

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第3部門第3区分

【発行日】平成20年10月16日(2008.10.16)

【公表番号】特表2004-506086(P2004-506086A)

【公表日】平成16年2月26日(2004.2.26)

【年通号数】公開・登録公報2004-008

【出願番号】特願2002-521535(P2002-521535)

【国際特許分類】

C 0 8 B 37/00 (2006.01)

A 6 1 K 39/145 (2006.01)

A 6 1 K 39/395 (2006.01)

A 6 1 P 31/16 (2006.01)

C 0 7 K 16/12 (2006.01)

C 1 2 P 21/08 (2006.01)

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

【F I】

C 0 8 B 37/00 Z

A 6 1 K 39/145

A 6 1 K 39/395 D

A 6 1 K 39/395 N

A 6 1 P 31/16

C 0 7 K 16/12

C 1 2 P 21/08

C 1 2 N 15/00 A

【手続補正書】

【提出日】平成20年8月27日(2008.8.27)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

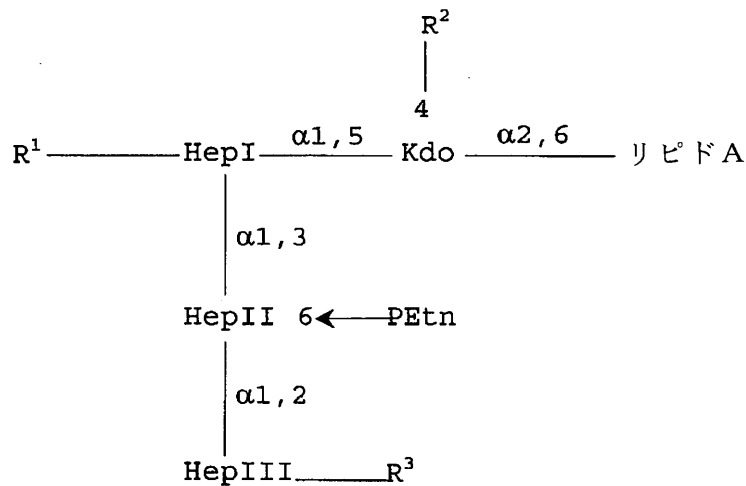
【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

以下の構造 [I I] :

【化1】



[R^1 は水素、 β -D-Glcp (1→4)、または PC_{Ho}→6) - β -D-Glcp (1→4) であり；

R^2 はリン酸基 (P) またはピロホスホエタノールアミン (P-PEtn) であり；

R^3 は水素、 β -D-Glcp または β -D-Galp であり、 R^1 が水素または β -D-Glcp (1→4) である場合には、 R^3 はさらに、
 β -D-Galp - (1→4) - β -D-Glcp、
 α -D-Galp - (1→4) - β -D-Galp - (1→4) - β -D-Glcp、
 β -D-GalpNAc - (1→3) - α -D-Galp - (1→4) - β -D-Galp - (1→4) - β -D-Glcp、または
 α -NeuAc (2→3) - β -D-Galp - (1→4) - β -D-Glcp - (1→3)

であってもよく、 R^3 は HepIII の O-3 位または O-2 位に結合しており；

Kdo は 3-デオキシ-D-マンノ-2-オクツロソン酸であり；

リピドAは解毒されている]

を有するトリヘプトシル内部コア部分から本質的になる、単離されたりボ多糖部分。

【請求項2】

請求項1に記載のリボ多糖部分を、医薬上許容される担体とともに含んでなる、組成物。

【請求項3】

医薬上許容される担体が免疫原性である、請求項2に記載の組成物。

【請求項4】

請求項1に記載のリボ多糖部分に特異的に結合する、抗体。

【請求項5】

保存されたトリヘプトシル内部コア部分に結合するモノクローナル抗体である、請求項4に記載の抗体。

【請求項6】

インフルエンザ菌の感染に起因する疾病を治療する方法であって、このような治療を必要とする被験体に、請求項2に記載の組成物を投与することを含んでなる、方法。

【請求項7】

インフルエンザ菌が非定型インフルエンザ菌である、請求項6に記載の方法。

【請求項8】

前記疾病が、中耳炎、髄膜炎、肺炎および気道感染症からなる群から選択されるものである、請求項7に記載の方法。

【請求項9】

受託番号 IDAC250801-1 として寄託されている、インフルエンザ菌 Rd1 ic11psA 株。

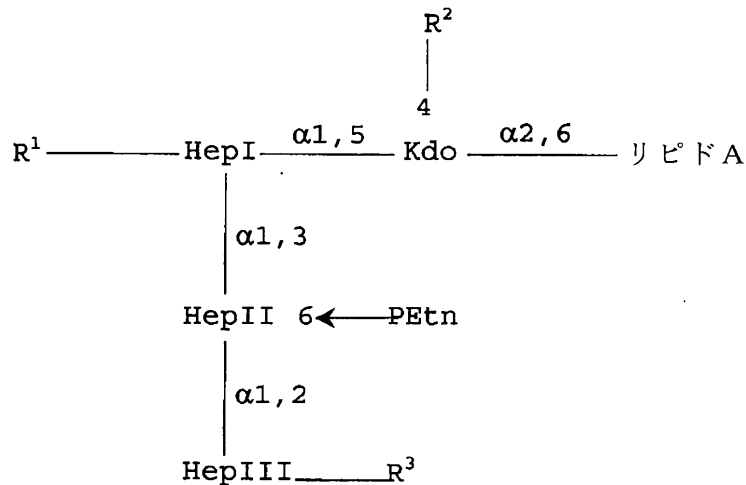
【請求項10】

受託番号 I D A C 2 5 0 8 0 1 - 2 として寄託されている、インフルエンザ菌 1 0 0 3 l i c 1 l p s A 株。

【請求項11】

以下の構造 [I I] :

【化2】



[R^1 は水素、 β -D-Glcp (1→4)、または PCho→6) - β -D-Glcp (1→4) であり；

R^2 はリン酸基 (P) またはピロホスホエタノールアミン (P-P-Etn) であり；

R^3 は水素、 β -D-Glcp、 β -D-Galp、 β -D-Galp - (1→4) - β -D-Glcp、または α -D-Galp - (1→4) - β -D-Galp - (1→4) - β -D-Glcp であり、 R^1 が水素または β -D-Glcp (1→4) である場合には、 R^3 はさらに、

β -D-GalpNAc - (1→3) - α -D-Galp - (1→4) - β -D-Galp - (1→4) - β -D-Glcp、または α -NeuAc (2→3) - β -D-Galp - (1→4) - β -D-Glcp - (1→3) である；

であってもよく、 R^3 は HepIII の O-3 位または O-2 位に結合しており；

Kdo は 3-デオキシ-D-マンノ-2-オクツロソン酸である]

を有する保存されたトリヘプトシル内部コア部分から本質的になるリポ多糖部分を製造する方法であって、

- l p s A、l i c 1、l i c 2、l i c 2 A、l i c 2 o r f 3、l i c 2 B、l i c 3 A、l g t C、l g t D および l g t F からなる群から選択される 1 以上の不活性化された遺伝子で、インフルエンザ菌株を形質転換すること；

- 形質転換されたインフルエンザ菌株を、前記リポ多糖部分の発現に適した条件下で培養すること；

- 前記リポ多糖部分を単離すること；ならびに

- 前記リポ多糖部分のリポド A 部分を解毒すること

を含んでなる、方法。

【請求項12】

インフルエンザ菌が非定型インフルエンザ菌である、請求項11に記載の方法。

【請求項13】

l p s A、l i c 1、l i c 2、l i c 2 A、l i c 2 o r f 3、l i c 2 B、l i c 3 A、l g t C、l g t D、l g t F、r f a F および o r f H からなる群から選択される 1 以上の遺伝子の不活性化の後に発現したエピトープに特異的なモノクローナル抗体に

、前記リボ多糖部分を接触させることにより、前記リボ多糖部分を同定することをさらに含んでなる、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

前記モノクローナル抗体が、請求項 1 に記載の保存されたトリヘプトシル内部コア部分に結合するものである、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

請求項 1 に記載のリボ多糖部分、および該リボ多糖部分に架橋した免疫原性担体を含んでなる、糖結合体。

【請求項 16】

前記リボ多糖部分と前記免疫原性担体がリンカー分子で架橋されている、請求項 15 に記載の糖結合体。

【請求項 17】

前記リンカー分子が、アジピン酸ジヒドラジド (ADH)、 ϵ -アミノヘキサン酸、クロロヘキサノールジメチルアセタール、D-グルクロノラクトンおよび p-ニトロフェニルアミンからなる群から選択されるものである、請求項 16 に記載の糖結合体。

【請求項 18】

前記担体が、破傷風トキソイド (TT) または非定型インフルエンザ菌高分子量タンパク質 (NTHi HMP) である、請求項 15 に記載の糖結合体。

【請求項 19】

請求項 15 に記載の 1 以上の糖結合体およびアジュバントを含んでなる、被験体において非定型インフルエンザ菌感染に対する免疫応答を引き起こすための免疫原組成物。

【請求項 20】

リボソームとして製剤化されている、請求項 19 に記載の免疫原組成物。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0018

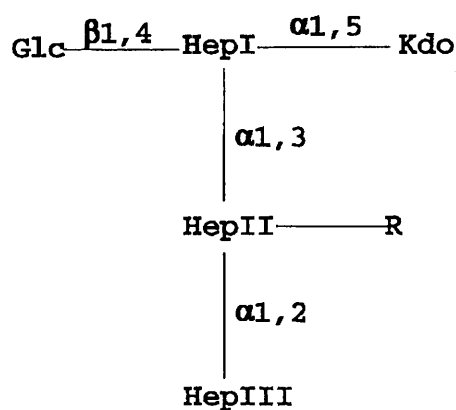
【補正方法】変更

【補正の内容】

【0018】

他の態様によれば、本発明により、以下の構造 [I] :

【化 3】



[R は水素またはホスホエタノールアミンであり、Glc は D-グルコピラノースであり、Kdo は 3-デオキシ-D-マンノ-2-オクツロソン酸である]

を有するインフルエンザ菌リボ多糖のトリヘプトシル内部コア部分を含んでなるリボ多糖部分が提供される。

【手続補正 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0019

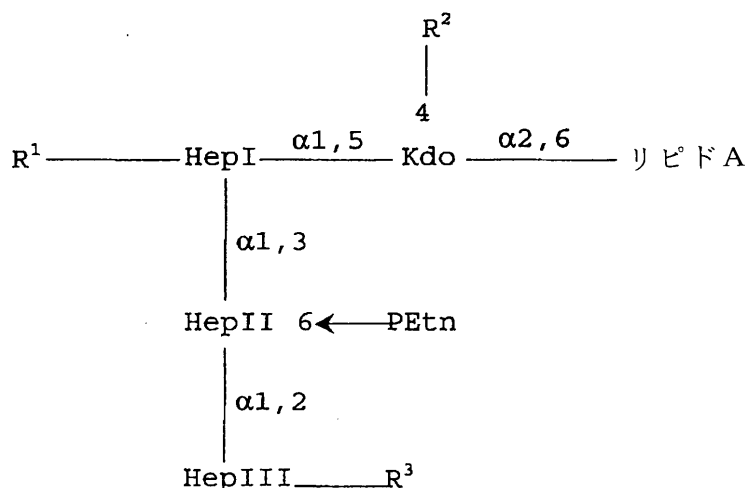
【補正方法】変更

【補正の内容】

【0019】

他の態様によれば、本発明により、以下の構造 [I I] :

【化 4】



[R^1 は水素、 β -D-Glcp (1 $\rightarrow$ 4)、または PCho $\rightarrow$ 6) - β -D-Glcp (1 $\rightarrow$ 4) であり；

R^2 はリン酸基 (P) またはピロホスホエタノールアミン (P-PEtn) であり；

R^3 は水素、 β -D-Glcp または β -D-Galp であり、 R^1 が水素または β -D-Glcp (1 $\rightarrow$ 4) である場合には、 R^3 はさらに、
 β -D-Galp - (1 $\rightarrow$ 4) - β -D-Glcp、
 α -D-Galp - (1 $\rightarrow$ 4) - β -D-Galp - (1 $\rightarrow$ 4) - β -D-Glcp、
 β -D-GalpNAc - (1 $\rightarrow$ 3) - α -D-Galp - (1 $\rightarrow$ 4) - β -D-Galp - (1 $\rightarrow$ 4) - β -D-Glcp、または
 α -NeuAc (2 $\rightarrow$ 3) - β -D-Galp - (1 $\rightarrow$ 4) - β -D-Glcp - (1 $\rightarrow$ 3)

であってもよく、 R^3 は HepIII の O-3 位または O-2 位に結合しており；

Kdo は 3-デオキシ-D-マンノ-2-オクトロソン酸であり；

リポド A は解毒されている]

を有するインフルエンザ菌リポ多糖のトリヘプトシル内部コア部分から本質的になる単離されたりポ多糖部分が提供される。

【手続補正 4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0020

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0020】

他の態様によれば、本発明により、本明細書に記載のいずれかのリポ多糖部分を含んでなる、動物宿主においてインフルエンザ菌により引き起こされる疾病に対する防御を与えるための免疫原組成物が提供される。

【手続補正 5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0021

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0021】

他の態様によれば、本発明により、本明細書に記載のいずれかのリポ多糖部分、および該リポ多糖部分に架橋した免疫原性担体を含んでなる、糖結合体が提供される。

【手続補正 6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0022

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0022】

他の態様によれば、本発明により、本明細書に記載のいずれかのリポ多糖部分を含んでなるインフルエンザ菌株を得るための、インフルエンザ菌においてリポ多糖を産生する生合成経路中の少なくとも一つの遺伝子の使用が提供される。

【手続補正 7】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0023

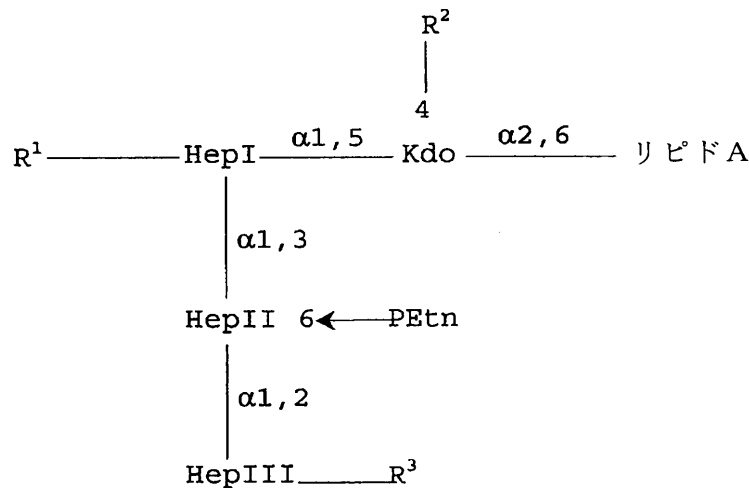
【補正方法】変更

【補正の内容】

【0023】

他の態様によれば、本発明により、以下の構造 [I I] :

【化 5】



[R¹ は水素、β-D-Glc p (1→4)、または PCho→6) - β-D-Glc p (1→4) であり；

R² はリン酸基 (P) またはピロホスホエタノールアミン (P-PEtn) であり；

R³ は水素、β-D-Glc p、β-D-Gal p、β-D-Gal p - (1→4) - β-D-Glc p、または α-D-Gal p - (1→4) - β-D-Gal p - (1→4) - β-D-Glc p であり、R¹ が水素または β-D-Glc p (1→4) である場合には、R³ はさらに、

β-D-Gal pNAc - (1→3) - α-D-Gal p - (1→4) - β-D-Gal p - (1→4) - β-D-Glc p、または
α-NeuAc (2→3) - β-D-Gal p - (1→4) - β-D-Glc p - (1→3)

であってもよく、R³ は HepIII の O-3 位または O-2 位に結合しており；

Kdo は 3-デオキシ-D-マンノ-2-オクツロソン酸である]

を有する保存されたトリヘプトシル内部コア部分から本質的になるリポ多糖部分を製造する方法が提供され、該方法は、

-lpsA、lic1、lic2、lic2A、lic2orf3、lic2B、lic

3 A、1 g t C、1 g t Dおよび1 g t Fからなる群から選択される1以上の不活性化された遺伝子で、インフルエンザ菌株を形質転換すること；

－形質転換されたインフルエンザ菌株を、前記リボ多糖部分の発現に適した条件下で培養すること；

－前記リボ多糖部分を単離すること；ならびに

－前記リボ多糖部分のリピドA部分を解毒すること

を含んでなる。

【手続補正8】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0024

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0024】

他の態様によれば、本発明により、インフルエンザ菌に対する機能性交差反応性抗体を誘導するための、本明細書に記載のいずれかのリボ多糖部分を含んでなる少なくとも一つの免疫原性エピトープの使用が提供される。

他の態様によれば、本発明により、インフルエンザ菌との交差反応性を有し、かつ本明細書に記載のいずれかのリボ多糖部分によって誘導される機能性抗体が提供される。

他の態様によれば、本発明により、インフルエンザ菌に対する機能性交差反応性抗体を製造する方法であって、(a) 上記のいずれかのリボ多糖部分に対する抗体を作製し、(b) 複数のインフルエンザ菌株に対して前記抗体を試験し、そして(c) 交差反応性を有する抗体を選択することを含んでなる方法が提供される。

他の態様によれば、本発明により、インフルエンザ菌の感染に起因する疾病に対して宿主を免疫化する方法であって、免疫上有効量の上記免疫原組成物を宿主に投与することを含んでなる方法が提供される。

【手続補正9】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0026

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0026】

インフルエンザLP S分子の炭水化物領域は、宿主免疫応答により認識される標的となる。特定のオリゴ糖エピトープの発現は、インフルエンザ菌感染の病因に関与することが分かっている。インフルエンザ菌LP Sの生物学的性質および細菌毒性におけるその役割を理解するには、構造の決定が重要である。インフルエンザ菌LP Sは、可変オリゴ糖部分と膜固定リピドA成分からなる異種分子混合物を含んでなる(Zamze, S.E., and Moxon, E.R. (1987) J. Gen. Microbiol. 133, 1433-1451)。本明細書に記載の実験をもとに、リン酸化されたケトデオキシオクトン酸残基を介してリピドA成分と結合している保存されたトリヘプトシル内部コア部分からなるインフルエンザ菌LP Sの構造モデルを作成した。本発明者らがこれまでに検討した総ての株において、このトリヘプトシル部分は以下の構造要素：

$$L - \underline{\alpha} - D - H e p \underline{p} - (1 \rightarrow 2) - L - \underline{\alpha} - D - H e p \underline{p} - [\underline{\beta} - D - G l c \underline{p} - (1 \rightarrow 4)] - (1 \rightarrow 3) - L - \underline{\alpha} - D - H e p \underline{p} - (1 \rightarrow 5) - K d o$$

から構成されていた。さらに、本発明者らがこれまでに検討した総ての株では、この1, 2-結合したヘプトース残基(Hep II)は、6位においてホスホエタノールアミン部分で置換されている。

【手続補正10】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0027

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0027】

内部コア領域内のヘプトース残基の各々は、ヘキソース含有オリゴ糖鎖の伸長または非炭水化物置換基の結合のための部位となりうる。公表されているデータ(Masoud et al., Biochem. 36: 2091-2103, 1997; Risberg et al., Eur. J. Biochem. 261: 171-180, 1999)によれば、この保存された内部コア部分の末端のヘプトース残基(Hep III)がO-2位で β -D-Glc p残基または β -D-Gal p残基により置換されることが示されている。また、Hep IIも置換されることがあり、特に、その3位において α -D-グルコース残基または置換された α -D-グルコース残基によって置換されることがある。隣接ヘプトース残基(Hep I)と1, 4-結合している β -D-グルコース残基は、それ自体、 β -D-グルコース、 β -D-ガラクトース、ヘプトース(例えば、L-グリセロ-D-マンノヘプトースおよびD-グリセロ-D-マンノヘプトースなど)またはこれらのオリゴ糖により、さらに置換されることがある。これらの糖残基の他、オリゴ糖鎖伸長部は β -D-ガラクトース、 β -D-グルコサミン、 β -D-ガラクトサミン、および5-N-アセチルノイライミン酸(acetylneuraminic acid)(シアル酸)を含むこともある。

【手続補正11】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0029

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0029】

b型RM7004株の所定の変異体(Schweda, E.K.M., Hegedus, O.E., Borrelli, S., Lindberg, A.A., Weiser, J.W., Maskell, D.J., and Moxon, E.R. (1993) Carbohydr. Res. 246, 319-330; Schweda, E.K.H., Jansson, P.-E., Moxon, E.R., and Lindberg, A.A. (1995) Carbohydr. Res. 272, 213-224)では、b型RM118株由来の形質転換変異体(Risberg, A., Schweda, E.K.H., and Jansson, P.-E. (1997) Eur. J. Biochem. 243, 701-707; Risberg, A., Alvelius, G., and Schweda, E.K.H. (1999) Eur. J. Biochem. 265, 1067-1074), およびb型A2株のトランスポゾン変異体(Phillips, N.J., McLaughlin, R., Miller, T.J., Apicella, M.A., and Gibson, B.W. (1996) Biochem. 35, 5937-5947)、に由来するLPSの詳細な構造研究により、インフルエンザ菌LPSに共通するヘプトース含有三糖内部コア部分が存在するというさらなる証拠が提示されている。本発明者ら(Risberg et al., Eur. J. Biochem. 261:171-180, 1999)は、インフルエンザ菌株RM118(Risberg, A., Masoud, H., Martin, A.; Richards, J.C., Moxon, E.R., and Schweda, E.K.H. (1999) Eur. J. Biochem. 261, 171-180)、完全なゲノム配列が決定されている株(Rd)(Fleischmann, R.D., Adams, M.D., White, O., Clayton, R.A., Kirkness, E.F., Kerlavage, A.R., Butt, C.J., Tomb, J.-F., Dougherty, B.A., Merrick, J.M., McKenney, K., Sutton, G., FitzHugh, W., Fields, C., Gocayne, J.D., Scott, J., Shirley, R., Liu, L.-I., Glodek, A., Kelley, J.M., Weidman, J.F., Phillips, C.A., Sprigs, T., Hedblom, E., Cotton, M.D., Utterback, T.R., Hanna, M.C., Nguyen, D.T., Saudek, D.M., Brandon, R.C., Fine, L.D., Fritchman, J.L., Fuhrmann, J.L., Geoghagen, N.S.M., Gnehm, C.L., McDonald, L.A., Small, K.V., Fraser, C.M., Smith, H.O., and Venter, J.G. (1995) Science 269, 496-512)に由来する、グロボテトラオース(β -D-Gal pNAc-(1 $\rightarrow$ 3)- α -D-Gal p-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-Gal p-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-Glc p)含有LPSの構造を報告している。この研究では、3つの主要なLPSグリコフォーム集団が同定され、これらは総てKdo部分と結合しているHep(Hep I)のPCho $\rightarrow$ 6)- β -D-Glc p基を含んでいたが、内部コア成分の末端Hep(Hep III)のオリゴ糖鎖の長さは異なっていた。組立の完全なグロボテトラオース側鎖を発現するLPSのグリコフォームの他、グロボシド(α -D-Gal p-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-Gal p-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-Glc p)

およびラクトース (β -D-Gal p - (1 $\rightarrow$ 4) - β -D-Glc p) を含む、順次末端切断されたグリコフォームも同定された(Risberg, A., Masoud, H., Martin, A., Richards, J.C., Moxon, E.R., and Schweda, E.K.H. (1999) Eur. J. Biochem. 261, 171-180)。

【手続補正 12】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0033

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0033】

実施例に記載のように、本発明者らは、構造フィンガープリント法を用い、インフルエンザ菌株 RM118 の LPS 生合成遺伝子の一連の規定された変異体から得られた LPS の構造を決定し、比較した (RM118 株についての説明は Risberg et al., 1999, 上記を参照)。特定の遺伝子を不活性化した株に由来する LPS を調べることにより、本発明者らは、LPS 分子の内部コア領域の生合成に関与するグリコシルトランスフェラーゼの同定につながる決定的な証拠を提示する。本発明者らはまた、さらに後述するように、シアリル化ラクトース側鎖の構築に関与する遺伝子も同定した。さらにまた、それぞれグロボトリオース構造およびグロボテトラオース構造を与えるための α -2, 3-結合 Neu5Ac (lic3A)、 α -1, 4-結合 Gal p (lgtC) および β -1, 3-結合 Gal p NA c (lgtD) の付加に関与する遺伝子のトランスフェラーゼ機能を、合成アクセプターを用いた酵素アッセイにより明確に決定した。これはインフルエンザ菌株の LPS オリゴ糖部分の生合成に関する遺伝的青写真を特定するはじめての研究である。

【手続補正 13】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0036

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0036】

これらの結果は、lpsA 遺伝子の産物が HepIII からのオリゴ糖鎖伸長の制御において一定の役割を果たしていることを示す。lpsA 遺伝子の突然変異により、HepII のオリゴ糖鎖伸長部を欠いている末端切断型 LPS がもたらされる。RM118 lpsA に由来する O-脱アシル化 LPS のESI-MS 分析では、主な LPS 種 (構造 2) としての単一のヘキソース残基を含む PchO 含有グリコフォームを示し、これにより、HepI は、HepIII からのヘキソース伸長がなくとも置換可能であることが確認された。機能的 lpsA 遺伝子を含む lic2A、lgtC および lgtD 変異体は、 β -D-Glc p 残基を 1, 2-結合で付加して HepIII からの鎖の伸長を開始させることができる (表 4)。lpsA は、パストレラ・ヘモリチカ (*Pasteurella haemolytica*) のグリコシルトランスフェラーゼをコードする遺伝子の相同体であり (Potter, M.D. and Lo, R.Y. (1995) FEMS Microbiol. Lett. 129, 75-81)、このタンパク質はそれぞれヘモフィルス属およびナイセリア属の lic2A および lgtB に分類されるガラクトシルトランスフェラーゼ群と相同性を有する。RM153 株では、lpsA 変異体由来の LPS が第三のヘプトースからの鎖の伸長を欠いていることも分かった (Hood, D.W., Deadman, M.E., Allen, T., Masoud, H., Martin, A., Brisson, J.R., Fleischmann, R., Venter, J.C., Richards, J.C., and Moxon, E.R. (1996) Mol. Microbiol. 22, 951-965)。さらに、本発明者らは、数種の NTHi 株における lpsA 変異体が HepIII からの鎖の伸長を欠いていることを確認した。このように、lpsA はインフルエンザ菌 LPS の生合成において HepIII に最初の糖を付加するためのトランスフェラーゼである。

【手続補正 14】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0037

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0037】

RM1181 *lic2A* 変異体は主要な LPS 種としての Pch_o 含有 Hex2 グリコフォーム（構造 4；表 1）を示し、機能的 *lic2A* 遺伝子を含む RM1181 *lgtC* は HepIII にラクトース側鎖を含む LPS（構造 5；表 1）を合成する。このことは、HepIII に結合している末端 β -D-Glc p 残基へ β -D-Galp 単位を 1, 4 結合で付加することに対する *lic2A* 遺伝子の関与と一致する。b 型株、RM153 および RM7004 の *lic2A* 相同体は、ジガラクトシド含有 P^K エピトープ（構造 α -D-Galp-（1 $\rightarrow$ 4）- β -D-Galp-（1 $\rightarrow$ 4）- β -D-Glc p を有するグロボシド三糖）の発現に参与することが示されている。このエピトープの相変異発現における *lic2A* の役割が既に実証されている (High, N.J., Deadman, M.E., and Moxon, E.R. (1993) Mol. Microbiol. 9, 1275-1282)。他のデータバンクの配列との相同性比較によれば、*lic2A* の β -ガラクトシルトランスフェラーゼとしての機能が支持される。重要なことは、それがナイセリアの *lgtB* および *lgtE* タンパク質（いずれもガラクトシルトランスフェラーゼ）と有意な相同性を有するということである (Wakarshuk, W., Martin, A., Jennings, M.P., Moxon, E.R., and Richards, J.C. (1996) J. Biol. Chem. 271, 19166-1917)。

【手続補正15】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0038

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0038】

lgtC に変異を有する RM118 株由来の LPS の構造解析により、この遺伝子の α -ガラクトシルトランスフェラーゼ機能を裏付ける α -D-Galp の欠損が確認された。髄膜炎菌 (*N. meningitidis*) におけるこの遺伝子の相同体が α -ガラクトシルトランスフェラーゼであることが実証されている (Gotschlich, E.C. (1994) J. Exp. Med. 180, 2181-2190; White, K.A., and Raetz, C.R.H. (1998) FASEB J. 12, L44; Wakarchuk, W.W., Cunningham, A.M., Watson, D.C., and Young, N.M. 1998, Role of paired basic residues in the expression of active recombinant galactosyltransferases from the bacterial pathogen *Neisseria meningitidis*, Protein Eng. 11: 295-302; Wakarchuk et al. 1998, Protein Engineering)。インフルエンザ菌の *lgtC* は、ちょうどリーディングフレーム (44) の 5' 末端内に会合したテトラヌクレオチドリピート (5'-GACA-3') を有することから、RM118 LPS におけるオリゴ糖の変異表現型に参与している。これに対応して、機能的 *lgtC* 遺伝子を含む *lgtD* 変異体およびその親株は、ラクトースエピトープの末端 β -D-Galp に 1, 4 結合で α -D-Galp を付加することができる（構造 6；表 1）。*lgtC* の機能は、組換え型 *lgtC* タンパク質と合成 FCHASE-Lac アクセプターを用いて α -ガラクトシルトランスフェラーゼ活性を実証することにより確認されている。その結果、*lgtC* 遺伝子は、RM118 Hex4 LPS グリコフォームの α -D-Galp-（1 $\rightarrow$ 4）- β -D-Galp 合成の特異的 α -ガラクトシルトランスフェラーゼをコードすることになる。

【手続補正16】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0039

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0039】

インフルエンザ菌 *lgtD* 遺伝子は、2つのナイセリア遺伝子、*lgtA* および *lgtD* の相同体であり、これらのナイセリア遺伝子は淋菌 (*N. gonorrhoeae*) LPS にそれぞれ

G l c N A c および G a l N A c を付加する (Gotschlich, E.C. (1994) J. Exp. Med. 180, 2181-2190)。l g t A 遺伝子産物は髄膜炎菌のグリコシルトランスフェラーゼであることが実証されている (Wakarchuk, W., Martin, A., Jennings, M.P., Moxon, E.R., and Richards, J.C. (1996) J. Biol. Chem. 271, 19166-1917)。ナイセリアの l g t A と l g t D 遺伝子間には有意な相同性があり、R M 1 1 8 H I 1 5 7 8 はデータベースにおいて淋菌の l g t D 遺伝子と最良の一致を示す。R M 1 1 8 および R M 1 1 8 l g t D 変異体の抽出物を用いた酵素アッセイでは、 β -D-G a l p N A c トランスフェラーゼ活性の存在が確認された。機能的 l g t D を含む親株 R M 1 1 8 は完全なグロボテトラオース単位を合成することができ、このことは末端 β -D-G a l p N A c の付加におけるその役割を示している。この l g t D 遺伝子はこれまでも研究されているが (6 では l g t A と呼ばれる)、b 型株 R M 1 5 3 および R M 7 0 0 4 に存在するということは見出されていない。これに対応して、R M 1 5 3 株によって合成される L P S は G a l N A c 部分を含まない (Masoud, H., Moxon, E.R., Martin, A., Krajcarski, D., and Richards, J.C. (1996) Biochem. 36, 2091-2103)。多くの N T H i 株は L g t D 遺伝子を含むことが分かっており、これらの株の L P S オリゴ糖側鎖は G a l N A c 部分を含むことが分かっている。

【手続補正 17】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0041

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0041】

R M 1 1 8 L P S 生合成の研究に利用できる最初の遺伝子セットおよび変異株を特定しても、H e p I への β -D-G l c p 単位の付加を担う明らかな候補は得られなかった。他の生物の L P S においてヘプトース残基にヘキソース糖を付加する遺伝子との相同性の低い一致についても、R d 株ゲノム配列を検索することによりさらなる候補 L P S 遺伝子を調べた。検索配列は、ヘプトースへのヘキソース残基の付加に参与する遺伝子であるナイセリア属の r f a K および l g t F 遺伝子 (Kahler, C.M., Carlson, R.W., Rahman, M.M., Martin, L.E., and Stephens, D.S. (1996) J. Bacteriol. 178, 6677-6684) を含むものとした。R M 1 1 8 株で l g t F 相同体が確認され、この遺伝子に変異を有する株由来の L P S の分析により、H e p I からの鎖の伸長における L g t F の役割が示された。E S I-M S では、H e p I において P c h o $\rightarrow$ 6) - β -D-G l c p を欠き、トリヘプトシル内部コア部分の H e p III からの鎖伸長を有するグリコフォームの混合物に相当する分子イオンが示された (図 6)。

【手続補正 18】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0042

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0042】

l g t F および l p s A 遺伝子は R M 1 1 8 L P S のヘプトース含有内部コア単位からのヘキソース伸長にとって重要なものであり、それぞれ H e p I および H e p III への最初のグリコスの付加を担うグリコシルトランスフェラーゼ酵素をコードする。H e p I および H e p III からの鎖伸長のプロセスは、R M 1 1 8 株の L P S において大きく独立したものであるようである。変異株 R M 1 1 8 l p s A は、H e p I 由来の β -D-G l c p 部分を含む L P S を産生する。R M 1 1 8 l g t F 株は、ラクトースおよびグロボテトラオース鎖を含む H e p III からのオリゴ糖伸長を含む不均質な L P S を産生する。R M 1 5 3 株では、l p s A は明らかに第三のヘプトースから単一の伸長部としてガラクトースの付加を担う若干異なる役割を果たす (Hood, D.W., Deadman, M.E., Allen, T., Masoud, H., Martin, A., Brisson, J.R., Fleischmann, R., Venter, J.C., Richards, J.C.,

and Moxon, E.R. (1996) Mol. Microbiol. 22, 951-965)。驚くべきことに、ある種の非定型株では l p s A は O-2 位の代わりに O-3 位でグルコースまたはガラクトースのいずれかを付加しうることが判明した。

【手続補正 19】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0043

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0043】

インフルエンザ菌の L P S 構造の不均質性は、部分的には、総ての分子が完全に合成されるわけではないという複雑な構造の生合成における固有の多様性によるものに違いない。しかし、認められた多様性の多くは、発現が変動しうる（相変異）特定の L P S 生合成遺伝子によるものであると思われる。野生型および変異型 R M 1 1 8 株由来の L P S の構造解析により、本発明者らは、はじめてインフルエンザ菌 L P S ジガラクトシドの重要な相変異型エピトープの合成に關与する遺伝子を確認することができた。R M 1 1 8 株では、L i c 2 A が H e p III からのオリゴ糖伸長部分としてのジガラクトシド (α -D-G a l p - (1 $\rightarrow$ 4) - β -D-G a l p) へ隣接 β -D-G a l p を、L g t C は末端 α -D-G a l p を付加するが、b 型 R M 1 5 3 株ではこの同ジエピトープが第二のヘプトースからの末端伸長として発現する (Masoud, H., Moxon, E.R., Martin, A., Krajcarski, D., and Richards, J.C. (1996) Biochem. 36, 2091-2103)。l i c 2 A および l g t C はいずれも相変異性遺伝子であり、生物内および生物間で極めて変化に富んだエピトープを発現させる。ジガラクトシドエピトープは、本明細書に開示される N T H i 株の多くの L P S において、また、ナイセリア属をはじめとする関連の細菌において発現する (Virji, M., Weiser, J.N., Lindberg, A.A., and Moxon, E.R. (1990) Microb. Pathogen. 9, 441-450)。このエピトープは、免疫優性である可能性があり、その存在は宿主構造の分子模倣の可能性を与え、実験系においてインフルエンザ菌の生存に影響を及ぼしうることから、病因論上興味深いことである (Weiser, J.N., and Pan, N. (1998) Mol. Microbiol. 30, 767-775; Hood, D.W., Deadman, M.E., Jennings, M.P., Bisceric, M., Fleischmann, R.D., Venter, J.C., and Moxon, E.R. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 93, 11121-11125)。

【手続補正 20】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0044

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0044】

シアリル化されたオリゴ糖は哺乳類組織でよく見られることから、オリゴ糖のシアリル化はヒト組織構造の模倣性を高めるものと考えられている修飾の一つである。実施例に記載のように、本発明者らは、N T H i 3 7 5 株、4 8 6 株および R D 株においてシアリル化された L P S を確認し、L P S 合成における l i c 3 A の役割を解明した (D.W. Hood et al., Mol. Microbiol. 39:341-350, 2001)。種の多様性の代表的なものとして 2 5 株の N T H i を調べたところ、一つを除いて総てがシアリル化された L P S オリゴ糖鎖伸長と確認された。N T H i 4 8 6 などのいくつかの N T H i 株における l i c 3 A の突然変異は、正常なヒト血清の殺菌作用への耐性に大きな影響を持つことが実証されている。N T H i 4 8 6 とその l i c 3 A 変異体に由来する L P S 構造の比較からはシアリル化グリコフォーム（シアリルーラクトース）が親株にしか存在しないことが明らかとなり、このことは、この株における血清耐性にとっての L i c 3 A の重要性を示している。インフルエンザ菌における L P S への荷電シアル酸残基の付加は、L P S エピトープの抗原模倣を調節するものと思われる。

【手続補正 21】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0048

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0048】

図7は、同定されたインフルエンザ菌 Rd における LPS の主要なグロボテトラオース含有オリゴ糖の生合成に関与する遺伝子をまとめたものである。本発明者らは、HepI (lgtF) および HepIII (lpsA) からの鎖伸長を担う遺伝子を同定した。さらに、インフルエンザ菌のいくつかの株（例えば、Eagan および RM7004）は、HepII からの鎖伸長を示しうる LPS を合成する。本発明者らは、lic2 遺伝子座にある遺伝子 (orf3) が HepII からの鎖伸長を開始させることを示した。これらの遺伝子の示差的な発現は、保存されたトリヘプトシル内部コア部分から発する多様な可変オリゴ糖エピトープをもたらす。これらの遺伝子の所定の突然変異によって、本発明者らは、特定のインフルエンザ菌株が表す複雑性の程度のみならず、結果として生じる LPS のコア領域で利用できるエピトープも制御することができる。このように、その生合成機構に所定の突然変異を有するインフルエンザ菌株の LPS により、LPS を基にした広域ワクチンを開発するための好適な候補が提供された。本発明者らは、これまでに LPS の変異性を示してワクチン開発を阻んでいた非定型株を含む種々の病原インフルエンザ菌株に対して交差反応性をもたらすことから、この手法がワクチンの設計に有用であるものと判断した。

【手続補正22】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0050

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0050】

NTHi 株コレクションからの LPS の遺伝解析および表現型解析に基づき、本発明者らははじめて、O-2 の代わりに HepIII の O-3 から鎖が伸長しているもう一つの内部コア構造を有する LPS を発現するインフルエンザ菌株を確認した。相同な lpsA 遺伝子は、株によって異なるが、HepIII の O-2 または O-3 位への β -D-Gal または β -D-Glc の特異的付加を媒介する。さらに、HepIII がオリゴ糖鎖によって置換されていない LPS を発現するインフルエンザ菌株もいくつかある。これらの発見は実施例で詳細に示す。

【手続補正23】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0051

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0051】

実施例の結果により、NTHi に保存された内部コア成分が存在することが確認される。これらの結果はまた、新たな構造モチーフ、すなわち HepIII 上の別の置換部位の証拠をはじめて提供するものである。HepIII は O-2 位のヘキソース残基により置換されていることは早くに分かっており、NTHi、例えば 285 株および 1158 株の場合にそうであることが分かっている。他の NTHi 株、例えば 176 株および 486 株では、この置換パターンは見られていない。これに対し、HepIII の O-3 位において置換が見られる。驚くべきことに、lpsA 遺伝子は、いくつかの株では β -D-Glc_p を (RD 株、図9)、あるいは他の株では (-D-Galp) を (b 型、例えば Eagan 株)、1, 2-結合で付加して HepIII から鎖伸長を開始させうることが示された。本発明者らは、lpsA の相同体が、HepIII への β -D-Glc_p 残基または β -D-Galp 残基の 1, 3-結合での付加を担うことを見出した。

【手続補正 24】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0052

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0052】

内部コア領域の他の有用な修飾は、PCh o エピトープに関するものである。これはインフルエンザ菌をはじめとするヒト気道に存在する病原体の表面構造の一般的な特徴である。インフルエンザ菌 Rd 株では、PCh o は H e p I の末端 β -D-G l c p 残基の O-6 と結合している (PCh o $\rightarrow$ 6) - β -D-G l c p)。他のインフルエンザ菌株、例えば b 型株 E a g a n では、PCh o は H e p III の末端 β -D-G a l p 残基の O-6 と結合している (PCh o $\rightarrow$ 6) - β -D-G a l p) (E.K.H. Schweda et al. Eur. J. Biochem., 267 (2000) 3902-3913)。これらの置換パターンはいずれも N T H i 株で見出されている。さらに、PCh o は末端 α -D-G l c p 残基でも見出された (PCh o $\rightarrow$ 6) - α -D-G l c p)。インフルエンザ菌 L P S における PCh o エピトープの発現および相変異には、l i c 1 遺伝子座の 4 つの遺伝子が必要である (J.N. Weiser et al. Infec. Immun., 65 (1997) 943-950)。これらの遺伝子は、検討した総ての N T H i 株で認められた。本発明者らは、l i c D 遺伝子の多形性が PCh o が付加される部位に影響することを突きとめた。

【手続補正 25】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0053

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0053】

トリヘプトシル内部コア部分に対する置換パターンの性質は、内部コアエピトープが免疫系に提示され、モノクローナル抗体によって認識される方法と関連がある。例えば、本発明者らは、ネズミ I g G 2 a モノクローナル抗体 (L 6 A 9) が H e p III の O-2 に β -D-G a l p 残基を含む株の L P S 内部コアオリゴ糖エピトープを認識するが、 β -D-G a l p 残基が存在しないか、あるいは O-3 位に結合している場合には認識しないことを見出している。高分子量型の構造確認図は 図 1 に示されている。

【手続補正 26】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0054

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0054】

上述のように、インフルエンザ菌 L P S 発現に関与する重要な生合成遺伝子が同定された。これにより、本発明者らは、保存された内部コア部分を含むが、ヒト組織構造を模倣するオリゴ糖伸長部を含まないインフルエンザ菌変異株を構築することができるようになった。実施例はこの方法の結果を示している。

【手続補正 27】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0055

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0055】

本発明者らは、当業者に公知の方法 (Gu の特許、上記) を用いて、例えばタンパク質結合体として製剤化することにより、インフルエンザ菌 L P S の保存されたトリヘプトシル内部コア部分を含むオリゴ糖は免疫原性を示すことを見出した。例えば、本発明者らは、

ウシ血清アルブミン (BSA) と結合させた H i 株 R d l i c l l p s A の O-脱アシル化 L P S からなるオリゴ糖-タンパク質結合体をマウスに感作させると、遺伝的に多様な N T H i 株のセットに由来する L P S サンプルの多数と交差反応性のある免疫血清が生じることを示した (表 3)。L P S の O-脱アシル化は無水ヒドラジンを用いて達成される。これには、次のタンパク質とのコンジュゲーション反応のために L P S オリゴ糖を可溶化する作用があり、リピド A 成分の著しい解毒をもたらす (Gu の特許、上記)。この O-脱アシル化 L P S は、当業者に公知の方法 (Gu の特許、上記) に従い、K d o 部分のカルボキシル基を介して結合する。最後に、マウスに H i 株 1 0 0 3 l i c l l p s A の O-脱アシル化 L P S を腹腔内追加投与した (実施例参照)。この実験で得られたマウス免疫血清は、内部コアからの複数の鎖伸長を有する N T H i 株由来の L P S と反応した。

【手続補正 28】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0056

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0056】

R d l i c l l p s A L P S は、保存されたトリヘプトシル内部コア部分の典型となる L P S を生産し、ラクト-N-ネオテトラオース (L N n T) 含有オリゴ糖鎖伸長を有する少量のグリコフォームを含む。このことは、L L A 5 との反応性から明らかである (表 4)。R d l i c l l p s A O-脱アシル化 L P S-B S A 結合体はまた、M a b L L A 5 ならびに内部コア M a b、L L A 4 との反応性も示した。N T H i 株 1 0 0 3 は L N n T を含むオリゴ糖鎖を有する L P S を合成しない。本発明者らは、構造解析、遺伝解析および免疫化学分析によってこのことを突きとめた。この株の L P S は L L A 5 とは反応せず、r f b 遺伝子座を含まない。二重突然変異 1 0 0 3 l i c l l p s A は、鎖伸長のない保存された内部コア部分を有する L P S を発現する。これは M a b L L A 4 によって認識される。

【手続補正 29】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0070

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0070】

本発明による結合ワクチンは、可溶形態であっても微粒子形態であってもよく、あるいはリポソームなどのマイクロスフェアまたはマイクロ小胞中に配合してもよい。例えば、筋肉内、皮下、腹腔内および動脈内をはじめ、種々のワクチン投与経路が考えられるが、好ましい経路は筋肉内投与である。好ましい実施態様によれば、投与する結合体の用量は約 $10\text{ }\mu\text{g}$ ~ 約 $50\text{ }\mu\text{g}$ の範囲である。より好ましい実施態様によれば、投与する量は約 $20\text{ }\mu\text{g}$ ~ 約 $40\text{ }\mu\text{g}$ の間である。最も好ましい実施態様によれば、投与する量は約 $25\text{ }\mu\text{g}$ である。体重をもとにそれ以上の用量を投与してもよい。厳密な用量は、当業者に公知の通常の用量/応答プロトコールによって決定することができる。

【手続補正 30】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0071

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0071】

本発明によるワクチンは、いずれの齢の温血哺乳類に投与してもよく、幼哺乳類、特にヒトにおいて N T H i により引き起こされる中耳炎および呼吸器感染症に対して能動免疫を誘導するように適合させてある。小児用ワクチンとしては、本結合体を約 2 ~ 4 ヶ月齢で投与する。典型的には、最初の注射から約 2 ヶ月、さらに約 13 ヶ月後に約 $10\text{ }\mu\text{g}$ ~

約 25 μ g の 2 回の追加注射を行う。あるいは、最初の注射から 2 ヶ月、4 ヶ月および 6 ヶ月後に 3 回の追加注射を行う。

【手続補正 31】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0073

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0073】

実施例は NTHi Rd1ic11psA を用いた結合ワクチンについて記載している。他の NTHi 株からのワクチンも本発明の範囲内にあり、同じ技術を用いて製造される。NTHi 株 Rd1ic11psA。dLPS-担体結合ワクチンの製造のための dLPS の供給源として考えられる他の臨床関連の NTHi 株としては、9274、2019、1479、5675 および 7502 株（それぞれ III 型、II 型、I 型、IV 型および V 型）、ならびに本明細書に記載の Finnish Colleciton からの株が挙げられる。これらの株ならびに 2019 株は、Campagnari et al. (Infect., Immun., 55:882-887, 1987) および Patrick et al. (Infect Immun., 55:2902-2911, 1987), and Hood et al. (Mol. Microbiol 33:679-692, 1999) により報告されており、通常は研究機関から入手することができる。

【手続補正 32】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0080

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0080】

陽イオン脂質もまた当技術分野で知られている。かかる脂質としては、DOTMA (N-[1-(2,3-ジオレイルオキシ)プロピル]-N,N,N-トリメチルアンモニウムクロリド)としても知られてるリポフェクチン(商標)、DOTAP (1,2-ビス(オレイルオキシ)-3-(トリメチルアンモニオ)プロパン)、DDAB (ジメチルジオクタデシルアンモニウムブロミド)、DOGS (ジオクタデシルアミドログリシルスベルミン)、および DC-Chol (3- β -(N-(N',N'-ジメチルアミノメタン)-カルバモイル)コレステロール)などのコレステロール誘導体が挙げられる。これらの陽イオン脂質についての説明は、EP187,702、WO90/11092、米国特許第5,283,185号明細書、WO91/15501、WO95/26356 および米国特許第5,527,928号明細書に見出される。

【手続補正 33】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0090

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0090】

粘膜および非経口投与の双方に有用なアジュバントとしては、ポリホスファゼン (WO95/02415)、DC-Chol (3- β -(N-(N'-N'-ジメチルアミノメタン)-カルバモイル)コレステロール (米国特許第5,283,185号明細書および WO96/14831) および QS-21 (WO88/09336) が挙げられる。

【手続補正 34】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0091

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0091】

リポ多糖を含有する本発明による医薬組成物または本発明による抗体はいずれも、常法

にて製造される。特に、医薬上許容される希釈剤または担体、例えば、水またはリン酸緩衝生理食塩水などの生理食塩水を用いて製剤化する。一般に、希釈剤または担体は、投与様式および投与経路、ならびに標準的な製薬上の運用に基づいて選択される。好適な医薬担体または希釈剤、ならびに医薬製剤におけるそれらの使用に関する医薬上の必要条件は、この分野および U S P / N F (National Formulary) における標準的な教本である Remington's Pharmaceutical Sciences に記載されている。

【手続補正 35】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0100

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0100】

実施例 1

H i L P S 変異株

細菌株および培養条件

インフルエンザ菌 R d 株は、もともと、Herriot により Alexander and Leidy (Alexander, H.E., and Leidy, G. (1951) J. Exp. Med. 93, 345-359) から入手したものである。H.O. Smith がこれを譲り受け、KW-20 と名付け、ゲノムシーケンシングプロジェクトに用いた (Fleischmann, R.D., Adams, M.D., White, O., Clayton, R.A., Kirkness, E.F., Kerlavage, A.R., Butt, C.J., Tomb, J.-E., Dougherty, B.A., Merrick, J.M., McKenney, K., Sutton, G., FitzHugh, W., Fields, C., Gocayne, J.D., Scott, J., Shirley, R., Liu, L.-I., Glodek, A., Kelley, J.M., Weidman, J.F., Phillips, C.A., Spriggs T., Hedblom, E., Cotton, M.D., Utterback, T.R., Hanna, M.C., Nguyen, D.T., Saudek, D.M., Brandon, R.C., Fine, L.D., Fritchman, J.L., Fuhrmann, J.L., Geoghagen, N.S.M., Gnehm, C.L., McDonald, L.A., Small, K.V., Fraser, C.M., Smith, H.O., and Venter, J.C., (1995) Science 269, 496-512)。Smith 研究室から入手した同株を本発明者らが用いた (RM118)。この株から得られた変異体の遺伝子型は表 2 に示されている。インフルエンザ菌株は 37℃ にてヘミン 10 μ g / ml および NAD 2 μ g / ml を添加した。ブレイン・ハート・インフュージョン (BHI) ブロス中で増殖させた。形質転換後の選択に関してはカナマイシン 10 μ g / ml をこの増殖培地に添加した。

【手続補正 36】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0101

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0101】

大腸菌 D H 5 α 株を用いてクローニングした PCR 産物および遺伝子構築物を増やし、37℃ にて、必要に応じてアンピシリン 100 μ g / ml またはカナマイシン 50 μ g / ml を添加した Luria-Bertani (LB) ブロス中で増殖させた (Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989) Molecular cloning; A laboratory manual. 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY)。

【手続補正 37】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0105

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0105】

l g t F の他、推定されるインフルエンザ菌 L P S 生合成遺伝子をこれまでに報告されているようにクローニングして変異誘発した (Hood, D.W., 'Deadman, M. E., Allen, T., Masoud, H., Martin, A., Brisson, J.R., Fleischmann, R., Venter, J.C., Richards,

J.C., and. Moxon, E.R. (1996) Mol. Microbiol. 22,951-965)。l g t F 遺伝子については、R d 株のゲノム配列からオリゴヌクレオチドプライマー l g t F a (5' - T G G T G G T G G G C A A G A C G C - 3') および l g t F b (5' - A G C C T G A A T T C G A C A G C C - 3') を設計し、ポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) により H I O 6 5 3 を含む 1 4 6 1 b p の断片を増幅した。P C R 条件は、変性 9 4 ° C 1 分、アニーリング 5 0 ° C および重合 7 2 ° C 3 0 分とした。P C R 産物の 1 μ l を 5 0 n g のプラスミド p T 7 B l u e (Novagen) と連結し、大腸菌 D H 5 株へ形質転換した。次に形質転換体から組換えプラスミドを調製し、制限エンドヌクレアーゼ消化およびプラスミド特異的プライマーの配列決定により確認した (Hood, D.W., Deadman, M.E., Allen, T., Masoud, H., Martin, A., Brisson, J.R., Fleischmann, R., Venter, J.C., Richards, J.C., and Moxon, E.R. (1996) Mol. Microbiol. 22, 951-965)。l g t F 遺伝子はカナマイシン耐性カセット (p U C 4 K a n, Pharmacia 由来の E c o R I での消化により遊離させる) を H I O 6 5 3 の 5' 末端から 2 5 7 b p 内側の M u n I 制限部位へ挿入することで不活性し、プラスミド p D Q 1 を得た。

【手続補正 3 8】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 1 0 6

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 1 0 6】

変異株の構築

変異型 L P S 生合成遺伝子を含む線状プラスミド 2 ~ 3 μ g を用い、M I V 法 (Herriot, R.M., Meyer, E.M., and Vogt, M.J. (1970) J. Bacteriol. 101, 517-524) によりインフルエンザ菌 R M 1 1 8 株を形質転換し、形質転換体をカナマイシンで選択した。R M 1 1 8 l i c 1 株を構築するため、対応する R M 1 5 3 変異体から単離した剪断染色体 DNA 5 μ g で R M 1 1 8 を形質転換した。R M 1 1 8 l i c 2 A 株は、R M 1 5 3 l i c 2 A から増幅した、l i c 2 A および隣接する遺伝子 k s g A を含む P C R 産物 1 μ g で R M 1 1 8 を形質転換することで構築した。P C R では上記のような条件下でプライマー L 2 A : 5' - C T C C A T A T T A C A T A A T - 3' および L 2 D : 5' - A A A C A C T T A G G C C A T A C G - 3' を用いた。総ての形質転換体を適当な B H I / 抗生物質プレートで再培養することで確認し、その後エンドヌクレアーゼ消化した染色体 DNA の P C R 増幅および／またはサザンブロッティング／ハイブリダイゼーション解析により変異体としての確認を行った。

【手続補正 3 9】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 1 1 3

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 1 1 3】

リポ多糖の構造フィンガープリンティング

1 0 L のバッチ培養 (1 L 1 0 ロット) からの細胞を一晩増殖させた後に収穫し、ホットフェノール水法 (Westphal, O. and Jann, K. (1965) Meth. Carbohydr. Chem. 5, 83-91) の後に、Thibault, and Richards (Thibault, P. and Richards, J.C. (2000) ????) により記載されているようにエタノール沈殿させることにより L P S を抽出した。L P S を超遠心分離 (1 0 5 0 0 0 g、4 ° C、2 × 5 時間) を繰り返すことで精製し、サンプルをそれらの O - 脱アシル化誘導体 (L P S - O H) として分析した。O - 脱アシル化はこれまでに記載のように (Holst, O., Broer, W., Thomas-Oates, J.E., Mamat, U., and Brade, H. (1993) Eur. J. Biochem. 214, 703-710)、3 7 ° C で 1 時間、L P S (1 ~ 1 0 m g) と無水ヒドラジン (0. 2 ~ 1. 0 m l) とを混合することにより行った。糖類はこれまでに記載のように (Jarosik, G.P., and Hansen, E.J. (1994) Infect. Immun. 62,

4861-4867)、ガス液体クロマトグラフィー質量分析 (GLC-MS) によりそれらの酢酸アルジトールとして同定した。結合分析は室温で24時間、無水酢酸 (0.5 ml) および4-ジメチルアミノピリジン (0.5 mg) でオリゴ糖をアセチル化した後に行った。次にペルアセチル化材料をリチウムメチルスルフィニルメタニドの存在下でジメチルスルホキシド中ヨウ化メチルで処理してメチル化オリゴ糖を得、これを Sep Pak TM C18 カートリッジを用いて回収し、糖分席を行った (Blakeney, A.B. and Stone, B. A. (1985) *Coabohydr. Res.* 140, 319-324)。糖およびメチル化分析で得られた種々の酢酸アルジトールと部分的メチル化酢酸アルジトールの相対的割合を GLC-MS の検出器の応答から測定し、補正は行わなかった。GLC-MS は NERMA G R10-10 H TM 四極質量分析計または Varian Inont rap TM システムを備えた Del si Di 200 TM クロマトグラフにて、DB-5 融合シリカキャピラリーカラム (25 m × 0.25 mm × 0.25 μm) および 160 °C 1 分、3 °C / 分にて 250 °C までの温度勾配を用いて行った。エレクトロスプレーイオン化質量分析 (ESI-MS) は VG Quattro TM 質量分析計 (Micromass, Manchester, UK) の陰イオンモードで行った。サンプルを水に溶解した後、1 % 酢酸を含有する 50 % アセトニトリル水溶液と 1 : 1 の比率で混合した。サンプル溶液をシリンジポンプから流速 5 μL / 分の H₂O : CH₃CN (1 : 1) の移動相にインジェクトした。1D ¹H NMR スペクトルは、D₂O で数回凍結乾燥させた後、Bruker AMX 500 TM 分光光度計にて、酸化ジューテリウム溶液について 22 °C、500 MHz で記録した。スペクトル分解能を高めるため、D₂O 溶液にペルジューテロー EDTA (2 mM) およびペルジューテロー SDS (10 mg / ml) を加えた (Risberg, A., Schweda, E.K.H., and Jansson, P.-E. (1997) *Eur. J. Biochem.* 243, 701-707)。内部アセトンのメチルプロトン共鳴 (δ : 2.25 ppm) に対する化学シフトを調べた。

【手続補正 40】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0114

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0114】

LgtC および LgtD からの酵素活性の分析

LgtD にコードされている酵素を、生成物の検出にキャピラリー電気泳動を用い、合成アクセプター FCHASE-P^k でアッセイした。キャピラリー電気泳動は実質的にこれまでに記載のように行った (Wakarchuk, W., Martin, A., Jennings, M.P., Moxon, E.R., and Richards, J.C. (1996) *J. Biol. Chem.* 271, 19166-1917)。FCHASE-P^k はこれまでに記載のよう (Wakarchuk, W.W., et al., *Protein Eng.* 11: 295-302, 1998)、髄膜炎菌 LgtC 酵素を用いて FCHASE-Lac から合成した。反応条件は 0.5 mM アクセプター、1 mM UDP-GalNAc、50 mM HEPES-NaOH pH 7.0、10 mM MgCl₂、10 mM MnCl₂ とした。抽出は、細胞を音波処理した後、100,000 × g 30 分間の遠心分離により膜画分を回収することで行った。RM118 および変異体 RM118 : LgtD の双方を分析した。少量の生成物をこれまでに記載のよう (Wakarchuk, W., Martin, A., Jennings, M.P., Moxon, E.R., and Richards, J.C. (1996) *J. Biol. Chem.* 271, 19166-1917)、TLC により単離した。生成物への変換が少ないことから、いくらかの出発材料もそれとともに単離された。回収した混合物を二等分した後、酵素供給者 (NEB) が奨励するように β -ヘキソサミニダーゼで処理した。LgtD の産物は β -ヘキソサミニダーゼ消化により β -アノマー特異性を有することが示された。

【手続補正 41】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0117

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0117】

変異株の構築およびスクリーニング

上記のように作製した変異体セットを用い、完全なゲノム配列が得られている指標株であるインフルエンザ菌RM118株のLPDSのオリゴ糖部分の生合成の遺伝的基礎を詳細に調べた。表2は発明者らが調べた遺伝子の一覧である。これら遺伝子の大部分を変異させるために用いたDNA構築物はこれまでに報告されている(Hood, D.W., Deadman, M.E., Allen, T., Masoud, H., Martin, A., Brisson, J.R., Fleischmann, R., Venter, J.C., Richards, J.C., and Moxon, E.R. (1996) Mol. Microbiol. 22, 951-965)。各構築物は推定LPDS遺伝子が推定されるリーディングフレームの5'末端(1/3)内に挿入されたカナマイシン耐性遺伝子とともにクローニングされているプラスミドベクターからなった。最初のヘプトース(HeptI)にグルコースを付加することを担う明らかな候補遺伝子は見られなかった。Rdゲノム配列データベースをナイセリア属由来のlgf配列を用いて検索したところリーディングフレームHI0653に対して一致が認められた(247個のアミノ酸にわたって31%の同一性)。lgfはRM118およびRM153株の染色体DNAからPCRによって増幅した。RM118株由来のクローニング産物はカナマイシンカセットを挿入することで不活性化してプラスミドpDQ1を得、インフルエンザ菌株の形質転換に用いた。lic1およびlic2Aは相変異LPDS生合成遺伝子座である(High, N.J., Deadman, M.E., and Moxon, E.R. (1993) Mol. Microbiol. 9, 1275-1282; Weiser, J.N., Love, J.M., and Moxon, E.R. (1989) Cell 59, 657-665)。lic1はインフルエンザ菌LPDSへのPCho基の付加に関与することが示されている(Weiser, J.N., Shchepetov, M., and Chong, S.T.H. (1997) Infect. Immun. 65, 943-950)。各遺伝子座に関して、RM118株を変異させた遺伝子構築物(10⁻¹⁰~10⁻⁵形質転換体/投入DNA μ g)を用いて形質転換した。大部分の遺伝子座ではRM118はクローニングされたDNAの供給源であったが、いくつかの例ではRM153株由来のDNAをドナーとして用い、形質転換効率に違いはなかった。リビドAに付加された最初の糖Kdoの合成を担う遺伝子(kdsA、kdsB)およびKdotransフェラーゼ(kdtA)は遺伝子配列から同定した(Fleischmann, R.D., Adams, M.D., White, O., Clayton, R.A., Kirkness, E.F., Kerlavage, A.R., Butt, C.J., Tomb, J-F., Dougherty, B.A., Merrick, J.M., McKenney, K., Sutton, G., FitzHugh, W., Fields, C., Gocayne, J.D., Scott, J., Shirley, R., Liu, L-I., Glodek, A., Kelley, J.M., Weidman, J.F., Phillips, C.A., Spriggs, T., Hedblom, E., Cotton, M.D., Utterback, T.R., Hanna, M.C., Nguyen, D.T., Saudek, D.M., Brandon, R.C., Fine, L.D., Fritchman, J.L., Furhmann, J.L., Geoghagen, N.S.M., Gnehm, C.L., McDonald, L.A., Small, K.V., Fraser, C.M., Smith, H.O., and Venter, J.C. (1995) Science 269, 496-512)。種々のプラスミド構築物を用いてkdtA遺伝子に変異を有する株を構築する試みからは形質転換体を作出することができなかった。これはb型株での知見と同様であり(Hood, D.W., Deadman, M.E., Allen, T., Masoud, H., Martin, A., Brisson, J.R., Fleischmann, R., Venter, J.C., Richards, J.C., and Moxon, E.R. (1996) Mol. Microbiol. 22, 951-965)、この変異体が不活性であるためと思われる。RM118および同型の変異株から単離したLPDSをTSDS-PAGEにより分析した(データは示されていない)。RM118オリゴ糖合成に関するグリコシルトランスフェラーゼをコードする可能性が最も高い遺伝子に変異を有し、TSDS-PAGEにより野生型と比較した場合(図2)にLPDSバンドに異なるパターンを示す株を、以下に記載のようにそれらのPLSの詳細な構造解析のために選択した。また、lic1遺伝子座が不活性化されている変異体についても検討した。

【手続補正42】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0118

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0118】

L P S の構造決定

T-S-D-S-P-A-G-EによるRM118株のL P Sの解析から、リピドAおよび結合している糖残基の数が異なるオリゴ糖成分からなる低分子量L P S集団の電気泳動移動度に相当するヘテロなバンドパターンを示した(図2)。本発明者らはこれまでに、同じ条件下で増殖させたRM118株が共通の内部コア要素に結合した3~5個のグリコース残基を含むL P Sの集団を発現することを示している(Risberg, A., Mascud, H., Martin, A., Richards, J.C., Moxon, E.R., and, Schweda, E.K.H. (1999) Eur J. Biochem. 261, 171-180)。l i c 1、l g t F、およびl g t Dに突然変異を有する株のL Pは同じような複雑なバンドパターンを示したが、l g t C、l i c 2 A、l p s A、o r f H、r f a Fおよびo p s Xに突然変異を有する株のL P Sは一連の糖欠損と一致する一貫して移動度の速いバンドを含む複雑でないパターンを示した。変異株由来のL P Sサンプルにおける糖欠損の性質および位置の同定は比較構造解析によって行った。RM118株の同系変異体から液体培養で増殖させた後にL P Sを抽出した。構造フィンガープリンティングは、無水ヒドラジン処理後に得られたO-脱アシル化L P S (L P S-OH) サンプルのE S I-M Sおよび ^1H -NMR分析を用いて行った。さらにまた、グリコースおよび結合分析は無処理のL P Sサンプルについて行った。特異的に不活性化された推定グリコシルトランスフェラーゼ遺伝子を含む変異株から得られたデータをグロボテトラオースを含有するRM118 L P Sの構造モデル(Risberg, A., Masoud, H., Martin, A., Richards, J.C., Moxon, E.R., and Schweda, E.K.H. (1999) Eur. J. Biochem. 261, 171-180) のものと比較したところ、変化したL P Sグリコフォームの重要な構造的特徴が確定された。E S I-M Sは低分子量L P Sの構造組成を探索する有効な手段を提供する(Gibson, B.W., Melaugh, W., Phillips, N.J., Apicella, M.A., Campagnari, A.A., and Griffiss, J.M. (1993) J. Bacteriol. 175, 2702-2712; Masoud, H., Moxon, E.R., Martin, A., Krajcarski, D., and Richards, J.C. (1996) Biochem. 36, 2091-2103; Risberg, A., Masoud, H., Martin, A., Richards, J.C., Moxon, E.R., and Schweda, E.K.H. (1999) Eur. J. Biochem. 261, 171-180; Risberg, A., Schweda, E.K.H., and Jansson P.-E. (1997) Eur. J. Biochem. 243, 701-707; Phillips, N.J., McLaughlin, R., Miller, T.J., Apicella, M.A., and Gibson, B.W. (1996) Biochem. 35, 5937-5947)。O-脱アシル化L P Sサンプルについて陰イオンモードで得られたE S I-M Sデータは表5に示されている。変異株由来のL P S-OHサンプルでは、ヘプトース、ヘキソースおよびホスフェート含有置換基の数が異なる共通のO-脱アシル化リピドA部分にK d o-4-ホスフェートを介して結合しているオリゴ糖の存在と一致するデータが得られた(Phillips, N.J., Apicella, M.A., Griffiss, J.M., and Gibson, B.W. (1992) Biochem. 31, 4515-4526 Masoud, H., Moxon, E.R., Martin, A., Krajcarski, D., and Richards, J.C. (1996) Biochem. 36, 2091-2103; Risberg, A., Masoud, H., Martin, A., Richards, J.C., Moxon, E.R., and Schweda, E.K.H. (1999) Eur. J. Biochem. 261, 171-180; Schweda, E.K.M., Hegedus, O.E., Borrelli, S., Lindberg, A.A., Weiser, J.W., Maskell, D.J., and Moxon, E.R. (1993). Carbohydr. Res. 246, 319-330; Schweda, E.K.H., Jansson, P.-E., Moxon, E.R., and Lindberg, A.A. (1995) Carbohydr. Res. 272, 213-224; Risberg, A., Schweda, E.K.H., and Jansson, P.-E. (1997) Eur. J. Biochem. 243, 701-707; Phillips, N.J., McLaughlin, R., Miller, T.J., Apicella, M.A., and Gibson, B.W. (1996) Biochem. 35, 5937-5947)。

【手続補正43】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0119

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0119】

ops X変異体 opsを不活性化すると、ヘプトースまたはヘキソース残基を欠き、リピドA部分と結合したリン酸化Kdoしか含有しない凹凸の深いLPSが生じた(表5)。発明者らはこれまでに、インフルエンザ菌b型RM153株のops X遺伝子が突然変異した結果、HepIとKdoの間でLPSが切断されることを示している(Hood, D.W., Deadman, M.E., Allen, T., Masoud, H., Martin, A., Brisson, J.R., Fleischmann, R., Venter, J.C., Richards, J.C., and Moxon, E.R., (1996) Mol. microbiol. 22, 951-965)。二価分子イオンの低エネルギー衝突活性によるLPS-OHサンプルのMS-M S分析(m/z 625)では、Kdo- β -D-グルコサミンバンドの切断によって生じる m/z 951における主要なフラグメントイオン(リピドA-OH)が得られた(データは示されていない)。このフラグメントイオンの質量はインフルエンザ菌リピドA-OHの期待値と一致する(Helander, I.M., Lindner, B., Brade, H., Altmann, K., Lindberg, K.K., Rietschel, E.T., and Zahringer, U. (1988) Eur. J. Biochem. 177, 483-492)。RM118およびRM153 ops X変異体は、これまでに同定されているRdisn (I69)変異株由来のものと同じLPSを発現することが明らかである(Helander, I.M., Lindner, B., Brade, H., Altmann, K., Lindberg, K.K., Rietschel, E.T., and Zahringer, U. (1988) Eur. J. Biochem. 177, 483-492; Preston, A., Maskell, D., Johnson, A., and Moxon, E.R. (1996) J. Bacteriol. 178, 396-402)。I69 LPS表現型はヘプトース合成遺伝子gmhAの突然変異により生じたものであり(Brook, J.S., and Valvan M.A. (1996) J. Bacteriol. 178, 3339-3341)、これによりこの変異株はそのLPSにヘプトースを付加できなくなる。

【手続補正44】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0120

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0120】

rfaF変異体 リピドAの α -結合型グルコサミン残基からの ^1H 共鳴期待値の他、RM118 rfaF由来のLPS-OHの ^1H NMR分析も一つのヘプトース単位由来の低電場領域でのアノマープロトン共鳴($\sim 5.19 \text{ ppm}$)を示した。糖分析によれば、このHep残基がL-グリセロール-マンノヘプトースであることが確認された。これに応じて、ESI-MSスペクトルは構造Hep1-Kdo-リピドA-OHに一致する m/z 721.6における単一の豊富な二価イオンによって占められていた(表5)。

【手続補正45】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0121

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0121】

orfH変異体 orfH遺伝子が不活性化されている生物は、ESI-MSデータから明らかのように、各々2つのHep残基を含有するLPSグリコフォームの混合物を生じた(表5)。RM118 rfaF LPSに比べ、付加的なHep残基、すなわちHep₂・PEtn₀₋₂・Kdo-リピドA-OHを含有する主なグリコフォーム集団に加え、Hex-PCホ単位を含有する種であった。糖分析によれば、D-グルコースおよびPCホメチルプロトンの存在が ^1H NMR 3.24 ppm に強いシグナルを与えることが示された。期待されたように、この株由来のLPSは免疫ブロット実験においてPCホ特異的モノクローナル抗体(Mab)であるTEPC-15(Weiser, J.N., Shchetov, M., and Chong, S.T.H. (1997) Infect. Immun. 65, 943-950)と反応した。結合分析では、末端Hep、3-置換Hepおよび3, 4-二置換Hep残基の存在が明らかになった(表6)。親株の構造を基にすれば、このデータは2つの主要なグリコフォーム構

造 1 および 2 を発現する L P S を合成する能力を有する R M 1 1 8 o r f H と一致する（
なお、P E t n は部分置換を示す）。

【手続補正 4 6】

【補正対象書類名】明細書

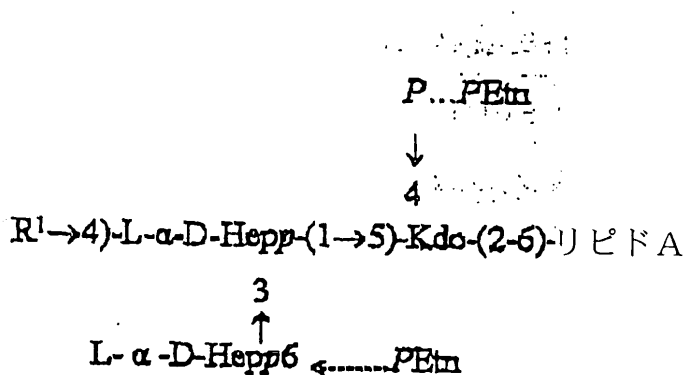
【補正対象項目名】0 1 2 2

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 1 2 2】

【化 6】



構造 1 : $R^1 = H$

構造 2 : $R^1 = P C h o \rightarrow 6) - \beta - D - G l c p$

【手続補正 4 7】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 1 2 3

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 1 2 3】

T - S D S - P A G E により分析した際の R M 1 1 8 o r f H の L P S での 2 つのバンドの存在（図 2）はこの結果に一致する。

【手続補正 4 8】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 1 2 4

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 1 2 4】

l p s A 変異体 R M 1 1 8 l p s A 由来の L P S - O H の E S I - M S 分析によれば、R M 1 1 8 o r f H と比較した場合、付加的な H e p 残基を有するグリコフォームを含むことが示され（表 5）、H e x 1 グリコフォームを含有するホスホコリンが主要な L P S 種である（図 3）。結合分析は構造 2 の末端 H e p へのヘプトースの一連の付加と一致していた（表 6）。これに応じ、この O - 脱アシル化 L P S サンプルの $^1 H$ N M R スペクトルはインフルエンザ菌の L P S トリヘプトース内部コア要素の低電場領域（5 . 0 ~ 6 . 0 p p m）において特徴的なパターン（H e p I I , 5 . 7 6 p p m ; H e p I / H e p I I , 5 . 1 6 / 5 . 1 5 p p m）を示した（図 4）（Risberg, A., Masoud, H., Martin, A., Richards, J.C., Moxon, E.R., and Schweda, E.K.H. (1999) Eur. J. Biochem. 261, 171-180）。このデータは構造 3 を有する R M 1 1 8 l p s A 由来 L P S に一致している（図 3、表 1）。

【手続補正 4 9】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 1 2 5

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0125】

l i c 2 A 変異体 R M 1 1 8 l i c 2 A 株由来のO-脱アシル化L P S のE S I - M S 分析から、主要なL P S 種としてのH e x 2 グリコフォームの存在が明らかになった（表 5）。R M 1 1 8 l i c 2 A L P S の組成分析では、唯一の中性ヘキソースとしてD-グルコースが存在することが示され、結合分析ではそれが末端残基であることが示された（表 6）。結合分析ではまた、相当な割合の2-結合ヘプトース残基が明らかになった。l p s A 変異体由来のL P S サンプルでは2-置換ヘプトース残基は、その残基がその結合分析法で用いられる加水分解条件下では容易に切断されないP E t n 基（図 3中の構造3参照）で置換されているために検出されなかったということは注目に値する。これらの発見によれば、l i c 2 A 変異体由来のL P S はl p s A 変異体のものとは、構造4に示されているように（表 1）H e p IIIの2位にグルコース残基を有する点で異なっているものと結論付けることができる。4. 65 ppmに付加的な¹H NMRシグナルが存在することは、この末端D-G l c p が、非置換類似体の場合と比べてH e p II共鳴値がアップフィールド側にシフトした（5. 58 ppm）β構造を有することを示し、5. 76 ppmはH e p IIIへの1, 2-結合（構造4；表 1）を示す(Masoud, H., Moxon, E.R., Martin, A., Krajcarski, D., and Richards, J.C. (1996) Biochem. 36, 2091-2103; Schweda, E.K.M., Hegedus, O.E., Borrelli, S., Lindberg, A.A., Weiser, J.W., Maskell, D.J., and Moxon, E.R. (1993) Carbohydr. Res. 246, 319-330; Schweda, E.K.H., Jansson, P.-E., Moxon, E.R., and Lindberg, A.A. (1995) Carbohydr. Res. 272, 213-224)。

【手続補正50】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0127

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0127】

l g t C 変異体 R M 1 1 8 l g t C 変異体では、O-脱アシル化L P S サンプルのE S I - M S 分析からH e x 3 グリコフォームの存在が明らかになった。糖分析ではl g t C 変異体由来のL P S がD-ガラクトースを含むことが示され、結合分析によればこれは末端残基として存在することが分かった（表 6）。結合分析ではまた、4-結合D-G l c p 残基はH e p IIIのラクトース部分により置換されている（構造5；表 1）主要なH e x 3 グリコフォーム（表 6）と一致する。L P S - O H の¹H NMRスペクトルは発明者らがこれまでに親株に存在しているラクトース含有H e x 3 L P S グリコフォームに関して報告しているものと同じである(Risberg, A., Masoud, H., Martin, A., Richards, J.C., Moxon, E.R., and Schweda, E.K.H. (1999) Eur. J. Biochem. 261, 171-180)。髄膜炎菌において、l g t C 遺伝子は1, 4-α-ガラクトシルトランスフェラーゼをコードしていることが示されている(Wakarchuk, W.W., Cunningham, A.M., Watson, D.C., and Young, N.M. 1998)。R M 1 1 8 由来のl g t C に関して同様の機能が、組換え酵素のトランスフェラーゼ活性を調べることで、またR M 1 1 8 l g t C 変異体由来のL P S の分析によって示されている。

【手続補正51】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0128

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0128】

l g t D 変異体 l g t D 遺伝子が不活性かされているインフルエンザ菌R M 1 1 8 株ではH e x 3 とH e x 4 L P S グリコフォームの混合物が合成された（表 5）。それに応

じてLPSのT-SDS-PAGE分析では2つのバンドが確認され、lgtC変異体由来のものの電気泳動移動度に相当するものとそれより遅く移動するバンドであった(図2)。この変異株由来のLPSは末端および4-結合D-Galp残基を含んでいた(表6)。親株とそのlgtC変異体の ^1H NMRスペクトルを比較したところ、Hex4グリコフォームに $\alpha\text{-D-Galp-(1}\rightarrow\text{4)-}\beta\text{-D-Galp}$ 単位が存在することが示され、5.01ppmにおけるシグナルは末端(-D-Galp残基(構造6; 表1))を示す。このlgtD遺伝子産物を合成アクセプターFCHASE- P^k によるグリコシルトランスフェラーゼ活性に関して調べた。CEアッセイにおいて親株RM118とlgtD変異株を比較したところ、変異株で $\beta\text{-GalpNAc}$ トランスフェラーゼ活性が欠損していることが示されされた(図5)。

【手続補正52】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0129

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0129】

lgtF変異体 インフルエンザ菌におけるlgtF遺伝子の突然変異によりLPSがMabTEPC-15とも反応しないし(データは示されていない)、それらの ^1H NMRにおいて特徴的なPChoメチルプロトンシグナル(3.24ppm)も示さない株が生じた。結合分析では、このLPSが末端 $\beta\text{-D-Glcp}$ 残基を欠き、モノ-3-置換Hepl残基だけを含むことが示された(表6)。lgtF変異体由来のLPS-OHではそのESI-MSにおいて、親株のLPSで見られるものと同じ、HeplIIIからのオリゴ糖の長さが異なるグリコフォームの分布が見られた(表5)。HeplIIIからのグロボテトラオース単位の完全な伸長はHeplに $\beta\text{-D-Glcp}$ 残基が存在しても存在しなくとも起こるということは注目に値する(図6)。本発明者らは親株がLPSグリコフォームの混合集団を合成することができ、そこではグロボテトラオース単位 $\beta\text{-D-GalpNAc-(1}\rightarrow\text{3)-}\alpha\text{-D-Galp-(1}\rightarrow\text{4)-}\beta\text{-D-Galp-(1}\rightarrow\text{4)-}\beta\text{-D-Glcp}$ を与える末端 $\beta\text{-D-GalpNAc}$ 残基を付加することでガラビオース単位が伸長することを示した(Risberg, A., Masoud, H., Martin, A., Richards, J.C., Moxon, E.R., and Schweda, E.K.H. (1999) Eur. J. Biochem. 261, 171-180)。

【手続補正53】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0130

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0130】

lic1変異体 lic1変異体由来のO-脱アシル化LPSのESI-MS分析では、PCho置換が存在しないこと以外は親株に見られるもの(Risberg, A., Masoud, H., Martin, A., Richards, J.C., Moxon, E.R., and Schweda, E.K.H. (1999) Eur. J. Biochem. 261, 171-180)と同じヘテロなグリコフォーム混合物(表5)が示された。RM118においてlic1遺伝子座は、3, 4-二置換ヘプトース(Hepl)に結合した $\beta\text{-D-Glcp}$ 6位におけるPCho置換基の発現を担う遺伝子を含むことが示されている(Risberg, A., Masoud, H., Martin, A., Richards, J.C., Moxon, E.R., and Schweda, E.K.H. (1999) Eur. J. Biochem. 261, 171-180; Weiser, J.N., Shchepetov, M., and Chong, S.T.H. (1997) Infect. Immun. 65, 943-950)。RM118lic1 O-脱アシル化LPSの ^1H NMRスペクトルを調べたところ、3.24ppmにおいて特徴的なPChoメチルプロトンシグナルが存在しないことが明らかになった。さらにこのlic1変異体由来のLPSは予測されたように(34) MabTEPC-15とは反応しなかった(データは示されていない)。

【手続補正54】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0131

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0131】

実施例 2

内部コア部分の置換および修飾

NTHi 2019株では、HepIがラクトースで置換されている ($R_1 = \beta\text{-D-Gal p} - (1 \rightarrow 4) - \beta\text{-D-Glc p}$; $R_2 / R_3 = H$) (N.J. Phillips et al. *Biochemistry*, 31 (1992) 4515-4526)。NTHi 375株では、HepIIIが小数のグリコフォーム集団でシアリル化ラクトースで置換されている ($R_1 = \beta\text{-D-Gal p}$ 、 $R_2 = H$ 、 $R_3 = \text{Neu5Ac} - \beta\text{-D-Gal p} - (1 \rightarrow 4) - \beta\text{-D-Glc p} - (1 \rightarrow 2)$) (D.W. Hood et al. *Mol. Micro.*, 33 (1999) 679-692)。本実施例では、メチル化分析、エレクトロスプレーイオン化質量分析 (ESI-MS) およびNMPを用いることで4つのNTHi株由来のLPSの構造研究の結果をまとめる。

【手続補正55】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0132

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0132】

インフルエンザ菌非定型株486、176、285および1159はEskola教授の株コレクションからFinnish otitis media cohort studyの一環として入手し (Hood, 上記参照)、内耳からの単離物も得た。細菌は37℃にてニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NAD) $2 \mu\text{g/mL}$ 、ヘミン $10 \mu\text{g/mL}$ 、およびノイラミン酸 (NeuAc) $50 \mu\text{g/mL}$ を含有するブレイン・ハート・インフュージョン (BHI) プロス (Difco 10^7 M) 3.7% W/V 中で増殖させた。LPSは凍結乾燥菌から、フェノールクロロホルム-石油エーテル法の後、超遠心分離を行うことで得た (A. Risberg et al. *Eur. J. Biochem.*, 261 (1999) 171-180)。無水ヒドラジンでのO-脱アシル化 (37℃、1時間) または薄い酢酸水溶液でのKドケトシド結合の切断 (100℃、2時間) のいずれかによってLPSサンプルから得たオリゴ糖サンプルに対してMSに基づく方法および高電場NMR法を用いて詳細な構造研究を行った。

【手続補正56】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0134

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0134】

LPS-OHサンプルのESI-MSでは、総ての株でヘテロなグリコフォーム混合物が示された。NTHi 486由来のLPS-OHのESI-MSスペクトルの部分が図10に示されている。これらのNTHi株の主要LPSグリコフォームの提案される組成は表7に示されている。総てのグリコフォームは、推定されるO-脱アシル化リピドA (リピドA-OH) とリン酸化Kドリンカーを介して結合した保存されたPetn置換トリヘプトシル内部コア部分を含む。

【手続補正57】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0136

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0136】

LPSサンプルのメチル化分析が表8に示されている。176および486株ではこれまでに発表されているインフルエンザ菌構造の必須成分である2-置換Hepの痕跡だけが検出できたことは注目に値する。その代わりに相当量の3-置換Hepが検出されたが、これはインフルエンザ菌LPSの共通のL- α -D-Hep p - (1 $\rightarrow$ 2) - L- α -D-Hep p - (1 $\rightarrow$ 3) - [β -D-Glc p - (1 $\rightarrow$ 4) -] - L-(-D-Hep p - (1 $\rightarrow$ 5) - α -Kdo p 内部コア要素の新しい置換パターンを示すものである。176および486株における主要グリコフォームの完全構造をNMRにより決定したが、その結果を図11にまとめる。285株のメチル化分析ではとりわけ3, 4-二置換Hepの他、多量の末端L, D-Hepが明らかになったが、これはトリヘプトシル内部コア部分のHep IIおよびHep IIIに置換が存在しない(すなわち、R₂およびR₃=H)ことを示すものであった。この株のHex 1グリコフォームの完全な構造(図12)をLPS-OHに対するNMRにより求めた(データは示されていない)。1158株のメチル化分析ではとりわけ、NMRによって明らかな(データは示されていない)構造要素D- α -D-Hep p - (1 $\rightarrow$ 6) - β -D-Glc p - (1 $\rightarrow$ 4) - L- α -D-Hep p と結合可能な6-置換D-Glc および末端D, D-Hepが示された。主要なLPSグリコフォームはHep II (α -D-Glc p) およびHep III (PCho $\rightarrow$ 6) - β -D-Glc p) において置換されていることが分かった。NTHi 1158の主要なグリコフォームの仮の構造が図13に示されている。

【手続補正58】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0137

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0137】

NTHi 176の詳細構造 薄い酢酸でLPSを部分酸加水分解したところ、可溶性リピドAとコアオリゴ糖画分が得られ、コアオリゴ糖画分をGPCで分離すると(図14)、フラクション1、フラクション2およびフラクション3が得られた。これらのフラクションのメチル化分析データは表8に示されている。フラクション1における3-および6-置換Gal および4-置換Glc Nの存在はこのオリゴ糖について新規な構造特徴が存在することを示している。フラクション1についてのCE-ESI-MSではとりわけm/z 1214.0における主要な二価イオンが明らかになり、これはフラクション2およびフラクション3で見られるものよりもこのフラクションでかなり高い分子量のグリコフォーム(HMG)を示す。NTHi 285についても同様の結果が得られた(下記参照)。フラクション2に関するESI-MSスペクトル(データは示されていない)からは、主要なグリコフォームが組成PCho₁・Hex₂・Hep₃・Pet_n・AnKdo-ol およびPCho₁・Hex₃・Hep₃・Pet_n・AnKdo-olを有することが示された。フラクション3に関するESI-MS(データは示されていない)からは、それぞれ組成Hex₃・Hep₃・Pet_n・AnKdo-ol およびHex₄・Hep₃・Pet_n・AnKdo-olを有するグリコフォームが示された。

【手続補正59】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0138

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0138】

フラクション2のHex 3グリコフォームの構造は詳細な¹H NMR分析により決定することができた。フラクション2の¹H NMRスペクトルは図11aに示されている。PChoのメチル基に特徴的なシグナルは δ 3.24に見られた。Hep I-Hep IIIのアノマー共鳴はそれぞれ5.03-5.13、5.83および5.26で確認された。Glc I、Glc IIおよびGalに相当するスペクトルはそれぞれ δ 4.56、4.62

および4.64における2D COSYおよびTOCSYスペクトルで確認された。化学シフトデータもメチル化分析と一致してGlcIIとGalが末端残基であることを示す。 δ 4.3においてGlcIのH-6, 6'の値がダウンフィールド側にシフトしていることは、この残基がこの位置でPChoで置換されていることを示す。プロトン対GlcII H-1/GlcI H-4、GlcI H-1/HepI H-4, 6間の内部残基NOEの連結性(図15)により、二糖単位の配列およびそのHepIとの結合点を β -D-Glcp-(1 $\rightarrow$ 4)-[PCho $\rightarrow$ 6]- β -D-Glcp-(1 $\rightarrow$ 4)-L- α -D-Hep p-(1 $\rightarrow$ として確定された。GalのH-1とHepIIIのH-3/H-2の間の内部残基NEOは、 β -D-Galp-(1 $\rightarrow$ 3)-L- α -D-Hep p-(1 $\rightarrow$ 単位の証拠となった。これらのデータを考え合わせると、PCho置換Hex3グリコフォームは構造2を有するものと結論付けることができた。フラクション2のメチル化分析では相当量の末端Hepが示され、ESI-MSスペクトルで見られたPCho置換Hex2グリコフォームは構造3を有するものと結論付けることができた。

【手続補正60】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0139

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0139】

フラクション3の ^1H NMRスペクトルは図11bに示されている。ESI-MSデータと一致して、PChoのメチルプロトンのシグナル強度は低いことから、フラクション2についてはPChoは高い程度では発現しないのは明らかである。HepIIIのアノマープロトンのシグナルはほぼフラクション2の対応するものと同じ化学シフトで共鳴する。 δ 5.26において α 結合の末端Glc残基(GlcIII)のアノマー共鳴が見られた。 β 結合ヘキソースのアノマー領域はフラクション2よりもよりヘテロなものであった。2Dスペクトルでは末端Glc残基のスピン系が δ 4.50および4.45で見られた。4-置換Glcおよび2つの末端Gal残基は δ 4.56、4.61および4.54で確認された。NOEデータからは、構造要素Glcp-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-Glcp-(1 $\rightarrow$ 4)-L- α -D-Hep p-(1 $\rightarrow$...ならびにHepIIIに結合したGalが確認された。さらにNOE結合性から、 α 結合GlcがHepIIの3位に結合していることが確認された。これらの証拠を考え合わせると構造4に示されているようなHex4グリコフォームの構造が得られる。2-置換Hepおよび末端Hepを示すメチル化分析に一致して、Hex3グリコフォームは構造5および6を有するものと結論付けられる。

【手続補正61】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0140

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0140】

NTHi486の詳細構造 弱い酸加水分解の後に得られたLPS-OHおよびオリゴ糖材料(OS-1)に対してESI-MS、NMRおよびメチル化分析を集中的に使用した後、グリコフォームNTHi486の主要なLPSの構造が確立された(図17)。176株については、HepIIIはO-3位で置換されているが、この場合にはグルコース残基による置換である。NTHi486 LPSはラクトース部分の末端 β -ガラクトースと結合したNeu5Acで著しくシアリル化されている。

【手続補正62】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0141

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0141】

LPS-OHの ^1H NMRスペクトルでは、 δ 5.8と5.0の間のほぼ同じ領域に5つの別個のシグナルが見られた。これらのシグナルのうち3つが内部コア領域の3つのヘプトース残基 (Hep I-Hep III) のH-1シグナルに相当していた。 α 結合グルコース残基 (Glc I) のアノマーシグナルは δ 5.28 (J 3.8 Hz) に確認され、 β 結合ヘキサースに相当するアノマーシグナルは δ 4.52と4.42の間に確認された。OS-1の ^1H NMRスペクトルでは、ヘプトースのアノマー共鳴ならびに一つのアセチル化部位が δ 5.83-5.75 (1H、分離していない) および δ 5.14-5.04 (3H、分離していない) で見られた。一つのO-アセチル基のメチルプロトンに相当する強いシグナルが δ 2.17で見られ、これはHSQCスペクトルの δ 21.0における ^{13}C シグナルに相当するものであった。内部コア領域内のグリコースの配列は、隣接する残基上のアノマープロトンおよびアグリコンプロトンを結びつけるトランスグリコシドのNOE結合性から確定した。PChoのメチルプロトンのシグナルは δ 3.21 (LPS-OH) および δ 3.23 (OS-1) で見られ、この結果から、またPETnからのエチレンプロトンのスピン系は以前に得られたものと同じであった (A. Risberg et al. Eur. J. Biochem., 261 (1999) 171-180)。LPS-OHおよびOS-1の ^1H - ^3H p

NMR相関研究では、PChoおよびPETnがそれぞれGlc IおよびHep II残基と結合していることが示された。シアル酸のH-3メチレンプロトン由来の特徴的なシグナルはLPS-OHの ^1H NMRスペクトルにおける δ 1.79 ($\text{H}-3_{\text{ax}}$, $J_{3_{\text{ax}}, 3_{\text{eq}}} = 12.3 \text{ Hz}$) および δ 2.73 ($\text{H}-3_{\text{eq}}$, $J_{3_{\text{eq}}, 4} = 4.3 \text{ Hz}$) に見られた。Neu5AcのH-3_{ax}とGal残基のH-3の間の内部残基NOEにより、メチル化分析によって示されているように、シアル酸がガラクトースと2,3-結合していることが確認された $\alpha\text{-D-Neu5Ac}-(2\rightarrow3)-\beta\text{-D-Galp}-(1\rightarrow$ 。OS-1のHep IIIにおける核の数に関するいくつかの化学シフト値はLPS-OHにおける対応する化学シフトとはかなり異なっていた。ダウンフィールドシフトはOS-1におけるHep IIIのH-2 (+0.99 ppm)、H-1 (+0.03 ppm)、H-3 (+0.22 ppm)、およびC-2 (+1.2 ppm) で見られ、一方、C-1 (-3.3 ppm) およびC-3 (-2.5 ppm) はアップフィールド側へシフトした。よって、Hep IIIはO-2位でアセチル化していることが示された。このアセチル化部位はHMBC実験でもさらに支持され、カルボニル炭素 (δ 174.0) とHep IIのH-2の間に相関性が見られた。さらにまた、カルボニル炭素とO-アセチル基のメチルプロトンの間でもクロスピークが見られ、これにより置換基の存在が確認された。

【手続補正63】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0142

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0142】

NTHi 486のlpsA変異体由来のLPSのESI-MSおよびメチル化分析ではHep IIIから鎖が伸長していないことが示された。O-脱アシル化材料のメチル化分析では、末端Glc、末端Hep、3,4-二置換Hep、2,3-二置換Hepおよび6-置換GlcNが相対比34:39:20:3:4で示された。LPS-OHのESI-MSスペクトルでは、 m/z 812.9/853.9で2つの主要な三価イオンが見られ、 $\text{PCho} \cdot \text{Hex}_2 \cdot \text{Hep}_3 \cdot \text{PETn}_{1-2} \cdot \text{P}_1 \cdot \text{Kdo}_1 \cdot \text{リピドA-OH}$ に相当した。

【手続補正64】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0143

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0143】

NTHi 176 および 285 における高分子量グリコフォーム NTHi 285 由来の LPS に対して弱い酸加水分解を行った後にゲル濾過を行ったところ、図12 に示されているグリコフォームを含んだ主要画分とともにそれより大きな分子量を有するグリコフォームを含有する少量の画分が示された。この高分子量 (HMW) 画分の糖分析では D-Glc、D-Gal、D-GlcNAc および L, D-Hep が示され、メチル化分析では末端 Gal、3-置換 Gal、6-置換 Gal、4-置換 GlcNAc、末端 Hep、および 3, 4-二置換 Hep を示した。CE-ESI-MS ではとりわけ m/z 1052 に主要な二価イオンが示された。このイオンに対する MS/MS によれば、NTHi 176 の HMW (上記参照) で見られた m/z 1214 と同様のフラグメンテーションパターンを示した。特に娘イオンが m/z 692 に見られ、組成物 PchoHex-Hex-HexNAc に相当した。

【手続補正65】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0145

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0145】

間接的 ELISA 培養上清および腹水を 96 ウェル Nunc Maxisorp EIA プレートで精製 LPS に対してアッセイした。37℃で3時間、0.02M $MgCl_2$ を含有する 0.05M 炭酸バッファー (pH 9.8) 100 μ L 中 1.0 μ g の LPS でウェルを被覆した後、室温にて1時間、1% BSA-PBS 200 μ L でブロッキングした。PBS-T (0.05% Tween 20) で洗浄した後、培養上清および腹水のサンプルを 1% BSA-PBS で連続希釈したものを加え、室温で1~3時間インキュベートした。次にこれらのプレートを洗浄し、アルカリ性ホスファターゼ標識ヤギ抗マウス IgG (Cedarlane Laboratories, Hornby, ON) を 1% BSA-PBS 中に 1:3000 希釈したものを室温にて1時間加えた。これらのプレートを p-NPP リン酸基質系 (Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, MD) で顕色させた。30~60分後、Dynatech EIA プレートリーダー 410 nm にてプレートを走査した。

【手続補正66】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0147

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0147】

実施例4Hiridliclip sALPS-OH-BSA 結合体の作製

これまでに記載されている手順に従い、インフルエンザ菌二重変異株 Rdliclip sA 由来の LPS を単離し、フェノール-水抽出プロトコールにより精製し、無水ヒドラジン処理により O-脱アシル化した。糖分析では、LPS-OH のオリゴ糖部分が L-グリセロール-D-マンノースおよび唯一検出可能なアルドースとしてのグルコースを含んでいることが示された。LPS-OH の ESI-MS によれば、分子量 2114.9 Da に相当する m/z 1056.5 に二価イオンが見られ、これは Glc (HepIII, Petn, Kdo, P-リピド A-OH (1) の予測組成と一致するものである。¹H NMR は明らかに Rdliclip sA 単一変異体で見られた LPS-OH のものと同じ保存されたトリヘプトシル部分に関する、5.16 (HepI)、5.15 (HepIII) および 5.76 (HepII) おけるヘプトース残基の十分定義されるアノマーシグナルを示した。Pcho メチル共鳴によるシグナル (Risberg et al., Eur. J. Biochem. 261:171-180, 1999) はこの ¹H NMR では検出されなかった。

【手続補正67】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0148

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0148】

実施例 5

炭水化物（CHO）－BSA結合体、その後の非結合CHOでの感作

これまでの例からのLPS－OHはGu et al., Infect. Immun. 64:4047-4053, 1996に記載の方法に従ってBSAを結合させることができる。あるいは図8に記載のようにカナダのNational Research CouncilのWei Zouが開発した手法に従い、Kdoカルボキシル基を介してBSAをM₂C₂H（4（4－N－マレイミドメチル）シクロヘキサン1－カルボキシルヒドラジド1／2ジオキサンと結合させることもできる。要するに、上記スキームに示されているリンカー戦略を用い、LPS－OHはEDCによるKdoカルボキシル基の選択的活性化を介してBSAと結合させたのである。

【手続補正68】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0149

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0149】

6～8週齢の雌BALB/cマウスにRd l i c l l p s A o d A LPS－BSA結合体を腹腔内感作させた。各マウスには一回の注射当たり0.2ml Ribis完全アジュバント(Cadarn Laboratories Ltd, Hornby, ON)中2μgの炭水化物を与えた。21日目と42日目に同量の結合ワクチンでマウスに追加抗原投与を行った。137日目にマウスに、Ribi中に10μgの1003 l i c l l p s A o d A LPSを含有する最後の腹腔内注射を行い、147日目に血清を採取した。

【手続補正69】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0151

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0151】

LLA4は同種株に存在する内部コアエピトープを認識することが分かった。ELISA試験では、LLA5は遺伝的に多様な培養コレクションの多数の株から精製したLPS（25種のうち14の非定型株LPS）と交差反応を示した（表3）。Mab LLA5によって認識されるエピトープはRd l p s A単一変異体に、また、HepIII残基を欠いたさらに末端切断されたRd l i c l l p s A二重変異体に存在した（表4）。LLA5エピトープは単一変異体Rd l g t FのLPSには存在しない。上で述べたように、l g t F遺伝子はHepIの4位にβ-D-Glc残基を付加するのに必要とされる。

【手続補正70】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0152

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0152】

この25株由来のLPSを当技術分野で公知の構造解析技術によって比較したところ、驚くべきことに、Mab LLA5が内部コア部分のHepI単位から鎖伸長を生じるラクト－N－ネオテトラオース（LNnT）含有オリゴ糖エピトープを検出していた。Mab LLA5によっては認識されない株はLNnTを含む鎖の伸長がないことを特徴とした。LNnTを含む鎖伸長を発現するインフルエンザ菌株は標準的な実験室増殖条件下で

は低い程度でしかそれを発現しない。それはこれまでには発現レベルが低いために R d 株では同定されていない(Risberg et al., Eur. J. Biochem., 261:717-180, 1999)。これが今般、図 1 4 と同様に、当業者に公知の手法である弱い酸加水分解およびバイオゲル P-4 でのゲル浸透クロマトグラフィーによる分離によって R d 株 (R M 1 1 8) の L P S から各オリゴ糖を遊離させることにより単離および同定された。この L N n T 含有コアオリゴ糖画分は少量の高分子量成分で標識された「H M W 画分」として溶出する。これは R d 株で同定されている主要なグリコフォーム(Risberg et al., 1999, 上記)からなる大きなピーク (4 0 0 を中心とする) と比べると少量成分である。R d 株由来の H M W コアオリゴ糖はタンデム質量分析 (M S / M S) 技術(Thibault and Richards, In methods in Molecular Biology, Vol 145, : Bacterial toxins: Methods and Protocols(Holst, O., ed.) pp 327-344, Human a Press, 1999 およびその中の参考文献)により H e p I から L N n T 含有鎖の伸長を有するものとして特徴付けられた。E S I - M S / M S におけるフラグメンテーションパターンは配列 G a l - G l c N A c - G a l - G l c を有し、末端糖単位 P e t n - G a l N A c でキャップされた L N n T オリゴ糖鎖伸長が存在することを示した (図 1)。

【手続補正 7 1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 1 5 3

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 1 5 3】

R d 株をシアル酸を含有する培地で増殖させると、シアリル化オリゴ糖を含有する L P S グリコフォームが発現する。本発明者らは H e p III からのオリゴ糖伸長として結合している構造 α -N e u 5 A c (2 $\rightarrow$ 3) - β -D - G a l p - (1 $\rightarrow$ 4) - β -D - G l c を有するシアラリルラクトースを見出した。さらにまた、このオリゴ糖伸長はいくつかの N T H i 株でも確認された。相変異遺伝子 l i c 3 A はラクトースアクセプターに C M P - N e u 5 A c を付加するシアリルトランスフェラーゼをコードしている。R d 株を記載の条件下で増殖させた場合、この生物の L P S で L N n T 鎖伸長部のシアリル化類似体が検出される。構造 α -N e u 5 A c (2 $\rightarrow$ 3) - β -D - G l c p - (1 $\rightarrow$ 4) - β -D - G l c p N A c - (1 $\rightarrow$ 3) -、 β -D - G a l p - (1 $\rightarrow$ 4) -、 β -D - G a l p を有する内部コア L P S からのシアリル化 L N n T オリゴ糖鎖伸長は O - 脱アシル化 L P S の E S - M S により R d l g t C l i c 3 A 二重変異体で容易に検出される。発明者らは M S / M S 技術、高電界核磁気共鳴技術、およびメチル化分析 (いずれも当業者に公知の構造解析法) を用い、保存された内部コアにおける L P S の構造がシアリル化 L N n T 含有鎖の伸長を有することを確認した。発明者らはインフルエンザ菌が r f b 遺伝子座の遺伝子を含む、L N n T 含有オリゴ糖鎖伸長部を付加するための一連の機構を用いていることを見出した。検討した総ての H i 株で、r f b 遺伝子の存在と L N n T の形成の間には絶対的な相関がある。

【手続補正 7 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 1 5 4

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 1 5 4】

また、M a b L L A 5 と反応性がある N T H i 株由来の L P S は弱い酸加水分解の後のゲル浸透クロマトグラフィーで高分子量 (H M W) 画分を示す。例えば N T H i 2 8 5 株の L P S は、図 1 に示したのと同様に、 L N n T を含有し、また、P e t n - G a l N A c 単位によってキャップされている鎖伸長の存在が M S / M S フラグメンテーションパターンから同定される少量の H M W 画分を示す。この L N n T 含有オリゴ糖鎖伸長は M S / M S / M S 実験からさらに確認された。L I A 5 反応性のない株、例えば N T H i 1 2

47株の弱い酸加水分解では検出可能なH M W画分は見られない。

【手続補正73】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0155

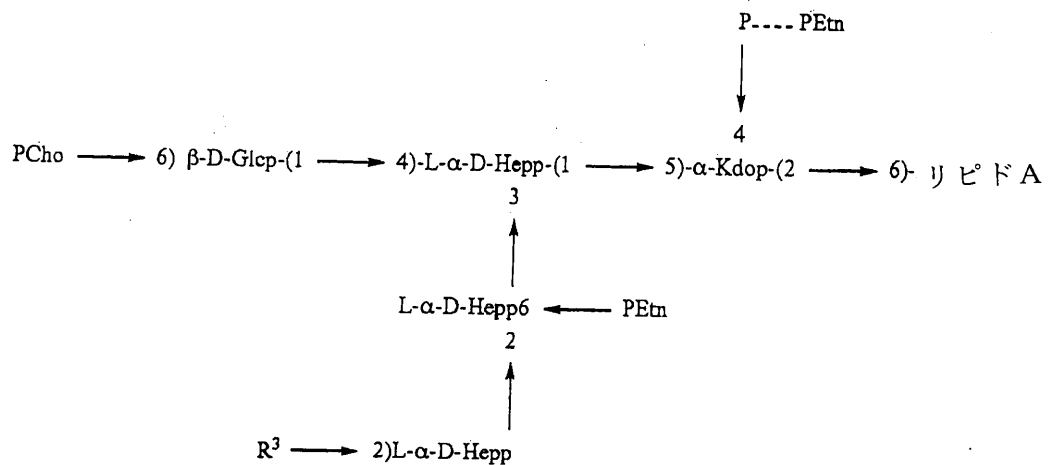
【補正方法】変更

【補正の内容】

【0155】

【表1】

表1 インフルエンザ菌RM118株の変異株のHepIIIから伸びているオリゴ糖鎖の主要なLPSグリコフォームの構造



構造	グリコフォーム	変異株	置換パターン (R ³)
3	Hex1	<i>lpsA</i>	H
4	Hex2	<i>lic2A</i>	β-D-Glcp
5	Hex3	<i>lgtC, lgtD</i>	β-D-Galp-(1→4)-β-D-Glcp
6	Hex4	<i>lgtD</i>	α-D-Galp-(1→4)-β-D-Gal-(1→4)-β-D-Glc

【手続補正74】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0156

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0156】

【表 2】

表 2 本研究においてRM118株で調べたLPS関連遺伝子

HI 番号はインフルエンザ菌ゲノム配列データベースについてTIGRが付したORF名である。太字で示された遺伝子は発現したLPSグリコフォームの詳細な比較分析のために選択されたものである。

遺伝子	HI 番号	参照
<i>kdtA</i>	0652	1
<i>lgtC</i>	0259	1
<i>lgtD</i>	1578	1
<i>lpsA</i>	0765	1
<i>orfZ</i>	0260.1	1
<i>opsX</i>	0261	1
<i>orfH</i>	0523	1
<i>rfaF</i>	1105	1
<i>lic2A</i>	0550	2
<i>lic1</i>	1537-1540	3
<i>lgtF</i>	0653	4
<i>cld</i>	0866	1
<i>galU</i>	0812	1
<i>kfiC</i>	0868	1
<i>lsg1</i>	0867	1
<i>orfM</i>	0260	1
<i>orfE</i>	0869	1
<i>orfO</i>	0870	1
<i>orfY</i>	0871	1

<i>pgmB</i>	0740	1
<i>pgmC</i>	1337	1
<i>rfe</i>	1716	1
<i>rfbP</i>	0872	1
<i>rfbB</i>	0873	1

- 1 . Hood, D.W., Deadman, M.E., Allen, T., Masoud, H., Martin, A., Brisson, J.R., Fleischmann, R., Venter, J.C., Richards, J.C., and Moxon, E.R. (1996) *Mol. Microbiol.* **22**, 951-965
- 2 . High, N.J., Deadman, M.E., and Moxon, E.R. (1993) *Mol. Microbiol.* **9**, 1275-1282
- 3 . Weiser, J.N., Maskell, D.J., Butler, P.D., Lindberg, A.A., and Moxon, E.R. (1990) *J. Bacteriol.* **172**, 3304-3309
- 4 . 本明細書に記載の本発明者らによる実験

【手続補正 7 5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 1 5 7

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 1 5 7】

【表 3】

インフルエンザ菌変異体および非定型株LPSに対するRd <i>licI</i> <i>lpsA</i> <i>odA</i> - BSA+1003 <i>licI</i> <i>lpsA</i> <i>odA</i> LPS147血清およびLL5A Mab			
株	EIA OD ₄₁₀		
	血清 1	血清 2	LLA5
1003 <i>licI</i> <i>lpsA</i> <i>odA</i>	2.329	1.575	-
Rd <i>licI</i> <i>lpsA</i> <i>odA</i>	0.746	0.742	1.414
1268	1.143	0.240	1.371
1247	0.571	0.250	-
1209	0.870	0.162	0.988
1233	0.436	0.135	1.451
1181	0.702	0.244	1.452
1232	0.568	0.270	1.661
981	0.474	0.182	-
486	0.512	0.287	-
1292	0.433	0.184	1.675
1008	0.830	0.172	-
1158	0.763	0.154	-
1124	0.524	0.127	-
1003	2.014	0.914	-
667	0.606	0.252	1.239
285	0.658	1.350	1.334
176	0.360	0.237	1.444
162	0.462	0.251	1.388
1180	0.974	0.254	1.464
1159	0.874	0.128	-
723	>2.500	1.253	-
1231	>2.500	1.008	1.404
1200	1.206	0.186	1.420
1207	0.667	0.137	1.040
432	0.530	0.159	-
375 wt	1.860	0.946	-

【手続補正 7 6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 1 5 8

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 1 5 8】

【表 4】

変異体 L P S	LLA5 Mab
	EIA OD ₄₁₀
Rd <i>licI</i> <i>lpsA</i> <i>odA</i>	0.889
Rd <i>lpsA</i>	1.630
Rd <i>licI</i> <i>orfH</i>	1.216
Rd <i>lgtF</i>	-

【手続補正 7 7】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 1 5 9

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0159】
【表5】

表5 インフルエンザウイルス株および変異株に由来するO-脱アシル化LPSの陰イオンESI-MSデータおよび提案される組成。提案される組成に基づき分子量の算出には、次のような平均質量単位を用いた：リビドA-OH, 953.00; Hex, 162.15; HexNAc, 203.19; Hep, 192.17; Kdo-P, 300.16; PEtn, 123.05; PCho, 165.05。

株	観測されたイオン(m/z)	分子質量(Da)	相対強度	提案される組成
	(M-2H) ⁺	測定値	理論値	
<i>OpsX</i>	616.0	1234.0	1235.1	Kdo-P, リビドA-OH(-H ₂ O)
	625.0	1252.0	1253.1	Kdo-P, リビドA-OH
<i>yfaF</i>	721.6	1445.1	1445.3	Hep, Kdo-P, リビドA-OH
<i>orfH</i>	817.5	1637.5	1637.5	2Hep, Kdo-P, リビドA-OH
	879.2	1760.4	1760.5	2Hep, PEtn, Kdo-P, リビドA-OH
	940.5	1883.4	1883.6	2Hep, 2PEtn, Kdo-P, リビドA-OH
	1042.3	2087.5	2087.7	PCho, Hex, 2Hep, PEtn, Kdo-P, リビドA-OH
	1104.8	2211.6	2210.8	PCho, Hex, 2Hep, 2PEtn, Kdo-P, リビドA-OH
<i>lpsA</i>	1056.3	2114.7	2114.9	Hex, 3Hep, PEtn, Kdo-P, リビドA-OH
	1139.0	2280.1	2279.9	PCho, Hex, 3Hep, PEtn, Kdo-P, リビドA-OH
	1200.4	2403.0	2403.0	PCho, Hex, 3Hep, 2PEtn, Kdo-P, リビドA-OH
<i>lir2A</i>	1137.5	2277.5	2277.1	2Hex, 3Hep, PEtn, Kdo-P, リビドA-OH
	1220.0	2442.5	2443.1	PCho, 2Hex, 3Hep, PEtn, Kdo-P, リビドA-OH
	1281.9	2565.8	2566.1	PCho, 2Hex, 3Hep, 2PEtn, Kdo-P, リビドA-OH
				PCho, 3Hex, 3Hep, PEtn, Kdo-P, リビドA-OH
<i>lgtC</i>	1301.1	2604.3	2604.3	80.0
	1362.7	2727.4	2727.3	20.0
<i>lgtD</i>	1300.6	2603.9	2604.3	62.0
	1362.0	2726.0	2727.3	5.0

株	観測されたイオン (m/z)	分子質量 (Da)	相対強度 ^b	提案される組成
	(M-2H) ²⁺	(M-3H) ³⁺	測定値	理論値
	1381.6	921.2	2765.5	2766.3
	1443.3	962.1	2888.9	2889.4
<i>IgF</i>	1137.4	757.8	2276.6	2277.1
	1218.6	812.2	2439.4	2439.2
	1280.0	853.2	2562.3	2562.3
	1320.3	879.9	2642.7	2642.3
	-	920.8	2765.3	2766.3
<i>IicI</i>	1056.2	-	2114.3	2114.9
	1117.4	744.9	2237.2	2237.9
	1218.3	812.1	2439.2	2439.2
	1279.7	852.6	2561.1	2562.3
	1299.2	865.7	2600.3	2601.3
	1360.6	906.5	2722.8	2724.4
	1401.1	933.7	2804.3	2804.5
	1462.5	974.6	2927.0	2927.5

^a バールヒューズドシリカ・キャピラリーカラムを搭載したAPI 3000トリプル四重極質量分析計 (Perkin-Elmer/Sciex) に接続したクリスタルモデル 310 CE 装置での、記載 (30) のように分離バッファーとして 5% メタノールを含有する 30 mM 酢酸モルホリン (pH 9.0) を用いた CE-ESI-MS によって得られたデータ。

^b 再構成されたスペクトルにおける個々の分子イオンから測定。

^c 観測された主なイオンは分子イオン-18 (H₂O の欠失) に相当した。

【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】0 1 6 0
【補正方法】変更
【補正の内容】
【0 1 6 0】

表 6 L P S 合成遺伝子に変異を有するインフルエンザ菌 R M 1 1 8 株に由来する L P S に関する結合分析データ

メチル化糖 ^a	T _{RM} ^b	変異株に対する検出器の相対的応答					結合の割り当て	
		<i>orfH</i>	<i>lpsA</i>	<i>lic2A</i>	<i>lgtC</i>	<i>lgtD</i>	<i>lgtF</i>	
2,3,4,6-Me ₄ -Glc	1.00	tr ^c	6.7	22.5	tr	tr		D-Glcp-(1→
2,3,4,6-Me ₄ -Gal	1.05	tr			34.3	22.9	10.3	D-Galp-(1→
2,3,6-Me ₃ -Glc	1.18	tr		6.3	33.0	24.4	18.8	→4)-D-Glcp-(1→
2,3,6-Me ₃ -Gal	1.17					12.4	16.6	→4)-D-Galp-(1→
2,4,6-Me ₃ -Gald	1.20	5.0	12.4	5.4	tr	4.0	10.3	→3)-D-Galp-(1→
2,3,4,6,7-Me ₅ -Hep	1.30	27.4	35.4					L,D-Heppp(1→
3,4,6,7-Me ₄ -Hep	1.44			53.3	15.8	16.0	16.3	→2)-L,D-Heppp(1→
2,4,6,7-Me ₄ -Hep	1.47	37.0					19.7	→3)-L,D-Heppp(1→
2,6,7-Me ₃ -Hep	1.52	23.7	45.4	12.5	10.6	17.1		→3,4)-L,D-Heppp(1→
2,3,4,6-Me ₄ -GalN	1.58						8.0	D-GalpNAc-1(1→

^a 2, 3, 4, 6-Me₄-Glc は 1, 5-ジ-オ-アセチル-2, 3, 4, 6-テトラ-オ-メチル-D-グルシトール-1-d₁などを表す。

^b 保持時間 (T_{RM}) は 2, 3, 4, 6-Me₄-Glc に対して報告し、値は検出器の応答因子の違いに関して補正していない。

^c 微量検出

^d 総てのサンプルが検出可能なレベルの 2, 4, 6-Me₃-Gal を示した。

【補正対象書類名】明細書
 【補正対象項目名】0161
 【補正方法】変更
 【補正の内容】
 【0161】
 【表7】

表7

NTHi176、486、285および1158株のO-脱アシル化LPSの主要なグリコフォームに
 関する陰イオンESI-MSデータおよび提案される組成。アステリスク(*)は優勢なイオンを示す。

株	観測されたイオン(m/z)		分子質量(Da)		提案される組成
	(M-4H) ⁴⁺	(M-3H) ³⁺	測定値	理論値 ^a	
176	608.8	811.9	2439.2	2439.2	Hex ₃ •Hep ₃ •PEtn ₁ •P ₁ •Kdo ₁ •リビドA-OH
	609.5	813.0	2442.0	2442.2	PCho•Hex ₂ •Hep ₃ •PEtn ₁ •P ₁ •Kdo ₁ •リビドA-OH
	639.6	853.0	2562.4	2562.1	Hex ₃ •Hep ₃ •PEtn ₂ •P ₁ •Kdo ₁ •リビドA-OH
	640.4	853.8	2565.6	2565.3	PCho•Hex ₂ •Hep ₃ •PEtn ₁ •P ₁ •Kdo ₁ •リビドA-OH
	650.0	867.0	2604.0	2604.3	PCho•Hex ₃ •Hep ₃ •PEtn ₁ •P ₁ •Kdo ₁ •リビドA-OH
	680.9*	908.3	2727.6	2727.3	PCho•Hex ₃ •Hep ₃ •PEtn ₂ •P ₁ •Kdo ₁ •リビドA-OH
	690.4	920.8	2765.5	2766.4	PCho•Hex ₄ •Hep ₃ •PEtn ₁ •P ₁ •Kdo ₁ •リビドA-OH
486	721.2*	961.8	2888.6	2889.5	PCho•Hex ₄ •Hep ₃ •PEtn ₂ •P ₁ •Kdo ₁ •リビドA-OH
	763.2	1017.9	3056.8	3057.7	Neu5Ac•PCho•Hex ₄ •Hep ₃ •PEtn ₁ •P ₁ •Kdo ₁ •リビドA-OH
	793.9	1059.1	3180.0	3180.7	Neu5Ac•PCho•Hex ₄ •Hep ₃ •PEtn ₂ •P ₁ •Kdo ₁ •リビドA-OH
	568.9	758.7	2279.5	2280.0	PCho•Hex ₁ •Hep ₃ •PEtn ₁ •P ₁ •Kdo ₁ •リビドA-OH
285	599.6*	799.8	2402.3	2403.1	PCho•Hex ₁ •Hep ₃ •PEtn ₂ •P ₁ •Kdo ₁ •リビドA-OH
1158	657.7	877.4*	2634.8	2634.4	PCho•Hex ₂ •Hep ₄ •PEtn ₁ •P ₁ •Kdo ₁ •リビドA-OH
	688.6	918.3	2758.4	2757.4	PCho•Hex ₂ •Hep ₄ •PEtn ₂ •P ₁ •Kdo ₁ •リビドA-OH
	698.1	931.0	2796.4	2796.6	PCho•Hex ₃ •Hep ₄ •PEtn ₁ •P ₁ •Kdo ₁ •リビドA-OH
	699.0	932.5	2800.0	2799.5	PCho ₂ •Hex ₂ •Hep ₄ •PEtn ₁ •P ₁ •Kdo ₁ •リビドA-OH

^a 分子量の算出には平均質量単位を用いた。

【補正対象書類名】明細書
 【補正対象項目名】0162
 【補正方法】変更
 【補正の内容】
 【0162】
 【表8】

表8

NTHi176、486、1158、285株に由来するLPSおよび
 NTHi176 LPS由来のオリゴ糖に関する結合分析データ

検出器の相対的応答

メチル化糖 ^a	NTHi株				NTHi176由来				結合の割り当て
	176	486	285	1158	LPS-P ^b	Fr.1 ^c	Fr.2	Fr.3	
2,3,4,6-Me ₄ -Glc	22	16		7	13	15	26	32	D-GlcP-(1→
2,3,4,6-Me ₄ -Gal	17	16	2	8	10	16	22	18	D-Galp-(1→
2,3,6-Me ₃ -Glc	6	27		15	14	7	2	15	4)-D-GlcP-(1→
2,3,6-Me ₃ -Gal			2	6		2			4)-D-Galp-(1→
2,4,6-Me ₃ -Gal	5	7	1	5	1	13	3	2	3)-D-Galp-(1→
2,3,4-Me ₃ -Glc			1	11	1	1			6)-D-GlcP-(1→
2,3,4-Me ₃ -Gal						6			6)-D-Galp-(1→
2,3,4,6,7-Me ₅ -Hep				11		1			D,D-HcPp-(1→
2,3,4,6,7-Me ₅ -Hep	1		52		1		5		L,D-HcPp-(1→
3,4,6,7-Me ₄ -Hep	1		4	13	12				2)-L,D-HcPp-(1→
2,4,6,7-Me ₄ -Hep	22	12			12	12	19	14	3)-L,D-HcPp-(1→
2,6,7-Me ₃ -Hep	22	14	34	16	26	16	23	16	3,4)-L,D-HcPp-(1→
4,6,7-Me ₃ -Hep	2	5			8	1			2,3)-L,D-HcPp-(1→
2,3,6-Me ₄ -GlcN						6			4)-D-GlcPNAc-(1→
2,3,4,-Me ₄ -GlcN	2	2	4						6)-D-GlcPNAc-(1→

^a 2, 3, 4, 6-Me₄-Glcは1, 5-ジ-O-アセチル-2, 3, 4, 6-テトラ-O-メチル-D-グルシトール-1-d₁などを表す。

^b LPS-Pは脱リン酸化LPS-OHを表す。

^c フラクション1は弱い酸加水分解の後に得られたNTHi176の高分子量サンプル (HMW) を表す。

【手続補正81】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】 0 1 6 3

【補正方法】 削除

【補正の内容】

【手続補正 8 2】

【補正対象書類名】 明細書

【補正対象項目名】 0 1 6 4

【補正方法】 削除

【補正の内容】

【手続補正 8 3】

【補正対象書類名】 明細書

【補正対象項目名】 図面の簡単な説明

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【図面の簡単な説明】

【図 1】

図 1 は、高分子量型 R M 1 1 8 の構造確認図である。

【図 2】

図 2 は、R M 1 1 8 野生型および推定されるグリコシルトランスフェラーゼ遺伝子に変異を有する株から精製した L P S の T - S D S - P A G E 後の電気泳動移動パターンである。R M 1 1 8 は野生型の L P S に相当し、同系変異体は関連の L P S 遺伝子で示されている。

【図 3】

図 3 は、主要な H e x 1 グリコフォーム（表 1、構造 3）由来の二価および三価イオンを示す、インフルエンザ菌 R M 1 1 8 株の l p s A 変異体由来の O - 脱アシル化 L P S の陰イオン E S I - M S である。

【図 4】

図 4 は、5. 0 と 6. 0 p p m の間に α -アノマープロトン領域を示す、インフルエンザ菌 R M 1 1 8 株の l p s A 変異体由来の O - 脱アシル化 L P S の ^1H NMR スペクトルである。3, 4 - 二置換 H e p (H e p I)、6 - P E t n 置換 H e p (H e p II)、末端 H e p (H e p III) およびリピド A 領域のリン酸化 α -G l c N に相当するアノマー共鳴が示されている。

【図 5】

図 5 は、インフルエンザ菌 R M 1 1 8 株の L g t D 活性のキャピラリー電気泳動分析である。パネル A / トレース 1 は音波処理物の 1 0 0, 0 0 0 x g ペレットを酵素源として用いた完全反応混合物であり；トレース 2 は U D P - G a l N A c を除いたこと以外は 1 の反応混合物と同じであり；トレース 3 は変異体 R M 1 1 8 : l g t D からの完全反応混合物であり；トレース 4 は U D P - G a l N A c を除いたこと以外はトレース 3 と同じである。ピーク A は F C H A S E - P^k 製剤中の不純物であり、ピーク b は F C H A S E - グロボテトラオースであり、ピーク c は F C H A S E - P^k である。パネル B / トレース 1 はパネル A トレース 1 で記載した反応から得られた T C L 精製産物である。トレース 2 は β -ヘキソサミニダーゼで処理したこと以外はトレース 1 と同じ材料である。

【図 6】

図 6 は、インフルエンザ菌 R M 1 1 8 株の l g t F 変異体由来の O - 脱アシル化 L P S の三価分子イオン領域の陰イオン E S I - M S である。H e x 2 (β -D-G a l p - (1 $\rightarrow$ 4) - β -D-G l c p)、H e x 3 (α -D-G a l p - (1 $\rightarrow$ 4) - β -D-G a l p - (1 $\rightarrow$ 4) - β -D-G l c p) および H e x 3 $\cdot$ H e x N A c (β -D-G a l p N A c - (1 $\rightarrow$ 3) - α -D-G a l p - (1 $\rightarrow$ 4) - β -D-G a l p - (1 $\rightarrow$ 4) - β -D-G l c p) から生じたピークが示されている。

【図 7】

図 7 は、Risberg et al., (16) の分析の結果に基づいたインフルエンザ菌 R M 1 1 8 株

由来の L P S の構造の模式図である。この実験で同定された遺伝子座の L P S 生合成において提案される作用部位を示し、関連の糖結合に矢印で結ばれている。相変異遺伝子座は下線で示されている。L P S 構造においては、K D O は 2-ケト-3-デオキシオクツロソン酸を、H e p は L-グリセロ-D-マンノ-ヘプトースを、G l c は D-グルコースを、G a l は D-ガラクトースを、G a l N A c は N-アセチルガラクトサミンを、P E t n は ホスホエタノールアミンを、P は リン酸を、P c h o は ホスホコリンを表す。ヘプトース残基については上から下に、ヘプトース I、ヘプトース II、次にヘプトース III である。

【図 8】

図 8 は、インフルエンザ菌 R d l i c 1 l p s A 株 L P S - O H と担体タンパク質 (この例では B S A) とのコンジュゲーションのスキームである。

【図 9】

図 9 は、インフルエンザ菌 R d 株の L P S 内部コアからの鎖伸張に關与する遺伝子を示す図である。b 型株では l i c 2 遺伝子座の遺伝子 o r f 3 および l i c 2 b が H e p I I からの鎖の伸長を制御する。これらの遺伝子は R d 株には存在しない。l i c 1 は P C h o の組み込みを制御する。

【図 10】

図 10 は、N T H i 4 8 6 株由来の O-脱アシル化 L P S の陰イオン E S I - M S スペクトルの一部を示す図である。主要なグリコフォームの提案される組成が示されている。ナトリウム化付加物がアステリスク (*) で示されている。

【図 11】

図 11 は、N T H i 1 7 6 由来のフラクション 2 (a) およびフラクション 3 (b) の $270\text{MHz } ^1\text{H NMR}$ スペクトルを示す図である。

【図 12】

図 12 は、N T H i 2 8 5 で見られた主要な H e x 1 L P S グリコフォームの構造を示す図である。

【図 13】

図 13 は、N T H i 1 1 5 8 の主要な L P S グリコフォームの仮構造を示す図である。

【図 14】

図 14 は、弱い酸加水分解後の N T H i 1 7 6 の L P S (100mg) のバイオゲル P-4 クロマトグラムを示す図である。

【図 15】

図 15 は、N T H i 1 7 6 のフラクション 2 の $500\text{MHz } 2\text{D NOESY}$ スペクトルの一部を示す図である。

【図 16】

図 16 は、N T H i 1 7 6 L P S 由来のオリゴ糖の構造を示す図である。

【図 17】

図 17 は、N T H i 4 8 6 の主要な N e u A c 含有 L P S グリコフォーム の構造を示す図である。

【手続補正 84】

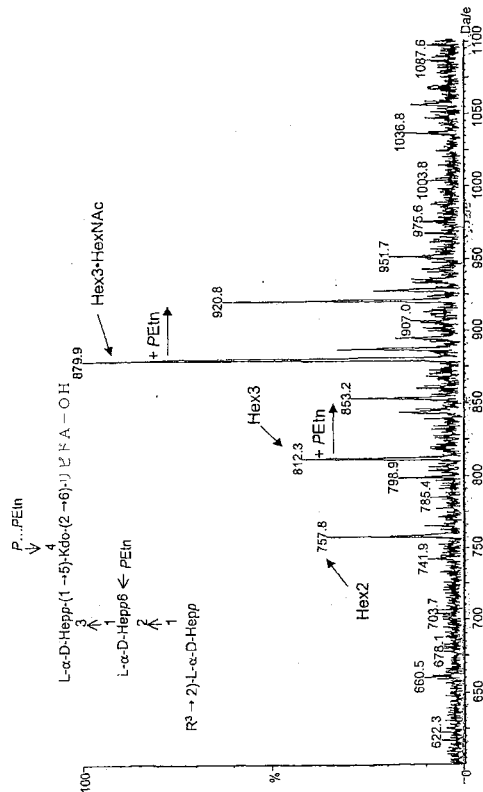
【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】全図

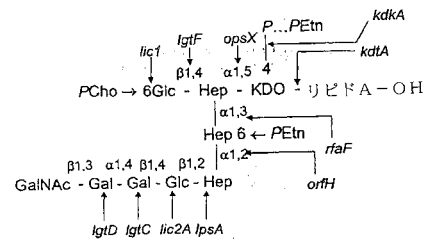
【補正方法】変更

【補正の内容】

【図 6】

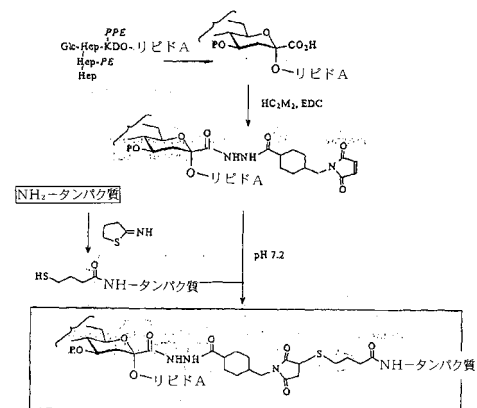


【図 7】

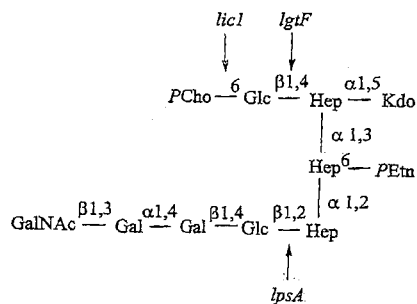


【図 8】

スキームXX:インフルエンザ菌Rdlic1lpsA LPS-OHと担体タンパク質(この例ではBSA)との結合に必要な工程

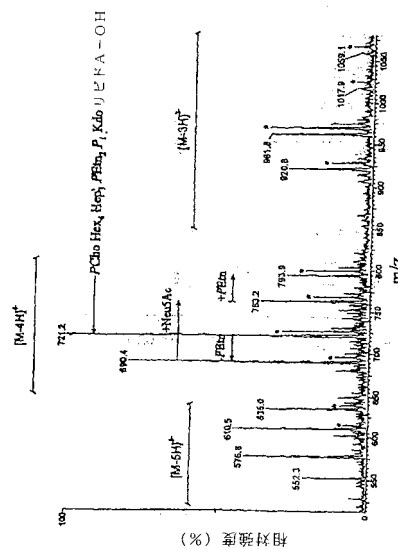


【図 9】



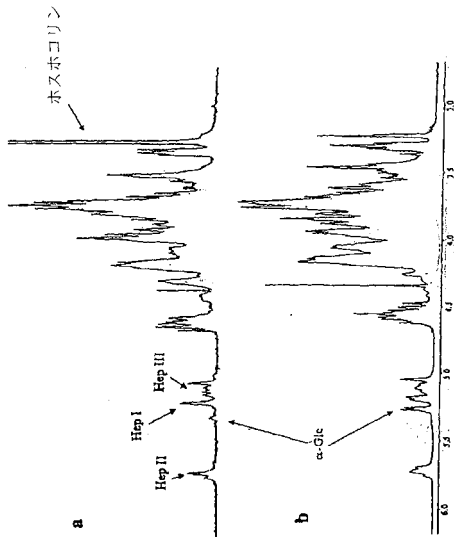
インフルエンザ菌Rd株のLPS内部コアからの鎖伸張に関与する遺伝子。b型株では遺伝子orf3およびlic2遺伝子座のlic2bがHepIIからの鎖の伸張を制御する。これらの遺伝子はRd株には存在しない。lic1はPChoの組み込みを制御する。

【図 10】

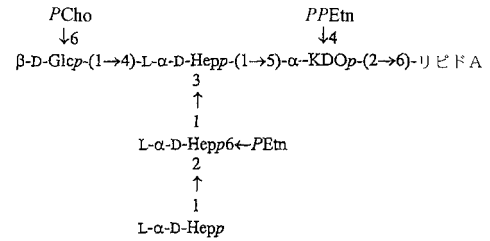


NT486株由来のO-脱アシル化LPSの陰イオンESI-MSスペクトルの一部。主要なグリコフォームの提案される組成が示されている。サトリウム化付加物がアステリスク(*)で示されている。

【図 1 1】

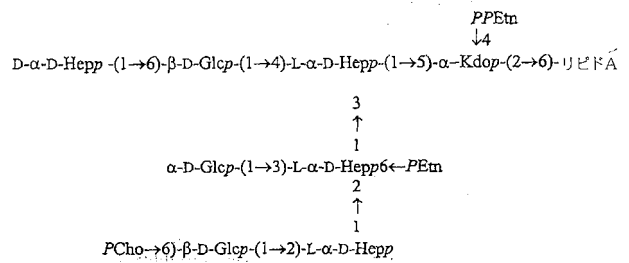
NTHi 176由来のフラクション2 (a) およびフラクション3 (b) の270MHz ¹H NMRスペクトル

【図 1 2】



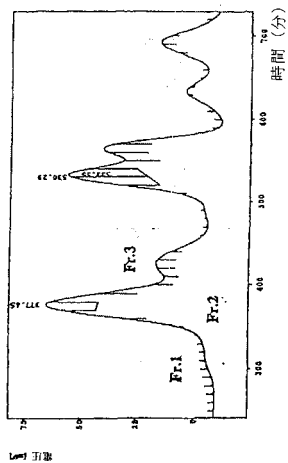
NTHi 285で見られた主要なHex 1 LPSグリコフォームの構造

【図 1 3】



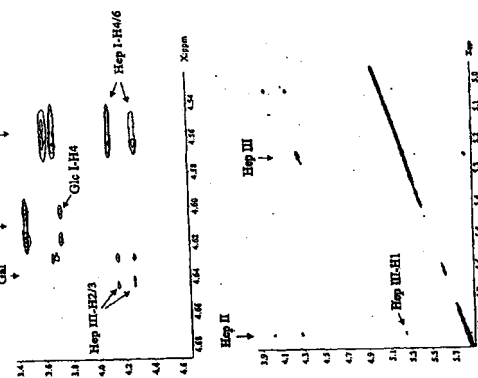
NTHi 1158の主要なLPSグリコフォームの仮構造

【図 1 4】

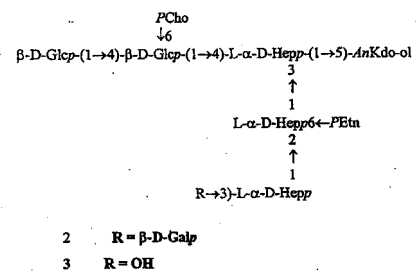


弱い酸加水分解後のNTHi 176のLPS (100mg) のバイオゲルP-4クロマトグラム。フラクション1 (1mg)、フラクション2 (10mg)、フラクション3 (6.4mg) が示されている。

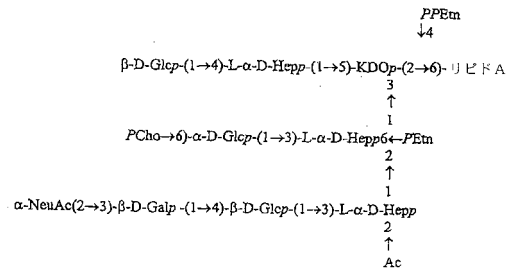
【図 1 5】



【図 1 6】



【図 17】



NTHi 486の主要なNeuAc含有LPSグリコフォームの構造