

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-520277

(P2004-520277A)

(43) 公表日 平成16年7月8日(2004.7.8)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 39/00	A 6 1 K 39/00	Z 2 G 0 4 5
A 6 1 K 38/00	A 6 1 K 39/015	4 B 0 2 4
A 6 1 K 39/015	A 6 1 K 39/395	D 4 B 0 6 3
A 6 1 K 39/395	A 6 1 K 48/00	4 C 0 8 4
A 6 1 K 48/00	A 6 1 K 49/00	Z 4 C 0 8 5
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 131 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-540755 (P2002-540755)	(71) 出願人	500483127
(86) (22) 出願日	平成13年11月9日 (2001.11.9)		ユニバーシティ カレッジ ロンドン
(85) 翻訳文提出日	平成15年5月9日 (2003.5.9)		イギリス国 ロンドン エヌダブリュー3
(86) 国際出願番号	PCT/GB2001/004985		2 ピーエフ ローランド ヒル ストリ
(87) 国際公開番号	W02002/038173		ート
(87) 国際公開日	平成14年5月16日 (2002.5.16)	(74) 代理人	100067828
(31) 優先権主張番号	0027433.2		弁理士 小谷 悦司
(32) 優先日	平成12年11月9日 (2000.11.9)	(74) 代理人	100075409
(33) 優先権主張国	英国 (GB)		弁理士 植木 久一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 胞子虫網 (apicomplexan) 寄生虫からの細胞侵入因子に基づくワクチン

(57) 【要約】

被験者における、抗原成分に特異的な抗体の産物を増強し得るワクチンに使用される抗原成分であって、

抗体は、配列番号1のアミノ酸配列を有するPidタンパク質に特異的に結合し得る抗原成分である。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

被験者における、抗原成分に特異的な抗体産物を増強し得るワクチンに使用される抗原成分であって、
抗体は、配列番号 1 のアミノ酸配列を有するPidタンパク質に特異的に結合し得る抗原成分。

【請求項 2】

配列番号 1 のアミノ酸配列を有する前記Pidタンパク質、または実質的にその抗原性に作用しないそれらの変異体を含有する請求項 1 に記載の抗原成分。

【請求項 3】

配列番号 1 のアミノ酸配列を有する前記Pidタンパク質のペプチド断片、または実質的にその抗原性に作用しないそれらの変異体を含有する請求項 1 に記載の抗原成分。

【請求項 4】

孢子虫綱 (apicomplexan) の寄生虫から調製されるものである請求項 2 または 3 に記載の抗原成分。

【請求項 5】

前記孢子虫綱の寄生虫は、アメリア属 (Eimeria)、イソスポラ属 (Isospora)、トキソプラズマ (Toxoplasma)、ハモンディア (Hammondia)、シストイソスポラ (Cystoisospora)、肉孢子虫属 (Sarcocystis)、ベスノイチア (Besnoitia)、フレンケリア (Frenkelia)、クリプトスポリジウム (Cryptosporidium)、プラスモディウム属 (Plasmodium)、バベシア属 (Babesia)、及びタイレリア属 (Theileria) よりなる群から選択される属である請求項 4 に記載の抗原成分。

【請求項 6】

前記孢子虫綱の寄生虫は、プラスモディウム属の一種である請求項 5 に記載の抗原成分。

【請求項 7】

請求項 1 ~ 6 のいずれかに記載の抗原成分を、免疫原成分に結合させた免疫原。

【請求項 8】

請求項 7 に記載の免疫原、及びアジュバントを含有するワクチン。

【請求項 9】

請求項 1 ~ 6 のいずれかに記載の抗原成分をコードするポリ核酸を含有するワクチン。

【請求項 10】

前記ポリ核酸は更に、抗原成分をコードする配列の発現を制御する為の真核生物プロモーターを含有するものである請求項 9 に記載のワクチン。

【請求項 11】

ヒト被験者の使用に適したものである請求項 8 ~ 10 のいずれかに記載のワクチン。

【請求項 12】

P. ファルシパルム (falciparum)、P. オバレ (ovale)、P. ビバックス (vivax)、及び P. マラリエ (malariae) から選択される寄生虫によって生じるヒトマラリアへの使用に適したものである請求項 11 に記載のワクチン。

【請求項 13】

特異的結合アッセイにおいて、配列番号 1 のアミノ酸配列を有するタンパク質に競合し得る成分を含有する治療剤。

【請求項 14】

配列番号 1 のアミノ酸配列を有するPidタンパク質に特異的に結合し得る抗体を含有する診断剤。

【請求項 15】

請求項 1 ~ 6 のいずれかに記載の抗原成分を含有する診断剤。

【請求項 16】

配列番号 1 のアミノ酸配列またはそのペプチド断片を含有する医薬用タンパク質。

【請求項 17】

10

20

30

40

50

配列番号 1 のアミノ酸配列またはその断片を有するPidタンパク質をコードする医薬用ポリ核酸。

【請求項 18】

配列番号 1 のアミノ酸配列を有するPidタンパク質に特異的に結合し得る医薬用抗体。

【請求項 19】

孢子虫網の寄生虫によって生じる疾病に有効な医薬を製造する為の、請求項 1 ~ 6 のいずれかに記載の抗原成分の使用。

【請求項 20】

孢子虫網の寄生虫によって生じる疾病に有効な医薬を製造する為の、配列番号 1 のアミノ酸配列またはそのペプチド断片を有するタンパク質の使用。

10

【請求項 21】

孢子虫網の寄生虫によって生じる疾病に有効な医薬を製造する為の、配列番号 1 のアミノ酸配列またはその断片を有するPidタンパク質をコードするポリ核酸の使用。

【請求項 22】

孢子虫網の寄生虫によって生じる疾病を診断する診断剤を製造する為の、配列番号 1 のアミノ酸配列を有するPidタンパク質に特異的に結合し得る抗体の使用。

【請求項 23】

孢子虫網の寄生虫によって生じる疾病を診断する診断剤を製造する為の、請求項 1 ~ 6 のいずれかに記載の抗原成分の使用。

【請求項 24】

孢子虫網の寄生虫によって生じる疾病を診断する方法における請求項 14 または 15 に記載の診断剤の使用。

20

【請求項 25】

孢子虫網の寄生虫によって生じる疾病を診断する診断剤を製造する為の、配列番号 1 のアミノ酸配列またはそのペプチド断片を含有するタンパク質の使用。

【請求項 26】

孢子虫網の寄生虫によって生じる疾病を診断する診断剤を製造する為の、配列番号 1 のアミノ酸配列またはその断片を有するPidタンパク質をコードするポリ核酸の使用。

【請求項 27】

孢子虫網の寄生虫によって生じる疾病に有効な医薬を製造する為のPidタンパク質 C d c 4 2 のインヒビターの使用。

30

【請求項 28】

前記孢子虫網 (apicomplexan) 寄生虫は、アメリカ属 (Eimeria)、イソスポラ属 (Isospora)、トキソプラスマ (Toxoplasma)、ハモンディア (Hammondia)、シストイソスポラ (Cystoisospora)、肉孢子虫属 (Sarcocystis)、ベスノイチア (Besnoitia)、フレンケリア (Frenkelia)、クリプトスポリジウム (Cryptosporidium)、プラスモディウム属 (Plasmodium)、パベシア属 (Babesia)、及びタイレリア属 (Theileria) よりなる群から選択される属である、請求項 19 ~ 27 のいずれかに記載の使用。

【請求項 29】

前記疾病は、マラリア、コクシジウム症、タイレリア症、クリプトスポリジウム症、イソスポーラ症、プラストシストシス (blastocystosis)、パベシア症、アナプラスマ症、サルコスポリディオシス (sarcosporidiosis)、トキソプラスマ症、及び肉孢子虫症より選択されるものである請求項 19 ~ 28 のいずれかに記載の使用。

40

【請求項 30】

前記孢子虫網の寄生虫は、プラスモディウム属の一種である請求項 19 ~ 29 のいずれかに記載の使用。

【請求項 31】

前記孢子虫網の寄生虫は、プラスモディウムファルシパルム (Plasmodium falciparum)、プラスモディウムビバックス (Plasmodium vivax)、プラスモディウムオバレ (Plasmodium ovale)、プラスモディウムマラリエ (Plasmodium malariae) から選択される一種

50

である請求項 30 に記載の使用。

【請求項 32】

前記疾病はマラリアである請求項 19 ~ 31 のいずれかに記載の使用。

【請求項 33】

前記疾病は、ヒトマラリアである請求項 32 に記載の使用。

【請求項 34】

被験者の孢子虫網による感染症を診断する *in vitro* の方法であって、
 (i) 被験者から、核酸含有サンプルを得る工程、及び
 (ii) 該サンプルを用い、*Pid* の核酸配列特徴の有無をテストする工程
 を包含する方法。

10

【請求項 35】

前記孢子虫網は、*Plasmodium* 属の一種である請求項 34 に記載の方法。

【請求項 36】

サンプルは、赤血球細胞を含有するものである請求項 34 または 35 に記載の方法。

【請求項 37】

前記核酸サンプルは、テストの前に増幅されるものである請求項 34 ~ 36 のいずれかに記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

この発明はワクチン用抗原成分に関し、特に、孢子虫網によって生じる疾病用の抗原成分に関するものである

20

【背景技術】

【0002】

孢子虫網には、*Eimeria* 属 (*Eimeria*)、*Isospora* 属 (*Isospora*)、*Toxoplasma* (*Toxoplasma*)、*Hammondia* (*Hammondia*)、*Cystoisospora* (*Cystoisospora*)、肉孢子虫属 (*Sarcocystis*)、*Besnoitia* (*Besnoitia*)、*Frenkelia* (*Frenkelia*)、*Cryptosporidium* (*Cryptosporidium*)、*Plasmodium* 属 (*Plasmodium*)、*Babesia* 属 (*Babesia*)、及び *Theileria* 属 (*Theileria*) といった属の寄生虫を始めとする様々な寄生虫が包含される。

30

【0003】

上記孢子虫網に属する全ての属は、アピカル複合体と呼ばれる特別のオルガネラ (以下、この名前と呼ぶ) を有している。このオルガネラは、侵入中に標的細胞の表面に突出する分泌性の顆粒 / タンパク質を含有している。この様なタンパク質の突出は、細胞の侵入よりも前に起こる。

【0004】

これらの寄生虫は、広範囲の宿主生物体の疾病に関与している。例えば *Eimeria* 属 (*Eimeria*) の種は、少なくとも鶏、七面鳥、雁、鴨、蓄牛、羊、豚、馬、ウサギ、ラット、及びマウスに対し、病原性を有することが知られている。ヒト、子犬、馬及び子羊における *Toxoplasma* 症は、*Toxoplasma* (*Toxoplasma*) の種、特に *T. gondii* (*T. gondii*) が関与している。クリプトスポリジウム種は、哺乳類、鳥及び爬虫類に感染する。特に *C. muris* (*C. muris*) 及び *C. parvum* (*C. parvum*) は、蓄牛、羊及びヒトに胃腸疾患をもたらすことが知られている。

40

【0005】

更に *Babesia* 種は、蓄牛、馬、羊、ヤギ、豚、猫及び犬を含む家畜動物に対し、致命的な疾患をもたらす。 *Theileria* 種は、蓄牛、羊及びヤギに感染力があることが知られている。特に *T. parva* (*T. parva*) 及び *T. annulata* (*T. annulata*) は、蓄牛における重篤な病原体であり、前者は、アフリカの *Theileria* 症または東海岸熱をもたらす。

【0006】

最も鋭意研究されている孢子虫網由来疾病の一つがマラリアである。この疾病は、現代に

50

おけるヒトの罹患率及び死亡率が最も重篤な、単一原因よりなる疾病の一つであり、感染者は、一年間につき推定で3百万人、正確には約500万人に近い(Butler, D. and J. Maurice, 1997)。

【0007】

マラリアは、プラスモディウム種によって生じるが、これは、雌性蚊のベクターを介して脊椎動物の血液に侵入する。今日、4種類のプラスモディウム種、即ち、P. ファルシパルム(*falciparum*)、P. オバレ(*ovale*)、P. ビバックス(*vivax*)、及びP. マラリエ(*malariae*)がヒトマラリアに関与している。これらのうち主な感染源は、P. ファルシパルム(*falciparum*)であると広く認識されている。更にヒト以外の霊長類では、P. cynomolgi、P. knowlesi、P. brasilianum、P. inui、P. berghei、P. yoelii、P. vinckei、及びP. chabaudiを含め、少なくとも20種類のプラスモディウムが関与していることが知られている。

10

【0008】

プラスモディウム種のライフサイクルを図1に示す。

【0009】

感染段階で、スポロゾイトは、蚊の唾液腺から血流中に直接侵入する。次に、スポロゾイトは肝細胞を攻撃し、過剰の赤血球シソゴニー(増殖生産)と呼ばれるプロセスを繰り返す。このステージで、P. ビバックス(*vivax*)またはP. オバレ(*ovale*)といった或る種の寄生虫は、ヒプノゾイトへと進展し、休眠状態を保つが、復活して再発する恐れもある。

【0010】

(種依存性の)期間経過後、メロゾイトと呼ばれる様になる寄生虫は、再び血流に侵入する。メロゾイトは赤血球に侵入した後、更に赤血球シソゴニーと呼ばれる繰り返し期へと進む。感染した赤血球細胞が破裂した後、遊離したメロゾイトは順次、新しい赤血球細胞に侵入する。この感染サイクルは、何回も繰り返される。

20

【0011】

メロゾイトは、マラリア疾患の主原因であると考えられている。例えば上記寄生虫は、その作用が、様々なマラリアの兆候及び症状に関与していると考えられている腫瘍壊死因子の様なサイトカインの遊離を刺激する。更に大脳マラリアは、脳内毛血管に癒着した感染赤血球細胞によって生じることが知られている。

【0012】

幾つかのメロゾイトは、生殖段階でガメトサイト(生殖母細胞)へと進展し得るが、雌性蚊が再び刺すと集結する。受精期間後、オーキネートが生成され、スポロゾイトへの進展準備ができると、蚊の消化管に侵入する。次にスポロゾイトは、次の刺傷に備えて、蚊の唾液腺を貫通する。

30

【0013】

マラリア以外の胞子虫網寄生虫が関与する疾病に対する最近の治療は、成功例が限られている。この属の生物体に有用なワクチンは、トキソプラズマ症に対する弱毒生ワクチン一つしかなく、動物用に認可されているのみである。葉酸阻害剤及びマクロライドによる治療は、トキソプラズマ症には有効であるが、スルファジアジン及びピリメタミンは、妊娠中の使用は危険である為、妊娠中にも使用でき、最も有効に治療し得る新規な治療法の開発が必要である。スピラミシン等のマクロライドは安全性に劣り、血管-脳バリアを通過することができない為、脳内トキソプラズマ症の治療には適さない。クリプトスポリジウム症に有効な治療法またはワクチンは、今のところ無い。

40

【0014】

マラリアへの抗疾病対策としては、蚊刺傷の予防、抗寄生虫薬及び予防治療法が広く含まれる。

【0015】

1980年代から、P. ファルシパルム(*falciparum*)のタンパク質成分を用いて、宿主防御抗体を刺激するワクチンを開発する試みがなされている。しかしながら、供試ワクチンはいずれも、当該分野で免疫応答が有効であるといえる程、強い刺激は認められなかった。

50

SPf66は、血液ステージをターゲットとする合成ワクチンであるが、実地試験では何らかの防御が認められたものの、現時点では、マラリアコントロール用の適切な候補物質とは考えられていない。

【0016】

SPf66は免疫原を有しており、南アメリカの住民では、或る程度の防御（30～35%）が認められたと報告されているが、高レベルの伝染力に曝されているアフリカの子供達には、殆ど無防備であった。このことは、上記ワクチンによる効力は、系統間の境界を超えられないことを意味している。ワクチン/薬物が有効である為には、疾病の流行地域にかかわらず、寄生虫-系統の境界を超えることが必要である。X線を照射したスポロゾイトは、チャレンジ試験では有効であると報告されているが、広範囲な使用は現実的でない。多くのスポロゾイトタンパク質を用いたワクチンCSPは、T細胞による応答を誘導しない為、長期間の免疫が得られなかった。メロゾイト表面タンパク質に基づく他のワクチンMSP-1は、サル臨床試験での防御が得られなかった。これらのワクチンが全て失敗した理由としては恐らく、誤った前提から直接導かれたワクチン候補物質を誤って選択したことが考えられる。可能性のある別の問題は、これらの抗原が、幾つかは重複しているが、或る地域から他の地域にわたって高度の多形を有するという点、即ち、これらは1個以上のコピー（MSP-1等）で生じるという点である。非常に重要なことであるが、ワクチン候補物質の選択に関する理論的根拠は、同種分子の生化学または生物学を考慮しておらず、どの様にしたら寄生虫伝染の全概要にフィットするのか考慮していない。例えば、過去20年間に亘って広範囲に研究されてきたMSP-1またはCSPの機能は、未だ解明されていない。分子機能の予備知識は、ワクチン設計における使用に欠くことのできない重要なものである。

10

20

【0017】

最近、宿主における細胞免疫応答を顕在化させるワクチンを開発する試みがなされている。

【0018】

その様な研究の一つとして、寄生虫に感染した肝細胞を破壊する宿主T細胞を刺激するワクチンを産生しようという試みがなされている。この研究は、所謂「プライムブースト（prime-boost）」技術を用いてなされたものであって、宿主免疫システムを一のワクチンで開始した後、他のワクチンでブーストし、細胞障害性T細胞のレベルを高めるというものである。プライムブーストワクチンの二つの成分は、同定した特定抗原に基づくDNAワクチン、及びそのDNAに挿入した同一抗原に対する遺伝子を有する、非複製ワクシニアウイルス（MVA）である。プライムブーストワクチンは、マウスの後期マラリア感染症を防御することが報告されている。現在、ヒトへの試みがなされているところである。

30

【0019】

更なる例として、RTSSは、スポロゾイトタンパク質をベースとするウイルスワクチンであるが現在、実地試験がなされている。

【0020】

しかしながら、この様な明白な進展にもかかわらず、有効な抗哺乳類ワクチンは未だ見出されていない。この様な状況下、胞子虫網寄生虫由来のマラリア及び他の疾病に対し、治療及び予防が共に有効な、新しい治療法へのニーズは依然として残っている。

40

【発明の開示】

【0021】

従って、この発明の第一の目的は、被験者における、抗原成分に特異的な抗体の産生を促進し得るワクチンに使用される抗原成分であって、抗体は、配列番号1のアミノ酸配列を有するPidタンパク質に特異的に結合し得る抗原成分を提供することにある。

【0022】

本発明者らは、胞子虫網寄生虫によって生じる侵入付与遺伝子座としてpid (Plasmodium invasion determinant) 座を同定した。寄生虫感染宿主は、感染マーカーとして、Pidタンパク質、及び当該タンパク質に対する抗体を有すると予想される。従って、Pidタンパク質は、これら寄生虫由来疾患に対する、ワクチン及び治療剤を含めた治療法における、

50

新しいターゲットの可能性を提供するものである。

【0023】

驚くべきことに、新たに同定したPidタンパク質は、pSaプラスミド (Kado, C.I. and S.M. Close, 1991; Chen, CY and C.I Kado, 1994) のosa遺伝子でコードしたOsa (oncogenic suppressive activity) タンパク質のアミノ酸配列と同じであることが分かった。上記osa座及びpid座もまた、同じヌクレオチド配列を有している。

【0024】

植物病理学分野では、pSaプラスミドは、Agrobacterium tumefaciensによる植物腫瘍刺激能を完全に阻害することが知られている。関連研究によれば、Osa座のみが、この阻害発生に適していることが報告されている。A. tumefaciensによる腫瘍形成力は、細菌Tiプラスミドの特異的なセクター (T-DNA) が植物細胞へトランスファーすることによって仲介される。上述の研究は、Osaタンパク質が、細菌から植物へVirE2がトランスファーされるのをブロックすることにより、腫瘍形成力を抑制し得ることを示唆するものである。

10

【0025】

本発明の第一の目的によれば、ワクチンに应答して被験者に生じた抗体に対する特異的ターゲットとなる、Pidタンパク質を提供するものである。

【0026】

抗体は一般に、エピトープまたは抗原決定基として知られているタンパク質の一部に結合している。タンパク質は、一以上のエピトープを有しており、一つのタンパク質に存在する様々なエピトープは、種々の抗体で認識されていると考えられる。同様に一つの抗体は、一以上のエピトープに結合し得る可能性がある。しかしながら、結合親和力、更には相互作用の特異性は、様々である。

20

【0027】

ワクチンに应答して生じる抗体の結合特異性は、ワクチンの抗原成分によって決定される。要約すると、ワクチンを投与すると、抗原成分は、宿主免疫システムによって認識され、当該成分に特異的に結合し得る抗体が産生される。本明細書では、抗原成分と特異的な同起源の抗体との結合は、 $10^{-6} \sim 10^{-7}$ M、若しくはそれ以下の範囲の結合定数で起こると予測している。

【0028】

本発明によれば、ワクチンに应答して生じた抗体は更に、感染宿主における標的Pidタンパク質を認識して結合することができる。ネイティブの宿主抗原との交叉反応を阻止する為、抗体はPidと、1~10nMの範囲、好ましくは1nM以下の結合定数で、特異的に結合しなければならない。

30

【0029】

一実施態様では、抗原成分は、アミノ酸配列番号1のPidタンパク質、またはその抗原性に実質的に影響しない変異体を含有し得る。この様に、抗原成分においてPidタンパク質のエピトープに特異的に結合して生じる抗体は、標的Pidタンパク質と同じエピトープに結合することができる。

【0030】

変異体配列を有するPidタンパク質は、変異体が自然に発生し得るか、若しくはエンジニア (巧みに工作) され得る。上記変異体の配列は、配列番号1の配列と比較して、1以上のアミノ酸が付加、置換、または欠失されたものを含有し得る。同様に上記変異体は、アミノ酸配列の変異体が、タンパク質の抗原性に実質的に影響しないのであれば、一以上の修飾アミノ酸を含有し得る。例えば同類置換によるバリエーションの可能性が挙げられる。同類置換の組合わせとしては、アスパラギン及びグルタミン (NまたはQ); バリンV、ロイシンL、イソロイシンI、及びメチオニンM; アスパラギン酸及びグルタミン酸 (DまたはE); リジンK、アルギニンR、及びヒスチジンH; アラニンA、及びグリシンG; セリンS、及びトレオニンT; フェニルアラニンF、チロシンY、及びトリプトファンWである。

40

【0031】

変異体Pidタンパク質の使用は、特別な利点をもたらす。例えば上記変異体により、溶解

50

性または安定性が改善され得、他のワクチン成分と一層適合し得る。例えば、チオレドキシン等の融合標識(タグ)は当該タンパク質と結合し、安定性及び/又は溶解性が改善される。

【0032】

上述した様にタンパク質は、抗体結合エピトープを1個以上含有し得る。従って、Pidタンパク質のエピトープはいずれも、当該タンパク質の断片にのみ含まれ得る。従って、前述した様に上記抗原成分は、配列番号1のアミノ酸配列を有するPidタンパク質のペプチド断片、またはその変異体を含有し得る。

【0033】

完全なタンパク質よりはペプチド断片を使用する方が、投与がより一層容易な、小さい抗原成分を提供することができる。小断片は、完全なタンパク質に比べ、より安価に且つ簡単に製造することができる。これらは、合成化学または組換え法により、簡単に合成することができる。

【0034】

抗原成分における上記Pidタンパク質または当該Pidタンパク質のペプチド断片は、孢子虫網寄生虫由来のものであることが好ましい。上記タンパク質は、源寄生虫で発現され、単離され得る。或いは、Pid座は、寄生虫から単離され、標準クローニング技術及び発現技術によって発現され得る。好適な孢子虫網寄生虫は、アメリカ属(*Eimeria*)、イソスポラ属(*Isospora*)、トキソプラズマ(*Toxoplasma*)、ハモンディア(*Hammondia*)、シストイソスポラ(*Cystoisospora*)、肉孢子虫属(*Sarcocystis*)、ベスノイチア(*Besnoitia*)、フレンケリア(*Frenkelia*)、クリプトスポリジウム(*Cryptosporidium*)、プラスモディウム属(*Plasmodium*)、バベシア属(*Babesia*)、及びタイレリア属(*Theileria*)よりなる群から選択される属であり、好ましいのはプラスモディウム属(*Plasmodium*)である。

【0035】

寄生虫源から精製されるタンパク質は、ネイティブに近い(ミリスチル化またはグリコシル化の様な、何らかの翻訳後修飾を有する)為、抗原成分源として推奨される。しかしながら、これらのタンパク質は、十分な量を精製することが困難である。細菌発現により、大量の組換えタンパク質が生じることは保証されるが、翻訳後修飾がなされ得るものではない。しかしながら、酵母(*Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae* または *Schizosaccharomyces pombe*)、またはバキュロウイルス/昆虫の細胞システムにおける発現は、組換えタンパク質が適切に修飾されることを保証するものである。しかし、抗原成分の使用に適したPidタンパク質の合成模倣品が構築され得ることも認識されている。

【0036】

抗体反応の顕在化を狙ったワクチンでは、免疫原性は、ワクチンの免疫原によって介在される。従って、本発明の第二の目的は、免疫原成分に結合する抗原成分を含有する免疫原を提供することにある。

【0037】

抗原成分はそれ自体、免疫原性を有する為、抗原成分それ自体が免疫原性成分を含有している。しかしながら、抗原成分は非常に小さいので、例えば宿主に対する免疫原性を有することはできない。その様な場合、抗原成分を、適切な担体に結合することが必要である。従って、単離した抗原は、生物感染の間に顕在化するのと同様のレベルまで或る程度、刺激することが好ましい。抗原の提示及び免疫原性を増強する為に、ウシ血清アルブミン及びキーホール(keyhole)カサガイヘモシアニン等のハプテン; ウイルス粒子またはデンドリマーに結合させてもよい。生ワクチンとして、経口的にデリバリーされるワクチンを運ぶことができる様に、弱毒化サルモネラ菌株をエンジニアすることも可能である。サルモネラは、抗体反応及び細胞性免疫応答の両方を高度に誘導する為、上記目的に適している。

【0038】

本発明の更なる目的は、抗体反応を増強する免疫原及びアジュバントを含有するワクチン

を提供することにある。例えば、非ヒトワクチンでは、フロイントの完全アジュバント及びフロイントの不完全アジュバントの使用が好ましい。ヒトでは、水酸化アルミニウム及びリン酸アルミニウムをアジュバントとして使用することが認可されている。更に好ましくは、アジュバントには、リポソーム、BCG、リポ多糖類、ムラミルジペプチド誘導體、スクワラン、非イオン疎水性ブロック共重合体、プルロニック(pluronic)ポリオール、酢酸ビニルエチレン、シクロデキストリン及びポリシアル酸が含まれる。

【0039】

本発明の更なる目的は、上述した抗原成分をコードするポリ核酸を含有するワクチンを提供することにある。上記ポリ核酸には、例えばDNA、RNA、または合成核酸が含まれる。

10

【0040】

一実施態様では、上記ポリ核酸は、配列番号2の配列を含有する。

【0041】

代表的にはポリ核酸ワクチンは、被験者の細胞性免疫応答を促す為に用いられる。上記タイプのワクチンの特徴部分は、ポリ核酸のワクチンでコードした抗原成分は、被験者の細胞表面で発現され、提示されるということである。これらのワクチンは、抗原が細胞内にある自然状態を模倣する為、特に、細胞内に侵入する寄生虫由来の疾病に使用することができる。

【0042】

本発明ワクチンのポリ核酸は更に、抗原成分を有効に発現する為の配列を含有する。この様な配列は例えば、プロモーター配列を含有し得るか、または分泌シグナルをコードし得る。

20

【0043】

好都合なことに、本発明のワクチンは更に、ポリ核酸を被験者に運ぶデリバリー手段を有している。上記ワクチンは更に、被験者の細胞性免疫応答を増強するアジュバントを含有し得る。

【0044】

本発明のポリ核酸ワクチンは、二つの主な形態、即ち、裸(naked)ワクチンまたは生ワクチンのいずれかをとることが好ましい。

【0045】

裸ワクチンの場合、上記ポリ核酸は被験者に投与された後、様々な代替手段のうちのいずれかによって標的宿主細胞に運ばれる。次いで、ポリ核酸でコードした抗原成分は、宿主細胞で発現される。

30

【0046】

例えば裸ワクチンのポリ核酸は、標的宿主細胞における抗原成分の有効発現を指示する真核細胞プロモーターを運ぶことができる、プラスミドを含有し得る。このプロモーターは例えば、CMVプロモーター属またはSV40プロモーター属で構成され得る。或いは、このプロモーターは、組織特異性を有していてもよい。一実施態様では、上記プロモーターは、MyoD、ミオシンまたはミオゲニンプロモーター等の筋肉特異的プロモーターである。筋肉特異的プロモーターが重要なのは、筋肉内注射で運ばれたポリ核酸ワクチンが、筋肉細胞によって直接発現され得る為である。

40

【0047】

肝臓もまた、抗原発現の標的となり得る。アルブミンプロモーター等の肝特異的プロモーターは、発現及び分泌用の抗原読取り枠で標識された分泌シグナルと共に使用することができる。

【0048】

上記ポリ核酸は更に、抗原成分の分泌シグナルをコードする配列を含有し得、発現の間、当該成分が、宿主細胞の外表面に分泌されることを保証する。例えば分泌シグナルには、細菌発現用のmalEシグナル、昆虫細胞におけるバキュロウイルス発現用ミツバチのメリチンシグナル(Sf9、Sf21)、

50

【 0 0 4 9 】

【 数 1 】

酵母での発現用V γ -因子

及び哺乳類細胞での発現用Ig6シグナルが含まれる。

【 0 0 5 0 】

裸ワクチンのポリ核酸は更に、適切なアジュバントを提供する免疫刺激配列を含有し得る。例えば上記目的の為に、メチル化していないCpG配列を使用することができる。CpG免疫刺激配列はまた、上述した完全または不完全のフロイドアジュバントの様な、一以上の他のアジュバントと組合わせても良い。

10

【 0 0 5 1 】

被験者に運ぶ為に、裸ワクチンのポリ核酸は、例えば、リポソーム小胞またはウイルス粒子で複合化され得る。一実施態様では、上記ワクチンは、皮膚または筋肉内注射によって運ばれる。更なる態様では上記ワクチンは、噴霧によって運ばれる。リポソーム及びウイルス粒子は、担体として作用する。必須プロモーターが、デリバリーされたDNA配列に含まれるといった、組織特異的発現が要求される場合を除き、特別な細胞タイプは、ターゲットとされない。

【 0 0 5 2 】

生ワクチンの場合はまず、ポリ核酸は、適切な細菌菌株に形質転換された後、当該細菌細胞は、その細胞表面に抗原成分を発現する。次に、発現した細菌菌株を被験者に投与することにより、上記細菌は、必要なデリバリー手段を提供する。

20

【 0 0 5 3 】

上記目的に好ましい細菌菌株としては、サルモネラ、リステリア及びコリネバクテリウム (*Corynebacterium*) pseudotuberculosisの弱毒化されたアロ (aro) / 栄養要求株が挙げられる。弱毒化した単純ヘルペス、BCG及びアデノウイルス等のウイルスベクターも使用することができる。

【 0 0 5 4 】

生ワクチンのポリ核酸は、細菌における抗原成分の有効発現を指示する原核細胞プロモーターを運ぶことができる、発現ベクターを含有し得る。細菌の発現に好ましいプロモーターとしては、tac、trc、BAD、T7及びP_L/trpプロモーターが挙げられる。このポリ核酸は更に、細菌細胞から上記成分の分泌を促す分泌シグナルをコードすることができ、これにより、宿主免疫系に当該成分を発現することができる。分泌シグナルの例としては、malE、ompT、pelB及びファージfd遺伝子IIIタンパク質シグナルが挙げられる。

30

【 0 0 5 5 】

更なる態様では、抗原成分をコードするポリ核酸は、細菌の染色体に組込まれ得る。組込みによって安定性が改善され、発現レベルが高められると予想される。抗原の発現は代表的には、上述した遺伝子プロモーターのいずれか一つによって誘導される。或いは、例えばサルモネラ遺伝子プロモーターを使用することも可能である。上記分泌シグナルは、標的組換えワクチンベクターの重要部分であると予想される為、細菌の染色体に安定して組込まれる。

40

【 0 0 5 6 】

生ワクチンの場合、アジュバントの使用は最適であり、例えば、サルモネラが使用される。サルモネラは分泌を促し、体液性免疫及び細胞性免疫を促進する。

【 0 0 5 7 】

好都合なことに、上述したワクチンは、ヒト被験者への使用に適している。例えばこれらのワクチンは、上記に例示した様な、ヒトへの使用に好適なアジュバントを含有する。代表的には上記ワクチンは、生物感染に対する防御作用を有するのみならず、発熱性がなく、非炎症性で、且つ、ネクレオタイズでない (non-necrotizing)。

【 0 0 5 8 】

50

一実施態様では、本発明のワクチンは、P. ファルシパルム (falciparum)、P. オバレ (ovale)、P. ビバックス (vivax)、またはP. マラリエ (malariae) 由来のヒトマラリアへの使用に適している。

【0059】

理論による裏付けは期待されないが、本発明のワクチンは、胞子虫網寄生虫のライフサイクルにおける一以上のステージで、Pidを標的とすることができる。プラスモディウム属寄生虫の場合、上記ワクチンは例えば、哺乳動物の肝細胞または赤血球細胞へ侵入するライフサイクルのステージをターゲットとする。標的となるライフサイクルのステージは、肝臓に侵入するスポロゾイト；赤血球細胞に侵入するメロゾイト、または吸血中若しくは吸血後に蚊の消化管壁に侵入してスポロゾイトへと進化するオーキネートである。

10

【0060】

ワクチン用の新たなターゲットの提供に加えて、Pidタンパク質はまた、胞子虫網由来の疾患等の感染症に対し、新しい治療法の基礎を提供するものである。

【0061】

更に本発明の他の目的は、特異的結合アッセイで、配列番号1のアミノ酸配列を有するタンパク質に競合し得る成分を含有する治療剤を提供するものである。

【0062】

Pidタンパク質は、例えば胞子虫網の寄生虫による細胞への侵入に重要な役割を果たしていることが認識されている。理論による裏付けは期待されないが、これは、Pidとレセプターとの相互作用によって起こると考えられている。In vitroでの特異的結合アッセイにおいてPidに競合し得る成分は、レセプター結合により、in vivoでPidに競合し得ると考えられる。従って、上記成分は、Pid-レセプターの相互作用をブロックする治療剤に組み込むことができる。

20

【0063】

一実施態様では、Pidは、ターゲットレセプターまたは相互作用に関する予備知識なしに、ランダムペプチド群からファージディスプレイを組合わせ選択して使用することができる。15アミノ酸に至るランダムペプチドライブラリーが構築され、ファージ表面に提示される。次に、組換えPidタンパク質をペトリ皿に固定し、BSAでブロックして非特異的部位を塞ぐ。ファージでコードしたペプチドはその後、Pidと共にインキュベートする。上記ステップの後、非特異的結合ペプチド/ファージを洗浄し、特異的ファージを溶出して、許容細菌宿主で増幅させた後、全てのパニング (panning) サイクルが繰返される。4~5回の選択後、ペプチド配列を決定する。結合親和性は、指定部位突然変異誘導によって更に最適化される。次にこれらのペプチドを合成し、結合アッセイに用いる。高親和結合とは、1~10nMの範囲の解離定数を有するペプチドと定義され得る。IC₅₀は、競・)LISAによって決定され得る。一般には10⁻⁶~10⁻⁷の値であれば、競合結合であると考えられている。

30

【0064】

一実施態様では、Pidタンパク質の模倣品を作製し、治療剤に組込むことができると考えられる。或いは、Pidのレセプターを同定し、Pid-レセプターの相互作用の阻害剤を治療剤成分として使用することができる。

40

【0065】

レセプター抗体エピトープとPid結合部位が同じであると仮定すると、Pidレセプター抗体は、Pidとの相互作用をブロックし得るので、治療剤としても有用である。

【0066】

本発明の更なる目的によれば、本発明は、配列番号1のアミノ酸配列を含有する医薬として有用なタンパク質、またはその断片を提供するものである。更に本発明は、上記タンパク質または当該タンパク質の断片をコードする、医薬として有用なポリ核酸を提供するものである。

【0067】

本発明によれば、上記ワクチン及び治療剤は共に、胞子虫網の寄生虫由来の感染症に対す

50

る治療方法に、好適に使用することができる。

【0068】

従って、本発明の目的は、孢子虫綱の寄生虫由来の疾病に対して有効な医薬を製造する為に、上述した抗原成分の有効な使用を提供することにある。上記によれば、前述した疾病に有効な医薬の製造は、配列番号1のアミノ酸配列を含有するペプチドまたはそのペプチド断片を含有するタンパク質の使用、及び/又は上述したタンパク質またはペプチド断片をコードするポリ核酸の使用を包含し得る。

【0069】

本発明によって有効に治療し得る疾病としては、以下に示す、孢子虫綱の寄生虫由来の疾病が挙げられる。アメリカ属 (*Eimeria*)、イソスポラ属 (*Isospora*)、トキソプラズマ (*Toxoplasma*)、ハモンディア (*Hammondia*)、シストイソスポラ (*Cystoisospora*)、肉孢子虫属 (*Sarcocystis*)、ベスノイチア (*Besnoitia*)、フレンケリア (*Frenkelia*)、クリプトスポリジウム (*Cryptosporidium*)、プラスモディウム属 (*Plasmodium*)、バベシア属 (*Babesia*)、及びタイレリア属 (*Theileria*)。

10

【0070】

好ましくは、上記疾病は、以下より選択されるものである。マラリア、コクシジウム症、タイレリア症、クリプトスポリジウム症、イソスポーラ症、プラストシストシス (*blastocystosis*)、バベシア症、アナプラズマ症、サルコスポリディオシス (*sarcosporidiosis*)、トキソプラズマ症、及び肉孢子虫症。

【0071】

特に本発明は、プラスモディウム寄生虫に関連のマラリア疾病を予防・治療する手段を提供するものである。例えば *P. ファルシパルム* (*falciparum*)、*P. オバレ* (*ovale*)、*P. ビバックス* (*vivax*)、及び *P. マラリエ* (*malariae*) より選択される寄生虫由来のヒトマラリアは、特に重要なターゲットとなる。

20

【0072】

上記に特記した通り、Pidタンパク質は、孢子虫綱の寄生虫等といった、pid座を運ぶ微生物由来の感染症における適切なマーカーを提供するものである。従って、本発明の目的の一つは、配列番号1のアミノ酸配列を有するPidタンパク質に特異的に結合し得る抗体を含有する診断剤を提供することにある。

【0073】

本明細書によれば、上記抗体は代表的には、 10^{-6} ~ 10^{-7} の範囲の結合定数を有するPidタンパク質に結合することができる。上記診断剤は好ましくは、抗体 - Pid複合体を検出する手段を包含する。上記抗体は例えば、発蛍光団、放射性同位元素、マーカー酵素、またはリガンドによる標準技術を使用して標識することができる。好適な発蛍光団は、フルオロレサミン、ローダミン、Cy3、TRITC及びフィコエリトリンである。好適なマーカー酵素は、アルカリホスファターゼ、 α -ガラクトシダーゼ、及び西洋ワサビペルオキシダーゼである。好適なリガンドは、ビオチン及びジゴキシゲニン (*DIG*) である。

30

【0074】

本発明の更なる目的は、孢子虫綱の寄生虫由来の疾病を診断する方法における、診断剤としての使用を提供することにある。上記診断剤は、*in vitro*で、被験者から採取したサンプル中のPidタンパク質の有無を検出するのに使用される。

40

【0075】

患者の血清/血漿中のPid抗体の検出をベースとした、*in vitro*における感染症の診断試験には、免疫蛍光顕微鏡で補完され得るELISAまたはEIAが包含され得る。Pidを含むいずれの診断剤も、陽性対照 (精製Pidタンパク質及び同起源の反応性抗体)、及び関連の標識用基質 [例えば、アルカリホスファターゼ (*AP*) で標識した第二抗体用 *p*-ニトロフェニルリン酸 (*NPP*)] が含まれる。

【0076】

感染症はまた、被験者血清中のPidタンパク質に対する抗体を検出することによって同定することができる。従って、本発明の更なる目的は、上述した抗原成分を含有する診断剤

50

を提供することにある。上記抗原成分は、被験者の血清中に存在する任意のPid抗体に結合する。上記結合は、種々の標準標識技術の一つによって検出することができる。

【0077】

更に本発明は、孢子虫綱の寄生虫由来の疾病を診断する方法における、診断剤の使用を提供するものである。

【0078】

一実施態様では、上記診断剤の抗原成分をELISAプレートに固定し、被験者の血清と共にインキュベートする。次に、上記血清中のPidに対する抗体は、陽性対照として使用されるPidに対するモノクローナル抗体を用いた、抗原捕獲によって検出され得る。

【0079】

他の標識及び検出法として、染色体法 [AP-NPPまたはニトロテトラゾリウムブル - 及び 5 - プロモ - 4 - クロロ - 3 - インドリルホスフェート (BCIP)]、蛍光遺伝子 (fluorogenic) 法 [例えばビオチン及びフルオロレシニンで標識したストレプトアビジン (streptavidin)] またはルミネセンス (例えばAP及びCDP-スター) が挙げられる。ELISA法またはEIA法を用いる場合には、ウエスタンブロット法または蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーションを行なうことも可能である。或る場合には、蛍光遺伝子ヌクレオチドを用いた *in situ* PCRで法増強することができる。

【0080】

固定した抗原成分は、フィールド診断のスポット分析またはディップスティック (dip-stick) 法によって提供される。次いで、ハプテン結合した (FITC、アルカリホスファターゼ等)、Pidに対するモノクローナル抗体を寄生虫と共にインキュベートし、蛍光顕微鏡で直接視覚化する。

【0081】

上述した様に本発明は、配列番号1のアミノ酸配列を有するPidタンパク質に特異的に結合し得る、医薬として有用な抗体を提供するものである。

【0082】

本発明はまた、孢子虫綱の寄生虫由来の疾病を診断する診断剤を製造する為の、その様な抗体の使用を提供するものである。

【0083】

本発明の更なる目的は、孢子虫綱の寄生虫由来の疾病の診断用診断剤を製造する為の、上述した抗原成分の使用を提供することにある。

【0084】

上述した診断剤の製造には、配列番号1のアミノ酸配列またはその断片を含有するタンパク質の使用、または、上記タンパク質またはペプチド断片をコードするポリ核酸の使用が包含され得ると評価されている。

【0085】

代表的には診断剤は、陽性対照 (精製Pidタンパク質及び同起源の反応性抗体)、及び関連の標識用基質 [例えばアルカリホスファターゼ (AP) で標識した第二抗体用 p - ニトロフェニルリン酸 (NPP)] を含むキットとして提供され得る。詳細且つ完全な参照指示マニュアル、及び計算情報は通常、上記キットの重要部分として含まれている。

【0086】

更なる目的は、被験者の孢子虫綱感染症を診断する為の、*in vitro*での方法を提供することであり、以下の工程を包含する。

【0087】

(i) 被験者から、核酸含有サンプルを得る工程；及び
(ii) サンプル中における、Pid核酸配列の特徴の存在を試験する工程。Pid核酸配列の特徴部分は、Pidタンパク質をコードする、全部または一部分の配列であっても良いし、或いは、Pidコード配列の上流または下流の核酸配列であっても良い。核酸含有サンプルに、PCR法等の増幅手段を施したものは、Pid核酸配列に特異的であるので推奨される。これは、図5に示すプライマーセットの如く、適切なプライマー類を用いることによって達成

10

20

30

40

50

することができる。標的核酸に特異的な他のプライマーも用いることができる。

【0088】

前述した孢子虫綱由来の感染症は、上記方法によって検出することができる。ヒトへの感染の場合、プラスモディウム感染の検出は特に、マラリアの診断に重要である。これは、核酸の供給源として赤血球細胞を用いることによって達成され得る。

【0089】

本発明によって診断することのできる、孢子虫綱由来の疾患としては、上述したものが挙げられる。

【0090】

実施例

10

Plasmodium (プラスモディウム) yoeliからの、pid座の単離

上述した様にプラスモディウム種のライフサイクルには、オーキネート、スポロゾイト及びメロゾイトという、三つの侵入ステージが含まれる(図1)。各ステージでは、異なる標的細胞が選択される。例えばスポロゾイトは、宿主細胞の肝細胞に選択的に侵入するのに対し、メロゾイトは赤血球細胞に侵入する。

【0091】

一般にプラスモディウムによる侵入は主に、認識、吸着、及び侵入という、三つの段階に分けられる。侵入工程に含まれる一または一以上の因子は、究極的には同定されていない。多くの潜在的な寄生虫特異的リガンドが、細胞侵入に関与しており、指定レセプターとして様々な細胞組織が示唆されている。しかしながら、これらの研究は、現実の細胞侵入ではなく、細胞結合に焦点が向けられている(Sim, B.K.L et al, 1994; Horuk, R et al, 1993; Breton, C. B et al, 1992; and Hadley, T J et al, 1986)。

20

【0092】

本発明の発明者らは、組換えアッセイ(Isberg, R.R. and S. Falkow, 1985)を用いて、P. yoeliから、E. coli K12による上皮細胞侵入に必要な且つ充分な座を単離した。

【0093】

まず、P. yoeliゲノムのコスミドクローンセグメントをE.coliに形質導入した。このクローンが、COS-7培養細胞に結合し、侵入する能力があるかをスクリーニングした。スクリーニング工程における侵入または内面化の確認は主に、ゲンタマイシンの死滅によって行なった。ゲンタマイシンは細胞を殆ど通過しない為、細胞表面に結合した細菌を排除するのに使用することができる。

30

【0094】

上記スクリーニング法に基づき、幾つかの侵入クローン('Inv')を単離すると、クロス-ハイブリダイズすることが分かった。上記クローンの制限酵素地図によれば、これらは相互にオーバーラップすることが分かる。

【0095】

同定したクローンが本当に侵入するかどうか確認する為に、コスミドクローンで形質転換したE.coli K12菌株を用いて、更に侵入アッセイを行なった。上記アッセイは、E.coli K12に特異的な一次ポリクローナル抗体による間接免疫蛍光法で細菌を追跡したこと以外は、上述した様に行なった。侵入細菌による点状の蛍光が観察された。上記アッセイは、対照菌株、非形質転換のE.coli、またはプラスミド若しくはコスミドベクターで形質転換した細菌で行なっても、侵入は認められなかった。

40

【0096】

上記細菌細胞は、細胞の外ではなく内部に取込まれることを証明する為に、侵入細胞を、TRITC標識ファロイジンで対比染色した。細胞侵入の中心にアクチン重合が観察され、侵入細菌は、重合アクチンフィラメントの核形成でコロキャライズされた(colocalised)。

【0097】

更に細胞侵入の証拠を得る為に、透過型電子顕微鏡を用いて侵入培養細胞を観察した。膜結合した小腔の内部に細菌が検出された。

50

【 0 0 9 8 】

更に、細胞侵入における上記座の役割を調査する為に、侵入性クローン Invcos18を、Tn10 00gdでトランスポゾンに突然変異させた (Morris, G.E et al, 1995)。

【 0 0 9 9 】

トランスポゾン変異体の97%が細胞侵入によって深刻なダメージを被っており、細胞侵入におけるE. coliを捕捉できなかった。

【 0 1 0 0 】

6個の非相補的クローン

【 0 1 0 1 】

【 数 2 】

10

(cfu_s1である)

の配列解析は、6例全部において、同じ部位でのトランスポゾン挿入を示している。このことは、侵入には、挿入座が不可欠であることを示唆している。図4Aに、配列中にトランスポゾン末端位をマークしたヌクレオチド配列領域を示す。

【 0 1 0 2 】

トランスポゾン挿入部位は、約567のヌクレオチドの推定読取り枠に関係する位置にある。Pid座配列は、配列番号2のアミノ酸配列に示す通りであり、図4Aのヌクレオチド607から、ヌクレオチド1172に至る。

20

【 0 1 0 3 】

図4Bに、Pid翻訳産物のアミノ酸予測配列を示し、配列番号1とする。これは、図4Aにも示している。Pid上流部分のDNA配列を配列番号3に示し、ORF3からコードしたアミノ酸配列を配列番号4に示す。Pid下流部分の配列を配列番号5に示す。

【 0 1 0 4 】

BLASTプログラムのGenBank、EMBL、DDBJ及びPDBデータベースを用いて、pid相同配列またはPid配列を探索した。

【 0 1 0 5 】

上記Pid座は、寄生虫の染色体DNAに比べ、異常に高いGC量(55%)で特徴付けられる病原性島であることが判明した。侵入座に隣接するDNA配列はATに富み、伝播性TraC/プライマーゼ座と相同性を示す(約38%)が、これは、広範な宿主域プラスミドIncN及びIncW (Valentine, C.R.I. and C.I.Kado, 1989)の接合トランスファーに不可欠である。IncWプラスミドpSaでコードした、Anatol, A. Belogurovらの非制限タンパク質Ard(タイプC)は、乱交雑プラスミドRP4のTrac1プライマーゼのタンパク質輸送ドメインと非常に類似している (Journal of Molecular Biology, (2000), 296: 969-977)。

30

【 0 1 0 6 】

理論による裏付けの期待はないが、このことは、寄生虫ゲノムに組込まれた潜在プラスミドDNA配列の存在を示唆している。Pid座は恐らく、病原性細菌または病原性ファージ由来の始原遺伝子が水平トランスファーして獲得されたものである。

【 0 1 0 7 】

相同性研究により、Pidタンパク質のアミノ酸配列は、Shigella flexneriの病原性をもたらすプラスミドpSaがosa遺伝子でコードされたOsaタンパク質の配列と同じであることが判明した。

40

【 0 1 0 8 】

上記Pidタンパク質も、リステリア菌のinIABオペロンにおけるインターナリンB座 (InIB)産物と相同性を有しており、侵入に不可欠であることが分かる (Gaillard, J.L. et al, 1991; Parida, S.K. et al, 1998)。

【 0 1 0 9 】

更に本発明者らは、Pidタンパク質配列における、推定CDC42/Racの相互結合 (CRIB)モチーフ: PVLSRDEASAVMLAEHVGVAを同定した。このモチーフを配列番号65に示す。上記モチー

50

フは、N-WASP、Ste20及びMSE55等といった低分子量GTPアーゼエフェクタータンパク質と関係している。Pidタンパク質配列と、他のCRIBタンパク質の配列を並べたものを、図4Bに示す。上記配列は、BLASTプログラムによって作製した。Pidにおける、推定CRIBドメインは、インターナリンB配列と整列しない。後者と、Rho GTPアーゼエフェクタータンパク質との相同性を、BLASTP探索によって同定した。Pid相同物のアクセス番号は以下の通りである。

インターナリンB	Acc #	AF 121032	
Cdc42エフェクタータンパク質 (MSE55)	Acc #	XM_001058.1	
STE20	Acc #	L04655	10
WASP/ヒト	Acc #	NM 000377	
p65 ^{PAK} -d/ラット	Acc #	NM 017198	

インターナリンを除く残りは全て、CRIBドメインを有している。

【0110】

WASP、Ste20及びMSE55のタンパク質は、アクチン細胞骨格の再編成に有効であることが知られている (Burbelo, P.D. et al, 1999; Hall, A et al, 1998; Burbelo, P.D et al, 1998)。例えばサルモネラ菌 (*Salmonella typhimurium*) の場合、N-WASP及びSopEと、Rho GTPアーゼCDC42及びRac1との相互作用は、食細胞以外の細胞侵入に必要である (Hardt, W.D et al, 1998; Chen, L.M. et al 1996; Susuki, T et al, 1998; Masol, P et al, 1998)。従って、pidは、グアニンヌクレオチド交換因子またはGTPアーゼ活性タンパク質となり得る。

20

【0111】

Pidの単離及び発現

Pid遺伝子は、標準クローニング技術により、適切な寄生虫から配列番号1及び2の配列情報として単離することができる。この遺伝子断片は、標準方法によって得られる。

【0112】

上記pid遺伝子または当該遺伝子の断片は、通常の方法によって発現され、タンパク質産物が精製される。

30

【0113】

上記方法の詳細は、Riggs, P., in Ausubel, F.M. et al (eds) 「分子生化学における近代プロトコール」、John Wiley & Sons, Inc., New York, pp 16.6.1-16.6.14 (1994)を参照すれば良い。

【0114】

ワクチンの調製

抗体由来ワクチン

抗原成分が得られた後は、当該抗原成分含有ワクチンは、通常の方法によって製造することができる。以下の文献を参照すれば良い：

Jane L. Holley, Mike Elmore, Margaret Mauchline, Nigel Minton and Richard W. Titball. 「*Clostridium botulinum*系F毒素に対する組換えサブユニットワクチンのクローニング、発現及び評価」、[要約][フルテキスト]、*Vaccine* 19 (2-3) 288-297 (2000)

Michael Theisen et al. 「ヒト抗体由来寄生虫の死滅をターゲットとする、プラスモディウムファルシパルムのグルタミン酸塩に富むタンパク質 (GLURP) の主要なB細胞エピトープの同定」、*Vaccine* 19 (2-3) 204-212 (2000)

40

JH Tian, S Kumar, DC Kaslow, and LH Miller, 「*Plasmodium yoelii*メロゾイト表面タンパク質1の様々な領域からの、組換えタンパク質による免疫化で誘導された防御の対比」、*Infect. Immun.* 1997 65: 3032-3036.

Bittle, J.L., Houghten, R.A., Alexander, H., Shinnick, T.M., Sutcliffe, J.G., Lerner, R.A., Rowlands, D.J. and Brown, F. 1982, 「ウイルスヌクレオチド配列から予

50

測される化学合成ペプチドでの免疫化による、口蹄疫に対する防御」、Nature 298:30-33

Harlow, E. & Lane, D. 1988. *Antibodies: A laboratory manual*, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York.

Holder, A.A. and Freeman, R.R. 1981、「精製された寄生虫抗原を用いた血流段階でのげっ歯類マラリアの免疫化」、Nature, 294:361-364.

Hollingdale, M.R., Nardin, E.H., Tharavanij, S., Schwartz, A.L. and Nussenzweig, R.S. 1984、「培養細胞への、プラスモディウムファルシパルム (*Plasmodium falciparum*) 及びプラスモディウムビバックス (*Plasmodium vivax*) のスポロゾイトの侵入阻害、防御抗体の *in vitro* アッセイ」、J. Immunol. 132:909-913. 10

Kaslow, D.C., Quakyi, I.A., Syin, C., Raum, M.G., Keister, D.B., Coligan, J.E., McCutchan, T.F. and Miller, L.H. 1988、「EGF様ドメインを含む、ヒトマラリア生殖段階からのワクチン候補物質」、Nature 333:74-76.

【0115】

上記ワクチンを被験者に投与し、当該ワクチンへの応答によって産生した抗体がPidに特異的に結合するかを、標準方法によって試験する。好適な方法は、以下の参考文献に例示されている：JH Tian, S Kumar, DC Kaslow, and LH Miller、「*Plasmodium yoelii*メロゾイト表面タンパク質1の様々な領域からの、組換えタンパク質による免疫化で誘導された防御の対比」、Infect. Immun. 1997 65: 3032-3036.

Harlow, E. & Lane, D. 1988. *Antibodies: A laboratory manual*, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York. 20

Holder, A.A. and Freeman, R.R. 1981、「精製された寄生虫抗原を用いた血流段階でのげっ歯類マラリアの免疫化」、Nature, 294:361-364.

Hollingdale, M.R., Nardin, E.H., Tharavanij, S., Schwartz, A.L. and Nussenzweig, R.S. 1984、「培養細胞への、プラスモディウムファルシパルム (*Plasmodium falciparum*) 及びプラスモディウムビバックス (*Plasmodium vivax*) のスポロゾイトの侵入阻害、防御抗体の *in vitro* アッセイ」、J. Immunol. 132:909-913.

Kaslow, D.C., Quakyi, I.A., Syin, C., Raum, M.G., Keister, D.B., Coligan, J.E., McCutchan, T.F. and Miller, L.H. 1988、「EGF様ドメインを含む、ヒトマラリア生殖段階からのワクチン候補物質」、Nature 333:74-76. 30

Armando Reyna-Bello, Axel Cloeckert, Nieves Vizcaino, Mary I. Gonzatti, Pedro M. Aso, Geerard Dubray, and Michel S. Zygmunt、「ベネズエラにおけるウシアナプラスマ症血清学診断の為の、組換え主要表面タンパク質5を用いた酵素結合免疫吸着検定法の評価」、Clin. Diagn. Lab. Immunol. 1998 5: 259-262.

M Theisen, J Vuust, A Gottschau, S Jepsen, and B Hogh、「*Escherichia coli*で発現したプラスモディウムファルシパルム (*Plasmodium falciparum*) の組換えグルタミン酸塩リッチタンパク質の抗原性及び免疫原生」、Clin Diagn. Lab. Immunol. 1995 2: 30-34.

【0116】

同様に上記ワクチンは、標準実験プロトコルを用い、胞子虫網の寄生虫由来の疾病に有効かどうか試験することができる。例えばこれらは、以下の参考文献を参照すればよい：JH Tian, S Kumar, DC Kaslow, and LH Miller、「*Plasmodium yoelii*メロゾイト表面タンパク質1の様々な領域からの、組換えタンパク質による免疫化で誘導された防御の対比」、Infect. Immun. 1997 65: 3032-3036. 40

Harlow, E. & Lane, D. 1988. *Antibodies: A laboratory manual*, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York.

Holder, A.A. and Freeman, R.R. 1981、「精製された寄生虫抗原を用いた血流段階でのげっ歯類マラリアの免疫化」、Nature, 294:361-364.

Hollingdale, M.R., Nardin, E.H., Tharavanij, S., Schwartz, A.L. and Nussenzweig, R.S. 1984、「培養細胞への、プラスモディウムファルシパルム (*Plasmodium falciparum*) 50

m) 及びプラスモディウムビバックス (*Plasmodium vivax*) のスポロゾイトの侵入阻害、
 防御抗体の *in vitro* アッセイ」、*J. Immunol.* 132:909-913.

Kaslow, D.C., Quakyi, I.A., Syin, C., Raum, M.G., Keister, D.B., Coligan, J.E.,
 McCutchan, T.F. and Miller, L.H. 1988、「EGF様ドメインを含む、ヒトマラリア生殖段
 階からのワクチン候補物質」、*Nature* 333:74-76.

Armando Reyna-Bello, Axel Cloeckert, Nieves Vizcaino, Mary I. Gonzatti, Pedro
 M. Aso, Geerard Dubray, and Michel S. Zygmunt、「ベネズエラにおけるウシアナプラ
 スマ症血清学診断の為に、組換え主要表面タンパク質5を用いた酵素結合免疫吸着検定法
 の評価」、*Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 1998 5: 259-262.

M Theisen, J Vuust, A Gottschau, S Jepsen, and B Hogh、「*Escherichia coli*で発現
 したプラスモディウムファルシパルム (*Plasmodium falciparum*) の組換えグルタミン酸
 塩に富むタンパク質の抗原性及び免疫原性」、*Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 1995 2: 30-
 34. 10

【 0 1 1 7 】

ポリ核酸ワクチン

適切なポリ核酸を同定した後、当該ポリ核酸は、通常の方法により、ワクチンに組込むこ
 とができる。これに関しては、以下の文献を参照すれば良い：(Jones, T.R. et al, 199
 9; Chatfield, S.N. et al, 1989;) Ricardo S. Corral and Patricia B. Petray、「トリ
 パノソマ (*Trypanosoma*) *cruzi* の免疫化における、Th1促進アジュバントとしてのCpG
 DNA」、*Vaccine* 19 (2-3) 234-242 (2000) 20

K.D. Song et、「保存アイメリア (*Eimeria*) タンパク質をコードするDNAワクチンは、生
 きたアイメリア *acervulina* のチャレンジに対する防御免疫を誘導する」、*Vaccine* 19 (2-
 3) 243-252 (2000)

Rong Xiang, Holger N. Lode, Ta-Hsiang Chao, J. Michael Ruehlmann, Carrie S. Dolm
 an, Fernando Rodriguez, J. Lindsay Whitton, Willem W. Overwijk, Nicholas P. Rest
 ifo, and Ralph A. Reisfeld、「マウスメラノーマに対する、自己経口DNAワクチンの防
 御」、*PNAS* 97: 5492-5497

Martha Sedegah, Trevor R. Jones, Manjit Kaur, Richard Hedstrom, Peter Hobart, Jo
 hn A. Tine, and Stephen L. Hoffman、「組換えワクチンの上昇は、マラリアDNAワクチ
 ンの免疫原性及び防御効率を増加させる」、*PNAS* 95: 7648-7653. 30

Donald L. Lodmell, Nancy B. Ray and Larry C. Ewalt、「プラスミドDNAの遺伝子ガン
 粒子介在ワクチン接種は、狂犬病ウイルス感染に対する防御免疫を付与する」、*Vaccine*
 16 (2-3) 115-118 (1998)

Cynthia L. Brazolot Millan, Risini Weeratna, Arthur M. Krieg, Claire-Anne Siegri
 st, and Heather L. Davis、「CpG DNAは、若年マウスのB型肝炎表面抗原に対する、強力
 なTh1体液性及び細胞性免疫応答を誘導し得る」、*PNAS* 95: 15553-15558.

Wendy C. Brown, D. Mark Estes, Sue Ellen Chantler, Kimberly A. Kegerreis, and Ca
 rlos E. Suarez、「*Babesia bovis*由来のDNA及びCpGオリゴヌクレオチドは、ウシB細胞の
 分泌促進剤である」、*Infect. Immun.* 1998 66: 5423-5432.

Zina Moldoveanu, Laurie Love-Homan, Wen Qiang Huang and Arthur M. Krieg、「イン
 フルエンザウイルスワクチンによる全身性及び粘膜免疫の為に、新規免疫エンハンサーCp
 G DNA」、16(11-12)1216-1224 40

上記ポリ核酸ワクチンを被験者に投与し、以下の参考文献に示す標準プロトコールを用い
 て治療効果を試験する：JH Tian, S Kumar, DC Kaslow, and LH Miller、「*Plasmodium y
 oelii*の様々なメロゾイト表面タンパク質1領域からの組換えタンパク質による免疫化で誘
 導された防御の対比」、*Infect. Immun.* 1997 65: 3032-3036.

Bittle, J.L., Houghten, R.A., Alexander, H., Shinnick, T.M., Sutcliffe, J.G., Le
 rner, R.A., Rowlands, D.J. and Brown, F. 1982、「ウイルスヌクレオチド配列から予
 測される化学合成ペプチドでの免疫化による、口蹄疫に対する防御」、*Nature* 298:30-33

Harlow, E. & Lane, D. 1988. 「抗体：実験マニュアル」、Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York.

Holder, A.A. and Freeman, R.R. 1981、「精製された寄生虫抗原を用いた血流段階でのげっ歯類マラリアの免疫化」、Nature, 294:361-364.

Hollingdale, M.R., Nardin, E.H., Tharavanij, S., Schwartz, A.L. and Nussenzweig, R.S. 1984、「培養細胞への、プラスモディウムファルシパルム (Plasmodium falciparum) 及びプラスモディウムビバックス (Plasmodium vivax) のスポロゾイトの侵入阻害、防御抗体の in vitro アッセイ」、J. Immunol. 132:909-913.

Kaslow, D.C., Quakyi, I.A., Syin, C., Raum, M.G., Keister, D.B., Coligan, J.E., McCutchan, T.F. and Miller, L.H. 1988、「EGF様ドメインを含む、ヒトマラリア生殖段階からのワクチン候補物質」、Nature 333:74-76. 10

M Theisen, J Vuust, A Gottschau, S Jepsen, and B Hogh、「Escherichia coliで発現したプラスモディウムファルシパルム (Plasmodium falciparum) の組換えグルタミン酸塩リッチタンパク質の抗原性及び免疫原性」、Clin. Diagn. Lab. Immunol. 1995 2: 30-34.

【0118】

治療剤の設計及び作製

Pid遺伝子を単離した後、Pidタンパク質を発現させて精製し、通常の方法によって治療剤用成分を得ることができる。

【0119】

上記Pidタンパク質を例えば結晶化させ、以下に記載の方法：Alex M. Aronov, Stephen Suresh, Frederick S. Buckner, Wesley C. Van Voorhis, Christophe L. M. J. Verlinde, Fred R. Opperdoes, Wim G. J. Hol, and Michael H. Gelb、「トリパノソーマ類のグリセルアルデヒド3 - リン酸デヒドロゲナーゼのサブマイクロモル生物学的活性阻害剤の、構造ベース設計」、PNAS 96: 4273-4278によって3-D構造を決定する。 20

【0120】

上記構造は、複合化学によるPid模倣品設計用鋳型として使用することができる。以下の方法を参照すればよい：(Aronov, A.M. et al, 1999; 'Combinatorial chemistry' (1996) Methods in Enzymology vol 267 ed. John N Abelson; Academic Press Inc. New York;) Kirk McMillan, Marc Adler, Douglas S. Auld, John J. Baldwin, Eric Blasko, Leslie J. Browne, Daniel Chelsky, David Davey, Ronald E. Dolle, Keith A. Eagen, Shawn Erickson, Richard I. Feldman, Charles B. Glaser, Cornell Mallari, Michael M. Morrissey, Michael H. J. Ohlmeyer, Gonghua Pan, John F. Parkinson, Gary B. Phillips, Mark A. Polokoff, Nolan H. Sigal, Ronald Vergona, Marc Whitlow, Tish A. Young, and James J. Devlin、「複合化学を介して発見された誘導一酸化窒素シンターゼ二量体化のアロステリック阻害剤」、PNAS 97: 1506-1511 30

Dustin J. Maly, Ingrid C. Choong, and Jonathan A. Ellman、「複合ターゲットをガイドするリガンドアセンブリー：潜在サブタイプ選択的c-Src阻害剤の同定」、PNAS 97: 2419-2424.

RAP Lutzke, NA Eppens, PA Weber, RA Houghten, and RHA Plasterk、「複合化学ライブラリーの使用による、ヒト免疫不全ウイルスインテグラーゼタンパク質のヘキサペプチド阻害剤の同定」、PNAS 92: 11456-11460 40

NF Sepetov, V Krchnak, M Stankova, S Wade, KS Lam, and M Lebl, Library of Libraries: 「ファルマコフォアモチーフの合成複合ライブラリーデザイン及びスクリーニングへのアプローチ」、PNAS 92: 5426-5430

JJ Burbaum, MHJ Ohlmeyer, JC Reader, I Henderson, LW Dillard, G Li, TL Randle, NH Sigal, D Chelsky, and JJ Baldwin、「コード化複合化学による薬物発見のパラダイム」、PNAS 92: 6027-6031

D.T. O'Hagan et al. Microparticles in MF59、「HIV-1に対する組換えタンパク質ワクチン用の潜在アジュバントのコンビネーション」、Vaccine 18(17):1793-1801 (2000) 50

Jing Huang and Stuart L. Schreiber, 「ナノドロップレットでのタンパク質 - タンパク質相互作用の小分子阻害剤選択用酵母遺伝システム」、PNAS 94: 13396-13401.

Jay Parrish, Helen Metters, Lin Chen, and Ding Xue, 「第二位サブレッサーの構造ベースデザインによる、in vivoでのキー細胞死滅調節剤の相互作用の証明」、PNAS 97: 11916-11921.

【0121】

上記模倣品は、Harlow, E. & Lane, D. 1988. *Antibodies: A laboratory manual*, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New Yorkに記載の方法による特異的結合アッセイで、Pidに対する競合的結合を試験すれば良い。

【0122】

このファーマコフォア (pharmacophores) は、QSAR (定量的な構造 - 活性相関) によって評価される。これらの毒性を in vivo で試験し、治療剤としての有効性を、寄生虫による感染症から受ける防御レベルで評価する。好ましいプロトコールは、以下のものを参照すれば良い: Alex M. Aronov, Stephen Suresh, Frederick S. Buckner, Wesley C. Van Vorhis, Christophe L. M. J. Verlinde, Fred R. Opperdoes, Wim G. J. Hol, and Michael H. Gelb, 「トリパノソーマ類のグリセルアルデヒド3 - リン酸デヒドロゲナーゼのサブミクロモル生物学的活性阻害剤の、構造ベース設計」、PNAS 96: 4273-4278.

NF Sepetov, V Krchnak, M Stankova, S Wade, KS Lam, and M Lebl, *Library of Libraries*: 「ファルマコフォアモチーフの合成複合ライブラリーデザイン及びスクリーニングへのアプローチ」、PNAS 92: 5426-5430

Bittle, J.L., Houghten, R.A., Alexander, H., Shinnick, T.M., Sutcliffe, J.G., Lerner, R.A., Rowlands, D.J. and Brown, F. 1982, 「ウイルスヌクレオチド配列から予測される化学合成ペプチドでの免疫化による、口蹄疫に対する防御」、Nature 298:30-33

Harlow, E. & Lane, D. 1988. *Antibodies: A laboratory manual*, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York.

Holder, A.A. and Freeman, R.R. 1981, 「精製された寄生虫抗原を用いた血流段階でのげっ歯類マラリアの免疫化」、Nature, 294:361-364.

Hollingdale, M.R., Nardin, E.H., Tharavanij, S., Schwartz, A.L. and Nussenzweig, R.S. 1984, 「培養細胞への、プラスモディウムファルシパルム (*Plasmodium falciparum*) 及びプラスモディウムビバックス (*Plasmodium vivax*) のスポロゾイトの侵入阻害、防御抗体の in vitro アッセイ」、J. Immunol. 132:909-913.

Kaslow, D.C., Quakyi, I.A., Syin, C., Raum, M.G., Keister, D.B., Coligan, J.E., McCutchan, T.F. and Miller, L.H. 1988, 「EGF様ドメインを含む、ヒトマラリア生殖段階からのワクチン候補物質」、Nature 333:74-76.

【0123】

上記治療剤は、リポソーム形態で直接注射、または酢酸ビニルエチル等の疎水性コポリマー、シクロデキストリン、ポリシアル酸、若しくは界面活性剤システムからの調節放出によって、経口投与することができる。好適な方法は、以下: (Ron, E. et al, 1993); PNAS 90:4176-4180.に記載されている。

【0124】

或いは、Pidレセプターは、(Chien, C-H. et al, 1991;); PNAS 88:9578-9582に記載の酵母ツーハイブリッドシステム等といったタンパク質 - タンパク質の相互作用トラップアッセイによって同定することができる。

【0125】

更に、上記相互作用の阻害剤を複合化学によって同定し、通常の方法を用いて、変異体による阻害を十分に最適化させる。好ましい方法は、以下の参考文献を参照すれば良い: Kirk McMillan, Marc Adler, Douglas S. Auld, John J. Baldwin, Eric Blasko, Leslie J. Browne, Daniel Chelsky, David Davey, Ronald E. Dolle, Keith A. Eagen, Shawn Erickson, Richard I. Feldman, Charles B. Glaser, Cornell Mallari, Michael M. Morri

10

20

30

40

50

ssey, Michael H. J. Ohlmeyer, Gonghua Pan, John F. Parkinson, Gary B. Phillips, Mark A. Polokoff, Nolan H. Sigal, Ronald Vergona, Marc Whitlow, Tish A. Young, and James J. Devlin, 「複合化学を介して発見された誘導一酸化窒素シンターゼ二量体化のアロステリック阻害剤」、PNAS 97: 1506-1511

Dustin J. Maly, Ingrid C. Choong, and Jonathan A., 「複合ターゲットをガイドするリガンドアセンブリー：潜在サブタイプ選択的c-Src阻害剤の同定」、PNAS 97: 2419-2424.

RAP Lutzke, NA Eppens, PA Weber, RA Houghten, and RHA Plasterk, 「複合化学ライブラリーの使用による、ヒト免疫不全ウイルスインテグラーゼタンパク質のヘキサペプチド阻害剤の同定」、PNAS 92: 11456-11460.

JJ Burbaum, MHJ Ohlmeyer, JC Reader, I Henderson, LW Dillard, G Li, TL Randle, N H Sigal, D Chelsky, and JJ Baldwin, 「コード化複合化学による薬物発見のパラダイム」、PNAS 92: 6027-6031

D.T. O'Hagan et al. Microparticles in MF59, 「HIV-1に対する組換えタンパク質ワクチンの為の、潜在アジュバントのコンビネーション」、Vaccine 18(17):1793-1801 (2000)

Jing Huang and Stuart L. Schreiber, 「ナノドロプレットでのタンパク質 - タンパク質相互作用の小分子阻害剤選択用酵母遺伝システム」、PNAS 94: 13396-13401.

Jay Parrish, Helen Metters, Lin Chen, and Ding Xue, 「第二位サブレッサーの構造ベースデザインによる、in vivoでのキー細胞死滅調節剤の相互作用の証明」、PNAS 97: 11916-11921.

10

20

【 0 1 2 6 】

次に上記阻害剤を、レセプター吸蔵用治療剤に組込ませた後、標準方法を用いて治療効果を試験すれば良い。

Bittle, J.L., Houghten, R.A., Alexander, H., Shinnick, T.M., Sutcliffe, J.G., Lerner, R.A., Rowlands, D.J. and Brown, F. 1982, 「ウイルスヌクレオチド配列から予測される化学合成ペプチドでの免疫化による、口蹄疫に対する防御」、Nature 298:30-33

Holder, A.A. and Freeman, R.R. 1981, 「精製された寄生虫抗原を用いた血流段階でのげっ歯類マラリアの免疫化」、Nature, 294:361-364.

Kaslow, D.C., Quakyi, I.A., Syin, C., Raum, M.G., Keister, D.B., Coligan, J.E., McCutchan, T.F. and Miller, L.H. 1988, 「EGF様ドメインを含む、ヒトマラリア生殖段階からのワクチン候補物質」、Nature 333:74-76.

30

診断剤の作製及び診断方法

抗体含有診断剤

Pidタンパク質またはその断片の発現に次いで、当該タンパク質に対する抗体を産生させる方法は、当業者間で熟知されている。好ましい方法は、以下の参考文献を参照すれば良い： Bittle, J.L., Houghten, R.A., Alexander, H., Shinnick, T.M., Sutcliffe, J.G., Lerner, R.A., Rowlands, D.J. and Brown, F. 1982, 「ウイルスヌクレオチド配列から予測される化学合成ペプチドでの免疫化による、口蹄疫に対する防御」、Nature 298:30-33.

40

Harlow, E. & Lane, D. 1988. 「抗体：実験マニュアル」、Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York.

Holder, A.A. and Freeman, R.R. 1981, 「精製された寄生虫抗原による、血流段階でのげっ歯類マラリアの免疫化」、Nature, 294:361-364.

Hollingdale, M.R., Nardin, E.H., Tharavanij, S., Schwartz, A.L. and Nussenzweig, R.S. 1984, 「培養細胞への、プラスモディウムファルシパルム (Plasmodium falciparum) 及びプラスモディウムビバックス (Plasmodium vivax) のスポロゾイトの侵入阻害、防御抗体のin vitroアッセイ」、J. Immunol. 132:909-913.

Kaslow, D.C., Quakyi, I.A., Syin, C., Raum, M.G., Keister, D.B., Coligan, J.E.,

50

- McCutchan, T.F. and Miller, L.H. 1988、「EGF様ドメインを含む、ヒトマラリア生殖段階からのワクチン候補物質」、*Nature* 333:74-76.
- これらの抗体は、診断剤に組込むことができ、常用の方法により診断に使用することができる。読者は、以下の文献を参照することができる： Shuli Li, Gina Galvan, Fausto G. Araujo, Yasuhiro Suzuki, Jack S. Remington, and Stephen Parmley、「組換え抗原を用いた酵素結合免疫吸着検定法による、最近の後天的トキソプラズマ (*Toxoplasma*) gondii感染症の血清学診断」、*Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2000 7: 781-787.
- Kerstin Hubert, Abel Andriantsimahavandy, Alain Michault, Matthias Frosch, and Fritz A. Muuhlschlegel、「カギサナダ (*Taenia solium*) *Cysticerci*からの組換え抗原の使用による、ヒト胞虫症の血清学診断」、*Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 1999 6: 479-482 10
- Byoung-Kuk Na and Chul-Yong Song、「カンジダアルビカンス (*Candida albicans*) 由来のカンディダ症診断におけるモノクローナル抗体の使用：循環アスパラチルプロテイナーゼ抗原の検出」、*Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 1999 6: 924-929.
- Felix Grimm, Friedrich E. Maly, Jian Luu, and Roberto Llano、「標準酵素結合免疫吸着検定法によるエキノコックス症の血清学診断の為の、特異的免疫グロブリンGサブクラス抗体の分析」、*Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 1998 5: 613-616.
- Armando Reyna-Bello, Axel Cloeckert, Nieves Vizcaino, Mary I. Gonzatti, Pedro M. Aso, Geerard Dubray, and Michel S. Zygmunt、「ベネズエラでのウシアナプラズマ症の血清学診断への、組換え主要表面タンパク質5を用いた酵素結合免疫吸着検定法の評価」、*Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 1998 5: 259-262. 20
- Francois Simondon, Isabelle Iteman, Marie Pierre Preziosi, Abdoulaye Yam, and Nicole Guiso、「セネガルでの百日咳の診断における、百日咳毒素及び繊維状血球凝集素の為の、免疫グロブリンG酵素結合免疫吸着検定法の評価」、*Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 1998 5: 130-134.
- I Bjerkas, MC Jenkins, and JP Dubey、「neosporosis診断に有用な、*Neospora caninum* tachyzoite抗原の同定及び特性」、*Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 1994 1: 214-221.
- M Theisen, J Vuust, A Gottschau, S Jepsen, and B Hogh、「*Escherichia coli*で発現したプラスモディウムファルシパルム (*Plasmodium falciparum*) の組換えグルタミン酸塩リッチタンパク質の抗原性及び免疫原生」、*Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 1995 2: 30-34. 30
- Laurens A. H. van Pinxteren, Pernille Ravn, Else Marie Agger, John Pollock, and Peter Andersen、「二種の特異的抗原ESAT-6及びCFP10に基づく結核の診断」、*Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2000 7: 155-160.
- E. E. Zijlstra, N. S. Daifalla, P. A. Kager, E. A. G. Khalil, A. M. El-Hassan, S. G. Reed, and H. W. Ghalib、「リーシュマニア (*Leishmania*) donovani感染症診断用のrK39酵素結合免疫吸着検定法」、*Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 1998 5: 717-720.

【 0 1 2 7 】

抗原含有診断剤

有効な抗原成分は、上述した方法によって得ることができる。次に上記抗原成分を診断剤に組み込み、標準方法を用いて診断に使用することができる。 40

【 0 1 2 8 】

好ましい方法は、以下の文献に記載されている： (Mills, C. D. et al, 1999;); Bull W H0 77:553-559; Felix Grimm, Friedrich E. Maly, Jian Luu, and Roberto Llano、「標準酵素結合免疫吸着検定法によるエキノコックス症の血清学診断の為の、特異的免疫グロブリンGサブクラス抗体の分析」、*Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 1998 5: 613-616.

Armando Reyna-Bello, Axel Cloeckert, Nieves Vizcaino, Mary I. Gonzatti, Pedro M. Aso, Geerard Dubray, and Michel S. Zygmunt、「ベネズエラでのウシアナプラズマ症の血清学診断への、組換え主要表面タンパク質5を用いた酵素結合免疫吸着検定法の評価」、*Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 1998 5: 259-262. 50

Francois Simondon, Isabelle Iteman, Marie Pierre Preziosi, Abdoulaye Yam, and Nicole Guiso, 「セネガルでの百日咳の診断における、百日咳毒素及び繊維状血球凝集素の為の、免疫グロブリンG酵素結合免疫吸着検定法の評価」、Clin. Diagn. Lab. Immunol. 1998 5: 130-134.

I Bjerkas, MC Jenkins, and JP Dubey, 「neosporosis診断に有用な、Neospora caninum tachyzoite抗原の同定及び特性」、Lab. Immunol. 1994 1: 214-221.

M Theisen, J Vuust, A Gottschau, S Jepsen, and B Høgh, 「Escherichia coliで発現したプラスモディウムファルシパルム (Plasmodium falciparum) 組換えグルタミン酸塩リッチタンパク質の抗原性及び免疫原生」、Clin. Diagn. Lab. Immunol. 1995 2: 30-34.

Laurens A. H. van Pinxteren, Pernille Ravn, Else Marie Agger, John Pollock, and Peter Andersen, 「二種の特異的抗原ESAT-6及びCFP10に基づく結核の診断」、Clin. Diagn. Lab. Immunol. 2000 7: 155-160.

E. E. Zijlstra, N. S. Daifalla, P. A. Kager, E. A. G. Khalil, A. M. El-Hassan, S. G. Reed, and H. W. Ghalib, 「リーシュマニア (Leishmania) donovani感染症診断用のrK39酵素結合免疫吸着検定法」、Clin. Diagn. Lab. Immunol. 1998 5: 717-720.

【0129】

材料及び方法

1. P. yoeliiゲノム遺伝子のコスミドライブラリーの構築

高分子量のゲノムDNAをP. yoeliiの非同期性培養物から単離した後、Sau3Aで部分切断し、30-50kbの断片を得た。これらをウシ腸アルカリホスファターゼで脱リン酸化させ、予めBamHIで消化したコスミドベクター-SuperCos1 (Stratagene) に連結した。この様にして連結した混合物のアリコットをGigapack III XLのパッケージ抽出物 (Stratagene) でパッケージし、XL1-Blue MR (Stratagene) に形質導入させた。アンピリシリンで選抜した組換えコスミドを集め、一回、増幅させた。

【0130】

2. 培養COS-7細胞の侵入に対するコスミドクローンの一次スクリーニング

侵入アッセイ用として、E. coli寄生コスミドの対数期培養物を、感染多重度10でCOS-7細胞に接種した後、上述した様に重要な侵入アッセイを行なった。5時間インキュベートした後、上記細胞を充分洗浄し、250µg/mlのゲンタマイシン含有新鮮培地を加え、非侵入性細菌を死滅させた。一晚インキュベートした後、この細胞をPBSで10回洗浄した。PBS/0.05%サポニンを用い、COS-7細胞を穏やかに溶菌させることによって侵入細菌を遊離させ、LBプレート上にてアンピシリン選抜で評価した。

【0131】

3. 免疫蛍光及び電子顕微鏡による研究

上記方法によって侵入アッセイを行なった。次に上記細胞を充分洗浄し、3.7%パラホルムアルデヒドで固定した。この細胞を室温で30分間、PBS/0.05%サポニンに浸透させ、5%脱脂粉乳PBS溶液でインキュベートした。室温で1時間経過後、上記細胞をPBSで3回洗浄し、E. coli K-12菌株C600 (Dako Ltd) に対するウサギポリクローナル抗体と共にインキュベートした。上記抗体を、他のK-12菌株と交叉反応させた。2時間インキュベートした後、当該細胞をPBSで洗浄し、ウサギFITC標識IgG (Sigma) で1時間インキュベートした後、PBSで充分洗浄し、Zeiss顕微鏡で蛍光顕微鏡用に固定した。この結果を図2A (陰性対照)、及び図2B (E. coli含有侵入コスミドクローンによる感染) に示す。

【0132】

更に細胞を、TRITCファロイジンで対比染色し、細菌及びアクチンポリマーのコロキャリゼーション (colocalisation) を測定した。

【0133】

形質転換E. coliが侵入したCOS-7細胞の電子顕微鏡写真を得る為に、上述した様な侵入アッセイを行なった後、COS-7細胞をPBSで充分洗浄し、4%グルタルアルデヒドで4時間一晚固定した。固定細胞を細断し、四酸化オスミウムで染色した後、透過型電子顕微鏡で

10

20

30

40

50

観察した。この結果を図2Cに示す。

【0134】

4. 同定した侵入クローンのトランスポゾン突然変異誘導及び配列解析

Tn1000 を用い、以下の如くマイナーな改変をした以外は上述した方法により、トランスポゾン変異誘導を行なった。

【0135】

侵入クローン Invcos11及び Invcos18を、コンピテントMH1638ドナー細胞に形質転換させた。メチシリン1ml当たり1個のコロニーを、LB/(100mg/mlアンピシリン)/(50mg/mlメチシリン)で対数期まで増殖させた。レシピエント細胞のHB101をLBで増殖させた。ドナー培養物2mlをスピン(spin)し、Falcon製チューブにて、LB15mlで再懸濁させた。4500rpmで10分間遠心した後、細胞ペレットを、レシピエントのHB101培養物1mlに再懸濁させた。この交配混合物をLB寒天平板(抗体なし)に広げ、37℃で2時間インキュベートした。

【0136】

上記細胞をLBブロス15mlで洗浄し、上記の様に遠心分離した。2回目の遠心後、そのペレットをLBブロス1mlで再懸濁した。このうち100μlを、100μg/mlのアンピシリン、50μg/mlのメチシリン及び100μg/mlのストレプトマイシンを添加したLBプレートで培養した。37℃で一晩培養した後、単離したコロニー50個を採取し、LB/amp/meth/strepで増殖させた後、上述した侵入アッセイに用いた。

【0137】

サポニン溶解COS-7細胞をLB/amp/meth/strepで培養することにより、侵入クローンを評価した。図3aに、野生型及びTn1000挿入クローンをを用いた挿入アッセイ後のプレート評価で得られたプレートを示す。

【0138】

図3bは、Tn1000挿入クローンのTM1及びTM5を用いた侵入アッセイ後における、プレート評価の結果を示す棒グラフである。野生型のInvcos11及びInvcos18を、侵入用陽性対照として使用し、一方、LB寒天またはLB/amp寒天で増殖させた、HB101またはpMAL-p2で形質転換したXL1 Blue(New England Biolabs)を、陰性対照として作用させた。

【0139】

上記アッセイで同定した非補足的クローンを精製し、以下のプライマーを用いて配列決定した。

CCTGAAAAGGGACCTTTGTATACTG(配列番号13)

AGGGGAAGCTGAGAGCTCTA(配列番号14)

図4Aに示す挿入領域の配列は、トランスポゾン突然変異生成からの配列アッセンブリーをコントすることによって得た。

【0140】

Pidへの抗原応答

方法

1. pidのサブクロニング及びPid-Myc融合タンパク質の発現

pidは、その5'末端及び3'末端を夫々、HindIII及びBglI制限部位で処理した invcos18からのPCRアンプライマー(amplimer)として調製した。

【0141】

このアンプライマーを、Mycエピトープ標識含有発現ベクターpR01ar A122(Clontech)中でサブクロン化させた。コロニーを、LB/カナマイシンプレートにて37℃で維持した。一晩培養したブイオン培養物のうち50μlを用い、5mlブイオン中に接種した後、インキュベートし、0.4-0.6OD₆₀₀の培養物に、100mM IPTGを5μl、及び15%アラビノースを53μl添加した。この培養物を37℃で3時間インキュベートした。

【0142】

2. Pidの調製

Pidの濃度を、c-Mycモノクローナル抗体アガロースビーズ(Clontech)を用いて高めた。

誘導細胞を氷冷したPBSで洗浄した後、そのペレットを、溶解 (lysis) バッファー中で再懸濁し、-70 で凍結した。次いで、このサンプルを氷で解凍し、20 μ l の c-Myc Mab を加えた後、軽くボルテックスし、4 で40分間、回転プラットフォーム (rotating platform) で混合した。次いで、上記調製物を冷却したPBSで3回洗浄し、1200gで1時間、微量遠心分離した。

【0143】

3. 患者血清

Royal Free Hospitalにマラリアで入院している8名の患者から血清を採取した。プラスモディウムファルシパルム (Plasmodium falciparum) の感染及び寄生虫血症の程度を調べた。出身国も記載した。

【0144】

4. ウエスタンブロット法

Pid調製物の多数のレーンを、12% SDS-PAGEで分離した後、Hybond-Cへの電気泳動によるトランスファー (AmershamPharmacia) を行なった。トランスファーは、10Vにて2時間行なった (Novablot, AmershamPharmacia)。1/100倍希釈した各患者血清について、得られたブロットを検査し、ECLウエスタンブロット用試薬 (AmershamPharmacia) で視覚化させた。

【0145】

結果

試験した8名の患者血清のうち5名に、Pid-Myc融合産物で共遊走したタンパク質バンドが認められた。一方、無関係な非プラスモディウム配列を含むpR01arで形質転換した細胞を試験しても、これらの血清には、上記分子量のバンドは認められなかった。各患者の出身国及び寄生虫血症の程度を表1に示す。

【0146】

結論

Pid発現を誘導したE. coli細胞調製物には、試験血清の5/8で、予測分子量を有する抗原部分の存在が見られた。患者は全て、重篤な寄生虫血症を有しており、いずれもサハラ砂漠以南のアフリカ出身者であった。プラスモディウムファルシパルム (Plasmodium falciparum) に感染した患者は、Pidへの免疫応答が上昇していることから、上記データは、当該感染症を検出する為の血清学的基礎を構築することを示唆している。

【0147】

【表1】

10

20

30

患者	寄生虫血症 %	出身国	ウエスタンブロットにて 陽性
1	3.8	ガーナ	+
2	<1.0	ガーナ	++
3	<1.0	ガーナ	-
4	1.2	ガーナ	-/+
5	4.5	タンザニア	++
6	<1.0	ナイジェリア	-
7	<1.0	ガーナ	+
8	<1.0	ナイジェリア	++

10

20

患者血清中のpidのPCR増幅

方法

1. pidのPCR増幅：

プラスモディウムファルシパルム (*Plasmodium falciparum*) T9-96からのゲノムDNAを用い、以下のプライマー類で一連の (nested) PCRプロトコールを最適化させた：第一ラウンドプライマー、pfpid1, 5' ATG CTG ATG TTG CTA CGG 3', pfpid2, 5' ATC TTC CTG CAT TGC TCA CGC 3' 及び第二ラウンドプライマー、pfpid3 5' CTT GGA ATG AGG TTG TTT G 3' 及びpfpid4 5' AAT CCT CGA CGC CTA ACG 3' (図1)。第一ラウンドPCR用に最適化された反応混合物は、1×NH₄Cl₂ストックバッファー (Bioline, UK)、5 mM MgCl₂、1μM pfpid1、1μM pfpid2、100μM dNTP、2.5 IU Taqポリメラーゼ (Bioline, UK) である。サイクル条件は、95 で3分間；92 で30秒間、50 で30秒、72 で30秒を45サイクル；72 で5分を1サイクルとした。第一ラウンドPCRからのアンプライマー調製物のPCR群2μlに、以下の反応混合物を加えた：1×NH₄Cl₂ストックバッファー (Bioline, UK)、5 mM MgCl₂、1μM pfpid3、1μM pfpid4、200μM dNTP、2.5 IU Taqポリメラーゼ (Bioline, UK)。サイクル条件は、95 で3分；92 で30秒、55 で30秒、72 で30秒を45サイクル；72 で5分を1サイクルである。

【0148】

2. 患者血清

Royal Free Hospitalにマラリアで入院している8名の患者の全血を集めた。新鮮な全血を3,000 gで5分間遠心分離した。血清を除去し、赤血球を-20 で保存した。プラスモディウムファルシパルム (*Plasmodium falciparum*) による感染及び寄生虫血症の程度を調べた。出身国も記載した。

【0149】

30

40

50

3. 患者サンプルからのpidのPCR増幅

Wizard (R) ゲノムDNA精製キット (Promega, UK) の製造指針に基づき、上記赤血球ペレットからDNAを抽出した。次に、項目1のPCRアンプライマーにおける最適プロトコールによって、得られたゲノムDNA5 μ lを増幅した。PCRアンプライマーを、臭化エチジウム含有2%アガロースゲルで視覚化させた。

【0150】

4. 患者サンプルからのPCRアンプライマーの配列分析

Wizard (R) PCR精製キット (Promega, UK) を用いて、予測した分子量を有するPCRアンプライマーを精製した。次に、アンプライマーをCambridge Biosciencesのシーケンス (now Cytomyx, UK) にかけた。

【0151】

結果

図6に、患者血清からのpidをPCR増幅した結果を示す。17/20のサンプルが陽性結果を示し、試験患者の全てに陽性結果が見られた。3名の患者では、1例のみが陰性結果であった。患者の詳細及びPCRの結果を表2に示す。

【0152】

最も強い結果をもたらすPCR反応からのアンプライマーであるサンプル4、5及び10のシーケンスを行なった。PILEUP (GCG, MRC-HGMP UK) を用い、pidに対する配列の類似性を分析した。サンプル4及び5は、同じ患者から供給されたもので、3つのサンプルは全て、pidとの類似性の程度が高かった (図7)。

【0153】

結論

上記データは、pidが、プラスモディウムファルシパルム (Plasmodium falciparum) による感染が確認された患者から増幅され、診断試験用の適切なターゲットになり得るという証拠を提供するものである。Pidとの類似性について調べたPCRアンプライマーは、相同性の程度が高いことを示しており、pidとの同一性が確認された。

【0154】

【表2】

患者	サンプル番号	出身国	寄生虫血症%	pid PCR
A	1	ガーナ	3.5	+
	2		3.8	+
	3		<1.0	-
B	4	ガーナ	<1.0	+
	5		0	+
	14		0	-
C	6	ガーナ	<1.0	+
	7		<1.0	+
	8		0	+
	9		0	+
D	10	タンザニア	1.2	+
	11		4.5	+
	12		<1.0	+
	13		0	-
E	15	ナイジェリア	<1.0	+
	16		<1.0	+
F	17	?	<1.0	+
	18		<1.0	+
G	19	?	<1.0	+
	20		1.5	+

10

20

30

ヒト赤血球細胞への、pid介在侵入
方法

1. 細菌細胞株

invcos18, pROLAR-pidまたはネイティブのpROLARのいずれかで形質転換されたE. coli K12菌株のXL1-Blue MRを用いた。これらの構成は上述した通りである。

【0155】

2. ヒト赤血球細胞 (rbc)

新鮮な血液10 mlを、リチウムヘパリン含有試験管にトランスファーした。血液ドナーは、何らかの手段でマラリア風土病地域へ旅行したという経験はなく、マラリア感染も知られていなかった。上記rbcを3,000gで5分間遠心して分離し、5000gの微量遠心分離により、DMEM/10%のウシ胎仔血清 (FBS) で3回洗浄した。

【0156】

3. 侵入アッセイ

40

50

形質転換したE. coliを、5% CO₂にて37 で3時間、赤血球と共に10:1の比率(85×10⁵細菌:8.5×10⁵ rbc)でインキュベートした。次にこの細胞を、5000gの微量遠心分離により、DMEM/10% FBSで3回洗浄した。洗浄した細胞をDMEM/FBSで再懸濁した後、200 μg/mlのゲンタマイシンを添加し、得られた沈殿物を、5% CO₂にて37 で一晩、インキュベートした。インキュベート後、上記細胞を5000gの微量遠心分離により、DMEM/10% FBSで3回洗浄した後、rbcを滅菌蒸留水で再懸濁し、溶解した。この溶解液50 μlを、カナマイシン含有LB寒天平板上に広げた後、溶解物を二重培養した。

【0157】

24時間後のプレートを調べ、コロニーの数を、二人の観察者が別々にカウントした。

【0158】

結果

カウントしたコロニーを表3に示す。

【0159】

結論

表3に示すデータは、E. coliによるヒト赤血球細胞の侵入は、pidのみの存在によって媒介され得るが、侵入は、完全コスミドの存在によって増強され得ることを示しており、これは、侵入プロセスに関与する更なる遺伝子の存在を示唆するものである。

【0160】

【表3】

表1：新鮮なヒト赤血球細胞への、pid介在侵入

構成	二重コロニーカウント	
	観察者1	観察者2
pROLAR	46/48	51/47
pROLAR-pid	88/90	97/99
Invcos18	780/881	847/743

PIDとRHO GTPアーゼとの相互反応

ヒトCdc42、Rac1及びRhoAをコードするcDNAを、下記セットよりなるプライマー類を用いたPCR法で増幅させた。Cdc42：センス(cag gaa ttc cag aca att aag tgt gtt g)；アンチセンス(cag gtc gac tta gaa tat aca gca ctt cc)；Rac1：センス(cag gaa ttc cag gcc atc aag tgt gtg)；アンチセンス(cag gtc gac cta caa cag gca ttt tct c)。RhoA：センス(cag gaa ttc gct gcc atc cgg aag aaa ctg)；アンチセンス(cag cgt cga ctc aca aga caa ggc aac c)。3つのGTPアーゼ全てをEcoRI及びSalIで消化し、活性ドメインベクターpAD-GAL4(Stratagene)で同じ部位に連結した。更にPidを増幅させ(センス:cag gga att cat gct gat gtt gct ac)；アンチセンス(cag cgt cga cct ag a tct tcc tgc)、上記酵素で消化した後、結合ドメインベクターpBD-GAL4(Stratagene

10

20

30

40

50

)に連結した。4つのライゲーション全てを、

【0161】

【数3】

コンピテントDH5V

を形質転換するのに使用し、LB寒天/アンピシリンプレート上で選別した。形質転換体をインサートする為にスクリーニングした後、これらのインサートを制限酵素地図にかけ、これらが、GAL4融合ドメインに正しく配向しているかどうか調べた。各タンパク質に対する新しいプラスミド夫々、AD-Cdc42、AD-Rac1、AD-RhoA及びBD-Pidと命名した。

10

【0162】

相互作用を調べる為に、コンピテント酵母細胞YRG-2(Stratagene)中にAD-GTPアーゼの構成物を、BD-Pidで同時形質転換した。次に、これらを合成デキストロース寒天平板(SD/-His-Leu-Trp)で培養した。上記培地は、アミノ酸のロイシン(活性ドメインのGTPアーゼ構成物用に選択される)、トリプトファン(結合ドメインPid用に選択される)、及びヒスチジン(HISレセプター遺伝子用に選択される)を欠失している。30℃で3~7日間インキュベートした後、コロニーを単離し、SD液体培地にて30℃で3日間、振盪インキュベーターにて増殖した。

【0163】

観察：

20

PidとRhoA GTPアーゼの相互作用を、アミノ酸原栄養株及びHISレポーター遺伝子の両方に基づいて評価した。しかしながら、Cdc42のみがPidと限定的に相互作用していると考えられる。

【0164】

PIDの細胞成分局在

多くの場合、レポータータンパク質として緑色または赤色の蛍光を発するタンパク質を用い、培養条件下での細胞を用いてタンパク質の位置を追跡することが可能である。この為にPidを、以下のプライマー類でPCR増幅した：cag gga att cat gct gat gtt gct ac(センス)及びアンチセンス(cat gct cga gat ctt cct gca ttg ctc ac)後、EcoRI及びXhoIで消化した。次に、赤色の蛍光を発するタンパク質のN末端及びインフレーム(in-frame)にて、pDsRed-N1(Clontech)のEcoRI/SalI部位に連結した。

30

【0165】

【数4】

DH5V

細胞由来の形質転換体を、カナマイシンLB寒天平板上で選択した。プラスミドDNAを精製し、Pid挿入の有無及び配向を、制限酵素地図により決定した。このプラスミドをpPid-DsRedで消化した。

【0166】

40

HeLa細胞(~10⁴細胞)を、Permanoxチャンバースライドに播種した後、5% CO₂下、37℃にて、10%ウシ胎仔血清、抗真菌剤及び抗体を補充したDulbeccos改変イーグル培地(DMEM)で増殖した。約80%の集密時点で、この細胞をリンスした後、新鮮培地で1~2時間インキュベートしてトランスフェクトした。pPid-DsRed(5:1)を、至適iMEM培地にて、最終容積が100:1、10:1リポゾーム(DOSPER, Roche)となる様に希釈した後、更に同量で希釈した。プラスミドDNA及びリポゾームの希釈液の両者を混合した後、室温で30分間インキュベートし、複合体を得た。この混合物をピペットでHeLa細胞中に移した後、6-12時間、インキュベートした。新鮮なDMEMを添加した後、更に、上記細胞を30時間インキュベートした。その後、この細胞をPBSで2回洗浄し、室温にて30分間、3.7%パラホルムアルデヒドで固定した。これらを、核対比染色用のDAPIを備えたVectashield Mounting Medium

50

m (Vector Laboratories) に固定した後、Nikon Eclipse E800 蛍光顕微鏡で観察した。Bio-Rad Radiance 2100 共焦顕微鏡にて、2 ミクロン切片からの画像を得た。

【0167】

観察：

pDsRed-N1 でトランスフェクトした HeLa 細胞では、シトゾル及び核の内腔の両方に、細胞全体にわたって蛍光が観察された。これに対し、pPid-DsRed でトランスフェクトした細胞では、蛍光は、(恐らく分泌性の) 顆粒または周辺小胞に限定されている様であった。

【0168】

アクチン脱重合は、Pid 形質転換細菌による細胞侵入を妨げる

前述した実験では、FITC 標識抗体と TRITC ファロイジンの二重染色により、細胞入口の中心に、アクチンの核生成 / 重合を誘導する侵入コスミドで形質転換された細菌細胞が観察された。これは、侵入プロセスにおける細胞骨格の新たな補充を示唆するものである。更にこのステップを考慮すれば、アクチンの脱重合は侵入プロセスに何らかの影響を及ぼすのではと考えられる。これに目を向けて、 10^4 HeLa 細胞を Thermanox カバーガラスに播種し、上記の様に DMEM にて培養した。侵入アッセイの前に、HeLa 細胞を PBS で 2 回洗浄した後、抗体無添加の新鮮培地でインキュベートした。阻害の為に、上記細胞に、0.5-1 :g/ml 濃度のシトカラシン B を加え、2~5 分後に侵入アッセイを開始した。次に、HeLa 細胞培養物に、pA15-Pid (pROLar.A122 中にサブクローンした Pid)、pGEX-Pid (pGEX-5X1 中にサブクローンした Pid)、Inc18 (野生型侵入コスミド)、In18TM1 (変異コスミド) または非形質転換体 HB101 を、感染多重度 10 の比率で加えた。侵入効率をコントロールする為に、形質転換細菌を加えたパラレルアッセイでは、シトカラシン B の添加を省略した。3~5 時間後、この細胞を PBS で 5 回洗浄した後、200 :g/ml のゲンタマイシンを補充した DME M でインキュベートし、インキュベーター内で一晩放置した。この細胞を PBS で 5 回洗浄した後、3.7% パラホルムアルデヒドで固定し、室温で 30 分間、PBS/0.05% サボニンで処理して透過性を高めた。これらを PBS/5% 脱脂粉乳と共に、室温で 1 時間インキュベートした後、PBS/5% 脱脂粉乳で希釈した抗 E. coli 抗体でインキュベートした。これらを PBS で 2 回リンスした後、抗ウサギ IgG-FITC 接合体を単独で、または TRITC-ファロイジンと共に、再びインキュベートした。この細胞を PBS で充分洗浄した後、蛍光顕微鏡用に固定した。

【0169】

観察：

シトカラシン B で処理した HeLa 細胞は、pA15-Pid 形質転換菌または pGEX-Pid 形質転換菌による侵入には反応しなかった。Inc18 形質転換細胞では、シトカラシン B で処理した HeLa 細胞の周囲で (当該細胞が存在する場合には)、細菌細胞が局在していた。これは、侵入工程からの HeLa 細胞に付着した細菌細胞が脱共役することを示すものである。シトカラシン B で処理していない HeLa 細胞は、Inc18、pGEX-Pid 及び pA15-Pid による侵入は有効に認められたが、In18TM1 または HB101 による侵入は認められなかった。

【0170】

クリプトスポリジウム (Cryptosporidium) に対応する Pid 配列

Cryptosporidium parvum の接合子嚢 (オーシスト) を、Moredun Scientific Ltd, Scotland から得た。約 100,000 の接合子嚢を遠心分離し、50mM Tris-HCl pH 8.0、5mM EDTA、50mM NaCl、0.5% Sarkosyl、100 μ g/ml proteinase K で再懸濁した。上記細胞を、PCR 機にて 60 で 2 時間インキュベートした。次に、この溶菌液を、フェノール-クロロホルム-イソアミルアルコールで 2 回抽出した。ゲノム DNA を、3M 酢酸ナトリウム 0.1 容積及び氷冷した 95% エタノール 2.5 容積で沈殿した。-20 で 30 分間の後、DNA を 13,000rpm で 30 分間遠心分離にかけてペレット化した後、70% エタノールで洗浄し、風乾した。この DNA ペレットを、100 μ l の 10mM Tris/1mM EDTA pH 8.0 で再懸濁した。PCR 用に、以下のプライマーを用いた：センス、CGA GAA TTC ATG CTA ATG TTG CTA CGG；アンチセンス、CGA AGC TTC TAG ATC TTC CTG CAT TGC。上記サイクルのパラメーターは以下の通りである：最初の変性を 94 で 3 分間；次いで 94 で 30 秒間、55 で 30 秒間、68 で 1 分間を 30 サイクル。68 での最終エクステンションは、10 分間行なった。この PCR 産物を T-vector pCR2.1 (Invitrogen)

に結合し、組換え体からプラスミドDNAを精製し、配列を決定した。

【0171】

観察：

配列決定を配列番号28に示すが、これは実質的に、*plasmodium yoeli*からのPidヌクレオチド配列と同じである。

【0172】

参考文献

- Aronov, A.M., Suresh, S., Buckner, F.S., van Voorhis, W.C., Verlinde, C.L.M.J., Opperdoes, F.R., Hol, W.G. and M.H. Gelb. (1999)、*「トリパノソーマ類のグリセルアルデヒド3 - リン酸デヒドロゲナーゼのサブマイクロモル生物学的活性阻害剤の、構造ベース設計」*、Proc. Natl. Acad. Sci. 96 4273-4278 10
- Breton, C.B., Blisnick, T., Jouin, H., Barale, J.C., Rabilloud, T., Langsley, G. & Da Silva, L.H.P. (1992)、*「マウス赤血球へのメロゾイト侵入に必要なPlasmodium c habaudi p68セリンプロテアーゼ活性」*、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89,9647-9651
- Burbelo, P.D., Drechel, D. & Hall, A. (1995)、*「Cdc42及びRac GTPアーゼの為の、多数のターゲット候補タンパク質を決定する保存結合モチーフ」*、J. Biol. Chem. 270, 29 071-29074
- Burbelo, P.D., Snow, D.M., Bahou, W. & Spiegel, S. (1999) MSE55、*「繊維芽細胞の長細胞エクステンションを誘導するCdc42エフェクタータンパク質」*、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 9083-9088. 20
- Butler, D. & Maurice, J. (1997)、*「アゲンダ (agenda) に対するマラリアコントロールする時間」*、Nature 386,535-541.
- Chatfield, S.N., Strugnell, R.A., and G. Dougan. (1989)、*「外来抗原決定因子のワクチン及びキャリアとしての生きたサルモネラ」*、Vaccine, 7, 495-498.
- Chen, C-Y. & Kado, C.I. (1994)、*「pSaのosa遺伝子によるAgrobacterium tumefaciensの発ガン能阻害」*、J. Bacteriol. 176,5697-5703.
- Chen, L-M., Hobbie, S. & Galan, J.E. (1996)、*「サルモネラ誘導細胞骨格及び核応答へのCDC42の要請」*、Science 274, 2115-2118.
- Chien, C-H., Bartel, P.L., Sternglanz, R. and S. Fields. (1991)、*「関心のあるタンパク質と相互反応するタンパク質遺伝子を同定し、クローンするツーハイブリッドシステムの方法」*、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 9578-9582 30
- Combinatorial chemistry, (1996) Methods in Enzymology vol 267 ed. John N Abelson ; Academic Press Inc. New York.
- Gaillard, J.-L., Berche, P., Frehel, C., Gouin, E. & Cossart, P. (1991)、*「L. monocytogenesの細胞への侵入はインターナリン、グラム陽性球菌からの表面抗原を暗示するリピートタンパク質で媒介される」*、Cell 65, 1127-1141.
- Hadley, T.J. (1986)、*「マラリア寄生虫による赤血球侵入：細胞分子概観」*、Annu. Rev. Microbiol. 40,451-477.
- Hall, A. (1998)、*「Rho GTPアーゼ及びアクチン細胞骨格」*、Science 279, 509-514.
- Hardt, W-D., Chen, L-M., Schuebel, K.E., Bustelo, X.R. & Galan, J.E. (1998)、*「S . typhimuriumは、宿主細胞での膜浪打ち運動及び核応答を誘導するRho GTPアーゼのアクチベーターをコードする」*、Cell 93, 815-826. 40
- Horuk, R., Chitnis, C.E., Darbonne, W.C., Colby, T.J., Rybicki, A., Hadley, T.J. & Miller, L.H. (1993)、*「マラリア寄生虫プラスモディウムビバックス (Plasmodium v ivax) のレセプター：赤血球ケモカインレセプター」*、Science 264,1182-1184.
- Isberg, R.R. & Falkow, S. (1985)、*「Escherichia coli K-12による培養動物細胞の侵入を許容するYersinia pseudotuberculosisでコードした単一遺伝子座」*、Nature 317, 2 62-264.
- Jones, T.R., Obaldia, N.III, Gramsinski, R.A., Charoenvit, Y., Kolodny, N., Kito v, S., Davis, H.L., Krieg, A.M. and S.L. Hoffman. (1999)、*「Aotus monkeysのペプ* 50

- チドマラリアワクチンの免疫原性をエンハンスするCpGモチーフ含有合成オリゴヌクレオチド」、*Vaccine*, 17, 3065-3071;
- Lu, P.-J., Zhou, X. Z., Shen, M., & Lu, K.P. (1999)、「ホスホセリンまたはホスホスレオニン結合モジュールとしてのWWドメイン機能」、*Science* 283,1325-1328
- Massol, P., Montcourrier, P., Guillemot, J.-C. & Chavrier, P. (1998)、「Fcレセプター媒介食作用は、CDC42及びRac1を必要とする」、*EMBO J.* 17, 6219-6229.
- Mills, C. D., Burgess, D.C., Taylor, H.J. and K.C.Kain. (1999)、「プラスモディウムファルシパルム (*Plasmodium falciparum*) によるマラリア診断の為に、急速及び安価なディップスティックアッセイの評価」、*Bull. WHO.* 77, 553-559
- Morris, G.E., thi Man, N., & Sedgwick, S.G. (1995)、「トランスポゾン変異誘導による組換え抗原のエピトープマッピング」、*Mol. Biotech.* 4, 45-54. 10
- Parida, S.K., Domann, E., Rohde, M., Muller, S., Darji, A., Hain, T., Wehland, J. & Chakraborty, T. (1998)、「インターナリンBは、接着に必要で、リステリア菌 (*Listeria monocytogenes*) のヒト内皮細胞への侵入を媒介する」、*Mol. Microbiol.* 28, 81-93.
- Ron, E., Turek, T. Mathiowitz, E., Chasin, M., Michael, H. and R. Langer (1993)、「ポリアンヒドリドからのポリペプチドの調整放出」、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 4176-4180.
- Sim, B.K.L., Chitnis, C.E., Wasniowska, K., Hadley, T.J., & Miller, L.H. (1994)、「*Plasmodium falciparum* (プラスモディウムファルシパルム) による赤血球侵入のレセプター及びリガンドドメイン」、*Science* 264,1941-1944. 20
- Sudol, M., Chen, H.I., Bougeret, C., Einbond, A. & Bork, P. (1995)、「新規なタンパク質結合モジュールWWドメインの特性」、*FEBS Lett* 369, 67-71.
- Susuki, T., Miki, H., Takenawa, T. & Sasakawa, C. (1998)、「天然ウイスコット - アルドリッチ症候群タンパク質は、*Shigella flexneri* のアクチンベース運動性に関与する」、*EMBO J.* 17, 2767-2776.
- Valentine, C.R.I. & Kado, C.I. (1989)、「グラム陰性菌Promiscuousプラスミド」(ed Thomas, C.) 125-163 (Academic Press, London,).

【図面の簡単な説明】

【0173】

以下、本発明を、添付図面を参照しつつ、より詳細に説明する。

【図1】図1は、プラスモディウム寄生虫のライフサイクルを図説したものである。

【図2a】図2aは、*P. yoeli* DNAのコスミドクローンで形質転換した*E. coli*菌株に対する、免疫蛍光侵入アッセイの結果を示すものである。

【図2b】図2bは、*P. yoeli* DNAのコスミドクローンで形質転換した*E. coli*菌株に対する、免疫蛍光侵入アッセイの結果を示すものである。

【図2c】図2cは、*P. yoeli* DNAの 'Inv' コスミドクローンで形質転換した*E. coli*菌株が侵入した、COS-7細胞の透過型電子顕微鏡写真を示す。

【図3】図3は、侵入アッセイの後、COS-7細胞からレスキューした野生型コスミドクローン (Invcos11WT 及び Invcos18WT)、及び Tn1000 挿入クローン (TM1及びTM5) のプレートスコアの結果を示す棒グラフである。 40

【図4a】図4aは、本発明によるPIDヌクレオチド配列 (配列番号2) を含むヌクレオチド配列、及び対応のアミノ酸配列 (配列番号1) を示す。

図4の説明 A. Pidの核酸及び翻訳アミノ酸配列、及び隣接した配列。上流はORF3で、pSaのosaオペロンの一部分である。pidの下流は、アンチレストリクション遺伝子のArdCの5' UTRである。トランスポゾン挿入部位を

【0174】

【数5】

矢じり (A)

で示す。ターミネーションシグナルを星印で示す。トランスポゾン挿入部位上流の配列はプライマー、下流配列はTn1000トランスポゾンのプライマーで得た。介在配列は、トランスポゾン挿入部位を通過するプライマー・ウォーキング (primer-walking) で得た後、野生型コスミド構成物 Invcos18を含む幾つかの他のクローンを配列決定することにより証明した。

【0175】

【図4b】 図4bは、PIDの概略表示及び隣接する配列を示す。

10

図4の説明 B. pidの概要発現量、並びに上流及び下流の配列 トランスポゾンの方向を矢印で示す。推定Cdc42/Rho GTPアーゼと相互作用する配列 (the CRIBドメイン) の配列番号6は印字を太くしており、Ste20/S cerevisiae (Acc # L04655) ; ヒトWASP (Acc # NM000377) ; Cdc42エフェクタータンパク質MSE55 (Acc # XM_001058.1) ; p65^{PAK} /ラット (Acc # NM017198) ; C09B8.7/C.elegans (cc # U29612) 及びSHK1/S.pombe (Acc # AL034433) の配列と対比できる。

【0176】

【図5】 図5は、診断アッセイ用プライマー部位を同定するPidヌクレオチド配列部分を示す。

20

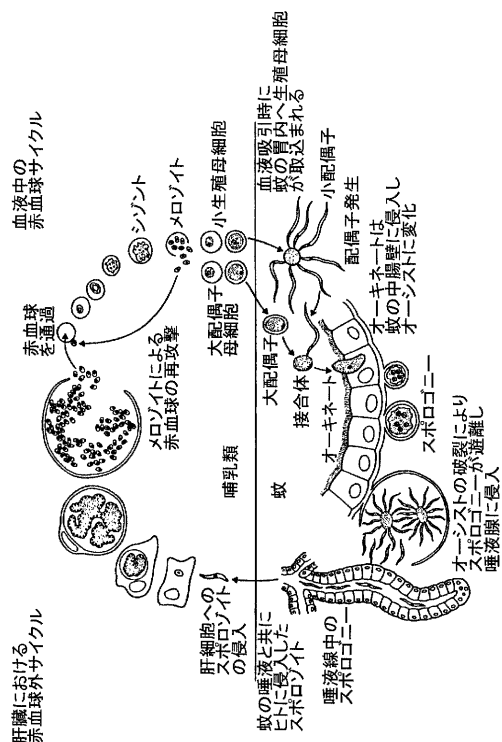
【0177】

【図6】 図6は、患者サンプル中のPidをPCR増幅した結果を示す。

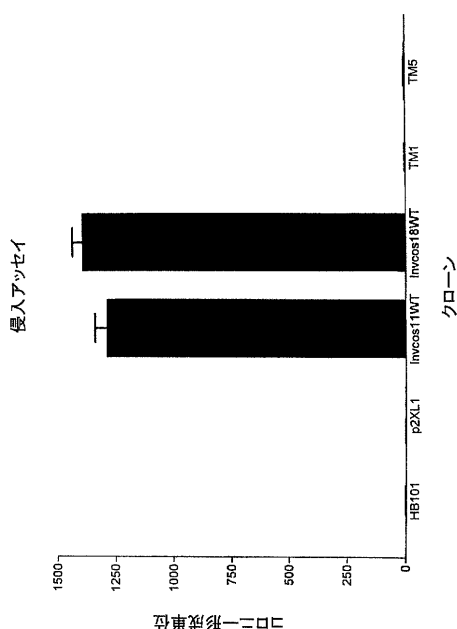
【0178】

【図7】 図7は、患者から増幅させたPid配列を示す。

【図1】



【図5】



【 8 】

```

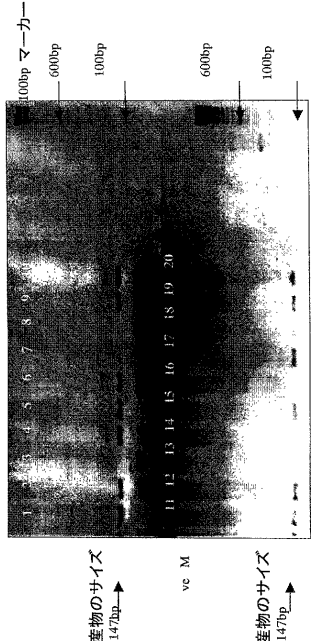
AAVGTGATGTTGCTACGGGCGGCGGTGTCGGCTTGGCTGGAATAATCGCGG
CTTGATAAGAGGTTGCGCAGTCGAGCGGTTGCCCCCTGAAATGCTCAAA
TCGTGCGGAATGCGGGCTGGCCGACAGTTCGGATTCATTTGTGTA
CCTGACCCCTTATGACAGCTTCAAAATGCCCGCAGATTCGGATTTGTGTA
TGTGAATGGCTTGGCTTTCATGAGCGTGTGG
CTCAAGCTGCCGCTTGAAGCAGCATGCTCAAAAGACCGGAAATCGCTC
GAGCGCGCGCATTTTCGCTGGGCAATCGAGCGCGCTTGGCTGAC
GPAACCCGACCAATGATTCCTGGCCATTTCCGGTGTGTTCATGATGGCAT
GACCCGTTCAATGGCTTTGGCCCAATGAGTCCGCTTCCGGTCTT
CCCGTGAAGAAGCATCCCGCTTATGTTGGCAACAACCTGGGGGTAGCAGC
GCCGATTCAGGTTTCAAAAGCTGGCTGAGCAATGCAGGAAGAT

```

第一ラウンドプライマー類: 5' ATG CTG ATG TTG CTA CGG 3',
 5' ATC TTC CTG CAT TGC TCA CGC 3',
 5' CTT GGA ATG AGG TTG TTT G 3',
 5' AAT CCT CGA CGC CTA AGC 3',

第二ラウンドプライマー類:

【 9 】



【 10 】

重層、内部PCR産物の群、4&5=同一患者、10=異なる患者であってすべてRFH患者

```

151
PFID-4-3  -----GANGCT-----ATG-C-N  AGH
PFID-5-3  -----GC-----ATG-C-A  AGH
pid      GACCATCT GAGGCT  ATGCC  A  AGH
pFid-10-3 -----ATGCC-----...T-G  GAG

201
PFID-4-3  -----T-TA-----
PFID-5-3  -----T-TA-----
pFid-10-3  -----T-TA-----

251
PFID-4-3  -----T-TA-----
PFID-5-3  -----T-TA-----
pid      FTCTCAGC CTGCCGTTG AAGCAGACA TGCCTAAGA
pFid-10-3  -----T-TA-----

```

【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
16 May 2002 (16.05.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/38173 A1

- (51) International Patent Classification: **A61K 39/015**,
39/018, C07K 19/00, A61K 39/39, 31/7088, C07K 16/20,
A61K 38/17, C07K 14/44, C12Q 1/04
- (21) International Application Number: PCT/GB01/04985
- (22) International Filing Date:
9 November 2001 (09.11.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
0027433.2 9 November 2000 (09.11.2000) GB
- (71) Applicant (for all designated States except US): **UNIVERSITY COLLEGE LONDON** [GB/GB]; Rowland Hill Street, London NW3 2PF (GB).
- (72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): **GILLESPIE, Stephen, Henry** [IE/GB]; Department of Medical Microbiology, Royal Free and University College Medical School, Rowland Hill Street, London NW3 2PF (GB). **BAYELE, Henry, Kean** [GH/GB]; Department of Biochemistry & Molecular Biology, University College London, Royal Free Campus, London NW3 2PF (GB). **McHUGH, Timothy, Daniel** [GB/GB]; Department of Medical Microbiology, Royal Free & University College
- Medical School, Royal Free Campus, University College London, Rowland Hill Street, London NW3 2PF (GB).
- (74) Agents: **DANIELS, Jeffrey, Nicholas** et al.; Page White & Farrer, 54 Doughty Street, London WC1N 2LS (GB).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BI, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:
— with international search report
— before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/38173 A1

(54) Title: VACCINE BASED ON A CELLULAR PENETRATION FACTOR FROM AN APICOMPLEXAN PARASITE

(57) Abstract: An antigenic component, for use in a vaccine capable of promoting production in a subject of an antibody specific to the antigenic component, which antibody is capable of specifically binding to the Pid protein having the amino acid sequence in Seq ID No. 1.

WO 02/38173

PCT/GB01/04985

VACCINE BASED ON A CELLULAR PENETRATION FACTOR FROM AN APICOMPLEXAN PARASITE

Field of the Invention

This invention relates to an antigenic component for use in a vaccine, particularly for diseases such as those caused by apicomplexan parasites.

Background to the Invention

The apicomplexans comprise a range of parasites including those of the genera: *Eimeria*; *Isospora*; *Toxoplasma*; *Hammondia*; *Cystoisospora*; *Sarcocystis*; *Besnoitia*; *Frenkelia*; *Cryptosporidia*; *Plasmodia*; *Babesia*; and *Theileria*.

All genera of the apicomplexans have a specialized organelle called the apical complex (hence their name). This organelle contains secretory granules/proteins that are extruded onto the surface of target cells during invasion. Extrusion of these proteins precedes cell entry

These parasites are associated with disease in a wide variety of host organisms. *Eimeria* species, for example, are known to be pathogenic to at least chickens, turkeys, geese, ducks, cattle, sheep, pigs, horses, rabbits, rats and mice. Toxoplasmosis of humans, puppies and lambs is associated with *Toxoplasma* species, in particular, *T. gondii*. *Cryptosporidia* species infect mammals, birds and reptiles. *C. muris* and *C. parvum* in particular are known to cause gastrointestinal disease in cattle, sheep and humans.

WO 02/38173

PCT/GB01/04985

2

Babesiosis, associated with *Babesia* species, is an often fatal disease of domesticated animals, including cattle, horses, sheep, goats, pigs, cats and dogs. *Theileria* species are known to infect cattle, sheep and goats. *T. parva* and *T. annulata* in particular, are important pathogens in cattle, the former causing African theileriosis or East Coast Fever.

One of the most intensively studied apicomplexan associated diseases is malaria. The disease is today one of the most significant single causes of human morbidity and mortality, with estimated death rates of up to 3 million and approximately 500 million infected cases per year (Butler, D. and J. Maurice, 1997).

Malaria is caused by *Plasmodium* species which are injected into the blood of vertebrates by female mosquito vectors. To date, four *Plasmodium* species have been associated with human malaria: *P. falciparum*; *P. vivax*; *P. ovale*; and *P. malariae*. Of these, *P. falciparum* is believed to be the major cause worldwide. Additionally, there are known to be at least 20 species of *Plasmodium* in non-human primates, including: *P. cynomolgi*; *P. knowlesi*; *P. brasilianum*; *P. inui*; *P. berghei*; *P. yoelii*; *P. vinckei*; and *P. chabaudi*.

The lifecycle of *Plasmodium* spp. is illustrated in Figure 1.

The infective stage, the sporozoites, are injected directly into the bloodstream from the salivary glands of a mosquito. These sporozoites then invade liver cells, within which they replicate in a process referred to as

WO 02/38173

PCT/GB01/04985

3

extra-erythrocytic schizogony. At this stage, some *P. vivax* or *P. ovale* parasites will develop into hypnozoites, which remain dormant, but which, upon reactivation, may cause relapses.

After a (species-dependent) period of time, the parasites, now called merozoites, reinvade the circulation. The merozoites invade red blood cells, and undergo a further phase of replication, referred to as erythrocytic schizogony. Following rupture of the infected red blood cells, the released merozoites may in turn invade new red blood cells. This cycle of infection may be repeated many times.

The merozoites are believed to be the primary cause of malarial pathology. For example, the parasites provoke the release of cytokines, such as tumour necrosis factor, whose action is thought to be responsible for many of the signs and symptoms of malaria. Furthermore, cerebral malaria is known to result from infected red blood cells adhering to capillaries in the brain.

Some of the merozoites are capable of developing into the sexual stages or gametocytes, which are taken up when a female mosquito bites again. After a period of fertilisation, ookinetes are formed and invade the mosquito gut, in preparation for development into sporozoites. The sporozoites in turn penetrate the mosquito salivary glands, in readiness for the next bite.

Current treatments against diseases associated with apicomplexan parasites other than malaria have met with

WO 02/38173

PCT/GB01/04985

4

limited success. There is only one vaccine available for this group of organisms, a live attenuated vaccine for Toxoplasmosis that is only licenced for animal use. Treatment with folate inhibitors and macrolides is available for toxoplasmosis, but there is a need to develop new treatments for use during pregnancy as the most effective treatment, sulphadiazine and pyrimethamine, is unsafe during pregnancy. Macrolides such as spiramycin, although safe are less effective and are unable to cross the blood-brain barrier, and thus is unsuitable for the treatment of cerebral toxoplasmosis. There is currently no treatment or vaccine available for cryptosporidiosis.

Anti-disease strategies for malaria broadly include mosquito bite prevention, anti-parasitic drugs and prophylactic treatment.

Attempts have been made since the 1980s to use protein components of *P. falciparum* to develop vaccines which would stimulate the production of protective antibodies in a host. However, none of the vaccines tested have provoked a strong enough immune response to be effective in the field. SPf66, a composite vaccine targeting the blood stage, appeared to provide some protection in field trials, but at present is not thought to be a suitable candidate for malarial control.

SPf66 was found to be immunogenic and to provide some level of protection (30-35%) in South American volunteers, but was largely unprotective in African children who are exposed to higher levels of infectivity. This means that the efficacy of this vaccine is not strain-transcending.

WO 02/38173

PCT/GB01/04985

5

For any vaccine/drug to be effective, it must cross parasite-strain boundaries regardless of the geography of disease prevalence. X-ray irradiated sporozoites have been shown to be effective in a challenge study but impractical for widespread use. A vaccine using the major sporozoite protein, the circumsporozoite protein, CSP, did not produce long-lasting immunity as it did not induce T-cell responses. Another vaccine based on the merozoite surface protein, MSP-1, failed to confer protection in monkey trials. The reason why all these vaccines fail is most probably due to a wrong choice of vaccine candidates derived directly from wrong premises. Another possible problem is that these antigens are highly polymorphic from one geographical region to the other; some are also redundant, i.e they occur in more than one copy (such as MSP-1) in the parasite. Crucially, the rationale for the choice of vaccine candidates does not take into account the biochemistry or biology of the cognate molecule and how it fits into the whole schema of parasite infectivity; for example, the functions of MSP-1 or CSP which have been widely studied over the last 20yrs, have not been elucidated; prior knowledge of function of a molecule is an important prerequisite for its use in vaccine design.

Recently, attempts have been made to develop vaccines which will elicit a cell-mediated immune response in the host.

One such study has aimed to produce a vaccine that would stimulate host T-cells to destroy parasite-infected liver cells. The study has made use of a so-called "prime-boost" technique, in which the host immune system is primed with one vaccine and boosted with another, to increase the

WO 02/38173

PCT/GB01/04985

6

levels of cytotoxic T-cells. The two components of the prime-boost vaccine are: a DNA vaccine based on particular identified antigens; and a non-replicating vaccinia virus (MVA) having the gene for those same antigens inserted in its DNA. The prime-boost vaccine has been shown to provide protection against later malarial infection in mice. Human trials are currently underway.

In a further example, RTSS is a viral vaccine based on sporozoite protein which is currently in field trials.

However, despite this apparent progress there is as yet no effective anti-malarial vaccine. This being so, there remains a need for new treatments, both therapeutic and prophylactic, effective against malaria and other diseases associated with apicomplexan parasites.

Summary of the Invention

Accordingly in a first aspect the present invention provides an antigenic component, for use in a vaccine capable of promoting in a subject production of an antibody specific to the antigenic component, which antibody is capable of specifically binding to the Pid protein having the amino acid sequence in Seq ID No 1.

The present inventors have identified the *pid* (Plasmodium invasion determinant) locus as an invasiveness-conferring locus, occurring in apicomplexan parasites. A parasite-infected host would be expected to bear the Pid protein and antibodies to the protein, as a marker of infection. The Pid protein therefore provides a potential new target for

WO 02/38173

PCT/GB01/04985

7

treatments against diseases associated with these parasites, including vaccines and therapeutic agents.

Surprisingly, the newly identified Pid protein has been found to have an identical amino acid sequence to that of the Osa (oncogenic suppressive activity) protein, encoded by the *osa* gene of the pSa plasmid (Kado, C.I. and S.M. Close, 1991; Chen, CY and C.I Kado, 1994). The *osa* and *pid* loci also have identical nucleotide sequences.

In the field of plant pathology, the pSa plasmid is known to inhibit completely the ability of *Agrobacterium tumefaciens* to incite tumours in plants. The above referenced studies reported that the *osa* locus alone is sufficient for this inhibition to occur. The oncogenicity of *A. tumefaciens* is mediated by the transfer of a specific sector (T-DNA) of the bacterial Ti plasmid to the plant cell. The above studies suggested that the Osa protein might suppress oncogenicity by blocking the transfer of VirE2 from bacterium to plant.

According to the first aspect of the present invention, the Pid protein provides a specific target for antibodies raised in a subject in response to a vaccine.

In general, an antibody binds to a part of a protein known as an epitope or antigenic determinant. A protein may have more than one epitope, and different epitopes on one protein may be recognised by different antibodies. Similarly, a single antibody may be capable of binding to more than one epitope; however the affinity of binding, and so the specificity of the interaction, will vary.

WO 02/38173

PCT/GB01/04985

8

The binding specificity of the antibodies raised in response to a vaccine is determined by the antigenic component of the vaccine. Briefly, on administration of the vaccine, the antigenic component is recognised by the host immune system, which produces antibodies capable of specifically binding to the component. In this context, binding between an antigenic component and a specific cognate antibody is expected to occur with a binding constant in the range 10^{-6} to 10^{-7} M or even lower.

In the present case, the antibodies raised in response to the vaccine must also be capable of recognising and binding to the target Pid protein in the infected host. In order to avoid cross-reactivity with native host antigens, the antibodies must bind Pid specifically, typically with a binding constant in the range 1 to 10nM and preferably below 1nM.

In one embodiment, the antigenic component may comprise the Pid protein having the amino acid sequence in SEQ ID No.1, or a variant thereof which does not substantially affect its antigenicity. In this way, antibodies, raised to bind specifically to an epitope of the Pid protein in the antigenic component, can bind that same epitope in the target Pid protein.

The Pid protein with a variant sequence may be a naturally occurring variant, or may be engineered. The variant sequence may comprise one or more amino acid additions, substitutions or deletions compared to the sequence in SEQ ID No 1. Similarly the variant may comprise one or more

WO 02/38173

PCT/GB01/04985

9

modified amino acids, provided that the variations in the amino acid sequence do not substantially affect the antigenicity of the protein. For example, variation by conservative substitution is a possibility. Combinations of conservative substitutions are asparagine and glutamine (N or Q); valine, V, leucine, L, isoleucine, I, and methionine, M; aspartic acid and glutamic acid (D or E); lysine, K, arginine, R, and histidine, H); alanine, A, and glycine, G; serine, S, and threonine, T; phenylalanine, F, tyrosine, Y, and tryptophan, W.

Use of a variant Pid protein may provide particular advantages. The variant may, for example, have improved solubility or stability, or may be more compatible with other vaccine components. For example, a fusion tag such as thioredoxin may be linked to the protein to improve stability and/or solubility.

As explained above, a protein may comprise more than one epitope for antibody binding. Any epitope of the Pid protein may therefore be contained in only a fragment of the protein. Accordingly, the antigenic component may comprise a peptide fragment of the Pid protein having the amino acid sequence in SEQ ID No 1 or a variant thereof as previously described.

Use of a peptide fragment rather than the entire protein provides a smaller antigenic component which may be more easily administered. Small fragments may also be produced more cheaply and more easily than the intact protein. These can be readily synthesized by synthetic chemistry or by recombinant methods.

WO 02/38173

PCT/GB01/04985

10

Preferably, the Pid protein or peptide fragment of the Pid protein in the antigenic component is preparable from an apicomplexan parasite. The protein may be expressed by, and isolated from the source parasite. Alternatively, the pid locus may be isolated from a parasite and expressed using standard cloning and expression techniques. Suitable apicomplexan parasites include those selected from the following genera: Eimeria; Isospora; Toxoplasma; Hammondia; Cystoisospora; Sarcocystis; Besnoitia; Frenkelia; Cryptosporidium; Babesia; Theileria; and, in particular, Plasmodium.

A protein purified from the parasite source is near-to-native (having any required post-translational modification such as myristylation or glycosylation), and therefore preferred as a source of antigenic component. However, these proteins are difficult to purify in sufficient quantities. Bacterial expression is guaranteed to yield large quantities of recombinant protein, but this may not be post-translationally modified. However, expression in yeast (*Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae* or *Schizosaccharomyces pombe*) or baculovirus/insect cell system, ensures that the recombinant protein is appropriately modified.

It is also however envisaged that synthetic mimics of the Pid protein may be constructed which are suitable for use in the antigenic component.

In a vaccine aimed at eliciting an antibody response, immunogenicity is mediated by the vaccine immunogen. Accordingly, in a second aspect the present invention

WO 02/38173

PCT/GB01/04985

11

provides an immunogen comprising the antigenic component coupled to an immunogenic component.

The antigenic component may itself be immunogenic so that the antigenic component itself comprises the immunogenic component. However, it may be that the antigenic component is, for example, too small to be immunogenic to the host. In that case, it may be necessary to couple the antigenic component to a suitable carrier. To be effective, therefore, the isolated antigen preferably stimulates the host immune system in a manner and at a level similar to that elicited during biological infection. To enhance antigen presentation and immunogenicity, it may be coupled to haptens such as bovine serum albumin and keyhole limpet haemocyanin; viral particles or dendrimers. It may also be possible to engineer attenuated *Salmonella* strains to carry vaccines to be delivered orally as live vaccines. *Salmonella* is appropriate for this purpose because it induces both high antibody and cell-mediated immune responses.

In a further aspect, the present invention provides a vaccine comprising an immunogen and an adjuvant, which enhances the antibody response. Freund's complete adjuvant and Freund's incomplete adjuvant, for example, are suitable for use in non-human vaccines. Aluminium hydroxide and aluminium phosphate are adjuvants authorised for human use. Possible further adjuvants include liposomes, BCG, lipopolysaccharides, muramyl dipeptide derivatives, squalene, non-ionic hydrophobic block copolymer surfactants such as polyoxypropylene and polyoxyethylene copolymers,

WO 02/38173

PCT/GB01/04985

12

pluronic polyols, ethylene-vinyl acetate, cyclodextrins and polysialic acid.

In a further aspect the present invention provides a vaccine comprising a polynucleic acid, which encodes the antigenic component described above. The polynucleic acid may comprise, for example, DNA, RNA or a synthetic nucleic acid.

In one embodiment, the polynucleic acid comprises the sequence in SEQ ID No 2.

Polynucleic acid vaccines are typically aimed at eliciting a cell-mediated immune response in a subject. A key feature of this type of vaccine is that the antigenic component encoded by the polynucleic acid of the vaccine is expressed in and displayed on the surface of a cell within the subject. These vaccines may be of particular use against diseases associated with cell-invasive parasites, since they mimic the natural situation where the antigen is intracellular.

The polynucleic acid of the present vaccine may further comprise sequence for efficient expression of the antigenic component. For example, such sequence may comprise a promoter sequence or encode a secretion signal.

Advantageously, the present vaccine also comprises a delivery means for delivery of the polynucleic acid to a subject. The vaccine may additionally comprise an adjuvant for enhancing the cell-mediated immune response in the subject.

WO 02/38173

PCT/GB01/04985

13

The present polynucleic acid vaccine preferably takes either of two main forms: a naked vaccine or a live vaccine.

In the case of a naked vaccine, the polynucleic acid is administered to a subject, and by one of a number of alternative means, is delivered to a target host cell. The antigenic component encoded by the polynucleic acid is then expressed by the host cell.

The polynucleic acid of a naked vaccine may, for example, comprise a plasmid, bearing a eukaryotic promoter to direct efficient expression of the antigenic component in a target host cell. The promoter may be constitutive, for example, the generic CMV promoter or SV40 promoter. Alternatively, the promoter may be tissue specific. In one embodiment the promoter is a muscle specific promoter such as the MyoD, myosin or myogenin promoters. The significance of a muscle-specific promoter is that a polynucleic acid vaccine delivered by intramuscular injection can be expressed directly by muscle cells.

The liver may also be targeted for expression of antigens; a liver-specific promoter such as the albumin promoter may be used in combination with a secretory signal tagged onto the antigen open reading frame for expression and secretion.

The polynucleic acid may additionally comprise sequence encoding a secretion signal for the antigenic component, to ensure that during expression the component is secreted to

WO 02/38173

PCT/GB01/04985

14

the outer surface of the host cell. For example, the secretion signal may comprise the *malE* signal for bacterial expression; the honeybee melittin signal for baculovirus expression in insect cells (Sf9; Sf21); the α -factor for expression in yeast and the Igk signal for expression in mammalian cells.

The polynucleic acid of the naked vaccine may further comprise immunostimulatory sequences which provide a suitable adjuvant. For example, unmethylated CpG sequences may be used for this purpose. CpG immunostimulatory sequences may also be combined with one or more other adjuvants indicated above such as complete or incomplete Freund's adjuvant.

For delivery to a subject, the polynucleic acid of the naked vaccine may be complexed with for example, liposomal vesicles or viral particles. In one embodiment, the vaccine is delivered by injection through the skin or muscle. In a further embodiment, the vaccine is delivered by nebulisation. Liposomes and viral particles act as carriers. No particular cell types are targeted except when tissue-specific expression is desired wherein the requisite promoter will be included on the delivered DNA sequence.

In the case of a live vaccine, the polynucleic acid is first transformed into a suitable strain of bacteria, so that the bacterial cells express the antigenic component on their cell surface. The expressing bacterial strain is then administered to the subject, so that the bacteria provide the required delivery means.

WO 02/38173

PCT/GB01/04985

15

Bacterial strains suitable for this purpose include attenuated *aro*/ auxotrophic mutants of *Salmonella*, *Listeria* and *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Viral vectors such as attenuated herpes simplex, BCG and adenoviruses can also be used.

The polynucleic acid of a live vaccine may comprise an expression vector, bearing a prokaryotic promoter to direct efficient expression of the antigenic component in the bacterium. Suitable promoters for bacterial expression include the *tac*, *trc*, *BAD*, *T7* and P_{L}/trp promoters. The polynucleic acid may also encode a secretion signal, directing secretion of the component from the bacterial cell, thereby exposing the component to the host immune system. Examples of secretion signals include *malE*, *ompT*, *pelB* and bacteriophage fd gene III protein signal.

In a further embodiment the polynucleic acid encoding the antigenic component may be integrated into the bacterial chromosome. Integration would be expected to provide improved stability and increased expression levels. Expression of the antigen will typically be driven by any one of the above generic promoters. Alternatively, it may be possible to use, for example, a *Salmonella* gene promoter. The secretion signal will be an integral part of any targeting recombinant vaccine vector, and therefore will be stably integrated into the bacterial chromosome.

In the case of the live vaccine, the use of an adjuvant may be optimal where, for example, *Salmonella* is used because

WO 02/38173

PCT/GB01/04985

16

Salmonella is able to induce secretory, humoral and cellular immunity.

Preferably, the vaccines described above are suitable for use in a human subject. These vaccines will, for example, comprise an adjuvant suitable for use in humans, such as those described above. Typically, these vaccines will be non-pyrogenic, non-inflammatory and non-necrotizing, as well as being protective against biological infection.

In one embodiment, the present vaccine is suitable for use against human malaria caused by *P. falciparum*, *P. ovale*, *P. vivax*, or *P. malariae*.

Without wishing to be bound by theory, the present vaccine may target *Pid* at one or more of the life-cycle stages of an apicomplexan parasite. In the case of a *Plasmodium* parasite, the vaccine may, for example, target a lifecycle stage which is invasive to mammalian liver cells or red blood cells. The target life-cycle stage may be the sporozoites which invade the liver; the merozoites which invade red blood cells or the ookinetes, which invade the mosquito gut wall during or after a blood meal to complete development to sporozoites.

In addition to providing a new target for a vaccine, the *Pid* protein also provides a basis for new therapies against infectious disease, such as apicomplexan-associated disease.

Accordingly, in a further aspect the present invention provides a therapeutic agent comprising a component which

WO 02/38173

PCT/GB01/04985

17

component is capable of competing with a protein having the amino acid sequence in Seq ID No.1 in a specific binding assay.

It is envisaged that the Pid protein has a critical role in cell invasion by, for example, apicomplexan parasites. Without wishing to be bound by theory this is likely to occur by interaction of Pid with a receptor. A component which is capable of competing with Pid in an *in vitro* specific binding assay is likely to be capable of competing with Pid *in vivo* for receptor binding. The component can therefore be incorporated into a therapeutic agent aimed at blocking Pid-receptor interaction.

In one embodiment, Pid can be used in combinatorial phage display selection from a pool of random peptides without prior knowledge of its target receptor(s) or interactors. A library of random peptides of up to 15 amino acids may be constructed and displayed on a phage surface. Recombinant Pid protein is then immobilized on Petri dishes, blocked with BSA to occlude non-specific sites. The phage-encoded peptides are then incubated with Pid. After this step, non-specifically bound peptides/phage are washed off and specific phage are eluted, amplified in permissive bacterial hosts and the whole panning cycle is repeated. After 4-5 selections, the peptide sequences are determined; the affinity of binding may then be further optimized by site-directed mutagenesis. These peptides are then synthesized and used in binding assays. High affinity binding may be defined as those peptides with a dissociation constant in the 1-10nM range. IC_{50} may be

WO 02/38173

PCT/GB01/04985

18

determined by competitive ELISA. Typically, a value of 10^{-6} to 10^{-7} is deemed competitive binding.

In one embodiment, it is envisaged that a mimic of the Pid protein may be produced and incorporated into a therapeutic agent. Alternatively, the receptor for Pid may be identified and an inhibitor of the Pid-receptor interaction used as a component of the therapeutic agent.

Antibodies to a Pid receptor may also be therapeutic since they may block interaction with Pid, assuming that receptor antibody epitopes and binding sites for Pid are the same.

In a further aspect the invention provides a protein comprising the amino acid sequence in SEQ ID No 1 or a fragment thereof for use in medicine. The invention additionally provides a polynucleic acid encoding the protein or a fragment of the protein, for use in medicine.

The vaccine and the therapeutic agent, both according to the present invention, are suitable for use in methods of treatment against infectious diseases such as those caused by apicomplexan parasites.

This aspect of the present invention therefore advantageously provides the use of the above antigenic component for the manufacture of a medicament effective against a disease caused by an apicomplexan parasite. According to the above, manufacture of a medicament effective against such a disease may comprise the use of a protein comprising the amino acid sequence in SEQ ID No 1 or a peptide fragment thereof, and/or the use of a

WO 02/38173

PCT/GB01/04985

19

polynucleic acid encoding such a protein or peptide fragment.

Diseases which may suitably be treated according to the present invention include those caused by apicomplexan parasites of the following genera: *Eimeria*; *Isospora*; *Toxoplasma*; *Hammondia*; *Cystoisospora*; *Sarcocystis*; *Besnoitia*; *Frenkelia*; *Cryptosporidium*; *Plasmodium*; *Babesia*; and *Theileria*.

Preferably, the disease is one selected from the following: malaria; coccidiosis; theileriosis; cryptosporidiosis; isosporiasis; blastocystosis; babesiosis; anaplasmosis; sarcosporidiosis; toxoplasmosis; and sarcosystosis.

In particular, the invention provides a means for preventing and treating malaria disease, associated with the *Plasmodium* parasite. Human malaria, associated with for example, *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* and *P. malariae*, is a particularly important target.

As noted above, the *Pid* protein provides a convenient marker of infection by an organism bearing the *pid* locus, such as an apicomplexan parasite. Accordingly, in one aspect the present invention provides a diagnostic agent comprising an antibody, which antibody is capable of specifically binding to the *Pid* protein having the amino acid sequence in SEQ ID No 1.

In this context, the antibody is typically capable of binding to the *Pid* protein with a binding constant in the range from 10^{-6} to 10^{-7} . The diagnostic agent preferably

WO 02/38173

PCT/GB01/04985

20

comprises a means for detecting antibody-Pid complexes. The antibody may, for example, be labelled using standard techniques with a fluorophore, a radiolabel, a marker enzyme or a ligand. Suitable fluorophores include fluorescein, rhodamine, Cy3, TRITC and phycoerythrin. Suitable marker enzymes include alkaline phosphatase, beta galactosidase and horse radish peroxidase. Suitable ligands include biotin and digoxigenin (DIG).

In a further aspect the invention provides the use of the diagnostic agent in a method of diagnosing disease caused by an apicomplexan parasite. The diagnostic agent may for example be used *in vitro* to detect the presence of the Pid protein in a sample taken from a subject.

An *in vitro* diagnostic test of infection based on the detection of pid antibodies in patient serum/plasma may involve ELISA or EIA which may be complemented with immunofluorescence microscopy. Any diagnostic agent involving pid should include positive controls (purified pid protein and the cognate reactive antibodies) as well substrates for the relevant label (eg. *p*-nitrophenyl phosphate (NPP) for alkaline phosphate (AP)-labelled secondary antibodies].

Infection may also be identified by detecting antibodies to a Pid protein in the serum of a subject. Accordingly in a further aspect the present invention provides a diagnostic agent comprising an antigenic component as described above. The antigenic component will bind to any Pid antibodies present in the subject sera; binding can be detected by one of a number of standard labelling techniques.

WO 02/38173

PCT/GB01/04985

21

The present invention further provides the use of the diagnostic agent in a method of diagnosing disease caused by an apicomplexan parasite.

In one embodiment, the antigenic component of the diagnostic agent may be immobilised onto ELISA plates, and incubated with subject sera. Antibodies to *Pid* in the sera may then be detected by antigen capture, with monoclonal antibodies to *Pid* being used as a positive control.

Other labelling and detection methods may include chromogenic methods [e.g. AP-NPP or nitrotetrazolium blue and 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (BCIP)], fluorogenic (e. g. biotin and fluorescein-labelled streptavidin) or luminescence (e.g AP and CDP-Star). While ELISA or EIA methods may be used, it may also be possible to perform Western blots or fluorescence *in situ* hybridization. In some cases, detection may be enhanced by *in situ* polymerase chain reaction using fluorogenic nucleotides.

The immobilised antigenic component may be provided in a spot test or dip-stick method for field diagnosis. Hapten-conjugated (FITC, alkaline phosphatase etc) monoclonal antibodies to *Pid* will then be incubated with parasites and visualised directly by fluorescence microscopy.

In accordance with the above, the present invention provides an antibody, which is capable of specifically binding to the *Pid* protein having the amino acid sequence in SEQ ID No 1 for use in medicine.

WO 02/38173

PCT/GB01/04985

22

The invention also provides the use of such an antibody for the manufacture of a diagnostic agent for diagnosis of a disease caused by an apicomplexan parasite.

In a further aspect, the invention provides the use of an antigenic component as described above, for the manufacture of a diagnostic agent for diagnosis of a disease caused by an apicomplexan parasite.

It will be appreciated that to manufacture the diagnostic agents described above may comprise the use of a protein comprising the amino acid sequence in SEQ ID No 1 or a fragment thereof, or the use of a polynucleic acid encoding the protein or peptide fragment.

A diagnostic agent may be provided in a kit typically comprising positive controls (purified pid protein and the cognate reactive antibodies) as well substrates for the relevant label [eg. *p*-nitrophenyl phosphate (NPP) for alkaline phosphate (AP)-labelled secondary antibodies]. A detailed and fully referenced instruction manual and calibration information would normally be an integral part of the kit.

In a further aspect there is provided an *in vitro* method for diagnosing apicomplexan infection in a subject, which comprises:

- (i) obtaining from the subject a nucleic acid containing sample; and
- (ii) testing the sample for the presence of nucleic acid sequence characteristic of *Pid*. The nucleic acid sequence

WO 02/38173

PCT/GB01/04985

23

characteristic of Pid may be all or a part of the sequence encoding the Pid protein or may be nucleic acid sequence upstream or downstream of the Pid coding sequence. Conveniently, the nucleic acid containing sample is subjected to a step of amplification, such as by PCR, which is preferably specific to the Pid nucleic acid sequence. This may be achieved using appropriate primers, such as any of those set out in Figure 5. Other primers unique to the target nucleic sequence may also be used.

Infection by any of the apicomplexans described above may be detected using this method. Where the infection is in humans, detection of plasmodium infection is particularly important in diagnosing malaria. This may be achieved using red blood cells as the sample source of nucleic acid.

The apicomplexan associated diseases which may be diagnosed according to the present invention include those described above.

Brief Description of the Drawings

The invention will now be described in more detail by way of example only with reference to the accompanying drawings in which :

Figure 1 illustrates the lifecycle of a *Plasmodium* parasite;

Figures 2a and 2b shows the results of an immunofluorescence invasion assay on *E. coli* strains transformed with cosmid clones of *P. yoeli* DNA;

Figure 2c shows transmission electron micrographs of COS-7 cells which have been invaded by *E. coli* strains transformed with 'Inv' cosmid clones of *P. yoeli* DNA;

WO 02/38173

PCT/GB01/04985

24

Figure 3 provides a bar chart displaying the results of plate scoring of wild type cosmid clones (Invcos11WT and Invcos18WT) and Tn1000 δ -inserted clones (TM1 and TM5), rescued from COS-7 cells following invasion assays;

Figure 4a shows a nucleotide sequence including the PID nucleotide sequence (SEQ ID:NO.2) and associated amino acid sequence (SEQ ID:NO.1) according to the invention;

Figure 4b shows a schematic representation of PID and adjacent sequences; and

Figure 5 shows a part of the Pid nucleotide sequence identifying primer sites for diagnostic assays;

Figure 6 shows results of PCR amplification of Pid from patient samples; and

Figure 7 shows Pid sequences amplified from patients.

Detailed Description of the Invention

Examples

Isolation of the pid locus from Plasmodium yoeli.

As described above, the lifecycle of *Plasmodium* sp. involves three invasive stages (Figure 1): the ookinete; the sporozoite and the merozoite. Each stage has a different target cell preference. In the host, for example, sporozoites invade liver cells preferentially, whereas merozoites invade red blood cells.

In general terms there are three major steps in *Plasmodium* invasion: recognition, attachment and entry. The factor or factors which are involved in the invasive process have not been conclusively identified. A number of possible parasite specific ligands have been implicated in cell

WO 02/38173

PCT/GB01/04985

25

entry, and various cellular structures suggested as putative receptors. However these studies have focused on binding to the cell rather than on actual cell entry (Sim, B.K.L et al, 1994; Horuk, R et al, 1993; Breton, C. B et al, 1992; and Hadley, T J et al, 1986).

Using a reconstitution assay (Isberg, R.R. and S. Falkow, 1985), the present inventors have isolated from *P. yoeli* (a murine malaria parasite), a locus that surprisingly is both necessary and sufficient for invasion of epithelial cells by *E. coli* K12.

Initially, cosmid clones of segments of the *P. yoeli* genome were transduced into *E.coli*. The clones were screened for the ability to bind to and invade cultured COS-7 cells. In the screening process, primary validation of invasion or internalisation was based on gentamicin-killing; gentamicin permeates cells very poorly and can therefore be used to eliminate cell-surface bound bacteria.

On the basis of the screening method, several invasive clones ('Inv') were isolated and found to cross-hybridise. Restriction mapping of the clones further showed that they overlapped with each other.

In order to confirm that the identified clones were indeed invasive, further invasion assays were carried out using *E.coli* K12 strains transformed with the cosmid clones. The assays were carried out as above but the bacteria were tracked by indirect immunofluorescence using a primary polyclonal antibody specific to *E. coli* K12. Punctate fluorescence of invading bacteria was observed. No

WO 02/38173

PCT/GB01/04985

26

invasion was observed when the assay was carried out with control strains: untransformed *E.coli* or bacteria transformed with plasmid or cosmid vector.

To establish that the bacterial cells were internalised rather than extracellular, the invaded cells were counter-stained with TRITC-labelled phalloidin. Actin polymerisation could be observed at foci of cell entry and invading bacteria colocalised with the nucleation of polymerised actin filaments.

To provide further proof of cell entry, transmission electron microscopy was performed on the invaded cultured cells. Bacteria were found within membrane-bound vacuoles.

In order to investigate further the role of this locus in cell entry, one invasion-proficient clone, *Invcos18*, was subjected to transposon mutagenesis with *Tn1000* $\gamma\delta$ (Morris, G.E et al, 1995).

97% of the transposon mutants were severely impaired for cell invasion, and were unable to complement *E. coli* in cell entry.

Sequence analysis of six non-complementing clones (with cfu ≤ 1) showed transposon insertion at the same site in all six cases, suggesting that the inserted locus was indispensable for invasion. Figure 4A shows the nucleotide sequence of the region, with the location of the transposon ends marked in sequence.

WO 02/38173

PCT/GB01/04985

27

Transposon insertion sites were located which intercept a putative open reading frame of about 567 nucleotides. The sequence of the *pid* locus is designated SEQ ID no 2 and runs from nucleotide 607 in Figure 4A to nucleotide 1172.

The predicted amino acid sequence of the *pid* translation product is presented in Figure 4B and is designated SEQ ID No.1. This is also shown in Figure 4A. The DNA ssequence upstream of *Pid* is designated SEQ ID NO:3 and encodes an amino acid sequence from CRF3, designated SEQ ID No.4. The sequence downstream of *Pid* is designated SEQ ID NO:5.

The BLAST programme was used to search the GenBank, EMBL, DDBJ and FDB databases for sequences homologous to the *pid* or *Pid* sequences.

The *pid* locus was found to be a pathogenicity island characterised by an unusually high GC content (55%) compared to parasite chromosomal DNA. DNA sequences contiguous with the invasion locus are more AT rich and show homology (about 38%) to the transmissible *TraC*/primase locus, which is required for conjugal transfer of the broad host range plasmids, *IncN* and *IncW* (Valentine, C.R.I. and C.I.Kado, 1989). Anatol, A. Belogurov *et al*, Antirestriction protein *Ard* (Type C) encoded by *IncW* plasmid *pSa* has a high similarity to the protein transport domain of *TraC1* primase of promiscuous plasmid *RP4*. *Journal of Molecular Biology*, (2000), 296: 969-977.

Without wishing to be bound by theory, this suggests the presence of integrated cryptic plasmid DNA sequences in the parasite genome. It is possible that the *pid* locus has

WO 02/38173

PCT/GB01/04985

28

been acquired by horizontal transfer of a primordial gene derived from a pathogenic bacterium or bacteriophage.

In the homology searches, the Pid protein amino acid sequence was found to be identical to that of the Osa protein, encoded by the *osa* gene on the *Shigella flexneri* virulence plasmid pSa. The *pid* and *osa* nucleotide sequences are identical.

The Pid protein also shows homology to the product of the internalin B locus (InlB) in the *inlAB* operon of *Listeria monocytogenes*, which has been shown to be indispensable for invasion (Gaillard, J.L. et al, 1991; Parida, S.K. et al, 1998).

The inventors have also identified a putative CDC42/Rac-interactive binding (CRIB) motif:

FVLSRDEASAVMLAEHVGVA

in the Pid protein sequence. This motif is designated SEQ ID No65. The motif is associated with small GTPase-effector proteins such as N-WASP, Ste20 and MSE55. An alignment of the sequences of Pid and other CRIB proteins is shown in Figure 4B. The alignment was produced using the BLAST programme. The putative CRIB domain in *pid* does not align with the internalin B sequence. The homology of the latter and of the Rho GTPase-effector proteins was identified by a BLASTP search. The Accession numbers for *pid* homologues are as follows:

Internalin B.	Acc #	AF 121032
Cdc42 effector protein (MSE55)	Acc #	XM_001058.1
<i>STE20</i>	Acc #	L04655

WO 02/38173

PCT/GB01/04985

29

WASP/human	Acc #	NM 000377
p65 ^{PAR} -d/rat	Acc #	NM 017198

Apart from internalin, all the rest have CRIB domains.

WASP, Ste20 and MSE55 proteins are known to have an effect on actin cytoskeletal reorganisation (Burbelo, P.D. *et al*, 1999; Hall, A *et al*, 1998; Burbelo, P.D *et al*, 1998). In *Salmonella typhimurium*, for example, an interaction of N-WASP and SopE with the Rho GTPases CDC42 and Rac1, is required for invasion of non-phagocytic cells (Hardt, W.D *et al*, 1998; Chen, L.M. *et al* 1996; Susuki,T *et al*, 1998; Masol, P *et al*, 1998). Thus, Pid may be a guanine nucleotide exchange factor or a GTPase-activating protein.

Isolation and expression of Pid.

The *pid* gene may be isolated from a suitable parasite using standard cloning techniques, and the sequence information in SEQ ID No1 and No2. Fragments of the gene may be obtained using standard methods.

The *pid* gene or fragments of the gene may be expressed, and the protein products purified using conventional methods.

For details of the above methods the reader is referred to Riggs, P., in Ausubel, F.M. *et al* (eds) *Current Protocols in Molecular Biology* John Wiley & Sons, Inc., New York, pp 16.6.1-16.6.14 (1994)

Vaccine production.

Antibody-mediated vaccine

Once an antigenic component has been obtained, a vaccine comprising the antigenic component may be produced by

WO 02/38173

PCT/GB01/04985

30

conventional means. The reader is directed towards the following references:

Jane L. Holley, Mike Elmore, Margaret Mauchline, Nigel Minton and Richard W. Titball. Cloning, expression and evaluation of a recombinant sub-unit vaccine against *Clostridium botulinum* type F toxin [Abstract] [Full text] *Vaccine* 19 (2-3) 288-297 (2000)

Michael Theisen et al. Identification of a major B-cell epitope of the *Plasmodium falciparum* glutamate-rich protein (GLURP), targeted by human antibodies mediating parasite killing; *Vaccine* 19 (2-3) 204-212 (2000)

JH Tian, S Kumar, DC Kaslow, and LH Miller Comparison of protection induced by immunization with recombinant proteins from different regions of merozoite surface protein 1 of *Plasmodium yoelii*. *Infect. Immun.* 1997 65: 3032-3036.

Bittle, J.L., Houghten, R.A., Alexander, H., Shinnick, T.M., Sutcliffe, J.G., Lerner, R.A., Rowlands, D.J. and Brown, F. 1982. Protection against foot-and-mouth disease by immunization with a chemically synthesized peptide predicted from the viral nucleotide sequence. *Nature* 298:30-33.

Harlow, E. & Lane, D. 1988. *Antibodies: A laboratory manual*, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York.

Holder, A.A. and Freeman, R.R. 1981. Immunization against bloodstage-rodent malaria using purified parasite antigens, *Nature*, 294:361-364.

Hollingdale, M.R., Nardin, E.H., Tharavani, S., Schwartz, A.L. and Nussenzeig, R.S. 1984. Inhibition of entry of sporozoites of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*

WO 02/38173

PCT/GB01/04985

31

sporozoites into cultured cells; an *in vitro* assay of protective antibodies. *J. Immunol.* **132**:909-913.

Kaslow, D.C., Quakyi, I.A., Syin, C., Raum, M.G., Keister, D.B., Coligan, J.E., McCutchan, T.F. and Miller, L.H. 1988. A vaccine candidate from the sexual stage of human malaria that contains EGF-like domains. *Nature* **333**:74-76.

The vaccine may be administered to a test subject and the antibodies raised in response to the vaccine tested for specific binding to *Pid*, both using standard methods. Suitable methods are described for example in the following references: JH Tian, S Kumar, DC Kaslow, and LH Miller Comparison of protection induced by immunization with recombinant proteins from different regions of merozoite surface protein 1 of *Plasmodium yoelii*. *Infect. Immun.* 1997 **65**: 3032-3036.

Harlow, E. & Lane, D. 1988. *Antibodies: A laboratory manual*, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York.

Holder, A.A. and Freeman, R.R. 1981. Immunization against bloodstage-rodent malaria using purified parasite antigens, *Nature*, **294**:361-364.

Hollingdale, M.R., Nardin, E.H., Tharavani, S., Schwartz, A.L. and Nussenzweig, R.S. 1984. Inhibition of entry of sporozoites of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* sporozoites into cultured cells; an *in vitro* assay of protective antibodies. *J. Immunol.* **132**:909-913.

Kaslow, D.C., Quakyi, I.A., Syin, C., Raum, M.G., Keister, D.B., Coligan, J.E., McCutchan, T.F. and Miller, L.H. 1988. A vaccine candidate from the sexual stage of human malaria that contains EGF-like domains. *Nature* **333**:74-76.

WO 02/38173

PCT/GB01/04985

32

Armando Reyna-Bello, Axel Cloeckeaert, Nieves Vizcaíno, Mary I. Gonzatti, Pedro M. Aso, Gérard Dubray, and Michel S. Zygmunt Evaluation of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Using Recombinant Major Surface Protein 5 for Serological Diagnosis of Bovine Anaplasmosis in Venezuela Clin. Diagn. Lab. Immunol. 1998 5: 259-262.

M Theisen, J Vuust, A Gottschau, S Jepsen, and B Hogh Antigenicity and immunogenicity of recombinant glutamate-rich protein of *Plasmodium falciparum* expressed in *Escherichia coli* Clin. Diagn. Lab. Immunol. 1995 2: 30-34.

Similarly, the vaccine may be tested for effectiveness against disease such as those caused by apicomplexan parasites, using standard laboratory protocols. These may be found, for example, in the following references: JH Tian, S Kumar, DC Kaslow, and LH Miller Comparison of protection induced by immunization with recombinant proteins from different regions of merozoite surface protein 1 of *Plasmodium yoelii* .Infect. Immun. 1997 65: 3032-3036.

Harlow, E. & Lane, D. 1988. Antibodies: A laboratory manual, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York.

Holder, A.A. and Freeman, R.R. 1981. Immunization against bloodstage-rodent malaria using purified parasite antigens, *Nature*, **294**:361-364.

Hollingdale, M.R., Nardin, E.H., Tharavanij, S., Schwartz, A.L. and Nussenzweig, R.S. 1984. Inhibition of entry of sporozoites of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* sporozoites into cultured cells; an *in vitro* assay of protective antibodies. *J. Immunol.* **132**:909-913.

WO 02/38173

PCT/GB01/04985

33

Kaslow, D.C., Quakyi, I.A., Syin, C., Raum, M.G., Keister, D.B., Coligan, J.E., McCutchan, T.F. and Miller, L.H. 1988. A vaccine candidate from the sexual stage of human malaria that contains EGF-like domains. *Nature* **333**:74-76.

Armando Reyna-Bello, Axel Cloeckert, Nieves Vizcaíno, Mary I. Gonzatti, Pedro M. Aso, Gérard Dubray, and Michel S. Zygmunt Evaluation of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Using Recombinant Major Surface Protein 5 for Serological Diagnosis of Bovine Anaplasmosis in Venezuela *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 1998 **5**: 259-262.

M Theisen, J Vuust, A Gottschau, S Jepsen, and B Hogh Antigenicity and immunogenicity of recombinant glutamate-rich protein of *Plasmodium falciparum* expressed in *Escherichia coli* *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 1995 **2**: 30-34.

Polynucleic acid vaccine

Once a suitable polynucleic acid has been identified, the polynucleic acid may be incorporated in a vaccine using conventional methods. In this regard the reader is directed following documents: (Jones, T.R. *et al*, 1999; Chatfield, S.N. *et al*, 1989;) Ricardo S. Corral and Patricia B. Petray CpG DNA as a Th1-promoting adjuvant in immunization against *Trypanosoma cruzi* *Vaccine* **19** (2-3) 234-242 (2000)

K.D. Song *et al*. A DNA vaccine encoding a conserved *Eimeria* protein induces protective immunity against live *Eimeria acervulina* challenge *Vaccine* **19** (2-3) 243-252 (2000)

Rong Xiang, Holger N. Lode, Ta-Hsiang Chao, J. Michael Ruehlmann, Carrie S. Dolman, Fernando Rodriguez, J. Lindsay Whitton, Willem W. Overwijk, Nicholas P. Restifo, and Ralph

WO 02/38173

PCT/GB01/04985

34

A. Reisfeld An autologous oral DNA vaccine protects against murine melanoma PNAS 97: 5492-5497

Martha Sedegah, Trevor R. Jones, Manjit Kaur, Richard Hedstrom, Peter Hobart, John A. Tine, and Stephen L. Hoffman Boosting with recombinant vaccinia increases immunogenicity and protective efficacy of malaria DNA vaccine PNAS 95: 7648-7653.

Donald L. Lodmell, Nancy B. Ray and Larry C. Ewalt Gene gun particle-mediated vaccination with plasmid DNA confers protective immunity against rabies virus infection, Vaccine 16 (2-3) 115-118 (1998)

Cynthia L. Brazolot Millan, Risini Weeratna, Arthur M. Krieg, Claire-Anne Siegrist, and Heather L. Davis CpG DNA can induce strong Th1 humoral and cell-mediated immune responses against hepatitis B surface antigen in young mice PNAS 95: 15553-15558.

Wendy C. Brown, D. Mark Estes, Sue Ellen Chantler, Kimberly A. Kegerreis, and Carlos E. Suarez DNA and a CpG Oligonucleotide Derived from *Babesia bovis* Are Mitogenic for Bovine B Cells Infect. Immun. 1998 66: 5423-5432.

Zina Moldoveanu, Laurie Love-Homan, Wen Qiang Huang and Arthur M. Krieg. CpG DNA, a novel immune enhancer for systemic and mucosal immunization with influenza virus Vaccine, 16(11-12)1216-1224

The polynucleic acid vaccine may be administered to a subject and tested for therapeutic efficacy using standard protocols, such as those found in the following references:

WO 02/38173

PCT/GB01/04985

35

JH Tian, S Kumar, DC Kaslow, and LH Miller Comparison of protection induced by immunization with recombinant proteins from different regions of merozoite surface protein 1 of *Plasmodium yoelii*. *Infect. Immun.* 1997 65: 3032-3036.

Bittle, J.L., Houghten, R.A., Alexander, H., Shinnick, T.M., Sutcliffe, J.G., Lerner, R.A., Rowlands, D.J. and Brown, F. 1982. Protection against foot-and-mouth disease by immunization with a chemically synthesized peptide predicted from the viral nucleotide sequence. *Nature* 298:30-33.

Harlow, E. & Lane, D. 1988. *Antibodies: A laboratory manual*, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York.

Holder, A.A. and Freeman, R.R. 1981. Immunization against bloodstage-rodent malaria using purified parasite antigens, *Nature*, 294:361-364.

Hollingdale, M.R., Nardin, E.H., Tharavanij, S., Schwartz, A.L. and Nussenzweig, R.S. 1984. Inhibition of entry of sporozoites of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* sporozoites into cultured cells; an *in vitro* assay of protective antibodies. *J. Immunol.* 132:909-913.

Kaslow, D.C., Quakyi, I.A., Syin, C., Raum, M.G., Keister, D.B., Coligan, J.E., McCutchan, T.F. and Miller, L.H. 1988. A vaccine candidate from the sexual stage of human malaria that contains EGF-like domains. *Nature* 333:74-76.

M Theisen, J Vuust, A Gottschau, S Jepsen, and B Høgh Antigenicity and immunogenicity of recombinant glutamate-rich protein of *Plasmodium falciparum* expressed in *Escherichia coli* Clin. Diagn. Lab. Immunol. 1995 2: 30-34.

WO 02/38173

PCT/GB01/04985

36

Design and production of therapeutic agent

Once a *pid* gene is isolated, and the Pid protein expressed and purified, a component for a therapeutic agent may be obtained by conventional methods.

The Pid protein may, for example, be crystallised and the 3-D structure determined, by methods such as those set out in Alex M. Aronov, Stephen Suresh, Frederick S. Buckner, Wesley C. Van Voorhis, Christophe L. M. J. Verlinde, Fred R. Oppendoes, Wim G. J. Hol, and Michael H. Gelb Structure-based design of submicromolar, biologically active inhibitors of trypanosomatid glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase PNAS 96: 4273-4278.

This structure may be used as a template to design Pid mimics by combinatorial chemistry; the reader is directed towards the following documents: (Aronov, A.M. *et al*, 1999; 'Combinatorial chemistry' (1996) Methods in Enzymology vol 267 ed. John N Abelson; Academic Press Inc. New York;) Kirk McMillan, Marc Adler, Douglas S. Auld, John J. Baldwin, Eric Blasko, Leslie J. Browne, Daniel Chelsky, David Davey, Ronald E. Doile, Keith A. Eagen, Shawn Erickson, Richard I. Feldman, Charles B. Glaser, Cornell Mallari, Michael M. Morrissey, Michael H. J. Ohlmeyer, Gonghua Pan, John F. Parkinson, Gary B. Phillips, Mark A. Polokoff, Nolan H. Sigal, Ronald Vergona, Marc Whitlow, Tish A. Young, and James J. Devlin Allosteric inhibitors of inducible nitric oxide synthase dimerization discovered via combinatorial chemistry PNAS 97: 1506-1511

Dustin J. Maly, Ingrid C. Choong, and Jonathan A. Ellman Combinatorial target-guided ligand assembly: Identification of potent subtype-selective c-Src inhibitors PNAS 97: 2419-

WO 02/38173

PCT/GB01/04985

37

2424.

RAP Lutzke, NA Eppens, PA Weber, RA Houghten, and RHA Plasterk Identification of a Hexapeptide Inhibitor of the Human Immunodeficiency Virus Integrase Protein by Using a Combinatorial Chemical Library PNAS 92: 11456-11460

NF Sepetov, V Krchnak, M Stankova, S Wade, KS Lam, and M Lebl Library of Libraries: Approach to Synthetic Combinatorial Library Design and Screening of "Pharmacophore" Motifs PNAS 92: 5426-5430

JJ Burbaum, MHJ Ohlmeyer, JC Reader, I Henderson, LW Dillard, G Li, TL Randle, NH Sigal, D Chelsky, and JJ Baldwin A Paradigm for Drug Discovery Employing Encoded Combinatorial Libraries PNAS 92: 6027-6031

D.T. O'Hagan et al. Microparticles in MF59, a potent adjuvant combination for a recombinant protein vaccine against HIV-1 Vaccine 18(17):1793-1801 (2000)

Jing Huang and Stuart L. Schreiber A yeast genetic system for selecting small molecule inhibitors of protein-protein interactions in nanodroplets PNAS 94: 13396-13401.

Jay Parrish, Helen Metters, Lin Chen, and Ding Xue Demonstration of the *in vivo* interaction of key cell death regulators by structure-based design of second-site suppressors PNAS 97: 11916-11921

The mimics may be tested for competitive binding with Pid in a specific binding assay according to the methods set out in Harlow, E. & Lane, D. 1988. Antibodies: A laboratory manual, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York.

WO 02/38173

PCT/GB01/04985

38

The pharmacophores may be assessed by QSAR (quantitative structure-activity relationships); their toxicity may be tested *in vivo* and their efficacy as therapeutic agents assessed by the level of protection they confer from parasite infection. For suitable protocols, the reader is directed towards: Alex M. Aronov, Stephen Suresh, Frederick S. Buckner, Wesley C. Van Voorhis, Christophe L. M. J. Verlinde, Fred R. Opperdoes, Wim G. J. Hol, and Michael H. Gelb Structure-based design of submicromolar, biologically active inhibitors of trypanosomatid glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase PNAS 96: 4273-4278.

NF Sepetov, V Krchnak, M Stankova, S Wade, KS Lam, and M Lebl Library of Libraries: Approach to Synthetic Combinatorial Library Design and Screening of "Pharmacophore" Motifs PNAS 92: 5426-5430

Bittle, J.L., Houghten, R.A., Alexander, H., Shinnick, T.M., Sutcliffe, J.G., Lerner, R.A., Rowlands, D.J. and Brown, F. 1982. Protection against foot-and-mouth disease by immunization with a chemically synthesized peptide predicted from the viral nucleotide sequence. Nature 298:30-33.

Harlow, E. & Lane, D. 1988. Antibodies: A laboratory manual, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York.

Holder, A.A. and Freeman, R.R. 1981. Immunization against bloodstage-rodent malaria using purified parasite antigens, Nature, 294:361-364.

Hollingdale, M.R., Nardin, E.H., Tharavanij, S., Schwartz, A.L. and Nussenzweig, R.S. 1984. Inhibition of entry of sporozoites of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* sporozoites into cultured cells; an *in vitro* assay of protective antibodies. J. Immunol. 132:909-913.

WO 02/38173

PCT/GB01/04985

39

Kaslow, D.C., Quakyi, I.A., Syin, C., Raum, M.G., Keister, D.B., Coligan, J.E., McCutchan, T.F. and Miller, L.H. 1988. A vaccine candidate from the sexual stage of human malaria that contains EGF-like domains. *Nature* **333**:74-76.

The therapeutic agents may be delivered orally, in liposomes, by direct injection, or by controlled release from hydrophobic copolymers such as ethylene-vinyl acetate, cyclodextrins, polysialic acid or surfactant systems. Suitable means are described in the following: (Ron, E. et al, 1993); PNAS 90:4176-4180.

Alternatively, the receptor for Pid may be identified by protein-protein interaction trap assays, such as the yeast two-hybrid system, described in: (Chien, C-H. et al, 1991); PNAS 88:9578-9582

Inhibitors to this interaction may then be identified by further combinatorial chemistry, and duly optimised for inhibition by mutagenesis, using conventional methods. Suitable methods may be found in the following references: Kirk McMillan, Marc Adler, Douglas S. Auld, John J. Baldwin, Eric Blasko, Leslie J. Browne, Daniel Chelsky, David Davey, Ronald E. Dolle, Keith A. Eagen, Shawn Erickson, Richard I. Feldman, Charles B. Glaser, Cornell Mallari, Michael M. Morrissey, Michael H. J. Ohlmeyer, Gonghua Pan, John F. Parkinson, Gary B. Phillips, Mark A. Polokoff, Nolan H. Sigal, Ronald Vergona, Marc Whitlow, Tish A. Young, and James J. Devlin Allosteric inhibitors of inducible nitric oxide synthase dimerization discovered via combinatorial chemistry PNAS 97: 1506-1511

Dustin J. Maly, Ingrid C. Choong, and Jonathan A. Ellman

WO 02/38173

PCT/GB01/04985

40

Combinatorial target-guided ligand assembly: Identification of potent subtype-selective c-Src inhibitors PNAS 97: 2419-2424.

RAP Lutzke, NA Eppens, PA Weber, RA Houghten, and RHA Plasterk Identification of a Hexapeptide Inhibitor of the Human Immunodeficiency Virus Integrase Protein by Using a Combinatorial Chemical Library PNAS 92: 11456-11460.

JJ Burbaum, MHJ Ohlmeyer, JC Reader, I Henderson, LW Dillard, G Li, TL Randle, NH Sigal, D Chelsky, and JJ Baldwin A Paradigm for Drug Discovery Employing Encoded Combinatorial Libraries PNAS 92: 6027-6031

D.T. O'Hagan et al. Microparticles in MF59, a potent adjuvant combination for a recombinant protein vaccine against HIV-1 Vaccine 18(17):1793-1801 (2000)

Jing Huang and Stuart L. Schreiber A yeast genetic system for selecting small molecule inhibitors of protein-protein interactions in nanodroplets PNAS 94: 13396-13401.

Jay Parrish, Helen Metters, Lin Chen, and Ding Xue Demonstration of the *in vivo* interaction of key cell death regulators by structure-based design of second-site suppressors PNAS 97: 11916-11921.

The inhibitors may then be incorporated into therapeutic agents for receptor occlusion, and tested for therapeutic efficacy using standard methods.

Bittle, J.L., Houghten, R.A., Alexander, H., Shinnick, T.M., Sutcliffe, J.G., Lerner, R.A., Rowlands, D.J. and Brown, F. 1982. Protection against foot-and-mouth disease by immunization with a chemically synthesized peptide predicted from the viral nucleotide sequence. Nature 298:30-33.

WO 02/38173

PCT/GB01/04985

41

Holder, A.A. and Freeman, R.R. 1981. Immunization against bloodstage-rodent malaria using purified parasite antigens, *Nature*, **294**:361-364.

Kaslow, D.C., Quakyi, I.A., Syin, C., Raum, M.G., Keister, D.B., Coligan, J.E., McCutchan, T.F. and Miller, L.H. 1988. A vaccine candidate from the sexual stage of human malaria that contains EGF-like domains. *Nature* **333**:74-76.

Diagnostic agent production and method of diagnosis

Diagnostic agent comprising antibody

Following expression of the Pfd protein or a fragment thereof, methods for raising antibodies to the protein are well known in the art. Suitable methods may be found in the following references: Bittle, J.L., Houghten, R.A., Alexander, H., Shinnick, T.M., Sutcliffe, J.G., Lerner, R.A., Rowlands, D.J. and Brown, F. 1982. Protection against foot-and-mouth disease by immunization with a chemically synthesized peptide predicted from the viral nucleotide sequence. *Nature* **298**:30-33.

Harlow, E. & Lane, D. 1988. *Antibodies: A laboratory manual*, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York.

Holder, A.A. and Freeman, R.R. 1981. Immunization against bloodstage-rodent malaria using purified parasite antigens, *Nature*, **294**:361-364.

Hollingdale, M.R., Nardin, E.H., Tharavani, S., Schwartz, A.L. and Nussenzweig, R.S. 1984. Inhibition of entry of sporozoites of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* sporozoites into cultured cells; an *in vitro* assay of protective antibodies. *J. Immunol.* **132**:909-913.

Kaslow, D.C., Quakyi, I.A., Syin, C., Raum, M.G., Keister, D.B., Coligan, J.E., McCutchan, T.F. and Miller, L.H.

WO 02/38173

PCT/GB01/04985

42

1988. A vaccine candidate from the sexual stage of human malaria that contains EGF-like domains. *Nature* **333**:74-76.

These antibodies may be incorporated into a diagnostic agent and used in diagnosis according to conventional methods. The reader is directed towards the following publications: Shuli Li, Gina Galvan, Fausto G. Araujo, Yasuhiro Suzuki, Jack S. Remington, and Stephen Parmley. Serodiagnosis of Recently Acquired *Toxoplasma gondii* Infection Using an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay with a Combination of Recombinant Antigens *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2000 **7**: 781-787.

Kerstin Hubert, Abel Andriantsimahavandy, Alain Michault, Matthias Frosch, and Fritz A. Mühlschlegel Serological Diagnosis of Human Cysticercosis by Use of Recombinant Antigens from *Taenia solium* Cysticerci *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 1999 **6**: 479-482.

Byoung-Kuk Na and Chul-Yong Song Use of Monoclonal Antibody in Diagnosis of Candidiasis Caused by *Candida albicans*: Detection of Circulating Aspartyl Proteinase Antigen *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 1999 **6**: 924-929.

Felix Grimm, Friedrich E. Maly, Jian Lüü, and Roberto Llano Analysis of Specific Immunoglobulin G Subclass Antibodies for Serological Diagnosis of Echinococcosis by a Standard Enzyme-Linked Immunosorbent Assay *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 1998 **5**: 613-616.

Armando Reyna-Bello, Axel Cloeckert, Nieves Vizcaíno, Mary I. Gonzatti, Pedro M. Aso, Gérard Dubray, and Michel S. Zygmunt Evaluation of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Using Recombinant Major Surface Protein 5 for

WO 02/38173

PCT/GB01/04985

43

Serological Diagnosis of Bovine Anaplasmosis in Venezuela
Clin. Diagn. Lab. Immunol. 1998 5: 259-262.

François Simondon, Isabelle Iteman, Marie Pierre Preziosi,
Abdoulaye Yam, and Nicole Guiso Evaluation of an
Immunoglobulin G Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for
Pertussis Toxin and Filamentous Hémagglutinin in Diagnosis
of Pertussis in Senegal Clin. Diagn. Lab. Immunol. 1998 5:
130-134.

I Bjerkas, MC Jenkins, and JP Dubey Identification and
characterization of Neospora caninum tachyzoite antigens
useful for diagnosis of neosporosis Clin. Diagn. Lab.
Immunol. 1994 1: 214-221.

M Theisen, J Vuust, A Gottschau, S Jepsen, and B Høgh
Antigenicity and immunogenicity of recombinant glutamate-
rich protein of Plasmodium falciparum expressed in
Escherichia coli Clin. Diagn. Lab. Immunol. 1995 2: 30-34.

Laurens A. H. van Pinxteren, Pernille Ravn, Else Marie
Agger, John Pollock, and Peter Andersen Diagnosis of
Tuberculosis Based on the Two Specific Antigens ESAT-6 and
CFP10 Clin. Diagn. Lab. Immunol. 2000 7: 155-160.

E. E. Zijlstra, N. S. Daifalla, P. A. Kager, E. A. G.
Khalil, A. M. El-Hassan, S. G. Reed, and H. W. Ghalib rK39
Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Diagnosis of
Leishmania donovani Infection Clin. Diagn. Lab. Immunol.
1998 5: 717-720.

Diagnostic agent comprising antigen

An effective antigenic component may be obtained as
described above. The antigenic component may then be

WO 02/38173

PCT/GB01/04985

44

incorporated in a diagnostic agent and used in diagnosis according to standard methods.

Suitable methods are described in the following documents: (Mills, C. D. et al, 1999;); Bull WHO 77:553-559; Felix Grimm, Friedrich E. Maly, Jian Lüü, and Roberto Llano Analysis of Specific Immunoglobulin G Subclass Antibodies for Serological Diagnosis of Echinococcosis by a Standard Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Clin. Diagn. Lab. Immunol. 1998 5: 613-616.

Armando Reyna-Bello, Axel Cloeckeaert, Nieves Vizcaino, Mary I. Gonzatti, Pedro M. Aso, Gérard Dubray, and Michel S. Zygmunt Evaluation of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Using Recombinant Major Surface Protein 5 for Serological Diagnosis of Bovine Anaplasmosis in Venezuela Clin. Diagn. Lab. Immunol. 1998 5: 259-262.

François Simondon, Isabelle Itean, Marie Pierre Preziosi, Abdoulaye Yam, and Nicole Guiso Evaluation of an Immunoglobulin G Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Pertussis Toxin and Filamentous Hemagglutinin in Diagnosis of Pertussis in Senegal Clin. Diagn. Lab. Immunol. 1998 5: 130-134.

I Bjerkas, MC Jenkins, and JP Dubey Identification and characterization of Neospora caninum tachyzoite antigens useful for diagnosis of neosporosis lin. Diagn. Lab. Immunol. 1994 1: 214-221.

M Theisen, J Vuust, A Gottschau, S Jepsen, and B Hogh Antigenicity and immunogenicity of recombinant glutamate-rich protein of Plasmodium falciparum expressed in Escherichia coli Clin. Diagn. Lab. Immunol. 1995 2: 30-34.

WO 02/38173

PCT/GB01/04985

45

Laurens A. H. van Pinxteren, Pernille Ravn, Else Marie Agger, John Pollock, and Peter Andersen Diagnosis of Tuberculosis Based on the Two Specific Antigens ESAT-6 and CFP10 Clin. Diagn. Lab. Immunol. 2000 7: 155-160.

E. E. Zijlstra, N. S. Daifalla, P. A. Kager, E. A. G. Khalil, A. M. El-Hassan, S. G. Reed, and H. W. Ghalib rK39 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Diagnosis of *Leishmania donovani* Infection Clin. Diagn. Lab. Immunol. 1998 5: 717-720.

Materials and Methods

1. Construction of cosmid library of *P. yoelii* genomic DNA.

High molecular weight genomic DNA was isolated from an asynchronous culture of *P. yoelii* and partially cleaved with *Sau3A* to yield fragments of 30-50kb. These were dephosphorylated with calf intestinal alkaline phosphatase and ligated into the cosmid vector SuperCos1 (Stratagene) previously digested with *Bam*H1. An aliquot of the ligation mixture was packaged with Gigapack III XL packaging extract (Stratagene) and transduced into XL1-Blue MR (Stratagene). Recombinant cosmids were selected on ampicillin, pooled and amplified once.

2. Primary screening of cosmid clones for invasion of cultured COS-7 cells.

For invasion assays, a logarithmic phase culture of *E. coli* harbouring the cosmids were seeded onto COS-7 cells at a multiplicity of infection of 10, and invasion assays

WO 02/38173

PCT/GB01/04985

46

performed essentially as described. After 5h of incubation the cells were washed extensively and fresh medium containing 250µg/ml gentamicin was added to kill non-invading bacteria. After an overnight incubation, the cells were washed 10X with PBS. Invading bacteria were released by gentle lysis of the COS-7 cells with PBS/0.05% saponin, and scored by ampicillin selection on LB plates.

3. Immunofluorescence and electron microscopy studies.

Invasion assays were performed as above. The cells were then washed extensively, and fixed with 3.7% paraformaldehyde. The cells were permeabilised at room temperature for 30 min with PBS/0.05% saponin, incubated with 5% non-fat dry milk in PBS. After 1h at room temperature, the cells were washed 3X with PBS and incubated with a rabbit polyclonal antibody to the *E. coli* K-12 strain C600 (Dako Ltd). This antibody cross-reacts with other K-12 strains. Following incubation for 2h, the cells were washed with PBS and incubated with rabbit FITC-labelled IgG (Sigma) for 1h, washed extensively with PBS and mounted for fluorescence microscopy on a Zeiss microscope. The results are illustrated in Figure 2A (negative control) and Fig 2B infections with *E.coli* containing invasion cosmid clone.

Cells may also be counter stained with TRITC-phalloidin to determine bacteria and actin polymer colocalisation.

In order to obtain electron micrographs of COS-7 cells invaded by transformed *E. coli*, invasion assays were carried out as above, and the COS-7 cells then washed

WO 02/38173

PCT/GB01/04985

47

extensively with PBS before fixing with 4% glutaraldehyde overnight at 4°C. The fixed cells were sectioned, stained with osmium tetroxide and viewed with a transmission electron microscope. The results are shown in Figure 2C.

4. Transposon mutagenesis of identified invasive clones, and sequence analysis.

Transposon mutagenesis was performed using the Tn1000γ8, essentially as described, with minor modifications as follows.

Two invasive clones Invcos11 and Invcos18 were transformed into competent MH1638 donor cells. Single colonies were grown to log phase in LB/100μg per ml ampicillin/50μg per ml methicillin. Recipient cells, HB101 were grown in LB. 2ml of donor culture were spun and resuspended with 15ml of LB in Falcon tubes. After centrifuging for 10 min at 4500rpm, the cell pellet was resuspended with 1ml of recipient HB101 culture. This mating mixture was spread on LB agar plates (without antibiotics) and incubated for 2h at 37°C.

The cells were washed with 15ml LB broth and centrifuged as above. After a second spin, the pellet was resuspended in 1ml LB broth. 100μl of this was plated on LB plates supplemented with 100μg/ml ampicillin, 50μg/ml methicillin and 100μg/ml streptomycin. After an overnight incubation at 37°C, 50 isolated colonies were picked, grown in LB/ampicillin/methicillin/streptomycin (LB/amp/meth/strep), and used in invasion assays as described above.

WO 02/38173

PCT/GB01/04985

48

Invading colonies were scored by plating saponin-lysed COS-7 cells on LB/amp/meth/strep. Figure 3a shows plates obtained in plate scoring after invasion assays using a wild type and a Tn1000 γ δ -inserted clone.

Figure 3b provides a bar chart displaying the results of plate scoring following invasion assays using Tn1000 γ δ -inserted clones TM1 and TM5. Wild type Invcos11 and Invcos18 were used as positive controls for invasion, while HB101 or XL1 Blue transformed with pMAL-p2 (New England Biolabs) grown on LB agar or LB/amp agar acted as negative controls.

Non-complementing clones identified from this assay were purified and sequenced using the following primers:

γ	CCTGAAAAGGGACCTTTGTATACTG	(SEQ ID No 13)
δ	AGGGGAAGTGGAGCTCTA	(SEQ ID No 14)

The sequence of the inserted region, shown in Figure 4A, was obtained by contig assembly of the sequences from the transposon mutants.

Antigenic responses to Pid

Methods

1. Sub-cloning of pid and expression of Pid-Myc fusion protein. pid was prepared as a PCR amplicon from invcos18 with HindIII and BglI restriction sites at the 5' and 3' ends respectively. The amplicon was sub-cloned into the expression vector pROlar A122

WO 02/38173

PCT/GB01/04985

49

(Clontech) which includes a Myc epitope tag. Colonies were maintained on LB/kanamycin plates at 37°C. A 50µl aliquot of an over night broth culture was used to inoculate a 5ml broth and this was incubated to 0.4 - 0.6 OD₆₀₀, at this point the culture was induced with 5µl 100 mM IPTG and 53µl 15% arabinose. The culture was incubated for 3 hours at 37°C.

2. Pid preparation. Concentration of Pid was enhanced using c-Myc monoclonal antibody-agarose beads (Clontech). Following induction cells were washed in ice-cold PBS, the pellet was then re-suspended in lysis buffer and frozen at -70°C. The sample was then thawed on ice and 20µl c-Myc Mab was added, vortexed briefly and mixed on a rotating platform for 40 min at 4°C. The preparation was then washed 3 times in ice cold PBS, with microcentrifugation at 1200g for 1 min.

3. Patient sera. Serum was collected from 8 patients admitted to the Royal Free Hospital with malaria. *Plasmodium falciparum* infection and degree of parasitaemia confirmed. Country of origin was noted.

4. Western blot analysis. Multiple lanes of Pid preparation were separated by 12% SDS-PAGE prior to electrophoretic transfer to Hybond-C (AmershamPharmacia), transfer was for 2 h at 10V (Novablot, AmershamPharmacia). The resultant blots were probed with each patient serum at a dilution of 1/100 and visualised using the ECL Western Blotting reagents (AmershamPharmacia).

WO 02/38173

PCT/GB01/04985

50

Results

Five out of eight patient sera tested recognised a protein band that co-migrated with the Pid-Myc fusion product. These sera did not recognise a band of this molecular weight when cells transformed with pROlar containing an unrelated non-*Plasmodium* sequence were tested. The country of origin of each patient and levels of parasitaemia are shown in Table 1.

Conclusion

The preparation of *E. coli* cells with induced expression of Pid did show the presence of an antigenic moiety of the predicted molecular weight in 5/8 sera tested. The patients all had marked parasitaemia and were from sub-saharan Africa. This data indicates that patients exposed to *Plasmodium falciparum* do raise an immune response to Pid and therefore this may form the basis of a serological assay for the detection of this infection.

Table 1.

Patient	Parasitaemia %	Country of origin	Positive on Western blot
1	3.8	Ghana	+
2	<1.0	Ghana	++
3	<1.0	Ghana	-
4	1.2	Ghana	-/+
5	4.5	Tanzania	++
6	<1.0	Nigeria	-
7	<1.0	Ghana	+
8	<1.0	Nigeria	++

PCR amplification of *pid* from patient sera.**Method**

1. PCR amplification of *pid*: Using genomic DNA from *Plasmodium falciparum* T9-96 a nested PCR protocol was optimised using the following primers; first round primers, pfpidi, 5' ATG CTG ATG TTG CTA CGG 3', pfpid2, 5' ATC TTC CTG CAT TGC TCA CGC 3' and Second round primers, pfpid3 5' CTT GGA ATG AGG TTG TTT G 3' and pfpid4 5' AAT CCT CGA CGC CTA ACG 3' (Figure 1). The optimised reaction mixture for the first round PCR was,

WO 02/38173

PCT/GB01/04985

52

1x NH₄Cl₂ stock buffer (Bioline, UK), 5 mM MgCl₂, 1 μM pfpid1, 1 μM pfpid2, 100 μM dNTP, 2.5 IU Taq polymerase (Bioline, UK). Cycling conditions were 95 °C for 3 min, 45 cycles of 92 °C 30 sec, 50 °C 30 sec, 72 °C 30 sec followed by a cycle of 72 °C 5 min. For the nested PCR 2 μl of the amplicon preparation from the first round PCR was added to the reaction mix; 1x NH₄Cl₂ stock buffer (Bioline, UK), 5 mM MgCl₂, 1 μM pfpid3, 1 μM pfpid4, 200 μM dNTP, 2.5 IU Taq polymerase (Bioline, UK). Cycling conditions were 95 °C for 3 min, 45 cycles of 92 °C 30 sec, 55 °C 30 sec, 72 °C 30 sec followed by a cycle of 72 °C 5 min.

2. Patient samples. Whole blood was collected from 8 patients admitted to the Royal Free Hospital with malaria. Fresh whole blood was centrifuged at 3,000 g for 5 mins. The serum was removed and the red cells stored at -20 °C. *Plasmodium falciparum* infection and degree of parasitaemia confirmed. Country of origin was noted.

3. PCR amplification of pid from patient samples: DNA was extracted from the red cell pellet, according to the manufacturers instructions using the Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, UK). 5 μl of the resultant genomic DNA was then amplified according to the optimised protocol in section 1. PCR amplicons were visualised on a 2% agarose gel containing ethidium bromide.

4. Sequence analysis of PCR amplimers from patient samples:

PCR amplimers of the predicted molecular weight were purified using the Wizard® PCR Purification Kit (Promega, UK). Amplimers were then submitted for sequencing to Cambridge Biosciences (now Cytomyx, UK).

Results

Figure 6 shows the results of PCR amplification of *pid* from patient samples; 17/20 samples gave positive results, this represents positive results from all patients tested, 3 patients had one negative result. Patient details and PCR results are summarised in Table 2.

Sequencing was performed using amplimers from the PCR reactions giving the strongest results, samples 4, 5 and 10. Analysis of the similarity of these sequences to *pid* was performed using PILEUP (GCG, MRC-HGMP UK), samples 4 and 5 came from the same patient, all 3 samples show a high degree of similarity to *pid* (Figure 7).

Conclusion

This data provides evidence that *pid* can be amplified from patients with confirmed *Plasmodium falciparum* infection and thus may be a suitable target for a diagnostic test. The PCR amplimers investigated for similarity to *pid* showed a high degree of homology, confirming their identity as *pid*.

WO 02/38173

PCT/GB01/04985

54

Table 2.

Patient	Sample Number	Country of origin	Parasitaemia %	<i>pid</i> PCR
A	1	Ghana	3.5	+
	2		3.8	+
	3		<1.0	-
B	4	Ghana	<1.0	+
	5		0	+
	14		0	-
C	6	Ghana	<1.0	+
	7		<1.0	+
	8		0	+
	9		0	+
D	10	Tanzania	1.2	+
	11		4.5	+
	12		<1.0	+
	13		0	-
E	15	Nigeria	<1.0	+
	16		<1.0	+
F	17	?	<1.0	+
	18		<1.0	+
G	19	?	<1.0	+
	20		1.5	+

WO 02/38173

PCT/GB01/04985

55

pid mediated invasion of human red blood cells**Methods**

1. Bacterial cell lines: *E. coli* K12 strain XL1-Blue MR transformed with either invcos18, pROLAR-pid or native pROLAR were used. These constructs are described above.
2. Human red blood cells (rbc): 10 ml freshly drawn blood was transferred to a tube containing lithium heparin. The blood donor had no history of travel to an area endemic for malaria in any form and had no known exposure to malaria. The rbc were separated by centrifugation at 3,000g for 5 min and washed 3 times in DMEM/10% foetal bovine serum (FBS) by microcentrifugation at 5000g.
3. Invasion assay: Transformed *E. coli* were incubated with red blood cells at a ratio of 10:1 (85 x 10⁵ bacteria: 8.5 x 10⁵ rbc) for 3 h at 37°C in 5% CO₂. The cells were then washed 3 times in DMEM/10% FBS by microcentrifugation at 5000g. The washed cells were resuspended in DMEM/FBS, 200 µg/ml gentamicin was added and the preparation was incubated overnight at 37°C in 5% CO₂. Following incubation the cells were washed 3 times in DMEM/10% FBS by microcentrifugation at 5000g and the rbc were lysed by resuspension in sterile distilled water. 50 µl of the lysates was spread on LB agar plates containing kanamycin, lysates were plated in duplicate.

WO 02/38173

PCT/GB01/04985

56

Plates were read after 24 h and the number of colonies counted by 2 independent observers.

Results

Colony counts are shown in Table 3.

Conclusion

The data presented in Table 3 indicate that invasion of human red blood cells by *E. coli* can be mediated by the presence of *pid* alone, however, invasion is enhanced by the presence of the complete cosmid, suggesting the presence of further genes that contribute to the invasive process.

Table 1: *pid* mediated invasion of fresh human red blood cells

Construct	Duplicate colony counts	
	Observer 1	Observer 2
pROLAR	46/48	51/47
pROLAR- <i>pid</i>	88/90	97/99
Invcos18	780/881	847/743

INTERACTION BETWEEN PID AND THE RHO GTPASES

cDNAs encoding human Cdc42, Rac1 and RhoA were amplified by PCR with the following set of primers:

WO 02/38173

PCT/GB01/04985

57

Cdc42: sense (cag gaa ttc cag aca att aag tgt gtt g); antisense (cag gtc gac tta gaa tat aca gca ctt cc). **Rac1:** sense (cag gaa ttc cag gcc atc aag tgt gtg); antisense (cag gtc gac cta caa cag gca ttt tct c). **RhoA:** sense (cag gaa ttc gct gcc atc cgg aag aaa ctg); antisense (cag cgt cga ctc aca aga caa ggc aac c). All three GTPases were digested with *EcoRI* and *SalI* and ligated into the same sites in the activation domain vector pAD-GAL4 (Stratagene). Pid was also amplified (sense: cag gga att cat gct gat gtt gct ac); antisense (cag cgt cga cct aga tct tcc tgc), digested with the above enzymes and ligated into the binding-domain vector pBD-GAL4 (Stratagene). All 4 ligations were used to transform competent DH5 α cells and selected on LB agar/ampicillin plates. Transformants were screened for inserts, and these inserts were restriction-mapped to determine whether they were in the right orientation with respect to the GAL4 fusion domains. The new plasmids were designated AD-Cdc42, AD-Rac1, AD-RhoA and BD-Pid for the respective proteins.

To determine interaction, the AD-GTPase constructs were each cotransformed with BD-Pid into competent yeast cells YRG-2 (Stratagene). These were then plated on synthetic dextrose agar plates (SD/-His-Leu-Trp). This medium lacks the amino acids leucine, (which selects for activation domain-GTPase constructs), tryptophan (which selects for binding domain-Pid) and histidine, which selects for the *HIS* reporter gene. After 3-7 days incubation at 30°C, colonies were isolated and grown in SD liquid medium for 3 days at 30°C in a shaking incubator.

Observation: Interaction between Pid and the RhoA GTPases was scored based on both amino acid prototrophy and the

WO 02/38173

PCT/GB01/04985

58

expression of the *HIS* reporter gene. However, only Cdc42 appeared to be definitely interacting with Pid.

SUBCELLULAR LOCALIZATION OF PID

Using a reporter protein, the green or red fluorescent protein, it is often possible to track the location of a protein using cells under culture conditions. To do this, Pid was PCR-amplified with the primers: cag gga att cat gct gat gtt gct ac (sense) and antisense (cat gct cga gat ctt cct gca ttg ctc ac) and digested with *EcoRI* and *XhoI*. It was then ligated into the *EcoRI/SaII* sites of pDsRed-N1 (Clontech), at the N-terminus and in-frame with the red fluorescent protein. Transformants were derived from DH5 α cells, which were selected on kanamycin LB agar plates. Plasmid DNA was purified and the presence and orientation of Pid insert were determined by restriction mapping. The plasmid was designated pPid-DsRed.

HeLa cells ($\sim 10^4$ cells) were seeded on Permax chamber slides and grown in Dulbeccos Modified Eagles Medium (DMEM) supplemented with 10% foetal bovine serum, antimycotics and antibiotics, at 37°C under 5% CO₂. At about 80% confluence the cells were rinsed and then incubated with fresh medium 1-2hr before transfection. pPid-DsRed (5 μ g) was diluted in OptiMEM medium to a final volume of 100 μ l. 10 μ l liposomes (DOSPER, Roche) was also diluted to the same volume. Both plasmid DNA and liposome dilutions were mixed and incubated at room temperature for 30 min to allow complex formation. The mixture was then transferred with a pipette onto the HeLa cells and incubation continued for 6-12 hrs. Fresh DMEM was then added and the cells incubated for another 30 hrs. After this time, the cells were washed 2X with PBS,

WO 02/38173

PCT/GB01/04985

59

and fixed with 3.7% paraformaldehyde for 30mins at room temperature. They were then mounted in Vectashield Mounting Medium with DAPI for nuclear counter-staining (Vector Laboratories) and viewed under a Nikon Eclipse E800 fluorescent microscope. Images were acquired from 2micron sections with the Bio-Rad Radiance 2100 confocal microscope.

Observation: In HeLa cells transfected with pDsRed-N1, fluorescence was observed throughout the entire cell, both in the cytosol and nuclear lumen. In contrast, in cells transfected with pPid-DsRed, fluorescence appeared to be confined within granules (possibly secretory) or peripheral vesicles that were in juxtaposition to the plasma membrane.

ACTIN DEPOLYMERIZATION IMPEDES CELL INVASION BY PID-TRANSFORMED BACTERIA

In earlier experiments it was observed by double staining with FITC-labelled antibodies and TRITC-phalloidin, that bacterial cells transformed with the invasion cosmid induced actin nucleation/polymerisation at foci of cell entry. This suggested the recruitment of cytoskeletal components in the invasion process. Taking this a step further, it was considered whether actin depolymerisation had any effect on the invasion process. To address this, 10^4 HeLa cells were seeded onto Thermanox cover slips and cultured in DMEM as above. Before invasion assays, the HeLa cells were washed 2X with PBS and then incubated with fresh medium lacking antibiotics. For inhibition, cytochalasin B was added to the cells at a concentration of 0.5-1 $\mu\text{g/ml}$, 2-5mins before invasion assays were initiated. Bacterial cells containing pA15-Pid (Pid subcloned into pROLar.A122),

WO 02/38173

PCT/GB01/04985

60

pGEX-Pid (Pid subcloned into pGEX-5X1), Incos18 (wild-type invasion cosmid), In18TM1 (mutant cosmid) or untransformed HB101 were then added to the HeLa cell culture at an m.o.i of 10. To control for invasion efficiency, cytochalasin B was omitted in parallel assays with the transformed bacteria. After 3-5 hr, the cells were washed 5X with PBS and then incubated with DMEM supplemented with 200 µg/ml gentamicin and left overnight in the incubator. The cells were then washed with PBS (5X), fixed with 3.7% paraformaldehyde and permeabilized with PBS/0.05% saponin for 30min at room temperature. They were incubated for 1hr at room temperature with PBS/5% non-fat dry milk and then with anti-*E. coli* antibody diluted in PBS/5% non-fat dry milk. They were rinsed 2X with PBS and incubated again for 1hr with anti-rabbit IgG-FITC conjugate alone or with TRITC-phalloidin. The cells were then washed extensively with PBS, and mounted for fluorescence microscopy.

Observation: HeLa cells treated with cytochalasin B were refractory to invasion by pA15-Pid or pGEX-Pid-transformed bacteria. Incos18-transformed cells showed a localization of the bacterial cells at the periphery of the cytochalasin B-treated HeLa cells if they were present. This showed the uncoupling of bacterial cell attachment to the HeLa cells from the invasion step. HeLa cells untreated with cytochalasin B were efficiently invaded by Incos18, pGEX-Pid and pA15-Pid but not by In18TM1 or HB101.

Corresponding Pid Sequence in Cryptosporidium

Cryptosporidium parvum oocysts were obtained from Moredun Scientific Ltd, Scotland. Approximately 100,000 oocysts

WO 02/38173

PCT/GB01/04985

61

were centrifuged and resuspended in 200ul of 50mM Tris-HCl pH 8.0, 5mM EDTA, 50mM NaCl, 0.5% Sarkosyl, 100ug/ml proteinase K. The cells were incubated for 2hrs at 60°C in a PCR machine. The lysate was then extracted 2X with phenol-chloroform-isoamyl alcohol. Genomic DNA was precipitated with 0.1 volume of 3M sodium acetate pH 5.2 and 2.5 volumes of ice-cold 95% ethanol. After 30mins at -20°C, the DNA was pelleted by centrifugation at 13,000rpm for 30mins, washed with 70% ethanol and air-dried. The DNA pellet was resuspended in 100ul 10mM Tris/1mM EDTA pH 8.0. For PCR, the following primers were used: sense, CGA GAA TTC ATG CTA ATG TTG CTA CGG; antisense, CGA AGC TTC TAG ATC TTC CTG CAT TGC. The cycling parameters were as follows: Initial denaturation at 94°C for 3mins, then 30 cycles at: 94°C for 30secs, 55°C for 30secs and 1min at 68°C. A final extension at 68°C was done for 10mins. The PCR product was ligated into the T-vector pCR2.1 (Invitrogen), plasmid DNA was purified from recombinants and sequenced.

Observation: Sequencing revealed sequence ID NO:28, which is virtually identical to the *Pid* nucleotide sequence from *Plasmodium yoeli*.

References

Aronov, A.M., Suresh, S., Buckner, F.S., van Voorhis, W.C., Verlinde, C.L.M.J., Opperdoes, F.R., Hol, W.G. and M.H. Gelb. (1999) Structure-based design of submicromolar biologically active inhibitors of trypanosomatid glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96** 4273-4278

Breton, C.B., Blisnick, T., Jouin, H., Barale, J.C., Rabilloud, T., Langsley, G. & Da Silva, L.H.P. (1992) *Plasmodium chabaudi* p68 serine protease activity required for merozoite entry into mouse erythrocytes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**,9647-9651

Burbelo, P.D., Drechel, D. & Hall, A. (1995) A conserved binding motif defines numerous candidate target proteins for Cdc42 and Rac GTPases, *J. Biol. Chem.* **270**, 29071-29074

Burbelo, P.D., Snow, D.M., Bahou, W. & Spiegel, S. (1999) MSE55, a Cdc42 effector protein, induces long cellular extensions in fibroblasts, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 9083-9088.

Butler, D. & Maurice, J. (1997) Time to put malaria control on the agenda, *Nature* **386**,535-541.

Chatfield, S.N., Strugnell, R.A., and G. Dougan. (1989) Live salmonellae as vaccines and carriers of foreign antigenic determinants. *Vaccine*, **7**, 495-498.

WO 02/38173

PCT/GB01/04985

63

Chen, C-Y. & Kado, C.I. (1994) Inhibition of oncogenicity of *Agrobacterium tumefaciens* by the *osa* gene of pSa, *J. Bacteriol.* **176**,5697-5703.

Chen, L-M., Hobbie, S. & Galán, J.E. (1996) Requirement of CDC42 for *Salmonella*-induced cytoskeletal and nuclear responses, *Science* **274**, 2115-2118.

Chien, C-H., Bartel, P.L., Sternglanz, R. and S. Fields. (1991) The two-hybrid system method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 9578-9582

Combinatorial chemistry, (1996) *Methods in Enzymology* vol 267 ed. John N Abelson; Academic Press Inc. New York.

Gaillard, J.-L., Berche, P., Frehel, C., Guin, E. & Cossart, P. (1991) Entry of *L. monocytogenes* into cells is mediated by internalin, a repeat protein reminiscent of surface antigens from Gram-positive cocci, *Cell* **65**, 1127-1141.

Hadley, T.J. (1986) Invasion of erythrocytes by malaria parasites: a cellular and molecular overview, *Annu. Rev. Microbiol.* **40**,451-477.

Hall, A. (1998) Rho GTPases and the actin cytoskeleton, *Science* **279**, 509-514.

Hardt, W-D., Chen, L-M., Schuebel, K.E., Bustelo, X.R. & Galán, J.E. (1998) *S. typhimurium* encodes an activator of

WO 02/38173

PCT/GB01/04985

64

Rho GTPases that induces membrane ruffling and nuclear responses in host cells, *Cell* **93**, 815-826.

Horuk, R., Chitnis, C.E., Darbonne, W.C., Colby, T.J., Rybicki, A., Hadley, T.J. & Miller, L.H. (1993) A receptor for the malarial parasite *Plasmodium vivax*: the erythrocyte chemokine receptor, *Science* **264**, 1182-1184.

Isberg, R.R. & Falkow, S. (1985) A single genetic locus encoded by *Yersinia pseudotuberculosis* permits invasion of cultured animal cells by *Escherichia coli* K-12, *Nature* **317**, 262-264.

Jones, T.R., Obaldia, N.III, Gramsinski, R.A., Charoenvit, Y., Kolodny, N., Kitov, S., Davis, H.L., Krieg, A.M. and S.L. Hoffman. (1999) Synthetic oligonucleotides containing CpG motifs enhance immunogenicity of a peptide malaria vaccine in Aotus monkeys. *Vaccine*, **17**, 3065-3071;

Lu, P.-J., Zhou, X. Z., Shen, M., & Lu, K.P. (1999) Function of WW domains as phosphoserine- or phosphothreonine-binding modules, *Science* **283**, 1325-1328

Massol, P., Montcourrier, P., Guillemot, J-C. & Chavrier, P. (1998) Fc receptor-mediated phagocytosis requires CDC42 and Rac1, *EMBO J.* **17**, 6219-6229.

Mills, C. D., Burgess, D.C., Taylor, H.J. and K.C.Kain. (1999) Evaluation of a rapid and inexpensive dipstick assay for the diagnosis of *Plasmodium falciparum* malaria. *Bull. WHO.* **77**, 553-559

WO 02/38173

PCT/GB01/04985

65

Morris, G.E., thi Man, N., & Sedgwick, S.G. (1995) Epitope mapping of recombinant antigens by transposon mutagenesis, *Mol. Biotech.* 4, 45-54.

Parida, S.K., Domann, E., Rohde, M., Müller, S., Darji, A., Hain, T., Wehland, J. & Chakraborty, T. (1998) Internalin B is essential for adhesion and mediates the invasion of *Listeria monocytogenes* into human endothelial cells, *Mol. Microbiol.* 28, 81-93.

Ron, E., Turek, T. Mathiowitz, E., Chasin, M., Michael, H. and R. Langer (1993). Controlled release of polypeptides from polyanhydrides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 4176-4180.

Sim, B.K.L., Chitnis, C.E., Wasniowska, K., Hadley, T.J., & Miller, L.H. (1994) Receptor and ligand domains for invasion of erythrocytes by *Plasmodium falciparum*, *Science* 264, 1941-1944.

Sudol, M., Chen, H.I., Bougeret, C., Einbond, A. & Bork, P. (1995) Characterization of a novel protein-binding module-the WW domain, *FEBS Lett* 369, 67-71.

Susuki, T., Miki, H., Takenawa, T. & Sasakawa, C. (1998) Neural Wiskott-Aldrich syndrome protein is implicated in the actin-based motility of *Shigella flexneri*, *EMBO J.* 17, 2767-2776.

Valentine, C.R.I. & Kado, C.I. (1989) In *Promiscuous plasmids of gram-negative bacteria* (ed Thomas, C.) 125-163 (Academic Press, London,).

WO 02/38173

PCT/GB01/04985

66

Legends of Figures

Fig. 4 legends

- A. Nucleic acid and translated amino acid sequence of *pid* and adjacent sequences. Upstream is ORF3, part of the *osa* operon in *pSa*; downstream of *pid* is the 5'UTR of the antirestriction gene *ArdC*. Transposon insertion sites are indicated by arrow heads (V). Termination signals are indicated with asterisks. Sequences upstream of transposon insertion sites were obtained with the γ primer while downstream sequences were obtained with the δ primer of the Tn1000 transposon. Intervening sequences were obtained by primer-walking across the transposon insertion sites, and verified by sequencing several other clones including the wild-type cosmid construct *Invcos18*.
- B. Schematic representation of *pid* as well as upstream and downstream sequences. The direction of transcription is indicated by an arrow. The putative Cdc42/Rho GTPase-interacting sequence (the CRIB domain) SEQ ID NO:6 is in bold print and is compared with that of *Ste20/S cerevisiae* (Acc # L04655); human WASP (Acc # NM000377); Cdc42 effector protein MSE55 (Acc # XM_001058.1); p65^{PAK}- α /rat (Acc # NM017198); C09B8.7/*C.elegans* (Acc # U29612) and SHK1/*S.pombe* (Acc # AL034433).

WO 02/38173

PCT/GB01/04985

67

SEQUENCE LISTING

<110> University College London
 <120> Vaccine Component
 <130> 206309/JND/RD
 <140>
 <141>
 <150> GB0027433.2
 <151> 2000-11-09
 <160> 32
 <170> PatentIn Ver. 2.1
 <210> 1
 <211> 189
 <212> PRT
 <213> Plasmodium yoelii
 <400> 1
 Met Leu Met Leu Leu Arg Arg Arg Cys Arg Ala Trp Leu Glu Ile Arg
 1 5 10 15
 Arg Leu Asp Lys Glu Leu Ala Gln Ser Ser Gly Leu Pro Leu Glu Leu
 20 25 30
 Pro Gln Ile Val Pro Asn Ala Trp Asn Glu Val Val Trp Arg Leu Pro
 35 40 45
 Val Pro Asn His Pro Asp Ala Phe Met Thr Ala Ser Asn Ala Ala Gln
 50 55 60
 Ser Asp Phe Ile Val Tyr Val Asn Gly Leu Ala Phe Tyr Arg Ala Trp
 65 70 75 80
 Leu Ala Leu Gly Val Glu Asp Ser Gln Ala Cys Pro Leu Lys Gln Asp
 85 90 95
 Met Pro Lys Asp Arg Lys Tyr Pro Ser Ser Ala Ala His Phe Ala Val
 100 105 110
 Gly Ile Asp Ser Pro Val Pro Leu Ala Asp Val Ser Pro Thr Met Ile
 115 120 125
 Leu Gly His Phe Ala Val Cys Phe Thr Asp Gly Met Thr Arg Ser Met
 130 135 140
 Trp Leu Leu Ala His Glu Val Ala Val Phe Pro Val Leu Ser Arg Asp
 145 150 155 160
 Glu Ala Ser Ala Val Met Leu Ala Glu His Val Gly Val Ala Ala Pro
 165 170 175

WO 02/38173

PCT/GB01/04985

68

Ile Gln Val Ser Lys Leu Arg Glu Gln Cys Arg Lys Ile
180 185

<210> 2
<211> 566
<212> DNA
<213> Plasmodium yoeli

<400> 2
atgctgaggt tgctacggcg ggggtgtcgc gcttggctgg aaattogggc gcttgataaa 60
gagcttgcgc agtcgagcgg gttgcccctc gaattgcctc aaatcgtgcc gaatgcttgg 120
aatgaggttg ttggggggtt gcccggtgcc aaccatcctg acgcttttat gacagcttca 180
aatgccgcac agtccgattt cattgtgtat tggaatggct tggctttcta tcgagcgtgg 240
ttggcgtagt gcgtcgagga ttctcaagcc tggccgttga agcagagcat gcctaagac 300
cggaaatata cgtcgagcgc cgcgcaatth gccgtgggca tcgacagccc cgttccgctt 360
gctgacgtaa gcccgaccat gattctgggc catttegggg tgtgtttcac tgatggcatg 420
acccttcaaa tgtggctttt gcccacatgag gtcgccgtgt tcccggtgct tcccgatg 480
gaagatccg ccgttatggt gccagaacac gtggcggtag cagcccgcat tcaggttca 540
aagctgcgtg agcaatgcag gaagat 566

<210> 3
<211> 606
<212> DNA
<213> Plasmodium yoeli

<400> 3
atgaccgaca cgcgcccga gcaggagaaa gacgaacgcc ggaagctgca agagcagtcg 60
cgccagaatg aagcggaaac catgcgcctg ctggctttcg aggcagggcc ccaattggcc 120
gaaattccga aagaagccaa agccaatgaa cccctgttgg agaactaca gagcggacta 180
caagagaccc gcaaagagct agaaacoacg ccagacgcca ctaagagcac caacggcaac 240
cggcttgagc gcgacgtaga aaggcccatc atcgagggcg aacaggtgcy ctaggcagta 300
ggcagggaga aagcccgcgc agatgaattt caccgccacg cagaaccggg cgaacttac 360
cggggccgtg tgatcggtcg caccaatagc tatgtcattc aggcagcaga tagccgccca 420
ggcacgatca ttctgcatga acgcccgcct gtttcggggc cggagaaagt gaagatgaac 480
gaccatcgcg aatcagtta tccgacggt cgcgccggaa tcgtccgcaa cccacagccc 540
gcgcaacatc aacyacagcy gcaqatggaa aaaaccggcg caggccgaga gcatggggcc 600
taacca 606

<210> 4
<211> 200
<212> FRT
<213> Plasmodium yoeli

<400> 4
Met Thr Asp Thr Arg Arg Glu Gln Glu Lys Asp Glu Arg Arg Lys Leu
1 5 10 15
Gln Glu Gln Ser Arg Gln Asn Glu Ala Glu Thr Met Arg Leu Leu Ala
20 25 30
Phe Glu Ala Gly Arg Gln Leu Ala Glu Ile Pro Lys Glu Ala Lys Gly
35 40 45

WO 02/38173

PCT/GB01/04985

69

Asn Glu Pro Leu Leu Glu Asn Tyr Lys Ser Gly Leu Gln Glu Thr Arg
50 55 60

Lys Glu Leu Glu Glu Thr Pro Asp Ala Thr Lys Ser Thr Asn Ala Asn
65 70 75 80

Arg Leu Glu Arg Asp Val Glu Arg Ala Ile Ile Glu Ala Gln Gln Val
85 90 95

Arg Glu Ala Val Gly Arg Glu Lys Ala Arg Ala Asp Glu Phe His Arg
100 105 110

His Ala Glu Pro Gly Glu Thr Tyr Arg Gly Arg Val Ile Gly Arg Thr
115 120 125

Asn Ser Tyr Val Ile Gln Ala Asp Asp Ser Arg Pro Gly Thr Ile Ile
130 135 140

Leu His Glu Arg Ala Ala Val Ser Gly Ala Glu Lys Val Lys Met Asn
145 150 155

Asp His Ala Glu Ile Ser Tyr Pro His Gly Arg Ala Gly Ile Val Arg
165 170 175

Asn Pro Gln Ala Ala Gln His Gln Arg Gln Arg Gln Met Glu Lys Thr
180 185 190

Gly Ala Gly Arg Glu His Gly Arg
195 200

<210> 5
<211> 563
<212> DNA
<213> Plasmodium yoeli

<400> 5
ctaggcgtg tcacctgctt ttgctccggg cctgctccta ttccgttga cctggccgcc 60
gctgcctct ggctaggtca aactccaccg aacccccttc ggggtttcgg ccattcggg 120
taacgatacc tcacgcctcc gggccgctgt agcgtccctg cgcgcccta tcggggcttg 180
ccatcccttc gcaccctgcc ccggctcctc atccctattc ggcgcctcac gccctcaag 240
ctgcctcagc gctcggcttg tccgggcaag ggtacgcttc gccgcctacc tcaccgcttc 300
gggtctcggc ttgggtcggc ctccggctgc ggctccggt ggcccccctg ccgcgcctc 360
ccctgcgggc agatcgggct taccgcgacg aacgacgaat gacgagcaga ccccgaggca 420
cccgttttca tgcctcgggg ccattgaagat gcgccccta tcggcggcag atcaaaccca 480
tgaagggcgc taaagcggcc tattcgtcgg ccttcggcgg ccgcccgcct ccttcaactg 540
gaaatcaag caggcccgga aaa 563

<210> 6
<211> 20
<212> PRT
<213> Plasmodium yoeli

<400> 6
Pro Val Leu Ser Arg Asp Glu Ala Ser Ala Val Met Leu Ala Glu His
1 5 10 15

WO 02/38173

PCT/GB01/04985

70

Val Gly Val Ala
20

<210> 7
<211> 18
<212> PRT
<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 7
Leu Arg Ile Ser Thr Pro Tyr Asn Ala Lys His Ile His His Val Gly
1 5 10 15

Val Asp

<210> 8
<211> 19
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 8
Asp Met Ile Ser His Pro Leu Gly Asp Phe Arg His Thr Met His Val
1 5 10 15

Gly Arg Gly

<210> 9
<211> 18
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 9
Ala Asp Ile Gly Ala Pro Ser Gly Phe Lys His Val Ser His Val Gly
1 5 10 15

Trp Asp

<210> 10
<211> 18
<212> PRT
<213> *Schizosaccharomyces pombe*

<400> 10
Thr Val Ile Ser Ser Pro Phe Asp Pro Lys His Val Thr His Val Gly
1 5 10 15

Phe Asn

WO 02/38173

PCT/GB01/04985

71

<210> 11
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Rattus rattus

<400> 11
 Pro Glu Ile Ser Leu Pro Ser Asp Phe Glu His Thr Ile His Val Gly
 1 5 10 15

Phe Asp

<210> 12
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Caenorhabditis elegans

<400> 12
 Pro Val Ile Ser Arg Pro Ser Asn Phe Glu His Thr Ile His Val Gly
 1 5 10 15

Tyr Asp

<210> 13
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Transposon Tn1000

<400> 13
 cctgaaaagg gacctttgta tactg 25

<210> 14
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Transposon Tn1000

<400> 14
 aggggaacty agagcteta 19

<210> 15
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Plasmodium yoeli

<400> 15
 atgotgatgt tgctacgg 18

WO 02/38173

PCT/GB01/04985

72

<210> 16
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Plasmodium yoeli
 <400> 16
 atcttcctgc attgotcag c 21

<210> 17
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Plasmodium yoeli
 <400> 17
 cttggaatga ggtgtttg 19

<210> 18
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Plasmodium yoeli
 <400> 18
 aatcctcgac gcctaag 18

<210> 19
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 19
 caggaattcc agacaattaa gtgtgttg 28

<210> 20
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 20
 caggtcgact tagaatatac agcacttcc 29

<210> 21
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 21
 caggaattcc aggcoatcah gtgtgtg 27

<210> 22
 <211> 28
 <212> DNA

WO 02/38173

PCT/GB01/04985

73

<213> Homo sapiens
 <400> 22
 caggtcgacc tacaacaggc attttctc 28

 <210> 23
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 23
 caggaattcg ctgccatccg gaagaaactg 30

 <210> 24
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 24
 cagcgtcgac tcacaagaca aggcaccc 28

 <210> 25
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Plasmodium yoelii
 <400> 25
 caggaatic atgctgatgt tgctac 26

 <210> 26
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Plasmodium yoelii
 <400> 26
 cagcgtcgac ctatattctc ctgc 24

 <210> 27
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Plasmodium yoelii
 <400> 27
 eatgctcgag atcttctctc attgctcac 29

 <210> 28
 <211> 588
 <212> DNA
 <213> Cryptosporidium parvum
 <400> 28
 cgagaattca tgataatggt gctacggcgg cgtgtcgcg ottggctgga aattcggcgg 60

WO 02/38173

PCT/GB01/04985

74

```

cttgataaag agcttgcgca gtogagcggg ttgcccctcg aattgocca aatcgtgccc 120
aatgcttggg atgaggttgg ttgocgctg ccogtgcoga accatcctga cgcctttatg 180
acagottcaa atgcccacaa gtocgatttc attgtgtatg tgaatggott ggctttctat 240
cgagcgttgg ttgocgttagg cgtcagggat tctcaagcct gcccgttgaa cgaggacatg 300
cctaaagacc ggaatatcc gtogagcggc gcgcattttg ccgtgggcat cgacagcccc 360
gttccgcttg ctgacgtaag ccgacccatg attctggggc atttccgggt gtgtttcaat 420
gatggcatga cccgttaaat gtggctttg gcccatgagg tgcocgtgtt tccggtgctt 480
tcccgtgatg aagcatccgc cgttatgttg gcagaacacg tgggtgttag cagcgcgatg 540
tcaggtttca aagctgcgtg agcaatgcag gaagatctag aagcttcc 588

```

```

<210> 29
<211> 102
<212> DNA
<213> Plasmodium falciparum

```

```

<400> 29
gangctttat ttttcttca aatgogena gtocgatttc attgtgtatg tgaatggctt 60
ggctttctat cgagcgttgg ttgocgttagg cgtcagggat ta 102

```

```

<210> 30
<211> 98
<212> DNA
<213> Plasmodium falciparum

```

```

<400> 30
gcttatgaca gcttcaaatg cgcacagtcg gatttcattg tgtatgtgaa tggcttggct 60
ttctatcgag cgtggttggc gtttagcgtc gaggatta 98

```

```

<210> 31
<211> 150
<212> DNA
<213> Plasmodium yoelii

```

```

<400> 31
gaaccatcct gacgccttta tgacagcttc aaatgcgca cagtcogatt tcattgtgta 60
tgtgaatggc ttgctttct atcgagcgtg gttggcgta ggcgtcgagg attctcaagc 120
ctgcccgttg aagcaggaca tgcctaaga 150

```

```

<210> 32
<211> 95
<212> DNA
<213> Plasmodium falciparum

```

```

<400> 32
atgcctttat gactgcttca atgcgcagc cgatttcatt gtgtatgtga atggcttggc 60
ttctatcgag cgtggttggc gtttagcgtc gagga 95

```

WO 02/38173

PCT/GB01/04985

75

Claims

1. An antigenic component, for use in a vaccine capable of promoting production in a subject of an antibody specific to the antigenic component, which antibody is capable of specifically binding to the Pid protein having the amino acid sequence in Seq ID No.1.
2. An antigenic component according to claim 1 which comprises the Pid protein having the amino acid sequence in Seq ID No 1 or a variant thereof which does not substantially affect its antigenicity.
3. An antigenic component according to claim 1 which comprises a peptide fragment of the Pid protein having the amino acid sequence in Seq ID No 1 or a variant thereof which does not substantially affect its antigenicity.
4. An antigenic component according to claim 2 or claim 3 which is preparable from an apicomplexan parasite.
5. An antigenic component according to claim 4 wherein the apicomplexan parasite is of a genus selected from the following :*Eimeria*; *Isospora*; *Toxoplasma*; *Hammondia*; *Cystoisospora*; *Sarcocystis*; *Besnoitia*; *Frenkelia*; *Cryptosporidium*; *Plasmodium*; *Babesia*; and *Theileria*.
6. An antigenic component according to claim 5 wherein the apicomplexan parasite is of the genus *Plasmodium*.

WO 02/38173

PCT/GB01/04985

76

7. An immunogen comprising an antigenic component according to any of the preceding claims coupled to an immunogenic component.

8. A vaccine comprising an immunogen according to claim 7 and an adjuvant.

9. A vaccine comprising a polynucleic acid, which encodes an antigenic component according to any one of claims 1 to 6.

10. A vaccine according to claim 9 wherein the polynucleic acid further comprises a eukaryotic promoter for controlling expression of the sequence encoding the antigenic component.

11. A vaccine according to any one of claims 8 to 10 which is suitable for use in a human subject.

12. A vaccine according to claim 11 which is suitable for use against human malaria caused by a parasite selected from: *P. falciparum*; *P. ovale*; *P. vivax*; and *P. malariae*.

13. A therapeutic agent comprising a component which component is capable of competing with a protein having the amino acid sequence in Seq ID No 1 in a specific binding assay.

14. A diagnostic agent comprising an antibody, which antibody is capable of specifically binding to the Pid protein having the amino acid sequence in Seq ID No 1.

WO 02/38173

PCT/GB01/04985

77

15. A diagnostic agent comprising an antigenic component according to any one of claims 1 to 6.

16. A protein comprising the amino acid sequence in SeqID No 1, or a peptide fragment thereof for use in medicine.

17. A polynucleic acid encoding a Pid protein having the amino acid sequence in SeqID No 1, or a fragment thereof for use in medicine.

18. An antibody, which is capable of specifically binding to the Pid protein having the amino acid sequence in Seq ID No 1, for use in medicine.

19. Use of an antigenic component according to any one of claims 1 to 6, for the manufacture of a medicament effective against a disease caused by an apicomplexan parasite.

20. Use of a protein comprising the amino acid sequence in SeqID No 1, or a peptide fragment thereof, for the manufacture of a medicament effective against a disease caused by an apicomplexan parasite.

21. Use of a polynucleic acid encoding a Pid protein having the amino acid sequence in Seq ID No 1, or a fragment thereof, for the manufacture of a medicament effective against a disease caused by an apicomplexan parasite.

22. Use of an antibody, capable of specifically binding to the Pid protein having the amino acid sequence in Seq ID No

WO 02/38173

PCT/GB01/04985

78

1 for the manufacture of a diagnostic agent for diagnosis of a disease caused by an apicomplexan parasite.

23. Use of an antigenic component according to any one of claims 1 to 6 for the manufacture of a diagnostic agent for diagnosis of a disease caused by an apicomplexan parasite.

24. Use of a diagnostic agent according to claim 14 or 15 in a method of diagnosing a disease caused by an apicomplexan parasite.

25. Use of a protein comprising the amino acid sequence in SeqID No 1, or a peptide fragment thereof, for the manufacture of a diagnostic agent for diagnosis of a disease caused by an apicomplexan parasite.

26. Use of a polynucleic acid encoding a Pid protein having the amino acid sequence in SeqID No 1, or a fragment thereof, for the manufacture of a diagnostic agent for diagnosis of a disease caused by an apicomplexan parasite.

27. Use of an inhibitor of Pid protein-Cdc42 interaction for the manufacture of a medicament effective against a disease caused by an apicomplexan parasite.

28. Use according to any one of claims 19 to 27 wherein the apicomplexan parasite is of a genus selected from the following :*Eimeria*; *Isospora*; *Toxoplasma*; *Hammondia*; *Cystoisospora*; *Sarcocystis*; *Besnoitia*; *Frenkelia*; *Cryptosporidium*; *Plasmodium*; *Babesia*; and *Theileria*.

WO 02/38173

PCT/GB01/04985

79

29. Use according to any one of claims 19 to 28 wherein the disease is selected from: malaria; coccidiosis; theileriosis; cryptosporidiosis; isosporiasis; blastocystosis; babesiosis; anaplasmosis; sarcosporidiosis; toxoplasmosis; and sarcocystosis.

30. Use according to any one of claims 19 to 29 wherein the apicomplexan parasite is of the genus *Plasmodium*.

31. Use according to claim 30 wherein the apicomplexan parasite is one selected from the following: *Plasmodium falciparum*; *Plasmodium vivax*; *Plasmodium ovale*; and *Plasmodium malariae*.

32. Use according to any one of claims 19 to 31 wherein the disease is malaria.

33. Use according to claim 32 wherein the disease is human malaria.

34. An *in vitro* method for diagnosing apicomplexan infection in a subject, which comprises:

- (i) obtaining from the subject a nucleic acid containing sample; and
- (ii) testing the sample for the presence of nucleic acid sequence characteristic of *Pid*.

35. A method according to claim 34, wherein the apicomplexan is of the genus *Plasmodium*.

36. A method according to claim 34 or claim 35, wherein sample comprises red blood cells.

WO 02/38173

PCT/GB01/04985

80

37. A method according to any one of claims 34 to 36, wherein the nucleic acid sample is amplified prior to testing.

1/10

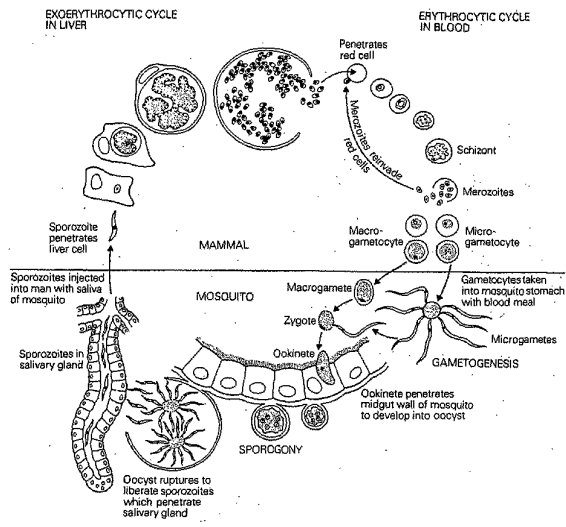


FIGURE 1

WO 02/38173

PCT/GB01/04985

2/10

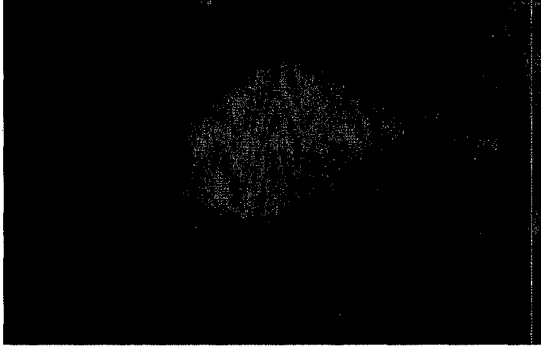


FIGURE 2a

3/10

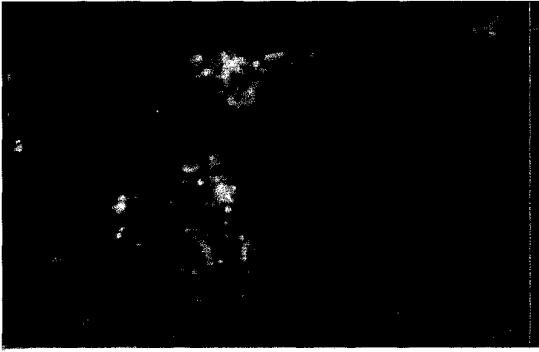


Figure 2b

4/10



Figure 2c

WO 02/38173

PCT/GB01/04985

5/10

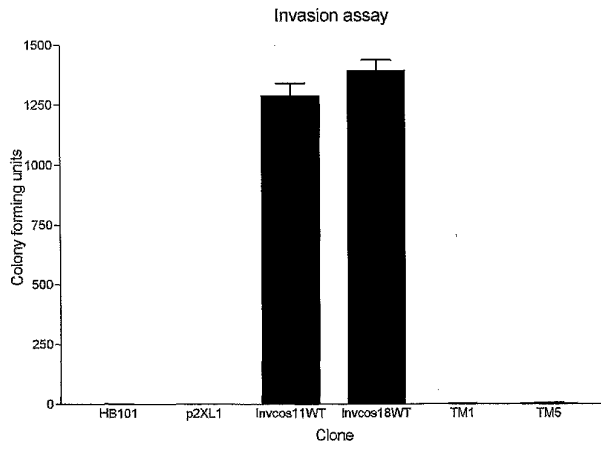
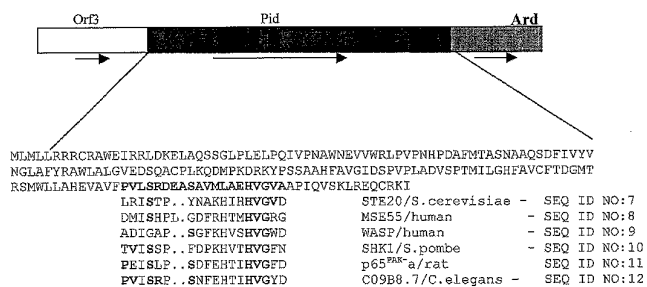


Figure 3

7/10

Figure 4b



8/10

Figure 5

```

AATTGCTGATGTTGCTACGGCGGGGGTGTGCGGCTTGGCTGGAATTCGGCGG
CTTGATAAAGAGCTTGGCGAGTCGAGCGGGTGGCCCTCGAATTCCTCAAA
TCGTGCCGAATG [REDACTED] GGGCTGCCCGTCCGAACCAT
CCTGACGCCCTTATGACAGCTTCAAATGCCGCACAGTCCGATTTCATTGTGTA
TGTGAATGGCTTGGCTTCTATCGAGCGTGGTTGG [REDACTED]
CTCAAGCCTGCCCGTTGAAGCAGGACATGCCFAAAGACCGGAAATATCCGTC
GAGCGCCGCCCATTTGCCGTGGGCATCGACAGCCCGTTCCGCTTGCTGAC
GTAAGCCCGACCATGATTCTGGGCCATTTCCGGTGTGTTTCACTGATGGCAT
GACCCGTTCAATGTGGCTTTGGCCCATGAGGTGCGCGTGTTCGGGTGCTTT
CCCGTGATGAAGCATCCGCCGTTATGTTGGCAGAACACGTGGCCGTAGCAGC
GCCGATTCAGGTTCAAAGCTGGTGAGCAATGCAGGAAGAT

```

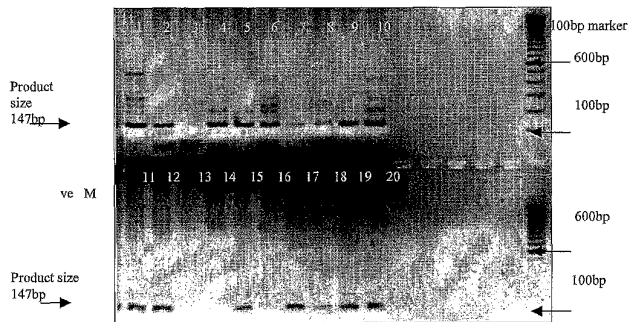
```

First round primers: 5' ATG CTG ATG TTG CTA CGG 3'
                    5' ATC TTC CTG CAT TGC TCA CGC 3'

[REDACTED]: 5' CTT GGA ATG AGG TTG TTT G 3'
            5' AAT CCT CGA CGC CTA ACG 3'

```

Figure 6



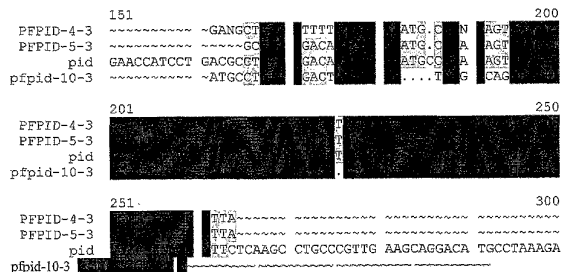
WO 02/38173

PCT/GB01/04985

10/10

Figure 7

Pile-up. Internal Nested PCR products. 4 & 5 = same patient, 10 = different patient, all RFH patients.



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

1 International Application No
PCT/GB 01/04985

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SAUL K. W. ET AL.: "Plasmodium berghei: Immunization of rats with antigens from a population of free parasites rich in merozoites" TROPENMEDIZIN UND PARASITOLOGIE, vol. 28, 1977, pages 302-318, XP001057917 the whole document	1-13, 19-24, 27-33
A		14-18, 25,26, 34-37
X	LILLEHOJ H S: "REVIEW ON VACCINE DEVELOPMENT AGAINST ENTERIC PARASITES EIMERIA ANDCRYPTOSPORIDIUM" JAPANESE POULTRY SCIENCE, XX, XX, vol. 37, no. 3, May 2000 (2000-05), pages 117-141, XP001005674 ISSN: 1340-3516 page 131 -page 132	1-13, 19-24, 27-33
A		14-18, 25,26, 34-37
A	DATABASE SWALL 'Online! EMBL; http://srs6.ebi.ac.uk/ , 1 April 1993 (1993-04-01) "Entry name OSA_SHIFL" XP002191964 cited in the application 100 % identity with seq ID:1 abstract & CLOSE S.M. ET AL.: "A gene near the plasmid pSa origin of replication encodes a nuclease" MOLECULAR MICROBIOLOGY, vol. 6, 1992, pages 521-527, the whole document	1-37

Form PCT/ISA210 (continuation of second sheet) (July 1992)

International Application No. PCT/GB 01 04985

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.2

Present claims 1-15, 19, 23, 24, 27, 28 and 29 relate to an antigenic component (or to an immunogen, a vaccine, a therapeutic agent, a diagnostic agent and uses thereof) for use in a vaccine defined by reference to a desirable characteristic or property, namely that "the said antigenic component is capable of promoting the production in a subject of an antibody specifically binding to the PID protein having the amino acid sequence in seq ID:1", see claim 1 of the present application.

The claim covers all products having this characteristic or property, whereas the application provides support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT for only a very limited number of such products. Indeed, the present application discloses PID proteins and/or the encoding polynucleic acid obtained from *P. yoelii*, *P. falciparum* and from *Cryptosporidium* exclusively.

It is further noted that the present application does not disclose PID proteins or polynucleotides isolated from *Isospora*, *Toxoplasma*, *Hammondia*, *Cystoisospora*, *Sarcocystis*, *Besnoitia*, *Frenkelia*, *Eimeria*, *Theileria* and *Babesia*.

In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible.

Independent of the above reasoning, the claims also lack clarity (Article 6 PCT). An attempt is made to define the product by reference to a result to be achieved. Again, this lack of clarity in the present case is such as to render a meaningful search over the whole of the claimed scope impossible.

Consequently, the search has been carried out for those parts of the said claims which appear to be clear, supported and disclosed, namely those parts relating to the PID proteins and/or nucleotides clearly and unambiguously disclosed in the present application, i.e. PID proteins and/or nucleotides from *Plasmodium* spp. or *Cryptosporidium* disclosed in the experimental part of the present application.

It should be noted that the search concerning claims 34-37 of the present application has also been restricted to the PID nucleotides disclosed in the present application (i.e. *Cryptosporidium* and *Plasmodium* spp.), since the exact sequence of the PID polynucleotide is the only way of clearly identifying it in view of the fact that the designation PID is an internal designation having no well recognized meaning in the field.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a

International Application No. PCT/GB 01 04985

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/SA/ 210

preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 49/00	A 6 1 P 33/06	4 H 0 4 5
A 6 1 P 33/06	C 0 7 K 14/445	
C 0 7 K 14/445	C 0 7 K 16/20	
C 0 7 K 16/20	C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 N 15/09	G 0 1 N 33/50	P
C 1 2 Q 1/68	G 0 1 N 33/531	A
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/569	A
G 0 1 N 33/531	A 6 1 K 37/02	
G 0 1 N 33/569	C 1 2 N 15/00	Z N A A

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, R O, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(72) 発明者 ステファン ヘンリー ギレスピ
イギリス国 ロンドン エヌダブリュー 3 2 ピーエフ ローランド ヒル ストリート ロイヤル フリー アンド ユニバーシティ カレッジ メディカル スクール メディカル マイクロ バイオロジー デパートメント

(72) 発明者 ヘンリー キーン バイエル
イギリス国 ロンドン エヌダブリュー 3 2 ピーエフ ロイヤル フリー キャンパス ユニバ ーシティ カレッジ ロンドン バイオケミストリー アンド モレキュラー バイオロジー デ パートメント

(72) 発明者 ティモシー ダニエル マックヒュー
イギリス国 ロンドン エヌダブリュー 3 2 ピーエフ ローランド ヒル ストリート ユニバ ーシティ カレッジ ロンドン ロイヤル フリー キャンパス ロイヤル フリー アンド ユ ニバーシティ カレッジ メディカル スクール メディカル マイクロバイオロジー デパート メント

F ターム(参考) 2G045 AA25 AA35 BB10 BB41 CA25 CA26 DA13 DA36 FA11 FA18
FB05 GC12
4B024 AA01 AA11 BA31 CA03 CA07 CA09 CA12 CA20 DA02 DA03
DA06 EA04 EA06 GA11 GA18 GA19 GA25 HA04 HA11 HA13
HA14 HA17
4B063 QA01 QA18 QA19 QQ02 QQ08 QQ43 QQ53 QQ79 QR08 QR32
QR35 QR40 QR42 QR48 QR56 QR62 QS16 QS25 QS33 QS34
QS36 QX01 QX02
4C084 AA02 AA13 BA01 BA02 BA08 BA22 BA23 CA11 CA53 NA14
ZC01
4C085 AA03 AA13 BA06 BB11 EE01 HH15 KA01 KA03
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA22 DA75 DA86 EA22
EA29 EA31 EA52 FA71 FA74 GA26

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2004520277A5	公开(公告)日	2005-07-21
申请号	JP2002540755	申请日	2001-11-09
[标]申请(专利权)人(译)	伦敦大学学院		
申请(专利权)人(译)	伦敦大学学院		
[标]发明人	ステファンヘンリーギレスピ ヘンリーキーンバイエル ティモシーダニエルマックヒュー		
发明人	ステファン ヘンリー ギレスピ ヘンリー キーン バイエル ティモシー ダニエル マックヒュー		
IPC分类号	G01N33/50 A61K38/00 A61K39/00 A61K39/015 A61K39/395 A61K48/00 A61K49/00 A61P33/06 C07K14/445 C07K16/20 C12N15/09 C12Q1/68 G01N33/531 G01N33/569		
CPC分类号	C07K14/445 A61K39/00 A61K2039/505 A61K2039/53 C07K16/205 Y02A50/403 Y02A50/412 Y02A50/489		
FI分类号	A61K39/00.Z A61K39/015 A61K39/395.D A61K48/00 A61K49/00.Z A61P33/06 C07K14/445 C07K16/20 C12Q1/68.A G01N33/50.P G01N33/531.A G01N33/569.A A61K37/02 C12N15/00.ZNA.A		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/AA35 2G045/BB10 2G045/BB41 2G045/CA25 2G045/CA26 2G045/DA13 2G045/DA36 2G045/FA11 2G045/FA18 2G045/FB05 2G045/GC12 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA31 4B024/CA03 4B024/CA07 4B024/CA09 4B024/CA12 4B024/CA20 4B024/DA02 4B024/DA03 4B024/DA06 4B024/EA04 4B024/EA06 4B024/GA11 4B024/GA18 4B024/GA19 4B024/GA25 4B024/HA04 4B024/HA11 4B024/HA13 4B024/HA14 4B024/HA17 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ08 4B063/QQ43 4B063/QQ53 4B063/QQ79 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR40 4B063/QR42 4B063/QR48 4B063/QR56 4B063/QR62 4B063/QS16 4B063/QS25 4B063/QS33 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QX01 4B063/QX02 4C084/AA02 4C084/AA13 4C084/BA01 4C084/BA02 4C084/BA08 4C084/BA22 4C084/BA23 4C084/CA11 4C084/CA53 4C084/NA14 4C084/ZC01 4C085/AA03 4C085/AA13 4C085/BA06 4C085/BB11 4C085/EE01 4C085/HH15 4C085/KA01 4C085/KA03 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA22 4H045/DA75 4H045/DA86 4H045/EA22 4H045/EA29 4H045/EA31 4H045/EA52 4H045/FA71 4H045/FA74 4H045/GA26		
优先权	2000027433 2000-11-09 GB		
其他公开文献	JP2004520277A		

摘要(译)

用于疫苗的抗原成分，能够在受试者中增强对抗原成分具有特异性的抗体的产物，包括：该抗体是能够与具有SEQ ID NO：1的氨基酸序列的Pid蛋白特异性结合的抗原成分。

