

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2011-509935

(P2011-509935A)

(43) 公表日 平成23年3月31日(2011.3.31)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C07K 14/195 (2006.01)</b>	C O 7 K 14/195 Z N A	4 B O 2 4
<b>C07K 16/12 (2006.01)</b>	C O 7 K 16/12	4 C O 8 5
<b>A61K 39/00 (2006.01)</b>	A 6 1 K 39/00 H	4 H O 4 5
<b>A61P 31/04 (2006.01)</b>	A 6 1 P 31/04	
<b>G01N 33/569 (2006.01)</b>	G O 1 N 33/569 F	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 89 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2010-542360 (P2010-542360)  
 (86) (22) 出願日 平成21年1月9日 (2009.1.9)  
 (85) 翻訳文提出日 平成22年8月18日 (2010.8.18)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2009/030527  
 (87) 国際公開番号 W02009/102509  
 (87) 国際公開日 平成21年8月20日 (2009.8.20)  
 (31) 優先権主張番号 61/020,379  
 (32) 優先日 平成20年1月10日 (2008.1.10)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 505098937  
 リサーチ ディベロップメント ファウン  
 デーション  
 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  
 (74) 代理人 100078282  
 弁理士 山本 秀策  
 (74) 代理人 100062409  
 弁理士 安村 高明  
 (74) 代理人 100113413  
 弁理士 森下 夏樹

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 *Ehrlichia chaffeensis* のためのワクチンおよび診断

(57) 【要約】

*Ehrlichia chaffeensis* は、ヒトにおける新たに発見された命にかかわる疾病であるヒト単球性エールリヒア症 (HME) の原因となるマダニ媒介性偏性細胞内寄生細菌であり、そして野犬および飼い犬における軽度から重度の疾患の原因にもなる。本発明は、*E. chaffeensis* についての VLPT 免疫反応性組成物、ならびにワクチン、抗体、ポリペプチド、ペプチドおよびポリヌクレオチドをはじめとするそれらに関連した組成物に関する。詳細には、*E. chaffeensis* VLPT についてのエピトープを開示する。

**N(17)** MSQFSEDNMGNIQMPFD  
**R4(30)** SDSHEPSHLELPSLSEEVIQLES DLQSSN  
**R3(30)** SDLHGFSVLELFDPFKEAVQLGNDLQSSD  
**R2(30)** SDLHGFSVLELFDPSKEEVQLES DLQSSN  
**R1(30)** SDLHESFVLELPGPSKEEVQFEDDAKNVY  
**C(61)** GQDHVSLSELGLLLGGVFSTMNYLSGYTPY  
 YHHYCCYNPYYYPDYVTPDYCHHCSESSLE

FIG. 1A

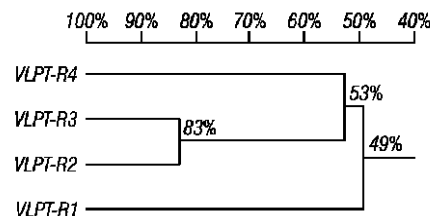


FIG. 1B

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

以下の 1 つ以上を含むポリペプチド組成物：

( a ) 配列番号 3 ; 配列番号 4 ; 配列番号 5 ; 配列番号 8 ; 配列番号 9 ; 配列番号 10 ; および配列番号 11 から成る群より選択される 1 つ以上のアミノ酸配列を含む単離されたポリペプチド ; または

( b ) ( a ) のポリペプチドと少なくとも 95 % 同一である単離されたポリペプチド。

**【請求項 2】**

前記単離されたポリペプチドが、医薬的に許容される希釈剤に分散している、請求項 1 に記載のポリペプチド組成物。

10

**【請求項 3】**

前記 ( a ) のポリペプチドが、配列番号 3、配列番号 4、および配列番号 5 から成る群より選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の組成物。

**【請求項 4】**

前記 ( a ) のポリペプチドが、配列番号 8 ; 配列番号 9 ; 配列番号 10 ; または配列番号 11 から成る群より選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の組成物。

**【請求項 5】**

前記 ( a ) のポリペプチドが、アミノ酸配列配列番号 8 を含む、請求項 1 に記載の組成物。

**【請求項 6】**

前記 ( a ) のポリペプチドが、アミノ酸配列配列番号 9 を含む、請求項 1 に記載の組成物。

20

**【請求項 7】**

前記 ( a ) のポリペプチドが、アミノ酸配列配列番号 10 を含む、請求項 1 に記載の組成物。

**【請求項 8】**

前記 ( a ) のポリペプチドが、アミノ酸配列配列番号 11 を含む、請求項 1 に記載の組成物。

**【請求項 9】**

前記 ( a ) のポリペプチドが、アミノ酸配列配列番号 3 を含む、請求項 1 に記載の組成物。

30

**【請求項 10】**

前記 ( a ) のポリペプチドが、アミノ酸配列配列番号 4 を含む、請求項 1 に記載の組成物。

**【請求項 11】**

前記 ( a ) のポリペプチドが、アミノ酸配列配列番号 5 を含む、請求項 1 に記載の組成物。

**【請求項 12】**

配列番号 3 ; 配列番号 4 ; 配列番号 5 ; 配列番号 8 ; 配列番号 9 ; 配列番号 10 ; および配列番号 11 から成る群より選択されるアミノ酸配列のうちの 1 つ以上と免疫反応する単離された抗体。

40

**【請求項 13】**

アミノ酸配列配列番号 3 と免疫反応する単離された抗体。

**【請求項 14】**

アミノ酸配列配列番号 4 と免疫反応する単離された抗体。

**【請求項 15】**

アミノ酸配列配列番号 5 と免疫反応する単離された抗体。

**【請求項 16】**

アミノ酸配列配列番号 8 と免疫反応する単離された抗体。

**【請求項 17】**

50

アミノ酸配列配列番号 9 と免疫反応する単離された抗体。

【請求項 18】

アミノ酸配列配列番号 10 と免疫反応する単離された抗体。

【請求項 19】

アミノ酸配列配列番号 11 と免疫反応する単離された抗体。

【請求項 20】

モノクローナル抗体である、請求項 12 に記載の抗体。

【請求項 21】

ポリクローナル抗体である、請求項 12 に記載の抗体。

【請求項 22】

個体における免疫応答を誘導する方法であって、治療有効量の請求項 1 に記載の組成物を該個体に送達する工程を含む方法。

【請求項 23】

被験体における E . c h a f f e e n s i s 感染症を抑制する方法であって、有効量の請求項 1 に記載の組成物を被験体に送達する工程を含む方法。

【請求項 24】

個体における E . c h a f f e e n s i s 感染症を同定する方法であって、該個体からのサンプルを以下の 1 つについてアッセイする工程を含む方法：

( a ) 配列番号 3 ; 配列番号 4 ; 配列番号 5 ; 配列番号 8 ; 配列番号 9 ; 配列番号 10 ; および配列番号 11 から成る群より選択される 1 つ以上のアミノ酸配列を含む単離されたポリペプチド ; または

( b ) ( a ) のポリペプチドから成る群より選択されるアミノ酸配列と免疫反応する抗体。

【請求項 25】

前記 ( a ) のポリペプチドが、アミノ酸配列配列番号 3 を有する、請求項 24 に記載の方法。

【請求項 26】

前記 ( a ) のポリペプチドが、アミノ酸配列配列番号 4 を有する、請求項 24 に記載の方法。

【請求項 27】

前記 ( a ) のポリペプチドが、アミノ酸配列配列番号 5 を有する、請求項 24 に記載の方法。

【請求項 28】

前記 ( a ) のポリペプチドが、アミノ酸配列配列番号 8 を有する、請求項 24 に記載の方法。

【請求項 29】

前記 ( a ) のポリペプチドが、アミノ酸配列配列番号 9 を有する、請求項 24 に記載の方法。

【請求項 30】

前記 ( a ) のポリペプチドが、アミノ酸配列配列番号 10 を有する、請求項 24 に記載の方法。

【請求項 31】

前記 ( a ) のポリペプチドが、アミノ酸配列配列番号 11 を有する、請求項 24 に記載の方法。

【請求項 32】

前記サンプルが、配列番号 17 および配列番号 19 のアミノ酸配列を有するポリペプチドについてアッセイされる、請求項 24 に記載の方法。

【請求項 33】

前記アッセイが、( b ) の抗体についての E L I S A によるものである、請求項 24 に記載の方法。

10

20

30

40

50

## 【請求項 34】

前記個体からサンプルを得ることをさらに含む、請求項 24 に記載の方法。

## 【請求項 35】

請求項 1 に記載のポリペプチド組成物を含む、適切な容器に収容された、キット。

## 【請求項 36】

請求項 1 に記載の 2 つ以上のポリペプチド組成物を含む、適切な容器に収容された、キット。

## 【請求項 37】

前記 (a) のポリペプチドが、アミノ酸配列配列番号 8 を含む、請求項 1 に記載の組成物を含む、適切な容器に収容された、キット。

10

## 【請求項 38】

前記 (a) のポリペプチドが、アミノ酸配列配列番号 9 を含む、請求項 1 に記載の組成物を含む、適切な容器に収容された、キット。

## 【請求項 39】

前記 (a) のポリペプチドが、アミノ酸配列配列番号 10 を含む、請求項 1 に記載の組成物を含む、適切な容器に収容された、キット。

## 【請求項 40】

前記 (a) のポリペプチドが、アミノ酸配列配列番号 11 を含む、請求項 1 に記載の組成物を含む、適切な容器に収容された、キット。

## 【請求項 41】

前記 (a) のポリペプチドが、アミノ酸配列配列番号 3 を含む、請求項 1 に記載の組成物を含む、適切な容器に収容された、キット。

20

## 【請求項 42】

前記 (a) のポリペプチドが、アミノ酸配列配列番号 4 を含む、請求項 1 に記載の組成物を含む、適切な容器に収容された、キット。

## 【請求項 43】

前記 (a) のポリペプチドが、アミノ酸配列配列番号 5 を含む、請求項 1 に記載の組成物を含む、適切な容器に収容された、キット。

## 【請求項 44】

請求項 12 に記載の 1 つ以上の抗体を含む、適切な容器に収容された、キット。

30

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本願は、2008年1月10日に出版された米国仮特許出願第61/020,379号に対する優先権を主張する。米国仮特許出願第61/020,379号は、その全体が本明細書中に参考により援用される。

## 【0002】

本願は、国立衛生研究所の補助金第R01 AI 071145-01号からの資金により少なくともある程度がなされた。米国政府は、本発明における特定の権利を有する。

## 【0003】

本発明は、分子生物学、細胞生物学、病理学、および医学（獣医学を含む）の分野に少なくとも関する。特定の態様において、本発明は、*E. chaffeensis* に関する免疫反応性VLP組成物に関する。

40

## 【背景技術】

## 【0004】

*Ehrlichia chaffeensis* は、ヒトにおける新たに発見された命にかかわる疾病であるヒト単球性エールリヒア症（HME）の原因となるマダニ媒介性偏性細胞内寄生細菌であり、そして野犬および飼い犬における軽度から重度の疾患の原因にもなる。（非特許文献1）。*E. canis* およびこの属の他の生物（*E. chaffeensis* および *E. ruminantium* を含む）のゲノムは、高いゲノムシンテニー

50

度、パラログス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大きな比率、ならびにO-グリコシル化およびリン酸化の可能性に関連したユニークなセリン-トレオニンの偏り、ならびに宿主-病原体相互作用に関連したタンパク質内の縦列反復配列およびアンキリンドメインを示す (Collinsら, 2005; Dunning Hotoppら, 2006; Frutosら, 2006; Mavromatisら, 2006)。これらのゲノムのそれぞれによってコードされている900を超えるタンパク質の小さなサブセットが抗体によって認識される (Doylerら, 2006; McBrideら, 2003; McBrideら, 2000)。同定されており分子的に特性づけられている幾つかの主要免疫反応性タンパク質は、分泌される高セリン糖タンパク質である。これらの糖タンパク質の多くは、縦列反復配列を有するが、あるものは、多数の真核細胞様アンキリンドメインを有する (Doylerら, 2006; McBrideら, 2003; McBrideら, 2000; Nethereryら, 2005; Singurら, 2005; Yuら, 2000)。

#### 【0005】

*E. chaffeensis*において縦列反復配列を有する3つの免疫反応性タンパク質 (gp120、gp47、およびVLPT) が、ならびに*E. canis*において2つのオルソログ (それぞれ、gp140およびgp36) が、同定され、分子的に特性づけられている。*E. chaffeensis* gp120およびgp47は、表面デンスコア (dense-core) エールリヒア上で特異的に発現され、分泌される、主要免疫反応性タンパク質である (Doylerら, 2006; Popovら, 2000)。*E. chaffeensis*免疫反応性タンパク質 (gp120、gp47およびVLPT) ならびに*E. canis* gp36における縦列反復配列の数および/または配列の甚だしい可変性は、十分に文献に記載されている (Chenら, 1997; Doylerら, 2006; Sumnerら, 1999)。gp120は、それぞれが80のアミノ酸を有する2から5のほぼ同一の高セリンTRを含有し、gp47は、それぞれの種の異なる単離物の間で数およびアミノ酸配列が異なるカルボキシ末端高セリンTRを有する。gp120とgp47の両方の主要抗体エピトープが、これらの高セリン酸性TRにマッピングされている。 (Doylerら, 2006; Yuら, 1996; Yuら, 1997)。類似して、VLPTは、3から6の非同高セリンTR (30アミノ酸) を有するが、*E. canis*オルソログ (gp19) には、多数のTRがない。そのゲノムのコーディング配列と非コーディング配列の両方における縦列反復配列の存在は、エールリヒアゲノムの拡大および縮小の活性プロセスに結びつけられており (Frutosら, 2006)、ゲノムの変化および不安定性の主な原因と考えられている (BzymekおよびLovett, 2001)。*E. chaffeensis* vlpt遺伝子も、90bp縦列反復配列の数 (2から6) の変動を示し、ならびに分子診断ターゲットとしておよび単離物の区別にも利用されている (Sumnerら, 1999; Yabsleyら, 2003)。

#### 【0006】

最近、*E. chaffeensis*におけるVLPTタンパク質について以前に報告されているものと同じ相対染色体位置および実質的な相同性をC末端高システイン-チロシンドメインに有する、*E. canis*の強酸性19kDa主要免疫反応性タンパク質が同定された (gp19)。しかし、*E. chaffeensis* VLPTは、免疫反応性であるが、その細胞の位置、機能および防御免疫発現における役割は、殆どわかっていない。天然VLPTの分子量も不明である。*E. chaffeensis* Arkansas株は、44kDaであることは示唆されているが、その質量と一致する免疫反応性タンパク質は、報告されていない (Sumnerら, 1999)。*E. chaffeensis* ArkansasのVLPTは、198アミノ酸タンパク質であり、これは、4つの反復配列 (30アミノ酸) を有し、およびそのアミノ酸配列によって予測されたものの約2倍の分子量を有する (Sumnerら, 1999)。*E. chaffeensis* VLPTタンパク質は、他の記載されているエールリヒア糖タンパク質と一致する翻訳後修飾を有するようだが、VLPT上の炭水化物の存在は、立証されていない。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 0 7 】

感染中の体液免疫の惹起に關与するエールリヒア免疫決定因子の分子特性の定義づけは、*Ehrlichia*種の免疫の基礎の理解に重要である。本発明は、哺乳動物におけるエールリヒア(*ehrlichial*)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該技術分野における要求を満たすものであり、詳細には、*E. chaffeensis* VLP Tを利用する方法および組成物を提供する。

## 【 先行技術文献 】

## 【 非特許文献 】

## 【 0 0 0 8 】

【 非特許文献 1 】 Paddock, C. D. and J. E. Childs. 2003. *Ehrlichia chaffeensis*: a prototypical emerging pathogen. *Clin. Microbiol. Rev.* 16:37-64.. 10

## 【 発明の概要 】

## 【 課題を解決するための手段 】

## 【 0 0 0 9 】

ヒト単球性エールリヒア症(HME)は、偏性細胞内寄生細菌*Ehrlichia chaffeensis*によって引き起こされるマダニ媒介疾患である。一般に、本発明は、エールリヒア組成物およびそれらを製造および使用する方法に關する。特定の実施形態において、本発明は、例えば、エールリヒア症のためのワクチン、例えばサブユニットワクチンなど、のような免疫防御抗原を含む、免疫原性組成物に關する。前記免疫原性組成物は、例えばヒト、イヌ、ネコ、ウマ、ブタ、ヤギまたはヒツジをはじめとする、任意の哺乳動物に利用することができる。 20

## 【 0 0 1 0 】

*Ehrlichia chaffeensis*および*E. canis*は、縦列反復配列(TR)含有タンパク質の小さなサブセットを有し、これらのタンパク質は、強い宿主免疫応答を惹起し、および宿主-病原体相互作用に關係する。以前、*E. canis*の高保存19kDa主要免疫反応性タンパク質(gp19)が、特性づけされ、*E. chaffeensis*における対応するTR含有オルソログ可変長PCRターゲット(VLP T)タンパク質が同定された。本発明の実施形態では、天然32kDa VLP Tタンパク質を同定し、その免疫決定因子を定義して、*E. chaffeensis*への宿主免疫応答の分子的基礎をさらに定義する。VLP Tの様々な領域に対応する合成および/または組換えポリペプチドを使用して、主要抗体エピトープをTR含有領域に局在定位した。*E. chaffeensis*に感染したイヌおよびHME患者からの血清中の抗体と強く反応する主要抗体エピトープを3つの非同一反復配列(R2、R3およびR4)において同定した。VLP T-R3およびVLP T-R2は、抗体と最も強く反応し、ならびにそのエピトープは、種特異的である、これらの反復配列間に共通するほぼ同一の隣接17アミノ酸領域に局在した。R4におけるエピトープは、R2およびR3のものとは異なり、配座的依存性を有することが判明した。感染細胞からの上清においてVLP Tが検出された。これは、そのタンパク質が分泌されたことを示している。VLP Tは、網状細胞とデンスコア細胞の両方に局在し、ならびに細胞外では桑実胚原線維基質において見つかり、桑実胚膜と会合していた。 30 40

## 【 0 0 1 1 】

本発明の一定の態様には、*E. chaffeensis*における主要免疫反応性糖タンパク質VLP T、*E. canis* gp19のオルソログの同定および特性づけがある。*E. canis* gp19には、*E. chaffeensis*のVLP T中に存在する縦列反復配列がないが、これら2つのタンパク質は、高システイン/チロシン・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、両方の遺伝子が、同じ相対染色体位置を有する。組換えエールリヒアTR含有タンパク質上の炭水化物が、それらの天然対応物に類似して予測質量より大きな質量を示すことが判明した。VLP Tは、ゲル電気泳動による予測質量より大きい質量を示し、この発見は、天然および組換え、両方のVLP Tタンパク質で觀察される。セリンおよびトレオニン残基は、O-グリカンのた 50

めの連結部位であり、これらのアミノ酸の一部は、V L P T上のグリカン結合部位であると予測された。しかし、他のエールリヒアタンパク質とは異なり、V L P T上で炭水化物は見つけれず、組換え2反復配列含有フラグメント(V L P T - R 3 2 ; 反復配列R 3 とR 2の組み合わせ)の(M A L D I - T O Fによって判定した場合の)質量は、その予測質量と一致し、これは、その異常な移動がV L P T縦列反復配列の翻訳後修飾に起因しないことを裏付けた。しかし、代替実施形態において、V L P Tは、翻訳後修飾される。V L P Tは、高酸性タンパク質であり、これは、一定の実施形態では、電気泳動の移動性の増加に関係する。特定の実施形態において、V L P Tの高い酸性アミノ酸含有率および低い総p I ( 3 . 8 )は、その電気泳動挙動に関係し、特別な場合、他の高酸性T R含有エールリヒアタンパク質の異常挙動の一因となる。

10

## 【 0 0 1 2 】

本発明の特定の態様には、以下の特性の1つ以上を有するエールリヒアV L P Tポリペプチド組成物(またはそれらのすべてもしくは一部をコードするポリヌクレオチド組成物)がある: 1) 特定の実施形態では、エピトープ決定因子の一部を含む、1つ以上の部分を含む; 2) 免疫原的に種特異的である1つ以上の部分、例えばエピトープ、を含む; 3) 細胞外的に、例えば分泌により、放出される; 4) 主要B細胞エピトープを含む; 5) 表面が露出されている; 6) 例えばその表面などで、感染性デンスコア形態のエールリヒアと会合している; および7) 桑実胚原線維(多数の個々のエールリヒアを保有する細胞空胞(桑実胚)内部の微小コロニーからのエールリヒア)と会合している。さらなる態様では、本発明の組換えポリペプチド組成物を、例えばワクチンをはじめとする、免疫原性組成物として利用することができる。

20

## 【 0 0 1 3 】

本発明の特定の実施形態には、免疫原性であるアミノ酸配列を含むE . c h a f f e e n s i s V L P T免疫原性組成物があり、およびさらなる特定の実施形態において、この免疫原性は、エピトープの少なくとも一部であることを特徴とする。さらなる実施形態において、前記アミノ酸配列は、エールリヒア属生物、例えばE . c h a f f e e n s i s、に対するワクチン組成物の少なくとも一つを構成する。特定の実施形態において、前記アミノ酸配列は、セリン、トレオニン、および/または場合によってはアラニン、プロリン、バリン、および/またはグルタミン酸を含む。

30

## 【 0 0 1 4 】

さらなる特定の実施形態において、本発明のアミノ酸配列、例えば、免疫原性アミノ酸配列は、以下の

## 【 0 0 1 5 】

## 【 化 1 】

例示的配列: SDSHEPSHLELPSLSEEVQLQSSN (配列番号3);

例示的配列: SDLHGFSVELFDPFKEAVQLGNDLQSSD (配列番号4);

例示的配列: SDLHGFSVELFDPFKEEVQLQSSN (配列番号5);

例示的配列: SDLHGFSVELFDPFKE (配列番号8);

40

例示的配列: HGSFSVELFDPFKE (配列番号9);

例示的配列:

HGSFSVELFDPFKEAVQ (配列番号10);

または例示的配列:

HGSFSVELFDPFKEAVQLGN (配列番号11)

の一部またはすべてを含む。追加の実施形態において、前記アミノ酸配列は、医薬的に許容される賦形剤の中に含まれており、前記賦形剤は、本発明の一部の態様ではアジュバントを含む。本発明の一定の態様には、配列番号1のペプチド配列

## 【 0 0 1 6 】

## 【化3】

(MSQFSEDNMGNIQMPFSDSHEPSHLELPSLSEEVIQLES DLQSSNSDLHG SFSVEL  
 FDPFKEAVQLGNDLQSSSDSLHG SFSVELFDPSKEEVQLES DLQSSNSDLHESSFV  
 ELPGPSKEEVQFEDDAKNVVYGDHVSLSSELG LLLGGVFSTMN YLSGYTPYYHHY  
 CCYNPYYYFDYVTPDYCHHCSESSLE).

をコードする配列番号16

## 【0017】

## 【化2】

(tttatattatataatgattaatataatgataatggatgtggtataactgcttattagttgatcatgtacctgtgtttatgttaaataagggtat  
 aaatagtcacaattctctgaagataatgggtaataacaaatgccttttgattctgattcacatgagccttctcatcttgagctacctagtc  
 tttctgaagaagtgattcaattagagagtgatctacaacaatcttctaattctgatttacacgggtcttttctgttgagttatttgatccttttaaa  
 gaagcagttcaattggggaatgatctacaacaatcttctgattctgatttacacgggtcttttctgttgagttatttgatccttctaaagaaga  
 agttcaattggagagtgatctacaacaatcttctaattctgatttacacgagctcttttctgttgagttacctggctctccaagaagaagttc  
 aattcgaagatgatgctaaaaatgtagtatatggacaagaccatgtagttatctgaattaggcttattgtaggtggtgttttagtacaatg  
 aattattgtctggttatacaccgattattatcatcattattgtgttataatccttattattttgattatgttactccagattattgtcatcactgt  
 agtgaagtagtttagagtaggatatttagaaaataaatggtgtgacttcacaaaagggtagttttatgttttatgctgttttagtgtt  
 ataaggatagagttgttttactatttt)

10

20

を含むポリヌクレオチドがある。

## 【0018】

本発明の一定の実施形態には、免疫原性VLPTE.chaffensis組成物があり、このVLPTE組成物の特定の配列が、その免疫原性を付与することができ、例えば、このVLPTE組成物の一領域は、エピトープを含むことがある。

## 【0019】

本発明の一部の態様において、多数の異なるE.chaffensis株が、免疫原性VLPTE組成物を含み、およびエピトープを含むVLPTE組成物の領域には株間で(例えば、約80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%を超えるような)有意な配列同一性がある。しかし、一部の実施形態では、エピトープを含まないVLPTE組成物の領域に株間での有意な配列同一性が存在する場合もある。本発明の特定の態様には、1つより多くのE.chaffensis株に対して免疫原性であるVLPTE組成物があり、特定の態様において、それらの株のうちの1つのエピトープは、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号8、配列番号9、配列番号10または配列番号11、である、またはを含む、またはから本質的に成る、またはから成るが、他のエピトープも同定されることがある。代替VLPTE.chaffensisエピトープが同定される実施形態では、例えば、配列番号3；  
 配列番号4；配列番号5；配列番号8；配列番号9；配列番号10；または配列番号11を含む混合物などの、VLPTE.chaffensisエピトープの混合物を含む免疫原性組成物を提供することができる。

30

40

## 【0020】

本発明の実施形態には、免疫原性VLPTE.chaffensis糖タンパク質がある。本発明の追加の実施形態には、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号8、配列番号9、配列番号10；または配列番号11を含むE.chaffensis組成物がある。本発明の特定の態様において、前記組成物は、医薬的に許容される賦形剤をさらに含む。前記組成物は、1つ以上の炭水化物部分を含むと、エピトープの一部もしくはすべてを含むと、および/またはサブユニットワクチンなどのワクチンとして、さら

50

に定義することができる。

【0021】

本発明のもう1つの実施形態には、配列番号16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たポリペプチドを含む *E. chaffensis* 組成物および/または配列番号1のポリペプチドを含む *E. chaffeensis* 組成物がある。本発明の1つの実施形態には、(a)配列番号3；配列番号4；配列番号5；配列番号8；配列番号9；配列番号10；もしくは配列番号11から成る群より選択される配列；または(b)(a)における1つ以上の配列と少なくとも約70%同一である配列を含む、*Ehrlichia* VLPT糖タンパク質を含む単離された組成物がある。前記組成物は、(a)における1つ以上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、さらに定義することができる。前記組成物は、医薬的に許容される賦形剤に含まれていると、1つ以上の炭水化物部分を含むと、および/またはワクチンとして適する医薬組成物に含まれていると、さらに定義することもできる。

10

【0022】

特定の実施形態には、SEQ配列番号3；配列番号4；配列番号5；配列番号8；配列番号9；配列番号10；もしくは配列番号11、またはそれらの混合物をコードする、単離されたポリヌクレオチドがある。

【0023】

特定の実施形態には、a)配列番号3；配列番号4；配列番号5；配列番号8；配列番号9；配列番号10；もしくは配列番号11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、および免疫反応性 *E. chaffeensis* VLPTポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む、単離されたポリヌクレオチドがある。

20

【0024】

本発明の追加の実施形態には、a)配列番号3；配列番号4；配列番号5；配列番号8；配列番号9；配列番号10；もしくは配列番号11、またはb)配列番号3；配列番号4；配列番号5；配列番号8；配列番号9；配列番号10；もしくは配列番号11と少なくとも約70%同一であり、および免疫原活性を含むVLPTポリペプチドを含む、単離されたポリペプチドがある。特定の実施形態において、前記ポリペプチドは、医薬的に許容される賦形剤に含まれており、および/または、ワクチンとして適する医薬組成物に含まれていると、さらに定義することができる。

30

【0025】

本発明の一定の態様には、配列番号17、配列番号18、配列番号19、配列番号20、配列番号21、または配列番号22の例示的プライマーのうちの一つ以上によって増幅することができるポリヌクレオチドがある(表4)。

【0026】

本発明のもう1つの態様には、本発明の1つ以上のポリペプチドを結合する、単離された抗体がある。抗体は、例えば、モノクローナルである場合もあり、ポリクローナルである場合もあり、または抗体フラグメントである場合もある。特定の実施形態において、前記抗体は、VLPT、例えば配列番号3；配列番号4；配列番号5；配列番号8；配列番号9；配列番号10；もしくは配列番号11を含むもの、のエピトープに選択的に結合する。特定の実施形態において、前記抗体は、本発明の1つ以上のポリペプチドと免疫学的に反応すると言われることがある。

40

【0027】

本発明の追加の実施形態には、*E. chaffeensis* 感染症に対する耐性をもたらす方法があり、この方法は、本発明の組成物、例えばVLPT抗体、ポリペプチドおよび/またはポリヌクレオチド、の治療有効量を個体に送達する工程を含む。

【0028】

もう1つの実施形態には、個体において免疫応答を誘導する方法があり、この方法は、治療有効量の本発明のVLPTポリペプチドをその個体に送達する工程を含む。本発明の

50

追加の実施形態には、被験体における *E. chaffeensis* 感染症を抑制または予防する方法があり、この方法は、*E. chaffeensis* に曝露する前のまたは曝露若しくは感染している疑いがある被験体を同定する工程、ならびに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 *E. chaffeensis* 感染症の抑制に有効な量で投与する工程を含む。

【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などのベクターに含まれていることがあり、この場合、前記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、アデノ関連ベクター、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り得、および前記非ウイルスベクターは、プラスミドであり得る。本発明のさらなる態様において、前記ベクターは、前記ポリヌクレオチドに作動可能に連結されたプロモーターを含み、この場合、前記プロモーターは、原核細胞、真核細胞、または両方において作動可能である。本発明のポリヌクレオチドは、リボソームに含まれていることがあり、および/または医薬的に許容される賦形剤に含まれていることがある。

10

【0030】

本発明の一定の態様には、本発明のポリペプチドと免疫反応する、単離された抗体があり、前記抗体は、例えば、モノクローナル抗体である場合があり、ポリクローナル抗血清に含まれている場合があり、または抗体フラグメントである場合がある。

【0031】

本発明の他の実施形態には、個体において免疫応答を誘導する方法があり、この方法は、本発明の組成物、例えばポリペプチド、抗体および/またはポリヌクレオチド、の治療有効量をその個体に送達する工程を含む。

20

【0032】

本発明の追加の実施形態には、被験体における *E. chaffeensis* 感染症を抑制する方法があり、この方法は、*E. chaffeensis* に曝露する前のまたは曝露若しくは感染している疑いがある被験体を同定する工程；ならびに本発明のポリペプチドを *E. chaffeensis* 感染症の抑制に有効な量で投与する工程を含む。本発明のさらなる実施形態には、個体における *E. chaffeensis* 感染症を同定する方法があり、この方法は、その個体からのサンプルを本発明の抗体、ポリペプチド、および/またはポリヌクレオチドについてアッセイする工程を含む。

30

【0033】

本発明の特定の態様において、ポリペプチドは、長さが10から11アミノ酸である、長さが10から12アミノ酸である、長さが10から13アミノ酸である、長さが10から14アミノ酸である、長さが10から15アミノ酸である、長さが10から17アミノ酸である、長さが10から20アミノ酸である、長さが10から25アミノ酸である、長さが14から20アミノ酸である、長さが14から25アミノ酸である、長さが14から27アミノ酸である、長さが14から30アミノ酸である、長さが15から30アミノ酸である、長さが16から20アミノ酸である、長さが16から25アミノ酸である、長さが16から30アミノ酸である、長さが17から20アミノ酸である、長さが17から25アミノ酸である、長さが17から30アミノ酸である、長さが20から25アミノ酸である、長さが20から27アミノ酸である、長さが20から30アミノ酸である、長さが24から30アミノ酸である、長さが24から35アミノ酸である、長さが24から40アミノ酸である、長さが24から45アミノ酸である、長さが24から50アミノ酸である、長さが24から55アミノ酸である、長さが24から60アミノ酸である、長さが24から65アミノ酸である、長さが24から70アミノ酸である、長さが24から75アミノ酸である、長さが24から80アミノ酸である、長さが24から85アミノ酸である、長さが24から90アミノ酸である、長さが24から95アミノ酸である、長さが24から100アミノ酸である、長さが30から50アミノ酸である、長さが30から45アミノ酸である、または長さが30から55アミノ酸である、とさらに定義される。

40

50

## 【0034】

特定の実施形態において、本発明のポリペプチドは、長さが少なくとも10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50、55、60、65、70、または75アミノ酸以上である。本発明の一定の態様において、本発明のポリペプチドは、長さが11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50、55、60、65、70、または75アミノ酸以下である。

## 【0035】

配列番号3；配列番号4；配列番号5；配列番号8；配列番号9；配列番号10；または配列番号11を含むポリペプチドの変異体は、配列番号3；配列番号4；配列番号5；配列番号8；配列番号9；配列番号10；もしくは配列番号11と少なくとも80%同一であると；配列番号3；配列番号4；配列番号5；配列番号8；配列番号9；配列番号10；もしくは配列番号11と少なくとも85%同一であると；配列番号3；配列番号4；配列番号5；配列番号8；配列番号9；配列番号10；もしくは配列番号11と少なくとも90%（もしくは91%、もしくは92%、もしくは93%、もしくは94%）同一であると；配列番号3；配列番号4；配列番号5；配列番号8；配列番号9；配列番号10；もしくは配列番号11と少なくとも95%（もしくは96%、もしくは97%、もしくは98%、もしくは99%）同一であると定義することができる。

## 【0036】

追加の実施形態には、(a)配列番号3；配列番号4；配列番号5；配列番号8；配列番号9；配列番号10；もしくは配列番号11を有するペプチド；または(b)(a)のペプチドの変異体を含む組成物があり、この場合、前記変異体は、配列番号3；配列番号4；配列番号5；配列番号8；配列番号9；配列番号10；または配列番号11と少なくとも75%同一であり、前記組成物は、個体の免疫応答を惹起することができる。特定の実施形態には、長さが14から30アミノ酸であるペプチドがある。特定の実施形態には、配列番号3；配列番号4；配列番号5；配列番号8；配列番号9；配列番号10；または配列番号11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、さらに定義される変異体がある。

## 【0037】

本発明の組成物は、個体に *Ehrlichia chaffeensis* に対する免疫を備えさせる活性を有すると定義することができる。本発明の組成物は、個体についての *Ehrlichia chaffeensis* に対する免疫反応を誘導する活性を有すると定義することができる。本発明の組成物は、本明細書において提供す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/または抗体を含む。

## 【0038】

ウイルスベクターまたは非ウイルスベクターなどのベクターに含まれていると核酸分子をさらに定義することができ、この場合、前記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、またはアデノ関連ウイルスベクターを含み得る。前記核酸は、リポソームに含まれていることがある。

## 【0039】

特定の実施形態には、配列番号3；配列番号4；配列番号5；配列番号8；配列番号9；配列番号10；および配列番号11から成る群より選択されるアミノ酸配列のうちの1つ以上と免疫反応する、単離された抗体がある。さらなる特定の実施形態において、前記抗体は、モノクローナル抗体であり、ポリクローナル抗血清に含まれており、または抗体フラグメントである。

## 【0040】

追加の実施形態には、ポリペプチドを生産する方法があり、この方法は、本発明のポリヌクレオチドを含む宿主細胞を提供すること、その宿主細胞がそのポリヌクレオチドを発現するために適する条件下でその細胞を培養して、コードされたポリペプチドを生産する

10

20

30

40

50

ことを含む。前記方法は、前記ポリペプチドの単離を含むことがある。

【0041】

本発明の追加の実施形態には、個体において免疫応答を誘導する方法があり、この方法は、治療有効量の本発明の組成物をその個体に送達する工程を含む。

【0042】

本発明のさらなる実施形態には、被験体における *E. chaffeensis* 感染症を抑制する方法があり、この方法は、*E. chaffeensis* に曝露する前のまたは曝露若しくは感染している疑いがある被験体に有効量の本発明の組成物を投与する工程を含む。

【0043】

本発明の追加の実施形態には、個体における *E. chaffeensis* 感染症を同定する方法があり、この方法は、その個体からのサンプルを次のものの一方または両方についてアッセイする工程を含む：(a) 配列番号3；配列番号4；配列番号5；配列番号8；配列番号9；配列番号10；もしくは配列番号11のポリペプチド、またはその混合物；あるいは(b) 配列番号3；配列番号4；配列番号5；配列番号8；配列番号9；配列番号10；もしくは配列番号11から成る群より選択されるアミノ酸配列と免疫反応する抗体。特定の実施形態において、前記(b)の抗体は、配列番号3；配列番号4；配列番号5；配列番号8；配列番号9；配列番号10；または配列番号11のアミノ酸配列と免疫反応する。特定の態様において、サンプルの抗体についてのアッセイは、ELISAによる、例えば前記(b)の抗体以外の1つ以上の *E. chaffeensis* 抗体についてのアッセイを可能にするものによる、抗体についてのアッセイと、さらに定義される。

【0044】

本発明の実施形態には、次の組成物の1つ以上を含むキットがある：(a) 配列番号3；配列番号4；配列番号5；配列番号8；配列番号9；配列番号10；または配列番号11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) 配列番号3；配列番号4；配列番号5；配列番号8；配列番号9；配列番号10；または配列番号11を含む単離されたポリペプチド；(d) 配列番号3；配列番号4；配列番号5；配列番号8；配列番号9；配列番号10；または配列番号11と少なくとも70%同一である単離されたポリペプチド；(e) 配列番号3；配列番号4；配列番号5；配列番号8；配列番号9；配列番号10；または配列番号11から成る群より選択されるアミノ酸配列のうちの1つ以上と免疫反応する単離された抗体。特定の実施形態において、前記キットは、前記組成物のうちの2つ以上を含むと、さらに定義される。

【0045】

本発明の1つの実施形態には、次のものの1つ以上を含むポリペプチド組成物がある：(a) 配列番号3；配列番号4；配列番号5；配列番号8；配列番号9；配列番号10；および配列番号11から成る群より選択される1つ以上のアミノ酸配列を含む単離されたポリペプチド；または(b) (a)のポリペプチドと少なくとも95%同一である単離されたポリペプチド。特定の実施形態において、前記単離されたポリペプチドは、医薬的に許容される希釈剤に分散している。もう1つの特定の実施形態において、前記(a)のポリペプチドは、配列番号3、配列番号4、および配列番号5から成る群より選択されるアミノ酸配列を含む。追加の特定の実施形態において、前記(a)のポリペプチドは、配列番号8；配列番号9；配列番号10；または配列番号11から成る群より選択されるアミノ酸配列を含む。

【0046】

本発明の追加の実施形態には、配列番号3；配列番号4；配列番号5；配列番号8；配列番号9；配列番号10；および配列番号11から成る群より選択されるアミノ酸配列の1つ以上と免疫反応する単離された抗体がある。特定の実施形態において、前記抗体は、モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体である。

【0047】

10

20

30

40

50

本発明のもう1つの実施形態には、個体において免疫応答を誘導する方法があり、この方法は、治療有効量の本発明の組成物をその個体に送達する工程を含む。本発明の1つの実施形態には、被験体における *E. chaffeensis* 感染症を抑制する方法があり、この方法は、有効量の本発明の組成物をその被験体に投与する工程を含む。

【0048】

本発明の一定の態様には、個体における *E. chaffeensis* 感染症を同定する方法があり、この方法は、その個体からのサンプルを、次のものの1つ以上についてアッセイする工程を含む：(a) 配列番号3；配列番号4；配列番号5；配列番号8；配列番号9；配列番号10；および配列番号11から成る群より選択される1つ以上のアミノ酸配列を含む単離されたポリペプチド；または(b) (a)のポリペプチドから成る群より選択されるアミノ酸配列と免疫反応する抗体。本発明の1つの実施形態では、前記サンプルを、配列番号17および配列番号19のアミノ酸配列を有するポリペプチドについてアッセイする。特定の実施形態において、前記アッセイは、前記(b)の抗体についてのELISAによるアッセイである。本発明のもう1つの実施形態において、前記方法は、前記個体からのサンプルを得ることをさらに含む。

10

【0049】

本発明の追加の実施形態には、本発明のポリペプチド組成物を含む、適する容器に収容された、キットがある。一部の実施形態において、前記キットは、本発明の2つ以上のポリペプチド組成物を含む。特定の実施形態において、前記ポリペプチドは、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号11、配列番号3、配列番号4、および/または配列番号5のアミノ酸配列を含む。

20

【0050】

上述の事項は、後続の発明を実施するための形態をよりよく理解するために、本発明の特徴および技術的利点をどちらかといえば広く概説したものである。本発明のクレームの主題を構成する本発明の追加の特徴および利点を下で説明することとする。開示する概念および特定の実施形態を、本発明の同目的を実施するために他の構造を修飾または設計するための基礎として容易に利用できることは、当業者には理解されるはずである。そのような等価の構築が、添付のクレームに示すような本発明の精神および範囲を逸脱しないことも、当業者にはわかるはずである。さらなる目的および利点と共に、本発明に特有であると考えられる新規の特徴は、その構成に関しても、操作方法に関しても、添付の図面と共に考えると以下の説明からよりよく理解されるであろう。しかし、これらの図面のそれぞれが、例証および説明のみを目的として提供するものであり、本発明の範囲の定義と解釈されないことを、明確に理解しなければならない。

30

【図面の簡単な説明】

【0051】

本発明のより完全な理解のために、添付の図面と合わせて以下の説明を参照する。

【図1】図1Aは、4つのTRのすべてのドメインおよび位置を示すVLPタンパク質のアミノ酸配列（括弧内にアミノ酸の数；R = 反復配列）を提供する。図1Bは、4つの *E. chaffeensis* VLP反復配列の関係を示す系統発生樹を提供する。目盛は、アミノ酸同一率を表す。

40

【図2】図2Aは、抗VLP-R3ペプチド抗体と反応した、*E. chaffeensis* 全細胞溶解産物中の天然VLP（レーン1）、*E. chaffeensis* 感染細胞から採取した上清中の天然VLP（レーン2）、および *E. canis* 全細胞溶解産物中の天然VLP（レーン3）の同定を示す。図2Bは、同じだが、抗 *E. chaffeensis* イヌ血清と反応したものを示す。予備免疫ウサギ血清またはイヌ血清対照は、*E. chaffeensis* 全細胞溶解産物または上清を認識しなかった（データは示さない）。

【図3】図3は、VLPエピトープをマッピングするために使用した合成および組換えペプチドの略図を提供する。

【図4】図4Aは、*E. chaffeensis* VLPの合成および組換えペプチド

50

と抗 E . c h a f f e e n s i s イヌ ( 番号 2 2 5 1 ) 血清との免疫反応性を示す。精製された組換えペプチドの S D S - P A G E および全タンパク質染色 ( 上 ) ならびに抗 E . c h a f f e e n s i s イヌ血清でプローブした対応する免疫ロット ( 下 ) 。 M 、 精度タンパク質標準物質 ( B i o - R a d ) ; C t r l 、 精製された組換えチオレドキシソ。図 4 B は、小さな組換えおよび対応する合成 V L P T ポリペプチド ( N [ 合成のみ ] 、 R 1 、 R 2 、 R 3 、 および R 4 ) ならびに大きな V L P T タンパク質フラグメント ( 組換えのみ ; C 、 R 4 3 2 1 - C 、 および R 3 2 ) の E L I S A による免疫反応性を提供する。O D 読み取り値は、バッファのみのウエルの O D を引いた、3 つのウエルについての平均値 ( ± 標準偏差 ) を表す。

【図 5】図 5 A は、V L P T - R 3 を代表するオーバーラッピングペプチド ( 7 ペプチド ) の配列および配向を提供する。図 5 B は、E L I S A による V L P T - R 3 オーバーラッピングペプチドと抗 E . c h a f f e e n s i s イヌ血清との免疫反応性を示す。

【図 6】図 6 は、E L I S A による合成および組換え E . c h a f f e e n s i s V L P T 反復配列 ( R 2 、 R 3 、 および R 4 ) と 3 つの H M E 患者血清との免疫反応性を示す ( 図 6 A 、 6 B 、 6 C ; C t r l 、 精製組換えチオレドキシソ ) 。合成 E . c h a f f e e n s i s V L P T - R 3 は、E L I S A により、1 4 の H M E 患者血清 ( レーン 1 ~ 1 4 ) 、抗 E . c h a f f e e n s i s イヌ血清 ( レーン 1 5 ) および正常ヒト血清 ( レーン 1 6 ) と反応した ( 図 6 D ) 。正常ヒト血清は、他のペプチドおよびまたタンパク質を認識しなかった ( データは示さない ) 。

【図 7】図 7 は、抗 V L P T - R 3 ペプチド抗体でプローブした E . c h a f f e e n s i s の D H 8 2 細胞培養上清のウエスタン免疫ロット ( 感染後 0 から 6 日、それぞれ レーン 1 から 7 ) 。 M 、 精度タンパク質標準物質 ( B i o - R a d ) 。

【図 8】図 8 A は、網状およびデンスコア・エールリヒアにおける E . c h a f f e e n s i s V L P T の局在を明示する、E . c h a f f e e n s i s 感染 D H 8 2 の超薄切片の電子顕微鏡写真を提供する。図 8 B は、未感染 D H 8 2 細胞を含有する対応する超薄切片 ( 陰性対照 ) を提供する。両方のパネルにおける細胞をウサギ抗 V L P T - R 3 ペプチド抗体と反応させた ( 1 : 1 0 , 0 0 0 ) 。バー = 1 μ m

【発明を実施するための形態】

【0052】

本出願は、2007年8月7日出願の P C T / U S 2 0 0 7 / 7 5 3 4 3 、 および 2 0 0 6 年 8 月 3 1 日 出 願 の 米 国 特 許 仮 出 願 第 6 0 / 8 4 1 , 4 6 5 号、それら全体を、参照により援用している。

【0053】

I . 定義

長年の特許法慣習に従って、語「1つ ( a ) 」および「1つ ( a n ) 」は、クレームを含めて、本明細書においてこの語が構成するものと一緒に用いるとき、「1つ以上」を示す。本発明の一部の実施形態は、本発明の1つ以上の要素、方法工程、および/または方法から成り得る、または本質的に成り得る。本明細書に記載する任意の方法または組成物を、本明細書に記載する任意の他の方法または組成物について実施することができると考えられる。

【0054】

本明細書において用いる場合の用語「炭水化物」は、炭素、水素および酸素から、特に 2 H : 1 C : 1 O の比で、成る組成物を指す。この用語は、例えば、糖、デンプン、およびセルロースを含む。

【0055】

本明細書において用いる場合の用語「エピトープ」は、特定の抗体が結合する組成物の部位を指す。

【0056】

本明細書において用いる場合、「多糖類」と呼ばれることもある、用語「グリカン」は、加水分解によって2つ以上の単糖類に分解され得る炭水化物を指す。言い換えると、そ

10

20

30

40

50

れを単純糖鎖（多価アルコールのアルデヒドまたはケトン誘導体）と呼ぶことができる。

【0057】

用語「同一性」は、当該技術分野において公知であるように、配列を比較することによって決定されるような2つ以上のポリペプチド分子または2つ以上の核酸分子の配列間の関係を指す。当該技術分野において、「同一性」は、場合によっては、二つ以上のヌクレオチド残基または二つ以上のアミノ酸残基間のマッチ数によって決定されるような、核酸分子間またはポリペプチド分子間の配列関連度も意味する。「同一性」は、特定の数理モデルまたはコンピュータプログラム（すなわち、「アルゴリズム」）によって取り組みられる、ギャップアラインメント（もしあれば）を伴う、2つ以上の配列のより小さいもの間の同一マッチ率の尺度となる。

10

【0058】

本明細書において用いる場合の用語「免疫原性」は、それに対して免疫応答を誘発することができる組成物を指す。

【0059】

本明細書において用いる場合の用語「免疫応答」は、抗原に対する抗体を作ることによる、抗原の存在に対する免疫系の反応を指す。さらなる特定の実施形態では、抗原に対する免疫が全身によって細胞レベルで発現されることがあり、抗原に対する過敏症が発現されることがあり、および/または耐性が、例えばその後の攻撃から、発現されることがある。特定の実施形態において、免疫応答は、抗原分子を異物として識別し、抗原の形成を誘導するリンパ球、およびそれと反応し、それをあまり有害でなくすることができるリンパ球を含意する。

20

【0060】

本明細書において用いる場合の用語「免疫反応性」は、個体の血清からの抗体と反応性である組成物を指す。特定の実施形態において、組成物は、抗体が、例えば、それに結合することおよび/またはそれと免疫反応することによって、それを認識する場合、免疫反応性である。

【0061】

本明細書において用いる場合の用語「ムチン」は、N - アセチルガラクトサミン（GalNAc）を伴う1つ以上の高グリコシル化糖タンパク質を指す。

【0062】

本明細書において用いる場合の用語「オルソログ」は、ある種からの、別の種におけるポリヌクレオチドに対応する、ポリヌクレオチドを指し、これら2つのポリヌクレオチドは、共通祖先種（相同ポリヌクレオチド）によって関連している。しかし、そのある種からのポリヌクレオチドは、進化して、その他の種のポリヌクレオチドとは違うものになっている。

30

【0063】

用語「類似性」は、関連概念であるが、「同一性」とは対照的に、同一マッチと保存的置換マッチの両方を含む配列関係を指す。2つのポリペプチド配列が、例えば、{分数(10/20)}同一のアミノ酸を有し、残りが、すべて非保存的置換である場合には、同一率および類似率は、両方とも50%であろう。同じ例で、保存的置換がある位置が5箇所以上ある場合には、その同一率は、50%のままであるが、類似率は、75%（{分数(15/20)}）になるであろう。従って、保存的置換がある場合、2つのポリペプチド間の類似度は、それら2つのポリペプチド間の同一率より高くなるであろう。

40

【0064】

本明細書において用いる場合の用語「サブユニットワクチン」は、生物全体とは対照的に、ポリペプチドまたはそのフラグメントを利用するワクチンを指す。

【0065】

本明細書において用いる場合の用語「ワクチン」は、攻撃により個体に免疫をもたらす組成物を指す。

【0066】

50

本明細書において用いる場合の用語「ビルレンス因子」は、特定の宿主種上または内で微生物がそれ自体を樹立できるようにする、従って、その病原性を増強することができる、1つ以上の遺伝子産物を指す。例示的ビルレンス因子としては、例えば、細菌付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炭水化物およびタンパク質、細菌毒素、ならびに細菌の病原性の一因となり得る加水分解酵素が挙げられる。

#### 【0067】

本発明の実施は、別の指示がない限り、分子生物学、微生物学、組換えDNA、および当業者の範囲内であるその他のものについての従来技術を利用するであろう。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; ならびに ADVANCES IN IMMUNOLOGY などのジャーナルにおけるモノグラフを参照のこと。本明細書において上で言及したおよび下で言及するすべての特許、特許出願、および出版物は、参照により本明細書に援用されている。

#### 【0068】

##### II. 本発明の実施形態

本発明は、Ehrlichia 種タンパク質、それらをコードするポリヌクレオチドならびにそれらのフラグメントおよび関連分子に関連した組成物および方法に関する。本発明の特定の態様には、グリコシル化縦列反復配列上のエピトープへの初期抗体応答を惹起する E. canis および E. chaffeensis の特異的に発現されるおよび分泌される主要免疫反応性タンパク質オルソログがある。具体的には、特定の実施形態において、本発明は、Ehrlichia 種からの1つ以上の糖タンパク質に関する。さらなる実施形態において、本発明は、VLPTタンパク質である、Ehrlichia 種からの糖タンパク質に関する。追加の実施形態において、前記VLPTタンパク質は、E. chaffeensis からのものである。

#### 【0069】

Ehrlichia chaffeensis は、感染したイヌにおいて初期エールリヒア特異的抗体応答を惹起する 19 kDa タンパク質を含む、主要免疫反応性タンパク質の小さなサブセットを有する。本発明は、E. chaffeensis 可変長 PCR ターゲット (VLPT) タンパク質の同定および分子的特性づけに関する。

#### 【0070】

本発明の一部の実施形態は、被験体における E. chaffeensis 感染症を抑制する方法に関し、この方法は、E. chaffeensis に曝露する前のまたは曝露若しくは感染している疑いがある被験体を同定する工程、および E. chaffeensis の抗原を含む組成物を、E. chaffeensis 感染症を抑制するために有効な量で投与する工程を含む。前記抑制は、任意の手段、例えば被験体の体液もしくは細胞免疫

応答の刺激などによって、または他の手段によって、例えば、抗原の正常機能を阻害することによって、もしくはその被験体の体内の何らかの物質との相互作用について抗原と競合させることによって、または例えばこれらの組み合わせによって、行うことができる。

【0071】

本発明は、個体に化合物を投与する工程を含む、個体へのターゲット療法の方法にも関し、この場合、前記化合物は、ターゲティング部分および治療部分を有し、そのターゲティング部分は、VLPタンパク質に特異的である。一定の態様において、前記ターゲティング部分は、VLPにまたはリガンドにまたはVLPを結合するリガンド結合ドメインに特異的な抗体である。同様に、前記治療部分は、例えば、放射性同位元素、

10

【0072】

本発明の他の実施形態は、哺乳動物におけるエールリヒア感染症の診断に関し、この診断は、例えば血液または血清などの哺乳動物からのサンプルを、(E. chaffeensis についての) VLP組成物に対する抗体についてアッセイすることによる。

【0073】

III. E. chaffeensis VLPアミノ酸組成物

本発明は、E. chaffeensis VLPを含むポリペプチドまたはペプチドに関する。簡素のために、以下のセクションは、ポリペプチドおよびペプチドをはじめとする、本発明の任意のE. chaffeensis VLPアミノ酸組成物について述べることにする。

20

【0074】

特定の実施形態において、ポリペプチドは、組換えポリペプチドである場合もあり、または例えば、自然から単離および/もしくは精製されたものである場合もある。特定の態様において、前記アミノ酸配列は、核酸配列によってコードされる。特定の実施形態において、前記ポリペプチドは、抗原として有用である。他の特定の実施形態において、ペプチドは、例えば、合成的に生成される場合もあり、またはオリゴヌクレオチドによってコードされる場合もある。特定の実施形態において、前記ペプチドは、抗原として有用である。

30

【0075】

本発明は、組換えポリペプチドを産生する方法にも関し、この方法は、プロモーターに機能するように連結され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工程；そのベクターを細胞に移入する工程；およびその発現構築物の発現に有効な条件下でその細胞を培養する工程を含む。代替実施形態では、前記アミノ酸配列を合成的に生成することができる。

【0076】

「実質的に純粋なタンパク質」とは、自然にそれを伴う成分の少なくとも一部から分離されたタンパク質を意味する。実質的に純粋な免疫反応性組成物は、例えば、天然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核酸の発現によって；またはそのタンパク質を化学合成することによって、例えば得ることができる。従って、実質的に純粋なタンパク質は、E. coli、他の原核生物、または任意の他の生物において合成された、天然に存在しないタンパク質を含む。

40

【0077】

従って、一定の実施形態において、本発明は、少なくとも1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る場合「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、約130アミノ酸より大きいタンパク質もしくは遺伝子から翻訳された完全長内因性配列；約100アミノ酸より大きいポリペプチド；および/または約3から約100アミノ酸のペプチドを一般には指すが、これらに限定されない。上に記載したすべての「タンパク質様」用語は、本明細書では、交換可能に用いることができる。

50

## 【0078】

一定の実施形態において、前記少なくとも1つのタンパク質様分子のサイズは、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、またはより多い数のアミノ酸残基、およびこれらから導出可能な任意の範囲を含むことができるが、それらに限定されない。

10

## 【0079】

本明細書において用いる場合、「アミノ酸分子」は、通常の出業者に公知であろうような任意のポリペプチド、ポリペプチド誘導体、またはポリペプチドミメティックを指す。一定の実施形態において、タンパク質様分子の残基は、連続的であり、そのアミノ酸分子残基の配列に割り込んでいる非アミノ酸分子が一切ない。他の実施形態において、前記配列は、1つ以上の非アミノ分子部分を含むことがある。特定の実施形態において、前記タンパク質様分子の残基の配列には1つ以上の非アミノ分子部分が割り込んでいることがある。

20

## 【0080】

従って、用語「タンパク質様組成物」は、天然合成タンパク質中の20の共通アミノ酸の少なくとも1個、または下の表1に示すものをはじめとする（しかしこれらに限定されない）少なくとも1つの修飾または非通常アミノ酸を含む、アミノ分子配列を包含する。

## 【0081】

【表 1】

表1. 修飾および非通常アミノ酸			
Abbr.	アミノ酸	Abbr.	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	ヒドロキシリシン
Bala	$\beta$ -アラニン, $\beta$ -アミノ-プロピオン酸	AHyl	アロー-ヒドロキシリシン
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,ピペリジン酸	4Hyp	4-ヒドロキシプロリン
Acp	6-アミノカプロン酸	Ide	イソデスモン
Ahe	2-アミノヘプタン酸	Alle	アロー-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-アミノピメル酸	MeLys	6-N-メチルリシン
Dbu	2,4-ジアミノ酪酸	MeVal	N-メチルバリン
Des	デスモン	Nva	ノルバリン
Dpm	2,2'-ジアミノピメル酸	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

30

一定の実施形態において、前記タンパク質様組成物は、少なくとも1つのタンパク質、ポリペプチドまたはペプチドを含む。さらなる実施形態において、前記タンパク質様組成物は、生体適合性タンパク質、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る場合、用語「生体適合性」は、本明細書に記載する方法および量に従って所与の生物に適用されたとき、または投与されたとき、有意に不適当な作用を生じさせない物質を指す。そのような不適当なまたは望ましくない効果は、例えば、有意な毒性または有害免疫反応である。

## 【0082】

タンパク質様組成物は、例えば、標準的な分子生物学技術によるタンパク質、ポリペプチドもしくはペプチドの発現、天然源からのタンパク質様化合物の単離、またはタンパク質様材料の化学合成をはじめとする、当業者に公知の任意の技術によって作ることができる。様々な遺伝子についての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は、以前に記載されており、通常当業者に公知のコンピュータデータベースにおいて見つけることができる。2つのそのようなデータベースは、例えば、米国国立生物学情報センター(The National Center for Biotechnology Information)のGenBank(登録商標)およびGenPeptデータベースである。これらの公知遺伝子についてのコーディング領域を、本明細書に開示する技術または通常当業者に公知であろうような技術を用いて、増幅および/または発現させることができる。あるいは、タンパク質、ポリペプチドおよびペプチドの様

40

50

々な市販調製品が当業者に公知である。

【0083】

一定の実施形態において、タンパク質様化合物を精製することができる。一般に、「精製された」は、分画に付して様々な他のタンパク質、ポリペプチドもしくはペプチドを除去した特定のまたはタンパク質、ポリペプチドもしくはペプチド組成物を指し、この組成物は、その活性を実質的に保持しており、例えば、その特定の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ついて通常の当業者に公知であろうようなタンパク質アッセイにより評価することができる。精製されたタンパク質様組成物における保持について評価することができる例示的活性は、鉄結合活性および免疫反応性である。

【0084】

本発明の特定の実施形態では、ポリペプチドは標識され、そして任意の検出可能な標識が本発明において適する。前記標識は、例えば、ポリペプチドのN末端、C末端、またはアミノ酸残基の側鎖に連結することができる。1つ以上の標識を利用することもできる。例示的標識としては、放射性標識、蛍光標識、比色標識などが挙げられた。特定の実施形態では、前記標識をポリペプチドに共有結合で連結する。

【0085】

*I V . E . c h a f f e e n s i s* V L P T 核酸組成物

本発明の一定の実施形態は、*E . c a n i s* g p 1 9 核酸に関する。簡素のために、以下のセクションは、本発明の任意の *E . c a n i s* g p 1 9 核酸組成物に付いて述べることにする。

【0086】

一定の態様において、核酸は、野生型または突然変異核酸を含む。特定の態様において、核酸は、転写核酸をコードする、または含む。他の態様において、核酸は、核酸セグメント、またはその生体機能的等価物を含む。特定の態様において、核酸は、タンパク質、ポリペプチド、ペプチドをコードする。

【0087】

用語「核酸」は、当該技術分野において公知であり、本明細書では、「ポリヌクレオチド」と交換可能に用いることができる。本明細書において用いる場合の「核酸」は、核酸塩基を含む、DNA、RNAまたはそれらの類似体もしくは誘導体の分子（すなわち、鎖）を一般に指すものとする。核酸塩基としては、例えば、DNA中で見つけられる天然に存在するプリンもしくはピリミジン塩基（例えば、アデニン「A」、グアニン「G」、チミン「T」もしくはシトシン「C」）またはRNA中で見つけられる天然に存在するプリンもしくはピリミジン塩基（例えば、A、G、ウラシル「U」もしくはC）が挙げられる。用語「核酸」は、用語「オリゴヌクレオチド」および「ポリヌクレオチド」を、それぞれ用語「核酸」の亜属として包含する。用語「オリゴヌクレオチド」は、長さが約3核酸塩基と約100核酸塩基の間の分子を指す。用語「ポリヌクレオチド」は、長さが約100核酸塩基より長い少なくとも1つの分子を指す。

【0088】

これらの定義は、一般に、1本鎖分子を指すが、特定の実施形態では、その1本鎖分子に、部分的に、実質的にまたは完全に相補的である追加の鎖も含むであろう。したがって、核酸は、分子を含む特定の配列の1つ以上の相補鎖（単数もしくは複数）または「補体」（単数もしくは複数）を含む、2本鎖分子または3本鎖分子を包含し得る。本明細書において用いる場合、1本鎖核酸を接頭語「s s」によって、2本鎖核酸を接頭語「d s」によって、および3本鎖核酸を接頭語「t s」によって示すことがある。

A . 核酸塩基

本明細書において用いる場合、「核酸塩基」は、複素環式塩基、例えば、少なくとも1つの天然に存在する核酸（すなわち、DNAおよびRNA）において見つけられる天然に存在する核酸塩基（すなわち、A、T、G、CもしくはU）、ならびにそのような核酸塩基の天然に存在するまたは天然に存在しない誘導体（単数または複数）および類似体などを指す。核酸塩基は、天然に存在する核酸塩基対合（例えば、AとT、GとC、およびA

10

20

30

40

50

とUの間の水素結合)と置き換わり得る様式で、少なくとも1つの天然に存在する核酸塩基と1つ以上の水素結合を形成する(「アニールする」または「ハイブリダイズする」)ことが一般にできる。

#### 【0089】

「プリン」および/または「ピリミジン」核酸塩基(単数または複数)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、ならびにアルキル、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、プロモもしくはヨード)、チオールまたはアルキルチオ部分のうち1つ以上によって置換されているプリンまたはピリミジンをはじめとする(しかしこれらに限定されない)、それらの誘導体(単数もしくは複数)および類似体(単数もしくは複数)も包含する。好ましいアルキル(例えば、アルキル、カルボキシアルキルなど)部分は、約1、約2、約3、約4、約5から、約6の炭素原子から成る。プリンまたはピリミジンの他の非限定的な例としては、デアザプリン、2,6-ジアミノプリン、5-フルオロウラシル、キサントシン、ヒポキサントシン、8-プロモグアニン、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-プロモウラシル、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(N,N-dimethyladenine)、アザアデニン、8-プロモアデニン、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)、およびこれらに類するものが挙げられる。

10

20

#### 【0090】

本明細書に記載するまたは通常当業者に公知の任意の化学合成または天然合成法を用いて、ヌクレオシドまたはヌクレオチドに核酸塩基を含めることができる。

#### B. ヌクレオシド

本明細書において用いる場合、「ヌクレオシド」は、核酸塩基リンカー部分に共有結合で連結され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」の非限定的な例は、デオキシリボース、リボース、アラビノース、または5炭素糖の誘導体もしくは類似体をはじめとする(しかしこれらに限定されない)、5個の炭素原子を含む糖(すなわち、「5炭素糖」)である。5炭素糖の誘導体または類似体の非限定的な例としては、2'-フルオロ-2'-デオキシリボース、または糖環内の酸素が炭素で置換されている炭素環式の糖が挙げられる。

30

#### 【0091】

核酸塩基リンカーへの核酸塩基の共有結合での連結の種々のタイプが当該技術分野において公知である。非限定的な例として、プリン(すなわち、AもしくはG)または7-デアザプリン核酸塩基を含むヌクレオシドは、概して、プリンまたは7-デアザプリン9位を5炭素糖の1'位に共有結合で連結する。もう1つの非限定的な例において、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、概して、ピリミジンの1位を5炭素糖の1'位に共有結合で連結する(Kornberg and Baker, 1992)。

40

#### C. ヌクレオチド

本明細書において用いる場合、「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、一般に、ヌクレオチドを、ヌクレオチドを含む別の分子に共有結合で連結する、またはヌクレオチドを別のヌクレオチドに共有結合で連結して核酸を形成する。天然に存在するヌクレオチドにおける「骨格部分」は、5炭素糖に共有結合で連結されているリン部分を概して含む。骨格部分の連結は、5炭素糖の3'または5'位のいずれかで生じる。しかし、特に、ヌクレオチドが天然に存在する5炭素糖またはリン部分の誘導体または変異体を含むとき、他のタイプの連結が当該技術分野において公知である。

#### D. 核酸類似体

50

核酸は、天然に存在する核酸中に存在し得る、核酸塩基の誘導体もしくは類似体、核酸塩基リンカー部分および/または骨格部分、を含むことがある、またはからもっぱら成ることがある。本明細書において用いる場合、「誘導体」は、天然に存在する分子の化学的修飾もしくは改変形態を指し、一方、用語「ミミック」または「類似体」は、天然に存在する分子または部分に構造的に似ていることもあり、似ていないこともあるが、同様の機能を有する分子を指す。本明細書において用いる場合、「部分」は、より大きな化学または分子構造のより小さな化学または分子成分を一般に指す。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、当該技術分野において周知であり、記載されている(例えば、参照により本明細書に援用されている、Scheit, 1980を参照のこと)。

#### 【0092】

5炭素糖を含むヌクレオシド、ヌクレオチドもしくは核酸および/または骨格部分誘導体もしくは類似体のさらなる非限定的な例としては、dsDNAと三重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載している米国特許第5,681,947号;DNAまたはRNAにおいて見つけられるヌクレオシドの蛍光類似体を組み込んだ核酸、特に、蛍光核酸プローブとして使用するものものを記載している米国特許第5,652,099号および同第5,763,167号;向上されたヌクレアーゼ安定性を有する、ピリミジン環上に置換を伴うオリゴヌクレオチド類似体を記載している米国特許第5,614,617号;核酸検出において使用される修飾5炭素糖(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を記載している米国特許第5,670,663号、同第5,872,232号および同第5,859,221号;ハイブリダイゼーションアッセイにおいて使用することができる水素以外の置換基で4'位が置換されている少なくとも1つの5炭素糖部分を含むオリゴヌクレオチドを記載している米国特許第5,446,137号;3'-5'ヌクレオチド間結合を有するデオキシリボヌクレオチドと2'-5'ヌクレオチド間結合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載している米国特許第5,886,165号;ヌクレオチド間結合の3'位酸素を炭素によって置換して核酸のヌクレアーゼ耐性を向上させる、修飾ヌクレオチド間結合を記載している米国特許第5,714,606号;ヌクレアーゼ耐性を向上させる1つ以上の5'メチレンリン酸ヌクレオチド間結合を含有するオリゴヌクレオチドを記載している米国特許第5,672,697号;向上されたヌクレアーゼ安定性および薬物または検出部分を送達する能力をもたらすための、薬物または標識を含み得る置換基部分のオリゴヌクレオチドの2'炭素への結合を記載している米国特許第5,466,786号および同第5,792,847号;細胞取り込み、ヌクレアーゼに対する耐性およびターゲットRNAへのハイブリダイゼーションを向上させるために隣接5炭素糖骨格の4'位および3'位を連結する2または3炭素骨格結合を有するオリゴヌクレオチドを記載している米国特許第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1つのスルファマートまたはスルファミドヌクレオチド間結合を含むオリゴヌクレオチドを記載している米国特許第5,470,967号;向上したヌクレアーゼ耐性、細胞取り込みおよびRNA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載している米国特許第5,378,825号、同第5,777,092号、同第5,623,070号、同第5,610,289号および同第5,602,240号;オリゴヌクレオチドの2'-O位に、それらの膜透過性または安定性を向上させるために、連結される疎水性担体物質を記載している米国特許第5,858,988号;DNAまたはRNAへの向上されたハイブリダイゼーション;ヌクレアーゼに対する向上された安定性を有する、5'末端のアントラキノンにコンジュゲートしたオリゴヌクレオチドを記載している米国特許第5,214,136号;DNAが、向上されたヌクレアーゼ耐性、結合親和性、およびRNAアーゼHを活性化する能力のために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キメラを記載している米国特許第5,700,922号;ならびにDNA-RNAハイブリッ

10

20

30

40

50

ドを形成するためにDNAに連結されたRNAを記載している米国特許第5,708,154号におけるものが挙げられる。

#### E. ポリエーテルおよびペプチド核酸

一定の実施形態では、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使用できると考えられる。非限定的な例は、参照により本明細書に援用されている、米国特許第5,908,845号に記載されている「ポリエーテル核酸」である。ポリエーテル核酸では、1つ以上の核酸塩基が、ポリエーテル骨格内のキラル炭素原子に連結している。

##### 【0093】

もう1つの非限定的な例は、「ペプチド核酸」であり、これは、「PNA」、「ペプチド系核酸類似体」または「PENAM」としても公知であり、米国特許第5,786,461号、同第5,891,625号、同第5,773,571号、同第5,766,855号、同第5,736,336号、同第5,719,262号、同第5,714,331号、同第5,539,082号、およびWO 92/20702に記載されており、これらのそれぞれが、参照により本明細書に援用されている。ペプチド核酸は、一般に、DNAおよびRNAなどの分子と比較して向上された配列特異性、結合特性、および酵素的分解に対する耐性を有する(Egholmら, 1993; PCT/EP/01219)。ペプチド核酸は、核酸塩基部分、5炭素糖で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ない骨格部分を含む、1つ以上のヌクレオチドまたはヌクレオシドを一般に含む。PNAについて記載されている核酸塩基リンカー部分の例としては、アザ窒素原子、アミドおよび/またはウレイドテナーが挙げられる(例えば、米国特許第5,539,082号を参照のこと)。PNAについて記載されている骨格部分の例としては、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、ポリスルフィンアミドまたはポリスルホンアミド骨格部分が挙げられる。

##### 【0094】

一定の実施形態において、ペプチド核酸などの核酸類似体は、米国特許番号5,891,625に記載されているように、PCRにおけるものなどの核酸増幅を抑制するために、偽陽性を減少させるために、単一塩基突然変異体間の識別のために、使用することができる。核酸類似体の他の修飾および使用は、当該技術分野において公知であり、およびgp36ポリヌクレオチドに包含される。非限定的な例では、米国特許第5,786,461号には、アミノ酸側鎖をPNA骨格に連結させてその分子の溶解度を向上させたPNAが記載されている。もう1つの例では、PNAの細胞取り込み特性が、親油性基の連結によって増大される。米国特許出願番号117,363には、PNAの細胞取り込みを向上させるために用いられる幾つかのアルキルアミノ部分が記載されている。もう1つの例は、米国特許第5,766,855号、同第5,719,262号、同第5,714,331号および同第5,736,336号に記載されており、これらには、天然に存在する核酸に比べて配列特異性、溶解度および/または結合親和性の向上をもたらす、天然に存在するおよび天然に存在しない核酸塩基とアルキルアミン側鎖とを含むPNAが記載されている。

#### F. 核酸の調製

核酸は、例えば化学合成、酵素的生産または生物学的生産などの、通常の当業者に公知の任意の技術によって作ることができる。合成核酸(例えば、合成オリゴヌクレオチド)の非限定的な例としては、EP 266,032(参照により本明細書に援用されている)に記載されているものなどの、ホスホトリエステル、ホスファイトもしくはホスホルアミド化学および固相技術を使用するインビトロ化学合成によって作られる核酸、またはFroehlerら, 1986および米国特許番号5,705,629(それぞれ、参照により本明細書に援用されている)によって記載されているようなデオキシヌクレオシドH-ホスホン酸中間体経由で作られる核酸が挙げられる。本発明の方法において、1つ以上のオリゴヌクレオチドを使用することがある。様々な異なるオリゴヌクレオチド合成メカニズムが、例えば、米国特許第4,659,774号、同第4,816,571号、同第

5, 141, 813号、同第5, 264, 566号、同第4, 959, 463号、同第5, 428, 148号、同第5, 554, 744号、同第5, 574, 146号、同第5, 602, 244号に開示されており、これらのそれぞれが参照により本明細書に援用されている。

#### 【0095】

酵素的に生産される核酸の非限定的な例としては、PCR（商標）などの増幅反応において酵素によって生産されるもの（例えば、米国特許第4, 683, 202号および米国特許第4, 682, 195号（それぞれ、参照により本明細書に援用されている）を参照のこと）または米国特許第5, 645, 897号（参照により本明細書に援用されている）に記載されているオリゴヌクレオチドの合成において酵素によって生産されるものが挙げられる。生物学的に生産される核酸の非限定的な例としては、細菌において複製された組換えDNAベクターなどの、生細胞において生産された（すなわち複製された）組換え核酸が挙げられる（例えば、参照により本明細書に援用されている、Sambrookら, 1989を参照のこと）。

10

#### 【0096】

##### G. 核酸の精製

ポリアクリルアミドゲル、塩化セシウム遠心分離勾配を用いて、または通常の当業者に公知の任意の他の手段（例えば、参照により本明細書に援用されている、Sambrookら, 1989を参照のこと）によって、核酸を精製することができる。

#### 【0097】

一定の態様において、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る場合、用語「単離された核酸」は、1つ以上の細胞の全ゲノムおよび転写核酸の大部分がない単離された、またはそれらが別様でない、核酸分子（例えば、RNAまたはDNA分子）を指す。一定の実施形態において、「単離された核酸」は、細胞成分またはインビトロ反応成分、例えば脂質またはタンパク質などの高分子、小さな生体分子、およびこれらに類するもの、の大部分がない単離された、またはそれらが別様でない、核酸を指す。

20

#### 【0098】

##### H. 核酸セグメント

一定の実施形態において、前記核酸は、核酸セグメントである。本明細書において用いる場合、用語「核酸セグメント」は、核酸のより小さなフラグメント、例えば非限定的な例として、ペプチドまたはポリペプチド配列の一部のみをコードするものである。従って、「核酸セグメント」は、ペプチドまたはポリペプチドコーディング領域の2ヌクレオチドから完全長の、遺伝子配列の任意の部分を含むことができる。

30

#### 【0099】

様々な核酸セグメントを特定の核酸配列に基づいて設計することができ、それらは、いずれの長さのものであってもよい。例えば、第一残基は1である、第二残基は2であるなどと、配列に数値を割り当てることにより、すべての核酸セグメントを定義するアルゴリズムを生成することができた：

$n$  から  $n + y$

40

この式中、 $n$  は、1からその配列の最後の数までの整数であり、 $y$  は、その核酸セグメントの長さマイナス1であり、この場合、 $n + y$  はその配列の最後の数を超えない。従って、10量体の場合、核酸セグメントは、塩基1から10、2から11、3から12...などに対応する。15量体の場合、核酸セグメントは、塩基1から15、2から16、3から17...などに対応する。20量体の場合、核酸セグメント (nucleic segments) は、塩基1から20、2から21、3から22...などに対応する。一定の実施形態において、前記核酸セグメントは、プローブまたはプライマーであり得る。本明細書において用いる場合、「プローブ」は、検出方法または組成の中で用いられる核酸を一般に指す。本明細書において用いる場合、「プライマー」は、伸長もしくは増幅法または組成の中で用いられる核酸を指す。

50

## 【0100】

## I. 核酸補体

本発明は、1つ以上の他の核酸に相補的である核酸も包含する。特定の実施形態において、例えば、核酸は、アンチセンスまたは siRNA のために、例えば、ポリヌクレオチドの少なくとも部分的な発現を阻害するために、利用される。

## 【0101】

特定の実施形態において、本発明は、例えば、本明細書において述べる配列に相補的な、核酸または核酸セグメントを包含する。核酸は、標準的な Watson-Crick 型、Hoogsteen 型または逆 Hoogsteen 型結合相補則に従って別の核酸と塩基対合することができる場合、別の核酸に対する「補体（単数もしくは複数）」である、または別の核酸に「相補的」である。本明細書において用いる場合、「別の核酸」は、異なる分子を指すこともあり、または同じ分子の空間的に離れた配列を指すこともある。本明細書において用いる場合、用語「相補的な」または「補体（単数もしくは複数）」は、すべてに満たない核酸塩基が、対応する核酸塩基と塩基対合しない場合であっても、別の核酸または2本鎖にハイブリダイズすることができる、連続核酸塩基または半連続核酸塩基（例えば、1つ以上の核酸塩基がその分子中に存在しない）の配列を含む核酸も指す。一定の実施形態において、「相補的」核酸は、核酸塩基の約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%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%から約100%、およびこれらから導出可能な任意の範囲が、ハイブリダイゼーション中に1本鎖または2本鎖核酸分子と塩基対合することができる配列を含む。一定の実施形態において、用語「相補的」は、通常の場合によって理解されているであろうような、ストリンジェントな条件で別の核酸鎖または2本鎖にハイブリダイズすることができる核酸を指す。

10

20

## 【0102】

一定の実施形態において、「部分的に相補的な」核酸は、低ストリンジェント条件下で1本もしくは2本鎖核酸にハイブリダイズすることができる配列を含む、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中に1本もしくは2本鎖核酸分子と塩基対合することができる配列を含有する。

30

## 【0103】

## J. ハイブリダイゼーション

本明細書において用いる場合、「ハイブリダイゼーション」、「ハイブリダイズする」または「ハイブリダイズすることができる」は、2本もしくは3本鎖分子、部分的2本もしくは3本鎖特性を有する分子を形成することを意味すると解釈される。本明細書において用いる場合の用語「アニールする」は、「ハイブリダイズする」と同義である。用語「ハイブリダイゼーション」、「ハイブリダイズする（一人称、二人称、三人称現在形）」または「ハイブリダイズすることができる」は、用語「ストリンジェントな条件（単数もしくは複数）」または「高ストリンジェンシー」および用語「低ストリンジェンシー」または「低ストリンジェントな条件（単数もしくは複数）」を包含する。

40

## 【0104】

本明細書において用いる場合、「ストリンジェントな条件（単数もしくは複数）」または「高ストリンジェンシー」は、相補的配列（単数または複数）を含有する1つ以上の核酸鎖（単数または複数）間または内でのハイブリダイゼーションを可能にするが、ランダム配列のハイブリダイゼーションを妨げる条件である。ストリンジェントな条件は、核酸とターゲット鎖の間のミスマッチを、あったとしても、ほとんど許容しない。そのような条件は、当業者に周知であり、および高い選択性を必要とする用途に好まれる。非限定的な用途としては、核酸、例えば遺伝子もしくはその核酸セグメントの単離、または少なくとも1つの特定の mRNA 転写産物もしくはその核酸セグメントの検出、およびこれらに類するものが挙げられる。

50

## 【0105】

ストリンジェントな条件は、約50 から約70 の温度で例えば約0.02 Mから約0.15 M NaClによって既定されるもの、または例えば、前記ストリンジェントな条件が、50~65、5X SSPC、50%ホルムアミドでのハイブリダイゼーション；50~65、5X SSPCでの洗浄；もしくは60、0.5X SSC、0.1% SDSでの洗浄であるものなどの、低塩および/または高温条件を含み得る。望ましいストリンジェンシーの温度およびイオン強度が、一部は、特定の核酸（単数または複数）の長さ、ターゲット配列（単数または複数）の長さおよび核酸塩基含有量、核酸（単数または複数）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（単数もしくは複数）の存在または濃度によって決まることは理解される。

10

## 【0106】

ハイブリダイゼーションについてのこれらの範囲、組成および条件を単に非限定的な例として述べていること、および特定のハイブリダイゼーション反応についての望ましいストリンジェンシーが、多くの場合、1つ以上の陽性または陰性対照との比較によって経験的に決定されることも理解される。考えられる用途に依存して、ターゲット配列に対する核酸の様々な選択度を達成するために様々なハイブリダイゼーション条件を用いることが好ましい。非限定的な例では、ストリンジェントな条件下で核酸にハイブリダイズしない関連ターゲット核酸の同定または単離を、低温および/または高イオン強度でのハイブリダイゼーションによって達成することができる。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限定的な例としては、約0.15 Mから約0.9 M NaClで、約20 から約50 の温度範囲で行われるハイブリダイゼーションが挙げられる。勿論、特定の用途に合うように前記低または高ストリンジェンシーをさらに変更することは、当業者の範囲内である。

20

## 【0107】

## V. 核酸に基づく発現系

特定の実施形態において、本発明は、免疫反応性エールリヒアポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに関し、ならびにその必要がある個体、例えばEhrlichiaに感染している個体および/またはEhrlichiaに感染しやすい個体、に前記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た産物を送達することも含む。簡素のために、以下のセクションでは、本発明の任意のE. chaffeensis VLP核酸組成物および/または核酸に基づく発現系について述べることにする。

30

## 【0108】

本発明は、免疫反応性Ehrlichia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配列に関する。一般に、前記コードされたタンパク質は、成熟タンパク質を生産する結果となる翻訳後修飾後に切断することができるN末端配列を含む。

## 【0109】

遺伝子コードの縮重（すなわち、大部分のアミノ酸に関して、単一のアミノ酸についての1つより多くのヌクレオチドトリプレット（コドン）コード）のため、異なるヌクレオチド配列が、ある特定のアミノ酸をコードする可能性があることは、当該技術分野において周知である。従って、本発明のポリヌクレオチド配列は、例えば、提供する例示的配列またはそのような配列の縮重変異体のいずれかを含む。本発明の特定の態様において、縮重変異体は、本発明の配列と同一でないが、本発明の配列の1つ以上の特性を尚保持する配列を含む。

40

## 【0110】

本明細書において用いる場合、「実質的に純粋なDNA」は、その環境の分子の一部もしくは全部の分離（部分的もしくは完全精製）のため、または主張するDNAに隣接する配列の変更のため、そのDNAが天然に存在する環境の一部ではないDNAを意味する。従って、この用語は、例えば、ベクターに、自律複製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に組み込まれている；あるいは他の配列が

50

ら独立して別個の分子（例えば、cDNA、またはポリメラーゼ連鎖反応（PCR）もしくは制限エンドヌクレアーゼ消化によって生産されたゲノムもしくはcDNAフラグメント）として存在する、組換えDNAを含む。追加のポリペプチド配列、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DNAも含む。

#### 【0111】

本発明は、免疫反応性Ehrlichia組成物をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターであって、そのベクターが細胞に導入されるとそのポリヌクレオチドを発現することができる該発現ベクターにさらに関する。特定の実施形態において、前記ベクターは、作動可能な連結で、次のものを含む：a)複製起点；b)プロモーター；およびc)前記タンパク質をコードするDNA配列。

10

#### 【0112】

本明細書において用いる場合、「ベクター」は、複製可能な核酸構築物、例えばプラスミドまたはウイルス核酸、と定義することができる。ベクターは、Ehrlichiaの免疫反応性組成物をコードする核酸を増幅するおよび/または発現させるために使用することができる。発現ベクターは、ポリペプチドをコードする核酸配列が、細胞においてそのポリペプチドの発現を果たすことができる適する制御配列に作動可能に連結されている、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択される形質転換方法に依存して変わるであろう。一般に、制御配列としては、例えば、転写プロモーターおよび/またはエンハンサー、適するmRNAリボソーム結合部位、ならびに転写および翻訳の終結を制御する配列が挙げられる。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ら、1989、Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd Ed.)、Cold Spring Harbor Press、N.Y.に記載されている技術を参照のこと。発現されるポリヌクレオチド配列およびその転写制御配列は、その転写制御配列が、そのポリヌクレオチド配列の転写を有効に制御する場合、「作動可能に連結されている」と定義される。本発明のベクターとしては、プラスミドベクターおよびウイルスベクターが挙げられるが、これらに限定されない。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、アデノ関連ウイルス、SV40ウイルス、またはヘルペスウイルスから誘導されたものである。

20

30

#### 【0113】

一般に、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助長する、宿主細胞と共に用いられる、プロモーター配列を含む。本明細書において用いる場合、用語「宿主」は、原核細胞ばかりでなく、真核細胞、例えば酵母、植物および動物細胞を含むものとする。本発明のEhrlichiaの免疫反応性組成物をコードする組換えポリヌクレオチドは、通常の当業者に一般に知られている技術のいずれかを用いて宿主を形質転換させるために使用することができる。原核宿主としては、E.coli、Styphimurium、Serratia marcescensおよびBacillus subtilisが挙げられる。原核宿主としては、酵母、例えばPichia pastoris、哺乳動物細胞および昆虫細胞が挙げられる。

40

#### 【0114】

以下の説明は、例示的要素、試薬、ならびにEhrlichiaポリヌクレオチドのポリヌクレオチドおよび核酸送達方法に関する。

#### 【0115】

##### A.ベクター

用語「ベクター」は、核酸配列を、それを複製することができる細胞への導入のために、挿入することができる担体核酸分子を指すために用いる。核酸配列は、「外因性」であり得、これは、ベクターが導入されることとなる細胞にとって異物であること、または当該配列が、前記細胞内の配列だが、この配列が本来見つかからないその宿主細胞の核酸内の位置にある配列と相同性であることを意味する。ベクターとしては、プラスミド、コスミ

50

ド、ウイルス（バキュロウイルス、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）が挙げられる。当業者には、標準的な組換え技術によってベクターを構築する素養が十分にあるであろう（例えば、Maniatisら, 1988およびAusubelら, 1994を参照のこと。両方とも参照により本明細書に援用されている）。

#### 【0116】

用語「発現ベクター」は、転写され得る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。ある場合、その後、RNA分子は、タンパク質、ポリペプチド、またはペプチドに翻訳される。他の場合、例えば、アンチセンス分子またはリボザイムの生産の際、これらの配列は、翻訳されない。発現ベクターは、様々な「制御配列」を含有することがあり、この制御配列は、特定の宿主細胞における動作可能に連結されたコーディング配列の転写およびことによると翻訳に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に加えて、ベクターおよび発現ベクターは、他の機能にも役立つ、下で説明する核酸配列を含有することがある。

10

#### 【0117】

##### 1. プロモーターおよびエンハンサー

「プロモーター」は、核酸配列の一領域である制御配列であり、そこで転写の開始および速度が制御される。それは、核酸配列の特定の転写を開始させるために調節タンパク質および分子、例えばRNAポリメラーゼおよび他の転写因子、が結合する遺伝子要素を含有することもある。「機能するように配置された」、「機能するように連結された」、「制御下」、および「転写制御下」というフレーズは、プロモーターが、核酸配列の開始および/または発現を制御するためにその核酸配列に対して正しい機能を果たせる位置および/または配向にあることを意味する。

20

#### 【0118】

プロモーターは、一般に、RNA合成の開始部位の位置を定めるように機能する配列を含む。これについての最もよく知られている例は、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についてのプロモーターおよびSV40後期遺伝子についてのプロモーターなどの一部のプロモーターにはTATAボックスがなく、その開始部位の上にある別の要素、それ自体が、開始位置の固定に役立つ。追加のプロモーター要素は、転写開始の頻度を調節する。概して、これらは、開始位置の上流30-110bp領域に位置するが、多数のプロモーターが、開始位置の下流にも機能性要素を含有することが証明されている。プロモーター「の制御下」にコーディング配列を置くために、転写リーディングフレームの転写開始部位の5'末端を、選択されたプロモーター「の下流」（すなわち、の3'）に配置する。「上流の」プロモーターが、DNAの転写を刺激し、コードされたRNAの発現を促進する。

30

#### 【0119】

プロモーター要素間の間隔は、多くの場合、順応性があり、そのため、要素を互いに対して逆転または移動してもプロモーター機能は保存される。tkプロモーターの場合、活性が低下し始める前に50bp離れるようにプロモーター要素間の間隔を増加させることができる。プロモーターに依存して、個々のプロモーターが協力して機能して転写を活性化する場合もあり、または独立して機能して転写を活性化する場合もあるようである。プロモーターは、「エンハンサー」と併用されることもあり、またはされないこともあり、このエンハンサーは、核酸配列の転写活性に関与するシス作用性調節配列を指す。

40

#### 【0120】

プロモーターは、コーディングセグメントおよび/またはエキソンの上流に位置する5'非コーディング配列を単離することによって得ることができるような、核酸配列と自然に会合しているものである場合がある。そのようなプロモーターを「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と自然に会合しているものである場合がある。あるいは、組換えまたは異種プロモーター（これは、その天然の環境で核酸配列と通常は会合していないプロモーターを指す

50

)の制御下にコーディング核酸セグメントを置くことによって、一定の利点を得られるであろう。組換えまたは異種エンハンサーは、同様に、その天然の環境では核酸配列と通常は会合していないエンハンサーを指す。そのようなプロモーターまたはエンハンサーとしては、他の遺伝子のプロモーターまたはエンハンサー、ならびに任意の他のウイルスまたは原核もしく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、ならびに「天然に存在する」のではない、すなわち、異なる転写調節領域の異なる要素、および/または発現を改変する突然変異を含有する、プロモーターまたはエンハンサーを挙げることができる。例えば、組換えDNA構築に最も一般的に使用されるプロモーターとしては、ベータラクタマーゼ(ペニシリナーゼ)、ラクトースおよびトリプトファン(trp)プロモーター系が挙げられる。プロモーターおよびエンハンサーの核酸配列の合成的生産に加えて、本明細書に開示する組成物と共に組換えクロニングおよび/または核酸増幅技術(PCR(商標)を含む)を用いて配列を生産することができる(例えば、米国特許第4,683,202号および同第5,928,906号を参照のこと。これらは、それぞれ、参照により本明細書に援用されている)。さらに、ミトコンドリア、葉緑体、およびこれらに類するものなどの無核細胞小器官内での配列転写および/または発現を指図する制御配列も利用できると考えられる。

10

#### 【0121】

当然、例えば選択された細胞、細胞小器官、細胞タイプ、組織、器官、または生物においてDNAセグメントの発現を有効に指図するプロモーターおよび/またはエンハンサーを利用することは重量であろう。分子生物学技術分野の技術者には、タンパク質発現のためのプロモーター、エンハンサーおよび細胞タイプの組み合わせの使用は公知である(例えば、参照により本明細書に援用されている、Sambrookら,1989を参照のこと)。利用されるプロモーターは、構成的である場合もあり、組織特異的である場合もあり、誘導性である場合もあり、および/または適切な条件下、導入されたDNAセグメントの高レベル発現の指図に有用である場合もあり、例えば、組換えタンパク質および/またはペプチドの大規模生産の際に有利である。前記プロモーターは、異種である場合もあり、または内因性である場合もある。

20

#### 【0122】

前記プロモーターは、原核細胞、真核細胞、または両方での使用に適するものであり得る。加えて、(例えば、the Eukaryotic Promoter Data Base EPDBに従って)任意のプロモーター/エンハンサーの組み合わせを用いて発現を誘導することもできよう。T3、T7またはSP6細胞質発現系の使用は、1つの可能な実施形態である。

30

#### 【0123】

##### 2. 開始シグナルおよび内部リボソーム結合部位

特定の開始シグナルが、コーディング配列の効率的な翻訳に必要とされることもある。これらのシグナルとしては、ATG開始コドンまたは隣接配列が挙げられる。ATG開始コドンをはじめとする外因性翻訳制御シグナルを与える必要がある場合がある。通常の当業者は、これを決定することおよび必要シグナルを容易に与えることができるであろう。所望のコーディング配列のリーディングフレームが、確実に挿入物全体を転写するために、開始コドンが「インフレーム」にあらねばならないことは、周知である。前記外因性翻訳制御シグナルおよび開始コドンは、天然のものである場合もあり、合成のものである場合もある。発現効率は、適切な転写エンハンサー要素を含めることによって向上させることができる。

40

#### 【0124】

本発明の一定の実施形態では、内部リボソーム進入部位(IRES)要素の使用を用いて、多重遺伝子、すなわちポリシストロン、メッセージを作る。IRES要素は、5'メチル化Cap依存性転写のリボソーム走査モデルを迂回することおよび内部位置で転写を開始することができる(Pelletier and Sonenberg,1988)。ピコルナウイルスファミリーの2つのメンバー(ポリオおよび脳心筋炎ウイルス)から

50

のIRES要素が記載されており(Pelletier and Sonenberg, 1988)、哺乳動物メッセージからのIRESも記載されている(Macejak and Sarnow, 1991)。IRES要素を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。IRESによって互いに隔てられた多数のオープンリーディングフレームを一緒に転写して、ポリシストロンメッセージを作ることができる。IRES要素によって、リボソームは効率的な転写のためにそれぞれのオープンリーディングフレームに接近することができる。単一メッセージを転写するために単一のプロモーター/エンハンサーを使用して、多数の遺伝子効率的に発現させることができる(例えば、米国特許第5,925,565号および同第5,935,819号を参照のこと。それぞれが、参照により本明細書に援用されている)。

10

#### 【0125】

##### 3. マルチクローニング部位

ベクターは、マルチクローニング部位(MCS)を含む場合があり、このマルチクローニング部位は、多数の制限酵素部位を含有する核酸領域であり、それらの制限酵素部位のいずれかを標準的な組換え技術と併用してそのベクターを消化することができる(例えば、参照により本明細書に援用されている、Carbonelliら, 1999、Levensonら, 1998、およびCocea, 1997を参照のこと)。「制限酵素消化」は、核酸分子内の特定の位置でのみ機能する酵素での核酸分子の酵素的分解開裂を指す。これらの制限酵素の多くが市販されている。そのような酵素の使用は、当業者に広く理解されている。多くの場合、MCS内で切断する制限酵素を使用してベクターを線形化またはフラグメント化して、外因性配列をそのベクターにライゲートすることができる。「ライゲーション」は、互いに連続していることもあり、していないこともある2つの核酸フラグメント間でのホスホジエステル結合の形成プロセスを指す。制限酵素およびライゲーション反応を含む技術は、組換え技術の技術分野における技術者には周知である。

20

#### 【0126】

##### 4. スプライシング部位

大部分の転写真核性RNA分子は、一次転写産物からイントロンを除去するためにRNAスプライシングを受ける。真核生物ゲノム配列を含有するベクターは、タンパク質発現のために転写産物の正確なプロセッシングを確実なものにするために、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し得る(例えば、参照により本明細書に援用されている、Chandlerら, 1997を参照のこと)。

30

#### 【0127】

##### 5. 終結シグナル

本発明のベクターまたは構築物は、一般に、少なくとも1つの終結シグナルを含むであろう。「終結シグナル」または「ターミネーター」は、RNAポリメラーゼによるRNA転写産物の特定の終結に関与するDNA配列から成る。従って、一定の実施形態では、RNA転写産物の生産を終わらせる終結シグナルが考えられる。望ましいメッセージレベルを達成するためにインピボでターミネーターが必要である。

#### 【0128】

真核細胞系の場合、ターミネーター領域は、ポリアデニル化部位を露出させるために新たな転写産物の部位特異的開裂を可能にする特異的DNA配列を含むこともある。これが、特化された内因性ポリメラーゼに、その転写産物の3'末端に約200のA残基(ポリA)の伸長部を付加するようにシグナルを送る。このポリAテールで修飾されたRNA分子は、より安定しているようであり、より効率的に翻訳される。従って、真核細胞を含む他の実施形態において、そのターミネーターが、RNAの開裂のためのシグナルを含むことは好ましく、およびそのターミネーターが、メッセージのポリアデニル化を促進することはさらに好ましい。ターミネーターおよび/またはポリアデニル化部位要素は、メッセージレベルの向上、およびそのカセットから他の配列への通読の最小化に役立ち得る。

40

#### 【0129】

本発明での使用が考えられるターミネーターとしては、本明細書に記載するまたは通常

50

の当業者に公知である任意の公知転写ターミネーターが挙げられ、それらとしては、例えば、遺伝子の終結配列、例えばウシ成長ホルモンターミネーターなど、またはウイルス終結配列、例えばSV40ターミネーターなど、が挙げられるが、これらに限定されない。一定の実施形態において、前記終結シグナルは、配列トランケーションなどのため、転写可能または翻訳可能配列を欠くことがある。

#### 【0130】

##### 6. ポリアデニル化シグナル

発現、特に、真核細胞系発現では、概して、転写産物の正しいポリアデニル化を果たすためにポリアデニル化シグナルを含むであろう。ポリアデニル化シグナルの性質は、本発明の実施の成功に重要であるとは考えられず、いずれのそのような配列を利用してもよい。好ましい実施形態は、適便であり、様々なターゲット細胞においてよく機能することが知られている、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を含む。ポリアデニル化は、転写産物の安定性を増すことができ、または細胞質輸送を助長することができる。

10

#### 【0131】

##### 7. 複製起点

宿主細胞においてベクターを増殖させるために、宿主細胞は、複製が開始される特異的核酸配列である1つ以上の複製起点部位（多くの場合、「ori」と呼ばれる）を含有することがある。あるいは、宿主細胞が酵母である場合には、自律複製配列（ARS）が利用されることがある。

20

#### 【0132】

##### 8. 選択可能およびスクリーニング可能マーカー

本発明の一定の実施形態では、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ピトロまたはインピボで同定することができる。そのようなマーカーは、同定可能な変化を細胞にもたらし、それによって、発現ベクターを含有する細胞を容易に同定できるであろう。一般に、選択可能マーカーは、選択が可能になる特性を付与するものである。陽性選択可能マーカーは、マーカーの存在によってその選択が可能になるものであり、一方、陰性選択可能マーカーは、その存在がその選択を妨げるものである。陽性選択可能マーカーの例は、薬物耐性マーカーである。

30

#### 【0133】

通常、薬物選択マーカーは、形質転換体のクローニングおよび同定を助長し、例えば、ネオマイシン、ピューロマイシン、ヒグロマイシン、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、有用な選択可能マーカーである。条件を満たすことに基づいて形質転換体を区別することができる表現型を付与するマーカーに加えて、その基礎が比色分析である他のタイプのスクリーニング可能マーカー、例えばGFP、も考えられる。あるいは、スクリーニング可能酵素、例えば、単純疱疹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）を利用することができる。免疫学的マーカーを、ことによるとFACS分析と共に、用いる方法も当業者には公知であろう。使用するマーカーは、それが遺伝子産物をコードする核酸と同時に発現され得る限り、重要であると考えられない。選択可能およびスクリーニング可能マーカーのさらなる例は、当業者に周知である。

40

#### 【0134】

##### 9. プラスミドベクター

一定の実施形態において、宿主細胞を形質転換するためにプラスミドベクターの使用が考えられる。一般に、宿主細胞と適合性の種に由来するレプリコンおよび制御配列を含有するプラスミドベクターが、これらの宿主と一緒に使用される。前記ベクターは、複製部位、ならびに形質転換細胞において表現型選択を生じさせることができるマーキング配列を、通常、保有する。非限定的な例では、pBR322（E. coli種に由来するプラスミド）の誘導体を使用して、E. coliを形質転換させることが多い。pBR322は、アンピシリンおよびテトラサイクリン耐性のための遺伝子を含有し、従って、形質転

50

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、例えば、その微生物によるそれ自体のタンパク質の発現に用いることができるプロモーターも含有しなければならず、または含有するように修飾されなければならない。

【0135】

加えて、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形質転換ベクターとしてこれらの宿主と共に使用することができる。例えば、ファージラムダGEMTM 11を、例えばE. coli LE392などの宿主細胞を形質転換するために使用することができる組換えファージベクターを作る際に、利用することができる。

10

【0136】

さらなる有用なプラスミドベクターとしては、pINベクター(Inouyeら, 1985); ならびに後の精製および分離または開裂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を精製するために使用するための、pGEXベクターが挙げられる。他の適する融合タンパク質は、ベータガラクトシダーゼ、ユビキチン、およびこれらに類するものを伴うものである。

【0137】

発現ベクターを含む細菌細胞宿主、例えばE. coliを、多数の適する培地のうちのいずれか、例えばLBにおいて成長させる。一定のベクターにおける組換えタンパク質の発現は、一定のプロモーターに特異的な薬剤と宿主細胞を接触させることにより、当業者に理解されるように、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替えることによって、誘導することができる。さらなる期間、一般には2時間と24時間の間の期間、にわたってその細菌を培養した後、遠心分離によって細胞を回収し、洗浄して残留培地を除去する。

20

【0138】

10. ウイルスベクター

一定のウイルスの、受容体媒介エンドサイトーシスにより細胞を感染させるもしくは細胞に進入する能力、および宿主細胞ゲノムに組み込まれ、ウイルス遺伝子を安定的且つ効率的に発現する能力が、それらを、細胞(例えば、哺乳動物細胞)への異種核酸の移入のための魅力的な候補にした。本発明の組成物は、1つ以上の組成物または他の成分、例えば免疫修飾物質もしくはアジュバントなど、をコードするウイルスベクターを含むことがある。本発明の核酸を送達するために使用することができるウイルスベクターの非限定的な例を下で説明する。

30

【0139】

a. アデノウイルスベクター

核酸の送達のための特定の方法は、アデノウイルス発現ベクターの使用を伴う。アデノウイルスベクターが、ゲノムDNAへの低い組み込み能力を有することは公知であるが、この特徴は、これらのベクターによってもたらされる高い遺伝子伝達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)その構築物のパッケージングを支持するためにおよび(b)組織または細胞内でクローニングされた組織または細胞特異的構築物を最終的に発現するために十分なアデノウイルス配列を含有する構築物を含むものとする。アデノウイルスの遺伝子構成、36kb、線形、2本鎖DNAウイルス、の知識により、アデノウイルスDNAの大きな断片を7kbまでの異種配列で置換することができる(Grunhaus and Horwitz, 1992)。

40

【0140】

b. AAVベクター

アデノウイルス支援トランスフェクションを用いて、核酸を細胞に導入することができる。アデノウイルス連結系を用いることによる、細胞系におけるトランスフェクション効率上昇が報告されている(Kelleher and Vos, 1994; Cottenら, 1992; Curriel, 1994)。アデノ関連ウイルス(AAV)は、本発明の

50

組成物において使用するために魅力的なベクター系である。それは、高い組み込み頻度を有し、および非分裂細胞を感染させることができるので、組織培養 (Muzyczka, 1992) またはインビトロでの例えば哺乳動物細胞への遺伝子の送達に有用なものになるからである。AAVは、感染力が広い宿主範囲を有する (Tratschinら, 1984; Laughlinら, 1986; Lebkowskiら, 1988; McLaughlinら, 1988)。rAAVベクターの生成および使用に関する詳細は、米国特許第5,139,941号および同第4,797,368号に記載されており、これらのそれぞれが参照により本明細書に援用されている。

#### c. レトロウイルスベクター

レトロウイルスは、それらの遺伝子を宿主ゲノムに組み込んで、大量の異種遺伝物質を輸送する、広いスペクトルの種および細胞タイプを感染させるならびに特別な細胞系にパッケージされるそれらの能力のため、送達ベクターとして有用である (Miller, 1992)。

##### 【0141】

レトロウイルスベクターを構築するために、核酸 (例えば、対象となる組成物をコードするもの) を、ウイルスゲノム内の一定のウイルス配列の位置に挿入して、複製欠陥のあるウイルスを生産する。ウイルス粒子を生産するために、gag、polおよびenv遺伝子を含むがLTRおよびパッケージング成分を伴わないパッケージング細胞系を構築する (Mannら, 1983)。レトロウイルスLTRおよびパッケージング配列と共にcDNAを含む組換えプラスミドを特別な細胞系に (例えば、例えばリン酸カルシウム沈降法によって) 導入すると、そのパッケージング配列によって、組換えプラスミドのRNA転写産物をウイルス粒子にパッケージすることができ、その後、それが培養基に分泌される (Nicolas and Rubenstein, 1988; Temin, 1986; Mannら, 1983)。その後、組換えレトロウイルスを含む培地を回収し、場合によっては濃縮し、遺伝子伝達に使用する。レトロウイルスベクターは、多種多様な細胞タイプを感染させることができる。しかし、組み込みおよび安定な発現には、宿主細胞の分裂が必要である (Paskindら, 1975)。

##### 【0142】

レンチウイルスは、一般的なレトロウイルス遺伝子gag、polおよびenvに加えて、調節または構造機能を有する他の遺伝子を含む、複雑なレトロウイルスである。レンチウイルスベクターは、当該技術分野において周知である (例えば、Naldiniら, 1996; Zuffereyら, 1997; Blomerら, 1997; 米国特許第6,013,516号および同第5,994,136号を参照のこと)。レンチウイルスの一部の例としては、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が挙げられる。レンチウイルスベクターは、HIVビルレンス遺伝子の多重弱毒化によって生成されており、例えば、そのベクターを生物学的に安全なものにするために遺伝子、env、vif、vpr、vpuおよびnefを欠失させる。

##### 【0143】

組換えレンチウイルスベクターは、非分裂細胞を感染させることができ、ならびにインビボおよびインビトロ両方の遺伝子伝達および核酸配列発現に使用することができる。例えば、パッケージング機能を有する2つ以上のベクター、すなわちgag、polおよびenv、ならびにrevおよびtat、で適する宿主細胞がトランスフェクトされる、非分裂細胞を感染させることができる組換えレンチウイルスは、参照により本明細書に援用されている米国特許第5,994,136号に記載されている。エンベロープタンパク質と抗体との、または特定の細胞タイプの受容体にターゲティングするための特定のリガンドとの連結によって、組換えウイルスをターゲティングすることができる。例えば特定のターゲット細胞上の受容体についてのリガンドをコードする別の遺伝子と共に、対象となる配列 (調節領域を含む) をウイルスベクターに挿入することによって、そのベクターは、今やターゲット特異的である。

##### 【0144】

10

20

30

40

50

## 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におけるワクチン構築物として利用することができる。ワクシニアウイルス (Ridgeway, 1988; Baichwal and Sugden, 1986; Couparら, 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疱疹ウイルスなどのウイルスに由来するベクターを利用することができる。それらは、様々な哺乳動物細胞に幾つかの魅力的な特徴をもたらす (Friedmann, 1989; Ridgeway, 1988; Baichwal and Sugden, 1986; Couparら, 1988; Horwichら, 1990)。

## 【0145】

## e. 修飾ウイルスを使用する送達

特定の結合リガンドを発現するように遺伝子操作された感染性ウイルスの中に送達すべき核酸を収容することができる。このウイルス粒子は、例えば、ターゲット細胞のコグネイト受容体に特異的に結合し、その細胞に内容物を送達するであろう。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が、ウイルスエンベロープへのラクトース残基の化学的付加によるレトロウイルスの化学的修飾に基づいて開発された。この修飾は、シアロ糖タンパク質受容体により肝細胞を特異的に感染させることができる。

## 【0146】

レトロウイルス・エンベロープ・タンパク質に対するおよび特異的細胞受容体に対するビオチニル化抗体を使用する、組換えレトロウイルスのもう1つのターゲティング方法が設計された。これらの抗体は、ストレプトタビジンを使用することによりビオチン成分によってカップリングされた (Rouxら, 1989)。主要組織適合遺伝子複合体クラス I およびクラス II 抗原に対する抗体を使用して、彼らは、それらの表面抗原を担持する様々なヒト細胞のインビトロでのエクトロピックウイルスでの感染を立証した (Rouxら, 1989)。

## 【0147】

## 11. ベクター送達および細胞形質転換

本発明と共に使用するための細胞小器官、細胞、組織または生物の形質転換のための適するエールリヒア核酸送達方法は、本明細書に記載するような、または通常 of 当業者に公知であろうような、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任意の方法を含むと考えられる。そのような方法としては、DNA の直接送達、例えば、エクスピボトランスフェクションによるもの (Wilsonら, 1989、Nabelら, 1989)、マイクロイジェクション (Harlan and Weintroub, 1985; 参照により本明細書に援用されている米国特許第 5, 789, 215 号) を含めて、注射によるもの (米国特許第 5, 994, 624 号、同第 5, 981, 274 号、同第 5, 945, 100 号、同第 5, 780, 448 号、同第 5, 736, 524 号、同第 5, 702, 932 号、同第 5, 656, 610 号、同第 5, 589, 466 号および同第 5, 580, 859 号 (それぞれが参照により本明細書に援用されている)); エレクトロポレーションによるもの (米国特許第 5, 384, 253 号 (参照により本明細書に援用されている)); Tur-Kaspala, 1986; Potterら, 1984); リン酸カルシウム沈殿法によるもの (Graham and Van Der Eb, 1973; Chen and Okayama, 1987; Rippeら, 1990); DEAE デキストラン、その後、ポリエチレングリコールを使用することによるもの (Gopal, 1985); ダイレクト・ソニック・ローディングによるもの (Fechheimerら, 1987); リボソーム媒介トランスフェクションによるもの (Nicolau and Sene, 1982; Fraleyら, 1979; Nicolauら, 1987; Wongら, 1980; Kanedaら, 1989; Katoら, 1991) および受容体媒介トランスフェクションによるもの (Wu and Wu, 1987; Wu and Wu, 1988); マイクロプロジェクトイル・ボンバードメントによるもの (PCT 出願番号 WO 94/09699 および 95/0612

10

20

30

40

50

8 ; 米国特許第 5 , 6 1 0 , 0 4 2 号、同第 5 , 3 2 2 , 7 8 3 号、同第 5 , 5 6 3 , 0 5 5 号、同第 5 , 5 5 0 , 3 1 8 号、同第 5 , 5 3 8 , 8 7 7 号および同第 5 , 5 3 8 , 8 8 0 号、ならびにそれぞれが参照により本明細書に援用されている) ; シリコンカーバイド線維との攪拌によるもの ( K a e p p l e r ら , 1 9 9 0 ; 米国特許第 5 , 3 0 2 , 5 2 3 号および同第 5 , 4 6 4 , 7 6 5 号 (それぞれが参照により本明細書に援用されている) ) ; アグロバクテリウム媒介形質転換によるもの ( 米国特許第 5 , 5 9 1 , 6 1 6 号および同第 5 , 5 6 3 , 0 5 5 号 (それぞれが参照により本明細書に援用されている) ) ; プロトプラストの P E G 媒介形質転換によるもの ( O m i r u l l e h ら , 1 9 9 3 ; 米国特許第 4 , 6 8 4 , 6 1 1 号および同第 4 , 9 5 2 , 5 0 0 号 (それぞれが参照により本明細書に援用されている) ) ; 乾燥 / 阻害媒介 D N A 取り込みによるもの ( P o t r y k u s ら , 1 9 8 5 ) 、ならびにこのような方法の任意の組み合わせが挙げられるが、それらに限定されない。これらなどの技術の適用により、細胞小器官 ( 単数もしくは複数 ) 、細胞 ( 単数もしくは複数 ) 、組織 ( 単数もしくは複数 ) または生物 ( 単数もしくは複数 ) を安定的にまたは一過的に形質転換させることができる。

#### a . エクスビポ形質転換

生物から除去した血管細胞および組織のエクスビポ設定でのトランスフェクション方法は、当業者に公知である。例えば、イヌ内皮細胞が、インビトロでのレトロウイルス遺伝子移入によって遺伝子改変され、イヌに移植された ( W i l s o n ら , 1 9 8 9 ) 。もう一つの例では、ユカタンミニプタ内皮細胞が、インビトロでレトロウイルスによりトランスフェクトされ、ダブルバルーン ( d o u b l e - b a l l o n w ) カテーテルを使用して動脈に移植された ( N a b e l ら , 1 9 8 9 ) 。それ故、細胞および組織を除去し、本発明の核酸を使用してエクスビポでトランスフェクトすることができると考えられる。特定の態様では、移植細胞および組織を生物に配置することができる。好ましい面では、移植細胞または組織において核酸を発現させる。

【 0 1 4 8 】

#### b . 注射

一定の実施形態では、核酸を細胞小器官、細胞、組織または生物に 1 回以上の注射 ( すなわち、針注入 ) により ( 例えば、例えば皮下的に、経皮的に、筋肉内に、静脈間に、腹腔内的になど ) 送達することができる。ワクチンの注射方法は、通常の当業者に周知である ( 例えば、食塩溶液を含む組成物の注射 ) 。本発明のさらなる実施形態は、直接マイクロインジェクションによる核酸の導入を含む。直接マイクロインジェクションは、核酸構築物をアフリカツメガエル卵母細胞に導入するために使用された ( H a r l a n d a n d W e i n t r a u b , 1 9 8 5 ) 。使用される組成物の量は、使用される細胞小器官、細胞、組織または生物ばかりでなく抗原の性質によって変わり得る。

【 0 1 4 9 】

#### c . エレクトロポレーション

一定の実施形態では、核酸をエレクトロポレーションによって細胞小器官、細胞、組織または生物に導入する。エレクトロポレーションは、高圧電気放電への細胞および D N A の懸濁液の曝露を伴う。この方法の幾つかの変形では、一定の細胞壁分解酵素、例えばペクチン分解酵素、を利用して、ターゲットレシピエント細胞を未処理細胞よりエレクトロポレーションによる形質転換を受けやすくする ( 参照により本明細書に援用されている、米国特許第 5 , 3 8 4 , 2 5 3 号を参照のこと ) 。あるいは、レシピエント細胞を、機械的傷害によって、形質転換をより受けやすくすることができる。

【 0 1 5 0 】

エレクトロポレーションを用いる真核細胞のトランスフェクションは、相当成功を収めている。この方法で、マウスプレ B リンパ球が、ヒトカップ免疫グロブリン遺伝子でトランスフェクトされ ( P o t t e r ら , 1 9 8 4 ) 、およびラット肝細胞が、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でトランスフェクトされた ( T u r k a s p a ら , 1 9 8 6 ) 。

【 0 1 5 1 】

10

20

30

40

50

例えば植物細胞などの細胞においてエレクトロポレーションによって形質転換を果たすために、もろい組織、例えば細胞もしくは胚形成カルの懸濁培養物、を利用することができ、または代替的に、未成熟胚もしくは他の器質化組織を直接形質転換することができる。この技術では、選択した細胞の細胞壁を、制御された様式でのペクチン分解酵素（ペクトリアーゼ）または機械的傷害に曝露することによって、部分的に分解することができるだろう。無損傷細胞のエレクトロポレーションによって形質転換された幾つかの種の例としては、トウモロコシ（米国特許第5,384,253号；Rhodesら,1995；D'Halluinら,1992）、小麦（Zhouら,1993）、トマト（Hou and Lin,1996）、大豆（Christouら,1987）およびタバコ（Leeら,1989）が挙げられる。

10

#### 【0152】

植物細胞のエレクトロポレーション形質転換にプロトプラストを利用することもできる（Bates,1994；Lazzari,1995）。例えば、子葉から採取したプロトプラストのエレクトロポレーションによるトランスジェニック大豆植物の産生が、DhirおよびWidholmによって国際特許出願番号WO 9217598（参照により本明細書に援用されている）に記載されている。プロトプラスト形質転換が記載されている種の他の例としては、大麦（Lazzari,1995）、モロコシ属（Battarawら,1991）、トウモロコシ（Bhattacharjeeら,1997）、小麦（Heら,1994）およびトマト（Tsukada,1989）が挙げられる。

20

#### d. リン酸カルシウム

本発明の他の実施形態では、リン酸カルシウム沈殿法を用いて核酸を細胞に導入する。この技術を用いて、ヒトKB細胞がアデノウイルス5DNAでトランスフェクトされた（Graham and Van Der Eb,1973）。同様に、この仕方で、マウスL(A9)、マウスC127、CHO、CV1、BHK、NIH3T3およびHeLa細胞が、ネオマイシンマーカー遺伝子でトランスフェクトされ（Chen and Okayama,1987）、ならびにラット肝細胞が、様々なマーカー遺伝子でトランスフェクトされた（Rippeら,1990）。

#### 【0153】

##### e. DEAEデキストラン

もう1つの実施形態では、DEAEデキストラン、続いてポリエチレングリコールを使用して、核酸を細胞に送達する。この方法で、レポータープラスミドが、マウス骨髄腫および赤白血病細胞に導入された（Gopal,1985）。

30

#### 【0154】

##### f. ソニフィケーション・ローディング

本発明の追加の実施形態は、ダイレクト・ソニック・ローディングによる核酸の導入を含む。ソニフィケーション・ローディングにより、LTK線維芽細胞が、チミジンキナーゼでトランスフェクトされた（Fechheimerら,1987）。

#### 【0155】

##### g. リポソーム媒介トランスフェクション

本発明のさらなる実施形態では、エールリヒア核酸を脂質複合体と共に含む、例えば、リポソームの中に含むことなどがある。リポソームは、リン脂質二重層の膜と内部の水性媒質とを特徴とする小胞構造である。多層リポソームは、水性媒質によって隔てられた多数の脂質を有する。それらは、リン脂質を過剰の水溶液に懸濁させると、自発的に形成する。脂質成分は、閉鎖構造形成前に自己再構成を経験し、脂質二重層間に水および溶解した溶質を閉じ込める（Ghosh and Bachhawat,1991）。Lipofectamine（Gibco BRL）またはSuperfect（Qiagen）と複合した核酸も考えられる。

40

#### 【0156】

インビトロでの異種DNAのリポソーム媒介核酸送達および発現は、非常に成功を収めている（Nicolau and Sene,1982；Fraleleyら,1979；N

50

icolaura, 1987)。培養ニワトリ胚、HeLaおよびヘパトーム細胞における異種DNAのリポソーム媒介送達および発現の実現可能性も実証された(Wongら, 1980)。

#### 【0157】

本発明の一定の実施形態では、リポソームを血球凝集ウイルス(HVJ)と複合させることがある。これが、細胞膜との融合を助長し、リポソーム封入DNAの細胞進入を促進することは証明されている(Kandedaら, 1989)。他の実施形態では、リポソームを核非ヒストン染色体タンパク質(HMG1)(Katoら, 1991)と複合させるまたは併用することがある。尚さらなる実施形態では、リポソームをHVJとHMG1の両方と複合させるまたは併用することがある。他の実施形態においては、送達ビヒクルは、リガンドおよびリポソームを含むことがある。

10

#### 【0158】

##### h. レポーター媒介トランスフェクション

尚、さらに、核酸は、受容体媒介送達ビヒクルによってターゲット細胞に送達することができる。これらは、ターゲット細胞で発生するであろう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タイプ特異的分布から考えて、この送達方法は、本発明に特異性というもう1つの地位を加える。

#### 【0159】

一定の受容体媒介遺伝子ターゲティングビヒクルは、細胞受容体特異的リガンドおよび核酸結合剤を含む。他のものは、送達すべき核酸が機能するように連結されている細胞受容体特異的リガンドを含む。幾つかのリガンドが、受容体媒介遺伝子伝達に使用されており(Wu and Wu, 1987; Wagnerら, 1990; Peralesら, 1994; Myers, EPO 0273085)、これによってこの技術の実行可能性が確証される。別の哺乳動物細胞タイプに関連して特異的送達が記載されている(Wu and Wu, 1993; 参照により本明細書に援用されている)。本発明の一定の態様において、リガンドは、ターゲット細胞集団上で特異的に発現される受容体に対応するように選択されるであろう。

20

#### 【0160】

他の実施形態において、細胞特異的核酸ターゲティングビヒクルの核酸送達ビヒクル成分は、特異的結合リガンドをリポソームとの組み合わせで含むことがある。送達すべき核酸(単数または複数)は、リポソームの中に収容され、特異的リガンドは、リポソーム膜に機能的に組み込まれる。従って、リポソームは、ターゲット細胞の受容体(単数または複数)に特異的に結合し、内容物を細胞に送達することとなる。そのようなシステムは、例えば、上皮増殖因子(EGF)がそのEGF受容体のアップレギュレーションを示す細胞への核酸の受容体媒介送達の際に使用されるシステムを用いて、機能的であることが証明されている。

30

#### 【0161】

尚さらなる実施形態において、ターゲット送達ビヒクルの核酸送達ビヒクル成分は、リポソームそれ自体であることがあり、このリポソームは、好ましくは、細胞特異的結合を指図する1つ以上の脂質または糖タンパク質を含む。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(asialganglioside)、がリポソームに組み込まれ、肝細胞によるインスリン遺伝子の取り込みの増加を維持した(Nicolaura, 1987)。類似した仕方では、本発明の組織特異的形質転換構築物をターゲット細胞に特異的に送達できると考えられる。

40

#### 【0162】

##### i. マイクロプロジェクタイトル・ボンバードメント

マイクロプロジェクタイトル・ボンバードメント技術を用いて、核酸を少なくとも1つの細胞小器官、細胞、組織または生物に導入することができる(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;これらのそれぞれが参照により本明細書に援用され

50

ている)。この方法は、DNAをコーティングしたマイクロプロジェクタイトイルを、高速に加速して細胞膜を貫通させ、細胞を死滅させることなく細胞に進入させる能力に依存する ( Kleinら, 1987)。当該技術分野において公知の多種多様なマイクロプロジェクタイトイル・ボンバードメント技術があり、それらの多くを本発明に利用することができる。

#### 【0163】

マイクロプロジェクタイトイル・ボンバードメントは、様々な細胞 (単数もしくは複数)、組織 (単数もしくは複数) または生物 (単数もしくは複数)、例えば任意の植物種、を形質転換するために用いることができる。マイクロプロジェクタイトイル・ボンバードメントによって形質転換された種の例としては、単子葉植物種、例えば、トウモロコシ (PCT出願WO 95/06128)、大麦 (Ritalaら, 1994; Hensgensら, 1993)、小麦 (参照により本明細書に援用されている、米国特許第5,563,055号)、米 (Hensgensら, 1993)、オート麦 (Torbetら, 1995; Torbetら, 1998)、ライ麦 (Hensgensら, 1993)、サトウキビ (Bowerら, 1992)、およびモロコシ属 (Casasら, 1993; Hagioら, 1991); ならびにタバコ (Tomesら, 1990; Buising and Benbow, 1994)、大豆 (参照により本明細書に援用されている、米国特許第米国特許第5,322,783号)、ヒマワリ (Knittelら, 1994)、落花生 (Singsitら, 1997)、綿 (McCabe and Martinell, 1993)、トマト (VanEckら, 1995)、および一般にマメ科植物 (参照により本明細書に援用されている、米国特許第5,563,055号) をはじめとする多数の双子葉植物が挙げられる。

10

20

#### 【0164】

このマイクロプロジェクタイトイル・ボンバードメントでは、1つ以上の粒子を少なくとも1つの核酸でコーティングし、推進力によって細胞に送達することができる。小粒子を加速するための幾つかの装置が開発された。1つのそのような装置は、電流を発生させる (その結果として動力をもたらず) ための高圧放電に基づく (Yangら, 1990)。使用されたマイクロプロジェクタイトイルは、タングステンまたは金粒子またはビーズなどの生物学的に不活性な物質から成った。例示的粒子としては、タングステン、白金および好ましくは金から成るものが挙げられる。場合によっては、金属粒子上へのDNA沈殿は、マイクロプロジェクタイトイル・ボンバードメントを用いるレシピエント細胞へのDNA送達に必要ないであろうと考えられる。しかし、粒子は、DNAでコーティングされるのではなくDNAを含有することができると考えられる。DNAでコーティングした粒子は、それ自体ではおよびだけでは必要ないが、粒子ボンバードメントによってDNA送達レベルを増加させることができる。

30

#### 【0165】

ボンバードメントのために、懸濁状態の細胞をフィルターまたは固体培養基で濃縮する。あるいは、未成熟胚または他のターゲット細胞を固体培養基上に配列してもよい。ボンバードメントを受ける細胞を、マイクロプロジェクタイトイル停止プレートの下の適切な距離に配置する。

40

#### 【0166】

加速によって細胞 (例えば、植物細胞) にDNAを送達するための方法の例示的实施形態は、Biolistics Particle Delivery Systemであり、これは、DNAまたは細胞でコーティングした粒子を、例えば懸濁状態で培養した単子葉植物細胞などの細胞で覆われたフィルター表面の上の網、例えばステンレス鋼またはNytexの網に通すために、使用することができる。その網が、粒子を分散させるので、それらは、大きな凝集体でレシピエント細胞に送達されない。発射装置と衝突させる細胞との間に介在する網が、凝集する発射物のサイズを低下させ、および大きすぎる発射物によりレシピエント細胞に負わせる傷害を減少させることでより高い形質転換頻度の一因になり得ると考えられる。

50

## 【0167】

## 12. 宿主動物

本明細書において用いる場合、用語「細胞」、「細胞系」および「細胞培養物」は、交換可能に用いることができる。これらの用語のすべてが、任意のおよびすべての後続世代である、それらの後代も含む。すべての後代は、意図的または偶発的突然変異のため、同一でない場合があることは、理解される。異種核酸配列の発現に関連して、「宿主細胞」は、原核または真核細胞を指し、ならびにベクターを複製することができるおよび/またはベクターによってコードされた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を含む。宿主細胞は、ベクターのためのレシピエントとして用いることができ、用いられてきた。宿主細胞を「トランスフェクトする」または「形質転換する」ことができ、これは、外因性核酸を宿主細胞に移入または導入するプロセスを指す。形質転換細胞は、初代対象細胞およびその後代を含む。本明細書において用いる場合、用語「遺伝子操作された」および「組換え」細胞または宿主細胞は、例えばベクターなどの外因性核酸配列が導入された細胞を指すと解釈する。従って、組換え細胞は、組換え導入核酸を含有しない天然に存在する細胞とは区別することができる。

10

## 【0168】

一定の実施形態では、RNAまたはタンパク質様配列を、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共発現させることができると考えられる。共発現は、宿主細胞を2つ以上の異なる組換えベクターでコ・トランスフェクトすることによって達成することができる。あるいは、RNAについての多数の異なるコーディング領域を含むように単一の組換えベクターを構築することができ、後にそれらの領域が、その単一ベクターでトランスフェクトされた宿主細胞において発現され得る。

20

## 【0169】

組織が、本発明の組成物で形質転換される宿主細胞（単数または複数）を含むことがある。前記組織は、生物から分割または分離することができる。一定の実施形態において、組織は、脂肪細胞、肺胞のもの、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、胸部、軟膏、子宮頸、結腸、角膜、胚のもの、子宮内膜、内皮のもの、上皮のもの、食道、筋膜（*facia*）、線維芽細胞、濾胞状のもの、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、（トウモロコシの）穂軸、（トウモロコシの）穂、花、殻、仁、葉、分裂組織細胞、花粉、根尖、根、（トウモロコシの）毛、柄、およびこれらのすべての癌を含み得るが、それらに限定されない。

30

## 【0170】

一定の実施形態において、前記宿主細胞または組織は、少なくとも1つの生物に含まれるものであり得る。一定の実施形態において、前記生物は、通常の当業者によって理解されているような、原核生物（例えば、真性細菌、古細菌）または真核細胞であり得る（例えば、ウェブページ <http://phylogeny.arizona.edu/tree/phylogeny.html> を参照のこと）。

## 【0171】

非常に多数の細胞系および培養物を宿主細胞としての使用に利用することができ、それらは、生存培養物および遺伝物質についてのアーカイブとしての役割を果たす機構である、米国微生物系統保存機関（American Type Culture Collection: ATCC）を通して入手することができる（[www.atcc.org](http://www.atcc.org)）。当業者は、ベクター骨格および所望の結果に基づいて、適切な宿主を決めることができる。例えば、プラスミドまたはコスミドを、多数のベクターの複製のために原核生物宿主細胞に導入することができる。ベクター複製および/または発現に利用できる細胞タイプとしては、細菌、例えば、*E. coli*（例えば、*E. coli* 株 RR1、*E. coli* LE392、*E. coli* B、*E. coli* X 1776（ATCC 番号 31537））ならびに *E. coli* W3110（F、ラムダ、原栄養菌のもの、ATCC 番号 2

40

50

73325)、DH5、JM109、およびKC8; 杆菌、例えば、*Bacillus subtilis*; ならびに多の腸内細菌、例えば、*Salmonella typhimurium*、*Serratia marcescens*、様々な*Pseudomonas*種、ならびに多数の市販細菌宿主、例えば、SURE(登録商標)Competent CellsおよびSOLOPACK Gold Cells(STRATAGENE(登録商標), La Jolla)が挙げられるが、これらに限定されない。一定の実施形態において、*E. coli* LE392などの細菌細胞は、ファージウイルスのための宿主細胞として、特に考えられる。

#### 【0172】

ベクターの複製および/または発現のための真核生物宿主細胞の例としては、HeLa、NIH3T3、Jurkat、293、Cos、CHO、Saos、およびPC12が挙げられるが、これらに限定されない。様々な細胞タイプおよび生物からの多数の宿主細胞を利用することができ、それらは当業者に公知であろう。類似して、ウイルスベクターを、真核生物または原核生物宿主細胞、特に、ベクターの複製または発現を許容するものと併用することができる。

10

#### 【0173】

一部のベクターは、原核生物細胞と真核生物細胞の両方においてそれを複製および/または発現させることができる制御配列を利用することがある。当業者は、上に記載した宿主細胞のすべてを、それらを維持するようおよびベクターの複製を可能にするようにインキュベートする条件をさらに了解していることであろう。ベクターの大規模生産、ならびにベクターによってコードされている核酸およびそれらのコグネイトポリペプチド、タンパク質またはペプチドの生産を可能にするであろう技術および条件も了解されており、知られている。

20

#### 【0174】

##### 13. 発現系

上で論じた組成物の少なくとも一部またはすべてを含む、非常に多数の発現系が存在する。核酸配列またはそれらのコグネイトポリペプチド、タンパク質およびペプチドを生産するために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利用することができる。多くのそのような系を商業的におよび広範に入手することができる。

30

#### 【0175】

昆虫細胞/バキュロウイルス系、例えば、米国特許第5,871,986号、同第4,879,236号(両方とも、参照により本明細書に援用されている)に記載されているもの、ならびに例えば、INVITROGEN(登録商標)からMAXBAC(登録商標)2.0の名でおよびCLONTECH(登録商標)からBACPAC(商標)BACULOVIRUS EXPRESSION SYSTEMの名で購入することができるものは、異種核酸セグメントの高いタンパク質発現レベルを生じさせることができる。

#### 【0176】

発現系の多の例としては、合成エクジソン誘導性受容体を含むSTRATAGENE(登録商標)のCOMPLETE CONTROL Inducible Mammalian Expression System、またはそのpET Expression System、*E. coli*発現系が挙げられる。誘導性発現系のもう1つの例は、INVITROGEN(登録商標)から入手することができ、これは、T-REX(商標)(テトラサイクリン調節発現系)System、完全長CMVプロモーターを使用する誘導性哺乳動物発現系、を有する。INVITROGEN(登録商標)は、*Pichia methanolica* Expression Systemと呼ばれる酵母発現系も提供しており、これは、メチロトロフ酵母*Pichia methanolica*における組換えタンパク質の高レベル生産用に設計されている。当業者は、ベクター、例えば発現構築物、を発現させて、核酸配列またはそのコグネイトポリペプチド、タンパク質もしくはペプチドを生産する方法を知っているであろう。

40

50

## 【0177】

本発明の方法によって生産されるタンパク質、ポリペプチドまたはペプチドは、「過発現させる」ことができる、すなわち、細胞におけるその自然発現と比較して増されたレベルで発現させることができると考えられる。そのような過発現は、放射標識および/またはタンパク質精製をはじめとする様々な方法によって評価することができる。しかし、単純で直接的な方法、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ティング、その後の定量分析、例えば結果として得られたゲルまたはプロットの比重走査、を含む方法、が好ましい。天然細胞におけるレベルと比較して組換えタンパク質、ポリペプチドまたはペプチドのレベルの特異的増加は過発現を示し、宿主細胞、および例えばゲル上の小胞によって生産された他のタンパク質と比較してのその特定のタンパク質、ポリペプチドまたはペプチドの相対的過多も同様である。

10

## 【0178】

一部の実施形態において、発現されたタンパク質様配列は、宿主細胞内への封入体を形成し、それらの宿主細胞を、例えば細胞ホモジナイザーでの破壊によって、溶解し、洗浄および/または遠心分離して濃密封入体および細胞膜を可溶性細胞成分から分離する。この遠心分離は、ラクトースなどの糖の緩衝液への添合および選択速度での遠心分離により前記濃密封入体を選択的に濃縮する条件下で行うことができる。通常の当業者に公知であろうように、高濃度の尿素（例えば、8M）またはカオトロピック剤、例えばベータメルカプトエタノールもしくはDTT（ジチオトレイトール）などの還元剤の存在下、塩酸グアニジン、を含有する溶液に封入体を可溶化し、より望ましい配座にリフォールディング

20

## 【0179】

## VI. 生体機能的等価物

本発明に従ってポリヌクレオチドおよび/またはタンパク質の構造の修飾および/または変更を行っても同様のまたは改善された特性を有する分子を得ることができる場合、そのような生体機能的等価物も本発明に包含される。

## 【0180】

## A. 修飾ポリヌクレオチドおよびポリペプチド

前記生体機能的等価物は、異なる配列を含有するように遺伝子操作されていると同時に「野生型」または標準タンパク質をコードする能力も保持するポリヌクレオチドを含むことができる。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ードンの存在によって果たすことができる。1つの例では、当業者は、制限酵素認識配列をポリヌクレオチドに、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妨げずに、導入することを望むことができる。

30

## 【0181】

もう1つの例では、ポリヌクレオチドは、より有意な変更を伴う生体機能的等価物である（および該等価物をコードする）ことがある。例えば抗体の抗原結合領域、基質分子上の結合部位、受容体およびそのようなものなどの構造との相互作用性結合能力を測定可能できるほどに喪失することなく、一定のアミノ酸でタンパク質構造内の他のアミノ酸を置換することができる。いわゆる「保存的」変更は、タンパク質の生体活性を壊さない。この構造の変更は、タンパク質のその予定された作用を実施する能力を侵害するものではないからである。従って、本発明者らは、本明細書に開示する遺伝子およびタンパク質の配列に様々な変更を施すことができるが、それでも尚、本発明の目的を果たすことができると考えている。

40

## 【0182】

機能的等価物という用語に関して、「生体機能的等価の」タンパク質および/またはポリヌクレオチドの定義には、許容される等価の生体活性レベルで分子を保持しながらその分子の被定義部分の中で行うことができる変更の数には制限があるという概念が内在することは、当業者には十分に理解されるであろう。従って、本明細書では、生体機能的等価物を、代用することができる選択されたアミノ酸（またはコードン）の中のタンパク質（およ

50

びポリヌクレオチド)と定義する。機能的活性。

【0183】

一般に、分子の長さが短いほど、機能を保持しながらその分子に行うことができる変更の数は少ない。より長いドメインは、中等度の数の変更を有することができる。完全長タンパク質は、より多数の変更に対して最も大きな許容度を有するであろう。しかし、それらの構造に高度に依存する一定の分子またはドメインは、殆どまたは全く修飾を許容できないことを理解しなければならない。

【0184】

アミノ酸置換は、アミノ酸側鎖置換基の相対的類似性、例えば、それらの疎水性、親水性、電荷、サイズ、および/またはこれらに類するもの、に一般に基づく。アミノ側鎖置換基のサイズ、形状および/またはタイプの分析は、アルギニン、リシンおよび/もしくはヒスチジンが、すべて正電荷を有する残基であること；アラニン、グリシンおよび/もしくはセリンが、すべて同様のサイズを有すること；ならびに/またはフェニルアラニン、トリプトファンおよび/もしくはチロシンが、すべて一般に類似した形状を有することを示す。従って、これらの考慮に基づいて、アルギニン、リシンおよび/もしくはヒスチジン；アラニン、グリシンおよび/もしくはセリン；ならびに/またはフェニルアラニン、トリプトファンおよび/もしくはチロシンを、本明細書では生体機能的等価物と定義する。

10

【0185】

より定量的な変更を果たすために、アミノ酸のハイドロパシー指数 (hydrophatic index) を考慮することができる。それぞれのアミノ酸は、それらの疎水性および/または荷電特性に基づいてハイドロパシー指数が割り当てられており、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)；グルタミン酸塩 (3.5)；グルタミン (3.5)；アスパラギン酸塩 (3.5)；アスパラギン (3.5)；リシン (3.9)；および/またはアルギニン (4.5) である。

20

【0186】

タンパク質に相互作用性生体機能を付与する前記ハイドロパシーアミノ酸指数の重要性は、当該技術分野において一般に理解されている (参照により本明細書に援用されている、Kyte & Doolittle, 1982)。一定のアミノ酸が、類似のハイドロパシー指数および/もしくはスコアを有する他のアミノ酸を置換し、尚、類似した生体活性を保持することができることは、公知である。ハイドロパシー指数に基づいて変更を行う場合、ハイドロパシー指数が ±2 の範囲内であるアミノ酸置換が好ましく、±1 の範囲内であるものが特に好ましく、および/または ±0.5 の範囲内であるものがさらにいっそう特に好ましい。

30

【0187】

同様のアミノ酸の置換を、特に、それによって作られる生体機能的等価のタンパク質および/またはペプチドが、本発明の一定の実施形態におけるような免疫学的実施形態における使用のためのものである場合、親水性に基づいて有効に行うことができることも当該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援用されている米国特許第 4, 554, 101号は、その隣接アミノ酸の親水性によって支配されるような、タンパク質の最大局所平均疎水性が、免疫原性および/または抗原性と、すなわちそのタンパク質の生物学的特性と相関すると述べている。

40

【0188】

米国特許第 4, 554, 101号に詳述されているように、以下の親水性値がアミノ酸残基に割り当てられている：アルギニン (+3.0)；リシン (+3.0)；アスパラギン酸塩 (+3.0 ± 1)；グルタミン酸塩 (+3.0 ± 1)；セリン (+0.3)；アス

50

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 ± 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) ; バリン (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) 。類似した親水性値に基づいて変更を行う場合、親水性値が ± 2 の範囲内であるアミノ酸置換が好ましく、± 1 の範囲内であるものが特に好ましく、および / または ± 0.5 の範囲内であるものがさらにいっそう特に好ましい。

#### 【0189】

##### B. 改変アミノ酸

多くの態様において、本発明は、適切なポリヌクレオチドの転写および翻訳による細胞内でのペプチドおよびポリペプチドの合成に基づく。これらのペプチドおよびポリペプチドは、20の「天然」アミノ酸、およびそれらの翻訳後修飾体を含むであろう。しかし、インビトロペプチド合成では、修飾および / または非通常アミノ酸を使用することができる。表1は、例示的であるが限定的でない、修飾および / または非通常アミノ酸を提供するものである。

10

#### 【0190】

##### C. ミメティック

上で論じた生体機能的等価物に加えて、本発明者らは、構造的に類似した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して調合することができるということも考えている。ペプチドミメティックと呼ぶことができる、そのような化合物は、本発明のペプチドと同じように使用することができ、従って、それらも機能的等価物である。

20

#### 【0191】

タンパク質二次および三次構造の要素を模倣する一定のミメティックが Johnson ら (1993) に記載されている。ペプチドミメティックの使用の背後の基本的な理論的根拠は、タンパク質のペプチド骨格が、抗体および / または抗原のものなどの分子の相互作用を助長するような方向でアミノ酸側鎖を配向させるように主として存在するという点である。従って、ペプチドミメティックは、天然分子に類似した分子間相互作用を可能にするように設計される。

#### 【0192】

ペプチドミメティックの概念の幾つかの成功した応用は、高抗原性であることがわかっているタンパク質内の ターンのミメティックに焦点をあてている。同様に、ポリペプチド内の ターンは、本明細書において論じるようなコンピュータベースのアルゴリズムによって予想することができる。前記ターンの成分アミノ酸が決定されたら、アミノ酸側鎖の必須要素の類似した空間的配向を達成するようにミメティックを構築することができる。

30

#### 【0193】

他のアプローチは、大きなタンパク質の結合部位を模倣する生体活性配座を生じさせるための魅力的な構造テンプレートとして多くのジスルフィドを含有する小さなタンパク質の使用に焦点をあてている。V i t a ら (1998) 。一定の毒素の中に進化的に保存されるようである構造モチーフは、小さく (30 ~ 40 アミノ酸) 、安定しており、および突然変異を大いに許容する。このモチーフは、3つのジスルフィド結合によって内部コア内で架橋しているベータシートとアルファヘリックスから成る。

40

#### 【0194】

ベータIIターンは、環状L - ペンタペプチドとD - アミノ酸を有するものを使用し、うまく模倣されている。W e i s s h o f f ら (1999) 。また、J o h a n n e s s o n ら (1999) は、逆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。

#### 【0195】

特定の構造を生じさせる方法が、当該技術分野において開示されている。例えば、アルファ - ヘリックスミメティックは、米国特許第 5, 446, 128 号 ; 同第 5, 710,

50

245号；同第5,840,833号；および同第5,859,184号に開示されている。これらの構造は、ペプチドまたはタンパク質をより熱安定性にし、タンパク質溶解性分解に対する耐性も増大させる。6、7、11、12、13および14員環構造が開示されている。

#### 【0196】

配座的に拘束されたベータ・ターンおよびベータバルジを生じさせる方法は、例えば、米国特許第5,440,013号；同第5,618,914号；および同第5,670,155号に記載されている。ベータ・ターンは、対応する骨格配座の変化を有することなく側鎖置換基変更を可能にし、および標準的な合成手順によってペプチドに組み込むための適切な末端を有する。ミメティックターンの他のタイプとしては、逆およびガンマターンが挙げられる。逆ターンミメティックは、米国特許第5,475,085号および同第5,929,237号に開示されており、ならびにガンマターンミメティックは、米国特許第5,672,681号および同第5,674,976号に記載されている。

10

#### 【0197】

##### VII. 免疫学的組成物

本発明の特定の実施形態では、免疫学的組成物を利用する。簡素のために、以下のセクションは、本明細書の他の箇所に単なる例示の実施形態として記載するものなどの、本発明の任意のE.chaffeensis VLP免疫学的組成物について述べることにする。例えば、前記組成物は、例えば、E.chaffeensis VLPポリペプチド、例えば配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号11、配列番号12、配列番号13、配列番号14もしくは配列番号15の一部もしくはすべてを含むもの、VLPポリヌクレオチド、例えば配列番号16の一部もしくはすべてを含むもの、本発明のポリペプチドもしくはペプチドに対する抗体、またはそれらの混合物、のすべてまたは一部を含むことがある。抗体を利用して抗原に結合することができ、それによって、例えば、その分子をその活性について少なくとも部分的無効にすることができる。他の実施形態では、抗原に対する抗体を、本発明の診断的態様において、例えば、サンプルからの抗原の存在を検出するために利用する。例示的サンプルは、E.canisもしくはE.chaffeensis感染症を有する疑いがある動物からのもの、E.canisもしくはE.chaffeensis感染症に罹患しやすい動物からのもの、またはE.canisもしくはE.chaffeensis感染症を有する動物からのものであり得る。例示的サンプルは、血液、血清、脳脊髄液、尿、糞便、頬の擦過標本、乳頭吸引液などから得ることができる。

20

30

#### 【0198】

精製された免疫反応性組成物または免疫反応性組成物の抗原性フラグメントは、当業者に公知の標準的なプロトコルを利用することにより新たな抗体を産生させるためにまたは既存の抗体を（例えば、診断アッセイにおいて陽性対照として）試験するために用いることができる。

#### 【0199】

当該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公知の免疫応答の非特異的刺激物質の使用によって強化することができる。例示的な好ましいアジュバントとしては、完全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)が挙げられる。

40

#### 【0200】

例えばウサギにおいて、免疫原として前記免疫反応性組成物または前記免疫反応性のフラグメントを使用することによって産生されたポリクローナル抗血清は、本発明に含まれる。当業者に公知のモノクローナルおよびポリクローナル抗体生産についての標準的なプロトコルを利用する。この手順によって産生されたモノクローナル抗体を、例えば、組換えEhrlichia cDNAを識別する能力およびそれらを公知のcDNAクローン

50

と区別する能力について、スクリーニングすることができる。

【0201】

本発明は、無損傷モノクローナル抗体ばかりでなく、免疫学的に活性な抗体フラグメント、例えば、Fabもしくは(Fab)<sub>2</sub>フラグメント；遺伝子操作された一本鎖scFv分子；またはキメラ分子、例えば、抗体（例えば、マウス由来のもの）と別の抗体（例えば、ヒト由来のもの）の残在部分との結合特異性を有する抗体も包含する。

【0202】

1つの実施形態において、前記抗体またはそのフラグメントは、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標識に連結させることができる。適する毒素の例としては、ジフテリア毒素、PseudomonasエンドトキシンA、リシン、およびコレラ毒素が挙げられる。適する酵素標識の例としては、リンゴ酸ヒドロゲナーゼ、ブドウ球菌のヌクレアーゼ、デルタ-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、アルファ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、ベータ-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などが挙げられる。適する放射性同位元素標識としては、<sup>3</sup>H、<sup>125</sup>I、<sup>131</sup>I、<sup>32</sup>P、<sup>35</sup>S、<sup>14</sup>Cなどが挙げられる。

10

【0203】

本発明の方法に従って、インビボ診断のために常磁性同位元素を使用することもできる。磁気共鳴イメージングにおいて有用である要素の非常に多数の例がある。インビボ核磁気イメージングに関する論考については、例えば、Schaeferら、(1989) JACC 14, 472-480；Shreveら、(1986) Magn. Reson. Med. 3, 336-340；Wolf, G. L., (1984) Physiol. Chem. Phys. Med. NMR 16, 93-95；Wesbyら、(1984) Physiol. Chem. Phys. Med. NMR 16, 145-155；Rungeら、(1984) Invest. Radiol. 19, 408-415を参照のこと。適する蛍光標識の例としては、フルオレセイン標識、イソチオシアレート(isothiocyanate)標識、ローダミン標識、フィコエリトリン標識、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(optaldehyde)、フルオレサミン標識などが挙げられる。化学発光標識の例としては、ルミナル標識、イソルミナル標識、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、エクオリン標識などが挙げられる。

20

30

【0204】

当業者は、本発明に従って利用することができるこれらのおよび他の適する標識を知っているであろう。これらの標識の抗体またはそのフラグメントへの結合は、通常の当業者に一般に知られている標準的な技術を用いて遂行することができる。代表的な技術は、Kennedyら、(1976) Clin. Chim. Acta 70, 1-31；およびSchursら、(1977) Clin. Chim. Acta 81, 1-40によって説明されている。後のものの中で述べられてい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。これらの方法のすべてが参照により本明細書に援用されている。

40

【0205】

D. 抗体

本発明の一定の態様では、発現されたVLPVに対する1つ以上の抗体を生産することができる。これらの抗体は、本明細書に記載する様々な診断および/または治療用途において使用することができる。

【0206】

50

本明細書において用いる場合、用語「抗体」は、任意の免疫結合物質、例えば、I g G、I g M、I g A、I g DおよびI g Eを広く指すと解釈する。一般に、I g Gおよび/またはI g Mは、生理環境において最も一般的な抗体であるため、および実験室設定で最も容易に作られるため、好ましい。

【0207】

用語「抗体」は、抗原結合領域を有し、且つ、抗体フラグメント、例えばF a b'、F a b、F ( a b' )<sup>2</sup>、単一領域抗体 ( D A B )、F v、s c F v ( 1本鎖F v )およびこれらに類するもの、を含む、任意の抗体様分子を指すために用いている。様々な抗体系構築物およびフラグメントを調製および使用するための技術は、当該技術分野において周知である。抗体を調製および特性づけするための手段も当該技術分野において周知である ( 10

(例えば、Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988を参照のこと;これは、参照により本明細書に援用されている)。

【0208】

「ミニ・ボディー」または「ミニボディー」も、本発明と共に使用することが考えられる。ミニボディーは、ヒンジ領域によってs F vから隔てられたオリゴマー化ドメインをそれらのC末端に含むs F vポリペプチド鎖である。Packら(1992) Biochem 31:1579-1584。前記オリゴマー化ドメインは、追加のジスルフィド結合によってさらに安定化され得る自己会合 - ヘリックス、例えばロイシンジッパー、を含む。前記オリゴマー化ドメインは、膜内外にわたる指向性フォールディング ( v e c t o r i a l f o l d i n g )、ポリペプチドの機能性結合タンパク質へのインビボフォールディングを助長すると考えられるプロセス、と適合性であるように設計される。一般に、ミニボディーは、当該技術分野において周知の組換え法を用いて生産される。例えば、Packら(1992) Biochem 31:1579-1584; Cumberら(1992) J Immunology 149B:120-126を参照のこと。 20

【0209】

抗体様結合ペプチドミメティックも本発明において考えられる。LiuらCell Mol Biol (Noisy-le-grand), 2003 Mar; 49(2):209-16は、「抗体様結合ペプチドミメティック」(A B i P s)を記載しており、これらは、切り詰められた ( p a r e d - d o w n ) 抗体として作用し、ならびにより長い血清半減期および然程煩わしくない合成方法という一定の利点を有するペプチドである。 30

【0210】

モノクローナル抗体 ( M a b ) は、一定の利点、例えば再生能および大規模生産を有するとみなされており、それらの使用は一般に好ましい。従って、本発明は、ヒト、マウス、サル、ラット、ハムスター、ウサギ、およびニワトリまでもに由来するモノクローナル抗体を提供する。試薬の調製の簡単さおよび入手しやすさのため、マウスモノクローナルが好ましいことが多いであろう。

【0211】

しかし、「ヒト化」抗体も考えられ、ヒト定常および/または可変領域ドメイン、二重特異性抗体、組換えおよび遺伝子操作された抗体ならびにそれらのフラグメントを保有する、マウス、ラットまたは他の種からのキメラ抗体も考えられる。本明細書において用いる場合、用語「ヒト化」免疫グロブリンは、ヒトフレームワーク領域と非ヒト ( 通常はマウスまたはラット ) 免疫グロブリンからの1つ以上のC D R とを含む免疫グロブリンを指す。C D R 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、ヒト化軽鎖およびヒト化重鎖免疫グロブリンを含む抗体である。 40

【0212】

E. モノクローナル抗体の例示的産生方法

モノクローナル抗体 ( M A b ) の例示的産生方法は、一般に、ポリクローナル抗体を調製するためのものと同じ線に沿って開始する。簡単に言うと、ポリクローナル抗体は、本 50

発明の L E E または C E E 抗体で動物を免疫し、その免疫された動物から抗血清を回収することによって調製される。

【0213】

広汎な動物種を抗血清の生産に使用することができる。概して、抗血清の生産に使用される動物は、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。動物の選択は、当業者に公知であるように、操作の容易さ、費用または所望される血清量に基づいて決めることができる。本発明の抗体は、対象となる免疫グロブリン重および軽鎖配列についてトランスジェニックである哺乳動物または植物の産生、およびそれらから回収可能な形態での抗体の生産によって、トランスジェニック生産することもできる。哺乳動物における前記トランスジェニック生産に関連して、抗体をヤギ、ウシまたは他の哺乳動物のミルクにおいて生産し、それらから回収することができる。例えば、米国特許第 5, 827, 690 号、同第 5, 756, 687 号、同第 5, 750, 172 号および同第 5, 741, 957 号を参照のこと。

10

【0214】

同じく当該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公知の、免疫応答の非特異的刺激物質の使用によって強化することができる。適するアジュバントは、すべての許容可能な免疫刺激化合物、例えば、サイトカイン、ケモカイン、補因子、毒素、形質胞体、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 L E E もしくは C E E を含む。

【0215】

使用することができるアジュバントとしては、I L - 1、I L - 2、I L - 4、I L - 7、I L - 12、 $\gamma$ -インターフェロン、G M C S P、B C G、水酸化アルミニウム、M D P 化合物、例えば t h u r - M D P および n o r - M D P、C G P ( M T P - P E )、脂質 A、ならびにモノホスホリル脂質 A ( M P L ) が挙げられる。2%スクアレン/T w e e n 80 エマルジョン中の、細菌から抽出された3成分、M P L、トレハロースジミコラート ( T D M ) および細胞壁骨格 ( C W S )、を含有する R I B I も考えられる。M H C 抗原を使用することさえできる。好ましいことが多い例示的アジュバントとしては、完全フロイントアジュバント ( 死菌 M y c o b a c t e r i u m t u b e r c u l o s i s を含有する免疫応答の非特異的刺激物質 )、不完全フロイント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挙げられる。

20

30

【0216】

アジュバントに加えて、T細胞免疫性をアップレギュレートするまたはサプレッサー細胞活性をダウンレギュレートする、生体応答調節剤 ( B R M ) を共同投与することが望ましい場合がある。そのような B R M としては、シメチジン ( C I M ; 1200 mg / d ) ( S m i t h / K l i n e , P A ) ; 低用量シクロホスファミド ( C Y P ; 300 mg / m<sup>2</sup> ) ( J o h n s o n / M e a d , N J )、サイトカイン、例えば  $\gamma$ -インターフェロン、I L - 2 もしくは I L - 12、または免疫ヘルパー機能に關与するタンパク質をコードする遺伝子、例えば B - 7 が挙げられるが、これらに限定されない。

【0217】

ポリクローナル抗体の生産において使用される免疫原組成物の量は、その免疫原の性質ならびに免疫処置に使用される動物によって変わる。皮下、筋肉内、経皮、表皮内、静脈内および腹腔内経路をはじめとする様々な経路を、免疫原を投与するために使用することができる。ポリクローナル抗体の生産は、免疫した動物の血液をその免疫処置後の様々な時点で採取することによってモニターすることができる。

40

【0218】

( 例えば、注射で施される ) 第二のブースター量を与えてもよい。適する力価を獲得するまで、追加免疫および力価測定のプロセスを繰り返す。所望の免疫原性レベルが得られたら、免疫した動物から採血し、血清を単離して保存する、および/またはその動物を使用して M A b を産生させる。

【0219】

50

ウサギポリクローナル抗体の生産については、耳静脈を通して、または代替として心臓穿刺によって、その動物から採血することができる。除去した血液を放置して凝血させ、その後、遠心分離して血清成分を全血および血餅から分離する。その血清を様々な用途にそのまま使用することができ、でなければ所望の抗体画分を、周知の方法、例えば、別の抗体、固体マトリックスに結合したペプチドを使用するアフィニティークロマトグラフィーによって、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を使用することによって、精製することができる。

#### 【0220】

MAbは、周知の技術、例えば、参照により本明細書に援用されている米国特許第4,196,265号に例示されているものの使用により、容易に調製することができる。概して、この技術は、野生型または突然変異組成物である、選択された免疫原組成物、例えば、精製または軽度精製タンパク質、ポリペプチド、ペプチドまたはドメインでの適する動物の免疫処置を含む。免疫組成物は、抗体生産細胞を刺激するために有効な様式で投与する。

10

#### 【0221】

モノクローナル抗体(MAb)の産生方法は、一般に、ポリクローナル抗体を調製するためのものと同じ線に沿って開始する。マウスおよびラットなどの齧歯動物が好ましい動物であるが、ウサギ、ヒツジまたはカエル細胞の使用も可能である。ラットの使用は、一定の利点をもたらすことができるが(Godding, 1986, pp. 60-61)、マウスが好ましく、BALB/cマウスは最も日常的に使用されているので、および一般により高い安定融合百分率を与えるので、最も好ましい。

20

#### 【0222】

それらの動物に、一般に上で説明したように、抗原を注射する。この抗原をアジュバント、例えばフロイント完全または不完全アジュバントと混合してもよい。同じ抗原またはその抗原をコードするDNAでのブースター投与を約2週間間隔で行うこととなる。

#### 【0223】

免疫処置後、抗体を生産する可能性のある体細胞、特にBリンパ球(B細胞)、をMAb産生プロトコルでの使用のために選択する。これらの細胞は、生検によって得た脾臓、扁桃もしくはリンパ節から、または末梢血サンプルから得ることができる。脾臓細胞および末梢血細胞が好ましい。前者は分裂形質芽球段階にある抗体生産細胞の豊富な源であるからであり、後者は末梢血を容易に入手できるからである。

30

#### 【0224】

多くの場合、動物パネルが免疫されており、最高抗体力価を有する動物の脾臓が除去され、その脾臓を注射器で均質化することによってその脾臓のリンパ球が得られるであろう。概して、免疫されたマウスからの脾臓は、約 $5 \times 10^7$ から $2 \times 10^8$ のリンパ球を含有する。

#### 【0225】

その後、その免疫された動物からの抗体生産性B細胞リンパ球を、不死骨髄腫細胞、一般にその免疫された動物と同じ種のもの、と融合させる。ハイブリドーマ生産性融合手順での使用に適する骨髄腫細胞系は、非抗体生産性であり、高い融合効率および酵素欠乏を有し、この酵素欠乏が、所望の融合細胞(ハイブリドーマ)のみの成長を支持する一定の選択培地においてそれらを成長できなくする。

40

#### 【0226】

当業者に公知であるように、多数の骨髄腫細胞のうちの任意のものを使用することができる(Godding, pp. 65-66, 1986; Campbell, pp. 75-83, 1984)。特記する)。例えば、免疫された動物がマウスである場合、P3X63/Ag8、X63Ag8.653、NS1/1.Ag41、Sp210Ag14、FO、NSO/U、MPC11、MPC11X45GTG1.7およびS194/5XX0Bu1を使用することができ；ラットについては、R210.RCY3、Y3Ag1.2.3、IR983Fおよび4B210を使用することができ；なら

50

びに、ヒト細胞融合に関連して、U 266、GM1500 GRG2、LICR LON HMy2およびUC729 6は、すべて有用である。骨髓腫瘍現系の論考については、Yooら, *J Immunol Methods*, 2002 Mar 1; 261(1-2): 1-20を参照のこと。

【0227】

1つの好ましいマウス骨髓腫細胞は、NS-1骨髓腫細胞系(P3-NS-1-Ag4-1とも呼ばれる)であり、これは、細胞系レポジトリ番号GM3573によってNIGMS Human Genetic Mutant Cell Repositoryから容易に入手することができる。使用することができるもう1つのマウス骨髓腫細胞系は、8アザグアニン耐性マウス・マウス骨髓腫SP2/0非プロデューサー細胞系である。

10

【0228】

抗体生産性脾臓またはリンパ節細胞と骨髓腫細胞のハイブリッドの産生方法は、通常、体細胞と骨髓腫細胞を2:1の割合で混合することを含むが、この割合は、細胞膜の融合を促進する(化学的または電氣的)作用因子(単数または複数)の存在下で、それぞれ約20:1から約1:1まで変動し得る。センダイウイルスを使用する融合方法が、Kohler and Milstein(1975; 1976)によって記載されており、ポリエチレングリコール(PEG)、例えば37%(v/v)PEG、を使用するものが、Geftera, (1977)によって記載されている。融合を電氣的に誘導する方法の使用も適する(Goding pp. 71-74, 1986)。

【0229】

融合手順は、通常、低頻度、約 $1 \times 10^{-6}$ から $1 \times 10^{-8}$ 、で生存可能ハイブリッドを生産する。しかし、これは、問題を提起しない。それらの生存可能な融合ハイブリッドは、選択培地での培養により、親非融合細胞(特に、通常は無限に分裂し続けるであろう非融合骨髓腫細胞)から分化されるからである。前記選択培地は、一般に、組織培養基におけるヌクレオチドのデノボ合成を阻止する薬剤を含有するものである。例示的な好ましい薬剤は、アミノプテリン、メトトレキサート、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サートは、プリンとピリミジンの両方のデノボ合成を阻止するが、アザセリンは、プリン合成のみを阻止する。アミノプテリンまたはメトトレキサートを使用する場合、その培地にヒポキサンチンおよびチミジンをヌクレオチド源として補足する(HAT培地)。アザセリンを使用する場合、その培地にヒポキサンチンを補足する。

20

30

【0230】

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作動させることができる細胞のみが、HAT培地において生き残ることができる。骨髓腫細胞には、前記サルベージ経路の重要な酵素、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(HPR T)が欠けており、それらは生き残ることができない。B細胞は、この経路を作動させることができるが、培養では限られた寿命しか有さず、一般に約2週間以内に死滅する。従って、前記選択培地において生き残ることができる唯一の細胞は、骨髓腫細胞とB細胞から成るハイブリッドである。

【0231】

この培養は、特定のハイブリドーマが選択されるハイブリドーマ集団を生じさせる。概して、ハイブリドーマの選択は、マイクロタイタープレートでの単一クローン希釈による細胞の培養、その後の(約2から3週間後の)個々のクローン上清の所望の活性についての試験によって行われる。このアッセイは、選択的で、単純で、迅速でなければならず、例えば、ラジオイムノアッセイ、エンザイムイムノアッセイ、細胞傷害性アッセイ、ブランクアッセイ、ドット免疫結合アッセイ、およびこれらに類するものでなければならない。

40

【0232】

その後、選択されたハイブリドーマを系列希釈し、個々の抗体生産細胞系にクローニングし、その後、それらのクローンを無限増殖させてMAbを得ることができる。前記細胞系は、2つの基本的な方法でMAb生産に活用することができる。第一に、前記ハイブリ

50

ドーマのサンプルを、原融合のための体細胞および骨髓腫細胞を生じさせるために用いたタイプの組織適合性動物（例えば、同系マウス）に（多くの場合、腹腔に）注射する。場合により、それらの動物を、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）などの油でプライミングする。注射した動物は腫瘍を発現し、それらの腫瘍が融合細胞ハイブリッドによって生産された特異的モノクローナル抗体分泌する。その後、前記動物の体液、例えば血清または腹水液を穿刺して、高濃度のM A bを得ることができる。第二に、個々の細胞系をインビトロで培養し、この場合、M A bは培養基に自然に分泌され、そこからそれらを高濃度で容易に得ることができる。

#### 【0233】

さらに、生産細胞系からの本発明の抗体（またはそれからの他の部分）の発現を、多数の公知の技術を用いて増進させることができる。例えば、グルタミンシンターゼおよびD H F R 遺伝子発現系は、一定の条件下で発現を増進するための一般的なアプローチである。制限希釈クローニングおよびマイクロドロップ技術などの従来技術を用いて、細胞クローンの高度な発現を同定することができる。G S系は、欧州特許番号第0 2 1 6 8 4 6号、同第0 2 5 6 0 5 5号、および同第0 3 2 3 9 9 7号ならびに欧州特許出願第8 9 3 0 3 9 6 4 . 4号に関連して、全部または一部、論じられている。

10

#### 【0234】

いずれかの方法によって生産されたM A bを、所望される場合には、濾過、遠心分離および様々なクロマトグラフ法、例えばH P L Cまたはアフィニティークロマトグラフィーを用いて、さらに精製することができる。本発明のモノクローナル抗体のフラグメントは、ペプシンもしくはパepsinなどの酵素での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、そのように生産されたモノクローナル抗体から得ることができる。あるいは、本発明に包含されるモノクローナル抗体フラグメントは、自動ペプチド合成装置を使用して合成することができる。

20

#### 【0235】

分子クローニングアプローチを用いてモノクローナルを産生させることも考えられる。一つの実施形態では、コンビナトリアル免疫グロブリン・ファージミド・ライブラリを、免疫された動物の脾臓から単離されたR N Aから調製し、抗原を発現する細胞および対照細胞を使用して、パンニングにより、適切な抗体を発現するファージミドを選択する。従来ハイブリドーマ技術に勝るこのアプローチの利点は、1ラウンドでおよそ $10^4$ 倍の多さの細胞を生産してスクリーニングすることができる点、ならびに適切な抗体を見つける機会をさらに増す、H鎖とL鎖の組み合わせによって新たな特異性を生じさせる点である。もう一つの例では、L E EまたはC E Eを使用して、無細胞系で抗原をインビトロ生産することができる。これらは、1本鎖抗体ライブラリをスクリーニングするためのターゲットとして使用することができる。これによって、動物を使用せずに多くの異なる抗体を非常に迅速に同定することができる。

30

#### 【0236】

本発明の抗体の生産についての本発明のもう一つの実施形態は、米国特許第6, 091, 001号において見つけることができ、この特許には、C r e 媒介部位特異的組換えを用いて、修飾免疫グロブリン遺伝子座を含む細胞のゲノム配列から抗体を発現する細胞を生産する方法が記載され、開示されている。前記方法は、相同ターゲティングベクターでの抗体生産細胞のトランスフェクションを先ず含み、前記ベクターは、1 o x 部位と、修飾された領域に変換されることとなるそのゲノム配列の免疫グロブリン遺伝子座の領域に隣接する第一のD N A 配列に相同なターゲティング配列とを含み、そのため前記第一1 o x 部位は、部位特異的相同組換えによって前記ゲノム配列に挿入される。次に、その細胞を、組み込まれている1 o x 部位とのC r e 媒介組換えに適する第二の1 o x 部位と、免疫グロブリン遺伝子座を修飾領域に変換するための修飾配列とを含む1 o x ターゲティングベクターでトランスフェクトする。この変換は、インビボでそれらの1 o x 部位とC r e との相互作用によって行われるので、それらの1 o x 部位のC r e 媒介部位特異的組換えによって前記修飾配列が前記ゲノム配列に挿入される。

40

50

## 【0237】

あるいは、自動ペプチド合成装置を使用して、またはE. coliにおける完全長遺伝子もしくは遺伝子フラグメントの発現によって、本発明に包含されるモノクローナル抗体フラグメントを合成することができる。

## 【0238】

## F. 抗体コンジュゲート

本発明は、少なくとも1つの作用因子に連結して抗体コンジュゲートを形成する、一般にモノクローナルタイプの、VLP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。診断または治療薬としての抗体分子の効力を増加させるために、少なくとも1つの所望の分子または部分と連結するまたは共有結合するまたは複合体を形成することは通常のことである。そのような分子または部分は、少なくとも1つのエフェクターまたはレポーター分子であり得るが、これらに限定されない。エフェクター分子は、所望の活性、例えば細胞傷害活性を有する分子を含む。抗体に連結されるエフェクター分子の非限定的な例としては、毒素、抗腫瘍薬、治療用酵素、放射性標識ヌクレオチド、抗ウイルス薬、キレート剤、サイトカイン、成長因子、およびオリゴ-またはポリ-ヌクレオチドが挙げられる。対照してみると、レポーター分子は、アッセイを用いて検出することができる任意の部分と定義される。抗体にコンジュゲートされたレポーター分子の非限定的な例としては、酵素、放射性標識、ハプテン、蛍光標識、リン光分子、化学発光分子、発色団、発行分子、フォトアフィニティー分子、着色粒子またはリガンド、例えばビオチンが挙げられる。

10

20

## 【0239】

十分な選択性、特異性または親和性の任意の抗体を抗体コンジュゲートのための基剤として利用することができる。そのような特性を、当業者に公知の従来の免疫学的スクリーニング方法論を用いて評価することができる。抗体分子における生体活性分子に結合するための部位としては、標準抗原結合部位に加えて、病原体、B細胞、スーパー抗原、T細胞補助受容体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(Sassora, 1989; Shorkira, 1991; Silvermannら, 1995; Clearyら, 1994; Lenertra, 1990; Berberianら, 1993; Kreierら, 1991)が挙げられる。加えて、前記可変ドメインは、抗体自己結合に関与し(Kangら, 1988)、および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ら, 1989)。

30

## 【0240】

抗体コンジュゲートの一定の例は、検出可能な標識に抗体が連結されているコンジュゲートである。「検出可能な標識」は、それらの特異的機能特性および/または化学的特徴のため検出することができる化合物および/または元素であり、それらの使用によって、それが連結している抗体を検出することができ、および/または、所望される場合には、さらに定量することができる。もう1つのそのような例は、細胞傷害剤または抗細胞剤(anti-cellular agent)に連結された抗体を含む、および「免疫毒素」と呼ばれることがある、コンジュゲートの形成である。

40

## 【0241】

抗体コンジュゲートは、一般に、診断薬としての使用に好まれる。抗体診断薬は、一般に2つのクラス、インビトロ診断において、例えば様々なイムノアッセイにおいて、用いるためのもの、および/または「抗体特異的イメージング(antibody directed imaging)」として一般に公知のインビボ診断プロトコルにおいて用いるためのもの、に分類される。

## 【0242】

多くの適切なイメージング剤が当該技術分野において公知であり、抗体にそれらを連結させる方法も公知である(例えば、米国特許第5,021,236号、同第4,938,948号、および同第4,472,509号を参照のこと;これらはそれぞれ参照により本明細書に援用されている)。使用されるイメージング部分は、常磁性イオン;放射性同

50

位元素；蛍光色素；NMR検出可能物質；X線イメージング剤であり得る。

【0243】

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)などのイオンを挙げる事ができ、ガドリニウムが特に好ましい。X線イメージングなどの他のものに関連して有用なイオンとしては、ランタン(III)、金(III)、鉛(II)、および特にビスマス(III)が挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0244】

治療および/または診断用途のための放射性同位元素の場合、アスタチン<sup>211</sup>、<sup>14</sup>炭素、<sup>51</sup>クロム、<sup>36</sup>塩素、<sup>57</sup>コバルト、<sup>58</sup>コバルト、銅<sup>67</sup>、<sup>152</sup>Eu、ガリウム<sup>67</sup>、<sup>3</sup>水素、ヨウ素<sup>123</sup>、ヨウ素<sup>125</sup>、ヨウ素<sup>131</sup>、インジウム<sup>111</sup>、<sup>9</sup>鉄、<sup>32</sup>リン、レニウム<sup>186</sup>、レニウム<sup>188</sup>、<sup>75</sup>セレン、<sup>35</sup>硫黄、テクネチウム<sup>99m</sup>(technetium<sup>99m</sup>)および/またはイットリウム<sup>90</sup>を挙げることができよう。<sup>125</sup>Iは、一定の実施形態では、使用に好ましいことが多く、ならびに長期検出のためにテクネチウム<sup>99m</sup>(technetium<sup>99m</sup>)および/またはインジウム<sup>111</sup>も、それらの低エネルギーおよび安定性ため、好ましいことが多い。本発明の放射性標識モノクローナル抗体は、当該技術分野において周知の方法に従って生産することができる。例えば、モノクローナル抗体は、ヨウ化ナトリウムおよび/もしくはカリウムならびに次亜塩素酸ナトリウムなどの化学的酸化剤、またはラクトペルオキシダーゼなどの酵素的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。本発明のモノクローナル抗体は、配位子交換プロセスによって、例えば、第一スズ溶液で過テクネチウム酸塩を還元し、その還元されたテクネチウムをSephadexカラムでキレートさせ、このカラムに抗体を適用することによって、標識することができる。あるいは、例えば、過テクネチウム酸塩と、SnCl<sub>2</sub>などの還元剤と、フタル酸ナトリウム-カリウム溶液などの緩衝溶液と、抗体とをインキュベートすることによる、直接標識技術を用いることができる。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使用されることが多い介在官能基は、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。

20

30

【0245】

コンジュゲートとしての使用が考えられる蛍光標識には、Alexa 350、Alexa 430、AMCA、BODIPY 630/650、BODIPY 650/665、BODIPY-FL、BODIPY-R6G、BODIPY-TMR、BODIPY-TRX、Cascade Blue、Cy3、Cy5,6-FAM、フルオレセインイソチオシアナート、HEX、6-JOE、Oregon Green 488、Oregon Green 500、Oregon Green 514、Pacific Blue、REG、Rhodamine Green、Rhodamine Red、Renografin、ROX、TAMRA、TET、テトラメチルローダミン、および/またはTexas Redが挙げられる。

40

【0246】

本発明において考えられるもう一つのタイプの抗体コンジュゲートは、主としてインビトロで使用するためのものであり、この場合、抗体を、第二の結合リガンドに、および/または色素産生物質と接触させると着色生成物を生成するであろう酵素に連結させる。適する酵素の例としては、ウレアーゼ、アルカリホスファターゼ、(ホースラディッシュ)過酸化水素分解酵素またはグルコースオキシダーゼが挙げられる。好ましい第二の結合リガンドは、ビオチンおよび/またはアビジンならびにストレプトアビジン化合物である。そのような標識の使用は、当業者に周知であり、例えば、米国特許第3,817,837号、同第3,850,752号、同第3,939,350号、同第3,996,345号、

50

同第4, 277, 437号、同第4, 275, 149号および同第4, 366, 241号（それぞれが参照により本明細書に援用されている）に記載されている。

【0247】

抗体に分子を部位特異的に連結させるさらにもう1つの公知方法は、抗体とハプテン系アフィニティー標識との反応を含む。本質的に、ハプテン系アフィニティー標識は、抗原結合部位内のアミノ酸と反応し、その結果、この部位を破壊し、特異的抗原反応を阻止する。しかし、これは抗体コンジュゲートによる抗原結合を失う結果となるので、有利ではないことがある。

【0248】

アゾ基を含有する分子を使用して、低強度紫外線により生成される反応性ニトレン中間体によってタンパク質への共有結合を形成することもできる（Potter & Haley, 1983）。特に、プリンヌクレオチドの2-および8-アゾ類似体は、培養細胞抽出物中のヌクレオチド結合タンパク質を同定するために部位特異的フォトプローブとして使用されている（Owens & Haley, 1987; Athertonら, 1985）。2-および8-ヌクレオチドは、精製タンパク質のヌクレオチド結合ドメインのマッピングにも使用されており（Khatoonら, 1989; Kingら, 1989; およびDholakiaら, 1989）、および抗体結合剤として使用することができる。

10

【0249】

抗体のそのコンジュゲート部分への連結またはコンジュゲーションのための幾つかの方法が当該技術分野において公知である。一部の連結方法は、例えば、抗体に連結させた有機キレート剤、例えばジエチレントリアミン五酢酸（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-3-6-ジフェニルグリコウリル-3（tetrachloro-3-6-diphenylglycouril-3）、を利用する金属キレート錯体の使用を含む（米国特許第4, 472, 509号および同第4, 938, 948号。それぞれが参照により本明細書に援用されている）。グルタルアルデヒドまたは過ヨウ素酸塩などのカップリング剤の存在下で、モノクローナル抗体を酵素と反応させることもできる。フルオレセインマーカートのコンジュゲートは、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ナートとの反応によって調製される。米国特許第4, 938, 948号では、モノクローナル抗体を使用して乳癌のイメージングを達成し、メチル-p-ヒドロキシベンズイミダートまたはN-スクシンイミジル-3-(4-ヒドロキシフェニル)プロピオナートなどのリンカーを使用して検出可能なイメージング部分を抗体に結合させている。

20

30

【0250】

他の実施形態では、抗体結合部位を改変しない反応条件を用いて、免疫グロブリンのFc領域内にスルフヒドリル基の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考えられる。この方法論に従って生産される抗体コンジュゲートが、向上した寿命、特異性および選択性を示すことは開示されている（参照により本明細書に援用されている、米国特許第5, 196, 066号）。エフェクターまたはレポーター分子（該レポーターまたはエフェクター分子は、Fc領域内の炭水化物残基にコンジュゲートしている）の部位特異的連結も文献に開示されている（O'Shannessyら, 1987）。このアプローチは、診断および治療に有望な抗体を生産すると報告されており、これらの抗体は、現在、臨床評価中である。

40

【0251】

本発明のもう1つの実施形態では、抗gp36抗体を半導体ナノ結晶、例えば、米国特許第6, 048, 616号、同第5, 990, 479号、同第5, 690, 807号、同第5, 505, 928号、同第5, 262, 357号（これらのすべては、それら全体が本明細書に援用されている）；ならびにPCT公開第99/26299号（1999年5月27日発行）に記載されているもの、に連結させる。詳細には、本発明の生物学的および化学的アッセイにおいて半導体ナノ結晶として使用するための例示的材料としては、I

50

I - V I 族、I I I - V 族およびI V 族半導体、例えばZ n S、Z n S e、Z n T e、C d S、C d S e、C d T e、M g S、M g S e、M g T e、C a S、C a S e、C a T e、S r S、S r S e、S r T e、B a S、B a S e、B a T e、G a N、G a P、G a A s、G a S b、I n P、I n A s、I n S b、A l S、A l P、A l S b、P b S、P b S e、G e およびS i ならびにこれらの三元および四元混合物をはじめとする、上で説明したものが挙げられるが、それらに限定されない。抗体に半導体ナノ結晶を連結させるための方法は、米国特許第6,630,307号および同第6,274,323号に記載されている。

#### 【0252】

##### G. 免疫検出法

尚、さらなる実施形態において、本発明は、免疫反応性ポリペプチドなどの生体化合物を結合させる、精製する、除去する、定量するおよび/または別様に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/または突然変異タンパク質、ポリペプチドおよび/またはペプチドを検出するために利用することができる。野生型および/または突然変異抗体の使用が考えられる。一部の免疫検出法としては、幾つか挙げると、酵素結合イムノソルベントアッセイ(ELISA)、ラジオイムノアッセイ(RIA)、イムノラジオメトリックアッセイ、フルオロイムノアッセイ、化学発光アッセイ、生物発光アッセイ、およびウエスタンブロットを挙げられる。様々な有用な免疫検出法の工程が、例えば、Doolittle MH and Ben-Zeev O, 1999; Gulbis B and Galand P, 1993; De Jager Rら, 1993; およびNakamuraら, 1987(それぞれが参照により本明細書に援用されている)などの科学文献に記載されている。

#### 【0253】

一般に、免疫結合法は、タンパク質、ポリペプチドおよび/またはペプチドを含む疑いがあるサンプルを得ること、およびそのサンプルを、本発明に従って、場合によっては、免疫複合体の形成を可能にすることに有効な条件下で、一次抗gp19抗体と接触させることを含む。

#### 【0254】

これらの方法は、親サンプルからの野生型および/もしくは突然変異タンパク質、ポリペプチドおよび/もしくはペプチドの精製に利用することができるような野生型および/もしくは突然変異タンパク質、ポリペプチドおよび/もしくはペプチドの精製方法、ならびに/または組換え発現された野生型および/もしくは突然変異タンパク質、ポリペプチドおよび/もしくはペプチドの精製方法を含む。これらの場合、抗体が、サンプルから抗原性野生型および/または突然変異タンパク質、ポリペプチドおよび/またはペプチド成分を除去する。前記抗体を、好ましくは、固体支持体、例えばカラムマトリックスの形態のもの、に連結させることとなり、野生型または突然変異タンパク質抗原性成分を含有する疑いがあるサンプルを、その固定された抗体に適用することとなる。カラムから望ましくない成分を洗い流して、その固定された抗体と免疫複合体を形成している抗原を遊離させることとなり、その後、そのカラムから野生型または突然変異タンパク質および/またはペプチドを除去することによって、野生型または突然変異タンパク質抗原を回収する。

#### 【0255】

前記免疫結合法は、サンプル中の成分と反応性である野生型または突然変異タンパク質の量の検出および定量方法、ならびにその結合プロセス中に形成される任意の免疫複合体の検出および定量方法も含む。ここでは、E. canis生物を含む疑いがある野生型または突然変異タンパク質および/またはペプチドを含むと予測されるサンプルを得、そのサンプルを野生多型または突然変異体に対する抗体と接触させ、その後、特定の条件下で形成された免疫複合体の量を検出し、定量することとなる。

#### 【0256】

抗原検出に関して、分析する生体サンプルは、野生型または突然変異タンパク質特異的

10

20

30

40

50

抗原を含有する疑いがある任意のサンプル、例えば、検体、均質化組織抽出物、細胞、上記いずれかの野生型もしくは突然変異タンパク質含有組成物の分離および/もしくは精製された形態であり得、または感染すると *E. canis* 生物に接触する任意の生体液でさえあり得る。

【0257】

抗体と選択されたサンプルとの、免疫複合体（一次免疫複合体）の形成を可能にするために有効な条件下でのおよび十分な期間にわたっての接触は、一般に、単に、抗体組成物のサンプルへの添加、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形成を形成する、すなわち結合する、ために十分な長さの期間にわたってのその混合物のインキュベーションの問題である。この時間の後、サンプル-抗体組成物、例えば、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を、一般に、洗浄して任意の非特異的結合抗体種を除去することとなり、それによって、一次免疫複合体中の特異的に結合した抗体のみを検出することができる。

10

【0258】

一般に、免疫複合体形成の検出は、当該技術分野において周知であり、および非常に多くのアプローチの適用によって達成することができる。これらの方法は、標識またはマーカー、例えばそれらの放射性、蛍光、生物学的および酵素的タグのいずれか、の検出に、一般に基づく。そのような標識の使用に関する米国特許としては、3,817,837; 3,850,752; 3,939,350; 3,996,345; 4,277,437; 4,275,149および4,366,241が挙げられ、これらのそれぞれが参照により本明細書に援用されている。勿論、当該技術分野において公知であるように、第二の結合リガンド、例えば第二の抗体および/またはビオチン/アビジンリガンド結合配列、の使用によって追加の利点を見出すことができる。

20

【0259】

検出に利用される抗体は、それ自体、検出可能な標識に連結されていることがあり、この場合には、このラベルを簡単に検出することができ、それによって、その組成物中の一次免疫複合体の量を検出することができる。あるいは、一次免疫複合体の中の結合することとなる第一の抗体を、その抗体に対して結合親和性を有する第二の結合リガンドによって検出することができる。これらの場合、前記第二の結合リガンドが、検出可能な標識に連結されていることがある。前記第二の結合リガンドは、それ自体、抗体であることが多く、それ故、それらは「二次」抗体を呼ぶことができる。前記一次免疫複合体と標識された二次結合リガンド、または抗体、とを、二次免疫複合体の形成を可能にするために有効な条件下でおよび十分な期間にわたって接触させる。その後、その二次免疫複合体を洗浄して任意の非特異的に結合した標識二次抗体またはリガンドを除去し、その後、その二次免疫複合体中の残存標識を検出する。

30

【0260】

さらなる方法としては、二工程アプローチによる一次免疫複合体の検出が挙げられる。抗体に対して結合親和性を有する、抗体などの、第二の結合リガンドを使用して、上で説明したような二次免疫複合体を形成する。洗浄後、その二次免疫複合体と、第二の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とを、再び免疫複合体（三次免疫複合体）の形成を可能にするために有効な条件下で十分な期間にわたって接触させる。前記第三のリガンドまたは抗体は、検出可能な標識に連結されているので、このようにして形成された三次免疫複合体を検出することができる。この系は、シグナル増幅に、これが望まれる場合には、備えることができる。

40

【0261】

1つの免疫検出法は、2つの異なる抗体を使用する。第一工程、ビオチニル化したモノクローナルまたはポリクローナル抗体を使用してターゲット抗原（単数または複数）を検出し、その後、第二工程、その複合体化されたビオチンに連結しているビオチンを、抗体を使用して検出する。その方法では、試験するサンプルを、先ず、第一工程抗体を含有する溶液中でインキュベートする。ターゲット抗原が存在する場合、抗体の一部がその抗原

50

に結合して、ビオチニル化抗体 / 抗原複合体を形成する。その後、その抗体 / 抗原複合体を、ストレプトアビジン（もしくはアビジン）の溶液、ビオチニル化 DNA の溶液、および / または相補的ビオチニル化 DNA の溶液中で逐次的にインキュベートすることによって増幅させ、それぞれの工程が追加のビオチン部位をその抗体 / 抗原複合体に付加させる。前記増幅工程を、適する増幅レベルが達成されるまで繰返し、達成された時点で、第二工程のビオチンに対する抗体を含有する溶液中でそのサンプルをインキュベートする。この第二工程抗体を、例えばその抗体 / 抗原複合体の存在下で色原体基質を使用して組織酵素学により検出するために使用することができる酵素などで、標識する。適する増幅により、コンジュゲートを生産し、それを肉眼で見ることができる。

#### 【0262】

もう1つの公知の免疫検出法は、イムノPCR（ポリメラーゼ連鎖反応）方法論を利用する。前記PCR法は、ビオチニル化DNAでのインキュベーションまではCantor法に類似しているが、ストレプトアビジンとビオチニル化DNAのインキュベーションの多数のラウンドを用いるのではなく、抗体を放出させる低pHまたは高塩緩衝液でDNA / ビオチン / ストレプトアビジン / 抗体複合体を洗浄除去する。その後、得られた洗浄溶液を使用して、適するプライマーと適切な対照でPCR反応を行う。少なくとも理論的には、PCRの莫大な増幅能および特異性を利用して単一の抗原分子を検出することができる。

#### 【0263】

本発明の免疫検出法は、例えば白血病を含めて癌などの様々な形態の高増殖性疾患などの状態の診断および予後判定に明らかな有用性を有する。この場合、野生型または突然変異タンパク質、ポリペプチド、および / またはペプチドを含有する疑いがある生体および / または臨床サンプルを使用する。しかし、これらの実施形態は、抗原または抗体サンプルの力価測定の際、例えばハイブリドーマの検出の際などの、非臨床サンプルへの用途も有する。

#### 【0264】

##### H. E L I S A

上記に詳述したように、イムノアッセイは、それらの最も単純なおよび / または直接的な意味で、結合アッセイである。一定の好ましいイムノアッセイは、当該技術分野において公知の様々なタイプの酵素結合イムノソルベントアッセイ（E L I S A）および / またはラジオイムノアッセイ（R I A）である。組織切片を使用する免疫組織化学的検出も、特に有用である。しかし、検出がそのような技術に限定されないこと、および / またはウエスタンブロット法、ドットブロット法、F A C S分析、および / またはこれらに類するものも用いることができることは、容易に理解されるであろう。

#### 【0265】

1つの例示的E L I S Aでは、本発明の抗体を、タンパク質親和性を示す選択された表面、例えばポリスチレン・マイクロタイター・プレート内のウエルに固定する。その後、野生型および / または突然変異タンパク質抗原を含有する疑いがある試験組成物、例えば臨床サンプルをそれらのウエルに添加する。結合させた後、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 / または突然変異タンパク質抗原を検出することができる。検出は、一般に、検出可能な標識に連結されている別の抗体の添加によって達成される。このタイプのE L I S Aは、単純な「サンドイッチE L I S A」である。第二の抗体の付加、続いて、その第二の抗体に対して結合親和性を有する第三の抗体であって、検出可能な標識に連結されている該三次抗体の付加によって、検出を達成することもできる。

#### 【0266】

もう1つの例示的E L I S Aでは、野生型および / または突然変異タンパク質抗原を含有する疑いがあるサンプルをウエル表面に固定する、および / またはその後、本発明の抗体と接触させる。結合させた後、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、結合した抗体を検出する。最初の抗体を検出可能な標識に連結させる場合

10

20

30

40

50

、その免疫複合体を直接検出することができる。さらにまた、それらの免疫複合体を、第一の抗体に対する結合親和性を有する第二の抗体であって、検出可能な標識に連結されている該第二抗体を使用して、検出することができる。

【0267】

野生型および/または突然変異タンパク質、ポリペプチドおよび/またはペプチドを固定するもう1つのELISAは、検出の際に抗体競合の使用を含む。このELISAでは、野生型または突然変異タンパク質に対する標識抗体をウエルに添加し、放置して結合させ、および/またはそれらの標識という手段によって検出する。その後、コーティングされたウエルでのインキュベーション前および/または中に、野生型および/または突然変異体に対する標識抗体と未知サンプルとを混合することによって、そのサンプル中の野生型または突然変異タンパク質抗原の量を決定する。サンプル中の野生型および/または突然変異タンパク質の存在は、ウエルへの結合に利用できる野生型または突然変異タンパク質に対する抗体の量を減少させる働きをし、従って、最終シグナルを現象させる。これは、抗原がコーティングされたウエルに非標識抗体が結合する場合の未知サンプルにおける野生型または突然変異タンパク質に対する抗体の検出にも適切であり、および標識抗体を結合するために利用できる抗原の量も減少させる。

10

【0268】

利用する形式に関係なく、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などの一定の特徴を共通して有する。これらを下記で説明する。

20

【0269】

抗原または抗体のいずれかでプレートをコーティングする場合、一般に、そのプレートのウエルと抗原または抗体の溶液とを、一晚または特定の時間にわたってインキュベートすることとなる。その後、そのプレートのウエルを洗浄して、不完全に吸着された物質を除去することとなる。その後、一切の残存する利用可能なウエル表面を、試験抗血清に対して抗原的に中性である非特異的タンパク質で「コーティング」する。これらとしては、ウシ血清アルブミン(BSA)、カゼイン、または粉乳の溶液が挙げられる。コーティングによって、固定する面上の非特異的吸着部位表面を阻止することができ、従って、その表面への抗血清の非特異的結合に起因するバックグラウンドが低減される。

30

【0270】

ELISAでは、直接手順よりむしろ二次または三次検出手段の使用のほうがおそらく通例である。従って、タンパク質または抗体をウエルに結合させ、非反応性材料でコーティングしてバックグラウンドを減少させ、洗浄して未結合物質を除去した後、固定する表面と試験する生体サンプルとを、免疫複合体(抗原/抗体)形成を可能にするために有効な条件下で接触させる。その後、その免疫複合体の検出には、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が必要である。

【0271】

「免疫複合体(抗原/抗体)形成を可能にするために有効な条件下」は、それらの条件が、BSA、ウシガンマグロブリン(BGG)またはリン酸緩衝食塩水(PBS)/Tweenなどの溶液での抗原および/または抗体の希釈を好ましくは含むことを意味する。これらの添加される薬剤も、非特異的バックグラウンドの低減を助長する傾向がある。

40

【0272】

「適する」条件は、インキュベーションが、有効な結合を可能にするために十分な温度でまたは十分な期間にわたってのものであることも意味する。インキュベーション工程は、概して、約1から2から4時間くらい、好ましくはおよそ25から27の温度でのものであり、または一晚、約4くらいのものである場合もある。

【0273】

ELISAにおけるすべてのインキュベーション工程の後、接触面を洗浄して、非複合体形成材料を除去する。好ましい洗浄手順は、PBS/Tween、またはホウ酸緩衝液

50

などの溶液での洗浄を含む。試験サンプルと初めから結合していた物質との間での非特異的免疫複合体の形成およびその後の洗浄の後、例え微量の免疫複合体の存在であっても判定することができる。

#### 【0274】

検出手段を提供するために、第二または第三の抗体は、検出を可能にする会合標識を有するであろう。好ましくは、これは、適切な色素産生基質とインキュベートすると発色を生じる酵素であろう。従って、例えば、第一および第二の免疫複合体とウレアーゼ、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過酸化水素分解酵素とコンジュゲートした抗体とを、さらなる免疫複合体形成の発生に好適である期間にわたっておよび条件下で接触またはインキュベートすること（例えば、PBS-TweenなどのPBS含有溶液中、2時間、室温でのインキュベーション）が望まれることもあるだろう。

10

#### 【0275】

標識された抗体とのインキュベーション後、そして続いて未結合物質を除去するために洗浄し、標識の量を例えば、尿素等の色素産生基質、またはプロモクレゾールパープル、または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))、またはペルオキシダーゼの場合は酵素標識として $H_2O_2$ とのインキュベーションによって定量する。その後、生じた色度を、例えば可視スペクトル分光光度計を使用して、測定することによって定量を達成する。

#### 【0276】

##### I. 免疫組織化学

本発明の抗体は、免疫組織化学(IHC)による研究のために調製される新鮮凍結および/またはホルマリン固定、パラフィン包埋組織ブロック両方と併用して使用することができる。これらの粒状検体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以前のIHC研究での使用に成功しており、および/または当業者に周知である(Brownら, 1990; Abbondanzolaら, 1990; Allredら, 1990)。

20

#### 【0277】

簡単に言うと、凍結切片は、50ngの凍結「微粉碎」組織を小型プラスチックカプセル内でリン酸緩衝食塩水(PBS)中、室温でもとに戻すこと；遠心分離によってそれらの粒子をペレット化すること；粘稠な包埋用媒質(OC T)にそれらを再び懸濁させること；そのカプセルを逆さにすること、および/もしくは遠心分離によって再びペレット化すること；70 イソペンタン中で急速冷凍させること；そのプラスチックカプセルを切断すること、および/もしくは組織の凍結シリンダーを除去すること；その組織シリンダーをクリオスタット・マイクローム・チャック上に留めること；ならびに/または25~50連続切片を切断することによって調製することができる。

30

#### 【0278】

永久切片は、50mgサンプルをプラスチック微量遠心管内でもとに戻すこと；ペレット化すること；4時間固化のために10%ホルマリンに再び懸濁させること；洗浄すること/ペレット化すること；温かい2.5%寒天に再び懸濁させること；ペレット化すること；氷水中で冷却して寒天を固めること；組織/寒天ブロックを管から除去すること；そのブロックをパラフィンに浸透させるおよび/もしくは包埋すること；ならびに/または50以下の連続永久切片に切断することを含む、同様の方法によって調製することができる。

40

#### 【0279】

##### J. 免疫電子顕微鏡検査

本発明の抗体を電子顕微鏡検査と併用して、細胞内組織成分を同定することもできる。簡単に言うと、高電子密度の標識を抗体に直接または間接的にコンジュゲートする。本発明の高電子密度の標識の例は、フェリチンおよび金である。高電子密度の標識は、電子を吸着し、および電子顕微鏡によって可視化することができる。

#### 【0280】

##### K. 免疫検出キット

50

尚、さらなる実施形態において、本発明は、上記に説明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。一般に、抗体を使用して野生型および/または突然変異タンパク質、ポリペプチドおよび/またはペプチドを検出するので、好ましくは、抗体がキットに含まれるであろう。しかし、両方のそのような成分を含むキットを提供することができる。従って、前記免疫検出キットは、野生型および/もしくは突然変異タンパク質、ポリペプチドおよび/もしくはペプチドに結合する第一の抗体、ならびに/または場合によっては、免疫検出試薬、ならびに/またはさらに場合によっては、野生型および/もしくは突然変異タンパク質、ポリペプチドおよび/もしくはペプチドを、適する容器手段の中に、含むであろう。

#### 【0281】

好ましい実施形態では、モノクローナル抗体が、使用されるであろう。一定の実施形態では、野生型および/または突然変異タンパク質、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を、カラムマトリックスおよび/またはマイクロタイタープレートのウエルなどの固体支持体に予め結合させることができる。

#### 【0282】

前記キットの免疫検出試薬は、所与の抗体と会合および/または連結している検出可能な標識をはじめとする様々な形態のうちのいずれか1つの形態をとるものであり得る。二次結合リガンドと会合および/または連結している検出可能な標識も考えられる。例示的二次リガンドは、第一の抗体に対して結合親和性を有する二次抗体である。

#### 【0283】

本発明のキットにおいて使用するためのさらに適する免疫検出試薬としては、第一の抗体に対して結合親和性を有する二次抗体を、その第二の抗体に対して結合親和性を有する第三の抗体であって、検出可能な標識に連結されている該第三の抗体と共に含む、二成分試薬が挙げられる。上記に述べたように、多数の例示的標識が、当該技術分野において公知であり、および/またはそのような標識を本発明に関連して利用することができる。

#### 【0284】

前記キットは、標識されているにせよ、および/または標識されていないにせよ、検出アッセイのための標準曲線を作成するために使用することができるような、野生型および/または突然変異タンパク質、ポリペプチドおよび/またはポリペプチドの適切に等分された組成物をさらに含むことがある。前記キットは、完全コンジュゲート形態で、中間体形態で、および/またはそのキットの使用者によってコンジュゲートされる別個の部分として、のいずれかで抗体-標識コンジュゲートを収容することができる。前記キットの成分を、水性媒質中で、および/または凍結乾燥形態で、のいずれかで包装することができる。

#### 【0285】

前記キットの容器手段は、抗体を配置することができる、および/または好ましくはその抗体を適切に等分することができる、少なくとも1つのバイアル、試験管、フラスコ、ボトル、注射器および/または他の容器手段を適切に収容し、一般には含むであろう。野生型および/もしくは突然変異 gp19 タンパク質、ポリペプチドおよび/もしくはペプチド、ならびに/または第二のおよび/もしくは第三の結合リガンドおよび/もしくは追加の成分を備えさせる場合、そのキットは、このリガンドおよび/または成分を配置することができる、第二、第三および/または他の追加の容器も一般に含むであろう。本発明のキットは、商業販売用に密閉された状態で抗体、抗原および/または任意の他の試薬容器を収容するための手段も概して含むであろう。そのような容器としては、所望のバイアルを保持することができる、射出および/またはブロー成形プラスチック容器を挙げることができる。

#### 【0286】

##### V I I I . 医薬製剤

本発明の新規組成物を使用して医薬組成物を調製することも考えられる。そのような場合、前記医薬組成物は、本発明の新規活性成分と医薬的に許容される担体とを含む。通常

10

20

30

40

50

の当業者は、過度の実験を伴うことなく、本発明の活性成分の適切な投薬量および投与経路を容易に決定できるであろう。

【0287】

「医薬的に許容される」というフレーズは、被験体に投与したときにアレルギー反応または類似した不適当な反応を生じさせない、分子単位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は、当該技術分野において十分に理解されている。概して、そのような組成物を注射可能薬物として、溶液または懸濁液のいずれかとして調製し；注射前に液体に溶解または懸濁することに適する固体形態として調製することもできる。前記製剤を乳化することもできる。

【0288】

一般に、本発明の医薬組成物は、E. chaffeensis VLPTポリペプチド、ポリヌクレオチド、または抗体および/またはそれらの混合物を含むものであり得る。

【0289】

タンパク質を中性または塩形態の組成物に調合することができる。医薬的に許容される塩としては、(タンパク質の遊離アミノ基とで形成される)酸付加塩が挙げられ、これらは、例えば塩酸もしくはリン酸などの無機酸、または酢酸、シュウ酸、酒石酸、マンデル酸、およびこれらに類するものなどのような有機酸とで形成される。遊離カルボキシル基とで形成される塩は、例えば水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化アンモニウム、水酸化カルシウムまたは水酸化第二鉄などの無機塩基、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、プロカインおよびこれらに類するものなどの有機塩基から誘導することもできる。

【0290】

調合し次第、溶液は、その投薬調合物に適合した手法でおよび治療に有効であるような量で投与されることとなる。前記調合物は、注射用溶液などの様々な剤形で容易に投与される。

【0291】

例えば、水溶液中での非経口投与のために、前記溶液を、必要な場合には、適切に緩衝すべきであり、およびまず、その液体希釈剤を十分な食塩水またはグルコースで等張性にすべきである。これらの特別な水溶液は、静脈内、筋肉内、皮下および腹腔内投与に特に適する。これに関連して、利用することができる滅菌水性媒体は、本開示に鑑みて、当業者には公知であろう。例えば、1投薬量を1mLの等張NaCl溶液に溶解し、1000mLの皮下注射液に添加するか、注入推奨部位に注射することができるであろう(例えば、「Remington's Pharmaceutical Sciences」15th Edition, 1035-1038頁および1570-1580頁を参照のこと)。治療する被験体の状態に依存して、投薬量の何らかの変化が必然的に発生するであろう。いずれにしても、投与に責任がある者が個々の被験体に適する用量を決めることとなる。

【0292】

本発明の医薬組成物は、医薬的に許容される担体に溶解または分散しているポリペプチドもしくはその分泌物をターゲットにする1つ以上の薬剤または追加の薬剤の有効量を含む。「製薬の」、「医薬的に許容される」、または「薬理的に許容される」というフレーズは、例えば、適する場合にはヒトなどの動物に投与したとき、副作用、アレルギー反応または他の不適当な反応を生じさせない分子単位および組成物を指す。前記ポリペプチドもしくはその分泌物をターゲットにする少なくとも1つの薬剤および/または追加の活性成分を含有する医薬組成物の調製は、参照により本明細書に援用されているRemington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. Mack Printing Company, 1990によって例示されるように、本発明の開示に鑑みて、当業者に公知であろう。さらに、動物(例えば、ヒト)への投与のために、製剤が、FDA Office of Biological Standardsによって要求されるような無菌性、発熱性、一般的な安全性および純度基準を満たさなけ

10

20

30

40

50

ればならないことは、理解されるであろう。

【0293】

本明細書において用いる場合、「医薬的に許容される担体」は、任意のおよびすべての溶媒、分散媒、コーティング剤、界面活性剤、抗酸化物質、保存薬（例えば、抗菌剤、抗真菌剤）、等張剤、吸収遅延剤、塩、保存薬、薬物、薬物安定剤、ゲル、結合剤、賦形剤、崩壊剤、滑沢剤、甘味剤、着香剤、色素、通常の当業者に公知であるような物質およびこれらの組み合わせを含む（例えば、参照により本明細書に援用されている Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. Mack Printing Company, 1990, pp. 1289 - 1329 を参照のこと）。任意の従来の特許が活性成分と非相溶性である場合を除き、治療用または予防用組成物におけるその使用が考えられる。

10

【0294】

本発明は、それが固体形態で投与されることとなるのか、液体形態で投与されることとなるのか、またはエロゾル形態で投与されることとなるのかに依存して、および注射などの投与経路のために無菌である必要があるのかに依存して、異なるタイプの担体を含み得る。本発明は、静脈内に、経皮的に、動脈内に、腹腔内に、病巣内に、頭蓋内に、関節内に、前立腺内に、胸膜内に、気管内に、鼻腔内に、硝子体内に、腔内に、直腸内に、局部的に、腫瘍内に、筋肉内に、腹腔内に、皮下に、結膜下に、膀胱内に、粘膜的に、心膜内に、臍帯内に、眼内に、経口的に、局部的に、局所的に、吸入（例えば、エロゾル吸入）、注射、注入、持続注入、ターゲット細胞を直接漬ける局所灌流、カテーテルにより、灌注により、クリームで、脂質組成物（例えば、リポソーム）で、または通常の当業者に公知であろうような他の方法もしくは上記のも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援用されている Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. Mack Printing Company, 1990 を参照のこと）。

20

【0295】

動物患者に投与される本発明の組成物の正確な投薬量は、肉体的および生理的要因、例えば体重、状態の重症度、治療する疾病のタイプ、以前のまたは併用する治療的介入、患者のおよび投与途中の特発性疾患によって決めることができる。いずれにしても投与に責任がある現場の人間が、組成物中の活性成分（単数または複数）の濃度および個々の被験体に適する用量（単数または複数）を決める。

30

【0296】

一定の実施形態において、医薬組成物は、少なくとも約 0.1% の活性化合物を含むことがある。他の実施形態において、活性化合物は、例えば、その単位の重量の約 2% から約 75% の間、または約 25% から約 60% の間、およびそこから導出可能な任意の範囲を構成することがある。他の非限定的な例において、1 用量は、投与あたり約 1 マイクログラム / kg / 体重、約 5 マイクログラム / kg / 体重、約 10 マイクログラム / kg / 体重、約 50 マイクログラム / kg / 体重、約 100 マイクログラム / kg / 体重、約 200 マイクログラム / kg / 体重、約 350 マイクログラム / kg / 体重、約 500 マイクログラム / kg / 体重、約 1 ミリグラム / kg / 体重、約 5 ミリグラム / kg / 体重、約 10 ミリグラム / kg / 体重、約 50 ミリグラム / kg / 体重、約 100 ミリグラム / kg / 体重、約 200 ミリグラム / kg / 体重、約 350 ミリグラム / kg / 体重、約 500 ミリグラム / kg / 体重、から約 1000 mg / kg / 体重以上まで、およびそこから導出可能な任意の範囲も含むことがある。本明細書において列挙する数から誘導可能な範囲の非限定的な例では、上に記載した数に基づき、約 5 mg / kg / 体重から約 100 mg / kg / 体重、約 5 マイクログラム / kg / 体重から約 500 ミリグラム / kg / 体重などの範囲を投与することができる。

40

【0297】

いずれの場合も、前記組成物は、1 つ以上の成分の酸化を遅らせるために様々な酸化防止剤を含むことがある。加えて、保存薬、例えば、パラベン（例えば、メチルパラベン、

50

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、チメロサルまたはこれらの組み合わせをはじめとする(しかしこれらに限定されない)、様々な抗菌剤および抗真菌剤によって、微生物の作用の予防をもたらすことができる。

#### 【0298】

本発明は、遊離塩基、中性または塩形態の組成物に調合することができる。医薬的に許容される塩としては、酸付加塩、例えば、タンパク質様組成物の遊離アミノ基とで形成されるもの、あるいは例えば塩酸もしくはリン酸などの無機酸、または酢酸、シュウ酸、酒石酸もしくはマンデル酸などの有機酸とで形成されるものが挙げられる。遊離カルボキシル基とで形成される塩は、例えば水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化アンモニウム、水酸化カルシウムもしくは水酸化第二鉄などの無機塩基；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などの有機塩基から誘導することもできる。

10

#### 【0299】

前記組成物が液体形態である実施形態において、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など)、脂質(例えば、トリグリセリド、植物油、リポソーム)およびこれらの組み合わせを含むがこれに限らない、溶媒または分散媒であり得る。例えば、レシチンなどのコーティングの使用によって；例えば液体ポリオールもしくは脂質などの担体への分散による必要粒径の維持によって；例えばヒドロキシプロピルセルロースなどの界面活性剤の使用によって；またはそのような方法の組み合わせによって、適正な流動性を維持することができる。多くの場合、例えば糖、塩化ナトリウムまたはこれらの組み合わせなどの等張剤を含めることが好ましいであろう。

20

#### 【0300】

他の実施形態では、本発明において点眼剤、鼻用溶液もしくは噴霧剤、エアロゾルまたは吸入薬を使用することができる。そのような組成物は、一般に、ターゲット組織タイプと適合性であるように設計される。非限定的な例において、鼻用溶液は、通常、滴剤または噴霧剤で鼻道に投与するように設計された水溶液である。鼻用溶液は、正常な毛様体作用が維持されるように、多くの点で鼻分泌物に類似しているように調製される。従って、好ましい実施形態において、前記鼻用水溶液は、通常、等張性であり、または約5.5から約6.5のpHを維持するようにわずかに緩衝される。加えて、眼科用製剤において使用されるものに類似した抗微生物性保存薬、薬物、または薬物安定剤を、所望される場合には前記調合物に含めることができる。例えば、様々な市販の鼻用製剤が公知であり、それらは抗生物質または抗ヒスタミン薬などの薬物を含む。

30

#### 【0301】

一定の実施形態において、前記組成物は、経口摂取などの経路によって投与するために調製される。これらの実施形態において、固体組成物は、例えば、溶液、懸濁液、エマルジョン、錠剤、ピル、カプセル(例えば、ハードもしくはソフトシェルのゼラチンカプセル)、徐放性製剤、口腔組成物、トローチ、エリキシル、懸濁液、シロップ、オブラート、またはこれらの組み合わせを含み得る。経口組成物を食品または食事に直接添合してもよい。経口投与のための好ましい担体は、不活性希釈剤、同化可能な可食担体またはこれらの組み合わせを含む。本発明の他の態様では、前記経口組成物をシロップまたはエリキシルとして調製することができる。シロップまたはエリキシルは、例えば、少なくとも1つの活性剤、甘味剤、保存薬、着香剤、色素、保存薬、またはこれらの組み合わせを含むことがある。

40

#### 【0302】

一定の好ましい実施形態において、経口組成物は、1つ以上の結合剤、賦形剤、崩壊剤、滑沢剤、着香剤、およびこれらの組み合わせを含むことがある。一定の実施形態において、組成物は、次のもののうちの1つ以上を含むことがある：例えばトラガカントゴム、アラビアゴム、コーンスターチ、ゼラチンもしくはこれらの組み合わせなどの、結合剤；例えば、リン酸二カルシウム、マンニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグ

50

ネシウム、サッカリンナトリウム、セルロース、炭酸マグネシウムもしくはこれらの組み合わせなどの、賦形剤；例えばコーンスターチ、馬鈴薯デンプン、アルギン酸もしくはこれらの組み合わせなどの、崩壊剤；例えばステアリン酸マグネシウムなどの、滑沢剤；例えばスクロース、ラクトース、サッカリンもしくはこれらの組み合わせなどの甘味剤；例えばペパーミント、ウインターグリーン油、チェリー着香剤、オレンジ着香剤などのような、着香剤；またはこれらの上述のものの組み合わせ。投薬単位形が、カプセルであるとき、それは、上のタイプの材料に加えて、液体担体などの担体を含有することがある。様々な他の材料が、コーティングとして、またはその投薬単位の物理的形態を別様に変えるために、存在することがある。例えば、錠剤、ピルまたはカプセルは、シエラック、糖または両方でコーティングされることがある。

10

#### 【0303】

他の投与形式に適している追加の製剤としては、坐剤が挙げられる。坐剤は、直腸、膣または尿道への挿入のための、通常投薬される、様々な重量および形状の固体剤形である。挿入後、坐剤は、腔液中で軟化、溶融または溶解する。一般に、坐剤用の従来の担体としては、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これらの組み合わせを挙げることができる。一定の実施形態において、坐剤は、例えば、活性成分を約0.5%から約10%、および好ましくは約1%から約2%の範囲で、含有する混合物から成り得る。

#### 【0304】

滅菌注射溶液は、適切な溶媒中の必要量の活性化化合物を、必要に応じて、上に列挙した様々な他の成分と配合し、その後、濾過滅菌することによって調製する。一般に、分散液は、それらの様々な滅菌した活性成分を、塩基性分散媒および/または他の成分を含有する滅菌ビヒクルに添合することによって調製する。滅菌注射溶液、懸濁液またはエマルジョンの調製のための滅菌粉末の場合、好ましい調製方法は、事前に滅菌濾過したそれらの液体媒質から活性成分と任意の追加の所望の成分との粉末を生じさせる、真空乾燥または冷凍乾燥技術である。前記液体媒質を、必要な場合には適切に緩衝すべきであり、その液体希釈剤を注射前に先ず十分な食塩水またはグルコースで等張性にすべきである。直接注射のための高濃度の組成物の調製も考えられ、この場合、溶媒としてのDMSOの使用は、結果として、極めて迅速な浸透を生じさせ、それによって高濃度の活性薬剤が小領域に送達されると想像される。

20

30

#### 【0305】

前記組成物は、製造および保管条件下で安定していなければならない、細菌および真菌などの微生物の汚染作用に対して防御されなければならない。エンドトキシン汚染を最低限安全レベル、例えばタンパク質0.5ng/mg未満、に保つべきであることは理解されるであろう。

#### 【0306】

特定の実施形態において、注射用組成物の持続吸収は、例えばモノステアリン酸アルミニウム、ゼラチンまたはこれらの組み合わせなどの吸収を遅延させる薬剤のその組成物における使用によって、生じさせることができる。

#### 【0307】

##### IX. 本発明の例示的キット

本発明の特定の実施形態には、適切な容器内に保持されたキットがある。このキットは、個体について、診断、治療、および/またはEhrlichia、例えばEhrlichia chaffeensis、からの防御に適し得る。特定の実施形態において、前記キットは、適する容器の中にE. chaffeensis VLP T抗原をターゲットにする薬剤を含む。前記薬剤は、抗体、小分子、ポリヌクレオチド、ポリペプチド、ペプチド、またはこれらの混合物であり得る。前記薬剤は、例えば滅菌形態、凍結乾燥形態または両方の形態などの、適する形態で前記キットに備えさせることができる。特定の実施形態において、前記キットは、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号1

40

50

1、配列番号12、配列番号14、もしくは配列番号15；および/またはこれらの関連タンパク質のうちの一つ以上に対する抗体を含む。本明細書において特に提示しない他の *E. chaffeensis* VLPT - 関連免疫原性 - 関連組成物（ポリペプチド、ペプチド、または抗体を含む）も含むことがある。

【0308】

前記キットは、組成物をその必要がある個体に送達するための一つ以上の装置をさらに含むことがある。前記装置としては、例えば、注射器、点眼びん、針、生検ツール、スバチュラ (*scoopula*)、カテーテルなどを含むことがある。

【0309】

前記キットが診断目的で用いられる実施形態の場合、そのキットは、*E. canis* gp19 抗原を同定するための一つ以上の検出組成物および/または装置をさらに備えていることがある。そのような実施形態は、例えば抗体などについての検出可能な標識を利用することがあり、この標識は、例えば、蛍光性、放射性、化学発光性、または比色用であり得る。

【実施例】

【0310】

本発明の好ましい実施形態を立証するために、以下の実施例含める。以下の実施例において開示する技術が、本発明の実施の際によく機能することを本発明者らが発見した技術の代表であること、従って、その実施に好ましい方式を構成するものと見なすことができることは、当業者には理解されるはずである。しかし、開示する特定の実施形態に、本発明の精神および範囲から逸脱することなく多くの変更を施すことができ、それでも同様のまたは類似の結果を得ることができることは、本発明の開示に鑑みて当業者には理解されるはずである。

【0311】

(実施例1)

例示的材料および方法

*Ehrlichia* の培養および精製。*E. canis* (Jake株) および *E. chaffeensis* (Arkansas株) を以前に記載されている (McBrideら, 2001) ように増殖させた。*Ehrlichia* を、以前に記載されている (Rikihisaら, 1992) ように、Sephacryl S-1000 (ニュージャージー州、ピスカタウェイの Amersham Biosciences) でのサイズ排除クロマトグラフィーによって精製した。細菌を含有する画分を凍結し、抗原および DNA 源として利用した。

【0312】

*E. chaffeensis* ゲノム DNA および抗原の調製。ゲノム DNA および抗原を、以前に記載されている (McBrideら, 1996) ように *E. chaffeensis* (Arkansas株) から精製した。

【0313】

*E. chaffeensis* VLPT 遺伝子フラグメントの PCR 増幅。*E. chaffeensis* VLPT 遺伝子フラグメントの増幅のためのオリゴヌクレオチドプライマーを、GenBank における配列 (アクセッション番号 AF121232) に従って手作業でまたは Primer Select (Lasergene v5.08、ウィスコンシン州、マディソンの DNASTAR) を使用することによって設計し、合成した (テキサス州、Woodlands の Sigma-Genosys) (表2)。*E. chaffeensis* VLPT 遺伝子の4つの単一TR (VLPT-R4、VLPT-R3、VLPT-R2 および VLPT-R1)、C 末端 (VLPT-C)、反復配列 R3 と R2 の組み合わせ (VLPT-R32)、ならびに多数の反復配列 (R4、R3、R2 および R1) を含有するほぼ完全長の VLPT (VLPT-R4321-C) に対応する7つの遺伝子フラグメントを、PCR HotMaster Mix (ニューヨーク州、ウエストベリーの Eppendorf)、およびテンプレートとして *E. chaffeensis*

10

20

30

40

50

sis (Arkansas株)ゲノムDNAを使用して増幅させた(表2および3)。熱サイクルプロフィールは、次のとおりであった: 4分間、95℃; 30秒間、94℃、30秒間、アニーリング温度(最低プライマー $T_m$ より3℃低い)、および適切な伸長時間(30秒/500塩基対)、72℃、を35サイクル;その後、7分間、72℃;そして4℃で保持。

#### 【0314】

組換え*E. chaffeensis* VLPTタンパク質の発現および精製。増幅PCR産物を、pBAD/Thio-TOPO(カリフォルニア州、カールズバッドのInvitrogen)またはpTriEx-6 3C/LIC発現ベクター(ウィスコンシン州、マディソンのNovagen)に直接クローニングした。University of Texas Medical Branch Protein Chemistry Core Laboratoryにおいて、*E. chaffeensis* VLPT遺伝子フラグメントを含有するプラスミドで*Escherichia coli*細胞(TOP10; Invitrogen)を形質転換し、陽性形質転換体を、PCRにより挿入物の存在および適正な配向についてスクリーニングし、ABI Prism 377XL DNAシーケンサー(カリフォルニア州、フォスター・シティーのApplied Biosystems)で配列決定した。0.2%アラビノース(pBAD/Thio-TOPO)または0.5mMイソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド(IPTG;pTriEx-6 3C/LIC)での誘導後、4時間、組換えタンパク質発現を行った。HisSelect(登録商標)カラム(pBAD/Thio-TOPOについて;ミズーリ州、セントルイスのSigma)またはStrep-Tactin(登録商標)Superflowカラム(pTriEx-6 3C/LICについて;Novagen)を使用して自然条件下で組換えタンパク質を精製し、BCAタンパク質アッセイ(イリノイ州、ロックフォードのPierce)をその製造業者の説示に従って用いて定量した。

10

20

#### 【0315】

*E. chaffeensis* VLPT合成ペプチド。*E. chaffeensis* VLPTタンパク質のN末端フラグメント(VLPT-N; 17アミノ酸)および4つの個々のTR単位(R4、R3、R2およびR1;それぞれ30アミノ酸)に対応する5つの合成ペプチド、ならびにR3の異なる領域に対応する7つのオーバーラッピングペプチド(R3-1からR3-7)および20アミノ酸N末端ペプチドR4(R4-N)を合成した(テキサス州、ルイスヴィルのBio-Synthesis)(表3)。凍結乾燥粉末を分子生物学グレードの水に再懸濁させた(1mg/mL)。

30

#### 【0316】

## 【表 2】

表2. *E. chaffeensis* (Arkansas) ゲノムコーディング配列およびタンパク質配列; 両方とも、GenBank (登録商標) アクセションAF121232で入手可能 (参照により本明細書に援用される)

配列	配列番号
MSQFSEDNMGNIQMPFSDSDSHEP SHLELPSLSEEV IQLES DLQSSNSDLHG SF SVELF DPFKEAVQLGNDLQQSSDSLHG SF SVELFDP SK EEVQLES DLQSSNSDLHES SF VEL PGPSKEEVQFEDDAKNVYVYGQDHVSLSELG LLLGGVFSTMNYLSGYTPYYHHYCCYNP YYYFDYVTPDYCHHCSESSLE	1
tttatatttatatatgattaatatataatgataatggtatgtgggtataactgcttatt agttgatcatgtacctgtgtgttatgttaaatagggtataaatatgtcacaattctctg aagataaatatgggtaatatatacaaatgccttttgattctgattcacatgagccttctcat cttgagctacctagctcttctgaagaagtgattcaattagagagtgatctacaacaatc ttctaattctgatttacacgggtcttttctgttgagttatttgatccttttaagaag cagttcaattggggaatgatctacaacaatctctgattctgatttacacgggtctttt tctgttgagttatttgatccttctaaagaagaagtcaattggagagtgatctacaaca atcttctaattctgatttacacgagctcttcttctgttgagttacctggctcttccaaag aagaagtcaattcgaagatgatgctaaaaatgtagtatatggacaagaccatgttagt ttatctgaattaggcttattgttaggtggtgttttagtacaatgaattattgtctgg ttatacaccgtattattatcatcattattgtgttataatccttattatttttgatt atgttactccagattattgtcatcactgtagtgaagtagtttagagtaggatatttag aaatataaatggttggtgacttcacaaaagggtgtagtttatatgttttatgctgttt atagtggtataaggatagaggtggttttactatttt	16

10

20

抗血清。回復期抗 *E. chaffeensis* イヌ血清を、実験的に感染させたイヌ (番号 2251) から採取した。HME 患者からの血清は、Focus Technologies (カリフォルニア州、サイプレス) からの親切な贈与品であった。ウサギ抗 VLPT-R3 抗血清は、商業販売業者 (Bio-Synthesis) が合成 *E. chaffeensis* VLPT-R3 KLH コンジュゲートペプチドに対して産生させたものであった。

## 【0317】

ゲル電気泳動およびウエスタン免疫ブロッティング。精製された *E. chaffeensis* または *E. canis* 全細胞溶解産物または組換えタンパク質を、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、ニトロセルロースに移し、そしてウエスタン免疫ブロッティングを、一次イヌおよびヒト血清を 1:100 希釈したことおよびウサギ抗 VLPT-R3 抗血清を 1:2,000 希釈したこと以外は以前に記載されている (McBride ら, 2003) とおりに行った。炭水化物検出。組換えタンパク質 VLPT に関するグリカン検出を、ジゴキシゲニングリカン検出キット (イリノイ州、インディアナポリスの Roche) で以前に記載されている (McBride ら, 2000) ように行った。

30

## 【0318】

ELISA。酵素結合免疫ソルベントアッセイ (ELISA) プレート (Maxisorp; デンマーク、ロスキレの NUNC) を、リン酸緩衝食塩水 (pH 7.4) 中の組換えタンパク質または合成ペプチドでコーティングした (0.5 μg / ウエル; 50 μL)。穏かに攪拌しながら 4 でタンパク質およびペプチドをその ELISA プレートに吸着させ、その後、0.2% Tween 20 を含有する Tris 緩衝食塩水 (TBST) 200 μL で 3 回洗浄し、TBST 中 3% のウシ血清アルブミン (BSA) 100 μL 中で 1 時間、室温で攪拌しながらブロックし、再び洗浄した。3% BSA-TBST で希釈した回復期抗 *E. chaffeensis* イヌまたはヒト血清 (1:100) をそれぞれのウエルに添加し (50 μL)、穏かに攪拌しながら室温で 1 時間インキュベートした。それらのプレートを 4 回洗浄し、3% BSA-TBST で希釈 (1:5,000) した 50 μL のアルカリホスファターゼ標識ヤギ抗イヌまたはヒト IgG (H+L) 二次抗体 (メリーランド州、ゲーサーズバーグの Kirkegaard & Perry Laboratories) を添加し、1 時間、室温でインキュベートした。それらのプレート

40

50

を4回洗浄し、基質(100 $\mu$ L、Blue Phos; Kirkegaard & Perry Laboratories)をそれぞれのウェルに添加した。それらのプレートを攪拌しながら暗所で30分間インキュベートし、マイクロプレートリーダー(VersaMax; カリフォルニア州、サニーヴェールのMolecular Devices)を用いてA<sub>650</sub>で発色を読み取り、データをSoftmax Pro v4.0(Molecular Devices)によって分析した。光学密度(OD)読み取り値は、バッファのみのウェルのODを引いた、3つのウェルについての平均値( $\pm$ 標準偏差)を表す。

#### 【0319】

免疫電子顕微鏡検査。一次ウサギ抗VLPT-R3ペプチド血清を1:10,000希釈したこと以外、以前に記載された(McBrideら, 2005)とおり、イムノゴールド電子顕微鏡検査をE. chaffeensis感染DH82細胞に対して行った。未感染DH82細胞を陰性対照として使用した。

10

#### 【0320】

質量分析。質量分析は、University of Texas Medical Branch Mass Spectrometry Core Laboratoryにおいて、マトリックス支援レーザー脱離イオン化(MALDI)飛行時間(TOF)型質量分析計(MS)(Voyager-DESTR; Applied Biosystems)を使用して行った。

#### 【0321】

分泌されたVLPTタンパク質の分析。細胞単相を乱さずに、毎日、E. chaffeensis感染DH82細胞培養上清(1mL)を回収し、高速(5分間、10,000 $\times$ g)で遠心分離して、細胞および細菌をペレット化した。その後、ゲル電気泳動および抗VLPT-R3特異的ポリクローナル抗体を使用するウエスタン免疫ブロッティングのために、上清を10倍濃縮した(Centricon超遠心濾過機、10-kDaカットオフ; マサチューセッツ州、ビルリカのMillipore)。

20

#### 【0322】

配列分析。Juleniusら, 2005によるYinOYang v1.2プログラムのコンピューターアルゴリズムおよびBlomら, 1999によるNetPhos v2.0プログラムのコンピューターアルゴリズムを用いて、E. chaffeensis VLPTを可能性のあるO結合グリコシル化およびリン酸化について評価した。グラム陰性細菌に向けたBendtsenら, 2004によるSignalP 3.0およびSecretomeP 2.0プログラムのコンピューターアルゴリズムを用いて、可能性のあるシグナル配列および非古典的分泌を同定した。核酸およびアミノ酸アラインメントをMegAlign(LaserGene v5.08, DNASTar)で行った。タンパク質-タンパク質Basic Local Alignment Search Tool(BLAST)を使用して、E. chaffeensis VLPTエピトープを他のEhrlichia種タンパク質(VLPTオルソログを含む)に対する相同性について調査した。

30

#### 【0323】

40

## 【表3】

表3. 例示的*E. chaffeensis* VLPT合成ポリペプチド

ペプチド	配列	アミノ酸	配列番号
N	MSQFSEDNMGNIQMPFD	17	2
R4	SDSHEPSHLELPSLSEEVIQLES	30	3
R3	SDLHGSFSVELFDPFKEAVQLGNDLQQSSD	30	4
R2	SDLHGSFSVELFDPFKEAVQLGNDLQQSSN	30	5
R1	SDLHESSFVELPGPSKEEVQFEDDAKNVVY	30	6
R3-1	SDLHGSFSVELFDP	14	7
R3-2	SDLHGSFSVELFDPFKE	17	8
R3-3	HGSFSVELFDPFKE	14	9
R3-4	HGSFSVELFDPFKEAVQ	17	10
R3-5	HGSFSVELFDPFKEAVQLGN	20	11
R3-6	VELFDPFKEAVQLGND	16	12
R3-7	FKEAVQLGNDLQQSSD	16	13
R4-N	HEPSHLELPSLSEEVIQLES	20	14
C	GQDHVSLSELGLLLGGVFSTMNYLSGYTPY YYHHYCCYNPYYFYFDYVTPDYCHHCSESSLE	61	15

10

20

## 【0324】

## 【表4】

表4. *E. chaffeensis* VLPT遺伝子フラグメントの増幅のためのオリゴヌクレオチドプライマー

フラグメント	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
R4	4F	TCTGATTCACATGAGCCTTC (配列番号17)	4(2)R	ATTAGAAGATTGTTGTAGATCAC TC (配列番号18)	90
R3	3(2)F	TCTGATTTACACGGGTCTT (配列番号19)	3R	ATCAGAAGATTGTTGTAGATCAT (配列番号20)	90
R2	3(2)F	TCTGATTTACACGGGTCTT (配列番号21)	4(2)R	ATTAGAAGATTGTTGTAGATCAC TC (配列番号22)	90
R1	1F	TCTGATTTACACGAGTCTTCT (配列番号23)	1R	ATATACTACATTTTTCATCAT CTTC (配列番号24)	90
C	CF	GGACAAGACCAITGTTAGTT (配列番号25)	CR	CTCTAAACTACTTTCACTACAGT G (配列番号26)	183
R4321-C	4F	TCTGATTCACATGAGCCTTC (配列番号27)	CR	CTCTAAACTACTTTCACTACAGT G (配列番号28)	543
R32	3(2)F	TCTGATTTACACGGGTCTT (配列番号29)	4(2)R	ATTAGAAGATTGTTGTAGATCAC TC (配列番号30)	180
R32a	3F-lic	CAGGGACCCGGTCTTCTAAAT TCTGATTTACACGG (配列番号31)	2R-lic	GGCACCAGAGCGTTTAAATTAGA AGATTGTTGTAGATCACTC (配列番号32)	213

30

40

## (実施例2)

*E. chaffeensis* VLPTタンパク質の特性づけ*E. chaffeensis* VLPTタンパク質組成物および特性。セリン(33残

50

基；16.7%）、ロイシン（22；11.1%）、グルタマート（20；10.1%）およびアスパルタート（17；8.6%）は、全アミノ酸含有量の46.5%を占める、*E. chaffeensis* VLPTタンパク質における最も存在頻度の高いアミノ酸である（図1A）。さらに、VLPTタンパク質の反復配列領域において、これら4残基の存在は、さらに高頻度になり、それぞれ20%、12.5%、13.3%および10%の組成で、全反復配列領域アミノ酸含有量の55.8%を占める。ジスルフィド結合で会合している4つのシステイン残基が、タンパク質のカルボキシル末端ドメインに存在したが、このドメインでは、チロシン残基が優位を占めていた（19.7%）。強酸性残基グルタマートおよびアスパルタートの大きな比率のため、このVLPTタンパク質は、非常に酸性である（ $pI$  3.8）。N末端領域（17アミノ酸）および最大ドメイン、TR領域（120アミノ酸）は、非常に酸性であり（それぞれ、 $pI$  3.2および3.8）、カルボキシル末端ドメイン（61アミノ酸）は、最低の酸性（ $pI$  4.7）である。

#### 【0325】

VLPTの前記TRは、同一でないが、R3とR2は、最も高いアミノ酸同一性（83%）を有し、ならびにR4およびR1は、R3と、それぞれ53%および49%の同一性を有した（図1B）。VLPT-R3およびVLPT-R4からのアミノ酸配列に関するBLAST検索により、これらのVLPT反復配列と、エールリヒアのタンパク質または近縁種属の生物からのタンパク質との間に相同性は見出せなかった。

#### 【0326】

天然VLPTタンパク質の同定。ウエスタンブロッティングにより、合成VLPT-R3ペプチドに対する単一特異性ウサギ抗血清と反応した*E. chaffeensis*感染細胞からの*E. chaffeensis*全細胞溶解産物および上清において、~32kDa（25.8kDaの予測分子量より~6.2kDa大きい）の分子量および5つのあまり顕著でないタンパク質（22~30kDa）を同定した（図2A）。さらに、抗VLPT-R3抗体は、*E. canis*全細胞溶解産物と反応しなかった（図2A）。感染培養物からの*E. chaffeensis*全細胞溶解産物および上清における類似のサイズ（~32kDa）のタンパク質も、抗*E. chaffeensis*イヌ血清と反応した（図2B）。予備免疫ウサギ血清またはイヌ血清対照は、*E. chaffeensis*全細胞溶解産物または上清を認識しなかった（データは示さない）。

#### 【0327】

VLPTのエピトープ含有領域。VLPTの主要エピトープ含有領域を決定するために、異なるVLPTドメイン（R4321-C、R32、R1、R2、R3 R4、およびC；図3）に対応する組換えタンパク質を発現させた。VLPT-R3およびVLPT-Cを除き、pBAD/Thio-TOPOにおいて発現された組換えVLPTタンパク質のすべてが、アミノ酸配列によって予測したものより実質的に大きい分子量をSDS-PAGEにより示した。実質的により小さいN末端融合タンパク質を有する代替ベクターpTriEx6 3C/LICにおいて発現されたVLPT-R32（pBAD/Thioについての13.1kDaと比較して2.4kDa）も、分子量増加（予測したものより3.7kDa大きい）を示したが、pBAD/Thioにおいて発現されたVLPT-R32のもの（予測したものより5.2kDa大きい）より小さかった。組換えVLPTタンパク質によって示されたこの分子量増加は、そのタンパク質が翻訳後修飾されたことを示しており；さらに、VLPTに関する幾つかの予測グリコシル化部位をコンピュータアルゴリズムによって同定した。しかし、いずれの組換え*E. chaffeensis* VLPTポリペプチドに関しても炭水化物は検出されなかった（データは示さない）。1つの組換えVLPTタンパク質の実際の分子量をさらに確認するために、pTriEx6 3C/LICにおいて発現されたVLPT-R32を含有する2反復配列の質量をMALDI-TOFによって決定した。VLPT-R32の質量は、9,206Daであり、アミノ酸配列（2.4kDa発現タグを除く）から予測した質量（9.325Da）よりわずかに小さかった。これは、翻訳後修飾が存在しなかったことを明示している。

#### 【0328】

10

20

30

40

50

ウエスタン免疫プロットにより、大きなTR含有タンパク質R4321-CおよびR32ならびに個々の反復単位R2およびR3は、抗E.chaffeensisイヌ血清と強く反応したが、カルボキシ末端ドメイン(C)ならびに反復単位R1およびR4を代表する組換えフラグメントは、抗E.chaffeensisイヌ血清と反応性でなかった(図4A)。VLPT(合成ポリペプチドおよび対応する組換えタンパク質)と抗E.chaffeensisイヌ血清との反応性をELISAによっても調査して、可能性のある配座エピトープを同定した(図4B)。VLPT-N(合成)、VLPT-C(組換え)、またはVLPT-R1(合成および組換え)ポリペプチドは、抗E.chaffeensisイヌ血清と反応しなかった。ウエスタン免疫プロットによる結果に類似して、VLPT-R3またはR2ペプチド(合成および組換え)は、抗E.chaffeensisイヌ血清と強く反応したが、VLPT-R3(合成)は、VLPT-R2(合成)より免疫反応性であった。逆に、ウエスタン免疫プロットにより免疫反応性でなかった組換えVLPT-R4は、ELISAにより抗E.chaffeensisイヌ血清と強く反応した(合成および組換え)。これは、配座エピトープがVLPT-R4中に存在したことを示している(図4AおよびB)。

10

#### 【0329】

主要VLPT免疫決定因子の同定。E.chaffeensis VLPTタンパク質の主要エピトープをさらに局在定位するために、VLPT-R3内の異なる位置に対応する7つのオーバーラッピングペプチド(R3-1からR3-7と呼ぶ)を抗E.chaffeensisイヌ血清と反応させた(図3および5A)。ペプチドR3-6およびR3-7(C末端領域)は、免疫反応性でなかったが、N末端領域に対応するR3-2、R3-3、R3-4およびR3-5は、抗E.chaffeensisイヌ血清と同様に強く反応することがELISAにより判明した(図4B)。これは、VLPT-R3のN末端領域(23アミノ酸; S D L H G S F S V E L F D P F K E A V Q L G N)が主要抗体エピトープを含有したことを示している。ペプチドR3-3(14アミノ酸; H G S F S V E L F D P F K E)は、抗E.chaffeensisイヌ血清と強く反応した最も小さいペプチドであった(図5AおよびB)。3つのアミノ酸(C末端)および5つのアミノ酸(N末端)が異なるペプチドR3-1とR3-6は、それぞれ反応性でなかった(図5AおよびB)。

20

#### 【0330】

VLPT-R4内の免疫決定因子を調査および比較すると、VLPT-R3内のR3-5に対応する20アミノ酸ペプチド(H E P S H L E L P S L S E E V I Q L E S)(図4A)は、イヌ血清とも患者血清とも免疫反応性でなかった(データは示さない)。これは、R4内のVLPTの第三エピトープが、分子的に異なっていたことを示しており、R3およびR2と比較してR4のアミノ酸配列に関して述べた相違(図1B)と一致する。

30

#### 【0331】

HME患者血清とのVLPT-R3ペプチドの免疫反応性。免疫蛍光アッセイ(IFA)により検出可能なE.chaffeensis抗体を有した3つのHME患者血清(番号1、4および12)を使用して、ELISAによりVLPT-R4、R3、およびR2(合成および組換え)の免疫反応性を調査した。(それぞれ、図6A~C)。抗E.chaffeensisイヌ血清とで示した免疫反応性と一致して、VLPT-R3およびR2は、HME患者血清との最も強い免疫反応性を示し、2人の患者(番号1および12)は、VLPT-R4への強い抗体応答を示した(図6A~C)。

40

#### 【0332】

前記3つのHME患者血清とVLPT-R3からの7つのオーバーラッピング合成ペプチド(R3-1からR3-7)との免疫反応性をELISAによって判定した(図6A~C)。類似したアミノ酸配列を含有するペプチドR3-4(17アミノ酸)およびR3-5(20アミノ酸)(図5A参照)は、試験したすべてのHME患者血清と強く一貫して反応した(図6A~C)。オーバーラッピングペプチドを比較すると、この免疫決定因子に必須の最小ペプチド配列は、17アミノ酸(ペプチドR3-5)であった。HME患者

50

および *E. chaffeensis* で実験的に感染させたイヌからの抗体は、同様に VLPT-R3 と反応した (図 4 B および 6 A ~ C)。しかし、ヒト血清における抗体は、主として、VLPT-R3 内のペプチド R3-4 および R3-5 に対するものであった (図 6 A ~ C)。正常ヒト血清は、これらのペプチドおよびタンパク質を認識しなかった (データは示さない)。

#### 【0333】

VLPT-R3 と検出可能な *E. chaffeensis* 抗体を有したより大きな HME 患者パネル (14 人の患者) の血清との反応性を判定した。すべての患者血清は、VLPT-R3 (合成) と反応した (図 6 D)。これは、このエピトープがヒトによって一貫して認識されること、および患者血清における抗体とこのエピトープとの反応性が IFA と完全に相関したことを示している。正常ヒト血清は、VLPT-R3 を認識しなかった (図 6 D、レーン 16)。

10

#### 【0334】

*E. chaffeensis* VLPT の経時的分泌。感染細胞からの上清において、感染後 1 日ほどの早さで VLPT が検出され、感染後 6 日間を通して量が増加した (図 7)。VLPT タンパク質は、未感染 DH82 細胞培養上清においては観察されなかった。

#### 【0335】

VLPT の細胞および細胞外局在。幾つかの特性づけしたエールリヒアタンパク質は、デンスコア・エールリヒア (gp120、gp36、および gp47) 上で特異的に発現される。しかし、*E. canis* のその gp19 オルソログと同様に、*E. chaffeensis* VLPT タンパク質は、免疫電子顕微鏡検査により、桑実胚の膜上ならびに網状およびデンスコア両方のエールリヒアの表面で観察されたが、桑実胚線維上でも検出された (図 8 A)。抗 VLPT-R3 抗体は、未感染 DH82 細胞と反応しなかった (図 8 B)。

20

#### 【0336】

(実施例 3)

本発明の有意性

*E. chaffeensis* VLPT 遺伝子の初期の説明は、分子診断学および疫学のためのこの遺伝子の用途に集中していた。それ故、VLPT 遺伝子は、この遺伝子中に存在する TR 単位の数の違いおよび配列変異に基づいて単離物を区別することに利用されることが多かった (Sumner ら, 1999; Yabsley ら, 2003)。以前の研究は、組換え VLPT が HME 患者血清における抗体と反応することを立証したが、VLPT タンパク質の免疫学的性質は、十分に定義されなかった (Popov ら, 2000)。注目に値することとして、VLPT タンパク質は、*E. chaffeensis* 天然全細胞溶解産物において最終的に同定されたことはいまだかつてなく、44 kDa (予測サイズの 2 倍) というその報告分子量に対応する主要免疫反応性タンパク質は、いまだかつて同定されていない。それ故、VLPT の素性およびそれに対する宿主応答の程度は、依然として確定されていない。最近、初期抗体応答を惹起する *E. canis* における保存された強酸性主要免疫反応性 19 kDa タンパク質 (gp19) の同定および特性づけが記載された (McBride ら, 2003)。それも、ゲノムおよびタンパク質分析に基づいて *E. chaffeensis* VLPT タンパク質が gp19 のオルソログであると結論づけていた。エールリヒア病理生物学における *E. chaffeensis* VLPT タンパク質の役割も不明であり、他の公知細菌タンパク質との関係がそれには無いことで、その潜在的機能に関する糸口が得られない。VLPT および *E. canis* gp19 の注目すべき特徴は、チロシンが優位を占める相同カルボキシ末端ドメインであり、これは、それが機能的に重要な保存ドメインであることを示している。

30

40

#### 【0337】

本発明において観察された *E. chaffeensis* VLPT タンパク質 (Arkansas 株) の見かけの分子量 (~32 kDa) と以前に報告された組換え VLPT の

50

もの (~ 44 kDa) との相違に注目し、天然 VLP T が以前の研究において同定されたことがないことが認められる。それにもかかわらず、抗 VLP T - R3 抗体によるエールリヒア溶解産物から同定された天然 VLP T タンパク質 (~ 32 kDa) と組換え VLP T タンパク質 (融合タグなし) の質量が一致した。それ故、本発明によって生じた証拠は、VLP T (組換えおよび天然) の質量が、~ 32 kDa であることを示しており、これは、予測質量 (25.7 kDa) より大きい、以前に報告されたもの (Sumnerら, 1999) より実質的に小さい。

#### 【0338】

E. chaffeensis および E. canis における主要免疫反応性タンパク質オルソログの4つのペア (gp200s, gp120/gp140, gp47/gp36、および VLP T / gp19) を同定した。2つのオルソログペアは、TR含有タンパク質であり、VLP T / gp19 も同様であるようである。E. canis gp19 は、E. chaffeensis VLP T において見つけられる多数の反復配列を欠くが、VLP T の高単一セリン反復配列のものにサイズおよび組成が類似している高 Ser / Thr / Glu パッチを有し、gp19 の主免疫決定因子をこの高 STE パッチにマッピングした。類似して、gp36/47 および gp120/140 をはじめとする他の高セリン TR含有エールリヒアタンパク質オルソログにおける抗体エピトープは同定されている (Doylerら, 2006; Yuら, 1996)。

#### 【0339】

p28/p30 を除き、特性づけされている E. chaffeensis および E. canis の主要免疫反応性タンパク質は、グルタマートおよびアスパルタートが優勢であるため高酸性であるが、それらは、これらのタンパク質において見つけられる TR 内により高い頻度で存在する大きな比率の極性タンパク質、例えばセリンも有する。さらに、これらのタンパク質の主要抗体エピトープは、これらの高セリン酸性 TR または酸性ドメインにマッピングされている (Doylerら, 2006; McBrideら, 2003; McBrideら, 2000; Yuら, 1997; Yuら, 2000; Nethereryら, 2007)。E. canis gp19 のアミノ酸組成は、3つのアミノ酸、セリン、グルタマートおよびアスパルタートから主として成った。gp19 をはじめとする他の主要免疫反応性タンパク質と一致して、VLP T は、同様のセリン、グルタマートおよびアスパルタート優勢を有し、これは TR 領域においてより顕著である。極性および酸性アミノ酸の高い頻度は、宿主免疫応答と酸性高セリン反復配列およびドメインとの間の直接的な関係を示している。

#### 【0340】

以前に、それらの天然対応物に類似した予測質量より大きい質量を示す組換えエールリヒア TR含有タンパク質上の炭水化物の検出が報告された。さらに、VLP T は、ゲル電気泳動により予測質量より大きい質量を示すことが報告されており (Sumnerら, 1999)、この発見は、本発明においても、天然と組換えの VLP T 両方で観察された。従って、グリコシル化がこの相違の原因である可能性を考えた。セリンおよびトレオニン残基は O-グルカンの連結部位であり、これらのアミノ酸の一部が VLP T 上のグルカン連結部位であると予測された。しかし、他のエールリヒアタンパク質とは異なり、VLP T 上で炭水化物は検出されず、組換え 2 反復配列含有フラグメント (VLP T - R32) の (MALDI-TOF によって決定した場合の) 質量は、その予測質量と一致し、これにより、この異常な移動が VLP T 縦列反復配列の翻訳後修飾に起因しないことが裏付けられた。1つの実施形態において、電気泳動移動度の増加は、VLP T が高酸性タンパク質であるからである。他のものは、リボヌクレアーゼ U2 およびカルデスモンなどの高酸性タンパク質が、中和後に正規化され得る異常電気泳動挙動を示すことを報告している (Garcia-Ortegaら, 2005; Graceffaら, 1992; Mousaら, 2004)。本発明の特定の実施形態では、VLP T の高い酸性アミノ酸含有および低い全 pI (3.8) が、その電気泳動挙動の説明となり、および他の高酸性 TR含有エールリヒアタンパク質の異常挙動の一因となる。

10

20

30

40

50

## 【0341】

*E. chaffeensis* VLPタンパク質において、非同一高セリン反復単位R2、R3およびR4それぞれにおける3つの主要エピトープ含有領域を同定した。これは、他のエールリヒアTR含有タンパク質におけるエピトープの位置と一致した(Doylerら、2006; McBrideら、2003; McBrideら、2000)。両方のヒト血清との最も強い抗体反応性を示した、R3における抗体エピトープを、R2と高相同性(2つのアミノ酸変更)である17アミノ酸N末端領域に局在定位した。それ故、R3に対する抗体は、R2と交差反応する可能性が高いであろう。従って、R3エピトープは、ヒト抗VLP抗体とイヌ抗VLP抗体の両方についての主要免疫決定因子であるようである。興味深いことに、R3免疫決定因子は、ヒト抗体によって検出したときにはペプチドR3-4における3つの末端アミノ酸(AVQ)に非常に依存するようであったが、イヌ血清にいて反応性の抗体は、直ぐ上流の3つのアミノ酸(FKE)により依存性であるようであった。それ故、R3-3は、イヌ抗体による認識のための最小エピトープ配列(14アミノ酸)であった。また、3つの追加のC末端アミノ酸を含有するR3-4(17アミノ酸)は、ヒト血清との抗体反応性に必要不可欠である。興味深いことに、R4は、最も異なる反復配列であり、ウエスタン免疫ブロッティングにより反応性でなかったが、ELISAでは抗体と反応性であった。これは、異なる配座エピトープがR4内に存在したことを示している。*Ehrlichia*および*Anaplasma*種における配座エピトープは、記載されている(Chenら、1996; Munodzanaら、1998)。それ故、R4は、R3に関係なくVLPの免疫反応性の一因となる。VLP-T-R3内のR3-5に対応する、より小さいR4ペプチド(20アミノ酸)は、免疫反応性ではなかったが、完全反復配列(30アミノ酸)は、免疫反応性であった。これは、このエピトープが、不連続であり、そのエピトープを作るために全反復配列を必要とするという結論を支持する。

10

20

## 【0342】

VLP反復単位において同定されたエピトープは、種特異的であるようである。抗VLP-T-R3抗体が近縁*E. canis*と交差反応しなかったから、およびVLP-T-R2、R3およびR4と、他の*Ehrlichia*種または近縁病原体のタンパク質との間で相同性が観察されなかったからである。これは、*E. canis* gp19(VLPオルソログ)において同定された、同じく種特異的である、以前に報告された抗体エピトープ(McBrideら、2006)と一致する。さらに、*E. chaffeensis* および*E. canis* タンパク質オルソログにおいてgp120/gp140、gp47/gp36、gp200sをはじめとする類似の種特異的エピトープが同定されている(Doylerら、2006; McBrideら、2003; McBrideら、2000; Yuら、1997; Yuら、2000)。この発見は、*E. chaffeensis* に対して産生された抗体が種特異的エピトープに主として対するものである実施形態をさらに支持する。それ故、1つの*Ehrlichia*種に対して産生された抗体は、近縁病原体、例えばこの場合は*E. canis* に対する防御を殆どまたはまったくすることができない。しかし、VLPなどの種特異的抗原は、感度の高い種特異的免疫診断法開発のための優れた候補であり、疫学に有用である。

30

40

## 【0343】

エールリヒアTR含有タンパク質、例えば*E. chaffeensis* gp120およびgp47が分泌されるという証拠がある(Doylerら、2006; Popovら、2000)。本発明では、VLPタンパク質も分泌されることを立証する。この分泌メカニズムは、VLPがアミノ末端シグナル配列を有さないので、sec依存性であるようである。VLPは、Secretome P 2.0により、非古典的および無リーダー分泌系によって分泌されると予測された。従って、同じくN末端シグナル配列を欠くが、桑実胚においておよび感染細胞培養物上清において細菌外部で見つけられる、*E. chaffeensis* gp120およびgp47を含めて、VLPおよび他のTR含有タンパク質の分泌は、類似したメカニズムによって起こりうる。タイプIV分泌系成分

50

をコードする遺伝子は、*Ehrlichia*と*Anaplasma*の両方で報告されており(Dunning Hotoppら, 2006; Ohashiら, 2002)、*Apicomplexophylum*のAnkAは、この系によって分泌されるようである(Linら, 2007)。しかし、VLPは、タイプIVエフェクタータンパク質コンセンサス配列(R-X<sub>7</sub>-R-X-R-X-R-X-X<sub>n</sub>)を含有しないようであり、および*Ehrlichia*種において同定されている(Dunning Hotoppら, 2006)他の分泌系の(sec依存性および非sec-依存性)基質であり得る。

【0344】

*E. chaffeensis* gp120およびgp47の(デンスコア・エールリヒア上での)特異的発現とは異なり、しかし*E. canis* gp19の局在(Doyleら, 2006; Popovら, 2000)と一致して、*E. chaffeensis* VLPタンパク質は、両方の形態学的形態、網状およびデンスコア・エールリヒア、上で検出されたが、細胞外では桑実胚線維および桑実胚膜と会合した状態で主として見つかった。それ故、VLPタンパク質は、主要表面タンパク質ではないようであり、感染性形態の(デンスコア)エールリヒアと特異的に会合しない。VLPの桑実胚空間および膜への分泌は、桑実胚維持にまたはビルレンス因子として潜在的に重要な役割を示している。

10

【0345】

*Ehrlichia*種の特異づけされている主要免疫反応性タンパク質の大部分は、一般的なアミノ酸使用量を有する、およびTRに対する強い体液免疫応答を惹起する、酸性TR含有タンパク質である。この宿主免疫応答は、主として、TR内のエピトープに対するものようであり、これはこれらのタンパク質のすべてが、宿主免疫応答と類似に相互作用することを示している。本発明の特定の実施形態において、TRタンパク質中の特定のエピトープに対する抗体は、防御性である。

20

【0346】

(実施例4)

本発明のワクチン

本発明の特定の態様において、本発明の免疫原性組成物は、サブユニットワクチンなどのワクチンとして適する。本発明の他の態様において、前記免疫原性組成物は、免疫防御性と呼ばれる。

30

【0347】

具体的には、例えば*E. chaffeensis* VLPエピトープを含むものなどの、本発明の1つ以上の組成物を、例えばヒト、イヌ、ウシまたはウマ科の動物などの哺乳動物に投与する。その哺乳動物からの血清を、例えばその血清中の抗体を検出することにより、免疫応答についてアッセイすることができる。その後、その哺乳動物を、病原性生物、例えば*E. canis*生物、または別の適切な組成物での後続の攻撃に付し、免疫防御を判定する。例えば突然変異エピトープまたは炭水化物部分を含まないエピトープでの免疫などの対照を利用してよい。その後続の攻撃に対する完全または部分的防御が、その組成物の免疫防御性を明示し、その組成物はワクチンである。部分的防御は、感染の少なくとも1つの症状が発現しないようにするもしくは発現を遅らせること、または少なくとも1つの症状が悪化しないようにすることと定義することができる。

40

【0348】

(参考文献)

本明細書において言及するすべての特許および出版物は、本発明が属する技術分野の技術者のレベルを示すものである。すべての特許および出版物は、それぞれの個々の出版物が、参照により援用されていると具体的に個々に示されているのと同程度に、参照により本明細書に援用されている。

【0349】

## 【数 1】

## 特許および特許出願

U.S. Patent 5,440,013

U.S. Patent 5,618,914

U.S. Patent 5,670,155

10

U.S. Patent 5,446,128

U.S. Patent 5,710,245

U.S. Patent 5,840,833

U.S. Patent 5,859,184

U.S. Patent 5,929,237

20

U.S. Patent 5,475,085

U.S. Patent 5,672,681

U.S. Patent 5,674,976

U.S. Patent 4,554,101

30

PCT/US07/75343

## 【 0 3 5 0 】

## 【数 2】

## 出版物

Bendtsen, J. D., H. Nielsen, H. G. von, and S. Brunak. 2004. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J. Mol. Biol.* 340:783-795.

Blom, N., S. Gammeltoft, and S. Brunak. 1999. Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *J. Mol. Biol.* 294:1351-1362.

40

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.

## 【 0 3 5 1 】

## 【数 3】

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.

Chen, S. M., V. L. Popov, H. M. Feng, and D. H. Walker. 1996. Analysis and ultrastructural localization of *Ehrlichia chaffeensis* proteins with monoclonal antibodies. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 54:405-412. 10

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. Zweygarth, 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. 20

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. 30

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. 40

Frutos, R., A. Viari, C. Ferraz, A. Morgat, S. Eychenie, Y. Kandassamy, I. Chantal, A. Bensaid, E. Coissac, N. Vachery, J. Demaille, and D. Martinez. 2006.

## 【 数 4 】

Comparative genomic analysis of three strains of *Ehrlichia ruminantium* reveals an active process of genome size plasticity. J Bacteriol 188:2533-2542.

Garcia-Ortega, L., I. R. De, V. A. Martinez-Ruiz, M. Onaderra, J. Lacadena, P. A. Martinez del, and J. G. Gavilanes. 2005. Anomalous electrophoretic behavior of a very acidic protein: ribonuclease U2. Electrophoresis 26:3407-3413.

Graceffa, P., A. Jancso, and K. Mabuchi. 1992. Modification of acidic residues normalizes sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis of caldesmon and other proteins that migrate anomalously. Arch. Biochem. Biophys. 297:46-51.

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.

Lin, M., A. den Dulk-Ras, P. J. Hooykaas, and Y. Rikihisa. 2007. Anaplasma phagocytophilum AnkA secreted by type IV secretion system is tyrosine phosphorylated by Abl-1 to facilitate infection. Cell Microbiol. 9:2644-2657.

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.

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.

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.

## 【 0 3 5 3 】

10

20

30

40

## 【 数 5 】

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., 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.

Munodzana, D., T. F. McElwain, D. P. Knowles, and G. H. Palmer. 1998. Conformational dependence of *Anaplasma marginale* major surface protein 5 surface-exposed B-cell epitopes. *Infection & Immunity* 66:2619-2624.

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.

Nethery, K. A., C. K. Doyle, X. Zhang, and J. W. McBride. 2007. *Ehrlichia canis* gp200 contains dominant species-specific antibody epitopes in terminal acidic domains. *Infect. Immun.* 75:4900-4908.

## 【 0 3 5 4 】

10

20

30

40

## 【数 6】

Ohashi, N., N. Zhi, Q. Lin, and Y. Rikihisa. 2002. Characterization and transcriptional analysis of gene clusters for a type IV secretion machinery in human granulocytic and monocytic ehrlichiosis agents. *Infect. Immun.* 70:2128-2138.

Paddock, C. D. and J. E. Childs. 2003. *Ehrlichia chaffeensis*: a prototypical emerging pathogen. *Clin. Microbiol. Rev.* 16:37-64..

10

Popov, V. L., X. J. Yu, and D. H. Walker. 2000. The 120-kDa outer membrane protein of *Ehrlichia chaffeensis*: preferential expression on dense-core cells and gene expression in *Escherichia coli* associated with attachment and entry. *Microb. Path.* 28:71-80..

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.

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.

30

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

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.

40

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*

## 【数 7】

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.

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.

本発明およびその利点を詳細に説明したが、添付のクレームによって定義するとおりの本発明の精神および範囲を逸脱することなく、様々な変更、置換および改変をここに施すことができることを、理解するべきである。さらに、本出願の範囲は、本明細書に記載するプロセス、機械、製造、合成物、手段、方法および工程の特定の実施形態に限定されると解釈されない。通常の当業者が本発明の開示から容易に理解するように、本明細書に記載する対応する実施形態と実質的に同じ機能を果たすまたは実質的に同じ結果を達成する、現在存在するまたは後に開発されるプロセス、機械、製造、合成物、手段、方法または工程を、本発明に従って利用することができる。従って、添付のクレームは、そのようなプロセス、機械、製造、合成物、手段、方法または工程をそれらの範囲内に含むと解釈される。

10

20

30

40

【 図 1 A 】

**N (17)** MSQFSEDNMGNIQMPFD  
**R4 (30)** SDSHERSHLELPSEEVITQLESDDLQSSN  
**R3 (30)** SDLHGFSVVELFDPFKEAVQLGNDLQSSD  
**R2 (30)** SDLHGFSVVELFDPSKEEVQLESDDLQSSN  
**R1 (30)** SDLHESFVELPGPSKEEVQFDDAKNVVY  
**C (61)** GQDHVSLSELGILLGGVFSTMNLYSGYTPY  
 YYHHYCCYNPYYFDYVTPDYCHHCSESSLE

FIG. 1A

【 図 1 B 】

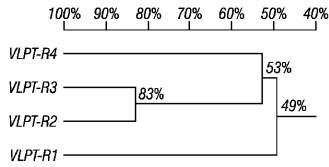


FIG. 1B

【 図 2 A 】

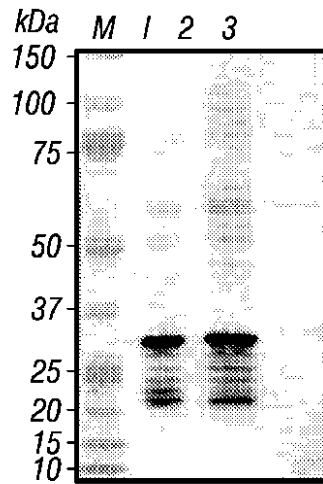


FIG. 2A

【 図 2 B 】

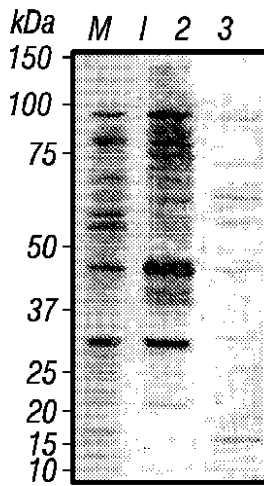


FIG. 2B

【 図 3 】

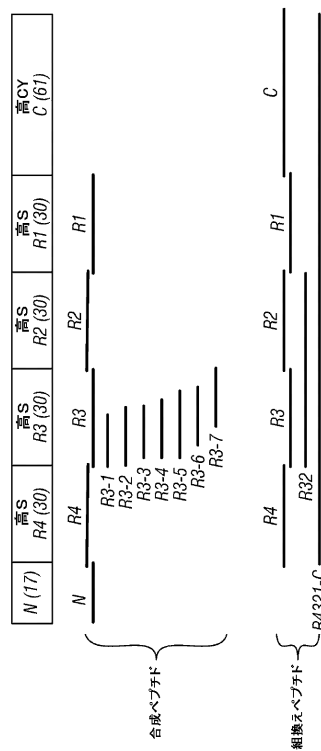


FIG. 3

【 図 4 】

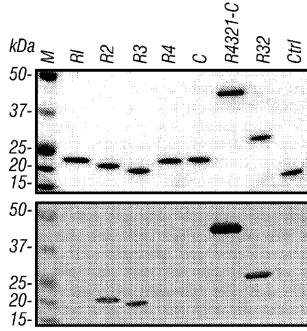


FIG. 4A

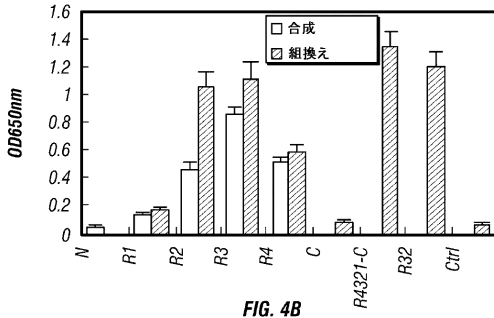


FIG. 4B

【 図 5 A 】

R3 (30)   SDLHGFSVVELFDPFKEAVQLGNDLQQSSD  
 R3-1 (14)  SDLHGFSVVELFDP  
 R3-2 (17)  SDLHGFSVVELFDPFKE  
 R3-3 (14)           HGFSVVELFDPFKE  
 R3-4 (17)           HGFSVVELFDPFKEAVQ  
 R3-5 (20)           HGFSVVELFDPFKEAVQLGN  
 R3-6 (16)                   VELFDPFKEAVQLGND  
 R3-7 (16)                               FKEAVQLGNDLQQS

FIG. 5A

【 図 5 B 】

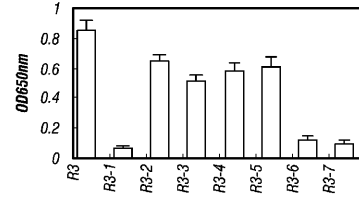


FIG. 5B

【 図 6 】

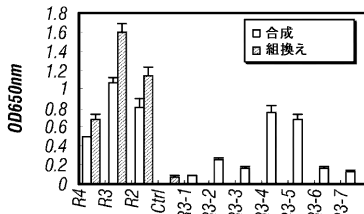


FIG. 6A

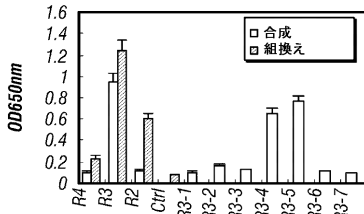


FIG. 6B

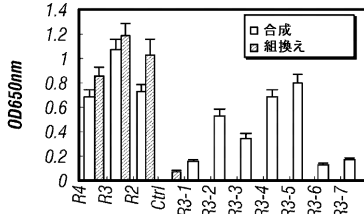


FIG. 6C

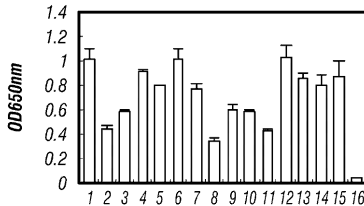


FIG. 6D

【 図 7 】

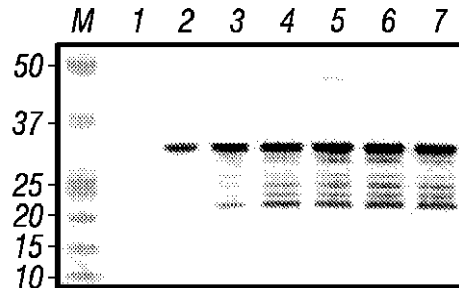


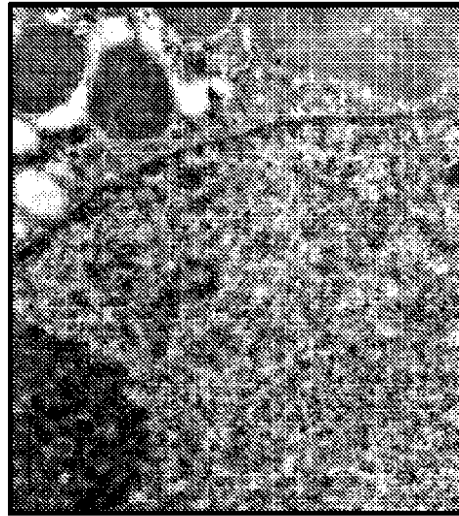
FIG. 7

【 図 8 A 】



**FIG. 8A**

【 図 8 B 】



**FIG. 8B**

【 配 列 表 】

2011509935000001.app

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/US2009/030527

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. C07K14/29 C07K16/12		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, MEDLINE		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SUMNER JOHN W ET AL: "Molecular cloning and characterization of the Ehrlichia chaffeensis variable-length PCR target: An antigen-expressing gene that exhibits interstrain variation" JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, vol. 37, no. 5, May 1999 (1999-05), pages 1447-1453, XP002544277 ISSN: 0095-1137 cited in the application	1-11, 22-31, 33-43
Y	the whole document	1-44
----- -/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:		
<p>*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>*E* earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>*L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>*X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>*Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>*&amp;* document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
7 September 2009		22/09/2009
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Wimmer, Georg

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/US2009/030527

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>MCBRIDE JERE W ET AL: "Identification of a glycosylated Ehrlichia canis 19-kilodalton major immunoreactive protein with a species-specific serine-rich glycopeptide epitope" INFECTION AND IMMUNITY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, WASHINGTON, US, vol. 75, no. 1, 1 January 2007 (2007-01-01), pages 74-82, XP002488935 ISSN: 0019-9567 the whole document</p>	1-44
X	<p>CHEN S-M ET AL: "ANALYSIS AND ULTRASTRUCTURAL LOCALIZATION OF EHRlichIA CHAFFEENSIS PROTEINS WITH MONOCLONAL ANTIBODIES" AMERICAN JOURNAL OF TROPICAL MEDICINE &amp; HYGIENE, AMERICAN SOCIETY OF TROPICAL MEDICINE AND HYGIENE, US, vol. 54, no. 4, 1 January 1996 (1996-01-01), pages 405-412, XP008041542 ISSN: 0002-9637 cited in the application the whole document</p>	12, 20, 44
P, X	<p>LUO TIAN ET AL: "A Variable-length PCR target protein of Ehrlichia chaffeensis contains major species-specific antibody Epitopes in acidic serine-rich tandem repeats" INFECTION AND IMMUNITY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, WASHINGTON, US, vol. 76, no. 4, 1 April 2008 (2008-04-01), pages 1572-1580, XP009103454 ISSN: 0019-9567 the whole document</p>	1-44
E	<p>WO 2009/039414 A (IDEXX LAB INC [US]; O'CONNOR THOMAS PATRICK [US]; KRAH EUGENC REGIS [U] 26 March 2009 (2009-03-26) the whole document</p>	1-44
A	<p>YABSLEY MICHAEL J ET AL: "Molecular variation in the variable-length PCR target and 120-kilodalton antigen genes of Ehrlichia chaffeensis from white-tailed deer (Odocoileus virginianus)." JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY NOV 2003, vol. 41, no. 11, November 2003 (2003-11), pages 5202-5206, XP002544278 ISSN: 0095-1137 cited in the application the whole document</p>	1-44

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US2009/030527**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

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

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2.  Claims Nos.: 32  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:  
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

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

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

**Remark on Protest**

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/US2009 /030527

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box II.2

Claims Nos.: 32

Claim 32 relates to a method of claim 24, wherein the sample is assayed for the polypeptides having the amino acid sequence of SEQ ID NO. 17 and SEQ ID NO. 19. However, SEQ ID NO. 17 and 19 define polynucleotides rather than peptides. Also, even if these polynucleotides were translated, incomplete peptidic sequences would result, which are moreover shorter than those of independent claim 24 and the dependent claim has therefore a broader or different scope. The intention of the limitation of claim 32 is therefore so unclear that a meaningful search of the claim is not possible.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure. If the application proceeds into the regional phase before the EPO, the applicant is reminded that a search may be carried out during examination before the EPO (see EPO Guideline C-VI, 8.2), should the problems which led to the Article 17(2)PCT declaration be overcome.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/US2009/030527

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2009039414 A	26-03-2009	US 2009081708 A1	26-03-2009

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I			テーマコード(参考)
<b>G 0 1 N 33/53</b>	<b>(2006.01)</b>		G 0 1 N 33/53			D
C 1 2 N 15/09	(2006.01)		C 1 2 N 15/00			A

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(72)発明者 マックブライド, ジェレ ダブリュー.  
 アメリカ合衆国 テキサス 77573, リーグ シティ, ミストクリーク コート 5303

(72)発明者 ルオ, ティアン  
 アメリカ合衆国 テキサス, ガルベトン, ミストクリーク コート 5303

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA13 BA31 BA50 CA01 HA15  
 4C085 AA03 BA21 BB11 CC32 EE01  
 4H045 AA10 AA11 BA10 CA11 DA76 DA86 EA31

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	<a href="#">JP2011509935A5</a>	公开(公告)日	2012-11-15
申请号	JP2010542360	申请日	2009-01-09
[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		
[标]发明人	マックブライドジェレダブリュー ルオティアン		
发明人	マックブライド, ジェレダブリュー, ルオ, ティアン		
IPC分类号	C07K14/195 C07K16/12 A61K39/00 A61P31/04 G01N33/569 G01N33/53 C12N15/09		
CPC分类号	A61K39/00 A61K39/0233 A61P31/00 A61P31/04 A61P33/00 A61P37/04 C07K14/29 C07K16/1246 C07K2317/34 G01N33/56911 G01N2333/29 G01N2333/43556 Y02A50/403 C07K17/00 G01N2333 /195		
FI分类号	C07K14/195.ZNA C07K16/12 A61K39/00.H A61P31/04 G01N33/569.F G01N33/53.D C12N15/00.A		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA13 4B024/BA31 4B024/BA50 4B024/CA01 4B024/HA15 4C085/AA03 4C085 /BA21 4C085/BB11 4C085/CC32 4C085/EE01 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/BA10 4H045/CA11 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA31		
代理人(译)	夏木森下		
优先权	61/020379 2008-01-10 US		
其他公开文献	JP2011509935A JP5677703B2		

#### 摘要(译)

本发明涉及用于恰菲埃里希体的VLPT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，公开了恰菲埃里希体VLPT的表位。