

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2011-142915

(P2011-142915A)

(43) 公開日 平成23年7月28日(2011.7.28)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
C O 7 K 14/22 (2006.01)	C O 7 K 14/22	4 C O 8 4
C O 7 K 16/12 (2006.01)	C O 7 K 16/12	4 C O 8 5
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	4 H O 4 5
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 D	

審査請求 有 請求項の数 8 O L 外国語出願 (全 82 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2011-37586 (P2011-37586)	(71) 出願人	592243793
(22) 出願日	平成23年2月23日 (2011. 2. 23)		ノバルティス ヴァクシンズ アンド ダ
(62) 分割の表示	特願2001-509520 (P2001-509520)		イアグノスティクス エスアールエル
原出願日	平成12年7月13日 (2000. 7. 13)		イタリア国 イー53100 シエナ, ビ
(31) 優先権主張番号	9916529.2		ア フィオレンティーナ 1
(32) 優先日	平成11年7月14日 (1999. 7. 14)	(74) 代理人	100078282
(33) 優先権主張国	英国 (GB)		弁理士 山本 秀策
		(74) 代理人	100062409
			弁理士 安村 高明
		(74) 代理人	100113413
			弁理士 森下 夏樹
		(72) 発明者	ヴェーガ マシニャーニ
			イタリア国 イー53100 シエナ,
			1, ヴィア フィオレンティーナ,
			カイロン エセ. ピー. アー.
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗原性髄膜炎菌性ペプチド

(57) 【要約】

【課題】細菌 *Neisseria meningitidis* 由来の抗原性ペプチド配列を提供すること。

【解決手段】WO 99 / 36544 は、*Neisseria meningitidis* 由来の多数のタンパク質を開示する。本発明は、少なくとも1つの抗原決定基を含む、これらのタンパク質のフラグメントに関する。これらのフラグメントを含む相同配列およびタンパク質もまた開示される。本発明のタンパク質は、種々の手段（例えば、組換え発現、細胞培養物からの精製、化学合成など）によって、そして種々の形態（例えば、ネイティブ型、C末端および/またはN末端融合型など）で調製され得る。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

WO 99 / 3 6 5 4 4 の配列番号 6 :

【化 1】

```

1  MNKIYRIIWN SALNAXVAVS ELTRNHTKRA SATVKTAVLA TLLFATVQAN
51  ATDEDEEEEEL ESVQRSVVGVS IQASMEGSGE LETISLSMTN DSKEFVDPYI
101 VVTLKAGDNL KIKQNTNENT NASSFTYSLK KDLTGLINVX TEKLSFGANG
151 KKVNIISDTK GLNFAKETAG TNGDTTVHLN GIGSTLTDTL AGSSASHVDA
201 GNXSTHYTRA ASIKDVLNAG WNIKGVKXGS TTGQSENVDF VRTYDTVEFL
251 SADTXTTTVN VESKDNGKRT EVKIGAKTSV IKEKDGKLV T GKKGKENGSS
301 TDEGEGLVTA KEVIDAVNKA GWRMKT TTAN GQTGQADKFE TVTSGTNVTF
351 ASGKGTTATV SKDDQGNITV MYDVNVGDAL NVNQLQNSGW NLDKAVAGS
401 SGKVISGNVS PSKGKMDTV NINAGNNIEI SRNGKNIDIA TSMAPQFSSV
451 SLGAGADAPT LSVDDGALN VGSKDANKPV RITNVAPGVK XGDVTNVXQL
501 KGVAQNLLNR IDNVDGNARA GIAQAIATAG LVQAYLPGKS MMAIGGGTYR
551 GEAGYAIGYS SISDGGNWII KGTASGNSRG HFGASASVGY QW

```

10

のフラグメントであって、該フラグメントは、該配列番号 6 のアミノ酸フラグメント 6 1 ~ 7 2、7 8 ~ 8 1、7 5 ~ 8 3、4 2 3 ~ 4 3 8、7 5 ~ 7 8 および 4 2 8 ~ 4 3 8 のうちの 1 つである、フラグメント。

【請求項 2】

請求項 1 に記載の 1 つ以上のフラグメントを含むタンパク質であって、該タンパク質は、WO 0 0 / 6 6 7 4 1 の配列番号 1 3、1 4、1 5、1 6 または 1 7 ではない、タンパク質。

20

【請求項 3】

請求項 1 に記載のフラグメントを認識する、抗体。

【請求項 4】

請求項 1 に記載のフラグメントまたは請求項 2 に記載のタンパク質をコードする、核酸。

【請求項 5】

請求項 1 に記載のフラグメント、請求項 2 に記載のタンパク質、請求項 3 に記載の抗体、および / または請求項 4 に記載の核酸を含む組成物であって、該組成物は、ワクチン、診断試薬、または免疫原性組成物である、組成物。

30

【請求項 6】

医薬としての使用のための、請求項 5 に記載の組成物。

【請求項 7】

請求項 1 に記載のフラグメント、請求項 2 に記載のタンパク質、請求項 3 に記載の抗体、および / または請求項 4 に記載の核酸の使用であって、該使用は、(i) ナイセリア細菌による感染を処置もしくは予防するための医薬、(i i) ナイセリア細菌の存在、もしくはナイセリア細菌に対して惹起された抗体の存在を検出するための診断試薬、および / または (i i i) ナイセリア細菌に対する抗体を惹起し得る試薬、の製造における、使用。

40

【請求項 8】

ナイセリア細菌による感染を処置または予防における使用のための、請求項 1 に記載のフラグメント、請求項 2 に記載のタンパク質、請求項 3 に記載の抗体、または請求項 4 に記載の核酸。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本明細書中に引用される全ての文書は、その全体が参考として援用される。特に、国際特許出願 WO 99 / 3 6 5 4 4 の内容は、本明細書中に十分に援用される。

【0 0 0 2】

(発明の分野)

50

本発明は、細菌 *Neisseria meningitidis* 由来の抗原性ペプチド配列に関する。

【背景技術】

【0003】

(背景)

Neisseria meningitidis は、ヒトにおいて病原性である非運動性のグラム陰性双球菌である。

【0004】

この生物体の莢膜多糖類に基づいて、12の血清型の *N. meningitidis* が同定された。A群はサハラアフリカ周縁での伝染病に最も頻繁に関与している病原体である。血清型B群および血清型C群は、米国および大部分の先進国における症例の大部分の原因である。血清型W135およびYは、米国および先進国における症例の残りの原因である。

10

【0005】

現在使用される髄膜炎菌性ワクチンは、血清型A、C、Y、およびW135で構成される4価の多糖類ワクチンであるが、*Meningococcus* Bは問題が残っている。この多糖類のアプローチは、menB莢膜多糖類が哺乳動物組織にもまた存在する α (2-8)結合型N-アセチルノイラミン酸のポリマーであるせいで、使用され得ない。menBワクチンに対する1つのアプローチは、外膜タンパク質(OMP)の混合物を使用する。抗原変異性を克服するために、9つまでの異なるポーリンを含む多価ワクチンが構築されている(例えば、Poolman JT (1992) *Infect. Agents Dis.* 4:13-28)。外膜ワクチンで使用するさらなるタンパク質は、opaおよびopcタンパク質であるが、これらのアプローチのいずれも抗原変異性を克服し得ない(例えば、Ala'AldeenおよびBorriello (1996) *Vaccine* 14(1):49-53)。

20

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0006】

(本発明)

本発明は、国際特許出願WO99/36544で開示されたタンパク質のフラグメントを提供する。この出願において、これらのフラグメントは、少なくとも1つの抗原決定基を含む。

30

【0007】

従って、WO99/36544で開示された任意の特定のタンパク質配列の長さがxアミノ酸である場合(表IIを参照のこと)、本発明は、そのタンパク質の最大x-1のアミノ酸のフラグメントを提供する。このフラグメントは、これより短くてもよく(例えば、x-2、x-3、x-4、...)、そして好ましくは100アミノ酸(例えば、90アミノ酸、80アミノ酸など)以下である。このフラグメントは、3アミノ酸程度の短さであり得るが、好ましくはより長い(例えば、6、7、8、9、10、12、15、20、25、30、35、40、50、75、または100アミノ酸まで)である。

40

【0008】

好ましいフラグメントは、表Iに開示される髄膜炎菌性ペプチド配列またはその部分配列を含む。このフラグメントは、表Iに示されるフラグメントより長くてもよい。ここで、例えば、表Iのフラグメントは、タンパク質のアミノ酸残基pから残基qまで延び、本発明はまた、残基(p-1)、(p-2)または(p-3)から残基(q+1)、(q+2)または(q+3)までのフラグメントに関する。

【0009】

本発明はまた、これらのフラグメントに相同な(すなわち、配列同一性を有する)ポリペプチドを提供する。この特定のフラグメントに依存して、配列同一性の程度は、好ましくは50%よりも大きい(例えば、60%、70%、80%、90%、95%、99%以

50

上)。これらの相同なポリペプチドは、このフラグメントの変異体および対立遺伝子改変体を含む。2つの配列の間の同一性は、好ましくはパラメーター： $\text{gap open penalty} = 12$ および $\text{gap extension penalty} = 1$ を用いたアフイン(affine)ギャップ検索を使用して、MPSRCHプログラム(Oxford Molecular)において実行されるようなSmith-Waterman相同性検索アルゴリズムにより決定される。

【0010】

本発明はまた、上記で規定されるフラグメントの1つ以上を含むタンパク質を提供する。

【0011】

本発明は、WO99/36544で開示された45タンパク質配列のいずれか(すなわち、WO99/36544の偶数配列番号の2、4、6、8、10、...、86、88、90)をその範囲内に含まないことを条件とする。

【0012】

本発明のタンパク質は、もちろん、種々の手段(例えば、組換え発現、細胞培養物からの精製、化学合成など)によって、そして種々の形態(例えば、ネイティブ型、C末端および/またはN末端融合型など)で調製され得る。これらは、好ましくは実質的に純粋な形態で調製される(すなわち、他のナイセリアタンパク質(Neisserial protein)または宿主細胞タンパク質を実質的に含まない)。短いタンパク質は、好ましくは、化学的ペプチド合成を用いて生成される。

【0013】

さらなる局面に従って、本発明は、本発明のフラグメントを認識する抗体を提供する。ただし、本発明は、WO99/36544の45の完全タンパク質配列のうちの1つを認識する抗体をその範囲内に含まない。この抗体は、ポリクローナルまたは好ましくはモノクローナルであり得、そして任意の適切な手段により産生され得る。

【0014】

本発明はまた、これらの抗体により認識されるペプチド配列を含むタンパク質を提供する。これらのペプチド配列は、もちろん、WO99/36544の髄膜菌タンパク質のフラグメントを含むが、免疫グロブリンに結合する場合、髄膜菌ペプチドの抗原性構造を模倣するペプチドもまた含む。

【0015】

さらなる局面に従って、本発明は、本発明のフラグメントおよびタンパク質をコードする核酸を提供する。ただし、本発明は、WO99/36544の45のタンパク質配列のうちの1つをコードする核酸をその範囲内に含まない。

【0016】

さらに、本発明は、これらの配列と相同な(すなわち、配列同一性を有する)配列を含む核酸を提供する。さらに、本発明は、これらの配列に、好ましくは「高ストリンジェンシー」な条件下で(例えば、 $0.1 \times \text{SSC}$ 、 $0.5\% \text{SDS}$ 溶液中65℃)ハイブリダイズし得る核酸を提供する。

【0017】

本発明が上記に記載される配列と相補的な配列を含む核酸を提供することもまた、認識されるべきである(例えば、アンチセンス目的またはプローブの目的において)。

【0018】

本発明に従う核酸は、もちろん、多くの様式(例えば、化学合成により、ゲノムライブラリーまたはcDNAライブラリーから、生物体自体などから)で調製され得、そして種々の形態(例えば、一本鎖、二本鎖、ベクター、プローブなど)をとり得る。さらに、用語「核酸」は、DNAおよびRNA、そしてまた改変された骨格を含むDNAおよびRNAのようなそれらの類似物、そしてまたペプチド核酸(PNA)などを含む。

【0019】

さらなる局面に従って、本発明は、本発明のヌクレオチド配列を含むベクター(例えば

10

20

30

40

50

、発現ベクター)およびそのようなベクターで形質転換された宿主細胞を提供する。

【0020】

さらなる局面に従って、本発明は、本発明に従うタンパク質、抗体および/または核酸を含む組成物を提供する、これらの組成物は、例えばワクチンとして、または診断用試薬として、または免疫原性組成物として適切であり得る。

【0021】

本発明はまた、医薬品として(例えばワクチンとしてまたは免疫原性組成物として)または治療用試薬として使用するための、本発明に従う核酸、タンパク質、または抗体を提供する。また、以下の製造における、本発明に従う核酸、タンパク質、または抗体の使用を提供する：(i) ナイセリア細菌(*Neisserial bacteria*)に起因する感染の処置または予防のための医薬品；(ii) ナイセリア細菌またはナイセリア細菌に対して惹起された抗体の存在を検出するための診断用試薬；および/または(iii) ナイセリア細菌に対する抗体を惹起し得る試薬。上記のナイセリア細菌は任意の種または菌株であり得る(例えば、*N. gonorrhoeae*)が、好ましくは*N. meningitidis*(特に、菌株Aまたは菌株B)である。

10

【0022】

本発明はまた、治療的有効量の、本発明に従う核酸、タンパク質、および/または抗体を患者に投与する工程を含む、患者の処置の方法を提供する。

【0023】

さらなる局面に従って、本発明は、種々のプロセスを提供する。

20

【0024】

本発明のタンパク質を産生するためのプロセスであって、タンパク質の発現を誘導する条件下において、本発明に従う宿主細胞を培養する工程を包含する、プロセスが提供される。

【0025】

本発明のタンパク質または核酸を産生するためのプロセスであって、ここでそのタンパク質または核酸は、化学的手段を使用して、一部または全体が合成されるプロセスが提供される。

【0026】

本発明のポリヌクレオチドを検出するためのプロセスであって、(a) 本発明に従う核プローブを、ハイブリダイズ条件下で生物学的サンプルと接触させて、二重鎖を形成する工程；および(b) 上記の二重鎖を検出する工程を包含する、プロセスが提供される。

30

【0027】

本発明のタンパク質を検出するためのプロセスであって、(a) 本発明に従う抗体を、抗体-抗原複合体の形成に適切な条件下で生物学的サンプルと接触させる工程；および(b) この複合体を検出する工程を包含する、プロセスが提供される。

本発明は、例えば、以下の項目を提供する。

(項目1) WO 99 / 3 6 5 4 4 に開示されたタンパク質のフラグメントであって、該フラグメントは少なくとも1つの抗原決定基を含む、フラグメント。

40

(項目2) 1 0 0 アミノ酸以下の長さを有する、項目1に記載のフラグメント。

(項目3) 3 アミノ酸以上の長さを有する、項目1または項目2に記載のフラグメント。

(項目4) 表Iの1 7 6 9のフラグメントのうちの1つである、項目1～3のいずれか1項に記載のフラグメント。

(項目5) 項目1～4のいずれか1項に記載のフラグメントに対して50%以上の配列同一性を有する、ポリペプチド。

(項目6) 項目1、項目2、または項目3に記載の1つ以上のフラグメントを含むタンパク質であって、ただし該タンパク質は、WO 99 / 3 6 5 4 4 に開示された45の完全タンパク質配列のうちの1つではない、タンパク質。

(項目7) 項目1～4のいずれか1項に記載のフラグメントを認識する、抗体。

50

(項目8) ペプチド配列を含むタンパク質であって、該ペプチド配列は、項目7に記載の

抗体により認識される、タンパク質。

(項目9) 項目1、項目2もしくは項目3に記載のフラグメント、項目5に記載のポリペプチド、または項目8に記載のタンパク質をコードする、核酸。

(項目10) 項目1、項目2もしくは項目3に記載のフラグメント、項目5に記載のポリペプチド、項目8に記載のタンパク質、項目7に記載の抗体、および/または項目9に記載の核酸を含む組成物であって、該組成物は、ワクチン、診断試薬、または免疫原性組成物である、組成物。

(項目11) 医薬としての使用のための、項目10に記載の組成物。

(項目12) 項目1、項目2もしくは項目3に記載のフラグメント、項目5に記載のポリペプチド、項目8に記載のタンパク質、項目7に記載の抗体、および/または項目9に記載の核酸の使用であって、該使用は、(i) ナイセリア細菌による感染を処置もしくは予防するための医薬、(ii) ナイセリア細菌の存在、もしくはナイセリア細菌に対して惹起された抗体の存在を検出するための診断試薬、および/または(iii) ナイセリア細菌に対する抗体を惹起し得る試薬、の製造における、使用。

(項目13) 治療有効量の項目10に記載の組成物を患者に投与する工程を包含する、患者を処置する方法。

【0028】

本発明を実行するために用いられ得る標準的な技術および手順(例えば、ワクチン接種目的または診断目的のために、開示された配列を利用するための)の要旨は以下の通りである。この要旨は、本発明に対する限定ではなく、むしろ使用され得るが必要とされるわけではない実施例を与えるものである。

【0029】

(一般)

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

【0030】

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

10

20

30

40

50

【 0 0 3 1 】

本明細書中で引用される全ての刊行物、特許、および特許出願は参考としてその全体が援用される。

【 0 0 3 2 】

(定義)

Xを含む組成物は、組成物中の全 X + Y の少なくとも 8 5 重量 % が X であるとき、Y を「実質的に含まない」。好ましくは、X は、組成物中の全 X + Y の少なくとも約 9 0 重量 % を、さらに好ましくは少なくとも約 9 5 重量 % または 9 9 重量 % さえを含む。

【 0 0 3 3 】

用語「含む (c o m p r i s i n g) 」は「含む (i n c l u d i n g) 」および「からなる (c o n s i s t i n g) 」を意味する。例えば、X を「含む」組成物は、もっぱら X からなり得るか、または X + Y のような X に何かを付加したものも含み得る。

【 0 0 3 4 】

用語「抗原決定基」は、B 細胞エピトープおよび T 細胞エピトープを含む。

【 0 0 3 5 】

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

【 0 0 3 6 】

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

【 0 0 3 7 】

(発現系)

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

【 0 0 3 8 】

(i . 哺乳動物系)

哺乳動物発現系は、当該分野において公知である。哺乳動物プロモーターは、哺乳動物 RNA ポリメラーゼを結合し、コード配列 (例えば、構造遺伝子) の m R N A への下流 (3 ') 転写を開始し得る任意の D N A 配列である。プロモーターは、転写開始領域 (これはコード配列の 5 ' 末端の近位に通常位置する) および T A T A ボックス (転写開始部位の 2 5 ~ 3 0 塩基対 (b p) 上流に通常位置する) を有する。T A T A ボックスは、その正しい部位において RNA ポリメラーゼ I I に RNA 合成を開始させるよう指示すると考えられている。哺乳動物プロモーターはまた、T A T A ボックスの 1 0 0 ~ 2 0 0 b p 上流以内に通常位置する上流プロモーターエレメントを含む。上流プロモーターエレメントは、転写が開始され、そしていずれかの方向において作用し得る速度を決定する (S a m b r o o k ら (1 9 8 9) 「 E x p r e s s i o n o f C l o n e d G e n e s i n M a m m a l i a n C e l l s 」 M o l e c u l a r C l o n i n g : A L a b o r a t o r y M a n u a l 、第 2 版) 。

【 0 0 3 9 】

哺乳動物ウイルス遺伝子は、しばしば高度に発現され、そして広い宿主範囲を有する ;

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

【0040】

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

【0041】

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

【0042】

あるいは、外来タンパク質もまた、哺乳動物細胞において外来タンパク質の分泌を提供するリーダー配列フラグメントで構成される融合タンパク質をコードするキメラDNA分子を作製することにより、細胞から増殖培地へ分泌され得る。好ましくは、インビボまたはインビトロのいずれかにおいて切断され得る、リーダーフラグメントと外来遺伝子との間にコードされるプロセシング部位が存在する。リーダー配列フラグメントは通常、細胞からのタンパク質の分泌を指示する疎水性アミノ酸で構成される単一のペプチドをコードする。アデノウイルスの3部のリーダー(tripartite leader)は、哺乳動物細胞における外来タンパク質の分泌を提供するリーダー配列の例である。

【0043】

通常、哺乳動物細胞によって認識される転写終結配列およびポリアデニル化配列は、翻訳終止コドンの3'側に存在する調節領域であり、従って、プロモーターエレメントと共に、コード配列に隣接する。成熟mRNAの3'末端は、部位特異的転写後切断およびポリアデニル化により形成される(Birnstielら(1985)Cell 41:349; ProudfootおよびWhitelaw(1988)「Termination and 3' end processing of eukaryotic RNA」Transcription and splicing (B.D. Hames およ

10

20

30

40

50

び D. M. Glover 編) ; Proudfoot (1989) Trends Biochem. Sci. 14: 105)。これらの配列は、mRNA の転写を方向づけ、その mRNA は、その DNA にコードされるポリペプチドに翻訳され得る。転写ターミネーター / ポリアデニル化シグナルの例としては、SV40 由来のシグナルが挙げられる (Sambrook ら (1989) 「Expression of cloned genes in cultured mammalian cells.」 Molecular Cloning: A Laboratory Manual)。

【0044】

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

【0045】

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

【0046】

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

【0047】

(i i バキュロウイルス系)

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

【0048】

転移ベクターにタンパク質をコードする DNA 配列を挿入した後、そのベクターおよび

野生型ウイルスゲノムを、昆虫宿主細胞にトランスフェクトし、そこでベクターとウイルスゲノムを組換え可能にする。パッケージングされた組換えウイルスは発現され、そして組換えプラークが同定されそして精製される。バキュロウイルス/昆虫細胞発現系の材料および方法は、特に、Invitrogen、San Diego CAからキット形態(「MaxBac」キット)で市販される。これらの技術は、一般に当業者に公知であり、そしてSummersおよびSmith, Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No. 1555 (1987) (以下、「Summers and Smith」)に十分に記載されている。

【0049】

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

【0050】

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

【0051】

このプラスミドはまた、通常、ポリヘドリンポリアデニル化シグナル(Millerら(1988)Ann. Rev. Microbiol., 42:177)、および原核生物のアンピシリン耐性(amp)遺伝子、ならびにE. coliにおいての選抜および増殖のための複製起点を含む。

【0052】

バキュロウイルス転移ベクターは通常、バキュロウイルスプロモーターを含む。バキュロウイルスプロモーターは、バキュロウイルスRNAポリメラーゼに結合し、そしてコード配列(例えば、構造遺伝子)のmRNAへの下流(5'から3')への転写を開始し得る任意のDNA配列である。プロモーターは、通常、コード配列の5'末端に近接して存在する転写開始領域を有している。この転写開始領域は通常、RNAポリメラーゼ結合部位および転写開始点を含む。バキュロウイルス転移ベクターはまた、エンハンサーと呼ばれる第二のドメインを有し得、存在する場合は、通常、構造遺伝子に対し遠位にある。発現は調節され得るかまたは構成的であるかのいずれかであり得る。

【0053】

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

【0054】

適切なシグナル配列をコードするDNAは、分泌昆虫タンパク質、あるいはバキュロウ

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

【0055】

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

【0056】

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

【0057】

タンパク質の前駆体である発現産物をコードする DNA 配列および/または遺伝子の挿入後、昆虫細胞宿主に、転移ベクターの異種 DNA および野生型バキュロウイルスのゲノム DNA を同時形質転換 (通常は、同時トランスフェクションによって) する。構築物のプロモーターおよび転写終結配列は、通常バキュロウイルスゲノムの 2 ~ 5 kb の区域を含む。バキュロウイルスの望ましい部位に異種 DNA を導入する方法は、当該分野で公知である (Summers および Smith、上記; Jurin (1987); Smith ら, Molec. Cell. Biol. (1983) 3:2156; ならびに Luckow および Summers (1989) を参照のこと)。例えば、その挿入物は、相同二重交差組換え (homologous double crossover recombination) により、ポリヘドリン遺伝子のような遺伝子内にあり得る; 挿入物はまた、所望のバキュロウイルス遺伝子に操作された制限酵素部位内にあり得る。Miller ら、(1989)、Bioessays 4:91。発現ベクター内のポリヘドリン遺伝子の代わりにクローン化される場合の DNA 配列は、ポリヘドリン特異的配列により 5' および 3' の両側で隣接され、そしてポリ
ヘドリンプロモーターの下流に位置される。

【0058】

新規に形成されたバキュロウイルス発現ベクターは続いて、感染性の組換えバキュロウイルス内にパッケージされる。相同組換えは、低い頻度で起こる (約 1% ~ 約 5% の間); それゆえ、同時トランスフェクション後に産生されたウイルスの大半は、依然野生型ウイルスである。従って、方法には、組換えウイルスの同定が必要である。この発現系の利点は、組換えウイルスを区別させ得る可視的スクリーニングである。ネイティブのウイルスにより産生されるポリヘドリンタンパク質は、ウイルス感染後の後期に、その感染された細胞の核内で非常に高いレベルで産生される。蓄積されたポリヘドリンタンパク質は、包埋された粒子を含む閉塞体 (occlusion body) を形成する。これらの閉

10

20

30

40

50

塞体は、最大15 μmの大きさで、高度に屈折し、明るく輝く外見を与え、容易に光学顕微鏡下で可視化される。組換えウイルスに感染された細胞は、閉塞体を欠く。組換えウイルスと野生型ウイルスを区別するために、トランスフェクションの上清を、当業者に公知の技術により昆虫細胞の単層にプラーク形成させる。すなわち、プラークを、光学顕微鏡下で閉塞体の存在（野生型ウイルスを示す）または非存在（組換えウイルスを示す）についてスクリーニングする。「Current Protocols in Microbiology」第2巻（Ausubelら編）16.8（補遺10、1990）；SummersおよびSmith、上記；Millerら（1989）。

【0059】

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

【0060】

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

【0061】

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

【0062】

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

【0063】

（iii. 植物系）

当該分野で公知の多くの植物細胞培養および植物全体での遺伝子発現系が存在する。例示的な植物細胞遺伝子発現系としては、米国特許第5,693,506号；米国特許第5,659,122号；および米国特許第5,608,143号のような特許に記載されるものが挙げられる。植物細胞培養における遺伝子発現のさらなる例は、Zenk, Phytochemistry 30：3861-3863（1991）に記載された。植物タンパク質のシグナルペプチドの記載は、上記の参考文献に加え、以下に示すものの中においても見出され得る；Vaulcombeら, Mol. Gen. Genet. 209：33-40（1987）；Chandlerら, Plant Molecular Biology 3：407-418（1984）；Rogers, J. Biol. Chem.

10

20

30

40

50

260:3731-3738(1985); Rothsteinら, Gene 55:353-356(1987); Whittierら, Nucleic Acids Research 15:2515-2535(1987); Wirsellら, Molecular Microbiology 3:3-14(1989); Yuら, Gene 122:247-253(1992)。植物ホルモン(ジベレリン酸およびジベレリン酸により誘導される分泌酵素)による植物遺伝子発現の調節の記載は、R. L. JonesおよびJ. MacMillin, Gibberellins: Advanced Plant Physiology, Malcolm B. Wilkins編 1984 Pitman Publishing Limited, London, 21-52頁の中に見出され得る。他の代謝調節性遺伝子が記載される参考文献は、以下である: Sheen, Plant Cell, 2:1027-1038(1990); Maasら, EMBO J. 9:3447-3452(1990); BenkelおよびHickey, Proc. Natl. Acad. Sci. 84:1337-1339(1987)。

【0064】

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

【0065】

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

【0066】

本発明の核酸分子は、目的のタンパク質の発現用の発現カセットに含まれ得る。2つ以上も可能であるが、通常はただ一つの発現カセットが存在する。組換え発現カセットは、異種タンパク質のコード配列に加え、以下のエレメントを含む; プロモーター領域、植物5'非翻訳配列、構造遺伝子が開始コドンを用意しているかどうかに依存して開始コドン、ならびに転写および翻訳終結配列。そのカセットの5'末端および3'末端の独特な制限酵素部位は、既存のベクター内への容易な挿入を可能にする。

【0067】

異種のコード配列は、本発明に係る任意のタンパク質のための配列であり得る。目的のタンパク質をコードする配列は、適切な場合、そのタンパク質のプロセッシングおよびトランスロケーションを可能にするシグナルペプチドをコードし、そして通常、本発明の所望のタンパク質の膜への結合を生じ得る任意の配列を欠いている。翻訳開始領域は、大部分は、発芽中に発現およびトランスロケーションされる遺伝子のためのものであるから、トランスロケーションを与えるシグナルペプチドを使用することにより、それはまた、目的のタンパク質のトランスロケーションを提供し得る。この方法で、目的のタンパク質

は、それらが発現される細胞からトランスロケーションされ、そして効率的に回収され得る。代表的には、種子における分泌は、種子の胚乳内へ、アリュースロン層あるいは胚盤上皮層を通過する。タンパク質を産生する細胞からタンパク質が分泌される必要はないが、このことは組換えタンパク質の分離および精製を容易にする。

【0068】

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

10

【0069】

ベクターは、組換えDNAを機械的に転移するためにマイクロピペットを用いて植物細胞内に直接的に微量注入され得る (Crossway、Mol. Gen. Genet, 202:179-185、1985)。遺伝子物質はまた、ポリエチレングリコールを用いて植物細胞内に移入され得る (Krensら、Nature, 296、72-74、1982)。核酸セグメントの導入の別の方法は、小さいビーズまたは粒子のマトリックスの内部に、あるいはその表面のいずれかに核酸を有する小さな粒子による高速バリスティック (ballistic) 穿通法である (Kleinら、Nature, 327、70-73、1987) ならびにKnudsenおよびMuller、1991、Planta, 185:330-336は、大麦胚乳の粒子ボンバードメントによりトランスジェニック大麦を作製することを示している)。さらに別の導入方法は、他の実体 (ミニ細胞、細胞、リソソームあるいは他の融合可能な脂質表面体のいずれか) とのプロトプラストの融合である (Fralleyら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79、1859-1863、1982)。

20

【0070】

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

30

【0071】

プロトプラストが単離され得、そして培養されて完全な再生植物を与え得る全ての植物は、移入された遺伝子を含む完全な植物が再生されるように、本発明により形質転換され得る。事実上全ての植物が、サトウキビ、テンサイ、ワタ、果実および他の樹木、マメ科植物および野菜の全ての主要な種を含むがそれらに限定されない培養細胞あるいは組織から再生され得ることが公知である。いくつかの適切な植物としては、例えば、以下の属由来の種が挙げられる: *Fragaria*、*Lotus*、*Medicago*、*Onobrychis*、*Trifolium*、*Trigonella*、*Vigna*、*Citrus*、*Linum*、*Geranium*、*Manihot*、*Daucus*、*Arabidopsis*、*Brassica*、*Raphanus*、*Sinapis*、*Atropa*、*Capsicum*、*Datura*、*Hyoscyamus*、*Lycopersicon*、*Nicotiana*、*Solanum*、*Petunia*、*Digitalis*、*Majorana*、*Cichorium*、*Helianthus*、*Lactuca*、*Bromus*、*Asparagus*、*Antirrhinum*、*Hererocallis*、*Nemesia*、*Pelargonium*、*Panicum*、*Pennisetum*、*Ranunculus*、*Senecio*、*Salpiglossis*、*Cucumis*、*Browaalia*、*Glycine*、*Lolium*、*Zea*、*Triticum*、*Sorghum*および*Datura*。

40

50

【 0 0 7 2 】

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

10

【 0 0 7 3 】

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

20

【 0 0 7 4 】

(i v . 細菌系)

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

30

【 0 0 7 5 】

代謝経路の酵素をコードする配列は、特に有用なプロモーター配列を提供する。例としては、ガラクトース、ラクトース(lac)[Changら(1977) *Nature* 198:1056]、およびマルトースのような糖代謝酵素由来のプロモーター配列が挙げられる。さらなる例としては、トリプトファン(trp)[Goeddelら(1980) *Nuc. Acids Res.* 8:4057; Yelvertonら(1981) *Nuc. Acids Res.* 9:731; 米国特許第4,738,921号; EP-A-0036776およびEP-A-0121775]のような生合成酵素由来のプロモーター配列が挙げられる。g-ラクタマーゼ(g-lactamase)(bla)プロモーター系[Weissmann(1981)「The cloning of interferon and other mistakes」*Interferon* 3(

40

50

I. Gresser 編)]、バクテリオファージ λ PL [Shimatake ら (1981) *Nature* 292: 128] および T5 [米国特許第 4, 689, 406 号] プロモーター系もまた有用なプロモーター配列を提供する。

【0076】

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

10

20

【0077】

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

30

【0078】

DNA 分子は、細胞内で発現され得る。プロモーター配列は、直接的にその DNA 分子と連結され得、この場合、N 末端の最初のアミノ酸は、常に、ATG 開始コドンによりコードされるメチオニンである。所望される場合、N 末端のメチオニンは、臭化シアンとのインビトロインキュベーションによって、あるいは細菌のメチオニン N 末端ペプチダーゼとのインビボまたはインビトロでのインキュベーションによって、タンパク質から切断され得る (EPO-A-0219237)。

40

【0079】

融合タンパク質は、直接的発現に代わるものを提供する。通常、内在性の細菌タンパク質、あるいは他の安定なタンパク質の N 末端部分をコードする DNA 配列は、異種のコード配列の 5' 末端と融合される。発現の際に、この構築物は、2つのアミノ酸配列の融合を提供する。例えば、バクテリオファージ λ 細胞遺伝子は、外来遺伝子の 5' 末端で連結され得、そして細菌において発現され得る。生じた融合タンパク質は、好ましくは、外来遺伝子からバクテリオファージタンパク質を切断するためのプロセシング酵素 (第 Xa 因

50

子)用の部位を保持する[Nagaiら(1984)Nature 309:810]。融合タンパク質はまた、lacZ[Jiaら(1987)Gene 60:197]、trpE[Allenら(1987)J. Biotechnol. 5:93; Makoffら(1989)J. Gen. Microbiol. 135:11]、およびChey[EP-A-0324647]遺伝子由来の配列を用いて作製され得る。2つのアミノ酸配列の接合部でのDNA配列は、切断可能部位をコードしてもよいし、あるいはコードしなくてもよい。別の例は、ユビキチン融合タンパク質である。そのような融合タンパク質は、好ましくは、外来タンパク質からユビキチンを切断するためのプロセシング酵素(例えば、ユビキチン特異的プロセシングプロテアーゼ)用の部位を保持するユビキチン領域と共に作製される。この方法を通して、ネイティブの外来タンパク質は分離され得る[Millerら(1989)Bio/Technology 7:698]。

10

【0080】

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

20

【0081】

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

30

【0082】

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

40

【0083】

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

50

少なくとも約 20 個のプラスミドを含む。高コピー数ベクターまたは低コピー数ベクターのいずれもが選択され得、それは、宿主に対するベクターおよび外来タンパク質の効果に依存する。

【0084】

あるいは、発現構築物は、組み込みベクターを用いて、細菌のゲノムへ組み込まれ得る。組み込みベクターは、通常、ベクターが組み込むのを可能にする、細菌の染色体と相同な少なくとも 1 つの配列を含む。組み込みは、ベクターにおける相同な DNA と細菌の染色体との間の組換えから生じるようである。例えば、種々の *Bacillus* 株からの DNA によって構築される組み込みベクターは、*Bacillus* 染色体に組み込まれる (EP-A-0 127 328)。組み込みベクターはまた、バクテリオファージまたはトランスポゾン配列から構成され得る。

10

【0085】

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

20

【0086】

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

【0087】

発現ベクターまたは形質転換ベクターは、染色体外レプリコンまたは組み込みベクターのいずれも、多くの細菌への形質転換のために開発されてきた。例えば、発現ベクターは、とりわけ、以下の細菌のために開発されてきた: *Bacillus subtilis* (Palva ら (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:5582; EP-A-0 036 259 および EP-A-0 063 953; WO 84/04541)、*Escherichia coli* (Shimatake ら (1981) *Nature* 292:128; Amann ら (1985) *Gene* 40:183; Studier ら (1986) *J. Mol. Biol.* 189:113; EP-A-0 036 776、EP-A-0 136 829 および EP-A-0 136 907)、*Streptococcus cremoris* (Powell ら (1988) *Appl. Environ. Microbiol.* 54:655); *Streptococcus lividans* (Powell ら (1988) *Appl. Environ. Microbiol.* 54:655)、*Streptomyces lividans* (米国特許第 4,745,056 号)。

30

【0088】

外来 DNA を細菌宿主へ導入する方法は、当該分野において周知であり、そして通常、 $CaCl_2$ または他の薬剤 (例えば、2 価カチオンおよび DMSO) のいずれかで処理された細菌の形質転換を含む。DNA はまた、エレクトロポレーションによって、細菌細胞へ導入され得る。形質転換の手順は、通常、形質転換される細菌の種によって変化する。例えば以下を参照のこと: (Masson ら (1989) *FEMS Microbiol. Lett.* 60:273; Palva ら (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:5582; EP-A-0 036 259 および EP-A-0 063 953; WO 84/04541、*Bacillus*)、(Miller ら (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85:856; Wang ら (1990) *J. Bacteriol.* 172:949、*Campylobacter*)、(Cohen

40

50

ら(1973) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 69:2110; Dowerら(1988) *Nucleic Acids Res.* 16:6127; Kushner(1978)「An improved method for transformation of *Escherichia coli* with ColE1-derived plasmids」、*Genetic Engineering: Proceedings of the International Symposium on Genetic Engineering*(H.W. BoyerおよびS. Nicosia編); Mandelら(1970) *J. Mol. Biol.* 53:159; Taketo(1988) *Biochim. Biophys. Acta* 949:318; *Escherichia*、(Chassyら(1987) *FEMS Microbiol. Lett.* 44:173 *Lactobacillus*); (Fiedlerら(1988) *Anal. Biochem.* 170:38、*Pseudomonas*); (Augustinら(1990) *FEMS Microbiol. Lett.* 66:203、*Staphylococcus*); (Baranyら(1980) *J. Bacteriol.* 144:698; Harlander(1987)「Transformation of *Streptococcus lactis* by electroporation」、*Streptococcal Genetics*(J. FerrettiおよびR. Curtiss III編); Perryら(1981) *Infect. Immun.* 32:1295; Powellら(1988) *Appl. Environ. Microbiol.* 54:655; Somkutiら(1987) *Proc. 4th Evr. Cong. Biotechnology* 1:412、*Streptococcus*)。 10 20

【0089】

(v. 酵母発現)

酵母発現系もまた、当業者に公知である。酵母プロモーターは、酵母RNAポリメラーゼに結合可能であり、そしてコード配列(例えば、構造遺伝子)からmRNAへの下流の(3'側の)転写を開始し得る、任意のDNA配列である。プロモーターは、通常、コード配列の5'末端の近接して位置する転写開始領域を有する。この転写開始領域は、通常、RNAポリメラーゼ結合部位(「TATAボックス」)および転写開始部位を含む。酵母プロモーターはまた、上流アクチベーター配列(UAS)と呼ばれる第2のドメインを有し得、これは、もし存在するならば、通常、構造遺伝子に対して遠位である。このUASは、調節される(誘導できる)発現を可能にする。構成的発現は、UASの非存在下で生じる。調節される発現は、正または負のいずれかであり得、それによって転写を増加させるかまたは減少させるかのいずれかであり得る。 30

【0090】

酵母は、活性な代謝経路を有する発酵性生物であり、従って、代謝経路における酵素をコードする配列は、特に有用なプロモーター配列を提供する。例としては、以下が挙げられる: アルコールデヒドロゲナーゼ(ADH)(EP-A-0 284044)、グルコース-6-リン酸イソメラーゼ、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ(GAPまたはGAPDH)、エノラーゼ、グルコキナーゼ、ヘキソキナーゼ、ホスホフルクトキナーゼ、3-ホスホグリセリン酸ムターゼ、およびビルビン酸キナーゼ(PyK)(EPO-A-0329203)。酵母PHO5遺伝子はまた、酸性ホスファターゼをコードし、有用なプロモーター配列を提供する(Myano haraら(1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:1)。 40

【0091】

さらに、天然には生じない合成プロモーターもまた、酵母のプロモーターとして機能する。例えば、ある1つの酵母プロモーターのUAS配列は、別の酵母プロモーターの転写活性化領域と連結され得、合成ハイブリッドプロモーターを生成し得る。このようなハイブリッドプロモーターの例は、GAP転写活性化領域と連結されるADH調節配列(米国特許第4,876,197号および同第4,880,734号)を含む。ハイブリッドプロモーターの他の例は、ADH2、GAL4、GAL10、またはPHO5遺伝子のいず 50

れかの調節配列からなり、GAPまたはPyK (EP-A-0 164 556) のような解糖酵素遺伝子の転写活性化領域に結合されているプロモーターを含む。さらに、酵母プロモーターは、酵母RNAポリメラーゼと結合し、そして転写を開始する能力を有する、天然に生じる非酵母起源のプロモーターを含み得る。このようなプロモーターの例としては、とりわけ、以下が挙げられる：(Cohenら、(1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:1078; Henikoffら(1981) Nature 283:835; Hollenbergerら(1981) Curr. Topics Microbiol. Immunol. 96:119; Hollenbergerら(1979) 「The Expression of Bacterial Antibiotic Resistance Genes in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*」、Plasmids of Medical, Environmental and Commercial Importance (K. N. Timmis および A. Puhler 編); Mercerau-Puigalonら(1980) Gene 11:163; Panthierら(1980) Curr. Genet. 2:109;)。

【0092】

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

【0093】

融合タンパク質は、酵母発現系について、ならびに哺乳動物、バキュロウイルス、および細菌の発現系において、代替物を提供する。通常、内因性酵母タンパク質、または他の安定なタンパク質のN末端部分をコードするDNA配列は、異種コード配列の5'末端に融合される。発現において、この構築物は、2つのアミノ酸配列の融合物を提供する。例えば、酵母またはヒトのスーパーオキシドジスムターゼ(SOD)遺伝子は、外来遺伝子の5'末端に連結され、そして酵母において発現し得る。2つのアミノ酸配列の連結部にあるDNA配列は、切断可能部位をコードしてもよいし、コードしなくてもよい。例えば、EP-A-0 196 056を参照のこと。別の例はユビキチン融合タンパク質である。このような融合タンパク質は、外来タンパク質からユビキチンを切断するプロセシング酵素(例えば、ユビキチン特異的プロセシングプロテアーゼ)のための部位を好ましくは保持する、ユビキチン領域を伴って作製される。従って、この方法を通じて、ネイティブな外来タンパク質が、単離され得る(例えば、WO88/024066)。

【0094】

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

【0095】

適切なシグナル配列をコードするDNAは、分泌性酵母タンパク質に関する遺伝子由来であり得、その遺伝子は例えば、酵母インベルターゼ遺伝子(EP-A-0 012 873; JPO. 62, 096, 086)およびA因子遺伝子(米国特許第4, 588, 684号)である。あるいは、インターフェロンリーダーのような、酵母における分泌もまた提供する、非酵母起源のリーダーが存在する(EP-A-0 060 057)。

【0096】

好ましいクラスの分泌リーダーは、酵母α因子遺伝子のフラグメントを使用するリーダ

ーであり、これは「ブレ」シグナル配列、および「プロ」領域の両方を含む。用いられ得る型の α 因子フラグメントは、完全長の、ブレ-プロ α 因子リーダー（約83アミノ酸残基）および短縮された α 因子リーダー（通常約25～約50アミノ酸残基）を含む（米国特許第4,546,083号および同第4,870,008号；EP-A-0324274）。分泌を提供する α 因子リーダーフラグメントを使用するさらなるリーダーは、第1の酵母のブレ配列を有するが、第2の酵母 α 因子からのプロ領域を有しないで作製される、ハイブリッド α 因子リーダーを含む（例えば、WO89/02463を参照のこと）。

【0097】

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

【0098】

通常、上記の成分（プロモーター、リーダー（もし所望ならば）、目的のコード配列、および転写終結配列を含む）は、組み立てられて発現構築物になる。発現構築物は、宿主（例えば、酵母または細菌）において安定に保持され得る染色体外エレメント（例えば、プラスミド）のような、レプリコンにおいてしばしば保持される。このレプリコンは、2つの複製系を有し得、従って、レプリコンが、例えば、発現のために酵母において、ならびにクローニングおよび増幅のために原核生物宿主において保持されることを可能にする。このような酵母-細菌シャトルベクターの例としては、以下が挙げられる：YEp24（Botssteinら（1979）Gene 8:17~24）、pCl/1（Brakeら（1984）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:4642~4646）、およびYRp17（Stinchcombら（1982）J. Mol. Biol. 158:157）。さらに、レプリコンは、高コピー数プラスミドまたは低コピー数プラスミドのいずれかであり得る。高コピー数プラスミドは、一般に約5～約200、そして通常約10～約150の範囲のコピー数を有す。高コピー数プラスミドを含む宿主は、好ましくは少なくとも約10個、そしてより好ましくは少なくとも約20個を有する。高コピー数ベクターまたは低コピー数ベクターのいずれかが選択され得、それは、宿主に対するベクターおよび外来タンパク質の効果に依存する。例えば、Brakeら、前出を参照のこと。

【0099】

あるいは、発現構築物は、組み込みベクターを用いて、酵母のゲノムへ組み込まれ得る。組み込みベクターは、通常、ベクターが組み込むのを可能にする、酵母の染色体と相同な少なくとも1つの配列を含み、そして好ましくは、発現構築物に隣接する2つの相同配列を含む。組み込みは、ベクターにおける相同なDNAと酵母の染色体との間の組換えから生じるようである（Orr-Weaverら（1983）Methods in Enzymol. 101:228~245）。組み込みベクターは、そのベクター中に含有するために適切な相同配列を選択することによって、酵母における特定の遺伝子座に指向され得る。Orr-Weaverら、前出を参照のこと。1つ以上の発現構築物が組み込まれ得、おそらく産生される組換えタンパク質のレベルに影響を与え得る（Rineら（1983）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:6750）。ベクターに含まれる染色体配列は、ベクターにおける単一セグメント（ベクター全体の組み込みを生じる）、または染色体における隣接セグメントに相同でかつベクターにおける発現構築物に隣接する2つのセグメント（発現構築物のみの安定した組み込みを生じ得る）のいずれかとして生じ得る。

【0100】

通常、染色体外発現構築物および組み込み発現構築物は、選択マーカーを含み得、形質転換された酵母株の選択を可能にする。選択マーカーは、酵母宿主において発現され得る

10

20

30

40

50

生合成遺伝子を含み得、それは例えば、A D E 2、H I S 4、L E U 2、T R P 1、および A L G 7、ならびに G 4 1 8 耐性遺伝子であり、それぞれ、酵母細胞にツニカマイシンおよび G 4 1 8 に対する耐性を付与する。さらに、適切な選択マーカーはまた、金属のような毒性化合物の存在下において増殖する能力を有する酵母を提供し得る。例えば、C U P 1 の存在は、酵母が、銅イオンの存在下において増殖することを可能にする (B u t t e r (1 9 8 7) M i c r o b i o l . R e v . 5 1 : 3 5 1)

あるいは、上記の成分のうちのいくつかは、組み立てられて形質転換ベクターになり得る。形質転換ベクターは、通常、上記のように、レプリコンのままで保持されるか、または組み込みベクターに開発されるかのいずれかである、選択マーカーを含む。

【 0 1 0 1 】

発現ベクターおよび形質転換ベクターは、染色体外レプリコンまたは組み込みベクターのいずれかであり、多くの酵母への形質転換のために開発されてきた。例えば、発現ベクターは、とりわけ、以下の酵母のために開発されてきた：C a n d i d a a l b i c a n s (K u r t z ら (1 9 8 6) M o l . C e l l . B i o l . 6 : 1 4 2)、C a n d i d a m a l t o s a (K u n z e ら (1 9 8 5) J . B a s i c M i c r o b i o l . 2 5 : 1 4 1)、H a n s e n u l a p o l y m o r p h a (G l e e s o n ら (1 9 8 6) J . G e n . M i c r o b i o l . 1 3 2 : 3 4 5 9 ; R o g g e n k a m p ら (1 9 8 6) M o l . G e n . G e n e t . 2 0 2 : 3 0 2)、K l u y v e r o m y c e s f r a g i l i s (D a s ら (1 9 8 4) J . B a c t e r i o l . 1 5 8 : 1 1 6 5)、K l u y v e r o m y c e s l a c t i s (D e L o u v e n c o u r t ら (1 9 8 3) J . B a c t e r i o l . 1 5 4 : 7 3 7 ; V a n d e n B e r g ら (1 9 9 0) B i o / T e c h n o l o g y 8 : 1 3 5)、P i c h i a g u i l l e r i m o n d i i (K u n z e ら (1 9 8 5) J . B a s i c M i c r o b i o l . 2 5 : 1 4 1)、P i c h i a p a s t o r i s (C r e g g ら (1 9 8 5) M o l . C e l l . B i o l . 5 : 3 3 7 6 ; 米国特許第 4 , 8 3 7 , 1 4 8 号および同第 4 , 9 2 9 , 5 5 5 号)、S a c c h a r o m y c e s c e r e v i s i a e (H i n n e n ら (1 9 7 8) P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 7 5 : 1 9 2 9 ; I t o ら (1 9 8 3) J . B a c t e r i o l . 1 5 3 : 1 6 3)、S c h i z o s a c c h a r o m y c e s p o m b e (B e a c h および N u r s e (1 9 8 1) N a t u r e 3 0 0 : 7 0 6)、および Y a r r o w i a l i p o l y t i c a (D a v i d o w ら (1 9 8 5) C u r r . G e n e t . 1 0 : 3 8 0 4 7 1 ; G a i l l a r d i n ら (1 9 8 5) C u r r . G e n e t . 1 0 : 4 9)。

【 0 1 0 2 】

外来 DNA を酵母宿主へ導入する方法は、当該分野において周知であり、そして通常、スフェロプラストの、またはアルカリカチオンで処理されたインタクトな酵母細胞のいずれかの形質転換を含む。形質転換の手順は、通常、形質転換される酵母の種によって変化する。例えば以下を参照のこと：(K u r t z ら (1 9 8 6) M o l . C e l l . B i o l . 6 : 1 4 2 ; K u n z e ら (1 9 8 5) J . B a s i c M i c r o b i o l . 2 5 : 1 4 1 ; C a n d i d a) ; (G l e e s o n ら (1 9 8 6) J . G e n . M i c r o b i o l . 1 3 2 : 3 4 5 9 ; R o g g e n k a m p ら (1 9 8 6) M o l . G e n . G e n e t . 2 0 2 : 3 0 2 ; H a n s e n u l a) ; (D a s ら (1 9 8 4) J . B a c t e r i o l . 1 5 8 : 1 1 6 5 ; D e L o u v e n c o u r t ら (1 9 8 3) J . B a c t e r i o l . 1 5 4 : 1 1 6 5 ; V a n d e n B e r g ら (1 9 9 0) B i o / T e c h n o l o g y 8 : 1 3 5 ; K l u y v e r o m y c e s) ; (C r e g g ら (1 9 8 5) M o l . C e l l . B i o l . 5 : 3 3 7 6 ; K u n z e ら (1 9 8 5) J . B a s i c M i c r o b i o l . 2 5 : 1 4 1 ; 米国特許第 4 , 8 3 7 , 1 4 8 号および同第 4 , 9 2 9 , 5 5 5 号 ; P i c h i a) ; (H i n n e n ら (1 9 7 8) P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 7 5 : 1 9 2 9 ; I t o ら (1 9 8 3) J . B a c t e r i o l . 1 5 3 : 1 6 3 S a c c h a r o m y c e s) ; (B e a c h および N u r s e (1 9 8 1) N a t u r e 3 0 0 : 7 0 6 ; S c h i z o s a c c h a

10

20

30

40

50

romyces); (Davidowら (1985) Curr. Genet. 10:39; Gaillardinら (1985) Curr. Genet. 10:49; Yarrowia)。

【0103】

(抗体)

本明細書中で使用される場合、用語「抗体」とは、少なくとも1つの抗体結合部位から構成されるポリペプチドまたはポリペプチド群をいう。「抗体結合部位」は、内部表面形状および抗原のエピトープの特徴に相補的な電荷分布を有する、3次元結合空間であり、これが、抗体と抗原の結合を可能にする。「抗体」は、例えば、脊椎動物抗体、ハイブリッド抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、改変された抗体、単価抗体、Fabタンパク質、および単一ドメイン抗体を含む。

10

【0104】

本発明のタンパク質に対する抗体は、親和性クロマトグラフィー、免疫アッセイ、および髄膜炎菌性のタンパク質の識別/同定に有用である。

【0105】

本発明のタンパク質に対する抗体(ポリクローナルおよびモノクローナルの両方)は、従来の方法によって調製され得る。一般に、タンパク質は、最初に、適切な動物、好ましくはマウス、ラット、ウサギ、またはヤギを免疫するために使用される。ウサギおよびヤギは、得られ得る血清の容量、および標識された抗ウサギ抗体および抗ヤギ抗体の入手可能性に起因して、ポリクローナル血清の調製のために好ましい。免疫は、一般的に、タンパク質を生理的食塩水(好ましくはフロイント完全アジュバントのようなアジュバント)に混合または乳化し、そして混合物または乳化物を非経口的に(一般的に皮下、または筋肉内に)注射することによって、行われる。50~200 μ g/注射の用量が、代表的に十分である。免疫は、一般的に、2~6週後に生理的食塩水(好ましくはフロイント不完全アジュバントを用いて)中のタンパク質の1回以上の注射でブーストされる。あるいは、当該分野において公知の方法を使用するインビトロ免疫によって抗体を産生し得、これは、本発明の目的にとっては、インビボ免疫に等しいと考えられる。ポリクローナル抗血清は、免疫された動物からガラスまたはプラスチック製の容器へ採血し、その血液を25

20

で1時間インキュベートし、その後4で2~18時間インキュベートすることによって得られる。この血清は、遠心分離(例えば1,000g、10分間)によって回収される。ウサギから、採血1回につき約20~50mlが得られ得る。

30

【0106】

モノクローナル抗体は、KohlerおよびMilstein(Nature (1975) 256:495~96)の標準的方法、またはその改変版を使用して調製される。代表的には、マウスまたはラットが、上記のように免疫される。しかし、血清を抽出するために動物から採血するよりも、脾臓(および必要に応じていくつかの大きなリンパ節)が取り出され、そして単一の細胞へ解離される。所望の場合、脾臓細胞は、(非特異的付着細胞の回収後)細胞懸濁液をタンパク質抗原でコーティングされたプレートまたはウェルへ適用することによって、スクリーニングされ得る。この抗原に特異的な膜結合免疫グロブリンを発現するB細胞は、このプレートに結合し、そして残りの懸濁液によって、洗い落とされない。得られるB細胞、または全ての解離された脾臓細胞は、次に骨髓腫細胞と融合するように誘導されてハイブリドーマを形成し、そして選択培地(例えばヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン培地、「HAT」)において培養される。得られるハイブリドーマは、限界希釈によってプレーティングされ、そして免疫する抗原に対して特異的に結合する(かつ関連しない抗原に結合しない)抗体の産生についてアッセイされる。選択されるMAb分泌ハイブリドーマは、次にインビトロ(例えば、組織培養瓶または中空線維リアクター中で)、またはインビボ(マウスにおける腹水として)のいずれかで培養される。

40

【0107】

所望の場合、抗体は(ポリクローナルまたはモノクローナルいずれであっても)、従来

50

技術を使用して標識され得る。適切な標識としては、以下が挙げられる：発蛍光団、発色団、放射性原子（特に ^{32}P および ^{125}I ）、電子密度試薬、酵素、および特異的結合パートナーを有するリガンド。酵素は、代表的に、その活性によって検出される。例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼは、通常、3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジン（TMB）を青い色素（分光光度計を用いて定量可能）へ変換するその能力によって、検出される。「特異的結合パートナー」とは、高い特異性でリガンド分子に結合し得るタンパク質をいい、例えば、抗原およびそれに特異的なモノクローナル抗体の場合である。他の特異的結合パートナーは、ビオチンおよびアビジンまたはストレプトアビジン、IgGおよびプロテインA、ならびに当該分野において公知の多くのレセプター-リガンド結合体を含む。同じ標識がいくつかの異なる様式で働き得るので、上記が、種々の標識を別個のクラスへ分類することを意味しないことは、理解されるべきである。例えば、 ^{125}I は、放射性標識として、または電子密度試薬として働き得る。HRPは、酵素として、またはMAbについての抗原として働き得る。さらに、所望の効果のために、種々の標識を組合せ得る。例えば、MAbおよびアビジンはまた、本発明の実施において、標識を必要とする。従って、MAbをビオチンで標識して、そして ^{125}I で標識したアビジン、またはHRPで標識した抗ビオチンMAbで、その存在を検出し得る。他の置換および可能性は、当業者に容易に明らかであり、そして本発明の範囲内の均等物であると考えられる。

10

【0108】

（薬学的組成物）

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

20

【0109】

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

30

【0110】

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

【0111】

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

40

【0112】

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

50

【0113】

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

【0114】

(送達方法)

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

10

【0115】

その組成物の直接送達は、一般的に、皮下的に、腹腔内に、静脈内に、または筋肉内のいずれかでの注入によって達成されるか、あるいは、組織の間質空間へ送達される。この組成物はまた、病巣へ投与され得る。他の投与様式には、経口投与、および肺投与、坐剤、および経皮(transdermal)適用または経皮(transcutaneous)適用(例えば、WO98/20734を参照のこと)、針、および遺伝子銃またはハイポスプレー(hypospray)が含まれる。投薬処置は、単回用量スケジュール、または多数回用量スケジュールであり得る。

20

【0116】

(ワクチン)

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

【0117】

このようなワクチンは、免疫抗原、免疫原、ポリペプチド、タンパク質または核酸を、通常「薬学的に受容可能なキャリア」とともに含み、このキャリア自体は、その組成物を受ける個体に有害である抗体の産生を誘発しない任意のキャリアを含む。適切なキャリアは、代表的に、大きく、ゆっくり代謝される高分子(例えば、タンパク質、多糖、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、重合アミノ酸、アミノ酸コポリマー、脂質凝集物(例えば、油小滴またはリボソーム)、および不活性ウイルス粒子である。このようなキャリアは、当業者

30

【0118】

に周知である。さらに、これらのキャリアは免疫刺激薬剤(「アジュバント」)として機能し得る。さらに、この抗原または免疫原は、細菌毒素(例えば、ジフテリア、破傷風、コレラ、H. pyloriなどの病原体由来の毒素)と結合体化され得る。

この組成物の効力を増強するために好ましいアジュバントは、(1)アルミニウム塩(「ミョウバン」)(例えば、水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウム、硫酸アルミニウムなど)、(2)水中油乳濁処方物(他の特定の免疫刺激薬剤(例えば、ムラミルペプチド(以下を参照のこと)または細菌細胞壁成分)を伴うか伴わない)を含むが、それらに限定されず、例えば、以下：(a)5%スクアレン、0.5% Tween 80、および0.5% Span 85(必要に応じて、種々の量のMTP-PE(以下を参照のこと)を含有するが、必要ではない)を含み、モデル110Y微小流体化器(Microfluidics, Newton, MA)のような微小流体化器を用いてμ未満の粒子へと処方されたMF59TM(WO90/14837; Vaccine design: the subunit and adjuvant approach、編、Powell & Newman、Plenum Press 1995の第10章)；(b)μ未満のエマルジョンへと微小流体化されたか、またはボルテックスして、より大きな粒子径エマルジョンを生成したかのいずれかである、10%スクアレン、0.4% Tween 80、5% プルロニックブロックポリマーL121、およびthr-MDP(以下を参照のこと)を含有するSAF、ならびに(c)2%スクアレン、0.2% Tween 80、およびモノホスホリピドA(MPL)、トレハロースジミコレート(TDM)、および細胞壁骨格

40

50

(CWS)、好ましくはMPLおよびCWS (DetoxTM) からなる群由来の1つ以上の細菌細胞壁成分を含むRibTMアジュバント系(RAS)、(Rib Immunochem、Hamilton、MT)；(3) サポニンアジュバント(例えば、StimulonTM) (Cambridge Bioscience、Worcester、MA) を使用し得るか、またはそれから粒子(例えば、ISCOM (免疫刺激性複合体)) を生成し得る；(4) 完全フロイントアジュバント(CFA) および不完全フロイントアジュバント(IFA)；(5) サイトカイン(例えば、インターロイキン(例えば、IL-1、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-12 など)、インターフェロン(例えば、 γ インターフェロン)、マクロファージコロニー刺激因子(M-CSF)、腫瘍壊死因子(TNF) など；および(6) その組成物の効力を強化するための免疫刺激性因子として作用する他の物質を含むが、それらに限定されない。ミョウバンおよびMF59TMが好ましい。

10

【0119】

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

20

【0120】

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

【0121】

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

30

【0122】

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

40

【0123】

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

【0124】

タンパク質ベースのワクチンの代替として、DNAワクチンが使用され得る(例えば、RobinsonおよびTorres (1997) Seminars in Immunology 9:271-283; Donnellyら(1997) Annu Rev

50

Immunol 15:617-648; 本明細書以下を参照のこと)。

【0125】

(遺伝子送達ビヒクル)

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

【0126】

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

【0127】

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

【0128】

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

【0129】

これらの組換えレトロウイルスベクターを使用して、適切なパッケージング細胞株へそれらを導入することによって形質導入適合性レトロウイルスベクター粒子を生成し得る(米国特許第5,591,624号を参照のこと)。レトロウイルスベクターは、レトロウイルス粒子へのキメラインテグラーゼ酵素の組込みによって宿主細胞DNAへの部位特異的組込みについて構築され得る(WO96/37626号を参照のこと)。この組換えウイルスベクターは複製欠損組換えウイルスであることが好ましい。

【0130】

上記に記載のレトロウイルスベクター用いる使用に適切なパッケージング細胞株は、当該分野で周知であり、容易に調製され(WO95/30763号およびWO92/05266号を参照のこと)、そしてこれを使用して、組換えベクター粒子の生産のためのプロデューサー細胞株(これは、ベクター細胞株、すなわち「VCL」とも称される)を作製し得る。好ましくは、このパッケージング細胞株は、ヒトの親細胞(例えば、HT108

10

20

30

40

50

0細胞)またはミンク親細胞株から作製され、これは、ヒト血清における不活化を除去する。

【0131】

レトロウイルス遺伝子治療ベクターの構築のために好ましいレトロウイルスは、トリ白血症ウイルス、ウシ白血病ウイルス、マウス白血病ウイルス、ミンク細胞フォーカス形成ウイルス、マウス肉腫ウイルス、細網内皮症ウイルス、およびラウス肉腫ウイルスを含む。特に好ましいマウス白血病ウイルスは、4070Aおよび1504A(HartleyおよびRowe(1976)J. Virol. 19:19-25)、Abelson(ATCC番号VR-999)、Friend(ATCC番号VR-245)、Graffi、Gross(ATCC番号VR-590)、Kirsten、Harvey肉腫ウイルスおよびRauscher(ATCC番号VR-998)およびモロニーマウス白血病ウイルス(ATCC番号VR-190)を含む。このようなレトロウイルスは、寄託機関または収集機関(例えば、Rockville、Marylandのアメリカンタイプカルチャーコレクション(「ATCC」))から入手し得るか、または一般に利用可能な技術を用いて公知の供給源から単離され得る。

10

【0132】

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

20

30

【0133】

ヒトアデノウイルス遺伝子治療ベクターもまた当該分野で公知であり、そして本発明において使用可能である。例えば、Berkner(1988)Biotechniques 6:616およびRosenfeld(1991)Science 252:431;ならびにWO93/07283、WO93/06223、およびWO93/07282を参照のこと。本発明において使用可能な例示的な公知のアデノウイルス遺伝子治療ベクターは、上記に参照される文書およびWO94/12649、WO93/03769、WO93/19191、WO94/28938、WO95/11984、WO95/00655、WO95/27071、WO95/29993、WO95/34671、WO96/05320、WO94/08026、WO94/11506、WO93/06223、WO94/24299、WO95/14102、WO95/24297、WO95/02697、WO94/28152、WO94/24299、WO95/09241、WO95/25807、WO95/05835、WO94/18922およびWO95/09654において記載されるものを含む。あるいは、Curie(1992)Hum. Gene Ther. 3:147-154に記載されるような殺傷したアデノウイルスに連結したDNAの投与が使用され得る。本発明の遺伝子送達ビヒクルはまた、アデノウイルス随伴ウイルス(AAV)ベクターを含む。本発明における使用のためのこのようなベクターの主要でかつ好ましい例は、Srivastava WO93/09239に開示されるAAV-2ベースのベクターである。最も好ましいAAVベクターは、2つのAAV逆

40

50

方向末端反復を含む。ここで、ネイティブD配列は、ヌクレオチドの置換によって改変され、その結果、少なくとも5つのネイティブなヌクレオチドおよび18までのネイティブヌクレオチド、好ましくは少なくとも10のネイティブヌクレオチドから18までのネイティブヌクレオチド、最も好ましくは10のネイティブヌクレオチドが維持され、そしてD配列の残りのヌクレオチドが欠失またはネイティブでないヌクレオチドで置換されている。AAV逆方向末端反復のネイティブなD配列は、各AAV逆方向末端反復において(すなわち、各末端に1つの配列が存在する)20の連続するヌクレオチドの配列であって、これは、HP形成に関与しない。ネイティブでない置換ヌクレオチドは、同じ位置でのネイティブなD配列に見出されるヌクレオチド以外の任意のヌクレオチドであり得る。他の使用可能な例示的なAAVベクターは、pWP-19、pWN-1であり、これらは両方ともNahreini(1993)Gene 124:257-262に開示される。このようなAAVベクターの別の例は、psub201(Samulski(1987)J. Virol. 61:3096を参照のこと)である。別の例示的なAAVベクターは、Double-D ITRベクターである。Double-D ITRベクターの構築は、米国特許第5,478,745号に開示される。なお他のベクターは、Carter 米国特許第4,797,368号およびMuzyczka 米国特許第5,139,941号、Charterjee 米国特許第5,474,935号ならびにKotkin WO94/288157に開示されるものである。本発明において使用可能なAAVベクターのなおさらなる例は、SSV9AFABTKneoであり、これは、AFPエンハンサーおよびアルブミンプロモーターを含み、そして肝臓において優性に発現を指向する。その構造および構築は、Su(1996)Human Gene Therapy 7:463-470に開示される。さらなるAAV遺伝子治療ベクターは、米国特許第5,354,678号、同第5,173,414号、同第5,139,941号、および同第5,252,479号に記載される。

【0134】

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

【0135】

本発明において使用され得るアルファウイルス遺伝子治療ベクターもまた、意図される。好ましいアルファウイルスベクターは、シンドビスウイルスベクターである。トガウイルス、セムリキ森林ウイルス(ATCC VR-67; ATCC VR-1247)、Middelbergウイルス(ATCC VR-370)、ロスリバーウイルス(ATCC VR-373; ATCC VR-1246)、ベネズエラウマ脳脊髄炎ウイルス(ATCC VR-923; ATCC VR-1250; ATCC VR-1249; ATCC VR-532)および米国特許第5,091,309号、同第5,217,879号、およびWO92/10578に記載されるもの。より詳細には、米国特許出願第08/405,627号(1995年3月15日出願)、WO94/21792号、WO92/10578号、WO95/07994号、米国特許第5,091,309号、および米国特許第5,217,879号に記載されるそれらのアルファウイルスベクターが使用可能である。このようなアルファウイルスは、Rockville、MarylandのAT

CCのような寄託機関または収集機関から入手し得るか、または一般的に利用可能な技術を用いて公知の供給源から単離され得る。好ましくは、細胞傷害性が減少したアルファウイルスベクターを使用する（米国特許出願番号08/679640号を参照のこと）。

【0136】

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

【0137】

本発明における使用に適切な他のウイルスベクターは、以下に由来するものを含む：ポリオウイルス（例えば、ATCC VR-58およびEvans, Nature 339 (1989) 385およびSabín (1973) J. Biol. Standardization 1:115に記載されるもの；リノウイルス、例えば、ATCC VR-1110およびArnold (1990) J. Cell Biochem L401に記載されるもの；ポックスウイルス（例えば、カナリアポックスウイルスまたはワクシニアウイルス（例えば、ATCC VR-111およびATCC VR-2010ならびにFisher-Hoch (1989) Proc Natl Acad Sci 86:317; Flexner (1989) Ann NY Acad Sci 569:86、Flexner (1990) Vaccine 8:17; 米国特許第4,603,112号および同第4,769,330号ならびにWO89/01973号に記載されるもの））；SV40ウイルス（例えば、ATCC VR-305およびMulligan (1979) Nature 277:108およびMadzak (1992) J. Gen. Virol 73:1533に記載されるもの）；インフルエンザウイルス（例えば、ATCC VR-797および米国特許第5,166,057号およびEnami (1990) Proc Natl Acad Sci 87:3802-3805; EnamiおよびPalese (1991) J. Virol 65:2711-2713およびLuytjes (1989) Cell 59:110 (McMichael (1983) NEJ Med 309:13ならびにYap (1978) Nature 273:238およびNature (1979) 277:108もまた参照のこと）に記載されるような逆遺伝子技術を使用して作製した組換えインフルエンザウイルス）；EP-0386882およびBuchschacher (1992) J. Virol 66:2731に記載されるようなヒト免疫不全ウイルス；麻疹ウイルス（例えば、ATCC VR-67およびVR-1247ならびにEP-0440219に記載されるもの）；アウラウイルス（例えば、ATCC VR-368）；ペバルウイルス（例えば、ATCC VR-600およびATCC VR-1240）；カバス（Cabassou）ウイルス（例えば、ATCC VR-922）；チクングンヤウイルス（例えば、ATCC VR-64およびATCC VR-1241）；フォートモーガン（Fort Morgan）ウイルス（例えば、ATCC VR-924）；ゲタウイルス（例えば、ATCC VR-369およびATCC VR-1243）；キジラガハ（Kyzylagach）ウイルス（例えば、ATCC VR-927）；マヤロウイルス（例えば、ATCC VR-66）；ムカンボウイルス（例えば、ATCC VR-580およびATCC VR-1244）；ヌヅムウイルス（例えば、ATCC VR-371）；ピクスナウイルス（例えば、ATCC VR-372およびATCC VR-1245）；トナテ（Tonate）ウイルス（例えば、ATCC VR-925）；トリニティウイルス（例えば、ATCC VR-469）；ユナウイルス（例えば、ATCC VR-374）；ワタロアウイルス（例えば、ATCC VR-926）；Y-62-33ウイルス（例えば、ATCC VR-375）；オニオンウイルス、東部ウマ脳脊髄炎ウイルス（例えば、ATCC VR-65およびATCC VR-1242）；西部ウマ脳脊髄炎ウイルス（例えば、ATCC VR-70、ATCC VR-1251、ATCC VR-622およびATCC VR-1252）；ならびにコロナウイルス（例えば、ATCC VR-740）およびHamre (1

966) Proc Soc Exp Biol Med 121:190に記載のもの。
【0138】

本発明の組成物の細胞への送達は、上記に言及したウイルスベクターに限定されない。他の送達方法および媒体が使用され得る（例えば、核酸発現ベクター、殺傷したアデノウイルスに連結したかまたは連結していないポリカチオン性縮合DNA単独（例えば、米国特許出願番号08/366,787（1994年12月30日出願）およびCurie（1992）Hum Gene Ther 3:147-154を参照のこと）、リガンド連結DNA（例えば、Wu（1989）J Biol Chem 264:16985-16987を参照のこと）、真核生物細胞送達ビヒクル細胞（例えば、米国特許出願番号08/240,030（1994年5月9日出願）および米国特許出願番号08/404,796を参照のこと）、光重合化ヒドロゲル物質の沈着、手動の遺伝子送達粒子銃（米国特許第5,149,655号に記載されるような）、米国特許第5,206,152号およびWO92/11033に記載されるような電離放射線、核電荷中和または細胞膜との融合）。さらなるアプローチは、Philip（1994）Mol Cell Biol 14:2411-2418およびWoffendin（1994）Proc Natl Acad Sci 91:1581-1585に記載される。

10

【0139】

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

20

【0140】

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

30

【0141】

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

40

50

、655号に記載されるような)；移入された遺伝子を活性化するための電離放射線の使用(米国特許第5,206,152号およびWO92/11033に記載されるような)を含む。

【0142】

例示的なりボソームおよびポリカチオン性遺伝子送達ビヒクルは、米国特許第5,422,120号および同4,762,915号；WO95/13796；WO94/23697；およびWO91/14445；EP-0524968；およびStryer、Biochemistry、236-240頁(1975)、W.H. Freeman、San Francisco；Szoka(1980)Biochem Biophys Acta 600:1；Bayer(1979)Biochem Biophys Acta 550:464；Rivnay(1987)Meth Enzymol 149:119；Wang(1987)Proc Natl Acad Sci 84:7851；Plant(1989)Anal Biochem 176:420に記載されるものである。

10

【0143】

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

【0144】

20

(送達方法)

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

【0145】

この組成物の直接送達は、皮下、腹腔内、静脈内、もしくは筋肉内のいずれかの注射によって、または組織の間質空間への送達によって一般的に達成される。この組成物はまた、病巣へ投与され得る。他の投与様式は、経口投与または肺投与、坐剤、および経皮または経皮適用(例えば、WO98/20734を参照のこと)、針、および遺伝子銃またはハイポスプレーを含む。投薬治療は、単回用量スケジュールまたは多数回用量スケジュールであり得る。

30

【0146】

エキソビボ送達および被験体への形質転換細胞の再移植のための方法は、当該分野で公知であり、そして例えばWO93/14778に記載されている。エキソビボ適用に有用である細胞の例は、例えば、幹細胞、詳細には、造血細胞、リンパ細胞、マクロファージ、樹状細胞または腫瘍細胞を含む。

【0147】

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

40

【0148】

(ポリヌクレオチドおよびポリペプチドの薬学的組成物)

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

【0149】

(A.ポリペプチド)

1つの例は、限定することなく以下を包含するポリペプチドである：アシアロオロソム

50

コイド (ASOR) ; トランスフェリン ; アシアロ糖タンパク質 ; 抗体 ; 抗体フラグメント ; フェリチン ; インターロイキン ; インターフェロン ; 顆粒球、マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF) 、顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) 、マクロファージコロニー刺激因子 (M-CSF) 、幹細胞因子およびエリスロポエチン。ウイルス抗原 (例えば、エンベロープタンパク質) もまた、使用され得る。また、他の侵襲性生物由来のタンパク質 (例えば、RIIとして知られる *Plasmodium falciparum* の環境スポロゾイト (circumsporozoite) タンパク質由来の17アミノ酸ペプチド) 。

【0150】

(B. ホルモン、ビタミンなど)

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

【0151】

(C. ポリアルキレン、ポリサッカリドなど)

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

【0152】

(D. 脂質およびリポソーム)

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

【0153】

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

【0154】

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

【0155】

カチオン性リポソームは容易に入手可能である。例えば、N[1-2, 3-ジオレイルオキシ)プロピル]-N, N, N-トリエチルアンモニウム (DOTMA) リポソームは、GIBCO BRL、Grand Island、NYからの商標リポフェクチン (Lipofectin) の下で入手可能である (Fegner (前出) もまた参照のこと)。他の市販されているリポソームは、トランスフェクテース (transfectace) (DDAB/DOPE) およびDOTAP/DOPE (Boerhinger) を含む。他のカチオン性リポソームは、当該分野で周知の技法を使用して、容易に利用可能な物質から調製され得る。例えば、DOTAP (1, 2-ビス(オレイルオキシ)-3-(ト

10

20

30

40

50

リメチルアンモニオ)プロパン)リボソームの合成の記載について、Szoka(1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75:4194-4198; WO 90/11092を参照のこと。

【0156】

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

10

【0157】

このリボソームは、多重膜のベシクル(MLV)、小さな単一膜ベシクル(SUV)、または大きな単一膜のベシクル(LUV)を含み得る。種々のリボソーム-核酸複合体は当該分野で公知の方法を使用して調製され得る。例えば、Straubinger(1983) Meth. Immunol. 101:512-527; Szoka(1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75:4194-4198; Papahadjopoulos(1975) Biochim. Biophys. Acta 392:483; Wilson(1979) Cell 17:77; DeamerおよびBangham(1976) Biochim. Biophys. Acta 443:629; Ostro(1977) Biochem. Biophys. Res. Commun. 76:836; Fraley(1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:3348; EnochおよびStrittmatter(1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:145; Fraley(1980) J. Biol. Chem. (1980) 255:10431; SzokaおよびPapahadjopoulos(1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75:145;ならびにSchaefer-Ridder(1982) Science 215:166を参照のこと。

20

【0158】

(E・リポタンパク質)

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

30

【0159】

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

40

【0160】

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

50

ポタンパク質 A、C、および E を含む。

【0161】

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

【0162】

リポタンパク質は、トリグリセリド、コレステロール（遊離およびエステル）、およびリン脂質を含む、種々の脂質を含む。天然に存在するリポタンパク質の脂質の組成は、変化する。例えば、キロミクロンは主としてトリグリセリドを含む。天然に存在するリポタンパク質の脂質含有量のより詳細な記載は、例えば、Meth. Enzymol. 128 (1986) に見いだされ得る。この脂質の組成は、レセプター結合活性についてアポタンパク質の立体構造を補助するために選択される。脂質組成はまた、ポリヌクレオチド結合分子との疎水性相互作用および会合を容易にするように選択され得る。

【0163】

天然に存在するリポタンパク質は、例えば、血清から超遠心分離によって単離され得る。そのような方法は、Meth. Enzymol. (前出); Pitas (1980) J. Biochem. 253:5454-5460 および Mahay (1979) J Clin Invest 64:743-750 に記載される。リポタンパク質はまた、インビトロまたは所望の宿主細胞中のアポタンパク質遺伝子の発現による組換え方法によって産生され得る。例えば、Atkinson (1986) Annu Rev Biophys Chem 15:403 および Radding (1958) Biochim Biophys Acta 30:443 を参照のこと。リポタンパク質はまた、Biomedical Technologies, Inc., Stoughton, Massachusetts, USA のような商業的な供給者から購入され得る。さらなるリポタンパク質の記載は、Zuckermannら、WO 98/06437 に見い出され得る。

【0164】

(F. ポリカチオン性薬剤)

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

【0165】

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

【0166】

以下は、ポリカチオン性薬剤としての有用なポリペプチドの例である：ポリリジン、ポリアルギニン、ポリオルニチン、およびプロタミン。他の例は、ヒストン、プロタミン、ヒト血清アルブミン、DNA 結合タンパク質、非ヒストン染色体タンパク質、DNA ウィルス由来のコートタンパク質（例えば、X174）を含む。転写因子もまた、DNA に結合するドメインを含み、従って核酸縮合薬剤として有用であり得る。手短に言えば、転写因子（例えば、C/EBP、c-jun、c-fos、AP-1、AP-2、AP-3、CPF、Prot-1、Sp-1、Oct-1、Oct-2、CREP、およびTFIID）は、DNA 配列に結合する塩基性ドメインを含む。

【0167】

有機ポリカチオン性薬剤は、スペルミン、スペルミジン、およびプトレシン（putrescine）を含む。

【0168】

ポリカチオン性薬剤の大きさおよびその物理的特性は、上記の表から推定されて、他のポリカチオン性薬剤が構築され得るか、または合成ポリカチオン性薬剤が産生され得る。

【0169】

有用な合成ポリカチオン性薬剤は、例えば、DEAE-デキストラン、ポリブレンを含む。LipofectinTM、およびlipofectAMINETMは、ポリヌクレオチド/ポリペプチドと組み合わせた場合にポリカチオン性複合体を形成するモノマーである。

【0170】

(免疫診断アッセイ)

本発明の髄膜炎菌性抗原は、抗体レベルを検出するためのイムノアッセイにおいて使用され得る(または、逆に抗髄膜炎菌性抗体は抗原レベルを検出するために使用され得る)。十分に規定された組換え抗原に基づくイムノアッセイは、侵襲性の診断方法と置き換えるために開発され得る。生物学的サンプル(例えば、血液サンプルまたは血清サンプルを含む)内の髄膜炎菌性タンパク質に対する抗体が検出され得る。このイムノアッセイの設計は、多くのバリエーションの対象であり、そして種々のこれらは当該分野で公知である。イムノアッセイのプロトコルは、例えば、競合アッセイ、または直接反応アッセイ、またはサンドイッチ型アッセイに基づき得る。プロトコルはまた、例えば、固体支持体を使用し得、または免疫沈降によってなされ得る。ほとんどのアッセイは、標識された抗体またはポリペプチドの使用を含み、その標識は、例えば、蛍光分子、化学発光分子、放射性分子、または色素分子であり得る。プローブからのシグナルを増幅するアッセイは公知である;これらの例は、ビオチンおよびアビジンを利用するアッセイ、ならびに酵素標識および酵素媒介イムノアッセイ(例えば、ELISAアッセイ)である。

【0171】

免疫診断に適切でありそして適切な標識試薬を備えるキットは、適切な容器中に、アッセイの実行に必要なとされる残りの試薬および物質(例えば、適切な緩衝液、塩溶液など)ならびに適切なセットのアッセイの説明書と共に本発明の組成物を含む適切な物質を詰めることによって構築される。

【0172】

(核酸ハイブリダイゼーション)

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

【0173】

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

【0174】

例えば、サザンブロットを行う場合、考慮する変数は、(1)プロットされるDNAの複雑さ、および(2)プローブおよび検出される配列の間の相同性である。研究されるフ

10

20

30

40

50

ラグメントの全量は、プラスミドまたはファージ消化物については $0.1 \sim 1 \mu\text{g}$ 、高度に複雑な真核生物ゲノム中の単一コピー遺伝子については $10^{-9} \sim 10^{-8} \text{g}$ まで、 10 倍変化し得る。より低い複雑さのポリヌクレオチドについては、実質的により短いプロッティング、ハイブリダイゼーション、および曝露時間、より少量の出発ポリヌクレオチド、およびより低い非活性のプロープが使用され得る。例えば、単一コピーの酵母遺伝子は、 $1 \mu\text{g}$ の酵母 DNA で開始し、 2 時間プロットし、そして $4 \sim 8$ 時間 $10^8 \text{cpm} / \mu\text{g}$ のプロープを用いてハイブリダイズして、わずか 1 時間の曝露時間を用いて検出され得る。単一コピーの哺乳動物遺伝子について、保存性のアプローチは、 $10 \mu\text{g}$ の DNA で開始し、一晚プロットし、そして $10^8 \text{cpm} / \mu\text{g}$ より多いプロープを用いて 10% 硫酸デキストランの存在下で一晚ハイブリダイズし、約 24 時間露光時間を生じる。

10

【0175】

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

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

20

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

【0176】

ハイブリダイゼーション実験の設計において、核酸ハイブリダイゼーションに影響を与えるいくつかの因子が簡便に変更され得る。ハイブリダイゼーションおよび洗浄の温度ならびに洗浄時の塩濃度を調整するのが最も単純である。ハイブリダイゼーション温度が上昇する (すなわち、ストリンジェンシー) につれて、非相同的な鎖の間で起こるハイブリダイゼーションは起こりにくくなるようであり、結果として、バックグラウンドが減少する。放射標識したプロープが固定化されたフラグメントと完全には相同ではない場合 (遺伝子ファミリーおよび種間のハイブリダイゼーション実験における場合で頻繁であるように)、ハイブリダイゼーション温度は低下されなければならない、そしてバックグラウンドが増大する。洗浄の温度は、類似の様式で、ハイブリダイゼーションバンドの強度、およびバックグラウンドの程度に影響を与える。洗浄のストリンジェンシーはまた、塩濃度の減少とともに増大する。

30

【0177】

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

40

【0178】

(核酸プロープアッセイ)

本発明に従う核酸プロープを利用する、PCR、分枝 DNA プロープアッセイ、または

50

プロッティング技術のような方法は、cDNAまたはmRNAの存在を決定し得る。プローブは、検出されるに十分安定な、二重鎖または二本鎖複合体を形成し得る場合に、本発明の配列に「ハイブリダイズする」といわれる。

【0179】

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

10

【0180】

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

20

【0181】

プローブの正確な長さおよび配列は、ハイブリダイゼーション条件（例えば、温度、塩条件など）に依存する。例えば、診断的適用については、分析物の配列の複雑さに依存して、核酸プローブは、代表的には、少なくとも10～20ヌクレオチド、好ましくは15～25、そしてより好ましくは少なくとも30ヌクレオチドを含むが、これよりも短くもあり得る。短いプライマーは、一般的には、鋳型との十分に安定なハイブリッド複合体を形成するのにより低い温度を必要とする。

【0182】

プローブは、合成的手順（例えば、Matteucciらのトリエステル法（J. Am. Chem. Soc. (1981) 103: 3185））によるか、またはUrdeaら（Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1983) 80: 7461）に従うか、または市販の自動オリゴヌクレオチド合成機を使用して、産生され得る。

30

【0183】

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

40

【0184】

あるいは、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）は、少量の標的核酸を検出する別の周知の手段である。そのアッセイは、Mullisら、(Meth. Enzymol. (1987) 155: 335-350)；米国特許第4,683,195号および同第4,683,202号に記載されている。2つの「プライマー」ヌクレオチドは、標的核酸とハイブリダイズし、そして反応をプライムするために使用される。このプライマーは、二重鎖の安定性を補助するための、または、例えば、首尾よい制限部位を組み込むための、増幅標

50

的（または、その相補物）の配列にハイブリダイズしない配列を含み得る。代表的には、このような配列は、所望の髄膜炎菌性配列に隣接する。

【0185】

熱安定性のポリメラーゼは、本来の標的核酸を鋳型として使用して、プライマーから標的核酸のコピーを作製する。標的核酸の閾値量がポリメラーゼによって産生された後、それらはより従来の方法（例えば、サザンブロット）によって検出され得る。サザンブロット法を使用する場合、標識されたプローブは、髄膜炎菌性配列（またはその相補物）にハイブリダイズする。

【0186】

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

【0187】

（好ましいフラグメントの例）

WO99/36544に開示されるタンパク質配列を、全長タンパク質内の推定抗原性ペプチドフラグメントに対するコンピューター分析に供した。この分析には以下の3つのアルゴリズムを用いた。

- AMPHI：このプログラムは、T細胞エピートプを予測するために用いられてきた [Gaoら（1989）J. Immunol. 143:3007; Robertsら（1996）AIDS Res Hum Retrovir 12:593; Quakyiら（1992）Scand J Immunol 補遺. 11:9]そして、DNASTAR, Inc. のProteanパッケージにおいて利用可能である（1228 South Park Street, Madison, Wisconsin 53715 USA）。

- JamesonおよびWolf（1988）The antigenic index: a novel algorithm for predicting antigenic determinants. CABIOS 4:181:186. によって開示されたような、ANTIGENIC INDEX（抗原性指標）。

- HoppおよびWoods（1981）Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequence. PNAS USA 78:3824~3828によって開示されたような、HYDROPHILICITY（親水性）。

【0188】

表Iは、WO99/36544に開示されるタンパク質の好ましいフラグメントを示す。3つのアルゴリズムがしばしば同じフラグメントを同定する（例えば、ORF38-1について、残基37~42由来のフラグメントおよび残基143~146由来のフラグメントは、両方とも2回同定される）。このような複数同定されるフラグメントが特に好ましい。このアルゴリズムは、しばしば重複するフラグメントを特定する（例えば、ORF40-1について、AMPHIは、残基161~165を同定し、そして親水性は、残基163~175を同定した）。本発明は、明白に、これらの重複するフラグメントの組合せから得られるフラグメントを含む（例えば、ORF40-1の場合、残基161~残基175由来のフラグメント）。単一のアミノ酸により分離されるフラグメントがまた、しばしば特定される（例えば、ORF40-1の抗原性指標423~426および428~438）。本発明はまた、このような「隣接する」フラグメントの2つの端にまたがるフラグメントを含む（例えば、ORF40-1について423~438）。

【0189】

10

20

30

40

50

(表 I - WO99/36544 に開示されたタンパク質の 1769 のフラグメント)
 重要：本出願のフラグメント番号 1 (Fragment # 1) は、WO99/36544
 に開示された ORF38-1 のアミノ酸 6 ~ 14 であり、本出願のフラグメント番号 2 (Fragment # 2) は、WO99/36544 に開示された ORF38-1 のアミノ酸 57 ~ 59 である、など。

【0190】

【表 1】

フラグメント#	WO99/36544 ORF	アルゴリズム	アミノ酸
1.	38-1	AMPHI	6-14
2.	38-1	AMPHI	57-59
3.	38-1	AMPHI	67-76
4.	38-1	AMPHI	92-100
5.	38-1	AMPHI	127-137
6.	38-1	AMPHI	149-166
7.	38-1	AMPHI	210-215
8.	38-1	AMPHI	231-236
9.	38-1	AMPHI	270-272
10.	38-1	AMPHI	303-320
11.	38-1	抗原性指標	16-34
12.	38-1	抗原性指標	37-42
13.	38-1	抗原性指標	46-64
14.	38-1	抗原性指標	72-91
15.	38-1	抗原性指標	94-112
16.	38-1	抗原性指標	114-117
17.	38-1	抗原性指標	124-136
18.	38-1	抗原性指標	143-146
19.	38-1	抗原性指標	148-160
20.	38-1	抗原性指標	167-195
21.	38-1	抗原性指標	201-216
22.	38-1	抗原性指標	218-240
23.	38-1	抗原性指標	244-252
24.	38-1	抗原性指標	257-278
25.	38-1	抗原性指標	282-290
26.	38-1	抗原性指標	308-314
27.	38-1	親水性	21-34
28.	38-1	親水性	37-42
29.	38-1	親水性	47-55
30.	38-1	親水性	57-61
31.	38-1	親水性	72-74
32.	38-1	親水性	76-78
33.	38-1	親水性	82-91
34.	38-1	親水性	94-101
35.	38-1	親水性	108-112
36.	38-1	親水性	126-136
37.	38-1	親水性	143-146
38.	38-1	親水性	148-160

10

20

30

40

表1の続き①

39.	38-l	親水性	167-195
40.	38-l	親水性	221-223
41.	38-l	親水性	226-236
42.	38-l	親水性	244-250
43.	38-l	親水性	257-274
44.	38-l	親水性	282-286
45.	38-l	親水性	311-314
46.	38a	AMPHI	6-14
47.	38a	AMPHI	57-59
48.	38a	AMPHI	67-76
49.	38a	AMPHI	92-100
50.	38a	AMPHI	127-137
51.	38a	AMPHI	149-166
52.	38a	AMPHI	210-215
53.	38a	AMPHI	223-225
54.	38a	AMPHI	231-236
55.	38a	AMPHI	270-272
56.	38a	AMPHI	303-320
57.	38a	抗原性指標	16-34
58.	38a	抗原性指標	37-42
59.	38a	抗原性指標	46-64
60.	38a	抗原性指標	72-91
61.	38a	抗原性指標	94-112
62.	38a	抗原性指標	114-117
63.	38a	抗原性指標	124-136
64.	38a	抗原性指標	143-146
65.	38a	抗原性指標	148-160
66.	38a	抗原性指標	165-195
67.	38a	抗原性指標	201-216
68.	38a	抗原性指標	218-240
69.	38a	抗原性指標	244-252
70.	38a	抗原性指標	257-278
71.	38a	抗原性指標	282-290
72.	38a	抗原性指標	308-314
73.	38a	親水性	21-34
74.	38a	親水性	37-42
75.	38a	親水性	47-55
76.	38a	親水性	57-61
77.	38a	親水性	72-74
78.	38a	親水性	76-78
79.	38a	親水性	82-91
80.	38a	親水性	94-101
81.	38a	親水性	108-112
82.	38a	親水性	126-136
83.	38a	親水性	143-146

10

20

30

40

(表1)の続き(2)

84.	38a	親水性	148-160
85.	38a	親水性	165-195
86.	38a	親水性	221-223
87.	38a	親水性	226-236
88.	38a	親水性	244-250
89.	38a	親水性	257-273
90.	38a	親水性	282-286
91.	38a	親水性	311-314
92.	39-1	AMPHI	6-13
93.	39-1	AMPHI	21-24
94.	39-1	AMPHI	37-40
95.	39-1	AMPHI	60-75
96.	39-1	AMPHI	118-122
97.	39-1	AMPHI	134-139
98.	39-1	AMPHI	165-183
99.	39-1	AMPHI	192-195
100.	39-1	AMPHI	233-241
101.	39-1	AMPHI	247-267
102.	39-1	AMPHI	273-275
103.	39-1	AMPHI	299-308
104.	39-1	AMPHI	310-319
105.	39-1	AMPHI	322-330
106.	39-1	AMPHI	338-347
107.	39-1	AMPHI	358-364
108.	39-1	AMPHI	366-368
109.	39-1	AMPHI	376-378
110.	39-1	AMPHI	385-392
111.	39-1	AMPHI	413-416
112.	39-1	AMPHI	421-424
113.	39-1	AMPHI	429-438
114.	39-1	AMPHI	445-454
115.	39-1	AMPHI	456-458
116.	39-1	AMPHI	498-500
117.	39-1	AMPHI	512-519
118.	39-1	AMPHI	576-587
119.	39-1	AMPHI	589-600
120.	39-1	AMPHI	650-652
121.	39-1	AMPHI	670-674
122.	39-1	抗原性指標	26-32
123.	39-1	抗原性指標	35-45
124.	39-1	抗原性指標	54-69
125.	39-1	抗原性指標	79-84
126.	39-1	抗原性指標	88-96
127.	39-1	抗原性指標	105-110
128.	39-1	抗原性指標	117-124

10

20

30

40

「表1」の続き(3)

129.	39-1	抗原性指標	152-154
130.	39-1	抗原性指標	190-192
131.	39-1	抗原性指標	222-231
132.	39-1	抗原性指標	246-265
133.	39-1	抗原性指標	292-295
134.	39-1	抗原性指標	318-335
135.	39-1	抗原性指標	353-362
136.	39-1	抗原性指標	370-372
137.	39-1	抗原性指標	402-404
138.	39-1	抗原性指標	406-408
139.	39-1	抗原性指標	419-421
140.	39-1	抗原性指標	446-449
141.	39-1	抗原性指標	453-460
142.	39-1	抗原性指標	465-469
143.	39-1	抗原性指標	476-487
144.	39-1	抗原性指標	491-499
145.	39-1	抗原性指標	505-514
146.	39-1	抗原性指標	522-536
147.	39-1	抗原性指標	557-567
148.	39-1	抗原性指標	569-575
149.	39-1	抗原性指標	577-580
150.	39-1	抗原性指標	593-599
151.	39-1	抗原性指標	603-619
152.	39-1	抗原性指標	626-628
153.	39-1	抗原性指標	634-637
154.	39-1	抗原性指標	639-647
155.	39-1	抗原性指標	655-658
156.	39-1	抗原性指標	672-674
157.	39-1	抗原性指標	677-686
158.	39-1	抗原性指標	688-691
159.	39-1	抗原性指標	693-699
160.	39-1	抗原性指標	707-710
161.	39-1	親水性	28-32
162.	39-1	親水性	38-44
163.	39-1	親水性	54-69
164.	39-1	親水性	80-83
165.	39-1	親水性	89-96
166.	39-1	親水性	117-119
167.	39-1	親水性	121-123
168.	39-1	親水性	152-154
169.	39-1	親水性	224-231
170.	39-1	親水性	247-265
171.	39-1	親水性	318-332
172.	39-1	親水性	357-361
173.	39-1	親水性	402-404

10

20

30

40

[表1]の続き④

174.	39-1	親水性	406-408
175.	39-1	親水性	446-449
176.	39-1	親水性	454-459
177.	39-1	親水性	465-469
178.	39-1	親水性	476-487
179.	39-1	親水性	491-499
180.	39-1	親水性	506-514
181.	39-1	親水性	525-535
182.	39-1	親水性	560-567
183.	39-1	親水性	573-575
184.	39-1	親水性	577-580
185.	39-1	親水性	594-596
186.	39-1	親水性	605-607
187.	39-1	親水性	611-619
188.	39-1	親水性	634-637
189.	39-1	親水性	639-647
190.	39-1	親水性	672-674
191.	39-1	親水性	677-686
192.	39-1	親水性	688-690
193.	39-1	親水性	693-695
194.	39a	AMPHI	6-13
195.	39a	AMPHI	21-24
196.	39a	AMPHI	37-40
197.	39a	AMPHI	60-75
198.	39a	AMPHI	118-122
199.	39a	AMPHI	134-139
200.	39a	AMPHI	165-183
201.	39a	AMPHI	192-195
202.	39a	AMPHI	233-241
203.	39a	AMPHI	247-267
204.	39a	AMPHI	273-275
205.	39a	AMPHI	299-308
206.	39a	AMPHI	310-319
207.	39a	AMPHI	322-330
208.	39a	AMPHI	338-347
209.	39a	AMPHI	358-364
210.	39a	AMPHI	366-368
211.	39a	AMPHI	376-378
212.	39a	AMPHI	385-392
213.	39a	AMPHI	413-416
214.	39a	AMPHI	421-424
215.	39a	AMPHI	429-438
216.	39a	AMPHI	445-454
217.	39a	AMPHI	456-458
218.	39a	AMPHI	498-500

10

20

30

40

[表]の続き⑤

219.	39a	AMPHI	512-520
220.	39a	AMPHI	576-587
221.	39a	AMPHI	589-600
222.	39a	AMPHI	650-652
223.	39a	AMPHI	670-674
224.	39a	抗原性指標	26-32
225.	39a	抗原性指標	35-45
226.	39a	抗原性指標	54-69
227.	39a	抗原性指標	79-84
228.	39a	抗原性指標	89-96
229.	39a	抗原性指標	103-110
230.	39a	抗原性指標	117-124
231.	39a	抗原性指標	152-154
232.	39a	抗原性指標	190-192
233.	39a	抗原性指標	222-231
234.	39a	抗原性指標	246-265
235.	39a	抗原性指標	292-295
236.	39a	抗原性指標	318-335
237.	39a	抗原性指標	353-362
238.	39a	抗原性指標	370-372
239.	39a	抗原性指標	402-404
240.	39a	抗原性指標	406-408
241.	39a	抗原性指標	419-421
242.	39a	抗原性指標	446-449
243.	39a	抗原性指標	453-460
244.	39a	抗原性指標	465-469
245.	39a	抗原性指標	476-487
246.	39a	抗原性指標	491-499
247.	39a	抗原性指標	505-514
248.	39a	抗原性指標	529-535
249.	39a	抗原性指標	557-567
250.	39a	抗原性指標	569-575
251.	39a	抗原性指標	577-580
252.	39a	抗原性指標	593-599
253.	39a	抗原性指標	603-619
254.	39a	抗原性指標	626-628
255.	39a	抗原性指標	634-637
256.	39a	抗原性指標	639-647
257.	39a	抗原性指標	655-658
258.	39a	抗原性指標	672-674
259.	39a	抗原性指標	677-686
260.	39a	抗原性指標	688-691
261.	39a	抗原性指標	693-699
262.	39a	抗原性指標	707-710
263.	39a	親水性	28-32

10

20

30

40

[表1]の続き⑥

264.	39a	親水性	38-44
265.	39a	親水性	54-69
266.	39a	親水性	80-83
267.	39a	親水性	89-95
268.	39a	親水性	105-108
269.	39a	親水性	117-119
270.	39a	親水性	121-123
271.	39a	親水性	152-154
272.	39a	親水性	224-231
273.	39a	親水性	247-265
274.	39a	親水性	318-332
275.	39a	親水性	357-361
276.	39a	親水性	402-404
277.	39a	親水性	406-408
278.	39a	親水性	446-449
279.	39a	親水性	454-459
280.	39a	親水性	465-469
281.	39a	親水性	476-487
282.	39a	親水性	491-499
283.	39a	親水性	506-514
284.	39a	親水性	529-535
285.	39a	親水性	560-567
286.	39a	親水性	573-575
287.	39a	親水性	577-580
288.	39a	親水性	594-596
289.	39a	親水性	605-607
290.	39a	親水性	611-619
291.	39a	親水性	634-637
292.	39a	親水性	639-647
293.	39a	親水性	672-674
294.	39a	親水性	677-686
295.	39a	親水性	688-690
296.	39a	親水性	693-695
297.	40-1	AMPHI	6-14
298.	40-1	AMPHI	16-19
299.	40-1	AMPHI	22-27
300.	40-1	AMPHI	30-33
301.	40-1	AMPHI	41-44
302.	40-1	AMPHI	62-68
303.	40-1	AMPHI	129-139
304.	40-1	AMPHI	161-165
305.	40-1	AMPHI	181-191
306.	40-1	AMPHI	199-202
307.	40-1	AMPHI	215-220
308.	40-1	AMPHI	237-249

10

20

30

40

〔表1〕の続き⑦

309.	40-1	AMPHI	298-302
310.	40-1	AMPHI	313-318
311.	40-1	AMPHI	335-342
312.	40-1	AMPHI	376-383
313.	40-1	AMPHI	399-402
314.	40-1	AMPHI	426-428
315.	40-1	AMPHI	430-433
316.	40-1	AMPHI	435-437
317.	40-1	AMPHI	479-482
318.	40-1	AMPHI	491-511
319.	40-1	AMPHI	523-525
320.	40-1	AMPHI	560-563
321.	40-1	抗原性指標	21-32
322.	40-1	抗原性指標	49-61
323.	40-1	抗原性指標	64-66
324.	40-1	抗原性指標	74-92
325.	40-1	抗原性指標	98-123
326.	40-1	抗原性指標	129-135
327.	40-1	抗原性指標	138-176
328.	40-1	抗原性指標	193-195
329.	40-1	抗原性指標	199-219
330.	40-1	抗原性指標	226-240
331.	40-1	抗原性指標	242-245
332.	40-1	抗原性指標	251-257
333.	40-1	抗原性指標	261-276
334.	40-1	抗原性指標	279-306
335.	40-1	抗原性指標	308-346
336.	40-1	抗原性指標	352-367
337.	40-1	抗原性指標	375-378
338.	40-1	抗原性指標	384-406
339.	40-1	抗原性指標	408-420
340.	40-1	抗原性指標	423-426
341.	40-1	抗原性指標	428-438
342.	40-1	抗原性指標	453-459
343.	40-1	抗原性指標	462-481
344.	40-1	抗原性指標	485-494
345.	40-1	抗原性指標	506-518
346.	40-1	抗原性指標	535-539
347.	40-1	抗原性指標	544-552
348.	40-1	抗原性指標	559-566
349.	40-1	抗原性指標	571-582
350.	40-1	親水性	21-32
351.	40-1	親水性	51-61
352.	40-1	親水性	64-66
353.	40-1	親水性	75-92

10

20

30

40

[表1]の続き (5)

354.	40-1	親水性	100-122
355.	40-1	親水性	129-135
356.	40-1	親水性	140-145
357.	40-1	親水性	149-152
358.	40-1	親水性	157-161
359.	40-1	親水性	163-175
360.	40-1	親水性	199-201
361.	40-1	親水性	203-219
362.	40-1	親水性	227-240
363.	40-1	親水性	251-257
364.	40-1	親水性	261-276
365.	40-1	親水性	279-306
366.	40-1	親水性	308-318
367.	40-1	親水性	320-328
368.	40-1	親水性	334-341
369.	40-1	親水性	354-356
370.	40-1	親水性	359-366
371.	40-1	親水性	392-398
372.	40-1	親水性	400-405
373.	40-1	親水性	410-420
374.	40-1	親水性	429-438
375.	40-1	親水性	463-467
376.	40-1	親水性	471-480
377.	40-1	親水性	487-493
378.	40-1	親水性	506-518
379.	40-1	親水性	547-552
380.	40-1	親水性	575-579
381.	40a	AMPHI	6-10
382.	40a	AMPHI	19-27
383.	40a	AMPHI	30-33
384.	40a	AMPHI	41-44
385.	40a	AMPHI	61-72
386.	40a	AMPHI	78-81
387.	40a	AMPHI	92-94
388.	40a	AMPHI	128-130
389.	40a	AMPHI	132-134
390.	40a	AMPHI	161-165
391.	40a	AMPHI	181-193
392.	40a	AMPHI	197-199
393.	40a	AMPHI	204-211
394.	40a	AMPHI	213-218
395.	40a	AMPHI	227-229
396.	40a	AMPHI	237-249
397.	40a	AMPHI	298-302
398.	40a	AMPHI	313-318

10

20

30

40

[表1]の続き⑨

399.	40a	AMPHI	335-342
400.	40a	AMPHI	376-383
401.	40a	AMPHI	399-402
402.	40a	AMPHI	426-428
403.	40a	AMPHI	435-437
404.	40a	AMPHI	475-483
405.	40a	AMPHI	492-512
406.	40a	AMPHI	524-526
407.	40a	AMPHI	561-564
408.	40a	抗原性指標	21-34
409.	40a	抗原性指標	50-64
410.	40a	抗原性指標	75-83
411.	40a	抗原性指標	88-97
412.	40a	抗原性指標	105-122
413.	40a	抗原性指標	129-134
414.	40a	抗原性指標	140-176
415.	40a	抗原性指標	190-207
416.	40a	抗原性指標	211-217
417.	40a	抗原性指標	224-240
418.	40a	抗原性指標	242-245
419.	40a	抗原性指標	250-255
420.	40a	抗原性指標	260-276
421.	40a	抗原性指標	279-306
422.	40a	抗原性指標	308-346
423.	40a	抗原性指標	352-367
424.	40a	抗原性指標	375-378
425.	40a	抗原性指標	384-406
426.	40a	抗原性指標	408-420
427.	40a	抗原性指標	423-438
428.	40a	抗原性指標	453-468
429.	40a	抗原性指標	471-481
430.	40a	抗原性指標	487-493
431.	40a	抗原性指標	507-519
432.	40a	抗原性指標	536-540
433.	40a	抗原性指標	545-553
434.	40a	抗原性指標	560-567
435.	40a	抗原性指標	572-583
436.	40a	親水性	21-34
437.	40a	親水性	50-64
438.	40a	親水性	75-83
439.	40a	親水性	88-96
440.	40a	親水性	105-121
441.	40a	親水性	129-134
442.	40a	親水性	140-145
443.	40a	親水性	148-155

10

20

30

40

[表1]の続き⑩

444.	40a	親水性	157-161
445.	40a	親水性	163-175
446.	40a	親水性	196-202
447.	40a	親水性	211-217
448.	40a	親水性	225-230
449.	40a	親水性	232-240
450.	40a	親水性	253-255
451.	40a	親水性	261-276
452.	40a	親水性	279-306
453.	40a	親水性	308-318
454.	40a	親水性	320-328
455.	40a	親水性	334-341
456.	40a	親水性	354-356
457.	40a	親水性	359-366
458.	40a	親水性	392-398
459.	40a	親水性	400-405
460.	40a	親水性	410-420
461.	40a	親水性	428-438
462.	40a	親水性	462-468
463.	40a	親水性	472-481
464.	40a	親水性	489-493
465.	40a	親水性	507-519
466.	40a	親水性	548-553
467.	40a	親水性	576-580
468.	41-1	AMPHI	30-36
469.	41-1	AMPHI	93-98
470.	41-1	AMPHI	111-122
471.	41-1	AMPHI	126-129
472.	41-1	AMPHI	136-143
473.	41-1	AMPHI	145-150
474.	41-1	AMPHI	156-158
475.	41-1	AMPHI	186-195
476.	41-1	AMPHI	201-208
477.	41-1	AMPHI	213-223
478.	41-1	AMPHI	236-247
479.	41-1	AMPHI	250-255
480.	41-1	AMPHI	273-282
481.	41-1	AMPHI	303-309
482.	41-1	AMPHI	311-314
483.	41-1	AMPHI	329-338
484.	41-1	AMPHI	344-362
485.	41-1	AMPHI	372-377
486.	41-1	AMPHI	385-392
487.	41-1	AMPHI	409-412
488.	41-1	AMPHI	419-426

10

20

30

40

〔表1〕の続き(11)

489.	41-1	AMPHI	458-463
490.	41-1	AMPHI	470-474
491.	41-1	AMPHI	486-489
492.	41-1	AMPHI	512-518
493.	41-1	AMPHI	527-551
494.	41-1	AMPHI	564-579
495.	41-1	AMPHI	593-597
496.	41-1	抗原性指標	13-22
497.	41-1	抗原性指標	30-38
498.	41-1	抗原性指標	43-55
499.	41-1	抗原性指標	73-75
500.	41-1	抗原性指標	87-89
501.	41-1	抗原性指標	105-112
502.	41-1	抗原性指標	114-124
503.	41-1	抗原性指標	136-141
504.	41-1	抗原性指標	147-153
505.	41-1	抗原性指標	163-166
506.	41-1	抗原性指標	174-184
507.	41-1	抗原性指標	195-207
508.	41-1	抗原性指標	226-236
509.	41-1	抗原性指標	244-246
510.	41-1	抗原性指標	249-265
511.	41-1	抗原性指標	281-287
512.	41-1	抗原性指標	294-313
513.	41-1	抗原性指標	317-342
514.	41-1	抗原性指標	350-375
515.	41-1	抗原性指標	379-386
516.	41-1	抗原性指標	390-396
517.	41-1	抗原性指標	413-422
518.	41-1	抗原性指標	425-430
519.	41-1	抗原性指標	436-440
520.	41-1	抗原性指標	446-465
521.	41-1	抗原性指標	468-495
522.	41-1	抗原性指標	498-518
523.	41-1	抗原性指標	520-522
524.	41-1	抗原性指標	525-542
525.	41-1	抗原性指標	547-558
526.	41-1	抗原性指標	565-590
527.	41-1	抗原性指標	595-602
528.	41-1	抗原性指標	608-619
529.	41-1	親水性	14-21
530.	41-1	親水性	30-33
531.	41-1	親水性	45-55
532.	41-1	親水性	87-89
533.	41-1	親水性	106-111

10

20

30

40

[表1]の続き(2)

534.	41-1	親水性	114-120
535.	41-1	親水性	122-124
536.	41-1	親水性	136-141
537.	41-1	親水性	148-150
538.	41-1	親水性	177-184
539.	41-1	親水性	195-207
540.	41-1	親水性	226-234
541.	41-1	親水性	249-265
542.	41-1	親水性	285-287
543.	41-1	親水性	294-297
544.	41-1	親水性	299-313
545.	41-1	親水性	317-321
546.	41-1	親水性	323-342
547.	41-1	親水性	350-371
548.	41-1	親水性	379-386
549.	41-1	親水性	417-422
550.	41-1	親水性	425-427
551.	41-1	親水性	447-449
552.	41-1	親水性	459-462
553.	41-1	親水性	468-475
554.	41-1	親水性	479-482
555.	41-1	親水性	484-491
556.	41-1	親水性	499-518
557.	41-1	親水性	520-522
558.	41-1	親水性	526-542
559.	41-1	親水性	550-558
560.	41-1	親水性	568-590
561.	41-1	親水性	595-598
562.	41-1	親水性	617-619
563.	41a	AMPHI	6-12
564.	41a	AMPHI	32-34
565.	41a	AMPHI	69-74
566.	41a	AMPHI	86-98
567.	41a	AMPHI	111-119
568.	41a	AMPHI	121-126
569.	41a	AMPHI	132-134
570.	41a	AMPHI	155-160
571.	41a	AMPHI	162-171
572.	41a	AMPHI	177-184
573.	41a	AMPHI	189-199
574.	41a	AMPHI	212-223
575.	41a	AMPHI	226-231
576.	41a	AMPHI	249-258
577.	41a	AMPHI	287-290
578.	41a	AMPHI	305-314

10

20

30

40

[表1]の続き(13)

579.	41a	AMPHI	320-338
580.	41a	AMPHI	348-353
581.	41a	AMPHI	361-368
582.	41a	AMPHI	385-388
583.	41a	AMPHI	395-402
584.	41a	AMPHI	434-439
585.	41a	AMPHI	446-450
586.	41a	AMPHI	462-467
587.	41a	AMPHI	470-475
588.	41a	AMPHI	488-494
589.	41a	AMPHI	503-525
590.	41a	AMPHI	540-555
591.	41a	AMPHI	569-573
592.	41a	AMPHI	578-594
593.	41a	抗原性指標	10-13
594.	41a	抗原性指標	19-31
595.	41a	抗原性指標	48-50
596.	41a	抗原性指標	63-65
597.	41a	抗原性指標	82-101
598.	41a	抗原性指標	112-117
599.	41a	抗原性指標	123-129
600.	41a	抗原性指標	139-142
601.	41a	抗原性指標	150-160
602.	41a	抗原性指標	171-183
603.	41a	抗原性指標	202-212
604.	41a	抗原性指標	220-222
605.	41a	抗原性指標	225-241
606.	41a	抗原性指標	257-263
607.	41a	抗原性指標	270-289
608.	41a	抗原性指標	293-318
609.	41a	抗原性指標	326-351
610.	41a	抗原性指標	355-362
611.	41a	抗原性指標	366-372
612.	41a	抗原性指標	389-398
613.	41a	抗原性指標	401-406
614.	41a	抗原性指標	412-416
615.	41a	抗原性指標	422-441
616.	41a	抗原性指標	444-446
617.	41a	抗原性指標	451-471
618.	41a	抗原性指標	475-494
619.	41a	抗原性指標	496-498
620.	41a	抗原性指標	501-518
621.	41a	抗原性指標	523-534
622.	41a	抗原性指標	540-566
623.	41a	抗原性指標	571-578

10

20

30

40

[表 1]の続き (14)

624.	41a	抗原性指標	582-595
625.	41a	親水性	21-31
626.	41a	親水性	63-65
627.	41a	親水性	83-96
628.	41a	親水性	98-100
629.	41a	親水性	112-117
630.	41a	親水性	124-126
631.	41a	親水性	153-160
632.	41a	親水性	171-183
633.	41a	親水性	202-210
634.	41a	親水性	220-222
635.	41a	親水性	225-241
636.	41a	親水性	261-263
637.	41a	親水性	270-273
638.	41a	親水性	275-289
639.	41a	親水性	293-297
640.	41a	親水性	299-318
641.	41a	親水性	326-347
642.	41a	親水性	355-362
643.	41a	親水性	393-398
644.	41a	親水性	401-403
645.	41a	親水性	423-425
646.	41a	親水性	435-438
647.	41a	親水性	454-458
648.	41a	親水性	460-471
649.	41a	親水性	475-494
650.	41a	親水性	496-498
651.	41a	親水性	502-518
652.	41a	親水性	527-534
653.	41a	親水性	544-566
654.	41a	親水性	571-574
655.	41a	親水性	593-595
656.	44-1	AMPHI	57-60
657.	44-1	AMPHI	76-79
658.	44-1	抗原性指標	22-34
659.	44-1	抗原性指標	38-46
660.	44-1	抗原性指標	50-55
661.	44-1	抗原性指標	64-70
662.	44-1	抗原性指標	72-80
663.	44-1	抗原性指標	83-89
664.	44-1	抗原性指標	96-106
665.	44-1	抗原性指標	110-124
666.	44-1	親水性	22-34
667.	44-1	親水性	40-46
668.	44-1	親水性	64-69

10

20

30

40

「表1」の続き⑮

669.	44-1	親水性	73-80
670.	44-1	親水性	84-89
671.	44-1	親水性	97-106
672.	44-1	親水性	120-124
673.	44a	AMPHI	57-60
674.	44a	AMPHI	76-79
675.	44a	抗原性指標	23-34
676.	44a	抗原性指標	38-46
677.	44a	抗原性指標	50-55
678.	44a	抗原性指標	64-70
679.	44a	抗原性指標	72-80
680.	44a	抗原性指標	83-89
681.	44a	抗原性指標	96-106
682.	44a	抗原性指標	110-124
683.	44a	親水性	28-34
684.	44a	親水性	40-46
685.	44a	親水性	64-69
686.	44a	親水性	73-80
687.	44a	親水性	84-89
688.	44a	親水性	97-106
689.	44a	親水性	120-124
690.	49-1	AMPHI	16-21
691.	49-1	AMPHI	44-48
692.	49-1	AMPHI	56-61
693.	49-1	AMPHI	92-97
694.	49-1	AMPHI	118-127
695.	49-1	AMPHI	130-149
696.	49-1	AMPHI	156-178
697.	49-1	AMPHI	235-240
698.	49-1	AMPHI	253-264
699.	49-1	AMPHI	268-271
700.	49-1	AMPHI	278-285
701.	49-1	AMPHI	287-292
702.	49-1	AMPHI	298-300
703.	49-1	AMPHI	328-337
704.	49-1	AMPHI	343-350
705.	49-1	AMPHI	355-365
706.	49-1	AMPHI	378-389
707.	49-1	AMPHI	422-424
708.	49-1	AMPHI	442-450
709.	49-1	AMPHI	464-481
710.	49-1	AMPHI	486-496
711.	49-1	AMPHI	514-521
712.	49-1	AMPHI	548-551
713.	49-1	AMPHI	553-557

10

20

30

40

[表1]の続き (16)

714.	49-1	AMPHI	562-568
715.	49-1	AMPHI	573-575
716.	49-1	AMPHI	588-590
717.	49-1	AMPHI	603-605
718.	49-1	AMPHI	614-618
719.	49-1	抗原性指標	15-21
720.	49-1	抗原性指標	26-43
721.	49-1	抗原性指標	50-59
722.	49-1	抗原性指標	61-75
723.	49-1	抗原性指標	79-87
724.	49-1	抗原性指標	98-108
725.	49-1	抗原性指標	110-120
726.	49-1	抗原性指標	122-139
727.	49-1	抗原性指標	147-164
728.	49-1	抗原性指標	171-179
729.	49-1	抗原性指標	185-197
730.	49-1	抗原性指標	214-216
731.	49-1	抗原性指標	229-231
732.	49-1	抗原性指標	248-266
733.	49-1	抗原性指標	278-283
734.	49-1	抗原性指標	289-295
735.	49-1	抗原性指標	316-326
736.	49-1	抗原性指標	337-349
737.	49-1	抗原性指標	368-378
738.	49-1	抗原性指標	386-388
739.	49-1	抗原性指標	390-410
740.	49-1	抗原性指標	412-414
741.	49-1	抗原性指標	423-429
742.	49-1	抗原性指標	438-454
743.	49-1	抗原性指標	462-475
744.	49-1	抗原性指標	482-500
745.	49-1	抗原性指標	503-509
746.	49-1	抗原性指標	521-528
747.	49-1	抗原性指標	540-562
748.	49-1	抗原性指標	572-579
749.	49-1	抗原性指標	590-606
750.	49-1	抗原性指標	610-612
751.	49-1	抗原性指標	617-619
752.	49-1	抗原性指標	626-634
753.	49-1	抗原性指標	637-640
754.	49-1	親水性	18-21
755.	49-1	親水性	26-29
756.	49-1	親水性	31-43
757.	49-1	親水性	51-57
758.	49-1	親水性	64-68

10

20

30

40

[表1]の続き(17)

759.	49-1	親水性	79-87
760.	49-1	親水性	98-107
761.	49-1	親水性	122-125
762.	49-1	親水性	147-164
763.	49-1	親水性	172-175
764.	49-1	親水性	187-197
765.	49-1	親水性	229-231
766.	49-1	親水性	256-262
767.	49-1	親水性	264-266
768.	49-1	親水性	278-283
769.	49-1	親水性	290-292
770.	49-1	親水性	319-326
771.	49-1	親水性	337-349
772.	49-1	親水性	368-376
773.	49-1	親水性	386-388
774.	49-1	親水性	390-410
775.	49-1	親水性	412-414
776.	49-1	親水性	423-429
777.	49-1	親水性	441-451
778.	49-1	親水性	466-472
779.	49-1	親水性	484-490
780.	49-1	親水性	492-494
781.	49-1	親水性	496-498
782.	49-1	親水性	522-528
783.	49-1	親水性	543-562
784.	49-1	親水性	591-606
785.	49-1	親水性	617-619
786.	49-1	親水性	626-632
787.	49-1	親水性	637-640
788.	49a	AMPHI	55-61
789.	49a	AMPHI	92-97
790.	49a	AMPHI	118-127
791.	49a	AMPHI	129-135
792.	49a	AMPHI	137-145
793.	49a	AMPHI	156-178
794.	49a	AMPHI	198-200
795.	49a	AMPHI	235-240
796.	49a	AMPHI	252-264
797.	49a	AMPHI	277-285
798.	49a	AMPHI	287-292
799.	49a	AMPHI	298-300
800.	49a	AMPHI	321-326
801.	49a	AMPHI	328-337
802.	49a	AMPHI	343-350
803.	49a	AMPHI	355-365

10

20

30

40

〔表1〕の続き(18)

804.	49a	AMPHI	378-389
805.	49a	AMPHI	392-397
806.	49a	AMPHI	415-424
807.	49a	AMPHI	453-456
808.	49a	AMPHI	471-480
809.	49a	AMPHI	486-504
810.	49a	AMPHI	514-519
811.	49a	AMPHI	527-534
812.	49a	AMPHI	551-554
813.	49a	AMPHI	561-568
814.	49a	AMPHI	600-605
815.	49a	AMPHI	612-616
816.	49a	AMPHI	628-633
817.	49a	AMPHI	636-641
818.	49a	AMPHI	654-660
819.	49a	AMPHI	669-691
820.	49a	AMPHI	706-721
821.	49a	AMPHI	735-739
822.	49a	AMPHI	744-760
823.	49a	抗原性指標	4-23
824.	49a	抗原性指標	27-43
825.	49a	抗原性指標	51-62
826.	49a	抗原性指標	64-68
827.	49a	抗原性指標	72-75
828.	49a	抗原性指標	79-87
829.	49a	抗原性指標	98-108
830.	49a	抗原性指標	110-120
831.	49a	抗原性指標	124-139
832.	49a	抗原性指標	147-164
833.	49a	抗原性指標	176-179
834.	49a	抗原性指標	185-197
835.	49a	抗原性指標	214-216
836.	49a	抗原性指標	229-231
837.	49a	抗原性指標	248-267
838.	49a	抗原性指標	278-283
839.	49a	抗原性指標	289-295
840.	49a	抗原性指標	305-308
841.	49a	抗原性指標	316-326
842.	49a	抗原性指標	337-349
843.	49a	抗原性指標	368-378
844.	49a	抗原性指標	386-388
845.	49a	抗原性指標	391-407
846.	49a	抗原性指標	423-429
847.	49a	抗原性指標	436-455
848.	49a	抗原性指標	459-484

10

20

30

40

[表1]の続き(19)

849.	49a	抗原性指標	492-517
850.	49a	抗原性指標	521-528
851.	49a	抗原性指標	532-539
852.	49a	抗原性指標	555-564
853.	49a	抗原性指標	567-572
854.	49a	抗原性指標	578-582
855.	49a	抗原性指標	588-607
856.	49a	抗原性指標	610-612
857.	49a	抗原性指標	617-637
858.	49a	抗原性指標	641-660
859.	49a	抗原性指標	662-664
860.	49a	抗原性指標	667-684
861.	49a	抗原性指標	689-700
862.	49a	抗原性指標	706-732
863.	49a	抗原性指標	737-744
864.	49a	抗原性指標	748-761
865.	49a	親水性	4-23
866.	49a	親水性	31-43
867.	49a	親水性	51-53
868.	49a	親水性	55-57
869.	49a	親水性	64-68
870.	49a	親水性	79-87
871.	49a	親水性	98-106
872.	49a	親水性	114-120
873.	49a	親水性	130-139
874.	49a	親水性	147-164
875.	49a	親水性	187-197
876.	49a	親水性	229-231
877.	49a	親水性	249-262
878.	49a	親水性	264-266
879.	49a	親水性	278-283
880.	49a	親水性	290-292
881.	49a	親水性	319-326
882.	49a	親水性	337-349
883.	49a	親水性	368-376
884.	49a	親水性	386-388
885.	49a	親水性	391-407
886.	49a	親水性	427-429
887.	49a	親水性	436-439
888.	49a	親水性	441-455
889.	49a	親水性	459-463
890.	49a	親水性	465-484
891.	49a	親水性	492-513
892.	49a	親水性	521-528
893.	49a	親水性	559-564

10

20

30

40

[表1]の続き(20)

894.	49a	親水性	567-569
895.	49a	親水性	589-591
896.	49a	親水性	601-604
897.	49a	親水性	620-624
898.	49a	親水性	626-637
899.	49a	親水性	641-660
900.	49a	親水性	662-664
901.	49a	親水性	668-684
902.	49a	親水性	693-700
903.	49a	親水性	710-732
904.	49a	親水性	737-740
905.	49a	親水性	759-761
906.	51-1	AMPHI	15-21
907.	51-1	AMPHI	40-54
908.	51-1	AMPHI	75-86
909.	51-1	AMPHI	108-110
910.	51-1	AMPHI	112-124
911.	51-1	AMPHI	141-148
912.	51-1	AMPHI	184-189
913.	51-1	AMPHI	211-216
914.	51-1	抗原性指標	58-65
915.	51-1	抗原性指標	123-127
916.	51-1	抗原性指標	132-137
917.	51-1	抗原性指標	149-153
918.	51-1	抗原性指標	165-177
919.	51-1	抗原性指標	198-204
920.	51-1	抗原性指標	222-231
921.	51-1	親水性	60-65
922.	51-1	親水性	123-127
923.	51-1	親水性	132-135
924.	51-1	親水性	165-174
925.	51-1	親水性	200-203
926.	51-1	親水性	222-227
927.	51a	AMPHI	15-21
928.	51a	AMPHI	40-54
929.	51a	AMPHI	75-86
930.	51a	AMPHI	108-110
931.	51a	AMPHI	112-124
932.	51a	AMPHI	141-148
933.	51a	AMPHI	184-189
934.	51a	AMPHI	211-216
935.	51a	親水性	60-65
936.	51a	親水性	123-127
937.	51a	親水性	132-135
938.	51a	親水性	165-174

10

20

30

40

(表1のつぎ) ②

939.	51a	親水性	200-203
940.	51a	親水性	222-227
941.	52-1	AMPHI	48-50
942.	52-1	AMPHI	64-73
943.	52-1	抗原性指標	19-26
944.	52-1	抗原性指標	30-35
945.	52-1	抗原性指標	42-52
946.	52-1	抗原性指標	57-86
947.	52-1	親水性	22-26
948.	52-1	親水性	30-35
949.	52-1	親水性	42-52
950.	52-1	親水性	57-71
951.	52-1	親水性	78-86
952.	69-1	AMPHI	25-27
953.	69-1	AMPHI	46-66
954.	69-1	抗原性指標	32-41
955.	69-1	抗原性指標	43-45
956.	69-1	抗原性指標	71-78
957.	69-1	親水性	32-38
958.	69-1	親水性	71-78
959.	69a	AMPHI	25-27
960.	69a	AMPHI	46-66
961.	69a	抗原性指標	32-41
962.	69a	抗原性指標	43-46
963.	69a	抗原性指標	71-78
964.	69a	親水性	32-38
965.	69a	親水性	71-78
966.	77-1	AMPHI	12-16
967.	77-1	AMPHI	23-33
968.	77-1	AMPHI	35-42
969.	77-1	AMPHI	51-57
970.	77-1	AMPHI	67-70
971.	77-1	AMPHI	73-79
972.	77-1	AMPHI	122-124
973.	77-1	AMPHI	130-134
974.	77-1	AMPHI	165-178
975.	77-1	AMPHI	191-211
976.	77-1	抗原性指標	22-31
977.	77-1	抗原性指標	34-44
978.	77-1	抗原性指標	80-94
979.	77-1	抗原性指標	101-104
980.	77-1	抗原性指標	155-158
981.	77-1	抗原性指標	167-181
982.	77-1	親水性	22-28
983.	77-1	親水性	38-44

10

20

30

(表 1 の続き) (22)

984.	77-1	親水性	80-92
985.	77-1	親水性	171-178
986.	77a	AMPHI	8-15
987.	77a	AMPHI	24-30
988.	77a	AMPHI	40-43
989.	77a	AMPHI	46-52
990.	77a	AMPHI	95-97
991.	77a	AMPHI	103-107
992.	77a	AMPHI	114-125
993.	77a	AMPHI	144-151
994.	77a	AMPHI	154-156
995.	77a	AMPHI	166-184
996.	77a	抗原性指標	7-17
997.	77a	抗原性指標	53-67
998.	77a	抗原性指標	74-77
999.	77a	抗原性指標	128-131
1000.	77a	抗原性指標	140-154
1001.	77a	親水性	11-17
1002.	77a	親水性	53-65
1003.	77a	親水性	141-151
1004.	81-1	AMPHI	30-40
1005.	81-1	AMPHI	54-56
1006.	81-1	AMPHI	60-63
1007.	81-1	AMPHI	76-93
1008.	81-1	AMPHI	96-101
1009.	81-1	AMPHI	104-406
1010.	81-1	AMPHI	118-126
1011.	81-1	AMPHI	190-205
1012.	81-1	AMPHI	230-233
1013.	81-1	AMPHI	239-242
1014.	81-1	AMPHI	256-258
1015.	81-1	AMPHI	264-284
1016.	81-1	AMPHI	290-297
1017.	81-1	AMPHI	317-326
1018.	81-1	AMPHI	388-396
1019.	81-1	AMPHI	403-414
1020.	81-1	AMPHI	458-463
1021.	81-1	AMPHI	476-480
1022.	81-1	抗原性指標	1-4
1023.	81-1	抗原性指標	35-38
1024.	81-1	抗原性指標	86-89
1025.	81-1	抗原性指標	95-98
1026.	81-1	抗原性指標	100-103
1027.	81-1	抗原性指標	128-136
1028.	81-1	抗原性指標	154-174

10

20

30

(表 1073) 23

1029.	81-1	抗原性指標	197-211
1030.	81-1	抗原性指標	220-226
1031.	81-1	抗原性指標	232-240
1032.	81-1	抗原性指標	244-249
1033.	81-1	抗原性指標	251-253
1034.	81-1	抗原性指標	255-258
1035.	81-1	抗原性指標	276-290
1036.	81-1	抗原性指標	292-301
1037.	81-1	抗原性指標	307-312
1038.	81-1	抗原性指標	318-323
1039.	81-1	抗原性指標	334-345
1040.	81-1	抗原性指標	352-358
1041.	81-1	抗原性指標	364-372
1042.	81-1	抗原性指標	376-384
1043.	81-1	抗原性指標	387-401
1044.	81-1	抗原性指標	409-417
1045.	81-1	抗原性指標	423-444
1046.	81-1	抗原性指標	452-459
1047.	81-1	抗原性指標	486-488
1048.	81-1	抗原性指標	490-499
1049.	81-1	抗原性指標	507-520
1050.	81-1	親水性	1-4
1051.	81-1	親水性	35-38
1052.	81-1	親水性	95-98
1053.	81-1	親水性	128-136
1054.	81-1	親水性	154-164
1055.	81-1	親水性	166-172
1056.	81-1	親水性	202-209
1057.	81-1	親水性	220-226
1058.	81-1	親水性	234-238
1059.	81-1	親水性	245-249
1060.	81-1	親水性	251-253
1061.	81-1	親水性	284-287
1062.	81-1	親水性	292-299
1063.	81-1	親水性	307-312
1064.	81-1	親水性	321-323
1065.	81-1	親水性	338-345
1066.	81-1	親水性	366-368
1067.	81-1	親水性	378-384
1068.	81-1	親水性	387-401
1069.	81-1	親水性	409-415
1070.	81-1	親水性	453-459
1071.	81-1	親水性	493-499
1072.	81-1	親水性	507-509
1073.	81-1	親水性	512-518

10

20

30

(表1のつづき) 24

1074.	82a	AMPHI	36-40
1075.	82a	AMPHI	95-111
1076.	82a	AMPHI	117-132
1077.	82a	AMPHI	135-137
1078.	82a	AMPHI	160-174
1079.	82a	AMPHI	183-187
1080.	82a	抗原性指標	2-8
1081.	82a	抗原性指標	56-60
1082.	82a	抗原性指標	90-97
1083.	82a	抗原性指標	104-111
1084.	82a	抗原性指標	114-137
1085.	82a	抗原性指標	141-151
1086.	82a	抗原性指標	170-175
1087.	82a	抗原性指標	180-188
1088.	82a	抗原性指標	194-201
1089.	82a	抗原性指標	206-209
1090.	82a	抗原性指標	216-218
1091.	82a	親水性	2-8
1092.	82a	親水性	56-60
1093.	82a	親水性	90-97
1094.	82a	親水性	105-108
1095.	82a	親水性	120-128
1096.	82a	親水性	130-134
1097.	82a	親水性	141-151
1098.	82a	親水性	170-175
1099.	82a	親水性	186-188
1100.	82a	親水性	195-201
1101.	82a	親水性	206-209
1102.	112-1	AMPHI	6-8
1103.	112-1	AMPHI	12-34
1104.	112-1	AMPHI	45-53
1105.	112-1	AMPHI	63-65
1106.	112-1	AMPHI	70-82
1107.	112-1	AMPHI	84-86
1108.	112-1	AMPHI	107-109
1109.	112-1	AMPHI	116-123
1110.	112-1	AMPHI	183-186
1111.	112-1	AMPHI	244-246
1112.	112-1	AMPHI	248-258
1113.	112-1	AMPHI	280-282
1114.	112-1	AMPHI	302-313
1115.	112-1	抗原性指標	35-44
1116.	112-1	抗原性指標	57-61
1117.	112-1	抗原性指標	81-84
1118.	112-1	抗原性指標	91-98

10

20

30

(表 1 のつぎ) ②5

1119.	112-1	抗原性指標	125-133
1120.	112-1	抗原性指標	140-147
1121.	112-1	抗原性指標	149-159
1122.	112-1	抗原性指標	161-165
1123.	112-1	抗原性指標	174-190
1124.	112-1	抗原性指標	192-200
1125.	112-1	抗原性指標	202-216
1126.	112-1	抗原性指標	218-224
1127.	112-1	抗原性指標	228-232
1128.	112-1	抗原性指標	239-244
1129.	112-1	抗原性指標	255-263
1130.	112-1	抗原性指標	290-300
1131.	112-1	親水性	38-40
1132.	112-1	親水性	57-61
1133.	112-1	親水性	92-98
1134.	112-1	親水性	125-133
1135.	112-1	親水性	141-143
1136.	112-1	親水性	150-159
1137.	112-1	親水性	161-164
1138.	112-1	親水性	175-190
1139.	112-1	親水性	203-216
1140.	112-1	親水性	218-224
1141.	112-1	親水性	228-232
1142.	112-1	親水性	239-244
1143.	112-1	親水性	259-261
1144.	112-1	親水性	293-297
1145.	112a	AMPHI	6-8
1146.	112a	AMPHI	12-34
1147.	112a	AMPHI	47-54
1148.	112a	AMPHI	63-65
1149.	112a	AMPHI	69-72
1150.	112a	AMPHI	84-86
1151.	112a	AMPHI	89-91
1152.	112a	AMPHI	107-109
1153.	112a	AMPHI	116-123
1154.	112a	AMPHI	183-186
1155.	112a	AMPHI	244-246
1156.	112a	AMPHI	248-258
1157.	112a	AMPHI	280-282
1158.	112a	AMPHI	302-310
1159.	112a	AMPHI	321-336
1160.	112a	抗原性指標	35-44
1161.	112a	抗原性指標	57-61
1162.	112a	抗原性指標	81-84
1163.	112a	抗原性指標	91-98

10

20

30

(表 1 のつぎ) ②b

1164.	112a	抗原性指標	125-133
1165.	112a	抗原性指標	140-147
1166.	112a	抗原性指標	150-158
1167.	112a	抗原性指標	161-164
1168.	112a	抗原性指標	174-190
1169.	112a	抗原性指標	194-200
1170.	112a	抗原性指標	202-216
1171.	112a	抗原性指標	218-220
1172.	112a	抗原性指標	222-224
1173.	112a	抗原性指標	228-232
1174.	112a	抗原性指標	239-244
1175.	112a	抗原性指標	256-263
1176.	112a	抗原性指標	290-301
1177.	112a	抗原性指標	351-356
1178.	112a	親水性	38-40
1179.	112a	親水性	57-61
1180.	112a	親水性	93-98
1181.	112a	親水性	125-133
1182.	112a	親水性	141-143
1183.	112a	親水性	150-155
1184.	112a	親水性	161-164
1185.	112a	親水性	175-190
1186.	112a	親水性	203-216
1187.	112a	親水性	218-220
1188.	112a	親水性	222-224
1189.	112a	親水性	228-232
1190.	112a	親水性	239-244
1191.	112a	親水性	259-261
1192.	112a	親水性	293-297
1193.	112a	親水性	351-356
1194.	114-1	AMPHI	45-54
1195.	114-1	AMPHI	154-160
1196.	114-1	AMPHI	182-190
1197.	114-1	AMPHI	224-226
1198.	114-1	AMPHI	229-233
1199.	114-1	AMPHI	285-287
1200.	114-1	AMPHI	303-310
1201.	114-1	AMPHI	321-332
1202.	114-1	AMPHI	392-398
1203.	114-1	AMPHI	413-416
1204.	114-1	AMPHI	450-452
1205.	114-1	AMPHI	477-487
1206.	114-1	AMPHI	506-509
1207.	114-1	AMPHI	525-529
1208.	114-1	AMPHI	565-567

10

20

30

(表のつぎ) 27

1209.	114-1	AMPHI	614-621
1210.	114-1	AMPHI	631-635
1211.	114-1	AMPHI	770-774
1212.	114-1	AMPHI	810-813
1213.	114-1	AMPHI	847-849
1214.	114-1	AMPHI	851-853
1215.	114-1	AMPHI	875-879
1216.	114-1	AMPHI	951-956
1217.	114-1	AMPHI	975-980
1218.	114-1	AMPHI	1034-1036
1219.	114-1	AMPHI	1048-1051
1220.	114-1	AMPHI	1073-1081
1221.	114-1	AMPHI	1086-1090
1222.	114-1	AMPHI	1095-1102
1223.	114-1	AMPHI	1111-1115
1224.	114-1	AMPHI	1163-1167
1225.	114-1	AMPHI	1242-1245
1226.	114-1	AMPHI	1275-1281
1227.	114-1	AMPHI	1312-1317
1228.	114-1	AMPHI	1338-1347
1229.	114-1	AMPHI	1349-1355
1230.	114-1	AMPHI	1357-1360
1231.	114-1	AMPHI	1362-1365
1232.	114-1	AMPHI	1376-1398
1233.	114-1	AMPHI	1418-1421
1234.	114-1	AMPHI	1425-1429
1235.	114-1	AMPHI	1468-1473
1236.	114-1	AMPHI	1476-1485
1237.	114-1	AMPHI	1495-1515
1238.	114-1	AMPHI	1518-1526
1239.	114-1	AMPHI	1546-1555
1240.	114-1	AMPHI	1557-1559
1241.	114-1	AMPHI	1580-1583
1242.	114-1	AMPHI	1585-1597
1243.	114-1	AMPHI	1604-1606
1244.	114-1	AMPHI	1613-1624
1245.	114-1	AMPHI	1626-1630
1246.	114-1	AMPHI	1638-1644
1247.	114-1	AMPHI	1655-1660
1248.	114-1	AMPHI	1662-1664
1249.	114-1	AMPHI	1672-1674
1250.	114-1	AMPHI	1677-1679
1251.	114-1	AMPHI	1691-1694
1252.	114-1	AMPHI	1713-1716
1253.	114-1	AMPHI	1719-1729

10

20

30

(表1のつぎ) 28

1254.	114-1	AMPHI	1735-1738
1255.	114-1	AMPHI	1753-1757
1256.	114-1	AMPHI	1772-1778
1257.	114-1	AMPHI	1790-1792
1258.	114-1	AMPHI	1817-1826
1259.	114-1	AMPHI	1828-1832
1260.	114-1	AMPHI	1840-1851
1261.	114-1	AMPHI	1854-1856
1262.	114-1	AMPHI	1871-1881
1263.	114-1	AMPHI	1883-1896
1264.	114-1	AMPHI	1922-1927
1265.	114-1	AMPHI	1934-1946
1266.	114-1	AMPHI	1950-1955
1267.	114-1	AMPHI	1957-1964
1268.	114-1	抗原性指標	1-6
1269.	114-1	抗原性指標	10-16
1270.	114-1	抗原性指標	23-37
1271.	114-1	抗原性指標	41-55
1272.	114-1	抗原性指標	75-85
1273.	114-1	抗原性指標	91-97
1274.	114-1	抗原性指標	102-140
1275.	114-1	抗原性指標	147-156
1276.	114-1	抗原性指標	161-168
1277.	114-1	抗原性指標	172-174
1278.	114-1	抗原性指標	181-189
1279.	114-1	抗原性指標	196-203
1280.	114-1	抗原性指標	208-213
1281.	114-1	抗原性指標	220-229
1282.	114-1	抗原性指標	242-248
1283.	114-1	抗原性指標	251-266
1284.	114-1	抗原性指標	268-276
1285.	114-1	抗原性指標	295-307
1286.	114-1	抗原性指標	309-312
1287.	114-1	抗原性指標	318-340
1288.	114-1	抗原性指標	345-351
1289.	114-1	抗原性指標	357-366
1290.	114-1	抗原性指標	371-381
1291.	114-1	抗原性指標	385-392
1292.	114-1	抗原性指標	404-417
1293.	114-1	抗原性指標	419-432
1294.	114-1	抗原性指標	440-456
1295.	114-1	抗原性指標	464-468
1296.	114-1	抗原性指標	473-480
1297.	114-1	抗原性指標	482-488
1298.	114-1	抗原性指標	496-511

10

20

30

(表 1 のつぎ) 29

1299.	114-1	抗原性指標	515-530
1300.	114-1	抗原性指標	535-549
1301.	114-1	抗原性指標	555-560
1302.	114-1	抗原性指標	564-582
1303.	114-1	抗原性指標	588-596
1304.	114-1	抗原性指標	602-615
1305.	114-1	抗原性指標	617-620
1306.	114-1	抗原性指標	622-624
1307.	114-1	抗原性指標	628-632
1308.	114-1	抗原性指標	637-640
1309.	114-1	抗原性指標	647-654
1310.	114-1	抗原性指標	660-666
1311.	114-1	抗原性指標	668-688
1312.	114-1	抗原性指標	696-725
1313.	114-1	抗原性指標	730-733
1314.	114-1	抗原性指標	738-755
1315.	114-1	抗原性指標	760-766
1316.	114-1	抗原性指標	779-783
1317.	114-1	抗原性指標	786-799
1318.	114-1	抗原性指標	807-809
1319.	114-1	抗原性指標	811-819
1320.	114-1	抗原性指標	831-839
1321.	114-1	抗原性指標	845-857
1322.	114-1	抗原性指標	860-862
1323.	114-1	抗原性指標	864-868
1324.	114-1	抗原性指標	872-879
1325.	114-1	抗原性指標	883-891
1326.	114-1	抗原性指標	893-903
1327.	114-1	抗原性指標	908-916
1328.	114-1	抗原性指標	919-936
1329.	114-1	抗原性指標	941-947
1330.	114-1	抗原性指標	950-956
1331.	114-1	抗原性指標	959-976
1332.	114-1	抗原性指標	979-991
1333.	114-1	抗原性指標	993-1000
1334.	114-1	抗原性指標	1007-1022
1335.	114-1	抗原性指標	1041-1053
1336.	114-1	抗原性指標	1062-1068
1337.	114-1	抗原性指標	1075-1108
1338.	114-1	抗原性指標	1115-1121
1339.	114-1	抗原性指標	1126-1145
1340.	114-1	抗原性指標	1148-1152
1341.	114-1	抗原性指標	1156-1178
1342.	114-1	抗原性指標	1195-1206
1343.	114-1	抗原性指標	1208-1212

10

20

30

(表1 のつぎ) 30

1344.	114-1	抗原性指標	1217-1243
1345.	114-1	抗原性指標	1246-1263
1346.	114-1	抗原性指標	1271-1282
1347.	114-1	抗原性指標	1284-1288
1348.	114-1	抗原性指標	1292-1295
1349.	114-1	抗原性指標	1299-1307
1350.	114-1	抗原性指標	1318-1328
1351.	114-1	抗原性指標	1330-1340
1352.	114-1	抗原性指標	1344-1359
1353.	114-1	抗原性指標	1367-1384
1354.	114-1	抗原性指標	1395-1399
1355.	114-1	抗原性指標	1405-1417
1356.	114-1	抗原性指標	1445-1449
1357.	114-1	抗原性指標	1491-1510
1358.	114-1	抗原性指標	1526-1529
1359.	114-1	抗原性指標	1532-1548
1360.	114-1	抗原性指標	1552-1556
1361.	114-1	抗原性指標	1560-1562
1362.	114-1	抗原性指標	1573-1583
1363.	114-1	抗原性指標	1594-1611
1364.	114-1	抗原性指標	1627-1635
1365.	114-1	抗原性指標	1643-1645
1366.	114-1	抗原性指標	1647-1665
1367.	114-1	抗原性指標	1680-1686
1368.	114-1	抗原性指標	1700-1722
1369.	114-1	抗原性指標	1724-1726
1370.	114-1	抗原性指標	1739-1746
1371.	114-1	抗原性指標	1752-1757
1372.	114-1	抗原性指標	1780-1783
1373.	114-1	抗原性指標	1791-1795
1374.	114-1	抗原性指標	1804-1808
1375.	114-1	抗原性指標	1829-1835
1376.	114-1	抗原性指標	1841-1859
1377.	114-1	抗原性指標	1867-1886
1378.	114-1	抗原性指標	1897-1903
1379.	114-1	抗原性指標	1908-1912
1380.	114-1	抗原性指標	1917-1922
1381.	114-1	抗原性指標	1926-1934
1382.	114-1	抗原性指標	1938-1945
1383.	114-1	抗原性指標	1947-1957
1384.	114-1	抗原性指標	1961-1968
1385.	114-1	抗原性指標	1974-1978
1386.	114-1	親水性	4-6
1387.	114-1	親水性	12-15
1388.	114-1	親水性	23-34

10

20

30

(表 1 のつぎ) 31

1389.	114-1	親水性	43-55
1390.	114-1	親水性	76-85
1391.	114-1	親水性	104-110
1392.	114-1	親水性	118-123
1393.	114-1	親水性	127-132
1394.	114-1	親水性	147-154
1395.	114-1	親水性	163-167
1396.	114-1	親水性	185-187
1397.	114-1	親水性	197-203
1398.	114-1	親水性	208-211
1399.	114-1	親水性	221-227
1400.	114-1	親水性	243-245
1401.	114-1	親水性	253-261
1402.	114-1	親水性	263-266
1403.	114-1	親水性	270-272
1404.	114-1	親水性	295-301
1405.	114-1	親水性	309-312
1406.	114-1	親水性	320-328
1407.	114-1	親水性	332-337
1408.	114-1	親水性	345-351
1409.	114-1	親水性	360-366
1410.	114-1	親水性	371-378
1411.	114-1	親水性	387-392
1412.	114-1	親水性	404-415
1413.	114-1	親水性	419-432
1414.	114-1	親水性	441-450
1415.	114-1	親水性	452-456
1416.	114-1	親水性	473-480
1417.	114-1	親水性	482-485
1418.	114-1	親水性	496-500
1419.	114-1	親水性	504-509
1420.	114-1	親水性	515-520
1421.	114-1	親水性	536-549
1422.	114-1	親水性	555-560
1423.	114-1	親水性	565-568
1424.	114-1	親水性	570-579
1425.	114-1	親水性	589-594
1426.	114-1	親水性	602-604
1427.	114-1	親水性	609-615
1428.	114-1	親水性	617-620
1429.	114-1	親水性	660-666
1430.	114-1	親水性	668-680
1431.	114-1	親水性	684-686
1432.	114-1	親水性	699-708
1433.	114-1	親水性	715-725

10

20

30

(表1のつぎ) 32

1434.	114-1	親水性	730-733
1435.	114-1	親水性	738-744
1436.	114-1	親水性	746-754
1437.	114-1	親水性	760-766
1438.	114-1	親水性	789-793
1439.	114-1	親水性	816-818
1440.	114-1	親水性	831-836
1441.	114-1	親水性	845-857
1442.	114-1	親水性	860-862
1443.	114-1	親水性	864-866
1444.	114-1	親水性	873-879
1445.	114-1	親水性	883-885
1446.	114-1	親水性	887-889
1447.	114-1	親水性	896-899
1448.	114-1	親水性	908-916
1449.	114-1	親水性	919-932
1450.	114-1	親水性	941-947
1451.	114-1	親水性	962-975
1452.	114-1	親水性	979-989
1453.	114-1	親水性	993-1000
1454.	114-1	親水性	1007-1022
1455.	114-1	親水性	1041-1043
1456.	114-1	親水性	1045-1053
1457.	114-1	親水性	1062-1068
1458.	114-1	親水性	1075-1078
1459.	114-1	親水性	1080-1087
1460.	114-1	親水性	1089-1104
1461.	114-1	親水性	1115-1121
1462.	114-1	親水性	1126-1141
1463.	114-1	親水性	1143-1145
1464.	114-1	親水性	1148-1151
1465.	114-1	親水性	1157-1178
1466.	114-1	親水性	1197-1203
1467.	114-1	親水性	1217-1243
1468.	114-1	親水性	1246-1263
1469.	114-1	親水性	1271-1273
1470.	114-1	親水性	1275-1277
1471.	114-1	親水性	1284-1288
1472.	114-1	親水性	1299-1307
1473.	114-1	親水性	1318-1326
1474.	114-1	親水性	1334-1340
1475.	114-1	親水性	1350-1355
1476.	114-1	親水性	1357-1359
1477.	114-1	親水性	1367-1384
1478.	114-1	親水性	1407-1417

10

20

30

(表のつぎ) 33

1479.	114-1	親水性	1491-1510
1480.	114-1	親水性	1534-1540
1481.	114-1	親水性	1576-1583
1482.	114-1	親水性	1595-1607
1483.	114-1	親水性	1629-1635
1484.	114-1	親水性	1643-1645
1485.	114-1	親水性	1649-1665
1486.	114-1	親水性	1682-1686
1487.	114-1	親水性	1704-1722
1488.	114-1	親水性	1724-1726
1489.	114-1	親水性	1740-1746
1490.	114-1	親水性	1804-1806
1491.	114-1	親水性	1829-1835
1492.	114-1	親水性	1842-1855
1493.	114-1	親水性	1876-1879
1494.	114-1	親水性	1898-1900
1495.	114-1	親水性	1910-1912
1496.	114-1	親水性	1920-1922
1497.	114-1	親水性	1928-1930
1498.	114-1	親水性	1938-1940
1499.	114-1	親水性	1948-1954
1500.	114-1	親水性	1962-1967
1501.	114a	AMPHI	45-54
1502.	114a	AMPHI	154-160
1503.	114a	AMPHI	182-190
1504.	114a	AMPHI	224-226
1505.	114a	AMPHI	229-233
1506.	114a	AMPHI	285-287
1507.	114a	AMPHI	303-310
1508.	114a	AMPHI	321-332
1509.	114a	AMPHI	348-350
1510.	114a	AMPHI	392-398
1511.	114a	AMPHI	414-416
1512.	114a	AMPHI	478-486
1513.	114a	AMPHI	506-509
1514.	114a	AMPHI	525-529
1515.	114a	AMPHI	565-567
1516.	114a	AMPHI	614-621
1517.	114a	AMPHI	631-635
1518.	114a	AMPHI	770-774
1519.	114a	AMPHI	811-813
1520.	114a	AMPHI	847-849
1521.	114a	AMPHI	851-853
1522.	114a	AMPHI	875-879
1523.	114a	AMPHI	951-959

10

20

30

(表) のつぎ (34)

1524.	114a	AMPHI	975-981
1525.	114a	AMPHI	1034-1036
1526.	114a	AMPHI	1048-1051
1527.	114a	AMPHI	1073-1081
1528.	114a	AMPHI	1086-1090
1529.	114a	AMPHI	1095-1102
1530.	114a	AMPHI	1111-1115
1531.	114a	AMPHI	1163-1166
1532.	114a	AMPHI	1275-1281
1533.	114a	AMPHI	1312-1317
1534.	114a	AMPHI	1338-1347
1535.	114a	AMPHI	1349-1355
1536.	114a	AMPHI	1357-1365
1537.	114a	AMPHI	1376-1398
1538.	114a	AMPHI	1418-1420
1539.	114a	AMPHI	1455-1460
1540.	114a	AMPHI	1472-1484
1541.	114a	AMPHI	1497-1505
1542.	114a	AMPHI	1507-1512
1543.	114a	抗原性指標	1-6
1544.	114a	抗原性指標	10-16
1545.	114a	抗原性指標	23-37
1546.	114a	抗原性指標	41-55
1547.	114a	抗原性指標	75-85
1548.	114a	抗原性指標	91-97
1549.	114a	抗原性指標	102-137
1550.	114a	抗原性指標	147-156
1551.	114a	抗原性指標	161-168
1552.	114a	抗原性指標	172-174
1553.	114a	抗原性指標	181-189
1554.	114a	抗原性指標	196-203
1555.	114a	抗原性指標	208-213
1556.	114a	抗原性指標	220-229
1557.	114a	抗原性指標	242-248
1558.	114a	抗原性指標	251-266
1559.	114a	抗原性指標	268-276
1560.	114a	抗原性指標	295-307
1561.	114a	抗原性指標	309-312
1562.	114a	抗原性指標	318-340
1563.	114a	抗原性指標	345-352
1564.	114a	抗原性指標	357-366
1565.	114a	抗原性指標	371-381
1566.	114a	抗原性指標	385-392
1567.	114a	抗原性指標	404-427
1568.	114a	抗原性指標	429-434

10

20

30

(表1 のつぎ) (35)

1569.	114a	抗原性指標	440-456
1570.	114a	抗原性指標	465-468
1571.	114a	抗原性指標	473-494
1572.	114a	抗原性指標	496-510
1573.	114a	抗原性指標	515-530
1574.	114a	抗原性指標	535-549
1575.	114a	抗原性指標	555-560
1576.	114a	抗原性指標	564-578
1577.	114a	抗原性指標	588-596
1578.	114a	抗原性指標	602-615
1579.	114a	抗原性指標	617-620
1580.	114a	抗原性指標	622-624
1581.	114a	抗原性指標	628-632
1582.	114a	抗原性指標	637-640
1583.	114a	抗原性指標	647-654
1584.	114a	抗原性指標	660-666
1585.	114a	抗原性指標	668-688
1586.	114a	抗原性指標	697-725
1587.	114a	抗原性指標	730-733
1588.	114a	抗原性指標	738-755
1589.	114a	抗原性指標	760-766
1590.	114a	抗原性指標	779-783
1591.	114a	抗原性指標	786-799
1592.	114a	抗原性指標	806-809
1593.	114a	抗原性指標	811-819
1594.	114a	抗原性指標	831-839
1595.	114a	抗原性指標	845-857
1596.	114a	抗原性指標	860-862
1597.	114a	抗原性指標	864-868
1598.	114a	抗原性指標	872-879
1599.	114a	抗原性指標	883-891
1600.	114a	抗原性指標	893-902
1601.	114a	抗原性指標	908-916
1602.	114a	抗原性指標	923-936
1603.	114a	抗原性指標	941-947
1604.	114a	抗原性指標	950-956
1605.	114a	抗原性指標	959-976
1606.	114a	抗原性指標	979-989
1607.	114a	抗原性指標	993-1000
1608.	114a	抗原性指標	1007-1022
1609.	114a	抗原性指標	1041-1053
1610.	114a	抗原性指標	1062-1068
1611.	114a	抗原性指標	1075-1108
1612.	114a	抗原性指標	1115-1121
1613.	114a	抗原性指標	1126-1145

10

20

30

(表) のつぎ) 36

1614.	114a	抗原性指標	1148-1152
1615.	114a	抗原性指標	1157-1176
1616.	114a	抗原性指標	1195-1206
1617.	114a	抗原性指標	1208-1212
1618.	114a	抗原性指標	1224-1243
1619.	114a	抗原性指標	1247-1263
1620.	114a	抗原性指標	1271-1282
1621.	114a	抗原性指標	1284-1288
1622.	114a	抗原性指標	1292-1295
1623.	114a	抗原性指標	1299-1307
1624.	114a	抗原性指標	1318-1328
1625.	114a	抗原性指標	1330-1340
1626.	114a	抗原性指標	1344-1359
1627.	114a	抗原性指標	1367-1384
1628.	114a	抗原性指標	1396-1399
1629.	114a	抗原性指標	1405-1417
1630.	114a	抗原性指標	1434-1436
1631.	114a	抗原性指標	1449-1451
1632.	114a	抗原性指標	1468-1487
1633.	114a	抗原性指標	1498-1503
1634.	114a	抗原性指標	1509-1515
1635.	114a	抗原性指標	1525-1532
1636.	114a	親水性	4-6
1637.	114a	親水性	12-15
1638.	114a	親水性	23-34
1639.	114a	親水性	43-55
1640.	114a	親水性	75-85
1641.	114a	親水性	104-110
1642.	114a	親水性	118-123
1643.	114a	親水性	127-132
1644.	114a	親水性	147-154
1645.	114a	親水性	163-167
1646.	114a	親水性	185-187
1647.	114a	親水性	197-203
1648.	114a	親水性	208-211
1649.	114a	親水性	221-227
1650.	114a	親水性	243-245
1651.	114a	親水性	253-261
1652.	114a	親水性	263-266
1653.	114a	親水性	270-272
1654.	114a	親水性	295-301
1655.	114a	親水性	309-312
1656.	114a	親水性	320-328
1657.	114a	親水性	332-337
1658.	114a	親水性	345-351

10

20

30

(表) のつづき 37

1659.	114a	親水性	360-366
1660.	114a	親水性	371-378
1661.	114a	親水性	387-392
1662.	114a	親水性	404-417
1663.	114a	親水性	421-423
1664.	114a	親水性	425-427
1665.	114a	親水性	442-456
1666.	114a	親水性	473-488
1667.	114a	親水性	499-509
1668.	114a	親水性	515-520
1669.	114a	親水性	536-549
1670.	114a	親水性	555-560
1671.	114a	親水性	565-568
1672.	114a	親水性	570-578
1673.	114a	親水性	589-594
1674.	114a	親水性	602-604
1675.	114a	親水性	609-615
1676.	114a	親水性	617-620
1677.	114a	親水性	660-665
1678.	114a	親水性	668-680
1679.	114a	親水性	684-686
1680.	114a	親水性	699-708
1681.	114a	親水性	715-725
1682.	114a	親水性	730-733
1683.	114a	親水性	738-744
1684.	114a	親水性	746-754
1685.	114a	親水性	760-766
1686.	114a	親水性	789-793
1687.	114a	親水性	816-818
1688.	114a	親水性	831-836
1689.	114a	親水性	845-857
1690.	114a	親水性	860-862
1691.	114a	親水性	864-866
1692.	114a	親水性	873-879
1693.	114a	親水性	883-885
1694.	114a	親水性	887-889
1695.	114a	親水性	896-899
1696.	114a	親水性	908-916
1697.	114a	親水性	923-932
1698.	114a	親水性	941-947
1699.	114a	親水性	961-975
1700.	114a	親水性	979-989
1701.	114a	親水性	993-1000
1702.	114a	親水性	1007-1022
1703.	114a	親水性	1041-1043

10

20

30

(表1 のつぎ) 38

1704.	114a	親水性	1045-1053
1705.	114a	親水性	1062-1068
1706.	114a	親水性	1075-1078
1707.	114a	親水性	1080-1087
1708.	114a	親水性	1089-1104
1709.	114a	親水性	1115-1121
1710.	114a	親水性	1126-1141
1711.	114a	親水性	1143-1145
1712.	114a	親水性	1148-1151
1713.	114a	親水性	1158-1171
1714.	114a	親水性	1197-1203
1715.	114a	親水性	1224-1243
1716.	114a	親水性	1251-1263
1717.	114a	親水性	1271-1273
1718.	114a	親水性	1275-1277
1719.	114a	親水性	1284-1288
1720.	114a	親水性	1299-1307
1721.	114a	親水性	1318-1326
1722.	114a	親水性	1334-1340
1723.	114a	親水性	1350-1359
1724.	114a	親水性	1367-1384
1725.	114a	親水性	1407-1417
1726.	114a	親水性	1449-1451
1727.	114a	親水性	1469-1482
1728.	114a	親水性	1484-1486
1729.	114a	親水性	1498-1503
1730.	114a	親水性	1510-1512
1731.	114a	親水性	1527-1532
1732.	124-1	AMPHI	37-43
1733.	124-1	AMPHI	94-96
1734.	124-1	AMPHI	113-115
1735.	124-1	抗原性指標	20-26
1736.	124-1	抗原性指標	38-43
1737.	124-1	抗原性指標	52-55
1738.	124-1	抗原性指標	62-70
1739.	124-1	抗原性指標	88-97
1740.	124-1	抗原性指標	104-114
1741.	124-1	抗原性指標	123-135
1742.	124-1	抗原性指標	146-155
1743.	124-1	親水性	20-26
1744.	124-1	親水性	41-43
1745.	124-1	親水性	52-55
1746.	124-1	親水性	63-69
1747.	124-1	親水性	91-94
1748.	124-1	親水性	104-114

10

20

30

(表1のつづき) (39)

1749.	124-1	親水性	123-135
1750.	124-1	親水性	146-155
1751.	124a	AMPHI	19-21
1752.	124a	AMPHI	23-29
1753.	124a	AMPHI	37-43
1754.	124a	AMPHI	94-96
1755.	124a	抗原性指標	38-43
1756.	124a	抗原性指標	52-55
1757.	124a	抗原性指標	62-70
1758.	124a	抗原性指標	77-80
1759.	124a	抗原性指標	90-96
1760.	124a	抗原性指標	105-115
1761.	124a	抗原性指標	120-135
1762.	124a	抗原性指標	145-153
1763.	124a	親水性	41-43
1764.	124a	親水性	52-55
1765.	124a	親水性	63-69
1766.	124a	親水性	91-95
1767.	124a	親水性	108-115
1768.	124a	親水性	120-135
1769.	124a	親水性	146-153

10

20

本発明は、例示の目的としてのみ上記のように記載されており、そして本発明の範囲および精神の範囲内にとどまったまま改変がなされ得ることが理解される。

【0191】

(表2)

本発明は、WO99/36544に開示される45のタンパク質配列のいずれかを含むタンパク質はその範囲内に包含しない。上記のようにWO99/36544に開示された任意の特定のタンパク質配列の長さがxアミノ酸である場合、本発明の抗原性フラグメントは、そのタンパク質の多くともx-1アミノ酸までを有する。WO99/36544に示された45のタンパク質配列のそれぞれについて、参照のためxの値を以下の表に示す。

30

【0192】

【表 2】

西列番号	x	西列番号	x	西列番号	x	西列番号	x
2	245	26	571	50	185	74	150
4	591	28	710	52	166	76	255
6	592	30	710	54	326	78	255
8	164	32	62	56	356	80	172
10	321	34	86	58	284	82	242
12	321	36	92	60	1978	84	242
14	124	38	103	62	1532	86	183
16	124	40	85	64	593	88	155
18	173	42	78	66	129	90	153
20	640	44	78	68	319		
22	761	46	219	70	619		
24	111	48	212	72	595		

10

20

フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
A 6 1 K 39/00	(2006.01)	A 6 1 K 39/00	H	
A 6 1 P 31/04	(2006.01)	A 6 1 P 31/04		

(72)発明者 ヴィンチェンツォ スカルラート
 イタリア国 イー - 5 3 1 0 0 シエナ, 1, ヴィア フィオレンティーナ, カイロン エ
 セ . ピー . アー .

(72)発明者 マリア スカルセツリ
 イタリア国 イー - 5 3 1 0 0 シエナ, 1, ヴィア フィオレンティーナ, カイロン エ
 セ . ピー . アー .

(72)発明者 チェシーラ ガレオッティ
 イタリア国 イー - 5 3 1 0 0 シエナ, 1, ヴィア フィオレンティーナ, カイロン エ
 セ . ピー . アー .

(72)発明者 マリアローザ モーラ
 イタリア国 イー - 5 3 1 0 0 シエナ, 1, ヴィア フィオレンティーナ, カイロン エ
 セ . ピー . アー .

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA13 BA31 HA15
 4C084 AA13 NA14 ZB35
 4C085 AA03 AA13 EE01 EE03
 4H045 AA11 BA09 BA12 BA15 BA16 BA17 CA11 CA42 DA75 DA86
 EA29 EA52 FA74

【外国語明細書】

2011142915000001.pdf

专利名称(译)	抗原脑膜炎球菌肽		
公开(公告)号	JP2011142915A	公开(公告)日	2011-07-28
申请号	JP2011037586	申请日	2011-02-23
[标]申请(专利权)人(译)	诺华科尔多瓦点击罪和诊断SRL		
申请(专利权)人(译)	诺华Vakushinzu和诊断SRL		
[标]发明人	ヴェーガマシニャーニ ヴィンチェンツォスカルラート マリアスカルセツリ チェシーラガレオッティ マリアローザモーラ		
发明人	ヴェーガ マシニャーニ ヴィンチェンツォ スカルラート マリア スカルセツリ チェシーラ ガレオッティ マリアローザ モーラ		
IPC分类号	C12N15/09 C07K14/22 C07K16/12 A61K48/00 A61K39/395 A61K39/00 A61P31/04 G01N33/53 A61K31/7088 A61K38/02 A61K38/40 A61K39/095 C07K2/00 C07K14/195 C12N15/31 C12Q1/68 G01N33/569		
CPC分类号	A61K39/00 A61K2039/505 A61K2039/53 C07K14/22 Y10S530/825		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K14/22 C07K16/12 A61K48/00 A61K39/395.D A61K39/00.H A61P31/04 C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12N15/31		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA13 4B024/BA31 4B024/HA15 4C084/AA13 4C084/NA14 4C084/ZB35 4C085 /AA03 4C085/AA13 4C085/EE01 4C085/EE03 4H045/AA11 4H045/BA09 4H045/BA12 4H045/BA15 4H045/BA16 4H045/BA17 4H045/CA11 4H045/CA42 4H045/DA75 4H045/DA86 4H045/EA29 4H045 /EA52 4H045/FA74		
代理人(译)	夏木森下		
优先权	1999016529 1999-07-14 GB		
其他公开文献	JP2011142915A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供源自脑膜炎奈瑟氏球菌的抗原肽序列。 WO 99/36544公开了许多来自脑膜炎奈瑟氏球菌的蛋白质。本发明涉及包含至少一种抗原决定簇的这些蛋白质的片段。还公开了同源序列和包含这些片段的蛋白质。本发明的蛋白质可以通过各种方式（例如，重组表达，从细胞培养物中纯化，化学合成等）和各种形式（例如，天然的，C-末端和/或可以准备。 【选择图】无

アラゲメント#	WO99/36544 ORF	アルゴリズム	アミノ酸
1.	38-1	AMPHI	6-14
2.	38-1	AMPHI	57-59
3.	38-1	AMPHI	67-76
4.	38-1	AMPHI	92-100
5.	38-1	AMPHI	127-137
6.	38-1	AMPHI	149-166
7.	38-1	AMPHI	210-215
8.	38-1	AMPHI	231-236
9.	38-1	AMPHI	270-272
10.	38-1	AMPHI	303-320
11.	38-1	抗原性指標	16-34
12.	38-1	抗原性指標	37-42
13.	38-1	抗原性指標	46-64
14.	38-1	抗原性指標	72-91
15.	38-1	抗原性指標	94-112
16.	38-1	抗原性指標	114-117
17.	38-1	抗原性指標	124-136
18.	38-1	抗原性指標	143-146
19.	38-1	抗原性指標	148-160
20.	38-1	抗原性指標	167-195
21.	38-1	抗原性指標	201-216
22.	38-1	抗原性指標	218-240
23.	38-1	抗原性指標	244-252
24.	38-1	抗原性指標	257-278
25.	38-1	抗原性指標	282-290
26.	38-1	抗原性指標	308-314
27.	38-1	親水性	21-34
28.	38-1	親水性	37-42
29.	38-1	親水性	47-55
30.	38-1	親水性	57-61
31.	38-1	親水性	72-74
32.	38-1	親水性	76-78
33.	38-1	親水性	82-91
34.	38-1	親水性	94-101
35.	38-1	親水性	108-112
36.	38-1	親水性	126-136
37.	38-1	親水性	143-146
38.	38-1	親水性	148-160