

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5414972号
(P5414972)

(45) 発行日 平成26年2月12日 (2014. 2. 12)

(24) 登録日 平成25年11月22日 (2013. 11. 22)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 N 15/09 (2006. 01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A
A 6 1 K 38/00 (2006. 01)	A 6 1 K 37/02
A 6 1 K 38/46 (2006. 01)	A 6 1 K 37/54
A 6 1 K 39/00 (2006. 01)	A 6 1 K 39/00 H
A 6 1 K 39/395 (2006. 01)	A 6 1 K 39/395 D
請求項の数 39 (全 82 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願2006-546204 (P2006-546204)	(73) 特許権者	507262268
(86) (22) 出願日	平成16年12月23日 (2004. 12. 23)		バイオキット, エセ. アー.
(65) 公表番号	特表2008-502318 (P2008-502318A)		スペイン国 O 8 1 8 6, バルセロナ,
(43) 公表日	平成20年1月31日 (2008. 1. 31)		リサ ダムント, カン マーレ エセ
(86) 国際出願番号	PCT/ES2004/000581		/エネ
(87) 国際公開番号	W02005/061532	(74) 代理人	100078282
(87) 国際公開日	平成17年7月7日 (2005. 7. 7)		弁理士 山本 秀策
審査請求日	平成18年6月22日 (2006. 6. 22)	(74) 代理人	100062409
審査番号	不服2010-25884 (P2010-25884/J1)		弁理士 安村 高明
審査請求日	平成22年11月16日 (2010. 11. 16)	(74) 代理人	100113413
(31) 優先権主張番号	03380307.3		弁理士 森下 夏樹
(32) 優先日	平成15年12月23日 (2003. 12. 23)	(72) 発明者	バルテット, フランソワ ハビエール
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		スペイン国 (バルセロナ) エー-O 8
			1 8 6 リサ ダムント, カン マーレ
			エセ/エネ, バイオキット エセ. アー.
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 病原体感染の検出のための組成物および方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

純粋な T p 1 7 様ポリペプチドおよび純粋なリゾチームポリペプチドを含有する組成物であって、該 T p 1 7 様ポリペプチドは、I v y ポリペプチドではなく、該 T p 1 7 様ポリペプチドが、配列番号 3 1 のアミノ酸 2 2 ~ 1 5 6 を含むポリペプチドに対して少なくとも 9 5 % 同一であり、かつ、該リゾチームポリペプチドに結合するものであり、かつ、該 T p 1 7 様ポリペプチドは、C P H A G K A K A E K V E C (配列番号 4 1) または K A P H E K E (配列番号 4 2) を含む、組成物。

【請求項 2】

前記リゾチームポリペプチドおよび前記 T p 1 7 様ポリペプチドが、0. 0 0 1 と 1, 0 0 0, 0 0 0 との間の分子比で存在する、請求項 1 に記載の組成物。 10

【請求項 3】

さらに、キャリア粒子を含有する、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 4】

前記キャリア粒子が、赤血球、ポリペプチド凝集粒子、ポリマー粒子、無機粒子、常磁性粒子および酵母細胞からなる群より選択される、請求項 3 に記載の組成物。

【請求項 5】

前記リゾチームポリペプチドが、以下のアミノ酸配列：

X a a X a a X a a X a a X a a X a a C y s X a a X a a X a a
X a a X a a X a a X a a X a a X a a X a a X a a X a a X a a

20

X a a X a a X a a X a a X a a X a a X a a T r p X a a
 C y s X a a X a a X a a X a a G l u S e r X a a X a a X a a
 T h r X a a X a a X a a X a a X a a X a a X a a X a a X a a
 X a a S e r X a a A s p T y r G l y X a a X a a G l n I l e
 A s n X a a X a a X a a T r p C y s X a a X a a X a a X a a
 X a a X a a X a a X a a X a a X a a X a a C y s X a a X a a
 X a a C y s X a a X a a L e u X a a X a a X a a X a a X a a
 X a a X a a X a a C y s A l a L y s X a a X a a X a a X a a
 X a a X a a X a a X a a X a a X a a X a a T r p X a a X a a
 T r p X a a X a a X a a C y s X a a X a a X a a X a a X a a
 X a a X a a X a a X a a C y s X a a X a a X a a (配列番号28)を
 含み、該配列において、X a aは、任意のアミノ酸であるか、または存在しない、請求項
 1に記載の組成物。

10

【請求項6】

前記T p 1 7様ポリペプチドは、トレポネーマ パリダム (T r e p o n e m a p a l l i d u m)に由来する、請求項1に記載の組成物。

【請求項7】

前記T p 1 7様ポリペプチドは、生物学的サンプルから単離される、請求項1に記載の組成物。

【請求項8】

20

前記T p 1 7様ポリペプチドは、組換えポリペプチドである、請求項1に記載の組成物。

【請求項9】

前記T p 1 7様ポリペプチドは、親和性タグに融合される、請求項1に記載の組成物。

【請求項10】

前記T p 1 7様ポリペプチド、および／または、前記リゾチームポリペプチドが、固体支持体に固定されている、請求項1に記載の組成物。

【請求項11】

前記リゾチームポリペプチドが、ヒト由来である、請求項1に記載の組成物。

【請求項12】

被験体において病原体に対する免疫応答を検出するための方法であって、該方法は、以下
 :

30

(a) 該被験体に由来する生物学的サンプルを、外来性のヒトリゾチームポリペプチドおよびT p 1 7様ポリペプチドと接触させる工程であって、該T p 1 7様ポリペプチドは、配列番号31のアミノ酸22～156を含むポリペプチドに対して少なくとも95%同一であり、該T p 1 7様ポリペプチドは、C P H A G K A K A E K V E C (配列番号41)またはK A P H E K E (配列番号42)を含む、工程；ならびに

(b) 該被験体に由来する生物学的サンプル中の抗体を検出する工程であって、該抗体はT p 1 7様ポリペプチドーリゾチームポリペプチド複合体に結合する、工程を包含し、

該T p 1 7様ポリペプチドが該ヒトリゾチームポリペプチドと共に用いられると、検出感度が高められるものである、方法。

40

【請求項13】

病原体に対する免疫応答を検出するための診断アッセイの感度を高めるための方法であって、該方法は、請求項12に記載の工程(a)および工程(b)を包含し、前記ヒトリゾチームポリペプチドへの接触が、該アッセイの感度を少なくとも5%増加させる、方法。

【請求項14】

前記方法が、凝集アッセイである、請求項12または13に記載の方法。

【請求項15】

前記リゾチームポリペプチドが、前記生物学的サンプルとの接触の前、接触の間、または接触後に、前記T p 1 7様ポリペプチドと接触される、請求項12に記載の方法。

50

【請求項 1 6】

前記 T p 1 7 様ポリペプチドが組み換え型である、請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 7】

前記リゾチームポリペプチドが組み換え型である、請求項 1 2 または 1 3 に記載の方法。

【請求項 1 8】

前記病原体が、トレポネーマ パリダム (T r e p o n e m a p a l l i d u m) である、請求項 1 2 または 1 3 に記載の方法。

【請求項 1 9】

前記 T p 1 7 様ポリペプチドまたは前記リゾチームポリペプチドが、親和性タグに融合されている、請求項 1 2 または 1 3 に記載の方法。

10

【請求項 2 0】

前記 T p 1 7 様ポリペプチドまたは前記リゾチームポリペプチドが、固体支持体に固定されている、請求項 1 2 または 1 3 に記載の方法。

【請求項 2 1】

前記方法が、イムノアッセイを含む、請求項 1 2 または 1 3 に記載の方法。

【請求項 2 2】

前記イムノアッセイが、酵素結合免疫吸着アッセイ (E L I S A)、ウェスタンブロット、免疫凝集アッセイ、ラジオイムノアッセイ、濁度アッセイ、比濁分析アッセイ、免疫クロマトグラフィーアッセイ、化学発光アッセイおよび蛍光アッセイからなる群より選択される、請求項 2 1 に記載の方法。

20

【請求項 2 3】

前記生物学的サンプルが、血液、血清、血漿、涙液、唾液、痰、鼻腔液、耳液、生殖液、乳液、乳汁、初乳、胎盤液、汗、滑液、腹水、胃腸液、滲出液、濾出液、胸水、心膜液、羊水、脳脊髄液、胆汁、胃液、精液、糞便物質、上気道液、腹水、炎症部位から回収した流体、プールされた堆積部位から回収された流体 (f l u i d h a r v e s t e d f r o m a p o o l e d c o l l e c t i o n s i t e)、気管支洗浄液 (b r o n c h i a l l a v a g e)、尿、生検物質、房水、反芻動物の噴門洞からの物質、有核細胞サンプル、粘膜表面に付随するあらゆる流体、毛髪および皮膚からなる群より選択される、請求項 1 2 または 1 3 に記載の方法。

【請求項 2 4】

請求項 1 に記載の組成物であって、該組成物が梅毒の診断に使用されることを特徴とする、組成物。

30

【請求項 2 5】

病原体に対する免疫応答を検出するためのキットであって、T p 1 7 様ポリペプチドおよびヒトリゾチームポリペプチドを含み、該 T p 1 7 様ポリペプチドが、配列番号 3 1 のアミノ酸 2 2 ~ 1 5 6 を含むポリペプチドに対して少なくとも 9 5 % 同一であり、かつ、該 T p 1 7 様ポリペプチドは、C P H A G K A K A E K V E C (配列番号 4 1) または K A P H E K E (配列番号 4 2) を含み、かつ、該 T p 1 7 様ポリペプチドが該ヒトリゾチームポリペプチドと共に用いられると、検出感度が高められるものである、キット。

【請求項 2 6】

前記ヒトリゾチームポリペプチドは、配列番号 2 8 のアミノ酸配列を含む、請求項 2 5 に記載のキット。

40

【請求項 2 7】

前記 T p 1 7 様ポリペプチドまたは前記リゾチームポリペプチドが、固体支持体に結合されている、請求項 2 5 または 2 6 に記載のキット。

【請求項 2 8】

前記固体支持体が、樹脂、ゲル、ビーズ、ウェル、カラム、チップ、膜、マトリックス、プレートおよびフィルタデバイスからなる群より選択される、請求項 2 7 に記載のキット。

【請求項 2 9】

50

病原体に対する免疫応答を検出するための組成物であって、Tp17様ポリペプチドおよびヒトリゾチームポリペプチドを含み、該Tp17様ポリペプチドが、配列番号31のアミノ酸22～156を含むポリペプチドに対して少なくとも95%同一であり、かつ、該Tp17様ポリペプチドは、CPHAGKAKAEKVEC（配列番号41）またはKAPHKE（配列番号42）を含み、かつ、該Tp17様ポリペプチドが該ヒトリゾチームポリペプチドと共に用いられると、検出感度が高められるものである、組成物。

【請求項30】

前記リゾチームポリペプチドは、組換えポリペプチドである、請求項1に記載の組成物。

【請求項31】

前記リゾチームポリペプチドは、組換えポリペプチドである、請求項25に記載のキット
10

【請求項32】

前記リゾチームポリペプチドは、生物学的サンプルから単離される、請求項1に記載の組成物。

【請求項33】

前記リゾチームポリペプチドは、生物学的サンプルから単離される、請求項12または13に記載の方法。

【請求項34】

前記リゾチームポリペプチドは、生物学的サンプルから単離される、請求項25に記載のキット
20

【請求項35】

前記アッセイに前記リゾチームを添加するための説明書をさらに含む、請求項25に記載のキット。

【請求項36】

キャリア粒子をさらに含む、請求項25に記載のキット。

【請求項37】

前記キャリア粒子が、赤血球、ポリペプチド凝集粒子、ポリマー粒子、無機粒子、常磁性粒子、および酵母細胞からなる群より選択される、請求項36に記載のキット。

【請求項38】

前記リゾチームポリペプチドとの接触が、凝集アッセイの感度を、少なくとも10%、25%、50%、75%、85%または95%増加させる、請求項14に記載の方法。
30

【請求項39】

前記キットが梅毒の診断に使用されることを特徴とする、請求項25に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

（発明の分野）

本発明は概して、リゾチームポリペプチドのTreponema pallidum P17ポリペプチド（Tp17）またはTp17様ポリペプチドへの結合の特徴付けから得られた診断用組成物および治療用組成物ならびに診断方法および治療方法を提供する。さらに、本発明はリゾチームポリペプチドとTP-17ポリペプチドまたはTP-17様ポリペプチドとの結合を増強または減弱させるための方法および組成物を提供する。
40

【背景技術】

【0002】

（発明の背景）

梅毒はTreponema pallidum（下でまた「Tp」とも呼ぶ）感染に起因する疾患である。梅毒の診断は一般に、例えば梅毒トレポネーマ血球凝集反応試験（TPHA）、梅毒トレポネーマ蛍光抗体吸収試験（FTA-ABS）および／または梅毒トレポネーマ運動抑制試験（TPI）、ならびに酵素結合免疫吸着法（ELISA）およびウェスタンブロット系を用いた、血中における抗Tp抗体のイムノアッセイによってなさ
50

れる。これらの試験はT pまたはT p由来の抗原調製物（例えばT p抗原であるT p 1 5、T p 1 7およびT p 4 7）と反応する抗体を検出する。T P I試験は、T pの運動性を阻害する、患者の血清中の補体活性化抗体の量の顕微鏡観察評価に関連する。この試験はコストが高いために一般に診断として用いられない。T P H A試験は、患者の血清抗体と、T p超音波処理抗原が結合した赤血球との凝集に関連する。F T A－A B S試験は、患者の血清中の特異的抗体が、固体支持体に付着されたT pへ結合することを蛍光標識された二次抗体を介して検出するための間接的な免疫蛍光顕微鏡観察に関連する。これらのアッセイは広く用いられているが、体液中のT p抗体レベルが極めて低い場合に、早期の感染または低レベルの感染を検出するために必要な感度を欠く。

【0003】

10

さらに、一般に普及している、梅毒の従来免疫アッセイにおける個々の組換えT p抗原または精製T p抗原の使用は、T p抗原と、被験体の体液に通常存在する他の抗原（すなわちT p抗原の結合パートナー）との間に形成される複合体に対するいくつかの抗体による結合の原因とならない。したがって、従来免疫アッセイではT p抗原結合パートナーの非存在下ではこのような抗体を検出できず、いくらかの場合は、結果として感度の低さまたは偽陰性のアッセイ結果につながる。それゆえ、病原体抗原／結合パートナー複合体に結合する抗体を検出する、感度の改善された病原体診断アッセイの必要性が存在する。

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

20

【0004】

（発明の要旨）

本発明は病原体の感染の検出および処置のための組成物および方法を提供する。本発明は概して、*Treponema pallidum*のポリペプチドであるT p 1 7が宿主によって生産される抗菌ペプチドであるリゾチームに結合し、そしてリゾチームの抗菌活性を阻害するという発見に関連する。リゾチームに対するT p 1 7の結合部位およびT p 1 7に対するリゾチームの結合部位が同定された。関連するタンパク質と、リゾチームの結合および阻害に必要なT p 1 7配列との比較は、単純ヘルペスウイルスを含む多くの異なる病原体にわたって保存されたコンセンサス配列に結合するリゾチームの同定を提供し、このことは、リゾチームに結合するT P 1 7関連ポリペプチドが宿主免疫応答を阻害する

30

ための一般的な機構を提供することを示唆した。したがって、本発明はまた、T P 1 7結合を阻害するまたは不安定化する変異を含む変異リゾチームポリペプチドの同定も提供する。このようなポリペプチドまたはその断片は、病原体感染の予防または処置に有用である。さらに、本発明はT p 1 7ーリゾチーム複合体に結合する抗体の検出に基づいた、改良された診断アッセイを提供する。

【0005】

T p 1 7のリゾチーム結合モチーフの同定、および他の病原体由来タンパク質に共有されるリゾチーム結合モチーフコンセンサス配列の同定はまた、リゾチームの検出または阻害、ならびに特定の病原体の検出および梅毒以外の対応する感染の阻害のための有用な組成物および方法を提供する。さらに、病原体由来ポリペプチドは、異常なリゾチーム活性に関連する疾患を含む多くの疾患の診断、予防および処置に有用である。これらのポリペプチドはまた、安価なリゾチームアフィニティクロマトグラフィーを用いたタンパク質生成における使用のための有用なアフィニティタグを提供する。

40

【0006】

1つの局面において、本発明は該して、X a a_n P r o H i s X a a_n（配列番号1）のアミノ酸配列を含む少なくとも1つのリゾチーム結合モチーフを含む実質的に純粋なT p 1 7様ポリペプチドの断片を特徴とし、ここでX a aは任意のアミノ酸であり、そしてnは少なくとも1であり、そしてこの断片はリゾチームポリペプチドに結合し得、そしてこのモチーフはC K P H D C（配列番号24）ではない。1つの実施形態において、この断片は約4アミノ酸～約200アミノ酸の間（例えば、5、10、25、50、7

50

5、100、125、150、175)のTp17様ポリペプチドである。別の実施形態において、この断片は約30アミノ酸または約100アミノ酸未満のTp17様ポリペプチドである。別の実施形態において、この断片はリゾチームの酵素活性または抗菌活性を実質的に阻害し得る。なお別の実施形態において、このリゾチーム結合モチーフはアミノ酸コンセンサス配列CS1:Cys Xaa₁ Xaa₂ Xaa₃ Pro His Xaa₄ Xaa₅ Xaa₆ Xaa₇ Xaa₈ Xaa₉ Xaa₁₀ Xaa₁₁ Xaa₁₂ Xaa₁₃ Cys(配列番号2)を含み、ここでXaa₁、Xaa₂、Xaa₃、Xaa₄、Xaa₅、Xaa₆、Xaa₇、Xaa₈、Xaa₉、Xaa₁₀、Xaa₁₁、Xaa₁₂またはXaa₁₃は任意のアミノ酸であるか、存在しないか、またはペプチド結合である。

10

【0007】

関連した局面において、本発明は先の局面の断片をコードする実質的に純粋な核酸分子、この核酸分子を含むベクター、およびこのようなベクターを含む宿主細胞を特徴とする。

【0008】

別の局面において、本発明は実質的に純粋な変異リゾチームポリペプチドを特徴とし、このポリペプチドはこの変異リゾチームポリペプチドとTp17様ポリペプチドとの間の結合を減弱させる(例えば、野生型の結合と比較して5%、10%、25%、50%、75%、85%、または95%結合を減弱させる)少なくとも1つのアミノ酸変異を含み、ここでこの変異リゾチームポリペプチドは対応する野生型リゾチームポリペプチドの抗菌活性の少なくとも50%、60%、75%、85%、または95%を保持する。1つの実施形態において、この変異は変異リゾチームポリペプチドとTp17様ポリペプチドとの間の結合を、野生型リゾチームポリペプチドの結合と比較して少なくとも5%減弱させる。別の実施形態において、この変異は対応する野生型ポリペプチドにおける表面電荷に影響する。他の実施形態において、この変異は正に荷電したアミノ酸残基にあるか、負に荷電したアミノ酸残基にあるか、またはTp17様ポリペプチドと接触する野生型リゾチームポリペプチドの疎水性アミノ酸残基にある。他の実施形態において、この変異は、ヒトリゾチームのLys19、Arg23、Lys51、Gly55、Asn57、Arg131、Asn132およびArg133からなる群より選択される、少なくとも1つ、2つ、3つ、4つ、またはそれ以上のアミノ酸部位のものであるか、または他の種(例えば、原核生物、真核生物、哺乳動物)に由来するリゾチームの対応する部位に存在する。

20

30

【0009】

関連した局面において、本発明は先の局面のリゾチームポリペプチドをコードする実質的に純粋な核酸分子、このような核酸分子を含むベクター、およびこのようなベクターを含む宿主細胞を特徴とする。

【0010】

さらに別の局面において、本発明は実質的に純粋なTp17様ポリペプチドおよび実質的に純粋なリゾチームポリペプチドを含む組成物を特徴とし、ここでこのTp17様ポリペプチドはIvyポリペプチドではない。1つの実施形態において、このリゾチームは外因性である。1つの実施形態において、この組成物はさらにキャリア粒子(例えば、赤血球、ポリペプチド凝集粒子、ポリマー粒子、無機粒子、常磁性粒子、および酵母細胞)を含む。

40

【0011】

さらに別の局面において、本発明は被験体中の病原体に対する免疫応答を検出するための方法の特徴とする。この方法は、(a)被験体由来の生物学的サンプルを外因性リゾチームおよびTp17様ポリペプチドと接触させる工程;および(b)Tp17様ポリペプチドまたはTp17様ポリペプチド-リゾチームポリペプチド複合体と結合する抗体を検出する工程を包含する。

【0012】

さらに別の局面において、本発明は病原体に対する免疫応答を検出するための診断アッ

50

【 0 0 1 3 】

20

【 0 0 1 4 】

【 0 0 1 5 】

【化 2】

Xaa

30

40

【 0 0 1 6 】

【 0 0 1 7 】

【化 3】

Xaa Xaa Xaa

Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Glu Ser Xaa Xaa
 Xaa Thr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Ser Xaa Asp Tyr Gly Xaa
 Xaa Gln Ile Asn Xaa Xaa Xaa Trp Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 Cys Ala Lys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Xaa Xaa Trp
 Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa

10

(配列番号 28) を含むリゾチームポリペプチド断片と接触させる工程であって、ここで Xaa は結合を許容する条件において任意のアミノ酸であるかまたは存在しない工程；および (2) リゾチームポリペプチドとサンプル中のポリペプチドとの結合を検出する工程であって、ここでこの結合はサンプル中の病原体または病原体ポリペプチドの存在を示す工程を包含する。別の実施形態において、本発明はさらにリゾチームポリペプチドに結合するポリペプチドの配列を決定する工程を包含する。いくつかの実施形態において、このリゾチームポリペプチドはヒトリゾチームポリペプチド由来の配列を含む。

【0018】

別の局面において、本発明はサンプル中のリゾチームを検出する方法を特徴とし、この方法は (a) このサンプルを固体支持体に結合された Tp-17 様ポリペプチドと接触させる工程；および (b) このサンプル中のポリペプチドへの上記ポリペプチドの結合を検出する工程であって、この結合はこのサンプル（例えば、生物学的流体、細胞培養物、体サンプル、水サンプル、流体サンプル、食物、薬物、または病原体培養物）中にリゾチームが存在することを示す工程を包含する。1つの実施形態において、この方法はさらに結合を通してこのサンプルからリゾチームを除く工程を包含する。

20

【0019】

別の局面において、本発明は Tp-17 様ポリペプチドおよびリゾチームポリペプチドを備える、病原体への免疫応答を検出するためのキットを特徴とする。

【0020】

別の局面において、本発明は配列番号 28 を含む標識されたリゾチームポリペプチドを含む、サンプル中の病原体の検出のためのキットを特徴とする。

30

【0021】

別の局面において、本発明は、天然では連結されない第二のアミノ酸配列と融合された Tp-17 様ポリペプチドリゾチーム結合モチーフの少なくとも 1つの断片を含む融合ポリペプチドを特徴とする。1つの実施形態において、この融合ポリペプチドは固体支持体に固定される。別の実施形態において、このモチーフはこの融合ポリペプチドの末端にある。別の実施形態において、この融合ポリペプチドはリゾチーム抗菌活性を減弱させ得る。

【0022】

別の局面において、本発明は融合ポリペプチドを単離するための方法を特徴とし、この方法は： (a) 先の局面の上記融合ポリペプチドを提供する工程； (b) この融合ポリペプチドをリゾチームポリペプチドと接触させる工程であって、ここでこのリゾチームは上記融合ポリペプチドのこのリゾチームポリペプチドへの結合を許容する条件下で固体支持体に付着される工程；および (c) このリゾチームポリペプチドから上記融合ポリペプチドを溶離させる工程を包含する。

40

【0023】

別の局面において、本発明はリゾチーム抗菌活性を増加する競合化合物を同定する方法を特徴とする。この方法は、この競合化合物の存在下において、リゾチームポリペプチドとリゾチーム結合モチーフを含むポリペプチドとの間の結合の減弱を検出する工程を包含する。1つの実施形態において、この競合化合物は、ヒトリゾチームの Glu53 に対応

50

する触媒作用性グルタミン酸に対するリゾチーム結合モチーフの結合を減弱させる。

【0024】

別の局面において、本発明は増加した抗菌活性を有する変異リゾチームポリペプチドを同定する方法を特徴とする。この方法は、(a)野生型リゾチーム配列と比較して少なくとも1つの変異をポリペプチドのアミノ酸配列内に含むリゾチームポリペプチドを提供する工程；および(b)この変異リゾチームポリペプチドとTp17様ポリペプチドとの間の結合の減弱を検出する工程を包含する。

【0025】

さらに別の局面において、本発明は病原体感染の処置または予防が必要な被験体における病原体感染の処置または予防のための方法の特徴とする。この方法は、アミノ酸変異を含む効果的な量の変異リゾチームポリペプチドを被験体に投与する工程を包含し、ここでこの変異はリゾチームポリペプチドとTp17様ポリペプチドとの間の結合を減弱させる。

10

【0026】

別の局面において、本発明は病原体感染の処置または予防が必要な被験体における病原体感染の処置または予防のための方法の特徴とする。この方法は、アミノ酸変異を含む効果的な量の変異Tp17様ポリペプチドを被験体に投与する工程を包含し、ここでこの変異Tp17様ポリペプチドの投与は、病原体に発現されたTp17様ポリペプチドと内因性リゾチームポリペプチドとの間の結合を減弱させる。

【0027】

別の局面において、本発明は免疫応答を必要とする被験体において免疫応答を増加させるワクチンの特徴とし、この組成物は2型単純ヘルペスウイルス由来のgJ糖タンパク質およびgD糖タンパク質の内の少なくとも1つを含む。

20

【0028】

別の局面において、本発明は免疫応答を必要とする被験体において免疫応答を増加させるワクチンの特徴とし、この組成物はリゾチームポリペプチドおよびリゾチーム結合モチーフを含むポリペプチドを含む。

【0029】

別の局面において、本発明は被験体における2型単純ヘルペスウイルスの診断の方法を特徴とする。この方法は、被験体に由来するサンプル中におけるgJタンパク質リゾチーム結合モチーフの存在を検出する工程を包含する。1つの実施形態において、このリゾチーム結合モチーフはリゾチーム結合アッセイにおいて検出される。別の実施形態において、このリゾチーム結合モチーフはイムノアッセイにおいて検出される。

30

【0030】

別の局面において、本発明はサンプルにおけるリゾチームの酵素活性を減少させる方法の特徴とする。この方法は、Tp17様ポリペプチドのこのリゾチームとの結合を許容する条件下においてサンプルをこのTp17様ポリペプチドと接触させる工程を包含し、ここでこのTp17様ポリペプチドはIvyタンパク質を含まない。

【0031】

別の局面において、本発明は被験体におけるリゾチームの酵素活性を減少させる方法の特徴とする。この方法は、被験体に効果的な量のTp17様ポリペプチドまたはその断片を投与する工程を包含する。

40

【0032】

先の局面の種々の実施形態において、このポリペプチドは2型単純ヘルペスウイルスの糖タンパク質Jである。先の局面の他の実施形態において、この方法は、癌、アルツハイマー病、アミロイド腎症、白血病、クローン病およびアレルギーからなる群より選択される疾患の処置または予防のために用いられる。

【0033】

別の局面において、本発明はアミノ酸配列Cys Xaa₁ Xaa₂ Xaa₃ His Xaa₄ Xaa₅ Xaa₆ Xaa₇ Xaa₈ Xaa₉ Xaa₁₀ X

50

$a a_{11}$ $X a a_{12}$ $X a a_{13}$ Cys（配列番号175）を含む少なくとも1つのリゾチーム結合モチーフを含む実質的に純粋なTp17様ポリペプチドの断片を特徴とし、ここでXaaは任意のアミノ酸であるかまたは存在せず、そしてこの断片はPorphyromonas gingivalisまたはHelicobacter pyloriに由来する。

【0034】

別の局面において、本発明はCys $X a a_1$ $X a a_2$ $X a a_3$ $X a a_4$ $X a a_5$ $X a a_6$ $X a a_7$ $X a a_8$ $X a a_9$ $X a a_{10}$ $X a a_{11}$ $X a a_{12}$ $X a a_{13}$ Cysのアミノ酸配列を含む少なくとも1つのリゾチーム結合モチーフを含む実質的に純粋なAPP様ポリペプチドの断片を特徴とし、ここで $X a a_1$ 、 $X a a_2$ 、 $X a a_3$ 、 $X a a_4$ および $X a a_5$ は任意のアミノ酸であるかまたは存在せず、 $X a a_6$ はアミノ酸K、RまたはHであり、 $X a a_7$ はAまたはGであり、 $X a a_8$ はK、RまたはHであり、 $X a a_9$ および $X a a_{10}$ は任意のアミノ酸であるかまたは存在せず、 $X a a_{11}$ はアミノ酸KまたはRであり、 $X a a_{12}$ は任意のアミノ酸であるかまたは存在せず、そして $X a a_{13}$ はアミノ酸E、D、QまたはNである（配列番号177）。1つの実施形態において、このAPP様ポリペプチドはβ-アミロイド前駆体タンパク質である。別の実施形態において、この断片は実質的にヒトβ-アミロイド前駆体タンパク質の断片である。

【0035】

関連した局面において、本発明は先の局面の断片をコードする核酸、この核酸を含むベクター、およびこのようなベクターを含む宿主細胞を特徴とする。

【0036】

別の局面において、本発明はAPP様ポリペプチドおよび実質的に純粋なリゾチームポリペプチドを含む組成物を特徴とする。

【0037】

別の局面において、本発明は被験体におけるアルツハイマー病を診断する方法を特徴とする。この方法は被験体由来の生物学的サンプル（血清サンプル、脳脊髄液サンプル、または組織サンプル）における、APP様ポリペプチドとリゾチームポリペプチドとの複合体の存在を検出する工程を包含する。1つの実施形態において、方法はイムノアッセイを包含する。

【0038】

別の局面において、本発明は、APP様ポリペプチドとリゾチームポリペプチドとの複合体に結合する抗体の存在を検出する工程による、アルツハイマー病を診断する方法を特徴とする。

【0039】

別の局面において、本発明は、APP様ポリペプチドとリゾチームポリペプチドとの結合を調節する候補化合物を同定する方法を特徴とする。この方法は、この候補化合物の存在下におけるTp17様ポリペプチドとリゾチームポリペプチドとの結合の減弱を検出する工程を包含する。

【0040】

別の局面において、本発明は $X a a_n$ Pro His $X a a_n$ （配列番号1）のアミノ酸配列を有する少なくとも1つのリゾチーム結合モチーフを含むTp17様ポリペプチドを特徴とし、ここでXaaは任意のアミノ酸であり、そしてnは少なくとも1であり、そしてこの断片はSLLP1に結合し得る。1つの実施形態において、この断片はTp17様ポリペプチドの約4アミノ酸〜約200アミノ酸である。1つの実施形態において、このモチーフはアミノ酸配列CS1：Cys $X a a_1$ $X a a_2$ $X a a_3$ Pro His $X a a_4$ $X a a_5$ $X a a_6$ $X a a_7$ $X a a_8$ $X a a_9$ $X a a_{10}$ $X a a_{11}$ $X a a_{12}$ $X a a_{13}$ Cys（配列番号2）を含み、ここで $X a a_1$ 、 $X a a_2$ 、 $X a a_3$ 、 $X a a_4$ 、 $X a a_5$ 、 $X a a_6$ 、 $X a a_7$ 、 $X a a_8$ 、 $X a a_9$

、X a a₁₀、X a a₁₁、X a a₁₂またはX a a₁₃は任意のアミノ酸であるか、存在しないか、またはペプチド結合である。

【0041】

関連した局面において、本発明は、先の局面の断片をコードする実質的に純粋な核酸分子、この核酸分子を含むベクター、およびこのベクターを含む宿主細胞を特徴とする。

【0042】

別の局面において、本発明は、野生型のS L L P 1ポリペプチドと比較して変異S L L P 1ポリペプチドとT p 1 7様ポリペプチドとの間の結合を減弱させる少なくとも1つのアミノ酸変異を含む、実質的に純粋な変異S L L P 1ポリペプチドを特徴とする。

【0043】

別の局面において、本発明は、野生型のS L L P 1ポリペプチドと比較して変異S L L P 1ポリペプチドの酵素活性を増加させる少なくとも1つのアミノ酸変異を含む、実質的に純粋な変異S L L P 1ポリペプチドを特徴とする。一実施形態において、その酵素活性は、抗菌活性を包含する。

【0044】

別の局面において、本発明は、受精能を必要とする被験体における受精能を調節するための方法の特徴とする。この方法は、この被験体に、効果的な量の、少なくとも1つのアミノ酸変異を含む変異S L L P 1ポリペプチドを投与する工程を包含し、ここでこの変異S L L P 1ポリペプチドの投与は、被験体の受精能を調節するように、T p 1 7様ポリペプチドと内因性S L L P 1ポリペプチドとの結合を変化させる。

【0045】

別の局面において、本発明は受精能を必要とする被験体における受精能を調節するための方法の特徴とする。この方法は、この被験体に効果的な量のT p 1 7様ポリペプチドを投与する工程を包含し、ここでこのT p 1 7様ポリペプチドの投与は、被験体の受精能を調節するように、内因性S L L P 1と卵細胞表面の同族レセプターとの結合を減弱させる。

【0046】

さらに別の局面において、本発明はヒト受精能を調節する候補化合物を同定する方法の特徴とする。この方法は、この候補化合物の存在下において、S L L P 1ポリペプチドとリゾチーム結合モチーフを含むポリペプチドとの結合における減弱を検出する工程を包含する。

【0047】

別の局面において、本発明は被験体における性感染性病原体感染の処置または予防のための方法の特徴とする。この方法は少なくとも1つのアミノ酸変異を含む変異S L L P 1ポリペプチドの効果的な量を被験体に投与する工程を包含し、ここでこの変異は内因性S L L P 1ポリペプチドと病原体に発現されたT p 1 7様ポリペプチドとの結合を減弱させる。

【0048】

別の局面において、本発明は被験体における性感染性病原体感染の処置または予防のための方法の特徴とする。この方法は効果的な量のT p 1 7様ポリペプチドを被験体に投与する工程を包含し、このT p 1 7様ポリペプチドの投与は、病原体に発現されたT p 1 7様ポリペプチドと内因性S L L P 1ポリペプチドとの結合を減弱させる。

【0049】

別の局面において、本発明は性感染性病原体感染の処置または予防に有用である候補化合物の同定の方法の特徴とする。この方法は、(a) S L L P 1ポリペプチドおよびT p 1 7様ポリペプチドを候補化合物と接触させる工程；および(b) この候補化合物の存在下におけるリゾチームポリペプチドと病原体に発現されたT p 1 7様ポリペプチドとの結合における減弱を検出する工程を包含する。

【0050】

別の局面において、本発明は、被験体内における性感染性病原体に発現されたT p 1 7

10

20

30

40

50

様タンパク質とSLLP1との結合を減弱させる方法の特徴とする。この方法は、効果的な量のTp17様ポリペプチドまたはリゾチームポリペプチドあるいはその断片を被験体に投与する工程を包含する。

【0051】

別の局面において、本発明は、受精プロセスの間のSLLP1結合を妨害するTp17様ポリペプチドを含む避妊組成物を特徴とする。

【0052】

別の局面において、本発明は性感染性病原体感染の予防または処置のための薬学的組成物を特徴とし、この組成物は感染プロセスの間のSLLP1結合を妨害するTp17様ポリペプチドを含む。

【0053】

別の局面において、本発明は少なくとも効果的な量のバクテリオファージT4リゾチームおよびパパインまたはバシトラシンを含む抗菌物質としての使用のための薬学的組成物を特徴とする。1つの実施形態において、先の局面の薬学的組成物は、バクテリオファージT4リゾチーム、パパインおよびバシトラシンを含む。1つの実施形態において、単位用量に存在するT4リゾチームの量は2mg~100mg（例えば、5、10、20、30、40、50、60、70、80または90）である。好ましくは、単位用量に存在するT4リゾチームの量は5mgである。別の実施形態において、単位用量に存在するパパインの量は2mgである。存在するバシトラシンの量は単位用量あたり3mgである。別の実施形態において、組成物は経口処方物である（例えば、バツカル錠）。

【0054】

別の局面において、本発明は被験体における病原体感染を処置する方法の特徴とし、病原体感染を有すると診断された被験体に、バクテリオファージT4リゾチームおよびパパインまたはバシトラシンを含む薬学的組成物を投与する工程を包含する。1つの実施形態において、この薬学的組成物はバクテリオファージT4リゾチーム、パパインおよびバシトラシンを含む。別の実施形態において、この薬学的組成物は経口処方物である。

【0055】

上記の局面の任意のものの種々の実施形態において、このTp17様ポリペプチドは、細菌、ウイルス、寄生生物、プラスミド、プリオン、マイコプラズマおよび糸状菌因子からなる群より選択される病原体に由来する。

【0056】

先の局面の任意のものの他の実施形態において、この病原体は、*Escherichia coli*、*Pseudomonas aeruginosa*、*Pseudomonas putida*、*Yersinia pestis*、*Shigella flexnerii*、*Treponema denticola*、*Vibrio cholerae*、*Vibrio vulnificus*、*Vibrio parahaemolyticus*、*Chlamydia pneumoniae*、*Chlamydia trachomatis*、*Staphylococcus aureus*、*Staphylococcus epidermidis*、*Streptococcus pneumoniae*、*Streptococcus agalactiae*、*Streptococcus mutans*、*Streptococcus pyogenes*、*Enterococcus faecalis*、*Bordetella bronchiseptica*、*Bordetella pertussis*、*Bordetella parapertussis*、*Helicobacter hepaticus*、*Helicobacter pylori*、*Salmonella typhimurium*、*Ralstonia solanacearum*、*Xanthomonas campestris*、*Pseudomonas syringae*、*Pasteurella multocida*、*Brucella melitensis*、*Brucella suis*、*Porphyromonas gingivalis*、重症急性呼吸器症候群（SARS）、コロナウイルス、呼吸器性シンシチウムウイルス、A型肝炎ウイルス、B型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス

ス、風疹ウイルス、*Toxoplasma gondii*、*Trypanozoma* spp.、*Gardnerella vaginalis*、*Mycobacterium avium*、*Mycobacterium leprae*、*Mycobacterium paratuberculosis*、*Mycobacterium tuberculosis*、*Campylobacter jejuni*、*Helicobacter* spp.、*Agrobacterium tumefaciens*、*Moraxella catarrhalis*、*Neisseria meningitidis*、*Neisseria gonorrhoeae*、*Haemophilus influenzae*、*Haemophilus ducreyi*、*Propionibacterium acnes*、*Listeria monocytogenes*、2型単純ヘルペスウイルス、インフルエンザウイルス、TACARIBEウイルス、ブルータングウイルス、*Bacteroides thetaiotaomicron*、*Coxiella burnettii*、*Legionella pneumophila*、*Salmonella typhi*、チンパンジーサイトメガロウイルス、ヒトサイトメガロウイルス、ヒトパピローマウイルス、デング熱ウイルス、口蹄疫ウイルス、西ナイルウイルス、鳥インフルエンザウイルス、ヒト免疫不全ウイルス、LdMNPV、*Plasmodium falciparum*、*Plasmodium ovale*、*Eimeria tenella*、*Eimeria acervulina*、*Giardia lamblia*、*Plasmodium yoelli*および*Anopheles gambiae*によって運ばれる病原体である。

10

20

【0057】

先の局面の任意のものの他の実施形態において、この病原体は*Treponema denticola*、*Bacteroides thetaiotaomicron*、*Coxiella burnettii*、*Haemophilus influenzae*、*Neisseria gonorrhoeae*、*Legionella pneumophila*、*Staphylococcus aureus*、ならびに*Salmonella typhi*、*Neisseria meningitidis* 血清型Aおよび血清型B、*Vibrio cholerae*、*Vibrio vulnificus*、*Haemophilus ducreyi*、ならびに*Bordetella pertussis*である。好ましくは、この病原体は*Treponema pallidum*である。

30

【0058】

先の局面の任意のものの他の実施形態において、このモチーフはアミノ酸コンセンサス配列CS2：Xaa₁ Xaa₂ Pro His Xaa₃ Xaa₄（配列番号3）を含み、ここでXaa₁はCys、Lys、Val、Alaであるか、または存在せず；Xaa₂はAla、CysまたはLysであり；Xaa₃はAla、AspまたはGluであり、そしてXaa₄はCys、GlyまたはLysである。先の局面の任意のものの他の実施形態において、このTp17様ポリペプチドは配列Cys Xaa₁ Xaa₂ Xaa₃ Pro His Xaa₄ Xaa₅ Xaa₆ Xaa₇ Xaa₈ Xaa₉ Xaa₁₀ Xaa₁₁ Xaa₁₂ Xaa₁₃ Cys（配列番号2）を含み、ここでXaa₁、Xaa₂、Xaa₃、Xaa₄、Xaa₅、Xaa₆、Xaa₇、Xaa₈、Xaa₉、Xaa₁₀、Xaa₁₁、Xaa₁₂またはXaa₁₃は任意のアミノ酸であるか、または存在しない。先の局面の任意のもののなお他の実施形態において、このモチーフはアミノ酸コンセンサス配列CS3：Xaa Cys Pro His Ala Gly（配列番号25）を含み、ここでXaaはCysまたはValである。先の局面の任意のもののさらに他の実施形態において、このモチーフは、CCPHAG（配列番号4）、VCPHAG（配列番号5）、VAPHDC（配列番号6）、KAPHDK（配列番号7）、VKPHDG（配列番号8）；KKPHAK（配列番号9）、KAPHEK（配列番号10）、KKPHAC（配列番号11）、VAPHAG（配列番号12）、VKPHAK（配列番号13）、VKPHAC（配列番号14）、VAPHEG（配列番号15）、VKPHEK（配列番号16）、VCPHEK（配列番号17）、CKPH

40

50

A G（配列番号 18）、A C P H A G（配列番号 19）または K C P H D C（配列番号 20）、V K P H D K（配列番号 21）、K K P H A G（配列番号 22）、および C A P H E K（配列番号 23）からなる群より選択される。

【0059】

上記の局面の任意のものの種々の実施形態において、このリゾチームポリペプチドは以下のアミノ酸配列：

【0060】

【化4】

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Xaa Cys Xaa
Xaa Xaa Xaa Glu Ser Xaa Xaa Xaa Thr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
Xaa Xaa Ser Xaa Asp Tyr Gly Xaa Xaa Gln Ile Asn Xaa Xaa Xaa Trp Cys
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Cys
Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Ala Lys Xaa
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Xaa Xaa Trp Xaa Xaa
Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa
Xaa（配列番号 28）

を含み、ここで X a a は任意のアミノ酸であるか、または存在しない。

【0061】

先の局面の任意のものの他の実施形態において、上記の T p 1 7 様ポリペプチドまたは上記のリゾチームポリペプチドあるいはそれらの断片は、生物学的サンプルから単離され、組換えポリペプチドであるか、アフィニティタグに融合されるか、固体支持体（例えば樹脂、ゲル、ビーズ、ウェル、カラム、チップ、膜、マトリックス、プレート、およびフィルターデバイス）に付着されるか、ヒトポリペプチドに由来するか、検出可能に標識される（例えば、フルオロフォア、蛍光タンパク質、発色団、放射性部分、発光性部分および酵素学的に活性な標識で標識される）。なお他の実施形態において、上記リゾチームポリペプチドおよび上記 T p 1 7 様ポリペプチドは、約 0.001～約 1,000,000

【0062】

本発明の組成物および方法は、病原体（例えば、*Treponema pallidum*、*Escherichia coli*（例えば、*E. coli* O157:H7 および *E. coli* K1）、*Pseudomonas aeruginosa*、*Pseudomonas putida*、*Yersinia pestis*、*Shigella flexnerii*、*Treponema denticola*、*Vibrio cholerae*、*Vibrio vulnificus*、*Vibrio parahaemolyticus*、*Chlamydia pneumoniae*、*Staphylococcus aureus*、*Staphylococcus epidermidis*、*Streptococcus pneumoniae*、*Streptococcus agalactiae*、*Streptococcus mutans*、*Streptococcus pyogenes*、*Enterococcus faecalis*、*Bordetella bronchiseptica*、*Bordetella pertussis*、*Bordetella parapertussis*、*Helicobacter hepaticus*、*Salmonella typhimurium*、*Ralstonia solanacearum*、*Xanthomonas campestris*、*Pseudomonas syringae*、*Pasteurella multocida*、*Brucella melitensis*、*Brucella suis*、*Mycobacterium tuberculosis*、*Campylobacter jejuni*、H

elicobacter spp.、*Agrobacterium tumefaciens*、*Moraxella catarrhalis*、*Neisseria meningitidis*、*Neisseria gonorrhoeae*、*Haemophilus influenzae*、*Haemophilus ducreyi*、*Propionobacterium acnes*、*Listeria monocytogenes*、2型単純ヘルペスウイルス、インフルエンザウイルス、TACARIBEウイルス、ブルータングウイルス、チンパンジーサイトメガロウイルス、ヒトサイトメガロウイルス、ヒトパピローマウイルス、デング熱ウイルス、口蹄疫ウイルス、ヒト免疫不全ウイルス、LdMNPV、*Plasmodium falciparum*、*Plasmodium ovale*、*Eimeria tenella*、*Eimeria acervulina*、*Giardia lamblia*、*Plasmodium yoelii*、および *Anopheles gambiae* によって運ばれる病原体) に対する抗体の同定および／または定性に有用である。別の実施形態において、*Mycobacterium paratuberculosis*、エボラウイルス、リフトバレー熱ウイルス、重症急性呼吸器症候群 (SARS) ウイルス、痘瘡ウイルス、*Bacillus anthracis*、*Leishmania* Spp、マイコプラズマ、リケッチア、真菌および酵母のような病原体が検出される。

10

【0063】

別の実施形態において、本発明は、サンプル中の抗病原体抗体を検出するための組成物を提供し、この組成物は (a) TAPHRGLATLYNGDC (配列番号26) または CSPEVGQMDC (配列番号27) のアミノ酸配列を含むポリペプチド、および (b) リゾチームポリペプチドの全長またはその断片を含む。

20

【0064】

1つの実施形態において、リゾチームポリペプチド (A) および Tp17 様ポリペプチド (B) は、約0.001～約1,000,000の間のモル比 (A/B) において存在する。好ましい実施形態では、リゾチームポリペプチド (A) および Tp17 様ポリペプチド (B) は、約0.01～約1,000,000の間のモル比 (A/B) において存在する。別の好ましい実施形態では、リゾチームポリペプチド (A) および Tp17 様ポリペプチド (B) は、約0.1～約1,000,000の間のモル比 (A/B) において存在する。最も好ましくは、リゾチームポリペプチド (A) および Tp17 様ポリペプチド (B) は、約1～約1000、約10～約1000、または約100～約1000の間のモル比 (A/B) にて存在する。

30

【0065】

本発明の方法は、疾患 (例えば、梅毒、HIV感染、陰部ヘルペス、腺ペスト、赤痢、細菌性赤痢、虫歯、*E. coli* 感染、嚢胞性線維症、結核、コレラ、A群またはB群ストレプトコッカス感染症、ブドウ球菌感染症、胃潰瘍、百日咳 (whooping cough)、腸球菌感染症、クラミジア症、ブルセラ症、中耳炎、髄膜炎、インフルエンザ感染、マラリア、B型肝炎ウイルス感染およびC型肝炎ウイルス感染) の診断に用いられる。別の実施形態において、本発明の方法は、サルモネラ症、淋疾、ビブリオ症、大腸菌症、肺炎、気管支炎、重症急性呼吸器症候群 (SARS)、およびリソソーム蓄積症のような細胞質蓄積症の診断に用いられる。

40

【0066】

本発明はまた、サンプル中のリゾチームを検出するための方法であって、このサンプルを Tp17 様ポリペプチドと接触させる工程、およびこの Tp17 様ポリペプチドのこのリゾチームへの結合を検出する工程による方法を提供する。リゾチームの抗菌活性は、Tp17 様ポリペプチドがこのリゾチームへ結合することを許容する条件下で、サンプルとこの Tp17 様ポリペプチドとを接触させることによって減少される。このサンプルは病原体調製物 (例えば、細菌、ウイルス、寄生生物、プラスミド、マイコプラズマ、糸状菌因子 (例えば、真菌および酵母)、およびプリオン調製物) であり得る。このサンプルはまた、リゾチームの汚染をなくすことが必要な物質 (例えば、生物学的サンプル (咽喉吸

50

引物、血液培養（hemoculture）、脳脊髄液）、培養管（culture vessel）、細胞培養物、キュベット、綿棒、臨床的診断装置またはアッセイ物質、医学的機器、流体、水、食物、薬物、インプラント、または移植片）であり得る。

【0067】

本発明の方法はまた、効果的な量のTp17様ポリペプチドを被験体（例えば、ヒトのような動物）に投与することによる、この被験体におけるリゾチームの抗菌活性を減少のためにも用いられ得る。この方法は、正常なレベルを越えて上昇したリゾチーム活性に関連する、癌、感染性疾患、炎症疾患、アルツハイマー病、アミロイド腎症、白血病、クローン病およびアレルギーのような疾患の処置または予防のために用いられる。

【0068】

別の局面において、本発明は、サンプル中の病原体を検出するための組成物を提供し、この組成物は、Tp17様ポリペプチドに結合し得るリガンドまたは結合パートナーを含む。1つの実施形態において、このリガンドは、例えばリゾチームポリペプチド、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、またはFab断片、あるいはDNAまたはRNAのアプタマーを含む。1つの実施形態において、このリガンドは検出分子を含む。

【0069】

別の局面において、本発明は、（1）リガンド（例えばリゾチームポリペプチド）が病原体または病原体ポリペプチドへ結合することを可能にする条件下で、Tp17様ポリペプチドへ結合し得るこのリガンドとサンプルを接触させる工程；および（2）存在する場合、このリガンドが病原体または病原体ポリペプチドへ結合することを検出する工程であって、ここでこのような結合は、サンプル中の病原体または病原体ポリペプチドの存在を示す工程によって、サンプル中の病原体を検出する方法を提供する。1つの実施形態において、このリガンドは、検出分子（例えば、フルオロフォア、蛍光タンパク質、発色団、放射性部分、発光性部分または酵素学的に活性なレポーター）によって標識される。

【0070】

別の局面において、本発明は、Tp17様ポリペプチド、およびこのTp17様ポリペプチドに結合し得るリガンドを備えるキットを提供する。1つの実施形態において、このリガンドは、固体支持体（例えば、樹脂、ビーズ、ウェル、チップ、カラム、ゲル、膜、またはフィルターデバイス）に付着される。好ましい実施形態において、このリガンドはリゾチームポリペプチドである。

【0071】

別の局面において、本発明は、目的のポリペプチドに連結されたTp17様ポリペプチドを含む組換え融合タンパク質を提供する。1つの実施形態において、このTp17様ポリペプチドは、目的のポリペプチドのN末端またはC末端にある。別の実施形態において、このTp17様ポリペプチドは、目的のポリペプチドのN末端またはC末端の間にある。1つの実施形態において、この組換えタンパク質はリゾチーム活性を減少させ得る。本発明はさらに、Tp17様ポリペプチドを目的のポリペプチドに連結することによる組換え融合タンパク質の調製の方法を提供する。なおさらに本発明は、（1）この組換え融合ポリペプチドを含むサンプルを、このポリペプチドがリゾチームへ結合することを可能にする条件下で、リゾチームと接触させる工程；（2）このサンプルを洗浄する工程；および（4）このリゾチームからこの組換え融合ポリペプチドを溶離させる工程によって、目的のポリペプチドのアフィニティ精製のために、この組換え融合タンパク質を用いる方法を提供する。1つの実施形態において、この方法は、このTp17様ポリペプチドから目的のポリペプチドを単離する工程を包含する。1つの実施形態において、このリゾチームは固体支持体に連結される。

【0072】

別の局面において、本発明は、病原体感染に関連する疾患の処置または予防の必要がある被験体に、Tp17様ポリペプチドによる阻害に抵抗性のリゾチームの有効量を投与する工程による、病原体感染に関連する疾患の処置または予防のための方法を提供する。

【0073】

別の局面において、本発明は、病原体感染に関連する疾患の処置または予防の必要がある被験体に、T p 1 7 様ポリペプチドがリゾチームポリペプチドへ結合することを阻害する、効果的な量の試薬を投与する工程による、病原体感染に関連する疾患の処置または予防のための方法を提供する。1つの実施形態において、この試薬は、T p 1 7 様ポリペプチドの、ヒトまたはニワトリのリゾチームのグルタミン酸53への結合、あるいは他の種における対応するアミノ酸への結合を阻害する（番号付けは、登録番号NP__000230において登録された全長ヒトリゾチーム配列を参照する）。別の実施形態において、この試薬はペプチド、化学薬物、抗体、核酸、PNA、低分子干渉RNA、あるいはバクテリオファージ、DNAアプタマーまたはRNAアプタマーである。別の実施形態において、この試薬はリゾチームリガンドである。

10

【0074】

本発明はまた、2型単純ヘルペスウイルス由来のgJ糖タンパク質またはgD糖タンパク質の少なくとも1つを含む処置またはワクチンを提供する。本発明はまた、(a) リゾチームリガンドおよび／または(b) リゾチームポリペプチドを含むワクチンを提供する。

【0075】

「T p 1 7 様ポリペプチド」によって、X a a_n P r o H i s X a a_n コンセンサス配列を含み、そしてリゾチームポリペプチドに結合する能力またはリゾチームの生物学的活性を阻害する能力を有するアミノ酸配列またはその断片を意味する。例示的なT P 1 7 様ポリペプチドは、図1および図2に提供される。T p 1 7 様ポリペプチドとしては、T p 1 7 の全ての改変体、ホモログ、および変異体、その全長または断片、ならびに材料のパートのような上記の任意のものを含む融合タンパク質が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、T P 1 7 様ポリペプチドは、X a a_n P r o H i s X a a_n コンセンサス配列を含み、そしてT P 1 7 (Genbank登録番号29722; 配列番号31) またはその断片と少なくとも50%、75%、85%、95%、または99%同一である。他の実施形態において、「T p 1 7 様ポリペプチド」は、以下のコンセンサス配列：C X (1, 5) [K R H] [A G] [K R H] X (0, 2) [K R] X (0, 1) [E D Q N] C (配列番号178) を含み、リゾチームに結合する。

20

【0076】

「変異T p 1 7 様ポリペプチド」によって、天然に存在する配列の配列と比較して少なくとも1アミノ酸変化を有するT P - 1 7 様ポリペプチドを意味する。このような変化としては、例えば、アミノ酸置換、アミノ酸欠失、またはアミノ酸挿入が挙げられる。いくつかの実施形態において、変異T p 1 7 様ポリペプチドホモログ、変異体、断片、置換および改変は、リゾチームとの結合能力を保持する。1つの好ましい実施形態において、このようなポリペプチドはリゾチームと結合するが、その抗菌活性を阻害しない。図7はポリペプチド変異体の、標的にされ、およびランダムな同定についての例示的な方法を記載する。

30

【0077】

「T p 1 7 様核酸分子」または「変異T p 1 7 様核酸分子」は、それぞれT p 1 7 様ポリペプチドまたは変異T p 1 7 様ポリペプチドをコードする核酸配列を意味する。

40

【0078】

「A P P 様ポリペプチド」によって、リゾチームに結合し、そして以下のコンセンサス配列：C X (1, 5) [K R H] [A G] [K R H] X (0, 2) [K R] X (0, 1) [E D Q N] C (配列番号178) を含むポリペプチドを意味する。

【0079】

「リゾチームポリペプチド」によって、以下のコンセンサス配列

【0080】

【化 5】

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Xaa Cys Xaa Xaa Xaa
 Xaa Glu Ser Xaa Xaa Xaa Thr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Ser
 Xaa Asp Tyr Gly Xaa Xaa Gln Ile Asn Xaa Xaa Xaa Trp Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Xaa
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Ala Lys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 Xaa Xaa Trp Xaa Xaa Trp Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa (配列番号 28)

10

を含み、そして抗菌活性または酵素活性を有するアミノ酸配列を意味する。例示的なリゾチームポリペプチドは図 3 A および図 3 B に記載される。1 つの好ましい実施形態において、リゾチームポリペプチドは、ヒトリゾチーム (Genbank 登録番号 NP_000230、NP_783862、NP_115906、NP_898881、NP_653235、NP_0065159、NP_776246、NP_995328、NP_002280) と少なくとも 50%、75%、85%、95% または 99% 同一である。

【0081】

「変異リゾチームポリペプチド」によって、天然に存在するリゾチームアミノ酸配列と比較して少なくとも 1 アミノ酸変化を含むリゾチームアミノ酸配列を意味する。

20

【0082】

「リゾチーム核酸分子」または「変異リゾチーム核酸分子」によって、それぞれリゾチームポリペプチドまたは変異リゾチームポリペプチドをコードする核酸分子を意味する。

【発明を実施するための最良の形態】

【0083】

(発明の詳細な説明)

一般に、本発明は、病原体 (例えば *Treponema pallidum*) の感染を有する被験体の検出および処置に関連する組成物および方法の特徴とする。下により詳細に記載するように、本発明は、病原体により発現されるポリペプチドである Tp17 が、宿主により発現される抗菌ポリペプチドであるリゾチームと結合してこれを阻害することの発見に部分的に基づく。多くの病原体が Tp17 関連タンパク質を発現するので、宿主の免疫応答を阻害するこの方法は、多数の病原体に渡って保存されるようである。したがって、本発明はこの知見に基づく病原体感染の処置または予防の方法を提供する。さらに、本発明は、Tp17-リゾチーム複合体へ結合する抗体の検出に基づく改善された診断アッセイを提供する。

30

【0084】

(*Treponema pallidum* P17 様ポリペプチド)

本発明の組成物および方法は、*Treponema pallidum* P17 (Tp17) ポリペプチド (Genbank 登録番号 P29722; 配列番号 31) および Tp17 様ポリペプチドを含む。これらのポリペプチドは、図 1 A、図 1 B および図 2 に図示されるように特定の構造的類似性 (本明細書中でひとまとめにして「Tp17 様ポリペプチド」と呼ばれる) および/または機能的な類似 (例えば、リゾチームへの結合能力、あるいはリゾチームの酵素活性または抗菌活性を阻害する能力) を共有する。Tp17 ポリペプチド (配列番号 31) の少なくとも 1 つの領域および可能性のある 2 つの領域がリゾチームと結合する: アミノ酸部位 28~33 のポリペプチド配列 VCPHAG (配列番号 5) およびアミノ酸部位 114~119 のポリペプチド配列 KAPHEK (配列番号 10)。図 1 A および図 2 は、多数の細菌種、ウイルス種、寄生生物種および哺乳動物種に由来する例示的な Tp17 様ポリペプチドのアラインメントをその登録番号と共に提供する。特に、図 2 に示されるアラインメントは、進化的に保存されたコンセンサス配列である

40

50

Xaa_n Pro His Xaa_nを同定し、これは全てのTp17様ポリペプチドに共通する。

【0085】

1つの実施形態において、Tp17様ポリペプチドは、Xaa_n Pro His Xaa_n（配列番号1）のアミノ酸コンセンサス配列を含み、ここでXaaは任意のアミノ酸であるか、存在しないか、またはペプチド結合であり、そしてnは少なくとも1である。

【0086】

別の実施形態において、今図1Aおよび図1Bを参照して、このTp17様ポリペプチドはアミノ酸コンセンサス配列CS1：Cys Xaa₁ Xaa₂ Xaa₃ Pro
His Xaa₄ Xaa₅ Xaa₆ Xaa₇ Xaa₈ Xaa₉ Xaa₁₀
Xaa₁₁ Xaa₁₂ Xaa₁₃ Cys（配列番号2）を含み、ここでXaa₁
、Xaa₂、Xaa₃、Xaa₄、Xaa₅、Xaa₆、Xaa₇、Xaa₈、Xaa₉
、Xaa₁₀、Xaa₁₁、Xaa₁₂またはXaa₁₃は任意のアミノ酸であるか、存在
しないか、またはペプチド結合である。好ましい実施形態において、Xaa₁はLys
、Gly、Ile、Arg、Leu、Ala、Ser、Thr、Gln、Asn、Phe
であるかまたは存在しないか、またはペプチド結合であり；Xaa₂はThr、His、
Cys、Gln、Asn、Ile、Ser、Leuであるかまたは存在しないか、または
ペプチド結合であり；Xaa₃はHis、Lysであるかまたは存在しないか、またはペ
プチド結合であり；Xaa₄はAsn、Gly、Tyr、Leu、Ala、Cys、Glu、Thr、Arg、Met、Pro、Ile、Val、Phe、His、Gln、Lys
であるかまたは存在しないか、またはペプチド結合であり；Xaa₅はHis、Arg
、Asn、Leu、Ser、Lys、Glu、Gly、Pro、Ile、Thr、Cys
、Trp、Val、Gln、Phe、Ala、Aspであるかまたは存在しないか、または
ペプチド結合であり；Xaa₆はVal、Cys、Ala、Asp、Ser、Pro、
Gly、Glu、Lys、Leu、Gln、Ile、Tyr、Arg、Asn、Metで
あるかまたは存在しないか、またはペプチド結合であり；Xaa₇はAsp、Glu、Ala、His、Val、Met、Pro、Lys、Arg、Cys、Asn、Gln、Phe、Leu、Serであるかまたは存在しないか、またはペプチド結合であり；Xaa₈はGly、Asn、Ala、Ile、Arg、Glu、Lys、Thr、Tyr、Pro、Asp、Leu、Serであるかまたは存在しないか、またはペプチド結合であり；Xaa₉はLeu、Arg、Phe、Ile、Ala、Pro、Asn、Gln、Lysであるかまたは存在しないか、またはペプチド結合であり；Xaa₁₀はVal、Thr、Asp、Glu、Tyr、Arg、Ala、Trpであるかまたは存在しないか、またはペプチド結合であり；Xaa₁₁はPro、Asp、Lys、Asn、Gly、Thr、Ileであるかまたは存在しないか、またはペプチド結合であり；Xaa₁₂はIle、Val、Gly、Asp、Asn、Leuであるかまたは存在しないか、またはペプチド結合であり；そしてXaa₁₃はAsp、Glu、Cys、Thrであるかまたは存在しないか、またはペプチド結合である。また、共通なCS1に厳密に適合しない好ましいTp17様ポリペプチドは、関連モチーフCSPEVGQMD C（配列番号27）を有するヒト免疫不全症ウイルス（HIV-1）Intタンパク質、および関連モチーフTAPHRGLATLYNGDC（配列番号26）を有する口蹄疫ウイルス（FMDV）ウイルスタンパク質VP1である（図1A）。

【0087】

別の実施形態において、今図2を参照して、このTp17様ポリペプチドは、アミノ酸コンセンサス配列CS2：Xaa₁ Xaa₂ Pro His Xaa₃ Xaa₄（配列番号3）を含み、ここでXaa₁はCys、Lys、Val、Alaであるかまたは存在しないか、またはペプチド結合であり；Xaa₂はAla、CysまたはLysであり；Xaa₃はAla、AspまたはGluであり、そしてXaa₄はCys、GlyまたはLysである。好ましい実施形態において、このTp17様ポリペプチドはアミノ酸

10

20

30

40

50

配列CCPHAG（配列番号4）、VCPHAG（配列番号5）、VAPHDC（配列番号6）、KAPHDK（配列番号7）、VKPHDG（配列番号8）、KKPHAK（配列番号9）、KAPHEK（配列番号10）、KKPHAC（配列番号11）、VAPHAG（配列番号12）、VKPHAK（配列番号13）、VKPHAC（配列番号14）、VAPHEG（配列番号15）、VKPHEK（配列番号16）、VCPHEK（配列番号17）、CKPHAG（配列番号18）、ACPHAG（配列番号19）またはKC PHDC（配列番号20）、VKPHDK（配列番号21）、KKPHAG（配列番号22）またはCAPHEK（配列番号23）を含む。好ましい実施形態において、このTp17様ポリペプチドはTreponema pallidum P17タンパク質または2型単純ヘルペスウイルス糖タンパク質Jを含む。

10

【0088】

1つの実施形態において、本明細書中で定義される場合、このTp17様ポリペプチドはIvyタンパク質を含まない。別の実施形態において、本発明はCKPHDC（配列番号24）を含むタンパク質を含まない。

【0089】

別の実施形態において、このTp17様ポリペプチドは、Tp17および2型単純ヘルペスウイルスgJタンパク質に共有される、例えばXaa Cys Pro His Ala Gly（配列番号25）（ここで、XaaはCysまたはVal）に対応するコンセンサス配列CS3を含む。

【0090】

20

図7は、ポリペプチド変異体の、標的にされ、およびランダムな同定についての例示的な方法を記載する。

【0091】

（リゾチーム分子）

リゾチームは細菌の細胞壁の加水分解を引き起こす。これは一般に粘膜表面に接触する流体および他の体液において見受けられ、そして細菌の感染に対する防御機構を構成する。この酵素は、N-アセチルムラミン酸の炭素番号1とN-アセチル-D-グルコサミンの炭素番号4との間のグリコシド結合を切断する。インビボにおいて、これらの2つの炭水化物は重合されて細胞壁の多糖を形成する。リゾチームは、4つの保存されたジスルフィド結合を有する、複数ドメインの混合した α および β 折り畳み構造を有する。

30

【0092】

リゾチームはまた、単純ヘルペスウイルス（HSV）および1型HIV（HIV-1）に対する強力な抗ウイルス効果を有する。HSVに感染された細胞単層における合胞体の形成は、鶏卵卵白リゾチームによって阻害される（Cisaniら（1989）Microbios. 59:73-83）。さらに、リゾチームはインビトロアッセイにおけるグリシルリジン酸の抗ヘルペス活性を亢進する（Lampira（2001）Antivir. Chem. Chemother. 12:125-131）。さらに、ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン（hCG）の調製物に見られる抗HIV-1活性は、リゾチームCに部分的に起因していた（Lee-Huangら（1999）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:2678-2681）さらに、Ivyと呼ばれるE. coliタンパク質は、ヒトリゾチームおよびニワトリリゾチームに結合して、これを阻害することが報告された（Monchoisら（2001）J. Biol. Chem. 276:18437-18441）。リゾチームとこのような病原体タンパク質との間の相互作用、およびこれらの作用の機構は先行技術において明白でない。本明細書中に記載されるように、Tp17抗原とリゾチームとの相互作用の特徴づけは、少なくとも部分的に、リゾチームがどのように病原体タンパク質と相互作用し、そしてその活性を阻害するかということの説明を提供する。

40

【0093】

リゾチームのレベルは、健康なコントロールと比べてHSV感染に罹患する患者においてより低く、このことは病原体の感染がリゾチーム生産の減少またはリゾチーム活性の阻

50

害に関連することを示唆する。本発明は少なくとも部分的に、侵入する病原ウイルスにより生産されるタンパク質によってリゾチーム活性がどのように阻害されるかということの説明を提供し、このことは病原ウイルスがリゾチームに対するインヒビターを生産することによってリゾチームによる溶解を避ける機構を示唆する。それゆえ本発明は、インビトロにおけるリゾチーム阻害を軽減するための組成物および方法、ならびにインビボでの病原体感染の予防または処置のための組成物および方法を提供する。

【0094】

本発明の組成物および方法は、ヒトリゾチームおよびそれとの配列類似性を有するポリペプチドを含む。図3Aおよび図3Bは多数の種に由来するリゾチームポリペプチドのアラインメントを提供し、これらの種としては、カモ、ニワトリ、ウズラ、ホロホロチョウ、キジ、クジャク、シチメンチョウ、ヒメシャクケイ、ヤギ、ヒツジ、ウシ、シカ、ブタ、ラット、マウス、イヌ、ウサギ、サル、ミドリザル、アカゲザル、ヒヒ、マーモセット、タマリン、リスザル、ゴリラ、ヒト、オランウータン、テナガザル、オナガザル、ヤセザル、ラクダ、フクロネズミ、マス、ヒラメ、魚類、イヌ、ウマ、ロバ、ハリモグラ、ハト、ツメバケイ、ハマダラカ、カイコガ、アカスジシンジュサン (*cecropia*)、ヤマユガ (*silkmoth*)、キンウワバ、イモムシおよびウェブワームが挙げられる。リゾチームタンパク質のアラインメントは、以下のリゾチームコンセンサス配列を定義し：

【0095】

【化6】

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Xaa Cys Xaa
Xaa Xaa Xaa Glu Ser Xaa Xaa Xaa Thr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
Xaa Xaa Ser Xaa Asp Tyr Gly Xaa Xaa Gln Ile Asn Xaa Xaa Xaa Trp Cys
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Cys
Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Ala Lys Xaa
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Xaa Xaa Trp Xaa Xaa
Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa
Xaa (配列番号28)

ここで、Xaaは任意のアミノ酸であるかまたは存在しない。1つの実施形態において、このリゾチームコンセンサス配列は、配列

【0096】

【化7】

「XkXXRcLaXX\$kXXgXdgyXgXs\$X#WvClaxXESXXnTXatnXnXXXgStDYGifQINsX
yWCndgktpXXXnXCX!XCxSL1Xd#itXaCAKk!vXdXXgXXaWvaWkXhCXgXdlsXyXXg
CXXX」(配列番号32)

を含み、ここでアミノ酸の保存はRisler比較記号(Rislerら(1988)J. Mol. Biol. 204:1019)に従って表される。その表記系において、Xは任意のアミノ酸を表すかまたは存在せず、大文字は100%のアミノ酸保存に対応し、小文字は50%~90%の間を含むアミノ酸保存の値に対応する。さらに、以下の記号を用いて、配列の50%より多くが共有される保存的变化が表される：\$はロイシンまたはメチオニンに対応し、!はイソロイシンまたはバリンに対応し、そして#はアスパラギンまたはアスパラギン酸に対応する。

【0097】

用語「リゾチーム」または「リゾチームポリペプチド」は、その全てのホモログ、変異体、全長または断片、置換、およびそれに対する欠失および付加を含む改変を包含する。1つの実施形態において、リゾチームポリペプチドはTp17様ポリペプチドと結合する

10

20

30

40

50

能力、あるいは他の会合するまたは相互作用する能力を減少する変異を含む。結果として、この変異リゾチームポリペプチドは、病原体によって発現される T p 1 7 様ポリペプチドによる阻害に耐性である。実施例 7 は、阻害耐性リゾチーム変異の標的にされ、およびランダムな同定についての例示的な方法を記載する。外因性のリゾチームは、本発明の方法において用いられるサンプルまたは T p 1 7 様ポリペプチド調製物以外に起因する（例えば、天然に存在しないか、または顕著に低い濃度で存在する）リゾチームである。1つの実施形態において、外因性のリゾチームは、サンプルまたは T p 1 7 様ポリペプチドに加えられて、本発明の組成物および方法を作り出すリゾチームである。

【0098】

（T p 1 7 様ポリペプチドおよびリゾチームのホモログ、変異体および誘導体）

本発明はまた、ホモログ、変異体および誘導体を含む、T p 1 7 様ポリペプチドまたはリゾチームポリペプチドの精製改変体または組換え改変体を提供する。いくつかの例において、組換え変異ポリペプチドは、天然の T p 1 7 様ポリペプチドまたはリゾチームポリペプチドと比較して組換えポリペプチドの生物学的活性を阻害する特異的変異（例えば、ミスセンス変異、挿入、欠失、またはナンセンス変異）を含む。特に有利な T p 1 7 様変異ポリペプチドは、天然に存在するポリペプチドの親和性と等しいかまたはそれを越える親和性でリゾチームに結合するが、リゾチームの抗菌活性（例えば、病原体に発現される多糖を切断する能力）は阻害できない。このような T p 1 7 様変異ポリペプチドは、病原体の感染の処置または予防に有用である。

【0099】

本発明の特に有利な変異リゾチームポリペプチドは、天然のリゾチームと比較して T p 1 7 様ポリペプチドと結合できないか、または結合の減弱を示す（図 3）。好ましくは、結合（例えば、結合の親和性または量）は少なくとも 5 %、10 %、25 %、50 %、75 %、85 %、95 % または 100 % 減弱される。他の有利なリゾチームポリペプチドは、T p 1 7 様ポリペプチドへの結合能力を残すが、このような結合はリゾチームポリペプチドの抗菌活性（例えば、その酵素活性）を阻害しない。

【0100】

特異的な生物学的効果は、T p 1 7 様ポリペプチドまたはリゾチームポリペプチドの参照形態または天然に存在する（すなわち野生型）形態の使用とは相対的に、機能の限られたホモログ、変異体または誘導体（例えば、より副作用が少ないか、またはより治療効力が高い）の使用によって誘起され得る。T p 1 7 様ポリペプチドまたはリゾチームポリペプチドの変異は、変異誘発によって（例えば、不連続の点変異、挿入、欠失または他の改変および変化の導入によって）生成され得る。例えば、天然に生じた変異または実験的に誘導された変異は、その変異ポリペプチドが由来した T p 1 7 様ポリペプチドまたはリゾチームポリペプチドの生物学的活性と実質的に同じ活性、またはその部分集合のみを保持する変異 T p 1 7 様ポリペプチドまたはリゾチームポリペプチドを生成し得る。あるいは、T p 1 7 様ポリペプチドまたはリゾチームポリペプチドのアンタゴニスト形態が生成され得る。このようなアンタゴニストは、天然に存在するリガンドと競合的に結合することによって、天然に存在する T p 1 7 様ポリペプチドまたはリゾチームポリペプチドの機能を阻害する。

【0101】

本発明の T p 1 7 様ポリペプチドまたはリゾチームポリペプチドの精製されたホモログまたは組換えホモログはまた、タンパク質分解性切断に天然に耐性である野生型 T p 1 7 様ポリペプチドまたはリゾチームポリペプチドの天然に存在するホモログを含む。

【0102】

T p 1 7 様ポリペプチドまたはリゾチームポリペプチドはまた、他の化学的部分（例えば、グリコシル基、脂質、ホスフェート、アセチル基など）と共有結合的なまたは凝集的な結合を形成することによって、化学的に改変されて、それぞれ T p 1 7 様ポリペプチド誘導体またはリゾチームポリペプチド誘導体を生成し得る。T p 1 7 様ポリペプチドまたはリゾチームポリペプチドの共有結合的誘導体は、タンパク質のアミノ酸側鎖にある官能

基に、あるいはタンパク質のN末端またはC末端に上記の化学的部分を連結することで調製され得る。

【0103】

Tp17様ポリペプチドまたはリゾチームポリペプチドの構造の改変（例えば、アミノ酸変異）は、治療的効力または予防的効力、安定性（例えば、エキソビボでの有効期間、およびタンパク質分解への耐性）、または翻訳後改変（例えば、タンパク質のリン酸化パターンの変化）を亢進するような目的のためになされ得る。このような改変されたまたは変異のTp17様ポリペプチドまたはリゾチームポリペプチドは、Tp17様ポリペプチドまたはリゾチームポリペプチドの天然に存在する形態の少なくとも1つの活性を保持するように、あるいはその特異的なアンタゴニストを生成するように設計される場合、本明細書中でさらに詳細に記載されるTp17様ポリペプチドまたはリゾチームポリペプチドの機能的等価物と考えられる。このような改変されたTp17様ポリペプチドまたはリゾチームポリペプチドは、例えばアミノ酸の置換、欠失または付加によって生成され得る。置換改変体は、保存的アミノ酸で置換されても、非保存的アミノ酸で置換されてもよい。

【0104】

例えば、イソロイシンまたはバリンによるロイシンの単発的置換、グルタミン酸によるアスパラギン酸の単発的置換、セリンによるトレオニンの単発的置換、または構造的に関連するアミノ酸によるアミノ酸の類似した置換（すなわち、等配電子のおよび／または等電点の変異）が、結果として生じる分子の生物学的活性に大きな影響を有しないと预期することは妥当である。保存的な置換は、その側鎖において関連するアミノ酸のファミリー内で起きる置換である。一般的にコードされるアミノ酸は4つのファミリーに分けられる：（1）酸性＝アスパラギン酸、グルタミン酸；（2）塩基性＝リジン、アルギニン、ヒスチジン；（3）非極性＝アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン；および（4）電荷を持たない極性＝グリシン、アスパラギン、グルタミン、システイン、セリン、トレオニン、チロシン。同様の様式で、アミノ酸レパートリーは、（1）酸性＝アスパラギン酸、グルタミン酸；（2）塩基性＝リジン、アルギニン、ヒスチジン、（3）脂肪族＝グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、セリン、トレオニン（セリンおよびトレオニンは必要に応じて別に水酸化脂肪族に分類される）；（4）芳香族＝フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン；（5）アミド＝アスパラギン、グルタミン；および（6）硫黄含有＝システインおよびメチオニンとして分類され得る。ペプチドのアミノ酸配列における変化が、結果として機能を有するTp17様ポリペプチドホモログまたはリゾチームポリペプチドホモログ（例えば、結果として生じたポリペプチドが野生型を模倣するまたはこれと拮抗するという意味における機能性）を生じるかどうかは、改変ペプチドが野生型タンパク質と類似した様式でアッセイまたは細胞において反応を生じる能力、またはこのような反応を競合的に阻害する能力を評価することによって容易に決定され得る。1つ以上の置換が生じたポリペプチドは、同様の様式で容易に試験され得る。このようなホモログを試験するために有用なアッセイおよび試薬は、明細書を通して例示される。

【0105】

したがって、用語「ポリペプチド」は天然に存在するペプチドまたはタンパク質、および合成的にまたは組換え的に産生されたペプチドまたはタンパク質を含む。このポリペプチドは任意の長さのアミノ酸鎖を包含し得、ここでこのアミノ酸残基は共有結合的なペプチド結合によって連結される。しかし、アミノ酸および／またはペプチド結合が機能的なアナログによって置換された、このようなポリペプチドのペプチド模倣物もまた本発明に包含される。本発明に基づけば、アミノ酸は天然に存在しないアミノ酸アナログを包含する。

【0106】

本発明はさらに、Tp17様ポリペプチドまたはリゾチームポリペプチドのコンビナトリアル変異体および短縮（truncation）変異体の組み合わせの生成のための方法を企図し、そして可能性のある改変体配列（例えばホモログ）を同定するために特に有

用である。このようなコンビナトリアルライブラリーのスクリーニングの目的は、例えば、アゴニストまたはアンタゴニストのいずれかとして作用し得るか、あるいは全体で新規の活性を有する、新規の変異Tp17様ポリペプチドまたは変異リゾチームポリペプチドを生成することである。したがって、コンビナトリアル法により誘導される変異ポリペプチドは、生成されて、このポリペプチドの天然に存在する（野生型）形態と比較して増加した効力を有し得る。

【0107】

別の実施形態において、本発明は単離されたTp17様ポリペプチドまたはリゾチームポリペプチドを、好ましくは実質的に純粋な調製物（例えば、体液由来、または組換え的に生成されたポリペプチド）を特徴とする。Tp17様ポリペプチドまたはリゾチームポリペプチドは全長のポリペプチドを含んでも、1つ以上の特定のモチーフ／ドメインに対応するより小さい断片を含んでも、例えば長さが少なくとも約5アミノ酸、約6アミノ酸、約7アミノ酸、約8アミノ酸、約9アミノ酸、約10アミノ酸、約11アミノ酸、約12アミノ酸、約13アミノ酸、約14アミノ酸、約15アミノ酸、約20アミノ酸、約25アミノ酸、約50アミノ酸、約75アミノ酸、約100アミノ酸、約125アミノ酸、約148アミノ酸の断片を含んでもよい。

【0108】

ペプチドは固相技術を用いた直接的なペプチド合成によって生成され得る（例えば、Stewartら（1969）Solid Phase Peptide Synthesis、WH Freeman Co. San Francisco; Merrifield（1963）J. Am. Chem. Soc. 85:2149-2154）。インビトロのタンパク質合成は、例えば、TnT（登録商標）キット（Promega、Madison、WI）またはRTSキット（Roche Applied Science、Barcelona、Spain）を用いた、または、例えばApplied Biosystems 431A Peptide Synthesizer（Perkin Elmer、Foster City、CA）を製造業者の指示書に従って用いる、自動化されたアプローチを用いた、インビトロの組み合わせられた転写および翻訳によって行われ得る。ペプチドは1つ以上の方法によって作られて、そして化学的に結合されて全長分子を生成してもよい。

【0109】

Tp17のリゾチーム結合部位、および多数の病原体由来Tp17様ポリペプチドに共有される結合部位のコンセンサス配列の特徴付けが活用されて、リゾチームポリペプチド／Tp17様ポリペプチドの結合のインヒビター、ならびに、多数の病原体による疾患または変化されたリゾチーム活性によって特徴付けられる疾患のための診断（例えばプローブ）、予防および処置としてそれらを作りそして用いる方法を提供し得る。また、本発明はリゾチームの天然の改変体および遺伝的に改変された改変体（ホモログ、変異体および誘導体を含む）、およびそれらを作る方法を提供し、ここでこれらの改変体はTp17様ポリペプチドに結合し得ず、例えばペプチドグリカン結合および加水分解（例えば、それによってTp17様ポリペプチドによる阻害を逃れる）のような他のリゾチーム機能を保持する。これらの非野生型リゾチーム（ホモログ、変異体および誘導体を含む）は、梅毒、AIDSおよび陰部ヘルペスを含む多くの病原体による疾患の処置または予防のために用いられ得る。

【0110】

本発明はまた、変化されたリゾチーム結合配列を有するTp17様変異ポリペプチド、および変化されたTp17様ポリペプチド結合配列を有する変異リゾチームポリペプチドを提供する。好ましくは、これらの変異ポリペプチドは変化した結合親和性を示す。特に好ましいのは、天然のTp17様ポリペプチドと比較してリゾチームへの結合が増加した（例えば、5%、10%、25%、50%、75%または100%）Tp17様変異ポリペプチドである。このような変異ポリペプチドは、リゾチームへの結合について天然のTp17様ポリペプチドと競合する。最も好ましいのは、リゾチームと少なくとも天然の親

和性を以て結合するが、リゾチームの抗菌活性（例えば酵素活性）を阻害しないTp17様変異ポリペプチドである。特に好ましいリゾチーム変異ポリペプチドは、Tp17関連ポリペプチドへの結合を減弱する（例えば、5%、10%、25%、50%、75%または100%）かまたは除去した、変化された結合部位を有する。他の好ましいリゾチーム変異ポリペプチドはTp17関連ポリペプチドに結合するが、このような結合はリゾチームの抗菌活性を減少も除去もしない。

【0111】

Tp17関連ポリペプチドまたはリゾチームポリペプチドにおける他の変化は、例えば部位特異的変異誘発またはコンビナトリアル生化学によってもたらされるような、インビトロまたはインビボの機能を変化させる。例えば、ペプチドグリカンへの結合能力を失ったが、Tp17様ポリペプチドへの結合能力を保持するリゾチーム改変体が提供される。

10

【0112】

本発明はさらに、目的のポリペプチドとの融合ポリペプチドを生成するために用いられ得るTp17様ポリペプチドを提供し、これはリゾチーム（例えば、固体支持体（例えば、樹脂、ビーズ、ウェル、チップ、カラム、ゲル、膜またはフィルターデバイス）に結合される）を用いて安価にアフィニティ精製され得る。

【0113】

本発明により提供される配列情報はまた、リゾチームをプローブとして用いるTp17様ポリペプチドの同定、またはTp17様ポリペプチドをプローブとして用いるリゾチームの同定のための特異的なプローブを提供する。さらに、標準的な方法を用いてこれらの結合部位を定義する配列に対して、抗体が惹起され得る。

20

【0114】

（病原体感染検出方法を改良するための方法）

本発明はまた、サンプルにおける抗病原体抗体の改良された検出（例えば、病原体感染の診断として）のための方法および組成物を提供する。このような診断方法の例は特に梅毒に関連し得るが、当業者はこのような方法がTp17様ポリペプチドを産生する実質的に任意の病原体に対する免疫応答を検出するために一般的に有用であることを理解する。本発明の診断方法は、とりわけリゾチームを含む試薬を用いたサンプル中における抗病原体抗体の検出を包含する。実施例8は、抗Tp17様ポリペプチド抗体についての例示的な梅毒アッセイの記載を提供する。上の方法および他の方法が、下記でさらに詳細に考察される。

30

【0115】

いかなる特定の理論とも結び付けられることなく、梅毒の被験体は、単離されたTp17タンパク質に対してだけでなく、Tp17ポリペプチド／リゾチーム複合体に対しても免疫応答を発生するようである。このような被験体由来する生物学的サンプルをリゾチームと接触させることは、Tp17／リゾチーム複合体を認識する抗体の検出を可能にし、梅毒診断アッセイの感度を増加させる。同様に、Tp17様タンパク質／リゾチーム複合体を認識する抗体の検出を包含する任意の病原体の診断方法は、そのアッセイ試薬にリゾチームを含めることで亢進される。好ましくは、アッセイ試薬へのリゾチームの添加は、診断方法の感度を、標準の診断方法と比較して少なくとも5%、10%、25%、50%、75%あるいは85%または95%も増加させる。

40

【0116】

（抗病原体抗体の検出のための組成物および方法）

本発明は、細菌性病原体（例えば、*Treponema pallidum*、*Escherichia coli*、*Pseudomonas aeruginosa*、*Pseudomonas putida*、*Yersinia pestis*、*Shigella flexneri*、*Treponema denticola*、*Vibrio cholerae*、*Vibrio vulnificus*、*Vibrio parahaemolyticus*、*Chlamydia pneumoniae*、*Staphylococcus aureus*、*Staphylococcus epidermidis*、*Str*

50

eptococcus pneumoniae, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus pyogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Bordetella bronchiseptica*, *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis*, *Helicobacter hepaticus*, *Salmonella typhimurium*, *Ralstonia solanacearum*, *Xanthomonas campestris*, *Pseudomonas syringae*, *Pasteurella multocida*, *Brucella melitensis*, *Brucella suis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Campylobacter jejuni*, *Helicobacter* 類、および *Agrobacterium tumefaciens*, *Moraxella catarrhalis*, *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus ducreyi*, *Propionibacterium acnes*, *Listeria monocytogenes* の存在、これらによる感染、またはこれらに対する免疫応答（例えば、体液性免疫応答）を示すサンプルにおける抗病原体抗体の検出のための組成物および方法を提供する。さらに、この組成物はウイルス性病原体（例えば、コクサッキーウイルス、2型単純ヘルペスウイルス、A型インフルエンザウイルス、TACARIBEウイルス、ブルータングウイルス、チンパンジーサイトメガロウイルス、B型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス、ヒトサイトメガロウイルス（HCMV）、ヒトパピローマウイルス、デング熱ウイルス、東部ウマ脳炎ウイルス、口蹄疫ウイルス（HMD）、ヒト免疫不全ウイルス、風疹ウイルス、および LdMNPV）の存在、これらによる感染、またはこれらに対する免疫応答（例えば、体液性免疫応答）を検出するために用いられる。さらに、この組成物は寄生物（例えば、*Plasmodium falciparum*, *Plasmodium ovale*, *Eimeria tenella*, *Eimeria acervulina*, *Giardia lamblia*, *Plasmodium yoelii* および *Anopheles gambiae* によって運ばれる病原体）の存在、これらによる感染、またはこれらに対する免疫応答（例えば、体液性免疫応答）を検出するために用いられる。さらに、この組成物はパラ結核菌、エボラウイルス、リフトバレー熱ウイルス、重症急性呼吸器症候群（SARS）ウイルス、痘瘡ウイルス、*Bacillus anthracis*, *Leishmania* 類、マイコプラズマ、リケッチア、真菌または酵母の存在、これらによる感染、またはこれらに対する免疫応答（例えば、体液性免疫応答）を検出するために用いられる。このような抗体は、例えば Tp17 様ポリペプチド、リゾチームポリペプチド、Tp17 様ポリペプチド／リゾチームポリペプチド複合体、またはそれらの断片に結合する抗体を検出するアッセイによって同定される。

【0117】

Tp17 様ポリペプチドまたはリゾチームポリペプチドはアフィニティタグ（例えば、グルタチオンS-トランスフェラーゼ（GST）、6-ヒスチジンテール（HIS）、マルトース結合タンパク質、エラスチン様ペプチド、または Strep-Tag（IBA, Goettingen, Germany））を含み得る。Tp17 様ポリペプチド、リゾチーム、および／または Tp17 様ポリペプチドーリゾチーム複合体は、固体支持体（例えば、樹脂、ビーズ、ウェル、チップ、カラム、ゲル、膜、マトリックス、プレートまたはフィルターデバイス）に付着され得る。複数のウェルのプレートまたはマイクロチップの使用は、多数のサンプルの大規模な試験や、あるいは単一のサンプルを二連で試験するため、または多数の病原体因子の存在を試験するために有用である。

【0118】

1つの実施形態において、本発明の方法は、存在する場合、サンプルに存在する抗病原体抗体の（i）Tp17 様ポリペプチド単独；（ii）リゾチーム単独；または（iii）Tp17 様ポリペプチドーリゾチーム複合体への結合を検出する工程を包含する。1つ

の実施形態において、この方法は（a）サンプル中の抗体のTp17様ポリペプチドへの結合を許容する条件下において、サンプルをこのTp17様ポリペプチドと接触させる工程；および（b）抗体のリゾチームへの結合を許容する条件下において、このサンプルをこの実質的に純粋な外因性のリゾチームに接触させる工程を包含する。このTp17様ポリペプチドおよびリゾチームは互いに結合されても、さもないと抗体がTp17様ポリペプチドおよびリゾチームの双方（例えば、Tp17様ポリペプチドおよびリゾチームの複合体）に結合し得るように会合されても良い。Tp17様ポリペプチド、リゾチームまたはこれらの複合体への抗体の結合は、15～25℃、またはこの抗体のTp17様ポリペプチドおよび／またはリゾチームへの結合を許容する任意の温度で起き得る。

【0119】

好ましい実施形態において、このアッセイは凝集アッセイ（例えば、実施例8および実施例9において記載されるように行われる血球凝集アッセイ）である。この凝集アッセイにおいて用いられるキャリア粒子は、例えば赤血球であっても、タンパク質凝集粒子であっても、ポリマー性粒子であっても、無機粒子であっても、常磁性粒子であっても、酵母細胞であってもよい。好ましい実施形態において、血球凝集はリゾチームの添加によって、少なくとも約0.1～約20倍の、約0.3～約10倍の、または約1～約10倍の、例えば、好ましくは少なくとも約3倍亢進される。このリゾチームは、アッセイサンプルが得られた被験体（例えば、ヒト）と同じ種に由来し得る。このリゾチームはTp17様ポリペプチド試薬、希釈緩衝液、またはアッセイにおいて用いられる任意の試薬または容器に加えられ、そして任意の時点で、一回でまたは何回かに分けて、例えば、アッセイの試薬の残りまたは容器にサンプルが接触する前、間あるいは後に加えられ得る。特定の実施形態において、外因性のリゾチームが約1fg/ml～約999mg/mlの範囲の濃度で存在する。リゾチームは約1ng/ml～約999μg/mlの範囲の濃度（例えば、1、10、25、50、100、250、500または1000ng/ml、あるいは1、10、25、50、100、250、500または1000μg/ml）で存在する。

【0120】

別の実施形態において、抗病原体抗体はELISAアッセイを用いて検出される。ELISAアッセイを実行するための方法は当該分野において周知である。手短かに言うと、サンプル中のTp17様ポリペプチドに対する抗体の存在を検出するために、例えばELISAプレートのような固相が、Tp17様ポリペプチド単独、Tp17様ポリペプチドおよびリゾチームの組み合わせ、またはリゾチーム単独で、プレート上の別々のウェルにコーティングされる。洗浄した後、抗Tp17様ポリペプチド抗体、抗Tp17様ポリペプチド-リゾチーム複合体抗体、および／または抗リゾチーム抗体を含み得るサンプルがウェルに加えられる。このサンプルはELISAプレートのいくつかのウェルに適用され得、そして抗Tp17様ポリペプチド抗体の二次結合パートナー（例えば、検出可能な標識を有するウサギ抗ヒトIgG）を用いて、あるいは三次抗体または検出試薬（例えば、ストレプトアビジン-ビオチン、あるいは標識されたプロテインAまたはプロテインG）を用いて、直接的な標識（適切である場合）を介して検出される。あるいは、検出はまた標識されたTp17様ポリペプチドを用いて達成され得る。特異的抗体が区別をつけて標識される場合、1種類より多い抗体の検出が同じサンプル中で（例えばELISAプレートの同じウェル中で）起き得る。このことは、例えば異なるUV吸収極大を有する色素を用いて、独立して定量され得る異なる信号を生成する標識の使用を通して達成され得る。さまざまに処理されたウェルについてのELISA値は比較されて、Tp17様ポリペプチド単独、Tp17様ポリペプチド-リゾチーム複合体、および／またはリゾチーム単独に対する抗体の存在を決定し得る。本明細書中で記載される任意のイムノアッセイは、標準の方法に従って、その同族の抗体に結合し得るTp17様ポリペプチド-リゾチーム複合体を、液相または固相のいずれかで作製するリゾチームの使用によって、Tp17様ポリペプチドおよびTp17様ポリペプチド-リゾチーム複合体に対する抗体の検出の実行において用いられ得る。

【0121】

特定の理論に限定することなく、このリゾチームがTp17様ポリペプチドとの複合体を形成し、それによって、Tp17-リゾチーム複合体だけに結合し、Tp17様ポリペプチド単独には結合しない抗体との結合のための基質を形成するので、このアッセイはリゾチームの添加によって亢進されるようである。したがって、このアッセイにリゾチームを添加することで、Tp17様ポリペプチド単独、リゾチーム単独またはその複合体を指向する抗体がサンプル中で検出される（図4）。

【0122】

本発明の1つの実施形態において、このアッセイは、リゾチームのTp17様ポリペプチドへの結合が拡充されるように、ペプチドグリカン結合活性を有さない天然の精製されたリゾチームまたは組換えリゾチーム（例えばリゾチーム変異体）を用いて達成され得る。この選択的結合は、例えば、リゾチームの部位特異的変異誘発、または、例えば実施例7に記載されるような当該分野で公知の他の方法によって達成され得る。

【0123】

別の実施形態において、このリゾチーム分子は変化されて、Tp17様ポリペプチドへの結合能力を除かれ得、結果として生じた変異体はTp17様ポリペプチドによる阻害に耐性となり得る。このような変異体は、Tp17様ポリペプチド毒性因子を備える病原体に対する亢進された抗菌活性を示し得る。アセチルムラミダーゼ活性および／または抗菌活性が影響されないように選択された、リゾチームコード配列に局在された変異はリゾチーム／インヒビター相互作用を不安定化し、そして病原体タンパク質（例えば、T. pallidum Tp17抗原またはIvyファミリーのメンバー）による阻害に対する耐性を与える。このような変異リゾチームは、感染性疾患の処置のための新規かつ興味深い組成物を表す。さらに、それらの増進された効力および活性スペクトルによって、それらは市販される薬用調製物において現在用いられるニワトリリゾチームよりも優れている。

【0124】

（インビトロにおけるリゾチーム活性を阻害するための組成物および方法）

別の局面において、本発明は、サンプルをTp17様ポリペプチドまたはその断片に接触させることによってサンプル中のリゾチーム活性を減少させるための組成物および方法を提供し、ここで、このTp17様ポリペプチドはサンプル中のリゾチームに結合してリゾチーム活性を阻害する。この処置は、リゾチームの不活性化または中和を必要とする任意のサンプル（例えば、ヒトへの投与のための薬学的流体の調製、細胞培養物流体、食物、薬物、水、あるいは他の摂食のための流体または因子、インプラント、移植片、あるいはリゾチームが望ましくないまたは有害である任意の他の調製物）にとって有用である。本発明の組成物および方法は、例えば給水の小規模または大規模な処理に適する。この組成物および方法は、リゾチームの汚染が無いと考えられる材料、またはリゾチーム活性の阻害が望まれる物質（例えば、生物学的サンプル、培養容器、キュベット、綿棒、臨床的診断装置またはアッセイ物質、医療用装置、細胞培養物、咽喉吸引物、脳脊髄液（cerebrospinal fluid）サンプルまたは血液培養（hemoculture））のリゾチームを阻害するために用いられ得る。いくつかの実施形態において、このTp17様ポリペプチドまたはリゾチーム結合断片は固体支持体に固定され、そしてサンプル中に存在するリゾチームはTP17様ポリペプチドに結合される。

【0125】

1つの実施形態において、反芻動物の噴門洞由来の物質は、本発明の方法および組成物を用いて試験されても処理されてもよい。この物質としては、例えば細菌、酵母、カビ、および原生動物細胞が挙げられる。このフロラは反芻動物における栄養素の分解および同化を制御する。1つの実施形態において、Tp17様ポリペプチドによるリゾチームの阻害、またはリゾチームによるTp17様ポリペプチドの阻害は、栄養素の同化速度変更し得、そして特定の状況において有利であり得る。

【0126】

このサンプルはまた、病原体抽出物の回収が細胞溶解の阻害によって亢進されるような

細菌性サンプルであり得る。

【0127】

さらに、前もって決定された配列のTp17様ポリペプチドの存在下においてリゾチームが細菌の細胞溶解を阻害し得る程度を決定することによる細菌の同定について、本発明は有用である。例えば、本発明の方法はHSV-1の感染とHSV-2の感染とを区別するために用いられ得る（実施例6を参照のこと）。

【0128】

（インビトロにおけるリゾチーム活性を減少させる方法）

Tp17様ポリペプチド上のリゾチーム結合モチーフの同定はまた、動物（例えば、哺乳動物、鳥類または魚類）におけるリゾチーム活性の阻害、不活性化または中和のための組成物および方法（例えば、ワクチンを含む治療的なものまたは予防的なもの）を提供する。リゾチーム結合モチーフを含むTp17様ポリペプチドは、Tp17様ポリペプチドのリゾチームへの結合をブロックするために用いられ得る。それゆえ本発明は、効果的な量のTp17様ポリペプチドを投与することによって動物におけるリゾチーム活性を減少させる方法を提供する。このような方法は、疾患（例えば、癌、感染性疾患、炎症疾患、アルツハイマー病、アミロイド腎症、白血病、クローン病およびアレルギー）の処置または予防に用いられ得る。

【0129】

（病原体およびTp17様ポリペプチドのリガンドの検出のための方法）

本発明の組成物および方法はまた、サンプルにおける病原体の検出のために用いられ得る。Tp17様ポリペプチドに結合し得るリガンドを含む組成物（例えばリゾチームポリペプチド、またはリゾチーム結合に競合し得る分子）が用いられ得る。あるいは、このリガンドはモノクローナル抗体であっても、ポリクローナル抗体であっても、Tp17様ポリペプチドに結合するFab断片であってもよい。

【0130】

このリガンドは直接的に検出され得、例えば検出分子（例えば、フルオロフォア、蛍光タンパク質、発色団、放射性部分、発光性部分あるいは酵素学的に活性なリポーターまたは標識）に連結される。例示的な検出分子は当該分野で周知であり、例えばフルオレセイン結合体、西洋ワサビペルオキシダーゼ結合体、アルカリホスファターゼ結合体およびイソルミノール結合体である。本発明のこの実施形態において、サンプルはリゾチームと、または他のTp17様リガンドと、このリガンドの病原体または病原体ポリペプチドとの結合を許容する条件下において接触され、そして存在する場合このリゾチームの病原体または病原体ポリペプチドとの結合が検出される。このような結合は、サンプル中の病原体または病原体ポリペプチドの存在を示し得る。

【0131】

本発明の組成物および方法はまた、サンプル中におけるリゾチームの存在を検出するために有用である。サンプルはTp17様ポリペプチドと接触され、そしてサンプル中におけるTp17様ポリペプチドのこのリゾチームとの結合が検出される。

【0132】

（キット）

本発明の組成物および方法は、Tp17様ポリペプチド、リゾチームおよびそのリガンド（ligand therefore）のうちの少なくとも1つを含む診断キットまたは治療キットに包含され得る。Tp17様ポリペプチドまたはリゾチームポリペプチドの投与、アッセイまたは精製に必要なまたは有用な試薬（例えば、反応容器（例えば、固体支持体、樹脂、ビーズ、ウェル、チップ、カラム、ゲル、膜およびフィルターデバイスを含む）、コントロール標準または使用説明書）がまたこのキットに含まれ得る。このような診断キットまたは治療キットは、病原体感染（例えば、梅毒またはヘルペス）の診断または処置、あるいはアルツハイマー病のために有用である。

【0133】

（融合ペプチドおよびアフィニティークロマトグラフィー）

本発明のT p 1 7様ポリペプチドまたはその断片は、リゾチームポリペプチド（例えば、固体支持体（例えば、カラム）に連結された）を用いたアフィニティクロマトグラフィーにおける使用のためのアフィニティタグとして有用である。それゆえ本発明は、第二のポリペプチド配列にペプチド結合で連結された第一のポリペプチド配列を含む組換え融合タンパク質（例えば、T p 1 7融合タンパク質）を提供し、ここで第一のポリペプチド配列はT p 1 7様ポリペプチドを含み、そして第二のポリペプチド配列は目的のアミノ酸配列を含む。1つの実施形態において、第一のポリペプチド配列は第二のポリペプチド配列に天然には連結されない。このT p 1 7様ポリペプチドは、目的のポリペプチドをリゾチームアフィニティカラムに結合させるために用いられる精製カセットとして作用する。この精製カセットは分子の任意の部分（例えば、目的のポリペプチドのN末端またはC末端）に位置し得る。あるいは、この精製カセットはN末端とC末端との間に位置し得る。この組換え融合ポリペプチドは、第一のポリペプチド配列をペプチド結合によって第二ポリペプチド配列に連結することで調製され、ここで第一のポリペプチド配列はT p 1 7様ポリペプチド精製カセットを含み、そして第二のポリペプチド配列は目的のアミノ酸配列を含む。次いでこのT p 1 7融合タンパク質は、T p 1 7様ポリペプチドのリゾチームとの結合を許容する条件下において、T p 1 7融合タンパク質を含むサンプルをリゾチームと接触させることで、目的のポリペプチドを精製するための方法において用いられる。次いで形成された複合体は洗浄され、そしてこのT p 1 7融合タンパク質はリゾチームから分離され、そして目的のタンパク質が当該分野で周知の方法に従ってこの精製カセットから単離され得る。1つの実施形態において、このT P 1 7様ポリペプチド断片は、少なくともリゾチーム結合コンセンサス配列（例えば、配列番号1）を含む5、10、15、20、25、50、75または100アミノ酸の断片である。

【0134】

（他の疾患の処置または予防の方法）

リゾチームポリペプチドは、変異の存在に起因して少なくともいくつかのT p 1 7様ポリペプチドに結合しない（例えば、リゾチーム機能の阻害）ことが提供される。これらの変異は、リゾチームの触媒作用活性に影響しない残基を標的とされる。このような変化されたリゾチームポリペプチドは標準の方法（例えば、本明細書中で記載される、部位特異的変異誘発またはランダムな変異誘発）によって作製される。このようなリゾチームは、T p 1 7様ポリペプチドによる阻害の回避に有用であり、そして病原体感染の予防または処置に用いられ得る。本発明はまた、T p 1 7様ポリペプチドに結合し得ない効果的な量のリゾチームポリペプチドを投与することによって病原体感染を阻害するための方法を提供する。

【0135】

本発明はまた、リゾチームインヒビター（例えばT p 1 7様ポリペプチド）のリゾチームのE 5 3（番号付けは、登録番号NP__000230として受託された全長ヒトリゾチーム配列を参照する）への結合を阻害する試薬の同定のための方法を提供する。好ましい実施形態において、この試薬はポリペプチド、化学物質、薬物、抗体、核酸、アプタマーまたはPNAである。例えば、このインヒビターはT p 1 7様ポリペプチドのリゾチームのE 5 3への結合を妨げる任意のこのような分子である。

【0136】

（スクリーニングアッセイ）

上に記載されるように、T p 1 7様ポリペプチドのリゾチームポリペプチドへの結合は、リゾチームの抗菌活性を阻害し得る。この知見に基づき、本発明の組成物は、T p 1 7様ポリペプチドとリゾチームポリペプチドとの間の結合を増強するまたは減弱させる候補化合物の同定のための、このような候補化合物のハイスループットかつ低コストなスクリーニングのために有用である。かなり多数の方法が、T p 1 7様ポリペプチドおよびリゾチームポリペプチドの結合を調節する新たな候補化合物の同定のためのスクリーニングアッセイを行うために、本発明によって利用可能であり、そして企図される。

【0137】

1つの実施形態において、候補化合物は、Tp17様ポリペプチドまたはリゾチームポリペプチドと特異的に結合するものについてスクリーニングされる。このような候補化合物の効力は、このようなポリペプチドまたはその機能的に同等なものと相互作用する能力に依存する。このような相互作用は、かなり多数の標準の結合技術および機能的アッセイ（例えば、Ausubelら、前出に記載されるもの）を用いて容易にアッセイされ得る。1つの実施形態において、候補化合物は、本発明のポリペプチドに特異的に結合する能力についてインビトロで試験され得る。別の実施形態において、候補化合物は、本明細書中に記載されるリゾチームポリペプチドの生物学的活性を亢進する能力について試験される（例えば、Tp17様ポリペプチドまたはリゾチームポリペプチド）。Tp17様ポリペプチドおよび／またはリゾチームポリペプチドにおける、この候補化合物の生物学的活性的影響は、当業者に公知の任意の標準的な方法（例えば、実施例3に記載されるアッセイ）を用いてアッセイされる。

10

【0138】

1つの特定の実施例において、Tp17様ポリペプチドまたはリゾチームポリペプチドに結合する候補化合物は、クロマトグラフィーに基づく技術を用いて同定される。例えば、本発明の組換えポリペプチドは、このポリペプチドを発現するように工作された細胞（例えば、本明細書中に記載されるもの）から標準の技術を用いて精製され得、そしてカラムに固定化され得る。次いで候補化合物の溶液がカラムを通り、Tp17様ポリペプチドまたはリゾチームに特異的に相互作用する化合物は、そのポリペプチドに結合し、そしてカラムに固定化される能力に基づいて同定される。この化合物を単離するために、カラムが洗浄されて非特異的結合した分子を除き、次いで目的の化合物がカラムから放出され、そして収集される。同様の方法がポリペプチドマイクロアレイ（例えば、複数のTp17様リゾチーム結合モチーフを含むアレイ）に結合する化合物を単離するために用いられ得る。この方法（または任意の他の適切な方法）により単離される化合物は、必要に応じて、さらに精製される（例えば、高速液体クロマトグラフィーによって）。さらに、これらの候補化合物は、Tp17様ポリペプチドとリゾチームポリペプチドとの間の結合を調節する能力について試験され得る。結合は、例えば複合体化された分子の数を増加または減少させることで、結合親和性を変化させることで、複合体が形成する可能性を変化させることで、または結合について分子の一方または双方と競合することで、変化され得る。他の実施形態において、この化合物はリゾチームの抗菌活性を増強する能力についてアッセイされる。さらに他の実施形態において、この化合物は、CX(1, 5) [KRH] [AG] [KRH] X(0, 2) [KR] X(0, 1) [EDQN] C共通モチーフを含むポリペプチド（例えばβ-アミロイド前駆体タンパク質）とリゾチームポリペプチドとの間の相互作用を調節する能力についてアッセイされる。

20

30

【0139】

このアプローチにより単離された化合物は、例えば、ヒト患者における病原体感染、リゾチーム障害またはアルツハイマー病を処置するための治療として用いられ得る。本発明のポリペプチドと、10mM以下の親和力定数（affinity constant）で結合するように同定された化合物は、本発明において特に有用であると考えられる。あるいは、任意のインビボタンパク質相互作用検出系（例えば、任意のツーハイブリッドアッセイ）が利用され得る。潜在的なアゴニストおよびアンタゴニストとしては、本発明の核酸配列またはポリペプチド（例えば、Tp17関連ポリペプチドまたはリゾチームポリペプチド）と結合する有機分子、ペプチド、ペプチド模倣物、ポリペプチド、核酸、および抗体が挙げられる。Tp17様ポリペプチドのリゾチーム阻害によって特徴付けられる障害（例えば、病原体感染）を有する患者のためには、Tp17様ポリペプチドのリゾチームへの結合を阻害する、あるいはリゾチームの抗菌活性または酵素活性を亢進する化合物が特に有用である。過剰なリゾチーム活性によって特徴付けられる障害を有する患者のためには、リゾチームと結合して、そしてその活性を阻害する、またはTp17様ポリペプチドとリゾチームとの間の結合を亢進する化合物が特に有用である。

40

【0140】

50

本明細書に記載されるTp17様ポリペプチドおよびリゾチームポリペプチドをコードするDNA配列はまた、病原体感染、リゾチーム障害、またはアルツハイマー病を有する患者の処置のための治療的化合物の発見および開発に用いられ得る。このコードされたタンパク質は、発見によって、薬物のスクリーニングの標的として用いられ得る。必要に応じて、上に記載した任意のアッセイにおいて同定された化合物は、Tp17様ポリペプチドとリゾチームポリペプチドとの間の結合を調節する、またはリゾチームポリペプチドの活性を調節する化合物についてのインビボでのアッセイにおいて有用であるとして確認され得る。本発明の小さな分子は好ましくは2000ダルトン未満の、より好ましくは300~1000ダルトンの、最も好ましくは400~700ダルトンの分子量を有する。これらの小さな分子は有機分子であることが好ましい。

10

【0141】

(試験化合物および抽出物)

一般に、Tp17様ポリペプチドのリゾチームポリペプチドへの結合を調節し得る化合物は、天然の産物もしくは合成（もしくは半合成）抽出物の双方の大きなライブラリー、または化学物質ライブラリーから、あるいはポリペプチドまたは核酸ライブラリーから、当該分野で公知の方法に従って同定される。薬物の発見および開発の分野における当業者は、試験抽出物または化合物の正確な供給源が本発明のスクリーニング手順に重大ではないことを理解する。スクリーニングで用いられる化合物は公知の化合物（例えば、他の疾患または障害について用いられる公知の治療）を含み得る。あるいは、実質的に任意の数の未知の化学的抽出物または化合物が、本明細書に記載される方法を用いてスクリーニングされ得る。このような抽出物または化合物の例としては、植物に基づく抽出物、真菌に基づく抽出物、原核生物に基づく抽出物、または動物に基づく抽出物、発酵ブロス、および合成的化合物、ならびに現存の化合物の改変体が挙げられるが、これらに限定されない。多数の方法がまた、かなり多数の化学的化合物（糖類に基づく化合物、脂質に基づく化合物、ペプチドに基づく化合物、および核酸に基づく化合物が挙げられるが、これらに限定されない）のランダムな合成または指向的な合成（例えば、半合成または全体的な合成）をきたすために利用可能である。合成的化合物のライブラリーは、Brandon Associates (Merrimack, N. H.) およびAldrich Chemical (Milwaukee, Wis.) から市販される。あるいは、細菌抽出物、カビ抽出物、植物抽出物、および動物抽出物の形態の天然化合物のライブラリーが多数の供給源 (Biotics (Sussex, UK)、Xenova (Slough, UK)、Harbor Branch Oceanographics Institute (Ft. Pierce, Fla.)、およびPharmaMar, U. S. A. (Cambridge, Mass.) が挙げられる) から市販される。さらに、天然および合成的に生成されたライブラリーは、必要に応じて、当該分野で公知の方法に従って（例えば、標準的な抽出および分画方法によって）生成される。さらに、必要に応じて、任意のライブラリーまたは化合物が、標準の化学的、物理的、または生化学的方法を用いて容易に改変される。

20

30

【0142】

さらに、薬物の発見および開発の分野における当業者は、回数の減少 (dereplication)（例えば、分類学的回数の減少、生物学的回数の減少、および化学的回数の減少、またはそれらの任意の組み合わせ）、または複製の除去、またはその活性が既に公知である物質の反復の方法が、可能であるときはいつでも用いられることを容易に理解する。

40

【0143】

粗製抽出物がTp17様ポリペプチドとリゾチームポリペプチドとの間の結合を調節することが見出される場合、観察された効果の原因となる化学的成分を単離するために、陽性の主要な抽出物のさらなる分画が必要である。したがって、抽出プロセス、分画プロセスおよび精製プロセスの目標は、Tp17様ポリペプチドとリゾチームポリペプチドとの間の結合を変化させる粗製抽出物に含まれる化学的存在物の注意深い特徴付けおよび同定

50

である。このような不均質な抽出物の分画および精製の方法は、当該分野で公知である。必要に応じて、病原体感染またはリゾチーム障害の処置のための治療剤として有用であると示された化合物は、当該分野で公知の方法に従って化学的に改変される。

【0144】

(抗体の調製)

本発明のイムノアッセイにおける使用に適切なモノクローナル抗体は、差次的な結合アッセイを用いて、その抗体がTp17様ポリペプチド、リゾチーム、Tp17様ポリペプチド-リゾチーム複合体、または他の目的の抗原に特異的であり、そして関連するタンパク質との間に交差反応性を示さないか、または限定された交差反応性しか示さないことを確実にすることで、標準のハイブリドーマ方法によって調製され得る。あるいは、適切なモノクローナル抗体は、抗体操作方法（例えばファージディスプレイ）を用いて調製され得る。抗体ファージディスプレイライブラリーから高度に特異的な抗体を取得する方法は当該分野で公知であり、そしていくつかのファージ抗体ライブラリーが、例えばMorphoSys (Martinsried, Germany)、Cambridge Antibody Technology (Cambridge, UK)、およびDyax (Cambridge, MA) から市販される。適切なファージディスプレイ方法は、例えば、米国特許第6,300,064号および同第5,969,108号に記載され、これらの文献はその全体が本明細書で参考として援用される。また、例えば「Antibody Engineering」McCaffertyら(編)(IRL Press 1996)およびその参考文献も参照のこと。ファージディスプレイ抗体方法は、FabまたはscFv形式における抗体のライブラリーを使用し得る。一旦、抗体の重鎖遺伝子および軽鎖遺伝子がファージ抗体から回収されると、任意の適切な形式の抗体が調製され得る（例えば、抗体全体、Fab、scFvなど）。

【0145】

他の抗体調製物（例えば、重鎖免疫グロブリン鎖しか含まない、ラクダ化抗体）もまた使用され得る。例えば、Muyldermansら(2001) J. Biotechnol. 74:277-302、およびその参考文献を参照のこと。

【0146】

あるいは、抗原（例えば、Tp17様ポリペプチド、リゾチーム、または他の目的の抗原）の検出のために、ポリクローナル抗体調製物が使用され得る。ファージディスプレイ法もまた、ポリクローナル抗体の再生できる集団の調製に用いられ得る。例えば、抗体ライブラリーは、固体表面に結合する他の抗原上の吸収によって交差反応するクローンが徹底的に除去されて、次いで固体表面上をパニングして、目的の抗原に結合する抗体を同定し得る。結果として得られるクローンの集団はまた、当該分野で周知の方法を用いて、無関係のタンパク質（例えば、ウシ血清アルブミンなど）をもつ表面での吸収によって交差反応性のクローンが除去され得る。このことは結果として、目的の抗原に特異的に結合する抗体の集団の同定につながる。

【0147】

目的の抗原に特異的なポリクローナル抗体はまた、従来の動物に基づく方法を用いて調製され得る。このような抗原（例えばペプチド）は、キャリアタンパク質（例えば、ウシ血清アルブミン(BSA)またはキーホールリンペットヘモシアニン(KLH)）に、そのN末端またはC末端において結合体化され得、そして周知の免疫レジメンを用いて動物（たとえばウサギ）を免疫するために用いられ得る。特異的なポリクローナル抗体は、例えば固体支持体に結合した免疫化に用いられるペプチドを含むマトリックス上におけるアフィニティクロマトグラフィーによって、動物の血清から得られ得る。また一方、例えばTp17様ポリペプチドに対して生じる抗血清が、固体支持体に結合した他のポリペプチドに対して吸収されて、任意の交差反応性抗体を除き得、そして逆もまた真である。

【0148】

(イムノアッセイ)

多数のイムノアッセイのうちのいずれもが、本発明の方法の実施において用いられ得る

。例えば、酵素結合免疫吸着法（E L I S A）、凝集アッセイ、ラジオイムノアッセイ、濁度アッセイ、比濁分析アッセイ、免疫クロマトグラフィー、化学発光アッセイ、および蛍光アッセイ。このようなアッセイは当該分野で周知であり、そして本明細書中に詳細に記載される（A n d r e o t t i ら（2003）B i o t e c h n i q u e s 35:850-859）。

【0149】

E L I S A アッセイを実行するための方法は、当該分野で周知である。手短に言うと、サンプル中における T p 1 7 様ポリペプチドの存在を検出するために、例えば、固相（例えば E L I S A プレート）が、リゾチームでコーティングされる。洗浄後、T p 1 7 様ポリペプチドを含み得るサンプルが、加えられる。このサンプルは、E L I S A プレートのいくつかのウェルに適用され得、そして（適切な場合には）直接的な標識を介してか、標識された抗 T p 1 7 様ポリペプチド抗体を用いることによってか、あるいは二次抗体および三次抗体または検出試薬（ストレプトアビジン-ビオチン）または標識されたプロテイン A もしくは標識されたプロテイン G を用いることによって、検出され得る。特異的な抗体が差次的に標識される場合、同じサンプルにおいて（例えば、E L I S A プレートの同じウェルにおいて）1 つよりも多い抗原の検出が生じ得る。このことは、例えば異なる U V 吸収極大を有する色素を用いることによって、独立して定量され得る別個のシグナルを生成する標識の使用を必要とする。有用な色素およびスペクトルとしては、西洋ワサビペルオキシダーゼのための A B T S（2, 2'-アジノビス（3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸）（2, 2'-a z i n o b i s（3-e t h y l b e n t h i a z o l i n e - 6 - s u l p h o n i c a c i d））色素生産性基質（410nmにおける吸収光）および西洋ワサビペルオキシダーゼのための T M B（3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジン）色素生産性基質（1M H₂SO₄の添加後に450nmにおける吸収光）が挙げられるが、これらに限定されない。

【0150】

他の公知のタンパク質検出方法が、上記のイムノアッセイの代わりに、またはこれに加えて、用いられ得る。例えば、タンパク質の非表面エпитープに対する抗体を用いる場合、検出前にそのタンパク質の酵素的消化または化学的消化（例えば、C N B r）が用いられ得る。例えば、全長の T p 1 7 様ポリペプチドが、T p 1 7 様ポリペプチドに結合する一般的な抗体を用いて取得され得、続いて酵素的タンパク質消化が行われ得、そして T p 1 7 様ポリペプチド特異的な抗体を用いて検出され得る。タンパク質の C N B r 消化のための改善された方法は、K a i s e r ら（1999）A n a l . B i o c h e m . 266:1-8に記載される。

【0151】

用いられ得る他の方法としては、ウェスタンブロット、ファ-ウェスタンブロット、免疫組織化学、スポットブロット/スロットブロット技術、プロテインチップ、およびバイオセンサーが挙げられる。ウェスタンブロットについては、例えば、二つ組のタンパク質サンプルがアクリルアミドゲル上にて電気泳動され、膜（例えば、ニトロセルロースまたは P V D F）に移され得る。一方のブロットは、T p 1 7 様ポリペプチドに対する抗体を用いて検出され、そして一方のブロットは、コントロールタンパク質に対する抗体を用いて検出される。次いで、これらの一次抗体は、例えば、標識された二次抗体を用いて検出される。あるいは、目的のタンパク質に対して特異的な抗体およびコントロールタンパク質に対して特異的な抗体が、異なる蛍光色素で各々標識され、そして同じブロットと同時に反応される。各々の色素の蛍光強度が、測定され、そしてその強度の比は2つのタンパク質の比を示す。

【0152】

ファ-ウェスタンブロットは、タンパク質の固体支持体への固定化工程、タンパク質に直接的に結合する可能性があるリガンドでこの支持体をプローブする工程、および結合したタンパク質-リガンドの免疫検出工程を、包含する。例示的なファ-ウェスタンブロットが、図5に示され、そして実施例2に詳細に記載される。

【0153】

免疫組織化学については、二つ組の組織切片が、目的のポリペプチドに対して特異的な抗体およびコントロールのポリペプチドに対して特異的な抗体を用いて処理され得る。これらの一次抗体は、直接的に標識されても、適切な二次抗体を用いて検出されても良い。染色強度は、電荷結合素子（CCD）カメラを用いて測定され得、そしてこのタンパク質が定量される。この染色強度の比は、上記タンパク質の量の比を示す。あるいは、抗体が異なる蛍光標識で標識された場合、単一の切片が双方の抗体を用いて染色され得る。

【0154】

スポットプロット／スロットプロット技術はまた、当該分野で周知である。例えば、上に記載したように、Tp17様ポリペプチド抗体、Tp17様ポリペプチドーリゾチーム複合体抗体、またはリゾチーム抗体を含む、同一の量の生物学的サンプルが、膜上に直接的にスポットされ得、そして、Tp17様ポリペプチド、リゾチーム、および／またはTp17様ポリペプチドーリゾチーム複合体によって検出され得る。このプローブは標識されても、二次リガンドが用いられても良い。

10

【0155】

多くの型のバイオセンサーに基づく方法が、当該分野で公知であり、そして抗Tp17様ポリペプチド抗体、抗Tp17様ポリペプチドーリゾチーム複合体抗体、または抗リゾチーム抗体を検出および定量するために用いられ得る。例えば、Tp17様ポリペプチドに対して特異的な抗体および／またはリゾチームに対して特異的な抗体を含むサンプルが、バイオセンサーの表面上に結合され得、Tp17様ポリペプチドおよび／またはリゾチームが、コーティングされた表面に結合した場合、その表面のある性質において検出可能な変化が生じるようになる。バイオセンサーは、例えば、その表面上の質量変化、電気的性質における変化、または光学的性質における変化を測定する。これらの方法の各々は、当該分野で周知であり、そして本方法における使用のために適切である。

20

【0156】

市販のバイオセンサーに基づく方法は、例えばBiacore（Piscataway、NJ）から入手可能であり、Tp17様ポリペプチドに対する抗体および／またはリゾチームに対する抗体のレベルの変化を検出および定量するための本発明における使用のために適切である。また、例えば米国特許第6,225,047号（その内容は、その全体が本明細書中で参考として援用される）、およびDaviesら（1999）Biotechniques 27:1258-61に記載されるタンパク質検出方法を参照のこと。市販のプロテインチップ検出方法は、Ciphergen（Fremont、CA）から入手可能である。本発明は、スケールアップされて、例えば、細菌の株が薬物耐性株であるか、あるいはリゾチームに結合し得ないか、またはリゾチームを阻害するかを決定するために、2つ以上の病原体を検出または区別し得る。

30

【0157】

別の実施形態において、本明細書中に記載される方法のうちの任意のものは、当該分野で周知である競合的イムノアッセイであり得る。例えば、Tp17様ポリペプチドに対する抗体および／またはリゾチームに対する抗体のレベルを測定するために、競合的サンドイッチイムノアッセイが行われ得、ここでTp17様ポリペプチドに対する結合について、サンプル中のTp17様ポリペプチド抗体と競合するために、既知のTp17様ポリペプチド抗体が用いられる。例えば、既知のTp17様ポリペプチド抗体の連続的な希釈物が、アッセイへの添加に先立ってサンプルまたはTp17様ポリペプチドと共にインキュベートされ得る。

40

【0158】

タンパク質検出のための質量分析方法もまた、例えば、サンプル中のTp17様ポリペプチドおよび／またはリゾチームに対する抗体またはそのフラグメントの、レベルにおける変化を検出および定量するために、用いられ得る。例えば、米国特許第5,719,060号；同第5,894,063号に記載された方法；ならびにShimizuら（2002）J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed.

50

Life Sci. 25:776:15-30; Kiermanら(2002) Anal. Biochem. 301:49-56; および Pramanikら(2002) Protein Sci. 11:2676-87を参照のこと。質量分析に基づくタンパク質検出方法はまた、Ciphergen (Fremont, CA) から入手可能である。

【0159】

(生物学的サンプル)

本発明の組成物および方法のうちの任意のものを用いて分析または処理されるサンプルは、体サンプル(例えば、血液、血清、血漿、涙、唾液、鼻流体、痰、耳流体、生殖流体、乳房流体、初乳、乳、胎盤流体、汗(perspirate)、滑液、腹水、脳脊髄液、胆汁、胃液、胃腸液、滲出液、漏出液、胸膜液、心膜流体、精液、糞便物質、上気道流体、腹膜流体、炎症または他の免疫応答の部位から収集された流体、プールされた収集部位から収集された流体、気管支洗浄、尿、眼房水、生検物質、反芻動物の噴門洞由来の物質、有核細胞サンプル、粘膜表面に関連する流体)を含み得る。あるいは、本発明に従う組成物および方法は、乾燥細胞サンプル(例えば、毛髪または皮膚)、あるいは目的の遺伝子または抗体が発現されるか沈着される、任意の組織の生検サンプルに対して行われ得る。

10

【0160】

(他のサンプル)

本明細書中で言及される場合、「サンプル」とはまた、リゾチームまたはTp17様ポリペプチドを含むことが疑われ得るか、あるいはさもないければ、リゾチームまたはTp17様ポリペプチドもしくはそれらに対する抗体の存在に関する試験または処理が必要な、任意の診断サンプル、実験的サンプルまたは臨床サンプル(例えば、培養管、キュベット、綿棒、医療用機器(例えば、手術用機器))を意味する。サンプルはまた、細胞培養物または流体培養物(例えば、咽喉吸引物、脳脊髄液サンプル、血液培養)であり得る。サンプルは1病原体調製物(例えば、細菌調製物、ウイルス調製物、寄生生物調製物、プラスミド調製物、マイコプラズマ調製物、糸状菌因子(例えば、カビ、酵母)調製物、またはプリオン調製物)であってもよい。サンプルは、液体因子または固体因子(例えば、食物、薬物、移植物、移植片、組織培養培地または細胞培養培地、水サンプル、あるいは滅菌が望まれるかまたは必要な、他の溶液、試薬または装置)であり得る。

20

【0161】

この組成物および方法は、病原体の混入または感染(例えば、病原体関連疾患(例えば、梅毒、HIV感染、陰部ヘルペス、腺ペスト、赤痢、細菌性赤痢、虫歯、E. coli感染、嚢胞性線維症、結核、コレラ、A群およびB群の連鎖球菌感染、ブドウ球菌感染、胃潰瘍、百日咳、クラミジア症、ブルセラ症、中耳炎、髄膜炎、インフルエンザ感染、マラリア、サルモネラ症、淋病、ビブリオ症、大腸菌症、肺炎、気管支炎、重症急性呼吸器症候群(SARS))を診断または処置するために用いられ得る。1つの実施形態において、本発明の組成物および方法は、細胞質蓄積症(例えばリソソーム蓄積症)を診断または処置するために有用である。

30

【0162】

さらに、本発明の組成物および方法は、疾患(例えば、癌、感染性疾患、炎症性疾患、アルツハイマー病、アミロイド腎症、白血病、クローン病、およびアレルギー)を診断または処置するために用いられ得る。

40

【0163】

(投与)

リゾチームとの結合についてTp17様ポリペプチドと競合するTp17様ポリペプチドのインヒビターが、被験体(例えば、哺乳動物(例えば、ヒト))に投与され、リゾチームとのTp17様ポリペプチドの結合を阻害するために、その結果、リゾチームは病原体因子に対抗することができる。あるいは、Tp17様ポリペプチドによる感染阻害に対して非感受性の変異リゾチームが、投与され得る。

【0164】

50

リゾチームとその同族のインヒビター（例えば、T p 1 7 様ポリペプチド）との結合を妨げる、任意の技術的手段（例えば、化学的薬物、競合ペプチド、抗体、ベクター、s i R N A）が、予防的または治療的に用いられ得る。このようなインヒビターを含む任意の病原体に起因する病原性疾患（例えば、梅毒、H I V 感染、陰部ヘルペス、腺ペスト、赤痢、細菌性赤痢、虫歯、E . c o l i 感染、嚢胞性線維症、結核、コレラ、A 群および B 群の連鎖球菌感染、ブドウ球菌感染、胃潰瘍、百日咳、腸球菌感染、クラミジア症、ブルセラ症、中耳炎、髄膜炎、インフルエンザ感染、マラリア、サルモネラ症、淋病、ビブリオ症、大腸菌症、肺炎、気管支炎、および重症急性呼吸器症候群（S A R S））に対抗するために、予防的または治療的に用いられ得る。1 つの実施形態において、本発明の組成物および方法は、細胞質蓄積症（例えばリソソーム蓄積症）の予防または処置において有用である。

10

【0 1 6 5】

あるいは、T p 1 7 様ポリペプチドとの結合についてリゾチームと競合するリガンドが、リゾチームの過剰生産に関連する疾患に罹患している患者、あるいはリゾチーム活性の減少が望まれる任意の疾患または状態に罹患している患者における、リゾチーム活性を不活性化するために、患者に投与され得る。

【0 1 6 6】

T p 1 7 様ポリペプチド／リゾチーム結合のインヒビターの経口投与のための調製物は、活性化化合物を徐放させるように適切に処方され得る。口腔内投与のために、このインヒビターは、従来の様式で処方される錠剤またはトローチ剤の形態をとり得る。あるいは、処置後サンプルを（例えば、擦過によって）得る前に、特定領域にインヒビターを塗布、噴霧、または適用され得る。吸入による投与のために、本発明の方法に従う使用のためのインヒビターは、適切な噴霧剤（例えば、ジクロロジフルオロメタン、トリクロロフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタン、二酸化炭素、または他の適切なガス）の使用を伴って、加圧されたパックまたは噴霧器からエアロゾル噴霧の体裁の形態にて、都合よく送達される。加圧されたエアロゾルの場合、投薬単位は、測定された量を送達するバルブを供給することで決定され得る。インヒビターの粉末混合物、および適切な粉末基剤（例えば、ラクトースまたはデンプン）を含む、吸入器または注入器における使用のための、（例えばゼラチンの）カプセルおよびカートリッジが、処方され得る。

20

【0 1 6 7】

このインヒビターは、注射による（例えば、ボーラス注射または連続的注入による）非経口的投与のために、処方され得る。注射のための処方物は、添加された保存剤を含む単位投与形態（例えば、アンプルまたは多用量容器）にて提示され得る。このインヒビターは、油性または水性のビヒクル中の懸濁液、溶液、または乳濁液などの形態を採り得、そして処方剤（例えば、懸濁剤、安定剤、および／または分散剤）を含み得る。あるいは、このインヒビターは、使用前に適切なビヒクル（例えば、滅菌された、発熱物質を含まない水）で構成するために、粉末形態であり得る。

30

【0 1 6 8】

このインヒビター（（例えば、従来の坐剤基剤（例えば、ココアバターまたは他のグリセリド）を含む）坐剤または持続浣腸（r e t e n t i o n e n e m a）のようなインヒビター）はまた、直腸投与のために処方され得る。

40

【0 1 6 9】

このインヒビターはまた、貯蔵調製物として処方され得る。例えば、非経口的貯蔵システム（P D S）は、筋肉または皮下組織に注射または移植され、そして徐放様式にて放出される薬物を組み込んでおり、数日間～1 年間の範囲の、長期間にわたる放出速度の調整を可能とする。このような長期間作用する処方物は、移植（例えば、皮下移植、または筋肉内移植）または筋肉注射によって投与され得る。このインヒビターは、適切なポリマー性材料もしくは疎水性材料（例えば、受容可能な油の中の乳濁液として）またはイオン交換樹脂を用いて処方され得るか、あるいは難溶性誘導体（例えば、難溶性塩）として処方され得る。他の適切な送達システムとしては、長期間にわたって、インヒビターの局所的

50

な非侵襲性送達の可能性を提供する、ミクロスフェアが挙げられる。この技術は、体の任意の選択された部分（例えば、眼または他の器官）に、冠血管カテーテルを介して、炎症も虚血も引き起こすことなく注入され得る、前毛細血管の大きさのミクロスフェアを利用する。投与されたインヒビターは、これらのミクロスフェアからゆっくりと放出され、そして周囲の組織細胞によって吸収される。

【0170】

このインヒビターの全身投与はまた、経粘膜手段または経皮手段を介し得る。経粘膜投与または経皮投与のために、浸透されるべき障壁に適する浸透剤が、処方物中で用いられる。このような浸透剤は当該分野で一般に公知であり、そして、例えば経粘膜投与のためには、胆汁酸塩およびフシジン酸誘導体が挙げられる。さらに、浸透を促進するために、界面活性剤が用いられ得る。経粘膜投与は、スプレー式点鼻薬を介し得、または坐薬を用い得る。局所投与のために、本発明のオリゴマーは、当該分野で一般に公知である軟膏（o i n t m e n t）、膏薬（s a l v e）、ゲル、またはクリームに処方される。治癒を促進させる目的で、損傷または炎症を処置するために、洗浄溶液が局所的に用いられ得る。

【0171】

（細胞）

本発明は、例えば、病原体ペプチドの調製または試験のための細胞を必要とし得る。培養された一次動物細胞株または培養された永続的な動物細胞株または培養された一次細菌細胞株または培養された永続的な細菌細胞株は、流体サンプルと同じ被験体に由来するか、別の個体に由来する一次細胞（単球、滑膜細胞、線維芽細胞、および内皮細胞が挙げられるが、これらに限定されない）であっても；一定範囲の組織起源および器官起源に由来する永続的な細胞株（A m e r i c a n T i s s u e T y p e C o l l e c t i o nのような、公共アクセス貯蔵所から利用可能な細胞株が挙げられるが、これに限定されない）であっても；あるいは「プロモーター読み出し」構築物で安定にトランスフェクトされた、一次細胞株または永続的な細胞株であってもよい。

【0172】

細菌細胞培養技術は、当該分野で周知である。例えば、細菌細胞は、2×YTブロス中にて、振盪機上で37℃にて増殖され得る。プラスミドまたはウイルスで形質転換された細菌の増殖の方法はまた、選択因子（例えば、アンピシリンまたは他の抗生物質）中での増殖を含み得る。細胞および細胞溶解物の調製、ならびにタンパク質および核酸の精製もまた、当該分野で周知である。

【0173】

本発明の実施は、他のように示されない限り、当業者の範囲内である、細胞生物学、分子生物学、遺伝子組換え生物学、微生物学、組換えDNA、および免疫学の従来技術を用い得る。このような技術は、文献において完全に説明される。M o l e c u l a r C l o n i n g - A L a b o r a t o r y M a n u a l（1989）第2版、S a m b r o o kら（編）C o l d S p r i n g H a r b o r L a b o r a t o r y P r e s s、第16章および第17章；H o g a nら（1986）M a n i p u l a t i n g t h e M o u s e E m b r y o : A L a b o r a t o r y M a n u a l、C o l d S p r i n g H a r b o r L a b o r a t o r y P r e s s、C o l d S p r i n g H a r b o r、NY；米国特許第4,683,195号；D N A C l o n i n g、第I巻および第II巻（1985）G l o v e r（編）；O l i g o n u c l e o t i d e S y n t h e s i s（1984）G a i t（編）；N u c l e i c A c i d H y b r i d i z a t i o n（1984）H a m e sおよびH i g g i n s（編）；T r a n s c r i p t i o n a n d T r a n s l a t i o n（1984）H a m e sおよびH i g g i n s（編）；C u l t u r e O f A n i m a l C e l l s（1987）F r e s h n e y、A l a n R. L i s s, I n c. ；I m m o b i l i z e d C e l l s A n d E n z y m e s（1986）I R L P r e s s；P e r b a l（1984）A P r a c t i c a l G u i d e T o M o l e c u l a r C l o n

ing; Methods In Enzymology (Academic Press, Inc., N. Y.); Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells (1987) MillerおよびCalos (編) Cold Spring Harbor Laboratory; Methods In Enzymology、第154巻および第155巻、Wuら (編) Academic Press Inc., N. Y.; Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology (1987) MayerおよびWalker (編) Academic Press, London; Handbook Of Experimental Immunology、第I巻～第IV巻 (1986) WeirおよびBlackwell (編)。

10

【0174】

それゆえ、本発明の方法は、診断手段および予後の判定手段として、疾患を処置するためまたは疾患に対して免疫するための手段として、疾患の進行および回復をモニターするための手段として、治療に対する応答または応答を欠くことを追跡するための手段として、代替りの薬物療法または併用する薬物療法の効力を評価するための手段として；ならびに薬物療法の妥当な治療用量を確立するための手段として、有用である。本発明の方法はまた、薬物研究および開発に関連して、動物試験ならびに／またはフェーズI、フェーズII、フェーズIIIおよびフェーズIVの臨床試験ならびに／または市販後の研究の過程で収集された生物学的サンプルにおける、研究中の薬物および認可された薬物の潜在的な効力および副作用を評価するために、用いられ得る。本発明の実施例の実行は、以下の実施例からより完全に理解される。これらの実施例は本明細書中にて例示目的のみのために提示され、決して本発明を限定するように解釈されるべきでない。

20

【実施例】

【0175】

(実施例1：ニワトリリゾチームは、*Treponema Pallidum* 17kDa抗原を組換え形態と共精製する)

*E. coli*由来の組換え*T. pallidum* Tp17抗原 (GST-Tp17またはTp17-HISの精製に関連して、タンパク質が再生的にTp17と共精製した。この「混入物」タンパク質は、14kDaの分子量を有し、そして抗Tp17ポリクローナル血清とは反応しなかった。この「混入物」タンパク質を、以下に記載するようにニワトリリゾチームとして同定した。

30

【0176】

両方の実態 (Tp17および「混入物」) を含むタンパク質画分を、PAGE-SDSで分離し、ゲルから切除して、そしてN末端アミノ酸配列決定に供した。この実験から、*T. pallidum* Tp17抗原またはニワトリリゾチームの期待される配列と完全に一致する短いN末端ペプチド配列 (6～7アミノ酸) を得、これを細胞ペースト再懸濁緩衝液に入れて、細菌細胞の溶解を促進した。これらの知見は、Tp17がニワトリリゾチームと物理的に相互作用することを示唆した。GST-Tp17およびTp17-HISの精製、ならびに微量配列決定実験に対応する実験プロトコルを、以下に示す。

【0177】

40

(GST-Tp17クロマトグラフィー)

pGEX2-Tp17 (Akinsら (1993) *Infect. Immun.* 61:1202-1210) (図6) を含む組換え*E. coli* DH5αを、100μg/mlのアンプシリン (Roche Diagnostics, Barcelona, Spain) を含む2×YTブロス (Sambrookら (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 第2版、Chris Nolan (編) Cold Spring Harbor Press.) 内で、5リットル発酵槽にて増殖させた。この培養物を、0.3mMのIPTG (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) で4時間誘導した。細胞を収集し、そして、プロテアーゼインヒビターカクテル (細胞ペースト1gあたり1ml、Sigma

50

ーAldrich、Madrid、Spain) および0.5mg/mlのニワトリリゾチーム(Sigma-Aldrich、Madrid、Spain)を含む、50mMのTris(pH8.0)、85mMのNaCl、2mMのEDTA、1%のポリオキシエチレン10トリデシルエーテル中に再懸濁した。50分間のインキュベートの後、細胞を超音波処理し、そして28,000gで遠心分離した。組換えGST-Tp17を、イオン交換クロマトグラフィー(Q Sepharose XL、Amersham Biosciences、Cerdanyola、Spain)によって上清から精製した。フロースルーを、グルタチオンアフィニティクロマトグラフィー(glutathione sepharose FF、Amersham、Cerdanyola、Spain)によってさらに精製した。100mMの還元グルタチオン緩衝液を用いて、GST-Tp17を溶出した。収集された画分を、ゲル電気泳動によって分析した。別の精製プロセスを、同じプロトコールの後にリゾチームを使用することなく行った。

10

【0178】

(Tp17-HISクロマトグラフィー)

成熟Tp17タンパク質コード配列(NCBI登録番号P29722において寄託されるTp17配列の残基23～残基156を含む)をコードする遺伝子配列を、pProExHT-Tp17(Norgard博士、University of Dallas、Texas、USA)ベクターをテンプレートとして用いて、PCR増幅した。PCR増幅は、Expand High Fidelity PCRシステムキット(Roche Diagnostics、Mannheim、Germany)およびオリゴヌクレオチドP17-NdeI(

20

【0179】

【化8】

5'-AGA TAT ACA

TAT GGT CTC GTG CAC AAC CGT GTG TCC GCA CGC CGG GAA GGC CAA -

3'

) (配列番号33) およびP17-rev1(XhoI) (5'-ATGTAGCGAACGGAGTTA-3') (配列番号34)を用いて、供給者(Roche Diagnostics、Mannheim、Germany)に推奨される条件下において行った。温度サイクル条件は以下の通りであった：変性サイクル(94℃にて1分間)、続いて30回の増幅サイクル(94℃にて1分間、55℃にて1分間、72℃にて1分間)。結果として生じたPCRアンプリコン(約300bp)を、Nucleotrap精製システム(Macherey-Nagel、Duren、Germany)を用いて精製した。精製したPCR断片1μg、および精製したpET24aプラスミド1μgを、それぞれ10ユニットのNdeIおよび10ユニットのXhoIを用いて、供給源(Roche Diagnostics、Mannheim、Germany)に推奨される条件を使用して消化した。制限断片を0.8%アガロースゲル(Sambrookら(1989))を通して分離し、そしてTp17に対応する断片(約300bp)およびpET24aベクターに対応する断片(約5300bp)を切除し、そしてNucleotrap精製システム(Macherey-Nagel、Duren、Germany)を用いてゲル精製した。両方の断片を、T4DNAリガーゼ(Roche Diagnostics、Mannheim、Germany)を用い、供給源に推奨される条件を用いて連結した。次いで、この連結反応物を用いて、化学的に適格なE. coli TOP10(Invitrogen SA、Barcelona Spain)を形質転換し、そして100μg/mlのアンピシリン(Roche Diagnostics、Mannheim、Germany)を補充されたLBプレート上にて形質転換体を選抜した。プラスミドDNAを、10個の個々のクローンから調製し、そしてNdeIおよびXhoIを用いた制限エンドヌクレアーゼ消化によって分析した。10クローン中8クローンが、正しいpET24a-Tp17組換えプラスミドを含んでいた。1つのプラスミドクロノンの配列を

30

40

50

、DNA配列決定 (DNA Sequencing Facility、UAB、Barcelona、Spain) で確認し、引き続いてこれを用いてE. coli BL21 (DE3) Rosetta (Novagen、Madison、WI) 発現株を形質転換した。結果として生じた株を、EcBK633と名付けた (図7を参照のこと)。

【0180】

組換えE. coli EcBK633を、アンピシリン (Roche Diagnostics、Mannheim、Germany) を含む2×YTブロス中で、5リットルのバイオリアクターにて増殖させた。この培養物を、1mMのIPTG (Roche Diagnostics、Mannheim、Germany) で4時間誘導した。細胞を収集し、そして、プロテアーゼインヒビター (Sigma-Aldrich Madrid、Spain) および0.6mg/mlのニワトリリゾチーム (Sigma-Aldrich、Madrid、Spain) を含む50mMのTris (pH8.5) に再懸濁した。45分間のインキュベートの後、細胞を超音波処理し、そして30,100gにて遠心分離した。この組換えTp17-HISを、ニッケル充填樹脂 (Chelating HP; Amersham、Cerdanyola、Spain) および勾配溶出10~200mMイミダゾール (Merck Darmstadt、Germany)、および供給源に推奨される500mMイミダゾールを用いた、金属イオンアフィニティクロマトグラフィーによって上清から精製した。収集した画分を、ゲル電気泳動およびウェスタンブロットにて解析した。

【0181】

(電気泳動およびウェスタンブロット分析)

上記のクロマトグラフィー画分およびタンパク質分子量マーカー (See Blue Plus IITM、Invitrogen、Barcelona、Spain) を、Sambrookら (1989) に記載されたように2つの同一の15% SDS-PAGEゲルを通して、電気泳動的に分離した。引き続いて、1つのゲルをCoomassie Brilliant Blue R250 (Merck、Darmstadt、Germany) で染色し、総タンパク質を検出した。図8Aに示すように、Tp17精製タンパク質に対応する画分において2つの主要なバンド (14kDaおよび17kDa) を認めた。もう一方のゲルにおけるタンパク質を、供給源に推奨されるようにImmobilonTM P PVDF膜 (Millipore Corp.、Bedford、Massachusetts) に電気移行させた。次いでこの膜を、PBSと、0.05% w/vのTweenと10% w/vの乾燥した脱脂スキムミルク (PBST) とを含む5mlのBlottoTM (BioRad、Hercules、California) 中で、室温 (18~22℃) にて1時間インキュベートした。次いで、この膜を以下のように処理した： (1) PBSTによる10分間の洗浄3回、 (2) 1/200にBlottoTM で希釈した、梅毒を有する患者に由来するヒト血清10mlの存在下での、室温 (18~22℃) における1時間のインキュベート、 (3) PBSTによる10分間の洗浄3回、 (4) PBST中に1/2000に希釈した、アルカリホスファターゼ結合体化ウサギ抗ヒトポリクローナル抗体 (BioRad、Hercules、California、USA) 10mlとの、室温での1時間のインキュベート、 (5) PBSTによる10分間の洗浄3回、および (6) 発色するまでの、NBT/BCIPアルカリホスファターゼ色素生産性基質 (Sigma-Aldrich、Madrid、Spain) 5mlとの最後のインキュベート。図8Bに示すように、このアッセイは17kDaタンパク質 (Tp17-HIS) へのヒトIgGの結合を検出するが、しかし14kDaタンパク質への結合は検出しない。

【0182】

(N末端配列決定)

精製Tp17-HISを混入物タンパク質 (14kDa) と共に含む上記のクロマトグラフィー画分およびタンパク質分子量マーカー (See Blue Plus IITM、Invitrogen SA、Barcelona、Spain) を、Sambrook

ら（1989）に記載されるように、15% SDS-PAGEゲルを通して電気泳動的に分離した。引き続いて、ゲル中のタンパク質を、供給業者の指針を用いて ImmobilonTM P PVDF膜（Millipore Corp.、Bedford、MA）に電気移行した。この膜を Coomassie Brilliant Blue R250 で染色し、そして2つのバンドを切り取って、そして配列決定分析のために乾燥した。自動エドマン分解によるN末端分析を、PTH-アミノ酸分析機を有する Beckman LF3000 シークエンサー（System Gold、Beckman Coulter、Fullerton、California）にて行った。

【0183】

得られた配列は：

17 kDa タンパク質について、 $\text{NH}_2\text{-VS(C)TTV-COOH}$ （配列番号35）

14 kDa タンパク質について、 $\text{NH}_2\text{-KVFGRC)ELAA-COOH}$ （配列番号36）であった。

【0184】

図8Bに示すように、この17 kDa タンパク質のN末端配列は、*Treponema pallidum* Tp17 に対応し、この14 kDa タンパク質の配列は、ニワトリリゾチームに対応した。

【0185】

（実施例2：ニワトリリゾチームおよびヒトリゾチームへのTp17の結合のファウエスタン検出）

T. pallidum 17 kDa (Tp17) タンパク質抗原がニワトリリゾチームと共精製するというこの知見は、両方のタンパク質の間の直接的な物理的相互作用を強く示唆した。この仮説を試験するために、ファウエスタンブロットリゾチーム-タンパク質相互作用アッセイを行った。このアッセイは図5に要約され、そして一般に以下の3つの工程を包含する：（1）膜上への精製されたリゾチームの固定化工程；（2）この膜を、リゾチームに直接結合しそうなリガンドでプロービングする工程；および（3）結合したリゾチーム-リガンドの免疫検出工程。詳細な実験手順を以下に示す。

【0186】

（リゾチーム-Tp17 タンパク質相互作用のファウエスタンブロット検出）

精製されたニワトリ卵白リゾチームおよびヒト母乳リゾチームを、Sigma-Aldrich (Madrid, Spain) から購入した。精製されたリゾチーム1 μg 、5 μg 、および10 μg を含む2つのシリーズのアリコート画分、ならびにタンパク質分子量マーカー (SeeBlue Plus IITM、Invitrogen SA、Barcelona, Spain) を、供給業者 (Invitrogen) に推奨される条件下にて、4~12% SDS-PAGEゲルを通して電気泳動的に分離した。次いで、このゲルを Sambrook ら（1989）に記載されるような、ウェスタンブロットのために当該分野で公知の方法に従って処理し、そしてこのタンパク質を ImmobilonTM P PVDF膜（Millipore Corp.、Bedford、Massachusetts）に電気移行した。PVDF膜上に固定化されたリゾチームの存在を、ポンソーS染色（Sigma-Aldrich、Madrid、Spain）を用いて1分間染色することによって評価し、次いで脱イオン水により5分間激しく洗浄することによって脱色した。この膜を2つに分けた。それぞれの部分は、タンパク質ラダー、および3種の量のニワトリリゾチームまたはヒトリゾチーム（レーンごとに、1 μg 、5 μg および10 μg ）を含んだ。次いでそれぞれの膜を、（TBST-ミルクを作るために）5%（重量／体積）の脱脂スキム乾燥SVELTESSETM ミルク（NESTLE、ESPANA、Barcelona、Spain）を補充し、5mlのTBST（10mlのTris-HCl pH8.0、150mMのNaCl、0.05%重量／体積のTween 20TM）中で、4℃にて16時間インキュベートした。次いでこの膜を別々に以下のように処理した：（1）10mlのTBSTによる1分間の洗浄3回、（2）100m

10

20

30

40

50

g/mlのGST-Tp17融合タンパク質(Akinら(1993))またはコントロールタンパク質であるGST-Tp47(Hsuら(1989) Infect. Immun. 57:196-203; Weigelら(1992) Infect. Immun. 60:1568-1576) 10mlの存在下における、室温(18~22℃)での1時間のインキュベート、(3) 5mlのTBSTによる10分間の洗浄3回、(4) TBST-ミルクで1/7500に希釈した抗GSTポリクローナルヤギ血清(Amersham Biosciences, Cerdanyola, Spain) 10mlとの室温での30分間のインキュベート、(5) 5mlのTBSTによる室温での10分間の洗浄3回、(6) TBST-ミルクで1/5000に希釈した、アルカリホスファターゼ結合体化ウサギ抗ヤギポリクローナル血清(Dako A/S, Glostrup, Denmark) 10mlとの室温における1時間のインキュベート、(7) 5mlのTBSTによる10分間の洗浄3回、および(8) 発色するまでの、ニトロブルーテトラゾリウム/ブロモクロロインドリルホスフェートアルカリホスファターゼ色素生産性基質(NBT/BCIP)(Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) 5mlとの3分間のインキュベート。

【0187】

上記のアッセイから、ニワトリリゾチームおよびヒトリゾチームの両方へのGST-Tp17融合タンパク質の結合(それぞれ、図9Bおよび図9Dにおける14kDaのバンド)を検出した。さらに、リゾチームへのGST-Tp17の結合は、界面活性剤(0.05%のTween 20TM)の存在下における多数の洗浄工程に耐えたので、この結合は強い。この膜をコントロールのGST-Tp47抗原と共にインキュベートした場合、シグナルを検出しなかった(図9Aおよび図9C)。このことは、Tp17とリゾチームとの間の相互作用が、特異的であり、そしてGST-Tp17およびGST-Tp47の両方に共有されるGST部分に関与しないことを示した。これらの結果は、(i) T. pallidum Tp17抗原は、ヒトリゾチームおよびニワトリリゾチームに、強くかつ特異的に結合すること、および(ii) この性質は、Tp17の残基22~残基156の間に含まれること(番号は、登録番号P29722に寄託された、Tp17ペプチド配列に関連する)を示す。このアッセイは、新規なリゾチーム結合タンパク質を特徴付けるため、およびリゾチームの同族インヒビターに結合し得ないリゾチーム変異体を同定するために、用いられる。逆に、このアッセイは、リゾチームと結合もし得ず、会合もし得ないTp17変異体とスクリーニングするために用いられる。このアッセイはまた、リゾチームが、その同族インヒビターへ結合するのを妨害する物質(例えば、ペプチド、タンパク質、薬物、抗体、核酸、PNAなど)をスクリーニングするために用いられる。

【0188】

(実施例3: T. pallidum Tp17タンパク質抗原は、ニワトリリゾチームおよびヒトリゾチームの抗菌活性を阻害する)

リゾチームは、粘膜表面および生物学的流体中に見受けられる、良く特徴付けられた抗菌因子である。リゾチームの強力なアセチルラムミダーゼ酵素活性に起因して、リゾチームは、細胞壁のペプチドグリカンを加水分解し得、それによって多くの病原性細菌を殺す。Tp17とヒトリゾチームとの間の強力な結合は、この結合がリゾチームの抗菌活性を変化させ得ることを示唆した。この仮説は、(i) T. pallidumが粘膜病原体であるという知見、および(ii) T. pallidumは、その感染生活環全体を通して、生態学的適所においてヒトリゾチームと接触するという知見と一致する。

【0189】

この仮説を試験するために、ヒトリゾチームおよびニワトリリゾチームの両方の抗菌活性を、GST-Tp17の存在下または非存在下において、EnzCheck(登録商標)リゾチームアッセイキット(Molecular Probes, Eugene, Oregon)を用いてアッセイした。このアッセイは、リゾチームの蛍光基質としての、フルオレセイン標識したMicrococcus lisyodeikticus細菌細胞の使用を包含する。このグラム陽性細菌において、ペプチドグリカン層がリゾチームに直

10

20

30

40

50

接接近可能であり、そして、蛍光が自然にクエンチされるようにフルオレセイン標識をされている。リゾチーム加水分解に際して、クエンチングが取り除かれ、そして、リゾチーム活性に比例する量にてフルオレセインが放出される。以下の実験プロトコルを用いた。

【0190】

(リゾチーム阻害アッセイ)

典型的な100 μ lの反応物は、25 μ lのリゾチーム溶液(ニワトリリゾチームについては10ユニット、またはヒトリゾチームについては50ユニットを、脱イオン水に溶解した)、25 μ lの試験タンパク質溶液、および50 μ lのフルオレセイン標識*Micrococcus lysodeikticus* (50 μ g/ml)懸濁液からなった。この反応物を、37℃にて45分間インキュベートした。KC juniorデータ取得ソフトウェア(Bio TEK Instruments、Winoosky、Vermont)を備える、蛍光マルチウェルプレートリーダーモデルFLx800(Bio TEK instruments、Winoosky、Vermont)を用いて、蛍光を測定した(λ_{exc} = 485 nm; λ_{emi} = 520 nm)。各々の実験点を、3つの独立したウェルの読み取りに対応する平均値および標準偏差として表した。50 μ lの脱イオン水を含むウェル、および50 μ lのフルオレセイン標識*Micrococcus lysodeikticus*懸濁液を含むウェルを、ブランクとして用いた。試験タンパク質の2倍連続希釈物を用いて、試験タンパク質の濃度を、83.5 μ g/ウェルから1.3 μ g/ウェルまで変化させた。

【0191】

図10に示すように、ヒトリゾチームおよびニワトリリゾチームの両方のアセチルムラミダーゼ活性が、わずか1.3 μ g/ウェルのGST-Tp17融合タンパク質の添加によって、強力に阻害された(85%を超える阻害)。対照的に、コントロールのGST-Tp47融合タンパク質は、ヒトリゾチームのアセチルムラミダーゼ酵素活性またはニワトリリゾチームのアセチルムラミダーゼ酵素活性のいずれにも、いかなる阻害効果も及ぼさなかった。このデータは、Tp17が、ニワトリリゾチームおよびヒトリゾチームの両方の抗菌活性を、特異的に阻害し、そしてGST部分に依存するものではないことを示す。さらに、このアッセイは、新規のリゾチームインヒビターを特徴付けるために、ならびに、リゾチームの同族のインヒビターに結合し得ず、および/あるいは、Tp17タンパク質、Ivyタンパク質、または他のTp17様タンパク質による阻害に対して非感受性であるリゾチーム変異体を同定するために、用いられる。このアッセイはまた、リゾチームの抗菌活性の阻害を妨害する物質(例えば、ペプチド、タンパク質、薬物、抗体、核酸、またはPNAなど)の、有用なスクリーニングを提供する。

【0192】

(実施例4:ニワトリリゾチームに対する、*Escherichia coli* Ivyの結合に必要な構造的決定因子)

リゾチームに対するT. pallidum Tp17の結合、およびリゾチームアセチルムラミダーゼ活性の阻害に関与するポリペプチド領域を同定するために、リゾチームに結合しそしてそのアセチルムラミダーゼ活性を阻害することが過去に記載されたポリペプチドについて、生物学的データベースを検索した。キーワードとして用語「リゾチーム」および用語「インヒビター」を用いた、国立保険研究所のPubMedデータベースを通じた検索から、Ivy(脊椎動物リゾチームのインヒビターを意味する)と名づけられる*Escherichia coli*タンパク質を同定した。このIvyは、ヒトリゾチームおよびニワトリリゾチームの両方に結合し、それらのアセチルムラミダーゼ活性を阻害することが報告されている(Monchoisら(2001) J. Biol. Chem. 276:18437-18441)。このタンパク質は、(i)成熟Tp17(15 kDaの成熟ポリペプチド)と、大きさが類似し(14 kDaの成熟ポリペプチド)、そして(ii)ニワトリリゾチームと複合体化したIvyの結晶構造が、Research Collaboration for Structural Bioinformatics(RCSB)におけるタンパク質データバンクPDBにおいて、登録番号1GPQと

して利用可能であるので、興味深かった。しかし、図11Aに表されるように、このIvyタンパク質は、Tp17と21%未満のアミノ酸配列同一性しか共有せず、そして、ポリペプチド配列アラインメントからは、明白なペプチドモチーフは推論出来なかった。このIvy/ニワトリリゾチームの三次元結晶構造を、両方の分子間の境界面に位置する残基について調べた。Cn3D三次元分子構造ビューアーを用いて、Ivyとニワトリリゾチームとの間の分子相互作用を分析した。以下の実施例において、全ての番号付けは、以下のNCBI登録番号として記録されたデータを参照し、そしてそのデータに対応する：ニワトリリゾチームについてP00698、ヒトリゾチームについてNP_000230、E.coli IvyについてP45502、およびT.pallidum Tp17についてP29722。

10

【0193】

図11Bに描写されるように、Ivyと接触する可能性のある、ニワトリリゾチームの3つの領域を同定した。対応するペプチドストレッチは：

【0194】

【化9】

ペプチド I: NH₂-₅₂QGHKLPAWVMKGG[**TYT**]P₆₇-COOH (配列番号 :37)

ペプチド II: NH₂-₈₅CK[**PHD**]CG₉₁-COOH (配列番号 :38)

ペプチド III: NH₂-₁₄₅GS[**LEN**]HPDGFN₁₅₅-COOH (配列番号 :39)

である。

20

【0195】

ペプチドIIは、両末端でKPHDモチーフ（配列番号40；図14A）を含むペプチドループに近接する、cys-cysジスルフィド架橋を含む指様構造を示した。このループに存在するアミノ酸の精密な分析から、H₈₈-ivyとE₅₃-chkcLysの間、およびD₈₉-ivyとR₁₃₂-chkcLysの間における2つの強力な非共有結合的静電相互作用を明らかにした。

【0196】

H₈₈-ivyの窒素原子は、E₅₃-chkcLysの酸素原子と相互作用し、そしてD₈₉-ivyの酸素原子は、R₁₃₂-chkcLysの窒素原子と相互作用した（図12）。3-D Molビューアーコンピュータソフトウェア（Vector NTI suite 8.0、Infomax、Frederick、Maryland）を用いて、原子中心間の距離を、H₈₈-ivy/E₅₃-chkcLys相互作用については2.56 Å（1 Å = 10⁻¹⁰ m）、およびD₈₉-ivy/R₁₃₂-chkcLys相互作用については2.46 Åと測定した。原子中心の性質（側鎖残基間の静電気引力）および近さ（2.4~3.4 Åの範囲）は、「塩橋」と呼ばれる特定の種類の非共有結合の存在を示した。ほとんどの塩橋は、比較的水分のない窪みか、または水が排除される生体分子の境界面において生じるので、（Petskoら（2003）Protein Structure and Function, LawrenceおよびRobertson（編）New Science Press Ltd.、UK）この知見は興味深かった。

30

40

【0197】

図13A~図13Dは、

【0198】

【化10】



を含む塩橋が、溶媒の水分子に部分的に曝露されており（図13Cおよび図13D）、一方で

【0199】

【化 1 1】



を含む塩橋が、タンパク質－タンパク質境界面によって完全に埋まり、そして結果的にタンパク質－タンパク質境界面によって溶媒から保護されていた（図 1 3 A および図 1 3 B）ことを図示する。塩橋の水和がその結合強度を弱めると仮定すると、

【0 2 0 0】

【化 1 2】



10

の塩橋は

【0 2 0 1】

【化 1 3】



の塩橋よりも、溶媒によってより破壊される可能性が低い。興味深いことに、図 1 3 A および図 1 3 B はまた、

【0 2 0 2】

【化 1 4】



20

の塩橋が、ニワトリリゾチームのグルタミン酸 5 3（ E_{53} ）への接近性を阻害したことを示す。全長リゾチーム配列におけるグルタミン酸 number 5 3（ E_{53} ）およびアスパラギン酸 7 1（ D_{71} ）は、成熟リゾチームペプチド鎖の残基 E_{35} および残基 D_{53} に対応する。図 3 A および図 3 B に描写されるように、成熟ニワトリリゾチームにおける（またはヒトリゾチームにおける） E_{53} は、 D_{53} と共に、全ての公知のリゾチーム配列に渡って保存され、そしてペプチドグリカンの加水分解に必要な 2 つの触媒作用的残基であると考えられる（Malcolmら（1989）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:133-7）。

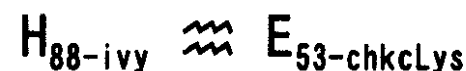
【0 2 0 3】

30

まとめると、これらのデータは、Ivy が、リゾチームでの 2 つの塩橋を確立することを実証する：一方は、特異性および相互作用の安定性

【0 2 0 4】

【化 1 5】



ならびに立体障害によるリゾチーム抗菌活性の阻害に必須であり、他方、

【0 2 0 5】

【化 1 6】

40



は、より少ない程度に、リゾチーム／インヒビター相互作用の安定化に関与する。残基 E_{35} および D_{53} ／ D_{52} D_{52} （番号付けは、成熟リゾチーム配列による）の種間の厳密な保存に起因して、これらの所見は、Tp17 が、全てではないにしても、広い範囲のリゾチームを阻害することを示す。

【0 2 0 6】

（実施例 5：哺乳動物リゾチームのタンパク質インヒビターが共有するコンセンサスペ

50

プチド配列の同定)

実施例 4 は、ペプチド I I 配列 $\text{NH}_2\text{-CKPHDCG-COOH}$ (配列番号 38) が、ニワトリリゾチームへ結合し、その酵素活性を阻害するために必要であることを実証する。Tp17 ポリペプチド配列の詳細な試験により、ニワトリおよびヒト両方のリゾチームの結合および阻害をおそらく媒介する 2 つの候補配列が同定された。これらの配列は、Tp17__pep1 および Tp17__pep2 といわれ、ともに、以下に列挙される：
 Tp17__pep1: $\text{NH}_2\text{-}_{29}\text{C P H A G K A K A E K V E C}_{42}\text{-COOH}$ (配列番号 41)
 Tp17__pep2: $\text{NH}_2\text{-}_{114}\text{K A P H E K E}_{120}\text{-COOH}$ (配列番号 42)。

10

【0207】

Tp17__pep1 は、E. coli Ivy タンパク質の $\text{NH}_2\text{-}_{85}\text{CKPHDCG}_{91}\text{-COOH}$ モチーフ (配列番号 38) に密接に関連しているが、ヒスチジン残基をアスパラギン酸残基から分離している 9 アミノ酸の拡がりが存在することで異なる。図 14B に示されるように、および Ivy モチーフについて見出されるように (図 14A)、2 つの隣り合うシステインの架橋が、おそらくリゾチームの残基 E_{53} および R_{132} と接触することができる配置で、空間的に近い、重要なヒスチジン残基およびアスパラギン酸残基をおそらく架橋する。Tp17 の考えられる 9 アミノ酸ループの機能は、現時点では未知であるものの、その組成は、非常に親水性であり、おそらく免疫原性であることを示唆する。この 9 アミノ酸ループ中に含まれる正に荷電したリジン残基は、リゾチームの負に荷電した表面領域と直接接触し得、このことは、結合を強めるためにさらなる結合点を提供する。Tp17__pep1 ペプチドと Ivy リゾチーム結合モチーフとを整列させることによって、コンセンサス配列 $\text{CX}_1\text{PHX}_n\text{X}_2\text{C}$ (配列番号 43) (ここで X_1 は、少なくとも 1 つのアミノ酸であるか、存在しないか、またはペプチド結合であり、 X_n は、0~9 個のアミノ酸であるか、またはペプチド結合であり、 X_2 は、グルタミン酸またはアスパラギン酸である) が得られた。

20

【0208】

この 2 つの隣り合うシステインを欠いているが、Tp17__pep2 はまた、E. coli Ivy タンパク質の $\text{NH}_2\text{-CKPHDCG-COOH}$ モチーフ (配列番号 38) によく似ていた。なぜなら、これは、重要な PH 残基、次に酸性残基 (D/E) を共有するからである。構造データを編集する場合、参考文献情報およびデータベース検索により、ユニバーサル PROSITE ペプチドパターンシンタックスフォーマットを用いて書かれたリゾチーム結合コンセンサス [CKVA] [ACK] P H [AED] [CGK] (配列番号 3) が明らかになった。

30

【0209】

さらなるコンセンサス配列を決定し、ユニバーサル PROSITE ペプチドパターンシンタックスフォーマット (このフォーマットは、Expert Protein Analysis System's SWISSProt データベースを通じて入手可能である) を用いて以下のように書いた。

(a) X_nPHX_n (配列番号 1) (ここで X_n は、少なくとも 1 つのアミノ酸である)

40

(b) $\text{CX}_1\text{X}_2\text{X}_3\text{PHX}_4\text{X}_5\text{X}_6\text{X}_7\text{X}_8\text{X}_9\text{X}_{10}\text{X}_{11}\text{X}_{12}\text{X}_{13}\text{C}$ (配列番号 2) (ここで $\text{X}_1\sim\text{X}_{13}$ は、任意のアミノ酸であるか、アミノ酸がないかまたはペプチド結合である)

(c) X_1CPHAG (配列番号 25) (ここで X_1 は、C または V である)。

【0210】

Tp17 様ポリペプチドの好ましい実施形態は、図 1A、図 1B および図 2 に例示される。

【0211】

(実施例 6: 推定リゾチーム結合タンパク質およびインヒビターのインシリコ同定)

E. coli Ivy および T. pallidum Tp17 が共有するペプチド配列

50

保存性が全体的に低いとすると、以前に検出されなかったリゾチーム結合モチーフは、おそらく、他の病原性生物のゲノム中に存在していた。この仮定を検証するために、実施例5において規定されるコンセンサス配列を使用して、ScanPrositeアルゴリズム (<http://us.expasy.org/tools/scanprosite/>) を使用して、タンパク質データベース (Swiss-Prot、TrEMBL、TrEMBLnewおよびPDB) を調べた。図1A、図1B、および図2は、コンセンサス配列内でフィットするペプチドの拡がりを含むタンパク質が、多くのヒトおよび動物の病原体中に存在したことを例示する。

【0212】

T. denticola、*B. thetaiotaomicron*、*C. burnettii*、*H. influenzae*、*N. meningitidis*の血清群Aおよび血清群B、*V. cholerae*、*V. vulnificus*、*H. ducreyi*、*S. typhi*、*L. pneumophila*、*S. aureus*、*N. gonorrhoeae*、ならびに*B. pertussis*に由来するタンパク質は、以下のコンセンサス配列に分けられ得る：CX (0, 3) PHX (0, 14) (これは、Cys Xaa₁ Xaa₂ Xaa₃ Pro His Xaa₄ Xaa₅ Xaa₆ Xaa₇ Xaa₈ Xaa₉ Xaa₁₀ Xaa₁₁ Xaa₁₂ Xaa₁₃ Xaa₁₄ Xaa₁₅ Xaa₁₆ Xaa₁₇ Cys (配列番号176) に対応し、ここでXaaは任意のアミノ酸であるか、または存在しない)。

【0213】

タンパク質 (*P. gingivalis* および *H. pylori* に由来する) は、わずかに典型的でない改変体であり、この改変体は、以下のコンセンサスに基づいて分けられ得る：CX (0, 3) HX (0, 10) C (これは、Cys Xaa₁ Xaa₂ Xaa₃ His Xaa₄ Xaa₅ Xaa₆ Xaa₇ Xaa₈ Xaa₉ Xaa₁₀ Xaa₁₁ Xaa₁₂ Xaa₁₃ Cys (配列番号175) に対応し、ここでxは、任意のアミノ酸であるかまたは存在しない)。

【0214】

この結果は、これらの生物の全てが、その感染性の生活環の一部または大部分の間で粘膜の病原体であるので、興味深い。単純ヘルペスウイルス2型gJ糖タンパク質のカルボキシ末端にコンセンサスペプチドモチーフが存在することは、特に興味深かった。このタンパク質の機能は、これまで未知であるものの、このウイルスの特有の短い (Us) 領域に存在するUs5遺伝子によってコードされる。この領域は、毒性およびヒト宿主タンパク質とのタンパク質-タンパク質相互作用の媒介に関与するHSVタンパク質の大部分を含むことが公知である。このことは、HSV感染の病因論におけるgJの役割を支持する。興味深いことに、いくつかの刊行物により、リゾチームが、HSV2感染およびその臨床的な症状発現に対して強力な阻害効果を有することが実証された (Cisaniら (1989) *Microbios.* 59:73-83; Overmannら (2003) *Antivir. Res.* 59:23-33)。HSV-2に由来するgJタンパク質はまた、リゾチーム結合/インヒビタータンパク質である。顕著なことには、このコンセンサスリゾチーム結合モチーフは、密接に関連したHSV-1 gJタンパク質には存在しない (図15)。この所見は、口顔領域に対するHSV-1の優先的ではあるが、唯一でない (exclusive) 向性を示すのに対して、HSV-2は、リゾチームリッチな、生殖器粘膜において最も頻繁に見出される、臨床的所見の考えられる説明を提供する (Lowhagenら (2002) *Acta Derm. Venereol.* 82:118-21; Bruistenら (2003) *Curr. Womens Health Report* 3:288-98)。さらに、2つの生殖器病原体 (1つはウイルス (HSV-2) であり、もう一方は細菌 (*T. pallidum*) である) が、共通するリゾチーム阻害性ペプチド配列を共有することを観察したのは興味深い。

【0215】

これらの所見は、gJが、単独でも、ヒトリゾチームと合わさっても、特異な血清学的

アッセイまたはウイルス学的診断アッセイを用いて、HSV-1感染とHSV-2感染との間を区別するために有用であることを実証する。このことはまた、gJならびに／またはIvyファミリーおよびTp17ファミリーのメンバーによる阻害を逃れ得るリゾチーム変異体で、単純ヘルペス感染を処置するための組成物および方法を提供する。

【0216】

(実施例7：リゾチーム／インヒビタータンパク質－タンパク質相互作用を不安定化する点変異の同定)

タンパク質－タンパク質相互作用が、構造的相補性および物理化学的相補性に依存していることは、広く認識されている。タンパク質表面の不規則性および局所的不均質性は、リガンドとの特異的結合および会合を可能にし、四次構造の形成の基礎を提供する。1つのタンパク質表面と別のタンパク質表面との間のフィットは、それらの形状に依存するだけではない。それは、一緒に複合体を維持している弱い物理化学的結合：共有結合、水素結合、塩橋、長距離の静電相互作用およびファンデルワールス相互作用に及ぶ。この相補性の特性は、タンパク質と低分子との間、またはタンパク質と別の種の高分子との間であろうと、普遍的である(Petskoら(2003))。

【0217】

リゾチームコード配列中に位置する変異を、アセチルムラミダーゼおよび抗菌活性に影響がなく、リゾチーム／インヒビター相互作用を不安定化し、病原体タンパク質(例えば、T.pallidum Tp17抗原またはIvyファミリーのメンバー)による阻害に対する耐性を付与するように選択した。一実施形態において、変異リゾチームは、対応する野生型リゾチームの望ましい抗菌活性(例えば、少なくとも約30%、50%またはさらに80%)を実質的に保持する。このような変異リゾチームは、感染症の処置のための新規かつ興味深いツールになる。これらの変異リゾチームはまた、市販の医療用調製物において使用される、天然の鶏卵由来のニワトリリゾチームの代わりでもあり、改善された効力および活性スペクトルを有する。このような阻害耐性リゾチーム変異体の使用によりおそらく改善される潜在的な薬物の列挙は、以下に示される：

【0218】

【化17】

市販薬	製薬会社
LYSOPAIN ORL	Boehringer Ingelheim
LYSO-6	UCB Health Care
GLOSSITHIASSE	Laboratoire Jolly-Jatel
CANTALENE	Laboratoire Cooper
HEXALYSE	Laboratoire Bouchara-Recordati

このようなリゾチーム変異体は、標的をしばったアプローチおよびランダムアプローチの両方を用いて得られる。

【0219】

(結晶学的データから推測される阻害耐性リゾチーム変異体の標的をしばった同定)

これらの高い等電点 (pI) に起因して、ヒトリゾチーム (理論的 pI = 9.28) およびニワトリゾチーム (理論的 pI = 9.32) は、pH 3 ~ pH 7 の間に含まれる生理学的値の pH で、強い正電荷を示す。全ての公知のリゾチームインヒビターは、低い pI 値を有する。例えば、*E. coli* 由来の成熟 Ivy タンパク質 (Monchois ら (2001) *J. Biol. Chem.* 276:18437-18441) (pI = 5.51) および *P. aeruginosa* 由来の成熟 Ivy タンパク質 (pI = 5.69) 、ならびに *S. pneumoniae* 由来の成熟 Sic タンパク質 (Fernie-King ら (2002) *Infect. Immun.* 70:4908-4916) (pI = 4.39) は、生理学的 pH で負に荷電している。リゾチーム/インヒビター接触領域に存在する正に荷電したリゾチーム残基は、変異誘発のための魅力的な標的であると仮説を立てた。負に荷電した接触領域を有するリゾチーム変異体を生成することは、そのインヒビターの結合を妨げる静電反発力を生成し得る。これらの変異は、リゾチームの触媒性残基に影響を及ぼさなかったため、病原体によって阻害されない、活性なリゾチーム変異体を生じるようである。

【0220】

PDB登録番号1GPQの下で受託された*E. coli* Ivy/ニワトリリゾチーム結晶構造、ならびにPDB登録番号1HKEの下で受託された*P. aeruginosa* Ivy結晶構造を、VNTI 3D分子ビューワーで調べた。重要な残基を、各リゾチームに対して同定し、インヒビターの結合を改変する以下の点変異を生成した：

【0221】

【化18】

ヒトリゾチーム (NP_000230) における位置	ニワトリリゾチーム (P00698)における位置	変異
リゾチーム表面電荷に影響を 及ぼす変異		
Lys ₁₉	Lys ₁₉	Asp, Glu または Gly
Arg ₂₃	Arg ₂₃	Asp, Glu, または Gly
Lys ₅₁	Lys ₅₁	Asp, Glu, または Gly
Arg ₁₃₁	Arg ₁₃₀	Asp, Glu, または Gly
Arg ₁₃₃	Arg ₁₃₂	Asp, Glu, または Gly
インヒビターの結合を立体的に障 害する変異		
Gly ₅₅	Asn ₅₅	Phe, Trp または Tyr
Asn ₅₇	Asn ₅₇	Phe, Trp または Tyr
Asn ₁₃₂	Asn ₁₃₁	Phe, Trp または Tyr

(部位指向性変異誘発による点変異の導入：)

QuikChange (登録商標) 部位指向性変異誘発キットを用いて、供給元 (Stratagene, La Jolla, CA) により推奨されるガイドラインに従って、変異を導入する。簡潔には、QuikChange (登録商標) 部位指向性変異誘発キットを、点変異を作製し、アミノ酸を変え、単一もしくは複数のアミノ酸を欠失もしくは挿入するために使用する。QuikChange (登録商標) 部位指向性変異誘発法を、PfuTurbo (登録商標) DNAポリメラーゼおよび温度サイクラーを用いて行う。PfuTurbo (登録商標) DNAポリメラーゼは、高忠実度で変異オリゴヌクレオチドプライマーを置換せずにプラスミド鎖の両方を複製する。その基本的な手順は、目的の挿入物を有するスーパーコイルド二本鎖DNA (dsDNA) ベクター、および望ましい変異を含む2種類の合成オリゴヌクレオチドプライマーを利用する。このオリゴヌクレオチドプライマーは、各々、ベクターの反対側の鎖に相補的であり、PfuTurbo DNAポリメラーゼによる温度サイクリングの間に伸長される。このオリゴヌクレオチドプライマーの組み込みは、互い違いの (staggered) ニックを含む変異プラスミドを生成する。温度サイクリングの後に、この生成物を、DpnIで処理する。このDpnIエンドヌクレアーゼ (標的配列: 5' - Gm 6 ATC - 3') は、メチル化DNAおよびヘミメチル化DNAに特異的であり、これを使用して、親DNAテンプレートを消化し、変異を含む合成DNAを選択する。ほとんど全てのE. coli株から単離されるDNAを、damメチル化し、よって、DpnI消化しやすくする。次いで、望ましい変異を含む、このニック形成したベクターDNAを、XL1-Blueスーパーコンピテント細胞 (supercompetent cell) に形質転換する。この方法を行うために必要な少量の出発DNAテンプレート、高忠実度のPfuTurbo DNAポリメラーゼ、および低サーマルサイクル数は、全て、反応の間の高変異効率およびランダム変異誘発生成の可能性の減少に寄与する。

【0222】

(PCR媒介性ランダム変異誘発、続いて微生物ツーハイブリッドスクリーニングを用いる阻害耐性リゾチーム変異体のランダム単離)

ツーハイブリッドシステムは、多くの真核生物転写アクチベーターが、2つの物理的に別個の分子ドメイン: DNA結合ドメイン (DNA-BD) および活性化ドメイン (AD) からなるという所見に基づく。このDNA-BDは、特定のプロモーター配列に結合し、このADは、RNAポリメラーゼII複合体を、選択可能表現型/スクリーニング可能表現型を付与する下流遺伝子を転写するように指向する。これらドメインは、独立したモジュールとして作用する: いずれも単独では転写を活性化できないが、各ドメインは、他方のタンパク質に融合されると機能し続ける。適切な市販の系としては、直ぐ使用できるBacterioMatch (登録商標) II ツーハイブリッドシステム (Stratagene, La Jolla, CA) またはBD Matchmaker0システム (BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA) が挙げられる。

【0223】

リゾチームおよびTp17 (一方はADに融合され、他方は、DNA-BDに融合された) を発現させる。この2つのタンパク質が相互作用する場合、DNA-BDドメインおよびADドメインは、近位にあって、レポーター遺伝子の転写を活性化させる。使用される宿主系 (例えば、細菌、酵母または哺乳動物) に依存して、相互作用を、観察可能な生理学的変化または構造的変化 (例えば、コロニーの色、蛍光発光、酵素活性など) についてのスクリーニングにより検出する。例えば、ADドメインおよびDNA-BDドメインを、リゾチームおよびTp17とそれぞれ融合し、適切な微生物宿主 (例えば、細菌または酵母) に形質転換し、得られた形質転換体を、レポーター遺伝子 (例えば、β-ガラクトシダーゼ) の活性化を示す青色コロニーの出現についてスクリーニングする。一旦コロニーが得られると、ヒトリゾチームオープンリーディングフレームを有するプラスミドDNA配列を、大規模なPCR媒介性ランダム変異誘発に供する。得られる形質転換体を、青色を失った変異体について視覚的にスクリーニングすると、リゾチーム/Tp17様ポ

リペプチド相互作用を損なっている1以上の変異を有するようである。次いで、対応するコロニーからプラスミドDNAを抽出し、配列決定する。

【0224】

(実施例8：ヒトリゾチームは、梅毒診断に使用される血球凝集キットの感度を改善するが、ニワトリリゾチームは、改善しない)

実施例3は、インビトロで、T. pallidumの17kDaタンパク質であるTp17がニワトリリゾチームおよびヒトリゾチームに強く結合し、この両方のリゾチームの抗菌活性を強く阻害することを実証する。以下の実験は、これらの結合および阻害の相互作用がまた、T. pallidumによるヒト粘膜表面の感染の間にインビボで生じることを実証する。リゾチームへのTp17結合の結果として、新たなエピトープがおそらく形成され、免疫系に曝される。梅毒患者は、図4に示されるように、Tp17エピトープに対する免疫応答、およびTp17-リゾチーム複合体によって共有されるエピトープまたはさらにリゾチーム単独に対する免疫応答を惹起させ得る。このことを検証するために、ヒトリゾチームまたはニワトリリゾチームを、その複合体に対して生成される抗体を検出するために、梅毒診断アッセイに使用される血球凝集試薬に添加し、それによりこのアッセイの感度を改善した。梅毒アッセイの感度の上昇により、ヒトリゾチームに特異的であったことが観察された。

【0225】

精製鶏卵卵白リゾチーム(L-6876)およびヒト乳汁リゾチーム(L-6394)を、Sigma-Aldrich (Madrid, Spain) から得た。割合：3 μg リゾチーム/1 μg Tp17を維持するために十分なニワトリリゾチームまたはヒトリゾチームの量を、以下のように調製した血球凝集試薬(BioKit SA, Llica d'Amunt, Spain)に添加した。ニワトリ赤血球を、以前に記載されるように(Herbertら(1979) Passive Haemagglutination With Special Reference to the Tanned Cell Technique. Handbook of Experimental Immunology (vol. 1), pgs 20. 1-22. 20 (DMWeir (編) Blackwell Scientific Publications (Oxford)) ; Stefanら(1951) J. Exp. Med. 93: 107-120 ; Hirata (1968) J. Immunol. 100: 641-46))、タンニン酸処理し(tanned)、固定し、GST-Tp17(40 μg/ml)でコーティングした。GST-Tp17コーティングした固定ニワトリ赤血球(5ml)のバッチ1つに、精製鶏卵卵白リゾチーム(100 μg/μl)を6 μl補充した。GST-Tp17コーティングした固定ニワトリ赤血球の別のバッチ(1ml)に、120 μlのヒト乳汁リゾチーム(1 μg/μl)を補充した。感作させた赤血球の両方のロットを、マグネチックスターラーで室温で30分間ホモジナイズした。次いで、各ロットの感度を、他の市販の血球凝集試薬では境界線上の応答を与えると特徴づけられたヒト梅毒血清のセットを用いて、血球凝集反応を行うことにより評価した。

【0226】

血球凝集反応を以下のように行った。丸底マイクロタイタープレート(U形状)において、25 μlの希釈液(Syphagen TPHA, BioKit SA, Barcelona, Spain)をウェル1に、100 μlをウェル2に、そして25 μlをウェル3~8の各々に添加した。25 μlのサンプルを、ウェル1に添加した。ウェル1の中身を混合し、25 μlをウェルに移し、混合した。25 μlをウェル2からウェル3に移し、混合した。次いで、連続2倍希釈をウェル8まで行った。ウェル8からの25 μlを、廃棄した。75 μlの血球凝集試薬を、ウェル3~8に添加した(最終的なサンプル希釈率は、1/80~1/2560であった)。振盪機で少なくとも30秒間、ウェルの中身を混合した。このプレートを覆い、1時間室温でインキュベートした。このアッセイの結果を、以下の基準を適用して読み取った。結果を、ウェルの底全体を滑らかな細胞の層(smooth mat of cell)が覆うかまたは滑らかな細胞の層がウェルの

底部を部分的に覆うかいずれかの場合に陽性とスコア付けし、細胞の濃い環で囲まれるのを観察した。小さな中心開口部を有する、細胞がボタン状になったものか、または中心において非常に小さな穴ありもしくはなしの、細胞がボタン状になったものが観察されたかのかいずれかの場合に、結果を陰性とスコア付けした。サンプルの力価は、陽性反応を与える最高の希釈率に対応した。この技術のカットオフは、 $1/80$ であった。

【0227】

図16Aおよび図16Bに示されるように、このアッセイにヒトリゾチームを添加すると、濃度依存性様式で、血球凝集強度が改善される（すなわち、リゾチームがない場合と比較して、ヒトリゾチームがある場合により高い希釈率で血球凝集が起こる）。このような改善は、ヒトリゾチームに特異的であるようであった。なぜなら、ニワトリリゾチームの添加は、応答を増強しなかったからである。ヒトリゾチームを添加すると、梅毒血球凝集試薬の感度が激しく改善され、市場に現在あるキットでは検出できない抗体の検出を可能にした。

10

【0228】

（実施例9：天然および組換え両方のヒトリゾチームが、梅毒診断に使用される血球凝集試験の感度を改善する）

ヒト乳汁は、天然のヒトリゾチーム供給源である。しかし、以下に起因して、この体液からリゾチームを精製することは面倒である：（i）その量が少ないこと、（ii）定期的かつ再現性のある供給物を確保することが困難であること、（iii）非検出病原体での考えられる汚染、ならびに（iv）社会的考慮事項および倫理上の考慮事項。従って、ヒトリゾチームの組換え供給源は、工業規模で使用するために好ましい。天然のヒト乳汁由来リゾチームおよびトランスジェニックイネ由来の組換えヒトリゾチーム両方の効力を試験した。

20

【0229】

精製天然ヒト乳汁リゾチーム（L-6394；Sigma-Aldrich, Madrid, Spain）は、 $101,000$ ユニット/mgタンパク質および10% リゾチーム含有量を有した。精製組換えヒトトランスジェニックイネリゾチーム（159-53 LZ-90P；Ventría Bioscience, Sacramento, California）は、 $187,000$ ユニット/mg タンパク質および90% リゾチーム含有量を有した。両方のリゾチームに関する単位定義は、以下の通りである。1ユニットは、2.6ml反応混合物中、基質として*Micrococcus lysodeikticus*の懸濁液を用いて、 450nm での吸光度が、 25°C 、 $\text{pH}6.24$ で1分あたり0.001増加を生じる（1cm光路）。（Shugarら（1952）Biochem. Biophys. 8:302-309）。実験の結果を比較できるようにするために、割合：594ユニットのヒトリゾチーム/ μg GST-Tp17を、各々使用した。天然または組換えいずれかのリゾチーム等量を、梅毒血球凝集試薬に添加して、血球凝集反応（実施例8に詳述される）を行った。両方のリゾチームの効力を、陽性梅毒サンプル陰性梅毒サンプルに対して試験した。

30

【0230】

図17Aおよび17Bに例示されるように、試験した10サンプルのうちの6サンプルは、天然ヒトリゾチーム（Lys N）または組換えヒトリゾチーム（Lys R）のいずれかを添加で、アッセイの感度において改善を示した。

40

【0231】

図18Aは、組換えヒトリゾチームを、梅毒血球凝集試薬に添加すると、アッセイ感度が実質的に改善されたことを示す。34個の真に陽性のサンプルの評価において、リゾチームを含まなかった試薬を使用して陰性と判断された19サンプルのうちの14個は、実際、リゾチームが反応系に添加された場合に陽性であった。図18Bに例示されるように、陽性反応と陰性反応との間のこの視覚的区別は、組換えヒトリゾチームがこの試薬に添加される場合に単純化される。

【0232】

50

図19は、組換えヒトリゾチーム（Lys R）あり（試薬Lys R）または組換えヒトリゾチーム（Lys R）なし（試薬R）での、2つの血球凝集試薬の性能（相対的血球凝集強度）を示す。その実験において、Lys R血球凝集試薬は、試薬Rをしのぎ、試験した全ての血清（ $\mu = 34$ ）で、約1倍～約2倍高い相対凝集力価を示した。

【0233】

図20は、組換えヒトリゾチーム（Lys R）を梅毒血球凝集試薬に添加しても、擬陽性結果をもたらさないことを示す。200個の血液バンクサンプルの評価において、両方の試薬の間の平均の結果および標準偏差は、非常に近かった。組換えヒトリゾチームの効力は、従って、天然の乳汁リゾチームの効力に等しい。よって、組換えリゾチームは、診断適用に関して、天然リゾチームの代わりとなり得る。

10

【0234】

（実施例10：ヒトリゾチームは、梅毒診断に使用される酵素結合免疫吸着法（ELISA）キットの感度を改善する）

梅毒スクリーニングは、酵素結合免疫吸着法（ELISA）キットを用いて慣用的に行われている。これらのキットは、マイクロタイタープレートのウェルに固定したT. pallidum抗原への抗梅毒抗体の結合を検出する。そのプレートへの抗梅毒抗体の結合の検出は、通常、ヒトFc抗体鎖に対する酵素標識抗血清（第2世代キット）または酵素標識T. pallidum抗原（第3世代キット）のいずれかによって行われる。

【0235】

このような市販の診断試薬の例を、以下に列挙する：

20

【0236】

【化19】

製品名	製造業者	キット形式
Bioelisa Syphilis	Biokit S.A. (Llica d' Amunt, Spain)	第2世代
Bioelisa Syphilis 3.0	Biokit S.A. (Llica d' Amunt, Spain)	第3世代
ICE* Syphilis	Abbot Murex (Dartford, UK)	
Syphilis EIA480	New Market Laboratories (Kentford, UK)	第3世代
Enzywell	Diesse (Siena, Italy)	第3世代

30

（第2世代キット形式を用いた梅毒抗体の検出）

この研究において使用される全ての試薬は、市販のBioelisa Syphilis 3.0検出キット（Biokit S.A., Llica d' Amunt, Spain）により提供される。使用されるプロトコルは、キットのパッケージ挿入物において推奨されるものである。簡潔には、血清サンプルまたは血漿サンプルを、マイクロタイタープレートのウェルに添加する。T. pallidumに特異的な抗体がサンプル中に存在する場合、その抗体は、ウェルを覆う抗原と安定な複合体を形成する。洗浄して非結合物質を除去した後、西洋ワサビペルオキシダーゼで標識されたウサギ結合体化抗ヒトIgGおよび抗ヒトIgMを添加し、抗原／抗体複合体が存在する場合、その結合体は、複合体に結合する。2回目の洗浄の後に、色素原を含む酵素基質溶液を添加する。この溶液は、サンプルが陽性である場合は、青色を発色させる。この青色は、硫酸で反応をブロックした後に黄色に変化する。色の強度は、サンプル中の抗T. pallidum抗体濃度に比例する。陰性サンプルを含むウェルは、無色のままである。

40

【0237】

（第3世代のキット形式を用いた梅毒抗体の検出）

50

この研究において使用される全ての試薬は、市販の Bio el i s a Sy p h i l i s 3. 0 検出キット (B i o k i t S. A. , L l i c a d ' A m u n t, S p a i n) により提供される。使用されるプロトコルは、キットのパッケージ挿入物において推奨されるものである。簡潔には、T. p a l l i d u m タンパク質 (例えば、組換え T p 1 5 抗原、組換え T p 1 7 抗原または組換え T p 4 7 抗原) でコーティングしたマイクロタイタープレートのウェル中で試験標本をインキュベートすることによって試験を行う。サンプル中に存在する特異的 I g G 抗体および I g M 抗体は、固相抗原に結合する。その後、ウェルを洗浄して、残りの試験サンプルを除去し、酵素ペルオキシダーゼと結合体化した T. p a l l i d u m 抗原を添加する。この結合体は、捕獲された特異的抗体に結合する。さらに洗浄して、非結合物質を除去した後に、酵素基質および色素原の溶液を添加する。この溶液は、サンプルが抗 T. p a l l i d u m 抗体を含む場合に、青色を発色する。この青色は、硫酸で反応をブロックした後に黄色に変化する。色の強度は、サンプル中の抗 T. p a l l i d u m 抗体濃度に比例する。

10

【0238】

(組換えヒトリゾチームの添加)

第2世代のELISA形式に関して、組換えヒトリゾチーム (V e n t r i a B i o s c i e n c e, V e n t u r a, C A) を、 $2.86\mu\text{g}/\text{ml}$ で、Bio el i s a Sy p h i l i s 3. 0 ELISA プレートに添加した。第3世代キットに関しては、組換えヒトリゾチームを、サンプル希釈緩衝液 ($10.8\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度) または結合体希釈緩衝液 ($1.08\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度) のいずれかに添加した。

20

【0239】

図21Aおよび図21Bに示されるように、梅毒陽性ヒト血清を、Bio el i s a Sy p h i l i s (第2世代) ELISA 試薬および Bio el i s a Sy p h i l i s 3. 0 (第3世代) ELISA 試薬で試験した場合に、シグナル強度の有意な増大が、ヒトリゾチームの存在下で検出された。シグナル強度の増大は、リゾチームをプレートに添加して、第2世代形式で血清を試験した場合、約20%の範囲であり、リゾチームをサンプル希釈緩衝液および結合体希釈緩衝液の両方に添加して、第3世代形式に従って処理した場合、(4血清のうち3血清について) 約200%の範囲であった。興味深いことに、リゾチームを添加しても、梅毒陰性ヒト血清の応答は変化しない。これらのデータは、ヒトリゾチームが、ELISAベースの梅毒検出およびスクリーニングの感度を増大させることを実証する。

30

【0240】

(実施例11：ヒトリゾチーム/Tp17複合体の精製)

ヒトリゾチーム/Tp17タンパク質複合体は、非常に抗原性が高く、上記のように、診断アッセイにおいて有用である。精製ヒトリゾチーム/Tp17複合体の単離は、構造研究 (例えば、タンパク質結晶化およびX線回折を介する原子構造の決定) の能力を促進する。以下に記載される実験手順を用いて、mg量の精製ヒトリゾチーム/Tp17-HIS複合体を得た。

【0241】

(Tp17-HIS単量体およびTp17-HIS二量体の単離)

40

精製Tp17-HISタンパク質 (実施例1に記載されるように得た) を、単量体および二量体を他の凝集形態から分離するために、ゲル濾過クロマトグラフィーによりさらに精製した (図22)。100mlのSuperose 12 HRを充填したHR16/50カラム (1.6cm 直径 $\times$ 60cm 高; A m e r s h a m B i o s c i e n c e s, C e r d a n y o l a, S p a i n) を、2カラム容量のゲル濾過緩衝液 (T r i s 20mM N a C l 300mM , pH8. 0) で平衡化した。次いで、8mgのTp17-HIS融合タンパク質を含む2mlサンプルを注入し、圧力0.70MPaの定圧下、流速1~1.25ml/分でクロマトグラフィーを行った。Tp17-HIS単量体およびTp17-HIS二量体に対応する画分 (1.5ml) を、3回の連続クロマトグラフィー運転から回収し、次いで、8mlのTp17-HIS単量体画分および6mlの

50

Tp17-HIS二量体画分にプールした。

【0242】

(インビトロでのTp17-HIS／ヒトリゾチーム複合体の形成)

組換えヒトリゾチーム (Ventria Bioscience, Sacramento, CA, USAから市販されている) は、図23に示されるアッセイ結果によって示されるように、非常に均質な単量体タンパク質からなった。

【0243】

インビトロで複合体を形成するために、3.8mgの精製Tp17-HIS単量体およびTp17-HIS二量体を、別個に、30分間、2倍モル過剰の精製組換えヒトリゾチーム (Ventria Bioscience, Sacramento, CA, USA) の存在下で、22℃で攪拌せずにインキュベートした。

10

【0244】

(ゲル濾過によるTp17-HIS／ヒトリゾチーム複合体の精製)

図24において示されるように、ヒトリゾチーム／Tp17複合体を、会合していない単量体から、上記のように、Superose 12 HR 16／50ゲルによるゲル濾過で分離した。Tp17-HIS／ヒトリゾチームピークに対応する画分を回収し、10kDaカットオフを有するCentricon Plus 20 (UFC2LGC08, The Millipore Corporation, Bedford, MA, USA) デバイスを用いて濃縮した。3カラム容量 (10ml) のTris-HCl 10mM, NaCl 50mM (pH8.0) で洗浄することによって、遠心分離濾過の間に緩衝液を交換した。Tp17-His_{単量体}／ヒトリゾチームおよびTp17-His_{二量体}／ヒトリゾチームの最終サンプルを、それぞれ、1.62mg/mlおよび1.57mg/mlで回収した。最終タンパク質回収率は、Tp17-His_{単量体}／ヒトリゾチーム複合体については60%であり、Tp17-His_{二量体}／ヒトリゾチーム複合体については44%であった。

20

【0245】

(実施例12：新規Tp17様タンパク質を発見するための方法)

Tp17およびTp17様タンパク質は、ヒトリゾチームに結合する能力を共有している。この所見に基づいて、病原性生物からの総タンパク質抽出物中のTp17様タンパク質の検出を提供する一般的な方法を考案した。一実施形態において、検出可能なマーカーと結合体化したヒトリゾチームを、タンパク質サンプルに混合する。リゾチームの結合は、サンプル中のTp17様ポリペプチドを同定する。

30

【0246】

(ヒトリゾチーム－西洋ワサビペルオキシダーゼ (HuLYS-POD) 結合体の調製)

ヒトリゾチーム－西洋ワサビペルオキシダーゼ結合体を、総容量3.5mlの炭酸緩衝液 (炭酸ナトリウム／－炭酸水素ナトリウム 50mM, pH9.55) 中で、9.72mgの組換えヒトリゾチーム (159-53LZ-90P; Ventria Bioscience, Sacramento, CA, USA) と13.6mgの活性化ペルオキシダーゼ (POD) (1.428.861; Roche, Mannheim, Germany) とを混合することにより、生成した。この結合反応を、30分ごとに手動で攪拌しながら、水浴中で25℃で2時間行った。この反応を、364μlのトリエタノールアミン2M (108379; Merck, Darmstadt, Germany)、および脱イオン水中4mg/mlの濃度の水素化ホウ素ナトリウム (45, 288-2; Sigma Aldrich Chemie, Steinheim, Germany) 455μlを、連続して添加することにより終了させた。得られた溶液を、15分間手動で攪拌し、次いで、2～8℃で30分間インキュベートした。次いで、227μlのトリエタノールアミン2Mを添加し、その混合物を、2～8℃で2時間インキュベートした。次に、91μlのグリシン1M (104201; Merck, Darmstadt, Germany) を添加し、その溶液を、15時間、TSG緩衝液 (Tris-HCl 20mM, NaC

40

50

1 150mM、グリシン 10mM、pH7.5) に対して透析した。次いで、この溶液を、30分間15,000gで遠心分離することによって透明にした。4.5mlの上清を回収した。500μlのBSA(Pentex Miles Inc., Kankakee, IL, USA; TSG緩衝液(Tris-HCl)中10%重量/容量)および25μlのマーシオレート(merthiolate)-硫酸ゲンタマイシンを、結合体に添加した。マーシオレート-硫酸ゲンタマイシンを、25mgの硫酸ゲンタマイシン(22191 E1; Jescuder, Terrassa, Spain)および400mgのチメロサル(T-5125 Sigma, Saint Louis, MO, USA)を、8.0mlのウシ胎仔血清中に溶かすことによって調製した。次いで、このpHを、水酸化ナトリウム(5M)でpH8.0に調節した。次いで、Millex GV 0.22μmフィルタ(SLGV R04 NL; The Millipore Corporation, Bedford, MA, USA)を通してこの結合体を滅菌濾過し、使用時まで、2~8℃で遮光保存した。

10

【0247】

(病原体に由来するタンパク質サンプルの処理)

2~20μgの病原体由来タンパク質を含む15μlサンプルを、5μlのNuPAGE(登録商標)LDS充填緩衝液(4×)(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)と混合し、直ぐに、NuPAGE(登録商標)MES SDS泳動緩衝液(1×)(NP0002; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)を使用して、4~12% NuPAGE(登録商標)Novex Bis-Trisポリアクリルアミドゲル(NP0323BOX; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)で分離した。印加された電圧は、35分間165ボルト一定である。タンパク質を移動させた後、ゲルを回収し、電気転写緩衝液(ET緩衝液: 25mM Tris、192mM グリシン、10% メタノール、pH調節なし)中で15分間インキュベートした。この分離されたゲル上のタンパク質を、次いで、電気泳動的にIMMOBILON(登録商標)P膜(IPVH00010; The Millipore Corporation, Bedford, MA, USA)に転写した。この膜を、メタノールで1回すすぎ、脱イオン水で2回すすぐことにより準備した。電気泳動的転写を行うために、印加した電圧を、1時間、65ボルトに一定して保持した。

20

【0248】

(HuLYS-PODタンパク質重層アッセイ)

電気転移の後、膜を、22℃で1時間、5%(重量/容量)のSVELTESSE(登録商標)スキムミルク(Nestle Espanya, Barcelona, Spain)によって補填したTBST(Tris-HCl 10mM pH8.0、NaCl 150mM、Tween 20)中でインキュベートする。次に、この膜をTBSTでリンスし、そして次に、1/5000希釈のHuLYS-HRP結合体を含むTBST-ミルク中、22℃で1時間インキュベートする。インキュベーションの後、この膜を、TBST中で3回洗浄する。次いで、この膜を10mlの3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジン(TMB)(T0565; SIGMA-ALDRICH Inc., Saint-Louis, MO, USA)中に浸漬することによって免疫染色を達成し、タンパク質を可視化する。ポジティブコントロールとして、17kDaで移動し、そしてIvyに対応する単一バンドが、Escherichia coli BL21(DE3)細胞抽出物中で検出される。

30

40

【0249】

(実施例13: グラム陽性細菌病原体は、ヒトリゾチームインヒビターを分泌する)

グラム陽性細菌は、外膜を欠き、そして培養培地に厚いペプチドグリカン層を広げる。結果として、これら細菌は、グラム陰性細菌よりリゾチーム殺傷に対しより感受性であるようである。従って、本発明者らは、ヒト病原体であるグラム陽性細菌がリゾチームインヒビターを所有すると仮定した。外膜の不在に起因して、これらインヒビターは、細菌培養培地中に存在し得る。以下に説明されるように、本発明者らは、8株の臨床的に関連す

50

るグラム陽性細菌種 (*Enterococcus faecalis* CECT184株、*Enterococcus faecium* ATCC10541株、*Staphylococcus aureus* ATCC11632株、*Staphylococcus epidermidis* ATCC12228株、*Streptococcus pneumoniae* ATCC49619株、*Streptococcus pyogenes* CECT598株、*Streptococcus agalactiae* CIP105451株、および*Propionibacterium acnes* NMR-GF株) からの培養培地中のリゾチームインヒビターの存在についてアッセイした。

【0250】

これらの株を、カチオン調節されたMueller-Hintonブロス (CAMHB) で48時間、37°Cで増殖させた。これらの細菌の細胞を、遠心分離 (20分間、14,000g、4°C) によってペレット化し、そして1mlの上清液を、Microcon (登録商標) YM-10遠心分離フィルターデバイス (The Millipore Corporation、Bedford、MA、USA) を用いて約200μlの最終容量まで濃縮した。各々の15μlの上清液濃縮物を、製造業者 (The Invitrogen company、Prat de Llobregat、Barcelona、Spain) の指示書に従って、NuPAGE (登録商標) の4-12%のグラーゼントゲルを用いたSDS-PAGE電気泳動によって分析し、そして次に銀染色 (Silver Xpress (登録商標) キット) して、タンパク質を視認可能にした。

【0251】

図25中に描写されるアッセイ結果によって示されるように、試験された8株の細菌種の各々について、別個のタンパク質パターンが検出された。ヒトリゾチーム (1単位) の細菌溶解活性は、上記8つの細菌種の各々に対応する濃縮された10μの上清液の不在下または存在下で決定された。このアッセイは、製造業者 (Molecular Probes、Eugene、OR、USA) の指示書に従って、EnzCheck (登録商標) リゾチームを用いて、先に記載のように実施された。図26に示されるように、リゾチーム酵素活性の完全な阻害が、*Propionibacterium acnes*、*Streptococcus agalactiae*、および*Streptococcus pyogenes*の濃縮された上清液の存在下で観察された。部分的な阻害が、*Staphylococcus aureus*、*Enterococcus faecalis*、および*Streptococcus pneumoniae*の濃縮された上清液の存在下で観察された。これらのアッセイ条件下では、*Enterococcus faecium* および*Staphylococcus epidermidis*の濃縮された上清液では阻害は検出されなかった。

【0252】

これらのデータは、ヒトリゾチームの特徴付けられていないインヒビターが臨床的に関連するグラム陽性細菌に存在し、これらは、このようなインヒビターを発見するための可能な供給源であり得ることを示す。これらのインヒビターは、薬物およびワクチン、ならびに新規な診断アッセイの新規かつ魅力的な標的を提示する。これらの実験はまた、グラム陽性細菌が、Tp17様ポリペプチド阻害に抵抗性である野生型または変異体の細菌により発現されるリゾチームポリペプチドをスクリーニングするために用いられ得ることを示す。

【0253】

(実施例14: Tp17/リゾチーム複合体の形成または安定性を阻害する候補化合物を同定する方法)

Tp17タンパク質およびTp17様タンパク質は、多くのヒト病原体および動物病原体 (例えば、ウイルス、細菌、真菌および原生動物) によって発現される。HuLYS/Tp17様タンパク質複合体の形成および/またはその安定性を妨害する薬物は、被験体中で病原体感染を防ぐか、またはこれを処置するために用いられ得る有望な抗微生物候補化合物である。このような抗微生物分子を単離するために、インビトロスクリーニング試

10

20

30

40

50

験が、以下のように考案された。この試験が、生物学的抽出物および化学的ライブラリーの高スループットスクリーニングのために有用であることは、当業者に明らかである。図27に示されるように、例示の方法は、以下の工程を含む：

(試薬の調製)

PBS 10×を、29 gの $\text{Na}_2\text{HPO}_4/12\text{H}_2\text{O}$ 、2 gの KH_2PO_4 および80 gの NaCl を1リットルの蒸留した発熱性物質なしの水に溶解し、そしてpHを水酸化ナトリウム(10M)でpH6.8に調節することによって調製した。BSA-グリシン溶液を、10 gのBSA(81-003; Pentex Miles Inc.、Kankakee、USA)、7.5 gのグリシン(500190; Merck、Darmstadt、Germany)および1 gのアジ化ナトリウム(6688; Merck、Darmstadt、Germany)を1リットルの蒸留水(MilliQグレード、The Millipore Corporation、Bedford、MA、USA)中に溶解することによって調製した。得られた溶液のpHを、 NaOH (10M)でpH7.4にした。ELISA洗浄緩衝液10×、TMB発色基質およびTMB希釈緩衝液は、市販される(BioELISA ANTI-HBS 96ウェルキット、3000-1101; biokit SA、Llica d'Amunt、Spain)。ELISAサンプル希釈緩衝液は、BioELISA Syphilis 3.0(3000-1148; biokit SA、Llica d'Amunt、Spain)から得た。

【0254】

(固体基板上的Tp17タンパク質および／またはTp17様タンパク質の固定化)

実施例1に記載のように産生された、精製GST-Tp17タンパク質を、PBS 1×中に0.4 μg/mlの濃度で再懸濁し、そしてその溶液の150 μlを、96ウェルのマイクロタイタープレート(MaxiSorp0 Lockwell10; NUNC、Roskilde、Denmark)中に分与し、そして室温(22°C)で16時間インキュベートした。次に、100 μlのBSA-グリシン溶液を添加し、そして22°Cで1時間インキュベートした。これらウェルを、次いで吸引により空にし、そして直ちに、200 μlのBSA-スクロースで満たした。インキュベーションを22°Cで1時間30分間実施した。各ウェルの液体内容物を注意深く吸引し、そしてこれらプレートを、次いで、気密なプラスチックバッグ中に詰める前に、乾燥室(15%相対湿度)中で3時間風乾した。

【0255】

(Tp17および／またはTp17様を化学薬品(単数または複数)ならびにHuLYS-PODと接触させること)

100 μlの候補化合物(ELISAサンプル希釈緩衝液中10 ng/ml~10 mg/mlの範囲の濃度で溶解)を、マイクロウェルに添加し、そして15分間37°Cでインキュベートする。ELISAサンプル希釈緩衝液中に1/20.000で希釈されたHuLYS-PODの50 μlを、ウェルに添加し、そしてさらなる15分の間インキュベートする。これらウェルを次いで、洗浄緩衝液で4回洗浄した。

【0256】

(候補化合物の発色およびスコアリング)

次いで、基質希釈緩衝液中に希釈された100 μlの西洋ワサビペルオキシダーゼ(POD)発色基質を各ウェルに添加し、そして30分後に100 μlの H_2SO_4 2Mを添加した後発色を停止する。この実験では、候補化合物なしでインキュベートされた3つのウェルの平均吸光度が、100%値に規格化される。HuLYS-PODの結合を、少なくとも40%、50%、60%、75%、85%、95%、またはそれ以上低減し得る分子または生物学的抽出物は、規格化された値と比較して単一チャンネルにおける個々の減少によって証明されるように、「ヒット」候補と考えられる。好ましくは、結合は、候補化合物と接触されなかったコントロールウェルに対して85%減少される。

【0257】

(実施例15: Tp17は、リゾチームの市販の調製物を阻害する)

ニワトリリゾチームは、細菌およびウイルスの両方に対して活性な潜在的抗微生物酵素である。リゾチームを活性薬剤として含む市販の調製物は、制限されないで、L I Z I P A I N A（登録商標）（Boehringer Ingelheim、San Cugat del Valles、Spain）およびL I S O Z I M A C H I E S I（CH I E S I E S P A N Y A S A、Barcelona、Spain）を含む。T p 1 7タンパク質は、精製されたニワトリリゾチームの酵素的抗細菌活性をインビトロで阻害することが示されたので、本発明者らは、T p 1 7がまた、L I Z I P A I N A（登録商標）およびL I S O Z I M A C H I E S Iの抗細菌活性を阻害し得ると仮定した。この仮説を試験するために、L I Z I P A I N A（登録商標）（1錠剤あたり5mgのニワトリリゾチームを含む）およびL I S O Z I M A C H I E S I（1錠剤あたり250mgのニワトリリゾチームを含む）の各々の薬物の1錠剤を、脱イオン水（The Millipore Corporation、Bedford、MA、USA）中に再懸濁し、リゾチーム濃度を4 μ g/mlに調節した。次いで、これらのサンプルを、G S T-T p 1 7またはT p 1 7-H I Sいずれかの増加する量の不在下または存在下でインキュベートした。この実験では、ニワトリリゾチームとその同族インヒビターとの間のモル比を、G S T-T p 1 7については1：5～1：50、そしてT p 1 7-H I Sについては1：16～1：160で変化させた。20℃で5分間のインキュベーションの後、これらサンプルを、E n z C h e c k（登録商標）リゾチームアッセイキット（E-22013；Molecular Probes Inc.、Eugene、OR、USA）を用い、供給者のガイドラインによって推奨されるように、リゾチーム酵素的活性についてアッセイした。

【0258】

図28Aおよび28Bで報告されるように、G S T-T p 1 7およびT p 1 7-H I Sの両者は、それぞれ、L I Z I P A I N A（登録商標）およびL I S O Z I M A C H I E S Iの酵素的抗細菌活性を強力に阻害した。したがって、T p 1 7およびT p 1 7様タンパク質は、2つの市販され入手可能な抗微生物薬物の酵素的抗細菌活性を阻害し得る。L I Z I P A I N A（登録商標）、L I S O Z I M A C H I E S I、および関連薬物によって提供されるある程度の治療的効力は、T p 1 7タンパク質およびT p 1 7様タンパク質の阻害に起因してインビボにおいて失われるようである。上記で論議されたように、T p 1 7タンパク質およびT p 1 7様タンパク質は、細菌、ウイルス、真菌および寄生生物のヒト病原体によって広く発現される。その結果、T p 1 7タンパク質およびT p 1 7様タンパク質による酵素的阻害を受けないリゾチーム改変体は、有望なクラスの新規抗微生物薬物である。

【0259】

（実施例16：r-リゾチーム0の抗細菌活性はT p 1 7によって阻害されない）

T p 1 7タンパク質およびT p 1 7様タンパク質の阻害に抵抗し得るリゾチームの検索において、本発明者らは、市販のrリゾチーム0（71110-5；Novagen（登録商標）Merck KGaA、Darmstadt、Germany）を試験した。rリゾチーム0は、E. coli細胞の溶解のために推奨される高度に精製された組換えリゾチームである。この酵素は、細菌細胞壁中のN-アセチルムラミド結合の加水分解を触媒する。rリゾチーム溶液（1.700.000U/mg）の比活性は、鶏卵卵白リゾチームのそれより250倍より大きく、そしてそれ故、E. coli溶解を達成するために必要な酵素はより少ない。さらに、rリゾチーム0は、タンパク質および核酸抽出試薬のNovagenの方針に適合する生理学的pH（6.0～8.0）で最適に活性である。

【0260】

その文脈で、本発明者らは、ヒトリゾチーム（Ventria Bioscience、Sacramento、CA、USA）、およびrリゾチーム0の抗細菌活性を、E n z C h e c kリゾチームアッセイ（E-22013；Molecular Probes、Eugene、Oregon）を用いて比較した。本発明者らは、最初、製造業者の処方されるアッセイ条件で、1単位のヒトリゾチームが、230単位のrリゾチーム0と同

じ蛍光強度を生成したことを決定した。次いで、本発明者らは、GST-Tp17またはTp17-HISのいずれかの10 μgの存在下または非存在下で、1単位のヒトリゾチームまたは230単位のrリゾチーム0いずれかの蛍光強度を測定した。図29に示されるように、rリゾチーム0は、GST-Tp17の阻害もTp17-HISの阻害も受けなかったが、ヒトリゾチームの抗細菌活性は、強く阻害された。興味深いことに、本発明者らは、Tp17の存在下で、rリゾチーム0の抗細菌活性の(20%の範囲にある)僅かな増加を再現可能に観察した。一緒に考慮して、これらの結果は、rリゾチーム0が、Tp17タンパク質および恐らくTp-17様タンパク質による阻害を受けないことを示唆している。結果として、rリゾチーム0は、ヒトおよび動物の使用のために意図された種々の治療調製物において、ニワトリリゾチームを最終的に置換し得る新規かつ有望な抗微生物薬物に相当する。さらに、それは、防腐剤として、および/または食品保存剤として用いられ得る。

10

【0261】

(実施例17: アルツハイマー前駆体タンパク質(βAPP)はTp17様タンパク質と構造的類似性を共有する)

Tp17と広範な配列類似性を共有するタンパク質(例えば、図1を参照のこと)の中で、本発明者らは、ヒトβアミロイド前駆体タンパク質(βAPP)を同定した。このタンパク質は、重要な医療的および診断的目的である。なぜなら、それは、アルツハイマー病の間にアミロイド沈着の生成に関与しているからである。図30に示されるように、本発明者らは、Ivyタンパク質ファミリー、Tp17、および3つのスプライシングアイソフォームβAPP(APP770、APP751およびAPP695)のメンバーによって共有される良好に保存されたペプチドモチーフを発見した。手動で実施した複数アラインメントは、本発明者らが、これらすべてのペプチド配列を、以下のコンセンサスの下にグループ分けすることを可能にした:

20

CX(1, 5) [KRH] [AG] [KRH] X(0, 2) [KR] X(0, 1) [EDQN] C (配列番号178)

このコンセンサスでは、C、K、R、H、A、G、E、D、QおよびNは、それぞれ、システイン、リジン、アスパラギン、ヒスチジン、アラニン、グリシン、グルタミン酸、アスパラギン酸、グルタミン、およびアスパラギンに対する1文字アミノ酸コードに対応する。記法規則は、PROSITEデータベース中で用いられるものである。このコンセンサスはまた、以下のように表され得る:

30

CysXaa₁Xaa₂Xaa₃Xaa₄Xaa₅Xaa₆Xaa₇Xaa₈Xaa₉Xaa₁₀Xaa₁₁Xaa₁₂Xaa₁₃Cys (配列番号177)

ここで、Xaa₁、Xaa₂、Xaa₃、Xaa₄およびXaa₅は、任意のアミノ酸または存在せず、Xaa₆は、アミノ酸K、RまたはHであり、Xaa₇は、AまたはGであり、Xaa₈は、K、R、またはHであり、Xaa₉およびXaa₁₀は、任意のアミノ酸または存在せず、Xaa₁₁は、アミノ酸KまたはRであり、Xaa₁₂は、任意のアミノ酸または存在せず、そしてXaa₁₃は、アミノ酸E、D、QまたはNである。

【0262】

これら3つのタンパク質(E. coliからのIvy、Tp17、P. aeruginosa)について、結晶構造が入手可能である。Cn3D分子ビューを用いて、本発明者らは、これら3つのタンパク質の各々の関連するペプチドストレッチが、保存された三次元組織を示したことを見出した。図31に示されるように、3つすべては、幅のあるβシートを形成し、ジスルフィド架橋ペプチドループを提示する。これらのタンパク質は、保存された三次元構造組織を共有する。3つの分子のすべては、幅のあるβシート構造、および剥き出たジスルフィド架橋ペプチドループを含む。この構造モチーフは、ヒトβAPPタンパク質の3つのすべてのアイソフォーム(APP770、APP751およびAPP695)で保存されている。3DビューがCn3Dソフトウェアを用いて生成された。このソフトウェアは、National Center for Biotechnologyのウェブサイト、および以下のProtein Data Bank(PDB

40

50

）原子座標ファイル：1GPQ (E. coli Ivy)、1UUZ (P. aeruginosa Ivy) および 1MWP (Homo sapiens β -APP) から入手可能である。これらのデータは、Ivy、Tp17 および β -APP が構造的および機能的に関連していることを示唆する。

【0263】

（実施例18：ヒトリゾチームは、固定化アルツハイマー前駆体タンパク質 (β -APP) に結合する)

図32に示されるように、 β -APP中で同定されたリゾチーム結合部位は、このタンパク質の極度のN末端にあり、そして残基92～116にまたがる。アイソフォームAPP751 (751アミノ酸長) は、例示のAPP様ポリペプチドである。この図から得られる結論はまた、アイソフォームAPP695およびAPP770についてもまた真実である。アミノ酸数は、Genbank受託番号NP_958816の下で受託された β -APP配列中のアミノ酸位置に言及している。このリゾチーム結合部位は、残基92～116の間に位置している。詳細には、本発明者らは、sAPP α と呼ばれる、 β -APP誘導体のより長いフラグメント、およびsAPP α (304-612) と呼ばれるより短いフラグメントを用いた。sAPP α およびsAPP α (304-612) の両方は、APP695アイソフォームから由来し、そして結果として、クニッツプロテアーゼインヒビタードメイン (APP770およびAPP751中の残基289～342) を欠いている。

【0264】

β -APPタンパク質がhuLYSを結合するかどうかを試験するために、本発明者らは、精製された組換え形態の β -APPを用いるリゾチーム結合アッセイを実施した。sAPP α (製品番号：S9564) およびsAPP α (302-612) (製品番号：S8065) をSigma-Aldrich (Tres cantos, Madrid, Spain) から購入した。10 μ gの各タンパク質を、Nytran膜 (Sclerich & Schouell, Dassel, Germany) 上にスポットした。非特異的吸着部位は、TBST-ミルク中で1時間のインキュベーションによってブロックされた。TBSTを用いた3回の洗浄の後、この膜を、TBST-ミルク中で1/1000希釈された、西洋ワサビペルオキシダーゼ (POD) -標識ヒトリゾチームとともに1時間インキュベートした。次いで、膜を、TBSTで3回 (各洗浄は5分間) 洗浄した。染色は、5mlのPOD発色基質 (TMB、製品番号：T0565、Sigma) を添加することにより実施した。図33に示されるように、huLYSはsAPP α に結合したが、sAPP α (302-612) には結合しなかった。この観察は、この β -APPタンパク質がhuLYSに結合し、しかも結合部位が、 β -APPの残基92と116との間のN末端領域中に位置することを示唆した。これらのデータは、アルツハイマー病の処置のための新規の薬理学的標的を規定する。さらに、この β -APP/huLYSタンパク質複合体は、アルツハイマー病の診断マーカーとして役立ちそうである。

【0265】

アルツハイマー病に関連する診断組成物および診断方法は、実質的に純粋なAPP様ポリペプチドのフラグメントを特徴とし、このフラグメントは、Cys Xaa₁Xaa₂Xaa₃Xaa₄Xaa₅Xaa₆Xaa₇Xaa₈Xaa₉Xaa₁₀Xaa₁₁Xaa₁₂Xaa₁₃Cys (配列番号177) のアミノ酸配列を含み、ここで、Xaa₁、Xaa₂、Xaa₃、Xaa₄およびXaa₅は任意のアミノ酸であるかまたは存在せず、Xaa₆はアミノ酸K、RまたはHであり、Xaa₇はAまたはGであり、Xaa₈はK、R、またはHであり、Xaa₉およびXaa₁₀は任意のアミノ酸であるかまたは存在せず、Xaa₁₁はアミノ酸KまたはRであり、Xaa₁₂は任意のアミノ酸であるかまたは存在せず、そしてXaa₁₃はアミノ酸E、D、QまたはNである。上記の組成物および方法はまた、このポリペプチドフラグメントをコードする核酸分子、このようなフラグメントの発現のためのベクター、およびこれらベクターを含む宿主細胞としての特徴をもつ。このようなフラグメントは、組換えポリペプチドとして発現され得、そして上記

フラグメントを認識するか、またはリゾチームポリペプチドに複合体化されるとき上記フラグメントを認識する抗体の生成のために用いられる。

【0266】

A P P様ポリペプチド／リゾチーム複合体に特異的に結合する抗体は、被験体におけるアルツハイマー病を診断するための方法で有用であり、ここで、この抗体は、血清サンプル、脳脊髄流体サンプル、または組織サンプルのような被験体からの生物学的サンプルをプローブ検査するために用いられる。現在のところ、アルツハイマー病の決定的な診断は、一般に、被験体からの脳組織の死後の検査を必要とする。従って、本発明の方法は、生存被験体から得られる体液中のアルツハイマー病の診断を容易にし、現存する診断方法に優る顕著な改良を提供する。

10

【0267】

詳細には、本発明は、被験体からのサンプル中のA P P様ポリペプチドとリゾチームポリペプチドと間の複合体の存在、またはこのような複合体に結合する抗体の存在を検出することによりアルツハイマー病を診断する方法を提供する。さらに、A P P様ポリペプチドとリゾチームポリペプチドとの間の結合を調節する候補化合物を同定する方法が提供され、この方法は、この候補化合物の存在下で、T p 1 7様ポリペプチドとリゾチームポリペプチドとの間の結合における減少を検出することによる。

【0268】

(実施例19：新規T p 1 7様タンパク質のコンピューター同定)

ペプチド配列データベース(S w i s s p r o t & T r E M B L)を、図30中に規定されるC X (1, 5) [K R H] [A G] [K R H] X (0, 2) [K R] X (0, 1) [E D Q N] C (配列番号178) コンセンサス配列を共有するタンパク質についてサーチした。この配列を有するとして同定された、細菌タンパク質、ウイルスタンパク質および真核生物タンパク質を図34Aおよび34Bに示す。これらのタンパク質は、T p 1 7様／h u L Y Sタンパク質複合体の形成を妨害するようである新規な治療標的および免疫原性組成物を提示する。さらに、h u L Y Sと複合体化されたこれらタンパク質は、ヒト疾患、動物疾患および植物疾患の診断のための魅力的なマーカーを提示し得る。

20

【0269】

(実施例20：T p 1 7変異体の阻害および結合能力)

T p 1 7のH₃₁およびH i s₁₀₄がh u L Y S阻害に寄与したか否かを決定するために、本発明者らは、G S T-T p 1 7をコードする遺伝子(図35A)の部位特異的変異誘発を実施した。このH₃₁AおよびH i s₁₀₄A G S T-T p 1 7変異体ポリペプチドは、Q u i c k C h a n g e (登録商標)部位特異的変異誘発キット(S t r a t a g e n e, L a J o l l a, C A, U S A)を用いて、p G E X 2 T-T p 1 7プラスミドベクター中に2つのヌクレオチド変化を導入することにより生成した。この目的のための変異誘発オリゴヌクレオチドは、F w_C P A A G (5'-C C G T G T G T C C G G C C G C C G G G A A G G C-3') (配列番号298)およびB w_C P A A G (5'-G C C T T C C C G G C G G G C C G G A C A C A C G G-3') (配列番号：299)およびオリゴヌクレオチドF w_K P A E (5'-A A T C G A A G G C A C C G G C C G A G A A A G A G C T G T A C G-3') (配列番号：300)およびB w_K P A E (5'-C G T A C A G C T C T T T C T C G G C C G G T G C C T T C G A T T-3') (配列番号：301)は、別個に変性p G E X 2 T-T p 1 7にアニールされ、そしてP f u T u r b o D N A ポリメラーゼを用いて供給者によって推奨される条件下で伸長された。非メチル化D N Aテンプレートは、D p n I消化によって除去され、そして得られる消化混合物を用いてX L-1 B l u e (登録商標)スーパーコンピテント細胞を形質転換した。変異体プラスミドは、得られるP C Rアンプリコンを制限酵素マッピングすることにより選択した。H₃₁A変異の存在は、完全長の変異したT p 1 7遺伝子を配列決定することにより確認した。次いで、H₃₁AまたはH i s₁₀₄A変異を保持する変異体G S T-T p 1 7を、実施例1に記載のように作製および精製した。リゾチーム阻害ア

30

40

50

ッセイを以下に記載のように実施した。

【0270】

各100 μ l反応混合物は、25 μ lのリゾチーム溶液（反応緩衝液中に溶解した、2ユニットのヒトリゾチーム）、25 μ lの試験タンパク質溶液、および50 μ lの蛍光標識*Micrococcus lysodeikticus*懸濁物（50 μ g/ml）を含んだ。その後、その反応混合物を、37℃にて45分間インキュベートした。その反応混合物中に存在する蛍光を、KCジュニアデータ取得ソフトウェア（Bio TEK Instruments, Winooksky, Vermont）を備えた蛍光マルチウェルプレートリーダーモデルFLx800（Bio TEK Instruments, Winooksky, Vermont）を使用して、測定した（ $\lambda_{exc.} = 485\text{nm}$; $\lambda_{em.}$ 10
 $\lambda_{em.} = 520\text{nm}$ ）。得られた蛍光データ（図35Bにおいて示される）は、3つの独立したウェルの読取り値に対応する平均および標準偏差を示す。ネガティブコントロールウェルは、50 μ lの脱イオン水および50 μ lのフルオレセイン標識*Micrococcus lysodeikticus*懸濁物を含んだ。

【0271】

図35Aおよび図35Bにおいて示されるように、H₃₁A変異体ポリペプチドおよびH₁₀₄A変異体ポリペプチドは、リゾチーム阻害の減少を示したが、そのリゾチーム結合能を保持した（図36）。これらのデータは、アミノ酸31位および104位がリゾチーム結合および／またはリゾチーム阻害に寄与することを、実証した。従って、本発明に従う変異体Tp17の実施形態は、Tp-17のH₃₁およびH₁₀₄において 20
、ならびに／またはH₃₁およびH₁₀₄の付近において、ならびに他のTp-17様病原体における対応部位において、1つ以上の変異を含む。そのような変異体は、インビボにてTp-17様タンパク質の通常の阻害を妨害し得、従って、上記のような治療効果を有する。

【0272】

（実施例21：Tp17は、SLLP1リゾチーム様タンパク質に結合し得る）

ニワトリ型リゾチーム様すなわち従来型（C型）リゾチーム様の独特な非細菌溶解性タンパク質であるSLLP1が、ヒト精子のアクロソーム中に存在する（Mandelら、*Biol Reprod.* 68:1525~37, 2003）。通常、C型リゾチームは、細菌溶解性であり、そしてこれは、 β -1, 4グリコシド結合によって連結されたN- 30
アセチルグルコサミンに結合し得る。すべてがシステインを含むその不変残基のうちのほとんど（20個中17個）が、SLLP1において保存されているが、C-リゾチームにおいて保存される2つの触媒残基E35およびD52が、SLLP1においてはそれぞれTおよびNで置換されて、T122およびN139となっている。Mandalらは、アクロソーム反応の後、SLLP1が、卵黄周囲腔内、透明帯の孔内、および卵丘層内で、卵オリゴ糖残基N-アセチルグルコサミン（これは、卵の原形質膜を覆う、細胞外マトリックス中に存在する）の潜在的レセプターであり得ると、仮説を立てた。

【0273】

本発明者らは、huLYS、chkLYSおよびSLLP1が、55%を超える配列同一性を共有することを見出した。図37において示されるように、ヒトリゾチームおよび 40
ニワトリリゾチームは、63%アミノ酸配列同一性を共有し、一方、SLLP1およびヒトリゾチームは、58%配列同一性を共有する。Tp17は、huLYSおよびchkLYSの両方に結合可能であるので、これらのタンパク質間に存在する高レベルの配列同一性に基づいて、Tp17様ポリペプチド（Tp17を含む）もまた、SLLP1に結合可能である可能性がある。この相互作用は、性的接触の間の病原体伝達を促進し得る。図38において示されるように、SLLP1/Tp17様ポリペプチド複合体は、ヒトおよび動物の受精能の制御のための有望な治療標的を示す。例えば、図38において示されるように、有効量のTp17様ポリペプチドを投与することは、避妊方法として役立ち得る。なぜなら、Tp17様ポリペプチドは、卵細胞表面における精子とその同族レセプター（*cognate receptor*）との正常な結合を妨害するからである。 50

【0274】

さらに、SLLP1に対するTp17様ポリペプチドの結合を減少させる候補化合物は、性感染症の有用なインヒビターである。そのような化合物をスクリーニングするための方法が、上記に記載されている。

【0275】

さらに、野生型SLLP1は、細菌溶解性である可能性はないが、一方、T122→Eおよび／またはN139→Dというアミノ酸変化を含む変異体SLLP1（特に、C型リゾチームの保存配列に戻る両方の変異を含む二重変異体）は、細菌溶解活性を獲得する可能性がある。これらの変異を含む変異体SLLP1は、Tp17様ポリペプチドに結合できない可能性があり、例えば、ニワトリリゾチームと比較して増加したリゾチーム酵素活性を有する可能性がある。従って、変異体SLLP1は、その増強された抗菌（例えば、細菌溶解）能力について、薬学的組成物または殺菌剤として使用され得る。他のリゾチーム改変体（例えば、バクテリオファージT4リゾチーム）もまた、同様な様式で使用され得る。そのような組成物の一実施形態は、約2mg～約100mgの上記リゾチーム改変体（好ましくは約5mg）、約2mgのパパイン、および／または約3mgのバシトラシンを含み得る。好ましい実施形態は、経口摂取のために溶解可能である。

【0276】

（他の実施形態）

本発明は、本発明の精神からも本質的特徴からも逸脱することなく、他の具体的な形態で実施され得る。上記の発明の任意の局面および特徴が、合わせられ得る。従って、上記の実施形態は、すべてに点において、本明細書中に記載される発明を限定するのではなく、例示するものであると考えられるべきである。従って、本発明の範囲は、上記の説明によって示されるのではなく、添付される特許請求の範囲によって示される。特許請求の範囲と等価である意味および範囲内におけるすべての変更が、本発明に包含される。

【0277】

（参考としての援用）

本出願において引用されるすべての刊行物および特許文献は、個々の刊行物または特許文献の各々の内容があたかも本明細書中に援用された場合と同じ程度まで、すべての目的のためにその全体が参考として援用される。

【図面の簡単な説明】

【0278】

本発明の先のおよび他の目的、特色および利点ならびに本発明自体は、添付の図と共に読む場合、以下の好ましい実施形態の説明からより完全に理解される。

【図1A】図1Aは、多数の細菌、ウイルス、寄生生物および哺乳動物の生物体に由来するTp17様ポリペプチド上のリゾチーム結合部位、ならびにこれらが定義する17アミノ酸のコンセンサス配列を図示する。

【図1B】図1Bは、多数の細菌、ウイルス、寄生生物および哺乳動物の生物体に由来するTp17様ポリペプチド上のリゾチーム結合部位、ならびにこれらが定義する17アミノ酸のコンセンサス配列を図示する。図1Bにおいて、*T. denticola*、*B. thetaiotaomicron*、*C. burnetti*、*H. influenzae*、*N. meningitidis* 血清群Aおよび*N. meningitidis* 血清群B、*V. cholerae*、*V. vulnificus*、*H. ducreyi*、*S. typhi*、*L. pneumophila*、*S. aureus*、*N. gonorrhoeae*、および*B. pertussis*に由来するTp17関連ポリペプチドは、コンセンサス配列：
 Cys Xaa₁ Xaa₂ Xaa₃ Pro His Xaa₄ Xaa₅ Xaa₆ Xaa₇ Xaa₈ Xaa₉ Xaa₁₀ Xaa₁₁ Xaa₁₂ Xaa₁₃ Xaa₁₄ Xaa₁₅ Xaa₁₆ Xaa₁₇ Cys（配列番号176）に一致し、ここでXaaは任意のアミノ酸であるかまたは存在しない。*P. gingivalis*および*H. pylori*由来の残る2つのタンパク質は、以下のコンセンサス配列：
 Cys Xaa₁ Xaa₂ Xaa₃ His Xaa₄ Xaa₅ Xaa₆ Xa

a₇ X a a₈ X a a₉ X a a₁₀ X a a₁₁ X a a₁₂ X a a₁₃ Cys
 (配列番号175)のもとに分類され、ここでxは任意のアミノ酸であるかまたは存在しない。図1Bは、種々の臨床的に関連する細菌性病原体の間に保存されるリゾチーム結合モチーフを定義する表である。

【図2】図2は、多数の細菌、ウイルス、寄生生物、昆虫および哺乳動物の生物体に由来するTp17様ポリペプチド上のリゾチーム結合部位、およびそれらの定義する6アミノ酸コンセンサス配列を図示する。

【図3A】図3Aは、多数の種に由来する成熟したリゾチーム配列のアラインメントである。成熟ニワトリリゾチームのE₃₅およびD₅₃（または成熟ヒトリゾチームのD₅₂）は、触媒性ダイアドに属し、そして全ての公知のリゾチーム配列を通して保存される。コンセンサス配列はアラインメントの下に示される。アミノ酸の保存は、Risler比較記号（Rislerら（1998）J. Mol. Biol. 204:1019）に従って表される。この表現系において、Xは任意のアミノ酸を表すか、またはアミノ酸が無いことを表し、大文字は100%のアミノ酸保存に対応し、小文字は50%～90%のアミノ酸保存の値に対応する。さらに、配列の50%を越えるものに共有される保存的变化は、ロイシンまたはメチオニンに対応する以下の記号\$、イソロイシンまたはバリンに対応する!、およびアスパラギンまたはアスパラギン酸に対応する#を用いて表される。

【図3B】図3Bは、図3Aに示された成熟リゾチーム配列のアラインメントの続きである。コンセンサス配列は、図3Aについて記載した命名法を用いて、アラインメントの下に示される。

【図4】従来のTp17抗体検出キットがTp17-リゾチーム複合体に対する抗体を検出しないので、図4は本発明の利点を図示する。1つの実施形態において、本発明は、Tp17様ポリペプチドおよびリゾチームポリペプチドを備えるキットを特徴とする。このようなキットは、Tp17単独に対する抗体、リゾチーム単独に対する抗体、または存在する場合、Tp17-リゾチーム複合体に対する抗体を検出し得る。

【図5】図5は、以下の5つの工程を包含するファーウェスタンブロットリゾチーム-タンパク質相互作用アッセイを図示する：（1）精製したリゾチームの固体支持体上への固定化；（2）リゾチームに対するリガンド（例えば、GST-Tp17）による固体支持体のプローブ工程；（3）GST-Tp17のヤギ抗GST抗体との結合；（4）ヤギ抗体の抗ヤギアルカリホスファターゼ結合体との結合；および（5）ニトロブルーテトラゾリウム/ブROMOKロロインドリルホスフェートアルカリホスファターゼ色素産生基質（NBT/BCIP）による染色工程。

【図6】図6は、GST-Tp17融合タンパク質のアミノ酸配列（配列番号29）およびヌクレオチド配列（配列番号30）を図示する。GST部分およびTp17に対応する配列は、それぞれイタリック体および太字で表される。番号のついた線（配列番号30）はセンスDNA鎖を示し；アンチセンス鎖またはRNA鎖はセンス鎖の下にある。

【図7】図7は、Tp17-HIS発現構築物であるpET24a-Tp17Hisを図示する。このベクターはpET24発現ベクター（Novagen Inc.、Madison, WI）に由来する。

【図8】図8Aは、精製されたGST-Tp17のクロマトグラフィー画分のクーマシーブリリアントブルー染色ゲルである。レーン1：添加したニワトリリゾチームを用いる精製プロセス；レーン2：添加したニワトリリゾチームなしでの精製プロセス；レーン3：MWM：分子量マーカー。図8Bは、精製されたTp17-HISのクロマトグラフィー画分のウェスタンブロットおよびクーマシーブリリアントブルー染色ゲルである。レーン1：添加したニワトリリゾチームの存在する精製プロセスから回収したタンパク質の、梅毒陽性ヒト血清を用いたウェスタンブロット。レーン2：添加したニワトリリゾチームの存在する精製プロセスから回収したタンパク質のクーマシーブリリアントブルー染色。レーン1およびレーン2における電気泳動バンドから回収されたタンパク質のN末端アミノ酸配列決定によって得られたペプチド配列が示される。

【図9】図9Aは、ファーウェスタンブロットアッセイにおけるGST-Tp47を用い

10

20

30

40

50

たニワトリリゾチームのプロービングの結果を図示する。レーンMW：分子量マーカー；レーン1：1 μ gの精製ニワトリリゾチーム；レーン2：5 μ gの精製ニワトリリゾチーム；レーン3：10 μ gの精製ニワトリリゾチーム。図9BはファーウェスタンブロットアッセイにおけるGST-Tp17をもちいたニワトリリゾチームのプロービングの結果を図示する。レーンMW：分子量マーカー；レーン4：1 μ gの精製ニワトリリゾチーム；レーン5：5 μ gの精製ニワトリリゾチーム；レーン6：10 μ gの精製ニワトリリゾチーム。図9CはファーウェスタンブロットアッセイにおけるGST-Tp47を用いたヒトリゾチームのプロービングの結果を図示する。レーンMW：分子量マーカー；レーン7：1 μ gの精製ヒトリゾチーム；レーン8：5 μ gの精製ヒトリゾチーム；レーン9：10 μ gの精製ヒトリゾチーム。図9DはファーウェスタンブロットアッセイにおけるGST-Tp17を用いたヒトリゾチームのプロービングの結果を図示する。レーンMW：分子量マーカー；レーン10：1 μ gの精製ヒトリゾチーム；レーン11：5 μ gの精製ヒトリゾチーム；レーン12：10 μ gの精製人リゾチーム。

【図10】図10は、Tp17ポリペプチドのリゾチーム抗菌活性に対する効果のグラフ表現を示す。ヒトリゾチーム（白丸）およびニワトリリゾチーム（黒三角）の存在下におけるGST-Tp17の濃度が、相対的蛍光強度に対してプロットされた。コントロールとして、ヒトリゾチーム（黒菱形）の存在下におけるGST-Tp47の濃度もまた、相対的蛍光強度に対してプロットされた。

【図11】図11Aは、E. coli由来のIVYタンパク質のアミノ酸配列と、T. pallidum由来のTp17アミノ酸配列とのアラインメントを示す。コンセンサス配列がアラインメントの下に示される。「#」は保存的变化（Asp/Glu）および半保存的变化（Asp/Asn）を同定し、一方「！」はVal/Ile変化を示す。図11Bは、ニワトリリゾチームのE. coli IVYとの、考えられる3つの接触領域の結晶構造を図示する：ペプチドI、ペプチドIIおよびペプチドIIIは暗い影付けで示される。

【図12】図12は、E. coli Ivyとニワトリリゾチームとの間の原子相互作用を図示し、これはH_{88-ivy}の窒素原子とE_{53-chkclys}の酸素原子との間の相互作用、およびD_{89-ivy}の酸素原子とR_{132-chkclys}の窒素原子との間の相互作用を含む。H_{88-ivy}/E_{53-chkclys}相互作用において原子中心間の距離は2.56 Å（1オングストローム=10⁻¹⁰メートル）であり、そしてD_{88-ivy}/R_{132-chkclys}相互作用においては2.46 Åであった。

【図13】図13Aはニワトリリゾチーム単体の、水のアクセス可能な分子表面（明るい）を図示する。アミノ酸残基E₅₃の表面に露出された水のアクセス可能な領域は影付けされる。図13Bは、E. coli IVYと複合体化されたニワトリリゾチームの、水のアクセス可能な分子表面を図示する。アミノ酸残基E₅₃は完全に遮蔽され、溶媒にほとんどアクセス可能で無い。図13Cは、ニワトリリゾチームの水にアクセス可能な分子表面（明るい）を図示する。アミノ酸残基R₁₃₂の表面に露出された水のアクセス可能な領域は影付けされる。図13Dは、E. coli IVYと複合体化されたニワトリリゾチームの、水のアクセス可能な分子表面を図示する。アミノ酸残基R₁₃₂は部分的に溶媒に露出されたままである。

【図14】図14Aは、E. coli IVY-ニワトリリゾチーム結合部位の2つの隣接するシステインの架橋を図示し、この架橋はヒスチジン残基とグルタミン酸残基を近接した空間的近傍にもたらし、ニワトリリゾチームの残基E₅₃とR₁₃₂とを接触させるような立体配置にする。図14Bは、T. pallidumのTp17-リゾチーム結合部位の2つの隣接するシステインの架橋を図示し、この架橋はヒスチジン残基とアスパラギン酸残基を近接した空間的近傍にもたらし、リゾチームのE₅₃残基とR₁₃₂残基とを接触させ得るような立体配置にする。

【図15】図15は1型単純ヘルペスウイルス（HSV1）および2型単純ヘルペスウイルス（HSV2）に由来するタンパク質gJのアラインメントを図示する。コンセンサス配列は、アラインメントの下で誇張される。挿入物は、HSV2のgJに見受けられるT

10

20

30

40

50

p17様コンセンサス配列をHSV1のgJが共有しないことを示す。「#」はAsp/Asnのような半保守的变化を同定する。

【図16】図16Aは、4つの境界線ヒト梅毒性血清 (borderline human syphilitic serum) (HPM10、HG38、HG48およびHG82) に対応する相対的血球凝集強度を図示する表である。血清サンプルはニワトリリゾチーム (Chicken Lyz) またはヒトリゾチーム (Human Lyz) の存在下または非存在下においてTp17 (R) と合わせられた。結果は、希釈力価の逆数 (reciprocal dilution titer) として表される (例えば、80は1/80の希釈率において陽性であることを意味する)。図16Bは、図16Aの血球凝集の結果のグラフ式表現である。リゾチーム無しでのTp17試薬 (黒い棒) ; ニワトリリゾチームを補充したTp17試薬 (斜線の棒) ; ヒトリゾチームを補充したTp17試薬 (空白の棒)。結果は、希釈力価の逆数として表される (例えば、80は1/80の希釈率において陽性であることを意味する)。

10

【図17】図17Aは、10のヒト梅毒性血清 (Syph71、09-4、09-3、HSP91、HSP17、HSP3、4932、5895、HG62およびHG82) に対応する相対的血球凝集強度を図示する表である。血清サンプルは、天然のヒトリゾチーム (LyzN) または組換えヒトリゾチーム (LyzR) の存在下または非存在下においてTp17 (R) と合わせられた。結果は、希釈力価の逆数として表される (例えば、80は1/80の希釈率において陽性であることを意味する)。図17Bは、図17Aの血球凝集の結果のグラフ式表現である。リゾチーム無しでのTp17試薬 (黒い棒) ; 天然のヒトリゾチームを補充したTp17試薬 (格子縞の棒) ; 組換えヒトリゾチームを補充したTp17試薬 (空白の棒)。結果は、希釈力価の逆数として表される (例えば、80は1/80の希釈において陽性であることを意味する)。

20

【図18】図18Aは組換えヒトリゾチームの添加による血球凝集の相対強度の増加を図示する。Tp17試薬 (R) または組換えヒトリゾチームを補充したTp17試薬 (R+LyzR) のいずれかを用いて、全てで34種の血清が試験された。この技術の結果は、陽性の凝集を示した最後の希釈度の逆数として与えられる。それぞれの結果は、数に変換された (1/80の希釈は1、1/160の希釈は2など)。カットオフは1/80の希釈においてであり、1未満の値は陰性の結果と考えられる。FNおよびPそれぞれは、偽陰性の結果および陽性の結果をそれぞれ表す。図18Bは、Tp17試薬 (R) または組換えヒトリゾチームを補ったTp17試薬 (R+LyzR) を用いた、組換えヒトリゾチームの偽陰性血清サンプルへの添加による血球凝集の相対強度を図示する。偽陰性サンプルにおける凝集強度は0~1の間の数で表される (1は血球凝集技術のカットオフを表す)。

30

【図19】図19は、34のヒト血清を用いて行われた血球凝集アッセイを図示する。アッセイは、Tp17試薬 (黒い棒) または組換えヒトリゾチームを補充したTp17試薬 (空白の棒) を用いて行われた。この技術の結果は、陽性の凝集を示した最後の希釈度の逆数によって与えられる。カットオフは1/80の希釈においてである。結果は希釈力価の逆数として表される (例えば、80は1/80の希釈において陽性であることを意味する)。

40

【図20】図20は、Tp17試薬 (R) または組換えヒトリゾチームを補ったTp17試薬 (R+LyzR) を用いた、200の梅毒陰性血液バンク血清サンプルにおける血球凝集アッセイの特異性に対するリゾチームの効果を図示する。陰性サンプルにおける凝集の強度は、0~0.5の間の数によって表される。SD、標準偏差。

【図21】図21Aは、組換えヒトリゾチームの存在下における第二世代ELISA梅毒アッセイの増加した感度を図示する。図21Bは、組換えヒトリゾチームの存在下における第三世代ELISA梅毒アッセイの増加した感度を図示する。

【図22】図22は、Tp17-Hisアイソフォームのサイズ排除クロマトグラフィー分離を示す。アフィニティー精製されたTp17-Hisは、3集団の分子から構成される：単量体Tp17-His (ピーク3)、二量体Tp17-His (ピーク2) および

50

多量体Tp17-His（ピーク1）。

【図23】図23は、精製された組換えヒトリゾチーム（Ventria Biosciences, Sacramento, CA, USA）のサイズ排除クロマトグラフィー分離を示す。組換えヒトリゾチームは、単一の高度に同質な集団の分子（ピーク1）から構成される。

【図24】図24は、Tp17-His/huLYS複合体のサイズ排除クロマトグラフィー分離を示す。単量体Tp17-His（円）または二量体Tp17-His（ひし形）のいずれかとのhuLYS複合体に対応するクロマトグラフィープロファイルが表される。ピークは、Tp17/huLYSタンパク質複合体（ピーク1および2）または単量体（huLYsおよびTp17）の過多（ピーク3および4）に対応する。

10

【図25】図25は濃縮された（5倍）細菌培養物の上清のSDS-PAGE電気泳動分離、および銀染色による分泌された細菌性タンパク質の検出を示す。以下の病原体が分析された：Enterococcus faecalis（レーン2）、Enterococcus faecium（レーン3）、Staphylococcus aureus（レーン4）、Streptococcus pneumoniae（レーン5）、Streptococcus pyogenes（レーン6）、Propionibacterium acnes（レーン7）、Staphylococcus epidermidis（レーン8）、Streptococcus agalactiae（レーン9）。

【図26】図26は、以下の8つの細菌種から収集された、濃縮された（5倍）細菌培養物の上清の非存在下または存在下において測定された、ヒトリゾチーム酵素活性を示す棒グラフである：Propionibacterium acnes、Streptococcus agalactiae、Streptococcus pyogenes、Staphylococcus aureus、Enterococcus faecalis、Streptococcus pneumoniae、Staphylococcus epidermidisおよびEnterococcus faecium。それぞれの棒の高さは検出された酵素活性を示す。リゾチームのコントロールは、図の最も左側にある。

20

【図27】図27は、リゾチームとのTp17様複合体の形成を妨害し得る候補化合物の同定のためのハイスループットスクリーニングアッセイの原理および設計を示す概略図である。工程1：試験サンプルと、西洋ワサビペルオキシダーゼ（POD）標識したhuLYSおよびTp17様ポリペプチドとの接触。工程2：試験サンプルの37℃でのインキュベート。工程3：大規模な洗浄、POD基質の添加および信号の検出。

30

【図28】図28Aおよび図28Bは、市販のニワトリリゾチーム治療的調製物のTp17による阻害を示す棒グラフである。図28Aは、種々のモル比におけるGST-Tp17およびTp17-His双方による、Lizipaina（登録商標）（Boehringer Ingelheim）の溶菌活性の阻害を示す。図28Bは、種々のモル比におけるGST-Tp17によるLizozima CHIESI（Laboratorio CHIESI）の溶菌活性の阻害を示す。それぞれの棒の高さは検出された酵素活性を示す。リゾチームのコントロールは図の最も左側にある。

【図29】図29は、r-LysozymeTM（Novagen, VWR International, Mollet del Valles, Spain）の溶菌活性がGST-Tp17またはTp17-HISによる阻害に対して感受性で無く、一方ヒトリゾチームの抗菌活性は強く阻害されたことを示す棒グラフである。それぞれの棒の高さは検出された蛍光を示す。r-LysozymeTMのコントロールおよびヒトリゾチーム（HuLYs）のコントロールは、それぞれの実験の組の左側にある。

40

【図30】図30は、Escherichia coli Ivy、Pseudomonas aeruginosa Ivy、Yersinia pestis Ivy、Treponema pallidum sp. pallidum Tp17およびヒトβアミロイド前駆体タンパク質（β-APP）の3つのアイソフォーム（APP770、APP751およびAPP695）に由来する、リゾチーム結合／阻害配列の配列アラインメ

50

ントを示す。それぞれのペプチド配列に対応するGenbank登録番号が示される。推論されるコンセンサス配列が、PROSITEデータベースにて用いられるパターン文法を用いて表される。

【図31】図31は、*Escherichia coli* Ivy、*Pseudomonas aeruginosa* Ivyおよびヒト β -APPのリゾチーム結合／阻害ドメインの三次元観察を示す。

【図32】図32は、sAPPおよびHomo sapiens β アミロイド前駆タンパク質 (β -APP) のドメイン構成を示す概略図である。

【図33】図33は、西洋ワサビペルオキシダーゼ (POD) - 標識されたhuLYSの、固定化されたsAPPaまたは固定化されていないsAPPa (304~612) への結合の検出を示す。sAPPaおよびsAPPa (304~612) の双方10 μ gがニトロセルロース膜にスポットされ、そして1/1000に希釈されたPOD-HuLYSでプローブされた。

10

【図34A】図34Aは、リゾチーム結合／インヒビタータンパク質、そのGenbank登録番号およびそのペプチドが存在する宿主種のアラインメントを示す表である。これらのアミノ酸配列は、CX (1, 5) [KRH] [AG] [KRH] X (0, 2) [KR] X (0, 1) [EDQN] Cペプチドパターン (図31に示される) を用いてインシリコで同定されて、ScanPrositeアルゴリズムを用いてSwiss-ProtデータベースおよびTrEMBLデータベースを検索した。

【図34B】図34Bは、リゾチーム結合／インヒビタータンパク質、そのGenbank登録番号およびそのペプチドが存在する宿主種のアラインメントを示す表である。これらのアミノ酸配列はCX (1, 5) [KRH] [AG] [KRH] X (0, 2) [KR] X (0, 1) [EDQN] Cペプチドパターン (図31に示される) を用いてインシリコで同定されて、ScanPrositeアルゴリズムを用いてSwiss-ProtデータベースおよびTrEMBLデータベースを検索した。

20

【図35】図35Aは、野生型Tp17ポリペプチドならびに変異Tp17 CPAポリペプチドおよび変異To17 KPAポリペプチドを示す模式図である。Tp17 CPAにおいて、アミノ酸第31位に存在するヒスチジンはアラニンで置換され、そしてTp17 KPAにおいて、アミノ酸第107位に存在するヒスチジンはアラニンで置換された。図35Bは、野生型Tp17ポリペプチドと比較した変異Tp17 CPAポリペプチドおよび変異Tp17 KPAポリペプチドの阻害能力を示す表である。

30

【図36】図36は、レーン1、2および3のそれぞれにおける45kDAの分子量を有するタンパク質を示すウェスタンブロットであり、レーン1は野生型Tp17、レーン2はCPA変異体およびレーン3はKPA変異体である。

【図37】図37は、ヒトリゾチーム (huLYS) およびニワトリリゾチーム (chhLYS)、ならびにhuLYSおよびヒト精子リゾチーム様 (SLLP1) タンパク質に対応するペプチド配列のアラインメントを示す。このアラインメントは、SLLP1がhuLYSおよびchhLYSの双方に密接に関連することを示し、Tp17がSLLP1に結合し得ることを支持する。

【図38】図38は、Tp17が精子表面においてSLLP1と結合し得、そして続いて受精プロセスを妨害し得ることを示す概略図である。

40

【図 1 A】

Figure 1

登録番号	説明	宿主	ペプチド配列	位置	配列番号
P45802	IVY-リゾチームインヒビター	<i>E. coli</i>	Ck...PH.....DC	85~90	24
Q8H81	IVY-リゾチームインヒビター	<i>P. aeruginosa</i>	Ck...PH.....DC	85~90	24
P58483	IVY-リゾチームインヒビター	<i>Y. pestis</i>	Ck...PH.....DC	85~90	24
Q83M91	IVY-リゾチームインヒビター	<i>S. flexneri</i>	Ck...PH.....DC	85~90	24
Q8147	IVY-リゾチームインヒビター	A型O157H7ウイルス	Cg...PH.....DC	124~129	44
Q87273	特徴付けられていないウイルス	<i>P. falciparum</i>	C...PH.....DC	96~101	45
EA03977	特徴付けられていないウイルス	<i>G. lamblia</i>	C...PH.....DC	66~71	46
Q87L75	TrmA様タンパク質	<i>V. parahaemolyticus</i>	C...PH.....DC	82~88	47
Q94022	特徴付けられていないウイルス	<i>P. aeruginosa</i>	C...PH.....DC	173~179	48
Q8C406	Dntタンパク質	<i>P. multocida</i>	C...PH.....DC	164~169	49
Q8YK0	メチルトランスフェラーゼ	<i>B. melitensis</i>	C...PH.....DC	215~221	50
Q8FZ86	特徴付けられていないウイルス	<i>B. suis</i>	C...PH.....DC	215~221	50
Q50682	特徴付けられていないウイルス	<i>M. tuberculosis</i>	C...PH.....DC	5~12	51
Q8B57	赤血球 凝集素	<i>P. falciparum</i>	C...PH.....DC	280~287	52
Q8B58	赤血球 凝集素	<i>P. falciparum</i>	C...PH.....DC	474~481	53
Q8PNE3	脂質ホスファターゼ	<i>C. jejuni</i>	C...PH.....DC	104~112	54
Q83R05	HspB	<i>S. flexneri</i>	C...PH.....DC	91~101	55
Q87C0	特徴付けられていないウイルス	<i>P. aeruginosa</i>	C...PH.....DC	91~101	56
Q88R80	加水分解酵素	<i>P. putida</i>	C...PH.....DC	89~99	57
Q7V21	特徴付けられていないタンパク質	<i>H. hepaticus</i>	C...PH.....DC	80~100	58
P16823	ULP1タンパク質	<i>HC MV</i>	C...PH.....DC	93~105	59
Q7X5N2	特徴付けられていないウイルス	<i>P. aeruginosa</i>	C...PH.....DC	205~216	60
Q811M5	U44タンパク質	<i>Tupaia</i>	C...PH.....DC	105~117	61
Q8Q828	ULP1タンパク質	<i>Chmp. CMV</i>	C...PH.....DC	93~105	62
P36778	E2 異相タンパク質	<i>HPV3</i>	C...PH.....DC	289~301	63
P27915	ポリタンパク質	3型 Dengue 熱ウイルス	C...PH.....DC	167~180	64
P29722	Tp17 抗原	<i>T. pallidum</i>	C...PH.....DC	29~42	65
Q8B5V5	VP1 タンパク質	<i>FMDV</i> ウイルス	C...PH.....DC	27~41	66
Q8Q6W1	インテグラーゼ	<i>HIV-1</i>	C...PH.....DC	56~65	67
P05067	アミロイド A 4 タンパク質	ヒト	C...PH.....DC	105~117	68
P15163	アミロイド A 4 タンパク質	ヒト	C...PH.....DC	128~140	69
Q8UKF5	ADAM 29 プロテアーゼ	ヒト	C...PH.....DC	307~313	70
P01730	T 細胞 CD4 タンパク質	ヒト	C...PH.....DC	445~455	71
P3676	12 型 アデノウイルス	ヒト	C...PH.....DC	17~28	72
P15556	ウイルス Env	ヒト	C...PH.....DC	615~622	73
P03437	血液凝集素 インテグラーゼ A	ヒト	C...PH.....DC	68~80	74
Q8H293	インターロイキン-17E	ヒト	C...PH.....DC	110~115	75
Q87568	IntpF	ネオ細菌	C...PH.....DC	10~20	76
P59868	インペットキシン IptxA	ザンリ	C...PH.....DC	3~17	77
P78395	黒色腫抗原 (OIP4)	ヒト	C...PH.....DC	487~490	78
P04637	細胞性腫瘍抗原 p53	ヒト	C...PH.....DC	176~182	79
Q85900	コアタンパク質 VP4	コクサッキーウイルス	C...PH.....DC	247~259	80
P27960	キヤプシンタンパク質 C	C型肝炎ウイルス	C...PH.....DC	452~459	82
P13889	非構造タンパク質	風疹ウイルス	C...PH.....DC	1446~1454	83
P15158	構造タンパク質	EBV ウイルス	C...PH.....DC	886~876	84
P17690	B-2 糖タンパク質 (ApoH)	ヒト	C...PH.....DC	54~68	85
Q8148	コア抗原	B型肝炎ウイルス	C...PH.....DC	174~188	86
P31627	Env タンパク質	C型肝炎ウイルス	C...PH.....DC	48~61	87
P11268	Env タンパク質	ヒト	C...PH.....DC	80~88	88
P11268	Env タンパク質	ヒト	C...PH.....DC	152~164	89

コンセンサス CXXXXPHXXXXXXXXXXC

【図 1 B】

生物	登録番号	配列	位置	配列番号
<i>Haemophilus ducreyi</i>	Q7VL21	CTTPEQQRVQQR	91 ~ 107	171
<i>Haemophilus influenzae</i>	P44452	CTTPEQQRVQQR	89 ~ 103	172
<i>Salmonella typhi</i>	Q82989	CTTPEQQRVQQR	92 ~ 109	173
<i>Vibrio cholerae</i>	Q8K734	CTTPEQQRVQQR	89 ~ 105	174
<i>Vibrio vulnificus</i>	Q7M824	CTTPEQQRVQQR	129 ~ 144	175
<i>Xylophilum pinguiculus</i>	Q7M824	CTTPEQQRVQQR	7 ~ 20	176
<i>Neisseria meningitidis</i>	Q25531	CTTPEQQRVQQR	92 ~ 100	177
<i>Neisseria meningitidis</i>	Q25531	CTTPEQQRVQQR	89 ~ 97	178
<i>Neisseria meningitidis</i>	Q25531	CTTPEQQRVQQR	89 ~ 97	179
<i>Neisseria meningitidis</i>	Q25531	CTTPEQQRVQQR	93 ~ 101	180
<i>Neisseria meningitidis</i>	Q25531	CTTPEQQRVQQR	89 ~ 97	181
<i>Neisseria meningitidis</i>	Q25531	CTTPEQQRVQQR	28 ~ 40	182
<i>Neisseria meningitidis</i>	Q25531	CTTPEQQRVQQR	77 ~ 91	183
<i>Neisseria meningitidis</i>	Q25531	CTTPEQQRVQQR	77 ~ 88	184
<i>Neisseria meningitidis</i>	Q25531	CTTPEQQRVQQR	62 ~ 74	185
<i>Neisseria meningitidis</i>	Q25531	CTTPEQQRVQQR	86 ~ 99	186

FIG.1B

【図 2】

生物	登録番号	配列	位置	配列番号
<i>Haemophilus ducreyi</i>	Q7VL21	CTTPEQQRVQQR	91 ~ 107	171
<i>Haemophilus influenzae</i>	P44452	CTTPEQQRVQQR	89 ~ 103	172
<i>Salmonella typhi</i>	Q82989	CTTPEQQRVQQR	92 ~ 109	173
<i>Vibrio cholerae</i>	Q8K734	CTTPEQQRVQQR	89 ~ 105	174
<i>Vibrio vulnificus</i>	Q7M824	CTTPEQQRVQQR	129 ~ 144	175
<i>Xylophilum pinguiculus</i>	Q7M824	CTTPEQQRVQQR	7 ~ 20	176
<i>Neisseria meningitidis</i>	Q25531	CTTPEQQRVQQR	92 ~ 100	177
<i>Neisseria meningitidis</i>	Q25531	CTTPEQQRVQQR	89 ~ 97	178
<i>Neisseria meningitidis</i>	Q25531	CTTPEQQRVQQR	89 ~ 97	179
<i>Neisseria meningitidis</i>	Q25531	CTTPEQQRVQQR	93 ~ 101	180
<i>Neisseria meningitidis</i>	Q25531	CTTPEQQRVQQR	89 ~ 97	181
<i>Neisseria meningitidis</i>	Q25531	CTTPEQQRVQQR	28 ~ 40	182
<i>Neisseria meningitidis</i>	Q25531	CTTPEQQRVQQR	77 ~ 91	183
<i>Neisseria meningitidis</i>	Q25531	CTTPEQQRVQQR	77 ~ 88	184
<i>Neisseria meningitidis</i>	Q25531	CTTPEQQRVQQR	62 ~ 74	185
<i>Neisseria meningitidis</i>	Q25531	CTTPEQQRVQQR	86 ~ 99	186

コンセンサス (C)(K)(A)PH(A)(C)(K)

FIG.2

【図 3 A】

生物	登録番号	配列	位置	配列番号
<i>Haemophilus ducreyi</i>	Q7VL21	CTTPEQQRVQQR	91 ~ 107	171
<i>Haemophilus influenzae</i>	P44452	CTTPEQQRVQQR	89 ~ 103	172
<i>Salmonella typhi</i>	Q82989	CTTPEQQRVQQR	92 ~ 109	173
<i>Vibrio cholerae</i>	Q8K734	CTTPEQQRVQQR	89 ~ 105	174
<i>Vibrio vulnificus</i>	Q7M824	CTTPEQQRVQQR	129 ~ 144	175
<i>Xylophilum pinguiculus</i>	Q7M824	CTTPEQQRVQQR	7 ~ 20	176
<i>Neisseria meningitidis</i>	Q25531	CTTPEQQRVQQR	92 ~ 100	177
<i>Neisseria meningitidis</i>	Q25531	CTTPEQQRVQQR	89 ~ 97	178
<i>Neisseria meningitidis</i>	Q25531	CTTPEQQRVQQR	89 ~ 97	179
<i>Neisseria meningitidis</i>	Q25531	CTTPEQQRVQQR	93 ~ 101	180
<i>Neisseria meningitidis</i>	Q25531	CTTPEQQRVQQR	89 ~ 97	181
<i>Neisseria meningitidis</i>	Q25531	CTTPEQQRVQQR	28 ~ 40	182
<i>Neisseria meningitidis</i>	Q25531	CTTPEQQRVQQR	77 ~ 91	183
<i>Neisseria meningitidis</i>	Q25531	CTTPEQQRVQQR	77 ~ 88	184
<i>Neisseria meningitidis</i>	Q25531	CTTPEQQRVQQR	62 ~ 74	185
<i>Neisseria meningitidis</i>	Q25531	CTTPEQQRVQQR	86 ~ 99	186

FIG.3A

【図 3 B】

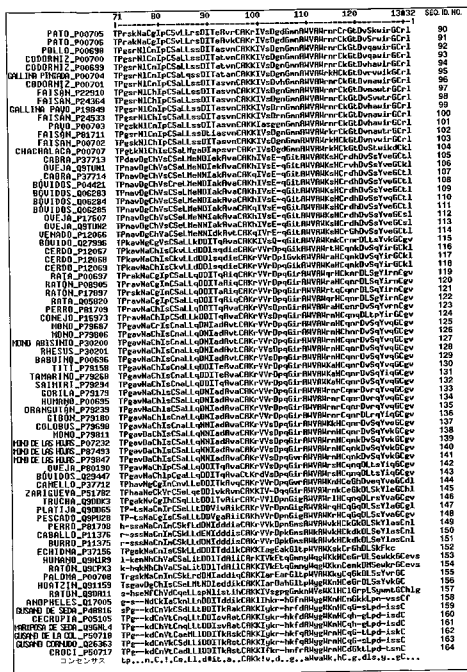


FIG.3B

【図 4】

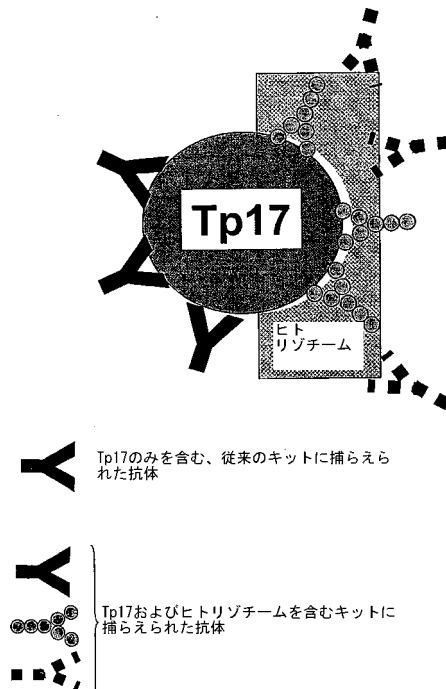


FIG.4

【図 5】

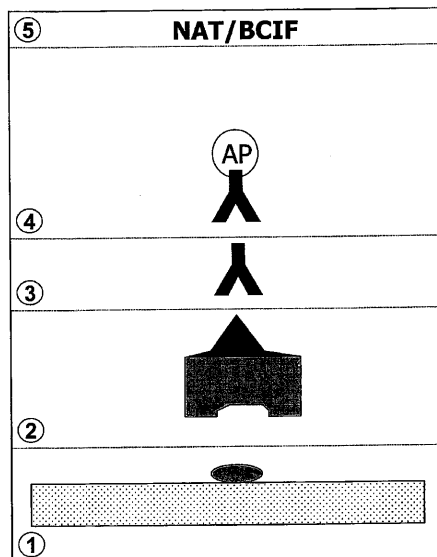


FIG.5

【图 6】

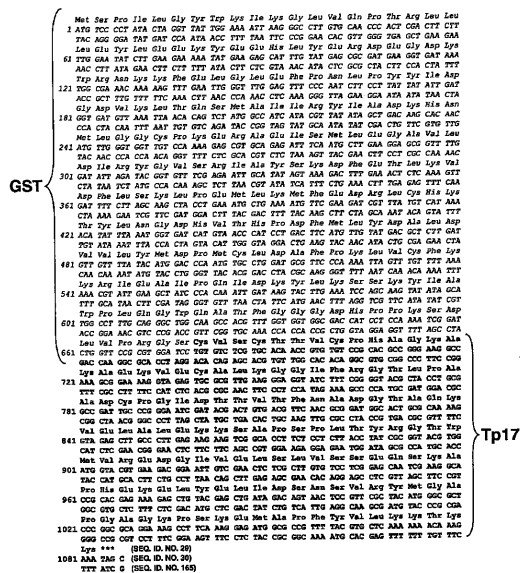


FIG.6

【图 8】

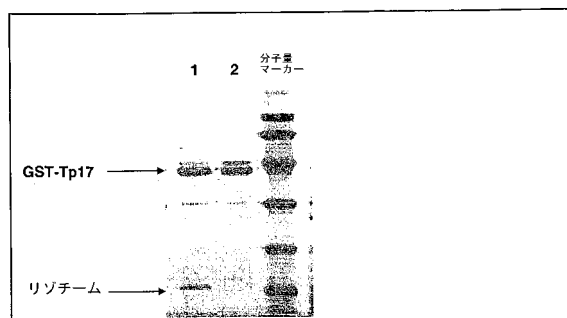


FIG. 8A

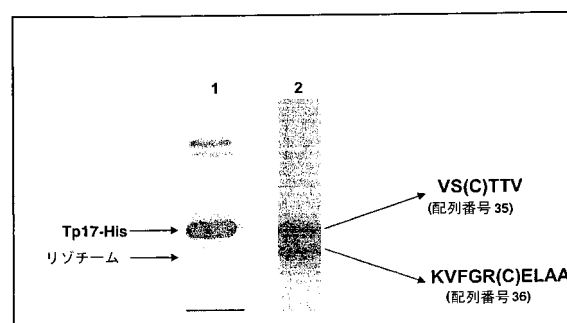


FIG.8B

【図 10】

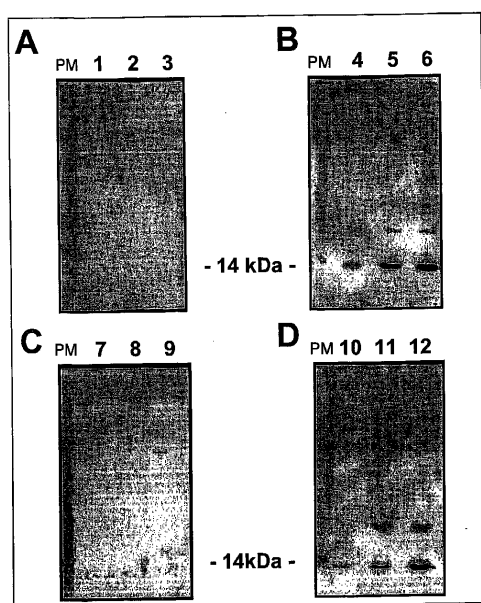


FIG.9

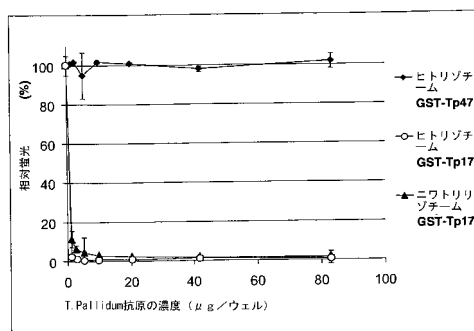


FIG.10

【図 1 1】

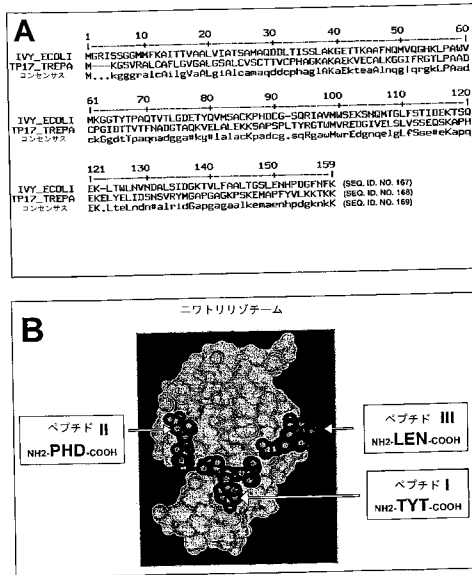


FIG.11

【図 1 2】

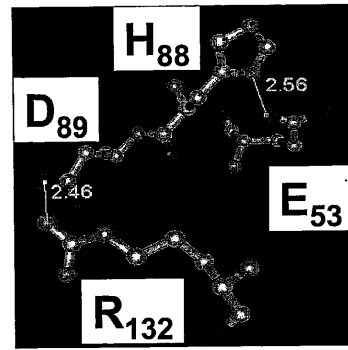


FIG.12

【図 1 3】

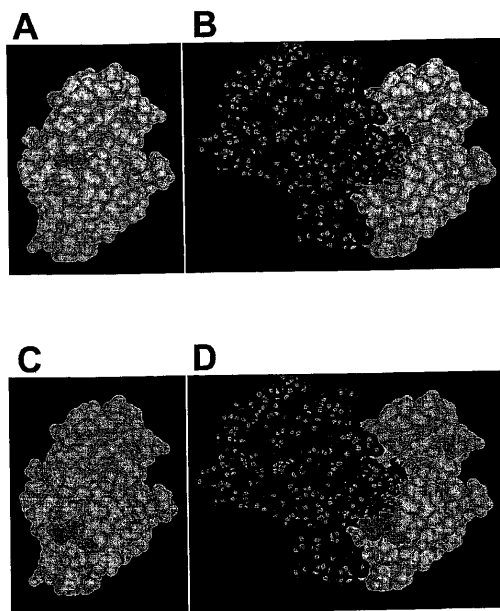


FIG.13

【図 1 4】

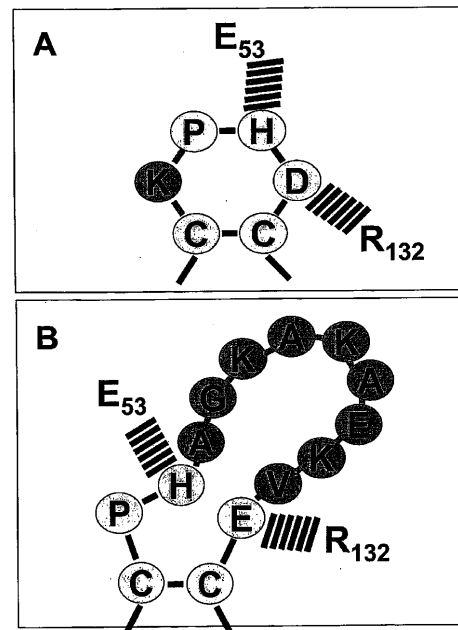


FIG.14

【図 15】

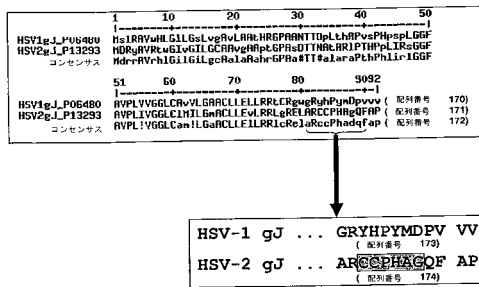


FIG.15

【図 16】

A

血清 I D	試薬 (R)	R+ニフトリ リゾチーム	R+ヒト リゾチーム
HPM10	80	80	160
HG38	80	80	320以上
HG48	80	ネガティブ	320
HG82	80	80	640

B

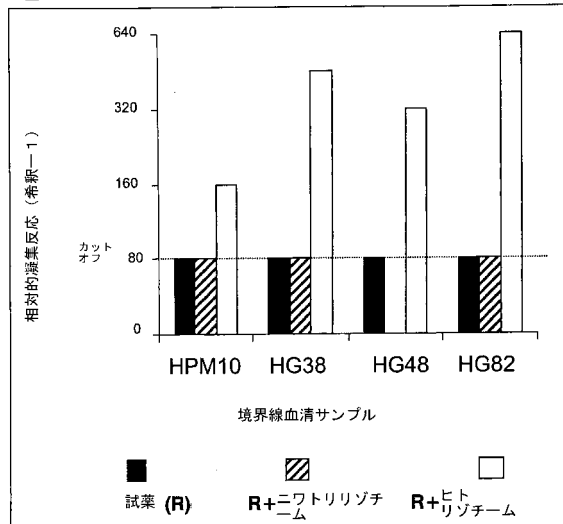


FIG.16

【図 17】

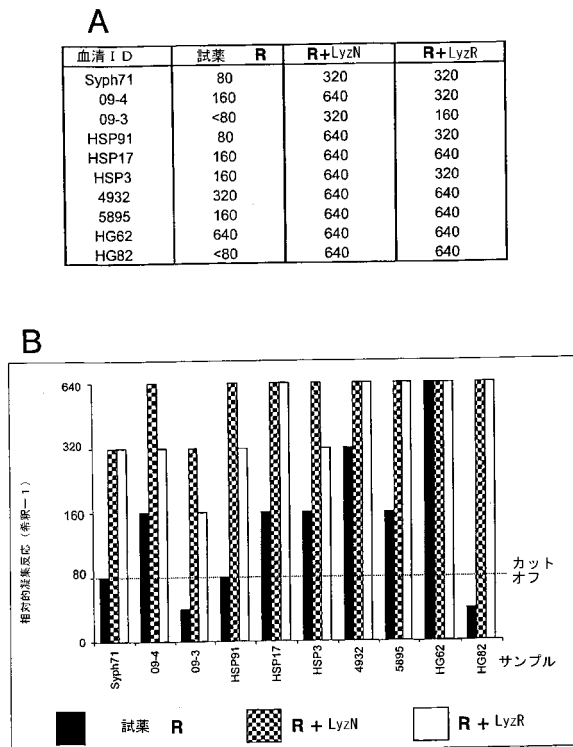


FIG.17

【図 18】

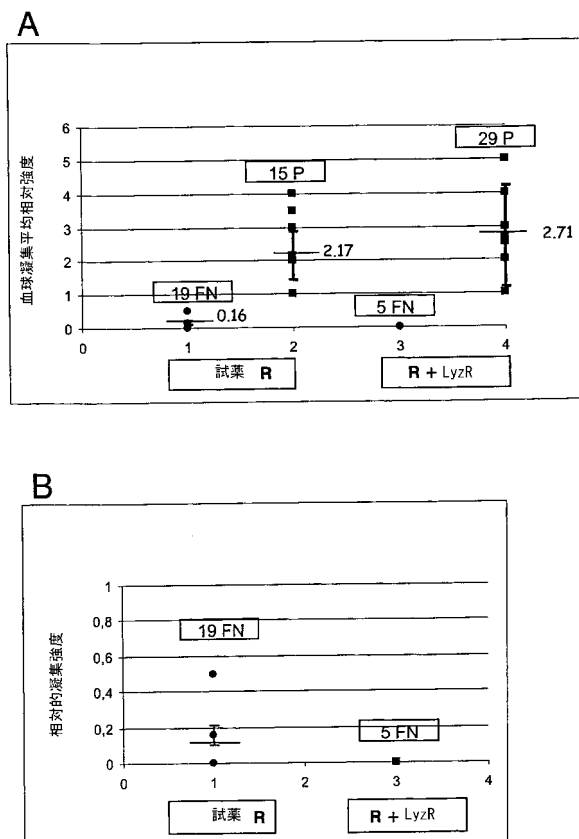


FIG.18

【図 19】

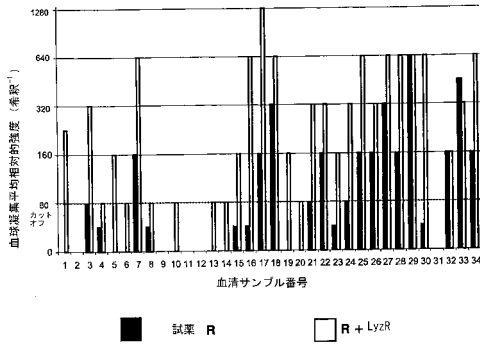


FIG.19

【図 20】

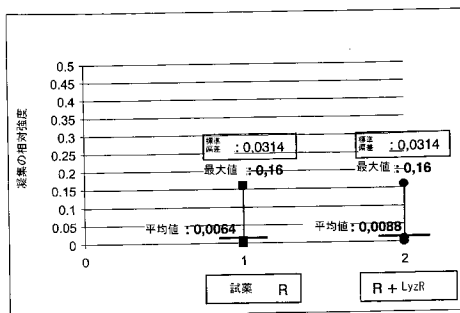


FIG.20

【図 22】

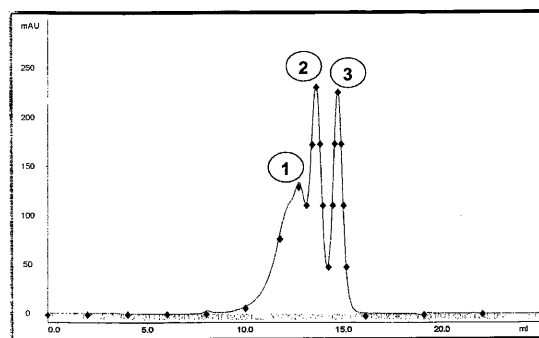


FIG.22

【図 21】

コントロール血清		従来のELISA プレート	ELISAプレート +ヒトリソチーム
ネガティブコントロール		79	121
ポジティブコントロール		2009	2177
梅毒陰性血清			
血清コード	従来のELISAプレート	ELISAプレート+ヒトリソチーム	
BQ 01	70	81	
BQ 02	51	60	
BQ 03	80	133	
BQ 04	86	66	
梅毒陽性血清			
血清コード	従来のELISAプレート	ELISAプレート+ヒトリソチーム	
BQ 110	1113	1319	
BQ 82	1381	1684	
SC 57 1/10	737	1000	
SC 77	1453	1801	

FIG.21A

第二世代梅毒のELISA

	サンプル希釈液 + 抗体	サンプル希釈液 + 抗体 + HgCl ₂	サンプル希釈液 + HgCl ₂
血清コード	450mlでの検収	450mlでの検収	450mlでの検収
ネガティブコントロール	11	11	15
ポジティブコントロール	1377	1271	1705
梅毒陰性血清			
BQ01	5	1	7
BQ02	3	0	7
BQ03	5	2	57
BQ04	7	4	7
梅毒陽性血清			
BQ 110	544	450	1171
BQ 82	1408	1407	2643
SC57 1/10	685	646	1415
SC77	1955	1838	2070

FIG.21B

第三世代梅毒のELISA

【図 23】

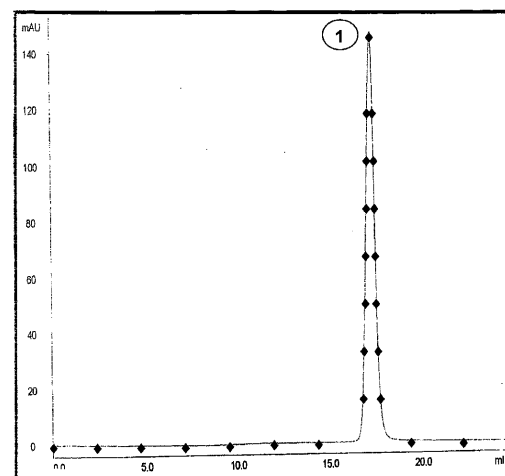


FIG.23

【図 24】

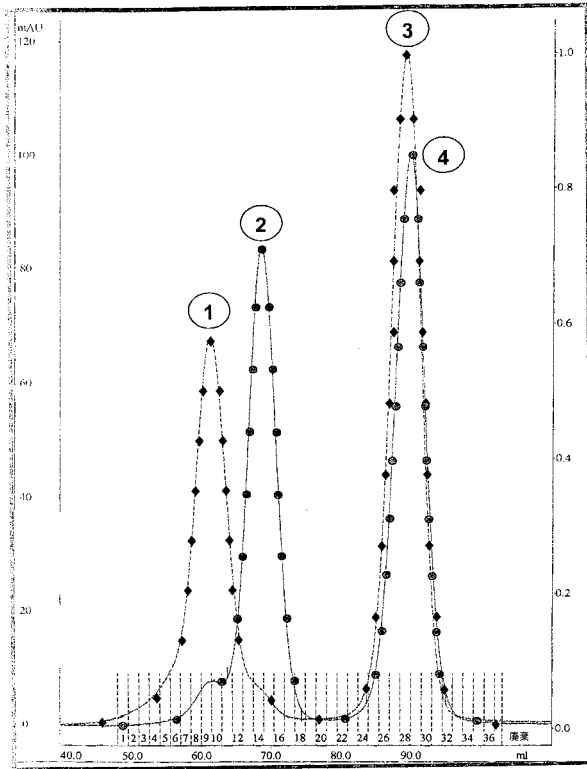


FIG.24

【図 26】

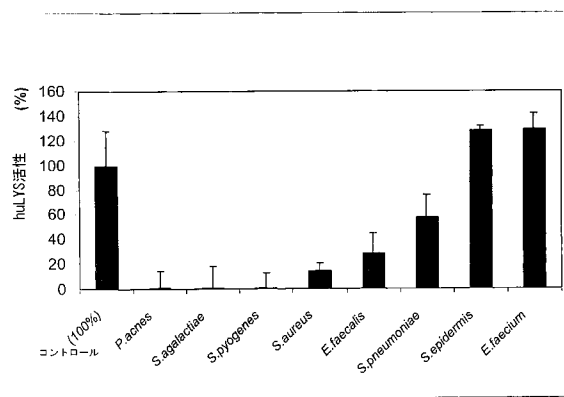


FIG.26

【図 25】

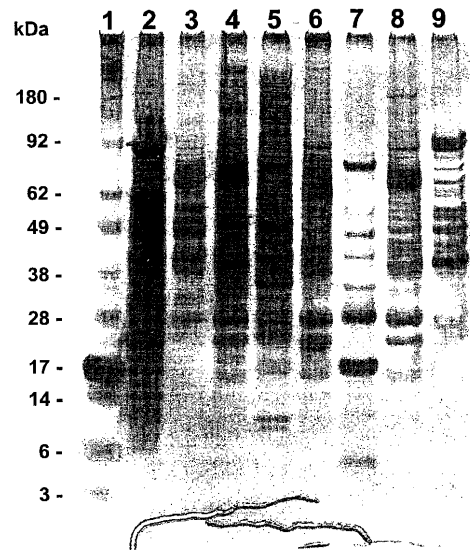


FIG.25

【図 27】

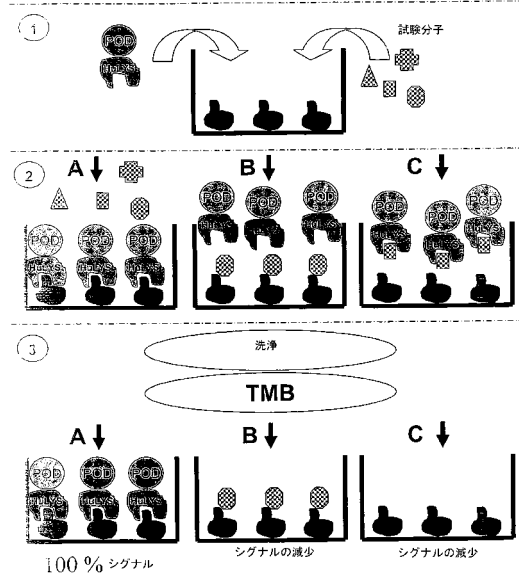


FIG.27

【図 28】

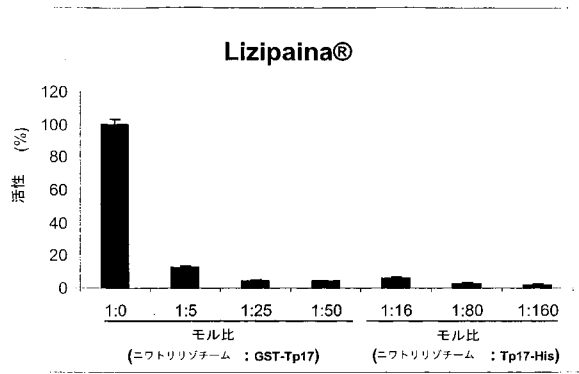


FIG.28A

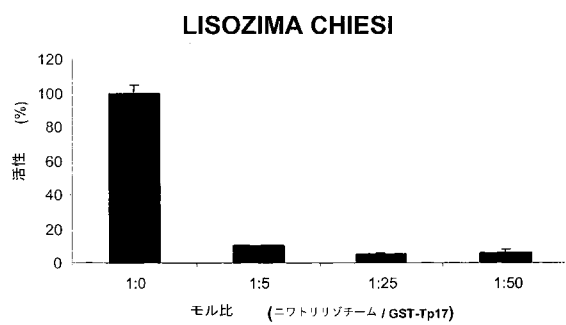


FIG.28B

【図 29】

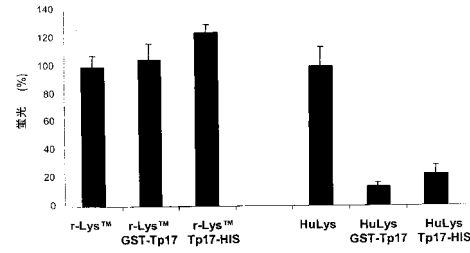


FIG.29

【図 30】

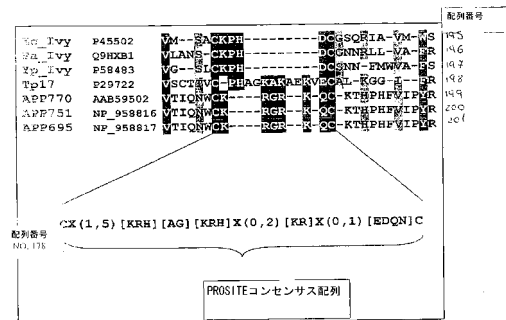


FIG.30

【図 31】

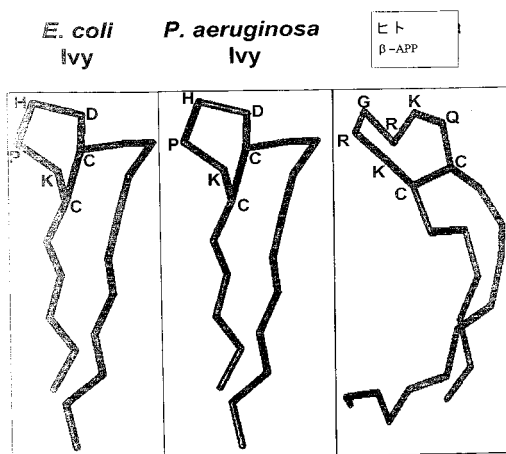


FIG.31

【図 32】

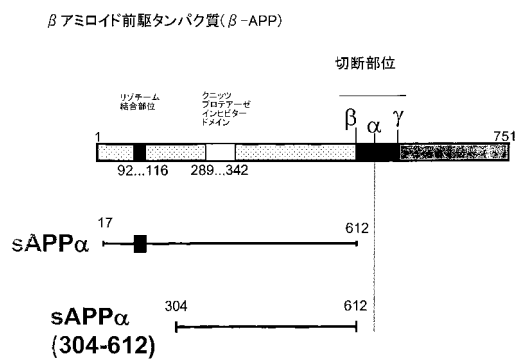


FIG.32

【図 33】



FIG.33

【図 3 4 A】

[illegible]

【图 3 4 B】

[illegible]

FIG.34A

【図 3 5】

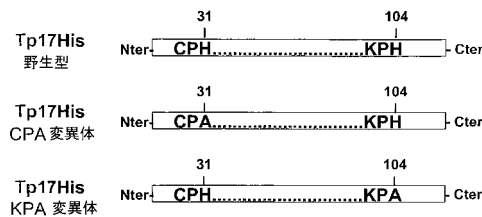


FIG.35A

	ソリタール用量 (%)	
GST-Tp17	huLYS	chkLYS
野生型	100	100
CPA変異体	49 ± 4	42 ± 2
KPA変異体	51 ± 4	58 ± 6

FIG.35B

【図 3 6】

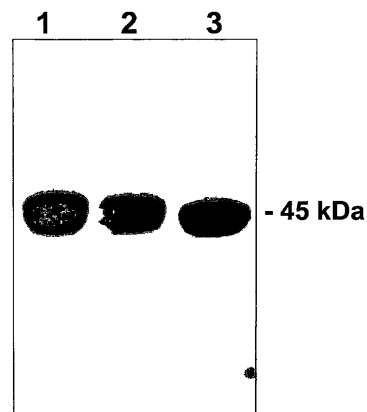
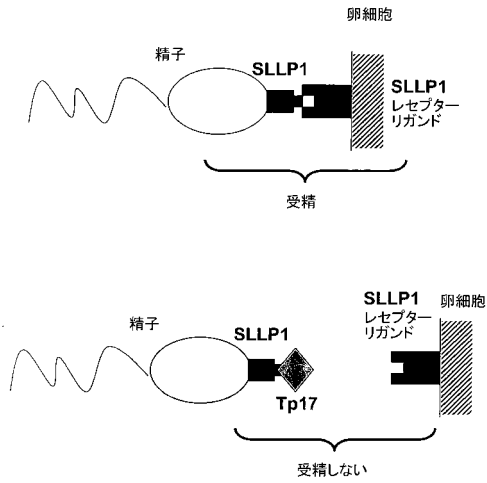


FIG.36

【図 3 8】

	1	10	20	30	40	50	60	
SLLP1	MYSALRGSLVLAIVKSVYVSGVSPGRRLVSSGLVSSGSGGSGTSPAGLELRASRL							配列番号 297
hULP1								
	61	70	80	90	100	110	120	
SLLP1	RRNRPSPGSLALVELLSGLTSPSSKLTGVEELRLALRYGLDLELYSLAARDVGLV							
hULP1	MKQSLVTLKLVLSVTVGQVKVTRDELRLRLTLKLRDQEDVSLALNMLKRL							
	121	130	140	150	160	170	180	
SLLP1	TFSGFNAALDYLA-DSGNTNIFZINRMRNCL-LTPNMYNRYCYSLTSLNPLHPLD							
hULP1	TFSGFNAALDYLA-DSGNTNIFZINRMRNCL-LTPNMYNRYCYSLTSLNPLHPLD							
	181	190	200	210	217			
SLLP1	KCKQKLTQDFQGLVYAGNARCKKSLTITVYVQGL							同一性: 58%
hULP1	KCKQKLTQDFQGLVYAGNARCKKSLTITVYVQGL							

FIG.38



0005414972000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 P 1/02 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N	
A 6 1 P 1/04 (2006.01)	A 6 1 P 1/02		
A 6 1 P 11/00 (2006.01)	A 6 1 P 1/04		
A 6 1 P 11/16 (2006.01)	A 6 1 P 11/00		
A 6 1 P 13/12 (2006.01)	A 6 1 P 11/16		
A 6 1 P 15/02 (2006.01)	A 6 1 P 13/12		
A 6 1 P 15/16 (2006.01)	A 6 1 P 15/02		
A 6 1 P 15/18 (2006.01)	A 6 1 P 15/16		
A 6 1 P 25/28 (2006.01)	A 6 1 P 15/18		
A 6 1 P 27/16 (2006.01)	A 6 1 P 25/28		
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 27/16		
A 6 1 P 31/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00		
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 P 31/00		
A 6 1 P 31/06 (2006.01)	A 6 1 P 31/04		
A 6 1 P 31/14 (2006.01)	A 6 1 P 31/06		
A 6 1 P 31/16 (2006.01)	A 6 1 P 31/14		
A 6 1 P 31/18 (2006.01)	A 6 1 P 31/16		
A 6 1 P 31/20 (2006.01)	A 6 1 P 31/18		
A 6 1 P 31/22 (2006.01)	A 6 1 P 31/20		
A 6 1 P 33/06 (2006.01)	A 6 1 P 31/22		
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 33/06		
A 6 1 P 35/02 (2006.01)	A 6 1 P 35/00		
A 6 1 P 37/04 (2006.01)	A 6 1 P 35/02		
A 6 1 P 37/08 (2006.01)	A 6 1 P 37/04		
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 37/08		
C 0 7 K 14/20 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 0 5	
C 0 7 K 16/12 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1	
C 0 7 K 16/40 (2006.01)	C 0 7 K 14/20		
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 0 7 K 16/12		
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 0 7 K 16/40		
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/15		
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 1/19		
C 1 2 N 9/36 (2006.01)	C 1 2 N 1/21		
C 1 2 N 9/99 (2006.01)	C 1 2 N 5/00	1 0 1	
C 1 2 Q 1/32 (2006.01)	C 1 2 N 9/36		
C 1 2 Q 1/34 (2006.01)	C 1 2 N 9/99		
G 0 1 N 33/15 (2006.01)	C 1 2 Q 1/32		
G 0 1 N 33/50 (2006.01)	C 1 2 Q 1/34		
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/15	Z	
G 0 1 N 33/571 (2006.01)	G 0 1 N 33/50	Z	
	G 0 1 N 33/53	D	
	G 0 1 N 33/571		

- (72)発明者 ヴァイレダ カサデバイユ, フランセス
 スペイン国 (バルセロナ) エー-08186 リサ ダムント, カン マレ エセ/エネ,
 ビオキット エセ. アー.
 (72)発明者 クルス サンツ, マリア

- スペイン国 (バルセロナ) エー-08186 リサ ダムント, カン マレ エセ/エネ,
バイオキット エセ. アー.
- (72)発明者 ヨップ ガルシア, テレサ
スペイン国 (バルセロナ) エー-08186 リサ ダムント, カン マレ エセ/エネ,
バイオキット エセ. アー.
- (72)発明者 モー オイユ, アンヘルス
スペイン国 (バルセロナ) エー-08186 リサ ダムント, カン マレ エセ/エネ,
バイオキット エセ. アー.

合議体

審判長 鈴木 恵理子

審判官 田中 晴絵

審判官 富永 みどり

- (56)参考文献 特開平10-218895 (JP, A)
J. Biol. Chem. 2001, Vol. 276, No. 21, p. 18437-18441

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N15/00-15/90

PUBMED

BIOSIS/WPI, DIALOG

GENBANK/EMBL/DBJ/GENSEQ

UNIPROT/GENSEQ