

(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2009-72192

(P2009-72192A)

(43) 公開日 平成21年4月9日(2009.4.9)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
C 12 N 15/09 (2006.01)	C 12 N 15/00 Z N A A	4 B 02 4
C 07 K 14/295 (2006.01)	C 07 K 14/295	4 C 08 4
A 61 K 38/00 (2006.01)	A 61 K 37/02	4 C 08 5
A 61 K 31/7088 (2006.01)	A 61 K 31/7088	4 C 08 6
A 61 K 48/00 (2006.01)	A 61 K 48/00	4 H 04 5

審査請求 有 請求項の数 13 O L (全 84 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2008-236179 (P2008-236179)	(71) 出願人	592243793 カイロン ソチエタ ア レスponsabili ta リミタータ イタリア国 イ-53100 シエナ, ピ ア フィオレンティーナ 1
(22) 出願日	平成20年9月16日 (2008.9.16)	(74) 代理人	100102978 弁理士 清水 初志
(62) 分割の表示	特願2003-550811 (P2003-550811) の分割	(74) 代理人	100128048 弁理士 新見 浩一
原出願日	平成14年12月12日 (2002.12.12)	(72) 発明者	グランディ, グイド イタリア国 イ-53100 シエナ, ピア フィオレンティーナ, 1, カイ ロン エセ, ピー, ア-
(31) 優先権主張番号	0129732.4		
(32) 優先日	平成13年12月12日 (2001.12.12)		
(33) 優先権主張国	英国(GB)		
(31) 優先権主張番号	0218233.5		
(32) 優先日	平成14年8月6日 (2002.8.6)		
(33) 優先権主張国	英国(GB)		
(31) 優先権主張番号	0218924.9		
(32) 優先日	平成14年8月14日 (2002.8.14)		
(33) 優先権主張国	英国(GB)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 CHLAMYDIA TRACHOMATISに対する免疫化

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 Chlamydia trachomatis の公開されたゲノム配列からの、免疫化およびワクチン接種のための有用な抗原の提供。

【解決手段】 ワクチン作製および開発のため、および / または診断目的のため、特定な C. trachomatis タンパク質配列。当該タンパク質のアミノ酸配列に対して 50 % 以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むタンパク質、または、特定な C. trachomatis タンパク質のフラグメントを含むタンパク質である、免疫原性組成物。

【選択図】なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

Chlamydia trachomatis に起因する感染の処置または予防のための医薬の製造におけるタンパク質の使用であって、該タンパク質が、(a) 配列番号 1、配列番号 3、配列番号 5、配列番号 7、配列番号 9、配列番号 11、配列番号 13、配列番号 15、配列番号 17、配列番号 19、配列番号 21、配列番号 23、配列番号 25、配列番号 27、配列番号 29、配列番号 31、配列番号 33、配列番号 35、配列番号 37、配列番号 39、配列番号 41、配列番号 43、配列番号 45、配列番号 47、配列番号 49、配列番号 51、配列番号 53、配列番号 55、配列番号 57、配列番号 59、配列番号 61、配列番号 63、配列番号 65、配列番号 67、配列番号 69、配列番号 71、配列番号 73、配列番号 75、配列番号 77、配列番号 79、配列番号 81、配列番号 83、配列番号 85、配列番号 87、配列番号 89、配列番号 91、配列番号 93、配列番号 95、配列番号 97、配列番号 99、配列番号 101、配列番号 103、配列番号 105、配列番号 107、配列番号 109、配列番号 111、配列番号 113、配列番号 115、配列番号 117、配列番号 119、配列番号 121、配列番号 123、配列番号 125、配列番号 127、配列番号 129、配列番号 131、配列番号 133、配列番号 135、配列番号 137、配列番号 139、配列番号 141、配列番号 143、配列番号 145、配列番号 147、配列番号 149、配列番号 151、配列番号 153、配列番号 155、配列番号 157、配列番号 159、配列番号 161、配列番号 163、配列番号 165、配列番号 167、配列番号 169、配列番号 171、配列番号 173、配列番号 175、配列番号 177、配列番号 179、配列番号 181、配列番号 183、配列番号 185、配列番号 187、配列番号 189、配列番号 191、配列番号 193、配列番号 195、配列番号 197、配列番号 199、配列番号 201、配列番号 203、配列番号 205、配列番号 207、配列番号 209、配列番号 211、配列番号 213、配列番号 215、配列番号 217、配列番号 219、配列番号 221、配列番号 223、配列番号 225、配列番号 227、配列番号 229、配列番号 231、配列番号 233、配列番号 235、配列番号 237、配列番号 239、配列番号 241、配列番号 243、配列番号 245、配列番号 247、配列番号 249、配列番号 251、配列番号 253、配列番号 255、配列番号 257、配列番号 259 および配列番号 261 からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むタンパク質、(b)(a) のアミノ酸配列に対して 50% 以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むタンパク質、または(c)(a) のアミノ酸配列のフラグメントを含むタンパク質である、使用。

## 【請求項2】

Chlamydia trachomatis に起因する感染の処置または予防のための医薬の製造における核酸の使用であって、該核酸が、(a) 配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12、配列番号 14、配列番号 16、配列番号 18、配列番号 20、配列番号 22、配列番号 24、配列番号 26、配列番号 28、配列番号 30、配列番号 32、配列番号 34、配列番号 36、配列番号 38、配列番号 40、配列番号 42、配列番号 44、配列番号 46、配列番号 48、配列番号 50、配列番号 52、配列番号 54、配列番号 56、配列番号 58、配列番号 60、配列番号 62、配列番号 64、配列番号 66、配列番号 68、配列番号 70、配列番号 72、配列番号 74、配列番号 76、配列番号 78、配列番号 80、配列番号 82、配列番号 84、配列番号 86、配列番号 88、配列番号 90、配列番号 92、配列番号 94、配列番号 96、配列番号 98、配列番号 100、配列番号 102、配列番号 104、配列番号 106、配列番号 108、配列番号 110、配列番号 112、配列番号 114、配列番号 116、配列番号 118、配列番号 120、配列番号 122、配列番号 124、配列番号 126、配列番号 128、配列番号 130、配列番号 132、配列番号 134、配列番号 136、配列番号 138、配列番号 140、配列番号 142、配列番号 144、配列番号 146、配列番号 148、配列番号 150、配列番号 152、配列番号 154、配列番号 156、配列番号 158、配列番号 160、配列番号 162、配列番号 164、配列番号 166、配列番号 168、配列番号 170、配列番号 172、配列番号 174、配列番号 176、配列番号 178、配列番号 180、配列番号 182、配列番号 184、配列番号 186、配列番号 188、配列番号 190、配列番号 192、配列番号 194、配列番号 196、配列番号 198、配列番号 200。

列番号 1 6 8、配列番号 1 7 0、配列番号 1 7 2、配列番号 1 7 4、配列番号 1 7 6、配列番号 1 7 8、配列番号 1 8 0、配列番号 1 8 2、配列番号 1 8 4、配列番号 1 8 6、配列番号 1 8 8、配列番号 1 9 0、配列番号 1 9 2、配列番号 1 9 4、配列番号 1 9 6、配列番号 1 9 8、配列番号 2 0 0、配列番号 2 0 2、配列番号 2 0 4、配列番号 2 0 6、配列番号 2 0 8、配列番号 2 1 0、配列番号 2 1 2、配列番号 2 1 4、配列番号 2 1 6、配列番号 2 1 8、配列番号 2 2 0、配列番号 2 2 2、配列番号 2 2 4、配列番号 2 2 6、配列番号 2 2 8、配列番号 2 3 0、配列番号 2 3 2、配列番号 2 3 4、配列番号 2 3 6、配列番号 2 3 8、配列番号 2 4 0、配列番号 2 4 2、配列番号 2 4 4、配列番号 2 4 6、配列番号 2 4 8、配列番号 2 5 0、配列番号 2 5 2、配列番号 2 5 4、配列番号 2 5 6、配列番号 2 5 8、配列番号 2 6 0 および配列番号 2 6 2 からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む核酸である、使用。10

#### 【請求項 3】

および 2 4 2、( b ) ( a ) のヌクレオチド配列に対して 50 % 以上の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む核酸、または ( c ) ( a ) ヌクレオチド配列のフラグメントを含む核酸。

#### 【請求項 4】

請求項 1 または 2 に記載の使用であって、感染が、Chlamydia 基本小体に対して特異的な免疫応答を誘発する医薬によって処置または予防される、使用。

#### 【請求項 5】

Chlamydia trachomatis 基本小体を中和するための医薬の製造における、請求項 1 に記載のタンパク質または請求項 2 に記載の核酸の使用。20

#### 【請求項 6】

免疫原性組成物であって、タンパク質およびアジュバントを含み、該タンパク質が、( a ) 配列番号 1、配列番号 3、配列番号 5、配列番号 7、配列番号 9、配列番号 11、配列番号 13、配列番号 15、配列番号 17、配列番号 19、配列番号 21、配列番号 23、配列番号 25、配列番号 27、配列番号 29、配列番号 31、配列番号 33、配列番号 35、配列番号 37、配列番号 39、配列番号 41、配列番号 43、配列番号 45、配列番号 47、配列番号 49、配列番号 51、配列番号 53、配列番号 55、配列番号 57、配列番号 59、配列番号 61、配列番号 63、配列番号 65、配列番号 67、配列番号 69、配列番号 71、配列番号 73、配列番号 75、配列番号 77、配列番号 79、配列番号 81、配列番号 83、配列番号 85、配列番号 87、配列番号 89、配列番号 91、配列番号 93、配列番号 95、配列番号 97、配列番号 99、配列番号 101、配列番号 103、配列番号 105、配列番号 107、配列番号 109、配列番号 111、配列番号 113、配列番号 115、配列番号 117、配列番号 119、配列番号 121、配列番号 123、配列番号 125、配列番号 127、配列番号 129、配列番号 131、配列番号 133、配列番号 135、配列番号 137、配列番号 139、配列番号 141、配列番号 143、配列番号 145、配列番号 147、配列番号 149、配列番号 151、配列番号 153、配列番号 155、配列番号 157、配列番号 159、配列番号 161、配列番号 163、配列番号 165、配列番号 167、配列番号 169、配列番号 171、配列番号 173、配列番号 175、配列番号 177、配列番号 179、配列番号 181、配列番号 183、配列番号 185、配列番号 187、配列番号 189、配列番号 191、配列番号 193、配列番号 195、配列番号 197、配列番号 199、配列番号 201、配列番号 203、配列番号 205、配列番号 207、配列番号 209、配列番号 211、配列番号 213、配列番号 215、配列番号 217、配列番号 219、配列番号 221、配列番号 223、配列番号 225、配列番号 227、配列番号 229、配列番号 231、配列番号 233、配列番号 235、配列番号 237、配列番号 239、配列番号 241、配列番号 243、配列番号 245、配列番号 247、配列番号 249、配列番号 251、配列番号 253、配列番号 255、配列番号 257、配列番号 259 および配列番号 261 からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むタンパク質、( b ) ( a ) のアミノ酸配列に対して 50 % 以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むタンパク質、または ( c ) ( a )40

のアミノ酸配列のフラグメントを含むタンパク質である、免疫原性組成物。

**【請求項 7】**

免疫原性組成物であって、核酸およびアジュバントを含み、該核酸が、(a) 配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、配列番号16、配列番号18、配列番号20、配列番号22、配列番号24、配列番号26、配列番号28、配列番号30、配列番号32、配列番号34、配列番号36、配列番号38、配列番号40、配列番号42、配列番号44、配列番号46、配列番号48、配列番号50、配列番号52、配列番号54、配列番号56、配列番号58、配列番号60、配列番号62、配列番号64、配列番号66、配列番号68、配列番号70、配列番号72、配列番号74、配列番号76、配列番号78、配列番号80、配列番号82、配列番号84、配列番号86、配列番号88、配列番号90、配列番号92、配列番号94、配列番号96、配列番号98、配列番号100、配列番号102、配列番号104、配列番号106、配列番号108、配列番号110、配列番号112、配列番号114、配列番号116、配列番号118、配列番号120、配列番号122、配列番号124、配列番号126、配列番号128、配列番号130、配列番号132、配列番号134、配列番号136、配列番号138、配列番号140、配列番号142、配列番号144、配列番号146、配列番号148、配列番号150、配列番号152、配列番号154、配列番号156、配列番号158、配列番号160、配列番号162、配列番号164、配列番号166、配列番号168、配列番号170、配列番号172、配列番号174、配列番号176、配列番号178、配列番号180、配列番号182、配列番号184、配列番号186、配列番号188、配列番号190、配列番号192、配列番号194、配列番号196、配列番号198、配列番号200、配列番号202、配列番号204、配列番号206、配列番号208、配列番号210、配列番号212、配列番号214、配列番号216、配列番号218、配列番号220、配列番号222、配列番号224、配列番号226、配列番号228、配列番号230、配列番号232、配列番号234、配列番号236、配列番号238、配列番号240、配列番号242、配列番号244、配列番号246、配列番号248、配列番号250、配列番号252、配列番号254、配列番号256、配列番号258、配列番号260 および配列番号262 からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む核酸、(b)(a)のヌクレオチド配列に対して50%以上の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む核酸、または(c)(a)ヌクレオチド配列のフラグメントを含む核酸である、免疫原性組成物。

**【請求項 8】**

医薬品としての使用のための、請求項5または請求項6に記載の組成物。

**【請求項 9】**

患者におけるC. trachomatis 感染性を中和する方法であって、請求項5または請求項6に記載の組成物、あるいは請求項1に記載のタンパク質を認識する抗体を、前記患者に投与する工程を包含する、方法。

**【請求項 10】**

C. trachomatis に対して患者を免疫する方法であって、請求項5または請求項6に記載の組成物を該患者に投与する工程を包含する、方法。

**【請求項 11】**

C. trachomatis 基本小体に特異的な抗体を惹起する方法であって、請求項5または請求項6に記載の組成物を該患者に投与する工程を包含する、方法。

**【請求項 12】**

請求項1に記載のタンパク質を認識する抗体を惹起する方法であって、C. trachomatis 基本小体を、該患者に投与する工程を包含する、方法。

**【請求項 13】**

生物学的サンプルにおけるC. trachomatis 基本小体を検出するための方法であって、該サンプルを、請求項1に記載のタンパク質を認識する抗体

10

20

30

40

50

と接触させる工程を包含する、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本明細書中で引用される全ての文献は、その全体が参考として援用される。

【0002】

(技術分野)

本発明は、クラミジア感染、特に、*Chlamydia trachomatis*による感染に対する免疫化の分野に存在する。

【背景技術】

【0003】

(背景技術)

*Chlamydiae*は、地域性の性感染症および種々の他の疾患症候群に寄与する真核生物細胞の偏性細胞内寄生生物である。これらは、排他的な真正細菌の分科を占め、他のいずれの既知の生物に対しても密接な関係を有さず、これらは、単一のファミリー (*Chlamydiaeae*) を含むこれら独自の目 (*Chlamydiales*) に分類され、次いで単一の属 (*Chlamydia*, *Chlamydophilus*ともいわれる) を含む。*Chlamydiaeae*は、これらの固有の生活環が特に特徴的であり、この生活環において、細菌は、2つの形態学的に別々の形態：細胞外感染性形態（基本小体、EB）と細胞内非感染性形態（網状体（reticulate bodies）、RB）との間で交替する。この生活環は、RBのEBへの再編成で完了し、EBは、引き続き、分裂した宿主細胞がさらなる細胞を感染する準備をさせておく。

【0004】

4つのクラミジア種 (*C. trachomatis*、*C. pneumoniae*、*C. pecorum*および*C. psittaci*) が現在知られており [ 例えば、参考文献 1, 2 ] (非特許文献 1, 2 )、ゲノム配列は、公表されている [ 参考文献 3 ~ 9 ] (非特許文献 3 ~ 6、特許文献 1 ~ 3 )。

【0005】

*C. trachomatis*のヒトの血清改変体（「血清型亜型」）は、2つのバイオ改変体（「biовар」）に分けられる。血清型亜型 A ~ K は、主に眼の組織 (A ~ C) または泌尿生殖器管 (D ~ K) において上皮性感染を誘発する。血清型亜型 L 1、L 2 および L 3 は、浸潤性の性病性リンパ肉芽腫 (LGV) の因子である。

【0006】

クラミジア感染自体が疾患を生じるが、幾人かの患者においては、症候群の重篤度は、実際には、異常な宿主免疫応答に起因していると考えられる。感染を排除することの失敗は持続的な免疫刺激を生じ、そして宿主を助けることよりも、これは、重篤な結果（不妊および失明を含む）を伴う慢性感染を生じる [ 10 ] (非特許文献 7 )。さらに、天然のクラミジア感染により与えられる防御は、通常、不完全で、一過性で、そして株特異的である。

【0007】

疾患の深刻な性質に起因して、適切なワクチンを提供することが所望される。これらは、(a) クラミジア感染に対する、またはクラミジア誘導性疾患に対する免疫のために（予防ワクチン接種）、あるいは (b) 確立された慢性クラミジア感染の根絶のために（治療ワクチン接種）有用であり得る。しかし、細胞内寄生生物であることから、この細菌は、一般に抗体媒介免疫応答を逃れ得る。

【0008】

種々の抗原性タンパク質が、*C. trachomatis*について記載されており、そして特に細胞表面が、詳細な検索の標的となっている [ 例えば、1, 11 ] (非特許文献 1, 8 )。これらとしては、例えば、pgp3 [ 12, 13, 14 ] (非特許文献 9、特許文献 4, 5 )、MOMP [ 15 ] (非特許文献 10 )、Hsp60 (GroEL) [ 1

10

20

30

40

50

6] (非特許文献11)およびHsp70(DnaK様)[17] (非特許文献12)が挙げられる。しかし、これらの全てが有効なワクチンであると証明されたわけではなく、そして、ワクチン開発における使用に適切な抗原および免疫原を提供するため、天然の感染の間に免疫応答を惹起する*C. trachomatis*抗原を同定することが本発明の目的である。*C. trachomatis*の診断(例えば、免疫診断)に有用な抗原を同定することは、さらなる目的である。

【特許文献1】International patent application WO99/27105

【特許文献2】International patent application WO00/27994

【特許文献3】International patent application WO99/28475

【特許文献4】EP-A-0499681

10

【特許文献5】International patent application WO95/28487

【非特許文献1】Raulston (1995) Mol Microbiol 15:607-616

【非特許文献2】Everett (2000) Vet Microbiol 75: 109-126

【非特許文献3】Kalman et al. (1999) Nature Genetics 21:385-389

【非特許文献4】Read et al. (2000) Nucleic Acids Res 28:1397-1406

【非特許文献5】Shirai et al. (2000) Nucleic Acids Res 28:2311-2314

【非特許文献6】Stephens et al. (1998) Science 282:754-759

【非特許文献7】Ward (1995) Apmis. 103:769-96.

【非特許文献8】Moulder (1991) Microbiol Rev 55(1):143-190.

20

【非特許文献9】Comanducci et al. (1994) Infect Immun 62(12):5491-5497.

【非特許文献10】Murdin et al. (1993) Infect Immun 61:4406-4414

【非特許文献11】Cerrone et al. (1991) Infect Immun 59(1):79-90.

【非特許文献12】Raulston et al. (1993) J. Biol. Chem. 268:23139-23147.

### 【発明の開示】

#### 【課題を解決するための手段】

##### 【0009】

参考文献18は、種々の*C. pneumoniae*由来のタンパク質を開示する。これらは、免疫反応性、免疫受容可能および/または基本小体に存在するとして、実験的に検証された。このタンパク質のこれらの性質は、ゲノム配列情報から推論できなかった。参考文献18は、これらのタンパク質が、*C. pneumoniae*が主要な病巣である*Chlamydia*細菌に起因する感染症の処置または予防に使用され得ることを開示する。*C. pneumoniae*タンパク質はまた、種間交差反応性に起因する、他の種の*Chlamydia*による感染症を処置または予防するために使用され得る。

30

##### 【0010】

全ゲノムの比較[3、4、5]によって示されるように、*C. pneumoniae*は*C. trachomatis*と密接に関連する。

##### 【0011】

本発明は、参考文献18に開示される*C. pneumoniae*タンパク質に対応する*C. trachomatis*タンパク質(配列番号1~261の奇数番号)に関する。これらのタンパク質は、*Chlamydia*細菌(特に*C. trachomatis*において)に起因する感染症の処置および予防において使用され得る。特に好ましいタンパク質は、以前に「仮定タンパク質」として注釈されたもの(本明細書中の表Iを参照のこと)か、または細胞質位置を有すると考えられたものである。

40

##### (*C. trachomatis*タンパク質)

本発明は、アミノ酸配列(配列番号1~261の奇数番号)のうちの1つ以上を含むタンパク質を提供する。

##### 【0012】

本発明はまた、1つ以上の配列番号1~261の奇数番号のアミノ酸配列と少なくともx%配列同一性を共有する配列を含むタンパク質を提供する。特定の配列に依存して、xは、好ましくは、50%以上(例えば、60%、70%、80%、90%、95%、99

50

%以上)である。これらは、変異体および対立遺伝子改変体を含む。代表的には、2つのタンパク質間の50%以上の同一性は、機能的同等性の指標であると考えられる。タンパク質間の同一性は、好ましくは、パラメーターのギャップオープンペナルティー=12およびギャップ伸長ペナルティー=1を用いるアフィンギャップ検索を使用して、M P S R C H プログラム(Oxford Molecular)において実行されるように、Smith-Waterman相同性検索アルゴリズムによって決定される。

## 【0013】

本発明は、配列番号1～261の奇数番号のアミノ酸配列のフラグメントを含むタンパク質をさらに提供する。これらのフラグメントは、配列から少なくともn連続するアミノ酸を含むはずであり、そして特定の配列に依存して、nは、7以上(例えば、8、10、12、14、16、18、20、30、40、50、75、100、150、200以上)である。好ましくは、これらのフラグメントは、配列から1つ以上のエピトープを含む。他の好ましいフラグメントは、シグナルペプチドを省略する。

10

## 【0014】

本発明のタンパク質は、種々の手段(例えば、化学合成(少なくとも一部)、プロテアーゼを用いるより長いポリペプチドの消化、RNAからの翻訳、細胞培養物(例えば、組換え発現物、C. trachomatis 培養物)からの精製など)によって調製され得る。E. coliにおける異種発現は、好ましい調製用経路である。

20

## 【0015】

本発明のタンパク質は種々の形態(例えば、ネイティブ、融合、グリコシリ化、非グリコシリ化、脂溶化(lipidate)など)を取り得る。

20

## 【0016】

本発明のタンパク質は、好ましくは、実質的に純粋な形態(すなわち、他のC. trachomatis または宿主細胞タンパク質を実質的に含まない)で調製される。

## 【0017】

本発明のタンパク質は、固体支持体に結合され得る。これらは検出可能な標識(例えば、放射活性標識もしくは蛍光標識、またはビオチン標識)を含み得る。

## 【0018】

本発明のタンパク質は、好ましくはChlamydialタンパク質である。

30

## 【0019】

(C. trachomatis 核酸)

本発明は、配列番号2～262の偶数番号のヌクレオチド配列を含むタンパク質を提供する。

## 【0020】

本発明はまた、配列番号2～262の偶数番号のヌクレオチド配列の1つ以上と少なくともx%配列同一性を共有する配列を含む核酸を提供する。特定の配列に依存して、xは、好ましくは、50%以上(例えば、60%、70%、80%、90%、95%、99%以上)である。

## 【0021】

さらに、本発明は、偶数のヌクレオチド配列である配列番号2～262を含む核酸にハイブリダイズし得る核酸を提供する。ハイブリダイゼーション反応は、異なる「ストリンジエンシー」の条件下で行われ得る。ハイブリダイゼーション反応のストリンジエンシーを増す条件は、広く知られており、当該分野で公開されている。関連する条件の例としては、(ストリンジエンシーを増大させるために)以下が挙げられる: 25°、37°、50°、55°および68°のインキュベーション温度; 10×SSC、6×SSC、1×SSC、0.1×SSCの緩衝液濃度および他の緩衝液系を使用するそれらの等価物; 0%、25%、50%および75%のホルムアミド濃度; 5分～24時間のインキュベーション時間; 1回、2回、またはそれ以上の洗浄工程; 1分、2分または15分の洗浄インキュベーション時間; ならびに6×SSC、1×SSC、0.1×SSCの洗浄溶液濃度または脱イオン水。いくつかの実施形態において、本発明の単離された核酸は、低いスト

40

50

リンジエンシー条件下で選択的にハイブリダイズする；他の実施形態において、これは、中間のストリンジエンシー条件下で選択的にハイブリダイズする；他の実施形態において、これは、高いストリンジエンシー条件下で選択的にハイブリダイズする。低いストリンジエンシーハイブリダイゼーション条件の例示的なセットは、50 および  $10 \times SSC$  である。中間のストリンジエンシーハイブリダイゼーション条件の例示的なセットは、55、 $1 \times SSC$  である。高いストリンジエンシーハイブリダイゼーション条件の例示的なセットは、68 および  $0.1 \times SSC$  である。

## 【0022】

偶数のヌクレオチド配列である配列番号2～262のフラグメントを含む核酸もまた、提供される。これらは、*C. trachomatis* 配列に由来する少なくともn個の連続した核酸ヌクレオチドを含むべきであり、そして特定の配列に依存して、nは、7以上（例えば、10、12、14、15、18、20、25、30、35、40、50、75、100、200、300以上）である。

10

## 【0023】

さらなる局面に従って、本発明は、本発明のタンパク質およびタンパク質フラグメントをコードする核酸を提供する。

## 【0024】

本発明が上記の配列に相補的な配列を含む核酸を（例えば、アンチセンスまたはプローブ化目的のために）提供する。

20

## 【0025】

本発明の核酸は、もちろん、多数の方法で（例えば、化学合成によって（少なくとも一部）、より長いポリヌクレオチドを制限酵素を使用して消化することによって、ゲノムライブラリーまたはcDNAライブラリーから、生物体自体からなど）調製され得る。

## 【0026】

本発明の核酸は、種々の形態（例えば、一本鎖、二本鎖、直鎖状、環状、ベクター、プライマー、プローブなど）を探り得る。

## 【0027】

本発明の核酸は、固体支持体（例えば、ビーズ、プレート、フィルター、フィルム、スライドガラス、樹脂など）に結合され得る。本発明の核酸は、検出可能な標識（例えば、放射活性標識または蛍光標識、あるいはビオチン標識）を含み得る。これは、核酸検出技術（例えば、その核酸が、プライマーであるか、またはPCR、LCR、TMA、NASBA、bDNAなどのような技術において使用するためのプローブとしてである場合）において使用される場合に特に有用である。

30

## 【0028】

本発明の核酸は、好ましくは、クラミジア核酸である。

## 【0029】

用語「核酸」は、DNA、RNA、DNA/RNAハイブリッド、およびDNAまたはRNAのアナログ（例えば、改変された骨格もしくは塩基を含むもの）、そしてまたペプチド核酸（PNA）などを含む。

40

## 【0030】

本発明の核酸は、単離され得、そして実質的な純度で得られ得、一般的には、インタクトな染色体以外として得られ得る。通常ポリヌクレオチドは、実質的に他の天然に存在する核酸配列なしに得られ、一般には、少なくとも約50%（重量で）純粋、通常は、少なくとも約90%純粋である。

## 【0031】

核酸は、例えば、以下のために使用され得る：ポリペプチドを生成するため；生物学的サンプル中の核酸の検出のためのプローブとして；ポリペプチドのさらなるコピーを生成するため；リボザイムまたはアンチセンスオリゴヌクレオチドを生成するため；および一本鎖DNAプローブとしてまたは三本鎖形成オリゴヌクレオチドとしてなど。

## 【0032】

50

本発明は、本発明のヌクレオチド配列を含むベクター（例えば、クローニングベクターまたは発現ベクター）およびそれで形質転換された宿主細胞を提供する。

【0033】

（組成物）

さらなる局面に従って、本発明は、本発明に従うタンパク質および／または核酸を含む組成物を提供する。これらの組成物は、好ましくは、免疫原性組成物（例えば、ワクチン）であり、免疫およびワクチン接種の目的に適している。本発明のワクチンは、予防的または治療的であり得、そして代表的に、（a）クラミジア付着、（b）クラミジア侵入、および／または（c）宿主細胞内での首尾良い複製を阻害し得る抗体を誘導し得る抗原を含む。これらのワクチンは、好ましくは、宿主からのクラミジアクリアランスに必要である任意の細胞媒介性T細胞応答を誘導する。

10

【0034】

本発明はまた、医薬としての（例えば、ワクチンとしての）使用のための本発明に従う核酸およびタンパク質を提供する。

【0035】

本発明はまた、*Chlamydia*に起因する感染を処置または予防するための医薬（例えば、ワクチンまたは免疫原性組成物）の製造における本発明に従う核酸またはタンパク質の使用を提供する。*Chlamydia*は、一般的に*C. trachomatis*であるが、種間交差反応に起因して、これはまた、*C. pneumoniae*、*C. pecorum*、または*C. psittaci*であり得る。予防のために、その医薬は、好ましくは、*Chlamydia*のEB形態に対して特異的な免疫応答を誘発する；処置のためには、その医薬は、好ましくは、*Chlamydia*のRB形態に対して特異的な免疫応答を誘発する。

20

【0036】

本発明はまた、*Chlamydia trachomatis*基本小体を中和するための医薬（例えば、ワクチンまたは免疫原性組成物）の製造において、本発明に従う核酸またはタンパク質の使用を提供する。

30

【0037】

本発明はまた、患者（例えば、ヒト）を処置（例えば、免疫化）する方法を提供し、この方法は、本発明に従う治療的に有効な量の核酸またはタンパク質を患者に投与する工程を包含する。

【0038】

本発明はまた、患者における免疫応答を惹起する方法を提供し、この方法は、本発明に従う免疫学的に有効な量の核酸またはタンパク質を患者に投与する工程を包含する。この免疫応答は、患者において抗体を惹起し、そして／または細胞性免疫応答（例えば、CTL応答）を惹起することを包含する。この免疫応答は、EBタンパク質またはRBタンパク質に特異的であり得るか、または宿主細胞質中で発現されるタンパク質に対して特異的であり得る。抗体応答は、好ましくはEBに対して特異的であるのに対して、細胞免疫応答は、好ましくは、細胞質タンパク質に対して、好ましくやRBタンパク質に対して特異的である。

40

【0039】

本発明はまた、本発明のタンパク質を認識する抗体を惹起する方法を提供し、この方法は、*Chlamydia*の基本小体または網様体を患者に投与する工程を包含する。この抗体は、好ましくは、EBに特異的である。

【0040】

本発明はまた、*C. trachomatis*感染を中和するための方法を提供し、この方法は、本発明のタンパク質、核酸または抗体を患者に投与する工程を包含する。この方法は、好ましくは、EB感染性を中和する。

【0041】

本発明はまた、生物学的サンプルにおける*Chlamydia EB*またはRBを検出

50

するための方法を提供し、この方法は、このサンプルと、本発明の抗体とを接触させる工程を包含する。このサンプルは、血液サンプル、別の体液、または組織サンプルであり得る。この方法は、クラミジア感染を診断するために使用され得る。

#### 【0042】

本発明の免疫原性組成物はまた、以下の抗原のうちの1つ以上を含み得る：

- *Helicobacter pylori* 由来のタンパク質抗原（例えば、*Vaca* A、*CagA*、NAP、*HopX*、*HopY* { 例えば、WO 98 / 04702 } ）および/またはウレアーゼ。

#### 【0043】

- *N. meningitidis* 血清群B由来のタンパク質抗原（例えば、WO 99 / 24578、WO 99 / 36544、WO 99 / 57280、WO 00 / 22430、*Tettelin* ら (2000) *Science* 287 : 1809 - 1815、*Pizzala* (2000) *Science* 287 : 1816 - 1820 および WO 96 / 29412 ) であり、タンパク質「287」および誘導体は、特に好ましい。

10

#### 【0044】

- *N. meningitidis* 血清群B由来の外膜ベシクル (OMV) 調製物（例えば、WO 01 / 52885 ; *Bjune* ら (1991) *Lancet* 338 (8775) : 1093 - 1096 ; *Fukasawa* ら (1999) *Vaccine* 17 : 2951 - 2958 ; *Rosenqvist* ら (1998) *Dev. Biol. Stand.* 92 : 323 - 333 などにおいて開示される）。

20

#### 【0045】

- *N. meningitidis* 血清群A、C、W135 および/またはY由来のサッカリド抗原（例えば、*Costantino* ら (1992) *Vaccine* 10 : 691 - 698 において開示された、血清群C由来のオリゴサッカリド { *Costantino* ら (1999) *Vaccine* 17 : 1251 - 1263 もまた参照のこと } ）。

#### 【0046】

*Streptococcus pneumoniae* 由来のサッカリド抗原 { 例えば、*Watson* (2000) *Pediatr Infect Dis J* 19 : 331 - 332 ; *Rubin* (2000) *Pediatr Clin North Am* 47 : 269 - 285 , v ; *Jedrzejas* (2001) *Microbiol Mol Biol Rev* 65 : 187 - 207 } 。

30

- B型肝炎ウイルス由来の抗原（例えば、表面抗原および/またはコア抗原）{ 例えば、*Gerlich* ら (1990) *Vaccine* 補遺 8 : S 63 ~ 68 および 79 ~ 80 } 。

- C型肝炎ウイルス由来の抗原 { 例えば、*Hsu* ら (1999) *Clin Liver Dis* 3 : 901 ~ 915 } 。

- *Bordetella pertussis* 由来の抗原（例えば、*B. pertussis* 由来の百日咳ホロトキシン (holotoxin) (PT) および線維状赤血球凝集素 (FHA) 、必要に応じてペルタクチンおよび/または凝集原2および凝集原3とも組み合わされる { *Gustafsson* ら (1996) *N. Engl. J. Med.* 334 : 349 - 355 ; *Rappuoli* ら (1991) *TI BTECH* 9 : 232 - 238 } ）。

40

- ジフテリア抗原（例えば、ジフテリアトキソイド { 例えば、*Vaccines* (1988) の第3章 *Plotkin* および *Mortimer* 編 ISBN 0 - 7216 - 1946 - 0 } ） 例えば、CRM<sub>197</sub> 変異体 { 例えば、*Dei Guidice* ら (1998) *Molecular Aspects of Medicine* 19 : 1 - 70 } 。

- 破傷風抗原（例えば、破傷風トキソイド { 例えば、*Plotkin* および *Mortimer* の第4章 } ）。

- *Haemophilus influenzae* B由来のサッカリド抗原。

- *N. gonorrhoeae* 由来の抗原 { 例えば、WO 99 / 24578、WO 99 /

50

36544、WO99/57280}。

- Chlamydia pneumoniae 由来の抗原 { 例えば、PCT / IB01 / 01445 ; Kalman ら (1999) Nature Genetics 21 : 385 - 389 ; Read ら (2000) Nucleic Acids Res 28 : 1397 - 406 ; Shirai ら (2000) J. Infect. Dis. 181 (補遺3) : S524 - S527 ; WO99/27105 ; WO00/27994 ; WO00/37494 }。

- Chlamydia trachomatis 由来の抗原 { 例えば、WO99/28475 }。

- Porphyromonas gingivalis 由来の抗原 { 例えば、Ross ら (2001) Vaccine 19 : 4135 - 4142 }。 10

- ポリオ抗原 { 例えば、Sutter ら (2000) Pediatr Clin North Am 47 : 287 - 308 ; Zimmerman および Spann (1999) Am Fam Physician 59 : 113 - 118, 125 - 126 } ( 例えば、IPV または OPV )。

- 狂犬病抗原 { 例えば、Dreesen (1997) Vaccine 補遺 15 : S2 - 6 } ( 例えば、凍結乾燥されて非活性化されたウイルス { 例えば、MMWR Morb Mortal Wkly Rep 1998 Jan 16 ; 47 (1) : 12, 19 ; Rab Avert<sup>TM</sup> } )。

- 麻疹抗原、耳下腺炎抗原および / または風疹抗原 { 例えば、Plotkin および Mortimer の 9、10 および 11 章 }。 20

- インフルエンザ抗原 { 例えば、Plotkin および Mortimer の 19 章 }。 ( 例えば、赤血球凝集素および / またはノイラミニダーゼ表面蛋白質 )。

- Moraxella catarrhalis 由来の抗原 { 例えば、McMichael (2000) Vaccine 19 補遺 1 : S101 - 107 }。

- Staphylococcus aureus 由来の抗原 { 例えば、Kuroda ら (2001) Lancet 357 (9264) : 1225 - 1240 ; 1218 - 1219 頁もまた参照のこと }。

- Streptococcus agalactiae 由来の抗原 { 例えば、WO02/34771 を参照のこと }。 30

- Streptococcus pyogenaes 由来の抗原 { 例えば、WO02/34771 を参照のこと }。

#### 【0047】

サッカリド抗原または糖鎖抗原が含まれる場合、免疫原性を高めるために、その抗原は、好ましくは、キャリアタンパク質に結合される { 例えば、Ramsay ら (2001) Lancet 357 (9251) : 195 - 196 ; Lindberg (1999) Vaccine 17 補遺 2 : S28 - 36 ; Conjugate Vaccines (Cruse ら編) ISBN 3805549326 , 特に 10 卷 : 48 - 114 等 }。好ましいキャリアタンパク質は、細菌毒素または細菌トキソイドである ( 例えば、ジフテリアトキソイドまたは破傷風トキソイド )。CRM<sub>9</sub>、ジフテリアトキソイドが、特に好ましい。他の適切なキャリアタンパク質としては、N. meningitidis 外膜タンパク質 { 例えば、EP - 0372501 }、合成ペプチド { 例えば、EP - 0378881, EP - 0427347 }、熱ショックタンパク質 { 例えば、WO93/17712 }、百日咳タンパク質 { 例えば、WO98/58668 ; EP - 0471177 }、H. influenzae 由来のタンパク質 D { 例えば、WO00/56360 }、C. difficile 由来の毒素 A または毒素 B { 例えば、WO00/61761 } などが挙げられる。任意の適切な結合反応が、必要に応じて任意の適切なリンカーと共に使用され得る。 40

#### 【0048】

毒素タンパク質抗原は、必要に応じて、解毒され得る ( 例えば、百日咳毒素の解毒は、化学的手段および / または遺伝的手段による )。 50

**【0049】**

ジフテリア抗原が組成物に含まれる場合、破傷風抗原および百日咳抗原をも含むことが好ましい。同様に、破傷風抗原が含まれる場合、ジフテリア抗原および百日咳抗原をも含むことが好ましい。同様に、百日咳抗原が含まれる場合、ジフテリア抗原および破傷風抗原をも含むことが好ましい。

**【0050】**

抗原は、好ましくはアルミニウム塩に吸着される。

**【0051】**

組成物中の抗原は、代表的には、各々少なくとも  $1 \mu g / ml$  の濃度で存在する。一般的に、任意の所定の抗原の濃度は、その抗原に対する免疫応答を誘発するのに十分である。

10

**【0052】**

本発明はまた、本発明の2つ以上のタンパク質を含む組成物を提供する。

**【0053】**

(プロセス)

本発明は、本発明のタンパク質を産生するプロセスを提供し、このプロセスは、タンパク質発現を誘導する条件下で、本発明に従う宿主細胞を培養する工程を包含する。

**【0054】**

本発明は、本発明のタンパク質または核酸を生成するプロセスを提供し、ここで、このタンパク質または核酸は、化学的手段を使用して一部または全体的に合成される。

20

**【0055】**

本発明は、サンプル中の *C. trachomatis* を検出するためのプロセスを提供し、ここで、このサンプルは、本発明のタンパク質に結合する抗体と接触される。

**【0056】**

本発明を実行するために(例えば、免疫化について開示される配列を利用するため)使用され得る標準的な技術および手順の要約は、以下の通りである。この要約は、本発明を制限するのではなく、むしろ使用され得る実施例を示すが、必要とされない。

**【0057】**

(概要)

本発明の実施は、他に示されなければ、当該分野の技術の範囲内である、分子生物学、微生物学、組換えDNA、および免疫学の従来の技術を使用する。このような技術は以下の文献で十分説明されている(例えば、*Sambrook Molecular Cloning; A Laboratory Manual* 第2版(1989)および第3版(2001); *DNA Cloning, Volumes I and II* (D. N. Glover編 1985); *Oligonucleotide Synthesis* (M. J. Gait編 1984); *Nucleic Acid Hybridization* (B. D. HamesおよびS. J. Higgins編 1984); *Transcription and Translation* (B. D. HamesおよびS. J. Higgins編 1984); *Animal Cell Culture* (R. I. Freshney編 1986); *Immobilized Cells and Enzymes* (IRL Press, 1986); *B. Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning* (1984); *the Methods in Enzymology series* (Academic Press, Inc.),特に154巻および155巻; *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells* (J. H. MillerおよびM. P. Calos編 1987, Cold Spring Harbor Laboratory); MayerおよびWalker編(1987), *Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology* (Academic Press, London); *Scopes, (1987) Protein Purification: Principles and Practice*, 第2版(Springer-Verlag, N. Y.)

30

40

50

)、およびHand book of Experimental Immunology, Volumes I - IV (D. M. WeirおよびC. C. Blackwell編 1986)。

#### 【0058】

ヌクレオチドおよびアミノ酸についての標準的な略語が、本明細書において使用される。

#### 【0059】

(定義)

Xを含む組成物は、組成物中の全X + Yの少なくとも85重量%がXであるとき、Yを「実質的に含まない」。好ましくは、Xは、組成物中の全X + Yの少なくとも約90重量%を、さらに好ましくは少なくとも約95重量%または99重量%さえを含む。

#### 【0060】

用語「含む (comprising)」は、「含む (including)」および「からなる」を意味する。例えば、Xを「含む」組成物は、もっぱらXからなり得るか、またはX + YのようなXに付加したものも含み得る。

#### 【0061】

用語「異種」とは、天然では共に見られない2つの生物学的成分をいう。この成分は、宿主細胞、遺伝子、または調節領域（例えば、プロモーター）であり得る。異種成分は天然では共に見られないが、遺伝子に対して異種のプロモーターがその遺伝子に作動可能に連結されるときのように、それらは共に機能し得る。別の例は、クラミジア配列がマウス宿主細胞に対して異種であることである。さらなる例は、天然においてみられない配置で単一タンパク質に組み立てられる同じタンパク質または異なるタンパク質由来の2つのエピトープである。

#### 【0062】

「複製起点」とは、発現ベクターのような、ポリヌクレオチドの複製を開始または調節するポリヌクレオチド配列である。複製起点は、細胞内でのポリヌクレオチド複製の自律性ユニットとして振る舞い、それ自体の制御下で複製し得る。複製起点は、ベクターが特定の宿主細胞において複製するために必要であり得る。特定の複製起点を有せば、発現ベクターは、細胞内の適切なタンパク質の存在下で高いコピー数で再生され得る。起点の例は、酵母において有効な自律性複製配列；およびCOS-7細胞で有効であるウイルスT抗原である。

#### 【0063】

「変異体」配列は、ネイティブの配列または開示された配列とは異なるが配列同一性を有するDNA配列、RNA配列またはアミノ酸配列として規定される。特定の配列に依存して、ネイティブの配列または開示された配列と変異体配列との間の配列同一性の程度は、好ましくは50%より大きい（例えば、上記のSmith-Watermanアルゴリズムを使用して算出して60%、70%、80%、90%、95%、99%またはそれ以上）。本明細書中で使用される場合、本明細書で核酸分子配列が提供される核酸分子、または領域の「対立遺伝子改变体」は、別のもしくは2番目の单離体のゲノム中の同じ遺伝子座で本質的に生じる、核酸分子、または領域および、例えば、変異または組換えにより生ずる天然変化に起因して、類似するが、しかし同一でない核酸配列を有する核酸分子、または領域である。コード領域の対立遺伝子改变体は、代表的には、比較される遺伝子によってコードされるタンパク質の活性と類似した活性を有するタンパク質をコードする。対立遺伝子改变体はまた、遺伝子の5'または3'非翻訳領域（例えば、調節制御領域）での変化を含み得る（例えば、米国特許第5,753,235号を参照のこと）。

#### 【0064】

(発現系)

クラミジアヌクレオチド配列は、種々の異なる発現系；例えば、哺乳動物細胞、バキュロウイルス、植物、細菌、および酵母と共に使用される発現系において発現され得る。

#### 【0065】

10

20

30

40

50

## ( i . 哺乳動物系 )

哺乳動物発現系は当該分野において公知である。哺乳動物プロモーターは、哺乳動物 RNA ポリメラーゼを結合し、コード配列（例えば、構造遺伝子）の mRNAへの下流（3'）転写を開始し得る任意の DNA 配列である。プロモーターは、転写開始領域（これはコード配列の 5' 末端の近位に通常位置する）および TATA ボックス（転写開始部位の 25 ~ 30 塩基対（bp）上流に通常位置する）を有する。TATA ボックスは、その正しい部位において RNA ポリメラーゼ II に RNA 合成を開始させるよう指示すると考えられている。哺乳動物プロモーターはまた、TATA ボックスの 100 ~ 200 bp 上流以内に通常位置する上流プロモーターエレメントを含む。上流プロモーターエレメントは、転写が開始され、そしていずれかの方向において作用し得る速度を決定する {Sambrookら(1989)「Expression of Cloned Genes in Mammalian Cells」Molecular Cloning: A Laboratory Manual、第2版}。

10

## 【0066】

哺乳動物ウイルス遺伝子は、しばしば高度に発現され、そして広い宿主範囲を有する；従って、哺乳動物ウイルス遺伝子をコードする配列は、特に有用なプロモーター配列を提供する。例としては、SV40 初期プロモーター、マウス乳癌ウイルスLTR プロモーター、アデノウイルス主要後期プロモーター（AdMLP）、および単純疱疹ウイルスプロモーターが挙げられる。さらに、マウスのメタロチオネイン遺伝子のような非ウイルス性遺伝子に由来する配列もまた、有用なプロモーター配列を提供する。発現は、構成性であるかまたは調節される（誘導可能）かのいずれかであり得る、プロモーターに依存して、ホルモン応答性細胞においてグルココルチコイドで誘導され得る。

20

## 【0067】

上記に記載されるプロモーターエレメントと組み合わされるエンハンサー要素（エンハンサー）の存在は、通常発現レベルを増大させる。エンハンサーは、相同性プロモーターまたは異種プロモーターに連結されるとき、転写を 1000 倍まで刺激し得る調節 DNA 配列であり、合成は、通常の RNA 開始部位で開始する。エンハンサーはまた、それらが、通常方向もしくは反対（flipped）方向のいずれかで転写開始部位より上流または下流に、もしくはプロモーターから 1000 ヌクレオチドを超える距離に位置するとき、活性である（Maniatisら(1987) Science 236: 1237; Albertsら(1989) Molecular Biology of the Cell, 第2版）。ウイルス由来のエンハンサー要素は、それらが通常、より広い宿主範囲を有するので、特に有用であり得る。例としては、SV40 初期遺伝子エンハンサー（Dijkemala(1985) EMBO J. 4: 761）およびラウス肉腫ウイルスの長末端反復（LTR）に由来するエンハンサー／プロモーター（Gormanら(1982) PNAS USA 79: 6777）およびヒトサイトメガウイルスに由来するエンハンサー／プロモーター（Boshartら(1985) Cell 41: 521）を包含する。さらに、いくつかのエンハンサーは調節可能であり、そしてホルモンまたは金属イオンのような誘導因子の存在下のみで活性になる（Sassone-Corsi および Borelli(1986) Trends Genet. 2: 215; Maniatisら(1987) Science 236: 1237）。

30

## 【0068】

DNA 分子は、哺乳動物細胞において細胞内で発現され得る。プロモーター配列は、組換えタンパク質の N 末端における最初のアミノ酸が常に ATG 開始コドンによりコードされるメチオニンである場合、DNA 分子と直接連結され得る。所望される場合、N 末端は、臭化シアンとのインピトロでのインキュベーションによりタンパク質から切断され得る。

40

## 【0069】

あるいは、外来タンパク質もまた、哺乳動物細胞において外来タンパク質の分泌を提供するリーダー配列フラグメントで構成される融合タンパク質をコードするキメラ DNA 分

50

子を作製することにより、細胞から成長培地へ分泌され得る。好ましくは、インビボまたはインビトロのいずれかにおいて切断され得る、リーダーフラグメントおよび外来遺伝子との間にコードされるプロセシング部位が存在する。リーダー配列フラグメントは通常、細胞からのタンパク質の分泌を指示する疎水性アミノ酸で構成される単一のペプチドをコードする。アデノウイルス3部分からなるリーダーは、哺乳動物細胞における外来タンパク質の分泌を提供するリーダー配列の例である。

#### 【0070】

通常、哺乳動物細胞によって認識される転写終結配列およびポリアデニル化配列は、翻訳終止コドンの3'側に存在する調節領域であり、従って、プロモーターエレメントと共に、コード配列に隣接する。成熟mRNAの3'末端は、部位特異的転写後切断およびポリアデニル化により形成される(Birnstielら(1985)Cell 41:349; ProudfootおよびWhitelaw(1988)「Termination and 3' end processing of eukaryotic RNA.」Transcription and splicing(B.D.HamesおよびD.M.Glover編); Proudfoot(1989)Trends Biochem. Sci. 14:105)。これらの配列は、mRNAの転写を指示し、そのmRNAは、そのDNAにコードされるポリペプチドに翻訳され得る。転写終結/ポリアデニル化シグナルの例としては、SV40由来のシグナルが挙げられる(Sambrookら(1989)「Expression of cloned genes in cultured mammalian cells.」Molecular Cloning: A Laboratory Manual)。

10

20

30

#### 【0071】

通常、プロモーター、ポリアデニル化シグナル、および転写終結配列を含む上記の構成要素は、発現構築物内に共に導入される。エンハンサー、機能的なスプライスドナー部位および受容部位を有するイントロン、ならびにリーダー配列もまた、所望される場合、発現構築物内に含まれ得る。発現構築物はしばしば、哺乳動物細胞または細菌のような宿主内で安定的に維持し得る染色体外エレメント(例えば、プラスミド)のような、レブリコン内で維持される。哺乳動物の複製系としては、複製にトランス作用性の因子を必要とする、動物ウイルス由来の複製系が挙げられる。例えば、SV40(Gluzman(1981)Cell 23:175)、あるいはポリオーマウイルスのようなパポバウイルスの複製系を含むプラスミドは、適切なウイルスのT抗原の存在下で極めて高いコピー数で複製する。哺乳動物レブリコンのさらなる例としては、ウシパピローマウイルスおよびエピスタンイン-バーウィルス由来のレブリコンが挙げられる。さらに、このレブリコンは、二つの複製系を有し得、従って、例えば、発現用の哺乳動物細胞内で、ならびにクローニングおよび增幅用の原核生物の宿主内で、そのレブリコンを維持することが可能である。このような哺乳動物-細菌シャトルベクターの例としては、pMT2(Kaufmannら(1989)Mol. Cell. Biol. 9:946)およびpHEBO(Shimizuら(1986)Mol. Cell. Biol. 6:1074)が挙げられる。

#### 【0072】

使用される形質転換の手順は、形質転換される宿主に依存する。異種のポリヌクレオチドの哺乳動物細胞への導入方法は、当該分野で公知であり、その方法としては、デキストラン媒介トランスフェクション、リン酸カルシウム沈殿、ポリブレン媒介トランスフェクション、プロトプラスト融合、エレクトロポレーション、リポソーム内でのポリヌクレオチドの封入、およびDNAの核内への直接微量注入が挙げられる。

40

#### 【0073】

発現用宿主として利用可能な哺乳動物細胞株は、当該分野で公知であり、そのような細胞株としては、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞、HeLa細胞、乳仔ハムスター腎臓(BHK)細胞、サル腎臓細胞(COS)、ヒト肝細胞癌細胞(例えば、Hep G2)および多くの他の細胞株を含むが、これらに限定しない、American Type Culture Collection(ATCC)から入手可能な多くの不死化細

50

胞株が含まれる。

【0074】

( i i バキュロウイルス系 )

タンパク質をコードしているポリヌクレオチドはまた、適切な昆虫の発現ベクター内に挿入され得、そしてそのベクター内で、制御エレメントに作動可能に連結される。ベクターの構築には、当該分野で公知の技術を使用する。一般に、その発現系の構成要素として、以下のものが挙げられる：バキュロウイルスゲノムのフラグメント、および発現させる異種遺伝子の挿入用の簡便な制限部位の両方を含む転移ベクター（通常は細菌プラスミド；転移ベクター内のバキュロウイルスに特異的なフラグメントに相同意のある配列を有する野生型バキュロウイルス（これは、バキュロウイルスゲノム内への異種遺伝子の相同組換えを可能にする）；ならびに適切な昆虫宿主細胞および成長培地。

10

【0075】

転移ベクターにタンパク質をコードするDNA配列を挿入した後、そのベクターおよび野生型ウイルスゲノムを、昆虫宿主細胞にトランスフェクトし、そこでベクターとウイルスゲノムを組換え可能にする。パッケージングされた組換えウイルスは発現され、そして組換えプラーカーが同定されそして精製される。バキュロウイルス／昆虫細胞発現系に対する材料および方法は、特に、Invitrogen、San Diego CAからキット形態（「MaxBac」キット）で市販される。これらの技術は、一般に当業者に公知であり、そして Summersならびに Smith, Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No. 1555 (1987) (以下、「Summers and Smith」) に十分に記載されている。

20

【0076】

タンパク質をコードするDNA配列をバキュロウイルスゲノムに挿入するの前に、プロモーター配列、リーダー配列（所望される場合は）、目的のコード配列、および転写終結配列を含む上記の構成要素を、通常、中間転移構築物（転移ベクター）に構築される。この構築物は、単一の遺伝子および作動可能に連結された調節エレメント；操作可能に連結された調節エレメントのセットを各々が所有する複数の遺伝子；あるいは同じ調節エレメントのセットにより調節される複数の遺伝子を含み得る。中間転移構築物は、しばしば、細菌のような宿主内で安定的に維持し得る染色体外エレメント（例えば、プラスミド）のような、レプリコン内で維持される。レプリコンは、複製系を有しており、従って、クローニングおよび増幅に適切な宿主内で維持されることを可能にする。

30

【0077】

現在、外来遺伝子のAcNPVへの導入のために最も一般に使用される転移ベクターは、pAc373である。当業者に公知の多くの他のベクターもまた設計され、これらのものとして、例えば、pVL985（ポリヘドリンの開始コドンをATGからATTに変更し、そしてそのATTから32塩基対下流に、BamHIクローニング部位を導入する；Luckowおよび Summers, Virology (1989) 17:31を参照のこと）が挙げられる。

【0078】

そのプラスミドも通常、ポリヘドリンポリアデニル化シグナル（Mille et al. (1988) Ann. Rev. Microbiol., 42:177）、および原核生物のアンピシリントリプトア（amp<sup>r</sup>）遺伝子、および大腸菌においての選抜ならびに増殖のための複製起点を含む。

40

【0079】

バキュロウイルス転移ベクターは通常、バキュロウイルスプロモーターを含む。バキュロウイルスプロモーターは、バキュロウイルスRNAポリメラーゼに結合し、そしてコード配列（例えば、構造遺伝子）のmRNAへの下流（5'から3'）方向の転写を開始し得る任意のDNA配列である。プロモーターは、通常、コード配列の5'末端に近接して存在する転写開始領域を有する。この転写開始領域は通常、RNAポリメラーゼ結合部位および転写開始部位を含む。バキュロウイルス転移ベクターはまた、エンハンサーと呼ば

50

れる第二のドメインを有し得、存在する場合は、通常、構造遺伝子に対し遠位にある。発現は調節され得るか、あるいは構成的であり得る。

#### 【0080】

ウイルスの感染周期の後期で大量に転写される構造遺伝子は、特に有用なプロモーター配列を提供する。例としては、ウイルス多面体タンパク質をコードする遺伝子 (Frieseisenら (1986) 「The Regulation of Baculovirus Gene Expression」; The Molecular Biology of Baculoviruses (Walter Doerfler 編); EPO公開番号 127839 および 155476; ならびに p10 タンパク質をコードする遺伝子 (Vlakら, (1988), J. Gen. Virol. 69: 765) 由来の配列が挙げられる。

10

#### 【0081】

適切なシグナル配列をコードする DNA は、分泌昆虫タンパク質、あるいはバキュロウイルスピリヘドリン遺伝子 (Carbonellら, (1998) Gene, 73: 409) のような、分泌バキュロウイルスタンパク質についての遺伝子から由来し得る。あるいは、哺乳動物細胞の翻訳後修飾 (例えば、シグナルペプチド切断、タンパク質分解性切断、およびリン酸化) のシグナルは、昆虫細胞に認識されると思われ、そして分泌および核蓄積に必要なシグナルはまた、無脊椎動物細胞と脊椎動物細胞との間で保存されると思われる所以、ヒトインターフェロン (Maedaら, (1985), Nature 315: 592); ヒトガストリン放出ペプチド (Lebacq-Verheydenら, (1988), Molec. Cell. Biol. 8: 3129); ヒト IL-2 (Smithら, (1985) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 82: 8404); マウス IL-3 (Miyajimaら, (1987) Gene 58: 273); およびヒトグルコセレブロシダーゼ (Martinら, (1988) DNA, 7: 99) をコードする遺伝子由来のような、非昆虫起源のリーダーも、昆虫での分泌を与えるために使用され得る。

20

#### 【0082】

組換えポリペプチドあるいは組換えポリタンパク質は、細胞内に発現され得、あるいは適切な調節配列と共に発現される場合、分泌され得る。非融合の外来タンパク質の優れた細胞内発現には通常、ATG 開始シグナルに先行する適切な翻訳開始シグナルを含む短いリーダー配列を理想的には有する異種遺伝子が必要である。所望であれば、N 末端のメチオニンは、臭化シアンとのインビトロインキュベーションにより、成熟タンパク質から切断され得る。

30

#### 【0083】

あるいは、自然に分泌されない組換えポリタンパク質あるいは組換えタンパク質は、昆虫において外来タンパク質の分泌を与えるリーダー配列フラグメントからなる、融合タンパク質をコードするキメラ DNA 分子を作成することにより、昆虫細胞から分泌され得る。リーダー配列フラグメントは通常、タンパク質の小胞体内への輸送を指示する疎水性アミノ酸からなるシグナルペプチドをコードしている。

40

#### 【0084】

タンパク質の前駆体である発現産物をコードする DNA 配列および / または遺伝子の挿入後、昆虫細胞宿主に、転移ベクターの異種 DNA および野生型バキュロウイルスのゲノム DNA を同時形質転換 (通常は、同時トランスフェクションによって) する。構築物のプロモーターおよび転写終結配列は、通常バキュロウイルスゲノムの 2 ~ 5 kb の区域を含む。バキュロウイルスウイルスの望ましい部位に異種 DNA を導入する方法は、当該分野で公知である (Summers および Smith、上記; Juら (1987); Smith, Mol. Cell. Biol. (1983) 3: 2156; ならびに Luckow および Summers (1989) を参照のこと)。例えば、その挿入物は、相同二重交差組換え (homologous double crossover recombination) により、ポリヘドリン遺伝子のような遺伝子内にあり得る; 挿入物はまた

50

、所望のバキュロウイルス遺伝子に設計された制限酵素部位内にあり得る。Millerら(1989)、Bioessays 4; 91。発現ベクター内のポリヘドリン遺伝子の代わりにクローン化される場合のDNA配列は、ポリヘドリン特異的配列により5'および3'の両側で隣接され、そしてポリヘドリンプロモーターの下流に位置される。

#### 【0085】

新規に形成されたバキュロウイルス発現ベクターは続いて、感染性の組換えバキュロウイルス内にパッケージされる。相同組換えは、低い頻度で起こる(約1%~約5%の間)；従って、同時トランスフェクション後に產生されたウイルスの大半は、依然野生型ウイルスである。従って、方法には、組換えウイルスの同定が必要となる。その発現系の利点は、組換えウイルスを區別させ得る可視的スクリーニングである。天然のウイルスにより產生されるポリヘドリンタンパク質は、ウイルス感染後の後期で、その感染された細胞の核内で非常に高いレベルで產生される。蓄積されたポリヘドリンタンパク質は、閉塞体を形成し、またそれは包理された粒子を含む。これらの閉塞体は、最大15μmの大きさで、高度に屈折し、明るく輝く外見を与え、容易に光学顕微鏡下で可視化される。組換えウイルスに感染された細胞は、閉塞体を欠く。組換えウイルスと野生型ウイルスを区別するために、トランスフェクションの上清を、当業者に公知の技術により昆虫細胞の単層にブラーク形成させた。すなわち、ブラークを、光学顕微鏡下で閉塞体の存在(野性型ウイルスを示す)または非存在(組換えウイルスを示す)によりスクリーニングする。「Current Protocols in Microbiology」2巻(Ausubelら編)16.8(増補10、1990); SummersおよびSmith、上記; Millerら(1989)。

10

20

30

40

#### 【0086】

組換えバキュロウイルス発現ベクターは、いくつかの昆虫細胞への感染用に開発された。例えば、組換えバキュロウイルスは、特に以下に示すものために開発された：*Aedes aegypti*、*Autographa californica*、*Bombyx mori*、*Drosophila melanogaster*、*Spodoptera frugiperda*、および*Trichoplusia ni*(WO89/046699; Carbonellら,(1985)J.Virol.56:153; Wright(1986)Nature 321:718; Smithら,(1983)Mol.Cell.Biol.3:2156; およびFraserら,(1989)In Vitro Cell.Dev.Biol.25:225を一般に参照のこと)。

#### 【0087】

細胞および細胞培養培地は、バキュロウイルス/発現系における異種ポリペプチドの直接発現および融合発現の両方のために市販される；細胞培養技術は、一般に当業者に公知である。例えば、SummersおよびSmith(上記)を参照のこと。

#### 【0088】

次いで、改変した昆虫細胞を、適切な栄養培地で増殖し、その改変した昆虫宿主内に存在するプラスミドの安定的維持を可能にする。発現産物の遺伝子が、誘導性の制御下にある場合、宿主は高密度で増殖され得、そして発現は誘導され得る。あるいは、発現が構成的である場合、その産物は培地中に連続的に発現され、そして栄養培地を連続的に循環し、目的産物を取り出し、そして枯渇した栄養を補給する必要がある。その産物は、クロマトグラフィー(例えば、HPLC、アフィニティーコロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーなど)；電気泳動；密度勾配遠心；溶媒抽出などのような技術により精製され得る。適切には、その産物をさらに精製し、必要ならば、培地中に分泌されたか、または昆虫細胞の溶解物から生じた任意の昆虫タンパク質を実質的に除去し、宿主細片(例えば、タンパク質、脂質および多糖類)を少なくとも実質的に含まない産物を提供する。

#### 【0089】

タンパク質の発現を得るために、形質転換体に由来する組換え宿主細胞は、組換えタンパク質をコードする配列の発現を可能にする条件下でインキュベートされる。これらの条件は、選択された宿主細胞に依存して変動する。しかし、その条件は、当該分野で公知の

50

条件に基づいて、当業者に容易に確かめられる。

【0090】

( i i i 植物系 )

当該分野で公知の多くの植物細胞培養および全植物遺伝子発現系が存在する。例示的な植物細胞遺伝子発現系としては、米国特許第5,693,506号；米国特許第5,659,122号；米国特許第5,608,143号のような特許に記載されるものが挙げられる。植物細胞培養における遺伝子発現の別の例は、Zenk, Phytochemistry 30: 3861 - 3863 (1991) に記載された。植物タンパク質のシグナルペプチドの記載は、上記の参考文献に加え、以下に示すものの中においても確認される；Vaulcombeら, Mol. Gen. Genet. 209: 33 - 40 (1987) 10 ; Chandlerら, Plant Molecular Biology 3: 407 - 418 (1984) ; Rogers, J. Biol. Chem. 260: 3731 - 3738 (1985) ; Rothsteinら, Gene 55: 353 - 356 (1987) ; Whittierら, Nucleic Acids Research 15: 2515 - 2535 (1987) ; Wirselら, Molecular Microbiology 3: 3 - 14 (1989) ; Yuら, Gene 122: 247 - 253 (1992) 20 。植物ホルモン(ジベレリン酸およびジベレリン酸により誘導される分泌酵素)による植物遺伝子発現の調節の記載は、R. L. JonesおよびJ. MacMillin, Gibberellins: Advanced Plant Physiology, Malcolm B. Wilkins編 1984 Pitman Publishing Limited, London, 21 - 52頁の中に確認され得る。他の代謝調節性遺伝子が記載される参考文献は以下である；Sheen, Plant Cell, 2: 1027 - 1038 (1990) ; Maassら, EMBO J. 9: 3447 - 3452 (1990) ; BenkelおよびHickey, Proc. Natl. Acad. Sci. 84: 1337 - 1339 (1987) 。

【0091】

代表的に、当該分野で公知の技術を使用して、所望のポリヌクレオチド配列は、植物内で操作するために設計された遺伝子調節エレメントを含む発現力セットの中に挿入される。その発現力セットは、植物宿主内での発現に適切な発現力セットの上流および下流にコンパニオン配列を有する所望の発現ベクターの中に挿入される。そのコンパニオン配列は、プラスミドまたはウイルス起源のものであり、そしてそのベクターが、細菌のような本来のクローニング宿主から、所望の植物宿主へDNAを移動させるために必要とされる特徴をベクターに提供する。基本的な細菌 / 植物ベクター構築物は、好ましくは、広い宿主範囲の原核生物の複製起点；原核生物の選択マーカー；および、アグロバクテリウムの形質転換については、アグロバクテリウム媒介転位のためのT-DNA配列を植物染色体に提供する。異種遺伝子が容易に検出に従順しない場合は、好ましくは、その構築物はまた、植物細胞が形質転換されたかどうかを決定するために適した選択マーカー遺伝子を有する。適切なマーカーの一般的な総説は、例えば、イネ科のメンバーについては、WilminkおよびDons, 1993, Plant Mol. Biol. Reptr, 11 (2) : 165 - 185 に見られる。 30

【0092】

植物ゲノムへの異種配列の組み込みを可能にするのに適した配列もまた、推奨される。これらは、植物ゲノム内へ異種発現力セットのランダム挿入を可能にする相同組換えのためのトランスポゾン配列など、およびTi配列を含み得る。適切な原核生物選択マーカーとしては、アンピシリンまたはテトラサイクリンのような抗生物質に対する耐性が挙げられる。別の機能をコードしている他のDNA配列もまた、そのベクターの中に存在し得、当該分野で公知である。 40

【0093】

本発明の核酸分子は、目的のタンパク質の発現用の発現力セットに含まれ得る。2つ以上も可能であるが、通常はただ一つの発現力セットである。組換え発現力セットは、異種

10

20

30

40

50

タンパクのコード配列に加え、以下のエレメントを含む；プロモーター領域、植物5'非翻訳配列、構造遺伝子がそれを備えているかどうかに依存して、開始コドン、ならびに転写および翻訳終結配列。そのカセットの5'および3'末端の独特な制限酵素部位は、既存のベクター内への容易な挿入を可能にする。

【0094】

異種のコード配列は、本発明に関係する任意のタンパク質のための配列であり得る。目的のタンパクをコードする配列は、そのタンパク質の適切なプロセッシングおよび輸送を可能にするシグナルペプチドをコードし、そして通常、本発明の所望のタンパク質の膜への結合を生じ得る任意の配列を欠いている。翻訳開始領域は、大部分は、発芽中に発現および輸送される遺伝子のためのものであるから、輸送を提供するシグナルペプチドを使用することにより、それはまた、目的のタンパク質の輸送を提供し得る。この方法で、目的のタンパク質は、それらが発現される細胞から輸送され、そして効率的に回収され得る。代表的には、種子における分泌は、種子の胚乳内へ、アリューロン層あるいは胚盤上皮層を通過する。タンパク質がそれが産生された細胞から分泌される必要がない場合、このことは組換えタンパク質の分離および精製を容易にする。

10

【0095】

所望の遺伝子産物の最終的な発現が、真核生物におけるものであるので、クローン化した遺伝子の任意の部分が、イントロンのような、宿主のスプライセオソーム(s p l i c o s o m e)機構により、プロセッシングされる配列を含むか否かを決定することが望ましい。そのような場合、「イントロン」領域の部位特異的変異誘発は、仮性イントロンコードとして遺伝的情報の一部を欠失することを防ぐために実施され得る。ReedおよびManiatis、Cell 41: 95-105 (1985)。

20

【0096】

ベクターは、組換えDNAを機械的に転移するためにマイクロピペットを用いて植物細胞内に直接的に微量注入され得る(Crossway、Mol. Gen. Genet., 202: 179-185、1985)。遺伝子物質はまた、ポリエチレン glycole を用いて植物細胞内に転移され得る(Krensら、Nature, 296, 72-74、1982)。核酸部分の導入の別の方法は、小さいビーズまたは微粒子のいずれかのマトリックスの内部に、あるいは表面に核酸を有する小さな微粒子による高速バリストイック(balistic)穿通法である(Kleinら、Nature, 327, 70-73, 1987)ならびにKnudsenおよびMueller, 1991, Plantae, 185: 330-336は、大麦胚乳の粒子の照射(bombardment)によりトランスジェニック大麦を作製することを示している)。さらに別の導入方法は、他の物体、いずれかのミニ細胞、細胞、リソソームあるいは他の易融な脂肪表面体とのプロトプラストの融合である(Fraleyら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 1859-1863, 1982)。

30

【0097】

ベクターはまた、エレクトロポレーションにより植物細胞内に導入され得る(Frommら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 5824, 1985)。この技術において、植物プロトプラストは、遺伝子構築物を含むプラスミドの存在中でエレクトロポレート(電気穿孔)される。高い電界の強さの電気インパルス(衝撃)により、生体膜を可逆的に通過できるようにし、プラスミドの導入を可能にする。エレクトロポレートされた植物プロトプラストは細胞壁を再形成し、分裂し、植物カルス形成する。

40

【0098】

プロトプラストが単離され得、そして培養されて完全な再生植物を与え得る全ての植物は、本発明により形質転換され得、これによって移入した遺伝子を保持する完全な植物が再生される。実際に、全ての植物は、さとうきび、甜菜、綿、果実および他の樹木、マメ科植物および野菜の全ての主要な種を含むがそれらに限定されない培養細胞あるいは組織から再生され得る。いくつかの適応した植物としては、例えば、以下の属由来の種が挙げられる；Fragaria, Lotus, Medicago, Onobrychis, T

50

rifolium, Trigonella, Vigna, Citrus, Linum, Geranium, Manihot, Daucus, Arabidopsis, Brassica, Raphanus, Sinapis, Atropa, Capsicum, Datura, Hyoscyamus, Lycopersicon, Nicotiana, Solanum, Petunia, Digitalis, Majorana, Cichorium, Helianthus, Lactuca, Bromus, Asparagus, Antirrhinum, Herero callis, Nemesia, Pelargonium, Panicum, Pennisetum, Ranunculus, Senecio, Salpiglossis, Cucumis, Browalia, Glycine, Lolium, Zea, Triticum, Sorghum, および Datura.

10

## 【0099】

再生のための手法は、植物の種によって変化するが、しかし一般に異種遺伝子のコピーを含む形質転換されたプロトプラストの懸濁液が最初に提供される。カルス組織は形成され、そしてシート（苗条）がカルスから誘導され得、続いて発根される。あるいは、胚形成がプロトプラスト懸濁液から誘導され得る。これらの胚は、天然の胚として発芽し、植物を形成する。培養培地は、一般に種々のアミノ酸、ならびにオーキシンおよびサイトカイニンのようなホルモンを含有する。またグルタミン酸およびプロリンを培地に添加することは、特にコーン（穀草）およびアルファルファのような種にとって有用である。シートおよび根は通常、同時に発生する。効果的な再生は培地、遺伝子型、および培養遍歴に依存する。これらの3つの変数が制御される場合は、再生は十分に再現性がありそて繰り返し可能である。

20

## 【0100】

いくつかの植物細胞培養系において、本発明の所望のタンパク質は排出され、あるいはこのタンパク質は植物全体から抽出され得る。本発明の所望のタンパク質が培地内に分泌される場合、これは回収され得る。あるいは、胚および胚のない不完全な種子または他の植物組織は、機械的に破壊され細胞間および組織間の任意の分泌されたタンパク質を放出し得る。その混合物は緩衝液に懸濁され、可溶タンパクを回収し得る。次いで、慣用的なタンパク質分離および精製方法は組換えタンパク質を精製するために使用される。時間、温度、pH、酸素、および容量のパラメーターは、慣用的な方法によって、異種タンパク質の発現および回収を最適化するように調整される。

30

## 【0101】

## (i) 細菌系

細菌の発現技術は、当該分野で公知である。細菌のプロモーターは、細菌のRNAポリメラーゼに結合し得、そしてコード配列（例えば、構造遺伝子）の下流方向（3'方向）へのmRNAへの転写を開始し得る任意のDNA配列である。プロモーターは、通常、コード配列の5'末端に近接して存在する転写開始領域を有する。この転写開始領域は、通常、RNAポリメラーゼ結合部位および転写開始部位を含む。細菌のプロモーターはまた、オペレーターと呼ばれる第二のドメインを有し、RNA合成が始まる近接のRNAポリメラーゼ結合部位と重複している。オペレーターは、遺伝子リプレッサータンパク質が、オペレーターに結合し、そのため特定の遺伝子の転写を抑制し得るような、負の調節された（誘導性の）転写を可能にする。構成的発現は、オペレーターのような負の調節エレメントの非存在下で起こり得る。さらに、正の調節は、遺伝子アクチベーター（活性化因子）タンパク質結合配列により達成され得、その配列が存在する場合は通常、RNAポリメラーゼ結合配列の（5'）側に近接している。遺伝子アクチベータータンパク質の例としては、異化（カタボライト）活性化タンパク質（CAP）があり、それはEscherichia coli (E. coli)における lacオペロンの転写の開始を助ける（Raibaudら(1984) Annu. Rev. Genet. 18: 173）。それゆえ、調節される発現は、正または負のいずれかであり得、従って転写を増強するかまたは低下し得るかのいずれかである。

40

## 【0102】

50

代謝経路の酵素をコードする配列は、特に有用なプロモーター配列を提供する。例としては、ガラクトース、ラクトース( l a c ) ( Changら( 1997 ) Nature 198 : 1056 )、およびマルトースのような糖代謝の酵素由来のプロモーター配列が挙げられる。さらなる例としては、トリプトファン( t r p ) ( Goeddeelら( 1980 ) Nuc . Acids Res . 8 : 4057 ; Yelvertonら( 1981 ) Nucl . Acids Res . 9 : 731 ; 米国特許第4 , 738 , 921号 ; EP - A - 0036776号およびEP - A - 0121775 )のような生合成酵素由来のプロモーター配列が挙げられる。g - ラクタマーゼ( g - laotamase ) ( bla ) プロモーター系( Weissmann( 1981 ) 「The cloning of Interferon and other mistakes.」Interferon 3 ( I . Gresser編 ) )、バクテリオファージ PL ( Shimatakeら( 1981 ) Nature 292 : 128 )およびT5( 米国特許第4 , 689 , 406号 )プロモーター系もまた有用なプロモーター配列を提供する。

#### 【 0103 】

さらに、天然に存在しない合成プロモーターもまた、細菌のプロモーターとして機能する。例えば、ある細菌(バクテリア)あるいはバクテリオファージプロモーターの転写活性化配列は、別のバクテリアあるいはバクテリオファージプロモーターのオペロン配列と結合し得、合成ハイブリッドプロモーターを形成する。(米国特許第4 , 551 , 433号)。例えば、t a c プロモーターは、l a c リプレッサーにより調節されるt r p プロモーター配列およびl a c オペロン配列の両方から構成される、ハイブリッドt r p - l a c プロモーターである( Amannら( 1983 ) Gene 25 : 167 ; de Boerら( 1983 ) Proc . Natl . Acad . Sci . 80 : 21 )。さらに、ある細菌のプロモーターは、細菌のRNAポリメラーゼに結合し、そして転写を開始させる能力を有する非細菌起源の天然に存在するプロモーターを含み得る。非細菌起源の天然に存在するプロモーターはまた、原核生物内でいくらかの遺伝子の高いレベルでの発現を生じるために、適合性のあるRNAポリメラーゼと結合され得る。バクテリオファージT7 RNAポリメラーゼ / プロモーター系は、連結したプロモーター系の例である( Studierら( 1986 ) J . Mol . Biol . 189 : 113 ; Taborら( 1985 ) Proc Natl . Acad . Sci . 82 : 1074 )。さらに、ハイブリッドプロモーターはまた、バクテリオファージプロモーターおよびE . coliオペレーター領域から構成され得る( EPO - A - 0267851 )。

#### 【 0104 】

機能性のプロモーター配列に加え、効果的なリボソーム結合部位もまた、原核生物における外来遺伝子の発現に有用である。E . coliにおいて、リボソーム結合部位は、シヤイン - ダルガノ( SD )配列と呼ばれ、そして開始コドン( ATG )および開始コドンの3 ~ 11ヌクレオチド上流に位置する長さ3 ~ 9ヌクレオチドの配列を含む( Shineら( 1975 ) Nature 254 : 34 )。SD配列は、SD配列とE . coliの16S rRNAの3'側との間の塩基対形成によりmRNAのリボソームへの結合を促進すると考えられている( Steitzら( 1979 ) 「Genetic Signals and nucleotide sequences in messenger RNA」Biological Regulation and Development : Gene Expression ( R . F . Goldbergerら編 ) )。弱いリボソーム結合部位を有する真核遺伝子および原核遺伝子の発現のためには( Sambrookら( 1989 ) 「Expression of cloned genes in Escherichia coli」Molecular Cloning : A Laboratory Manual )。

#### 【 0105 】

DNA分子は、細胞内で発現され得る。プロモーター配列は、直接的にそのDNA分子と連結され得、この場合、N末端の最初のアミノ酸は、常に、ATG開始コドンによりコードされるメチオニンである。所望される場合、N末端のメチオニンは、臭化シアンとの

10

20

30

40

50

インビトロインキュベーション、あるいは細菌のメチオニンN末端ペプチダーゼとのインビオまたはインビトロインキュベーションのいずれかによりタンパク質から切断され得る(EPO-A-0219237)。

#### 【0106】

融合タンパク質は、直接的発現に代わるものを提供する。通常、内在性の細菌のタンパク質、あるいは他の安定なタンパク質のN末端部分をコードするDNA配列は、異種のコード配列の5'末端と融合される。発現の際に、この構築物は、2つのアミノ酸配列の融合を提供する。例えば、バクテリオファージ 細胞遺伝子は、外来遺伝子の5'末端と連結し得、そして細菌において発現され得る。生じた融合タンパク質は、好ましくは、外来遺伝子由来のバクテリオファージタンパク質を切断するための切断酵素(第Xa因子)用の部位を保持する(Nagaiら(1984)Nature 309:810)。融合タンパク質はまた、lacZ(Jiaら(1987)Gene 60:197)、trpE(Alleenら(1987)J.Biotechnol. 5:93; Makoffら(1989)J.Gen.Microbiol. 135:11)、およびChey(EP-A-0324647)遺伝子由来の配列を用いて作製され得る。2つのアミノ酸配列の接合部でのDNA配列は、切断部位をコードしてもよいし、あるいはコードしなくてもよい。別の例としては、ユビキチン融合タンパク質である。そのような融合タンパク質は、好ましくは、外来タンパク質からユビキチンを切断するための切断酵素(例えば、ユビキチン特異的切断プロテアーゼ)用の部位を保持するユビキチン領域と共に作製され得る。この方法を通して、天然外来タンパク質は分離され得る(Millerら(1989)Biotechnology 7:698)。

10

20

30

40

#### 【0107】

あるいは、外来タンパク質はまた、細菌における外来タンパク質の分泌を提供するシグナルペプチド配列フラグメントから構成される、融合タンパク質をコードするキメラDNA分子を作製することによって、細胞から分泌され得る(米国特許第4,336,336号)。シグナル配列フラグメントは、通常、細胞からのタンパク質の分泌を指向する、疎水性アミノ酸から構成されるシグナルペプチドをコードする。このタンパク質は、増殖培地(グラム陽性細菌)、または細胞の内膜と外膜との間に位置する細胞周辺腔(グラム陰性細菌)のいずれかへ分泌される。好ましくは、インビオまたはインビトロのいずれかで切断され得る、このシグナルペプチドフラグメントと外来遺伝子との間にコードされるプロセシング部位がある。

#### 【0108】

適切なシグナル配列をコードするDNAは、E.coli外膜タンパク質遺伝子(ompA)(Masuiら(1983)、Experimental Manipulation of Gene Expression; Ghrayebら(1984)EMBO J. 3:2437)およびE.coliアルカリホスファターゼシグナル配列(phoA)(Okajimaら(1985)Proc.Natl.Acad.Sci. 82:7212)のような、分泌性細菌タンパク質に関する遺伝子由来であり得る。さらなる例として、種々のBacillus株由来の-アミラーゼ遺伝子のシグナル配列は、B.subtilis由来の異種タンパク質を分泌するために使用され得る(Palvayaら(1982)Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 79:5582; EP-A-0244042)。

#### 【0109】

通常、細菌によって認識される転写終結配列は、翻訳終止コドンの3'側に位置する調節領域であり、そして従って、プロモーターとともに、コード配列に隣接する。これらの配列は、そのDNAによってコードされるポリペプチドへと翻訳され得るmRNAの転写を指向する。転写終結配列は、しばしば、転写の終結を補助するステムループ構造を形成し得る、約50ヌクレオチドのDNA配列を含む。例は、強力なプロモーターを有する遺伝子(例えば、E.coliのtrp遺伝子および他の生合成遺伝子)由来の転写終結配列を含む。

#### 【0110】

50

通常、上記の成分（プロモーター、シグナル配列（もし所望ならば）、目的のコード配列、および転写終結配列を含む）は、組み立てられて発現構築物となる。発現構築物は、しばしば、宿主（例えば細菌）における安定な保持が可能である染色体外エレメント（例えばプラスミド）のような、レプリコンに保持される。このレプリコンは複製系を有し、従って、このことによって、発現またはクローニングおよび増幅のいずれかのために、レプリコンが原核生物宿主において保持されることを可能になる。さらに、レプリコンは、高コピー数プラスミドまたは低コピー数プラスミドのいずれかであり得る。高コピー数プラスミドは、一般に約5～約200、そして通常約10～約150の範囲のコピー数を有する。高コピー数プラスミドを含む宿主は、好ましくは少なくとも約10個、そしてより好ましくは少なくとも約20個のプラスミドを含む。高コピー数ベクターまたは低コピー数ベクターのいずれかが選択され得、それは、宿主に対するベクターおよび外来タンパク質の効果に依存する。

10

## 【0111】

あるいは、発現構築物は、組み込みベクターを用いて、細菌のゲノムへ組み込まれ得る。組み込みベクターは、通常、ベクターが組み込むのを可能にする、細菌の染色体と相同な少なくとも1つの配列を含む。組み込みは、ベクターにおける相同なDNAと細菌の染色体との間の組換えから生じるようである。例えば、種々の*Bacillus*株からのDNAによって構築される組み込みベクターは、*Bacillus*染色体に組み込まれる（EP-A-0127328）。組み込みベクターはまた、バクテリオファージまたはトランスポゾン配列から構成され得る。

20

## 【0112】

通常、染色体外発現構築物および組み込み発現構築物は、選択マーカーを含んで、形質転換された細菌株の選択を可能にし得る。選択マーカーは、細菌宿主において発現され得、そして細菌が薬物（例えば、アンピシリン、クロラムフェニコール、エリスロマイシン、カナマイシン（ネオマイシン）、およびテトラサイクリン）に耐性になるようにする遺伝子を含み得る（Daviesら（1978）Annu. Rev. Microbiol. 32：469）。選択マーカーはまた、ヒスチジン、トリプトファン、およびロイシンの生合成経路における生合成遺伝子のような、生合成遺伝子を含み得る。

30

## 【0113】

あるいは、上記の成分のいくつかは、形質転換ベクターにおいて組み立てられ得る。形質転換ベクターは、通常、上記のように、レプリコンにおいて保持されるか、または組み込みベクターへと開発されるかのいずれかの選択マーカー（market）から構成され得る。

## 【0114】

発現ベクターまたは形質転換ベクターは、染色体外レプリコンまたは組み込みベクターのいずれも、多くの細菌への形質転換のために開発されてきた。例えば、発現ベクターは、とりわけ、以下の細菌のために開発されてきた：*Bacillus subtilis*（Palvára（1982）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79：5582；EP-A-0036259およびEP-A-0063953；WO 84/04541）、*Escherichia coli*（Shimatakeら（1981）Nature 292：128；Amannら（1985）Gene 40：183；Studierら（1986）J. Mol. Biol. 189：113；EP-A-0036776、EP-A-0136829およびEP-A-0136907）、*Streptococcus cremoris*（Powellら（1988）Appl. Environ. Microbiol. 54：655）；*Streptococcus lividans*（Powellら（1988）Appl. Environ. Microbiol. 54：655）、*Streptomyces lividans*（米国特許第4,745,056号）。

40

## 【0115】

外来DNAを細菌宿主へ導入する方法は、当該分野において周知であり、そして通常、

50

CaCl<sub>2</sub> または他の薬剤（例えば、2価の陽イオンおよびDMSO）のいずれかで処理された細菌の形質転換を含む。DNAはまた、エレクトロポレーションによって、細菌細胞へ導入され得る。形質転換の手順は、通常、形質転換される細菌の種によって変化する。例えば以下を参照のこと：(Massonら(1989)FEMS Microbiol. Lett. 60: 273; Palvaら(1982)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 5582; EP-A-0 036 259およびEP-A-0 63 953; WO 84/04541、Bacillus)、(Millerら(1988)Proc. Natl. Acad. Sci. 85: 856; Wangら(1990)J. Bacteriol. 172: 949、Campylobacter)、(Cohenら(1973)Proc. Natl. Acad. Sci. 69: 2110; Dowerら(1988)Nucleic Acids Res. 16: 6127; Kushner(1978)「ColE1由来のプラスミドによるEscherichia coliの形質転換のための改良された方法」Genetic Engineering: Proceedings of the International Symposium on Genetic Engineering(H.W. BoyerおよびS. Nicosia編); Mandelら(1970)J. Mol. Biol. 53: 159; Takeeto(1988)Biochim. Biophys. Acta 949: 318; Escherichia)、(Chassyら(1987)FEMS Microbiol. Lett. 44: 173 Lactobacillus); (Fiedlerら(1988)Anal. Biochem 170: 38、Pseudomonas); (Augustinら(1990)FEMS Microbiol. Lett. 66: 203、Staphylococcus)、(Baranyら(1980)J. Bacteriol. 144: 698; Harlander(1987)「エレクトロポレーションによるStreptococcus lactisの形質転換」Streptococcal Genetics(J. FerrettiおよびR. Curtiss III編); Perryら(1981)Infect. Immun. 32: 1295; Powellら(1988)Appl. Environ. Microbiol. 54: 655; Somkutiら(1987)Proc. 4th Evr. Cong. Biotechnology 1: 412、Streptococcus)。

## 【0116】

## (v. 酵母発現)

酵母発現系もまた、当業者に公知である。酵母プロモーターは、酵母RNAポリメラーゼに結合可能であり、そしてコード配列（例えば、構造遺伝子）からmRNAへの下流の（3'側の）転写を開始し得る、任意のDNA配列である。プロモーターは、通常、コード配列の5'末端の近位に位置する転写開始領域を有する。この転写開始領域は、通常、RNAポリメラーゼ結合部位（「TATAボックス」）および転写開始部位を含む。酵母プロモーターはまた、上流アクチベーター配列（UAS）と呼ばれる第2のドメインを有し得、これは、もし存在するならば、通常、構造遺伝子とは遠位である。このUASは、調節された（誘導できた）発現を可能にする。構成的発現は、UASの非存在下で生じる。調節される発現は、正または負のいずれかであり得、それによって転写を増加させるかまたは減少させるかのいずれかであり得る。

## 【0117】

酵母は、活性な代謝経路を有する発酵性生物であり、従って、代謝経路における酵素をコードする配列は、特に有用なプロモーター配列を提供する。例としては、以下が挙げられる：アルコールデヒドロゲナーゼ(ADH)(EP-A-0 284 044)、エノラーゼ、グルコキナーゼ、グルコース-6-リン酸イソメラーゼ、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ(GAPまたはGAPDH)、ヘキソキナーゼ、ホスホフルクトキナーゼ、3-ホスホグリセリン酸ムターゼ、およびピルビン酸キナーゼ(PyK)(EPO-A-0 329 203)。酵母PHO5遺伝子はまた、酸性ホスファターゼをコードし、有用なプロモーター配列を提供する(Myanoharaら(1983)Pro

10

20

30

40

40

50

c . Nat l . Acad . Sci . U S A 8 0 : 1 ) 。

【 0 1 1 8 】

さらに、天然には生じない合成プロモーターもまた、酵母のプロモーターとして機能する。例えば、ある1つの酵母プロモーターのUAS配列は、別の酵母プロモーターの転写活性化領域と連結され得、合成ハイブリッドプロモーターを生成し得る。このようなハイブリッドプロモーターの例は、GAP転写活性化領域と連結されるADH調節配列（米国特許第4,876,197号および同第4,880,734号）を含む。ハイブリッドプロモーターの他の例は、ADH2、GAL4、GAL10、またはPHO5遺伝子のいずれかの調節配列からなり、GAPまたはPyK(EP-A-0 164 556)のような解糖酵素遺伝子の転写活性化領域に結合されているプロモーターを含む。さらに、酵母プロモーターは、酵母RNAポリメラーゼと結合し、そして転写を開始する能力を有する、天然に生じる非酵母起源のプロモーターを含み得る。このようなプロモーターの例としては、とりわけ、以下が挙げられる：(Cohenら(1980) Proc . Natl . Acad . Sci . USA 77 : 1078 ; Henikoffら(1981) Nature 283 : 835 ; Hollenbergら(1981) Curr . Topics Microbiol . Immunol . 96 : 119 ; Hollenbergら(1979)「酵母Saccharomyces cerevisiaeにおける細菌の抗生物質耐性遺伝子の発現」、Plasmids of Medical , Environmental and Commercial Importance(K . N . TimmisおよびA . Puhler編) ; Mercerau-Puigalonsら(1980) Gene 11 : 163 ; Panthierら(1980) Curr . Genet . 2 : 109 ; )。

10

20

30

40

【 0 1 1 9 】

DNA分子は、酵母において、細胞内で発現され得る。プロモーター配列は、DNA分子と直接連結され得、その場合、組換えタンパク質のN末端にある最初のアミノ酸は常にATG開始コドンによってコードされているメチオニンである。もし所望ならば、N末端のメチオニンは、臭化シアンとのインビトロインキュベーションによって、タンパク質から切断され得る。

【 0 1 2 0 】

融合タンパク質は、酵母発現系について、ならびに哺乳動物、バキュロウイルス、および細菌の発現系において、代替物を提供する。通常、内因性酵母タンパク質、または他の安定なタンパク質のN末端部分をコードするDNA配列は、異種コード配列の5'末端に融合される。発現の際に、この構築物は、2つのアミノ酸配列の融合物を提供する。例えば、酵母またはヒトのスーパーオキシドジスムターゼ(SOD)遺伝子は、外来遺伝子の5'末端に連結され、そして酵母において発現し得る。2つのアミノ酸配列の連結部にあるDNA配列は、切断部位をコードしてもよいし、コードしなくてもよい。例えば、EP-A-0 196 056を参照のこと。別の例はユビキチン融合タンパク質である。このような融合タンパク質は、プロセシング酵素（例えば、ユビキチン特異的プロセシングプロテアーゼが）外来タンパク質からユビキチンを切断するための部位を好ましくは保持する、ユビキチン領域を伴って作製される。従って、この方法により、ネイティブ外来タンパク質は、単離され得る（例えば、WO 88 / 024066）。

【 0 1 2 1 】

あるいは、外来タンパク質はまた、酵母における外来タンパク質の分泌を提供する、リーダー配列フラグメントから構成される融合タンパク質をコードする、キメラDNA分子を作製することによって、細胞から増殖培地へ分泌され得る。好ましくは、インビボまたはインビトロのいずれかで切断され得る、リーダーフラグメントと外来遺伝子との間にコードされるプロセシング部位が存在する。リーダー配列フラグメントは、細胞からのタンパク質の分泌を指向する、疎水性アミノ酸から構成されるシグナルペプチドを、通常コードする。

【 0 1 2 2 】

適切なシグナル配列をコードするDNAは、分泌性酵母タンパク質に関する遺伝子由来

50

であり得、その遺伝子は例えば、インペルターゼ遺伝子（E P - A - 0 0 1 2 8 7 3 ; J P O 6 2 , 0 9 6 , 0 8 6 ）およびA因子遺伝子（米国特許第4 , 5 8 8 , 6 8 4号）である。あるいは、インターフェロンリーダーのような、酵母における分泌もまた提供する、非酵母起源のリーダーが存在する（E P - A - 0 0 6 0 0 5 7 ）。

#### 【0123】

好みしいクラスの分泌リーダーは、酵母 因子遺伝子のフラグメントを使用するリーダーであり、これは「プレ」シグナル配列、および「プロ」領域の両方を含む。用いられ得る 因子フラグメントの型は、完全長の、プレ - プロ 因子リーダー（約83アミノ酸残基）および短縮された 因子リーダー（通常約25～約50アミノ酸残基）を含む（米国特許第4 , 5 4 6 , 0 8 3号および同第4 , 8 7 0 , 0 0 8号；E P - A - 0 3 2 4 2 7 4）。分泌を提供する 因子リーダーフラグメントを使用するさらなるリーダーは、第1の酵母のプレ配列を有するが、第2の酵母 因子からのプロ領域を有しないで作製される、ハイブリッド 因子リーダーを含む（例えば、W O 8 9 / 0 2 4 6 3 を参照のこと）。

10

#### 【0124】

通常、酵母に認識される転写終結配列は、翻訳終止コドンの3'側に位置する調節領域であり、従って、プロモーターと共にコード配列に隣接する。これらの配列は、そのDNAにコードされるポリペプチドへと翻訳され得る、mRNAの転写を指向する。転写終結配列および他の酵母に認識される終結配列の例は、例えば、解糖酵素をコードする転写終結配列である。

20

#### 【0125】

通常、上記の成分（プロモーター、リーダー（もし所望ならば）、目的のコード配列、および転写終結配列を含む）は、組み立てられて発現構築物になる。発現構築物は、宿主（例えば、酵母または細菌）において安定に保持され得る染色体外エレメント（例えば、プラスミド）のような、レプリコンにおいてしばしば保持される。このレプリコンは、2つの複製系を有し得、従って、例えば、発現のために酵母において、ならびにクローニングおよび増幅のために原核生物宿主において保持されることを可能にする。このような酵母 - 細菌シャトルベクターの例としては、以下が挙げられる：Y E p 2 4 (B o t s t e i n ら (1979) G e n e 8 : 1 7 ~ 2 4 )、p C l / 1 (Br a k e ら (1984) P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 8 1 : 4 6 4 2 ~ 4 6 4 6 )、およびY R p 1 7 (S t i n c h c o m b ら (1982) J . M o l . B i o l . 1 5 8 : 1 5 7 )。さらに、レプリコンは、高コピー数プラスミドまたは低コピー数プラスミドのいずれかであり得る。高コピー数プラスミドは、一般に約5～約200、そして通常約10～約150の範囲のコピー数を有する。高コピー数プラスミドを含む宿主は、好ましくは少なくとも約10、そしてより好ましくは少なくとも約20を有する。高コピー数ベクターまたは低コピー数ベクターのいずれかが選択され得、それは、宿主に対するベクターおよび外来タンパク質の効果に依存する。例えば、Br a k e ら、前出を参照のこと。

30

#### 【0126】

あるいは、発現構築物は、組み込みベクターを用いて、酵母のゲノムへ組み込まれ得る。組み込みベクターは、通常、ベクターが組み込むのを可能にする、酵母の染色体と相同な少なくとも1つの配列を含み、そして好ましくは、発現構築物に隣接する2つの相同配列を含む。組み込みは、ベクターにおける相同なDNAと酵母の染色体との間の組換えから生じるようである（O rr - W e a v e r ら (1983) M e t h o d s i n E n z y m o l . 1 0 1 : 2 2 8 ~ 2 4 5 ）。組み込みベクターは、そのベクター中に含有するために適切な相同配列を選択することによって、酵母における特定の遺伝子座を指向され得る。O rr - W e a v e r ら、前出を参照のこと。1つ以上の発現構築物が組み込まれ得、産生される組換えタンパク質のレベルにおそらく影響を与え得る（R i n e ら (1983) P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 8 0 : 6 7 5 0 ）。ベクターに含まれる染色体配列は、ベクターにおける単一セグメント（ベクター全体の組み込みを生じる）、または染色体における隣接セグメントに相同でかつベクターにおける発現構築物

40

50

に隣接する2つのセグメント(発現構築物のみの安定した組み込みを生じ得る)のいずれかとして生じ得る。

#### 【0127】

通常、染色体外発現構築物および組み込み発現構築物は、選択マーカーを含み得、形質転換された酵母株の選択を可能にする。選択マーカーは、酵母宿主において発現され得る生合成遺伝子(例えば、ADE2、HIS4、LEU2、TRP1、およびALG7)、ならびにG418耐性遺伝子(それぞれ、酵母細胞がツニカマイシンおよびG418に耐性になるようとする)を含み得る。さらに、適切な選択マーカーはまた、金属のような毒性化合物の存在下において増殖する能力を、酵母に提供し得る。例えば、CUP1の存在は、酵母が、銅イオンの存在下において増殖することを可能にする(Buttら(1987)Microbiol. Rev. 51:351)。

10

#### 【0128】

あるいは、上記成分のうちのいくつかは、組み立てられて形質転換ベクターになり得る。形質転換ベクターは、通常、上記のように、レブリコンにおいて保持される選択マーカーから構成されるか、または組み込みベクターへと構築されるかのいずれかである。

#### 【0129】

発現ベクターおよび形質転換ベクターは、染色体外レブリコンまたは組み込みベクターのいずれかであり、多くの酵母への形質転換のために開発されてきた。例えば、発現ベクターは、とりわけ、以下の酵母のために開発されてきた:Candida albicans(Kurtzら(1986)Mol. Cell. Biol. 6:142)、Candida maltosa(Kunzeら(1985)J. Basic Microbiol. 25:141)。Hansenula polymorpha(Gleesonら(1986)J. Gen. Microbiol. 132:3459; Roggenkampら(1986)Mol. Gen. Genet. 202:302)、Kluyveromyces fragilis(Dasら(1984)J. Bacteriol. 158:1165)、Kluyveromyces lactis(De Louvencourtら(1983)J. Bacteriol. 154:737; Van den Bergら(1990)Bio/Technology 8:135)、Pichia guillerimondii(Kunzeら(1985)J. Basic Microbiol. 25:141)、Pichia pastoris(Creggら(1985)Mol. Cell. Biol. 5:3376; 米国特許第4,837,148号および同第4,929,555号)、Saccharomyces cerevisiae(Hinnenら(1978)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75:1929; Itoら(1983)J. Bacteriol. 153:163)、Schizosaccharomyces pombe(BeachおよびNurse(1981)Nature 300:706)、およびYarrowia lipolytica(Davidowら(1985)Curr. Genet. 10:380471; Gaillardinら(1985)Curr. Genet. 10:49)。

20

#### 【0130】

外来DNAを酵母宿主へ導入する方法は、当該分野において周知であり、そして通常、スフェロプラストの、またはアルカリ陽イオンで処理されたインタクトな酵母細胞のいずれかの形質転換を含む。形質転換の手順は、通常、形質転換される酵母の種によって変化する。例えば以下を参照のこと:(Kurtzら(1986)Mol. Cell. Biol. 6:142; Kunzeら(1985)J. Basic Microbiol. 25:141; Candida); (Gleesonら(1986)J. Gen. Microbiol. 132:3459; Roggenkampら(1986)Mol. Gen. Genet. 202:302; Hansenula); (Dasら(1984)J. Bacteriol. 158:1165; De Louvencourtら(1983)J. Bacteriol. 154:1165; Van den Bergら(1990)Bio/Technology 8:135; Kluyveromyces); (Creggら(1985)Mol. Cell. Biol. 5:3376; 米国特許第4,837,148号および同第4,929,555号)。

30

40

50

1985) Mol. Cell. Biol. 5: 3376; Kunzeら(1985) J. Basic Microbiol. 25: 141; 米国特許第4,837,148号および同第4,929,555号; Pichia); (Hinnenら(1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 1929; Itoら(1983) J. Bacteriol. 153: 163 Saccharomyces); (BeachおよびNurse(1981) Nature 300: 706; Schizosaccharomyces); (Davidowら(1985) Curr. Genet. 10: 39; Gaillardinら(1985) Curr. Genet. 10: 49; Yarrowia)。

## 【0131】

10

## (薬学的組成物)

薬学的組成物は、本発明のポリペプチドおよび/または核酸を含み得る。この薬学的組成物は、治療上有効な量の、本願発明のポリペプチド、抗体、またはポリヌクレオチドのいずれかを含む。

## 【0132】

20

本明細書において使用される用語「治療上有効な量」とは、所望の疾患または状態を処置、改善、または予防するための治療薬剤の量、または、検出可能な治療効果または予防効果を示すための治療薬剤の量をいう。この効果は、例えば、キメラマーカーまたは抗原レベルによって検出され得る。治療効果はまた、体温低下のような、身体の症状における減少を含む。被験体に関する正確な有効量は、被験体の大きさおよび健康、状態の性質および程度、および投与のために選択される治療または治療の組合せに依存する。従って、あらかじめ正確な有効量を特定することは有用ではない。しかし、所定の情況のための有効量は、慣用的な実験によって決定され得、そして臨床医の判断内である。

## 【0133】

本発明の目的のために、有効な用量は、DNA構築物が投与される個体において、約0.01mg/kg ~ 50mg/kgまたは0.05mg/kg ~ 約10mg/kgのDNA構築物である。

## 【0134】

30

薬学的組成物はまた、薬学的に受容可能なキャリアを含み得る。用語「薬学的に受容可能なキャリア」とは、抗体またはポリペプチド、遺伝子、および他の治療薬剤のような、治療薬剤の投与のためのキャリアをいう。この用語は、この組成物を与える個体に有害な抗体の産生をそれ自体誘導せず、そして過度の毒性を伴わずに投与され得る、任意の薬学的キャリアをいう。適切なキャリアは、タンパク質、多糖、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、ポリマーアミノ酸、アミノ酸コポリマー、および不活性ウイルス粒子のように、大きく、遅く代謝される高分子であり得る。このようなキャリアは、当業者に周知である。

## 【0135】

薬学的に受容可能な塩が、その中で使用され得る。例えば、塩酸塩、臭化水素酸塩、リン酸塩、硫酸塩などのような鉱酸塩；および酢酸塩、プロピオン酸塩、マロン酸塩、安息香酸塩などのような有機酸の塩である。薬学的に受容可能な賦形剤の徹底的な議論は、Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Pub. Co., N.J. 1991)にて利用可能である。

40

## 【0136】

治療組成物における薬学的に受容可能なキャリアは、水、生理的食塩水、グリセロールおよびエタノールのような液体を含み得る。さらに、湿潤剤または乳化剤、pH緩衝物質などのような補助物質が、このようなビヒクルに存在し得る。代表的には、治療組成物は、液体溶液または懸濁液のいずれかの、注射可能物質として調製される；注射前に液体ビヒクルに溶解または懸濁するのに適切な固体形態もまた、調製され得る。リポソームは、薬学的に受容可能なキャリアの定義中に含まれる。

## 【0137】

50

## (送達方法)

一旦処方されると、本発明の組成物は、その被験体へ直接投与され得る。処置される被験体は、動物であり得；特に、ヒト被験体が処置され得る。

#### 【0138】

その組成物の直接送達は、一般的に、皮下に、腹腔内に、静脈内に、または筋肉内のいずれかでの注入によって達成されるか、あるいは、組織の間質空間へ送達される。この組成物はまた、病巣へ投与され得る。他の投与様式には、経口投与、および肺投与、坐剤、および経皮(transdermal)適用または経皮(transcutaneous)適用(例えば、WO 98/20734を参照のこと)、針、および遺伝子銃またはハイポスプレー(hyposprayer)が含まれる。投薬処置は、単回用量スケジュール、または多数回用量スケジュールであり得る。

10

#### 【0139】

##### (ワクチン)

本発明に従うワクチンは、予防的(すなわち、感染を予防するため)または治療(すなわち、感染後の疾患を処置するため)のいずれかであり得る。

#### 【0140】

このようなワクチンは、免疫抗原、免疫原、ポリペプチド、タンパク質または核酸を、通常「薬学的に受容可能なキャリア」とともに含み、このキャリア自体は、その組成物を受ける個体に有害である抗体の產生を誘発しない任意のキャリアを含む。適切なキャリアは、代表的に、大きく、ゆっくり代謝される高分子(例えば、タンパク質、ポリサッカリド、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、ポリマーアミノ酸、アミノ酸コポリマー、脂質凝集物(例えば、油小滴またはリボソーム)、および不活性ウイルス粒子である。このようなキャリアは、当業者に周知である。さらに、これらのキャリアは免疫刺激剤(「アジュvant」)として機能し得る。さらに、この抗原または免疫原は、細菌毒素(例えば、ジフテリア、破傷風、コレラ、H. pyloriなどの病原因子からの毒素)と結合体化され得る。

20

#### 【0141】

この組成物の効力を増強するために好ましいアジュvantとしては、(1)アルミニウム塩(「明礬」)(例えば、水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウム、硫酸アルミニウムなど)、(2)o/wエマルジョン処方物(他の特定の免疫刺激剤(例えば、ムラミルペプチド(以下を参照のこと)または細菌細胞壁成分)を伴うか伴わない)が挙げられるが、それらに限定されず、例えば、以下:(a)5%スクアレン、0.5%Tween 80、および0.5%Span 85(必要に応じて、種々の量のMTP-PE(以下を参照のこと)を含有するが、必要ではない)を含み、モデル110Y微小流体化器(Microfluidics, Newton, MA)のような微小流体化器を用いてミクロン未満の粒子へと処方されたMF59<sup>TM</sup>(WO 90/14837; Vaccine design: the subunit and adjuvant approachの第10章、PowellおよびNewman編、Plenum Press 1995);(b)ミクロン未満のエマルジョンへと微小流体化されたか、またはボルテックスして、より大きな粒子径エマルジョンを生成したかのいずれかである、10%スクアレン、0.4%Tween 80、5%ブルロニックロックポリマー-L121、およびthr-MDP(以下を参照のこと)を含有するSAF、ならびに(c)2%スクアレン、0.2%Tween 80、およびモノホスホリリピドA(MPL)、トレハロースジミコレート(TDM)、および細胞壁骨格(CWS)好ましくはMPLおよびCWS(Detox<sup>TM</sup>)からなる群由来の1つ以上の細菌細胞壁成分を含むRibit<sup>TM</sup>アジュvant系(RAS)、(Ribit Immunochem, Hamilton, MT);(3)サボニンアジュvant(例えば、Stimulon<sup>TM</sup>)(Cambridge Bioscience, Worcester, MA)を使用し得るか、またはそれから粒子(例えば、ISCO M(免疫刺激性複合体)を生成し得る;(4)完全フロイントアジュvant(CFA)および不完全フロイントアジュvant(IFN);(5)サイトカイン(例えば、インターロイキン(例えば、IL-1、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、I

30

40

50

L - 12など)、インターフェロン(例えば、インターフェロン)、マクロファージコロニー刺激因子(M-CSF)、腫瘍壞死因子(TNF)など;および(6)その組成物の効力を強化するための免疫刺激因子として作用する他の物質である。ミョウバンおよびMF59<sup>T M</sup>が好ましい。

#### 【0142】

上記で言及したように、ムラミルペプチドとしては、N-アセチル-ムラミル-L-スレオニル-D-イソグルタミン(thr-MDP)、N-アセチル-ノルムラミル-L-アラニル-D-イソグルタミン(ノル-MDP)、N-アセチルムラミル-L-アラニル-D-イソグルタミニル-L-アラニン-2-(1'-2'-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ヒドロキシホスホリルオキシ)-エチルアミン(MTP-PE)などが挙げられるがそれらに限定されない。10

#### 【0143】

免疫原性組成物(例えば、免疫抗原/免疫原/ポリペプチド/タンパク質/核酸、薬学的に受容可能なキャリア、およびアジュバント)は、代表的に、希釈剤(例えば、水、生理食塩水、グリセロール、エタノールなど)を含有する。さらに、補助物質(例えば、湿潤剤または乳化剤、pH緩衝物質など)は、このようなビヒクルにおいて存在し得る。

#### 【0144】

代表的に、免疫原性組成物は、液体溶液または懸濁物として、注射剤として調製され;注射前に液体ビヒクル中の溶液または懸濁物として適切な固体形態もまた調製され得る。この調製物はまた、薬学的に受容可能なキャリアの下で、上記に記載のように、アジュバント効果の強化のために乳化され得るかまたはリポソーム中にカプセル化され得る。20

#### 【0145】

ワクチンとして使用される免疫原性組成物は、免疫学的有効量の抗原性または免疫原性のポリペプチド、および任意の他の上記の成分を必要に応じて含む。「免疫学的有効量」とは、その量の個体への投与が、単回用量であれ、一連の(用量の)一部としてであれ、処置または予防に有効であることを意味する。この量は、処置される個体の健康および身体状態、処置される個体の分類学上の群(例えば、非ヒト靈長類、靈長類など)、個体の免疫系が抗体を合成する能力、所望される保護の程度、そのワクチンの処方物、処置する医師の医療的状況の評価、および他の関連する因子に依存して変動する。その量は、比較的広い範囲に入り、この量が慣用的な試行を通して決定され得ることが予想される。30

#### 【0146】

免疫学的組成物は、従来のように、非経口的(例えば、皮下、筋肉内または経皮(transudermal ly)/経皮(transcutaneously)のいずれかでの注射による)(例えは、WO98/20734)に投与される)。他の投与様式に適切なさらなる処方物は、経口処方物および肺処方物、坐剤、および経皮適用を含む。投薬処置は、単回用量スケジュールまたは多数回用量スケジュールであり得る。ワクチンは、他の免疫調節剤とともに投与され得る。

#### 【0147】

タンパク質ベースのワクチンの代替として、DNAワクチンを使用し得る(例えは、RobinsonおよびTorres(1997) Seminars in Immunology 9:271-283; Donnellyら(1997) Annual Review of Immunology 15:617-648; 本明細書中後半部を参照のこと)。40

#### 【0148】

(遺伝子送達ビヒクル)

本発明の治療剤のコード配列を含む、哺乳動物における発現のためにその哺乳動物へ送達される構築物の送達のための遺伝子治療ビヒクルは、局所または全身的のいずれかで投与され得る。これらの構築物は、ウイルスベクターアプローチまたは非ウイルスベクター・アプローチを、インビボまたはエキソビボの様式で利用し得る。このようなコード配列の発現は、内因性哺乳動物プロモーターまたは外因性プロモーターを用いて誘導され得る。このコード配列のインビボでの発現は、構成性または調節性のいずれかであり得る。50

## 【0149】

本発明は、意図された核酸配列を発現し得る遺伝子送達ビヒクルを含む。この遺伝子送達ビヒクルは、好ましくは、ウイルスベクター、およびより好ましく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（AAV）ベクター、ヘルペスウイルスベクターまたはウイルスベクターである。このウイルスベクターはまた、アストロウイルスベクター、コロナウイルスベクター、オルトミクソウイルスベクター、バボバウイルスベクター、パラミクソウイルスベクター、パルボウイルスベクター、ピコルナウイルスベクター、ポックスウイルスベクター、またはトガウイルスベクターであり得る。一般的には、Jolley (1994) Cancer Gene Therapy 1:51 - 64; Kimura (1994) Human Gene Therapy 5:845 - 852; Connell (1995) Human Gene Therapy 6:185 - 193; および Kaplitt (1994) Nature Genetics 6:148 - 153 を参考のこと。10

## 【0150】

レトロウイルスベクターは、当該分野で周知であり、そして本発明者らは、任意のレトロウイルス遺伝子治療ベクターが本発明において使用可能であることを意図する。これには、B型、C型およびD型のレトロウイルス、異種栄養性ウイルス（例えば、NZB-X1、NZB-X2およびNZB9-1 (O'Neill (1985) J. Virol. 53: 160 を参考のこと）多栄養性レトロウイルス（例えば、MCF およびMCF-MLV (Kelly (1983) J. Virol. 45: 291 を参考のこと）、スマウイルスおよびレンチウイルスが含まれる。RNA Tumor Viruses、第2版、Cold Spring Harbor Laboratory、1985 を参考のこと。20

## 【0151】

レトロウイルス遺伝子治療ベクターの部分は、異なるレトロウイルスに由来し得る。例えば、レトロウイルスLTRは、マウス肉腫ウイルスに由来し得、tRNA結合部位はラウス肉腫ウイルスに由来し得、パッケージングシグナルはマウス白血病ウイルスに由来し得、そして第二の鎖合成の起源はトリ白血病ウイルスに由来し得る。

## 【0152】

これらの組換えレトロウイルスベクターを使用して、適切なパッケージング細胞株へそれらを導入することによって形質導入適合性レトロウイルスベクター粒子を生成し得る（米国特許第5,591,624号を参考のこと）。レトロウイルスベクターは、レトロウイルス粒子へのキメラインテグラーーゼ酵素の組込みによって宿主細胞DNAへの部位特異的組込みについて構築され得る（WO 96/37626号を参考のこと）。この組換えウイルスベクターは複製欠損組換えウイルスであることが好ましい。30

## 【0153】

上記に記載のレトロウイルスベクターを伴う使用について適切なパッケージング細胞株は、当該分野で周知であり、容易に調製され（WO 95/30763号およびWO 92/05266号を参考のこと）、そしてこれを使用して、組換えベクター粒子の生産のためのプロデューサー細胞株（これは、ベクター細胞株または「VCL」とも称される）を作製し得る。好ましくは、このパッケージング細胞株は、ヒトの親細胞（例えば、HT1080細胞）またはミンク親細胞株から作製され、これは、ヒト血清における不活化を除去する。40

## 【0154】

レトロウイルス遺伝子治療ベクターの構築のために好ましいレトロウイルスは、トリ白血病ウイルス、ウシ白血病ウイルス、マウス白血病ウイルス、ミンク細胞フォーカス形成ウイルス、マウス肉腫ウイルス、細網内皮症ウイルス、およびラウス肉腫ウイルスを含む。特に好ましいマウス白血病ウイルスは、4070A および 1504A (Hartley および Rowe (1976) J. Virol. 19: 19-25)、Abelson (ATCC 番号 VR-999)、Friend (ATCC 番号 VR-245)、Graffi、Gross (ATCC 番号 VR-590)、Kirsten、Harvey 肉腫ウイルス50

ルスおよびRauscher (ATCC番号VR-998) およびモロニーマウス白血病ウイルス(ATCC番号VR-190)を含む。このようなレトロウイルスベクターは、寄託機関または収集機関(例えば、アメリカンタイプカルチャコレクション('ATCC')、Rockville、Maryland)から入手し得るか、または一般に利用可能な技術を用いて公知の供給源から単離され得る。

#### 【0155】

本発明において使用可能な例示的な公知のレトロウイルス遺伝子治療ベクターは、特許出願GB2200651、EP0415731、EP0345242、EP0334301、WO89/02468; WO89/05349、WO89/09271、WO90/02806、WO90/07936、WO94/03622、WO93/25698、WO93/25234、WO93/11230、WO93/10218、WO91/02805、WO91/02825、WO95/07994、米国特許第5,219,740号、同4,405,712号、同4,861,719号、同4,980,289号、同4,777,127号、同5,591,624号に記載されるものを含む。Vile(1993)Cancer Res 53:3860-3864; Vile(1993)Cancer Res. 53:962-967; Ram(1993)Cancer Res 53(1993)83-88; Takamiya(1992)J Neurosci Res 33:493-503; Baba(1993)J Neurosurg 79:729-735; Mann(1983)Cell 33:153; Cane(1984)Proc Natl Acad Sci 81; 6349; およびMiller(1990)Human Gene Therapy 1もまた参照のこと。  
10  
20

#### 【0156】

ヒトアデノウイルス遺伝子治療ベクターもまた当該分野で公知であり、そして本発明において使用可能である。例えば、Berkner(1988)Biotechnology 6:616およびRosenfeld(1991)Science 252:431; ならびにWO93/07283、WO93/06223、およびWO93/07282を参照のこと。本発明において使用可能な例示的な公知のアデノウイルス遺伝子治療ベクターは、上記に参照される文書およびWO94/12649、WO93/03769、WO93/19191、WO94/28938、WO95/11984、WO95/00655、WO95/27071、WO95/29993、WO95/34671、WO96/05320、WO94/08026、WO94/11506、WO93/06223、WO94/24299、WO95/14102、WO95/24297、WO95/02697、WO94/28152、WO94/24299、WO95/09241、WO95/25807、WO95/05835、WO94/18922およびWO95/09654において記載されるものを含む。あるいは、Curiel(1992)Hum. Gene Ther. 3:147-154に記載されるような殺傷したアデノウイルスに連結したDNAの投与が使用され得る。本発明の遺伝子送達ビヒクルはまた、アデノウイルス随伴ウイルス(AAV)ベクターを含む。本発明における使用のためのこのようベクターの主要なおよび好ましい例は、Srivastava WO93/09239に開示されるAAV-2ベースのベクターである。最も好ましいAAVベクターは、2つのAAV逆方向末端反復を含む。ここで、ネイティブD配列は、ヌクレオチドの置換によって改変され、その結果、少なくとも5つのネイティブなヌクレオチドおよび18までのネイティブヌクレオチド、好ましくは少なくとも10のネイティブヌクレオチドから18までのネイティブヌクレオチド、最も好ましくは10のネイティブヌクレオチドが維持され、そしてD配列の残りのヌクレオチドが欠失またはネイティブでないヌクレオチドで置換されている。AAV逆方向末端反復のネイティブなD配列は、各AAV逆方向末端反復において(すなわち、各末端に1つの配列が存在する)20の連続するヌクレオチドの配列であって、これは、HP形成に関与しない。ネイティブでない置換ヌクレオチドは、同じ位置でのネイティブなD配列に見出されるヌクレオチド以外の任意のヌクレオチドであり得る。他の使用可能な例示的なAAVベクターは、、pWP-19、pWN-1であり、これらは  
30  
40  
50

両方とも Nahreini (1993) Gene 124 : 257 - 262 に開示される。このようなAAVベクターの別の例は、psub201 (Samulski (1987) J. Virol. 61 : 3096 を参照のこと) である。別の例示的なAAVベクターは、Double-D ITRベクターである。Double-D ITRベクターの構築は、米国特許第5,478,745号に開示される。なお他のベクターは、Carter 米国特許第4,797,368号およびMuzyckza 米国特許第5,139,941号、Chartejee 米国特許第5,474,935号ならびにKotin WO94/288157 に開示されるものである。本発明において使用可能なAAVベクターのなおさらなる例は、SSV9AFABTKnneo であり、これは、AFPエンハンサーおよびアルブミンプロモーターを含み、そして肝臓において優性に発現を指向する。その構造および構築は、Su (1996) Human Gene Therapy 7 : 463 - 470 に開示される。さらなるAAV遺伝子治療ベクターは、米国特許第5,354,678号、同5,173,414号、同5,139,941号、および同5,252,479号に記載される。

10

20

30

40

## 【0157】

本発明の遺伝子治療ベクターはまた、ヘルペスウイルスベクターを含む。主要なおよび好ましい例は、チミジンキナーゼポリペプチドをコードする配列を含む単純ヘルペスウイルスベクター（例えば、米国特許第5,288,641号、およびEP0176170 (Roizman) に開示されるもの）である。さらなる例示的な単純ヘルペスウイルスベクターは、WO95/04139 (Wistar) に開示されるHFEM / ICP6-1 acZ、Gellier (1988) Science 241 : 1667 - 1669 ならびにWO90/09441 およびWO92/07945 に記載されるpHSV1ac、Fink (1992) Human Gene Therapy 3 : 11 - 19 に記載されるHSV Us3 : pgC-1acZ、ならびにEP0453242 (Breakefield) に記載されるHSV 7134、2RH 105 およびGAL4、ならびにATCCに受託番号ATCC VR - 977 およびATCC VR - 260 として寄託されたものを含む。

## 【0158】

意図されるのはまた、本発明において使用され得るウイルス遺伝子治療ベクターである。好ましいウイルスベクターは、シンドビスウイルスベクターである。トガウイルス、セムリキ森林ウイルス (ATCC VR - 67; ATCC VR - 1247)、Middlebergウイルス (ATCC VR - 370)、ロスリバーウイルス (ATCC VR - 373; ATCC VR - 1246)、ベネズエラウマ脳脊髄炎ウイルス (ATCC VR - 923; ATCC VR - 1250; ATCC VR - 1249; ATCC VR - 532) および米国特許第5,0091,309号、同5,217,879号、およびWO92/10578 に記載されるもの。より詳細には、米国特許出願第08/405,627号 (1995年3月15日出願)、WO94/21792号、WO92/10578号、WO95/07994号、米国特許第5,091,309号、および米国特許第5,217,879号に記載されるそれらのウイルスベクターが使用可能である。このようなウイルスは、ATCC、Rockville、Maryland のような寄託機関または収集機関から入手し得るか、または一般的に利用可能な技術を用いて公知の供給源から単離され得る。好ましくは、細胞傷害性が減少したウイルスベクターを使用する（米国特許仮出願08/679640号を参照のこと）。

## 【0159】

DNAベクター系（例えば、真核細胞層状発現系）もまた、本発明の核酸の発現について有用である。真核生物層状発現系の詳細な説明についてはWO95/07994を参照のこと。好ましくは、本発明の真核細胞層状発現系はウイルスベクターに由来し、そして最も好ましくはシンドビスウイルスベクターに由来する。

## 【0160】

本発明における使用に適切な他のウイルスベクターは、ポリオウイルス（例えば、AT

50

CC VR - 58 および Evans、Nature 339 (1989) 385 および Sabin (1973) J. Biol. Standardization 1:115 に記載されるもの；ライノウイルス、例えば、ATCC VR - 1110 および Arnold (1990) J Cell Biochem L 401 に記載されるもの；ポックスウイルス（例えば、カナリアポックスルウイルスまたはワクシニアウイルス（例えば、ATCC VR - 111 および ATCC VR - 2010 ならびに Fisher-Hoch (1989) Proc Natl Acad Sci 86:317; Flexner (1989) Ann NY Acad Sci 569:86、Flexner (1990) Vaccine 8:17；米国特許第4,603,112号および同4,769,330号ならびにWO89/01973号に記載されるもの）；SV40ウイルス（例えば、ATCC VR - 305 および Mulligan (1979) Nature 277:108 および Madzak (1992) J Gen Virol 73:1533 に記載されるもの）；インフルエンザウイルス（例えば、ATCC VR - 797 および米国特許第5,166,057号および Enami (1990) Proc Natl Acad Sci 87:3802-3805；Enami および Palese (1991) J Virol 65:2711-2713 および Luytjes (1989) Cell 59:110 (McMichael (1983) NEJM 309:13 ならびに Yap (1978) Nature 273:238 および Nature (1979) 277:108 もまた参考のこと）に記載されるような逆遺伝子技術を使用して作製した組換えインフルエンザウイルス）；EP - 0386882 および Buchschaechler (1992) J. Virol. 66:2731 に記載されるようなヒト免疫不全ウイルス；麻疹ウイルス（例えば、ATCC VR - 67 および VR - 1247 ならびに EP - 0440219 に記載されるもの）；アウラウイルス（例えば、ATCC VR - 368）；ベバルウイルス（例えば、ATCC VR - 600 および ATCC VR - 1240）；カバス (Cabassou) ウィルス（例えば、ATCC VR - 922）；チクングンヤウイルス（例えば、ATCC VR - 64 および ATCC VR - 1241）；フォートモーガン (Fort Morgan) ウィルス（例えば、ATCC VR - 924）；ゲタウイルス（例えば、ATCC VR - 369 および ATCC VR - 1243）；キジラガハ (Kyzylagach) ウィルス（例えば、ATCC VR - 927）；マヤロウイルス（例えば、ATCC VR - 66）；ムカンボウイルス（例えば、ATCC VR - 580 および ATCC VR - 1244）；ヌヅムウイルス（例えば、ATCC VR - 371）；ピクスナウイルス（例えば、ATCC VR - 372 および ATCC VR - 1245）；トナテ (Tonate) ウィルス（例えば、ATCC VR - 925）；トリニティウイルス（例えば、ATCC VR - 469）；ユナウイルス（例えば、ATCC VR - 374）；ワタロアウイルス（例えば、ATCC VR - 926）；Y - 62 - 33 ウィルス（例えば、ATCC VR - 375）；オニオンウイルス、東部ウマ脳脊髄炎ウイルス（例えば、ATCC VR - 65 および ATCC VR - 1242）；西部ウマ脳脊髄炎ウイルス（例えば、ATCC VR - 70、ATCC VR - 1251、ATCC VR - 622 および ATCC VR - 1252）；ならびにコロナウイルス（例えば、ATCC VR - 740）および Hamre (1966) Proc Soc Exp Biol Med 121:190 に記載のものに由来するウイルスベクターを含む。

#### 【0161】

本発明の組成物の細胞への送達は、上記に言及したウイルスベクターに限定されない。他の送達方法および媒体が使用され得る（例えば、核酸発現ベクター、殺傷したアデノウイルスに連結したかまたは連結していないポリカチオン性縮合DNA単独（例えば、米国特許出願番号08/366,787（1994年12月30日出願）および Curieel (1992) Hum Gene Ther 3:147-154 を参照のこと）、リガンド連結DNA（例えば、Wu (1989) J Biol Chem 264:16985-16987 を参照のこと）、真核生物細胞送達ビヒクル細胞（例えば、米国特許出願番号08/240,030（1994年5月9日出願）および米国特許出願番号08/404,750

96を参照のこと)、光重合化ヒドロゲル物質の沈着、手動の遺伝子送達粒子銃(米国特許第5,149,655号に記載されるような)、米国特許第5,206,152およびWO92/11033に記載されるような電離放射線、核酸電荷中和または細胞膜との融合)。さらなるアプローチは、Philip(1994)Mol Cell Biol 14:2411-2418およびWoffendin(1994)Proc Natl Acad Sci 91:1581-1585に記載される。

#### 【0162】

粒子媒介遺伝子送達が使用され得る(例えば、米国特許出願60/023,867号を参考のこと)。手短には、配列を、高レベル発現のための従来の制御配列を含む従来のベクターに挿入し得、次いで細胞標的化リガンド(例えば、アシアロオロソムコイド(WuおよびWu(1987)J. Biol. Chem. 262:4429-4432に記載されるような)、Hucke(1990)Biochem Pharmacol 40:253-263に記載されるようなインスリン、Plank(1992)Bioconjugate Chem 3:533-539に記載されるようなガラクトース、ラクトースまたはトランスフェリン)に連結された合成遺伝子送達分子(例えば、ポリリジン、プロタミンおよびアルブミンのような重合DNA結合カチオン)とともにインキュベートされ得る。

#### 【0163】

裸のDNAもまた使用され得る。例示的な裸のDNA導入方法は、WO90/11092および米国特許第5,580,859号に記載される。取り込み効率は、生体分解性のラテックスビーズを用いて改良され得る。DNAコードトラテックスビーズは、ビーズによるエンドサイトシス開始の後に効率よく細胞へと輸送される。この方法は、ビーズを処理して疎水性を高め、それによってエンドソームの破壊および細胞質へのDNAの放出を容易にすることによってさらに改良され得る。

#### 【0164】

遺伝子送達ビヒクルとして作用し得るリポソームは、米国特許第5,422,120号、WO95/13796、WO94/23697、WO91/14445、およびEP524,968に記載される。米国特許出願60/023,867に記載されるように、非ウイルス性送達において、ポリペプチドをコードする核酸配列は、高レベル発現のための従来の制御配列を含む従来のベクターへと挿入され得、次いで細胞標的化リガンド(例えば、アシアロオロソムコイド、インスリン、ガラクトース、ラクトースまたはトランスフェリン)に連結された、重合性DNA結合カチオン(例えば、ポリリジン、プロタミン、およびアルブミン)のような合成遺伝子伝達分子とともにインキュベートされ得る。他の送達系は、種々の組織特異的または普遍的作用性のプロモーターの制御下に遺伝子を含むDNAをカプセル化するためのリポソームの使用を含む。さらに、使用に適切な非ウイルス送達は、機械的送達系(例えば、Woffendinら(1994)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91(24):11581-11585に記載されるアプローチを含む。さらに、コード配列およびそのようなものの発現産物は、光重合化ヒドロゲル物質の沈着を介して送達され得る。コード配列の送達について使用され得る、遺伝子送達のための他の従来の方法は、例えば、手動の遺伝子送達粒子銃(米国特許第5,149,655号に記載されるような)；移入された遺伝子を活性化するための電離放射線の使用(米国特許第5,206,152号およびWO92/11033に記載されるような)を含む。

#### 【0165】

例示的なリポソームおよびポリカチオン性遺伝子送達ビヒクルは、米国特許第5,422,120号および同4,762,915号；WO95/13796；WO94/23697；およびWO91/14445；EP-0524968；およびStryer、Bioc hemistry、236-240頁(1975)、W.H.Freeman、San Francisco；Szoka(1980)Biochem Biophys Acta 600:1；Bayer(1979)Biochem Biophys Acta

10

20

30

40

50

550 : 464 ; Rivnay (1987) Meth Enzymol 149 : 119 ; Wang (1987) Proc Natl Acad Sci 84 : 7851 ; Plant (1989) Anal Biochem 176 : 420 に記載されるものである。

#### 【0166】

ポリヌクレオチド組成物は、治療有効量（この用語は上記に定義されるとおりである）の遺伝子治療ビヒクルを含み得る。本発明の目的のために、有効用量は、投与される個体において、約0.01mg/kg ~ 50mg/kgまたは0.05mg/kg ~ 約10mg/kgのDNA構築物である。

#### 【0167】

（送達方法）

一旦処方されると、本発明のポリヌクレオチド組成物は、（1）被験体に直接；（2）エキソビボで被験体由来の細胞に送達されて；または（3）組換えタンパク質の発現のためにインピトロで、投与され得る。処置される被験体は、哺乳動物または鳥類であり得る。ヒト被験体もまた処置され得る。

#### 【0168】

この組成物の直接送達は、皮下、腹腔内、静脈内、または筋肉内の注射によって、または組織の間質空間への送達のいずれかによって一般的に達成される。この組成物はまた、病巣へ投与され得る。他の投与様式は、経口投与または肺投与、坐剤、および経皮（transdermal）または経皮（transcutaneous）適用（例えば、WO 98/20734を参照のこと）、針、および遺伝子銃またはハイポスプレーを含む。投薬治療は、単回用量スケジュールまたは多数回用量スケジュールであり得る。

#### 【0169】

エキソビボ送達および被験体への形質転換細胞の再移植のための方法は、当該分野で公知であり、そして例えばWO 93/14778に記載されている。エキソビボ適用に有用である細胞の例は、例えば、幹細胞、特に、造血細胞、リンパ細胞、マクロファージ、樹状細胞または腫瘍細胞を含む。

#### 【0170】

一般的に、エキソビボ適用およびインピトロ適用の両方のための核酸の送達は、以下の手順：例えば、デキストラン媒介トランスフェクション、リン酸カルシウム沈降、ポリブレン媒介トランスフェクション、原形質融合、エレクトロポレーション、ポリヌクレオチドのリポソーム内へのカプセル化、およびDNAの核への直接の微量注入（これらはすべて当該分野で周知である）で達成され得る。

#### 【0171】

（ポリヌクレオチドおよびポリペプチドの薬学的組成物）

上記に記載の薬学的に受容可能なキャリアおよび塩に加えて、以下のさらなる薬剤がポリヌクレオチド組成物および/またはポリペプチド組成物とともに使用され得る。

#### 【0172】

（A. ポリペプチド）

1つの例は、限定することなく以下を包含する：アシアロオロソムコイド（ASOR）；トランスフェリン；アシアロ糖タンパク質；抗体；抗体フラグメント；フェリチン；インターロイキン；インターフェロン；顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）；顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）；マクロファージコロニー刺激因子（M-CSF）；幹細胞因子およびエリスロポエチン。ウイルス抗原（例えば、エンベロープタンパク質）もまた、使用され得る。また、他の侵襲性生物由来のタンパク質（例えば、*Plasmodium falciparum*の環境スプロゾイト（circumsporozoite）タンパク質由来の17アミノ酸ペプチド）。

#### 【0173】

（B. ホルモン、ビタミンなど）

包含され得る他の群は、例えば、ホルモン、ステロイド、アンドロゲン、エストロゲン、甲状腺ホルモン、またはビタミン、葉酸である。

10

20

30

40

50

## 【0174】

(C. ポリアルキレン、ポリサッカリドなど)

また、ポリアルキレングリコールが、所望のポリヌクレオチド／ポリペプチドとともに含有され得る。好ましい実施態様において、ポリアルキレングリコールは、ポリエチレングリコールである。さらに、モノサッカリド、ジサッカリド、またはポリサッカリドが含有され得る。この局面の好ましい実施態様において、このポリサッカリドは、デキストランまたはD E A E - デキストランである。また、キトサンおよびポリ(乳酸-コ-グリコリド)。

## 【0175】

(D. 脂質およびリポソーム)

所望のポリヌクレオチド／ポリペプチドはまた、被験体またはそれに由来する細胞への送達の前に、脂質中にカプセル化され得るか、またはリポソーム中にパッケージングされ得る。

## 【0176】

脂質カプセル化は、一般的に、核酸に安定に結合し得るか、または核酸を捕捉もしくは維持し得るリポソームを用いて達成される。縮合ポリヌクレオチドの脂質調製物に対する比は、変動し得るが、一般的に約1:1(mg DNA:マイクロモル脂質)であるか、またはより多くの脂質である。核酸の送達のためのキャリアとしてのリポソーム使用の概説については、HugおよびSleight(1991)Biochim. Biophys. Acta. 1097:1-17; Straubinger(1983)Meth. Enzymol. 101:512-527を参照のこと。

## 【0177】

本発明における使用のためのリポソーム調製物は、カチオン性(正に荷電した)、アニオン性(負に荷電した)および中性の調製物を包含する。カチオン性リポソームは、機能的な形態で、プラスミドDNA(Felgner(1987)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:7413-7416); mRNA(Malone(1989)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:6077-6081; および精製した転写因子(Debs(1990)J. Biol. Chem. 265:10189-10192)の細胞内送達を媒介することが示されている。

## 【0178】

カチオン性リポソームは容易に入手可能である。例えば、N{1-2, 3-ジオレイルオキシ)プロピル}-N,N,N-トリエチルアンモニウム(DOTMA)リポソームは、GIBCO BRL、Grand Island、NYからの商標リポフェクチン(Lipofection)の下で入手可能である(Fegeenr前出もまた参考のこと)。他の市販されているリポソームとしては、トランスフェクテース(transfectace)(DDAB/DOPE)およびDOTAP/DOPE(Boerhinger)が挙げられる。他のカチオン性リポソームは、当該分野で周知の技法を使用して、容易に利用可能な物質から調製され得る。例えば、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)リポソームの合成の記載について、Szoka(1978)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75:4194-4198; WO90/11092を参照のこと。

## 【0179】

同様に、アニオン性リポソームおよび中性リポソームは、例えば、Avanti Polar Lipids(Birmingham, AL)から容易に入手可能であるか、または容易に入手可能な物質を使用してたやすく調製され得る。このような物質には、とりわけ、ホスファチジルコリン、コレステロール、ホスファチジルエタノールアミン、ジオレオイルホスファチジルコリン(DOPC)、ジオレオイルホスファチジルグリセロール(DOPG)、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン(DOPE)が含まれる。これらの物質はまた、適切な比率でDOTMAおよびDOTAPの出発物質と混合され得る。これらの物質を使用してリポソームを作製する方法は、当該分野で周知である。

10

20

30

40

50

## 【0180】

このリポソームは、多重膜のベシクル（M L V）、小さな単一膜ベシクル（S U V）、または大きな単一膜のベシクル（L U V）を含み得る。種々のリポソーム・核酸複合体は、当該分野で公知の方法を使用して調製される。例えば、Straubinger (1983) Meth. Immunol. 101: 512-527; Szoka (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 4194-4198; Papahadjopoulos (1975) Biochim. Biophys. Acta 394: 483; Wilson (1979) Cell 17: 77); Deamer およびBingham (1976) Biochim. Biophys. Acta 443: 629; Ostro (1977) Biochem. Biophys. Res. Commun. 76: 836; Fraley (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 3348; Enoch およびStrittmatter (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 145; Fraley (1980) J. Biol. Chem. (1980) 255: 10431; Szoka およびPapahadopoulos (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 145; ならびにSchaefer-Ridder (1982) Science 215: 166を参照のこと。

## 【0181】

## (E. リポタンパク質)

さらに、リポタンパク質が、送達されるポリヌクレオチド／ポリペプチドとともに含まれ得る。利用されるリポタンパク質の例としては、キロミクロン、HDL、IDL、LDL、およびVLDLが挙げられる。これらのタンパク質の変異体、フラグメント、または融合物もまた、使用され得る。また、天然に存在するリポタンパク質の改変体（例えば、アセチル化されたLDL）が使用され得る。これらのリポタンパク質は、リポタンパク質レセプターを発現する細胞へ、ポリヌクレオチドの送達を標的化し得る。好ましくは、リポタンパク質が、送達されるポリヌクレオチドとともに含まれる場合、他の標的化リガンドはその組成物中には含まれない。

## 【0182】

天然に存在するリポタンパク質は、脂質部分およびタンパク質部分を含む。このタンパク質部分は、アポタンパク質として知られる。現在では、アポタンパク質A、B、C、D、およびEが単離および同定されている。少なくともこれらの2つはいくつかのタンパク質を含み、ローマ数字、A I、A II、A IV；C I、C II、C IIIによって命名されている。

## 【0183】

1つのリポタンパク質は、1を超えるアポタンパク質を含み得る。例えば、天然に存在するキロミクロンはA、B、C、およびEからなり、そして時間が経てばこれらのリポタンパク質はAを欠失し、そしてCおよびEアポタンパク質を獲得する。VLDLは、A、B、C、およびEアポタンパク質を含み、LDLはアポタンパク質Bを含み；そしてHDLはアポタンパク質A、C、およびEを含む。

## 【0184】

これらのアポタンパク質のアミノ酸は公知であり、そして例えば、Breslow (1985) Annu Rev. Biochem 54: 699; Law (1986) Adv. Exp. Med. Biol. 151: 162; Chen (1986) J. Biol. Chem. 261: 12918; Kane (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 2465; Utermann (1984) Hum. Genet. 65: 232に記載されている。

## 【0185】

リポタンパク質は、トリグリセリド、コレステロール（遊離およびエステル）、およびリン脂質を含む、種々の脂質を含む。この脂質の組成は、天然に存在するリポタンパク質において変化する。例えば、キロミクロンは主としてトリグリセリドを含む。天然に存在

10

20

30

40

50

するリポタンパク質の脂質含有物のより詳細な記載は、例えば、M e t h . E n z y m o 1 . 1 2 8 ( 1 9 8 6 ) に見いだされ得る。この脂質の組成は、レセプター結合活性についてアポタンパク質の立体構造において補助するために選択される。脂質組成はまた、ポリヌクレオチド結合分子との疎水性相互作用および会合を容易にするように選択され得る。

#### 【 0 1 8 6 】

天然に存在するリポタンパク質は、例えば、血清から超遠心分離によって単離され得る。そのような方法は、M e t h . E n z y m o l . ( 前出 ) ; P i t a s ( 1 9 8 0 ) J . B i o c h e m . 2 5 3 : 5 4 5 4 - 5 4 6 0 および Ma h e y ( 1 9 7 9 ) J C l i n . I n v e s t 6 4 : 7 4 3 - 7 5 0 に記載される。リポタンパク質はまた、インビトロまたは所望の宿主細胞中のアポタンパク質遺伝子の発現による組換え方法によって產生され得る。例えば、A t k i n s o n ( 1 9 8 6 ) A n n u R e v B i o p h y s C h e m 1 5 : 4 0 3 および R a d d i n g ( 1 9 5 8 ) B i o c h i m B i o p h y s A c t a 3 0 : 4 4 3 を参照のこと。リポタンパク質はまた、B i o m e d i c a l T e c h n i o l o g i e s , I n c . , S t o u g h t o n , M a s s a c h u s e t t s , U S A のような商業的な供給者から購入され得る。さらなるリポタンパク質の記載は、Z u c k e r m a n n ら、P C T / U S 9 7 / 1 4 4 6 5 に見い出され得る。

#### 【 0 1 8 7 】

( F . ポリカチオン性薬剤 )

ポリカチオン性薬剤は、送達される所望のポリヌクレオチド / ポリペプチドを有する組成物中に、リポタンパク質を伴って、またはリポタンパク質を伴わずに含まれ得る。

#### 【 0 1 8 8 】

ポリカチオン性薬剤は、代表的には、生理的に適切な pH において正味の正電荷を示し、そして所望の位置への送達を容易にするための核酸の電荷を中和し得る。これらの薬剤は、インビトロ、エキソビオ、およびインビオ適用のいずれもを有する。ポリカチオン性薬剤は、生きている被験体に、筋肉内、皮下などのいずれかで核酸を送達するために使用され得る。

#### 【 0 1 8 9 】

以下は、ポリカチオン性薬剤としての有用なポリペプチドの例である：ポリリジン、ポリアルギニン、ポリオルニチン、およびプロタミン。他の例は、ヒストン、プロタミン、ヒト血清アルブミン、D N A 結合タンパク質、非ヒストン染色体タンパク質、D N A ウイルス由来のコートタンパク質（例えば、X 1 7 4 ）を含む。転写因子もまた、D N A に結合するドメインを含み、従って核酸縮合薬剤として有用であり得る。手短に言えば、転写因子（例えば、C / C E B P 、c - j u n 、c - f o s 、A P - 1 、A P - 2 、A P - 3 、C P F 、P r o t - 1 、S p - 1 、O c t - 1 、O c t - 2 、C R E P 、およびT F I I D ）は、D N A 配列に結合する塩基性ドメインを含む。

#### 【 0 1 9 0 】

有機ポリカチオン性薬剤は、スペルミン、スペルミジン、およびプトレシン（p u r t r e s c i n e ）を含む。

#### 【 0 1 9 1 】

ポリカチオン性薬剤の大きさおよびその物理的特性は、上記の表から外挿されて、他のポリペプチドポリカチオン性薬剤が構築され得るか、または合成ポリカチオン性薬剤が产生され得る。

#### 【 0 1 9 2 】

有用な合成ポリカチオン性薬剤は、例えば、D E A E - デキストラン、ポリブレンを含む。L i p o f e c t i n <sup>T M</sup> 、および l i p o f e c t A M I N E <sup>T M</sup> は、ポリヌクレオチド / ポリペプチドと組み合わせた場合にポリカチオン性複合体を形成するモノマーである。

#### 【 0 1 9 3 】

( 核酸ハイブリダイゼーション )

10

20

30

40

50

「ハイブリダイゼーション」とは、水素結合による2つの核酸配列の互いの会合をいう。代表的には、1つの配列は、固体支持体に固定され、そして他方は溶液中で遊離している。次いで、2つの配列は、水素結合に好ましい条件下で互いに接触される。この結合に影響を与える因子は以下を含む：溶媒のタイプおよび容量；反応温度；ハイブリダイゼーションの時間；搅拌；液体相の配列の固体支持体への非特異的な付着をブロックする薬剤（Denhardt's試薬またはBLOTT）；配列の濃度；配列の会合の速度を増大させる化合物（硫酸デキストランまたはポリエチレングリコール）の使用；およびハイブリダイゼーション後の洗浄条件のストリングエンシー。Sambrookら（前出）第2巻、第9章、9.47～9.57頁を参照のこと。

## 【0194】

10

「ストリングエンシー」とは、異なる配列よりも、非常に類似する配列の会合に好ましいハイブリダイゼーション反応における条件をいう。例えば、研究中のハイブリッドの計算されたT<sub>m</sub>より約120～200低い温度および塩濃度の組み合わせが選択されるべきである。温度および塩条件はしばしば、フィルターに固定したゲノムDNAのサンプルが目的の配列にハイブリダイズし、次いで異なるストリングエンシーの条件下で洗浄される、予備的な実験において経験的に決定され得る。Sambrookら、9.50頁を参照のこと。

## 【0195】

20

例えば、サザンプロットを行う場合、考慮する変数は、(1)プロットされるDNAの複雑さ、および(2)プローブと検出される配列との間の相同性である。研究されるフラグメント全量は、プラスミドまたはファージ消化物については0.1～1μg、高度に複雑な真核生物ゲノム中の單一コピーの遺伝子については10<sup>-9</sup>～10<sup>-8</sup>gまで、10倍変化し得る。より低い複雑さのポリヌクレオチドについては、実質的により短いプロッティング、ハイブリダイゼーション、および曝露回数、より少量の出発ポリヌクレオチド、およびより低い非活性のプローブが使用され得る。例えば、單一コピーの酵母遺伝子は、1μgの酵母DNAで開始し、2時間プロットし、そして4～8時間10<sup>8</sup>cpm/μgのプローブを用いてハイブリダイズして、わずか1時間の曝露時間を用いて検出され得る。單一コピーの哺乳動物遺伝子について、保存性のアプローチは、10μgのDNAで開始し、一晩プロットし、そして10<sup>8</sup>cpm/μgより多いプローブを用いて10%硫酸デキストランの存在下で一晩ハイブリダイズし、約24時間露光時間を生じる。

30

## 【0196】

いくつかの因子が、プローブと目的のフラグメントとの間のDNA-DNAハイブリッドの融解温度(T<sub>m</sub>)、ならびに、結果として、ハイブリダイゼーションおよび洗浄についての適切な条件に影響を与え得る。多くの場合において、そのプローブはフラグメントに対して100%相同なわけではない。他の共通して直面する変数には、長さ、ハイブリダイズする配列の全G+C含量、ならびにイオン強度およびハイブリダイゼーション緩衝液のホルムアミド含量が含まれる。これらのすべての因子の影響は、一つの式によって近似され得る：

$$T_m = 81 + 16.6 (\log_{10} C_i) + 0.4 \{ (G + C) \% \} - 0.6 (\text{ホルムアミド\%}) - 600 / n - 1.5 (\text{ミスマッチ\%})$$

40

ここでC<sub>i</sub>は、塩濃度(一価イオン)であり、そしてnは塩基対内のハイブリッドの長さである(MeinkothおよびWahl(1984)Anal.Biochem.138:267/284からわずかに改変した)。

## 【0197】

50

ハイブリダイゼーション実験の設計において、核酸ハイブリダイゼーションに影響を与えるいくつかの因子が簡便に変更され得る。ハイブリダイゼーションおよび洗浄の温度ならびに洗浄時の塩濃度を調整するのが最も単純である。ハイブリダイゼーション温度(すなわち、ストリングエンシー)が上昇するにつれて、非相同的な鎖の間で起こるハイブリダイゼーションは起こりにくくなるようであり、結果として、バックグラウンドが減少する。放射標識したプローブが固定化されたフラグメントと完全に相同ではない場合(遺伝

子ファミリーおよび種間のハイブリダイゼーション実験における場合で頻繁であるように）、ハイブリダイゼーション温度は低下されなければならず、そしてバックグラウンドが増大する。洗浄の温度は、類似の様式で、ハイブリダイズするバンドの強度、およびバックグラウンドの程度に影響を与える。洗浄のストリンジエンシーはまた、塩濃度の減少とともに増大する。

#### 【0198】

一般的に、50%ホルミアミドの存在下で都合よいハイブリダイゼーション温度は、標的フラグメントに95%～100%相同であるプローブについて42、90%～95%相同性では37、85%～90%相同性については32である。より低い相同性については、上記の式を用いて、適切にホルムアミド含量が低くされ、そして温度が調整されるべきである。プローブと標的フラグメントとの間の相同性が未知である場合、最も単純なアプローチは、ともにストリンジエントではないハイブリダイゼーション条件および洗浄条件で開始することである。オートラジオグラフィー後に非特異的バンドまたは高いバックグラウンドが観察される場合、フィルターは高ストリンジエンシーで洗浄され得、そして再び露光され得る。露光のために必要な時間がこのアプローチを非実用的にする場合、いくつかのハイブリダイゼーションおよび／または洗浄ストリンジエンシーが並行して試験されるべきである。

10

#### 【0199】

##### (核酸プローブアッセイ)

本発明に従う核酸プローブを利用する、PCR、分枝DNAプローブアッセイ、またはプロッティング技術のような方法は、cDNAまたはmRNAの存在を決定し得る。プローブは、検出されるに十分に安定な、二重鎖または二本鎖複合体を形成し得る場合に、本発明の配列に「ハイブリダイズする」といわれる。

20

#### 【0200】

核酸プローブは、本発明のクラミジアの(Chlamydia)ヌクレオチド配列(センス鎖およびアンチセンス鎖の両方を含む)にハイブリダイズする。多くの異なるヌクレオチド配列がアミノ酸配列をコードするが、ネイティブなクラミジアの配列は、細胞に存在する実際の配列であるので、好ましい。mRNAは、コード配列を表し、従ってプローブはコード配列に相補的であるべきであり、一本鎖cDNAはmRNAに相補的であり、従ってcDNAプローブは非コード配列に相補的であるべきである。

30

#### 【0201】

プローブ配列はクラミジアの配列(またはその相補物)に同一である必要はない。核酸プローブが標的ヌクレオチドと検出され得る二重鎖を形成し得る場合、配列および長さのいくらかの変動は、アッセイの感度の増加をもたらし得る。また、核酸プローブは、形成された二重鎖を安定化するためにさらなるヌクレオチドを含み得る。さらなるクラミジアの配列もまた、形成された二重鎖を検出するための標識としての一助となり得る。例えば、非相補的ヌクレオチド配列が、そのプローブの5'末端に付着され得、ここでそのプローブ配列の残りはクラミジアの配列に相補的である。あるいは、プローブ配列が、クラミジアの配列とハイブリダイズし、そしてそれによって検出され得る二重鎖を形成するためにクラミジアの配列との十分な相補性を有する場合、非相補的塩基またはより長い配列は、プローブ中に分散され得る。

40

#### 【0202】

プローブの正確な長さおよび配列は、ハイブリダイゼーション条件(例えば、温度、塩条件など)に依存する。例えば、診断的適用については、分析物の配列の複雑さに依存して、核酸プローブは、代表的には、少なくとも10～20ヌクレオチド、好ましくは15～25、そしてより好ましくは少なくとも30ヌクレオチド以上を含むが、これよりも短くてもよい。短いプライマーは、一般的には、鉄型との安定なハイブリッド複合体を形成するのにより低い温度を必要とする。

#### 【0203】

プローブは、合成的手順(例えば、Matteucciらのトリエステル法、(J.A.

50

m. Chem. Soc. (1981) 103: 3185)）、またはUrdedら(Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1983) 80: 7461)に従って、または市販の自動オリゴスクレオチド合成機を使用して、產生され得る。

#### 【0204】

プローブの化学的性質は、優先度に従って選択され得る。特定の適用については、DNAまたはRNAが適切である。他の適用については、改変（例えば、ホスホロチオエートまたはメチルホスホネートのようなバックボーンの改変）が組み込まれ得、インビボの半減期を増大させるために使用され得、RNA親和性を変化させ、スクレアーゼ耐性などを増大させるなどを行い（例えば、AgrawalおよびIyer (1995) Curr Opin Biotechnol 6: 12-19; Agrawal (1996) TIBTECH 14: 376-387）；ペプチド核酸のようなアナログもまた使用され得る（例えば、Corey (1997) TIBTECH 15: 224-229; Buchardtら (1993) TIBTECH 11: 384-386を参照のこと）。

#### 【0205】

あるいは、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）は、少量の標的核酸を検出する別の周知の手段である。そのアッセイは、Mullisら（Meth. Enzymol. (1987) 155: 335-350）；米国特許第4,683,195号および同第4,683,202号に記載されている。2つの「プライマー」スクレオチドは、標的核酸とハイブリダイズし、そして反応を開始するために使用される。このプライマーは、増殖標的（またはその相補物）の配列にハイブリダイズしない、二重鎖の安定性を補助するための、または、例えば、首尾よい制限部位を組み込むための配列を含む。代表的には、このような配列は、所望のクラミジアの配列に隣接する。

#### 【0206】

熱安定性のポリメラーゼは、もともとの標的核酸を錆型として使用して、プライマーから標的核酸のコピーを作製する。標的核酸の閾値量がポリメラーゼによって產生された後、それらはより従来的な方法（例えば、サザンプロット）によって検出され得る。サザンプロット法を使用する場合、標識されたプローブは、クラミジアの配列（またはその相補物）にハイブリダイズする。

#### 【0207】

また、mRNAまたはcDNAは、Sambrookら（前出）に記載される、従来的なプロッティング技術によって検出され得る。mRNA、またはmRNAからポリメラーゼ酵素を使用して生成されたcDNAは、ゲル電気泳動を使用して精製および分離され得る。次いで、ゲル上のこの核酸は、ニトロセルロースのような固体支持体にプロットされる。この固体支持体は、標識されたプローブに曝露され、次いですべてのハイブリダイズしていないプローブを洗浄して除去する。次に、標識プローブを含む二重鎖を検出する。代表的には、そのプローブは、放射活性部分で標識される。

#### 【0208】

ウエスタンプロットのために、2つのサンプルを各タンパク質について試験した。対の左側のレーンは、前免疫血清で染色した膜ストリップを使用し、一方、右側のレーンは、免疫血清で染色した膜ストリップを使用した。図1～5、35B、37B、38Bおよび39のウエスタンプロットにおいて、マーカーは、66kDa、45kDa、30kDa、20.1kDaおよび14.4kDaにある。図6～16、20B、23C、24D、27E、38A、40、41、42および43のウエスタンプロットにおいて、マーカーは、172.6kDa、111.4kDa、79.6kDa、61.3kDa、49.0kDa、36.4kDa、24.7kDa、19.2kDaおよび13.1kDaにある。

#### 【0209】

図1～5のウエスタンプロットにおいて、レーン2および3は、GST融合コントロール抗原に対して惹起されたコントロール血清を示す。図1～5のウエスタンプロットにおいて、レーン4および5は、Hisタグ化コントロール抗原に対して惹起されたコントロ

10

20

30

40

50

ール血清を含む。

【0210】

低分子量マーカーは、精製ゲルのレーン1で泳動される。

【0211】

(発明を実施するための様式)

表Iは、参考文献18由来の*C. pneumoniae*タンパク質の名称、このタンパク質についてのGenBank登録番号および表題、本発明の対応する*C. trachomatis*タンパク質についてのGenBank登録番号および表題、ならびにこれらの*C. trachomatis*タンパク質についての配列番号(配列番号1~262、奇数はアミノ酸配列であり、そして偶数はヌクレオチド配列である)を与える。これらは、対応する*C. pneumoniae*タンパク質について参考文献18に記載されたのと同じ方法で、発現および使用され得る。*C. trachomatis*タンパク質は、診断目的および免疫原性目的のために有用である。これらの特性は、配列のみからでは明らかでない。

10

【0212】

種々の試験を使用して、本発明のタンパク質のインビボでの免疫原性を評価し得る。例えば、これらのタンパク質は、組換え的に発現され得、そしてイムノプロットによって患者の血清をスクリーニングするために使用され得る。タンパク質と患者の血清との間のポジティブ反応は、この患者が、問題のタンパク質に対する免疫応答を以前に生じていたことを示す(すなわち、このタンパク質は、免疫原である)。この方法はまた、免疫優性タンパク質を同定するためにも使用され得る。

20

【0213】

この組換えタンパク質はまた、例えば、マウスにおいて、抗体を調製するために簡便に使用され得る。これらは、(例えば、インタクトなクラミジアに対するウエスタンプロットにおいてこれらの抗体を使用することによって)タンパク質が*C. trachomatis*の細胞表面上に位置することを直接確認するために使用され得る。標識された抗体(例えば、FACSのための蛍光標識)は、インタクトな細菌と共にインキュベートされ得、そしてこの細菌表面上の標識の存在が、タンパク質の位置を確認する。FACSの図は、アッセイにおいて使用される*Chlamydia*調製物の散乱プロファイル、組換え抗原に対する抗体が、*Chlamydia*細胞に結合する場合に得られるピークシフト(白抜き領域=コントロールサンプル;塗りつぶした領域=抗体と反応したサンプル)、定量的Kolmogorov-Smirnov(K-S)統計分析、およびFACS分析ソフトウェアの出力を示す。

30

【実施例】

【0214】

(実施例1)

CT242(配列番号57および配列番号58)は、*E. coli*中で発現された。この組換え産物は、GST融合タンパク質(図1A;レーン4および5、クロマトグラフィー画分1および2、予測された分子量42.4kDa)として、およびHisタグ化融合タンパク質(図1B;レーン2~4、クロマトグラフィー画分1、2および3、予測された分子量16.4kDa)としての両方で精製された。

40

【0215】

この組換えタンパク質を、マウスを免疫化するために使用し、このマウスの血清を、ウエスタンプロットで使用した(図1C: Hisタグ化: レーン12および13; GST融合: レーン20および21)。レーン12は、Hisタグ化CT242についての、前免疫血清で染色した膜ストリップを示し、一方、レーン13は、Hisタグ化CT242についての、免疫血清で染色した膜ストリップを示す。レーン20は、GST融合CT242についての前免疫血清で染色した膜ストリップを示し、レーン21は、GST融合CT242についての免疫血清で染色した膜ストリップを示す。

【0216】

50

これらの実験は、C T 2 4 2 が表面曝露されておりかつ免疫アクセス可能 (immunorecognizable) なタンパク質であること、およびこのC T 2 4 2 が有用な免疫原であることを示す。これらの特性は、配列単独では明らかでない。

#### 【0217】

(実施例2)

C T 0 4 5 (配列番号71および配列番号72) は、E.coli 中で発現された。この組換え産物は、Hisタグ化融合タンパク質 (図2A; レーン4~6、クロマトグラフィー画分1、2および3、予測された分子量55.8kDa) として精製された。この組換えタンパク質を、マウスを免疫化するために使用し、この血清を、ウエスタンプロット (図2B: レーン8および9) およびFACS分析 (図2C、K-S値16.81) のために使用した。

10

#### 【0218】

これらの実験は、C T 0 4 5 が表面曝露されておりかつ免疫アクセス可能なタンパク質であること、およびこのC T 0 4 5 が有用な免疫原であることを示す。これらの特性は、配列単独では明らかでない。

#### 【0219】

(実施例3)

C T 3 8 1 (配列番号105および配列番号106) は、E.coli 中で発現された。この組換え産物は、GST融合タンパク質 (図3A; レーン2および3、クロマトグラフィー画分1および2、予測された分子量52.7kDa) およびHisタグ化融合タンパク質 (図3A; レーン7~9、クロマトグラフィー画分1、2および3、予測された分子量26.7kDa) として精製された。この組換えタンパク質を、マウスを免疫化するために使用し、この血清を、ウエスタンプロット (図3B: Hisタグ化: レーン6および7; GST融合: レーン16および17) およびFACS分析 (図3C、GSTタグ化、K-S値35.98; 図3D: Hisタグ化、K-S値32.54) のために使用した。

20

#### 【0220】

これらの実験は、C T 3 8 1 が表面曝露されておりかつ免疫アクセス可能なタンパク質であること、およびこのC T 3 8 1 が有用な免疫原であることを示す。これらの特性は、配列単独では明らかでない。

30

#### 【0221】

(実施例4)

C T 3 9 6 (配列番号107および配列番号108) は、E.coli 中で発現された。この組換え産物は、GST融合タンパク質 (図4A; レーン6および7、クロマトグラフィー画分1および2、予測された分子量99.5kDa) およびHisタグ化融合タンパク質 (図4B; レーン5~7、クロマトグラフィー画分1、2および3、予測された分子量73.5kDa) として精製された。この組換えHisタグ化タンパク質を、マウスを免疫化するために使用し、この血清を、ウエスタンプロット (図4C: レーン14および15) に使用した。この組換えHisタグ化タンパク質および組換えGST融合タンパク質をまた、FACS分析 (図4D: Hisタグ化、K-S値34.50; 図4E: GST融合、K-S値32.76) のために使用した。

40

#### 【0222】

これらの実験は、C T 3 9 6 が表面曝露されておりかつ免疫アクセス可能なタンパク質であること、およびこのC T 3 9 6 が有用な免疫原であることを示す。これらの特性は、配列単独では明らかでない。

#### 【0223】

(実施例5)

C T 3 9 8 (配列番号111および配列番号112) は、E.coli 中で発現された。この組換え産物は、GST融合タンパク質 (図5A; レーン8および9、クロマトグラフィー画分1および2、予測された分子量54.8kDa) およびHisタグ化融合タン

50

パク質（図 5 B；レーン 8 ~ 10、クロマトグラフィー画分 1、2 および 3、予測された分子量 28.8 kDa）として精製された。この組換えタンパク質を、マウスを免疫化するために使用し、この血清を、ウエスタンプロット（図 5 C：His タグ化：レーン 10 および 11；GST 融合：レーン 18 および 19）および FACS 分析（図 5 D：GST 融合、K-S 値 31.24；図 5 E：His タグ化、K-S 値 26.10）のために使用した。

#### 【0224】

これらの実験は、CT398 が表面曝露されておりかつ免疫アクセス可能なタンパク質であること、およびこの CT398 が有用な免疫原であることを示す。これらの特性は、配列単独では明らかでない。

10

#### 【0225】

##### （実施例 6）

CT089（配列番号 61 および 配列番号 62）は、E.coli 中で発現された。この組換え産物は、GST 融合タンパク質（図 6 C；レーン 2、クロマトグラフィー画分 1、予測された分子量 70.8 kDa）および His タグ化融合タンパク質（図 6 C；レーン 3、4 および 5、クロマトグラフィー画分 1、2 および 3、予測された分子量 44.8 kDa）として精製された。この組換えタンパク質を、マウスを免疫化するために使用し、この血清を、ウエスタンプロット（図 6 A：GST 融合：レーン 14 および 15；His タグ化：レーン 16 および 17）および FACS 分析（図 6 B：His タグ化、K-S 値 26.59）のために使用した。

20

#### 【0226】

これらの実験は、CT089 が表面曝露されておりかつ免疫アクセス可能なタンパク質であること、およびこの CT089 が有用な免疫原であることを示す。これらの特性は、配列単独では明らかでない。

#### 【0227】

##### （実施例 7）

CT443（配列番号 125 および 配列番号 126）は、E.coli 中で発現された。この組換え産物は、His タグ化融合タンパク質として精製された。この組換えタンパク質を、マウスを免疫化するために使用し、この血清を、ウエスタンプロット（図 7 A：レーン 10 および 11）および FACS 分析（図 7 B：K-S 値 21.28）のために使用した。

30

#### 【0228】

これらの実験は、CT443 が表面曝露されておりかつ免疫アクセス可能なタンパク質であること、およびこの CT443 が有用な免疫原であることを示す。これらの特性は、配列単独では明らかでない。

#### 【0229】

##### （実施例 8）

CT541（配列番号 149 および 配列番号 150）を、E.coli において発現させた。この組換え産物を、GST 融合タンパク質として精製した（図 8 C：レーン 2 および 3、クロマトグラフィー画分 1 および 2、予測分子量 51.6 kDa）。この組換えタンパク質を使用してマウスを免疫し、このマウスの血清を、ウエスタンプロット（図 8 A：レーン 6 および 7）ならびに FACS 分析（図 8 B：K-S 値 9.94）のために使用した。

40

#### 【0230】

これらの実験は、CT541 が、表面に露出された免疫アクセス可能なタンパク質であり、そして有用な免疫原であることを示す。これらの特性は、配列単独からは明らかではない。

#### 【0231】

##### （実施例 9）

CT547（配列番号 151 および 配列番号 152）を、E.coli において発現さ

50

せた。この組換え産物を、GST融合タンパク質（図9D：レーン4および5、クロマトグラフィー画分1および2、予測分子量58.3kDa）およびHisタグ化融合タンパク質の両方として精製した。この組換えタンパク質を使用してマウスを免疫し、このマウスの血清を、ウェスタンプロット（図9A：Hisタグ化：レーン20および21）ならびにFACS分析（図9B：GST融合：K-S値14.60および15.57；図9C：Hisタグ化：K-S値28.21）のために使用した。

#### 【0232】

これらの実験は、CT547が、表面に露出された免疫アクセス可能なタンパク質であり、そして有用な免疫原であることを示す。これらの特性は、配列単独からは明らかではない。

10

#### 【0233】

##### （実施例10）

CT587（配列番号189および配列番号190）を、E.coliにおいて発現させた。この組換え産物を、Hisタグ化融合タンパク質として精製した（図10C：レーン5、6および7、クロマトグラフィー画分1、2および3、予測分子量47.5kDa）。この組換えタンパク質を使用してマウスを免疫し、このマウスの血清を、ウェスタンプロット（図10A：レーン12および13）ならびにFACS分析（図10B：Hisタグ化：K-S値20.85）のために使用した。

#### 【0234】

これらの実験は、CT587が、表面に露出された免疫アクセス可能なタンパク質であり、そして有用な免疫原であることを示す。これらの特性は、配列単独からは明らかではない。

20

#### 【0235】

##### （実施例11）

CT266（配列番号77および配列番号78）を、E.coliにおいて発現させた。この組換え産物を、Hisタグ化融合タンパク質として精製した（図11C：レーン11および12、クロマトグラフィー画分1および2、予測分子量44.1kDa）。この組換えタンパク質を使用してマウスを免疫し、このマウスの血清を、ウェスタンプロット（図11A：レーン4および5）ならびにFACS分析（図11B：K-S値21.29）のために使用した。

30

#### 【0236】

これらの実験は、CT266が、表面に露出された免疫アクセス可能なタンパク質であり、そして有用な免疫原であることを示す。これらの特性は、配列単独からは明らかではない。

#### 【0237】

##### （実施例12）

CT444（配列番号127および配列番号128）を、E.coliにおいて発現させた。この組換え産物を、GST融合タンパク質（図12B：レーン2および3、クロマトグラフィー画分1および2、予測分子量87.3kDa）およびHisタグ化融合タンパク質（図12C：レーン3および4、クロマトグラフィー画分2および3、予測分子量9.0kDa）として精製した。この組換えタンパク質を使用してマウスを免疫し、このマウスの血清を、ウェスタンプロット（図12A：レーン16および17）ならびにFACS分析（図12D：GST融合：K-S値14.98；図12E：Hisタグ化：K-S値13.28）のために使用した。

40

#### 【0238】

これらの実験は、CT444が、表面に露出された免疫アクセス可能なタンパク質であり、そして有用な免疫原であることを示す。これらの特性は、配列単独からは明らかではない。

#### 【0239】

##### （実施例13）

50

C T 5 5 9 (配列番号 1 9 9 および配列番号 2 0 0) を、E . c o l i において発現させた。この組換え産物を、H i s タグ化タンパク質として精製した(図 1 3 C : レーン 2 、3 および 4 、クロマトグラフィー画分 1 、2 および 3 、予測分子量 3 4 . 9 k D a )。この組換えタンパク質を使用してマウスを免疫し、このマウスの血清を、ウェスタンプロット(図 1 3 A : レーン 6 および 7 )ならびに F A C S 分析(図 1 3 B : K - S 値 2 3 . 2 1 )のために使用した。

#### 【 0 2 4 0 】

これらの実験は、C T 5 5 9 が、表面に露出された免疫アクセス可能なタンパク質であり、そして有用な免疫原であることを示す。これらの特性は、配列単独からは明らかではない。

10

#### 【 0 2 4 1 】

##### ( 実施例 1 4 )

C T 6 8 1 (配列番号 1 5 5 および配列番号 1 5 6 ) を、E . c o l i において発現させた。この組換え産物を、H i s タグ化融合タンパク質として精製した(図 1 4 C : レーン 5 および 6 、クロマトグラフィー画分 1 および 2 、予測分子量 4 1 . 8 k D a )。この組換えタンパク質を使用してマウスを免疫し、このマウスの血清を、ウェスタンプロット(図 1 4 A : レーン 1 0 および 1 1 )ならびに F A C S 分析(図 1 4 B : K - S 値 3 4 . 6 6 )のために使用した。

#### 【 0 2 4 2 】

これらの実験は、C T 6 8 1 が、表面に露出された免疫アクセス可能なタンパク質であり、そして有用な免疫原であることを示す。これらの特性は、配列単独からは明らかではない。

20

#### 【 0 2 4 3 】

##### ( 実施例 1 5 )

C T 7 1 3 (配列番号 2 0 1 および配列番号 2 0 2 ) を、E . c o l i において発現させた。この組換え産物を、H i s タグ化融合タンパク質として精製した(図 1 5 B : レーン 4 、5 および 6 、クロマトグラフィー画分 1 、2 および 3 、予測分子量 3 5 . 4 k D a )。この組換えタンパク質を使用してマウスを免疫し、このマウスの血清を、ウェスタンプロット(図 1 5 A : レーン 1 2 および 1 3 )ならびに F A C S 分析(図 1 5 C : K - S 値 2 5 . 8 2 )のために使用した。

30

#### 【 0 2 4 4 】

これらの実験は、C T 7 1 3 が、表面に露出された免疫アクセス可能なタンパク質であり、そして有用な免疫原であることを示す。これらの特性は、配列単独からは明らかではない。

#### 【 0 2 4 5 】

##### ( 実施例 1 6 )

C T 8 2 3 (配列番号 2 2 9 および配列番号 2 3 0 ) を、E . c o l i において発現させた。この組換え産物を、H i s タグ化融合タンパク質として精製した(図 1 6 C : レーン 7 、8 および 9 、クロマトグラフィー画分 1 、2 および 3 、予測分子量 5 3 . 9 k D a )。この組換えタンパク質を使用してマウスを免疫し、このマウスの血清を、ウェスタンプロット(図 1 6 A : レーン 1 4 および 1 5 )ならびに F A C S 分析(図 1 6 B : K - S 値 2 6 . 6 2 )のために使用した。

40

#### 【 0 2 4 6 】

これらの実験は、C T 8 2 3 が、表面に露出された免疫アクセス可能なタンパク質であり、そして有用な免疫原であることを示す。これらの特性は、配列単独からは明らかではない。

#### 【 0 2 4 7 】

##### ( 実施例 1 7 )

C T 1 1 4 (配列番号 2 4 3 および配列番号 2 4 4 ) を、E . c o l i において発現させた。この組換え産物を、H i s タグ化融合タンパク質として精製した(図 1 7 : レーン

50

6および7、クロマトグラフィー画分1および2、予測分子量48.5kDa)。

**【0248】**

(実施例18)

CT198(配列番号43および配列番号44)を、E.coliにおいて発現させた。この組換え産物を、Hisタグ化融合タンパク質として精製した(図18A:レーン6、クロマトグラフィー画分1、予測分子量56.3kDa)。このHisタグ化組換えタンパク質を使用してマウスを免疫し、このマウスの血清を、FACS分析のために使用した(図18B)。

**【0249】**

これらの実験は、CT198がEB異種集団のほんの一部において存在することを示す(クラミジア調製物が通常そうであるように)。これが存在する場合、これは、表面に露出された免疫アクセス可能なタンパク質である。これらの特性は、配列単独からは明らかではない。

**【0250】**

(実施例19)

CT241(配列番号55および配列番号56)を、E.coliにおいて発現させた。この組換え産物を、Hisタグ化融合タンパク質として精製した(図19:レーン4、クロマトグラフィー画分3、予測分子量85.3kDa)。

**【0251】**

(実施例20)

CT350(配列番号27および配列番号28)を、E.coliにおいて発現させた。この組換え産物を、Hisタグ化融合タンパク質(図20A:レーン2、3および4、クロマトグラフィー画分1、2および3、予測分子量61.3kDa)およびGST融合タンパク質(図20A:レーン7、8および9、クロマトグラフィー画分1、2および3、予測分子量87.3kDa)の両方として精製した。これらの組換えタンパク質を使用してマウスを免疫し、このマウスの血清を、ウェスタンプロット(図20B:Hisタグ化:レーン4および5;GSTタグ化:レーン8および9)のために使用した。

**【0252】**

(実施例21)

CT351(配列番号25および配列番号26)を、E.coliにおいて発現させた。この組換え産物を、Hisタグ化融合タンパク質(図21:レーン2および3、クロマトグラフィー画分1および2、推定分子量76.1kDa)として精製した。

**【0253】**

(実施例22)

CT391(配列番号251および配列番号252)を、E.coliにおいて発現させた。この組換え産物を、Hisタグ化融合タンパク質(図22:レーン8および9、クロマトグラフィー画分1および2、推定分子量32.6kDa)として精製した。

**【0254】**

(実施例23)

CT077(配列番号65および配列番号66)を、E.coliにおいて発現させた。この組換え産物を、GSTタグ化融合タンパク質(図23:レーン2および3、クロマトグラフィー画分1および2、推定分子量59.7kDa)、およびHisタグ化融合タンパク質として精製した。この組換えタンパク質を使用して、マウスを免疫し、このマウスの血清を、ウェスタンプロット(図23C:レーン6および7)、およびFACS分析(図23B、Hisタグ化:K-S値9.17)のために使用した。

**【0255】**

これらの実験は、CT077が、表面露出された免疫接近可能なタンパク質であること、およびこのCT077が有用な免疫原であることを示す。これらの特性は、配列のみからは示されない。

**【0256】**

10

20

30

40

50

(実施例 24)

C T 1 8 1 (配列番号 2 4 5 および配列番号 2 4 6) を、E . c o l iにおいて発現させた。この組換え産物を、G S T タグ化融合タンパク質(図 2 4 A : レーン 4、クロマトグラフィー画分 1、推定分子量 5 0 . 1 k D a )、およびH i s タグ化融合タンパク質(図 2 4 B : レーン 2、3 および 4、クロマトグラフィー画分 1、2 および 3、推定分子量 3 2 . 0 k D a )の両方として精製した。このG S T タグ化組換えタンパク質を使用して、マウスを免疫し、このマウスの血清を、ウエスタンプロット(図 2 4 D : レーン 4 および 5 (矢印で示される))、およびF A C S 分析(図 2 4 C、K - S 値 7 . 6 2 )のために使用した。

【0 2 5 7】

これらの実験は、C T 1 8 1 が、表面露出された免疫接近可能なタンパク質であること、およびこのC T 1 8 1 が有用な免疫原であることを示す。これらの特性は、配列のみからは示されない。

【0 2 5 8】

(実施例 25)

C T 5 8 9 (配列番号 1 8 5 および配列番号 1 8 6) を、E . c o l iにおいて発現させた。この組換え産物を、G S T タグ化融合タンパク質(図 2 5 A : レーン 4 および 5、クロマトグラフィー画分 1 および 2、推定分子量 8 9 . 4 k D a )、およびH i s タグ化融合タンパク質(図 2 5 B : レーン 2 および 3、クロマトグラフィー画分 1 および 2、推定分子量 6 3 . 4 k D a )の両方として精製した。このH i s タグ化組換えタンパク質を使用して、マウスを免疫し、このマウスの血清を、F A C S 分析(図 2 5 C )のために使用した。

【0 2 5 9】

これらの実験は、C T 5 8 9 が、E B 異種集団の一部のみにしか存在しないことを示す(クラミジア調製物が通常そうであるように)このC T 5 8 9 が存在する場合、このC T 5 8 9 は、表面露出された免疫接近可能なタンパク質である。これらの特性は、配列のみからは示されない。

【0 2 6 0】

(実施例 26)

C T 5 9 7 (配列番号 1 7 9 および配列番号 1 8 0) を、E . c o l iにおいて発現させた。この組換え産物を、G S T タグ化融合タンパク質(図 2 6 A : レーン 5 および 6、クロマトグラフィー画分 1 および 2、推定分子量 3 6 . 0 k D a )、およびH i s タグ化融合タンパク質(図 2 6 B : レーン 2、3 および 4、クロマトグラフィー画分 1、2 および 3、推定分子量 1 0 . 3 k D a )の両方として精製した。

【0 2 6 1】

(実施例 27)

C T 6 2 3 (配列番号 1 6 3 および配列番号 1 6 4) を、E . c o l iにおいて発現させた。この組換え産物を、G S T タグ化融合タンパク質(図 2 7 A : レーン 3 および 4、クロマトグラフィー画分 1 および 2、推定分子量 7 1 . 8 k D a )、およびH i s タグ化融合タンパク質(図 2 7 B : レーン 2、3 および 4、クロマトグラフィー画分 1、2 および 3、推定分子量 4 5 . 8 k D a )の両方として精製した。この組換えタンパク質を使用して、マウスを免疫し、このマウスの血清を、ウエスタンプロット(図 2 7 E : G S T タグ化、レーン 4 (矢印で示される) ; H i s タグ化、レーン 1 3 (矢印で示される) )、およびF A C S 分析(図 2 7 C : G S T タグ化 : K - S 値 1 5 . 8 9 ; 図 2 7 D : H i s タグ化 : K - S 値 2 0 . 2 7 )のために使用した。

【0 2 6 2】

これらの実験は、C T 6 2 3 が、表面露出された免疫接近可能なタンパク質であること、およびこのC T 6 2 3 が有用な免疫原であることを示す。これらの特性は、配列のみからは示されない。

【0 2 6 3】

10

20

30

40

50

## (実施例 28)

C T 7 0 0 (配列番号 2 6 1 および配列番号 2 6 2) を、E . c o l i において発現させた。この組換え産物を、G S T タグ化融合タンパク質 (図 2 8 A : レーン 5、6 および 7、クロマトグラフィー画分 1、2 および 3、推定分子量 7 3 . 7 k D a) として精製した。この組換えタンパク質を使用して、マウスを免疫し、このマウスの血清を、F A C S 分析 (図 2 8 B : K - S 値 8 . 7 2) のために使用した。

## 【0 2 6 4】

これらの実験は、C T 7 0 0 が、表面露出された免疫接近可能なタンパク質であること、およびこのC T 7 0 0 が有用な免疫原であることを示す。これらの特性は、配列のみからは示されない。

## 【0 2 6 5】

## (実施例 29)

C T 7 6 1 (配列番号 2 1 7 および配列番号 2 1 8) を、E . c o l i において発現させた。この組換え産物を、G S T タグ化融合タンパク質 (図 2 9 A : レーン 6 および 7、クロマトグラフィー画分 1 および 2、推定分子量 6 3 . 9 k D a) として精製した。この組換えタンパク質を使用して、マウスを免疫し、このマウスの血清を、F A C S 分析 (図 2 9 B : K - S 値 1 1 . 4 5) のために使用した。

## 【0 2 6 6】

これらの実験は、C T 7 6 1 が、表面露出された免疫接近可能なタンパク質であること、およびこのC T 7 6 1 が有用な免疫原であることを示す。これらの特性は、配列のみからは示されない。

## 【0 2 6 7】

## (実施例 30)

C T 4 1 5 (配列番号 1 1 7 および配列番号 1 1 8) を、E . c o l i において発現させた。この組換え産物を、G S T タグ化融合タンパク質 (図 3 0 : レーン 3 および 4、クロマトグラフィー画分 1 および 2、推定分子量 5 5 . 4 k D a) として精製した。

## 【0 2 6 8】

## (実施例 31)

C T 4 5 4 (配列番号 2 5 3 および配列番号 2 5 4) を、E . c o l i において発現させた。この組換え産物を、H i s タグ化融合タンパク質 (図 3 1 : レーン 2 および 3、クロマトグラフィー画分 1 および 2、推定分子量 5 6 . 2 k D a) として精製した。

## 【0 2 6 9】

## (実施例 32)

C T 4 6 7 (配列番号 1 2 9 および配列番号 1 3 0) を、E . c o l i において発現させた。この組換え産物を、G S T タグ化融合タンパク質 (図 3 2 : レーン 3 および 4、クロマトグラフィー画分 1 および 2、推定分子量 6 5 . 6 k D a) として精製した。

## 【0 2 7 0】

## (実施例 33)

C T 5 5 1 (配列番号 2 5 7 および配列番号 2 5 8) を、E . c o l i において発現させた。この組換え産物を、H i s タグ化融合タンパク質 (図 3 3 A : レーン 5、6 および 7、クロマトグラフィー画分 1、2 および 3、推定分子量 3 4 . 1 k D a)、および G S T タグ化融合タンパク質 (図 3 3 B : レーン 4 および 5、クロマトグラフィー画分 1 および 2、推定分子量 6 0 . 1 k D a) の両方として精製した。

## 【0 2 7 1】

## (実施例 34)

C T 5 6 7 (配列番号 1 9 5 および配列番号 1 9 6) を、E . c o l i において発現させた。この組換え産物を、G S T タグ化融合タンパク質 (図 3 4 A : レーン 8 および 9、クロマトグラフィー画分 1 および 2、推定分子量 4 4 . 0 k D a)、および H i s タグ化融合タンパク質 (図 3 4 B : レーン 7 および 8、クロマトグラフィー画分 1 および 2、推定分子量 1 8 . 3 k D a) の両方として精製した。

10

20

30

40

50

## 【0272】

## (実施例35)

C T 5 6 9 (配列番号193および配列番号194)を、E. coliにおいて発現させた。この組換え産物を、H i sタグ化融合タンパク質(図35A:レーン2、3および4、クロマトグラフィー画分1、2および3、推定分子量11.2kDa)として精製した。この組換えタンパク質を使用して、マウスを免疫し、このマウスの血清を、ウエスタンプロット(図35B:レーン8および9、矢印で示される)で使用した。

## 【0273】

## (実施例36)

C T 6 4 7 (配列番号169および配列番号170)を、E. coliにおいて発現させた。この組換え産物を、G S Tタグ化融合タンパク質(図36:レーン6および7、クロマトグラフィー画分1および2、推定分子量45.7kDa)として精製した。

10

## 【0274】

## (実施例37)

C T 6 0 0 (配列番号173および配列番号174)を、E. coliにおいて発現させた。この組換え産物を、H i sタグ化融合タンパク質(図37A:レーン5、6および7、クロマトグラフィー画分1、2および3、推定分子量19.5kDa)として精製した。この組換え産物を使用して、マウスを免疫し、このマウスの血清を、ウエスタンプロット(図37B:レーン10および11、矢印で示される)、およびF A C S分析(図37C、K-S値10.46)のために使用した。

20

## 【0275】

これらの実験は、C T 6 0 0 が、表面露出された免疫接近可能なタンパク質であること、およびこのC T 6 0 0 が有用な免疫原であることを示す。これらの特性は、配列のみからは示されない。

## 【0276】

## (実施例38)

C T 2 7 9 (配列番号247および配列番号248)を、E. coliにおいて発現させた。この組換え産物を、G S Tタグ化融合タンパク質、H i sタグ化融合タンパク質として精製した。これらの組換えH i sタグ化タンパク質および組換えG S Tタグ化タンパク質を使用して、マウスを免疫し、このマウスの血清を、ウエスタンプロット(図38A:H i sタグ化:レーン5(矢印で示される);図38B:G S Tタグ化:レーン12および13(矢印で示される))において使用した。

30

## 【0277】

## (実施例39)

C T 5 6 0 (配列番号259および配列番号260)を、E. coliにおいて発現させた。この組換え産物を、H i sタグ化融合タンパク質として精製した。この組換えH i sタグ化タンパク質を使用して、マウスを免疫し、このマウスの血清を、ウエスタンプロット(図39:レーン6および7(矢印で示される))において使用した。

## 【0278】

## (実施例40)

C T 3 8 9 (配列番号249および配列番号250)を、E. coliにおいて発現させた。この組換え産物を、G S Tタグ化融合タンパク質として精製した。この組換えタンパク質を使用して、マウスを免疫し、このマウスの血清を、ウエスタンプロット(図40:レーン16および17(矢印で示される))において使用した。

40

## 【0279】

## (実施例41)

C T 4 5 6 (配列番号255および配列番号256)を、E. coliにおいて発現させた。この組換え産物を、G S Tタグ化融合タンパク質として精製した。この組換えタンパク質を使用して、マウスを免疫し、このマウスの血清を、ウエスタンプロット(図41:レーン2および3(矢印で示される))において使用した。

50

## 【0280】

(実施例42)

C T 6 2 2 (配列番号 1 6 1 および配列番号 1 6 2 )を、E . c o l iにおいて発現させた。この組換え産物を、H i s タグ化融合タンパク質として精製した。この組換えタンパク質を使用して、マウスを免疫し、このマウスの血清を、ウエスタンプロット (図42 : レーン9 (矢印で示される) )において使用した。

## 【0281】

(実施例43)

C T 7 5 9 (配列番号 2 1 3 および配列番号 2 1 4 )を、E . c o l iにおいて発現させた。この組換え産物を、H i s タグ化融合タンパク質として精製した。この組換えタンパク質を使用して、マウスを免疫し、このマウスの血清を、ウエスタンプロット (図43 : レーン8および9 (矢印で示される) )において使用した。

10

## 【0282】

(実施例44)

インビトロ中和アッセイは、培養物中の真核細胞に対するC . t r a c h o m a t i s 感染性を阻害するために、本発明の種々の組換えタンパク質で免疫されたマウスから得られた血清の能力を示し、このアッセイを、L L C M K 2 (アカゲザル腎臓内皮)細胞を使用して実施した。マウスポリクローナル血清の連続4倍希釈を、S P (スクロース-リン酸)緩衝液中に調製した。全E Bに対するマウス抗血清を、ポジティブコントロールとして使用し、前免疫血清およびS P 緩衝液のみを、ネガティブコントロールとして使用した。C . t r a c h o m a t i s (血液型亜型D)から精製されたE Bを、S P 緩衝液中に希釈し、 $3 \times 10^5$  I F U / m lを含むようにし、この懸濁液の $10 \mu l$ を、最終容量 $100 \mu l$ で各血清希釈液に添加した。抗体E B相互作用が、37℃で30分間進行するようにした。次いで、各サンプルからの $100 \mu l$ の反応混合液を、96ウェルマイクロタイタープレート中のP B S洗浄L L C M K 2細胞単層の上に添加し、 $805 \times g$ で37℃で1時間遠心分離した。全ての血清およびコントロールを、2連のサンプルで試験した。過剰の接種物の除去後、細胞を、P B Sで一度 rinsed し、20% F C Sおよび $1 \mu g$ シクロヘキシミドを補充した $200 \mu l$ のD M E M 培地を補充し、そして37℃で48時間インキュベートした。細胞をメタノールで固定し、進行性細胞内クラミジア感染によって生成された代表的な細胞質封入物を、抗クラミジアフルオレセイン結合モノクローナル抗体 (M e r i d i a n D i a g n o s t i c s )で染色した。宿主細胞に対する十分な希釈およびE B比において、観察された封入物の数を、宿主細胞感染を最初に首尾よく確立し得た生存クラミジアの数に等しいと考えられる(これらは、I n c l u s i o n F o r m i n g U n i t s , I F Uと名づけられる)。フルオレセイン標識封入物を、 $40 \times$ の倍率で1ウェル当たり4つの顕微鏡視野において計数した。抗体相互作用に起因する感染性の阻害を、S P コントロール(緩衝液のみ)に比較した場合、平均I F Uのパーセント減少として計算した。共通の実施に従って、血清を、これらが50%以上の感染性の減少を引き起こし得る場合、「中和」として標識し、全スクリーニングアッセイ(例えば、宿主細胞の交換、またはケラミジア単離物、または感染性接種物の調製における環境条件のバリエーション)の複雑性を考慮して、より低い程度のE B感染性を阻害し得る血清はまた、さらなる研究のためのワクチン候補として考慮されるべきである。図44Aは、中和ポジティブ血清から得られた結果の例を示し、一方、図44Bは、中和ネガティブ血清から得られた結果の例を示す。

20

## 【0283】

インビトロ中和アッセイを、実施例1～10、13～22、24～26および29～37において言及される組換えタンパク質で免疫されたマウスから得られた血清を使用して実施した。結果を、表I Iに示す。これらの結果は、C T 0 4 5 、C T 2 4 2 、C T 3 8 1 、C T 3 9 6 、C T 3 9 8 、C T 4 6 7 、C T 5 4 7 、C T 5 8 7 およびC T 6 8 1 が、C . t r a c h o m a t i s による感染を予防するワクチンに対する、特に良好な候補の全てであることを示す。これらの特性は、配列単独からは示されない。

30

40

50

## 【 0 2 8 4 】

さらなる実験において、*C. trachomatis*に対して惹起された血清を、交差中和活性について、*C. pneumoniae* EBに対して試験した。手順は、上記されるとおりであったが、*C. pneumoniae*から精製されたEBを、SP緩衝液中に希釈し、 $3 \times 10^6$  IFU/mlを含むようにし、この懸濁物の $10\mu l$ を、最終容量 $100\mu l$ で各血清希釈物に添加した。CT242およびCT467を使用して得られた血清は、*C. pneumoniae* EBを交差中和し得た。

## 【 0 2 8 5 】

本発明が例示のためのみに記載され、その改変がなされ得、一方で、本発明の意図および範囲内のままであることは、理解される。

## 【 0 2 8 6 】

## 【 数 1 】

- {1} Raulston (1995) *Mol Microbiol* 15:607-616
- {2} Everett (2000) *Vet Microbiol* 75:109-126
- {3} Kalman *et al.* (1999) *Nature Genetics* 21:385-389
- {4} Read *et al.* (2000) *Nucleic Acids Res* 28:1397-1406
- {5} Shirai *et al.* (2000) *Nucleic Acids Res* 28:2311-2314
- {6} Stephens *et al.* (1998) *Science* 282:754-759
- {7} International patent application WO99/27105
- {8} International patent application WO00/27994
- {9} International patent application WO99/28475
- {10} Ward (1995) *Apmis.* 103:769-96.
- {11} Moulder (1991) *Microbiol Rev* 55(1):143-190.
- {12} Comanducci *et al.* (1994) *Infect Immun* 62(12):5491-5497.
- {13} EP-A-0499681
- {14} International patent application WO95/28487
- {15} Murdin *et al.* (1993) *Infect Immun* 61:4406-4414
- {16} Cerrone *et al.* (1991) *Infect Immun* 59(1):79-90.
- {17} Raulston *et al.* (1993) *J. Biol. Chem.* 268:23139-23147.
- {18} International patent application WO02/02606.

## 【 0 2 8 7 】

10

20

30

40

【表1】

参考文献番号および注釈	<i>C. trachomatis</i> 登録番号および注釈	配列番号
cp0010 gi 43176729 gb AAD18590_1 多型外膜タンパク質 G ファミリー	gi 3329346 gb AAC68469.1 推定外膜タンパク質 G	1,2
cp0014 gi 43176729 gb AAD18590_1 多型外膜タンパク質 G ファミリー	gi 3329346 gb AAC68469.1 推定外膜タンパク質 G	3,4
cp0015 gi 43176731 gb AAD18591_1 多型外膜タンパク質 GII ファミリー	gi 3329346 gb AAC68469.1 推定外膜タンパク質 G	5,6
cp0016 gi 43176731 gb AAD18591_1 多型外膜タンパク質 GII ファミリー	gi 3329350 gb AAC68472.1 推定外膜タンパク質 I	7,8
cp0017 gi 43176731 gb AAD18591_1 多型外膜タンパク質 GII ファミリー	gi 3329346 gb AAC68469.1 推定外膜タンパク質 G	9,10
cp0018 gi 43176733 gb AAD18593_1 多型外膜タンパク質 GII ファミリー	gi 3329840 gb AAC68009.1 推定外膜タンパク質 A	11,12
cp0019 gi 43176731 gb AAD18591_1 多型外膜タンパク質 GII ファミリー	gi 3329346 gb AAC68469.1 推定外膜タンパク質 G	13,14
cp00468 gi 43176754 gb AAD18611_1 多型外膜タンパク質 (Cでのフレームシフト)	gi 3329344 gb AAC68467.1 推定外膜タンパク質 E	15,16
cb6260 gi 43176260 gb AAD18163_1 多型外膜タンパク質 GII ファミリー	gi 3329346 gb AAC68469.1 推定外膜タンパク質 G	17,18
cb6262 gi 43176262 gb AAD18165_1 推測タンパク質	gi 3328765 gb AAC687940.1 推測タンパク質	19,20
cb6269 gi 43176269 gb AAD18171_1 推測タンパク質	gi 3328825 gb AAC68795.1 推測タンパク質	21,22
cb6270 gi 43176270 gb AAD18172_1 多型外膜タンパク質 GII ファミリー	gi 3329350 gb AAC68472.1 推定外膜タンパク質 I	23,24
cb6272 gi 43176272 gb AAD18173_1 推定 dOMP (リードペプチド外膜)	gi 3328772 gb AAC687946.1 推測タンパク質	25,26
cb6273 gi 43176273 gb AAD18174_1 推定 dOMP (リードペプチド)	gi 3328771 gb AAC687945.1 推測タンパク質	27,28
cb6296 gi 43176296 gb AAD18195_1 推測タンパク質	gi 3328520 gb AAC687712.1 リプロース-Rエピメラーゼ	29,30
cp6362 gi 43176362 gb AAD18254_1 YbbP ファミリー 推測タンパク質	gi 3329340 gb AAC687612.1 推測タンパク質	31,32
cp6372 gi 43176372 gb AAD18263_1 シグナルペプチダーゼ I	gi 3328410 gb AAC687610.1 シグナルペプチダーゼ I	33,34
cp6397 gi 43176397 gb AAD18286_1 CHLPS 推測タンパク質	gi 3328506 gb AAC687700.1 CHLPS 推測タンパク質	35,36
cp6402 gi 43176402 gb AAD18290_1 ACR ファミリー	gi 3328505 gb AAC687699.1 ACR ファミリー	37,38
cp6419 gi 43176419 gb AAD18305_1 CTI49 推測タンパク質	gi 3328551 gb AAC687740.1 可能性ヒドロラーゼ	39,40
cp6446 gi 43176446 gb AAD18330_1 推測タンパク質	gi 3328261 gb AAC68390.1 推測タンパク質	41,42
cp6466 gi 43176466 gb AAD18346_1 オリゴペプチド結合タンパク質	gi 3328604 gb AAC6790.1 オリゴペプチド結合タンパク質	43,44
cp6467 gi 43176467 gb AAD18349_1 オリゴペプチド結合タンパク質	gi 3328604 gb AAC6790.1 オリゴペプチド結合タンパク質	45,46
cp6468 gi 43176468 gb AAD18350_1 オリゴペプチド結合タンパク質	gi 3328339 gb AAC67730.1 オリゴペプチド結合タンパク質	47,48
cp6469 gi 43176469 gb AAD18351_1 オリゴペプチド結合タンパク質	gi 3328579 gb AAC67766.1 オリゴペプチド結合タンパク質	49,50
cp6520 gi 43176520 gb AAD18398_1 ボリサッカリドヒドロラーゼ 侵入リピートファミリー	gi 3328261 gb AAC67718.1 予測ボリサッカリドヒドロラーゼ 侵入反復ファミリー	51,52
cp6567 gi 43176567 gb AAD18441_1 封入膜タンパク質 C	gi 332842 gb AAC67825.1 封入膜タンパク質 C	53,54
cp6576 gi 43176576 gb AAD18449_1 Omp85 アナログ	gi 332851 gb AAC67834.1 Omp85 アナログ	55,56
cp6577 gi 43176577 gb AAD18450_1 (Omp85-様外膜タンパク質)	gi 332852 gb AAC67835.1 (Omp85-様外膜タンパク質)	57,58
cp6601 gi 43176601 gb AAD18472_1 低カルシウム応答 D	gi 3328486 gb AAC67681.1 低カルシウム応答 D	59,60
cp6602 gi 43176602 gb AAD18473_1 低カルシウム応答 E	gi 3328485 gb AAC67680.1 低カルシウム応答 E	61,62
cp6607 gi 43176607 gb AAD18478_1 ホスホリバーゼ D スーパーファミリー	gi 3328479 gb AAC67675.1 ホスホリバーゼ D スーパーファミリー	63,64
cp6615 gi 43176615 gb AAD18485_1 Yol 推測タンパク質	gi 3328472 gb AAC67668.1 推測タンパク質	65,66
cp6624 gi 43176624 gb AAD18493_1 溶質タンパク質結合ファミリー	gi 3328461 gb AAC67658.1 溶質タンパク質結合ファミリー	67,68
cp6639 gi 43176639 gb AAD18507_1 Flagellar 分泌タンパク質	gi 3328453 gb AAC67651.1 Flagellar 分泌タンパク質	69,70

表1

【表2】

cp6664	q14376664 gb AAD18529.1 ロイシル アミノペプチダーゼ A	q13328437 gb AAC67636.1 ロイシル アミノペプチダーゼ A	71,72
cp6672	q14376672 gb AAD18537.1 CBS ドメイントンパク質 (溶血素 ホモログ)	q13328667 gb AAC67849.1 CBS ドメイントンパク質	73,74
cp6679	q14376679 gb AAD18543.1 CT253 収定タンパク質	q13328684 gb AAC67846.1 収定タンパク質	75,76
cp6696	q14376696 gb AAD18559.1 CT266 収定タンパク質	q13328678 gb AAC67859.1 収定タンパク質	77,78
cp6717	q14376717 gb AAD18579.1 ホスリノバーゼ D スーパーファミリー	q13328698 gb AAC67877.1 ホスホリバーゼ D スーパーファミリー	79,80
cp6727	q14376727 gb AAD18588.1 多型外膜タンパク質 G ファミリー	q13329346 gb AAC68469.1 推定外膜タンパク質 G	81,82
cp6728	q14376728 gb AAD18589.1 多型外膜タンパク質 G ファミリー	q13329346 gb AAC68469.1 推定外膜タンパク質 G	83,84
cp6729	q14376729 gb AAD18590.1 多型外膜タンパク質 G ファミリー	q13329350 gb AAC68472.1 推定外膜タンパク質 I	85,86
cp6731	q14376731 gb AAD18591.1 多型外膜タンパク質 G ファミリー	q13329350 gb AAC68472.1 推定外膜タンパク質 I	87,88
cp6733	q14376733 gb AAD18593.1 多型外膜タンパク質 G ファミリー	q13329840 gb AAC68009.1 推定外膜タンパク質 A	89,90
cp6735	q14376735 gb AAD18594.1 多型外部膜タンパク質 (短縮) A ファミリー	q13329840 gb AAC68009.1 推定外膜タンパク質 A	91,92
cp6736	q14376736 gb AAD18595.1 多型外膜タンパク質 G ファミリー	q13329846 gb AAC68469.1 推定外膜タンパク質 G	93,94
cp6737	q14376737 gb AAD18596.1 多型外膜タンパク質 H ファミリー	q13329847 gb AAC68470.1 推定外膜タンパク質 H	95,96
cp6751	q14376751 gb AAD18608.1 多型外膜タンパク質 E ファミリー	q13329849 gb AAC68467.1 推定外膜タンパク質 E	97,98
cp6752	q14376752 gb AAD18609.1 多型外膜タンパク質 E ファミリー	q13329849 gb AAC68467.1 推定外膜タンパク質 E	99,100
cp6753	q14376753 gb AAD18610.1 多型外膜タンパク質 EF ファミリー	q13329849 gb AAC68467.1 推定外膜タンパク質 E	101,102
cp6757	q14376757 gb AAD18613.1 収定タンパク質	q13328670 gb AAC67980.1 PP-ループ スーパーファミリー ATPase	103,104
cp6767	q14376767 gb AAD18622.1 アルギニンペリラズム結合タンパク質	q13328806 gb AAC67977.1 アルギニン結合タンパク質	105,106
cp6790	q14376790 gb AAD18643.1 熱ショックタンパク質-70	q13328622 gb AAC67983.1 HSP-70	107,108
cp6802	q14376802 gb AAD18654.1 CT427 収定タンパク質	q13328857 gb AAC68024.1 収定タンパク質	109,110
cp6814	q14376814 gb AAD18665.1 CT398 収定タンパク質	q13328825 gb AAC67985.1 収定タンパク質	111,112
cp6829	q14376829 gb AAD18679.1 多型外膜タンパク質 A ファミリー	q13328840 gb AAC68009.1 推定外膜タンパク質 A	113,114
cp6830	q14376830 gb AAD18680.1 多型外膜タンパク質 B ファミリー	q13328841 gb AAC68010.1 推定外膜タンパク質 B	115,116
cp6832	q14376832 gb AAD18681.1 溶質結合タンパク質	q13328844 gb AAC68012.1 溶質結合タンパク質	117,118
cp6834	q14376834 gb AAD18683.1 （金属輸送タンパク質）	q13328846 gb AAC68014.1 （金属輸送タンパク質）	119,120
cp6847	q14376847 gb AAD18695.1 テール特異的プロテアーゼ	q13328872 gb AAC68040.1 テール特異的プロテアーゼ	121,122
cp6848	q14376848 gb AAD18696.1 15 kDa システイン-リッチタンパク質	q13328873 gb AAC68041.1 15kDa システイン-リッチタンパク質	123,124
cp6849	q14376849 gb AAD18697.1 60 kDa システイン-リッチ OMP	q13328874 gb AAC68042.1 60kDa システイン-リッチ OMP	125,126
cp6850	q14376850 gb AAD18698.1 9 kDa -システイン-リッチリボタンパク質	q13328876 gb AAC68043.1 9kDa -システイン-リボタンパク質	127,128
cp6878	q14376878 gb AAD18723.1 2-成分センサー	q13328901 gb AAC68067.1 2-成分調節システムセンサー-ヒスチジンキナーゼ	129,130
cp6879	q14376879 gb AAD18724.1 CHIPS Inca との類似性	q13328451 gb AAC67649 収定タンパク質	131,132
cp6884	q14376884 gb AAD18729.1 CT471 収定タンパク質	q13328905 gb AAC68071.1 収定タンパク質	133,134
cp6886	q14376886 gb AAD18731.1 YidD ファミリー	q13328908 gb AAC68073.1 収定タンパク質	135,136
cp6890	q14376890 gb AAD18734.1 CT476 収定タンパク質	q13328911 gb AAC68076.1 収定タンパク質	137,138
cp6892	q14376892 gb AAD18736.1 オリゴペプチドベルミニアーゼ	q13328913 gb AAC68078.1 オリゴペプチドベルミニアーゼ	139,140
cp6894	q14376894 gb AAD18738.1 オリゴペプチド結合リボタンパク質	q13328915 gb AAC68080.1 オリゴペプチド結合リボタンパク質	141,142
cp6900	q14376900 gb AAD18743.1 グルタミン結合タンパク質	q13328922 gb AAC68086.1 グルタミン結合タンパク質	143,144
cp6909	q14376909 gb AAD18752.1 プロテアーゼ	q16578107 gb AAC68094.2 プロテアーゼ	145,146

【表3】

cp6952	gi 4376952 gb AAD18792.1 アボリボタンパク N-アセチルトランスクエラーゼ	gi 3328972 gb AAC68136.1 アボリボタンパク N-アセチルトランスクエラーゼ	147,148
cp6960	gi 4376960 gb AAD18800.1 FBPK-型ペチナーゼ	gi 3328979 gb AAC68143.1 FBPK-型ペチナーゼ	149,150
cp6968	gi 4376968 gb AAD18807.1 CT547 反定タンパク質	gi 3328986 gb AAC68149.1 反定タンパク質	151,152
cp6989	gi 4376969 gb AAD18808.1 CT548 反定タンパク質	gi 3328987 gb AAC68150.1 反定タンパク質	153,154
cp6988	gi 4376988 gb AAD18834.1 主要外膜タンパク質	gi 3329123 gb AAC68276.1 主要外膜タンパク質	155,156
cp7005	gi 4377005 gb AAD18841.1 YopG/Gen 分泌タンパク質 D	gi 3329125 gb AAC68289.1 Yopタンパク質転座タンパク質	157,158
cp7015	gi 4377015 gb AAD18851.1 FHA ドメイン: (アデニルシクラーゼとの相同)	gi 3329115 gb AAC68289.1 FHAドメイン: アデニルシクラーゼとの相同)	159,160
cp7033	gi 4377033 gb AAD18867.1 CHLPN 76 kDa ホモログ 1 (C1622)	gi 3329069 gb AAC68226.1 CHLPN 76 kDa ホモログ	161,162
cp7034	gi 4377034 gb AAD18868.1 CHLPN 76 kDa ホモログ 2 (C1623)	gi 6578109 gb AAC68227.2 CHLPN 76 kDa ホモログ	163,164
cp7035	gi 4377035 gb AAD18869.1 内在性膜タンパク質	gi 3329071 gb AAC68228.1 内在性膜タンパク質	165,166
cp7072	gi 4377072 gb AAD18892.1 CT648 反定タンパク質	gi 3329077 gb AAC68228.1 反定タンパク質	167,168
cp7073	gi 4377073 gb AAD18903.1 CT647 反定タンパク質	gi 3329096 gb AAC68892.1 反定タンパク質	169,170
cp7085	gi 4377085 gb AAD18914.1 CT605 反定タンパク質	gi 3329050 gb AAC68208.1 反定タンパク質	171,172
cp7090	gi 4377090 gb AAD18919.1 ペプチドリカノン結合リポタンパク質	gi 3329044 gb AAC68202.1 ペプチドリカノン結合リポタンパク質	173,174
cp7091	gi 4377091 gb AAD18920.1 高分子輸送体	gi 3329043 gb AAC68201.1 高分子輸送系の成分	175,176
cp7092	gi 4377092 gb AAD18921.1 CT598 反定タンパク質	gi 3329042 gb AAC68200.1 反定タンパク質	177,178
cp7093	gi 4377093 gb AAD18922.1 ハイオブリマー輸送タンパク質	gi 3329041 gb AAC68199.1 ハイオブリマー輸送タンパク質	179,180
cp7094	gi 4377094 gb AAD18923.1 高分子輸送体	gi 3329040 gb AAC68198.1 多糖輸送体	181,182
cp7101	gi 4377094 gb AAD18929.1 CT590 反定タンパク質	gi 3329033 gb AAC68192.1 反定タンパク質	183,184
cp7102	gi 4377095 gb AAD18930.1 CT589 反定タンパク質	gi 3329032 gb AAC68191.1 反定タンパク質	185,186
cp7106	gi 4377106 gb AAD18933.1 反定タンパク質	gi 3328736 gb AAC67968.1 反定タンパク質	187,188
cp7111	gi 4377111 gb AAD18938.1 エノラーゼ	gi 3329030 gb AAC68189.1 エノラーゼ	189,190
cp7127	gi 4377127 gb AAD18953.1 一般分泌タンパク質 D	gi 3329013 gb AAC68174.1 Gen 分泌タンパク質 D	191,192
cp7130	gi 4377130 gb AAD18956.1 予測されたOMP [リードベーブチ F]	gi 3329010 gb AAC68171.1 予測されたOMP	193,194
cp7132	gi 4377132 gb AAD18958.1 CT567 反定タンパク質	gi 3329008 gb AAC68169.1 反定タンパク質	195,196
Cp7133	gi 4377133 gb AAD18959.1 CT566 反定タンパク質	gi 3329007 gb AAC68168.1 反定タンパク質	197,198
Cp7140	gi 4377140 gb AAD18965.1 Yop 転座 J	gi 3329000 gb AAC68161.1 Yopタンパク質転座リポタンパク質 J	199,200
Cp7170	gi 4377170 gb AAD18992.1 外膜タンパク質 B	gi 3329169 gb AAC68308.1 外膜タンパク質アノログ	201,202
Cp7177	gi 4377177 gb AAD18998.1 鞭毛 M-リングタンパク質	gi 3329175 gb AAC68314.1 鞭毛M-リングタンパク質	203,204
Cp7182	gi 4377182 gb AAD19003.1 CT724 反定タンパク質	gi 3329181 gb AAC68319.1 反定タンパク質	205,206
Cp7184	gi 4377184 gb AAD19005.1 棒型タンパク質	gi 3329183 gb AAC68321.1 棒型タンパク質	207,208
Cp7193	gi 4377189 gb AAD19013.1 CT734 反定タンパク質	gi 3329192 gb AAC68329.1 反定タンパク質	209,210
Cp7206	gi 4377206 gb AAD19025.1 CHLTR 可能なリントンタンパク質	gi 3329204 gb AAC68339.1 CHLTR可能なリントンタンパク質	211,212
Cp7222	gi 4377222 gb AAD19040.1 ムラミダーゼ (インベーシン繰り返しファミリー)	gi 3329221 gb AAC68354.1 ムラミダーゼ (インベーシン繰り返しファミリー)	213,214
Cp7223	gi 4377223 gb AAD19041.1 細胞分裂タンパク質 FtsW	gi 3329222 gb AAC68355.1 細胞分裂タンパク質 FtsW	215,216
Cp7224	gi 4377224 gb AAD19042.1 ペプチドリカントラنسフェラーゼ	gi 3329223 gb AAC68356.1 ペプチドリカントラنسフェラーゼ	217,218
Cp7225	gi 4377225 gb AAD19043.1 ムラメート・AlaリガーゼおよびD-Ala-D-Alaリガーゼ	gi 3329224 gb AAC68357.1 UDP-N-アセチルムラメート・アラニンリガーゼ	219,220
Cp7248	gi 4377248 gb AAD19064.1 チオレドキシンジスルトイドインソメラーゼ	gi 3329244 gb AAC68375.1 チオレドキシンジスルトイドインソメラーゼ	221,222

【表4】

Cp7261	gi 437726 gb AAD19076.1  CTT88版定タンパク質・(リーターべナチドーベリプラスム)	gi 3329253 gb AAC68383.1  リーター-(6-O)ベブチド-ベリプラスム)	223, 224
Cp7280	gi 437728 gb AAD19093.1  インスリナーゼファミリー／プロテアーゼ I I I	gi 3329273 gb AAC68402.1  インスリナーゼファミリー／プロテアーゼ I I I	225, 226
Cp7287	gi 4377287 gb AAD19099.1  推定外膜タンパク質 D ファミリー	gi 3329279 gb AAC68408.1  推定外膜タンパク質 D	227, 228
Cp7306	gi 4377306 gb AAD19116.1  DOセリンプロテアーゼ	gi 332923 gb AAC68420.1  DOセリンプロテアーゼ	229, 230
Cp7342	gi 4377342 gb AAD19149.1  ABC輸送ベルミアーゼ	gi 3329327 gb AAC68451.1  ABC輸送ベルミアーゼ-ビリミジン生合成タンパク質	231, 232
Cp7347	gi 4377347 gb AAD19153.1  CT858_版定タンパク質	gi 6578118 gb AAC68456.2  IRBP よりのDHRドメインを含む予測されたプロテアーゼ	233, 234
Cp7353	gi 4377353 gb AAD19159.1  CT863_版定タンパク質	gi 3329337 gb AAC68461.1  版定タンパク質	235, 236
Cp7367	gi 4377367 gb AAD19171.1  予測されたOMP	gi 3329395 gb AAC67967.1  版定タンパク質	237, 238
Cp7408	gi 4377408 gb AAD19208.1  版定タンパク質	gi 3329795 gb AAC67967.1  版定タンパク質	239, 240
Cp7409	gi 4377409 gb AAD19210.1  予測された外膜タンパク質 (CT371)	gi 3329795 gb AAC67967.1  版定タンパク質	241, 242
	gi 4378411 gb	gi 33298512 gb AAC67705.1  版定タンパク質	243, 244
	gi 4378508 gb	gi 33298585 gb AAC67722.1  版定タンパク質	245, 246
	gi 4378710 gb	gi 33298692 gb AAC67872.1  NADH_(ユビキノン)オキシドリダクターゼ、ガノマ	247, 248
	gi 4378719 gb	gi 33298815 gb AAC67986.1  版定タンパク質	249, 250
	gi 4378782 gb	gi 33298817 gb AAC67988.1  版定タンパク質	251, 252
	gi 4378833 gb	gi 33298887 gb AAC68054.1  アルギニルtRNAトランスフェラーゼ	253, 254
	gi 4378866 gb	gi 33298899 gb AAC68056.1  版定タンパク質	255, 256
	gi 4376972 gb	gi 33298919 gb AAC68153.1  D-Ala-D-Alaカルボキシペプチダーゼ	257, 258
	gi 4377139 gb	gi 33290019 gb AAC68162.1  版定タンパク質	259, 260
	gi 4377154 gb	gi 3329154 gb AAC68295.1  版定タンパク質	261, 262

-5-

【表5】

表 II

CT	融合型	50% 中和力値	特定の血清希釈での LLCMK2 細胞培養のためのEB感染性の%中和			
			1/40	1/160	1/540	1/2560
CT045	HIS	1:160	32	50	18	
	HIS		44	37	0	
CT089	GST		6	25	37	
CT114	HIS		0	18		
CT181	GST		19	0		
CT198	HIS		19	0	13	
CT241	HIS		5	42		
	HIS	1:100	58	45	0	
CT242	GST		46	24	40	
CT350	GST		0	39		
CT351	HIS		1	5		
	HIS	1:450	67	56	48	
CT381	GST		24	0	0	
CT391	HIS		0	14		
	HIS	1:300	55	62	35	
CT396	GST		8	33	25	
CT398	HIS	1:640	57	45	50	
	GST	1:>640	68	60	60	
CT415	GST		21	21		
CT427	HIS		25	13	13	
CT443	HIS		25	25		
CT454	HIS		16	4		
CT467	GST	1:1100	65	67	62	48
CT541	GST		10	24	13	
	HIS	1:40	50	13	18	
CT547	GST		0	0	18	
CT551	HIS		5	11		
CT559	HIS		20	23		
CT567			0	26		
CT569	HIS		0	5		
CT587	HIS	1:1200	51	61	56	42
	HIS		37	21		
CT589	GST		0	33		
CT597	GST		0	4		
CT600	HIS		0	11		
CT647	GST		15	0		
CT681	HIS	1:160	95	53		
CT713	HIS		10	10		
CT761	GST		0	16		
CT823	HIS		5	23		
NN-GST			0	0	0	
NN-HIS			0	0	0	

10

20

30

40

## 【図面の簡単な説明】

## 【0292】

【図1A】図1Aは、実施例1のデータを示す。図はゲルの図であり、レーン1とは、その図の左側のレーンである。

【図1B】図1Bは、実施例1のデータを示す。図はゲルの図であり、レーン1とは、その図の左側のレーンである。

【図1C】図1Cは、実施例1のデータを示す。図はゲルの図であり、レーン1とは、その図の左側のレーンである。

【図2A】図2Aは、実施例2のデータを示す。図はゲルの図であり、レーン1とは、その図の左側のレーンである。

【図2B】図2Bは、実施例2のデータを示す。図はゲルの図であり、レーン1とは、その図の左側のレーンである。

【図2C】図2Cは、実施例2のデータを示す。図はゲルの図であり、レーン1とは、その図の左側のレーンである。

【図3A】図3Aは、実施例3のデータを示す。図はゲルの図であり、レーン1とは、その図の左側のレーンである。

【図3B】図3Bは、実施例3のデータを示す。図はゲルの図であり、レーン1とは、そ

50

の図の左側のレーンである。

【図3C】図3Cは、実施例3のデータを示す。図はゲルの図であり、レーン1とは、その図の左側のレーンである。

【図3D】図3Dは、実施例3のデータを示す。図はゲルの図であり、レーン1とは、その図の左側のレーンである。

【図4A】図4Aは、実施例4のデータを示す。図はゲルの図であり、レーン1とは、その図の左側のレーンである。

【図4B】図4Bは、実施例4のデータを示す。図はゲルの図であり、レーン1とは、その図の左側のレーンである。

【図4C】図4Cは、実施例4のデータを示す。図はゲルの図であり、レーン1とは、その図の左側のレーンである。

【図4D】図4Dは、実施例4のデータを示す。図はゲルの図であり、レーン1とは、その図の左側のレーンである。

【図4E】図4Eは、実施例4のデータを示す。図はゲルの図であり、レーン1とは、その図の左側のレーンである。

【図5A】図5Aは、実施例5のデータを示す。図はゲルの図であり、レーン1とは、その図の左側のレーンである。

【図 5 B】図 5 B は、実施例 5 のデータを示す。図はゲルの図であり、レーン 1 とは、その図の左側のレーンである。

【図 5 C】図 5 C は、実施例 5 のデータを示す。図はゲルの図であり、レーン 1 とは、その図の左側のレーンである。

【図 5 D】図 5 D は、実施例 5 のデータを示す。図はゲルの図であり、レーン 1 とは、その図の左側のレーンである。

【図 5 E】図 5 E は、実施例 5 のデータを示す。図はゲルの図であり、レーン 1 とは、その図の左側の上一帯である。

【図 6 A】図 6 A は、実施例 6 のデータを示す。図はゲルの図であり、レーン 1 とは、その他の図の左側の上部である。

【図 6 B】図 6 B は、実施例 6 のデータを示す。図はゲルの図であり、レーン 1 とは、その他の図の左側の上部である。

【図 6 C】図 6 C は、実施例 6 のデータを示す。図はゲルの図であり、レーン 1 とは、その他の lane との違いを示す。

【図 7 A】図 7 A は、実施例 7 のデータを示す。図はゲルの図であり、レーン 1 とは、そ

【図 7 B】図 7 B は、実施例 7 のデータを示す。図はゲルの図であり、レーン 1 とは、そ

【図 8 A】図 8 A は、実施例 8 のデータを示す。図はゲルの図であり、レーン 1 とは、そ

【図 8 B】図 8 B は、実施例 8 のデータを示す。図はゲルの図であり、レーン 1 とは、そ

【図 8 C】図 8 C は、実施例 8 のデータを示す。図はゲルの図であり、レーン 1 とは、そ

【図 9 A】図 9 A は、実施例 9 のデータを示す。図はゲルの図であり、レーン 1 とは、そ

【図 9 B】図 9 B は、実施例 9 のデータを示す。図はゲルの図であり、レーン 1 とは、そ

【図 9 C】図 9 C は、実施例 9 のデータを示す。図はゲルの図であり、レーン 1 とは、そ

【図 9 D】図 9 D は、実施例 9 のデータを示す。図はゲルの図であり、レーン 1 とは、そ

【図10A】図10Aは、実施例10のデータを示す。図はゲルの図であり、レーン1と

は、その図の左側のレーンである。

【図10B】図10Bは、実施例10のデータを示す。図はゲルの図であり、レーン1とは、その図の左側のレーンである。

【図10C】図10Cは、実施例10のデータを示す。図はゲルの図であり、レーン1とは、その図の左側のレーンである。

【図11A】図11Aは、実施例11のデータを示す。図はゲルの図であり、レーン1とは、その図の左側のレーンである。

【図11B】図11Bは、実施例11のデータを示す。図はゲルの図であり、レーン1とは、その図の左側のレーンである。

【図11C】図11Cは、実施例11のデータを示す。図はゲルの図であり、レーン1とは、その図の左側のレーンである。

【図12A】図12Aは、実施例12のデータを示す。図はゲルの図であり、レーン1とは、その図の左側のレーンである。

【図12B】図12Bは、実施例12のデータを示す。図はゲルの図であり、レーン1とは、その図の左側のレーンである。

【図12C】図12Cは、実施例12のデータを示す。図はゲルの図であり、レーン1とは、その図の左側のレーンである。

【図12D】図12Dは、実施例12のデータを示す。図はゲルの図であり、レーン1とは、その図の左側のレーンである。

【図12E】図12Eは、実施例12のデータを示す。図はゲルの図であり、レーン1は、その図の左側のレーンである。

【図13A】図13Aは、実施例13のデータを示す。図はゲルの図であり、レーン1は、その図の左側のレーンである。

【図13B】図13Bは、実施例13のデータを示す。図はゲルの図であり、レーン1は、その図の左側のレーンである。

【図13C】図13Cは、実施例13のデータを示す。図はゲルの図であり、レーン1は、その図の左側のレーンである。

【図14A】図14Aは、実施例14のデータを示す。図はゲルの図であり、レーン1は、その中の左側のレーンである。

【図14B】図14Bは、実施例14のデータを示す。図はゲルの図であり、レーン1は、その図の左側のレーンである。

【図14C】図14Cは、実施例14のデータを示す。図はゲルの図であり、レーン1とは、その図の左側のレーンである。

【図15A】図15Aは、実施例15のデータを示す。図はゲルの図であり、レーン1とレーン2の両方の左側の上にアラム

【図15B】図15Bは、実施例15のデータを示す。図はゲルの図であり、レーン1とは、その図の左側のレーンである。

【図 15C】図 15C は、実施例 15 のデータを示す。図はゲルの図であり、レーン 1 と

【図16A】図16Aは、実施例16のデータを示す。図はゲルの図であり、レーン1と

【図16B】図16Bは、実施例16のデータを示す。図はゲルの図であり、レーン1と

【図16C】図16Cは、実施例16のデータを示す。図はゲルの図であり、レーン1と

【図17】図17は、実施例17のデータを示す。図はゲルの図であり、レーン1とは、

【図18A】図18Aは、実施例18のデータを示す。図はゲルの図であり、レーン1と

【図18B】図18Bは、実施例18のデータを示す。図はゲルの図であり、レーン1と

は、その図の左側のレーンである。

【図19】図19は、実施例19のデータを示す。図はゲルの図であり、レーン1とは、その図の左側のレーンである。

【図20A】図20Aは、実施例20のデータを示す。図はゲルの図であり、レーン1とは、その図の左側のレーンである。

【図20B】図20Bは、実施例20のデータを示す。図はゲルの図であり、レーン1とは、その図の左側のレーンである。

【図21】図21は、実施例21のデータを示す。図はゲルの図であり、レーン1とは、その図の左側のレーンである。

【図22】図22は、実施例22のデータを示す。図はゲルの図であり、レーン1とは、その図の左側のレーンである。

【図23A】図23Aは、実施例23のデータを示す。図はゲルの図であり、レーン1とは、その図の左側のレーンである。

【図23B】図23Bは、実施例23のデータを示す。図はゲルの図であり、レーン1とは、その図の左側のレーンである。

【図23C】図23Cは、実施例23のデータを示す。図はゲルの図であり、レーン1とは、その図の左側のレーンである。

【図24A】図24Aは、実施例24のデータを示す。図はゲルの図であり、レーン1は、その図の左側のレーンである。

【図24B】図24Bは、実施例24のデータを示す。図はゲルの図であり、レーン1とは、その他の左側のレーンである。

【図24C】図24Cは、実施例24のデータを示す。図はゲルの図であり、レーン1とは、その他の左側のレーンである。

【図 24D】図 24D は、実施例 24 のデータを示す。図はゲルの図であり、レーン 1 とは、その他の各レーンと並んである。

【図25A】図25Aは、実施例25のデータを示す。図はゲルの図であり、レーン1とは、その図の左側のレーンである。

【図25B】図25Bは、実施例25のデータを示す。図はゲルの図であり、レーン1とレーン2の両方の左側のレーンである。

【図25C】図25Cは、実施例25のデータを示す。図はゲルの図であり、レーン1と

【図26A】図26Aは、実施例26のデータを示す。図はゲルの図であり、レーン1と

【図26B】図26Bは、実施例26のデータを示す。図はゲルの図であり、レーン1と

【図27A】図27Aは、実施例27のデータを示す。図はゲルの図であり、レーン1と

【図27B】図27Bは、実施例27のデータを示す。図はゲルの図であり、レーン1と

【図27C】図27Cは、実施例27のデータを示す。図はゲルの図であり、レーン1と

【図27D】図27Dは、実施例27のデータを示す。図はゲルの図であり、レーン1と

【図27E】図27Eは、実施例27のデータを示す。図はゲルの図であり、レーン1と

【図28A】図28Aは、実施例28のデータを示す。図はゲルの図であり、レーン1と

【図28B】図28Bは、実施例28のデータを示す。図はゲルの図であり、レーン1と

【図29A】図29Aは、実施例29のデータを示す。図はゲルの図であり、レーン1と

は、その図の左側のレーンである。

【図29B】図29Bは、実施例29のデータを示す。図はゲルの図であり、レーン1とは、その図の左側のレーンである。

【図30】図30は、実施例30のデータを示す。図はゲルの図であり、レーン1とは、その図の左側のレーンである。

【図31】図31は、実施例31のデータを示す。図はゲルの図であり、レーン1とは、その図の左側のレーンである。

【図32】図32は、実施例32のデータを示す。図はゲルの図であり、レーン1とは、その図の左側のレーンである。

【図33A】図33Aは、実施例33のデータを示す。図はゲルの図であり、レーン1とは、その図の左側のレーンである。 10

【図33B】図33Bは、実施例33のデータを示す。図はゲルの図であり、レーン1とは、その図の左側のレーンである。

【図34A】図34Aは、実施例34のデータを示す。図はゲルの図であり、レーン1とは、その図の左側のレーンである。

【図34B】図34Bは、実施例34のデータを示す。図はゲルの図であり、レーン1とは、その図の左側のレーンである。

【図35A】図35Aは、実施例35のデータを示す。図はゲルの図であり、レーン1とは、その図の左側のレーンである。

【図35B】図35Bは、実施例35のデータを示す。図はゲルの図であり、レーン1とは、その図の左側のレーンである。 20

【図36】図36は、実施例36のデータを示す。図はゲルの図であり、レーン1とは、その図の左側のレーンである。

【図37A】図37Aは、実施例37のデータを示す。図はゲルの図であり、レーン1とは、その図の左側のレーンである。

【図37B】図37Bは、実施例37のデータを示す。図はゲルの図であり、レーン1とは、その図の左側のレーンである。

【図37C】図37Cは、実施例37のデータを示す。図はゲルの図であり、レーン1とは、その図の左側のレーンである。

【図38A】図38Aは、実施例38のデータを示す。図はゲルの図であり、レーン1とは、その図の左側のレーンである。 30

【図38B】図38Bは、実施例38のデータを示す。図はゲルの図であり、レーン1とは、その図の左側のレーンである。

【図39】図39は、実施例39のデータを示す。図はゲルの図であり、レーン1とは、その図の左側のレーンである。

【図40】図40は、実施例40のデータを示す。図はゲルの図であり、レーン1とは、その図の左側のレーンである。

【図41】図41は、実施例41のデータを示す。図はゲルの図であり、レーン1とは、その図の左側のレーンである。

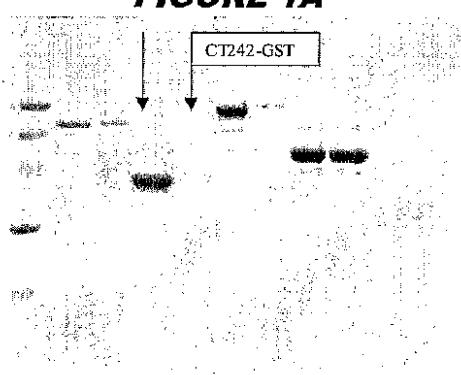
【図42】図42は、実施例42のデータを示す。図はゲルの図であり、レーン1とは、その図の左側のレーンである。 40

【図43】図43は、実施例43のデータを示す。図はゲルの図であり、レーン1とは、その図の左側のレーンである。

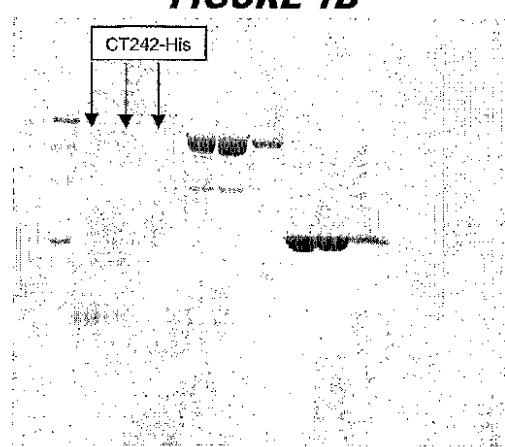
【図44A】図44Aは、実施例44のデータを示す。図はゲルの図であり、レーン1とは、その図の左側のレーンである。

【図44B】図44Bは、実施例44のデータを示す。図はゲルの図であり、レーン1とは、その図の左側のレーンである。

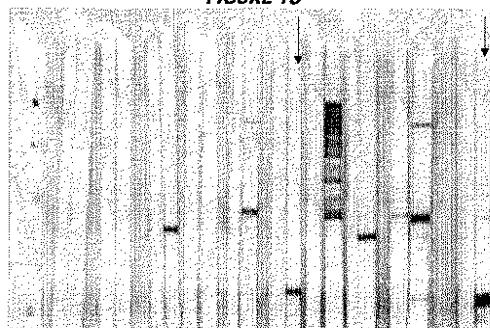
【図 1 A】

**FIGURE 1A**

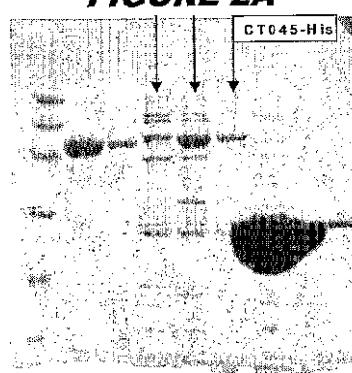
【図 1 B】

**FIGURE 1B**

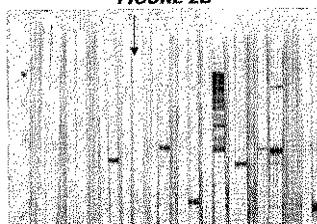
【図 1 C】

**FIGURE 1C**

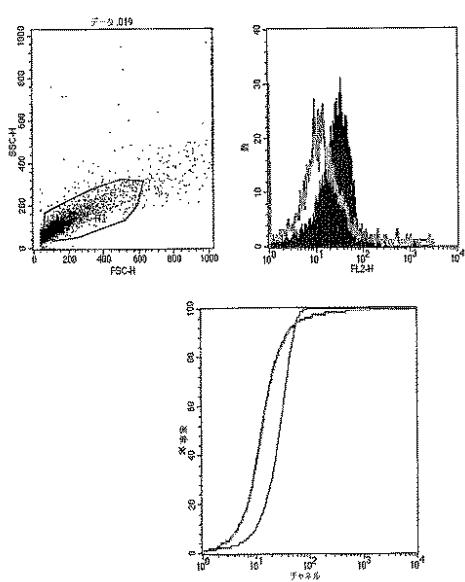
【図 2 A】

**FIGURE 2A**

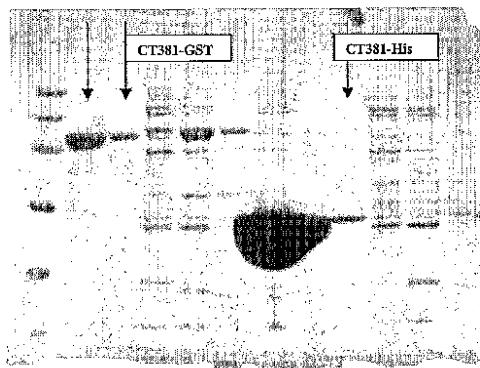
【図 2 B】

**FIGURE 2B**

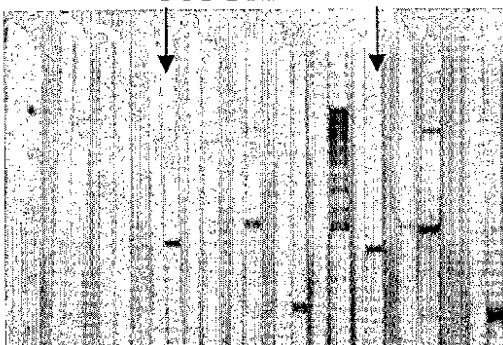
【図2C】

**FIGURE 2C**

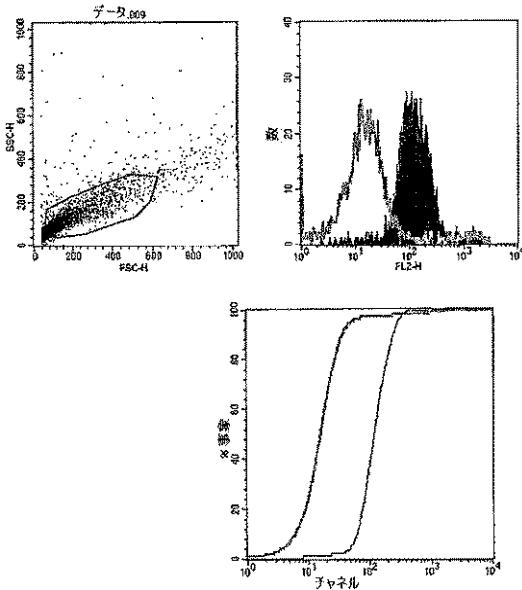
【図3A】

**FIGURE 3A**

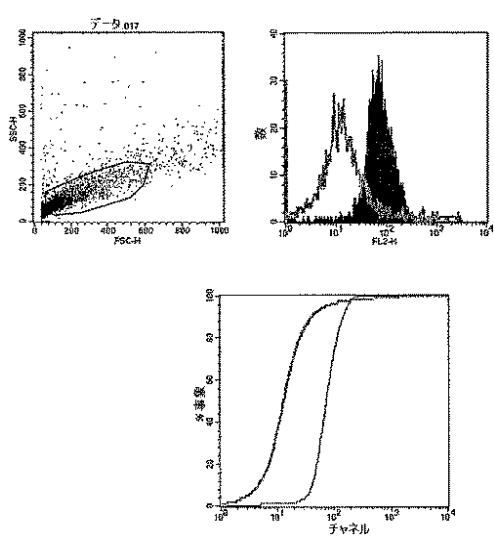
【図3B】

**FIGURE 3B**

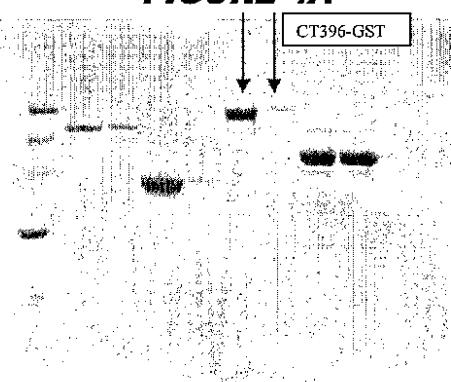
【図3C】

**FIGURE 3C**

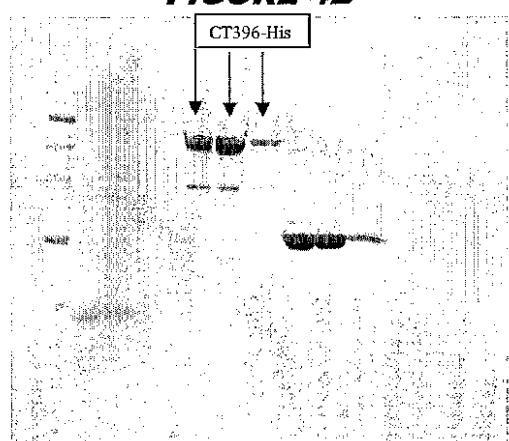
【図3D】

**FIGURE 3D**

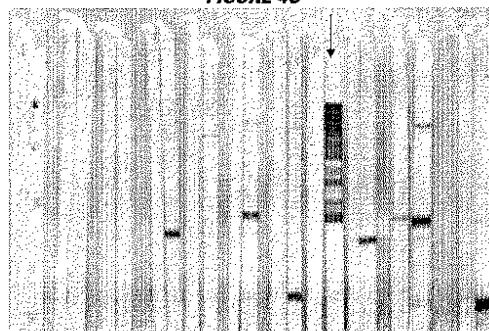
【図4A】

**FIGURE 4A**

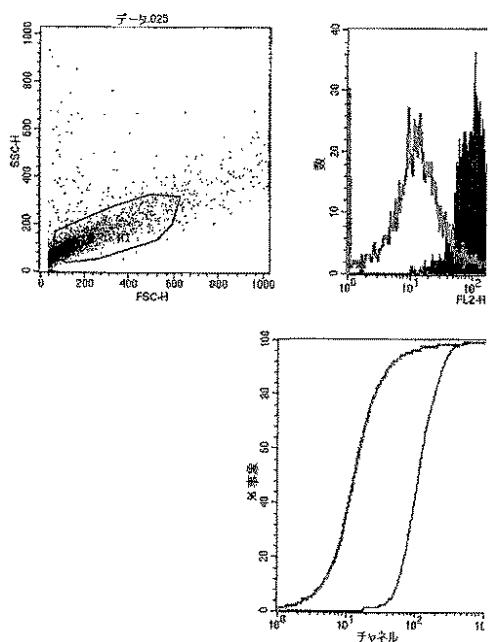
【図4B】

**FIGURE 4B**

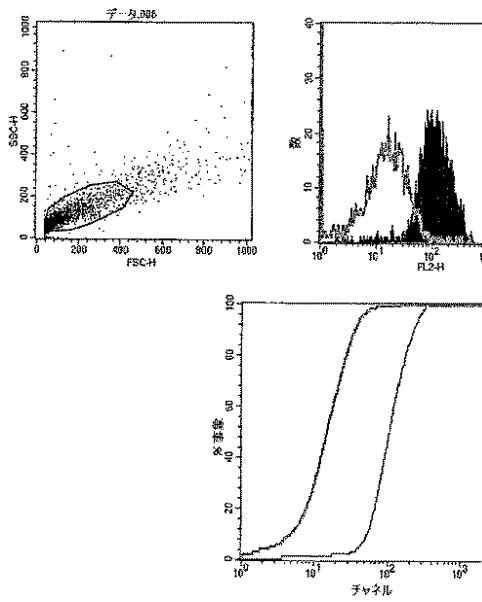
【図4C】

**FIGURE 4C**

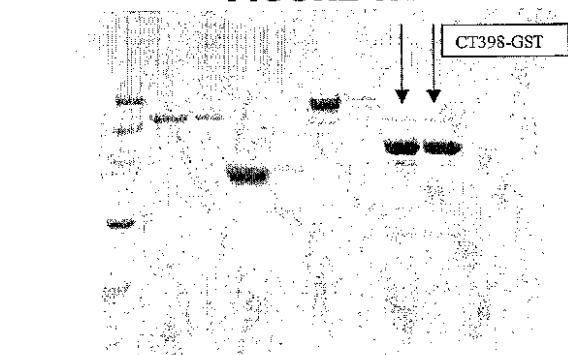
【図 4 D】

**FIGURE 4D**

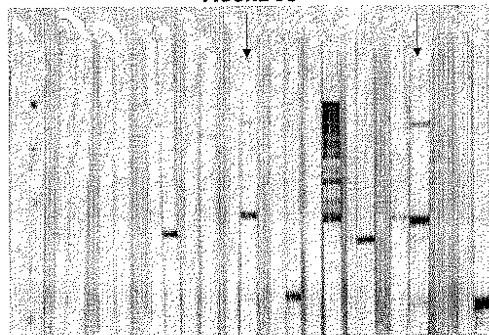
【図 4 E】

**FIGURE 4E**

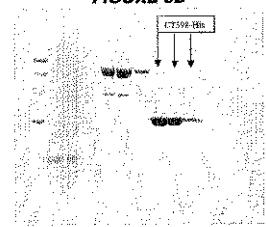
【図 5 A】

**FIGURE 5A**

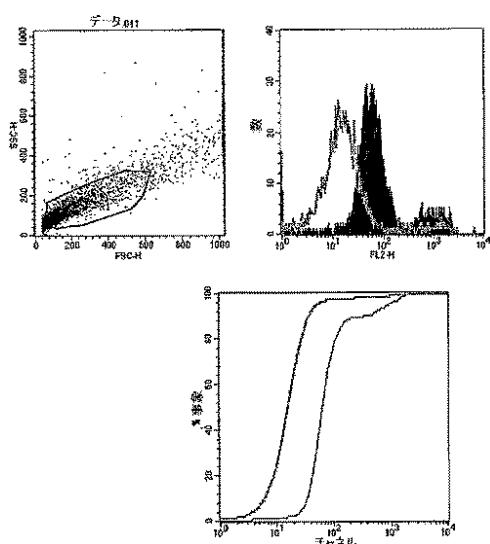
【図 5 C】

**FIGURE 5C**

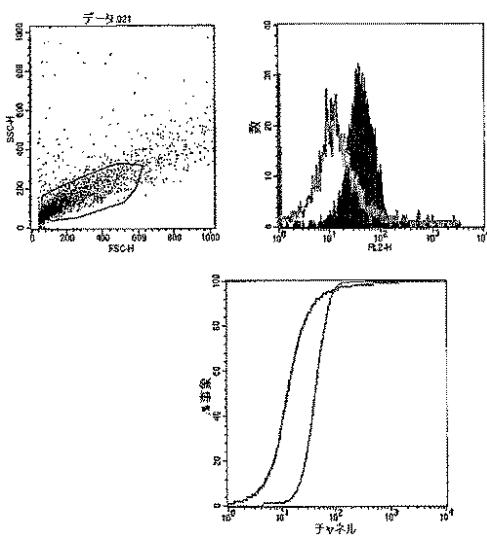
【図 5 B】

**FIGURE 5B**

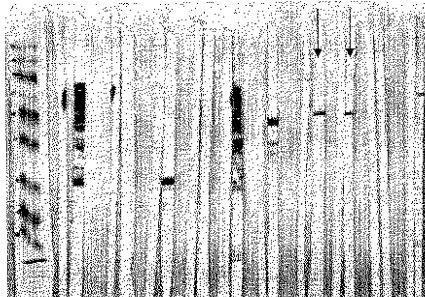
【図 5 D】

**FIGURE 5D**

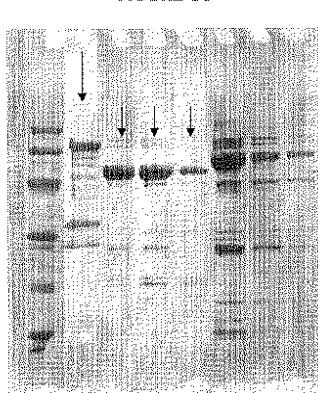
【図 5 E】

**FIGURE 5E**

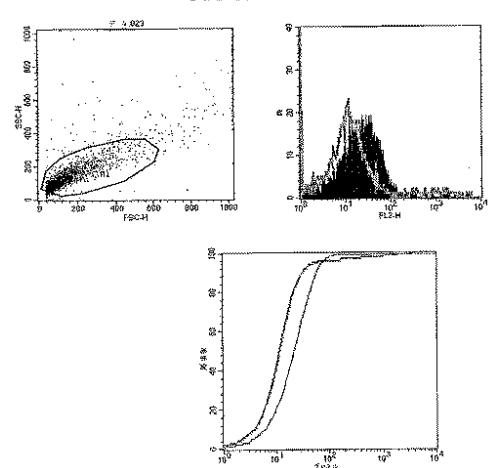
【図 6 A】

**FIGURE 6A**

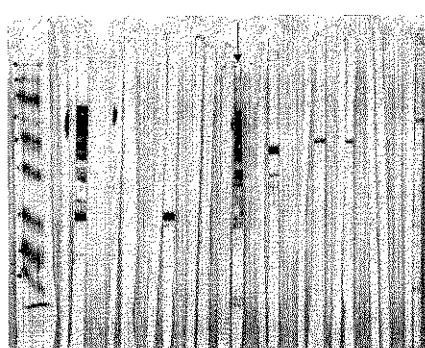
【図 6 C】

**FIGURE 6C**

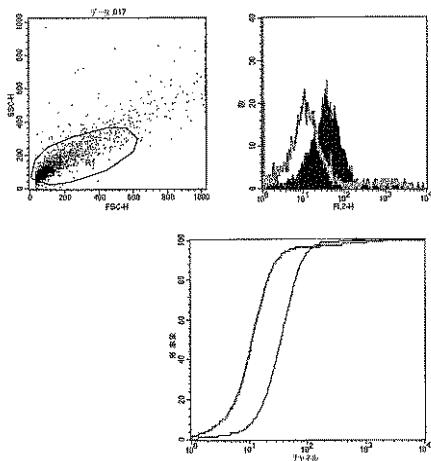
【図 6 B】

**FIGURE 6B**

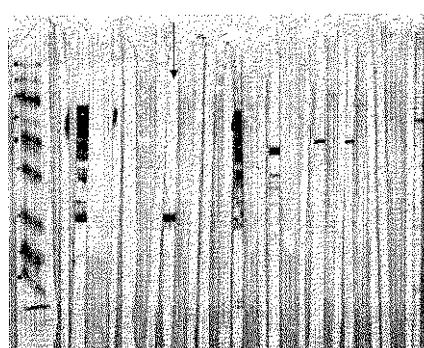
【図 7 A】



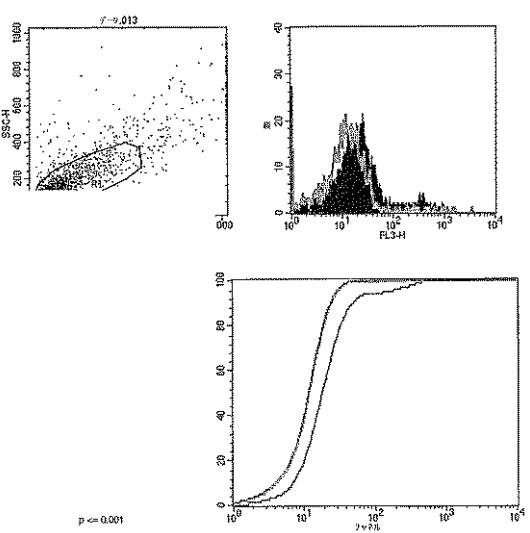
【図 7 B】

**FIGURE 7B**

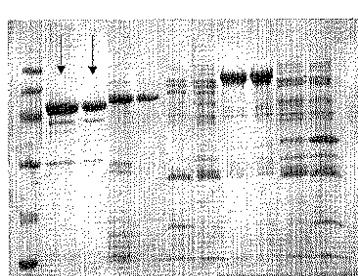
【図 8 A】



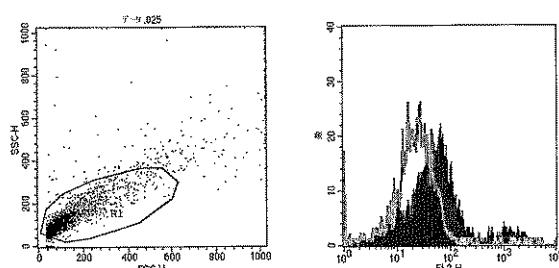
【図 8 B】

**FIGURE 8B**

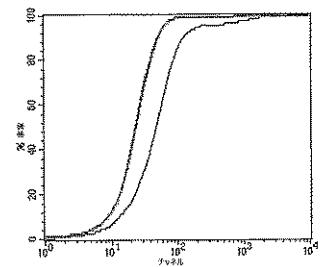
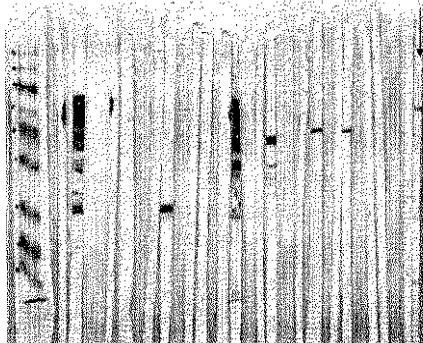
【図 8 C】

**FIGURE 8C**

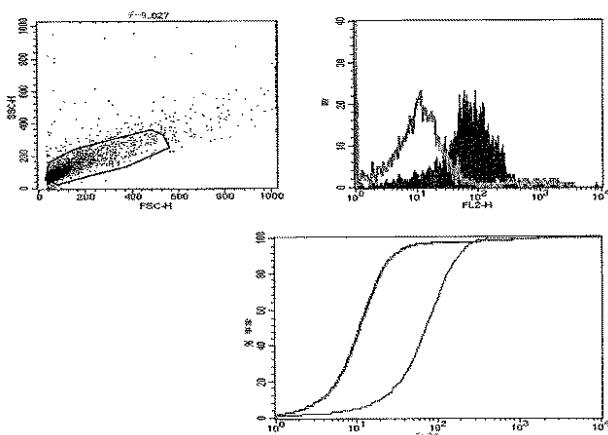
【図 9 B】

**FIGURE 9B**

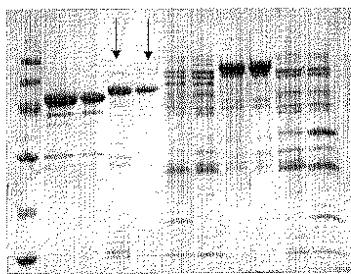
【図 9 A】

**FIGURE 9A**

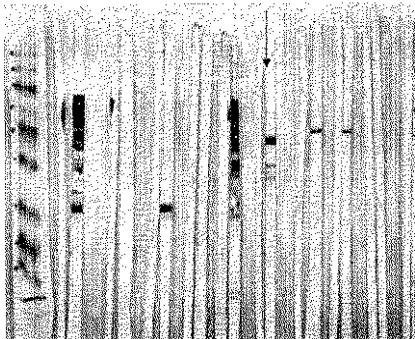
【図 9 C】

**FIGURE 9C**

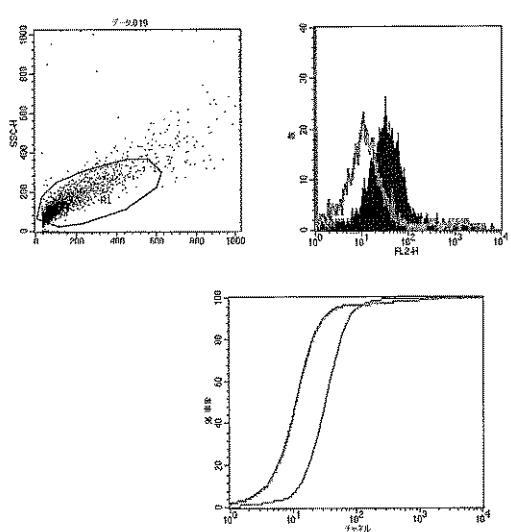
【図 9 D】

**FIGURE 9D**

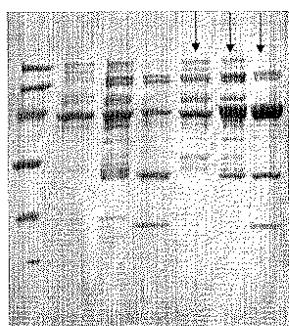
【図 10 A】

**FIGURE 10A**

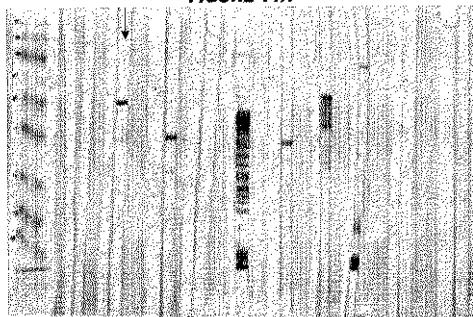
【図 10B】

**FIGURE 10B**

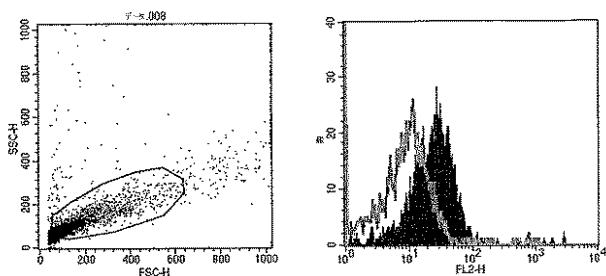
【図 10C】

**FIGURE 10C**

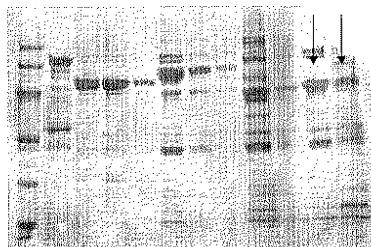
【図 11A】

**FIGURE 11A**

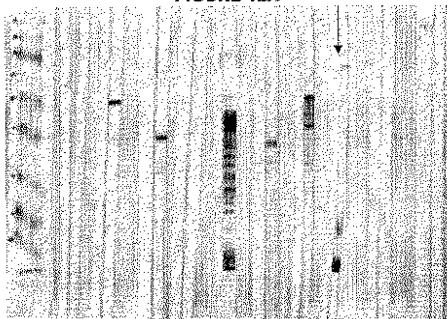
【図 11B】

**FIGURE 11B**

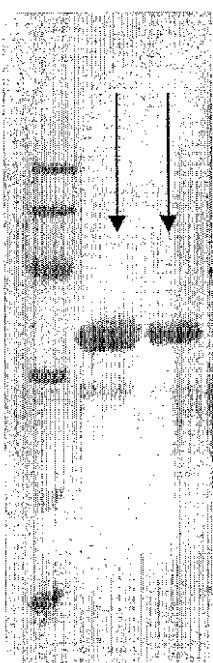
【図 11C】

**FIGURE 11C**

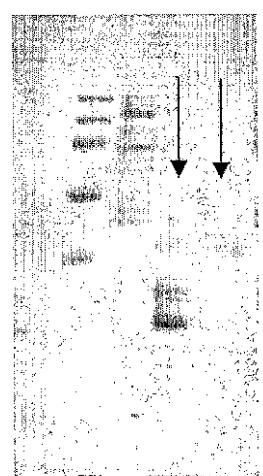
【図 12A】

**FIGURE 12A**

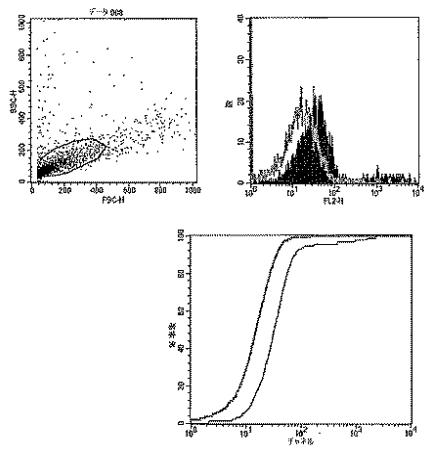
【図 12B】

**FIGURE 12B**

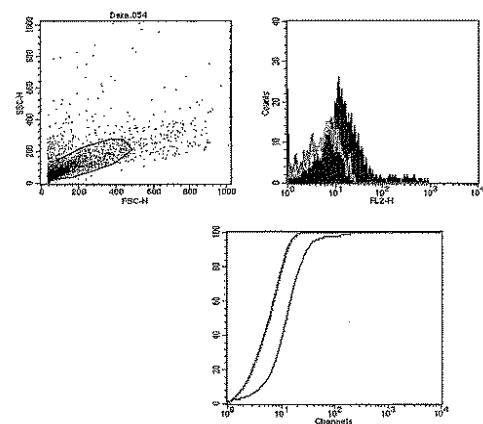
【図 12C】

**FIGURE 12C**

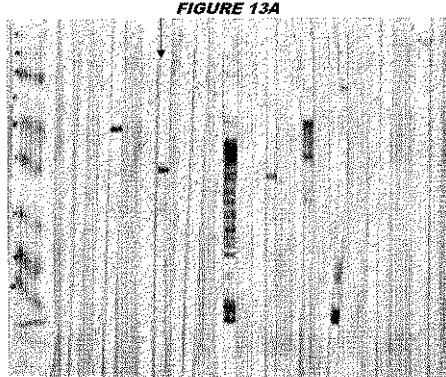
【図 12D】

**FIGURE 12D**

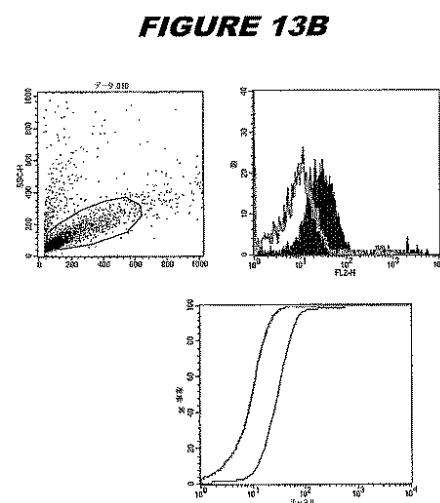
【図 12E】

**FIGURE 12E**

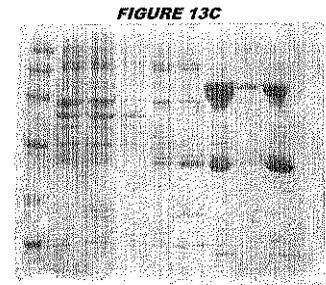
【図 13A】



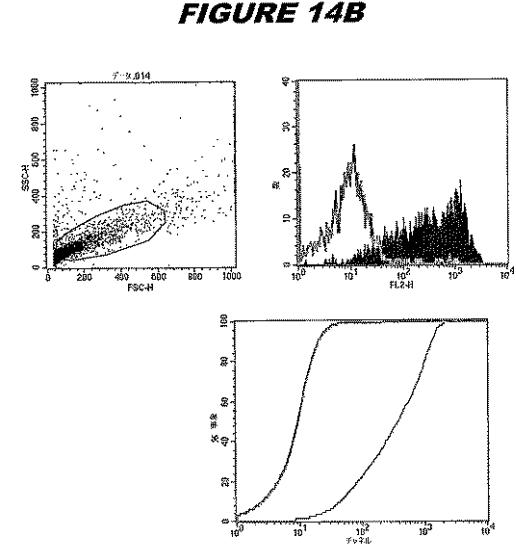
【図 13B】



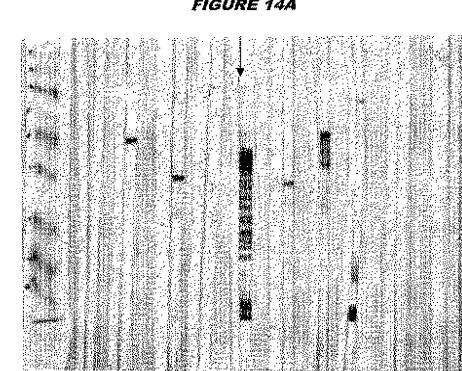
【図 13C】



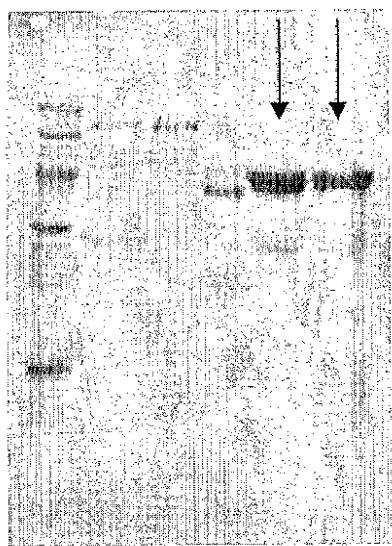
【図 14B】



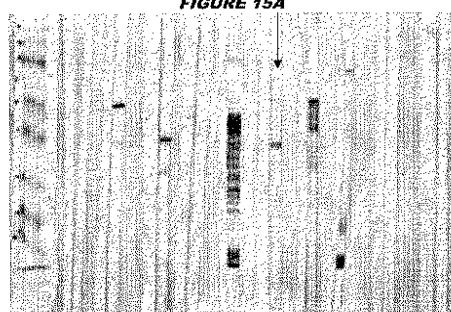
【図 14A】



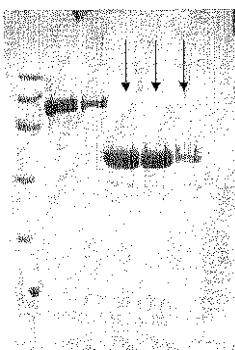
【図 14 C】

**FIGURE 14C**

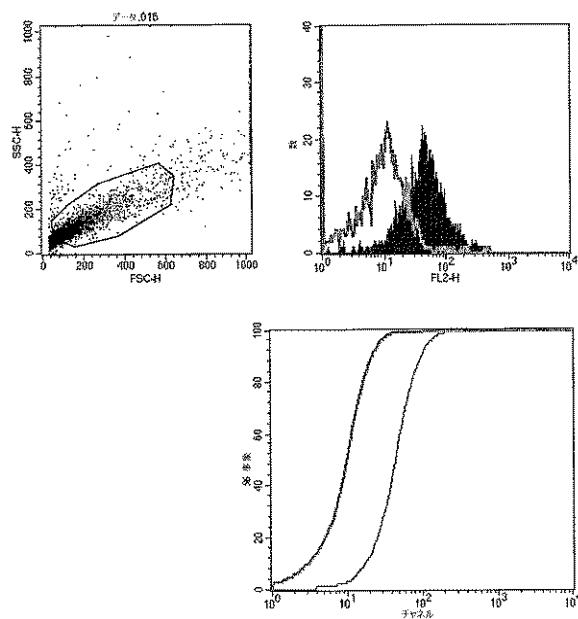
【図 15 A】

**FIGURE 15A**

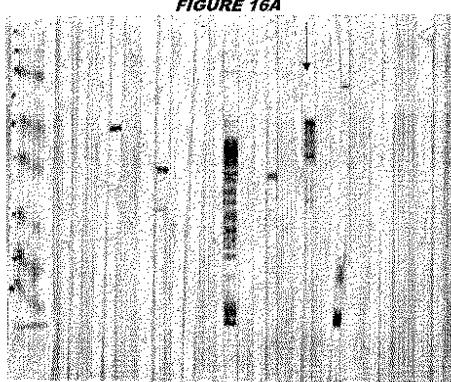
【図 15 B】

**FIGURE 15B**

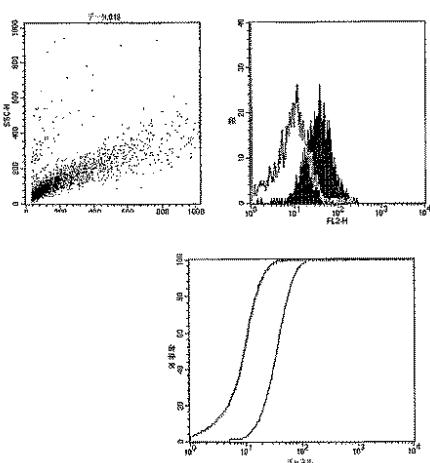
【図 15 C】

**FIGURE 15C**

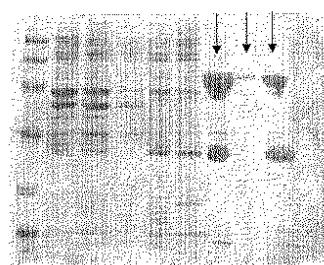
【図 16 A】

**FIGURE 16A**

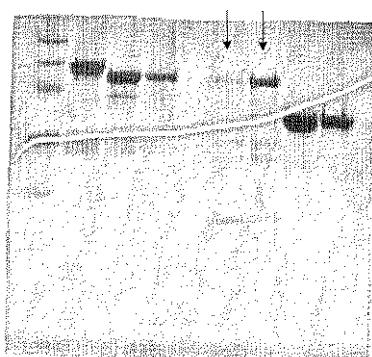
【図 16B】

**FIGURE 16B**

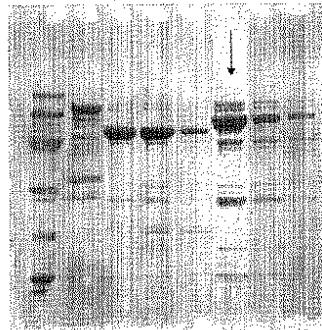
【図 16C】

**FIGURE 16C**

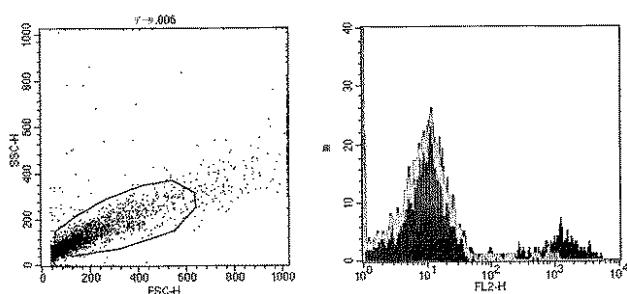
【図 17】

**FIGURE 17**

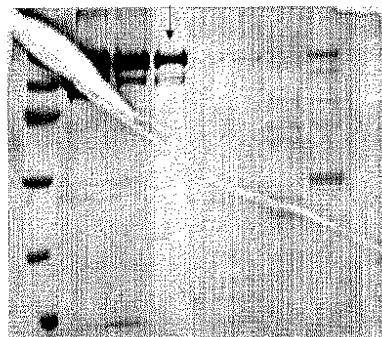
【図 18A】

**FIGURE 18A**

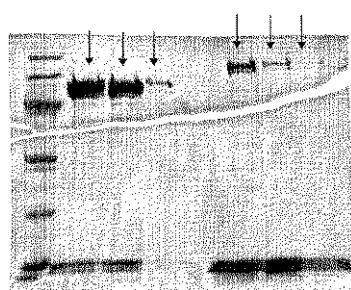
【図 18B】

**FIGURE 18B**

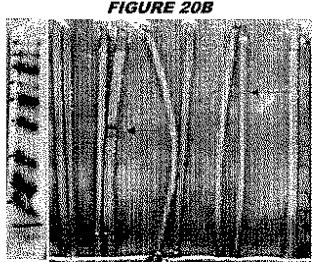
【図 19】

**FIGURE 19**

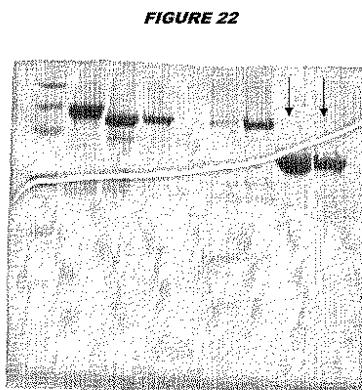
【図 20A】

**FIGURE 20A**

【図 20B】



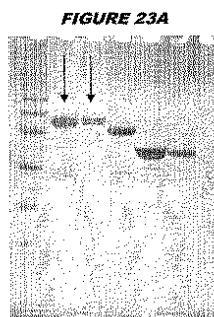
【図 22】



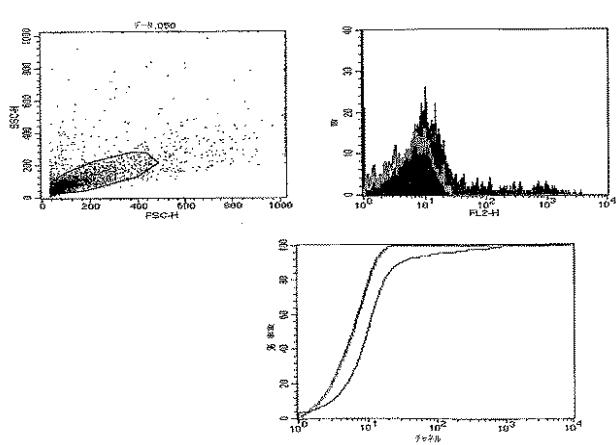
【図 21】



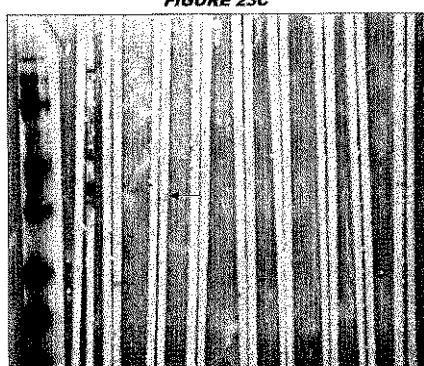
【図 23A】



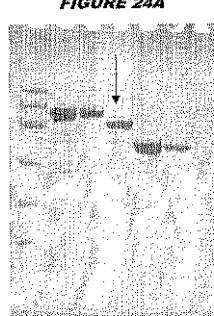
【図 23B】



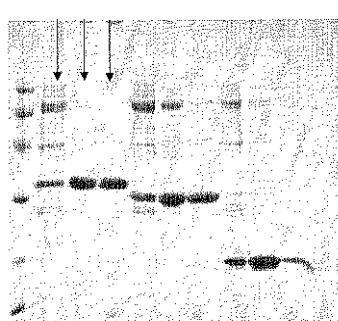
【図 23C】



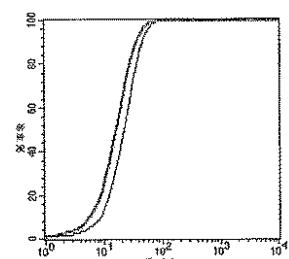
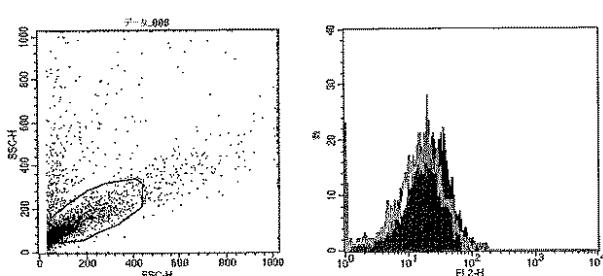
【図 24A】



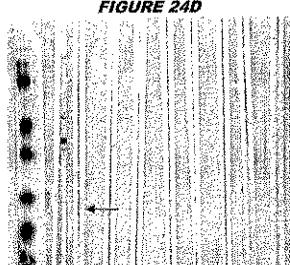
【図 24B】



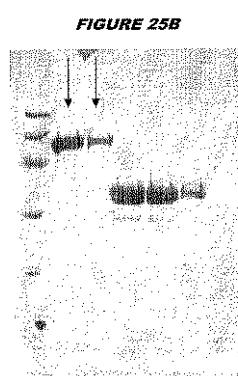
【図 24C】

**FIGURE 24C**

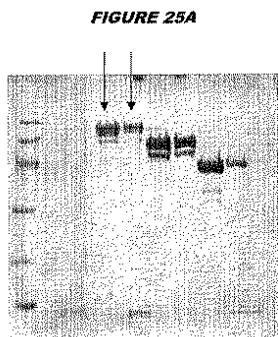
【図 24D】



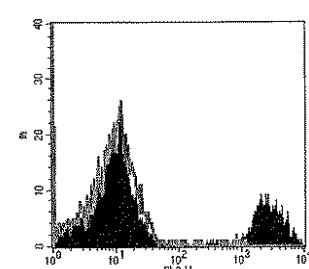
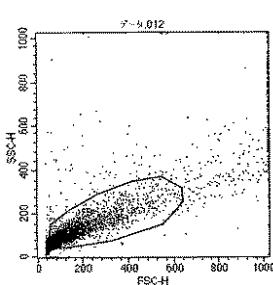
【図 25B】



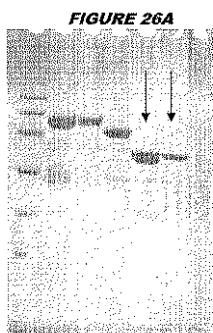
【図 25A】



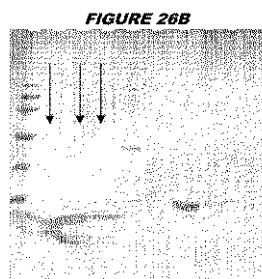
【図 25C】

**FIGURE 25C**

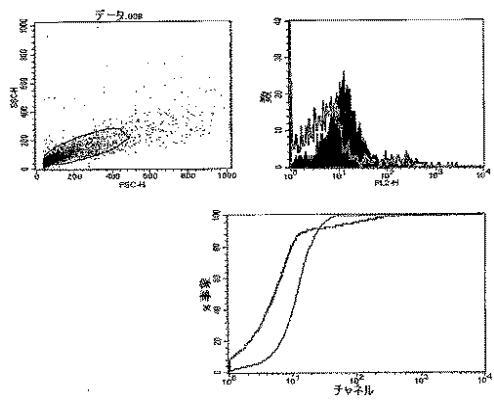
【図 26A】



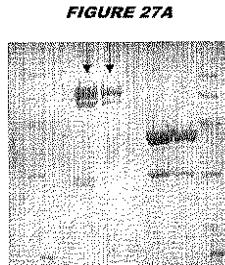
【図 26B】



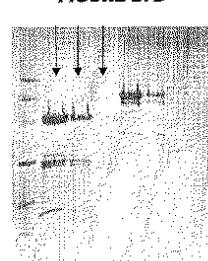
【図 27C】



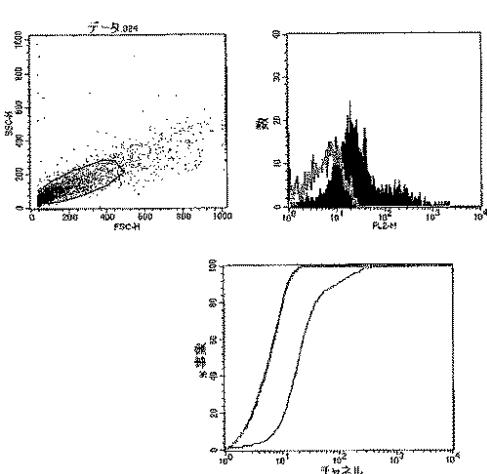
【図 27A】



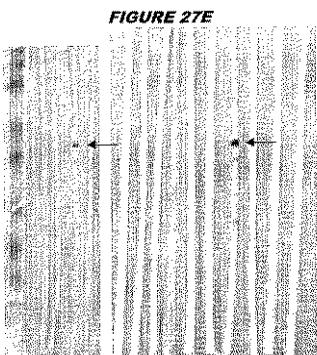
【図 27B】



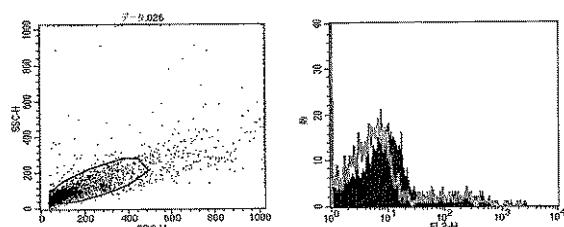
【図 27D】



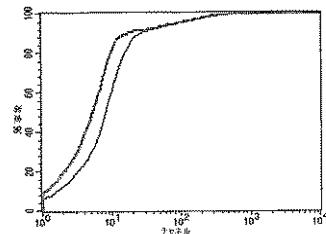
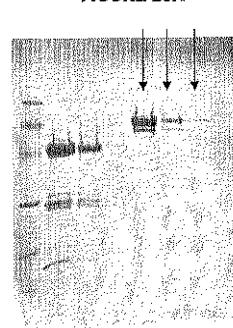
【図 27 E】



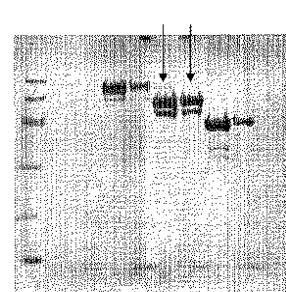
【図 28 B】

**FIGURE 28B**

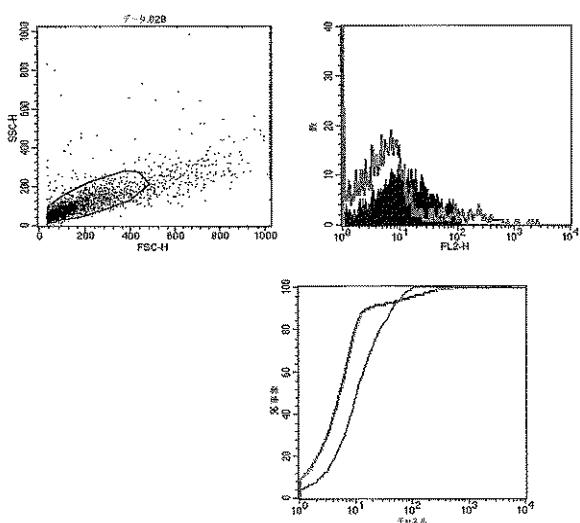
【図 28 A】



【図 29 A】

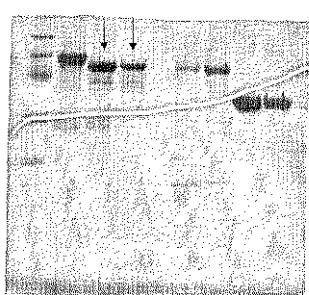


【図 29 B】

**FIGURE 29B**

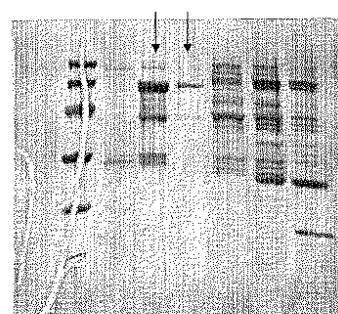
【図 3 0】

FIGURE 30



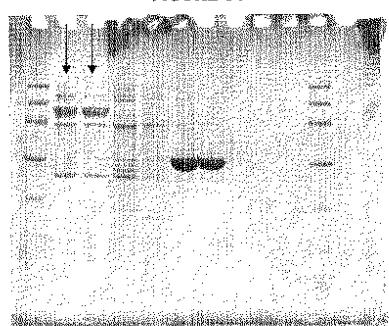
【図 3 2】

FIGURE 32



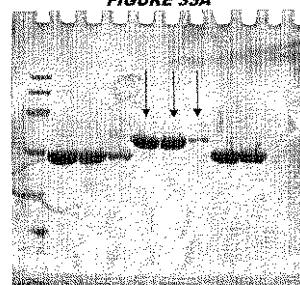
【図 3 1】

FIGURE 31



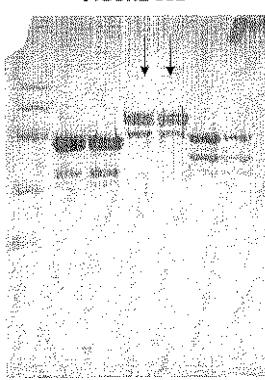
【図 3 3 A】

FIGURE 33A



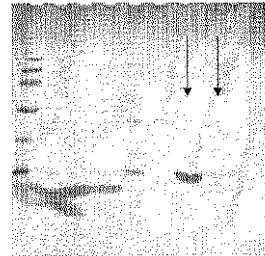
【図 3 3 B】

FIGURE 33B



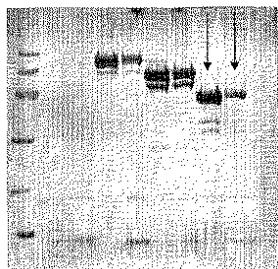
【図 3 4 B】

FIGURE 34B



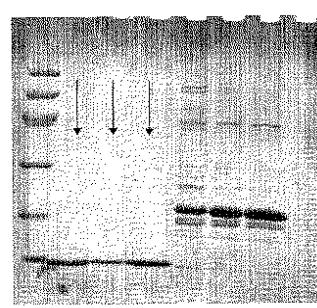
【図 3 4 A】

FIGURE 34A

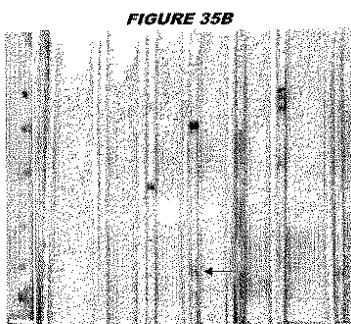


【図 3 5 A】

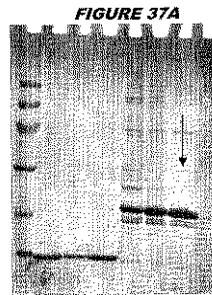
FIGURE 35A



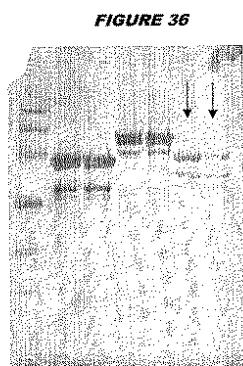
【図 35B】



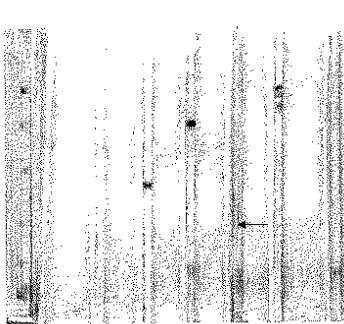
【図 37A】



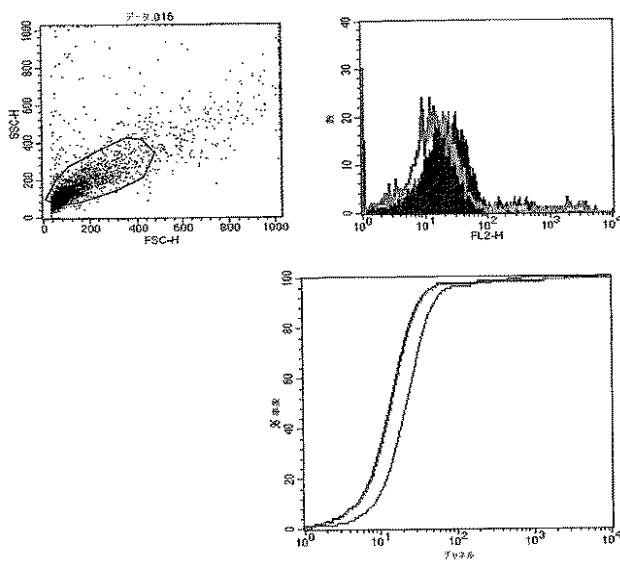
【図 36】



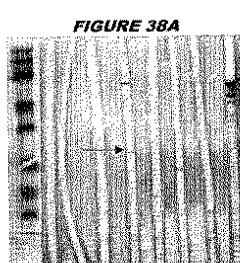
【図 37B】



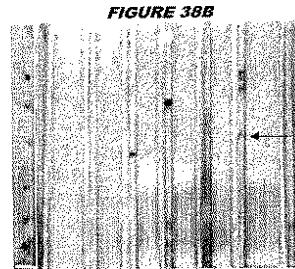
【図 37C】

**FIGURE 37C**

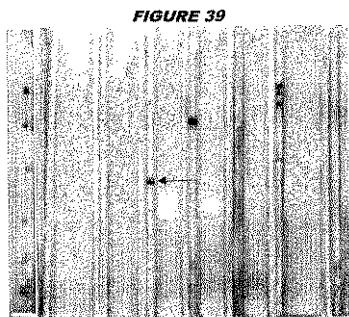
【図 38A】



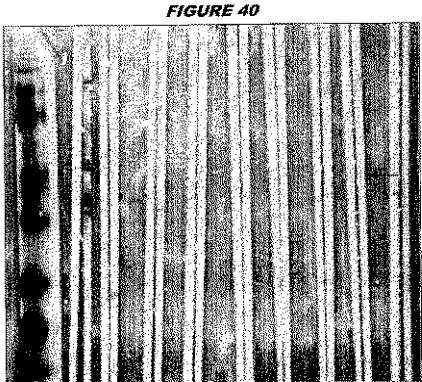
【図 38B】



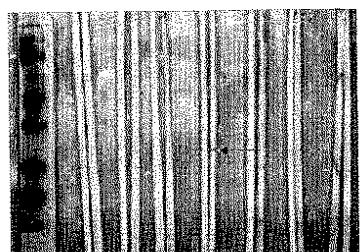
【図 3 9】



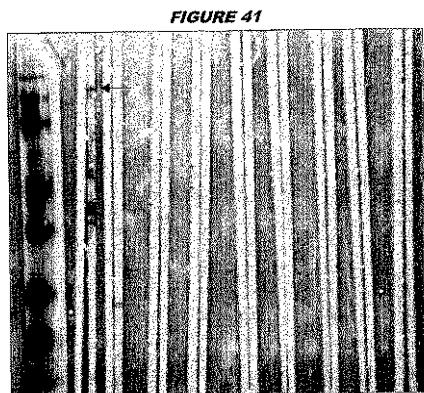
【図 4 0】



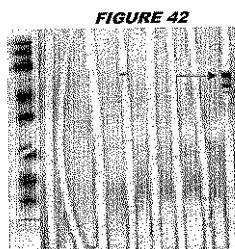
【図 4 3】



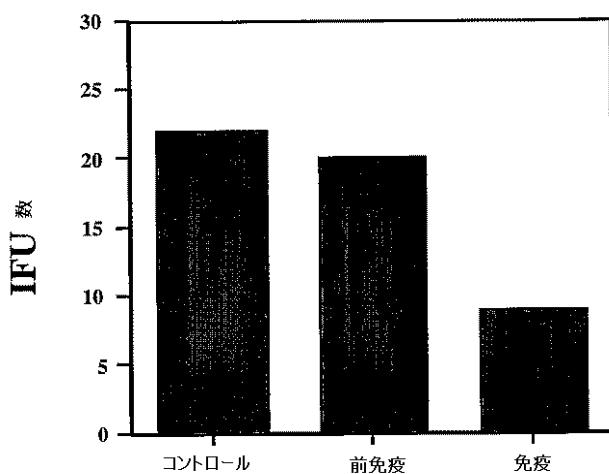
【図 4 1】



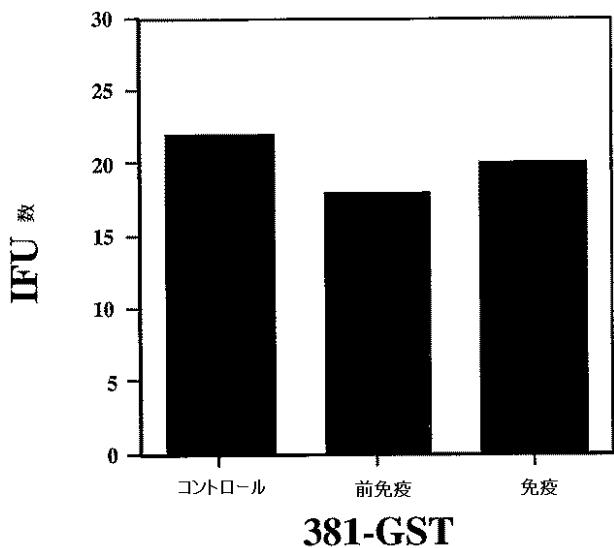
【図 4 2】



【図 4 4 A】

**FIGURE 44A****398-GST**

【図 4 4 B】

**FIGURE 44B**

【配列表】

2009072192000001.app

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 39/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/00	H
A 6 1 K 39/118 (2006.01)	A 6 1 K 39/118	
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 P 31/04	
A 6 1 P 15/00 (2006.01)	A 6 1 P 15/00	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	D
A 6 1 K 39/39 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	R
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	A 6 1 K 39/39	
G 0 1 N 33/569 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	D
	G 0 1 N 33/569	B

(72)発明者 ラッティ , ギウリオ

イタリア国 イ - 5 3 1 0 0 シエナ , ビア フィオレンティーナ , 1 , カイロン エセ  
. ピー . アー .

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA31 CA01 CA09 CA11 CA20 DA06 EA04 GA11 HA01  
HA11  
4C084 AA02 AA03 AA13 BA01 BA08 BA22 CA04 DA39 MA31 MA52  
MA55 MA56 MA60 MA63 MA66 NA14 ZA811 ZA812 ZB351 ZB352  
4C085 AA03 AA13 AA14 AA38 BA45 BB11 CC22 CC23 DD86 EE01  
EE06 FF02 FF17 FF24 GG01 GG02 GG06 GG08 GG10  
4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 NA14 ZA81 ZB35  
4H045 AA11 AA30 BA10 CA11 DA86 EA20 EA50

专利名称(译)	免疫CHLAMYDIATRACHOMATIS		
公开(公告)号	JP2009072192A	公开(公告)日	2009-04-09
申请号	JP2008236179	申请日	2008-09-16
[标]申请(专利权)人(译)	凯龙Sochie数据数组赞助拓弥塔里首发		
申请(专利权)人(译)	凯龙Sochieta一个Resuponsabirita Rimitata		
[标]发明人	グランディ グイド ラッティ ギウリオ		
发明人	グランディ, グイド ラッティ, ギウリオ		
IPC分类号	C12N15/09 C07K14/295 A61K38/00 A61K31/7088 A61K48/00 A61K39/00 A61K39/118 A61P31/04 A61P15/00 A61K39/395 A61K39/39 G01N33/53 G01N33/569 A61K38/16		
CPC分类号	A61K39/118 A61P15/00 A61P31/04 A61P31/10		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K14/295 A61K37/02 A61K31/7088 A61K48/00 A61K39/00.H A61K39/118 A61P31/04 A61P15/00 A61K39/395.D A61K39/395.R A61K39/39 G01N33/53.D G01N33/569.B A61K38 /00 A61K38/16 C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/BA31 4B024/CA01 4B024/CA09 4B024/CA11 4B024/CA20 4B024/DA06 4B024 /EA04 4B024/GA11 4B024/HA01 4B024/HA11 4C084/AA02 4C084/AA03 4C084/AA13 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA22 4C084/CA04 4C084/DA39 4C084/MA31 4C084/MA52 4C084/MA55 4C084 /MA56 4C084/MA60 4C084/MA63 4C084/MA66 4C084/NA14 4C084/ZA811 4C084/ZA812 4C084 /ZB351 4C084/ZB352 4C085/AA03 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/AA38 4C085/BA45 4C085/BB11 4C085/CC22 4C085/CC23 4C085/DD86 4C085/EE01 4C085/EE06 4C085/FF02 4C085/FF17 4C085 /FF24 4C085/GG01 4C085/GG02 4C085/GG06 4C085/GG08 4C085/GG10 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZA81 4C086/ZB35 4H045/AA11 4H045 /AA30 4H045/BA10 4H045/CA11 4H045/DA86 4H045/EA20 4H045/EA50		
代理人(译)	清水初衷		
优先权	2001029732 2001-12-12 GB 2002018233 2002-08-06 GB 2002018924 2002-08-14 GB		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

## 摘要(译)

要解决的问题：提供一种有用的抗原，用于从已发表的沙眼衣原体基因组序列进行免疫接种。用于疫苗生产和开发和/或用于诊断目的的特定沙眼衣原体蛋白序列。免疫原性组合物，其是包含与该蛋白质的氨基酸序列具有50%或更多的序列同一性的氨基酸序列的蛋白质，或包含特定沙眼衣原体蛋白质片段的蛋白质。[选择图]无

