(19)日本国特許庁(JP)　(12)公開特許公報(A)　(11)特許出願公開番号
特開2017-143841
(P2017-143841A)
(43)公開日　平成29年8月24日(2017.8.24)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	A	4B065
C07K 16/12	(2006.01)	C07K	16/12	ZNA	4C085
C12N 15/02	(2006.01)	C12N	15/00	C	4C086
C12N 5/16	(2006.01)	C12N	5/16		4C087
A61K 39/395	(2006.01)	A61K	39/395	D	4H045

審査請求 有　請求項の数 16　ＯＬ　外国語出願　（全 111 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2017-109356 (P2017-109356)
(22)出願日　平成29年6月1日 (2017.6.1)
(62)分割の表示　特願2016-519661 (P2016-519661)の分割
原出願日　平成26年6月12日 (2014.6.12)
(31)優先権主張番号　61/834,846
(32)優先日　平成25年6月13日 (2013.6.13)
(33)優先権主張国　米国 (US)

(71)出願人　515289842
リサーチ　インスティチュート　アット　ネイションワイド　チルドレンズ　ホスピタル
アメリカ合衆国　オハイオ　４３２０５，　コロンバス，　チルドレンズ　ドライブ　７００，　ルーム　ダブリュー１７２
(71)出願人　504043048
ユニバーシティ　オブ　サザン　カリフォルニア
アメリカ合衆国　カリフォルニア　９００１５，　ロサンゼルス，　サウス　オリーブ　ストリート　１１５０，　スイート　２３００

最終頁に続く

(54)【発明の名称】Ｂｕｒｋｈｏｌｄｅｒｉａ感染の処置のための組成物および方法

(57)【要約】
【課題】Ｂｕｒｋｈｏｌｄｅｒｉａ感染の処置のための組成物および方法を提供すること。
【解決手段】
嚢胞性線維症患者におけるバイオフィルムの破壊方法を開示する。本発明の特定の実施形態によれば、Ｂｕｒｋｈｏｌｄｅｒｉａ感染の処置または再発防止を必要とする嚢胞性線維症（ＣＦ）患者においてＢｕｒｋｈｏｌｄｅｒｉａ感染の処置または再発防止のための用いるための抗ＩＨＦ抗体が提供される。前記抗ＩＨＦ抗体は、ＤＮアーゼ処置なしで前記患者に投与されてもよい。本発明の別の実施形態によれば、本発明のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞株もまた提供される。
【選択図】なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
単離されたポリペプチドを特異的に認識して結合する抗体であって、前記ポリペプチドが、
（ａ）ＭＡＴＩＴＫＬＤＩＩＥＹＬＳＤＫＹＨＬＳ、ＫＹＨＬＳＫＱＤＴＫＮＶＶＥＮＦＬＥＥＩ、ＦＬＥＥＩＲＬＳＬＥＳＧＱＤＶＫＬＳＧＦ、ＫＬＳＧＦＧＮＦＥＬＲＤＫＳＳＲＰＧＲＮ、ＲＰＧＲＮＰＫＴＧＤＶＶＰＶＳＡＲＲＶＶおよびＡＲＲＶＶＴＦＫＰＧＱＫＬＲＡＲＶＥＫＴＫの群から選択される配列からなる単離されたポリペプチド；
（ｂ）表２において同定されたポリペプチドのＡｒｍ断片の配列からなる単離されたポリペプチド；
（ｃ）配列番号３３７～３４０から選択される単離されたポリペプチド；
（ｄ）（ａ）から（ｃ）のうちの１つのポリペプチドに対して少なくとも６０％の配列同一性を有する単離されたポリペプチド；
（ｅ）ポリペプチドのアミン末端および／またはカルボキシ末端上に２５までのアミノ酸が付加された（ａ）から（ｄ）のうちの１つのポリペプチドからなる単離されたポリペプチド
の群から選択される、抗体。
【請求項２】
前記抗体が、
（ａ）ＦＬＥＥＩＲＬＳＬＥＳＧＱＤＶＫＬＳＧＦまたはＲＰＧＲＮＰＫＴＧＤＶＶＰＶＳＡＲＲＶＶ；
（ｂ）（ａ）のポリペプチドに対して少なくとも６０％の配列同一性を有する単離されたポリペプチド；または
（ｃ）ポリペプチドのアミン末端および／またはカルボキシ末端に２５迄のアミノ酸が付加された（ａ）または（ｂ）のポリペプチドからなる単離されたポリペプチド
の群から選択される単離されたポリペプチドを特異的に認識し結合する、請求項１に記載の抗体。
【請求項３】
前記抗体がＦＬＥＥＩＲＬＳＬＥＳＧＱＤＶＫＬＳＧＦまたはＲＰＧＲＮＰＫＴＧＤＶＶＰＶＳＡＲＲＶＶの群から選択される単離されたポリペプチドを特異的に認識して結合する、請求項１に記載の抗体。
【請求項４】
前記抗体がポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、またはその抗原結合断片である、請求項１から３のいずれか一項に記載の抗体。
【請求項５】
検出可能な標識にコンジュゲートしている請求項１から４のいずれか一項に記載の抗体。
【請求項６】
請求項４に記載のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞株。
【請求項７】
請求項１から５のいずれか一項に記載の抗体をコードする単離されたポリヌクレオチド。
【請求項８】
請求項１から５のいずれか一項に記載の抗体、請求項６に記載のハイブリドーマおよび請求項７に記載の単離されたポリヌクレオチドのうちの１つまたはそれより多くを含む組成物。
【請求項９】
キャリアまたはアジュバントをさらに含む、請求項８に記載の組成物。
【請求項１０】
前記キャリアが薬学的に許容され得るキャリアである、請求項９に記載の組成物。
【請求項１１】
検出可能な標識をさらに含む、請求項８または９に記載の組成物。

【請求項１２】
ＤＮＡＢＩＩタンパク質への微生物ＤＮＡの結合を干渉または妨害するための組成物であって、請求項１から５のいずれか１項に記載の抗体、請求項６に記載のハイブリドーマ、請求項７に記載の単離されたポリヌクレオチド、および請求項８から１１のいずれか一項に記載の組成物のうちの１つまたはそれより多くを含む、組成物。
【請求項１３】
ｉｎ　ｖｉｔｒｏまたはｉｎ　ｖｉｖｏにおいて使用するための、請求項１２に記載の組成物。
【請求項１４】
診断または治療用途のためのキットであって、請求項１から５のいずれか１項に記載の抗体、請求項６に記載のハイブリドーマ、請求項７に記載の単離されたポリヌクレオチド、および請求項８から１１のいずれか１項に記載の組成物のうちの１つまたはそれより多くを含む、キット。
【請求項１５】
診断に使用するための請求項１４に記載のキットであって、ＦＬＥＥＩＲＬＳＬＥＳＧＱＤＶＫＬＳＧＦの配列からなる単離されたポリペプチド、前記ポリペプチドに対して少なくとも６０％の配列同一性を有する単離されたポリペプチド、またはポリペプチドのアミン末端および／またはカルボキシ末端上に２５までのアミノ酸が付加されたＦＬＥＥＩＲＬＳＬＥＳＧＱＤＶＫＬＳＧＦの配列を有するポリペプチドからなる単離されたポリペプチドを特異的に認識して結合する抗体を含むキット。
【請求項１６】
治療に使用するための請求項１４に記載のキットであって、ＲＰＧＲＮＰＫＴＧＤＶＶＰＶＳＡＲＲＶＶの配列からなる単離されたポリペプチド、前記ポリペプチドに対して少なくとも６０％の配列同一性を有する単離されたポリペプチド、またはポリペプチドのアミン末端および／またはカルボキシ末端上に２５までのアミノ酸が付加されたＲＰＧＲＮＰＫＴＧＤＶＶＰＶＳＡＲＲＶＶの配列を有するポリペプチドからなる単離されたポリペプチドを特異的に認識して結合する抗体を含むキット。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願の引用
本願は、２０１３年６月１３日に出願した米国仮出願第６１／８３４，８４６号に対する米国特許法第１１９条（ｅ）項の下での優先権を主張する。米国仮出願第６１／８３４，８４６号の内容は、これにより本願に参考として援用される。
【背景技術】
【０００２】
背景
本開示を通して、文献、例えば、技術刊行物、科学刊行物、特許公報などを括弧内に記載する。本情報は、その全体が、技術的現状をより完全に記載し、特許請求の範囲に記載の主題を支持するために、本開示に参考として援用される。
【０００３】
嚢胞性線維症（ＣＦ）は、コーカソイドが罹患する最も一般的な遺伝性致死性障害である（Ｃａｍｐａｎａら（２００４）Ｊ．Ｃｙｓｔ．Ｆｉｂｒｏｓ．３：１５９－１６３）。この遺伝的障害の最も大きな問題は、ＣＦ患者が肺から細菌性病原体を根絶することができないことである。結果として、細菌繁殖（proliferation）後に接着性細胞外バイオフィルム内に留まり、そして／または局所的に宿主細胞に侵入するという悪循環がおこる慢性感染状態を発症する。各急性繁殖サイクルにより、強い宿主応答が誘発され、これらの感染を一掃するために、過剰増殖性の炎症応答が肺組織を損傷し、それにより、瘢痕が形成されて肺機能が損なわれ、しばしば死に至る。今日でさえ、少なくとも９０％のＣＦ患者が呼吸不全で死亡している。現在の処置方法は、抗生物質に依るところが大きいが、

一定の病原体は抗生物質処置に対して高い抵抗性を保持し、これはバイオフィルム内に生息する能力に主に寄与する表現型である。一旦ＣＦ肺内でバイオフィルムが形成されて感染が確立されると、細菌の根絶は稀である（Ｇｅｏｒｇｅら（２００９）ＦＥＭＳ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．Ｌｅｔｔ．３００：１５３－１６４）。

【０００４】

成人ＣＦ患者における主な病原体はＰｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ ａｅｒｕｇｉｎｏｓａであるのに対して、最も有害なＣＦ関連病原体はセパシア菌群（Ｂｃｃ）のメンバーであり、おそらく最も病原性の高いメンバーはＢｕｒｋｈｏｌｄｅｒｉａ ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａ（グラム陰性日和見病原体）である。セパシア菌群内の１７の公式に命名された種のうちで、Ｂ．ｍｕｌｔｉｖｏｒａｎｓおよびＢ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａがＣＦで優位を占め（Ｓｉｍｐｓｏｎら（１９９４）Ｊ．Ａｎｔｉｍｉｃｒｏｂ．Ｃｈｅｍｏｔｈｅｒ．３４：３５３－３６１；Ｂｕｔｌｅｒら（１９９５）Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．３３：１００１－１００４；Ｃａｓｔｅｌｌａｎｉら（１９９５）Ａｒｃｈ Ｄｉｓ Ｃｈｉｌｄ ７３：２７６；ＬｉＰｕｍａら（１９９５）Ｎ．Ｅｎｇｌ．Ｊ．Ｍｅｄ．３３２：８２０－８２１）、全Ｂｕｒｋｈｏｌｄｅｒｉａ感染のおよそ８５～９７％を占める。任意のＢｃｃ種に感染されたＣＦ患者はしばしば予後不良である一方で、Ｂ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａ感染はより重篤であり、生存率が低下し、致命的な「ｃｅｐａｃｉａ症候群」の発症リスクが高くなる（Ｓｉｍｐｓｏｎら（１９９４）Ｊ．Ａｎｔｉｍｉｃｒｏｂ．Ｃｈｅｍｏｔｈｅｒ．３４：３５３－３６１；Ｂｕｔｌｅｒら（１９９５）Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．３３：１００１－１００４；Ｃａｓｔｅｌｌａｎｉら（１９９５）Ａｒｃｈ．Ｄｉｓ．Ｃｈｉｌｄ．７３：２７６；ＬｉＰｕｍａら（１９９５）Ｎ．Ｅｎｇｌ．Ｊ．Ｍｅｄ．３３２：８２０－８２１；Ｂｕｒｎｓら（１９９９）Ｐｅｄｉａｔｒ．Ｉｎｆｅｃｔ．Ｄｉｓ．Ｊ．１８：１５５－１５６；Ｈｏｐｋｉｎｓら（２００９）Ａｍ．Ｊ．Ｒｅｓｐｉｒ．Ｃｒｉｔ．Ｃａｒｅ Ｍｅｄ．１７９：２５７－２５８；Ｄｅ Ｓｏｙｚａら（２０１０）Ｊ．Ｈｅａｒｔ．Ｌｕｎｇ Ｔｒａｎｓｐｌａｎｔ ２９：１３９５－１４０４；Ｎａｓｈら（２０１０）Ｔｒａｎｓｐｌ．Ｉｎｆｅｃｔ．Ｄｉｓ．１２：５５１－５５４）。Ｂ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａは、ポリミキシン、アミノグリコシド、およびほとんどのβ－ラクタムに本質的に耐性を示し、本質的に全ての抗菌薬クラスに耐性を生じ得る（Ａａｒｏｎら（２０００）Ａｍ．Ｊ．Ｒｅｓｐｉｒ．Ｃｒｉｔ．Ｃａｒｅ Ｍｅｄ．１６１：１２０６－１２１２；Ｇｏｌｉｎｉら（２００６）Ｅｕｒ．Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．Ｉｎｆｅｃｔ．Ｄｉｓ．２５：１７５－１８０；Ｄｕｂａｒｒｙら（２０１０）Ａｐｐｌ．Ｅｎｖｉｒｏｎ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．７６：１０９５－１１０２）。

【０００５】

Ｂ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａは、同定および処置が困難であり、また、ＣＦ個体間で容易に伝播することができるので、ＣＦにおける病原体として悪名を得ていた。ＣＦ以外でさえ、Ｂ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａの伝染性の強い流行株は、医療現場を汚染し、院内に拡大することが示されている（Ｇｒａｉｎｄｏｒｇｅら（２０１０）Ｄｉａｇｎ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．Ｉｎｆｅｃｔ．Ｄｉｓ．６６：２９－４０）。多剤耐性Ｂ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａは耐性機構をヒト気道内に存在する他の微生物、特にＣＦ肺に同時コロニー形成する微生物に伝達することができる可能性も高い。この仮定は、２５～４５％の成人ＣＦ患者が複数の多剤耐性細菌に慢性的に感染するという所見によって支持される（Ｌｅｃｈｔｚｉｎら（２００６）Ｒｅｓｐｉｒａｔｉｏｎ ７３：２７－３３）。

【０００６】

ＣＦ気道疾患の病理発生は、多因子性であり、気道分泌物の抗菌活性の欠損、粘液線毛クリアランスの変化、粘膜下腺機能の異常、および活性酸素種（ＲＯＳ）の過剰産生が含まれる。慢性炎症は肺感染の結果としてのＣＦ病理発生の中核を成し、肺障害を引き起こし、８５％が死亡する。過剰なサイトカイン分泌性肺胞マクロファージがＣＦ患者で認められる肺病状にさらに寄与する。炎症促進性メディエーター、例えば、ＩＬ－１β、ＩＬ－８、ＴＮＦ－α、および抗炎症性ＩＬ－１０などは、ＣＦ患者、培養陽性感染の無い若

年患者でさえも検出される。さらに、肺胞マクロファージは、典型的には、肺に接近する微生物を貪食し、液胞内に囲い込んでリソソームと融合し、リソソームで自食作用と呼ばれる過程を介して内容物が分解されて除去されるのに対して、ＣＦマクロファージはこれに関して不完全である。この固有の自食作用の脆弱さ（Ｌｕｃｉａｎｉら（２０１０）Ｎａｔ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．１２：８６３－８７５；Ｌｕｃｉａｎｉら（２０１１）Ａｕｔｏｐｈａｇｙ　７：１０４－１０６；Ｌｕｃｉａｎｉら（２０１２）Ａｕｔｏｐｈａｇｙ　８）は、Ｂ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａが必須の自食作用分子を下方制御することができるのでさらに拍車がかかる（Ａｂｄｕｌｒａｈｍａｎら（２０１１）Ａｕｔｏｐｈａｇｙ　７：１３５９－１３７０）。

ＣＦ患者のＢ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａ感染は、処置が非常に困難であり、しばしば最後の救命手段である肺移植を受けることもできないので、実質上の死刑宣告と考えられる。それにより、ＣＦ患者の肺ならびに医学的環境からＢ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａを根絶するための新規で非常に有効なアプローチを開発する必要性は過小評価されていいわけがない。本発明は、この必要性を満たし、関連する利点も提供する。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【０００７】

【非特許文献１】Ｃａｍｐａｎａら（２００４）Ｊ．Ｃｙｓｔ．Ｆｉｂｒｏｓ．３：１５９－１６３

【非特許文献２】Ｇｅｏｒｇｅら（２００９）ＦＥＭＳ　Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．Ｌｅｔｔ．３００：１５３－１６４

【非特許文献３】Ｓｉｍｐｓｏｎら（１９９４）Ｊ．Ａｎｔｉｍｉｃｒｏｂ．Ｃｈｅｍｏｔｈｅｒ．３４：３５３－３６１

【非特許文献４】Ｂｕｔｌｅｒら（１９９５）Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．３３：１００１－１００４

【非特許文献５】Ｃａｓｔｅｌｌａｎｉら（１９９５）Ａｒｃｈ．Ｄｉｓ　Ｃｈｉｌｄ　７３：２７６

【非特許文献６】ＬｉＰｕｍａら（１９９５）Ｎ．Ｅｎｇｌ．Ｊ．Ｍｅｄ．３３２：８２０－８２１

【非特許文献７】Ｂｕｒｎｓら（１９９９）Ｐｅｄｉａｔｒ．Ｉｎｆｅｃｔ．Ｄｉｓ．Ｊ．１８：１５５－１５６

【非特許文献８】Ｈｏｐｋｉｎｓら（２００９）Ａｍ．Ｊ．Ｒｅｓｐｉｒ．Ｃｒｉｔ．Ｃａｒｅ　Ｍｅｄ．１７９：２５７－２５８

【非特許文献９】Ｄｅ　Ｓｏｙｚａら（２０１０）Ｊ．Ｈｅａｒｔ．Ｌｕｎｇ　Ｔｒａｎｓｐｌａｎｔ　２９：１３９５－１４０４

【非特許文献１０】Ｎａｓｈら（２０１０）Ｔｒａｎｓｐｌ．Ｉｎｆｅｃｔ．Ｄｉｓ．１２：５５１－５５４

【非特許文献１１】Ａａｒｏｎら（２０００）Ａｍ．Ｊ．Ｒｅｓｐｉｒ．Ｃｒｉｔ．Ｃａｒｅ　Ｍｅｄ．１６１：１２０６－１２１２

【非特許文献１２】Ｇｏｌｉｎｉら（２００６）Ｅｕｒ．Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．Ｉｎｆｅｃｔ．Ｄｉｓ．２５：１７５－１８０

【非特許文献１３】Ｄｕｂａｒｒｙら（２０１０）Ａｐｐｌ．Ｅｎｖｉｒｏｎ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．７６：１０９５－１１０２

【非特許文献１４】Ｇｒａｉｎｄｏｒｇｅら（２０１０）Ｄｉａｇｎ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．Ｉｎｆｅｃｔ．Ｄｉｓ．６６：２９－４０

【非特許文献１５】Ｌｅｃｈｔｚｉｎら（２００６）Ｒｅｓｐｉｒａｔｉｏｎ　７３：２７－３３

【非特許文献１６】Ｌｕｃｉａｎｉら（２０１０）Ｎａｔ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．１２：８６３－８７５

【非特許文献１７】Ｌｕｃｉａｎｉら（２０１１）Ａｕｔｏｐｈａｇｙ　７：１０４－１

０６
【非特許文献１８】Ａｂｄｕｌｒａｈｍａｎら（２０１１）Ａｕｔｏｐｈａｇｙ ７：１３５９－１３７０
【発明の概要】
【課題を解決するための手段】
【０００８】
開示の概要
本発明者らは、ＣＦ感染処置のための新規のアプローチの開発のためのタンパク質標的を同定した。このタンパク質標的（ＤＮＡ結合タンパク質のＤＮＡＢＩＩファミリーのメンバー）は、これらの細菌集団内の細胞外ＤＮＡ（ｅＤＮＡ）の構造格子へのその寄与により、複数のヒト病原体（Ｇｏｏｄｍａｎら（２０１１）Ｍｕｃｏｓａｌ Ｉｍｍｕｎｏｌ．４：６２５－６３７；Ｊｕｓｔｉｃｅら（２０１２）ＰＬｏＳ Ｏｎｅ ７：ｅ４８３４９；Ｇｕｓｔａｖｅら（２０１２）Ｊ．Ｃｙｓｔ．Ｆｉｂｒｏｓ．）によるバイオフィルムの形成および安定性に必須である。ＤＮＡＢＩＩファミリーは、核様体関連タンパク質（ＮＡＰ）（細胞内細菌核様体を部分的に形づくる細菌タンパク質）と呼ばれるタンパク質クラスのメンバーである（Ｂｒｏｗｎｉｎｇら（２０１０）Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．１３：７７３－７８０）。さらに、このファミリーは、偏在性であり、事実上全ての真正細菌によって発現される。これまでに特徴付けられている全てのファミリーメンバーは、サブユニットのホモ二量体またはヘテロ二量体のいずれかとして機能する。このファミリーは、２つのタイプ、ＨＵ（ヒストン様タンパク質）およびＩＨＦ（組込み宿主因子）に分類され、Ｂ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａはこれらの両方を発現することが可能である（Ｊ２３１５遺伝子株：ＢＣＡＬ３５３０、ｈｕｐＡ；ＢＣＡＬ１５８５、ｈｕｐＢ；ＢＣＡＬ１４８７、ｉｈｆＡ、およびＢＣＡＬ２９４９、ｉｈｆｂ）。これらのファミリーメンバー間の主な相違は、ＨＵが配列から独立した様式でＤＮＡに結合する一方で、ＩＨＦはコンセンサス配列に結合するという点である（ＷＡＴＣＡＡＮＮＮＮＴＴＲ（ここで、ＷはＡまたはＴであり、Ｒはプリンである）、配列番号３６）は属間で保存されている（Ｓｗｉｎｇｅｒら（２００４）Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｓｔｒｕｃｔ．Ｂｉｏｌ．１４：２８－３５））。全てのＤＮＡＢＩＩタンパク質はＤＮＡに結合してかなり屈曲させる（例えば、Ｅ．ｃｏｌｉ ＩＨＦはＤＮＡを実質的なＵターンに屈曲させることができる（Ｒｉｃｅら（１９９６）Ｃｅｌｌ ８７：１２９５－１３０６））。さらに、全てのファミリーメンバーは、予め屈曲したか湾曲したＤＮＡ構造（例えば、ホリデイジャンクション、ＤＮＡ組換えの中核を成す十字様構造）を好む。実際、ＤＮＡＢＩＩタンパク質は、全ての細胞内ＤＮＡ機能（遺伝子の発現、組換え、修復、および複製が含まれる）を容易にする補助因子として機能する（Ｓｗｉｎｇｅｒら（２００４）Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｓｔｒｕｃｔ．Ｂｉｏｌ．１４：２８－３５）。
【０００９】
過去２０年間に、複数の研究者がこれらのタンパク質が細胞外にも存在することを発見していた（Ｇａｏ（２０００）Ｌｏｓ Ａｎｇｅｌｅｓ：Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ ｏｆ Ｓｏｕｔｈｅｒｎ Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａ；Ｗｉｎｔｅｒｓら（１９９３）Ｉｎｆｅｃｔ．Ｉｍｍｕｎ．６１：３２５９－３２６４；Ｌｕｎｓｆｏｒｄら（１９９６）Ｃｕｒｒ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．３２：９５－１００；Ｂｏｌｅｉｊら（２００９）Ｉｎｆｅｃｔ．Ｉｍｍｕｎ．７７：５５１９－５５２７）。今日までに、３種の細胞外機能が記載されている。第１に、連鎖球菌ＨＵは、ＴＮＦαおよびインターロイキン－１の放出誘導によって強力な炎症性先天性免疫応答を誘発することが示されている（Ｚｈａｎｇら（１９９９）Ｉｎｆｅｃｔ．Ｉｍｍｕｎ．６７：６４７３－６４７７）。興味深いことに、Ｂ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａは、依然として未知の機構による宿主受容体Ｐｙｒｉｎを介したＩＬ－１β産生の悪化によって末梢損傷を誘導する（Ｇａｖｒｉｌｉｎら（２０１２）Ｉｍｍｕｎｏｌ．１８８：３４６９－３４７７；Ｋｏｔｒａｎｇｅら（２０１１）Ｊ．Ｌｅｕｋｏｃ．Ｂｉｏｌ．８９：４８１－４８８）。これに関して、ＤＮＡＢＩＩファミリーメンバーの細胞外の役割は、依然としてＢ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａについて試験されなけれ

ばならない。第２に、細胞外ＤＮＡＢＩＩタンパク質は、ラミニンに結合し、宿主細胞への直接的な接触を誘発すると考えられる（Ｗｉｎｔｅｒｓら（１９９３）Ｉｎｆｅｃｔ．Ｉｍｍｕｎ．６１：３２５９－３２６４）。第３に、ＤＮＡＢＩＩタンパク質は、複数の病原体のバイオフィルムの細胞外の重合マトリックスまたは重合物質（またはＥＰＳ）内のｅＤＮＡの構造完全性を安定化することが知られている（Ｇｏｏｄｍａｎら（２０１１）Ｍｕｃｏｓａｌ Ｉｍｍｕｎｏｌ．４：６２５－６３７）。これらのタンパク質に指向する抗血清は、バイオフィルムを不安定化し、その結果常在細菌を暴露／放出させ、したがって常在細菌を抗菌剤および免疫系エフェクターの両方の作用に感作させるのに十分である（Ｇｏｏｄｍａｎら（２０１１）Ｍｕｃｏｓａｌ Ｉｍｍｕｎｏｌ．４：６２５－６３７）。最近、両ＩＨＦサブユニットが尿路病原性Ｅ．ｃｏｌｉによる膀胱の有効なコロニー形成に必要であること、さらに、両ＩＨＦサブユニットが細胞内細菌集団の集団構造に影響を及ぼすことも示されている（Ｊｕｓｔｉｃｅら（２０１２）ＰＬｏＳ Ｏｎｅ ７：ｅ４８３４９）。理論に拘束されず、且つＢ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａ誘導性バイオフィルム内の大量のｅＤＮＡを考慮して、本発明者らは、同様にこれらのバイオフィルムの安定化におけるＤＮＡＢＩＩタンパク質ファミリーの役割が存在するかどうか、したがって、このタンパク質ファアミリーが治療的介入のための標的としての機能を果たすかどうかを調査した。さらに、おそらく細菌細胞に関連する細胞外ＤＮＡＢＩＩタンパク質の存在は、Ｂ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａの宿主細胞との相互作用、特にその主な貯蔵所（マクロファージ）との相互作用に影響を及ぼし得る。

【００１０】

したがって、調査および研究後、本発明者らは、本明細書中に、ＤＮＡＢＩＩタンパク質をターゲティングする免疫治療アプローチを開示し、特に既存の従来の治療法と組み合わせた場合に、Ｂ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａによって形成されたバイオフィルムの減量およびバイオフィルムＥＰＳから新たに放出される細菌への抗生物質の作用に対する感受性付与の両方で非常に有効であることが見出された。本方法を、ＣＦ患者の肺由来のＢ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａの貯蔵所を縮小して根絶させるために使用することができる。さらに、本方法は、Ｂ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａがＣＦマウス（ヒトにおけるＣＦの重要な動物モデル）から単離したマクロファージ内で増幅（multiply）能力を阻害することによってＣＦ疾患の再発を防止することを示している。

【００１１】

したがって、一態様では、ＣＦ中に存在するかまたはＣＦに寄与するバイオフィルム（例えば、Ｂ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａ誘導性バイオフィルム）を阻害するか、それと競合するか、その力価を決定する方法であって、バイオフィルムを干渉作用剤と接触させ、それにより、バイオフィルムを阻害するか、それと競合するか、その力価を決定する、接触させることを含む、あるいはそれから本質的になる、またはさらにそれからなる方法を提供する。接触は、ｉｎ ｖｉｔｒｏまたはｉｎ ｖｉｖｏで実施することができる。

【００１２】

別の態様では、ＣＦ患者またはＣＦに寄与する感染を保有する患者におけるバイオフィルム中の細菌細胞を阻害するか、防止するか、その力価を決定する方法であって、細菌細胞を干渉作用剤と接触させ、それにより、細菌細胞および感染を阻害するか、防止するか、その力価を決定する、接触させることを含む、あるいはそれから本質的になる、またはさらにそれからなる方法を本明細書中に提供する。接触は、ｉｎ ｖｉｔｒｏまたはｉｎ ｖｉｖｏで実施することができる。

【００１３】

ＣＦ患者または細菌感染の発症リスクのある患者における細菌感染の再発を処置または防止する方法であって、有効量の干渉作用剤を被験体に投与し、それにより、ＣＦ患者における細菌感染の再発を処置または防止する、投与することを含む、あるいはそれから本質的になる、またはさらにそれからなる方法も提供する。

【００１４】

治療をさらに補足するために、干渉作用剤を、抗菌剤（例えば、セフタジジム、シプロ

フロキサシン、イミペネム、およびミノサイクリン）と組み合わせることができる。したがって、任意の上記方法は、有効量の抗菌薬（例えば、セフタジジム、シプロフロキサシン、イミペネム、およびミノサイクリン）を投与するか、抗菌薬と接触させることをさらに含む、あるいはそれから本質的になる、またはさらにそれからなることができる。別の態様では、干渉作用剤の投与または接触を、ＤＮアーゼ処置を使用せずに実施する。一態様では、治療から排除されるＤＮアーゼ処置は、ＤＮＡ骨格内のホスホジエステル結合の切断を触媒する酵素を含む。十字構造だけでなく、ＤＮＡの多様な二次構造も標的とすることが公知であるＤＮアーゼ酵素についての３つの非限定的な例には、ＤＮアーゼＩ、Ｔ４　Ｅｎｄｏ　ＶＩＩ、およびＴ７　Ｅｎｄｏ　Ｉが含まれる。一態様では、治療から排除されるＤＮアーゼ処置は、プルモザイム（Ｐｕｌｍｏｚｙｍｅ）（登録商標）（ドルナーゼα；Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈ，Ｉｎｃ．）を含む、あるいはそれから本質的になる、またはさらにそれからなる。

【００１５】

本明細書中に記載の方法について、細胞内持続に必要な重要表面を閉塞するか、微生物ＤＮＡのＤＮＡＢＩＩタンパク質またはＤＮＡＢＩＩポリペプチドへの結合を干渉または妨害する任意の作用剤は、本発明の範囲内に含まれることが意図される。干渉作用剤の非限定的な例としては、

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

（ｂ）表１、表２において同定される単離されたかまたは組換え型のタンパク質またはポリペプチド、表２、表３において同定されたＡｒｍ断片、または図９において同定されるＤＮＡ結合性ペプチド、またはそのそれぞれの断片もしくは等価物；

（ｃ）配列番号１～３３またはその等価物の単離されたかまたは組換え型のポリペプチドまたはそのそれぞれの断片もしくは等価物；

（ｄ）配列番号５～１１、２８、２９の、または表１において同定された単離されたかまたは組換え型のＣ末端ポリペプチド、またはそのそれぞれの断片もしくは等価物；

（ｅ）微生物ＤＮＡへの結合において組込み宿主因子と競合するか、置換することなく重要表面を閉塞させるポリペプチド；

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

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

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

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

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

が挙げられる。

【００１６】

一態様では、配列番号１～５、１２～２７、または３０～３３から選択されるアミノ酸配列、または図９において同定されるＤＮＡ結合性ペプチドから本質的になる単離されたかまたは組換え型のポリペプチドが提供される。

【００１７】

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

【００１８】

別の態様では、配列番号３、４、または５を含む、あるいはそれから本質的になる、ま

たはさらにそれからなるが、配列番号６～１１、２８、または２９のいずれでもない単離されたかまたは組換え型のポリペプチドを使用した方法を実施する。

【００１９】

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

【００２０】

一態様では、配列番号１３、１５、１７、１９、２１、２３、２５、２７、３１、または３３を含む、あるいはそれから本質的になる、またはさらにそれからなるが、配列番号６～１１、２８、または２９のいずれでもない単離されたかまたは組換え型のポリペプチドを使用した方法を実施する。

【００２１】

別の態様では、配列番号１２および１３、または１４および１５、または１６および１７、または１８および１９、または２０および２１、または２２および２３、または２４および２５、または２６および２７、または３０および３１、または３２および３３を含む、あるいはそれから本質的になる、またはさらにそれからなるが、配列番号６～１１、２８、または２９のいずれでもない単離されたかまたは組換え型のポリペプチドを使用した方法を実施する。

【００２２】

別の態様では、ＤＮＡＢＩＩポリペプチド、ＩＨＦポリペプチド、配列番号６～１１、２８、２９、または表１において同定されたポリペプチドの群のポリペプチドのＣ末端領域またはペプチド、またはそのそれぞれの断片もしくは等価物を含む、あるいはそれから本質的になる、またはさらにそれからなる単離されたかまたは組換え型のポリペプチドを使用して本方法を実施する。

【００２３】

本発明の方法において使用され得る作用剤のさらなる非限定的な例としては、

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

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

（ｃ）表１、表２において同定される単離されたかまたは組換え型のタンパク質もしくはポリペプチド、表２、表３、表４において同定されたＡｒｍ断片、または図９において同定されるＤＮＡ結合性ペプチド、またはそのそれぞれの断片もしくは等価物、

（ｄ）配列番号１～３４８の単離されたかまたは組換え型のポリペプチド、またはそのそれぞれの断片もしくは等価物、

（ｅ）配列番号６～１１、２８、２９、４２～１００、表１の単離されたかまたは組換え型のＣ末端のポリペプチド、または表４において同定されるＣ末端のポリペプチド、またはそのそれぞれの断片もしくは等価物、

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

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

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

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

物もしくは断片、
（ｊ）（ｉ）の抗体もしくは抗原結合性断片またはその相補物をコードする、単離されたかまたは組換え型のポリヌクレオチド、または
（ｋ）ＤＮＡＢＩＩタンパク質またはＤＮＡＢＩＩポリペプチドの微生物ＤＮＡへの結合を閉塞させるかまたはそれと競合する小分子
が挙げられる。
【００２４】
本明細書では、免疫応答を誘導する、またはそれを必要とする被験体に受動免疫を付与することを必要とするＣＦ被験体において免疫応答を誘導する、またはそれを必要とする被験体に受動免疫を付与するための方法であって、ＣＦ被験体に、群：
（ａ）単離されたかまたは組換え型の組込み宿主因子（ＩＨＦ）ポリペプチド、またはそのそれぞれの断片もしくは等価物、
（ｂ）Ｅ．ｃｏｌｉのＵ９３株由来の単離されたかまたは組換え型のヒストン様タンパク質（ＨＵ）ポリペプチド、またはそのそれぞれの断片もしくは等価物、
（ｃ）表１、表２において同定される単離されたかもしくは組換え型のタンパク質ポリペプチド、表２、表３、表４において同定されるＡｒｍ断片、または図９において同定されるＤＮＡ結合性ペプチド、またはそのそれぞれの断片もしくは等価物、
（ｄ）配列番号１～３４８の単離されたかまたは組換え型のポリペプチド、またはその断片もしくは等価物、
（ｅ）配列番号６～１１、２８、２９、４２～１００、表１の単離されたかまたは組換え型のＣ末端のポリペプチド、または表４において同定されるＣ末端のポリペプチド、またはそのそれぞれの断片もしくは等価物、
（ｆ）（ａ）～（ｅ）のうちの任意の１つをコードする、単離されたかまたは組換え型のポリヌクレオチド、または配列番号３６の単離されたかまたは組換え型のポリヌクレオチド、またはそのそれぞれの等価物、またはストリンジェントな条件下でポリヌクレオチド、その等価物もしくはその相補物とハイブリダイズするポリヌクレオチド、
（ｇ）（ａ）～（ｅ）のうちの任意の１つを特異的に認識する、またはそれに特異的に結合する抗体もしくは抗原結合性断片、またはそのそれぞれの等価物もしくは断片、
（ｈ）（ｇ）の抗体もしくは抗原結合性断片をコードする、単離されたかまたは組換え型のポリヌクレオチド、
（ｉ）（ａ）～（ｅ）のうちの任意の１つでパルスした抗原提示細胞、および
（ｊ）（ａ）～（ｅ）のうちの任意の１つをコードする１種または複数種のポリヌクレオチドでトランスフェクトされた抗原提示細胞
の１つまたは複数の作用剤を有効量で投与することを含む、あるいはそれから本質的になる、またはさらにそれからなる方法も提供される。
【００２５】
そのような免疫応答または補助を必要とする被験体としては、微生物バイオフィルムが生じる感染症の危険性がある、またはそれに罹患している被験体が挙げられる。
【００２６】
本明細書ではまた、上記の方法において使用するための、ポリヌクレオチド、ポリペプチドおよび抗体、抗原結合断片ならびに組成物も提供され、その非限定的な例は以下に考察されている。
【００２７】
一態様では、配列番号１～５または１２～２７、３０～３５、１０１～３４８から選択されるアミノ酸配列または図９において同定されるＤＮＡ結合性ペプチドを含む、あるいはそれから本質的になる単離されたかまたは組換え型のポリペプチドが提供される。
【００２８】
別の態様では、配列番号１または２を含む、あるいはそれから本質的になる、またはさらにそれからなるが、配列番号６～１１、２８、２９、または４２～１００のいずれでもない単離されたかまたは組換え型のポリペプチドが提供される。

【００２９】
一態様では、配列番号３、４、または５を含む、あるいはそれから本質的になる、またはさらにそれからなるが、配列番号６～１１、２８、２９、または４２～１００のいずれでもない単離されたかまたは組換え型のポリペプチドもまた提供される。
【００３０】
一態様では、配列番号１２、１４、１６、１８、２０、２２、２４、２６、３０、または３２を含む、あるいはそれから本質的になる、またはさらにそれからなるが、配列番号６～１１、２８、２９、または４２～１００のいずれでもない単離されたかまたは組換え型のポリペプチドが提供される。
【００３１】
一態様では、配列番号１３、１５、１７、１９、２１、２３、２５、２７、３１、または３３を含む、あるいはそれから本質的になる、またはさらにそれからなるが、配列番号６～１１、２８、２９、または４２～１００のいずれでもない単離されたかまたは組換え型のポリペプチドが提供される。
【００３２】
一態様では、配列番号３３７、３３８、３３９、または３４０を含む、あるいはそれから本質的になる、またはさらにそれからなるが、配列番号６～１１、２８、２９、または４２～１００のいずれでもない単離されたかまたは組換え型のポリペプチドが提供される。
【００３３】
一態様では、配列番号１２および１３、または１４および１５、または１６および１７、または１８および１９、または２０および２１、または２２および２３、または２４および２５、または２６および２７、または３０および３１、または３２および３３を含む、あるいはそれから本質的になる、またはさらにそれからなるが、配列番号６～１１、２８、２９、または４２～１００のいずれでもない単離されたかまたは組換え型のポリペプチドが提供される。
【００３４】
一態様では、少なくとも１０個、あるいは少なくとも１５個、あるいは少なくとも２０個、あるいは少なくとも２５個、あるいは少なくとも３０個を含むＣ末端領域、ＤＮＡＢＩＩポリペプチド、ＩＨＦポリペプチド、ＨＵポリペプチド、配列番号６～１１、２８、２９、または表１、表２において同定されたポリペプチドの群のポリペプチドのＣ末端アミノ酸、表２、表４において同定されたＡｒｍ断片、またはそのそれぞれの断片もしくは等価物、あるいは配列番号３３７～３４０のポリペプチド、またはその等価物を含む、あるいはそれから本質的になる、またはさらにそれからなる単離されたかまたは組換え型のポリペプチドを提供する。
【００３５】
一態様では、
配列番号１２および１３を含むポリペプチド、
配列番号１４および１５を含むポリペプチド、
配列番号１６および１７を含むポリペプチド、
配列番号１８および１９を含むポリペプチド、
配列番号２０および２１を含むポリペプチド、
配列番号２３および２４を含むポリペプチド、
配列番号２５および２６を含むポリペプチド、
配列番号３０および３１を含むポリペプチド、
配列番号３２および３３を含むポリペプチド、
配列番号３４および３５を含むポリペプチド、
配列番号３３７および３３８を含むポリペプチド、または
配列番号３３９および３４０を含むポリペプチド、
配列番号３４１～３４８を含むポリヌクレオチドまたはポリペプチド

からなる群の単離されたかまたは組換え型のポリペプチドまたはポリヌクレオチドであって、該ポリペプチドは、ＩＨＦアルファ、ＩＨＦベータのうちの任意の１つの野生型でも配列番号６～１１、２８、２９、または４２～１００のいずれでもない、ポリペプチドまたはポリヌクレオチドが提供される。

【００３６】

一態様では、

配列番号１２および１３から本質的になるポリペプチド、

配列番号１４および１５から本質的になるポリペプチド、

配列番号１６および１７から本質的になるポリペプチド、

配列番号１８および１９から本質的になるポリペプチド、

配列番号２０および２１から本質的になるポリペプチド、

配列番号２３および２４から本質的になるポリペプチド、

配列番号２５および２６から本質的になるポリペプチド、

配列番号３０および３１から本質的になるポリペプチド、

配列番号３２および３３から本質的になるポリペプチド、

配列番号３４および３５から本質的になるポリペプチド、

配列番号３３７および３３８から本質的になるポリペプチド、または

配列番号３３９および３４０から本質的になるポリペプチド、

配列番号３４１～３４８のいずれか１つから本質的になるポリヌクレオチドまたはポリペプチド、

の群の単離されたかまたは組換え型のポリヌクレオチドまたはポリペプチドであって、該ポリペプチドがＩＨＦアルファ、ＩＨＦベータのうちの任意の１つの野生型または配列番号６～１１、２８、２９、または４２～１００のいずれでもない、ポリヌクレオチドまたはポリペプチドが提供される。

【００３７】

上で同定された単離されたポリペプチドを、その断片および等価物も含めて、２つ以上、または３つ以上または４つ以上、または多数含む、あるいはそれから本質的になる、またはさらにそれからなる単離されたかまたは組換え型のポリペプチドも提供される。その例としては、配列番号１～４および／または１２～２９、および／または３０～３３、および／または３０～３５、例えば、配列番号１および２、あるいは１および３、あるいは１および４、あるいは２および３、あるいは配列番号１、２および３、あるいは、２、３および４、あるいは１、３および４または等価のポリペプチドを含む単離されたポリペプチドが挙げられ、その例は表２および特に、表２において同定されるＡｒｍ断片またはその等価物、あるいは配列番号３３７～３４０のポリペプチド、またはそれらの等価物に示されている。ポリペプチドは任意の方向、例えば、配列番号１、２、および３、または配列番号３、２および１、あるいは配列番号２、１および３、あるいは３、１および２、あるいは１１および１２、あるいは１および１２、あるいは２および１２、あるいは１および１２、あるいは２および１３、あるいは１２、１６および１、あるいは１、１６および１２であってよい。

【００３８】

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

またはＩＨＦβ微生物のβ－３断片および／またはα－３断片に対応するアミノ酸を含む、あるいはそれから本質的になる、またはさらにそれからなり、その非限定的な例として配列番号１２～２７および３０～３３が挙げられるポリペプチド、またはそのそれぞれの等価物は、配列番号３または４またはその断片もしくは等価物の上流またはアミノ末端に位置する。別の態様では、単離されたポリペプチドは、配列番号３または４、またはＩＨＦα微生物またはＩＨＦβ微生物のβ－３断片および／またはα－３断片に対応するアミノ酸を含む、あるいはそれから本質的になる、またはさらにそれからなり、その非限定的な例として配列番号１２～２７が挙げられるポリペプチド、または配列番号１または２、またはその等価物の上流またはアミノ末端に位置するその等価物を含む。

【００３９】

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

【００４０】

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

【００４１】

微生物ＤＮＡと、ポリペプチドまたはその断片もしくは等価物の結合に干渉するポリヌクレオチド、例えば、配列番号３６、またはホリデイジャンクションと似ている４方向のジャンクションポリヌクレオチド、複製フォークと似ている３方向のジャンクションポリヌクレオチド、固有の柔軟性を有するポリヌクレオチドまたは屈曲したポリヌクレオチド；ポリヌクレオチドの発現および／または複製に必要な調節エレメントに作動可能に連結することができる、上記のポリペプチドまたは抗体またはその断片をコードする、単離されたかまたは組換え型のポリヌクレオチドがさらに提供される。ポリヌクレオチドは、ベクター内に含有されてよい。

【００４２】

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

【００４３】

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

【００４４】

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

【００４５】

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

【００４６】

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

【００４７】

抗体、ポリヌクレオチド、ポリペプチド、ベクターまたは宿主細胞は、検出可能な標識またはキャリア（例えば、薬学的に許容されるキャリア）をさらに含んでよい。

【００４８】

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

【００４９】

組成物は、追加的な生物学的に活性な作用剤をさらに含んでよい。その非限定的な例は、１種の抗菌剤、例えば、他のワクチン構成成分（すなわち、抗原性ペプチド）、例えば、表面抗原、例えば、ＩＶ型Ｐｉｌｉｎタンパク質など（ＪｕｒｃｉｓｅｋおよびＢａｋａｌｅｔｚ（２００７年）Ｊ．ｏｆ Ｂａｃｔｅｒｉｏｌｏｇｙ １８９巻（１０号）：３８６８～３８７５頁を参照されたい）である。

【００５０】

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

【００５１】

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

配列表

配列番号１

Ａ１－Ａ２－Ａ３－Ａ４－Ａ５－Ａ６－Ａ７－Ａ８－Ａ９

ここで、

Ａ１はＶまたはＩであり；

Ａ２は、Ｋ、Ｑ、Ｅ、Ａ、ＶまたはＹのうちの任意の１つであり；

Ａ３はＫ、Ｌ、Ｉ、ＶまたはＦのうちの任意の１つであり；

Ａ４はＳ、Ｉ、ＲまたはＶのうちの任意の１つであり；
Ａ５はＧまたはＳのうちの任意の１つであり；
Ａ６はＦであり；
Ａ７はＧであり；
Ａ８はＮまたはＳまたはＴまたはＫのうちの任意の１つであり；
Ａ９はＦである。
配列番号２は、ＶＫＫＳＧＦＧＮＦである。
配列番号３は、Ｂ１－Ｂ２－Ｂ３－Ｂ４－Ｂ５－Ｂ５－Ｂ６－Ｂ７であり、
Ｂ１は存在しない、またはＧまたはＫのうちの任意の１つであり；
Ｂ２は存在しない、またはＲ、ＩまたはＫのうちの任意の１つであり；
Ｂ３はＮまたはＶであり；
Ｂ４はＰまたはＩであり；
Ｂ５は、Ｋ、Ｑ、ＳまたはＧのうちの任意の１つであり；
Ｂ６は、Ｔ、ＫまたはＳのうちの任意の１つであり；
Ｂ７は、Ｇ、Ｋ、ＱまたはＤのうちの任意の１つである。
配列番号４はＮＰ（Ｋ／Ｑ）ＴＧである。
配列番号５　ＧＲＮＰ（Ｋ／Ｑ）ＴＧ
配列番号６　全長の野生型（ｗｔ）８６－０２８ＮＰ　Ｈａｅｍｏｐｈｉｌｕｓ　ｉｎｆｌｕｅｎｚａｅ　ＩｈｆＡ；
Ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＡＡＸ８８４２５．１、２０１１年３月２１日に最終アクセス：
ＭＡＴＩＴＫＬＤＩＩＥＹＬＳＤＫＹＨＬＳＫ　ＱＤＴＫＮＶＶＥＮＦＬＥＥＩＲＬＳＬＥＳＧＱＤＶＫＬＳＧＦＧＮＦＥＬＲＤＫＳＳＲＰＧＲＮＰＫＴＧＤＶＶＰＶＳＡＲＲＶＶＴＦＫＰＧＱＫＬＲＡＲＶＥＫＴＫ。
配列番号７　全長のｗｔ　８６－０２８ＮＰ　Ｈａｅｍｏｐｈｉｌｕｓ　ｉｎｆｌｕｅｎｚａｅ　ＨＵ、Ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＹＰ＿２４８１４２．１、２０１１年３月２１日に最終アクセス：
ＭＲＦＶＴＩＦＩＮＨＡＦＮＳＳＱＶＲＬＳＦＡＱＦＬＲ　ＱＩＲＫＤＴＦＫＥＳＮＦＬＦＮＲＲＹＫＦＭＮＫＴＤＬＩＤＡＩＡＮＡＡＥＬＮＫＫＱＡＫＡＡＬＥＡＴＬＤＡＩＴＡＳＬＫＥＧＥＰＶＱＬＩＧＦＧＴＦＫＶＮＥＲＡＡＲＴＧＲＮＰＱＴＧＡＥＩＱＩＡＡＳＫＶＰＡＦＶＳＧＫＡＬＫＤＡＩＫ。
配列番号８　全長のｗｔ　Ｒ２８４６　Ｈａｅｍｏｐｈｉｌｕｓ　ｉｎｆｌｕｅｎｚａｅ　ＩｈｆＡ、Ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＡＤＯ９６３７５、２０１１年３月２１日に最終アクセス：
ＭＡＴＩＴＫＬＤＩＩＥＹＬＳＤＫＹＨＬＳＫＱＤＴＫＮＶＶＥＮＦＬ　ＥＥＩＲＬＳＬＥＳＧＱＤＶＫＬＳＧＦＧＮＦＥＬＲＤＫＳＳＲＰＧＲＮＰＫＴＧＤＶＶＰＶＳＡＲＲＶＶＴＦＫＰＧＱＫＬＲＡＲＶＥＫＴＫ。
配列番号９　全長のｗｔ　Ｒｄ　Ｈａｅｍｏｐｈｉｌｕｓ　ｉｎｆｌｕｅｎｚａｅ　ＩｈｆＡ、Ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＡＡＣ２２９５９．１、２０１１年３月２１日に最終アクセス：
ＭＡＴＩＴＫＬＤＩＩＥＹＬＳＤＫＹＨＬＳＫＱＤＴＫ　ＮＶＶＥＮＦＬＥＥＩＲＬＳＬＥＳＧＱＤＶＫＬＳＧＦＧＮＦＥＬＲＤＫＳＳＲＰＧＲＮＰＫＴＧＤＶＶＰＶＳＡＲＲＶＶＴＦＫＰＧＱＫＬＲＡＲＶＥＫＴＫ；
配列番号１０　全長のｗｔ　Ｅ．ｃｏｌｉ　Ｋ１２　ＩｈｆＡ；Ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＡＡＣ７４７８２．１、２０１１年３月２１日に最終アクセス：
ＭＡＬＴＫＡＥＭＳＥＹＬＦＤＫＬＧＬＳＫＲＤＡＫＥＬＶＥＬＦＦＥ　ＥＩＲＲＡＬＥＮＧＥＱＶＫＬＳＧＦＧＮＦＤＬＲＤＫＮＱＲＰＧＲＮＰＫＴＧＥＤＩＰＩＴＡＲＲＶＶＴ　ＦＲＰＧＱＫＬＫＳＲＶＥＮＡＳＰＫＤＥ；　ＤＮＡ　Ｇｅｎｂａｎｋ番号ＮＣ＿０００９１３。
配列番号１１　全長のｗｔ　Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ　ＰＡ　０１　ＩｈｆＡ；Ｇｅ

ｎｂａｎｋ受託番号：ＡＡＧ０６１２６．１、２０１１年3月２１日に最終アクセス：
ＭＧＡＬＴＫＡＥＩＡＥＲＬＹＥＥＬＧＬＮＫＲＥＡ　ＫＥＬＶＥＬＦＦＥＥＩＲＱＡＬ
ＥＨＮＥＱＶＫＬＳＧＦＧＮＦＤＬＲＤＫＲＱＲＰＧＲＮＰＫＴＧＥＥＩＰＩＴＡＲＲＶ
ＶＴＦＲＰＧＱＫＬＫＡＲＶＥＡＹＡＧＴＫＳ
配列番号１２および１３：（ＩＨＦβ）のβ－３部分およびα－３部分、配列番号１２：ＴＦＲＰＧＱおよび配列番号１３：ＫＬＫＳＲＶＥＮＡＳＰＫＤＥ
配列番号１４および１５：（ＩＨＦβ）のβ－３部分およびα－３部分、配列番号１４：ＨＦＫＰＧＫおよび配列番号１５：ＥＬＲＤＲＡＮＩＹＧ
配列番号１６および１７：配列番号６のβ－３部分およびα－３部分、配列番号１６：ＴＦＫＰＧＱおよび配列番号１７：ＫＬＲＡＲＶＥＫＴＫ
配列番号１８および１９：２０１９　Ｈａｅｍｏｐｈｉｌｕｓ　ｉｎｆｌｕｅｎｚａｅ　ＩｈｆＡのβ－３部分およびα－３部分、配列番号１８：ＴＦＫＰＧＱおよび配列番号１９：ＫＬＲＡＲＶＥＮＴＫ
配列番号２０および２１：配列番号８のβ－３部分およびα－３部分、配列番号２０：ＴＦＫＰＧＱおよび配列番号２１：ＫＬＲＡＲＶＥＫＴＫ
配列番号２２および２３：配列番号９のβ－３部分およびα－３部分、配列番号２２：ＴＦＫＰＧＱおよび配列番号２３：ＫＬＲＡＲＶＥＫＴＫ
配列番号２４および２５：配列番号１０のβ－３部分およびα－３部分、配列番号２４：ＴＦＲＰＧＱおよび配列番号２５：ＫＬＫＳＲＶＥＮＡＳＰＫＤＥ
配列番号２６および２７：　配列番号１１のβ－３部分およびα－３部分、配列番号２６：ＴＦＲＰＧＱおよび配列番号２７：ＫＬＫＡＲＶＥＡＹＡＧＴＫＳ
配列番号２８：Ｅ．ｃｏｌｉ　ｈｕｐＡ、Ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＡＰ＿００３８１８、２０１１年3月２１日に最終アクセス：
ＭＮＫＴＱＬＩＤＶＩＡＥＫＡＥＬＳＫＴＱＡＫＡＡＬＥＳＴＬＡＡＩＴＥＳＬＫＥＧＤ
ＡＶＱＬＶＧＦＧＴＦＫ　ＶＮＨＲＡＥＲＴＧＲＮＰＱＴＧＫＥＩＫＩＡＡＡＮＶＰＡＦ
ＶＳＧＫＡＬＫＤＡＶＫ
配列番号２９：Ｅ．ｃｏｌｉ　ｈｕｐＢ、Ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＡＰ＿００１０９０．１、２０１１年3月２１日に最終アクセス：
ＭＮＫＳＱＬＩＤＫＩＡＡＧＡＤＩＳＫＡＡＡＧＲＡＬＤＡＩＩＡＳＶＴＥＳＬＫＥＧＤ
ＤＶＡＬＶＧＦＧ　ＴＦＡＶＫＥＲＡＡＲＴＧＲＮＰＱＴＧＫＥＩＴＩＡＡＡＫＶＰＳＦ
ＲＡＧＫＡＬＫＤＡＶＮ
配列番号３０および３１：配列番号２８のβ－３部分およびα－３部分、配列番号３０：ＡＦＶＳＧＫおよび配列番号３１：ＡＬＫＤＡＶＫ
配列番号３２および３３：配列番号２９のβ－３部分およびα－３部分、配列番号３２：ＳＦＲＡＧＫおよび配列番号３３：ＡＬＫＤＡＶＮ
配列番号３４：ＩＨＦ　αのＣ末端の２０アミノ酸：ＴＦＲＰＧＱＫＬＫＳＲＶＥＮＡＳＰＫＤＥ
配列番号３５：ＩＨＦ　βのＣ末端の２０アミノ酸：ＫＹＶＰＨＦＫＰＧＫＥＬＲＤＲＡＮＩＹＧ
配列番号３６：ＤＮＡＢＩＩ結合性コンセンサス配列：ＷＡＴＣＡＡＮＮＮＮＴＴＲ、ＷはＡまたはＴであり、Ｎは任意の塩基であり、Ｒはプリンである
配列番号３３７：Ｅ．ｃｏｌｉ　ＩＨＦアルファ：ＧＲＮＰＫＴＧＥＤＩＰＩ
配列番号３３８：Ｅ．ｃｏｌｉ　ＩＨＦベータ：ＧＲＮＰＫＴＧＤＫＶＥＬ
配列番号３３９：Ｅ．ｃｏｌｉ　ＨＵアルファ：ＧＲＮＰＱＴＧＫＥＩＫＩ
配列番号３４０：Ｅ．ｃｏｌｉ　ＨＵベータ：ＧＲＮＰＱＴＧＫＥＩＴＩ。

【００５２】

表の説明

表１は、本明細書において提供される方法において使用することができる、グラム（＋）細菌およびグラム（－）細菌によって産生されるＤＮＡ結合性タンパク質の非限定的な要約である。

【００５３】
表２は、本発明の種々の実施形態のＤＮＡ結合性タンパク質の関連する部分の配列アラインメントである。太字は、コンセンサスとの正確な一致を示し、薄い灰色の文字は、保存されたアミノ酸の変化を示し、薄い影付きまたは濃い影付きの配列は、種間にわたって高度に保存されている。アミノ末端および／またはカルボキシ末端における灰色の影付きの未定義の配列は、コンセンサス配列と共有されない未定義のアミノ酸である。表２は、Ｏｂｅｔｏら（１９９４年）Ｂｉｏｃｈｉｍｉｅ　７６巻：９０１～９０８頁において以前公開された情報に基づく。フラグメント「ＡＲＭ」を表の下部に示し、これらの断片を含む、あるいはそれから本質的になる、またはさらにそれからなるポリペプチド断片またはその等価物は、本明細書中に記載の生物学的活性を有する。
【００５４】
表３は、１６アミノ酸ペプチドモチーフの、Ｌｉｕら（２００８年）Ｃｅｌｌ　Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．　１０巻（１号）：２６２～２７６頁に対する比較である。
【００５５】
表４は、示された生物体由来のＤＮＡＢＩＩタンパク質のα部分、β部分、およびＣ末端部分の一覧表である。
特定の実施形態では、例えば以下が提供される：
（項目１）
Ｂｕｒｋｈｏｌｄｅｒｉａ感染の処置または再発防止を必要とする嚢胞性線維症（ＣＦ）患者においてＢｕｒｋｈｏｌｄｅｒｉａ感染の処置または再発防止のために用いるための抗ＩＨＦ抗体。
（項目２）
前記抗ＩＨＦ抗体が、ＤＮアーゼ処置なしで前記患者に投与される、項目１に記載の抗体。
（項目３）
項目１または２に記載の抗体、およびＢｕｒｋｈｏｌｄｅｒｉａの増殖を阻害する抗菌薬。
（項目４）
前記ＢｕｒｋｈｏｌｄｅｒｉａがＢｕｒｋｈｏｌｄｅｒｉａ　ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａまたはＢ．ｍｕｌｔｉｖｏｒａｎｓである、項目１～３のいずれか１項に記載の抗体。
（項目５）
前記抗ＩＨＦ抗体が抗ＩＨＦα抗体または抗ＩＨＦβ抗体である、項目１～４のいずれか１項に記載の抗体。
（項目６）
前記抗体がＩｇＧ抗体である、任意の前記項目に記載の抗体。
（項目７）
前記抗体がポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、またはその抗原結合断片である、任意の前記項目に記載の抗体。
（項目８）
前記抗体が、群ＴＣＴＣＡＡＣＧＡＴＴＴＡもしくはＷＡＴＣＡＡＮＮＮＮＴＴＲ（ここで、ＷはＡまたはＴであり、Ｎは任意のヌクレオチドであり、ＲはＡまたはＧである）またはそのそれぞれの等価物のポリヌクレオチド、あるいはＭＡＴＩＴＫＬＤＩＩＥＹＬＳＤＫＹＨＬＳ；ＫＹＨＬＳＫＱＤＴＫＮＶＶＥＮＦＬＥＥＩ；ＦＬＥＥＩＲＬＳＬＥＳＧＱＤＶＫＬＳＧＦ；ＫＬＳＧＦＧＮＦＥＬＲＤＫＳＳＲＰＧＲＮ；ＲＰＧＲＮＰＫＴＧＤＶＶＰＶＳＡＲＲＶＶ；もしくはＡＲＲＶＶＴＦＫＰＧＱＫＬＲＡＲＶＥＫＴＫまたはその等価物の群から選択されるポリペプチド、あるいは表２において同定されたポリペプチド、もしくは表２において同定されたポリペプチドのＡｒｍ断片、またはそのそれぞれの等価物、あるいは配列番号３３７～３４０のポリペプチドまたはその等価物を特異的に認識して結合する、任意の前記項目に記載の抗体。
（項目９）

Ｂｕｒｋｈｏｌｄｅｒｉａに感染した被験体におけるＢｕｒｋｈｏｌｄｅｒｉａによって引き起こされる感染または疾患の処置で用いるための抗ＩＨＦ抗体。
（項目１０）
前記抗ＩＨＦ抗体が、ＤＮアーゼ処置なしで前記被験体に投与される、項目９に記載の抗体。
（項目１１）
項目９または１０に記載の抗体、およびＢｕｒｋｈｏｌｄｅｒｉａの増殖を阻害する抗菌薬。
（項目１２）
前記ＢｕｒｋｈｏｌｄｅｒｉａがＢｕｒｋｈｏｌｄｅｒｉａ　ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａまたはＢ．ｍｕｌｔｉｖｏｒａｎｓである、項目９～１１のいずれか１項に記載の抗体。
（項目１３）
前記抗ＩＨＦ抗体が抗ＩＨＦα抗体または抗ＩＨＦβ抗体である、項目９～１２のいずれか１項に記載の抗体。
（項目１４）
前記抗体がＩｇＧ抗体である、項目９～１３のいずれか１項に記載の抗体。
（項目１５）
前記抗体がポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、またはその抗原結合断片である、項目９～１４のいずれか１項に記載の抗体。
（項目１６）
前記抗体が、群ＴＣＴＣＡＡＣＧＡＴＴＴＡもしくはＷＡＴＣＡＡＮＮＮＮＴＴＲ（ここで、ＷはＡまたはＴであり、Ｎは任意のヌクレオチドであり、ＲはＡまたはＧである）またはそのそれぞれの等価物のポリヌクレオチド、あるいはＭＡＴＩＴＫＬＤＩＩＥＹＬＳＤＫＹＨＬＳ；ＫＹＨＬＳＫＱＤＴＫＮＶＶＥＮＦＬＥＥＩ；ＦＬＥＥＩＲＬＳＬＥＳＧＱＤＶＫＬＳＧＦ；ＫＬＳＧＦＧＮＦＥＬＲＤＫＳＳＲＰＧＲＮ；ＲＰＧＲＮＰＫＴＧＤＶＶＰＶＳＡＲＲＶＶ；もしくはＡＲＲＶＶＴＦＫＰＧＱＫＬＲＡＲＶＥＫＴＫまたはそのそれぞれの等価物の群から選択されるポリペプチド、あるいは表２において同定されたポリペプチド、もしくは表２において同定されたＡｒｍ断片、またはその等価物、あるいは配列番号３３７～３４０のポリペプチド、またはその等価物を特異的に認識して結合する、項目９～１５のいずれか１項に記載の抗体。
（項目１７）
前記被験体が哺乳動物である、項目１～１６のいずれか１項に記載の抗体。
（項目１８）
前記哺乳動物がヒト患者である、項目１７に記載の抗体。
（項目１９）
前記哺乳動物またはヒト患者が未成熟哺乳動物または小児患者である、項目１７または１８に記載の抗体。
（項目２０）
Ｂｕｒｋｈｏｌｄｅｒｉａに感染した前記被験体が嚢胞性線維症被験体である、項目９～１９のいずれか１項に記載の抗体。
（項目２１）
Ｂｕｒｋｈｏｌｄｅｒｉａによって産生されるバイオフィルムの阻害、競合、または力価決定で用いるための抗体。
（項目２２）
前記抗体がｉｎ　ｖｉｔｒｏまたはｉｎ　ｖｉｖｏでバイオフィルムと接触させられる、項目２１に記載の抗体。
（項目２３）
前記抗体の前記接触が、ＤＮアーゼ処置なしにおいてである、項目２１または２２に記載の抗体。
（項目２４）

前記バイオフィルムまたはＢｕｒｋｋｈｏｌｄｅｒｉａを、前記バイオフィルムを産生するＢｕｒｋｋｈｏｌｄｅｒｉａの増殖を阻害する抗菌薬の有効量と接触させることをさらに含む、項目２１～２３のいずれか１項に記載の抗体。
（項目２５）
配列ＴＣＴＣＡＡＣＧＡＴＴＴＡもしくはＷＡＴＣＡＡＮＮＮＮＴＴＲ（ここで、ＷはＡまたはＴであり、Ｎは任意のヌクレオチドであり、ＲはＡまたはＧである）またはその等価物を含む単離されたポリヌクレオチド；あるいは群ＭＡＴＩＴＫＬＤＩＩＥＹＬＳＤＫＹＨＬＳ；ＫＹＨＬＳＫＱＤＴＫＮＶＶＥＮＦＬＥＥＩ；ＦＬＥＥＩＲＬＳＬＥＳＧＱＤＶＫＬＳＧＦ；ＫＬＳＧＦＧＮＦＥＬＲＤＫＳＳＲＰＧＲＮ；ＲＰＧＲＮＰＫＴＧＤＶＶＰＶＳＡＲＲＶＶ；ＡＲＲＶＶＴＦＫＰＧＱＫＬＲＡＲＶＥＫＴＫの配列またはその等価物を含む単離されたポリペプチド、あるいは表２において同定されたポリペプチド、もしくは表２において同定されたポリペプチドのＡｒｍ断片、またはそれぞれの等価物、あるいは配列番号３３７～３４０のポリペプチド、またはその等価物。
（項目２６）
アジュバントまたは検出可能な標識をさらに含む、項目２５に記載の単離されたポリヌクレオチドまたはポリペプチド。
（項目２７）
項目２５に記載の単離されたポリヌクレオチドまたはポリペプチドを特異的に認識して結合する単離された抗体。
（項目２８）
前記抗体がポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、またはその抗原結合断片である、項目２７に記載の抗体。
（項目２９）
項目２８に記載のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞株。
（項目３０）
項目２７または２８に記載の抗体、およびキャリア。
（項目３１）
前記キャリアが薬学的に許容され得るキャリアである、項目３０に記載の抗体。
（項目３２）
項目２５に記載の単離されたポリペプチドまたは項目２７に記載の抗体をコードする単離されたポリヌクレオチド。
【図面の簡単な説明】
【００５６】
【図１】図１Ａ～１Ｃは、Ｂ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａによって形成されたバイオフィルム内のｅＤＮＡおよびＩＨＦの両方の存在を示す。図１Ａ－ＦｉｌｍＴｒａｃｅｒＦＭ１－４３で染色したＢ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａによって形成された２４時間非固定バイオフィルム。図１Ｂ－ｄｓＤＮＡに指向するモノクローナル抗血清で免疫標識したＢ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａによって形成された２４時間非固定バイオフィルム（画像中の白色）。図１Ｃ－バイオフィルム内のＩＨＦおよびｄｓＤＮＡ（白色）の存在を示すためにｄｓＤＮＡに指向する抗血清およびウサギ抗ＩＨＦ血清の両方によって標識したＢ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａによって形成された２４時間非固定バイオフィルム。図１Ａ中のＢ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａによって形成された頑強なバイオフィルムに留意のこと。バイオフィルムの下部で特に密度の高いｅＤＮＡが存在することが図１Ｂ中に認められる。図１Ｃ中の存在量によって示されるように、Ｂ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａによって形成された２４時間バイオフィルムは、ＩＨＦ中にも豊富である。６３Ｘ対物レンズを用いて全画像をキャプチャーした。
【００５７】
【図２】図２は、Ｂ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａ陽性のＣＦ患者の培養物から採取した痰内のＩＨＦおよびｅＤＮＡの標識を示す。免疫標識した光学顕微鏡写真は、Ｂ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａ感染したＣＦ患者から回収した痰サンプル内のｅＤＮＡ（白色の鎖）および

ＤＮＡＢＩＩタンパク質ＩＨＦ（点状の標識；矢印を参照のこと）の両方の強い標識を示す。分類不能型Ｈａｅｍｏｐｈｉｌｕｓ　ｉｎｆｌｕｅｎｚａｅ形成バイオフィルムを用いて以前に示されたように、Ｂ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａによって形成されたバイオフィルムにおいて、細菌ｅＤＮＡの鎖が交差するジャンクションがＩＨＦの存在を強く標識し、これらのバイオフィルムの構造的足場の維持でのその役割が示唆される。スケールバーは５μｍを示す。

【００５８】

【図３Ａ－Ｃ】図３Ａ～３Ｈは、ＩＨＦに指向する抗血清とのインキュベーションによる予め形成されたＢ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａバイオフィルムの破壊を示す。チャンバースライド中で２４時間増殖させ、その後に以下で１６時間処理したＢ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａバイオフィルム：図３Ａ－滅菌培地。図３Ｂ－ナイーブウサギ血清。図３Ｃ－単離ＩＨＦに指向するウサギ抗血清。図３Ｄ－ＩｇＧ富化抗ＩＨＦ。図３Ｅ－濃縮カラム由来の血清溶出物。図３Ｆ－ＩＨＦに指向する抗体ならびに精製ＩＨＦおよびＢ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａホールセルライセート内のＩＨＦに対するＩｇＧ富化抗ＩＨＦの認識を示すウェスタンブロット。矢印は、各ブロット中のＩＨＦの単量体形の認識を示す。さらに、各血清画分は、Ｂ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａ　Ｋ５６－２株のホールセルライセート内のＩＨＦの二量体形および三量体形を認識した。図３Ｇ－表示の各処理後の平均バイオフィルム厚さの変化±ＳＥＭのプロット。図３Ｈ－表示の各処置後のバイオフィルムバイオマスの変化±ＳＥＭのプロット。滅菌培地、ナイーブウサギ血清、またはＩｇＧ濃縮カラム由来の血清溶出物を用いた処置と比較した場合に予め形成されたＢ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａバイオフィルムの統計的に有意な破壊がウサギ抗ＩＨＦ血清およびＩｇＧを富化されたＩＨＦ血清の画分のみによって媒介されることに留意のこと。アスタリスクは、滅菌培地、ナイーブ血清、および濃縮カラム溶出物と比較した統計的有意性（ｐ＜０．０５）を示す。

【図３Ｄ－Ｈ】図３Ａ～３Ｈは、ＩＨＦに指向する抗血清とのインキュベーションによる予め形成されたＢ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａバイオフィルムの破壊を示す。チャンバースライド中で２４時間増殖させ、その後に以下で１６時間処理したＢ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａバイオフィルム：図３Ａ－滅菌培地。図３Ｂ－ナイーブウサギ血清。図３Ｃ－単離ＩＨＦに指向するウサギ抗血清。図３Ｄ－ＩｇＧ富化抗ＩＨＦ。図３Ｅ－濃縮カラム由来の血清溶出物。図３Ｆ－ＩＨＦに指向する抗体ならびに精製ＩＨＦおよびＢ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａホールセルライセート内のＩＨＦに対するＩｇＧ富化抗ＩＨＦの認識を示すウェスタンブロット。矢印は、各ブロット中のＩＨＦの単量体形の認識を示す。さらに、各血清画分は、Ｂ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａ　Ｋ５６－２株のホールセルライセート内のＩＨＦの二量体形および三量体形を認識した。図３Ｇ－表示の各処理後の平均バイオフィルム厚さの変化±ＳＥＭのプロット。図３Ｈ－表示の各処置後のバイオフィルムバイオマスの変化±ＳＥＭのプロット。滅菌培地、ナイーブウサギ血清、またはＩｇＧ濃縮カラム由来の血清溶出物を用いた処置と比較した場合に予め形成されたＢ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａバイオフィルムの統計的に有意な破壊がウサギ抗ＩＨＦ血清およびＩｇＧを富化されたＩＨＦ血清の画分のみによって媒介されることに留意のこと。アスタリスクは、滅菌培地、ナイーブ血清、および濃縮カラム溶出物と比較した統計的有意性（ｐ＜０．０５）を示す。

【００５９】

【図４Ａ－Ｌ】図４Ａ～４Ｎは、抗菌剤または抗生物質と組み合わせたＩＨＦに指向する抗体の相乗的挙動を示す。図４Ａ～４Ｃ－未処置Ｂ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａバイオフィルム。図４Ｄ～４Ｆ－５０倍希釈の抗ＩＨＦでの処置後のＢ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａバイオフィルム。図４Ｇ～４Ｉ－ＭＩＣのセフタジジム（１６μｇ／ｍｌ）での処置後のＢ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａバイオフィルム。図４Ｊ～４Ｌ－記載のＭＩＣでの抗ＩＨＦ＋セフタジジムの組合せでの処置後のＢ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａバイオフィルム。抗ＩＨＦおよびセフタジジムの両方で処置した場合に抗生物質のみでの処置と比較してＢ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａのバイオフィルムの高さが顕著に減少し、Ｂ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉ

ａの死滅が顕著に増加することに留意のこと（二列目の画像中に示す；パネルＨおよびＫを比較せよ）。

【図４Ｍ－Ｎ】図４Ａ～４Ｎは、抗菌剤または抗生物質と組み合わせたＩＨＦに指向する抗体の相乗的挙動を示す。図４Ｍ－抗生物質または抗生物質＋抗ＩＨＦでの処置後の平均バイオフィルム厚さ±ＳＥＭ。図４Ｎ－抗生物質または抗生物質＋抗ＩＨＦでのインキュベーション後のバイオフィルムバイオマス±ＳＥＭ。アスタリスクは、指定した対の間の統計的有意性を示す（ｐ＜０．０５）。抗ＩＨＦ血清＋セフタジジム、シプロフロキサシン、イミペネム、およびミノサイクリンの組合せによって媒介された平均バイオフィルム厚さおよびバイオマスの両方の有意な減少に留意のこと。

【００６０】

【図５Ａ－Ｃ】図５Ａ～５Ｅは、プルモザイム（ＤＮアーゼ）への暴露後のより頑強なＢ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａバイオフィルムの誘導を示す。図５Ａ－生理食塩水希釈物のみでの２４時間のＢ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａバイオフィルムの処置。図５Ｂ－プルモザイム（ＤＮアーゼ）での２４時間のＢ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａバイオフィルムの処置により、生理食塩水希釈物のみでの処置より顕著に密度が高く且つ厚いバイオフィルムの形成が誘導された（パネルＡおよびＢを比較せよ）。図５Ｃ－プルモザイムおよび抗ＩＨＦの両方での２４時間のＢ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａバイオフィルムの処置。バイオフィルムを生存について染色し、白色（生細胞）および暗色（死細胞）に擬似的に着色し、任意の処置の際の最小細菌死を示す。

【図５Ｄ－Ｅ】図５Ａ～５Ｅは、プルモザイム（ＤＮアーゼ）への暴露後のより頑強なＢ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａバイオフィルムの誘導を示す。図５Ａ－生理食塩水希釈物のみでの２４時間のＢ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａバイオフィルムの処置。図５Ｂ－プルモザイム（ＤＮアーゼ）での２４時間のＢ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａバイオフィルムの処置により、生理食塩水希釈物のみでの処置より顕著に密度が高く且つ厚いバイオフィルムの形成が誘導された（パネルＡおよびＢを比較せよ）。図５Ｃ－プルモザイムおよび抗ＩＨＦの両方での２４時間のＢ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａバイオフィルムの処置。バイオフィルムを生存について染色し、白色（生細胞）および暗色（死細胞）に擬似的に着色し、任意の処置の際の最小細菌死を示す。平均相対バイオフィルム厚さ±ＳＤおよびバイオマス±ＳＥＭを、図５Ｄおよび５Ｅにグラフを使用して示す。アスタリスクは、生理食塩水希釈物での処置と比較してプルモザイムへの暴露後のバイオフィルムが有意に厚いことを示す（ｐ＜０．０５）。

【００６１】

【図６】図６は、抗ＩＨＦでのＢ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａの前処置によりネズミＣＦマクロファージにおける生存度の有意な減少が誘導されたことを示す。ナイーブ血清と比較して抗ＩＨＦでの細菌の前処置の６時間後にＢ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａが有意に減少した（＊ｐ＜０．０５）。各時点についての細菌ＣＦＵ／ｍｌ±ＳＤも示す。

【００６２】

【図７】図７Ａ～７Ｅは、ＩＨＦを組み入れた頑強なＢ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａバイオフィルムの発現が活性Ｔ６ＳＳに依存したことを示す。図７Ａ－親単離株（Ｂ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａ　Ｋ５６－２株）によって形成されたバイオフィルム。図７Ｂ－ヨウ化プロピジウムで染色したタイプＩＩＩ分泌系変異体（ＪＲＬ２株）によって形成されたバイオフィルム。図７Ｃ－ヨウ化プロピジウムで染色したタイプＶＩ分泌系変異体（ＤＦＡ２株）によって形成されたバイオフィルム。全バイオフィルムを、ＤＮＡＢＩＩタンパク質（ＩＨＦ）の存在について標識した。いずれかの分泌系変異体によって形成されたバイオフィルムが親単離株によって形成されたバイオフィルムより顕著に頑強性が低かったのに対して、Ｔ６ＳＳ変異体によって形成されたバイオフィルムの標識が顕著に減少したことに留意のこと（図７Ｃを参照のこと）。これは、Ｔ６ＳＳ変異体がこれらの条件下で形成されたバイオフィルムにＩＨＦを組み込む能力を損なったことが示唆された。図７Ｄ－ＢＣＡＬ０３３９とＢＣＡＬ０３４０（Ｂ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａのＴ６ＳＳ遺伝子クラスターの一部）との間の遺伝子間間隙（３８６ｂｐ）のＩＨＦ結合ＤＮアーゼフットプリ

ント。ＩＨＦフットプリントがＢＡＣＬ０３４０開始コドンの２５ｂｐ～５２ｂｐ上流の領域を対象とする一方で、推定プロモーターは、開始コドンの７５ｂｐ～１０４ｂｐ上流であることが見出された（図７Ｅ）。ＨＳＳ：ＤＮＡ屈曲を示す高感受性部位。この所見は、ＩＨＦがＩＨＦ自体の放出を自己制御することができ、おそらくバイオフィルムマトリックスに組み込まれたｅＤＮＡの放出を自己制御することもできることを示唆した。

【００６３】

【図８】図８Ａ～８Ｆは、親分離株Ｋ５６－２、そのＴ３ＳＳ変異体、またはそのＴ６ＳＳ変異体のいずれかによってチャンバースライド中に形成されたバイオフィルムの相対ｅＤＮＡ含有量を示す。親Ｂ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａ株またはそのＴ３ＳＳ変異体およびＴ６ＳＳ変異体のいずれかによって形成され、その後にＦｉｌｍＴｒａｃｅｒＦＭ１－４３で染色したバイオフィルムは、図８Ａ、８Ｃ、および８Ｅにそれぞれ認められる。各非固定バイオフィルムの相対ｅＤＮＡ含有量を、図８Ｂ、８Ｄ、および８Ｆにおいて見られるようにｄｓＤＮＡに指向するモノクローナル抗体での各バイオフィルムの免疫標識によって確認することができる。

【００６４】

【図９】図９Ａは、ＩＨＦ－ＩＨＦ二量体において別のＩＨＦと相互作用する、もしくはそれに結合するＩＨＦのアミノ酸残基（上欄の三角形により示される）、またはＤＮＡと相互作用する、もしくはそれに結合するＩＨＦのアミノ酸残基（下欄の三角形により示される）を示すマップである。ペプチドは、短い垂直のバーにより、３アミノ酸を含有する領域へと分割される。図９Ｂは、ＩＨＦとの微生物ＤＮＡの相互作用をグラフとして示す。

【００６５】

【図１０】図１０Ａ～１０Ｂは、抗$IHF_{E.coli}$によるＮＴＨＩバイオフィルムの破壊を示す。（Ａ）ＮＴＨＩバイオフィルムの代表的な画像および（Ｂ）平均バイオマスの計算。ａ、培地；ｂ、ナイーブ血清；ｃ、抗$IHF_{E.coli}$。抗$IHF_{E.coli}$は、ナイーブ血清または培地と比較して１６時間～２週間で確立されたＮＴＨＩバイオフィルムを有意に破壊した。データを、３つの独立したアッセイの平均±ＳＥＭとして示す。各ナイーブ血清処置と比較して＊ｐ＜０．０５；＊＊ｐ＜０．０１（一元配置ＡＮＯＶＡ）。

【００６６】

【図１１Ａ】図１１Ａ～１１Ｃは、抗$IHF_{E.coli}$によるバイオフィルムの破壊速度を示す。（Ａ）ＮＴＨＩバイオフィルムの代表的な画像および（Ｂ）平均バイオマスの計算。ａ、培地；ｂ、ナイーブ血清；ｃ、抗$IHF_{E.coli}$。抗$IHF_{E.coli}$によって媒介されたバイオマスの減少は６時間で最大であり、２４時間持続した。（Ｃ）培地、ナイーブ血清または抗$IHF_{E.coli}$の５倍希釈物で２４時間時間処置したバイオフィルム。より高い濃度の抗$IHF_{E.coli}$での処置によりバイオフィルムが根絶し、細菌の単層が残存した。データを、３つの独立したアッセイの平均±ＳＥＭとして示す。各ナイーブ血清処置と比較して＊ｐ＜０．０１（一元配置ＡＮＯＶＡ）。

【図１１Ｂ】図１１Ａ～１１Ｃは、抗$IHF_{E.coli}$によるバイオフィルムの破壊速度を示す。（Ａ）ＮＴＨＩバイオフィルムの代表的な画像および（Ｂ）平均バイオマスの計算。ａ、培地；ｂ、ナイーブ血清；ｃ、抗$IHF_{E.coli}$。抗$IHF_{E.coli}$によって媒介されたバイオマスの減少は６時間で最大であり、２４時間持続した。（Ｃ）培地、ナイーブ血清または抗$IHF_{E.coli}$の５倍希釈物で２４時間時間処置したバイオフィルム。より高い濃度の抗$IHF_{E.coli}$での処置によりバイオフィルムが根絶し、細菌の単層が残存した。データを、３つの独立したアッセイの平均±ＳＥＭとして示す。各ナイーブ血清処置と比較して＊ｐ＜０．０１（一元配置ＡＮＯＶＡ）。

【図１１Ｃ】図１１Ａ～１１Ｃは、抗$IHF_{E.coli}$によるバイオフィルムの破壊速度を示す。（Ａ）ＮＴＨＩバイオフィルムの代表的な画像および（Ｂ）平均バイオマスの計算。ａ、培地；ｂ、ナイーブ血清；ｃ、抗$IHF_{E.coli}$。抗$IHF_{E.coli}$によって媒介されたバイオマスの減少は６時間で最大であり、２４時間持続した。（Ｃ）

培地、ナイーブ血清または抗ＩＨＦ$_{E.coli}$の５倍希釈物で２４時間時間処置したバイオフィルム。より高い濃度の抗ＩＨＦ$_{E.coli}$での処置によりバイオフィルムが根絶し、細菌の単層が残存した。データを、３つの独立したアッセイの平均±ＳＥＭとして示す。各ナイーブ血清処置と比較して＊ｐ＜０．０１（一元配置ＡＮＯＶＡ）。

【００６７】

【図１２】図１２Ａ～１２Ｆは、抗ＩＨＦ$_{E.coli}$とバイオフィルムとの間の直接的な接触は破壊の媒介に必要なかったことを示す。（Ａ）培地または血清でバソラテラル側を処置したバイオフィルムの代表的な画像。（Ｂ～Ｃ）アガロースビーズにカップリングした抗体のトランスウェル内への配置によってアピカル側を処置したバイオフィルム、（Ｄ）アピカル側の抗体をカップリングしたビーズ下に裸のビーズを積層した後のＮＴＨＩバイオフィルム、（Ｅ）裸のビーズおよび抗体をカップリングしたビーズの混合後のバイオフィルム。（Ｆ）以下とのインキュベーション後のバイオマス値：ａ、培地；ｂ、ナイーブ血清；ｃ、抗ＩＨＦ$_{E.coli}$；ｄ、カップリングしたＩｇＧ富化ナイーブ血清；ｅ、カップリングしたＩｇＧ富化抗ＩＨＦ$_{E.coli}$；ｆ、カップリングしたＩｇＧ富化ナイーブ血清下に積層した裸のビーズ；ｇ、カップリングしたＩｇＧ富化抗ＩＨＦ$_{E.coli}$下に積層した裸のビーズ；ｈ、裸のビーズとカップリングしたＩｇＧ富化ナイーブ血清との混合物；ｉ、裸のビーズとカップリングしたＩｇＧ富化抗ＩＨＦ$_{E.coli}$との混合物。データを、３つの独立したアッセイの平均±ＳＥＭとして示す。アガロースビーズ処置とコンジュゲートした代表的なナイーブ血清またはＩｇＧ富化ナイーブ血清と比較して＊ｐ＜０．０５（一元配置ＡＮＯＶＡ）。

【００６８】

【図１３Ａ】図１３Ａ～１３Ｂは、抗ＩＨＦ特異的抗体の吸着を示す。（Ａ）ＩＨＦ吸着血清とインキュベートしたバイオフィルムの代表的な画像。（Ｂ）バイオフィルムのバイオマスおよび平均厚さの変化。ａ、ナイーブ血清；ｂ、抗ＩＨＦ$_{E.coli}$。以下を使用して吸着させた抗ＩＨＦ$_{E.coli}$（４．４μｇ）：ｃ、０μｇ ＩＨＦ$_{E.coli}$；ｄ、２．２μｇ ＩＨＦ$_{E.coli}$；ｅ、４．４μｇ ＩＨＦ$_{E.coli}$；ｆ、４．４μｇ ｒｓＰｉｌＡ。ＩＨＦ特異的抗体の吸着によりバイオフィルム破壊が妨げられた。データを、３つの独立したアッセイの平均±ＳＥＭとして示す。ナイーブ血清と比較して＊ｐ＜０．０５（一元配置ＡＮＯＶＡ）。

【図１３Ｂ】図１３Ａ～１３Ｂは、抗ＩＨＦ特異的抗体の吸着を示す。（Ａ）ＩＨＦ吸着血清とインキュベートしたバイオフィルムの代表的な画像。（Ｂ）バイオフィルムのバイオマスおよび平均厚さの変化。ａ、ナイーブ血清；ｂ、抗ＩＨＦ$_{E.coli}$。以下を使用して吸着させた抗ＩＨＦ$_{E.coli}$（４．４μｇ）：ｃ、０μｇ ＩＨＦ$_{E.coli}$；ｄ、２．２μｇ ＩＨＦ$_{E.coli}$；ｅ、４．４μｇ ＩＨＦ$_{E.coli}$；ｆ、４．４μｇ ｒｓＰｉｌＡ。ＩＨＦ特異的抗体の吸着によりバイオフィルム破壊が妨げられた。データを、３つの独立したアッセイの平均±ＳＥＭとして示す。ナイーブ血清と比較して＊ｐ＜０．０５（一元配置ＡＮＯＶＡ）。

【００６９】

【図１４】図１４Ａ～１４Ｅは、抗ＩＨＦ$_{E.coli}$が抗生物質と相乗的に作用したことを示す。（Ａ～Ｄ）培地、ＭＩＣ$_{90}$の抗生物質、または抗血清で処置したバイオフィルムの代表的な画像。（Ｅ）処置したバイオフィルムのバイオマスおよび平均厚さ。ａ、培地；ｂ、ナイーブ血清；ｃ、抗ＩＨＦ$_{E.coli}$。抗ＩＨＦ$_{E.coli}$＋抗生物質とのＮＴＨＩバイオフィルムのインキュベーションにより、バイオフィルムの構造が顕著に変化し、バイオフィルムのバイオマスおよび平均厚さが有意に減少し、生存度に悪影響を及ぼした（バイオフィルムの黄色に留意のこと）。データを、３つの独立したアッセイの平均±ＳＥＭとして示す。バーは、ｐ＜０．０５（一元配置ＡＮＯＶＡ）を示す。

【００７０】

【図１５】図１５Ａ～１５Ｆは、抗ＩＨＦ$_{E.coli}$での処置によってバイオフィルムから新規に放出された細菌の抗生物質に対する感受性が増強されたことを示す。バイオフィルムを、抗ＩＨＦ$_{E.coli}$またはナイーブ血清の５０倍希釈物の非存在下または存

在下でアンピシリン（ＡおよびＤ）、アモキシシリン－クラブラナート（ＢおよびＥ）、またはセフジニル（ＣおよびＦ）とインキュベートした。（Ａ～Ｃ）バイオフィルム内の接着性ＣＦＵ　ＮＴＨＩ。（Ｄ～Ｆ）プランクトン様ＮＴＨＩと接着性のＮＴＨＩとの和。ａ、培地のみ；ｂ、ナイーブ血清；ｃ、抗$IHF_{E.coli}$。データを、３つの独立したアッセイの平均±ＳＥＭとして示す。バーはｐ＜　０．０５（一元配置ＡＮＯＶＡ）を示す。

【００７１】

【図１６Ａ－Ｃ】図１６Ａ～１６Ｆは、IHF_{NTHI}のエピトープマッピングおよび最小IHF_{NTHI}ターゲティングペプチドのデザインを示す。（Ａ）チンチラ抗$IHF_{E.coli}$および（Ｂ）ＤＮＡに複合体化したチンチラ抗$IHF_{E.coli}$のIHF_{NTHI}を示す合成ペプチドに対する反応性を示す三次元モデル。反応性を有する領域を灰色で示し、非反応性領域を黒色で示す。（Ｃ）先端結合領域の閉塞を示すためにＩＨＦに結合したＤＮＡの三次元モデル。（Ｄ）ＩＨＦモデル内の$IhfA-3_{NTHI}$（黄色）および$IhfA-5_{NTHI}$（緑色）の局在化。チンチラ血清とのインキュベーション後のバイオフィルムの（Ｅ）代表的画像および（Ｆ）平均バイオマス。データを、３つの独立したアッセイの平均±ＳＥＭとして示す。バーはｐ＜０．０５（一元配置ＡＮＯＶＡ）を示す。ａ、ナイーブ血清；ｂ、抗$IHF_{E.coli}$；ｃ、ＤＮＡと複合体化した抗$IHF_{E.coli}$；ｄ、抗$IhfA-3_{NTHI}$；ｅ、抗$IhfA-5_{NTHI}$。

【図１６Ｄ－Ｆ】図１６Ａ～１６Ｆは、IHF_{NTHI}のエピトープマッピングおよび最小IHF_{NTHI}ターゲティングペプチドのデザインを示す。（Ａ）チンチラ抗$IHF_{E.coli}$および（Ｂ）ＤＮＡに複合体化したチンチラ抗$IHF_{E.coli}$のIHF_{NTHI}を示す合成ペプチドに対する反応性を示す三次元モデル。反応性を有する領域を灰色で示し、非反応性領域を黒色で示す。（Ｃ）先端結合領域の閉塞を示すためにＩＨＦに結合したＤＮＡの三次元モデル。（Ｄ）ＩＨＦモデル内の$IhfA-3_{NTHI}$（黄色）および$IhfA-5_{NTHI}$（緑色）の局在化。チンチラ血清とのインキュベーション後のバイオフィルムの（Ｅ）代表的画像および（Ｆ）平均バイオマス。データを、３つの独立したアッセイの平均±ＳＥＭとして示す。バーはｐ＜０．０５（一元配置ＡＮＯＶＡ）を示す。ａ、ナイーブ血清；ｂ、抗$IHF_{E.coli}$；ｃ、ＤＮＡと複合体化した抗$IHF_{E.coli}$；ｄ、抗$IhfA-3_{NTHI}$；ｅ、抗$IhfA-5_{NTHI}$。

【００７２】

【図１７】図１７は、精製ＩＨＦＥ．ｃｏｌｉに対するウェスタンブロットによって判断したところ、アガロースビーズに結合し、トランスウェルのアピカル側チャンバー内に配置したＩｇＧ富化抗ＩＨＦＥ．ｃｏｌｉがバソラテラル側チャンバー内に拡散しなかったことを示す。バソラテラル側チャンバー由来の培地を、以下での処置から２４時間後に回収した：ａ、バソラテラル側に添加したナイーブ血清；ｂ、バソラテラル側に添加した抗ＩＨＦＥ．ｃｏｌｉ；ｃ、アピカル側に添加したアガロースビーズに係留したＩｇＧ富化ナイーブ血清；ｄ、アピカル側に添加したアガロースビーズに係留したＩｇＧ富化抗ＩＨＦＥ．ｃｏｌｉ。

【００７３】

【図１８】図１８Ａ～１８Ｂは、抗ＩＨＦ抗体の吸着を示す。（Ａ）スロットブロットによって示されるように抗$IHF_{E.coli}$の精製$IHF_{E.coli}$とのインキュベーションによってバンド強度は減少し、この強度を（Ｂ）デンシトメトリーによって定量した。ａ、ナイーブ血清；ｂ、抗$IHF_{E.coli}$；ｃ、０μｇ　$IHF_{E.coli}$を使用して吸着させた抗$IHF_{E.coli}$；ｄ、２．２　μｇ　$IHF_{E.coli}$を使用して吸着させた抗$IHF_{E.coli}$；ｅ、４．４μｇ　$IHF_{E.coli}$を使用して吸着させた抗$IHF_{E.coli}$；ｆ、４．４μｇ　ｒｓＰｉｌＡを使用して吸着させた抗$IHF_{E.coli}$。

【００７４】

【図１９】図１９Ａ～１９Ｃは、抗$IHF_{E.coli}$での処置がＮＴＨＩのプランクトン様培養物の抗生物質に対する感受性を増大させなかったことを示す。（Ａ～Ｃ）ＮＴＨ

Ｉのブロス培養物を、抗ＩＨＦ$_{E.coli}$またはナイーブ血清の非存在下または存在下でアンピシリン、アモキシシリン－クラブラナート、またはセフジニルとインキュベートした。ａ、培養物のみ；ｂ、ナイーブ血清；ｃ、抗ＩＨＦ$_{E.coli}$。データは、３つの独立したアッセイの平均±ＳＥＭを示す。バーはｐ＜０．０５（一元配置ＡＮＯＶＡ）を示す。

【発明を実施するための形態】

【００７５】

詳細な説明

定義

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

【００７６】

本発明の実施には、別段の指定のない限り、当技術分野の技術の範囲内である、組織培養、免疫学、分子生物学、微生物学、細胞生物学および組換えＤＮＡの従来の技法を使用する。例えば、ＳａｍｂｒｏｏｋおよびＲｕｓｓｅｌｌ編（２００１年）Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ、第３版；Ａｕｓｕｂｅｌら編（２００７年）Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙシリーズ；Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ（Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｉｎｃ．，Ｎ．Ｙ．）シリーズ；ＭａｃＰｈｅｒｓｏｎら（１９９１年）ＰＣＲ １：Ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ａｐｐｒｏａｃｈ（ＩＲＬ Ｐｒｅｓｓ ａｔ Ｏｘｆｏｒｄ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｐｒｅｓｓ）；ＭａｃＰｈｅｒｓｏｎら（１９９５年）ＰＣＲ ２：Ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ａｐｐｒｏａｃｈ；ＨａｒｌｏｗおよびＬａｎｅ編（１９９９年）Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ、Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ；Ｆｒｅｓｈｎｅｙ（２００５年）Ｃｕｌｔｕｒｅ ｏｆ Ａｎｉｍａｌ Ｃｅｌｌｓ：Ａ Ｍａｎｕａｌ ｏｆ Ｂａｓｉｃ Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅ、第５版；Ｇａｉｔ編（１９８４年）Ｏｌｉｇｏｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ；米国特許第４，６８３，１９５号；ＨａｍｅｓおよびＨｉｇｇｉｎｓ編（１９８４年）Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄ Ｈｙｂｒｉｄｉｚａｔｉｏｎ；Ａｎｄｅｒｓｏｎ（１９９９年）Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄ Ｈｙｂｒｉｄｉｚａｔｉｏｎ；ＨａｍｅｓおよびＨｉｇｇｉｎｓ編（１９８４年）Ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎ ａｎｄ Ｔｒａｎｓｌａｔｉｏｎ；Ｉｍｍｏｂｉｌｉｚｅｄ Ｃｅｌｌｓ ａｎｄ Ｅｎｚｙｍｅｓ（ＩＲＬ Ｐｒｅｓｓ（１９８６年））；Ｐｅｒｂａｌ（１９８４年）Ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ｇｕｉｄｅ ｔｏ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ；ＭｉｌｌｅｒおよびＣａｌｏｓ編（１９８７年）Ｇｅｎｅ Ｔｒａｎｓｆｅｒ Ｖｅｃｔｏｒｓ ｆｏｒ Ｍａｍｍａｌｉａｎ Ｃｅｌｌｓ（Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ）；Ｍａｋｒｉｄｅｓ編（２００３年）Ｇｅｎｅ Ｔｒａｎｓｆｅｒ ａｎｄ Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ ｉｎ Ｍａｍｍａｌｉａｎ Ｃｅｌｌｓ；ＭａｙｅｒおよびＷａｌｋｅｒ編（１９８７年）Ｉｍｍｕｎｏｃｈｅｍｉｃａｌ Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｃｅｌｌ ａｎｄ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ（Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ、Ｌｏｎｄｏｎ）；およびＨｅｒｚｅｎｂｅｒｇら編（１９９６年）Ｗｅｉｒ’ｓ Ｈａｎｄｂｏｏｋ ｏｆ Ｅｘｐｅｒｉｍｅｎｔａｌ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙを参照されたい。

【００７７】

範囲を含めた全ての数字表示、例えば、ｐＨ、温度、時間、濃度、および分子量は近似であり、１．０または０．１単位で、必要に応じて、またはその代わりに、＋／－１５％

、あるいは１０％あるいは５％あるいは２％の変動で（＋）または（－）に変動する。必ずしも明記されているとは限らないが、全ての数字表示に「約」という用語が先行することが理解されるべきである。本明細書に記載の試薬はただ単に例示的なものであり、その等価物が当技術分野で公知であることも、必ずしも明記されているとは限らないが、理解されるべきである。

【００７８】

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

【００７９】

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

【００８０】

「バイオフィルム」とは、構造物の表面に接着する微生物の薄い層を意味し、有機または無機であり得、それらが分泌するＤＮＡなどのポリマーと一緒にあり得る。バイオフィルムは、微生物（ｍｉｃｒｏｂｉｏｔｉｃｓ）および抗菌剤に対して非常に耐性である。バイオフィルムは、歯肉組織、歯および修復物に生息し、歯周プラーク疾患としても公知の齲歯および歯周病を引き起こす。バイオフィルムは、慢性中耳感染症も引き起こす。バイオフィルムは、歯科インプラント、ステント、カテーテル線およびコンタクトレンズの表面上にも形成され得る。バイオフィルムは、ペースメーカー、心臓弁置換物、人工関節および他の外科用インプラントの上で増殖する。Ｃｅｎｔｅｒｓ　ｆｏｒ　Ｄｉｓｅａｓｅ　Ｃｏｎｔｒｏｌ）は、院内の感染（ｎｏｓｏｃｏｍｉａｌ　ｉｎｆｅｃｔｉｏｎ）（院内感染（ｈｏｓｐｉｔａｌ－ａｃｑｕｉｒｅｄ　ｉｎｆｅｃｔｉｏｎ））の６５％超はバイオフィルムによって引き起こされると推定している。真菌バイオフィルムはまた、頻繁に、医療デバイスを汚染する。バイオフィルムは、慢性膣感染症を引き起こし、免疫系が妨げられている人において生命にかかわる全身感染症を導く。バイオフィルムは、多数の疾患にも関与する。例えば、嚢胞性線維症の患者は、抗生物質耐性のバイオフィルムをもたらすことも多いシュードモナスおよびＢ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａ感染を有する。

【００８１】

「を阻害すること、それと競合することまたはその力価を決定すること」という用語は、微生物バイオフィルムの構成成分であるＤＮＡ／タンパク質マトリックスの形成を減らすことまたは予防することを意味する。

【００８２】

「ＤＮＡ　ＢＩＩポリペプチドまたはＤＮＡ　ＢＩＩタンパク質」とは、ＤＮＡ結合性ドメインで構成され、したがって、微生物ＤＮＡに対して特異的であるまたは一般的な親和性を有するＤＮＡ結合性のタンパク質またはポリペプチドを意味する。一態様では、ＤＮＡ　ＢＩＩポリペプチドまたはＤＮＡ　ＢＩＩタンパク質は、ＤＮＡに、副溝において結合する。ＤＮＡ　ＢＩＩタンパク質の非限定的な例は、組込み宿主因子（ＩＨＦ）タンパク質である。バイオフィルムと関連する可能性がある他のＤＮＡ結合性タンパク質としては、ＤＰＳ（Ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＣＡＡ４９１６９）、Ｈ－ＮＳ（Ｇｅｎｂａｎ

ｋ受託番号：ＣＡＡ４７７４０）、Ｈｆｑ（Ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＡＣＥ６３２５６）、ＣｂｐＡ（Ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＢＡＡ０３９５０）およびＣｂｐＢ（Ｇｅｎｂａｎｋ受託番号：ＮＰ＿４１８８１３）が挙げられる。

【００８３】

「組込み宿主因子」タンパク質は、バクテリオファージがそのＤＮＡを宿主細菌に組み入れるために使用する細菌のタンパク質である。これらは、細胞外の微生物ＤＮＡにも結合する。

【００８４】

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

【００８５】

「ＨＵ」とは、一般にはＥ．ｃｏｌｉに付随するヘテロ二量体タンパク質のクラスを指す。ＨＵタンパク質は、ＤＮＡジャンクションに結合することが公知である。他の微生物から関連するタンパク質が単離されている。Ｅ．ｃｏｌｉ　ＨＵの完全なアミノ酸配列は、Ｌａｉｎｅら（１９８０年）Ｅｕｒ．　Ｊ．　Ｂｉｏｃｈｅｍ．　１０３巻（３号）：４４７～４８１頁によって報告された。ＨＵタンパク質に対する抗体がＡｂｃａｍから市販されている。

【００８６】

「ＨＵ」または「Ｅ．ｃｏｌｉ　Ｕ９３株由来のヒストン様タンパク質」とは、一般にはＥ．ｃｏｌｉに付随するヘテロ二量体タンパク質のクラスを指す。ＨＵタンパク質は、ＤＮＡジャンクションに結合することが公知である。他の微生物から関連するタンパク質が単離されている。Ｅ．ｃｏｌｉ　ＨＵの完全なアミノ酸配列は、Ｌａｉｎｅら（１９８０年）Ｅｕｒ．　Ｊ．　Ｂｉｏｃｈｅｍ，　１０３巻（３号）：４４７～４８１頁によって報告された。ＨＵタンパク質に対する抗体がＡｂｅａｍから市販されている。Ｅ．ｃｏｌｉにおけるＨＵタンパク質サブユニットをコードする遺伝子は、それぞれ配列番号２８および２９に対応するｈｕｐＡおよびｈｕｐＢである。他の生物体においてこれらの遺伝子に対するホモログが見いだされ、他の生物体由来のこれらの遺伝子に対応するペプチドは、表４に見いだすことができる。

【００８７】

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

【００８８】

バイオフィルムを「阻害、予防または破壊すること」とは、バイオフィルムの構造を予防的または治療的に縮小させることを意味する。

【００８９】

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

上記の（１）または（２）を指し、ＤＮＡに、副溝において結合する小分子、すなわち、副溝結合性分子を包含する。「４方向のポリヌクレオチド」とは、ＤＮＡの４つの鎖間にホリデイジャンクションとしても公知の４方向のジャンクションを含有するポリヌクレオチドを意味する。

【００９０】

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

【００９１】

「ＤＮＡへの結合においてＩＨＦと競合するポリペプチド」とは、屈曲したＤＮＡ構造または歪んだＤＮＡ構造を閉塞させるかまたはそのＤＮＡ結合への結合においてＩＨＦと競合するが、ＤＮＡとバイオフィルムを形成しないタンパク質またはペプチドを意味する。例としては、これらに限定することなく、ＩＨＦの１つまたは複数のＤＮＡ結合ドメインを含むＩＨＦの断片、またはその生物学的等価物が挙げられる。ＤＮＡ結合ドメインは図９に示されている。

【００９２】

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

【００９３】

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

【００９４】

「Ｃ末端のポリペプチド」とは、ポリペプチドのＣ末端側半分を意図する。一例として、９０アミノ酸を含有するポリペプチドについて、Ｃ末端のポリペプチドは、アミノ酸４６～９０を含む。別の態様では、この用語は、カルボキシ末端から２０個のＣ末端のアミノ酸を意味する。

【００９５】

「ポリヌクレオチド」および「オリゴヌクレオチド」という用語は互換的に使用され、任意の長さのポリマーの形態のヌクレオチド、デオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチドのいずれか、またはその類似体を指す。ポリヌクレオチドは、任意の三次元構造を有してよく、公知または未知の任意の機能を果たし得る。以下はポリヌクレオチドの非限定的な例である：遺伝子または遺伝子断片（例えば、プローブ、プライマー、ＥＳＴタグまたはＳＡＧＥタグ）、エクソン、イントロン、メッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）、転移ＲＮＡ、リボソームＲＮＡ、ＲＮＡｉ、リボザイム、ｃＤＮＡ、組換えポリヌクレオチド、分岐ポリヌクレオチド、プラスミド、ベクター、任意の配列の単離されたＤＮＡ、任意の配列の単離されたＲＮＡ、核酸プローブおよびプライマー。ポリヌクレオチドは、

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

【００９６】

ポリヌクレオチドは、特異的な配列の４つのヌクレオチド塩基：アデニン（Ａ）；シトシン（Ｃ）；グアニン（Ｇ）；チミン（Ｔ）；およびポリヌクレオチドがＲＮＡである場合はチミンの代わりにウラシル（Ｕ）で構成される。したがって、「ポリヌクレオチド配列」という用語は、ポリヌクレオチド分子のアルファベット表示である。このアルファベット表示は、中央処理装置を有するコンピュータ内のデータベースに入力し、バイオインフォマティクスの適用、例えば、機能ゲノム科学および相同性検索などのために使用することができる。

【００９７】

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

【００９８】

明示的な列挙がなくとも、また別段の意図がなければ、本発明がポリペプチド、タンパク質、ポリヌクレオチドまたは抗体に関する場合、本発明の範囲内でその等価物または生物学的等価物が意図されることが推定されるべきである。本明細書で使用される場合、「生物学的なその等価物」は、参照のタンパク質、抗体、ポリペプチドまたは核酸について言及される場合、「その等価物」という用語と同義であるものとし、所望の構造または機能性を依然として維持しながら最小の相同性または配列同一性を有するものを意味する。本明細書において具体的に列挙されていなければ、本明細書で言及されているポリヌクレオチド、ポリペプチドまたはタンパク質はいずれも、その等価物も包含すると考えられる。例えば、別の態様では、等価物とは、少なくとも約６０％、あるいは少なくとも約６５％、あるいは少なくとも約７０％、あるいは少なくとも約７５％、あるいは少なくとも約８０％、あるいは少なくとも約８５％、あるいは少なくとも約９０％、あるいは少なくとも約９５％、あるいは９８％の相同性または配列同一性の百分率を意味し、参照タンパク質、参照ポリペプチドまたは参照核酸と実質的に等しい生物活性を示す。生物学的に等価なポリペプチドの例は表２において提供され、Ａｒｍ断片は、表２において同定され、そこでは好ましいアミノ酸配列への保存されたアミノ酸置換が同定されている。

【００９９】

別の配列に対して特定の百分率（例えば、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、または９５％）の「配列同一性」を有するポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチド領域（または、ポリペプチドまたはポリペプチド領域）は、アラインメントすると、比較されている２つの配列の塩基（またはアミノ酸）の百分率が同じであることを意味する。アラインメントおよび相同性または配列同一性の百分率は、当技術分野で公知のソフトウェアプログラム、例えば、Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ（Ａｕｓｕｂｅｌら編、１９８７年）付録３０、セクション７．７．１８、表７．７．１に記載のものを使用して決定することができる。アラインメントのために初期状態のパラメータを使用することが好ましい。好ましいアラインメントプログラムは、初期状態のパラメータを使用したＢＬＡＳＴである。具体的には、好ましいプログラムは、以下の初期状態のパラメータを使用したＢＬＡＳＴＮおよびＢＬＡＳＴＰである：遺伝暗号（Ｇｅｎｅｔｉｃ ｃｏｄｅ）＝標準；フィルター（ｆｉｌｔｅｒ）＝なし；鎖（ｓｔｒａｎｄ）＝両方；カットオフ（ｃｕｔｏｆｆ）＝６０；エクスペクト（ｅｘｐｅｃｔ）＝１０；行列（Ｍａｔｒｉｘ）＝ＢＬＯＳＵＭ６２；デスクリプション（Ｄｅｓｃｒｉｐｔｉｏｎｓ）＝５０配列；ソート（ｓｏｒｔ ｂｙ）＝ＨＩＧＨ ＳＣＯＲＥ；データベース（Ｄａｔａｂａｓｅｓ）＝非冗長性、ＧｅｎＢａｎｋ＋ＥＭＢＬ＋ＤＤＢＪ＋ＰＤＢ＋ＧｅｎＢａｎｋ ＣＤＳ ｔｒａｎｓｌａｔｉｏｎｓ＋ＳｗｉｓｓＰｒｏｔｅｉｎ＋ＳＰｕｐｄａｔｅ＋ＰＩＲ。これらのプログラムの詳細は、以下のインターネットアドレスにおいて見いだすことができる：ｎｃｂｉ．ｎｌｍ．ｎｉｈ．ｇｏｖ／ｃｇｉ－ｂｉｎ／ＢＬＡＳＴ。

【０１００】

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

【０１０１】

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

【０１０２】

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

【０１０３】

ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件の例としては、約２５℃～約３７℃のインキュベーション温度；約６×ＳＳＣ～約１０倍ＳＳＣのハイブリダイゼーション緩衝液の濃度；約０％～約２５％のホルムアミド濃度；および約４×ＳＳＣ～約８×ＳＳＣの洗浄溶液が挙げられる。中程度のハイブリダイゼーション条件の例としては、約４０℃～約５０℃のインキュベーション温度；約９×ＳＳＣ～約２×ＳＳＣの緩衝液の濃度；約３０％～約５０％のホルムアミド濃度；および約５×ＳＳＣ～約２×ＳＳＣの洗浄溶液が挙げられる。高ストリンジェンシー条件の例としては、約５５℃～約６８℃のインキュベーション温度；約１×ＳＳＣ～約０．１×ＳＳＣの緩衝液の濃度；約５５％～約７５％のホルムアミド濃度；および約１×ＳＳＣ、０．１×ＳＳＣの洗浄溶液、または脱イオン水が

挙げられる。一般に、ハイブリダイゼーションのインキュベート時間は、５分から２４時間の間であり、１つ、２つ、またはそれ以上の洗浄ステップを伴い、洗浄インキュベート時間は約１分、２分、または１５分である。ＳＳＣは０．１５ＭのＮａＣｌおよび１５ｍＭのクエン酸緩衝液である。他の緩衝系を用いたＳＳＣの等価物を使用することができることが理解される。

【０１０４】

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

【０１０５】

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

【０１０６】

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

【０１０７】

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

【０１０８】

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

【０１０９】

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

【０１１０】

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

適切な医薬キャリアは、意図された投与形態、すなわち、経口的な錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、シロップ剤などに関して選択すること、および従来の医薬の慣習と一致することが好ましい。

【０１１１】

注射用途に適切な医薬組成物としては、滅菌水溶液（成分が水溶性である場合）または分散液および滅菌注射用溶液または分散液の即時調製のための滅菌粉末が挙げられ得る。静脈内投与の場合、適切なキャリアには、生理食塩液、静菌水、Ｃｒｅｍｏｐｈｏｒ ＥＬ（商標）（ＢＡＳＦ、Ｐａｒｓｉｐｐａｎｙ、Ｎ．Ｊ．）、またはリン酸緩衝生理食塩液（ＰＢＳ）が含まれる。いずれの場合にも、非経口投与のための組成物は、無菌でなければならず、シリンジ注射が容易に可能となる程度の流体であるべきである。医薬組成物は、製造および貯蔵条件下で安定であるべきであり、細菌および真菌などの微生物の汚染作用に対抗して保存されなければならない。

【０１１２】

経口組成物としては、一般に、不活性希釈剤または食用キャリアが挙げられる。治療用経口投与のために、活性化合物を、賦形剤と共に組み入れ、錠剤、トローチ、またはカプセル（例えば、ゼラチンカプセル）の形態で使用することができる。経口組成物を、含嗽剤として使用するために液体キャリアを使用して調製することもできる。薬学的に適合性の結合剤および／またはアジュバント材料は、組成物の一部として組み入れることができる。錠剤、丸薬、カプセル、トローチなどは、以下の成分または類似の性質の化合物：微晶質セルロース、トラガカントガム、もしくはゼラチンなどの結合剤；デンプンもしくはラクトースなどの賦形剤；アルギン酸、Ｐｒｉｍｏｇｅｌ、もしくはトウモロコシデンプンなどの崩壊剤；ステアリン酸マグネシウムもしくはＳｔｅｒｏｔｅｓなどの潤滑剤；コロイド性二酸化ケイ素などの流動促進剤；スクロースもしくはサッカリンなどの甘味剤；またはペパーミント、サリチル酸メチル、もしくはオレンジ芳香剤などの芳香剤のうちのいずれかを含有し得る。

【０１１３】

吸入投与の場合、化合物は、適切な高圧ガス、例えば、二酸化炭素などのガスを含有する高圧容器もしくは高圧分注器、または噴霧器からのエアゾールスプレーの形態で送達することができる。

【０１１４】

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

【０１１５】

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

【０１１６】

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

【０１１７】

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

【０１１８】

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

【０１１９】

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

【０１２０】

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

【０１２１】

「リポソーム」は、同心脂質二重層からなる顕微鏡レベルの小胞である。構造的に、リポソームは、数百オングストロームから数分の１ミリメートルまでの寸法を有する長い管から球体まで、サイズおよび形状に幅がある。小胞形成性脂質は、外層の脂質組成物をもたらす最終的な複合体の特定の程度の流動性または剛性が実現されるように選択する。これらは、中性（コレステロール）または双極性であり、リン脂質、例えば、ホスファチジルコリン（ＰＣ）、ホスファチジルエタノールアミン（ＰＥ）、ホスファチジルイノシトール（ＰＩ）、およびスフィンゴミエリン（ＳＭ）など、およびこれらに限定されないが、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン（ＤＯＰＥ）を含めた他の種類の双極性の脂質を含み、炭化水素の鎖長は１４～２２の範囲内であり、飽和型であるまたは１つまたは複数のＣ＝Ｃ２重結合を有する。単独で、または他の脂質構成成分と組み合わせて安定なリポソームを作製することができる脂質の例は、リン脂質、例えば、水素化大豆ホスファチジルコリン（ＨＳＰＣ）、レシチン、ホスファチジルエタノールアミン、リゾレシチン、リゾホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルイノシトール、スフィンゴミエリン、セファリン、カルジオリピン、ホスファチジン酸、セレブロシド、ジステアロイルホスファチジルエタン（ｄｉｓｔｅａｒｏｙｌｐｈｏｓｐｈａｔｉｄｙｌｅｔｈａｎ）－オラミン（ＤＳＰＥ）、ジオレオイルホスファチジルコリン（ＤＯＰＣ）、ジパルミトイルホスファチジルコリン（ＤＰＰＣ）、パルミトイルオレオイルホスファチジルコリン（ｐａｌｍｉｔｏｙｌｏｌｅｏｙｌｐｈｏｓｐｈａｔｉｄｙｌｃｈｏｌｉｎｅ）（ＰＯＰＣ）、パルミトイルオレオイルホスファチジルエタノールアミ

ン（ｐａｌｍｉｔｏｙｌｏｌｅｏｙｌｐｈｏｓｐｈａｔｉｄｙｌｅｔｈａｎｏｌａｍｉｎｅ）（ＰＯＰＥ）およびジオレオイルホスファチジルエタノールアミン４－（Ｎ－マレイミド－メチル）シクロヘキサン－１－カルボキシレート（ＤＯＰＥ－ｍａｌ）などである。リポソームに組み入れることができる、脂質を含有する非亜リン酸のさらなるものとしては、ステアリルアミン、ドデシルアミン、ヘキサデシルアミン、ミリスチン酸イソプロピル、ラウリル硫酸トリエタノールアミン、アルキル－アリール硫酸塩、アセチルパルミテート（ａｃｅｔｙｌ　ｐａｌｍｉｔａｔｅ）、グリセロールリシノレエート（ｇｌｙｃｅｒｏｌ　ｒｉｃｉｎｏｌｅａｔｅ）、ヘキサデシルステアレート（ｈｅｘａｄｅｃｙｌ　ｓｔｅｒｅａｔｅ）、両性のアクリルポリマー、ポリエチルオキシレート化（ｐｏｌｙｅｔｈｙｌｏｘｙｌａｔｅｄ）脂肪酸アミド、および上記のカチオン性脂質（ＤＤＡＢ、ＤＯＤＡＣ、ＤＭＲＩＥ、ＤＭＴＡＰ、ＤＯＧＳ、ＤＯＴＡＰ（ＤＯＴＭＡ）、ＤＯＳＰＡ、ＤＰＴＡＰ、ＤＳＴＡＰ、ＤＣ－Ｃｈｏｌ）が挙げられる。負に荷電した脂質としては、小胞を形成することができるホスファチジン酸（ＰＡ）、ジパルミトイルホスファチジルグリセロール（ＤＰＰＧ）、ジオレオイルホスファチジルグリセロール（ＤＯＰＧ）、およびジセチルホスフェート（ｄｉｃｅｔｙｌｐｈｏｓｐｈａｔｅ）が挙げられる。一般には、リポソームは、それらの全体的なサイズおよびラメラ構造の本質に基づいて３つのカテゴリーに分けることができる。Ｎｅｗ　Ｙｏｒｋ　Ａｃａｄｅｍｙ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ　Ｍｅｅｔｉｎｇ、「Ｌｉｐｏｓｏｍｅｓ　ａｎｄ　Ｔｈｅｉｒ　Ｕｓｅ　ｉｎ　Ｂｉｏｌｏｇｙ　ａｎｄ　Ｍｅｄｉｃｉｎｅ」、１９７７年１２月によって展開された３つの分類は、多層状の小胞（ＭＬＶ）、小さな単層の小胞（ＳＵＶ）および大きな単層の小胞（ＬＵＶ）である。生物活性のある作用剤を、本明細書に記載の方法に従って投与するためにそのようなものに封入することができる。

【０１２２】

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

【０１２３】

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

【０１２４】

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

【０１２５】

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

【０１２６】

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

【０１２７】

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

【０１２８】

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

【０１２９】

「ウイルスベクター」は、宿主細胞に送達しようとするポリヌクレオチドを含む、ｉｎ　ｖｉｖｏ、ｅｘ　ｖｉｖｏまたはｉｎ　ｖｉｔｒｏのいずれかで組換えによって作製されるウイルスまたはウイルス粒子と定義される。ウイルスベクターの例としては、レトロ

ウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、アルファウイルスベクターなどが挙げられる。感染性のタバコモザイクウイルス（ＴＭＶ）ベースのベクターは、タンパク質の製造に使用することができ、タバコの葉においてＧｒｉｆｆｉｔｈｓｉｎを発現することが報告されている（Ｏ’Ｋｅｅｆｅら（２００９年）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ １０６巻（１５号）：６０９９～６１０４頁）。アルファウイルスベクター、例えば、セムリキ森林ウイルスベースのベクターおよびシンドビスウイルスベースのベクターなどが、遺伝子療法および免疫療法において使用するために開発されている。Ｓｃｈｌｅｓｉｎｇｅｒ ＆ Ｄｕｂｅｎｓｋｙ（１９９９年）Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．５巻：４３４～４３９頁およびＹｉｎｇら（１９９９年）Ｎａｔ．Ｍｅｄ．５巻（７号）：８２３～８２７頁を参照されたい。遺伝子移入がレトロウイルスベクターによって媒介される態様では、ベクター構築物とは、レトロウイルスのゲノムまたはその一部、および治療的な遺伝子を含むポリヌクレオチドを指す。

【０１３０】

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

【０１３１】

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

【０１３２】

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

【０１３３】

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

【０１３４】
遺伝子送達ビヒクルは、ＤＮＡ／リポソーム複合体、ミセルおよび標的ウイルスタンパク質－ＤＮＡ複合体も包含する。本発明の方法では、ターゲティング抗体またはその断片も含むリポソームを用いることができる。タンパク質トランスフェクションの非限定的な技法により、ポリヌクレオチドを細胞または細胞集団に送達することに加えて、本明細書に記載のタンパク質を細胞または細胞集団に直接導入することができる、あるいは発現を増強し、かつ／または本発明のタンパク質の活性を促進する培養条件が他の非限定的な技法である。
【０１３５】
本明細書で使用される場合「ｅＤＮＡ」という用語は、病原性の（例えば、細菌性の）バイオフィルムに対する構成成分として見いだされる細胞外のＤＮＡを指す。
【０１３６】
本明細書で使用される場合、「抗体」および「免疫グロブリン」という用語は、任意のアイソタイプの抗体または免疫グロブリン、これらに限定されないが、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、$F(ab)_2$、Ｆｖ、ｓｃＦｖ、ｄｓＦｖ、Ｆｄ断片、ｄＡｂ、ＶＨ、ＶＬ、ＶｈＨ、およびＶ－ＮＡＲドメインを含めた、抗原への特異的な結合を保持する抗体の断片；ミニ抗体（ｍｉｎｉｂｏｄｙ）、二重特異性抗体、三重特異性抗体、四重特異性抗体およびカッパ抗体（ｋａｐｐａ　ｂｏｄｙ）；抗体断片から形成された多特異性の抗体断片および１つまたは複数の単離されたもの；ＣＤＲまたは機能的パラトープ；キメラ抗体、ヒト化抗体、単鎖抗体、および抗体の抗原結合性部分を含む融合タンパク質および非抗体タンパク質も包含する。免疫グロブリン分子の重鎖および軽鎖の可変領域は、抗原と相互作用する結合ドメインを含有する。抗体（Ａｂ）の定常領域は、免疫グロブリンの宿主組織への結合を媒介することができる。
【０１３７】
本明細書中の用語「抗体」を、最も広範な意味で使用し、特に、所望の生物学的活性を示す限り、全長モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、ヒトモノクローナル抗体、組換えヒト抗体、キメラ抗体、抗体誘導体、多重特異性抗体（例えば、二重特異性抗体）、および抗体フラグメント、抗原結合断片が挙げられる。
【０１３８】
本明細書で使用される場合、「モノクローナル抗体」とは、実質的に同種の抗体集団から得られた抗体を指す。モノクローナル抗体は、そのそれぞれが抗原上の単一の決定因子を対象とするので、高度に特異的である。抗体は、例えば、放射性同位元素、検出可能な産物を生成する酵素、蛍光タンパク質などを用いて検出可能に標識することができる。抗体は、さらに他の部分、例えば、特異的結合対のメンバー、例えば、ビオチン（ビオチン－アビジン特異的結合対のメンバー）などとコンジュゲートすることができる。抗体は、これらに限定されないが、ポリスチレンのプレートまたはビーズなどを含めた固体支持体に結合させることもできる。
【０１３９】
モノクローナル抗体は、当技術分野で公知のハイブリドーマ法または組換えＤＮＡ法を用いて生成することができる。抗体を生成または選択するための代替の技法としては、ｉｎ　ｖｉｔｒｏでリンパ球を被験体の抗原に曝露させること、および細胞、ファージ、または同様の系において抗体表出ライブラリーをスクリーニングすることが挙げられる。
【０１４０】
「ヒト抗体」という用語は、本明細書で使用される場合、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列に由来する可変領域および定常領域を有する抗体を含むものとする。本発明のヒト抗体としては、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列にコードされないアミノ酸残基（例えば、ｉｎ　ｖｉｔｒｏでのランダム変異誘発または部位特異的変異誘発によって、またはｉｎ　ｖｉｖｏでの体細胞変異によって導入された変異）を挙げることができる。しかし、「ヒト抗体」という用語は、本明細書で使用される場合、マウスなどの別の哺乳動物種の生殖系列に由来するＣＤＲ配列がヒトフレームワーク配列に移植された抗体を含まないもの

とする。したがって、本明細書で使用される場合、「ヒト抗体」という用語は、タンパク質の実質的に全ての部分（例えば、ＣＤＲ、フレームワーク、C_Lドメイン、C_Hドメイン（例えば、C_{H1}、C_{H2}、C_{H3}）、ヒンジ、（ＶＬ、ＶＨ））が、ヒトにおいて実質的に非免疫原性であり、軽微な配列の変化または変異のみを伴う抗体を指す。同様に、霊長類（サル、ヒヒ、チンパンジーなど）、げっ歯類（マウス、ラット、ウサギ、モルモット、ハムスター、など）および他の哺乳動物に指定された抗体は、そのような種、亜属、属、サブファミリー、ファミリーに特異的な抗体を示す。さらに、キメラ抗体は、上記の任意の組合せを含む。そのような変化または変異は、場合によって、ヒトまたは他の種において、修飾されていない抗体と比較して、免疫原性を保持する、または免疫原性が低いことが好ましい。したがって、ヒト抗体は、キメラ抗体またはヒト化抗体とは異なる。ヒト抗体は、機能的に再編成されたヒト免疫グロブリン（例えば、重鎖および／または軽鎖）遺伝子を発現することができる非ヒト動物または原核細胞または真核細胞によって作製することができることが指摘されている。さらに、ヒト抗体が単鎖抗体である場合、ヒト抗体は、ネイティブなヒト抗体においては見いだされないリンカーペプチドを含んでよい。例えば、Ｆｖは、重鎖の可変領域と軽鎖の可変領域をつなぐリンカーペプチド、例えば、２個～約８個のグリシンまたは他のアミノ酸残基などを含んでよい。そのようなリンカーペプチドは、ヒト起源のものであるとみなされる。

【０１４１】

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

【０１４２】

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

【０１４３】

「組換えヒト抗体」という用語は、本明細書で使用される場合、組換え手段によって調製した、発現させた、創出した、または単離したヒト抗体、例えば、ヒト免疫グロブリン遺伝子についてトランスジェニックまたは染色体導入体（ｔｒａｎｓｃｈｒｏｍｏｓｏｍａｌ）またはそれから調製されるハイブリドーマである動物（例えば、マウス）から単離された抗体、抗体を発現するように形質転換された宿主細胞から、例えば、トランスフェクトーマ（ｔｒａｎｓｆｅｃｔｏｍａ）から単離された抗体、組換え型の、コンビナトリアルなヒト抗体ライブラリーから単離された抗体、およびヒト免疫グロブリン遺伝子配列をスプライシングして他のＤＮＡ配列にすることを伴う任意の他の手段によって調製した、発現させた、創出した、または単離した抗体などの全てを包含する。そのような組換えヒト抗体は、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列に由来する可変領域および定常領域を有する。しかし、ある特定の実施形態では、そのような組換えヒト抗体は、ｉｎ　ｖｉｔｒｏ

での変異誘発（または、ヒトＩｇ配列に対する動物トランスジェニックを使用する場合は、ｉｎ　ｖｉｖｏでの体細胞の変異誘発）に供することができ、したがって、組換え型の抗体のＶＨ領域およびＶＬ領域のアミノ酸配列は、ヒト生殖系列のＶＨ配列およびＶＬ配列に由来し、それと関連するが、ｉｎ　ｖｉｖｏでのヒト抗体生殖系列レパートリーに天然に存在しない可能性がある配列である。これらの抗体を作出するための方法は、本明細書に記載されている。

【０１４４】

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

【０１４５】

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

【０１４６】

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

【０１４７】

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

【０１４８】

本明細書で使用される場合、「検出可能な標識」という用語は、「標識された」組成物を生成するために、検出しようとする組成物に直接または間接的にコンジュゲートした、直接または間接的に検出可能な化合物または組成物、例えば、Ｎ末端ヒスチジン（ｈｉｓｔａｄｉｎｅ）タグ（Ｎ－Ｈｉｓ）、磁気的に活性な同位元素、例えば、^{115}Ｓｎ、^{117}Ｓｎおよび^{119}Ｓｎ、非放射性同位元素、例えば、^{13}Ｃおよび^{15}Ｎなど、ポリヌクレオチドまたはタンパク質、例えば抗体などを意味する。この用語は、ポリヌクレオチドとコンジュゲートした、挿入配列が発現されるとシグナルをもたらす配列、例えば、緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）なども包含する。標識は、単独で検出可能であってよい（例えば、放射性同位元素標識または蛍光標識）、または、酵素的な標識の場合では、基質である化合物または組成物の検出可能な化学的変質を触媒することができる。標識は、小規模な検出に適していてよい、またはハイスループットなスクリーニングのためにより適

していてよい。そのように、適切な標識としては、これらに限定されないが、磁気的に活性な同位元素、非放射性同位元素、放射性同位元素、蛍光色素、発光化合物、色素、および酵素を含めたタンパク質が挙げられる。標識は、単に検出することができる、または、数量化することができる。単に検出する反応は、一般には、ただ単にその存在が確認される反応を含み、一方、数量化する反応は、一般には、数量化できる（例えば、数値で報告することができる）値、例えば、強度、偏光、および／または他の性質などを有する反応を含む。発光アッセイまたは蛍光アッセイでは、検出可能な反応を、実際に結合に関与するアッセイの構成成分と結びつけた発光団またはフルオロフォアを使用して直接生成する、または別の（例えば、レポーターまたは指示薬）構成成分と結びつけた発光団またはフルオロフォアを使用して間接的に生成することができる。

【０１４９】

シグナルを生じる発光標識の例としては、これらに限定されないが、生物発光および化学発光が挙げられる。検出可能な発光反応は、一般には、発光シグナルの変化または出現を含む。発光標識化アッセイの構成成分のための適切な方法および発光団は、当技術分野で公知であり、例えば、Ｈａｕｇｌａｎｄ，　Ｒｉｃｈａｒｄ　Ｐ．（１９９６年）Ｈａｎｄｂｏｏｋ　ｏｆ　Ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｔ　Ｐｒｏｂｅｓ　ａｎｄ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　Ｃｈｅｍｉｃａｌｓ（第６版）に記載されている。発光プローブの例としては、これらに限定されないが、エクオリンおよびルシフェラーゼが挙げられる。

【０１５０】

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

【０１５１】

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

【０１５２】

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

【０１５３】

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

【０１５４】
「真核細胞」は、モネラ界を除いた生物界の全てを含む。真核生物は、膜に結合した核によって容易に区別することができる。動物、植物、真菌、および原生生物は、その細胞が内部の膜および細胞骨格によって複雑な構造に組織化された真核生物または生物体である。最も特徴的な膜に結合した構造は核である。特に列挙がなければ、「宿主」という用語は、例えば、酵母、高等植物、昆虫および哺乳動物の細胞を含めた真核生物の宿主を包含する。真核細胞または宿主の非限定的な例としては、サル、ウシ、ブタ、ネズミ、ラット、鳥類、爬虫類およびヒトが挙げられる。
【０１５５】
「原核細胞」は、通常、核または任意の他の膜に結合した細胞小器官を欠き、２つの界、細菌および古細菌に分けられる。さらに、染色体ＤＮＡを有することの代わりに、これらの細胞の遺伝情報は、プラスミドと称される環状のループ内にある。細菌細胞は、非常に小さく、およそ動物ミトコンドリアのサイズである（直径約１～２μｍ、長さ１０μｍ）。原核細胞は、３つの主要な形状：ロッド形状、球状、およびスパイラルを特徴とする。真核生物のような精巧な複製プロセスを行う代わりに、細菌細胞は二分裂によって分裂する。例としては、これらに限定されないが、Ｂａｃｉｌｌｕｓ細菌、Ｅ．ｃｏｌｉ細菌、およびＳａｌｍｏｎｅｌｌａ細菌が挙げられる。
【０１５６】
「ネイティブな」または「天然の」抗原は、エピトープを含有する、天然の生物学的な供給源から単離された、かつ被験体において抗原受容体、具体的には、Ｔ細胞抗原受容体（ＴＣＲ）に特異的に結合することができるポリペプチド、タンパク質または断片である。
【０１５７】
「抗原」および「抗原性」という用語は、抗体によって認識される能力を有する、または別のように抗体－リガンド対のメンバーとしての機能を果たす分子を指す。「特異的な結合」とは、抗原と免疫グロブリンの重鎖および軽鎖の可変領域の相互作用を指す。抗体－抗原結合は、ｉｎ　ｖｉｖｏまたはｉｎ　ｖｉｔｒｏで起こり得る。当業者は、タンパク質、核酸、脂肪酸、脂質、リポ多糖および多糖を含めた巨大分子は、抗原としての機能を果たす潜在性を有することを理解されよう。当業者は、さらに、抗体リガンドとしての機能を果たす潜在性を有するタンパク質をコードする核酸は、必ず抗原をコードすることを理解されよう。当業者は、さらに、抗原は、全長の分子に限定されず、部分的な分子も含んでよいことを理解されよう。「抗原性」という用語は、抗原の性質を有する分子に対する形容詞的参照である。この用語は、免疫原性である物質、すなわち免疫原、ならびに免疫学的不応答性、またはアネルギーを誘導する物質、すなわちアネルゲン（ａｎｅｒｇｅｎ）を包含する。
【０１５８】
「変化した抗原」は、対応する野生型抗原の一次配列とは異なる一次配列を有する抗原である。変化した抗原は、合成方法または組換え方法によって作出することができ、それらとしては、これらに限定されないが、翻訳の間に、または翻訳後に、例えば、リン酸化、グリコシル化、架橋、アシル化、タンパク質分解性の切断、抗体分子、膜分子または他のリガンドへの連結によって示差的に修飾された抗原性ペプチドが挙げられる（Ｆｅｒｇｕｓｏｎら（１９８８年）Ａｎｎ．　Ｒｅｖ．　Ｂｉｏｃｈｅｍ．　５７巻：２８５～３２０頁）。本発明の合成抗原または変化した抗原は、天然のエピトープと同じＴＣＲに結合するものとする。
【０１５９】
本明細書ではネイティブな抗原または野生型抗原とも称される「自己抗原」は、被験体において、抗原に対する自己免疫寛容に起因して、免疫応答をわずかに誘導する、または全く誘導しない抗原性ペプチドである。自己抗原の例は、黒色腫特異的抗原ｇｐ１００である。
【０１６０】

「主要組織適合性遺伝子複合体」または「ＭＨＣ」という用語は、Ｔ細胞への抗原提示のため、および急速な移植片拒絶のために必要な細胞表面分子をコードする遺伝子の複合体を指す。ヒトでは、ＭＨＣは「ヒト白血球抗原」または「ＨＬＡ」複合体としても公知である。ＭＨＣにコードされるタンパク質は、「ＭＨＣ分子」として公知であり、クラスＩ　ＭＨＣ分子およびクラスＩＩ　ＭＨＣ分子に分類される。クラスＩ　ＭＨＣは、β２－ミクログロブリンと非共有結合的に連結したＭＨＣにおいてコードされるα鎖でできている膜ヘテロ二量体タンパク質を含む。クラスＩ　ＭＨＣ分子は、ほぼ全ての有核細胞によって発現され、ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞への抗原の提示において機能することが示されている。クラスＩ分子は、ヒトにおけるＨＬＡ－Ａ、ＨＬＡ－Ｂ、およびＨＬＡ－Ｃを含む。クラスＩＩ　ＭＨＣ分子は、非共有結合的に結びついたα鎖およびβ鎖からなる膜ヘテロ二量体タンパク質も含む。クラスＩＩ　ＭＨＣ分子は、ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞において機能することが公知であり、ヒトでは、ＨＬＡ－ＤＰ、ＨＬＡ－ＤＱ、およびＨＬＡ－ＤＲを含む。好ましい実施形態では、本発明の組成物およびリガンドは、任意のＨＬＡ型のＭＨＣ分子と複合体を形成し得る。当業者は、ＨＬＡの血清型および遺伝子型に詳しい。ｂｉｍａｓ．ｄｃｒｔ．ｎｉｈ．ｇｏｖ／ｃｇｉ－ｂｉｎ／ｍｏｌｂｉｏ／ｈｌａ　ｃｏｅｆｆｉｃｉｅｎｔ　ｖｉｅｗｉｎｇ　ｐａｇｅ、Ｒａｍｍｅｎｓｅｅ　Ｈ．Ｇ．、Ｂａｃｈｍａｎｎ　Ｊ．、およびＳｔｅｖａｎｏｖｉｃ　Ｓ．ＭＨＣ　Ｌｉｇａｎｄｓ　ａｎｄ　Ｐｅｐｔｉｄｅ　Ｍｏｔｉｆｓ（１９９７年）Ｃｈａｐｍａｎ　＆　Ｈａｌｌ　Ｐｕｂｌｉｓｈｅｒｓ；Ｓｃｈｒｅｕｄｅｒ　Ｇ．Ｍ．Ｔｈ．ら　Ｔｈｅ　ＨＬＡ　ｄｉｃｔｉｏｎａｒｙ（１９９９年）Ｔｉｓｓｕｅ　Ａｎｔｉｇｅｎｓ　５４巻：４０９～４３７頁を参照されたい。

【０１６１】

「免疫応答」とは、広範には、外来物質に対するリンパ球の抗原特異的な応答を指す。「免疫原」および「免疫原性」という用語は、免疫応答を引き出す能力を持つ分子を指す。この応答は抗体産生または免疫細胞の活性化を含み得る。応答は、ｉｎ　ｖｉｖｏまたはｉｎ　ｖｉｔｒｏで起こり得る。当業者は、タンパク質、核酸、脂肪酸、脂質、リポ多糖および多糖を含めた種々の巨大分子が免疫原性である潜在性を有することを理解されよう。当業者は、さらに、免疫応答を引き出すことができる分子をコードする核酸は必ず免疫原をコードすることを理解されよう。当業者は、さらに、免疫原は、全長の分子に限定されず、部分的な分子を含んでよいことを理解されよう。

【０１６２】

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

【０１６３】

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

【０１６４】
本明細書で使用される場合、「固相支持体」または「固体支持体」は互換的に使用され、特定の種類の支持体に限定されない。それどころか、多数の支持体が利用可能であり、当業者に公知である。固相支持体としては、シリカゲル、樹脂、誘導体化プラスチックフィルム、ガラスビーズ、綿、プラスチックビーズ、アルミナゲルが挙げられる。本明細書で使用される場合、「固体支持体」は、合成の抗原提示マトリックス、細胞、およびリポソームも包含する。適切な固相支持体は、所望の最終用途および種々のプロトコールに対する適合性に基づいて選択することができる。例えば、ペプチド合成に関しては、固相支持体とは、樹脂、例えば、ポリスチレン（例えば、Ｂａｃｈｅｍ Ｉｎｃ．，Ｐｅｎｉｎｓｕｌａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓなどから得られるＰＡＭ－樹脂）、ＰＯＬＹＨＩＰＥ．ＲＴＭ樹脂（Ａｍｉｎｏｔｅｃｈ、Ｃａｎａｄａから得られる）、ポリアミド樹脂（Ｐｅｎｉｎｓｕｌａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓから得られる）、ポリエチレングリコールをグラフトしたポリスチレン樹脂（ＴｅｎｔａＧｅｌ．ＲＴＭ、Ｒａｐｐ Ｐｏｌｙｍｅｒｅ、Ｔｕｂｉｎｇｅｎ、Ｇｅｒｍａｎｙ）またはポリジメチルアクリルアミド樹脂（Ｍｉｌｌｉｇｅｎ／Ｂｉｏｓｅａｒｃｈ、Ｃａｌｉｆ．から得られる）などを指し得る。
【０１６５】
固相支持体の例としては、ガラス、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリエチレン、デキストラン、ナイロン、アミラーゼ、天然セルロース、修飾されたセルロース、ポリアクリルアミド、斑糲岩、および磁鉄鉱が挙げられる。キャリアの本質は、いくらかの程度まで可溶性であってよい、または不溶性であってよい。支持材料は、カップリングされた分子が、ポリヌクレオチド、ポリペプチドまたは抗体に結合することができる限りは、実質的にいかなる可能性のある構造的な立体配置を有してもよい。したがって、支持体の立体配置は、ビーズのように球状であってよい、または、試験管の内側表面、またはロッド外面のように円柱状であってよい。あるいは、表面は、例えばシート、試験紙など平らであってよい、あるいはポリスチレンビーズであってよい。当業者は、抗体または抗原に結合する多くの他の適切なキャリアを知っている、または常套的な実験を使用することによってそれらを確認することができるであろう。
【０１６６】
開示を実施するための形態
嚢胞性線維症（ＣＦ）は、コーカソイドが罹患する最も一般的な致死性の遺伝的障害である。医学が進歩しても、ＣＦは短命であり、患者は典型的には３８歳までしか生存できない。Ｂｕｒｋｈｏｌｄｅｒｉａ ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａ（Ｂ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａ）によってＣＦ肺が感染したこれらの患者は、臨床的にこの微生物が事実上全ての抗生物質に耐性を示し、伝染性が高く、ＣＦ患者がこの微生物に感染することにより、しばしば最後の救命選択肢である肺移植の対象外となるので、医学的管理が例外的に困難である。本発明者らは、免疫介入のためにＢ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａバイオフィルムの以下の２つの豊富な成分を標的にした：細胞外ＤＮＡおよびＤＮＡＢＩＩタンパク質（後者は細菌核酸結合タンパク質である）。これらのＤＮＡＢＩＩタンパク質のうちの１つ（組込み宿主因子、すなわちＩＨＦ）に指向する抗血清でのＢ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａバイオフィルムの処置により、バイオフィルムが有意に破壊された。さらに、Ｂ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａバイオフィルムの抗ＩＨＦ媒介性の不安定化と伝統的な抗生物質への暴露とが組み合わされた場合、バイオフィルム内に常在し、それにより典型的には抗生物質作用に高い耐性を示すＢ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａは直ちに死滅するようになった。通常は摂取されたＢ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａを有効に分解することができないネズミＣＦマクロファージへの暴露前の抗ＩＨＦ血清とのＢ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａのプレインキュベーションにより、貪食されたＢ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａの死滅が統計的に有意に増加した。まとめると、これらの所見は、ＤＮＡＢＩＩタンパク質のターゲティングはＣＦ患者、特に肺がＢ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａに感染されたＣＦ患者の処置のための新規のアプローチであることを示す。
【０１６７】

診断方法および治療方法

本開示は、Ｂｕｒｋｈｏｌｄｅｒｉａによって産生されたバイオフィルムを阻害するか、それと競合するか、その力価を決定する方法であって、バイオフィルムを有効量の抗組込み宿主因子（抗ＩＨＦ）抗体と接触させ、それにより、バイオフィルムを阻害するか、それと競合するか、その力価を決定する、接触させることを含む、あるいはそれから本質的になる、またはさらにそれからなる方法を提供する。本方法をｉｎ　ｖｉｔｒｏまたはｉｎ　ｖｉｖｏで行うことができる。一態様では、抗ＩＨＦ抗体の接触を、ＤＮアーゼ処置を使用せずに実施する。一態様では、治療から排除されるＤＮアーゼ処置は、ＤＮＡ骨格内のホスホジエステル結合の切断を触媒する酵素を含む。治療から排除され、且つ十字構造だけでなく、ＤＮＡの多様な二次構造も標的とすることが公知であるＤＮアーゼ酵素についての３つの非限定的な例には、ＤＮアーゼＩ、Ｔ４　Ｅｎｄｏ　ＶＩＩ、およびＴ７　Ｅｎｄｏ　Ｉが含まれる。一態様では、治療から排除されるＤＮアーゼ処置は、プルモザイム（登録商標）（ドルナーゼアルファ；Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈ、Ｉｎｃ．）を含む、あるいはそれから本質的になる、またはさらにそれからなる。

【０１６８】

別の態様では、本方法は、バイオフィルムまたはＢｕｒｋｋｈｏｌｄｅｒｉａを有効量のバイオフィルムを生じるＢｕｒｋｋｈｏｌｄｅｒｉａの増殖を阻害する抗菌薬と接触させることをさらに含む、あるいはそれから本質的になる、またはさらにそれからなる。かかる抗菌薬の非限定的な例には、アンピシリン、アモキシシリン－クラブラナート、セフタジジム（ｃｅｆｔａｚｉｄｉｎｅ）、シプロフロキサシン、イミペネム、ミノサイクリン、およびセフジニルが含まれる。接触をｉｎ　ｖｉｔｒｏ（ｉｎ　ｖｉｔｒｏ　ｉｎ）またはｉｎ　ｖｉｖｏで行うことができる。

【０１６９】

被験体におけるＢｕｒｋｈｏｌｄｅｒｉａ感染に原因する感染または疾患を処置する方法であって、被験体に有効量の抗ＩＨＦ抗体を投与し、それによりＢｕｒｋｈｏｌｄｅｒｉａ感染に原因する感染または疾患を処置する、投与することを含む、あるいはそれから本質的になる、またはさらにそれからなる方法も本明細書中に提供する。

【０１７０】

本開示はまた、感染の再発の処置または防止を必要とするＣＦ患者において感染の再発を処置または防止する方法であって、患者に有効量の抗ＩＨＦ抗体を投与し、それによりＣＦ患者における感染の再発を処置または防止する、投与することを含む、あるいはそれから本質的になる、またはさらにそれからなる方法も提供する。

【０１７１】

一態様では、抗ＩＨＦ抗体を、ＤＮアーゼ処置を使用せずに投与する。一態様では、治療から排除されるＤＮアーゼ処置は、ＤＮＡ骨格内のホスホジエステル結合の切断を触媒する酵素を含む。治療から排除され、且つ十字構造だけでなく、ＤＮＡの多様な二次構造も標的とすることが公知であるＤＮアーゼ酵素についての３つの非限定的な例には、ＤＮアーゼＩ、Ｔ４　Ｅｎｄｏ　ＶＩＩ、およびＴ７　Ｅｎｄｏ　Ｉが含まれる。一態様では、治療から排除されるＤＮアーゼ処置は、プルモザイム（登録商標）（ドルナーゼアルファ；Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈ，Ｉｎｃ．）を含む、またはそれから本質的になる、またはさらにそれからなる。なおさらなる態様では、本方法は、被験体に有効量のバイオフィルムを生じるＢｕｒｋｈｏｌｄｅｒｉａの増殖を阻害する抗菌薬を投与することをさらに含む、またはそれからなおさらに本質的になる、またはさらにそれからなる。かかる抗菌薬の非限定的な例には、アンピシリン、アモキシシリン－クラブラナート、セフタジジム（ｃｅｆｔａｚｉｄｉｎｅ）、シプロフロキサシン、イミペネム、ミノサイクリン、およびセフジニルが含まれる。

【０１７２】

上記の各方法では、Ｂｕｒｋｈｏｌｄｅｒｉａの非限定的な例は、Ｂｕｒｋｈｏｌｄｅｒｉａ　ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａ（Ｂ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａ）、Ｂ．ｍｕｌｔｉｖｏｒａｎｓ、Ｂ．ｍａｌｌｅｉ、Ｂ．ｃｅｐａｃｉ、またはＢ．ｐｓｅｕｄｏｍａｌｌｅｉ

である。

【０１７３】

上記方法で用いる抗ＩＨＦ抗体は、１つまたは複数の抗ＩＨＦα抗体または抗ＩＨＦβ抗体である。１つのさらなる態様では、抗ＩＨＦ抗体はＩｇＧ抗体である。抗体は、本明細書中に記載の種々の抗体のうちのいずれかであり得、かかる抗体の非限定的な例には、所望の生物学的活性を示す限り、全長モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、ヒトモノクローナル抗体、組換えヒト抗体、キメラ抗体、ベニア化抗体、二特異性抗体、ヒト化抗体、抗体誘導体、組換えヒト化抗体、そのフラグメントまたは抗原結合断片が含まれる。一態様では、フラグメントは、抗体のＣＤＲを含む、あるいはそれから本質的になる、またはさらにそれからなる。一態様では、抗体は、検出可能に標識されているか、抗体にコンジュゲートした検出可能な標識をさらに含む。

【０１７４】

抗ＩＨＦ抗体の非限定的な例を本明細書中に記載し、一態様では、表２において同定されるポリペプチドもしくは表２において同定されるＡｒｍ断片、またはかかるポリペプチドの等価物、または１つまたは複数の以下の配列を含むポリヌクレオチドもしくはポリペプチドを特異的に認識して結合する１つまたは複数の抗体である：

【数１】

TCTCAACGATTTA (配列番号 341); WATCAANNNNTTR (ここで、WはAまたはTであり、Nは任意のヌクレオチドであり、RはAまたはGである ; (配列番号 342);

MATIT**K**LDIIEYLSDKYHLS (本明細書中で、hIFA1ともいう ; (配列番号343);

KYHLSKQDTKNVVEN**FLEEI** (本明細書中でhIFA2ともいう ; (配列番号 344);

FLEEIRLSLESGQD**VKLSGF** (本明細書中でhIFA3ともいう ; (配列番号 345);

KLSGFGNFELRDKSS**RPGRN** (本明細書中でhIFA4ともいう ; (配列番号 346);

RPGRNPKTGDVVPVSARRVV (本明細書中でhIFA5ともいう ; (配列番号 347);

ARRVVTFKPGQKLRARVEKTK (本明細書中でhIFA6ともいう ; (配列番号 348)、

またはその等価物、またはこれらと少なくとも６０％、あるいは少なくとも６５％、あるいは少なくとも７０％、あるいは少なくとも７５％、あるいは８０％、あるいは少なくとも８５％、あるいは少なくとも９０％、あるいは少なくとも９５％同一であるか、ポリペプチド配列については、高ストリンジェンシー条件下でかかるポリペプチド配列をコードするポリヌクレオチドにハイブリッド形成するポリヌクレオチドまたはその相補物によってコードされるポリヌクレオチドもしくはペプチド。高ストリンジェンシー条件を上に記載し、この条件は本明細書中で参考として援用される。出願人は、太字で下線を引いたアミノ酸が高度に保存されていることを確認しており、したがって、一態様では、これらのアミノ酸は等価なポリペプチドのデザインにおいて改変または変更されない。等価なポリペプチドのさらなる例としては、例えば、アミン末端上またはカルボキシ末端上のいずれか（または両方上）に２５まで、あるいは２０、あるいは１５、あるいは１０まで、あるいは５までの無作為なアミノ酸が付加された上記ポリペプチドからなるかこれを含むポリペプチドが含まれる。

【０１７５】

これらの方法のために、感染は、ｉｎ　ｖｉｖｏおよび哺乳動物宿主（ヒト患者など）で生じ、例えば、未成熟の哺乳動物宿主または小児患者で生じる。

【０１７６】

本開示はまた、ＣＦ中に存在するかＣＦに寄与するバイオフィルム（例えば、Ｂ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａ誘導性バイオフィルム）を阻害するか、それと競合するか、その力価を決定する方法であって、バイオフィルムを干渉作用剤と接触させ、それにより、バイオフィルムを阻害するか、それと競合するか、その力価を決定する、接触させることを含む、あるいはそれから本質的になる、またはさらにそれからなる方法を提供する。接触は、ｉｎ　ｖｉｔｒｏまたはｉｎ　ｖｉｖｏで実施することができる。

【０１７７】
別の態様では、ＣＦ患者またはＣＦに寄与する感染を保有する患者における細菌バイオフィルムを阻害するか、防止するか、破壊する方法であって、バイオフィルムを干渉作用剤と接触させ、それにより、細菌バイオフィルムを阻害するか、防止するか、破壊する、接触させることを含む、あるいはそれから本質的になる、またはさらにそれからなる方法を提供する。患者は、動物、哺乳動物、またはヒトの患者であり得る。
【０１７８】
ｉｎ　ｖｉｔｒｏで実施する場合、方法は、本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチド、抗体、宿主細胞、小分子および組成物と同じ、類似したまたは逆の力を有する干渉作用剤をスクリーニングまたは確認するために有用である。あるいは、方法を使用して、微生物感染症を処置するためにはどの干渉作用剤が最適であるかを同定することができる。例えば、新しい作用剤または併用療法を、例えば、２つの試料にＤＮＡ　ＢＩＩポリペプチドおよび微生物ＤＮＡまたはバイオフィルムおよび試験される作用剤を含有させることによってスクリーニングすることができる。第２の試料は、ＤＮＡ　ＢＩＩポリペプチドおよび微生物ＤＮＡまたはバイオフィルムおよび活性であることが公知の作用剤、例えば、抗ＩＨＦ抗体または陽性対照としての機能を果たす小分子を含有する。別の態様では、いくつかの試料を準備し、干渉作用剤を、希釈度を増しながら系に加えて、臨床の場で対象を処置することにおいて有効だと思われる最適な用量を決定する。当業者には明らかであるように、ＤＮＡ　ＢＩＩポリペプチドおよび微生物ＤＮＡまたはバイオフィルムを含有する陰性対照を準備することができる。別の態様では、ＤＮＡ　ＢＩＩポリペプチドおよび微生物ＤＮＡまたはバイオフィルムを、例えば、互いに密接に接触させるとシグナルを放出する発光分子を用いて検出可能に標識する。試料を、作用剤がＤＮＡ　ＢＩＩポリペプチドと微生物ＤＮＡまたはバイオフィルムの間の相互作用を阻害する、それと競合するまたはその力価を決定するために有効な時間、同様の条件下で含有し、次いで試料を、発光分子からのシグナルの放出についてアッセイする。試料からシグナルが放出されれば、その作用剤は結合を阻害するために有効ではない。
【０１７９】
別の態様では、ヒト／動物から、ＣＦ感染症を引き起こしている微生物の（例えば細菌などの）単離株を単離し、次いで、それを培養してｉｎ　ｖｉｔｒｏでバイオフィルムとして増殖させることができる小型化チャンバースライド系においてｉｎ　ｖｉｔｒｏにおける方法を実施する。干渉作用剤（例えば、抗ＩＨＦ抗体など）または潜在的な干渉作用剤バイオフィルムを、単独で、または別の作用剤と組み合わせて、潜在的な干渉作用剤または干渉作用剤、例えば、抗ＩＨＦなど（または他の抗体、小分子、作用剤など）の希釈度を増しながら、または増さずに培養物に加えて、対象の感染症が存在する箇所に送達した場合に、その患者を処置することにおいて有効であると思われる最適用量を見いだす。当業者には明らかであるように、陽性対照および陰性対照を同時に実施することができる。
【０１８０】
別の態様では、フローセル中の干渉作用剤（例えば、抗ＩＨＦ抗体など）および／または潜在的な干渉作用剤（単独で、または別の作用剤と組み合わせて）を用いて、ハイスループットなプラットフォームにおいて方法を実施する。干渉作用剤（例えば、抗ＩＨＦ抗体など）または潜在的な干渉作用剤バイオフィルムを、単独で、または別の作用剤と組み合わせて、潜在的な干渉作用剤または干渉作用剤、例えば、抗ＩＨＦなど（または他の抗体、小分子、作用剤など）の希釈度を増しながら、または増さずに培養物に加えて、対象の感染症が存在する箇所に送達した場合に、その患者を処置することにおいて有効であると思われる最適用量を見いだす。バイオフィルム単離体を超音波処理して、微生物ＤＮＡに結合したＩＨＦなどのＤＮＡ　ＢＩＩポリペプチドからバイオフィルム細菌を分離する。ＤＮＡ　ＢＩＩポリペプチド－ＤＮＡ複合体をプラットフォーム上の抗ＩＨＦ抗体によって単離する。次いで、付加したバイオフィルム細菌を同定するために使用するために、微生物ＤＮＡを、例えば、塩洗浄を用いて放出させる。次いで、遊離したＤＮＡを、例え

ば、ＰＣＲによる配列決定によって同定する。ＤＮＡが遊離されなければ、干渉作用剤（複数可）は、首尾よく機能したまたは微生物ＤＮＡに結合した。ＤＮＡが試料に見いだされれば、作用剤はＤＮＡ　ＢＩＩポリペプチドー微生物ＤＮＡの結合に干渉しなかった。当業者には明らかであるように、陽性対照および／または陰性対照を同時に実施することができる。

【０１８１】

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

【０１８２】

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

【０１８３】

臨床の場に加えて、この方法は、工業の場において有効な干渉作用剤を同定し、かつ／または確認するために使用することができる。

【０１８４】

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

【０１８５】

非ヒト動物においてｉｎ　ｖｉｖｏで実施する場合、方法は、単独で、または他の作用剤と組み合わせてバイオフィルムを分解するために使用することができる干渉作用剤を同定するための前臨床的なスクリーニングを提供する。

【０１８６】

別の態様では、ＣＦ患者またはＣＦに寄与する感染を保有する患者における細菌バイオフィルムを阻害するか、防止するか、破壊し、そして／または細菌感染を除去する方法であって、バイオフィルムを干渉作用剤と接触させ、それにより、細菌感染または細菌バイオフィルムを阻害するか、防止するか、破壊し、そして／または除去する、接触させることを含む、あるいはそれから本質的になる、またはさらにそれからなる方法を提供する。患者は、動物、哺乳動物、またはヒトの患者であり得る。

【０１８７】

ＣＦ患者またはバイオフィルム形成に寄与する感染の発症リスクのある患者におけるバイオフィルムの再発を処置または防止する方法であって、有効量の干渉作用剤を患者に投与し、それにより、ＣＦ患者における細菌感染の再発を処置または防止する、投与することを含む、あるいはそれから本質的になる、またはさらにそれからなる方法も提供する。ＣＦ患者は、動物、哺乳動物、またはヒトの患者であり得る。

【０１８８】

ＣＦにおける感染再発の処置または防止を必要とする患者において感染再発を処置また

は防止する方法であって、患者に有効量の干渉作用剤を投与することを含む、あるいはそれから本質的になる、またはさらにそれからなる方法も提供する。

【０１８９】

治療をさらに補助するために、干渉作用剤を抗菌薬と組み合わせることができる。したがって、任意の上記方法は、有効量の抗菌薬の投与または抗菌薬との接触をさらに含む、またはそれから基本的になる、またはさらにそれからなることができる。抗菌薬の非限定的な例には、・・・が含まれる。

【０１９０】

上記のｉｎ　ｖｉｔｒｏ法およびｉｎ　ｖｉｖｏ法のための干渉作用剤および干渉組成物は、米国特許出願公開第２０１１／０２３６３０６号、特に、段落番号２３８～２６３および２７７～３２９（本明細書中で参考として援用される）に記載されている。

【０１９１】

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

【０１９２】

抗菌剤の非限定的な例は、別の他のワクチン構成成分、例えば、表面抗原、例えば、ＩＶ型Ｐｉｌｉｎタンパク質などである（ＪｕｒｃｉｓｅｋおよびＢａｋａｌｅｔｚ（２００７年）Ｊ．　ｏｆ　Ｂａｃｔｅｒｉｏｌｏｇｙ　１８９巻（１０号）：３８６８～３８７５頁）。

【０１９３】

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

【０１９４】

本発明の方法によって処置することができる微生物感染症および疾患としては、ＣＦ感染症をもたらすかまたはそれと関連する感染症が挙げられる。これらの微生物感染症は、上気道、中気道および下気道に存在し得る（耳炎、副鼻腔炎、気管支炎、同様に、慢性閉塞性肺疾患（ＣＯＰＤ）の増悪、慢性咳、嚢胞性線維症（ＣＦ）の合併症および／または主因ならびに市中感染性肺炎（ＣＡＰ）。したがって、本発明のｉｎ　ｖｉｖｏにおける方法を実施することによって、これらの感染症由来のこれらの疾患および合併症も予防または処置することができる。

【０１９５】

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

【０１９６】

吸入による投与以外の非経口的な投与経路としては、これらに限定されないが、局所経路、経皮（ｔｒａｎｓｄｅｒｍａｌ）経路、皮下経路、筋肉内経路、眼窩内経路、嚢内経路、脊髄内経路、胸骨内経路、および静脈内経路、すなわち、消化管を通る経路以外の任意の投与経路が挙げられる。非経口投与は、阻害剤の全身送達または局所送達をもたらすように行うことができる。全身送達が望まれる場合、投与は、一般には、医薬調製物の侵

襲的または全身的に吸収される局所投与または粘膜を通じた投与を伴う。

【０１９７】

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

【０１９８】

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

【０１９９】

本発明の方法の種々の実施形態では、干渉作用剤は、吸入によって、注射または経口的に、連続的に、毎日、１日当たり少なくとも１回（ＱＤ）、および種々の実施形態では、１日２回（ＢＩＤ）、１日３回（ＴＩＤ）、または、さらには１日４回、投与する。一般には、治療的に有効な１日用量は、少なくとも約１ｍｇ、または少なくとも約１０ｍｇ、または少なくとも約１００ｍｇ、または約２００ｍｇ～約５００ｍｇ、および時には、化合物に応じて、約１ｇ～約２．５ｇと同程度に至るまでである。

【０２００】

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

【０２０１】

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

【０２０２】

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

【０２０３】

いくつかの実施形態では、処置効果または予防効果を実現するために十分な有効量の組成物は、投与当たり体重１キログラム当たり約０．０００００１ｍｇから投与当たり体重１キログラム当たり約１０，０００ｍｇまでにわたる。投与量の範囲は、投与当たり体重１キログラム当たり約０．０００１ｍｇから投与当たり体重１キログラム当たり約１００ｍｇまでであることが適切である。投与は、初回投与、その後の１回または複数回の「ブースター」投与としてもたらすことができる。ブースター投与は、初回投与の１日後、２

日後、３日後、１週間後、２週間後、３週間後、１カ月後、２カ月後、３カ月後、６カ月後または１２カ月後にもたらすことができる。いくつかの実施形態では、ブースター投与は、前の投与に対する対象の応答を評価した後に投与される。

【０２０４】

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

【０２０５】

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

【０２０６】

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

【０２０７】

他の実施形態では、方法および組成物を、抗生薬および／または抗菌薬と組み合わせることもできる。抗菌薬とは、細菌、真菌、または原虫などの微生物を死滅させるまたはそれらの増殖を阻害する物質である。バイオフィルムは一般に、抗生薬の作用に対して耐性であるが、本明細書で説明される組成物および方法を用いて、バイオフィルムを伴う感染症を、感染症を処置するための従来の療法に対して感作することができる。他の実施形態では、抗生薬または抗菌薬を、本明細書で説明される方法および組成物と組み合わせて用いることにより、抗菌薬および／またはバイオフィルム低減剤の有効量を低減することが可能となる。本発明の方法との組合せに有用な抗菌薬および抗生薬についての一部の非限定的な例には、アモキシシリン、アモキシシリン－クラブラン酸、セフジニル、アジトロマイシン、およびスルファメトキサゾール－トリメトプリムが含まれる。バイオフィルム低減剤と組み合わされる抗菌薬および／または抗生薬の処置有効量は、従来の方法により容易に決定することができる。一部の実施形態では、バイオフィルム低減剤と組み合わされる抗菌薬の用量が、他の細菌感染症、例えば、感染症の病因がバイオフィルムを包含しない細菌感染症において有効であることが示されている平均有効用量である。他の実施形態では、用量が、平均有効用量の０．１、０．１５、０．２、０．２５、０．３０、０．３５、０．４０、０．４５、０．５０、０．５５、０．６０、０．６５、０．７０、０．７５、０．８、０．８５、０．９、０．９５、１．１、１．２、１．３、１．４、１．５、１．６、１．７、１．８、１．９、２．０、２．５、３．０、または５倍である。抗生薬または抗菌薬は、抗ＤＮＡＢＩＩ抗体を添加する前に付加することもでき、それと共時的に付加することもでき、その後で付加することもできる。

【０２０８】

他の実施形態では、方法および組成物を、細菌感染症を処置する抗体と組み合わせることもできる。本明細書で説明される方法および組成物と組み合わせるのに有用な抗体の一例は、非類縁外膜タンパク質（すなわち、ＯＭＰ　Ｐ５タンパク質）を指向する抗体であ

る。この抗体単独による処置は、ｉｎ　ｖｉｔｒｏにおいてバイオフィルムをデバルキングすることがない。この抗体と、バイオフィルム低減剤および/または抗菌薬とによる組合せ療法は、同じ濃度のいずれかの試薬を単独で用いることにより達成され得る効果より大きな効果を結果としてもたらす。バイオフィルム低減剤またはバイオフィルムを縮小させる方法と組み合わせて用いると相乗効果をもたらし得る他の抗体には、抗ｒｓＰｉｌＡ抗ＯＭＰ２６、抗ＯＭＰ　Ｐ２、および抗全ＯＭＰ抗体調製物が含まれる。

【０２０９】

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

【０２１０】

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

【０２１１】

キット

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

【０２１２】

例えば、キットは、単離されたもしくは組換え型の組込み宿主因子（ＩＨＦ）ポリペプチド、ポリヌクレオチドまたはそのそれぞれの断片もしくは等価物；表１、表２において同定される単離されたかまたは組換え型のタンパク質ポリペプチド、表２、表３、表４において同定されるＡｒｍ断片、図９において同定されるＤＮＡ結合性ペプチド、またはそのそれぞれの断片もしくは等価物；配列番号１～３３または３４１～３４８の単離されたもしくは組換え型のポリペプチド、ポリヌクレオチドまたはそのそれぞれの断片もしくは等価物；配列番号６～１１、２８、２９の単離されたもしくは組換え型のＣ末端のポリペプチド、または表１、表４において同定される単離されたもしくは組換え型のＣ末端のポリペプチド、またはそのそれぞれの断片もしくは等価物；微生物ＤＮＡへの結合について組込み宿主因子と競合するポリペプチド；ホリデイジャンクションと似ている４方向ジャンクションポリヌクレオチド、複製フォークと似ている３方向ジャンクションポリヌクレオチド、固有の柔軟性を有するポリヌクレオチドまたは屈曲したポリヌクレオチド；上記で言及したポリペプチドのうちの任意の１つをコードする、単離されたかまたは組換え型のポリヌクレオチド；上記で言及したポリペプチドのうちの任意の１つを特異的に認識する、またはそれに特異的に結合する抗体、またはその等価物もしくは断片；またはＤＮＡＢＩＩタンパク質またはＤＮＡＢＩＩポリペプチドの微生物ＤＮＡへの結合と競合する小分子の群のうちの任意の１つまたは複数の作用剤と、使用指示書とを含む場合もあり、あ

るいはそれから本質的になる場合もあり、さらにまたそれからなる場合もある。キットは、アジュバント、抗原性ペプチド、または抗菌薬のうちの１つまたは複数をさらに含み得る。キャリアの例には、液体のキャリア、薬学的に許容されるキャリア、固相のキャリア、薬学的に許容されるキャリア、薬学的に許容されるポリマー、リポソーム、ミセル、インプラント、ステント、ペースト、ゲル、歯科インプラント、または医療用インプラントが含まれる。

【０２１３】

ポリペプチド

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

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

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

（ｃ）表１、表２において同定される単離されたかまたは組換え型のタンパク質ポリペプチド、表２、表３、表４において同定されるＡｒｍ断片を含むかまたはそれからなるポリペプチド、あるいは図９において同定されるＤＮＡ結合性ペプチド、またはそのそれぞれの断片もしくは等価物、

（ｄ）配列番号１～３４８の単離されたかまたは組換え型のポリペプチド、またはその断片もしくは等価物、

（ｅ）配列番号６～１１、２８、２９、４２～１００、表１の単離されたかまたは組換え型のＣ末端のポリペプチド、または表４において同定されるＣ末端のポリペプチド、またはそのそれぞれの断片もしくは等価物、または

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

の群のものである。

【０２１４】

特定の一態様では、干渉作用剤は、単離されたかまたは組換え型のＤＮＡＢＩＩポリペプチド、またはそのそれぞれの断片もしくは等価物である。その非限定的な例は、ＩＨＦまたはＨＵのアルファポリペプチドまたはベータポリペプチド；ＩＨＦ αポリペプチド；Ｍｏｒａｘｅｌｌａ ｃａｔａｒｒｈａｌｉｓ ＨＵ；Ｅ．ｃｏｌｉ ＨｕｐＡ、ＨｕｐＢ、ｈｉｍＡ、ｈｉｍＤ；Ｅ．ｆａｅｃａｌｉｓ ＨＵ（例えば、Ｖ５８３など）、ＨＭＧＢ１および表１において同定されるものである。

【０２１５】

別の態様では、干渉作用剤は、配列番号１～５または１２～２７、３０～３５、１０１～３４０から選択されるアミノ酸配列または図９において同定されるＤＮＡ結合性ペプチドから本質的になる単離されたかまたは組換え型のポリペプチドである。

【０２１６】

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

【０２１７】

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

【０２１８】

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

【０２１９】
別の態様では、単離されたかまたは組換え型のポリペプチドは、配列番号１３、１５、１７、１９、２１、２３、２５、２７、３１、３３、３４、または３５を含む、あるいはそれから本質的になる、またはさらにそれからなるが、配列番号６～１１、２８、２９、または４２～１００のいずれでもない。
【０２２０】
別の態様では、単離されたかまたは組換え型のポリペプチドは、
配列番号１２および１３を含むポリペプチド、
配列番号１４および１５を含むポリペプチド、
配列番号１６および１７を含むポリペプチド、
配列番号１８および１９を含むポリペプチド、
配列番号２０および２１を含むポリペプチド、
配列番号２３および２４を含むポリペプチド、
配列番号２５および２６を含むポリペプチド、
配列番号３０および３１を含むポリペプチド、
配列番号３２および３３を含むポリペプチド、
配列番号３４および３５を含むポリペプチド、
配列番号３３７および３３８を含むポリペプチド、または
配列番号３３９および３４０を含むポリペプチド
からなる群の単離されたかまたは組換え型のポリペプチドを含む、またはそれから本質的になる、またはさらにそれからなるポリペプチドであって、ＩＨＦアルファ、ＩＨＦベータのうちの任意の１つの野生型または配列番号６～１１、２８、２９、または４２～１００のいずれでもない。
【０２２１】
別の態様では、単離されたかまたは組換え型のポリペプチドは、
配列番号１２および１３から本質的になるポリペプチド、
配列番号１４および１５から本質的になるポリペプチド、
配列番号１６および１７から本質的になるポリペプチド、
配列番号１８および１９から本質的になるポリペプチド、
配列番号２０および２１から本質的になるポリペプチド、
配列番号２３および２４から本質的になるポリペプチド、
配列番号２５および２６から本質的になるポリペプチド、
配列番号３０および３１から本質的になるポリペプチド、
配列番号３２および３３から本質的になるポリペプチド、
配列番号３４および３５から本質的になるポリペプチド、
配列番号３３７および３３８から本質的になるポリペプチド、または
配列番号３３９および３４０から本質的になるポリペプチド
からなる群の単離されたかまたは組換え型のポリペプチドであって、ＩＨＦアルファ、ＩＨＦベータのうちの任意の１つの野生型または配列番号６～１１、２８、２９、または４２～１００のいずれでもない。
【０２２２】
１つまたは複数の以下の配列を含む単離されたポリヌクレオチドまたはポリペプチドも本明細書中に提供する：

【数２】

TCTCAACGATTTA (配列番号341); WATCAANNNNTTR (ここで、WはA
またはTであり、Nは任意のヌクレオチドであり、RはAまたはGである; (配列番号342);
MATITKLDIIEYLSDKYHLS (本明細書中で、hIFA1ともいう; (配列番号343);
KYHLSKQDTKNVVENFLEEI (本明細書中でhIFA2ともいう; (配列番号344);
FLEEIRLSLESGQDVKLSGF (本明細書中でhIFA3ともいう; (配列番号345);
KLSGFGNFELRDKSSRPGRN (本明細書中でhIFA4ともいう; (配列番号346);
RPGRNPKTGDVVPVSARRVV (本明細書中でhIFA5ともいう; (配列番号347);
ARRVVTFKPGQKLRARVEKTK (本明細書中でhIFA6ともいう; (配列番号348)、

またはその等価物、またはこれらと少なくとも６０％、あるいは少なくとも６５％、あるいは少なくとも７０％、あるいは少なくとも７５％、あるいは８０％、あるいは少なくとも８５％、あるいは少なくとも９０％、あるいは少なくとも９５％同一であるか、ポリペプチド配列については、ポリヌクレオチドまたは高ストリンジェンシー条件下でかかるポリペプチド配列をコードするポリヌクレオチドにハイブリッド形成するその相補物によってコードされるポリヌクレオチドもしくはペプチド。高ストリンジェンシー条件を上に記載し、この条件は本明細書中で参考として援用される。出願人は、太字で下線を引いたアミノ酸が高度に保存されていることを確認しており、したがって、一態様では、これらのアミノ酸は等価なポリペプチドのデザインにおいて改変または変更されない。等価なポリペプチドのさらなる例としては、例えば、アミン末端上またはカルボキシ末端上のいずれか（または両方上）に２５まで、あるいは２０、あるいは１５、あるいは１０まで、あるいは５までの無作為なアミノ酸が付加された上記ポリペプチドからなるかこれを含むポリペプチドが含まれる。一態様では、単離されたポリペプチドを、１つまたは複数の検出可能な標識、キャリア（薬学的に許容され得るキャリアなど）、またはアジュバントと組み合わせる。

【０２２３】

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

【０２２４】

例えば、単離されたかまたは組換え型のポリペプチドは、配列番号１～５、１２～２７または３０～３３、または断片もしくは等価なポリペプチドのうちの任意の１つを含む、あるいはそれから本質的になる、またはさらにそれからなる。その例は、表１において同定される、または表２に示される、あるいは、Ａｒｍ断片は表２、表３または表４に同定される。一態様では、単離された野生型ポリペプチドは排除される、すなわち、ポリペプチドは、配列番号６～１１、２８、２９、または表１において同定されるまたは表２に示されている野生型配列のいずれでもない。

【０２２５】

一態様では、本発明は、配列番号１～５、１２～２７または３０～３５、１～６および１３～３５の群のアミノ酸配列から本質的になる単離されたかまたは組換え型のポリペプチド、またはＨａｅｍｏｐｈｉｌｕｓ ｉｎｆｌｕｅｎｚａｅ ＩＨＦαまたはＨａｅｍｏｐｈｉｌｕｓ ｉｎｆｌｕｅｎｚａｅ ＩＨＦβのβ－３断片および／またはα－３断片に対応するアミノ酸を含む、あるいはそれから本質的になる、またはさらにそれからなるポリペプチドを提供し、その非限定的な例としては、配列番号１２～２７、またはそのそれぞれの断片もしくは等価物が挙げられる。別の態様では、本発明は、配列番号１～４

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

【０２２６】

別の態様では、本発明は、配列番号１または２のみを含む、あるいはそれから本質的になる、またはさらにそれからなるか、Ｈａｅｍｏｐｈｉｌｕｓ　ｉｎｆｌｕｅｎｚａｅ　ＩＨＦ－αまたはＩＨＦβのβ－３断片および／またはα－３断片に対応するアミノ酸を含む、あるいはそれから本質的になる、またはさらにそれからなるポリペプチドと組み合わせた単離されたかまたは組換え型のポリペプチドを提供し、その非限定的な（ｏｎ－ｌｉｍｉｔｉｎｇ）例には配列番号１２～２７またはそのそれぞれの断片もしくは生物学的等価物が含まれる。一態様では、単離された野生型ＤＮＡ結合ポリペプチドが排除される。すなわち、ポリペプチドは、配列番号６～１１、２８、２９、４２～１００、表１に列挙されたか表２に示された単離されたポリペプチド配列ではない。

【０２２７】

なおさらなる態様では、本発明は、配列番号３または４またはそのそれぞれの断片もしくは等価物のみを含む、あるいはそれから本質的になる、またはさらにそれからなるか、Ｈａｅｍｏｐｈｉｌｕｓ　ｉｎｆｌｕｅｎｚａｅ　ＩＨＦ－αまたはＩＨＦβのβ－３断片および／またはα－３断片に対応するアミノ酸を含む、あるいはそれから本質的になる、またはさらにそれからなるポリペプチドと組み合わせた単離されたかまたは組換え型のポリペプチドを提供し、その非限定的な例には配列番号１２～２７および３４～３５またはそのそれぞれの生物学的等価物が含まれる。一態様では、単離された野生型ＤＮＡ結合ポリペプチドが排除される。すなわち、ポリペプチドは、配列番号６～１１、２８、２９、４２～１００、表１に列挙されたか表２に示された単離された野生型ポリペプチド配列ではない。

【０２２８】

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

【０２２９】

別の態様では、本発明は、配列番号１または２および３または４、またはそのそれぞれ

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

【０２３０】

一実施形態では、野生型ポリペプチドまたはＰｅｄｕｌｌａら（１９９６年）ＰＮＡＳ９３巻：１５４１１～１５４１６頁に開示されているものに対して配列同一性を有するポリペプチドまたはタンパク質はいずれも本発明から排除される。

【０２３１】

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

【０２３２】

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

【０２３３】

野生型ポリペプチドまたはタンパク質の機能的等価物または変異体、例えば、アミノ酸の保存されたアミノ酸置換を有するものも本発明の範囲内であることが理解される。例えば、表２を参照されたい。他の類似体としては、抗原提示マトリックスとつながったポリペプチドを含み得る本発明のタンパク質またはポリペプチドを含む融合タンパク質が挙げられる。

【０２３４】

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

【０２３５】

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

【０２３６】

タンパク質およびポリペプチドは、当業者に公知のいくつものプロセスによって得られ、そのプロセスとしては、精製、化学合成および組換え方法が挙げられる。ポリペプチドは、調製物、例えば、宿主細胞系などから、抗体を用いた免疫沈降などの方法、および標

準の技法、例えば、ゲル濾過、イオン交換、逆相クロマトグラフィー、およびアフィニティークロマトグラフィーなどによって単離することができる。そのような方法体系については、例えば、Ｄｅｕｔｓｃｈｅｒら（１９９９年）Ｇｕｉｄｅ Ｔｏ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ：Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ（１８２巻、Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ）を参照されたい。したがって、本発明は、これらのポリペプチドを得るためのプロセスならびにこれらのプロセスによって得ることができる生成物および得られた生成物も提供する。

【０２３７】

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

【０２３８】

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

【０２３９】

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

【０２４０】

本発明のペプチドを修飾して特性を変更することができることは当業者には周知である。本明細書で使用される場合、「アミノ酸」という用語は、天然アミノ酸および／または非天然アミノ酸または合成アミノ酸のいずれかを指し、グリシンおよびＤ光学異性体またはＬ光学異性体の両方、およびアミノ酸の類似体およびペプチド模倣薬を含める。３つ以上のアミノ酸のペプチドは、一般に、ペプチド鎖が短ければオリゴペプチドと称される。ペプチド鎖が長ければ、ペプチドは、一般に、ポリペプチドまたはタンパク質と称される。

【０２４１】

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

【０２４２】

本発明のポリペプチドは、種々の固相キャリア、例えば、インプラント、ステント、ペースト、ゲル、歯科インプラント、もしくは医療用インプラントなど、または液相キャリア、例えば、ビーズ、滅菌溶液または水溶液、薬学的に許容されるキャリア、薬学的に許容されるポリマー、リポソーム、ミセル、懸濁液およびエマルションなどと組み合わせることもできる。非水系の溶媒の例としては、プロピルエチレングリコール、ポリエチレン

グリコールおよび植物油が挙げられる。ｉｎ　ｖｉｖｏで抗体を調製するためまたは免疫応答を誘導するために使用する場合、キャリアは、特異的な免疫応答を非特異的に増大するために有用なアジュバントも含んでよい。当業者は、アジュバントが必要かどうかを容易に決定し、それを選択することができる。しかし、ただ単に例示する目的で、適切なアジュバントとしては、これらに限定されないが、フロイント完全アジュバントおよびフロイント不完全アジュバント、無機塩類およびポリヌクレオチドが挙げられる。他の適切なアジュバントとしては、モノホスホリルリピドＡ（ＭＰＬ）、Ｅ．ｃｏｌｉの熱に不安定なエンテロトキシンの変異体誘導体、コレラ毒素の変異体誘導体、ＣＰＧオリゴヌクレオチド、およびスクアレンに由来するアジュバントが挙げられる。

【０２４３】

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

【０２４４】

ポリヌクレオチド

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

【０２４５】

別の態様では、本発明は、ＤＮＡ　ＢＩＩポリヌクレオチドが微生物ＤＮＡに結合することを処置または阻害する、ならびにバイオフィルムの形成および関連する感染症および障害を処置、予防または阻害することができる、ホリデイジャンクションと似ている４方向のジャンクションポリヌクレオチド、複製フォークと似ている３方向のジャンクションポリヌクレオチド、固有の柔軟性を有するポリヌクレオチドまたは屈曲したポリヌクレオチドである干渉作用剤を提供する。当業者は、そのようなポリヌクレオチドを、本明細書において提供される情報および当業者の知見を用いて作出することができる。ＧｏｏｄｍａｎおよびＫａｙ（１９９９年）Ｊ．　Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ　Ｃｈｅｍ．　２７４巻（５２号）：３７００４～３７０１１頁およびＫａｍａｓｈｅｖおよびＲｏｕｖｉｅｒｅ－Ｙａｎｉｖ（２０００年）ＥＭＢＯ　Ｊ．　１９巻（２３号）：６５２７～６５３５頁を参照されたい。

【０２４６】

本発明は、さらに、ＲＮＡ転写のプロモーター、ならびにＤＮＡまたはＲＮＡの複製および／または一過性発現、または安定発現のための他の調節配列に作動可能に連結した単離されたかまたは組換え型のポリヌクレオチドを提供する。本明細書で使用される場合、「作動可能に連結した」という用語は、プロモーターが、ＤＮＡ分子からＲＮＡの転写を導くように位置づけられていることを意味する。そのようなプロモーターの例は、ＳＰ６、Ｔ４およびＴ７である。ある特定の実施形態では、挿入されたポリヌクレオチドを細胞特異的に発現させるために細胞特異的なプロモーターを使用する。プロモーターまたはプロモーター／エンハンサーを含有し、そのプロモーターに作動可能に連結することができる終結コドンおよび選択マーカー配列、ならびにＤＮＡの小片が挿入されたクローニング部位を伴うベクターは、当技術分野で公知であり、市販されている。一般的な方法体系およびクローニング戦略については、Ｇｅｎｅ　Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏ

ｇｙ（Ｇｏｅｄｄｅｌ編、Ａｃａｄｅｍｉｃ　Ｐｒｅｓｓ，　Ｉｎｃ．（１９９１年））およびそこで引用されている参照文献、ならびに種々の適切なベクターについてのマップ、機能的性質、商業的な供給者およびＧｅｎＥＭＢＬ受託番号の参照を含有するＶｅｃｔｏｒｓ：Ｅｓｓｅｎｔｉａｌ　Ｄａｔａ　Ｓｅｒｉｅｓ（ＧａｃｅｓａおよびＲａｍｊｉ編、Ｊｏｈｎ　Ｗｉｌｅｙ　＆　Ｓｏｎｓ、Ｎ．Ｙ．（１９９４年））を参照されたい。

【０２４７】

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

【０２４８】

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

【０２４９】

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

頁；およびＲｉｌｌ（１９９１年）Ｂｌｏｏｄ　７９巻（１０号）：２６９４～２７００頁）。

【０２５０】

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

【０２５１】

ポリヌクレオチドは、検出可能なマーカー、例えば、細胞における核酸および／または遺伝子の発現を検出するための酵素標識または放射性同位元素とコンジュゲートすることができる。検出可能なシグナルを生じることができる蛍光リガンド、放射性リガンド、酵素的リガンドまたは他のリガンド、例えば、アビジン／ビオチンなどを含めた多種多様な適切な検出可能なマーカーが当技術分野で公知である。一態様では、放射性試薬または他の環境的に望ましくない試薬の代わりに、蛍光標識または酵素タグ、例えば、ウレアーゼ、アルカリホスファターゼまたはペルオキシダーゼなどを使用することが望まれる可能性がある。酵素タグの場合では、熱量測定的指示基質を使用して、相補的な核酸含有試料との特異的なハイブリダイゼーションを同定するための、ヒトの眼による、または分光光度的な可視手段をもたらすことができる。したがって、本発明は、さらに、一本鎖のポリヌクレオチドまたはその相補物を、相補的な一本鎖のポリヌクレオチドのハイブリダイゼーションが可能になる条件下で（中程度にストリンジェントなハイブリダイゼーション条件であることが好ましい）、またはより好ましくは、高度にストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で、標的の一本鎖のポリヌクレオチドと本発明のポリヌクレオチドの一部である標識された一本鎖のポリヌクレオチド（プローブ）を接触させることによって検出するための方法を提供する。ハイブリダイズしたポリヌクレオチド対をハイブリダイズしていない一本鎖のポリヌクレオチドから分離する。ハイブリダイズしたポリヌクレオチド対は、当業者に公知の、例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋら（１９８９年）上記に記載の方法を使用して検出する。

【０２５２】

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

【０２５３】

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

ることができる。この方法によってポリヌクレオチドを得るためのプロセスならびにそうして得られたポリヌクレオチドがさらに本明細書において提供される。

【０２５４】

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

【０２５５】

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

【０２５６】

特異的なハイブリダイゼーションのために「完全に一致する」プローブは必要ないことが当技術分野では公知である。プローブ配列の軽微な変化は、ハイブリダイゼーションの特異性に影響を及ぼさない少数の塩基の置換、欠失または挿入によって実現される。一般に、２０％程度の塩基対のミスマッチ（最適にアラインメントした場合）が容認され得る。上述のｍＲＮＡを検出するために有用なプローブは、相同領域と少なくとも約８０％同一であることが好ましい。プローブは、相同な領域とアラインメントした後に、対応する遺伝子配列と８５％同一であることがより好ましい；プローブは９０％の同一性を示すことがさらに好ましい。

【０２５７】

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

【０２５８】

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

【０２５９】

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

のために、選択された配列を組換えベクターに導入することによって、容易に調製することができる。一態様では、プローブは、約５０～７５ヌクレオチドまたはそれ以上、あるいは、５０～１００ヌクレオチドの長さである。

【０２６０】

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

【０２６１】

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

【０２６２】

有効量の遺伝子送達ベクターまたはビヒクルを細胞に投与するための方法が開発されており、それは当業者に公知であり本明細書に記載されている。細胞における遺伝子発現を検出するための方法は当技術分野で公知であり、その方法としては、例えば、ＤＮＡマイクロアレイへのハイブリダイゼーション、ｉｎ　ｓｉｔｕハイブリダイゼーション、ＰＣＲ、ＲＮアーゼ保護アッセイおよびノーザンブロット分析などの技法が挙げられる。そのような方法は、細胞における遺伝子の発現を検出し、数量化するために有用である。あるいは、コードされるポリペプチドの発現は、種々の方法によって検出することができる。具体的には、標的ポリペプチドに特異的に応答するポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体を調製することが有用である。そのような抗体は、例えば、免疫組織学的方法、ＥＬＩＳＡ、およびウェスタンブロット法などの技法を用いてポリペプチドを発現している細胞を視覚化するために有用である。これらの技法を使用して、発現されたポリヌクレオチドの発現レベルを決定することができる。

【０２６３】

抗体およびそれらの誘導体

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

【０２６４】

抗体は、当技術分野において公知であり、文献中で十分に説明されている従来の技法を用いて産生することができる。ポリクローナル抗体を産生するには、いくつかの方法が存在する。例えば、ポリクローナル抗体は、ニワトリ、ヤギ、モルモット、ハムスター、ウ

マ、マウス、ラット、およびウサギなどであるがそれらに限定されない適切な哺乳動物を免疫化することにより産生することが典型的である。抗原を哺乳動物に注射すると、これが、Ｂリンパ球を誘導して、この抗原に特異的な免疫グロブリンを産生させる。免疫グロブリンは、哺乳動物の血清から精製することができる。ＩＨＦαおよびＩＨＦβに特異的な抗体は、ＩＨＦαおよびＩＨＦβの異なるエピトープに対応するポリペプチドを注射することにより産生することができる。例えば、抗体を、ＩＨＦαについてのＴＦＲＰＧＱＫＬＫＳＲＶＥＮＡＳＰＫＤＥ（配列番号３４）およびＩＨＦβについてのＫＹＶＰＨＦＫＰＧＫＥＬＲＤＲＡＮＩＹＧ（配列番号３５）などの各サブユニットの２０アミノ酸を使用して生成することができるか、あるいは１つまたは複数の以下の配列を含むポリヌクレオチドまたはペプチドを特異的に認識して結合する抗体であり得る：

【数３】

TCTCAACGATTTA (配列番号341); WATCAANNNNTTR (ここで、WはA
またはTであり、Nは任意のヌクレオチドであり、RはAまたはGである; (配列番号342);
MATIT**K**LDIIEYLSDKYHLS (本明細書中で、hIFA1ともいう ; (配列番号343);
KYHLSKQDTKNVVEN**FLEEI** (本明細書中でhIFA2ともいう ; (配列番号344);
FLEEIRLSLESGQD**VKLSGF** (本明細書中でhIFA3ともいう ; (配列番号 345);
KLSGFGNFELRDKSS**RPGRN** (本明細書中でhIFA4ともいう ; (配列番号 346);
RPGRNPKTGDVVPVSARRVV (本明細書中でhIFA5ともいう ; (配列番号 347);
ARRVVTFKPGQKLRARVEKTK (本明細書中でhIFA6ともいう ; (配列番号348)、

またはこれらと少なくとも６０％、あるいは少なくとも６５％、あるいは少なくとも７０％、あるいは少なくとも７５％、あるいは８０％、あるいは少なくとも８５％、あるいは少なくとも９０％、あるいは少なくとも９５％同一であるか、ポリペプチド配列については、ポリヌクレオチドまたは高ストリンジェンシー条件下でかかるポリペプチド配列をコードするポリヌクレオチドにハイブリッド形成するその相補物によってコードされるポリヌクレオチドもしくはペプチド。高ストリンジェンシー条件を上に記載し、この条件は本明細書中で参考として援用される。出願人は、太字で下線を引いたアミノ酸が高度に保存されていることを確認しており、したがって、一態様では、これらのアミノ酸は等価なポリペプチドのデザインにおいて改変または変更されない。等価なポリペプチドのさらなる例としては、例えば、アミン末端上またはカルボキシ末端上のいずれか（または両方上）に２５まで、あるいは２０、あるいは１５、あるいは１０まで、あるいは５までの無作為なアミノ酸が付加された上記ポリペプチドからなるかこれを含むポリペプチドが含まれる。さらなる例には、表２において同定されたポリペプチドを特異的に認識して結合する抗体が含まれる（本明細書中で参考として援用される）。この方法の変化形には、産生を最適化し、動物を人道的に取り扱うための、アジュバント、投与経路および投与部位、部位１カ所当たりの注射容量および動物１匹当たりの部位数の改変が含まれる。例えば、抗原に対する免疫応答を改善または増強するために、アジュバントを用いることが典型的である。大半のアジュバントは、注射部位における抗原貯留をもたらし、それにより、抗原の排出リンパ節内への緩徐な放出が可能となる。他のアジュバントには、タンパク質抗原分子の濃縮を広大な表面積にわたり促進する界面活性剤、および免疫賦活性分子が含まれる。ポリクローナル抗体を産生するためのアジュバントの非限定的な例には、フロイントによるアジュバント、Ｒｉｂｉアジュバント系、およびＴｉｔｅｒｍａｘが含まれる。ポリクローナル抗体は、当技術分野において公知の方法を用いて産生することができ、それらのうちの一部は、米国特許第７，２７９，５５９号；同第７，１１９，１７９号；同第７，０６０，８００号；同第６，７０９，６５９号；同第６，６５６，７４６号；同第６，３２２，７８８号；同第５，６８６，０７３号；および同第５，６７０，１５３号において説明されている。

【０２６５】
モノクローナル抗体は、当技術分野において公知であり、文献中で十分に説明されている従来のハイブリドーマ法を用いて産生することができる。例えば、ハイブリドーマは、適切な不死細胞株（例えば、Ｓｐ２／０細胞、Ｓｐ２／０－ＡＧ１４細胞、ＮＳＯ細胞、ＮＳ１細胞、ＮＳ２細胞、ＡＥ－１細胞、Ｌ．５細胞、Ｐ３Ｘ６３Ａｇ８．６５３細胞、Ｓｐ２　ＳＡ３細胞、Ｓｐ２　ＭＡＩ細胞、Ｓｐ２　ＳＳ１細胞、Ｓｐ２　ＳＡ５細胞、Ｕ３９７細胞、ＭＬＡ　１４４細胞、ＡＣＴ　ＩＶ細胞、ＭＯＬＴ４細胞、ＤＡ－１細胞、ＪＵＲＫＡＴ細胞、ＷＥＨＩ細胞、Ｋ－５６２細胞、ＣＯＳ細胞、ＲＡＪＩ細胞、ＮＩＨ　３Ｔ３細胞、ＨＬ－６０細胞、ＭＬＡ　１４４細胞、ＮＡＭＡＩＷＡ細胞、ＮＥＵＲＯ　２Ａ細胞、ＣＨＯ細胞、ＰｅｒＣ．６細胞、ＹＢ２／Ｏ細胞などであるがそれらに限定されない骨髄腫細胞株）など、あるいはヘテロ骨髄腫、これらの融合産生物、またはそれらに由来する任意の細胞もしくは融合細胞、あるいは当技術分野において公知の他の任意の適切な細胞株（以下のウェブアドレス、例えば、２００７年１１月２６日に最終アクセスされたａｔｃｃ．ｏｒｇ、ｌｉｆｅｔｅｃｈ．ｃｏｍ．における細胞株を参照されたい）を、単離されたかまたはクローニングされた脾臓細胞、末梢血細胞、リンパ球、扁桃腺細胞、または他の免疫細胞もしくはＢ細胞を含有する細胞、あるいは組換えまたは内因性のウイルス、細菌、藻類、原核生物、両生類、昆虫、爬虫類、魚類、哺乳動物、齧歯動物、ウマ、ヒツジ（ｏｖｉｎｅ）、ヤギ、ヒツジ（ｓｈｅｅｐ）、霊長動物、真核生物のゲノムＤＮＡ、ｃＤＮＡ、ｒＤＮＡ、ミトコンドリアＤＮＡもしくはミトコンドリアＲＮＡ、クロロプラストＤＮＡもしくはクロロプラストＲＮＡ、ｈｎＲＮＡ、ｍＲＮＡ、ｔＲＮＡ、一本鎖核酸、二本鎖核酸、または三本鎖核酸、ハイブリダイズした核酸など、あるいはそれらの任意の組合せの核酸としての内因性核酸または異種核酸としての、重鎖定常配列もしくは重鎖可変配列もしくは重鎖フレームワーク配列もしくは重鎖ＣＤＲ配列または軽鎖定常配列もしくは軽鎖可変配列もしくは軽鎖フレームワーク配列もしくは軽鎖ＣＤＲ配列を発現する他の任意の細胞などであるがそれらに限定されない抗体産生細胞と融合させることにより産生する。抗体産生細胞はまた、対象の抗原で免疫化したヒトまたは他の適切な動物の末梢血、または好ましくは脾臓もしくはリンパ節から得ることもできる。また、他の任意の適切な宿主細胞も、本発明の抗体、指定された断片、またはそれらの変異体をコードする異種核酸または内因性核酸を発現させるのに用いることができる。融合細胞（ハイブリドーマ）または組換え細胞は、選択培養条件または他の適切な公知の方法を用いて単離することができ、限界希釈法、もしくは細胞分取法、または他の公知の方法を介してクローニングすることができる。

【０２６６】
ペプチドライブラリーまたはタンパク質ライブラリー（例えば、バクテリオファージディスプレイライブラリー、リボソームディスプレイライブラリー、オリゴヌクレオチドディスプレイライブラリー、ＲＮＡディスプレイライブラリー、ｃＤＮＡディスプレイライブラリーなどであるがそれらに限定されないライブラリー；例えば、当技術分野において公知の方法を用いる、ＭｏｒｐｈｏＳｙｓ（Ｍａｒｔｉｎｓｒｅｉｄ／Ｐｌａｎｅｇｇ、Ｄｅｌ．）、ＢｉｏＩｎｖｅｎｔ（Ｌｕｎｄ、Ｓｗｅｄｅｎ）、Ａｆｆｉｔｅｃｈ（Ｏｓｌｏ、Ｎｏｒｗａｙ）など、各販売元から市販されているライブラリー）から組換え抗体を選択する方法が含まれるがそれらに限定されない、必須の特異性を有する抗体を産生または単離する他の適切な方法を用いることができる。当技術分野で公知の方法は、特許文献において説明されており、それらのうちの一部には、米国特許第４，７０４，６９２号；同第５，７２３，３２３号；同第５，７６３，１９２号；同第５，８１４，４７６号；同第５，８１７，４８３号；同第５，８２４，５１４号；同第５，９７６，８６２号が含まれる。代替的な方法は、トランスジェニック動物（例えば、ＳＣＩＤマウス；　Ｎｇｕｙｅｎら（１９７７年）、Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．　Ｉｍｍｕｎｏｌ．、４１巻：９０１～９０７頁（１９９７年）；Ｓａｎｄｈｕら（１９９６年）、Ｃｒｉｔ．　Ｒｅｖ．　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．、１６巻：９５～１１８頁；Ｅｒｅｎら（１９９８年）、Ｉｍｍｕｎｏｌ．、９３巻：１５４～１６１頁）の免疫化に依存し、それにより、当技術分野におい

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

【０２６７】

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

【０２６８】

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

【０２６９】

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

【０２７０】

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

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

【０２７１】

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

【０２７２】

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

【０２７３】

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

【０２７４】

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

【０２７５】

代替的に、本発明の抗体はまた、ベニア化抗体を創出するように修飾することもできる。ベニア抗体とは、第１の種の抗体が、第２の種において免疫原性とならず、それにより、この抗体の免疫原性を低減するように、１つの種の抗体の外部のアミノ酸残基を、第２の種の外部のアミノ酸残基で慎重に置換または「ベニア化」された抗体である。タンパク質の免疫原性は、主に、その表面の性質に依存するので、別の哺乳動物種の抗体中に通常見いだされる残基とは異なる露出残基を置換することによれば、抗体の免疫原性を低減し得るであろう。このように外部残基を慎重に置換すれば、内部ドメインまたはドメイン間の接合部にはほとんどまたは全く影響が及ばないはずである。したがって、可変領域のフ

レームワーク残基に限定される変更の結果として、リガンドの結合特性に影響が及ぶことはないはずである。変更するのは抗体の外面または皮膚だけであり、支持残基は攪乱されずに維持されるので、このプロセスを、「ベニア化」と称する。

【０２７６】

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

【０２７７】

「抗体誘導体」という用語はまた、２つの抗原結合部位を伴う小型の抗体断片であって、断片が、同じポリペプチド鎖内の軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）に連結された重鎖可変ドメイン（ＶＨ）を含む「ダイアボディー」も包含する（例えば、ＥＰ４０４，０９７；ＷＯ９３／１１１６１；およびＨｏｌｌｉｎｇｅｒら（１９９３年）、Ｐｒｏｃ． Ｎａｔｌ． Ａｃａｄ． Ｓｃｉ． ＵＳＡ、９０巻：６４４４～６４４８頁を参照されたい）。同じ鎖の２つのドメイン間における対合を可能とするには短すぎるリンカーを用いることにより、これらのドメインは、別の鎖の相補的ドメインと対合し、２つの抗原結合部位を創出することを余儀なくされる（また、１種または複数種のアミノ酸が親抗体の超可変領域内に挿入され、標的抗原に対する結合アフィニティーが、この抗原に対する親抗体の結合アフィニティーの少なくとも約２倍強い抗体変異体について開示する、Ｃｈｅｎらによる米国特許第６，６３２，９２６号も参照されたい）。

【０２７８】

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

【０２７９】

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

【０２８０】

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

【０２８１】

本発明の抗体には、天然の精製産生物、化学合成手順の産生物、ならびに、例えば、酵母、高等植物、昆虫、および哺乳動物細胞を含めた真核生物宿主に由来する組換え法、ま

たは、代替的に、上記で説明した原核生物宿主に由来する組換え法を介して産生される産生物が含まれる。ＢｉｒｃｈおよびＲａｄｎｅｒ（２００６年）、Ａｄｖ．　Ｄｒｕｇ　Ｄｅｌｉｖｅｒｙ　Ｒｅｖ．、５８巻：６７１～６８５頁では、多くの抗体産生系が説明されている。

【０２８２】

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

【０２８３】

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

【０２８４】

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

【０２８５】

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

【０２８６】

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

【０２８７】

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

【０２８８】

加えて、本発明の抗体を操作して、Ｆｃ領域内に、血清半減期、補体の結合、Ｆｃ受容体の結合、および／または抗原依存性細胞傷害作用など、抗体の１つまたは複数の機能的特性を変化させる修飾を包含させることもできる。このような修飾には、軽鎖および重鎖のアセンブリーを容易にする、または抗体の安定性を増大させる、もしくは減少させる、ヒンジ領域におけるシステイン残基数の変化（米国特許第５，６７７，４２５号）、ならびに抗体の生物学的半減期を短縮する、Ｆｃヒンジ領域におけるアミノ酸の変異（米国特許第６，１６５，７４５号）が含まれるがそれらに限定されない。

【０２８９】

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

【０２９０】

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

【０２９１】

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

【０２９２】

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

材料の例には、^{125}Ｉ、^{131}Ｉ、インジウム１１１、ルテチウム１７１、ビスマス２１２、ビスマス２１３、アスタチン２１１、銅６２、銅６４、銅６７、イットリウム９０、ヨウ素１２５、ヨウ素１３１、リン３２、リン３３、スカンジウム４７、銀１１１、ガリウム６７、プラセオジム１４２、サマリウム１５３、テルビウム１６１、ジスプロシウム１６６、ホルミウム１６６、レニウム１８６、レニウム１８８、レニウム１８９、鉛２１２、ラジウム２２３、アクチニウム２２５、鉄５９、セレン７５、ヒ素７７、ストロンチウム８９、モリブデン９９、ロジウム１０５、パラジウム１０９、プラセオジム１４３、プロメチウム１４９、エルビウム１６９、イリジウム１９４、金１９８、金１９９、および鉛２１１が含まれる。モノクローナル抗体は、これらの抗体に共有結合する二官能性のキレート化剤を用いることにより、放射性金属イオンと間接的にコンジュゲートすることができる。キレート化剤は、アミン（Ｍｅａｒｅｓら、１９８４年　Ａｎａｌ．　Ｂｉｏｃｈｅｍ．、１４２巻：６８～７８頁）、アミノ酸残基のスルフヒドラール基（Ｋｏｙａｍａ、１９９４年、Ｃｈｅｍ．　Ａｂｓｔｒ．、１２０巻：２１７２６２ｔ頁）、および炭水化物基（Ｒｏｄｗｅｌｌら、１９８６年、ＰＮＡＳ　ＵＳＡ、８３巻：２６３２～２６３６頁；Ｑｕａｄｒｉら、１９９３年、Ｎｕｃｌ．　Ｍｅｄ．　Ｂｉｏｌ．、２０巻：５５９～５７０頁）を介して結合させることができる。

【０２９３】

さらに、本発明の抗体またはそのフラグメントを、治療薬（例えば、Ｂｕｒｋｌｅｄｅｒｉａ感染の再発を処置または防止するであろう抗菌薬）にコンジュゲートすることができる。適切な治療薬には、セフタジジム、シプロフロキサシン、イミペネム、およびミノサイクリンが含まれる。

【０２９４】

追加的な適切なコンジュゲートされた分子には、リボヌクレアーゼ（ＲＮアーゼ）、ＤＮアーゼＩ、アンチセンス核酸、ｓｉＲＮＡ分子などの阻害性ＲＮＡ分子、免疫賦活性核酸、アプタマー、リボザイム、三重鎖形成分子、および外部ガイド配列が含まれる。アプタマーとは、ステムループまたはＧカルテットなど、規定の二次構造および三次構造へとフォールディングされる、１５～５０塩基の範囲の長さの低分子核酸であり、ＡＴＰ（米国特許第５，６３１，１４６号）およびテオフィリン（米国特許第５，５８０，７３７号）などの低分子のほか、逆転写酵素（米国特許第５，７８６，４６２号）およびトロンビン（米国特許第５，５４３，２９３号）などの高分子にも結合し得る。リボザイムとは、化学反応を分子内的にまたは分子間的に触媒することが可能な核酸分子である。リボザイムは、その後に切断される標的基質を認識し、それに結合することにより、核酸基質を切断することが典型的である。三重鎖形成機能を有する核酸分子は、三重鎖を形成することにより二本鎖核酸と相互作用する場合もあり、一本鎖核酸と相互作用する場合もあり、この場合、ＤＮＡの三本鎖は、ワトソン－クリックによる塩基対合およびフーグスティーンによる塩基対合の両方に依存して複合体を形成する。三重鎖分子は、高度なアフィニティーおよび特異性により、標的領域と結合し得る。

【０２９５】

機能性核酸分子は、標的分子により保有される特異的活性のエフェクター、阻害剤、調節剤、および刺激剤として作用する場合もあり、他の分子には依存しない新規の活性を保有する場合もある。

【０２９６】

利用可能な多数の方法のうちのいずれかを用いて、治療薬を、直接的にまたは間接的に、抗体に連結することができる。例えば、作用剤を、還元した抗体成分のヒンジ領域に、Ｎ－スクシニル　３－（２－ピリジルジチオ）プロピオネート（ＳＰＤＰ）などの架橋形成剤を用いるジスルフィド結合形成を介して結合させることもでき、抗体のＦｃ領域における炭水化物部分を介して結合させることもできる（Ｙｕら、１９９４年、Ｉｎｔ．　Ｊ．　Ｃａｎｃｅｒ、５６巻：２４４頁；Ｕｐｅｓｌａｃｉｓら、「Ｍｏｄｉｆｉｃａｔｉｏｎ　ｏｆ　Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ　ｂｙ　Ｃｈｅｍｉｃａｌ　Ｍｅｔｈｏｄｓ」、Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ　ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：　ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ　ａｎｄ　ａｐｐｌ

ｉｃａｔｉｏｎｓ、Ｂｉｒｃｈら（編）、１８７～２３０頁（Ｗｉｌｅｙ－Ｌｉｓｓ，Ｉｎｃ．、１９９５年）；Ｐｒｉｃｅ、「Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ｐｒｏｄｕｃｔｉｏｎ，ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ ａｎｄ ｃｌｉｎｉｃａｌ ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎ」内の「Ｐｒｏｄｕｃｔｉｏｎ ａｎｄ Ｃｈａｒａｃｔｅｒｉｚａｔｉｏｎ ｏｆ Ｓｙｎｔｈｅｔｉｃ Ｐｅｐｔｉｄｅ－Ｄｅｒｉｖｅｄ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ」、Ｒｉｔｔｅｒら（編）、６０～８４頁（Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｐｒｅｓｓ、１９９５年））。

【０２９７】

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

【０２９８】

本発明の抗体またはそれらの抗原結合領域は、別の抗体または受容体のリガンドなど、別の機能性分子に連結して、少なくとも２種以上の異なる結合部位または標的分子に結合する、二重特異性分子または多重特異性分子を産生することができる。抗体を、別の抗体、抗体断片、ペプチド、または結合模倣体など、１種または複数種の他の結合分子に連結することは、例えば、化学的連結、遺伝子融合、または非共有結合的会合を介して行うことができる。多重特異性分子は、第１および第２の標的エピトープに加えて、第３の結合特異性をさらに包含し得る。

【０２９９】

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

のヒンジ領域をスルフヒドリル結合させることにより、それらをコンジュゲートすることができる。

【０３００】

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

【０３０１】

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

【０３０２】

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

【実施例】

【０３０３】

以下の実施例は、本発明の例示を意図し、本発明を制限することを意図しない。

【０３０４】

実験手順

実験番号１

材料と方法

倫理に関する記述。Ｎａｔｉｏｎｗｉｄｅ Ｃｈｉｌｄｒｅｎ’ｓ Ｈｏｓｐｉｔａｌでの小児患者からの痰の採取前に、書面によるインフォームドコンセントおよび許可を、親または法的に委任された代表者から得た。この手順は、全ての施設および連邦政府のガイドラインに従い、Ｎａｔｉｏｎｗｉｄｅ Ｃｈｉｌｄｒｅｎ’ｓ Ｈｏｓｐｉｔａｌ，Ｃｏｌｕｍｂｕｓ，Ｏｈｉｏの施設内審査委員会によって承認されたプロトコールに従って実施した。

【０３０５】

ｉｎ ｖｉｔｒｏでのバイオフィルム形成。Ｂ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａ株（Ｋ５６－２株、ＤＦＡ２株、およびＪＲＬ２株が含まれる）を、凍結ストックからＬＢブロス（ＢＢＬ）中に播種し、２００ｒｐｍにて振とうしながら３７℃で一晩増殖させた。次いで、培養物を新鮮なブロスで１００倍希釈し、６００ｎｍでの光学密度を読み取り、１０６ ＣＦＵ Ｂ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａ／ｍｌ培地の最終濃度に調整した。細菌をＬＢブロスで２５００倍にさらに希釈し、２００μｌの細菌懸濁液をＬａｂＴｅｋ ＩＩ ８－ウェルチャンバーカバーガラス（ＬａｂＴｅｋ）の各ウェルに添加した。スライドを加湿雰囲気下にて３７℃で１６時間静置してインキュベートし、この時点で培地を吸引し、新鮮なＬＢブロスと置換した。さらに8時間後（総インキュベーション時間は２４時間）、バイオフィルムを、染色するか抗血清または抗生物質で処置した。アッセイを最低３回行った。

【０３０６】

Ｂ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａバイオフィルム内のＩＨＦおよびＤＮＡの分布。Ｂ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａ株によって形成されたバイオフィルム内のＩＨＦの相対分布を試験するために、２４時間非固定バイオフィルムを、ナイーブウサギ血清またはウサギ抗Ｅ．ｃｏｌｉ ＩＨＦ（Ｇｏｏｄｍａｎら（２０１１）Ｍｕｃｏｓａｌ Ｉｍｍｕｎｏｌ．４：

６２５－６３７）とインキュベートし、ＡｌｅｘａＦｌｕｏｒ　５９４（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）にコンジュゲートしたヤギ抗ウサギＩｇＧを使用して明らかにした。バイオフィルム内のＤＮＡを、抗ｄｓＤＮＡ抗体（Ａｂｃａｍ，Ｉｎｃ．）で染色し、ＡｌｅｘａＦｌｕｏｒ　６４７（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｐｒｏｂｅｓ）にコンジュゲートしたヤギ抗マウスＩｇＧを使用して明らかにした。インタクトな細菌細胞を、製造者の説明書に従って膜染料ＦｉｌｍＴｒａｃｅｒ（商標）ＦＭ（登録商標）１－４３　Ｇｒｅｅｎ　Ｂｉｏｆｉｌｍ　Ｓｔａｉｎ（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｐｒｏｂｅｓ）を使用して染色した。６３Ｘ対物レンズを使用したＺｅｉｓｓ　５１０　ｍｅｔａ－レーザー走査型共焦点顕微鏡（Ｃａｒｌ　Ｚｅｉｓｓ）を使用して画像を収集した。ＡｘｉｏＶｉｓｉｏｎ　Ｒｅｌ．４．８（Ｃａｒｌ　Ｚｅｉｓｓ）を使用して三次元画像を再構築した。

【０３０７】

Ｂ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａによって形成された２４時間バイオフィルム中のｅＤＮＡの相対存在量を決定するために、ＤＮＡ－細菌比を、ＦｉｌｍＴｒａｃｅｒ（商標）に対する抗ｄｓＤＮＡ標識の相対蛍光強度を比較するＺｅｉｓｓ画像収集ソフトウェアを使用して決定した。分類不能型Ｈａｅｍｏｐｈｉｌｕｓ　ｉｎｆｌｕｅｎｚａｅによって形成されたバイオフィルムも確立し（Ｇｏｏｄｍａｎら（２０１１）Ｍｕｃｏｓａｌ　Ｉｍｍｕｎｏｌ．４：６２５－６３７；Ｊｕｒｃｉｓｅｋら（２０１１）Ｊ．Ｖｉｓ．Ｅｘｐ．）、同様に染色した。

【０３０８】

ヒト痰内のＩＨＦの分布。ヒト痰を使用してＩＨＦ標識を視覚化するために、痰サンプルを３人のＣＦ小児患者から採取し、このサンプルは、承認されたＩＲＢプロトコール下でＢ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａについて陽性の培養物でもあった。痰をＯＣＴコンパウンド（Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）に包埋し、液体窒素の気相中で瞬間凍結した。１０ミクロンの連続切片に切断し、スライドガラスに接着させた。スライドを風乾し、冷アセトン中で固定し、０．０５Ｍ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、０．１５Ｍ　ＮａＣｌ、および０．０５％Ｔｗｅｅｎ２０（ｐＨ７．４）を含む緩衝液中で平衡化し、次いで、ｉｍａｇｅ－ｉＴ　ＦＸ　ｓｉｇｎａｌ　ｅｎｈａｎｃｅｒ（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｐｒｏｂｅｓ）およびＢａｃｋｇｒｏｕｎｄ　Ｓｎｉｐｅｒ（ＢｉｏＣａｒｅ　Ｍｅｄｉｃａｌ）を使用してブロッキングした。切片をポリクローナル抗体抗ＩＨＦまたはナイーブウサギ血清とインキュベートし、ヤギ抗ウサギＩｇＧ－Ａｌｅｘａｆｌｕｏｒ　５９４（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を使用して明らかにした。ＤＮＡを、ＤＡＰＩ含有Ｐｒｏｌｏｎｇ　Ｇｏｌｄ褪色防止用封入剤（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｐｒｏｂｅｓ）を使用して対比染色した。前述のように画像を観察した。

【０３０９】

確立されたＢ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａバイオフィルムの分解。抗血清がｉｎ　ｖｉｔｒｏで形成されたバイオフィルムを分解する能力を評価するために、２４時間バイオフィルムを、記載のようにＫ５６－２株を使用して最初に確立し、次いで、ＬＢブロスで５０倍希釈したナイーブウサギ血清またはウサギ抗Ｅ．ｃｏｌｉ　ＩＨＦ、またはＬＢブロスのみのいずれかに１６時間暴露した。次いで、バイオフィルムを、以前に記載のように（Ｊｕｒｃｉｓｅｋら（２０１１）Ｊ．Ｖｉｓ．Ｅｘｐ．）顕微鏡法のためのＬＩＶＥ／ＤＥＡＤ（登録商標）ＢａｃＬｉｇｈｔ（商標）Ｂａｃｔｅｒｉａｌ　Ｖｉａｂｉｌｉｔｙキット（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｐｒｏｂｅｓ）を使用して染色し、次いで、１６％パラホルムアルデヒド－２．５％グルタルアルデヒド－４％酢酸を含む０．２Ｍリン酸緩衝液の溶液（ｐＨ７．４）で固定後、直ちに前に記載のように共焦点顕微鏡法によって画像化した。平均厚さおよび平均バイオマスを、ＣＯＭＳＴＡＴ２分析によって定量した（Ｈｅｙｄｏｒｎら（２０００）Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌｏｇｙ　１４６（Ｐｔ　１０）：２４０９－２４１５）。ナイーブ血清および免疫ウサギ血清を適用しても細胞死が誘導されなかったことを確認するためのさらなる基準として、プランクトン様およびバイオフィルム接着性Ｂ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａの両方を処置１６時間後に回収し、フローサイトメトリー用のＬＩＶＥ／ＤＥＡＤ（登録商標）ＢａｃＬｉｇｈｔ（商標）Ｂａｃｔｅｒｉａｌ　Ｖｉ

ａｂｉｌｉｔｙ ａｎｄ Ｃｏｕｎｔｉｎｇキット（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｐｒｏｂｅｓ）を使用して非固定細胞を染色し、Ｃ６補正フローサイトメーター（Ａｃｃｕｒｉ）を使用して生細菌と死細菌とを区別した。アッセイを最低３回行った。

【０３１０】

全血清由来のＩｇＧの富化。バイオフィルム分解が抗体によって媒介されたが、他の血清成分によって媒介されなかったことを確認するために、ＩｇＧを、製造者の説明書にしたがってＨｉＴｒａｐ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｇ ＨＰカラム（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）を使用してウサギ抗ＩＨＦ血清から精製し、血清の適用後にカラムを通過した溶離液およびＩｇＧ富化画分の両方を回収した。抗ＩＨＦおよびＩｇＧ富化抗ＩＨＦがＢ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａ Ｋ５６－２株によって発現された未変性ＩＨＦに加えて精製ＩＨＦを認識したことを証明するために、ＳＤＳ－ＰＡＧＥおよびウェスタンブロッティングを行った。簡潔に述べれば、０．５μｇ精製ＩＨＦ（［２５］；Ｈｏｗａｒｄ Ｎａｓｈ，ＮＩＨから授与）および５μｇのＢ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａのホールセルライセートを、Ｔｒｉｓ／グリシン／ＳＤＳ緩衝液（ＢｉｏＲａｄ）含有４～１５％Ｍｉｎｉ－ＰＲＯＴＥＡＮ ＴＧＸゲル（ＢｉｏＲａｄ）上で分離し、次いで、ニトロセルロース膜（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）に移した。膜を、３％スキムミルクを含む０．５％Ｔｗｅｅｎ２０含有Ｔｒｉｓ緩衝化生理食塩水（Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）中にて４℃で一晩ブロッキング後、ウサギ抗ＩＨＦまたはＩｇＧ富化抗ＩＨＦ、その後にヤギ抗ウサギＩｇＧ－ＨＲＰ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）とインキュベートした。ＣＮ／ＤＡＢ基質キット（Ｐｉｅｒｃｅ）を使用してブロットを発色させ、ＢｉｏＲａｄ ＧＳ８００デンシトメーターを使用して画像をキャプチャーした。

【０３１１】

バイオフィルム分解における抗ＩＨＦおよび抗生物質の相乗効果。

Ｂ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａ Ｋ５６－２株によって形成されたバイオフィルムに適用した場合のＩＨＦに指向する抗血清と組み合わせた抗生物質の相乗効果の試験には、Ｂ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａ Ｋ５６－２株のプランクトン様培養物のためのいくつかの抗生物質の最小阻止濃度（ＭＩＣ）を決定することが必要であった。そのためには、１００ＣＦＵのＢ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａを、以下の抗生物質の２倍系列希釈物を含むＬＢブロスに播種した：セフタジジム、シプロフロキサシン、イミペネム、メロペネム、ミノサイクリン、スルファメトキサゾール－トリメトプリム、またはトブラマイシン（Ｓｉｇｍａ）。培養物を２４時間静置してインキュベートし、培養物の濁度を評価した。プランクトン様Ｂ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａのＭＩＣを、細菌増殖が認められない抗生物質の濃度として同定した。この情報を使用して、確立されたＢ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａバイオフィルムを、抗ＩＨＦの５０倍希釈物、決定したＭＩＣの抗生物質、抗ＩＨＦ＋抗生物質、または培地のみで１６時間処置後、ＬＩＶＥ／ＤＥＡＤ（登録商標）ＢａｃＬｉｇｈｔ（商標）Ｂａｃｔｅｒｉａｌ Ｖｉａｂｉｌｉｔｙキットを使用して生存度染色を行い、前に記載のように共焦点顕微鏡法によって視覚化した。以下の抗生物質濃度を使用した：セフタジジム－１６μｇ／ｍｌ、シプロフロキサシン－２μｇ／ｍｌ、イミペネム－３２μｇ／ｍｌ、メロペネム－１６μｇ／ｍｌ、ミノサイクリン－４μｇ／ｍｌ、スルファメトキサゾール－トリメトプリム－１６μｇ／ｍｌ、およびトブラマイシン－５１２μｇ／ｍｌ。平均厚さおよび平均バイオマスを、ＣＯＭＳＴＡＴ２分析によって定量した。アッセイを最低３回行った。

【０３１２】

確立されたバイオフィルムのプルモザイム（登録商標）での処置。確立されたＢ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａ Ｋ５６－２株バイオフィルムのプルモザイム（登録商標）（ドルナーゼアルファ；Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈ，Ｉｎｃ．）での処置の結果を試験するために、確立されたバイオフィルムを、抗ＩＨＦの５０倍希釈物、０．２５ｍｇのプルモザイム（登録商標）、抗ＩＨＦ＋プルモザイム（登録商標）、または培地のみで１６時間処置後、生存染色を行い、共焦点顕微鏡法によって視覚化した。平均厚さおよび平均バイオマスを、ＣＯＭＳＴＡＴ２分析によって定量した。アッセイを最低３回行った。

【０３１３】
マクロファージ内のＢ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａ生存に及ぼす抗ＩＨＦ抗体の影響。ゲンタマイシン感受性を付与する抗生物質排出ポンプの変異を有するが、マクロファージ中の変異体の輸送を変化させないＢ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａ　ＭＨＫ１株（Ｈａｍａｄら（２０１０）Ａｐｐｌ．Ｅｎｖｉｒｏｎ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．７６：３１７０－３１７６）を本アッセイのために使用した。ＭＨＫ１株を上記のように培養し、次いで、１０００倍希釈の濃度のナイーブ血清または抗ＩＨＦ血清で１５分間処置した。次いで、処置したＢ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａをネズミ骨髄由来マクロファージに１時間添加した。細胞外細菌を死滅させるために、１０％熱失活ＦＢＳ（ＧＩＢＣＯ）および５０μｇゲンタマイシン／ｍｌ（ＧＩＢＣＯ）を含むＩｓｃｏｖｅ培地（ＧＩＢＣＯ）を３０分間添加した。感染から２、４、および６時間後にマクロファージを溶解し、ライセートをプレートしてＣＦＵ　Ｂ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａ／ｍｌを決定した。アッセイを最低３回行った。

【０３１４】
ＤＮアーゼフットプリント実験。３８６ｂｐのＢＣＡＬ０３３９およびＢＣＡＬ０３４０由来の上流ＤＮＡを、ＰＣＲ反応によって増幅した。同位体で末端標識した（３２Ｐ）アンプリコンを、結晶学的に純粋なＥ．ｃｏｌｉ　ＩＨＦとの結合反応（Ｒｉｃｅら（１９９６）Ｃｅｌｌ　８７：１２９５－１３０６；Ｈｏｗａｒｄ　Ｎａｓｈ，ＮＩＨからの譲渡）で使用し、その後にＤＮアーゼＩフットプリントアッセイ（Ｈｕｎｇら（２０１１）Ｊ．Ｂａｃｔｅｒｉｏｌ．１９３：３６４２－３６５２）で使用した。

【０３１５】
統計学的方法。平均バイオフィルム厚さおよび平均バイオマスならびにマクロファージ結合アッセイにおける有意差を決定するために、対応のある２標本ｔ検定を、ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｐｒｉｓｍソフトウェア、バージョン６．００を使用して行った。

【０３１６】
結果
ｉｎ　ｖｉｔｒｏでＢ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａによって形成されたバイオフィルム中の豊富な細胞外ＤＮＡ（ｅＤＮＡ）の存在の証拠。ｉｎ　ｖｉｔｒｏで形成された場合のＢ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａバイオフィルムの基本構造を最初に特徴づけるために、Ｂ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａ　Ｋ５６－２株をチャンバースライド中で２４時間静置にて増殖させた後、ＦｉｌｍＴｒａｃｅｒ　ＦＭ　１－４３で標識した。図１Ａに示すように、Ｂ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａは、特徴的な塔状の高さおよそ２６μｍの頑強なバイオフィルムを形成した。ここでＢ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａがそのバイオフィルムマトリックス内にＤＮＡを組み込んだかどうかを決定するために、非固定バイオフィルムをモノクローナル抗体で標識してｄｓＤＮＡの存在（白色）を検出した。形成されたバイオフィルムは大量のｅＤＮＡを含んでおり、このｅＤＮＡはバイオフィルムの底部で特に密度が高く（図１Ｂ）、このマトリックス成分がバイオフィルム発生の初期における細菌の接着および係留で必須の役割を果たし得ることが示唆された。興味深いことに、視覚的に明らかであるが、Ｂ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａバイオフィルムおよび分類不能型Ｈａｅｍｏｐｈｉｌｕｓ　ｉｎｆｌｕｅｎｚａｅ（ＮＴＨＩ）によって形成されたバイオフィルムの両方のさらなるＣＯＭＳＴＡＴ分析（データ示さず）、その後の同一の様式での標識および個別のレーザーチャネル（細菌およびＤＮＡを検出するため）の使用により、より客観的な様式でＢ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａがこのさらなる重要なヒト気道病原体よりもそのバイオフィルム内への細菌細胞あたりのｅＤＮＡの組込みがおよそ３０％高いことが確認された（Ｊｕｒｃｉｓｅｋら（２００７）Ｊ．Ｂａｃｔｅｒｉｏｌ．１８９：３８６８－３８７５）。

【０３１７】
Ｂ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａによって生成されたバイオフィルム内のＤＮＡＢＩＩタンパク質の証明。Ｂ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａ　Ｋ５６－２株によって形成されたバイオフィルムがＤＮＡＢＩＩタンパク質ファミリーのメンバーを含んでいたかどうかを決定するために、Ｂ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａ　Ｋ５６－２株によってｉｎ　ｖｉｔｒｏで形成さ

れたバイオフィルムをウサギ抗ＩＨＦ抗体（複数のＤＮＡＢＩＩファミリーメンバーと交差反応するＥ．ｃｏｌｉ　ＩＨＦに対する抗血清（Ｇｏｏｄｍａｎら（２０１１）Ｍｕｃｏｓａｌ　Ｉｍｍｕｎｏｌ．４：６２５－６３７））とインキュベートし、バイオフィルム全体の標識を観察した（図１Ｃ）。

【０３１８】

ここでｉｎ　ｖｉｔｒｏでの所見がＣＦ患者の臨床症状に関連していたかどうかを評価し、同様に、ＮＴＨＩ（２０）で認められるように、Ｂ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａによって形成されたバイオフィルム内に存在するｅＤＮＡ鎖の交点にＩＨＦが位置したかどうかを決定するために、Ｂ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａ感染が既知のＣＦ患者から痰サンプルを得た。サンプルを瞬間凍結し、同一の抗ＩＨＦ抗体を使用して免疫標識した。発明者らは、今まで回収された痰サンプルの３／３（１００％）で強い標識を認めた。特に、これらのサンプル内に存在する重複ｄｓＤＮＡ鎖によって形成された交点の実質的に１００％で特異的標識が認められた（図２）。Ｂ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａ産生バイオフィルムのＥＰＳマトリックス内に存在する大量のｅＤＮＡおよびＩＨＦがこのマトリックス内に決定的に存在するようであるといいう事実を考慮すると、介入のためにこのタンパク質をターゲティングすることによりバイオフィルムの構造が崩壊し得るということが言えた。この崩壊が起こった場合、免疫エフェクター、抗生物質、または他の治療薬のＥＰＳによって以前に保護された細菌へのアクセスを非常に容易にし、したがってその根絶を促進し得るとさらに推論された。

【０３１９】

抗ＩＨＦがｉｎ　ｖｉｔｒｏでＢ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａによって形成されたバイオフィルムを破壊する能力の証明。これらの仮説の１つを試験するために、Ｂ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａ　Ｋ５６－２株の２４時間バイオフィルムを、培地（図３Ａ）、ナイーブウサギ血清（５０倍希釈）（図３Ｂ）、またはウサギ抗ＩＨＦ血清（任意に選択した５０倍希釈物）（図３Ｃ）のいずれかで処置した。インキュベーション２４時間後、これらのバイオフィルムを、ＣＯＭＳＴＡＴソフトウェアによって分析し、ナイーブウサギ血清での処置によりバイオフィルム厚さは小さく且つ統計的に有意でない変化があったが、平均バイオマスは滅菌培地を使用した場合に認められる平均バイオマスを超える効果はなかったことが見出された（図３Ｇおよび３Ｈ）。この効果は、複数のグラム陰性細菌の外膜タンパク質と交差作用する全ウサギ血清内の非特異的抗体に寄与する。しかし、逆に、ＩＨＦに指向する抗血清での処置により、ナイーブ血清と比較して、厚さが４４％減少し、バイオマスが５６％減少し、高さが５２％減少した。これらの後者の効果は、滅菌培地またはナイーブ血清のいずれかの使用と比較して統計的に有意であった（図３Ｇおよび３Ｈ）。ＩＨＦに指向する抗血清での処置では常在細菌は死滅せず、したがってバイオフィルムの破壊が認められたことを説明するために、処置後、本発明者らは培養培地内に含まれる細菌のプランクトン様亜集団およびバイオフィルム内に残存する細菌亜集団の両方を回収し、両調製物をフローサイトメトリーによる分析に供して生細菌の死滅細菌に対する相対比を決定した。使用した処置と無関係に、本発明者らは、プランクトン様亜集団内の細菌の８０％以上およびバイオフィルム内に残留している細菌の９３％以上が生存していることを見出した。この結果は、抗ＩＨＦでの処置がプランクトン様相内への生細菌の放出を媒介していることを示唆していた。

【０３２０】

ウサギ抗ＩＨＦ血清での処置の際に認められるバイオフィルム破壊活性が主にこのポリクローナルであるが過免疫の血清中のＩＨＦに指向するＩｇＧ抗体に起因することを証明するために、本発明者らは方法（上記）に記載のようにこのＩｇＧの血清を富化し、次いで、ＩｇＧが富化した画分（図３Ｄ）およびカラムを通過した血清画分（図３Ｅ）の両方を、予め形成されたＢ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａバイオフィルムを破壊する相対能力についてアッセイした。図３Ｄおよび３Ｅで認められ、３Ｇおよび３Ｈに描画されるように、ＩｇＧ富化抗血清調製物は全ウサギ抗ＩＨＦの活性を保持していたが、濃縮カラム由来の溶出物はバイオフィルムを同様に破壊する能力はなかった。ウェスタンブロットを行って

、全抗ＩＨＦ血清内およびＩｇＧが富化した画分内の両方に含まれる抗体が精製ＩＨＦタンパク質ならびにＢ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａ　Ｋ５６－２株のホールセルライセート内のこのタンパク質の単量体型、二量体型、および三量体型を認識することが証明され（図３Ｆ）；ＤＮＡＢＩＩファミリーメンバーであるＰＧ０１２１（Ｐｏｒｐｈｙｒｏｍｏｎａｓ　ｇｉｎｇｉｖａｌｉｓ由来のＨＵβ）もＳＤＳ　ＰＡＧＥ中に多量体を維持する能力を示す（Ｓ．Ｇｏｏｄｍａｎ，私信）。

【０３２１】

抗ＩＨＦと伝統的な抗生物質との間の相乗的相互作用の証明。抗ＩＨＦ媒介性バイオフィルム破壊が常在細菌を他の既存の潜在的治療薬での処置により感受性を示すようにすることができるかどうかを確認するために、予め形成されたＢ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａバイオフィルムを、７つの各抗生物質（実験手順に記載のようにそれぞれのプランクトン様に増殖したＢ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａ　Ｋ５６－２株の所定のＭＩＣを使用）に単独または抗ＩＨＦ血清（５０倍希釈）と組合せて暴露した。図４（例としてセフタジジム（１６μｇ／ｍｌで）とのインキュベーションを使用）に示すように、抗ＩＨＦでの処置（図４Ｄ）によってバイオフィルムの高さ、厚み、およびバイオマスが未処置バイオフィルム（図４Ａ）よりも減少したのに対して、これらの処置では大量の細菌細胞死を誘導しなかった（図４ＢおよびＥ）。さらに、抗生物質処置のみではＢ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａ誘導性バイオフィルムに及ぼす観察可能な影響はほとんどなく（図４Ｇ）、細菌細胞死は滅菌培地または抗ＩＨＦのみのいずれかでの処置後に認められた細菌細胞死より増加した一方で、この影響は最小であった（図４Ｈ）。しかし、共に使用した場合、抗生物質を単独で使用した場合より高さの４３％減少（図４Ｊ）および細菌細胞死（赤色／橙色で示される）の自明且つ顕著な減少（図４Ｋ）が認められ（図４ＨとＫとを比較のこと）、抗ＩＨＦとセフタジジムとの間の相乗的相互作用が示唆された。抗ＩＨＦ＋抗生物質での処置と抗生物質のみでの処置との間の平均バイオフィルム高さ（図４Ｍ）およびバイオマス（図４Ｎ）の有意な減少は、シプロフロキサシン＋抗ＩＨＦ、イミペネム＋抗ＩＨＦ、およびミノサイクリン＋抗ＩＨＦでのＢ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａバイオフィルムの処置後に同様に得られた（ｐ＜０．０５）。

【０３２２】

プルモザイム（ＤＮアーゼ）の使用はＢ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａ感染したＣＦ患者に禁忌であり得ることの証明。ＤＮアーゼでの処置は、ＣＦ患者ケアの標準として使用されており、Ｂ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａが大量のｅＤＮＡをそのバイオフィルム内に組み込むことを考慮して、本発明者らは、本発明者らがＮＴＨＩを用いて以前に示したように（Ｇｏｏｄｍａｎら（２０１１）Ｍｕｃｏｓａｌ　Ｉｍｍｕｎｏｌ．４：６２５－６３７）、ＤＮアーゼと組み合わせた抗ＩＨＦの使用はｉｎ　ｖｉｔｒｏでのＢ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａ誘導性バイオフィルム内の細菌の減量および根絶に関して潜在的に相乗効果も有すると仮定した。しかし、これは真実ではなかった。実際、複数回繰り返したアッセイにおいて、Ｂ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａバイオフィルムのＤＮアーゼへの暴露によって希釈物のみでの処置（図５Ａ）より平均厚さに関して有意により頑強なバイオフィルムが誘導された（図５ＢおよびＤ）。これらのＤＮアーゼ処置したバイオフィルムは、最大高さがわずかにのみ増加したが（３２μｍと２８μｍとを比較のこと）、表面－体積比の平均増加は１２％であった。バイオマスの平均増加は１７４％であり、平均厚さについて比較した場合、ＤＮアーゼで処置したＢ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａによって形成されたバイオフィルムの厚さは希釈物のみで処置したＢ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａによって形成されたバイオフィルムより２０４％厚かった。ＩＨＦに指向する抗血清はこれらの増強されたバイオフィルムを依然として有効に減少させることができたのに対して（図５Ｃ、ＤおよびＥ）、ＤＮアーゼのみを用いて得られた予想外の結果を考慮して、潜在的な相乗的使用についてのこの一連の調査を追求すると直感に反するようになった。重要なことに、ＤＮアーゼの反復使用がその疾患を実際に悪化させ、これらの患者が被る非常に不良な臨床成績に寄与し得るので、この結果はＢ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａ感染したＣＦ患者において有意に有望な臨床上の意義を有する。

【０３２３】
ナイーブ血清ではなくＤＮＡＢＩＩタンパク質に指向する抗体とのＢ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａのインキュベーションによりマクロファージからの細菌回収が減少したことの証明。Ｂ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａは、ネズミおよびヒトのＣＦマクロファージ内で持続および複製することができる。しかし、ＷＴネズミマクロファージまたは非ＣＦ患者由来のマクロファージは、分解のためのリソソームへの生物の輸送によってＢ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａ感染を制限する。尿路病原性Ｅ．ｃｏｌｉに関連するＩＨＦがこの細菌の膀胱に効率的にコロニー形成する能力に影響を及ぼすことが最近証明されたことを考慮して（Ｊｕｓｔｉｃｅら（２０１２）ＰＬｏＳ　Ｏｎｅ　７：ｅ４８３４９）、ＣＦ肺からの細菌のクリアランスにおけるこの宿主細胞の重要性を考慮して、本発明者らはＢ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａのＩＨＦに指向する抗血清とのインキュベーションがマクロファージとのその相互作用に影響を及ぼし得ると考えた。ゲンタマイシン感受性が導入されたＫ５６－２株のバリアント（ＭＨＫ１株）を使用して、（ゲンタマイシン処置による細胞外細菌の死滅後の）Ｂ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａの細胞内増幅数を決定した。感染２時間後のマクロファージ関連Ｂ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａ数がナイーブ血清での予備処置と抗ＩＨＦ血清（１０００倍希釈）での予備処置との間で有意に異ならず、この時点でのマクロファージによる等価な取り込みが示唆されたのに対して、感染６時間後までに抗ＩＨＦ血清で予備処置されたＢ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａはＣＦマクロファージ内での増殖を有意に妨害された（ｐ＜０．０５）（図６）。したがって、Ｂ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａの抗ＩＨＦでの予備処置はＣＦマクロファージによるそのクリアランスを促進したが、この所見の根底にある機構は依然として決定されず、進行中の研究における対象である。

【０３２４】
Ｔ３ＳＳまたはＴ６ＳＳのＢ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａバイオフィルムマトリックス内へのＤＮＡＢＩＩタンパク質の組込みとの関連の証明。Ｂ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａがｅＤＮＡおよびＤＮＡＢＩＩタンパク質の両方をそのバイオフィルム内に組み込む分子機構を解明し始めるために、本発明者らは、Ｂ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａ　Ｋ５６－２株（親分離株）、Ｂ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａ　ＪＲＬ２株（ΔｂｃｓＶ；タイプＩＩＩ分泌系変異体－Ｔ３ＳＳ）、またはＢ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａ　ＤＦＡ２株（ΔＢｃｓＫ；タイプＶＩ分泌系変異体－Ｔ６ＳＳ）のいずれかによって２４時間で形成されたバイオフィルムを抗ＩＨＦ抗体とインキュベートした（Ａｕｂｅｒｔら（２０１０）Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２８５：３５９８８－３５９９８）。親分離株によって形成されたバイオフィルムでは、前に記載のようにバイオフィルム全体に陽性標識が分布した（図７Ａ）。Ｔ３ＳＳ変異体によって形成されたバイオフィルムでは、バイオフィルム自体が親分離株によって形成されたバイオフィルムより全体的に頑強性が低かったのに対して（バイオマスは親分離株の１８μｍ３／μｍ２と比較して４．５μｍ３／μｍ２；平均厚さは親分離株の２５．２μｍと比較して５．５μｍ）、抗ＩＨＦ血清による標識もバイオフィルム全体に存在したが、親分離株を使用して認められるように、標識はバイオフィルムの底部ではるかに強いようであった（図７Ｂ）。しかし、逆に、Ｔ６ＳＳ変異体によって形成されたバイオフィルムの標識は非常に少なく（図７Ｃ）、このバイオフィルムも親分離株によって形成されたバイオフィルムより有意に頑強性が低かった（バイオマス２．９μｍ３／μｍ２；厚さ３．９μｍ）。Ｂ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａのＴ６ＳＳがバイオフィルム形成に関連することが公知であるので（Ａｕｂｅｒｔら（２００８）Ｉｎｆｅｃｔ．Ｉｍｍｕｎ．７６：１９７９－１９９１）、この後者の所見は予想外であった。しかし、まとめると、これらのデータは、ＤＮＡＢＩＩタンパク質（おそらくｅＤＮＡも同様）の搬出がＢ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａのＴ６ＳＳに依存することを示唆していた。

【０３２５】
ｉｎ　ｖｉｔｒｏで樹立されたバイオフィルム中に存在するＩＨＦおよびｅＤＮＡの相対量に及ぼすＴ６ＳＳ変異体の影響（図８）を考慮すると、本発明者らはＩＨＦがＢ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａにおいてＴ６ＳＳ遺伝子クラスター（ＢＣＡＬ０３４０～ＢＣＡＬ０３４８；ＢｃｓＫ遺伝子はＢＣＡＬ０３４２と等価である）の転写に影響を及ぼすよう

に細胞内で作用する可能性があるかどうかに疑念を持った。これに関する第１の工程として、この遺伝子クラスターの上流領域を試験し、配列ＴＣＴＣＡＡＣＧＡＴＴＴＡを同定した（ＩＨＦ結合コンセンサス配列ＷＡＴＣＡＡＮＮＮＮＴＴＲ（ここで、ＷはＡまたはＴであり、Ｎは任意のヌクレオチドであり、ＲはＡまたはＧである）とほぼ完全に適合した）。５０ｎＭのＥ．ｃｏｌｉ　ＩＨＦの存在下で、強いＤＮアーゼフットプリントが視覚可能であり（図７Ｄ）、これはＢＣＡＬ０３４０のコード配列の２５～５２ｂｐ上流の領域を対象とし、このコンセンサス配列との適合と重複する。この結果は、ＩＨＦ自体がその放出およびおそらくバイオフィルムマトリックスに組み込まれるｅＤＮＡの放出を自己調節することを示し得る。

【０３２６】

考察

嚢胞性線維症（ＣＦ）は、現在の処置方法を受け入れない慢性持続性疾患の特徴的な例である。ＣＦ患者の肺内に生息するバイオフィルムは、病理発生および慢性の両方に有意に寄与する。バイオフィルムは、不活性なまたは生物学的な表面に付着した細胞外ポリマーマトリックスまたは物質（またはＥＰＳ）で覆われた高度に組織化された多細胞共同体であり、事実上全ての細菌の好ましい生活様式である。バイオフィルム内の細菌集団は、そのプランクトン様または自由生活性の対応物と対照的に、増殖速度が遅く（栄養制限に起因する）、トランスクリプトームが異なり（Ｐｏｓｔら（２００７）Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｏｔｏｌａｒｙｎｇｏｌ．Ｈｅａｄ　Ｎｅｃｋ　Ｓｕｒｇ．１５：３４７－３５１；Ｐｏｓｔら（２００４）Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｏｔｏｌａｒｙｎｇｏｌ．Ｈｅａｄ　Ｎｅｃｋ　Ｓｕｒｇ．１２：１８５－１９０）、先天免疫および後天免疫のフェクターに対してだけでなく、抗生物質作用に対する耐性も実質的に高い（Ｓｌｉｎｇｅｒら（２００６）Ｄｉａｇｎ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．Ｉｎｆｅｃｔ．Ｄｉｓ．５６：２４７－２５３）。さらに、ＥＰＳは、食細胞および他の細菌クリアランス機構（物理学的および生理学的の両方）に手強い物理的バリアを提供し、それにより、バイオフィルムは根絶するのが非常に困難である（Ｆｌｅｍｍｉｎｇら（２０１０）Ｎａｔ．Ｒｅｖ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．８：６２３－６３３）。したがって、バイオフィルムが病理発生および慢性で重要な役割を果たす疾患（ＣＦなど）は、新規の処置方法および防止方法が必要である。バイオフィルムのＥＰＳの組成が属間で非常に多様であり、また、形成された環境に影響を受けるのに対して、非常に一般的且つ重要な構成要素は細胞外ＤＮＡ（ｅＤＮＡ）の組み込みである。ｅＤＮＡが微生物によって放出され、そして／またはバイオフィルムマトリックス内に組み込まれる機構は多数の病原体について依然として解明されていないが、それでもなおｅＤＮＡはその生物学的機能性およびバイオフィルムの構造成分としてのその役割の両方に関して非常に興味深い。

【０３２７】

Ｂｕｒｋｈｏｌｄｅｒｉａ　ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａが大量のｅＤＮＡを形成したバイオフィルム内に組み込むことを本明細書中に開示する。この大量のｅＤＮＡの存在が物理的バリアとして常在性Ｂ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａを例外的に防御する可能性が高く、本発明者らが最近示したように、バイオフィルム内のｅＤＮＡは先天免疫のエフェクターに結合することもでき（Ｊｏｎｅｓら（２０１２）Ｊ．Ｉｎｎａｔｅ　Ｉｍｍｕｎ）、したがって、バイオフィルム内の細菌細胞への接近を制限または防止することができる。特にＢ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａに関して、Ｐｅｅｔｅｒｓら（Ｐｅｅｔｅｒｓら（２００８）Ｊ．Ｈｏｓｐ．Ｉｎｆｅｃｔ．７０：３６１－３６８）は、固着性のＢ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａがクロルヘキシジン、過酸化水素、および５％漂白剤に対して５分間の処置後でさえも高い耐性を示すことを示した。さらに、１９９８年から２００６年までの非無菌医薬製品のＦＤＡ製品リコールデータの分析により、リコールのうち４８％がＢ．ｃｅｐａｃｉａ、Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ｓｐｅｃｉｅｓ、またはＲａｌｓｔｏｎｉａ　ｐｉｃｋｅｔｔｉのいずれかによる汚染に起因することが示された（Ｊｉｍｅｎｅｚ（２００７）ＰＤＡ　Ｊ．Ｐｈａｒｍ．Ｓｃｉ．Ｔｅｃｈｎｏｌ．６１：３８３－３９９）。非無菌製品および無菌製品について、Ｂ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａは、最も頻繁に分離された

種であった。まとめると、これらのデータは、表面、装置、および薬学的デバイスにおけるおそらくバイオフィルムの形態のＢ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａの汚染がＣＦ患者だけでなく、ＣＦを発症していない任意の入院患者、人工呼吸患者（Ｇｒａｉｎｄｏｒｇｅら（２０１０）Ｄｉａｇｎ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．Ｉｎｆｅｃｔ．Ｄｉｓ．６６：２９－４０；Ｌｕｃｅｒｏら（２０１１）Ａｍ．Ｊ．Ｉｎｆｅｃｔ．Ｃｏｎｔｒｏｌ．３９：７７５－７７８）、および／または免疫低下患者（Ｖａｎｄａｍｍｅら（１９９７）Ｉｎｔ．Ｊ．Ｓｙｓｔ．Ｂａｃｔｅｒｉｏｌ．４７：１１８８－１２００）における感染源として働くことを示す。これらの所見により、ＣＦ患者、特にＢ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａ感染したＣＦ患者のための新規の免疫治療ストラテジーを開発することにした。これを行うために、ｅＤＮＡおよびこの細胞外ＤＮＡに結合することが公知のタンパク質ファミリー（ＤＮＡＢＩＩタンパク質）に注目した。

【０３２８】

Ｂ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａが大量のｅＤＮＡをそのバイオフィルム内に組み込むことを本明細書中に開示する。このｅＤＮＡはＥ．ｃｏｌｉによって産生された単離未変性ＩＨＦに指向する抗血清と相互作用するＤＮＡＢＩＩタンパク質に関連する。このＤＮＡＢＩＩタンパク質の空間分布を決定するためにＢ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａバイオフィルムを試験する場合、ＮＴＨＩについて認められるように（Ｇｏｏｄｍａｎら（２０１１）Ｍｕｃｏｓａｌ Ｉｍｍｕｎｏｌ．４：６２５－６３７）、陽性標識がバイオフィルム内に存在するｅＤＮＡ鎖の各交点に関連することが見出された。Ｂ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａによって産生されたバイオフィルムは、ｉｎ ｖｉｔｒｏアッセイ系においてナイーブ血清ではなく抗ＩＨＦによる破壊に感受性を示した。さらに、ＩＨＦに指向する抗血清のこの破壊効果により、Ｂ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａ誘導性バイオフィルム内の細菌がＣＦ患者を処置するために使用されてきたいくつかの抗生物質の伝統的であるが通常は無効な死滅作用に感受性を示すようになった。これらの抗生物質は、抗ＩＨＦ血清を使用した処置を行わないｉｎ ｖｉｔｒｏでのバイオフィルム内のＢ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａの死滅に有効でなかったか、有効性が有意に低かった。抗ＩＨＦ血清の作用により、これらのバイオフィルム内で認められた格子構造内へのｅＤＮＡの屈曲および安定化を担う基軸タンパク質（ｌｙｎｃｈｐｉｎ ｐｒｏｔｅｉｎ）をターゲティングすることによってＢ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａが形成したバイオフィルムが破壊されたのに対して、ＤＮアーゼは、ｉｎ ｖｉｔｒｏでＢ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａバイオフィルムとインキュベートした場合に有効であることが見出されなかった。実際、ＮＴＨＩ（Ｇｕｓｔａｖｅら（２０１２）Ｊ．Ｃｙｓｔ．Ｆｉｂｒｏｓ．）またはＰ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ（Ｗｈｉｔｃｈｕｒｃｈら（２００２）Ｓｃｉｅｎｃｅ ２９５：１４８７）のいずれかによって形成されたバイオフィルムを使用して認められた減少効果と異なり、ＤＮアーゼでのＢ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａバイオフィルムの処置により顕著により頑強なバイオフィルムの形成が誘導され、Ｂ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａに感染したＣＦ患者の処置では禁忌であることが示唆された。感染６時間後に抗ＩＨＦで処置した摂取Ｂ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａの死滅はナイーブ血清でプレインキュベートした摂取Ｂ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａの死滅より統計的に有意に増加したので、ＩＨＦに指向する抗血清でのＢ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａの前処置がネズミＣＦマクロファージ内のより有効な分解経路への摂取Ｂ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａの経路指示を容易にするようであることも証明された。この所見の機構は依然として知られていないのに対して、本発明者らは、抗ＩＨＦの細菌細胞関連細胞外ＩＨＦへの結合がこれに関して役割を果たしたかもしれないと仮定する。最後に、Ｂ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａがｅＤＮＡおよびＤＮＡＢＩＩタンパク質の両方をそのバイオフィルム内に組み込む分子機構の解明を開始するために、本発明者らは、本明細書中で使用したＫ５６－２単離株のＴ３ＳＳ変異体およびＴ６ＳＳ変異体の両方によって構築されたバイオフィルムを試験した。両変異体のバイオフィルムが相対的バイオフィルムの頑強性に関して全体的に損なわれたのに対して、Ｔ６ＳＳ変異体によって構築されたバイオフィルムがＩＨＦに指向する抗血清による標識を欠き、このことは、このタンパク質の分泌および頑強なバイオフィルム形成が活性Ｔ６ＳＳに依存することを示唆していた。さらに、本発明者らは

Ｔ６ＳＳ遺伝子クラスターの直ぐ上流に推定ＩＨＦ結合部位を同定し、ＩＨＦ自体の排出を調節することができることが示唆された。実際、ＩＨＦ欠損変異体の正式な転写分析によりＢ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａ病理発生におけるＩＨＦの役割をさらに詳細に説明することができ；ＩＨＦが細胞外基質の両方の部分であり、尿路病原性Ｅ．ｃｏｌｉにおける病原性因子発現を調節することが既知である（Ｊｕｓｔｉｃｅら（２０１２））。これらの所見の根底にある機構は、さらに調査中である。

【０３２９】

最近の大幅な進歩によりＣＦ患者をより良好に管理することができるにもかかわらず、これらの患者は、今でさえ３０代半ばまで生存することしか期待できない。少なくとも９０％のＣＦ患者は長年の慢性、再発性、および持続性の肺の細菌感染後に呼吸不全のために死亡する。ＣＦ患者の肺内のバイオフィルム内に細菌が生息すると、手強い障害をもたらす。それにより、ＣＦに特徴的な長期間の細菌感染をより良好に処置および／または防止するための新規且つ有効なストラテジーをデザインするために、バイオフィルムの両方の固有の生物学的性質を理解し、どのようにしてこれらの構造を弱体化して治療的または防止的な「治癒」を媒介することができるのかを決定することが必要である。本明細書中に、本発明者らは、バイオフィルム内に存在するｅＤＮＡを安定化する細菌タンパク質のターゲティングがｉｎ ｖｉｔｒｏでのバイオフィルムの構造の減少または根絶に非常に有効であることを示した。さらに、Ｂ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａ誘導性バイオフィルムの抗ＩＨＦでの処置により、常在性細菌細胞が感受性を示して死滅するように複数の標準的な抗生物質と相乗的に作用した。最後に、本発明者らは、Ｂ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａのＩＨＦに指向する抗血清での前処置によりネズミＣＦマクロファージによって摂取された場合にその生存が有意に阻害されることを発見した。今日までに得られたデータに基づいて、Ｂ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａバイオフィルム内のｅＤＮＡに関連するＤＮＡＢＩＩタンパク質をターゲティングするアプローチは、ＣＦ患者、特にＢ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａがコロニー形成したＣＦ患者の処置のための有望な新規のアプローチが得られる見込みがある。最も重要には、複数のヒト病原体が、バイオフィルム内のｅＤＮＡが核酸結合タンパク質のＤＮＡＢＩＩファミリーのメンバーに関連する類似のストラテジーを使用するようであることを考慮して、本明細書中で開発したアプローチは、しばしばＣＦ肺のＢ．ｃｅｎｏｃｅｐａｃｉａ感染に先行して増殖する他の気道病原体に有用である可能性が高い（Ｇｅｏｒｇｅら（２００９）ＦＥＭＳ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．Ｌｅｔｔ．３００：１５３－１６４）。

【０３３０】

実験番号２

細菌株、バイオフィルム形成、ＩＨＦ、および血清

ＮＴＨＩ ８６－０２８ＮＰは、慢性中耳炎のために中耳腔換気用チューブ挿入を受けた小児の上咽頭から培養した最小継代数の臨床分離株である。８ウェルチャンバーカバーガラススライド中のＮＴＨＩバイオフィルムの形成は、記載されている（Ｊｕｒｃｉｓｅｋら（２０１１）Ｊ．Ｖｉｓ．Ｅｓｐ）。全バイオフィルムアッセイのために、二連のウェルをＺｅｉｓｓ５１０Ｍｅｔａ－レーザー走査型共焦点顕微鏡で観察し、画像をＺｅｉｓｓ Ｚｅｎソフトウェアでコンパイルし、バイオマスおよび／または平均バイオフィルム厚さの値を、ＣＯＭＳＴＡＴ２ソフトウェアを使用して計算した（Ｈｅｙｄｏｒｎら（２０００）Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌｏｇｙ １４６（Ｐｔ１０）：２３９５－２４０７）。全てのバイオフィルムアッセイを別の日に最低３回繰り返した。データを平均±ＳＥＭで示す。

【０３３１】

精製Ｅ．ｃｏｌｉ ＩＨＦおよび精製Ｅ．ｃｏｌｉ ＩＨＦに指向するウサギ抗血清（「抗$IHF_{E.coli}$」）を、Ｈｏｗａｒｄ Ｎａｓｈから提供を受けた（Ｇｒａｎｓｔｏｎら（１９９３）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２３４：４５－５９；Ｒｉｃｅら（１９９６）Ｃｅｌｌ ８７：１２９５－１３０６）。ナイーブウサギ血清をＳｐｒｉｎｇ Ｖａｌｌｅｙ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓから購入した。

【０３３２】
ＩＨＦ特異的ＩｇＧの定量
ＩＨＦ特異的ＩｇＧを、ＨｉＴｒａｐ　Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｇ　ＨＰカラム（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）を使用してポリクローナル血清から精製した。ポリクローナルおよびＩｇＧ富化抗ＩＨＦ$_{E.coli}$の両方におけるＩＨＦ特異的ＩｇＧを、スロットブロット対精製ＩＨＦ$_{E.coli}$によって定量した。ウサギ基準血清対精製ウサギＩｇＧ（Ｂｅｔｈｙｌ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ，Ｉｎｃ．）を使用して検量線を作成し、ＡｌｐｈａＶｉｅｗソフトウェア（ＰｒｏｔｅｉｎＳｉｍｐｌｅ）を使用してバンド強度を分析した。
【０３３３】
成熟バイオフィルムの分解
バイオフィルムを、２４時間、４８時間、および９６時間、または１週間および２週間確立させた。細菌生存を維持するために、培地（それぞれ２μｇ／ｍｌ$^{-1}$のβ－ＮＡＤおよびヘムを補足した脳心臓滲出物ブロス）を１日２回交換した。バイオフィルムを、培地、抗ＩＨＦ$_{E.coli}$（５０倍希釈物（４８時間以下のバイオフィルムのための４．４μｇのＩＨＦ特異的ＩｇＧ／ウェル$^{-1}$に等価）または１０倍希釈物（９６時間以上のバイオフィルムのための２２．０μｇのＩＨＦ特異的ＩｇＧ／ウェル$^{-1}$に等価））、または等体積のナイーブ血清とインキュベートした。１６時間後、バイオフィルムを、ＢａｃＬｉｇｈｔ（商標）細菌生存キット（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｐｒｏｂｅｓ）で染色し、１．６％パラホルムアルデヒド、２．５％グルタルアルデヒド、および４．０％酢酸を含む０．１Ｍリン酸緩衝液の溶液中で固定し、記載のように観察した。
【０３３４】
バイオフィルムの分解動態学
２４時間確立したバイオフィルムを、培地または抗ＩＨＦ$_{E.coli}$もしくはナイーブ血清（５０倍希釈物）のいずれかと０、６、１２、１６、または２４時間インキュベート後、記載のように生存染色および固定を行った。０時間のために、処置を施し、次いで直ちに除去した。２４時間処置したバイオフィルムの細菌生存を維持するために、１６時間後に処置物を置換し、さらに８時間インキュベートした。２４時間バイオフィルムを完全に根絶させるために、抗ＩＨＦ$_{E.coli}$または等体積のナイーブ血清の５倍希釈物を適用した。
【０３３５】
抗ＩＨＦ抗体とＮＴＨＩバイオフィルムとの間の直接接触の阻害
ＩｇＧ富化抗ＩＨＦ$_{E.coli}$を、ＡｍｉｎｏＬｉｎｋ　Ｐｌｕｓキット（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）によってアガロースビーズ（直径４５μｍ超）に共有結合性にカップリングさせた。抗ＩＨＦ$_{E.coli}$抗体のバイオフィルムとの直接接触が分解の誘導に必要であるか決定するために、２４時間バイオフィルムをオプティカルボトム９６ウェルプレート中で確立し、次いで、培地、抗ＩＨＦ$_{E.coli}$の５０倍希釈物、または等体積のナイーブ血清とインキュベートし、バイオフィルム（総体積８０μｌ）に直接適用したか、ポアサイズ５μｍのＨＴＳ　Ｔｒａｎｓｗｅｌｌ（Ｃｏｒｎｉｎｇ）の９６ウェルプレートへの挿入後、培地、０．５μｇ、５．０μｇ、または５０．０μｇのアガロースビーズに共有結合させたＩｇＧ富化抗ＩＨＦ$_{E.coli}$、または等体積のアガロースビーズに結合させたＩｇＧ富化ナイーブ血清をアピカル側チャンバー内に入れた（総体積８０μｌ）。バイオフィルムを１６時間インキュベーション後、記載のように処理した。ＩＨＦ特異的抗体がバソラテラル側チャンバー内に拡散しなかったことを確認するために、バソラテラル側チャンバー由来の上清を回収し、ウェスタンブロッティングによって精製ＩＨＦ$_{E.coli}$に対する反応性についてアッセイした。
【０３３６】
抗ＩＨＦ$_{E.coli}$によるバイオフィルム分解を立体障害によって阻止することができるかどうかを決定するために、８０μｌの裸のアガロースビーズをアピカル側チャンバーに添加し、１時間後に５０．０μｇのビーズに結合したＩｇＧ富化抗ＩＨＦ$_{E.coli}$

$_{i}$または同等な体積のビーズにカプリングしたナイーブ血清から富化したＩｇＧを重層した。プレートをさらに１６時間インキュベートし、次いで、バイオフィルムを染色し、観察し、記載のように分析した。

【０３３７】

ＩＨＦ特異的抗体が遊離ＩＨＦを隔絶する能力が相対的接近能によって制限されるかどうかを同定するために、５０．０μｇのビーズにコンジュゲートしたＩｇＧ富化抗ＩＨＦ$_{E.coli}$または等体積のビーズに結合したＩｇＧ富化ナイーブ血清（ＩｇＧ－ｅｎｒｉｃｈｅｄ ｆｒｏｍ ｎａｉｖｅ ｓｅｒｕｍ）を、バソラテラル側チャンバーが２４時間ＮＴＨＩバイオフィルムを含んでいるトランスウェルのアピカル側チャンバーに適用した。６時間後、アピカル側チャンバーの内容物を攪拌によって混合し、さらに１０時間インキュベートし、次いで、バイオフィルムを染色し、観察し、記載のように分析した。

【０３３８】

抗ＩＨＦ$_{E.coli}$の吸着

抗ＩＨＦ$_{E.coli}$媒介性のバイオフィルム減量を無効にするために、ＩＨＦ特異的抗体を、精製ＩＨＦ$_{E.coli}$とのインキュベーションによって血清から吸着させた。抗ＩＨＦ$_{E.coli}$のアリコート（４．４μｇのＩＨＦ特異的ＩｇＧ）を、２．２μｇまたは４．４μｇの精製ＩＨＦ$_{E.coli}$、生理食塩水希釈物、または「ｒｓＰｉｌＡ」と呼ばれる等価な分子質量の組換えタンパク質（Ｎｏｖｏｔｎｙら（２００９）ＰＬｏＳ Ｏｎｅ ８：ｅ６７６２９）と1時間インキュベートした。ウェスタンブロットを行って抗ＩＨＦ$_{E.coli}$の吸着を確認した。抗ＩＨＦ$_{E.coli}$吸着の機能的意義を評価するために、次いで、吸着した血清を、標準的な処置および処理プロトコールにしたがって２４時間ＮＴＨＩバイオフィルムに適用した。

【０３３９】

抗ＩＨＦ$_{E.coli}$および抗生物質のＮＴＨＩバイオフィルムに対する相乗作用

ＮＴＨＩ感染を処置するために典型的に使用される抗生物質への暴露の際にＮＴＨＩバイオフィルムの生存能の変化を視覚化するために、２４時間バイオフィルムを確立し、抗ＩＨＦ$_{E.coli}$またはナイーブ血清の５０倍希釈物、アンピシリン（３２．０μｇ／ｍｌ$^{-1}$）、セフジニル（０．２５μｇ／ｍｌ$^{-1}$）、またはアモキシシリン（１．０μｇ／ｍｌ$^{-1}$）＋クラブラナート－リチウム（０．５μｇ／ｍｌ$^{-1}$）と１６時間インキュベートした。各抗生物質を、標準的なブロス微量希釈法によって決定する場合にプランクトン様ＮＴＨＩのＭＩＣ$_{90}$で使用した（Ｂｉｅｄｅｎｂａｃｈら（２００３）Ｄｉａｇｎ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．Ｉｎｆｅｃｔ．Ｄｉｓ．４６：５５－６１；Ｔｒｉｓｔａｍら（２００７）Ｃｌｉｎ．Ｍｉｃｒｏｌ．Ｒｅｖ．２０：３６８－３８９）。

【０３４０】

処置後のバイオフィルム内のＮＴＨＩ接着およびプランクトン様形態に新規に放出された細菌を定量するために、２４時間バイオフィルムをＭＩＣ$_{90}$の各抗生物質またはその４倍もしくは８倍希釈物と抗血清を用いるか用いずにインキュベートした。新規に放出されたＮＴＨＩを培養するために、吸引によって上清を回収し、バイオフィルムは無菌生理食塩水で２回穏やかに洗浄して弱く接着した細菌を除去し、バイオフィルム内のＮＴＨＩを強いピペット操作の反復によって回収した。プランクトン様細菌および接着性細菌を個別にプレートしてＣＦＵ ＮＴＨＩ／ｍｌ$^{-1}$を決定し、これらの値を組み合わせて示すように総ＣＦＵ細菌を証明した。データを、３つの独立したアッセイの平均±ＳＥＭで示す。

【０３４１】

プランクトン様ＮＴＨＩに対する抗ＩＨＦ$_{E.coli}$および抗生物質の相乗作用

ＮＴＨＩを記載のように調製し（Ｊｕｒｃｉｓｅｋら（２０１１）Ｊ．Ｖｉｓ．Ｅｘｐ．）、10^{6}ＣＦＵ ＮＴＨＩを９６ウェルプレートのウェル内に播種後、ＭＩＣ$_{90}$の抗生物質またはその４倍もしくは８倍希釈物と抗ＩＨＦ$_{E.coli}$または等体積のナイーブ血清の５０倍希釈物を用いるか用いずにインキュベートした。１６時間後、培養物を連続希釈し、チョコレート寒天上に半定量的ＣＦＵ ＮＴＨＩ／ウェルまでプレートした

。データを、３つの独立したアッセイの平均±ＳＥＭで示す。

【０３４２】

ＮＴＨＩ　ＩＨＦのエピトープマッピング

ＩＨＦ内の免疫優性領域を同定するために、一連の１２種の５残基が重複した２０マー合成ペプチドを、ＮＴＨＩ　８６－０２８ＮＰ株によって発現されることが予想されるＩＨＦ（「IHF_{NTHI}」）のα－サブユニットのＮ末端からＣ末端を模倣するように合成した。全合成ペプチドの合成、精製、および配列確認を、Ｏｈｉｏ　Ｐｅｐｔｉｄｅ，ＬＬＣによって行った。未変性$IHF_{E.coli}$または過剰な二本鎖ＤＮＡに予め結合させた$IHF_{E.coli}$のいずれかを用いて免疫しているチンチラから回収したポリクローナル血清の得られたサンプル（ａｒｃｈｉｖｅｄ　ｓａｍｐｌｅ）（Ｇｏｏｄｍａｎら（２０１１）Ｍｕｃｏｓａｌ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．４：６２５－６３７）を使用して、ＩＨＦの免疫優性エピトープをマッピングした。IHF_{NTHI}合成ペプチドとチンチラ血清中に存在する抗体との間の相互作用を、記載のようにＢｉａｃｏｒｅ　３０００（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）を使用して分析した（Ｎｏｖｏｔｎｙら（２０００）Ｉｎｆｅｃｔ．Ｉｍｍｕｎ．６８：２１１９－２１２８；Ｎｏｖｏｔｎｙら（２００９）Ｖａｃｃｉｎｅ　２８：２７９－２８９）。IHF_{NTHI}ペプチドに対するチンチラ血清の反応性を、ＰｙＭｏｌソフトウェア（Ｓｃｈｒｏｅｄｉｎｇｅｒ）を使用して描画して３Ｄモデル画像を作成した。

【０３４３】

ＮＴＨＩバイオフィルムを破壊するためのIHF_{NTHI}エピトープ特異的抗血清の評価

エピトープマッピング研究から得た結果にもとづいて、IHF_{NTHI}α－サブユニット内の２つの領域を、以下のポリクローナルチンチラ抗血清を生成するために選択した：$IhfA-3_{NTHI}$（非反応性領域）および$IhfA-5_{NTHI}$（$IHF_{E.coli}$に対する抗体に反応性を示すが、ＤＮＡに予め結合させた抗$IHF_{E.coli}$に反応性を示さない）。２４時間確立させたＮＴＨＩバイオフィルムを、以下のチンチラ血清の５０倍希釈物で処置した：抗$IHF_{E.coli}$、ＤＮＡに予め結合させた抗$IHF_{E.coli}$、ナイーブ血清、抗$IhfA-3_{NTHI}$、または抗$IhfA-5_{NTHI}$で１６時間。その後に染色および評価を行った。ＮＩＨ実験動物の管理と使用に関する指針に従い、且つＮａｔｉｏｎｗｉｄｅ　Ｃｈｉｌｄｒｅｎ’ｓ　Ｈｏｓｐｉｔａｌの実験動物委員会に承認されたプロトコール下で動物実験を行った。

【０３４４】

統計分析

ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｐｒｉｓｍソフトウェアを使用して統計分析を行った。バイオフィルムのバイオマスおよび厚さを、一元配置分散分析（ＡＮＯＶＡ）後、５％に設定したチューキーの多重比較検定を使用して比較した。処置後のＣＦＵ　ＮＴＨＩの有意差を、一元配置ＡＮＯＶＡおよびその後の多重比較のためのホルム－シダック検定によって決定した；０．０５以下のｐ値を有意と見なした。

【０３４５】

結果

ＮＴＨＩバイオフィルムの抗ＩＨＦ誘導性分解

以前の研究では、５０倍希釈で使用したＥ．ｃｏｌｉ　ＩＨＦに対するポリクローナルウサギ抗血清（すなわち、「抗$IHF_{E.coli}$」）（５０倍希釈で使用、４．４μｇのＩＨＦ特異的ＩｇＧ／ｍｌ$^{-1}$と等価）が２４時間ＮＴＨＩバイオフィルムをｉｎ　ｖｉｔｒｏで破壊することを証明している（Ｇｏｏｄｍａｎら（２０１１）Ｍｕｃｏｓａｌ　Ｉｍｍｕｎｏｌ．４：６２５－６３７）。次に、本発明者らは、初期に形成されたＮＴＨＩバイオフィルムおよび成熟ＮＴＨＩバイオフィルムの両方に及ぼす抗$IHF_{E.coli}$の相対有効性を試験した。処置の１６時間前、２４時間前、４８時間前、または９６時間前および１週間前もしくは２週間前に形成されたバイオフィルムは、抗$IHF_{E.coli}$とのインキュベーション後に残存バイオフィルムが顕著に減少した一方で、ナイー

ブ血清に暴露したバイオフィルムは、培地中で維持されたバイオフィルムに匹敵した（図１０Ａ）。定量的には、抗ＩＨＦ$_{E.coli}$に暴露した１６時間、２４時間、および４８時間バイオフィルムのバイオマスは、ナイーブ血清と比較して、それぞれ９４％、８６％、および７４％有意に減少した（ｐ＜０．０５、図１０Ｂ）。より成熟したバイオフィルムに対して類似の影響を達成するために、抗ＩＨＦ$_{E.coli}$を１０倍希釈した。結果的に、９６時間または１週間もしくは２週間のバイオフィルムのバイオマスは、ナイーブ血清と比較してそれぞれ７４％、４３％、５７％有意に減少した（ｐ＜０．０１または０．０５）。ＮＴＨＩバイオフィルムがｉｎ ｖｉｔｒｏで成熟するにつれて、ｅＤＮＡの相対量が増加し（Ｊｏｎｅｓら（２０１３）Ｊ．Ｉｎｎａｔｅ Ｉｍｍｕｎ．５：２４－３８）、したがって、より高い濃度のＩＨＦ特異的抗血清がこれらの「より古く」且つ高密度のバイオフィルムのバイオマスの類似の減少に必要であることは予想されなかった。まとめると、これらのデータは、抗ＩＨＦ$_{E.coli}$が有意に有効であり、初期形成ＮＴＨＩバイオフィルムおよび成熟ＮＴＨＩバイオフィルムの両方を破壊することができることを証明した。

【０３４６】

次いで、抗ＩＨＦ媒介性破壊の動態学を試験した。２４時間確立させたバイオフィルムを、その後に０、６時間、１２時間、１６時間、または２４時間培地または５０倍希釈の抗ＩＨＦ$_{E.coli}$もしくはナイーブ血清のいずれかで処置した。処置の適用、その後の即時除去は培地と比較してバイオフィルムバイオマスの変化を誘導しなかった（図１１Ａおよび１１Ｂ）。しかし、抗ＩＨＦ$_{E.coli}$を６時間、１２時間、１６時間、または２４時間暴露したバイオフィルムは、それぞれ、ナイーブ血清と比較してバイオマスが７６％、４３％、６５％、６７％減少し（ｐ＜０．０１）、６時間で最大減少が認められた。非ＳＰＦ動物由来のナイーブ血清の中程度の影響を培地中で維持されたバイオフィルムと比較したことが以前に報告されていた（Ｇｏｏｄｍａｎら（２０１１）Ｍｕｃｏｓａｌ Ｉｍｍｕｎｏｌ．４：６２５－６３７；Ｎｏｖｏｔｎｙら（２０１３）ＰＬｏＳ Ｏｎｅ ８：ｅ６７６２９）。本発明者らは、次に、より高い濃度の抗ＩＨＦ$_{E.coli}$または暴露時間の延長が予め形成されたバイオフィルムをさらに減少させるか根絶することができるかどうかを試験した。ＮＴＨＩバイオフィルムの５倍希釈した抗ＩＨＦ$_{E.coli}$とのインキュベーションにより、ナイーブ血清と比較してバイオマスが８６％減少した（ｐ＜０．０１；図１１Ａおよび１１Ｂ）。より高い濃度の抗ＩＨＦ$_{E.coli}$や２４時間までの処置時間の延長では全生菌を完全に根絶しなかったので、この結果が最大のようであった。いずれの場合も、処置後に単層の細菌が残存し、これらの単層中に抗ＩＨＦ$_{E.coli}$の標的は存在しなかったことが示唆された。

【０３４７】

ＮＴＨＩバイオフィルムを破壊するために抗ＩＨＦに直接接触は必要なかった。

ここまでで、抗ＩＨＦをＮＴＨＩバイオフィルムに直接適用した。抗ＩＨＦ$_{E.coli}$とバイオフィルムとの間の直接接触が必要であるかどうかをここで決定するために、ＮＴＨＩバイオフィルムをトランスウェルのバソラテラル側チャンバー中に確立した。アガロースビーズに共有結合させたＩｇＧ富化抗ＩＨＦ$_{E.coli}$をアピカル側チャンバーに入れ、したがって、膜の存在によって抗体がバイオフィルムから物理的に分離された。本発明者らは、ウェスタンブロットによるトランスウェルのアピカル側チャンバー中の抗体結合ビーズの配置から２４時間後のバソラテラル側チャンバー内の培地の回収によって、アガロースビーズにカップリングした抗ＩＨＦ$_{E.coli}$がバソラテラル側チャンバー中に分散されなかったことを最初に確認した（図１８）。ＩＨＦ$_{E.coli}$のバイオフィルムへの直接的な適用と比較して（図１２Ａ）、トランスウェルのアピカル側チャンバー内のアガロースビーズに係留した抗ＩＨＦ$_{E.coli}$の存在下でのバイオフィルムの減少は等価であり（図１２Ｃ）、ナイーブ血清由来の係留ＩｇＧと比較してバイオマスの有意な減少（ｐ＜０．０５）が認められた（図１２Ｂおよび１２Ｆ）。３つの濃度のアガロースビーズにカップリングした抗体をアッセイしたが、全てが有効であり、用量依存性バイオフィルム破壊が認められなかった。これらのデータは、バイオフィルム培地とト

ランスウェル膜との間の境界の利用可能な抗体結合部位の飽和を示唆した。この理論を試験するために、裸のアガロースビーズの層をＩＨＦ$_{Ｅ．ｃｏｌｉ}$抗体が結合している層の下に配置し、したがって、「遊離」ＩＨＦへの結合能力が立体的にブロッキングされた。予測通り、バイオフィルムの破壊は認められなかった（図１２Ｄおよび１２Ｆ）。しかし、バイオフィルム破壊は、裸のビーズおよび抗ＩＨＦ結合抗体の混合の際に修復された（図１２Ｅ）。まとめると、これらのデータは、抗ＩＨＦ$_{Ｅ．ｃｏｌｉ}$は破壊を媒介するためにＮＴＨＩバイオフィルムと直接接触する必要はなく、さらに、このタンパク質がバイオフィルム内のｅＤＮＡから天然に解離した（すなわち、「オフ」状態にある）場合に遊離ＩＨＦが抗体によって捕捉されるので、この破壊は、強制的平衡シフトによって媒介される可能性が高いことを証明していた。

【０３４８】

認められたバイオフィルム破壊がＩＨＦに指向する抗体によって特異的に媒介され、過免疫ウサギ血清（この血清は使用前に熱失活されていなかったので）内の他の成分の影響に起因しなかったことを証明するために、抗ＩＨＦ$_{Ｅ．ｃｏｌｉ}$のアリコートを、精製ＩＨＦ（すなわち、陰性対照として）またはｒｓＰｉｌＡと呼ばれる類似の分子質量のＮＴＨＩタンパク質のいずれかを使用して吸着させた（Ｎｏｖｏｔｎｙら（２００９）Ｖａｃｃｉｎｅ　２８：２７９－２８９）。本発明者らは、バイオフィルムアッセイで利用した抗血清の任意に選択した５０倍希釈物が各バイオフィルムへの４．４μｇのＩＨＦ特異的ＩｇＧが適用されることと同一であることを最初に確認した。ウェスタンブロッティングにより、漸増濃度の精製ＩＨＦとのインキュベーション後にＩＨＦ特異的抗体の反応性が減少することが明らかとなった（図１９）。関連しない組換えＮＴＨＩタンパク質とのインキュベーションによって反応性の減少が認められなかったので、この結果は特異的であった。さらに、バイオフィルムのＩＨＦ吸着血清とのインキュベーションにより、全血清と比較して予め形成されたバイオフィルムを有効に破壊する能力が減少した（図１３Ａおよび１３Ｂ）。これらのデータにより、認めれたＮＴＨＩバイオフィルム破壊がポリクローナルウサギ血清内のＩＨＦ特異的抗体によって媒介されることが明らかとなった。

【０３４９】

抗ＩＨＦの抗生物質との相乗作用

本発明者らは、次に、抗ＩＨＦ$_{Ｅ．ｃｏｌｉ}$によるバイオフィルム破壊がＮＴＨＩ感染処置で一般に使用される抗生物質による死滅に対するバイオフィルム常在細菌の感受性を増加させるかどうか試験した。プランクトン様に増殖したＮＴＨＩの９０％の増殖を阻害するために必要な最小阻止濃度（ＭＩＣ$_{９０}$）を以前に記載のように決定し（Ｔｒｉｓｔｒａｍら（２００７）Ｃｌｉｎ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．Ｒｅｖ．２０：３６８－３８９）、以下の濃度を使用した：アンピシリン（３２μｇ／ｍｌ$^{-1}$）、アモキシシリン－クラブラナート（それぞれ、１μｇ／ｍｌ$^{-1}$および０．５μｇ／ｍｌ$^{-1}$）、およびセフジニル（０．２５μｇ／ｍｌ$^{-1}$）。次いで、２４時間ＮＴＨＩバイオフィルムを、５０倍希釈した抗ＩＨＦ$_{Ｅ．ｃｏｌｉ}$、抗生物質、または抗ＩＨＦ$_{Ｅ．ｃｏｌｉ}$＋抗生物質の組み合わせに曝露した。予測通り、抗ＩＨＦ$_{Ｅ．ｃｏｌｉ}$は有意なバイオフィルム破壊を媒介し（図１４Ａ）、しかし、プランクトン様ＮＴＨＩのＭＩＣ$_{９０}$での３つの抗生物質のうちのいずれかとのインキュベーションにより、生存染色によって決定したところ細菌は死滅せず（図１４Ｂ～１４Ｄ）、平均バイオフィルム厚さおよび平均バイオマスは、培地と抗生物質のみとの間で類似していた（図１４Ｅ）。特に、確立されたＮＴＨＩバイオフィルムの抗ＩＨＦ$_{Ｅ．ｃｏｌｉ}$と３つの抗生物質のうちのいずれかとの組み合わせでの処置により、抗生物質のみでの処置と比較して、バイオフィルム構造の顕著な変化および平均バイオマスの統計的に有意な減少（ｐ≦０．０５）が誘導された。さらに、抗ＩＨＦ$_{Ｅ．ｃｏｌｉ}$＋３つの抗生物質のうちのいずれかで処置したバイオフィルム内で細胞死が認められた。これらのデータは、ＮＴＨＩバイオフィルムの抗ＩＨＦ媒介性破壊により常在細菌が以前に無効であった抗菌剤の作用により感受性を示すようになったことを示唆していた。

【０３５０】

予め形成されたバイオフィルムの物理的破壊の記述データの範囲外にこの一連の調査を拡大するために、抗ＩＨＦ$_{E.coli}$曝露が新規に放出された細菌の抗生物質媒介性の死滅を増大させるかどうかを試験した。そのためには、３つのターゲティングされた抗生物質を、プランクトン様ＮＴＨＩのＭＩＣ$_{90}$（Ｂｉｅｄｅｎｂａｃｈら（２００３）Ｄｉａｇｎ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．Ｉｎｆｅｃｔ．Ｄｉｓ．４６：２９１－２９４；Ｔｒｉｓｔｒａｍら（２００７）Ｃｌｉｎ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．Ｒｅｖ．２０：３６８－３８９）およびその４倍希釈または８倍希釈の両方でアッセイした。ＭＩＣ$_{90}$の３つの抗生物質のうちのいずれかとインキュベートした場合、培地と比較して接着性コロニー形成単位（ＣＦＵ）細菌／ｍｌ$^{-1}$（図１５Ａ～１５Ｃ）の有意差は認められなかった。しかし、抗ＩＨＦ$_{E.coli}$の添加により、培地と比較してチャンバースライドに接着したままであるＮＴＨＩ数は有意に減少した（ｐ＜０．０５）（Ｇｏｏｄｍａｎら（２０１１）Ｍｕｃｏｓａｌ Ｉｍｍｕｎｏｌ．４：６２５－６３７）。さらに、抗ＩＨＦ$_{E.coli}$と組み合わせたＭＩＣ$_{90}$の任意の抗生物質の使用により、培地のみと比較して接着性細菌数のなおさらなる有意な減少が誘導された（ｐ＜０．０５）。この減少は、アンピシリン濃度の１／８（４μｇ／ｍｌ$^{-1}$）およびアモキシシリン－クラブラナート（ｃｌａｖｕｌａｎｔｅ）濃度の１／８（それぞれ０．１２５μｇ／ｍｌ$^{-1}$および０．０６２５μｇ／ｍｌ$^{-1}$）ならびにセフジニル濃度の１／４（０．０６２５μｇ／ｍｌ$^{-1}$）で維持された。

【０３５１】

接着性集団およびプランクトン様集団の両方における細菌の抗ＩＨＦ$_{E.coli}$媒介性の死滅の増強によるバイオフィルムの破壊を証明するために、抗ＩＨＦ$_{E.coli}$を用いるか用いずに送達させた各抗生物質での処置後の総生菌／ウェル（図１６Ｄ～１６Ｆ）を試験した。全抗生物質について、抗ＩＨＦ$_{E.coli}$の５０倍希釈物と組み合わせてＭＩＣ$_{90}$またはその４倍もしくは８倍希釈のいずれかの抗生物質を使用した場合、全生存ＣＦＵ ＮＴＨＩ／チャンバースライドウェルが有意に減少した。すべての場合において、これらの相違は、抗生物質のみ、抗ＩＨＦ$_{E.coli}$のみ、または抗生物質＋ナイーブ血清を使用した処置と比較して有意であった（ｐ＜０．０５）。

【０３５２】

新規に放出されたＮＴＨＩ、または恐らく破壊されたバイオフィルムと低ストリンジェントに会合したＮＴＨＩが通常はこれらの抗生物質作用に感受性を示すかどうかを決定するために、ＮＴＨＩブロス培養物を、単独またはアンピシリン、アモキシシリン／クラブラナート、もしくはセフジニルの存在下で送達させた抗ＩＨＦ$_{E.coli}$またはナイーブ血清のいずれかの５０倍培養物で処置した。抗生物質を、プランクトン様ＮＴＨＩのＭＩＣ$_{90}$およびその４倍希釈または８倍希釈の両方で使用した。プランクトン様に増殖したＮＴＨＩの抗ＩＨＦ$_{E.coli}$のみへの曝露の際に抗生物質媒介性の死滅は増強されず（図２０Ａ～２０Ｃ）、抗ＩＨＦ$_{E.coli}$作用によってバイオフィルムから新規に放出されたＮＴＨＩがそのバイオフィルムまたはプランクトン様対応物のいずれかと表現型が異なることが示唆された。

【０３５３】

ＩＨＦ内の免疫優性領域の同定

以前の研究で、未変性ＩＨＦ$_{E.coli}$でのチンチラの免疫化により抗体形成が誘導され、実験ＯＭ中にチンチラ中耳内の確立されたＮＴＨＩバイオフィルムが迅速に分解されたことが示された。しかし、ＤＮＡと予め複合体化されているＩＨＦ$_{E.coli}$（疾患時に天然に存在する可能性が高い形態）での免疫化により疾患は回復しなかった（Ｇｏｏｄｍａｎら（２０１１）Ｍｕｃｏｓａｌ Ｉｍｍｕｎｏｌ．４：６２５－６３７）。まとめると、これまでのデータは、多数の細菌のＤＮＡＢＩＩタンパク質内にバイオフィルム構造の有効な破壊のためにターゲティングすることができる保存ドメイン（ＩＨＦおよびＨＵ）が存在し、ＩＨＦ／ＨＵがＤＮＡに会合する場合にこのドメインがマスキングまたは閉塞されることを意味する。この有効な／マスキングされたドメインの位置を決定するために、ＮＴＨＩ由来のＩＨＦ（「ＩＨＦ$_{NTHI}$」という）を、このＤＮＡＢＩＩタ

ンパク質のα－サブユニットの推定されるＮ末端からＣ末端を模倣するようにデザインされた一連の２０量体の重複ペプチドを使用してエピトープマッピングした。これらのペプチドを、未変性ＩＨＦ$_{E.coli}$または過剰量のＤＮＡと複合体化されているＩＨＦ$_{E.coli}$のいずれかで免疫されているチンチラから回収した抗血清を使用してスクリーニングした（Ｇｏｏｄｍａｎら（２０１１）Ｍｕｃｏｓａｌ Ｉｍｍｕｎｏｌ．４：６２５－６３７）。未変性ＩＨＦ$_{E.coli}$に対する抗血清はＤＮＡ結合先端領域を示すと予想されるペプチドに反応性を示し（図１６Ａ）、これに対して、ＩＨＦ$_{E.coli}$－ＤＮＡ複合体に対する抗血清によりＩＨＦ$_{NTHI}$のＮ末端テールを示すペプチドに対して最も高い反応性が得られた（図１６Ｂ）。図１６Ｃに示すようにＩＨＦ$_{E.coli}$がＤＮＡに結合した場合にＤＮＡ結合先端領域が閉塞される可能性が高いので、この結果は論理上当然であった。したがって、テール領域が曝露されるのに対して、先端結合領域は免疫学的に接近不可能であると予想される。

【０３５４】

本発明者らのエピトープマッピング研究によって血清抗体が反応性を示すＩＨＦ分子内の特異的領域が明らかとなったので、本発明者らは、次に、このターゲティングされたエピトープに指向する抗体が未変性タンパク質に指向する抗体と同等の有効性を示すかどうかを決定することを試みた。そのためには、チンチラ中で免疫血清を生成するための以下の２つのペプチドを選択した：ペプチドＩｈｆＡ－５$_{NTHI}$（ＩＨＦのα－サブユニット内に反応性ＤＮＡ先端結合領域を示す）（図１６Ｄ）および陰性対照としてのＩｈｆＡ－３　ＮＴＨＩ（同一サイズであるがエピトープマッピングによって非反応性を示したペプチドを示す）（図１６Ｄ）。精製ＩＨＦ$_{E.coli}$およびＤＮＡと予め複合体化したＩＨＦ$_{E.coli}$を比較免疫原として使用した。予想通り、未変性チンチラ血清と比較して、ＤＮＡと複合体化した抗ＩＨＦ$_{E.coli}$または抗ＩｈｆＡ－３　ＮＴＨＩとインキュベートしたＮＴＨＩバイオフィルムは、バイオフィルムの形態やバイオマスが変化しなかった（図１６Ｅおよび１６Ｆ）。しかし、抗ＩＨＦ$_{E.coli}$を使用して認められたバイオフィルムと同様に、抗ＩｈｆＡ－５$_{NTHI}$とのインキュベーションはナイーブ血清と比較してバイオフィルムのバイオマスの有意な減少（ｐ＜０．０１）を誘導するのに等しく有効であった。

【０３５５】

考察

細菌バイオフィルムは、ほとんどの再発性および慢性の細菌性疾患（気道、尿生殖路、および口腔の疾患が含まれる）に有意に寄与する。バイオフィルムは宿主免疫系および抗菌剤の作用に不応性を示し、バイオフィルム成分を有する疾患のための新規の処置方法を開発することが必要である。ｅＤＮＡは多数の微生物のバイオフィルムＥＰＳの一般的な成分であり、本発明者らは、ＩＨＦに指向する抗体へのバイオフィルムの曝露が有意な破壊を媒介するので、タンパク質のＤＮＡＢＩＩファミリーのメンバーがバイオフィルム構造の安定化で重要な役割を果たすと以前に証明している（Ｇｏｏｄｍａｎら（２０１１）Ｍｕｃｏｓａｌ Ｉｍｍｕｎｏｌ．４：６２５－６３７）。

【０３５６】

ＮＴＨＩバイオフィルムが成熟するにつれてＥＰＳ内のｅＤＮＡ濃度が増加し（Ｊｏｎｅｓら（２０１３）Ｊ．Ｉｎｎａｔｅ Ｉｍｍｕｎ．５：２４－３８）、推論の結果として、それに調和して会合したＤＮＡＢＩＩタンパク質の濃度が相対的に増加する。したがって、本発明者らは、本明細書中に、バイオフィルムが古いほど破壊を媒介するためにはより高い濃度の抗ＩＨＦ$_{E.coli}$が必要であることを示した。抗ＩＨＦ$_{E.coli}$が確立された２４時間ＮＴＨＩバイオフィルムを破壊する能力は迅速であり、曝露６時間以内に最大の効果を示し（ナイーブ血清と比較してバイオマスが７６％減少し、平均厚さが７１％減少した）、単一処置を使用したさらなる２４時間のインキュベーション後にさらなる破壊は生じなかった。抗ＩＨＦ$_{E.coli}$抗体の濃度または暴露時間の相対的増加と無関係に、ＮＴＨＩの完全な根絶は達成することができなかった。その代わりに、生菌の単層が残存し、ｅＤＮＡおよびＩＨＦを含むＥＰＳの非存在下では抗ＩＨＦ指向治療

の標的は存在しないことが示唆された。
【０３５７】
それにより、組み合わせアプローチが理想的であり、これらの疾患を回復させるために既存の抗生物質または他の治療薬を使用することができる可能性が高いであろう。
【０３５８】
作用機構をより良好に定義するために、バイオフィルムと抗ＩＨＦ$_{E.coli}$抗体との間の直接的接触がバイオフィルム破壊に必要であるのかどうかを調査した。なぜならかかる必要性が真実でないと以前に仮定されているからである（Ｇｏｏｄｍａｎら（２０１１）Ｍｕｃｏｓａｌ Ｉｍｍｕｎｏｌ．４：６２５－６３７）。予想通り、微多孔膜によるバイオフィルムからのアガロースビーズに係留した抗体の分離によりバイオフィルム破壊が阻害されず、直接的な接触は必要ないことが示唆された。その代わりに、まとめると、データは、ＤＮＡを有するＩＨＦ間の通常の平衡の一部としてバイオフィルム内のｅＤＮＡから遊離ＩＨＦが解離したので、ＩＨＦ$_{E.coli}$に指向する抗体が遊離ＩＨＦを捕捉したことを示した。実際、エピトープマッピング実験により、抗体作用部位としてのＩＨＦのＤＮＡ結合ドメインの競合的阻害が指摘される。したがって、過剰量のＩＨＦに対する抗体の存在がこの平衡をシフトさせ、バイオフィルム構造の崩壊または破壊を媒介する。
【０３５９】
バイオフィルムの抗ＩＨＦでの処置がプランクトン様相内への細菌の放出を媒介するので（Ｇｏｏｄｍａｎら（２０１１）Ｍｕｃｏｓａｌ Ｉｍｍｕｎｏｌ．４：６２５－６３７）、抗ＩＨＦ$_{E.coli}$が伝統的な抗生物質との組み合わせ様式でその死滅能力を増大させるように作用することができるかどうかを試験した。ＮＴＨＩに起因する治療抵抗性気道感染を処置するために伝統的に使用される３つの抗生物質について、これが実際に真実であると判断した。確立されたバイオフィルムの抗ＩＨＦ$_{E.coli}$＋抗生物質での処置により、常在細菌が死滅に対して感受性を示すようになった。さらに、これらの新規に放出された細菌は、死滅に対する感受性が増大し、この死滅は抗ＩＨＦ$_{E.coli}$のみへの曝露が原因ではなかった。３つ全ての試験した抗生物質は、プランクトン様増殖細胞のＭＩＣ$_{90}$の１／４～１／８の濃度で使用した場合に死滅を媒介することができ、したがって、真の相乗作用が証明された。これらの所見はまた、バイオフィルム内に生息するＮＴＨＩまたはプランクトン様に増殖したＮＴＨＩのいずれかと比較してバイオフィルム増殖から新規に放出されているＮＴＨＩの固有の表現型の可能性があることを示唆した。重要なことに、バイオフィルムから放出された肺炎球菌が、いくつかの処置によって媒介された場合、バイオフィルムとして増殖する細菌および富栄養培地中で増殖したプランクトン様細菌の両方（Ｍａｒｋｓら（２０１３）ＭＢｉｏ．４）と比較して固有のトランスクリプトームを有し、且つ病原性が増大することを見出したＡｎｄｅｒｓ Ｈａｋａｎｓｓｏｎによる先駆的研究におけるＳ．ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅと類似の所見が得られた。
【０３６０】
まとめると、これらのデータは、ＩＨＦに対する抗血清が確立されたバイオフィルムの破壊を誘導する機構を説明するためのモデルを支持する。バイオフィルムの抗ＩＨＦへの曝露により、バイオフィルム内（またはバイオフィルム「上」）のｅＤＮＡに結合したＩＨＦ分子と「オフ」状態のＩＨＦ分子との間の平衡シフトが誘導される。周囲の水性環境中に遊離したＩＨＦ分子が除去され、結合したＩＨＦがバイオフィルムｅＤＮＡから強制的に解離され、したがって、バイオフィルム構造の崩壊が媒介される。これらの所見は、バイオフィルム成分を有する複数の疾患の処置のためにバイオフィルムの完全性に重要な構造の分子をターゲティングすることが可能であることを証明している。
【０３６１】
別段に定義しない限り、本明細書で用いられる技術用語および科学用語は、本発明が属する技術分野における当業者により一般的に理解される意味と同じ意味を有する。本明細書で提示される全てのヌクレオチド配列は、５’から３’への方向で示される。

【０３６２】
本明細書において例示的に説明された本発明は、本明細書で具体的に開示されていない、１つまたは複数の任意の要素、１つまたは複数の任意の限定が存在しない場合にも、適切に実施することができる。したがって、例えば、「～を含む」、「～を包含する」、「～を含有する」などの用語は、外延的に、かつ限定なしに読まれるものとする。加えて、本明細書で用いられる用語および表現は、説明を目的として用いられるものであり、限定を目的として用いられるものではなく、示され、かつ、説明される特徴またはその部分の任意の等価物を除外する、このような用語および表現の使用を意図するものではなく、特許請求される本発明の範囲内にある多様な改変が可能であると認識される。
【０３６３】
したがって、本発明は、好ましい実施形態により具体的に開示されているが、本明細書で開示される任意選択の特徴、改変、改善、および変更も当業者により回復される場合があり、このような改変、改善、および変更は、本発明の範囲内にあるものと考えられることを理解されたい。本明細書で提示される材料、方法、および例は、好ましい実施形態を示すものであり、例示的なものであり、本発明の範囲に対する限定として意図されるものではない。
【０３６４】
本明細書では、本発明について、広範かつ一般的に説明してきた。本一般的な開示の範囲内に収まる、より狭い範囲内にある種類、および亜属の群分けのそれぞれもまた、本発明の一部を形成する。これは、除外される材料が、本明細書で具体的に列挙されているかどうかにかかわらず、属から任意の対象物を除外する条件または否定的限定を伴う本発明の一般的な説明を包含する。
【０３６５】
加えて、本発明の特徴または態様が、マーカッシュ群との関係で説明される場合、当業者は、本発明がまた、それにより、マーカッシュ群の任意の個別のメンバーまたはマーカッシュ群のメンバーの亜群との関係でも説明されることを認識するであろう。
【０３６６】
本発明を、上記の実施形態と共に説明してきたが、前出の説明および例は、本発明の例示を目的とするものであり、本発明の範囲の限定を目的とするものではないことを理解されたい。本発明の範囲内にある他の態様、利点、および改変は、本発明が関連する技術分野における当業者には明らかであろう。

表 1

グラム (+) –HUのみ、 グラム (-) – 全て HU を有し、一部は IHFも有する

細菌株	略語	タンパク質名（単数または複数）	
S. sobrinus 6715	*Ss*	1310	(HU)(完全には配列決定されていない)
S. pyogenes MGAS10270	*Spyog*	Spy1239	(HU)
S. gordonii Challis NCTC7868	*Sg*	SGO_0701	(HlpA)
S. agalactiae (B 群 Strep)2603V/R	GBS	SAG_0505	(Hup)
S. mutans UA159	*Sm*	Smu_589	(HU)
S. pneumoniae R6	*Spneu*	spr1020	(HU)
S. gallolyticus UCN34 (*S. bovis*)	*Sgall*	YP_003430069	(HlpA)
S. aureus MW2	*Sa*	MW1362	(HU)
S. epidermidis RP62A	*Se*	SERP1041	(Hup)
E. coli K12-MG1655	*Ec*	b1712	(HimA)
		b0912	(HimD)
			(HupA)
			(HupB)
H. influenza KW20 Rd	*Hi*	HI1221	(HimA)
		HI1313	(HimD)
		HI0430	(HupA)
Salmonella enteric serovar typhi CT18	*Salm*	Sty1771	(HimA)
		Sty0982	(HimD)
Aggregatibacter actinomycetemcomitans D11S-1	*Aa*	YP_003255965	(IHFα)
		YP_003256209	(IhfB)
		YP_003255304	(HU)
P. gingivalis W83	*Pg*	PG_0121	(Hup-1)
		PG_1258	(Hup-2)
N. gonorrhoeae FA1090 (Oklahoma)	*Ng*	NGO603	(IHFβ)
		NGO030	(IHFα)

【表１－２】

表１（続き）

N. meningitides MC58	*Nm*	NMB_0729	(HimA)
		NMB_1302	(HimA)
P. aeruginosa	*Pa*	PA3161	(HimD)
		PA1804	(HupB)
		PA2758	(HimA)
H. pylori 26695	*Hp*	Hp0835	(Hup)
B. burgdorferi B31	*Bb*	BB_0232	(Hbb)
Moraxella catarrhalis RH4	*Mc*	YP_003626307	(HimA)
		YP_003627027	(HimD)
		YP_003626775	(HupB)

【表１－３】

表１（続き）

V. cholera El Tor N16961	*Vc*	VC_0273	(HupA)
		VC_1914	(HipB)
		VC_1919	(HupB)
		VC_1222	(HimA)
Burkholderia cenocepacia HI2424	*Bc*	Bcen2424_1048	(IHFB)
		Bcen2424_1481	(IHFA)
Burkholderia pseudomallei 668	*Bp*	BURPS668_2881	(IHFB)
		BURPS668_1718	(IHFA)
Mycobacterium tuberculosis CDC1551	*Mtb*	MT_3064	(HU)
Mycobacterium smegmatis MC2	*Ms*	MSMEG_2389	(Hup)
Treponema denticola ATCC 35405	*Td*	TDE_1709	(HU)
Treponema palladum Nichols	*Tp*	TP_0251	(DNA結合タンパク質 II)
Prevotella melaninogenica ATCC 25845	*Pm*	PREME0022_2103	(HupB)
		PREME0022_0268	(HupA)
		PREME0022_0341	(Hup)
		PREME0022_0340	(HimA)
Prevotella intermedia 17	*Pi*	PIN_A0704	(Hup)
		PIN_A1504	(Hup-2)
		PIN_0345	(HimA)
		PIN_0343	(仮想タンパク質)
Bordetella pertusis Tohama 1	*Bpert*	BP2572	(IhfA)
		BP3530	(HupB)
		BP0951	(IhfB)
Enterococcus faecalis V583	*Ef*	Ef1550	(hup)

【表２－１】

2	2（続き）

出現順にそれぞれ配列番号42～72

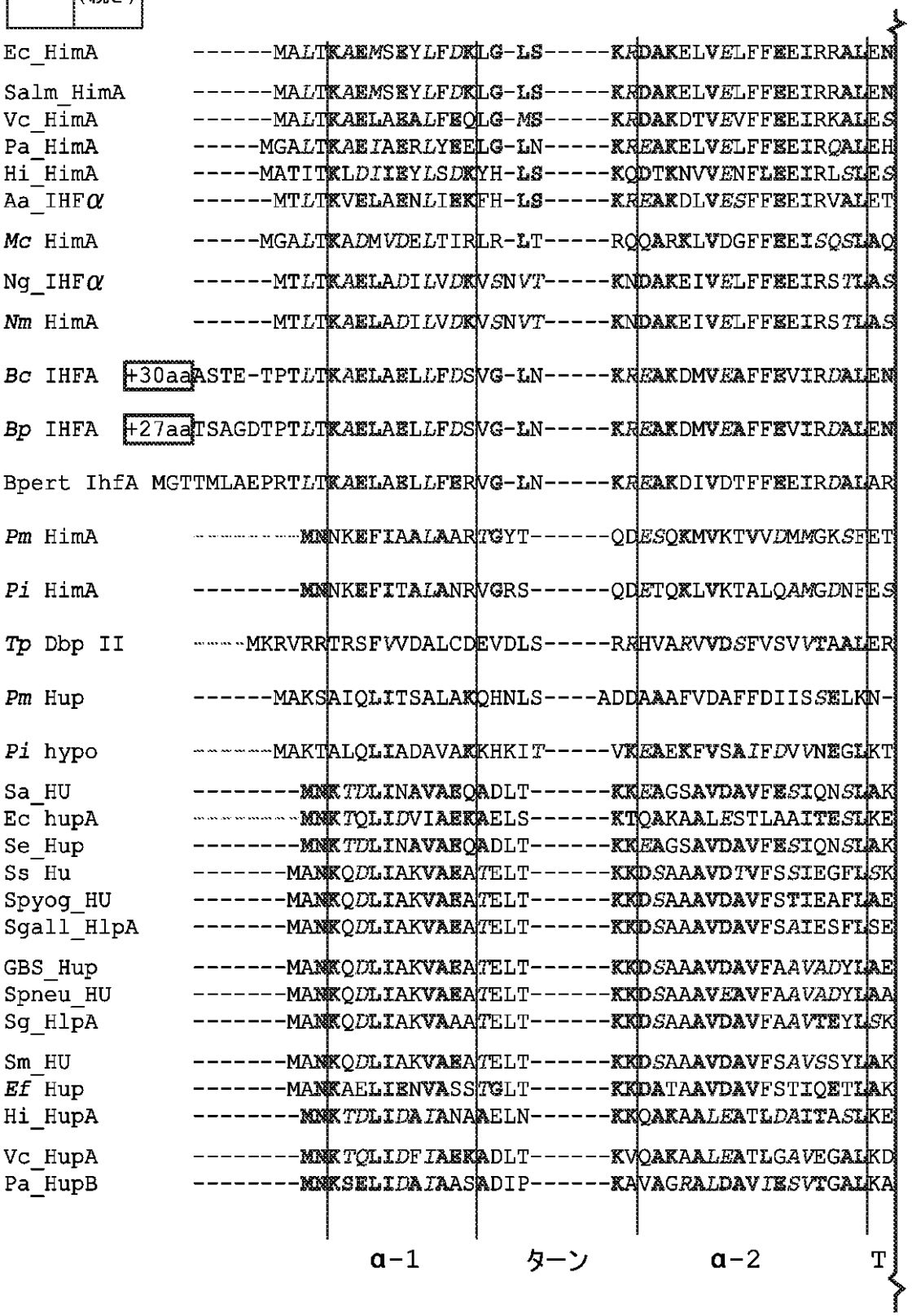


表２

【表２－２】

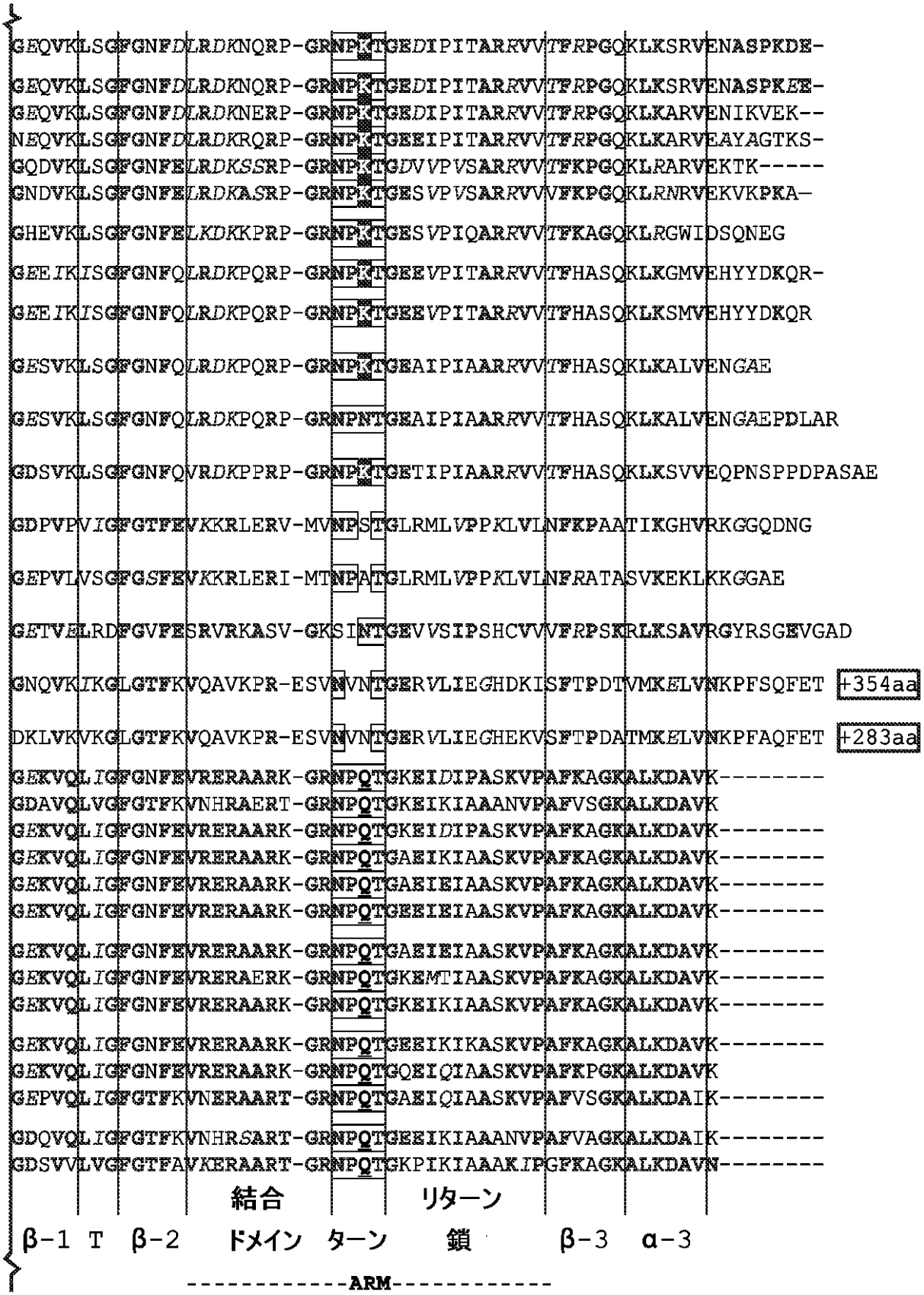


表２(続き)

【表２－３】

2	2（続き）

出現順にそれぞれ配列番号73～76

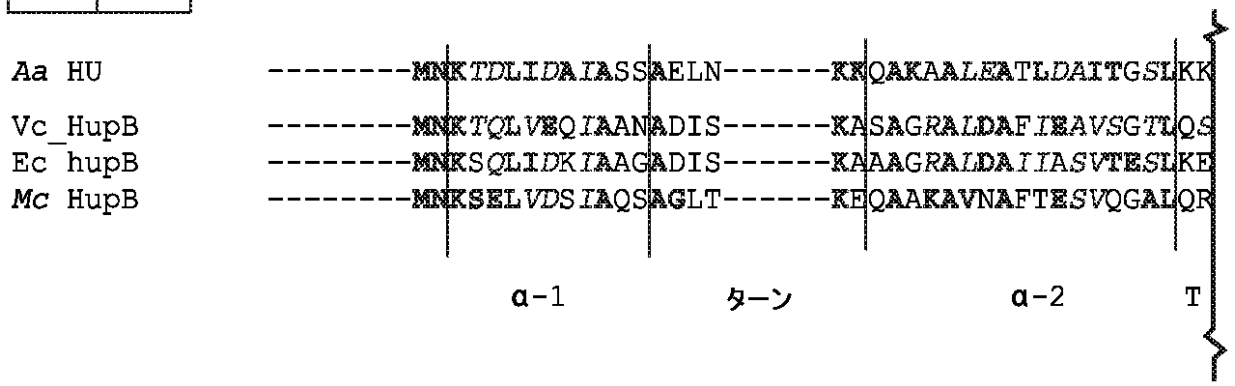


表２（続き）

【表２－４】

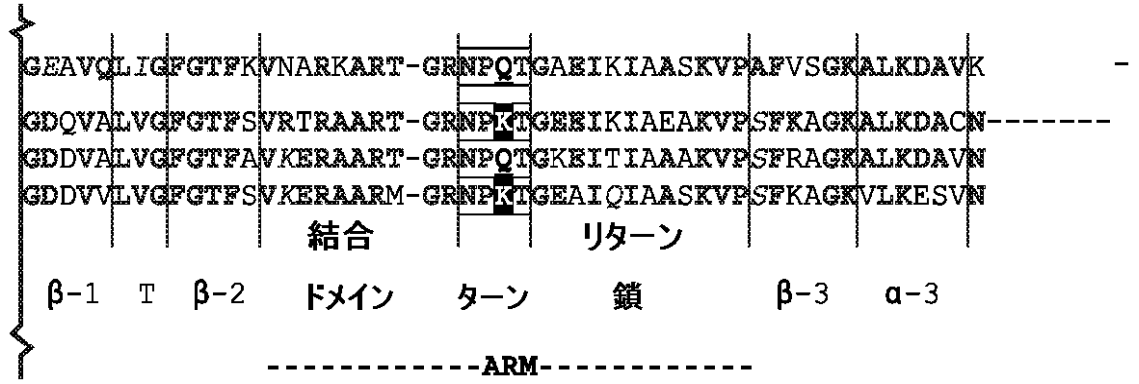


表２（続き）

【表２－５】

2	2（続き）

出現順にそれぞれ配列番号77～100

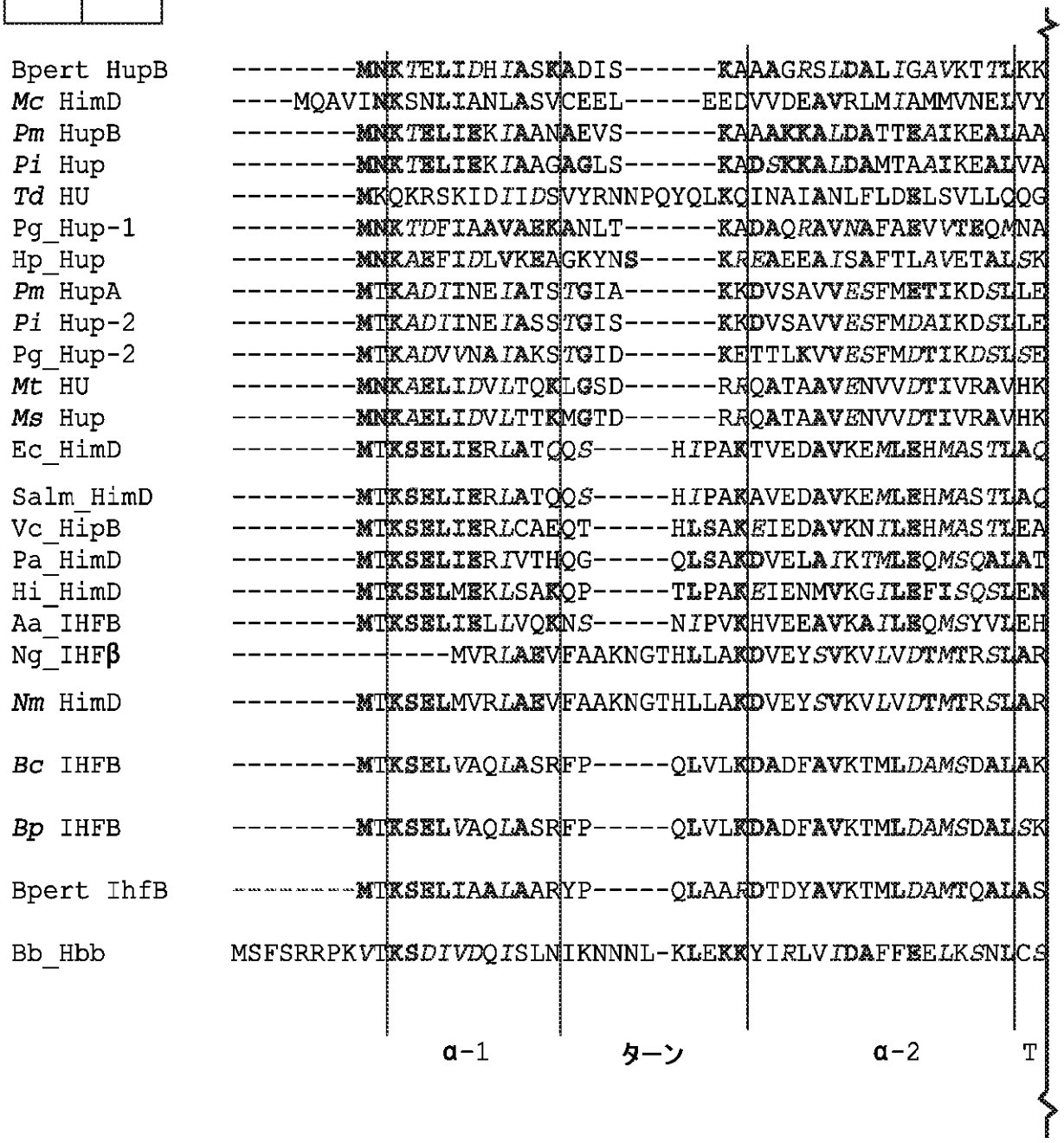


表２（続き）

【表２－６】

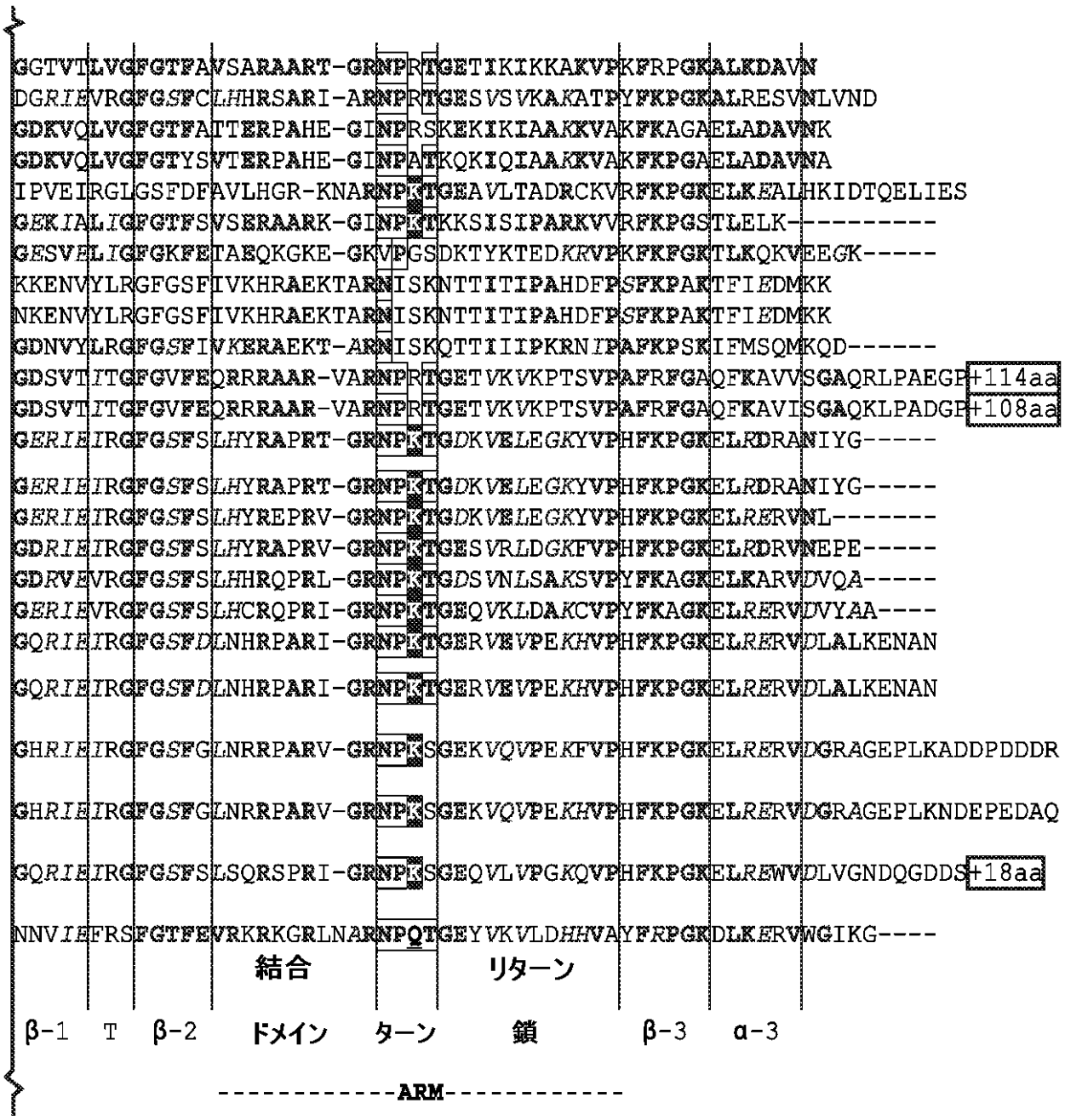


表２（続き）

【表３－１】

出現順にそれぞれ配列番号101～128

Liuらの16アミノ酸ペプチドモチーフとの比較

Strep inter HU	**EVRERAARK-GRNPQTG**
Ec_HimA	*DLRDK*NQRP-GRNPKTG
Salm_HimA	*DLRDK*NQRP-GRNPKTG
Vc_HimA	*DLRDK*NERP-GRNPKTG
Pa_HimA	*DLRDK*RQRP-GRNPKTG
Hi_HimA	*ELRDKSS*RP-GRNPKTG
Aa_IHF α	**ELRDKA**SRP-GRNPKTG
Mc HimA	**E***LKDK*KPRP-GRNPKTG
Ng_IHF α	Q*LRDK*PQRP-GRNPKTG
Nm HimA	Q*LRDK*PQRP-GRNPKTG
Bc IHFA	Q*LRDK*PQRP-GRNPKTG
Bp IHFA	Q*LRDK*PQRP-GRNPNTG
Bpert IhfA	Q*VRDK*PPRP-GRNPKTG
Pm HimA	**EV***KKR*LERV-MVNPSTG
Pi HimA	**EV***KKR*LERI-MTNPATG
Tp Dbp II	ESRVRK**A**SV-GKSINTG
Pm Hup	K**V**QAVKPR-ESVNVNTG
Pi hypo	K**V**QAVKPR-ESVNVNTG
Sa_HU	**EVRERAAR**K-GRNPQTG
Ec hupA	K**V**NHRAERT-GRNPQTG
Se_Hup	**EVRERAAR**K-GRNPQTG
Ss Hu	**EVRERAAR**K-GRNPQTG
Spyog_HU	**EVRERAAR**K-GRNPQTG
Sgall_HlpA	**EVRERAAR**K-GRNPQTG
GBS_Hup	**EVRERAAR**K-GRNPQTG
Spneu_HU	**EVRERA**ERK-GRNPQTG
Sg_HlpA	**EVRERAAR**K-GRNPQTG
Sm_HU	**EVRERAAR**K-GRNPQTG

表３

【表３－２】

出現順にそれぞれ配列番号129～139

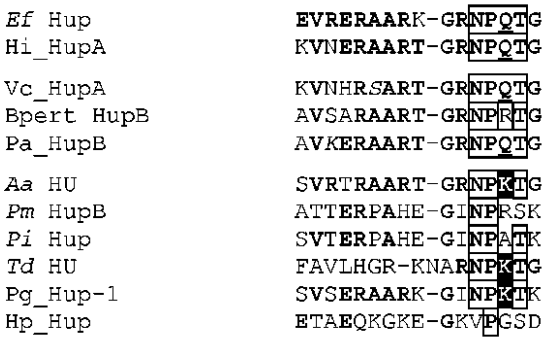


表３（続き）

【表３－３】

出現順にそれぞれ配列番号140～159

Liuらの16アミノ酸ペプチドモチーフとの比較

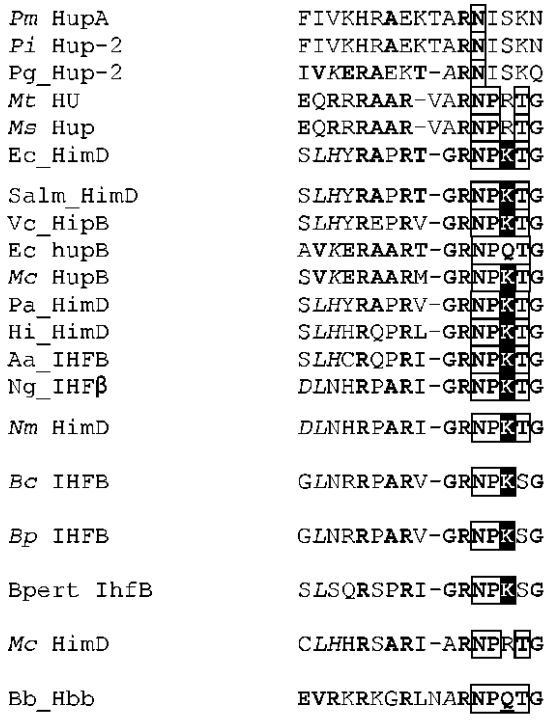


表３（続き）

表４（出現順にそれぞれ配列番号 160～336）

細菌株, タンパク質名	β3配列	α3配列	C末端 20 aa
S. pyogenes MGAS10270, HU	AFKAGK	ALKDAVK	IAASKVPAFKAGKALKDAVK
S. gallolyticus UCN34 (*S. bovis*), HlpA	AFKAGK	ALKDAVK	IAASKVPAFKAGKALKDAVK
S. sobrinus 6715　HU	AFKAGK	ALKDAVK	IAASKVPAFKAGKALKDAVK
S. agalactiae (B群Strep)2603V/R Hup	AFKAGK	ALKDAVK	IAASKVPAFKAGKALKDAVK
S. pneumoniae R6 HU	AFKAGK	ALKDAVK	IAASKVPAFKAGKALKDAVK
S. gordonii Challis NCTC7868, HlpA	AFKAGK	ALKDAVK	IAASKVPAFKAGKALKDAVK
S. mutans UA159, HU	AFKAGK	ALKDAVK	IKASKVPAFKAGKALKDAVK
Enterococcus faecalis V583, Hup	AFKPGK	ALKDAVK	IAASKVPAFKPGKALKDAVK
S. aureus MW2, HU	AFKAGK	ALKDAVK	IPASKVPAFKAGKALKDAVK
S. epidermidis RP62A Hup	AFKAGK	ALKDAVK	IPASKVPAFKAGKALKDAVK
H. influenza KW20 Rd HupA	AFVSGK	ALKDAIK	IAASKVPAFVSGKALKDAIK
Aggregatibacter actinomycetemcomitans D11S-1 HU	AFVSGK	ALKDAVK	IAASKVPAFVSGKALKDAVK
V. cholera El Tor N16961, HupA	AFVAGK	ALKDAIK	IAAANVPAFVAGKALKDAIK
E. coli K12-MG1655 hupA	AFVSGK	ALKDAVK	IAAANVPAFVSGKALKDAVK
P. aeruginosa HupB	GFKAGK	ALKDAVN	IAAAKIPGFKAGKALKDAVN
E. coli K12-MG1655 hupB	SFRAGK	ALKDAVN	IAAAKVPSFRAGKALKDAVN
V. cholera El Tor N16961 HupB	SFKAGK	ALKDACN	IAEAKVPSFKAGKALKDACN
Bordetella pertusis Tohama 1 HupB	KFRPGK	ALKDAVN	IKKAKVPKFRPGKALKDAVN
Prevotella melaninogenica ATCC 25845 HupB	KFKAGA	ELADAVNK	AAKKVAKFKAGAELADAVNK
Prevotella intermedia 17 Hup	KFKPGA	ELADAVNA	AAKKVAKFKPGAELADAVNA
Moraxella catarrhalis RH4 HupB	SFKAGK	VLKESVN	IAASKVPSFKAGKVLKESVN
P. gingivalis W83 Hup-1	RFKPGS	TLELK	ISIPARKVVRFKPGSTLELK
H. pylori 2669 Hup	KFKPGK	TLKQKVEEGK	KRVPKFKPGKTLKQKVEEGK
Prevotella melaninogenica ATCC 25845 HupA	SFKPAK	TFIEDMKK	PAHDFPSFKPAKTFIEDMKK
Prevotella intermedia 17 Hup-2	SFKPAK	TFIEDMKK	PAHDFPSFKPAKTFIEDMKK
P. gingivalis W83 Hup-2	AFKPSK	IFMSQMKQD	KRNIPAFKPSKIFMSQMKQD
Mycobacterium tuberculosis CDC1551 HU	AFRPGA	QFKAVVSGAQRLPAEGPAVKRG	AKRPATKAPAKKATARRGRK
Mycobacterium smegmatis MC2 Hup	AFRPGA	QFKAVISGAQKLPADGPAVKRG	TKAPAKKAAAKKAPAKKGRR
Prevotella melaninogenica ATCC 25845 HimA	NFKPAA	TIKGHVRKGGQDNG	NFKPAATIKGHVRKGGQDNG
Prevotella intermedia 17 HimA	NFRATA	SVKEKLKKGGAE	VLNFRATASVKEKLKKGGAE
E. coli K12-MG1655 HimA	TFRPGQ	KLKSRVENASPKDE	TFRPGQKLKSRVENASPKDE
Salmonella enteric serovar typhi CT18 HimA	TFRPGQ	KLKSRVENASPKEE	TFRPGQKLKSRVENASPKEE
V. cholera El Tor N1696 HimA	TFRPGQ	KLKARVENIKVEK	VTFRPGQKLKARVENIKVEK
P. aeruginosa HimA	TFRPGQ	KLKARVEAYAGTKS	TFRPGQKLKARVEAYAGTKS
Burkholderia cenocepacia HI2424 IHFA	TFHASQ	KLKALVENGAE	RVVTFHASQKLKALVENGAE
Burkholderia pseudomallei 668 IHFA	TFHASQ	KLKALVENGAEPDLAR	HASQKLKALVENGAEPDLAR
Bordetella pertusis Tohama 1 IhfA	TFHASQ	KLKSVVEQPNSPPDPASAE	QKLKSVVEQPNSPPDPASAE
N. gonorrhoeae FA1090 (Oklahoma) IHFα	TFHASQ	KLKGMVEHYYDKQR	TFHASQKLKGMVEHYYDKQR
N. meningitides MC58 HimA	TFHASQ	KLKSMVEHYYDKQR	TFHASQKLKSMVEHYYDKQR

【表４－２】

表 4 （続き）

H. influenza KW20 Rd HimA	TFKPGQ	KLRARVEKTK	RRVVTFKPGQKLRARVEKTK
Aggregatibacter actinomycetemcomitans D11S-1 HimA	VFKPGQ	KLRNRVEKVKPKA	VVFKPGQKLRNRVEKVKPKA
Moraxella catarrhalis RH4 HimA	TFKAGQ	KLRGWIDSQNEG	VVTFKAGQKLRGWIDSQNEG
Treponema palladium Nichols DNA_binding_protein_II	VFRPSK	RLKSAVRGYRSGEVGAD	PSKRLKSAVRGYRSGEVGAD
Prevotella melaninogenica ATCC 25845 Hup	SFTPDT	VMKELVNKPFSQFETVVINDGV	MQAGDTMKVPKVELRPEYRK
Prevotella intermedia 17 **仮想**	SFTPDA	TMKELVNKPFAQFETVVLNDGV	SAGDTMKVPKVELRPQYRTK
E. coli K12-MG1655 HimD	HFKPGK	ELRDRANIYG	KYVPHFKPGKELRDRANIYG
Salmonella enteric serovar typhi CT18 bHimD	HFKPGK	ELRDRANIYG	KYVPHFKPGKELRDRANIYG
V. cholera El Tor N1696 HipB	HFKPGK	ELRERVNL	EGKYVPHFKPGKELRERVNL
P. aeruginosa HimD	HFKPGK	ELRDRVNEPE	KFVPHFKPGKELRDRVNEPE
H. influenza KW20 Rd HimD	YFKAGK	ELKARVDVQA	KSVPYFKAGKELKARVDVQA
Aggregatibacter actinomycetemcomitans D11S-1 IHFB	YFKAGK	ELRERVDVYAA	CVPYFKAGKELRERVDVYAA
N. gonorrhoeae FA1090 (Oklahoma) IHFβ	HFKPGK	ELRERVDLALKENAN	FKPGKELRERVDLALKENAN
N. meningitides MC58 HimD	HFKPGK	ELRERVDLALKENAN	FKPGKELRERVDLALKENAN
Burkholderia cenocepacia HI2424 IHFB	HFKPGK	ELRERVDGRAGEPLKADDPDDDR	ERVDGRAGEPLKADDPDDDR
Burkholderia pseudomallei 668 IHFB	HFKPGK	ELRERVDGRAGEPLKNDEPEDAQ	ERVDGRAGEPLKNDEPEDAQ
Bordetella pertusis Tohama 1 IhfB	HFKAGK	ELREWVDLVGNDQGDDSSNGSS	DSSNGSSDPLQSVMDMHAMH
Moraxella catarrhalis RH4 HimD	YFKPGK	ALRESVNLVND	ATPYFK?GKALRESVNLVND
B. burgdorferi B31 Hbb	YFRPGK	DLKERVWGIKG	HVAYFR?GKDLKERVWGIKG
		ELKEALHKIDTQELIES	PGKELKEALHKIDTQELIES
Treponema denticola ATCC 35405 HU	RFKPGK		

【図１】

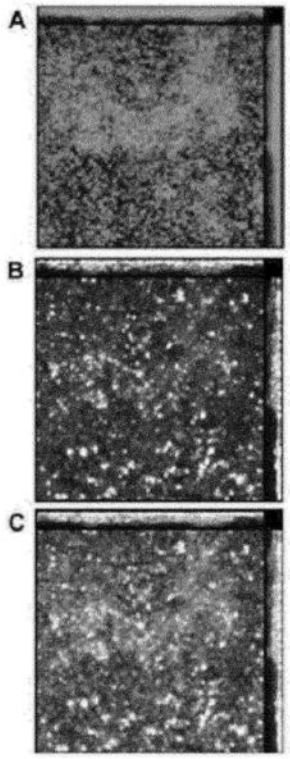


FIG. 1

【図２】

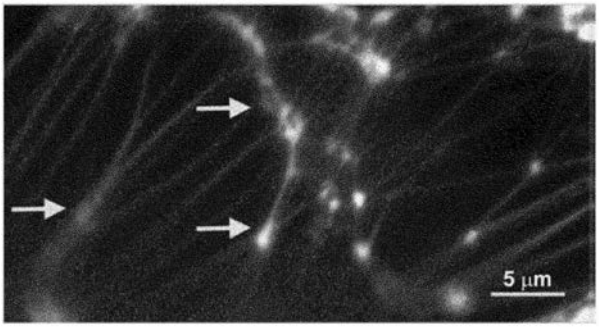


FIG. 2

【図３Ａ－Ｃ】

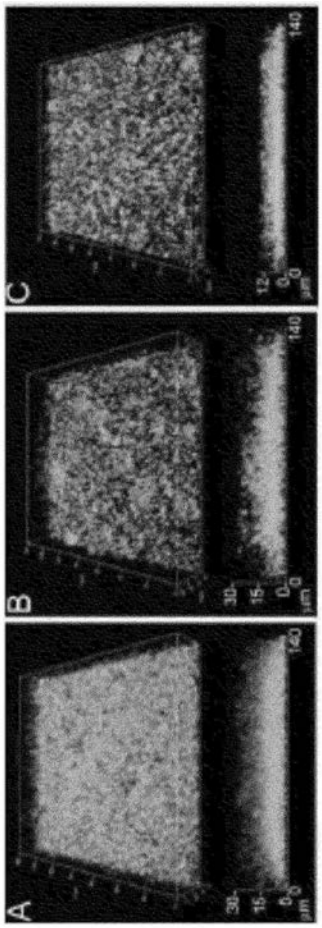


FIG. 3

【図３Ｄ－Ｈ】

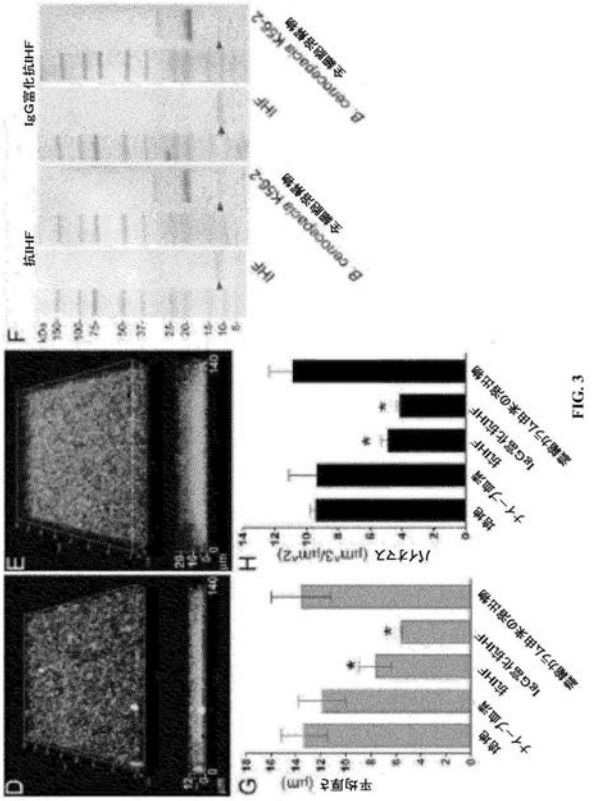


FIG. 3

【図４Ａ－Ｌ】

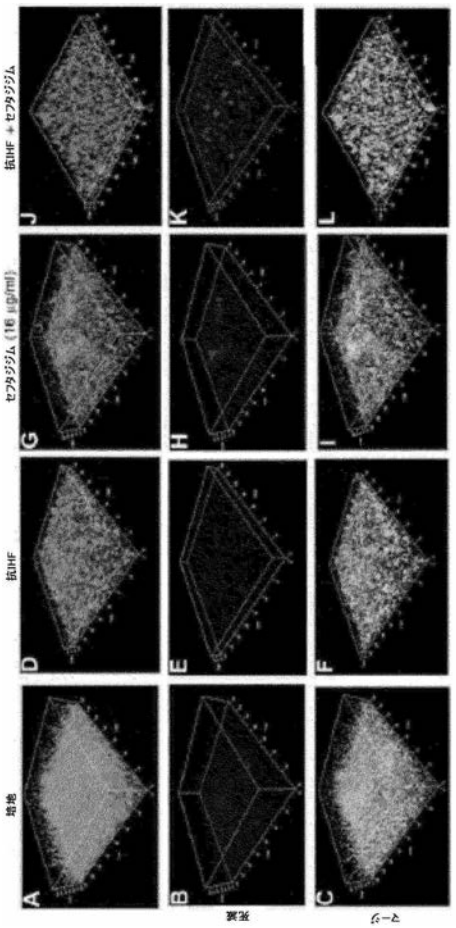


FIG. 4

【図４Ｍ－Ｎ】

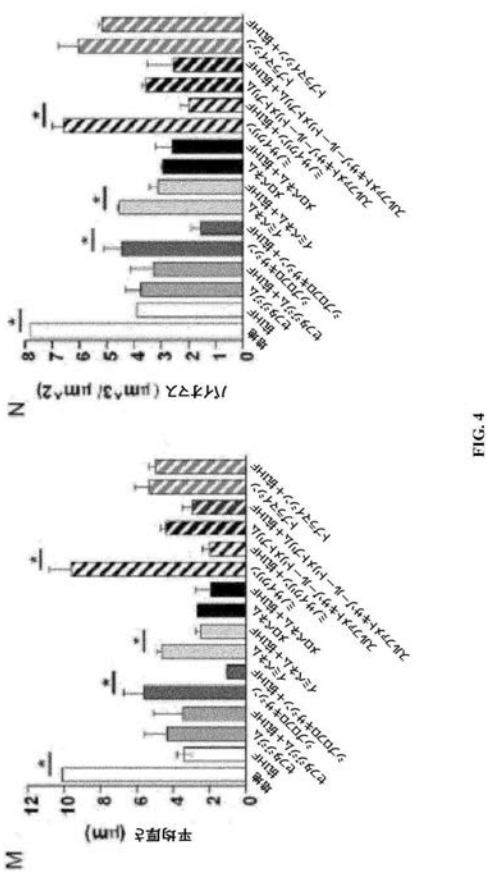


FIG. 4

【図５Ａ－Ｃ】

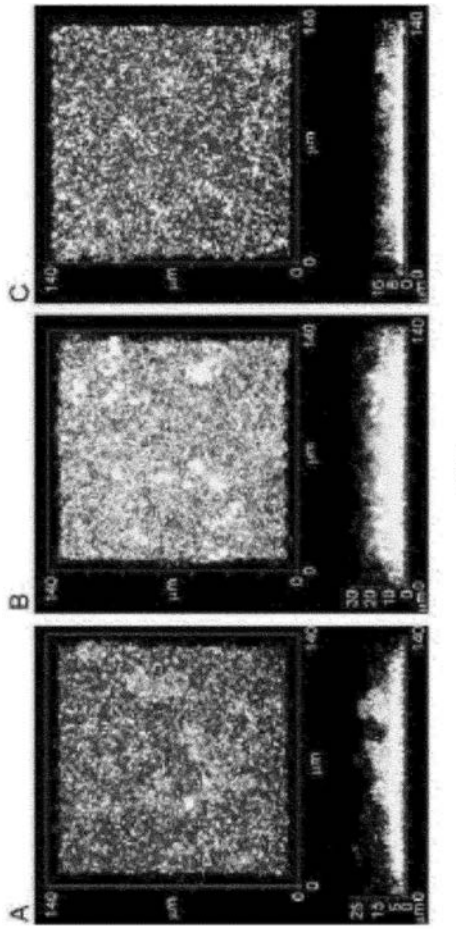


FIG. 5

【図５Ｄ－Ｅ】

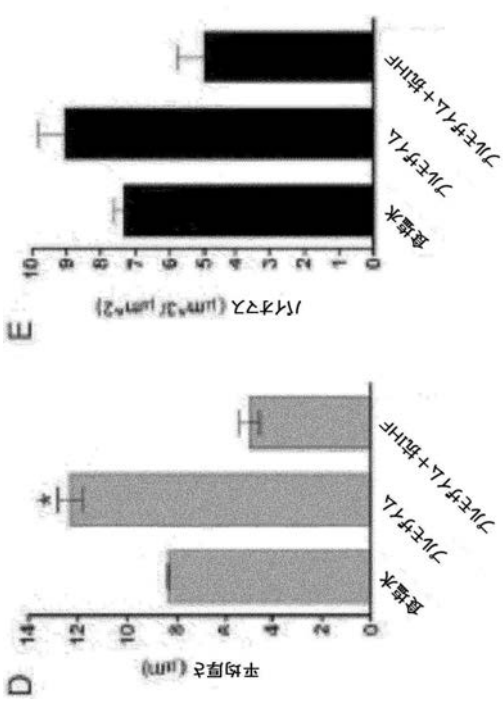
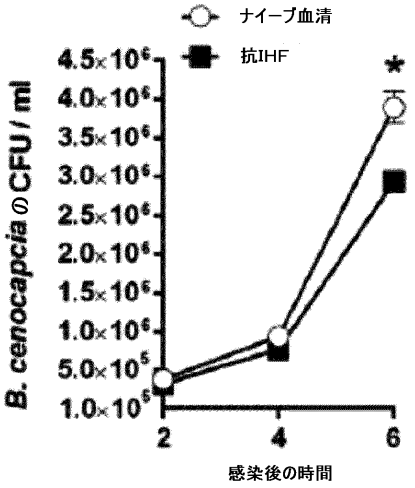


FIG. 5

【図６】



	2時間	4時間	6時間
ナイーブウサギ血清	$3.9 \times 10^5 \pm 4.2 \times 10^3$	$9.4 \times 10^5 \pm 1.8 \times 10^4$	$3.9 \times 10^6 \pm 2.1 \times 10^5$
ウサギ抗IHF	$3.3 \times 10^5 \pm 2.4 \times 10^4$	$7.7 \times 10^5 \pm 7.1 \times 10^2$	$*2.9 \times 10^6 \pm 7.1 \times 10^3$

$*p < 0.05$

FIG. 6

【図７】

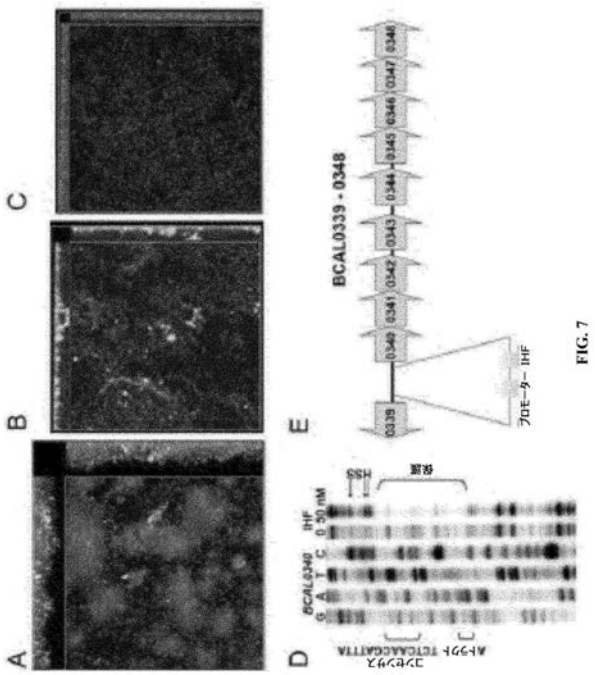


FIG. 7

【図８】

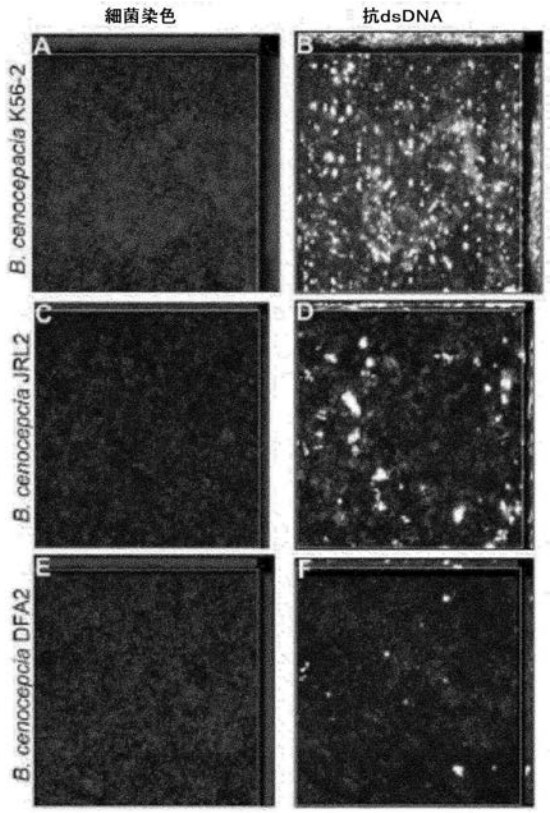


FIG. 8

【図９】

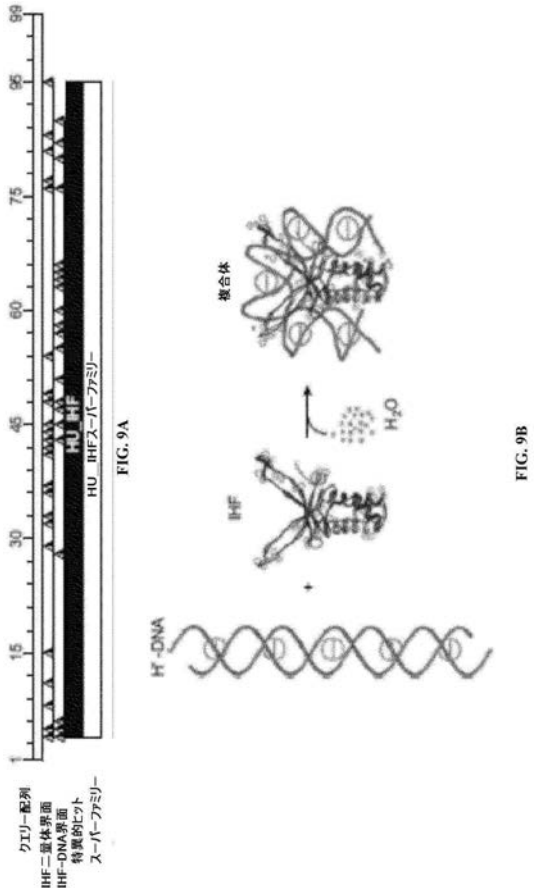


FIG. 9A

FIG. 9B

【図１０】

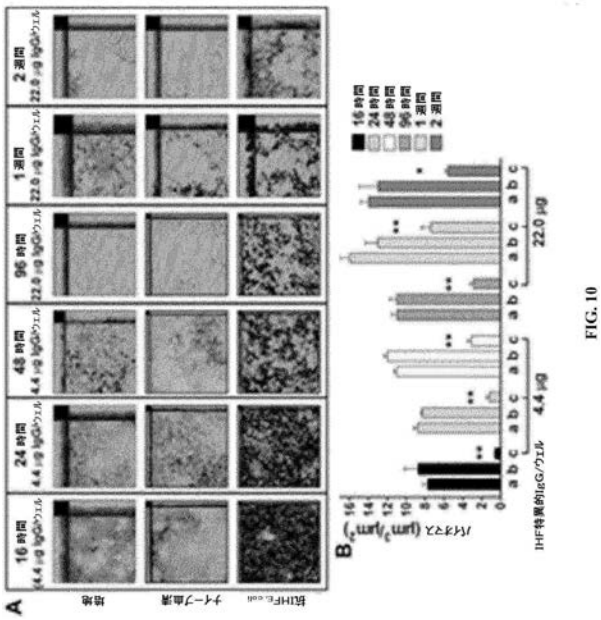


FIG. 10

【図１１Ａ】

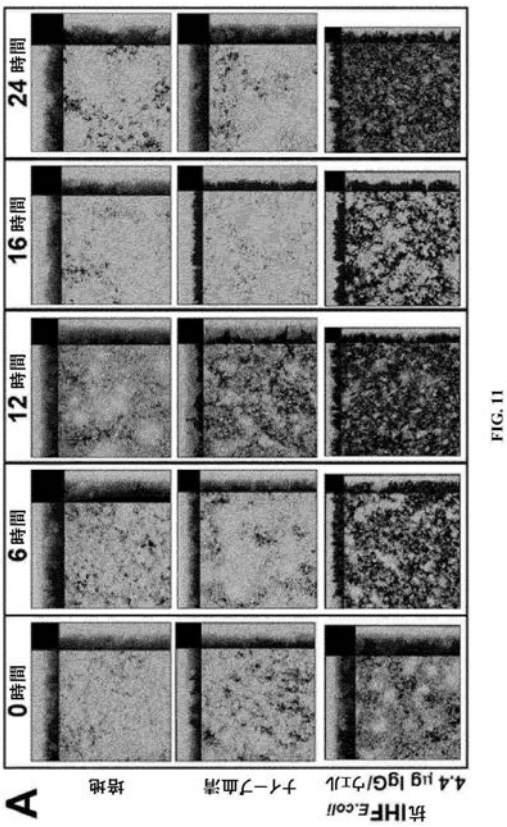


FIG. 11

【図１１Ｂ】

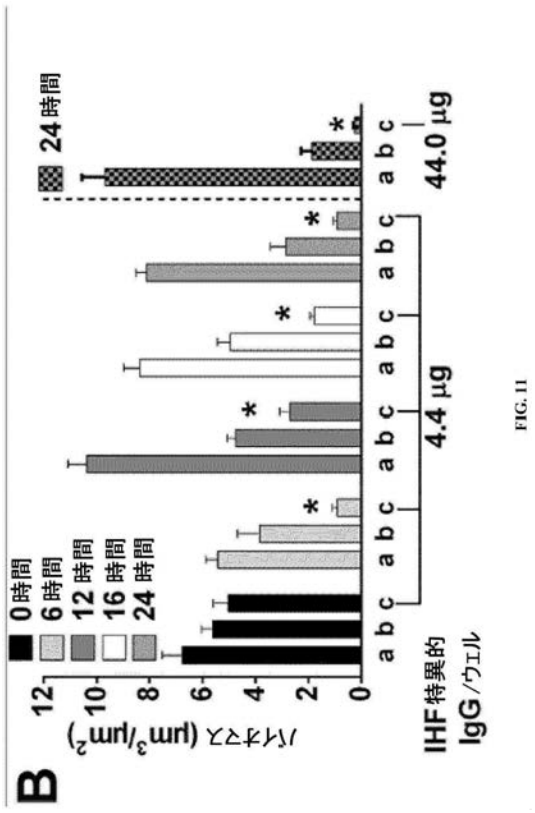


FIG. 11

【図１１Ｃ】

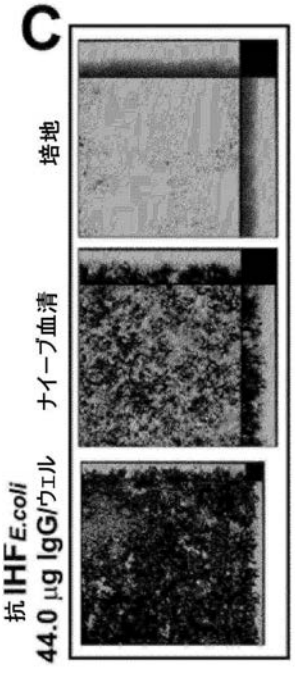


FIG. 11

【図１２】

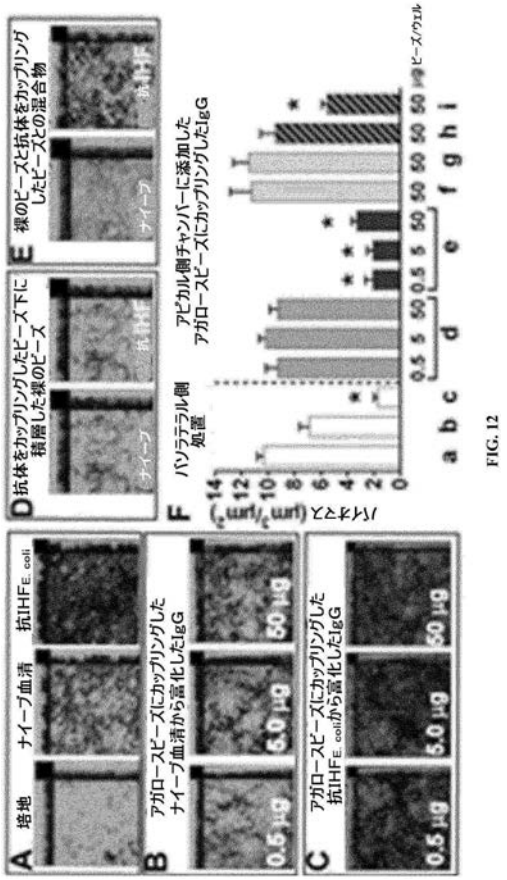


FIG. 12

【図１３Ａ】

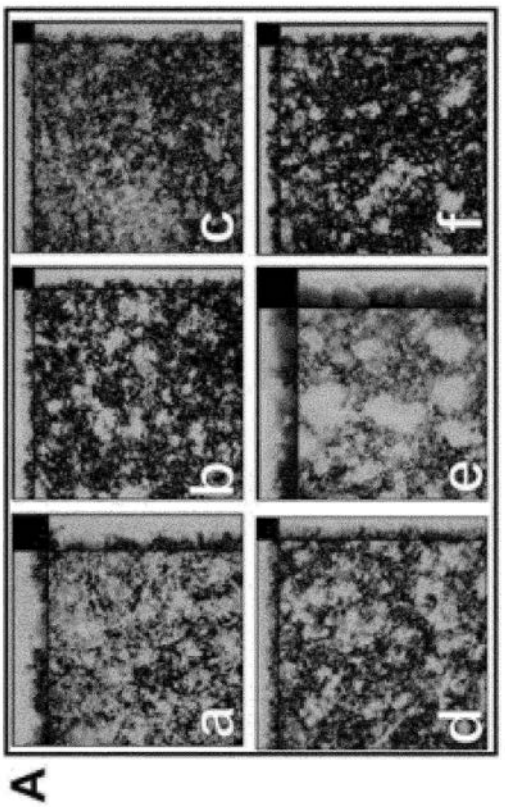


FIG. 13

【図１３Ｂ】

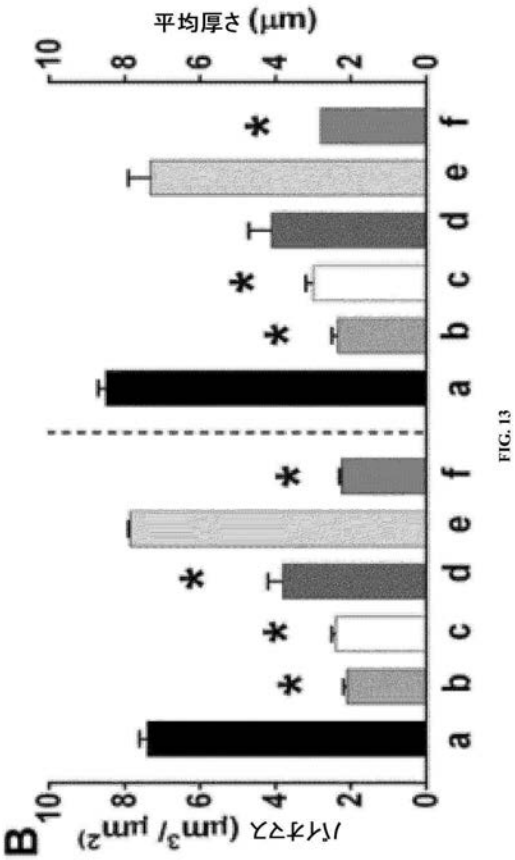


FIG. 13

【図１４】

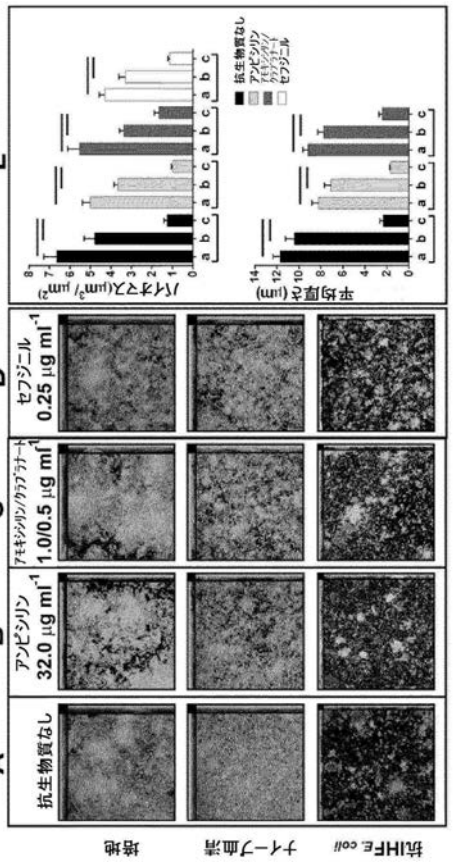


FIG. 14

【図１５】

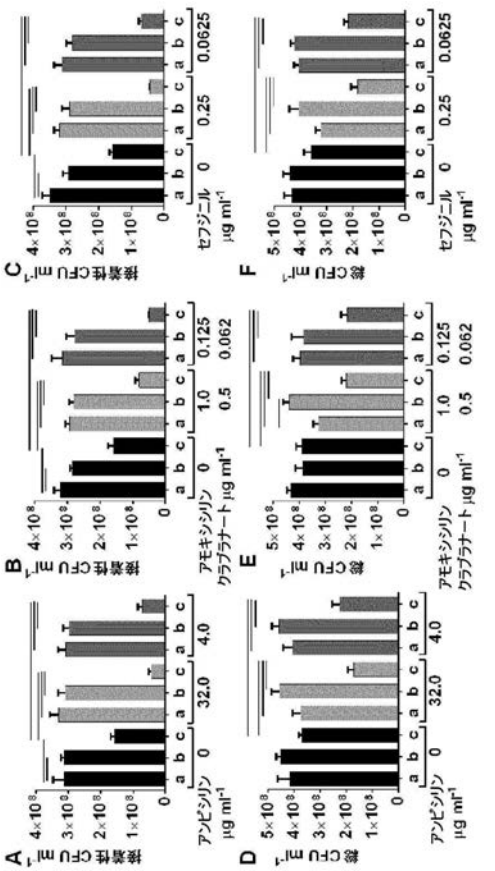


FIG. 15

【図１６Ａ－Ｃ】

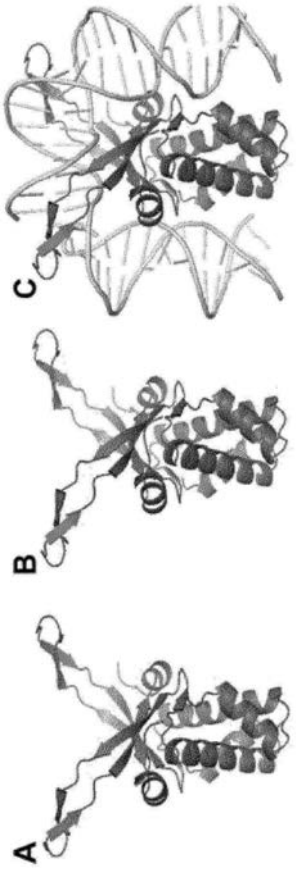


FIG. 16

【図１６Ｄ－Ｆ】

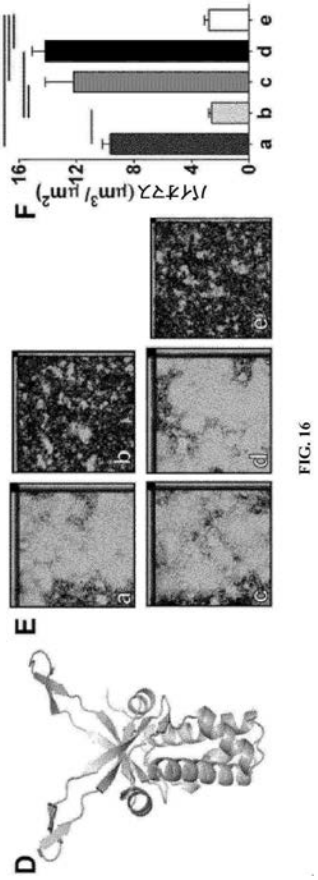


FIG. 16

【図１７】

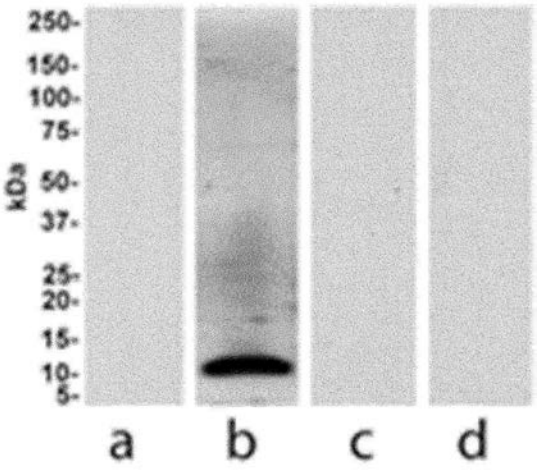


FIG. 17

【図１８】

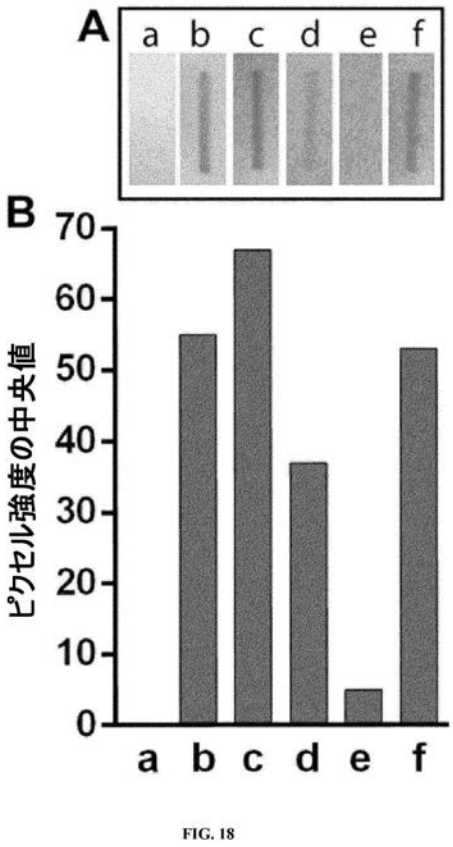


FIG. 18

【図１９】

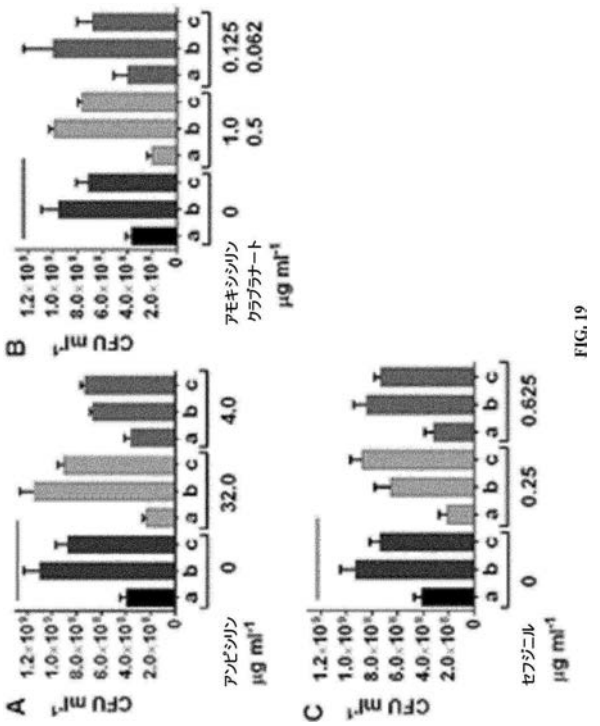


FIG. 19

【配列表】
2017143841000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
Ａ６１Ｋ 39/39	***(2006.01)***	Ａ６１Ｋ	39/395	Ｍ	
Ａ６１Ｐ 31/04	***(2006.01)***	Ａ６１Ｋ	39/39		
Ａ６１Ｋ 35/12	***(2015.01)***	Ａ６１Ｐ	31/04		
Ａ６１Ｋ 31/7088	***(2006.01)***	Ａ６１Ｋ	35/12		
		Ａ６１Ｋ	31/7088		

(71)出願人 514137997
オハイオ・ステイト・イノベーション・ファウンデーション
アメリカ合衆国オハイオ州４３２０１，コロンバス，ノース・ハイ・ストリート １５２４
(74)代理人 100078282
弁理士 山本 秀策
(74)代理人 100113413
弁理士 森下 夏樹
(74)代理人 100181674
弁理士 飯田 貴敏
(74)代理人 100181641
弁理士 石川 大輔
(74)代理人 230113332
弁護士 山本 健策
(72)発明者 スティーブン ディー. グッドマン
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９００１５， ロサンゼルス， サウス オリーブ ストリート １１５０， スイート ２３００， ユニバーシティ オブ サザン カリフォルニア 気付
(72)発明者 ローレン オー. バカレッツ
アメリカ合衆国 オハイオ ４３２０５， コロンバス， チルドレンズ ドライブ ７００， リサーチ インスティチュート アット ネイションワイド チルドレンズ ホスピタル 気付
(72)発明者 アマル アメル
アメリカ合衆国 オハイオ ４３２０１， コロンバス， ノース ハイ ストリート １５２４ ， オハイオ ステイト イノベーション ファウンデーション 気付

Ｆターム(参考) 4B065 AA01X AA90X BA08 BC03 BC26 CA25 CA44 CA46
4C085 AA13 AA14 AA38 BA15 BB11 CC23 EE01 EE06
4C086 AA01 AA02 AA03 EA16 MA01 MA04 NA14 ZB35
4C087 AA01 AA02 AA03 BB65 NA14 ZB35
4H045 AA11 DA76 EA20 EA50

【外国語明細書】
2017143841000001.pdf