

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表2003 - 500037

(P2003 - 500037A)

(43)公表日 平成15年1月7日(2003.1.7)

(51) Int. Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マコード* (参考)
C 1 2 N 15/09	ZNA	A 6 1 K 35/74	A 2 G 0 4 5
A 6 1 K 35/74		39/00	B 4 B 0 2 4
39/00			D 4 B 0 6 3
			H 4 B 0 6 5
		39/02	4 C 0 8 5
審査請求 未請求 予備審査請求 (全155数) 最終頁に続く			

(21)出願番号	特願2000 - 619460(P2000 - 619460)	(71)出願人	オレゴン ヘルス アンド サイエンス ユニバーシティー アメリカ合衆国 オレゴン州 ポートラン ド エル335 エス.ダブリュー. サム ジ ャクソン パーク ロード 3181 オフィ ス オブ テクノロジー マネジメント
(86)(22)出願日	平成12年5月26日(2000.5.26)	(72)発明者	ヘフロン フレッド エル. アメリカ合衆国 オレゴン州 ウェスト リン ヒルサイド ドライブ 17887
(85)翻訳文提出日	平成13年11月26日(2001.11.26)	(72)発明者	パーカー デイビッド シー. アメリカ合衆国 オレゴン州 ポートラン ド エス.イー. 20ス アベニュー 1953
(86)国際出願番号	PCT/US00/14687	(74)代理人	弁理士 清水 初志 (外 1 名) 最終頁に続く
(87)国際公開番号	W000/071158		
(87)国際公開日	平成12年11月30日(2000.11.30)		
(31)優先権主張番号	60/136,210		
(32)優先日	平成11年5月26日(1999.5.26)		
(33)優先権主張国	米国(US)		

(54)【発明の名称】 エピトープタンパク質のタグをもつ転移因子

(57)【要約】

3'端および5'端を有する一つの転移因子を提供する。
この転移因子は、選択マーカーをコードする核酸配列の5'側にある5'側組換え部位、選択マーカーをコードする核酸配列の3'側にある3'側組換え部位、コードする核酸配列、および5'側組換え部位の5'側または3'側組換え部位の3'側にあるMHCエピトープ、および転移因子の5'端および3'端にある転移因子の組込みに十分な逆方向反復配列からなる挿入端を含む。一つの態様における転移因子は5'端および3'端を有するものとして提供される。この転移因子は、選択マーカーをコードする核酸の5'側にある5'側loxP配列、選択マーカーをコードする核酸の3'側にある3'側loxP配列、5'側loxP配列の5'側または3'側loxP配列の3'側にあるMHCエピトープ、転移因子の5'端にある挿入末端、および転移因子の3'端にある挿入末端を含む。病原体細胞に本発明の転移因子を感染させることによる病原体の抗原エピトープ検出法であって、この感染により細菌細胞の核酸配列に転移因子が組込みが起こる段階、病原体細胞をトランスポザーゼを含むベクターで形質転換する段階、病原体細胞を内面化可能な真核細胞に、転移因子を感染させた病原体細胞を接触させる段階、真核細胞に、MHCエピトープ

【特許請求の範囲】

【請求項1】 3'末端および5'末端を有する転移因子であって、以下を含む転移因子：

選択マーカをコードする核酸配列の5'側にある5'側組換え部位；

選択マーカをコードする核酸配列の3'側にある3'側組換え部位；

5'側組換え部位の5'側、または3'側組換え部位の3'側にMHCエピトープをコードする核酸配列；

転移因子の5'端および3'端における転移因子の組込みに十分な逆方向反復配列を含む挿入末端。

【請求項2】 請求項1記載の転移因子であって、5'側組換え部位または3'側組換え部位がloxP組換え部位、flit組換え部位、TN3組換え部位、マリナー組換え部位、ガンマ/デルタ組換え部位からなる群より選択される転移因子。

【請求項3】 5'側組換え部位または3'側組換え部位がloxP組換え部位である、請求項1記載の転移因子。

【請求項3】 MHCエピトープがクラスI MHCエピトープである、請求項1記載の転移因子。

【請求項4】 MHCエピトープがクラスII MHCエピトープである、請求項1記載の転移因子。

【請求項5】 MHCエピトープが

SIINFEKL (配列番号 6)、**LLFGYPVYV** (配列番号 7)、及び
ASFEAQGALANIAVDKA (配列番号 8)。

からなる群より選択される、請求項1記載の転移因子。

【請求項6】 選択マーカが抗生物質耐性をコードする核酸である、請求項1記載の転移因子。

【請求項7】 抗生物質耐性がアンピシリン、カナマイシン、ゼオマイシン、ハイグロマイシン、テトラサイクリン、ピューロマイシン、またはブレオマイシンに耐性である、請求項6記載の転移因子。

【請求項8】 選択マーカが分光光度学的な性質を元に検出される、請求項1記載の転移因子。

【請求項9】 選択マーカが β -ガラクトシダーゼまたは緑色蛍光タンパク質からなる群より選択される、請求項1記載の転移因子。

【請求項10】 トランスポザーゼをコードする核酸配列をさらに含む、請求項1記載の転移因子。

【請求項11】 アフィニティタグをコードする核酸配列をさらに含む、請求項1記載の転移因子。

【請求項12】 アフィニティタグをコードする核酸配列が、5'側組換え部位の5'側にある、請求項11記載の転移因子。

【請求項13】 アフィニティタグをコードする核酸配列が、3'側組換え部位の3'側にある、請求項11記載の転移因子。

【請求項14】 5'端および3'端を有する転移因子であって、以下を含む転移因子：

選択マーカをコードする核酸の5'側にある5'側loxP配列；

選択マーカをコードする核酸の3'側にある3'側loxP配列；

5'側loxP配列の5'側、または3'側loxP配列の3'側にあるMHCエピトープ；

転移因子の5'端にある挿入末端；および

転移因子の3'端にある挿入末端。

【請求項15】 loxP配列が配列番号：11に示す配列を含む、請求項14記載の転移因子。

【請求項16】 MHCエピトープが

SIINFEKL (配列番号 6)、**LLFGYPVYV** (配列番号 7)、及び

ASFDAQGALANIAVDKA (配列番号 8)。

からなる群より選択される、請求項14記載の転移因子。

【請求項17】 転移因子の5'端の挿入末端が配列番号：4および配列番号：5からなる群より選択される、請求項14記載の転移因子。

【請求項18】 転移因子の3'端の挿入末端が配列番号：3および配列番号：4からなる群より選択される、請求項14記載の転移因子。

【請求項19】 トランスポザーゼをコードする核酸をさらに含む、請求項14記載の転移因子。

【請求項20】 トランスポザーゼがCreトランスポザーゼである、請求項19記載の転移因子。

【請求項21】 アフィニティータグをさらに含む、請求項14記載の転移因子。

【請求項22】 アフィニティータグが、ヒスチジン、Sタグ、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ、およびストレプトアビジンからなる群より選択される、請求項21記載の転移因子。

【請求項23】 アフィニティータグが6×ヒスチジンである、請求項22記載の転移因子。

【請求項24】 選択マーカーをコードする核酸が抗生物質耐性カセットである、請求項14記載の転移因子。

【請求項25】 抗生物質耐性カセットが、カナマイシン、アンピシリン、ゼオマイシン、ハイグロマイシン、テトラサイクリン、ピューロマイシン、または、ブレオマイシン耐性をコードする核酸配列である、請求項12記載の転移因子。

【請求項26】 5'端および3'端を有する転移因子であって、以下を含む転移因子：

抗生物質耐性カセット；

抗生物質耐性カセットの5'側にある5'側loxP配列、および抗生物質耐性カセットの3'側にある3'側loxP配列；

5'側loxP配列の5'側または3'側loxP配列の3'側にあるMHCエピトープ；

アフィニティータグ；

転移因子の5'端にある挿入末端；および

転移因子の3'側にある挿入末端。

【請求項27】 トランスポザーゼをさらに含む、請求項26記載の転移因子。

【請求項28】 5'端および3'端を有する転移因子であって、以下を含む転移因子：

カナマイシン抗生物質耐性カセット；

抗生物質耐性カセットに対して5'側および3'側に位置し、配列番号：11に示す配列を含むloxP配列；

トランスポザーゼをコードする核酸配列；

MHCエピトープをコードする核酸配列；

6×ヒスチジンアフィニティータグをコードする核酸配列；

転移因子の5'端にある挿入末端；および

転移因子の3'端にある挿入末端。

【請求項29】 MHCエピトープがMHCクラスIエピトープである、請求項28記載の転移因子。

【請求項30】 MHCクラスIエピトープが、SIINFEKLおよびLLFGYPVYVからなる群より選択される、請求項29記載の転移因子。

【請求項31】 MHCエピトープがMHCクラスIIエピトープである、請求項29記載の転移因子。

【請求項32】 MHCクラスIIエピトープが、ASFEAQGALANIAVDKAからなる群より選択される、請求項31記載の転移因子。

【請求項30】 転移因子の5'端にある挿入末端が、配列番号：5に示す配列を含む、請求項21記載の転移因子。

【請求項31】 転移因子の3'端にある挿入末端が、配列番号：3に示す配列を含む、請求項21記載の転移因子。

【請求項32】 トランスポザーゼをコードする核酸がCreトランスポザーゼをコードする、請求項21記載の転移因子。

【請求項33】 病原体の抗原エピトープを検出する方法であって、以下の段階を含む方法：

(i) 病原体細胞に請求項1記載の転移因子を感染させる段階であって、感染により細菌細胞の核酸配列における転移因子の組込みが起こる段階；

(ii) 病原体細胞を、トランスポザーゼを含むベクターで形質転換する段階；

(iii) 病原体細胞を内面化可能な真核細胞を、転移因子を感染させた病原体細胞に接触させる段階；

(iv) 真核細胞を、MHCエピトープを認識する標識抗体に接触させる段階；

- (v) 標識真核細胞を同定する段階；
- (vi) 標識真核細胞を溶解して、細菌細胞に外面化する段階；
- (vii) 外面化細菌細胞を増殖させて、細菌細胞集団を産生させる段階；および
- (viii) 核酸配列が病原体の抗原領域をコードし、組込まれた状態の転移因子を有する細菌細胞の核酸配列を同定する段階。

【請求項34】 真核細胞が免疫系の細胞である、請求項33の方法。

【請求項35】 免疫系の細胞がマクロファージである、請求項34の方法。

【請求項36】 標識真核細胞の同定が、蛍光標示式細胞分取法による、請求項33の方法。

【請求項37】 MHCエピトープがMHCクラスIエピトープである、請求項33の方法。

【請求項38】 MHCエピトープがMHCクラスIIエピトープである、請求項33の方法。

【請求項39】 病原体が細菌である、請求項33の方法。

【請求項40】 病原体がサルモネラ菌 (*Salmonella*)、結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*)、プラスモジウム (*Plasmodium*)、またはリステリア菌 (*Listeria monocytogenes*) である、請求項33の方法。

【請求項41】 病原体の抗原エピトープを検出する方法であって、以下の段階を含む方法：

- (i) トランスポザーゼを発現する病原性細胞に請求項1記載の転移因子を感染させる段階であって、感染により細菌細胞の核酸配列における転移因子の組み込みが起こる段階；
- (ii) 病原体細胞を内面化可能な真核細胞を、転移因子を感染させた病原体細胞に接触させる段階；
- (iii) 真核細胞を、MHCエピトープを認識する標識抗体に接触させる段階；
- (iv) 標識真核細胞を同定する段階；
- (v) 真核細胞を溶解して、細菌細胞に外面化する段階；
- (vi) 外面化細菌細胞を増殖させて、細菌細胞集団を産生させる段階；および
- (vii) 核酸配列が病原体の抗原因子をコードし、組込まれた状態の転移因子を

有する細菌細胞の核酸配列を同定する段階。

【請求項42】 病原体の抗原エピトープを検出する方法であって、以下の段階を含む方法：

- (i) 病原体細胞に請求項10記載の転移因子を感染させる段階であって、感染により細菌細胞の核酸配列における転移因子の組込みが起こる段階；
- (ii) 病原体細胞を内面化可能な真核細胞を、転移因子を感染させた病原体細胞に接触させる段階；
- (iii) 真核細胞を、MHCエピトープを認識する標識抗体に接触させる段階；
- (iv) 標識真核細胞を同定する段階；
- (v) 標識真核細胞を溶解して、細菌細胞を外面化する段階；
- (vi) 外面化細菌細胞を増殖させて、細菌細胞集団を産生させる段階；および
- (vii) 核酸配列が病原体の抗原因子をコードし、組込まれた状態の転移因子を有する細菌細胞の核酸配列を同定する段階。

【請求項43】 キャリアワクチンを作製する方法であって、以下の段階を含む方法；

- (i) 細菌細胞に請求項10記載の転移因子を感染させる段階であって、該転移因子が、転移因子のMHCエピトープに使用可能に連結させる疾患に関連した抗原をさらに含み、細菌の感染により細菌細胞の核酸配列における転移因子の組込みが起こる段階；
- (ii) 病原体細胞を内面化可能な真核細胞を、転移因子を感染させた病原体細胞に接触させる段階；
- (iii) 真核細胞を、MHCエピトープを認識する標識抗体に接触させる段階；
- (iv) 標識真核細胞を同定する段階；
- (v) 標識真核細胞を溶解して、細菌細胞を外面化させる段階；
- (vi) 外面化細菌細胞を増殖させて、細菌細胞集団を産生させる段階；
- (vii) 核酸配列が病原体の抗原因子をコードし、組込まれた状態の転移因子を有する細菌細胞の核酸配列を同定する段階；および
- (viii) 段階(iv)で同定された細菌細胞を増殖させる段階であって、細菌細胞がキャリアワクチンである段階。

【請求項44】 疾患が癌である、請求項43記載の方法。

【請求項45】 癌が乳癌である、請求項44記載の方法。

【請求項45】 疾患がウイルス性疾患または細菌性疾患である、請求項43記載の方法。

【請求項46】 細菌細胞を弱毒化する段階をさらに含む、請求項45記載の方法。

【請求項47】 MHCエピトープがMHCクラスIエピトープである、請求項45記載の方法。

【請求項48】 MHCエピトープがMHCクラスIIエピトープである、請求項45記載の方法。

【請求項49】 細菌細胞が弱毒化された細菌細胞である、請求項45記載の方法。

【発明の詳細な説明】**【0001】****発明の分野**

本発明はトランスポゾン、特に抗原性エピトープを同定するためにトランスポゾンをゲノム中に挿入するトランスポゾンの用途に関する。本発明はまたワクチン抗原の同定に関する。

【0002】**発明の背景**

免疫系は、感染細胞表面に複合体を提示することで外来感染性病原体の存在に対して変化する。このような複合体は、病原体に由来する抗原および主要組織適合複合体(MHC)のタンパク質群からなる。2つの異なる経路(MHC IおよびMHC II)は、それぞれ細胞性免疫応答および液性免疫応答を駆動する。一般にMHC Iで提示される抗原は細胞質タンパク質に由来する。しかしながら抗原提示細胞(APC)においてMHC Iが提示した抗原は、リソソーム区画を介する別の経路に由来する(Morrisonら、J. Exp. Med. 163: 903~21、1986; Pfeifer ら、Nature 361: 359~62、1993)。MHC II抗原は一般に飲作用機構または食作用機構に由来する(Morrisonら、J. Exp. Med. 163: 903~21、1986)。

【0003】

ヒトおよび動物で疾患を媒介可能な多くの病原性細菌のうち、細胞内の病原体については、細菌/宿主細胞の相互作用を理解しようとする際に特有の問題がある。細胞内の病原体は二群に分けられる。一つはファゴリソソーム区画に存在する群(サルモネラ属(*Salmonella*)、結核菌(*Mycobacterium tuberculosis*)など)であり、もうひとつは細胞質に存在する群(リステリア菌(*Listeria monocytogenes*)、赤痢菌属(*Shigella*)など)である。細胞内の病原体は、宿主細胞の正常な構造および代謝の機構を変えることで細菌の生存および宿主の免疫監視機構回避を促すように設計されたタンパク質を選択的に分泌して宿主細胞の環境に適合する。ファゴリソソームおよび細胞質に存在する細胞内病原体はいずれも、特に宿主細胞内の細胞質内においてそれらの作用を仲介することが分かっているタンパク質群を分泌する(CornelisおよびWolf-Watz、Mol. Microbial. 23: 861

～7、1997；CollazoおよびGalan、Mol. Microbial. 24：747～56、1997；FuおよびGalan、Mol. Microbial. 27：359～68、1998）。細菌タンパク質が細胞質に局在することからも宿主細胞のプロテオソームのもつ分解機構へ近づくことが可能になると考えられることから、これらのタンパク質はクラスI接触可能タンパク質（Class I Accessible Proteins：CAPs）と命名されている。

【0004】

サルモネラ菌ワクチンを接種すると、細菌そのものに対する強固な細胞性および体液性の応答が生じる（Szteinら、J. Immunol. 155：3987～93、1995）。ただし異種抗原に特異的な免疫応答は変動が大きく、抗原そのものの性質、抗原が発現する細胞および組織の種類、発現のレベル、ならびに抗原の提示および経路（クラスI MHC経路またはクラスII MHC経路）による作用などを含む複数の因子の影響を受ける。SIVカプシド抗原またはマラリアのスポロゾイド周囲抗原を対象として得られた結果では、抗原をサルモネラ菌で発現させた場合に抗原特異的な細胞傷害性Tリンパ球（CTL）の応答が誘導されることが判明している（Flynnら、Mol. Microbiol. 4：2111～8、1990；Sadoffら、Science、240：336～8、1988；Valentineら、Vaccine. 14：138～46、1996）。同様の発現システムでCTL応答を誘発するような他の抗原は認められていない（Titeら、Immunology 70（4）：540～6、1990）。真核生物のプロモーターにより発現する外来抗原の遺伝子を含むプラスミドでは、外来抗原に対して強い細胞性応答が引き起こされた（Darjiら、Cell 91（6）：765～75、1997；SchodelおよびCurtiss、Dev. Biol. Stand. 84：245～53、1995）。

【0005】

癌ワクチンの分野における著しい進歩の一つが、腫瘍特異的なエピトープの同定である。一般に癌ワクチンでは、腫瘍特異的なエピトープを免疫系の様々な区画に指向することで対腫瘍免疫応答の誘発が試みられる。DNA、タンパク質、ペプチド、細胞全体、炭水化物、および組換えベクターからなるワクチンを始めとするいくつかの戦略が、腫瘍ワクチンの作製に用いられている。組換えベクターの使用には、ワクシニア、BCG、カナリア痘、およびサルモネラ菌などの生キャリアベクターの使用が含まれ、腫瘍および感染の副産物としての感染性病原体に

対する適切な免疫応答を刺激するように設計されている。有効なワクチンは、執拗な癌に対して強固かつ長時間持続し、かつ複数のハプロタイプ防護を誘発する必要がある。理想的なワクチンであれば、多種多様の抗原を送り込むことで上記の要求事項を満たし、不可避の免疫応答を誘発するであろう。

【0006】

発明の要約

一つの転移因子は3'端と5'端を有するものとして提供される。この転移因子は、選択マーカーをコードする核酸配列の5'側にある5'側組換え部位、選択マーカーをコードする核酸配列の3'側にある3'側組換え部位、5'側組換え部位の5'側または3'側組換え部位の3'側にあるMHCエピトープをコードする核酸、および転移因子の5'端および3'端にある、転移因子の組込みに十分な逆方向反復配列からなる挿入末端を含む。

【0007】

一つの態様における転移因子は、5'端と3'端を有するものとして提供される。この転移因子は、選択マーカーをコードする核酸の5'側にある5'側loxP配列、選択マーカーをコードする核酸の3'側にある3'側loxP配列、5'側loxP配列の5'側または3'側loxP配列の3'側にあるMHCエピトープ、転移因子の5'端にある挿入末端、および転移因子の3'側に挿入末端を含む。

【0008】

別の態様における転移因子は、5'端と3'端を有するものとして提供される。この転移因子は、抗生物質耐性カセット、抗生物質耐性カセットの5'側にある5'側loxP配列および抗生物質耐性カセットの3'側にある3'側loxP配列、5'側loxP配列の5'側または3'側loxP配列の3'側にあるMHCエピトープ、アフィニティータグ、転移因子の5'端にある挿入末端、および転移因子の3'端にある挿入末端を含む。

【0009】

さらに別の態様における転移因子は、5'端と3'端を有するものとして提供される。この転移因子は、カナマイシン抗生物質耐性カセット、抗生物質耐性カセットの5'側および3'側に位置して配列番号：11に示す配列からなるloxP配列、トランスポザーゼをコードする核酸配列、MHCエピトープをコードする核酸配列、6×

ヒスチジンアフィニティータグをコードする核酸配列、転移因子の5'端にある挿入末端、および転移因子の3'端にある挿入末端を含む。

【0010】

転移因子は、細菌の染色体全体に読み枠のあった挿入が可能のように作製されている。このシステムにより、遺伝子および最終的に得られるタンパク質に「タグ」が付けられ、細菌が感染した細胞の膜を越えて分泌されるタンパク質の同定に使用される。

【0011】

この方法の特定の態様は、本発明の転移因子を病原体細胞に感染させる段階（この感染により細菌細胞の核酸配列に転移因子が組込まれる）、トランスポザーゼを含むベクターで病原体細胞を形質転換する段階、転移因子を感染させた病原体細胞を、病原体細胞を内面化可能な真核細胞に接触させる段階、この真核細胞をMHCエピトープを認識する標識抗体に接触させる段階、標識真核細胞を同定する段階、標識真核細胞が溶解して細菌細胞に外面化される段階、この表面提示細菌細胞を増殖させて細菌細胞集団を産生させる段階、および組込まれた転移因子を有する細菌細胞の核酸配列（この核酸配列は病原体の抗原因子をコードする）を同定する段階を含む。

【0012】

別の態様ではキャリアワクチンを作製する方法が提供される。この方法は、転移因子のMHCエピトープに使用可能に連結される疾患に関連した抗原をさらに含む本発明の転移因子を細菌細胞に感染させる段階を含む。この細菌感染により、細菌細胞の核酸配列中に転移因子の組込みが起こる。この方法はまた、病原体細胞を内部に取り込むことができる真核細胞に転移因子を有する病原体細胞を接触させる段階、この真核細胞をMHCエピトープを認識する標識抗体に接触させる段階、標識真核細胞を同定する段階、標識真核細胞が溶解して細菌細胞に外面化される段階、この表面提示細菌細胞を増殖させて細菌細胞集団を産生させる段階、組込まれた転移因子を有する細菌細胞の核酸配列（この核酸配列は病原体の抗原因子をコードする）を同定する段階、および同定された細菌細胞を増殖させる段階からなる。同定された細菌細胞はキャリアワクチンとなる。

【0013】

配列表

添付した配列表に記載した核酸およびアミノ酸の配列を、ヌクレオチド塩基については標準的な略号で、かつアミノ酸については3文字表記法を用いて示す。個々の核酸配列は1本鎖のみを示すが、表示した鎖に対する任意の参照によって含まれるような相補鎖は理解される。

【0014】

配列番号：1は、転移因子が挿入された遺伝子の配列決定に使用可能なプライマーの核酸配列である。

【0015】

配列番号：2は、転移因子が挿入された遺伝子の配列決定に使用可能なプライマーの核酸配列である。

【0016】

配列番号：3は、0末端の配列である。

【0017】

配列番号：4は、モザイク末端の配列である。

【0018】

配列番号：5は、I末端の配列である。

【0019】

配列番号：6は、SIINFEKLエピトープである。

【0020】

配列番号：7は、LLFGYPVYVエピトープである。

【0021】

配列番号：8は、ASFEAQGALANIAVDKAエピトープである。

【0022】

配列番号：9は、5'側PCR部位の配列であり、図12では54～77位に示されている。

【0023】

配列番号：10は、6×ヒスチジンの配列であり、図12では82～100位に示されて

いる。

【0024】

配列番号：11は、loxPの配列であり、図12では109～143位に示されている。

【0025】

配列番号：12は、3'側PCR部位の配列であり、図12では145～167位に示されている。

【0026】

配列番号：13は、5'側PCR部位の配列であり、図13では25～45位に示されている。

【0027】

配列番号：14は、5'側アスパリジニル (asparaginyl) エンドペプチダーゼ切断部位の配列であり、図13では34～45位に示されている。

【0028】

配列番号：15は、3'側アスパリジニルエンドペプチダーゼ切断部位の配列であり、図13では97～108位に示されている。

【0029】

いくつかの態様の詳細な説明

転移因子は、細菌の染色体全体に読み枠のあった挿入断片を導入可能なように遺伝子操作された。このシステムにより、遺伝子および最終的に得られるタンパク質に「タグ」が付けられ、細菌が感染した細胞の膜を超えて分泌されるタンパク質の同定が可能となる。一つの態様における転移因子は、抗生物質耐性カセット、2か所の極めて小さなloxP組換え部位、MHCクラスIエピトープまたはクラスIIエピトープ、および隣接する挿入末端を含む。creリコンビナーゼタンパク質などのトランスポザーゼは、プラスミドからみてトランスに発現するか、または転移因子に含まれる。creリコンビナーゼは抗生物質耐性カセットを含む介在配列をループにして切り出す。転移因子がある遺伝子内へ挿入すると、分離する挿入断片がその遺伝子の読み枠にMHCクラスIまたはクラスIIエピトープを持ち込む。制限酵素切断部位を用いて他のマーカータンパク質を導入することができる。

【0030】

クラスIエピトープの散在性挿入 (Disseminated Insertions of Class-I Epitopes (DICE-I) (クラスIIの場合はDICE-II)) と命名されている上記技術の一つの態様では、細菌の病原性にかかわるタンパク質の迅速かつ正確な同定が可能である。この技術の用途には、ヒトおよび動物に対して病原性を有するさまざまな細菌に対する治療用ワクチンおよび薬剤の標的の同定などが含まれる。またこのシステムでは、ゲノム解析を介して同定済みの遺伝子群に対する機能の割り付けを容易にする。この方法はまた、患者の免疫応答を評価する方法の一つとしてのハプロタイプに依存しない細胞傷害性Tリンパ球 (CTL) 応答を所定の抗原に対して引き起こすこと、特異的な感染症を診断する方法としてのCTL応答の測定、強いCTL応答を必要とするヒトおよび動物用のワクチンの開発、感染に対するCTL応答誘導に使用可能な新しい細菌キャリアタンパク質の同定、および真核免疫エフェクターにより送達されることで免疫応答の増強に直接応用することができる。

【0031】

宿主細胞との相互作用に応じてMHCクラスI経路またはクラスII経路で分泌されるCAPsの同定は、より良好な細菌キャリアワクチンを設計する際に、かつさまざまな病原体および腫瘍に由来する全く新しいクラスの有用な可能性のあるワクチン標的タンパク質を同定する際に極めて有用である。この理由は、宿主の抗原プロセッシング機構および提示機構に対してCAPsが特有の接近を行うからである。さらに、ゲノム全体の解析で明らかになったオープンリーディングフレームの実質的な部分は機能未知なので、宿主細胞との相互作用に応じて分泌されるCAPsの同定が可能なシステムであれば、病原体/宿主細胞の相互作用の多くの段階を理解する上で極めて有用なツールとなる。さらに、CAPsは、サルモネラ菌などの細菌ワクチン株による外来エピトープの送達において有用な仲介的役割を果たす。

【0032】

DICE-IとDICE-IIには、CAPsを同定する際に固有の強みがいくつかある。いくつかの態様においてはDICEの選択は条件的であり、宿主のクラスIの到達可能タンパク質は、H-2K^bと関連するプロセッシングおよび提示の結果として単離され、また、宿主のクラスII到達可能タンパク質は、I-A^bと関連するプロセッシングおよ

び提示の結果として単離される。さらに、分泌シグナルを変化させない同じフレームの挿入断片のみが回収される。選択は単純かつ強力に行うことが可能であり、フローサイトメトリーにより感染細胞の大規模集団から興味深い株を速やかに回収することができる。選択は特異的なので、ファゴリソソーム内における細菌の自然減に起因する非分泌性細胞内タンパク質に由来するMHCエピトープを提示したマクロファージから細菌を回収することはできない。これは、このような細菌が増殖できないからである。さらに転移因子には6×ヒスチジンタグなどのアフィニティータグを付けることが可能なので、タンパク質の細胞内における位置を顕微鏡で描出することができることから、相同性が認められないタンパク質に関して引き出せる機能および表現型に関して推定を行うことが可能となる。またこのようなタンパク質は、対象株を弱毒化して適切なモデル動物を免疫することで、エピトープキャリアとして容易に評価することができる。

【0033】

略語および定義

本発明をより適切に定義するために、また、本発明の実施に際しての当業者向けのガイドとするために以下に挙げる定義および方法を提供する。本明細書および添付した請求項で用いる単数形の「一つの(a, an)」または「その(the)」には、文中で明瞭に指示しない限り複数の対象が含まれる。したがって例えば「一つのトランスポゾン(a transposon)」と記述する場合は、複数のトランスポゾンを含み、また「その抗原(the antigen)」と記述する場合は、一つまたは複数の抗原、および当業者に既知であるその同等物などが含まれる。

【0034】

特に明記しない限り、本明細書で使用するすべての技術用語および科学用語は、本発明が属する技術分野における当業者が通常理解するものと同じ意味をもつ。

【0035】

MOI：感染効率。

【0036】

RT：室温。

【0037】

アフィニティータグ：転移因子に含めることができる配列で、これにより転移因子が挿入したタンパク質の精製が容易になる。アフィニティータグという用語は、タグの核酸配列、およびこの核酸配列にコードされたタグのタンパク質配列を意味する。アフィニティータグの例には、6×ヒスチジンなどのヒスチジン、S-タグ、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ（GST）およびストレプトアビジンなどがあるがこれらに限定されない。

【0038】

動物：生きている多細胞脊椎生物であり、例えば哺乳類、霊長類、および鳥類を含むカテゴリーを意味する。

【0039】

抗生物質耐性カセット：抗生物質に対する耐性を付与する核酸配列である選択マーカーであり、宿主細胞においてこの核酸が翻訳される。抗生物質耐性カセットの例には、カナマイシン、アンピシリン、テトラサイクリン、クロラムフェニコール、ネオマイシン、ハイグロマイシン、ゼオシンなどがあるがこれらに限定されない。

【0040】

癌：分化の欠損、増殖率の上昇、周辺組織への浸潤を伴う特徴的な退形成が生じ、かつ転移可能な悪性新生物である。

【0041】

CAPs：MHCのクラスIまたはクラスIIの到達可能タンパク質（accessible proteins）。

【0042】

cDNA（相補的DNA）：内部の非コードセグメント（イントロン）、および転写を決定する調節配列がないDNA断片。cDNAは細胞から抽出したメッセンジャーRNAを逆転写することで実験室で合成される。

【0043】

欠失：DNA配列の除去を意味し、その両側の領域は連結される。

【0044】

DNA：デオキシリボ核酸。DNAは長い鎖状ポリマーであり、ほぼ全ての生物の遺伝物質を構成する（一部のウイルスはリボ核酸すなわちRNAからなる遺伝子を有する）。DNAポリマーの反復性の単位は4種の異なるヌクレオチドであり、それぞれリン酸基に結合したデオキシポリボース糖に4種の塩基（アデニン、グアニン、シトシン、およびチミン）が結合したもののいずれかである。ヌクレオチドの3塩基配列はコドンと呼ばれ、DNA分子中ではポリペプチドのアミノ酸をコードする。コドンという用語はまた、DNA配列が転写されてできるmRNA中にみられる対応する（および相補する）3個のヌクレオチド配列についても用いられる。

【0045】

挿入末端：トランスポザーゼが結合する核酸配列。一般に挿入末端の長さは19塩基対である。本明細書に記述するコンストラクトでは、挿入配列はMHCエピートープに対して5'側（5'側挿入末端）と3' loxP配列の3'側（3'側挿入末端）に位置する。5'側挿入末端の例には、IS50RのI末端（例：配列番号：5、ゲンバンクアクセス番号U32991.1）およびモザイク配列（配列番号：4、GoryshinおよびReznikoff、Journal of Biological Chemistry 273（13）：7367～74を参照）などがあるがこれらに限定されない。3'側挿入末端の例には、IS50RのO末端（配列番号：3、ゲンバンクアクセス番号U00004.1）、および本発明に示されるモザイク配列（図11参照）などが含まれるがこれらに限定されない。

【0046】

IS50R：挿入配列（Inserion sequence：IS）のタイプ50R。このIS因子の末端には短い逆方向反復があり、I末端およびO末端（挿入末端）と命名されている（例：ゲンバンクアクセス番号U32991.1およびU00004.1をそれぞれ参照）。

【0047】

単離された：「単離された」生物学的構成成分（核酸、ペプチドまたはタンパク質など）は、実質的に単離され、個別に産生され、または、構成成分が天然に存在する生物の細胞中における他の生物学的構成成分—すなわち他の染色体および染色体外のDNAおよびRNAならびにタンパク質—とは別に精製される。したがって「単離された」核酸、ペプチドおよびタンパク質には、標準的な精製法で精製された核酸およびタンパク質が含まれる。この用語はまた、化学的に合成された

核酸のほか、宿主細胞における組換え発現で調製された核酸、ペプチド、およびタンパク質を含む。

【0048】

loxP配列：細菌のcreリコンビナーゼで認識される標的配列であり、loxPは酵素Creリコンビナーゼが認識する組換え部位である。loxP配列は本来バクテリオファージP1に由来する（Hoekstraら、Proceedings of the National Academy of Sciences 88（12）：5457～61、1991を参照）。一つの態様において、loxP部位は配列

ATAACTTCGTATAATGTATGCTA TACGAAGTTAT

で定義される。「最小」のloxP配列とはcreリコンビナーゼにより認識される最小の配列を意味する。一つの態様における最小のloxP配列は、ヘクストラ（Hoekstra）ら、Proceedings of the National Academy of Sciences 88（12）：5457～61 1991に記載されている。特異的な非制限性の例には、ゲンバンクアクセス番号M10494.1に登録された配列が含まれるがこれらに限定されない。loxP配列の5'側と3'側は同一でなければならない。loxP部位は未熟な転写の終結を防ぐために上述のような明確な配列で表される。

【0049】

本明細書に用いる際にこれらの配列は、選択マーカをコードする配列に対して上流および下流（それぞれ5'側および3'側）に位置する。

【0050】

哺乳類：この用語は、ヒトおよびヒト以外の哺乳類を含む。これと同様に「被験者」「患者」および「個体」という用語は、ヒトおよび獣医学的対象を含む。

【0051】

MHCエピトープ：クラスIまたはクラスIIのMHC経路を介して提示されるエピトープで、少なくとも一つの抗体が使用できる。この抗体は遊離状態のエピトープではなく、MHC分子群と複合体を形成したエピトープに優先的に結合する。クラスI MHCエピトープの例には、オボアルブミンエピトープ、SIINFEKL（配列番号：6）、およびHTLV-1（ゲンバンクアクセス番号B45714参照）に由来するHLA-2拘束ヒトT細胞エピトープLLFGYPVYV（配列番号：7）などが含まれるがこれ

らに限定されない。クラスⅠ MHCエピトープの例には、I-A^b拘束性T細胞エピトープであるASFEAQGALANIAVDKA（配列番号：8）などが含まれるがこれらに限定されない。

【0052】

MHCエピトープは、MHCエピトープをコードする核酸配列が、転移因子の5'側組換え部位の5'側、または3'側組換え部位の3'側にある場合に、組換え部位（すなわち5'側または3'側の組換え部位）に「隣接する」。転移因子とゲノム間で組換えが起こると、MHCエピトープがゲノム上に挿入することになり、MHCエピトープが細胞のタンパク質とともに発現する。一つの態様において、MHCエピトープは組換え部位の約5000 bp以内に存在する。またはMHCエピトープは、組換え部位から1000 bp、500 bp、100 bp、20 bp、10 bp、もしくは0 bp以内に位置する場合がある。

【0053】

オリゴヌクレオチド：最長約200ヌクレオチド塩基の直鎖状ポリヌクレオチド配列で、例えば少なくとも6ヌクレオチドであるポリヌクレオチド（DNAまたはRNAなど）であり、例えば少なくとも15ヌクレオチド、50ヌクレオチド、100ヌクレオチドまたさらには200ヌクレオチドの長さである。

【0054】

使用可能に連結される：第1の核酸配列が、第2の核酸配列と機能的に関連のあるように位置する場合に、第1の核酸配列と第2の核酸配列は使用可能に連結されている。例えばプロモーターがコード配列の転写または発現に影響する場合に、プロモーターとコード配列は使用可能に連結されている。使用可能に連結されるDNA配列は一般に隣接しており、また必要に応じて2つのタンパク質のコード領域は同じリーディングフレームに結びつけられる。

【0055】

ORF（オープンリーディングフレーム）：終止コドンをもたずにアミノ酸をコードする一連のヌクレオチドの3塩基配列（コドン）。このような配列は通常ペプチドに転写される。

【0056】

相同分子種：2つのヌクレオチド配列は、両者が共通の祖先の配列を共有する場合に、かつその祖先配列を有する種が2つの種に分かれて分岐した場合のことであり、2つの配列は互いに相同分子種となる。相同分子種である配列はまた相同配列 (homologous sequence) でもある。

【0057】

PCR：ポリメラーゼ連鎖反応。変性、プライマーとのアニーリング、またDNAポリメラーゼによるその後の伸長を行って標的DNA配列のコピー数を増幅させるサイクルからなる手法を意味する。

【0058】

薬学的に許容されるキャリア：本発明において有用な薬学的に許容されるキャリアは従来型のものである。「レミントン薬理科学 (Remington's Pharmaceutical Sciences)」、マーティン (E.W. Martin) 著、Mack Publishing Co.、ペンシルベニア州イーストン、第15版 (1975) では、本明細書に記載されたDNA、RNA、およびタンパク質の医薬品の送達に適した組成および剤形について記載されている。薬物を含む本発明の態様は、当業者に既知であると思われる従来型の、薬学的に許容されるキャリア、アジュバントおよび対イオン類を用いて調製することができる。

【0059】

キャリアの性質は一般に、使用する特定の投与様式の影響を受ける。例えば、非経口製剤は通常、水、生理食塩水、平衡塩類溶液、水溶性デキストロース、グリセロール、エタノール、ゴマ油、それらの組み合わせなどの薬学的におよび生理学的に許容される溶液を溶媒として含む注射溶液である。培地も例えば薬学的に許容される、浸透圧の調整を目的とした塩類などの従来の医薬品用補助剤、緩衝液、保存剤などを含む場合がある。キャリアおよび組成は無菌性とすることが可能であり、また製剤は投与様式に合わせる。固体成分 (例えば、粉末、ピル、錠剤、またはカプセル剤) については、例えば医薬品級のマンニトール、乳糖、デンプン、サッカリンナトリウム、セルロース、炭酸マグネシウム、またはステアリン酸マグネシウムなどの従来の非毒性固体キャリアを含めることができる。また生物学的に中性のキャリアのほかに投与可能な医薬品成分には、湿潤剤、乳

化剤、保存剤、および酢酸ナトリウムやソルビタンモノラウレートなどのpH緩衝剤などの微量の非毒性の補助物質を含めることができる。

【0060】

組成物は、液体溶液、懸濁液、乳濁液、錠剤、ピル、カプセル、徐放性製剤、または粉末とすることができる。このような組成は、従来の結合剤およびトリグリセリドなどのキャリアとともに坐薬として製剤化することができる。

【0061】

プローブおよびプライマー：核酸のプローブおよびプライマーは、本発明で提供されるアミノ酸配列を元に容易に調製することができる。プローブは検出用標識またはレポーター分子に結合する単離された核酸である。典型的な標識には、放射性同位元素、リガンド、化学発光試薬、および酵素などがある。さまざまな目的の標識の選択における標識および誘導の方法に関しては例えばサンプブック (Sambrook) ら、「分子クローニング：実験室マニュアル (Molecular Cloning : A Laboratory Manual)」、Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) およびアウシュベル (Ausubel) ら、「分子生物学の現行のプロトコル (Current Protocols in Molecular Biology)」、Greene Publishing Associates and Wiley-Intersciences (1987) に記載されている。

【0062】

プライマーはDNAオリゴヌクレオチドなどの短い核酸で、長さは15ヌクレオチドまたはそれ以上である。プライマーは、核酸ハイブリダイゼーションによりプライマーと標的DNA鎖の間でハイブリッドを形成させて相補的な標的DNA鎖にアニールさせ、次にDNAポリメラーゼ酵素によって標的DNA鎖に沿って伸長させることができる。プライマー対は例えばポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) または、当技術分野で周知の他の核酸増幅法により核酸配列の増幅に使用することができる。

【0063】

プローブおよびプライマーの調製法および使用法は例えばサンプブックら (「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」、Cold Spring Harbor Laboratory Press、1989)、アウシュベルら、「Current Protocols in Molecular Biology」、Greene Publishing Associates and Wiley-Intersciences (1987)、および

イニス (Innis) ら、「PCRプロトコール、方法と応用の手引き (PCR Protocol s, A Guide to Methods and Applications)」、1990、Innisら (編)、21~27、Academic Press、Inc.、カリフォルニア州サンディエゴ、に記載されている。PCR用のプライマー対は例えばPrimer (バージョン0.5、(著作権) 1991、Whitehead Institute for Biomedical Research、マサチューセッツ州ケンブリッジ) などの専用のコンピュータープログラムを使用することで、既知の配列を元に作製することができる。特定のプローブまたはプライマーの特異性がその長さとともに上昇することを当業者であれば理解すると思われる。したがって例えばcDNAまたは遺伝子の連続20個のヌクレオチドからなるプライマーであれば、cDNAまたはゲノムDNAのライブラリーに含まれる遺伝子の相同体などの標的配列に対し、対応するわずか15ヌクレオチドのプライマーと比べて高い特異性でアニールする。このためより高い特異性を得るために、プローブおよびプライマーは、本明細書に開示された20個、25個、30個、35個、40個、50個またはそれ以上の核酸配列の連続したヌクレオチドからなるものとして選択される。

【0064】

したがって本発明は、開示された遺伝子配列の特定の長さからなる単離された核酸分子を含む。このような分子は、このような配列の少なくとも20個、21個、25個、30個、35個、40個、50個または100個またはそれ以上の連続ヌクレオチドからなるほか、開示された配列の任意の領域から得られる。例としてcDNAおよび遺伝子の配列が、配列の長さの半分または4分の1に割り当てられることがあるほか、単離された核酸分子が、その分子の第1の半分または第2の半分、または4分の1の部分の4つのいずれかに基づく場合がある。特にDNA配列は、これまで開示されていなかったタンパク質の特有の部分にコードする場合がある。

【0065】

精製された：精製されたという用語は、絶対的に純粋であることを必要とせず、むしろ相対的な意味で用いられる。したがって例えば、精製されたタンパク質調製物とは、そのタンパク質が、細胞内に存在する天然の環境におけるタンパク質より純度が高いことを意味する。一つの態様において、タンパク質の調製物は、そのタンパク質が調製物の総タンパク質量の少なくとも50%となるように精製

される。

【0066】

組換え体：組換え体の核酸は、天然には存在しない配列を有する核酸か、または2つの通常は別個の配列セグメントを人工的な組み合わせで作製される配列を有する核酸である。このような人工的な組み合わせは、化学的な合成により、またはさらに一般的には、単離された核酸セグメントを人工的に操作することにより—例えば遺伝子工学的手法で—構築される場合が多い。

【0067】

組換え部位：非対称性配列で分けられた向きが反対のパリンドロームを含む核酸配列で、部位特異的組換え反応が起こりうる核酸配列。一つの特定の非制限的な例における組換え部位はLoxP部位である（上記参照）。別の特定の非制限的な例における組換え部位はFli_t部位である。FRTは、ともに最小のFRT部位を含む2つの逆方向の13塩基対（bp）からなる反復、および8 bpのスペーサーに加えて、最小基質の反応性を高める付加的な13 bpの反復からなる（例えば米国特許第5,654,182号を参照）。別の特定の非制限性の例における組換え部位はTN3、マリナー、またはガンマ/デルタのトランスポゾンに由来する組換え部位である。

【0068】

リコンビナーゼ：組換え部位における組換えを触媒するタンパク質（総説としてKilbyら、TIG、9、413～421（1993）；Landy、Current Opinion in Genetics and Development、3、699～707（1993）；Argosら、EMBO J.、5、433～440（1986））。一つの特定の非制限性のリコンビナーゼの例はCreタンパク質である。別の特定の非制限性の例がリコンビナーゼはFlpタンパク質である。他の特定の非制限性のリコンビナーゼの例はTn3リコンビナーゼ、トランスポゾン ガンマ/デルタのリコンビナーゼ、およびトランスポゾン マリナーに由来するリコンビナーゼがある。

【0069】

Creタンパク質とFlpタンパク質は、λインテグラーゼファミリーのDNAリコンビナーゼに属する。CreリコンビナーゼとFlpリコンビナーゼには、行う反応の種類についても標的部位の構造および組換えの機構についても高い類似性が認めら

れる（例えば、Jayaram、TIBS、19、78～82（1994）；Leeら、J. Biolog. Chem.、270、4042～4052（1995）を参照）。例えば一連の組換え現象は、複製、およびATPなどの外的エネルギー源に依存せず、スーパーコイル状および直線状のDNA 鑄型の関数となる。

【0070】

リコンビナーゼは、対応する2つの組換え部位間における組換えを促すことでその作用を発揮する。Creの場合、組換え部位はLox部位であり、Flpの場合、組換え部位はFrtである。同様の部位はトランスポゾン ガンマ/デルタ、TN3、およびトランスポゾン マリナーに認められている。このような組換え部位は非対称性配列で分けられた逆向きのパリンドロームからなる（例えば、Mackら、Nucleic Acids Research、20、4451～4455（1992）；Hoessら、Nucleic Acids Research、14、2287～2300（1986）；Kilbyら（上記）を参照）。同じ直線状DNA分子上に平行に配置された標的部位（すなわちいわゆる「ダイレクトリピート」）間で組換えが起こることで、介在するDNA配列が環状分子として切り出される。環状DNA分子上のダイレクトリピート間で組換えが起こると、介在するDNAが切り出されて2つの環状分子が生じる。Cre/Lox組換え系もFlp/Frt組換え系も、植物、昆虫、酵母、細菌および哺乳類の染色体への部位特異的組込みなどの広範囲の目的に使用されていることが報告されている（例えば、Sauerら、Proc. Natl. Acad. Sci.、85、5166～5170（1988）を参照）。組換え体を対象とした陽性および陰性の選択法またはスクリーニング法が開発されている（例えば、Sauerら、J. Mol. Biol.、223、911～928（1992）を参照）。組換えシステムまたはその成分のトランスジェニックマウス、植物および昆虫などにおける使用では、宿主がリコンビナーゼ遺伝子を発現して、明瞭な悪影響が認められていないので、これらのタンパク質が一般に安全であることが確認されている（例えば、Orbinら、Proc. Natl. Acad. Sci.、89、6861～6865（1992）を参照）。

【0071】

試料：末梢血、尿、唾液、生検組織、外科的検体、羊水穿刺試料、生検材料中に存在するものなどの、体細胞から得られるゲノムDNA、RNA、またはタンパク質を含む生物学的試料を含む。

【0072】

選択マーカー：ポリペプチドを発現する対象細胞の同定に使用するポリペプチド。選択マーカーは、当業者に既知の任意の方法で検出することができる。このような方法には、酵素アッセイ法、分光光度学的アッセイ法、抗生物質耐性アッセイ法、および抗体を用いるアッセイ法（例えばELISAや免疫化学的手法）などが含まれる。選択マーカーの特定の非制限性の例には、ルシフェラーゼ、緑色蛍光タンパク質（GFP）、または β -ガラクトシダーゼがある。一つの態様における選択マーカーは酵素である。別の態様における選択マーカーは酵素である。さらに別の態様における選択マーカーは抗原エピトープである。使用される選択マーカーの特定の非制限性の例は、細胞を薬剤耐性にするタンパク質である（例えば、ゼオマイシン耐性、ハイグロマイシン耐性、テトラサイクリン耐性、ピューロマイシン耐性またはブレオマイシン耐性）。

【0073】

配列の同一性：2つの核酸配列またはアミノ酸配列の類似性は配列相互の類似性で表され、通常は配列の同一性と呼ばれる。配列の同一性は、同一性（または類似性または相同性）のパーセンテージで測定されることが多い。すなわちパーセンテージが大きくなればなるほど2つの配列の類似性は大きくなる。本発明におけるDICEトランスポゾンの核酸配列およびタンパク質配列の相同体は、標準的な方法で整列させた場合に比較的高度の配列同一性を有する。このような相同性は、相同分子種のタンパク質またはcDNAが、より関連性が薄い種と比べてより密接に関連する種に由来したものである場合に、より顕著になると考えられる。

【0074】

通常、本発明のDICEトランスポゾンの相同体は、本発明のDICEトランスポゾームを相同なDICEトランスポゾームと比較した場合に、ヌクレオチドレベルで少なくとも50%同一であり、アミノ酸レベルでは少なくとも50%同一である。さらに高いレベルの相同性も可能であり、例えば少なくともヌクレオチドレベルで75%、90%、95%または98%が同一となる。

【0075】

比較を目的とした配列の整列化の方法は当技術分野で周知である。さまざまな

プログラムおよび整列アルゴリズムが諸文献に記載されている (SmithおよびWaterman、Adv. Appl. Math. 2 : 482、1981 ; NeedlemanおよびWunsch、J. Mol. Biol. 48 : 443、1970 ; PearsonおよびLipman、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 : 2444、1988 ; HigginsおよびSharp、Gene、73 : 237 ~ 44、1988 ; HigginsおよびSharp、CABIOS 5 : 151 ~ 3、1989 ; Corpetら、Nuc. Acids Res. 16 : 10881 ~ 90、1988 ; Huangら、Computer Appls. in the Biosciences 8、155-65、1992 ; およびPearsonら、Meth. Mol. Bio. 24 : 307 ~ 31、1994)。アルチュール (Altschul) ら、J. Mol. Biol. 215 : 403-10、1990では、配列整列法および相同性計算に関する詳細な考察が述べられている。

【 0 0 7 6 】

NCBI Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (Altschulら、J. Mol. Biol. 215 : 403 ~ 10、1990) は、National Center for Biotechnology Information (NCBI、メリーランド州ベセスダ) などの複数のソースおよびインターネットから配列解析プログラムblastp、blastn、blastx、tblastnおよびtblastxと関連して使用する目的で入手できる。NCBIのウェブサイトで入手することができる。

【 0 0 7 7 】

開示されたDICEトランスポゾームのアミノ酸配列の相同体は、NCBI Blast 2.0 (gapped blastpはデフォルトパラメータに設定) を用いて、開示したDICEトランスポゾームのアミノ酸配列の完全長の整列に関してカウントした場合に、少なくとも60%、70%、80%、90%、95%、98%または少なくとも99%の配列の同一性を有する場合がある。blastnプログラムで検索した照会はDUSTでフィルタリングされる (HancockおよびArmstrong、1994、Comput. Appl. Biosci. 10 : 67 ~ 70)。他のプログラムではSEGが使用される。

【 0 0 7 8 】

約30アミノ酸を超えるアミノ酸の配列を比較する場合は、デフォルトのパラメータ (gap existence cost = 11、およびper residue gap cost = 1) で設定されたデフォルトのBLOSUM62マトリックスを用いてBlast 2配列関数を使用する。短いペプチド (約30アミノ酸以下) を整列させる際にはBlast 2配列関数を用いて、デフォルトのパラメータ (open gap = 9、extension gap = 1 penalties) に設

定したPAM30マトリックスを使用して整列を行う。参照配列に対してさらに高度の類似性があるタンパク質では、この方法で評価した場合に、少なくとも70%、75%、80%、90%、95%、98%、または少なくとも99%の配列同一性といった高い同一性のパーセンテージを示す場合がある。全配列より短い配列について配列同一性を比較する際には、相同体は通常10~20アミノ酸の短いウィンドウについて少なくとも75%の配列同一性を有する。また、参照配列に対する類似性に依拠して少なくとも85%の配列同一性、または少なくとも90%または95%の配列同一性を有する場合がある。

【0079】

または複数の配列をマニュアルで整列させて、元の配列と、オリジナル配列と比較する参照配列における同一のアミノ酸の数をカウントする場合がある。こうして得られた同一アミノ酸の数を参照配列のアミノ酸総数で割り、100を乗じて同一性のパーセントを得る。

【0080】

上記の配列同一性の範囲がガイダンスのみで提供されることを当業者であれば理解すると思われる。すなわち、著しく有意な相同体であれば、提供される範囲外に判定される可能性があることはほぼ確実である。本発明は上述したペプチドの相同体だけでなく、そのような相同体をコードする核酸分子も提供する。

【0081】

2つの核酸配列が実質的に同一であることの指標の一つは、第1の核酸がコードするポリペプチドが第2の核酸がコードするポリペプチドと免疫学的に交差反応するということである。

【0082】

高度の同一性を示さない核酸配列でも、遺伝暗号の縮重のために類似のアミノ酸配列をコードする場合がある。核酸配列上の変化は縮重を用いることで、すべてが実質的に同じタンパク質をコードする複数の核酸配列を生じうることが理解される。

【0083】

2つの核酸分子が密接に関連していることの別の指標は、両分子がストリンジ

メント条件下で相互にハイブリッドを形成することである。

【0084】

本発明は、上述のペプチドの相同体だけでなく、そのような相同体をコードする核酸分子も提供する。

【0085】

被験者：生きている多細胞性脊椎生物であり、ヒトおよび獣医学的対象（例えば哺乳類、鳥類、および霊長類）を含むカテゴリー。

【0086】

形質転換された：形質転換された細胞は、分子生物学的手法で核酸分子が導入された細胞である。本明細書で用いる形質転換という用語は、そのような細胞に核酸分子を導入するすべての手法を含み、ウイルスベクターを用いたトランスフェクション、プラスミドベクターを用いた形質転換、ならびにエレクトロポレーション、リポフェクション、およびパーティクルガン加速法による裸のDNAの導入などが含まれる。

【0087】

トランスジェニック細胞：外来の非天然型のDNAを含む形質転換細胞。

【0088】

転移因子：短い可動性DNA配列で、複製してコピーを染色体上のランダムな部位に挿入可能な配列。一般に転移因子では、両末端の配列は互いにほぼ同一で反対方向（逆向き）の反復である。天然の転移因子（トランスポゾン）は、それらの挿入を触媒する酵素であるトランスポザアーゼをコードする。細菌には2つの種類のトランスポゾンがあり、一つは単純なトランスポゾンであり挿入に必要な遺伝子群のみを有する。もう一つは複合型のトランスポゾンであり挿入に必要な遺伝子群のほかにも遺伝子群を有する。真核生物には、2つのクラスの可動性遺伝因子がある。第1のクラスは細菌のトランスポゾン様のものでありDNA配列が直接動く。第2のクラス（レトロトランスポゾン）は逆転写酵素でRNAを転写してDNAを作って、DNAが新しい部位に挿入することで動く。

【0089】

「転移因子」という用語には「トランスポゾン」と「トランスポゾーム」が含

まれる。本明細書に記載された方法を用いて、転移因子を使用してMHCクラスI経路またはクラスII経路からCAPsを同定することができる。

【0090】

トランスポザーゼ：トランスポゾンの転位を担う酵素。本明細書では、核酸配列（ゲンバンクアクセッション番号AAB60064を参照）およびアミノ酸配列（ゲンバンクアクセッション番号U15573を参照）の両方を意味する。

【0091】

トランスポゾーム：自身をゲノム上の他の位置に移動させることができる可動性遺伝因子。本明細書で転移因子と記述する場合は、トランスポザーゼを含まない可動性遺伝因子を意味する。例として、それぞれ図7および図8に示すDICE-IおよびDICE-IIがあるがこれらに限定されない。

【0092】

トランスポゾン：自身をゲノム上の他の位置に移動させることができる可動性遺伝因子。本明細書ではトランスポザーゼを含む転移因子を意味する。例として図2に示すTn5-DICE、図5に示すTn5-HER/neu/SOB、および図6に示すTn5-HIV 1/SOBなどがあるがこれらに限定されない。

【0093】

ベクター：宿主細胞に導入される核酸分子で、導入されることで形質転換宿主細胞が作製される。ベクターには、宿主細胞内で自身の複製を可能とする核酸配列（複製起点など）が含まれる場合がある。ベクターはまた、一つまたは複数の選択マーカー遺伝子群、および当技術分野で既知の他の遺伝因子群を含む場合がある。

【0094】

アミノ酸配列および核酸配列の異型：開示されたDICEトランスポゾンは様々な方法で産生させることができる。DNAがコードされたタンパク質の生物学的活性に影響することなく多くの方法で変化する場合があることを当業者であれば理解すると思われる。例えばPCRにより、開示されたDICEトランスポゾームをコードするDNA配列の変異を作製することができる。このような異型は、該タンパク質を発現させるため使用される宿主細胞内におけるコドン使用優先度が最適化され

た異型、または発現を促進する他の配列の変化が最適化された異型となる場合がある。

【0095】

2つのタイプのcDNA配列の異型を作製することができる。第1のタイプにおけるcDNA配列の変異は、コードされるポリペプチドのアミノ酸配列上の変化として現れない。このようなサイレント型の変異は遺伝暗号の縮重を単に反映したものである。第2のタイプにおけるcDNA配列の変異は、コードされるタンパク質のアミノ酸配列上の変化と結びつく。この場合における異型cDNA配列は、異型ポリペプチド配列を生じる。コードされるポリペプチドの機能上の同一性および免疫学的同一性を最適に維持するために、このようなアミノ酸の置換は保存的なものとされる。保存的な置換では、一つのアミノ酸が、大きさ、疎水性などが類似した他のアミノ酸に置き換えられる。このような置換は一般に、対象タンパク質の特性を詳細に調節することが望まれる場合に保存的である。あるタンパク質中で元のアミノ酸に対して置換されるアミノ酸の例、また保存的な置換であるとみなされるアミノ酸の例を以下に挙げる：Alaに対するSer；Argに対するLys；Asnに対するGlnまたはHis；Aspに対するGlu；Cysに対するSer；Glnに対するAsn；Gluに対するAsp；Glyに対するPro；Hisに対するAsnまたはGln；Ileに対するLeuまたはVal；Leuに対するIleまたはVal；Lysに対するArgまたはGln；Metに対するLeuまたはIle；Pheに対するMet、LeuまたはTyr；Serに対するThr；Thrに対するSer；Trpに対するTyr；Tyrに対するTrpまたはPhe；およびValに対するIleまたはLeu。

【0096】

アミノ酸の変化を生じるcDNA配列上の変異は、それが保存的なものであれ非保存的なものであれ、コードされるタンパク質の機能および免疫学的同一性の維持を促すために最小限とする。タンパク質の免疫学的同一性は、開示されたDICEトランスポゾームに対して抗体により認識されるか否かを判定して評価することができる。すなわちそのような抗体で認識される異型は免疫学的に保存されている。特定の態様における任意のcDNAの異型はコードされるポリペプチドに対してわずか20アミノ酸、例えば10アミノ酸より少ない置換を導入する。異型アミノ酸配列は例えば天然のアミノ酸配列に対して80%、90%またはさらには95%の同一性を

有することがある。

【0097】

様々な種に由来する同一または同等のタンパク質中に保存された残基もまた、配列中に導入されうる置換の位置に関するガイダンスを提供することもある。複数の種にわたって高度に保存されている残基は、タンパク質の機能上、複数の種にわたってそれほど保存されていない残基と比べて重要である可能性が高い。

【0098】

分子遺伝学分野で一般に使用されている他の用語の定義については、ルーウィン (Benjamin Lewin) 「遺伝子 V (Genes V)」 (Oxford University Press、1994 (ISBN 0-19-854287-9)) ; ケンドリュー (Kendrew) ら (編) 「分子生物学百科事典 (The Encyclopedia of Molecular Biology)」 (Blackwell Science Ltd.、1994 (ISBN 0-632-02182-9)) ; およびマイヤーズ (Robert A. Meyers) (編) 「分子生物学とバイオテクノロジー：包括的卓上参考書 (Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference)」 (VCH Publishers, Inc.、1995 (ISBN 1-56081-569-8)) で参照することができる。

【0099】

実施例1

転移因子の作製

転移因子は、MHCクラスIまたはMHCクラスIIエピトープを細菌ゲノム全体にランダムに分布させることが可能である。転移因子は5'末端および3'末端において、トランスポザナーゼが結合する挿入末端と隣接している。一般に挿入末端の長さは約19ヌクレオチドである。5'側の挿入末端の例には、IS50R (ゲンバンクアクセス番号U32991.1) のI末端、ならびにI末端および0末端のモザイク配列などがあるがこれらに限定されない。3'側の挿入末端の例には、IS50R (ゲンバンクアクセス番号U00004.1) の0末端ならびにI末端および0末端のモザイク配列などがあるがこれらに限定されない (図10参照)。

【0100】

転移因子はまた組換え部位の対を含むことがある。例として最短のloxP配列の対があり、これはcreリコンビナーゼなどのリコンビナーゼと相互作用すること

で、組換え部位間に位置する配列を細菌ゲノム上への転移因子の挿入に伴って除去することができる。一つの態様における5'側loxP配列は、選択マーカをコードする核酸配列の5'側に、またMHCクラスIエピトープまたはクラスIIエピトープの3'側に位置する。3'側loxP配列は3'側挿入末端の5'側、および選択マーカをコードする核酸配列の3'側に位置する。本発明で使用するloxP配列（配列番号：11）には、loxPがその機能を保持することができる最小配列の例が含まれる。本発明ではより長いloxP配列が使用される場合がある。一方で長いloxP配列ほど細菌ゲノム上に挿入される。特定の理論に拘束されるわけではないが、タンパク質へのより短い挿入で対象タンパク質が適切に機能する可能性が大きい。

【0101】

本発明の転移因子はまた、選択マーカをコードする核酸配列をloxP配列間を含み、これにより転移因子プラスミドを含む細菌の選択が可能となる。一つの態様における選択マーカをコードする核酸配列は抗生物質耐性をコードする。選択した選択マーカをコードする核酸配列は、転移因子を挿入する細菌に依存する場合がある。例えばサルモネラ菌を使用する場合はカナマイシン耐性カセットを転移因子に使用する場合がある。本発明を実施するために使用される可能性のある他の抗生物質耐性カセットの例には、アンピシリン、テトラサイクリン、クロラムフェニコール、ネオマイシン、ハイグロマイシン、ゼオシンなどがあるがこれらに限定されない。

【0102】

MHCクラスIまたはMHCクラスIIに拘束されるエピトープは、本発明の転移因子により細菌ゲノムに送達される。MHCエピトープは5'側挿入末端の3'側、および5'側loxP配列の5'側に位置する。使用したMHCエピトープには少なくとも一つの利用可能な抗体結合部位がある。抗体は遊離状態のエピトープではなく、MHC分子と複合体を形成したエピトープに優先的に結合する。使用可能なクラスI MHCエピトープの例には、オボアルブミンエピトープ、SIINFEKL（配列番号：6）、およびHTLV-1に由来するHLA-A2拘束性ヒトT細胞エピトープであるLLFGYPVYV（ゲンバンクアクセッション番号B45714）などがあるがこれらに限定されない。使用可能なクラスII MHC拘束性エピトープの例には、I-A^b拘束性T細胞エピトープであ

るASFEAQGALANI AVDKA (ゲンバンクアクセス番号228499) などがあるがこれらに限定されない。

【 0 1 0 3 】

本発明の転移因子はまたTn5トランスポザーゼの配列を含む場合がある。この配列を含む場合、トランスポザーゼは、選択マーカーをコードする核酸配列の3'側、および3'側loxP配列の5'側に位置する。creリコンビナーゼが付加されると、トランスポザーゼ、および選択マーカーをコードする核酸配列は除去される。

【 0 1 0 4 】

本発明の転移因子は、MHCエピトープを細菌を含む多様な生物のゲノム上に転移させるために使用される場合がある。本発明を実施するために使用される可能性のある生物の例には、サルモネラ菌、結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*)、プラスモジウム (*Plasmodium*) およびリステリア菌 (*Listeria monocytogenes*) などがあるがこれらに限定されない。

【 0 1 0 5 】

実施例2

Tn5を基礎とするDICE転移因子の構築

Tn5-DICEトランスポゾン、Tn5トランスポザーゼ、およびその5'末端および3'末端において最小loxP組換え部位のダイレトリピートと隣接する抗生物質耐性カセット (カナマイシン) からなるものとして作製した (図1)。Tn5-DICEトランスポゾン全体はIS50RのI末端とO末端に隣接する。このトランスポゾンの5'末端はTn5のI末端、H-2K^b拘束性オボアルブミンエピトープであるSIINFEKL (配列番号 : 6)、6×ヒスチジンタグ、および一つのloxP部位からなり、これらは転写的に読み枠が合っている。Tn5-DICEはオボアルブミンエピトープであるSIINFEKL (配列番号 : 6) を細菌染色体全体に無作為に分布させる。感染細菌から放出されるエピトープタグCAPsは、宿主細胞のタンパク質分解装置によるプロセッシングを受け、保持されたオボアルブミンエピトープSIINFEKL (配列番号 : 6) は、H-2K^bという状況において宿主細胞の表面に提示される (図11参照)。このコンストラクトにおけるI末端はアミノ酸1~19位にあり、SIINFEKL (配列番号 : 6) は28~52位にあり、5'側PCR部位は54~77位にあり、6×ヒスチジンは82~100位にあ

り、LoxPは109～143位にあり、3'側PCR部位は145～167位にあり、また0末端は153～171位にある(図12参照)。

【0106】

Tn5-DICEは、Creリコンビナーゼによる誘導で挿入がloxP部位で分離するように構築された。カナマイシンおよびTn5トランスポザゼのカセットは、非複製性のループに分かれて失われる。ある遺伝子に対して読み枠があった挿入が起きた場合には、49アミノ酸の分離産物がSIINFEKL(配列番号:6)エピトープをもつ融合タンパク質を作る(図2)。

【0107】

F'プラスミドとTn5-DICEをもつプラスミドpDE510(tra-/mob-)(図3A)の両方を含む大腸菌ドナー株(ATCC番号53323)を、ナリジクス酸耐性のネズミチフス菌(*Salmonella typhimurium*)株(ATCC番号14028)と接合させた。両細菌は1:1の割合でルリア-ベルターニブロス中で37℃で12時間ともにインキュベートして接合させた。ナリジクス酸およびカナマイシンに耐性のサルモネラ菌のトランス接合体であるF'プラスミドとプラスミドを持つTn5-DICEの両方を有するpDE510(F':Tn5-DICE)を単離した。F':Tn5-DICEの存在は、P22感受性試験(Miller J.H.「分子遺伝学実験(Experiments in Molecular Genetics)」、Cold Spring Harbor Laboratory Press(1972))、およびトランスポゾンのカナマイシンマーカーを大腸菌(*E. coli*)またはサルモネラ菌のレシピエントにF'プラスミドの伝達頻度と等しい頻度で戻す転移能力を指標に確認した。これは、挿入が実際にF'プラスミド上にあることを保証するための対照実験である。F'プラスミドは特定の頻度で移る。転移因子がF'プラスミド上にある場合、最初の接合と同じ速度で新しいレシピエントに再伝達されるはずである。

【0108】

サルモネラ菌に特異的なバクテリオファージであるP22(HTint)(ATCC番号19585-B1)を用いて、F':Tn5-DICEをもつネズミチフス菌のトランス接合体の溶菌液プールを調製した。(「プールする」とは、トランスポゾンが挿入したF'プラスミドをもつサルモネラ菌株のドナー培養液を用いてファージ溶菌液を調製することを意味する)。P22の形質導入は、複数のサルモネラ菌株間で遺伝マーカー

を移すために頻繁に使用されている方法である。サルモネラ菌にはF'に対する配列の相同性はないので、第2のサルモネラ菌レシピエント (ATCC 14028) であるpBAD33creを含むサルモネラ菌株に変異を誘発するためにP22ファージの溶菌液を使用した。レシピエントとF'との間に相同性がないことから、カナマイシン耐性の形質導入体が、相同組換えではなく転移の結果に由来することが保証された。形質導入体はカナマイシン耐性 (30 µg/ml) を含むルリア寒天上で選択された。pBAD33cre (図3B) 上のCreリコンビナーゼは、pBADプロモーターの強固な調節制御下にあり、カナマイシン耐性遺伝子およびTn5トランスポザーゼ遺伝子の分離および消失は、該株をアラビノース (1 mM) の存在下で増殖させた場合に限られる。pBAD33creプラスミドは不安定であり、このプラスミドをもつサルモネラ菌株を選択なしに増殖させると第3~10世代以内に失われる。

【0109】

サルモネラ菌に特異的なバクテリオファージP22 (HTint) を用いて、F':Tn5-DICEをもつネズミチフス菌のトランス接合体の溶菌液プールを調製した (トランスポゾンが挿入されたF'プラスミドをもつサルモネラ菌株のドナー培養液を用いてファージ溶菌液を調製した)。サルモネラ菌にはF'に対する配列の相同性がないので、P22ファージ溶菌液を用いて、第2のサルモネラ菌レシピエントであるpBAD33creをもつサルモネラ菌株 (ATCC 14028) に変異を導入した。プラスミドpBAD33creは以下の手順で構築した。creリコンビナーゼを発現する大腸菌 (*Escherichia coli*) 株NS2114から、PCR増幅によりCreリコンビナーゼをクローニングした (Seifertら、Proc. Natl. Acad. Sci. 83: 735~40 (1986))。サブクローニングしたcreリコンビナーゼ遺伝子のClaI-HindIII切断断片を、ClaI-HindIII切断したアラビノースで誘導可能なプラスミドpBAD33にクローニングした (Guzmanら、J. Bacteriol. 177 (14): 4121~30 (1995))。

【0110】

レシピエントにはF'との相同性がないので、カナマイシン耐性の形質導入体が、相同組換えではなく転移の結果であることが保証された。形質導入体はカナマイシン耐性 (30 µg/ml) を指標にルリア寒天上で選択した。pBAD33cre (図3B) 上のCreリコンビナーゼは、pBADプロモーターの強い調節制御下にあり、カナマ

イシン耐性遺伝子およびTn5トランスポザーゼ遺伝子の分離および消失は、該株をアラビノース (1 mM) の存在下で増殖させた場合に限られる。pBAD33creプラスミドは不安定であり、このプラスミドをもつサルモネラ菌株を選択なしに増殖させると第3～10世代以内に失われる。

【0111】

実施例3

DICE挿入を含む株の同定

実施例1で調製したネズミチフス菌変異体のプールを対象に、分泌型エフェクタータンパク質をコードする遺伝子群中への分離Tn5-DICEトランスポゾンを読み枠のあった挿入を、蛍光標示式細胞分取法 (FACS) で濃縮した。Tn5-DICEが無作為に組込まれたとすると、120,000個の独立したTn5-DICE挿入が生じた場合に、そのうち約1/6 (20,000個) の変異体を読み枠の合う分離した挿入断片を含むはずである。これらのうち挿入の多くは、代謝に不可欠な遺伝子群中にあると思われる。また多くの挿入がプロモーター上か、または遺伝子間の非コード領域上にあると思われる。残りの変異体のうち、極めて少数がCAPs内に含まれると思われる。ネズミチフス菌中に存在するCAPsの正確な数は不明である。CAPs中におけるDICEの挿入はまれにしか起こらないので、高感度の選択法が必要であった。適切な細胞マーカーを用いることで、FACSにより極めてまれな変異体の単離が可能となった。

【0112】

マクロファージへの感染

4～6週齢のC57B1/6マウス (H-2K^b) の大腿を切断して採取した。30ゲージの針を装着して2 mlのRPMIを充填した3 ccのシリンジを用いて大腿の両端を破碎して骨髓細胞を抽出した。骨髓細胞をRPMIで37℃において3回洗浄し、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF) 源として20% L929培地を含むRPMI 1640/10% EBS中に 1×10^6 細胞/mlになるように再懸濁した。L929培地は、L929細胞 (マウス線維肉腫、American Type Culture Collection、バージニア州マナサス) を増殖させたものを元とし、次いで増殖した細胞がコンフルエントな状態になってから7日後に培地を回収した。骨髓細胞を5% CO₂中で37℃で6日間培養してこの培養

液を、骨髓由来のマクロファージ (BMDM) に分化させた。BMDMをRPMI 1640/10% FBS中に再懸濁して、6ウェルのプレートに1ウェルあたり 1×10^7 細胞となるように分注した。

【0113】

実施例1で作製したTn-5分離SIINFEKL (配列番号: 6) ライブラリー (ネズミチフス菌) プールを用いてBMDM細胞に感染させた。Tn5-DICEトランスポゾンの独立した挿入ライブラリーを大規模に作製することで、ネズミチフス菌にコードされる各遺伝子が確実に複数の「ヒット」を受けるようにした。プールライブラリーをルリアブロス (LB) 中で37 °Cにおいて振盪しながら一晩増殖させた。次にプールライブラリーをRPMI 1640中で3回洗浄し、RPMI中に 5×10^8 細胞/mlになるように懸濁した。再懸濁後のライブラリー (20 μ l) を、吸着状態にあるBMDM細胞を含む各ウェルに分注した (MOI = 1)。MOIが1またはそれ以下とすることで、同じBMDMに対する複数の感染が制限される。インビトロにおけるネズミチフス菌への感染率は1%と予測されている。培養液を200 rpmで2分間遠心して接触を開始させた後に37 °Cで1時間インキュベートした。次に培養液を37 °Cのリン酸緩衝食塩水 (PBS、pH 7.4、9 g/l NaCl ; 0.144 g/l KH_2PO_4 ; 0.795 g/l Na_2HPO_4) で3回洗浄した。この培養液に細胞外細菌殺菌用の50 μ g/mlのゲンタマイシンを含む3 mlのRPMI 1640/10% FBSをさらに添加した後に37 °Cで2時間インキュベートした。この培養液を37 °CのPBSで3回洗浄し、細胞をプレートからかきとり、10 mlのRPMI 1640/1% FBSに再懸濁して氷中でインキュベートした。

【0114】

FACS解析

BMDM細胞をFITC接合抗H-2D^bおよびビオチン化した抗H-2K^b/SIINFEKL (5 μ g 25-D1.2) とともにインキュベートした。H-2/K^b/SIINFEKLに特異的な抗体 (25-D1.2) はジャーメイン (R. Germain) (米国立衛生研究所) から入手することができた。I-A^b ASFEAQGALANIAVDKAに特異的な抗体 (Y-ae) はレスゼック博士 (Leszek Ignatowicz) (Institute of Molecular Medicine and Genetics、Medical College of Georgia、ジョージア州オーガスタ) の厚意により提供され。細胞を抗体により30分間4 °Cで標識した。抗H-2K^b/SIINFEKLはモノクローナル抗体であ

り、クラスI拘束因子であるH-2K^bと複合体を形成した場合にSIINFEKLエピトープ（配列番号：6；Porgadorら、Immunity 6（6）：715～26（1997））のみを認識する。BMDM細胞も野生型のサルモネラ菌もこのペプチドを作らないので、分離した挿入を含む感染性サルモネラ菌株は（配列番号：6）のエピトープの供給源となる。細胞を4のPBSで3回洗浄し、1 μgのフィコエリトリン（PE）を結合させたストレプトアビジン（Cal tag）とインキュベートした。

【0115】

FACS解析を用いて、読み枠が同じ分離トランスポゾン挿入断片を、マクロファージのクラスI抗原のプロセッシングおよび提示の経路に到達している遺伝子内に含む、サルモネラ菌が感染したマクロファージを同定および単離した。サルモネラ菌-DICEライブラリーを感染させたBMDMを、マクロファージに特徴的な前方および側方の散乱集団に最初にゲートを設けてソーティングを行った。明赤色（PE-抗H-2K^b/SIINFEKL）および明緑色（FITC結合性抗H-2D^b）の集団を、ダブルポジティブ象限中で描出し、2 mlのRPMI 1640/1% FBSを含む5 mlのポリプロピレンチューブ中にソートした。ソートされた細胞を遠心し、LB/1% Triton X-100に溶解した後、LB寒天上にプレーティングし、37℃で一晩インキュベートしてサルモネラ菌-DICE株を回収した。

【0116】

CAP挿入を欠く感染BMDMは、フローソートされた細胞集団中に凝集体が形成する結果として回収することができる。回収がH-2K^b/SIINFEKLの表現型の発現によるものであることを確認するために、回収された細菌コロニーをカウントしてプールし、さらに2ラウンドのFACSによるソーティングを行ってCAP挿入片を含むサルモネラ菌変異体を濃縮した。個々の分離株についてさらに1ラウンドのFACS解析を行ってその表現型を確認した。ダブルポジティブのBMDMに感染しているサルモネラ菌を除き、増殖させて確認して配列決定を行った。

【0117】

実施例4

CAP遺伝子群の配列決定

読み枠の合うSIINFEKL（配列番号：6）挿入を含むCAPsが同一であることを判

定するために、CAP遺伝子の特異的かつ高効率の同定を可能とする特有のシステムを開発した(図4)。このシステムはまた、Tn5-DICE変異体を高効率で再形質導入してその表現型を再確認する際にも使用した。分離したTn5-DICEトランスポゾンをもつプラスミド(pAV353a)のKpnI-SacI断片を、アンピシリン耐性の自殺ベクターpGP704にクローニングしてプラスミドpAV353を得た(図4A)。

【0118】

プラスミドpAV353(amp^r tra⁺ mob⁺)で、アンピシリン耐性かつナリジクス酸感受性のドナー株である大腸菌S17λpir(Kinder, S.A.ら、Gene 136、271~5(1993))を形質転換し、また、pBAD33creをもち、自然発生的なナリジクス酸耐性でCreを発現するネズミチフス菌Tn5-DICE変異体CAP変異株と接合させた。染色体のloxP部位にプラスミドpAV353が組込まれたコピーを有するトランス接合体(amp^r nal^r)の選択を、Creリコンビナーゼで誘導後に、ナリジクス酸およびアンピシリン耐性のトランス接合体を選択することで行った(図4B)。

【0119】

染色体DNAを単離し、切断可能な複数の制限エンドヌクレアーゼ(図4A参照)の一つで37℃で2時間切断することで、元のSIINFEKL(配列番号:6)挿入に隣接する5'側または3'側のDNA配列のクローニングが可能となった。切断後のDNAをDNA精製用カラムに吸収させて制限エンドヌクレアーゼを除き、一晩15℃で連結した。アンピシリン耐性の形質転換体をTn5-DICEに特異的なプライマー

5'- GCGGATATCCACCACCACCACC-3' (ClaI, SalI, XhoI, 又はKpnI 消化)又は
5'- TATGCCCCGGGCCGTGGTGGTGG-3' (EcoRI, SacI 消化)

を用いてさらに解析した。

【0120】

大腸菌S17λpirを形質転換した場合、再連結してpAV353を含む環状断片があれば機能的なレプリコンとしてアンピシリン耐性の形質転換体が生じる。組込まれた状態のプラスミドpAV353を有する再連結した染色体断片は大腸菌S17λpir内で機能的レプリコンを形成し、元のSIINFEKL(配列番号:6)挿入(図4C)に隣接して3'側(すなわちSalI)または5'側(すなわちEcoRI)の配列のいずれかをもつ。アンピシリン耐性の形質転換体を、Tn5-DICEに特異的なプライマー

5'-GCGGATATCCACCACCACCACC-3' (ClaI, Sall, XhoI, 又は KpnI 消化) (配列番号 1)

又は 5'-TATGCCCCGGCCGTGGTGGTGG-3' (EcoRI, SacI 消化) (配列番号 2)

を用いてさらに解析した。

【0121】

表1に示すようにTn5-DICEトランスポゾン（図2）ではマクロファージおよび腸管上皮細胞系列におけるクラスI-MHC到達可能なネズミチフス菌のタンパク質の同定が可能である（実施例4参照）。宿主細胞のクラスI経路に達しないと予測されるネズミチフス菌のタンパク質が同定された。さらに少なくとも一例では、ネズミチフス菌に固有の細菌のエフェクタータンパク質が細胞質に分泌されていることが認められた（LS28）。同定した各CAPに対する免疫応答の特性を解析することで特異性の高いキャリアワクチンを構築し、特定の病原菌のライフサイクルに合わせた免疫応答が可能になると考えられる。

【0122】

実施例5

DICE法の確認

DICEスクリーンの妥当性を確認するために複数の検討を行い、同定されたCAP エピトープが抗原提示細胞（APC）の表面に存在することと、変異体がT細胞に特異的な免疫を刺激可能であることを保証した。さらに、抗原送達経路を調べて、DICE変異体により送達されたタンパク質が、選択的抗原プロセッシングおよび提示の経路によりクラスI MHC経路に到達可能か、もしくはファゴリソソーム障壁を越えた移行により内因性経路に直接入るのかを判定した。

【表1】 DICEで同定されたサルモネラ菌の遺伝子群

株	遺伝子	Comp*	細菌	CMT-93	機能/ホモロジー
LS28	ams**	S	<i>S.t., S. typhi</i>	+	プロテアーゼ IV
SIIN16	argT	P	<i>S.t., S. typhi, E.c.</i>	-	アルギニン輸送
SIIN17	fhuA	P	<i>S.t., S. typhi, E.c.</i>	-	鉄輸送
SIIN27	S2OMP	OMP	<i>S.t., S. typhi, E.c., K.p.</i>	-	外膜タンパク質
SIIN15	hspG	S?	<i>S.t., S. typhi, E.c.</i>	+	高温熱ショックタンパク質
SIIN29	hemK	C	<i>S.t., S. typhi, E.c.</i>	-	ヘム合成
SIIN50	ims75	S	<i>S.t., S. typhi</i>	+	マクロファージ生存不能、MIP
SIIN61	ORF	S	<i>S.t., S. typhi</i>	+	不明
SIIN71	hemL	C	<i>S.t., S. typhi, E.c.</i>	-	ヘム合成

S.t. = ネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium*) ; S.typhi = チフス菌 (*Salmonella typhi*) ; E.c. = 大腸菌 (*E.coli*)

【0123】

蛍光顕微鏡

サルモネラ菌のDICE株LS28に、緑色蛍光タンパク質 (GFP) を構成的に発現するプラスミドをトランスフェクトした。分離したネズミチフス菌/SI INFEKLのこの株 (LS28GFP) を用いて、H-2K^b拘束性BMDMにインビトロで感染後、実施例2に記載した方法を用いたモノクローナル抗体25-D1.2を用いて蛍光標識を付けた。感染BMDM細胞は、広視野の蛍光イメージングを用いて描出した。H-2K^b/SI INFEKL複合体が細胞表面で観察され、BMDMがSI INFEKLエピトープ (配列番号: 6) をLS28GFPに由来することがわかった。

【0124】

抗原プロセシングの経路を調べるために、単離した複数のDICE変異体を用いて、H-2K^b拘束性マウス腸上皮系列CMT-93 (ATCC、バージニア州マナサス、カタログ番号CCL-223) に感染させた。CMT-93は、オボアルブミンエピトープが細菌の細胞内で発現する際に、サルモネラ菌によって送達された抗原を提示することができないので、CMT-93細胞が別の抗原プロセシング経路をもたないことが示唆される。CMT-93がSI INFEKL (配列番号: 6) をその細胞表面に提示することの最も可能性の高い説明は、このエピトープがIII型分泌タンパク質との融合体として内因性経路に直接送達されるというものである。

【0125】

H-2K^b/SI INFEKLに特異的なCD8⁺ T細胞ハイブリドーマB3Z (Karttunenら、Proceedings of the National Academy of Sciences 89: 6020~24 (1992)) はレポーター細胞であり、リガンドに遭遇すると青色に変わる。H-2K^b/SI INFEKL複合体がCMT-93の表面に存在することを示す指標としてB3Zを使用した。青色のB3Z細胞が認められれば、H-2K^b/SI INFEKL複合体が、特異的なT細胞受容体により認識されることが、細菌のタンパク質により送達されることがわかる。

【0126】

CMT-93細胞 (3×10^4 細胞/ウェル) の単層にMOIが1になるように96ウェルの組

織培養プレート上でLS28を感染させた。培養液を37℃で1時間インキュベートし、非浸潤性のサルモネラ菌を洗浄し、ゲンタマイシン (50 µg/ml) を含む新鮮な培地を添加した。この培養液に 3×10^4 細胞/ウェルのB3Z細胞を添加し、遠心して細胞どうしの接触を開始させた。培養液を37℃で6時間インキュベートした後、各ウェルを洗浄して固定処理を行い (2%ホルムアルデヒド/0.2%グルタルアルデヒド)、現像用緩衝液 (1 mg/ml X-gal ; 5 mM $K_3Fe(CN)_6$; 5 mM $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$; 2 mM $MgCl_2$) 中でインキュベートした。この細胞を光学顕微鏡で観察した。青色のB3Z細胞が存在すれば、SI INFEKLエピトープが宿主細胞の細胞質に対する直接の標的であることを意味する。このデータが有意である理由は、サルモネラ菌が移行装置を用いてこれらのタンパク質を標的として細胞質に送ることを示しているためである。このようなデータは、サルモネラ菌によるクラスI MHC経路への到達が、細胞のタイプに依存することを示している。

【0127】

B3Zの刺激が特異的であること (B3Zがサルモネラ菌に感染したCMT-93細胞に遭遇した場合のみT細胞に特異的な免疫の刺激がみられること) を確認するために、広視野蛍光顕微鏡を用いてCMT-93 : B3Zの相互作用を描出するために同様の実験を行った。CMT-93細胞 (2×10^5 /ウェル、チャンバーカバーガラス番号1.5) にLS28GFPを感染させ (37℃、1時間、MOI = 10)、ゲンタマイシンを含む培地 (50 µg/ml) を添加した。培養液をB3Z T細胞ハイブリドーマ (2×10^5 細胞) とともに分注して37℃で12時間インキュベートした。培養液をPBSで3回洗浄し、蛍光色素 (TMA-DPH、Molecular Probes) およびβ-ガラクトシダーゼ (C_{12} FDG、Molecular Probes) で細胞膜を染色し、Advanced Precision Instrumentsのデコンボリューション顕微鏡で描出した。B3Zの刺激はB3Zと感染CMT-93との同起源の相互作用に依存していた。この結果から、細菌タンパク質が移行していることの視覚的証拠が得られた。これらの結果から、宿主細胞のクラスI MHC経路に直接到達するタンパク質の単離にDICE解析が使用可能であり、これが細胞のタイプに特異的であることがわかる。さらに、DICE株は、DICE株が存在するために特異的なT細胞応答を刺激する。

【0128】

β-ガラクトシダーゼアッセイ法

感染細胞が、T細胞レポーターに抗原を提示できる能力についてもβ-ガラクトシダーゼアッセイ法を用いてアッセイした。T細胞レポーターとは、クラスI MHC対立遺伝子H-2K^bという状況において提示された場合にSIINFEKLエピトープを認識するT細胞ハイブリドーマ（T細胞と腫瘍細胞が融合したもの）である。T細胞がSIINFEKL/H-2K^b複合体に遭遇すると、β-ガラクトシダーゼの合成が開始される。基質（X-gal）の存在下でインキュベートすると、細胞は青色に変わる。細胞は、この特異的な相互作用が生じた場合にのみ青色に変わる。H-2K^b拘束性上皮細胞（ATCC番号CCL-223）に、フローサイトメトリー解析で単離した複数のサルモネラ菌株を、実施例2で上述した方法により感染させた。次にこの細胞に 1×10^7 CPU（MOI=100）で、実施例2で単離された複数のDICE変異体のそれぞれを感染させた。37℃で1時間後にウェルをリン酸緩衝食塩水（PBS）で3回洗浄し、 1×10^5 個のB3Z細胞を添加した。200×gで2分間遠心して細胞どうしの接触を開始させた。この培養液を37℃/5% CO₂の環境で6時間インキュベートした。細胞を次にPBSで3回洗浄して1%ホルムアルデヒドと0.2%グルタルアルデヒドを含むPBS溶液中で4℃で5分間かけて固定処理を行った。次に細胞に1 mg/ml X-gal、5 mMフェリシアン化カリウム、5 mMフェロシアン化カリウム、および2 mM MgCl₂を含むPBS溶液を添加した。細胞を37℃で一晩インキュベートして顕微鏡を用いて青色細胞の有無を調べた。

【0129】

複数のサルモネラ菌のクローンが青色に変わり、SIINFEKLエピトープが感染後にサルモネラ菌によりファゴリソソーム障壁を越える方向に活発に向けられることと、クラスI MHC経路による処理を受けるようになることがわかった。

【0130】

実施例6

インビボにおけるT細胞免疫

宿主細胞の内因性経路への到達から、宿主のクラスI MHCのプロセッシングおよび提示経路が推測される。CAPs内に抗原を有するワクチンは抗原特異的な細胞性免疫応答を刺激できるはずである。このような抗原に対するインビボにおけるT

細胞免疫は、このようなワクチンのもつ適切な応答を刺激する能力の尺度として非常に優れている。

【0131】

C57B1/6マウスを複数のDICE株で経口的に免疫した。簡単に説明すると雌のC57B1/6マウス(6~8週齢)を経口胃管栄養法で各サルモネラ菌DICE変異体につき 1×10^7 CFUとなるように免疫した。

【0132】

このような株のもつT細胞応答をインビボで刺激する能力は、従来のCTLアッセイ法、H-2K^b/SIINFEKLテトラマー分析(NIH AIDS Reagent Programから入手したK^b/SIINFEKLテトラマーを使用)、および腫瘍保護アッセイ法で評価することができる。T細胞免疫の尺度のこのような組み合わせを用いることで、抗原特異的なT細胞集団の刺激と、これらのT細胞が機能しているか否かの両方が確認される。H-2K^b/SIINFEKLテトラマーは、ワクチン接種が免疫した動物におけるT細胞に及ぼす影響を評価する際に極めて感度の高い方法をもたらす。陽性の作用は、免疫後の総抗原特異的T細胞の増加によって明らかになると考えられる。しかしながら、免疫後の抗原特異的なT細胞の増加からは、これらの細胞の機能に関して得られる情報はほとんどない。抗原特異的な集団を免疫により刺激したと仮定すると、刺激された細胞がその標的を死滅させない場合は、ワクチンはほとんど構築されないと考えられる。CTLアッセイ法では、抗原特異的なT細胞集団の機能性に関する必要かつ正確な尺度が得られる。SIINFEKLエピトープを発現する腫瘍細胞が、このアッセイ法の標的として使用される。ワクチンが抗原特異的なT細胞集団を刺激し、これらの細胞が効率的にその標的を死滅させた場合、ワクチンは有効に防護免疫応答を生じるとみなすことができる。

【0133】

実施例7

異種抗原乳癌ワクチンの構築

本発明の転移因子を用いることで、ワクチン開発の有益な標的となると考えられるCAPsの迅速な同定が可能となる。CAPsは宿主の免疫系に到達するので、ウイルス、細菌、および癌に対するワクチンは、防護用エピトープ(例えば外来感染

性病原体または癌細胞に由来するタンパク質の断片)をAPCの細胞質区画に直接指向するワクチンキャリアとしてCAPsを用いることで構築することができる。宿主細胞のクラスIまたはクラスIIの経路に対する到達は、多くのタンパク質が誘引性のワクチン標的としてはたらきうることを示している。サルモネラ菌のワクチン株が発現する異種抗原は、動物およびヒトにおいて防護免疫応答を誘導する可能性がある。異種抗原特異的免疫は、局所性および全身性のTh1またはTh2タイプの免疫応答の両方の場合がありうる。

【0134】

CAPsのはたらきでAPCの細胞質区画に直接蓄積したHER2/neuに由来するHLA-A2拘束性エピトープは良好なMHCクラスI提示となり、そのために細胞性免疫の誘導を大きく促す可能性がある。Her2/neuは上皮成長因子様のタンパク質であり、その発現増加は様々な乳癌および他の組織の癌と関連する。強固かつ持続性の細胞性免疫応答を生じることが、HER2/neuが上昇した乳癌などの腫瘍に対する防護免疫に不可欠である。本実施例では図2に示すTn5-DICEトランスポゾンの異型を用いたHER2/neu/SOB (HER2/neu/String of Beads) 挿入断片の構築、およびネズミチフス菌の染色体全体への送達について説明する。

【0135】

HER2/neu/SOBライブラリーの構築

HLA-A2拘束性HER2/neuエピトープを含むエピトープ挿入のライブラリーを作製するためにトランスポゾンシステムを開発した(図5)。HER2/neu/SOBは、6×ヒスチジン部位、HLA-A2拘束性HTLV-1 taxエピトープであるLLFGYPVYV、および3つのHLA-A2拘束性HER2/neuエピトープであるHER2/neu₍₃₆₉₋₃₇₇₎、HER2/neu₍₇₇₃₋₇₈₂₎、およびHER2/neu₍₆₅₄₋₆₆₂₎を有する。Tn5-HER2/neu/SOBの読み枠の合う挿入が分離することで、各エピトープをコードする81アミノ酸の産物が得られる。

【0136】

野生型のネズミチフス菌(14028s株)を最初に用いて、弱毒化変異とDICE挿入間の相互作用を避ける。抗原を最良に提示する株におけるDICE挿入を例えば他の3種の背景をもつ株に導入して、HLA-A2.1トランスジェニックマウスにおける免

疫応答を試験する。弱毒株はaroAに変異があると思われる。AroAは芳香族アミノ酸の生合成経路にかかわる酵素である。aroA遺伝子座に変異が生じると、サルモネラ菌ワクチン株を用いた治療法が著しく弱まり、ワクチン株のもつ散在能力が小さくなって疾患が引き起こされる。または弱毒化株であるCL401またはCL553を使用することができる（2種のネズミチフス菌株は当研究室で見出された株で病原性が大きく弱められている。変異の遺伝子座は不明である）。aroAが使用可能である理由は、芳香族アミノ酸の生合成上の複数の変異が最良のチフス菌ワクチンの一種であると考えられるCV908（チフス菌（*Salmonella typhi*）のワクチン株）で使用されるためである。

【0137】

上記の実施例1～3で述べた方法を用いて、F'::HER2/neu/SOBを含むサルモネラ菌株の溶菌液を調製するためにP22を使用する。ネズミチフス菌の変異体のプールを対象に、上述のFACSを以下のように改変することでCAPs内におけるHER2/neu/SOBカセットの読み枠の合うの挿入について濃縮する。

【0138】

HTLV1 taxのクラスIの提示を促進可能なサルモネラ菌分離株の同定

ペプチドをSOBペプチドを含むサルモネラ菌株ライブラリーからクラスI経路に指向する、サルモネラ菌のSOB含有タンパク質はHTLV 1 tax/A2.1に特異的なモノクローナル抗体を用いて同定することができる。

【0139】

H-2K^b/HLA-A2⁺トランスジェニックマウス（C57B1/6のバックグラウンドを有する）から単離したBMDMを6ウェルの組織培養用プレートに分注し（ 1×10^7 細胞/ウェル）、プールしたネズミチフス菌/HIV-1/SOBライブラリーを感染させた（37℃、MOI = 10）。1時間後に細胞を洗浄し、RPMI 1640/10% FBS（ゲンタマイシン、50 µg/ml）を重層し、2時間インキュベートする（37℃）。細胞を回収して洗浄し、10 mlのRPMI 1640/1% FBSに懸濁する。BMDMを、FITC結合性抗H-2D^b（Caltag）およびビオチン化したA6-TCRキメラ抗体（HTLV-1 taxエピトープLLFGYPVYVと複合体を形成したHLA-A2を認識するキメラ抗体）（Jonathan Schneck博士（Johns Hopkins University）より入手；O'Herrinら、Journal of Experimental Medi-

cine 186 (8) : 1333 ~ 45) で標識し、HLA - A2に関する状況では、taxペプチドを提示するクラスI発現細胞にタグを付ける。次にビオチン化したA6-TCRをPEストレプトアビジン (Cal tag) で標識する。BMDMをRPMI 1640/1% FBS (4) に再懸濁し、FACS解析でH-2D^b とA6-TCRとともに発現する集団に対するゲートを制御してソーティングを行う。ソーティングした細胞から回収した細胞を沈澱させて、1% triton X-100を含むLBブロス中に溶解した後に、上記の実施例2で記載した通りにLB寒天培地にプレーティングした。

【0140】

読み枠のあったHER2/neu/SOB挿入断片を持つ遺伝子を同定するために、配列解析用のDNA鋳型を、TAIL PCR法を一部改変した方法で作製した (実施例3を参照) 。この方法では、分離したHER2/neu/SOB挿入断片内で開始する一連のタンデムのオリゴヌクレオチドを使用し、エピトープ挿入断片を増幅して挿入断片に隣接する領域を同定する。全体のサイクリング手法は、1次、2次、および3次の一連の反応条件として順次実施される。1次条件と2次条件は100 μ lの容量で行う。すべてのサイクリング条件は公開されている (LiuおよびWhittier、1995) 。簡単に説明すると、この方法では、複雑な一連の溶解法およびアニーリング法を用いて、挿入断片に隣接する配列を決定する。これを行うためには3種のタンデムプライマーを用いて挿入断片上を「歩き」、4番目のランダムプライマーから増幅を行う。増幅後に断片をゲルで精製して配列決定用ベクターにクローニングする。

【0141】

または一つのCAP挿入を含む個々の分離菌から染色体の調製を行う。1 μ gの染色体を制限酵素Pst Iで1時間37 °で切断して精製する。次にリガーゼを加えて15 °で一晩かけてこの染色体を連結する。次に環状化した混合物を対象に、プライマー

CTACTAGTATGGATGGTGTC 及び CTAGAACCAGAT GTGTATAAG

を用いてinverse PCRを行う。PCR混合液組成のは以下の通りである : 1 mMの各プライマー、10 ngの鋳型、0.2 mMのdNTP (dATP、dCTP、dGTP、dTTP) 、0.5 UのTa

qポリメラーゼ、10 μ lの10×PCR緩衝液、1 mMのMgCl₂、およびH₂O（最終容量100 μ l）。サイクリング条件は、溶解（95 30秒）、アニーリング（55 1分）伸長（72 3分）の35サイクルとする。

【0142】

実施例8

異種抗原乳癌ワクチンの特性解析

実施例7で説明したネズミチフス菌のHER2/neuワクチン株を構築した後に、HLA-A2トランスジェニックマウスにおける、ワクチンのもつエピトープ特異的な細胞免疫応答の誘導能力の特性を解析して定量を行った。サルモネラ菌ワクチンシステムの利点の一つは、適切に小さな動物モデル（マウス）において開発したワクチンコンストラクトの安全性および有効性を評価することができる点である。

【0143】

ワクチン候補は、以下の基準を元に選択することができる：1) CAPsタンパク質をコードする遺伝子がネズミチフス菌とチフス菌間で保存されていなければならない（サルモネラ菌ゲノムプロジェクトで判定する）；および2) エピトープ挿入を有するCAPsは、繰り返し行う個別のフローソーティングで回収可能でなければならない。過去に行われた実験ではH-2K^bにおけるSIINFEKLを最終的に提示する遺伝子挿入を含むすべての株は二度目に回収された。他の基準が使われる場合もある。

【0144】

実施例7のように単離されるネズミチフス菌のHER2/neu/S0Bワクチン株を使用して、K^b/HLA-A2トランスジェニックマウスを経口的に免疫する。このマウスは経口胃管栄養法で 1×10^7 の感染性ユニットのサルモネラ菌で免疫した。次に各ワクチンにより生じた応答を以下の方法を用いて後に分析する。

【0145】

HLAテトラマーの構築、およびエピトープ特異的なT細胞の解析

ワクチン接種に対するT細胞の応答は例えばワクチン接種を行ったHLA-A2トランスジェニックマウス、模擬ワクチン接種を行った同マウス、およびワクチン接種を行わなかった同マウスの脾臓および腸間膜リンパ節に由来するT細胞集団を

対象としたHLAテトラマー分析を行って最初に評価される。使用したHLA-A2トランスジェニックマウスは、シェルマン (Linda Sherman) 博士 (Scripps Institute、カリフォルニア州ラホーヤ) の厚意により提供された。個々のHER2/neuエピトープに対するクラスI応答を評価する際には、個々のHER2/neuエピトープに一種の無関係な対照を加えたものを含むHLA-A2テトラマーを使用する。HLA-A2および β 2-ミクログロブリンを発現するプラスミドは、アルトマン (John Altman) 博士 (Emory University) から入手可能である。またテトラマーは、米国立衛生研究所 (メリーランド州ベセスダ) のAids Reagent Repositoryから入手可能である。個々のネズミチフス菌のHER2/neu/SOBワクチンで免疫した K^b /HLA-A2マウスの分離直後の脾臓細胞および腸間膜リンパ節に由来する細胞に、FITC結合性抗CD8および個々のPE標識HLA-A2テトラマーで標識を付ける。具体的には 1×10^6 個の細胞を、 $1 \mu\text{g}$ の各テトラマーおよび $5 \mu\text{g}$ の抗CD8抗体で30分間4℃で標識する。テトラマーの陽性CD8集団のエフェクターの状態はさらにCD28、CD44、およびCD62の発現レベルを評価して特性を解析する。これらのマーカーはエフェクター細胞の分化の状態を示す特徴となる。各細胞集団をそれぞれ $1 \mu\text{g}$ のマーカーで30分間4℃で標識する。CD8⁺/CD44^{lo}/CD62⁺の表現型は、脾臓エフェクター細胞の記憶集団と相関する。このデータから、ワクチン接種に対する細胞応答の性質の特性を解析する。理想的なワクチン候補は、ワクチンを設計する元となった感染性病原体による再刺激後に速やかな発現増加能力をもつ強固な記憶CTL集団を産生するはずである。

【0146】

標的を発現するHIVエピトープのCTLの溶解

腫瘍エピトープを有する K^b /HLA-A2トランスジェニックマウスへのワクチン接種の結果として生じるエピトープ特異的なT細胞には、ヒトのHLA-A2⁺腫瘍標的の死滅を仲介する能力がある。サルモネラ菌ワクチン株が有するHER2/neuに特異的なCTL産生能力を評価するために、ワクチン接種の結果として生じたCTL集団の溶解能を測定することを目的としたアッセイ法が使用可能である。HER2/neuに対する特異的な免疫応答を測定するためには、クロム放出アッセイ法を使用してワクチン接種マウスで生じたCTLが有する、HER2/neuが上昇したHLA-A2⁺腫瘍標的 (Or

egon Health Sciences Universityの腫瘍バンクから入手)の死滅能力を測定することが利用できる。クロム放出アッセイ法は、活性化した細胞傷害性T細胞による標的死滅能力を決定する際に用いられる標準的な方法である。簡単に説明すると、標的細胞に Cr^{51} を充満させて洗浄し、エフェクターと標的との比が1:1~1:10,000の範囲になるようにT細胞とともにインキュベートする。死滅については、インキュベート後のさまざまな時間において培養液上清中に放出される放射性クロム量が尺度となる。未感作動物および感染動物から脾臓を感染後14~49日にマウスから採取し、またテトラマー解析用とCTLアッセイ用に脾臓細胞を回収する。CTL応答を観察する前に2次的な刺激を必要とする場合がある。個々のHLA-A2拘束性HER2/neuエピトープまたは無関係なエピトープのいずれかを充満させたT1 (HLA-A2⁺-H-2^d) 標的細胞を使用することができる。T1細胞は大量のHLA-A2を発現してHLA-A2拘束性エピトープを充満させやすいことから良好な2次的刺激因子となる。別の刺激方法には、コンカナバリンAとともにインキュベートする方法や、抗CD3抗体を用いてT細胞受容体を介する方法がある。コンカナバリンAは植物の分裂促進因子の一種でありT細胞を広範に刺激する。抗CD3は抗原提示細胞との相互作用に似せることで同様にT細胞を刺激する。各エピトープに対するHLA-A2テトラマー陽性のT細胞クローンは単離して保存することができる。

【0147】

実施例9

異種抗原HIVワクチンの構築

Tn5-DICEを一部改変してHIV-1ワクチンを構築した。図6に示すように、ワクチンTn5-HIV 1/SOB (ヒト免疫不全ウイルス/ビーズの紐 (human immunodeficiency virus 1/string of beads)) は、6×ヒスチジン部位、HLA-A2拘束性HTLV-1 taxエピトープ、および5つのHLA-A2拘束性HIV-1エピトープ (p17₇₇₋₈₅; p24₁₉₃₋₂₀₃; RT₂₆₇₋₂₇₇; gp160₃₁₃₋₃₂₂; およびnef₇₁₋₈₀) を有する。Tn5-HIV 1/SOBの読み枠の合う挿入片が分離すると、各エピトープをコードする109アミノ酸からなる産物が生じる。

【0148】

Tn5-HIV 1/SOBコンストラクトをNaI⁺サルモネラ菌レシピエントに接合により

移し、実施例1および実施例6に記載した方法でP22を用いてプール溶菌液を作製した。ファージ溶菌液を使用してネズミチフス菌（野生株14028s株）およびチフス菌（Ty21aワクチン株）に変異を誘導した。適切なCTL応答を誘発するサルモネラ菌の分子を選択して、防護免疫応答の誘導能力についてさらに検討する。有効性に関する2つの尺度を、これらのワクチンの有効性を評価する際に考慮することができる。第一の尺度は、このワクチンがエピトープを発現する細胞に対して防護免疫応答を誘発する可能性の有無であり、第二の尺度は、これらのワクチンが、ウイルス負荷に対して防護応答を誘発する可能性である。既に概説した方法の差が、インビトロおよびインビボにおけるワクチンの有効性を評価する際に使用される。

【0149】

実施例10

DICE-IおよびDICE-IIのトランスポゾームの構築

図2に示したTn5-DICEトランスポゾン、多様な差のある因子群を受容するように作製可能である。例えば、サルモネラ菌のタンパク質群（または上述した多様な感染性細菌のタンパク質群）を同定するために使用可能なトランスポゾームで、そのサイクルがクラスIまたはクラスII（MHC、HLA）の経路に入るものを作製することができる。サルモネラ菌のタンパク質で、そのサイクルがMHCクラスIまたはクラスIIの経路に入るタンパク質を同定するために使用可能なトランスポゾームには、例えばそれぞれDICE I（図7）およびDICE II（図8）がある。Tn5を基礎とする元のDICEトランスポゾンは、DICE-IとDICE-IIでは、トランスポザゼを除くことで修飾された。トランスポザゼを除くことで多くの利点が得られる。例えば挿入が安定し、ライブラリー構築の効率が改善される。この理由は、プロセスにおける多くの段階—例えば接合段階—が省かれることによる。トランスポザゼを除去すると、トランスポゾンが使用可能となる細菌の範囲も広がる。トランスポゾームの細菌染色体への組込みは、簡単なエレクトロポレーション法で行うことができる。図7と図8に示すトランスポゾームは過剰な二次構造も除く。Tn5-DICEにみられるこのような二次構造は、PCRおよびクローニングをやや複雑にしていた。固有の5'側および3'側のプライマー部位を付加することでinve

rse PCRが可能となっている。I末端およびO末端はモザイク配列に変えられており、効率のよいトランスポゾーム構築が可能となっている。

【0150】

DICE-IはオボアルブミンエピトープSIINFEKLを含み、MHCクラスI経路のサイクルに入る細菌タンパク質を同定する。一方で他のMHCクラスIエピトープ—例えばHTLV-1 taxエピトープであるLLFGYPVYV（配列番号：7）—を使用することができるほか、当技術分野で既知の他のエピトープを使用することも可能である。

【0151】

DICE IIは、I-A^b拘束性T細胞エピトープであるASFDAQGALANIAVDKA（配列番号：8）を含む。一方で、他のMHCクラスII拘束性エピトープを使用することができる。例として、抗I-A^k/鶏卵リゾチーム（Hen Egg Lysozyme）（HEL₄₆₋₆₁）または抗I-A^k/鶏卵リゾチーム（HEL₁₁₆₋₁₂₉、アクセッション番号LZCH）のモノクローナル抗体などが挙げられる。

【0152】

細菌抗原のプロセッシングは複雑であり、細胞の種類に依存する。細菌に対する宿主の免疫には、CD8とCD4の応答が必要である。CD8とCD4は一般には免疫応答における個別の役割を果たす。CD8細胞は細胞免疫応答を代表し、CD4細胞は液性（抗体）免疫応答を代表する。このような応答を刺激する抗原は宿主細胞によって異なるプロセッシングを受ける。細菌抗原がプロセッシングを受ける複数の経路があることから、宿主免疫のより詳細な理解は、各経路内における細菌抗原の到達可能性を決定することで得られると思われる。このため、複数のツールを、クラスII MHC経路内における抗原のプロセッシングを検討する方法に使用するために設計することができる。このような方法を採用することで、キャリアタンパク質を動員して抗原をクラスII MHC経路に送達することで、より有効なワクチンの構築が可能となる。この方法はクラスI MHC経路に関して既に詳述した実験と同様に、ただし、MHC IIの核酸配列が転移因子に含まれる点とMHC IIに特異的な結合剤をアッセイ法で使用する点を除いて行われる。

【0153】

実施例11

その他の異種抗原ワクチンの構築

エピトープをサルモネラ菌のゲノム上に広範囲に散在させ、防護免疫応答を誘発するキャリアタンパク質を同定して使用することで、強力なワクチンを構築することができる。サルモネラ菌は複数の多様な組織で散在性の感染を引き起こす。本発明の転移因子は様々な組織で発現する遺伝子群を同定するために使用することが可能であり、また組織特異的なキャリアタンパク質をキャリアとして使用することで、免疫応答に合わせたワクチンを構築することができる。

【0154】

実施例12

他の転移因子

蛍光タンパク質の挿入

Tn5-DICEトランスポゾンならびにDICE-IトランスポゾームおよびDICE-IIトランスポゾームの異型を、蛍光タンパク質をコードする一つまたは複数の遺伝子をもたせるように構築することができる。このようなトランスポゾンが読み枠を維持しながら任意の遺伝子に挿入されることで、強化型蛍光タンパク質—例えばGFP（アクセッション番号U55761）および赤色蛍光タンパク質（アクセッション番号U70496）—をもつ融合タンパク質を作ることができる。本明細書におけるGFPは、野生型のタンパク質およびスペクトルがシフトしたその変異体の両方を意味する。これは例えばツィエン（Tsien）、1998、Am. Rev. Biochem. 67:509、ならびに、ツィエンおよびハイム（Heim）による米国特許第5,777,079号および5,625,048号に記載されている。これらは参照として本明細書に組み入れられる。アスパリジニル（Asparaginyl）エンドペプチダーゼの切断部位があることで、蛍光タンパク質を融合産物から切断することが可能となり、立体構造のゆがみは避けられ、タンパク質が蛍光を発することができる。GFP遺伝子は、DICE-IIに含まれるI-A^b拘束性T細胞エピトープであるASFEAQGALANIAVDKAと同じ位置に内に置かれる可能性がある。GFP遺伝子またはRFP遺伝子を修飾して終結シグナルを除去すれば、挿入および分離後に転写および翻訳の読み過しを可能とすることができる。

【0155】

一つまたは複数の蛍光体を添加することで、系の宿主細菌の範囲を大きく広げることができると思われる。この理由は、実施例2で記載したように組織ホモジネートのFACS解析により、インビボにおける発現遺伝子群の同定が可能になると思われるためである。このようなトランスポゾン/トランスポゾームの異型で同定されるタンパク質産物は、ヒトおよび動物に病原性があるこれまで遺伝学的に扱いにくかった微生物における有効な細菌ワクチン抗原の同定に使用することができる。このようなトランスポゾン/トランスポゾームの異型は、蛍光標識を付けた感染性宿主細胞のソーティングを直接的に行うことで、分泌型細菌抗原の同定に使用することができる。

【0156】

カスタマイズされたエフェクタータンパク質

Tn5-トランスポゾンならびにDICE-IトランスポゾームおよびDICE-IIトランスポゾームの異型は、カスタマイズされた宿主エフェクター分子群を送達するための細菌キャリアワクチンを作製するために遺伝子操作することができる。例えば宿主の情報伝達分子の断片または全体を、ワクチン取り込み後に宿主細胞に送達することで、免疫応答がより効率のよい応答に対して歪むおそれがある。候補となる情報伝達分子には、Jak/Stat経路にかかわる分子群が含まれるがこれらに限定されない。

【0157】

免疫応答に適切にバイアスをかける能力を有するワクチンでは、従来型のワクチンでみられる多くの悪い副作用が避けられる。さらに、ワクチンは急性の病原体感染を治療する目的で構築することができる。このようなタイプのワクチンに対する応答は、迅速、強力、特異的であり、さらに一過性なものとなる場合がある。このようなタイプのワクチンは、生物兵器暴露を扱う一手法として、軍関係者にとって理想的である。

【0158】

多価ワクチン

上記の実施例で記載した一種以上の生物からエピトープを送達するワクチンの異型を作製することができる。多価ワクチン構築にはサルモネラ菌を使用するこ

とができる。これはサルモネラ菌にワクチン抗原をコードする大量の補助的なDNAを保持する能力があるためである。DICEシステムの強みは、複数のエピトープを組み合わせるための適切なキャリアタンパク質の同定能力にある。

【0159】

病原体感染の多くは初期感染とは異なる他の微生物の増殖を増強する。このようなワクチンは「ワンショット」による防護法に使用することができる。

【0160】

宿主受容体の送達

宿主細胞表面に局在する分子を送達するトランスポゾン/トランスポゾームの異型を作製することができる。このようなコンストラクトには少なくとも2つの潜在的な用途がある。第1に宿主細胞表面に分泌型タンパク質の存在を確認することで、感染後に分泌型細菌タンパク質を同定することができる。第2にこのような異型は、キメラ情報伝達分子群（細胞表面に結合して外部シグナルに応じて細胞内情報伝達を開始する分子群）を送達可能であると思われる。例えばワクチンを送達することは、任意の薬剤による治療後の応答を次に活性化させる。このためAPCに抗原を充満させて免疫応答を増強することができる。

【0161】

α - ω 相補性

β -ガラクトシダーゼの α 断片をコードするトランスポゾン/トランスポゾームの異型を作製することができる。多くの細菌は分泌型タンパク質の解析には適していない。これはMHC拘束による分泌型遺伝子群の同定が可能なツールが使用できないためである。このようなトランスポゾン/トランスポゾームの異型では、 β -ガラクトシダーゼの α 断片を含む融合タンパク質を細菌が分泌可能となる。宿主細胞（またはトランスジェニックの宿主動物）が β -ガラクトシダーゼの ω 断片を発現するために、分泌されたタンパク質が検出されうる。分泌型の α 断片および宿主の ω 断片が接触すると機能的な β -ガラクトシダーゼ複合体となり、様々な酵素基質を用いて相互作用を描出することができる。例えば基質となる C_{12} FDG（Molecular Probes、番号I-2904）は、機能的な β -ガラクトシダーゼで切断されると蛍光を発する。または、広く使用されている基質であるX-galを使用

して、活性のある β -ガラクトシダーゼを細胞内で描出することも可能であると思われる。このようなシステムを用いることで、さまざまな宿主組織中で蛍光細菌の有無を判定して動物の個体全体を対象として病原性を検討することができる。さらに、細菌タンパク質の組織特異的な分泌を決定して、適切な宿主の区画で抗原を分泌するキャリアワクチンを最適化することが可能であると思われる。

【0162】

実施例13

転移因子の他の用途

本発明の転移因子はまた、サルモネラ菌のワクチンキャリア株を修飾して、Jak2またはTyk2などの真核エフェクタータンパク質をCAP融合体として送達することで、運ばれた抗原に対する免疫応答を増強するためまたは歪めたりするために使用することもできる。このような転移因子から作られる変異体は、組織特異的なサルモネラ菌のCAPsを同定するのに使用することが可能で、運ばれた抗原に対する免疫応答のタイミングを調節するのに有用であると考えられ、そのためさまざまな病原体のライフサイクルにより適した高感度の免疫応答を生じるとと思われる。例えばJAK2（宿主のキナーゼの一種）は、細胞性免疫応答を促進するサイトカインの発現を最終的に増加させる情報伝達カスケードを開始する。原理的には、このようなトランスポゾンを作製してJAK2（またはJAK2の一部）を送達して、細胞性免疫が支配的である免疫応答に対してバイアスをかけることができるとと思われる。

【0163】

実施例14

機能ゲノム学

病原体ゲノムの配列を決定することで、多種多様な生物体のライフサイクルに関して有用な知見がもたらされる。一方でこのようなプロジェクトから得られるデータでは、機能未知の遺伝子群が40%ほどあることを示している。したがってゲノムプロジェクトで同定された遺伝子群に機能を速やかに割り付ける手法が必要である。本発明の転移因子は、6×ヒスチジン部位などのアフィニティータグをもつように構築することができるので、免疫局在性を調べることにより、ゲ

ノム配列決定プロジェクトで同定された遺伝子群の機能に関する有用な知見を引き出すことができる。

【0164】

実施例15

カスタマイズされたエフェクター分子群の構築

情報伝達カスケードにより特定の免疫応答が誘導される。DICEは宿主細胞の細胞質に到達するタンパク質を同定する。DICE技術を用いることで、免疫応答を歪める機能をもつと思われるカスタマイズされたエフェクター分子群を構築することができるほか、病原体の除去に適した細菌キャリアワクチンを作製することができる。

【0165】

実施例16

診断用タンパク質の同定

これまでにない毒性のより強い細菌株が出現しており、生物テロの恐怖とあいまって、さまざまな病原体の迅速かつ正確な同定を可能とする標的が強く求められている。DICEを用いることで、感染過程で病原体が用いる種特異的な遺伝子群の同定が可能となる。

【0166】

実施例17

DNAの細胞への移行

真核細胞—特にヒトまたは哺乳類の細胞—へのDNAの移行は現在一般的な技術となっている。ベクターを純粋なDNAとしてレシピエントに導入する（トランスフェクション）方法には例えば、リン酸カルシウムとの沈澱（Grahamおよびvander Eb、1973、Virology 52：466）、もしくはリン酸ストロンチウムとの沈澱（Brashら、1987、Mol. Cell Biol. 7：2013）、エレクトロポレーション（Neumannら、1982、EMBO J. 1：841）、リポフェクション（Felgnerら、1987、Proc. Natl. Acad. Sci USA 84：7413）、DEAEデキストラン（McCuthanら、1968、J. Natl. Cancer Inst. 41：351）、マイクロインジェクション（Muellerら、1978、Cell 15：579）、プロトプラスト融合（Schaffer、1980、Proc. Natl. Acad. Sci.

USA 77:2163-7)、またはペレットガン(Kleinら、1987、Nature 327:70)などがある。またはウイルスベクターを感染させてcDNAを導入することができる。この用途には例えばレトロウイルス(Bernsteinら、1985、Gen. Engrg. 7:235)、アデノウイルス(Ahmadら、1986、J. Virol. 57:267)、またはヘルペスウイルス(Spaeteら、1982、Cell 30:295)を使用するシステムが開発されている。

【0167】

実施例18

転移因子の配列の異型

本発明の転移因子の構成、ならびにDICE-IおよびDICE-IIの配列をふまえ、本発明は現在DNA分子群およびタンパク質群の作製も容易にする。これらは開示されたものに由来するが、正確なヌクレオチド配列またはアミノ酸配列は開示されたものとは異なる。このような異型は分子生物学分野における標準的な研究手法と本発明で開示されたヌクレオチド配列情報を組み合わせることによって得られる場合がある。

【0168】

DNA配列の操作は、制限酵素による切断、DNAポリメラーゼによる充填、エキソヌクレアーゼによる欠失、末端デオキシヌクレオチドトランスフェラーゼによる伸長、合成もしくはクローニングされたDNA配列の連結、1本鎖バクテリオファージの中間体を介した部位特異的配列変更、またはPCRと組み合わせて特異的なオリゴヌクレオチドを使用する部位特異的配列変更などの標準的な手法で可能となる。

【0169】

異型DNA分子群には例えばM13プライマー変異導入法などの標準的なDNA変異導入法で作製されたものが含まれる。このような手法の詳細はサンプリックら、「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」、Cold Spring Harbor、ニューヨーク、1989、第15章に記載されている。これは参照として本明細書に組み入れられる。このような手法を使用することで、開示されたものとはわずかに異なる異型を作製することができる。特に本明細書に開示されたものの派生物であり、また

、ヌクレオチドの欠失、付加、または置換により開示されたものとは異なるDNA分子群およびヌクレオチド配列は、これらの変更にかかわらず本発明に含まれるタンパク質群の機能的特徴を維持するタンパク質をコードしている。

【0170】

開示されたDNA分子群に由来する小DNA分子もまた本発明の範囲内に含まれる。このような小DNA分子群には、ハイブリダイゼーション用プローブまたはPCR用プライマーとしての使用に適したオリゴヌクレオチドなどが含まれる。したがってこれらの小DNA分子群は転移因子DNA分子の少なくとも一つのセグメントを含み、PCR目的では転移因子の核酸配列中における少なくとも20～25個の連続したヌクレオチドを含む。上述のように開示されたDNA分子群に由来するDNA分子およびヌクレオチド配列はまた、開示されたDNA配列またはその断片とストリンジェントな条件下でハイブリッドを形成するDNA配列として定義される。

【0171】

特定の程度のストリンジェンシーをもつハイブリダイゼーションの条件は、選択されるハイブリダイゼーション法の内容、および使用されるハイブリッドを形成するDNAの組成および長さに依存して変わる。一般に、ハイブリダイゼーション時の温度、およびハイブリダイゼーション用緩衝液のイオン強度（特にNa⁺濃度）がハイブリダイゼーションのストリンジェンシーを決定する。特定の程度のストリンジェンシーを得るために必要なハイブリダイゼーションの条件に関する計算式はサンプブックら、（「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」、Cold Spring Harbor、ニューヨーク、1989、第9章および第11章）に記載されており、これは参照として本明細書に組み入れられる。説明のみの目的で記述すると、ハイブリダイゼーション実験は、標的DNA分子（例えば転移因子のDNA）に対するDNA分子群（例えば転移因子の偏り）のハイブリダイゼーションにより行われ、アガロースゲル上で電気泳動を行い、当技術分野において周知の手法の一つであるサザンブロッティング（Southern、J. Mol. Biol. 98: 503、1975）によりニトロセルロースフィルターに転写される。この手法はサンプブックら、（「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」、Cold Spring Harbor、ニューヨーク、1989）に記載されている。

【0172】

[^{32}P]-dCTPで標識された標的プローブとのハイブリダイゼーションは、 $6\times\text{SSC}$ などの高イオン強度の溶液中で、後述する融解温度 (T_m) より20～25 以下の温度で通常行われる。サザンロット上における標的DNA分子が、10 ngまたはそれ以上のDNAを含むこのようなサザンハイブリダイゼーション実験では、ハイブリッドの形成は通常、1～2 ng/mlの放射性標識プローブ (比活性が 10^9 CPM/ μg またはそれ以上) を用いて6～8時間実施される。ハイブリッドを形成させた後に、ニトロセルロースフィルターを洗浄してバックグラウンドのハイブリダイゼーションを除く。洗浄条件は、特異的なハイブリダイゼーションシグナルを保持しながらバックグラウンドのハイブリダイゼーションを除くために、可能な限りストリンジェントである必要がある。 T_m という用語は、それ以上の温度になると一般的なイオン強度の下では放射性標識されたプローブ分子が標的DNA分子とハイブリッドを形成しなくなる温度を意味する。ハイブリッド分子の T_m は以下の方程式 (BoltonおよびMcCarthy、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48:1390、1962) で推定できる場合がある： $T_m = 81.5 - 16.6(\log_{10}[\text{Na}^+]) + 0.41(\%G+C) - 0.63(\% \text{ホルムアミド}) - (600/l)$ ；この式において、「 l 」はハイブリッドの長さを塩基対で表したものである。

【0173】

この方程式は Na^+ 濃度が0.01 M～0.4 Mの範囲にある場合は妥当であり、 $[\text{Na}^+]$ が高い溶液の T_m の場合、計算の精度が劣る。この方程式はまた、G+C量が30～75%の範囲内にあるDNAについては非常に有効であり、また長さが100ヌクレオチドを上回るハイブリッドに適用できる (オリゴヌクレオチドプローブの挙動についてはサンプルックら (「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」、Cold Spring Harbor、ニューヨーク、1989) の第11章に詳述されている。

【0174】

したがって例として、転移因子の核酸配列 (%GC=45%と仮定) に由来する150塩基対のDNAプローブについては、特定のストリンジェンシーを得るために必要なハイブリダイゼーション条件の計算は以下になる。ただしこの例では、ハイブリッドを形成させた後にフィルターを $0.3\times\text{SSC}$ 溶液で3回洗浄すると仮定す

る。したがって $[Na^+] = 0.045 \text{ M}$; %GC=45% ; ホルムアミド濃度 = 0 ; $l=150$ 塩基対 ; $T_m = 81.5 - 16.6 (\log_{10} [Na^+]) + (0.41 \times 45) - (600/150)$ となり、 $T_m = 74.4$ となる。

【0175】

2本鎖DNAの T_m は相同性が1%低下するごとに1~1.5 小さくなる (Bonnerら、J. Mol. Biol 81 : 123、1973)。したがって例として $0.3 \times \text{SSC}$ を用いて59.4~64.4 でフィルターを洗浄すると仮定すると、ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーは90%となる。すなわち標的転移因子DNAに対して10%を上回る配列相違があるDNA分子群はハイブリッドを形成しないことになる。またはハイブリッドを形成させた後のフィルターを $0.3 \times \text{SSC}$ を用いて65.4~68.4 で洗浄する場合はハイブリダイゼーションのストリンジェンシーは94%になる。すなわち標的転移因子DNA分子に対して6%を上回る配列相違があるDNA分子はハイブリッドを形成しないことになる。これらの例はほぼすべて理論的な説明によるものである。他のハイブリダイゼーション法が使用される場合もあることと、実験条件の変動によっては別のストリンジェンシー計算式が必要となる場合があることを当業者であれば理解すると思われる。

【0176】

本発明の特定の態様におけるストリンジェントな条件は、その条件以下であれば25%、15%、10%、6%または2%以上の配列相違 (「ミスマッチとも呼ばれる」) をもつDNA分子群が、ハイブリッドを形成しない条件として定義されることがある。

【0177】

遺伝暗号の縮重は、コードされるタンパク質のアミノ酸配列は維持しつつも、DNA分子のヌクレオチド配列の大きな相違を許容することからさらに本発明の範囲を広げる。例えば転移因子Tn5-DICEのC末端のアミノ酸残基はアラニンである。これはTn5-DICEのDNA中にヌクレオチドコドンGCGとしてコードされている。遺伝暗号が縮重することから、他のヌクレオチドコドンの3塩基配列が、C末端のアミノ酸残基 (例えばGCTおよびGCC) をコードする場合がある。両者ともアラニンをコードするコドンである。したがってTn5-DICEのcDNAのヌクレオチド配列は、

コードされるタンパク質のアミノ酸組成またはタンパク質の特性に影響を及ぼすことなくこの位置で3種のコドンのいずれかをとりうる。遺伝暗号の縮重に基づき異型DNA分子は、上述の標準的なDNA変異導入法を用いて、またはDNA配列の合成を行うことで本発明で開示されたcDNA分子に由来する場合がある。本明細書で示した遺伝暗号の縮重に基づく配列相違によって、ストリンジェントな条件下でも開示されたcDNA配列に対してハイブリッドを形成しないDNA配列についても本発明の範囲に含まれる。

【0178】

本発明はまた、本発明に開示された任意のDNA配列と実質的に同一なDNA配列を含む。ここで「実質的に同一である」とは、整列させた配列に対して少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%または99%同一なヌクレオチドを有する配列を意味する。

【0179】

上述したDNA変異導入法が、異型DNA分子の作製だけでなく、構造的局面が転移因子とはある程度異なるものの、そのタンパク質が明らかに転移因子タンパク質の誘導体であって転移因子タンパク質の本質的な特性を保持しているタンパク質の産生を促すためにも用いられる場合があることを当業者であれば理解すると思われる。新たに作製されたタンパク質が、転移因子タンパク質の特性上の多様性を得るために選択される場合もある。これについては以下に詳述する。このような誘導体には小さな欠失、付加、および置換を含むアミノ酸配列上に相違がある誘導体などが含まれる。

【0180】

アミノ酸配列上の相違を導入する部位は事前に決定されるが、変異そのものは事前に決まっていない。例えば所定の部位における変異のパフォーマンスを最適化する目的で、標的となるコドンまたは領域においてランダムな変異導入が行われる場合があり、発現するタンパク質の異型が、望ましい活性の最適な組み合わせに対してスクリーニングされる場合がある。既知配列を有するDNA上の事前に決定した部位において置換変異を作製する上述の手法はよく知られている。

【0181】

アミノ酸の置換は通常1残基であり、挿入は通常1～10アミノ酸残基の規模であり、欠失は約1～30残基の範囲内にある。欠失または挿入は隣接する対において作製される場合がある。すなわち2残基の欠失または2残基の挿入を行う。置換、欠失、挿入またはそれらの任意の組み合わせが選択されて最終的なコンストラクトとなる。タンパク質をコードするDNA上で作られる変異が、読み枠以外の配列にあるはずはないことは明らかであり、mRNAの二次構造を生じる可能性のある相補領域を形成しないことが望ましい。

【0182】

置換の異型は、アミノ酸配列の少なくとも1残基が除かれて、異なる残基が同じ場所に代わりに挿入されるというものである。このような置換は一般に上述のように保存的に作製される。

【0183】

機能的同一性または免疫学的同一性における実質的な変化は、上述した置換と比べてそれほど保存的ではない置換を選択することで生じる。すなわち以下に挙げる(a)～(c)の維持に及ぼす作用が、より顕著に異なる残基が選択される：(a)置換領域におけるポリペプチドバックボーンの構造(例えばシート構造またはらせん構造)、(b)標的部位における分子の電荷または疎水性、または(c)側鎖のかさ高さ。タンパク質の性質に一般に極めて大きな変化を持ち込むことが予想される置換には(a)～(d)がある：(a)セリンまたはスレオニンなどの親水性残基が、ロイシン、イソロイシン、フェニルアラニン、バリン、アラニンなどの疎水性残基と相互に置換される、(b)システインまたはプロリンが他の残基と相互に置換される、(c)リジン、アルギニン、ヒスチジンなどの正に帯電した側鎖をもつ残基が、グルタミンまたはアスパラギンなどの負に帯電した残基と相互に置換される、または、(d)フェニルアラニンなどのかさの大きな側鎖をもつ残基がグリシンなどの側鎖をもたない残基と相互に置換される。

【0184】

以上のアミノ酸の置換または欠失または付加による影響は、因子群の転移能力を評価するアッセイ法で転移因子の派生物を評価することができる。

【0185】

実施例19

薬学的組成物および投与様式

本発明の転移因子を送り込むさまざまな送達システムが知られており、例えばリポソーム、微粒子、マイクロカプセル中への封入、組換え細胞による発現、受容体を介したエンドサイトーシス（WuおよびWu、J. Biol. Chem. 1987、262：4429～32を参照）、およびレトロウイルスまたは他のベクターの一部としての治療用核酸の構築などが含まれる。導入方法には、皮内注入、筋肉注入、腹腔内注入、静脈内注入、皮下注入、経鼻注入、および経口投与の経路などがあるがこれらに限定されない。化合物は任意の至便な経路で投与される。これには例えば、点滴静注または大量瞬時投与、上皮または粘膜皮膚ライニング（例えば口内粘膜、直腸粘膜および腸管粘膜など）を介した吸収、および他の生物学的に活性のある薬剤とともに投与される場合がある。投与は全身投与でも局所投与でもよい。さらに薬学的組成物は、脳室内注射および髄腔内注射を含む適切な経路で中枢神経系に導入することができる。脳室内注射は、脳室内カテーテルを例えばオンマヤリザーバーなどのリザーバーに取り付けることで容易になる場合がある。

【0186】

一つの態様においては、本発明の薬学的組成物を治療が必要とされる領域に局所的に投与することが望ましい場合がある。これには例えば手術時における局所的な注入、局所適用（例えば術後の創傷に対する包帯を併用）、注射、カテーテル経由、坐薬または、多孔性物質もしくは非多孔性物質またはゼラチン状の物質（サイラスティック膜や繊維などの膜を含む）などのインプラントなどがある。一つの態様における投与は、悪性腫瘍もしくは新生物または新生物発生前の該当部位（または前の部位）における直接注入による場合がある。

【0187】

送達媒介物としてのリポソームの使用は関心対象の送達法の一つである。リポソームは標的部位と融合して内腔の内容物を細胞内に送達する。リポソームは、分離剤および結合剤などの接触を保つための様々な方法を用いることで、標的細胞と接触した状態が融合が起きるまで十分な時間維持される。リポソームは、膜との融合を媒介する精製タンパク質またはペプチド（センダイウイルスやインフ

ルエンザウイルスなど)とともに調製することができる。脂質は既知のリポソーム形成脂質との有用な組み合わせとなる。これには例えばホスファチジルコリンなどの陽イオン性脂質がある。他の脂質にはコレステロール、ホスファチジルセリン、ホスファチジルグリセロールなどの中性脂質がある。リポソームを調製する際にはカトウ(Kato)らによる手法(J. Biol. Chem. 1991、266:3361)が用いられる場合がある。

【0188】

本発明はまた、治療学的に有効な量の転移因子を単独で、または薬学的に許容される担体とともに含む薬学的組成物を提供する。一つの実施例における転移因子の治療用分子群の均一な組成には、組成中に少なくとも90%のペプチド、異型、類似体、誘導体、模倣体からなる組成が含まれる。

【0189】

送達システム

このような担体には、生理食塩水、緩衝食塩水、デキストロース、水、グリセロール、エタノール、およびこれらの組み合わせが含まれるがこれらに限定されない。担体および組成は無菌性とすることが可能であり、また剤型は投与様式に合わせることができる。組成にはまた少量の湿潤剤や乳化剤またはpH緩衝剤を含めることができる。組成は液体溶液、懸濁液、乳濁液、錠剤、ピル、カプセル、徐放性剤、または粉末とすることができる。組成は従来型の結合剤およびトリグリセリドなどの担体を用いて坐薬として製剤化することができる。経口製剤には、医薬品級のマンニトール、乳糖、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、セルロース、および炭酸カルシウムなどの標準的な担体を含めることができる。

【0190】

特定の疾患または状態の治療に効果に有効な誘導性薬剤および分散用薬剤の量は、疾患または病状の性質に依存し、かつ標準的な臨床的手法で決定されることがある。さらにインビトロアッセイ法を選択的に用いることで、最適投与範囲の同定に役立つ場合がある。製剤化で用いる正確な用量はまた投与経路および疾患または障害の重症度に依存するので、術者の判断に従い、かつ各患者の環境を見

極める必要がある。有効用量はインビトロ試験システムまたは動物モデルの試験システムで得られた用量反応曲線から外挿される場合がある。

【0191】

本発明はまた、一種または複数の薬学的組成物成分を充填した1個または複数の容器からなる製剤のパックまたはキットを提供する。このような容器には、医薬品または生物学的製剤の製造、使用、または販売を規制する政府組織によって規定される形状をとる注意書きが選択的に加えられることがある。このような注意書きは、ヒトへの投与に関する規制当局による製造、使用、または販売に関する承認を示す。また組成物の使用上の指示が含まれる場合がある。

【0192】

薬学的組成物または投与方法は、抗新生物療法や抗腫瘍療法などの他の治療上の処置と組み合わせて行われる場合がある。

【0193】

核酸分子の投与

遺伝子の送達または治療に転移因子の核酸を用いる一つの態様では、類似体が細胞内に送達される（例えば、核酸ベクターの発現や受容体を介した機構による）。治療的分子が核酸分子またはアンチセンス分子である特定の態様における投与は、例えばレトロウイルスベクター（米国特許第4,980,286号を参照）の使用、または直接注入による方法、または微粒子銃（例えば、遺伝子銃；Biolistic、Dupont）の使用、または脂質もしくは細胞表面受容体または感染性病原体による被覆、または核移行が既知であるホメオボックス様ペプチドと連結させたものの投与（例えば、Joliotら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1991、88：1864～8を参照）により、細胞内に入るように投与される適切な核酸発現ベクターによりなされる場合がある。または核酸を細胞内に導入して、相同組換えにより宿主細胞のDNAに組込ませて発現させることができる。

【0194】

ベクターpcDNAは、外来cDNAをウイルス由来の強力なプロモーター（CMV）の制御下において細胞内に導入して発現を導く方法の一例である。一方で他のベクターが使用される場合もある。他のレトロウイルスベクター（pRETRO-ON、Clontec

hなど)も同じプロモーターを使用するが、何ら形質導入的な処置を行うことなく細胞内に入り、標的細胞が分裂中の場合(例として癌細胞、特に化学療法後の最初の緩解期中)、および調節される場合にのみ標的細胞のゲノム上に組み込まれるという利点がある。また、このようなプラスミドを使用する際に、テトラサイクリンを投与することで転移因子の核酸の発現を始めることも可能である。つまりこのようなプラスミドでは、細胞を形質導入した後に一連の化学療法とともにテトラサイクリンを投与することで良好な細胞毒性を得ることが可能となる。

【0195】

pMAM-neo (Clontech) やpMSG (Amersham Pharmacia Biotech、ニュージャージー州ピスカッタウェイ)などの他のプラスミドベクターでは(ステロイドで調節可能な)MMTV-LTRプロモーターまたはSV10後期プロモーター(pSVL、Amersham Pharmacia Biotech、ニュージャージー州ピスカッタウェイ)またはメタロチオネイン応答性プロモーター(pBPV、Amersham Pharmacia Biotech)が用いられており、またレトロウイルスを含む他のウイルスベクターが用いられている。他のウイルスベクターの例にはアデノウイルス、AAV(アデノ関連ウイルス)、組換え型のHSV、ポックスウイルス(ワクシニア)、および組換え型のレンチウイルス(HIVなど)などがある。これらすべてのベクターは標的細胞内にcDNA配列および転写に必要な制御因子群を送達するという基本的な目的が達成されている。本発明には、ゲノムに組み込まれるか否かは別として、合成オリゴ、裸のDNA、プラスミドおよびウイルスなどのあらゆる方式の核酸送達法が含まれる。

【0196】

転移因子の構築および使用に関する原理を説明したが、本発明がこのような原理から逸脱することなく、その配置および細部を改変可能であることは当業者には明らかと思われる。本発明の原理を応用することが可能な多くの態様を考えると、説明した態様が本発明の例に過ぎないことが理解されるはずであり、また本発明の範囲を制限するものとはならないはずである。むしろ本発明の範囲は、特許請求項の範囲に準じている。したがって本発明者らは、添付する特許請求項の範囲およびの精神に含まれるすべてを主張する。

【図面の簡単な説明】

【図1】 Tn5-DICEトランスポゾンの略図である。

【図2】 SI INFEKLエピトープと6×ヒスチジンタグを含む融合タンパク質を発現させるために使用されたTn5-DICEの読み枠の合う状態を維持した分離を示す略図である。

【図3】 DICE分析に使用するプラスミド群の略図である。図3Aは、Tn5-DICE分離性トランスポゾンを含むプラスミドである。図3Bは、アラビノースで誘導可能なcreリコンビナーゼプラスミドpBAD33creである。

【図4】 Tn5-DICE分離後のCAPsの配列決定用に開発した方法の一つの態様を示す略図である。図4Aは、Tn5-DICEの分離後のコピーを含むスーサイドプラスミドpAV353を、ナリジクス酸耐性でCreを発現するTn5-DICE変異体を接合させた。図4Bは、アンピシリンおよびナリジクス酸耐性のトランス接合体 (transconjugant) をCre-loxP組換えにより得た。図4Cは、単離した染色体DNAを制限酵素EcoRIまたはSalIで切断し、元のSI INFEKL休止に隣接する5'側または3'側の配列にそれぞれクローン化した。

【図5】 Tn5-HER2/neu/SOB (HER2/neu/String of Beads) コンストラクトを示す略図である。

【図6】 Tn5-HIV 1/SOBコンストラクトを示す略図である。

【図7】 トランスポザーゼを含まず、MHC I経路で提示されたCAPsの同定に使用可能なDICE Iトランスポゾムの略図である。

【図8】 トランスポザーゼを含まず、MHC II経路で提示されたCAPsの同定に使用可能なDICE IIトランスポゾムの略図である。

【図9】 サルモネラ菌のHER2/neuエピトープのキャリアワクチンの略図である。

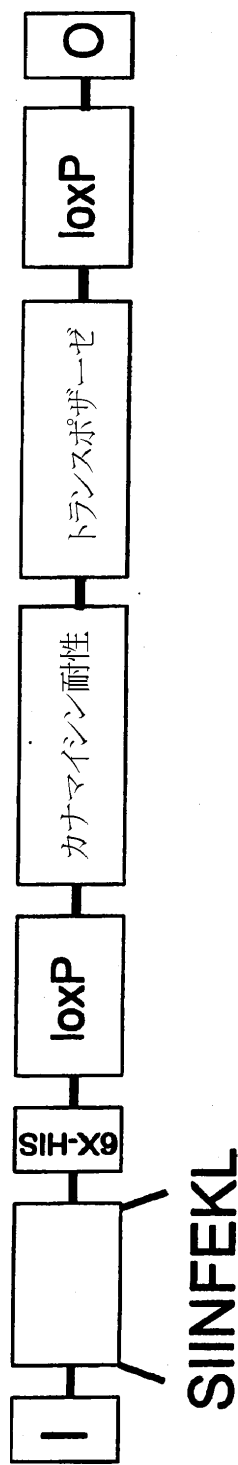
【図10】 サルモネラ菌-HIVエピトープキャリアワクチンの略図である。

【図11】 Tn5のモザイク末端配列を示す。

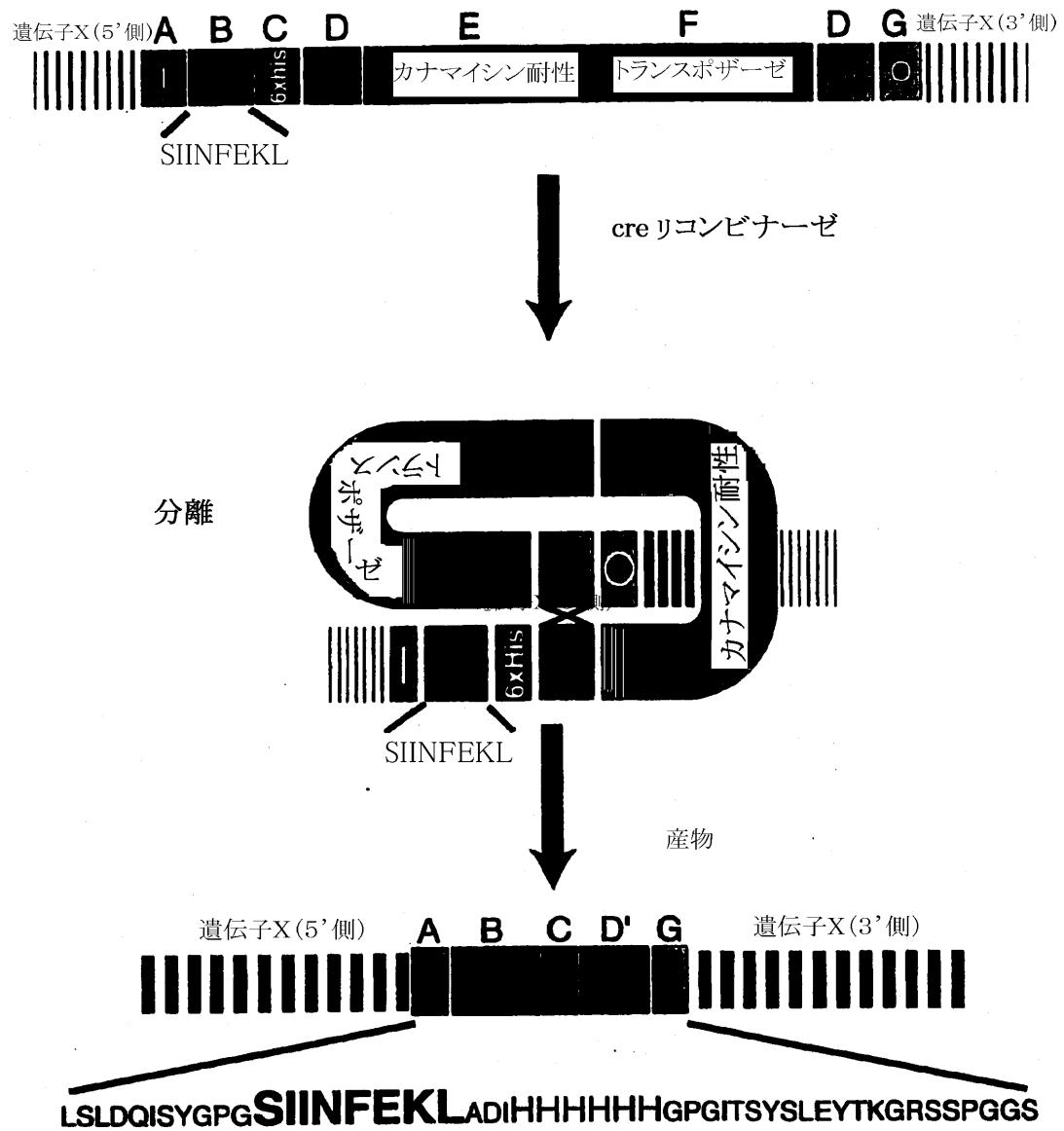
【図12】 DICE-I分離配列を示す。

【図13】 DICE-II分離配列を示す。

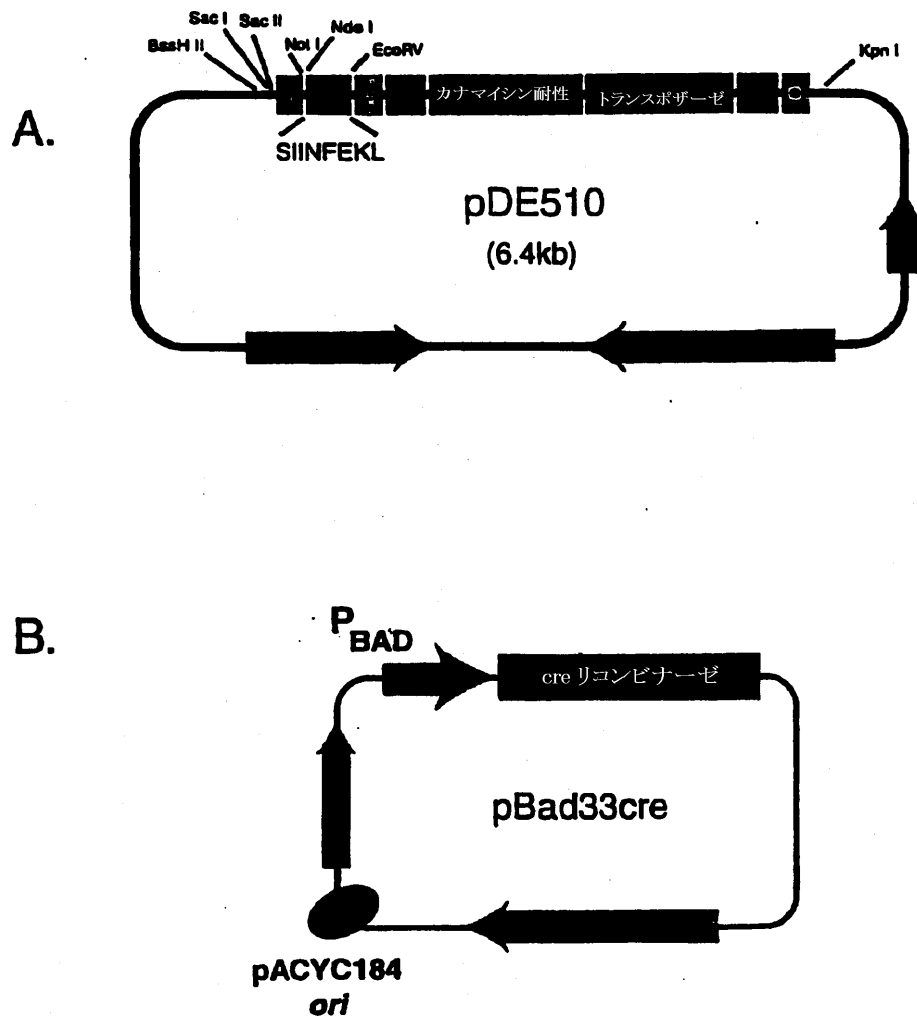
【図1】



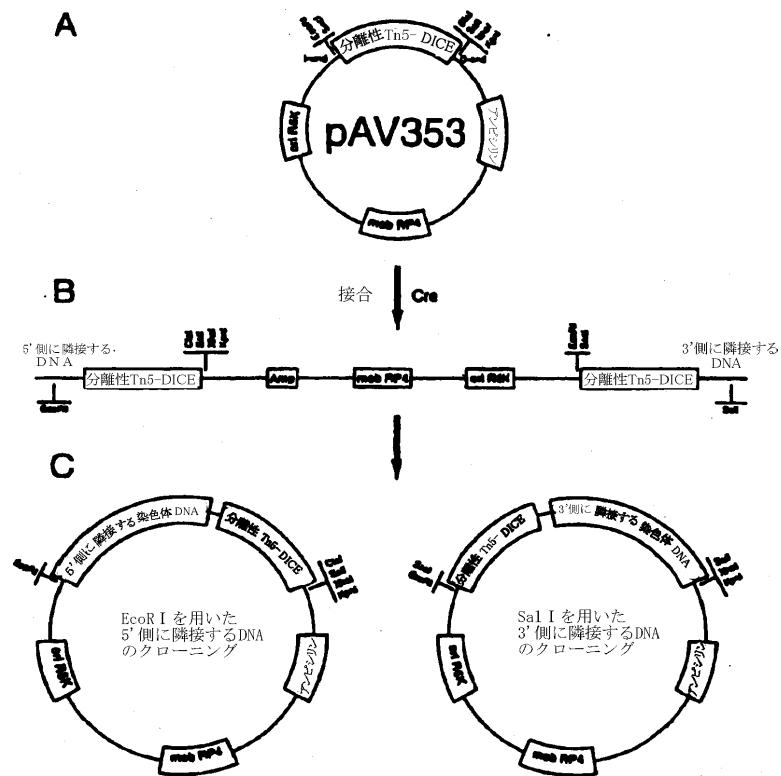
【図2】



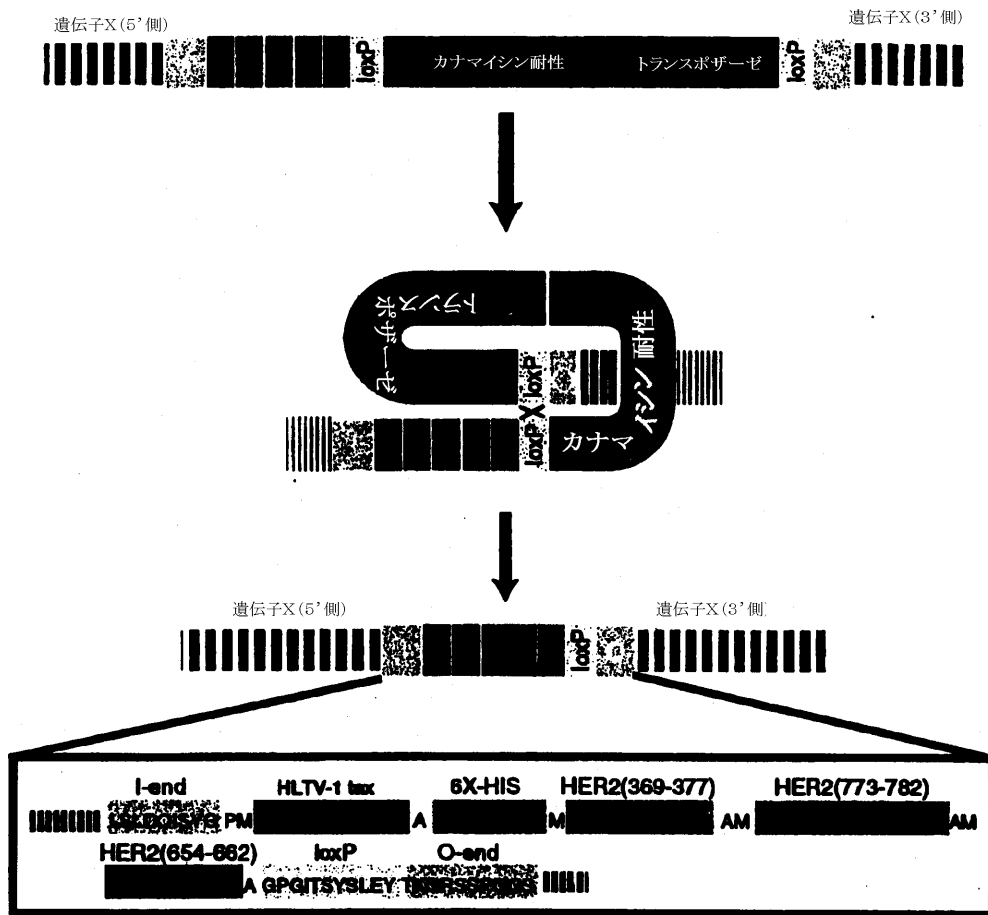
【図3】



【図4】

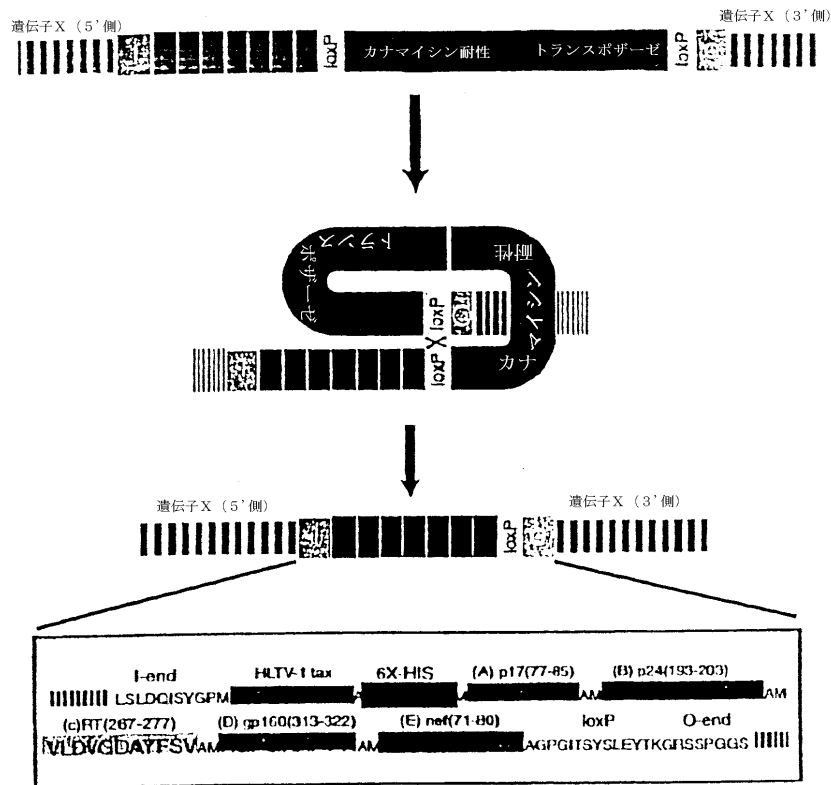


【図5】



81アミノ酸の分離産物は、3つのタンデムに並んだHLA-A2
拘束性HER2/neu エピトープをコードする

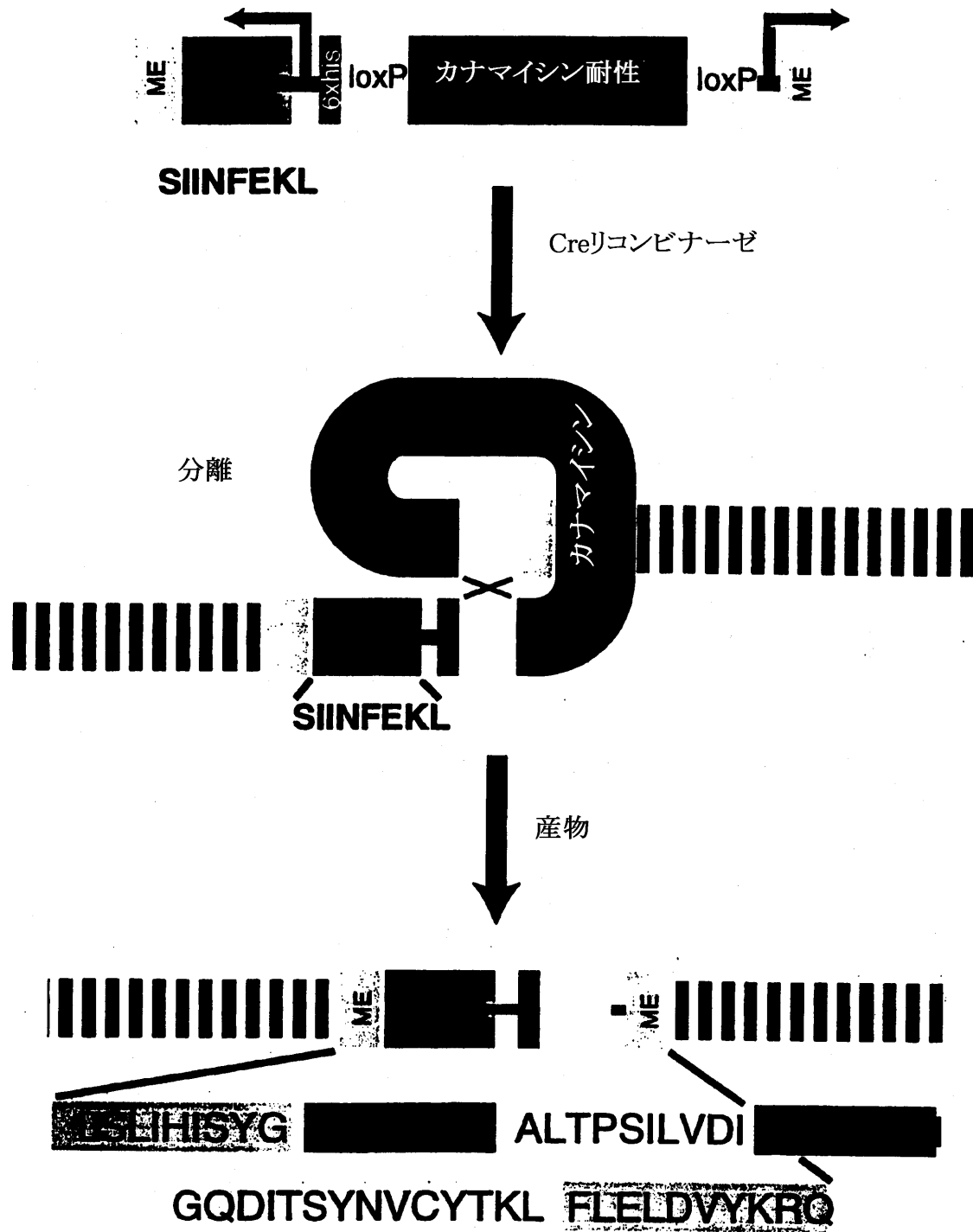
【図6】



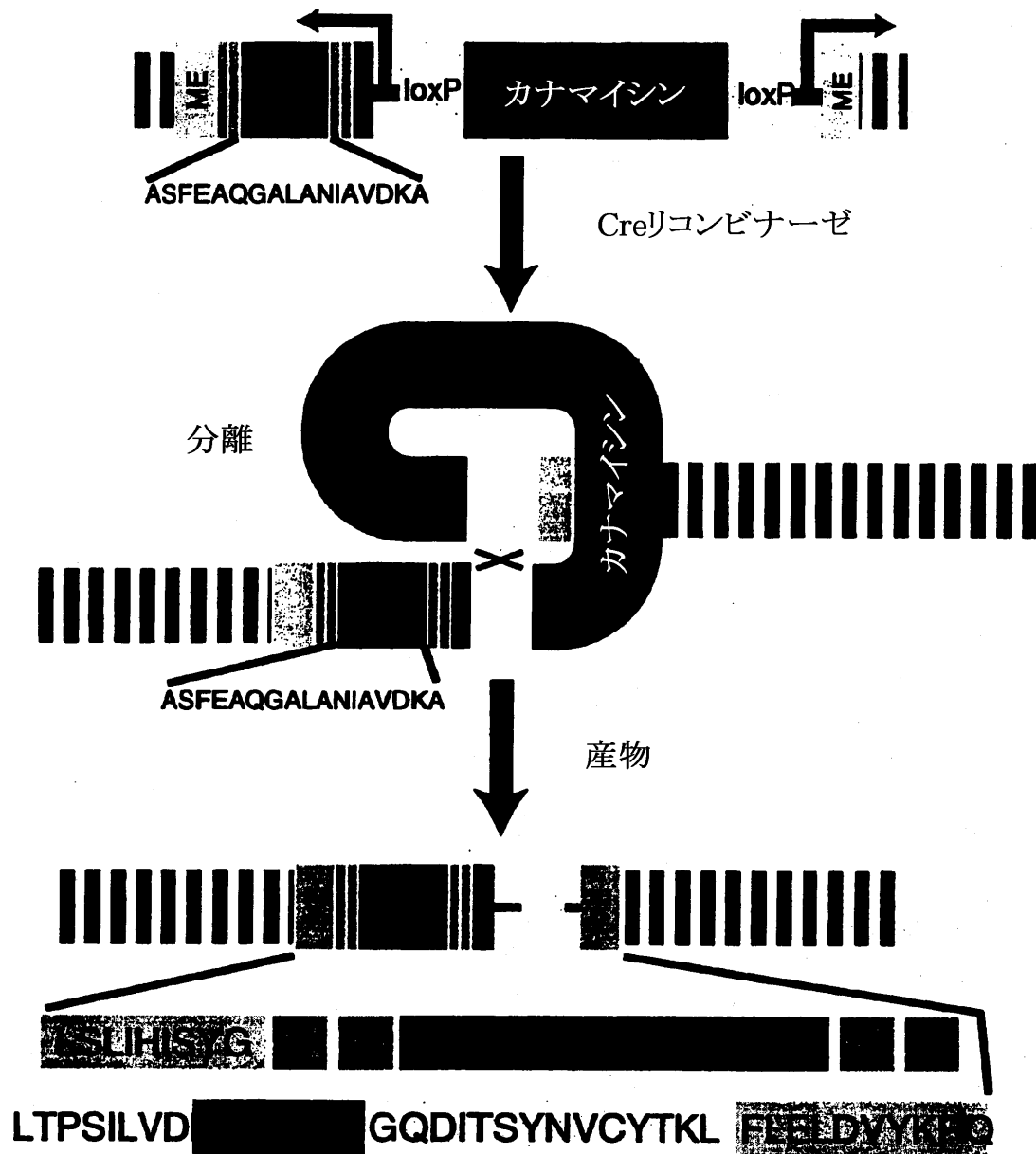
109アミノ酸の分離産物は、5つのタンデムに並んだ
HLA-A2拘束性HIV-1エピトープをコードする

サルモネラ菌-HIVエピトープキャリアワクチン株の構築。Tn5-HIV 1/SOB (ヒト免疫不全ウイルス 1/ビーズの紐(Human Immunodeficiency Virus 1/String of Beads))を、接合によりNaI^rのサルモネラ菌レシピエントに移す。サルモネラ菌のトランス接合体をプールし、ファージP22溶菌液を用いてTn5 HIV 1/SOBをネズミチフス菌(野生株14028s) およびチフス菌(Ty21aワクチン株)に移す。各ファージレシピエントはアラビノースによる誘導でcreリコンビナーゼを産生するプラスミドpBAD33creを有する。Tn5-HIV 1/SOB挿入は、アラビノース(1 mM)によるcreリコンビナーゼの誘導により、カナマイシンマーカーおよびTn5トランスポザラーゼを分離する。Tn5-HIV 1/SOBは、6×ヒスチジン部位、HLA-A2拘束性HTLV-1 taxエピトープLLFGYPVYV、および5つのHLA-A2拘束性HIV 1エピトープ(p17₇₇₋₈₅、p24₁₉₃₋₂₀₃、RT₂₆₇₋₂₇₇、gp160₃₁₃₋₃₂₂、およびnef₇₁₋₈₀)をもつ。同じ読み枠のTn5-HIV 1/SOB挿入断片の分離により、各エピトープをコードする109アミノ酸産物が得られる。

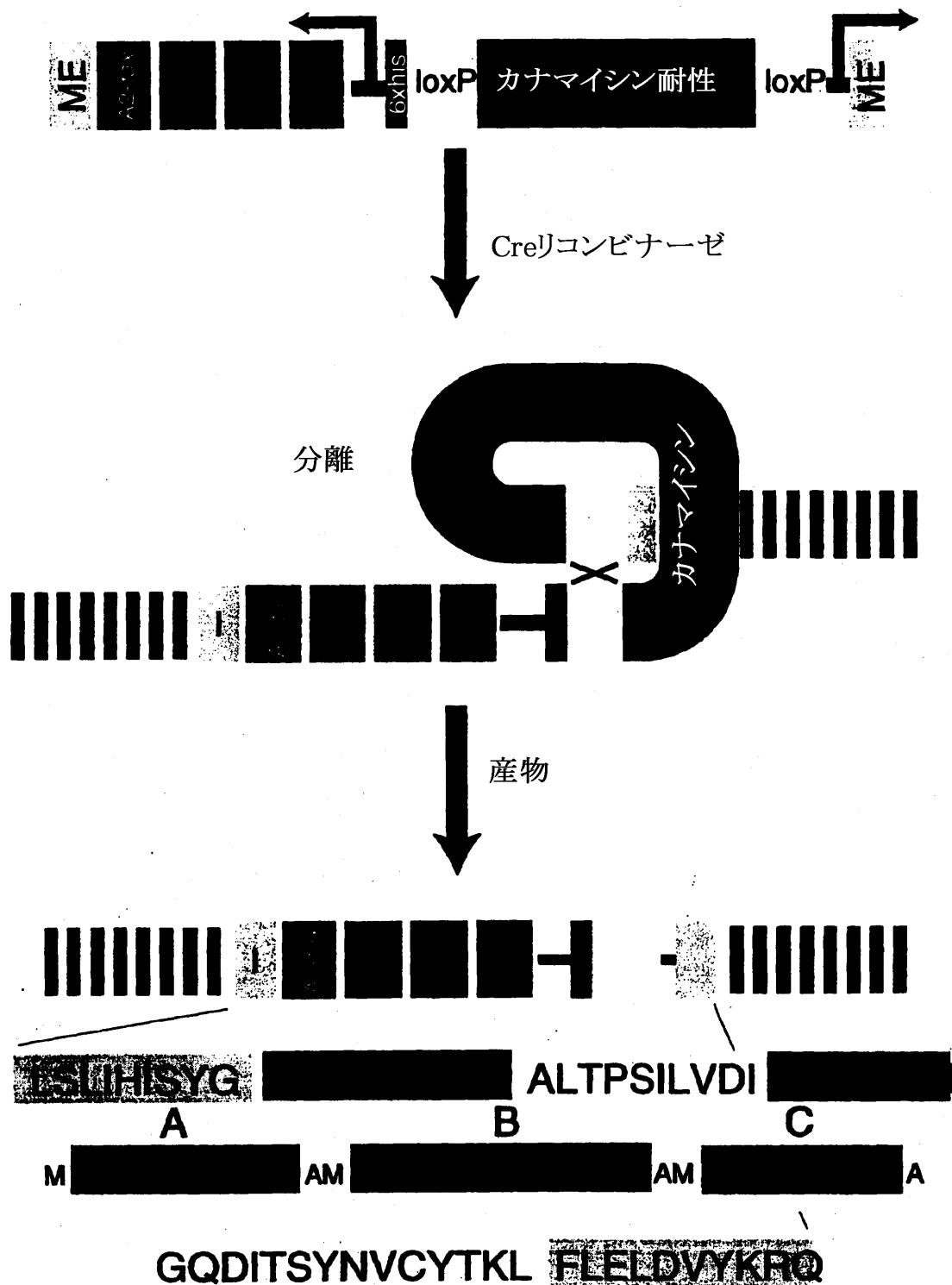
【図7】



【図8】



【図9】



92アミノ酸の分離産物は、3つのタンデムに並んだ
HLA-A2拘束性HER2/neuエピトープをコードする

119アミノ酸の分離産物は、5つのタンデムに並んだHLA-A2拘束性HIV-1エпитープをコードする

Tn5 モザイク末端配列

OE	C	T	G	A	C	T	C	T	T	A	T	A	C	A	C	A	A	G	T
ME	C	T	G	T	C	T	C	T	T	A	T	A	C	A	C	A	T	C	T
IE	C	T	G	T	C	T	C	T	T	G	A	T	C	A	G	A	T	C	T

【図12】

DICE-I 分離配列

```

      10      20      30      40      50
CTGTCTCTTATACACATCTCATATGGCTCTATCATCAACTTCGAAAACT
GACAGAGAATATGTGTAGAGTATACCGAGATAGTAGTTGAAGCTTTTGA
  L  S  L  I  H  I  S  Y  G  S  I  I  N  F  E  K  L

      60      70      80      90     100
GGCGTTGACACCATCCATACTAGTAGATATCCACCACCACCACCACCAG
CCGCAACTGTGGTAGGTATGATCATCTATAGGTGGTGGTGGTGGTGC
  A  L  T  P  S  I  L  V  D  I  H  H  H  H  H  H

      110     120     130     140     150
GCCAGGACATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTATTTCTAGAA
CGGTCCTGTATTGAAGCATATTACATACGATATGCTTCAATAAAGATCTT
  G  Q  D  I  T  S  Y  N  V  C  Y  T  K  L  F  L  E

      160     170
CCAGATGTGTATAAGAGACAG
GGTCTACACATATTCTCTGTC
  P  D  V  Y  K  R  Q

```

目印位置

I末端	1-19
SIINFEL	28-52
5'側PCR部位	54-77
6-ヒスチジン部位	82 - 100
LoxP	109-143
3'PCR部位	145-167
O末端	153-171

DICE-II 分離配列

ACAG
TGTC
Q

<u>目印</u>	<u>位置</u>
I末端	1-19
5'側PCR部位	25-45
5'側アスパリジニルエンドペプチターゼ 切断部位	34-45
ASFEAQGALANIAVDKA	46-84
5'側アスパリジニルエンドペプチターゼ 切断部位	97-108
6-ヒスチジン部位	115-132
LoxP	142-175
3'側PCR部位	178-198
O末端	186-204

【手続補正書】

【提出日】平成14年7月12日(2002.7.12)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】 3'末端および5'末端を有する転移因子であって、以下を含む転移因子：

選択マーカをコードする核酸配列の5'側にある5'側組換え部位；

選択マーカをコードする核酸配列の3'側にある3'側組換え部位；

5'側組換え部位の5'側、または3'側組換え部位の3'側にMHCエピトープをコードする核酸配列；

転移因子の5'端および3'端における転移因子の組込みに十分な逆方向反復配列を含む挿入末端。

【請求項2】 請求項1記載の転移因子であって、5'側組換え部位または3'側組換え部位がloxP組換え部位、flit組換え部位、TN3組換え部位、マリナー組換え部位、またはガンマ/デルタ組換え部位である転移因子。

【請求項3】 5'側組換え部位または3'側組換え部位がloxP組換え部位である、請求項1記載の転移因子。

【請求項4】 MHCエピトープがクラスI MHCエピトープである、請求項1記載の転移因子。

【請求項5】 MHCエピトープがクラスII MHCエピトープである、請求項1記載の転移因子。

【請求項6】 MHCエピトープが

SIINFEKL(配列番号：6)、LLFGYPVYV(配列番号：7)、および

ASFEAQGALANIAVDKA(配列番号：8)

からなる群より選択される、請求項1記載の転移因子。

【請求項7】 選択マーカが抗生物質耐性をコードする核酸である、請求項1記載の転移因子。

【請求項8】 抗生物質耐性がアンピシリン、カナマイシン、ゼオマイシン、ハイグロマイシン、テトラサイクリン、ピューロマイシン、またはブレオマイシンに耐性である、請求項7記載の転移因子。

【請求項9】 選択マーカが分光光度学的な性質を基に検出される、請求項1記載の転移因子。

【請求項10】 選択マーカが β -ガラクトシダーゼまたは緑色蛍光タンパク質である、請求項1記載の転移因子。

【請求項11】 トランスポザーゼをコードする核酸配列をさらに含む、請求項1記載の転移因子。

【請求項12】 アフィニティタグをコードする核酸配列をさらに含む、請求項1記載の転移因子。

【請求項13】 アフィニティタグをコードする核酸配列が、5'側組換え部位の5'側にある、請求項12記載の転移因子。

【請求項14】 アフィニティタグをコードする核酸配列が、3'側組換え部位の3'側にある、請求項12記載の転移因子。

【請求項15】 5'端および3'端を有する転移因子であって、以下を含む転移因子：

選択マーカをコードする核酸の5'側にある5'側loxP配列；

選択マーカをコードする核酸の3'側にある3'側loxP配列；

5'側loxP配列の5'側、または3'側loxP配列の3'側にあるMHCエピトープ；

転移因子の5'端にある挿入末端；および

転移因子の3'端にある挿入末端。

【請求項16】 loxP配列が配列番号：11に示す配列を含む、請求項15記載の転移因子。

【請求項17】 MHCエピトープが

SIINFEKL (配列番号:6)、LLFGYPVYV (配列番号:7)および
ASFEAQGALANIAVDKA (配列番号:8)

からなる群より選択される、請求項15記載の転移因子。

【請求項18】 転移因子の5'端の挿入末端が配列番号:4および配列番号:5からなる群より選択される、請求項15記載の転移因子。

【請求項19】 転移因子の3'端の挿入末端が配列番号:3および配列番号:4からなる群より選択される、請求項15記載の転移因子。

【請求項20】 トランスポザーゼをコードする核酸配列をさらに含む、請求項15記載の転移因子。

【請求項21】 トランスポザーゼがCreトランスポザーゼである、請求項20記載の転移因子。

【請求項22】 アフィニティータグをさらに含む、請求項15記載の転移因子。

【請求項23】 アフィニティータグが、ヒスチジン、Sタグ、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ、およびストレプトアビジンからなる群より選択される、請求項22記載の転移因子。

【請求項24】 アフィニティータグが6×ヒスチジンである、請求項23記載の転移因子。

【請求項25】 選択マーカーをコードする核酸が抗生物質耐性カセットである、請求項15記載の転移因子。

【請求項26】 選択マーカーがカナマイシン、アンピシリン、ゼオマイシン、ハイグロマイシン、テトラサイクリン、ピューロマイシン、およびブレオマイシン耐性からなる群より選択される抗生物質耐性カセットである、請求項13記載の転移因子。

【請求項27】 5'端および3'端を有する転移因子であって、以下を含む転移因子:

抗生物質耐性カセット;

抗生物質耐性カセットの5'側にある5'側loxP配列、および抗生物質耐性カセット

の3'側にある3'側loxP配列；

5'側loxP配列の5'側または3'側loxP配列の3'側にあるMHCエピトープ；

アフィニティータグ；

転移因子の5'端にある挿入末端；および

転移因子の3'側にある挿入末端。

【請求項28】 トランスポザーゼをさらに含む、請求項27記載の転移因子。

【請求項29】 5'端および3'端を有する転移因子であって、以下を含む転移因子：

カナマイシン抗生物質耐性カセット；

抗生物質耐性カセットに対して5'側および3'側に位置し、配列番号：11に示す配列を含むloxP配列；

トランスポザーゼをコードする核酸配列；

MHCエピトープをコードする核酸配列；

6×ヒスチジンアフィニティータグをコードする核酸配列；

転移因子の5'端にある挿入末端；および

転移因子の3'端にある挿入末端。

【請求項30】 MHCエピトープがMHCクラスIエピトープである、請求項29記載の転移因子。

【請求項31】 MHCクラスIエピトープが、SIINFEKL（配列番号：6）およびLLFGYPVYV（配列番号：7）からなる群より選択される、請求項30記載の転移因子。

【請求項32】 MHCエピトープがMHCクラスIIエピトープである、請求項29記載の転移因子。

【請求項33】 MHCクラスIIエピトープが、ASFEAQGALANIAVDKA（配列番号：8）である、請求項32記載の転移因子。

【請求項34】 転移因子の5'端にある挿入末端が、配列番号：5に示す配列を含む、請求項22記載の転移因子。

【請求項35】 転移因子の3'端にある挿入末端が、配列番号：3に示す配

列を含む、請求項22記載の転移因子。

【請求項36】 Creトランスポナーゼをコードするトランスポナーゼをさらに含む、請求項22記載の転移因子。

【請求項37】 病原体の抗原エピトープを検出する方法であって、以下の段階を含む方法：

- (i) 病原体細胞に請求項1記載の転移因子を感染させる段階であって、感染により病原体細胞の核酸配列における転移因子の組込みが起こる段階；
- (ii) 病原体細胞を、トランスポナーゼを含むベクターで形質転換する段階；
- (iii) 病原体細胞を内面化可能な真核細胞を、転移因子を感染させた病原体細胞に接触させる段階；
- (iv) 真核細胞を、MHCエピトープを認識する標識抗体に接触させる段階；
- (v) 標識真核細胞を同定する段階；
- (vi) 標識真核細胞を溶解して、病原体細胞に外面化する段階；
- (vii) 外面化病原体細胞を増殖させて、病原体細胞集団を産生させる段階；および
- (viii) 核酸配列が病原体の抗原領域をコードし、組込まれた状態の転移因子を有する病原体細胞の核酸配列を同定する段階。

【請求項38】 真核細胞が免疫系の細胞である、請求項37記載の方法。

【請求項39】 免疫系の細胞がマクロファージである、請求項38記載の方法。

【請求項40】 標識真核細胞の同定が、蛍光標示式細胞分取法による、請求項37記載の方法。

【請求項41】 MHCエピトープがMHCクラスIエピトープである、請求項37記載の方法。

【請求項42】 MHCエピトープがMHCクラスIIエピトープである、請求項37記載の方法。

【請求項43】 病原体細胞が細菌細胞である、請求項37記載の方法。

【請求項44】 病原体がサルモネラ菌 (Salmonella)、結核菌 (Mycobacterium tuberculosis)、プラスモジウム (Plasmodium)、またはリステリア菌 (L

ist~~eria~~ monocytogenes)である、請求項37記載の方法。 _____

【請求項45】 病原体の抗原エピトープを検出する方法であって、以下の段階を含む方法：

(i) トランスポザゼを発現する病原体細胞に請求項1記載の転移因子を感染させる段階であって、感染により病原体細胞の核酸配列における転移因子の組み込みが起こる段階；

(ii) 病原体細胞を内面化可能な真核細胞を、転移因子を感染させた病原体細胞に接触させる段階；

(iii) 真核細胞を、MHCエピトープを認識する標識抗体に接触させる段階；

(iv) 標識真核細胞を同定する段階；

(v) 真核細胞を溶解して、病原体細胞に外面化する段階；

(vi) 外面化病原体細胞を増殖させて、病原体細胞集団を産生させる段階；および

(vii) 核酸配列が病原体の抗原因子をコードし、組み込まれた状態の転移因子を有する病原体細胞の核酸配列を同定する段階。

【請求項46】 病原体の抗原エピトープを検出する方法であって、以下の段階を含む方法：

(i) 病原体細胞に請求項11記載の転移因子を感染させる段階であって、感染により病原体細胞の核酸配列における転移因子の組み込みが起こる段階；

(ii) 病原体細胞を内面化可能な真核細胞を、転移因子を感染させた病原体細胞に接触させる段階；

(iii) 真核細胞を、MHCエピトープを認識する標識抗体に接触させる段階；

(iv) 標識真核細胞を同定する段階；

(v) 標識真核細胞を溶解して、病原体細胞を外面化する段階；

(vi) 外面化細菌細胞を増殖させて、病原体細胞集団を産生させる段階；および

(vii) 核酸配列が病原体の抗原因子をコードし、組み込まれた状態の転移因子を有する病原体細胞の核酸配列を同定する段階。

【請求項47】 キャリアワクチンを作製する方法であって、以下の段階を含む方法；

(i) 細菌細胞に請求項11記載の転移因子を感染させる段階であって、該転移因子が、転移因子のMHCエピトープに使用可能に連結させる疾患に関連した抗原をさらに含み、細菌の感染により細菌細胞の核酸配列における転移因子の組み込みが起こる段階；

(ii) 細菌細胞を内面化可能な真核細胞を、転移因子を感染させた細菌細胞に接触させる段階；

(iii) 真核細胞を、MHCエピトープを認識する標識抗体に接触させる段階；

(iv) 標識真菌細胞を同定する段階；

(v) 標識真核細胞を溶解して、細菌細胞を外面化させる段階；

(vi) 外面化細菌細胞を増殖させて、細菌細胞集団を産生させる段階；

(vii) 核酸配列が病原体の抗原因子をコードし、組み込まれた状態の転移因子を有する細菌細胞の核酸配列を同定する段階；および

(viii) 段階(iv)で同定された細菌細胞を増殖させる段階であって、細菌細胞がキャリアワクチンである段階。

【請求項48】 疾患が癌である、請求項47記載の方法。

【請求項49】 癌が乳癌である、請求項48記載の方法。

【請求項50】 疾患がウイルス性疾患または細菌性疾患である、請求項47記載の方法。

【請求項51】 細菌細胞を弱毒化する段階をさらに含む、請求項47記載の方法。

【請求項52】 MHCエピトープがMHCクラスIエピトープである、請求項50記載の方法。

【請求項53】 MHCエピトープがMHCクラスIIエピトープである、請求項50記載の方法。

【請求項54】 細菌細胞が弱毒化された細菌細胞である、請求項50記載の方法。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】発明の詳細な説明

【補正方法】変更

【補正の内容】

【発明の詳細な説明】

【0001】

発明の分野

本発明はトランスポゾン、特に抗原性エピトープを同定するためにトランスポゾンをゲノム中に挿入するトランスポゾンの用途に関する。本発明はまたワクチン抗原の同定に関する。

【0002】

発明の背景

免疫系は、感染細胞表面に複合体を提示することで外来感染性病原体の存在に対して変化する。このような複合体は、病原体に由来する抗原および主要組織適合複合体(MHC)のタンパク質群からなる。2つの異なる経路(MHC IおよびMHC II)は、それぞれ細胞性免疫応答および液性免疫応答を駆動する。一般にMHC Iで提示される抗原は細胞質タンパク質に由来する。しかしながら抗原提示細胞(APC)においてMHC Iが提示した抗原は、リソソーム区画を介する別の経路に由来する(Morrisonら、J. Exp. Med. 163: 903~21、1986; Pfeifer ら、Nature 361: 359~62、1993)。MHC II抗原は一般に飲作用機構または食作用機構に由来する(Morrisonら、J. Exp. Med. 163: 903~21、1986)。

【0003】

ヒトおよび動物で疾患を媒介可能な多くの病原性細菌のうち、細胞内の病原体については、細菌/宿主細胞の相互作用を理解しようとする際に特有の問題がある。細胞内の病原体は二群に分けられる。一つはファゴリソソーム区画に存在する群(サルモネラ属(*Salmonella*)、結核菌(*Mycobacterium tuberculosis*)など)であり、もうひとつは細胞質に存在する群(リステリア菌(*Listeria monocytogenes*)、赤痢菌属(*Shigella*)など)である。細胞内の病原体は、宿主細胞の正常な構造および代謝の機構を変えることで細菌の生存および宿主の免疫監視機構回避を促すように設計されたタンパク質を選択的に分泌して宿主細胞の環境に適合する。ファゴリソソームおよび細胞質に存在する細胞内病原体はいずれも、

特に宿主細胞内の細胞質内においてそれらの作用を仲介することが分かっているタンパク質群を分泌する (CornelisおよびWolf-Watz, Mol. Microbial. 23 : 861 ~ 7、1997 ; CollazoおよびGalan, Mol. Microbial. 24 : 747 ~ 56、1997 ; FuおよびGalan, Mol. Microbial. 27 : 359 ~ 68、1998)。細菌タンパク質が細胞質に局在することからも宿主細胞のプロテオソームのもつ分解機構へ近づくことが可能になると考えられることから、これらのタンパク質はクラスI接触可能タンパク質 (Class I Accessible Proteins : CAPs) と命名されている。

【0004】

サルモネラ菌ワクチンを接種すると、細菌そのものに対する強固な細胞性および体液性の応答が生じる (Szteinら、J. Immunol. 155 : 3987 ~ 93、1995)。ただし異種抗原に特異的な免疫応答は変動が大きく、抗原そのものの性質、抗原が発現する細胞および組織の種類、発現のレベル、ならびに抗原の提示および経路 (クラスI MHC経路またはクラスII MHC経路) による作用などを含む複数の因子の影響を受ける。SIVカプシド抗原またはマラリアのスポロゾイド周囲抗原を対象として得られた結果では、抗原をサルモネラ菌で発現させた場合に抗原特異的な細胞傷害性Tリンパ球 (CTL) の応答が誘導されることが判明している (Flynnら、Mol. Microbiol. 4 : 2111 ~ 8、1990 ; Sadoffら、Science、240 : 336 ~ 8、1988 ; Valentineら、Vaccine. 14 : 138 ~ 46、1996)。同様の発現システムでCTL応答を誘発するような他の抗原は認められていない (Titeら、Immunology 70 (4) : 540 ~ 6、1990)。真核生物のプロモーターにより発現する外来抗原の遺伝子を含むプラスミドでは、外来抗原に対して強い細胞性応答が引き起こされた (Darjiら、Cell 91 (6) : 765 ~ 75、1997 ; SchodelおよびCurtiss、Dev. Biol. Stand. 84 : 245 ~ 53、1995)。

【0005】

癌ワクチンの分野における著しい進歩の一つが、腫瘍特異的なエピトープの同定である。一般に癌ワクチンでは、腫瘍特異的なエピトープを免疫系の様々な区画に指向することで対腫瘍免疫応答の誘発が試みられる。DNA、タンパク質、ペプチド、細胞全体、炭水化物、および組換えベクターからなるワクチンを始めとするいくつかの戦略が、腫瘍ワクチンの作製に用いられている。組換えベクター

の使用には、ワクシニア、BCG、カナリア痘、およびサルモネラ菌などの生キャリアベクターの使用が含まれ、腫瘍および感染の副産物としての感染性病原体に対する適切な免疫応答を刺激するように設計されている。有効なワクチンは、執拗な癌に対して強固かつ長時間持続し、かつ複数のハプロタイプ防護を誘発する必要がある。理想的なワクチンであれば、多種多様の抗原を送り込むことで上記の要求事項を満たし、不可避の免疫応答を誘発するであろう。

【0006】

発明の要約

一つの転移因子は3'端と5'端を有するものとして提供される。この転移因子は、選択マーカをコードする核酸配列の5'側にある5'側組換え部位、選択マーカをコードする核酸配列の3'側にある3'側組換え部位、5'側組換え部位の5'側または3'側組換え部位の3'側にあるMHCエピトープをコードする核酸、および転移因子の5'端および3'端にある、転移因子の組込みに十分な逆方向反復配列からなる挿入末端を含む。

【0007】

一つの態様における転移因子は、5'端と3'端を有するものとして提供される。この転移因子は、選択マーカをコードする核酸の5'側にある5'側loxP配列、選択マーカをコードする核酸の3'側にある3'側loxP配列、5'側loxP配列の5'側または3'側loxP配列の3'側にあるMHCエピトープ、転移因子の5'端にある挿入末端、および転移因子の3'側に挿入末端を含む。

【0008】

別の態様における転移因子は、5'端と3'端を有するものとして提供される。この転移因子は、抗生物質耐性カセット、抗生物質耐性カセットの5'側にある5'側loxP配列および抗生物質耐性カセットの3'側にある3'側loxP配列、5'側loxP配列の5'側または3'側loxP配列の3'側にあるMHCエピトープ、アフィニティータグ、転移因子の5'端にある挿入末端、および転移因子の3'端にある挿入末端を含む。

【0009】

さらに別の態様における転移因子は、5'端と3'端を有するものとして提供される。この転移因子は、カナマイシン抗生物質耐性カセット、抗生物質耐性カセッ

トの5'側および3'側に位置して配列番号：11に示す配列からなるloxP配列、トランスポザーゼをコードする核酸配列、MHCエピトープをコードする核酸配列、6×ヒスチジンアフィニティータグをコードする核酸配列、転移因子の5'端にある挿入末端、および転移因子の3'端にある挿入末端を含む。

【0010】

転移因子は、細菌の染色体全体に読み枠のあった挿入が可能ないように作製されている。このシステムにより、遺伝子および最終的に得られるタンパク質に「タグ」が付けられ、細菌が感染した細胞の膜を越えて分泌されるタンパク質の同定に使用される。

【0011】

この方法の特定の態様は、本発明の転移因子を病原体細胞に感染させる段階（この感染により細菌細胞の核酸配列に転移因子が組込まれる）、トランスポザーゼを含むベクターで病原体細胞を形質転換する段階、転移因子を感染させた病原体細胞を、病原体細胞を内面化可能な真核細胞に接触させる段階、この真核細胞をMHCエピトープを認識する標識抗体に接触させる段階、標識真核細胞を同定する段階、標識真核細胞が溶解して細菌細胞に外面化される段階、この表面提示細菌細胞を増殖させて細菌細胞集団を産生させる段階、および組込まれた転移因子を有する細菌細胞の核酸配列（この核酸配列は病原体の抗原因子をコードする）を同定する段階を含む。

【0012】

別の態様ではキャリアワクチンを作製する方法が提供される。この方法は、転移因子のMHCエピトープに使用可能に連結される疾患に関連した抗原をさらに含む本発明の転移因子を細菌細胞に感染させる段階を含む。この細菌感染により、細菌細胞の核酸配列中に転移因子の組込みが起こる。この方法はまた、病原体細胞を内部に取り込むことができる真核細胞に転移因子を有する病原体細胞を接触させる段階、この真核細胞をMHCエピトープを認識する標識抗体に接触させる段階、標識真核細胞を同定する段階、標識真核細胞が溶解して細菌細胞に外面化される段階、この表面提示細菌細胞を増殖させて細菌細胞集団を産生させる段階、組込まれた転移因子を有する細菌細胞の核酸配列（この核酸配列は病原体の抗原

因子をコードする)を同定する段階、および同定された細菌細胞を増殖させる段階からなる。同定された細菌細胞はキャリアワクチンとなる。

【0013】

配列表

添付した配列表に記載した核酸およびアミノ酸の配列を、ヌクレオチド塩基については標準的な略号で、かつアミノ酸については3文字表記法を用いて示す。個々の核酸配列は1本鎖のみを示すが、表示した鎖に対する任意の参照によって含まれるような相補鎖は理解される。

【0014】

配列番号：1は、転移因子が挿入された遺伝子の配列決定に使用可能なプライマーの核酸配列である。

【0015】

配列番号：2は、転移因子が挿入された遺伝子の配列決定に使用可能なプライマーの核酸配列である。

【0016】

配列番号：3は、0末端の配列である。

【0017】

配列番号：4は、0Eモザイク末端の配列である。

【0018】

配列番号：5は、I末端の配列である。

【0019】

配列番号：6は、SIINFEKLエピトープである。

【0020】

配列番号：7は、LLFGYPVYVエピトープである。

【0021】

配列番号：8は、ASFEAQGALANIAVDKAエピトープである。

【0022】

配列番号：9は、MEモザイク末端の配列である。

【0023】

配列番号：10は、IEモザイク末端の配列である。

【0024】

配列番号：11は、5'側PCR部位の配列であり、図12では54～77位に示されている。

【0025】

配列番号：12は、6×ヒスチジンの核酸配列であり、図12では82～100位に示されている。

【0026】

配列番号：13は、6×ヒスチジンのアミノ酸配列であり、図12ではヌクレオチドが82～100位に示されている。

【0027】

配列番号：14は、loxPの配列であり、図12では109～143位に示されている。

【0028】

配列番号：15は、3'側PCR部位の配列であり、図12では145～167位に示されている。

【0029】

配列番号：16は、5'側PCR部位の配列であり、図13では25～45位に示されている。

【0030】

配列番号：17は、5'側アスパリジニル（asparaginyl）エンドペプチダーゼ切断部位の配列であり、図13では34～45位に示されている。

【0031】

配列番号：18は、3'側アスパリジニルエンドペプチダーゼ切断部位の配列であり、図13では97～108位に示されている。

【0032】

配列番号：19は、ASFEAQGALANIAVDKAエピトープの核酸配列であり、図13では46～96位に示されている。

【0033】

配列番号：20は、ASFEAQGALANIAVDKAエピトープのアミノ酸配列であり、図13

に示されている。

【0034】

配列番号：21は、3'側PCR部位の配列であり、図13では178～198位に示されている。

【0035】

配列番号：22は、DICE-Iの核酸配列であり、図12に示されている。

【0036】

配列番号：23は、DICE-Iのアミノ酸配列であり、図12に示されている。

【0037】

配列番号：24は、DICE-IIの核酸配列であり、図13に示されている。

【0038】

配列番号：25は、DICE-IIのアミノ酸配列であり、図13に示されている。

【0039】

配列番号：26は、図2に示す構築に用いる分離アミノ酸配列である。

【0040】

配列番号：27は、図5に示す構築に用いる分離アミノ酸配列である。

【0041】

配列番号：28は、図6に示す構築に用いる分離アミノ酸配列である。

【0042】

配列番号：29は、図7に示す構築に用いる分離アミノ酸配列である。

【0043】

配列番号：30は、図8に示す構築に用いる分離アミノ酸配列である。

【0044】

配列番号：31は、図9に示す構築に用いる分離アミノ酸配列である。

【0045】

配列番号：32は、図10に示す構築に用いる分離アミノ酸配列である。

【0046】

配列番号：33は、読み枠のあったHER/neu/SOB挿入断片を持つ遺伝子の同定に用いるプライマーの核酸配列である。

【0047】

配列番号：34は、読み枠のあったHER/neu/SOB挿入断片を持つ遺伝子の同定に用いるプライマーの核酸配列である。

【0048】

いくつかの態様の詳細な説明

転移因子は、細菌の染色体全体に読み枠のあった挿入断片を導入可能なように遺伝子操作された。このシステムにより、遺伝子および最終的に得られるタンパク質に「タグ」が付けられ、細菌が感染した細胞の膜を超えて分泌されるタンパク質の同定が可能となる。一つの態様における転移因子は、抗生物質耐性カセット、2か所の極めて小さなloxP組換え部位、MHCクラスIエピトープまたはクラスIIエピトープ、および隣接する挿入末端を含む。creリコンビナーゼタンパク質などのトランスポザーゼは、プラスミドからみてトランスに発現するか、または転移因子に含まれる。creリコンビナーゼは抗生物質耐性カセットを含む介在配列をループにして切り出す。転移因子がある遺伝子内へ挿入すると、分離する挿入断片がその遺伝子の読み枠にMHCクラスIまたはクラスIIエピトープを持ち込む。制限酵素切断部位を用いて他のマーカータンパク質を導入することができる。

【0049】

クラスIエピトープの散在性挿入 (Disseminated Insertions of Class-I Epitopes (DICE-I) (クラスIIの場合はDICE-II)) と命名されている上記技術の一つの態様では、細菌の病原性にかかわるタンパク質の迅速かつ正確な同定が可能である。この技術の用途には、ヒトおよび動物に対して病原性を有するさまざまな細菌に対する治療用ワクチンおよび薬剤の標的の同定などが含まれる。またこのシステムでは、ゲノム解析を介して同定済みの遺伝子群に対する機能の割り付けを容易にする。この方法はまた、患者の免疫応答を評価する方法の一つとしてのハプロタイプに依存しない細胞傷害性Tリンパ球 (CTL) 応答を所定の抗原に対して引き起こすこと、特異的な感染症を診断する方法としてのCTL応答の測定、強いCTL応答を必要とするヒトおよび動物用のワクチンの開発、感染に対するCTL応答誘導に使用可能な新しい細菌キャリアタンパク質の同定、および真核免疫エフェクターにより送達されることで免疫応答の増強に直接応用することができる。

る。

【0050】

宿主細胞との相互作用に応じてMHCクラスI経路またはクラスII経路で分泌されるCAPsの同定は、より良好な細菌キャリアワクチンを設計する際に、かつさまざまな病原体および腫瘍に由来する全く新しいクラスの有用な可能性のあるワクチン標的タンパク質を同定する際に極めて有用である。この理由は、宿主の抗原プロセッシング機構および提示機構に対してCAPsが特有の接近を行うからである。さらに、ゲノム全体の解析で明らかになったオープンリーディングフレームの実質的な部分は機能未知なので、宿主細胞との相互作用に応じて分泌されるCAPsの同定が可能なシステムであれば、病原体/宿主細胞の相互作用の多くの段階を理解する上で極めて有用なツールとなる。さらに、CAPsは、サルモネラ菌などの細菌ワクチン株による外来エピトープの送達において有用な仲介的役割を果たす。

【0051】

DICE-IとDICE-IIには、CAPsを同定する際に固有の強みがいくつかある。いくつかの態様においてはDICEの選択は条件的であり、宿主のクラスIの到達可能タンパク質は、H-2K^bと関連するプロセッシングおよび提示の結果として単離され、また、宿主のクラスII到達可能タンパク質は、I-A^bと関連するプロセッシングおよび提示の結果として単離される。さらに、分泌シグナルを変化させない同じフレームの挿入断片のみが回収される。選択は単純かつ強力に行うことが可能であり、フローサイトメトリーにより感染細胞の大規模集団から興味深い株を速やかに回収することができる。選択は特異的なので、ファゴリソソーム内における細菌の自然減に起因する非分泌性細胞内タンパク質に由来するMHCエピトープを提示したマクロファージから細菌を回収することはできない。これは、このような細菌が増殖できないからである。さらに転移因子には6×ヒスチジンタグなどのアフィニティータグを付けることが可能なので、タンパク質の細胞内における位置を顕微鏡で描出することができることから、相同性が認められないタンパク質に関して引き出せる機能および表現型に関して推定を行うことが可能となる。またこのようなタンパク質は、対象株を弱毒化して適切なモデル動物を免疫することで、エピトープキャリアとして容易に評価することができる。

【0052】

略語および定義

本発明をより適切に定義するために、また、本発明の実施に際しての当業者向けのガイドとするために以下に挙げる定義および方法を提供する。本明細書および添付した請求項で用いる単数形の「一つの (a, an)」または「その (the)」には、文中で明瞭に指示しない限り複数の対象が含まれる。したがって例えば「一つのトランスポゾン (a transposon)」と記述する場合は、複数のトランスポゾンを含み、また「その抗原 (the antigen)」と記述する場合は、一つまたは複数の抗原、および当業者に既知であるその同等物などが含まれる。

【0053】

特に明記しない限り、本明細書で使用するすべての技術用語および科学用語は、本発明が属する技術分野における当業者が通常理解するものと同じ意味をもつ。

【0054】

MOI：感染効率。

【0055】

RT：室温。

【0056】

アフィニティータグ：転移因子に含めることができる配列で、これにより転移因子が挿入したタンパク質の精製が容易になる。アフィニティータグという用語は、タグの核酸配列、およびこの核酸配列にコードされたタグのタンパク質配列を意味する。アフィニティータグの例には、6×ヒスチジンなどのヒスチジン、S-タグ、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) およびストレプトアビジンなどがあるがこれらに限定されない。

【0057】

動物：生きている多細胞脊椎生物であり、例えば哺乳類、霊長類、および鳥類を含むカテゴリーを意味する。

【0058】

抗生物質耐性カセット：抗生物質に対する耐性を付与する核酸配列である選択

マーカーであり、宿主細胞においてこの核酸が翻訳される。抗生物質耐性カセットの例には、カナマイシン、アンピシリン、テトラサイクリン、クロラムフェニコール、ネオマイシン、ハイグロマイシン、ゼオシンなどがあるがこれらに限定されない。

【0059】

癌：分化の欠損、増殖率の上昇、周辺組織への浸潤を伴う特徴的な退形成が生じ、かつ転移可能な悪性新生物である。

【0060】

CAPs：MHCのクラスIまたはクラスIIの到達可能タンパク質（accessible proteins）。

【0061】

cDNA（相補的DNA）：内部の非コードセグメント（イントロン）、および転写を決定する調節配列がないDNA断片。cDNAは細胞から抽出したメッセンジャーRNAを逆転写することで実験室で合成される。

【0062】

欠失：DNA配列の除去を意味し、その両側の領域は連結される。

【0063】

DNA：デオキシリボ核酸。DNAは長い鎖状ポリマーであり、ほぼ全ての生物の遺伝物質を構成する（一部のウイルスはリボ核酸すなわちRNAからなる遺伝子を有する）。DNAポリマーの反復性の単位は4種の異なるヌクレオチドであり、それぞれリン酸基に結合したデオキシポリボース糖に4種の塩基（アデニン、グアニン、シトシン、およびチミン）が結合したもののいずれかである。ヌクレオチドの3塩基配列はコドンと呼ばれ、DNA分子中ではポリペプチドのアミノ酸をコードする。コドンという用語はまた、DNA配列が転写されてできるmRNA中にみられる対応する（および相補する）3個のヌクレオチド配列についても用いられる。

【0064】

挿入末端：トランスポザーゼが結合する核酸配列。一般に挿入末端の長さは19塩基対である。本明細書に記述するコンストラクトでは、挿入配列はMHCエピートープに対して5'側（5'側挿入末端）と3' loxP配列の3'側（3'側挿入末端）に位置

する。5'側挿入末端の例には、IS50RのI末端（例：配列番号：5、ゲンバンクアクセス番号U32991.1）およびモザイク配列（配列番号：4、GoryshinおよびReznikoff、Journal of Biological Chemistry 273（13）：7367～74を参照）などがあるがこれらに限定されない。3'側挿入末端の例には、IS50RのO末端（配列番号：3、ゲンバンクアクセス番号U00004.1）、および本発明に示されるモザイク配列（図11参照）などが含まれるがこれらに限定されない。

【0065】

IS50R：挿入配列（Inserion sequence：IS）のタイプ50R。このIS因子の末端には短い逆方向反復があり、I末端およびO末端（挿入末端）と命名されている（例：ゲンバンクアクセス番号U32991.1およびU00004.1をそれぞれ参照）。

【0066】

単離された：「単離された」生物学的構成成分（核酸、ペプチドまたはタンパク質など）は、実質的に単離され、個別に産生され、または、構成成分が天然に存在する生物の細胞中における他の生物学的構成成分—すなわち他の染色体および染色体外のDNAおよびRNAならびにタンパク質—とは別に精製される。したがって「単離された」核酸、ペプチドおよびタンパク質には、標準的な精製法で精製された核酸およびタンパク質が含まれる。この用語はまた、化学的に合成された核酸のほか、宿主細胞における組換え発現で調製された核酸、ペプチド、およびタンパク質を含む。

【0067】

loxP配列：細菌のcreリコンビナーゼで認識される標的配列であり、loxPは酵素Creリコンビナーゼが認識する組換え部位である。loxP配列は本来バクテリオファージP1に由来する（Hoekstraら、Proceedings of the National Academy of Sciences 88（12）：5457～61、1991を参照）。一つの態様において、loxP部位は配列

ATAACTTCGTATAATGTATGCTA TACGAAGTTAT

で定義される。「最小」のloxP配列とはcreリコンビナーゼにより認識される最小の配列を意味する。一つの態様における最小のloxP配列は、ヘクストラ（Hoekstra）ら、Proceedings of the National Academy of Sciences 88（12）：5457

～61 1991に記載されている。特異的な非制限性の例には、ゲンバンクアクセス
ション番号M10494.1に登録された配列が含まれるがこれらに限定されない。loxP
配列の5'側と3'側は同一でなければならない。loxP部位は未熟な転写の終結を防
ぐために上述のような明確な配列で表される。

【0068】

本明細書に用いる際にこれらの配列は、選択マーカをコードする配列に対し
て上流および下流（それぞれ5'側および3'側）に位置する。

【0069】

哺乳類：この用語は、ヒトおよびヒト以外の哺乳類を含む。これと同様に「被
験者」「患者」および「個体」という用語は、ヒトおよび獣医学的対象を含む。

【0070】

MHCエピトープ：クラスIまたはクラスIIのMHC経路を介して提示されるエピト
ープで、少なくとも一つの抗体が使用できる。この抗体は遊離状態のエピトープ
ではなく、MHC分子群と複合体を形成したエピトープに優先的に結合する。クラ
スI MHCエピトープの例には、オボアルブミンエピトープ、SIINFEKL（配列番号
：6）、およびHTLV-1（ゲンバンクアクセスション番号B45714参照）に由来するH
LA-2拘束ヒトT細胞エピトープLLFGYPVYV（配列番号：7）などが含まれるがこれ
らに限定されない。クラスI MHCエピトープの例には、I-A^b拘束性T細胞エピト
ープであるASFEAQGALANIAVDKA（配列番号：8）などが含まれるがこれらに限定され
ない。

【0071】

MHCエピトープは、MHCエピトープをコードする核酸配列が、転移因子の5'側組
換え部位の5'側、または3'側組換え部位の3'側にある場合に、組換え部位（すな
わち5'側または3'側の組換え部位）に「隣接する」。転移因子とゲノム間で組換
えが起こると、MHCエピトープがゲノム上に挿入することになり、MHCエピトープ
が細胞のタンパク質とともに発現する。一つの態様において、MHCエピトープは
組換え部位の約5000 bp以内に存在する。またはMHCエピトープは、組換え部位か
ら1000 bp、500 bp、100 bp、20 bp、10 bp、もしくは0 bp以内に位置する場合
がある。

【0072】

オリゴヌクレオチド：最長約200ヌクレオチド塩基の直鎖状ポリヌクレオチド配列で、例えば少なくとも6ヌクレオチドであるポリヌクレオチド（DNAまたはRNAなど）であり、例えば少なくとも15ヌクレオチド、50ヌクレオチド、100ヌクレオチドまたさらには200ヌクレオチドの長さである。

【0073】

使用可能に連結される：第1の核酸配列が、第2の核酸配列と機能的に関連のあのように位置する場合に、第1の核酸配列と第2の核酸配列は使用可能に連結されている。例えばプロモーターがコード配列の転写または発現に影響する場合に、プロモーターとコード配列は使用可能に連結されている。使用可能に連結されるDNA配列は一般に隣接しており、また必要に応じて2つのタンパク質のコード領域は同じリーディングフレームに結びつけられる。

【0074】

ORF（オープンリーディングフレーム）：終止コドンをもたずにアミノ酸をコードする一連のヌクレオチドの3塩基配列（コドン）。このような配列は通常ペプチドに転写される。

【0075】

相同分子種：2つのヌクレオチド配列は、両者が共通の祖先の配列を共有する場合に、かつその祖先配列を有する種が2つの種に分かれて分岐した場合のことであり、2つの配列は互いに相同分子種となる。相同分子種である配列はまた相同配列（homologous sequence）でもある。

【0076】

PCR：ポリメラーゼ連鎖反応。変性、プライマーとのアニーリング、またDNAポリメラーゼによるその後の伸長を行って標的DNA配列のコピー数を増幅させるサイクルからなる手法を意味する。

【0077】

薬学的に許容されるキャリア：本発明において有用な薬学的に許容されるキャリアは従来型のものである。「レミントン薬理科学（Remington's Pharmaceutical Sciences）」、マーティン（E.W. Martin）著、Mack Publishing Co.、ペン

シルベニア州イーストン、第15版（1975）では、本明細書に記載されたDNA、RNA、およびタンパク質の医薬品の送達に適した組成および剤形について記載されている。薬物を含む本発明の態様は、当業者に既知であると思われる従来型の、薬学的に許容されるキャリア、アジュバントおよび対イオン類を用いて調製することができる。

【0078】

キャリアの性質は一般に、使用する特定の投与様式の影響を受ける。例えば、非経口製剤は通常、水、生理食塩水、平衡塩類溶液、水溶性デキストロース、グリセロール、エタノール、ゴマ油、それらの組み合わせなどの薬学的および生理学的に許容される溶液を溶媒として含む注射溶液である。培地も例えば薬学的に許容される、浸透圧の調整を目的とした塩類などの従来の医薬品用補助剤、緩衝液、保存剤などを含む場合がある。キャリアおよび組成は無菌性とすることが可能であり、また製剤は投与様式に合わせる。固体成分（例えば、粉末、ピル、錠剤、またはカプセル剤）については、例えば医薬品級のマンニトール、乳糖、デンプン、サッカリンナトリウム、セルロース、炭酸マグネシウム、またはステアリン酸マグネシウムなどの従来の非毒性固体キャリアを含めることができる。また生物学的に中性のキャリアのほかに投与可能な医薬品成分には、湿潤剤、乳化剤、保存剤、および酢酸ナトリウムやソルビタンモノラウレートなどのpH緩衝剤などの微量の非毒性の補助物質を含めることができる。

【0079】

組成物は、液体溶液、懸濁液、乳濁液、錠剤、ピル、カプセル、徐放性製剤、または粉末とすることができる。このような組成は、従来の結合剤およびトリグリセリドなどのキャリアとともに坐薬として製剤化することができる。

【0080】

プローブおよびプライマー：核酸のプローブおよびプライマーは、本発明で提供されるアミノ酸配列を元に容易に調製することができる。プローブは検出用標識またはレポーター分子に結合する単離された核酸である。典型的な標識には、放射性同位元素、リガンド、化学発光試薬、および酵素などがある。さまざまな目的の標識の選択における標識および誘導の方法に関しては例えばサンブルック

(Sambrook)ら、「分子クローニング：実験室マニュアル (Molecular Cloning : A Laboratory Manual)」、Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) およびアウシュベル (Ausubel) ら、「分子生物学の現行のプロトコール (Current Protocols in Molecular Biology)」、Greene Publishing Associates and Wiley-Intersciences (1987) に記載されている。

【0081】

プライマーはDNAオリゴヌクレオチドなどの短い核酸で、長さは15ヌクレオチドまたはそれ以上である。プライマーは、核酸ハイブリダイゼーションによりプライマーと標的DNA鎖の間でハイブリッドを形成させて相補的な標的DNA鎖にアニールさせ、次にDNAポリメラーゼ酵素によって標的DNA鎖に沿って伸長させることができる。プライマー対は例えばポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) または、当技術分野で周知の他の核酸増幅法により核酸配列の増幅に使用することができる。

【0082】

プローブおよびプライマーの調製法および使用法は例えばサンプブルックら (「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」、Cold Spring Harbor Laboratory Press、1989)、アウシュベルら、「Current Protocols in Molecular Biology」、Greene Publishing Associates and Wiley-Intersciences (1987)、およびイニス (Innis) ら、「PCRプロトコール、方法と応用の手引き (PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications)」、1990、Innisら (編)、21~27、Academic Press、Inc.、カリフォルニア州サンディエゴ、に記載されている。PCR用のプライマー対は例えばPrimer (バージョン0.5、(著作権) 1991、Whitehead Institute for Biomedical Research、マサチューセッツ州ケンブリッジ) などの専用のコンピュータプログラムを使用することで、既知の配列を元に作製することができる。特定のプローブまたはプライマーの特異性がその長さとともに上昇することを当業者であれば理解すると思われる。したがって例えばcDNAまたは遺伝子の連続20個のヌクレオチドからなるプライマーであれば、cDNAまたはゲノムDNAのライブラリーに含まれる遺伝子の相同体などの標的配列に対し、対応するわずか15ヌクレオチドのプライマーと比べて高い特異性でアニールする。このためより高い特異性を得るために、プローブおよびプライマーは、本明細

書に開示された20個、25個、30個、35個、40個、50個またはそれ以上の核酸配列の連続したヌクレオチドからなるものとして選択される。

【0083】

したがって本発明は、開示された遺伝子配列の特定の長さからなる単離された核酸分子を含む。このような分子は、このような配列の少なくとも20個、21個、25個、30個、35個、40個、50個または100個またはそれ以上の連続ヌクレオチドからなるほか、開示された配列の任意の領域から得られる。例としてcDNAおよび遺伝子の配列が、配列の長さの半分または4分の1に割り当てられることがあるほか、単離された核酸分子が、その分子の第1の半分または第2の半分、または4分の1の部分の4つのいずれかに基づく場合がある。特にDNA配列は、これまで開示されていなかったタンパク質の特有の部分をコードする場合がある。

【0084】

精製された：精製されたという用語は、絶対的に純粋であることを必要とせず、むしろ相対的な意味で用いられる。したがって例えば、精製されたタンパク質調製物とは、そのタンパク質が、細胞内に存在する天然の環境におけるタンパク質より純度が高いことを意味する。一つの態様において、タンパク質の調製物は、そのタンパク質が調製物の総タンパク質量の少なくとも50%となるように精製される。

【0085】

組換え体：組換え体の核酸は、天然には存在しない配列を有する核酸か、または2つの通常は別個の配列セグメントを人工的な組み合わせで作製される配列を有する核酸である。このような人工的な組み合わせは、化学的な合成により、またはさらに一般的には、単離された核酸セグメントを人工的に操作することにより—例えば遺伝子工学的手法で—構築される場合が多い。

【0086】

組換え部位：非対称性配列で分けられた向きが反対のパリンドロームを含む核酸配列で、部位特異的組換え反応が起こりうる核酸配列。一つの特定の非制限的な例における組換え部位はLoxP部位である（上記参照）。別の特定の非制限的な例における組換え部位はFRT部位である。FRTは、ともに最小のFRT部位を含む2つ

の逆方向の13塩基対 (bp) からなる反復、および8 bpのスペーサーに加えて、最小基質の反応性を高める付加的な13 bpの反復からなる (例えば米国特許第5,654,182号を参照)。別の特定の非制限性の例における組換え部位はTN3、マリナー、またはガンマ/デルタのトランスポゾンに由来する組換え部位である。

【0087】

リコンビナーゼ：組換え部位における組換えを触媒するタンパク質 (総説としてKilbyら、TIG、9、413~421 (1993) ; Landy、Current Opinion in Genetics and Development、3、699~707 (1993) ; Argosら、EMBO J.、5、433~440 (1986))。一つの特定の非制限性のリコンビナーゼの例はCreタンパク質である。別の特定の非制限性の例がリコンビナーゼはFlpタンパク質である。他の特定の非制限性のリコンビナーゼの例はTn3リコンビナーゼ、トランスポゾン ガンマ/デルタのリコンビナーゼ、およびトランスポゾン マリナーに由来するリコンビナーゼがある。

【0088】

Creタンパク質とFlpタンパク質は、 λ インテグラーゼファミリーのDNAリコンビナーゼに属する。CreリコンビナーゼとFlpリコンビナーゼには、行う反応の種類についても標的部位の構造および組換えの機構についても高い類似性が認められる (例えば、Jayaram、TIBS、19、78~82 (1994) ; Leeら、J. Biol. Chem.、270、4042~4052 (1995) を参照)。例えば一連の組換え現象は、複製、およびATPなどの外的エネルギー源に依存せず、スーパーコイル状および直線状のDNA 鑄型の関数となる。

【0089】

リコンビナーゼは、対応する2つの組換え部位間における組換えを促すことでその作用を発揮する。Creの場合、組換え部位はLox部位であり、Flpの場合、組換え部位はFrtである。同様の部位はトランスポゾン ガンマ/デルタ、TN3、およびトランスポゾン マリナーに認められている。このような組換え部位は非対称性配列で分けられた逆向きのパリンドロームからなる (例えば、Mackら、Nucleic Acids Research、20、4451~4455 (1992) ; Hoessら、Nucleic Acids Research、14、2287~2300 (1986) ; Kilbyら (上記) を参照)。同じ直線状DNA分子上

に平行に配置された標的部位（すなわちいわゆる「ダイレクトリピート」）間で組換えが起こることで、介在するDNA配列が環状分子として切り出される。環状DNA分子上のダイレクトリピート間で組換えが起こると、介在するDNAが切り出されて2つの環状分子が生じる。Cre/Lox組換え系もFlp/Frt組換え系も、植物、昆虫、酵母、細菌および哺乳類の染色体への部位特異的組込みなどの広範囲の目的に使用されていることが報告されている（例えば、Sauerら、Proc. Natl. Acad. Sci., 85、5166～5170（1988）を参照）。組換え体を対象とした陽性および陰性の選択法またはスクリーニング法が開発されている（例えば、Sauerら、J. Mol. Biol., 223、911～928（1992）を参照）。組換えシステムまたはその成分のトランスジェニックマウス、植物および昆虫などにおける使用では、宿主がリコンビナーゼ遺伝子を発現して、明瞭な悪影響が認められていないので、これらのタンパク質が一般に安全であることが確認されている（例えば、Orbinら、Proc. Natl. Acad. Sci., 89、6861～6865（1992）を参照）。

【0090】

試料：末梢血、尿、唾液、生検組織、外科的検体、羊水穿刺試料、生検材料中に存在するものなどの、体細胞から得られるゲノムDNA、RNA、またはタンパク質を含む生物学的試料を含む。

【0091】

選択マーカー：ポリペプチドを発現する対象細胞の同定に使用するポリペプチド。選択マーカーは、当業者に既知の任意の方法で検出することができる。このような方法には、酵素アッセイ法、分光光度学的アッセイ法、抗生物質耐性アッセイ法、および抗体を用いるアッセイ法（例えばELISAや免疫化学的手法）などが含まれる。選択マーカーの特定の非制限性の例には、ルシフェラーゼ、緑色蛍光タンパク質（GFP）、または β -ガラクトシダーゼがある。一つの態様における選択マーカーは酵素である。別の態様における選択マーカーは酵素である。さらに別の態様における選択マーカーは抗原エピトープである。使用される選択マーカーの特定の非制限性の例は、細胞を薬剤耐性にするタンパク質である（例えば、ゼオマイシン耐性、ハイグロマイシン耐性、テトラサイクリン耐性、ピューロマイシン耐性またはブレオマイシン耐性）。

【0092】

配列の同一性：2つの核酸配列またはアミノ酸配列の類似性は配列相互の類似性で表され、通常は配列の同一性と呼ばれる。配列の同一性は、同一性（または類似性または相同性）のパーセンテージで測定されることが多い。すなわちパーセンテージが大きくなればなるほど2つの配列の類似性は大きくなる。本発明におけるDICEトランスポゾンの核酸配列およびタンパク質配列の相同体は、標準的な方法で整列させた場合に比較的高度の配列同一性を有する。このような相同性は、相同分子種のタンパク質またはcDNAが、より関連性が薄い種と比べてより密接に関連する種に由来したものである場合に、より顕著になると考えられる。

【0093】

通常、本発明のDICEトランスポゾンの相同体は、本発明のDICEトランスポゾムを相同なDICEトランスポゾムと比較した場合に、ヌクレオチドレベルで少なくとも50%同一であり、アミノ酸レベルでは少なくとも50%同一である。さらに高いレベルの相同性も可能であり、例えば少なくともヌクレオチドレベルで75%、90%、95%または98%が同一となる。

【0094】

比較を目的とした配列の整列化の方法は当技術分野で周知である。さまざまなプログラムおよび整列アルゴリズムが諸文献に記載されている（SmithおよびWaterman、Adv. Appl. Math. 2 : 482、1981 ; NeedlemanおよびWunsch、J. Mol. Biol. 48 : 443、1970 ; PearsonおよびLipman、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 : 2444、1988 ; HigginsおよびSharp、Gene、73 : 237 ~ 44、1988 ; HigginsおよびSharp、CABIOS 5 : 151 ~ 3、1989 ; Corpetら、Nuc. Acids Res. 16 : 10881 ~ 90、1988 ; Huangら、Computer Appls. in the Biosciences 8、155-65、1992 ; およびPearsonら、Meth. Mol. Bio. 24 : 307 ~ 31、1994）。アルチュール（Altschul）ら、J. Mol. Biol. 215 : 403-10、1990では、配列整列法および相同性計算に関する詳細な考察が述べられている。

【0095】

NCBI Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (Altschulら、J. Mol. Biol. 215 : 403 ~ 10、1990) は、National Center for Biotechnology Informati

on (NCBI、メリーランド州ベセスダ)などの複数のソースおよびインターネットから配列解析プログラムblastp、blastn、blastx、tblastnおよびtblastxと関連して使用する目的で入手できる。NCBIのウェブサイトで入手することができる。

【0096】

開示されたDICEトランスポゾームのアミノ酸配列の相同体は、NCBI Blast 2.0 (gapped blastpはデフォルトパラメータに設定)を用いて、開示したDICEトランスポゾームのアミノ酸配列の完全長の整列に関してカウントした場合に、少なくとも60%、70%、80%、90%、95%、98%または少なくとも99%の配列の同一性を有する場合がある。blastnプログラムで検索した照会はDUSTでフィルタリングされる(HancockおよびArmstrong、1994、Comput. Appl. Biosci. 10:67~70)。他のプログラムではSEGが使用される。

【0097】

約30アミノ酸を超えるアミノ酸の配列を比較する場合は、デフォルトのパラメータ(gap existence cost = 11、およびper residue gap cost = 1)で設定されたデフォルトのBLOSUM62マトリックスを用いてBlast 2配列関数を使用する。短いペプチド(約30アミノ酸以下)を整列させる際にはBlast 2配列関数を用いて、デフォルトのパラメータ(open gap = 9、extension gap = 1 penalties)に設定したPAM30マトリックスを使用して整列を行う。参照配列に対してさらに高度の類似性があるタンパク質では、この方法で評価した場合に、少なくとも70%、75%、80%、90%、95%、98%、または少なくとも99%の配列同一性といった高い同一性のパーセンテージを示す場合がある。全配列より短い配列について配列同一性を比較する際には、相同体は通常10~20アミノ酸の短いウィンドウについて少なくとも75%の配列同一性を有する。また、参照配列に対する類似性に応じて少なくとも85%の配列同一性、または少なくとも90%または95%の配列同一性を有する場合がある。

【0098】

または複数の配列をマニュアルで整列させて、元の配列と、オリジナル配列と比較する参照配列における同一のアミノ酸の数をカウントする場合がある。こうして得られた同一アミノ酸の数を参照配列のアミノ酸総数で割り、100を乗じて

同一性のパーセントを得る。

【0099】

上記の配列同一性の範囲がガイダンスのみで提供されることを当業者であれば理解すると思われる。すなわち、著しく有意な相同体であれば、提供される範囲外に判定される可能性があることはほぼ確実である。本発明は上述したペプチドの相同体だけでなく、そのような相同体をコードする核酸分子も提供する。

【0100】

2つの核酸配列が実質的に同一であることの指標の一つは、第1の核酸がコードするポリペプチドが第2の核酸がコードするポリペプチドと免疫学的に交差反応するということである。

【0101】

高度の同一性を示さない核酸配列でも、遺伝暗号の縮重のために類似のアミノ酸配列をコードする場合がある。核酸配列上の変化は縮重を用いることで、すべてが実質的に同じタンパク質をコードする複数の核酸配列を生じることが理解される。

【0102】

2つの核酸分子が密接に関連していることの別の指標は、両分子がストリンジエント条件下で相互にハイブリッドを形成することである。

【0103】

本発明は、上述のペプチドの相同体だけでなく、そのような相同体をコードする核酸分子も提供する。

【0104】

被験者：生きている多細胞性脊椎生物であり、ヒトおよび獣医学的对象（例えば哺乳類、鳥類、および霊長類）を含むカテゴリー。

【0105】

形質転換された：形質転換された細胞は、分子生物学的手法で核酸分子が導入された細胞である。本明細書で用いる形質転換という用語は、そのような細胞に核酸分子を導入するすべての手法を含み、ウイルスベクターを用いたトランスフェクション、プラスミドベクターを用いた形質転換、ならびにエレクトロポレー

ション、リポフェクション、およびパーティクルガン加速法による裸のDNAの導入などが含まれる。

【0106】

トランスジェニック細胞：外来の非天然型のDNAを含む形質転換細胞。

【0107】

転移因子：短い可動性DNA配列で、複製してコピーを染色体上のランダムな部位に挿入可能な配列。一般に転移因子では、両末端の配列は互いにほぼ同一で反対方向（逆向き）の反復である。天然の転移因子（トランスポゾン）は、それらの挿入を触媒する酵素であるトランスポザゼをコードする。細菌には2つの種類のトランスポゾンがあり、一つは単純なトランスポゾンであり挿入に必要な遺伝子群のみを有する。もう一つは複合型のトランスポゾンであり挿入に必要な遺伝子群のほかにも遺伝子群を有する。真核生物には、2つのクラスの可動性遺伝因子がある。第1のクラスは細菌のトランスポゾン様のものでありDNA配列が直接動く。第2のクラス（レトロトランスポゾン）は逆転写酵素でRNAを転写してDNAを作って、DNAが新しい部位に挿入することで動く。

【0108】

「転移因子」という用語には「トランスポゾン」と「トランスポゾーム」が含まれる。本明細書に記載された方法を用いて、転移因子を使用してMHCクラスI経路またはクラスII経路からCAPsを同定することができる。

【0109】

トランスポザゼ：トランスポゾンの転位を担う酵素。本明細書では、核酸配列（ゲンバンクアクセッション番号AAB60064を参照）およびアミノ酸配列（ゲンバンクアクセッション番号U15573を参照）の両方を意味する。

【0110】

トランスポゾーム：自身をゲノム上の他の位置に移動させることができる可動性遺伝因子。本明細書で転移因子と記述する場合は、トランスポザゼを含まない可動性遺伝因子を意味する。例として、それぞれ図7および図8に示すDICE-IおよびDICE-IIがあるがこれらに限定されない。

【0111】

トランスポゾン：自身をゲノム上の他の位置に移動させることができる可動性遺伝因子。本明細書ではトランスポザーゼを含む転移因子を意味する。例として図2に示すTn5-DICE、図5に示すTn5-HER/neu/SOB、および図6に示すTn5-HIV 1/S0Bなどがあるがこれらに限定されない。

【0112】

ベクター：宿主細胞に導入される核酸分子で、導入されることで形質転換宿主細胞が作製される。ベクターには、宿主細胞内で自身の複製を可能とする核酸配列（複製起点など）が含まれる場合がある。ベクターはまた、一つまたは複数の選択マーカー遺伝子群、および当技術分野で既知の他の遺伝因子群を含む場合がある。

【0113】

アミノ酸配列および核酸配列の異型：開示されたDICEトランスポゾンは様々な方法で産生させることができる。DNAがコードされたタンパク質の生物学的活性に影響することなく多くの方法で変化する場合があることを当業者であれば理解すると思われる。例えばPCRにより、開示されたDICEトランスポゾムをコードするDNA配列の変異を作製することができる。このような異型は、該タンパク質を発現させるため使用される宿主細胞内におけるコドン使用優先度が最適化された異型、または発現を促進する他の配列の変化が最適化された異型となる場合がある。

【0114】

2つのタイプのcDNA配列の異型を作製することができる。第1のタイプにおけるcDNA配列の変異は、コードされるポリペプチドのアミノ酸配列上の変化として現れない。このようなサイレント型の変異は遺伝暗号の縮重を単に反映したものである。第2のタイプにおけるcDNA配列の変異は、コードされるタンパク質のアミノ酸配列上の変化と結びつく。この場合における異型cDNA配列は、異型ポリペプチド配列を生じる。コードされるポリペプチドの機能上の同一性および免疫学的同一性を最適に維持するために、このようなアミノ酸の置換は保存的なものとされる。保存的な置換では、一つのアミノ酸が、大きさ、疎水性などが類似した他のアミノ酸に置き換えられる。このような置換は一般に、対象タンパク質の特性

を詳細に調節することが望まれる場合に保存的である。あるタンパク質中で元のアミノ酸に対して置換されるアミノ酸の例、また保存的な置換であるとみなされるアミノ酸の例を以下に挙げる：Alaに対するSer；Argに対するLys；Asnに対するGlnまたはHis；Aspに対するGlu；Cysに対するSer；Glnに対するAsn；Gluに対するAsp；Glyに対するPro；Hisに対するAsnまたはGln；Ileに対するLeuまたはVal；Leuに対するIleまたはVal；Lysに対するArgまたはGln；Metに対するLeuまたはIle；Pheに対するMet、LeuまたはTyr；Serに対するThr；Thrに対するSer；Trpに対するTyr；Tyrに対するTrpまたはPhe；およびValに対するIleまたはLeu。

【0115】

アミノ酸の変化を生じるcDNA配列上の変異は、それが保存的なものであれ非保存的なものであれ、コードされるタンパク質の機能および免疫学的同一性の維持を促すために最小限とする。タンパク質の免疫学的同一性は、開示されたDICEトランスポゾームに対して抗体により認識されるか否かを判定して評価することができる。すなわちそのような抗体で認識される異型は免疫学的に保存されている。特定の態様における任意のcDNAの異型はコードされるポリペプチドに対してわずか20アミノ酸、例えば10アミノ酸より少ない置換を導入する。異型アミノ酸配列は例えば天然のアミノ酸配列に対して80%、90%またはさらには95%の同一性を有することがある。

【0116】

様々な種に由来する同一または同等のタンパク質中に保存された残基もまた、配列中に導入されうる置換の位置に関するガイダンスを提供することもある。複数の種にわたって高度に保存されている残基は、タンパク質の機能上、複数の種にわたってそれほど保存されていない残基と比べて重要である可能性が高い。

【0117】

分子遺伝学分野で一般に使用されている他の用語の定義については、ルーウィン (Benjamin Lewin) 「遺伝子 V (Genes V)」 (Oxford University Press、1994 (ISBN 0-19-854287-9)) ；ケンドリュー (Kendrew) ら (編) 「分子生物学百科事典 (The Encyclopedia of Molecular Biology)」 (Blackwell Science Ltd.、1994 (ISBN 0-632-02182-9)) ；およびマイヤーズ (Robert A. Meyers)

(編)「分子生物学とバイオテクノロジー：包括的卓上参考書 (Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference)」(VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8))で参照することができる。

【0118】

実施例1

転移因子の作製

転移因子は、MHCクラスIまたはMHCクラスIIエピトープを細菌ゲノム全体にランダムに分布させることが可能である。転移因子は5'末端および3'末端において、トランスポザーゼが結合する挿入末端と隣接している。一般に挿入末端の長さは約19ヌクレオチドである。5'側の挿入末端の例には、IS50R (ゲンバンクアクセス番号U32991.1)のI末端、ならびにI末端およびO末端のモザイク配列などがあるがこれらに限定されない。3'側の挿入末端の例には、IS50R (ゲンバンクアクセス番号U00004.1)のO末端ならびにI末端およびO末端のモザイク配列などがあるがこれらに限定されない(図10参照)。

【0119】

転移因子はまた組換え部位の対を含むことがある。例として最短のloxP配列の対があり、これはcreリコンビナーゼなどのリコンビナーゼと相互作用することで、組換え部位間に位置する配列を細菌ゲノム上への転移因子の挿入に伴って除去することができる。一つの態様における5'側loxP配列は、選択マーカートをコードする核酸配列の5'側に、またMHCクラスIエピトープまたはクラスIIエピトープの3'側に位置する。3'側loxP配列は3'側挿入末端の5'側、および選択マーカートをコードする核酸配列の3'側に位置する。本発明で使用されるloxP配列(配列番号:11)には、loxPがその機能を保持することができる最小配列の例が含まれる。本発明ではより長いloxP配列が使用される場合がある。一方で長いloxP配列ほど細菌ゲノム上に挿入される。特定の理論に拘束されるわけではないが、タンパク質へのより短い挿入で対象タンパク質が適切に機能する可能性が大きい。

【0120】

本発明の転移因子はまた、選択マーカートをコードする核酸配列をloxP配列間に含み、これにより転移因子プラスミドを含む細菌の選択が可能となる。一つの態

様における選択マーカーをコードする核酸配列は抗生物質耐性をコードする。選択した選択マーカーをコードする核酸配列は、転移因子を挿入する細菌に依存する場合がある。例えばサルモネラ菌を使用する場合はカナマイシン耐性カセットを転移因子に使用する場合がある。本発明を実施するために使用される可能性のある他の抗生物質耐性カセットの例には、アンピシリン、テトラサイクリン、クロラムフェニコール、ネオマイシン、ハイグロマイシン、ゼオシンなどがあるがこれらに限定されない。

【0121】

MHCクラスIまたはMHCクラスIIに拘束されるエピトープは、本発明の転移因子により細菌ゲノムに送達される。MHCエピトープは5'側挿入末端の3'側、および5'側loxP配列の5'側に位置する。使用したMHCエピトープには少なくとも一つの利用可能な抗体結合部位がある。抗体は遊離状態のエピトープではなく、MHC分子と複合体を形成したエピトープに優先的に結合する。使用可能なクラスI MHCエピトープの例には、オボアルブミンエピトープ、SIINFEKL（配列番号：6）、およびHTLV-1に由来するHLA-A2拘束性ヒトT細胞エピトープであるLLFGYPVYV（ゲンバンクアクセッション番号B45714）などがあるがこれらに限定されない。使用可能なクラスII MHC拘束性エピトープの例には、I-A^b拘束性T細胞エピトープであるASFEAQGALANIAVDKA（ゲンバンクアクセッション番号228499）などがあるがこれらに限定されない。

【0122】

本発明の転移因子はまたTn5トランスポザーゼの配列を含む場合がある。この配列を含む場合、トランスポザーゼは、選択マーカーをコードする核酸配列の3'側、および3'側loxP配列の5'側に位置する。creリコンビナーゼが付加されると、トランスポザーゼ、および選択マーカーをコードする核酸配列は除去される。

【0123】

本発明の転移因子は、MHCエピトープを細菌を含む多様な生物のゲノム上に転移させるために使用される場合がある。本発明を実施するために使用される可能性のある生物の例には、サルモネラ菌、結核菌（*Mycobacterium tuberculosis*）、プラスモジウム（*Plasmodium*）およびリステリア菌（*Listeria monocytogenes*）

）などがあるがこれらに限定されない。

【0124】

実施例2

Tn5を基礎とするDICE転移因子の構築

Tn5-DICEトランスポゾン、Tn5トランスポザゼ、およびその5'末端および3'末端において最小loxP組換え部位のダイレトリピートと隣接する抗生物質耐性カセット（カナマイシン）からなるものとして作製した（図1）。Tn5-DICEトランスポゾン全体はIS50RのI末端とO末端に隣接する。このトランスポゾンの5'末端はTn5のI末端、H-2K^b拘束性オボアルブミンエピトープであるSIINFEKL（配列番号：6）、6×ヒスチジンタグ、および一つのloxP部位からなり、これらは転写的に読み枠が合っている。Tn5-DICEはオボアルブミンエピトープであるSIINFEKL（配列番号：6）を細菌染色体全体に無作為に分布させる。感染細菌から放出されるエピトープタグCAPsは、宿主細胞のタンパク質分解装置によるプロセッシングを受け、保持されたオボアルブミンエピトープSIINFEKL（配列番号：6）は、H-2K^bという状況において宿主細胞の表面に提示される（図11参照）。このコンストラクトにおけるI末端はアミノ酸1～19位にあり、SIINFEKL（配列番号：6）は28～52位にあり、5'側PCR部位は54～77位にあり、6×ヒスチジンは82～100位にあり、LoxPは109～143位にあり、3'側PCR部位は145～167位にあり、またO末端は153～171位にある（図12参照）。

【0125】

Tn5-DICEは、Creリコンビナーゼによる誘導で挿入がloxP部位で分離するように構築された。カナマイシンおよびTn5トランスポザゼのカセットは、非複製性のループに分かれて失われる。ある遺伝子に対して読み枠があった挿入が起きた場合には、49アミノ酸の分離産物がSIINFEKL（配列番号：6）エピトープをもつ融合タンパク質を作る（図2）。

【0126】

F⁺プラスミドとTn5-DICEをもつプラスミドpDE510（tra-/mob-）（図3A）の両方を含む大腸菌ドナー株（ATCC番号53323）を、ナリジクス酸耐性のネズミチフス菌（*Salmonella typhimurium*）株（ATCC番号14028）と接合させた。両細菌は1

: 1の割合でルリア-ベルターニブロス中で37℃で12時間ともにインキュベートして接合させた。ナリジクス酸およびカナマイシンに耐性のサルモネラ菌のトランス接合体であるF'プラスミドとプラスミドを持つTn5-DICEの両方を有するpDE510 (F'::Tn5-DICE)を単離した。F'::Tn5-DICEの存在は、P22感受性試験 (Miller J.H. 「分子遺伝学実験 (Experiments in Molecular Genetics)」, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1972))、およびトランスポゾンのカナマイシンマーカーを大腸菌 (E. coli) またはサルモネラ菌のレシピエントにF'プラスミドの伝達頻度と等しい頻度で戻す転移能力を指標に確認した。これは、挿入が実際にF'プラスミド上にあることを保証するための対照実験である。F'プラスミドは特定の頻度で移る。転移因子がF'プラスミド上にある場合、最初の接合と同じ速度で新しいレシピエントに再伝達されるはずである。

【0127】

サルモネラ菌に特異的なバクテリオファージであるP22 (HTint) (ATCC番号19585-B1)を用いて、F'::Tn5-DICEをもつネズミチフス菌のトランス接合体の溶菌液プールを調製した。(「プールする」とは、トランスポゾンが挿入したF'プラスミドをもつサルモネラ菌株のドナー培養液を用いてファージ溶菌液を調製することを意味する)。P22の形質導入は、複数のサルモネラ菌株間で遺伝マーカーを移すために頻繁に使用されている方法である。サルモネラ菌にはF'に対する配列の相同性はないので、第2のサルモネラ菌レシピエント (ATCC 14028)であるpBAD33creを含むサルモネラ菌株に変異を誘発するためにP22ファージの溶菌液を使用した。レシピエントとF'との間に相同性がないことから、カナマイシン耐性の形質導入体が、相同組換えではなく転移の結果に由来することが保証された。形質導入体はカナマイシン耐性 (30 µg/ml)を含むルリア寒天上で選択された。pBAD33cre (図3B)上のCreリコンビナーゼは、pBADプロモーターの強固な調節制御下にあり、カナマイシン耐性遺伝子およびTn5トランスポザーゼ遺伝子の分離および消失は、該株をアラビノース (1 mM)の存在下で増殖させた場合に限られる。pBAD33creプラスミドは不安定であり、このプラスミドをもつサルモネラ菌株を選択なしに増殖させると第3~10世代以内に失われる。

【0128】

サルモネラ菌に特異的なバクテリオファージP22 (HTint) を用いて、F':::Tn5-DICEをもつネズミチフス菌のトランス接合体の溶菌液プールを調製した (トランスポゾンが挿入されたF'プラスミドをもつサルモネラ菌株のドナー培養液を用いてファージ溶菌液を調製した)。サルモネラ菌にはF'に対する配列の相同性がないので、P22ファージ溶菌液を用いて、第2のサルモネラ菌レシピエントであるpBAD33creをもつサルモネラ菌株 (ATCC 14028) に変異を導入した。プラスミドpBAD33creは以下の手順で構築した。creリコンビナーゼを発現する大腸菌 (*Escherichia coli*) 株NS2114から、PCR増幅によりCreリコンビナーゼをクローニングした (Seifertら、Proc. Natl. Acad. Sci. 83: 735~40 (1986))。サブクローニングしたcreリコンビナーゼ遺伝子のClaI-HindIII切断断片を、ClaI-HindIII切断したアラビノースで誘導可能なプラスミドpBAD33にクローニングした (Guzmanら、J. Bacteriol. 177 (14): 4121~30 (1995))。

【0129】

レシピエントにはF'との相同性がないので、カナマイシン耐性の形質導入体が、相同組換えではなく転移の結果であることが保証された。形質導入体はカナマイシン耐性 (30 µg/ml) を指標にルリア寒天上で選択した。pBAD33cre (図3B) 上のCreリコンビナーゼは、pBADプロモーターの強い調節制御下にあり、カナマイシン耐性遺伝子およびTn5トランスポザーゼ遺伝子の分離および消失は、該株をアラビノース (1 mM) の存在下で増殖させた場合に限られる。pBAD33creプラスミドは不安定であり、このプラスミドをもつサルモネラ菌株を選択なしに増殖させると第3~10世代以内に失われる。

【0130】

実施例3

DICE挿入を含む株の同定

実施例1で調製したネズミチフス菌変異体のプールを対象に、分泌型エフェクタータンパク質をコードする遺伝子群中への分離Tn5-DICEトランスポゾンの読み枠のあった挿入を、蛍光標示式細胞分取法 (FACS) で濃縮した。Tn5-DICEが無作為に組込まれたとすると、120,000個の独立したTn5-DICE挿入が生じた場合に、そのうち約1/6 (20,000個) の変異体が読み枠の合う分離した挿入断片を含むは

ずである。これらのうち挿入の多くは、代謝に不可欠な遺伝子群中にあると思われる。また多くの挿入がプロモーター上か、または遺伝子間の非コード領域上にあると思われる。残りの変異体のうち、極めて少数がCAPs内に含まれると思われる。ネズミチフス菌中に存在するCAPsの正確な数は不明である。CAPs中におけるDICEの挿入はまれにしか起こらないので、高感度の選択法が必要であった。適切な細胞マーカーを用いることで、FACSにより極めてまれな変異体の単離が可能となった。

【0131】

マクロファージへの感染

4～6週齢のC57B1/6マウス（H-2K^b）の大腿を切断して採取した。30ゲージの針を装着して2 mlのRPMIを充填した3 ccのシリンジを用いて大腿の両端を破砕して骨髓細胞を抽出した。骨髓細胞をRPMIで37 °Cにおいて3回洗浄し、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）源として20% L929培地を含むRPMI 1640/10% EBS中に 1×10^6 細胞/mlになるように再懸濁した。L929培地は、L929細胞（マウス線維肉腫、American Type Culture Collection、バージニア州マナサス）を増殖させたものを元とし、次いで増殖した細胞がコンフルエントな状態になってから7日後に培地を回収した。骨髓細胞を5% CO₂中で37 °Cで6日間培養してこの培養液を、骨髓由来のマクロファージ（BMDM）に分化させた。BMDMをRPMI 1640/10% FBS中に再懸濁して、6ウェルのプレートに1ウェルあたり 1×10^7 細胞となるように分注した。

【0132】

実施例1で作製したTn-5分離SI INFEKL（配列番号：6）ライブラリー（ネズミチフス菌）プールを用いてBMDM細胞に感染させた。Tn5-DICEトランスポゾンの独立した挿入ライブラリーを大規模に作製することで、ネズミチフス菌にコードされる各遺伝子が確実に複数の「ヒット」を受けるとした。プールライブラリーをルリアブロス（LB）中で37 °Cにおいて振盪しながら一晩増殖させた。次にプールライブラリーをRPMI 1640中で3回洗浄し、RPMI中に 5×10^8 細胞/mlになるように懸濁した。再懸濁後のライブラリー（20 μ l）を、吸着状態にあるBMDM細胞を含む各ウェルに分注した（MOI = 1）。MOIが1またはそれ以下とすることで、同じ

BMDMに対する複数の感染が制限される。インビトロにおけるネズミチフス菌への感染率は1%と予測されている。培養液を200 rpmで2分間遠心して接触を開始させた後に37 °Cで1時間インキュベートした。次に培養液を37 °Cのリン酸緩衝食塩水 (PBS、pH 7.4、9 g/l NaCl ; 0.144 g/l KH_2PO_4 ; 0.795 g/l Na_2HPO_4) で3回洗浄した。この培養液に細胞外細菌殺菌用の50 µg/mlのゲンタマイシンを含む3 mlのRPMI 1640/10% FBSをさらに添加した後に37 °Cで2時間インキュベートした。この培養液を37 °CのPBSで3回洗浄し、細胞をプレートからかきとり、10 mlのRPMI 1640/1% FBSに再懸濁して氷中でインキュベートした。

【0133】

FACS解析

BMDM細胞をFITC接合抗H-2D^bおよびビオチン化した抗H-2K^b/SIINFEKL (5 µg 25-D1.2) とともにインキュベートした。H-2K^b/SIINFEKLに特異的な抗体 (25-D1.2) はジャーメイン (R. Germain) (米国立衛生研究所) から入手することができた。I-A^b ASFEAQGALANIAVDKAに特異的な抗体 (Y-ae) はレスゼック博士 (Leszek Ignatowicz) (Institute of Molecular Medicine and Genetics、Medical College of Georgia、ジョージア州オーガスタ) の厚意により提供され。細胞を抗体により30分間4 °Cで標識した。抗H-2K^b/SIINFEKLはモノクローナル抗体であり、クラスI拘束因子であるH-2K^bと複合体を形成した場合にSIINFEKLエピトープ (配列番号 : 6 ; Porgadorら、Immunity 6 (6) : 715 ~ 26 (1997)) のみを認識する。BMDM細胞も野生型のサルモネラ菌もこのペプチドを作らないので、分離した挿入を含む感染性サルモネラ菌株は (配列番号 : 6) のエピトープの供給源となる。細胞を4 °CのPBSで3回洗浄し、1 µgのフィコエリトリン (PE) を結合させたストレプトアビジン (Cal tag) とインキュベートした。

【0134】

FACS解析を用いて、読み枠が同じ分離トランスポゾン挿入断片を、マクロファージのクラスI抗原のプロセッシングおよび提示の経路に到達している遺伝子内に含む、サルモネラ菌が感染したマクロファージを同定および単離した。サルモネラ菌-DICEライブラリーを感染させたBMDMを、マクロファージに特徴的な前方および側方の散乱集団に最初にゲートを設けてソーティングを行った。明赤色 (PE

-抗H-2K^b/SI INFEKL) および明緑色 (FITC結合性抗H-2D^b) の集団を、ダブルポジティブ象限中で描出し、2 mlのRPMI 1640/1% FBSを含む5 mlのポリプロピレンチューブ中にソートした。ソートされた細胞を遠心し、LB/1% Triton X-100に溶解した後、LB寒天上にプレーティングし、37 °Cで一晩インキュベートしてサルモネラ菌-DICE株を回収した。

【0135】

CAP挿入を欠く感染BMDMは、フローソートされた細胞集団中に凝集体が形成する結果として回収することができる。回収がH-2K^b/SI INFEKLの表現型の発現によるものであることを確認するために、回収された細菌コロニーをカウントしてプールし、さらに2ラウンドのFACSによるソーティングを行ってCAP挿入片を含むサルモネラ菌変異体を濃縮した。個々の分離株についてさらに1ラウンドのFACS解析を行ってその表現型を確認した。ダブルポジティブのBMDMに感染しているサルモネラ菌を除き、増殖させて確認して配列決定を行った。

【0136】

実施例4

CAP遺伝子群の配列決定

読み枠の合うSI INFEKL (配列番号: 6) 挿入を含むCAPsが同一であることを判定するために、CAP遺伝子の特異的かつ高効率の同定を可能とする特有のシステムを開発した (図4)。このシステムはまた、Tn5-DICE変異体を高効率で再形質導入してその表現型を再確認する際にも使用した。分離したTn5-DICEトランスポゾンをもつプラスミド (pAV353a) のKpnI-SacI断片を、アンピシリン耐性の自殺ベクターpGP704にクローニングしてプラスミドpAV353を得た (図4A)。

【0137】

プラスミドpAV353 (amp^r tra⁺ mob⁺) で、アンピシリン耐性かつナリジクス酸感受性のドナー株である大腸菌S17 λ pir (Kinder, S.A.ら、Gene 136, 271~5 (1993)) を形質転換し、また、pBAD33creをもち、自然発生的なナリジクス酸耐性でCreを発現するネズミチフス菌Tn5-DICE変異体CAP変異株と接合させた。染色体のloxP部位にプラスミドpAV353が組込まれたコピーを有するトランス接合体 (amp^r nal^r) の選択を、Creリコンビナーゼで誘導後に、ナリジクス酸およびアン

ピシリン耐性のトランス接合体を選択することで行った（図4B）。

【0138】

染色体DNAを単離し、切断可能な複数の制限エンドヌクレアーゼ（図4A参照）の一つで37℃で2時間切断することで、元のSI INFEKL（配列番号：6）挿入に隣接する5'側または3'側のDNA配列のクローニングが可能となった。切断後のDNAをDNA精製用カラムに吸収させて制限エンドヌクレアーゼを除き、一晩15℃で連結した。アンピシリン耐性の形質転換体をTn5-DICEに特異的なプライマー

5'- GCGGATATCCACCACCACCACC-3' (ClaI, SalI, XhoI, 又は KpnI 消化) 又は
5'- TATGCCCGGGCCGTGGTGGTGG-3' (EcoRI, SacI 消化)

を用いてさらに解析した。

【0139】

大腸菌S17λpirを形質転換した場合、再連結してpAV353を含む環状断片があれば機能的なレプリコンとしてアンピシリン耐性の形質転換体が生じる。組込まれた状態のプラスミドpAV353を有する再連結した染色体断片は大腸菌S17λpir内で機能的レプリコンを形成し、元のSI INFEKL（配列番号：6）挿入（図4C）に隣接して3'側（すなわちSalI）または5'側（すなわちEcoRI）の配列のいずれかをもつ。アンピシリン耐性の形質転換体を、Tn5-DICEに特異的なプライマー

5'-GCGGATATCCACCACCACCACC-3' (ClaI, SalI, XhoI, 又は KpnI 消化) (配列番号 1)
又は 5'-TATGCCCGGGCCGTGGTGGTGG-3' (EcoRI, SacI 消化) (配列番号 2)

を用いてさらに解析した。

【0140】

表1に示すようにTn5-DICEトランスポゾン（図2）ではマクロファージおよび腸管上皮細胞系列におけるクラスI-MHC到達可能なネズミチフス菌のタンパク質の同定が可能である（実施例4参照）。宿主細胞のクラスI経路に達しないと予測されるネズミチフス菌のタンパク質が同定された。さらに少なくとも一例では、ネズミチフス菌に固有の細菌のエフェクタータンパク質が細胞質に分泌されていることが認められた（LS28）。同定した各CAPに対する免疫応答の特性を解析することで特異性の高いキャリアワクチンを構築し、特定の病原菌のライフサイクルに合わせた免疫応答が可能になると考えられる。

【0141】

実施例5

DICE法の確認

DICEスクリーンの妥当性を確認するために複数の検討を行い、同定されたCAP
 エピトープが抗原提示細胞（APC）の表面に存在することと、変異体がT細胞に特
 異的な免疫を刺激可能であることを保証した。さらに、抗原送達経路を調べて、
 DICE変異体により送達されたタンパク質が、選択的抗原プロセッシングおよび提示
 の経路によりクラスⅠ MHC経路に到達可能か、もしくはファゴリソソーム障壁を
 越えた移行により内因性経路に直接入るのかを判定した。

【表1】 DICEで同定されたサルモネラ菌の遺伝子群

株	遺伝子	Comp*	細菌	CMT-93	機能/ホモロジー
LS28	<i>ams**</i>	S	<i>S.t., S. typhi</i>	+	プロテアーゼ IV
SIIN16	<i>argT</i>	P	<i>S.t., S. typhi, E.c.</i>	-	アルギニン輸送
SIIN17	<i>fhuA</i>	P	<i>S.t., S. typhi, E.c.</i>	-	鉄輸送
SIIN27	<i>S2OMP</i>	OMP	<i>S.t., S. typhi, E.c., K.p.</i>	-	外膜タンパク質
SIIN15	<i>hspG</i>	S?	<i>S.t., S. typhi, E.c.</i>	+	高温熱ショックタンパク質
SIIN29	<i>hemK</i>	C	<i>S.t., S. typhi, E.c.</i>	-	ヘム合成
SIIN50	<i>ims75</i>	S	<i>S.t., S. typhi</i>	+	マクロファージ生存不能、MIP
SIIN61	<i>ORF</i>	S	<i>S.t., S. typhi</i>	+	不明
SIIN71	<i>hemL</i>	C	<i>S.t., S. typhi, E.c.</i>	-	ヘム合成

S.t. = ネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium*) ; S.typhi = チフス菌 (*Salmonella typhi*) ; E.c. = 大腸菌 (*E.coli*)

【0142】

蛍光顕微鏡

サルモネラ菌のDICE株LS28に、緑色蛍光タンパク質（GFP）を構成的に発現する
 プラスミドをトランスフェクトした。分離したネズミチフス菌/SIINFEKLのこ
 の株（LS28GFP）を用いて、H-2K^b拘束性BMDMにインビトロで感染後、実施例2に
 記載した方法を用いたモノクローナル抗体25-D1.2を用いて蛍光標識を付けた。
 感染BMDM細胞は、広視野の蛍光イメージングを用いて描出した。H-2K^b/SIINFEKL
 複合体が細胞表面で観察され、BMDMがSIINFEKLエピトープ（配列番号：6）をLS2
 8GFPに由来することがわかった。

【0143】

抗原プロセシングの経路を調べるために、単離した複数のDICE変異体を用いて、H-2K^b拘束性マウス腸上皮系列CMT-93 (ATCC、バージニア州マナサス、カタログ番号CCL-223) に感染させた。CMT-93は、オボアルブミンエピトープが細菌の細胞内で発現する際に、サルモネラ菌によって送達された抗原を提示することができないので、CMT-93細胞が別の抗原プロセシング経路をもたないことが示唆される。CMT-93がSI INFEKL (配列番号: 6) をその細胞表面に提示することの最も可能性の高い説明は、このエピトープがIII型分泌タンパク質との融合体として内因性経路に直接送達されるというものである。

【0144】

H-2K^b/SI INFEKLに特異的なCD8⁺ T細胞ハイブリドーマB3Z (Karttunenら、Proceedings of the National Academy of Sciences 89: 6020~24 (1992)) はレポーター細胞であり、リガンドに遭遇すると青色に変わる。H-2K^b/SI INFEKL複合体がCMT-93の表面に存在することを示す指標としてB3Zを使用した。青色のB3Z細胞が認められれば、H-2K^b/SI INFEKL複合体が、特異的なT細胞受容体により認識されることと、細菌のタンパク質により送達されることがわかる。

【0145】

CMT-93細胞 (3×10⁴細胞/ウェル) の単層にMOIが1になるように96ウェルの組織培養プレート上でLS28を感染させた。培養液を37℃で1時間インキュベートし、非浸潤性のサルモネラ菌を洗浄し、ゲンタマイシン (50 µg/ml) を含む新鮮な培地を添加した。この培養液に3×10⁴細胞/ウェルのB3Z細胞を添加し、遠心して細胞どうしの接触を開始させた。培養液を37℃で6時間インキュベートした後、各ウェルを洗浄して固定処理を行い (2%ホルムアルデヒド/0.2%グルタルアルデヒド)、現像用緩衝液 (1 mg/ml X-gal; 5 mM K₃Fe(CN)₆; 5 mM K₄Fe(CN)₆·3H₂O; 2 mM MgCl₂) 中でインキュベートした。この細胞を光学顕微鏡で観察した。青色のB3Z細胞が存在すれば、SI INFEKLエピトープが宿主細胞の細胞質に対する直接の標的であることを意味する。このデータが有意である理由は、サルモネラ菌が移行装置を用いてこれらのタンパク質を標的として細胞質に送ることを示しているためである。このようなデータは、サルモネラ菌によるクラスI MHC経路への到達が、細胞のタイプに依存することを示している。

【0146】

B3Zの刺激が特異的であること（B3Zがサルモネラ菌に感染したCMT-93細胞に遭遇した場合のみT細胞に特異的な免疫の刺激がみられること）を確認するために、広視野蛍光顕微鏡を用いてCMT-93：B3Zの相互作用を描出するために同様の実験を行った。CMT-93細胞（ 2×10^5 /ウェル、チャンバーカバーガラス番号1.5）にLS28GFPを感染させ（37℃、1時間、MOI = 10）、ゲンタマイシンを含む培地（50 $\mu\text{g/ml}$ ）を添加した。培養液をB3Z T細胞ハイブリドーマ（ 2×10^5 細胞）とともに分注して37℃で12時間インキュベートした。培養液をPBSで3回洗浄し、蛍光色素（TMA-DPH、Molecular Probes）および β -ガラクトシダーゼ（ C_{12} FDG、Molecular Probes）で細胞膜を染色し、Advanced Precision Instrumentsのデコンボリューション顕微鏡で描出した。B3Zの刺激はB3Zと感染CMT-93との同起源の相互作用に依存していた。この結果から、細菌タンパク質が移行していることの視覚的証拠が得られた。これらの結果から、宿主細胞のクラスI MHC経路に直接到達するタンパク質の単離にDICE解析が使用可能であり、これが細胞のタイプに特異的であることがわかる。さらに、DICE株は、DICE株が存在するために特異的なT細胞応答を刺激する。

【0147】

 β -ガラクトシダーゼアッセイ法

感染細胞が、T細胞レポーターに抗原を提示できる能力についても β -ガラクトシダーゼアッセイ法を用いてアッセイした。T細胞レポーターとは、クラスI MHC対立遺伝子H-2K^bという状況において提示された場合にSIINFEKLエピトープを認識するT細胞ハイブリドーマ（T細胞と腫瘍細胞が融合したもの）である。T細胞がSIINFEKL/H-2K^b複合体に遭遇すると、 β -ガラクトシダーゼの合成が開始される。基質（X-gal）の存在下でインキュベートすると、細胞は青色に変わる。細胞は、この特異的な相互作用が生じた場合にのみ青色に変わる。H-2K^b拘束性上皮細胞（ATCC番号CCL-223）に、フローサイトメトリー解析で単離した複数のサルモネラ菌株を、実施例2で上述した方法により感染させた。次にこの細胞に 1×10^7 CPU（MOI=100）で、実施例2で単離された複数のDICE変異体のそれぞれを感染させた。37℃で1時間後にウェルをリン酸緩衝食塩水（PBS）で3回洗浄し、 $1 \times$

10⁵個のB3Z細胞を添加した。200 × gで2分間遠心して細胞どうしの接触を開始させた。この培養液を37 °C/5% CO₂の環境で6時間インキュベートした。細胞を次にPBSで3回洗浄して1%ホルムアルデヒドと0.2%グルタルアルデヒドを含むPBS溶液中で4 °Cで5分間かけて固定処理を行った。次に細胞に1 mg/ml X-gal、5 mMフェリシアン化カリウム、5 mMフェロシアン化カリウム、および2 mM MgCl₂を含むPBS溶液を添加した。細胞を37 °Cで一晩インキュベートして顕微鏡を用いて青色細胞の有無を調べた。

【0148】

複数のサルモネラ菌のクローンが青色に変わり、SIINFEKLエピトープが感染後にサルモネラ菌によりファゴリソソーム障壁を越える方向に活発に向けられることと、クラスI MHC経路による処理を受けるようになることがわかった。

【0149】

実施例6

インビボにおけるT細胞免疫

宿主細胞の内因性経路への到達から、宿主のクラスI MHCのプロセッシングおよび提示経路が推測される。CAPs内に抗原を有するワクチンは抗原特異的な細胞性免疫応答を刺激できるはずである。このような抗原に対するインビボにおけるT細胞免疫は、このようなワクチンのもつ適切な応答を刺激する能力の尺度として非常に優れている。

【0150】

C57B1/6マウスを複数のDICE株で経口的に免疫した。簡単に説明すると雌のC57B1/6マウス(6~8週齢)を経口胃管栄養法で各サルモネラ菌DICE変異体につき1 × 10⁷CFUとなるように免疫した。

【0151】

このような株のもつT細胞応答をインビボで刺激する能力は、従来のCTLアッセイ法、H-2K^b/SIINFEKLテトラマー分析(NIH AIDS Reagent Programから入手したK^b/SIINFEKLテトラマーを使用)、および腫瘍保護アッセイ法で評価することができる。T細胞免疫の尺度のこのような組み合わせを用いることで、抗原特異的なT細胞集団の刺激と、これらのT細胞が機能しているか否かの両方が確認される

。H-2K^b/SI INFEKLテトラマーは、ワクチン接種が免疫した動物におけるT細胞に及ぼす影響を評価する際に極めて感度の高い方法をもたらす。陽性の作用は、免疫後の総抗原特異的T細胞の増加によって明らかになると考えられる。しかしながら、免疫後の抗原特異的なT細胞の増加からは、これらの細胞の機能に関して得られる情報はほとんどない。抗原特異的な集団を免疫により刺激したと仮定すると、刺激された細胞がその標的を死滅させない場合は、ワクチンはほとんど構築されないと考えられる。CTLアッセイ法では、抗原特異的なT細胞集団の機能性に関する必要かつ正確な尺度が得られる。SI INFEKLエピトープを発現する腫瘍細胞が、このアッセイ法の標的として使用される。ワクチンが抗原特異的なT細胞集団を刺激し、これらの細胞が効率的にその標的を死滅させた場合、ワクチンは有効に防護免疫応答を生じるとみなすことができる。

【0152】

実施例7

異種抗原乳癌ワクチンの構築

本発明の転移因子を用いることで、ワクチン開発の有益な標的となると考えられるCAPsの迅速な同定が可能となる。CAPsは宿主の免疫系に到達するので、ウイルス、細菌、および癌に対するワクチンは、防護用エピトープ（例えば外来感染性病原体または癌細胞に由来するタンパク質の断片）をAPCの細胞質区画に直接指向するワクチンキャリアとしてCAPsを用いることで構築することができる。宿主細胞のクラスIまたはクラスIIの経路に対する到達は、多くのタンパク質が誘引性のワクチン標的としてはたらきうることを示している。サルモネラ菌のワクチン株が発現する異種抗原は、動物およびヒトにおいて防護免疫応答を誘導する可能性がある。異種抗原特異的免疫は、局所性および全身性のTh1またはTh2タイプの免疫応答の両方の場合がありうる。

【0153】

CAPsのはたらきでAPCの細胞質区画に直接蓄積したHER2/neuに由来するHLA-A2拘束性エピトープは良好なMHCクラスI提示となり、そのために細胞性免疫の誘導を大きく促す可能性がある。Her2/neuは上皮成長因子様のタンパク質であり、その発現増加は様々な乳癌および他の組織の癌と関連する。強固かつ持続性の細胞

性免疫応答を生じることが、HER2/neuが上昇した乳癌などの腫瘍に対する防護免疫に不可欠である。本実施例では図2に示すTn5-DICEトランスポゾンの異型を用いたHER2/neu/SOB (HER2/neu/String of Beads) 挿入断片の構築、およびネズミチフス菌の染色体全体への送達について説明する。

【0154】

HER2/neu/SOBライブラリーの構築

HLA-A2拘束性HER2/neuエピトープを含むエピトープ挿入のライブラリーを作製するためにトランスポゾンシステムを開発した(図5)。HER2/neu/SOBは、6×ヒスチジン部位、HLA-A2拘束性HTLV-1 taxエピトープであるLLFGYPVYV、および3つのHLA-A2拘束性HER2/neuエピトープであるHER2/neu₍₃₆₉₋₃₇₇₎、HER2/neu₍₇₇₃₋₇₈₂₎、およびHER2/neu₍₆₅₄₋₆₆₂₎を有する。Tn5-HER2/neu/SOBの読み枠の合う挿入が分離することで、各エピトープをコードする81アミノ酸の産物が得られる。

【0155】

野生型のネズミチフス菌(14028s株)を最初に用いて、弱毒化変異とDICE挿入間の相互作用を避ける。抗原を最良に提示する株におけるDICE挿入を例えば他の3種の背景をもつ株に導入して、HLA-A2.1トランスジェニックマウスにおける免疫応答を試験する。弱毒株はaroAに変異があると思われる。AroAは芳香族アミノ酸の生合成経路にかかわる酵素である。aroA遺伝子座に変異が生じると、サルモネラ菌ワクチン株を用いた治療法が著しく弱まり、ワクチン株のもつ散在能力が小さくなって疾患が引き起こされる。または弱毒化株であるCL401またはCL553を使用することができる(2種のネズミチフス菌株は当研究室で見出された株で病原性が大きく弱められている。変異の遺伝子座は不明である)。aroAが使用可能である理由は、芳香族アミノ酸の生合成上の複数の変異が最良のチフス菌ワクチンの一種であると考えられるCV908(チフス菌(*Salmonella typhi*)のワクチン株)で使用されるためである。

【0156】

上記の実施例1~3で述べた方法を用いて、F'::HER2/neu/SOBを含むサルモネラ菌株の溶菌液を調製するためにP22を使用する。ネズミチフス菌の変異体のプー

ルを対象に、上述のFACSを以下のように改変することでCAPs内におけるHER2/neu/SOBカセットの読み枠の合うの挿入について濃縮する。

【0157】

HTLV1 taxのクラスIの提示を促進可能なサルモネラ菌分離株の同定

ペプチドをSOBペプチドを含むサルモネラ菌株ライブラリーからクラスI経路に指向する、サルモネラ菌のSOB含有タンパク質はHTLV 1 tax/A2.1に特異的なモノクローナル抗体を用いて同定することができる。

【0158】

H-2K^b/HLA-A2⁺トランスジェニックマウス (C57B1/6のバックグラウンドを有する) から単離したBMDMを6ウェルの組織培養用プレートに分注し (1×10⁷細胞/ウェル)、プールしたネズミチフス菌/HIV-1/SOBライブラリーを感染させた (37、MOI = 10)。1時間後に細胞を洗浄し、RPMI 1640/10% FBS (ゲンタマイシン、50 μg/ml) を重層し、2時間インキュベートする (37)。細胞を回収して洗浄し、10 mlのRPMI 1640/1% FBSに懸濁する。BMDMを、FITC結合性抗H-2D^b (Caltag) およびビオチン化したA6-TCRキメラ抗体 (HTLV-1 taxエピトープLLFGYPVYVと複合体を形成したHLA-A2を認識するキメラ抗体) (Jonathan Schneck博士 (Johns Hopkins University) より入手; O'Herrinら、Journal of Experimental Medicine 186 (8) : 1333~45) で標識し、HLA-A2に関する状況では、taxペプチドを提示するクラスI発現細胞にタグを付ける。次にビオチン化したA6-TCRをPEストレプトアビジン (Caltag) で標識する。BMDMをRPMI 1640/1% FBS (4) に再懸濁し、FACS解析でH-2D^bとA6-TCRとともに発現する集団に対するゲートを制御してソーティングを行う。ソーティングした細胞から回収した細菌を沈澱させて、1% triton X-100を含むLBブロス中に溶解した後に、上記の実施例2で記載した通りにLB寒天培地にプレーティングした。

【0159】

読み枠のあったHER2/neu/SOB挿入断片を持つ遺伝子を同定するために、配列解析用のDNA鋳型を、TAIL PCR法を一部改変した方法で作製した (実施例3を参照)。この方法では、分離したHER2/neu/SOB挿入断片内で開始する一連のタンデムのオリゴヌクレオチドを使用し、エピトープ挿入断片を増幅して挿入断片に隣接す

る領域を同定する。全体のサイクリング手法は、1次、2次、および3次の一連の反応条件として順次実施される。1次条件と2次条件は100 μ lの容量で行う。すべてのサイクリング条件は公開されている（LiuおよびWhittier、1995）。簡単に説明すると、この方法では、複雑な一連の溶解法およびアニーリング法を用いて、挿入断片に隣接する配列を決定する。これを行うためには3種のタンデムプライマーを用いて挿入断片上を「歩き」、4番目のランダムプライマーから増幅を行う。増幅後に断片をゲルで精製して配列決定用ベクターにクローニングする。

【0160】

または一つのCAP挿入を含む個々の分離菌から染色体の調製を行う。1 μ gの染色体を制限酵素PstIで1時間37℃で切断して精製する。次にリガーゼを加えて15で一晩かけてこの染色体を連結する。次に環状化した混合物を対象に、プライマー

CTACTAGTATGGATGGTGTC 及び CTAGAACCAGAT GTGTATAAG

を用いてinverse PCRを行う。PCR混合液組成のは以下の通りである：1 mMの各プライマー、10 ngの鋳型、0.2 mMのdNTP（dATP、dCTP、dGTP、dTTP）、0.5 UのTaqポリメラーゼ、10 μ lの10×PCR緩衝液、1 mMのMgCl₂、およびH₂O（最終容量100 μ l）。サイクリング条件は、溶解（95℃ 30秒）、アニーリング（55℃ 1分）伸長（72℃ 3分）の35サイクルとする。

【0161】

実施例8

異種抗原乳癌ワクチンの特性解析

実施例7で説明したネズミチフス菌のHER2/neuワクチン株を構築した後に、HLA-A2トランスジェニックマウスにおける、ワクチンのもつエпитープ特異的な細胞免疫応答の誘導能力の特性を解析して定量を行った。サルモネラ菌ワクチンシステムの利点の一つは、適切に小さな動物モデル（マウス）において開発したワクチンコンストラクトの安全性および有効性を評価することができる点である。

【0162】

ワクチン候補は、以下の基準を元に選択することができる：1) CAPsタンパク質をコードする遺伝子がネズミチフス菌とチフス菌間で保存されていなければならない(サルモネラ菌ゲノムプロジェクトで判定する)；および2) エピトープ挿入を有するCAPsは、繰り返し行う個別のフローソーティングで回収可能でなければならない。過去に行われた実験ではH-2K^bにおけるSIINFEKLを最終的に提示する遺伝子挿入を含むすべての株は二度目に回収された。他の基準が使われる場合もある。

【0163】

実施例7のように単離されるネズミチフス菌のHER2/neu/SOBワクチン株を使用して、K^b/HLA-A2トランスジェニックマウスを経口的に免疫する。このマウスは経口胃管栄養法で 1×10^7 の感染性ユニットのサルモネラ菌で免疫した。次に各ワクチンにより生じた応答を以下の方法を用いて後に分析する。

【0164】

HLAテトラマーの構築、およびエピトープ特異的なT細胞の解析

ワクチン接種に対するT細胞の応答は例えばワクチン接種を行ったHLA-A2トランスジェニックマウス、模擬ワクチン接種を行った同マウス、およびワクチン接種を行わなかった同マウスの脾臓および腸間膜リンパ節に由来するT細胞集団を対象としたHLAテトラマー分析を行って最初に評価される。使用したHLA-A2トランスジェニックマウスは、シェルマン(Linda Sherman)博士(Scripps Institute、カリフォルニア州ラホーヤ)の厚意により提供された。個々のHER2/neuエピトープに対するクラスI応答を評価する際には、個々のHER2/neuエピトープに一種の無関係な対照を加えたものを含むHLA-A2テトラマーを使用する。HLA-A2およびβ2-ミクログロブリンを発現するプラスミドは、アルトマン(John Altman)博士(Emory University)から入手可能である。またテトラマーは、米国立衛生研究所(メリーランド州ベセスダ)のAids Reagent Repositoryから入手可能である。個々のネズミチフス菌のHER2/neu/SOBワクチンで免疫したK^b/HLA-A2マウスの分離直後の脾臓細胞および腸間膜リンパ節に由来する細胞に、FITC結合性抗CD8および個々のPE標識HLA-A2テトラマーで標識を付ける。具体的には 1×10^6 個の細胞を、1 μgの各テトラマーおよび5 μgの抗CD8抗体で30分間4℃で標識する

。テトラマーの陽性CD8集団のエフェクターの状態はさらにCD28、CD44、およびCD62の発現レベルを評価して特性を解析する。これらのマーカーはエフェクター細胞の分化の状態を示す特徴となる。各細胞集団をそれぞれ1 μ gのマーカーで30分間4 で標識する。CD8⁺/CD44^{lo}/CD62⁺の表現型は、脾臓エフェクター細胞の記憶集団と相関する。このデータから、ワクチン接種に対する細胞応答の性質の特性を解析する。理想的なワクチン候補は、ワクチンを設計する元となった感染性病原体による再刺激後に速やかな発現増加能力をもつ強固な記憶CTL集団を産生するはずである。

【0165】

標的を発現するHIVエピトープのCTLの溶解

腫瘍エピトープを有するK^b/HLA-A2トランスジェニックマウスへのワクチン接種の結果として生じるエピトープ特異的なT細胞には、ヒトのHLA-A2⁺腫瘍標的の死滅を仲介する能力がある。サルモネラ菌ワクチン株が有するHER2/neuに特異的なCTL産生能力を評価するために、ワクチン接種の結果として生じたCTL集団の溶解能を測定することを目的としたアッセイ法が使用可能である。HER2/neuに対する特異的な免疫応答を測定するためには、クロム放出アッセイ法を使用してワクチン接種マウスで生じたCTLが有する、HER2/neuが上昇したHLA-A2⁺腫瘍標的（Oregon Health Sciences Universityの腫瘍バンクから入手）の死滅能力を測定することが利用できる。クロム放出アッセイ法は、活性化した細胞傷害性T細胞による標的死滅能力を決定する際に用いられる標準的な方法である。簡単に説明すると、標的細胞にCr⁵¹を充満させて洗浄し、エフェクターと標的との比が1:1~1:10,000の範囲になるようにT細胞とともにインキュベートする。死滅については、インキュベート後のさまざまな時間において培養液上清中に放出される放射性クロム量が尺度となる。未感作動物および感染動物から脾臓を感染後14~49日にマウスから採取し、またテトラマー解析用とCTLアッセイ用に脾臓細胞を回収する。CTL応答を観察する前に2次的な刺激を必要とする場合がある。個々のHLA-A2拘束性HER2/neuエピトープまたは無関係なエピトープのいずれかを充満させたT1（HLA-A2⁺-H-2^d）標的細胞を使用することができる。T1細胞は大量のHLA-A2を発現してHLA-A2拘束性エピトープを充満させやすいことから良好な2次的刺激因

子となる。別の刺激方法には、コンカナバリンAとともにインキュベートする方法や、抗CD3抗体を用いてT細胞受容体を介する方法がある。コンカナバリンAは植物の分裂促進因子の一種でありT細胞を広範に刺激する。抗CD3は抗原提示細胞との相互作用に似せることで同様にT細胞を刺激する。各エピトープに対するHLA-A2テトラマー陽性のT細胞クローンは単離して保存することができる。

【0166】

実施例9

異種抗原HIVワクチンの構築

Tn5-DICEを一部改変してHIV-1ワクチンを構築した。図6に示すように、ワクチンTn5-HIV 1/SOB（ヒト免疫不全ウイルス/ビーズの紐（human immunodeficiency virus 1/string of beads））は、6×ヒスチジン部位、HLA-A2拘束性HTLV-1 taxエピトープ、および5つのHLA-A2拘束性HIV-1エピトープ（p17₇₇₋₈₅；p24₁₉₃₋₂₀₃；RT₂₆₇₋₂₇₇；gp160₃₁₃₋₃₂₂；およびnef₇₁₋₈₀）を有する。Tn5-HIV 1/SOBの読み枠の合う挿入片が分離すると、各エピトープをコードする109アミノ酸からなる産物が生じる。

【0167】

Tn5-HIV 1/SOBコンストラクトをNaI⁺サルモネラ菌レシピエントに接合により移し、実施例1および実施例6に記載した方法でP22を用いてプール溶菌液を作製した。ファージ溶菌液を使用してネズミチフス菌（野生株14028s株）およびチフス菌（Ty21aワクチン株）に変異を誘導した。適切なCTL応答を誘発するサルモネラ菌の分子を選択して、防護免疫応答の誘導能力についてさらに検討する。有効性に関する2つの尺度を、これらのワクチンの有効性を評価する際に考慮することができる。第一の尺度は、このワクチンがエピトープを発現する細胞に対して防護免疫応答を誘発する可能性の有無であり、第二の尺度は、これらのワクチンが、ウイルス負荷に対して防護応答を誘発する可能性である。既に概説した方法の差が、インビトロおよびインビボにおけるワクチンの有効性を評価する際に使用される。

【0168】

実施例10

DICE-IおよびDICE-IIのトランスポゾームの構築

図2に示したTn5-DICEトランスポゾン¹は、多様な差のある因子群を受容するよう²に作製可能である。例えば、サルモネラ菌のタンパク質群（または上述した多様な感染性細菌のタンパク質群）を同定するために使用可能なトランスポゾームで、そのサイクルがクラスIまたはクラスII（MHC、HLA）の経路に入るものを作製することができる。サルモネラ菌のタンパク質で、そのサイクルがMHCクラスIまたはクラスIIの経路に入るタンパク質を同定するために使用可能なトランスポゾームには、例えばそれぞれDICE I（図7）およびDICE II（図8）がある。Tn5を基礎とする元のDICEトランスポゾンは、DICE-IとDICE-IIでは、トランスポザゼを除くことで修飾された。トランスポザゼを除くことで多くの利点を得られる。例えば挿入が安定し、ライブラリー構築の効率が改善される。この理由は、プロセスにおける多くの段階—例えば接合段階—が省かれることによる。トランスポザゼを除去すると、トランスポゾンが使用可能となる細菌の範囲も広がる。トランスポゾームの細菌染色体への組込みは、簡単なエレクトロポレーション法で行うことができる。図7と図8に示すトランスポゾームは過剰な二次構造も除く。Tn5-DICEにみられるこのような二次構造は、PCRおよびクローニングをやや複雑にしていた。固有の5'側および3'側のプライマー部位を付加することでinverse PCRが可能となっている。I末端およびO末端はモザイク配列に変えられており、効率のよいトランスポゾーム構築が可能となっている。

【0169】

DICE-IはオボアルブミンエピトープSIINFEKLを含み、MHCクラスI経路のサイクルに入る細菌タンパク質を同定する。一方で他のMHCクラスIエピトープ—例えばHTLV-1 taxエピトープであるLLFGYPVYV（配列番号：7）—を使用することができるほか、当技術分野で既知の他のエピトープを使用することも可能である。

【0170】

DICE IIは、I-A^b拘束性T細胞エピトープであるASFEAQGALANIAVDKA（配列番号：8）を含む。一方で、他のMHCクラスII拘束性エピトープを使用することができる。例として、抗I-A^k/鶏卵リゾチーム（Hen Egg Lysozyme）（HEL₄₆₋₆₁）または抗I-A^k/鶏卵リゾチーム（HEL₁₁₆₋₁₂₉、アクセッション番号LZCH）のモノクロ

ーナル抗体などが挙げられる。

【0171】

細菌抗原のプロセッシングは複雑であり、細胞の種類に依存する。細菌に対する宿主の免疫には、CD8とCD4の応答が必要である。CD8とCD4は一般には免疫応答における個別の役割を果たす。CD8細胞は細胞免疫応答を代表し、CD4細胞は液性（抗体）免疫応答を代表する。このような応答を刺激する抗原は宿主細胞によって異なるプロセッシングを受ける。細菌抗原がプロセッシングを受ける複数の経路があることから、宿主免疫のより詳細な理解は、各経路内における細菌抗原の到達可能性を決定することで得られると思われる。このため、複数のツールを、クラスII MHC経路内における抗原のプロセッシングを検討する方法に使用するために設計することができる。このような方法を採用することで、キャリアタンパク質を動員して抗原をクラスII MHC経路に送達することで、より有効なワクチンの構築が可能となる。この方法はクラスI MHC経路に関して既に詳述した実験と同様に、ただし、MHC IIの核酸配列が転移因子に含まれる点とMHC IIに特異的な結合剤をアッセイ法で使用する点を除いて行われる。

【0172】

実施例11

その他の異種抗原ワクチンの構築

エピトープをサルモネラ菌のゲノム上に広範囲に散在させ、防護免疫応答を誘発するキャリアタンパク質を同定して使用することで、強力なワクチンを構築することができる。サルモネラ菌は複数の多様な組織で散在性の感染を引き起こす。本発明の転移因子は様々な組織で発現する遺伝子群を同定するために使用することが可能であり、また組織特異的なキャリアタンパク質をキャリアとして使用することで、免疫応答に合わせたワクチンを構築することができる。

【0173】

実施例12

他の転移因子

蛍光タンパク質の挿入

Tn5-DICEトランスポゾンならびにDICE-IトランスポゾムおよびDICE-IIトラ

ンスポゾームの異型を、蛍光タンパク質をコードする一つまたは複数の遺伝子を
もたせるように構築することができる。このようなトランスポゾンが読み枠を維
持しながら任意の遺伝子に挿入されることで、強化型蛍光タンパク質—例えばGF
P (アクセッション番号U55761) および赤色蛍光タンパク質 (アクセッション番
号U70496) —をもつ融合タンパク質を作ることができる。本明細書におけるGFP
は、野生型のタンパク質およびスペクトルがシフトしたその変異体の両方を意味
する。これは例えばツィエン (Tsien)、1998、Am. Rev. Biochem. 67: 509、な
らびに、ツィエンおよびハイム (Heim) による米国特許第5,777,079号および5,6
25,048号に記載されている。これらは参照として本明細書に組み入れられる。ア
スパリジニル (Asparaginy) エンドペプチダーゼの切断部位があることで、蛍
光タンパク質を融合産物から切断することが可能となり、立体構造のゆがみは避
けられ、タンパク質が蛍光を発することができる。GFP遺伝子は、DICE-IIに含ま
れるI-A^b拘束性T細胞エピトープであるASFEAQGALANIAVDKAと同じ位置に内に置か
れる可能性がある。GFP遺伝子またはRFP遺伝子を修飾して終結シグナルを除去す
れば、挿入および分離後に転写および翻訳の読み過しを可能とすることができる

。

【0174】

一つまたは複数の蛍光体を添加することで、系の宿主細菌の範囲を大きく広げ
ることができると思われる。この理由は、実施例2で記載したように組織ホモジ
ネートのFACS解析により、インビボにおける発現遺伝子群の同定が可能になると
思われるためである。このようなトランスポゾン/トランスポゾームの異型で同
定されるタンパク質産物は、ヒトおよび動物に病原性があるこれまで遺伝学的
に扱いにくかった微生物における有効な細菌ワクチン抗原の同定に使用すること
ができる。このようなトランスポゾン/トランスポゾームの異型は、蛍光標識を
付けた感染性宿主細胞のソーティングを直接的に行うことで、分泌型細菌抗原の
同定に使用することができる。

【0175】

カスタマイズされたエフェクタータンパク質

Tn5-トランスポゾンならびにDICE-IトランスポゾームおよびDICE-IIトランス

ポゾムの異型は、カスタマイズされた宿主エフェクター分子群を送達するための細菌キャリアワクチンを作製するために遺伝子操作することができる。例えば宿主の情報伝達分子の断片または全体を、ワクチン取り込み後に宿主細胞に送達することで、免疫応答がより効率のよい応答に対して歪むおそれがある。候補となる情報伝達分子には、Jak/Stat経路にかかわる分子群が含まれるがこれらに限定されない。

【0176】

免疫応答に適切にバイアスをかける能力を有するワクチンでは、従来型のワクチンでみられる多くの悪い副作用が避けられる。さらに、ワクチンは急性の病原体感染を治療する目的で構築することができる。このようなタイプのワクチンに対する応答は、迅速、強力、特異的であり、さらに一過性なものとなる場合がある。このようなタイプのワクチンは、生物兵器暴露を扱う手法として、軍関係者にとって理想的である。

【0177】

多価ワクチン

上記の実施例で記載した一種以上の生物からエピトープを送達するワクチンの異型を作製することができる。多価ワクチン構築にはサルモネラ菌を使用することができる。これはサルモネラ菌にワクチン抗原をコードする大量の補助的なDNAを保持する能力があるためである。DICEシステムの強みは、複数のエピトープを組み合わせるための適切なキャリアタンパク質の同定能力にある。

【0178】

病原体感染の多くは初期感染とは異なる他の微生物の増殖を増強する。このようなワクチンは「ワンショット」による防護法に使用することができる。

【0179】

宿主受容体の送達

宿主細胞表面に局在する分子を送達するトランスポゾン/トランスポゾムの異型を作製することができる。このようなコンストラクトには少なくとも2つの潜在的な用途がある。第1に宿主細胞表面に分泌型タンパク質の存在を確認することで、感染後に分泌型細菌タンパク質を同定することができる。第2にこのよ

うな異型は、キメラ情報伝達分子群（細胞表面に結合して外部シグナルに応じて細胞内情報伝達を開始する分子群）を送達可能であると思われる。例えばワクチンを送達することは、任意の薬剤による治療後の応答を次に活性化させる。このためAPCに抗原を充満させて免疫応答を増強することができる。

【0180】

α - ω 相補性

β -ガラクトシダーゼの α 断片をコードするトランスポゾン/トランスポゾームの異型を作製することができる。多くの細菌は分泌型タンパク質の解析には適していない。これはMHC拘束による分泌型遺伝子群の同定が可能なツールが使用できないためである。このようなトランスポゾン/トランスポゾームの異型では、 β -ガラクトシダーゼの α 断片を含む融合タンパク質を細菌が分泌可能となる。宿主細胞（またはトランスジェニックの宿主動物）が β -ガラクトシダーゼの ω 断片を発現するために、分泌されたタンパク質が検出される。分泌型の α 断片および宿主の ω 断片が接触すると機能的な β -ガラクトシダーゼ複合体となり、様々な酵素基質を用いて相互作用を描出することができる。例えば基質となる C_{12} -FDG（Molecular Probes、番号I-2904）は、機能的な β -ガラクトシダーゼで切断されると蛍光を発する。または、広く使用されている基質であるX-galを使用して、活性のある β -ガラクトシダーゼを細胞内で描出することも可能であると思われる。このようなシステムを用いることで、さまざまな宿主組織中で蛍光細菌の有無を判定して動物の個体全体を対象として病原性を検討することができる。さらに、細菌タンパク質の組織特異的な分泌を決定して、適切な宿主の区画で抗原を分泌するキャリアワクチンを最適化することが可能であると思われる。

【0181】

実施例13

転移因子の他の用途

本発明の転移因子はまた、サルモネラ菌のワクチンキャリア株を修飾して、Jak2またはTyk2などの真核エフェクタータンパク質をCAP融合体として送達することで、運ばれた抗原に対する免疫応答を増強するためまたは歪めたりするために使用することもできる。このような転移因子から作られる変異体は、組織特異的

なサルモネラ菌のCAPsを同定するのに使用することが可能で、運ばれた抗原に対する免疫応答のタイミングを調節するのに有用であると考えられ、そのためさまざまな病原体のライフサイクルにより適した高感度の免疫応答を生じると思われる。例えばJAK2（宿主のキナーゼの一種）は、細胞性免疫応答を促進するサイトカインの発現を最終的に増加させる情報伝達カスケードを開始する。原理的には、このようなトランスポゾンを作製してJAK2（またはJAK2の一部）を送達して、細胞性免疫が支配的である免疫応答に対してバイアスをかけることができると思われる。

【0182】

実施例14

機能ゲノム学

病原体ゲノムの配列を決定することで、多種多様な生物体のライフサイクルに関して有用な知見がもたらされる。一方でこのようなプロジェクトから得られるデータでは、機能未知の遺伝子群が40%ほどもあることを示している。したがってゲノムプロジェクトで同定された遺伝子群に機能を速やかに割り付ける手法が必要である。本発明の転移因子は、6×ヒスチジン部位などのアフィニティータグをもつように構築することができるので、免疫局在性を調べることにより、ゲノム配列決定プロジェクトで同定された遺伝子群の機能に関する有用な知見を引き出すことができる。

【0183】

実施例15

カスタマイズされたエフェクター分子群の構築

情報伝達カスケードにより特定の免疫応答が誘導される。DICEは宿主細胞の細胞質に到達するタンパク質を同定する。DICE技術を用いることで、免疫応答を歪める機能をもつと思われるカスタマイズされたエフェクター分子群を構築することができるほか、病原体の除去に適した細菌キャリアワクチンを作製することができる。

【0184】

実施例16

診断用タンパク質の同定

これまでにない毒性のより強い細菌株が出現しており、生物テロの恐怖とあいまって、さまざまな病原体の迅速かつ正確な同定を可能とする標的が強く求められている。DICEを用いることで、感染過程で病原体が用いる種特異的な遺伝子群の同定が可能となる。

【0185】

実施例17

DNAの細胞への移行

真核細胞—特にヒトまたは哺乳類の細胞—へのDNAの移行は現在一般的な技術となっている。ベクターを純粋なDNAとしてレシピエントに導入する（トランスフェクション）方法には例えば、リン酸カルシウムとの沈澱（Grahamおよびvander Eb、1973、Virology 52:466）、もしくはリン酸ストロンチウムとの沈澱（Brashら、1987、Mol. Cell Biol. 7:2013）、エレクトロポレーション（Neumannら、1982、EMBO J. 1:841）、リポフェクション（Felgnerら、1987、Proc. Natl. Acad. Sci USA 84:7413）、DEAEデキストラン（McCuthanら、1968、J. Natl. Cancer Inst. 41:351）、マイクロインジェクション（Muellerら、1978、Cell 15:579）、プロトプラスト融合（Schaffer、1980、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:2163-7）、またはペレットガン（Kleinら、1987、Nature 327:70）などがある。またはウイルスベクターを感染させてcDNAを導入することができる。この用途には例えばレトロウイルス（Bernsteinら、1985、Gen. Engrg. 7:235）、アデノウイルス（Ahmadら、1986、J. Virol. 57:267）、またはヘルペスウイルス（Spaeteら、1982、Cell 30:295）を使用するシステムが開発されている。

。

【0186】

実施例18

転移因子の配列の異型

本発明の転移因子の構成、ならびにDICE-IおよびDICE-IIの配列をふまえ、本発明は現在DNA分子群およびタンパク質群の作製も容易にする。これらは開示されたものに由来するが、正確なヌクレオチド配列またはアミノ酸配列は開示され

たものとは異なる。このような異型は分子生物学分野における標準的な研究手法と本発明で開示されたヌクレオチド配列情報を組み合わせることで得られる場合がある。

【0187】

DNA配列の操作は、制限酵素による切断、DNAポリメラーゼによる充填、エキソヌクレアーゼによる欠失、末端デオキシヌクレオチドトランスフェラーゼによる伸長、合成もしくはクローニングされたDNA配列の連結、1本鎖バクテリオファージの中間体を介した部位特異的配列変更、またはPCRと組み合わせて特異的なオリゴヌクレオチドを使用する部位特異的配列変更などの標準的な手法で可能となる。

【0188】

異型DNA分子群には例えばM13プライマー変異導入法などの標準的なDNA変異導入法で作製されたものが含まれる。このような手法の詳細はサンプブックら、「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」、Cold Spring Harbor、ニューヨーク、1989、第15章に記載されている。これは参照として本明細書に組み入れられる。このような手法を使用することで、開示されたものとはわずかに異なる異型を作製することができる。特に本明細書に開示されたものの派生物であり、また、ヌクレオチドの欠失、付加、または置換により開示されたものとは異なるDNA分子群およびヌクレオチド配列は、これらの変更にかかわらず本発明に含まれるタンパク質群の機能的特徴を維持するタンパク質をコードしている。

【0189】

開示されたDNA分子群に由来する小DNA分子もまた本発明の範囲内に含まれる。このような小DNA分子群には、ハイブリダイゼーション用プローブまたはPCR用プライマーとしての使用に適したオリゴヌクレオチドなどが含まれる。したがってこれらの小DNA分子群は転移因子DNA分子の少なくとも一つのセグメントを含み、PCR目的では転移因子の核酸配列中における少なくとも20～25個の連続したヌクレオチドを含む。上述のように開示されたDNA分子群に由来するDNA分子およびヌクレオチド配列はまた、開示されたDNA配列またはその断片とストリンジェントな条件下でハイブリッドを形成するDNA配列として定義される。

【0190】

特定の程度のストリンジェンシーをもつハイブリダイゼーションの条件は、選択されるハイブリダイゼーション法の内容、および使用されるハイブリッドを形成するDNAの組成および長さに依存して変わる。一般に、ハイブリダイゼーション時の温度、およびハイブリダイゼーション用緩衝液のイオン強度（特に Na^+ 濃度）がハイブリダイゼーションのストリンジェンシーを決定する。特定の程度のストリンジェンシーを得るために必要なハイブリダイゼーションの条件に関する計算式はサンプルックら、（「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」、Cold Spring Harbor、ニューヨーク、1989、第9章および第11章）に記載されており、これは参照として本明細書に組み入れられる。説明のみの目的で記述すると、ハイブリダイゼーション実験は、標的DNA分子（例えば転移因子のDNA）に対するDNA分子群（例えば転移因子の偏り）のハイブリダイゼーションにより行われ、アガロースゲル上で電気泳動を行い、当技術分野において周知の手法の一つであるサザンブロッティング（Southern、J. Mol. Biol. 98: 503、1975）によりニトロセルロースフィルターに転写される。この手法はサンプルックら、（「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」、Cold Spring Harbor、ニューヨーク、1989）に記載されている。

【0191】

$[^3\text{P}]$ -dCTPで標識された標的プローブとのハイブリダイゼーションは、 $6\times\text{SSC}$ などの高イオン強度の溶液中で、後述する融解温度（ T_m ）より20～25 以下の温度で通常行われる。サザンプロット上における標的DNA分子が、10 ngまたはそれ以上のDNAを含むこのようなサザンハイブリダイゼーション実験では、ハイブリッドの形成は通常、1～2 ng/mlの放射性標識プローブ（比活性が 10^9 CPM/ μg またはそれ以上）を用いて6～8時間実施される。ハイブリッドを形成させた後に、ニトロセルロースフィルターを洗浄してバックグラウンドのハイブリダイゼーションを除く。洗浄条件は、特異的なハイブリダイゼーションシグナルを保持しながらバックグラウンドのハイブリダイゼーションを除くために、可能な限りストリンジェントである必要がある。 T_m という用語は、それ以上の温度になると一般的なイオン強度の下では放射性標識されたプローブ分子が標的DNA分子とハイブ

リッドを形成しなくなる温度を意味する。ハイブリッド分子の T_m は以下の方程式 (BoltonおよびMcCarthy、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48:1390、1962) で推定できる場合がある： $T_m = 81.5 - 16.6(\log_{10} [Na^+]) + 0.41(\%G+C) - 0.63(\% \text{ ホルムアミド}) - (600/l)$ ；この式において、「 l 」はハイブリッドの長さを塩基対で表したものである。

【0192】

この方程式は Na^+ 濃度が0.01 M ~ 0.4 Mの範囲にある場合は妥当であり、 $[Na^+]$ が高い溶液の T_m の場合、計算の精度が劣る。この方程式はまた、G+C量が30 ~ 75%の範囲内にあるDNAについては非常に有効であり、また長さが100ヌクレオチドを上回るハイブリッドに適用できる (オリゴヌクレオチドプローブの挙動についてはサンプルックら (「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」、Cold Spring Harbor、ニューヨーク、1989) の第11章に詳述されている。

【0193】

したがって例として、転移因子の核酸配列 (%GC=45%と仮定) に由来する150塩基対のDNAプローブについては、特定のストリンジェンシーを得るために必要なハイブリダイゼーション条件の計算は以下になる。ただしこの例では、ハイブリッドを形成させた後にフィルターを0.3×SSC溶液で3回洗浄すると仮定する。したがって $[Na^+] = 0.045 \text{ M}$ ；%GC=45%；ホルムアミド濃度 = 0； $l = 150$ 塩基対； $T_m = 81.5 - 16.6(\log_{10} [Na^+]) + (0.41 \times 45) - (600/150)$ となり、 $T_m = 74.4$ となる。

【0194】

2本鎖DNAの T_m は相同性が1%低下するごとに1 ~ 1.5 小さくなる (Bonnerら、J. Mol. Biol. 81:123、1973)。したがって例として0.3×SSCを用いて59.4 ~ 64.4 でフィルターを洗浄すると仮定すると、ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーは90%となる。すなわち標的転移因子DNAに対して10%を上回る配列相違があるDNA分子群はハイブリッドを形成しないことになる。またはハイブリッドを形成させた後のフィルターを0.3×SSCを用いて65.4 ~ 68.4 で洗浄する場合はハイブリダイゼーションのストリンジェンシーは94%になる。すなわち標的転移因子DNA分子に対して6%を上回る配列相違があるDNA分子はハイブリッドを形成し

ないことになる。これらの例はほぼすべて理論的な説明によるものである。他のハイブリダイゼーション法が使用される場合もあることと、実験条件の変動によっては別のストリンジェンシー計算式が必要となる場合があることを当業者であれば理解すると思われる。

【0195】

本発明の特定の態様におけるストリンジェントな条件は、その条件以下であれば25%、15%、10%、6%または2%以上の配列相違（「ミスマッチとも呼ばれる」）をもつDNA分子群が、ハイブリッドを形成しない条件として定義されることがある。

【0196】

遺伝暗号の縮重は、コードされるタンパク質のアミノ酸配列は維持しつつも、DNA分子のヌクレオチド配列の大きな相違を許容することからさらに本発明の範囲を広げる。例えば転移因子Tn5-DICEのC末端のアミノ酸残基はアラニンである。これはTn5-DICEのDNA中にヌクレオチドコドンGCGとしてコードされている。遺伝暗号が縮重することから、他のヌクレオチドコドンの3塩基配列が、C末端のアミノ酸残基（例えばGCTおよびGCC）をコードする場合がある。両者ともアラニンをコードするコドンである。したがってTn5-DICEのcDNAのヌクレオチド配列は、コードされるタンパク質のアミノ酸組成またはタンパク質の特性に影響を及ぼすことなくこの位置で3種のコドンのいずれかをとりうる。遺伝暗号の縮重に基づき異型DNA分子は、上述の標準的なDNA変異導入法を用いて、またはDNA配列の合成を行うことで本発明で開示されたcDNA分子に由来する場合がある。本明細書で示した遺伝暗号の縮重に基づく配列相違によって、ストリンジェントな条件下でも開示されたcDNA配列に対してハイブリッドを形成しないDNA配列についても本発明の範囲に含まれる。

【0197】

本発明はまた、本発明に開示された任意のDNA配列と実質的に同一なDNA配列を含む。ここで「実質的に同一である」とは、整列させた配列に対して少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%または99%同一なヌクレオチドを有する配列を意味する。

【0198】

上述したDNA変異導入法が、異型DNA分子の作製だけでなく、構造的局面が転移因子とはある程度異なるものの、そのタンパク質が明らかに転移因子タンパク質の誘導体であって転移因子タンパク質の本質的な特性を保持しているタンパク質の産生を促すためにも用いられる場合があることを当業者であれば理解すると思われる。新たに作製されたタンパク質が、転移因子タンパク質の特性上の多様性を得るために選択される場合もある。これについては以下に詳述する。このような誘導体には小さな欠失、付加、および置換を含むアミノ酸配列上に相違がある誘導体などが含まれる。

【0199】

アミノ酸配列上の相違を導入する部位は事前に決定されるが、変異そのものは事前に決まっていない。例えば所定の部位における変異のパフォーマンスを最適化する目的で、標的となるコドンまたは領域においてランダムな変異導入が行われる場合があり、発現するタンパク質の異型が、望ましい活性の最適な組み合わせに対してスクリーニングされる場合がある。既知配列を有するDNA上の事前に決定した部位において置換変異を作製する上述の手法はよく知られている。

【0200】

アミノ酸の置換は通常1残基であり、挿入は通常1～10アミノ酸残基の規模であり、欠失は約1～30残基の範囲内にある。欠失または挿入は隣接する対において作製される場合がある。すなわち2残基の欠失または2残基の挿入を行う。置換、欠失、挿入またはそれらの任意の組み合わせが選択されて最終的なコンストラクトとなる。タンパク質をコードするDNA上で作られる変異が、読み枠以外の配列にあるはずはないことは明らかであり、mRNAの二次構造を生じる可能性のある相補領域を形成しないことが望ましい。

【0201】

置換の異型は、アミノ酸配列の少なくとも1残基が除かれて、異なる残基が同じ場所に代わりに挿入されるというものである。このような置換は一般に上述のように保存的に作製される。

【0202】

機能的同一性または免疫学的同一性における実質的な変化は、上述した置換と比べてそれほど保存的ではない置換を選択することで生じる。すなわち以下に挙げる(a)～(c)の維持に及ぼす作用が、より顕著に異なる残基が選択される：
(a)置換領域におけるポリペプチドバックボーンの構造(例えばシート構造またはらせん構造)、(b)標的部位における分子の電荷または疎水性、または(c)側鎖のかさ高さ。タンパク質の性質に一般に極めて大きな変化を持ち込むことが予想される置換には(a)～(d)がある：(a)セリンまたはスレオニンなどの親水性残基が、ロイシン、イソロイシン、フェニルアラニン、バリン、アラニンなどの疎水性残基と相互に置換される、(b)システインまたはプロリンが他の残基と相互に置換される、(c)リジン、アルギニン、ヒスチジンなどの正に帯電した側鎖をもつ残基が、グルタミンまたはアスパラギンなどの負に帯電した残基と相互に置換される、または、(d)フェニルアラニンなどのかさの大きな側鎖をもつ残基がグリシンなどの側鎖をもたない残基と相互に置換される。

【0203】

以上のアミノ酸の置換または欠失または付加による影響は、因子群の転移能力を評価するアッセイ法で転移因子の派生物を評価することができる。

【0204】

実施例19

薬学的組成物および投与様式

本発明の転移因子を送り込むさまざまな送達システムが知られており、例えばリポソーム、微粒子、マイクロカプセル中への封入、組換え細胞による発現、受容体を介したエンドサイトーシス(WuおよびWu、J. Biol. Chem. 1987、262:4429～32を参照)、およびレトロウイルスまたは他のベクターの一部としての治療用核酸の構築などが含まれる。導入方法には、皮内注入、筋肉注入、腹腔内注入、静脈内注入、皮下注入、経鼻注入、および経口投与の経路などがあるがこれらに限定されない。化合物は任意の至便な経路で投与される。これには例えば、点滴静注または大量瞬時投与、上皮または粘膜皮膚ライニング(例えば口内粘膜、直腸粘膜および腸管粘膜など)を介した吸収、および他の生物学的に活性のある薬剤とともに投与される場合がある。投与は全身投与でも局所投与でもよい。さ

らに薬学的組成物は、脳室内注射および髄腔内注射を含む適切な経路で中枢神経系に導入することができる。脳室内注射は、脳室内カテーテルを例えばオンマヤリザーバーなどのリザーバーに取り付けることで容易になる場合がある。

【0205】

一つの態様においては、本発明の薬学的組成物を治療が必要とされる領域に局所的に投与することが望ましい場合がある。これには例えば手術時における局所的な注入、局所適用（例えば術後の創傷に対する包帯を併用）、注射、カテーテル経由、坐薬または、多孔性物質もしくは非多孔性物質またはゼラチン状の物質（サイラスティック膜や繊維などの膜を含む）などのインプラントなどがある。一つの態様における投与は、悪性腫瘍もしくは新生物または新生物発生前の該当部位（または前の部位）における直接注入による場合がある。

【0206】

送達媒介物としてのリポソームの使用は関心対象の送達法の一つである。リポソームは標的部位と融合して内腔の内容物を細胞内に送達する。リポソームは、分離剤および結合剤などの接触を保つための様々な方法を用いることで、標的細胞と接触した状態が融合が起きるまで十分な時間維持される。リポソームは、膜との融合を媒介する精製タンパク質またはペプチド（センダイウイルスやインフルエンザウイルスなど）とともに調製することができる。脂質は既知のリポソーム形成脂質との有用な組み合わせとなる。これには例えばホスファチジルコリンなどの陽イオン性脂質がある。他の脂質にはコレステロール、ホスファチジルセリン、ホスファチジルグリセロールなどの中性脂質がある。リポソームを調製する際にはカトウ（Kato）らによる手法（J. Biol. Chem. 1991、266：3361）が用いられる場合がある。

【0207】

本発明はまた、治療学的に有効な量の転移因子を単独で、または薬学的に許容される担体とともに含む薬学的組成物を提供する。一つの実施例における転移因子の治療用分子群の均一な組成には、組成中に少なくとも90%のペプチド、異型、類似体、誘導体、模倣体からなる組成が含まれる。

【0208】

送達システム

このような担体には、生理食塩水、緩衝食塩水、デキストロース、水、グリセロール、エタノール、およびこれらの組み合わせが含まれるがこれらに限定されない。担体および組成は無菌性とすることが可能であり、また剤型は投与様式に合わせることができる。組成にはまた少量の湿潤剤や乳化剤またはpH緩衝剤を含めることができる。組成は液体溶液、懸濁液、乳濁液、錠剤、ピル、カプセル、徐放性剤、または粉末とすることができる。組成は従来型の結合剤およびトリグリセリドなどの担体を用いて坐薬として製剤化することができる。経口製剤には、医薬品級のマンニトール、乳糖、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、セルロース、および炭酸カルシウムなどの標準的な担体を含めることができる。

【0209】

特定の疾患または状態の治療に効果に有効な誘導性薬剤および分散用薬剤の量は、疾患または病状の性質に依存し、かつ標準的な臨床的手法で決定されることがある。さらにインビトロアッセイ法を選択的に用いることで、最適投与範囲の同定に役立つ場合がある。製剤化で用いる正確な用量はまた投与経路および疾患または障害の重症度に依存するので、術者の判断に従い、かつ各患者の環境を見極める必要がある。有効用量はインビトロ試験システムまたは動物モデルの試験システムで得られた用量反応曲線から外挿される場合がある。

【0210】

本発明はまた、一種または複数の薬学的組成物成分を充填した1個または複数の容器からなる製剤のパックまたはキットを提供する。このような容器には、医薬品または生物学的製剤の製造、使用、または販売を規制する政府組織によって規定される形状をとる注意書きが選択的に加えられることがある。このような注意書きは、ヒトへの投与に関する規制当局による製造、使用、または販売に関する承認を示す。また組成物の使用上の指示が含まれる場合がある。

【0211】

薬学的組成物または投与方法は、抗新生物療法や抗腫瘍療法などの他の治療上の処置と組み合わせて行われる場合がある。

【0212】

核酸分子の投与

遺伝子の送達または治療に転移因子の核酸を用いる一つの態様では、類似体が細胞内に送達される（例えば、核酸ベクターの発現や受容体を介した機構による）。治療的分子が核酸分子またはアンチセンス分子である特定の態様における投与は、例えばレトロウイルスベクター（米国特許第4,980,286号を参照）の使用、または直接注入による方法、または微粒子銃（例えば、遺伝子銃；Biolistic、Dupont）の使用、または脂質もしくは細胞表面受容体または感染性病原体による被覆、または核移行が既知であるホメオボックス様ペプチドと連結させたものの投与（例えば、Joliotら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1991、88：1864～8を参照）により、細胞内に入るように投与される適切な核酸発現ベクターによりなされる場合がある。または核酸を細胞内に導入して、相同組換えにより宿主細胞のDNAに組込ませて発現させることができる。

【0213】

ベクター-pcDNAは、外来cDNAをウイルス由来の強力なプロモーター（CMV）の制御下において細胞内に導入して発現を導く方法の一例である。一方で他のベクターが使用される場合もある。他のレトロウイルスベクター（pRETRO-ON、Clontechなど）も同じプロモーターを使用するが、何ら形質導入的な処置を行うことなく細胞内に入り、標的細胞が分裂中の場合（例として癌細胞、特に化学療法後の最初の緩解期中）、および調節される場合にのみ標的細胞のゲノム上に組み込まれるという利点がある。また、このようなプラスミドを使用する際に、テトラサイクリンを投与することで転移因子の核酸の発現を始めることも可能である。つまりこのようなプラスミドでは、細胞を形質導入した後に一連の化学療法とともにテトラサイクリンを投与することで良好な細胞毒性を得ることが可能となる。

【0214】

pMAM-neo（Clontech）やpMSG（Amersham Pharmacia Biotech、ニュージャージー州ピスカッタウェイ）などの他のプラスミドベクターでは（ステロイドで調節可能な）MMTV-LTRプロモーターまたはSV10後期プロモーター（pSVL、Amersham Pharmacia Biotech、ニュージャージー州ピスカッタウェイ）またはメタロチオネ

イン応答性プロモーター（pBPV、Amersham Pharmacia Biotech）が用いられており、またレトロウイルスを含む他のウイルスベクターが用いられている。他のウイルスベクターの例にはアデノウイルス、AAV（アデノ関連ウイルス）、組換え型のHSV、ポックスウイルス（ワクシニア）、および組換え型のレンチウイルス（HIVなど）などがある。これらすべてのベクターは標的細胞内にcDNA配列および転写に必要な制御因子群を送達するという基本的な目的が達成されている。本発明には、ゲノムに組込まれるか否かは別として、合成オリゴ、裸のDNA、プラスミドおよびウイルスなどのあらゆる方式の核酸送達法が含まれる。

【0215】

転移因子の構築および使用に関する原理を説明したが、本発明がこのような原理から逸脱することなく、その配置および細部を改変可能であることは当業者には明らかと思われる。本発明の原理を応用することが可能な多くの態様を考えると、説明した態様が本発明の例に過ぎないことが理解されるはずであり、また本発明の範囲を制限するものとはならないはずである。むしろ本発明の範囲は、特許請求項の範囲に準じている。したがって本発明者らは、添付する特許請求項の範囲およびの精神に含まれるすべてを主張する。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US00/14687

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER												
IPC(6) : A61K 39/04, 39/112, 39/12, 39/02												
US CL : 536/23.4, 23.5; 435/4, 69.5; 424/184.1, 185.1, 192.1, 204.1, 234.1, 265.1.												
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC												
B. FIELDS SEARCHED												
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 536/23.4, 23.5; 435/4, 69.5; 424/184.1, 185.1, 192.1, 204.1, 234.1, 265.1.												
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched												
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) STN/CAS medline, embase, biosis, caplus												
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT												
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.										
x	SZALAY, G. et al. Presentation of Lysteria monocytogenes antigens by major histocompatibility complex class I molecules to CD8 cytotoxic T lymphocytes independent of lysteriolysin secretion and virulence. European Journal of Immunology. July 1994, Vol. 24, No. 7, pages 1471-1477, entire document.	1-2 and 10										
y		33, 35, 37, 39-42										
A	MCMAHON, C.W. et al. Transposon-mediated random insertions and site-directed mutagenesis prevent the trafficking of a mouse mammary tumor virus superantigen. Virology. 10 April 1998, Vol. 243, No. 2, pages 354-365.	1-2, 4-29, 33-44										
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.												
* Special categories of cited documents: <table border="0"> <tr> <td>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</td> <td>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</td> </tr> <tr> <td>"E" earlier application or patent published on or after the international filing date</td> <td>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</td> </tr> <tr> <td>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</td> <td>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</td> </tr> <tr> <td>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td> <td>"&" document member of the same patent family</td> </tr> <tr> <td>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td> <td></td> </tr> </table>			"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention	"E" earlier application or patent published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone	"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art	"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family	"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention											
"E" earlier application or patent published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone											
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art											
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family											
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed												
Date of the actual completion of the international search August 25, 2000		Date of mailing of the international search report 20 SEP 2000										
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231		Authorized officer David Saunders										
Facsimile No.		Telephone No. (703) 498-0916										

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US00/14687

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

This international report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claim Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☒ Claim Nos.: 3, 30-32 and 45-49
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
Claims 3, 30-32 and 45-49 as they are different claims with these numbers or claims are dependent claims which depend from duplicated claim numbers.
3. ☐ Claim Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マコ-ト ⁷ (参考)	
A 6 1 K	39/02	A 6 1 K	39/12	4 C 0 8 7
	39/12			
A 6 1 P	31/04	A 6 1 P	31/04	
	31/12		31/12	
	35/00		35/00	
C 1 2 Q	1/68	C 1 2 Q	1/68	A
G 0 1 N	33/48	G 0 1 N	33/48	M
	33/53		33/53	D
// C 1 2 N	5/10	C 1 2 N	15/00	Z N A A
			5/00	B
(81)指定国 E P (A T , B E , C H , C Y , D E , D K , E S , F I , F R , G B , G R , I E , I T , L U , M C , N L , P T , S E) , O A (B F , B J , C F , C G , C I , C M , G A , G N , G W , M L , M R , N E , S N , T D , T G) , A P (G H , G M , K E , L S , M W , M Z , S D , S L , S Z , T Z , U G , Z W) , E A (A M , A Z , B Y , K G , K Z , M D , R U , T J , T M) , A E , A G , A L , A M , A T , A U , A Z , B A , B B , B G , B R , B Y , C A , C H , C N , C R , C U , C Z , D E , D K , D M , D Z , E E , E S , F I , G B , G D , G E , G H , G M , H R , H U , I D , I L , I N , I S , J P , K E , K G , K P , K R , K Z , L C , L K , L R , L S , L T , L U , L V , M A , M D , M G , M K , M N , M W , M X , M Z , N O , N Z , P L , P T , R O , R U , S D , S E , S G , S I , S K , S L , T J , T M , T R , T T , T Z , U A , U G , U S , U Z , V N , Y U , Z A , Z W				
(72)発明者	パーカー デイビッド シー . アメリカ合衆国 オレゴン州 ポートラン ド エス . イー . 20ス アベニュー 1953			
(72)発明者	エルフソン ドルフ ディー . アメリカ合衆国 オレゴン州 ポートラン ド エス . ダブリュー . 12ス アベニ ュー 3327エイ			

F ターム(参考) 2G045 AA24 AA26 AA35 BB20 CA25
CB01 CB02 CB03 CB07 DA12
DA13 DA14 DA36 FB02 FB03
4B024 AA01 AA12 AA13 AA14 BA31
CA01 DA02 DA05 FA10
4B063 QA18 QQ06 QQ42 QQ96 QR38
QR55 QR77 QS15 QS34 QX01
4B065 AA01X AA36X AA46X AA90X
AB00 AC14 BA02 BD01 CA45
CA46
4C085 AA04 BA07 BA51 BB01 CC07
CC08 CC21 DD23 DD62 EE01
4C087 AA01 AA02 AA03 BC30 CA10
CA12 NA14 ZB02 ZB05 ZB26
ZB33 ZB35

专利名称(译)	具有表位蛋白标签的转座因子		
公开(公告)号	JP2003500037A	公开(公告)日	2003-01-07
申请号	JP2000619460	申请日	2000-05-26
[标]申请(专利权)人(译)	俄勒冈健康与科学大学		
申请(专利权)人(译)	俄勒冈健康与科学大学		
[标]发明人	ヘフロンフレッドエル パーカーデイビッドシー エルフソンドルフディー		
发明人	ヘフロン フレッド エル. パーカー デイビッド シー. エルフソン ドルフ ディー.		
IPC分类号	G01N33/48 A61K35/74 A61K39/00 A61K39/02 A61K39/12 A61K39/21 A61P31/04 A61P31/12 A61P35/00 A61P37/04 C07K14/74 C12N5/10 C12N15/09 C12N15/10 C12N15/63 C12Q1/68 C12Q1/689 G01N33/53		
CPC分类号	A61K39/0011 A61K39/12 A61K39/21 A61P31/04 A61P31/12 A61P35/00 A61P37/04 C07K14/70539 C12N15/1034 C12N15/63 C12N2740/16034 C12Q1/689 Y02A50/412 A61K2039/812		
FI分类号	A61K35/74.A A61K39/00.B A61K39/00.D A61K39/00.H A61K39/02 A61K39/12 A61P31/04 A61P31/12 A61P35/00 C12Q1/68.A G01N33/48.M G01N33/53.D C12N15/00.ZNA.A C12N5/00.B		
F-TERM分类号	2G045/AA24 2G045/AA26 2G045/AA35 2G045/BB20 2G045/CA25 2G045/CB01 2G045/CB02 2G045/CB03 2G045/CB07 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/FB02 2G045/FB03 4B024/AA01 4B024/AA12 4B024/AA13 4B024/AA14 4B024/BA31 4B024/CA01 4B024/DA02 4B024/DA05 4B024/FA10 4B063/QA18 4B063/QQ06 4B063/QQ42 4B063/QQ96 4B063/QR38 4B063/QR55 4B063/QR77 4B063/QS15 4B063/QS34 4B063/QX01 4B065/AA01X 4B065/AA36X 4B065/AA46X 4B065/AA90X 4B065/AB00 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/BD01 4B065/CA45 4B065/CA46 4C085/AA04 4C085/BA07 4C085/BA51 4C085/BB01 4C085/CC07 4C085/CC08 4C085/CC21 4C085/DD23 4C085/DD62 4C085/EE01 4C087/AA01 4C087/AA02 4C087/AA03 4C087/BC30 4C087/CA10 4C087/CA12 4C087/NA14 4C087/ZB02 4C087/ZB05 4C087/ZB26 4C087/ZB33 4C087/ZB35		
优先权	60/136210 1999-05-26 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

提供了具有3'端和5'端的一个可换位元件。该转座因子是编码选择标记的核酸序列的5'侧的5'侧重组位点，编码选择标记的核酸序列的3'侧的3'侧重组位点，编码核酸序列，以及足以在5'侧重组位点的5'侧或3'侧重组位点的3'侧以及可转座元件的5'侧和3'侧整合MHC表位的反向重复。包括由序列组成的插入端。在一个实施方案中，可转座元件被提供为具有5'端和3'端。该转座因子是在选择标记编码核酸的5'侧的5'侧loxP序列，在选择标记编码核酸3'侧的3'侧loxP序列和5'侧侧loxP序列的5'侧。备选地，其包含3'侧loxP序列的3'侧的MHC表位，在转座元件的5'端的插入端和在转座元件的3'端的插入端。通过用根据本发明的转座因子感染病原体细胞来检测病原体的抗原表位的方法，其中通过感染将转座子整合到细菌细胞的核酸序列中，并用含有转座酶的载体转化病原体细胞。使能使病原体细胞内在化的真核细胞与感染了转座因子的病原体细胞接触，使真核细胞与识别

株	遺伝子	Comp*	細菌	CMT-93	機能/ホモロジー
LS23	ams**	S	<i>S.t., S. typhi</i>	+	プロテアーゼ IV
SIIN16	argT	P	<i>S.t., S. typhi, E.c.</i>	-	アルギニン輸送
SIIN17	fluA	P	<i>S.t., S. typhi, E.c.</i>	-	鉄輸送
SIIN27	S2OMP	OMP	<i>S.t., S. typhi, E.c., K.p.</i>	-	外膜タンパク質
SIIN15	hspG	S?	<i>S.t., S. typhi, E.c.</i>	+	高温熱ショックタンパク質
SIIN29	hemK	C	<i>S.t., S. typhi, E.c.</i>	-	ヘム合成
SIIN30	ims7S	S	<i>S.t., S. typhi</i>	+	マクロファージ生存不能、NTP
SIIN61	ORF	S	<i>S.t., S. typhi</i>	+	不明
SIIN71	hemL	C	<i>S.t., S. typhi, E.c.</i>	-	ヘム合成

MHC表位的特异性结合伴侣接触，进行标记 提供的方法包括鉴定核细胞并使细菌细胞外化的步骤。使外化细菌细胞生长以产生细菌细胞群，并鉴定具有整合状态下的转座因子的细菌细胞核酸序列。该核酸序列编码病原体抗原因子。还提供了用本发明的转座因子感染细菌细胞以产生载体疫苗的方法。可转座因子还包含与疾病相关的抗原，该抗原可操作地连接至可转座因子的MHC表位。细菌感染导致转座因子整合到细菌细胞的核酸序列上。然后将病原体细胞内化到真核细胞中，将其暴露于识别MHC表位，鉴定标记的真核细胞的特异性结合物中，然后裂解并外化到细菌细胞中。有待完成。培养这产生细菌细胞群。鉴定具有处于整合状态的转座因子的细菌细胞的核酸序列。该核酸序列编码病原体抗原因子。鉴定出的基础细菌细胞可用作载体疫苗。