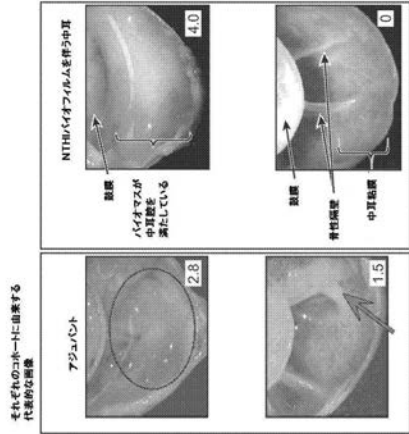


FIG. 9B

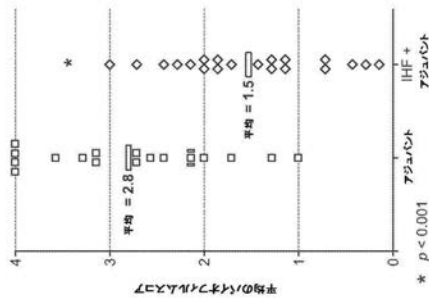


FIG. 9A

【 図 10 】

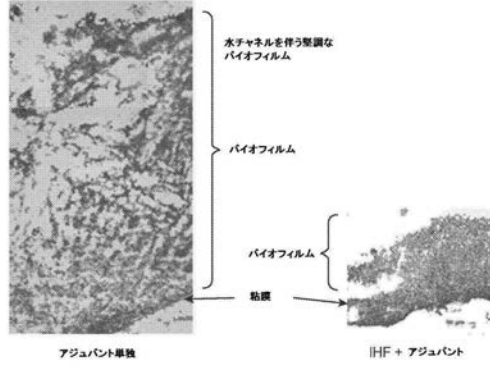


FIG. 10A

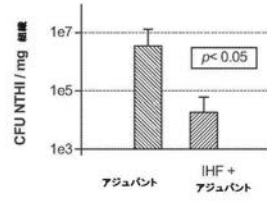


FIG. 10B

【 図 11 】

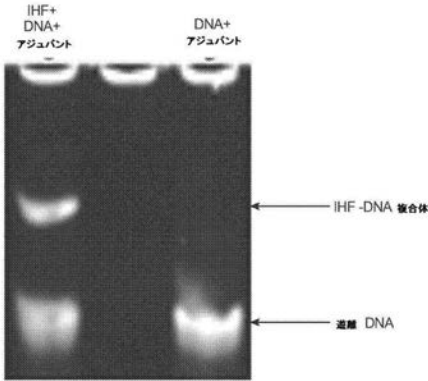


FIG. 11

【 図 12 】

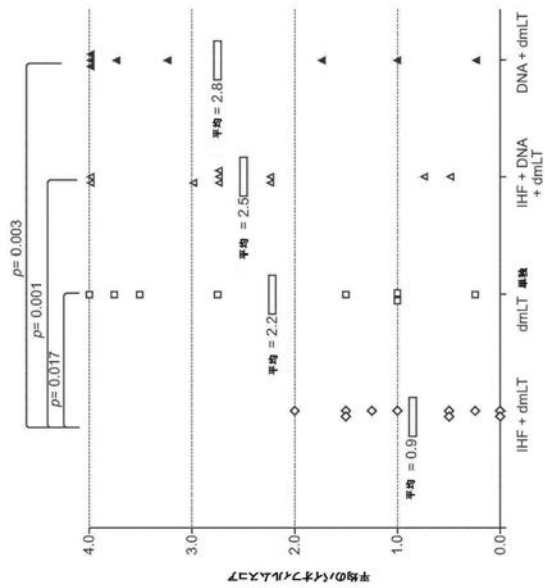


FIG. 12

【 図 1 3 】

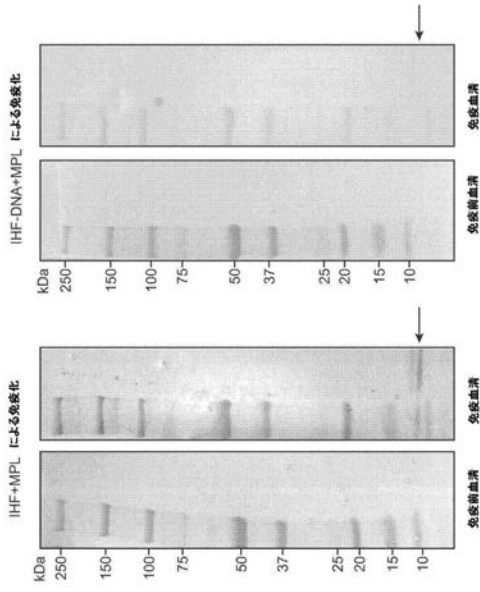


FIG. 13

【 図 1 4 】

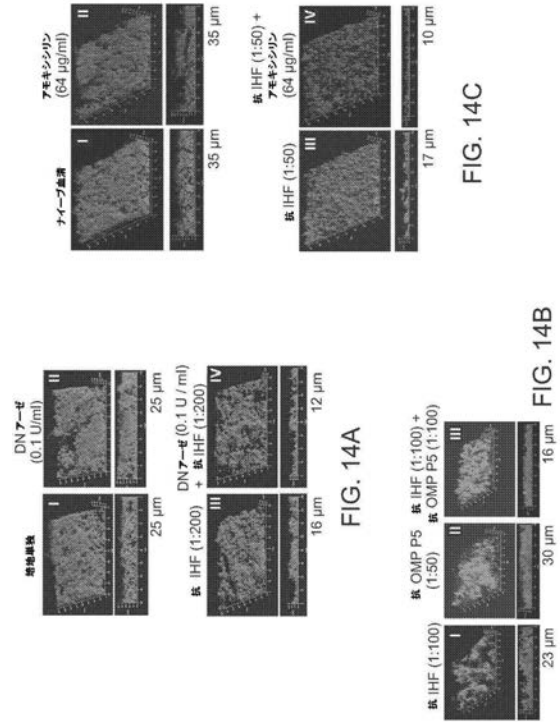


FIG. 14A

FIG. 14B

【 図 1 5 】

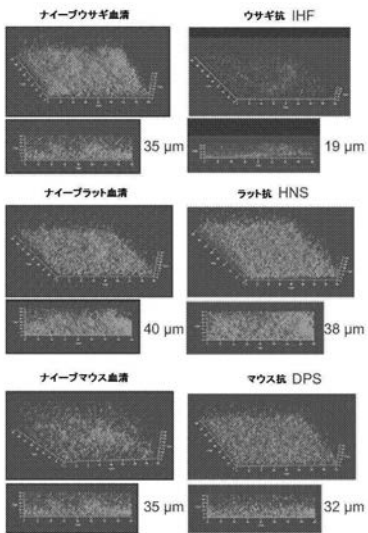


FIG. 15

【 図 1 6 】

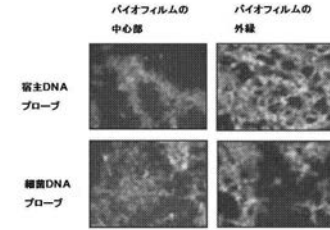


FIG. 16

【配列表】

2018086029000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
C 1 2 N	1/21 (2006.01)	C 1 2 N	1/21	4 C 0 8 4
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10	4 C 0 8 5
C 0 7 K	16/12 (2006.01)	C 0 7 K	16/12	4 C 0 8 7
C 1 2 N	15/02 (2006.01)	C 1 2 N	15/00	C 4 H 0 4 5
C 0 7 K	16/46 (2006.01)	C 0 7 K	16/46	
C 1 2 Q	1/02 (2006.01)	C 1 2 Q	1/02	
A 6 1 K	35/76 (2015.01)	A 6 1 K	35/76	
A 6 1 K	35/761 (2015.01)	A 6 1 K	35/761	
A 6 1 K	35/12 (2015.01)	A 6 1 K	35/12	
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	D
A 6 1 K	45/00 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	L
A 6 1 K	47/34 (2017.01)	A 6 1 K	39/395	R
A 6 1 K	47/42 (2017.01)	A 6 1 K	45/00	
A 6 1 K	47/50 (2017.01)	A 6 1 K	47/34	
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	47/42	
A 6 1 K	49/00 (2006.01)	A 6 1 K	47/50	
A 6 1 K	49/06 (2006.01)	A 6 1 K	48/00	
A 6 1 K	51/00 (2006.01)	A 6 1 K	49/00	
A 6 1 K	51/02 (2006.01)	A 6 1 K	49/06	
A 6 1 K	51/10 (2006.01)	A 6 1 K	51/00	
G 0 1 N	33/50 (2006.01)	A 6 1 K	51/00	2 0 0
G 0 1 N	33/15 (2006.01)	A 6 1 K	51/02	2 0 0
G 0 1 N	33/53 (2006.01)	A 6 1 K	51/10	2 0 0
C 1 2 P	21/08 (2006.01)	G 0 1 N	33/50	Z
		G 0 1 N	33/15	Z
		G 0 1 N	33/53	D
		C 1 2 P	21/08	

(31)優先権主張番号 61/318,743

(32)優先日 平成22年3月29日(2010.3.29)

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 512246178

ザ リサーチ インスティテュート アット ネイションワイド チルドレンズ ホスピタル
 アメリカ合衆国 オハイオ 4 3 2 0 5 - 2 6 9 6 , コロンバス , チルドレンズ ドライブ
 ダブリュー-5 9 1 7 0 0 , センター フォー マイクロバイアル パソジェネシス

(74)代理人 100078282

弁理士 山本 秀策

(74)代理人 100113413

弁理士 森下 夏樹

(74)代理人 100181674

弁理士 飯田 貴敏

(74)代理人 100181641

弁理士 石川 大輔

(74)代理人 230113332

弁理士 山本 健策

(72)発明者 スティーブン ディー . グッドマン

アメリカ合衆国 カリフォルニア 90089-2561, ロサンゼルス, マクリントック
 アベニュー 3740, イーイーピー 131, ユニバーシティ オブ サザン カリフォ
 ルニア 気付

(72)発明者 ローレン オー . バカレッツ

アメリカ合衆国 オハイオ 43205-2696, コロンバス, チルドレンズ ドライブ
 ダブリュー-591 700, ザ リサーチ インスティテュート アット ネイションワイド
 チルドレンズ ホスピタル, センター フォー マイクロバイアル パソジェネシス 気付

F ターム(参考) 2G045 AA25

4B063 QA06 QA20 QQ02 QQ03 QQ06 QQ42 QQ61 QR32 QR48 QR77
 QR80 QS38
 4B064 AG27 CA10 CA19 CC24 DA01
 4B065 AA90X AA90Y AB01 AC14 BA02 CA25 CA44
 4C076 AA01 AA06 AA11 AA17 AA19 AA24 AA30 AA31 AA36 AA53
 AA72 BB01 BB02 BB15 BB16 BB22 BB24 BB25 BB28 BB29
 BB30 BB31 CC06 CC07 CC32 EE23 EE41 EE59 FF63
 4C084 AA13 AA17 MA13 MA16 MA17 MA22 MA24 MA28 MA31 MA32
 MA35 MA37 MA41 MA43 MA52 MA57 MA58 MA59 MA60 MA63
 MA66 MA67 NA14 ZB09 ZB32
 4C085 AA13 AA14 AA25 CC02 CC07 CC23 DD62 EE01 EE03 EE06
 GG03 GG04 GG06 GG08 GG10 HH03 HH07 HH11 HH13 KA04
 KA27 KA28 KA29 KB07 KB08 KB11 KB15 KB18 LL20
 4C087 AA01 AA02 BB65 BC83 CA04 CA12 MA13 MA16 MA17 MA23
 MA24 MA28 MA31 MA32 MA35 MA37 MA41 MA43 MA52 MA57
 MA58 MA59 MA60 MA63 MA66 MA67 NA14 ZB09 ZB32
 4H045 AA10 AA11 AA30 BA15 CA11 DA76 EA20 EA31 FA74

【外国語明細書】

2018086029000001.pdf

专利名称(译)	用于去除生物膜的组合物和方法		
公开(公告)号	JP2018086029A	公开(公告)日	2018-06-07
申请号	JP2018038392	申请日	2018-03-05
[标]申请(专利权)人(译)	南加利福尼亚大学 该研究所在全国儿童医院		
申请(专利权)人(译)	南加州大学 该研究所在全国儿童医院		
[标]发明人	スティーブンディーグッドマン ローレンオーバカレッツ		
发明人	スティーブン ディー. グッドマン ローレン オー. バカレッツ		
IPC分类号	C12N15/09 C12Q1/68 C07K7/06 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C07K16/12 C12N15/02 C07K16/46 C12Q1/02 A61K35/76 A61K35/761 A61K35/12 A61K39/395 A61K45/00 A61K47/34 A61K47/ /42 A61K47/50 A61K48/00 A61K49/00 A61K49/06 A61K51/00 A61K51/02 A61K51/10 G01N33/50 G01N33/15 G01N33/53 C12P21/08 A61K38/16		
CPC分类号	A61K38/164 A61K39/0258 A61K39/102 A61K39/40 C07K14/195 C07K14/21 C07K14/245 C07K14/285 C07K16/1203 C07K16/1214 C07K16/1217 C07K16/1232 C07K16/1242 C07K16/1271 C07K16/1275 C07K2317/14 C07K2317/34 C07K2317/76 A61K2300/00 A61P31/00 A61P31/04 A61P31/12 A61P37/ /04 G01N33/56911 G01N2800/26 G01N2800/52 Y02A50/474 A61K2039/505		
FI分类号	C12N15/00.A C12Q1/68.ZNA.Z C07K7/06 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C07K16/12 C12N15/00.C C07K16/46 C12Q1/02 A61K35/76 A61K35/761 A61K35/12 A61K39/395.D A61K39/395.L A61K39/395.R A61K45/00 A61K47/34 A61K47/42 A61K47/50 A61K48/00 A61K49/00 A61K49/06 A61K51/00 A61K51/00.200 A61K51/02.200 A61K51/10.200 G01N33/50.Z G01N33/15.Z G01N33/53.D C12P21/08 A61K49/08 C12Q1/68.ZZN.A		
F-TERM分类号	2G045/AA25 4B063/QA06 4B063/QA20 4B063/QQ02 4B063/QQ03 4B063/QQ06 4B063/QQ42 4B063/ /QQ61 4B063/QR32 4B063/QR48 4B063/QR77 4B063/QR80 4B063/QS38 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B065/AA90X 4B065/AA90Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/ /BA02 4B065/CA25 4B065/CA44 4C076/AA01 4C076/AA06 4C076/AA11 4C076/AA17 4C076/AA19 4C076/AA24 4C076/AA30 4C076/AA31 4C076/AA36 4C076/AA53 4C076/AA72 4C076/BB01 4C076/ /BB02 4C076/BB15 4C076/BB16 4C076/BB22 4C076/BB24 4C076/BB25 4C076/BB28 4C076/BB29 4C076/BB30 4C076/BB31 4C076/CC06 4C076/CC07 4C076/CC32 4C076/EE23 4C076/EE41 4C076/ /EE59 4C076/FF63 4C084/AA13 4C084/AA17 4C084/MA13 4C084/MA16 4C084/MA17 4C084/MA22 4C084/MA24 4C084/MA28 4C084/MA31 4C084/MA32 4C084/MA35 4C084/MA37 4C084/MA41 4C084/ /MA43 4C084/MA52 4C084/MA57 4C084/MA58 4C084/MA59 4C084/MA60 4C084/MA63 4C084/MA66 4C084/MA67 4C084/NA14 4C084/ZB09 4C084/ZB32 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/AA25 4C085/ /CC02 4C085/CC07 4C085/CC23 4C085/DD62 4C085/EE01 4C085/EE03 4C085/EE06 4C085/GG03 4C085/GG04 4C085/GG06 4C085/GG08 4C085/GG10 4C085/HH03 4C085/HH07 4C085/HH11 4C085/ /HH13 4C085/KA04 4C085/KA27 4C085/KA28 4C085/KA29 4C085/KB07 4C085/KB08 4C085/KB11 4C085/KB15 4C085/KB18 4C085/LL20 4C087/AA01 4C087/AA02 4C087/BB65 4C087/BC83 4C087/ /CA04 4C087/CA12 4C087/MA13 4C087/MA16 4C087/MA17 4C087/MA23 4C087/MA24 4C087/MA28 4C087/MA31 4C087/MA32 4C087/MA35 4C087/MA37 4C087/MA41 4C087/MA43 4C087/MA52 4C087/ /MA57 4C087/MA58 4C087/MA59 4C087/MA60 4C087/MA63 4C087/MA66 4C087/MA67 4C087/NA14 4C087/ZB09 4C087/ZB32 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA15 4H045/CA11 4H045/ /DA76 4H045/EA20 4H045/EA31 4H045/FA74		
代理人(译)	夏木森下 饭田TakashiSatoshi		

