

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4448281号
(P4448281)

(45) 発行日 平成22年4月7日 (2010.4.7)

(24) 登録日 平成22年1月29日 (2010.1.29)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C O 7 K 19/00 (2006.01)

C O 7 K 19/00

C O 7 K 14/18 (2006.01)

C O 7 K 14/18

C 1 2 N 1/15 (2006.01)

C 1 2 N 1/15

C 1 2 N 1/19 (2006.01)

C 1 2 N 1/19

請求項の数 21 (全 124 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2002-579516 (P2002-579516)
 (86) (22) 出願日 平成14年4月4日 (2002.4.4)
 (65) 公表番号 特表2004-532023 (P2004-532023A)
 (43) 公表日 平成16年10月21日 (2004.10.21)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2002/010764
 (87) 国際公開番号 W02002/081754
 (87) 国際公開日 平成14年10月17日 (2002.10.17)
 審査請求日 平成17年3月8日 (2005.3.8)
 (31) 優先権主張番号 09/826, 115
 (32) 優先日 平成13年4月4日 (2001.4.4)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

前置審査

(73) 特許権者 500554265
 アメリカ合衆国
 アメリカ合衆国 メリーランド 2085
 2-3804, ロックビル, エグゼク
 ティブ プールバード 6011, スイ
 ート 325, オフィス オブ テクノ
 ロジー トランスファー, ナショナル
 インスティテューツ オブ ヘルス
 (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】 フラビウイルス感染症の予防のための核酸ワクチン

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

第一のフラビウイルスの構造蛋白質のシグナル配列、および免疫原性フラビウイルス抗原をコードする転写単位を含む単離された核酸であって、ここで該抗原は第二のフラビウイルスの抗原であるか、または該抗原は複数のフラビウイルス由来のアミノ酸配列を含むキメラ抗原であり、転写単位は抗原の合成を指示し、該シグナル配列が日本脳炎ウイルスのprMシグナル配列であり、そして該転写単位が西ナイルウイルスのM蛋白質およびE蛋白質；またはセントルイス脳炎ウイルスのM蛋白質およびE蛋白質；またはデングウイルスのM蛋白質、ならびに日本脳炎ウイルスおよびデングウイルス由来のアミノ酸配列を含むキメラE蛋白質をコードする、核酸。

【請求項 2】

転写単位が、西ナイルウイルスのM蛋白質およびE蛋白質をコードする、請求項1記載の核酸。

【請求項 3】

転写単位が、セントルイス脳炎ウイルスのM蛋白質およびE蛋白質をコードする、請求項1記載の核酸。

【請求項 4】

核酸がDNAである、請求項1記載の核酸。

【請求項 5】

配列番号：15および配列番号：21からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む、

請求項4記載の核酸。

【請求項6】

転写単位が、抗原の合成を機能的に制御するように適切に配置された制御配列を含む、請求項1記載の核酸。

【請求項7】

制御配列がサイトメガロウイルス前初期プロモーターである、請求項6記載の核酸。

【請求項8】

転写単位によってコードされる抗原を含むポリペプチドの翻訳開始部位に存在するコゼックコンセンサス配列を含む、請求項1記載の核酸。

【請求項9】

転写単位が、ポリ-Aターミネーターを含む、請求項1記載の核酸。

【請求項10】

請求項1記載の核酸を含む細胞。

【請求項11】

請求項1記載の核酸および薬学的に許容される担体を含む組成物。

【請求項12】

フラビウイルスによる感染症に対して被験者を免疫する医薬の調製のための請求項11記載の組成物の使用。

【請求項13】

フラビウイルス抗原がM蛋白質およびE蛋白質の双方であって、被験者の体内の細胞が、その中に核酸を組み入れた後、M蛋白質およびE蛋白質を含むサブウイルス粒子を分泌する、請求項12記載の使用。

【請求項14】

転写単位が、西ナイルウイルスのM蛋白質およびE蛋白質をコードする、請求項12記載の使用。

【請求項15】

転写単位が、セントルイス脳炎ウイルスのM蛋白質およびE蛋白質をコードする、請求項12記載の使用。

【請求項16】

被験者に組成物の1回量を投与する段階を含む、請求項12記載の使用。

【請求項17】

組成物が非経口経路によって投与される、請求項12記載の使用。

【請求項18】

シグナル配列が、配列番号：14または配列番号：27を含む改変された日本脳炎ウイルスのシグナル配列である、請求項1記載の核酸。

【請求項19】

キメラE蛋白質が、日本脳炎ウイルス由来のカルボキシ末端部分を含み、カルボキシ末端部分はキメラE蛋白質の約5%、10%、15%、20%、25%、30%、40%、50%、または75%である、請求項1記載の核酸。

【請求項20】

カルボキシ末端部分がキメラE蛋白質の約10%である、請求項19記載の核酸。

【請求項21】

カルボキシ末端部分がキメラE蛋白質の約20%である、請求項20記載の核酸。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、1998年6月4日に提出された米国特許仮出願第60/087,908号からの、かつその恩典を主張する、1999年6月3日に提出された国際出願第PCT/US99/12298号の国内段階出願であり、かつ現状は係属中である、2000年11月29日に提出された米国特許出願第09/701,536号の一部継続出願であり、かつその恩典を主張し、かつ現状は係属中である、2001年4

10

20

30

40

50

月4日に提出された米国特許出願第09/826,115号の一部継続出願であり、かつその恩典を主張し、これらの出願はその全文が参照として本明細書に組み入れられる。

【0002】

発明の分野

本発明は、フラビウイルスによって引き起こされる疾患の治療および予防の双方において用いられる新規ワクチン、診断薬および方法に関する。特に、ワクチンは、日本脳炎ウイルス (JEV)、西ナイルウイルス (WNV)、または関連フラビウイルスのようなフラビウイルスの構造蛋白質の遺伝子を含む組み換え型核酸である。これらのワクチンは、インビボで投与した場合にウイルス蛋白質抗原を生合成するための転写単位として作用する。診断薬は、フラビウイルス感染症を検出するために用いることができる組み換え型核酸から作製した抗原を含む組成物である。

10

【背景技術】

【0003】

発明の背景

フラビウイルスは、フラビウイルス科に分類されるフラビウイルス属のメンバーである。フラビウイルスは、ヒトおよび他の哺乳類に対して主として病原性である。ヒトおよび動物に疾患を引き起こすフラビウイルスには、アルフエイ (Alfuy)、アポイ (Apoi)、アロア (Aroa)、バガザ (Bagaza)、バンジ (Banzi)、バツ洞 (Batu Cave)、ブブイ (Bouboui)、ブカラサコウモリ (Bukalasa bat)、ブスクアラ (Bussuquara)、カシパコア (Cacipacore)、カーリー島 (Carey Island)、カウボーンリッジ (Cowbone Ridge)、ダカールコウモリ (Dakar bat)、デング (Dengue) (血清型1、2、3および4)、エッジヒル (Edge Hill)、エンテベコウモリ (Entebbe bat)、ガジェッツガリー (Gadgets Gully)、イグアペ (Iguape)、イルヘウス (Ilheus)、イスラエル七面鳥髄膜脳炎 (Israel turkey meningoencephalitis)、日本脳炎 (Japanese encephalitis)、ジュグラ (Jugra)、ジュチアパ (Jutiapa)、カダム (Kadam)、Karshi (カーシ)、ケドーゴ (Kedougou)、ココベラ (Kokobera)、コウタンゴ (Koutango)、クンジン (Kunjin)、キャサヌール森林病 (Kyasaur Forest disease)、ランガト (Langat)、メアバン (Meaban)、モドック (Modoc)、モンタナ筋炎白質脳炎 (Montana myotis leukoencephalitis)、マリーバレー脳炎 (Murray Valley encephalitis)、ナランジャル (Naranjal)、ネギシ (Negishi)、ウンタヤ (Ntaya)、オムスク出血熱 (Omsk hemorrhagic fever)、フノンペンコウモリ (Phnom Penh bat)、ポチスクム (Potiskum)、ポワッサン (Powassan)、リオブラボー (Rio Bravo)、ロシオ (Rocio)、ロイヤルファーム (Royal Farm)、ロシア春夏脳炎 (Russian spring summer encephalitis)、サボヤ (Saboya)、サルビエジャ (Sal Vieja)、サンパーリタ (San Perlita)、サウマレツリーフ (Saumarez Reef)、セピク (Sepik)、ソクルク (Skuluk)、スpondウェニ (Spondweni)、セントルイス脳炎 (St. Louis encephalitis)、ストラトフォード (Stratford)、ダニ媒介脳炎-中欧サブタイプ (Tick-borne encephalitis - Central European subtype)、ダニ媒介脳炎-極東サブタイプ (Tick-borne encephalitis - far eastern subtype)、テンブス (Tembusu)、THCAR、チュレニイ (Tyuleny)、ウガンダS (Uganda S)、ウスツ (Usutu)、西ナイル (West Nile)、ヤウンデ (Yaounde)、黄熱病 (Yellow fever)、ヨコセ (Yokose)、ジキ (Ziki)、細胞融合物質およびKunoら (J. Virol. 72: 73~83 (1998)) に記載される他の関連フラビウイルスが含まれる。

20

30

40

【0004】

フラビウイルスは、以下の三つの構造蛋白質を含む：prM/M、前膜および膜蛋白質；E、エンベロープ蛋白質；およびC、カプシド蛋白質。(Monath、「Virology」(Fields編)、Raven Press、New York、1990、763~814頁；HeinzおよびRoehrig、「Immunochemistry of Viruses II: The Basis for Serodiagnosis and Vaccines」(van RegenmortelおよびNeurath編)、Elsevier、Amsterdam、1990、289~305頁)。Mは分子量 (MW) 約7~8キロダルトン (kDa) であり、Eの分子量は約50kDa~60 kDaである。MはprMと呼ばれるより大きい前駆体として合成される。prMのpr部分は、prMが成熟ビリオンにおいてM蛋白質を

50

形成するように処理される際に除去される。MおよびEは、フラビウイルス粒子の膜に存在し、そのため、長い間ウイルスの重要な免疫原性成分を構成すると考えられてきた。

【 0 0 0 5 】

フラビウイルスは、様々な種において長さ約10キロベース (kb) の一本鎖RNAを含むRNAウイルスである。分子量12kDa ~ 14 kDaのC蛋白質は、RNAと複合体を形成して、ヌクレオカプシド複合体を形成する。いくつかの非構造蛋白質も同様に、RNAゲノムによってコードされ、それらはNS1、NS2A、NS2B、NS3、NS4A、NS4B、およびNS5と呼ばれるRNAゲノムによってコードされる。ゲノムは、宿主細胞内でポリ蛋白質として翻訳された後、ウイルスまたは宿主特異的プロテアーゼによって翻訳と同時に、または翻訳後個々の遺伝子産物にプロセッシングされる (図1)。

10

【 0 0 0 6 】

米国特許第5,494,671号に要約されているように、いくつかのフラビウイルスのゲノムのヌクレオチド配列が既知である。JEVのヌクレオチド配列は、Sumiyoshiら (Virology 161 : 497 ~ 510 (1987)) およびHashimotoら (Virus Genes 1 : 305 ~ 317 (1988)) によって提供されている。JEVのビルレント株SA-14および中華人民共和国においてワクチンとして用いられている弱毒株SA-14-14-2のヌクレオチド配列は、Nitayaphanら (Virology 177 : 541 ~ 552 (1990)) の研究において比較されている。

【 0 0 0 7 】

他のフラビウイルス種の構造蛋白質をコードするヌクレオチド配列も既知である。多くの場合、完全なゲノムの配列が報告されている。利用できる配列には、デング血清型1型ウイルス、デング血清型2型ウイルス (Deubelら、Virology 155 : 365 ~ 377 (1986)) ; Gruenbergら、J. Gen. Virol. 69 : 1391 ~ 1398 (1988) ; Hahnら、Virology 162 : 167 ~ 180 (1988))、デング血清型3型ウイルス (Osatomiら、Virus Genes 2 : 99 ~ 108 (1988))、デング血清型4型ウイルス (Mackowら、Virology 159 : 217 ~ 228 (1987)) ; Zhaoら、Virology 155 : 77 ~ 88 (1986))、西ナイルウイルス (Lanciottiら、Science 286 : 2331 ~ 2333 (1999))、ポワッサンウイルス (Mandlら、Virology 194 : 173 ~ 184 (1993))、および黄熱病ウイルス (YFV) (Riceら、Science 229 : 726 ~ 733 (1985)) が含まれる。

20

【 0 0 0 8 】

セントルイス脳炎ウイルス (SLEV)、WNVおよびJEVを含む多くのフラビウイルスが、蚊によってヒトおよび他の宿主動物に伝播される。したがって、それらは広い地域にわたって発生し、その伝播は容易に中断または予防されない。

30

【 0 0 0 9 】

西ナイル熱は、主に様々な種のイエカ (Culex mosquitoes) によって脊椎動物に伝播される、蚊媒介性フラビウイルス感染症である。JE、SLE、およびマリーバレー脳炎 (MVE) ウイルスを含むフラビウイルスの日本脳炎 (JE) 抗原性複合体の他のメンバーと同様に、WNVは、節足動物ベクターとトリの間の天然のサイクルにおいて維持される。このウイルスは1937年にウガンダの西ナイル地区で発熱した人から初めて単離された (Smithburnら、Am. J. Trop. Med. Hyg. 20 : 471 ~ 492 (1940))。まもなく、これは最も広く分布するフラビウイルスの一つであると認識され、その地理的範囲は、アフリカ、中東、西アジア、ヨーロッパおよびオーストラリアに及ぶ (Hubalekら、Emerg. Infect. Dis. 5 : 643 ~ 50 (1999))。臨床的には、ヒトにおける西ナイル熱は、頭痛、筋肉痛、多発性関節症、発疹およびリンパ節症を伴う自己限定性の急性発熱性疾患である (MonathおよびTsai、「Clinical Virology」、(Richman, WhitleyおよびHayden編)、Churchill-Livingstone、New York、1133 ~ 1186頁)。急性肝炎または膵炎が時に報告されており、高齢患者におけるWNV感染症の症例は、時に脳炎または髄膜炎を併発する (Asnisら、Clin. Infect. Dis. 30 : 413 ~ 418 (2000))。このように、WNVによる感染症は、世界の多くの地域において健康に関する重篤な懸念である。

40

【 0 0 1 0 】

疾患の地理的伝播、特にWNVが1999年にアメリカ合衆国に入ったことは、この疾患のヒトおよび動物の健康への懸念に対する関心を大きく増加させた。1999年の8月の終わりが

50

ら9月の初めにかけて、ニューヨーク市およびその周辺地域において、ウイルス脳炎が大発生して、確認症例は62例、死亡7例を認めた。この大流行と同時に、地域の保健担当者は、トリ（特にカラス）およびウマにおける死亡率の増加を認めた。大流行はその後、モノクローナル抗体（Mab）マッピングおよびヒト、トリ、および蚊の標本におけるゲノム配列の検出に基づき、WNVによって引き起こされたことが示された（Andersonら、Science 286：2331～2333（1999）；Jiaら、Lancet 354：1971～1972（1999）；Lanciottiら、Science 286：2333～2337（1999））。続く冬の月の間に検出されたウイルス活性は、ウイルスが北米で確立したことを示した（Morb Mortal. Wkly. Rep. 49：178～179（2000）；Asnisら、Clin. Infect. Dis. 30：413～418（2000）；Garmendiaら、J. Clin. Micro. 38：3110～3111（2000））。2000年の間に北東部および大西洋中部の州から報告された調査データから、強まった家畜流行性／流行性伝播およびウイルスの地理的拡大が確認され、ヒトのみならずトリ、蚊およびウマにおける多数の感染例が報告された（Morb. Mortal. Wkly. Rep. 49：820～822（2000））。

10

【0011】

現在、WNV感染症を予防するために利用できるヒトまたは獣医用ワクチンはなく、疾患の伝播と闘う唯一の実践的戦略は蚊の制御である。

【0012】

日本脳炎ウイルス（JEV）は、成人および子供に感染し、熱帯および亜熱帯アジア地域では、幼児、子供、および高齢者における死亡率は高い（Tsaiら、「Vaccines」（Plotkin編）、W.B. Saunders、Philadelphia、Pa、1999年、672～710頁）。生存者において、感染後も持続する脳炎の症状に関連した重篤な神経学的結末が起こる。日本、台湾、および韓国のようなこの地域のより先進国では、JEVは、不活化JEVのワクチンを用いることによってほぼ制御されている。それにもかかわらず、この地域の他の国ではなおも流行している。

20

【0013】

JEV感染症に対して用いるために利用できるワクチンには、ホルマリン処置のような方法によって不活化した生きたウイルスと共に、弱毒化ウイルスが含まれる（Tsaiら、「Vaccines」、（Plotkin編）、W. B. Saunders、Philadelphia、Pa、1994年、671～713頁）。全ウイルスワクチンは有効であるが、特定の問題および／または短所を有する。ウイルスは、マウス脳において、または宿主として哺乳類細胞を用いる細胞培養において培養する。そのような培養法は、厄介で費用がかさむ。さらに、宿主細胞、すなわち脳または他の宿主からの抗原を最終的なワクチン産物に組み入れることに付随したリスクがあり、おそらくワクチンレシピエントにおいて意図しない、かつ望ましくないアレルギー反応を引き起こす。同様に、ワクチン産生に従事する労働者における偶発的な感染症のリスクも存在する。最後に、ウイルスが十分にまたは完全に不活化または弱毒化されていない可能性があり、このようなワクチンが実際に疾患を引き起こす可能性があるというリスクがある。

30

【0014】

デング熱およびデング出血熱（DF/DHF）は、同様に蚊が媒介するフラビウイルスであるデングウイルスによって引き起こされる。四つの抗原的に関連した、しかし異なるデングウイルス血清型（DEN-1、DEN-2、DEN-3およびDEN-4）が存在し、その全てがDF/DHFを引き起こしうる。デング関連疾患の軽症型であるDFの症状には、発熱、発疹、重度の頭痛および関節痛が含まれる。DFを有する被験者の死亡率は低い；しかし、DHFを有する被験者では死亡率は5%もの高さとなりうる。利用可能な証拠から、過去40年間にDHFの300万以上の症例および58,000例以上の死亡例の原因がDHFであり、DHFは主な新たな疾患となっている（Halstead、「Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever」、（GublerおよびKuno編）、CAB International、New York、NY、（1997）、23～44頁）。それにもかかわらず、何十年もの努力にもかかわらず、デングウイルス感染症に対して保護する安全かつ有効なワクチンはおも利用できない。

40

【0015】

50

黄熱病は、南米およびサハラ下アフリカの熱帯地域において流行し、蚊によって媒介される。感染によって発熱、悪寒、重度の頭痛および他の疼痛、食欲不振、悪心および嘔吐が起こり、黄疸が出現する。感染させたニワトリ胚において増殖させた生きたウイルスワクチン17Dは、安全かつ有効であると考えられている。それにもかかわらず、ワクチンが最も必要とされるアフリカおよびアメリカの熱帯地域において一般的に遭遇するような不利な条件でも安定であるワクチンがなおも必要である。

【 0 0 1 6 】

二つのフラビウイルスのキメラである組み換え型フラビウイルスは、PCT出願国際公開公報第93/06214号に開示されている。キメラは、デングウイルスまたはフラビウイルスの一つの「タイプ」または血清型からの非構造蛋白質を、デングウイルスまたは他のフラビ

10

【 0 0 1 7 】

近年、いくつかの組み換え型サブユニットおよびウイルスワクチンが考案されている。米国特許第4,810,492号は、ワクチンにおける抗原として用いるためのJEVのE糖蛋白質の産生について記述している。大腸菌、酵母、または高等生物の細胞培養物のような適した宿主細胞において抗原蛋白質を発現させるために、対応するDNAを発現系にクローニングする。米国特許第5,229,293号は、JEV E蛋白質の遺伝子を有する組み換え型とバキュロウイルスを開示する。E蛋白質が産生され、ワクチンとして用いるために回収されるように、ウイルスを用いて培養昆虫細胞に感染させる。

【 0 0 1 8 】

20

米国特許第5,021,347号は、JEV E蛋白質の遺伝子が組み入れられる組み換え型ワクシニアウイルスゲノムを開示する。生きた組み換え型ワクシニアウイルスは、JEVに対して免疫するためのワクチンとして用いる。ウイルスがデング血清型2型、デング血清型4型およびJEVのE蛋白質のC-末端切断型の遺伝子を組み入れる組み換え型ワクシニアウイルスおよびバキュロウイルスは、米国特許第5,494,671号に開示される。米国特許第5,514,375号は、prMからNS2Bに及ぶJEVオープンリーディングフレームの一部を発現する様々な組み換え型ワクシニアウイルスを開示する。これらのボックスウイルスは、プロセシングされたM蛋白質およびE蛋白質を含む細胞外粒子の形成を誘導した。これらのJEV蛋白質をコードする二つの組み換え型ウイルスは、高い力価の中和およびヘムアグルチニン阻害抗体を産生し、マウスにおいて保護免疫を生じた。これらの効果の程度は、1回限りの免疫後より2回

30

【 0 0 1 9 】

組み換え型ウイルスベクターも同様に、デング熱のウイルスワクチンとして役立てるために調製されている。Zhaoら(J. Virol. 61: 4019~4022 (1987))は、デング血清型4型からの構造蛋白質およびNS1を有する組み換え型ワクシニアウイルスを調製して、哺乳類細胞を組み換え型ウイルスに感染させた後発現を得た。類似の発現は、標的昆虫細胞に感染させるために組み換え型バキュロウイルスを用いて得られた(Zhangら、J. Virol. 62: 3027~3031 (1988))。Brayら(J. Virol. 63: 2853~2856 (1989))も同様に、チャレンジした場合にデング脳炎に対する保護免疫をマウスに付与する、E蛋白質遺伝子に基づく組み換え型ワクシニアデングワクチンを報告した。Falgoutら(J. Virol. 63: 1852~1860 (1989))およびFalgoutら(J. Virol. 64: 4356~4363 (1990))は、類似の結果を報告した。Zhangら(J. Virol. 62: 3027~3031 (1988))は、デングEおよびNS1蛋白質をコードする組み換え型バキュロウイルスが同様に、チャレンジした場合にデング脳炎に対してマウスを保護することを示した。構造遺伝子と非構造遺伝子とを組み換え型ウ

40

50

イルスワクチンに組み入れた他の組み合わせは、有意な免疫を生じることができなかった (Brayら、J. Virol. 63: 2853 ~ 2856 (1989))。同様に、サルは、E蛋白質を発現する組み換え型バキュロウイルスによって免疫した場合に、デングウイルスチャレンジに対して十分な保護免疫を産生できなかった (Laiら、(1990)、119 ~ 124頁、F. Brown, R.M. Chancock, H.S.GinsbergおよびR. Lerner (編)「Vaccines 90: Modern approaches to new vaccines including prevention of AIDS」、Cold Spring Harbor Laboratory、Cold Spring Harbor、NY)。

【 0 0 2 0 】

組み換え型DNA調製物を用いた免疫は、モデルとして離乳したばかりのマウスを用いて、SLEVおよびデング-2ウイルスに関して報告されている (Phillpottsら、Arch. Virol. 141: 743 ~ 749 (1996) ; Kochelら、Vaccine 15: 547 ~ 552 (1997))。SLEVのprMおよびE遺伝子をコードするプラスミドDNAは、DNA免疫の1回用量または2回用量によるSLEVチャレンジに対して部分的保護を提供した。これらの実験において、対照マウスは約25%の生存を示し、DNA免疫マウスには保護抗体は検出されなかった (Phillpottsら、Arch. Virol. 141: 743 ~ 749 (1996))。prMを含む組み換え型デング-2プラスミドDNAの皮内注射を3回行ったマウスでは、100%が抗デング-2中和抗体を産生し、対応するE遺伝子を投与したマウスの92%が同様に中和抗体を産生した (Kochelら、Vaccine 15: 547 ~ 552 (1997))。しかし、2用量スケジュールを用いたチャレンジ実験は、致死性デング-2ウイルスチャレンジに対してマウスを保護することができなかった。

【 0 0 2 1 】

JEV、SLEV、デングウイルス、および他のフラビウイルスによる感染症に対して免疫するために今日開発されたワクチンは、その使用に伴って多くの短所および問題を有する。不活化ワクチンは費用が高く、調製が不便である。さらに、そのような如何なるワクチンもウイルスを調製するために用いられる宿主細胞の蛋白質に由来するアレルギー反応のリスクを伴う。さらに、そのようなワクチンは、その製造のために雇用される労働者に対してかなりのリスクを呈する。候補弱毒化JEVワクチンは、現在臨床試験中であるが、1996年現在、中華人民共和国外では広く受け入れられていない (Hennessyら、Lancet 347: 1583 ~ 1586 (1996))。

【 0 0 2 2 】

JEVのようなフラビウイルスのごく特定の蛋白質を用いることに基づく組み換え型ワクチンは、細胞培養における生合成発現、その後抗原の精製および処置によって産生されるが、高い抗体力価を誘導しない。同様に、全ウイルス調製物と同様に、これらのワクチンは、宿主からの抗原またはベクターに対する有害なアレルギー反応のリスクを有する。デングウイルスおよびWNVに対するワクチン開発はあまり進んでおらず、そのようなワクチンに基づくまたは組み換え型蛋白質に基づくワクチンは、先に言及した問題と類似の問題に直面する。

【 0 0 2 3 】

したがって、調製が安価で、その製造にかかわる労働者に対するリスクが少なく、不純物または外因性の免疫原性成分による有害な免疫反応のリスクが最小限であり、しかも中和抗体および保護免疫を誘発するために非常に有効である、黄熱病ウイルス、デングウイルス、JEV、SLEV、およびWNVのようなフラビウイルスに対して向けられるワクチンまたは改善されたワクチンが必要である。さらに、必要な免疫量を最小限にするJEV、WNV、および関連フラビウイルスに対するワクチンが必要である。

【 0 0 2 4 】

ワクチンの製造に関して詳細に記述したように現状技術の短所の多くはまた、免疫診断薬の製造のために用いられる抗原および抗体の製造にも当てはまる。特に、ウイルスからの抗原の製造に伴って発生するリスクおよび費用、ならびに現在利用できるほとんどの組み換え型発現抗原が、有効な免疫反応を誘発できないことは、免疫診断薬の分野における、同様のリスク、高い費用および対応する感度の欠如と同等である。このように、高い費用、生きたウイルスの偶発的感染のリスク、およびこれまでに利用可能な試験の感度の所

望より低いレベルのために、フラビウイルス感染症および／または混入を検出するための迅速、単純、および高感度の診断試験が必要とされている。

【 0 0 2 5 】

本発明は、選択したフラビウイルスに対する抗体を検出するための診断アッセイ法において用いられる、非常に免疫原性の高い組み換え型抗原を提供することによってこれらの需要を満たす。本発明はさらに、フラビウイルス蛋白質に対する抗体を検出するための免疫診断アッセイ法において、フラビウイルス、フラビウイルス遺伝子、またはその模倣体に由来する組み換え型抗原を用いることを提供する。

【発明の開示】

【 0 0 2 6 】

発明の概要

本発明は、免疫原性フラビウイルス抗原の転写単位 (TU) を含む核酸分子を提供する。TUは、細胞内に取り込まれた後、宿主細胞に抗原を合成するように指示する。本発明の重要な局面において、フラビウイルスは、黄熱病ウイルス (YFV)、デング血清型1型ウイルス (DEN-1)、デング血清型2型ウイルス (DEN-2)、デング血清型3型ウイルス (DEN-3)、デング血清型4型ウイルス (DEN-4)、セントルイス脳炎ウイルス (SLEV)、日本脳炎ウイルス (JEV)、西ナイルウイルス (WNV)、ポワッサンウイルスまたは他の如何なるフラビウイルスとなりうる。本発明の重要な態様において、抗原はフラビウイルスprM/M蛋白質、E蛋白質、またはその双方となりうる。本発明の重要な態様において、抗原はキメラフラビウイルス蛋白質となりうる。特に、TUがprM/MとE蛋白質の双方を含む場合、宿主細胞は、prM/MとE抗原とを含むサブウイルス粒子を分泌する。本発明のさらに重要な局面において、核酸はDNA分子である。さらに重要な態様において、核酸TUは、それがprM/MおよびE抗原の発現を機能的に制御するように適当に配置された制御配列を含み、この制御配列は、サイトメガロウイルス前初期プロモーターとなりうる。さらなる態様において、TUのヌクレオチド配列は、TUによって産生されたmRNAの5'末端非翻訳領域における大きいヘアピン構造を模倣することによって、および／またはTUによって産生されたmRNAの翻訳開始部位にコザックコンセンサス配列を含めることによって、真核細胞での翻訳を最適にするように操作される。さらなる態様において、転写単位にはまたポリ-Aターミネーターも含まれる。

【 0 0 2 7 】

本発明はさらに、免疫原性抗原を合成するように宿主細胞を指示する、免疫原性フラビウイルス抗原の転写単位を含む核酸分子を含む宿主細胞を提供する。フラビウイルスは、YFV、DEN-1、DEN-2、DEN-3、DEN-4、SLEV、JEV、WNV、ポワッサンウイルスまたは他のフラビウイルスであってもよい。重要な態様において、抗原はprM/M蛋白質、E蛋白質、またはprM/MとE蛋白質の双方であってもよい。後者の場合、細胞は、prM/MとE蛋白質とを含むサブウイルス粒子を分泌する。

【 0 0 2 8 】

さらに、本発明は、免疫原性フラビウイルス抗原の転写単位を含む核酸分子を含むフラビウイルスに対して、被験者にワクチン接種するための組成物を提供する。転写単位は、被験者の体内の細胞に、その中に取り込まれた後、免疫原性抗原を合成するように指示する。組成物はさらに、薬学的に許容される担体を含む。重要な態様において、フラビウイルスは、YFV、DEN-1、DEN-2、DEN-3、DEN-4、SLEV、JEV、WNV、ポワッサンウイルスまたは他のフラビウイルスであってもよい。さらに、抗原はprM/M蛋白質、E蛋白質、またはprM/MとE蛋白質の双方であってもよい。後者の場合、細胞は、フラビウイルスprM/MとE蛋白質とを含むサブウイルス粒子を分泌する。これらのサブウイルス粒子はまた、非感染性組み換え型抗原 (NRA) とも呼ばれる。重要な態様において、核酸分子はDNA分子である。さらに重要な態様において、転写単位はさらに、核酸が被験者の細胞内に導入された場合にprM/MとE抗原との合成を機能的に制御するように適当に配置された制御配列を含む。この制御配列は、サイトメガロウイルス前初期プロモーターとなりうる。なおさらなる態様において、転写単位はまた、ポリ-Aターミネーターを含みうる。

【0029】

フラビウイルスに対して被験者にワクチン接種するために本発明によって提供される組成物は、一つ以上のフラビウイルス抗原に対する転写単位を含む、核酸分子、または複数の分子を含む。一つ以上の免疫原性フラビウイルス抗原は、異なるフラビウイルス種、株、または単離体の如何なる組み合わせに由来する。有意な態様において、含まれるフラビウイルスは、二つもしくはそれ以上、三つもしくはそれ以上、四つもしくはそれ以上、五つもしくはそれ以上、または七つもしくはそれ以上のフラビウイルスとなりうる。そのようなフラビウイルスの例には、YFV、DEN-1、DEN-2、DEN-3、DEN-4、SLEV、JEV、WNV、ポワッサンウイルスまたは他のフラビウイルスが含まれるがこれらに限定されない。特定の地理的地域に対して一般的なフラビウイルス疾患に対する免疫を付与するために、複合ワクチンを処方することができる。熱帯および亜熱帯アジアに向けられる特定の態様において、DEN-1、DEN-2、DEN-3、DEN-4、WN、およびJEウイルスを選択することができる。アフリカに向けられる特定の態様では、DEN-1、DEN-2、DEN-3、DEN-4、WN、およびYFを選択することができる。ラテンアメリカに向けられる特定の態様では、DEN-1、DEN-2、DEN-3、DEN-4、RocioおよびYFウイルスを選択することができる。

10

【0030】

本発明は、フラビウイルスによる感染症に対して被験者を免疫する方法をなおさらに提供する。方法は、免疫原性フラビウイルス抗原の転写単位を含む核酸分子を含むワクチン接種組成物の有効量を被験者に投与することを含む。転写単位は、被験者の体内において、それらが細胞に取り込まれた後に、免疫原性抗原を合成するように細胞に指示する。組成物はさらに、薬学的に許容される担体を含む。方法の有意な態様において、フラビウイルスは、YFV、DEN-1、DEN-2、DEN-3、DEN-4、SLEV、JEV、WNV、ポワッサンウイルスまたは他のフラビウイルスであってもよい。方法のなお他の重要な局面において、抗原はprM/M蛋白質、E蛋白質、またはprM/MとE蛋白質の双方であってもよい。抗原がprM/MとE蛋白質の双方である場合、被験者の体内の細胞は、その中に核酸を組み入れた後、prM/MとE蛋白質とを含むサブウイルス粒子を分泌する。さらに、方法の重要な態様において、ワクチン接種組成物は非経口経路によって1回量を被験者に投与される。方法のなおさらなる局面において、核酸はDNA分子である。方法のなおさらなる態様において、転写単位はさらに、prM/MとE抗原との合成を機能的に制御するように適当に配置された制御配列を含み、この態様の重要な局面において、制御配列は、サイトメガロウイルス前初期プロモーターである。さらに、転写単位はまた、ポリ-Aターミネーターを含んでもよい。

20

30

【0031】

本発明のこれらの局面および態様は、その異なる属性および長所に基づく。核酸構築物が完全なゲノムを含む配列より、むしろフラビウイルスゲノムのごく一部を含むために、核酸TU含有ワクチンは完全に非生存である。したがって、その製造に関わる労働者またはワクチンを接種された被験者に対するフラビウイルス感染の危険はない。核酸ワクチンは、調製が容易で、投与が容易で、しかも使用前に保存しても安定である。意外にも、本発明の核酸ワクチンは、1回量のための投与後でも哺乳類において保護免疫の付与に本質的に100%成功する。さらに意外な結果は、核酸TUが雌性哺乳類において、乳汁を通してその子孫に伝搬されうる免疫をフラビウイルスに対して産生することができる点である。理論に拘束されたくないが、本発明者らは、核酸が保護免疫の付与に成功するための可能性のあるメカニズムは、ワクチンが投与される被験者の細胞のような、核酸を有する宿主細胞が、フラビウイルスprM/MおよびE抗原を含むサブウイルス粒子を産生するという点である。これらの粒子は、本来のフラビウイルスビリオンの免疫原性属性を模倣する。

40

【0032】

本発明はまた、膜貫通シグナル配列が第一のフラビウイルスに由来し、Mおよび/またはE蛋白質が第二のフラビウイルスに由来する、フラビウイルスの非感染性の抗原性ポリペプチド、抗原性ポリペプチド断片、およびprM/MおよびE蛋白質を含むNRAを提供する。さらに、prM/M蛋白質は、第一と第二のフラビウイルスの双方からのアミノ酸配列を含みうる。さらに、E蛋白質は、第一と第二のフラビウイルスの双方からのアミノ酸配列を含

50

みうる。本明細書において用いられる「キメラ」とは、一つ以上のフラビウイルスからの配列を含む如何なる蛋白質または核酸も意味する。本明細書において用いられるように、「非ビルレント」とは、本発明の抗原またはワクチンが疾患を引き起こすことができないことを意味する。より詳しくは、組み換え型蛋白質抗原は、フラビウイルスの感染、複製、および発病にとって必要であるフラビウイルスからの混入ゲノム材料を含まない。

【0033】

本発明のポリペプチドは、選択したフラビウイルスのprM、M、および/またはE蛋白質に関して、本明細書に定義した、または当技術分野で既知の氨基酸配列を含みうる。本発明の核酸は、選択したフラビウイルスのprM、M、および/またはE蛋白質をコードするヌクレオチド配列を含みうる。

10

【0034】

本発明の抗原は非結合となりうる、または固相上での抗原の配置を促進する担体分子に結合させることができる。担体分子は、抗原をそれに結合させることができ、ヒトの血清において抗体と反応しない分子である。そのような担体の例は、ウシ血清アルブミン (BSA) である。

【0035】

本発明の抗原はまた、抗原を産生することができる発現系において、抗原をコードする核酸を発現することによって得られる組み換え型蛋白質となりうる。

【0036】

本発明の抗原の氨基酸配列は、prM、M、および/またはE抗原の免疫反応性部分を含みうる。これらの抗原はさらに、より堅固な二次構造を提供することによってエピトープの反応性を増加させるためにジスルフィド結合することができる氨基酸を除去および/または付加するため、その生体内寿命を増加させるため、その細胞障害性を変化させるため、または感染症を予防するためなどの、いくつかのさらなる特性を提供するように設計された配列に結合してもよい。いずれにせよ、抗原は免疫反応性および/または免疫原性を有しなければならない。

20

【0037】

発明の詳細な説明

本発明は、prM/MおよびE蛋白質抗原のようなフラビウイルス抗原性蛋白質をコードする核酸転写単位を含む。核酸は、特に細胞が被験者の細胞である場合、核酸が適当な細胞に取り込まれると、prM/MおよびE蛋白質抗原を発現するように機能する。本発明はまた、その活性物質が核酸転写単位 (TU) であるワクチンを含む。本発明はさらに、TUを含む細胞を含む。本発明はさらに、核酸TU分子を含むワクチンの有効量を被験者に投与することによって、フラビウイルス感染症に対して被験者を免疫する方法を含む。

30

【0038】

本発明は、転写単位が抗原の合成を指示する、第一のフラビウイルスの構造蛋白質のシグナル配列と、第二のフラビウイルスの免疫原性フラビウイルス抗原とをコードする転写単位を含む単離された核酸を提供する。本発明はさらに、フラビウイルス抗原を作製するために核酸転写単位 (TU) を用いることおよび核酸TUによって産生されたフラビウイルス抗原を用いることを含む。本発明に含まれるフラビウイルス抗原には、第一のフラビウイルスと、少なくとも一つのさらなるフラビウイルスからの氨基酸配列を組み入れた、キメラフラビウイルス抗原が含まれる。本発明はさらに、フラビウイルス特異的抗体を産生するため、およびフラビウイルス特異的抗体の存在を検出するために、本発明のTUによってコードされるフラビウイルス抗原を用いることを含む。

40

【0039】

一つの態様において、本発明の単離された核酸は、日本脳炎ウイルスシグナル配列をコードする転写単位を含みうる。

【0040】

もう一つの態様において、本発明の転写単位は、以下のフラビウイルスの一つまたは複数に由来しうる免疫原性フラビウイルス抗原をコードしうる；黄熱病ウイルス、デング血

50

清型1型ウイルス、デング血清型2型ウイルス、デング血清型3型ウイルス、デング血清型4型ウイルス、日本脳炎ウイルス、ポワッサンウイルス、および西ナイルウイルス。

【0041】

もう一つの態様において、本発明の転写単位は、以下のフラビウイルスの一つまたは複数からの配列を含みうる免疫原性キメラフラビウイルス抗原をコードしうる：黄熱病ウイルス、デング血清型1型ウイルス、デング血清型2型ウイルス、デング血清型3型ウイルス、デング血清型4型ウイルス、日本脳炎ウイルス、ポワッサンウイルス、および西ナイルウイルス。

【0042】

特定の態様において、本発明の核酸は、日本脳炎ウイルスのシグナル配列、ならびに西ナイルウイルス、SLEV、YFV、および/またはポワッサンウイルスのM蛋白質およびE蛋白質をコードしうる。核酸はまた、フラビウイルスのM蛋白質、フラビウイルスのE蛋白質、フラビウイルスのM蛋白質およびE蛋白質の双方、フラビウイルスのM蛋白質の一部、フラビウイルスのE蛋白質の一部、ならびに/またはフラビウイルスのM蛋白質の一部およびフラビウイルスのE蛋白質の一部の双方となりうる。好ましい態様において、単離された核酸は、フラビウイルスのM蛋白質とE蛋白質の双方をコードする。さらに、本発明の核酸は、DNAであってよく、配列番号：15、配列番号：19、配列番号：21、配列番号：23、または配列番号：42のヌクレオチド配列を含みうる。

【0043】

もう一つの特定の態様において、本発明の核酸は、日本脳炎ウイルスのシグナル配列、第二のウイルスのM蛋白質、および第二のウイルスのE蛋白質をコードする核酸の一部を、JEV E蛋白質の対応する部分をコードする核酸に置換することによって形成される、キメラE蛋白質をコードしうる。または、第二のウイルスのE蛋白質の欠失部分に対応する配列の部分は、第三のウイルスから選択した他の配列によって置換することができるか、またはそれは非ウイルス配列となりうる。第二の蛋白質は、西ナイルウイルス、SLEV、YFV、ポワッサンウイルスおよび/またはデングウイルス血清型となりうる。キメラE蛋白質は、カルボキシ末端部分が一つのフラビウイルスに由来し、キメラE蛋白質の残りの部分がもう一つのフラビウイルスに由来する蛋白質を含みうる。カルボキシ末端部分は、キメラE蛋白質の例えば、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、60、または75%となりうる。本発明の核酸はDNAとなりえて、配列番号：44または配列番号：46のヌクレオチド配列からの蛋白質コード配列を含みうる。本発明の核酸は、配列番号：44または配列番号：46のヌクレオチド配列を含みうる。

【0044】

本発明の転写単位はまた、それが抗原の合成を機能的に制御するように適切に配置された制御配列を含みうる。制御配列は、例えば、サイトメガロウイルス前初期プロモーターとなりうる。本発明の核酸はまた、転写単位によってコードされる抗原を含むポリペプチドに関する翻訳開始部位に存在する、コザックコンセンサス配列を含みうる。本発明の転写単位はまた、ポリ-Aターミネーターを含みうる。

【0045】

本発明はさらに、本発明の核酸を含む細胞を提供する。

【0046】

同様に、薬学的に許容される担体と、本発明の核酸、細胞、または抗原とを含む組成物が提供される。本発明はさらに、本発明の組成物の有効量を被験者に投与することを含む、フラビウイルスによる感染症に対して被験者を免疫する方法を提供する。特定の態様において、被験者を免疫するために用いられる組成物は、フラビウイルスのM蛋白質およびE蛋白質の双方の合成を指示し、被験者の体内の細胞は、その中に核酸を組み入れた後、M蛋白質とE蛋白質とを含むサブウイルス粒子を分泌する。または、組成物は、フラビウイルスのM蛋白質および/またはE蛋白質、またはM蛋白質とE蛋白質とを含むサブウイルス粒子を含みうる。本発明の方法において、免疫組成物は、1回用量を被験者に投与することができ、かつ非経口経路によって投与することができる。

【 0 0 4 7 】

本発明はさらに、本発明の単離された核酸から産生された抗原を提供する。例として、TUのヌクレオチド配列によってコードされた第二のフラビウイルスからの抗原は、例えば西ナイルウイルスに由来しうるM蛋白質となりうる。抗原はまた、デングウイルス、セントルイス脳炎ウイルス、日本脳炎ウイルス、ポワッサンウイルスおよび/または黄熱病ウイルスに由来する蛋白質となりうる。さらなる態様において、抗原は、第一のフラビウイルスからの膜貫通シグナル配列と、SLEV、JEV、YFV、WNVおよび/またはポワッサンウイルスに由来しうる、第二のフラビウイルスからのprM/M蛋白質の残りを含む、さらなるアミノ酸配列とを含む。第一のフラビウイルスからの膜貫通シグナル配列は、高いシグナル配列確率のような所望の特徴を付与する、改善または改変されたシグナル配列となりうる。設計または選択によってこれらの目標を達成することは、隠れたマルコフモデルを用いるプログラムを含むがこれらに限定されない、機械学習コンピュータプログラムを用いて行うことができる。

10

【 0 0 4 8 】

TUのヌクレオチド配列によってコードされる抗原は、西ナイルウイルス抗原、デングウイルス抗原、セントルイス脳炎ウイルス抗原、日本脳炎ウイルス抗原、ポワッサンウイルス抗原および/または黄熱病ウイルス抗原となりうる。

【 0 0 4 9 】

TUのヌクレオチド配列によってコードされる抗原は、E蛋白質であってもよく、それは西ナイルウイルス、デングウイルス、セントルイス脳炎ウイルス、日本脳炎ウイルス、ポワッサンウイルスおよび/または黄熱病ウイルスに由来するE蛋白質となりうる。コードされる抗原はまた、一つ以上のフラビウイルスから選択されたアミノ酸配列を含む、カメラE蛋白質となりうる。

20

【 0 0 5 0 】

さらに、TUのヌクレオチド配列によってコードされる抗原は、西ナイルウイルス、デングウイルス、セントルイス脳炎ウイルス、日本脳炎ウイルス、ポワッサンウイルスおよび/または黄熱病ウイルスに由来しうるM蛋白質およびE蛋白質となりうる。

【 0 0 5 1 】

本明細書において用いられるように、「M蛋白質」、「prM蛋白質」、または「prM/M蛋白質」とは、フラビウイルスM蛋白質またはフラビウイルスprM蛋白質を意味する。例には、一つまたは複数のフラビウイルスprM蛋白質からのアミノ酸配列を含むprM蛋白質、さらなるアミノ酸配列を含まないM蛋白質、およびインビトロまたはインビボで成熟M蛋白質を産生するようにプロセッシングされる、さらなるアミノ酸配列を含む蛋白質が含まれるが、これらに限定されない。

30

【 0 0 5 2 】

本明細書において用いられるように、「核酸転写単位」または「核酸転写単位分子」は、一つまたは複数の明記された蛋白質をコードする核酸を意味する。TUは、適した細胞に組み入れられた後、核酸が核酸によってコードされる一つまたは複数の明記された遺伝子産物の合成を誘導するような生物活性を有する。遺伝子産物（複数）は、TUに化学的に関連していない蛋白質のような他の生体高分子である。核酸TUは、その細胞成分を用いてTUの核酸によってコードされる特異的遺伝子産物、または複数の産物を生じるように細胞を誘導する。如何なる核酸もTUとして機能する可能性があるが、好ましい態様において、TUは、プラスミドまたはベクターが、実験および生合成のためにTUを用いることを容易にするマーカー遺伝子、または他の配列構築物のコード配列を含む、プラスミドまたは類似のベクターのDNAである。

40

【 0 0 5 3 】

本明細書において用いられるように、「制御配列」とは、細胞の適当な細胞成分と相互作用して、TUによってコードされる遺伝子産物の増強されたまたは活性化された生合成に至る、TU内に組み入れられた調節ヌクレオチド配列である。このように、適した制御配列は、細胞の成分がそれに対して相互作用することができ、それによって遺伝子産物の合成

50

が得られる配列である。核酸において明記されたコード配列に関して機能的に配置されると、制御配列は、明記された核酸の発現を有効に制御して遺伝子産物を産生する。

【 0 0 5 4 】

本明細書において用いられるように、「プロモーター」は、制御配列として作用するTUにおけるヌクレオチド配列である。

【 0 0 5 5 】

本明細書において用いられるように、「コザック配列」または「コザックコンセンサス配列」は、真核細胞mRNAsの翻訳を最適にする翻訳開始部位でのヌクレオチド配列である (Kozak、Mol. Cell Biology 9 : 5134 ~ 5142 (1989))。

【 0 0 5 6 】

本明細書において用いられるように、「ターミネーター」は、成熟mRNAの3'末端でのポリアデニル化を誘導するように作用する伸長ヌクレオチド配列である。ターミネーター配列は特定のコード配列の後、またはそこから下流に認められる。

【 0 0 5 7 】

本明細書において用いられるように、「細胞」は一つもしくは複数の遺伝子産物をコードするTUを含む、または中にそのようなTUが導入されている原核細胞または真核細胞である。このように、細胞は、細胞において成分として天然にまたは内因性に認められない外来または異種物質、すなわちTUを含む。適した細胞は、TUを導入した結果、遺伝子産物を生合成することができる細胞である。特に、適した細胞は、もしあればTU内に含んでもよい制御配列、およびターミネーター配列に反応する細胞である。本発明の重要な態様において、細胞は哺乳類細胞である。本発明の特に重要な態様において、細胞は、TUがワクチンの成分として投与されているヒトまたはヒト以外の被験者の体内に本来存在する細胞である。または、ワクチンとして、もしくは免疫診断アッセイ法において用いるため、または証明目的のために抗原を調製することを含む、分析または診断応用において、細胞は、インビトロで培養されたヒトまたはヒト以外の細胞であってもよい。

【 0 0 5 8 】

本明細書において用いられるように、特定の病原体に対して特異的な「ワクチン」または「被験者にワクチン接種するための組成物」は、被験者に投与した場合に、被験者において免疫応答を誘導する調製物を意味する。本明細書において用いられるように、「免疫原性」反応は、病原体に対する保護免疫を被験者に付与する反応である。理論に拘束されたくはないが、免疫原性反応は、中和抗体の産生によって (すなわち、液性免疫応答)、免疫系の細胞障害細胞によって (すなわち、細胞性免疫応答)、またはその双方によって起こってもよいと考えられる。本明細書において用いられるように、「免疫原性抗原」は、被験者に導入した場合に、または宿主もしくは被験者の細胞内で合成された場合に、免疫原性反応を誘導する抗原である。本明細書において用いられるように、ワクチンまたはワクチン組成物の「有効量」は、被験者に投与した場合に、被験者に保護免疫を付与するために十分である量である。歴史的に、ワクチンは、活性成分として、病原体、特にその表面を含む、一つまたは複数の特異的分子成分または構造を含むと理解されてきた。そのような構造には、病原性生物において一般的に認められる蛋白質、複合糖質、および/または複合脂質のような表面成分が含まれてもよい。

【 0 0 5 9 】

しかし、本明細書において用いられるように、「ワクチン」または「被験者にワクチン接種するための組成物」という用語は、先行段落において要約した従来の意味を拡大することを強調しなければならない。本明細書において用いられるように、これらの用語はまた、本発明のTUまたはTUを含む組成物にも関する。TUは、病原体の明記された抗原であって、被験者の細胞内でTUによってコードされる一つまたは複数の特異的遺伝子産物の生合成を誘導する。次に、生合成抗原が免疫原として作用する。既に記述したように、TU、したがってワクチンは、明記された免疫原性抗原をコードする如何なる核酸であってもよい。本発明の好ましい態様において、ワクチンのTUはDNAである。TUは、分子生物学、細胞生物学、およびウイルス免疫学の分野の当業者にとって簡便となるように、さらなる遺伝

10

20

30

40

50

子または特定の配列を組み入れたプラスミドまたはベクターを含みうる（参照として本明細書に組み入れられる、「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」、第二版、Sambrook、FritschおよびManiatis、Cold Spring Harbor Laboratory、Cold Spring Harbor、NY、1989；ならびに「Current Protocols in Molecular Biology」、Ausubelら、John Wiley and Sons、New York 1987（四半期ごとに更新）を参照のこと）。

【0060】

本発明のTU分子は、WNV、JEV、デングウイルス、黄熱病ウイルス、およびSLEVのような、しかしこれらに限定されないフラビウイルス抗原に関連した特異的遺伝子産物をコードするヌクレオチド配列を有する、核酸または核酸誘導体を含む。如何なる核酸もTUとして作用する可能性があるが、重要な態様において、TUはDNAである。または核酸はRNA分子であってよい。それらはまた、薬剤としてのTUの安定性を増加するように化学改変されている、ホスホジエステル結合の骨格を有するDNAまたはRNAのいくつかの誘導体の如何なる一つであってよい。そのように想定される改変には、ホスホロチオエート誘導体またはホスホネート誘導体が含まれるがこれらに限定されない。誘導体に関するこれらおよび他の例は、核酸化学の当業者に周知である。

【0061】

JEVのゲノムは特徴が調べられ、シーケンシングされている（図1および2）。M構造蛋白質は、プレM蛋白質（pr）を含むポリ蛋白質の一部として発現される。このpr配列は、M蛋白質配列に対して隣接するアミノ末端であるが、ポリ蛋白質のプロセッシングにおける構造上の問題を防止する。特に、pr配列が存在することは、E蛋白質の誤った折り畳みを防止する上で重要である。このように、prMの存在によって、JEV粒子は集合することができる。ビリオンまたは粒子が形成されると、pr配列はprM蛋白質から切断されて、M蛋白質を含む成熟ウイルス粒子を生じることができるが、M蛋白質を生じるためのprM蛋白質の切断は、感染性粒子を産生するためには必ずしも必要ではない。多くの異なる関連するフラビウイルスからのprM配列は、程度は低いものの切断されるが、フラビウイルスそのものはそれにもかかわらず感染性である。類似のゲノム構造および機能を有するそのような関連するフラビウイルスの例には、WNV、YFV、デングウイルス、およびSLEVが含まれるがこれらに限定されない。

【0062】

一つの態様において、本発明におけるフラビウイルスMおよびE蛋白質をコードするTUはDNAである。先行段落における考察に従って、このDNAは、プレM配列を含むM蛋白質をコードするヌクレオチド配列と、E蛋白質をコードするヌクレオチド配列とを含む。このようにして、意図される遺伝子産物は、細胞内でサブウイルス粒子を形成させることができる。次に、プレM配列は、充満したビリオンに関して起こる方法と類似の方法で切断することができる。

【0063】

インビボでワクチンとして有効に機能するために、TU内に、抗原をコードするヌクレオチド配列の転写を増強または促進する作用を有する制御配列を含めることが都合がよい。そのようなプロモーターを用いることは、分子生物学、細胞生物学、およびウイルス免疫学の分野の当業者に周知である（参照として本明細書に組み入れられる、「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」、第二版、Sambrook、FritschおよびManiatis、Cold Spring Harbor Laboratory、Cold Spring Harbor、NY、1989；および「Current Protocols in Molecular Biology」、Ausubelら、John Wiley and Sons、New York 1987（四半期ごとに更新）を参照のこと）。TUを哺乳類宿主においてワクチンとして用いる場合、用いられるプロモーターは、好ましくは哺乳類細胞において有効に機能するプロモーターである。そのようなプロモーターは、転写が促進されるコード配列に関して、そのような転写を機能的に促進する可能性がある位置に配置される。本発明の重要な態様において、このプロモーターは、サイトメガロウイルス初期プロモーターである。さらに、本発明のさらに好ましい態様において、TU核酸においてコード配列の後にターミネーター配列が続く（Sambrookら）。本発明の特定の態様は、原核細胞および真核細胞の双方に関する。原核細胞ま

たは真核細胞のいずれかにおいて有用である多くのプロモーター配列が既知である（Sambrookらを参照のこと）。

【0064】

本発明の核酸は、さらに、免疫刺激要素として作用することが当業者に既知であるDNAを含んでもよい。そのような要素の例には、細菌DNAにおける特定のCpGモチーフが含まれるがこれらに限定されない（Satoら、Science 273：352～354（1996）；Klinmanら、Vaccine 17：19～25（1998））。

【0065】

本発明のTUの調製は、分子生物学の分野の当業者に周知の方法によって容易に行われる。含まれる技法は、例えば、「Molecular Cloning：A Laboratory Manual」、第二版、Sambrook、FritschおよびManiatis、Cold Spring Harbor Laboratory、Cold Spring Harbor、NY、1989；および「Current Protocols in Molecular Biology」、Ausubelら、John Wiley and Sons、New York 1987（四半期ごとに更新）に記載されている。フラビウイルスRNA分子は、例えば、フラビウイルスおよび他のグループのウイルスも同様に熟知しているウイルス学者に広く知られている方法によって生きたウイルスの試料から単離してもよい。JEVについて用いられる方法は、Kunoら（J. Virol. 72：73～83（1998））において要約されている。RNAは、逆転写酵素を用いたcDNAの合成のための鋳型として用いられる。cDNAから、プレMからEコード領域までを含む断片（図2）を提供するために適切にcDNAを切断することが知られている、制限ヌクレアーゼによる消化によって、そのような断片が得られる。JEVの制限消化の例は、Nitayaphanら（1990）およびKonishiら（1991）に提供される。サイトメガロウイルスプロモーターのようなプロモーター、コザック配列のような有効な翻訳を促進する配列、およびポリアデニル化シグナルの配列を組み入れることも同様に、分子生物学および組み換え型DNA操作の当業者に周知である（Kozak、Mol. Cell Biology 9：5134～5142（1989）；Azevedoら、Braz. J. Med. Biol. Res. 32：147～153（1999））。所望のコード配列および制御配列を含むTUを含む核酸を調製する場合、これは核酸を増幅する方法によってより大量に得てもよい。そのような方法は、分子生物学および組み換えDNA操作の当業者に広く既知である。これらの方法の例には、当技術分野で周知であるように、原核細胞のような細胞において培養することによって複製するためにプラスミドに核酸を組み入れること、および培養終了後にプラスミドを回収することと共に、PCRおよび他の増幅プロトコルのような方法による核酸の増幅が含まれる。これらの例は、TUを含む核酸が得られる方法に限定されないと解釈される。

【0066】

本発明のTU含有核酸分子は、分子生物学およびウイルス免疫学の分野の当業者に周知の多くの方法で、適当な細胞に導入してもよい。例として、これらには、細胞によって取り込まれるプラスミドもしくは類似の核酸ベクターへの組み込み、リボソーム、特に陽イオン脂質を含むリボソームのような小胞脂質構造内への封入、またはエンドサイトーシスによって細胞に取り込まれる粒子への吸着が含まれるがこれらに限定されない。

【0067】

一般的に、本発明の細胞は、TUを含む、またはその中にTUが導入されている原核細胞または真核細胞である。本発明のTUはコードされるprM/MおよびE抗原の細胞内生合成を誘導する。適した細胞は、核酸導入の結果として遺伝子産物の生合成能を有する細胞である。本発明の特定の態様において、適した細胞は、制御配列に、そしてもし存在すれば、TU内に含まれてもよいターミネーター配列に反応する細胞である。この様式で反応するために、そのような細胞は、制御配列およびターミネーター配列と相互作用して、促進および終了機能のそれぞれを実行するように作用する成分をその中に含む。インビトロで培養する場合、細胞は原核細胞、単細胞真核細胞、または多細胞真核細胞であってもよい。本発明の特定の態様において、細胞は哺乳類細胞である。これらの場合、合成されたprM/MおよびE蛋白質遺伝子産物は、ワクチンとしてもしくは免疫診断アッセイにおいて用いるため、または証明目的のために抗原を調製することを含む、分析的または診断応用において用いるために利用できる。

【0068】

細胞が培養哺乳類細胞であるような何らかの状況では、prM/MおよびE抗原は、サブウイルス粒子の形で分泌される。これらは、表面の超微細構造形態および免疫原性特性という点で生きたウイルスに類似のprM/MとE蛋白質との凝集体である。しかし、本発明のTUは、フラビウイルスゲノムの残りを含まないため、カプシドが組み入れられることはなく、最も重要なことに感染性のウイルスRNAは存在しない。

【0069】

本発明のもう一つの重要な態様において、細胞は、TUがワクチンとして投与されている被験者の天然の細胞成分である。被験者に投与した場合、TUは、被験者の細胞に取り込まれる。被験者の細胞は、如何なるプロモーター配列、および存在すればターミネーターにも反応することができる。いずれにせよ、TUは、フラビウイルスprM/MおよびE遺伝子産物を合成するように被験者の細胞を誘導する。理論的検討に拘束されたくはないが、被験者の細胞は、インビトロでの培養哺乳類細胞について起こることが判明しているように、prM/MおよびE抗原からなるサブウイルス粒子をインビボで産生すると考えられている。そのようなサブウイルス粒子は、インビボ免疫原として作用して、被験者の免疫系を刺激して、被験者に保護免疫を付与する免疫応答を生じると考えられている。この場合も、理論に拘束されたくはないが、得られた保護免疫は液性または細胞性免疫のいずれかによって、すなわちそれぞれ、MHCクラスIIもしくはクラスI拘束メカニズムのいずれかによって、または双方のメカニズムによって生じる可能性がある。

【0070】

本発明に従って、prMおよび/またはE抗原をコードする核酸を含むTUの有効量を被験者に投与することによって、JEV、YFV、デングウイルス、SLEV、WNV、または他のフラビウイルスのようなフラビウイルスによる感染症に対して被験者を免疫する。核酸は、被験者の細胞に組み入れられた後、フラビウイルスprM/Mおよび/またはE抗原の合成に至る。

【0071】

TUを被験者に投与するために、TUは薬学的担体を含む組成物に組み入れられる。「薬学的に許容される」という用語は、生物学的に、またはそれ以外の意味で有害でない材料を意味し、すなわち材料は、如何なる望ましくない生物学的作用も引き起こさなければ、またはそれが含まれるワクチンの他の成分の如何なるものとも有害な相互作用を起こさなければ、免疫原性材料（すなわち、組み換え型フラビウイルス蛋白質抗原またはその一部）と共に被験者に投与してもよい。薬学的に許容される担体またはその成分の例には、水、生理食塩液、および一般的な生理緩衝液が含まれる（さらなる例に関しては、Arnon, R.（編）、「Synthetic Vaccines I」：83～92頁、CRC Press、Boca Raton、Florida、1987を参照のこと）。

【0072】

ワクチン接種量を記述する場合の重要な値は、ビルレントまたは野生型フラビウイルス感染によって引き起こされる感染疾患を受ける宿主において、保護反応を誘発するために必要な免疫原の総量であることは、当業者によって理解される。用いられる用量の回数および容量は、変更することができ、年齢、体重、性別、種、投与されるワクチンのタイプ、投与様式、被験者の全身状態等と共に、当業者によって認識される他の重要な要因のようなパラメータに基づいて医師によって決定される。

【0073】

TUは、被験者に経口、非経口（例えば、静脈内）、筋肉内注射、腹腔内注射、経皮、体外、鼻腔内、局所等によって投与してもよい。輸送はまた、挿管によって呼吸器系（例えば、肺）の如何なる領域にも直接行うことができる。必要なTUの正確な量は、被験者の種、年齢、体重、および全身状態、用いるワクチンの免疫原性、被験者が免疫されるフラビウイルスの株または種に応じて、被験者ごとに変化するであろう。このように、本発明のあらゆる態様に関して正確な量を明記することは可能ではない。しかし、当業者は、本明細書の教示に示される単に日常的な実験を用いて、適当な量を決定することができる。

【0074】

本発明のワクチンの非経口投与は、必要であれば、一般的に注射を特徴とする。注射剤は、液体溶液もしくは懸濁液、注射前に液体にされる溶液もしくは懸濁液に適した固体、または乳剤のいずれかとして通常の形で調製することができる。非経口投与のためのより最近改訂されたアプローチは、一定用量が維持される遅延型放出または徐放系を用いることを含む。例えば、参照として本明細書に組み入れられる、米国特許第3,610,795号を参照のこと。

【0075】

固体組成物に関して、通常の高毒性固体担体には、例えば、薬学等級のマニトール、乳糖、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、タルク、セルロース、グルコース、ショ糖、炭酸マグネシウム等が含まれる。液体の薬学的に投与可能な組成物は、例えば本明細書に記載の活性化合物と選択的な薬学的アジュバントとを、例えば、水、生理食塩液、デキストロース水溶液、グリセロール、エタノール等のような賦形剤に溶解、分散等して、それによって溶液または懸濁液を形成することによって調製することができる。望ましければ、投与される薬学的組成物はまた、湿潤または乳化剤、pH緩衝剤等、例えば、酢酸ナトリウム、モノラウリン酸ソルビタン、酢酸ナトリウムトリエタノールアミン、オレイン酸トリエタノールアミン等のような高毒性の補助物質を少量含んでもよい。そのような投与剤形を調製する実際の方法は、当業者に既知または明らかであり、例えば、「Remington's Pharmaceutical Sciences」(Martin, E.W.編、最新版、Mack Publishing Co., Easton, PA)を参照のこと。

【0076】

一つの態様において、本発明のTUは、TUを被験者に投与した直後に、経皮電気パルス被験者に適用し、被験者の組織へのインビボ核酸移入のより大きい効率および再現性を提供する、エレクトロトランスファー媒介インビボ遺伝子輸送を用いることによって被験者に投与することができる(Mirら、Proc. Nat. Acad. Sci. USA 96:4262~4267(1999))。

【0077】

本発明のワクチンを被験者に投与することによって被験者を免疫することを記述する本発明の方法において、免疫の効率は、被験者の免疫状態をモニターするために当技術分野で周知の臨床プロトコールに従ってモニターすることができる。

【0078】

ワクチン接種組成物の有効量は、被験者に投与した場合に、被験者に保護免疫を付与する量であると、当業者によって容易に決定される。そのような決定を行うために、当業者は、ワクチンが投与された被験者の血液中に存在するフラビウイルスprM/MおよびE特異的抗体および/またはフラビウイルスprM/MおよびE特異的細胞障害性Tリンパ球の誘導能を評価することができる。同様に、実験的被験者を免疫するために用いられる抗原性組成物に対応する生きたフラビウイルスをチャレンジすることによって、実験的被験者に付与される保護免疫のレベルを決定することができる。そのようなチャレンジは当業者に周知である。

【0079】

一般的に、WNV、JEV、YFV、デングウイルス、SLEV、または本発明に従う他のフラビウイルスによる感染症に対して被験者を免疫するために、そしてそのような方法において用いられるTUは全体的な大きさが異なることを認識して、約0.1 µg/kg体重~約50 µg/kg体重の用量範囲を用いることができる。

【0080】

意外にも、DNAである本発明のTUは、筋肉内注射、またはエレクトロトランスファーによってTUの1回有効量のみを投与した後でも、約100%の有効性レベルで保護免疫を付与することが判明した。これは、1回またはそれ以上の追加ワクチン接種を必要とし、ほぼ100%もの有効性の保護免疫を付与しない可能性がある通常のワクチン(上記のように)を用いて行った多くの免疫法とは対照的である。

【0081】

さらに意外にも、保護免疫は、ワクチン接種した雌性被験者から被験者の子孫に保護免疫を伝搬する可能性があることが判明した。本発明のTU DNAを用いて母親にワクチン接種した後、新生仔マウスの有意な比率がウイルスチャレンジに対して保護されることが示された。理論に拘束されたくはないが、受動免疫は、母親の乳汁中に様々な病原体に対して特異的な中和抗体が存在することにより、新生仔哺乳類に付与される可能性があることが知られている。新生仔において認められたJEVに対する保護免疫は、このようにしてそれらに伝搬された可能性がある。

【0082】

本発明のもう一つの態様において、TUは、第一のフラビウイルスの構造蛋白質のシグナル配列と、第二のフラビウイルスの免疫原性フラビウイルス抗原とをコードする。このように、一つの態様において、例えば、第一のフラビウイルスの構造蛋白質のシグナル配列を、第二のフラビウイルスの構造蛋白質のシグナル配列に置換すると、これによって、宿主における新生ポリペプチドの適切な折り畳み、宿主における適切なプロセッシング、および/またはプロセッシングされた蛋白質の適切な折り畳みが起こる。

【0083】

本発明のもう一つの態様において、TUは、抗原が一つまたは一つ以上のフラビウイルスからの配列を含む、免疫原性フラビウイルス抗原をコードしてもよい。シグナル配列は、改善されたシグナルペプチドとなりうる。シグナル配列の改善、またはより最適なシグナル配列の選択は、実施例18およびそこで引用された参考文献において教示された原理および技術を適用することによって行うことができ、それらの参考文献のそれぞれは、所望の特性および機能を有するシグナル配列の選択、同定、および設計に関連した明白な教示に関して、参照として本明細書に組み入れられる。一般的に、これらの所望の特性および機能は高いシグナル配列確率を含むと考えられる。

【0084】

本発明のもう一つの態様において、一つ以上のフラビウイルスからの免疫原性フラビウイルス抗原をコードする、一つ以上のTUまたは一つのTUが、単一の組成物に含まれる。このように、一つの態様において、例えば、TUは、一つ以上のフラビウイルスからの蛋白質にプロセッシングされる新生ポリペプチドまたは複数のポリペプチドをコードしうる。好ましくは、プロセッシングされた蛋白質は、蛋白質に対する免疫応答を誘発するサブウイルス粒子を形成する。サブウイルス粒子は、同じフラビウイルス、フラビウイルスの組み合わせ、またはキメラフラビウイルス蛋白質の配列に由来する、プロセッシングされた蛋白質から形成することができる。一つ以上のフラビウイルスからの免疫原性フラビウイルス抗原をコードする、一つ以上のTUまたは一つのTUを含む複合ワクチンは、地域で流行しているか、またはそうでなければ遭遇する可能性があるフラビウイルスからの蛋白質を含めることによって特定の地理的地域において用いるために作製することができる。例えば、熱帯および亜熱帯アジアのためのワクチンは、DEN、WN、およびJEウイルスワクチンの四つの血清型からの蛋白質をコードするTU（複数）を含みうる。アフリカおよびラテンアメリカのための同様に有用なワクチンはそれぞれ、DENの四つの血清型、WN、およびYFウイルス、ならびにDENの四つの血清型、Rocio、およびYFウイルスからの蛋白質をコードするTU（複数）を含みうるであろう。

【0085】

もう一つの態様において、TUは、第一のフラビウイルスの構造蛋白質のシグナル配列と一つ以上のフラビウイルスからのアミノ酸配列を含む免疫原性キメラフラビウイルス抗原とをコードする。このシグナル配列は、日本脳炎ウイルスシグナル配列となりうる。キメラフラビウイルス抗原は日本脳炎ウイルス抗原からの配列を含みうる。特定の態様において、キメラ抗原はE蛋白質である。E蛋白質のカルボキシ末端部分は、日本脳炎ウイルスからのE蛋白質となりうる。カルボキシ末端部分は、例えば、キメラE蛋白質の5、10、15、20、25、30、40、50、または75%となりうる。好ましい態様において、TUは、日本脳炎ウイルスの構造蛋白質のシグナル配列、デングウイルスのprM蛋白質、および日本脳炎ウイルスとデングウイルスの双方からの配列を含むキメラE蛋白質をコードする。キメラ蛋白

10

20

30

40

50

質は、カルボキシ末端部分が日本脳炎ウイルス配列を含むE蛋白質となりうる。TUの例には、配列番号：45および配列番号：47に示す抗原のようなフラビウイルス抗原の合成を指示することができる配列番号：44および配列番号：46に示される核酸配列が含まれる。

【0086】

本発明はさらに、蛋白質ワクチンとして用いるための、薬学的に許容される担体中に本発明のポリペプチドを含む、免疫原性組成物を提供する。本発明の転写単位から産生される抗原は、被験者において有効な免疫応答を誘発するために用いることができる。この目的の抗原は、蛋白質の免疫原性断片を含む、フラビウイルスprM、フラビウイルスM蛋白質、フラビウイルスE蛋白質またはその如何なる組み合わせを含みうる。特に好ましい態様は、本明細書に記載のNRAを用いることである。さらに好ましい態様は、一つまたは複数のフラビウイルスのシグナル配列と、一つまたは複数の異なるフラビウイルスの構造蛋白質（複数）とを含むキメラ蛋白質である。特に好ましい態様において、抗原のシグナル配列は、日本脳炎ウイルスシグナル配列である。他の好ましい態様において、シグナル配列は改善されたシグナルペプチドである。シグナル配列の改善、またはより最適なシグナル配列の選択は、実施例18およびそこで引用されている参考文献において教示される原理および技術を適用することによって行うことができ、その文献のそれぞれは、所望の特性および機能を有するシグナル配列の選択、同定、および設計にそれぞれ関連する明白な教示に関して、参照として本明細書に組み入れられる。一般的に、これらの所望の特性および機能は高いシグナル配列確率を含むであろう。

【0087】

他の態様において、本発明の蛋白質ワクチンはさらに適したアジュバントを含む。本明細書において用いられるように、「アジュバント」は、免疫応答の強化剤または増強剤である。「適している」という用語は、ワクチン接種被験者において有害反応を生じることなく免疫応答を増強するために、ワクチン免疫原（すなわち、フラビウイルスprM蛋白質、フラビウイルスM蛋白質、フラビウイルスE蛋白質、またはその如何なる組み合わせ）と併用して用いることができる如何なる物質も含まれることを意味する。特定のアジュバントの有効量は、ワクチン接種被験者の免疫応答に及ぼすアジュバントの増強作用を最適にするために容易に決定できる。好ましい態様において、本発明のワクチンのアジュバント投与は、2%水酸化アルミニウム溶液とその後鉱油を用いる2段階プロセスである。特定の態様において、適したアジュバントは、以下の群から選択することができる：鉱油、植物または魚油と水との乳剤、フロイントの不完全アジュバント、大腸菌J5、硫酸デキストラン、酸化鉄、アルギン酸ナトリウム、バクトアジュバント、カルボボル（Carbopol）（BF Goodrich Company、Cleveland、Ohio）のような特定の合成ポリマー、ポリアミノ酸およびアミノ酸コポリマー、サポニン、カラゲニン、REGRESSIN（Vetrepharm、Athens、GA）、AVRIDINE（N,N-ジオクタデシル-N',N'-ビス(2-ヒドロキシエチル)-プロパンジアミン）、O-アセチル基散在長鎖多分散 β (1,4)結合マンナンポリマー（例えば、ACEMANNAN）、マイコバクテリウム種の非病原性株に由来する徐蛋白された高度精製細胞壁抽出物（例えば、EQUIMUNE、Vetrepharm Research Inc.、Athens、GA）、モノオレイン酸マンニット、パラフィン油およびムラミルジペプチド。

【0088】

もう一つの局面において、本発明は、被験者における有効な免疫応答を誘発するために、本発明の蛋白質ワクチンの免疫原性量によって被験者を免疫する方法を提供する。免疫は、経口、非経口、鼻腔内、気管内、筋肉内、乳腺内、皮下、静脈内および/または皮内に行うことができる。フラビウイルスprM蛋白質、フラビウイルスM蛋白質および/またはフラビウイルスE蛋白質を含むワクチンは、注射、吸入、摂取、または注入によって投与することができる。1回量を投与することができ、および/またはワクチン調製物の反復用量、すなわち「追加免疫」を、最初の免疫応答を増強するために定期的に投与するか、または最後の用量以降長期間の後投与することができる。ワクチン接種の間隔は、被験者の年齢および状態に応じて変化する。

【0089】

「免疫原性量」という用語は、ワクチン接種被験者において免疫応答を誘導するために十分であって、それらに曝露された際に、野生型またはビルレントフラビウイルス感染によって引き起こされた疾患に対して被験者を保護するか、またはワクチン接種被験者に対するフラビウイルス感染症の作用を減弱する、治療のもしくは商業的に有益な作用を有する免疫原、またはその一部の量を意味する。

【0090】

本発明はさらに、本発明の抗原による免疫に反応して産生された抗体を提供する。本発明の抗体には、無傷の免疫グロブリン分子、キメラ免疫グロブリン分子、「ヒト化抗体」、またはFabもしくはF(ab')₂断片となりうるポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体が含まれる。そのような抗体および抗体断片は、当技術分野で周知の技術によって産生することができ、それらには、参照として本明細書に組み入れられる、HarlowおよびLane (「Antibodies: A Laboratory Manual」、Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1989) ならびにKohlerら (Nature 256: 495~97, 1975) ならびに米国特許第5,545,806号、第5,569,825号、および第5,625,126号に記載されたものが含まれる。抗体は如何なるアイソタイプIgG、IgA、IgD、IgE、およびIgMの抗体となりうる。

10

【0091】

本発明は、連結したV_HおよびV_Lドメインを含み、抗体の本来のイディオタイプのコンフォメーションおよび特異的結合活性を保持する、一本鎖抗体 (ScFv) が含まれる。そのような一本鎖抗体は当技術分野で周知であり、標準的な方法によって産生することができる (例えば、Alvarezら、Hum. Gene Ther. 8: 229~242 (1997))。

20

【0092】

抗体は、一つまたは複数のフラビウイルスのprM、M、および/またはE抗原の免疫原性アミノ酸配列と、異なるフラビウイルス (例えば、JEV) のシグナル配列とをコードする核酸配列から合成した、本発明の抗原に対して作製することができる。これらのキメラ構築物を用いて合成された免疫原性ペプチドは、アミノ酸配列における免疫原性領域を同定するために、当技術分野で周知の方法を用いることによって容易に同定することができ、本発明の抗体を産生するために用いられる。

【0093】

抗原/抗体複合体を形成することができる状態、ならびに抗原/抗体複合体の形成を検出するためのアッセイ法、および検出された蛋白質の定量は、当技術分野で標準である。そのようなアッセイ法には、当業者に周知である、ウェスタンブロッティング、免疫沈殿、免疫蛍光、免疫細胞化学、免疫組織化学、蛍光活性化細胞ソーティング (FACS)、蛍光インサイチューハイブリダイゼーション (FISH)、免疫磁気アッセイ、ELISA、ELISPOT (Coliganら編、1995、Current Protocols in Immunology, Wiley, New York)、凝集アッセイ、フロキュレーションアッセイ、細胞パニング等が含まれるが、これらに限定されない。

30

【0094】

本明細書において用いられるように、「結合する」という用語は、抗原に対する抗体の十分に特徴が調べられた結合、ならびに抗原と他の非ランダム会合を意味する。本明細書に記載の「特異的に結合する」は、この場合、本発明の抗原である明記されたもの以外の、如何なる抗原とも実質的に交叉反応しない抗体、または他のリガンドを記述する。

40

【0095】

本発明の抗体またはリガンドは、基質に結合させる、または検出可能な部分と共役させる、または結合させて共役させることができる。本発明に関して企図される検出可能な部分には、免疫蛍光部分 (例えば、フルオレセイン、ローダミン)、放射活性部分 (例えば、³²P、¹²⁵I、³⁵S)、酵素部分 (例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ)、金コロイド部分、およびビオチン部分が含まれるがこれらに限定されない。そのような共役技法は当技術分野で標準である (例えば、HarlowおよびLane、Antibodies: A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989); Yangら、Nature 382: 319~324 (1996))。

50

【0096】

本発明はさらに、抗原／抗体複合体を形成することができる条件下で、試料を本発明のフラビウイルス抗原に接触させる段階；および複合体の形成を検出して、それによって試料中のフラビウイルス抗体を検出する段階を含む、試料におけるフラビウイルス抗体を検出する方法を提供する。

【0097】

本発明はさらに、抗原／抗体複合体を形成することができる条件で、試料を本発明の抗体に接触させる段階；および複合体の形成を検出して、それによって試料中のフラビウイルス抗原を検出する段階を含む、試料中のフラビウイルス抗原を検出する方法を提供する。

10

【0098】

試料中のフラビウイルス抗原を検出する方法は、例えば、被験者からの液体または組織試料を本発明の抗体に接触させ、抗原に対する抗体の結合を検出することによって行うことができる。抗原は、無傷のフラビウイルスビリオン上であるか、抗原を発現するフラビウイルス感染細胞の表面上に示されるフラビウイルスコード蛋白質であるか、または抗原断片であることが企図される。この方法の液体試料は、脳脊髄液、血液、胆汁、血漿、血清、唾液、および尿のような、抗原を含むか、または抗原を含む細胞を含む、如何なる生体液も含みうる。可能性のある他の体液試料には、喀痰、粘液等が含まれる。

【0099】

試料中のフラビウイルス抗体を検出する方法は、例えば、被験者からの液体または組織試料を本発明の抗原に接触させる段階、および抗体に対する抗原の結合を検出する段階、によって行うことができる。この方法の液体試料は、脳脊髄液、血液、胆汁、血漿、血清、唾液、および尿のような、抗体を含む如何なる生体液も含みうる。他の可能性のある体液試料には、喀痰、粘液等が含まれる。

20

【0100】

免疫蛍光アッセイ（IFA）、酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）、および免疫ブロット法のような酵素免疫アッセイ法は、本発明の方法に従うフラビウイルス抗体の検出を行うために容易に適合させることができる。抗体を検出するために有効なELISA法は、例えば、以下となりうる：（１）抗原を基質に結合させる；（２）結合した抗原を、抗体を含む液体または組織試料に接触させる；（３）結合した抗体と反応する検出可能な部分に結合した二次抗体に、上記を接触させる（例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ酵素またはアルカリホスファターゼ酵素）；（４）酵素の基質に上記を接触させる；（５）着色試薬に上記を接触させる；および（６）色の变化または発色を観察／測定する。

30

【0101】

フラビウイルス抗体を検出するために有効となりうるもう一つの免疫技術は、競合的阻害アッセイ法において、フラビウイルス抗原に特異的に反応する抗体を検出するために、モノクローナル抗体（Mab）を用いる。簡単に説明すると、試料を、基質（例えば、ELISA 96ウェルプレート）に結合した本発明の抗原に接触させる。標識した（例えば、酵素結合、蛍光、放射性等）モノクローナル抗体を、既に形成された抗原抗体複合体に接触させて、モノクローナル抗体結合量を測定する。モノクローナル抗体結合の阻害量は、対照（抗体なし）と比較して測定し、試料中の抗体の検出および測定を可能にする。モノクローナル抗体阻害の程度は、フラビウイルスの特定の変種または株に対するモノクローナル抗体結合特異性に基づいて、特定のフラビウイルス変種または株を検出するために非常に特異的なアッセイとなりうる。Mabはまた、例えば、標準的な方法に従って、免疫蛍光アッセイ法（IFA）によって、細胞におけるフラビウイルス抗原を直接検出するために用いることができる。

40

【0102】

さらなる例として、微小凝集試験を用いて、試料中のフラビウイルス抗体の有無を検出することができる。簡単に説明すると、ラテックスビーズ、赤血球、または他の凝集可能な粒子を本発明の抗原によってコーティングして、抗原と特異的に反応する試料中の抗体

50

が、抗原とクロスリンクして、凝集を引き起こすように、試料と混合する。凝集した抗原抗体複合体は、裸眼で目に見えるか、または分光光度計によって測定可能な沈殿物を形成する。上記の試験の改変において、本発明の抗体を、凝集可能な粒子に結合させて、それによって試料中の抗原を検出することができる。

【0103】

本発明はさらに、抗原/抗体複合体が形成されうる条件で、被験者からの試料を本発明の抗原に接触させる段階；および抗原/抗体複合体形成を検出して、それによって被験者におけるフラビウイルス感染症を診断する段階を含む、被験者におけるフラビウイルス感染症を診断する方法を提供する。

【0104】

本発明はさらに、抗原/抗体複合体が形成されうる条件で、被験者からの試料を本発明の抗体に接触させる段階；および抗原/抗体複合体形成を検出して、それによって被験者におけるフラビウイルス感染症を診断する段階を含む、被験者におけるフラビウイルス感染症を診断する方法を提供する。

【0105】

本明細書において教示した診断法において、本発明の抗原は、基質に結合させて、血液、血清、尿、または唾液のような液体試料に接触させることができる。この試料は、患者から直接採取することができる、または部分的に精製された形で得ることができる。このようにして、抗原に対して特異的な抗体（一次抗体）は、結合した抗原と特異的に反応するであろう。その後、検出可能な部分に結合した、またはそれによって標識した二次抗体を加えて、一次抗体の検出を増強することができる。一般的に、抗原の異なるエピトープと特異的に反応する、またはリガンドもしくは反応した抗体と非特異的に反応する、二次抗体または他のリガンドは、一次抗体上の多数の部位と反応できるか否かに関して選択されるであろう。このように、例えば、二次抗体のいくつかの分子は、それぞれの一次抗体と反応し、それによって一次抗体をより検出可能にすることができる。

【0106】

検出可能な部分によって、沈殿物もしくは色の変化の肉眼による検出、顕微鏡による視覚的検出、または分光光度計による自動検出、放射測定等が可能となる。検出可能な部分の例には、フルオレセインおよびローダミン（蛍光顕微鏡に関して）、西洋ワサビペルオキシダーゼ（光学または電子顕微鏡および生化学的検出に関して）、ピオチン-ストレプトアビジン（光学または電子顕微鏡に関して）、およびアルカリホスファターゼ（色の変化による生化学的検出）が含まれる。

【0107】

本発明の特定の態様を下記の実施例に記述する。これらの実施例は、本明細書に開示される本発明の範囲を制限すると解釈されない。

【0108】

実施例

本発明の核酸TU分子の調製および発現に関連して分子生物学および組み換え型DNA技術を利用する一般的方法是、例えば、「Current Protocols in Molecular Biology」、Ausubelら、John Wiley and Sons、New York 1987（四半期ごとに更新）、および「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」、第二版、Sambrook、Fritsch and Maniatis、Cold Spring Harbor Laboratory、Cold Spring Harbor、NY、1989に記載される。

【0109】

実施例1：JEV prMおよびE抗原をコードする転写単位を含む組み換え型プラスミドの調製。

ゲノムRNAを、QIAamp（商標）ウイルスRNAキット（Qiagen、Santa Clarita、CA）を用いて、マウス脳から増殖させたJEV株SA14ウイルスシード150μlから抽出した。シリカ膜上に吸着させたRNAをヌクレアーゼ不加水80μl中で溶出して、JEV prMおよびE遺伝子コード配列を増幅するための鋳型として用いた。プライマー配列は、Nitayaphanら（Virology 177：541～552（1990））の研究から得られた。ゲノムヌクレオチド領域389～2478位を

10

20

30

40

50

含む単一のcDNA断片を、逆転写酵素-ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) によって増幅した。制限部位KpnIおよびXbaI、コンセンサスコザックリボソーム結合配列、ならびに翻訳開始部位を、アンプリマー (amplimer) 14DV389 (ヌクレオチド配列、配列番号: 1; アミノ酸配列、配列番号: 2) によってcDNAの5'末端で作成 (engineer) した。インフレーム翻訳終了コドンの後にNotI制限部位を、アンプリマーc14DV2453 (配列番号: 3) によってcDNAの3'末端に導入した (図2)。Titan RT-PCRキット (Boehringer Mannheim、Indianapolis、IN) を用いて1試験管RT-PCRを行った。ウイルスRNA 10 µlを14DV389 (50 µM) およびc14DV2453 (50 µM) 各1 µl、ならびにヌクレアーゼ不含水18 µlと混合して、混合物を85

で5分間加熱した後、4 に冷却した。反応ミックス[5×緩衝液20 µl、dNTP混合物2 µl (各10 mM)、ジチオスレイトール (0.1 mM) 5 µl、RNasin (商標) (40 U/µl、ベリンガーマンハイム社) 0.5 µl、ポリメラーゼ混合物2 µl、およびヌクレアーゼ不含水45.5 µl]75 µlを加えて、RT-PCRを以下のように行った: 1サイクル (50 で30分、94 で3分、50 で30秒、68 で2.5分)、9サイクル (94 で30秒、50 で30秒、68 で2.5分)、20サイクル (最初のサイクルは94 で30秒、50 で30秒、68 で2.5分、その後1サイクルごとに5秒ずつ増加)、および68 で15分間の最終伸長。RT-PCR産物は、QIAquick (商標) PCR精製キット (Qiagen) によって精製して、50 µlの1 mMトリス塩酸、pH 7.5によって溶出した。

【0110】

全てのベクター構築物および分析は、標準的な技術を用いて行った (Sambrookら、1989)。KpnIおよびNotIヌクレアーゼによって消化したRT-PCR増幅cDNAを、真核細胞発現プラスミドベクター (pCDNA3、Invitrogen、Carlsbad、CA) のKpnI-NotI部位に挿入した。電気穿孔コンピテント大腸菌XL1-Blue細胞 (Stratagene、La Jolla、CA) を、電気穿孔 (ジーンパルサー (Gene Pulser、商標)、Bio-Rad、Hercules、CA) によって形質転換して、100 µg/mlカルベニシリン (Sigma Chemical Co.、St. Louis、MO) を含むLB寒天プレート上に播種した。クローンを採取して、100 µg/mlカルベニシリンを含むLBブロス3 mlに接種した。QIAprep (商標) スピンミニプレップキット (Qiagen) を用いて、14時間培養物からプラスミドDNAを抽出した。自動DNAシーケンシングは、推奨された通りに (Applied Biosystems/Perkin Elmer、Foster City、CA) 行った。cDNAの双方の鎖をシーケンシングしたところ、当初のSA14株の配列と同一であることが示された (Nitayaphanら、1990)。

【0111】

f1 ori、SV40 ori、ネオマイシン抵抗性遺伝子、およびSV40ポリ(A)要素を含むヌクレオチド (nt) 1289 ~ nt 3455位のプラスミドpCDNA3 (Invitrogen、Carlsbad、CA) の断片を、PvuII消化によって欠失した後、ライゲーションしてpCBampプラスミドを作製した。pCBampのNcoI/KpnI部位にキメライントロン挿入を含むベクターpCIBampは、NcoIおよびKpnIによる消化によってpCI (プロメガ社、マディソン、ウィスコンシン州) からイントロン配列を切除することによって構築した。得られた566-bp断片を、NcoI-KpnIによって消化することによってpCBampにクローニングし、その289-bp断片を置換した。図3は、プラスミドpCDNA3、pCBamp、およびpCIBampの間の関係を表す。

【0112】

JEV prMおよびE蛋白質をコードする転写単位を含むプラスミドは、これらのプラスミドから調製した。pCDNA3ベクターに由来する組み換え型プラスミドpCDJE2-7 (ヌクレオチド配列、配列番号: 10; アミノ酸配列、配列番号: 11) においてJEV prMおよびEコード領域を含むcDNA断片を、NotIおよびKpnIまたはXbaIによる消化によって切断して、pCBamp、pCIBamp、pCEP4 (Invitrogen、Carlsbad、CA)、もしくはpREP4 (Invitrogen、Carlsbad、CA) のKpnI-NotI部位、またはpRc/RSV (Invitrogen、Carlsbad、CA) 発現ベクターのSpeI-NotI部位にクローニングして、それぞれ、pCBJE1-14 (ヌクレオチド配列、配列番号: 17; アミノ酸配列、配列番号: 18)、pCIBJES14、pCEJE、pREFE、およびpRCJEを作製した。各プラスミドのクローンからのcDNAの双方の鎖をシーケンシングして、正確なヌクレオチド配列を有する組み換え型クローンを同定した。哺乳類細胞のインビトロ形質転換また

はマウス免疫実験に用いるプラスミドDNAは、EndoFree（商標）プラスミドマキシキット（Qiagen）を用いて、陰イオン交換クロマトグラフィーによって精製した。

【0113】

実施例2：間接的免疫蛍光抗体アッセイ法を用いた、様々な組み換え型プラスミドによって発現されたJEV prMおよびE蛋白質の評価

様々な組み換え型発現プラスミドによるJEV特異的遺伝子産物の発現を、COS-1、COS-7、およびSV-T2（ATCC、ロックビル、メリーランド州；それぞれ、1650-CRL、1651-CRL、および163.1-CCL）の一過性にトランスフェクトした細胞株において、間接的免疫蛍光抗体アッセイ（IFA）によって評価した。SV-T2細胞株は、予備的な結果から、JEV抗原陽性であった細胞が形質転換したSV-T2細胞の1～2%に過ぎないことが示されたことから、以降の試験から除外した。形質転換を行うために、細胞を150 cm²培養フラスコにおいて75%コンフルエンスまで増殖させ、トリプシン処理を行って、4%の燐酸緩衝生理食塩液に最終細胞数 5×10^6 個/mlとなるように再懸濁させた。150 V、960 μ F、および100 Ω 抵抗に設定したBioRadジーンパルス（商標）（Bio-Rad）を用いて、プラスミドDNA 10 μ gを細胞浮遊液300 μ lに電気穿孔した。電気穿孔の5分後、細胞を新鮮な培地25 mlによって希釈して、75 cm²フラスコに播種した。形質転換の48時間後、培地を細胞から除去して、細胞にトリプシン処理を行い、3%正常ヤギ血清を含むPBS 5 mlに再懸濁させた。少量10 μ lをスライドガラス上にスポットし、風乾させ、アセトン中で-20℃で20分間固定した。IFAは、フルオレセインイソチオシアネート結合ヤギ抗マウス免疫グロブリンG（Sigma Chemical Co.）およびJEV HIAFを用いて、アセトン固定プラスミド形質転換細胞について行った。

【0114】

JEV prMおよびE蛋白質発現に及ぼす様々なプロモーター、およびポリ(A)要素の影響を調べるために、COS-1およびCOS-7細胞株を、等量のpCDJE2-7（配列番号：10）、pCEJE、pREJE、またはpRJEプラスミドDNAによって一過性に形質転換した。JEV抗原は、四つ全ての組み換え型プラスミドによって形質転換された双方の細胞株において発現され、このように、CMVまたはRSV（ラウス肉腫ウイルス）プロモーターおよびBGHまたはSV40ポリ(A)要素が機能的に活性であることを確認した。しかし、IFA陽性細胞数およびIFA強度によってそれぞれ決定した形質転換細胞の割合および発現されたJEV抗原のレベルは、プラスミドが異なれば大きく異なった（表1）。pCDJE2-7（配列番号：10）、pCBE1-14（配列番号：17）およびpCIBJES14によって形質転換されたCOS-1細胞の有意に高い割合が、JEV抗原を発現し、発現された蛋白質レベルは、JEV感染細胞と同等であった。一方、pCEJE、pREJE、またはpRCJEベクターをトランスフェクションした細胞は、抗原発現細胞の割合が低いのみならず、蛍光強度も低く、抗原の発現が弱いことを示している。

【0115】

pCDJE2-7（配列番号：10）によるJEV蛋白質の発現の増強がSV40がコードする真核細胞複製開始点によって影響を受けるか否かを確認するために、pCDJE2-7からf1 ori、SV40 ori、ネオマイシン抵抗性遺伝子、およびSV40ポリ(a)要素を含む2166 bp断片を欠失したプラスミドpCBE1-14（配列番号：17）を構築した。次に、キメライントロンをpCBE1-14に挿入して、pCIBJES14を作製した。pCIBJES14プラスミドを用いて、JEV蛋白質の発現がイントロン配列によって増強されるか否かを決定した。形質転換の後、pCBE1-14およびpCIBJES14ベクターの双方を有する細胞は、pCDJE2-7の場合に認められたものと類似のJEV抗原レベルを発現した（表1）。この結果は、組み換え型ベクターによるJEV prMおよびE抗原の発現が、転写調節要素に限って影響を受けることを示している。真核細胞の複製開始点もイントロン配列も、用いた細胞においてJEV抗原の発現を増強しなかった。CMVプロモーターおよびBGHポリ(A)（図3）を含むベクターをさらなる分析のために選択した。

【0116】

実施例3：JEV特異的遺伝子産物を構成的に発現する、インビトロで形質転換した安定な細胞株の選択

COS-1細胞を、先の実施例に記載した電気穿孔によってpCDJE2-7 DNA 10 μ gによって形

質転換した。非選択的な培養培地において24時間インキュベートした後、細胞をネオマイシン(0.5 mg/ml、シグマケミカル社)によって処置した。2~3週間で目に見えるようになるネオマイシン抵抗性コロニーを、ネオマイシン含有培地において限界希釈法によってクローニングした。ベクターがコードするJEV遺伝子産物の発現は、JEV HIAFを用いたIFAによって最初にスクリーニングした。JEV-IFA陽性クローン(JE-4B)1個、および陰性クローン(JE-5A)1個をさらなる分析のために選択して、200 µg/ml ネオマイシンを含む培地において維持した。

【0117】

JE-4Bクローンによって発現されたJEV E蛋白質の真偽は、JEV E特異的マウスモノクローナル抗体(Mab)のパネルを用いた、IFAによるエピトープマッピングによって証明した(Kimura-Kurodaら、J. Virol. 45:124~132(1983); Kimura-Kurodaら、J. Gen. Virol. 67:2663~2672(1986); Zhangら、J. Med. Virol. 29:133~138(1989); およびRoehrigら、Virol. 128:118~126(1983))。JEV HIAFおよび正常マウス血清をそれぞれ、陽性および陰性抗体対照として用いた。四つのJEV-特異的、六つのフラビウイルス亜群特異的、および二つのフラビウイルス群反応性Mabが、4BクローンまたはJEV感染COS-1細胞に対して同様に反応した(表2)。

【0118】

実施例4. JE-4B COS-1細胞株によって分泌されたサブウイルス粒子の抗原特性および免疫学的検出

a. サブウイルス粒子の調製。 JE-4B COS-1細胞は、200 µg/ml ネオマイシンを含む培地において増殖および維持した。培養培地は通常通り採取して4℃で保存して、週2回新鮮な培地に交換して、細胞を7日~10日ごとに1:5に分割して継代した。培養培地をSorvall F16/250ローターにおいて4℃、10,000 rpmで30分間遠心することによって透明にし、Sorvall TH641ローターにおいて5%ショ糖クッション(w/w、10 mM トリス塩酸、pH 7.5、100 mM NaCl (TN緩衝液)によって調製)の中を4℃、39,000 rpmでさらに4時間遠心した。サブウイルス粒子を含む沈降物をTN緩衝液に再懸濁させて、4℃で保存した。または、7%もしくは10%PEG-8000(w/v)を透明にした培養培地に加えた。混合物を4℃で少なくとも2時間攪拌して、沈殿した粒子を10,000 rpmで30分間遠心することによって回収した。沈殿物をTN緩衝液に再懸濁させて、4℃で保存した。サブウイルス粒子を、5%~25%連続ショ糖勾配のTN溶液において4℃、38,000 rpmで90分間の速度ゾーン遠心によって、沈降した調整物およびPEG沈殿した調製物の双方から精製した。1 ml分画を勾配の上部から回収して、抗原捕獲ELISA(下記参照)によって調べ、陽性分画を25%~50%ショ糖勾配のTN溶液にローディングした。これを、4℃、35,000 rpmでの平衡密度遠心において一晩遠心した。平衡勾配からの0.9 ml分画を底から回収した。それらを抗原捕獲ELISAによって調べ、pH 6.6でのヘムアグルチニン(HA)活性に関して評価した。各分画の100 µlのアリコートの重量を正確に測定して、その密度を測定した。ELISA陽性分画をプールして、4℃、39,000 rpmで3~4時間遠心して沈降させ、沈降物をTN緩衝液に再懸濁させた。沈降させた試料に関して抗原捕獲ELISAおよびHA力価を測定した。JEV感染COS-1細胞上清にも同様に、先に詳細に記述したように類似の精製プロトコルを行い、勾配分析のための陽性対照として用いた。JEピリオンも同様に、感染後5日~6日の感染C6/36細胞から、グリセロール/酒石酸塩平衡勾配における沈降によって精製した。

【0119】

b. サブウイルス粒子のウェスタンブロット。 サブウイルス粒子の勾配精製試料を電気泳動試料緩衝液と共に混合して、Laemmli(Nature 277:680~685(1970))によって記述されるように、10%または12.5%ドデシル硫酸ナトリウム含有ポリアクリルアミドゲル(SDS-PAGE)の中を泳動させた。蛋白質をニトロセルロースメンブレンに転写して、ポリクローナルJEV HIAF、フラビウイルス交叉反応性抗E Mab 4G2抗体(Henchalら、Amer. J. Trop. Med. Hyg. 31:830~836(1982))またはマウス抗prMペプチド過免疫血清(JM 01)によって免疫化学的に検出した。図4は、JEV感染C6/36およびJE-4B COS-1細胞によって産生されたMおよびE蛋白質の比較を示す。E蛋白質に対する何らかの非特異的反応性を

、正常マウス腹水およびJmo1抗ペプチド血清において認めた。大きさがMおよびEと同一である蛋白質がサブウイルス粒子において分泌され、それぞれ、E特異的Mab 4G2およびprM特異的JM01抗血清によって検出することができた。

【0120】

c. 培養培地におけるJEVサブウイルス粒子の密度勾配検出。 ELISAのために、抗原捕獲抗体(4G2)をpH 9.6の0.1 M炭酸ナトリウム緩衝液によって希釈して、これを用いて4で一晩インキュベートすることによって96ウェルマイクロタイタープレート(Immulon II、Dynatech、Chantilly、VA)をコーティングした。3%正常ヤギ血清のPBS溶液によってブロッキングした後、連続2倍希釈試料を4G2でコートされたプレートに加えて、37で1.5時間インキュベートした。捕獲した抗原を西洋ワサビペルオキシダーゼ結合6B6C-1 Mabによって検出して、37で1時間インキュベートした。次に、固相上の酵素活性をTMB(3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン)-ELISA(Life Technologies、Grand Island、NY)によって検出した。

10

【0121】

JE-4B細胞の15×150 cm²フラスコからの細胞培養培地約500 mlを、細胞を播種した4日後に回収した。PEG沈殿サブウイルス粒子をpH 7.5のTN緩衝液2 mlに再懸濁させて、この再懸濁させた沈降物0.7 mlのアリコートに5%~25%ショ糖勾配にローディングした。サブウイルス粒子を破壊するトライトンX-100を、最終濃度が0.1%となるように別の0.7 mlアリコートに加えて、これを0.1%トライトンX-100を含むTN緩衝液中で調製した5%~25%ショ糖勾配にローディングした。トライトンX-100を含む勾配の上部から約2.5 cmのところ

20

【0122】

ヘムアグルチニン(HA)活性は、ClarkeおよびCasals(Amer. J. Trop. Med. Hyg. 7: 561~573(1958))の方法によってpH範囲6.1~7.0において決定した。JE-4B細胞によって分泌されたサブウイルス粒子およびJEV感染COS-1細胞によって産生されたビリオン粒子は、最適なpHが6.6であると決定された類似のHAプロフィールを有した。

30

【0123】

実施例5. 本発明のpCDJE2-7核酸ワクチンおよび市販のJEVワクチンによってワクチン接種したマウスにおける免疫応答の比較

3週齢の雌性ICR非近交系マウス1群5匹に、左四頭筋および右四頭筋にpCDJE2-7プラスミド100 µgのdH₂O溶液100 µlを筋肉内注射するか、またはヒトに投与する用量の5分の1であるJE-VAX用量(製造は、大阪大学微生物病研究会、および販売は、Connaught Laboratories、Swiftwater、PA)を皮下投与した。無関係な蛋白質をコードして発現するプラスミドpCDNA3/CAT(インビトロジェン社)を陰性ワクチン接種対照として用いた。pCDJE2-7ワクチン接種マウス1群を除き、動物は全て、さらなる用量のプラスミドまたはJE-VAXによって3週間後に追加免疫した。接種後3週、6週、9週、23週、40週、および60週間目にマウスの眼窩後洞から採血した。JEV抗体力価は、精製JEVに対する酵素結合免疫吸着アッセイ法(ELISA)によって、またはブランク減少中和試験(PRNT)(Roehrigら、Virol, 171: 49~60(1989); およびHuntおよびCalisher、Amer. J. Trop. Hyg. 28: 740~749(1979))によって決定した。

40

【0124】

pCDJE2-7核酸ワクチンおよびJE-VAXは、三つ全ての群のマウスにおいて、最初のワクチ

50

ン接種の3週間以内に100%血清転換を示した(表3)。JEV ELISAおよびPRNT抗体力価は、免疫後6週目および9週目にそれぞれ最高レベルに達した。DNAワクチン1用量を接種したマウスは、2用量を接種したマウスと類似の抗体反応を示した。DNAワクチン接種群では、同等のELISA抗体力価が、その後実験を終了した60週まで維持された。しかし、JE-VAX群のマウスでは、接種後60週でJEV抗体陽性であったのは4匹中1匹に過ぎなかった。pCDNA3/CAT対照群は、如何なる測定可能なJEV抗体も生じなかった。これらの結果は、JEV-特異的核酸ワクチンの1回接種が、市販のFDA承認JE-VAXワクチンより、マウスにおけるJEV抗体の維持において有効であることを示している。

【0125】

実施例6. 異なる齢でのワクチンの有効性に関する、本発明の様々な核酸ワクチン構築物と市販のJEVワクチンとの比較

10

類似のレベルのJEV蛋白質が、pCDJE2-7、pCBE1-14、またはpCIBJES14によって形質転換したCOS-1細胞によって発現された。これらの核酸構築物によるJEV抗体誘導を、ワクチン接種時に二つの異なる齢で、JE-VAX市販ワクチンと比較した。1群10匹の3日齢(性別混合)または3週齢(雌性)ICR非近交系マウスに、プラスミドDNA 50 µgもしくは100 µgを筋肉内にワクチン接種するか、またはヒトに投与する用量の10分の1または5分の1であるJE VAX用量を皮下にワクチン接種した。血清標本を免疫後3週間および7週間で採取して、精製JEVを抗原として用いたELISAによって1600倍希釈で試験した。結果を表4に示す。

【0126】

プラスミドpCBE1-14は、最も高い程度の血清変換、すなわち、1600倍以上の抗体力価を示し、双方の齢のワクチン接種で80%~100%に達した。pCDJE2-7またはpCIBJES14の投与は、3日齢のマウスにワクチンを接種した場合には7週目までに中程度の血清変換を示したが(それぞれ60%)、ワクチン接種後3週目に測定した場合にはより弱い血清変換を示した(それぞれ、40%および10%)。しかし、これらのプラスミドを3週齢で投与すると、ワクチン接種の3週間および7週後の双方で血清変換90%または100%が得られた。対照的に、市販のワクチン、JE-VAXは、3日齢で投与した場合に血清変換を示さず、3週齢で投与した場合には100%の血清変換を示した。このように、JEV prMおよびEに対する核酸TUは、市販のワクチンの非常に高い用量より、良好な程度の血清変換を示し、若い動物およびより成熟した動物の双方において予想外に高い血清変換を示した。

20

【0127】

実施例7. 本発明の核酸ワクチンによって与えられる保護免疫

30

実施例6からの3日齢ワクチン接種群に、ワクチン接種後7週目にマウス適合JEV株SA14 50,000 pfu/100 µlを腹腔内注射によってチャレンジして、3週間観察した。様々な核酸TU含有ワクチン構築物を接種した群では100%の保護が21日間得られた(表5)。対照的に、JE-VAXワクチン接種マウスの60%、ならびにpCDNA3/CATワクチン接種陰性対照の70%が、ウイルスチャレンジから21日まで生き残ることができなかった。これらの結果は、本発明の核酸TUは、ワクチン接種マウスに対して予想外に有効な保護を与えることを示している。これは、ヒト用の初期幼少期ワクチンとして本発明の核酸ワクチンを用いる可能性を示唆している。対照的に、現在用いられている不活化ヒトワクチンJE-VAXは、若い動物において有効ではないように思われる。

40

【0128】

実施例8. 母体の抗体力価と相関する新生仔マウスの受動的保護

3週齢の雌性ICRマウスに、pCDJE2-7プラスミドDNAを100 µg/100 µlの1用量もしくは2日間あけて2用量、またはヒトに投与する用量の5分の1であるJE VAX 2用量をワクチン接種した。陰性対照群には、pCDNA-3/CATプラスミド100 µg/100 µlの2用量を投与した。母体抗体による受動的保護は、第一のワクチン接種後9週目または第二のワクチン接種後6週目に、実験の雌性マウスを非免疫雄性マウスと交配させることによって得られた仔において評価した。生後3日~15日の間の仔を、マウス適合SA14ウイルス5,000 pfu/100 µlの腹腔内投与によってチャレンジして、3週間毎日観察した(表6)。生存率は、母体の中和抗体力価と相関した。PRNT 1:80の母親によって哺乳された仔の100%がウイルス感染から生

50

き残ったのに対し、対照母親からの仔はいずれも生き残らなかった（表6）。PRNT力価がそれぞれ、1：20および1：40である母親によって哺乳されたより週齢の大きい仔では、45%および75%の部分的保護を認めた。生存率はまた、仔が免疫母親によって哺乳された期間にも相関した。まさに示しているように、13日～15日齢の仔は高い生存率を示した。しかし、3～4日齢の仔は、母親のPRNT力価が1：20、または1：40である場合にはウイルスチャレンジから生き残れなかった。このように、母親の抗体は、子孫に部分的ないし完全な保護免疫を提供する。さらに、ELISAによって、チャレンジ後の仔の97%（29/30）の血清中にJEV抗体が検出された。

【0129】

マウスにプラスミドDNA 100 µg用量を1回もしくは2回筋肉内接種するか、またはJE VAX ワクチンのヒト用量の5分の1を2回皮下接種した。非免疫雄性マウスとの交配の前に、PRNT試験のためにワクチン接種後9週目に血清を採取した。

【0130】

実施例9．WNV prMおよびE抗原をコードする転写単位を含む、組み換え型プラスミドの調製

ゲノムRNAを、QIAamp（商標）ウイルスRNAキット（Qiagen、Santa Clarita、CA）を用いて、1999年にニューヨークでの大流行から単離した株であるNY 99-6480株に感染させたVero細胞培養培地150 µlから抽出した。抽出したRNAを溶出させて、ヌクレアーゼ不含水80 µlに浮遊させて、WNV prMおよびE遺伝子コード配列を増幅するための鋳型として用いた。プライマー配列は、Lanciottiら（Science 286：2333～2337（1999））の研究から得た。ゲノムヌクレオチド領域を含むcDNA断片を逆転写酵素-ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）によって増幅した。制限部位BsmBIおよびKasIを、アンプリマーWN466（ヌクレオチド配列、配列番号：12）を用いてcDNAの5'末端に作成（engineer）した。NotI制限部位が後に続くインフレーム翻訳終了コドン、アンプリマーcWN2444（配列番号：13）を用いてcDNAの3'末端に導入した。RT-PCR産物は、QIAquick（商標）PCR精製キット（Qiagen）によって精製した。

【0131】

上記の二つのアンプリマー（配列番号：12および配列番号：13）を用いて産生された二本鎖アンプリコンを、KasIおよびNotI酵素によって消化して、DNAの998 bp（nt-1470～2468）断片を作製し、これをpCBJESSベクターのKasIおよびNotI部位に挿入して、中間プラスミドpCBINTを形成した。pCBJESSは、pCBampプラスミドに由来し、これはサイトメガロウイルス初期遺伝子プロモーター、転写制御要素および操作されたJEシグナル配列要素を含んだ（Changら、J. Virol. 74：4244～4252（2000））。JEシグナル配列要素はJEシグナル配列（配列番号：14）を含む。

【0132】

次に、cDNAアンプリコンをBsmBIおよびKasI酵素によって消化して、残っている1003 bp断片（ヌクレオチド466～1470）をpCBINTのKasI部位に挿入してpCBWN（核酸配列、配列番号：15；アミノ酸配列、配列番号：16）を形成した。ABIプリズム377シーケンサー（アプライドバイオシステムズ/パーキンエルマー、フォルターシティ、カリフォルニア州）を用いた自動DNAシーケンシングを用いて、組み換え型プラスミドがLanciottiら（Science 286：2333～2337（1999））によって定義された正確なprMおよびE配列を有することを確認した。

【0133】

哺乳類細胞のインビトロ形質転換、またはマウス免疫実験において用いるためのプラスミドDNAは、実施例1に記載するように陰イオン交換クロマトグラフィーによって精製した。

【0134】

実施例10．pCBWNによって発現されたWNV prMおよびE蛋白質の免疫化学特徴付けと評価

pCBWNプラスミドによってコードされたWNV特異的遺伝子産物を、COS-1細胞において発現させた。Changら（J. Virol. 74：4244～4252（2000））に従って細胞を電気穿孔して

10

20

30

40

50

、pCBWNプラスミドによって形質転換した。電気穿孔した細胞を75 cm²培養フラスコ、または滅菌カバーガラス1枚/ウェルを含む12ウェル組織培養皿に播種した。フラスコおよび12ウェルプレートは全て、37℃、5%CO₂インキュベータで維持した。電気穿孔の40時間後、接着細胞を含むカバーガラスをウェルから取り出して、PBSによって簡単に洗浄して、室温でアセトンによって2分間固定し、空気乾燥させた。

【0135】

蛋白質発現は、実施例2に記載するように間接的免疫蛍光抗体アッセイ (IFA) を用いて検出した。フラビウイルスE蛋白質特異的モノクローナル抗体 (Mab) 4G2、WNVマウス過免疫腹水 (HIAF) および正常マウス血清 (NMS) の、PBSによる200倍希釈液を一次抗体として用いて、蛋白質発現を検出した (Henchalら、Am. J. Trop. Med. Hyg. 31 : 830 ~ 836 (1982))。

10

【0136】

組織培養培地を電気穿孔後40および80時間で回収した。抗原捕獲 (Ag捕獲) ELISAを用いて、一過性に形質転換したCOS-1細胞の培養培地に分泌されたWNウイルス抗原を検出した。Mab 4G2および西洋ワサビペルオキシダーゼ結合Mab 6B6C-1をそれぞれ用いて、WNウイルス抗原を捕獲し、捕獲された抗原を検出した (Changら、J. Virol. 74 : 4244 ~ 4252 (2000) ; Henchalら、Am. J. Trop. Med. Hyg. 31 : 830 ~ 836 (1983) ; Roehrigら、Virology 128 : 118 ~ 126 (1983))。

【0137】

培地中のWNウイルス抗原は、10% ポリエチレングリコール (PEG) -8000による沈殿によって濃縮した。沈殿物をTNE緩衝液 (50 mM トリス、100 mM NaCl、10 mM EDTA、pH 7.5) に再懸濁させて、遠心によって透明にし、4℃ で保存した。または、沈殿物を凍結乾燥緩衝液 (0.1 M TRIZMAおよび0.4% ウシ血清アルブミンのホウ酸塩生理食塩液緩衝液、pH 9.0) に再懸濁させて、凍結乾燥して4℃ で保存した。凍結乾燥調製物を、MAC-および間接的IgG ELISAにおいて評価するための抗原として用いた。

20

【0138】

一過性に形質転換したCOS-1細胞において、IFAによってWNウイルス特異的蛋白質を検出した。これらの細胞において発現されたE、prMおよびM蛋白質は、培養培地に分泌された。PEG沈殿によって濃縮されたWNウイルス抗原を、7.0% エタノールによって抽出して、残っているPEGを除去した (Aizawaら、Appl. Environ. Micro. 39 : 54 ~ 57 (1980))。エタノール抽出抗原および勾配精製WNビリオンを、Excel Plus電気泳動装置 (Invitrogen、Carlsbad、CA) においてNuPAGE、4% ~ 12% 勾配ピストリスゲルにおいて分析して、その後Excel Plusプロットユニット (インビトロジェン社) を用いてニトロセルロースメンブレンにエレクトロブロッティングを行った。一過性に形質転換されたCOS-1細胞によって産生されたWNウイルス特異的蛋白質は、陰性血清対照としてNMSを用いたウェスタンブロット分析において、WNウイルス特異的マウスHIAFまたはフラビウイルスE蛋白質反応性Mab 4G2によって検出された。蛋白質は、WNウイルスに感染したほ乳期マウス脳 (SMB) に由来する、対応する勾配精製ビリオンE、prMおよびM蛋白質と類似の反応性および同一の分子量を示した。

30

【0139】

診断的ELISAに関する抗原としてのNRAの分析において、組織培養液40 mlから回収した抗原を提示する、1バイアルの凍結乾燥NRAを蒸留水1.0 ml中で再構成し、β-プロピオラクトン不活化ショ糖-アセトン抽出物として凍結乾燥されて提供される、再構成されたWNウイルス感染ほ乳期マウス脳 (SMB) 抗原と比較した (Clarkeら、Am. J. Trop. Med. Hyg. 7 : 561 ~ 573 (1958))。全ての組み換え型蛋白質、prM、M、およびEは、勾配精製ビリオンE、prM、およびM蛋白質と類似の反応性を示した。

40

【0140】

暗号化した (coded) ヒト標本を、発達段階での同じ試験における抗原と共に試験した。用いたMAC-およびIgG ELISAプロトコールは、公表された方法と同一であった (Johnsonら、J. Clin. Microbiol. 38 : 1827 ~ 1831 (2000) ; Martinら、J. Clin. Microbiol. 38

50

：1823～1826（2000））。ヒト血清標本は、1999年の大流行の際にWNウイルス確認試験のためにDVBIDに送付した標本からなる、本発明者らの施設の血清バンクから入手した。これらの試験において、スクリーニングMAC-およびIgG ELISAを標本の400倍希釈液について行った。陽性／陰性（P/N）OD比2～3を生じる標本を擬陽性に見なした。疑われる血清標本は、ELISAエンドポイント滴定およびブランク減少中和試験（PRNT）の双方によって陽性であることを確認した。P/N OD比3.0以上を示す全ての標本は、さらなる確認試験を行わずに陽性であると見なした。

【0141】

フラビウイルス群反応性抗E Mab、4G2、および6B6C-1を用いるAg-捕獲ELISAを用いて、pCBWN形質転換COS-1細胞の培養液に分泌されたNRAを検出した。抗原は、形質転換後1日目に培地において検出することができ、さらに濃縮していない培養液中の最高ELISA力価（1：32～1：64）を、2日～4日の間に認めた。NRAは、PEG沈殿によって濃縮し、凍結乾燥緩衝液に再懸濁させ、保存のために凍結乾燥した。診断試験の開発のために、1バイアルの凍結乾燥NRAを蒸留水1.0 mlによって再構成して、WNウイルス陽性および陰性基準ヒト血清（Johnsonら、J. Clin. Microbiol. 38：1827～1831（2000）；Martinら、J. Clin. Microbiol. 38：1823～1826（2000））を用いてMAC-または間接的IgG ELISAにおいて滴定した。NRAの320倍および160倍希釈液はそれぞれ、MAC-およびIgG ELISAにおいて用いるための最適な濃度であることが判明した。これらの希釈液は、MAC-およびIgG試験に関してそれぞれ、P/N OD₄₅₀比が4.19および4.54となった。NY-6480およびEg101株によって産生されたWNウイルスSMB抗原はそれぞれ、MAC-ELISAに関して320倍および640倍希釈で用い、IgG ELISAに関して120倍および320倍で用いた。陰性対照抗原、正常COS-1細胞の培養培地のPEG沈殿物、および正常SMB抗原は、それぞれのNRAおよびSMB抗原に関する場合と同じ希釈で用いた。400倍希釈したヒト血清標本を、ウイルス特異的および陰性対照抗原について、1試料あたり3個ずつ同時に試験した。有効な陽性試験結果を得るためには、ウイルス抗原（P）と反応した試験血清のOD₄₅₀は、陰性対照抗原（N）と反応した同じ血清の対応する吸光度値より少なくとも2倍大きくなければならなかった。

【0142】

NRAおよびNY-06480、Eg101、およびSLEウイルスSMBの反応性を、暗号化ヒト血清標本21個を用いてMAC-およびIgG ELISAによって比較した。標本21個のうち、19個は、三つ全ての抗原に対して類似の結果を示した（陰性8例、および擬陽性または陽性11例）。標本18個も同様に、SLE SMB抗原を用いて個別に試験した。Eg-101-SMB陽性標本13個中3個のみがSLE MAC-ELISAにおいて陽性であった（表1）。WN抗原陰性標本はいずれもSLE MAC-ELISAによって陽性ではなかった。この結果は、抗WNウイルスIgMが他のフラビウイルスと有意に交叉反応せず（Tardeiら、J. Clin. Microbiol. 38：2232～2239（1940））、NRAまたはSMB抗原を試験に用いるか否かにかかわらず、急性のWNウイルス感染症を診断するために特異的であるというこれまでの知見を確認した。全ての標本を同様に、間接的IgG ELISAによって同時に試験した。標本21個中10個は三つの抗原のいずれを用いても陽性であった。

【0143】

いずれも同じ患者から、疾患発症後4日目および44日目に採取したの二つの異なる血清標本（7および9）は、NRAおよびSMB NY抗原に関してIgM陰性であり、初回の試験においてEg-101 SMB抗原を用いるとIgM陽性であった。これらの二つの一致しない標本をさらに調べるために、この患者から6個の連続して採取した標本をエンドポイントMAC-およびIgG ELISAによって再試験した。MAC-ELISAにおいて3日～15日の間に示された32倍以上の連続した増加は、用いた全ての抗原について証明することができた。疾患発症後9日目に採取した脳脊髄液も同様に、この患者が実際に試料を採取する直前にWNに感染したことを確認した。脳脊髄液は、IgM P/Nの読みがそれぞれ、Eg-101-およびSLE-SMB抗原に対して13.71および2.04であった。31日目および44日目の標本は、NY-SMB抗原を用いて陰性（<1：400）であったが、NRAおよびEg101-SMBを用いると陽性であった。試験に用いた三つ全ての抗原について同等のIgG力価を認めた。

【0144】

実施例11. pCBWNをワクチン接種した動物における免疫応答の評価

3週齢の雌性ICRマウス1群10匹を試験に用いた。マウスにpCBWNまたは緑色蛍光蛋白質発現プラスミド (pEGFP) DNA (Clontech, San Francisco, CA) の1回量を筋肉内注射した。pCBWNプラスミドDNAは、EndoFreeプラスミドギガキット (Qiagen) によってXL-1 blue細胞から精製して、pH 7.5のPBSに濃度 $1.0 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ となるように再懸濁させた。pEGFP 100 μg を投与したマウスを非ワクチン接種対照として用いた。マウスに100 μl の容量中100 μg 、10 μg 、1.0 μg 、または0.1 μg の用量でpCBWNプラスミドを注射した。pCBWN 10 μg 、1.0 μg 、または0.1 μg を投与した群にEMC-830方形波電気穿孔装置 (Genetronics, San Diego, CA) を用いて、エレクトロトランスファー媒介インビボ遺伝子輸送プロトコールによってワクチン接種した。エレクトロトランスファープロトコールは、Mirら (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 4262~4267 (1999)) の方法に基づいた。DNA注射の直後、脚のそれぞれの側に4.5mm~5.5 mm離して配置した2本のステンレス鋼プレート電極によって、経皮電気パルスを適用した。脚の皮膚との電氣的接触は、PBSによって脚を完全に湿らせることによって確実にした。パルス間の間隔200 msecで、持続25 msecの40ボルト/mmのパルス4回2組を適用した。電極の極性は、エレクトロトランスファーの効率を増強するために、パルスの組の間で逆転させた。

10

【0145】

マウスを注射後3週間ごとに採血した。WNウイルス特異的抗体反応は、Ag捕獲ELISAおよびプラーク減少中和試験 (PRNT) によって評価した。個々の血清をIgG-ELISAによって調べ、各群マウス10匹のプールした血清をPRNTによってアッセイした。pCBWNをワクチン接種した全てのマウスは、ワクチン接種後3週間で640倍~1280倍の範囲のIgG ELISA力価を示した。3週および6週で採取したプールされた血清は、80倍のNt抗体力価を有した。pEGFP対照マウスからの血清標本はいずれも、WNウイルスに対して如何なるELISAまたはNt力価も示さなかった。

20

【0146】

pCBWNの1回筋肉内ワクチン接種が、マウスをWN感染症から保護しうるか否かを決定するために、マウスに腹腔内注射するか、またはウイルス感染イエカ (Culex mosquitoes) に刺されることによってNY-6480ウイルスをチャレンジした。マウスの群の半数に、NY99-6480ウイルスの LD_{50} の1,000倍 (1,025 PFU/100 μl) をワクチン接種後6週目に腹腔内チャレンジした。残りのマウスはそれぞれ、チャレンジ実験の7日前にNY99-6480ウイルスを感染させたコガタアカイエカ (Culex tritaeniorhynchus mosquitoes) 3匹に刺された。蚊は十分に吸血するまでマウスの血を吸わせた。マウスは、チャレンジ後3週間毎日2回観察した。

30

【0147】

WNウイルスDNAを免疫した全てのマウスが、ウイルスチャレンジ後も健康であったが、対照マウスは全て、ウイルスチャレンジの4~6日にCNS感染症の症状を発症し、腹腔内または感染性の蚊のチャレンジ後、平均で6.9および7.4日で死亡したことから、Nt抗体の存在は、保護免疫と相関することは明白であった。ワクチン接種群において、ウイルスチャレンジ (免疫後9週間) 後3週目に採取したプールされた血清は、Nt抗体力価640倍または320倍を示した。プールしたワクチン接種マウス血清は、ウェスタンブロット分析においてE蛋白質のみと反応した。

40

【0148】

1群10匹のマウスを、エレクトロトランスファーを用いることによって、動物あたりpCBWN 10.0~0.1 μg によって免疫した。pCBWNを投与した群は全て、ウイルスチャレンジから完全に保護された。免疫後6週目で、エレクトロトランスファーを行ったマウスの群は全て、エレクトロトランスファーを行わずに通常の筋肉内注射によってpCBWN 100 μg を投与した動物より、4倍弱異なるNt力価を示した。有効な免疫の証拠となるこれらの結果はいずれも、エレクトロトランスファープロトコールが本発明のDNAワクチンの免疫原性および保護有効性を増強することを示唆している (Mirら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 96

50

: 4262 ~ 4267 (1999)) に記載されるとおりに実施した場合)。

【0149】

本研究において用いた、様々な年齢の混合繁殖雌ウマおよび去勢ウマは、ELISAおよびPRNTによって、WNウイルスおよびSLEウイルス抗体陰性であることが示された。ウマ4頭にpCBWNプラスミド1回量 (1,000 µg/1,000 µl、PBS、pH 7.5) を筋肉内注射した。血清標本はウイルスチャレンジの前に2日毎に38日間採取して、WNウイルス特異的抗体反応をMAC-、またはIgG-ELISAおよびPRNTによって評価した。

【0150】

ウイルスチャレンジの2日前、ウマ12頭 (ワクチン接種4頭および対照8頭) を、コロラド州立大学の生物安全性レベル (BSL) -3封じ込め施設に移した。非ワクチン接種対照ウマ8頭は、ウマにおけるWN誘発発病およびウマが増幅宿主として作用することができるかを調べるように設計された試験のサブセットであった。ウマはそれぞれ、ウマのチャレンジの12日前にNY99-6425またはBC787ウイルスによって感染させたヒトスジシマカ (*Aedes albopictus*) 14匹または15匹に刺された。蚊に10分間ウマの血を吸わせた。ウマを疾患の兆候に関して1日2回調べた。体温を記録し、血清標本を0日 (感染日) ~ 10日まで毎日2回、その後14日まで1日1回採取した。脈拍および呼吸数はチャレンジ後毎日記録した。採取した血清試料は、ウイルス血症の検出のためにブラーク滴定によって、ならびに抗体反応に関してMAC-、またはIgG ELISAおよびPRNTによって調べた。

【0151】

如何なるワクチン接種ウマにも全身または局所反応を認めなかった。個々のウマ血清をPRNTによって調べた。ワクチン接種したウマは、14日 ~ 31日の間に5倍以上またはそれに等しいNt抗体を産生した。37日目 (蚊のチャレンジの2日前) でのワクチン接種したウマ、#5、#6、#7、および#8のエンドポイント力価はそれぞれ、40倍、5倍、20倍、および20倍であった。pCBWNプラスミドをワクチン接種したウマは、ウイルスチャレンジ後も健康であった。いずれのウマも、1日 ~ 14日の間、検出可能なウイルス血症または発熱を示さなかった。非ワクチン接種対照ウマは全て、感染した蚊に刺された後WNウイルスに感染した。非ワクチン接種ウマ8頭中7頭は、ウイルス血症を発症し、これはウイルスチャレンジ後最初の6日間に出現した。ウイルス血症のウマは、ウイルスチャレンジ後7日目 ~ 9日目の間にNt抗体を産生した。疾患の臨床兆候を示した全試験からの唯一のウマはウマ#11であり、感染後8日を初めとして発熱し、神経学的兆候を示した。このウマは24時間以内に重度の臨床疾患に進行し、9日目に安楽死させた。0日、2日、4日、または6日間ウイルス血症を示した代表的な4頭のウマ、#9、#10、#14および#15を選択して、本実施例において例として用いた。ウイルス力価は、われわれのアッセイにおいて検出可能な最低レベルである、血清の $10^{1.0}$ PFU/ml (ウマ#10) から血清の $10^{2.4}$ /ml (ウマ#9) の範囲に及んだ。ウマ#14は、試験期間中に検出可能なウイルス血症を発症しなかった。しかし、このウマは、12日後検出されたNt抗体によって示されたように、ウイルスに感染していた。

【0152】

既往のNt抗体反応は、実験の間Nt力価が徐々に増加したことによって示されるように、ワクチン接種ウマにおいて認められなかった。蚊のチャレンジ前のワクチン接種ウマに既に存在したNt抗体は、最初のウイルス感染および複製を抑制することができた。ウイルスが複製しなければ、感染した蚊によって提供されたチャレンジウイルス抗原は、ワクチン接種したウマにおいて既往の免疫応答を刺激するための十分な抗原量を含まない可能性がある。ワクチン接種したウマは全て、ウイルスチャレンジ後14日目で安楽死させた。WNウイルス感染症を示す肉眼的病理および組織病理学病変は認めなかった。

【0153】

実施例12. 黄熱病ウイルス (YFV) またはセントルイス脳炎ウイルス (SLEV) prMおよびE蛋白質のコード配列を含む、組み換え型プラスミドの調製

pCDJE2-7組み換え型プラスミドの構築と類似の戦略を用いて、YFVおよびSLEV組み換え型プラスミドを調製した。ゲノムRNAを、QIAamp (商標) ウイルスRNAキット (Qiagen, Santa Clarita, CA) を用いて、YFV株TRI-788379またはSLE株78V-6507ウイルスシード150 µ

10

20

30

40

50

Iから抽出した。ウイルスRNAは、YFVまたはSLEV prMおよびE遺伝子コード領域を増幅するための鋳型として用いた。プライマーYFDV389（ヌクレオチド配列、配列番号：4；アミノ酸配列、配列番号：5）、cYFDV2452（配列番号：6）、SLEDV410（ヌクレオチド配列、配列番号：7；アミノ酸配列、配列番号：8）、およびcSLEDV2449（配列番号：9）を用いて、JEVおよびWNV組み換え型プラスミドの調製のために、上記のように対応する組み換え型核酸を作製した。KpnIおよびNotI酵素によって消化したRT-PCR増幅cDNAを、真核細胞発現プラスミドベクターpCDNA3（Invitrogen）のKpnI-NotI部位に挿入した。cDNAの双方の鎖をシーケンシングして、YFV株TRI-788379またはSLEV株78V-6507からの配列に対する同一性を確認した。YFVまたはSLEVのprMおよびEコード領域のヌクレオチド配列をそれぞれ含む、組み換え型プラスミドpCDYF2およびpCDSLE4-3は、EndoFree（商標）プラスミドマキシキット（Qiagen）を用いて精製し、インビトロ形質転換またはマウス免疫に用いた。

【0154】

10

YFVまたはSLEV特異的抗原はそれぞれ、pCDYF2またはpCDSLE4-3によって形質転換したCOS-1細胞において発現させた。発現された蛋白質レベルは、YFVまたはSLEV感染COS-1細胞対照と類似であった。JEVモデルにおけるように、ウイルス抗原の遺伝子を有するベクターによって形質転換したCOS-1細胞株が得られ、これはYFVまたはSLEV抗原性蛋白質を構成的に発現する。YFVまたはSLEV E特異的Mabのパネルを用いたIFAによるエピトープマッピングは、真正のE蛋白質が、pCDYF2-またはpCDSLE4-3形質転換COS-1細胞によって発現されたことを示した。予備試験は、pCDSLE4-3プラスミド100 µg/100 µlの脱イオン水溶液の1回量を筋肉内接種後、3週齢の雌性ICRマウスの100%が血清転換したことを示した。

20

【0155】

実施例13．JEVシグナル配列と共に、セントルイス脳炎ウイルスprMおよびE抗原のコード配列を含む、組み換え型プラスミドの調製

QIAamp（商標）ウイルスRNAキット（Qiagen, Santa Clarita, CA）を用いて、セントルイス脳炎ウイルスのMSI-7株に感染させた、Vero細胞培養培地150 µlからゲノムRNAを抽出した。抽出したRNAを溶出して、ヌクレアーゼ不含有水80 µlに懸濁させ、セントルイス脳炎ウイルスprMおよびE遺伝子コード配列を増幅するための鋳型として用いた。プライマー配列は、Trentら（Virology 156：293～304（1987））の研究から得た。ゲノムヌクレオチド領域を含むcDNA断片は、逆転写酵素-ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）によって増幅した。制限部位AfeIを、アンプリマーSLE463（配列番号：30）を用いることによってcDNAの5'末端に作成（engineer）した。NotI制限部位が後に続くインフレーム翻訳終了コドン、アンプリマーcSLE2447（配列番号：31）を用いてcDNAの3'末端に導入した。RT-PCR産物は、QIAquick（商標）PCR精製キット（Qiagen）によって精製した。

30

【0156】

上記の二つのプライマー（配列番号：30および配列番号：31）を用いることによって産生された二本鎖アンプリコンを、AfeIおよびNotI酵素によって消化して、DNAの2004断片（463～2466 nt）を作製し、pCBJESS-MベクターのAfeIおよびNotI部位に挿入して、pCBSLE（ヌクレオチド配列、配列番号：21；アミノ酸配列、配列番号：22）を形成した。pCBJESS-Mは、pCBampプラスミドに由来し、これはサイトメガロウイルス初期遺伝子プロモーター、翻訳制御要素、および操作された改変JEシグナル配列要素（配列番号：27）を含んだ。JEシグナル配列要素は、当初のpCBJESSプラスミドにおける-4（CysからGly）および-2（GlyからSer）位で改変JEシグナル配列を含む。

40

【0157】

ABIプリズム377シーケンサー（Applied Biosystems/Perkin Elmer, Foster City, CA）を用いた自動DNAシーケンシングを用いて、組み換え型プラスミドが、Trentら（Virology 156：293～304（1987））によって定義された正確なprMおよびE配列を有することを確認した。

【0158】

実施例14．JEVシグナル配列、ならびに黄熱病ウイルス（YFV）prMおよびE蛋白質のコード配列を含む組み換え型プラスミドの調製

50

QIAamp (商標) ウイルスRNAキット (Qiagen, Santa Clarita, CA) を用いて、黄熱病ウイルスの17D-213株に感染させたVero細胞培養培地150 µlからゲノムRNAを抽出した。抽出したRNAを溶出して、ヌクレアーゼ不含水80 µlに懸濁させ、黄熱病ウイルスprMおよびE遺伝子コード配列を増幅するための鋳型として用いた。プライマー配列は、dos Santosら (Virus Research 35 : 35 ~ 41 (1995)) の研究から得た。ゲノムヌクレオチド領域を含むcDNA断片を、逆転写酵素-ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) によって増幅した。制限部位AfeIは、アンプリマー-YF482 (配列番号 : 28) を用いてcDNAの5'末端に作成 (engineer) した。後にNotI制限部位が続くインフレーション翻訳終了コドンを、アンプリマー-cYF2433 (配列番号 : 29) を用いてcDNAの3'末端に導入した。RT-PCR産物はQIAquick (商標) PCR精製キット (Qiagen) によって精製した。

10

【 0 1 5 9 】

上記の二つのアンプリマー (配列番号 : 28および配列番号 : 29) を用いることによって産生された二本鎖アンプリコンを、AfeIおよびNotI酵素によって消化して、DNAの1971断片 (482 ~ 2452 nt) を作製し、これをpCBJESS-MベクターのAfeIおよびNotI部位に挿入して、pCBYF (ヌクレオチド配列、配列番号 : 23 ; アミノ酸配列、配列番号 : 24) を形成した。pCBJESS-Mは、pCBampプラスミドに由来し、これはサイトメガロウイルス初期遺伝子プロモーター、翻訳制御要素および操作されたJEシグナル配列要素 (配列番号 : 27) を含んだ。JEシグナル配列要素は、pCBJESSプラスミドにおけるJESSの - 4 (CysからGly) および - 2 (GlyからSer) 位で改変JEシグナル配列を含む。

20

【 0 1 6 0 】

ABI プリズム377シーケンサー (Applied Biosystems/Perkin Elmer, Foster City, CA) を用いた自動DNAシーケンシングを用いて、組み換え型プラスミドが、dos Santosら (Virus Research 35 : 35 ~ 41 (1995)) によって定義された正確なprMおよびE配列を有することを確認した。

【 0 1 6 1 】

実施例15 . JEVシグナル配列、ならびにポワッサンウイルスprMおよびE抗原のコード配列を含む、組み換え型プラスミドの調製

QIAamp (商標) ウイルスRNAキット (Qiagen, Santa Clarita, CA) を用いて、ポワッサンウイルスのLB株に感染させたVero細胞培養培地150 µlから、ゲノムRNAを抽出した。抽出したRNAを溶出して、ヌクレアーゼ不含水80 µlに懸濁させ、ポワッサンウイルスprMおよびE遺伝子コード配列を増幅するための鋳型として用いた。プライマー配列は、MandIら (Virology 194 : 173 ~ 184 (1993)) の研究から得た。ゲノムヌクレオチド領域を含むcDNA断片を、逆転写酵素-ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) によって増幅した。制限部位AfeIは、アンプリマー-POW454 (配列番号 : 25) を用いてcDNAの5'末端に作成 (engineer) した。NotI制限部位が後に続くインフレーション翻訳終了コドンを、アンプリマー-cPOW2417 (配列番号 : 26) を用いてcDNAの3'末端に導入した。RT-PCR産物はQIAquick (商標) PCR精製キット (Qiagen) によって精製した。

30

【 0 1 6 2 】

上記の二つのアンプリマー (配列番号 : 25および配列番号 : 26) を用いることによって産生された二本鎖アンプリコンを、AfeIおよびNotI酵素によって消化して、DNAの1983断片 (454 ~ 2436 nt) を作製し、これをpCBJESS-MベクターのAfeIおよびNotI部位に挿入して、pCBPOW (ヌクレオチド配列、配列番号 : 19 ; アミノ酸配列、配列番号 : 20) を形成した。pCBJESS-Mは、pCBampプラスミドに由来し、これはサイトメガロウイルス初期遺伝子プロモーター、翻訳制御要素および操作されたJEシグナル配列要素 (配列番号 : 27) を含んだ。JEシグナル配列要素は、pCBJESSプラスミドにおけるJESSの - 4位 (CysからGly) および - 2 (GlyからSer) 位で改変JEシグナル配列を含む。

40

【 0 1 6 3 】

ABI プリズム377シーケンサー (Applied Biosystems/Perkin Elmer, Foster City, CA) を用いた自動DNAシーケンシングを用いて、組み換え型プラスミドが、MandIら (Virology 194 : 173 ~ 184 (1993)) によって定義された正確なprMおよびE配列を有することを

50

確認した。

【0164】

実施例16． Deng 血清型2型 構造蛋白質のコード配列を含むプラスミドの調製

他のフラビウイルスに関して行ったような技法（実施例1、9、および12～15を参照のこと）に従って、 Deng 血清型2型 抗原の核酸TUを含むベクターを調製する。実施例に従って、ベクターを構築するために用いられるアンプリマーは、正常な Deng ウイルスシグナル配列を操作するために選択してもよく、または改変された日本脳炎ウイルスシグナル配列のような、他のフラビウイルスからのシグナル配列を操作するために選択してもよい。

【0165】

prMからEまでの Deng 血清型2型 遺伝子領域を含むプラスミドを構築する。 Deng 血清型2型 prM および E 遺伝子（Deubelら、Virology 155：365～377（1986）；Gruenbergら、J. Gen. Virol. 69、1301～1398（1988）；Hahnら、Virology 162：167～180（1988））を pCDNA3のようなプラスミドにライゲーションした後、切除して、発現させるために pCBamp、pCEP4、pREP4、または pRc/RSVのようなベクター（Invitrogen、Carlsbad、CAから供給）にクローニングする。必要であれば、cDNA配列においてコードされる Deng 血清型2型 ウイルス 特異的配列を、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）のような技法を用いて増幅してもよい。または、ウイルスRNAが遺伝子領域源である場合、RT-PCR技法によってDNA配列を増幅してもよい。5'末端で開始コドンおよび3'末端で停止コドンを含むDNA断片を、サイトメガロウイルス（CMV）前初期（IE）遺伝子プロモーター、開始コドン、およびターミネーターが Deng 血清型2型 ウイルス配列に機能的に結合するように、適当な制限ヌクレアーゼ特異的部

10

20

【0166】

実施例17． Deng 血清型2型 DNAワクチンを用いたマウスのワクチン接種

実施例16において調製した、prMからEまでの遺伝子領域をコードする Deng 血清型2型 核酸TUワクチンを、注射用水または緩衝生理食塩液のような適した薬学的担体に懸濁させ、離乳期のマウス群に筋肉内注射する。対照群には、 Deng 血清型2型 特異的遺伝子を欠損する同等のプラスミド調製物を注射する。 Deng 血清型2型 特異的抗体および/または Deng 血清型2型 特異的免疫系細胞障害細胞の産生を、その後一定の間隔で、例えば毎週の間隔で評価する。核酸TUワクチンを投与した約2ヶ月～4ヶ月後、マウスに Deng 血清型2型 ウイルスをチャレンジする。ウイルス血症のレベルは、2日ごとなどのその後の適当な間隔で評価する。母体の抗体による受動的保護は、実施例8に示すように評価する。

30

【0167】

実施例18． 改善されたシグナルペプチドの設計および構築

シグナルペプチドは、挿入された蛋白質の転移および方向、したがってprMおよびE蛋白質の位相学（topology）を左右しうる。真核細胞のシグナルペプチドの最も一般的な特徴は、h-領域と呼ばれる疎水性アミノ酸の枝8個～12個からなる（von Heijne、「Signal sequences. The limits of variation」、J. Mol. Biol. 184：99～105（1985））。n-領域として知られる開始メチオニンとh-領域との間の領域は、通常、アミノ酸1個～5個を有し、通常、陽性荷電アミノ酸を有する。h-領域と切断部位との間はc-領域であり、これは3個～7個の極性アミノ酸、しかしほとんどが非荷電のアミノ酸残基からなる。ウイルスポリ蛋白質合成の際、CおよびprM蛋白質の接合部での、潜在型から切断可能なコンフォメーションへのシグナラーゼ切断部位の調節は、ウイルスプロテアーゼ複合体NS2B/NS3によってC蛋白質が予め除去されていることに依存する（Lobigs、「Flavivirus premembrane protein cleavage and spike heterodimer secretion require the function of the viral proteinase NS3」、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90：6218～6222（1993））。このように、prMおよびE蛋白質を発現プラスミドのみによって発現させる場合、ウイルスシグナル配列の有効性を検討することが重要である。

40

【0168】

様々なプラスミド構築物におけるシグナルペプチドの差は、少なくとも部分的に、蛋白質転移、切断部位提示、および正確な位相学の差、したがってprMおよびE分泌ならびにVL

50

P形成を説明することができる。これらの属性の調節または最適化は、所望の特徴を付与する特性を有するシグナル配列を選択するか、または用いることによって改善することができる。これは、例えば、真核細胞について訓練された隠れたMarkovモデル(HMM)を用いた、機械学習コンピュータプログラムを用いることによって行うことができる(Henrik Nielsenら、「Prediction of signal peptides and signal anchors by a hidden Markov model」、第6回分子生物学のためのインテリジェントシステムに関する国際学会(ISMB 6)抄録、AAAI Press、Menlo Park、California、122~130頁(1998); Nielsenら、「Machine learning approaches to the prediction of signal peptides and other protein sorting signals」、Protein Engineering 12: 3~9(1999); Nielsenら、「A neural network method for identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites」、Int. J. Neural Sys. 8: 581~599(1997); 「From sequence to sorting: Prediction of signal peptides」、Henrik Nielsen、Ph.D.論文、ストックホルム大学生化学部で保護(1999年5月25日); そのそれぞれが、特に、コンピュータによるアルゴリズムを用いた、シグナル配列の最適化に関連する教示に関して、参照として本明細書に組み入れられる)。

【0169】

用いられるプログラムのタイプの例は、2002年4月3日現在、<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-2.0/>において認められる。参照および組み入れられた参考文献に記載されるHMMを適用して、異なるプラスミド構築物における、prMシグナルペプチド配列のシグナルペプチド確率を計算した(表7)。シグナルP-HMM検索は、全ての構築物におけるシグナルペプチダーゼ切断部位を正確に予測した。しかし、切断の確率(0.164~1.000の範囲)およびシグナルペプチド確率(0.165~1.00の範囲)にかなりの差を認めた(表7)。これは、切断部位とシグナルペプチド確率が同様に、構築物のn-領域における陽性荷電アミノ酸、h-領域における疎水性アミノ酸の長さ、およびc-領域におけるアミノ酸組成によっても影響を受けることが知られていることから、意外ではない(Changら、「Flavivirus DNA vaccines: current status and potential」、Annals of NY Acad. Sci. 951: 272~285(2001); Sakaguchiら、「Functions of Signal and Signal-Anchor Sequences are Determined by the Balance Between the Hydrophobic Segment and the N-Terminal Charge」、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 16~19(1992)。

【0170】

それぞれがJEウイルスの異なる株に由来する、三つのJEウイルスプラスミド構築物は、異なるワクチン能を示した(Linら、「DNA immunization with Japanese encephalitis virus nonstructural protein NS1 elicits protective immunity in mice」、J. Virol. 72: 191~200(1998); Konishiら、「Induction of protective immunity against Japanese encephalitis in mice by immunization with a plasmid encoding Japanese encephalitis virus premembrane and envelope genes」、J. Virol. 72: 4925~4930(1998); Changら、「A single intramuscular injection of recombinant plasmid DNA induces protective immunity and prevents Japanese encephalitis in mice」、J. Virol. 74: 4244~4252(2000)」。これらの構築物におけるシグナルペプチド配列は、荷電アミノ酸を含んでも含まなくてもよいn-領域の長さが異なる(表7)。陽性荷電アミノ酸を含むn-領域は、細胞質側に短いループを形成し、これによってh-領域(膜貫通ヘリックス)はテール方向に挿入されて、シグナラーゼ切断部位を露出する。本発明者らの研究において、prM/MおよびE蛋白質を含む分泌されたVLPは、pCDJE2-7形質転換細胞株、JE4B、またはpCBJE1-14一過性形質転換COS-1細胞の培養培地から精製することができた。勾配精製VLPおよびビリオンは、同一の免疫学的および生化学的特性を有する。フラビウイルス形態形成の顕著な特徴である、prMから成熟M蛋白質へのプロセッシング効率もまた、VLPとビリオン粒子との間で類似である。このように、pCDJE2-7およびpCBJE1-14によって発現されたprMおよびE蛋白質は、ビリオンprMおよびEと類似の方向に、I型膜貫通蛋白質として発現される(Changら、「A single intramuscular injection of recombinant plasmid DNA induces protective immunity and prevents Japanese encephalitis in mice」、J. Virol.

74 : 4244 ~ 4252 (2000)) 。 対照的に、pcDNA3JEMEのprM蛋白質は、そのn-領域に陽性荷電アミノ酸が存在しないために、膜貫通h-領域が頭部方向に挿入されたII型膜蛋白質として発現されうる (Konishiら、 「 Induction of protective immunity against Japanese encephalitis in mice by immunization with a plasmid encoding Japanese encephalitis virus premembrane and envelope genes 」、 J. Virol. 72 : 4925 ~ 4930 (1998)) 。 特に、発現されたprMおよびEの正確な位相学を有する発現された蛋白質と、効率的な蛋白質合成とを組み合わせると、VLP形成および分泌を増強することができ、したがってDNAワクチンの免疫原性を促進する (Changら、 「 A single intramuscular injection of recombinant plasmid DNA induces protective immunity and prevents Japanese encephalitis in mice 」、 J. Virol. 74 : 4244 ~ 4252 (2000)) 。

10

【 0 1 7 1 】

先に記述したように、コンピューターに基づく計算を用いることは、発現プラスミドの設計を最適にするために適用されている。特に、シグナルP-HMMプログラムの予想される検出力を適用して、WNウイルス発現プラスミドを設計した (表2) (Davisら、 「 West Nile virus recombinant DNA vaccine protects mouse and horse from virus challenge and expresses in vitro a noninfectious recombinant antigen that can be used in enzyme-linked immunosorbent assays 」、 J. Virol. 75 : 4040 ~ 4047 (2001)) 。 pCBWNプラスミドは、WNウイルスprM-E遺伝子配列が後に続く短縮型のJEウイルスシグナルペプチドからなる。この構築物のワクチン能は、pCBWN DNAの1回筋肉内注射が保護免疫を誘導したのみならず、マウスおよびウマにおけるWNウイルス感染症を予防したことから十分に証明された。

20

【 0 1 7 2 】

先に考察したように、かつ実施例13~15において証明したように、抗原コード領域と同じウイルスからのウイルスコードシグナル配列が、必ずしも利用できる最適なシグナルペプチドである必要はない。さらに、非改変シグナル配列が必ずしも最適である必要はない。例えば、pCBE1-14プラスミドにおいてコードされるシグナルペプチドは、シグナル配列の確率によって測定すると、n-領域を短縮することによって、c-領域配列を変化させることによって、または双方の改変の組み合わせによって改善することができる (図6) 。 例示のため、JEウイルスシグナルペプチドの短縮型は、本明細書に記載され、かつ教示のために参照として本明細書に組み入れられる、WNウイルスprMおよびE遺伝子の発現のために用いられている (Davisら、 「 West Nile virus recombinant DNA vaccine protects mouse and horse from virus challenge and expresses in vitro a noninfectious recombinant antigen that can be used in enzyme-linked immunosorbent assays 」、 J. Virol. 75 : 4040 ~ 4047 (2001)) 。 1回筋肉内接種による用量設定試験により、pCBWNは、マウスにおける免疫原性がpCBE1-14より少なくとも2倍~4倍強いことが示された。

30

【 0 1 7 3 】

実施例19 . 多価ワクチン

多数のフラビウイルスに対して免疫するように設計された、多価および/または複合ワクチンも同様に作製することができる。多価ワクチンの調製において、YF、異なる血清型のDEN、JE、WN、SLE、およびTBE (RSSEおよびCEE) ウイルス、またはフラビウイルスの他の任意の組み合わせのような、関係する病原体に関連した要素を含む一価ワクチン成分を調製する。他の実施例および本明細書において記述したDNA構築物の設計および作製は、記述通りに実施する。適当なワクチンの組み合わせは、多数の病原体に対して保護する多価または複合ワクチンを提供するように作製されうる。本発明者らのグループの予備的なデータは、pCBE1-14およびpCBWN DNAの複合ワクチンの筋肉内注射によって、マウスにおいてJEウイルス、およびWNウイルス特異的Nt抗体が誘導されることを証明した (表8) 。 それぞれの一価の成分は、たとえ同一の転写および翻訳調節物質を用いて構築しても、好ましくは、そのワクチン能を確実にするために類似のモデル系において試験すべきである。その後、複合ワクチンカクテルを処方することができる。これらのワクチンカクテルは、特定の地理的地域に対して特異的に作製することができる。例えば、熱帯および亜熱帯

40

50

アジアのためのワクチンカクテルは、DENの四つの血清型、WN、およびJEウイルスワクチンを含むべきである。アフリカおよび南アメリカのための同様に有用なワクチンカクテルはそれぞれ、DENの四つの血清型、WN、およびYFウイルスワクチン、ならびにDENの四つの血清型、Rocio、およびYFウイルスワクチンを含むべきである。

【0174】

実施例20．組み換え型 Deng2 型ウイルスの調製と試験

a．実施例の要約。 Deng2 型ウイルス (DEN-2) の前膜 (prM) およびエンベロープ (E) 蛋白質をコードする一連のプラスミドを構築した。これらのプラスミドには、配列番号: 43によって記述される蛋白質をコードする真正のDEN-2prM-E構築物 (pCBD2-14-6) (配列番号: 42)、配列番号: 45によって記述される蛋白質をコードする90%DEN-2 E-10%日本脳炎 (JE) ウイルスEキメラ構築物 (pCB9D2-1J-4-3) (配列番号: 44)、および配列番号: 47によって記述される蛋白質をコードする80%DEN-2 E-20%JE Eキメラ構築物 (pCB8D2-2J-2-9-1) (配列番号: 46) が含まれた。モノクローナル抗体 (MAb) 反応性は、三つ全てのプラスミドが、ドメイン1、2、および3の抗体のパネルと反応するE蛋白質エピトープを発現することを示した。しかし、pCB8D2-2J-2-9-1構築物 (配列番号: 46) のみが高レベルのprM (成熟prM) およびEを、プラスミド形質転換COS-1細胞の培地に分泌した。pCBD2-14-6プラスミド (配列番号: 42) によって形質転換されたCOS-1細胞、およびpCB9D2-4-3プラスミド (配列番号: 44) によって形質転換されたCOS-1細胞によって発現されたprMおよびE蛋白質の主要な部分は、膜に結合したままであった。DEN-2のE蛋白質をコードする配列の20%を対応するJE E蛋白質配列をコードする配列に置換しても、MAb反応性に影響を及ぼさなかった。

【0175】

試験において、選択したプラスミドをマウスの群に0週目および3週目に2回筋肉内注射して、特異的中和抗体およびELISA抗体を測定することによって免疫応答を評価した。サブウイルス粒子 (SVPs) を形成することができる分泌型prMおよびEを発現するプラスミドは、抗体反応の刺激において他の構築物より優れていた。pCB8D2-2J-2-9-1免疫マウスの血清標本9例中7例において、40倍~1000倍超に及び90%中和力価を認めた。

【0176】

b．DEN-2ウイルスの重要性とワクチン。 Deng (DEN) 熱は、亜熱帯および熱帯地域に発生する急性感染症である。これはヒトの最も重要なフラビウイルス疾患の一つである。先に述べたように、Dengウイルスには異なる四つのDEN血清型 (DEN-1、DEN-2、DEN-3、およびDEN-4) が存在する。これらのいずれかに感染すると、通常、無症候性であるか、またはDeng熱 (DF) として知られる自己限定性の発熱疾患を生じる。しかし、少ない割合の症例において、Dengウイルス感染症の結果、はるかにより重篤な疾患で生命に危険があるDeng出血熱またはDengショック症候群 (DHF/DSS) が起こる。このように、あまり関心を集めない比較的軽度のDF症例は世界中で年間約1億例であるが、入院を必要とするDHF/DSS症例は年間で推定50万例が報告されている。この疾患に対して保護するために、DENが風土病であり、かつ流行している地域の子供、および免疫がない大人に投与するために、四つ全ての血清型に対して有効な安全かつ有効なDENワクチンが必要である。

【0177】

安全なワクチンは、ビルレントウイルスによる重篤な感染症の起こりうるリスクを最小限にしなければならない。そのようなビルレントウイルスは、遺伝子復帰変異または弱毒化ワクチンウイルスに由来する、何らかのタイプのワクチンの組み換えによって生じうる。そのような発生は、ポリオウイルス撲滅キャンペーンにおいて実際に起こった (Guillotら、"Natural Genetic Exchanges between Vaccine and Wild Poliovirus Strains in Humans", J. Virol. 74: 8434~8443 (2000); Liuら "Molecular Evolution of a Type 1 Wild-Vaccine Poliovirus Recombinant during Widespread Circulation in China", J. Virol. 74: 11153~11161 (2000))。さらに、黄熱病のアメリカ株TRINID79Aのゲノムシーケンシングを行ったところ、この株と弱毒化黄熱病ワクチンウイルスFNVの間

に高度の類似性があることが証明されている (Changら、「Nucleotide sequence variation of the envelope protein gene identifies two distinct genotypes of yellow fever virus」、J. Virol. 69 : 5773 ~ 5780 (1995) ; Pisanoら、「Complete nucleotide sequence and phylogeny of an American strain of yellow fever virus, TRINID79A」、Arch. Virol. 144 : 1837 ~ 1843 (1999))。それ自身結論的ではないが、類似性は、TRINID79AがFNVワクチンウイルスに由来することを強く示唆する。

【 0 1 7 8 】

DNAに基づくワクチンを用いることは、フラビウイルスワクチンを開発するための新規かつ有望な免疫アプローチである (本明細書において記述するように、Changら、「Flavi virus DNA vaccines : current status and potential」、Ann. NY Acad. Sci. 951 : 272 ~ 285 (2001)、およびその中に引用されている参考文献)。本実施例において、多くのDEN-2ワクチンを作製し、DEN-2構築物を筋肉内に免疫した後のマウスにおける免疫応答は、prM/MおよびE分泌の効率と相関した。有意な量のprM/MおよびE抗原を分泌する一つの構築物は、プラスミドワクチン接種マウスにおいて高い力価の中和抗体を刺激できることが示された。

【 0 1 7 9 】

c. 材料および方法

i. 細胞培養およびウイルス株。 COS-1細胞 (ATCC、Manassas、VA ; 1650-CRL) を、10 % 熱不活化ウシ胎児血清 (FBS、Hyclone Laboratories Inc.、Logan、UT)、1 mMピルピ ン酸ナトリウム、1 mM非必須アミノ酸、30 ml/L 7.5 % NaHCO₃、100単位/mlペニシリン、 および100 µg/mlストレプトマイシンを添加したダルベッコ改変イーグル最小基本培地 (D MEM、GIBCO、Grand Island、NY) において5 % CO₂、37 °Cで増殖させた。VeroおよびC6/36 細胞を、COS-1細胞に関して用いた条件と同じ条件で増殖させた。DEN-2ウイルス、株1668 1を、cDNAクローニング、IgG ELISA、およびブランク減少中和試験 (PRNT) のために用い た。ウイルスは、C6/36細胞培養において増殖させた。免疫学的または生化学的研究のた めに用いられるウイルスは、7 % ポリエチレングリコール (PEG-8000 ; Fisher Scientific 、Fair Lawn、NJ) による沈殿の後、30 % グリセロール-45 % 酒石酸カリウム勾配中で超遠 心することによって精製した (Obijeskiら、「Segmented genome and nucleocapsid of L a Crosse virus」、J. Virol. 20 : 664 ~ 675 (1976))。

【 0 1 8 0 】

ii. プラスミドの構築。 ゲノムRNAは、QIAamp (商標) ウイルスRNAキット (Qiagen、 Santa Clarita、CA) を用いて、DEN-2 16681株を感染させたC6/36細胞培養培地150 µl から抽出した。抽出したRNAをジエチルピロカーボネート処置水 (DEPC、Sigma、ST.Louis、 MO) 80 µl に再懸濁させてから、DEN-2ウイルスprMおよびE抗原を逆転写酵素-PCR (RT-PCR) によって増幅するための鋳型として用いた。公表された配列に基づいてプライマー配列 (表9) を設計した (Gadkariら、「Critical evaluation of Kyasanur Forest disease v irus neutralizing antibodies found in bats (a preliminary report)」、Indian J. Med. Res. 64 : 64 ~ 67 (1976) ; Kinneyら、「Construction of infectious cDNA clones for dengue 2 virus : strain 16681 and its attenuated vaccine derivative, strain PDK-53」、Virology 230 : 300 ~ 308 (1997))。制限酵素KasIの認識および切断部位をcD NAアンプリコンの5'末端に組み入れた。NotI制限部位が後に続くインフレーム終了コドン をcDNAアンプリコンの3'末端に導入した。DEN-2ウイルスcDNAアンプリコンをKasIおよびN otI酵素によって消化した後、pCBJESSベクターのKasIおよびNotI部位に挿入して、100 % D EN-2 Eプラスミド、pCBD2-14-6 (配列番号 : 42) を作製した。

【 0 1 8 1 】

90 % および80 % DEN-2 Eプラスミドを構築するために、100 % DEN-2プラスミド、pCBD2-1 4-6 (配列番号 : 42) およびJEプラスミド、pCBJE1-14 (配列番号 : 17) をPCR鋳型として 用いて、それぞれ、DEN-2およびJE DNA配列を増幅した。DEN-2およびJE遺伝子断片を得る ために増幅反応において用いた、プライマーの組を表9に記載する。T7およびSP6プライミ ング部位は、当初のpCDNA-3プラスミド (Invitrogen、Carlsbad、CA) に由来するpCBamp

プラスミドにおいて認められ、望ましければ、または必要に応じて利用することができる。90%DEN-2-10%JE E蛋白質遺伝子のPCR増幅DNA断片をBstX1制限エンドヌクレアーゼによって消化し、T4 DNAリガーゼを用いてライゲーションし、KasIおよびNotI酵素によって消化し、pCBJESSベクターのKasIおよびNotI部位に挿入して、プラスミド、pCB9D2-1J-4-3（配列番号：44）を得た。80%DEN-2-20%JE E遺伝子のPCR増幅DNA断片を、BsmBIによって消化し、T4 DNAリガーゼによってライゲーションし、KasIおよびNotI酵素によって消化し、pCBJESSベクターのKasIおよびNotI部位に挿入して、pCB8D2-2J-2-9-1（配列番号：46）を得た。三つのプラスミド構築物の略図を図7に示す。90%DEN-2-10%JE Eおよび80%DEN-2-20%JE E蛋白質接合領域を、それぞれ表9に示す。

【0182】

ABIプリズム377シーケンサー（Applied Biosystems/Perkin Elmer, Foster City, CA）において、製造元の推奨する技法に従って、自動DNAシーケンシングを行った。正確なprMおよびE配列を有する組み換え型プラスミドを、配列分析を用いて同定した。

【0183】

iii. 電気穿孔によるCOS-1細胞におけるDEN-2組み換え型抗原の一過性の発現。COS-1細胞は、実施例の他の部分、およびChangら、（「A single intramuscular injection of recombinant plasmid DNA induces protective immunity and prevents Japanese encephalitis in mice」、J. Virol. 74 : 4244 ~ 4252 (2000)）に記載したプロトコルを用いて、各DEN-2プラスミドまたは緑色蛍光蛋白質発現プラスミド対照（pEGFP、Clontech、San Francisco, CA）について個々に電気穿孔した。電気穿孔した細胞を75 cm²培養フラスコに播種して、37℃、5%CO₂において維持した。電気穿孔の6時間後、増殖培地を2%ウシ胎児血清を含む維持培地に交換した。組織培養培地および細胞は、抗原特徴付けのために電気穿孔後個々に48時間で回収した。

【0184】

iv. DEN-2 E特異的モノクローナル抗体を用いたエピトープマッピング。電気穿孔の48時間後、接着細胞をトリプシン処理して、5%ヤギ血清を含むPBSに再懸濁させて、12ウェルスポットスライド上にスポットして、風乾させた。スポットスライドに接着した細胞をアセトンによって-20℃で10分間固定した後、風乾させた。E-蛋白質特異的モノクローナル抗体（Mab）を用いて、既に記述されているように間接的免疫蛍光抗体アッセイ（IFA）によって蛋白質発現を検出した（表10：Changら、（「A single intramuscular injection of recombinant plasmid DNA induces protective immunity and prevents Japanese encephalitis in mice」、J. Virol. 74 : 4244 ~ 4252 (2000)））。

【0185】

v. 組み換え型DEN-2ウイルス抗原の特徴付け。組織培養培地を電気穿孔の48時間後に回収した。抗原捕獲（Ag-捕獲）ELISAを用いて、一過性に形質転換したCOS-1細胞の、培養培地に分泌されたDEN-2ウイルス抗原を検出した。Mab 4G2および西洋ワサビペルオキシダーゼ結合Mab 6B6C-1を用いて、それぞれ、DENウイルス抗原を捕獲して、捕獲した抗原を検出した（Changら、（「A single intramuscular injection of recombinant plasmid DNA induces protective immunity and prevents Japanese encephalitis in mice」、J. Virol. 74 : 4244 ~ 4252 (2000) ; Huntら、「A recombinant particulate antigen of Japanese encephalitis virus produced in stably-transformed cells is an effective noninfectious antigen and subunit immunogen」、J. Virol. Methods. 97 : 133 ~ 149 (2001)））。

【0186】

電気穿孔の48時間後、各プラスミドに関して形質転換した細胞をトリプシン処理し、5 × 10⁶個を含むアリコートとしてPBSに再懸濁させた。これらの細胞試料は、Mem-PER哺乳類膜蛋白質抽出試薬キット（Pierce、Rockford, IL）を用いて、製造元の提案するプロトコルに従って、膜蛋白質抽出に関して処理した。疎水性および親水性蛋白質の双方を単離した。この技法は、疎水相において認められた膜貫通蛋白質を濃縮するために開発された。疎水性および親水性分画はいずれも、DEN-2組み換え型抗原に関して抗原-捕獲ELISA

10

20

30

40

50

によって分析した。

【 0 1 8 7 】

培地中の組み換え型抗原は、10% ポリエチレングリコール (PEG) -8000による沈殿によって濃縮した。沈殿物は、TNE緩衝液 (50 mM トリス、100 mM NaCl、10 mM EDTA、pH 7.5) に、当初の容量の100分の1となるように再懸濁し、遠心によって透明にし、4℃ で保存した。PEG沈殿によって濃縮し、TNE緩衝液に再懸濁させた組み換え型抗原を、4.0% エタノールによって抽出し、残留PEGを除去した (Huntら、*「A recombinant particulate antigen of Japanese encephalitis virus produced in stably-transformed cells is an effective noninfectious antigen and subunit immunogen」*、J. Virol. Methods. 97: 133~149 (2001))。エタノール抽出した抗原、形質転換細胞からの疎水性膜蛋白質、および勾配精製DEN-2ビリオンを、Excel Plus電気泳動装置 (商標) (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA) においてNuPAGE、4~12% ビストリス勾配ゲルにおいて分析した後、Excel Plusプロットユニット (Invitrogen Corp.) を用いてニトロセルロースメンブレン上にエレクトロブロッティングを行った。DEN-2ウイルス特異的蛋白質は、DEN-2ウイルス特異的 MAb 1A6A-8 (E特異的) および1A2A-1 (カプシド特異的)、ならびにDEN-2 prMに対して特異的なウサギ血清、およびDEN-2 M蛋白質のアミノ酸1~34位からなるペプチドに対して特異的なマウス血清を用いて、ウェスタンブロットによって検出し、正常マウス腹水を陰性対照として用いた (Murrayら、*「Processing of the dengue virus type 2 proteins prM and C-prM」*、J. Gen. Virol. 74 (Pt 2): 175~182 (1993) ; Roehrigら、*「Monoclonal antibody mapping of the envelope glycoprotein of the dengue 2 virus, Jamaica」*、Virology 246: 317~328 (1998))。

【 0 1 8 8 】

vi. マウスのワクチン接種。 3週齢の雌性ICR非近交系マウス1群10匹を試験に用いた。0週目および3週目に容量100 μ l / マウスで用量100 μ g のpCBD2-14-6、pCB9D2-1J-4-3、pCB8D2-2J-2-9-1またはpEGFPをマウスに筋肉内注射した。プラスミドDNAは、EndoFreeプラスミドギガキット (商標) (Qiagen) を用いてXL-1 blue細胞から精製して、1.0 μ g / μ l の濃度でpH 7.5のPBSに再懸濁させた。pEGFP 100 μ gを投与したマウスをプラスミドワクチン接種対照として用いた。マウスを注射後3週間毎に採血して、DEN-2ウイルス特異的抗体反応を間接的ELISAおよびPRNTを用いて評価した。

【 0 1 8 9 】

vii. 血清学試験。 ワクチン接種前および接種後の血清標本を、ELISAによって精製DEN-2ビリオンに対する抗体結合能に関して、PRNTによって中和 (Nt) 抗体に関して、およびウェスタンブロッティングによって精製DEN-2ウイルス蛋白質を認識する抗体に関して調べた。PRNTは、DEN-2 (16681株) およびJE (Nakayama株) ウイルスを用いて、既に記述されているようにVero細胞に関して行った (Changら、*「A single intramuscular injection of recombinant plasmid DNA induces protective immunity and prevents Japanese encephalitis in mice」*、J. Virol. 74: 4244~4252 (2000))。エンドポイントは、90% ブラーク減少レベルで決定した (Huntら、*「A recombinant particulate antigen of Japanese encephalitis virus produced in stably-transformed cells is an effective noninfectious antigen and subunit immunogen」*、J. Virol. Methods. 97: 133~149 (2001))。

【 0 1 9 0 】

d. 結果

i. DEN-2ウイルス組み換え型抗原の一過性の発現。 DEN-2ウイルスのprMおよびE遺伝子の発現、またはDEN-2およびJEウイルス配列の組み合わせ (80% DEN-20% JEまたは90% DEN-10% JE) からのキメラE遺伝子の発現は、三つの組み換え型DEN-2 DNAプラスミドのそれぞれを、COS-1細胞に個別に形質転換することによって得た。基本のプラスミド設計は、プラスミド形質転換細胞が発現され、真正のウイルス蛋白質が細胞培養液に分泌される、JEウイルスおよびWNウイルスの組み換え型プラスミドによるこれまでの研究結果に基づいた (Changら、*「A single intramuscular injection of recombinant plasmid DNA i*

nduces protective immunity and prevents Japanese encephalitis in mice」、J. Virol. 74 : 4244 ~ 4252 (2000) ; Davisら、「West Nile virus recombinant DNA vaccine protects mouse and horse from virus challenge and expresses in vitro a noninfectious recombinant antigen that can be used in enzyme-linked immunosorbent assays」、J. Virol. 75 : 4040 ~ 4047 (2001))。DEN-2組み換え型蛋白質の一過性の発現は当初、細胞培養上清の抗原捕獲ELISA、およびアセトン固定形質転換COS-1細胞のIFAによって評価した (Changら、(「A single intramuscular injection of recombinant plasmid DNA induces protective immunity and prevents Japanese encephalitis in mice」、J. Virol. 74 : 4244 ~ 4252 (2000))。最適な抗原発現点は、電気穿孔の48時間後であると決定された。

10

【 0 1 9 1 】

ii . 一過性に形質転換されたCOS-1細胞によって発現されたE蛋白質のエピトープマッピング。組み換え型プラスミドのそれぞれによって発現されたDEN-2蛋白質を、DEN-2ウイルスに対して既知の反応性を有するマウスMAbのパネルを用いてIFAによって評価した (表10 : Henchalら、「Epitopic analysis of antigenic determinants on the surface of dengue-2 virions using monoclonal antibodies」、Am. J. Trop. Med. Hyg. 34 : 162 ~ 169 (1985) ; Roehrigら、「Monoclonal antibody mapping of the envelope glycoprotein of the dengue 2 virus, Jamaica」、Virology 246 : 317 ~ 328 (1998))。MAbパネルには、prMおよびC蛋白質と同様にフラビウイルスのE蛋白質の三つの抗原性ドメインのそれぞれと反応する抗体が含まれた (Mandlら、「Antigenic structure of the flavivirus envelope protein E at the molecular level, using tick-borne encephalitis virus as a model」、J. Virol. 63 : 564 ~ 571 (1989) ; Reyら、「The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 resolution」、Nature 375 : 291 ~ 298 (1995))。フラビウイルス抗原性ドメイン2および3に対して特異的なMAbは、DEN-2ウイルスおよび三つのプラスミド発現蛋白質のそれぞれに対して、ほぼ同一の定量的反応性を示した。ドメイン-1特異的MAbの一つ、1B4C-2もまた、発現された全ての蛋白質と類似の反応性パターンを示した。しかし、二つのドメイン1特異的MAb、2B3A-1および9A4D-1は、エンドポイント滴定によって示されるように、プラスミドpCBD2-14-6およびpCB9D2-1J-4-3によって発現されたE蛋白質との反応性がかなり低かった (括弧内の値、表10)。エンドポイント力価の比較から、100%DEN-2 Eおよび90%DEN-2 E-10%JE Eを含む構築物において、エピトープC3およびC4の発現が明白に少ないことが判明した。prMに対して特異的なMAb 2H2は、三つ全てのプラスミドによって発現された抗原と同じ反応性を示した。抗-C MAb 1A2A-1は、DEN-2ウイルスと良好に反応し、prMおよびEを含むがCは含まないプラスミド発現ウイルス蛋白質と低いレベルの非特異的反応性を示した。

20

30

【 0 1 9 2 】

iii . 三つのDEN-2組み換え型プラスミドのそれぞれによって産生された、分泌蛋白質および膜結合型蛋白質の比較。それぞれの組み換え型DEN-2プラスミドに関して、形質転換後48時間のCOS-1細胞から類似の量の細胞培養液を回収した。培養液に認められた分泌型組み換え型抗原を、PEG沈殿によって100倍濃縮した後、エタノール抽出によって、ポリアクリルアミドゲル電気泳動によるその後の分析を妨害するPEGを除去した。各プラスミドによって発現された分泌型抗原の相対量は、PEG沈殿およびエタノール抽出細胞培養液調製物の双方の、Ag捕獲ELISA分析によって決定した (表11)。分泌型抗原は、80%DEN-2 Eおよび20%JE E遺伝子を含むpCB8D2-2J-2-9-1 (配列番号 : 34) にトランスフェクトさせた細胞に限って検出された。100%DEN-2 Eまたは90%DEN-2 E-10%JE E遺伝子のいずれかを含む組み換え型プラスミドは、発現された蛋白質を濃縮する努力にもかかわらず、ELISAによって検出可能な抗原を培養液に産生しなかった。

40

【 0 1 9 3 】

ウェスタンブロット分析も同様に用いて、DEN-2組み換え型プラスミドのそれぞれによる分泌型抗原の産生を評価した。比較目的のために、PEG-沈殿、エタノール抽出細胞培養上清の同等の容量を、NuPAGE勾配ゲルで泳動し、ニトロセルロースにエレクトロブロット

50

し、全てのDEN-2構造蛋白質と反応することができるMabまたはポリクローナル抗血清を用いて分析した（図8A）。ウェスタンブロット分析は、DEN-2特異的蛋白質が二つのプラスミド、すなわちpCB8D2-2J-2-9-1およびpCB9D2-1J-4-3（それぞれ、配列番号：46および44）からの培養液において検出されたことから、組み換え型抗原の検出に関してAg-捕獲ELISAより大きい感度を示した。プラスミドpCB8D2-2J-2-9-1（配列番号：46）はE、prM、およびM蛋白質からなることが示されている分泌型抗原の最大量を発現した。pCB9D2-1J-4-3（配列番号：44）によって産生された分泌型抗原は比較的少なく、pCBD2-14-6（配列番号：42）調製物に関しては、かすかに検出可能なレベルが認められたに過ぎず、これは、特に、対照pEGFPに対するE-特異的Mab、1A6A-8の非特異的反応性を考慮に入れても、発現されたE蛋白質が比較的少ないように思われた（図8A、14-6およびGFPに関してレーンa、b）。

10

【0194】

E、prMおよびMは、その細胞内合成を通して膜会合蛋白質であることから、三つの組み換え型DEN-2プラスミドによるこれらの蛋白質の発現について、何らかの評価を行う場合には、プラスミド形質転換細胞からの細胞膜調製物の評価を含まなければならない。MemPER哺乳類膜蛋白質抽出試薬キット（Pierce）を用いて、組み換え型プラスミドのそれぞれによって形質転換された細胞の同等数から、膜貫通蛋白質を単離した。疎水性蛋白質を、相分離によって親水性蛋白質から分離した。Ag-捕獲ELISAによる予備的な分析によって、親水性蛋白質分画が非反応性であることが示された；しかし、組み換え型DEN-2プラスミドのそれぞれによって形質転換したCOS-1細胞からの疎水性蛋白質分画は、ELISA試験において類似の力価を有した（表11）。これらの結果は、三つ全てのプラスミドによってコードされた組み換え型抗原が、形質転換後に発現されたものの、発現された組み換え型抗原は同じレベルで必ずしも全て分泌されないことを示した。

20

【0195】

疎水性蛋白質分画に関するAg-捕獲の結果の確認は、ウェスタンブロットによって行った（図8B）。プラスミド形質転換細胞のそれぞれからの疎水性蛋白質分画の同等の容量を、バンドおよびレーンの歪みを減少させるために、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動に関する製造元の推奨に従って希釈した。E-、prM-、C-、およびM-特異的Mabまたはポリクローナル抗血清による免疫ブロット法により、三つ全てのDEN-2プラスミドが、EおよびprMからなる組み換え型抗原の類似量の産生を誘導したことが証明された。M蛋白質はprMからプロセッシングされなかったためか、またはそのレベルが低すぎて検出できなかったために、検出されなかった。バンドの歪みを減少させる努力にもかかわらず、疎水性蛋白質試料における高レベルの界面活性剤のために、そのような高濃度の界面活性剤を含まない試料と比較すると、EおよびprMはわずかに異常に移動した（図8Aおよび8BにおいてEおよびprMの移動を比較）。

30

【0196】

iv. 三つの異なるDEN-2組み換え型DNAプラスミドをワクチン接種したマウスにおける免疫応答の比較。3週齢のICRマウスをpCB8D2-2J-2-9-1（配列番号：46）、pCB9D2-1J-4-3（配列番号：44）、pCBD2-14-6（配列番号：42）またはpEGFP 100 μgによる筋肉内注射によって0週目および3週目に免疫した。マウスを初回免疫後3週、6週、および9週目に採血した。個々の血清、およびプールした血清を、ワクチン接種後3週および6週で100倍および400倍希釈液のスクリーニング、およびワクチン接種後9週におけるエンドポイント滴定を用いて、間接的ELISAによって調べた。9週の血清も同様に、DEN-2およびJEウイルスによるPRNTによって調べた。ELISAの結果は、1回免疫後（3週目の血清）、pCB8D2-2J-2-9-1を投与した全てのマウスが血清変換したのに対し、pCB9D2-1J-4-3では50%、およびpCBD2-14-6ワクチン接種マウスでは20%がDEN-2ウイルスと反応したに過ぎなかったことを示した（表12）。ワクチン接種後の9週までに、pCB8D2-2J-2-9-1またはpCBD2-1J-4-3のいずれかをワクチン接種したマウスは全て、抗DEN-2 ELISA反応性を示した；しかし、幾何平均力価は、有意に異なった（それぞれ、力価20,000倍対708倍）。100倍を超える抗DEN-2 ELISA力価を示したのは、pCBD2-14-6免疫マウスの40%に過ぎなかった。精製DEN-2ウイルス

40

50

に対する、pCB8D2-2J-2-9-1免疫マウスからのプールした9週の血清のウェスタンブロットは、免疫優性反応がE糖蛋白質に対してであったことを示した。prMおよびMに対するわずかな反応性も同様に検出された。

【0197】

より重要なことに、三つのDEN-2プラスミドのワクチン能の評価に関して、90%プラーク減少エンドポイントに基づいて、pCB8D2-2J-2-9-1(配列番号:46)によって免疫したマウス9匹中7匹においてウイルス中和抗体の誘導を認めた(表10)。しかし、50%中和エンドポイントを用いる場合、血清9例中9例全てがPRNT力価³40倍を有する。90%中和力価は、中和活性を有する血清7例に関して40倍から1000倍超の範囲であった。pCB9D2-1J-4-3を免疫したマウスはいずれも、中和抗体を産生せず、pCBD2-14-6ワクチン接種マウスから

10

【0198】

二つの組み換え型プラスミド、すなわち、pCB9D2-1J-4-3(配列番号:44)およびpCB8D2-2J-2-9-1(配列番号:46)がJEウイルスE遺伝子配列を含むため、全ての血清を、JEウイルス中和活性の存在に関しても評価した。しかし、そのような活性は、如何なる免疫群のマウスに関しても90%中和エンドポイントでは検出されなかった。対照プラスミドpEGFPを免疫したマウスがDEN-2またはJEウイルスのいずれにに対しても反応性を示さなかったことは意外ではなかった。

【0199】

e. 考察

20

JEおよびWNワクチンに関して初期に用いた同じ段階を最初に用いて、真正DEN-2 prMおよびE遺伝子領域からなる組み換え型DEN-2プラスミド、pCBD2-14-6(配列番号:42)を構築した。MAbのパネルを用いて、IFAにより、このプラスミドによって形質転換したCOS-1細胞によって発現された、DEN-2蛋白質の抗原性マッピングを行ったところ、prMおよびE蛋白質が適合性の蛍光強度を示し、ウイルス感染細胞と類似のMAb反応性を有することが示された(表10)。しかし、真正DEN-2 prMおよびE領域をコードするプラスミドによって形質転換したこれらのCOS-1細胞は、検出可能なDEN-2抗原を培養液に分泌することができなかった(抗原捕獲ELISAによって測定した場合)。さらに、真正のDEN-2 prMおよびE領域をコードするプラスミドを用いてワクチン接種を行っても、筋肉内に免疫したマウスにおいて抗DEN-2ウイルス中和抗体を刺激することができなかった(表13)。興味深いことに、pCBD2-14-6による細胞の形質転換によって、穴の開いた球状の蛍光染色が得られ、これはDEN-2のE蛋白質のC-末端が、蛋白質の膜保持シグナルに関与する可能性があることを示唆している。このIFA染色パターンは、JEまたはWN構築物形質転換細胞のいずれにおいても認められなかった(Changら、(「A single intramuscular injection of recombinant plasmid DNA induces protective immunity and prevents Japanese encephalitis in mice」、J. Virol. 74:4244~4252(2000); Davisら、「West Nile virus recombinant DNA vaccine protects mouse and horse from virus challenge and expresses in vitro a noninfectious recombinant antigen that can be used in enzyme-linked immunosorbent assays」、J. Virol. 75:4040~4047(2001))。したがって、本出願の教示に従ってなされた知見に照らして、DEN-2のC-末端の10%または20%を、それぞれJEウイルスE蛋白質の対応する領域に置換して、DNA配列の適当な操作を行った二つのさらなるプラスミド、pCB9D2-1J-4-3(配列番号:44)およびpCB8D2-2J-2-9-1(配列番号:46)を作製した。ワクチン接種マウスにおける検出可能な抗DEN-2 ELISA抗体を刺激するための、異なる構築物の相対的な有効性を表13に示す。

30

40

【0200】

これらの結果は、prMとEとの間の相互作用が、粒子の集合および分泌のプロセスに影響を及ぼするというモデルと一致する。このモデルに関する支持は、ダニが媒介する脳炎ウイルスの研究において認められ、これは、prMとEの外部ドメインとの相互作用が、prM-EのprM媒介細胞内輸送に関係し、このようにしてウイルス様粒子が分泌されることを推定的に示唆している(Allisonら、「Mapping of functional elements in the stem-anchor

50

region of tick-borne encephalitis virus envelope protein E」、J. Virol. 73: 5605 ~ 5612 (1999))。

【 0 2 0 1 】

本実施例において、DEN-2 E蛋白質のC-末端部分を、TBE H1^{pred}からTM2に対応するJE E蛋白質に置換すると、DEN-2 prM蛋白質およびキメラE蛋白質が分泌された。しかし、対照的に、TBEにおいてTM1およびTM2を置換しても、抗原分泌にごく軽微な改善を生じたに過ぎなかった。pCBD2-14-6およびpCB9D2-4-3プラスミドによって形質転換したCOS-1によって発現された、prMおよびE蛋白質の主要な部分は、膜に結合したままであった(表13)。これらの結果は、同定されていない膜保持配列がDEN-2 E蛋白質のC-末端幹領域に存在することを示した。このC-末端幹領域をJEウイルスからの配列に置換すると、この保持配列は除去されるか、または無効となる。

10

【 0 2 0 2 】

prM蛋白質は、prM-E成熟の際のE蛋白質の適切なコンフォメーションおよび分泌を維持するために必須であることは、他の研究者によっても主張されている(Aberleら、「A DNA immunization model study with constructs expressing the tick-borne encephalitis virus envelope protein E in different physical forms」、J. Immunol. 163: 6756 ~ 6761 (1999) ; Allisonら、「Synthesis and secretion of recombinant tick-borne encephalitis virus protein E in soluble and particulate form」、J. Virol. 69: 5816 ~ 5820 (1995))。さらに、E蛋白質の外部ドメインがprMと相互作用することも証明されている。この相互作用は、マリーバレー脳炎ウイルスにおけるEのアミノ酸残基200 ~ 327位内のアミノ酸配列が関係することが推定されている(Guirakhooら、「The Murray Valley encephalitis virus prM protein confers acid resistance to virus particles and alters the expression of epitopes within the R2 domain of E glycoprotein」、Virology 191: 921 ~ 931 (1992))。

20

【 0 2 0 3 】

適切なprMとEとの相互作用、およびE蛋白質の構造の完全性が保持されることは、少なくともそれらが免疫反応性にとって必要である限り、三つ全てのDEN-2構築物によって発現された蛋白質において維持される可能性がある。さらに、pCB8D2-2J-2-9-1におけるC-末端の20%のEの置換によって、真正DEN-2 Eのアミノ酸395個を維持する蛋白質が得られた。そのような如何なる改変も、EおよびprM-E相互作用に対する影響はほとんどなく、キメラE蛋白質の抗原性特徴に対する影響もほとんどないと予想される。DEN-2 EのC-末端領域をJE幹アンカー配列に置換しても、MAbの反応性に対して影響を及ぼさなかったことから(表10)、そのように置換されたDEN-2配列の保持は、DEN-2特異的免疫学的反応を得るためにごく選択的となりうる。

30

【 0 2 0 4 】

これまで、ダニ媒介脳炎ウイルスprM、およびE蛋白質の分泌型サブウイルス粒子をコードするプラスミド構築物は、抗体反応の程度および機能性に関して、ならびにウイルスチャレンジに対する反応に関して、分泌されるC-末端切断型可溶性E二量体、分泌されない完全長のE、または効率よく分泌されない切断型Eをコードする他の構築物より優れていることが示されている(Aberleら、「A DNA immunization model study with constructs expressing the tick-borne encephalitis virus envelope protein E in different physical forms」、J. Immunol. 163: 6756 ~ 6761 (1999))。しかし、本明細書において、本発明者らは、DEN-2 DNAのワクチン能がprM/MおよびEの分泌と相関することを証明した(表13)。分泌されたprMおよびEの形態学および物理的特徴は本研究において証明しなかった。しかし、pCB8D2-2J-2-9-1構築物によって分泌されたprMおよびEは、ウイルス様粒子を形成する可能性がある。粒子表面上に多数の保護抗原が提示されることは、この構築物のワクチン能を改善すると考えられている。

40

【 0 2 0 5 】

DEN-2 ウイルスDNAの開発に関するこれまでの試みは、成否が多様であった(Kochelら、「Inoculation of plasmids expressing the dengue-2 envelope gene elicit neutral

50

izing antibodies in mice」、Vaccine 15 : 547 ~ 552 (1997) ; Konishiら、「A DNA vaccine expressing dengue type 2 virus premembrane and envelope genes induces neutralizing antibody and memory B cells in mice」、Vaccine 18 : 1133 ~ 1139 (2000)) 。有効性のレベルを改善するために、異なる戦略が用いられている。例えば、ワクチン処方における、pUC19プラスミド、マウスGM-CSFを発現するプラスミドを含む、免疫刺激CpGモチーフの同時免疫、またはEのC-末端のアミノ酸43個を、ライソゾーム会合膜保持配列に置換することによって、DEN-2ワクチンに対する抗体反応が改善し、これらが用いられている (Porterら、「Protective efficacy of a dengue 2 DNA vaccine in mice and the effect of CpG immuno-stimulatory motifs on antibody responses」、Arch. Virol. 143 : 997 ~ 1003 (1998) ; Raviprakashら、「Synergistic Neutralizing Antibody Response to a Dengue Virus Type 2 DNA Vaccine by Incorporation of Lysosome-Associated Membrane Protein Sequences and Use of Plasmid Expressing GM-CSF」、Virology 290 : 74 ~ 82 (2001)) 。非メチル化CpGモチーフは、マクロファージ、ナチュラルキラー細胞、およびリンパ球を直接活性化して、サイトカインおよびケモカインを分泌させ、Th1 サイトカインによって媒介される免疫応答の発達を支持する (Mandersら、「Immunology of DNA vaccines : CpG motifs and antigen presentation」、Inflamm. Res. 49 : 199 ~ 205 (2000)) 。しかし、CpGを含めると、宿主のサイトカインプロファイルを偏らせて、それによって、Th-1媒介臓器特異的自己免疫障害の発症、および免疫恒常性の妨害の双方に關与する可能性がある (Smithら、「The regulation of DNA vaccines」、Curr. Opin. Biotech. 12 : 299 ~ 303 (2001)) 。同様に、サイトカインの過剰レベルは、特定のTヘルパー細胞の反応を増加させるものの、免疫応答における他の作用物質の反応を減少または遮断して、それによって全身性の免疫抑制または慢性炎症が起こりうるという証拠がマウスにおいて認められている (Robertsonら、「Assuring the quality, safety, and efficacy of DNA vaccines」、Mol. Biotechnol. 17 : 143 ~ 149 (2001)) 。相応して、フラビウイルスDNA免疫の安全性および有効性は、転写および翻訳を増強するような発現プラスミドの操作によって、ならびに正しいポリ蛋白質のプロセッシングおよび集合を促進する、分泌型prMおよびE蛋白質のターゲティングによって利益を得ることができるであろう (Changら、「Flavivirus DNA vaccines : current status and potential」、Ann. NY Acad. Sci. 951 : 272 ~ 285 (2001)) 。今後の改善は、抗原提示細胞または筋肉細胞によるDNA取り込みの増強に向けることができる (Rodriguezら、「Enhancing DNA immunization」、Virology 268 : 233 ~ 238 (2000)) 。

【 0 2 0 6 】

(表 1)

移入された二つの細胞株における、様々な組み換え型プラスミドによるJE prMおよびE蛋白質の一過性の発現。

ベクター					組み換え型 プラスミド	IFA強度/ 抗原陽性細胞の割合*	
	プロモーター	イントロン	ポリ(A)	ORI		COS-1	COS-7
pCDNA3	CMV	なし	BGH	SV40	pCDJE2-7	3+/40	3+/35
pCBamp	CMV	なし	BGH	なし	pCBE1-14	3+/45	nd
pCIBamp	CMV	あり	BGH	なし	pCIBJES14	3+/39	nd
pCEP4	CMV	なし	SV40	oriP	pCEJE	2+/4	2+/3
pREP4	RSV	なし	SV40	oriP	pREJE	1+/3	1+/2
pRe/RSV	RSV	なし	BGH	SV40	pRCJE	1+/3	1+/3
pCDNA3	CMV	なし	BGH	SV40	pCDNA3/CAT	-	-

* 様々な細胞株をpCDNA3/CAT（陰性対照）、pCDJE2-7、pCBE1-14、pCIBJES14、pCEJE、pREJE、またはpRCJEによって形質転換した。細胞を48時間後にトリプシン処理して、JEウイルス特異的HIAFによる間接的免疫蛍光抗体アッセイ（IFA）によって調べた。データは、IFA陽性細胞の強度（尺度1+～4+）および割合として表記する。pCDNA3/CAT形質転換細胞を陰性対照として用いた。

【 0 2 0 7 】

（表 2）

JEウイルス反応抗体によるCOS-1細胞のpCDJE2-7によって安定に形質転換したクローン（J

10

20

30

40

50

E-4B) によって発現された蛋白質の特徴付け

Mabまたは 抗血清	Mabの生物活性		細胞の免疫蛍光強度	
	特異性	生物機能	JEV感染	4B
Mab:				
MC3	JEV特異的		2+	2+
2F2	JEV特異的	HI, N	4+	4+
112	JEV特異的		4+	4+
503	JEV特異的	N	4+	3+
109	亜群	HI	2+	1+
N.04	亜群	HI, N	3+	4+
201	亜群		1+	1+
203	亜群		4+	3+
204	亜群		2+	2+
301	亜群	HI	2+	2+
504	フラビウイルス		4+	4+
6B6C-1	フラビウイルス		2+	2+
3B4C-4	VEE		-	-
H1AF:				
抗-JEV			4+	3+
抗-WEE			-	-
PBS			-	-

【 0 2 0 8 】

(表 3)

pCDJE2-7またはJE-VEXワクチンによって免疫したマウスにおける免疫応答の持続

	ELISA 力価 (log ₁₀)						PRNT _{90%} 力価		
	3 週間	6 週間	9 週間	23 週間	40 週間	60 週間 *	3 週間	6 週間	9 週間
1x pCDJE2-7	2.6-3.2	3.8-5.0	3.8-4.4	>3.2	>3.2	2.4, 2.4, 3.8, 4.4	<20	20	40-160
2x pCDJE2-7	2.6-3.8	4.4	3.8-4.4	>3.2	>3.2	2.6, 3.8, 3.8	<20	20-40	40-160
2x JE-VAX	2.6-3.8	4.4-5.0	3.8-5.6	>3.2	>3.2	<2, <2, 4.4	<20	20-40	20-160
2x pCDNA3/CAT	<2	<2	<2	ND	ND	<2	<20	<20	<20

マウスに100 µg/用量のプラスミドDNA、またはJE-VAXワクチンのヒト用量の1/5を1回もしくは2回接種した。2回目の免疫を行う前に、試験のために血清を採取した。

*個々の血清力価。

【 0 2 0 9 】

(表 4)

様々なJEVワクチンによるワクチン接種後のマウスにおける、年齢依存的 % 血清陽性率

10

20

30

40

	3日齢		3週齢	
	3週間 PV	7週間 PV	3週間 PV	7週間 PV
JE-VAX	0	0	100	100
pCDNA3/CAT	0	0	0	0
pCDJE2-7	40	60	90	90
pC1BJES14	10	60	80	100
pCBE1-14	80	100	100	100

【 0 2 1 0 】

10

(表 5)

様々なJEVワクチンによる3日齢でのワクチン接種後、8週齢マウスにおけるJEVチャレンジからの保護

ワクチン	チャレンジ前 JEV血清変換	チャレンジ後の日の生存率 (%)				
		6	7	8	9	21
JE-VAX	0	100	100	60	40	40
pCDNA3/CAT	0	100	80	30	30	30
pCDJE2-7	60	100	100	100	100	100
pC1BJES14	60	100	100	100	100	100
pCBE1-14	100	100	100	100	100	100

20

【 0 2 1 1 】

(表 6)

JEV核酸ワクチン接種雌性マウスからの母体抗体が、致死性JEV脳炎から仔を保護することができるか否かに関する評価

ワクチン接種母親		JEVチャレンジした仔		
ワクチン	PRNT _{90%}	チャレンジ 日齢 (日)	生存数 ¹	ELISA ²
1 x pCDJE2-7	40	4	0/11	
2 x pCDJE2-7	80	4	12/12	12/12
2 x JE-VAX	20	3	0/16	
2 x pCDNA-3/CAT	<10	5	0/14	
1 x pCDJE2-7	20	15	5/11	5/5
2 x pCDJE2-7	40	14	8/12	7/8
2 x JE-VAX	80	13	5/5	5/5
2 x pCDNA-3/CAT	<10	14	0/14	

30

40

マウスにプラスミドDNA 100 µg用量を1回もしくは2回筋肉内に接種するか、またはJE-VAXワクチンのヒト用量の1/5量を2回皮下接種した。非免疫雄性マウスと交配させる前に、PRNT試験のためにワクチン接種後9週目に血清を採取した。

1：生存数 / 各同腹子の総数

2：JEV ELISA抗体陽性動物数（力価 400倍） / 生存数；血清は、チャレンジ後12週目に試験のために採取した。

【 0 2 1 2 】

50

(表7)
 フラビウイルスDNAワクチン構築物におけるシグナルペプチドの特徴とワクチン能

プラスミド	シグナルペプチド配列 ^a	シグナルペプチド確率 ^a			免疫プロトコール ／保護
		SP	AP	C部位	
pSLE1	? <u>LDTINRRPSKKRGGT</u> <u>ESLLGLAALIGLASS/LQLLSTYQG</u> (配列番号:32)	0.702	0.292	0.352	im x 2/部分的
pJME	<u>MWLASLAVVIACAGA/MKLSNFQGK</u> (配列番号:33)	0.998	0.000	0.778	im x 2/部分的
pCJEME	<u>MNEGSIMWLASLAVVIACAGA/MKLSNFQGK</u> (配列番号:34)	0.985	0.012	0.785	im x 2/100%
pCBJE1-14	<u>MGRKQNKRGGNEGSIMWLASLAVVIACAGA/MKLSNFQGK</u> (配列番号:35)	0.791	0.199	0.623	im x 1/100%
pcDNA3prM-E	<u>MSKKRGGSETSVLMVIFMLIGFAAA/LKLSNFQGK</u> (配列番号:36)	0.721	0.277	0.622	im x 4/部分的
pCBWN	<u>MGKR</u> SAGSIMWLASLAVVIACAGA/ <u>VTLSNFQGK</u> (配列番号:37)	0.976	0.024	0.526	gg x 2-4/100%
p1012D2ME	<u>MNVLRGFRKEIGRMLNILNRRRTAGMIIMLIPVMA/FHLTTRNGE</u> (配列番号:38)	0.165	0.778	0.164	id x 2/なし
SV-PE	<u>MVGLQKRGKRRSA</u> TDMSWLLVITLLGMTLA/ <u>ATVRKERGD</u> (配列番号:39)	0.943	0.056	0.899	im or gg x 2/100%
pWRG707- RSSE	<u>MGWLLVVVLLGVTLA/ATVRKERGD</u> (配列番号:40)	1.000	0.000	0.912	gg x 2/100%
pWRG707- CEE	<u>MSWLLVITLLGMTIA/ATVRKERGD</u> (配列番号:41)	0.999	0.000	0.821	gg x 2/100%

^a シグナルP HMMプログラムを適用して、シグナルペプチド (SP)、アンカーペプチド (AP)、およびシグナラーゼ切断部位 (C部位) の確率を計算した。一文字アミノ酸コードを使用し、荷電アミノ酸は、下線と太字の文字で強調した。SPとprMの間のシグナラーゼ切断部位を「/」で示す。DNAワクチンは、筋肉内 (im)、皮内 (id)、または遺伝子ガ

10

20

30

40

50

ン (gg) 法によって接種した。

【 0 2 1 3 】

(表 8)

WNおよびJEウイルスの複合DNAワクチンの異なる用量によって免疫したマウスにおける中和抗体 (Nt) 反応

プラスミドあたりの 用量 (μg)	pCBWN + pCBJE1-14				pCB対照
	100 + 100	40 + 40	20 + 20	10 + 10	100
Ntを有するマウスの割合：					
WNウイルス/JEウイルス：	100 / 100	100 / 70	70 / 0	60 / 0	0 / 0
PRNT ₉₀ 力価の範囲：					
WNウイルス：	1:320 - 1:80	1:80 - 1:20	1:80 - <1:10	1:20 - <1:10	<1:10
JEウイルス：	1:40 - 1:10	1:10 - <1:10	<1:10	<1:10	<1:10

10

3週齢の雌性ICR非近交系マウス1群10匹に、表記の複合プラスミドの用量を1回筋肉内注射した。免疫後12週目に採取した血清標本を、ブランク減少中和試験 (PRNT) によってアッセイした。JEおよびWNウイルスに対するエンドポイント力価はそれぞれ、JEウイルス (SA-14株) および西ナイルウイルス (NY-6480株) を用いて、90% ブランク減少に基づいて計算した。

20

【 0 2 1 4 】

(表 9)

DEN-2ウイルスprM E発現プラスミドを構築するために用いられるオリゴヌクレオチド、およびキメラDEN-2およびJE Eの接合領域を示す。

100% DEN-2 prM-E:D2KasI-438^a 5' TGTGCAGGGCGCCTTCCATTTAACCACACGTAACG (配列番号:48)CD2NotI-2402 5' TCGAGGCGGCCGCTCAACTAATTAGGCCTGCACCATGACTC (配列番号:49)**90% DEN-2 E & 10% JE E:**

T7 5' CTTATCGAAATTAATACGACTCACTATAGG (配列番号:50)

CD2BstXI-2244 5' ATAGATTGCTCCAAACACTTGGTTGG (配列番号:51)

JE-2281 5' ACTCCATAGGAAAAAGCCGTTACC (配列番号:52)

CSP6 5' GCGAGCTCTAGCATTTAGGTGACACTATAG (配列番号:53)

DEN-2↔→JE**90-10 接合部 : Leu His Gln Val Phe Gly Gly Ala Phe Arg Thr (配列番号:55)****CTC CAC CAA GTG TTT GGT GGT GCC TTC AGA ACA (配列番号:54)****80% DEN-2 E & 20% JE E:**

T7 5' CTTATCGAAATTAATACGACTCACTATAGG (配列番号:56)

CD2BsmBI-2097 5' GAATTCGTCTCACTTCCTTTCTTAAACCAGTTGAGCTTC (配列番号:57)JEBsmBI-2175 5' GGAATTCGTCTCGGAAGCACGCTGGGCAAGG (配列番号:58)

CSP6 5' GCGAGCTCTAGCATTTAGGTGACACTATAG 3' (配列番号:59)

DEN-2↔→JE**80-20 接合部 : Asn Trp Lys Lys Gly Ser Thr Leu Gly Lys Ala (配列番号:61)****AAC TGG TTT AAG AAA GGA AGC ACG CTG GGC GCC (配列番号:60)**

^a オリゴヌクレオチドにおいてコードされる制限酵素部位は、太字、斜体、および下線で強調した。

【 0 2 1 5 】

(表 1 0)

間接蛍光抗体アッセイ法 (IFA) によって決定した、組み換え型DEN-2プラスミドによって発現されたDEN-2 E糖蛋白質エピトープの特徴付け

10

20

30

抗体	対照 ^a		プラスミド構築物 ^a		
	抗原ドメイン ^c	PRNT ^d	DEN-2 感染細胞	正常細胞	正常細胞
MAb (エピトープ) ^b					
4G2 (A1)	2	+/-	4+	-	4+
4E5 (A2)	2	はい	3+	-	3+
1B7 (A5)	2	はい	3+	-	4+
1B4C-2 (C1)	1	いいえ	3+	-	2+
2B3A-1 (C3)	1	いいえ	3+	-	2+
9A4D-1 (C4)	1	いいえ	3+	-	3+
3H5 (B2)	3	はい	4+	-	4+
10A4D-2 (B3)	3	はい	2+	-	2+
1A1D-2 (B4)	3	はい	4+	-	3+
9D12-6		はい	2+	-	2+
2H2	prM	いいえ	4+	-	3+
1A2A-1	カプシド	いいえ	2+	-	1+

^a IFA基質は、DEN-2 16681に感染した、非感染対照、およびDEN-2組み換え型プラスミドによって形質転換したアセトン固定COS-1細胞であった。

^b モノクローナル抗体は、DEN-2 16681ウイルスに対する反応性に基づいて規定の最適な希釈で用いた。いくつかのMAbに関しては、括弧内に示すエンドポイント力価を報告し、他のMAbに関しては、1+~4+の尺度に基づいて定性的な値のみを報告し、3~4+を陽性とし、2+は不明確、そして1+は陰性で見なす。

^c TBEウイルスのE-糖蛋白質に基づく抗原性ドメイン (Mandlら、「Antigenic structure of the flavivirus envelope protein E at the molecular level, using tick-borne encephalitis virus as a model」、J. Virol. 63 : 564 ~ 571 (1989) ; Reyら、「The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 resolution」、Nature 375 : 291 ~ 298 (1995))。

^d 50%中和エンドポイントが報告された4G2および9D12-6を除き、90%ブランク減少エン

10

20

30

40

50

ドポイントを用いた、腹水の100倍希釈でのブランク減少中和活性（Henchalら、「Epitopic analysis of antigenic determinants on the surface of dengue-2 virions using monoclonal antibodies」、Am. J. Trop. Med. Hyg. 34 : 162 ~ 169 (1985) ; Roehrigら、「Monoclonal antibody mapping of the envelope glycoprotein of the dengue 2 virus , Jamaica」、Virology 246 : 317 ~ 328 (1998))。

【 0 2 1 6 】

(表 1 1)

抗原捕獲ELISAによる、分泌型および膜結合型DEN-2組み換え型蛋白質の検出

プラスミド	試料のタイプ	エンドポイントELISA力価	
pCBD2-14-6	PEG沈殿培養液 ^a	<1:10	10
pCBD2-14-6	PEG沈殿、 エタノール抽出培養液 ^b	<1:20	
pCBD2-14-6	疎水性膜蛋白質調製物 ^c	1:160	
pCB9D2-1J-4-3	PEG沈殿培養液 ^a	<1:10	
pCB9D2-1J-4-3	PEG沈殿、 エタノール抽出培養液 ^b	<1:20	
pCB9D2-1J-4-3	疎水性膜蛋白質調製物 ^c	1:80	20
pCB8D2-2J-2-9-1	PEG沈殿培養液 ^a	1:640	
pCB8D2-2J-2-9-1	PEG沈殿、 エタノール抽出培養液 ^b	1:80	
pCB8D2-2J-2-9-1	疎水性膜蛋白質調製物 ^c	1:80	
pEGFP	PEG沈殿培養液 ^a	<1:10	
pEGFP	PEG沈殿、 エタノール抽出培養液 ^b	<1:10	30
pEGFP	疎水性膜蛋白質調製物 ^c	<1:10	

^a プラスミド形質転換細胞からの培養上清を、10%ポリエチレングリコールによって沈殿させ、最初の容積の100分の1に再懸濁させた。

^b PEG沈殿培養上清を4%エタノールによって抽出してPEGを除去し、ペレットを抽出した容量の1/5に再懸濁させた。

^c 疎水性膜分画は、材料と方法に記載のように調製した。

【 0 2 1 7 】

(表 1 2)

ICRマウスにおける三つのDEN-2組み換え型プラスミドの免疫原性

40

プラスミド DNA ^b	マウス#	DEN-2ウイルスに対するELISA					DEN-2ウイルス に対するPRNT ^a	JEウイルス に対するPRNT ^a
		ワクチン接種後3週間でスクリーニング ^c		ワクチン接種後6週間でスクリーニング ^c		ワクチン接種後 9週間でのエンド ポイント力価		
		1:100	1:400	1:100	1:400			
pCB8D2-2J-2-9-1	プール、 1,2,4-10	ND ^d	ND	+	+	64,000	ND	ND
	1	+	+	+	+	64,000	>1000	<2
	2	+	+	+	+	32,000	>1000	<2
	4	+	+	+	+	16,000	200	<2
	5	+	+	+	+	4,000	<10	<2
	6	+	+	+	+	16,000	200	<2
	7	+	-	+	+	64,000	100	<2
	8	+	-	+	+	8,000	40	<2
	9	+	+	+	+	6,400	<2	<4
	10	+	+	+	+	64,000	>1000	<2
pCB9D2-1J-4-3	プール、1-10	ND	ND	+	+	1,000	ND	<2 ^e
	1	-	-	+	-	400	<10	ND
	2	+	-	+	+	200	<10	ND
	3	+	+	+	+	4,000	<2	≤4
	4	+	-	+	-	200	<10	ND
	5	-	-	+	+	400	<10	ND
	6	+	+	+	+	4,000	<2	2
	7	-	+/-	-	-	100	<10	ND
	8	-	-	-	-	200	<10	ND
	9	+	-	+	-	4,000	<2	<2
	10	-	-	+	+	4,000	<2	<2
pCBD2-14-6	プール、1-10	ND	ND	+	-	200	<2 ^f	<2 ^g
	1	-	-	-	-	400	<10	ND
	2,3,6-9	-	-	-	-	<100	ND	ND
	4	+	+	+	+	1,000	<2	<2
	5	-	-	+	-	2,000	8	<2
	10	+	-	-	-	<100	ND	ND
pEGFP	プール、1-10	-	ND	-	ND	<100	<2	<2

^a PRNT、ブランク減少中和試験、90%中和エンドポイント。

^b マウスを0週目および3週目にプラスミドDNA 100 μgによって筋肉内に免疫した。

^c ELISAスクリーニングは、100倍および400倍希釈した血清を用いた。

^d ND、行っていない。

^e プール、1、2、4、5、7、8。

^f プール、2、3、6~10。

^g プール、1~3、6~10。

【 0 2 1 8 】

(表 1 3)

三つのDEN-2組み換え型プラスミドの特徴の要約。

10

20

30

40

プラスミド	IFA ^a		Ag捕獲ELISA力価		DEN-2に関するELISA力価 ^b		DEN-2 PRNT ^c
	+/-	球状 / 拡散	分泌型抗原	疎水性膜蛋白質調製物	100倍以上の血清の数	プールした血清の力価	10倍以上の血清の数
pCB8D2-2J-2-9-1	+	拡散	1:640	1:80	9/9	1:64000	7/9 ^d
pCB9D2-1J-4-3	+	球状	<1:10	1:80	10/10	1:1000	0/10
pCBD2-14-6	+	球状	<1:10	1:160	3/10	1:200	0/10

10

^a 間接蛍光抗体アッセイ (IFA) 染色の特徴、+または-、および拡散または球状パターン。

^b 組み換え型プラスミドによって免疫したマウスからの血清の、抗DEN-2 ELISA力価。血清は、ワクチン接種後9週目に採取した (0週目および3週目)。プールした血清試料のエンドポイントELISA力価を含む、力価が100倍以上のマウスの数 / マウスの総数を示す。

^c プラーク減少中和力価 (PRNT、90%減少) が10倍以上であるマウスの数 / マウスの総数。血清はワクチン接種後9週目に採取した。

^d 中和抗体を有するマウス7匹中、マウス3匹は、PRNT力価が1000倍以上であり、3匹は、100倍以上1000倍未満、そして1匹は力価40倍であった。

20

【図面の簡単な説明】

【0219】

【図1】フラビウイルスポリ蛋白質プロセシングの略図である。中央の水平方向の部分は、ウイルスゲノムの略図を示す。線は、5'および3'非翻訳領域を示し、四角で囲った部分は、構造蛋白質 (左と上) および非構造蛋白質 (右と下) のオープンリーディングフレームを表す。宿主シグナラーゼによる切断は、E蛋白質C-末端で翻訳と同時に起こり、構造領域と非構造領域とを分離する。サブチラーゼ様細胞酵素であるフリンがprMの切断に関与する可能性がある。ウイルスポリ蛋白質の潜在的な膜貫通ドメインを、影をつけた部分で示す。

【図2】prM-E蛋白質コード領域を発現させる転写単位を構築するために (下)、逆転写酵素-ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) において用いたJEVゲノム (上) およびオリゴヌクレオチドのDNA配列のマップである。ウイルスポリ蛋白質の、潜在的な膜貫通ドメインを、影をつけた部分で示す。

30

【図3】プラスミドベクター、pCDNA3、pCBamp、およびpCIBampの略図と、それらの関係を示す。これらのプラスミドには、CMV (サイトメガロウイルス) プロモーター / エンハンサー要素、BGHp(A) (ウシ成長ホルモンポリアデニル化シグナルおよび転写終了配列)、アンピシリン抵抗性遺伝子、ならびに大腸菌において選択および維持するためのColE1複製開始点が含まれる。pCBampを作製するために、大腸菌細胞における一本鎖救出のためのf1複製開始点、SV40複製開始点 (SV40 ORI)、ネオマイシン抵抗性コード領域およびSV40p(A)配列を、pCDNA3から欠失した。プラスミドpCIBampを作製するために、pCBampのNco I-KpnI部位にイントロン配列を挿入した。

40

【図4】JE-4B COS-1培養液からのショ糖勾配精製サブウイルス粒子のSDS-PAGE免疫プロット分析を示す (4B、各対の右のレーン)。JEV感染C6/36細胞培養物からの密度勾配精製JEビリオンを陽性対照として用いた (JEV、各対の左のレーン)。JE HIAF (過免疫腹水) ; 4G2、抗Eモノクローナル抗体 ; JM01、抗-Mモノクローナル抗体 ; NMAF (正常マウス腹水)。

【図5】トライトンX-100処置を行うか、または行わないJE-4B細胞培養培地のPEG沈殿物から調製した、E抗原の速度ゾーンショ糖密度勾配分析におけるプロフィールを示す。

【図6】シグナルP-HMMプログラムによって予想される、pCBE1-14 (pCBE) のシグナルペプチド確率を示す (A)。シグナルペプチド確率は、-4および-2位 (C-4GおよびG-2S

50

）でc-領域配列を変化させることによって（パネルB、JE-LSS-M）、n-領域を短縮することによって（パネルC、JE-SS-ORI）、または双方の改変の組み合わせによって（パネルD、JE-SS-M）改善される。

【図7】プラスミドベクターpCBD2-14-16（100%DEN-2E）、pCBD2-1J-4-3（90%DEN-2E；10%JEV E）、およびpCB8D2-2J-2-9-1（80%DEN-2E；20%JEV E）の略図を示す。これらのプラスミドはヒトサイトメガロウイルス（CMV）初期遺伝子プロモーター；JEウイルスシグナル配列；DEN-2ウイルスprMおよびE遺伝子領域（それぞれ、アミノ末端100%、90%、または80%）；JEウイルスE遺伝子領域（それぞれ、なし、10%または20%）；およびウシ成長ホルモンポリAシグナル（BGH）を含む。

【図8】ウェスタンブロットによる、分泌型および膜結合型組み換え型蛋白質の比較を示す。（A）DEN-2プラスミドpCB8D2-2J-2-9-1、pCB9D2-1J-4-3、pCBD2-14-16、および対照プラスミドpEGFPに関する、培養液のPEG-沈殿およびエタノール抽出後の分泌型組み換え型抗原の分析。レーン1（V）、ゴールドブロット（Gold Blot）（Owl Separation System s, Portsmouth, NH）によって染色した精製DEN-2ウイルス。それぞれのプラスミドからの分泌型組み換え型抗原の、a、抗エンベロープ（E）特異的Mab 1A6A-8；b、MAB 1A6A-8、抗カプシド（C）特異的Mab1A2A-1、DEN-2ウイルス前膜（prM）蛋白質に対して特異的な抗血清反応性の混合物；およびc、正常マウス腹水、に対する反応性。（B）組み換え型プラスミド形質転換細胞の、疎水性膜蛋白質の分析。レーン1（V）、ゴールドブロットによって染色した精製DEN-2ウイルス；レーン2（V）、精製DEN-2ウイルスと、Mab 1A6A-8、Mab 1A2A-1、DEN-2ウイルスM蛋白質に対して特異的な抗血清、およびDEN-2ウイルスprM蛋白質に対する抗血清の混合物との反応性。それぞれのプラスミド形質転換細胞株から単離された疎水性膜蛋白質の、a、Mab1A6A-8；b、Mab 1A6A-8、Mab 1A2A-1、DEN-2ウイルスM蛋白質に対して特異的な抗血清、およびDEN-2ウイルスprM蛋白質に対する抗血清の混合物；ならびにc、正常マウス腹水、に対する反応性。

【配列表】

10

20

SEQUENCE LISTING

<110> The Government of the United States of America, as represented by the Secretary, Department of Health and Human Services, c/o Centers for Disease Control and Prevention

Chang, Gwong-Jen J

<120> Nucleic Acid Vaccines for Prevention of Flavivirus Infection

<130> 14114.0332P2

<150> 09/826,115

<151> 2001-04-04

<150> 09/701,536

<151> 2000-11-29

<150> PCT/US99/12298

<151> 1999-06-03

<150> 60/087,908

<151> 1998-06-04

<160> 61

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of artificial sequence; note =
synthetic construct

<221> CDS

<222> (25)...(48)

<221> misc_feature

<222> 1-48

<223> Amplimer 14DV389

<400> 1

cttggtacct ctagagccgc cgcc atg ggc aga aag caa aac aaa aga 48
Met Gly Arg Lys Gln Asn Lys Arg
1 5

<210> 2

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of artificial sequence; note =
synthetic construct

10

20

30

<400> 2
Met Gly Arg Lys Gln Asn Lys Arg
1 5

<210> 3
<211> 50
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of artificial sequence; note =
synthetic construct

<221> misc_feature
<222> 1-50
<223> Amplimer c14DV2453

10

<400> 3
tttttttttg cggccgctca aacttaagca tgcacattgg tcgctaagaa 50

<210> 4
<211> 48
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of artificial sequence; note =
synthetic construct

<221> CDS
<222> (25)...(48)

20

<221> misc_feature
<222> (1)...(48)
<223> Amplimer YFDV389

<400> 4
cttggtacct ctagagccgc cgcc atg cgt tcc cat gat gtt ctg act 48
Met Arg Ser His Asp Val Leu Thr
1 5

<210> 5
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of artificial sequence; note =
synthetic construct

30

<400> 5
Met Arg Ser His Asp Val Leu Thr
1 5

<210> 6
<211> 41
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of artificial sequence; note =
synthetic construct

<221> misc_feature
<222> 1-41
<223> Amplimer cYFDV2452

<400> 6
ttttcttttg cgcccgctca cgccccaact cctagagaaa c 41

<210> 7
<211> 51
<212> DNA
<213> Artificial Sequence 10

<220>
<223> Description of artificial sequence; note =
synthetic construct

<221> CDS
<222> (25)...(54)

<221> misc_feature
<222> 1-54
<223> Amplimer SLEDV410

<400> 7
cttggtacct ctagagccgc cgcc atg tct aaa aaa aga gga ggg acc aga 51
Met Ser Lys Lys Arg Gly Gly Thr Arg
1 5

<210> 8
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence 20

<220>
<223> Description of artificial sequence; note =
synthetic construct

<400> 8
Met Ser Lys Lys Arg Gly Gly Thr Arg
1 5

<210> 9
<211> 38
<212> DNA
<213> Artificial Sequence 30

<220>
<223> Description of artificial sequence; note =
synthetic construct

<221> misc_feature
<222> 1-38
<223> Amplimer cSLEDV2449

<400> 9
ttttcttttg cgcccgctta ggcttgcaag ctggttgc 38

<210> 10
 <211> 7500
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of artificial sequence; note =
 synthetic construct

<221> CDS
 <222> (916)...(3009)

<221> misc_feature
 <222> 1-7500
 <223> pCDJE 2-7

<400> 10
 gacggatcgg gagatctccc gatcccttat ggtcgactct cagtacaatc tgctctgatg 60
 ccgcataagtt aagccagttat ctgctccctg cttgtgtgtt ggaggtcgct gagtagtgcg 120
 cgagcaaaat ttaagctaca acaaggcaag gcttgaccga caattgcatg aagaatctgc 180
 ttagggtagt gcggttttgcg ctgcttcgcg atgtacgggc cagatatacg cgttgacatt 240
 gattattgac tagttattaa tagtaataca ttacgggggtc attagtccat agcccatata 300
 tggaggttccg cgttacataa cttacggtaa atggcccgcc tggttgacgg cccaacgacc 360
 cccgccatt gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt aacgccaata gggactttcc 420
 attgacgtca atgggtggac tatttacggg aaactgcccc cttggcagta catcaagtggt 480
 atcatatgcc aagttacgcc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt 540
 atgcccagta catgacctta tgggactttc ctacttggca gtacatctac gtattagtca 600
 tcgctattac catggtgatg cgggttttggc agtacatcaa tggggcgtgga tagcgggtttg 660
 actcacgggg atttccaagt ctccacccca ttgacgtcaa tggggagtgtg ttttggcacc 720
 aaaatcaacg ggactttcca aaatgtcgta acaactcgcg ccattgacg caaatgggcy 780
 gtaggcgtgt acggtgggag gtctatataa gcagagctct ctggctaact agagaaccca 840
 ctgcttactg gcttatcgaa attaatacga ctactatag ggagacccaa gcttgggtacc 900
 gagctcgccg ccgcc atg ggc aga aag caa aac aaa aga gga gga aat gaa 951
 Met Gly Arg Lys Gln Asn Lys Arg Gly Gly Asn Glu
 1 5 10
 ggc tca atc atg tgg ctg gcg agc ttg gca gtt gtc ata gct tgt gcg 999
 Gly Ser Ile Met Trp Leu Ala Ser Leu Ala Val Val Ile Ala Cys Ala
 15 20 25
 gga gcc atg aag ttg tgg aat ttc cag ggg aag ctt ttg atg acc atc 1047
 Gly Ala Met Lys Leu Ser Asn Phe Gln Gly Lys Leu Leu Met Thr Ile
 30 35 40
 aac aac acg gac att gca gac gtt atc gtg att ccc acc tca aaa gga 1095
 Asn Asn Thr Asp Ile Ala Asp Val Ile Val Ile Pro Thr Ser Lys Gly
 45 50 55 60
 gag aac aga tgc tgg gtc cgg gca atc gac gtc ggc tac atg tgt gag 1143
 Glu Asn Arg Cys Trp Val Arg Ala Ile Asp Val Gly Tyr Met Cys Glu
 65 70 75
 gac act atc acg tac gaa tgt cct aag ctt acc atg ggc aat gat cca 1191
 Asp Thr Ile Thr Tyr Glu Cys Pro Lys Leu Thr Met Gly Asn Asp Pro
 80 85 90
 gag gat gtg gat tgc tgg tgt gac aac caa gaa gtc tac gtc caa tat 1239
 Glu Asp Val Asp Cys Trp Cys Asp Asn Gln Glu Val Tyr Val Gln Tyr
 95 100 105

10

20

30

gga cgg tgc acg cgg acc agg cat tcc aag cga agc agg aga tcc gtg Gly Arg Cys Thr Arg Thr Arg His Ser Lys Arg Ser Arg Arg Ser Val 110 115 120	1287
tcg gtc caa aca cat ggg gag agt tca cta gtg aat aaa aaa gag gct Ser Val Gln Thr His Gly Glu Ser Ser Leu Val Asn Lys Lys Glu Ala 125 130 135 140	1335
tgg ctg gat tca acg aaa gcc aca cga tat ctc atg aaa act gag aac Trp Leu Asp Ser Thr Lys Ala Thr Arg Tyr Leu Met Lys Thr Glu Asn 145 150 155	1383
tgg atc ata agg aat cct ggc tat gct ttc ctg gcg gcg gta ctt ggc Trp Ile Ile Arg Asn Pro Gly Tyr Ala Phe Leu Ala Ala Val Leu Gly 160 165 170	1431
tgg atg ctt ggc agt aac aac ggt caa cgc gtg gta ttt acc atc ctc Trp Met Leu Gly Ser Asn Asn Gly Gln Arg Val Val Phe Thr Ile Leu 175 180 185	1479
ctg ctg ttg gtc gct ccg gct tac agt ttt aat tgt ctg gga atg ggc Leu Leu Leu Val Ala Pro Ala Tyr Ser Phe Asn Cys Leu Gly Met Gly 190 195 200	1527
aat cgt gac ttc ata gaa gga gcc agt gga gcc act tgg gtg gac ttg Asn Arg Asp Phe Ile Glu Gly Ala Ser Gly Ala Thr Trp Val Asp Leu 205 210 215 220	1575
gtg ctg gaa gga gat agc tgc ttg aca atc atg gca aac gac aaa cca Val Leu Glu Gly Asp Ser Cys Leu Thr Ile Met Ala Asn Asp Lys Pro 225 230 235	1623
aca ttg gac gtc cgc atg att aac atc gaa gct agc caa ctt gct gag Thr Leu Asp Val Arg Met Ile Asn Ile Glu Ala Ser Gln Leu Ala Glu 240 245 250	1671
gtc aga agt tac tgc tat cat gct tca gtc act gac atc tcg acg gtg Val Arg Ser Tyr Cys Tyr His Ala Ser Val Thr Asp Ile Ser Thr Val 255 260 265	1719
gct cgg tgc ccc acg act gga gaa gcc cac aac gag aag cga gct gat Ala Arg Cys Pro Thr Thr Gly Glu Ala His Asn Glu Lys Arg Ala Asp 270 275 280	1767
agt agc tat gtg tgc aaa caa ggc ttc act gac cgt ggg tgg ggc aac Ser Ser Tyr Val Cys Lys Gln Gly Phe Thr Asp Arg Gly Trp Gly Asn 285 290 295 300	1815
gga tgt gga ctt ttc ggg aag gga agc att gac aca tgt gca aaa ttc Gly Cys Gly Leu Phe Gly Lys Gly Ser Ile Asp Thr Cys Ala Lys Phe 305 310 315	1863
tcc tgc acc agt aaa gcg att ggg aga aca atc cag cca gaa aac atc Ser Cys Thr Ser Lys Ala Ile Gly Arg Thr Ile Gln Pro Glu Asn Ile 320 325 330	1911
aaa tac gaa gtt ggc att ttt gtg cat gga acc acc act tcg gaa aac Lys Tyr Glu Val Gly Ile Phe Val His Gly Thr Thr Thr Ser Glu Asn 335 340 345	1959

10

20

30

cat ggg aat tat tca gcg caa gtt ggg gcg tcc cag gcg gca aag ttt His Gly Asn Tyr Ser Ala Gln Val Gly Ala Ser Gln Ala Ala Lys Phe 350 355 360	2007
aca gta aca ccc aat gct cct tcg ata acc ctc aaa ctt ggt gac tac Thr Val Thr Pro Asn Ala Pro Ser Ile Thr Leu Lys Leu Gly Asp Tyr 365 370 375 380	2055
gga gaa gtc aca ctg gac tgt gag cca agg agt gga ctg aac act gaa Gly Glu Val Thr Leu Asp Cys Glu Pro Arg Ser Gly Leu Asn Thr Glu 385 390 395	2103
gcg ttt tac gtc atg acc gtg ggg tca aag tca ttt ctg gtc cat agg Ala Phe Tyr Val Met Thr Val Gly Ser Lys Ser Phe Leu Val His Arg 400 405 410	2151
gag tgg ttt cat gac ctc gct ctc ccc tgg acg tcc cct tcg agc aca Glu Trp Phe His Asp Leu Ala Leu Pro Trp Thr Ser Pro Ser Ser Thr 415 420 425	2199
gcg tgg aga aac aga gaa ctc ctc atg gaa ttt gaa gag gcg cac gcc Ala Trp Arg Asn Arg Glu Leu Met Glu Phe Glu Glu Ala His Ala 430 435 440	2247
aca aaa cag tcc gtt gtt gct ctt ggg tca cag gaa gga ggc ctc cat Thr Lys Gln Ser Val Val Ala Leu Gly Ser Gln Glu Gly Gly Leu His 445 450 455 460	2295
cag gcg ttg gca gga gcc atc gtg gtg gag tac tca agc tca gtg aag Gln Ala Leu Ala Gly Ala Ile Val Val Glu Tyr Ser Ser Ser Val Lys 465 470 475	2343
tta aca tca ggc cac ctg aaa tgt agg ctg aaa atg gac aaa ctg gct Leu Thr Ser Gly His Leu Lys Cys Arg Leu Lys Met Asp Lys Leu Ala 480 485 490	2391
ctg aaa ggc aca acc tat ggc atg tgt aca gaa aaa ttc tcg ttc gcg Leu Lys Gly Thr Thr Tyr Gly Met Cys Thr Glu Lys Phe Ser Phe Ala 495 500 505	2439
aaa aat ccg gcg gac act ggt cac gga aca gtt gtc att gaa ctc tcc Lys Asn Pro Ala Asp Thr Gly His Gly Thr Val Val Ile Glu Leu Ser 510 515 520	2487
tac tct ggg agt gat ggc ccc tgc aaa att ccg att gct tcc gtt gcg Tyr Ser Gly Ser Asp Gly Pro Cys Lys Ile Pro Ile Ala Ser Val Ala 525 530 535 540	2535
agc ctc aat gac atg acc ccc gtt ggg cgg ctg gtg aca gtg aac ccc Ser Leu Asn Asp Met Thr Pro Val Gly Arg Leu Val Thr Val Asn Pro 545 550 555	2583
ttc gtc gcg act tcc agt gcc agc tca aag gtg ctg gtc gag atg gaa Phe Val Ala Thr Ser Ser Ala Ser Ser Lys Val Leu Val Glu Met Glu 560 565 570	2631
ccc ccc ttc gga gac tcc tac atc gta gtt gga agg gga gac aag cag Pro Pro Phe Gly Asp Ser Tyr Ile Val Val Gly Arg Gly Asp Lys Gln 575 580 585	2679

10

20

30

atc aac cac cat tgg cac aaa gct gga agc acg ctg ggc aag gcc ttt	2727
Ile Asn His His Trp His Lys Ala Gly Ser Thr Leu Gly Lys Ala Phe	
590 595 600	
tca aca act ttg aag gga gct caa aga ctg gca gcg ttg ggc gac aca	2775
Ser Thr Thr Leu Lys Gly Ala Gln Arg Leu Ala Ala Leu Gly Asp Thr	
605 610 615 620	
gcc tgg gac ttt ggc tct att gga ggg gtc ttc aac tcc ata gga aaa	2823
Ala Trp Asp Phe Gly Ser Ile Gly Gly Val Phe Asn Ser Ile Gly Lys	
625 630 635	
gcc gtt cac caa gtg ttt ggt ggt gcc ttc aga aca ctc ttt ggg gga	2871
Ala Val His Gln Val Phe Gly Gly Ala Phe Arg Thr Leu Phe Gly Gly	
640 645 650	
atg tct tgg atc aca caa ggg cta atg ggt gcc cta ctg ctc tgg atg	2919
Met Ser Trp Ile Thr Gln Gly Leu Met Gly Ala Leu Leu Leu Trp Met	
655 660 665	
ggc gtc aac gca cga gac cga tca att gct ttg gcc ttc tta gcc aca	2967
Gly Val Asn Ala Arg Asp Arg Ser Ile Ala Leu Ala Phe Leu Ala Thr	
670 675 680	
ggg ggt gtg ctc gtg ttc tta gcg acc aat gtg cat gct taa	3009
Gly Gly Val Leu Val Phe Leu Ala Thr Asn Val His Ala *	
685 690 695	
ttagtttgag cgcccgctcg agcatgcac tagagggccc tattctatag tgtcacctaa	3069
atgctagagc tcgctgatca gccctcgactg tgccttctag ttgccagcca tctgttggtt	3129
gcccccccc cgtgccttcc ttgacctgg aagggtgccac tcccactgtc ctttccataat	3189
aaaatgagga aattgcatcg cattgtctga gtagggtgca ttctattctg gggggtgggg	3249
tggggcagga cagcaagggg gaggattggg aagacaatag caggcatgct ggggatgcgg	3309
tgggctctat ggcttctgag gcggaagaa ccagctgggg ctctaggggg tatccccacg	3369
cgccctgtag cgccgcatta agcgcggcgg gtgtggtggt tacgcgcagc gtgaccgcta	3429
cacttgccag cgccctagcg ccgcctcctt tcgctttctt cccttccttt ctcgccacgt	3489
tcgcggctt tccccgtcaa gctctaaatc ggggcacccc tttagggttc cgatttagtg	3549
ctttacggca cctcgacccc aaaaaacttg attagggtga tgggttcacgt agtggggccat	3609
cgccctgata gacggttttt cgccctttga cgttgagtc cacgttcttt aatagtggac	3669
tcttgttcca aactggaaca acactcaacc ctatctcggt ctattctttt gatttataag	3729
ggattttggg gatctcgccc tatttggttaa aaaatgagct gatttaacaa aaatttaacg	3789
cgaatttaatt ctgtggaatg tgtgtcagtt aggggtgtga aagtccccag gctccccagg	3849
caggcagaag tatgcaaagc atgcatctca attagtcagc aaccagggtg ggaagtcacc	3909
caggctcccc agcaggcaga agtatgcaaa gcacgcacat caattagtca gcaaccatag	3969
tccccccctt aactccgcgc atcccgcccc taactccgcc cagttccgcc cattctccgc	4029
cccatggctg actaattttt tttattttatg cagaggccga ggccgcctct gcctctgagc	4089
tattccagaa gtatgagga ggcttttttg gaggcctagg cttttgcaaa aagctcccg	4149
gagcttgat atccattttt ggatctgac aagagacagg atgaggatcg ttctgcacga	4209
ttgaacaaga tggattgcac gcaggttctc cgcccgcttg ggtggagagg ctattcggct	4269
atgactgggc acaacagaca atcggtgct ctgatgccgc cgtgttccgg ctgtcagcgc	4329
aggggcgccc ggttcttttt gtcaagaccg acctgtcccg tgcctgaat gaactgcagg	4389
acgaggcagc gcggctatcg tggctggcca cgacgggcgt tccttgccga gctgtgctcg	4449
acgttgtcac tgaagcggga agggactggc tgctatttgg cgaagtgcgg gggcaggatc	4509
tcctgtcaco tcaccttgct cctgcggaga aagtatccat catggctgat gcaatgcggc	4569
ggctgcatac gcttgatccg gctacctgcc cattcgacca ccaagcgaaa catcgcatcg	4629
agcgagcacg tactcggtat gaagccggtc ttgtcgatca ggatgatctg gacgaagagc	4689
atcaggggct cgcgccagcc gaactgttcg ccaggctcaa ggccgcgatg cccgacggcg	4749
aggatctcgt cgtgacccat ggcgatgcct gcttgcgaa tatcatggtg gaaaaaggcc	4809
gcttttcttg attcatcgac tgtggccggc tgggtgtggc ggaccgctat caggacatag	4869
cgttggctac ccgtgatatt gctgaagagc ttggcggcga atgggctgac cgcttccctg	4929
tgctttacgg tatcgccgct cccgattcgc agcgcacgcg ctctctatcg cttcttgacg	4989

10

20

30

```

agttcttctg agcgggactc tgggggttcga aatgaccgac caagcgacgc ccaacctgcc 5049
atcacgagat ttcgattcca ccgcgcgcct ctatgaaagg ttgggcttcg gaatcgtttt 5109
ccgggacgccc ggctgggatga tccctccagc cggggatctc atgctggagt tcttcgcccc 5169
ccccaaacttg tttattgcag cttataatgg ttacaaataa agcaatagca tcacaaatth 5229
cacaaataaaa gcattttttt cactgcattc tagttgtggt ttgtccaaac tcataaatgt 5289
atcttatcat gtctgtatac cgtcgacctc tagctagagc ttggcgtaat catggtcata 5349
gctgttttct gtgtgaaatt gttatccgct cacaattcca cacaacatac gagccgggag 5409
cataaagtgt aaagcctggg gtgcctaata agtgagctaa ctcacattaa ttgctgtgag 5469
ctcactgccc gctttccagt cgggaaacct gtcgtgccag ctgcattaat gaatcgggca 5529
acgcgcgggg agaggcggtt tgcgtattgg gcgctcttcc gcttctctgc tcaactgactc 5589
gctgcgctcg gtctgttcggc tggcgcgagc ggtatcagct cactcaaaag cggtaataacg 5649
gttatccaca gaatcagggg ataacgcagg aaagaacatg tgagcaaaag gccagcaaaa 5709
ggccagggaac cgtaaaaaag ccgcgttgct ggcgtttttc cataggctcc gccccctga 5769
cgagcatcac aaaaaatcgac gctcaagtea gaggtggcga aacccgacag gactataaag 5829
ataccagggc tttccccctg gaagctccct cgtgcgctct cctgttccga ccctgcccgt 5889
taccggatac ctgtccgcct tctctccctc gggaaagcgt gcgctttctc aatgctcacg 5949
ctgtaggatat ctacgttcgg tgtaggctgt tgcctccaaag ctgggctgtg tgcacgaacc 6009
ccccgttcag ccgcacgcct gcgccttata cggtaactat cgtcttgagt ccaaccgggt 6069
aagacacgac ttatcgccct cactggtaac cactggtaac aggtattgca gagcgaggta 6129
tgtaggcggt gctacagagt tcttgaagtg gtggcctaac taaggctaca ctagaaggac 6189
agtatttggg atctcgctc tcgtgaagcc agttaccttc ggaaaaaagag ttggtagctc 6249
ttgatccggc taacgcgaga aaaaaaggat ctcaagaaga tcttttgatc ttttctacgg ggtctgacgc 6309
tcagtggaac gaaaaactcac gtttaaggat tttggtcatg agattatcaa aaaggatctt 6369
cacctagatc ctttttaaat aaaaatgaag ttttaaatca atctaaagta tatatgagta 6429
aacttggctc gacagttaac aatgcttaat cagtgggca cctatctcag cgtatctgtc 6489
atttcgttca tccatagttg cctgactccc cgtcgtgtag ataactacga tacgggaggg 6549
cttaccatct ggcctcagtg ctgcaatgat accgcgagac ccacgctcac cggctccaga 6609
tttatcagca ataaaccagc cagccggaag ggcgagcgc agaagtggc ctgcaacttt 6669
atccgcctcc atccagtcta ttaattgttg ccgggaagct agagtaagta gttcgccagt 6729
taatagtgtg cgcaacgttg ttgccattgc tacaggcatc gtggtgtcac gctcgtcgtt 6789
tggtatggct tcattcagct ccggttccca acgatcaagg cgagttacat gatccccc 6849
gttgtgcaaa aaagcgggta gctccttcgg tctccgac cgtgtcagaa gtaagtggc 6909
cgcagtggtt tcactcatgg ttatggcagc actgcataat tctcttactg tcatgccatc 6969
cgtaagatgc ttttctgtga ctggtgagta ctcaaccaag tcattctgag aatagtgtat 7029
gcggcgacgg agttgctctt gcccgcgctc aatacgggat aatacggcgc cacatagcag 7089
aactttaaaa gtgctcatca ttggaaaacg ttcttcgggg cgaaaactct caaggatctt 7149
accgctgttg agatccagtt cgatgtaacc cactcgtgca ccaactgat cttcagcatc 7209
ttttactttc accagcgttt ctgggtgagc aaaaacagga aggcataatg ccgcaaaaaa 7269
gggaataagg gcgacacgga aatgttgaat actcactatc ttcttttttc aatattattg 7329
aagcatttat cagggttatt gtctcatgag cggatacata tttgaatgta tttagaaaaa 7389
taaacaataa ggggttccgc gcacatttcc ccgaaaagtg ccacctgacg t 7449
7500

```

```

<210> 11
<211> 697
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

```

```

<220>
<223> Description of artificial sequence; note =
        synthetic construct
<223> pCDJE 2-7

```

```

<400> 11
Met Gly Arg Lys Gln Asn Lys Arg Gly Gly Asn Glu Gly Ser Ile Met
 1             5             10             15
Trp Leu Ala Ser Leu Ala Val Val Ile Ala Cys Ala Gly Ala Met Lys
 20             25             30
Leu Ser Asn Phe Gln Gly Lys Leu Met Thr Ile Asn Asn Thr Asp
 35             40             45

```

10

20

30

Ile Ala Asp Val Ile Val Ile Pro Thr Ser Lys Gly Glu Asn Arg Cys
 50 55 60
 Trp Val Arg Ala Ile Asp Val Gly Tyr Met Cys Glu Asp Thr Ile Thr
 65 70 75 80
 Tyr Glu Cys Pro Lys Leu Thr Met Gly Asn Asp Pro Glu Asp Val Asp
 85 90 95
 Cys Trp Cys Asp Asn Gln Glu Val Tyr Val Gln Tyr Gly Arg Cys Thr
 100 105 110
 Arg Thr Arg His Ser Lys Arg Ser Arg Arg Ser Val Ser Val Gln Thr
 115 120 125
 His Gly Glu Ser Ser Leu Val Asn Lys Lys Glu Ala Trp Leu Asp Ser
 130 135 140
 Thr Lys Ala Thr Arg Tyr Leu Met Lys Thr Glu Asn Trp Ile Ile Arg
 145 150 155 160
 Asn Pro Gly Tyr Ala Phe Leu Ala Ala Val Leu Gly Trp Met Leu Gly
 165 170 175
 Ser Asn Asn Gly Gln Arg Val Val Phe Thr Ile Leu Leu Leu Val
 180 185 190
 Ala Pro Ala Tyr Ser Phe Asn Cys Leu Gly Met Gly Asn Arg Asp Phe
 195 200 205
 Ile Glu Gly Ala Ser Gly Ala Thr Trp Val Asp Leu Val Leu Glu Gly
 210 215 220
 Asp Ser Cys Leu Thr Ile Met Ala Asn Asp Lys Pro Thr Leu Asp Val
 225 230 235 240
 Arg Met Ile Asn Ile Glu Ala Ser Gln Leu Ala Glu Val Arg Ser Tyr
 245 250 255
 Cys Tyr His Ala Ser Val Thr Asp Ile Ser Thr Val Ala Arg Cys Pro
 260 265 270
 Thr Thr Gly Glu Ala His Asn Glu Lys Arg Ala Asp Ser Ser Tyr Val
 275 280 285
 Cys Lys Gln Gly Phe Thr Asp Arg Gly Trp Gly Asn Gly Cys Gly Leu
 290 295 300
 Phe Gly Lys Gly Ser Ile Asp Thr Cys Ala Lys Phe Ser Cys Thr Ser
 305 310 315 320
 Lys Ala Ile Gly Arg Thr Ile Gln Pro Glu Asn Ile Lys Tyr Glu Val
 325 330 335
 Gly Ile Phe Val His Gly Thr Thr Thr Ser Glu Asn His Gly Asn Tyr
 340 345 350
 Ser Ala Gln Val Gly Ala Ser Gln Ala Ala Lys Phe Thr Val Thr Pro
 355 360 365
 Asn Ala Pro Ser Ile Thr Leu Lys Leu Gly Asp Tyr Gly Glu Val Thr
 370 375 380
 Leu Asp Cys Glu Pro Arg Ser Gly Leu Asn Thr Glu Ala Phe Tyr Val
 385 390 395 400
 Met Thr Val Gly Ser Lys Ser Phe Leu Val His Arg Glu Trp Phe His
 405 410 415
 Asp Leu Ala Leu Pro Trp Thr Ser Pro Ser Ser Thr Ala Trp Arg Asn
 420 425 430
 Arg Glu Leu Leu Met Glu Phe Glu Glu Ala His Ala Thr Lys Gln Ser
 435 440 445
 Val Val Ala Leu Gly Ser Gln Glu Gly Gly Leu His Gln Ala Leu Ala
 450 455 460
 Gly Ala Ile Val Val Glu Tyr Ser Ser Ser Val Lys Leu Thr Ser Gly
 465 470 475 480
 His Leu Lys Cys Arg Leu Lys Met Asp Lys Leu Ala Leu Lys Gly Thr
 485 490 495
 Thr Tyr Gly Met Cys Thr Glu Lys Phe Ser Phe Ala Lys Asn Pro Ala
 500 505 510
 Asp Thr Gly His Gly Thr Val Val Ile Glu Leu Ser Tyr Ser Gly Ser
 515 520 525

10

20

30

Asp Gly Pro Cys Lys Ile Pro Ile Ala Ser Val Ala Ser Leu Asn Asp
 530 535 540
 Met Thr Pro Val Gly Arg Leu Val Thr Val Asn Pro Phe Val Ala Thr
 545 550 555 560
 Ser Ser Ala Ser Ser Lys Val Leu Val Glu Met Glu Pro Pro Phe Gly
 565 570 575
 Asp Ser Tyr Ile Val Val Gly Arg Gly Asp Lys Gln Ile Asn His His
 580 585 590
 Trp His Lys Ala Gly Ser Thr Leu Gly Lys Ala Phe Ser Thr Thr Leu
 595 600 605
 Lys Gly Ala Gln Arg Leu Ala Ala Leu Gly Asp Thr Ala Trp Asp Phe
 610 615 620
 Gly Ser Ile Gly Gly Val Phe Asn Ser Ile Gly Lys Ala Val His Gln
 625 630 635 640
 Val Phe Gly Gly Ala Phe Arg Thr Leu Phe Gly Gly Met Ser Trp Ile
 645 650 655
 Thr Gln Gly Leu Met Gly Ala Leu Leu Trp Met Gly Val Asn Ala
 660 665 670
 Arg Asp Arg Ser Ile Ala Leu Ala Phe Leu Ala Thr Gly Gly Val Leu
 675 680 685
 Val Phe Leu Ala Thr Asn Val His Ala
 690 695

10

<210> 12
 <211> 46
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of artificial sequence; note =
 synthetic construct

20

<221> misc_feature
 <222> 1-46
 <223> WN 466

<400> 12
 cttggtaccc gtctcggcgc cgtgaccctc tcgaacttcc agggca

46

<210> 13
 <211> 43
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of artificial sequence; note =
 synthetic construct

30

<221> misc_feature
 <222> 1-43
 <223> CWN2444

<400> 13
 agaggcactt gcacgtgcgg acttccgccg gcgaaaaaga aaa

43

<210> 14
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of artificial sequence; note =
synthetic construct

<223> JE Signal

<400> 14

Met Gly Lys Arg Ser Ala Gly Ser Ile Met Trp Leu Ala Ser Leu Ala
1 5 10 15
Val Val Ile Ala Cys Ala Gly Ala
20

<210> 15

<211> 5308

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> Description of artificial sequence; note =
synthetic construct

<221> CDS

<222> (911)...(2987)

<221> misc_feature

<222> (1)...(5308)

<223> pCBWN

<400> 15

gacggatcgg gagatctccc gatcccccatt ggtgcactct cagtacaatc tgctctgatg 60
ccgcatagtt aagccagtat ctgctccctg cttgtgtgtt ggaggtcgct gtagtagtgcg 120
cgagcaaaat ttaagctaca acaaggcaag gcttgaccga caattgcatg aagaatctgc 180
ttagggtagt gcgtttttgcg ctgcttcgcg atgtacgggc cagatatacg cgttgacatt 240
gattattgac tagttattaa tagtaataca ttacgggggc attagttcat agcccatata 300
tggagttccg cgltacataa cttacggtaa atggcccgc tggctgaccg cccaacgacc 360
cccgcccatt gacgtcaata atgacgtatg tccccatagt aacgccaata gggactttcc 420
attgacgtca atgggtggag tatttacggt aaactgccc cttggcagta catcaagtgt 480
atcatatgcc aagtacgccc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt 540
atgcccagta catgacctta tgggactttc ctacttggca gtacatctac gtattagtca 600
tcgctattac catggtgatg cgggtttttg cagtacatca atgggcgtgg atagcggttt 660
gactcacggg gatttccaag tctccacccc attgacgtca atgggagttt gttttggcac 720
caaaatcaac gggactttcc aaaatgtcgt aacaactccg ccccatgac gcaaatgggc 780
ggtaggcgtg tacggtggga ggtctatata agcagagctc tctggctaac tagagaacc 840
actgcttact ggcttatcga aattaatacg actcactata gggagaccca agcttgggtac 900
cgccgccgcc atg gcc aag agg tcc gcc ggc tca atc atg tgg ctc gcg 949
Met Gly Lys Arg Ser Ala Gly Ser Ile Met Trp Leu Ala
1 5 10

20

agc ttg gca gtt gtc ata gct tgt gca ggc gcc gtg acc ctc tgc aac 997
Ser Leu Ala Val Val Ile Ala Cys Ala Gly Ala Val Thr Leu Ser Asn 1045
15 20 25

30

ttc cag ggc aag gtg atg atg acg gta aat gct act gac gtc aca gat 1045
Phe Gln Gly Lys Val Met Thr Val Asn Ala Thr Asp Val Thr Asp 1093
30 35 40 45

gtc atc acg att cca aca gct gct gga aag aac cta tgc att gtc aga 1093
Val Ile Thr Ile Pro Thr Ala Ala Gly Lys Asn Leu Cys Ile Val Arg 1140
50 55 60

gca atg gat gtg gga tac atg tgc gat gat act atc act tat gaa tgc Ala Met Asp Val Gly Tyr Met Cys Asp Asp Thr Ile Thr Tyr Glu Cys 65 70 75	1141
cca gtg ctg tgc gct ggt aat gat cca gaa gac atc gac tgt tgg tgc Pro Val Leu Ser Ala Gly Asn Asp Pro Glu Asp Ile Asp Cys Trp Cys 80 85 90	1189
aca aag tca gca gtc tac gtc agg tat gga aga tgc acc aag aca cgc Thr Lys Ser Ala Val Tyr Val Arg Tyr Gly Arg Cys Thr Lys Thr Arg 95 100 105	1237
cac tca aga cgc agt cgg agg tca ctg aca gtg cag aca cac gga gaa His Ser Arg Arg Ser Arg Arg Ser Leu Thr Val Gln Thr His Gly Glu 110 115 120 125	1285
agc act cta gcg aac aag aag ggg gct tgg atg gac agc acc aag gcc Ser Thr Leu Ala Leu Lys Lys Gly Ala Trp Met Asp Ser Thr Lys Ala 130 135 140	1333
aca agg tat ttg gta aaa aca gaa tca tgg atc ttg agg aac cct gga Thr Arg Tyr Leu Val Lys Thr Glu Ser Trp Ile Leu Arg Asn Pro Gly 145 150 155	1381
tat gcc ctg gtg gca gcc gtc att ggt tgg atg ctt ggg agc aac acc Tyr Ala Leu Val Ala Ala Val Ile Gly Trp Met Leu Gly Ser Asn Thr 160 165 170	1429
atg cag aga gtt gtg ttt gtc gtg cta ttg ctt ttg gtg gcc cca gct Met Gln Arg Val Val Phe Val Val Leu Leu Leu Val Ala Pro Ala 175 180 185	1477
tac agc ttc aac tgc ctt gga atg agc aac aga gac ttc ttg gaa gga Tyr Ser Phe Asn Cys Leu Gly Met Ser Asn Arg Asp Phe Leu Glu Gly 190 195 200 205	1525
gtg tct gga gca aca tgg gtg gat ttg gtt ctc gaa ggc gac agc tgc Val Ser Gly Ala Thr Trp Val Asp Leu Val Leu Glu Gly Asp Ser Cys 210 215 220	1573
gtg act atc atg tct aag gac aag cct acc atc gat gtg aag atg atg Val Thr Ile Met Ser Lys Asp Lys Pro Thr Ile Asp Val Lys Met Met 225 230 235	1621
aat atg gag gcg gcc aac ctg gca gag gtc cgc agt tat tgc tat ttg Asn Met Glu Ala Ala Asn Leu Ala Glu Val Arg Ser Tyr Cys Tyr Leu 240 245 250	1669
gct acc gtc agc gat ctc tcc acc aaa gct gcg tgc ccg acc atg gga Ala Thr Val Ser Asp Leu Ser Thr Lys Ala Ala Cys Pro Thr Met Gly 255 260 265	1717
gaa gct cac aat gac aaa cgt gct gac cca gct ttt gtg tgc aga caa Glu Ala His Asn Asp Lys Arg Ala Asp Pro Ala Phe Val Cys Arg Gln 270 275 280 285	1765
gga gtg gtg gac agg ggc tgg ggc aac ggc tgc gga cta ttt ggc aaa Gly Val Val Asp Arg Gly Trp Gly Asn Gly Cys Gly Leu Phe Gly Lys 290 295 300	1813

10

20

30

gga agc att gac aca tgc gcc aaa ttt gcc tgc tct acc aag gca ata Gly Ser Ile Asp Thr Cys Ala Lys Phe Ala Cys Ser Thr Lys Ala Ile 305 310 315	1861
gga aga acc atc ttg aaa gag aat atc aag tac gaa gtg gcc att ttt Gly Arg Thr Ile Leu Lys Glu Asn Ile Lys Tyr Glu Val Ala Ile Phe 320 325 330	1909
gtc cat gga cca act act gtg gag tgc cac gga aac tac tcc aca cag Val His Gly Pro Thr Thr Val Glu Ser His Gly Asn Tyr Ser Thr Gln 335 340 345	1957
gtt gga gcc act cag gca ggg aga ttc agc atc act cct gcg gcg cct Val Gly Ala Thr Gln Ala Gly Arg Phe Ser Ile Thr Pro Ala Ala Pro 350 355 360 365	2005
tca tac aca cta aag ctt gga gaa tat gga gag gtg aca gtg gac tgt Ser Tyr Thr Leu Lys Leu Gly Glu Tyr Gly Glu Val Thr Val Asp Cys 370 375 380	2053
gaa cca cgg tca ggg att gac acc aat gca tac tac gtg atg act gtt Glu Pro Arg Ser Gly Ile Asp Thr Asn Ala Tyr Tyr Val Met Thr Val 385 390 395	2101
gga aca aag acg ttc ttg gtc cat cgt gag tgg ttc atg gac ctc aac Gly Thr Lys Thr Phe Leu Val His Arg Glu Trp Phe Met Asp Leu Asn 400 405 410	2149
ctc cct tgg agc agt gct gga agt act gtg tgg agg aac aga gag acg Leu Pro Trp Ser Ser Ala Gly Ser Thr Val Trp Arg Asn Arg Glu Thr 415 420 425	2197
tta atg gag ttt gag gaa cca cac gcc acg aag cag tct gtg ata gca Leu Met Glu Phe Glu Glu Pro His Ala Thr Lys Gln Ser Val Ile Ala 430 435 440 445	2245
ttg ggc tca caa gag gga gct ctg cat caa gct ttg gct gga gcc att Leu Gly Ser Gln Glu Gly Ala Leu His Gln Ala Leu Ala Gly Ala Ile 450 455 460	2293
cct gtg gaa ttt tca agc aac act gtc aag ttg acg tgc ggt cat ttg Pro Val Glu Phe Ser Ser Asn Thr Val Lys Leu Thr Ser Gly His Leu 465 470 475	2341
aag tgt aga gtg aag atg gaa aaa ttg cag ttg aag gga aca acc tat Lys Cys Arg Val Lys Met Glu Lys Leu Gln Leu Lys Gly Thr Thr Tyr 480 485 490	2389
ggc gtc tgt tca aag gct ttc aag ttt ctt ggg act ccc gcg gac aca Gly Val Cys Ser Lys Ala Phe Lys Phe Leu Gly Thr Pro Ala Asp Thr 495 500 505	2437
ggt cac ggc act gtg gtg ttg gaa ttg cag tac act ggc acg gat gga Gly His Gly Thr Val Val Leu Glu Leu Gln Tyr Thr Gly Thr Asp Gly 510 515 520 525	2485
cct tgc aaa gtt cct atc tgc tca gtg gct tca ttg aac gac cta acg Pro Cys Lys Val Pro Ile Ser Ser Val Ala Ser Leu Asn Asp Leu Thr 530 535 540	2533

10

20

30

cca gtg ggc aga ttg gtc act gtc aac cct ttt gtt tca gtg gcc acg 2581
 Pro Val Gly Arg Leu Val Thr Val Asn Pro Phe Val Ser Val Ala Thr
 545 550 555

gcc aac gct aag gtc ctg att gaa ttg gaa cca ccc ttt gga gac tca 2629
 Ala Asn Ala Lys Val Leu Ile Glu Leu Glu Pro Pro Phe Gly Asp Ser
 560 565 570

tac ata gtg gtg ggc aga gga gaa caa cag atc aat cac cat tgg cac 2677
 Tyr Ile Val Val Gly Arg Glu Gln Gln Ile Asn His His Trp His
 575 580 585

aag tct gga agc agc att ggc aaa gcc ttt aca acc acc ctc aaa gga 2725
 Lys Ser Gly Ser Ser Ile Gly Lys Ala Phe Thr Thr Thr Leu Lys Gly
 590 595 600 605

gcg cag aga cta gcc gct cta gga gac aca gct tgg gac ttt gga tca 2773
 Ala Gln Arg Leu Ala Ala Leu Gly Asp Thr Ala Trp Asp Phe Gly Ser
 610 615 620

gtt gga ggg gtg ttc acc tca gtt ggg aag gct gtc cat caa gtg ttc 2821
 Val Gly Gly Val Phe Thr Ser Val Gly Lys Ala Val His Gln Val Phe
 625 630 635

gga gga gca ttc cgc tca ctg ttc gga ggc atg tcc tgg ata acg caa 2869
 Gly Gly Ala Phe Arg Ser Leu Phe Gly Gly Met Ser Trp Ile Thr Gln
 640 645 650

gga ttg ctg ggg gct ctc ctg ttg tgg atg ggc atc aat gct cgt gat 2917
 Gly Leu Leu Gly Ala Leu Leu Trp Met Gly Ile Asn Ala Arg Asp
 655 660 665

agg tcc ata gct ctc acg ttt ctc gca gtt gga gga gtt ctg ctc ttc 2965
 Arg Ser Ile Ala Leu Thr Phe Leu Ala Val Gly Gly Val Leu Leu Phe
 670 675 680 685

ctc tcc gtg aac gtg cac gcc t gaaggcggcc gctcgagcat gcatttagag 3017
 Leu Ser Val Asn Val His Ala
 690

ggccctattc tatagtgtca cctaaatgct agagctcgct gatcagctc gactgtgctt 3077
 tctagttgcc agccatctgt tgtttgcccc tcccccgctc attccttgac cctggaaggt 3137
 gccactccca ctgtcctttc ctaataaaat gaggaattg catcgcatg tctgagtagg 3197
 tgtcattcta ttctgggggg tgggggtggg caggacagca agggggagga ttgggaagac 3257
 aatagcaggc atgctgggga tgcgggtggc tctatggctt ctgaggcgga aagaaccagc 3317
 tgcattaatg aatcggccaa cgcgcgggga gaggcggttt gcgtattggg cgtcttccg 3377
 cttcctcgct cactgactcg ctgcgctcgg tegtccggct gcggcgagcg gtatcagctc 3437
 actcaaagc ggtaatacgg ttatccacag aatcagggga taacgcagga aagaacatgt 3497
 gagcaaaagg ccagcaaaag gccaggaacc gtaaaaaggc cgcgttgctg gcgtttttcc 3557
 ataggctccg cccccctgac gagcatcaca aaaatcgacg ctcaagtcag aggtggcgaa 3617
 acccgacagg actataaaga taccaggcgt ttccccctgg aagctccctc gtgcgctctc 3677
 ctgttccgac cctgcgcgtt accggatacc tgtccgcctt tctcccttcg ggaagcgtgg 3737
 cgctttctca tagctcacgc tgtaggtatc tcagttcggg taggtcgtt cgtcccaagc 3797
 tgggctgtgt gcacgaaccc ccggttcagc ccgaccgctg cgccttatcc ggtaactatc 3857
 gtcttgagtc caacccggta agacacgact tatcgccact ggcagcagcc actggtaaca 3917
 ggattagcag agcgagggtat gtaggcgggt ctacagagtt cttgaagtgg tggcctaact 3977
 acggtacac tagaagaaca gtatttgga tctgcgtctt gctgaagcca gttaccttcg 4037
 gaaaaagagt tggtagctct tgatccggca aacaaaccac cgctggtagc ggtgggtttt 4097
 ttgtttgcaa gcagcagatt acgcgcagaa aaaaaggatc tcaagaagat cctttgatct 4157
 tttctacggg gtctgacgct cagtggaaag aaaactcacg ttaaggagatt ttggtcatga 4217
 gattatcaaa aaggatcttc acctagatcc ttttaaatga aaaaatgaagt tttaaatcaa 4277

10

20

30

```

tctaaagtat atatgagtaa acttgggtctg acagttacca atgcttaatc agtgaggcac 4337
ctatctcagc gatctgtcta tttcgttcat ccatagttgc ctgactcccc gtcgtgtaga 4397
taactacgat acgggagggc ttaccatctg gccccagtgc tgcaatgata ccgcgagacc 4457
cacgctcacc ggctccagat ttatcagcaa taaaccagcc agccggaagg gccgagcgca 4517
gaagtggtec tgcaacttta tccgcctcca tccagtctat taattgttgc cgggaagcta 4577
gagtaagtag ttgcgcagtt aatagtttgc gcaacgttgt tgccattgct acaggcctcg 4637
tggtgtcagc ctcgctgttt ggtatggctt cattcagctc cggttcccaa cgatcaaggc 4697
gagttacatg atcccccatg ttgtgcaaaa aagcgggttag ctctctcggt cctccgctcg 4757
ttgtcagaag taagtgggcc gcagtgttat cactcatggt tatggcagca ctgcataatt 4817
ctcttactgt catgccatcc gtaagatgct tttctgtgac tgggtgagta tcaaccaagt 4877
cattctgaga atagtgtatg cggcgaccga gttgctcttg ccgcgctga atacgggata 4937
ataccgcgcc acatagcaga actttaaag tgctcatcat tggaaaacgt tcttcggggc 4997
gaaaactctc aaggatctta ccgctgttga gatccagttc gatgtaacct actcgtgcac 5057
ccaactgac ttacagcatc ttactttca ccagcgttcc tgggtgagca aaaacaggaa 5117
ggcaaaatgc cgcaaaaaag ggaataagg cgacacggaa atgttgaata ctcatctct 5177
tcctttttca atattattga agcatttate aggtttattg tctcatgagc ggatacatat 5237
ttgaatgtat ttagaaaaat aaacaaatag gggttccgca cacatttccc cgaaaagtgc 5297
cacctgacgt c 5308

```

<210> 16
 <211> 692
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of artificial sequence; note =
 synthetic construct

<223> pCBWN

```

<400> 16
Met Gly Lys Arg Ser Ala Gly Ser Ile Met Trp Leu Ala Ser Leu Ala
1          5          10          15
Val Val Ile Ala Cys Ala Gly Ala Val Thr Leu Ser Asn Phe Gln Gly
20          25          30
Lys Val Met Met Thr Val Asn Ala Thr Asp Val Thr Asp Val Ile Thr
35          40          45
Ile Pro Thr Ala Ala Gly Lys Asn Leu Cys Ile Val Arg Ala Met Asp
50          55          60
Val Gly Tyr Met Cys Asp Thr Ile Thr Tyr Glu Cys Pro Val Leu
65          70          75          80
Ser Ala Gly Asn Asp Pro Glu Asp Ile Asp Cys Trp Cys Thr Lys Ser
85          90          95
Ala Val Tyr Val Arg Tyr Gly Arg Cys Thr Lys Thr Arg His Ser Arg
100         105         110
Arg Ser Arg Arg Ser Leu Thr Val Gln Thr His Gly Glu Ser Thr Leu
115         120         125
Ala Asn Lys Lys Gly Ala Trp Met Asp Ser Thr Lys Ala Thr Arg Tyr
130         135         140
Leu Val Lys Thr Glu Ser Trp Ile Leu Arg Asn Pro Gly Tyr Ala Leu
145         150         155         160
Val Ala Ala Val Ile Gly Trp Met Leu Gly Ser Asn Thr Met Gln Arg
165         170         175
Val Val Phe Val Val Leu Leu Leu Val Ala Pro Ala Tyr Ser Phe
180         185         190
Asn Cys Leu Gly Met Ser Asn Arg Asp Phe Leu Glu Gly Val Ser Gly
195         200         205
Ala Thr Trp Val Asp Leu Val Leu Glu Gly Asp Ser Cys Val Thr Ile
210         215         220
Met Ser Lys Asp Lys Pro Thr Ile Asp Val Lys Met Met Asn Met Glu
225         230         235         240

```

10

20

30

Ala Ala Asn Leu Ala Glu Val Arg Ser Tyr Cys Tyr Leu Ala Thr Val
 245 250 255
 Ser Asp Leu Ser Thr Lys Ala Ala Cys Pro Thr Met Gly Glu Ala His
 260 265 270
 Asn Asp Lys Arg Ala Asp Pro Ala Phe Val Cys Arg Gln Gly Val Val
 275 280 285
 Asp Arg Gly Trp Gly Asn Gly Cys Gly Leu Phe Gly Lys Gly Ser Ile
 290 295 300
 Asp Thr Cys Ala Lys Phe Ala Cys Ser Thr Lys Ala Ile Gly Arg Thr
 305 310 315 320
 Ile Leu Lys Glu Asn Ile Lys Tyr Glu Val Ala Ile Phe Val His Gly
 325 330 335
 Pro Thr Thr Val Glu Ser His Gly Asn Tyr Ser Thr Gln Val Gly Ala
 340 345 350
 Thr Gln Ala Gly Arg Phe Ser Ile Thr Pro Ala Ala Pro Ser Tyr Thr
 355 360 365
 Leu Lys Leu Gly Glu Tyr Gly Glu Val Thr Val Asp Cys Glu Pro Arg
 370 375 380
 Ser Gly Ile Asp Thr Asn Ala Tyr Tyr Val Met Thr Val Gly Thr Lys
 385 390 395 400
 Thr Phe Leu Val His Arg Glu Trp Phe Met Asp Leu Asn Leu Pro Trp
 405 410 415
 Ser Ser Ala Gly Ser Thr Val Trp Arg Asn Arg Glu Thr Leu Met Glu
 420 425 430
 Phe Glu Glu Pro His Ala Thr Lys Gln Ser Val Ile Ala Leu Gly Ser
 435 440 445
 Gln Glu Gly Ala Leu His Gln Ala Leu Ala Gly Ala Ile Pro Val Glu
 450 455 460
 Phe Ser Ser Asn Thr Val Lys Leu Thr Ser Gly His Leu Lys Cys Arg
 465 470 475 480
 Val Lys Met Glu Lys Leu Gln Leu Lys Gly Thr Thr Tyr Gly Val Cys
 485 490 495
 Ser Lys Ala Phe Lys Phe Leu Gly Thr Pro Ala Asp Thr Gly His Gly
 500 505 510
 Thr Val Val Leu Glu Leu Gln Tyr Thr Gly Thr Asp Gly Pro Cys Lys
 515 520 525
 Val Pro Ile Ser Ser Val Ala Ser Leu Asn Asp Leu Thr Pro Val Gly
 530 535 540
 Arg Leu Val Thr Val Asn Pro Phe Val Ser Val Ala Thr Ala Asn Ala
 545 550 555 560
 Lys Val Leu Ile Glu Leu Glu Pro Pro Phe Gly Asp Ser Tyr Ile Val
 565 570 575
 Val Gly Arg Gly Glu Gln Gln Ile Asn His His Trp His Lys Ser Gly
 580 585 590
 Ser Ser Ile Gly Lys Ala Phe Thr Thr Thr Leu Lys Gly Ala Gln Arg
 595 600 605
 Leu Ala Ala Leu Gly Asp Thr Ala Trp Asp Phe Gly Ser Val Gly Gly
 610 615 620
 Val Phe Thr Ser Val Gly Lys Ala Val His Gln Val Phe Gly Gly Ala
 625 630 635 640
 Phe Arg Ser Leu Phe Gly Gly Met Ser Trp Ile Thr Gln Gly Leu Leu
 645 650 655
 Gly Ala Leu Leu Leu Trp Met Gly Ile Asn Ala Arg Asp Arg Ser Ile
 660 665 670
 Ala Leu Thr Phe Leu Ala Val Gly Gly Val Leu Leu Phe Leu Ser Val
 675 680 685
 Asn Val His Ala
 690

10

20

30

<210> 17

<211> 5334

<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of artificial sequence; note =
synthetic construct

<221> CDS
<222> (916)...(3007)

<221> misc_feature
<222> (1)...(5334)
<223> pCBJE 1-14

<400> 17 10

gacggatcgg gagatctccc gatccctat ggtgcaactct cagtacaatc tgctctgatg 60
ccgcatagtt aagccagtat ctgctccctg cttgtgtgtt ggaggtcgct gagtagtgcg 120
cgagcaaaat ttaagctaca acaaggcaag gcttgaccga caattgcatg aagaatctgc 180
ttaggggttag gcgtttttgcg ctgcttcgcg atgtacgggc cagatatacg cgttgacatt 240
gattattgac tagttattaa tagtaataca ttacgggggc attagtccat agcccatata 300
tggagttccg cgttacataa cttacggtaa atggcccgcc tggctgaccg cccaacgacc 360
cccgcccatg gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt aacgcccaata gggactttcc 420
attgacgtca atgggtggag tatttacggt aaactgccc cttggcagta catcaagtgt 480
atcatatgcc aagtaacgcc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt 540
atgccagta catgacctta tgggaacttc ctacttgcca gtacatctac gtattagtca 600
tcgctattac catggtgatg cggttttggc agtacatcaa tgggagtttg ttttggcacc 660
actcacgggg atttccaagt ctccacccca ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc 720
aaaatcaacg ggactttcca aaatgtcgta acaactccgc cccattgacg caaatgggcg 780
gtaggcgtgt acgggtggag gtctatataa gcagagctct ctggctaact agagaaccca 840
ctgcttactg gcttatcgaa attaatacga ctactatag ggagacccaa gcttggtacc 900
tctagagccg ccgcc atg ggc aga aag caa aac aaa aga gga gga aat gaa 951
Met Gly Arg Lys Gln Asn Lys Arg Gly Gly Asn Glu 20
1 5 10

ggc tca atc atg tgg ctg gcg agc ttg gca gtt gtc ata gct tgt gcg 999
Gly Ser Ile Met Trp Leu Ala Ser Leu Ala Val Val Ile Ala Cys Ala
15 20 25

gga gcc atg aag ttg tgg aat ttc cag ggg aag ctt ttg atg acc atc 1047
Gly Ala Met Lys Leu Ser Asn Phe Gln Gly Lys Leu Leu Met Thr Ile
30 35 40

aac aac acg gac att gca gac gtt atc gtg att ccc acc tca aaa gga 1095
Asn Asn Thr Asp Ile Ala Asp Val Ile Val Ile Pro Thr Ser Lys Gly
45 50 55 60

gag aac aga tgc tgg gtc cgg gca atc gac gtc ggc tac atg tgt gag 1143
Glu Asn Arg Cys Trp Val Arg Ala Ile Asp Val Gly Tyr Met Cys Glu
65 70 75 30

gac act atc acg tac gaa tgt cct aag ctt acc atg ggc aat gat cca 1191
Asp Thr Ile Thr Tyr Glu Cys Pro Lys Leu Thr Met Gly Asn Asp Pro
80 85 90

gag gat gtg gat tgc tgg tgt gac aac caa gaa gtc tac gtc caa tat 1239
Glu Asp Val Asp Cys Trp Cys Asp Asn Gln Glu Val Tyr Val Gln Tyr
95 100 105

gga cgg tgc acg cgg acc agg cat tcc aag cga agc agg aga tcc gtg	1287
Gly Arg Cys Thr Arg Thr Arg His Ser Lys Arg Ser Arg Arg Ser Val	
110 115 120	
tcg gtc caa aca cat ggg gag agt tca cta gtg aat aaa aaa gag gct	1335
Ser Val Gln Thr His Gly Glu Ser Ser Leu Val Asn Lys Lys Glu Ala	
125 130 135 140	
tgg ctg gat tca acg aaa gcc aca cga tat ctc atg aaa act gag aac	1383
Trp Leu Asp Ser Thr Lys Ala Thr Arg Tyr Leu Met Lys Thr Glu Asn	
145 150 155	
tgg atc ata agg aat cct ggc tat gct ttc ctg gcg gcg gta ctt ggc	1431
Trp Ile Ile Arg Asn Pro Gly Tyr Ala Phe Leu Ala Ala Val Leu Gly	
160 165 170	
tgg atg ctt ggc agt aac aac ggt caa cgc gtg gta ttt acc atc ctc	1479
Trp Met Leu Gly Ser Asn Asn Gly Gln Arg Val Val Phe Thr Ile Leu	
175 180 185	
ctg ctg ttg gtc gct ccg gct tac agt ttt aat tgt ctg gga atg ggc	1527
Leu Leu Leu Val Ala Pro Ala Tyr Ser Phe Asn Cys Leu Gly Met Gly	
190 195 200	
aat cgt gac ttc ata gaa gga gcc agt gga gcc act tgg gtg gac ttg	1575
Asn Arg Asp Phe Ile Glu Gly Ala Ser Gly Ala Thr Trp Val Asp Leu	
205 210 215 220	
gtg ctg gaa gga gat agc tgc ttg aca atc atg gca aac gac aaa cca	1623
Val Leu Glu Gly Asp Ser Cys Leu Thr Ile Met Ala Asn Asp Lys Pro	
225 230 235	
aca ttg gac gtc cgc atg att aac atc gaa gct agc caa ctt gct gag	1671
Thr Leu Asp Val Arg Met Ile Asn Ile Glu Ala Ser Gln Leu Ala Glu	
240 245 250	
gtc aga agt tac tgc tat cat gct tca gtc act gac atc tcg acg gtg	1719
Val Arg Ser Tyr Cys Tyr His Ala Ser Val Thr Asp Ile Ser Thr Val	
255 260 265	
gct cgg tgc ccc acg act gga gaa gcc cac aac gag aag cga gct gat	1767
Ala Arg Cys Pro Thr Thr Gly Glu Ala His Asn Glu Lys Arg Ala Asp	
270 275 280	
agt agc tat gtg tgc aaa caa ggc ttc act gac cgt ggg tgg ggc aac	1815
Ser Ser Tyr Val Cys Lys Gln Gly Phe Thr Asp Arg Gly Trp Gly Asn	
285 290 295 300	
gga tgt gga ctt ttc ggg aag gga agc att gac aca tgt gca aaa ttc	1863
Gly Cys Gly Leu Phe Gly Lys Gly Ser Ile Asp Thr Cys Ala Lys Phe	
305 310 315	
tcc tgc acc agt aaa gcg att ggg aga aca atc cag cca gaa aac atc	1911
Ser Cys Thr Ser Lys Ala Ile Gly Arg Thr Ile Gln Pro Glu Asn Ile	
320 325 330	
aaa tac gaa gtt ggc att ttt gtg cat gga acc acc act tcg gaa aac	1959
Lys Tyr Glu Val Gly Ile Phe Val His Gly Thr Thr Thr Ser Glu Asn	
335 340 345	

10

20

30

cat ggg aat tat tca gcg caa gtt ggg gcg tcc cag gcg gca aag ttt His Gly Asn Tyr Ser Ala Gln Val Gly Ala Ser Gln Ala Ala Lys Phe 350 355 360	2007
aca gta aca ccc aat gct cct tcg ata acc ctc aaa ctt ggt gac tac Thr Val Thr Pro Asn Ala Pro Ser Ile Thr Leu Lys Leu Gly Asp Tyr 365 370 375 380	2055
gga gaa gtc aca ctg gac tgt gag cca agg agt gga ctg aac act gaa Gly Glu Val Thr 385 Asp Cys Glu Pro Arg Ser Gly Leu Asn Thr Glu 395	2103
gcg ttt tac gtc atg acc gtg ggg tca aag tca ttt ctg gtc cat agg Ala Phe Tyr 400 Met Thr Val Gly Ser Lys Ser Phe Leu Val His Arg 410	2151
gag tgg ttt cat gac ctc gct ctc ccc tgg acg tcc cct tcg agc aca Glu Trp Phe His Asp Leu Ala Leu Pro Trp Thr Ser Pro Ser Ser Thr 415 420 425	2199
gcg tgg aga aac aga gaa ctc ctc atg gaa ttt gaa gag gcg cac gcc Ala Trp Arg Asn Arg Glu Leu Met Glu Phe Glu Glu Ala His Ala 430 435 440	2247
aca aaa cag tcc gtt gtt gct ctt ggg tca cag gaa gga ggc ctc cat Thr Lys Gln Ser Val Val Ala Leu Gly Ser Gln Glu Gly Gly Leu His 445 450 455 460	2295
cag gcg ttg gca gga gcc atc gtg gtg gag tac tca agc tca gtg aag Gln Ala Leu Ala Gly Ala Ile Val Val Glu Tyr Ser Ser Ser Val Lys 465 470 475	2343
tta aca tca ggc cac ctg aaa tgt agg ctg aaa atg gac aaa ctg gct Leu Thr Ser Gly His Leu Lys Cys Arg Leu Lys Met Asp Lys Leu Ala 480 485 490	2391
ctg aaa ggc aca acc tat ggc atg tgt aca gaa aaa ttc tcg ttc gcg Leu Lys Gly Thr Thr Tyr Gly Met Cys Thr Glu Lys Phe Ser Phe Ala 495 500 505	2439
aaa aat ccg gcg gac act ggt cac gga aca gtt gtc att gaa ctc tcc Lys Asn Pro Ala Asp Thr Gly His Gly Thr Val Val Ile Glu Leu Ser 510 515 520	2487
tac tct ggg agt gat ggc ccc tgc aaa att ccg att gct tcc gtt gcg Tyr Ser Gly Ser Asp Gly Pro Cys Lys Ile Pro Ile Ala Ser Val Ala 525 530 535 540	2535
agc ctc aat gac atg acc ccc gtt ggg cgg ctg gtg aca gtg aac ccc Ser Leu Asn Asp Met Thr Pro Val Gly Arg Leu Val Thr Val Asn Pro 545 550 555	2583
ttc gtc gcg act tcc agt gcc agc tca aag gtg ctg gtc gag atg gaa Phe Val Ala Thr Ser Ser Ala Ser Ser Lys Val Leu Val Glu Met Glu 560 565 570	2631
ccc ccc ttc gga gac tcc tac atc gta gtt gga agg gga gac aag cag Pro Pro Phe Gly Asp Ser Tyr Ile Val Val Gly Arg Gly Asp Lys Gln 575 580 585	2679

10

20

30

atc aac cac cat tgg cac aaa gct gga agc acg ctg ggc aag gcc ttt 2727
 Ile Asn His His Trp His Lys Ala Gly Ser Thr Leu Gly Lys Ala Phe
 590 595 600

tca aca act ttg aag gga gct caa aga ctg gca gcg ttg ggc gac aca 2775
 Ser Thr Thr Leu Lys Gly Ala Gln Arg Leu Ala Leu Gly Asp Thr
 605 610 615 620

gcc tgg gac ttt ggc tct att gga ggg gtc ttc aac tcc ata gga aaa 2823
 Ala Trp Asp Phe Gly Ser Ile Gly Gly Val Phe Asn Ser Ile Gly Lys
 625 630 635

gcc gtt cac caa gtg ttt ggt ggt gcc ttc aga aca ctc ttt ggg gga 2871
 Ala Val His Gln Val Phe Gly Gly Ala Phe Arg Thr Leu Phe Gly Gly
 640 645 650

atg tct tgg atc aca caa ggg cta atg ggt gcc cta ctg ctc tgg atg 2919
 Met Ser Trp Ile Thr Gln Gly Leu Met Gly Ala Leu Leu Leu Trp Met
 655 660 665

ggc gtc aac gca cga gac cga tca att gct ttg gcc ttc tta gcc aca 2967
 Gly Val Asn Ala Arg Asp Arg Ser Ile Ala Leu Ala Phe Leu Ala Thr
 670 675 680

ggg ggt gtg ctc gtg ttc tta gcg acc aat gtg cat gct t aattagtttg 3017
 Gly Gly Val Leu Val Phe Leu Ala Thr Asn Val His Ala
 685 690 695

agcggcgct cgagcatgca tctagagggc cctattctat agtgtcacct aaatgctaga 3077
 gctcgtgat cagcctcgac tgtgcttct agttgccagc catctgttgt ttgccccctcc 3137
 cccgtgctt ccttgacctt ggaaggtgcc actccactg tccctttccta ataaaaatgag 3197
 gaaattgcat cgcattgtct gagtaggtgt cattctattc tgggggggtgg ggtggggcag 3257
 gacagcaagg gggaggattg ggaagacaat agcaggcatg ctgggggatgc ggtgggctct 3317
 atggcttctg aggcggaaaag aaccagctgc attaatgaat cggccaacgc gcggggagag 3377
 gcggtttgctg tattgggcgc tcttcgcctt cctcgtctac tgactcgtg cgcctcggtcg 3437
 ttcggctgcg gcgagcggta tcaagctcact caaaggcggg aatacgggta tccacagaat 3497
 caggggataa cgcaggaaaag aacatgtgag caaaaggcca gcaaaaggcc aggaaccgta 3557
 aaaaggccgc gttgctggcg tttttccata ggctccgccc cctcgacgag catcacaaaa 3617
 atcgacgctc aagtcagagg tggcgaaacc cgacaggact ataaagatac caggcgtttc 3677
 cccctggaag ctccctcgtg cgcctctctg ttccgaccct gccgcttacc ggataacctgt 3737
 ccgccttctt ccttcgggga agcgtggcgc tttctcatag ctacagctgt aggtatctca 3797
 gtccggtgta ggtcgttcgc tccaagctgg gctgtgtgca cgaacccccc gttcagcccg 3857
 accgctgcgc cttatccggg aactatcgtc ttgagtcaca cccggtaaga cagcacttat 3917
 cgccactggc agcagccact ggtaacagga ttagcagagc gaggtatgta ggcggtgcta 3977
 cagagttctt gaagtgggtg cctaactacg gctacactag aagaacagta tttgggtatct 4037
 gcgctctgct gaagccagtt accttcggaa aaagagttgg tagctcttga tccggcaaac 4097
 aaaccaccgc tggtagcggg ggtttttttg tttgcaagca gcagattacg cgcagaaaaa 4157
 aaggatctca agaagatcct ttgatctttt ctacggggtc tgacgctcag tggaaacgaa 4217
 actcagttta agggattttg gtcattgagat tatcaaaaag gatcttcacc tagatccttt 4277
 taaattaaaa atgaagtttt aaatcaatct aaagtatata tgagtaaaact tggcttgaca 4337
 gttaccaatg cttaatcagt gaggcaccta tctcagcgat ctgtctatctt cgttcatcca 4397
 tagttgcctg actcccgctc gtgtagataa ctacgatacg ggagggctta ccatctggcc 4457
 coagtgctgc aatgataccg cgagaccac gctcaccggc tccagattta tcagcaataa 4517
 accagccagc cggaaaggcc gagcgcagaa gtggctctgc aactttatcc gccctccatcc 4577
 agtctattaa ttgttgccgg gaagctagag taagtagtct gccagttaat agtttgcgca 4637
 acgttggtgc cattgctaca ggcacgtgtg tgtcacgctc gtcgttttgt atggcttcat 4697
 tcagctcggg ttcccaacga tcaaggcgag ttacatgac ccccatgttg tgcaaaaaag 4757
 cggttagctc cttcggctct ccgacgtgtg tcagaagtaa gttggccgca gtgttatcac 4817
 tcatggttat ggcagcactg cataattctc ttactgtcat gccatccgta agatgctttt 4877
 ctgtgactgg tgagtactca accaagtcac tctgagaata gtgtatgcgg cgaccaggtt 4937
 gctcttgccc ggcgtcaata cgggataata ccgcgccaca tagcagaact ttaaaagtgc 4997

10

20

30

```

tcattcattgg aaaacgttct tcggggcgaa aactctcaag gatcttaccg ctgttgagat 5057
ccagttcgat gtaaccact cgtgcacca actgatcttc agcatctttt actttcacca 5117
gcgtttcttg gtgagcaaaa acaggaaggc aaaatgccgc aaaaaaggga ataaggcgga 5177
cacggaaatg ttgaatactc atactcttcc tttttcaata ttattgaagc atttatcagg 5237
gttattgtct catgagcgga tacatatttg aatgtattta gaaaaataaa caaatagggg 5297
ttccgcgcac atttccccga aaagtgccac ctgacgt 5334

```

<210> 18
 <211> 697
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of artificial sequence; note =
 synthetic construct

<223> pCBJE 1-14

<400> 18

Met	Gly	Arg	Lys	Gln	Asn	Lys	Arg	Gly	Gly	Asn	Glu	Gly	Ser	Ile	Met
1			5					10					15		
Trp	Leu	Ala	Ser	Leu	Ala	Val	Val	Ile	Ala	Cys	Ala	Gly	Ala	Met	Lys
			20					25					30		
Leu	Ser	Asn	Phe	Gln	Gly	Lys	Leu	Leu	Met	Thr	Ile	Asn	Asn	Thr	Asp
			35				40					45			
Ile	Ala	Asp	Val	Ile	Val	Ile	Pro	Thr	Ser	Lys	Gly	Glu	Asn	Arg	Cys
			50			55					60				
Trp	Val	Arg	Ala	Ile	Asp	Val	Gly	Tyr	Met	Cys	Glu	Asp	Thr	Ile	Thr
65					70				75					80	
Tyr	Glu	Cys	Pro	Lys	Leu	Thr	Met	Gly	Asn	Asp	Pro	Glu	Asp	Val	Asp
				85				90						95	
Cys	Trp	Cys	Asp	Asn	Gln	Glu	Val	Tyr	Val	Gln	Tyr	Gly	Arg	Cys	Thr
			100					105					110		
Arg	Thr	Arg	His	Ser	Lys	Arg	Ser	Arg	Arg	Ser	Val	Ser	Val	Gln	Thr
			115					120					125		
His	Gly	Glu	Ser	Ser	Leu	Val	Asn	Lys	Lys	Glu	Ala	Trp	Leu	Asp	Ser
			130			135					140				
Thr	Lys	Ala	Thr	Arg	Tyr	Leu	Met	Lys	Thr	Glu	Asn	Trp	Ile	Ile	Arg
145					150					155				160	
Asn	Pro	Gly	Tyr	Ala	Phe	Leu	Ala	Ala	Val	Leu	Gly	Trp	Met	Leu	Gly
				165					170					175	
Ser	Asn	Asn	Gly	Gln	Arg	Val	Val	Phe	Thr	Ile	Leu	Leu	Leu	Leu	Val
			180					185					190		
Ala	Pro	Ala	Tyr	Ser	Phe	Asn	Cys	Leu	Gly	Met	Gly	Asn	Arg	Asp	Phe
			195				200						205		
Ile	Glu	Gly	Ala	Ser	Gly	Ala	Thr	Trp	Val	Asp	Leu	Val	Leu	Glu	Gly
			210			215					220				
Asp	Ser	Cys	Leu	Thr	Ile	Met	Ala	Asn	Asp	Lys	Pro	Thr	Leu	Asp	Val
225					230					235				240	
Arg	Met	Ile	Asn	Ile	Glu	Ala	Ser	Gln	Leu	Ala	Glu	Val	Arg	Ser	Tyr
				245					250					255	
Cys	Tyr	His	Ala	Ser	Val	Thr	Asp	Ile	Ser	Thr	Val	Ala	Arg	Cys	Pro
			260					265					270		
Thr	Thr	Gly	Glu	Ala	His	Asn	Glu	Lys	Arg	Ala	Asp	Ser	Ser	Tyr	Val
			275				280					285			
Cys	Lys	Gln	Gly	Phe	Thr	Asp	Arg	Gly	Trp	Gly	Asn	Gly	Cys	Gly	Leu
			290			295					300				
Phe	Gly	Lys	Gly	Ser	Ile	Asp	Thr	Cys	Ala	Lys	Phe	Ser	Cys	Thr	Ser
305					310					315				320	
Lys	Ala	Ile	Gly	Arg	Thr	Ile	Gln	Pro	Glu	Asn	Ile	Lys	Tyr	Glu	Val
				325					330					335	

10

20

30

Gly Ile Phe Val His Gly Thr Thr Thr Ser Glu Asn His Gly Asn Tyr
 340 345 350
 Ser Ala Gln Val Gly Ala Ser Gln Ala Ala Lys Phe Thr Val Thr Pro
 355 360 365
 Asn Ala Pro Ser Ile Thr Leu Lys Leu Gly Asp Tyr Gly Glu Val Thr
 370 375 380
 Leu Asp Cys Glu Pro Arg Ser Gly Leu Asn Thr Glu Ala Phe Tyr Val
 385 390 395 400
 Met Thr Val Gly Ser Lys Ser Phe Leu Val His Arg Glu Trp Phe His
 405 410 415
 Asp Leu Ala Leu Pro Trp Thr Ser Pro Ser Ser Thr Ala Trp Arg Asn
 420 425 430
 Arg Glu Leu Leu Met Glu Phe Glu Glu Ala His Ala Thr Lys Gln Ser
 435 440 445
 Val Val Ala Leu Gly Ser Gln Glu Gly Gly Leu His Gln Ala Leu Ala
 450 455 460
 Gly Ala Ile Val Val Glu Tyr Ser Ser Ser Val Lys Leu Thr Ser Gly
 465 470 475 480
 His Leu Lys Cys Arg Leu Lys Met Asp Lys Leu Ala Leu Lys Gly Thr
 485 490 495
 Thr Tyr Gly Met Cys Thr Glu Lys Phe Ser Phe Ala Lys Asn Pro Ala
 500 505 510
 Asp Thr Gly His Gly Thr Val Val Ile Glu Leu Ser Tyr Ser Gly Ser
 515 520 525
 Asp Gly Pro Cys Lys Ile Pro Ile Ala Ser Val Ala Ser Leu Asn Asp
 530 535 540
 Met Thr Pro Val Gly Arg Leu Val Thr Val Asn Pro Phe Val Ala Thr
 545 550 555 560
 Ser Ser Ala Ser Ser Lys Val Leu Val Glu Met Glu Pro Pro Phe Gly
 565 570 575
 Asp Ser Tyr Ile Val Val Gly Arg Gly Asp Lys Gln Ile Asn His His
 580 585 590
 Trp His Lys Ala Gly Ser Thr Leu Gly Lys Ala Phe Ser Thr Thr Leu
 595 600 605
 Lys Gly Ala Gln Arg Leu Ala Ala Leu Gly Asp Thr Ala Trp Asp Phe
 610 615 620
 Gly Ser Ile Gly Gly Val Phe Asn Ser Ile Gly Lys Ala Val His Gln
 625 630 635 640
 Val Phe Gly Gly Ala Phe Arg Thr Leu Phe Gly Gly Met Ser Trp Ile
 645 650 655
 Thr Gln Gly Leu Met Gly Ala Leu Leu Trp Met Gly Val Asn Ala
 660 665 670
 Arg Asp Arg Ser Ile Ala Leu Ala Phe Leu Ala Thr Gly Gly Val Leu
 675 680 685
 Val Phe Leu Ala Thr Asn Val His Ala
 690 695

10

20

<210> 19
 <211> 5283
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

30

<220>
 <223> Description of artificial sequence; note =
 synthetic construct

<221> CDS
 <222> (910)...(2965)

<400> 19
 gacggatcgg gagatctccc gatccctat ggtcgactct cagtacaatc tgctctgatg

60

```

ccgcatagtt aagccagtat ctgctccctg cttgtgtgtt ggaggtcgt gagtagtgcg 120
cgagcaaaat ttaagctaca acaaggcaag gcttgaccga caattgcatg aagaatctgc 180
ttagggtagt gcgttttgcg ctgcttcgag atgtacgggc cagatatacg cgttgacatt 240
gattattgac tagttattaa tagtaatcaa ttacgggggc attagtccat agcccatata 300
tggagttccg cgttacataa cttacggtaa atggcccggc tggctgaccg cccaacgacc 360
cccgccatt gacgtcaata atgacgtatg tccccatagt aacgccaaata gggactttcc 420
attgacgtca atgggtggac tatttacggt aaactgccc cttggcagta catcaagtgt 480
atcatatgcc aagracgccc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt 540
atgccacgta catgacctta tgggactttc ctacttggca gtacatctac gtattagtca 600
tcgctattac catggtgatg cggttttggc agtacatcaa tgggcgtgga tagcgggttg 660
actcacgggg atttccaagt ctccacccca ttgacgtcaa tgggagtgtg ttttggcacc 720
aaaatcaacg ggactttcca aaatgtcgta acaactccgc cccattgacg caaatgggag 780
gtaggcgtgt acggtgggag gtctatataa gcagagctct ctggctaact agagaaccca 840
ctgcttactg gcttatcgaa attaatacga ctactatag ggagacccaa gcttggtacc 900
gcgcgcgcc atg ggc aag agg tcc gcc ggc tca atc atg tgg ctg gcg agc 951
Met Gly Lys Arg Ser Ala Gly Ser Ile Met Trp Leu Ala Ser
1 5 10

```

10

```

ttg gca gtt gtc ata gct ggt aca agc gct acc acc atc cac cgg gac 999
Leu Ala Val Val Ile Ala Gly Thr Ser Ala Thr Thr Ile His Arg Asp
15 20 25 30

```

```

agg gaa gga tac atg gtt atg cgg gcc agt gga agg gac gct gca agc 1047
Arg Glu Gly Tyr Met Val Met Arg Ala Ser Gly Arg Asp Ala Ala Ser
35 40 45

```

```

cag gtc agg gta caa aac gga acg tgc gtc atc ctg gca aca gac atg 1095
Gln Val Arg Val Gln Asn Gly Thr Cys Val Ile Leu Ala Thr Asp Met
50 55 60

```

```

gga gag tgg tgt gaa gat tca atc acc tac tct tgc gtc acg att gac 1143
Gly Glu Trp Cys Glu Asp Ser Ile Thr Tyr Ser Cys Val Thr Ile Asp
65 70 75

```

20

```

cag gag gaa gaa ccc gtt gac gtg gac tgc ttc tgc cga ggt gtt gat 1191
Gln Glu Glu Glu Pro Val Asp Val Asp Cys Phe Cys Arg Gly Val Asp
80 85 90

```

```

agg gtt aag tta gag tat gga cgc tgt gga agg caa gct gga tct agg 1239
Arg Val Lys Leu Glu Tyr Gly Arg Cys Gly Arg Gln Ala Gly Ser Arg
95 100 105 110

```

```

ggg aaa agg tct gtg gtc att cca aca cat gca caa aaa gac atg gtc 1287
Gly Lys Arg Ser Val Val Ile Pro Thr His Ala Gln Lys Asp Met Val
115 120 125

```

```

ggg cga ggt cat gca tgg ctt aaa ggt gac aat att cga gat cat gtc 1335
Gly Arg Gly His Ala Trp Leu Lys Gly Asp Asn Ile Arg Asp His Val
130 135 140

```

30

```

acc cga gtc gag ggc tgg atg tgg aag aac aag ctt cta act gcc gcc 1383
Thr Arg Val Glu Gly Trp Met Trp Lys Asn Lys Leu Leu Thr Ala Ala
145 150 155

```

```

att gtg gcc ttg gct tgg ctg atg gtt gat agt tgg atg gcc aga gtg 1431
Ile Val Ala Leu Ala Trp Leu Met Val Asp Ser Trp Met Ala Arg Val
160 165 170

```

```

act gtc atc ctg ttg gcg ttg agt cta ggg cca gtg tac gcc acg agg 1479
Thr Val Ile Leu Leu Ala Leu Ser Leu Gly Pro Val Tyr Ala Thr Arg
175 180 185 190

```

tgc acg cat ctt gag aac aga gat ttt gtg aca gga act caa ggg acc Cys Thr His Leu Glu Asn Arg Asp Phe Val Thr Gly Thr Gln Gly Thr 195 200 205	1527
acc aga gtg tcc cta gtt ttg gaa ctt gga ggc tgc gtg acc atc aca Thr Arg Val Ser Leu Val Leu Glu Leu Gly Gly Cys Val Thr Ile Thr 210 215 220	1575
gct gag ggc aag cca tcc att gat gta tgg ctc gaa gac att ttt cag Ala Glu Gly Lys Pro Ser Ile Asp Val Trp Leu Glu Asp Ile Phe Gln 225 230 235	1623
gaa agc ccg gct gaa acc aga gaa tac tgc ctg cac gcc aaa ttg acc Glu Ser Pro Ala Glu Thr Arg Glu Tyr Cys Leu His Ala Lys Leu Thr 240 245 250	1671
aac aca aaa gtg gag gct cgc tgt cca acc act gga ccg gcg aca ctt Asn Thr Lys Val Glu Ala Arg Cys Pro Thr Thr Gly Pro Ala Thr Leu 255 260 265 270	1719
ccg gag gag cat cag gct aat atg gtg tgc aag aga gac caa agc gac Pro Glu Glu His Ala Asn Met Val Cys Lys Arg Asp Gln Ser Asp 275 280 285	1767
cgt gga tgg gga aac cac tgc ggg ttt ttt ggg aag ggc agt ata gtg Arg Gly Trp Gly Asn His Cys Gly Phe Phe Gly Lys Gly Ser Ile Val 290 295 300	1815
gct tgt gca aag ttt gaa tgc gag gaa gca aaa aaa gct gtg ggc cac Ala Cys Ala Lys Phe Glu Cys Glu Ala Lys Lys Ala Val Gly His 305 310 315	1863
gtc tat gac tcc aca aag atc acg tat gtt gtc aag gtt gag ccc cac Val Tyr Asp Ser Thr Lys Ile Thr Tyr Val Val Lys Val Glu Pro His 320 325 330	1911
aca ggg gat tac ttg gct gca aat gag acc aat tca aac agg aaa tca Thr Gly Asp Tyr Leu Ala Ala Asn Glu Thr Asn Ser Asn Arg Lys Ser 335 340 345 350	1959
gca cag ttt acg gtg gca tcc gag aaa gtg atc ctg cgg ctc ggc gac Ala Gln Phe Thr Val Ala Ser Glu Lys Val Ile Leu Arg Leu Gly Asp 355 360 365	2007
tat gga gat gtg tgc ctg acg tgt aaa gtg gca agt ggg att gat gtc Tyr Gly Asp Val Ser Leu Thr Cys Lys Val Ala Ser Gly Ile Asp Val 370 375 380	2055
gcc caa act gtg gtg atg tca ctc gac agc agc aag gac cac ctg cct Ala Gln Thr Val Val Met Ser Leu Asp Ser Ser Lys Asp His Leu Pro 385 390 395	2103
tct gca tgg caa gtg cac cgt gac tgg ttt gag gac ttg gcg ctg ccc Ser Ala Trp Gln Val His Arg Asp Trp Phe Glu Asp Leu Ala Leu Pro 400 405 410	2151
tgg aaa cac aag gac aac caa gat tgg aac agt gtg gag aaa ctt gtg Trp Lys His Lys Asp Asn Gln Asp Trp Asn Ser Val Glu Lys Leu Val 415 420 425 430	2199

10

20

30

gaa ttt gga cca cca cat gct gtg aaa atg gat gtt ttc aat ctg ggg 2247
 Glu Phe Gly Pro Pro His Ala Val Lys Met Asp Val Phe Asn Leu Gly
 435 440 445

gac cag acg gct gtg ctg ctc aaa tca ctg gca gga gtt ccg ctg gcc 2295
 Asp Gln Thr Ala Val Leu Leu Lys Ser Leu Ala Gly Val Pro Leu Ala
 450 455 460

agt gtg gag ggc cag aaa tac cac ctg aaa agc ggc cat gtt act tgt 2343
 Ser Val Gly Gln Lys Tyr His Leu Lys Ser Gly His Val Thr Cys
 465 470 475

gat gtg gga ctg gaa aag ctg aaa ctg aaa ggc aca acc tac tcc atg 2391
 Asp Val Gly Leu Glu Lys Phe Lys Leu Lys Gly Thr Thr Tyr Ser Met
 480 485 490

tgt gac aaa gca aag ttc aaa tgg aag aga gtt cct gtg gac agc ggc 2439
 Cys Asp Lys Ala Lys Phe Lys Trp Lys Arg Val Pro Val Asp Ser Gly
 495 500 505 510

cat gac aca gta gtc atg gag gta tca tac aca gga agc gac aag cca 2487
 His Asp Thr Val Met Glu Val Ser Tyr Thr Gly Ser Asp Lys Pro
 515 520 525

tgt cgg atc ccg gtg cgg gct gtg gca cat ggt gtc cca gcg gtt aat 2535
 Cys Arg Ile Pro Val Arg Ala Val Ala His Gly Val Pro Ala Val Asn
 530 535 540

gta gcc atg ctc ata acc ccc aat cca acc att gaa aca aat ggt ggc 2583
 Val Ala Met Leu Ile Thr Pro Asn Pro Thr Ile Glu Thr Asn Gly Gly
 545 550 555

gga ttc ata gaa atg cag ctg cca cca ggg gat aac atc atc tat gtg 2631
 Gly Phe Ile Glu Met Gln Leu Pro Pro Gly Asp Asn Ile Ile Tyr Val
 560 565 570

gga gac ctt agc cag cag tgg ttt cag aaa ggc agt acc att ggt aga 2679
 Gly Asp Leu Ser Gln Gln Trp Phe Gln Lys Gly Ser Thr Ile Gly Arg
 575 580 585 590

atg ttt gaa aaa acc cgc agg gga ttg gaa agg ctc tct gtg gtt gga 2727
 Met Phe Glu Lys Thr Arg Arg Gly Leu Glu Arg Leu Ser Val Val Gly
 595 600 605

gaa cat gca tgg gac ttt ggc tca gta ggc ggg gta ctg tct tct gtg 2775
 Glu His Ala Trp Asp Phe Gly Ser Val Gly Gly Val Leu Ser Ser Val
 610 615 620

ggg aag gca atc cac acg gtg ctg ggg gga gct ttc aac acc ctt ttt 2823
 Gly Lys Ala Ile His Thr Val Leu Gly Gly Ala Phe Asn Thr Leu Phe
 625 630 635

ggg ggg gtt gga ttc atc cct aag atg ctg ctg ggg gtt gct ctg gtc 2871
 Gly Gly Val Gly Phe Ile Pro Lys Met Leu Leu Gly Val Ala Leu Val
 640 645 650

tgg ttg gga cta aat gcc agg aat cca acg atg tcc atg acg ttt ctt 2919
 Trp Leu Gly Leu Asn Ala Arg Asn Pro Thr Met Ser Met Thr Phe Leu
 655 660 665 670

10

20

30

gct gtg ggg gct ttg aca ctg atg atg aca atg gga gtt ggg gca t 2965
 Ala Val Gly Ala Leu Thr Leu Met Met Thr Met Gly Val Gly Ala
 675 680 685

gagcgccgc tcgagcatgc atctagaggg cctatttcta tagtgtcacc taaatgctag 3025
 agctcgctga tcagcctcga ctgtgccttc tagttgccag ccattctgtt tttgccccctc 3085
 ccccggtgct tccttgacct tggaaagggt cactcccaact gtcctttcct aataaaatga 3145
 ggaaattgca tcgcattgtc tgagtaggtg tcattctatt ctgggggggt ggggtggggca 3205
 ggacagcaag ggggagagatt gggaagacaa tagcaggcat gctggggatg cgggtgggctc 3265
 tatggcttct gagggcgaaa gaacagctgc attaatgaat cggccaacgc gcggggagag 3325
 gcgggttgcg tattgggcgc tcttcgcctt cctcgctcac tgactcgctg cgtcgggtcg 3385
 ttccggtgcg gcgagcggta tcagctcact caaaggcggg aatacggtta tccacagaat 3445
 caggggataa cgcaggaaaag aacatgtgag caaaaggcca gcaaaaggcc aggaaccgta 3505
 aaaaggccgc gttgctggcg tttttccata ggctccgccc ccctgacgag catcacaaaa 3565
 atcgacgctc aagtcagagg tggcgaaaacc cgacaggact ataaagatac caggcgtttc 3625
 cccctggaag ctccctcggt cgtctctctg ttccgacctt gccgcttacc ggatacctgt 3685
 ccgcctttct cccttcggga agcgtggcgc tttctcaatg ctccagctgt aggtatctca 3745
 gtccggtgta ggtcgctcgc tccaagctgg gctgtgtgca cgaaccccc gttcagcccc 3805
 accgctgctc ctlatccggt aactatcgtc ttgagtcaca cccggttaaga cagcacttat 3865
 cgccactggc agcagccact ggtaacagga ttagcagagc gaggtatgta ggcgggtgcta 3925
 cagagtctct gaagtgtgtg cctaactacg gctacactag aaggacagta ttggtatct 3985
 gcgctctgtc gaagccaggt accttcggaa aaagagttgg tagctcttga tccggcaaac 4045
 aaaccaccgc tggtagcggg ggtttttttt ttgcaagca gcagattacg cgcagaaaaa 4105
 aaggatctca agaagatcct ttgatctttt ctacggggtc tgacgctcag tggaaacgaaa 4165
 actcacgtta agggattttt gtcattgagat tatcaaaaag gatcttcacc tagatccttt 4225
 taaattaaaa atgaagtttt aaatcaatct aaagtatata tgagtaaac ttggtctgaca 4285
 gttaccaatg cttaatcagt gaggcacctc tctcagcgat ctgtctattt cgttcatcca 4345
 tagttgcctg actccccgct gtgtagataa ctacgatacg ggagggtta ccattctggc 4405
 ccagtgctgc aatgataccg cgagaccac gctcaccggc tccagattta tcagcaataa 4465
 accagccagc cgggaaggcc gagcgcagaa gtggtcctgc aactttatcc gcctccatcc 4525
 agtctattaa ttgttgccgg gaagctagag taagtgttc gccagttaat agtttgccga 4585
 acgttgttgc cattgctaca ggcatcggtg tgtcacgctc gtcgtttggt atggcttcat 4645
 tcagctccgg ttcccaacga tcaaggcgag ttacatgac ccccatgttg tgcaaaaaag 4705
 cgggttagct ctccggtcct ccgatcggtg tcagaagtaa gttggccgca gtgttatcac 4765
 tcatggttat ggcagcactg cataattctc ttactgtcat gccatccgta agatgctttt 4825
 ctgtgactgg tgagtactca accaagtcac tctgagaata gtgtatgcgg cgaccgagtt 4885
 gctcttgccc ggcgtcaata cgggataata ccgcgccaca tagcagaact ttaaaagtgc 4945
 tcatcattgg aaaaagttct tcggggcgaa aactctcaag gatcttaccg ctggtgagat 5005
 ccagttcgat gtaacccact cgtgcacca actgatcttc agcatctttt actttcacca 5065
 gcgtttctgg gtgagcaaaa acaggaaggc aaaatgccgc aaaaaagga ataaggcgga 5125
 cacggaaatg ttgaatactc atactcttc tttttcaata ttattgaagc atttatcagg 5185
 gttattgtct catgagcgga tacatatttg aatgtattta gaaaaataaa caaatagggg 5245
 ttccgcgcac atttccccga aaagtgccac ctgacgctc 5283

<210> 20
 <211> 681
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of artificial sequence; note =
 synthetic construct

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

10

20

30

Val Gly Thr Gly Asn Cys Thr Thr Asn Ile Leu Glu Ala Lys Tyr Trp
 50 55 60
 Cys Pro Asp Ser Met Glu Tyr Asn Cys Pro Asn Leu Ser Pro Arg Glu
 65 70 75 80
 Glu Pro Asp Asp Ile Asp Cys Trp Cys Tyr Gly Val Glu Asn Val Arg
 85 90 95
 Val Ala Tyr Gly Lys Cys Asp Ser Ala Gly Arg Ser Arg Arg Ser Arg
 100 105 110
 Arg Ala Ile Asp Leu Pro Thr His Glu Asn His Gly Leu Lys Thr Arg
 115 120 125
 Gln Glu Lys Trp Met Thr Gly Arg Met Gly Glu Arg Gln Leu Gln Lys
 130 135 140
 Ile Glu Arg Trp Phe Val Arg Asn Pro Phe Phe Ala Val Thr Ala Leu
 145 150 155 160
 Thr Ile Ala Tyr Leu Val Gly Ser Asn Met Thr Gln Arg Val Val Ile
 165 170 175
 Ala Leu Leu Val Leu Ala Val Gly Pro Ala Tyr Ser Ala His Cys Ile
 180 185 190
 Gly Ile Thr Asp Arg Asp Phe Ile Glu Gly Val His Gly Gly Thr Trp
 195 200 205
 Val Ser Ala Thr Leu Glu Gln Asp Lys Cys Val Thr Val Met Ala Pro
 210 215 220
 Asp Lys Pro Ser Leu Asp Ile Ser Leu Glu Thr Val Ala Ile Asp Arg
 225 230 235 240
 Pro Ala Glu Val Arg Lys Val Cys Tyr Asn Ala Val Leu Thr His Val
 245 250 255
 Lys Ile Asn Asp Lys Cys Pro Ser Thr Gly Glu Ala His Leu Ala Glu
 260 265 270
 Glu Asn Glu Gly Asp Asn Ala Cys Lys Arg Thr Tyr Ser Asp Arg Gly
 275 280 285
 Trp Gly Asn Gly Cys Gly Leu Phe Gly Lys Gly Ser Ile Val Ala Cys
 290 295 300
 Ala Lys Phe Thr Cys Ala Lys Ser Met Ser Leu Phe Glu Val Asp Gln
 305 310 315 320
 Thr Lys Ile Gln Tyr Val Ile Arg Ala Gln Leu His Val Gly Ala Lys
 325 330 335
 Gln Glu Asn Trp Thr Thr Asp Ile Lys Thr Leu Lys Phe Asp Ala Leu
 340 345 350
 Ser Gly Ser Gln Glu Val Glu Phe Ile Gly Tyr Gly Lys Ala Thr Leu
 355 360 365
 Glu Cys Gln Val Gln Thr Ala Val Asp Phe Gly Asn Ser Tyr Ile Ala
 370 375 380
 Glu Met Glu Thr Glu Ser Trp Ile Val Asp Arg Gln Trp Ala Gln Asp
 385 390 395 400
 Leu Thr Leu Pro Trp Gln Ser Gly Ser Gly Gly Val Trp Arg Glu Met
 405 410 415
 His His Leu Val Glu Phe Glu Pro Pro His Ala Ala Thr Ile Arg Val
 420 425 430
 Leu Ala Leu Gly Asn Gln Glu Gly Ser Leu Lys Thr Ala Leu Thr Gly
 435 440 445
 Ala Met Arg Val Thr Lys Asp Thr Asn Asp Asn Asn Leu Tyr Lys Leu
 450 455 460
 His Gly Gly His Val Ser Cys Arg Val Lys Leu Ser Ala Leu Thr Leu
 465 470 475 480
 Lys Gly Thr Ser Tyr Lys Ile Cys Thr Asp Lys Met Phe Phe Val Lys
 485 490 495
 Asn Pro Thr Asp Thr Gly His Gly Thr Val Val Met Gln Val Lys Val
 500 505 510
 Ser Lys Gly Ala Pro Cys Arg Ile Pro Val Ile Val Ala Asp Asp Leu
 515 520 525

10

20

30

```

Thr Ala Ala Ile Asn Lys Gly Ile Leu Val Thr Val Asn Pro Ile Ala
530          535          540
Ser Thr Asn Asp Asp Glu Val Leu Ile Glu Val Asn Pro Pro Phe Gly
545          550          555          560
Asp Ser Tyr Ile Ile Val Gly Arg Gly Asp Ser Arg Leu Thr Tyr Gln
          565          570          575
Trp His Lys Glu Gly Ser Ser Ile Gly Lys Leu Phe Thr Gln Thr Met
          580          585          590
Lys Gly Val Glu Arg Leu Ala Val Met Gly Asp Thr Ala Trp Asp Phe
          595          600          605
Ser Ser Ala Gly Gly Phe Phe Thr Ser Val Gly Lys Gly Ile His Thr
          610          615          620
Val Phe Gly Ser Ala Phe Gln Gly Leu Phe Gly Gly Leu Asn Trp Ile
625          630          635          640
Thr Lys Val Ile Met Gly Ala Val Leu Ile Trp Val Gly Ile Asn Thr
          645          650          655
Arg Asn Met Thr Met Ser Met Ser Met Ile Leu Val Gly Val Ile Met
          660          665          670
Met Phe Leu Ser Leu Gly Val Gly Ala
          675          680

```

<210> 21
 <211> S304
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of artificial sequence; note =
 synthetic construct

<221> CDS
 <222> (910)...(2986)

```

<400> 21
gacggatcgg gagatctccc gatccctat ggtcgactct cagtacaatc tgctctgatg      60
ccgcatagtt aagccagtat ctgctccctg cttgtgtgtt ggaggtcgct gagtagtgcg      120
cgagcaaaat ttaagctaca acaaggcaag gcttgaccga caattgcatg aagaatctgc      180
ttagggttag gcgtttttgcg ctgcttcgcg atgtacgggc cagatatacg cgttgacatt      240
gattattgac tagttattaa tagtaatcaa ttacggggtc attagttcat agcccatata      300
tgaggttccg cgttacataa cttacggtaa atggcccgcc tggctgaccg cccaacgacc      360
cccgcccatc gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt aacgccaata gggactttcc      420
attgacgtca atgggtggac tatttacggt aaactgccc cttggcagta catcaagtgt      480
atcatatgcc aagtacgccc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcttggcatt      540
atgcccagta catgacctta tgggactttc ctacttggca gtacatctac gtattagtca      600
tcgctattac catggtgatg cggttttggc agtacatcaa tgggcgtgga tagcggtttg      660
actcacgggg atttccaagt ctccacccca ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc      720
aaaatcaacg ggactttcca aaatgtcgta acaactccgc cccattgacg caaatgggcg      780
gtaggcgtgt acgggtggag gtctatataa gcagagctct ctggctaact agagaaccca      840
ctgcttactg gcttatcgaa attaatcga ctcactatag ggagacccaa gcttgggtacc      900
gccgcgcgcc atg ggc aag agg tcc gcc ggc tca atc atg tgg ctc gcg agc      951
      Met Gly Lys Arg Ser Ala Gly Ser Ile Met Trp Leu Ala Ser
          1          5          10

```

```

ttg gca gtt gtc ata gct ggt aca agc gct ttg cag tta tca acc tat      999
Leu Ala Val Val Ile Ala Gly Thr Ser Ala Leu Gln Leu Ser Thr Tyr
  15          20          25          30

```

```

cag ggg aaa gtg tta atg tca atc aac aag act gac gct caa agc gcc      1047
Gln Gly Lys Val Leu Met Ser Ile Asn Lys Thr Asp Ala Gln Ser Ala
          35          40          45

```

10

20

30

ata aac att cct agt gcc aac gga gca aac act tgc att gtg agg gct Ile Asn Ile Pro Ser Ala Asn Gly Ala Asn Thr Cys Ile Val Arg Ala 50 55 60	1095
cta gat gtg ggg gtc atg tgc aaa gat gac atc aca tac ctg tgc cca Leu Asp Val Gly Val Met Cys Lys Asp Asp Ile Thr Tyr Leu Cys Pro 65 70 75	1143
gtg ctt tca gcg gga aat gat ccc gag gac att gac tgt tgg tgt gac Val Leu Ser Ala Gly Asn Asp Pro Glu Asp Ile Asp Cys Trp Cys Asp 80 85 90	1191
gtc gaa gag gtg tgg gtg cac tac ggc aga tgc acg cgc atg gga cat Val Glu Glu Val Trp Val His Tyr Gly Arg Cys Thr Arg Met Gly His 95 100 105 110	1239
tcg agg cgt agc cga cgg tca atc tct gtg cag cat cat gga gat tcc Ser Arg Arg Ser Arg Arg Ser Ile Ser Val Gln His His Gly Asp Ser 115 120 125	1287
aca ctg gca aca aag aac acg cca tgg ttg gac acc gtg aaa acc acc Thr Leu Ala Thr Lys Asn Thr Pro Leu Asp Thr Val Lys Thr Thr 130 135 140	1335
aaa tac ttg aca aaa gta gaa aac tgg gtt ttg cgc aat cct gga tat Lys Tyr Leu Thr Lys Val Glu Asn Trp Val Leu Arg Asn Pro Gly Tyr 145 150 155	1383
gcc cta gtt gcg ctg gcg att gga tgg atg ctc ggt agc aac aac aca Ala Leu Val Ala Leu Ala Ile Gly Trp Met Leu Gly Ser Asn Asn Thr 160 165 170	1431
cag aga gtg gtt ttt gtg atc atg ctg atg ctg att gct ccg gca tac Gln Arg Val Val Phe Val Ile Met Leu Met Leu Ile Ala Pro Ala Tyr 175 180 185 190	1479
agc ttc aac tgt ctg gga aca tca aac agg gac ttt gtc gag gga gcc Ser Phe Asn Cys Leu Gly Thr Ser Asn Arg Asp Phe Val Glu Gly Ala 195 200 205	1527
agt ggg gca aca tgg att gac ttg gta ctt gaa ggg gga agc tgt gtc Ser Gly Ala Thr Trp Ile Asp Leu Val Leu Glu Gly Gly Ser Cys Val 210 215 220	1575
aca gtg atg gca cca gag aaa cca aca ctg gac ttc aaa gtg atg aag Thr Val Met Ala Pro Glu Lys Pro Thr Leu Asp Phe Lys Val Met Lys 225 230 235	1623
atg gag gct acc gag tta gcc act gtg cgt gag tat tgt tac gaa gca Met Glu Ala Thr Glu Leu Ala Thr Val Arg Glu Tyr Cys Tyr Glu Ala 240 245 250	1671
acc ttg gac acg ctg tca aca gtg gca agg tgc ccc aca aca gga gaa Thr Leu Asp Thr Leu Ser Thr Val Ala Arg Cys Pro Thr Thr Gly Glu 255 260 265 270	1719
gct cac aac acc aaa agg agt gac cca aca ttt gtc tgc aaa aga gat Ala His Asn Thr Lys Arg Ser Asp Pro Thr Phe Val Cys Lys Arg Asp 275 280 285	1767

10

20

30

gtt gtg gac cgc gga tgg ggt aac gga tgt ggt ctg ttt gga aaa ggg 1815
 Val Val Asp Arg Gly Trp Gly Asn Gly Cys Gly Leu Phe Gly Lys Gly
 290 295 300

agc att gac aca tgc gct aag ttc aca tgc aaa aac aag gca aca ggg 1863
 Ser Ile Asp Thr Cys Ala Lys Phe Thr Cys Lys Asn Lys Ala Thr Gly
 305 310 315

aag acg atc ttg aga gaa aac atc aag tat gag gtt gca atc ttt gtg 1911
 Lys Thr Ile Leu Arg Glu Asn Ile Lys Tyr Glu Val Ala Ile Phe Val
 320 325 330

cat ggt tca acg gac tct acg tca cat ggc aat tac tct gag cag att 1959
 His Gly Ser Thr Asp Ser Thr Ser His Gly Asn Tyr Ser Glu Gln Ile
 335 340 345 350

gga aaa aac caa gcg gct aga ttc acc ata agc ccg caa gca ccg tcc 2007
 Gly Lys Asn Gln Ala Ala Arg Phe Thr Ile Ser Pro Gln Ala Pro Ser
 355 360 365

ttt acg gcc aac atg ggc gag tat gga aca gtt acc att gat tgt gaa 2055
 Phe Thr Ala Asn Met Gly Glu Tyr Gly Thr Val Thr Ile Asp Cys Glu
 370 375 380

gca aga tca gga atc aac acg gag gat tat tat gtt ttc act gtc aag 2103
 Ala Arg Ser Gly Ile Asn Thr Glu Asp Tyr Tyr Val Phe Thr Val Lys
 385 390 395

gag aag tca tgg cta gtg aac agg gac tgg ttt cac gac ttg aac ctt 2151
 Glu Lys Ser Trp Leu Val Asn Arg Asp Trp Phe His Asp Leu Asn Leu
 400 405 410

cca tgg acg agc cct gcc aca act gat tgg cgc aac aga gaa aca ctg 2199
 Pro Trp Thr Ser Pro Thr Thr Asp Trp Arg Asn Arg Glu Thr Leu
 415 420 425 430

gtg gaa ttt gag gaa ccg cat gcc acc aag caa act gta gta gcc cta 2247
 Val Glu Phe Glu Glu Pro His Ala Thr Lys Gln Thr Val Val Ala Leu
 435 440 445

gga tgc caa gaa ggt gcc ctg cac aca gca ttg gct gga gcc att cca 2295
 Gly Ser Gln Glu Gly Ala Leu His Thr Ala Leu Ala Gly Ala Ile Pro
 450 455 460

gcc act gtt agc agc tca acc cta acc ttg caa tca ggg cat ttg aaa 2343
 Ala Thr Val Ser Ser Ser Thr Leu Thr Leu Gln Ser Gly His Leu Lys
 465 470 475

tgc aga gct aag ctt gac aag gtc aaa atc aag gga acg aca tat ggc 2391
 Cys Arg Ala Lys Leu Asp Lys Val Lys Ile Lys Gly Thr Thr Tyr Gly
 480 485 490

atg tgt gac tct gcc ttc acc ttc agc aag aac cca act gac aca ggg 2439
 Met Cys Asp Ser Ala Phe Thr Phe Ser Lys Asn Pro Thr Asp Thr Gly
 495 500 505 510

cac ggg aca gtg att gtg gaa ctg cag tat act gga agc aac gga ccc 2487
 His Gly Thr Val Ile Val Glu Leu Gln Tyr Thr Gly Ser Asn Gly Pro
 515 520 525

10

20

30

tgc cga gtt ccc atc tcc gtg act gca aac ctc atg gat ttg aca ccg Cys Arg Val Pro Ile Ser Val Thr Ala Asn Leu Met Asp Leu Thr Pro 530 535 540	2535
gtt gga aga ttg gtc acg gtc aat ccc ttt ata agc aca ggg gga gcg Val Gly Arg Leu Val Thr Val Asn Pro Phe Ile Ser Thr Gly Gly Ala 545 550 555	2583
aac aac aag gtc atg atc gaa gtt gaa cca ccc ttt ggc gat tct tac Asn Asn Lys Val Met Ile Glu Val Glu Pro Pro Phe Gly Asp Ser Tyr 560 565 570	2631
atc gtc gtc gga aga ggc acc acc cag att aac tac cac tgg cac aaa Ile Val Val Gly Arg Gly Thr Thr Gln Ile Asn Tyr His Trp His Lys 575 580 585 590	2679
gag gga agc agc att ggg aag gct ttg gcg acc aca tgg aaa gga gcc Glu Gly Ser Ser Ile Gly Lys Ala Leu Ala Thr Thr Trp Lys Gly Ala 595 600 605	2727
caa cgg cta gcc gtc tta ggg gac aca gcg tgg gac ttt gga tct att Gln Arg Leu Ala Val Leu Gly Asp Thr Ala Trp Asp Phe Gly Ser Ile 610 615 620	2775
gga gga gtt ttc aat tca att ggc aaa gct gtc cac caa gtt ttc gga Gly Gly Val Phe Asn Ser Ile Gly Lys Ala Val His Gln Val Phe Gly 625 630 635	2823
gga gcg ttc agg act ctg ttc ggg gga atg tcc tgg atc aca cag ggg Gly Ala Phe Arg Thr Leu Phe Gly Gly Met Ser Trp Ile Thr Gln Gly 640 645 650	2871
cta ctt gga gct ctt ctc ctg tgg atg ggg ttg cag gcc cgc gac agg Leu Leu Gly Ala Leu Leu Trp Met Gly Leu Gln Ala Arg Asp Arg 655 660 665 670	2919
agc atc tcg ctg act cta ctg gct gtc gga ggg att ctc atc ttt ctg Ser Ile Ser Leu Thr Leu Leu Ala Val Gly Gly Ile Leu Ile Phe Leu 675 680 685	2967
gca acc agc gtg caa gcc t gaggcgccgc tcgagcatgc atctagaggg Ala Thr Ser Val Gln Ala 690	3016
ccctattcta tagtgteacc taaatgctag agctcgtga tcagcctega ctgtgccttc tagttgcag ccattctgtt tttgcccc ccccggtgct tccttgaccc tggaagggtgc cactcccact gtccttttct aataaaatga ggaaattgca tcgcattgtc tgagtaggtg tcattctatt ctgggggggt ggggtggggca ggacagcaag ggggaggatt gggaagacaa tagcaggcat gctggggatg cgggtgggctc tatggcttct gaggcggaaa gaacagctgc attaatgaat cggccaacgc gcggggagag gcggtttgctg tattgggcgc tcttccgctt ctcgcctcac tgactcgtg cgcctggctg ttccgctgcg gcgagcggta tcagctcact caaaggcgg aatacggtta tccacagaat caggggataa cgcaggaaa aacatgtgag caaaaggcca gcaaaaggcc aggaaccgta aaaaggccgc gttgctggcg tttttccata ggctccgccc cctgacgag catcacaaaa atcgacgctc aagtcagagg tggcgaaacc cgacaggact ataaagatac caggcgtttc cccctggaag ctccctcgtg cgctctcctg ttccgaccct gccgcttacc ggatacctgt ccgcctttct ccttccggga agcgtggcgc tttctcaatg ctcacgctgt aggtatctca gttcgggtga ggtcgttcgc tccaagctgg gctgtgtgca cgaaccccc gttcagcccg accgctgcgc cttatccggt aactatcgtc ttgagtccaa cccgtaaga cagcacttat cgcactggc agcagccact ggtaacagga ttagcagagc gaggtatgta ggcggtgcta cagagttctt gaagtgggtg cctaactacg gctacactag aaggacagta tttggatatc gcgctctgct gaagccagtt accttcggaa	3076 3136 3196 3256 3316 3376 3436 3496 3556 3616 3676 3736 3796 3856 3916 3976 4036

10

20

30

```

aaagagttgg tagctcttga tccggcaaac aaaccaccgc tggtagcggg ggtttttttg 4096
tttgcaagca gcagattacg cgcagaaaaa aaggatctca agaagatect ttgatctttt 4156
ctacgggggc tgacgctcag tggaaacgaaa actcacgtta agggattttg gtcattgagat 4216
tatcaaaaaa gatcttccac tagatccttt taaattaaaa atgaagtttt aaatcaatct 4276
aaagtatata tgagtaaaact tgggtctgaca gttaccaatg cttaatcagt gaggcaccta 4336
tctcagcgat ctgtctatct cgttcaccca tagttgcctg actccccgct gtgtagataa 4396
ctacgatacg ggagggttta ccatctggcc ccagtgtctg aatgataccg cgagaccac 4456
gtccaccggc tccagattta tcagcaataa accagccagc cggaaggggc gagcgagaa 4516
gtggtcctgc aactttatcc gccctccatcc agtctattaa ttggttgcgg gaagctagag 4576
taagtagttc gccagttaat agtttgccga acgttgttgc cattgctaca ggcacgtgtg 4636
tgtcacgctc gtctgttggg atggcttcat tcagctccgg ttcccaacga tcaaggcgag 4696
ttacatgata ccccatgttg tgcaaaaaaag cgttagctc ctccggctct cgcacgttg 4756
tcagaagtaa gttggccgca gtgttatcac tcatggttat ggcagcactg cataattctc 4816
ttactgtcat gccatccgta agatgctttt ctgtgactgg tgagtactca accaagtcac 4876
tctgagaata gtgtatgagg cgaccgagtt gctcttgccc ggcgtcaata cgggataata 4936
ccgcgccaca tagcagaact ttaaaagtgc tcatcattgg aaaacgttct tcggggcgaa 4996
aacttccaag gatcttaccg ctgttgagat ccagttcgat gtaaccact cgtgcacca 5056
actgatcttc agcatctttt actttcacca gcgtttctgg gtgagcaaaa acaggaaggc 5116
aaaatgcgc aaaaaaggga ataaggcgca cacggaaatg ttgaatactc atactcttcc 5176
tttttcaata ttattgaagc atttatcagg gttattgtct catgagcgga tacatatttg 5236
aatgtattta gaaaaataaa caaatagggg ttccgcgcac atttcccgga aaagtgccac 5296
ctgacgtc 5304

```

<210> 22

<211> 692

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of artificial sequence; note =
synthetic construct

<400> 22

```

Met Gly Lys Arg Ser Ala Gly Ser Ile Met Trp Leu Ala Ser Leu Ala
1          5          10          15
Val Val Ile Ala Gly Thr Ser Ala Leu Gln Leu Ser Thr Tyr Gln Gly
20          25          30
Lys Val Leu Met Ser Ile Asn Lys Thr Asp Ala Gln Ser Ala Ile Asn
35          40          45
Ile Pro Ser Ala Asn Gly Ala Asn Thr Cys Ile Val Arg Ala Leu Asp
50          55          60
Val Gly Val Met Cys Lys Asp Asp Ile Thr Tyr Leu Cys Pro Val Leu
65          70          75          80
Ser Ala Gly Asn Asp Pro Glu Asp Ile Asp Cys Trp Cys Asp Val Glu
85          90          95
Glu Val Trp Val His Tyr Gly Arg Cys Thr Arg Met Gly His Ser Arg
100         105         110
Arg Ser Arg Arg Ser Ile Ser Val Gln His His Gly Asp Ser Thr Leu
115         120         125
Ala Thr Lys Asn Thr Pro Trp Leu Asp Thr Val Lys Thr Thr Lys Tyr
130         135         140
Leu Thr Lys Val Glu Asn Trp Val Leu Arg Asn Pro Gly Tyr Ala Leu
145         150         155         160
Val Ala Leu Ala Ile Gly Trp Met Leu Gly Ser Asn Asn Thr Gln Arg
165         170         175
Val Val Phe Val Ile Met Leu Met Leu Ile Ala Pro Ala Tyr Ser Phe
180         185         190
Asn Cys Leu Gly Thr Ser Asn Arg Asp Phe Val Glu Gly Ala Ser Gly
195         200         205
Ala Thr Trp Ile Asp Leu Val Leu Gly Gly Ser Cys Val Thr Val
210         215         220

```

10

20

30

Met Ala Pro Glu Lys Pro Thr Leu Asp Phe Lys Val Met Lys Met Glu
 225 230 235 240
 Ala Thr Glu Leu Ala Thr Val Arg Glu Tyr Cys Tyr Glu Ala Thr Leu
 245 250 255
 Asp Thr Leu Ser Thr Val Ala Arg Cys Pro Thr Thr Gly Glu Ala His
 260 265 270
 Asn Thr Lys Arg Ser Asp Pro Thr Phe Val Cys Lys Arg Asp Val Val
 275 280 285
 Asp Arg Gly Trp Gly Asn Gly Cys Gly Leu Phe Gly Lys Gly Ser Ile
 290 295 300
 Asp Thr Cys Ala Lys Phe Thr Cys Lys Asn Lys Ala Thr Gly Lys Thr
 305 310 315 320
 Ile Leu Arg Glu Asn Ile Lys Tyr Glu Val Ala Ile Phe Val His Gly
 325 330 335
 Ser Thr Asp Ser Thr Ser His Gly Asn Tyr Ser Glu Gln Ile Gly Lys
 340 345 350
 Asn Gln Ala Ala Arg Phe Thr Ile Ser Pro Gln Ala Pro Ser Phe Thr
 355 360 365
 Ala Asn Met Gly Glu Tyr Gly Thr Val Thr Ile Asp Cys Glu Ala Arg
 370 375 380
 Ser Gly Ile Asn Thr Glu Asp Tyr Tyr Val Phe Thr Val Lys Glu Lys
 385 390 395 400
 Ser Trp Leu Val Asn Arg Asp Trp Phe His Asp Leu Asn Leu Pro Trp
 405 410 415
 Thr Ser Pro Ala Thr Thr Asp Trp Arg Asn Arg Glu Thr Leu Val Glu
 420 425 430
 Phe Glu Glu Pro His Ala Thr Lys Gln Thr Val Val Ala Leu Gly Ser
 435 440 445
 Gln Glu Gly Ala Leu His Thr Ala Leu Ala Gly Ala Ile Pro Ala Thr
 450 455 460
 Val Ser Ser Ser Thr Leu Thr Leu Gln Ser Gly His Leu Lys Cys Arg
 465 470 475 480
 Ala Lys Leu Asp Lys Val Lys Ile Lys Gly Thr Thr Tyr Gly Met Cys
 485 490 495
 Asp Ser Ala Phe Thr Phe Ser Lys Asn Pro Thr Asp Thr Gly His Gly
 500 505 510
 Thr Val Ile Val Glu Leu Gln Tyr Thr Gly Ser Asn Gly Pro Cys Arg
 515 520 525
 Val Pro Ile Ser Val Thr Ala Asn Leu Met Asp Leu Thr Pro Val Gly
 530 535 540
 Arg Leu Val Thr Val Asn Pro Phe Ile Ser Thr Gly Gly Ala Asn Asn
 545 550 555 560
 Lys Val Met Ile Glu Val Glu Pro Pro Phe Gly Asp Ser Tyr Ile Val
 565 570 575
 Val Gly Arg Gly Thr Thr Gln Ile Asn Tyr His Trp His Lys Glu Gly
 580 585 590
 Ser Ser Ile Gly Lys Ala Leu Ala Thr Thr Trp Lys Gly Ala Gln Arg
 595 600 605
 Leu Ala Val Leu Gly Asp Thr Ala Trp Asp Phe Gly Ser Ile Gly Gly
 610 615 620
 Val Phe Asn Ser Ile Gly Lys Ala Val His Gln Val Phe Gly Gly Ala
 625 630 635 640
 Phe Arg Thr Leu Phe Gly Gly Met Ser Trp Ile Thr Gln Gly Leu Leu
 645 650 655
 Gly Ala Leu Leu Leu Trp Met Gly Leu Gln Ala Arg Asp Arg Ser Ile
 660 665 670
 Ser Leu Thr Leu Leu Ala Val Gly Gly Ile Leu Ile Phe Leu Ala Thr
 675 680 685
 Ser Val Gln Ala
 690

10

20

30

<210> 23
 <211> 5271
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of artificial sequence; note =
 synthetic construct

<221> CDS
 <222> (910)...(2953)

<400> 23
 gagggatcgg gagatctccc gatccctat ggtcgactct cagtacaatc tgctctgatg 60
 ccgcatagtt aagccagtat ctgctccctg cttgtgtgtt ggaggtcgct gagtagtgcg 120
 cgagcaaaat ttaagctaca acaaggcaag gcttgaccga caattgcatg aagaatctgc 180
 ttagggtttag gcgttttgcg ctgcttcgcg atgtacgggc cagatatacg cgttgacatt 240
 gattattgac tagttattaa tagtaatcaa ttacggggtc attagttcat agcccatata 300
 tggagttccg cgttacataa cttacggtaa atggcccgcc tggctgaccg cccaacgacc 360
 cccgcccatt gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt aacgccataa gggactttcc 420
 attgacgtca atgggtggac tatttacggt aaactgccca cttggcagta catcaagtgt 480
 atccatagcc aagtaacgcc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt 540
 atgcccagta catgacctta tgggactttc ctacttggca gtacatctac gtattagtca 600
 tcgctattac catgtgatg cggttttggc agtacatcaa tgggcgtgga tagcggtttg 660
 actcacgggg atttccaagt ctccacccca ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc 720
 aaaatcaacg ggactttcca aaatgtcgta acaactccgc cccattgacg caaatggcg 780
 gtaggcgtgt acggtgggag gtctatataa gcagagctct ctggctaact agagaaccca 840
 ctgcttactg gcttatcgaa attaatagca ctactatag ggagacccaa gcttgggtacc 900
 gccgcgcc atg ggc aag agg tcc gcc ggc tca atc atg tgg ctc gcg agc 951
 Met Gly Lys Arg Ser Ala Gly Ser Ile Met Trp Leu Ala Ser
 1 5 10
 ttg gca gtt gtc ata gct ggt aca agc gct gtg acc ttg gtg cgg aaa 999
 Leu Ala Val Val Ile Ala Gly Thr Ser Ala Val Thr Leu Val Arg Lys
 15 20 25 30
 aac aga tgg ttg ctc cta aat gtg aca tct gag gac ctc ggg aaa aca 1047
 Asn Arg Trp Leu Leu Leu Asn Val Thr Ser Glu Asp Leu Gly Lys Thr
 35 40 45
 ttc tct gtg ggc aca ggc aac tgc aca aca aac att ttg gaa gcc aag 1095
 Phe Ser Val Gly Thr Gly Asn Cys Thr Thr Asn Ile Leu Glu Ala Lys
 50 55 60
 tac tgg tgc cca gac tca atg gaa tac aac tgt ccc aat ctc agt cca 1143
 Tyr Trp Cys Pro Asp Ser Met Glu Tyr Asn Cys Pro Asn Leu Ser Pro
 65 70 75
 aga gag gag cca gat gac att gat tgc tgg tgc tat ggg gtg gaa aac 1191
 Arg Glu Glu Pro Asp Asp Ile Asp Cys Trp Cys Tyr Gly Val Glu Asn
 80 85 90
 gtt aga gtc gca tat ggt aag tgt gac tca gca ggc agg tct agg agg 1239
 Val Arg Val Ala Tyr Gly Lys Cys Asp Ser Ala Gly Arg Ser Arg Arg
 95 100 105 110
 tca aga agg gcc att gac ttg cct acg cat gaa aac cat ggt ttg aag 1287
 Ser Arg Arg Ala Ile Asp Leu Pro Thr His Glu Asn His Gly Leu Lys
 115 120 125

10

20

30

acc cgg caa gaa aaa tgg atg act gga aga atg ggt gaa agg caa ctc 1335
 Thr Arg Gln Glu Lys Trp Met Thr Gly Arg Met Gly Glu Arg Gln Leu
 130 135 140

caa aag att gag aga tgg ttc gtg agg aac ccc ttt ttt gca gtg acg 1383
 Gln Lys Ile Glu Arg Trp Phe Val Arg Asn Pro Phe Phe Ala Val Thr
 145 150 155

gct ctg acc att gcc tac ctt gtg gga agc aac atg acg caa cga gtc 1431
 Ala Leu Thr Ile Ala Tyr Leu Val Gly Ser Asn Met Thr Gln Arg Val
 160 165 170

gtg att gcc cta ctg gtc ttg gct gtt ggt ccg gcc tac tca gct cac 1479
 Val Ile Ala Leu Leu Val Leu Ala Val Gly Pro Ala Tyr Ser Ala His
 175 180 185 190

tgc att gga att act gac agg gat ttc att gag ggg gtg cat gga gga 1527
 Cys Ile Gly Ile Thr Asp Arg Asp Phe Ile Glu Gly Val His Gly Gly
 195 200 205

act tgg gtt tca gct acc ctg gag caa gac aag tgt gtc act gtt atg 1575
 Thr Trp Val Ser Ala Thr Leu Glu Gln Asp Lys Cys Val Thr Val Met
 210 215 220

gcc cct gac aag cct tca ttg gac atc tca cta gag aca gta gcc att 1623
 Ala Pro Asp Lys Pro Ser Leu Asp Ile Ser Leu Glu Thr Val Ala Ile
 225 230 235

gat aga cct gct gag gtg agg aaa gtg tgt tac aat gca gtt ctc act 1671
 Asp Arg Pro Ala Glu Val Arg Lys Val Cys Tyr Asn Ala Val Leu Thr
 240 245 250

cat gtg aag att aat gac aag tgc ccc agc act gga gag gcc cac cta 1719
 His Val Lys Ile Asn Asp Lys Cys Pro Ser Thr Gly Glu Ala His Leu
 255 260 265 270

gct gaa gag aac gaa ggg gac aat gcg tgc aag cgc act tat tct gat 1767
 Ala Glu Glu Asn Glu Gly Asp Asn Ala Cys Lys Arg Thr Tyr Ser Asp
 275 280 285

aga ggc tgg ggc aat ggc tgt ggc cta ttt ggg aaa ggg agc att gtg 1815
 Arg Gly Trp Gly Asn Gly Cys Gly Leu Phe Gly Lys Gly Ser Ile Val
 290 295 300

gca tgc gcc aaa ttc act tgt gcc aaa tcc atg agt ttg ttt gag gtt 1863
 Ala Cys Ala Lys Phe Thr Cys Ala Lys Ser Met Ser Leu Phe Glu Val
 305 310 315

gat cag acc aaa att cag tat gtc atc aga gca caa ttg cat gta ggg 1911
 Asp Gln Thr Lys Ile Gln Tyr Val Ile Arg Ala Gln Leu His Val Gly
 320 325 330

gcc aag cag gaa aat tgg act acc gac att aag act ctc aag ttt gat 1959
 Ala Lys Gln Glu Asn Trp Thr Thr Asp Ile Lys Thr Leu Lys Phe Asp
 335 340 345 350

gcc ctg tca ggc tcc cag gaa gtc gag ttc att ggg tat gga aaa gct 2007
 Ala Leu Ser Gly Ser Gln Glu Val Glu Phe Ile Gly Tyr Gly Lys Ala
 355 360 365

10

20

30

aca ctg gaa tgc cag gtg caa act gcg gtg gac ttt ggt aac agt tac Thr Leu Glu Cys Gln Val Gln Thr Ala Val Asp Phe Gly Asn Ser Tyr 370 375 380	2055
atc gct gag atg gaa aca gag agc tgg ata gtg gac aga cag tgg gcc Ile Ala Glu Met Glu Thr Glu Ser Trp Ile Val Asp Arg Gln Trp Ala 385 390 395	2103
cag gac ttg acc ctg cca tgg cag agt gga agt ggc ggg gtg tgg aga Gln Asp Leu Thr Leu Pro Trp Gln Ser Gly Ser Gly Gly Val Trp Arg 400 405 410	2151
gag atg cat cat ctt gtc gaa ttt gaa cct ccg cat gcc gcc act atc Glu Met His His Leu Val Glu Phe Glu Pro Pro His Ala Ala Thr Ile 415 420 425 430	2199
aga gta ctg gcc ctg gga aac cag gaa ggc tcc ttg aaa aca gct ctt Arg Val Leu Ala Glu Gly Asn Gln Glu Ser Leu Lys Thr Ala Leu 435 440 445	2247
act ggc gca atg agg gtt aca aag gac aca aat gac aac aac ctt tac Thr Gly Ala Met Arg Val Thr Lys Asp Thr Asn Asp Asn Asn Leu Tyr 450 455 460	2295
aaa cta cat ggt gga cat gtt tct tgc aga gtg aaa ttg tca gct ttg Lys Leu His Gly Gly His Val Ser Cys Arg Val Lys Leu Ser Ala Leu 465 470 475	2343
aca ctc aag ggg aca tcc tac aaa ata tgc act gac aaa atg ttt ttt Thr Leu Lys Gly Thr Ser Tyr Lys Ile Cys Thr Asp Lys Met Phe Phe 480 485 490	2391
gtc aag aac cca act gac act ggc cat ggc act gtt gtg atg cag gtg Val Lys Asn Pro Thr Asp Thr Gly His Gly Thr Val Val Met Gln Val 495 500 505 510	2439
aaa gtg tca aaa gga gcc ccc tgc agg att cca gtg ata gta gct gat Lys Val Ser Lys Gly Ala Pro Cys Arg Ile Pro Val Ile Val Ala Asp 515 520 525	2487
gat ctt aca gcg gca atc aat aaa ggc att ttg gtt aca gtt aac ccc Asp Leu Thr Ala Ala Ile Asn Lys Gly Ile Leu Val Thr Val Asn Pro 530 535 540	2535
atc gcc tca acc aat gat gat gaa gtg ctg att gag gtg aac cca cct Ile Ala Ser Thr Asn Asp Asp Glu Val Leu Ile Glu Val Asn Pro Pro 545 550 555	2583
ttt gga gac agc tac att atc gtt ggg aga gga gat tca cgt ctc act Phe Gly Asp Ser Tyr Ile Ile Val Gly Arg Gly Asp Ser Arg Leu Thr 560 565 570	2631
tac cag tgg cac aaa gag gga agc tca ata gga aag ttg ttc act cag Tyr Gln Trp His Lys Glu Gly Ser Ser Ile Gly Lys Leu Phe Thr Gln 575 580 585 590	2679
acc atg aaa ggc gtg gaa cgc ctg gcc gtc atg gga gac acc gcc tgg Thr Met Lys Gly Val Glu Arg Leu Ala Val Met Gly Asp Thr Ala Trp 595 600 605	2727

10

20

30

gat ttc agc tcc gct gga ggg ttc ttc act tgc gtt ggg aaa gga att 2775
 Asp Phe Ser Ser Ala Gly Gly Phe Phe Thr Ser Val Gly Lys Gly Ile
 610 615 620

cat acg gtg ttt ggc tct gcc ttt cag ggg cta ttt ggc ggc ttg aac 2823
 His Thr Val Phe Gly Ser Ala Phe Gln Gly Leu Phe Gly Gly Leu Asn
 625 630 635

tgg ata aca aag gtc atc atg ggg gcg gta ctt ata tgg gtt ggc atc 2871
 Trp Ile Thr Lys Val Ile Met Gly Ala Val Leu Ile Trp Val Gly Ile
 640 645 650

aac aca aga aac atg aca atg tcc atg agc atg atc ttg gta gga gtg 2919
 Asn Thr Arg Asn Met Thr Met Ser Met Ser Met Ile Leu Val Gly Val
 655 660 665 670

atc atg atg ttt ttg tct cta gga gtt ggg gcg t gagcggccgc 2963
 Ile Met Met Phe Leu Ser Leu Gly Val Gly Ala
 675 680

tgcagcatgc atctagaggg cccatttcta tagtgtcacc taaatgctag agctcgtctga 3023
 taagccctga ctgtgccttc tagttgccag ccatctgttg ttggcccttc ccccgctgct 3083
 tcccttgaccc tggaaagggtgc cactccact gtcccttccct aataaaatga ggaaattgca 3143
 tcgcattgtc tgagtaggtg tcatctctatt ctgggggggtg ggggtgggca ggacagcaag 3203
 ggggaggatt gggaagacaa tagcaggcat gctggggatg cgggtgggctc tatggcttct 3263
 gaggcggaaa gaacagctgc attaatgaat cggccaacgc gcggggagag gcggtttgcg 3323
 tattggggcg tcttccgctt cctcgtctac tgactcgtcg cgtcgggtcg ttccgctgcg 3383
 gcgagcggtg tcagctcact caaaggcgtt aatacgggtt tccacagaat caggggataa 3443
 cgcaggaaaag aacatgtgag caaaaggcca gcaaaaggcc aggaaccgta aaaaggccgc 3503
 gttgctggcg tttttccata ggctccggcc ccttgacgag catcacaaaa atcgacgctc 3563
 aagtcagagg tggcgaaacc cgacaggact ataaagatac caggcggttc cccctggaag 3623
 ctccctcgtg cgtctcctcg ttcgcagccct gccgcttacc ggatacctgt ccgcttctct 3683
 ccccttcggg agcgtggcgc tttctcaatg ctacgctgt aggtatctca gttcgggtga 3743
 ggtcgttcgc tccaagctgg gctgtgtgca cgaacccccc gtlcagcccg accgctgcgc 3803
 cttatccggg aactatcgtc ttgagtcctaa cccggttaaga cagcacttat cgcactggc 3863
 agcagccact ggtaacagga tttagcagagc gagggtatgta ggcgggtgcta cagagtctct 3923
 gaagtggtgg cctaactacg gctacactag aaggacagta ttgtgtatct gcgctctgct 3983
 gaagccagtt acccttcgaa aaagagttgg tagctcttga tccggcaaac aaaccaccgc 4043
 tggtagcggg ggtttttttg ttgcaagca gcagattacg cgcagaaaaa aaggatctca 4103
 agaagatcct ttgatctttt ctacggggtc tgacgctcag tggaaacgaaa actcacgtta 4163
 agggattttg gtcattgagat tatcaaaaag gatcttcacc tagatccttt taaattaaaa 4223
 atgaagtttt aaatcaatct aaagtatata tgagtaaaact tgggtctgaca gttaccaatg 4283
 cttaatcagt gaggcacctt tctcagcgat ctgtctatct cgttcaccca tagttgctcg 4343
 actcccccgc gtgtagataa ctacgatacg ggagggtcta ccatctggcc ccagtgcctgc 4403
 aatgataccg cgagaccac gctcaccggc tccagattta tcagcaataa accagccagc 4463
 cggaaaggcc gagcgagaa gtggtcctgc aactttatcc gcctccatcc agtctattaa 4523
 ttgtttccgg gaagctagag taagtagttc gccagttaat agtttgccga acgttggtgc 4583
 cattgtctca ggcacgtggt ttgtcagctc gtggtttggt atggcttcat tcagctccgg 4643
 ttcccaacga tcaaggcgag ttacatgac ccccatgttg tgcaaaaaag cggttagctc 4703
 cttcggctct ccgacgttg tcagaagtaa gttggccgca gtgttatcac tcatgggttat 4763
 ggcagcactg cataattctc ttactgtcat gccatccgta agatgctttt ctgtgactgg 4823
 tgagtactca accaagtcct tctgagaata gtgtatgcgg cgaccgagtt gctcttgccc 4883
 ggcgtcaata cgggataata ccgcgccaca tagcagaact ttaaaagtgc tcatcattgg 4943
 aaaacgttct tcggggcgaa aactctcaag gatcttaccg ctgttgagat ccagttcgat 5003
 gtaacccact cgtgcaccca actgatcttc agcatctttt actttcacca gcgtttctgg 5063
 gtgagcaaaa acaggaaggg aaaaatgccg aaaaaaggga ataaggcgca cagggaatg 5123
 ttgaatactc atactcttcc tttttcaata ttattgaagc atttatcagg gttattgtct 5183
 catgagcggg tacatatttg aatgtattta gaaaaataaa caaatagggg ttccgcgcac 5243
 atttccccga aaagtccac ctgacgtc 5271

<210> 24

10

20

30

<211> 681
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of artificial sequence; note =
 synthetic construct

<400> 24

```

Met Gly Lys Arg Ser Ala Gly Ser Ile Met Trp Leu Ala Ser Leu Ala
 1          5          10          15
Val Val Ile Ala Gly Thr Ser Ala Val Thr Leu Val Arg Lys Asn Arg
 20          25          30
Trp Leu Leu Leu Asn Val Thr Ser Glu Asp Leu Gly Lys Thr Phe Ser
 35          40          45
Val Gly Thr Gly Asn Cys Thr Thr Asn Ile Leu Glu Ala Lys Tyr Trp
 50          55          60
Cys Pro Asp Ser Met Glu Tyr Asn Cys Pro Asn Leu Ser Pro Arg Glu
 65          70          75          80
Glu Pro Asp Asp Ile Asp Cys Trp Cys Tyr Gly Val Glu Asn Val Arg
 85          90          95
Val Ala Tyr Gly Lys Cys Asp Ser Ala Gly Arg Ser Arg Arg Ser Arg
100          105          110
Arg Ala Ile Asp Leu Pro Thr His Glu Asn His Gly Leu Lys Thr Arg
115          120          125
Gln Glu Lys Trp Met Thr Gly Arg Met Gly Glu Arg Gln Leu Gln Lys
130          135          140
Ile Glu Arg Trp Phe Val Arg Asn Pro Phe Phe Ala Val Thr Ala Leu
145          150          155          160
Thr Ile Ala Tyr Leu Val Gly Ser Asn Met Thr Gln Arg Val Val Ile
165          170          175
Ala Leu Leu Val Leu Ala Val Gly Pro Ala Tyr Ser Ala His Cys Ile
180          185          190          195
Gly Ile Thr Asp Arg Asp Phe Ile Glu Gly Val His Gly Gly Thr Trp
200          205
Val Ser Ala Thr Leu Glu Gln Asp Lys Cys Val Thr Val Met Ala Pro
210          215          220
Asp Lys Pro Ser Leu Asp Ile Ser Leu Glu Thr Val Ala Ile Asp Arg
225          230          235          240
Pro Ala Glu Val Arg Lys Val Cys Tyr Asn Ala Val Leu Thr His Val
245          250          255
Lys Ile Asn Asp Lys Cys Pro Ser Thr Gly Glu Ala His Leu Ala Glu
260          265          270
Glu Asn Glu Gly Asp Asn Ala Cys Lys Arg Thr Tyr Ser Asp Arg Gly
275          280          285
Trp Gly Asn Gly Cys Gly Leu Phe Gly Lys Gly Ser Ile Val Ala Cys
290          295          300
Ala Lys Phe Thr Cys Ala Lys Ser Met Ser Leu Phe Glu Val Asp Gln
305          310          315          320
Thr Lys Ile Gln Tyr Val Ile Arg Ala Gln Leu His Val Gly Ala Lys
325          330          335
Gln Glu Asn Trp Thr Thr Asp Ile Lys Thr Leu Lys Phe Asp Ala Leu
340          345          350
Ser Gly Ser Gln Glu Val Glu Phe Ile Gly Tyr Gly Lys Ala Thr Leu
355          360          365
Glu Cys Gln Val Gln Thr Ala Val Asp Phe Gly Asn Ser Tyr Ile Ala
370          375          380
Glu Met Glu Thr Glu Ser Trp Ile Val Asp Arg Gln Trp Ala Gln Asp
385          390          395          400
Leu Thr Leu Pro Trp Gln Ser Gly Ser Gly Gly Val Trp Arg Glu Met
405          410          415

```

10

20

30

His His Leu Val Glu Phe Glu Pro Pro His Ala Ala Thr Ile Arg Val
 420 425 430
 Leu Ala Leu Gly Asn Gln Glu Gly Ser Leu Lys Thr Ala Leu Thr Gly
 435 440 445
 Ala Met Arg Val Thr Lys Asp Thr Asn Asp Asn Asn Leu Tyr Lys Leu
 450 455 460
 His Gly Gly His Val Ser Cys Arg Val Lys Leu Ser Ala Leu Thr Leu
 465 470 475 480
 Lys Gly Thr Ser Tyr Lys Ile Cys Thr Asp Lys Met Phe Phe Val Lys
 485 490 495
 Asn Pro Thr Asp Thr Gly His Gly Thr Val Val Met Gln Val Lys Val
 500 505 510
 Ser Lys Gly Ala Pro Cys Arg Ile Pro Val Ile Val Ala Asp Asp Leu
 515 520 525
 Thr Ala Ala Ile Asn Lys Gly Ile Leu Val Thr Val Asn Pro Ile Ala
 530 535 540
 Ser Thr Asn Asp Asp Glu Val Leu Ile Glu Val Asn Pro Pro Phe Gly
 545 550 555 560
 Asp Ser Tyr Ile Ile Val Gly Arg Gly Asp Ser Arg Leu Thr Tyr Gln
 565 570 575
 Trp His Lys Glu Gly Ser Ser Ile Gly Lys Leu Phe Thr Gln Thr Met
 580 585 590
 Lys Gly Val Glu Arg Leu Ala Val Met Gly Asp Thr Ala Trp Asp Phe
 595 600 605
 Ser Ser Ala Gly Gly Phe Phe Thr Ser Val Gly Lys Gly Ile His Thr
 610 615 620
 Val Phe Gly Ser Ala Phe Gln Gly Leu Phe Gly Gly Leu Asn Trp Ile
 625 630 635 640
 Thr Lys Val Ile Met Gly Ala Val Leu Ile Trp Val Gly Ile Asn Thr
 645 650 655
 Arg Asn Met Thr Met Ser Met Ser Met Ile Leu Val Gly Val Ile Met
 660 665 670
 Met Phe Leu Ser Leu Gly Val Gly Ala
 675 680

10

20

<210> 25
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of artificial sequence; note =
 synthetic construct

<221> misc_feature
 <222> 1-35
 <223> POW 454

<400> 25
 aaaagaaaaa gcgctaccac catccaccgg gacag

35

30

<210> 26
 <211> 41
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of artificial sequence; note =
 synthetic construct

<221> misc_feature

<222> 1-41
 <223> CPOW 2417

<400> 26
 actgttaccc tcaaccccggt actcgccggc gaaaaagaaa a 41

<210> 27
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of artificial sequence; note =
 synthetic construct

<223> Modified JE Signal

10

<400> 27
 Met Gly Lys Arg Ser Ala Gly Ser Ile Met Trp Leu Ala Ser Leu Ala
 1 5 10 15
 Val Val Ile Ala Gly Thr Ser Ala
 20

<210> 28
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of artificial sequence; note =
 synthetic construct

<221> misc_feature
 <222> 1-36
 <223> YF 482

20

<400> 28
 aaaagaaaaa gcgctgtgac cttggtgagg aaaaac 36

<210> 29
 <211> 41
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of artificial sequence; note =
 synthetic construct

<221> misc_feature
 <222> 1-41
 <223> CYF 2433

30

<400> 29
 acagagatcc tcaaccccggt actcgccggc gaaaaagaaa a 41

<210> 30
 <211> 41
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of artificial sequence; note =
synthetic construct

<221> misc_feature

<222> 1-41

<223> SLE 463

<400> 30

aaaagaaaaa gcgctttgca gttatcaacc taccagggga a

41

<210> 31

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

10

<223> Description of artificial sequence; note =
synthetic construct

<221> misc_feature

<222> 1-40

<223> CSLE 2477

<400> 31

accggttggtc gcacgttcgg actcgccggc gaaaaagaaa

40

<210> 32

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

20

<223> Description of artificial sequence; note =
synthetic construct

<400> 32

Leu Asp Thr Ile Asn Arg Arg Pro Ser Lys Lys Arg Gly Gly Thr Arg

1 5 10 15

Ser Leu Leu Gly Leu Ala Ala Leu Ile Gly Leu Ala Ser Ser Leu Gln

20 25 30

Leu Leu Ser Thr Tyr Gln Gly

35

<210> 33

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

30

<223> Description of artificial sequence; note =
synthetic construct

<400> 33

Met Trp Leu Ala Ser Leu Ala Val Val Ile Ala Cys Ala Gly Ala Met

1 5 10 15

Lys Leu Ser Asn Phe Gln Gly Lys

20

<210> 34

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of artificial sequence; note =
synthetic construct

<400> 34

```
Met Asn Glu Gly Ser Ile Met Trp Leu Ala Ser Leu Ala Val Val Ile
 1             5             10            15
Ala Cys Ala Gly Ala Met Lys Leu Ser Asn Phe Gln Gly Lys
 20            25            30
```

<210> 35

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> Description of artificial sequence; note =
synthetic construct

<400> 35

```
Met Gly Arg Lys Gln Asn Lys Arg Gly Gly Asn Glu Gly Ser Ile Met
 1             5             10            15
Trp Leu Ala Ser Leu Ala Val Val Ile Ala Cys Ala Gly Ala Met Lys
 20            25            30
Leu Ser Asn Phe Gln Gly Lys
 35
```

<210> 36

<211> 34

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> Description of artificial sequence; note =
synthetic construct

<400> 36

```
Met Ser Lys Lys Arg Gly Gly Ser Glu Thr Ser Val Leu Met Val Ile
 1             5             10            15
Phe Met Leu Ile Gly Phe Ala Ala Ala Leu Lys Leu Ser Asn Phe Gln
 20            25            30
Gly Lys
```

<210> 37

<211> 33

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> Description of artificial sequence; note =
synthetic construct

<400> 37

```
Met Gly Lys Arg Ser Ala Gly Ser Ile Met Trp Leu Ala Ser Leu Ala
 1             5             10            15
Val Val Ile Ala Cys Ala Gly Ala Val Thr Leu Ser Asn Phe Gln Gly
 20            25            30
Lys
```

<210> 38
 <211> 46
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of artificial sequence; note =
 synthetic construct

<400> 38
 Met Asn Val Leu Arg Gly Phe Arg Lys Glu Ile Gly Arg Met Leu Asn
 1 5 10 15
 Ile Leu Asn Arg Arg Arg Arg Thr Ala Gly Met Ile Ile Met Leu Ile
 20 25 30
 Pro Thr Val Met Ala Phe His Leu Thr Thr Arg Asn Gly Glu
 35 40 45

10

<210> 39
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of artificial sequence; note =
 synthetic construct

<400> 39
 Met Val Gly Leu Gln Lys Arg Gly Lys Arg Arg Ser Ala Thr Asp Trp
 1 5 10 15
 Met Ser Trp Leu Leu Val Ile Thr Leu Leu Gly Met Thr Leu Ala Ala
 20 25 30
 Thr Val Arg Lys Glu Arg Gly Asp
 35 40

20

<210> 40
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of artificial sequence; note =
 synthetic construct

<400> 40
 Met Gly Trp Leu Leu Val Val Val Leu Leu Gly Val Thr Leu Ala Ala
 1 5 10 15
 Thr Val Arg Lys Glu Arg Gly Asp
 20

30

<210> 41
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of artificial sequence; note =
 synthetic construct

<400> 41

Met Ser Trp Leu Leu Val Ile Thr Leu Leu Gly Met Thr Ile Ala Ala
 1 5 10 15
 Thr Val Arg Lys Glu Arg Gly Asp
 20

<210> 42
 <211> 5292
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of artificial sequence; note =
 synthetic construct

<221> CDS
 <222> (910)...(2964)

10

<400> 42
 gacggatcgg gagatctccc gatcccttat ggtgcactct cagtacaatc tgctctgatg 60
 ccgcatagtt aagccagtat ctgctccctg cttgtgtgtt ggaggtcgct gagtagtgcg 120
 cgagcaaaat ttaagctaca acaaggcaag gcttgaccga caattgcatg aagaatctgc 180
 ttaggggttag gcgcttttgcg ctgcttcgcg atgtacgggc cagatatacg cgttgacatt 240
 gattattgac tagttattaa tagtaataca ttacgggggc attagtccat agcccatata 300
 tggagttccg cgttacataa cttacggtaa atggcccgcc tggctgaccg cccaacgacc 360
 ccgcgccatt gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt aacgcccaata gggactttcc 420
 attgacgtca atgggtggag tatttacggt aaactgccca cttggcagta catcaagtgt 480
 atcatatgcc aagtagcgcc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt 540
 atgcccagta catgacctta tgggactttc ctacttggca gtacatctac gtattagtca 600
 tcgctattac catggtgatg cgggttttggc agtacatcaa tgggctgga tagcggtttg 660
 actcaagggg atttccaagt ctccacccca ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc 720
 aaaatcaacg ggactttcca aaatgtcgta acaactccgc cccattgacg caaatgggag 780
 gtaggcgtgt acggtgggag gtctatataa gcagagctct ctggctaact agagaaccca 840
 ctgcttactg gcttatcgaa attaatacga ctactatag ggagacccaa gcttggtacc 900
 gcgcgcgcc atg ggc aag agg tcc gcc ggc tca atc atg tgg ctc gcg agc 951
 Met Gly Lys Arg Ser Ala Gly Ser Ile Met Trp Leu Ala Ser
 1 5 10

20

ttg gca gtt gtc ata gct tgt gca ggc gcc ttc cat tta acc aca cgt 999
 Leu Ala Val Val Ile Ala Cys Ala Gly Ala Phe His Leu Thr Thr Arg
 15 20 25 30

aac gga gaa cca cac atg atc gtc agc aga caa gag aaa ggg aaa agt 1047
 Asn Gly Glu Pro His Met Ile Val Ser Arg Gln Glu Lys Gly Lys Ser
 35 40 45

ctt ctg ttt aaa aca gag gat ggc gtg aac atg tgt acc ctc atg gcc 1095
 Leu Leu Phe Lys Thr Glu Asp Gly Val Asn Met Cys Thr Leu Met Ala
 50 55 60

30

atg gac ctt ggt gaa ttg tgt gaa gac aca atc acg tac aag tgt ccc 1143
 Met Asp Leu Gly Glu Leu Cys Glu Asp Thr Ile Thr Tyr Lys Cys Pro
 65 70 75

ctt ctc agg cag aat gag cca gaa gac ata gac tgt tgg tgc aac tct 1191
 Leu Leu Arg Gln Asn Glu Pro Glu Asp Ile Asp Cys Trp Cys Asn Ser
 80 85 90

acg tcc acg tgg gta act tat ggg acg tgt acc acc atg gga gaa cat 1239
 Thr Ser Thr Trp Val Thr Tyr Gly Thr Cys Thr Thr Met Gly Glu His
 95 100 105 110

aga aga gaa aaa aga tca gtg gca ctc gtt cca cat gtg gga atg gga 1287
 Arg Arg Glu Lys Arg Ser Val Ala Leu Val Pro His Val Gly Met Gly
 115 120 125

ctg gag aca cga act gaa aca tgg atg tca tca gaa ggg gcc tgg aaa 1335
 Leu Glu Thr Arg Thr Glu Thr Trp Met Ser Ser Glu Gly Ala Trp Lys
 130 135 140

cat gtc cag aga att gaa act tgg atc ttg aga cat cca ggc ttc acc 1383
 His Val Gln Arg Ile Glu Thr Trp Ile Leu Arg His Pro Gly Phe Thr
 145 150 155

atg atg gca gca atc ctg gca tac acc ata gga acg aca cat ttc caa 1431
 Met Met Ala Ala Ile Leu Ala Tyr Thr Ile Gly Thr His Phe Gln
 160 165 170

aga gcc ctg att ttc atc tta ctg aca gct gtc act cct tca atg aca 1479
 Arg Ala Leu Ile Phe Ile Leu Leu Thr Ala Val Thr Pro Ser Met Thr
 175 180 185 190

atg cgt tgc ata gga atg tca aat aga gac ttt gtg gaa ggg gtt tca 1527
 Met Arg Cys Ile Gly Met Ser Asn Arg Asp Phe Val Glu Gly Val Ser
 195 200 205

gga gga agc tgg gtt gac ata gtc tta gaa cat gga agc tgt gtg acg 1575
 Gly Gly Ser Trp Val Asp Ile Val Leu Glu His Gly Ser Cys Val Thr
 210 215 220

acg atg gca aaa aac aaa cca aca ttg gat ttt gaa ctg ata aaa aca 1623
 Thr Met Ala Lys Asn Lys Pro Thr Leu Asp Phe Glu Leu Ile Lys Thr
 225 230 235

gaa gcc aaa cag cct gcc acc cta agg aag tac tgt ata gag gca aag 1671
 Glu Ala Lys Gln Pro Ala Thr Leu Arg Lys Tyr Cys Ile Glu Ala Lys
 240 245 250

cta acc aac aca aca aca gaa tct cgc tgc cca aca caa ggg gaa ccc 1719
 Leu Thr Asn Thr Thr Thr Glu Ser Arg Cys Pro Thr Gln Gly Glu Pro
 255 260 265 270

agc cta aat gaa gag cag gac aaa agg ttc gtc tgc aaa cac tcc atg 1767
 Ser Leu Asn Glu Glu Gln Asp Lys Arg Phe Val Cys Lys His Ser Met
 275 280 285

gta gac aga gga tgg gga aat gga tgt gga cta ttt gga aag gga ggc 1815
 Val Asp Arg Gly Trp Gly Asn Gly Cys Gly Leu Phe Gly Lys Gly Gly
 290 295 300

att gtg acc tgt gct atg ttc aga tgc aaa aag aac atg gaa gga aaa 1863
 Ile Val Thr Cys Ala Met Phe Arg Cys Lys Lys Asn Met Glu Gly Lys
 305 310 315

gtt gtg caa cca gaa aac ttg gaa tac acc att gtg ata aca cct cac 1911
 Val Val Gln Pro Glu Asn Leu Glu Tyr Thr Ile Val Ile Thr Pro His
 320 325 330

tca ggg gaa gag cat gca gtc gga aat gac aca gga aaa cat ggc aag 1959
 Ser Gly Glu Glu His Ala Val Gly Asn Asp Thr Gly Lys His Gly Lys
 335 340 345 350

10

20

30

gaa atc aaa ata aca cca cag agt tcc atc aca gaa gca gaa ttg aca 2007
 Glu Ile Lys Ile Thr Pro Gln Ser Ser Ile Thr Glu Ala Glu Leu Thr
 355 360 365

ggt tat ggc act gtc aca atg gag tgc tct cca aga acg ggc ctc gac 2055
 Gly Tyr Gly Thr Val Thr Met Glu Cys Ser Pro Arg Thr Gly Leu Asp
 370 375 380

ttc aat gag atg gtg ttg ttg cag atg gaa aat aaa gct tgg ctg gtg 2103
 Phe Asn Glu Met Val Leu Leu Met Glu Asn Lys Ala Trp Leu Val
 385 390 395

cac agg caa tgg ttc cta gac ctg ccg tta cca tgg ttg ccc gga gcg 2151
 His Arg Gln Trp Phe Leu Asp Leu Pro Leu Pro Trp Leu Pro Gly Ala
 400 405 410

gac aca caa ggg tca aat tgg ata cag aaa gag aca ttg gtc act ttc 2199
 Asp Thr Gln Gly Ser Asn Trp Ile Gln Lys Glu Thr Leu Val Thr Phe
 415 420 425 430

aaa aat ccc cat gcg aag aaa cag gat gtt gtt gtt tta gga tcc caa 2247
 Lys Asn Pro His Lys Lys Lys Gln Asp Val Val Val Leu Gly Ser Gln
 435 440 445

gaa ggg gcc atg cac aca gca ctt aca ggg gcc aca gaa atc caa atg 2295
 Glu Gly Ala Met His Thr Ala Leu Thr Gly Ala Thr Glu Ile Gln Met
 450 455 460

tca tca gga aac tta ctc ttc aca gga cat ctc aag tgc agg ctg aga 2343
 Ser Ser Gly Asn Leu Leu Phe Thr Gly His Leu Lys Cys Arg Leu Arg
 465 470 475

atg gac aag cta cag ctc aaa gga atg tca tac tct atg tgc aca gga 2391
 Met Asp Lys Leu Gln Leu Lys Gly Met Ser Tyr Ser Met Cys Thr Gly
 480 485 490

aag ttt aaa gtt gtg aag gaa ata gca gaa aca caa cat gga aca ata 2439
 Lys Phe Lys Val Val Lys Glu Ile Ala Glu Thr Gln His Gly Thr Ile
 495 500 505 510

gtt atc aga gtg caa tat gaa ggg gac ggc tct cca tgc aag atc cct 2487
 Val Ile Arg Val Gln Tyr Glu Gly Asp Gly Ser Pro Cys Lys Ile Pro
 515 520 525

ttt gag ata atg gat ttg gaa aaa aga cat gtc tta ggt cgc ctg att 2535
 Phe Glu Ile Met Asp Leu Glu Lys Arg His Val Leu Gly Arg Leu Ile
 530 535 540

aca gtc aac cca att gtg aca gaa aaa gat agc cca gtc aac ata gaa 2583
 Thr Val Asn Pro Ile Val Thr Glu Lys Asp Ser Pro Val Asn Ile Glu
 545 550 555

gca gaa cct cca ttc gga gac agc tac atc atc ata gga gta gag ccg 2631
 Ala Glu Pro Pro Phe Gly Asp Ser Tyr Ile Ile Ile Gly Val Glu Pro
 560 565 570

gga caa ctg aag ctc aac tgg ttt aag aaa gga agt tct atc ggc caa 2679
 Gly Gln Leu Lys Leu Asn Trp Phe Lys Lys Gly Ser Ser Ile Gly Gln
 575 580 585 590

10

20

30

atg ttt gag aca aca atg agg ggg gcg aag aga atg gcc att tta ggt	2727
Met Phe Glu Thr Thr Met Arg Gly Ala Lys Arg Met Ala Ile Leu Gly	
595 600 605	
gac aca gcc tgg gat ttt gga tcc ttg gga gga gtg ttt aca tct ata	2775
Asp Thr Ala Trp Asp Phe Gly Ser Leu Gly Gly Val Phe Thr Ser Ile	
610 615 620	
gga aag gct ctc cac caa gtc ttt gga gca atc tat gga gct gcc ttc	2823
Gly Lys Ala Leu His Gln Val Met Gly Ala Ile Tyr Gly Ala Ala Phe	
625 630 635	
agt ggg gtt tca tgg act atg aaa atc ctc ata gga gtc att atc aca	2871
Ser Gly Val Ser Trp Thr Met Lys Ile Leu Ile Gly Val Ile Ile Thr	
640 645 650	
tggtg gga atg aat tca cgc agc acc tca ctg tct gtg aca cta gta	2919
Trp Ile Gly Met Asn Ser Arg Ser Thr Ser Leu Ser Val Thr Leu Val	
655 660 665 670	
ttg gtg gga att gtg aca ctg tat ttg gga gtc atg gtg cag gcc	2964
Leu Val Gly Ile Val Thr Leu Tyr Leu Gly Val Met Val Gln Ala	
675 680 685	
taattagttg agcggccgct cgagcatgca tctagagggc cctattctat agtgtcacct	3024
aaatgctaga gctcgctgat cagcctcgac tgtgccttct agttgccagc catctgttgt	3084
ttgccccctc cccgtgcctt ccttgaccct ggaagggtgcc actccactgt tcttttcccta	3144
ataaaatgag gaaattgcat cgcattgtct gactaggtgt cattctattc tgggggggtgg	3204
ggtggggcag gacagcaagg gggaggattg ggaagacaat agcaggcatg ctgggggatgc	3264
ggtgggctct atggtctctg aggcggaaag aaccagctgc attaatgaat cggccaacgc	3324
gcggggagag gcggttttgc tattgggggc tcttcgctt cctcgctcac tgactcgctg	3384
cgtcggctcg ttcggctgcg gcgagcgtta tcagctcact caaaggcgggt aatacggtta	3444
tccacagaat caggggataa cgcaggaaaag aacatgtgag caaaaggcca gcaaaaggcc	3504
aggaaccgta aaaaggccgc gttgctggcg tttttccata ggctccgccc cctgacgag	3564
catcacaaaa atcgacgctc aagtcagagg tggcgaaacc cgacaggact ataaagatac	3624
caggcgcttc cccctggaag ctccctcgtg cgtctctctg ttcggacctt gccgcttacc	3684
ggatacctgt ccgctcttct ccttcgggga agcgtggcgc tttctcatag ctacagctgt	3744
aggtatctca gttegggtgc ggtcggtcgc tccaagctgg gctgtgtgca cgaaccccc	3804
gttcagcccg accgctggcg cttatccggg aactatcgtc ttgagttcaa cccggtaaga	3864
cacgacttat cgcactggcg agcagccact ggtaacagga ttagcagagc gaggtatgta	3924
ggcgggtgcta cagagttctt gaagtgggtg cctaactacg gctacactag aagaacagta	3984
tttgggtatc gcgctctgct gaagccagtt accttcggaa aaagagttgg tagctcttga	4044
tccggcaaac aaaccaccgc tggtagcggg ggtttttttg ttgcaagca gcagattacg	4104
cgcagaaaaa aaggatctca agaagatcct ttgatctctt ctacggggtc tgacgctcag	4164
tggaacgaaa actcacgtta agggattttg gtcattgagat tatcaaaaag gatcttcacc	4224
tagatctctt taaattaaaa atgaagtttt aaatcaatct aaagtatata tgagtaaaact	4284
tggtctgaca gttaccaatg cttaatcagt gaggcacctt tctcagcgat ctgtctattt	4344
cgttcaccca tagttgcctg actccccgtc gtgtagataa ctacgatacg ggagggttta	4404
ccatctggcc ccagtgtgct aatgataccg cgagaccacg gctcaccggc tccagattta	4464
tcagcaataa accagccagc cggaaggggc gagcgagaaa gtgggtcctgc aactttatcc	4524
gcctccatcc agtctattaa ttgttgccgg gaagctagag taagtagttc gccagttaat	4584
agtttgcgca acgttggttc cattgctaca ggcacgtggg tgtcacgctc gtcggttggg	4644
atggcttcat tcagctccgg ttcccaacga tcaaggcgag ttacatgac ccccatgttg	4704
tcgaaaaaag cggtttagct cttcgggtct ccgactgttg tcagaagtaa gttggccgca	4764
gtgttatcac tcatggttat ggcagcactg cataattctt ttactgtcat gccatccgta	4824
agatgctttt ctgtgactgg tgagtactca accaagtcac tctgagaata gtgtatgagg	4884
cgaccgagtt gctcttgccc ggcgtcaata cgggataata ccgcggccaca tagcagaact	4944
ttaaaagtgc tcatcattgg aaaacgttct tcggggcgaa aactctcaag gatcttaccg	5004
ctgttgagat ccagttcgat gtaacccact cgtgcaccca actgatcttc agcatctttt	5064
actttcacca gcgtttcttg gtgagcaaaa acaggaagge aaaatgccgc aaaaaaggga	5124
ataagggcga cacggaatg ttgaatactc atactcttcc tttttcaata ttattgaagc	5184

10

20

30

atttatcagg gttattgtct catgagcgga tacatatattg aatgtattta gaaaaataaa 5244
 caaatagggg ttccgcgcac atttccccga aaagtgcac ctgacgtc 5292

<210> 43
 <211> 685
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of artificial sequence; note =
 synthetic construct

<400> 43
 Met Gly Lys Arg Ser Ala Gly Ser Ile Met Trp Leu Ala Ser Leu Ala
 1 5 10 15
 Val Val Ile Ala Cys Ala Gly Ala Phe His Leu Thr Thr Arg Asn Gly
 20 25 30
 Glu Pro His Met Ile Val Ser Arg Gln Glu Lys Gly Lys Ser Leu Leu
 35 40 45
 Phe Lys Thr Glu Asp Gly Val Asn Met Cys Thr Leu Met Ala Met Asp
 50 55 60
 Leu Gly Glu Leu Cys Glu Asp Thr Ile Thr Tyr Lys Cys Pro Leu Leu
 65 70 75 80
 Arg Gln Asn Glu Pro Glu Asp Ile Asp Cys Trp Cys Asn Ser Thr Ser
 85 90 95
 Thr Trp Val Thr Tyr Gly Thr Cys Thr Thr Met Gly Glu His Arg Arg
 100 105 110
 Glu Lys Arg Ser Val Ala Leu Val Pro His Val Gly Met Gly Leu Glu
 115 120 125
 Thr Arg Thr Glu Thr Trp Met Ser Ser Glu Gly Ala Trp Lys His Val
 130 135 140
 Gln Arg Ile Glu Thr Trp Ile Leu Arg His Pro Gly Phe Thr Met Met
 145 150 155 160
 Ala Ala Ile Leu Ala Tyr Thr Ile Gly Thr Thr His Phe Gln Arg Ala
 165 170 175
 Leu Ile Phe Ile Leu Leu Thr Ala Val Thr Pro Ser Met Thr Met Arg
 180 185 190
 Cys Ile Gly Met Ser Asn Arg Asp Phe Val Glu Gly Val Ser Gly Gly
 195 200 205
 Ser Trp Val Asp Ile Val Leu Glu His Gly Ser Cys Val Thr Thr Met
 210 215 220
 Ala Lys Asn Lys Pro Thr Leu Asp Phe Glu Leu Ile Lys Thr Glu Ala
 225 230 235 240
 Lys Gln Pro Ala Thr Leu Arg Lys Tyr Cys Ile Glu Ala Lys Leu Thr
 245 250 255
 Asn Thr Thr Thr Glu Ser Arg Cys Pro Thr Gln Gly Glu Pro Ser Leu
 260 265 270
 Asn Glu Glu Gln Asp Lys Arg Phe Val Cys Lys His Ser Met Val Asp
 275 280 285
 Arg Gly Trp Gly Asn Gly Cys Gly Leu Phe Gly Lys Gly Gly Ile Val
 290 295 300
 Thr Cys Ala Met Phe Arg Cys Lys Lys Asn Met Glu Gly Lys Val Val
 305 310 315 320
 Gln Pro Glu Asn Leu Glu Tyr Thr Ile Val Ile Thr Pro His Ser Gly
 325 330 335
 Glu Glu His Ala Val Gly Asn Asp Thr Gly Lys His Gly Lys Glu Ile
 340 345 350
 Lys Ile Thr Pro Gln Ser Ser Ile Thr Glu Ala Glu Leu Thr Gly Tyr
 355 360 365
 Gly Thr Val Thr Met Glu Cys Ser Pro Arg Thr Gly Leu Asp Phe Asn
 370 375 380

10

20

30

Glu Met Val Leu Leu Gln Met Glu Asn Lys Ala Trp Leu Val His Arg
 385 390 395 400
 Gln Trp Phe Leu Asp Leu Pro Leu Pro Trp Leu Pro Gly Ala Asp Thr
 405 410 415
 Gln Gly Ser Asn Trp Ile Gln Lys Glu Thr Leu Val Thr Phe Lys Asn
 420 425 430
 Pro His Ala Lys Lys Gln Asp Val Val Val Leu Gly Ser Gln Glu Gly
 435 440 445
 Ala Met His Thr Ala Leu Thr Gly Ala Thr Glu Ile Gln Met Ser Ser
 450 455 460
 Gly Asn Leu Leu Phe Thr Gly His Leu Lys Cys Arg Leu Arg Met Asp
 465 470 475 480
 Lys Leu Gln Leu Lys Gly Met Ser Tyr Ser Met Cys Thr Gly Lys Phe
 485 490 495
 Lys Val Val Lys Glu Ile Ala Glu Thr Gln His Gly Thr Ile Val Ile
 500 505 510
 Arg Val Gln Tyr Glu Gly Asp Gly Ser Pro Cys Lys Ile Pro Phe Glu
 515 520 525
 Ile Met Asp Leu Glu Lys Arg His Val Leu Gly Arg Leu Ile Thr Val
 530 535 540
 Asn Pro Ile Val Thr Glu Lys Asp Ser Pro Val Asn Ile Glu Ala Glu
 545 550 555 560
 Pro Pro Phe Gly Asp Ser Tyr Ile Ile Ile Gly Val Glu Pro Gly Gln
 565 570 575
 Leu Lys Leu Asn Trp Phe Lys Lys Gly Ser Ser Ile Gly Gln Met Phe
 580 585 590
 Glu Thr Thr Met Arg Gly Ala Lys Arg Met Ala Ile Leu Gly Asp Thr
 595 600 605
 Ala Trp Asp Phe Gly Ser Leu Gly Gly Val Phe Thr Ser Ile Gly Lys
 610 615 620
 Ala Leu His Gln Val Phe Gly Ala Ile Tyr Gly Ala Ala Phe Ser Gly
 625 630 635 640
 Val Ser Trp Thr Met Lys Ile Leu Ile Gly Val Ile Ile Thr Trp Ile
 645 650 655
 Gly Met Asn Ser Arg Ser Thr Ser Leu Ser Val Thr Leu Val Leu Val
 660 665 670
 Gly Ile Val Thr Leu Tyr Leu Gly Val Met Val Gln Ala
 675 680 685

10

<210> 44
 <211> 5293
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of artificial sequence; note =
 synthetic construct

<221> CDS
 <222> (910)...(2964)

20

30

<400> 44
 gacggatcgg gagatctccc gatcccttat ggtgcactct cagtacaatc tgctctgatg 60
 ccgcatagtt aagccagtat ctgctccctg cttgtgtgtt ggaggtegct gagtagtgcg 120
 cgagcaaaat ttaagctaca acaaggcaag gcttgaccga caattgcatg aagaatctgc 180
 ttagggttag gcgtttttgcg ctgcttcgcg atgtacgggc cagatatacg cgttgacatt 240
 gattattgac tagttattaa tagtaatcaa ttacgggggc attagttcat agcccatata 300
 tggagttccg cgttacataa cttacggtaa atggcccgcc tggetgaccg cccaacgacc 360
 cccgcccatt gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt aacgccaata gggactttcc 420
 attgacgtca atgggtggag tatttacggc aaactgcccc cttggcagta catcaagtgt 480
 atcatatgcc aagtacgccc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt 540

```

atgccagta catgacctta tgggactttc ctacttgga gtacatctac gtattagtca 600
tcgctattac catgggtgat cgggttttggc agtacatcaa tggggtgga tagcgggttg 660
actcaacggg atttccaagt ctccacccca ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc 720
aaaatcaacg ggactttcca aaatgtcgta acaactccgc cccattgacg caaatgggag 780
gtaggcgtgt acggtgggag gtctatataa gcagagctct ctggctaact agagaaccca 840
ctgcttactg gcttatcgaa attaatacga ctactatag ggagacccaa gcttggtacc 900
gccgccgcc atg ggc aag agg tcc gcc ggc tca atc atg tgg ctc gcg agc 951
      Met Gly Lys Arg Ser Ala Gly Ser Ile Met Trp Leu Ala Ser
          1             5             10

ttg gca gtt gtc ata gct tgt gca ggc gcc ttc cat tta acc aca cgt 999
Leu Ala Val Val Ile Ala Cys Ala Gly Ala Phe His Leu Thr Thr Arg
  15             20             25             30

aac gga gaa cca cac atg atc gtc agc aga caa gag aaa ggg aaa agt 1047
Asn Gly Glu Pro His Met Ile Val Ser Arg Gln Glu Lys Gly Lys Ser
          35             40             45

ctt ctg ttt aaa aca gag gat ggc gtg aac atg tgt acc ctc atg gcc 1095
Leu Leu Phe Lys Thr Glu Asp Gly Val Asn Met Cys Thr Leu Met Ala
          50             55             60

atg gac ctt ggt gaa ttg tgt gaa gac aca atc acg tac aag tgt ccc 1143
Met Asp Leu Gly Glu Leu Cys Glu Asp Thr Ile Thr Tyr Lys Cys Pro
          65             70             75

ctt ctc agg cag aat gag cca gaa gac ata gac tgt tgg tgc aac tct 1191
Leu Leu Arg Gln Asn Glu Pro Glu Asp Ile Asp Cys Trp Cys Asn Ser
          80             85             90

acg tcc acg tgg gta act tat ggg acg tgt acc acc atg gga gaa cat 1239
Thr Ser Thr Trp Val Thr Tyr Gly Thr Cys Thr Thr Met Gly Glu His
          95             100             105             110

aga aga gaa aaa aga tca gtg gca ctc gtt cca cat gtg gga atg gga 1287
Arg Arg Glu Lys Arg Ser Val Ala Leu Val Pro His Val Gly Met Gly
          115             120             125

ctg gag aca cga act gaa aca tgg atg tca tca gaa ggg gcc tgg aaa 1335
Leu Glu Thr Arg Thr Glu Thr Trp Met Ser Ser Glu Gly Ala Trp Lys
          130             135             140

cat gtc cag aga att gaa act tgg atc ttg aga cat cca ggc ttc acc 1383
His Val Gln Arg Ile Glu Thr Trp Ile Leu Arg His Pro Gly Phe Thr
          145             150             155

atg atg gca gca atc ctg gca tac acc ata gga acg aca cat ttc caa 1431
Met Met Ala Ala Ile Leu Ala Tyr Thr Ile Gly Thr Thr His Phe Gln
          160             165             170

aga gcc ctg att ttc atc tta ctg aca gct gtc act cct tca atg aca 1479
Arg Ala Leu Ile Phe Ile Leu Leu Thr Ala Val Thr Pro Ser Met Thr
          175             180             185             190

atg cgt tgc ata gga atg tca aat aga gac ttt gtg gaa ggg gtt tca 1527
Met Arg Cys Ile Gly Met Ser Asn Arg Asp Phe Val Glu Gly Val Ser
          195             200             205

gga gga agc tgg gtt gac ata gtc tta gaa cat gga agc tgt gtg acg 1575
Gly Gly Ser Trp Val Asp Ile Val Leu Glu His Gly Ser Cys Val Thr
          210             215             220

```

10

20

30

acg atg gca aaa aac aaa cca aca ttg gat ttt gaa ctg ata aaa aca 1623
 Thr Met Ala Lys Asn Lys Pro Thr Leu Asp Phe Glu Leu Ile Lys Thr
 225 230 235

gaa gcc aaa cag cct gcc acc cta agg aag tac tgt ata gag gca aag 1671
 Glu Ala Lys Gln Pro Ala Thr Leu Arg Lys Tyr Cys Ile Glu Ala Lys
 240 245 250

cta acc aac aca aca aca gaa tct cgc tgc cca aca caa ggg gaa ccc 1719
 Leu Thr Asn Thr Thr Thr Glu Ser Arg Cys Pro Thr Gln Gly Glu Pro
 255 260 265 270

agc cta aat gaa gag cag gac aaa agg ttc gtc tgc aaa cac tcc atg 1767
 Ser Leu Asn Glu Glu Gln Asp Lys Arg Phe Val Cys Lys His Ser Met
 275 280 285

gta gac aga gga tgg gga aat gga tgt gga cta ttt gga aag gga ggc 1815
 Val Asp Arg Gly Trp Gly Asn Gly Cys Gly Leu Phe Gly Lys Gly Gly
 290 295 300

att gtg acc tgt gct atg ttc aga tgc aaa aag aac atg gaa gga aaa 1863
 Ile Val Thr Cys Ala Met Phe Arg Cys Lys Lys Asn Met Glu Gly Lys
 305 310 315

gtt gtg caa cca gaa aac ttg gaa tac acc att gtg ata aca cct cac 1911
 Val Val Gln Pro Glu Asn Leu Glu Tyr Thr Ile Val Ile Thr Pro His
 320 325 330

tca ggg gaa gag cat gca gtc gga aat gac aca gga aaa cat ggc aag 1959
 Ser Gly Glu Glu His Ala Val Gly Asn Asp Thr Gly Lys His Gly Lys
 335 340 345 350

gaa atc aaa ata aca cca cag agt tcc atc aca gaa gca gaa ttg aca 2007
 Glu Ile Lys Ile Thr Pro Gln Ser Ser Ile Thr Glu Ala Glu Leu Thr
 355 360 365

ggt tat ggc act gtc aca atg gag tgc tct cca aga acg ggc ctc gac 2055
 Gly Tyr Gly Thr Val Thr Met Glu Cys Ser Pro Arg Thr Gly Leu Asp
 370 375 380

ttc aat gag atg gtg ttg ttg cag atg gaa aat aaa gct tgg ctg gtg 2103
 Phe Asn Glu Met Val Leu Leu Gln Met Glu Asn Lys Ala Trp Leu Val
 385 390 395

cac agg caa tgg ttc cta gac ctg ccg tta cca tgg ttg ccc gga gcg 2151
 His Arg Gln Trp Phe Leu Asp Leu Pro Leu Pro Trp Leu Pro Gly Ala
 400 405 410

gac aca caa ggg tca aat tgg ata cag aaa gag aca ttg gtc act ttc 2199
 Asp Thr Gln Gly Ser Asn Trp Ile Gln Lys Glu Thr Leu Val Thr Phe
 415 420 425 430

aaa aat ccc cat gcg aag aaa cag gat gtt gtt gtt tta gga tcc caa 2247
 Lys Asn Pro His Ala Lys Lys Gln Asp Val Val Val Leu Gly Ser Gln
 435 440 445

gaa ggg gcc atg cac aca gca ctt aca ggg gcc aca gaa atc caa atg 2295
 Glu Gly Ala Met His Thr Ala Leu Thr Gly Ala Thr Glu Ile Gln Met
 450 455 460

10

20

30

tca tca gga aac tta ctc ttc aca gga cat ctc aag tgc agg ctg aga Ser Ser Gly Asn Leu Leu Phe Thr Gly His Leu Lys Cys Arg Leu Arg 465 470 475	2343
atg gac aag cta cag ctc aaa gga atg tca tac tct atg tgc aca gga Met Asp Lys Leu Gln Leu Lys Gly Met Ser Tyr Ser Met Cys Thr Gly 480 485 490	2391
aag ttt aaa gtt gtg aag gaa ata gca gaa aca caa cat gga aca ata Lys Phe Lys Val Val Lys Glu Ile Ala Glu Thr Gln His Gly Thr Ile 495 500 505 510	2439
gtt atc aga gtg caa tat gaa ggg gac ggc tct cca tgc aag atc cct Val Ile Arg Val Tyr Glu Gly Asp Gly Ser Pro Cys Lys Ile Pro 515 520 525	2487
ttt gag ata atg gat ttg gaa aaa aga cat gtc tta ggt cgc ctg att Phe Glu Ile Met Asp Leu Glu Lys Arg His Val Leu Gly Arg Leu Ile 530 535 540	2535
aca gtc aac cca att gtg aca gaa aaa gat agc cca gtc aac ata gaa Thr Val Asn Pro Ile Val Thr Glu Lys Asp Ser Pro Val Asn Ile Glu 545 550 555	2583
gca gaa cct cca ttc gga gac agc cac atc atc ata gga gta gag ccg Ala Glu Pro Pro Phe Gly Asp Ser His Ile Ile Ile Gly Val Glu Pro 560 565 570	2631
gga caa ctg aag ctc aac tgg ttt aag aaa gga agt tct atc ggc caa Gly Gln Leu Lys Leu Asn Trp Phe Lys Lys Ser Ser Ile Gly Gln 575 580 585 590	2679
atg ttt gag aca aca atg agg ggg gcg aag aga atg gcc att tta ggt Met Phe Glu Thr Met Arg Gly Ala Lys Arg Met Ala Ile Leu Gly 595 600 605	2727
gac aca gcc tgg gat ttt gga tcc ttg gga gga gtg ttt aca tct ata Asp Thr Ala Trp Asp Phe Gly Ser Leu Gly Gly Val Phe Thr Ser Ile 610 615 620	2775
gga aag gct ctc cac caa gtg ttt ggt ggt gcc ttc aga aca ctc ttt Gly Lys Ala Leu His Gln Val Phe Gly Gly Ala Phe Arg Thr Leu Phe 625 630 635	2823
ggg gga atg tct tgg atc aca caa ggg cta atg ggt gcc cta ctg ctc Gly Gly Met Ser Trp Ile Thr Gln Gly Leu Met Gly Ala Leu Leu Leu 640 645 650	2871
tgg atg ggc gtc aac gca cga gac cga tca att gct ttg gcc ttc tta Trp Met Gly Val Asn Ala Arg Asp Arg Ser Ile Ala Leu Ala Phe Leu 655 660 665 670	2919
gcc aca ggg ggt gtg ctc gtg ttc tta gcg acc aat gtg cat gct Ala Thr Gly Gly Val Leu Val Phe Leu Ala Thr Asn Val His Ala 675 680 685	2964
taattagttt gggcgccgc tcgagcatgc atctagaggg ccctattcta tagtgtcacc taaagtctag agctcgctga tcagcctega ctgtgccttc tagttgccag ccattctgtg tttgcccttc ccccgctcct tccttgaccc tggaaggtgc cactcccaact gtcctttcct aataaaatga ggaaattgca tcgcattgtc tgagtaggtg tcattctatt ctgggggggtg gggtggggca ggacagcaag ggggaggatt gggaagacaa tagcaggcat gctggggatg	3024 3084 3144 3204 3264

10

20

30

```

cgggtgggctc tatggcttct gagggcgaaa gaaccagctg cattaatgaa tcggccaacg 3324
cgcgggggaga ggcggtttgc gtattgggag ctcttcgctc tcctcgtcga ctgactcgct 3384
gcgctcggtc gttcggctgc ggcgagcggc atcagctcac tcaaaggcgg taatacgggt 3444
atccacagaa tcaggggata acgcaggaaa gaacatgtga gcaaaaggcc agcaaaaggc 3504
caggaaccgt aaaaaggcgg cggttgcctg gtttttccat aggctccgcc cccctgacga 3564
gcatacaaaa aatcgacgct caagtcagag gtggcgaaac ccgacaggac tataaagata 3624
ccaggcggtt cccctgggaa gctccctcgt gcctctcctt gttccgaacc tgccgcttac 3684
cggatacctg tcgccttctc tcccttcggg aagcgtggcg cttttctcata gctcacgctg 3744
taggtatctc agttcgggtg aggtcgttcg ctccaagctg ggctgtgtgc acgaaccccc 3804
cgttcagccc gaccgctgcg ccttatccgg taactatcgt cttgagtcca acccggttaag 3864
acacgactta tcgccaactg cagcagccac tggtaacagg attagcagag cgaggatatg 3924
agggcggtgct acagagttct tgaagtgtg gcctaactac ggctacacta gaagaacagt 3984
atttggtatc tcgctctcgc tgaagccagt taccttcgga aaaagagttg gtagctcttg 4044
atccggcaaa caaaccccg ctggtagcgg tggttttttt gtttgcaagc agcagattac 4104
gcgcagaaaa aaaggatctc aagaagatcc ttgatctttt tctacggggg ctgacgtcca 4164
gtggaacgaa aactcacggt aagggtattt ggtcatgaga ttatcaaaaa ggatcttcac 4224
ctagatcctt ttaaatataa aatgaagttt taaatcaatc taaagtatat atgagtaaac 4284
ttggtctgac agttaccaat gcttaatcag tgaggcacct atctcagcga tctgtctatt 4344
tcgttctacc atagttgcct gactccccgt cgtgtagata actacgatac gggaggggctt 4404
accatctggc cccagtgcgt caatgatacc gcgagaccca cgctcacccg ctccagattt 4464
atcagcaata aaccagccag ccggaagggc cgagcgcgaga agtggtcctg caactttatc 4524
cgccctcacc cagtcattta attgttgcg ggaagctaga gtaagtagtt cggcagttaa 4584
tagtttgccg aacgttggtt ccattgctac aggcacgtg gtgtcacgct cgtcgtttgg 4644
tatggctcca ttcagctccg gttcccaacg atcaaggcga gttacatgat ccccatgtt 4704
gtgcaaaaaa gcggttagct ccttcgggtcc tccgatcgtt gtcagaagta agttggccgc 4764
agtggttatc cagtcgttta tggcagcact gcataattct cttactgtca tgccatccgt 4824
aagatgcttt tctgtgactg gtgagtactc aaccaagtca ttctgagaat agtgtatgcg 4884
gcgaccgagt tgctcttgcc cggcgtcaat accgggataat accgcgccac atagcagaac 4944
tttaaaagtg ctcacatctg gaaaacgttc ttccggggcga aaactctcaa ggatcttacc 5004
gctgttgaga tccagttcga tgtaacccac tcgtgcaccc aactgatott cagcatottt 5064
tactttcacc agcgtttctg ggtgagcaaa aacaggaagg caaaatgccg caaaaaaggg 5124
aataagggcg acacggaaat gttgaatact catactcttc ctttttcaat attattgaag 5184
catttatcag ggttattgct tcatgagcgg atacatatct gaatgtattt agaaaaataa 5244
acaaataggg gttccgcgca catttccccg aaaagtgcga cctgacgtc 5293

```

10

<210> 45
 <211> 685
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of artificial sequence; note =
 synthetic construct

```

<400> 45
Met Gly Lys Arg Ser Ala Gly Ser Ile Met Trp Leu Ala Ser Leu Ala
 1             5             10             15
Val Val Ile Ala Cys Ala Gly Ala Phe His Leu Thr Thr Arg Asn Gly
 20             25             30
Glu Pro His Met Ile Val Ser Arg Gln Glu Lys Gly Lys Ser Leu Leu
 35             40             45
Phe Lys Thr Glu Asp Gly Val Asn Met Cys Thr Leu Met Ala Met Asp
 50             55             60
Leu Gly Glu Leu Cys Glu Asp Thr Ile Thr Tyr Lys Cys Pro Leu Leu
 65             70             75             80
Arg Gln Asn Glu Pro Glu Asp Ile Asp Cys Trp Cys Asn Ser Thr Ser
 85             90             95
Thr Trp Val Thr Tyr Gly Thr Cys Thr Thr Met Gly Glu His Arg Arg
100            105            110
Glu Lys Arg Ser Val Ala Leu Val Pro His Val Gly Met Gly Leu Glu
115            120            125

```

30

Thr Arg Thr Glu Thr Trp Met Ser Ser Glu Gly Ala Trp Lys His Val
 130 135 140
 Gln Arg Ile Glu Thr Trp Ile Leu Arg His Pro Gly Phe Thr Met Met
 145 150 155 160
 Ala Ala Ile Leu Ala Tyr Thr Ile Gly Thr Thr His Phe Gln Arg Ala
 165 170 175
 Leu Ile Phe Ile Leu Leu Thr Ala Val Thr Pro Ser Met Thr Met Arg
 180 185 190
 Cys Ile Gly Met Ser Asn Arg Asp Phe Val Glu Gly Val Ser Gly Gly
 195 200 205
 Ser Trp Val Asp Ile Val Leu Glu His Gly Ser Cys Val Thr Thr Met
 210 215 220
 Ala Lys Asn Lys Pro Thr Leu Asp Phe Glu Leu Ile Lys Thr Glu Ala
 225 230 235 240
 Lys Gln Pro Ala Thr Leu Arg Lys Tyr Cys Ile Glu Ala Lys Leu Thr
 245 250 255
 Asn Thr Thr Thr Glu Ser Arg Cys Pro Thr Gln Gly Glu Pro Ser Leu
 260 265 270
 Asn Glu Glu Gln Asp Lys Arg Phe Val Cys Lys His Ser Met Val Asp
 275 280 285
 Arg Gly Trp Gly Asn Gly Cys Gly Leu Phe Gly Lys Gly Gly Ile Val
 290 295 300
 Thr Cys Ala Met Phe Arg Cys Lys Lys Asn Met Glu Gly Lys Val Val
 305 310 315 320
 Gln Pro Glu Asn Leu Glu Tyr Thr Ile Val Ile Thr Pro His Ser Gly
 325 330 335
 Glu Glu His Ala Val Gly Asn Asp Thr Gly Lys His Gly Lys Glu Ile
 340 345 350
 Lys Ile Thr Pro Gln Ser Ser Ile Thr Glu Ala Glu Leu Thr Gly Tyr
 355 360 365
 Gly Thr Val Thr Met Glu Cys Ser Pro Arg Thr Gly Leu Asp Phe Asn
 370 375 380
 Glu Met Val Leu Leu Gln Met Glu Asn Lys Ala Trp Leu Val His Arg
 385 390 395 400
 Gln Trp Phe Leu Asp Leu Pro Leu Pro Trp Leu Pro Gly Ala Asp Thr
 405 410 415
 Gln Gly Ser Asn Trp Ile Gln Lys Glu Thr Leu Val Thr Phe Lys Asn
 420 425 430
 Pro His Ala Lys Lys Gln Asp Val Val Val Leu Gly Ser Gln Glu Gly
 435 440 445
 Ala Met His Thr Ala Leu Thr Gly Ala Thr Glu Ile Gln Met Ser Ser
 450 455 460
 Gly Asn Leu Leu Phe Thr Gly His Leu Lys Cys Arg Leu Arg Met Asp
 465 470 475 480
 Lys Leu Gln Leu Lys Gly Met Ser Tyr Ser Met Cys Thr Gly Lys Phe
 485 490 495
 Lys Val Val Lys Glu Ile Ala Glu Thr Gln His Gly Thr Ile Val Ile
 500 505 510
 Arg Val Gln Tyr Glu Gly Asp Gly Ser Pro Cys Lys Ile Pro Phe Glu
 515 520 525
 Ile Met Asp Leu Glu Lys Arg His Val Leu Gly Arg Leu Ile Thr Val
 530 535 540
 Asn Pro Ile Val Thr Glu Lys Asp Ser Pro Val Asn Ile Glu Ala Glu
 545 550 555 560
 Pro Pro Phe Gly Asp Ser His Ile Ile Ile Gly Val Glu Pro Gly Gln
 565 570 575
 Leu Lys Leu Asn Trp Phe Lys Lys Gly Ser Ser Ile Gly Gln Met Phe
 580 585 590
 Glu Thr Thr Met Arg Gly Ala Lys Arg Met Ala Ile Leu Gly Asp Thr
 595 600 605

10

20

30

Ala Trp Asp Phe Gly Ser Leu Gly Gly Val Phe Thr Ser Ile Gly Lys
 610 615 620
 Ala Leu His Gln Val Phe Gly Gly Ala Phe Arg Thr Leu Phe Gly Gly
 625 630 635 640
 Met Ser Trp Ile Thr Gln Gly Leu Met Gly Ala Leu Leu Leu Trp Met
 645 650 655
 Gly Val Asn Ala Arg Asp Arg Ser Ile Ala Leu Ala Phe Leu Ala Thr
 660 665 670
 Gly Gly Val Leu Val Phe Leu Ala Thr Asn Val His Ala
 675 680 685

<210> 46
 <211> 5293
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of artificial sequence; note =
 synthetic construct

<221> CDS
 <222> (910)...(2964)

<400> 46
 gagcgatcgg gagatctccc gatccccctat ggtcgactct cagtacaatc tgctctgatg 60
 ccgcatagtt aagccagtat ctgctccctg cttgtgtgtt ggaggtcgct gagtagtgcg 120
 cgagcaaaat ttaagctaca acaaggcaag gcttgaccga caattgcatg aagaatctgc 180
 ttaggggttag gcgtttttgcg ctgcttcgcg atgtacgggc cagatatacg cgttgacatt 240
 gattattgac tagttattaa tagtaataca ttacgggggc attagtccat agcccatata 300
 tggagttccg cgttacataa cttacggtaa atggcccgcc tggctgaccg cccaacgacc 360
 ccgcccatt gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt aacgccaata gggactttcc 420
 attgacgtca atgggtggac tatttacggt aaactgccc cttggcagta catcaagtgt 480
 atcatatgcc aagtaagccc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt 540
 atgcccagta catgacctta tgggactttc ctacttggca gtacatctac gtattagtca 600
 tcgctattac catggtgatg cgggttttggc agtacatcaa tgggctgga tagcggtttg 660
 actcacgggg atttccaagt ctccacccca ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc 720
 aaaatcaacg ggactttcca aaatgtcgta acaactccgc cccattgacg caaatgggcg 780
 gtaggcggtg acggtgggag gtctatataa gcagagctct ctggctaact agagaaccca 840
 ctgcttaactg gcttatcgaa attaatacga ctactatag ggagacccaa gcttggtacc 900
 gcgcgcgcc atg ggc aag agg tcc gcc ggc tca atc atg tgg ctc gcg agc 951
 Met Gly Lys Arg Ser Ala Gly Ser Ile Met Trp Leu Ala Ser
 1 5 10

ttg gca gtt gtc ata gct tgt gca ggc gcc ttc cat tta acc aca cgt 999
 Leu Ala Val Val Ile Ala Cys Ala Gly Ala Phe His Leu Thr Thr Arg
 15 20 25 30

aac gga gaa cca cac atg atc gtc agc aga caa gag aaa ggg aaa agt 1047
 Asn Gly Glu Pro His Met Ile Val Ser Arg Gln Glu Lys Gly Lys Ser
 35 40 45

ctt ctg ttt aaa aca gag gat ggc gtg aac atg tgt acc ctc atg gcc 1095
 Leu Leu Phe Lys Thr Glu Asp Gly Val Asn Met Cys Thr Leu Met Ala
 50 55 60

atg gac ctt ggt gaa ttg tgt gaa gac aca atc acg tac aag tgt ccc 1143
 Met Asp Leu Gly Glu Leu Cys Glu Asp Thr Ile Thr Tyr Lys Cys Pro
 65 70 75

10

20

30

ctt ctc agg cag aat gag cca gaa gac ata gac tgt tgg tgc aac tct Leu Leu Arg Gln Asn Glu Pro Glu Asp Ile Asp Cys Trp Cys Asn Ser 80 85 90	1191
acg tcc acg tgg gta act tat ggg acg tgt acc acc atg gga gaa cat Thr Ser Thr Trp Val Thr Tyr Gly Thr Cys Thr Thr Met Gly Glu His 95 100 105 110	1239
aga aga gaa aaa aga tca gtg gca ctc gtt cca cat gtg gga atg gga Arg Arg Glu Lys Arg Ser Val Ala Leu Val Pro His Val Gly Met Gly 115 120 125	1287
ctg gag aca cga act gaa aca tgg atg tca tca gaa ggg gcc tgg aaa Leu Glu Thr Arg Thr Glu Thr Trp Met Ser Ser Glu Gly Ala Trp Lys 130 135 140	1335
cat gtc cag aga att gaa act tgg atc ttg aga cat cca ggc ttc acc His Val Gln Arg Ile Glu Thr Ile Leu Arg His Pro Gly Phe Thr 145 150 155	1383
atg atg gca gca atc ctg gca tac acc ata gga acg aca cat ttc caa Met Met Ala Ala Ile Leu Ala Tyr Thr Ile Gly Thr Thr His Phe Gln 160 165 170	1431
aga gcc ctg att ttc atc tta ctg aca gct gtc act cct tca atg aca Arg Ala Leu Ile Phe Ile Leu Leu Thr Ala Val Thr Pro Ser Met Thr 175 180 185 190	1479
atg cgt tgc ata gga atg tca aat aga gac ttt gtg gaa ggg gtt tca Met Arg Cys Ile Gly Met Ser Asn Arg Phe Val Glu Gly Val Ser 195 200 205	1527
gga gga agc tgg gtt gac ata gtc tta gaa cat ggg agc tgt gtg acg Gly Gly Ser Trp Val Asp Ile Val Leu Glu His Gly Ser Cys Val Thr 210 215 220	1575
acg atg gca aaa aac aaa cca aca ttg gat ttt gaa ctg ata aaa aca Thr Met Ala Lys Asn Lys Pro Thr Leu Asp Phe Glu Leu Ile Lys Thr 225 230 235	1623
gaa gcc aaa cag cct gcc acc cta agg aag tac tgt ata gag gca aag Glu Ala Lys Gln Pro Ala Thr Leu Arg Lys Tyr Cys Ile Glu Ala Lys 240 245 250	1671
cta acc aac aca aca aca gaa tct cgc tgc cca aca caa ggg gaa ccc Leu Thr Asn Thr Thr Thr Glu Ser Arg Cys Pro Thr Gln Gly Glu Pro 255 260 265 270	1719
agc cta aat gaa gag cag gac aaa agg ttc gtc tgc aaa cac tcc atg Ser Leu Asn Glu Glu Gln Asp Lys Arg Phe Val Cys Lys His Ser Met 275 280 285	1767
gta gac aga gga tgg gga aat gga tgt gga cta ttt gga aag gga ggc Val Asp Arg Gly Trp Gly Asn Gly Cys Gly Leu Phe Gly Lys Gly Gly 290 295 300	1815
att gtg acc tgt gct atg ttc aga tgc aaa aag aac atg gaa gga aaa Ile Val Thr Cys Ala Met Phe Arg Cys Lys Lys Asn Met Glu Gly Lys 305 310 315	1863

10

20

30

gtt gtg caa cca gaa aac ttg gaa tac acc att gtg ata aca cct cac Val Val Gln Pro Glu Asn Leu Glu Tyr Thr Ile Val Ile Thr Pro His 320 325 330	1911
tca ggg gaa gag cat gca gtc gga aat gac aca gga aaa cat ggc aag Ser Gly Glu Glu His Ala Val Gly Asn Asp Thr Gly Lys His Gly Lys 335 340 345 350	1959
gaa atc aaa ata aca cca cag agt tcc atc aca gaa gca gaa ttg aca Glu Ile Lys Ile Thr Pro Gln Ser Ser Ile Thr Glu Ala Glu Leu Thr 355 360 365	2007
ggc tat ggc act gtc aca atg gag tgc tct cca aga acg ggc ctc gac Gly Tyr Gly Val Thr Met Glu Cys Ser Pro Arg Thr Gly Leu Asp 370 375 380	2055
ttc aat gag atg gtg ttg ttg cag atg gaa aat aaa gct tgg ctg gtg Phe Asn Gln Met Val Leu Leu Met Glu Asn Lys Ala Trp Leu Val 385 390 395	2103
cac agg caa tgg ttc cta gac ctg ccg tta cca tgg ttg ccc gga gcg His Arg Gln Trp Phe Leu Asp Leu Pro Leu Pro Trp Leu Pro Gly Ala 400 405 410	2151
gac aca caa ggg tca aat tgg ata cag aaa gag aca ttg gtc act ttc Asp Thr Gln Gly Ser Asn Trp Ile Gln Lys Glu Thr Leu Val Thr Phe 415 420 425 430	2199
aaa aat ccc cat gcg aag aaa cag gat gtt gtt gtt tta gga tcc caa Lys Asn Pro His Ala Lys Lys Gln Asp Val Val Val Leu Gly Ser Gln 435 440 445	2247
gaa ggg gcc atg cac aca gca ctt aca ggg gcc aca gaa atc caa atg Glu Gly Ala Met His Thr Ala Leu Thr Gly Ala Thr Glu Ile Gln Met 450 455 460	2295
tca tca gga aac tta ctc ttc aca gga cat ctc aag tgc agg ctg aga Ser Ser Gly Asn Leu Leu Phe Thr Gly His Leu Lys Cys Arg Leu Arg 465 470 475	2343
atg gac aag cta cag ctc aaa gga atg tca tac tct atg tgc aca gga Met Asp Lys Leu Gln Leu Lys Gly Met Ser Tyr Ser Met Cys Thr Gly 480 485 490	2391
aag ttt aaa gtt gtg aag gaa ata gca gaa aca caa cat gga aca ata Lys Phe Lys Val Val Lys Glu Ile Ala Glu Thr Gln His Gly Thr Ile 495 500 505 510	2439
gtt atc aga gtg caa tat gaa ggg gac ggc tct cca tgc aag atc cct Val Ile Arg Val Gln Tyr Glu Gly Asp Gly Ser Pro Cys Lys Ile Pro 515 520 525	2487
ttt gag ata atg gat ttg gaa aaa aga cat gtc tta ggt cgc ctg att Phe Glu Ile Met Asp Leu Glu Lys Arg His Val Leu Gly Arg Leu Ile 530 535 540	2535
aca gtc aac cca att gtg aca gaa aaa gat agc cca gtc aac ata gaa Thr Val Asn Pro Ile Val Thr Glu Lys Asp Ser Pro Val Asn Ile Glu 545 550 555	2583

10

20

30

gca gaa cct cca ttc gga gac agc tac atc atc ata gga gta gag ccg	2631
Ala Glu Pro Pro Phe Gly Asp Ser Tyr Ile Ile Ile Gly Val Glu Pro	
560 565 570	
gga caa ctg aag ctc aac tgg ttt aag aaa gga agc acg ctg ggc aag	2679
Gly Gln Leu Lys Leu Asn Trp Phe Lys Lys Gly Ser Thr Leu Gly Lys	
575 580 585 590	
gcc ttt tca aca act ttg aag gga gct caa aga ctg gca gcg ttg ggc	2727
Ala Phe Ser Thr Thr Leu Lys Gly Ala Gln Arg Leu Ala Ala Leu Gly	
595 600 605	
gac aca gcc tgg gac ttt ggc tct att gga ggg gtc ttc aac tcc ata	2775
Asp Thr Ala Trp Asp Phe Gly Ser Ile Gly Gly Val Phe Asn Ser Ile	
610 615 620	
gga aaa gcc gtt cac caa gtg ttt ggt ggt gcc ttc aga aca ctc ttt	2823
Gly Lys Ala Val His Gln Val Gly Gly Ala Phe Arg Thr Leu Phe	
625 630 635	
ggg gga atg tct tgg atc aca caa ggg cta atg ggt gcc cta ctg ctc	2871
Gly Gly Met Ser Trp Ile Thr Gln Gly Leu Met Gly Ala Leu Leu Leu	
640 645 650	
tgg atg ggc gtc aac gca cga gac cga tca att gct ttg gcc ttc tta	2919
Trp Met Gly Val Asn Ala Arg Asp Arg Ser Ile Ala Leu Ala Phe Leu	
655 660 665 670	
gcc aca ggg ggt gtg ctc gtg ttc tta gcg acc aat gtg cat gct	2964
Ala Thr Gly Gly Val Leu Val Phe Leu Ala Thr Asn Val His Ala	
675 680 685	
taattagttt gagcgccgcg tcgagcatgc atctagaggg ccctattcta tagtgccacc	3024
taaatgctag agctcgctga tcagcctcga ctgtgccttc tagttgccag ccactctgtt	3084
tttgcccttc ccccggtgct tccctgaccc tggaggtgct cactcccaact gtcccttcc	3144
aataaaatga ggaaattgca tcgcattgtc tgagttagtg tcattctatt ctgggggggtg	3204
gggtggggca ggacagcaag ggggaggatt gggaagacaa tagcaggcat gctgggggatg	3264
cggtgggctc tatggcttct gaggcggaaa gaaccagctg cattaatgaa tcggccaacg	3324
cgcggggaga ggcggtttgc gtattgggct ctcttccgct tcctcgctca ctgactcgct	3384
gcgctcggtc gttcggtgct ggcgagcggt atcagctcac tcaaaaggcg taatacgggt	3444
atccacagaa tcaggggata acgcaggaaa gaacatgtga gcaaaaggcc agcaaaaggc	3504
caggaaccgt aaaaaggccg cgttgctggc gtttttccat aggcctccgc cccctgacga	3564
gcatacacia aatcgacgct caagtcagag gtggcgaaac ccgacaggac tataaagata	3624
ccaggcgctt cccctgggaa gctccctcgt gcgctctcct gttccgaccc tgccgcttac	3684
cggtacacct tcgccttttc tcccttcggg aagcgtggcg ctttctcaat gctcacgctg	3744
taggtatctc agttcggtgt aggtcggtcg ctccaagctg ggctgtgtgc acgaaccccc	3804
cgttcagccc gaccgctgct ccttatccgg taactatcgt cttgagtcga acccggtatg	3864
acacgactta tcgcccactg cagcagccac tggtaacagg attagcagag cgaggtatgt	3924
aggcggtgct acagagttct tgaagtcgtg gcctaactac ggctacacta gaaggacagt	3984
atttggtatc tgcgctctgc tgaagccagt taccttcgga aaaagagttg gtatgtcttg	4044
atccggcaaa caaaccaccg ctggtagcgg tggttttttt gtttgcaagc agcagattac	4104
gcgcagaaaa aaaggatctc aagaagatcc tttgatcttt tctacggggt ctgacgctca	4164
gtggaacgaa aactcacggt aagggaatttt ggtcatgaga ttatcaaaaa ggatcttcac	4224
ctagatcctt ttaaattaaa aatgaagttt taaatcaatc taaagtatat atgagtaaac	4284
ttggtctgac agttaccaat gcttaatcag tgaggcacct atctcagcga tctgtctatt	4344
tcgttcatec atagttgcct gactccccgt cgtgtagata actacgatac gggagggctt	4404
accatctggc cccagtgtg caatgatacc gcgagacca cgtccaccgg ctccagattt	4464
atcagcaata aaccagccag ccggaagggc cgagcgcaga agtggctctg caactttatc	4524
cgctccatc cagtctatta attgttgccg ggaagctaga gtaagtgtt cgccagttaa	4584
tagtttgccg aacgttgttg ccattgctac aggcacgtg gtgtcacgct cgtcgtttgg	4644
tatggctcoa ttcagctccg gttcccaacg atcaaggcga gttacatgat ccccatgtt	4704

10

20

30

```

gtgcaaaaaa gcggttagct ccttcgggtcc tccgatcggt gtcagaagta agttggccgc 4764
agtgttatca ctcattggtta tggcagcact gcataattct cttactgtca tgccatccgt 4824
aagatgcttt tctgtgactg gtgagtactc aaccaagtca ttctgagaat agtgtatgcg 4884
gcgaccgagt tgctcttgcc cggcggtcaat acgggataat accgcgccac atagcagaac 4944
tttaaaagtg ctcattcattg gaaaacgttc ttccggggcga aaactctcaa ggatctttacc 5004
gctgttgaga tccagttcga tgtaacccac tctgtcaccc aactgatctt cagcatcttt 5064
tactttcacc agcgtttctg ggtgagcaaa aacaggaagg caaaatgccg caaaaaaggg 5124
aataagggcg acacggaaat gttgaatact catactcttc ctttttcaat attattgaag 5184
catttatcag gggttatgtc tcatgagcgg atacatattt gaatgtattt agaaaaataa 5244
acaaataggg gttccgcgca catttccccg aaaagtgcc a cctgacgtc 5293

```

<210> 47

<211> 685

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of artificial sequence; note =
synthetic construct

<400> 47

```

Met Gly Lys Arg Ser Ala Gly Ser Ile Met Trp Leu Ala Ser Leu Ala
 1          5          10          15
Val Val Ile Ala Cys Ala Gly Ala Phe His Leu Thr Thr Arg Asn Gly
 20          25          30
Glu Pro His Met Ile Val Ser Arg Gln Glu Lys Gly Lys Ser Leu Leu
 35          40          45
Phe Lys Thr Glu Asp Gly Val Asn Met Cys Thr Leu Met Ala Met Asp
 50          55          60
Leu Gly Glu Leu Cys Glu Asp Thr Ile Thr Tyr Lys Cys Pro Leu Leu
 65          70          75          80
Arg Gln Asn Glu Pro Glu Asp Ile Asp Cys Trp Cys Asn Ser Thr Ser
 85          90          95
Thr Trp Val Thr Tyr Gly Thr Cys Thr Thr Met Gly Glu His Arg Arg
100          105          110
Glu Lys Arg Ser Val Ala Leu Val Pro His Val Gly Met Gly Leu Glu
115          120          125
Thr Arg Thr Glu Thr Trp Met Ser Ser Glu Gly Ala Trp Lys His Val
130          135          140
Gln Arg Ile Glu Thr Trp Ile Leu Arg His Pro Gly Phe Thr Met Met
145          150          155          160
Ala Ala Ile Leu Ala Tyr Thr Ile Gly Thr Thr His Phe Gln Arg Ala
165          170          175
Leu Ile Phe Ile Leu Leu Thr Ala Val Thr Pro Ser Met Thr Met Arg
180          185          190
Cys Ile Gly Met Ser Asn Arg Asp Phe Val Glu Gly Val Ser Gly Gly
195          200          205
Ser Trp Val Asp Ile Val Leu Glu His Gly Ser Cys Val Thr Thr Met
210          215          220
Ala Lys Asn Lys Pro Thr Leu Asp Phe Glu Leu Ile Lys Thr Glu Ala
225          230          235          240
Lys Gln Pro Ala Thr Leu Arg Lys Tyr Cys Ile Glu Ala Lys Leu Thr
245          250          255
Asn Thr Thr Thr Glu Ser Arg Cys Pro Thr Gln Gly Glu Pro Ser Leu
260          265          270
Asn Glu Glu Gln Asp Lys Arg Phe Val Cys Lys His Ser Met Val Asp
275          280          285
Arg Gly Trp Gly Asn Gly Cys Gly Leu Phe Gly Lys Gly Gly Ile Val
290          295          300
Thr Cys Ala Met Phe Arg Cys Lys Lys Asn Met Glu Gly Lys Val Val
305          310          315          320

```

10

20

30

Gln Pro Glu Asn Leu Glu Tyr Thr Ile Val Ile Thr Pro His Ser Gly
 325 330 335
 Glu Glu His Ala Val Gly Asn Asp Thr Gly Lys His Gly Lys Glu Ile
 340 345 350
 Lys Ile Thr Pro Gln Ser Ser Ile Thr Glu Ala Glu Leu Thr Gly Tyr
 355 360 365
 Gly Thr Val Thr Met Glu Cys Ser Pro Arg Thr Gly Leu Asp Phe Asn
 370 375 380
 Glu Met Val Leu Leu Gln Met Glu Asn Lys Ala Trp Leu Val His Arg
 385 390 395 400
 Gln Trp Phe Leu Asp Leu Pro Leu Pro Trp Leu Pro Gly Ala Asp Thr
 405 410 415
 Gln Gly Ser Asn Trp Ile Gln Lys Glu Thr Leu Val Thr Phe Lys Asn
 420 425 430
 Pro His Ala Lys Lys Gln Asp Val Val Val Leu Gly Ser Gln Glu Gly
 435 440 445
 Ala Met His Thr Ala Leu Thr Gly Ala Thr Glu Ile Gln Met Ser Ser
 450 455 460
 Gly Asn Leu Leu Phe Thr Gly His Leu Lys Cys Arg Leu Arg Met Asp
 465 470 475 480
 Lys Leu Gln Leu Lys Gly Met Ser Tyr Ser Met Cys Thr Gly Lys Phe
 485 490 495
 Lys Val Val Lys Glu Ile Ala Glu Thr Gln His Gly Thr Ile Val Ile
 500 505 510
 Arg Val Gln Tyr Glu Gly Asp Gly Ser Pro Cys Lys Ile Pro Phe Glu
 515 520 525
 Ile Met Asp Leu Glu Lys Arg His Val Leu Gly Arg Leu Ile Thr Val
 530 535 540
 Asn Pro Ile Val Thr Glu Lys Asp Ser Pro Val Asn Ile Glu Ala Glu
 545 550 555 560
 Pro Pro Phe Gly Asp Ser Tyr Ile Ile Ile Gly Val Glu Pro Gly Gln
 565 570 575
 Leu Lys Leu Asn Trp Phe Lys Lys Gly Ser Thr Leu Gly Lys Ala Phe
 580 585 590
 Ser Thr Thr Leu Lys Gly Ala Gln Arg Leu Ala Ala Leu Gly Asp Thr
 595 600 605
 Ala Trp Asp Phe Gly Ser Ile Gly Gly Val Phe Asn Ser Ile Gly Lys
 610 615 620
 Ala Val His Gln Val Phe Gly Gly Ala Phe Arg Thr Leu Phe Gly Gly
 625 630 635 640
 Met Ser Trp Ile Thr Gln Gly Leu Met Gly Ala Leu Leu Leu Trp Met
 645 650 655
 Gly Val Asn Ala Arg Asp Arg Ser Ile Ala Leu Ala Phe Leu Ala Thr
 660 665 670
 Gly Gly Val Leu Val Phe Leu Ala Thr Asn Val His Ala
 675 680 685

10

20

<210> 48
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

30

<220>
 <223> Description of artificial sequence; note =
 synthetic construct

<400> 48
 tgtgcaggcg ccttccattt aaccacacgt aacg

34

<210> 49
 <211> 40

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of artificial sequence; note =
 synthetic construct

 <400> 49
 tcgagcggcc gctcaactaa ttaggcctgc accatgactc 40

 <210> 50
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of artificial sequence; note = 10
 synthetic construct

 <400> 50
 cttatcgaaa ttaatacgac tcactatagg 30

 <210> 51
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of artificial sequence; note =
 synthetic construct

 <400> 51 20
 atagattgct ccaaactt ggtgg 25

 <210> 52
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of artificial sequence; note =
 synthetic construct

 <400> 52 24
 actccatagg aaaagcgtt cacc

 <210> 53
 <211> 30 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of artificial sequence; note =
 synthetic construct

 <400> 53 30
 gcgagctcta gcatttaggt gacactatag

 <210> 54
 <211> 33
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of artificial sequence; note =
synthetic construct

<400> 54

ctccaccaag tgtttggtgg tgccttcaga aca

33

<210> 55

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of artificial sequence; note =
synthetic construct

10

<400> 55

Leu His Gln Val Phe Gly Gly Ala Phe Arg Thr

1

5

10

<210> 56

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of artificial sequence; note =
synthetic construct

<400> 56

cttatcgaaa ttaatacgac tcactatagg

30

20

<210> 57

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of artificial sequence; note =
synthetic construct

<400> 57

gaattcgtct cacttccttt cttaaaccag ttgagcttc

39

<210> 58

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> Description of artificial sequence; note =
synthetic construct

<400> 58

ggaattcgtc tcggaagcac gctgggcaag g

31

<210> 59

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of artificial sequence; note =
synthetic construct

<400> 59

gcgagctcta gcatttaggt gacactatag

30

<210> 60

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of artificial sequence; note =
synthetic construct

10

<400> 60

aactgggtta agaaaggaag cacgctgggc gcc

33

<210> 61

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of artificial sequence; note =
synthetic construct

<400> 61

Asn Trp Lys Lys Gly Ser Thr Leu Gly Lys Ala

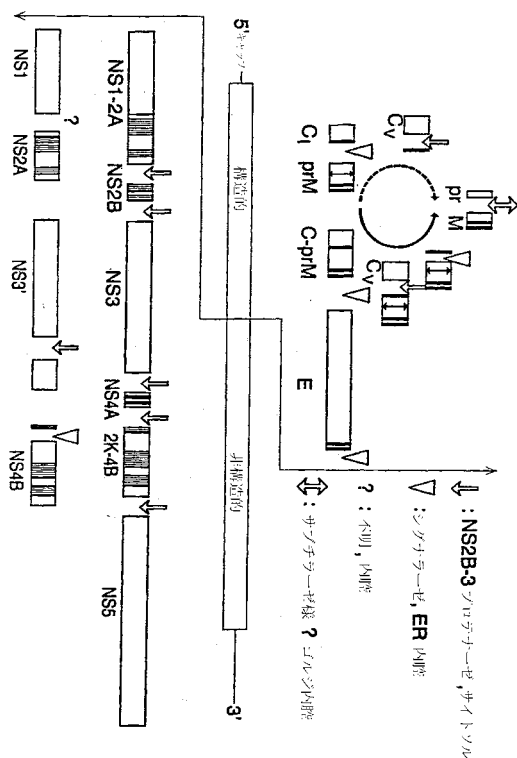
1

5

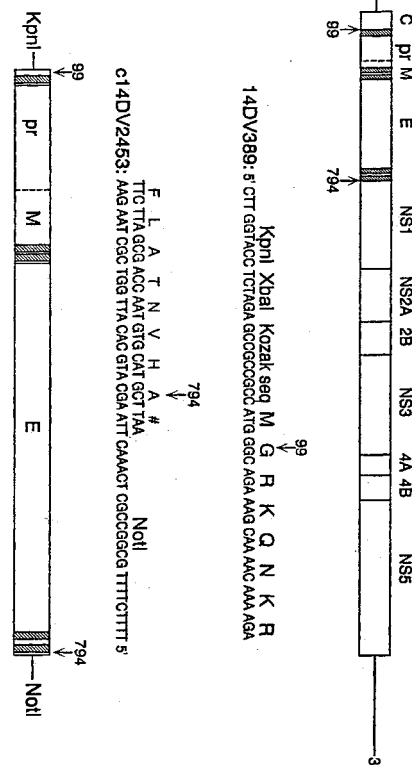
10

20

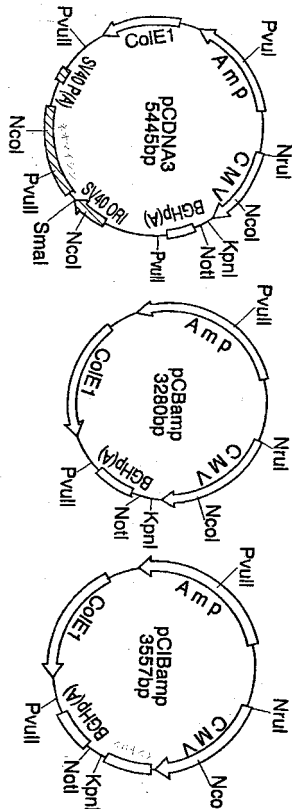
【図 1】



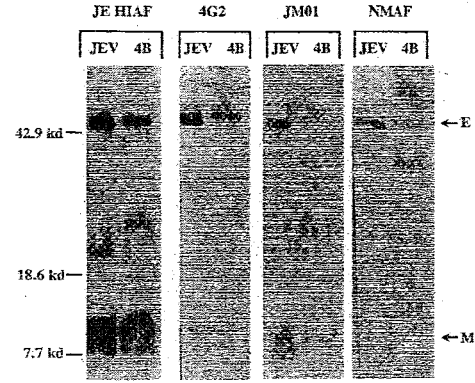
【図 2】



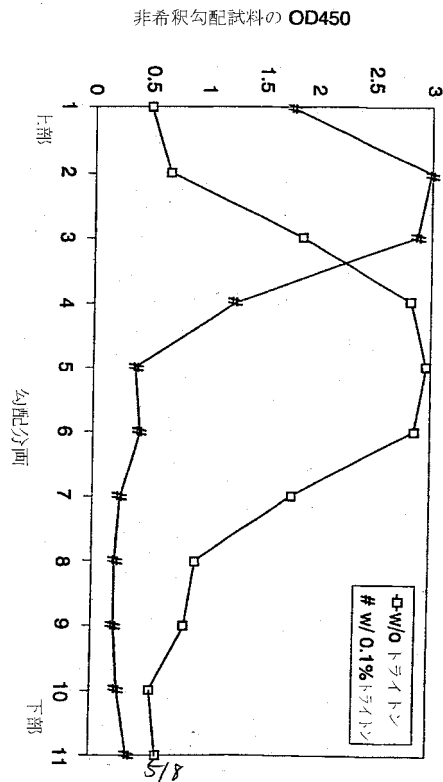
【図3】



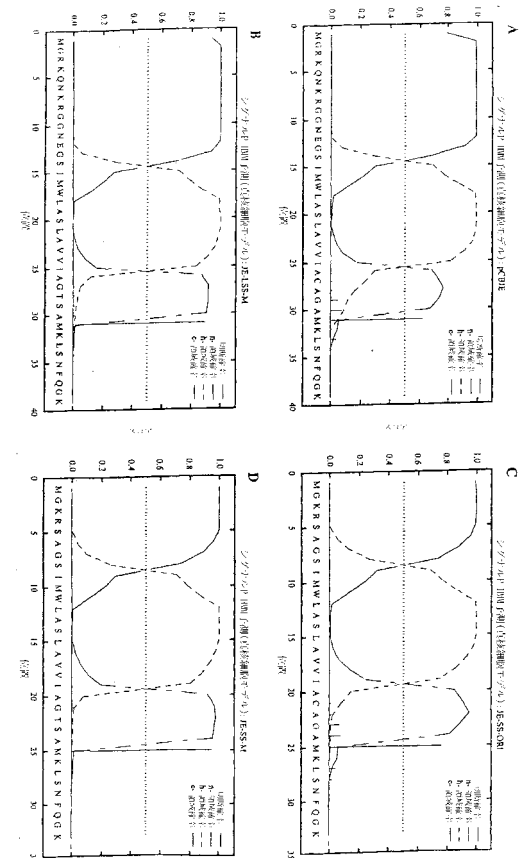
【図4】



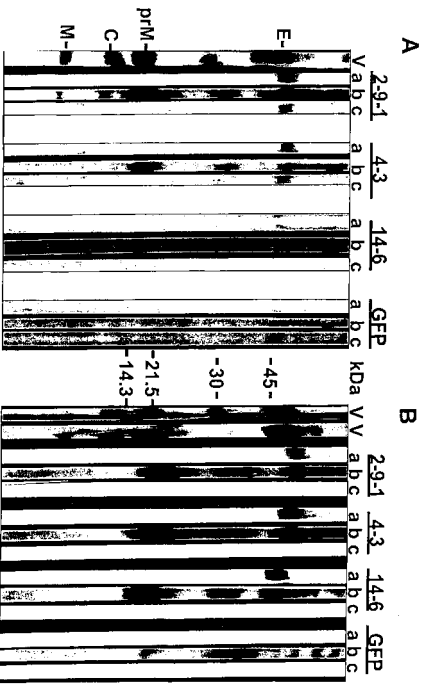
【図5】



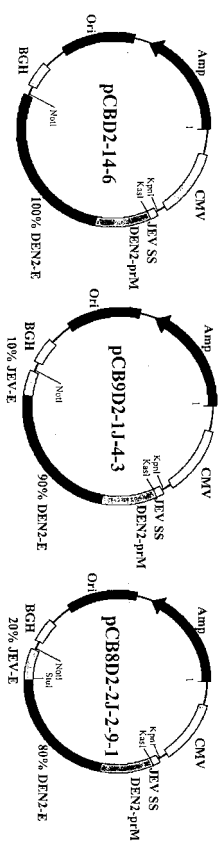
【図6】



【 8 】



【 7 】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N 1/21
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N 5/00 1 0 1
A 6 1 K	39/12	(2006.01)	A 6 1 K 39/12
A 6 1 P	31/14	(2006.01)	A 6 1 P 31/14

(72)発明者 チャン グウォン - ジェン ジェイ .
 アメリカ合衆国 コロラド州 フォート コリンス ビーバー クリーク ドライブ 4 2 3 7

審査官 戸来 幸男

(56)参考文献 国際公開第 9 8 / 0 3 7 9 1 1 (W O , A 1)
 国際公開第 9 9 / 0 6 3 0 9 5 (W O , A 1)
 特開平 0 7 - 2 6 5 0 9 3 (J P , A)
 特開平 0 3 - 1 4 8 0 6 6 (J P , A)
 特開平 0 1 - 5 0 1 2 0 3 (J P , A)
 J. Virol. , 2 0 0 0 年 , vol.74, no.9 , p.4244-4252
 Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A , 1 9 9 2 年 , vol.89, no.21 , p.10532-10536
 J. Virol. , 1 9 9 8 年 , vol.72, no.6 , p.4925-4930
 J. Virol. , 1 9 9 7 年 , vol.71, no.12 , p.9563-9569
 Virology , 1 9 9 8 年 , vol.250, no.1 , p.151-163
 Vaccine , 1 9 9 7 年 , vol.15, no.5 , p.547-552
 Arch. Virol. , 1 9 9 6 年 , vol.141, no.3-4 , p.743-749

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

C12N 15/00-15/90
 C07K 14/18
 C07K 19/00
 A61K 39/12
 A61P 31/14
 MEDLINE/Caplus/BIOSIS/WPIDS(STN)
 JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)
 PubMed

专利名称(译)	用于预防黄病毒感染的核酸疫苗		
公开(公告)号	JP4448281B2	公开(公告)日	2010-04-07
申请号	JP2002579516	申请日	2002-04-04
[标]申请(专利权)人(译)	美国政府 美國政府		
申请(专利权)人(译)	美国		
当前申请(专利权)人(译)	美国		
[标]发明人	チャングウォンジェンジェイ		
发明人	チャン グウォン-ジェン ジエイ.		
IPC分类号	C12N15/09 C07K19/00 C07K14/18 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 A61K39/12 A61P31/14 A61K31/711 A61K39/00 A61K48/00 C07K16/10 C12N15/40 C12Q1/70 G01N33/53 G01N33/569		
CPC分类号	A61K39/12 A61K48/00 A61K2039/53 A61K2039/70 C07K14/005 C07K16/1081 C07K2319/02 C12N2770/24022 C12N2770/24122 C12N2770/24134 C12Q1/701 G01N33/56983 G01N2333/18 Y02A50/386 Y02A50/388 Y02A50/39 Y02A50/394 Y02A50/53 Y02A50/60		
FI分类号	C12N15/00.ZNAA C07K19/00 C07K14/18 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.101 A61K39/12 A61P31/14		
代理人(译)	夏木森下		
优先权	09/826115 2001-04-04 US		
其他公开文献	JP2004532023A5 JP2004532023A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明包括编码嵌合免疫原性黄病毒抗原的转录单位，其包含黄病毒信号序列和来自第二黄病毒免疫原性黄病毒抗原或黄病毒，包括分离的核酸。本发明进一步包括使用核酸和蛋白质疫苗以及针对黄病毒感染免疫受试者的疫苗。本发明还提供了抗原和/或抗体在诊断由本发明的核酸编码的抗原，响应于抗原诱导的抗体以及黄病毒检测或黄病毒感染中的用途。

[illegible]