

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5837917号
(P5837917)

(45) 発行日 平成27年12月24日 (2015. 12. 24)

(24) 登録日 平成27年11月13日 (2015. 11. 13)

(51) Int. Cl.	F 1	
C 1 2 N 15/09 (2006. 01)	C 1 2 N 15/00	Z N A A
C 0 7 K 14/195 (2006. 01)	C 0 7 K 14/195	
C 0 7 K 16/12 (2006. 01)	C 0 7 K 16/12	
C 1 2 P 21/02 (2006. 01)	C 1 2 P 21/02	C
A 6 1 K 39/00 (2006. 01)	A 6 1 K 39/00	H
請求項の数 16 (全 90 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2013-257840 (P2013-257840)	(73) 特許権者	505098937
(22) 出願日	平成25年12月13日 (2013. 12. 13)		リサーチ ディベロップメント ファウン デーション
(62) 分割の表示	特願2009-526792 (P2009-526792) の分割		アメリカ合衆国 ネバダ州 カーソン シ ティー ノース ディビジョン ストリー ト 402
原出願日	平成19年8月7日 (2007. 8. 7)	(74) 代理人	100102978
(65) 公開番号	特開2014-113149 (P2014-113149A)		弁理士 清水 初志
(43) 公開日	平成26年6月26日 (2014. 6. 26)	(74) 代理人	100119507
審査請求日	平成26年1月10日 (2014. 1. 10)		弁理士 刑部 俊
(31) 優先権主張番号	60/841, 465	(74) 代理人	100128048
(32) 優先日	平成18年8月31日 (2006. 8. 31)		弁理士 新見 浩一
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100129506
			弁理士 小林 智彦
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 エーリキア・カニスの免疫反応性糖タンパク質 g p 1 9

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a) SEQ ID NO:17もしくはSEQ ID NO:19の21乃至44位のアミノ酸を含む、SEQ ID NO:17もしくはSEQ ID NO:19のアミノ酸配列の連続する24乃至50個のアミノ酸からなる単離されたポリペプチド；または

(b) (a) のポリペプチドのアミノ酸配列と少なくとも95%同一である、単離されたポリペプチド；

のうちのいずれか一つまたは複数の免疫原性を有するポリペプチドを含み、

該ポリペプチドが、希釈剤に分散されている、

E. カニス由来のgp19ポリペプチドに免疫学的に反応する抗体を検出するための組成物。 10

【請求項 2】

該ポリペプチドが、SEQ ID NO:13のアミノ酸配列と少なくとも90%同一であるアミノ酸配列からなるポリペプチドとしてさらに定義される、請求項1記載の組成物。

【請求項 3】

該ポリペプチドが、SEQ ID NO:13のアミノ酸配列と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列からなるポリペプチドとしてさらに定義される、請求項2記載の組成物。

【請求項 4】

該ポリペプチドが、SEQ ID NO:13のアミノ酸配列からなるポリペプチドとしてさらに定義される、請求項3記載の組成物。

【請求項 5】

(a) SEQ ID NO:17もしくはSEQ ID NO:19の21乃至44位のアミノ酸を含む、SEQ ID NO:17もしくはSEQ ID NO:19のアミノ酸配列の連続する24乃至50個のアミノ酸からなる単離されたポリペプチド；または

(b) (a)のポリペプチドのアミノ酸配列と少なくとも95%同一である、単離されたポリペプチド；

のうちのいずれか一つまたは複数のポリペプチドを免疫学的に認識する抗体の存在に関して、個体から採取した試料をアッセイする段階を含む、該試料におけるE.カニス由来のgp19ポリペプチドに免疫学的に反応する抗体を検出する方法。

【請求項6】

SEQ ID NO:13のアミノ酸配列と少なくとも90%同一であるアミノ酸配列からなるポリペプチドを免疫学的に認識する抗体の存在に関して、該試料をアッセイする段階を含む、請求項5記載の方法。

10

【請求項7】

SEQ ID NO:13のアミノ酸配列と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列からなるポリペプチドを免疫学的に認識する抗体の存在に関して、該試料をアッセイする段階を含む、請求項6記載の方法。

【請求項8】

SEQ ID NO:13のアミノ酸配列からなるポリペプチドを免疫学的に認識する抗体の存在に関して、該試料をアッセイする段階を含む、請求項7記載の方法。

【請求項9】

20

SEQ ID NO:13のアミノ酸配列からなるポリペプチドを免疫学的に認識する抗体の存在に関して、個体から採取した試料をアッセイする段階を含む、該試料におけるE.カニス由来のgp19ポリペプチドに免疫学的に反応する抗体を検出する方法。

【請求項10】

該抗体の検出が、ELISAにより行われる、請求項5乃至9のいずれか一項記載の方法。

【請求項11】

gp36、gp19、gp28/30、およびgp200ポリペプチドからなる群より選択されるE.カニス由来のポリペプチドと免疫学的に反応する他の抗体の検出の組み合わせを含む、請求項5乃至9のいずれか一項記載の方法。

【請求項12】

30

SEQ ID NO:17もしくはSEQ ID NO:19の21乃至44位のアミノ酸領域と免疫学的に反応するモノクローナル抗体またはその抗原結合断片を用いて、個体から採取した試料をアッセイする段階を含む、該試料におけるE.カニス由来のgp19ポリペプチドを検出する方法。

【請求項13】

(a) SEQ ID NO:17もしくはSEQ ID NO:19の21乃至44位のアミノ酸を含む、SEQ ID NO:17もしくはSEQ ID NO:19のアミノ酸配列の連続する24乃至50個のアミノ酸からなる単離されたポリペプチド；

(b) (a)のポリペプチドのアミノ酸配列と少なくとも95%同一である、単離されたポリペプチド；

(c) SEQ ID NO:17もしくはSEQ ID NO:19の21乃至44位のアミノ酸領域と免疫学的に反応するモノクローナル抗体またはその抗原結合断片；

40

のうちのいずれか一つまたは複数を含む、E.カニス由来のgp19ポリペプチドに免疫学的に反応する抗体またはE.カニス由来のgp19ポリペプチドを検出するためのキット。

【請求項14】

SEQ ID NO:17もしくはSEQ ID NO:19の21乃至44位のアミノ酸を含む、SEQ ID NO:17もしくはSEQ ID NO:19のアミノ酸配列の連続する24乃至50個のアミノ酸からなる単離されたポリペプチド。

【請求項15】

該ポリペプチドが、合成ポリペプチドである、請求項14記載のポリペプチド。

【請求項16】

50

E.カニス由来のgp19ポリペプチドに免疫学的に反応する抗体の検出において使用するための、請求項14または15記載のポリペプチド。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、少なくとも部分的に米国国立衛生研究所助成金番号R01 AI 071145-01および1 P41 PR018502-01からの基金によってなされた。米国政府は本発明に一定の権利を有する。

【0002】

発明の分野

本発明は少なくとも、分子生物学、細胞生物学、病理学、および獣医学が含まれる医学の分野に関する。特定の局面において、本発明は、E.カニス (*E. canis*) における免疫反応性gp19組成物に関する。

【背景技術】

【0003】

発明の背景

エーリキア・カニス (*Ehrlichia canis*) は、野生および家畜のイヌにおける中等度から重度の、時に致死的な疾患を引き起こすマダニ伝播性の偏性細胞内細菌である。E.カニスならびにE.シャフェンシス (*E. chaffeensis*) およびE.ルミナンチウム (*E. ruminantium*) が含まれる属の他の生物のゲノムは、高い程度のゲノムシンテニー、パラローグタンパク質ファミリー、膜貫通ヘリックスおよび/またはシグナル配列を有するタンパク質の割合が大きいこと、ならびにO-グリコシル化およびリン酸化能に関連する独自のセリントレオニンバイアスを示し、宿主-病原体相互作用に関連するタンパク質においてタンデムリピートおよびアンキリンドメインを有する (Collins et al., 2005; Hotopp et al., 2006; Frutos et al., 2006; Mavromatis et al., 2006)。これらのゲノムのそれぞれによってコードされる900個より多いタンパク質の小さいサブセットが抗体によって認識される (Doyle et al., 2006; McBride et al., 2003; McBride et al., 2000; Sumner et al., 2000)。同定され、分子的に特徴付けされた主要な免疫反応性タンパク質のいくつかは、分泌されるセリンに富む糖タンパク質である。これらの糖タンパク質の多くはタンデムリピートを有する；しかし、多数の真核生物様アンキリンドメインを有するものもある (Doyle et al., 2006; McBride et al., 2003; McBride et al., 2000; Nethery et al., 2005; Singu et al., 2005; Yu et al., 2000)。

【0004】

タンデムリピートを含有する多数のタンパク質が、E.カニス (n=12) およびE.ルミナンチウム (n=31) において同定されている。特に、タンデムリピートを有する三つの免疫反応性タンパク質が、E. シャフェンシス (gp120、gp47、およびVLPT) と共にE.カニスにおける二つのオルソログ (それぞれ、gp140およびgp36) において同定され、分子的に特徴付けされている。E.シャフェンシスvlpt遺伝子のオルソログは、E.カニスにおいて同定されていないが、この遺伝子は他のエーリキアゲノムには存在しないことが報告されている (Hotopp et al., 2006)。E.シャフェンシス免疫反応性タンパク質 (gp120、gp47、およびVLPT) と共にE.カニスgp36におけるタンデムリピートの数および/または配列における広範な変動性は、十分に報告されている (Chen et al., 1997; Doyle et al., 2006; Sumner et al., 1999)。ゲノムのコードおよび非コード領域の両方におけるタンデムリピートの存在は、エーリキアゲノムの膨張および低減の能動的プロセスに連鎖しており (Frutos et al., 2006)、ゲノムの変化および不安定性の主な起源であると考えられている (Bzymek and Lovett, 2001)。

【0005】

E.シャフェンシスVLPTは免疫反応性であるが、その細胞内位置、機能、および防御免疫の発達における役割に関してはほとんどわかっていない。E.シャフェンシスvlpt遺伝子は、90 bpのタンデムリピートの数に変動を示し (3~5個)、分子診断の標的として、およ

10

20

30

40

50

び分離株 (isolate) を識別するために利用されている (Sumner et al., 1999; Yabsley et al., 2003)。E. シャフェンシスアーカンソー (Arkansas) のVLPTは、リピート4個 (アミノ酸30個) を有し、そのアミノ酸配列によって予測される分子量のほぼ2倍の分子量を有する (Sumner et al., 1999) アミノ酸198個のタンパク質である。E. シャフェンシスVLPTタンパク質は、他の記述されるエーリキア糖タンパク質と一貫する翻訳後修飾を有するように見えるが、VLPTにおける糖質の存在は証明されていない。

【0006】

本発明は、哺乳動物におけるエーリキア感染症に関する新規方法および組成物を提供することによって、当技術分野における必要性を満たし、特にE. シャフェンシスVLPTのE. カニスオルソログにおける方法および組成物を提供する。

10

【発明の概要】

【0007】

イヌ単球エーリキア症は、偏性細胞内細菌であるE. カニスによって引き起こされる世界中に分布するマダニ媒介疾患であり、ヒト単球指向性エーリキア症の原因物質であるE. シャフェンシスの免疫および病原性機構を理解するための有用なモデルである。一般的に、本発明は、例えばサブユニットワクチンのような例えばエーリキア病のワクチンとしての免疫防御抗原が含まれるエーリキア免疫原性組成物に関する。免疫原性組成物は、例えばヒト、イヌ、ネコ、ウマ、ブタ、ヤギ、またはヒツジが含まれる任意の哺乳動物に関して用いられてもよい。

【0008】

本発明の一定の局面において、E. シャフェンシスVLPTのオルソログであるE. カニスにおける高度に保存された19kDaの主要な免疫反応性糖タンパク質 (gp19) が同定および特徴付けされる。E. カニスgp19は、E. シャフェンシスのVLPTに存在するタンデムリピートを欠損するが、二つのタンパク質は、システイン/チロシンに富むカルボキシル末端領域において実質的なアミノ酸類似性 (59%) を示し、両方の遺伝子は、同じ相対的染色体位置を有する。糖質が組換え型gp19において検出され、一つの主要な抗体エピトープがセリン/トレオニン/グルタメート (STE) に富むパッチにマップされた。このエピトープは、過ヨウ素酸塩 (periodate) 処置に対して感受性があり、例示的な組換え型タンパク質は、例示的な合成ペプチドよりも実質的に免疫反応性であり、本発明の一定の態様において、免疫決定因子としての糖質の役割を証明する。gp19は、網状 (reticulate) 細胞および高密度中心を有する (dense cored) 細胞の両方において見い出され、同様に、細胞外マトリクスに存在し、モルラ (morula) の膜に会合し、タンパク質が分泌されることを示した。

20

30

【0009】

本発明の特定の局面においては、以下の特徴の一つまたは複数を有するエーリキアgp19ポリペプチド組成物 (または、それらの全てもしくは一部をコードするポリヌクレオチド組成物) が存在する: 1) 特定の態様において、エピトープ決定基の一部を含む一つまたは複数の糖質部分を含む; 2) 免疫原性の種特異的であるエピトープなどの一つまたは複数の部分を含む; 3) 分泌などにより、細胞外に放出される; 4) 主要なB細胞エピトープを含む; 5) 表面に露出している; 6) 例えば表面上などのエーリキア属の感染性の高密度中心型に会合する; および7) 高密度中心型を含むモルラの膜に会合する (エーリキア属の生物は、多くの個々のエーリキアを有する細胞液胞 (モルラ) 内でマイクロコロニーを形成する)。さらなる局面において、本発明の組換え型ポリペプチド組成物を、例えば大腸菌 (E. coli) のような、自然には該組成物を含まない細胞においてグリコシル化することができる。組換え型ポリペプチドは、例えばワクチンを含む免疫原性組成物として使用されてもよい。

40

【0010】

本発明の特定の態様において、免疫原性であるアミノ酸配列を含むE. カニスgp19免疫原性組成物が存在し、さらに特定の態様において、免疫原性は、エピトープの少なくとも一部であることを特徴とする。さらなる態様において、アミノ酸配列は、E. カニスのような

50

エーリキア生物に対するワクチン組成物の少なくとも一部を含む。特定の態様において、アミノ酸配列は、セリン、トレオニン、または任意でアラニン、プロリン、バリン、および/またはグルタミン酸を含む；さらなる態様において、アミノ酸配列はグリコシル化される。さらに特定の態様において、アミノ酸配列は、以下の例示的な配列の一部または全てを含む。

HFTGPTSFEVNLSEEEKMELQEVS (SEQ ID NO:13)

一定の態様において、エピトープは、SEQ ID NO:17またはSEQ ID NO:19において例示されるように、天然に存在するgp19において、SEQ ID NO:13の配列に隣接してC末端に存在するアミノ酸のような、C末端上のさらなるアミノ酸を含む。特定の態様において、SEQ ID NO:13のC末端には1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個またはそれ以上のさらなるアミノ酸が存在してもよい。さらなる態様において、アミノ酸配列は、本発明のいくつかの局面においてアジュバントを含む、薬学的に許容される賦形剤に含まれる。本発明の一定の局面においては、SEQ ID NO:13のペプチド配列をコードするSEQ ID NO:20

(CATTTTACTGGTCCTACTAGTTTTGAAGTTAATCTTTCTGAAGAAGAAAAAA
TGGAGTTACAAGAAGTATCT)

を含むポリヌクレオチドが存在する。

【0011】

E.カニス配列は、他の株におけるgp19のシークエンシング後に同定される可能性がある；ノースカロライナ(North Carolina)(Jake)、オクラホマ(Oklahoma)、ノースカロライナ(Demon)、ノースカロライナ(DJ)、ノースカロライナ(Fuzzy)、ルイジアナ(Louisiana)、フロリダ(Florida)、サンパウロ(Sao Paulo)、カメルーン(Cameroon)、イスラエル(Israeli)、およびメキシコ(Mexico)を含むさらなるE.カニス株を試験する。さらなる態様において、アミノ酸配列は、本発明のいくつかの局面においてアジュバントを含む薬学的に許容される賦形剤に含まれる。

【0012】

本発明の一定の態様において、免疫原性gp19 E.カニス組成物が存在し、gp19組成物の特定の配列がその免疫原性を付与する可能性がある；例えば、gp19組成物の領域はエピトープを含んでもよい。特定の態様において、gp19組成物上の一つまたは複数のエピトープは、gp19ポリペプチドのC末端またはN末端に存在する。特定の局面において、C末端は、例えばSEQ ID NO:17またはSEQ ID NO:19の最後の60個のアミノ酸を含む。本発明のさらなる局面において、C末端は、SEQ ID NO:17またはSEQ ID NO:19の最後の60個のアミノ酸を含み、かつ特定の局面において、C末端はSEQ ID NO:17またはSEQ ID NO:19の最後の55個、最後の50個、最後の45個、最後の40個、最後の35個、最後の30個、最後の25個、最後の20個、最後の15個、最後の10個、または最後の5個のアミノ酸を含む。本発明のさらなる局面において、C末端は、SEQ ID NO:17またはSEQ ID NO:19の最後の60個を超えないアミノ酸を含み、かつ特定の局面において、C末端は、SEQ ID NO:17またはSEQ ID NO:19の最後の55個、最後の50個、最後の45個、最後の40個、最後の35個、最後の30個、最後の25個、最後の20個、最後の15個、最後の10個、または最後の5個を超えないアミノ酸を含む。他の特定の局面において、N末端は、SEQ ID NO:17またはSEQ ID NO:19の最初の74個のアミノ酸を含む。本発明のさらなる局面において、N末端は、SEQ ID NO:17またはSEQ ID NO:19の最初の74個のアミノ酸を含み、かつ特定の局面において、N末端は、SEQ ID NO:17またはSEQ ID NO:19の最初の70個、最初の65個、最初の60個、最初の55個、最初の50個、最初の45個、最初の40個、最初の35個、最初の30個、最初の25個、最初の20個、最初の15個、最初の10個、または最初の5個のアミノ酸を含む。本発明のさらなる局面において、N末端は、SEQ ID NO:17またはSEQ ID NO:19の最初の74個を超えないアミノ酸を含み、かつ特定の局面において、N末端は、SEQ ID NO:17またはSEQ ID NO:19の最初の70個、最初の65個、最初の60個、最初の55個、最初の50個、最初の45個、最初の40個、最初の35個、最初の30個、最初の25個、最初の20個、最初の15個、最初の10個、または最初の5個を超えない

10

20

30

40

50

いのアミノ酸を含む。

【0013】

本発明のいくつかの局面において、多数の異なるE.カニス株が免疫原性のgp19組成物を含み、エピトープを含むgp19組成物の領域では、株の間で有意な配列同一性が存在する（例えば、約80%、85%、90%、95%、または98%より大きいような）。しかし、いくつかの態様において、エピトープを含まないgp19組成物の領域において、株の間での有意な配列同一性が存在してもよい。本発明の特定の局面において、例えばノースカロライナ（Ja ke）、オクラホマ、ノースカロライナ（Demon）、ノースカロライナ（DJ）、ノースカロライナ（Fuzzy）、ルイジアナ、フロリダを含むE.カニスの一つより多い株に関して免疫原性であるgp19組成物が存在し、特定の局面において、他の株のエピトープはSEQ ID NO: 13であるが、他のエピトープも同様に同定される可能性がある。SEQ ID NO:13に対する代替のgp19 E.カニスエピトープが同定される態様において、例えばSEQ ID NO:13が含まれる混合物のような、gp19 E.カニスエピトープの混合物を含む免疫原性組成物が提供されてもよい。

10

【0014】

本発明の一定の態様において、E.カニスの免疫原性組成物は、一つまたは複数の糖質部分を含む。特定の局面において、糖質部分は、組成物の免疫原性の性質を助長する。特定の態様において、糖質部分は、免疫原性にとって必要であるが、代替の態様において、糖質部分は免疫原性を増強する。糖質部分は免疫原性を可能にするかまたは増強するために適している限り、いかなる種の部分であってもよい。糖質部分の同一性は、当技術分野における任意の適した手段によって決定されてもよいが、特定の局面において、ポリペプチドまたはペプチドから特定の糖質を切断する酵素を利用してよく、その後切断された糖質の分析を、例えば質量分析によって行ってもよい。他の手段においては、糖質を除去して、特異的な糖に結合することが知られている多様なレクチンによってアッセイする。特定の態様において、糖質は、グルコース、ガラクトース、および/またはキシロースを含む。本発明の特定の態様において、糖タンパク質における一つまたは複数の糖質部分は、当技術分野において適した方法、例えばガスクロマトグラフィー/質量分析によって同定される。

20

【0015】

本発明の態様においては、免疫原性gp19 E.カニス糖タンパク質が存在する。本発明のさらなる態様においては、SEQ ID NO:13を含むE.カニス組成物が存在する。本発明の特定の局面において、組成物はさらに、薬学的に許容される賦形剤を含む。組成物はさらに、一つまたは複数の糖質部分を含むとして、エピトープの一部または全てを含むとして、および/またはサブユニットワクチンのようなワクチンとして、定義されてもよい。

30

【0016】

本発明の別の態様においては、SEQ ID NO:16またはSEQ ID NO:18のポリヌクレオチドの少なくとも一部によってコードされるポリペプチドを含むE.カニス組成物、および/またはSEQ ID NO:17またはSEQ ID NO:19のポリペプチドを含むE.カニス組成物が存在する。本発明の一つの態様においては、以下を含むエーリアgp19糖タンパク質を含む、単離された組成物が存在する：(a) SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:17、もしくはSEQ ID NO:19からなる群より選択される配列；(b) (a)における一つまたは複数の配列に対して少なくとも約70%同一である配列。組成物はさらに、(a)における一つまたは複数の配列と少なくとも約75%、約80%、約85%、約90%、または約95%同一である配列として定義されてもよい。組成物はまた、薬学的に許容される賦形剤に含まれるとして、一つまたは複数の糖質部分を含むとして、および/またはワクチンとして適した薬学的組成物に含まれるとして定義されてもよい。

40

【0017】

特定の態様においては、SEQ ID NO:17をコードする単離されたポリヌクレオチド、SEQ ID NO:19をコードする単離されたポリヌクレオチド、SEQ ID NO:13をコードする単離されたポリヌクレオチド、またはその混合物が存在する。

50

【0018】

特定の態様においては、以下を含む単離されたポリヌクレオチドが存在する：(a) SEQ ID NO:17をコードするポリヌクレオチド；または(b) (a)のポリヌクレオチドと少なくとも約90%同一であり、かつ免疫反応性E.カニスgp19ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド。特定の態様において、ポリヌクレオチドはSEQ ID NO:16としてさらに定義される。

【0019】

特定の態様においては、以下を含む単離されたポリヌクレオチドが存在する：(a) SEQ ID NO:19をコードするポリヌクレオチド；または(b) (a)のポリヌクレオチドと少なくとも約90%同一であり、かつ免疫反応性E.カニスgp19ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド。特定の態様において、ポリヌクレオチドはSEQ ID NO:18としてさらに定義される。

10

【0020】

本発明のさらなる態様においては、以下を含む単離されたポリヌクレオチドが存在する：(a) SEQ ID NO:17をコードするポリヌクレオチド；または(b) (a)のポリヌクレオチドと少なくとも約90%同一であり、かつ免疫反応性E.カニスgp19ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド。特定の態様において、ポリヌクレオチドは、SEQ ID NO:16としてさらに定義される。本発明のさらなる局面においては、以下を含む単離されたポリヌクレオチドが存在する：(a) SEQ ID NO:19をコードするポリヌクレオチド；または(b) (a)のポリヌクレオチドと少なくとも約90%同一であり、かつ免疫反応性E.カニスgp19ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド。特定の態様において、ポリヌクレオチドはSEQ ID NO:18としてさらに定義される。

20

【0021】

本発明のさらなる態様においては、以下を含む単離されたポリペプチドが存在する：(a) SEQ ID NO:17および/またはSEQ ID NO:19、または(b) SEQ ID NO:17および/またはSEQ ID NO:19と少なくとも約70%同一であり、かつ免疫原活性を含むgp19ポリペプチド。特定の態様において、ポリペプチドは、薬学的に許容される賦形剤に含まれ、および/またはこれはさらに、ワクチンとして適している薬学的組成物に含まれると定義されてもよい。

【0022】

本発明の一定の局面においては、SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:14、またはSEQ ID NO:15の例示的なプライマーの一つまたは複数によって増幅可能であるポリヌクレオチドが存在する。

30

【0023】

本発明の特定の局面においては、SEQ ID NO:13を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、および特定の態様においては、SEQ ID NO:20を含むポリヌクレオチドが存在する。本発明の他の局面においては、SEQ ID NO:17および/またはSEQ ID NO:19を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチドが存在する。

【0024】

本発明の別の局面においては、本発明の一つまたは複数のポリペプチドに結合する単離された抗体が存在する。抗体は、例えばモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、または抗体断片であってもよい。特定の態様において、抗体は、gp19のエピトープ、例えばSEQ ID NO:13を含むエピトープに選択的に結合する。特定の態様において、抗体は、本発明の一つまたは複数のポリペプチドと免疫学的に反応すると見なされてもよい。

40

【0025】

さらなる局面において、SEQ ID NO:13を含む、またはSEQ ID NO:13と比較して置換基1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、または23個を有する配列を有するペプチドまたはポリペプチドが存在し、特定の局面において、置換は保存的置換である。

50

【0026】

本発明のさらなる態様においては、gp19抗体、ポリペプチド、および/またはポリヌクレオチドのような本発明の組成物の治療的有効量を個体に送達する段階を含む、E.カニス感染症に対する耐性を提供する方法が存在する。

【0027】

別の態様においては、本発明のgp19ポリペプチドの治療的有効量を個体に送達する段階を含む、個体における免疫反応を誘導する方法が存在する。本発明のさらなる態様においては、E.カニスに曝露される前の被験体、またはE.カニスに曝露されたこともしくはE.カニスに感染していることが疑われる被験体を同定する段階、およびE.カニス感染症を抑制するために有効な量の本発明のポリペプチド、抗体、および/またはポリヌクレオチドを投与する段階を含む、被験体におけるE.カニス感染症を抑制または予防する方法が存在する。

10

【0028】

本発明のいくつかの局面において、組成物は、以下を含むポリヌクレオチドによってコードされてもよい：(a) SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:18、およびSEQ ID NO:20からなる群より選択されるポリヌクレオチド、または(b) (a)のポリヌクレオチドと少なくとも約70%同一であり、かつ免疫反応性E.カニスgp19ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、または(c) ストリンジェントな条件下で(a)もしくは(b)のうちの一つもしくは複数のポリヌクレオチドとハイブリダイズするポリヌクレオチド。本発明の特定の態様において、(c)のポリヌクレオチドは、(a)または(b)のポリヌクレオチドと少なくとも

20

【0029】

本発明のポリヌクレオチドは、ウイルスベクターまたは非ウイルスベクターのようなベクター中に含まれてもよく、ウイルスベクターは、アデノウイルスベクター、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、ヘルペスウイルスベクター、またはワクシニアウイルスベクターであってもよく、非ウイルスベクターはプラスミドであってもよい。本発明のさらなる局面において、ベクターは、プロモーターが原核生物、真核生物、またはその両方において機能的である、ポリヌクレオチドに機能的に連結したプロモーターを含む。本発明のポリヌクレオチドは、リボソーム中に含まれてもよく、および/または薬学的に許容される賦形剤に含まれてもよい。

30

【0030】

本発明の一定の局面において、本発明のポリペプチドと免疫学的に反応する単離された抗体が存在し、抗体はモノクローナル抗体であってもよく、ポリクローナル抗血清中に含まれてもよく、または例えば抗体断片であってもよい。

【0031】

本発明の他の態様においては、ポリペプチド、抗体、および/またはポリヌクレオチドのような本発明の組成物の治療的有効量を個体に送達する段階を含む、個体における免疫応答を誘導する方法が存在する。

40

【0032】

本発明のさらなる態様においては、E.カニスに曝露される前の被験体、またはE.カニスに曝露されたこともしくはE.カニスに感染していることが疑われる被験体を同定する段階、およびE.カニス感染症を抑制するのに有効な量の本発明のポリペプチドを投与する段階を含む、被験体におけるE.カニス感染症を抑制する方法が存在する。本発明のさらなる態様においては、本発明の抗体、ポリペプチド、および/またはポリヌクレオチドに関して、個体からの試料をアッセイする段階を含む、個体におけるE.カニス感染症を同定する方法が存在する。

【0033】

本発明の一つの態様においては、以下の一つまたは複数を含む薬学的組成物が存在する

50

: (a) SEQ ID NO:17またはSEQ ID NO:19を含む、単離されたポリペプチド; (b) (a)のポリペプチドと少なくとも70%同一である、単離されたポリペプチド; (c) SEQ ID NO:13を含む、単離されたポリペプチド; または (d) SEQ ID NO:13と少なくとも70%同一である、単離されたポリペプチド。ここで、ポリペプチドは薬学的に許容される希釈剤に分散されている。特定の態様において、(b)は、(a)のポリペプチドと少なくとも75%同一であるポリペプチドとして; (a)のポリペプチドと少なくとも80%同一であるポリペプチドとして; (a)のポリペプチドと少なくとも85%同一であるポリペプチドとして; (a)のポリペプチドと少なくとも90%同一であるポリペプチドとして; または (a)のポリペプチドと少なくとも95%同一であるポリペプチドとしてさらに定義される。薬学的組成物はさらに、ワクチン組成物として定義されてもよい。

10

【0034】

特定の態様において、薬学的組成物のポリペプチドは、一つまたは複数の糖質部分を含むとしてさらに定義される。一定の局面において、ポリペプチドはSEQ ID NO:17を含み、またはポリペプチドはSEQ ID NO:19を含む。

【0035】

本発明の特定の局面において、ポリペプチドは、例えばアミノ酸24~30個の長さ、アミノ酸24~35個の長さ、アミノ酸24~40個の長さ、アミノ酸24~45個の長さ、アミノ酸24~50個の長さ、アミノ酸24~55個の長さ、アミノ酸24~60個の長さ、アミノ酸24~65個の長さ、アミノ酸24~70個の長さ、アミノ酸24~75個の長さ、アミノ酸24~80個の長さ、アミノ酸24~85個の長さ、アミノ酸24~90個の長さ、アミノ酸24~95個の長さ、またはアミノ酸24~100個の長さであるとしてさらに定義される。

20

【0036】

SEQ ID NO:13を含むポリペプチドの変種は、SEQ ID NO:13と少なくとも80%同一であるとして; SEQ ID NO:13と少なくとも85%同一であるとして; SEQ ID NO:13と少なくとも90%同一であるとして; またはSEQ ID NO:13と少なくとも95%同一であるとして定義されてもよい。

【0037】

本発明のさらなる態様においては、(a) SEQ ID NO:16またはSEQ ID NO:18を含むポリヌクレオチド; または (b) ストリンジェントな条件下で (a) のポリヌクレオチドとハイブリダイズすることができるポリヌクレオチドを含む、単離された核酸分子によってコードされる単離されたポリペプチドを含む、薬学的組成物が存在する。ここで、ポリペプチドはSEQ ID NO:17またはSEQ ID NO:19に対して少なくとも70%の同一性を有し、かつポリペプチドは、薬学的に許容される希釈剤に分散されている。ポリペプチドは、SEQ ID NO:17もしくはSEQ ID NO:19と少なくとも75%同一; SEQ ID NO:17もしくはSEQ ID NO:19と少なくとも80%同一; SEQ ID NO:17もしくはSEQ ID NO:19と少なくとも85%同一; SEQ ID NO:17もしくはSEQ ID NO:19と少なくとも90%同一; またはSEQ ID NO:17もしくはSEQ ID NO:19と少なくとも95%同一であってもよい。

30

【0038】

一定の局面において、本発明は、(a) SEQ ID NO:17もしくはSEQ ID NO:19の20個より多いような、23個より多いような、15個より多いが、130個を超えない連続するアミノ酸を含む単離されたポリペプチドもしくはペプチド; または (b) SEQ ID NO:17もしくはSEQ ID NO:19の130個を超えない連続するアミノ酸である配列と約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、もしくは約95%同一であるポリペプチドもしくはペプチドを含む、組成物に関する。

40

【0039】

さらなる局面においては、SEQ ID NO:16またはSEQ ID NO:18と75%を超えない、80%、85%、90%、95%、97%、または99%同一であるポリヌクレオチドによってコードされるとしてさらに定義されるポリペプチドが存在する。

【0040】

さらなる態様においては、(a) SEQ ID NO:13を有するペプチド、または (b) (a) の

50

ペプチドの変種を含む組成物が存在し、変種はSEQ ID NO:13と少なくとも75%同一であり、組成物は、個体において免疫反応を誘発することができる。特定の態様においては、長さがアミノ酸24～50個であるペプチドが存在する。特定の態様において、変種は、SEQ ID NO:13と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、または少なくとも95%同一であるとしてさらに定義される。

【0041】

本発明の組成物は、個体に関してエーリキア・カニスに対する免疫を提供する活性を有すると定義されてもよい。本発明の組成物は、個体に関してエーリキア・カニスに対する免疫反応を誘導する活性を有するとして定義されてもよい。本発明の組成物には、本明細書において提供される任意のポリペプチド、ペプチド、ポリヌクレオチド、および/または抗体が含まれる。

10

【0042】

本発明の別の態様においては、(a) SEQ ID NO:16もしくはSEQ ID NO:18を含むポリヌクレオチド、または(b)ストリンジェントな条件下で(a)のポリヌクレオチドとハイブリダイズすることができるポリヌクレオチドであり、かつSEQ ID NO:17もしくはSEQ ID NO:19に対して少なくとも70%の同一性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む、単離された核酸分子が存在し、核酸分子は、真核細胞において活性である、または原核細胞において活性であるプロモーターのような、異種プロモーターに機能的に連結される。特定の態様において、核酸分子は、SEQ ID NO:16を含むポリヌクレオチドとして、またはSEQ ID NO:18を含むポリヌクレオチドとしてさらに定義される。(b)のポリヌクレオチドは、SEQ ID NO:17もしくはSEQ ID NO:19と少なくとも75%同一；SEQ ID NO:17もしくはSEQ ID NO:19と少なくとも80%同一；SEQ ID NO:17もしくはSEQ ID NO:19と少なくとも85%同一；SEQ ID NO:17もしくはSEQ ID NO:19と少なくとも90%同一；またはSEQ ID NO:17もしくはSEQ ID NO:19と少なくとも95%同一であるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドとしてさらに定義されてもよい。

20

【0043】

本発明のさらなる態様においては、(a) SEQ ID NO:16もしくはSEQ ID NO:18と98%を超えないが75%以上同一である配列、または(b) (a)における配列と相補的である配列を含む、単離されたDNAが存在する。特定の態様において、(a)は、SEQ ID NO:16もしくはSEQ ID NO:18と98%を超えないが80%以上同一である配列として；SEQ ID NO:16もしくはSEQ ID NO:18と98%を超えないが85%以上同一である配列として；SEQ ID NO:16もしくはSEQ ID NO:18と98%を超えないが90%以上同一である配列として；SEQ ID NO:16もしくはSEQ ID NO:18と98%を超えないが95%以上同一である配列として；SEQ ID NO:16もしくはSEQ ID NO:18と95%を超えないが80%以上同一である配列として；SEQ ID NO:16もしくはSEQ ID NO:18と90%を超えないが80%以上同一である配列として；またはSEQ ID NO:16もしくはSEQ ID NO:18と85%を超えないが80%以上同一である配列としてさらに定義される。

30

【0044】

核酸分子は、ウイルスベクターまたは非ウイルスベクターのようなベクター中に含まれるとしてさらに定義されてもよく、ウイルスベクターはアデノウイルスベクター、レトロウイルスベクター、またはアデノ随伴ウイルスベクターを含んでもよい。核酸分子は、リポソーム中に含まれてもよい。

40

【0045】

特定の態様においては、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:17、およびSEQ ID NO:19からなる群より選択されるアミノ酸配列の一つまたは複数と免疫学的に反応する単離された抗体が存在する。さらに特定の態様において、抗体はモノクローナル抗体であるか、ポリクローナル抗血清中に含まれるか、または抗体断片である。

【0046】

さらなる態様においては、本発明のポリヌクレオチドを含む宿主細胞を提供する段階、およびコードされたポリペプチドを産生するために、ポリヌクレオチドを発現させるよう

50

に宿主細胞に適した条件下で細胞を培養する段階を含む、ポリペプチドを産生する方法が存在する。方法はさらに、ポリペプチドを単離する段階を含んでもよい。

【0047】

別の態様においては、ストリンジェントな条件下でSEQ ID NO:16またはSEQ ID NO:18とゲノムDNAとをハイブリダイズさせる段階、およびSEQ ID NO:16またはSEQ ID NO:18によって検出されたポリヌクレオチドを単離する段階を含む、ポリヌクレオチドを産生する方法が存在する。特定の態様においては、方法に従って調製された、単離されたDNAが存在する。

【0048】

本発明のさらなる態様においては、本発明の組成物の治療的有効量を個体に送達する段階を含む、個体における免疫応答を誘導する方法が存在する。

10

【0049】

本発明のさらなる態様においては、E.カニスに曝露される前の被験体、またはE.カニスに曝露されたこともしくはE.カニスに感染していることが疑われる被験体に、本発明の組成物の有効量を投与する段階を含む、被験体におけるE.カニス感染症を抑制する方法が存在する。

【0050】

本発明のさらなる態様においては、以下の一つまたは両方に関して、個体からの試料をアッセイする段階を含む、個体におけるE.カニス感染症を同定する方法が存在する：(a) SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:19、もしくはその両方のポリペプチド；または(b) SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:17、およびSEQ ID NO:19からなる群より選択されるアミノ酸配列と免疫学的に反応する抗体。この方法の特定の態様において、(a)のポリペプチドは、SEQ ID NO:17である。この方法の特定の態様において、(a)のポリペプチドは、SEQ ID NO:19である。この方法の特定の態様において、(a)のポリペプチドは、SEQ ID NO:17およびSEQ ID NO:19の混合物である。特定の態様において、(b)の抗体は、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:17、またはSEQ ID NO:19のアミノ酸配列と免疫学的に反応する。特定の局面において、抗体の試料をアッセイする段階は、(b)の抗体以外の一つまたは複数のE.カニス抗体に関するアッセイを可能にすることによるような、抗体に関してELISAによりアッセイすることとしてさらに定義される。他のE.カニス抗体は、gp36、gp19、gp28/30、およびgp200に関する抗体からなる群より選択される。

20

30

【0051】

本発明の態様においては、以下の組成物の一つまたは複数を含むキットが存在する：(a) SEQ ID NO:17もしくはSEQ ID NO:19を含む、単離されたポリペプチド；(b) (a)のポリペプチドと少なくとも70%同一である、単離されたポリペプチド；(c) SEQ ID NO:13を含む、単離されたポリペプチド；(d) SEQ ID NO:13と少なくとも70%同一である、単離されたポリペプチド；(e) SEQ ID NO:16もしくはSEQ ID NO:18を含むポリヌクレオチド；(f) ストリンジェントな条件下で(a)のポリヌクレオチドとハイブリダイズすることができるポリヌクレオチドであり、かつSEQ ID NO:17もしくはSEQ ID NO:19に対して少なくとも70%の同一性を有するポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチド；または(g) SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:17、およびSEQ ID NO:19からなる群より選択されるアミノ酸配列の一つまたは複数と免疫学的に反応する、単離された抗体。特定の態様において、キットはさらに、組成物の二つまたはそれ以上を含むとして定義される。

40

【0052】

前述においては、以下の本発明の詳細な説明がよりよく理解されるように、本発明の特色および技術的長所をむしろ広く概説してきた。本発明の特許請求の範囲の主題を形成する本発明のさらなる特色および長所を以降に記述する。開示の概念および特定の態様を、本発明の同じ目的を実行するために他の構造を改変または設計するための基礎として容易に利用してもよいことは、当業者に認識されるべきである。同様に、そのような同等の構築物は、添付の特許請求の範囲に記載されるように、本発明の趣旨および範囲に含まれることも当業者に認識されるべきである。さらなる目標および長所と共に、その構築および

50

操作法の両方に関して本発明の特徴であると考えられる新規特色は、添付の図面に関連して考慮すると、以下の説明からよりよく理解されると考えられる。しかし、図面のそれぞれは、説明および記述する目的に限って提供され、本発明の限界の定義であると意図されないことは、明白に理解される。

[本発明101]

- (a)SEQ ID NO:17もしくはSEQ ID NO:19を含む、単離されたポリペプチド;
- (b)(a)のポリペプチドと少なくとも70%同一である、単離されたポリペプチド;
- (c)SEQ ID NO:13を含む、単離されたポリペプチド;または
- (d)SEQ ID NO:13と少なくとも70%同一である、単離されたポリペプチド

のうちの一つまたは複数を含む薬学的組成物であって、

該ポリペプチドが、薬学的に許容される希釈剤に分散されている、
薬学的組成物。

10

[本発明102]

(b)が、(a)のポリペプチドと少なくとも75%同一であるポリペプチドとしてさらに定義される、本発明101記載の組成物。

[本発明103]

(b)が、(a)のポリペプチドと少なくとも80%同一であるポリペプチドとしてさらに定義される、本発明102記載の組成物。

[本発明104]

(b)が、(a)のポリペプチドと少なくとも85%同一であるポリペプチドとしてさらに定義される、本発明103記載の組成物。

20

[本発明105]

(b)が、(a)のポリペプチドと少なくとも90%同一であるポリペプチドとしてさらに定義される、本発明104記載の組成物。

[本発明106]

(b)が、(a)のポリペプチドと少なくとも95%同一であるポリペプチドとしてさらに定義される、本発明105記載の組成物。

[本発明107]

ワクチン組成物としてさらに定義される、本発明101記載の組成物。

[本発明108]

ポリペプチドが、一つまたは複数の糖質部分を含むとしてさらに定義される、本発明101記載の組成物。

30

[本発明109]

(a)のポリペプチドがSEQ ID NO:17を含む、本発明101記載の組成物。

[本発明110]

(a)のポリペプチドがSEQ ID NO:19を含む、本発明101記載の組成物。

[本発明111]

(c)のポリペプチドが、アミノ酸24~50個の長さであるとしてさらに定義される、本発明101記載の組成物。

[本発明112]

(d)のポリペプチドが、SEQ ID NO:13と少なくとも80%同一であるとしてさらに定義される、本発明101記載の組成物。

40

[本発明113]

(d)のポリペプチドが、SEQ ID NO:13と少なくとも85%同一であるとしてさらに定義される、本発明112記載の組成物。

[本発明114]

(d)のポリペプチドが、SEQ ID NO:13と少なくとも90%同一であるとしてさらに定義される、本発明113記載の組成物。

[本発明115]

(d)のポリペプチドが、SEQ ID NO:13と少なくとも95%同一であるとしてさらに定義され

50

る、本発明114記載の組成物。

[本発明116]

(a)SEQ ID NO:16もしくはSEQ ID NO:18を含むポリヌクレオチド;または

(b)ストリンジェントな条件下で(a)のポリヌクレオチドとハイブリダイズすることができるポリヌクレオチド

を含む単離された核酸分子によってコードされる単離されたポリペプチドを含む薬学的組成物であって、

該ポリペプチドが、SEQ ID NO:17またはSEQ ID NO:19に対して少なくとも70%の同一性を有し、かつ該ポリペプチドが、薬学的に許容される希釈剤に分散されている、
薬学的組成物。

10

[本発明117]

ポリペプチドがSEQ ID NO:17またはSEQ ID NO:19と少なくとも75%同一である、本発明116記載の組成物。

[本発明118]

ポリペプチドがSEQ ID NO:17またはSEQ ID NO:19と少なくとも80%同一である、本発明117記載の組成物。

[本発明119]

ポリペプチドがSEQ ID NO:17またはSEQ ID NO:19と少なくとも85%同一である、本発明118記載の組成物。

[本発明120]

ポリペプチドがSEQ ID NO:17またはSEQ ID NO:19と少なくとも90%同一である、本発明119記載の組成物。

20

[本発明121]

ポリペプチドがSEQ ID NO:17またはSEQ ID NO:19と少なくとも95%同一である、本発明120記載の組成物。

[本発明122]

(a)SEQ ID NO:16もしくはSEQ ID NO:18を含むポリヌクレオチド;または

(b)ストリンジェントな条件下で(a)のポリヌクレオチドとハイブリダイズすることができるポリヌクレオチドであり、かつSEQ ID NO:17もしくはSEQ ID NO:19に対して少なくとも70%の同一性を有するポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチド

を含み、かつ異種プロモーターに機能的に連結している、単離された核酸分子。

30

[本発明123]

(a)が、SEQ ID NO:16を含むポリヌクレオチドとしてさらに定義される、本発明122記載の単離された核酸分子。

[本発明124]

(a)が、SEQ ID NO:18を含むポリヌクレオチドとしてさらに定義される、本発明122記載の単離された核酸分子。

[本発明125]

(b)が、SEQ ID NO:17またはSEQ ID NO:19と少なくとも75%同一であるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドとしてさらに定義される、本発明122記載の単離された核酸分子。

40

[本発明126]

(b)が、SEQ ID NO:17またはSEQ ID NO:19と少なくとも80%同一であるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドとしてさらに定義される、本発明125記載の単離された核酸分子。

[本発明127]

(b)が、SEQ ID NO:17またはSEQ ID NO:19と少なくとも85%同一であるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドとしてさらに定義される、本発明126記載の単離された核酸分子。

[本発明128]

50

(b)が、SEQ ID NO:17またはSEQ ID NO:19と少なくとも90%同一であるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドとしてさらに定義される、本発明127記載の単離された核酸分子。

[本発明129]

(b)が、SEQ ID NO:17またはSEQ ID NO:19と少なくとも95%同一であるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドとしてさらに定義される、本発明128記載の単離された核酸分子。

[本発明130]

異種プロモーターが真核生物プロモーターである、本発明122記載の単離された核酸分子。

10

[本発明131]

異種プロモーターが原核生物プロモーターである、本発明122記載の単離された核酸分子。

[本発明132]

ベクター中に含まれるとしてさらに定義される、本発明122記載の単離された核酸分子。

[本発明133]

ベクターがウイルスベクターまたは非ウイルスベクターである、本発明132記載の単離された核酸分子。

[本発明134]

ウイルスベクターが、アデノウイルスベクター、レトロウイルスベクター、またはアデノ随伴ウイルスベクターを含む、本発明133記載の単離された核酸分子。

20

[本発明135]

リポソーム中に含まれる、本発明122記載の単離された核酸分子。

[本発明136]

SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:17、およびSEQ ID NO:19からなる群より選択されるアミノ酸配列の一つまたは複数と免疫学的に反応する、単離された抗体。

[本発明137]

モノクローナル抗体であるか、ポリクローナル抗血清中に含まれるか、または抗体断片である、本発明136記載の抗体。

30

[本発明138]

本発明122～135のいずれか一項記載のポリヌクレオチドを含む宿主細胞を提供する段階；および

コードされたポリペプチドを産生するために、ポリヌクレオチドを発現させるように宿主細胞に適した条件下で細胞を培養する段階を含む、ポリペプチドを産生する方法。

[本発明139]

ポリペプチドを単離する段階をさらに含む、本発明138記載の方法。

[本発明140]

ストリンジェントな条件下でSEQ ID NO:16またはSEQ ID NO:18とゲノムDNAとをハイブリダイズさせる段階、および

40

SEQ ID NO:16またはSEQ ID NO:18によって検出されたポリヌクレオチドを単離する段階を含む、ポリヌクレオチドを産生する方法。

[本発明141]

本発明140記載の方法に従って調製された、単離されたDNA。

[本発明142]

本発明101～137のいずれか一項記載の組成物の治療的有効量を個体に送達する段階を含む、個体における免疫応答を誘導する方法。

[本発明143]

E.カニス(E. canis)に曝露される前の被験体、またはE.カニスに曝露されたこともしく

50

はE.カニスに感染していることが疑われる被験体に、本発明101～137のいずれか一項記載の組成物の有効量を投与する段階を含む、被験体におけるE.カニス感染症を抑制する方法。

[本発明144]

(a)SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:19、もしくはその両方のポリペプチド;または

(b)SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:17、およびSEQ ID NO:19からなる群より選択されるアミノ酸配列と免疫学的に反応する抗体の一つまたは両方に関して、個体からの試料をアッセイする段階を含む、個体におけるE.カニス感染症を同定する方法。

[本発明145]

(a)のポリペプチドがSEQ ID NO:17である、本発明144記載の方法。

[本発明146]

(a)のポリペプチドがSEQ ID NO:19である、本発明144記載の方法。

[本発明147]

(a)のポリペプチドがSEQ ID NO:17およびSEQ ID NO:19の両方である、本発明144記載の方法。

[本発明148]

(b)の抗体がSEQ ID NO:13のアミノ酸配列と免疫学的に反応する、本発明144記載の方法。

[本発明149]

(b)の抗体がSEQ ID NO:17のアミノ酸配列と免疫学的に反応する、本発明144記載の方法。

[本発明150]

(b)の抗体がSEQ ID NO:19のアミノ酸配列と免疫学的に反応する、本発明144記載の方法。

[本発明151]

(b)が、抗体に関してELISAによりアッセイすることとしてさらに定義される、本発明144記載の方法。

[本発明152]

ELISAにより、(b)の抗体以外の一つまたは複数のE.カニス抗体に関してアッセイすることが可能になる、本発明151記載の方法。

[本発明153]

他のE.カニス抗体が、gp36、gp19、gp28/30、およびgp200の抗体からなる群より選択される、本発明152記載の方法。

[本発明154]

(a)SEQ ID NO:17もしくはSEQ ID NO:19を含む、単離されたポリペプチド;

(b)(a)のポリペプチドと少なくとも70%同一である、単離されたポリペプチド;

(c)SEQ ID NO:13を含む、単離されたポリペプチド;

(d)SEQ ID NO:13と少なくとも70%同一である、単離されたポリペプチド;

(e)SEQ ID NO:16もしくはSEQ ID NO:18を含むポリヌクレオチド;

(f)ストリンジェントな条件下で(a)のポリヌクレオチドとハイブリダイズすることができるポリヌクレオチドであり、かつSEQ ID NO:17もしくはSEQ ID NO:19に対して少なくとも70%の同一性を有するポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチド;または

(g)SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:17、およびSEQ ID NO:19からなる群より選択されるアミノ酸配列の一つまたは複数と免疫学的に反応する、単離された抗体の組成物のうちの一つまたは複数を含むキット。

[本発明155]

前記組成物のうちの二つまたはそれ以上を含むとしてさらに定義される、本発明154記載のキット。

【図面の簡単な説明】

10

20

30

40

50

【 0 0 5 3 】

本発明をより完全に理解するために、添付の図面と共に以下の説明を行う。

【図 1】E. カニスgp19染色体位置と隣接する遺伝子 (bpでの大きさ) および遺伝子間領域 (bpでの大きさ) の略図を提供する。E. シャフェンシスvlptは同じ隣接遺伝子を有した。

【図 2】gp19チオ融合タンパク質に関する。(パネルA) ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) 後のE. カニスgp19 pBADチオ融合タンパク質の分子量 (~35kDa) (レーン1); M-BioRad精度分子量マーカー。(パネルB) 抗E. カニスイヌ血清 (#2995) と反応した、組換え型gp19チオ融合タンパク質 (レーン1) およびチオレドキシソ对照タンパク質 (13kDa) (レーン2) の対応するウエスタン免疫プロット。

【図 3】E. カニスgp19 (アミノ末端断片) (レーン2) およびE. カニスDsbタンパク質 (レーン1; 陰性对照) の糖質検出を示す。M = BioRad精度タンパク質標準物質; CCM = グリコシル化および非グリコシル化タンパク質の混合物 (グリコシル化タンパク質、42kDaおよび18kDa、非グリコシル化タンパク質、29kDaおよび14kDa) を含有するCandyCane糖タンパク質分子量標準物質。

【図 4】gp19に関連するウエスタンを示す。(パネルA) 抗E. カニスgp19血清 (レーン1) および抗E. カニスイヌ血清 (レーン2) によってプロービングしたE. カニス全細胞溶解物のウエスタン免疫プロット。抗E. カニスイヌ血清によってプロービングした感染DH82細胞溶解物 (レーン3)。(パネルB) 抗E. カニスgp19 (レーン1) および抗E. シャフェンシスイヌ血清 (レーン2) によってプロービングしたE. シャフェンシス全細胞溶解物。

【図 5】(上部) エピトープを含む領域N1-Cが含まれるE. カニス組換え型gp19断片の概略図を提供する。(パネルA) E. カニス組換え型gp19断片のSDS-PAGE (N1、レーン1; N2、レーン2; N末端、レーン3; およびC末端、レーン4; ならびにチオレドキシソ对照) および抗E. カニスイヌ血清によってプロービングした対応するウエスタン免疫プロット (パネルB)。

【図 6】ELISAによる、合成ペプチド (無グリコシル化) と比較した、イヌ抗E. カニス血清との組換え型gp19 (N1-Cエピトープ; グリコシル化) の免疫反応性 (上部) を示す。ELISAによって決定した、過ヨウ素酸塩による処置後のE. カニスgp19 (N1-Cエピトープ) と抗E. カニスイヌ血清との免疫反応性 (底部)。

【図 7】網状および高密度中心型の両方のエーリキアを含有するモルラにおけるE. カニスgp19局在の例示的な免疫金標識電子顕微鏡写真を示す。

【図 8】E. カニスgp19発現の例示的な共焦点免疫蛍光顕微鏡写真を示す。E. カニス感染細胞を、抗E. カニスgp19 (赤色; 左) および抗エーリキアDsb (緑色; 中心) によって二重染色して、画像を融合した (右)。

【図 9】ウエスタン免疫プロット (左) および対応するELISA (右) によって決定した、接種後0、7、14、21、28、35、および42日目の組換え型タンパク質5個、gp36 ()、gp19 ()、p28 ()、gp200N (x)、gp200C ()、およびチオレドキシソ对照 (+) に対する実験的に感染させたイヌ3匹 (A = イヌ33; B = イヌ34; およびC = イヌ44) におけるE. カニスに対するIgG抗体応答の動態を示す。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 5 4 】

発明の詳細な説明

I. 定義

長年にわたる特許法の協定に従って、特許請求の範囲を含む本明細書において、含むという用語と協調して用いられる場合の「一つの (a)」および「一つの (an)」という用語は、「一つまたは複数」を指す。本発明のいくつかの態様は、本発明の一つまたは複数の要素、方法の段階、および/または方法から本質的になってもよく、またはそれらからなる。本明細書に記述される任意の方法または組成物は、本明細書に記述される任意の他の方法または組成物に関して実行することができると企図される。

【 0 0 5 5 】

本明細書において用いられるように、「糖質」という用語は、炭素、水素、および酸素

10

20

30

40

50

を特に2H：1C：10の比率で含む組成物を指す。この用語には、例えば糖、デンプン、およびセルロースが含まれる。

【0056】

本明細書において用いられるように「エピトープ」という用語は、それに対して特異的抗体が結合する組成物の部位を指す。

【0057】

本明細書において用いられるように、「多糖類」と呼ばれることがある「グリカン」という用語は、加水分解によって二つまたはそれ以上の単糖類に分解されうる糖質を指す。言い換えれば、これは単純な糖（多価アルコールのアルデヒドまたはケトン誘導体）の鎖と呼ばれることがある。

10

【0058】

当技術分野において公知であるように「同一性」という用語は、配列を比較することによって決定されるように、二つもしくはそれ以上のポリペプチド分子、または二つもしくはそれ以上の核酸分子の配列間の関係を指す。当技術分野において、「同一性」はまた、場合によっては、二つもしくはそれ以上のヌクレオチド残基、または二つもしくはそれより多いアミノ酸残基の鎖の間のマッチ数によって決定される、核酸分子間、またはポリペプチド間の配列の関連性の程度を意味する。「同一性」は、特定の数学的モデルまたはコンピュータープログラム（すなわち、「アルゴリズム」）によって対処されるギャップアラインメント（もしあれば）と共に、より小さい二つまたはそれ以上の配列間の同一マッチのパーセントを測定する。

20

【0059】

本明細書において用いられるように、「免疫原性」という用語は、それ自体に対する免疫応答を誘発することができる組成物を指す。

【0060】

本明細書において用いられるように、「免疫応答」という用語は、抗原に対する抗体を作製することによる、抗原の存在に対する免疫系の反応を指す。さらに特定の態様において、抗原に対する免疫は、細胞レベルで、全身によって発生してもよく、抗原に対する過敏性が発生してもよく、および/またはその後の攻撃誘発（challenge）に対する寛容を発生してもよい。特定の態様において、免疫応答は、抗原分子を異物として同定して、抗体の形成を誘導するリンパ球、および抗原分子と反応してそれをより無害にすることができるリンパ球を必要とする。

30

【0061】

本明細書において用いられるように、「免疫反応性」という用語は、個体の血清からの抗体と反応する組成物を指す。特定の態様において、組成物は、それに結合することによる、および/またはそれと免疫学的に反応することによるように、抗体がそれを認識すれば免疫反応性である。

【0062】

本明細書において用いられるように、「ムチン」という用語は、N-アセチルガラクトサミン（GalNAc）によって一つまたは複数の高度にグリコシル化された糖タンパク質を指す。

40

【0063】

本明細書において用いられるように、「オルソログ」という用語は、一つの種におけるポリヌクレオチドに対応するもう一つの種からのポリヌクレオチドを指し；二つのポリヌクレオチドは、共通の先祖種（相同なポリヌクレオチド）を通して関連する。しかし、一つの種からのポリヌクレオチドは、他の種のポリヌクレオチドとは異なるように進化している。

【0064】

「類似性」という用語は、関連する概念であるが、「同一性」とは対照的に、同一のマッチと保存的置換マッチの両方が含まれる配列関係を指す。二つのポリペプチド配列が、例えば{分画（10/20）}の同一アミノ酸を有し、残りが全て非保存的置換である場合、同

50

一性および類似性(%)はいずれも、50%であると考えられる。同じ例において、保存的置換が存在する位置が5個より多く存在する場合、同一性(%)は、50%のままであるが、類似性(%)は75%になると考えられる(分画(15/20))。したがって、保存的置換が存在する場合には、二つのポリペプチド間の類似性の程度は、二つのポリペプチド間の同一性(%)より高いと考えられる。

【0065】

本明細書において用いられるように、「サブユニットワクチン」という用語は、生物全体に対立するものとしての、ポリペプチドまたはその断片が使用されるワクチンを指す。

【0066】

本明細書において用いられるように、「ワクチン」という用語は、攻撃誘発後に個体に免疫を提供する組成物を指す。

【0067】

本明細書において用いられる「病原因子」という用語は、特定の宿主種において、またはその内部で微生物が自身を確立させて、その病原性を増強することができる一つまたは複数の遺伝子産物を指す。例示的な病原因子には、例えば細菌の接着を媒介する細胞表面タンパク質、細菌を保護する細胞表面の糖質およびタンパク質、細菌毒素、ならびに細菌の病原性に寄与する可能性がある加水分解酵素が含まれる。

【0068】

本発明の実践は、別途示されている場合を除き、当業者の範囲内である分子生物学、微生物学、組換え型DNA等の従来技術を使用すると考えられる。そのような技術は、文献において十分に説明されている。例えば、Sambrook, Fritsch, and Maniatis, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, Second Edition (1989), OLIGONUCLEOTIDE SYNTHESIS (M. J. Gait Ed., 1984), ANIMAL CELL CULTURE (R. I. Freshney, Ed., 1987), the series METHODS IN ENZYMOLOGY (Academic Press, Inc.); GENE TRANSFER VECTORS FOR MAMMALIAN CELLS (J. M. Miller and M. P. Calos eds. 1987), HANDBOOK OF EXPERIMENTAL IMMUNOLOGY, (D. M. Weir and C. C. Blackwell, Eds.), CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Siedman, J. A. Smith, and K. Struhl, eds., 1987), CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY (J. E. Coligan, A. M. Kruisbeek, D. H. Margulies, E. M. Shevach and W. Strober, eds., 1991); ANNUAL REVIEW OF IMMUNOLOGY; と共にADVANCES IN IMMUNOLOGYのような雑誌の単行本を参照されたい。上記および下記の本明細書において言及した全ての特許、特許出願、および刊行物は、参照により本明細書に組み入れられる。

【0069】

II. 本発明の態様

本発明は、エーリキア種のタンパク質およびそれらをコードするポリヌクレオチドに関連する組成物および方法に関する。本発明の特定の局面においては、グリコシル化タンデムリピート上のエプトープに対して初期抗体応答を誘発するE.カニスおよびE.シャフェンシスの、異なるように発現され、分泌された主要な免疫反応性タンパク質オルソログが存在する。具体的に、本発明は、特定の態様において、エーリキア種からの一つまたは複数の糖タンパク質に関する。さらなる態様において、本発明は、gp19タンパク質であるエーリキア種からの糖タンパク質に関する。さらなる態様において、gp19タンパク質は、E.カニスのタンパク質である。

【0070】

エーリキア・カニスは、感染したイヌにおいて初期エーリキア特異的抗体応答を誘発する19kDaタンパク質が含まれる主要な免疫反応性タンパク質の小さいサブセットを有する。本発明は、E.シャフェンシスの多様な長さのPCR標的(VLPT)タンパク質のこの高度に保存された19kDaの主要な免疫反応性糖タンパク質(gp19)オルソログの同定および分子特徴付けに関する。E.カニスgp19は、E.シャフェンシスVLPTと実質的なカルボキシ末端アミノ酸相同性(59%)および同じ染色体位置を有する;しかしE.シャフェンシスvlpt遺伝子(594 bp)は、E.カニスgp19(414-bp)には存在しないタンデムリピートを有する。他

10

20

30

40

50

のエーリキア糖タンパク質と一致して、gp19は、予想質量（～3kDa）より大きい質量を示した。O-連結グリコシル化部位は、アミノ末端のセリン/トレオニン/グルタミン酸（STE）に富むパッチ（アミノ酸24個）において予測され、糖質は、組換え型gp19において検出され、ならびに中性糖グルコースおよびキシロースは組換え型アミノ末端領域において検出された。E.カニスgp19組成物は、優勢なアミノ酸5個、すなわちシステイン、グルタミン酸、チロシン、セリン、およびトレオニンを含み、これらはSTEに富むパッチにおいて濃縮され、カルボキシ末端テール内ではシステインおよびチロシンが優勢（55%）である。アミノ末端のSTEに富むパッチは、E.カニスに感染したイヌからの血清によって強く認識される主要な種特異的抗体エピトープを含んだ。例示的な組換え型グリコペプチドエピトープは、例示的な合成（非グリコシル化）ペプチドより抗体と実質的に反応性であり、組換え型グリコペプチドエピトープの過ヨウ素酸塩処置は、その免疫原性を低減させ、糖質が、免疫決定因子の一部として有用であることを示している。gp19は、網状細胞および高密度中心細胞に存在し、原線維マトリクスにおいて細胞外に見い出され、モルラ膜に会合した。

【0071】

本発明のいくつかの態様は、E.カニスに曝露される前の被験体、またはE.カニスに曝露されたこともしくはE.カニスに感染していることが疑われる被験体を同定する段階、およびE.カニス感染症を抑制するのに有効な量のE.カニスの19kDa抗原を含む組成物を投与する段階を含む、被験体におけるE.カニス感染症を抑制する方法に向けられる。抑制は、例えば被験体の液性または細胞性免疫応答の刺激などの任意の手段を通して、または19kDa抗原の通常の機能を抑制する、例えば被験体の体内でいくつかの物質との相互作用に関して抗原と競合する、もしくはその組み合わせのような他の手段によって行ってもよい。

【0072】

本発明はまた、化合物がターゲティング部分と治療部分とを含み、およびターゲティング部分がgp19タンパク質に対して特異的である、化合物を個体に投与する段階を含む、個体に対する標的化治療の方法に向けられる。一定の局面において、ターゲティング部分は、gp19に対して特異的な抗体、またはgp19に結合するリガンドもしくはリガンド結合ドメインである。同様に、治療部分は、例えば放射性同位元素、毒素、化学療法剤、免疫刺激剤、細胞障害剤、または抗生物質を含んでもよい。

【0073】

本発明の他の態様は、例えばgp19組成物（E.カニスに関する）に対する抗体に関して、血液または血清のような哺乳動物からの試料をアッセイすることによる、哺乳動物におけるエーリキア感染症の診断に関する。

【0074】

III. E.カニスgp19アミノ酸組成物

本発明は、E.カニスgp19を含むポリペプチドまたはペプチドに関する。簡潔にするために、以下の章は、ポリペプチドおよびペプチドを含む本発明の任意のE.カニスgp19アミノ酸組成物について言及する。

【0075】

特定の態様において、ポリペプチドは、組換え型ポリペプチドであってもよく、または例えば天然から単離および/または精製されてもよい。特定の局面において、アミノ酸配列は核酸配列によってコードされる。ポリペプチドは、特定の態様において、抗原として有用である。他の特定の態様において、ペプチドは、例えば合成によって生成されてもよく、またはオリゴヌクレオチドによってコードされてもよい。ペプチドは、特定の態様において抗原として有用である。

【0076】

本発明はまた、プロモーターに機能的に連結したアミノ酸配列をコードする配列を含む発現構築物を含むベクターを得る段階；ベクターを細胞にトランスフェクションする段階；および発現構築物の発現にとって有効な条件で細胞を培養する段階を含む、組換え型ポリペプチドを産生する方法にも向けられる。アミノ酸配列は、代替の態様において、合成

10

20

30

40

50

によって生成されてもよい。

【0077】

「実質的に純粋なタンパク質」とは、それが天然に伴うそれらの成分の少なくともいくつかから分離されているタンパク質を意味する。例えば、天然起源からの抽出によって；免疫反応性組成物をコードする組換え型核酸の発現によって；または例えばタンパク質の化学合成によって、実質的に純粋な免疫反応性組成物を得てもよい。したがって、実質的に純粋なタンパク質には、それらが天然に存在しない大腸菌、他の原核細胞、または他の任意の生物において合成されたタンパク質が含まれる。

【0078】

このように、一定の態様において、本発明は、少なくとも一つのタンパク質様分子を含む新規組成物に関する。本明細書において用いられるように、「タンパク質様分子」、「タンパク質様組成物」、「タンパク質様化合物」、「タンパク質様鎖」、または「タンパク質様材料」は一般的に、アミノ酸約130個より大きいタンパク質、または遺伝子から翻訳された完全長の内因性の配列；アミノ酸が約100個より多いポリペプチド；および/またはアミノ酸約3～約100個のペプチドを指すが、これらに限定されない。上述の「タンパク質様」という用語は全て、本明細書において互換的に用いられる可能性がある。

10

【0079】

一定の態様において、少なくとも一つのタンパク質様分子の大きさは、約1、約2、約3、約4、約5、約6、約7、約8、約9、約10、約11、約12、約13、約14、約15、約16、約17、約18、約19、約20、約21、約22、約23、約24、約25、約26、約27、約28、約29、約30、約31、約32、約33、約34、約35、約36、約37、約38、約39、約40、約41、約42、約43、約44、約45、約46、約47、約48、約49、約50、約51、約52、約53、約54、約55、約56、約57、約58、約59、約60、約61、約62、約63、約64、約65、約66、約67、約68、約69、約70、約71、約72、約73、約74、約75、約76、約77、約78、約79、約80、約81、約82、約83、約84、約85、約86、約87、約88、約89、約90、約91、約92、約93、約94、約95、約96、約97、約98、約99、約100、約110、約120、約130個またはそれ以上のアミノ酸残基、およびそれから誘導可能な任意の範囲を含んでもよいが、それらに限定されない。

20

【0080】

本明細書において用いられるように、「アミノ酸分子」は、当業者に公知であると考えられる任意のポリペプチド、ポリペプチド誘導體、またはポリペプチド模倣体を指す。一定の態様においては、タンパク質様分子の残基は連続的であり、いかなる非アミノ酸分子もアミノ酸分子の残基の配列を中断しない。他の態様においては、配列は一つまたは複数の非アミノ酸分子部分を含んでもよい。特定の態様においては、タンパク質様分子の残基の配列は、一つまたは複数の非アミノ酸分子部分によって中断されてもよい。

30

【0081】

したがって、「タンパク質様組成物」という用語は、以下の表1において示されるものが含まれるがこれらに限定されない、天然に合成されるタンパク質における一般的アミノ酸20個の少なくとも一つを含む、または少なくとも一つの修飾アミノ酸もしくは非通常アミノ酸を含むアミノ酸分子配列を包含する。

【0082】

(表1) 修飾アミノ酸および非通常アミノ酸

40

略称	アミノ酸	略称	アミノ酸
Aad	2-アミノアジピン酸	EtAsn	N-エチルアスパラギン
Baad	3-アミノアジピン酸	Hyl	ヒドロキシリジン
Bala	β -アラニン、 β -アミノプロピオン酸	AHyl	アロ-ヒドロキシリジン
Abu	2-アミノ酪酸	3Hyp	3-ヒドロキシプロリン
4Abu	4-アミノ酪酸、ペペリジン酸	4Hyp	4-ヒドロキシプロリン
Acp	6-アミノカブロン酸	Ide	イソデスモシン
Ahe	2-アミノヘプタン酸	Alle	アロ-イソロイシン
Aib	2-アミノイソ酪酸	MeGly	N-メチルグリシン、 サルコシン
Baib	3-アミノイソ酪酸	Melle	N-メチルイソロイシン
Apm	2-アミノピメリン酸	MeLys	6-N-メチルリジン
Dbu	2,4-ジアミノ酪酸	MeVal	N-メチルバリン
Des	デスモシン	Nva	ノルバリン
Dpm	2,2'-ジアミノピメリン酸	Nle	ノルロイシン
Dpr	2,3-ジアミノプロピオン酸	Orn	オルニチン
EtGly	N-エチルグリシン		

10

20

【0083】

一定の態様において、タンパク質様組成物は、少なくとも一つのタンパク質、ポリペプチド、またはペプチドを含む。さらなる態様において、タンパク質様組成物は、生物学的適合性のタンパク質、ポリペプチド、またはペプチドを含む。本明細書において用いられるように、「生物学的適合性」という用語は、本明細書に記述される方法および量に従って、所定の生物に適用または投与された場合に、有意な不都合な効果を生じない物質を指す。そのような不都合な、または望ましくない効果は、有意な毒性または有害な免疫反応のような効果である。

30

【0084】

タンパク質様組成物は、標準的な分子生物学技術を通してのタンパク質、ポリペプチド、またはペプチドの発現、天然起源からのタンパク質様化合物の単離、または例えばタンパク質様材料の化学合成が含まれる、当業者に公知の任意の技術によって作製されてもよい。様々な遺伝子に関するヌクレオチドおよびタンパク質、ポリペプチド、およびペプチド配列が、既に開示されており、当業者に公知のコンピューター化データベースにおいて見い出される可能性がある。そのようなデータベースの二つは、例えばthe National Center for Biotechnology Information's GenBank（登録商標）およびGenPeptデータベースである。これらの公知の遺伝子に関するコード領域は、本明細書において開示される技術を用いて、または当業者に公知であるように、増幅および/または発現されてもよい。または、タンパク質、ポリペプチド、およびペプチドの様々な市販の調製物が、当業者に公知である。

40

【0085】

一定の態様において、タンパク質様化合物は精製されてもよい。一般的に「精製された」とは、様々な他のタンパク質、ポリペプチド、およびペプチドを除去するために分画に供されている特異的タンパク質、ポリペプチド、またはペプチド組成物を指し、組成物は

50

、特異的または所望のタンパク質、ポリペプチド、またはペプチドに関して当業者に公知であるような、例えばタンパク質アッセイによって評価されうるような、その活性を実質的に保持する。精製タンパク質様組成物における保持に関して評価される可能性がある例示的な活性は、鉄結合活性および免疫反応性である。

【0086】

本発明の特定の態様において、ポリペプチドは標識され、任意の検出可能な標識が本発明において適している。標識は、例えばアミノ酸残基のN末端、C末端、または側鎖におけるポリペプチドに付着してもよい。一つまたは複数の標識を使用してもよい。例示的な標識には、放射活性標識、蛍光標識、比色定量標識等が含まれた。特定の態様において、標識はポリペプチドに共有結合的に付着される。

10

【0087】

IV. E. カニスgp19核酸組成物

本発明の一定の態様は、E. カニスgp19核酸に関する。簡潔にするために、以下の章は、本発明の任意のE. カニスgp19核酸組成物について言及する。

【0088】

一定の局面において、核酸は、野生型または変異型核酸を含む。特定の局面において、核酸は、転写された核酸をコードするかまたは含む。他の局面において、核酸は核酸セグメントまたはその生物機能同等物を含む。特定の局面において、核酸は、タンパク質、ポリペプチド、またはペプチドをコードする。

【0089】

「核酸」という用語は当技術分野において周知であり、本明細書において「ポリヌクレオチド」という用語と互換的に用いられる可能性がある。本明細書において用いられる「核酸」は一般的に、DNA、RNAまたは核酸塩基を含むその誘導体もしくは類似体の分子（すなわち、鎖）を指す。核酸塩基には、例えばDNA（例えばアデニン「A」、グアニン「G」、チミン「T」、またはシトシン「C」）またはRNA（例えば、A、G、およびウラシル「U」、またはC）において見い出される天然に存在するプリンまたはピリミジン塩基が含まれる。「核酸」という用語は、それぞれ「核酸」という用語の亜属としての「オリゴヌクレオチド」および「ポリヌクレオチド」という用語を包含する。「オリゴヌクレオチド」という用語は、核酸塩基約3～約100個の間の長さの分子を指す。「ポリヌクレオチド」という用語は、長さが核酸塩基約100個より長い少なくとも一つの分子を指す。

20

【0090】

これらの定義は一般的に一本鎖分子を指すが、特定の態様において、一本鎖分子と部分的、実質的、または完全に相補的であるさらなる鎖を包含すると考えられる。このように、核酸は、分子を含む特定の配列の一つまたは複数の相補鎖または「相補体」を含む二本鎖分子、または三本鎖分子を包含してもよい。本明細書において用いられるように、一本鎖核酸は、接頭辞「ss」によって示されてもよく、二本鎖核酸は接頭辞「ds」によって示されてもよく、および三本鎖核酸は接頭辞「ts」によって示されてもよい。

30

【0091】

A. 核酸塩基

本明細書において用いられるように、「核酸塩基」とは、例えば少なくとも一つの天然の核酸（すなわち、DNAおよびRNA）、ならびにそのような核酸塩基の天然または非天然の誘導体および類似体において見い出される、天然の核酸塩基（すなわち、A、T、G、C、またはU）のような複素環塩基を指す。核酸塩基は一般的に、天然の核酸塩基対形成（例えばAとT、GとC、およびAとUの間の水素結合）の代わりとなるように、少なくとも一つの天然の核酸塩基と一つまたは複数の水素結合（「アニール」または「ハイブリダイズ」）を形成することができる。

40

【0092】

「プリン」および/または「ピリミジン」核酸塩基は、天然に存在するプリンおよび/またはピリミジン核酸塩基を包含し、同様にアルキル、カルボキシアルキル、アミノ、ヒドロキシル、ハロゲン（すなわち、フルオロ、クロロ、ブロモ、またはヨード）、チオー

50

ル、またはアルキルチオール部分の一つまたは複数によって置換されたプリンまたはピリミジンが含まれるがこれらに限定されるわけではないその誘導体および類似体を包含する。好ましいアルキル（例えば、アルキル、カルボキシアルキル等）部分は、炭素原子約1個、約2個、約3個、約4個、約5個～約6個を含む。プリンまたはピリミジンの他の非制限的な例には、デアザプリン、2,6-ジアミノプリン、5-フルオロウラシル、キサンチン、ヒポキサンチン、8-ブロモグアニン、8-クロログアニン、プロモチミン、8-アミノグアニン、8-ヒドロキシグアニン、8-メチルグアニン、8-チオグアニン、アザグアニン、2-アミノプリン、5-エチルシトシン、5-メチルシトシン、5-ブロモウラシル、5-エチルウラシル、5-ヨードウラシル、5-クロロウラシル、5-プロピルウラシル、チオウラシル、2-メチルアデニン、メチルチオアデニン、N,N-ジメチルアデニン、アザアデニン、8-ブロモアデニン、8-ヒドロキシアデニン、6-ヒドロキシアミノプリン、6-チオプリン、4-(6-アミノヘキシル/シトシン)等が含まれる。

【0093】

核酸塩基は、本明細書に記述されるまたは当業者に公知の任意の化学または天然の合成法を用いてヌクレオシドまたはヌクレオチドに含まれてもよい。

【0094】

B. ヌクレオシド

本明細書において用いられるように、「ヌクレオシド」は、核酸塩基リンカー部分に共有結合的に付着した核酸塩基を含む個々の化学単位を指す。「核酸塩基リンカー部分」の非制限的な例は、炭素原子5個を含む糖（すなわち、「五炭糖」）であり、デオキシリボース、リボース、アラビノース、または五炭糖の誘導体もしくは類似体が含まれるがこれらに限定されるわけではない。五炭糖の誘導体または類似体の非制限的な例には、炭素が糖環における酸素原子に置換されている2'-フルオロ-2'-デオキシリボース、または炭素環等が含まれる。

【0095】

核酸塩基リンカー部分に対する核酸塩基の、異なるタイプの共有結合的付着が当技術分野において公知である。非制限的な例として、プリン（すなわち、AまたはG）または7-アザプリン核酸塩基を含むヌクレオシドは典型的に、プリンまたは7-デアザプリンの9位を五炭糖の1'位に共有結合的に付着させる。もう一つの非制限的な例において、ピリミジン核酸塩基（すなわち、C、T、またはU）を含むヌクレオシドは典型的に、ピリミジンの1位を五炭糖の1'位に共有結合的に付着させる（Kornberg and Baker, 1992）。

【0096】

C. ヌクレオチド

本明細書において用いられるように、「ヌクレオチド」は、「骨格部分」をさらに含むヌクレオシドを指す。骨格部分は一般的に、ヌクレオチドを含むもう一つの分子またはもう一つのヌクレオチドにヌクレオチドを共有結合的に付着させて、核酸を形成する。天然に存在するヌクレオチドにおける「骨格部分」は、典型的に五炭糖に共有結合的に付着するリン部分を含む。骨格部分の付着は典型的に、五炭糖の3'または5'位のいずれかで起こる。しかし、特にヌクレオチドが天然に存在する五炭糖またはリン部分の誘導体または類似体を含む場合には、他のタイプの付着が当技術分野において公知である。

【0097】

D. 核酸類似体

核酸は、天然に存在する核酸に存在する可能性がある核酸塩基、核酸塩基リンカー部分、および/または骨格部分の誘導体または類似体を含んでもよく、または完全にそれらで構成されてもよい。本明細書において用いられるように、「誘導体」は、天然に存在する分子の化学改変または変化型を指すが、「模倣体」または「類似体」という用語は、天然に存在する分子または部分に構造的に類似する、または類似しなくてもよいが類似の機能を保有する分子を指す。本明細書において用いられるように、「部分」は一般的に大きい化学または分子構造の、より小さい化学または分子成分を指す。核酸塩基、ヌクレオシド、およびヌクレオチド類似体または誘導体は当技術分野において周知であり、記述されて

10

20

30

40

50

いる（例えば、参照により本明細書に組み入れられるScheit, 1980を参照されたい）。

【0098】

五炭糖および/または骨格部分の誘導体または類似体を含むヌクレオシド、ヌクレオチド、または核酸のさらなる非制限的な例には、dsDNAと3本ヘリックスを形成するおよび/またはdsDNAの発現を防止するプリン誘導体を含むオリゴヌクレオチドを記述する米国特許第5,681,947号；特に蛍光核酸プローブとして用いるためのDNAおよびRNAにおいて見いだされるヌクレオシドの蛍光類似体を組み入れている核酸を記述する米国特許第5,652,099号および第5,763,167号；増強されたヌクレアーゼ安定性を保有するピリミジン環における置換を有するオリゴヌクレオチド類似体を記述する米国特許第5,614,617号；核酸検出において用いられる修飾五炭糖（すなわち、修飾2'-デオキシフラノシル部分）を有するオリゴヌクレオチド類似体を記述する米国特許第5,670,663号、第5,872,232号、および第5,859,221号；ハイブリダイゼーションアッセイにおいて用いることができる水素以外の置換基による4'位置で置換された少なくとも一つの五炭糖部分を含むオリゴヌクレオチドを記述する米国特許第5,446,137号；3'-5'ヌクレオチド間連結を有するデオキシリボヌクレオチドと2'-5'ヌクレオチド間連結を有するリボヌクレオチドの両方を有するオリゴヌクレオチドを記述する米国特許第5,886,165号；核酸のヌクレアーゼ耐性を増強するために、ヌクレオチド間連結の3'位の酸素が炭素によって置換されている修飾ヌクレオチド間連結を連結を記述する米国特許第5,714,606号；ヌクレアーゼ耐性を増強する一つまたは複数の5'メチレンホスホネートヌクレオチド間連結を含有するオリゴヌクレオチドを記述する米国特許第5,672,697号；ヌクレアーゼ安定性および薬物または検出部分の送達能を提供するためにオリゴヌクレオチドの2'炭素に対する薬物または標識を含んでもよい置換基部分の連結を記述する米国特許第5,466,786号および第5,792,847号；細胞の取り込み、ヌクレアーゼに対する耐性、および標的RNAとのハイブリダイゼーションを増強するために、隣接五炭糖部分の4'位および3'位を付着させる2または3炭素骨格連結を有するオリゴヌクレオチド類似体を記述する米国特許第5,223,618号；核酸ハイブリダイゼーションプローブとして有用である少なくとも一つのスルファメートまたはスルファミドヌクレオチド間連結を含むオリゴヌクレオチドを記述する米国特許第5,470,967号；改善されたヌクレアーゼ耐性、細胞取り込みおよびRNA発現の調節のために用いられるホスホジエステル骨格部分を置換する3または4原子リンカー部分を有するオリゴヌクレオチドを記述する米国特許第5,378,825号、第5,777,092号、第5,623,070号、第5,610,289号、および第5,602,240号；その膜透過性および安定性を増強するために、オリゴヌクレオチドの2'-O位に付着した疎水性担体物質を記述する米国特許第5,858,988号；DNAまたはRNAに対するハイブリダイゼーションの増強、ヌクレアーゼに対する安定性の増強を保有する、5'末端でアントラキノンに結合したオリゴヌクレオチドを記述する米国特許第5,214,136号；増強されたヌクレアーゼ耐性、結合親和性、およびRNアーゼHの活性化能のためにDNAが2'-デオキシ-エリスロ-ペントフラノシルヌクレオチドを含む、PNA-DNA-PNAキメラを記述する米国特許第5,700,922号；ならびにDNA-RNAハイブリッドを形成するためにDNAに連結したRNAを記述する米国特許第5,708,154号における例が含まれる。

【0099】

E. ポリエーテルおよびペプチド核酸

一定の態様においては、ヌクレオシドまたはヌクレオチドの誘導体または類似体を含む核酸を本発明の方法および組成物において用いてもよいと企図される。非制限的な例は、参照により本明細書に組み入れられる米国特許第5,908,845号に記述される「ポリエーテル核酸」である。ポリエーテル核酸において、一つまたは複数の核酸塩基は、ポリエーテル骨格におけるキラル炭素原子に連結する。

【0100】

もう一つの非制限的な例は、そのそれぞれが参照により本明細書に組み入れられる、米国特許第5,786,461号、第5891,625号、第5,773,571号、第5,766,855号、第5,736,336号、第5,719,262号、第5,714,331号、第5,539,082号、およびWO 92/20702に記述される「PNA」、「ペプチドに基づく核酸類似体」、または「PENAM」として知られる「ペプチド核酸

」である。ペプチド核酸は一般的に、DNAおよびRNAのような分子と比較して増強された配列特異性、結合特性、および酵素的分解に対する耐性を有する (Egholm et al., 1993; PCT/EP/01219)。ペプチド核酸は一般的に、核酸塩基部分、五炭糖ではない核酸塩基リンカー部分、および/またはリン酸骨格部分ではない骨格部分を含む一つまたは複数のヌクレオチドまたはヌクレオシドを含む。PNAに関して記述される核酸塩基リンカー部分の例には、アザ窒素原子、アミド、および/またはウレイド係留 (tether) が含まれる (例えば、米国特許第5,539,082号を参照されたい)。PNAに関して記述される骨格部分の例には、アミノエチルグリシン、ポリアミド、ポリエチル、ポリチオアミド、ポリスルホンアミド (polysulfonamide)、またはポリスルホンアミド骨格部分が含まれる。

【0101】

一定の態様において、ペプチド核酸のような核酸類似体は、米国特許第5891,625号に記述されるように、偽陽性を低減させて一塩基変異体を区別するために、PCRにおけるような核酸増幅を抑制するために用いられてもよい。核酸類似体の他の修飾および使用は、当技術分野において公知であり、gp36ポリヌクレオチドによって包含される。非制限的な例において、米国特許第5,786,461号は、分子の溶解度を増強するためにPNA骨格にアミノ酸側鎖が付着したPNAを記述する。もう一つの例において、PNAの細胞取り込み特性は、脂肪親和性基の付着によって増加する。米国特許出願公開第117,363号は、PNAの細胞取り込みを増強するために用いられるいくつかのアルキルアミノ部分を記述する。もう一つの例は、天然に存在する核酸と比較して配列特異性、溶解度および/または結合親和性の改善を提供する天然および非天然の核酸塩基およびアルキルアミン側鎖を含むPNAを記述する米

【0102】

F. 核酸の調製

核酸は、例えば化学合成、酵素産生、または生物学的産生のような、当業者に公知の任意の技術によって作製してもよい。合成核酸の非制限的な例 (例えば、合成オリゴヌクレオチド) には、ホスホトリエステル、ホスファイト、またはホスホラミダイト化学を用いるインビトロ化学合成によって、および参照により本明細書に組み入れられるEP 266,032に記述されるような固相技術によって、またはそのそれぞれが参照により本明細書に組み入れられる、Froehler et al., 1986および米国特許第5,705,629号によって記述されるようなデオキシヌクレオシドH-ホスホネート中間体によって作製された核酸が含まれる。本発明の方法において、一つまたは複数のオリゴヌクレオチドを用いてもよい。オリゴヌクレオチド合成の様々な異なる機構が、例えばそのそれぞれが参照により本明細書に組み入れられる、米国特許第4,659,774号、第4,816,571号、第5,141,813号、第5,264,566号、第4,959,463号、第5,428,148号、第5,554,744号、第5,574,146号、第5,602,244号において開示されている。

【0103】

酵素により産生された核酸の非制限的な例には、PCR (商標) のような増幅反応において酵素によって産生された核酸 (例えば、それぞれが参照により本明細書に組み入れられる、米国特許第4,683,202号および米国特許第4,682,195号を参照されたい)、または参照により本明細書に組み入れられる、米国特許第5,645,897号に記述されるオリゴヌクレオチドの合成によって産生された核酸が含まれる。生物学的に産生された核酸の非制限的な例には、細菌において複製される組換え型DNAベクターのような、生きている細胞において産生された (すなわち複製された) 組換え型核酸が含まれる (例えば、参照により本明細書に組み入れられる、Sambrook et al., 1989を参照されたい)。

【0104】

G. 核酸の精製

核酸をポリアクリルアミドゲル、塩化セシウム勾配遠心分離、または当業者に公知の任意の他の手段によって精製してもよい (例えば、参照により本明細書に組み入れられる、Sambrook et al., 1989を参照されたい)。

10

20

30

40

50

【0105】

一定の局面において、本発明は、単離された核酸である核酸に関する。本明細書において用いられるように、「単離された核酸」という用語は、一つまたは複数の細胞の総ゲノムおよび転写された核酸のバルクを含まずに単離されている、またはそうでなければそれらを含まない核酸分子（例えば、RNAまたはDNA分子）を指す。一定の態様において、「単離された核酸」は、細胞成分のバルク、または脂質もしくはタンパク質のような高分子、小さい生体分子等のようなインビトロ反応成分を含まずに、単離されているか、またはそうでなければそれらを含まない核酸を指す。

【0106】

H. 核酸セグメント

一定の態様において、核酸は核酸セグメントである。本明細書において用いられるように、「核酸セグメント」という用語は、例えば非制限的な例に関して、ペプチドまたはポリペプチド配列のごく一部をコードする核酸のような、核酸のより小さい断片である。このように、「核酸セグメント」は、ペプチドまたはポリペプチドコード領域の約2ヌクレオチドから全長までの遺伝子配列の任意の部分を含んでもよい。

【0107】

様々な核酸セグメントは、特定の核酸配列に基づいて設計されてもよく、任意の長さのセグメントであってもよい。例えば配列に数値を割付することによって、第一の残基は1、第二の残基は2などであり、全ての核酸セグメントを定義するアルゴリズムを作製することができる。

n から $n+y$

n が1から配列の最後の数までの整数であって、 y が核酸セグメントマイナス1の長さである場合、 $n+y$ は、配列の最後の数を超えない。このように、10量体の場合、核酸セグメントは、塩基1~10、2~11、3~12位などに対応する。15量体の場合、核酸セグメントは塩基1~15、2~16、3~17位などに対応する。20量体の場合、核酸セグメントは塩基1~20、2~21、3~22位などに対応する。一定の態様において、核酸セグメントはプローブまたはプライマーであってもよい。本明細書において用いられるように、「プローブ」は一般的に、検出法または組成物において用いられる核酸を指す。本明細書において用いられるように、「プライマー」は一般的に、伸長または増幅法または組成物において用いられる核酸を指す。

【0108】

I. 核酸相補体

本発明はまた、一つまたは複数の他の核酸と相補的である核酸を包含する。特定の態様において、例えば、核酸は、ポリヌクレオチドの発現を少なくとも部分的に抑制するために、アンチセンスまたはsiRNAの目的のために使用される。

【0109】

特定の態様において、本発明は、例えば本明細書に記載される配列と相補的な核酸または核酸セグメントを包含する。核酸は、標準的なワトソン-クリック、フーグスティーン、または逆フーグスティーン結合相補性規則に従ってもう一つの核酸と塩基対を形成することができる場合、もう一つの核酸に対して「相補体」または「相補的」である。本明細書において用いられるように、「もう一つの核酸」は、異なる分子または同じ分子の空間的に離れた分子を指してもよい。

【0110】

本明細書において用いられるように、「相補的」または「相補体」という用語はまた、たとえ全核酸塩基が相対物の核酸塩基と塩基対を形成するわけではない場合であっても、もう一つの核酸鎖または二本鎖とハイブリダイズすることができる連続的核酸塩基または半連続的核酸塩基の配列（例えば、一つまたは複数の核酸塩基部分が分子に存在しない）を含む核酸を指す。一定の態様において、「相補的な」核酸は、核酸塩基配列の約70%、約71%、約72%、約73%、約74%、約75%、約76%、約77%、約77%、約78%、約79%、約80%、約81%、約82%、約83%、約84%、約85%、約86%、約87%、約88%、約89%、

10

20

30

40

50

約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%から約100%、およびそれに由来する任意の範囲が、ハイブリダイゼーションの間に一本鎖または二本鎖核酸分子と塩基対を形成することができる配列を含む。一定の態様において、「相補的」という用語は、当業者によって理解されるように、ストリンジェントな条件でもう一つの核酸鎖または二本鎖とハイブリダイズする可能性がある核酸を指す。

【0111】

一定の態様において、「部分的に相補的な」核酸は、低ストリンジェンシー条件で一本鎖または二本鎖核酸とハイブリダイズする可能性がある配列を含み、または核酸塩基配列の約70%未満が、ハイブリダイゼーションの際に一本鎖または二本鎖核酸と塩基対を形成することができる配列を含有する。

【0112】

J. ハイブリダイゼーション

本明細書において用いられるように、「ハイブリダイゼーション」、「ハイブリダイズする」、「ハイブリダイズすることができる」とは、二本鎖もしくは三本鎖分子または部分的二本鎖もしくは三本鎖の性質を有する分子を形成することができることを意味すると理解される。本明細書において用いられるように、「アニール」という用語は、「ハイブリダイズ」と同義である。「ハイブリダイゼーション」、「ハイブリダイズする」、「ハイブリダイズすることができる」という用語は、「ストリンジェントな条件」、または「高ストリンジェンシー」という用語、および「低ストリンジェンシー」、または「低ストリンジェンシー条件」という用語を包含する。

【0113】

本明細書において用いられるように、「ストリンジェントな条件」または「高ストリンジェンシー」は、相補的配列を含有する一つまたは複数の核酸鎖の間、またはその中のハイブリダイゼーションを可能にするが、無作為な配列のハイブリダイゼーションを排除する条件である。ストリンジェントな条件は、もしあるとしても僅かしか、核酸と標的鎖の間のミスマッチを認容しない。そのような条件は当業者に周知であり、高い選択性を必要とする応用にとって好ましい。非制限的な適用には、遺伝子またはその核酸セグメントのような核酸を単離する段階、または少なくとも一つの特異的mRNA転写物もしくはその核酸セグメントを検出する段階等が含まれる。

【0114】

ストリンジェントな条件は、例えば約0.02 M~約0.15 M NaCl、例えば温度約50 ~約70 によって提供されるような低塩および/または高温条件を含んでもよく、該ストリンジェントな条件は、50~65 、5×SSPC、50%ホルムアミドでのハイブリダイゼーション ; 50~65 、5×SSPCでの洗浄、または60 、0.5×SSC、0.1%SDSでの洗浄である。所望のストリンジェンシーの温度およびイオン強度は部分的に、特定の核酸の長さ、標的配列の長さおよび核酸塩基含有量、核酸の電荷組成、ならびにハイブリダイゼーション混合物中のホルムアミド、塩化テトラメチルアンモニウム、または他の溶媒の存在もしくは濃度によって決定されると理解される。

【0115】

同様に、ハイブリダイゼーションに関するこれらの範囲、組成物、および条件は、非制限的な例のみによって言及され、特定のハイブリダイゼーション反応に関する所望のストリンジェンシーは、一つまたは複数の陽性または陰性対照との比較によってしばしば経験的に決定されると理解される。想像される応用に応じて、標的配列に向けて様々な程度の核酸の選択性を達成するために多様なハイブリダイゼーション条件を使用することが好ましい。非制限的な例において、ストリンジェントな条件下で核酸とハイブリダイズしない関連する標的核酸の同定または単離は、低温および/または高いイオン強度でのハイブリダイゼーションによって達成される可能性がある。そのような条件は、「低ストリンジェンシー」または「低ストリンジェンシー条件」と呼ばれ、低ストリンジェンシーの非制限的な例には、約0.15 M~約0.9 M NaClで、約20 ~約50 の温度範囲で行われるハイブリダイゼーションが含まれる。当然、特定の応用に適合させるために低または高ストリンジ

10

20

30

40

50

エンシー条件をさらに改変することは当業者の範囲内である。

【0116】

V. 核酸に基づく発現系

特定の態様において、本発明は、免疫反応性エーリキアポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに関し、同様にポリペプチドをコードするポリヌクレオチドまたはそのコードされる産物を、エーリキアに感染した個体および/またはエーリキアに感染していることが疑われる個体のような、その必要がある個体に送達する段階が含まれる。簡潔にするために、以下の章は、本発明の任意のE. カニスgp19核酸組成物および/または核酸に基づく発現系について言及する。

【0117】

本発明は、免疫反応性エーリキア組成物をコードする実質的に純粋なおよび/または単離されたDNA配列に向けられる。一般的に、コードされるタンパク質は、N末端配列を含み、これは翻訳後修飾の後に切断されて、成熟タンパク質を産生する可能性がある。

【0118】

遺伝子コードの縮重(すなわち、ほとんどのアミノ酸に関して、一つのアミノ酸に関して一つより多いヌクレオチドトリプレット(コドン)コードが存在する)のために、異なるヌクレオチド配列が特定のアミノ酸またはポリペプチドをコードしうることは当技術分野において周知である。このように、本発明のポリヌクレオチド配列には、例えば提供された例示的な配列またはそのような配列の縮重変種のいかなるものも含まれる。本発明の特定の局面において、縮重変種は、本発明の配列と同一ではないが、本発明の配列の1つまたは複数の特性をなおも保持している配列を含む。

【0119】

本明細書において用いられるように、「実質的に純粋なDNA」は、その環境のいくつかのまたは全ての分子が分離(部分的または完全な精製)されているために、または特許請求されるDNAに隣接する配列の変化のために、そのDNAが天然に存在している環境の一部とはならないDNAを意味する。したがってこの用語には、例えばベクターに、自立的に複製するプラスミドもしくはウイルスに、または原核生物もしくは真核生物のゲノムDNAに組み入れられる、または他の配列とは無関係な異なる分子(例えば、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)または制限エンドヌクレアーゼ消化によって産生されたcDNA、またはゲノムもしくはcDNA断片)として存在する、組換え型DNAが含まれる。同様に、さらなるポリペプチド配列、例えば融合タンパク質をコードするハイブリッド遺伝子の一部である組換え型DNAも含まれる。

【0120】

本発明はさらに、免疫反応性エーリキア組成物をコードするポリヌクレオチドを含み、ベクターが細胞に導入されるとポリヌクレオチドを発現することができる発現ベクターに向けられる。特定の態様において、ベクターは、以下を機能的に連結して含む:(a)複製開始点;(b)プロモーター;および(c)タンパク質をコードするDNA配列。

【0121】

本明細書において用いられるように、「ベクター」は、複製可能な核酸構築物として、例えばプラスミドまたはウイルス核酸として定義されてもよい。ベクターは、エーリキア属の免疫反応性組成物をコードする核酸を増幅および/または発現するために用いてもよい。発現ベクターは、ポリペプチドをコードする核酸配列が、細胞においてポリペプチドの発現を行うことができる適した制御配列に機能的に連結している複製可能な構築物である。そのような制御配列の必要性は、選択される細胞および選ばれる形質転換法に応じて変化すると考えられる。一般的に、制御配列には、例えば、転写プロモーターおよび/またはエンハンサー、適したmRNAリボソーム結合部位、ならびに転写および翻訳の終止を制御する配列が含まれる。当業者に周知である方法を用いて、適切な転写および翻訳制御シグナルを含む発現ベクターを構築することができる。例えば、Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd Ed.), Cold Spring Harbor Press, N. Y. に記述される技術を参照されたい。発現されるポリヌクレオチド配列およびその転写制御

10

20

30

40

50

配列は、転写制御配列がポリヌクレオチド配列の転写を有効に制御すれば、「機能的に連結している」と定義される。本発明のベクターには、プラスミドベクターおよびウイルスベクターが含まれるがこれらに限定されるわけではない。本発明の好ましいウイルスベクターは、例えば、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、SV40ウイルス、またはヘルペスウイルスに由来するベクターである。

【0122】

一般的に、発現ベクターは、発現されるポリヌクレオチドの効率的な転写を促進し、宿主細胞に関連して用いられるプロモーター配列を含む。本明細書において用いられるように、「宿主」という用語は、原核生物のみならず、酵母、植物、および動物細胞のような真核生物が含まれることを意味する。本発明のエーリキア属の免疫反応性組成物をコードする組換え型ポリヌクレオチドを用いて、当業者に一般的に公知である任意の技術を用いて、宿主を形質転換することができる。原核生物宿主には、大腸菌 (*E. coli*)、ネズミチフス菌 (*S. typhimurium*)、霊菌 (*Serratia marcescens*)、および枯草菌 (*Bacillus subtilis*) が含まれてもよい。真核生物宿主には、ピチア・パストリス (*Pichia pastoris*) のような酵母、哺乳動物細胞、および昆虫細胞が含まれる。

10

【0123】

以下の記述は、エーリキア属ポリヌクレオチドのポリヌクレオチドおよび核酸送達のための例示的な要素、試薬、および方法に関する。

【0124】

A. ベクター

「ベクター」という用語は、細胞内に導入するためにその中に核酸配列を挿入することができ、細胞内で核酸配列を複製させることができる担体核酸分子を指すために用いられる。核酸配列は「外因性」であってもよく、このことは、配列が、ベクターが導入される細胞にとって異物であること、または配列が、細胞の配列と相同であるが、配列が通常見い出されない宿主核酸内の位置に存在することを意味する。ベクターには、プラスミド、コスミド、ウイルス (バクテリオファージ、動物ウイルス、および植物ウイルス)、および人工染色体 (例えば、YAC) が含まれる。当業者は、標準的な組換え技術を通してベクターを構築する能力を十分に備えていると考えられる (例えば、その両方が参照により本明細書に組み入れられる、Maniatis et al., 1988およびAusubel et al., 1994を参照されたい)。

20

30

【0125】

「発現ベクター」という用語は、転写されうるRNAをコードする核酸を含む任意のタイプの遺伝子構築物を指す。いくつかの場合においては、次にRNA分子をタンパク質、ポリペプチド、またはペプチドに翻訳する。他の場合において、これらの配列は例えばアンチセンス分子またはリボザイムの産生において翻訳されない。発現ベクターは、多様な「制御配列」を含有してもよく、これは特定の宿主細胞において機能的に連結したコード配列の転写および起こりうる翻訳にとって必要な核酸配列を指す。転写および翻訳を支配する制御配列の他に、ベクターおよび発現ベクターは、他の機能を供給すると共に、以下に記述される核酸配列を含有してもよい。

【0126】

1. プロモーターおよびエンハンサー

「プロモーター」は、そこで転写の開始および速度が制御される核酸配列の領域である制御配列である。これは、RNAポリメラーゼおよび他の転写因子のような調節タンパク質および分子が結合して、核酸配列の特異的転写を開始する可能性がある遺伝的要素を含有してもよい。「機能的に配置される」、「機能的に連結した」、「制御下である」、および「転写制御下である」という句は、プロモーターが、その配列の転写開始および/または発現を制御するために核酸配列に関して正確な機能的な位置および/または方向に存在することを意味する。

40

【0127】

プロモーターは一般的に、RNA合成のための開始部位を配置するように機能する配列を

50

含む。この最も周知の例は、TATAボックスであるが、例えば哺乳動物末端デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ遺伝子およびSV40後期遺伝子のプロモーターのようなTATAボックスを欠損するいくつかのプロモーターでは、開始部位に重なる別個のエLEMENT自体が開始場所を固定するために役立つ。さらなるプロモーターELEMENTは、転写開始の頻度を調節する。典型的に、これらは開始部位の30-110 bp上流の領域に存在するが、多くのプロモーターが開始部位の下流の機能的ELEMENTを同様に含有することが示されている。コード配列を「プロモーターの制御下」に置くために、転写読み枠の転写開始部位の5'末端を、選ばれたプロモーターの「下流」（すなわち、3'）に配置する。「上流の」プロモーターは、DNAの転写を刺激して、コードされるRNAの発現を促進する。

【0128】

プロモーターELEMENT間の間隔は、ELEMENTが逆方向となった場合、または互いに相対的に移動した場合であってもプロモーター機能が保存されるようにしばしば柔軟である。tkプロモーターにおいて、プロモーターELEMENT間の間隔は、活性が低下し始める50 bpまで離れさせることができる。プロモーターによって、個々のELEMENTは転写を活性化するために協調してまたは独立して機能することができるように見える。プロモーターは、核酸配列の転写活性化に関係するシス作用調節配列を指す「エンハンサー」と共に用いられてもよく、または用いられなくてもよい。

【0129】

プロモーターは、コードセグメントおよび/またはエキソンの上流に位置する5'非コード配列を単離することによって得られうるように、核酸配列に本来会合するプロモーターであってもよい。そのようなプロモーターは、「内因性」と呼ぶことができる。同様に、エンハンサーは、その配列の下流または上流のいずれかに位置する、核酸配列に本来会合するエンハンサーであってもよい。または、その天然の環境にある核酸配列に通常会合していないプロモーターを指す組換え型または異種プロモーターの制御下で、コード核酸セグメントを配置することによって一定の長所が獲得されると考えられる。組換え型または異種エンハンサーはまた、その天然の環境において核酸配列に通常会合しないエンハンサーも指す。そのようなプロモーターまたはエンハンサーには、他の遺伝子のプロモーターまたはエンハンサー、他の任意のウイルス、原核細胞または真核細胞から単離されたプロモーターまたはエンハンサー、および「天然に存在しない」、すなわち異なる転写調節領域の、異なるELEMENTおよび/または発現を変化させる変異を含有する、プロモーターまたはエンハンサーが含まれてもよい。例えば、組換え型DNA構築において最も一般的に用いられるプロモーターには、ラクタマーゼ（ペニシリナーゼ）、ラクトースおよびトリプトファン（trp）プロモーター系が含まれる。プロモーターおよびエンハンサーの核酸配列を合成によって産生する他に、本明細書において開示される組成物に関連して、組換えクローニングおよび/またはPCR（商標）を含む核酸増幅技術を用いて、配列を産生してもよい（それぞれが参照により本明細書に組み入れられる、米国特許第4,683,202号および第5,928,906号を参照されたい）。さらに、ミトコンドリア、葉緑体等のような非核細胞小器官内で配列の転写および/または発現を指示する制御配列も同様に使用してもよいと企図される。

【0130】

もちろん、発現のために選ばれた細胞、細胞小器官、細胞型、組織、臓器、または臓器においてDNAセグメントの発現を有効に指示するプロモーターおよび/またはエンハンサーを使用することは重要であると考えられる。分子生物学の当業者は一般的に、タンパク質発現のためにプロモーター、エンハンサー、および細胞型の組み合わせを用いることを承知している（例えば、参照により本明細書に組み入れられる、Sambrook et al., 1989を参照されたい）。使用されるプロモーターは、組換え型タンパク質および/またはペプチドの大規模産生において都合がよいように、導入されたDNAセグメントの高レベル発現を指示するために適切な条件下で、構成的、組織特異的、誘導型、および/または有用であってもよい。プロモーターは異種または内因性であってもよい。

【0131】

プロモーターは、原核細胞、真核細胞、またはその両方において用いるために適したプロモーターであってもよい。さらに、任意のプロモーター/エンハンサーの組み合わせ（例えば、the Eukaryotic Promoter Data Base EPDBによる）も同様に、発現を推進するために用いることができる。T3、T7、またはSP6細胞質発現系を用いることは、可能性のある一つの態様である。

【0132】

2. 開始シグナルおよび内部リボソーム結合部位

特異的開始シグナルも同様に、コード配列の効率的な翻訳に必要である可能性がある。これらのシグナルには、ATG開始コドンまたは隣接配列が含まれる。ATG開始コドンを含む外因性の翻訳制御シグナルが提供される必要があることがある。当業者は容易にこれを決定して、必要なシグナルを提供することができると考えられる。開始コドンは、全挿入物が確実に翻訳されるように、所望のコード配列の読み枠と「インフレーム」でなければならないことは周知である。外因性の翻訳制御シグナルおよび開始コドンは、天然または合成のいずれかとなりうる。発現効率は、適切な転写エンハンサーエレメントを含めることによって増強される可能性がある。

【0133】

本発明の一定の態様において、内部リボソーム進入部位（IRES）エレメントを用いて、多重遺伝子、またはポリシストロニックメッセージを作製する。IRESエレメントは、5'メチル化Cap依存的翻訳のリボソーム走査モデルを無視して、内部部位で翻訳を開始することができる（Pelletier and Sonenberg, 1988）。ピコルナウイルス科（ポリオおよび脳心筋炎）の二つのメンバーからのIRESエレメント（Pelletier and Sonenberg, 1988）と共に、哺乳動物メッセージからのIRES（Macejak and Sarnow, 1991）が記述されている。IRES要素は、異種オープンリーディングフレームに連結させることができる。それぞれがIRESによって離れた多数のオープンリーディングフレームを共に転写して、ポリシストロニックメッセージを作製することができる。IRESエレメントのために、それぞれのオープンリーディングフレームは、効率的な翻訳のためにリボソームにアクセスすることができる。多数の遺伝子を、一つのメッセージを転写するために一つのプロモーター/エンハンサーを用いて効率よく発現させることができる（それぞれが参照により本明細書に組み入れられる、米国特許第5,925,565号および第5,935,819号を参照されたい）。

【0134】

3. 多重クローニング部位

ベクターには、そのいずれも、ベクターを消化するために標準的な組換え技術と共に用いることができる、多数の制限酵素部位を含有する核酸領域である多数のクローニング部位（MCS）が含まれうる（例えば、参照により本明細書に組み入れられる、Carbonelli et al., 1999、Levenson et al., 1998、およびCocea, 1997を参照されたい）。「制限酵素消化」は、核酸分子における特異的位置のみで機能する酵素による核酸分子の触媒的切断を指す。これらの制限酵素の多くは市販されている。そのような酵素を用いることは、当業者に広く理解されている。しばしば、ベクターは、外因性の配列をベクターにライゲーションさせることができるように、MCS内で切断する制限酵素を用いて直線状にするかまたは断片化する。「ライゲーション」は、互いに連続してもよく、連続していなくてもよい二つの核酸断片の間のホスホジエステル結合を形成するプロセスを指す。制限酵素およびライゲーション反応を伴う技術は、組換え技術の当業者に周知である。

【0135】

4. スプライシング部位

ほとんどの転写された真核細胞RNA分子は、RNAスプライシングを受けて一次転写物からイントロンを除去すると考えられる。ゲノム真核細胞配列を含有するベクターは、タンパク質発現のための転写物の適当なプロセシングが確実に起こるようにドナーおよび/またはアクセプタースプライシング部位を必要とする可能性がある（例えば、参照により本明細書に組み入れられるChandler et al., 1997を参照されたい）。

【0136】

5. 終止シグナル

本発明のベクターまたは構築物は、一般的に少なくとも一つの終止シグナルを含むと考えられる。「終止シグナル」または「ターミネーター」は、RNAポリメラーゼによるRNA転写物の特異的な終止に関係するDNA配列を含む。このように、一定の態様において、RNA転写物の産生を終了させる終止シグナルが企図される。ターミネーターは、所望のメッセージレベルを達成するためにインビボにおいて必要である可能性がある。

【0137】

真核細胞系において、ターミネーター領域はまた、ポリアデニル化部位を露出するように新しい転写物の部位特異的切断を許容する特異的DNA配列を含んでもよい。このシグナルは、A残基約200個（ポリA）の枝を転写物の3'末端に付加するように、特殊化された内因性のポリメラーゼにシグナルを送る。このポリAテールによって修飾されたRNA分子は、より安定であるように見え、より効率的に翻訳される。このように、真核生物を伴う他の態様において、ターミネーターは、RNAの切断のためのシグナルを含むことが好ましく、ターミネーターシグナルは、メッセージのポリアデニル化を促進することがより好ましい。ターミネーターおよび/またはポリアデニル化部位エレメントは、メッセージレベルを増強するために、およびカセットから他の配列への読み過ぎを最小限にするために役立つ。

【0138】

本発明において用いることが企図されるターミネーターには、例えばウシ成長ホルモンターミネーターのような遺伝子の終止配列、または例えばSV40ターミネーターのようなウイルス終止配列が含まれるがこれらに限定されるわけではない、本明細書に記述される、または当業者に公知の任意の公知の転写ターミネーターが含まれる。一定の態様において、終止シグナルは、配列切断によるような、転写可能な配列または翻訳可能な配列の欠如であってもよい。

【0139】

6. ポリアデニル化シグナル

発現、特に真核細胞の発現において、転写物の適当なポリアデニル化を行うためにポリアデニル化シグナルが含まれると考えられる。ポリアデニル化シグナルの性質は、本発明の実践の成功にとって重大ではないと考えられ、そのようないかなる配列も使用することができる。好ましい態様には、様々な標的細胞において良好に機能するために簡便で、機能することが公知である、SV40ポリアデニル化シグナルまたはウシ成長ホルモンポリアデニル化シグナルが含まれる。ポリアデニル化は、転写物の安定性を増加させる可能性があり、または細胞質輸送を促進する可能性がある。

【0140】

7. 複製開始点

宿主細胞においてベクターを成長させるために、ベクターは、そこから複製が開始される特異的核酸配列である一つまたは複数の複製開始点（しばしば、「ori」と呼ばれる）を含有してもよい。または、宿主細胞が酵母である場合、自律複製配列（ARS）を使用することができる。

【0141】

8. 選択可能かつスクリーニング可能なマーカー

本発明の一定の態様において、発現ベクターにマーカーを含めることによって、本発明の核酸構築物を含有する細胞をインビトロまたはインビボにおいて同定することができる。そのようなマーカーは、細胞に対して同定可能な変化を付与し、発現ベクターを含有する細胞の容易な同定を許容する。一般的に、選択マーカーは、選択を可能にする特性を付与するマーカーである。陽性選択マーカーは、マーカーの存在がその選択を可能にするマーカーであり、陰性選択マーカーはその存在がその選択を防止するマーカーである。陽性選択マーカーの例は薬物耐性マーカーである。

【0142】

通常、薬物選択マーカーを含めることは、形質転換体のクローニングおよび同定におい

10

20

30

40

50

て役立つ、ネオマイシン、ピューロマイシン、ハイグロマイシン、DHFR、GPT、ゼオシン、およびヒスチジノールに対する耐性を付与する遺伝子は有用な選択マーカーである。条件の実行に基づいて形質転換体の識別を可能にする表現型を付与するマーカーの他に、その基礎が比色定量分析であるGFPのようなスクリーニング可能なマーカーを含む他のタイプのマーカーも同様に企図される。または、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ (tk) またはクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CAT) のようなスクリーニング可能な酵素を利用してよい。当業者はまた、おそらくFACS分析と共に免疫マーカーを使用する方法を知っていると考えられる。用いられるマーカーは、それが遺伝子産物をコードする核酸と同時に発現されうる限り、重要ではないと考えられる。選択およびスクリーニング可能なマーカーのさらなる例は当業者に周知である。

10

【0143】

9. プラスミドベクター

一定の態様において、プラスミドベクターは、宿主細胞を形質転換する目的で用いるために企図される。一般的に、レプリコン、および宿主細胞と適合性の種に由来する制御配列を含有するプラスミドベクターを、これらの宿主に関連して用いる。ベクターは通常、複製部位と共に、形質転換細胞において表現型選択を提供することができるマーキング配列を有する。非制限的な例において、大腸菌はしばしば大腸菌種に由来するプラスミドであるpBR322の誘導体を用いて形質転換される。pBR322は、アンピシリンおよびテトラサイクリン耐性に関する遺伝子を含有し、したがって、形質転換細胞を同定するための容易な手段を提供する。pBRプラスミドまたは他の微生物プラスミドもしくはファージはまた、

20

例えばその自身のタンパク質の発現のために微生物によって用いられうるプロモーターを含有しなければならないか、または含有するように改変されなければならない。

【0144】

さらに、宿主微生物と適合性であるレプリコンおよび制御配列を含有するファージベクターを、これらの宿主に関連してベクターを形質転換するために用いることができる。一般的に、例えば大腸菌LE392のような宿主細胞を形質転換するために用いることができる組換え型ファージベクターの作製において、ファージ GEMTM 11を利用してよい。

【0145】

さらに有用なプラスミドベクターには、pINベクター (Inouye et al., 1985) および後の精製および分離、または切断のためにグルタチオンSトランスフェラーゼ (GST) 可溶性融合タンパク質の生成において用いられるpGEXベクターが含まれる。他の適した融合タンパク質は、ガラクトシダーゼ、ユビキチン等との融合タンパク質である。

30

【0146】

細菌宿主細胞、例えば発現ベクターを含む大腸菌を任意の多数の適した培地、例えばLBにおいて生育させる。一定のベクターにおける組換え型タンパク質の発現は、当業者によって理解されるように、宿主細胞を一定のプロモーターに対して特異的な物質に接触させること、例えばIPTGを培地に加えることによって、またはインキュベーションをより高温に切り換えることによって誘導される可能性がある。さらなる期間、一般的に2~24時間細菌を培養した後、細胞を遠心分離によって回収し、洗浄して残留培地を除去した。

【0147】

40

10. ウイルスベクター

一定のウイルスが細胞に感染する、または受容体媒介エンドサイトーシスを通して細胞に入る、および宿主細胞のゲノムに組み入れられて、ウイルス遺伝子を安定かつ効率的に発現させることができることにより、ウイルスは、外来核酸を細胞 (例えば、哺乳動物細胞) に移入するための魅力的な候補物となる。本発明の成分は、例えば免疫調節剤またはアジュバントのような一つもしくは複数の組成物または他の成分をコードするウイルスベクターを含んでもよい。本発明の核酸を送達するために用いられてもよいウイルスベクターの非制限的な例を、以下に記述する。

【0148】

a. アデノウイルスベクター

50

核酸を送達するための特定の方法は、アデノウイルス発現ベクターを用いることを伴う。アデノウイルスベクターは、ゲノムDNAへの組み込み能が低いことが知られているが、この特色はこれらのベクターによって与えられる高い遺伝子移入効率によって相殺される。「アデノウイルス発現ベクター」は、(a)構築物のパッケージングを支持するのに十分な、および(b)その中で、クローニングされている組織または細胞特異的構築物を最終的に発現させるのに十分なアデノウイルス配列を含有する構築物が含まれることを意味する。遺伝子構築またはアデノウイルス36 kbの直線状の二本鎖DNAウイルスを理解することによって、アデノウイルスDNAの大きい断片を7 kbまでの外来配列に置換することができる(Grunhaus and Horwitz, 1992)。

【0149】

10

b. AAVベクター

アデノウイルス補助トランスフェクションを用いて、核酸を細胞に導入してもよい。アデノウイルスカップリング系を用いる細胞系において、トランスフェクション効率の増加が報告されている(Kelleher and Vos, 1994; Cotten et al., 1992; Curiel, 1994)。アデノ随伴ウイルス(AAV)は、それが高い組み込み頻度を有し、非分裂細胞に感染することができることから、本発明の組成物において用いるための魅力的なベクター系であり、このように遺伝子を哺乳動物細胞、例えば組織培養(Muzyczka, 1992)、またはインビボにおいて遺伝子を送達するために有用となる。AAVは、感染性に関して広い宿主範囲を有する(Tratschin et al., 1984; Laughlin et al., 1986; Lebkowski et al., 1988; McLaughlin et al., 1988)。rAAVベクターの生成および使用に関する詳細は、それぞれが参照により本明細書に組み入れられる、米国特許第5,139,941号および第4,797,368号に記載される。

20

【0150】

c. レトロウイルスベクター

レトロウイルスベクターは、宿主ゲノムにその遺伝子を組み入れる能力、大量の外来遺伝子材料を移入できること、広いスペクトルの種および細胞型に感染できること、ならびに特殊な細胞株においてパッケージングされる能力のために送達ベクターとして有用である(Miller, 1992)。

【0151】

レトロウイルスベクターを構築するために、核酸(例えば、関心対象組成物をコードする核酸)を一定のウイルス配列の代わりにウイルスゲノムに挿入して、複製欠損であるウイルスを産生する。ビリオンを産生するために、gag、pol、およびenv遺伝子を含有するがLTRおよびパッケージング成分を含まないパッケージング細胞株を構築する(Mann et al., 1983)。cDNAを含有する組換え型プラスミドをレトロウイルスLTRおよびパッケージング配列と共に特殊な細胞株に導入する場合(例えば、リン酸カルシウム沈殿によって)、パッケージング配列は、組換え型プラスミドのRNA転写物をウイルス粒子にパッケージングさせて、次にこれが培養培地に分泌される(Nicolas and Rubenstein, 1988; Temin, 1986; Mann et al., 1983)。組換え型レトロウイルスベクターを含有する培地を回収して、任意で濃縮し、遺伝子移入のために用いる。レトロウイルスベクターは、広く多様な細胞型に感染することができる。しかし、組み込みおよび安定な発現は宿主細胞の分裂を必要とする(Paskind et al., 1975)。

30

40

【0152】

レンチウイルスは、複雑なレトロウイルスであり、これは一般的なレトロウイルス遺伝子であるgag、pol、およびenvの他に、調節または構造機能を有する他の遺伝子を含有する。レンチウイルスベクターは、当技術分野において周知である(例えば、Naldini et al., 1996; Zufferey et al., 1997; Blomer et al., 1997; 米国特許第6,013,516号および第5,994,136号を参照されたい)。レンチウイルスのいくつかの例には、ヒト免疫不全ウイルス:HIV-1、HIV-2、およびサル免疫不全ウイルス:SIVが含まれる。レンチウイルスベクターは、HIV病原遺伝子を幾重にも弱毒化させることによって生成されており、例えば遺伝子env、vif、vpr、vpu、およびnefを欠失させて、ベクターを生物学的に安全に

50

する。

【0153】

組換え型レンチウイルスベクターは、非分裂細胞に感染することができ、核酸配列のインピボおよびエクスピボ遺伝子移入および発現の両方のために用いることができる。例えば、適した宿主細胞に、パッケージング機能、すなわちgag、pol、およびenvと共にrevおよびtatを有する二つまたはそれ以上のベクターをトランスフェクションするといった、非分裂細胞への感染が可能な組換え型レンチウイルスは、参照により本明細書に組み入れられる、米国特許第5,994,136号に記述される。特定の細胞型の受容体にターゲティングするために、抗体または特定のリガンドとエンベロープタンパク質との連結によって組換え型ウイルスをターゲティングしてもよい。例えば特異的標的細胞上の受容体に対するリガンドをコードするもう一つの遺伝子と共に、関心対象配列（調節領域が含まれる）をウイルスベクターに挿入することによって、ベクターは標的的特異的となる。

10

【0154】

d. 他のウイルスベクター

他のウイルスベクターを本発明のワクチン構築物として使用してもよい。ワクシニアウイルス（Ridgeway, 1988; Baichwal and Sugden, 1986; Coupar et al., 1988）、シンドビスウイルス、サイトメガロウイルスおよび単純ヘルペスウイルスのようなウイルスに由来するベクターを使用してもよい。それらは、様々な哺乳動物細胞にとっていくつかの魅力的な特色を提供する（Friedmann, 1989; Ridgeway, 1988; Baichwal and Sugden, 1986; Coupar et al., 1988; Horwich et al., 1990）。

20

【0155】

e. 改変ウイルスを用いた送達

送達される核酸は、特異的結合リガンドを発現するように操作されている感染性ウイルス内に収容されてもよい。このように、ウイルス粒子は、標的細胞の同族の受容体に特異的に結合して、内容物を細胞に送達する。レトロウイルスベクターの特異的ターゲティングを可能にするように設計された新規アプローチは、ウイルスエンベロープに乳糖残基を化学的に付加することによるレトロウイルスの化学改変に基づいて開発された。この改変は、シアロ糖タンパク質受容体を通して肝細胞の特異的感染を許容することができる。

【0156】

レトロウイルスエンベロープタンパク質および特異的細胞受容体に対するビオチニル化抗体が用いられる、組換え型レトロウイルスのターゲティングに対するもう一つのアプローチを用いた。抗体をストレプトアビジンを用いることによってビオチン成分を通して結合させた（Roux et al., 1989）。主要組織適合抗原複合体クラスIおよびクラスII抗原に対する抗体を用いて、インピトロにおけるエコトロピックウイルスによる表面抗原を有する多様なヒト細胞の感染が証明された（Roux et al., 1989）。

30

【0157】

11. ベクターの送達および細胞の形質転換

本発明と共に用いるための細胞小器官、細胞、組織、または生物を形質転換するためのエーリキア核酸送達のための適した方法には、本明細書において記述されるように、または当業者に公知であるように、核酸（例えば、DNA）を細胞小器官、細胞、組織、または生物に導入することができる実質的にいかなる方法も含まれると考えられる。そのような方法には、エクスピボトランスフェクション（Wilson et al., 1989; Nabel et al., 1989）、マイクロインジェクション（参照により本明細書に組み入れられる、Harlan and Weintraub, 1985; 米国特許第5,789,215号）を含む注入（そのそれぞれが参照により本明細書に組み入れられる、米国特許第5,994,624号、第5,981,274号、第5,945,100号、第5,780,448号、第5,736,524号、第5,702,932号、第5,656,610号、第5,589,466号、および第5,580,859号）；電気穿孔（参照により本明細書に組み入れられる米国特許第5,384,253号；Tur-Kaspa et al., 1986; Potter et al., 1984）；リン酸カルシウム沈殿（Graham and Van Der Eb, 1973; Chen and Okayama, 1987; Rippe et al., 1990）；DEAEデキストランの後にポリエチレングリコールを用いることによって（Gopal, 1985）；直接超音波ローデ

40

50

イング (Fechheimer et al., 1987) ; リポソーム媒介トランスフェクション (Nicolau and Sene, 1982 ; Fraley et al., 1979 ; Nicolau et al., 1987 ; Wong et al., 1980 ; Kaneda et al., 1989 ; Kato et al., 1991) 、および受容体媒介トランスフェクション (Wu and Wu, 1987 ; Wu and Wu, 1988) ; 微粒子銃 (そのそれぞれが参照により本明細書に組み入れられる、PCT出願番号WO 94/09699および95/06128 ; 米国特許第5,610,042号、第5,322,783号、第5,563,055号、第5,550,318号、第5,538,877号、および第5,538,880号) ; シリコンカーバイド繊維による攪拌 (そのそれぞれが参照により本明細書に組み入れられる、Kaeppeler et al., 1990 ; 米国特許第5,302,523号および第5,464,765号) ; アグロバクテリウム (Agrobacterium) 媒介形質転換 (そのそれぞれが参照により本明細書に組み入れられる、米国特許第5,591,616号および5,563,055) ; プロトプラストのPEG媒介形質転換 (そのそれぞれが参照により本明細書に組み入れられる、Omirulleh et al., 1993 ; 米国特許第4,684,611号および第4,952,500号) ; 乾燥 / 抑制媒介DNA取り込み (Potrykus et al., 1985) によるようなDNAの直接送達、およびそのような方法の任意の組み合わせが含まれるがこれらに限定されるわけではない。これらのような技術の適用を通して、細胞小器官、細胞、組織、または生物は、安定にまたは一過性に形質転換される可能性がある。

【 0 1 5 8 】

a. エクスビボ形質転換

エクスビボにおいて生物から採取した血管細胞および組織をトランスフェクションする方法は当業者に公知である。例えばイヌ内皮細胞は、インビトロにおいてレトロウイルス遺伝子移入によって遺伝子改変され、イヌに移植されている (Wilson et al., 1989) 。もう一つの例において、ユカタンミニブタの内皮細胞は、インビトロにおいてレトロウイルスによってトランスフェクションされ、二重パルーンカテーテルを用いて動脈に移植された (Nabel et al., 1989) 。このように、細胞または組織を採取して、本発明の核酸を用いてエクスビボにおいてトランスフェクションしてもよいと企図される。特定の局面においては、移植された細胞または組織を生物内に留置してもよい。好ましい面において、核酸は、移植された細胞または組織において発現される。

【 0 1 5 9 】

b. 注入

一定の態様において、核酸は、皮下、皮内、筋肉内、静脈内、腹腔内等のような、1回または複数回の注入 (すなわち、針による注入) によって細胞小器官、細胞、組織、または生物に送達されてもよい。ワクチンを注入する方法は当業者に周知である (例えば、生理食塩液溶液を含む組成物の注入) 。本発明のさらなる態様には、直接マイクロインジェクションによる核酸の導入が含まれる。直接マイクロインジェクションは、核酸構築物をツメガエル (Xenopus) の卵母細胞に導入するために用いられている (Harland and Weintraub, 1985) 。用いる組成物の量は、用いる細胞小器官、細胞、組織、または生物と共に抗原の性質に応じて変化してもよい。

【 0 1 6 0 】

c. 電気穿孔

本発明の一定の態様において、核酸は電気穿孔によって細胞小器官、細胞、組織、または生物に導入される。電気穿孔は高圧放電に細胞およびDNAの浮遊液を曝露することを伴う。この方法のいくつかの変法において、ペクチン分解酵素のような一定の細胞壁分解酵素を使用して標的レシピエント細胞を、電気穿孔による形質転換に対して未処置細胞よりも感受性があるようにする (参照により本明細書に組み入れられる、米国特許第5,384,253号) 。または、レシピエント細胞を、機械的創傷による形質転換に対してより感受性があるようにすることができる。

【 0 1 6 1 】

電気穿孔を用いる真核細胞のトランスフェクションは、非常に成功している。このようにして、マウスプレBリンパ球にヒト 免疫グロブリン遺伝子をトランスフェクションしており (Potter et al., 1984) 、ラット肝細胞にクロラムフェニコールアセチルトラン

スフェラーゼ遺伝子をトランスフェクションしている (Tur Kaspas et al., 1986)。

【0162】

例えば植物細胞のような細胞における電気穿孔による形質転換を行うために、細胞もしくは胚形成カルスの浮遊液のようなもろい組織を使用してもよく、または未成熟な胚もしくは他の組織化された組織を直接形質転換してもよい。この技術において、選んだ細胞をペクチン分解酵素 (ペクトリアーゼ) または制御された方法での機械的損傷に曝露することによって、選んだ細胞の細胞壁は部分的に分解されると考えられる。無傷の細胞の電気穿孔によって形質転換されているいくつかの種の例には、トウモロコシ (米国特許第5,384,253号; Rhodes et al., 1995; D'Halluin et al., 1992)、コムギ (Zhou et al., 1993)、トマト (Hou and Lin, 1996)、ダイズ (Christou et al., 1987)、およびタバコ (Lee et al., 1989) が含まれる。

10

【0163】

同様に、植物細胞の電気穿孔による形質転換のためにプロトプラストを使用してもよい (Bates, 1994; Lazzeri, 1995)。例えば、子葉由来プロトプラストの電気穿孔によるトランスジェニックダイズ植物の生成が、参照により本明細書に組み入れられる国際特許出願WO 9217598においてDhir and Widholmによって記述されている。プロトプラスト形質転換が記述されている種の他の例には、オオムギ (Lazzeri, 1995)、モロコシ (Battraw et al., 1991)、トウモロコシ (Bhattacharjee et al., 1997)、コムギ (He et al., 1994) およびトマト (Tsukada, 1989) が含まれる。

【0164】

20

d. リン酸カルシウム

本発明の他の態様において、核酸はリン酸カルシウム沈殿を用いて細胞に導入される。この技術を用いて、ヒトKB細胞にアデノウイルス5 DNAをトランスフェクションしている (Graham and Van Der Eb, 1973)。同様に、このようにして、マウスL (A9)、マウスC127、CHO、CV1、BHK、NIH3T3およびHeLa細胞にネオマイシンマーカー遺伝子をトランスフェクションし (Chen and Okayama, 1987)、ラット肝細胞に多様なマーカー遺伝子をトランスフェクションした (Rippe et al., 1990)。

【0165】

e. DEAEデキストラン

別の態様において、核酸はDEAEデキストランの後にポリエチレングリコールを用いて細胞に送達される。このようにしてレポータープラスミドは、マウス骨髄腫および赤白血病細胞に導入された (Gopal, 1985)。

30

【0166】

f. 超音波ローディング

本発明のさらなる態様には、直接超音波ローディングによる核酸の導入が含まれる。超音波ローディングによってLTK線維芽細胞にチミジンキナーゼ遺伝子をトランスフェクションしている (Fechheimer et al., 1987)。

【0167】

g. リポソーム媒介トランスフェクション

本発明のさらなる態様において、エーリキア核酸は、例えばリポソーム中に含まれるように、脂質複合体に含まれてもよい。リポソームは、リン脂質二重層膜と内部水性媒体とを特徴とする小胞構造である。マルチラメラリポソームは、水性媒体によって分かれた多数の脂質層を有する。それらは、リン脂質を過剰量の水溶液に懸濁させると自然に形成する。脂質成分は、閉鎖構造を形成する前に自己再編成を受けて、脂質二重層の中に水および溶解した溶質を捕獲する (Ghosh and Bachhawat, 1991)。同様に、Lipofectamine (Gibco BRL)、またはSuperfect (Qiagen) と複合体を形成した核酸も企図される。

40

【0168】

インビトロにおける外来DNAのリポソーム媒介核酸送達および発現は非常に成功している (Nicolau and Sene, 1982; Fraley et al., 1979; Nicolau et al., 1987)。培養鶏卵、HeLa、および肝腫細胞における外来DNAのリポソーム媒介送達および発現の実現可能

50

性も同様に証明されている (Wong et al., 1980)。

【0169】

本発明の一定の態様において、リポソームは、血液凝集ウイルス (HVJ) と複合体を形成してもよい。これは、細胞膜との融合を促進して、リポソーム封入DNAの細胞流入を促進することが示されている (Kaneda et al., 1989)。他の態様において、リポソームは、核の非ヒストン染色体タンパク質 (HMG 1) と共に複合体を形成してもよく、またはそれらと共に使用してもよい (Kato et al., 1991)。なおさらなる態様において、リポソームは、HVJおよびHMG 1の両方と共に複合体を形成してもよく、または使用してもよい。他の態様において、送達媒体はリガンドおよびリポソームを含んでもよい。

【0170】

h. 受容体媒介トランスフェクション

なおさらに、核酸を受容体媒介送達媒体によって標的細胞に送達してもよい。これらは、標的細胞内で起こると考えられる受容体媒介エンドサイトーシスによる、高分子の選択的取り込みを利用する。様々な受容体の細胞型特異的分布を考慮して、この送達法は、本発明の特異性のもう一つの程度を高める。

【0171】

一定の受容体媒介遺伝子ターゲティング媒体は、細胞受容体特異的リガンドおよび核酸結合物質を含む。他は、それに対して送達されるべき核酸が機能的に付着している細胞受容体特異的リガンドを含む。いくつかのリガンドが受容体媒介遺伝子移入のために用いられており (Wu and Wu, 1987; Wagner et al., 1990; Perales et al., 1994; Myers, EPO 0273085)、これは技術の操作性を確立する。もう一つの哺乳動物細胞型の状況における特異的送達が記述されている (参照により本明細書に組み入れられる、Wu and Wu, 1993)。本発明の一定の局面において、リガンドは、標的細胞集団において特異的に発現される受容体に対応するように選ばれると考えられる。

【0172】

他の態様において、細胞特異的核酸ターゲティング媒体の核酸送達媒体成分は、リポソームと組み合わせると特異的結合リガンドを含んでもよい。送達される核酸は、リポソーム内に収容され、特異的結合リガンドはリポソーム膜に機能的に組み入れられる。リポソームは、このように標的細胞の受容体に特異的に結合して、内容物を細胞に送達すると考えられる。そのような系は、例えば上皮細胞増殖因子 (EGF) を使用する系を用いて、EGF受容体の上方制御を示す細胞に対する核酸の受容体媒介送達において機能的であることが示されている。

【0173】

なおさらなる態様において、標的化送達媒体の核酸送達媒体成分はリポソーム自体であり、これは好ましくは細胞特異的結合を支持する一つまたは複数の脂質または糖タンパク質を含むと考えられる。例えば、ラクトシルセラミド、ガラクトース末端アシアロガングリオシドは、リポソームに組み入れられており、肝細胞によるインスリン遺伝子の取り込みの増加が観察されている (Nicolau et al., 1987)。本発明の細胞特異的形質転換構築物は、同様に標的細胞に特異的に送達されることが企図される。

【0174】

i. 微粒子銃

微粒子銃技術は、少なくとも一つの細胞小器官、細胞、組織、または生物に核酸を導入するために用いることができる (そのそれぞれが参照により本明細書に組み入れられる、米国特許第5,550,318号; 米国特許第5,538,880号; 米国特許第5,610,042号; およびPCT出願WO 94/09699)。この方法は、DNAをコーティングした微粒子を、細胞膜を通過させて細胞を殺すことなく細胞内に入らせるように、高速で加速させることができることに依存する (Klein et al., 1987)。当技術分野において公知の広く多様な微粒子銃技術が存在し、その多くは本発明に適用可能である。

【0175】

微粒子銃は、例えば様々な細胞、組織または任意の植物種のような生物を形質転換する

10

20

30

40

50

ために用いてもよい。微粒子銃によって形質転換されている種の例には、トウモロコシ (PCT出願WO 95/06128)、オオムギ (Ritala et al., 1994; Hensgens et al., 1993)、コムギ (参照により本明細書に組み入れられる、米国特許第5,563,055号)、イネ (Hensgens et al., 1993)、オート麦 (Torbet et al., 1995; Torbet et al., 1998)、ライ麦 (Hensgens et al., 1993)、サトウキビ (Bower et al., 1992)、およびモロコシ (Casas et al., 1993; Hagio et al., 1991) のような単子葉植物と共に、タバコ (Tomes et al., 1990; Buising and Benbow, 1994)、ダイズ (参照により本明細書に組み入れられる、米国特許第5,322,783号)、ヒマワリ (Knittel et al., 1994)、ピーナツ (Singsit et al., 1997)、ワタ (McCabe and Martinell, 1993)、トマト (VanEck et al., 1995)、およびマメ科植物 (参照により本明細書に組み入れられる、米国特許第5,563,055号) を含む多くの双子葉植物が含まれる。

10

【0176】

この微粒子銃において、一つまたは複数の粒子を少なくとも一つの核酸によってコーティングしてもよく、推進力によって細胞に送達してもよい。小粒子を加速させるいくつかの装置が開発されている。そのような一つの装置は、高圧放電に依存して電流を生成し、次にこれが動力を提供する (Yang et al., 1990)。用いられる微粒子は、タングステン、金粒子、またはビーズのような生物学的に不活性な物質からなる。例示的な粒子には、タングステン、白金、および好ましくは金を含む粒子が含まれる。いくつかの場合において、金属粒子上へのDNA沈着は、微粒子銃を用いてレシピエント細胞にDNAを送達するために必要ではないと企図される。しかし、粒子はDNAによってコーティングされるよりむしろDNAを含有してもよいと企図される。DNAコーティング粒子は、粒子銃によるDNA送達レベルを増加させる可能性があるが、それ自体は必要ではない。

20

【0177】

衝突に関して、細胞浮遊液をフィルター上または固体液体培地において濃縮する。または、未成熟な胚または他の標的細胞を固体培養培地に並べてもよい。衝突を受ける細胞は、マクロ発射物 (macroprojectile) 停止プレートの下で適切な距離で配置される。

【0178】

加速によってDNAを細胞 (例えば、植物細胞) に送達するための方法の例示的な態様は、ステンレススチールまたはNytexスクリーンのようなスクリーンを通してDNAによってコーティングされた粒子または細胞を、例えば浮遊培養された単子葉植物細胞のような細胞によって覆われたフィルター表面上に推進させるために用いることができるバイオリスティック粒子送達システム (Biolistics Particle Delivery System) である。スクリーンは、それらが大きい凝集塊でレシピエント細胞に送達されないように粒子を分散させる。発射装置と、衝突を受ける細胞との間に介在するスクリーンは、発射物の凝集体の大きさを低減させ、大きすぎる発射物によってレシピエント細胞に加えられる損傷を低減することによって、より高い形質転換頻度に寄与する可能性があると考えられる。

30

【0179】

12. 宿主細胞

本明細書において用いられるように、「細胞」、「細胞株」および「細胞培養」という用語は、互換的に用いられる可能性がある。これらの用語には全て、任意のおよび全てのその後の世代であるその子孫が含まれる。子孫は全て、計画的または偶然の変異により同一ではなくてもよいと理解される。異種核酸配列を発現する文脈において、「宿主細胞」は、原核細胞または真核細胞を指し、これには、ベクターを複製することができ、および/またはベクターによってコードされる異種遺伝子を発現することができる任意の形質転換可能な生物が含まれる。宿主細胞は、ベクターのレシピエントとして用いることができ、用いられている。宿主細胞は「トランスフェクション」または「形質転換」されてもよく、これは外因性の核酸がそれによって宿主細胞に移入または導入されるプロセスを指す。形質転換細胞には、主要な本発明の細胞およびその子孫が含まれる。本明細書において用いられるように、「操作された」および「組換え型」細胞または宿主細胞は、その中に例えばベクターのような外因性の核酸配列が導入されている細胞を指すと意図される。し

40

50

たがって、組換え型細胞は、組換えによって導入された核酸を含有しない天然に存在する細胞とは区別される。

【0180】

一定の態様において、RNAまたはタンパク質様配列は、同じ宿主細胞において他の選択されたRNAまたはタンパク質様配列と同時に発現されてもよいと企図される。同時発現は、宿主細胞に二つまたはそれ以上の別個の組換え型ベクターを同時トランスフェクションすることによって達成されてもよい。または、RNAの多数の別個のコード領域を含めるように、一つの組換え型ベクターを構築してもよく、次にこれらを一つのベクターをトランスフェクションした宿主細胞において発現させることができると考えられる。

【0181】

組織は、本発明の組成物によって形質転換される宿主細胞または細胞を含んでもよい。組織は、生物の一部であってもよく、または生物から分離されてもよい。一定の態様において、組織は、脂肪細胞、肺胞細胞、エナメル芽細胞、軸索、基底細胞、血液（例えば、リンパ球）、血管、骨、骨髄、脳、乳腺、軟骨、頸部、結腸、角膜、胚、子宮内膜、内皮、上皮、食道、筋膜、線維芽細胞、小胞、神経節細胞、グリア細胞、杯細胞、腎臓、肝臓、肺、リンパ節、筋肉、ニューロン、卵巣、膵臓、末梢血、前立腺、皮膚、皮膚、小腸、脾臓、幹細胞、胃、精巣、薬、腹水組織、穂軸、耳、花、穀皮、穀粒、葉、分裂組織細胞、花粉、根の先端、根、絹、茎、およびその全ての癌を含んでもよいが、これらに限定されない。

【0182】

一定の態様において、宿主細胞または組織は少なくとも一つの生物に含まれていてもよい。一定の態様において、生物は、当業者によって理解されるように、原核生物（例えば、ユーバクテリア、古細菌）、または真核生物であってもよいがこれらに限定されない（例えば、ウェブページ<http://phylogeny.arizona.edu/tree/phylogeny.html>を参照されたい）。

【0183】

多数の細胞株および培養物は宿主細胞として用いるために入手可能であり、それらは生きている培養物および遺伝子材料のアーカイブとして役立つ機構であるAmerican Type Culture Collection (ATCC) (www.atcc.org)を通して得ることができる。適切な宿主は、ベクター骨格および所望の結果に基づいて当業者によって決定される。例えば、プラスミドまたはコスミドを、多くのベクターの複製のために原核宿主細胞に導入することができる。ベクターの複製および/または発現のために利用できる細胞型には、大腸菌（例えば、大腸菌株RRI、大腸菌LE392、大腸菌B、大腸菌X 1776 (ATCC No. 31537) と共に、大腸菌W3110 (F⁻、原栄養株、ATCC No. 273325)、DH5^α、JM 109、およびKC8のような細菌、枯草菌のようなバチルス (bacilli)、ならびにネズミチフス菌、霊菌、様々なシュードモナス (Pseudomonas) 種のような他の腸内細菌と共に、SURE (登録商標) コンピテント細胞およびSOLOPACK Gold Cells (STRATAGENE (登録商標)、La Jolla) が含まれるがこれらに限定されるわけではない。一定の態様において、大腸菌LE392のような細菌細胞は、ファージウイルスに関する宿主細胞として特に企図される。

【0184】

ベクターの複製および/または発現のための真核宿主細胞の例には、HeLa、NIH3T3、Jurkat、293、Cos、CHO、Saos、およびPC12が含まれるがこれらに限定されるわけではない。様々な細胞型および生物からの多くの宿主細胞が利用可能であり、当業者に公知であると考えられる。同様に、ウイルスベクターは、真核または原核宿主細胞のいずれか、特にベクターの複製または発現に関して許容性である細胞に関連して用いてもよい。

【0185】

いくつかのベクターは、原核および真核細胞の両方において複製および/または発現させる制御配列を使用してもよい。当業者はさらに、それらを維持してベクターの複製を許容するために上記の宿主細胞の全てをインキュベートする条件を理解すると考えられる。同様に、ベクターの大規模産生と共に、ベクターによってコードされる核酸、およびその

10

20

30

40

50

同族のポリペプチド、タンパク質、またはペプチドの産生を可能にすると考えられる技術および条件が理解され、公知である。

【0186】

13. 発現系

先に記述した組成物の少なくとも一部または全てを含む多数の発現系が存在する。核酸配列、またはその同族のポリペプチド、タンパク質、およびペプチドを産生する目的で、本発明と共に用いるために、原核生物および/または真核生物に基づく系を使用することができる。そのような多くの系が市販され、広く入手可能である。

【0187】

昆虫細胞/バキュロウイルス系は、参照により本明細書に組み入れられる、米国特許第5,871,986号、第4,879,236号に記述されるような異種核酸セグメントの高レベルタンパク質発現をもたらすことができ、例えば、INVITROGEN(登録商標)からMAXBAC(登録商標)2.0の名称で、およびCLONTECH(登録商標)からBACPACK(商標)バキュロウイルス発現系として購入することができる。

【0188】

発現系の他の例には、合成エクジソン誘導型受容体またはそのpET発現系、大腸菌発現系を伴うSTRATAGENE(登録商標)COMPLETE CONTROL誘導型哺乳動物発現系が含まれる。誘導型発現系のもう一つの例は、INVITROGEN(登録商標)から入手可能であり、これは完全長のCMVプロモーターを用いる誘導型哺乳動物発現系であるT-REX(商標)(テトラサイクリン調節発現)系を有する。INVITROGEN(登録商標)はまた、ピチア・メタノリカ(*Pichia methanolica*)発現系と呼ばれる酵母発現系を提供し、これはメチル栄養性酵母ピチア・メタノリカにおける組換え型タンパク質の高レベル産生のために設計されている。当業者は、核酸配列、またはその同族のポリペプチド、タンパク質、またはペプチドを産生するために、発現構築物のような、ベクターを発現させる方法を知っていると考えられる。

【0189】

本発明の方法によって産生されたタンパク質、ポリペプチド、またはペプチドは、「過剰発現」されてもよく、すなわち細胞におけるその天然の発現と比較して増加したレベルで発現されてもよいと企図される。そのような過剰発現は、放射線標識および/またはタンパク質精製が含まれる多様な方法によって評価されてもよい。しかし、単純かつ直接的な方法、例えばSDS/PAGEおよびタンパク質染色またはウエスタンブロットを伴う方法の後に、得られたゲルまたはブロットの密度測定走査のような定量的分析が好ましい。天然の細胞におけるレベルと比較した場合の組換え型タンパク質、ポリペプチド、またはペプチドレベルの特異的な増加は、宿主細胞によって産生され、例えばゲルにおいて可視化される他のタンパク質と比較した場合の特異的タンパク質、ポリペプチド、またはペプチドの相対的量と同様に、過剰発現を示す。

【0190】

いくつかの態様において、発現されたタンパク質様配列は、宿主細胞において封入体を形成し、宿主細胞を例えば、細胞ホモジナイザーによって破壊することによって溶解して、洗浄し、および/または遠心分離して、密度の高い封入体および細胞膜を可溶性の細胞膜成分から分離する。この遠心分離は、蔗糖のような糖を緩衝液に組み入れて、選択的速度で遠心分離することによって、密度の高い封入体を選択的に濃縮させる条件で行うことができる。封入体は、メルカプトエタノールまたはDTT(ジチオスレイトール)のような還元剤の存在下で尿素(例えば、8M)または塩酸グアニジンのようなカオトロピック剤を高濃度で含有する溶液において可溶化し、当業者に公知であるように、より望ましいコンフォメーションにリフォールディングしてもよい。

【0191】

VI. 生物機能同等物

本発明に記載のポリヌクレオチドおよび/またはタンパク質の構造に、改変および/または変化を施してもよく、それでも類似または改善された特徴を有する分子を得、そのような生物機能同等物もまた本発明に含まれる。

10

20

30

40

50

【 0 1 9 2 】

A. 改変ポリヌクレオチドおよびポリペプチド

生物機能同等物は、別個の配列を含有するように操作されているが、同時に「野生型」または標準的なタンパク質をコードする能力を保持しているポリヌクレオチドを含んでもよい。これは、遺伝子コードの縮重、すなわち同じアミノ酸をコードする多数のコドンの存在により達成される。一つの例において、当業者は、タンパク質をコードするそのポリヌクレオチドの能力を乱すことなく、ポリヌクレオチドに制限酵素認識配列を導入しようとしてもよい。

【 0 1 9 3 】

別の例において、ポリヌクレオチドは、より有意な変化を有する生物機能同等物となるように作製してもよい（および該同等物をコードしてもよい）。例えば抗体の抗原結合領域、基質分子上の結合部位、受容体等のような構造との相互作用結合能をほとんど失わずに、一定のアミノ酸をタンパク質構造における他のアミノ酸と置換することができる。いわゆる「保存的」変化は、タンパク質がその所望の機能を実行する能力に影響を与える構造変化ではないことから、タンパク質の生物活性を乱さない。このように、様々な変化を本明細書に開示の遺伝子およびタンパク質の配列に施してもよく、それらも本発明の目標をなお満たすことは、本発明者らによって企図される。

【 0 1 9 4 】

機能的同等物に関して、「生物機能が同等な」タンパク質および/またはポリヌクレオチドの定義において固有であるのは、同等な生物活性の許容されるレベルを有する分子を保持しながら、分子の既定の部分に施しうる変化の数には制限があるという考え方であることは当業者によって十分に理解される。生物機能同等物は、このように、本明細書において選択されたアミノ酸（またはコドン）におけるタンパク質（およびポリヌクレオチド）が置換されてもよいと定義される。

【 0 1 9 5 】

機能的活性

一般的に、分子の長さがより短ければ、機能を保持しながら分子内で施すことができる変化はより少なくなる。より長いドメインは、中等の数の変化を有する可能性がある。完全長のタンパク質は、より多数の変化に関して最大の寛容を有すると考えられる。しかし、その構造に高度に依存する一定の分子またはドメインは、ほとんどまたは全く改変を認容しない可能性があることを認識しなければならない。

【 0 1 9 6 】

アミノ酸置換は一般的に、アミノ酸側鎖の置換、例えばその疎水性、親水性、電荷、大きさ等の相対的類似性に基づく。アミノ酸側鎖置換基の大きさ、形状、および/またはタイプの分析により、アルギニン、リジン、および/またはヒスチジンが全て陽性荷電残基であること；アラニン、グリシン、および/またはセリンが全て類似の大きさであること；および/またはフェニルアラニン、トリプトファン、および/またはチロシンが全て一般的に類似の形状を有することが明らかとなる。したがって、これらの検討に基づき、アルギニン、リジン、および/またはヒスチジン；アラニン、グリシン、および/またはセリン；および/またはフェニルアラニン、トリプトファン、および/またはチロシンは、本明細書において生物機能同等物であると定義される。

【 0 1 9 7 】

より定量的変化を行うために、アミノ酸のヒドロパシー指数を考慮してもよい。それぞれのアミノ酸は、その疎水性および/または電荷特徴に基づいてヒドロパシー指数を割付されており、これらは：イソロイシン（+4.5）；バリン（+4.2）；ロイシン（+3.8）；フェニルアラニン（+2.8）；システイン/シスチン（+2.5）；メチオニン（+1.9）；アラニン（+1.8）；グリシン（0.4）；トレオニン（0.7）；セリン（0.8）；トリプトファン（0.9）；チロシン（1.3）；プロリン（1.6）；ヒスチジン（3.2）；グルタミン酸（3.5）；グルタミン（3.5）；アスパラギン酸（3.5）；アスパラギン（3.5）；リジン（3.9）；および/またはアルギニン（4.5）である。

10

20

30

40

50

【0198】

タンパク質に対して相互作用生物機能の付与におけるヒドロパシーアミノ酸指数の重要性は、一般的に当技術分野において理解されている（参照により本明細書に組み入れられる、Kyte & Doolittle, 1982）。一定のアミノ酸を、類似のヒドロパシー指数および/またはスコアを有する他のアミノ酸の代わりに置換してもよく、および/またはそれでもなお類似の生物活性を保持することは公知である。ヒドロパシー指数に基づく変化を作製する場合、そのヒドロパシー指数が ± 2 以内であるアミノ酸の置換が好ましく、 ± 1 以内であるアミノ酸の置換が特に好ましく、および/または ± 0.5 以内であるアミノ酸の置換はさらにより特に好ましい。

【0199】

同様に、類似のアミノ酸の置換は、特にそれによって作製される生物機能が同等なタンパク質および/またはペプチドが、本発明の一定の態様における場合のように、免疫学的態様において用いることが意図される場合に、親水性に基づいて有効に行うことができることは、当技術分野において理解される。参照により本明細書に組み入れられる米国特許第4,554,101号は、タンパク質の最大の局所平均親水性は、その隣接するアミノ酸の親水性によって支配されるため、その免疫原性および/または抗原性、すなわちタンパク質の生物特性と相関していると述べている。

【0200】

米国特許第4,554,101号において詳述されるように、以下の親水性値がアミノ酸残基に割付されている：アルギニン（+3.0）；リジン（+3.0）；アスパラギン酸（+3.0 \pm 1）；グルタミン酸（+3.0 \pm 1）；セリン（+0.3）；アスパラギン（+0.2）；グルタミン（+0.2）；グリシン（0）；トレオニン（0.4）；プロリン（-0.5 \pm 1）；アラニン（0.5）；ヒスチジン（0.5）；システイン（1.0）；メチオニン（1.3）；パリン（1.5）；ロイシン（1.8）；イソロイシン（1.8）；チロシン（2.3）；フェニルアラニン（2.5）；トリプトファン（3.4）。類似の親水性値に基づく変化を作製する場合、その親水性値が ± 2 以内であるアミノ酸置換が好ましく、 ± 1 以内であるアミノ酸置換が特に好ましく、および/または ± 0.5 以内であるアミノ酸置換がさらにより特に好ましい。

【0201】

B. 変更されたアミノ酸

多くの局面において、本発明は、適切なポリヌクレオチドの転写および翻訳を通して、細胞内でのペプチドおよびポリペプチドの合成に依存する。これらのペプチドおよびポリペプチドには、「天然の」アミノ酸20個およびその翻訳後修飾が含まれると考えられる。しかし、インビトロペプチド合成は、修飾および/または非通常アミノ酸の使用を許容する。表1は、例示的な、しかし修飾されたおよび/または非通常のアミノ酸を提供する。

【0202】

C. 模倣体

先に考察した生物機能同等物の他に、本発明者らはまた、構造的に類似の化合物を、本発明のペプチドまたはポリペプチドの重要な部分を模倣するように製剤化してもよいと企図する。ペプチド模倣体と呼ばれるそのような化合物は、本発明のペプチドと同じ方法で用いられてもよく、よって同様に機能的同等物である。

【0203】

タンパク質の二次および三次構造のエレメントを模倣する一定の模倣体がJohnson et al. (1993) によって記述されている。ペプチド模倣体の使用の背後にある基礎となる根本的理由は、タンパク質のペプチド骨格が、主に抗体および/または抗原の相互作用のような、分子相互作用を促進するようにアミノ酸側鎖を方向付けるために存在することである。このように、ペプチド模倣体は天然の分子と類似の分子相互作用を許容するように設計される。

【0204】

ペプチド模倣体の概念のいくつかの応用の成功は、非常に抗原性であることが知られているタンパク質内の ターンの模倣体に集中している。おそらく、ポリペプチド内の タ

10

20

30

40

50

ーン構造は、本明細書において考察されるように、コンピューターに基づくアルゴリズムによって予測することができる。ターンの成分アミノ酸が決定された後、アミノ酸側鎖の本質的な要素の類似の空間的方向付けを達成するように模倣体を構築することができる。

【0205】

他のアプローチは、大きいタンパク質の結合部位を模倣する生物活性コンフォメーションを産生するための魅力的な構造鋳型として、小さい、多数のジスルフィド含有タンパク質を用いることに集中している。Vita et al. (1998)。一定の毒素において進化的に保存されるように見える構造モチーフは小さく（アミノ酸30～40個）、安定で変異に関して非常に許容性である。このモチーフは、内部コアにおいて三つのジスルフィドによって架橋されたシートとヘリックスとで構成される。

10

【0206】

IIターンは、環状のL-ペプチドとD-アミノ酸を有するペプチドを用いて首尾よく模倣されている。Weisshoff et al. (1999)。同様に、Johannesson et al. (1999)は、逆方向ターン誘導特性を有する二環式トリペプチドについて報告している。

【0207】

特異的構造を生成するための方法が当技術分野において開示されている。例えば、ヘリックス模倣体は、米国特許第5,446,128号；第5,710,245号；第5,840,833号；および第5,859,184号において開示されている。これらの構造は、ペプチドまたはタンパク質をより熱に安定にして、同様にタンパク質分解に対する耐性を増加させる。6、7、11、12、13、および14員環構造が開示されている。

20

【0208】

構造的に拘束されたターンおよびバルジを生成するための方法が、例えば米国特許第5,440,013号；第5,618,914号；および第5,670,155号において開示されている。ターンは、対応する骨格コンフォメーションにおける変化を有することなく、変化した側鎖置換基を許容して、標準的な合成技法によってペプチドに組み入れるための適切な末端を有する。他のタイプの模倣体ターンには、逆方向およびターンが含まれる。逆方向ターン模倣体は、米国特許第5,475,085号および第5,929,237号に開示され、ターン模倣体は、米国特許第5,672,681号および第5,674,976号に開示されている。

【0209】

VII. 免疫学的組成物

30

本発明の特定の態様において、免疫学的組成物が使用される。簡潔にするために、以下の章は、例示的に過ぎない態様として本明細書において他所で記述されているように、本発明の任意のE.カニスgp19免疫学的組成物について言及する。例えば、組成物には、例えばSEQ ID NO:17もしくはSEQ ID NO:19の一部または全てを含むポリペプチドのようなE.カニスgp19ポリペプチド、SEQ ID NO:16もしくはSEQ ID NO:18の一部もしくは全てを含むポリヌクレオチドのようなgp19ポリヌクレオチド、SEQ ID NO:13を含むペプチドのようなペプチド、本発明のポリペプチドもしくはペプチドに対する抗体、またはその混合物の全てもしくは一部が含まれてもよい。抗体は、抗原に結合して、それによって例えば分子をその活性に関して少なくとも部分的に無効にするために利用されてもよい。他の態様において、抗原に対する抗体は、試料からの抗原の存在を検出するためのような、本発明の診断的局面において使用される。例示的な試料は、E.カニスもしくはE.シャフェンシス感染症を有することが疑われる動物、E.カニスもしくはE.シャフェンシス感染症に対して感受性がある動物、またはE.カニスもしくはE.シャフェンシス感染症を有する動物からの試料であってもよい。例示的な試料は、血液、血清、脳脊髄液、尿、糞、口腔内擦過標本、乳頭吸引液等から得てもよい。

40

【0210】

精製免疫反応組成物または免疫反応組成物の抗原性断片は、当業者に公知の標準的なプロトコールを使用することによって、新しい抗体を生成する、または既存の抗体（例えば診断アッセイにおける陽性対照として）を試験するために用いることができる。

【0211】

50

当技術分野において周知であるように、特定の免疫原に対する免疫原性は、アジュバントとして知られる免疫応答の非特異的刺激剤を用いることによって増強されうる。例示のおよび好ましいアジュバントには、完全なBCG、Detox (RIBI, Immunochem Research Inc.)、ISCOMSおよび水酸化アルミニウムアジュバント (Superphos, Biosector) が含まれる。

【0212】

例えばウサギにおける免疫原として免疫反応性組成物または免疫反応性組成物の断片を用いることによって生成されたポリクローナル抗血清が本発明に含まれる。当業者に公知であるモノクローナルおよびポリクローナル抗体産生に関する標準的なプロトコールを使用する。この技法によって生成されたモノクローナル抗体は、例えば、組換え型エーリキアcDNAクローンの同定能に関して、および公知のcDNAクローンとのそれらの識別能に関してスクリーニングすることができる。

10

【0213】

本発明は、無傷のモノクローナル抗体のみならず、免疫学的に活性な抗体断片、例えばFabもしくは(Fab)₂断片；操作された一本鎖scFv分子；またはキメラ分子、例えば一つの抗体の、例えばマウス起源の抗体の結合特異性と、もう一つの抗体、例えばヒト起源の抗体の残りの部分とを含有する抗体を包含する。

【0214】

一つの態様において、抗体またはその断片を、毒素または検出可能な標識、例えば放射性標識、非放射性同位元素標識、蛍光標識、化学発光標識、常磁性標識、酵素標識、または比色定量標識に連結させてもよい。適した毒素の例には、ジフテリア毒素、シュードモナス外毒素A、リシン、およびコレラ毒素が含まれる。適した酵素標識の例には、リンゴ酸ヒドロゲナーゼ、ブドウ球菌ヌクレアーゼ、 β -5-ステロイドイソメラーゼ、アルコールデヒドロゲナーゼ、グリセロールリン酸デヒドロゲナーゼ、トリオースリン酸イソメラーゼ、ペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、アスパラギナーゼ、グルコースオキシダーゼ、ガラクトシダーゼ、リボヌクレアーゼ、ウレアーゼ、カタラーゼ、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ、グルコアミラーゼ、アセチルコリンエステラーゼ等が含まれる。適した放射性同位元素標識の例には、³H、¹²⁵I、¹³¹I、³²P、³⁵S、¹⁴C等が含まれる。

20

【0215】

インビボ診断目的での常磁性同位元素もまた、本発明の方法に従って用いることができる。磁気共鳴画像において有用である多数の要素の例が存在する。インビボ核磁気共鳴画像における論評に関しては、例えばSchaefer et al., (1989) JACC 14, 472-480; Shreve et al., (1986) Magn. Reson. Med. 3, 336-340; Wolf, G.L., (1984) Physiol. Chem. Phys. Med. NMR 16, 93-95; Wesby et al., (1984) Physiol. Chem. Phys. Med. NMR 16, 145-155; Runge et al., (1984) Invest. Radiol. 19, 408-415を参照されたい。適した蛍光標識の例には、フルオレセイン標識、イソチオシアネート標識、ローダミン標識、フィコエリスリン標識、フィコシアニン標識、アロフィコシアニン標識、オプタルデヒド (opthaldehyde) 標識、フルオレスカミン標識等が含まれる。化学発光標識の例には、ルミナール標識、イソルミナール標識、芳香族アクリジニウムエステル標識、ルシフェリン標識、ルシフェラーゼ標識、エクオリン標識等が含まれる。

30

40

【0216】

当業者は、本発明に従って使用してもよいこれらおよび他の適した標識を知っていると考えられる。抗体またはその断片に対するこれらの標識の結合は、当業者に一般的に公知の標準的な技術を用いて達成されうる。典型的な技術は、Kennedy et al., (1976) Clin. Chim. Acta 70, 1-31; およびSchurs et al., (1977) Clin. Chim. Acta 81, 1-40に記載される。後述するカップリング技術は、グルタルアルデヒド法、過ヨウ素酸塩法、ジマレイミド法、マレイミドベンジル-N-ヒドロキシ-スクシンイミドエステル法である。これらの方法は全て参照により本明細書に組み入れられる。

【0217】

50

D. 抗体

本発明の一定の局面において、発現されたgp36またはgp47に対して一つまたは複数の抗体を産生してもよい。これらの抗体は、本明細書において記述される様々な診断および/または治療応用において用いられてもよい。

【0218】

本明細書において用いられるように、「抗体」という用語は、IgG、IgM、IgA、IgD、およびIgEのような任意の免疫学的結合物質を広く指すと意図される。一般的に、IgGおよび/またはIgMは生理的状況で最も一般的な抗体であること、およびそれらが実験室の状況において最も容易に作成されることから、IgGおよび/またはIgMが好ましい。

【0219】

「抗体」という用語は、抗体結合領域を有する任意の抗体様分子を指すために用いられ、これにはFab'、Fab、F(ab')₂、一本鎖抗体(DAB)、Fv、scFv(一本鎖Fv)等のような抗体断片が含まれる。様々な抗体に基づく構築物および断片を調製および用いるための技術は当技術分野において周知である。抗体を調製および特徴付けするための手段も同様に当技術分野において周知である(例えば、参照により本明細書に組み入れられるAntibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988を参照されたい)。

【0220】

「ミニ抗体」または「ミニボディ」もまた、本発明と共に用いるために企図される。ミニボディは、ヒンジ領域によってsFvから離れているそのC末端においてオリゴマー化ドメインを含むsFvポリペプチド鎖である。Pack et al. (1992) Biochem 31:1579-1584。オリゴマー化ドメインは、さらなるジスルフィド結合によってさらに安定化させることができる自己会合ヘリックス、例えばロイシンジッパーを含む。オリゴマー化ドメインは、ポリペプチドの機能的結合タンパク質へのインビボフォールディングを促進すると考えられているプロセスである、膜を超えてのベクターのフォールディングと適合するように設計される。一般的に、ミニボディは、当技術分野において周知の組換え法を用いて産生される。例えば、Pack et al. (1992) Biochem 31:1579-1584; Cumber et al. (1992) J Immunology 149B:120-126を参照されたい。

【0221】

抗体様結合ペプチド模倣体も同様に本発明において企図される。Liu et al., Cell Mol Biol (Noisy-le-grand). 2003 Mar;49(2):209-16は、「抗体様結合ペプチド模倣体」(A BiP)を記述しており、これは切り詰められた(pared-down)抗体として作用し、より長い血清半減期と共にあまり煩雑ではない合成法という一定の長所を有するペプチドである。

【0222】

モノクローナル抗体(MAb)は、一定の長所、例えば再現性および大規模産生を有するとして認識され、その使用は一般的に好ましい。このように、本発明は、ヒト、マウス、サル、ラット、ハムスター、ウサギ、およびニワトリ起源のモノクローナル抗体でさえ提供する。調製の容易さおよび試薬の容易な利用可能性により、マウスモノクローナル抗体がしばしば好ましいと考えられる。

【0223】

しかし、ヒト定常領域および/または可変領域ドメインを有するマウス、ラット、または他の種からのキメラ抗体、二重特異的抗体、組換え型および操作された抗体およびその断片と同様に、「ヒト化」抗体もまた企図される。本明細書において用いられるように、「ヒト化」免疫グロブリンという用語は、ヒトフレームワーク領域と非ヒト(通常、マウスまたはラット)免疫グロブリンからの一つまたは複数のCDRとを含む免疫グロブリンを指す。CDRを提供する非ヒト免疫グロブリンは「ドナー」と呼ばれ、フレームワークを提供するヒト免疫グロブリンは「アクセプター」と呼ばれる。「ヒト化抗体」は、ヒト化軽鎖とヒト化重鎖免疫グロブリンとを含む抗体である。

【0224】

E. モノクローナル抗体を生成するための例示的な方法

10

20

30

40

50

モノクローナル抗体 (MAb) を生成するための例示的な方法は一般的に、ポリクローナル抗体を調製するための系列と同じ系列に沿って始まる。簡単に説明すると、ポリクローナル抗体は、本発明に従ってLEEまたはCEE組成物によって動物を免疫する段階、および免疫した動物から抗血清を採取する段階によって調製される。

【0225】

広範囲の動物種を抗血清の産生のために用いることができる。典型的に、抗血清の産生のために用いられる動物は、ウサギ、マウス、ラット、ハムスター、モルモット、またはヤギである。動物を選ぶことは、当業者に公知であるように、操作の容易さ、血清の費用または所望の量に応じて決定される可能性がある。本発明の抗体はまた、関心対象の免疫グロブリン重鎖および軽鎖配列に関してトランスジェニックである哺乳動物または植物の生成、およびそれらから回収可能な形態での抗体の産生を通して遺伝子導入により (transgenically) 産生することができる。哺乳動物におけるトランスジェニック産生に関連して、抗体は、ヤギ、ウシ、または他の哺乳動物の乳汁において産生され、そこから回収することができる。例えば米国特許第5,827,690号、第5,756,687号、第5,750,172号、および第5,741,957号を参照されたい。

10

【0226】

同様に当技術分野において周知であるように、特定の免疫原組成物の免疫原性は、アジュバントとして知られる、免疫応答の非特異的刺激剤を用いることによって増強される。適したアジュバントには、サイトカイン、ケモカイン、補助因子、毒素、変形体、合成組成物、またはそのようなアジュバントをコードするLEEもしくはCEEのような、全ての受け入れられる免疫刺激化合物が含まれる。

20

【0227】

用いてもよいアジュバントには、IL-1、IL-2、IL-4、IL-7、IL-12、 γ -インターフェロン、GMCSF、BCG、水酸化アルミニウム、thur-MDPおよびnor-MDPのようなMDP化合物、CGP (MTP-PE)、リポドA、およびモノホスホリルリポドA (MPL) が含まれる。細菌から抽出した三つの成分を含有するRIBI、MPL、ジミコール酸トレハロース (TDM)、および2%スクアレン/Tween 80乳剤における細胞壁骨格 (CWS) も同様に企図される。MHC抗原でさえも用いてもよい。例示的な、しばしば好ましいアジュバントには、フロイントの完全アジュバント (ヒト結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) 死菌を含有する免疫応答の非特異的刺激剤)、フロイントの不完全アジュバント、および水酸化アルミニウムアジュバントが含まれる。

30

【0228】

アジュバントの他に、T細胞免疫を上方制御する、またはサプレッサー細胞活性を下方制御することが示されている生体反応修飾剤 (BRM) を同時投与することが望ましいことがある。そのようなBRMには、シメチジン (CIM; 1200 mg/d) (Smith/Kline, PA); 低用量シクロホスファミド (CYP; 300 mg/m²) (Johnson/ Mead, NJ)、 γ -インターフェロン、IL-2、もしくはIL-12のようなサイトカイン、またはB-7のような免疫ヘルパー機能に係るタンパク質をコードする遺伝子が含まれるがこれらに限定されるわけではない。

【0229】

ポリクローナル抗体の産生に用いられる免疫原組成物の量は、免疫のために用いられる動物と共に免疫原の性質に応じて変化する。皮下、筋肉内、皮内、表皮内、静脈内、および腹腔内が含まれるがこれらに限定されるわけではない多様な経路を用いて、免疫原を投与することができる。ポリクローナル抗体の産生は、免疫後の様々な時点で免疫した動物の血液を採取することによってモニターしてもよい。

40

【0230】

第二の追加免疫投与 (例えば、注射剤として提供される) も同様に与えてもよい。適した力価が達成されるまで、追加免疫および力価測定のプロセスを繰り返す。所望のレベルの免疫原性が得られれば、免疫した動物から採血して、血清を単離および保存し、および/または動物を用いてMAbを生成することができる。

【0231】

50

ウサギポリクローナル抗体を産生するために、動物を耳静脈を通して、または心穿刺によって採血することができる。採取した血液を凝固させた後、遠心分離して、全細胞および凝血から血清成分を分離する。様々な応用のために血清を用いてもよく、またはそうでなければ所望の抗体分画を、別の抗体、固相マトリクスに結合したペプチドを用いるアフィニティクロマトグラフィー、または例えばプロテインAもしくはプロテインGクロマトグラフィーのような周知の方法によって精製してもよい。

【0232】

MAbは参照により本明細書に組み入れられる、米国特許第4,196,265号において例示される技術のような周知の技術を用いることを通して容易に調製されうる。典型的に、この技術は、それが野生型または変異型組成物であれば、選択された免疫原組成物、例えば精製または部分精製タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、またはドメインによって、適した動物を免疫する段階を伴う。免疫組成物は、抗体産生細胞を刺激するために有効な方法で投与される。

10

【0233】

モノクローナル抗体(MAb)を生成するための方法は一般的に、ポリクローナル抗体を調製するための系列と同じ系列に沿って始まる。マウスおよびラットのような齧歯類は好ましい動物であるが、ウサギ、ヒツジ、またはカエル細胞を用いることも可能である。ラットを用いることは、一定の長所を提供する可能性があるが(Goding, 1986, pp. 60 61)、マウスが好ましく、BALB/cマウスは最も慣習的に用いられ、一般的に、安定な融合体のより高いパーセンテージを与えることから、BALB/cマウスが最も好ましい。

20

【0234】

動物に、一般的に先に記述したように、抗原を注射する。抗原をフロイントの完全または非完全アジュバントのようなアジュバントと混合してもよい。同じ抗原または抗原をコードするDNAの追加免疫投与は、およそ2週間間隔で行われると考えられる。

【0235】

免疫後、抗体を産生する可能性を有する体細胞、具体的にBリンパ球(B細胞)をMAb生成プロトコールにおいて用いるために選択する。これらの細胞は、生検として採取された脾臓、扁桃、もしくはリンパ節から得てもよく、または末梢血試料から得てもよい。脾臓細胞および末梢血細胞が好ましく、前者はそれらが分裂する形質芽球段階の抗体産生細胞に富む起源であることから、および後者は末梢血が容易にアクセス可能であることから好ましい。

30

【0236】

しばしば、動物のパネルを免疫して、最高の抗体力価を有する動物の脾臓を採取し、シリンジによって脾臓をホモジナイズすることによって脾臓リンパ球を得る。典型的に、免疫したマウスからの脾臓はリンパ球約 $5 \times 10^7 \sim 2 \times 10^8$ 個を含有する。

【0237】

次に、免疫した動物からの抗体産生Bリンパ球を、不死化骨髄腫細胞、一般的に免疫した動物と同じ種の細胞と融合させる。ハイブリドーマ産生融合技法において用いるのに適した骨髄腫細胞株は好ましくは、非抗体産生細胞であり、高い融合効率を有し、所望の融合細胞(ハイブリドーマ)のみの生育を支持する一定の選択的培地において生育不可能になる酵素欠損を有する。

40

【0238】

当業者に公知であるように、多くの骨髄腫細胞の任意の一つを用いてもよい(Goding, pp. 65 66, 1986; Campbell, pp. 75 83, 1984, 引用)。例えば、免疫動物がマウスである場合、P3 X63/Ag8、X63 Ag8.653、NS1/1.Ag 4 1、Sp210 Ag14、FO、NS0/U、MPC 11、MPC11 X45 GTG 1.7、およびS194/5XX0 Bu1を用いてもよく;ラットの場合、R210.RCY3、Y3 Ag 1.2.3、IR983Fおよび4B210を用いてもよい;ならびにU 266、GM1500 GRG2、LICR LON HMy2、およびUC729 6は全て、ヒト細胞融合体に関連して有用である。骨髄腫発現系に関する考察に関しては、Yoo et al., J Immunol Methods. 2002 Mar 1;261(1-2):1-20を参照されたい。

50

【0239】

一つの好ましいマウス骨髄腫細胞は、NS-1骨髄腫細胞株（P3-NS-1-Ag4-1とも呼ばれる）であり、これは細胞株寄託番号GM3573を要請することによって、NIGMS Human Genetic Mutant Cell Repositoryから容易に入手可能である。用いてもよいもう一つのマウス骨髄腫細胞株は、8アザグアニン耐性マウス骨髄腫SP2/0非産生細胞株である。

【0240】

抗体産生脾臓またはリンパ節細胞と骨髄腫細胞とのハイブリッドを生成するための方法は通常、骨髄腫細胞と体細胞とを2:1の比率で混合する段階を含むが、比率は細胞膜の融合を促進する物質または複数の物質（化学物質または電気物質）の存在下でそれぞれ、約20:1~約1:1まで変化してもよい。センダイウイルスを用いる融合法は、Kohler and Milstein (1975; 1976) によって記述されており、Geffer et al., (1977) による37% (v/v) PEGのようなポリエチレングリコール (PEG) を用いる方法が記述されている。電氣的に誘発された融合法を用いることも適切である (Goding pp. 71 74, 1986)。

10

【0241】

融合技法は通常、低い頻度で、約 1×10^{-6} ~ 1×10^{-8} の生存ハイブリッドを産生する。しかし、生存融合ハイブリッドは、選択培地において培養することによって、親の非融合細胞（特に、通常無限に分裂し続けると考えられる非融合骨髄腫細胞）から識別されることから、これは問題を提起しない。選択培地は一般的に、組織培養培地においてヌクレオチドのデノボ合成を遮断する物質を含有する培地である。例示的なおよび好ましい物質は、アミノプテリン、メトトレキセート、およびアザセリンである。アミノプテリンおよびメトトレキセートは、プリンおよびピリミジンの両方のデノボ合成を遮断するが、アザセリンはプリン合成のみを遮断する。アミノプテリンまたはメトトレキセートを用いる場合、ヌクレオチド源としてヒポキサンチンおよびチミジン培地に補給する（HAT培地）。アザセリンを用いる場合、ヒポキサンチンを培地に補給する。

20

【0242】

好ましい選択培地はHATである。ヌクレオチドサルベージ経路を操作することができる細胞のみがHAT培地において生存することができる。骨髄腫細胞はサルベージ経路における重要な酵素、例えばヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ (HPRT) を欠損し、それらは生存することができない。B細胞はこの経路を操作することができるが、それらは培養において限定された寿命を有し、一般的に約2週間以内に死滅する。したがって、選択培地を生存できる細胞のみが、骨髄腫およびB細胞から形成されたハイブリッドである。

30

【0243】

この培養は、特異的ハイブリドーマが選択されるハイブリドーマ集団を提供する。典型的に、ハイブリドーマの選択は、マイクロタイプレートにおける単クローン希釈によって細胞を培養する段階の後、個々のクローン上清を所望の反応性に関して試験する（約2~3週間後）ことによって行われる。アッセイは、放射性免疫測定法、酵素免疫測定法、細胞障害アッセイ、プラークアッセイ、ドット免疫結合アッセイ等のように、感度がよく、単純かつ迅速であるべきである。

【0244】

次に、選択されたハイブリドーマを連続希釈して、個々の抗体産生細胞株へとクローニングし、MAbを提供するためにクローンを無限に成長させることができる。細胞株を二つの基本的方法でMAb産生のために活用してもよい。第一に、ハイブリドーマの試料を、当初の融合体のための体細胞および骨髄腫細胞を提供するために用いられる組織適合性のタイプの動物（例えば、同系マウス）に注入（しばしば腹腔内に）することができる。任意で、動物を注射前に炭化水素、特にプリスタン（テトラメチルペンタデカン）のような油によってプライミングする。注入された動物は、融合細胞ハイブリッドによって産生される特異的モノクローナル抗体を分泌する腫瘍を発生させる。血清または腹水のような動物の体液を採取して、高濃度のMAbを提供することができる。第二に個々の細胞株をインビトロにおいて培養することができ、そこで、MAbは培養培地に自然と分泌され、そこから

40

50

抗体を高濃度で容易に得ることができる。

【0245】

さらに、産生細胞株からの本発明の抗体（またはそれに由来する他の部分）の発現を、多数の公知の技術を用いて増強することができる。例えば、グルタミンシンターゼおよびDHFR遺伝子発現系は、一定の条件下で発現を増強するための一般的アプローチである。限界希釈クローニングおよびマイクロドロップ（Microdrop）技術のような通常の技術を用いて、高発現細胞クローンを同定することができる。GS系は、欧州特許第0 216 846号、第0 256 055号、および第0 323 997号、ならびに欧州特許出願第89303964.4号に関連して全体または部分的に考察されている。

【0246】

いずれかの手段によって産生されたMAbは、必要に応じて濾過、遠心分離、およびHPLCまたはアフィニティクロマトグラフィーのような様々なクロマトグラフィー法を用いてさらに精製してもよい。本発明のモノクローナル抗体の断片は、ペプシンまたはパピンのような酵素による消化を含む方法によって、および/または化学的還元によるジスルフィド結合の切断によって産生されたモノクローナル抗体から得ることができる。または、本発明によって包含されるモノクローナル抗体断片は、自動ペプチド合成機を用いて合成することができる。

【0247】

同様に、分子クローニングアプローチを用いてモノクローナル抗体を生成してもよいことが企図される。一つの態様において、免疫動物の脾臓から単離したRNAから、コンビナトリアル免疫グロブリンファージミドライブラリーを調製して、適切な抗体を発現するファージミドを、抗原を発現する細胞および対照細胞を用いるパニングによって選択する。従来のハイブリドーマ技術に対するこのアプローチの長所は、およそ 10^4 倍もの多くの抗体を1回のラウンドで産生およびスクリーニングできる点、ならびにHおよびL鎖の組み合わせによって新しい特異性が生成され、それによって適切な抗体を発見する機会がさらに増加する点にある。もう一つの例において、LEEまたはCEEを用いて無細胞系でインビトロにおいて抗原を産生することができる。これらは、一本鎖抗体ライブラリーを走査するための標的として用いることができる。これは、動物を用いることなく異なる多くの抗体を非常に迅速に同定することができると考えられる。

【0248】

本発明に記載の抗体を産生するための本発明の別の態様は、Cre媒介部位特異的組換えを用いて改変免疫グロブリン座を含む細胞のゲノム配列から抗体を発現する細胞を産生する方法を記述する、米国特許第6,091,001号において見い出され、開示される。方法は、第一のlox座が部位特異的相同的組換えを通してゲノム配列に挿入されるように、lox座と、改変領域に変換されるゲノム配列の免疫グロブリン座の領域に隣接する第一のDNA配列と相同なターゲティング配列とを含む相同性ターゲティングベクターを抗体産生細胞に最初にトランスフェクションする段階を伴う。次に、組み込まれたlox部位とのCre媒介組換えに適した第二のlox部位と、免疫グロブリン座の領域を改変領域に変換するための改変配列とを含むloxターゲティングベクターを細胞にトランスフェクションする。この変換は、改変配列がlox部位のCre媒介部位特異的組換えを通してゲノム配列に挿入されるように、インビボにおいてCreとlox部位を相互作用させることによって行われる。

【0249】

または、本発明によって包含されるモノクローナル抗体断片は、自動ペプチド合成機を用いて、または大腸菌における完全長の遺伝子もしくは遺伝子断片の発現によって、合成することができる。

【0250】

F. 抗体結合体

本発明はさらに、少なくとも一つの物質に連結して抗体結合体を形成する、一般的にモノクローナル型のgp19タンパク質、ポリペプチド、およびペプチドに対する抗体を提供する。診断または治療物質としての抗体分子の有効性を増加させるために、少なくとも一つ

10

20

30

40

50

の所望の分子または部分で連結、共有結合、または複合体を形成することが慣例的である。そのような分子または部分は、少なくとも一つのエフェクターまたはレポーター分子であってもよいがそれらに限定されない。エフェクター分子は、所望の活性、例えば細胞障害活性を有する分子を含む。抗体に付着しているエフェクター分子の非制限的な例には、毒素、抗腫瘍物質、治療酵素、放射標識ヌクレオチド、抗ウイルス剤、キレート剤、サイトカイン、増殖因子、およびオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドが含まれる。対照的に、レポーター分子は、アッセイを用いて検出される可能性がある任意の部分として定義される。抗体に結合しているレポーター分子の非制限的な例には、酵素、放射標識、ハプテン、蛍光標識、リン光分子、化学発光分子、発色団、発光分子、光親和性分子、着色粒子、またはビオチンのようなリガンドが含まれる。

10

【0251】

十分な選択性、特異性、または親和性の任意の抗体を、抗体結合体の基礎として使用してもよい。そのような特性は、当業者に公知の慣例的な免疫学的スクリーニング方法論を用いて評価してもよい。標準的な抗原結合部位の他に、抗体分子における生物活性分子に対する結合部位には、病原体、B細胞スーパー抗原、T細胞共受容体CD4およびHIV-1エンベロープに結合することができる可変ドメインに存在する部位が含まれる (Sasso et al., 1989; Shorki et al., 1991; Silvermann et al., 1995; Cleary et al., 1994; Lenert et al., 1990; Berberian et al., 1993; Kreier et al., 1991)。さらに、可変ドメインは、抗体の自己結合に関係しており (Kang et al., 1988)、抗抗体によって認識されるエピトープ (イディオトープ) を含有する (Kohler et al., 1989)。

20

【0252】

抗体結合体の一定の例は、抗体が検出可能な標識に連結している結合体である。「検出可能な標識」は、その使用によって、それらが付着している抗体が検出され、および/または必要に応じてさらに定量される、その特異的機能的特性および/または化学的特徴により検出される化合物および/またはエレメントである。もう一つのそのような例は、細胞障害剤または抗細胞剤に連結した抗体を含む結合体の形成であり、「免疫毒素」と呼ばれる。

【0253】

抗体結合体は一般的に、診断物質として用いるために好ましい。抗体診断物質は一般的に二つのクラスに分類され、多様な免疫測定法のようなインビトロ診断において用いるための抗体、および/または「抗体指向性の (antibody directed) 造影」として一般的に知られるインビボ診断プロトコールにおいて用いるための抗体に分類される。

30

【0254】

多くの適切な造影剤が、その抗体に対する付着法と共に、当技術分野において公知である (例えば、それぞれが参照により本明細書に組み入れられる、米国特許第5,021,236号; 第4,938,948号; および第4,472,509号を参照されたい)。用いられる造影部分は、常時性イオン; 放射活性同位元素; 蛍光体; NMRにより検出可能な物質; X線造影剤となりうる。

【0255】

常磁性イオンの場合、例としてクロム (III)、マンガン (II)、鉄 (III)、鉄 (II)、コバルト (II)、ニッケル (II)、銅 (II)、ネオジウム (III)、サマリウム (III)、イッテルビウム (III)、ガドリニウム (III)、バナジウム (II)、テルビウム (III)、ジスプロシウム (III)、ホルミウム (III) および/またはエルビウム (III) のようなイオンが挙げられ、ガドリニウムが特に好ましい。X線造影のような他の状況において有用なイオンには、ランタン (III)、金 (III)、鉛 (II) が含まれるがこれらに限定されるわけではなく、特にビスマス (III) が好ましい。

40

【0256】

治療および/または診断応用のための放射活性同位元素の場合、アスタチン²¹¹、¹⁴炭素、⁵¹クロム、³⁶塩素、⁵⁷コバルト、⁵⁸コバルト、銅⁶⁷、¹⁵²Eu、ガリウム⁶⁷、³水素、ヨウ素¹²³、ヨウ素¹²⁵、ヨウ素¹³¹、インジウム¹¹¹、⁵⁹鉄、³²リン、レニウム186、レニウ

50

ム188、⁷⁵セレン、³⁵イオウ、テクネチウム99mおよび/またはイットリウム⁹⁰が挙げられる。¹²⁵Iは、一定の態様において用いるためにしばしば好ましく、テクネチウム^{99m}および/またはインジウム¹¹¹もまた、その低エネルギーのためにおよびロングレンジ検出に適切であるためにしばしば好ましい。本発明の放射活性標識モノクローナル抗体は、当技術分野において周知の方法に従って産生されてもよい。例えば、モノクローナル抗体は、ヨウ化ナトリウムおよび/またはカリウム、および次亜塩素酸ナトリウムのような化学酸化剤またはラクトペルオキシダーゼのような酵素酸化剤と接触させることによってヨウ素化することができる。本発明に記載のモノクローナル抗体は、リガンド交換プロセスによって、例えば過テクネチウム酸をスズ溶液(stannous solution)によって還元する段階、還元したテクネチウムをSephadexカラム上でキレート化する段階、および抗体をこのカラムに適用する段階によって、テクネチウム99mによって標識してもよい。または、例えば過テクネチウム酸、 SnCl_2 のような還元剤、フタル酸ナトリウム-カリウム溶液のような緩衝液、および抗体をインキュベートすることによる直接標識技術を用いてもよい。金属イオンとして存在する放射性同位元素を抗体に結合させるためにしばしば用いられる中間官能基は、ジエチレントリアミン五酢酸(DTPA)、またはエチレンジアミン四酢酸(EDTA)である。

10

【0257】

結合体として用いるために企図される蛍光標識には、Alexa 350、Alexa 430、AMCA、BODIPY 630/650、BODIPY 650/665、BODIPY-FL、BODIPY-R6G、BODIPY-TMR、BODIPY-TRX、カスケードブルー、Cy3、Cy5、6-FAM、フルオレセインイソチオシアネート、HEX、6-JOE、オレゴングリーン488、オレゴングリーン500、オレゴングリーン514、パシフィックブルー、REG、ローダミンググリーン、ローダミンレッド、レノグラフィン、ROX、TAMRA、TET、テトラメチルローダミン、および/またはテキサスレッドが含まれる。

20

【0258】

本発明において企図されるもう一つのタイプの抗体結合体は、抗体が二次結合リガンドおよび/または酵素(酵素タグ)に連結され、色素形成基質と接触した場合に発色産物を生成する、インビボにおいて主に用いることが企図される結合体である。適した酵素の例には、ウレアーゼ、アルカリホスファターゼ、(西洋ワサビ)水素ペルオキシダーゼ、またはグルコースオキシダーゼが含まれる。好ましい二次結合リガンドは、ビオチンおよび/またはアビジンおよびストレプトアビジン化合物である。そのような標識を用いることは当業者に周知であり、例えばそのそれぞれが参照により本明細書に組み入れられる、米国特許第3,817,837号;第3,850,752号;第3,939,350号;第3,996,345号;第4,277,437号;第4,275,149号および第4,366,241号に記述される。

30

【0259】

分子を抗体に部位特異的に付着させるなもう一つの公知の方法は、ハプテンに基づくアフィニティ標識と抗体との反応を含む。本質的に、ハプテンに基づくアフィニティ標識は、抗原結合部位においてアミノ酸と反応し、それによってこの部位を破壊して、特異的抗原反応を遮断する。しかし、これは抗体結合体による抗原結合の損失が起こることから、有利ではない可能性がある。

【0260】

アジド基を含有する分子もまた、低強度紫外光によって生成される反応性のナイトレン中間体を通してタンパク質と共有結合を形成するために用いられる可能性がある(Potter & Haley, 1983)。特に、プリンヌクレオチドの2-および8-アジド類似体は、粗細胞抽出物におけるヌクレオチド結合タンパク質を同定するための部位特異的フォトプローブとして用いられている(Owens & Haley, 1987; Atherton et al., 1985)。2-および8-アジドヌクレオチドはまた、精製タンパク質のヌクレオチド結合ドメインをマッピングするためにも用いられており(Khatoun et al., 1989; King et al., 1989; およびDholakia et al., 1989)、かつ抗体結合剤として用いられうる。

40

【0261】

抗体をその結合部分に付着または結合させるためにいくつかの方法が当技術分野におい

50

て公知である。いくつかの付着法は、例えば抗体に付着させたジエチレントリアミン五酢酸無水物（DTPA）；エチレントリアミン四酢酸；N-クロロ-p-トルエンスルホンアミド；および/またはテトラクロロ-3,4,5,6-ジフェニルグリコウリル（diphenylglycouril）-3のような有機キレート剤を使用する金属キレート錯体を用いることを伴う（それぞれ参照により本明細書に組み入れられる、米国特許第4,472,509号および第4,938,948号）。モノクローナル抗体はまた、グルタルアルデヒドまたは過ヨウ素酸塩のようなカップリング剤の存在下で酵素と反応させてもよい。フルオレセインマーカ-との結合体は、これらのカップリング剤の存在下でまたはイソチオシアネートとの反応によって調製される。米国特許第4,938,948号において、乳腺腫瘍の造影は、モノクローナル抗体を用いて達成され、検出可能な造影部分をメチル-p-ヒドロキシベンズイミデートまたはN-スクシンイミジル-3-(4-ヒドロキシフェニル)プロピオネートのようないんカーを用いて抗体に結合させる。

10

【0262】

他の態様において、抗体結合部位を変化させない反応条件を用いて、免疫グロブリンのFc領域にスルフヒドリル基を選択的に導入することによる免疫グロブリンの誘導体化が企図される。本発明の方法論に従って産生された抗体結合体は、改善された寿命、特異性、および感度を示すことが開示されている（参照により本明細書に組み入れられる米国特許第5,196,066号）。Fc領域における糖質残基に結合しているエフェクターまたはレポーター分子の部位特異的付着も同様に、文献において開示されている（O'Shannessy et al., 1987）。このアプローチは、現在臨床評価中である診断的および治療的に有望な抗体を産生するために報告されている。

20

【0263】

本発明の別の態様において、抗gp36抗体は、米国特許第6,048,616号；第5,990,479号；第5,690,807号；第5,505,928号；第5,262,357号（その全てのその全内容物が参照により本明細書に組み入れられる）と共にPCT公開番号99/26299（1999年5月27日に公開）に記述されるような半導体ナノ結晶に連結される。特に、本発明の生物および化学アッセイにおいて半導体ナノ結晶として用いるための例示的な材料には、ZnS、ZnSe、ZnTe、CdS、CdSe、CdTe、MgS、MgSe、MgTe、CaS、CaSe、CaTe、SrS、SrSe、SrTe、BaS、BaSe、BaTe、GaN、GaP、GaAs、GaSb、InP、InAs、InSb、AlS、AlP、AlSb、PbS、PbSe、Ge、およびSi、ならびにその三級および四級混合物のようなII~VI属、III~V、およびIV属半導体が含まれる、先に記述された材料が含まれるがこれらに限定されるわけではない。半導体ナノ結晶を抗体に連結させる方法は、米国特許第6,630,307号および第6,274,323号に記述される。

30

【0264】

G. 免疫検出法

なおさらなる態様において、本発明は、免疫反応性ポリペプチドのような生物学的成分を結合、精製、除去、定量、および/またはそうでなければ一般的に検出するための免疫検出法に関する。本発明に従って調製される抗体は、野生型および/または変異型タンパク質、ポリペプチド、および/またはペプチドを検出するために使用されてもよい。野生型および/または変異型抗体を用いることが企図される。いくつかの免疫検出法には、いくつか例を挙げれば、酵素結合免疫吸着測定法（ELISA）、放射性免疫測定法（RIA）、免疫放射線測定法、蛍光免疫測定法、化学発光アッセイ、生物発光アッセイ、およびウエストンプロットが含まれる。様々な有用な免疫検出法の段階が、例えばそれぞれ参照により本明細書に組み入れられる、Doolittle MH and Ben-Zeev O, 1999；Gulbis B and Galand P, 1993；De Jager R et al., 1993；およびNakamura et al., 1987のような科学文献に記述されている。

40

【0265】

一般的に、免疫結合法には、タンパク質、ポリペプチド、および/またはペプチドを含むことが疑われる試料を得る段階、および場合によっては免疫複合体を形成させるために有効な条件で、試料を本発明に記載の第一の抗gp19抗体に接触させる段階が含まれる。

【0266】

これらの方法には、患者の試料から野生型および/または変異型タンパク質、ポリペ

50

チド、および/またはペプチドを精製するために用いられうるように、野生型および/または変異型タンパク質を精製するための方法、および/または組換えによって発現された野生型または変異型タンパク質、ポリペプチド、および/またはペプチドを精製するための方法が含まれる。これらの例において、抗体は、抗原性の野生型および/または変異型タンパク質、ポリペプチド、および/またはペプチド成分を試料から除去する。抗体は好ましくは、カラムマトリクスの形態のような、固相支持体に連結させてもよく、野生型または変異型タンパク質抗原成分を含有することが疑われる試料を、固定した抗体に添加する。望ましくない成分はカラムから洗浄され、固定した抗体に対して免疫複合体を形成した抗原が残され、次に、カラムから野生型または変異型タンパク質および/またはペプチドを取り除くことによって、野生型または変異型タンパク質抗原を回収する。

10

【0267】

免疫結合法にはまた、試料における野生型または変異型タンパク質反応成分の量を検出および定量するための方法、ならびに結合プロセスの際に形成された任意の免疫複合体を検出および定量するための方法が含まれる。本明細書においては、野生型または変異型タンパク質および/またはペプチドを含むことが疑われる、および/またはE.カニス生物を含むことが疑われる試料を得て、野生型または変異型に対する抗体に試料を接触させ、ならびに次に、特異的な条件で形成された免疫複合体の量を検出および定量することが考えられる。

【0268】

抗原の検出に関して、分析される生物試料は、標本、ホモジナイズした組織抽出物、細胞、上記の野生型または変異型タンパク質含有組成物の任意の分離および/または精製形態、または感染時にE.カニス生物に接触するようになる任意の生物学的液体のような、野生型または変異型タンパク質特異的抗原を含有することが疑われる任意の試料であってもよい。

20

【0269】

選ばれた生物試料を、免疫複合体（一次免疫複合体）を形成させるために有効な条件および十分な期間、抗体に接触させる段階は、一般的に抗体組成物を試料に単純に加える段階、および抗体が、存在する任意のタンパク質抗原と免疫複合体を形成する、すなわち結合するのに十分な長い期間、混合物をインキュベートする段階の問題である。この後、組織切片、ELISAプレート、ドットプロット、またはウエスタンプロットのような試料-抗体組成物を一般的に洗浄して、任意の非特異的結合抗体種を洗浄し、一次免疫複体内で特異的に結合した抗体のみを検出する。

30

【0270】

一般的に、免疫複合体形成の検出は当技術分野において周知であり、多数のアプローチの応用を通して達成されてもよい。これらの方法は一般的に、任意の放射活性、蛍光、生物学的および酵素的タグのような、標識またはマーカーの検出に基づく。そのような標識の使用に関する米国特許には、それぞれ参照により本明細書に組み入れられる、第3,817,837号；第3,850,752号；第3,939,350号；第3,996,345号；第4,277,437号；第4,275,149号；および第4,366,241号が含まれる。当然、当技術分野において公知であるように、二次抗体および/またはビオチン/アビジンリガンド結合配置のような二次結合リガンドを用いることを通してさらなる長所が発見される可能性がある。

40

【0271】

検出のために使用される抗体はそれ自体、検出可能な標識に連結してもよく、次にこの標識を単純に検出して、それによって組成物における一次免疫複合体の量を決定することができる。または、一次免疫複体内で結合するようになる第一の抗体は、その抗体に対する結合親和性を有する第二の結合リガンドによって検出されてもよい。これらの場合、第二の結合リガンドは、検出可能な標識に連結してもよい。第二の結合リガンドはそれ自体、しばしば抗体であり、このように「二次」抗体と呼ばれることがある。一次免疫複合体を標識二次結合リガンド、または抗体に、二次免疫複体の形成を可能にするのに有効な条件および十分な期間、接触させる。次に、二次免疫複合体を一般的に洗浄して、任意

50

の非特異的結合標識二次抗体またはリガンドを除去して、二次免疫複合体に残っている標識を検出する。

【0272】

さらなる方法には、二段階アプローチによって一次免疫複合体を検出する段階が含まれる。抗体に対して結合親和性を有する抗体のような、第二の結合リガンドを用いて、先に記述したように二次免疫複合体を形成する。洗浄後、二次免疫複合体を、第二抗体に対して結合親和性を有する第三の結合リガンドまたは抗体に、この場合も免疫複合体（三次免疫複合体）の形成を可能にするのに有効な条件および十分な期間、接触させる。第三のリガンドまたは抗体を検出可能な標識に連結して、このように形成された三次免疫複合体を検出する。この系は、望ましい場合はシグナル増幅を提供する可能性がある。

10

【0273】

一つの免疫検出法は、異なる二つの抗体を用いる。第一段階のビオチニル化モノクローナルまたはポリクローナル抗体を用いて標的抗原を検出し、次に第二段階の抗体を用いて、複合体を形成したビオチンに結合したビオチンを検出する。その方法において、試験される試料は、最初に第一段階抗体を含有する溶液中でインキュベートされる。標的抗原が存在する場合、抗体のいくつかは、抗原に結合してビオチニル化抗体/抗原複合体を形成する。次に、抗体/抗原複合体を、ストレプトアビジン（またはアビジン）、ビオチニル化DNA、および/または相補的ビオチニル化DNAの連続的な溶液におけるインキュベーションによって増幅して、各段階は抗体/抗原複合体にさらなるビオチン部位を付加する。適した増幅レベルが達成されるまで増幅段階を繰り返し、その時点で試料を、ビオチンに対する第二段階抗体を含有する溶液においてインキュベートする。この第二段階抗体を、例えば色素原基質を用いる組織酵素学によって、抗体/抗原複合体の存在を検出するために用いることができる酵素によって標識する。適した増幅によって、肉眼的に可視化可能な結合体を産生することができる。

20

【0274】

公知の別の免疫検出方法は、免疫-PCR（ポリメラーゼ連鎖反応）方法論を利用する。PCR法は、ビオチニル化DNAとのインキュベーションまではCantor法と類似であるが、ストレプトアビジンおよびビオチニル化DNAインキュベーションの多数回のラウンドを用いる代わりに、DNA/ビオチン/ストレプトアビジン/抗体複合体を、抗体を放出する低pHまたは高塩緩衝液によって洗浄する。次に、得られた洗浄液を用いて、適切な対照と共に適したプライマーによるPCR反応を行う。少なくとも理論的に、PCRの膨大な増幅能および特異性を利用して一つの抗原分子を検出することができる。

30

【0275】

本発明の免疫検出法は、例えば白血病が含まれる癌のような、様々な形態の過増殖疾患のような状態の診断および予後において明白な有用性を有する。よって、野生型または変異型タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、および/または変異体を含有することが疑われる生物および/または臨床試料を用いる。しかし、これらの態様はまた、例えばハイブリドーマの選択において抗原または抗体試料の力価測定におけるような、非臨床試料に対する応用も有する。

【0276】

H. ELISA

先に詳述したように、その最も単純および/または直接的な意味における免疫測定法は、結合アッセイである。一定の好ましい免疫測定法は、当技術分野において公知の、様々なタイプの酵素結合免疫吸着測定法（ELISA）および/または放射性免疫測定法（RIA）である。組織切片を用いる免疫組織化学検出も同様に特に有用である。しかし、検出はそのような技術に限定されず、および/またはウエスタンブロットティング、ドットブロットティング、FACS分析等も同様に用いてもよいと容易に認識されると考えられる。

40

【0277】

一つの例示的なELISAにおいて、本発明の抗体は、ポリスチレンマイクロタイタープレートにおけるウェルのような、タンパク質親和性を示す選択された表面に固定される。次

50

に、臨床試料のような野生型および/または変異型タンパク質抗原を含有することが疑われる試験組成物をウェルに加える。結合および/または洗浄して、非特異的に結合した免疫複合体を除去した後、結合した野生型および/または変異型タンパク質抗原を検出してもよい。検出は一般的に、検出可能な標識に連結される別の抗体を付加することによって達成される。このタイプのELISAは、単純な「サンドイッチELISA」である。検出はまた、第二抗体を付加した後に、第二抗体に対して結合親和性を有しかつ検出可能な標識に連結されている第三抗体を付加することによって達成されてもよい。

【0278】

別の例示的なELISAにおいて、野生型および/または変異型タンパク質抗原を含有することが疑われる試料をウェル表面に固定して、および/または本発明の抗体に接触させる。結合および/または洗浄して、非特異的に結合した免疫複合体を除去した後、結合抗体を検出する。最初の抗体が、検出可能な標識に連結している場合、免疫複合体を直接検出してもよい。この場合も、免疫複合体は、第一抗体に対する結合親和性を有しかつ検出可能な標識に連結されている第二抗体を用いて検出してもよい。

10

【0279】

野生型および/または変異型タンパク質、ポリペプチド、および/またはペプチドが固定されているもう一つのELISAは、検出において抗体の競合を用いることを伴う。このELISAにおいて、野生型または変異型タンパク質に対する標識抗体をウェルに付加して、結合させ、その標識によって検出する。次に、未知試料における野生型または変異型タンパク質抗原の量は、コーティングしたウェルとのインキュベーションの前および/または間に、野生型および/または変異型に対する標識抗体と試料とを混合することによって決定する。試料における野生型および/または変異型タンパク質の存在は、ウェルに対する結合に利用できる野生型または変異型タンパク質に対する抗体の量を低減するように作用して、このように最終的なシグナルを低減させる。これはまた、未知試料における野生型または変異型タンパク質に対する抗体を検出するためにも適切であり、この場合、非標識抗体は、抗原コーティングウェルに結合し、同様に標識抗体への結合に利用できる抗原の量を低減させる。

20

【0280】

使用されるフォーマットによらず、ELISAはコーティング、インキュベーションおよび結合、非特異的結合種を除去するための洗浄、ならびに結合した免疫複合体の検出のような、一般的な一定の特色を有する。これらを以下に記述する。

30

【0281】

抗原または抗体のいずれかをプレートにコーティングする場合、一般的にプレートのウェルを抗原または抗体の溶液と共に終夜、または明記された時間、インキュベートする。次にプレートのウェルを洗浄して、不完全に吸着された材料を除去する。ウェルの残っている利用可能な任意の表面を、試験抗血清に関して抗原的に中性である非特異的タンパク質によって「コーティング」する。これらには、ウシ血清アルブミン(BSA)、カゼインまたは乳汁粉末溶液が含まれる。コーティングによって、固定表面上の非特異的吸着部位を遮断することができ、このように、表面上の抗血清の非特異的結合によって引き起こされたバックグラウンドを低減させる。

40

【0282】

ELISAにおいて、おそらく直接技法よりむしろ二次または三次検出手段を用いることはより慣例的である。このように、タンパク質または抗体をウェルに結合させて、バックグラウンドを低減させるために非反応性材料によってコーティングし、洗浄して非結合材料を除去した後、固定表面を、試験される生物学的試料に、免疫複合体(抗原/抗体)形成を可能にするのに有効な条件下で接触させる。次に、免疫複合体の検出は、標識された二次結合リガンドまたは抗体、および標識された三次抗体または第三の結合リガンドと共に二次結合リガンドまたは抗体を必要とする。

【0283】

「免疫複合体(抗原/抗体)の形成を可能にするのに有効な条件下」とは、条件に、好

50

ましくはBSA、ウシ グロブリン (BGG)、またはリン酸緩衝生理食塩液 (PBS) / Tweenのような溶液によって抗原および / または抗体を希釈する段階が含まれることを意味する。これらの付加された物質はまた、非特異的バックグラウンドの低減を補助する傾向がある。

【 0 2 8 4 】

「適した」条件はまた、インキュベーションが、有効な結合を可能にするのに十分な温度または期間で行われることを意味する。インキュベーション段階は典型的に、約1~2~4時間等で、温度は好ましくは25 ~ 27 のオーダーであり、または約4 で終夜等であってもよい。

【 0 2 8 5 】

ELISAにおける全てのインキュベーション段階の後、非複合体形成材料を除去するために接触した表面を洗浄する。好ましい洗浄技法には、PBS/Tweenまたはホウ酸緩衝液のような溶液による洗浄が含まれる。試験試料と最初に結合した材料との間の特異的免疫複合体の形成、およびその後の洗浄後、微量の免疫複合体の存在でさえも決定される可能性がある。

【 0 2 8 6 】

検出手段を提供するために、第二または第三抗体は、検出を可能にするために関連する標識を有すると考えられる。好ましくは、これは適切な色素原基質と共にインキュベートした場合に発色を生成する酵素であると考えられる。このように、例えば、第一および第二の免疫複合体をウレアーゼ、グルコースオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、または水素ペルオキシダーゼ結合抗体に、さらなる免疫複合体形成の発生に都合がよい期間および条件 (例えば、PBS-TweenのようなPBS含有溶液において室温で2時間インキュベーション) で接触させる、またはそれらと共にインキュベートすることが要求されることが考えられる。

【 0 2 8 7 】

標識抗体と共にインキュベーションし、洗浄して非結合材料を除去した後、標識の量を、例えば尿素、プロモクレゾールパープル、もしくは2,2'-アジノ-ジ-(3-エチル-ベンズチアゾリン-6-スルホン酸 (ABTS) のような色素形成基質、または酵素標識がペルオキシダーゼの場合にはH₂O₂と共にインキュベートすることによって定量する。次に定量は、例えば可視スペクトルの分光光度計を用いて生成された色素の程度を測定することによって達成される。

【 0 2 8 8 】

1. 免疫組織化学

本発明の抗体はまた、免疫組織化学 (IHC) による試験のために調製された新鮮な凍結および / またはホルマリン固定の両方のパラフィン包埋組織ブロックと共に用いてもよい。これらの粒状の標本から組織ブロックを調製する方法は、様々な予後因子に関するこれまでのIHC試験において用いられて成功しており、および / または当業者に周知である (Brown et al., 1990 ; Abbondanzo et al., 1990 ; Allred et al., 1990)。

【 0 2 8 9 】

簡単に説明すると、凍結した「粉碎された」組織50 ngを、小さいプラスチック製のカプセルにおいて室温でリン酸緩衝生理食塩液 (PBS) 中で再水和させる段階 ; 粒子を遠心分離によって沈降させる段階 ; 粘性の包埋培地 (OCT) にそれらを浮遊させる段階 ; カプセルを上下にして、および / または遠心分離によって再度沈降させる段階 ; 70 のイソペンタンにおいて瞬間凍結させる段階 ; プラスチックカプセルを切断して、および / または凍結した柱状組織を採取する段階 ; 柱状組織を低温槽マイクロームチャックに固定する段階 ; および / または25 ~ 50枚の連続切片を切断する段階によって、凍結切片を調製してもよい。

【 0 2 9 0 】

永久的な切片は、プラスチック製の微量遠心管における試料50 mgの再水和させる段階 ; 4時間固定するために10%ホルマリンに浮遊させる段階 ; 洗浄 / 沈降段階 ; 温かい2.5%

10

20

30

40

50

寒天に浮遊させる段階；沈降させる段階；氷水において冷却して寒天を硬化させる段階；組織／寒天ブロックをチューブから取り出す段階；ブロックをパラフィンの中に浸潤および／または包埋する段階；および／または最大50枚の連続永久切片を切断する段階を伴う、類似の方法によって調製されてもよい。

【0291】

J. 免疫電子顕微鏡

本発明の抗体はまた、細胞内組織成分を同定するために電子顕微鏡と共に用いてもよい。簡単に説明すると、電子密度の高い標識を抗体に直接または間接的に結合させる。本発明に記載の電子密度の高い標識の例は、フェリチンおよび金である。電子密度の高い標識は電子を吸収して、電子顕微鏡によって可視化することができる。

10

【0292】

K. 免疫検出キット

なおさらなる態様において、本発明は、先に記述した免疫検出法と共に使用するための免疫検出キットに関する。抗体は一般的に、野生型および／または変異型タンパク質、ポリペプチド、および／またはペプチドを検出するために用いられることから、抗体は好ましくはキットに含まれると考えられる。しかし、そのような成分の両方が含まれるキットを提供してもよい。このように、免疫検出キットは、ふさわしい容器手段において、野生型および／または変異型タンパク質、ポリペプチド、および／またはペプチドに結合する第一の抗体、および／または任意で免疫検出試薬、および／またはさらに任意で野生型および／または変異型タンパク質、ポリペプチド、および／またはペプチドを含むと考えられる。

20

【0293】

好ましい態様においては、モノクローナル抗体を用いる。一定の態様において、野生型および／または変異型タンパク質、ポリペプチド、および／またはペプチドに結合する第一抗体を、カラムマトリクスおよび／またはマイクロタイタープレートのウェルのような固相支持体に予め結合させてもよい。

【0294】

キットの免疫検出試薬は、所定の抗体に会合するおよび／または連結される検出可能な標識が含まれる、多様な形態の任意の一つを呈してもよい。二次結合リガンドに会合および／または付着する検出可能な標識もまた企図される。例示的な二次リガンドは第一抗体に対する結合親和性を有する二次抗体である。

30

【0295】

さらに、本発明のキットにおいて用いるための適した免疫検出試薬には、第二抗体に対する結合親和性を有しかつ検出可能な標識に連結されている第三抗体と共に、第一抗体に対する結合親和性を有する第二抗体を含む、二成分試薬が含まれる。先に述べたように、多数の例示的な標識が当技術分野において公知であり、および／またはそのような全ての標識を本発明に関連して使用してもよい。

【0296】

キットはさらに、検出アッセイのための標準曲線を作製するために用いられる可能性があることから、標識および／または非標識に関わらず、野生型および／または変異型タンパク質、ポリペプチド、および／またはポリペプチドの適したアリコート組成物を含んでもよい。キットは、完全な結合型、中間体型、および／またはキットのユーザーによって結合される個別の部分のいずれかとして抗体標識結合体を含有してもよい。キットの成分は、水性培地中および／または凍結乾燥型のいずれかで包装されうる。

40

【0297】

キットの容器手段は、適切に収容され、これには一般的に、その中に抗体を入れてもよい、および／または好ましくは適切にアリコートとなりうる少なくとも一つのバイアル、試験管、フラスコ、ボトル、シリンジおよび／または他の容器手段が含まれる。野生型および／または変異型gp19タンパク質ポリペプチド、および／またはペプチドおよび／または第二および／または第三の結合リガンドおよび／またはさらなる成分が提供される場合

50

、キットはまた一般的に、その中にリガンドおよび/または成分を入れてもよい第二、第三、および/または他のさらなる容器を含有すると考えられる。本発明のキットにはまた、典型的に、抗体、抗原、および/または販売用に密封された他の任意の試薬容器を含有するための手段が含まれると考えられる。そのような容器には、所望のバイアルが保持される注入成型および/または吹き込み成型プラスチック容器が含まれてもよい。

【0298】

VIII. 薬学的調製物

薬学的組成物はまた、本発明の新規組成物を用いて調製されてもよいことが企図される。そのような場合において、薬学的組成物は、本発明の新規活性組成物と薬学的に許容される担体とを含む。当業者は過度な実験を行うことなく、本発明の活性成分の適切な用量および投与経路を容易に決定できると考えられる。

10

【0299】

「薬学的に許容される」という句は、被験体に投与した場合に、アレルギーまたは類似の望ましくない反応を生じない分子実体および組成物を指す。活性成分としてタンパク質を含有する水性組成物の調製物は、当技術分野において十分に理解されている。典型的に、そのような組成物は、液体溶液または懸濁液のいずれかとしての注射剤として調製され；注射前に液体において溶液または懸濁液にするために適した固体剤形も同様に調製することができる。調製物はまた、乳化することができる。

【0300】

一般的に、本発明の薬学的組成物は、E. カニスgp19ポリペプチド、ポリヌクレオチド、または抗体および/またはその混合物を含みうる。

20

【0301】

タンパク質は、組成物に中性または塩形態で製剤化されてもよい。薬学的に許容される塩には、酸付加塩（タンパク質の遊離のアミノ基によって形成される）、および例えば塩酸もしくはリン酸のような無機酸によって形成される塩、または酢酸、シュウ酸、酒石酸、マンデル酸等のような有機酸によって形成される塩が含まれる。遊離のカルボキシル基によって形成される塩も同様に、例えばナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム、または水酸化第二鉄のような無機塩基、およびイソプロピルアミン、トリメチルアミン、ヒスチジン、プロカイン等のような有機塩基に由来しうる。

【0302】

製剤化の際に、溶液は、投与製剤と適合性となるように、および治療的有効となるような量で投与されてもよい。製剤は、注射溶液のような多様な投与剤形において容易に投与される。

30

【0303】

水溶液における非経口投与に関して、溶液は必要であれば適切に緩衝作用を有すべきであり、液体希釈液を最初に十分な生理食塩液またはグルコースによって等張にすべきである。これらの特定の水溶液は静脈内、筋肉内、皮下、および腹腔内投与に特に適している。これに関連して、用いることができる滅菌水性培地は、本開示に照らして当業者に公知であると考えられる。例えば、一つの用量を等張NaCl溶液1 mLに溶解して、皮下注入液100 mLに加えるか、または提唱される注入部位で注射できると考えられる（例えば、"Remington's Pharmaceutical Sciences" 15th Edition, pages 1035-1038 and 1570-1580を参照されたい）。用量の何らかの変動は、処置される被験体の状態に応じて必然的に起こると考えられる。投与の責任者はいずれにせよ、個々の被験体に関して適切な用量を決定できると考えられる。

40

【0304】

本発明の薬学的組成物は、ポリペプチドまたはその分泌物を標的とする一つもしくは複数の物質の有効量、または薬学的に許容される担体に溶解もしくは分散されているさらなる物質を含む。「薬学的」、「薬学的に許容される」、または「薬理的に許容される」という句は、例えば適切であればヒトのような動物に投与した場合に有害な反応、アレルギー反応、または他の望ましくない反応を産生しない分子実体および組成物を指す。ポリ

50

ペプチドまたはその分泌物を標的とする少なくとも一つの物質および/またはさらなる活性物質を含有する薬学的組成物の調製は、参照により本明細書に組み入れられる、Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. Mack Printing Company, 1990によって例示されるように本発明開示に照らして当業者に公知であると考えられる。その上、動物（例えば、ヒト）の投与に関して、調製物は、FDA生物標準局（FDA Office of Biological Standards）によって要求される、無菌性、発熱性、全般的安全性および純度標準を満たすべきであると理解される。

【0305】

本明細書において用いられるように、「薬学的に許容される担体」には、当業者に公知であるように、任意のおよび全ての溶媒、分散培地、コーティング、界面活性剤、抗酸化剤、保存剤（例えば、抗菌剤、抗真菌剤）、等張剤、吸収遅延剤、塩、保存剤、薬物、薬物安定化剤、ゲル、結合剤、賦形剤、崩壊剤、潤滑剤、甘味料、着色料、色素、そのような材料およびその組み合わせが含まれる（例えば、参照により本明細書に組み入れられる Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. Mack Printing Company, 1990, pp. 1289-1329を参照されたい）。いかなる通常の担体も活性成分と非適合性である場合を除き、治療的または薬学的組成物におけるその使用が企図される。

10

【0306】

本発明は、固体、液体、またはエアロゾル型で投与されるか否か、および注射のような投与経路に関して無菌的である必要があるか否かに応じて、異なるタイプの担体を含んでもよい。本発明は、静脈内、皮内、動脈内、腹腔内、病変内、頭蓋内、関節内、前立腺内、胸膜腔内、気管内、鼻腔内、硝子体内、腔内、直腸内、局所、腫瘍内、筋肉内、腹腔内、皮下、結膜下、小胞内、粘膜内、心膜内、臍帯内、眼内、経口、局所塗布、局所、吸入（例えばエアロゾル吸入）、注射、注入、持続的注入、標的細胞を直接浴する局所還流、カテーテルによる、洗浄による、クリーム、液体組成物（例えば、リボソーム）、または当業者に公知であるような他の方法または前述の任意の組み合わせによって投与することができる（例えば、参照により本明細書に組み入れられる Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. Mack Printing Company, 1990を参照されたい）。

20

【0307】

動物患者に投与される本発明の組成物の実際の用量は、体重、状態の重症度、処置される疾患のタイプ、これまでのまたは同時の治療介入、患者の特発疾患、および投与経路のような物理的および生理的要因によって決定されうる。投与の責任を有する医師はいずれにせよ、組成物における活性成分の濃度および個々の患者に関する適切な用量を決定すると考えられる。

30

【0308】

一定の態様において、薬学的組成物は、例えば少なくとも約0.1%の活性化化合物を含んでもよい。他の態様において、活性化化合物は、例えば、単位重量の約2%~75%、または約25%~約60%、およびそれに由来する任意の範囲を含んでもよい。他の非制限的な例において、用量は、投与あたり、約1 μ g/kg体重、約5 μ g/kg体重、約10 μ g/kg体重、約50 μ g/kg体重、約100 μ g/kg体重、約200 μ g/kg体重、約350 μ g/kg体重、約500 μ g/kg体重、約1mg/kg体重、約5mg/kg体重、約10mg/kg体重、約50mg/kg体重、約100mg/kg体重、約200mg/kg体重、約350mg/kg体重、約500mg/kg/体重~約1000mg/kg/体重またはそれ以上、およびそれに由来する任意の範囲を含んでもよい。本明細書に記載される数値から誘導可能な範囲の非制限的な例において、先に記述した数値に基づいて、約5mg/kg/体重~約100mg/kg/体重、約5 μ g/kg/体重~約500mg/kg/体重等を投与することができる。

40

【0309】

いずれの場合においても、組成物は、一つまたは複数の成分の酸化を遅らせるために様々な抗酸化剤を含んでもよい。さらに、パラベン（例えば、メチルパラベン、プロピルパラベン）、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸、チメロサル、またはその組み合わせが含まれるがこれらに限定されるわけではない、様々な抗菌剤および抗真菌剤のような保存剤によって、微生物の作用の防止をもたらすことができる。

50

【0310】

本発明は、遊離の塩基、中性、または塩形態の組成物に製剤化してもよい。薬学的に許容される塩には、酸付加塩、例えばタンパク質様組成物の遊離のアミノ基によって形成される塩、例えば塩酸もしくはリン酸のような無機酸によって形成される塩、または酢酸、シュウ酸、酒石酸、もしくはマンデル酸のような有機酸によって形成される塩が含まれる。遊離のカルボキシル基によって形成される塩も同様に、例えばナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム、または水酸化第二鉄のような無機塩基、またはイソプロピルアミン、トリメチルアミン、ヒスチジン、もしくはプロカインのような有機塩基に由来しうる。

【0311】

組成物が液体剤形である態様において、担体は水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、液体ポリエチレングリコール等）、脂質（例えば、トリグリセリド、植物油、リポソーム）、およびその組み合わせを含むがこれらに限定されない溶媒または分散媒体となりうる。適当な流動性は、例えばレシチンのようなコーティングを用いることによって、例えば液体ポリオールまたは脂質のような担体における分散によって必要な粒子径を維持することによって、例えばヒドロキシプロピルセルロースのような界面活性剤を用いることによって、またはそのような方法の組み合わせによって維持することができる。多くの場合において、例えば糖、塩化ナトリウム、またはその組み合わせのような等張剤を含めることが好ましいと考えられる。

【0312】

他の態様において、本発明において、点眼液、点鼻液またはスプレー、エアロゾルまたは吸入剤を用いてもよい。そのような組成物は一般的に、標的組織タイプと適合性となるように設計される。非制限的な例において、点鼻液は通常、小滴またはスプレーで鼻孔に投与されるように設計された水溶液である。点鼻液は、それらが多くの局面において、鼻の分泌物と類似であるように、正常な線毛作用が維持されるように調製される。このように、好ましい態様において、水性点鼻液は通常、等張であるか、またはpH約5.5～約6.5を維持するように僅かに緩衝作用を有する。さらに、眼科用調製物において用いられるものと類似の抗菌保存剤、薬物、または適切な薬物安定化剤を、必要であれば製剤に含めてもよい。例えば、様々な市販の点鼻調製物が公知であり、これには抗生物質または抗ヒスタミン剤のような薬物が含まれる。

【0313】

一定の態様において、組成物は、経口摂取物と同じ経路で投与のために調製される。これらの態様において、固体組成物は、例えば液剤、懸濁剤、乳剤、錠剤、丸剤、カプセル剤（例えば、硬質または軟質ゼラチンカプセル）、徐放性製剤、口腔内組成物、トローチ剤、エリキシル剤、懸濁剤、シロップ剤、ウェーハ、またはその組み合わせを含んでもよい。経口組成物は、食事の食物に直接組み入れてもよい。経口投与のための好ましい担体は、不活性希釈剤、同化可能な食用担体、またはその組み合わせを含む。本発明の他の局面において、経口組成物は、シロップまたはエリキシル剤として調製されてもよい。シロップまたはエリキシル剤は、例えば少なくとも一つの活性剤、甘味料、保存剤、着色料、色素、保存剤、またはその組み合わせを含んでもよい。

【0314】

一定の好ましい態様において、経口組成物は、一つまたは複数の結合剤、賦形剤、崩壊剤、潤滑剤、着色料、およびその組み合わせを含んでもよい。一定の態様において、組成物は以下の一つまたは複数を含んでもよい：例えば、トラガカントゴム、アカシア、コーンスターチ、ゼラチンまたはその組み合わせのような結合剤；例えばリン酸カルシウム、マンニトール、乳糖、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、セルロース、炭酸マグネシウム、またはその組み合わせのような賦形剤；例えば、コーンスターチ、ジャガイモデンプン、アルギン酸、またはその組み合わせのような崩壊剤；例えばステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤；例えば蔗糖、乳糖、サッカリン、またはその組み合わせのような甘味料；例えばペパーミント、冬緑油、サクランボ香料、オレンジ

10

20

30

40

50

香料等のような着香料；または前述の組み合わせ。投与単位剤形がカプセル剤である場合、これは上記のタイプの材料の他に、液体担体のような担体を含んでもよい。他の様々な材料がコーティングとして存在してもよく、またはそうでなければ物理的な投与単位剤形を改変するために存在してもよい。例えば、錠剤、丸剤、またはカプセル剤をシェラック、糖、または両方によってコーティングしてもよい。

【0315】

他の投与様式に適したさらなる製剤には、坐剤が含まれる。坐剤は、様々な重量および形状の固体投与剤形であり、通常、直腸、腔、または尿道に挿入するために投薬される。挿入後、坐剤は軟化して、腔内の液によって融解または溶解する。一般的に、坐剤に関して、従来の担体には、例えばポリアルキレングリコール、トリグリセリド、またはその組み合わせが含まれてもよい。一定の態様において、坐剤は、例えば約0.5%～約10%の範囲、好ましくは約1%～約2%の範囲で活性成分を含有する混合物から形成されてもよい。

10

【0316】

滅菌注射溶液は、先に列挙した他の様々な成分と共に適切な溶媒において必要量の活性化化合物を組み入れた後に必要に応じて濾過滅菌することによって調製される。一般的に、分散剤は、塩基性分散培地および/または他の成分を含有する滅菌媒体に様々な滅菌活性成分を組み入れることによって調製される。滅菌注射溶液、懸濁液、または乳剤を調製するための滅菌粉末の場合、好ましい調製法は、予め濾過滅菌したその液体培地からの、活性成分+任意のさらなる所望の成分の粉末を生じる真空乾燥または凍結乾燥技術である。液体培地は、必要であれば適切には緩衝作用を有するべきであり、液体希釈剤は、注射の前に十分な生理食塩液またはグルコースによってまず等張にされるべきである。溶媒としてDMSOを用いることによって極めて迅速な浸透が起こると想像され、小さい領域に高濃度の活性物質を送達する、直接注射のための高濃度組成物の調製物も同様に企図される。

20

【0317】

組成物は、製造および保存条件で安定でなければならず、細菌および真菌のような微生物の混入作用に対して保護されなければならない。エンドトキシンの混入は、安全なレベルで、例えば0.5 ng/mgタンパク質未満で最小限維持されるべきであると認識される。

【0318】

特定の態様において、注射用組成物の持続的な吸収は、例えばモノステアリン酸アルミニウム、ゼラチン、またはその組み合わせのような吸収を遅らせる物質を組成物中に用いることによってもたらされうる。

30

【0319】

IX. 本発明の例示的なキット

本発明の特定の態様においては、適した容器に収容されたキットが存在する。キットは、エーリキア・カニスのようなエーリキアから個体を診断、処置、および/または防御するために適している可能性がある。特定の態様において、キットは、E.カニスgp19抗原を標的とする物質を適した容器において含む。物質は、抗体、低分子、ポリヌクレオチド、ポリペプチド、ペプチド、またはその混合物であってもよい。物質は、例えば滅菌、凍結乾燥、またはその両方のような適した剤形でキットに提供されてもよい。特定の態様において、キットは、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:17、またはSEQ ID NO:19 (E.カニスに関して) および/またはその関連するタンパク質の一つまたは複数に対する抗体を含む。本明細書において具体的に紹介されない他のE.カニスgp19関連免疫原性関連組成物 (ポリペプチド、ペプチド、または抗体が含まれる) も同様に含まれてもよい。

40

【0320】

キットはさらに、その必要がある個体に組成物を送達するための一つまたは複数の装置を含んでもよい。装置には、例えばシリンジ、点眼液、針、生検ツール、スパチュラ、カテーテル等が含まれてもよい。

【0321】

診断目的のためにキットが使用される態様において、キットはE.カニスgp19抗原を同定するための一つまたは複数の検出組成物および/または装置をさらに提供してもよい。そ

50

のような態様は、例えば抗体のような検出可能な標識を使用してもよく、標識は例えば蛍光、放射活性、化学発光、または比色測定であってもよい。

【実施例】

【0322】

以下の実施例は、本発明の好ましい態様を証明するために含まれる。以下の実施例において開示される技術は、本発明者らによって発見された技術が、本発明の実践において十分に機能することを表し、このように、その実践のための好ましい態様を構成すると見なすことができることは当業者に認識されるべきである。しかし、当業者は本開示に照らし、開示の特定の態様に多くの変化を施すことができ、それでもなお同様または類似の結果を得ることができ、本発明の趣旨および範囲に含まれることを認識すべきである。

10

【0323】

実施例1

例示的な材料および方法

エーリキアの培養および精製

E.カニス (Jake, DJ, Demon, Louisiana, Florida, およびSao Paulo株) を、既に記述されているように増殖させた (McBride et al., 2001)。エーリキアを、Sephacryl S-1000 (Amersham Biosciences, Piscataway, N.J.) でのサイズ排除クロマトグラフィーによって、既に記述されているように (Rikihisa et al., 1992) 精製した。細菌を含有する分画を凍結して、抗原およびDNA起源として利用した。

【0324】

20

E.カニスゲノムライブラリーの構築およびスクリーニング

E.カニスJake株ゲノムライブラリーを、HpaII制限消化を用いて構築して、既に記述されているように (McBride et al., 2001) スクリーニングした。

【0325】

DNAシーケンシング

ライブラリーの挿入物、プラスミド、およびPCR産物を、University of Texas Medical Branch Protein Chemistry Core Laboratoryで、ABI Prism 377XL DNAシーケンサー (Perkin-Elmer Applied Biosystems, Foster City, Calif.) によってシーケンシングした。

【0326】

30

糖タンパク質の分析

核酸およびアミノ酸アラインメントをMegAlign (Lasergene v5.08, DNASTAR, Madison, Wis.) によって行った。E.カニスgp19およびE.シャフェンシスVLPTタンパク質配列を、コンピューターアルゴリズムYinOYang 1.2およびNetOGlyc v3.1 (Julenius et al., 2005) によって、可能性があるO-連結グリコシル化およびリン酸化に関して評価した。Tandem Repeat Finder (Benson, 1999) を用いて、E.カニスgp19をコードする遺伝子のタンデムリピートを分析した。可能性があるシグナル配列を、グラム陰性細菌に関して訓練したコンピューターアルゴリズムSignal Pによって同定した (Nielsen et al., 1997)。

【0327】

E.カニスgp19遺伝子断片のPCR増幅

40

E.カニスgp19遺伝子断片 (gp19; gp19N末端、gp19N1、gp19N2、gp19N1-C、gp19C末端) を増幅するためのオリゴヌクレオチドプライマーを、手動で、またはPrimer Select (Lasergene v5.08, DNASTAR, Madison Wis.) を用いることによって設計した (表2)。E.カニスgp19断片を、PCR Master mix (F. Hoffmann-La Roche Ltd, Basel, Switzerland) およびE.カニス (Jake株) ゲノムDNAを鋳型として用いて増幅した。

【0328】

(表2) E.カニスgp19遺伝子を増幅するための例示的なオリゴヌクレオチドプライマー

組換え型 タンパク質	フォワード プライマー	配列	リバース プライマー	配列	アンプリコン サイズ
gp19	P16N-F	5'-CACGTTCAAATCATGTTGA-3' (SEQ ID NO:1)	P16C-R	5'-CGCACAATCACAACAGTTGT- 3'(SEQ ID NO:7)	405 bp
gp19N	P16N-F	5'-CACGTTCAAATCATGTTGA-3'(SEQ ID NO:2)	P16N-R	5'-GCATACTGGTCTTTCCT-3'(SEQ ID NO:8)	222 bp
gp19N1	P16N-F	5'-CACGTTCAAATCATGTTGA-3'(SEQ ID NO:3)	p19 132-R	5'-AGATACTTCTTGTAACCCATT- 3'(SEQ ID NO:9)	126 bp
gp19N1-C	Small FOR	5'-CATTITACTGGTCTACT-3'(SEQ ID NO:4)	p19 132-R	5'-AGATACTTCTTGTAACCCATT- 3'(SEQ ID NO:10)	72 bp
gp19N2	p19 133-F	5'-TCTATTGATAGTGTAGGATGC- 3'(SEQ ID NO:5)	P16N-R	5'-GCATACTGGTCTTTCCT-3'(SEQ ID NO:11)	96 bp
gp19C	P16C-F	5'-GCAGTTTAGAGAGCTT-3'(SEQ ID NO:6)	P16C-R	5'-CGCACAATCACAACAGTTGT- 3'(SEQ ID NO:12)	180 bp

【 0 3 2 9 】

組換え型E.カニスgp19のクローニングおよび発現

増幅されたPCR産物をpBAD/TOPO Thio Fusion (登録商標) またはpCR T7/NT TOPO発現ベクター (Invitrogen, Carlsbad, Calif.) に直接クローニングした。大腸菌 (TOP10、Invitrogen) を、E.カニスgp19遺伝子断片を含有するプラスミドによって形質転換して、陽性形質転換体を挿入物の存在およびその方位に関してPCRによってスクリーニングして、遺伝子の読み枠を確認するためにシーケンシングした。組換え型タンパク質発現を、Overnight Express Autoinduction System 1 (Novagen, Madison, Wis.) を用いて、0.2% アラビノース (pBAD/TOPO Thio Fusion)、またはIPTG (pCR T7/NT) によって誘導した。細菌を沈降させて (5,000 x gで20分間)、PBSに浮遊させ、既に記述されているように (Doyle et al., 2005) 組換え型タンパク質を未変性条件で精製した。

【 0 3 3 0 】

ゲル電気泳動およびウエスタン免疫ブロッティング

精製E.カニスまたはE.シャフェンシスの全細胞溶解物または組換え型タンパク質をSDS-PAGEによって分離して、ニトロセルロースに転写して、一次抗体を希釈した (1:500) ことを除き、既に記述されているように (McBride et al., 2003) ウエスタンブロットを行った。抗E.カニスまたはE.シャフェンシスイヌ血清は、実験的に感染させたイヌ (それぞれ、#2995および#2551) に由来した。

【 0 3 3 1 】

糖質検出およびグリコシル組成物

組換え型タンパク質gp19のグリカン検出を、DIGグリカン検出キット (Roche, Indianapolis, IN) によって、既に記述されているように (McBride et al., 2000) 行った。グリコシル組成物は、University of Georgia Complex Carbohydrate Research Centerにおいて酢酸アルジトール分析によって決定した。糖タンパク質を2 Mトリフルオロ酢酸 (TFA; 121) で密封管において2時間) を用いて加水分解して、NaBD4によって還元し、無水酢酸/TFAを用いてアセチル化した。得られた酢酸アルジトールを、5970質量選択的検出器 (電子衝撃イオン化モード) にインターフェースで接続したHewlett Packard 5890ガスクロマトグラフにおいて分析し、30 m Supelco 2330結合相融解シリカキャピラリーカラムにおいて分離を行った。

【 0 3 3 2 】

マウスの免疫

BALB/cマウス (Jackson Laboratories, Bar Harbor, Me.) 5匹を組換え型E.カニスgp19 (Thio fusion; アミノ酸4~137位) によって免疫した。組換え型タンパク質 (100 µg) を0.1 mLにおいて第一の腹腔内注射のためにフロイント完全アジュバントの当量と混合して、その後の注射のためにフロイントの不完全アジュバントと混合した。マウスに2週間間隔で2回注射を行った。

【 0 3 3 3 】

E.カニスgp19合成ペプチド抗体エピトープ

E.カニスgp19エピトープ含有領域に対応するアミノ酸24個のペプチド (N1-C; HFTGPTSFEVNLSEEEKMELQEVSS; SEQ ID NO:13)

10

20

30

40

50

は、Bio-Synthesis, Inc. (Lewisville, Tx) によって合成された。

【 0 3 3 4 】

酵素結合免疫吸着測定法 (ELISA)

ELISAプレート (MaxiSorp (商標) 表面を有するNunc-Immuno (商標) プレート、NUNC, Roskilde, Denmark) を、リン酸緩衝生理食塩液 (PBS) において組換え型タンパク質またはペプチド (1.25 µg/ウェル、100 µL) によってコーティングした。抗原を、軽く攪拌しながらELISAプレートに4 で終夜吸着させた後、Tween 20 (0.2%) を有するトリス緩衝生理食塩液 (TBST) 200 µLによって3回洗浄し、TBSTにおいて3%BSAによって室温で1時間攪拌しながらブロックした後、再度洗浄した。3%BSA TBSTにおいて希釈した回復期の抗E.カニスヌ血清 (1:4000) を各ウェルに加えて (100 µL)、室温で軽く攪拌しながら1時間インキュベートした。プレートを4回洗浄して、3%BSA TBSTにおいてアルカリホスファターゼ標識ヤギ抗イヌIgG (H+L) 二次抗体 (1:2500) (Kirkegaard & Perry Laboratories) を加えて1時間インキュベートした。プレートを4回洗浄して基質 (100 µL) (BluePhos, Kirkegaard & Perry Laboratories) を各ウェルに加えた。プレートを暗所で攪拌しながら30分間インキュベートして、発色をマイクロプレートリーダー (Versamax, Molecular Devices, Sunnyvale, Calif.) においてA650で読み取って、SoftmaxPro v4.0 (Molecular Devices) によってデータを分析した。棒グラフの光学密度の読み取りは、緩衝液のみのウェルのO.D.を差し引いたウェル2個の平均値を表す。組換え型gp19の過ヨウ素酸塩処置を、100 mM酢酸ナトリウム緩衝液において、100 mMメタ過ヨウ素酸ナトリウムによって20分間行った。偽処置対照タンパク質を過ヨウ素酸塩の非存在下で同じ緩衝液においてインキュベートした。プレートを乳汁希釈液/ブロッキング溶液によってブロックしたことを除き、E.カニス抗原に関して先に記述したようにELISAを行った (Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, Md)。

10

20

【 0 3 3 5 】

免疫電子顕微鏡

免疫金電子顕微鏡は、一次抗E.カニスgp19抗体を1:10,000倍希釈したことを除き、既に記述されているとおりに (Doyle et al., 2005) 行った。非感染DH82細胞を陰性対照として抗E.カニスgp19と反応させた。

【 0 3 3 6 】

蛍光共焦点顕微鏡

抗原スライドガラスを既に記述されているように (McBride et al., 2001) E.カニス (Jake株) に感染させたDH82細胞から調製した。1:100倍希釈した組換え型E.カニスジスルフィド結合形成タンパク質 (DsbA) (McBride et al., 2002) に対する単特異的ウサギ血清を各ウェル (15 µL) に加えて、30分間インキュベートした。スライドガラスを洗浄して、マウス抗gp19 (1:100倍希釈) を加えて、30分間インキュベートした。1:100倍希釈したAlexa Fluor (登録商標) 488ヤギ抗ウサギIgG (H & L) 二次抗体 (Molecular Probes, Eugene, Or.) を加えて30分間インキュベートした後、洗浄して、その後ローダミン標識ヤギ抗マウスIgG (H & L) 二次抗体 (Kirkegaard & Perry Laboratories) を加えてインキュベートした。封入培地 (ProLong Gold, Molecular Probes) を加えて、スライドガラスをOlympus FV-1000レーザー共焦点顕微鏡およびFluoview (商標) ソフトウェアによって観察した。

30

40

【 0 3 3 7 】

地理的に分散した分離株からのE.カニスgp19のPCR増幅

北米 (Jake, Demon, DJ, Louisiana, およびFlorida) 分離株、南米 (ブラジル) 分離株 (Sao Paulo; Marcelo Labruna氏の厚意により提供)、およびメキシコの感染したイヌ (Yucatan; Carlos Perez氏の厚意により提供) から単離されたDNAを鋳型として用いて、隣接するプライマー (フォワード-E.カニス p19 FOR

5'-AAAATTAGTGTTGTGGTTATG-3' (SEQ ID NO:14)

5'-TTTTACGCTTGCTGAAT-3'; SEQ ID NO:15)

を用いて全gp19遺伝子を増幅した。アンプリコンをTAクローニングベクター (pCR 2.1, Invitrogen) にクローニングして、プラスミドを大腸菌 (TOP10) に形質転換した。gp19を含有するプラスミドをプラスミド精製キット (Roche) によって精製してシーケンシングした。

【0338】

実施例2

E. カニスgp19主要免疫反応性タンパク質の分子的同定

E. カニスゲノム発現ライブラリーのスクリーニングにより、抗体と強く反応して、~3 kb挿入物を含有するクローンが同定された。このクローンを部分的にシーケンシング (~900 bp) して、不完全なORFを明らかにして、これを、利用できるE. カニスゲノム配列と整列させると、3 kbクローン内に存在する遺伝子を完全に同定した。クローンは、リボフラビン生合成タンパク質 (RibD) をコードする完全な1086 bpの遺伝子、および未知機能の予測質量15.8kDaのアミノ酸137個のタンパク質をコードする下流の414 bpのORFを含有した。タンパク質は、公知の免疫反応性タンパク質であるE. シャフェンシスVLPTと>53%の同一性および~60%の全相同性を有するアミノ酸47個のC末端領域を有した；したがって、この遺伝子をさらなる研究のために検討した。E. カニスタンパク質は、E. シャフェンシスVLPTと実質的なC末端領域相同性 (60%) を有したが、特徴的なタンデムリピートを欠損した。E. カニスタンパク質は、いくつかの予測O-グリカン付着部位と、予測Yin-Yang部位 (グリコシル化/リン酸化) であるアミノ酸1個 (セリン44位) を有した。染色体

10

20

【0339】

タンパク質の特徴付け

システイン (14個; 10.2%)、セリンおよびトレオニン (13個; 合わせて9.5%)、グルタミン酸 (13個; 9.5%)、およびチロシン (13個; 9.5%) は、E. カニスgp19において最も頻繁に存在するアミノ酸であり、全アミノ酸含有量の38%より多くを占めた。システイン残基は最初のアミノ酸50個には存在しないが、タンパク質のカルボキシル末端領域 (最後のアミノ酸28個) はシステインおよびチロシンが優勢であった (55%)。セリン、トレオニン (それぞれ7個; 27%) およびグルタミン酸残基 (6個; 23%) は、小さい中心領域 (STEに富むパッチ; アミノ酸26個) における最も頻繁に存在するアミノ酸であり、アミノ酸含有量の50%を占めた。

30

【0340】

E. カニスgp19の保存

E. カニスgp19を、地理的に分散した北米 (Jake, DJ, Demon, Louisiana、およびFlorida)、および南米 (ブラジル; Sao Paulo) 分離株において調べたところ、完全に保存された。メキシコ (Yucatan) のE. カニスに感染したイヌから増幅したgp19配列は、それによってグリシンからアスパラギン酸への一アミノ酸変化が起こる一ヌクレオチド置換 (71位) を有した。

【0341】

分子量および免疫反応性

gp19融合組換え型タンパク質の質量は、~35kDaであり、融合タグ (13kDa) が含まれる予測 (32kDa) 質量より大きかった (~3kDa) が、本来のgp19 (19kDa) の予測 (16kDa) 質量より~3kDa大きいことで一致した (図2A)。同様に、組換え型融合タンパク質として発現されたgp19 (N末端、N1およびN1c) のより小さい断片は、そのアミノ酸配列によって予測されるより大きい (~6kDa) 分子量を有した (方位に関しては図5を参照されたい)。組換え型gp19は、E. カニスを実験的に感染させたイヌ (#2995) の血清と強く反応した (図2B)。

40

【0342】

糖質検出

50

糖質は、STE-パッチを含有する組換え型gp19（N末端、方位に関しては図4を参照されたい）において検出された（図3）。さらに、酢酸アルジトール分析を用いたUniversity of Georgia Complex Carbohydrate Research CenterによるN末端断片のグリコシル組成分析により、グルコースおよびキシロースの存在が明らかとなった。

【0343】

本来のgp19の同定および種特異性

抗組換え型gp19抗血清は、E.カニス全細胞溶解物における19kDaタンパク質と強く反応し、このタンパク質は、抗E.カニスイヌ血清によって同様に認識された（図4A）。抗組換え型gp19血清はまた、もう一つの十分に特徴付けされたE.カニス糖タンパク質であるgp36とも弱く反応し、これらの二つのタンパク質の間の弱い交叉反応性を示唆した。抗組換え型gp19血清は、E.シャフェンシス全細胞溶解物における抗原を認識しなかった（図4B）。

【0344】

一つの主要なエピトープ

E.シャフェンシスgp47およびE.カニスgp36が含まれる他の糖タンパク質のエピトープ決定基が決定されている（Doyle et al., 2006）。E.カニスgp19は感染したイヌの抗体によって強く認識され、これは初期抗体反応を誘発する（McBride et al., 2003）。エピトープ含有領域を同定するために、E.カニスgp19遺伝子断片（N末端、C末端、N1、N2、N1C）（図5）をプライマー（表2）によって増幅して、重なり合う組換え型融合タンパク質を製した。発現されたgp19断片（N1、N2、N末端およびC末端）は、SDS-PAGEによって予測された質量より大きい（2~6kDa）質量を示した（図4A）。抗体は、N末端の組換え型断片と強く反応したが、C末端断片とは反応せず、エピトープがタンパク質のN末端領域に存在することを示している（図5B）。エピトープ含有領域のさらなる局在を、断片N1およびN2によって決定した。抗体は、N1（アミノ酸42個）と強く反応して、N2は弱く認識された（図5B）。他のエーリキアタンパク質において同定された他のエピトープと一貫して、高いSer/Thr/Glu含有量（N1C；アミノ酸24個）を有するN1内の領域は、より大きいN1断片と一致して抗体と強く反応して、一つの主要なエピトープがN1Cのアミノ酸24個の領域に存在することを証明している。

【0345】

エピトープ決定基としての糖質

糖質は、主要な免疫反応性糖タンパク質における重要なエピトープ決定基であることがこれまでに示されている（Doyle et al., 2006）。糖質は、gp19のN末端領域において検出され、エピトープはSTE-に富むパッチに局在した。グリカン付着部位も同様に、STEに富むパッチ内で予測された。抗体認識における糖質決定基の役割を決定するために、組換え型N1Cの免疫反応性を合成ペプチドの免疫反応性と比較した。ELISAによって、合成ペプチドは、組換え型版より抗E.カニスイヌ血清（#2995）に対する免疫反応性が実質的に低かった（図6）。同様に、グリカン構造を変更させるために過ヨウ素酸塩によって処置したN1Cは、偽処置したN1Cタンパク質より免疫反応性が低かった（図6）。

【0346】

gp19の細胞局在および細胞外局在

いくつかの特徴付けされたエーリキア糖タンパク質は、高密度中心を有するエーリキア（gp120、gp36、およびgp47）において異なるように発現されている。しかし、免疫電子顕微鏡によって、E.カニスgp19は、網状および高密度中心を有するエーリキアの両方の細胞質内で観察されたが、同様に、モルラの前線維マトリクスにおいて細胞外に検出され、モルラの膜に会合した（図7）。これらの結果は、抗gp19（図8A）および抗Dsb抗体（エーリキアに存在するが、細胞外ではない）を用いる共焦点免疫蛍光顕微鏡を用いた知見と一致し（図8B）、Dsbおよびgp19の両方がエーリキアにおいて同時局在することを示しており、抗gp19のみ（融合）によってモルラの膜の境界が染色されることを示している（図8C）。

【0347】

ヌクレオチド配列アクセション番号

10

20

30

40

50

エーリキア・カニスgp19 (Jake, DJ, Demon, Louisiana, Florida, Sao Paulo, および Mexico) 分離株からのE.カニスgp19遺伝子配列は、GenBank (登録商標) に寄託されており、以下のそれぞれのアクセッション番号DQ858221、DQ858222、DQ858223、DQ858224、DQ858225、DQ860145、およびDQ858226を割付された。これらのアクセッション番号は全て、SEQ ID NO:18のポリヌクレオチド配列およびSEQ ID NO:19のポリペプチド配列において表されるGenBank (登録商標) アクセッション番号DQ858226を除き、SEQ ID NO:16のポリヌクレオチド配列およびSEQ ID NO:17のポリペプチド配列において表される。

【0348】

実施例3

本発明の有意性

実験的感染の際のE.カニスの主要な免疫反応性抗原に対する抗体反応の動態は、これまでの研究において十分に確立されている (McBride et al., 2003)。二つのE.カニス抗原 (37および19kDa) は、急性の免疫応答において一貫して初期に認識される。より最近の研究において、高密度中心を有するエーリキアにおける異なるように発現される糖タンパク質であって分泌される、37kDaタンパク質 (gp36) の同定および分子的特徴付けが記述された (Doyle et al., 2006)。より主要な免疫反応性タンパク質がE.カニスおよびE.シャフェンシスにおいて分子的に特徴付けされていることから、多くが高いセリン/トレオニン含有量を示し、タンデムリピートを含むし、およびグリコシル化されることは明らかとなった (Doyle et al., 2006; McBride et al., 2000; Yu et al., 1997; Yu et al., 2000)。

【0349】

他の研究者らは、E.シャフェンシスvlptのオルソログが関連するゲノムにおいて同定されなかったことを報告したが (E.カニスおよびE.ルミナンチウム) (Hotopp et al., 2006)、本発明者らは、本研究において同定された19kDaタンパク質が、E.シャフェンシスにおける既に記述されたVLPTタンパク質のオルソログであるという証拠を本明細書において提供する (Sumner et al., 1999)。E.シャフェンシスVLPTは、免疫反応性であり、非同一のセリンに富むタンデムリピートを有する。糖質は、E.シャフェンシスVLPTにおいて報告されていないが、タンパク質はまた、そのアミノ酸含有量によって予測される質量の倍の質量を示し、記述された他のエーリキア糖タンパク質と類似であった (Sumner et al., 1999)。興味深いことに、本研究において本発明者らがE.カニスにおいて同定したvlptオルソログは、E.シャフェンシスvlptにおいて見いだされるタンデムリピートを欠損するが、一つのVLPT反復単位と大きさおよび組成が類似であるSer/Thr/Gluに富むパッチを有する。さらに、これらの遺伝子は、同じ染色体位置を共有して、カルボキシル末端領域において実質的なアミノ酸相同性 (~60%) を有する。

【0350】

アナプラズマ・マルギナーレ (Anaplasma marginale) MSP5に関連するもう一つの主要な免疫反応タンパク質 (MAP2) が、E.カニス、E.シャフェンシス、およびE.ルミナンチウムにおいて同定および分子的に特徴付けされており、分子量 (~21kDa) は、本研究において同定されたgp19と類似であった (Alleman et al., 2000; Alleman et al., 2001; Mahan et al., 1994)。しかし、MAP2とgp19の間にアミノ酸相同性は存在せず、このように、これらのタンパク質は分子的小よび免疫学的に別個のものである。gp19とは異なり、MAP2はそのアミノ酸配列によって予測される質量と一致する質量を有するように見え、いかなるセリンに富むドメインも有しない。エーリキア種におけるMAP2オルソログとの間には実質的な相同性が存在し、異種MAP2タンパク質における交叉反応が報告されている (Knowles et al., 2003; Mahan et al., 1994)。対照的に、E.カニスgp19に対して生成された抗体はE.シャフェンシスVLPTと交叉反応せず、したがってこれらのタンパク質は、種特異的オルソログであるように見える。MAP2とgp19との間の他の著しい差には、ウエスタン免疫プロットによって抗体によって強く認識されるgp19の主要なセリンに富む直線状のエピトープが含まれるが、E.カニスおよびE.シャフェンシスのMAP2に対する抗体は、主にコンフォメーションエピトープの方位を向くように見える (Alleman et al., 2000; Alleman

10

20

30

40

50

et al., 2001; Knowles et al., 2003)。先の研究において、同定された19kDaの主要な免疫反応性タンパク質は、MAP2である可能性があることが示唆された (McBride et al., 2003) ; しかし、本発明において紹介したデータは、このタンパク質がMAP2ではなく、むしろgp19であることを示している。興味深いことに、15~25kDaの範囲における唯一の主要な免疫反応性タンパク質が、これまでの研究において同定された (McBride et al., 2003)。MAP2に対する抗体が検出できなかったという事実は、コンフォメーションエピトープがE.カニスおよびE.シャフェンシスMAP2の両方において優勢であるという事実におそらく関連する (Alleman et al., 2000; Alleman et al., 2001)。

【0351】

特徴付けがなされている多数の他の主要な免疫反応性タンパク質と一致して、糖質は、E.カニス19kDaタンパク質のN末端領域に存在し、グルコースおよびキシロースはこの断片において検出された。E.シャフェンシスgp120およびE.カニスgp140に付着した糖としてのグルコースおよびガラクトースの存在が報告されている。E.カニスgp19は、グリカン付着部位であるように見えるセリンに富むタンデムリピートを有しないが、これは、他のエーリキア糖タンパク質において見いだされるタンデムリピートのアミノ酸組成物と類似の、N末端領域内でSTEに富むパッチを含有した。したがって、O-連結グリカンは、このSTE-に富むパッチにおいてアミノ酸 (セリン/トレオニン) に付着する可能性がある。さらに、予測サーバーYinOYangを用いることによって、この領域内のセリン残基が、可能性があるグリコシル化/リン酸化部位として同定された。この予測サーバーは、真核生物の糖タンパク質に関して訓練されていることから、グリコシル化される特異的残基の同定は、信頼できない可能性がある ; しかし、この真核生物に基づく予想アルゴリズムによって生成された予測と、本発明者らの実験データとの間に一貫する正の相関が存在することは注目に値する。

【0352】

E.カニスgp19のアミノ酸組成は、主にアミノ酸5個、システイン、グルタミン酸、チロシン、セリン、およびトレオニンからなつた。興味深いことに、これらのアミノ酸は、二つの特異的ドメイン、エピトープ含有領域およびカルボキシル末端領域において濃縮された。エピトープ含有領域の高いSer/Thr/Glu含有量は、エピトープがマッピングされている他のエーリキア糖タンパク質において報告されており (Doyle et al., 2006)、高いセリンおよびトレオニン含有量は、他のエーリキア糖タンパク質において、特にタンデムリピート領域において (Doyle et al., 2006; Yu et al., 1997; Yu et al., 2000) 見いだされている。E.シャフェンシスVLPTはまた、類似のアミノ酸含有量を有するタンデムリピートを含有する。この類似性は、E.カニスgp19内のこの領域がE.シャフェンシスVLPTにおけるタンデムリピートに対応することを示している。タンデムリピートの付加および欠失は、エーリキアゲノムにおける変化および不安定性の主な起源であると見なされている (Frutos et al., 2006)。E.カニスgp19がタンデムリピートを欠損するが、E.シャフェンシスVLPTは多様な数を有するという事実は、これらの遺伝子がこのプロセスによって影響を受けることを示している。

【0353】

gp19のもう一つの新規特色は、チロシンおよびシステイン (55%) が優勢であるカルボキシル末端テールである。このカルボキシル末端テールはまた、リピート領域の下流のE.シャフェンシスVLPTにも存在し、これがこれらのタンパク質における重要な保存ドメインであることを示している。全体的に、システインは、他のいかなるアミノ酸よりも多く存在し、このために、gp19は高いシステイン含有量を有するタンパク質の小さい群 (n=36) のメンバーである (Mavromatis et al., 2006)。システインは、分子内および分子間ジスルフィド結合形成にとって本質的であり、gp19におけるその高い含有量は、このタンパク質が、ジスルフィド結合によって他のシステイン含有タンパク質に連結される可能性を有する、またはそれらが残りのgp19構造にとって必要な分子内結合にとって重要であることを示している。

【0354】

チロシンおよびセリンは、一般的にリン酸化される。gp19のカルボキシル末端領域におけるチロシン残基のチロシン残基の高い比率は、タンパク質のこのドメインがリン酸化される高い潜在性を有することを示唆している。この状態はまた、gp19がタンパク質のシグナル伝達に関係する可能性を高める。リン酸化型タンパク質の存在は、E.シャフェンシスにおいて報告されており (Singu et al., 2005)、より多くのSer/Thr/Tyrキナーゼおよびリン酸化型タンパク質が細菌において同定されている (Hinc et al., 2006; Levine et al., 2006; Madec et al., 2002; Obuchowski et al., 2000)。それにもかかわらず、このC末端領域におけるチロシン残基は、真核細胞タンパク質に関して訓練されているNet Phosによるリン酸化部位として同定されなかった。したがって、これが本発明の特定の態様においてタンパク質機能にどのように関連するか、チロシン残基のリン酸化状態の特徴を調べるためにさらなる試験を行う。

10

【0355】

一つの主要なエピトープが、E.カニスgp19におけるSTEに富むドメインにおいて同定された。このエピトープはE.カニスに実験的に感染させたイヌにおいて初期抗体反応を誘発する (McBride et al., 2003)。エーリキア糖タンパク質において特徴が調べられた他のエピトープは、セリンに富むタンデムリピートにマッピングされた。よって、gp19のSTE-領域内で主要なエピトープが見い出されることは、これまでの試験と一貫しており、エーリキア種に関する免疫決定基としての、セリンに富む領域および付着された糖質の重要性を証明する。糖質は、STE領域を含有するgp19のN末端領域において検出された。組換え型gp19エピトープは、対応する合成ペプチドより免疫反応性であり、翻訳後修飾がこのエピトープに存在することを示した。さらに、組換え型エピトープ含有ペプチドを過ヨウ素酸塩によって処置すると、免疫決定基としての糖質の役割をさらに支持する。これらの知見は、E.シャフェンシスgp47およびE.カニスgp36のセリンに富むタンデムリピート領域においてマッピングされたエピトープ上の免疫決定基としての糖質に関するこれまでの証明と一致する (Doyle et al., 2006)。著しいことに、このエピトープは、種特異的であるように見え、抗gp19抗体は、gp36が含まれる、同定されている他の種特異的な主要免疫反応性抗原と類似の、E.シャフェンシス抗原と交叉反応しなかった (Doyle et al., 2006; Yu et al., 1997; Yu et al., 2000)。したがって、E.カニスgp19を単独でまたはgp36のような他の抗原と組み合わせて利用する感度のよい種特異的免疫診断を用いることは、本発明の特定の態様である。

20

30

【0356】

E.カニスgp19は、網状または高密度中心を有する細胞の両方において見い出され、エーリキアの細胞質において主に局在するように見えた。gp19の局在は、本発明者らが、高密度中心細胞の主に表面において異なるように発現されると報告したもう一つのE.カニス糖タンパク質 (gp36) とは対照的である (Doyle et al., 2006)。しかし、gp36と同様に、gp19もまた、モルラ原線維マトリクスにおいて細胞外で観察され、モルラの膜に会合した。エーリキア、原線維マトリクスおよびモルラの膜におけるgp19の発現は、Dsbとの二重染色を用いる免疫蛍光によってさらに確認され、これは分泌されず、網状および高密度中心を有する生物の両方に存在する (McBride et al., 2002)。いくつかの小さいモルラはより少ないgp19を有するように見えたが、gp19の発現はモルラが成熟するにつれてより優勢となることを示唆している。E.カニスgp19は、アミノ末端シグナル配列を有しない；したがって、このタンパク質の輸送は、おそらくsecとは無関係な分泌系 (1型またはIII型) を伴う。

40

【0357】

E.カニスgp19は米国、メキシコ、およびブラジルから調べたE.カニス分離株において高度に保存された。地理的に離れたE.カニス分離株において主要な免疫反応性遺伝子 (p28、gp140、gp36) が保存されることは、一貫して報告されている (Doyle et al., 2006; McBride et al., 2000; McBride et al., 1999; Ndip et al., 2005; Yu et al., 2000)。これは、gp19のような主要な免疫反応性タンパク質に基づいて、E.カニスに関する世界的に有効なワクチンおよび信頼できる免疫診断が実現可能であることを示している。

50

【 0 3 5 8 】

実施例4

保存された免疫反応性糖タンパク質gp36およびgp19による酵素結合免疫吸着測定法による
 エーリキア・カニス感染症の感度の増強および種特異的免疫診断

エーリキアカニスは、世界中に分布し、おそらく致死的なイヌの疾患であるイヌ単球エーリキア症（CME）の一次病因物質である。本発明者らは、保存された二つの主要な免疫反応抗原、すなわちE.カニス特異的抗体反応を誘発する最初のタンパク質であるgp36およびgp19の同定、ならびに急性感染症において後に強い抗体反応を誘発するgp200およびp28の同定をこれまでに報告した。本発明において、組換え型E.カニスタンパク質5個の感度および特異性を、酵素結合免疫吸着測定法（ELISA）を用いてE.カニス感染症の免疫診断
 10
 に関して評価した。組換え型gp36、gp19、およびgp200ポリペプチド（NおよびC）は、E.カニスに天然に感染したイヌにおける抗体の検出において、IFA（至適基準（ゴールドスタンダード））と比較して100%の感度および特異性を示した。さらに、IFAと比較してgp36およびgp19の増強された感度は、実験的に感染させたE.カニスイヌにおいて証明され、接種後14日目に2週間も早く検出された。さらに、gp36およびgp19は、E.シャフェンシスに感染したイヌからの血清中の抗体と交叉反応せず、このように、E.カニスとE.シャフェンシス感染症の種特異的な血清学的識別を提供した。これは、「至適基準（ゴールドスタンダード）」IFAと比較した組換え型タンパク質技術の改善された検出能を証明した最初の試験であり、種特異的同定および急性感染症において初期に起こる低い抗体力価に関連する感度の欠如が含まれる、E.カニス感染症の免疫診断に関連する残りの障害を消失させる可能性
 20
 がある。

【 0 3 5 9 】

材料および方法

実験動物

実験的E.カニス感染症において用いられたイヌおよびプロトコールは既に記述された（McBride et al., 2003）。実験的E.シャフェンシス感染症のために、年齢1歳の健康なビーグル犬2匹を販売元から得て、全米実験動物飼育信任協会（American Association for the Accreditation of Laboratory Animal Care）によって信任されているUniversity of Texas Medical Branch Laboratory Animal Resourcesの施設に収容した。試験の前に、イヌは、身体検査において異常がないことが証明され、IFAによるE.シャフェンシスに対する検出可能な抗体を有しなかった。実験プロトコールは、Animal Care and Use Committee at the University of Texas Medical Branchによって承認された。
 30

【 0 3 6 0 】

E.シャフェンシスおよびE.カニスの接種

E.シャフェンシス接種物の組織培養感染用量（TCID）を、24ウェル組織培養プレートに播種したDH82単層のMEMにおける接種物（0.2 ml）の10倍希釈液（ $10^{-1} \sim 10^{-5}$ ）の接種によって決定した。接種物を37℃で1時間インキュベートした後、増殖培地1 mlを加えた。接種の7日後、IFAによる接種細胞におけるE.シャフェンシスの同定によってTCIDを決定した。E.カニス接種物のTCIDは、既に記述されたように決定した（Gaunt et al., 1996）。
 40

【 0 3 6 1 】

イヌにおける実験的E.カニスおよびE.シャフェンシス感染症

イヌ2匹を既に記述されたように（Chen et al., 1995）、マウス胚細胞株において増殖させたE.シャフェンシス（Arkansas株）に実験的に感染させた。T-150フラスコ6本からの感染細胞を、細胞が80%感染した後、13,000 × gで25分間遠心分離した後回収した。イヌ2匹に、E.シャフェンシス細胞浮遊液4 mlを調製直後に静脈内に投与して、TCID50をレトロスペクティブに決定した。免疫血清を接種の4週間後に採取して、抗E.シャフェンシスおよび抗E.カニス抗体力価をIFAによって決定した。イヌ15匹をE.カニスに実験的に感染させ、既に記述されているように（McBride et al., 2003）血清を毎週採取した。
 50

【 0 3 6 2 】

イヌ血清

CMEに一致する臨床徴候または出血異常を示す病気のイヌからの血清試料が、既に記述されているように (McBride et al., 2001)、州全体の獣医師からLouisiana Veterinary Medical Diagnostic Laboratory (LAVMDL) に提出された。血清をIFA (1:40) によってスクリーニングして、エーリキア陽性および陰性血清の群に分けた。健康なイヌからの血清を、商業的ブリーダー (Marshall Farms, New York) からの1歳の健康なビーグルから得た。

【0363】

E. カニス組換え型タンパク質の遺伝子のクローニング

gp19 (ヌクレオチド7~411位)、gp36 (ヌクレオチド28~816位)、gp200N (ヌクレオチド22~564位)、およびgp200C (ヌクレオチド3665~4188位) およびp28-3遺伝子 (ヌクレオチド82~695位) を、既に記述されているように (Doyle et al., 2006; McBride et al., 2006; McBride et al., 2001; McBride et al., 2000; Nethery et al., 2006)、原核生物発現ベクターにクローニングした。プライマーを、pUni/V5-His-TOPOベクターへのアンプリコンのインフレーム挿入のために設計して、pBAD Thio-E Echoアクセプターベクター (p28) (Invitrogen Corporation, Carlsbad, Calif.) と組換えるか、またはpBAD/TOPO ThioFusion発現ベクター (gp19、gp36、gp200N、およびgp200C) (Invitrogen) に直接クローニングした。

【0364】

E. カニス組換え型タンパク質の発現および精製

gp19、gp36、gp200N末端およびgp200C末端組換え型タンパク質を、0.02%アラビノースによって2時間誘導後、大腸菌 (TOP10) において発現させた。細菌 (発酵培養物10 Lから) を5,000 × gで40分間遠心分離後回収して、PBSに浮遊させた。溶解緩衝液 (PBS、0.05% Triton 100X、0.5 M NaCl、1 mM PMSFおよび5 mMイミダゾール) において浮遊させた細菌を溶解する段階、および氷水においてフレンチプレスを用いて1100 psiで破壊する段階、および10,000 × gで1時間遠心分離することによって不溶性材料を沈降させる段階によって、組換え型タンパク質 (gp19、gp36、gp200N、およびgp200C) を未変性条件で精製した。透明にした上清を、平衡にしたNi-NTAカラム (50 mlカラム) に充填した。結合した組換え型タンパク質を、増加濃度のイミダゾール (4%、8%、20%、および100%) のカラム容積の15倍によって洗浄して、溶解緩衝液において250 mMイミダゾールによって溶出させた。溶解緩衝液 (50 mM Tris-HCl、400 mM NaCl、1 mM PMSF、および0.1% Triton 100X) において浮遊させた沈降細菌を50 Wで30分間 (20秒オン、20秒オフ)、氷水中で超音波処理する段階、および30分間の遠心分離 (10,000 × g) によって不溶性材料を沈降させる段階によって、組換え型p28タンパク質を変性条件で精製した。沈降物を最初は2 M尿素によって3回洗浄し、次に溶解緩衝液において4 M尿素によって洗浄した後、室温で30分間攪拌する水によって洗浄した後、30分間沈降させた (6000 g)。最終的な洗浄は、4 M尿素 + 1% Triton X100および0.1% デオキシコール酸において室温で1時間攪拌することによって行い、遠心分離 (10,000 × g、45分間) によって沈降させた。沈降物を試料緩衝液 (4 M尿素、6 Mグアニジンおよび50 mM 2-メルカプトエタノール) において4 で終夜攪拌しながら浮遊させて、沈降させた (10,000 × g、40分間)。透明にした上清を平衡にした逆相カラム (26/10 XK, Amersham Biosciences) に充填して、緩衝液A (0.1% TFA) によって洗浄し、緩衝液Aおよび緩衝液B (0.1% TFAおよび85% アセトニトリル) の増加比 (0% ~ 100% 緩衝液B) のカラム容積の6倍によって溶出した。

【0365】

酵素結合免疫吸着測定法 (ELISA)

E. カニス組換え型タンパク質5個 (gp36、gp19、p28、gp200N、およびgp200C) に対する抗体反応を、酵素結合免疫吸着測定法 (ELISA) によって評価した。ELISAプレートを選ぶこと、タンパク質濃度、血清希釈、およびブロッキング緩衝液が含まれるELISAプロトコールを最適化した。組換え型gp36 (0.3 μg/ml)、gp19 (1.2 μg/ml)、p28 (2.5 μg/ml)、gp200N (1.4 μg/ml)、gp200C (0.5 μg/ml)、およびチオレドキシシン対照 (2.5 μg/ml) をPBSにおいて希釈して、アッセイプレート (Polysorp (商標) 表面を有するNunc-Immu

10

20

30

40

50

no (商標) プレート、NUNC, Roskilde, Denmark) ウェルを、組換え型タンパク質を含有する50 μ lによってコーティングして、室温で2時間または4 で終夜インキュベートした。プレートを、洗浄緩衝液 (PBSおよびTween 20、0.05%) 200 μ lによって4回洗浄して、ブロッキング緩衝液 (PBSにおける10%ウマ血清; HyClone Laboratories, Inc., Logan, Utah) 100 μ lによってブロックして、37 で1時間インキュベートした。それぞれの一次抗体をブロッキング緩衝液において1:250倍希釈して、抗体50 μ lを、抗原を含有する試験ウェル、組換え型チオレドキシシ (陰性対照) を含有する対照ウェル、および抗原を含有しないブランクウェルに1試料あたり2個ずつ加えて、室温で1時間インキュベートした。プレートを洗浄して、ブロッキング緩衝液において1:1000に希釈したアフィニティ精製ペルオキシダーゼ標識ヤギ抗イヌIgG (H&L) (Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, MD) 50 μ lを各ウェルに加えた。プレートを室温で1時間インキュベートして、洗浄した。基質 (100 μ l) (Sure Blue Reserveペルオキシダーゼ基質、Kirkegaard & Perry Laboratories) を加えた後に結合抗体を検出した。プレートを、室温で20分間インキュベートした後、調整可能なマイクロプレートリーダー (Molecular Devices, Sunnyvale, Calif.) においてA630で読み取った。各試料の吸光度を630 nm (OD630) での光学密度としてプロットして、陰性対照ウェルからのバックグラウンドをそれぞれの対応する試料から差し引いて最終的な吸光度を決定した。

【0366】

ゲル電気泳動およびウエスタン免疫プロット

E. カニス組換え型タンパク質をドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) によって分離して、ニトロセスローズ膜に転写して、既に記述されているように (McBride et al., 2003) ウエスタン免疫プロットを行った。

【0367】

IFA

E. カニスに実験的に感染させた、臨床的に病気の、および天然に感染したイヌの抗体状態を、これまでに記述されているように決定した (McBride et al., 2003)。健康なイヌ、ならびにE. シャフェンシスに実験的または天然に感染したイヌの抗体状態を、E. カニス (Jake株) およびE. シャフェンシス (Arkansas株) 抗原スライドガラスによって同様に行った。血清を1:64で開始するPBSにおける2倍希釈を用いてアッセイした。

【0368】

ウエスタンプロットおよびELISAによるE. カニス組換え型タンパク質に対する抗体動態の比較

E. カニス主要免疫反応性タンパク質に対する抗体は、急性感染症の際に異なるように発生する (McBride et al., 2003)。実験的に感染させたイヌ3匹におけるE. カニス組換え型タンパク質に対する抗体反応をELISAおよびウエスタン免疫プロットによって調べて、二つの免疫測定法の相関を決定し、本来のE. カニス溶解物についてこれまでに観察された動態が組換え型タンパク質について再現されるか否かを決定した。E. シャフェンシスに感染したイヌ3匹からの血清における抗体は、ウエスタン免疫プロットおよびELISAの両方によって組換え型gp36と最も早く (14日目) 反応し、次にgp19 (21日目) と反応した。p28 およびgp200 N-およびC末端ポリペプチドは、類似の検出感度を示し、感染の過程 (28~35日) において後の、gp36よりおよそ2週間後に抗体と反応する (図9)。

【0369】

E. カニス組換え型糖タンパク質ELISAの分析感度および特異性

免疫診断に関する現在の「至適基準 (ゴールドスタンダード)」は、間接的蛍光抗体 (IFA) 試験である。この基準を用いて本発明者らの組換え型タンパク質ELISAの感度および特異性を決定した。組換え型gp36、gp19、gp200Nおよびgp200Cに対する抗体は、E. カニスに実験的に感染させた (範囲1280 ~ > 10,240)、および天然に感染した (抗体力価: 4、3200; 4、1600; 3、800; および2、400) イヌのELISAによって陽性IFA試料29例全てにおいて検出された (表3)。組換え型タンパク質 (gp36、gp19、gp200NおよびC末端) は、健康なおよび病気のイヌからの血清に対してIFAと比較して100%の特異性を示した (表3

10

20

30

40

50

)。逆に、組換え型p28は、いくつかのイヌ血清について高レベルの非特異的抗体結合（陰性対照レベルより上）を示し、このように実質的により低い特異性（60%）を有した。

【0370】

（表3）組換え型タンパク質およびIFAによるE.カニス免疫診断の分析感度および特異性

	検出可能な抗体を有するイヌ (%)				
	IFA	gp36	gp19	gp200N	gp200C
実験的にE.カニスに感染 (n=15)*	15 (100)	15 (100)	15 (100)	15 (100)	15 (100)
天然にE.カニスに感染 (n=14)	14 (100)	14 (100)	14 (100)	14 (100)	14 (100)
全体 (n=29)	29 (100)	29 (100)	29 (100)	29 (100)	29 (100)
臨床的に健康 (n=10)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
臨床的に病気 (n=26)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
全体 (n=36)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
実験的にE.シャフエンシスに感染 (n=2)	2 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
天然にE.シャフエンシスに感染 (n=2)**	2 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

10

【0371】

組換え型糖タンパク質による抗E.カニス抗体の早期検出

抗体反応の動態が定義された (McBride et al., 2003) E.カニスに実験的に感染させたイヌ (n=15) を用いて、ELISAにおける組換え型タンパク質と比較してIFAの検出感度を決定した。実験的に感染させたイヌ (例外1匹) はE.カニスgp36に対するIgG抗体を発生させ、これは、接種後14日 (dpi) までにELISAによって検出可能であり、これらのイヌの3分の1 (n=5) は、gp19と反応する抗体を有した (表3)。逆に、いずれのイヌも、14 dpiではIFAによって検出可能なIgG抗体を有しなかった (表3)。抗体は、21 dpiでイヌ4匹に限ってIFAによって検出可能であった。IFAおよび組換え型糖タンパク質ELISA感度は28 dpiで同等となったが、完全な一致は42 dpiまで達成されなかった (表4)。

20

【0372】

（表4）実験的に感染させたイヌにおけるIFAおよびELISA (gp36およびgp19) によるE.カニス感染症の血清学的検出感度の比較

	0日目	7日目	14日目	21日目	28日目	35日目	42日目
	IFA gp36 gp19	IFA gp36 gp19	IFA gp36 gp19	IFA gp36 gp19	IFA gp36 gp19	IFA gp36 gp19	IFA gp36 gp19
32	- - -	- - -	- + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +
33	- - -	- - -	- + -	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +
34	- - -	- - -	- + -	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +
35	- - -	- - -	- + +	- + +	+ + +	+ + +	+ + +
37	- - -	- - -	- + +	- + +	+ + +	+ + +	+ + +
41	- - -	- - -	- + -	- + +	+ + +	+ + +	+ + +
43	- - -	- - -	- + -	- + +	+ + +	+ + +	+ + +
44	- - -	- - -	- + -	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +
45	- - -	- - -	- + +	- + -	+ + +	+ + +	+ + +
46	- - -	- - -	- + -	- + -	+ + +	+ + +	+ + +
48	- - -	- - -	- + +	- + +	- - -	- + -	+ + +
51	- - -	- - -	- - -	- - -	- + -	+ + +	+ + +
52	- - -	- - -	- + -	- + +	+ + +	+ + +	+ + +
54	- - -	- - -	- + -	- + -	+ + +	+ + +	+ + +
59	- - -	- - -	- + -	- + -	- + -	+ + +	+ + +

30

40

【0373】

gp19およびgp36による種特異的免疫診断

E.シャフエンシス (実験的感染2匹および天然感染2匹) に感染したイヌ4匹はE.カニス抗原に対してIFA陽性であったが、E.カニス組換え型タンパク質 (gp36、gp19、およびgp200) と反応しなかった。E.シャフエンシスに実験的に感染させたイヌの血清における抗E.

50

シャフェンシス抗体力価は 1280であった。E.シャフェンシスに天然に感染したイヌの抗E.シャフェンシスIFA抗体力価は、相同な抗原（E.カニスに対して1：64）に対して1：400および1：800であった。

【0374】

本発明の態様の有意性

急性感染期におけるCMEの初期診断後にドキシサイクリンによる処置は、最善の予後を保証する。IFAによるE.カニス抗体の検出は、CMEの診断のために現在最も応用いられている方法であり、「至適基準（ゴールドスタンダード）」であると見なされる（Waner et al., 2001）。しかし、IFAは大きい参照診断研究所において慣習的に行われており、高レベルの技術的経験を必要とすることから、ポイントオブケアでの診断またはスクリーニング試験としては有用ではなく、研究所間および研究所内の変動および誤解釈を受けやすく、高価な蛍光顕微鏡機器を必要とする。さらに、IFAは、十分に定義されておらず、他の属のメンバー（E.シャフェンシスおよびE.エウイングイ（*E. ewingii*））および他の属（ネオリケッチア）の生物に対して生成された抗体と反応することができる抗原（熱ショックおよびp28/p30）を含有するE.カニス感染細胞を用いる（Comer et al., 1999）。このように、イヌにおける多数のダニ媒介性感染症の可能性は、IFAによる血清学的診断を複雑にする（Kordick et al., 1999）。現在、市販されているポイントオブケア診断試験（Snap 3Dx, IDEXX Laboratories ; Dip-S-Tick, PanBio InDx ; Immunocomb, Biogal）は、全細胞抗原または二つの主要外膜タンパク質（p30およびp30-1）からの合成もしくは組換え型タンパク質/ペプチドを利用する。Snap 3Dxアッセイは、最も広く用いられている試験の一つであるように見えるが、最近の二つの研究は、感度はIFAより実質的に低いように見えるという結論に達し（Belanger et al., 2002 ; Harrus et al., 2002）、この問題は低い（<320）抗体力価を含有する血清についてより顕著である（Harrus et al., 2002 ; O'Connor et al., 2006）。さらに、市販のアッセイは全て、イヌにおいて感染症を引き起こすことが知られている様々なエーリキア種を区別することができない。よって、特に初期急性感染期に、よりよい感度、および感染症の原因となる特異的物質の識別能を提供することができ、十分に特徴付けがなされて一貫して再現可能な組換え型または合成抗原を利用する免疫診断が必要であるが、現在利用可能ではない。

【0375】

gp36、gp19、gp200およびp28/30が含まれるE.カニスのいくつかの異なるが保存された主要な免疫反応性タンパク質が最近、分子的に同定されたことにより、CMEの血清学的診断における実質的な改善のための新しい機会が得られた（Doyle et al., 2006 ; McBride et al., 2003 ; McBride et al., 2001 ; McBride et al., 1999 ; Ohashi et al., 1998）。本発明者らは、これまでに、E.カニスgp36、gp19、およびgp200がE.シャフェンシスにおけるそれぞれのオルソログ（gp47、VLPT、およびgp200）とは分子のおよび免疫学的に別個であること、ならびにこれらの特徴付けされたタンパク質の二つ（gp36およびgp19）が、E.カニスに感染したイヌにおける抗体応答を誘発する最初のものであることを報告した（McBride et al., 2003）。さらに、これらのタンパク質は、地理的に分散されたE.カニス株において保存されている（Doyle et al., 2006 ; McBride et al., 2006 ; McBride et al., 2000 ; McBride et al., 1999）。したがって、これらの抗原は、E.カニス感染症を検出するための超高感度で非常に特異的な新世代の免疫診断の開発を助長する高い潜在性を有する。一定の態様において、これらのタンパク質は、感染症において早期に抗体を検出するために、全細胞抗原（IFA）より増加した感度を提供すると考えられた。本発明において、ELISAフォーマットにおいて用いられた二つの組換え型E.カニスタンパク質（gp36およびgp19）は、初期免疫応答の際に抗体を検出するためにIFAと比較して感度の増強を提供し、E.カニスに対して非常に特異的であることが証明された。

【0376】

分子的に特徴付けがなされた組換え型タンパク質（gp36、gp19、p28/30、およびgp200）は、ポイントオブケアでの診断試験のために一般的に用いられる二つの免疫測定法フォーマット（ELISAおよび膜）において、本来のE.カニス溶解物（McBride et al., 2003）

における対応するタンパク質について報告された動態と類似の動態で、感染したイヌ血清からの抗体と反応した。これらの結果は、組換え型タンパク質が本来のエーリキアタンパク質の適した代用物であり、感染症の際に生成された抗体と類似に反応することを確認する。さらに、二つの免疫測定法フォーマットによって得られた一貫した結果は、これらのタンパク質が、利用される測定法フォーマットによらず、一貫した感度を提供しうることを示している。この特定の試験において、ウエスタン免疫ブロッティングは、ELISAと比較して類似の結果を提供したが、結果は研究所依存的となることがあり、しかもこの技術は労力がかかり、時間がかかり、ポイントオブケアの試験にとってあまり適切ではない。

【 0 3 7 7 】

E.カニス組換え型タンパク質の分析感度は、天然および実験的感染症を有するイヌからの血清を用いてIFAと完全に相関した。本発明者らは、E.カニスgp200-N (P43) による100%の感度をこれまでに報告したが、それらの結果は本試験において確認された (McBride et al., 2001)。しかし、最近、gp200タンパク質内に主要なエピトープが5個存在することが同定された (Nethery et al., 2006)。gp200-N (P43) は、一つの主要なエピトープを含有し、カルボキシ末端領域、gp200-Cは、二つの主要な抗体エピトープ (Nethery et al., 2006) を含有する。双方のgp200組換え型タンパク質に対する抗体応答は、gp36およびgp19より後に発生したが、それらは実験的に感染させたイヌからの後期急性期血清中の抗体と強く反応した。これらの知見は、gp200に対する強い後期急性期抗体反応が観察されたこれまでの知見と一致した (McBride et al., 2003; McBride et al., 2001)。E.カニスP28に対する抗体はまた、後期急性期免疫応答において後に発生した。本来のおよび組換え型P28の両方と一貫する類似の抗体応答動態がこれまでに報告された (McBride et al., 2003)。P28に対するいくつかの非特異的応答がELISAフォーマットにおいて観察されたが、これは特定の態様における他の混入タンパク質によるものである。P28は非常に不溶性であって、このように、高度に精製された組換え型タンパク質を産生することは達成が非常に難しい。それにもかかわらず、本試験におけるウエスタン免疫ブロッティングおよび他の試験によって得られた結果は、高度精製p28/p30が特異的免疫診断抗原であることを示唆している (Belanger et al., 2002; McBride et al., 2003; McBride et al., 2001)。

【 0 3 7 8 】

E.カニスに対する第一の検出可能な抗体は、gp36およびgp19に向けられる (Doyle et al., 2006; McBride et al., 2003)。E.カニス組換え型タンパク質は全て、天然に感染したイヌにおいてIFAと類似の感度を提供した；しかし、抗体応答の動態を正確に決定することができる実験的に感染させたイヌの群において、gp36およびgp19は、gp200およびp28を用いるIFAまたはELISAより7~14日早く抗体を検出した。本発明者らの知る限り、これは、初期の急性エーリキア感染症の際に産生された低い抗体レベルを検出するために、種特異的E.カニスタンパク質が全細胞抗原より感度がよいことの最初の証明である。多くのE.カニスタンパク質が、後期急性期抗体を検出するために適している可能性があるが、特異的タンパク質の感度は疾患相に関連するよう見える。抗体を検出するためのp28/p30、gp200、およびMAP2のようなE.カニス抗原の感度は、血清が中等度から高レベルの抗体を含有する後期疾患相において最善であるよう見える。しかし、感染症の初期に得られるレベルのような、低い抗体レベルを有する血清は、これらの組換え型抗原および全細胞抗原では多くの難しさを提起する (Harrus et al., 2002; O'Connor et al., 2006)。この状況は、抗体レベルが低く、および正確な診断が血清学的に最も難題となりうる感染初期に、イヌから採取した血清に特に関連する可能性がある。

【 0 3 7 9 】

gp36およびgp19は、同定されて分子的に特徴付けされている種特異的なセリンに富む主要なエピトープを有する (Doyle et al., 2006; McBride et al., 2006)。同様に、E.カニスおよびE.シャフェンシスgp200オルソログは、抗原的に別個であり、分子的に特徴付けされているエピトープを有する (McBride et al., 2003; McBride et al., 2001; Nethery et al., 2006)。gp36、gp19、およびgp200における主要なエピトープは、エピトー

10

20

30

40

50

プの免疫反応性に寄与する糖質免疫決定基を有するように見える (Doyle et al., 2006 ; McBride et al., 2006 ; Nethery et al., 2006)。これらの主要な免疫反応性抗原は、E. カニスと、最も近縁の生物であるE. シャフェンシスとを血清学的に識別することができ、特異的感染物質を識別することができる非常に特異的なアッセイの開発を可能にすると考えられる。感度のよい種特異的識別を行うことができるE. シャフェンシスのもう一つの主要な免疫反応性抗原 (gp120) も同様に報告されている (Yu et al., 1996 ; Yu et al., 1997 ; Yu et al., 1999)。このように、E. カニスgp36および/またはgp19およびE. シャフェンシスgp120の主要なエピトープが含まれる高度に定義された組換え型抗原を、E. カニスおよびE. シャフェンシスの特異的診断のために同じアッセイにおいて利用できると考えられる。

10

【0380】

組換え型または合成抗原による感染症の血清学的診断の信頼性は、選択される抗原の抗原性変動がないことに依存する。E. カニスの場合、血清診断において利用される潜在性を有するgp36、gp19、gp200およびp28が含まれる主要な免疫反応性抗原の多くは、地理的に別個の分離株において高度に保存されている (Doyle et al., 2006 ; McBride et al., 2006 ; McBride et al., 2000 ; McBride et al., 1999 ; Yu et al., 2000)。逆に、E. シャフェンシスは、異なる分離株においてより多様性を示すが、gp120の抗体エピトープは良好に保存されるように見える (Chen et al., 1997 ; Doyle et al., 2006 ; Reddy and Streck, 2000 ; Doyle et al., 2006 ; Yu et al., 1997 ; Yu et al., 2000)。その上、抗体エピトープを含有する抗原的に別個の超可変領域を有する主要外膜タンパク質 (p28/p30) の差次的発現も同様に (Barnewall et al., 1999 ; Li et al., 2002 ; Li et al., 2002 ; McBride et al., 1999 ; Ohashi et al., 1998 ; Ohashi et al., 1998 ; Unver et al., 2002 ; Yu et al., 2000)、E. カニスおよびE. シャフェンシスに対する血清学的反応の変動に寄与する可能性がある。このように、血清学的変動に関する潜在性を最小限にするまたは消失させる高度に保存された一つの遺伝子タンパク質であるgp36およびgp19のような抗原は、CME血清診断に関連するこれらの障害を克服する世界的に有用な超高感度で種特異的免疫診断を開発するための最善の潜在性を有すると結論された。

20

【0381】

実施例5

本発明のワクチン

本発明の特定の局面において、本発明の免疫原性組成物は、サブユニットワクチンのようなワクチンとして適している。本発明の他の局面において、免疫原性組成物は免疫防御的であると呼ばれる。

30

【0382】

具体的に、E. カニスgp19エピトープを含む組成物のような本発明の一つまたは複数の組成物は、例えばヒト、イヌ、ウシ、またはウマ動物のような哺乳動物に投与される。哺乳動物からの血清を、血清における抗体を検出することによるような、免疫応答に関してアッセイしてもよい。次に、哺乳動物をE. カニス生物またはもう一つの適切な組成物のような病原性生物によるその後の攻撃誘発に供して、免疫防御を決定する。例えば、変異エピトープまたは糖質部分を含まないエピトープによる免疫のような、対照を使用してもよい。その後の攻撃誘発に対する完全または部分的な防御は、組成物の免疫防御的性質を証明し、組成物はワクチンである。部分的防御は、感染症の少なくとも一つの症状の発生を防止する、もしくは発生を遅らせる、または少なくとも一つの症状が悪化することを防止するとして定義されてもよい。

40

【0383】

参考文献

本明細書において言及した全ての特許および刊行物は、本発明が属する当業者のレベルを示している。全ての特許および刊行物は、それぞれの個々の刊行物が具体的および個々に参照により本明細書に組み入れられると示されるのと同じ程度に参照により本明細書に組み入れられる。

50

【 0 3 8 4 】

特許および特許出願

米国特許第5,440,013号

米国特許第5,618,914号

米国特許第5,670,155号

米国特許第5,446,128号

米国特許第5,710,245号

米国特許第5,840,833号

米国特許第5,859,184号

米国特許第5,929,237号

米国特許第5,475,085号

米国特許第5,672,681号

米国特許第5,674,976号

米国特許第4,554,101号

【 0 3 8 5 】

出版物

Alleman, A. R., A. F. Barbet, M. V. Bowie, H. L. Sorenson, S. J. Wong, and M. Belanger. 2000. Expression of a gene encoding the major antigenic protein 2 homolog of *Ehrlichia chaffeensis* and potential application for serodiagnosis. *J. Clin. Microbiol.* 38:3705-3709. 10

Alleman, A. R., L. J. McSherry, A. F. Barbet, E. B. Breitschwerdt, H. L. Sorenson, M. V. Bowie, and M. Belanger. 2001. Recombinant major antigenic protein 2 of *Ehrlichia canis*: a potential diagnostic tool. *J. Clin. Microbiol.* 39:2494-2499.

Barnewall, R. E., N. Ohashi, and Y. Rikihisa. 1999. *Ehrlichia chaffeensis* and *E. sennetsu*, but not the human granulocytic ehrlichiosis agent, colocalize with transferrin receptor and up-regulate transferrin receptor mRNA by activating iron-responsive protein 1. *Infect.Immun.* 67:2258-2265. 30

Belanger, M., H. L. Sorenson, M. K. France, M. V. Bowie, A. F. Barbet, E. B. Breitschwerdt, and A. R. Alleman. 2002. Comparison of serological detection methods for diagnosis of *Ehrlichia canis* infections in dogs. *J Clin Microbiol.* 40:3506-3508.

Benson, G. 1999. Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences. *Nucleic Acids Res.* 27:573-580. 40

Breitschwerdt, E. B., B. C. Hegarty, and S. I. Hancock. 1998. Sequential evaluation of dogs naturally infected with *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia equi*, *Ehrlichia ewingii*, or *Bartonella vinsonii*. *J.Clin.Microbiol.* 36:2645-2651.

Bzymek, M. and S. T. Lovett. 2001. Instability of repetitive DNA sequences: the role of replication in multiple mechanisms. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 98:8319-8325.

Chen, S. M., V. L. Popov, H. M. Feng, J. Wen, and D. H. Walker. 1995. Cultivation of *Ehrlichia chaffeensis* in mouse embryo, Vero, BGM, and L929 cells and study of *Ehrlichia*-induced cytopathic effect and plaque formation. Infect.Immun. 63:647-655.

Chen, S. M., X. J. Yu, V. L. Popov, E. L. Westerman, F. G. Hamilton, and D. H. Walker. 1997. Genetic and antigenic diversity of *Ehrlichia chaffeensis*: comparative analysis of a novel human strain from Oklahoma and previously isolated strains. J. Infect. Dis. 175:856-863.

Codner, E. C. and L. L. Farris-Smith. 1986. Characterization of the subclinical phase of ehrlichiosis in dogs. J.Am.Vet.Med.Assoc. 189:47-50.

Collins, N. E., J. Liebenberg, E. P. de Villiers, K. A. Brayton, E. Louw, A. Pretorius, F. E. Faber, H. H. van, A. Josemans, K. M. van, H. C. Steyn, M. F. van Strijp, E. Zwegarth, F. Jongejan, J. C. Maillard, D. Berthier, M. Botha, F. Joubert, C. H. Corton, N. R. Thomson, M. T. Allsopp, and B. A. Allsopp. 2005. The genome of the heartwater agent *Ehrlichia ruminantium* contains multiple tandem repeats of actively variable copy number. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 102:838-843.

Comer, J. A., W. L. Nicholson, J. G. Olson, and J. E. Childs. 1999. Serologic testing for human granulocytic ehrlichiosis at a national referral center. J.Clin.Microbiol. 37:558-564.

Cowell, R. L., R. D. Tyler, K. D. Clinkenbeard, and J. H. Meinkoth. 1988. Ehrlichiosis and polyarthritis in three dogs. J.Am.Vet.Med.Assoc. 192:1093-1095.

Dawson, J. E. and S. A. Ewing. 1992. Susceptibility of dogs to infection with *Ehrlichia chaffeensis*, causative agent of human ehrlichiosis. Am.J Vet.Res. 53:1322-1327.

Dawson, J. E., K. L. Biggie, C. K. Warner, K. Cookson, S. Jenkins, J. F. Levine, and J. G. Olson. 1996. Polymerase chain reaction evidence of *Ehrlichia chaffeensis*, an

10

20

30

40

etiologic agent of human ehrlichiosis, in dogs from southeast Virginia. *Am.J.Vet.Res.* 57:1175-1179.

Doyle, C. K., A. M. Cardenas, D. M. Aguiar, M. B. Labruna, L. M. Ndip, X. J. Yu, and McBride J.W. 2006. Molecular characterization of *E. canis* gp36 and *E. chaffeensis* gp47 tandem repeats among different geographic locations. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1063.

Doyle, C. K., K. A. Nethery, V. L. Popov, and J. W. McBride. 2006. Differentially expressed and secreted major immunoreactive protein orthologs of *Ehrlichia canis* and *E. chaffeensis* elicit early antibody responses to epitopes on glycosylated tandem repeats. *Infect. Immun.* 74:711-720. 10

Doyle, C. K., M. B. Labruna, E. B. Breitschwerdt, Y. W. Tang, R. E. Corstvet, B. C. Hegarty, K. C. Bloch, P. Li, D. H. Walker, and J. W. McBride. 2005. Detection of medically important *Ehrlichia* spp. by quantitative multicolor Taqman real-time PCR of the *dsb* gene. *J.Mol.Diagn.* 10:504-510. 20

Doyle, C. K., X. Zhang, V. L. Popov, and J. W. McBride. 2005. An immunoreactive 38-kilodalton protein of *Ehrlichia canis* shares structural homology and iron-binding capacity with the ferric ion-binding protein family. *Infect. Immun.* 73:62-69.

Dunning Hotopp, J. C., M. Lin, R. Madupu, J. Crabtree, S. V. Angiuoli, J. Eisen, R. Seshadri, Q. Ren, M. Wu, T. R. Utterback, S. Smith, M. Lewis, H. Khouri, C. Zhang, H. Niu, Q. Lin, N. Ohashi, N. Zhi, W. Nelson, L. M. Brinkac, R. J. Dodson, M. J. Rosovitz, J. Sundaram, S. C. Daugherty, T. Davidsen, A. S. Durkin, M. Gwinn, D. H. Haft, J. D. Selengut, S. A. Sullivan, N. Zafar, L. Zhou, F. Benahmed, H. Forberger, R. Halpin, S. Mulligan, J. Robinson, O. White, Y. Rikihisa, and H. Tettelin. 2006. Comparative genomics of emerging human ehrlichiosis agents. *PLoS Genet.* 2:e21. 30

Frutos, R., A. Viari, C. Ferraz, A. Morgat, S. Eychenie, Y. Kandassamy, I. Chantal, A. Bensaid, E. Coissac, N. Vachiery, J. Demaille, and D. Martinez. 2006. Comparative genomic analysis of three strains of *Ehrlichia ruminantium* reveals an active process of genome size plasticity. *J Bacteriol* 188:2533-2542. 40

Gaunt, S. D., R. E. Corstvet, C. M. Berry, and B. Brennan. 1996. Isolation of *Ehrlichia canis* from dogs following subcutaneous inoculation. *J.Clin.Microbiol.* 34:1429-1432.

Goldman, E. E., E. B. Breitschwerdt, C. B. Grindem, B. C. Hegarty, J. J. Walls, and J. S. Dumler. 1998. Granulocytic ehrlichiosis in dogs from North Carolina and Virginia. *J Vet Intern Med* 12:61-70.

Harrus, S., A. R. Alleman, H. Bark, S. M. Mahan, and T. Waner. 2002. Comparison of three enzyme-linked immunosorbant assays with the indirect immunofluorescent antibody test for the diagnosis of canine infection with *Ehrlichia canis*. *Vet.Microbiol.* 86:361-368.

Hinc, K., K. Nagorska, A. Iwanicki, G. Wegrzyn, S. J. Seror, and M. Obuchowski. 2006. Expression of genes coding for GerA and GerK spore germination receptors is dependent on the protein phosphatase PrpE. *J Bacteriol* 188:4373-4383.

Johannesson et al., 1999, "Bicyclic tripeptide mimetics with reverse turn inducing properties." *J. Med. Chem.* 42:601-608.

Julenius, K., A. Molgaard, R. Gupta, and S. Brunak. 2005. Prediction, conservation analysis, and structural characterization of mammalian mucin-type O-glycosylation sites. *Glycobiology* 15:153-164.

Knowles, T. T., A. R. Alleman, H. L. Sorenson, D. C. Marciano, E. B. Breitschwerdt, S. Harrus, A. F. Barbet, and M. Belanger. 2003. Characterization of the major antigenic protein 2 of *Ehrlichia canis* and *Ehrlichia chaffeensis* and its application for serodiagnosis of ehrlichiosis. *Clin. Diagn. Lab Immunol.* 10:520-524.

Kordick, S. K., E. B. Breitschwerdt, B. C. Hegarty, K. L. Southwick, C. M. Colitz, S. I. Hancock, J. M. Bradley, R. Rumbough, J. T. Mcpherson, and J. N. MacCormack. 1999. Coinfection with multiple tick-borne pathogens in a Walker hound kennel in North Carolina. *J.Clin.Microbiol.* 37:2631-2638.

Kuehn, N. F. and S. D. Gaunt. 1985. Clinical and hematologic findings in canine ehrlichiosis. *J.Am.Vet.Med.Assoc.* 186:355-358.

10

20

30

40

Levine, A., F. Vannier, C. Absalon, L. Kuhn, P. Jackson, E. Scrivener, V. Labas, J. Vinh, P. Courtney, J. Garin, and S. J. Seror. 2006. Analysis of the dynamic *Bacillus subtilis* Ser/Thr/Tyr phosphoproteome implicated in a wide variety of cellular processes. *Proteomics*. 6:2157-2173.

Li, J. S., E. Yager, M. Reilly, C. Freeman, G. R. Reddy, A. A. Reilly, F. K. Chu, and G. M. Winslow. 2001. Outer membrane protein-specific monoclonal antibodies protect SCID mice from fatal infection by the obligate intracellular bacterial pathogen *Ehrlichia chaffeensis*. *J.Immunol.* 166:1855-1862. 10

Li, J. S., F. Chu, A. Reilly, and G. M. Winslow. 2002. Antibodies highly effective in SCID mice during infection by the intracellular bacterium *Ehrlichia chaffeensis* are of picomolar affinity and exhibit preferential epitope and isotype utilization. *J.Immunol.* 169:1419-1425.

Madec, E., A. Laszkiewicz, A. Iwanicki, M. Obuchowski, and S. Seror. 2002. Characterization of a membrane-linked Ser/Thr protein kinase in *Bacillus subtilis*, implicated in developmental processes. *Mol. Microbiol.* 46:571-586. 20

Mahan, S. M., T. C. McGuire, S. M. Semu, M. V. Bowie, F. Jongejan, F. R. Rurangirwa, and A. F. Barbet. 1994. Molecular cloning of a gene encoding the immunogenic 21 kDa protein of *Cowdria ruminantium*. *Microbiol.* 140 (Pt 8):2135-2142.

Mavromatis, K., C. K. Doyle, A. Lykidis, N. Ivanova, M. P. Francino, P. Chain, M. Shin, S. Malfatti, F. Larimer, A. Copeland, J. C. Detter, M. Land, P. M. Richardson, X. J. Yu, D. H. Walker, J. W. McBride, and N. C. Kyrpides. 2006. The genome of the obligately intracellular bacterium *Ehrlichia canis* reveals themes of complex membrane structure and immune evasion strategies. *J Bacteriol* 188:4015-4023. 30

McBride J.W., C. K. Doyle, X. F. Zhang, A. M. Cardenas, V. L. Popov, K. A. Nethery, and M. E. Woods. 2006. *Ehrlichia canis* 19-kDa glycoprotein ortholog of *E. chaffeensis* variable length PCR target contains a single serine-rich epitope defined by a carbohydrate immunodeterminant. *Infect.Immun.* 40

McBride JW, R. E. Corstvet, S. D. Gaunt, C. Boudreaux, T. Guedry, and D. H. Walker. 2003. Kinetics of antibody response to *Ehrlichia canis* immunoreactive proteins. *Infect. Immun.* 71:2516-2524.

McBride JW, R. E. Corstvet, S. D. Gaunt, C. Boudreaux, T. Guedry, and D. H. Walker. 2003. Kinetics of antibody response to *Ehrlichia canis* immunoreactive proteins. *Infect. Immun.* 71:2516-2524.

McBride, J. W., J. E. Comer, and D. H. Walker. 2003. Novel immunoreactive glycoprotein orthologs of *Ehrlichia* spp. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 990:678-684.

McBride, J. W., L. M. Ndip, V. L. Popov, and D. H. Walker. 2002. Identification and functional analysis of an immunoreactive DsbA-like thio-disulfide oxidoreductase of *Ehrlichia* spp. *Infect. Immun.* 70:2700-2703.

McBride, J. W., R. E. Corstvet, E. B. Breitschwerdt, and D. H. Walker. 2001. Immunodiagnosis of *Ehrlichia canis* infection with recombinant proteins. *J. Clin. Microbiol.* 39:315-322.

McBride, J. W., R. E. Corstvet, E. B. Breitschwerdt, and D. H. Walker. 2001. Immunodiagnosis of *Ehrlichia canis* infection with recombinant proteins. *J. Clin. Microbiol.* 39:315-322.

McBride, J. W., X. J. Yu, and D. H. Walker. 1999. Molecular cloning of the gene for a conserved major immunoreactive 28-kilodalton protein of *Ehrlichia canis*: a potential serodiagnostic antigen. *Clin. Diag. Lab. Immunol.* 6:392-399.

McBride, J. W., X. J. Yu, and D. H. Walker. 2000. Glycosylation of homologous immunodominant proteins of *Ehrlichia chaffeensis* and *E. canis*. *Infect. Immun.* 68:13-18.

McBride, J. W., X. Yu, and D. H. Walker. 2000. A conserved, transcriptionally active p28 multigene locus of *Ehrlichia canis*. *Gene* 254:245-252.

10

20

30

40

Ndip, L. M., R. N. Ndip, S. N. Esemu, V. L. Dickmu, E. B. Fokam, D. H. Walker, and J. W. McBride. 2005. ehrlichial infection in Cameroonian canines by *Ehrlichia canis* and *Ehrlichia ewingii*. Vet. Microbiol. 111:59-66.

Nethery, K. A., C. K. Doyle, B. L. Elsom, N. K. Herzog, V. L. Popov, and J. W. McBride. 2005. Ankyrin repeat containing immunoreactive 200 kD glycoprotein (gp200) orthologs of *Ehrlichia chaffeensis* and *Ehrlichia canis* are translocated to the nuclei of infected monocytes, p. O-60. In 4th International Conference on Rickettsiae and Rickettsial Diseases, Longrono, Spain. 10

Nethery, K. A., Doyle C.K., X. F. Zhang, and McBride J.W. 2006. *Ehrlichia canis* gp200 contains five major B cell epitopes defined by O-linked carbohydrate immunodeterminants. Infect.Immun.

Nielsen, H., J. Engelbrecht, S. Brunak, and G. von Heijne. 1997. Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. Protein Eng 10:1-6. 20

Obuchowski, M., E. Madec, D. Delattre, G. Boel, A. Iwanicki, D. Foulger, and S. J. Seror. 2000. Characterization of PrpC from *Bacillus subtilis*, a member of the PPM phosphatase family. J Bacteriol 182:5634-5638.

O'Connor, T. P., Esty K.J., MacHenry P., and Hanscom J.L. 2002. Performance evaluation of *Ehrlichia canis* and *Borrelia burgdorferi* peptides in a new *Dirofilaria immitis* combinantion assay., p. 77-84. In Recent advances in heartworm disease: symposium '01. American Heartworm Society, Batavia, Ill. 30

O'Connor, T. P., J. L. Hanscom, B. C. Hegarty, R. G. Groat, and E. B. Breitschwerdt. 2006. Comparison of an indirect immunofluorescence assay, western blot analysis, and a commercially available ELISA for detection of *Ehrlichia canis* antibodies in canine sera. Am.J Vet.Res. 67:206-210.

Ohashi, N., A. Unver, N. Zhi, and Y. Rikihisa. 1998. Cloning and characterization of multigenes encoding the immunodominant 30-kilodalton major outer membrane proteins of *Ehrlichia canis* and application of the recombinant protein for serodiagnosis. J.Clin.Microbiol. 36:2671-2680. 40

Ohashi, N., N. Zhi, Y. Zhang, and Y. Rikihisa. 1998. Immunodominant major outer membrane proteins of *Ehrlichia chaffeensis* are encoded by a polymorphic multigene family. *Infect.Immun.* 66:132-139.

Reddy, G. R. and C. P. Streck. 2000. Variability in the 28-kDa surface antigen protein multigene locus of isolates of the emerging disease agent *Ehrlichia chaffeensis* suggests that it plays a role in immune evasion [published erratum appears in *Mol Cell Biol Res Commun* 2000 Jan;3(1):66]. *Mol.Cell.Biol.Res.Commun.* 1:167-175. 10

Reddy, G. R., C. R. Sulsona, A. F. Barbet, S. M. Mahan, M. J. Burrige, and A. R. Alleman. 1998. Molecular characterization of a 28 kDa surface antigen gene family of the tribe Ehrlichieae. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 247:636-643.

Rikihisa, Y., S. A. Ewing, J. C. Fox, A. G. Siregar, F. H. Pasaribu, and M. B. Malole. 1992. Analyses of *Ehrlichia canis* and a canine granulocytic *Ehrlichia* infection. *J. Clin. Microbiol.* 30:143-148. 20

Singu, V., H. Liu, C. Cheng, and R. R. Ganta. 2005. *Ehrlichia chaffeensis* expresses macrophage- and tick cell-specific 28-kilodalton outer membrane proteins. *Infect. Immun.* 73:79-87.

Sirigireddy, K. R. and R. R. Ganta. 2005. Multiplex detection of *Ehrlichia* and *Anaplasma* species pathogens in peripheral blood by real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J Mol Diagn* 7:308-316. 30

Stockham, S. L., D. A. Schmidt, K. S. Curtis, B. G. Schauf, J. W. Tyler, and S. T. Simpson. 1992. Evaluation of granulocytic ehrlichiosis in dogs of Missouri, including serologic status to *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia equi* and *Borrelia burgdorferi*. *Am.J.Vet.Res.* 53:63-68.

Sumner, J. W., J. E. Childs, and C. D. Paddock. 1999. Molecular cloning and characterization of the *Ehrlichia chaffeensis* variable-length PCR target: an antigen-expressing gene that exhibits interstrain variation. *J. Clin. Microbiol.* 37:1447-1453. 40

Troy, G. C. and S. D. Forrester. 1990. Canine ehrlichiosis, p. 404-418. In C. E. Green (ed.), *Infectious diseases of the dog and cat*. W.B. Saunders Co., Philadelphia.

Unver, A., Y. Rikihisa, R. W. Stich, N. Ohashi, and S. Felek. 2002. The omp-1 major outer membrane multigene family of *Ehrlichia chaffeensis* is differentially expressed in canine and tick hosts. *Infect.Immun.* 70:4701-4704.

Vita et al., 1998, "Novel miniproteins engineered by the transfer of active sites to small natural scaffolds." *Biopolymers* 47:93-100.

Waner, T., S. Harrus, F. Jongejan, H. Bark, A. Keysary, and A. W. Cornelissen. 2001. Significance of serological testing for ehrlichial diseases in dogs with special emphasis on the diagnosis of canine monocytic ehrlichiosis caused by *Ehrlichia canis*. *Vet.Parasitol.* 95:1-15. 10

Weisshoff et al., 1999, "Mimicry of beta II'-turns of proteins in cyclic pentapeptides with one and without D-amino acids." *Eur. J. Biochem.* 259:776-788.

Yabsley, M. J., S. E. Little, E. J. Sims, V. G. Dugan, D. E. Stallknecht, and W. R. Davidson. 2003. Molecular variation in the variable-length PCR target and 120-kilodalton antigen genes of *Ehrlichia chaffeensis* from white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). *J. Clin. Microbiol.* 41:5202-5206. 20

Yu, X. J., J. W. McBride, C. M. Diaz, and D. H. Walker. 2000. Molecular cloning and characterization of the 120-kilodalton protein gene of *Ehrlichia canis* and application of the recombinant 120-kilodalton protein for serodiagnosis of canine ehrlichiosis. *J. Clin. Microbiol.* 38:369-374. 30

Yu, X. J., J. W. McBride, C. M. Diaz, and D. H. Walker. 2000. Molecular cloning and characterization of the 120-kilodalton protein gene of *Ehrlichia canis* and application of the recombinant 120-kilodalton protein for serodiagnosis of canine ehrlichiosis. *J.Clin.Microbiol.* 38:369-374.

Yu, X. J., J. W. McBride, X. F. Zhang, and D. H. Walker. 2000. Characterization of the complete transcriptionally active *Ehrlichia chaffeensis* 28 kDa outer membrane protein multigene family. *Gene* 248:59-68. 40

Yu, X. J., P. A. Crocquet-Valdes, L. C. Cullman, V. L. Popov, and D. H. Walker. 1999. Comparison of *Ehrlichia chaffeensis* recombinant proteins for serologic diagnosis of human monocytotropic ehrlichiosis. *J.Clin.Microbiol.* 37:2568-2575.

Yu, X. J., P. Crocquet-Valdes, and D. H. Walker. 1997. Cloning and sequencing of the gene for a 120-kDa immunodominant protein of *Ehrlichia chaffeensis*. *Gene* 184:149-154.

Yu, X. J., P. Crocquet-Valdes, L. C. Cullman, and D. H. Walker. 1996. The recombinant 120-kilodalton protein of *Ehrlichia chaffeensis*, a potential diagnostic tool. *J.Clin.Microbiol.* 34:2853-2855.

Yu, X., J. F. Piesman, J. G. Olson, and D. H. Walker. 1997. Short report: geographic distribution of different genetic types of *Ehrlichia chaffeensis*. *Am.J Trop.Med Hyg.* 56:679-680.

Zhang, X. F., J. Z. Zhang, S. W. Long, R. P. Ruble, and X. J. Yu. 2003. Experimental *Ehrlichia chaffeensis* infection in beagles. *J.Med.Microbiol.* 52:1021-1026.

【 0 3 8 6 】

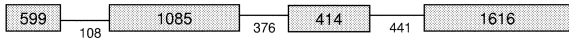
本発明およびその長所を詳細に記述してきたが、様々な変化、置換、および変更を行うことができ、それらも添付の特許請求の範囲によって定義される本発明の趣旨および範囲に含まれると理解すべきである。その上、本出願の範囲は、本明細書に記述されるプロセス、機構、製造、物質の組成、手段、方法および段階に関する特定の態様に限定されないと意図される。当業者は、本発明の開示から容易に認識すると考えられるように、本明細書に記述される対応する態様と実質的に同じ機能を行う、または実質的に同じ結果を達成する、既に存在するまたは後に開発されるプロセス、機構、製造、物質の組成、手段、方法、または段階を、本発明に従って利用してもよい。したがって、添付の特許請求の範囲は、そのようなプロセス、機構、製造、物質の組成、手段、方法、または段階をその範囲に含めると意図される。

10

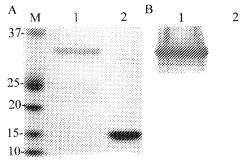
20

30

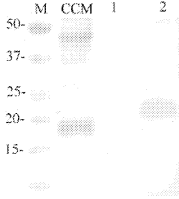
【図1】



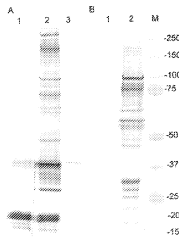
【図2】



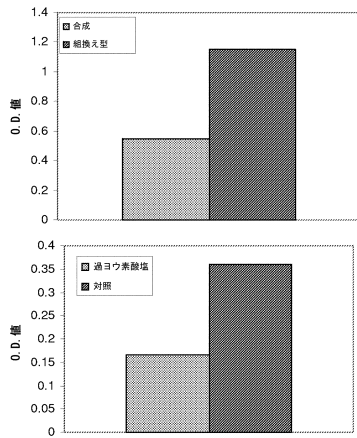
【図3】



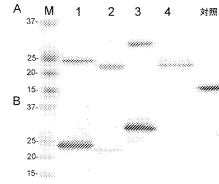
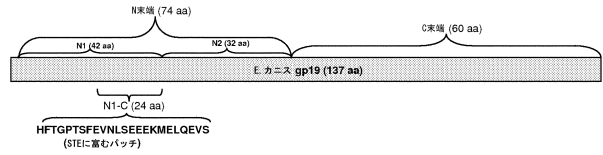
【図4】



【図6】



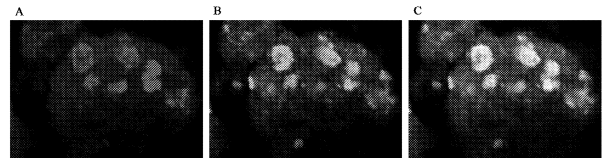
【図5】



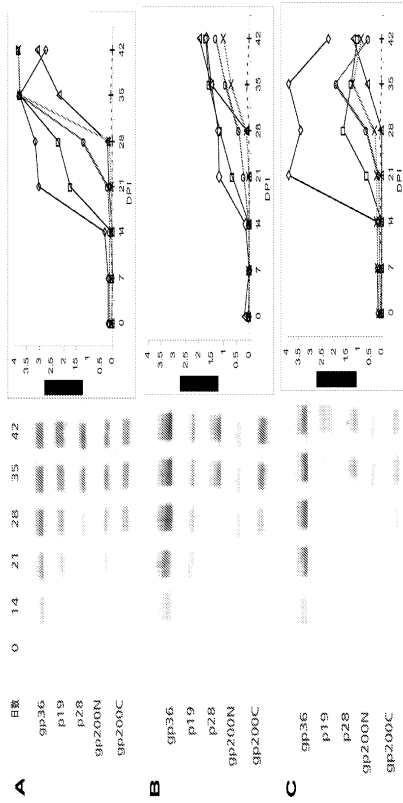
【図7】



【図8】



【 図 9 】



【 配列表 】

0005837917000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		
A 6 1 P 31/04 (2006.01)		A 6 1 P 31/04	1 7 1	
A 6 1 K 9/10 (2006.01)		A 6 1 K 9/10		
A 6 1 K 39/395 (2006.01)		A 6 1 K 39/395		D
G 0 1 N 33/53 (2006.01)		A 6 1 K 39/395		N
G 0 1 N 33/569 (2006.01)		G 0 1 N 33/53		D
C 1 2 P 21/08 (2006.01)		G 0 1 N 33/53		N
		G 0 1 N 33/569		F
		C 1 2 P 21/08		

(74)代理人 100142929

弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(72)発明者 マクブライド ジェレ ダブリュー .

アメリカ合衆国 テキサス州 リーグ シティー ガストンベリー コート 4 1 0

(72)発明者 ドイル クリストファー カイラー

アメリカ合衆国 テキサス州 バクリフ チャールズ ストリート 3 2 2 3

審査官 渡邊 潤也

(56)参考文献 Infect.Immun.,2003 May,71(5),p.2516-24

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

UniProt/GeneSeq

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CAplus/BIOSIS(STN)

PubMed

DWPI(Thomson Innovation)

专利名称(译)	Ehrlichia·canis免疫反应性糖蛋白gp 19		
公开(公告)号	JP5837917B2	公开(公告)日	2015-12-24
申请号	JP2013257840	申请日	2013-12-13
[标]申请(专利权)人(译)	研究发展基金会		
申请(专利权)人(译)	研究发展基金会		
当前申请(专利权)人(译)	研究发展基金会		
[标]发明人	マクブライドジェレダブリュー ドイルクリストファーカイラー		
发明人	マクブライド ジェレ ダブリュー. ドイル クリストファー カイラー		
IPC分类号	C12N15/09 C07K14/195 C07K16/12 C12P21/02 A61K39/00 A61P31/04 A61K9/10 A61K39/395 G01N33/53 G01N33/569 C12P21/08		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K14/195 C07K16/12 C12P21/02.C A61K39/00.H A61P31/04.171 A61K9/10 A61K39/395.D A61K39/395.N G01N33/53.D G01N33/53.N G01N33/569.F C12P21/08 C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12N15/31		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA31 4B024/BA53 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/CA20 4B024 /DA01 4B024/DA02 4B024/DA05 4B024/DA11 4B024/DA12 4B024/EA02 4B024/EA04 4B024/FA02 4B024/FA06 4B024/GA11 4B024/HA03 4B024/HA12 4B024/HA15 4B064/AG26 4B064/AG27 4B064 /AG31 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA15 4C076/AA16 4C076/CC31 4C085/AA03 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BA07 4C085/BB11 4C085/CC07 4C085/DD23 4C085 /DD61 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA09 4H045/CA11 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA29 4H045/EA52 4H045/FA74		
代理人(译)	清水初衷 小林智彦 井上隆一 正人大关		
优先权	60/841465 2006-08-31 US		
其他公开文献	JP2014113149A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及用于犬埃里希氏体的gp19免疫反应性组合物及其相关组合物，包括疫苗，抗体，多肽，肽和多核苷酸。特别地，公开了犬埃里希体gp19的表位。

(45) 発行日 平成27年12月24日 (2015. 12. 24)

(24) 登録日 平成27年11月13日 (2015. 11. 13)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 N 15/09 (2006. 01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A
C O 7 K 14/195 (2006. 01)	C O 7 K 14/195
C O 7 K 16/12 (2006. 01)	C O 7 K 16/12
C 1 2 P 21/02 (2006. 01)	C 1 2 P 21/02 C
A 6 1 K 39/00 (2006. 01)	A 6 1 K 39/00 H

請求項の数 16 (全 90 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2013-257840 (P2013-257840)	(73) 特許権者	505098937
(22) 出願日	平成25年12月13日 (2013. 12. 13)		リサーチ デイベロップメント ファウン デーション
(62) 分割の表示	特願2009-526792 (P2009-526792) の分割		アメリカ合衆国 ネバダ州 カーソン シ ティー ノース ディビジョン ストリー ト 402
原出願日	平成19年8月7日 (2007. 8. 7)	(74) 代理人	100102978
(65) 公開番号	特開2014-113149 (P2014-113149A)		弁理士 清水 初志
(43) 公開日	平成26年6月26日 (2014. 6. 26)		100119507
審査請求日	平成26年1月10日 (2014. 1. 10)	(74) 代理人	弁理士 刑部 俊
(31) 優先権主張番号	60/841,465		100128048
(32) 優先日	平成18年8月31日 (2006. 8. 31)	(74) 代理人	弁理士 新見 浩一
(33) 優先権主張国	米国 (US)		100129506
		(74) 代理人	弁理士 小林 晋彦

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 エーキア・カニスの免疫反応性糖タンパク質 g p 1 9