

(19)日本国特許庁(JP)

## (12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7189124号

(P7189124)

(45)発行日 令和4年12月13日(2022.12.13)

(24)登録日 令和4年12月5日(2022.12.5)

(51)国際特許分類

F I

G 0 1 N 33/15 (2006.01)

G 0 1 N 33/15 Z

G 0 1 N 33/50 (2006.01)

G 0 1 N 33/50 Z

A 6 1 K 45/00 (2006.01)

A 6 1 K 45/00

A 6 1 P 43/00 (2006.01)

A 6 1 P 43/00 1 1 1

A 6 1 P 1/04 (2006.01)

A 6 1 P 1/04

請求項の数 3 (全65頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2019-502575(P2019-502575)

(86)(22)出願日 平成29年7月20日(2017.7.20)

(65)公表番号 特表2019-529346(P2019-529346  
A)

(43)公表日 令和1年10月17日(2019.10.17)

(86)国際出願番号 PCT/EP2017/068297

(87)国際公開番号 WO2018/015468

(87)国際公開日 平成30年1月25日(2018.1.25)

審査請求日 令和2年7月3日(2020.7.3)

(31)優先権主張番号 16180430.7

(32)優先日 平成28年7月20日(2016.7.20)

(33)優先権主張国・地域又は機関  
欧州特許庁(EP)

前置審査

(73)特許権者 504150162

テクニシェ ユニバーシタット ミュンヘン  
ドイツ国, ミュンヘン, 8 0 3 3 3, ア  
ルシスストラーセ 2 1

(73)特許権者 500449363

マックス - ブランク - ゲゼルシャフト  
ツール フェルデルンク デル ヴィッセ  
ンシャフテン エー. ファウ.  
ドイツ連邦共和国 ミュンヘン 8 0 5 3  
9 ホフガルテンシュトラーセ 8

(74)代理人 100088904

弁理士 庄司 隆

(72)発明者 ジェバエリ, アナヒータ

ドイツ, 8 0 9 3 9 ミュンヘン, ゴン  
ダースハウザーシュトラーセ 4 4

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 H. ピロリ感染の予防又は治療に関する作用物質及び方法

## (57)【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

H.ピロリ感染及びH.ピロリによって引き起こされる胃十二指腸障害からなる群から選択される疾患又は障害を予防又は治療するための薬物候補を同定するin vitroでの方法であって、該方法は、

(a) (i) CEACAMタンパク質又はその機能性断片を、(ii) H.ピロリHopQタンパク質の細胞外ドメイン又はそのCEACAM結合断片を含む、H.ピロリHopQタンパク質の機能性断片及び(iii) 試験化合物と接触させることと、並びに

(b) 該試験化合物が、該CEACAMタンパク質又はその機能性断片と、該H.ピロリHopQタンパク質の機能性断片との間の相互作用を阻害するかどうかを決定すること、

を含み、

該CEACAMタンパク質又はその機能性断片と、該H.ピロリHopQタンパク質の機能性断片との間の相互作用を阻害する試験化合物は、H.ピロリ感染及びH.ピロリによって引き起こされる胃十二指腸障害からなる群から選択される疾患又は障害を予防又は治療するための薬物候補として同定され、

前記H.ピロリHopQの細胞外ドメインは、H.ピロリHopQの挿入ドメイン、ループA、ループB、ループC又はループDであり、

ループAは、H.ピロリHopQのヘリックスH3とストランドS1との間に位置し、

ループBは、H.ピロリHopQのストランドS2とヘリックスH4との間に位置し、

ループCは、H.ピロリHopQのヘリックスH5とヘリックスH6との間に位置し、及び

10

20

ループDは、H.ピロリHopQのヘリックスH7とヘリックスH8との間に位置する、方法。

【請求項2】

ステップ(b)は、該試験化合物が、H.ピロリHopQタンパク質の機能性断片の、CEACAMタンパク質又はその機能性断片への結合を阻害するかどうかを決定すること、及び/又はHopQ-CEACAM媒介性シグナル伝達を阻害するかどうかを決定することを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

CEACAMタンパク質の機能性断片は、細胞外ドメイン、N-ドメイン、またはこれらの断片を含む、請求項1又は2に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、H.ピロリ(H. pylori) HopQと、癌胎児性抗原関連細胞接着分子(CEACAM)ファミリーの成員との間の相互作用の阻害剤、及びH.ピロリHopQに基づく免疫原性組成物に関する。本発明は更に、H.ピロリによって引き起こされるか、又はH.ピロリと関連付けられる疾患又は障害を予防又は治療するための該阻害剤及び免疫原性組成物の使用に関する。

【背景技術】

【0002】

ヘリコバクター・ピロリ(Helicobacter pylori)(H.ピロリ)は、ヒトの胃の中で一生にわたって存続することが可能な微好気性グラム陰性菌である。H.ピロリ感染は、ヒトにおいて最も一般的な細菌感染疾患であり、世界人口の約半分が、その地域の社会経済的状况に応じて、H.ピロリに感染している(非特許文献1)。感染は、慢性萎縮性胃炎、消化性潰瘍、胃癌又は胃の癌及び粘膜関連リンパ組織(MALT)リンパ腫等の多数の胃の疾患と関連付けられる(非特許文献2、非特許文献3、非特許文献4、非特許文献5)。H.ピロリは、2011年に世界中で983000の症例を有する3番目に一般的な癌のタイプである胃癌の主な原因である(非特許文献6)。

【0003】

胃癌は、相当な社会経済的コストを伴う。胃癌を患う患者1人を治療するのに、現在約50000ユーロかかる。胃癌の予防は、H.ピロリによって引き起こされる感染の早期治療を含む。試算によると、H.ピロリによって引き起こされる感染を患う個体の少なくとも3分の1が、治療を要する。目下のところ、どの患者がH.ピロリ感染と関連付けられる続発性の疾患を発症するかを予測することは困難である。多数の研究結果に基づいて、胃癌腫を予防するためのH.ピロリ感染の一般的な治療は、95%を上回る症例を予防するため、コスト効率が良い(非特許文献7)。治療法は、胃潰瘍、前癌性又は確定性胃癌を患う患者、胃癌患者の血縁者、及び非ステロイド性抗炎症薬(心血管疾患用のアスピリンを含む)による長期的な治療法を要する患者に関して明確に示されている。日本における高い胃癌の割合に起因して、抗生物質耐性の割合が着実に増加しているにも関わらず、H.ピロリに感染した個体全ての治療が日本では推奨されている(非特許文献8)。

【0004】

H.ピロリによって引き起こされる感染の標準的な治療法は、今日までは、オメプラゾール等のプロトンポンプ阻害剤と組み合わせた2つの抗生物質からなる。1週の治療のコストは、患者1人当たりおよそ200ユーロである。この治療法は、患者によっては著しい副作用を有し、耐性病原体の急増を招く。第二次及び第三次治療法は、失敗することが多いことから、目下、全ての患者の約10%が、これ以上治療することができず(非特許文献9)、その数は、2020年までに推定60%にまで増加し得る。

【0005】

さらに、動物及びヒトの腸肝管にコロニーを形成するますます多くのヘリコバクター種(Helicobacter species)(H.ピロリ以外)が、近年同定されており、各種疾患に関与すると提唱されている(非特許文献10)。例えば、H.ピリス(H. bilis)は、胆嚢炎、胆

10

20

30

40

50

胃癌、胆道悪性腫瘍等の疾患と関連付けられている（非特許文献11、非特許文献12、非特許文献13）。

【0006】

したがって、ヘリコバクター属（*Helicobacter*）、例えばH.ピロリ又はH.ビリスによって引き起こされるか、又はそれと関連付けられる疾患又は障害を予防又は治療するための新規治療アプローチが必要とされる。例えば、H.ピロリに対するワクチンが利用可能であった場合、それは、何百万もの患者に恩恵を与え、医療費を大幅に低減する。ワクチンは、流行性の感染性疾患と闘う際に非常に有効である。実際に、米国疾病管理センターは、ワクチン接種を、感染性疾患を予防する最も有効な方法であるとした（非特許文献14）。しかしながら、今日まで、利用可能なH.ピロリに対するヒト用の有効なワクチンは存在しない。ワクチンを設計する場合、標的スクリーニング及び選択は、総防御（pan protection）を首尾よく達成するのに悪影響をもたらす（非特許文献15）。ワクチン接種に最適な抗原は、保存的であるだけでなく、コロニー形成、感染の維持、又は病原性にとって重要なものであるべきである。したがって、細菌とその宿主との間の直接的な相互作用を可能にする抗原は、概して、ワクチン接種及び治療法に好ましい標的を提供し得る。

10

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0007】

【文献】Perez-Perez et al., 2004

Nomura et al., 1994

Forman, 1996

Parsonnet et al., 1991

Blaser et al., 1995

Jemal et al., 2011

Graham & Shiotani, 2005

Shiota et al., 2010

Gao et al., 2010

Fox, 2002

Fox et al., 1998

Matsukura et al., 2002

Pisani et al., 2008

U.S. CDC, 2011

Gomez-Gascon et al., 2012

20

30

【発明の概要】

【0008】

1つの態様において、本発明は、ヘリコバクター・ピロリによって引き起こされるか、又はH.ピロリと関連付けられる疾患又は障害を予防又は治療する方法における使用のための、H.ピロリHopQと、癌胎児性抗原関連細胞接着分子（CEACAM）ファミリーの成員との間の相互作用の阻害剤に関する。

【0009】

1つの実施の形態において、上記阻害剤は、H.ピロリHopQの、上記CEACAMファミリーの成員への結合及び/又はHopQ-CEACAM媒介性シグナル伝達を阻害する。

40

【0010】

1つの実施の形態において、上記阻害剤は、H.ピロリHopQのCEACAMファミリーの成員への、好ましくは上記CEACAMファミリーの成員の細胞外ドメインへの、より好ましくは上記CEACAMファミリーの成員のN-ドメインへの結合を阻害する。

【0011】

1つの実施の形態において、上記CEACAMファミリーの成員は、上皮細胞、内皮細胞及び/又は免疫細胞の表面上で発現される。

【0012】

50

1つの実施の形態において、上記CEACAMファミリーの成員は、ヒトCEACAMファミリー成員、非ヒト霊長類CEACAMファミリー成員及びラットCEACAMファミリー成員からなる群から選択される。

【0013】

1つの実施の形態において、上記CEACAMファミリーの成員は、CEACAM1、CEACAM3、CEACAM5及びCEACAM6からなる群から選択される。

【0014】

1つの実施の形態において、H.ピロリHopQは、I型HopQタンパク質又はII型HopQタンパク質である。

【0015】

1つの実施の形態において、上記阻害剤は、  
(a) H.ピロリHopQへ、好ましくはH.ピロリHopQの細胞外ドメインへ結合する(ポリ-)ペプチドリガンド又はペプチド模倣体リガンド、  
(b) 上記CEACAMファミリーの成員へ、好ましくは上記CEACAMファミリーの成員の細胞外ドメインへ、より好ましくは上記CEACAMファミリーの成員のN-ドメインへ結合する(ポリ-)ペプチドリガンド又はペプチド模倣体リガンド、  
(c) (a) 及び (b) の該(ポリ-)ペプチドリガンドをコードする核酸分子、  
(d) H.ピロリHopQへ、好ましくはH.ピロリHopQの該細胞外ドメインへ結合する核酸リガンド、  
(e) 上記CEACAMファミリーの成員へ、好ましくは上記CEACAMファミリーの成員の細胞外ドメインへ、より好ましくは上記CEACAMファミリーの成員のN-ドメインへ結合する核酸リガンド、  
(f) 上記CEACAMファミリーの成員又はH.ピロリHopQの発現を阻害する阻害性核酸分子、  
(g) H.ピロリHopQへ、好ましくはH.ピロリHopQの細胞外ドメインへ結合する小分子、並びに、  
(h) 上記CEACAMファミリーの成員へ、好ましくは上記CEACAMファミリーの成員の細胞外ドメインへ、より好ましくは上記CEACAMファミリーの成員のN-ドメインへ結合する小分子、  
からなる群から選択される。

【0016】

1つの実施の形態において、上記(ポリ-)ペプチドリガンドは、抗体、抗体誘導体、抗体模倣体、ペプチドアプタマー及び上記CEACAMファミリーの成員又はH.ピロリHopQの可溶性断片からなる群から選択される。

【0017】

1つの実施の形態において、上記ペプチド模倣体リガンドは、ペプチド、ベータ-ペプチド及びD-ペプチドからなる群から選択される。

【0018】

1つの実施の形態において、上記核酸リガンドは、DNAアプタマー、RNAアプタマー及びXNAアプタマーからなる群から選択される。

【0019】

1つの実施の形態において、上記阻害性核酸分子は、siRNA、shRNA、miRNA及びアンチセンスDNA又はRNA分子からなる群から選択される。

【0020】

1つの実施の形態において、H.ピロリHopQの上記細胞外ドメインは、H.ピロリHopQの挿入ドメインである。

【0021】

1つの実施の形態において、H.ピロリHopQの上記細胞外ドメインは、H.ピロリHopQのループA、ループB、ループC又はループDであり、  
ループAは、H.ピロリHopQのヘリックスH3とストランドS1との間に位置し、

10

20

30

40

50

ループBは、H.ピロリHopQのストランドS2とヘリックスH4との間に位置し、  
ループCは、H.ピロリHopQのヘリックスH5とヘリックスH6との間に位置し、  
ループDは、H.ピロリHopQのヘリックスH7とヘリックスH8との間に位置する。

【0022】

1つの実施の形態において、上記阻害剤は、医薬組成物中に含まれる。

【0023】

1つの実施の形態において、H.ピロリによって引き起こされるか、又はH.ピロリと関連付けられる疾患又は障害は、H.ピロリ感染及びH.ピロリによって引き起こされる胃十二指腸障害からなる群から選択される。

【0024】

1つの実施の形態において、H.ピロリによって引き起こされる上記胃十二指腸障害は、胃炎、慢性胃炎、胃萎縮症、胃又は十二指腸潰瘍、胃癌及びMALTリンパ腫からなる群から選択される。

【0025】

別の態様において、本発明は、H.ピロリによって引き起こされるか、又はH.ピロリと関連付けられる疾患又は障害を予防又は治療するための薬物候補を同定するin vitroでの方法であって、該方法は、

(a) (i) CEACAMタンパク質又はその機能性断片を、(ii) H.ピロリHopQタンパク質又はその機能性断片及び(iii) 試験化合物と接触させることと、

(b) 該試験化合物が、該CEACAMタンパク質又はその機能性断片と、該H.ピロリHopQタンパク質又はその機能性断片との間の相互作用を阻害するかどうかを決定することと、  
を含み、

該CEACAMタンパク質又はその機能性断片と、該H.ピロリHopQタンパク質又はその機能性断片との間の相互作用を阻害する試験化合物は、H.ピロリによって引き起こされるか、又はH.ピロリと関連付けられる疾患又は障害を予防又は治療するための薬物候補として同定される、方法に関する。

【0026】

1つの実施の形態において、工程(b)は、上記試験化合物が、上記H.ピロリHopQタンパク質又はその機能性断片の、上記CEACAMタンパク質又はその機能性断片への結合を阻害するかどうかを決定することであって、好ましくは、該H.ピロリHopQタンパク質の機能性断片は、細胞外ドメイン又はその断片を含み、及び/又は該CEACAMタンパク質の機能性断片は、細胞外ドメイン又はその断片、好ましくはN-ドメインを含むこと、及び/又は該試験化合物が、HopQ-CEACAM媒介性シグナル伝達を阻害するかどうかを決定することを含む。

【0027】

1つの実施の形態において、上記CEACAMタンパク質は、ヒトCEACAMタンパク質、非ヒト霊長類CEACAMタンパク質及びラットCEACAMタンパク質からなる群から選択される。

【0028】

1つの実施の形態において、上記CEACAMタンパク質は、CEACAM1、CEACAM3、CEACAM5及びCEACAM6からなる群から選択される。

【0029】

1つの実施の形態において、H.ピロリHopQタンパク質は、I型HopQタンパク質又はII型HopQタンパク質である。

【0030】

1つの実施の形態において、H.ピロリHopQの上記細胞外ドメインは、H.ピロリHopQの挿入ドメイン又はその機能性断片である。

【0031】

1つの実施の形態において、H.ピロリHopQの上記細胞外ドメインは、H.ピロリHopQのループA、ループB、ループC若しくはループD又は先述のいずれかの機能性断片であり、

10

20

30

40

50

ループAは、H.ピロリHopQのヘリックスH3とストランドS1との間に位置し、  
ループBは、H.ピロリHopQのストランドS2とヘリックスH4との間に位置し、  
ループCは、H.ピロリHopQのヘリックスH5とヘリックスH6との間に位置し、  
ループDは、H.ピロリHopQのヘリックスH7とヘリックスH8との間に位置する。

【0032】

1つの実施の形態において、H.ピロリHopQの上記細胞外ドメインは、H.ピロリHopQのループA、ループB若しくはループC又は先述のいずれかの機能性断片である。

【0033】

1つの実施の形態において、上記試験化合物は、(ポリ-)ペプチド、ペプチド模倣体、核酸分子及び小分子からなる群から選択される。

10

【0034】

別の態様において、本発明は、H.ピロリ感染を研究するか、又はH.ピロリによって引き起こされるか、若しくはH.ピロリと関連付けられる疾患若しくは障害を予防若しくは治療するための薬物候補を同定するための、H.ピロリHopQと相互作用することが可能なCEACAMタンパク質又はその機能性断片の使用に関する。

【0035】

更なる態様において、本発明は、H.ピロリ感染を研究するか、又はH.ピロリによって引き起こされるか、若しくはH.ピロリと関連付けられる疾患若しくは障害を予防若しくは治療するための薬物候補を同定するための、H.ピロリHopQと相互作用することが可能なCEACAMタンパク質又はその機能性断片を異種的に発現する細胞の使用に関する。

20

【0036】

更に別の態様において、本発明は、H.ピロリ感染を研究するか、又はH.ピロリによって引き起こされるか、若しくはH.ピロリと関連付けられる疾患又は障害を予防又は治療するための薬物候補を同定するための、H.ピロリHopQと相互作用することが可能なCEACAMタンパク質又はその機能性断片を異種的に発現する非ヒトトランスジェニック動物の使用に関する。

【0037】

1つの実施の形態において、上記CEACAMタンパク質は、ヒトCEACAMタンパク質、非ヒト霊長類CEACAMタンパク質及びラットCEACAMタンパク質からなる群から選択される。

30

【0038】

1つの実施の形態において、上記CEACAMタンパク質は、CEACAM1、CEACAM3、CEACAM5及びCEACAM6からなる群から選択される。

【0039】

上記方法又は使用の1つの実施の形態において、H.ピロリによって引き起こされるか、又はH.ピロリと関連付けられる上記疾患又は障害は、H.ピロリ感染及びH.ピロリによって引き起こされる胃十二指腸障害からなる群から選択される。

【0040】

1つの実施の形態において、H.ピロリによって引き起こされる上記胃十二指腸障害は、胃炎、慢性胃炎、胃萎縮症、胃又は十二指腸潰瘍、胃癌及びMALTリンパ腫からなる群から選択される。

40

【0041】

別の態様において、本発明は、H.ピロリHopQと、癌胎児性抗原関連細胞接着分子(CEACAM)ファミリーの成員との間の相互作用の阻害剤であって、

(a) H.ピロリHopQの細胞外ドメインへ結合する(ポリ-)ペプチドリガンド又はペプチド模倣体リガンド、

(b) 該CEACAMファミリーの成員のN-ドメインへ結合する(ポリ-)ペプチドリガンド又はペプチド模倣体リガンド、

(c) (a) 及び (b) の該(ポリ-)ペプチドリガンドをコードする核酸分子、

(d) H.ピロリHopQの細胞外ドメインへ結合する核酸リガンド、

50

(e) 該CEACAMファミリーの成員のN-ドメインへ結合する核酸リガンド、  
(f) 該CEACAMファミリーの成員又はH.ピロリHopQの発現を阻害する阻害性核酸分子、  
(g) H.ピロリHopQの細胞外ドメインへ結合する小分子、並びに、  
(h) 該CEACAMファミリーの成員のN-ドメインへ結合する小分子、  
からなる群から選択される、阻害剤に関する。

【0042】

1つの実施の形態において、上記(ポリ-)ペプチドリガンドは、抗体、抗体誘導体、抗体模倣体、ペプチドアプタマー及び上記CEACAMファミリーの成員又はH.ピロリHopQの可溶性断片からなる群から選択される。

【0043】

1つの実施の形態において、上記ペプチド模倣体リガンドは、ペプチド、ペータ-ペプチド及びD-ペプチドからなる群から選択される。

【0044】

1つの実施の形態において、上記核酸リガンドは、DNAアプタマー、RNAアプタマー及びXNAアプタマーからなる群から選択される。

【0045】

1つの実施の形態において、上記阻害性核酸分子は、siRNA、shRNA、miRNA及びアンチセンスDNA又はRNA分子からなる群から選択される。

【0046】

1つの実施の形態において、H.ピロリHopQの上記細胞外ドメインは、H.ピロリHopQの挿入ドメインである。

【0047】

1つの実施の形態において、H.ピロリHopQの上記細胞外ドメインは、H.ピロリHopQのループA、ループB、ループC又はループDであり、  
ループAは、H.ピロリHopQのヘリックスH3とストランドS1との間に位置し、  
ループBは、H.ピロリHopQのストランドS2とヘリックスH4との間に位置し、  
ループCは、H.ピロリHopQのヘリックスH5とヘリックスH6との間に位置し、  
ループDは、H.ピロリHopQのヘリックスH7とヘリックスH8との間に位置する。

【0048】

1つの実施の形態において、上記(ポリ-)ペプチドリガンド又はペプチド模倣体リガンドは、それぞれ、上記CEACAMファミリーの成員又はH.ピロリHopQの可溶性断片及びそれらのペプチド模倣体変異体から選択される。

【0049】

1つの実施の形態において、H.ピロリHopQの可溶性断片は、H.ピロリHopQの挿入ドメイン又はその機能性断片を含む。

【0050】

1つの実施の形態において、H.ピロリHopQの可溶性断片は、H.ピロリHopQのループA、ループB、ループC若しくはループD又は先述のいずれかの機能性断片を含み、  
ループAは、H.ピロリHopQのヘリックスH3とストランドS1との間に位置し、  
ループBは、H.ピロリHopQのストランドS2とヘリックスH4との間に位置し、  
ループCは、H.ピロリHopQのヘリックスH5とヘリックスH6との間に位置し、  
ループDは、H.ピロリHopQのヘリックスH7とヘリックスH8との間に位置する。

【0051】

1つの実施の形態において、上記CEACAMファミリーの成員は、ヒトCEACAMファミリー成員、非ヒト霊長類CEACAMファミリー成員及びラットCEACAMファミリー成員からなる群から選択される。

【0052】

1つの実施の形態において、上記CEACAMファミリーの成員は、CEACAM1、CEACAM3、CEACAM5及びCEACAM6からなる群から選択される。

【0053】

10

20

30

40

50

更に別の態様において、本発明は、(a)(i) H.ピロリHopQのアミノ酸配列、若しくは(ii) その免疫原性変異体、若しくは(iii) (i) 若しくは(ii) の免疫原性断片を含む少なくとも1つの単離(ポリ-)ペプチド、又は(b) 項目(a)に記載の単離(ポリ-)ペプチドをコードする少なくとも1つの核酸分子を含む免疫原性組成物に関する。

【0054】

1つの実施の形態において、上記単離(ポリ-)ペプチドは、組換え(ポリ-)ペプチドである。

【0055】

1つの実施の形態において、上記免疫原性断片は、H.ピロリHopQの細胞外ドメインを含む。

【0056】

1つの実施の形態において、H.ピロリHopQの上記細胞外ドメインは、H.ピロリHopQの挿入ドメイン又はその機能性断片である。

【0057】

1つの実施の形態において、H.ピロリHopQの上記細胞外ドメインは、H.ピロリHopQのループA、ループB、ループC若しくはループD又は先述のいずれかの機能性断片であり、ループAは、H.ピロリHopQのヘリックスH3とストランドS1との間に位置し、ループBは、H.ピロリHopQのストランドS2とヘリックスH4との間に位置し、ループCは、H.ピロリHopQのヘリックスH5とヘリックスH6との間に位置し、ループDは、H.ピロリHopQのヘリックスH7とヘリックスH8との間に位置する。

【0058】

1つの実施の形態において、上記単離(ポリ-)ペプチドは、融合タンパク質である。

【0059】

1つの実施の形態において、上記核酸分子は、DNA又はRNAであり、ここで、好ましくは、上記核酸分子は、ベクター中に含有される。

【0060】

1つの実施の形態において、上記免疫原性組成物は、少なくとも1つのアジュバントを更に含む。

【0061】

1つの実施の形態において、上記免疫原性組成物は、ワクチンである。

【0062】

1つの実施の形態において、上記免疫原性組成物は、抗体の分泌を含む免疫応答を誘発し、好ましくは、該抗体は、H.ピロリHopQと、癌胎児性抗原関連細胞接着分子(CEACAM)ファミリーの成員との間の相互作用を阻害する。

【0063】

更なる態様において、本発明は、薬剤としての使用のための、上記で規定するような免疫原性組成物に関する。

【0064】

更に別の態様において、本発明は、H.ピロリによって引き起こされるか、又はH.ピロリと関連付けられる疾患又は障害を予防又は治療する方法における使用のための、上記で規定するような免疫原性組成物に関し、ここで、好ましくは、該疾患又は障害は、H.ピロリ感染及びH.ピロリによって引き起こされる胃十二指腸障害からなる群から選択される。

【0065】

1つの実施の形態において、上記胃十二指腸障害は、胃炎、慢性胃炎、胃又は十二指腸潰瘍、胃癌及びMALTリンパ腫からなる群から選択される。

【0066】

別の態様において、本発明は、H.ピロリによって引き起こされるか、又はH.ピロリと関連付けられる疾患又は障害を予防又は治療する方法における使用のための、H.ピロリHopQと相互作用することが可能なCEACAMタンパク質又はその機能性断片に関し、ここで、該CEACAMタンパク質又はその機能性断片は、固体支持体、好ましくは非細胞固体支持体

10

20

30

40

50



に結合される。

【0067】

1つの実施の形態において、上記疾患又は障害は、H.ピロリ感染及びH.ピロリによって引き起こされる胃十二指腸障害からなる群から選択され、好ましくは、該胃十二指腸障害は、胃炎、慢性胃炎、胃又は十二指腸潰瘍、胃癌及びMALTリンパ腫からなる群から選択される。

【0068】

1つの実施の形態において、上記CEACAMタンパク質は、CEACAM1、CEACAM3、CEACAM5及びCEACAM6からなる群から選択される。

【0069】

1つの実施の形態において、上記固体支持体は、ミクロスフェアである。

【図面の簡単な説明】

【0070】

【図1-1】H.ピロリが、hu-CEACAM1のN-末端ドメインを用いて、CEACAM5及びCEACAM6を結合するが、CEACAM8を結合しないことを示す図である。生H.ピロリ、及び (a) hu-CEACAM1-Fc及び (b) それぞれ、hu-CEACAM5-Fc、hu-CEACAM6-Fc又はhu-CEACAM8-Fcのプルダウン実験を、ウェスタンブロット及びフローサイトメトリーによって分析した (n=3)。(c) CEACAM1、CEACAM5及びCEACAM6に関するヒトの正常な胃、胃炎及び胃癌のIHC染色。スケールバー、50 µm。(d) hu-CEACAM1 N-Fcを、ウェスタンブロットによって検出したか、又は細胞を、-hu-IgG-FITCで染色して、細菌の蛍光強度をフローサイトメトリーによって分析した。(e) GFPでタグ付けしたCEACAM1変異体とともにインキュベートしたH.ピロリを、フローサイトメトリーによって分析し、細菌へ結合するCEACAM変異体の比を測定した。一元配置分散分析、P値=0.009、n.s.:有意でない。エラーバーは、s.e.m.を示す。(f) 脱グリコシル化したhu-CEACAM1-FcとともにインキュベートしたH.ピロリ株のプルダウン実験。

【図1-2】同上

【図1-3】同上

【図2-1】ヒト病原体によるHu-CEACAM1の使用は非常に選択的であることを示す図である。種々のH.ピロリ株及び他の細菌の、CEACAMファミリー成員への結合の定量化。(a、c及びf) H.ピロリ株、モラクセラ・カタラーリス (Moraxella catarrhalis)、モラクセラ・ラクナータ (Moraxella lacunata) 及びカンピロバクター・ジェジュニ (Campylobacter jejuni) を、hu-CEACAM1-Fc、hu-CEACAM3-Fc、hu-CEACAM5-Fc、hu-CEACAM6-Fc及びhu-CEACAM8-Fcとともにインキュベートした。洗浄した後、細菌を溶解させて、タンパク質をSD'S-ゲル/ウェスタンブロットに付して、相当する抗体を用いて検出したか、又は (b、d及びg) 細菌を、抗hu-IgG-FITCを用いて染色して、細菌の蛍光強度をフローサイトメトリーによって分析した (3回の技術的反復)。一元配置分散分析、n.s.:有意でない。エラーバーは、s.e.m.を示す。(e) ナイーブ健常個体及びH.ピロリ陽性胃炎の胃生検材料におけるCEACAM発現の点数化。(h) hu-CEACAM1 (P13688、配列番号28)、CEACAM5 (P06731、配列番号29)、CEACAM6 (P40199、配列番号30) 及びCEACAM8 (P31997、配列番号31) のN-末端ドメインのアミノ酸配列を比較した。(i) 精製hu-CEACAM1-Fc、精製hu-CEACAM1 N-Fc、精製hu-CEACAM6-Fc及び精製hu-CEACAM8-Fc発現のクマシー染色を示すSD'S-PAGE。

【図2-2】同上

【図2-3】同上

【図3-1】CEACAM1オルソログへのH.ピロリ結合を示す図である。(a) GFPでタグ付けした種々の種由来の可溶性のCEACAMを、H.ピロリとともにインキュベートして、蛍光をフローサイトメトリーによって決定した (3回の技術的反復)。(b) ラット-CEACAM1-Fc及び (c) ラット-CEACAM1 N-Fcを使用した細菌プルダウンを、ウェスタンブロットによって検出したか、又は (d) -Hu-IgG-FITCで染色して、フローサイトメトリーによって分析した。(e) ヒト、ラット及びマウスCEACAM1発現CHO細胞へのH.ピロリ結

10

20

30

40

50

合の代表的な共焦点画像。トランスフェクトしていないCHO細胞は、対照としての機能を果たした。スケールバー：左側パネル、25  $\mu\text{m}$ 、右側 (right-hand) パネル、10  $\mu\text{m}$ 。(f) H.ピロリとともにインキュベートした、トランスフェクトしていないCHO細胞、ヒトCEACAM1でトランスフェクトしたCHO細胞、マウスCEACAM1でトランスフェクトしたCHO細胞及びラットCEACAM1でトランスフェクトしたCHO細胞の全細胞溶解産物のプルダウン。洗浄した後、細菌を溶解させて、タンパク質をSD'S-ゲル/ウェスタンブロットに付して、相当する -CEACAM1抗体を用いて検出した。

【図3 - 2】同上

【図4 - 1】CEACAM1オルソログ及び非ピロリ・ヘリコバクターに関する図である。(a) ヒトCEACAM1 (P13688、配列番号28)、マウスCEACAM1 (P31809、配列番号33) 及びラットCEACAM1 (P16573、配列番号32) のN-末端ドメインのアミノ酸配列を比較した。ヒト及びラットCEACAM1配列では同一であるが、マウスCEACAM1配列と異なるアミノ酸を矢印で示す。(b) 生非ピロリ株を、hu-CEACAM1-Fc、CEACAM5-Fc、CEACAM6-Fc、CEACAM8-Fc、及びCEACAM1 N-Fcとともにインキュベートした。厳密な洗浄後、細菌を溶解させて、タンパク質をSD'S-ゲルで分離して、相当する抗体を用いて検出した。(c) 細菌プルダウン及び抗hu-IgG-FITC染色後、細菌の蛍光強度の比をフローサイトメトリーによって分析した(3回の技術的反復)。一元配置分散分析、\* :  $P = 0.03$ 、\*\*\* :  $P = 0.0001$ 、n.s. : 有意でない。(d) H.ピロリ-CEACAM相互作用の分析に関する細菌プルダウンのスキーム。

【図4 - 2】同上

【図5 - 1】H.ピロリは、HopQを介してCEACAM1へ結合することを示す図である。(a) hu-CEACAM1-Fcとともにインキュベートした各種H.ピロリノックアウト株のプルダウン。(b) H.ピロリ株G27の全溶解産物をhu-CEACAM1-Fcとともにインキュベートして、プロテインGセファロースを用いて沈降させた。質量分析用に、タンパク質を変性させて、トリプシンで消化させて、ペプチドをMS/MSにより分析して、続いてH.ピロリG27プロテオームに対して検索した。同定される外膜タンパク質の選択を示す。高いSequestスコアを示すHopQ及びHopZを更に分析した。(c) hu-CEACAM1-Fc、hu-CEACAM5-Fc及びhu-CEACAM6-Fcへの、H.ピロリ株P12、P12 hopQ及びP12 hopZの結合のプルダウン及びウェスタンブロット及びFACS分析。

【図5 - 2】同上

【図6 - 1】H.ピロリのhu-CEACAM1相互作用パートナーとしてのHopQの同定に関連する図である。(a) H.ピロリ株G27の全溶解産物をhu-CEACAM1-Fcとともにインキュベートして、プロテインGセファロースを用いて沈降させた。質量分析用に、タンパク質を変性させて、トリプシンで消化させて、ペプチドをMS/MSにより分析して、続いてH.ピロリG27プロテオームに対して検索した。(b) CHO-CEACAM1、AGS、MKN45及びMKN28を、myc-Hisでタグ付けしたHopQとともに、次にc-myc mAb、続いてFITC結合ヤギ抗マウスF(ab')<sub>2</sub>とともにインキュベートした。並行して、CEACAMの存在は、ウサギ抗-CEA pAb (Dianova社)を用いて染色することによって制御した。バックグラウンド蛍光は、細胞を、HopQタンパク質又は一次抗体の代わりに対照IgG抗体とともにインキュベートすることによって測定した(細線)。試料をフローサイトメトリーによって分析した。(c) 上述するように、表示したCHOトランスフェクタントを、HopQ及び抗CEA pAbとともにインキュベートした。次に、試料をフローサイトメトリーによって分析した( $n = 3$ )。(d) hopQ遺伝子は、全ての大陸のH.ピロリ単離菌から収集した(NCBIデータベース<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)。MEGA6プログラムを適用して、近隣結合(Neighbor-Joining)法を使用してDNA関連性を推測した。複合最尤(Maximum Composite Likelihood)法を利用して、進化距離を計算した。hopQ遺伝子を2つの主要な対立遺伝子変異体(I型及びII型)に分類した。I型対立遺伝子は、より多様であり、表示するように2つのサブグループIa型及びIb型に更に分割した。

【図6 - 2】同上

【図6 - 3】同上

10

20

30

40

50

【図7】HopQアドヘシンドメインのX線構造及び結合特性を示す図である。(a) BabA及びSabAアドヘシンにおいても見られるような(図8d)、3+4-ヘリックス束トポロジーを示すHopQ<sup>AD</sup>のリボン図。大部分のHopファミリー成員において保存される3つのCysペア(Cys102-Cys131、Cys237-Cys269及びCys361-Cys384)は、HopQアドヘシンドメインの遠位末端で、伸長ループを摘み取って(pinch off)、配列多様性の増加を伴って共通タンパク質表面積を形成する。アドヘシンの炭水化物結合部位を収容するBabAの4鎖挿入ドメイン(BabA-ID、図8d)に類似して、HopQ<sup>AD</sup>は、ヘリックスH4とヘリックスH5との間にベータ-ヘアピン挿入ドメイン(HopQ-ID)を保持する。(b) 増加濃度のC1NDへ結合するHopQ<sup>AD</sup>又はHopQ-IDを欠如する突然変異体HopQ<sup>AD</sup> (HopQ<sup>AD</sup> ID)の平均ELISA力価(n=4、±s.d.)。HopQ-IDの欠如は、結合親和性のおよそ10倍の低減をもたらす。(c) ファーウェスタンブロット実験においてクマシーブルー(「C」)を用いて又はHopQ<sup>AD</sup>(「HopQ」)を用いて染色したC1NDのSDSpage及びネイティブpage。SD'S-PAGE及びネイティブ-PAGEは、非グリコシル化タンパク質(下のバンド)の他に、C1NDの3つのグリコシル化形態を示す。HopQ<sup>AD</sup>は、非変性条件下でC1NDを選択的に結合して、HopQ-CEACAM相互作用における強力なタンパク質間の構成成分の関与を実証している。

10

【図8-1】ヒトCEACAM1 N-ドメインへのHopQ<sup>AD</sup>結合の等温滴定量測定(ITC)を示す図である。250 µM HopQ<sup>AD</sup>を用いて滴定した、25 µM C1ND(a)又は大腸菌(E. coli)で発現されるC1ND(Ec-C1ND)(b)のITC注入熱(上)及び正規化した結合等温線(下)は、それぞれ、N-グリコシル化の存在又は非存在下での等価な当モル相互作用を示す。結合親和性及び熱力学的プロファイルを差し込んで示してある。(c) HopQ<sup>AD</sup>のH5ヘリックス周辺で、1.0 Åで外形を示した2mFo-DFc電子密度マップ。(d) BabA<sub>1-527</sub>(PDBアクセッションコード4ZH0)、HopQ<sup>AD</sup>及びSabA<sub>1-460</sub>(PDBアクセッションコード4O5J)の構造の重ね合わせ。BabA及びSabA構造はともに、それらのN-末端においてねじれを示して、それらをコアドメインに垂直に配置するが、この配向の変化は、HopQ構造では欠けている。-ヘリックスコアドメインは、全ての構造間で保存される一方で、HopQにおける2鎖挿入ドメイン(ID)は、BabAにおいて2つの更なる-ストランドによって伸長される。これまでに、BabAのIDが、血液型受容体への付着の原因となることが示された。ストランド及びヘリックスは、HopQトポロジーに従って命名される。(e) この研究で使用されるHopQ<sup>AD</sup>及びHopQ<sup>AD</sup> ID断片のSD'S-PAGE及び略図。(f) 増加濃度のCEACAM5又はCEACAM8へ結合するHopQ<sup>AD</sup>又はHopQ-IDを欠如する突然変異体HopQ<sup>AD</sup> (HopQ<sup>AD</sup> ID)の平均ELISA力価(n=4、±s.d.)。

20

30

【図8-2】同上

【図9-1】H.ピロリにおけるhopQの欠失が、細菌細胞接着の低減をもたらして、CagA送達、IL-8放出及び細胞伸長を抑制することを示す図である。(a) MOI 10のCFSE-DA標識した細菌株P12、G27、P12 hopQ及びG27 babA sabAとともにインキュベートしたCHO-hu-CEACAM1-L、MKN45及びAGS細胞のフローサイトメトリー分析(3回の技術的反復)。平均値±s.e.mを示す。両側t検定、\*P 0.03。(b) CHO-CEACAM1-L細胞を、H.ピロリとともに、及びH.ピロリを伴わずにインキュベートした。続いて、CEACAM1のTyrリン酸化をIP及びウェスタンブロットによって分析した。過パナジン酸塩処理は、陽性対照としての機能を果たし、CEACAM1の検出はローディング対照(最下)としての機能を果たした。(c) AGS細胞を、P12、NCTC11637及び相当する同質遺伝子hopQ突然変異体で感染させた。プロットを、-ホスホチロシン及び-CagAでプローブした。(d) ELISAによって決定されるAGSによるIL-8の生成。(e) 表示したH.ピロリwt及びノックアウト株又はwt hopQ遺伝子を再発現するNCTC11637 hopQで感染させたHAでタグ付けしたHEK293-hu-CEACAM1トランスフェクタント。(f) 異なって感染させたAGSの代表的な位相差顕微鏡写真。(g) P12、P12 hopQ又はwt hopQ遺伝子を再発現するP12 hopQ/hopQで6時間感染させたAGS細胞(3回の技術的反復)。(h) AGS細胞を、4×10<sup>5</sup>個の細胞につき -CEACAM Ab 2 µg、5 µg、10 µg又は20 µgで前処理した(レーン3~レーン6)。30分のインキュベーション後、MOI 20の野生型H.ピ

40

50

ロリを細胞に添加した。(i)野生型H.ピロリを、 $8 \times 10^6$ 個の細菌につき -HopQ 2  $\mu$ g、5  $\mu$ g、10  $\mu$ g又は20  $\mu$ gで前処理した(レーン3～レーン6)後、AGS細胞に添加した。6時間の感染後、細胞を撮影して、収集した後、-PY99及び-CagAで免疫プロットした。最下パネルは、5個の異なる0.25 mm<sup>2</sup>の領域における各実験での伸長AGS細胞の定量化を示す(3回の技術的反復)。エラーバーは、平均値 $\pm$ s.d.を示す。(j) HopQ-IDに相当するHopQ由来のペプチド(aa 190～218)による細胞のブレインキューベーションは、低マイクロモル濃度で、CagAのHopQ依存性リン酸化及び細胞伸長を阻害する。

【図9-2】同上

【図10-1】胃細胞系統におけるCEACAM発現パターン及びCagAリン酸化の特性化を示す図である。種々の細胞成長段階における胃細胞系統を、hu-CEACAM1、CEACAM5及びCEACAM6に関してmAbで染色して、(a) FITC結合二次抗体によって染色して、続いてCEACAM細胞表面発現をフローサイトメトリーによってモニタリングしたか、又は(b)細胞溶解産物をSD'S-ゲル/ウェスタンブロットに付して、相当する抗体を用いて検出した。(c) AGS細胞を、wt H.ピロリ株P12及び重要なアドヘシンの各種同質遺伝子突然変異体(BabA、SabA及びOipA又は二重突然変異体BabA/SabA)で感染させた。細胞を、MOI 50を使用して6時間感染させた。プロットを、-PY-99でプローブした。(d) HEK293細胞を、ベクター対照でトランスフェクトした後、表示したcagPAI陽性H.ピロリ株P12、NCTC11637及びcagPAI陰性株Ka89で6時間、MOI 50で感染させた。(e) HEK293細胞を、表示したCEACAM発現ベクターで48時間トランスフェクトした後、wt H.ピロリ株NCTC11637で6時間、MOI 50で感染させた。抗CagA検出は、同等の細菌ローディング用の対照としての機能を果たした。抗GAPDH検出は、細胞溶解産物ローディング対照としての機能を果たした。(f) CHO-hu-CEACAM1-4Lを、転写因子Myc、STAT3、CreATF2/CREB、GREに関する表示したルシフェラーゼレポーター構築物及び陰性対照としてpTAL-ルシフェラーゼでトランスフェクトした。次に、トランスフェクトした細胞を、H.ピロリwt、同質遺伝子hopQ検出突然変異体で感染させたか、又は未処理のままにして、続いて、表示するように相対発光量(RLU)としてルシフェラーゼ活性の測定を行った(n=3)。(g) HopQ<sup>AD</sup>によるAGS細胞のブレインキューベーションは、マイクロモル以下の濃度でCagAのP12誘導性リン酸化、及び細胞伸長を阻害するが、HopQ-ID検出突然変異体(HopQ<sup>AD</sup> ID)によるAGS細胞のブレインキューベーションは、これらを阻害しない。同様に、HopQ-IDペプチド(aa 190～218、図9jを参照)によるブレインキューベーションは、完全HopQ<sup>AD</sup>と比較して、およそ10倍～20倍高い濃度においてではあるが、CagAのP12誘導性リン酸化を阻止する。

【図10-2】同上

【図11】ラットの胃のH.ピロリコロニー形成は、HopQに依存することを示す図である。(a) ラット-CEACAM1に関するラットの胃のIHC染色。(b) 雄スプラーグドローリーラット(データは、1群につき8匹のラットを用いた1回の実験からのものである)は、SS1及びSS1 hopQ株で2回、経口感染させた。平均値 $\pm$ s.e.mを示す。両側t検定、\*P=0.02。(c) 感染したラットの胃のヘマトキシリン/エオシン染色。

【図12】H.ピロリのSS1株のみが、ラットの胃にコロニーを形成することができることを示す図である。(a) フローサイトメトリー及びウェスタンブロットによって分析されるH.ピロリwt株SS1、SS1 hopQ、wt hopQ遺伝子を再発現するSS1 hopQ、並びにhu-CEACAM1-Fc及びラット-CEACAM1-Fcを用いたブルダウン実験。(b) ラットの胃生検材料の単離されたRNAにおけるラット-CEACAM1の発現。NTC：鋳型なしの対照、NEC：酵素なしの対照。

【図13-1】(a) ヒトCEACAM1のN-末端ドメイン(huCEACAM1-ND)に結合されるHopQアドヘシンドメイン(HopQ<sup>AD</sup>)のX線構造を示す図である。CEACAM1-NDと接触界面を形成するHopQループは、配列番号15(株P12のHopQ)の残基123～136(ループA)、残基152～180(ループB)及び残基258～290(ループC)を含む。HopQ挿入ドメイン(例えば、配列番号1の残基210～238を参照)及び配列番号15のループ371～407(ループD)は、直接的な結合界面に隣接している。CEACAM結合界面の内側に存

10

20

30

40

50

在するか、又はそれに隣接するペプチドに対して産生された抗体は、中和作用を有し、立体障害によってHopQ-CEACAM結合を阻害する。(b) H.ピロリ株P12に見出されるような代表的な配列及び4つのループに関するコンセンサス配列。コンセンサス配列は、種々の臨床的なH.ピロリ単離菌由来の87個の代表的なHopQ対立遺伝子の多重配列アラインメントに基づき、ここで、個々のアミノ酸上のバーの高さは、HopQ対立遺伝子間の同一性を示す。配列保存のロゴは、各々のループにおける考え得るアミノ酸配列変動を示し、ここで、アミノ酸一文字の記号の高さは、その蓋然性を表している。

【図13-2】同上

【図13-3】同上

【発明を実施するための形態】

【0071】

本発明は、前後で詳細に記載されているが、本発明は、本明細書に記載される特定の方法論、プロトコル及び試薬に限定されるものではなく、これらは変更することができると理解されるべきである。また、本明細書で使用される用語は、単に特定の実施形態を説明するためのものであると理解されるべきであり、本発明の範囲を限定することを目的とするものではなく、本発明の範囲は、付属の特許請求の範囲によってのみ限定されることとなる。特に定義されない限り、本明細書で使用される全ての技術用語及び科学用語は、当業者によって通常理解されるのと同じ意味を有する。

【0072】

以下で、本発明の特定の構成要素に記載することとする。これらの構成要素は、特定の実施形態をもって列挙されることがあるが、それらの構成要素を、あらゆる様式及びあらゆる数において組み合わせることで、更なる実施形態を作り出すことができると理解されるべきである。様々に記載される例及び好ましい実施形態は、本発明を明示的に記載された実施形態のみに限定するものと解釈されるべきではない。この詳細な説明は、明示的に記載された実施形態と幾つもの開示された構成要素及び/又は好ましい構成要素とを合わせた実施形態をサポートし、かつ包含するものと理解されるべきである。さらに、本出願に記載される全ての構成要素のあらゆる並び替え及び組み合わせも、内容により特に指示されない限り、本出願の詳細な説明によって開示されるものと考慮されるべきである。

【0073】

好ましくは、本明細書で使用される用語は、「生物学用語の多言語用語集(IUPAC推奨)(A multilingual glossary of biotechnological terms (IUPAC Recommendations))」、H.G.W. Leuenberger、B. Nagel及びH. Koelbl編、Helvetica Chimica Acta、スイス、CH-4010バーゼル、(1995)に記載されるように定義される。

【0074】

本発明の実施では、特に示されない限り、当該分野での文献(例えば、モレキュラー・クローニング:研究室マニュアル(Molecular Cloning: A Laboratory Manual)、第3版、J. Sambrook他編、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor 2000を参照)に説明される化学、生化学、細胞生物学、免疫学及び組換えDNA技術の慣用の方法が使用されることとなる。

【0075】

以降の本明細書及び特許請求の範囲全体を通じて、内容により特に必要とされない限り、「含む(comprise)」という用語並びに「含む(comprises)」及び「含む(comprising)」等の別形は、示された要素、整数若しくは工程又は複数の要素、複数の整数若しくは複数の工程の群を包含することを意味するが、その他のあらゆる要素、整数若しくは工程又は複数の要素、複数の整数若しくは複数の工程の群を除外することを意味するものではないと理解されることとなるが、幾つかの実施形態においては、そのようなその他の要素、整数若しくは工程又は複数の要素、複数の整数若しくは複数の工程の群が排除されることがある、すなわち、その対象は、示された要素、整数若しくは工程又は複数の要素、複数の整数若しくは複数の工程の群を包含することにある。数量が特定されていない語(The terms "a" and "an" and "the")及び本発明の記載に関して(特に特許請求の範

10

20

30

40

50

図において) 使用される同様の指示は、本明細書で特に示されない限り、又は内容により明らかに矛盾しない限り、単数及び複数の両方を包含するものと理解されるべきである。本明細書における値の範囲の列挙は、単に、その範囲内に含まれるそれぞれ別々の値を個別に指す略式法としての役割を果たすものと解釈されるにすぎない。本明細書で特に示されない限り、それぞれの個別の値は、その値が本明細書で個別に列挙されているかのごとく、本明細書中に組み込まれる。本明細書に記載される全ての方法は、本明細書で特に示されない限り、又は内容により明らかに矛盾しない限り、任意の適切な順序で行うことができる。本明細書中で規定されるあらゆる例又は例示的な言い回し(例えば、「等の(such as)」)の使用は、単に本発明をより良く説明するものと解釈されるにすぎず、決してその他の点で規定される本発明の範囲に限定を与えるものではない。本明細書中の言い回しは、本発明の実施に必須な何らかの規定されていない構成要素を示していると解釈されるべきではない。

10

#### 【0076】

幾つかの文献が本明細書の文章全体を通して引用される。本明細書に引用される各々の文献(特許、特許出願、科学出版物、製造者の仕様書、使用説明書等の全てを含む)は、上記又は下記を問わず、それらの全体が引用することにより本明細書の一部をなす。本明細書中のいずれの記載も、本発明が先行発明のためにかかる開示に先行する権利がないことを認めるものと解釈されるものではない。

#### 【0077】

H.ピロリは、ヒトの胃の上皮に特異的にコロニーを形成するものであり、潰瘍性疾患及び胃癌の発症に関する主な原因因子である。本発明者らは、ヒトH.ピロリ単離菌全ての重要な受容体として癌胎児性抗原関連細胞接着分子(CEACAM)ファミリーの成員を同定しており、HopQが、ヒトCEACAM1、CEACAM3、CEACAM5及びCEACAM6を特異的に結合する新規の表面で露出されるアドヘシンであることを示す。CEACAM1 N-ドメインへのH.ピロリ結合は、CEACAM1媒介性シグナル伝達を誘導し、HopQ-CEACAM1相互作用は、病原性因子CagAの宿主細胞への移行を可能にし、ラット感染モデルにおけるコロニー形成を可能にし、インターロイキン-8等の炎症促進性媒介因子の放出を増強する。HopQ及びHopQ-CEACAM複合体の結晶構造に基づいて、本発明者らは、HopQの細胞外3+4ヘリックス束ドメインにおけるベータ-ヘアピン挿入ドメイン及び4つの特異的なループ領域がCEACAM結合に関与することを見出した。挿入ドメインに由来するペプチドは、HopQ機能の遺伝的又は抗体媒介性抑止がそうであるように、CagAの病原性経路のHopQ媒介性活性化を競合的に阻害する。総合すると、本発明は、H.ピロリ関連疾患と闘うための新規治療的標的として、HopQ-CEACAM相互作用を同定する。

20

30

#### 【0078】

本発明は、H.ピロリによって引き起こされるか、又はH.ピロリと関連付けられる疾患又は障害を予防又は治療する方法における使用のための、H.ピロリHopQと、癌胎児性抗原関連細胞接着分子(CEACAM)ファミリーの成員との間の相互作用の阻害剤を提供する。

#### 【0079】

本発明は、H.ピロリによって引き起こされるか、又はH.ピロリと関連付けられる疾患又は障害を予防又は治療するための薬剤の作製における、H.ピロリHopQと、CEACAMファミリーの成員との間の相互作用の阻害剤の使用を更に提供する。

40

#### 【0080】

本発明は、対象において、H.ピロリによって引き起こされるか、又はH.ピロリと関連付けられる疾患又は障害を予防又は治療する方法であって、H.ピロリHopQと、CEACAMファミリーの成員との間の相互作用の阻害剤を、対象に投与することを含む、方法を更に提供する。

#### 【0081】

本発明によれば、H.ピロリによって引き起こされるか、又はH.ピロリと関連付けられる疾患又は障害は、好ましくは、H.ピロリ感染及びH.ピロリによって引き起こされる胃十二指腸障害からなる群から選択される。

50

## 【0082】

「感染」という用語は、本明細書中で使用する場合、疾患を引き起こす因子（例えば、H.ピロリ）による対象の身体組織の浸潤、それらの増殖、並びにこれらの因子及びこれらの因子が産生する毒素に対する組織の反応を指す。

## 【0083】

「胃十二指腸障害」（又は単に「胃障害」）という用語は、本明細書中で使用する場合、胃及び隣接している十二指腸を冒す障害を指す。「H.ピロリによって引き起こされる胃十二指腸障害」は、当業者に既知であり、例えば、胃炎、慢性胃炎、胃萎縮症、胃又は十二指腸潰瘍、胃癌（胃の癌とも称される）及びMALTリンパ腫を含む。

## 【0084】

「対象」という用語は、本明細書中で記載する場合、脊椎動物、特に、ヒト及び別の哺乳動物、例えば、げっ歯類、ウサギ、ウシ、ヒツジ、ウマ、イヌ、ネコ、ラマ、ブタ又は非ヒト霊長類（例えば、サル）等の動物の両方を含む任意の哺乳動物等の任意の生物を指す。げっ歯類は、マウス、ラット、ハムスター、モルモット、又はチンチラであり得る。1つの実施形態において、対象は、ヒト、ラット又は非ヒト霊長類である。好ましくは、対象は、ヒトである。1つの実施形態において、対象は、疾患又は障害、特に本明細書中に開示するような疾患若しくは障害を有するか、又は疾患若しくは障害を有する疑いのある対象であり、本明細書中では「患者」とも呼ばれる。

## 【0085】

「予防すること」という用語は、本明細書中で使用する場合、疾患又は障害の発病を停止／阻害すること（例えば、予防的処置によって）を指し得る。この用語はまた、疾患若しくは障害の発病の遅延、疾患若しくは障害と関連付けられる症状の頻度の低減又はその症状の重篤性の低減（例えば、予防的処置によって）を指し得る。

## 【0086】

「治療すること」という用語は、本明細書中で使用する場合、健康状態を改善し、及び／又は患者の寿命を延長する（増やす）任意の処置を指す。

## 【0087】

「薬剤」という用語は、本明細書中で使用する場合、治療法において、即ち、疾患又は障害の予防又は治療において使用される物質／組成物を指す。本発明によれば、「疾患」又は「障害」という用語は、任意の病理学的状態、特に、本明細書中で規定するような疾患又は障害を指す。

## 【0088】

癌胎児性抗原関連細胞接着分子（CEACAM）ファミリーは、免疫グロブリン関連脊椎動物糖タンパク質の既知のファミリーである（例えば、Tchoupa et al., 2014を参照）。CEACAMファミリーの成員は通常、N-末端細胞外Ig<sub>V</sub>様ドメインを含み、それに、最大6つの細胞外Ig<sub>C2</sub>様ドメインが続いてもよく、C-末端膜貫通ドメイン（TMヘリックス）又はC-末端GPI-アンカーを介して細胞膜において係留される。Ig<sub>V</sub>様ドメインはまた、N-末端ドメイン又はN-ドメインとも称される。例えば、ヒトCEACAM1は、N-ドメイン、続いて、3つの（A1、B、A2）Ig<sub>C2</sub>様ドメインを含む。1つの実施形態において、ヒトCEACAM1のN-ドメインは、ヒトCEACAM1のアミノ酸残基35～142を含む、本質的にそれらからなる、又はそれらからなる。

## 【0089】

本発明によれば、CEACAMファミリーの成員は、好ましくは、上皮細胞、内皮細胞及び／又は免疫細胞（特に、T細胞、B細胞及び好中球等の白血球）の表面上で発現される。1つの実施形態において、CEACAMファミリーの成員は、上皮細胞（例えば、胃の上皮細胞）の表面上で、好ましくは上皮細胞の頂端側で発現される。

## 【0090】

本発明によれば、CEACAMファミリーの成員は、好ましくは、ヒトCEACAMファミリー成員、非ヒト霊長類CEACAMファミリー成員及びラットCEACAMファミリー成員からなる群から選択される。1つの実施形態において、CEACAMファミリーの成員は、ヒトCEACA

10

20

30

40

50

Mファミリーの成員である。1つの実施形態において、CEACAMファミリーの成員は、CEACAM8ではない。1つの実施形態において、CEACAMファミリーの成員は、CEACAM4、CEACAM7及びCEACAM8ではない。1つの実施形態において、CEACAMファミリーの成員は、CEACAM1、CEACAM3、CEACAM5及びCEACAM6からなる群から選択される。1つの実施形態において、CEACAMファミリーの成員は、CEACAM1、CEACAM5及びCEACAM6からなる群から選択される。1つの実施形態において、CEACAMファミリーの成員は、CEACAM1である。ヒトCEACAM1のUniProt IDは、P13688である。ヒトCEACAM3のUniProt IDは、P40198である。ヒトCEACAM5のUniProt IDは、P06731である。ヒトCEACAM6のUniProt IDは、P40199である。

【0091】

「H.ピロリHopQ」及び「HopQ」という用語は、本明細書中では区別なく使用される。HopQは、外膜タンパク質のH.ピロリ特異的なパラログスなファミリーの成員である。H.ピロリhopQ (omp27; H.ピロリ参照株26695におけるHP1177) は、2つの対立遺伝子ファミリーであるI型及びII型を表す遺伝的多様性を示す。本発明によれば、「H.ピロリHopQ」という用語は、I型及びII型 HopQタンパク質の両方を包含する。1つの実施形態において、H.ピロリHopQは、I型HopQタンパク質又はII型HopQタンパク質である。1つの実施形態において、I型HopQタンパク質は、配列番号1若しくは配列番号3若しくは配列番号15のアミノ酸配列、又は配列番号1若しくは配列番号3若しくは配列番号15のアミノ酸配列に少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%又は99%類似する、好ましくは同一であるアミノ酸配列を有する。1つの実施形態において、II型HopQタンパク質は、配列番号5のアミノ酸配列、又は配列番号5のアミノ酸配列に少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%又は99%類似する、好ましくは同一であるアミノ酸配列を有する。

【0092】

「配列類似性」は、同一であるか、又は保存的アミノ酸置換を表すアミノ酸のパーセントを示す。2つのアミノ酸配列間の「配列同一性」は、配列間で同一であるアミノ酸のパーセントを示す。配列類似性、好ましくは配列同一性を決定するためのアラインメントは、当該技術分野で既知のツールを用いて、好ましくは最良の配列アラインメントを使用して、例えば、CLC main Workbench (CLC bio社) 又はAlignを使用して、標準的な設定、好ましくはEMBOSS::needle, Matrix: Blosum62, Gap Open 10.0, Gap Extend 0.5を使用して実施することができる。

【0093】

1つの実施形態において、阻害剤は、H.ピロリHopQの、CEACAMファミリーの成員への結合及び/又はHopQ-CEACAM媒介性シグナル伝達を阻害する。

【0094】

「HopQ-CEACAM媒介性シグナル伝達」という用語は、本明細書中で使用する場合、CagA病原性経路の活性化及び/又はCagAのリン酸化及び/又は細胞(例えば、上皮細胞)へのCagA移行及び/又はIL-8誘導及び/又は細胞伸長を指す。1つの実施形態において、HopQ-CEACAM媒介性シグナル伝達は、細胞(例えば、上皮細胞)へのCagA移行、IL-8誘導及び細胞伸長を指す。1つの実施形態において、HopQ-CEACAM媒介性シグナル伝達は、細胞(例えば、上皮細胞)へのCagA移行を指す。

【0095】

1つの実施形態において、阻害剤は、H.ピロリHopQの、CEACAMファミリーの成員への、好ましくはCEACAMファミリーの成員の細胞外ドメインへの結合を阻害し、例えばそれを競合的に阻害する。

【0096】

「細胞外ドメイン」という用語は、本明細書中で使用する場合、細胞質ゾル/細胞質ではなく、膜中にも包埋されていないタンパク質の部分の部分を指し、細胞の表面で、及び/又は細胞膜周辺腔中に位置/露出される部分を含むと意図される。かかる配列/ドメインは、当業者に既知の標準的なバイオインフォマティクスツール及び/又は公共データベース

10

20

30

40

50



を使用することによって同定され得る。1つの実施形態において、細胞外ドメインは、N-末端分泌配列を更に欠如する。

【0097】

CEACAMファミリーの成員に関連して、「細胞外ドメイン」という用語は、上記成員の細胞外部分全体を指してもよく、「細胞外ドメイン」という用語は、好ましくは、特異的なCEACAMファミリー成員に応じて、1つ以上のIg<sub>C2</sub>様ドメインが続き得るN-ドメインを含む。1つの実施形態において、CEACAMファミリー成員の細胞外ドメインは、N-ドメイン及び1つ、2つ、3つ、4つ、5つ又は6つのIg<sub>C2</sub>様ドメインを含むか、本質的にそれらからなるか、又はそれらからなる。1つの実施形態において、CEACAMファミリー成員の細胞外ドメインは、N-ドメインを含むか、本質的にそれらからなるか、又はそれらからなる。1つの実施形態において、細胞外ドメインは、N-ドメインである。「断片」という用語は、CEACAMファミリー成員の細胞外ドメインに関連して使用する場合、N-ドメイン及び/又は1つ以上のIg<sub>C2</sub>様ドメインを指し得る。「断片」という用語はまた、N-ドメイン及び/又は1つ以上のIg<sub>C2</sub>様ドメインの断片を指し得るが、但し、これらの断片は、H.ピロリHopQと相互作用し、及び/又はそれへ結合することが可能である（HopQ結合断片とも称される）。

10

【0098】

H.ピロリHopQに関連して、「細胞外ドメイン」という用語は、H.ピロリHopQの細胞外部分全体、即ち、C-末端膜貫通ドメインを欠如する完全長タンパク質を指し得る。1つの実施形態において、細胞外ドメインは、N-末端ベータ-ストランド及び/又は分泌配列を更に欠如する。1つの実施形態において、細胞外ドメインは、配列番号1の残基37~463を含むか、本質的にそれらからなるか、又はそれらからなるアミノ酸配列に相当する。1つの実施形態において、細胞外ドメインは、H.ピロリHopQの挿入ドメインを含むか、本質的にそれらからなるか、又はそれらからなる。1つの実施形態において、細胞外ドメインは、H.ピロリHopQの挿入ドメインである。1つの実施形態において、H.ピロリHopQの細胞外ドメインは、H.ピロリHopQのループA、ループB、ループC及び/又はループD、好ましくはループA、ループB及び/又はループCを含むか、本質的にそれらからなるか、それらからなるか、又はそれらである。「断片」という用語は、H.ピロリHopQの細胞外ドメインに関連して使用する場合、好ましくは、CEACAMファミリー成員と相互作用し、及び/又はそれへ結合することが可能である断片を指す（CEACAM結合断片とも称される）。

20

30

【0099】

「挿入ドメイン」という用語は、本明細書中で使用する場合、CEACAM結合に関与する、H.ピロリHopQの細胞外3+4ヘリックス束ドメインにおける、より詳細にはヘリックスH4とヘリックスH5との間の、ベータ-ヘアピン挿入ドメインを指す。挿入ドメインは、本明細書中でHopQ-IDとも称される。1つの実施形態において、挿入ドメインは、配列番号1の残基210~238を含むか、本質的にそれらからなるか、又はそれらからなるアミノ酸配列に相当する。

【0100】

「ループA」という用語は、本明細書中で使用する場合、H.ピロリHopQのヘリックスH3とストランドS1との間に位置するループを指す。

40

【0101】

1つの実施形態において、ループAは、アミノ酸配列CGGYX<sub>a5</sub>X<sub>a6</sub>X<sub>a7</sub>PX<sub>a9</sub>EX<sub>a11</sub>X<sub>a12</sub>QK（配列番号17）を含むか、本質的にそれらからなるか、又はそれらからなり、ここで、X<sub>a5</sub>は、T及びYからなる群から選択されるアミノ酸であるか、又は欠失され、X<sub>a6</sub>は、K及びNからなる群から選択されるアミノ酸であるか、又は欠失され、X<sub>a7</sub>は、S、K、N及びTからなる群から選択されるアミノ酸であるか、又は欠失され、X<sub>a9</sub>は、G、S、Q、R、T、I及びVからなる群から選択されるアミノ酸であるか、又は欠失され、X<sub>a11</sub>は、N及びGからなる群から選択されるアミノ酸であるか、又は欠失され、X<sub>a12</sub>は、N及びHからなる群から選択されるアミノ酸であるか、又は欠失される。

50

## 【 0 1 0 2 】

1つの実施形態において、ループAは、配列番号21のアミノ酸配列を含むか、本質的にそれらからなるか、又はそれらからなる。1つの実施形態において、ループAは、配列番号15の残基123～136を含むか、本質的にそれらからなるか、又はそれらからなるアミノ酸配列に相当する。

## 【 0 1 0 3 】

「ループB」という用語は、本明細書中で使用する場合、H.ピロリHopQのストランドS2とヘリックスH4との間に位置するループを指す。

## 【 0 1 0 4 】

1つの実施形態において、ループBは、アミノ酸配列CGGX<sub>b4</sub>X<sub>b5</sub>X<sub>b6</sub>X<sub>b7</sub>X<sub>b8</sub>GX<sub>b10</sub>X<sub>b11</sub>X<sub>b12</sub>X<sub>b13</sub>X<sub>b14</sub>X<sub>b15</sub>GX<sub>b17</sub>X<sub>b18</sub>X<sub>b19</sub>LX<sub>b21</sub>AX<sub>b23</sub>KX<sub>b25</sub>X<sub>b26</sub>SLSI（配列番号18）を含むか、本質的にそれらからなるか、又はそれらからなり、ここで、

X<sub>b4</sub>は、S、G、N、T及びFからなる群から選択されるアミノ酸であるか、又は欠失され、

X<sub>b5</sub>は、T及びIからなる群から選択されるアミノ酸であるか、又は欠失され、

X<sub>b6</sub>は、N、G及びKからなる群から選択されるアミノ酸であるか、又は欠失され、

X<sub>b7</sub>は、S及びAからなる群から選択されるアミノ酸であるか、又は欠失され、

X<sub>b8</sub>は、N及びDからなる群から選択されるアミノ酸であるか、又は欠失され、

X<sub>b10</sub>は、Q、K及びRからなる群から選択されるアミノ酸であるか、又は欠失され、

X<sub>b11</sub>は、T、V及びSからなる群から選択されるアミノ酸であるか、又は欠失され、

X<sub>b12</sub>は、H、Q及びYからなる群から選択されるアミノ酸であるか、又は欠失され、

X<sub>b13</sub>は、S及びNからなる群から選択されるアミノ酸であるか、又は欠失され、

X<sub>b14</sub>は、S、P及びNからなる群から選択されるアミノ酸であるか、又は欠失され、

X<sub>b15</sub>は、N及びSからなる群から選択されるアミノ酸であるか、又は欠失され、

X<sub>b17</sub>は、T及びVからなる群から選択されるアミノ酸であり、

X<sub>b18</sub>は、N及びSからなる群から選択されるアミノ酸であり、

X<sub>b19</sub>は、T、L及びMからなる群から選択されるアミノ酸であるか、又は欠失され、

X<sub>b21</sub>は、K及びPからなる群から選択されるアミノ酸であるか、又は欠失され、

X<sub>b23</sub>は、D、G及びAからなる群から選択されるアミノ酸であるか、又は欠失され、

X<sub>b25</sub>は、N及びGからなる群から選択されるアミノ酸であるか、又は欠失され、

X<sub>b26</sub>は、V及びSからなる群から選択されるアミノ酸であるか、又は欠失される。

## 【 0 1 0 5 】

1つの実施形態において、ループBは、配列番号22又は配列番号23のアミノ酸配列を含むか、本質的にそれらからなるか、又はそれらからなる。1つの実施形態において、ループBは、配列番号15の残基152～180を含むか、本質的にそれらからなるか、又はそれらからなるアミノ酸配列に相当する。

## 【 0 1 0 6 】

「ループC」という用語は、本明細書中で使用する場合、H.ピロリHopQのヘリックスH5とヘリックスH6との間に位置するループを指す。

## 【 0 1 0 7 】

1つの実施形態において、ループCは、アミノ酸配列CPX<sub>c3</sub>LIX<sub>c6</sub>X<sub>c7</sub>X<sub>c8</sub>X<sub>c9</sub>X<sub>c10</sub>X<sub>c11</sub>X<sub>c12</sub>X<sub>c13</sub>X<sub>c14</sub>X<sub>c15</sub>X<sub>c16</sub>X<sub>c17</sub>X<sub>c18</sub>NX<sub>c20</sub>PSWQX<sub>c25</sub>X<sub>c26</sub>X<sub>c27</sub>X<sub>c28</sub>X<sub>c29</sub>KNX<sub>c32</sub>C（配列番号19）を含むか、本質的にそれらからなるか、又はそれらからなり、ここで、

X<sub>c3</sub>は、M、I及びVからなる群から選択されるアミノ酸であるか、又は欠失され、

X<sub>c6</sub>は、A及びGからなる群から選択されるアミノ酸であるか、又は欠失され、

X<sub>c7</sub>は、K及びRからなる群から選択されるアミノ酸であるか、又は欠失され、

X<sub>c8</sub>は、S及びTからなる群から選択されるアミノ酸であるか、又は欠失され、

X<sub>c9</sub>は、S及びTからなる群から選択されるアミノ酸であるか、又は欠失され、

X<sub>c10</sub>は、S、N及びGからなる群から選択されるアミノ酸であるか、又は欠失され、

X<sub>c11</sub>は、G、N、E、S及びDからなる群から選択されるアミノ酸であるか、又は欠失され、

X<sub>c12</sub>は、S、G及びNからなる群から選択されるアミノ酸であるか、又は欠失され、

X<sub>c13</sub>は、S、M、G、N及びTからなる群から選択されるアミノ酸であるか、又は欠失され、  
X<sub>c14</sub>は、G、A、T、S、N及びMからなる群から選択されるアミノ酸であるか、又は欠失され、

X<sub>c15</sub>は、G、N、T、A及びVからなる群から選択されるアミノ酸であるか、又は欠失され、

X<sub>c16</sub>は、A、N、G及びSからなる群から選択されるアミノ酸であるか、又は欠失され、

X<sub>c17</sub>は、T、N、A、G及びSからなる群から選択されるアミノ酸であるか、又は欠失され、

X<sub>c18</sub>は、T及びAからなる群から選択されるアミノ酸であるか、又は欠失され、

X<sub>c20</sub>は、T及びAからなる群から選択されるアミノ酸であるか、又は欠失され、

X<sub>c25</sub>は、T及びIからなる群から選択されるアミノ酸であるか、又は欠失され、

X<sub>c26</sub>は、A、S、T及びNからなる群から選択されるアミノ酸であるか、又は欠失され、

10

X<sub>c27</sub>は、G及びSからなる群から選択されるアミノ酸であるか、又は欠失され、

X<sub>c28</sub>は、G及びNからなる群から選択されるアミノ酸であるか、又は欠失され、

X<sub>c29</sub>は、G、L及びSからなる群から選択されるアミノ酸であるか、又は欠失され、

X<sub>c32</sub>は、S及びAからなる群から選択されるアミノ酸であるか、又は欠失される。

【0108】

1つの実施形態において、ループCは、配列番号24又は配列番号25のアミノ酸配列を含むか、本質的にそれらからなるか、又はそれらからなる。1つの実施形態において、ループCは、配列番号15の残基258～290を含むか、本質的にそれらからなるか、又はそれらからなるアミノ酸配列に相当する。

【0109】

20

「機能性断片」という用語は、ループA、ループB及び/又はループCに関連して使用する場合、好ましくは、CEACAMファミリー成員と相互作用し、及び/又はそれへ結合することが可能である断片を指す（CEACAM結合断片とも称される）。

【0110】

「ループD」という用語は、本明細書中で使用する場合、H.ピロリHopQのヘリックスH7とヘリックスH8との間に位置するループを指す。

【0111】

1つの実施形態において、ループDは、アミノ酸配列SSX<sub>d3</sub>X<sub>d4</sub>LKX<sub>d7</sub>YIX<sub>d10</sub>KCDX<sub>d14</sub>SX<sub>d16</sub>X<sub>d17</sub>SX<sub>d19</sub>X<sub>d20</sub>X<sub>d21</sub>X<sub>d22</sub>X<sub>d23</sub>NMX<sub>d26</sub>X<sub>d27</sub>X<sub>d28</sub>X<sub>d29</sub>X<sub>d30</sub>KX<sub>d32</sub>X<sub>d33</sub>X<sub>d34</sub>WGX<sub>d37</sub>GCAG（配列番号20）を含むか、本質的にそれらからなるか、又はそれらからなり、ここで、

30

X<sub>d3</sub>は、G及びDからなる群から選択されるアミノ酸であるか、又は欠失され、

X<sub>d4</sub>は、H及びYからなる群から選択されるアミノ酸であるか、又は欠失され、

X<sub>d7</sub>は、D及びNからなる群から選択されるアミノ酸であるか、又は欠失され、

X<sub>d10</sub>は、G及びRからなる群から選択されるアミノ酸であるか、又は欠失され、

X<sub>d14</sub>は、M、A及びVからなる群から選択されるアミノ酸であるか、又は欠失され、

X<sub>d16</sub>は、A及びGからなる群から選択されるアミノ酸であるか、又は欠失され、

X<sub>d17</sub>は、I及びVからなる群から選択されるアミノ酸であるか、又は欠失され、

X<sub>d19</sub>は、S及びGからなる群から選択されるアミノ酸であるか、又は欠失され、

X<sub>d20</sub>は、任意のアミノ酸であるか、又は欠失され、

40

X<sub>d21</sub>は、任意のアミノ酸であるか、又は欠失され、

X<sub>d22</sub>は、任意のアミノ酸であるか、又は欠失され、

X<sub>d23</sub>は、T、A及びSからなる群から選択されるアミノ酸であるか、又は欠失され、

X<sub>d26</sub>は、T及びAからなる群から選択されるアミノ酸であるか、又は欠失され、

X<sub>d27</sub>は、M、P、A及びQからなる群から選択されるアミノ酸であるか、又は欠失され、

X<sub>d28</sub>は、Q、R、K及びHからなる群から選択されるアミノ酸であるか、又は欠失され、

X<sub>d29</sub>は、S及びNからなる群から選択されるアミノ酸であるか、又は欠失され、

X<sub>d30</sub>は、Q及びMからなる群から選択されるアミノ酸であるか、又は欠失され、

X<sub>d32</sub>は、N及びSからなる群から選択されるアミノ酸であるか、又は欠失され、

X<sub>d33</sub>は、N及びTからなる群から選択されるアミノ酸であるか、又は欠失され、

50

X<sub>d34</sub>は、T、N及びIからなる群から選択されるアミノ酸であるか、又は欠失され、  
X<sub>d37</sub>は、N及びKからなる群から選択されるアミノ酸であるか、又は欠失される。

【0112】

1つの実施形態において、ループDは、配列番号26又は配列番号27のアミノ酸配列を含むか、本質的にそれらからなるか、又はそれらからなる。1つの実施形態において、ループDは、配列番号15の残基371～407を含むか、本質的にそれらからなるか、又はそれらからなるアミノ酸配列に相当する。

【0113】

1つの実施形態において、上記阻害剤は、

(a) H.ピロリHopQへ、好ましくはH.ピロリHopQの細胞外ドメインへ結合する(ポリ-)ペプチドリガンド又はペプチド模倣体リガンド、

10

(b) 上記CEACAMファミリーの成員へ、好ましくは上記CEACAMファミリーの成員の細胞外ドメインへ、より好ましくは上記CEACAMファミリーの成員のN-ドメインへ結合する(ポリ-)ペプチドリガンド又はペプチド模倣体リガンド、

(c) (a) 及び (b) の該(ポリ-)ペプチドリガンドをコードする核酸分子、

(d) H.ピロリHopQへ、好ましくはH.ピロリHopQの細胞外ドメインへ結合する核酸リガンド、

(e) 上記CEACAMファミリーの成員へ、好ましくは上記CEACAMファミリーの成員の細胞外ドメインへ、より好ましくは上記CEACAMファミリーの成員のN-ドメインへ結合する核酸リガンド、

20

(f) 上記CEACAMファミリーの成員又はH.ピロリHopQの発現を阻害する阻害性核酸分子、

(g) H.ピロリHopQへ、好ましくはH.ピロリHopQの細胞外ドメインへ結合する小分子、及び、

(h) 上記CEACAMファミリーの成員へ、好ましくは上記CEACAMファミリーの成員の細胞外ドメインへ、より好ましくは上記CEACAMファミリーの成員のN-ドメインへ結合する小分子、

からなる群から選択される。

【0114】

「(ポリ-)ペプチドリガンド」という用語は、本明細書中で使用する場合、(ポリ-)ペプチドであるCEACAMファミリーの成員のリガンド又はH.ピロリHopQのリガンドを指すと意図され、ここで、「(ポリ-)ペプチド」という用語は、ペプチド又はポリペプチドのいずれかである分子を指す。

30

【0115】

「ペプチド」という用語は概して、ペプチド結合によって一緒に結合される少なくとも2個、少なくとも3個、少なくとも4個、少なくとも6個、少なくとも8個、少なくとも10個、少なくとも12個又は少なくとも14個、好ましくは最大8個、10個、12個、14個、16個、18個、20個、25個、30個、50個、又は100個の連続アミノ酸を含む物質に関する。「ポリペプチド」及び「タンパク質」という用語は、大きなペプチド、好ましくは100個を超えるアミノ酸を有するペプチドに関するが、「ペプチド」、「ポリペプチド」及び「タンパク質」という用語は、本明細書中では一般的に区別なく使用される。

40

【0116】

本発明による(ポリ-)ペプチドは、単離されることが好ましい。「単離(ポリ-)ペプチド」という用語は、(ポリ-)ペプチドが、その天然環境と分離されることを意味する。単離(ポリ-)ペプチドは、本質的に精製された状態及び/又は本質的に純粋な状態で存在し得る。「本質的に精製された」又は「本質的に純粋な」という用語は、(ポリ-)ペプチドが、他の物質、例えば、他のタンパク質、核酸、脂質及び炭水化物等の、自然に又はin vivoで、(ポリ-)ペプチドとともに存在し、及び/又は関連付けられる物質を本質的に含まないことを意味する。幾つかの実施形態において、本発明による(ポリ-)ペプチドは、(化学的に)合成される。

50

## 【0117】

本発明によれば、(ポリ-)ペプチドリガンドは、抗体、抗体誘導体、抗体模倣体、ペプチドアプタマー及びCEACAMファミリーの成員及びH.ピロリHopQの可溶性断片からなる群から選択されることが好ましい。

## 【0118】

「抗体」(免疫グロブリン、Igとも称される)という用語は、ジスルフィド結合によって相互結合された少なくとも2つの重(H)鎖及び2つの軽(L)鎖を含む糖タンパク質を指す。重鎖はそれぞれ、重鎖可変領域(本明細書中ではVHと略記)及び重鎖定常領域で構成される。軽鎖はそれぞれ、軽鎖可変領域(本明細書中ではVLと略記)及び軽鎖定常領域で構成される。VH領域及びVL領域は、フレームワーク領域(FR)と称される、より保存される領域が散在されている相補性決定領域(CDR)と称される高頻度可変性の領域に更に細分化することができる。VH及びVLはそれぞれ、アミノ末端からカルボキシ末端まで、下記の順序で配置される3つのCDR及び4つのFRで構成される:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。重鎖及び軽鎖の可変領域は、抗原と相互作用する結合ドメインを含有する。抗体の定常領域は、免疫グロブリンの、免疫系の各種細胞(例えば、エフェクター細胞)及び古典的な補体系の第1の構成成分(C1q)を含む、宿主組織又は因子への結合を媒介し得る。

## 【0119】

「抗体誘導体」という用語は、本明細書中で使用する場合、少なくとも1つの抗体可変ドメインを含むが、IgA、IgD、IgE、IgG、IgM、IgY又はIgW等の抗体の構造全体を有さないものの、依然として標的分子を結合することが可能な分子を指す。上記誘導体は、Fab、Fab2、scFv、Fv若しくはそれらの部分等の機能性(即ち、標的結合、特に特異的標的結合)抗体断片、又はナノボディ、二重特異性抗体、ミニボディ、ラクダ科(camelid)単ドメイン抗体、単ドメイン若しくはFab断片、可変領域の重鎖及び軽鎖のドメイン(Fd、Vラムダ及びVカッパーを含むVL、VH、VHH等の)並びに少なくとも2つの構造ループによって結合される免疫グロブリンドメインの2つのベータ-ストランドからなるミニドメイン等の免疫グロブリンの他の誘導体若しくは組合せであり得るが、これらに限定されない。好ましくは、抗体誘導体は、一価である。より好ましくは、誘導体は単鎖抗体であり、最も好ましくは構造VL-ペプチドリinker-VH又はVH-ペプチドリinker-VLを有する単鎖抗体である。

## 【0120】

「抗体模倣体」という用語は、本明細書中で使用する場合、抗体のように、抗原を特異的に結合することができるが、構造的に抗体に関連しない人工(ポリ-)ペプチドを指す。それらは通常、約3 kDa~20 kDaのモル質量を有し、抗体よりも著しく小さい。抗体模倣体の非限定的な例は、アフィボディ(affibodies)、アフィリン(affilins)、アフィマー(affimers)、アルファボディ(alphabodies)、アフィチン(affitins)、アンチカリン(anticalins)、アヴィマー(avimers)、DARPin、フィノマー(fynomers)、Kunitsドメインペプチド、モノボディ、プロテインAのZドメイン、ガンマBクリスタリン、ユビキチン、シスタチン、スルホロブス・アシドカルダリウス(Sulfolobus acidocaldarius)由来のSac7D、リポカリン、膜受容体のAドメイン、アンキリン反復モチーフ、FynのSH3ドメイン、プロテアーゼ阻害剤のKunitsドメイン、フィブロネクチンの10番目のIII型ドメイン、3-又は4-ヘリックス束タンパク質、アルマジロ反復ドメイン、ロイシンリッチ反復ドメイン、PDZドメイン、SUMO又はSUMO様ドメイン、免疫グロブリン様ドメイン、ホスホチロシン結合ドメイン、プレクストリン相同性ドメイン、src相同性2ドメイン又は例えば(ランダム)ペプチドライブラリー由来の合成ペプチドリガンドである。合成ペプチドリガンドは、特定の標的分子を結合するように機能する天然に存在しないアミノ酸配列を有する。

## 【0121】

ペプチドアプタマーは、他のタンパク質相互作用を妨害するように設計されるタンパク質である。ペプチドアプタマーは通常、両方の末端でタンパク質スカフォールドに結合さ

10

20

30

40

50

れた可変性ペプチドループからなる。可変性ループ長は通常、10個～20個のアミノ酸で構成され、スカフォールドは、良好な溶解性及び緻密性を有する任意のタンパク質、例えば、チオレドキシン-Aであり得る。「ペプチドアプタマー」という用語はまた、本明細書中で使用する場合、アフイマータンパク質等のペプチドアプタマーの誘導体も包含する。

【0122】

「部分」又は「断片」という用語は、本明細書では区別なく使用され、連続要素を指す。例えば、アミノ酸配列又はタンパク質等の構造の部分は、上記構造の連続要素を指す。タンパク質配列の部分又は断片は、タンパク質配列の少なくとも6個、特に、少なくとも8個、少なくとも12個、少なくとも15個、少なくとも20個、少なくとも30個、少なくとも50個、少なくとも100個、少なくとも150個、少なくとも160個、少なくとも170個、少なくとも180個、少なくとも190個又は少なくとも200個の連続アミノ酸の配列を含むことが好ましい。本発明によれば、タンパク質配列の部分又は断片は、好ましくは、その部分又は断片に連続して、タンパク質配列の更なるN-及び/又はC-末端アミノ酸配列を含まない。

10

【0123】

「可溶性」という用語は、CEACAMファミリー成員又はH.ピロリHopQの断片に関連して使用する場合、水、PBS又は細胞質ゾル（例えば、pH 6～8で）等の水溶液中に主に可溶性である（ポリ-）ペプチドを指す。「主に可溶性」という用語は、大部分の、例えば50%を上回るか、又は60%を上回るか、又は70%を上回るか、又は80%を上回るか、又は90%を上回る（ポリ-）ペプチド分子が、上記水溶液中に可溶性状態で存在することを意味する。1つの実施形態において、かかる可溶性断片は、膜貫通ドメイン又はGPI-アンカーを欠如する。

20

【0124】

1つの実施形態において、CEACAMファミリー成員の可溶性断片は、CEACAMファミリー成員の細胞外ドメイン又はそのHopQ結合断片を含むか、本質的にそれからなるか、又はそれからなる。1つの実施形態において、可溶性断片は、N-ドメイン又はそのHopQ結合断片を含むか、本質的にそれからなるか、又はそれからなる。

【0125】

1つの実施形態において、H.ピロリHopQの可溶性断片は、H.ピロリHopQの細胞外ドメイン又はそのCEACAM結合断片を含むか、本質的にそれからなるか、又はそれからなる。1つの実施形態において、可溶性断片は、H.ピロリHopQの挿入ドメイン、ループA、ループB、ループC及び/又はループD、好ましくはループA、ループB及び/又はループC、又は上述のいずれかの機能性断片を含むか、本質的にそれらからなるか、又はそれらからなる。

30

【0126】

また、CEACAMファミリーの成員又はH.ピロリHopQの可溶性断片のペプチド模倣体変異体も本発明に包含される。さらに、以下で更に記載するようなアミノ酸挿入変異体、アミノ酸付加変異体、アミノ酸欠失変異体及び/又はアミノ酸置換変異体が包含される。かかる変異体は、本発明によれば、H.ピロリHopQと、CEACAMファミリーの成員との間の相互作用を阻害する機能性変異体である。

40

【0127】

1つの実施形態において、可溶性断片は、以下で更に記載するような検出可能な標識又はタグを更に含む。1つの実施形態において、可溶性断片は、免疫原性断片に関連して以下で更に記載するような、可溶性断片の安定性を高めて、及び/又はその凝集を防止する1つ以上の修飾を更に含む。

【0128】

「ペプチド模倣体リガンド」という用語は、本明細書中で使用する場合、ペプチド模倣体であるCEACAMファミリーの成員のリガンド又はH.ピロリHopQのリガンドを指すと意図される。

【0129】

50

「ペプチド模倣体」という用語は、本明細書中で使用する場合、安定性及び／又は生物学的機能を高める修飾を伴う、相当する（ポリ－）ペプチドの本質的に同じ一般構造を有する化合物を指す。ペプチド模倣体として、例えば、2つ以上のアミノ酸間に変更された骨格を有する相当する（ポリ－）ペプチドの同じアミノ酸配列を含む化合物が挙げられる。あるいは、又はさらに、ペプチド模倣体は、天然に存在するアミノ酸の代わりに、合成アミノ酸又は天然に存在しないアミノ酸を含み得る。例示的なペプチド模倣体として、ペプトイド、ベータ－ペプチド及びD-ペプチドが挙げられる。

【0130】

「ペプチド模倣体変異体」という用語は、本明細書中で使用する場合、例えば、CEACAMファミリーの成員又はH.ピロリHopQの可溶性断片の所与の天然親（ポリ－）ペプチドのペプチド模倣体誘導体を指すと意図される。

10

【0131】

「ペプトイド」という用語は、本明細書中で使用する場合、各アミノ酸の側鎖がアルファ炭素とは対照的に、アミノ酸の窒素原子に付加されるペプチド模倣体を指す。例えば、ペプトイドは、 $\text{NRCH}_2\text{CO}$ の一般構造の反復単位を有し、かつ相当するポリペプチドと同じか、又は実質的に同じアミノ酸配列を有するN-置換グリシンと考えられ得る。

【0132】

ベータ－ペプチドは、20個の標準的な生物学的アミノ酸において見られるように、アルファ炭素ではなく、ベータ炭素に結合されたアミノ基を有するベータアミノ酸からなる。ベータ－ペプチドは、*in vitro*及び*in vivo*でタンパク質分解に対して安定である。

20

【0133】

D-ペプチドは、D-アミノ酸の配列である。ベータ－ペプチドと全く同様に、D-ペプチドは、タンパク質分解によって、胃の中で、又は細胞の内側で、分解の影響をあまり受けない。

【0134】

核酸分子は、本発明によれば、一本鎖又は二本鎖であり、かつ線状又は共有結合により閉じて環を形成した分子の形であってよい。1つの実施形態においては、核酸分子は、DNA又はRNA又はXNAである。

【0135】

本発明においては、「DNA」という用語は、デオキシリボヌクレオチド残基を含む分子であり、好ましくはデオキシリボヌクレオチド残基で全体的に又は本質的に構成される分子に関連する。「デオキシリボヌクレオチド」は、 $\beta$ -D-リボフラノシル基の2'位におけるヒドロキシル基を欠くヌクレオチドに関連する。「DNA」という用語は、部分的に又は完全に精製されたDNA、本質的に純粋なDNA、合成DNA、及び組換えにより生成されたDNA等の単離DNAを含み、1つ以上のヌクレオチドの付加、欠失、置換及び／又は変更によって天然に存在するDNAと異なる修飾DNAを含む。かかる変更は、例えば、DNAの1つ以上のヌクレオチドで、例えばDNAの末端（複数の場合もある）への又は内部での非ヌクレオチド材料の付加を含み得る。DNA分子におけるヌクレオチドはまた、天然に存在しないヌクレオチド又は化学的に合成されたヌクレオチド等の非標準的なヌクレオチドを含み得る。これらの変更されたDNAは、類似体又は天然に存在するDNAの類似体と称され得る。

30

40

【0136】

本発明においては、「RNA」という用語は、リボヌクレオチド残基を含む分子であり、好ましくはリボヌクレオチド残基で全体的に又は本質的に構成される分子に関連する。「リボヌクレオチド」は、 $\beta$ -D-リボフラノシル基の2'位にヒドロキシル基を有するヌクレオチドに関連する。「RNA」という用語は、部分的に又は完全に精製されたRNA、本質的に純粋なRNA、合成RNA、及び組換えにより生成されたRNA等の単離RNAを含み、1つ以上のヌクレオチドの付加、欠失、置換及び／又は変更によって天然に存在するRNAと異なる修飾RNAを含む。かかる変更は、例えば、RNAの1つ以上のヌクレオチドで、例えばRNAの末端（複数の場合もある）への又は内部での非ヌクレオチド材料の付加を含み得る。RNA分子におけるヌクレオチドはまた、天然に存在しないヌクレオチド若しくは化学的に合

50

成されたヌクレオチド等の非標準的なヌクレオチド又はデオキシヌクレオチドを含み得る。これらの変更されたRNAは、類似体又は天然に存在するRNAの類似体と称され得る。本発明によれば、「RNA」は、一本鎖RNA又は二本鎖RNAを指す。1つの実施形態において、RNAは、mRNAである。1つの実施形態において、RNAは、in vitroで転写されるRNA (IVT RNA) 又は合成RNAである。

【0137】

異種核酸 (XNA) は、異なる化学構造を有する代替核酸塩基、糖、又は結合骨格等の天然に存在しない構成成分を含有する合成DNA/RNA類似体である。

【0138】

「核酸リガンド」という用語は、本明細書中で使用する場合、核酸分子、例えば、核酸アプタマーであるCEACAMファミリーの成員のリガンド又はH.ピロリHopQのリガンドを指すと意図される。

10

【0139】

核酸アプタマー、即ちRNAアプタマー、DNAアプタマー及びXNAアプタマーは、RNA又は単鎖DNA又はXNAオリゴヌクレオチドで構成され、かつそれらの標的に対して高い特異性及び親和性を有する小核酸リガンドの一種である。抗体と同様に、アプタマーは、特異的な三次元構造を認識することによって、それらの標的と相互作用する。

【0140】

「阻害性核酸分子」という用語は、明細書中で使用する場合、標的分子、例えば、CEACAMファミリーの成員又はH.ピロリHopQの発現を阻害する核酸分子を指す。例示的な阻害性核酸分子として、低分子干渉RNA (siRNA)、小/低分子ヘアピンRNA (shRNA)、マイクロRNA (miRNA) 及びアンチセンスDNA又はRNA分子が挙げられ、それらは全て、当業者に既知である。

20

【0141】

「小分子」という用語は、本明細書中で使用する場合、低分子量 (例えば、900 Da未満又は500 Da未満) の有機化合物を指す。

【0142】

「結合」という用語は、本発明において、例えば、本明細書中で規定するような (ポリ-) ペプチドリガンド、核酸リガンド又は小分子に関連して、特異的な結合を指し得る。

「特異的な結合」又は「特異的に結合する」という用語は、本明細書中で使用する場合、(ポリ-) ペプチドリガンド (例えば、抗体) 等の結合剤が特異的であるエピトープ等の標的への結合が、別の標的への結合と比較して、より強力であることを意味する。「より強力な結合」は、例えばより低い解離定数 ( $K_D$ ) を特徴とし得る。1つの実施形態において、結合剤は、既定標的へ結合することが可能である一方で、他の標的に結合することが不可能である場合に、上記の既定標的に特異的である。1つの実施形態において、標的を「特異的に結合する」結合剤は、その標的に対して  $10^{-5}$  M未満 (例えば、 $10^{-6}$ 、 $10^{-7}$ 、 $10^{-8}$ 、 $10^{-9}$ 、 $10^{-10}$ 、 $10^{-11}$ 、及び  $10^{-12}$  又はそれ以下) の  $K_D$  値を有する。所与の結合剤の  $K_D$  値は、結合剤のオンレート及びオフレート (on and off-rate: 結合速度及び解離速度) の両方によって影響され、温度によって変化する。本発明において、 $K_D$  値は、室温で、上記の指定値未満であることが好ましい。結合条件は、生理学的条件であることが好ましい。  $K_D$  値を決定する各種アッセイを、当業者は認識している。好ましいアッセイ系は、競合アッセイである。

30

40

【0143】

1つの実施形態において、H.ピロリHopQへ結合する (ポリ-) ペプチドリガンド又はペプチド模倣体リガンド又は核酸リガンド又は小分子は、H.ピロリHopQの挿入ドメイン、ループA、ループB、ループC及び/又はループD、好ましくはループA、ループB及び/又はループCに含まれる少なくとも1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個又は8個のアミノ酸残基を含むH.ピロリHopQのエピトープへ結合する。

【0144】

1つの実施形態において、阻害剤は、医薬組成物中に含まれる。したがって、本発明は

50



また、本明細書中で規定するようなH.ピロリHopQと、CEACAMファミリーの成員との間の相互作用の阻害剤を含む医薬組成物を提供する。

【0145】

本発明は、H.ピロリによって引き起こされるか、又はH.ピロリと関連付けられる疾患又は障害を予防又は治療するための薬物候補を同定するin vitroでの方法であって、該方法は、

(a) (i) CEACAMタンパク質又はその機能性断片を、(ii) H.ピロリHopQタンパク質又はその機能性断片及び(iii) 試験化合物と接触させることと、

(b) 該試験化合物が、該CEACAMタンパク質又はその機能性断片と、該H.ピロリHopQタンパク質又はその機能性断片との間の相互作用を阻害するかどうかを決定することと、  
を含み、

該CEACAMタンパク質又はその機能性断片と、該H.ピロリHopQタンパク質又はその機能性断片との間の相互作用を阻害する試験化合物は、H.ピロリによって引き起こされるか、又はH.ピロリと関連付けられる疾患又は障害を予防又は治療するための薬物候補として同定される、方法を更に提供する。

【0146】

1つの実施形態において、工程(b)は、上記試験化合物が、上記H.ピロリHopQタンパク質又はその機能性断片の、上記CEACAMタンパク質又はその機能性断片への結合を阻害するかどうかを決定することであって、好ましくは、該H.ピロリHopQタンパク質の機能性断片は、細胞外ドメイン又はその断片を含み、及び/又は該CEACAMタンパク質の機能性断片は、細胞外ドメイン又はその断片、好ましくはN-ドメインを含むこと、及び/又は該試験化合物が、HopQ-CEACAM媒介性シグナル伝達を阻害するかどうかを決定することを含む。

【0147】

1つの実施形態において、試験化合物は、(ポリ-)ペプチド、ペプチド模倣体、核酸分子及び小分子からなる群から選択される。

【0148】

本発明は、H.ピロリ感染を研究するか、又はH.ピロリによって引き起こされるか、若しくはH.ピロリと関連付けられる疾患若しくは障害を予防若しくは治療するための薬物候補を同定するための、H.ピロリHopQと相互作用することが可能なCEACAMタンパク質又はその機能性断片の使用を更に提供する。

【0149】

「機能性断片」という用語は、CEACAMタンパク質に関連して本明細書中で使用する場合、例えば、CEACAMタンパク質の細胞外ドメイン又はその断片を指し得る。

【0150】

本発明は、H.ピロリ感染を研究するか、又はH.ピロリによって引き起こされるか、若しくはH.ピロリと関連付けられる疾患若しくは障害を予防若しくは治療するための薬物候補を同定するための、H.ピロリHopQと相互作用することが可能なCEACAMタンパク質又はその機能性断片を異種的に発現する細胞の使用を更に提供する。

【0151】

かかる細胞(宿主細胞とも称される)は、原核細胞(例えば、細菌細胞)又は真核細胞(例えば、真菌、植物又は動物細胞)のいずれかであり得る。1つの実施形態において、細胞は、哺乳動物細胞、例えば、CHO細胞又はHEK293細胞である。好ましくは、細胞は、単離細胞である。

【0152】

本発明は、H.ピロリ感染を研究するか、又はH.ピロリによって引き起こされるか、若しくはH.ピロリと関連付けられる疾患若しくは障害を予防若しくは治療するための薬物候補を同定するための、H.ピロリHopQと相互作用することが可能なCEACAMタンパク質又はその機能性断片を異種的に発現する非ヒトトランスジェニック動物の使用を更に提供する。

【0153】

10

20

30

40

50

「非ヒトトランスジェニック動物」という用語は、本明細書中で使用する場合、特に、非ヒト哺乳類、例えば、げっ歯類、ウサギ、ウシ、ヒツジ、ウマ、イヌ、ネコ、ラマ、ブタ、又は非ヒト霊長類（例えば、サル）に関する。げっ歯類は、マウス、ラット、ハムスター、モルモット、又はチンチラであり得る。1つの実施形態において、非ヒトトランスジェニック動物は、ラットである。

【0154】

本発明は、H.ピロリHopQと、癌胎児性抗原関連細胞接着分子（CEACAM）ファミリーの成員との間の相互作用の阻害剤であって、

（a）H.ピロリHopQの細胞外ドメインへ結合する（ポリ-）ペプチドリガンド又はペプチド模倣体リガンド、

（b）該CEACAMファミリーの成員のN-ドメインへ結合する（ポリ-）ペプチドリガンド又はペプチド模倣体リガンド、

（c）（a）及び（b）の該（ポリ-）ペプチドリガンドをコードする核酸分子、

（d）H.ピロリHopQの細胞外ドメインへ結合する核酸リガンド、

（e）該CEACAMファミリーの成員のN-ドメインへ結合する核酸リガンド、

（f）該CEACAMファミリーの成員又はH.ピロリHopQの発現を阻害する阻害性核酸分子、

（g）H.ピロリHopQの細胞外ドメインへ結合する小分子、並びに、

（h）該CEACAMファミリーの成員のN-ドメインへ結合する小分子、

からなる群から選択される、阻害剤を更に提供する。

【0155】

1つの実施形態において、H.ピロリHopQの上記細胞外ドメインは、H.ピロリHopQの挿入ドメインである。

【0156】

1つの実施形態において、H.ピロリHopQの上記細胞外ドメインは、H.ピロリHopQのループA、ループB、ループC又はループDである。

【0157】

1つの実施形態において、上記（ポリ-）ペプチドリガンド又はペプチド模倣体リガンドは、それぞれ、上記CEACAMファミリーの成員又はH.ピロリHopQの可溶性断片及びそれらのペプチド模倣体変異体から選択される。

【0158】

1つの実施形態において、H.ピロリHopQの上記可溶性断片は、H.ピロリHopQの挿入ドメイン又はその機能性断片を含む。

【0159】

1つの実施形態において、H.ピロリHopQの上記可溶性断片は、H.ピロリHopQのループA、ループB、ループC若しくはループD又は先述のいずれかの機能性断片を含む。

【0160】

本発明はまた、

（a）（i）H.ピロリHopQのアミノ酸配列、若しくは（ii）その免疫原性変異体、若しくは（iii）（i）若しくは（ii）の免疫原性断片を含む少なくとも1つ、例えば、1つ、2つ、3つ、4つ若しくは5つ若しくはそれ以上の単離（ポリ-）ペプチド、又は、

（b）項目（a）に記載の単離（ポリ-）ペプチドをコードする少なくとも1つ、例えば、1つ、2つ、3つ、4つ若しくは5つ若しくはそれ以上の核酸分子、を含む免疫原性組成物を提供する。

【0161】

「免疫原性」という用語は、本明細書中で使用する場合、対象において、免疫応答を誘発する能力、即ち、体液性及び／又は細胞性免疫応答を誘導する能力を指すと意図される。「体液性免疫応答」は、分泌抗体、補体タンパク質及び或る特定の抗菌ペプチド等の細胞外体液に見られる巨大分子によって媒介される。「細胞性免疫応答」は、抗原に应答した、食細胞、抗原特異的なTリンパ球及び各種サイトカインの放出の活性化を包含する。1つの実施形態において、免疫応答は、抗体によって媒介される（＝抗体応答）。「免疫原

10

20

30

40

50

性断片」及び「免疫原性変異体」という用語は、本明細書中で使用する場合、好ましくは、断片及び変異体が由来する（ポリ-）ペプチドに特異的である免疫応答を誘発することが可能な断片及び変異体を指す。

【0162】

1つの実施形態において、H.ピロリHopQのアミノ酸配列は、配列番号1若しくは配列番号3若しくは配列番号5若しくは配列番号15のアミノ酸配列、又は配列番号1若しくは配列番号3若しくは配列番号5若しくは配列番号15のアミノ酸配列に少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%若しくは99%類似する、好ましくは同一であるアミノ酸配列である。

【0163】

1つの実施形態において、免疫原性断片は、H.ピロリHopQの細胞ドメインを含むか、本質的にそれからなるか、又はそれからなる。1つの実施形態において、免疫原性断片は、H.ピロリHopQの挿入ドメイン、ループA、ループB、ループC及び/又はループDを含む。1つの実施形態において、免疫原性断片は、N-末端ベータ-ストランド及び/又はN-末端分泌配列（＝シグナルペプチド）及び/又はC-末端膜貫通（TM）ドメインを欠如する。1つの実施形態において、免疫原性断片は、N-末端ベータ-ストランド及びN-末端分泌配列及びC-末端TMドメインを欠如する。1つの実施形態において、免疫原性断片は、配列番号1の残基37～463を含むか、本質的にそれらからなるか、又はそれらからなる。

【0164】

1つの実施形態において、H.ピロリHopQの上記細胞外ドメインは、H.ピロリHopQの挿入ドメイン又はその機能性断片である。

【0165】

1つの実施形態において、H.ピロリHopQの上記細胞外ドメインは、H.ピロリHopQのループA、ループB、ループC若しくはループD又は先述のいずれかの機能性断片である。

【0166】

本発明による「免疫原性変異体」という用語は、特に、免疫原性突然変異体、スプライス変異体、コンホメーション変異体、アイソフォーム、対立遺伝子変異体、種変異体及びホモログ、特に天然に存在するものを指す。対立遺伝子変異体は、遺伝子の正常配列における変更を指し、その意義は、不明瞭である場合が多い。完全遺伝子シーケンシングは多くの場合、所与の遺伝子の多数の対立遺伝子変異体を同定する。ホモログは、所与の核酸又はアミノ酸配列の起源の種（又は株）と異なる起源の種（又は株）を有する核酸又はアミノ酸配列である。「変異体」という用語は、任意の翻訳後修飾変異体及びコンホメーション変異体を包含する。

【0167】

本発明の目的で、アミノ酸配列の「免疫原性変異体」は、免疫原性アミノ酸挿入変異体、アミノ酸付加変異体、アミノ酸欠失変異体及び/又はアミノ酸置換変異体を含む。タンパク質のN-末端及び/又はC-末端で欠失を含むアミノ酸欠失変異体はまた、N-末端及び/又はC-末端トランケーション変異体とも呼ばれる。

【0168】

アミノ酸挿入変異体は、単一又は2つ以上のアミノ酸、特にアミノ酸配列の挿入を含む。挿入を有するアミノ酸配列変異体の場合、1つ以上のアミノ酸残基が、アミノ酸配列における特定の部位へ挿入されるが、得られた産物の適切なスクリーニングによるランダム挿入もまた可能である。

【0169】

アミノ酸付加変異体は、1個、2個、3個、5個、10個、20個、30個、50個、又はそれ以上のアミノ酸等の1個以上のアミノ酸のN-及び/又はC-末端融合を含む。

【0170】

アミノ酸欠失変異体は、1個、2個、3個、5個、10個、20個、30個、50個、又はそれ以上のアミノ酸の除去等の、配列からの1個以上のアミノ酸の除去を特徴とする。欠失は、タンパク質の任意の位置に、例えばN-及び/又はC-末端に存在し得る。

10

20

30

40

50

## 【0171】

アミノ酸置換変異体は、配列中の少なくとも1個の残基が除去され、その場所に別の残基が挿入されることを特徴とする。1つの実施形態において、アミノ酸置換変異体は、最大10個、9個、8個、7個、6個、5個、4個、3個又は2個のアミノ酸の置換を含む。修飾が、相同タンパク質又はペプチド間で保存されないアミノ酸配列中の位置に存在すること、及び/又はアミノ酸を、類似した特性を有する他のアミノ酸で置き換えることが好ましい。好ましくは、タンパク質変異体におけるアミノ酸置換は、保存的アミノ酸置換である。保存的アミノ酸置換は、アミノ酸を、同じファミリーのアミノ酸、即ち、それらの側鎖において（例えば、電荷及び/又はサイズに関して）関連されるアミノ酸の別のアミノ酸で置換することを包含する。天然に存在するアミノ酸は概して、4つのファミリー：酸性（アスパラギン酸塩、グルタミン酸塩）、塩基性（リジン、アルギニン、ヒスチジン）、無極性（アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、及び非荷電極性（グリシン、アスパラギン、グルタミン、システイン、セリン、スレオニン、チロシン）アミノ酸に分けられる。フェニルアラニン、トリプトファン、及びチロシンは、場合によっては、芳香族アミノ酸として両方に分類される。しかしながら、アミノ酸を、異なる特性を有する他のアミノ酸で置き換えること、例えば、単離（ポリ-）ペプチドの凝集を低減又は阻害するように、1つ以上の（表面で露出される）疎水性アミノ酸を、1つ以上の親水性アミノ酸で置換することも可能であり、ここで、好ましくは、これらの（ポリ-）ペプチドの他の特性、例えば、それらの免疫原性又は結合特性は、かかるアミノ酸置換によって損なわれない。

10

20

## 【0172】

本発明によれば、所与の参照アミノ酸配列と、上記所与のアミノ酸配列の変異体であるアミノ酸配列との間の類似性度、好ましくは、同一性度は、少なくとも約60%、65%、70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%であることが好ましい。類似性度又は同一性度は、好ましくは参照アミノ酸配列の完全長の少なくとも約10%、少なくとも約20%、少なくとも約30%、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%又は約100%であるアミノ酸領域に関して付与される。例えば、参照アミノ酸配列が、200個のアミノ酸からなる場合、類似性度又は同一性度は、好ましくは、少なくとも約20個、少なくとも約40個、少なくとも約60個、少なくとも約80個、少なくとも約100個、少なくとも約120個、少なくとも約140個、少なくとも約160個、少なくとも約180個、又約200個のアミノ酸、好ましくは連続アミノ酸に関して付与される。好ましい実施形態において、類似性度/パーセント又は同一性度/パーセントは、参照アミノ酸配列の完全長に関して付与される。

30

## 【0173】

1つの実施形態において、免疫原性変異体は、別のH.ピロリ株由来の等価なタンパク質である。1つの実施形態において、等価なタンパク質は、ホモログ、好ましくはオルソログである。「オルソログ」は、単一祖先遺伝子/タンパク質由来の種分化により関連され、遺伝子重複により関連されないホモログ遺伝子/タンパク質である。

## 【0174】

40

1つの実施形態において、免疫原性変異体は、配列番号1、配列番号1の残基37～463、配列番号3、配列番号15及び配列番号5からなる群から選択されるアミノ酸配列に少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%又は少なくとも97%（例えば、97%又は98%又は99%）同一であるアミノ酸配列を含む。

## 【0175】

1つの実施形態において、単離（ポリ-）ペプチドは、組換え（ポリ-）ペプチドである。

## 【0176】

「組換え（ポリ-）ペプチド」という用語は、本明細書中で使用する場合、例えば、特定の発現ベクターを用いた、生細胞内の組換え核酸分子（例えば、DNA）の発現に起因す

50

る（ポリ - ）ペプチドを指すと意図される。組換え核酸分子は、遺伝子組換え（例えば、分子クローニング）の研究室の方法によって形成される核酸分子である。

【0177】

1つの実施形態において、単離（ポリ - ）ペプチドは、宿主細胞、好ましくは、大腸菌等の原核生物宿主細胞において産生される。

【0178】

1つの実施形態において、本明細書中に記載する単離（ポリ）ペプチドは、検出可能な標識又はタグを更に含む。

【0179】

「検出可能な標識又はタグ」という用語は、本明細書中で使用する場合、本明細書中に記載する単離（ポリ）ペプチドの検出及び／又は単離及び／又は固定化を可能にする検出可能な標識又はタグを指し、これらの目的で当該技術分野において既知の任意の標識／タグを含むと意図される。キチン結合タンパク質（CBP）、マルトース結合タンパク質（MBP）、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ（GST）、ポリ（His）（例えば、6×His、又はHis6）、Strep-tag（商標）、Strep-tag II（商標）及びTwin-Strep-tag（商標）等の親和性タグ；チオレドキシン（TRX）、ポリ（NANP）及びSUMO等の可溶化タグ；FLAG-tag等のクロマトグラフィータグ；V5-tag、myc-tag及びHA-tag等のエピトープタグ；蛍光タンパク質（例えば、GFP、YFP、RFP等）及び蛍光色素等（例えば、FITC、TRITC、クマリン及びシアニン）等の蛍光標識又はタグ（即ち、フルオロクロム／フルオロフォア）；ルシフェラーゼ等の発光標識又はタグ；並びに（他の）酵素標識（例えば、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、ウレアーゼ又はグルコースオキシダーゼ）が特に好ましい。また、上述の標識又はタグのいずれかの組合せも包含される。

【0180】

（ポリ）ペプチド標識又はタグのアミノ酸配列は、本明細書中に記載する単離（ポリ - ）ペプチドのアミノ酸配列内の任意の位置で導入され得る。例えば、（ポリ）ペプチド標識又はタグのアミノ酸配列は、例えば、リジンへのEDC-NHSカップリングによって、それらのN-及び／又はC-末端に、及び／又はアミノ酸側鎖に付加され得る。同じことが、非ペプチド標識又はタグに当てはまる。

【0181】

1つの実施形態において、単離（ポリ - ）ペプチドは、融合タンパク質である。

【0182】

「融合タンパク質」という用語は、2つ以上の別個の（ポリ - ）ペプチド又はタンパク質を、好ましくはヘッドトゥテールで（即ち、N-末端をC-末端に、又はその逆）結合して、元のタンパク質それぞれに由来する機能特性を有する単一タンパク質を生じることによって創出されるタンパク質を指す。

【0183】

本発明はまた、本明細書中で規定するような融合タンパク質を提供する。

【0184】

本発明による単離（ポリ - ）ペプチドは、単離（ポリ - ）ペプチドの安定性を高める及び／又はその凝集を防止する1つ以上の修飾を更に含み得る。単離（ポリ - ）ペプチドの「安定性」という用語は、特に、例えばin vivoでのその「半減期」に関する。「半減期」は、分子の活性、量又は数の半分を排除するのに必要とされる期間に関する。凝集の防止はまた、単離（ポリ - ）ペプチドの貯蔵安定性を高める。

【0185】

単離（ポリ - ）ペプチドは、例えば、半減期延長モジュールに融合又はコンジュゲートされてもよい。かかるモジュールは、当業者に既知であり、例えば、アルブミン、アルブミン結合ドメイン、免疫グロブリンのFc領域／ドメイン、免疫グロブリン結合ドメイン、FcRn結合モチーフ、及びポリマーを含む。特に好ましいポリマーとして、ポリエチレングリコール（PEG）、ヒドロキシエチルデンプン（HES）、ヒアルロン酸、ポリシアル酸及

10

20

30

40

50

びPEG-模倣体ペプチド配列が挙げられる。単離（ポリ - ）ペプチドの凝集を防止する修飾もまた、当業者に既知であり、例えば、1つ以上の疎水性アミノ酸、好ましくは表面で露出される疎水性アミノ酸の、1つ以上の親水性アミノ酸による置換を含む。1つの実施形態において、単離（ポリ - ）ペプチド若しくはその免疫原性変異体又は上述のいずれかの免疫原性断片は、最大10個、9個、8個、7個、6個、5個、4個、3個又は2個、好ましくは5個、4個、3個又は2個の疎水性アミノ酸、好ましくは表面で露出される疎水性アミノ酸の、親水性アミノ酸による置換を含む。好ましくは、単離（ポリ）ペプチドの他の特性、例えば、その免疫原性は、かかる置換によって損なわれない。

【0186】

本発明による単離（ポリ - ）ペプチドはまた、免疫応答、特に高力価抗体の誘発を可能にするか、又は促進する方法で、各々の抗原を対象の免疫系に提示するように、キーホールリンペットヘモシアニン（KLH）、BSA、オボアルブミン等の担体材料に融合又はコンジュゲートされてもよい。

10

【0187】

「に融合される」という用語は、本明細書中で使用する場合、特に、例えば組換えDNA技術による遺伝子融合を指す。

【0188】

「にコンジュゲートされる」という用語は、本明細書中で使用する場合、特に、安定な共有結合をもたらす化学的及び/又は酵素的コンジュゲーションを指す。

【0189】

20

本発明による単離（ポリ - ）ペプチドは、所与の細胞、組織又は臓器への単離（ポリ - ）ペプチドの標的送達を可能にするアミノ酸配列、好ましくは、特定の細胞型、例えば樹状細胞へと単離（ポリ - ）ペプチドを標的化するアミノ酸配列を更に含み得る。適切なアミノ酸配列は、例えば、Sioud et al., 2013及びApostolopoulos et al., 2013に記載されており、例えば、アミノ酸配列NWYLPWLGTNDW（配列番号7）を有するペプチドを含む。

【0190】

1つの実施形態において、核酸分子は、DNA又はRNAである。

【0191】

また、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で、上記項目（b）による核酸分子にハイブリダイズする核酸分子も本発明に包含される。

30

【0192】

「ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件」は、本明細書中で規定する場合、 $5 \times \text{SSC}/5 \times \text{デンハルト溶液}/1.0\% \text{ SDS}$ 中で68 のハイブリダイゼーション、及び室温で $0.2 \times \text{SSC}/0.1\% \text{ SDS}$ 中での洗浄を含むか、又は当該技術分野で理解されているそれらの等価物（例えば、ハイブリダイゼーションを、 $2.5 \times \text{SSC}$ 緩衝液中で60 にて実施した後、低緩衝液濃度中で37 の幾つかの洗浄工程を行い、静置する条件）を含む。塩濃度及び温度のパラメーターを変更させて、オリゴヌクレオチドと標的核酸との間の最適レベルの同一性を達成することができる。かかる条件に関するガイダンスは、例えば、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3<sup>rd</sup> Edition, J. Sambrook et al. eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor 2000、及びAusubel et al. (eds.), 1995, Current Protocols in Molecular Biology, (John Wiley and Sons, N. Y.) at Unit 2.10によって、当該技術分野で入手可能である。

40

【0193】

1つの実施形態において、核酸分子は、例えば、大腸菌等の、H.ピロリ以外の細菌における発現に関して、又は哺乳動物細胞（例えば、CHO細胞、BHK細胞、COS細胞及びHEK 293細胞）又は昆虫細胞（例えば、SF9細胞、SF21細胞及びHigh Five（商標）細胞）等の真核細胞における発現に関して、コドンが最適化される。

【0194】

1つの実施形態において、核酸分子は、ベクター中に含有される/含まれる。

50

## 【0195】

「ベクター」という用語は、本明細書中で使用する場合、プラスミドベクター、コスミドベクター、ラムダファージ等のファージベクター、アデノウイルス、AAV若しくはバキュロウイルスベクター等のウイルスベクター、又は細菌人工染色体（BAC）、酵母人工染色体（YAC）若しくはP1人工染色体（PAC）等の人工染色体ベクターを含む、当業者に既知の任意のベクターを含む。上記ベクターは、発現ベクター及びクローニングベクターを含む。発現ベクターは、プラスミド及びウイルスベクターを含み、一般的に、所望のコード配列及び作動可能に連結される（operably linked）コード配列の特定の宿主生物（例えば、細菌、酵母、植物、昆虫、又は哺乳動物）における、又はin vitroでの発現系における発現に必要な適切なDNA配列を含有する。クローニングベクターは概して、或る特定の所望のDNA断片を操作及び増幅するのに使用され、所望のDNA断片の発現に必要とされる機能性配列を欠如してもよい。

10

## 【0196】

1つの実施形態において、免疫原性組成物は、少なくとも1つの、H.ピロリ由来の更なる抗原を更に含む。

## 【0197】

「H.ピロリ由来の更なる抗原」という用語は、本明細書中で使用する場合、好ましくは、上記項目（a）及び項目（b）による作用物質、即ち、単離（ポリ-）ペプチド及び核酸分子と異なる抗原を指す。

## 【0198】

好ましい実施形態において、更なる抗原は、H.ピロリの外膜タンパク質及び病原性因子タンパク質、それらの免疫原性断片、並びにこれらのタンパク質又は断片をコードする核酸分子からなる群から選択される。

20

## 【0199】

「外膜タンパク質」という用語は、H.ピロリの外膜と関連付けられるタンパク質を指し、「外膜タンパク質」という用語は、内在性膜タンパク質並びにN-末端に結合された脂質を用いて膜に係留されるリポタンパク質を含む。それらの構造及び機能は、例えば、Koebnik et al., 2000に更に記載されている。本発明による使用のためのH.ピロリの特に好ましい外膜タンパク質は、BabA、HpaA、Omp18、Omp22及びSabAからなる群から選択される。

30

## 【0200】

「病原性因子タンパク質」という用語は、本明細書中で使用する場合、H.ピロリの病原性に寄与する酵素等のタンパク質、例えば機能性タンパク質を指す（例えば、Kalali et al., 2014を参照）。本発明による特に好ましい病原性因子タンパク質は、H.ピロリのガンマグルタミルトランスぺプチダーゼ（gGT）（HPGGT又はHPGとも称される）である。適切なHPGタンパク質は、例えば、国際公開第2008/046650号に記載されるものであり、任意選択でN-末端分泌配列を欠如する、HPGの酵素的に不活性化された形態（S451/452A）を含む。

## 【0201】

本発明による免疫原性組成物の部分であり得る更なる抗原はまた、米国特許出願公開第2007/0042448号又は国際公開第2004/094467号に記載されるものである。

40

## 【0202】

1つの実施形態において、免疫原性組成物は、少なくとも1つのアジュバントを更に含む。

## 【0203】

「アジュバント」という用語は、例えば、免疫系の一般的な刺激を供給することによって、抗原に対する、例えば、上記項目（a）及び項目（b）による作用物質又は本明細書中で規定するようなH.ピロリ由来の更なる抗原に対する免疫応答を増強する物質を指す。適切なアジュバントは、当業者に既知であり、毒素ベースのアジュバント、TLRリガンドベースのアジュバント、核酸/ベクターベースのアジュバント、タンパク質ベースのアジュ

50

バント、ポリマーベースのアジュバント、粘膜アジュバント、ISCOMマトリクス及び上述のいずれかの組合せを含む。特定のアジュバントとして、ポリカチオンポリマー/ペプチド、免疫賦活性デオキシヌクレオチド(ODN)、合成KLKペプチド、向神経活性化化合物(例えば、ヒト成長ホルモン)、アラム(alum)、フロイント完全又は不完全アジュバント、コレラ毒素(CT)、CTA1-DD、熱不安定性エンテロトキシン(LT)、CT又はLTの突然変異体、ポリIC、樹状細胞(DC)結合ペプチド及びC3d融合タンパク質が挙げられるが、これらに限定されない。1つの実施形態において、TLRリガンドベースのアジュバントは、例えば、国際公開第2010/050903号、Mori et al., 2012及びSong et al., 2015に記載されるもの等の細菌フラジェリンの群由来のTLR5リガンドである。1つの実施形態において、アジュバントは、コレラ毒素(CT)、CTA1-DD及び熱不安定性エンテロトキシン(LT)からなる群から選択される。

10

**【0204】**

1つの実施形態において、免疫原性組成物は、ワクチンであるか、又はワクチン中に含まれる。

**【0205】**

「ワクチン」という用語は、特定の疾患に対して免疫力を付与又は改善する調製物を指す。本発明によるワクチンは、H.ピロリによって引き起こされるか、又はH.ピロリと関連付けられる疾患又は障害、特に、本明細書中で言及する特定疾患に対して免疫力を付与又は改善する。

**【0206】**

1つの実施形態において、本発明の免疫原性組成物は、抗体の分泌を含む免疫応答を誘発し、ここで、好ましくは、抗体は、本明細書で規定するように、H.ピロリHopQと、癌胎児性抗原関連細胞接着分子(CEACAM)ファミリーの成員との間の相互作用を阻害する。1つの実施形態において、抗体は、H.ピロリHopQの、CEACAMファミリーの成員への結合及び/又はHopQ-CEACAM媒介性シグナル伝達を阻害する。1つの実施形態において、抗体は、H.ピロリHopQの細胞外ドメイン又はその断片、例えば、H.ピロリHopQの挿入ドメイン、ループA、ループB、ループC及び/又はループDへ結合する。1つの実施形態において、抗体は、H.ピロリHopQの挿入ドメイン、ループA、ループB、ループC及び/又はループD、好ましくはループA、ループB及び/又はループCに含まれる少なくとも1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個又は8個のアミノ酸残基を含むH.ピロリHopQのエピトープへ結合する。

20

30

**【0207】**

本発明によれば、免疫原性/医薬組成物は、所望の反応又は所望の効果を生じるのに有効量の活性剤、例えば、本明細書中に記載する(ポリ-)ペプチド又はペプチド模倣体又は核酸分子又は小分子を含有する。

**【0208】**

本発明による免疫原性/医薬組成物は、無菌であることが好ましい。免疫原性/医薬組成物は、一様な投薬形態で供給することができ、それ自体が知られている様式で作製され得る。本発明による免疫原性/医薬組成物は、例えば、溶液又は懸濁液の形態で存在し得る。

40

**【0209】**

免疫原性/医薬組成物は、1つ以上の担体及び/又は賦形剤を更に含んでもよく、それらは全て、薬学的に許容されることが好ましい。「薬学的に許容される」という用語は、本明細書中で使用する場合、無毒性の材料、好ましくは免疫原性/医薬組成物の活性剤の作用と相互作用しないものを指す。特に、「薬学的に許容される」は、動物における、より詳細にはヒトにおける使用に関して、連邦若しくは州政府の規制当局によって承認されているか、又は米国薬局方、欧州薬局方若しくは他の一般的に認識されている薬局方に列挙されていることを意味する。

**【0210】**

「担体」という用語は、適用を促進、増強又は可能にするように、活性構成成分が組み

50



合わせられる天然性又は合成性の有機又は無機構成成分を指す。本発明によれば、「担体」という用語はまた、対象への投与に適切である1つ以上の適合性の固体又は液体の充填剤、希釈剤又は封入物質を含む。考え得る担体物質（例えば、希釈剤）は、例えば、滅菌水、リンゲル溶液、乳酸加リンゲル溶液、生理食塩水、静菌性生理食塩水（例えば、0.9%ベンジルアルコールを含有する生理食塩水）、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）、ハンクス溶液、不揮発性油、ポリアルキレングリコール、水素化ナフタレン及び生体適合性ラクチドポリマー、ラクチド/グリコリド共重合体又はポリオキシエチレン/ポリオキシ-プロピレン共重合体である。1つの実施形態において、担体は、PBSである。得られた溶液又は懸濁液は、レシipientの血液と等張性であることが好ましい。適切な担体及びそれらの配合物は、Remington's Pharmaceutical Sciences, 17<sup>th</sup> ed., 1985, Mack Publishing Co.により詳細に記載されている。

10

#### 【0211】

「賦形剤」という用語は、本明細書中で使用する場合、塩、結合剤（例えば、ラクトース、デキストロース、スクロース、トレハロース、ソルビトール、マンニトール）、滑沢剤、増粘剤、界面活性剤、防腐剤、乳化剤、緩衝液物質、安定剤、風味剤又は着色料等の医薬組成物中に存在してもよく、かつ活性成分ではない物質全てを含むと意図される。

#### 【0212】

薬学的に許容されない塩は、薬学的に許容される塩を作製するのに使用されてもよく、本発明に含まれる。この種の薬学的に許容される塩は、非限定的な方法で、下記の酸：塩酸、臭化水素酸、硫酸、硝酸、リン酸、マレイン酸、酢酸、サリチル酸、クエン酸、ギ酸、マロン酸、コハク酸等から作製されるものを含む。薬学的に許容される塩はまた、ナトリウム塩、カリウム塩又はカルシウム塩等のアルカリ金属塩又はアルカリ土類金属塩として作製されてもよい。塩は、イオン強度又は等張性（tonicity）を調節するために添加され得る。

20

#### 【0213】

医薬組成物における使用に適した防腐剤として、酸化防止剤、クエン酸、クエン酸ナトリウム、塩化ベンザルコニウム、クロロブタノール、システイン、メチオニン、パラベン及びチメロサルが挙げられる。

#### 【0214】

医薬組成物における使用に適した緩衝液物質として、塩中の酢酸、塩中のクエン酸、塩中のホウ酸及び塩中のリン酸が挙げられる。他の適切な緩衝液物質として、アルギニン塩酸塩及びアルギニンリン酸塩が挙げられる。

30

#### 【0215】

適切な安定剤として、グリセロール、アスコルビン酸塩及びヒスチジンが挙げられる。

#### 【0216】

本発明による免疫原性組成物はまた、米国特許第6,838,089号及び米国特許第6,372,260号に記載されるように配合され得る。

#### 【0217】

本発明による免疫原性/医薬組成物はまた、適切な希釈剤で再構成される安定な凍結乾燥製品として配合されてもよく、それは、任意選択で、上述するような1つ以上の賦形剤を含む。

40

#### 【0218】

本発明はまた、薬剤としての使用のための、本明細書中で規定するような免疫原性組成物を提供する。

#### 【0219】

本発明はまた、H.ピロリによって引き起こされるか、又はH.ピロリと関連付けられる疾患又は障害を予防又は治療する方法における使用のための、本明細書中で規定するような免疫原性組成物を提供する。

#### 【0220】

本発明は、H.ピロリによって引き起こされるか、又はH.ピロリと関連付けられる疾患又

50

は障害を予防又は治療するための薬剤の作製における、本明細書中で規定するような免疫原性組成物の使用を更に提供する。

【0221】

本発明はまた、対象において、H.ピロリによって引き起こされるか、又はH.ピロリと関連付けられる疾患又は障害を予防又は治療する方法であって、本明細書中で規定するような免疫原性組成物を、対象に投与することを含む、方法を提供する。

【0222】

本発明は、H.ピロリによって引き起こされるか、又はH.ピロリと関連付けられる疾患又は障害を予防又は治療する方法における使用のための、H.ピロリHopQと相互作用することが可能なCEACAMタンパク質又はその機能性断片を更に提供し、ここで、CEACAMタンパク質又はその機能性断片は、固体支持体、好ましくは非細胞性固体支持体に結合される。

10

【0223】

本発明は、H.ピロリによって引き起こされるか、又はH.ピロリと関連付けられる疾患又は障害を予防又は治療するための薬剤に作製における、H.ピロリHopQと相互作用することが可能なCEACAMタンパク質又はその機能性断片の使用を更に提供し、ここで、CEACAMタンパク質又はその機能性断片は、固体支持体、好ましくは非細胞性固体支持体に結合される。

【0224】

本発明はまた、対象において、H.ピロリによって引き起こされるか、又はH.ピロリと関連付けられる疾患又は障害を予防又は治療する方法であって、H.ピロリHopQと相互作用することが可能なCEACAMタンパク質又はその機能性断片を、対象に投与することを含む、方法を提供し、ここで、CEACAMタンパク質又はその機能性断片は、固体支持体、好ましくは非細胞性固体支持体に結合される。

20

【0225】

「固体支持体」という用語は、本明細書中で使用する場合、本明細書中で規定するようなCEACAMタンパク質又はその機能性断片へ結合することが可能な任意の固体支持体を指す。1つの実施形態において、固体支持体は、非細胞性固体支持体である。かかる非細胞性固体支持体は、ポリマー、特に生体接着性カチオンポリマー（例えば、キトサン、ポリガラクトサミン、ポリリジン、ジエチルアミノエチルデキストラン（DEAE）、DEAE-イミン）等の支持体材料を含み得る。支持体は、それに結合される分子がその各々の結合パートナー（例えば、ヘリコバクター属の細菌）へ結合することが可能である限りは、任意の考え得る構造形状を有してもよい。適切な形状として、ミクロスフェア等の球形状が挙げられる（例えば、国際公開第2013/164652号を参照）。1つの実施形態において、固体支持体は、ミクロスフェアである。

30

【0226】

本発明は、ヘリコバクター・ビルス（*Helicobacter bilis*）（H.ビルス）によって引き起こされるか、又はH.ビルスと関連付けられる疾患又は障害を予防又は治療する方法における使用のための、H.ビルスと、癌胎児性抗原関連細胞接着分子（CEACAM）ファミリーの成員との間の相互作用の阻害剤を更に提供する。

【0227】

本発明は、H.ビルスによって引き起こされるか、又はH.ビルスと関連付けられる疾患又は障害を予防又は治療するための薬剤の作製における、H.ビルスと、癌胎児性抗原関連細胞接着分子（CEACAM）ファミリーの成員との間の相互作用の阻害剤の使用を更に提供する。

40

【0228】

本発明は、対象において、H.ビルスによって引き起こされるか、又はH.ビルスと関連付けられる疾患又は障害を予防又は治療する方法であって、H.ビルスと、癌胎児性抗原関連細胞接着分子（CEACAM）ファミリーの成員との間の相互作用の阻害剤を、対象に投与することを含む、方法を更に提供する。

【0229】

50

本発明によれば、H.ピリスによって引き起こされるか、又はH.ピリスと関連付けられる疾患又は障害は、好ましくは、H.ピリス感染、胆嚢炎、胆石（複数の場合もある）、胆嚢癌及び胆管癌からなる群から選択される。

【0230】

1つの実施形態において、阻害剤は、H.ピリスの、CEACAMファミリーの成員への、好ましくはCEACAMファミリーの成員の細胞外ドメインへの、より好ましくはCEACAMファミリーの成員のN-ドメインへの結合を阻害し、例えばそれを競合的に阻害する。

【0231】

1つの実施形態において、CEACAMファミリーの成員は、上皮細胞、内皮細胞及び/又は免疫細胞（特に、T細胞、B細胞及び好中球等の白血球）の表面上で発現される。1つの実施形態において、CEACAMファミリーの成員は、上皮細胞（例えば、胆管上皮細胞）の表面上で、好ましくは上皮細胞の頂端側で発現される。

【0232】

1つの実施形態において、CEACAMファミリーの成員は、ヒトCEACAMファミリー成員、非ヒト霊長類CEACAMファミリー成員及びラットCEACAMファミリー成員からなる群から選択される。1つの実施形態において、CEACAMファミリーの成員は、CEACAM1、CEACAM5及びCEACAM6からなる群から選択される。

【0233】

1つの実施形態において、阻害剤は、  
(a) CEACAMファミリーの成員へ、好ましくはCEACAMファミリーの成員の細胞外ドメインへ、より好ましくはCEACAMファミリーの成員のN-ドメインへ結合する（ポリ-）ペプチドリガンド又はペプチド模倣体リガンド、  
(b) (a) の（ポリ-）ペプチドリガンドをコードする核酸分子、  
(c) CEACAMファミリーの成員へ、好ましくはCEACAMファミリーの成員の細胞外ドメインへ、より好ましくはCEACAMファミリーの成員のN-ドメインへ結合する核酸リガンド、  
(d) CEACAMファミリーの成員の発現を阻害する阻害性核酸分子、及び、  
(e) CEACAMファミリーの成員へ、好ましくはCEACAMファミリーの成員の細胞外ドメインへ、より好ましくはCEACAMファミリーの成員のN-ドメインへ結合する小分子、  
からなる群から選択される。

【0234】

1つの実施形態において、阻害剤は、医薬組成物中に含まれる。

【0235】

本発明は、H.ピリスによって引き起こされるか、又はH.ピリスと関連付けられる疾患又は障害を予防又は治療するための薬物候補を同定するin vitroでの方法であって、該方法は、

(a) (i) CEACAMタンパク質又はその機能性断片を、(ii) H.ピリス及び(iii) 試験化合物と接触させることと、  
(b) 試験化合物が、CEACAMタンパク質又はその機能性断片と、H.ピリスとの間の相互作用を阻害するかどうかを決定することと、  
を含み、

CEACAMタンパク質又はその機能性断片と、H.ピリスとの間の相互作用を阻害する試験化合物は、H.ピリスによって引き起こされるか、又はH.ピリスと関連付けられる疾患又は障害を予防又は治療するための薬物候補として同定される、方法を更に提供する。

【0236】

1つの実施形態において、工程(b)は、試験化合物が、H.ピリスの、CEACAMタンパク質又はその機能性断片への結合を阻害するかどうかを決定することを含み、ここで、好ましくは、CEACAMタンパク質の機能性断片は、細胞外ドメイン又はその断片、好ましくはN-ドメインを含む。

【0237】

10

20

30

40

50

1つの実施形態において、CEACAMタンパク質は、ヒトCEACAMタンパク質、非ヒト霊長類CEACAMタンパク質及びラットCEACAMタンパク質からなる群から選択される。1つの実施形態において、CEACAMタンパク質は、CEACAM1、CEACAM5及びCEACAM6からなる群から選択される。

【0238】

1つの実施形態において、試験化合物は、(ポリ-)ペプチド、ペプチド模倣体、核酸分子及び小分子からなる群から選択される。

【0239】

別の態様において、本発明は、H.ピリス感染を研究するか、又はH.ピリスによって引き起こされるか、若しくはH.ピリスと関連付けられる疾患若しくは障害を予防若しくは治療するための薬物候補を同定するための、H.ピリスと相互作用することが可能なCEACAMタンパク質又はその機能性断片の使用に関する。

10

【0240】

更なる態様において、本発明は、H.ピリス感染を研究するか、又はH.ピリスによって引き起こされるか、若しくはH.ピリスと関連付けられる疾患若しくは障害を予防若しくは治療するための薬物候補を同定するための、H.ピリスと相互作用することが可能なCEACAMタンパク質又はその機能性断片を異種的に発現する細胞の使用に関する。

【0241】

更に別の態様において、本発明は、H.ピリス感染を研究するか、又はH.ピリスによって引き起こされるか、若しくはH.ピリスと関連付けられる疾患若しくは障害を予防若しくは治療するための薬物候補を同定するための、H.ピリスと相互作用することが可能なCEACAMタンパク質又はその機能性断片を異種的に発現する非ヒトトランスジェニック動物の使用に関する。

20

【0242】

上記使用の1つの実施形態において、CEACAMタンパク質は、ヒトCEACAMタンパク質、非ヒト霊長類CEACAMタンパク質及びラットCEACAMタンパク質からなる群から選択される。1つの実施形態において、CEACAMタンパク質は、CEACAM1、CEACAM5及びCEACAM6からなる群から選択される。

【0243】

本発明は、H.ピリスによって引き起こされるか、又はH.ピリスと関連付けられる疾患又は障害を予防又は治療する方法における使用のための、H.ピリスと相互作用することが可能なCEACAMタンパク質又はその機能性断片を更に提供し、ここで、CEACAMタンパク質又はその機能性断片は、固体支持体、好ましくは非細胞性固体支持体に結合される。

30

【0244】

本発明は、H.ピリスによって引き起こされるか、又はH.ピリスと関連付けられる疾患又は障害を予防又は治療するための薬剤に作製における、H.ピリスと相互作用することが可能なCEACAMタンパク質又はその機能性断片の使用を更に提供し、ここで、CEACAMタンパク質又はその機能性断片は、固体支持体、好ましくは非細胞性固体支持体に結合される。

【0245】

本発明はまた、対象において、H.ピリスによって引き起こされるか、又はH.ピリスと関連付けられる疾患又は障害を予防又は治療する方法であって、H.ピリスと相互作用することが可能なCEACAMタンパク質又はその機能性断片を、対象に投与することを含む、方法を提供し、ここで、CEACAMタンパク質又はその機能性断片は、固体支持体、好ましくは非細胞性固体支持体に結合される。

40

【0246】

上記使用の1つの実施形態において、CEACAMタンパク質は、ヒトCEACAMタンパク質、非ヒト霊長類CEACAMタンパク質及びラットCEACAMタンパク質からなる群から選択される。1つの実施形態において、CEACAMタンパク質は、CEACAM1、CEACAM5及びCEACAM6からなる群から選択される。

【0247】

50

本明細書中に記載する作用物質及び組成物は、任意の従来の経路により、例えば、経腸投与によって、又は注射若しくは注入を含む非経口投与によって投与され得る。1つの実施形態において、投与は、非経口的、例えば、皮内、皮下又は筋内である。1つの実施形態において、粘膜投与は、例えば、経口的に又は舌下で使用される。

#### 【0248】

本明細書中に記載する作用物質及び組成物は、有効量で投与される。「有効量」は、単独で、又は更なる用量と一緒に、所望の反応又は所望の効果を達成する量を指す。特定の疾患又は特定の状態の治療の場合、所望の反応は、好ましくは、疾患の経過の阻害に関する。これは、疾患の進行の速度を落とすこと、特に、疾患の進行を中断させること、又はその進行を逆戻りさせることを含む。疾患又は状態の治療における所望の反応はまた、上記疾患又は上記状態の発症の遅延又は発症の予防であり得る。本明細書中に記載する作用物質又は組成物の有効量は、治療される状態、疾患の重篤性、年齢、生理学的条件、大きさ及び体重を含む対象の個々のパラメーター、治療の持続期間、付随する治療法（存在する場合）のタイプ、特定の投与経路、並びに類似した因子に依存する。したがって、本明細書中に記載する作用物質の投与される用量は、様々なかかるパラメーターに依存し得る。対象における反応が、初期用量では不十分である場合には、より高い用量（又は異なる、より局在化された投与経路によって達成される、より効果的に高い用量）を使用してもよい。

10

#### 【0249】

本発明は、本明細書中で規定するような(i)阻害剤又は(ii)免疫原性組成物又は(iii)CEACAMタンパク質若しくはその機能性断片を含むキットを更に提供する。

20

#### 【0250】

本明細書中で使用する場合、「部品のキット（簡単に言うと、キット）」という用語は、1つ以上の容器、及び任意選択で、データキャリア（data carrier）を含む製品を指す。上記1つ以上の容器に、本明細書中に開示する手段又は試薬の1つ以上を充填してもよい。例えば、希釈剤、緩衝液及び更なる試薬を含有する更なる容器がキット中に含まれてもよい。上記データキャリアは、非電子データキャリア、例えば、情報リーフレット、情報シート、バーコード若しくはアクセスコード等のグラフィックデータキャリア、又はフロッピーディスク、コンパクトディスク（CD）、デジタル多用途ディスク（DVD）、マイクロチップ若しくは別の半導体ベースの電子データキャリア等の電子データキャリアであり得る。アクセスコードにより、データベース、例えばインターネットデータベース、集中データベース又は分散データベースへのアクセスが可能となり得る。上記データキャリアは、本発明によるキットの使用に関する指示書を含み得る。

30

#### 【0251】

本発明は、下記の実施例によって更に説明され、下記の実施例は、本発明の範囲を限定するものと解釈されるべきではない。

#### 【実施例】

#### 【0252】

実施例1：H.ピロリは、ヒトの胃において発現されるCEACAMへ結合する

ブルダウン及びフローサイトメトリーアプローチを使用して、組換えヒトCEACAM1-Fcと、モラクセラ・カタラーリスとの相互作用（図2a及び図2b）に匹敵する、H.ピロリ株G27との頑強な相互作用（図1a）を見出した。陰性対照として、モラクセラ・ラクナータは、ヒトCEACAM1へ結合せず、またH.ピロリに密接に関連される病原体であるカンピロバクター・ジェジュニも結合しなかった（図2a及び図2b）。CEACAM特異性に関して検査した際、H.ピロリと、CEACAM5及びCEACAM6との明確な相互作用が観察されたが、CEACAM8との明確な相互作用は観察されず（図1b）、各々のN-ドメインの比較により、CEACAM1、CEACAM5及びCEACAM6において保存されるが、CEACAM8では保存されない幾つかの残基が示された（図2h）。H.ピロリは、CEACAM3とも相互作用した（図2c及び図2d）。重要なことに、十分に特性化された参照株（26695、J99）及びマウス適応株S1を含む、試験したH.ピロリ株は全て、これまでのところ、これらのCEACAMに結合し

40

50

た（図2f及び図2g）。しかしながら、結合強度は、株間で異なり、幾つかが優先してCEACAM1へ結合するものもあり、またCEACAM5及び／又はCEACAM6へ結合するものもあった（図2f及び図2g）。顕著なことに、CEACAM1結合剤は、CagAの送達に関するIV型分泌系（T4SS）をコードするcag病原性アイランド（cagPAI）を保有する非常に病原性のある株の群に主に由来するのに対して、古典的なcagPAI陰性株であるTX30は、CEACAM5及びCEACAM6への優先的な結合を示した（図2f及び図2g）。続いて、本発明者らは、正常なヒトの胃組織及び炎症性のヒトの胃組織、並びに胃癌におけるCEACAM1、CEACAM5及びCEACAM6の発現プロファイルを分析した。CEACAM1及びCEACAM5は、上皮細胞の頂端側で発現され、それらの発現及びCEACAM6の発現は、胃炎時に、及び胃腫瘍においてアップレギュレートされた（図1c及び図2e）。したがって、感染中、H.ピロリ誘導性応答は、そのCEACAM受容体の発現の増加を引き起こし得る。

#### 【0253】

本発明者らは、組換えCEACAM1 Nが、細菌と相互作用しなかったため、H.ピロリは、CEACAM1のN-ドメインに結合することを見出し（図1d）、さらに、H.ピロリの、N-ドメインを含有する全てのCEACAMへの、またN-ドメイン単独への結合を観察した（図1e）。しかしながら、N-ドメイン単独への結合は、N-A1-B-A2変異体よりも結合しないN-A1-B CEACAM1変異体よりも弱く（図1e）、これらのドメインは、CEACAM1-H.ピロリ相互作用を安定化する一方で、結合は、ほんの部分的にグリコシル化に依存することを示した（図1f）。このCEACAM結合特性は、H.ピロリに、BabA及びSabAアドヘシンによって使用されるLewis血液型抗原とは無関係に、頑強な上皮付着を提供する。胃腸腫瘍におけるCEACAMの過剰発現が十分に記載されているのに対して、胃におけるH.ピロリ誘導性炎症中のそれらのアップレギュレーションは、これまで報告されておらず、病原体が、それ自体の接着性ニッチを形作る能力を有することを示唆する。CEACAM調節への妥当な経路は、転写因子NF- $\kappa$ B及びAP1によるものであり、それらはともに、H.ピロリ感染中に誘導されて、CEACAM発現を調節することが知られている。これらのCEACAM-受容体のアップレギュレーションは、コロニー形成中にBabA発現の記載されている欠如を相殺することが可能であり、持続的なコロニー形成を可能にしている。

#### 【0254】

##### 実施例2：ヘリコバクター属-CEACAM相互作用の種特異性

H.ピロリは、これまでのところ、ヒト及び非ヒト霊長類に感染すると記載されてきた。CEACAMは、ほとんどの哺乳動物種において見出され、高度の保存を有するが、本発明者らは、H.ピロリが、選択的にヒトへ結合するが、マウス、ウシ又はイヌのCEACAM1オルソログへは選択的に結合しないことを見出した（図3a）。しかしながら、驚くべきことに、H.ピロリ株とラット-CEACAM1との強力な相互作用が見られた（図3b及び図3d）。また、ここでは、この相互作用は、ラット-CEACAM1のN-ドメインにより媒介された（図3c及び図3d）。これらの発見を立証するために、本発明者らは、ヒト-CEACAM1、マウス-CEACAM1又はラット-CEACAM1を、通常はH.ピロリ付着を許容しないCHO細胞にトランスフェクトした。共焦点レーザー走査顕微鏡法を使用して、本発明者らは、H.ピロリの、ヒト及びラットのCEACAM1を発現するCHO細胞への新生接着を観察したが、マウスCEACAM1を発現するCHO細胞への新生接着は観察されず（図3e）、それらは、トランスフェクトした細胞由来の溶解産物のブルダウン及びウェスタンブロッティングによって確認することができた（図3f及び図4d）。この発見により、H.ピロリは、そのCEACAM結合が1つの種に制限されない最初の病原体となる。CEACAM1-Nドメインのタンパク質配列を比較すると、ヒト及びラットで保存される幾つかのアミノ酸が、マウスでは異なっている（即ち、asn10、glu26、asn42、tyr48、pro59、thr66、asn77、val79、val89、ile90、glu103、tyr108）（図4a）。さらに、マウスCEACAM1への結合の欠如の本発明者らの発見は、感染マウスとヒトとの間の病態で見られる差を説明し得る。

#### 【0255】

ヘリコバクター属は、幾つかの他の菌種、即ちH.フェリス（*H. felis*）、スイス（*suis*）、及びビゾゼロニイ（*bizzozeronii*）、並びにヒト病原性H.ピリス及びハイルマニ（*h*

eilmannii)を含む。これらのヘリコバクター属と、ヒトCEACAMとの間の相互作用を評価した場合、H.ピリスのみが、hu-CEACAM1、hu-CEACAM5及びhu-CEACAM6に結合した(図4b及び図4c)。H.ピロリと同様に、H.ピリスは、hu-CEACAM1のN-ドメインと相互作用した(図4b及び図4c)。この相互作用は、H.ピリスが、高レベルの恒常的に発現されるCEACAM1が存在するヒト胆管にどのようにコロニー形成を成し遂げるかを説明し得る。

#### 【0256】

実施例3：HopQは、CEACAMと相互作用するヘリコバクター属アドヘシンである

ヘリコバクター属におけるCEACAM結合パートナーを同定するために、本発明者らはまず、宿主細胞相互作用の各種モードで関与することが示されている規定の病原性因子(BabA、SabA、AlpA/B、VacA、gGT、ウレアーゼ及びCagPAI)を欠如した多数のヘリコバクター属突然変異体をスクリーニングした。これらの突然変異体は全て、依然としてhu-CEACAM1に結合した(図5a)。その結果として、本発明者らは、H.ピロリ溶解産物及びプロテインGにカップリングされた組換えhu-CEACAM1-Fcを使用して、免疫沈降アプローチを確立させた(図6a)。共沈殿物の質量分析により、候補CEACAM1アドヘシンとして、2つの高度に保存されたH.ピロリ外膜タンパク質：HopQ及びHopZが同定された(図5b)。hopZ突然変異体と異なり、hopQ欠失突然変異体は、CEACAM1結合を欠如していた(図5c)。重要なことに、hopQ突然変異体はまた、CEACAM5及びCEACAM6へ結合することは不可能であった(図5c)。

#### 【0257】

次に、本発明者らは、組換えHopQの、種々の胃癌細胞系統への結合を検査して、HopQが、ともにCEACAMを内因的に発現するAGS及びMKN45と相互作用することを発見した(図6b)。HopQは、CEACAM陰性細胞系統MKN28へ結合しなかった。それらのCHOトランスフェクタントを利用して、本発明者らは、組換えHopQが、優先的にCEACAM1及びCEACAM5と相互作用して、CEACAM3及びCEACAM6との相互作用は比較的程度が低いことを見出した。CEACAM4、CEACAM7、又はCEACAM8のいずれかを発現するCHO細胞への結合は観察されなかった(図6c)。

#### 【0258】

HopQは、外膜タンパク質のH.ピロリ特異的なファミリーの成員であり、他のグラム陰性菌由来の他のCEACAM結合アドヘシン、即ち、それぞれナイセリア・メニンギティディス(*Neisseria meningitidis*)及びナイセリア・ゴノレア(*Neisseria gonorrhoeae*)又はモラクセラ・カタラーリスに由来するOpaタンパク質、又はUspA1に対して有意な相同性を示さず、その結果として、新規細菌因子ハイジャック(hijacking)CEACAMである。Opa及びUspA1のように、HopQは、CEACAMにおけるN-末端ドメインを標的とし、本発明者らは、相互作用が、折り畳まれたタンパク質を必要とし、またCEACAM配列に依存적であり、ヒトCEACAM1、ヒトCEACAM3、ヒトCEACAM5及びヒトCEACAM6に関する特異性を生じることを見出した。H.ピロリhopQ(omp27; H.ピロリ参照株H26695におけるHP1177)は、2つの対立遺伝子ファミリー(Cao & Cover, 2002)のI型及びII型を表す遺伝子多様性を示し(図6d)、そのうちのI型対立遺伝子は、cag(+)/type s1-vacA株においてより高頻度で見られる。対立遺伝子はともに、75%~80%のヌクレオチド配列を共有し、アミノ酸レベルで70%の相同性を示す(Cao & Cover, 2002)。本発明者らは、CEACAMに対するHopQの結合強度の対立遺伝子の差を観察し、それにより、hopQ I型対立遺伝子は、CEACAM1へより強力に結合するようであるのに対して、II型対立遺伝子は、株TX30において見られるように、CEACAM5及びCEACAM6を好む。重要なことに、hopQ遺伝子型は、地理的変動を示し、hopQ I型対立遺伝子は、西洋株と比較してアジア株においてより流行しており、また、株病原性と関連することもわかっており、I型対立遺伝子は、より高い炎症及び胃萎縮症と関連付けられる。

#### 【0259】

実施例4：HopQアドヘシンドメインの構造及び結合特性

HopQは、H.ピロリ外膜タンパク質(Hop)のパラログスなファミリーに属し、血液型

抗原結合アドヘシンBabA及びSabAもまた、それに属する。その構造 - 機能の関係性に対する洞察を得るために、本発明者らは、その予測細胞外ドメインに相当するHopQ断片のX線構造を決定した（成熟タンパク質、即ち、シグナルペプチドの除去後の残基17～443；HopQ<sup>AD</sup>；図7a及び表1）。HopQ<sup>AD</sup>は、ELISAにおいてヒトCEACAM1のN-末端ドメイン（C1ND；残基35～142）への強力な用量依存性結合を示した（図7b）。C1NDを用いたHopQ<sup>AD</sup>滴定の等温滴定量測定（ITC）によって測定される結合プロファイルは、 $296 \pm 40$  nMの解離定数Kdを伴う1:1の化学量論を明らかにした（図8a）。

【0260】

HopQ<sup>AD</sup>のX線構造により、BabA及びSabAのように、HopQ外部ドメインが、3+4-ヘリックス束トポロジーをとるが、外部ドメインを膜貫通領域に結合する伸長コイルドコイル「基部（stem）」ドメインを欠如することが示される（図8d）。BabAにおいて、炭水化物結合部位は、ヘリックスH4とH5との間に挿入される4鎖のベータ - ドメインに完全に存在する（図8d）。HopQにおいて、2鎖のベータ - ヘアピンは、この位置で見出される（残基180～218）。ベータ - ヘアピンの除去は、CEACAM1結合親和性のおよそ10倍の低減を示す安定なタンパク質をもたらし、HopQ挿入ドメインは結合に関与するが、それは、BabAで見られるように完全な結合部位を含まないことを示した（図7b）。BabA及びSabAアドヘシンは、それぞれ、Lewis b、並びにシアル酸付加されたLewis x及びaグリカンに結合するレクチンである。HopQ-CEACAM相互作用が、同様にグリカン駆動型であるかどうかを検証するために、本発明者らは、自然又は変性条件下で、C1NDへのHopQ結合を評価した。ファウースタン分析により、HopQが、折り畳まれたCEACAM1-Nを特異的に結合するが、変性されたCEACAM1-Nを特異的に結合しないことが明らかとなった（図7c）。対比して、細菌プルダウン実験により、CEACAM1-Fc脱グリコシル化時に結合のほんのわずかな低減が示され（図1f）、タンパク質間相互作用が、HopQ-CEACAM結合への主な寄与因子を形成することを裏付けた。

【0261】

10

20

30

40

50



【表 1】

HopQ <sup>AD</sup>		
<b>Data collection</b>		
Space group	データ収集 空間群	P 1 2 <sub>1</sub> 1
Cell dimensions	格子寸法	
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å)		57.7, 57.7, 285.7
$\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ (°)		90.0, 90.1, 90.0
Resolution (Å)	分解能	49.38-2.6 (2.74-2.6)*
<i>R</i> <sub>merge</sub>		14.7 (121.0)*
<i>I</i> / $\sigma$ <i>I</i>		7.3 (0.9)*
CC1/2		99.3 (57.6)* <sup>†</sup>
Completeness (%)	完全性	99.7 (98.2)*
Redundancy	重複性	4.7 (4.5)*
<b>Refinement</b>	精密化	
Resolution (Å)	分解能	285.6-2.6
No. reflections	反射の数	55541
<i>R</i> <sub>work</sub> / <i>R</i> <sub>free</sub>		20.9 /23.6
No. atoms	原子の数	
Protein	タンパク質	10946
Water	水	35
B-factors	B-因子	
Protein		42.8
Water		60.7
R.m.s deviations	R. m. s 偏差	
Bond lengths (Å)	結合長	0.014
Bond angles (°)	結合角	1.71

10

20

最外郭分解能 (Highest resolution shell) を括弧内に示す。

分解能限界は、およそ0.5のデータセットの半分の平均強度相関係数 (CC1/2) に基づくカットオフを適用することによって決定した。

30

表1. HopQ<sup>AD</sup> 構造に関するデータ収集及び精密化統計

【 0 2 6 2 】

実施例5: HopQ-CEACAM1相互作用は、細胞応答を誘発する

HopQが、どのようにして接着及び細胞応答に影響を及ぼし得るかを更に検討するために、本発明者らは、HopQ-CEACAM媒介性接着を分析することができる細胞発病モデルを確立しようとした。その結果として、本発明者らは、CEACAMの発現に関するH.ピロリの in vitroでの実験に通常用いられる各種胃細胞系統を特性化して、MKN45、KatoIII及びAGSは、CEACAM1、CEACAM5及びCEACAM6を発現する一方で、MKN28は、CEACAMの存在を示さないことを観察した (図10a及び図10b)。CHO細胞は、CEACAM1-L (ITIMモチーフを含有する) で安定にトランスフェクトされた。H.ピロリ野生型株P12及びその同質遺伝子的なhopQ欠失突然変異体による感染時に、本発明者らは、CHO-CEACAM1-L、MKN45及びAGS細胞への著しく低減された付着を観察した一方で、アドヘシンBabA及びSabAが欠如している株は、ほんのわずかに低減された接着を示した (図9a)。CHO-CEACAM1-L細胞において、本発明者らは、H.ピロリへの曝露時にCEACAM1 ITIMドメインのチロシンリン酸化を観察し、それは、5分以内ではっきりと見え、最大1時間維持された (図9b)。CEACAM1 ITIMドメインのリン酸化は、下流のシグナル伝達カスケードを誘導するSHP1/2漸増を誘発する既知の初期事象である。CEACAMによる接触依存性シグナル伝達は、感染、炎症及び癌に関連した免疫応答を調節する一般的な手段であり、これらの免疫を弱めるカスケードは、ナイセリア属 (Neisseria)、ヘモフィルス属 (Haemophilus)、エシャリキア属 (Escherichia)、サルモネラ属 (Salmonella)、モラ

40

50

クセラ属 (Moraxella) の菌種を含む多様な粘膜グラム陰性病原体における非相同CEACAM相互作用タンパク質の多重独立出現を反映している可能性が高い。H.ピロリに関して、HopQによるヒトCEACAM1との相互作用は、コロニー形成及びヒトの慢性感染中の免疫調節性シグナル伝達に関する重要なパラメーターを表し得る。

#### 【0263】

さらに、hopQ突然変異体H.ピロリ株は、T4SS依存性CagA移行のほぼ完全な欠如を示し(図9c)、IL-8誘導を強力に低減した(図9d)一方で、他の既知のアドヘシンの欠如は、CagA送達に対して影響しなかった(図10c及び図10d)。

#### 【0264】

独立モデルにおけるこれらのデータを裏付けして、安定にトランスフェクトされた細胞における潜在的なクローン効果を相殺するために、本発明者らは、HEK293細胞を、ヒトCEACAM(1-L、3、4、5、6、7、8)発現プラスミドで一過的にトランスフェクトした。これらの細胞の感染により、CHO-CEACAM1-L細胞において観察されるCagA移行の欠如が確認され、それは、hopQ突然変異体株(P12 hopQ/hopQ)の補完時に回復した(図9e及び図10e)。また、いわゆる「ハミングバード表現型」である細胞伸長は、hopQの欠失時に著しく低減した(図9f及び図9g)。さらに、本発明者らは、H.ピロリが、Myc、STAT3、CreATF2/CREB、GRE及びNF- $\kappa$ B等の重要な宿主転写因子をhopQ依存的に調節することを観察した(図10f)。これらの結果は、HopQ-CEACAM結合が、宿主細胞シグナル伝達カスケードにおける直接的及び間接的な変更を引き起こすこと明らかにし、これらのHopQ関連病原性の状況に光を投げ始める。胃癌発生に関するこれらのシグナル伝達事象の重要性を考慮して、本発明者らは、CagA移行及び下流の影響を防止するように、CEACAM-HopQ相互作用を標的とすることができかどうかを探究した。実際に、-CEACAM1抗体を使用して、-HopQ抗血清又はHop-IDに相当するHopQ由来のペプチド(aa190~218)は、用量依存的にCagA移行を低減した(図9h~図9j)が、相当する対照は低減しなかった(図10g)。これらのデータにより、HopQ-CEACAM1相互作用が、腫瘍性タンパク質CagAの、上皮細胞への首尾よい移行及び炎症性シグナルの調節に必要であること、並びにこの相互作用の妨害は、CagA移行を防止する可能性があり、HopQを標的とするH.ピロリワクチン接種又は免疫療法のトランスレーショナルな(translational)可能性を示すことが実証される。

#### 【0265】

実施例6: hopQの欠失は、H.ピロリ感染のラットモデルにおいてコロニー形成を抑止する  
本発明者らが、HopQの、ヒト及びラットのCEACAMへの結合を見出したが、マウスCEACAMへの結合は見出さなかったため、本発明者らは、H.ピロリ感染のラットモデルを使用して、in vivoでのHopQの役割を決定した。CEACAM1が正常なラットの胃で発現されたことが観察されており(図11a及び図12b)、本発明者らは、げっ歯類に感染することが知られている種々のH.ピロリ株をラットに感染させた。全ての株が、in vitroでラットCEACAM1に結合した一方で、SS1のみが、効率的にラットにコロニーを形成することが可能であった(図12a)。hopQ欠損SS1株は、検出可能なレベルでラットにコロニーを形成することは不可能であり、野生型SS1株と比較して、炎症性応答を誘導することができなかった(図11b及び図11c)。したがって、このモデルにおいて、HopQはまた、H.ピロリコロニー形成を媒介する重要な因子としての機能を果たすようである。

#### 【0266】

実施例7: HopQ<sup>AD</sup>及びC1ND複合体の構造

HopQアドヘシンドメインと、大腸菌から組換えにより産生及び精製したヒトCEACAM1の非グリコシル化N-末端ドメインとの間の複合体の構造を決定した(図13a及び表2)。構造により、CEACAM N-末端ドメインを結合するHopQの接触表面が3つの伸長ループ: HopQ\_123~136(ループA)、HopQ\_152~180(ループB)及びHopQ\_258~290(ループC)によって形成されることが示される。ループHopQ\_123~136の結合コンホメーションは、HopQ-IDによって形成される $\alpha$ -ヘアピンとの主鎖水素結合によって安定化される。したがって、HopQ-IDの欠失は、HopQ-CEACAM結合の劇的な低減をもたらす

ことがわかった。HopQアドヘシンドメイン上の第4の伸長ループであるHopQ\_371~407(ループD)は、HopQ-CEACAM結合界面に隣接して存在する。HopQ\_371~407とCEACAM N-ドメインとの間では、直接的な接触は行われないが、HopQ\_371~407を結合する抗体又は抗体誘導体は、立体障害によってHopQ-CEACAM相互作用を崩壊させる。

【0267】

【表2】

HopQ <sup>AD</sup> -hC1ND		
<b>Data collection</b>	データ収集	
Space group	空間群	C2
Cell dimensions	格子寸法	
<i>a, b, c</i> (Å)		118.0, 174.0, 118.1
$\alpha, \beta, \gamma$ (°)		90.0, 118.4, 90.0
Resolution (Å)	分解能	50.00-3.55 (3.64-3.55)*
<i>R</i> <sub>merge</sub>		11.8 (88.0)*
<i>I</i> / $\sigma$ <i>I</i>		8.0 (1.6)*
CC1/2		99.5 (59.7)*
Completeness (%)	完全性	99.3 (99.5)*
Redundancy	重複性	3.8 (3.8)*
<b>Refinement</b>	精密化	
Resolution (Å)	分解能	48.81-3.55
No. reflections	反射の数	25252
<i>R</i> <sub>work</sub> / <i>R</i> <sub>free</sub>		28.1 / 33.8
No. atoms	原子の数	
Protein	タンパク質	9621
Water	水	0
B-factors	B-因子	
Protein		81.5
Water		NA
R.m.s deviations	R. m. s偏差	
Bond lengths (Å)	結合長	0.008
Bond angles (°)	結合角	1.12

最外郭分解能を括弧内に示す。

分解能限界は、およそ0.5のデータセットの半分の平均強度相関係数(CC1/2)に基づくカットオフを適用することによって決定した。

表2. HopQ<sup>AD</sup>-hC1ND構造に関するデータ収集及び精密化統計

【0268】

材料及び方法

細菌及び細菌成長条件

H.ピロリ株G27、PMSS1、SS1、J99(ATCC、700824)、2808、26695(ATCC、70039)、TX30、60190、P12、NCTC11637(ATCC、43504)、Ka89及びH.ピリス(ATCC43879)を、Wilkins-Chalgren血液寒天プレート上で、微好気性条件(10% CO<sub>2</sub>、5% O<sub>2</sub>、8.5% N<sub>2</sub>、及び37℃)下で成長させた。H.スイス及びH.ハイルマニは、Brucella寒天上で成長させて、H.フェリス(ATCC 49179)及びH.ピゾゼロニは、10%ウマ血液を補充したブレインハートインフュージョン(BHI)寒天上で成長させた。モラクセラ・カタラーリス(ATCC、25238)、モラクセラ・ラクナータ(ATCC 17967)及びカンピロバクター・ジェジュニ(ATCC、33560)は、5%加熱ウマ血液を補充したブレインハートインフュージョン(BHI)寒天上で、CO<sub>2</sub>インキュベーターにおいて37℃で一晩培養した。同質遺伝的なDhopQ突然変異体の生成は、記載されるようにクロラムフェニコール耐性カセットによる完全遺伝子の置き換えによって為された(Belogolova et

al., 2013)。

#### 【0269】

##### CEACAMタンパク質の産生

ヒトCEACAM1-Fc (N-A1-B1-A2ドメインからなる)、ヒトCEACAM1dN-Fc (A1-B1-A2からなる)、ラットCEACAM1-Fc (N-A1-B1-A2からなる)、ラットCEACAM1dN-Fc (A1-B1-A2からなる)、ヒトCEACAM3-Fc (Nからなる)、ヒトCEACAM6-Fc (N-A-Bからなる)、ヒトCEACAM8-Fc (N-A-Bからなる)の細胞外ドメインをコードするcDNAを、それぞれ、記載されるように、ヒト重鎖Fc-ドメインと融合させて、pcDNA3.1(+)発現ベクター (Invitrogen社、カリフォルニア州サンディエゴ) にクローニングして、配列決定して、HEK293 (ATCC CRL-1573) 細胞に安定にトランスフェクトした (Singer et al., 2014)。FcキメラCEACAM-Fcタンパク質を、無血清Pro293s-CDM培地 (Lonza社) 中に蓄積させて、プロテインA/G-セファロースアフィニティークロマトグラフィー (Pierce社) によって回収した。タンパク質は、SDS-PAGEによって分析して、クマシーブルーによって染色して、産生された融合タンパク質の等量及び完全性を実証した (図2i)。

組換えヒトCEACAM5-Fcは、Sino Biological Inc.社から発注された。組換えヒトCEACAM1 N-ドメイン (C1ND) の産生に関して、アノテートしたドメイン (UniProt ID: P13688) をまず、GeneOptimizer (商標) (LifeTechnologies社) を使用して逆翻訳し、Igk-鎖のリーダー配列及びC-末端Strep-Tag IIを付加した。遺伝子を合成して、pCDNA3.4-TOPO (LifeTechnologies社) にシームレスクローニングした。タンパク質は、Expi293発現系指示書 (LifeTechnologies社) に従って、Expi293細胞の2 L培養液中で産生された。得られた上清を濃縮して、Hydrosart 5 kDa分子量カットオフ膜 (Sartorius社) を使用して、クロスフロー濾過によって、10倍容量の1×SAC緩衝液 (100 mM Tris, 140 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) に対してダイアフィルトレーションした。残余分をStrepTrap HPカラム (GE Healthcare社) 上にロードして、2.5 mM D-デスチオピオチン (IBA) を補充した1×SACで溶出させた。タンパク質を+4 で貯蔵した。

#### 【0270】

C1ND (Ec-C1ND) の細菌発現に関して、アミノ酸配列は、大腸菌における発現に関してコドン最適化して、GeneArt新生遺伝子合成 (Life Technologies社) によって合成して、Gateway技術 (Invitrogen社) を使用して、pDEST (商標) 14ベクターにおいて、C-末端His6タグと共にクローニングした。大腸菌C43 (DE3) 細胞を、生じた構築物で形質転換して、100 µg/mLのアンプシリンを補充したLB中で、振盪しながら37 で増殖させた。OD<sub>600</sub> = 1で、Ec-C1ND発現を、1 mM IPTGを用いて30 で一晩誘導した。4 で15分の6238 gでの遠心分離によって、細胞を収集して、5 µM ロイペプチン及び1 mM AEBSF、100 µg/mLのリゾチーム、及び20 µg/mLのDNase Iを補充した50 mM Tris-HCl pH 7.4、500 mM NaCl中に再懸濁した (4 mL/g (湿潤細胞))。次に、細胞を、Constant System Cell Crackerにおいて、4 で20 kPsiで1通過によって溶解させて、細胞組織片 (debris) を48400 gで40分間の遠心分離によって除去した。細胞質抽出物を0.45 µm孔フィルターに通して濾過して、緩衝液A (50 mM Tris-HCl pH 7.4、500 mM NaCl及び20 mMイミダゾール) で平衡化した5 mLのプレパックドNi-NTAカラム (GE Healthcare社) 上にロードした。続いて、カラムを、40総容量の緩衝液Aで洗浄して、結合タンパク質を、0% 75%の緩衝液B (50 mM Tris-HCl pH 7.4、500 mM NaCl及び500 mMイミダゾール) の線形勾配を用いて溶出させた。SDS-PAGE によって決定されるEc-C1NDを含有する分画をプールして、10 kDa MWカットオフのスピンコンセンレーターにおいて、最終容量5 mlにまで濃縮した。少量のタンパク質混入物質を除去するために、濃縮した試料を、50 mM Tris-HCl pH 8.0、150 mM NaClを含有する緩衝液で予め平衡化したHi-Prep (商標) 26/60 Sephacryl S-100 HRカラム (GE Healthcare社) に注入した。Ec-C1ND複合体を含有する分画をプールして、10 kDa MWカットオフのスピンコンセンレーターを使用して濃縮した。

#### 【0271】

HopQ<sup>AD</sup>及びHopQ<sup>AD</sup> IDのクローニング、産生及び精製

可溶性HopQ断片を得るために、H.ピロリG27株由来のHopQ遺伝子（アクセッション番号CP001173 領域：1228696..1230621、配列番号1）を使用して、残基37～463に及ぶHopQ断片を産生し（成熟タンパク質の残基17～443）、したがって、N-末端 - スtrand及びシグナルペプチド、並びにTMドメインを表すと予想されるC-末端 - ドメインを除去した。HopQ<sup>AD</sup> IDにおいて、成熟タンパク質のアミノ酸190～218を、2つのグリシンで置き換えた（図8e）。HopQ I型断片に相当するDNAコード配列を、アンピシリン耐性カセットをカナマイシン耐性カセットに置き換えた、pPR-IBA 1（IBA GmbH社）の誘導体であるpPRkana-1のフランキング標的ベクター配列に対する30bpの重複を含有するプライマー（フォワード：GTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACAAATGGCGGTTCAAAAAGTGAAAAACGC（配列番号8）、リバーズ：TCAAGCTTATTAATGATGATGATGATGATGGTGGGCGCCGTTATTCGTGGTTG（配列番号9））を使用して、T7プロモーター下で、H.ピロリG27ゲノムDNAからPCR増幅させた。並行して、ベクターを、プライマー（フォワード：CACCATCATCATCATCATTAATAAGCTTGATCCGGCTGCTAAC（配列番号10）、リバーズ：GTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACAAATG（配列番号11））を使用して、逆配向性で同じ重複配列を使用して、PCR増幅させた。フォワードプライマーは、6×His-タグに関する配列を更に保有した。アンプリコンは、Gibson Assembly（New England Biolabs GmbH社）を使用してシームレスクローニングした。コドン最適化したHopQ<sup>AD</sup>プラスミドに基づいて、HopQ<sup>AD</sup> ID構築物をクローニングした。プラスミドは、ID領域を2つのグリシンで置き換える5'リン酸化プライマー（フォワード：GGTGACGCTCAGAACCTGCTGAC（配列番号12）、リバーズ：ACCACCTTTAGAGTTCAGCGGAG（配列番号13））によって増幅して、DpnI（NEB社）消化して、T4リガーゼ（NEB社）によって平滑末端ライゲートした。

#### 【0272】

大腸菌BL21（DE3）細胞（NEB GmbH社）をpPRkana-1構築物で形質転換して、2 mM MgSO<sub>4</sub>、100 mg/Lのカナマイシン硫酸塩（Carl Roth GmbH + Co. KG社）、0.2 g/LのPPG2000（Sigma Aldrich社）及び0.2% w/v ラクトース水和物（Sigma Aldrich社）を補充した{Studier:2005ku}に従う自己誘導性テリフィックブロス（TRB）上で、275 rpmで37℃にて、OD 1～2に到達するまで増殖させた。その後、温度を25℃に下げて、一晚自己誘導させて、翌朝に最終OD 10～15に到達した。Sorvall RC-6 Plus遠心分離機（Thermo Fischer社）においてSLA-3000ローターを使用して、6000 gで4分にて15分間の遠心分離によって、細胞を収集した。細胞破壊に先立って、細胞を、0.1 mM AEBSF-HCl、150 U/gのBWW DNase I及び5 mM MgCl<sub>2</sub>を補充した生物学的湿重量（BWW）1グラム当たり冷NiNTA緩衝液A（500 mM NaCl、100 mM Tris、25 mM イミダゾール、pH 7.4）10 ml中に再懸濁して、Ultra-Turrax T25デジタル（IKA GmbH + Co. KG社）を用いて分散させた。細胞破壊は、PANDA2000（GEA Niro Soavi社）を用いて、4分で3回の通過で800パール～1200パールでの高圧ホモジネーションによって実施した。細胞溶解産物を、SLA-1500ローターにおいて、4分で30分間の25000 gでの遠心分離によって清澄化して、残存粒子を、0.2 µm フィルターに通した濾過によって除去した。

#### 【0273】

HopQ断片を、連続したニッケルアフィニティ及びサイズ排除クロマトグラフィーによって精製した。簡潔に述べると、清澄化した細胞溶解産物を、緩衝液Aで予め平衡化した5 mlのプレパックドNi-NTA HisTrap FF粗製カラム（GE Healthcare社）上へロードして、10倍カラム容量（CV）の緩衝液Aで洗浄して、結合タンパク質を、15 CVの75%までの線形勾配のNiNTA緩衝液B（500 mM NaCl、100 mM Tris、500 mM イミダゾール、pH 7.4）で溶出させた。溶出したピーク分画を収集して、ブールして、10 kDa分子量カットオフスピンコンセンレーターを使用して、最終濃度8 mg ml<sup>-1</sup>～10 mg ml<sup>-1</sup>へ濃縮した。次に、濃縮したタンパク質5 mlを、Buffer C（5 mM Tris、140 mM NaCl、pH 7.3）で予め平衡化したHiLoad 16/600 Superdex 75 pgカラム（GE Healthcare社）上へロードして、1 ml min<sup>-1</sup>で溶出させた。最終的に、モノマーピークに相当する

タンパク質のみをプールして、結晶化に先立って+4 で貯蔵した。HopQ<sup>AD</sup>の多量体化状態を分析するために、Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare社) で、総容量24 mlを用いて、SECを実施した。カラムは、緩衝液Cで予め平衡化され、続いて、タンパク質25 µgを注入して、流速0.5 ml/分で分離した。

【0274】

HopQ挿入ドメイン (HopQ-ID) を表すペプチドをHAでタグ付けして、合成して (EKL EAHVTTSKYQQDNQTKTTTVIDTTNYPYDVPDYA (配列番号14、HA-タグに下線を付した))、HPLC精製した (Peptide Specialty Laboratories社、ドイツ、ハイデルベルク)。細胞アッセイに関して、凍結乾燥させたペプチドを、滅菌PBS中に1 mMの濃度になるように溶解させて、0.1 kDa ~ 0.5 kDaの分子量カットオフ膜を用いてPBSに対し

10

【0275】

【表3】

Protein タンパク質	H. pylori Strain H.ピロリ株	UniProt ID	UniProt Reference Cluster 90 % sequence identity UniProt参照クラス ター90%配列同一性 (07/2016)	SEQ ID NO (Protein/DNA) 配列番号 (タンパク質/DNA)	Comment(s)
HopQ Type I	G27	-	-	1 / 2	Accession No. CP001173, Region: 1228696..1230621
HopQ Type I	26695	O25791	173	3 / 4	Also referred to as Omp27 and HP1177
HopQ Type I	P12	H6A3H4	173	15/16	-
HopQ Type II	Tx30a	Q8GDI6	77	5 / 6	-
trxA (reference)	J99	P66929	231	-	-

20

注釈 (複数の場合もある)

アクセッション番号CP001173、領域: 1228696..1230621

Omp27及びHP1177とも称される

表3. HopQ配列。

【0276】

30

ELISAによるHopQ-CEACAM相互作用の検出

CEACAMとHopQ<sup>AD</sup>との間の相互作用の検出のために、PBS中の組換えC1ND (1 µg/ml) を、96ウェルイムノプレート (Nunc MaxiSorb社) 上へ4 で一晩コーティングした。ウェルを、SmartBlock (Candor社) を用いて、RTで2時間ブロックした。続いて、HopQ断片を、10 µg/ml ~ 0.05 ng/mlの範囲の5倍系列希釈で、室温にて2時間添加した。次に、-6 × His-HRPコンジュゲート (クローン3D5、LifeTechnologies社) を1:5000で希釈して、室温で1時間インキュベートした。検出に関しては、1-Step (商標) Ultra TMB-ELISA Substrate溶液 (LifeTechnologies社) を使用して、酵素反応は、2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>で停止させた。インキュベーション工程間の洗浄 (3回 ~ 5回) は、PBS/0.05% Tween20を用いて実施した。

40

【0277】

等温滴定熱量測定

ITC測定は、MicroCal iTC200熱量計 (Malvern社) で実施した。HopQ<sup>AD</sup> I型 (50 µM) 又はC1ND (25 µM) のいずれかを、熱量計のセルへロードして、それぞれ、CEACAM (50 µM又は500 µM) 又はHopQ<sup>AD</sup> I型 (250 µM) をシリンジ中にロードした。測定は全て、攪拌速度600 rpmで25 に行われ、20 mM HEPES緩衝液 (pH 7.4)、150 mM NaCl、5% (v/v) グリセロール及び0.05% (v/v) Tween-20中で実施した。結合データは、MicroCal ITC200ソフトウェアを使用して分析した。

【0278】

ウェスタンブロットのためのSDS-PAGE及びネイティブPAGE

50

CEACAMを、氷冷25 mM Tris、250 mMグリシン緩衝液中で、SDS-PAGE及びネイティブPAGE（それぞれ、15%及び7.5%のポリアクリルアミドゲル上で）の両方を用いて分離した。次に、試料を氷冷転写緩衝液（25 mM Tris、250 mMグリシン及び20%メタノール）中で、25Vで60分間のウェット式ブロッティングによって、PVDF膜に転写した。膜を、10%粉乳（MP）、1×PBS及び0.005% Tween-20中で1時間ブロックした。両方の膜を洗浄して、2 μM HopQ<sup>AD</sup> I型の存在下で1時間、5% MP、1×PBS、0.005% Tween-20中で一緒にインキュベートして、HopQ<sup>AD</sup> I型とCEACAMとの間の複合体形成を可能にした。洗浄工程後、5% MP、1×PBS、0.005% Tween-20中で、マウス -His（AbD Serotec社）及びヤギ -マウス抗体（Sigma-Aldrich社）を、それぞれ1時間及び30分間、連続して添加することによって、HopQのC-末端His-タグ（CEACAMは、strepでタグ付けした）を検出した。洗浄工程後、展開緩衝液（10 mM Tris-HCl pH 9.5、100 mM NaCl、50 mM MgCl<sub>2</sub>）中にBCIP/NBT基質（5-ブromo-4-クロロ-3-インドリル-リン酸塩/ニトロブルーテトラゾリウム）（Roche社）を添加することによってプロットを展開した。

【0279】

#### 細菌ブルダウン

細菌を、WCdent寒天プレート上で一晩成長させた。細菌をプレートから掻取って、PBS中に懸濁して、コロニー形成単位（cfu）を、標準曲線に従って、光学密度600の読み取りによって推定した。細菌をPBSで2回洗浄して、2×10<sup>8</sup>個の細胞/mlを、可溶性CEACAM-Fc又はCEACAM-GFPタンパク質又はCHO細胞溶解産物とともに、37 °Cで1時間、ヘッドオーバーヘッド回転でインキュベートした。インキュベーション後、細菌をPBSで5回洗浄して、SDS-PAGE及びウェスタンブロッティングに先立って、SDS試料緩衝液（62.5 mM Tris-HCl [pH 6.8]、2% w/v SDS、10%グリセロール、50 mM DTT、及び0.01% w/v ブロモフェノールブルー）中で沸騰させたか、又はフローサイトメトリー分析用にFACS緩衝液（PBS/0.5% BSA）中に採取した。

【0280】

#### 免疫沈降及び質量分析

プロテアーゼ及びホスファターゼ阻害剤（Roche社）を含有する冷PBS中の細菌（2×10<sup>8</sup>個）を、氷上で超音波によって溶解した（10回、20秒）。4 °Cで30分間の15000 rpmの遠心分離によって、細胞組織片を溶解産物から除去した後、予め洗浄したプロテインG-アガロース（Roche Diagnostics社）で予め浄化した。CEACAM1-Fcを溶解産物（10 μg）に添加して、4 °Cで1時間インキュベートした。予め洗浄したプロテインG-アガロース（60 μL）を抗体及び溶解産物混合物に添加して、4 °Cで2時間インキュベートした。ビーズをPBSで5回洗浄して、非特異的に結合されたタンパク質を除去した。ビーズの3分の2を分離して、質量分析試料作製に使用した。タンパク質の変性用に、上清を除去して、ビーズを20 mM Hepes（pH 7.5）中に溶解させた7M 尿素/2M チオ尿素50 μl中に2回再懸濁させた。遠心分離によって、ビーズをペレット化して、上清をプールして、新たなEppendorfチューブに移した。続いて、タンパク質を1 mM DTT中で45分間還元して、暗所で最終濃度5.5 mMのヨードアセトアミド（iodoacetamide）で30分間アルキル化した。アルキル化工程は、DTT濃度を5 mMまで、30分間上昇させることによってクエンチした。インキュベーション工程は全て、強振盪（Eppendorf振盪機、450 rpm）下で、RTにて実施した。タンパク質の消化に関して、LysC（0.5 μg/μl）1 μlを添加して、試料をRTで4時間インキュベートした。尿素濃度を低減するために、試料を50 mM 炭酸水素トリエチルアンモニウムを用いて1:4で希釈して、続いてトリプシン（0.5 μg/μl）1.5 μlとともに、37 °Cで一晩インキュベートした。最終的に、トリプシンは、ギ酸による酸性化によって不活性化された。上清を新たなEppendorfチューブに移して、0.1%ギ酸によるビーズの下記洗浄分画とともにプールした。ギ酸（100% v/v）を用いて、試料をpH3に調節して、SepPak C18カラム（50 mg、Waters社）によるペプチド脱塩に付した。簡潔に述べると、続いて、カラムを100%アセトニトリル1 ml及び80%アセトニトリル500 μl、0.5%ギ酸で洗浄した。カラムを0.1% TFA 1 mlで平衡化して、試料を

10

20

30

40

50

ロードして、カラムを再び0.1% TFA 1mlで洗浄した。0.5%ギ酸500  $\mu$ lによる更なる洗浄工程後、ペプチドを80%アセトニトリル、0.5%ギ酸250  $\mu$ lで2回溶出させた。次に、有機層を真空遠心分離によって除去し、ペプチドを-80 で貯蔵した。測定の直前に、ペプチドを0.1%ギ酸20  $\mu$ l中に分解させて (resolved)、5分間超音波処理して (水浴)、その後、試料を、予め洗浄及び平衡化したフィルター (0.45  $\mu$ mの低タンパク質結合フィルター、VWR International, LLC社) で濾過した。Orbitrap XL機器 (Thermo Scientific社) に直接連結されたUltimate 3000 nano HPLCからなるLC-MSシステムで、測定を実施した。試料を捕捉カラム (2  $\mu$ m、100 Å、2 cm長) 上にロードして、5%から30%アセトニトリル、0.1%ギ酸の範囲の150分の勾配中に、15 cmのC18カラム (2  $\mu$ m、100 Å、Thermo Scientific社) 上で分離した。サーベイスpekトルをm/z 400で60000の分解能で、オービトラップにおいて獲得した。タンパク質同定用に、完全スキャンの最も強いイオンのうちの最大5個を、順次単離して、衝突誘起解離によって断片化した。受信したデータを、Proteome Discoverer Softwareバージョン1.4 (Thermo Scientific社) で分析して、SEQUESTアルゴリズムでH.ピロリ (株G27) データベース (タンパク質1501個) に対して検索した。タンパク質N-末端アセチル化及びメチオニンの酸化は、可変修飾として加えられ、システイン上でのカルバミドメチル化は、静的修飾として加えられた。酵素特異性は、トリプシンに設定され、前駆物質及び断片イオンの質量許容差は、それぞれ、10 ppm及び0.8 Daに設定された。それぞれ、電荷状態+1、+2、+3及び+4に関して、 $X_{corr}$ 値1.5、2.0、2.25及び2.5を満たすペプチドのみを、データ分析の対象とした。

#### 【0281】

細胞、細胞 - 細菌共培養及び伸長表現型定量化アッセイ

胃癌細胞系統MKN45、KatoIII (ATCC、HTB-103)、MKN28及びAGS (ATCC、CRL-1739) をATCC及びDSMZから入手し、ショートタンデムリピート (STR) プロファイリングを利用することによって確認して、10% FBS (GIBCO、Invitrogen社、米国カリフォルニア州) 及び1%ペニシリン/ストレプトマイシン (GIBCO、Invitrogen社、米国カリフォルニア州) を補充した2mM L-グルタミン (GIBCO、Invitrogen社、米国カリフォルニア州) を含有するDMEM (GIBCO、Invitrogen社、米国カリフォルニア州カルスバッド) 中で低密度又は高密度コンフルエンスのいずれかになるように培養した。細胞系統は全て、CO<sub>2</sub> 5%及び湿度100%で、37 にてインキュベーター中で維持し、DAPI株及びPCRによって1年に2回、日常的にマイコプラズマ (mycoplasma) に関して検査した。プレートで成長した細菌を、DMEM中に懸濁して、微量遠心分離機において150 gで5分間の遠心分離によって洗浄した。DMEM中での再懸濁後、600 nmでの光学密度を決定して、種々の比の細菌/細胞 (MOI) で、細菌を、一晚血清欠乏させた細胞に37 で添加して、感染を開始した。規定の時間後、細胞をPBSで2回洗浄した後、プロテアーゼ&ホスファターゼ阻害剤PBS中の1% NP-40で溶解させた。HEK293細胞をCEACAMトランスフェクション研究用に選択した。というのは、HEK293細胞が、huCEACAM発現に関して陰性であることがわかっており、また容易にトランスフェクト可能であるためである。HEK細胞を、25 mM HEPES緩衝液及び10%熱失活FBS (Biochrom社、ドイツ、ベルリン) を補充したRPMI 1640培地 (Invitrogen社) を含有する6-ウェルプレートにおいて、およそ70%コンフルエンスになるように2日間増殖させた。細胞を一晚、血清欠乏させて、各図に表示した時点に関して、MOI 50でH.ピロリに感染させた。感染後、細胞を、1 mmol/LのNa<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> (Sigma-Aldrich社) を含有する氷冷PBS中に収集した。各実験における伸長AGS細胞を、Olympus IX50位相差顕微鏡を使用して、5つの異なる0.25 mm<sup>2</sup>視野で定量化した。

#### 【0282】

トランスフェクション

製造業者のプロトコル (Invitrogen社) に従って、リポフェクトアミン2000手順を利用して、細胞をそれぞれ、pcDNA3.1-huCEACAM1-4L、pcDNA3.1-huCEACAM1-4S、pcDNA3.1-msCEACAM1-L、pcDNA3.1-ratCEACAM1-Lプラスミド (Singer社) 4



μgで安定にトランスフェクトすることによって、hu-CEACAM1-4L、マウス-CEACAM1-L及びラット-CEACAM1-Lを永続的に発現するCHO細胞系統(ATCC)を生成した。安定にトランスフェクトした細胞を、1 mg/mlのGeneticin sulfat (G418、Biochrom社、ドイツ、ベルリン)を含有する培養培地中で選択した。対数期で増殖中の個々のクローンにおけるCEACAM1の表面発現をフローサイトメトリー(FACScalibur、BD社)によって決定した。HEK293細胞を、製造業者の指示書に従って、TurboFect試薬(Fermentas社、ドイツ)を用いて、HAでタグ付けしたCEACAM構築物又はルシフェラーゼレポーター構築物(Clontech社、ドイツ)4 μgで48時間トランスフェクトした。

#### 【0283】

##### ウェスタンブロット

等量の細胞溶解産物を、8% SDS-PAGEゲル上にロードして、電気泳動後、分離したタンパク質を、ニトロセルロース膜(Whatman/GE Healthcare社、ドイツ、フライブルグ)に転写した。膜を5%脱脂乳中で、室温にて1時間ブロックして、CEACAM1、CEACAM3、CEACAM5、CEACAMB3-17及びCEACAMC5-1Xに結合する一次抗体mAb 18/20(hu-CEACAM1に単一特異性、Singer社)、4/3/17(CEACAM1、CEACAM5に結合、Genovac社)、及び5C8C4(hu-CEACAM5に単一特異性、Singer社)、1H7-4B(hu-CEACAM6に単一特異性、Singer社)、6/40c(hu-CEACAM8に単一特異性、Singer社)、Be9.2(-ラット-CEACAM1)、mAb 11-1H(-ラット-CEACAM1 N、Singer社)、ホスホチロシン抗体PY-99(Santa Cruz社、米国カリフォルニア州ラホヤ)、-CagAホスホチロシン抗体PY-972、マウスモノクローナル -CagA抗体(Austral Biologicals社、米国カリフォルニア州サンラモン)、マウスモノクローナル -CEACAM1(クローンD14HD11、Genovac/Aldevron社、ドイツ、フライブルグ)又はヤギ -GAPDH(Santa Cruz社)で一晩インキュベートした。洗浄後、膜を二次抗体[HRP-コンジュゲート -マウスIgG(Promega社)]とともにインキュベートして、タンパク質をECLウェスタンブロットティング検出試薬によって検出した。定量化は、LabImage 1Dソフトウェア(INTAS社)によって行われた。

#### 【0284】

##### フローサイトメトリー

Fcでタグ付けしたCEACAM(2.5 μg/ml)をH.ピロリとともに(OD:1)、続いて、FITC-コンジュゲートヤギ -ヒトIgG(Sigma社)とともにインキュベートした。FACS緩衝液で洗浄した後、細菌に対してゲーティングすること(前方散乱光及び側方散乱光に基づいて)、及び細菌関連蛍光を測定することによって、試料を分析した。各々の場合、試料1つ当たり10000個の事象が得られた。FACS CyAn(Beckman Coulter社)を用いて、分析を実施して、FlowJoソフトウェア(Treestar社)でデータを評価した。CEACAM媒介性HopQ結合の分析に関して、指定の細胞型(50 μl中に $5 \times 10^5$ 個)を、20 μg/mlのH.ピロリ株P12由来の、3%FCS/PBS中に希釈したmyc及び6×Hisでタグ付けした組換えHopQとともに、氷上で1時間インキュベートした。3%FCS/PBSによる3回の洗浄後、試料を20 μg/mlのマウス -c-myc mAb(クローン9E10、AbD Serotec社)で、続いて、FITCコンジュゲートヤギ -マウスF(ab')<sub>2</sub>(Dianova社、ドイツ)で標識した。並行して、ウサギ抗CEA pAb(A0115、Dianova社)、続いてFITCコンジュゲートヤギ -ウサギF(ab')<sub>2</sub>(Dianova社、ドイツ)を利用して細胞を染色することによって、CEACAMの存在を制御した。アイソタイプ適合Ig mAbを使用して、バックグラウンド蛍光を決定した。染色された細胞試料を、FACScaliburフローサイトメーター(BD Biosciences社、カリフォルニア州サンディエゴ)において検査して、CellQuestソフトウェアを利用して、データを分析した。PI染色によって同定される死滅細胞を、測定から排除した。

#### 【0285】

##### 免疫組織化学検査

地方倫理委員会の承認を受けて、パラフィンに包埋したヒトの正常な胃、胃炎及び癌試料を、ドイツのInstitut fuer Pathologie, Klinikum Bayreuthの組織バンクからランダムに選択した。組織学的試料は、組織品質が乏しい場合には排除した。圧力窯における10

10

20

30

40

50

mmol/Lのクエン酸ナトリウム緩衝液pH 6を用いた抗原賦活化 (retrieval) 後、切片を、 $\alpha$ -hu-CEACAM1、 $\alpha$ -hu-CEACAM5、 $\alpha$ -hu-CEACAM6及び $\alpha$ -ラット-CEACAM1抗体 (それぞれ、クローンB3-17、5C8C4、1H7-4B及びBe9.2) とともにインキュベートした。切片を、製造業者の指示書に倣って、SignalStain DAB (Cell Signaling社) で展開した。切片をヘマトキシリン (Morphisto社) で対比染色した。Olympus Virtual Slide System VS120 (Olympus社、ドイツ、ハンブルグ) を用いて、自動画像収集を実施した。

#### 【0286】

##### 付着アッセイ

付着アッセイは、Hytonen et al., 2006に従って実施した。簡潔に述べると、ヒトの胃の上皮細胞 (MKN45及びAGS) 及びCEACAM1でトランスフェクトしたCHO細胞を、組織培養96ウェルプレート (Bioscience社) 上で、5% FCS及びL-グルタミン (2 mmol、Sigma社、米国セントルイス) を補充した抗生物質を含まないDMEM (Gibco社、メリーランド州ゲイザースパーク) 中で、5% CO<sub>2</sub>雰囲気下で2日間増殖させた。接着アッセイにおいてH.ピロリ細胞を可視化するために、OD:1の細菌を、CFDA-SE (Molecular Probes社) で蛍光標識して、PBSで洗浄した。CFDA-SEを10  $\mu$ mol/Lの濃度で、37 °Cで30分間、暗所にて一定回転下で添加した。過剰な色素を、3回のPBS洗浄によって除去した。更なる使用まで、細菌をPBS中に再懸濁させた。標識した細菌を、37 °Cで穏やかに攪拌しながら1時間、細胞とともに共インキュベートした (MOI 10)。PBSで洗浄して (1 ml、3回)、非接着細菌を除去した後、細胞をパラホルムアルデヒド中に固定した (2%、10分)。フローサイトメトリー分析を使用して、蛍光標識した細菌を結合する細胞のパーセントを測定することによって、細菌結合を決定した。

#### 【0287】

##### IL-8サイトカインELISA

AGS細胞系統に、上述するようにH.ピロリを感染させて、PBSとともにインキュベートした対照細胞は、陰性対照としての機能を果たした。培養上清を収集して、アッセイするまで、-20 °Cで貯蔵した。上清中のIL-8濃度は、記載される手順に従って市販のアッセイキット (Becton Dickinson社、ドイツ) を用いて、標準的なELISAによって決定した。

#### 【0288】

##### CagA病原性経路のHopQ依存性

別記しない場合、AGS細胞系統 (ATCC CRL-1730) に各種H.ピロリ株を、感染多重度 (MOI) 50で6時間感染させた。次に、細胞を、1 mmol/LのNa<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> (Sigma-Aldrich社) の存在下で、氷冷PBS中に収集した。各実験において、伸長AGS細胞の数を、位相差顕微鏡 (Olympus IX50) を使用して、10個の異なる0.25 mm<sup>2</sup>視野で定量化した。CagA移行は、Tyrリン酸化CagAを検出する指定の抗体を使用して決定した。実験は全て、三重反復で実施した。阻害実験に関して、細胞を、感染前に指定の抗体又はペプチドとともにインキュベートした。

#### 【0289】

##### 共焦点顕微鏡法

CHO細胞を、チャンバースライド (Thermo Scientific社) 上で増殖させて、パラホルムアルデヒド中に固定して (4%、10分)、PBS/5%ウシ血清アルブミンでブロックした。MOI 5でCFDA-SEで標識した細菌 (10  $\mu$ mol/L、37 °Cで30分間、暗所にて一定回転下で) を、37 °Cにて一定回転下で1時間、細胞とともにインキュベートした。5×PBS洗浄後、細胞膜を、Deep Red (Life Technology社) で染色して、細胞核を、DAPI (Life Technology社) で染色した。細胞の共焦点画像は、Leica SP5共焦点顕微鏡を使用して撮影した。

#### 【0290】

##### HopQ<sup>AD</sup>、並びにHopQ<sup>AD</sup>及びC1NDの複合体の結晶化及び構造決定

HopQ<sup>AD</sup>を40 mg/mLまで濃縮して、結晶化緩衝液として0.12 Mアルコール (0.02 M 1,6-ヘキサンジオール、0.02 M 1-ブタノール、0.02 M 1,2-プロパンジオール、0.02

10

20

30

40

50

M 2-Pプロパノール、0.02 M 1,4-ブタンジオール、0.02 M 1,3-プロパンジオール)、0.1 M Tris (塩基) / BICINE pH 8.5、20% v/v PEG 500\*MME、10% w/v PEG 20000を使用して、20 でシッティングドロップ蒸気拡散によって結晶化した。結晶をループに載せて (loop-mounted)、液体窒素で急冷した (flash-cooled)。データは、ビームラインProxima1 (SOLEIL、ジフ = シュル = イヴェット、フランス) で100 Kにて収集して、XDSパッケージを使用して、インデックスを作成して、加工して、縮尺した。結晶は全て、 $a = 57.7$ 、 $b = 57.7$ 、 $c = 285.7$  及びベータ = 90.1度のおおよその単位格子寸法並びに非対称単位 (asymmetric unit) 1つにつきHopQ<sup>AD</sup>の4つのコピーを有するP<sub>2</sub><sub>1</sub>空間群で存在した。相は、BabA構造を使用した分子置換によって得られ、モデルは、手動による再構築の反復サイクル及びRefmac5を使用した最尤精密化によって精密化した。表1に、結晶パラメーター、データ処理及び構造精密化統計をまとめる。

10

#### 【0291】

HopQ<sup>AD</sup>と、ヒトCEACAM1のN-ドメイン (C1ND) との間で複合体を形成するために、精製した組換えC1NDを、精製したHopQ<sup>AD</sup>に対して、1.2倍のモル過剰で添加して、混合物を、20 mM Tris-HCl pH 8.0、500 mM NaCl緩衝液中で予め平衡化したHi-Prep (商標) 26/60 Sephacryl S-100 HRカラム (GE Healthcare社) 上へ注入した。HopQ<sup>AD</sup>-C1ND複合体を含有する分画と一緒にプールして、30 kDa MWカットオフスピンコンセンレーターを使用して、最終濃度30 mg/mLにまで濃縮した。結晶は、0.03 M フッ化ナトリウム、0.03 M 臭化ナトリウム、0.03 M ヨウ化ナトリウム、0.1 M MES pH 6.5、20% v/v エチレングリコール及び10% w/v PEG 8000中に得られた。結晶をループに載せて、液体窒素で急冷して、データは、ビームラインProxima1 (Soleil、ジフ = シュル = イヴェット、フランス) で100 Kにて収集した。結晶は、 $a = 118.0$ 、 $b = 174.0$ 、 $c = 118.1$ 、ベータ = 118.4のおおよその単位格子寸法並びに非対称単位1つにつきHopQ<sup>AD</sup>-C1NDの3つのコピーを有するC2空間群で存在した。相は、HopQ<sup>AD</sup>及びC1ND (PDBコード4WHD) 構造を使用した分子置換によって得られ、モデルは、手動による再構築の反復サイクル及びRefmac5を使用した最尤精密化によって精密化した。表2に、結晶パラメーター、データ処理及び構造精密化統計をまとめる。

20

#### 【0292】

##### アミノ酸配列アラインメント

ヒト、マウス及びラット-CEACAM1のN-末端ドメイン並びにヒトCEACAM (1、5、6及び8) のアミノ酸配列アラインメントは、CLC main Workbench (CLC bio社) を使用して実施した。

30

#### 【0293】

##### ルシフェラーゼレポーターアッセイ

各種ルシフェラーゼレポーター及び対照構築物 (Clontech社) でトランスフェクトしたCHO-CEACAM1-L細胞にH.ピロリを5時間感染させ、製造業者の指示書 (Promega社、米国) に従って、Dual-Luciferase Reporter Assay Systemを使用して、ルシフェラーゼアッセイによって分析した。簡潔に述べると、細胞をパッシブ溶解によって収集して、タンパク質濃度を、Precision Red (Cytoskeleton社、米国) を用いて測定し、溶解産物を、パッシブ溶解緩衝液を添加することによって均質にした。ルシフェラーゼ活性は、Plate Luminometer (ドイツのBerthold社からのMITHRAS LB940) を使用することによって測定した。

40

#### 【0294】

##### 動物実験

4週齢の特定病原体を含まない120 gr ~ 150 grの雄スプライングドローリーラットを、Charles River Laboratories、ドイツ、ズルツフェルトから入手した。実験に関与しない動物世話人によって、動物を無作為に種々の実験群に分配した。また動物の排除に関する基準を予め確立した。研究者盲検 (Investigator blinding) は、結果及びデータの全ての評価に関して実施され、組織学的検査は、盲検様式で独立した治験研究者によって実施された。動物に、2日おきに、およそ $1 \times 10^9$ 個の生H.ピロリを8個の群において胃内に2回

50

負荷した (challenged)。実験は、Zentrum fuer Praeklinische Forschung Klinikum r. d. Isar der TU Muenchenの特異的な病原体を含まない部署において、倫理委員会及び州獣医当局の許容及びガイダンス (Regierung von Oberbayern, 55.2-1.54-253 2-160-12) に従って実施された。

【0295】

統計分析

in vitroでの実験に関して、正規分布は、Shapiro-Wilk検定によって決定された。データは全て、Graph Pad Prismソフトウェアを使用して、事後Bonferroni検定 (2つよりも多い群を比較) を伴う両側スチューデントt検定及び一元配置分散分析で分析した。データは、少なくとも3回の独立した実験に関して、平均値  $\pm$  s.e.m又はs.d.として示される。0.05未満のP値を有意であるとみなした。動物研究に関して、出力計算は、実験動物に関する倫理ガイドラインに適合するのに最も小さな考え得る数を使用しながら、0.05の両側有意性を達成するように、これまでの動物実験に基づいて実施された。

10

【符号の説明】

【0296】

図面記

図1

Cells 細胞

Log fluorescence intensity 蛍光強度の対数

図1 (続き)

20

Normal stomach 正常な胃

Gastritis 胃炎

Gastric cancer 胃癌

Cells 細胞

Log fluorescence intensity 蛍光強度の対数

図1 (続き)

Log fluorescence intensity 蛍光強度の対数

MFI ratio of CEACAM1 isoforms binding to G27 G27へ結合するCEACAM1アイソフォームのMFI比

deglycosylated-CEACAM1-Fc 脱グリコシル化したCEACAM1-Fc

30

図2

H. pylori H.ピロリ

Moraxella catarrhalis (Moraxella catarrhalis) モラクセラ・カタラーリス

Moraxella lacunata モラクセラ・ラクナータ

Campylobacter jejuni カンピロバクター・ジェジュニ

Cells 細胞

Log fluorescence intensity 蛍光強度の対数

Stomach biopsies 胃生検材料

Normal 正常

Gastritis 胃炎

40

No. of samples 試料数

No. Of CEACAM1 positive samples with staining score 染色スコアを有するCEACAM1陽性試料数

図2 (続き)

MFI ratio of H. pylori strains binding to CEACAM1 CEACAM1へ結合するH.ピロリ株のMFI比

MFI ratio of H. pylori strains binding to CEACAM5 CEACAM5へ結合するH.ピロリ株のMFI比

MFI ratio of H. pylori strains binding to CEACAM6 CEACAM6へ結合するH.ピロリ株のMFI比

50

MFI ratio of *H. pylori* strains binding to CEACAM8 CEACAM8へ結合するH.ピロリ株のMFI比

図2 ( 続き )

HUMAN N-Domain ヒトN-ドメイン

図3

Human ヒト

Mouse マウス

Bovine ウシ

Canine イヌ

Rat ラット

Cells 細胞

Log fluorescence intensity 蛍光強度の対数

図3 ( 続き )

untransfected トランスフェクトしていないもの

Human ヒト

Mouse マウス

Rat ラット

CHO cells CHO細胞

lysate 溶解産物

図4

HUMAN ヒト

Domain ドメイン

RAT ラット

MOUSE マウス

*H. pylori* H.ピロリ

*H. bilis* H.ピリス

*H. felis* H.フェリス

*H. suis* H.スイス

*H. heilmannii* H.ヘリルマンニイ

*H. bizzozeronii* H.ビゾゼロニイ

図4 ( 続き )

MFI ratio of non-*pylori* strains binding to CEACAM1 CEACAM1へ結合する非ピロリ株のMFI比

*H. pylori* H.ピロリ

*H. bilis* H.ピリス

*H. felis* H.フェリス

*H. suis* H.スイス

*H. heilmannii* H.ヘリルマンニイ

*H. bizzozeronii* H.ビゾゼロニイ

MFI ratio of non-*pylori* strains binding to CEACAM5 CEACAM5へ結合する非ピロリ株のMFI比

MFI ratio of non-*pylori* strains binding to CEACAM6 CEACAM6へ結合する非ピロリ株のMFI比

MFI ratio of non-*pylori* strains binding to CEACAM8 CEACAM8へ結合する非ピロリ株のMFI比

MFI ratio of non-*pylori* strains binding to CEACAM1 N CEACAM1 Nへ結合する非ピロリ株のMFI比

1h 1時間

lysates 溶解産物

wash 洗浄

10

20

30

40

50

SDS lysis & Western blot SDS溶解&ウェスタンブロット

Detection with: -CEACAM antibodies -CEACAM抗体による検出

図5

Mass spectrometry analysis 質量分析

Accession アクセッション

Description 説明

Score スコア

Unique Peptides ユニークペプチド

Area 領域

Outer membrane protein 外膜タンパク質

10

図6

Immunoprecipitation 免疫沈降

Cell lysate 細胞溶解産物

Coupled Ab カップリングされたAb

Antigen 抗原

Incubation with Ab coupled Resin Abがカップリングされた樹脂とともにインキュベーション

Spin & Wash 回転させて、洗浄する

Elute 溶出させる

Analysis 分析

20

Mass spectrometry 質量スペクトル分析

Sample 試料

MS1 Spectra MS1スペクトル

MS2 Spectra MS2スペクトル

Counts 計数

Relative Fluorescence 相対蛍光

median=number 中央値 = 数

図6 ( 続き )

cell number 細胞数

Counts 計数

30

Relative Fluorescence 相対蛍光

median=number 中央値 = 数

図6 ( 続き )

Type II II型

Type Ia Ia型

Type Ib Ib型

Asia アジア

North America 北アメリカ

Australia オーストラリア

South America 南アメリカ

40

Europe ヨーロッパ

Africa アフリカ

図7

Protein タンパク質

well ウェル

Native-PAGE ネイティブPAGE

図8

Time 時間

min 分

sec 秒

50

sites 部位

kcal mol<sup>-1</sup> of injectant 注入物質 1 mol 当たりの kcal

Molar Ratio モル比

図8 ( 続き )

Protein タンパク質

well ウェル

図9

MFI ratio of *H. pylori* adhering to CHO-CEACAM1 CHO-CEACAM1 へ接着する *H. pylori* の MFI 比

MFI ratio of *H. pylori* adhering to MKN45 MKN45 へ接着する *H. pylori* の MFI 比

10

MFI ratio of *H. pylori* adhering to AGS AGS へ接着する *H. pylori* の MFI 比

Pervanadate 過バナジン酸塩

min 分

*H. pylori* *H. pylori*

Cytokine release サイトカイン放出

図9 ( 続き )

Elongation phenotype 伸長表現型

Blocking ブロッキング

*H. pylori* *H. pylori*

PBS control PBS 対照

20

図10

Relative fluorescence 相対蛍光

Log phase 対数期

Confluent コンフルエント

Confluent phase コンフルエント期

Vector control ベクター対照

Negative control 陰性対照

Mouse マウス

図10 ( 続き )

PBS control PBS 対照

30

*H. pylori* *H. pylori*

Relative CagA phosphorylation 相対 CagA リン酸化  
in % % で

Elongation phenotype 伸長表現型

図11

Rat ラット

CFU/mg Stomach CFU/胃 1mg

図12

% of Maximum 最大値の %

Log fluorescence intensity 蛍光強度の対数

40

Marker マーカー

Pull down プルダウン

図13 ( 続き )

reference 参照

SEQ ID NO: 配列番号

Consensus コンセンサス

bits ビット

図13 ( 続き )

reference 参照

SEQ ID NO: 配列番号

50

## Consensus コンセンサス

bits ビット

【 0 2 9 7 】

## 参照文献

1. Apostolopoulos, V. et al., 2013. Targeting antigens to dendritic cell receptors for vaccine development. *Journal of Drug Delivery*, 2013:869718.
2. Belogolova, E. et al., 2013. *Helicobacter pylori* outer membrane protein HopQ identified as a novel T4SS-associated virulence factor. *Cell Microbiol.* 15, pp.1896-1912.
3. Blaser, M.J. et al., 1995. Infection with *Helicobacter pylori* strains possessing *cagA* is associated with an increased risk of developing adenocarcinoma of the stomach. *Cancer Research*, 55(10), pp.2111-2115. 10
4. Cao, P. & Cover, T.L., 2002. Two different families of hopQ alleles in *Helicobacter pylori*. *Journal of Clinical Microbiology*, 40, pp.4504-4511.
5. Forman, D., 1996. *Helicobacter pylori* and gastric cancer. *Scandinavian Journal of Gastroenterology. Supplement*, 214, pp.31-3- discussion 40-3.
6. Fox, J.G., 2002. The non-*Helicobacter pylori* helicobacters: their expanding role in gastrointestinal and systemic diseases. *Gut*, 50, pp.273-283.
7. Fox, J.G. et al., 1998. Hepatic *Helicobacter* species identified in bile and gallbladder tissue from Chileans with chronic cholecystitis. *Gastroenterology*, 114, pp.755-763. 20
8. Gao, W. et al., 2010. The evolution of *Helicobacter pylori* antibiotics resistance over 10 years in Beijing, China. *Helicobacter*, 15(5), pp.460-466.
9. Gomez-Gascon, L. et al., 2012. Exploring the pan-surform of *Streptococcus suis*: looking for common protein antigens. *Journal of Proteomics*, 75(18), pp.5654-5666.
10. Graham, D.Y. & Shiotani, A., 2005. The time to eradicate gastric cancer is now. *Gut*, 54(6), pp.735-738.
11. Hytonen, J. et al., 2006. Use of flow cytometry for the adhesion analysis of *Streptococcus pyogenes* mutant strains to epithelial cells: investigation of the possible role of surface pullulanase and cysteine protease, and the transcriptional regulator Rgg. *BMC Microbiol.*, 6, 18, doi:10.1186/1471-2180-6-18. 30
12. Jemal, A. et al., 2011. Global cancer statistics. *CA: a cancer journal for clinicians*, 61(2), pp.69-90.
13. Kalali, B. et al., 2014. *H. pylori* virulence factors: influence on immune system and pathology. *Mediators of Inflammation*, 2014:426309.
14. Koebnik, R. et al., 2000. Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell. *Molecular Microbiology*, 37(2), pp.239-253.
15. Matsukura, N. et al., 2002. Association between *Helicobacter bilis* in bile and biliary tract malignancies: *H. bilis* in bile from Japanese and Thai patients with benign and malignant diseases in the biliary tract. *Jpn J Cancer Res.*, 93(7), pp.842-7. 40
16. Mori, J. et al., 2012. Chimeric flagellin as the self-adjucanting antigen for the activation of immune response against *Helicobacter pylori*. *Vaccine*, 30(40), pp.5856-5863.
17. Nomura, A. et al., 1994. *Helicobacter pylori* infection and the risk for duodenal and gastric ulceration. *Annals of Internal Medicine*, 120(12), pp.977-981.
18. Parsonnet, J. et al., 1991. *Helicobacter pylori* infection and the risk of gastric carcinoma. *New England Journal of Medicine*, 325(16), pp.1127-1131.
19. Perez-Perez, G.I. et al., 2004. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infecti 50



on. *Helicobacter*, 9 Suppl 1, pp.1-6.

20. Pisani, P. et al., 2008. Cross-Reactivity between Immune Responses to *Helicobacter bilis* and *Helicobacter pylori* in a Population in Thailand at High Risk of Developing Cholangiocarcinoma. *Clin Vaccine Immunol.*, 15(9), pp.1363-1368.

21. Shiota, S. et al., 2010. Population-based strategies for *Helicobacter pylori*-associated disease management: a Japanese perspective. *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology*, 4(2), pp.149-156.

22. Singer, B.B. et al., 2014. Soluble CEACAM8 interacts with CEACAM1 inhibiting TLR2-triggered immune responses. *PLoS One*, 9, e94106.

23. Sioud, M. et al., 2013. A novel peptide carrier for efficient targeting of antigens and nucleic acids to dendritic cells. *FASEB J.*, 27(8), pp.3272-3283.

24. Song, H. et al., 2015. A novel chimeric flagellum fused with the multi-epitope vaccine CTB-UE prevents *Helicobacter pylori*-induced gastric cancer in a BALB/c mouse model. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 99(22), pp.9495-9502.

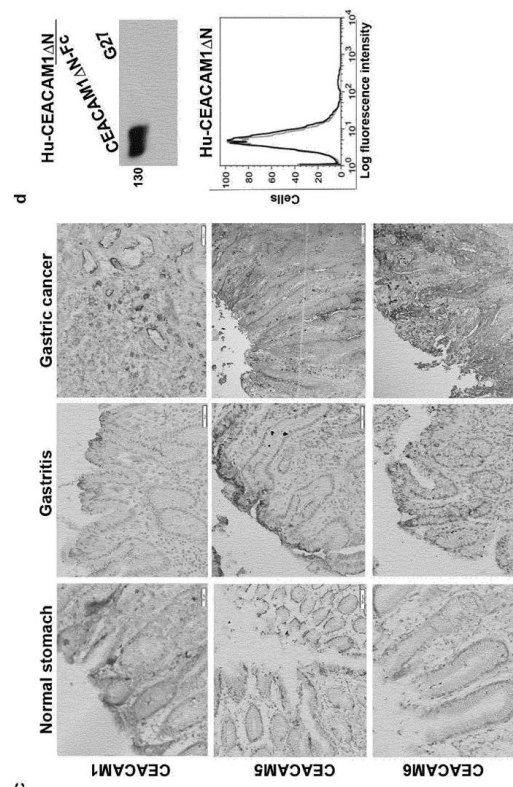
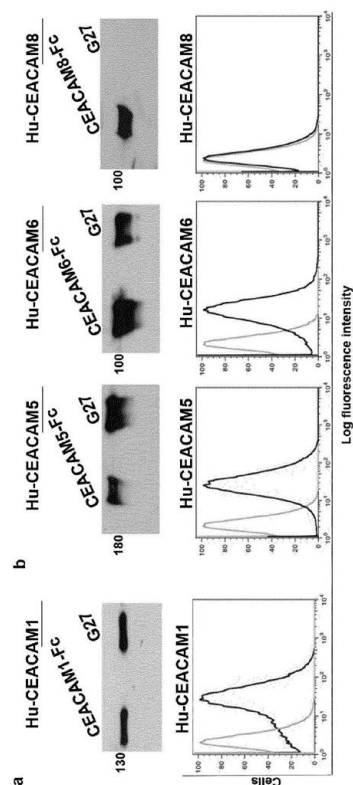
25. Tchoupa, A.K. et al., 2014. Signaling by epithelial members of the CEACAM family-mucosal docking sites for pathogenic bacteria. *Cell Commun Signal*, 12:27.

26. United States Centers for Disease Control and Prevention (2011). "A CDC framework for preventing infectious diseases", accessed 20.12.2012.

【図面】

【図 1 - 1】

【図 1 - 2】



10

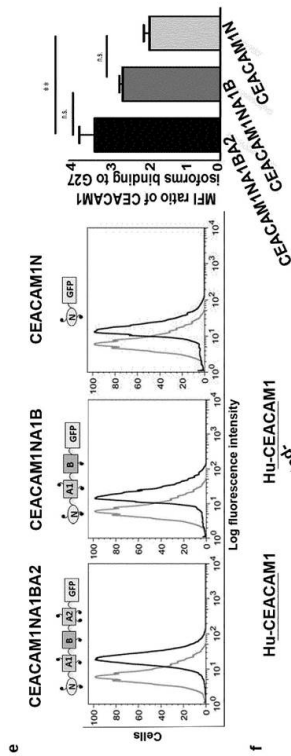
20

30

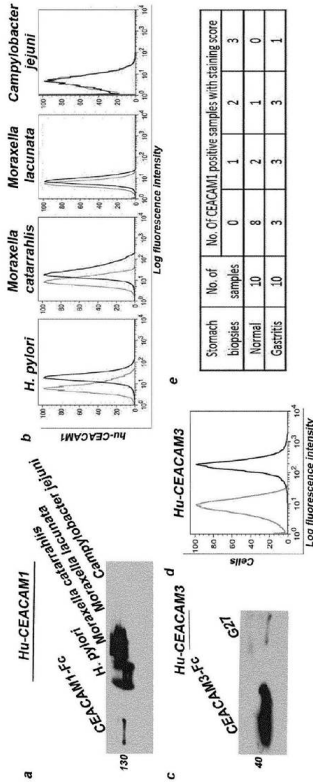
40

50

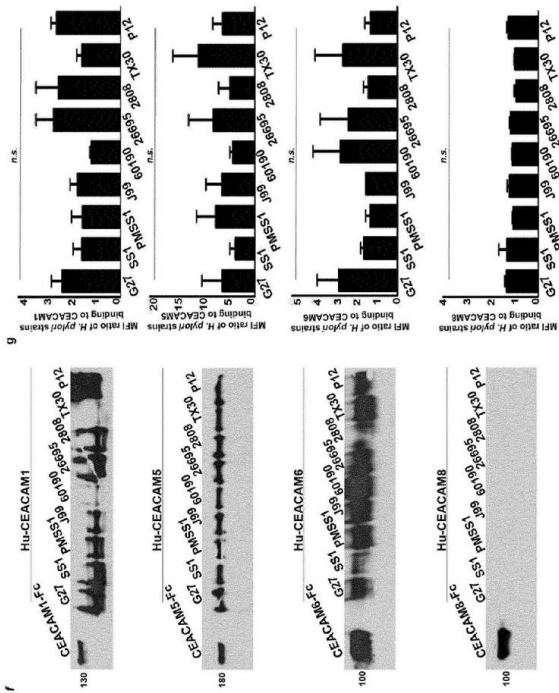
【 1 - 3 】



【 2 - 1 】



【 2 - 2 】

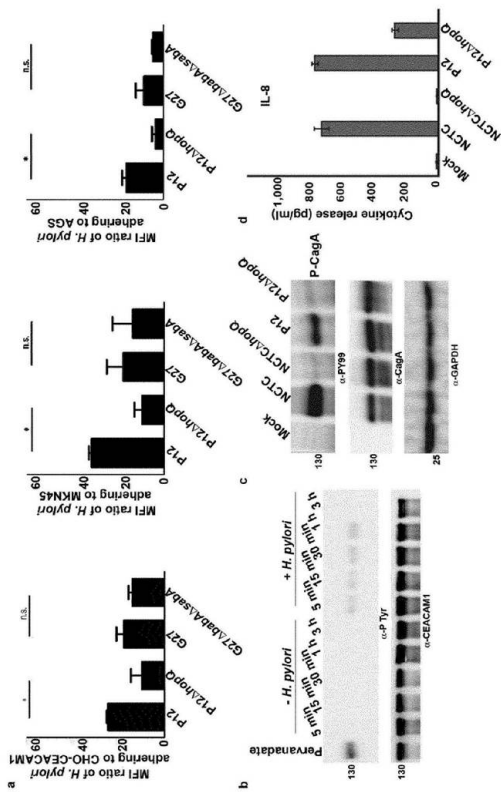




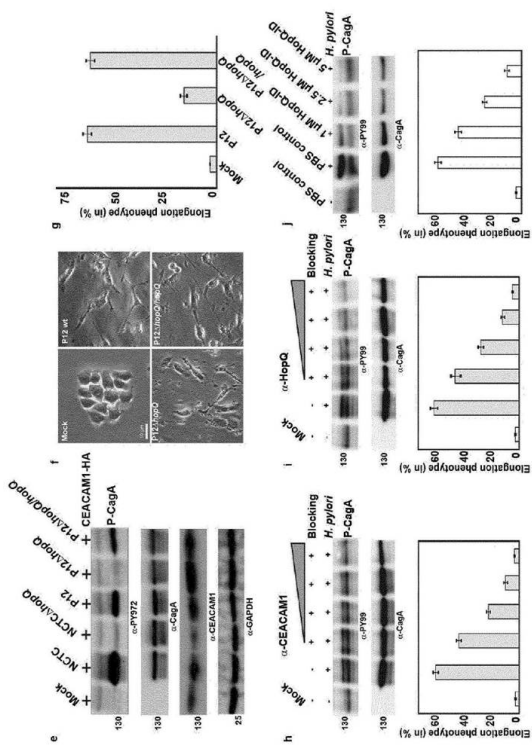




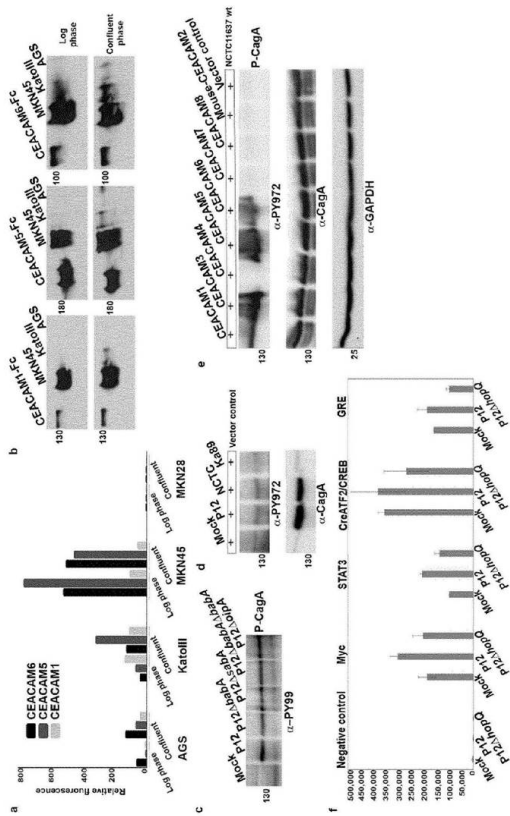
【図 9 - 1】



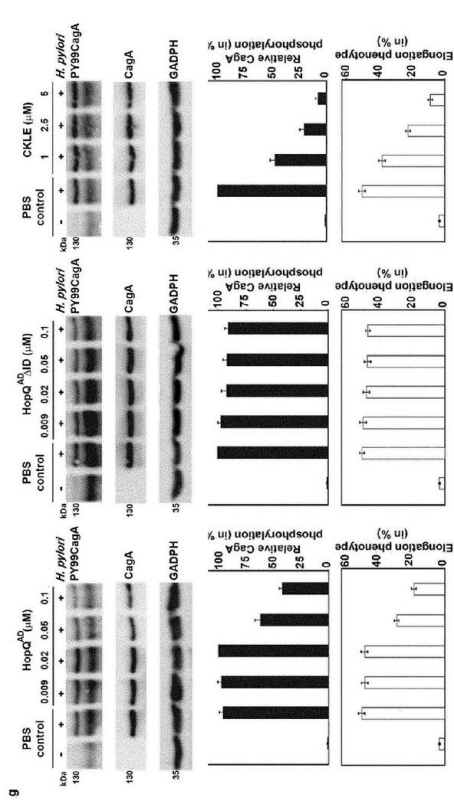
【図 9 - 2】



【図 10 - 1】



【図 10 - 2】



10

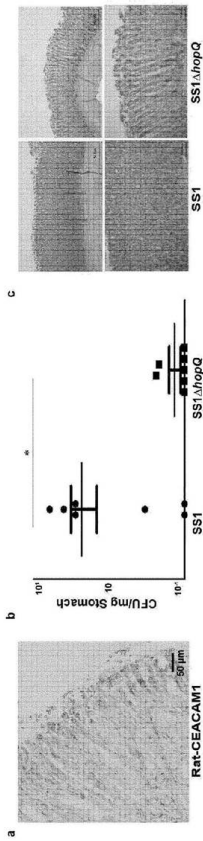
20

30

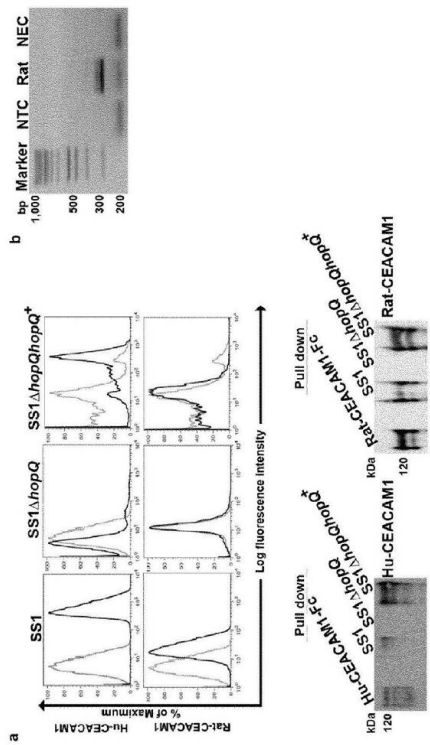
40

50

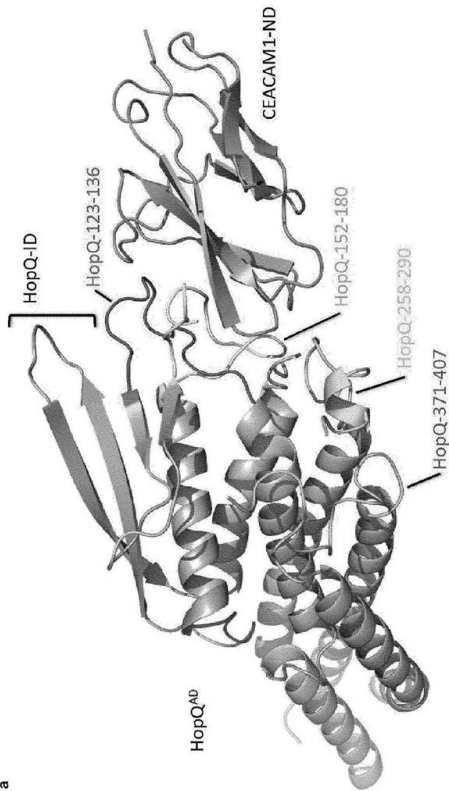
【 1 1 】



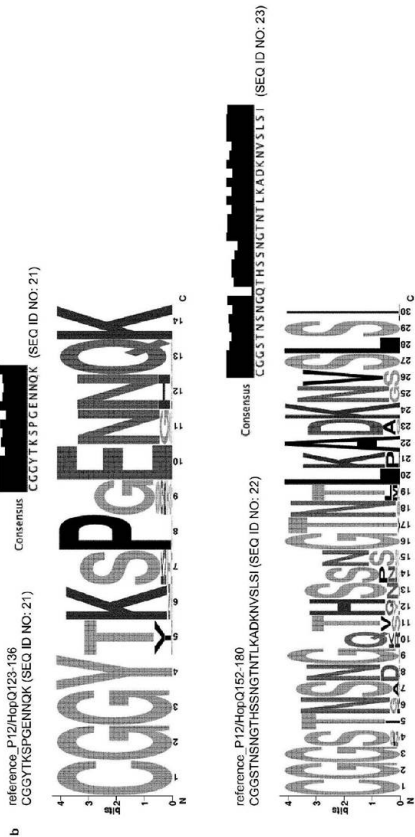
【 1 2 】



【 1 3 - 1 】



【 1 3 - 2 】



10

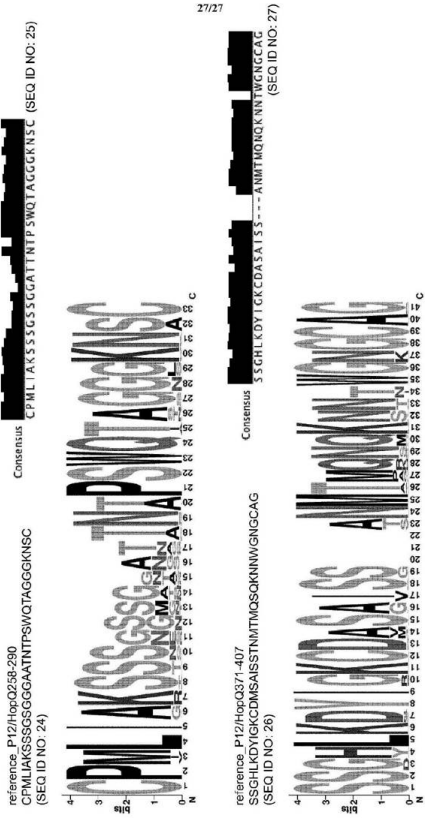
20

30

40

50

【 1 3 - 3 】



【 配列表 】

0007189124000001.app



## フロントページの続き

## (51)国際特許分類

F I

A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	31/04 (2006.01)	A 6 1 P	31/04	
C 0 7 K	14/195 (2006.01)	C 0 7 K	14/195	Z N A
C 0 7 K	14/705 (2006.01)	C 0 7 K	14/705	

(72)発明者 クルーズ, トピウス

ドイツ, 8 1 6 7 9 ミュンヘン, デニングーシュトラッセ 3 0

(72)発明者 ゲルハルト, マルクス

ドイツ, 8 1 6 6 7 ミュンヘン, プロイジングシュトラッセ 1 0

(72)発明者 シンゲル, ベルンハルト ベー .

ドイツ, 4 5 1 4 9 エッセン, ゾンマーブルクシュトラッセ 9 4

(72)発明者 ホルンブルク, ダニエル

ドイツ, 8 0 6 3 4 ミュンヘン, アルンウルフシュトラッセ 1 3 4

(72)発明者 レマウト, ハン

ベルギー, 3 3 7 0 フェルトライク, カステールストラート 1 0 アー

(72)発明者 マン, マシアス

ドイツ, 8 2 1 5 2 ミュンヘン, アム クロップファーシュピッツ 1 4 アー

(72)発明者 マイスナー, フェリクス

ドイツ, 8 2 1 3 1 ガウティング, テレジエンシュトラッセ 9

(72)発明者 バケルト, シュテファン

ドイツ, 9 1 0 5 8 エルランゲン, シュテッティナー シュトラッセ 3 0

審査官 藤井 美穂

## (56)参考文献

Lea Charlotte Holsten, Charakterisierung neuer Adhasinrezeptoren von Helicobacter pylori und deren Rolle bei der Translokation des Cytotoxins CagA, 2015.7, [https://edoc.ub.uni-muenchen.de/18445/1/Holsten\\_Lea.pdf](https://edoc.ub.uni-muenchen.de/18445/1/Holsten_Lea.pdf), [retrieved on 2021.6.15]

Verena Koniger, CEACAMs as novel receptors for Helicobacter pylori outer membrane protein HopQ, 2015.11, [https://edoc.ub.uni-muenchen.de/20024/1/Koeniger\\_Verena.pdf](https://edoc.ub.uni-muenchen.de/20024/1/Koeniger_Verena.pdf), [retrieved on 2021.6.15]

Scand. J. Gastroenterol., 1996, Vol.31, Suppl.214, pp.31-33

日本消化器病学会雑誌, 2007, 第104巻第5号, pp.635-643

## (58)調査した分野 (Int.Cl., D B 名)

A 6 1 K 4 5 / 0 0 - 4 5 / 0 8

G 0 1 N 3 3 / 0 0 - 3 3 / 9 8

P u b M e d

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T N )