

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4864264号
(P4864264)

(45) 発行日 平成24年2月1日(2012.2.1)

(24) 登録日 平成23年11月18日(2011.11.18)

(51) Int.Cl.		F I	
A 6 1 K 39/118	(2006.01)	A 6 1 K 39/118	Z N A
A 6 1 K 48/00	(2006.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 K 39/39	(2006.01)	A 6 1 K 39/39	
A 6 1 P 31/04	(2006.01)	A 6 1 P 31/04	

請求項の数 25 (全 34 頁)

(21) 出願番号	特願2001-547133 (P2001-547133)	(73) 特許権者	501174136
(86) (22) 出願日	平成12年12月20日 (2000.12.20)		サノフィ、パストゥール、リミテッド
(65) 公表番号	特表2003-517844 (P2003-517844A)		Sanofi Pasteur Limited
(43) 公表日	平成15年6月3日 (2003.6.3)		カナダ国オンタリオ州、トロント、ステイ
(86) 国際出願番号	PCT/CA2000/001534		ーレス、アベニュー、ウェスト、1755
(87) 国際公開番号	W02001/046224	(74) 代理人	100075812
(87) 国際公開日	平成13年6月28日 (2001.6.28)		弁理士 吉武 賢次
審査請求日	平成19年12月20日 (2007.12.20)	(74) 代理人	100091487
(31) 優先権主張番号	60/171,525		弁理士 中村 行孝
(32) 優先日	平成11年12月22日 (1999.12.22)	(74) 代理人	100094640
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 紺野 昭男
		(74) 代理人	100107342
			弁理士 横田 修孝

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 クラミジア抗原および対応するDNA断片ならびにその使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

ワクチンにおいて好適に使用できる生理学的に許容される希釈剤または担体と、

(a) ポリペプチドをコードする、核酸、

(b) 前記ポリペプチド、

(c) 前記ポリペプチドと付加的なポリペプチドとを含んでなる、融合タンパク質、
または

(d) 前記融合タンパク質をコードするハイブリッド核酸

のいずれか一つと

を含んでなる、ワクチンであって、

前記ポリペプチドが、

(i) 配列番号2、または

(ii) 配列番号2とアミノ酸配列において少なくとも90%の同一性を有する配列

であって、免疫原性を失わずに改変された配列

を含んでなり、

前記(a)の核酸が、哺乳類細胞において複製できず、かつ実質的に組み込むことができないように、哺乳類細胞で発現する条件下のプラスミドに置かれている、クラミジア感染症の予防用ワクチン。

【請求項2】

ワクチンベクター中に前記(a)の核酸を含んでなる、請求項1に記載のワクチンであ

10

20

って、

前記核酸が、

(i) 配列番号2をコードする、核酸配列、または

(ii) 配列番号2と少なくとも90%の同一性を有するポリペプチドであって、免疫原性を失わずに改変されたポリペプチドをコードする、核酸配列を含んでなる、ワクチン。

【請求項3】

配列番号2をコードする核酸配列を含んでなる、請求項2に記載のワクチン。

【請求項4】

プラスミド中のプロモーターがウイルスプロモーターである、請求項2または3に記載のワクチン。 10

【請求項5】

ワクチンベクター中に前記(d)のハイブリッド核酸を含んでなる、請求項1に記載のワクチンであって、

前記ハイブリッド核酸が、

(i) 配列番号2をコードする、核酸配列、または

(ii) 配列番号2と少なくとも90%の同一性を有するポリペプチドであって、免疫原性を失わずに改変されたポリペプチドをコードする、核酸配列を含んでなる、ワクチン。

【請求項6】

図3で示される、発現プラスミドpCABk831を含んでなる、請求項3に記載のワクチン。 20

【請求項7】

前記(b)のポリペプチドを含んでなる、請求項1に記載のワクチン。

【請求項8】

前記(c)の融合タンパク質を含んでなる、請求項1に記載のワクチン。

【請求項9】

ポリペプチドと、アジュバントとを含んでなるワクチンであって、

前記ポリペプチドが、

(i) 配列番号2、または

(ii) 配列番号2とアミノ酸配列において少なくとも90%の同一性を有する配列であって、免疫原性を失わずに改変された配列を含んでなる、クラミジア感染症の予防用ワクチン。 30

【請求項10】

ポリペプチドが、配列番号2を含んでなる、請求項9に記載のワクチン。

【請求項11】

ポリペプチドが、配列番号2とアミノ酸配列において少なくとも90%の同一性を有する配列であって、免疫原性を失わずに改変された配列を含んでなる、請求項9に記載のワクチン。

【請求項12】

アジュバンドがリポソームである、請求項9～11のいずれか一項に記載のワクチン。 40

【請求項13】

リポソームが、中性イオンリポソーム、陰イオンリポソーム、マイクロフェア、ISCOMS、およびウイルス様粒子(VLP)からなる群より選択されるすくなくとも1種のリポソームである、請求項12に記載のワクチン。

【請求項14】

非経口投与に適用される、請求項9～11のいずれか一項に記載のワクチン。

【請求項15】

アジュバンドが、アルミニウム化合物、RIBI、ポリホスファゼン、DC-chol(3b-(N-(N', N'-ジメチルアミノメタン)-カルバモイル)コレステロール 50

)、およびQS - 21からなる群より選択されるすくなくとも1種のアジュバンドである、請求項14に記載のワクチン。

【請求項16】

アジュバンドが、水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウム、またはヒドロキシリン酸アルミニウムである、請求項15に記載のワクチン。

【請求項17】

粘膜投与に適した、請求項9～11のいずれか一項に記載のワクチン。

【請求項18】

アジュバンドが、細菌毒、細菌モノホスホリル脂質A(MPLA)、サポニン、ポリアクチドグリコリド(PLGA)ミクロスフェア、ポリホスファゼン、DC-cho1(3b-(N-(N',N'-ジメチルアミノメタン)-カルバモイル)コレステロール)、およびQS - 21からなる群より選択されるすくなくとも1種のアジュバンドである、請求項17に記載のワクチン。

10

【請求項19】

アジュバンドが、コレラ毒(CT)、大腸菌易熱性毒(LT)、クロストリジウム・ディフィシル(*Clostridium difficile*)毒Aおよび百日咳毒(PT)、もしくはその組合せ、サブユニット、変性毒素、または、アジュバンド活性を保有しているか、および/もしくは弱毒化した、それらの変異体からなる群より選択されるすくなくとも1種の細菌毒である、請求項18に記載のワクチン。

【請求項20】

20

アジュバンドが、天然コレラ毒サブユニットB(CTB)、Arg-7-Lys CT変異体)、Arg-192-Gly LT変異体、Arg-9-LysおよびGlu-129-Gly PT変異体、Ser-63-Lys LT変異体、Ala-69-Gly LT変異体、Glu-110-Asp LT変異体、および、Glu-112-Asp LT変異体からなる群より選択されるすくなくとも1種の細菌毒である、請求項19に記載のワクチン。

【請求項21】

アジュバンドが、大腸菌、サルモネラ・ミネソタ(*Salmonella minnesota*)、ネズミチフス菌、またはシゲラ・フレクスネリ(*Shigella Flexneri*)の細菌モノホスホリル脂質A(MPLA)である、請求項18に記載のワクチン。

30

【請求項22】

ヒト成人に粘膜投与するための、予防上の有効用量が10μg～500mgの、請求項9～11のいずれか一項に記載のワクチン。

【請求項23】

多段階免疫化プロセスの要素として連続的に用いられる、請求項1～22のいずれか一項に記載のワクチンであって、

まず哺乳類にベクターを注入し、次いでベクターによりコードされるポリペプチドで2回追加免疫抗原性を高めた、ワクチン。

【請求項24】

クラミジア感染症を予防するためのワクチンの製造における、ポリペプチドの使用であって、

40

前記ポリペプチドが、

(i) 配列番号2、または

(iii) 配列番号2とアミノ酸配列において少なくとも90%の同一性を有する配列であって、免疫原性を失わずに改変された配列を含んでなる、使用。

【請求項25】

クラミジア感染症を予防するための製剤の製造における、発現され得る核酸の使用であって、

前記の核酸が、

50

(i) 配列番号2をコードする、核酸配列、または
(ii) 配列番号2と少なくとも90%の同一性を有するポリペプチドであって、免疫原性を失わずに改変されたポリペプチドをコードする、核酸配列を含んでなる、使用。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の背景】

発明の分野

本発明はヒトなどの哺乳類におけるクラミジア感染症の予防および治療に使用できるクラミジア (*Chlamydia*) omp P6 前駆体および対応するDNA分子に関する。

10

【0002】

背景技術

クラミジアは原核生物である。それらは、リポ多糖および大腸菌 (*E. coli*) で見られるタンパク質と構造的および機能的に類似するいくつかの膜タンパク質を含む三層の外膜をはじめ、グラム陰性菌との形態的および構造的類似性を示す。それらは、代謝上不活性であるが感染力のある細胞外段階と、複製はするが感染力のない細胞内段階からなる独自の二相性生活環を有する偏性細胞内寄生体である。生活環の複製段階は感染した宿主細胞の細胞質からこの細菌を隔離する膜に結合した封入体内で起こる。

【0003】

肺炎クラミジア (*C. pneumoniae*) は一般的なヒト病原体で、初めにオウム病クラミジア (*Chlamydia psittaci*) の TWAR 株として記載されていたが、その後は新種であると認識されている。肺炎クラミジアは他のクラミジア種 (トラコーマクラミジア (*C. trachomatis*)、C. ペコラム (*C. pecorum*) およびオウム病クラミジアとは抗原的、遺伝的および形態的に異なっている。それはトラコーマクラミジアまたはオウム病クラミジアといずれかと DNA 配列において 10% 以下の相同性しか示さない。

20

【0004】

肺炎クラミジアはコミュニティ獲得性の肺炎の三番目に多い一般的な原因であり、肺炎球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) および肺炎マイコプラズマ (*Mycoplasma pneumoniae*) よりもわずかに低い頻度である (Grayston et al. (1995) *Journal of Infectious Diseases* 168:1231; Campos et al. (1995) *Investigation of Ophthalmology and Visual Science* 36:1477)。それはまた気管支炎および副鼻腔炎をはじめとする上気道症状および疾患を引き起こす (Grayston et al. (1990) *Journal of Infectious Diseases* 168:1231; Grayston et al. (1990) *Journal of Infectious Diseases* 161:618-625; Marrie (1993) *Clinical Infectious Diseases*, 18:501-513; Wang et al. (1986) *Chlamydial Infections*, Cambridge University Press, Cambridge, p.329)。大部分の成人集団 (60% を超える) は肺炎クラミジアに対する抗体を持っており (Wang et al. (1986) *Chlamydial Infections*, Cambridge University Press, Cambridge, p.329)、これはまだ認識されていないか、または無症候性である過去の感染を示している。

30

【0005】

肺炎クラミジア感染は通常には急性呼吸器系疾患 (すなわち、咳、咽頭炎、嚔声、および発熱; 聴診での異常な胸部音) として示される。ほとんどの患者では咳が 2 ~ 6 週間持続し、回復が遅い。このようなケースの約 10% で、上気道感染の後に気管支炎または肺炎が起こる。さらに肺炎クラミジア流行の際には、次ぎにこれらの肺炎患者の約半数、特に虚弱者や高齢者で肺炎球菌の同時感染が認められた。上記で示されたように、肺炎クラミジア感染が呼吸器系感染以外の疾患にも関連するさらに多くの証拠がある。

40

【0006】

この生物の貯蔵庫はおそらくヒトである。オウム病クラミジアとは対照的に、鳥類または動物の貯蔵庫は知られていない。伝染については明らかには定義されていない。それは分泌物との直接的な接触、媒介物、または風媒拡散によると考えられる。長い潜伏期間があり、それは何ヶ月も持続する。流行の分析に基づけば、感染者はその生物の効率の悪い媒

50

介者であるので、肺炎クラミジアはある集団にゆっくり拡散すると考えられる（患者から患者の間隔は平均30日）。肺炎クラミジア罹病率は普遍的である。小児期に最初に感染した後、成人期に再感染が起こる。肺炎クラミジアは、2～3年持続する高い発病率（流行病）間隔を重ね合わせると著しくは世界中の伝染病であると考えられる。トラコーマクラミジア感染は肺炎クラミジアに対する交差免疫を付与しない。感染症は経口抗せ物質テトラサイクリンまたはエリスロマイシン（2g/d、少なくとも10～14日間）で容易に治療される。最近開発された薬剤アジスロマイジンはクラミジア感染症に対して単回投与として極めて有効である。

【0007】

ほとんどの場合、肺炎クラミジア感染は軽いことが多く、合併症もなく、感染症の90%までは亜急性であるか、認識されない。工業国の小児の間では感染は5才まではまれであると考えられていたが、最近の研究(E Normann et al, *Chlamydia pneumoniae* in children with acute respiratory tract infections, *Acta Paediatrica*, 1998, Vol 87, Iss 1, pp 23-27)では、この世代の子供の多くは血清反応陰性であるにもかかわらず感染のPCR証拠を示し、2～4才の17～19%有病率と見積もられることが報告されている。発展途上国では、幼児の間の肺炎クラミジア抗体の血清有病率は上昇し、肺炎クラミジアは急性下気道疾患、ならびに世界の熱帯地方の幼児および小児の死亡率の重要な原因であり得ると疑われる。

【0008】

血清有病率の研究および地方の流行病の研究によれば、肺炎クラミジアの一次感染は通常、5才から20才の間で起こる。米国では例えば、肺炎クラミジアによって引き起こされる毎年の小児肺炎の30,000症例であると思積もられる。感染は小児または若年（例えば、学生や徴兵）群の中で集団発生する。

【0009】

肺炎クラミジアはコミュニティ獲得性の下気道感染症の10～25%を起こす（スウェーデン、イタリア、フィンランドおよび米国から報告）。流行中、肺炎クラミジアは感染は肺炎の症例の50～60%にのぼると考えられる。このような期間にはまた、さらに肺炎球菌による混合感染があることが報告されている。

【0010】

成人期の再感染もよくあり、臨床徴候はより軽い傾向にある。集団血清有病率の研究に基づけば、年齢とともに曝露が増す傾向にあり、これは特にヒトにおいて明らかである。何人かの研究者が、持続性、無症候性の肺炎クラミジア感染状態がよくあることであると推測している。

【0011】

中年または高年者では、肺炎クラミジア感染は慢性気管支炎および副鼻腔炎へと進行する可能性がある。米国での研究は、60才より若い人において肺炎クラミジアによって引き起こされた発病率は年間1,000人につき1症例であるが、若年層では発病率は3倍に上昇していたことを明らかにした。肺炎クラミジア感染は病床中にある患者を除いては入院につながることはまれである。

【0012】

極めて重要なのは、アテローム性動脈硬化症と肺炎クラミジア感染との関連である。従来の肺炎クラミジア感染と心臓発作、冠動脈疾患および頸動脈疾患との関係を示すいくつかの疫学研究がある(Saikku et al. (1988) *Lancet*; ii:983-986; Thom et al. (1992) *JAMA* 268:68-72; Linnanmaki et al. (1993), *Circulation* 87:1030; Saikku et al. (1992) *Annals Internal Medicine* 116:273-287; Melnick et al (1993) *American Journal of Medicine* 95:499)。さらに、この微生物は冠動脈、頸動脈、末梢動脈および大動脈のアテロームおよび脂肪索で検出されている(Shor et al. (1992) *South African Medical Journal* 82:158-161; Kuo et al. (1993) *Journal of Infectious Diseases* 167:841-849; Kuo et al. (1993) *Arteriosclerosis and Thrombosis* 13:1501-1504; Campbell et al (1995) *Journal of Infectious Diseases* 172:585; Chiu et al. *Circulation*, 1997. *Circ*

10

20

30

40

50

ulation. 96:2144-2148)。種々の肺炎クラミジアは冠動脈および頸動脈から回収されている(Ramirez et al (1996) *Annals of Internal Medicine* 125:979-982; Jackson et al. 1997. *J. Infect. Dis.*176:292-295)。さらに肺炎クラミジアはウサギモデルにおけるアテローム性動脈硬化症の変化を誘導することが示されている(Fong et al (1997) *Journal of Clinical Microbiology* 35:48 および Laitinen et al. 1997. *Infect. Immun.* 65:4832-4835)。考え併せるとこれらの結果は、クラミジア性のアテローム性動脈硬化症の疫学的重要性は依然証明されてはいないが、肺炎クラミジアがヒトにおいてアテローム性動脈硬化症を引き起こし得るという高い可能性があることを示している。

【 0 0 1 3 】

いくつかの最近の研究はまた、肺炎クラミジア感染と喘息との間の関連も示している。感染は喘鳴性の喘息性気管支炎、成人発症喘息および成人における喘息の急性再燃に結びつけられており、小規模研究では何人かで長期抗生物質治療が効果的にゆっくりと疾病の重篤度を軽減することが示されている(Hahn DL, et al. *Evidence for Chlamydia pneumoniae infection in steroid-dependent asthma.* *Ann Allergy Asthma Immunol.* 1998 Jan; 80(1): 45-49; Hahn DL, et al. *Association of Chlamydia pneumoniae IgA antibodies with recently symptomatic asthma.* *Epidemiol Infect.* 1996 Dec; 117(3): 513-517; Bjornsson E, et al. *Serology of chlamydia in relation to asthma and bronchial hyperresponsiveness.* *Scand J Infect Dis.* 1996; 28(1): 63-69; Hahn DL. *Treatment of Chlamydia pneumoniae infection in adult asthma: a before-after trial.* *J Fam Pract.* 1995 Oct; 41(4): 345-351; Allegra L, et al. *Acute exacerbations of asthma in adults: role of Chlamydia pneumoniae infection.* *Eur Respir J.* 1994 Dec; 7(12): 2165-2168; Hahn DL, et al. *Association of Chlamydia pneumoniae (strain TWAR) infection with wheezing, asthmatic bronchitis, and adult-onset asthma.* *JAMA.* 1991 Jul 10; 266(2): 225-230)。

【 0 0 1 4 】

これらの結果に照らして、肺炎クラミジア感染に対する防御ワクチンが極めて重要であると考えられる。いずれのヒトクラミジア感染にも有用なワクチンはまだない。有効なワクチンは物理的または化学的に不活化したクラミジアを用いて開発できると考えられる。しかしながらかかるワクチンは高い安全域がない。一般に、安全なワクチンはその微生物の遺伝子操作のよって弱毒化するか、または組換えによって作出される。従って、ヒトクラミジア感染に対する有効かつ安全なワクチンを作成する主な障壁は、クラミジア、特に肺炎クラミジアに関する遺伝情報が不十分であることであった。

【 0 0 1 5 】

肺炎クラミジアおよびオウム病クラミジアを用いた研究では、クラミジアに対する安全かつ有効なワクチンが達成可能な目標であることを示している。例えば、トラコーマクラミジアの肺感染から回復したマウスはその後の腫攻撃によって誘導される不妊症から保護される(Pal et al. (1996) *Infection and Immunity.* 64:5341)。同様に、不活化したオウム病クラミジアで免疫化したヒツジはその後のクラミジア誘発性の流産および死産から保護された(Jones et al. (1995) *Vaccine* 13:715)。マウスモデルにおいて、クラミジア感染症からの保護は、Th1免疫応答、特にCD8+CITL応答と関連づけられている(Rotter et al.1999. *J. Immunol.* 162:2829-2836 および Penttila et al.1999. *Immunology* 97:490-496)。そして、同様の応答が保護を付与するためにヒトにおいて誘導されることが必要となることは起こりそうもない。しかしながら、肺炎クラミジアに対する保護免疫応答を引き起こすことができる抗原はあまり知られていない。粘膜表面の十分高力価の中和抗体の存在も保護作用を発揮し得る(Cotter et al. (1995) *Infection and Immunity* 63:4704)。

【 0 0 1 6 】

肺炎クラミジア種内の抗原のバリエーションは遺伝情報が不十分であるために十分記載されていないが、バリエーションはトラコーマクラミジアに基づいて存在しているものと予測される。トラコーマクラミジアの血清学的亜型は主要外膜タンパク質(MOMP)にお

10

20

30

40

50

ける抗原バリエーションに基づいて定義されているが、公表されている肺炎クラミジア M O M P 遺伝子配列はこの微生物のいくつかの異なる単離物の間ではダリエーションを示していない(Campbell et al Infection and Immunity (1990)58:93; McCafferty et al Infection and Immunity (1995) 63:2387-9; Gaydos et al. Infection and Immunity (1992)60(12) :5319-5323。76kDaの抗原をコードする遺伝子は肺炎クラミジアのただ単一株からクローニングされたものであり、その配列は公開されている(Perez Melgosa et al., Infection and Immunity. 1994. 62:880)。9kDaおよび60kDaのシステイン豊富な外膜タンパク質遺伝子を含むオペロンが記載されている(Watson et al., Nucleic Acids Res (1990) 18:5299; Watson et al., Microbiology (1995) 141:2489)。肺炎クラミジアに対する免疫血清によって認識される多くの抗原は総てのクラミジア間で保存されているが、98kDa、76kDaおよび他のいくつかのタンパク質は肺炎クラミジア特異的である可能性がある(Knudsen et al. Infect. Immun. 1999. 67: 375-383; Perez Melgosa et al., Infection and Immunity. 1994. 62:880; Melgosa et al., FEMS Microbiol Lett (1993) 112:119; Campbell et al., J Clin Microbiol (1994) 32:583)。76kDaおよび54kDaの抗原に対する抗血清が報告されており、インビトロにおいて肺炎クラミジアを無効にする(Perez Melgosa et al. 1994. Infect. Immun. 62:880-886 および Wiedman-Al-Ahmad et al. 1997. Clin Diagn.Lab. Immunol. 4:700-704)。肺炎クラミジア血清型の数および相対頻度の評価、ならびに抗原の定義はまだ可能ではない。肺炎クラミジアCWL-029株の全ゲノム配列はすでに知られており(<http://chlamydia-www.berkeley.edu:4231/>)、さらなる配列が入手できるので、抗原バリエーションのよりよい理解が得られる。

【0017】

肺炎クラミジアに対して血清を免疫化することによって認識される多くの抗原は総てのクラミジアにわたって保存されているが、98kDa、76kDaおよび54kDaタンパク質は肺炎クラミジア特異的であると思われる(Campos et al. (1995) Investigation of Ophthalmology and Visual Science 36: 1477; Marrie (1993) Clinical Infectious Diseases, 18:501-513; Wiedmann-Al-Ahmad M, et al. Reactions of polyclonal and neutralizing anti-p54 monoclonal antibodies with an isolated, species-specific 54-kilodalton protein of Chlamydia pneumoniae, Clin Diagn Lab Immunol. 1997 Nov; 4(6) : 700-704)。患者由来の血清による単離物の免疫プロットングは、単離物間でプロットングパターンにバリエーションがあることを示し、血清型肺炎クラミジアが存在し得ること示している(Grayston et al. (1995) Journal of Infectious Diseases 168:1231; Ramirez et al. (1996) Annals of Internal Medicine 125:979-982)。しかしながらこの結果は、患者の血清の免疫プロットプロフィールが感染後経時的に変化するので、患者の感染状態によって混乱しているかもしれない。血清型の数および相対頻度の評価、ならびに抗原の定義は依然として可能ではない。

【0018】

肺炎クラミジアのマウス肺炎(MOPN)株を用いる、Balb/cマウスにおける肺感染に対する保護免疫応答を誘導するための、DNA免疫措置の使用が報告されている(Zhang et al. 1997. J.Infect.Dis. 76:1035-1040、およびZhang et al. 1999. Immunology. 96:314-321)。

以下の文献も関連性のあり得るものである: W099/27105A (GENSET SA; GRIFFAIS REMY(FR)) 3 June 1999 (1999-06-03) および "Nucleotide sequence of the complete genome of Chlamydia pneumoniae" GENESEQ NUCLEIC ACID SEQUENCE DATABASE, 13 September 1999 (1999-09-03), XP002168446 および "Chlamydia pneumoniae transmembrane protein sequence" GENESEQ AMINO ACID SEQUENCE DATABASE, 13 September 1999 (1999-09-13), XP002168447; KALMAN et al.: "Peptideglycan-associated lipoprotein" SWISSPROT SEQUENCE DATABASE, 1 May 1999 (1999-05-01), XP002168449 および KALMAN et al.: "Comparative genomes of Chlamydia pneumoniae and C. trachomatis" NATURE GENETICS, vol .21, April 1999 (1999-04), 385-389頁, XP000853883; W095/12411A; およびW097/46709

10

20

30

40

50

A.

【0019】

従って、クラミジア感染を予防および治療するのに用いられる治療する肺炎クラミジアのポリヌクレオチド配列を同定および単離する必要性がある。

【0020】

【発明の概要】

本発明は、クラミジア感染を予防、治療または診断する方法に使用できる、クラミジアポリペプチド指定 omp P 6 前駆体遺伝子産物（配列番号 1）をコードする精製および単離されたポリヌクレオチド分子を提供する。本発明の一つの形態では、ポリヌクレオチド分子は配列番号 2 のポリペプチドをコードする DNA である。

10

【0021】

本発明のもう一つの形態は単離された DNA 分子に対応するポリペプチドを提供する。対応するコードペプチドのアミノ酸配列は配列番号 2 で示されている。

【0022】

当業者ならば、クラミジア omp P 6 前駆体をコードするポリヌクレオチド配列を提供する限り、本発明はまたかかるポリペプチドに由来する断片をコードするポリヌクレオチドを提供することが分かるであろう。さらに、本発明は、本明細書に記載の非必須アミノ酸の付加、欠失または置換によって生じるかかるペプチドおよびそれらに由来する断片の変異体および誘導体、ならびにを提供するものと理解される。当業者ならば、本発明はクラミジアポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列が提供される限り、さらにかか

20

【0023】

本発明は広い応用を有し、発現カセット、ベクターおよび本発明のポリヌクレオチドで形質転換またはトランスフェクトされた細胞を含む。従って、本発明はさらに (i) 組換え宿主系において本発明のポリペプチドを製造する方法、ならびに関連の発現カセット、ベクター、および形質転換またはトランスフェクト細胞；(ii) 希釈剤または担体と組み合わせた、本発明のポリヌクレオチドを含有するワクチン、またはポックスウイルス、ネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium*) またはコレラ菌 (*Vibrio cholerae*) ベクターなどの生ワクチン（かかるワクチンおよびワクチンベクターは、例えばクラミジア感染を予防および治療するのに有用である）、ならびに関連の医薬組成物および関連の治療および/または予防方法；(iii) 裸の形態もしくは送達ビヒクルと配合した本発明の RNA または DNA 分子、本発明のポリペプチドもしくはポリペプチドの組合せ、または単一特異性抗体、ならびに関連の医薬組成物の治療的および/または予防的使用；(iv) DNA または RNA 分子、単一特異性抗体、または本発明のポリペプチドの使用を含み得る、生物学的サンプルにおけるクラミジアの存在の診断方法；および (v) 抗体に基づくアフィニティークロマトグラフィーによる本発明のポリペプチドの精製方法を提供する。

30

【0024】

【発明の具体的説明】

肺炎クラミジアゲノムからクラミジア omp P 6 前駆体をコードするオープンリーディングフレーム (ORF) が同定されている。このタンパク質をコードする遺伝子を発現プラスミドに挿入されているが、これはクラミジア感染に対する免疫防御を与えることが分かっている。従ってこの omp P 6 前駆体および関連のポリペプチドを用いてクラミジア感染を予防および治療することができる。

40

【0025】

本発明の第一の態様によれば、クラミジアポリペプチドをコードする単離ポリヌクレオチドが提供され、そのアミノ酸配列は配列番号 2 に示されている。

【0026】

「単離されたポリヌクレオチド」とは、天然に存在する環境から取り出されたポリヌクレオチドと定義される。例えば生細菌のゲノム中、または遺伝子バンクの一部として存在す

50

る天然DNA分子は単離されないが、細菌ゲノムの残存部分から同分子は分離される、例えばクローニング（増幅）の結果として単離される。典型的には単離されたDNA分子は天然に存在するゲノムの5'または3'末端にすぐ隣接するDNA領域（例えばコドン領域）から遊離している。かかる単離ポリヌクレオチドはベクターまたは組成物の一部であってよいが、かかるベクターまたは組成物がかかるポリヌクレオチドの自然環境の一部ではないということから「単離された」と定義される。

【0027】

本発明のポリヌクレオチドはRNAまたはDNA（cDNA、ゲノムDNAまたは合成DNA）のいずれか、またはその改変体、変異体、相同体もしくは断片である。DNAは二本鎖または一本鎖のいずれかであり、一本鎖であれば、コード鎖または非コード（アンチセンス）鎖のいずれかである。配列番号1で示される本発明のポリペプチドをコードする配列のいずれか1つが、（a）コード配列、（b）（a）の転写により誘導されるリボヌクレオチド配列、または（c）遺伝子コードの重複または縮重により同じポリペプチドをコードするコード配列である。「ポリペプチド」または「タンパク質」とは、長さまたは翻訳後修飾（例えばグリコシル化またはリン酸化）にかかわらず、いずれのアミノ酸鎖をも意味する。本願では両用語を相互に使用してもよい。

10

【0028】

本発明の第一の態様によれば、配列番号2と相同なアミノ酸配列が提供される。本明細書において使用される「相同アミノ酸配列」とは、臨界融解温度（ T_m ）を超えない25～35において、配列番号1の核酸配列のいずれの部分ともハイブリダイズする核酸配列によって総てまたは一部がコードされるいずれかのポリペプチドである。相同アミノ酸配列は配列番号2で示されるアミノ酸配列と1つ以上の保存的アミノ酸置換に関して異なるものである。またかかる配列は血清型変異体（下記）ならびに免疫原性などのポリペプチド本来の特徴を維持する、欠失または挿入を含む配列も包含する。かかる配列は配列番号2と好ましくは少なくとも75%、さらに好ましくは80%、および最も好ましくは90%同一である。

20

相同アミノ酸配列には配列番号2と同一または実質的に同一の配列が挙げられる。「実質的に同一のアミノ酸配列」とは、参照アミノ酸配列と少なくとも90%、好ましくは95%、さらに好ましくは97%、および最も好ましくは99%同一であり、かつ好ましくは参照配列と大部分の保存的アミノ酸置換に関して異なる配列を意味する。

30

【0029】

保存的アミノ酸置換は同種類のアミノ酸間の置換である。これらの種類には、例えばアスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、およびチロシンのような非荷電極性側鎖を有するアミノ酸；リジン、アルギニン、およびヒスチジンのような塩基性側鎖を有するアミノ酸；アスパラギン酸、およびグルタミン酸のような酸性側鎖を有するアミノ酸；およびグリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン、およびシステインのような非極性側鎖を有するアミノ酸が挙げられる。

【0030】

相同性は、Genetics Computer Group, University of Wisconsin Biotechnology Center, 1710 University Avenue, Madison, WI 53705のSequence Analysis Software Packageのような配列解析ソフトウェアを用いて求められる。アミノ酸配列を同一性が最大となるように配列する。配列に人為的にギャップを挿入し適当な配列を得てもよい。ひと度最適なアライメントが設定されれば、全位置数に対し、両配列のアミノ酸が一致する位置を総て記録することにより相同性の程度が確認される。

40

【0031】

同様に相同ポリヌクレオチド配列も定義される。相同配列は配列番号1のコード配列と好ましくは少なくとも45%、より好ましくは60%、さらに好ましくは75%、さらにより好ましくは85%、および最も好ましくは90%同一のものである。

【0032】

50

本発明の第一の態様によれば、配列番号2と相同な配列を有するポリペプチドには、天然に存在する対立遺伝子変異体、ならびに配列番号2のポリペプチド本来の特徴を維持する変異体または天然には存在しないいづれの他の変異体も包含される。

【0033】

当技術分野では公知であるように、対立遺伝子変異体はポリペプチドの生物学的機能を変更しない、1つ以上のアミノ酸の置換、欠失または付加を有することを特徴とするポリペプチドのもう一つの形態である。「生物学的機能」とは、たとえその機能が細胞の増殖または生存に必要でなくとも、それが天然に存在する細胞におけるポリペプチドの機能を意味する。例えばポーリンの生物学的機能は細胞外媒質に存在する化合物を細胞へ侵入させることである。生物学的機能は抗原性特性とは性質が異なる。ポリペプチドは1以上の生物学的機能を有し得る。

10

【0034】

対立遺伝子変異体は本来極めて一般的なものである。例えば肺炎クラミジアなどの細菌種は通常対立遺伝子の小さな変化に関し互いに異なる種々の株で表される。実際、異なる株において同じ生物学的機能を果たすポリペプチドはそれぞれの株で同一でないアミノ酸配列(およびポリヌクレオチド配列)を有していてもよい。この変動にかかわらず、一般に多くの対立遺伝子変異体に対して向けられた免疫応答が実証されている。クラミジアMOMP抗原の研究では、株間のMOMPのアミノ酸配列の変化にかかわらず、雑種株抗体結合が起こるとともに感染力の中和がなされ、免疫原として用いた際に、MOMPがアミノ酸変化を許容することが示される。

20

【0035】

相同ポリペプチドまたは対立遺伝子変異体をコードするポリヌクレオチドは、常法により抽出されたゲノム細菌DNAのポリメラーゼ鎖反応(PCR)増幅法によって回収される。これにはコードメインの5'および3'末端の上流および下流に適合する合成オリゴヌクレオチドプライマーの使用が含まれる。好適なプライマーは配列番号1で提供されるヌクレオチド配列情報により設計される。その工程は次の通りである: 10~40個、好ましくは15~25個のヌクレオチドからなるプライマーを選択する。効率的なハイブリダイゼーションを確実にするのに十分な比率でCおよびGを含有する、すなわちCおよびGヌクレオチド量が全ヌクレオチド含量の少なくとも40%、好ましくは50%である、プライマーを選択することが有利である。標準的なPCR反応は典型的には100μLにつき0.5~5単位のTaqDNAポリメラーゼ、各20~200μMのデオキシヌクレオチド(好ましくは同濃度)、全デオキシヌクレオチド濃度にわたって0.5~2.5mM、 $10^5 \sim 10^6$ の標的分子、および約20pmolの各プライマーを含む。PCRサイクル約25~50回を行い、アニーリング温度をプライマーの真のT_mより15~5低い温度とする。よりストリンジентなアニーリング温度にすると誤ってアニーリングしたプライマーの識別が向上し、プライマーの3'末端への誤ったヌクレオチドの組み込みが少なくなる。変性温度は95~97が典型であるが、G+C豊富な標的の変性についてはより高い温度が適当であろう。実施するサイクル数は最初の標的分子の濃度にもよるが、典型的には特異的でないバックグラウンド産物が集積する傾向にあるので、40サイクルを超えない方がよい。

30

40

【0036】

相同ポリペプチドまたは対立遺伝子変異体をコードするポリヌクレオチドを回収する別法としては、DNAまたはRNAライブラリーのハイブリダイゼーションスクリーニングによるものがある。ハイブリダイゼーション手順は当技術分野では十分に知られており、Ausubel et al., (Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons Inc., 1994), Silhavy et al. (Silhavy et al. Experiments with Gene Fusions, Cold Spring harbor Laboratory Press, 1994)、およびDavis et al. (Davis et al. A Manual for Genetic Engineering: Advanced Bacterial Genetics, Cold Spring harbor Laboratory Press, 1980)に記載されている。ハイブリダイゼーション条件を至適化する重要なパラメーターは、その温度を超えると2本の相補DNA鎖が互いに分離する臨界

50

融解温度を得るのに用いる式で表される (Casey & Davidson, Nucl. Acid Res. (1977) 4: 1539)。約 600 個以上のヌクレオチドでなるポリヌクレオチドの場合、この式は次の通りである：

$$T_m = 81.5 + 0.41x(\%G+C) + 16.6 \log(\text{陽イオン濃度}) - 0.63x(\% \text{ホルムアミド}) - 600 / \text{塩基数}$$

【0037】

好適なストリンジェント条件下では、ハイブリダイゼーション温度 (T_h) は約 20 ~ 40、20 ~ 25、または好ましくは計算値 T_m を超えない 30 ~ 40 である。最適温度および塩条件が容易に求め得ることは当業者には明らかであろう。

【0038】

本発明のポリヌクレオチドに関しては (i) 42 で 4 ~ 16 時間以内、6 x 50 %ホルムアミド含有 SSC における、または (ii) 65 で 4 ~ 16 時間以内、6 x SSC 水溶液 (1 M NaCl、0.1 M クエン酸ナトリウム (pH 7.0)) における、プレハイブリダイゼーションおよびハイブリダイズインキュベーション双方の間にストリンジェント条件に達する。

【0039】

典型的には、ハイブリダイゼーション実験は 60 ~ 68、例えば 65 で行われる。このような温度では、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件は 6 x SSC、好ましくは 2 x SSC または 1 x SSC、より好ましくは 0.5 x SSC、0.3 x SSC または 0.1 x SSC (ホルムアミドの不在下) 行うことができる。1 x SSC は 0.15 M NaCl および 0.015 M クエン酸ナトリウムを含む。

【0040】

天然には存在しない有用な相同体およびその断片は、アミノ酸配列変化および/または欠失を許容すると思われる抗原の領域を同定する公知の方法を用いて設計される。例として、異なる種由来の相同ポリペプチドを比較し、保存された配列を同定することを挙げる。さらに分岐した配列が最も配列変化を許容すると考えられる。配列間の相同性は例えば Altschul et al., Nucleic Acids Res., 25:3389-3402 (1997) の BLAST 相同性検索アルゴリズムを用いて解析すればよい。あるいは、コンピューターによって支援される可能性のある T または B 細胞エピトープの解析に基づいて配列が T および/または B 細胞とより高い反応性を有するように改変する。さらにもう 1 つの別法では、in vitro においてポリペプチド内のある特定のアミノ酸残基または配列を変異させ、次いでその変異ポリペプチドを、以下に概略を記した方法によりクラミジア感染症を予防または治療する能力についてスクリーニングする。

【0041】

当業者ならば、本発明のスクリーニングプロセスに従うことによって配列番号 2 のある特定の相同体がクラミジア感染症の予防または治療に有用であるかを過度な実験を行うことなく求められることが容易に理解されるであろう。

【0042】

スクリーニング手順は

(i) 動物、好ましくはマウスを試験相同体または断片により免疫化し；

(ii) 免疫化した動物にクラミジアを接種し；さらに

(iii) クラミジアに対する感染防御を付与するそれらの相同体または断片を選択する

工程を含んでなる。

【0043】

「感染防御を付与する」とは、試験相同体または断片で免疫化していない対照動物と比べた場合のクラミジア感染症のいずれかの影響の重篤度の軽減を意味する。

【0044】

本発明の第一の態様によれば、配列番号 2 の部分配列、配列番号 2 と相同なポリペプチド配列の部分配列、内部欠失により全長ポリペプチドから誘導されたポリペプチド、および融合タンパク質であるポリペプチド誘導体が提供される。

10

20

30

40

50

【 0 0 4 5 】

タンパク質に対する免疫応答を誘導するのに必要とされるものは総てタンパク質の小さな（例えば 8 ~ 10 個のアミノ酸）免疫原性領域であるため、ワクチンとしてタンパク質免疫原の断片および変異体を使用することは免疫学分野では一般に認められた慣例である。クラミジア以外の病原体の表面に曝された抗原に対応する種々の短い合成ペプチドがそれぞれの病原体、例えばネズミ乳癌ウイルスの 11 残基ペプチド (Casey & Davidson, Nucl. Acid Res. (1977) 4:1539)、セムリキ森林ウイルスの 16 残基ペプチド (Snijders et al., 1991. J.Gen.Virol. 72:557-565)、およびイヌパルボウイルス由来の 15 残基各々の 2 つの重複ペプチド (Langeveld et al., Vaccine 12(15):1473-1480, 1994) に対する有効なワクチン抗原であることが分かっている。

10

【 0 0 4 6 】

従って本記載により、配列番号 2 の部分配列またはその相同アミノ酸配列が全長配列固有のものであり、本発明により教示されることは当業者には容易に理解されるであろう。かかるポリペプチド断片の長さは少なくとも 12 個のアミノ酸であることが好ましい。それらの長さが少なくとも 20 個のアミノ酸、好ましくは少なくとも 50 個のアミノ酸、さらに好ましくは少なくとも 75 個のアミノ酸、およびさらに好ましくは少なくとも 100 個のアミノ酸であることが有利である。

【 0 0 4 7 】

配列番号 2 と相同な配列の部分配列をコードする 30 ~ 600 個のヌクレオチドからなるポリヌクレオチドは、以下に概略を記したパラメーターを用い、かつ増幅される断片の 5' および 3' 末端の上流および下流の配列に適合するプライマーを使用する PCR 増幅法により回収される。かかる増幅物の鋳型ポリヌクレオチドは配列番号 1 と相同な全長ポリヌクレオチド、または DNA または RNA ライブラリーなどのポリヌクレオチド混合物に含まれるポリヌクレオチドのいずれかである。部分配列を回収する別法としては、上記の条件下において T_m の計算式を用いてスクリーニングハイブリダイゼーションを行う。30 ~ 600 個のヌクレオチドからなる断片を回収する場合、計算値 T_m を減法 ($600 / \text{塩基対のポリヌクレオチドサイズ}$) により補正し、ストリンジェント条件を T_m を超えない 5 ~ 10 °C であるハイブリダイゼーション温度で定義する。20 ~ 30 塩基より短いオリゴヌクレオチドを得る場合、 T_m の計算式は次の通りである： $T_m = 4 \times (G + C) + 2 \times (A + T)$ 。例えば、50% C + G の 18 個のヌクレオチド断片は約 54 °C の T_m を有するであろう。配列番号 2 の断片またはその相同配列である短いペプチドは化学合成 (E. Gross and H. J. Meinhofer, 4 The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology; Modern Techniques of Peptide Synthesis, John Wiley & Sons (1981)、および M. Bodanzki, Principles of Peptide Synthesis, Springer-Verlag (1984)) により直接得られる。

20

30

【 0 0 4 8 】

有用なポリペプチド誘導體、例えばポリペプチド断片をアミノ酸配列のコンピューター支援解析を用いて設計する。これにより表面に曝された有望な抗原性領域が同定されよう (Hughes et al., 1992. Infect. Immun. 60(9):3497)。プログラム SEQSEE (Wishart DS, et al., "SEQSEE: タンパク質配列解析に適した総合プログラム" Comput Appl Biosci. 1994 Apr; 10 (2): 121-32) を使用する、産物の順応性および疎水性に基づく配列番号 2 にある 6 個のアミノ酸配列の解析では、有用な免疫原性断片および変異体を選択する基準として使用してもよい、可能性ある B および T 細胞エピトープが明らかとなり得る。この解析では抗体により認識されると考えられる外面特徴の適当な組合せを使用する。HLA-A0201 MHC サブクラスの有望な T 細胞エピトープが NIH で開発されたアプローチとエミュレートする、アルゴリズムにより明らかにすることができる (Parke KC, et al. "Peptide binding to MHC class I molecules: implications for antigenic peptide prediction." Immunol Res 1995; 14 (1) 34-57)。

40

【 0 0 4 9 】

感染防御 T 細胞依存性免疫応答を誘導するエピトープはポリペプチドの長さの範囲全体に存在する。しかしながら、いくつかのエピトープはポリペプチドの 2 次および 3 次構造に

50

よりマスクされる。かかるマスクされたエピトープを明らかにするため、大きな内部欠失を引き起こし、それによってもとのタンパク質構造の大部分を取り除いてマスクされたエピトープを露出させる。かかる内部欠失は時に株間の高変異性の免疫優性領域を取り去るといった付加的な利点をもたらす。ポリペプチド断片をコードするポリヌクレオチドおよび大きな内部欠失を有するおよびポリペプチドを常法により構築する(Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons Inc., 1994)。かかる方法には標準PCR、逆PCR、クローニングしたDNA分子の制限酵素処理、またはKunkel et al.(Kunkel et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1985) 82:448)の方法が挙げられる。これらの方法の成分およびその使用説明書はStratageneなどの様々な販売元から容易に入手可能である。ひと度欠失変異体を構築すれば、それらを上記のようにクラミジア感染症を予防または治療する能力について調べる。

10

【0050】

本明細書において使用される「融合ポリペプチド」は、他のいずれかのポリペプチドとNまたはC末端で融合した本発明のポリペプチドまたはポリペプチド誘導体を含むものである(以後ペプチドテールと記す)。かかる融合ペプチドを得る簡便な方法はポリヌクレオチド配列のインフレーム融合物、すなわちハイブリッド遺伝子の翻訳による。融合ポリペプチドをコードするハイブリッド遺伝子を発現ベクターに挿入し、それを用いて宿主細胞を形質転換またはトランスフェクトする。そうでなければ、ポリペプチドまたはポリペプチド誘導体をコードするポリヌクレオチド配列を、ペプチドテールをコードするポリヌクレオチドが既に存在する発現ベクターに挿入する。かかるベクターおよびその使用説明書は商業的に入手可能である、例えばペプチドテールがマルトース結合タンパク質である、New England BiolabsのpMal-c2またはpMal-p2系、Pharmaciaのグルタチオン-S-トランスフェラーゼ系、またはNovagenから入手可能なHis-Tag系。これらおよび他の発現系により本発明のポリペプチドおよび誘導体のさらなる単離のための便宜な手段が提供される。

20

【0051】

融合ポリペプチドの有利な例としては、本発明のポリペプチドまたは相同体もしくは断片と、コレラ毒素または大腸菌(*E. coli*)易熱性毒素のいずれかのサブユニットBのようなアジュバント活性を有するポリペプチドとを融合したものである。もう一つの有利な融合物はポリペプチド、相同体または断片と、強力なT細胞エピトープまたはB細胞エピトープとを融合したものである。かかるエピトープは当技術分野で公知のもの(例えば、B型肝炎コア抗原、D. R. Millich et al., "Antibody production to the nucleocapsid and envelope of the Hepatitis B virus primed by a single synthetic T cell site", Nature. 1987. 329: 547-549)、または、可能性のあるTまたはB細胞のコンピュータ補助分析に基づく本発明のもう一つのポリペプチドにおいて同定されたものであってよい。本発明のこの態様に従い、融合ポリペプチドは配列番号2、またはその相同体もしくは断片由来のTまたはB細胞エピトープを含んでなる(ここで、エピトープはそのポリペプチドまたは相同体もしくは断片の多様な変異体から誘導され、各々のエピトープはそのエピトープのポリペプチド内の位置および配列において他とは異なっている)。かかる融合物は全ポリペプチド、相同体または断片に対するTまたはB細胞応答を最適にするため、それはクラミジア感染症の予防および治療に有効である。

30

40

【0052】

融合を達成するために、本発明のポリペプチドと、アジュバント活性を有するポリペプチドのN、または好ましくはC末端、またはTもしくはB細胞エピトープとを融合する。そうでなければ、本発明のポリペプチド断片をアジュバント活性を有するポリペプチドのアミノ酸配列内に挿入する。またTまたはB細胞エピトープを本発明のポリペプチドのアミノ酸配列内に挿入してもよい。

【0053】

第一の態様によれば、本発明のポリヌクレオチドは異種シグナルペプチドを含む、本発明のポリペプチドへと成熟するハイブリッド前駆体ポリペプチドもコードする。「異種

50

シグナルペプチド」とは、本発明のポリペプチドの天然に存在する前駆体には見られないシグナルペプチドを意味する。

【0054】

RNA、DNA、または改変体もしくはその組合せを包含する本発明のポリヌクレオチド分子は多方面に適用される。DNA分子は例えば(i)組換え宿主系においてコードされたポリペプチドを生産するプロセスにおいて、(ii)クラミジア感染症を予防および/または治療する方法および組成物においてさらに用いられる、ポックスウイルスなどのワクチンベクターの構築において、(iii)裸の形態で、または送達ビヒクルと配合したワクチン薬剤として(RNA分子と同様)、および(iv)本発明のポリヌクレオチドを過剰発現できる、またはそれを無毒性、変異型で発現する弱毒クラミジア株の構築において用いられる。

10

【0055】

従って、本発明の第二の態様は、(i)発現に必要なエレメントの制御下、特に適当なプロモーターの制御下に置かれた本発明のDNA分子を含有する発現カセット；(ii)本発明の発現カセットを含有する発現ベクター；(iii)本発明の発現カセットおよび/またはベクターで形質転換またはトランスフェクトした原核生物または真核生物細胞、ならびに(iv)本発明のDNA分子の発現を可能にする条件下において、本発明の発現カセットおよび/またはベクターで形質転換またはトランスフェクトした原核生物または真核生物細胞を培養し、細胞培養物からコードされたポリペプチドまたはポリペプチド誘導体を回収することを含む、本発明のポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチドまたはポリペプチド誘導体を生産する方法を含む。

20

【0056】

組換え発現系は原核生物および真核生物宿主から選択される。真核生物宿主には、酵母細胞(例えばサッカロミセス・セレビスエ(*Saccharomyces cerevisiae*)またはピキア・パストリス(*Pichia pastoris*))、哺乳類細胞(例えばCOSI、NIH3T3、またはJEG3細胞)、節足動物細胞(例えばスポドプテラ・フルギベルダ(*Spodoptera frugiperda*))(SF9細胞)、および植物細胞が挙げられる。好ましい発現系としては大腸菌のような原核生物宿主がある。当業者には細菌および真核生物細胞は商業的供給者をはじめいくつかの異なる供給者、例えばAmerican Type Culture Collection(ATCC; Rockville, Maryland)から入手可能である。組換えタンパク質発現に用いる細胞の商業的供給者は細胞の使用説明書も提供する。

30

【0057】

発現系の選択は発現されるポリペプチドに望まれる特徴によって異なる。例えば、特定の脂質化形態(lipidated form)または他のいずれかの形で本発明のポリヌクレオチドを生産するのが有用であると考えられる。

【0058】

総てのベクターおよび発現制御配列ならびに宿主が本発明のポリヌクレオチドを等しく十分に発現するとは考えられないことは当業者には容易に理解されるであろう。しかしながら、下記の指針により、過度な実験を行うことなく、かつ本発明の範囲を逸脱することなく、ベクター、発現制御配列および宿主が選択できよう。

40

【0059】

ベクターを選択する場合、そこに存在し、かつ可能な限り複製し得るベクターと適合する宿主を選択する必要がある。ベクターコピー数、コピー数を調節する能力、抗生物質耐性などの他のタンパク質の発現が考慮される。発現制御配列を選択する場合、いくつかの変数が考慮される。重要な変数には配列の相対強度(例えば、種々の条件下において発現を駆動する能力)、配列の機能を調節する能力、発現されるポリヌクレオチドと制御配列間の適合性(例えば二次構造は効率的な転写を妨げるヘアピン構造を回避すると考えられる)がある。宿主を選択する場合、所望のコンホメーションで産物を発現でき、スケールアップが容易で、さらにそれが最終産物の精製を容易にすることが望むならば、選択されたベクターと適合し、発現産物のいずれかの起こりうる有毒作用に耐性であり、発現産物を

50

効率的に分泌できる単細胞宿主を選択する。

【0060】

発現カセットの選択は発現されるポリペプチドに望まれる特徴だけでなく選択される宿主系にもよっても異なる。典型的には発現カセットは選択された宿主系において機能し得るものであり、かつ構成的または誘導性であり得るプロモーター；リボソーム結合部位；要すれば開始コドン（ATG）；シグナルペプチド、例えば脂質化(lipidation)シグナルペプチドをコードする領域；本発明のDNA分子；停止コドン；および所望により3'末端領域（翻訳および/または転写ターミネーター）を含む。シグナルペプチドコード領域は本発明のポリヌクレオチドに隣接し、適当なリーディングフレームに存在する。シグナルペプチドコード領域は成熟ポリペプチドをコードするDNA分子と相同または異種であり、発現に用いられる宿主の分泌機構と適合する。本発明のDNA分子により単独またはシグナルペプチドとともに構成されるリーディングフレームは転写および翻訳が宿主系において起こるようにプロモーターの制御下に置かれる。プロモーターおよびシグナルペプチドコード領域は広く知られており、当業者ならば入手可能である。例えばアラビノースにより誘導可能であり（プロモーター *araB*）かつ大腸菌などのグラム陰性菌において機能し得る、ネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium*)（および誘導體）のプロモーター（米国特許第5,028,530号およびCagnon et al., (Cagnon et al., Protein Engineering (1991) 4(7):843)に記載）；T7ポリメラーゼを発現する数多くの大腸菌株において機能し得る、RNAポリメラーゼをコードするバクテリオファージT7遺伝子のプロモーター（米国特許第4,952,496号に記載）；OspA脂質化シグナルペプチド；およびRlpB脂質化シグナルペプチド(Takase et al., J. Bact. (1987) 169:5692)が挙げられる。

10

20

【0061】

典型的には発現カセットは選択された発現系で複製する能力が選択される発現ベクターの一部である。発現ベクター（例えばプラスミドまたはウイルスベクター）は、例えばPouwels et al. (Cloning Vectors: A Laboratory Manual 1985, Supp. 1987)に記載されるものから選択することができる。好適な発現ベクターは商業的供給者から購入することができる。

【0062】

宿主細胞を発現ベクターで形質転換/トランスフェクトする方法は当技術分野では十分に公知であり、Ausubel et al., (Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons Inc., 1994)に記載されるように選択した宿主系によって異なる。

30

【0063】

発現の際、本発明の組換えポリペプチド（またはポリペプチド誘導體）は生産され細胞内コンパートメントに留まり、細胞外媒質または原形質膜空間に分泌/放出されるか、または細胞膜に埋め込まれる。ポリペプチドは組換え細胞培養物の遠心分離後の細胞抽出物からまたは上清から実質的に精製された形で回収される。典型的には組換えポリペプチドは抗体に基づくアフィニティー精製により、またはポリペプチドまたはその誘導體をコードするポリヌクレオチドとアフィニティー結合小ドメインとの融合などの当業者によって容易に適合できる十分に公知な他の方法により精製する。本発明のポリペプチドを免疫アフィニティーにより精製するのに有用な抗体は下記のようにして得られる。

40

【0064】

本発明のポリヌクレオチドはまたワクチンとしても有用である。遺伝子送達ビヒクル（生ワクチンベクター）としてウイルスまたは細菌宿主を用いるか、または遺伝子を遊離型で、例えばプラスミドに挿入して投与するかの2つの主要な経路がある。本発明のポリヌクレオチドの治療または予防効力は下記のようにして評価される。

【0065】

従って、本発明の第三の態様によれば、(i)発現に必要なエレメントの制御下に置かれた本発明のDNA分子を含有するボックスウイルスなどのワクチンベクター；(ii)本発

50

明のワクチンベクターとともに希釈剤または担体を含んでなる材料の組成物；とりわけ（iii）治療または予防上有効な量の本発明のワクチンベクターを含有する医薬組成物；（iv）哺乳類に免疫原性上有効な量の本発明のワクチンベクターを投与してクラミジアに対する感染防御または治療免疫応答を誘導することを含む、哺乳類（例えばヒト）のクラミジアに対する免疫応答を誘導する方法；またこの方法は動物（例えばネコまたは鳥）のクラミジア感染症を治療または予防する獣医学的適用に用いることができる；さらに詳しくは（v）感染した個体に予防または治療量の本発明のワクチンベクターを投与することを含む、クラミジア（例えばC.トラチヨマチス(C. trachomatis)、C.プシタチ(C. psittaci)、肺炎クラミジア、C.ペコラム(C. pecorum)）感染症を予防および/または治療する方法が提供される。さらに本発明の第三の態様によれば、クラミジア感染症を予防および/または治療する医薬の製造における本発明のワクチンベクターの使用が含まれる。

10

【0066】

本明細書において、ワクチンベクターは本発明の1つまたはいくつかのポリペプチドまたは誘導体を発現する。ワクチンベクターはさらに免疫応答を増大する（アジュバント効果）インターロイキン-2（IL-2）またはインターロイキン-12（IL-12）などのサイトカインを発現すると考えられる。発現される各成分が哺乳類細胞における発現に必要なエレメントの制御下に置かれていることは明らかである。

【0067】

本発明の第三の態様によれば、組成物はそれぞれが本発明のポリペプチドまたは誘導体を発現し得るいくつかのワクチンベクターを含んでなる。組成物はまた付加的なクラミジア抗原、またはそのサブユニット、断片、相同体、変異体もしくは誘導体；または必要に応じてIL-2もしくはIL-12などのサイトカインと共に、または該サイトカインをを発現し得るワクチンベクターを含んでなってもよい。

20

【0068】

哺乳類における感染症を治療または予防する予防接種方法は、いずれかの一般的な経路により、特に粘膜（例えば目、鼻腔内、口腔、胃、肺、腸、直腸、膣、または尿管）表面にまたは非経口（例えば皮下、皮内、筋肉内、静脈内、または腹膜内）経路により投与される本発明のワクチンベクターの使用を含んでなる。好ましい経路はワクチンベクターの選択による。1回の投与で治療を果たしてもよいし、または間隔をおいて反復してもよい。好適な用量は当業者に理解されている、ワクチンベクター自体、投与経路または予防接種する哺乳類の条件（重量、年齢など）といった種々のパラメーターによって異なる。

30

【0069】

当技術分野で入手可能な生ワクチンベクターには、アデノウイルスおよびポックスウイルスなどのウイルスベクター、ならびに細菌ベクター（例えば赤痢菌属(*Shigella*)、サルモネラ菌(*Salmonella*)、コレラ菌(*Vibrio cholerae*)、乳酸桿菌(*Lactobacillus*)、カルメット-ゲラン菌(*Bacille bilie de Calmette-Guerin*) (BCG)、および連鎖球菌(*Streptococcus*)）が挙げられる。

【0070】

アデノウイルスベクター例、ならびに本発明のDNA分子を発現し得るアデノウイルスベクターの構築方法が米国特許第4,920,209号に記載されている。ポックスウイルスベクターにはワクシニアおよびカナリヤポックスウイルスがあり、それぞれ米国特許第4,722,848号および米国特許第5,364,773号に記載されている。例えばワクシニアウイルスベクターの記載はTartaglia et al., Virology (1992) 188:217、カナリヤポックスの参考文献はTaylor et al. Vaccine (1995) 13:539も参照。哺乳類細胞における発現に好適な条件下で本発明のポリヌクレオチドをウイルスゲノムに挿入するために、本発明のポリヌクレオチドを発現し得るポックスウイルスベクターをKieny et al., Nature (1984) 312:163に記載される相同組換えにより得る。一般に治療または予防に使用するワクチンウイルスベクターの用量はキログラム当たりのプラーク形成単位が、約 1×10^4 ~ 約 1×10^{11} 、有利には約 1×10^7 ~ 約 1×10^{10} 、好ましくは約 1×10^7 ~ 約 1×10^9 であってよい。好ましくは、ウイルスベクターを、例えば4週間おき

40

50

に3回で、非経口投与する。本発明のウイルスベクターを含有する組成物に化学アジュバントを加えることを避け、それによってウイルスベクター自身に対する免疫応答を最小にすることが好ましい。

【0071】

経口生ワクチンとして有用な無毒性コレラ菌変異株が知られている。Mekalanos et al., Nature (1983) 306:551および米国特許第4, 882, 278号では、機能し得るコレラ毒素が生産されないように欠失させた、2つのc t x A対立遺伝子それぞれの実在する量のコード配列を有する株が記載されている。WO92/11354では、変異(この変異を単一株においてc t x A変異と組み合わせてもよい)によりi r g A遺伝子座を不活性化した株が記載されている。WO94/01533では、機能し得るc t x Aおよびa t t R S 1 DNA配列を欠いた欠失変異体が記載されている。WO94/19482に記載されるように、これらの変異株を遺伝子操作して非対応抗原を発現させる。本発明のDNA分子によりコードされるポリペプチドまたはポリペプチド誘導体を発現し得るコレラ菌株の有効なワクチン用量は、選択された投与経路に適した用量中の生存細菌数、約 1×10^5 ~ 約 1×10^9 、好ましくは約 1×10^6 ~ 約 1×10^8 を含有する。好ましい投与経路としてはあらゆる粘膜経路が挙げられ、最も好ましくはこれらのベクターは鼻腔内または経口投与される。

10

【0072】

非対応抗原の組換え発現用に遺伝子操作した、またはしない弱毒ネズミチフス菌株、および経口ワクチンとしてのそれらの使用は、Nakayama et al. (Bio/Technology (1988) 6:693)およびWO92/11361に記載されている。好ましい投与経路としてはあらゆる粘膜経路が挙げられ、最も好ましくはこれらのベクターは鼻腔内または経口投与される。

20

【0073】

本発明においてワクチンベクターとして用いられる他の細菌株は、High et al., EMBO (1992) 11:1991およびSizemore et al., Science (1995) 270:299(フレクスナー赤痢菌(*Shigella flexneri*)); Medaglini et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1995) 92:6868(ストレプトコッカス・ゴルドニー(*Streptococcus gordonii*)); Flynn J. L., Cell. Mol. Biol. (1994) 40 (suppl. 1): 31(Bacille Calmette Guerin)、WO88/06626、WO90/00594、WO91/13157、WO92/01796、およびWO92/21376(カルメットーグラン菌)に記載されている。

30

【0074】

細菌ベクターでは本発明のポリヌクレオチドを細菌ゲノムに挿入するか、または遊離状態でプラスミドの一部として残す。

【0075】

本発明のワクチン細菌ベクターを含んでなる組成物はアジュバントをさらに含有してもよい。いくつかのアジュバントが当業者に公知である。好ましいアジュバントは以下に挙げるように選択される。

【0076】

従って、本発明の第四の態様によれば、(i)本発明のポリヌクレオチドとともに希釈剤または担体を含んでなる材料の組成物;(ii)治療または予防上有効な量の本発明のポリヌクレオチドを含有する医薬組成物;(iii)免疫原性上有効な量の本発明のポリヌクレオチドを投与してクラミジアに対する感染防御免疫応答を誘導することにより哺乳類のクラミジアに対する免疫応答を誘導する方法;さらに詳しくは(iv)感染した個体に予防または治療量の本発明のポリヌクレオチドを投与することにより、クラミジア(例えばC.トラチョマチス、C.プシタチ、肺炎クラミジア、またはC.ペコラム)感染症を予防および/または治療する方法が提供される。さらに本発明の第四の態様によれば、クラミジア感染症を予防および/または治療する医薬の製造における本発明のポリヌクレオチドの使用が含まれる。好ましい使用には哺乳類細胞における、特に哺乳類細胞において複製できず、かつ哺乳類ゲノムに実質的に組み込むことのできないプラスミドにおける発現の条

40

50

件下に置かれたDNA分子の使用が挙げられる。

【0077】

本発明のポリヌクレオチドの使用には、治療または予防目的での哺乳類へのワクチンとしての投与が挙げられる。かかるポリヌクレオチドは哺乳類細胞において複製できず、かつ哺乳類ゲノムに組み込むことのできないプラスミドの一部としてDNAの形で用いられる。典型的には、かかるDNA分子は哺乳類細胞の発現に好適なプロモーターの制御下に置かれる。プロモーターは遍在して、または組織特異的のいずれかで機能する。非組織特異的プロモーターの例としては、初期サイトメガロウイルス(CMV)プロモーター(米国特許第4,168,062号に記載される)およびラウス肉腫ウイルスプロモーター(Norton & Coffin, *Molec. Cell Biol.* (1985) 5:281に記載される)が挙げられる。組織特異的プロモーターの例としては、筋肉細胞における発現を駆動するデスミンプロモーター(Li et al., *Gene* (1989) 78:243、Li & Paulin, *J. Biol. Chem.* (1991) 266:6562およびLi & Paulin, *J. Biol. Chem.* (1993) 268:10403に記載される)である。プロモーターの使用については当業者は十分に公知である。有用なベクターは多くの公報、特にWO94/21797およびMartikka et al., *Human Gene Therapy* (1996) 7: 1205で記載されている。

10

【0078】

ワクチンとして用いられる本発明のポリヌクレオチドは対応するポリペプチドの前駆体または成熟型のいずれかをコードする。前駆体型ではシグナルペプチドは相同または異種のいずれかである。後者の場合、組織型プラスミノゲン因子(tPA)のリーダー配列などの真核生物リーダー配列が好ましい。

20

【0079】

本明細書において、本発明の組成物は1つまたはいくつかのポリヌクレオチドとともに所望によりウレアーゼサブユニットA、Bもしくはその両方などの別のクラミジア抗原、またはその断片、誘導体、変異体もしくは類似体をコードする少なくとも一つの付加的なポリヌクレオチドを含有する。また組成物は免疫応答を増強するためにインターロイキン-2(IL-2)またはインターロイキン-12(IL-12)などのサイトカインをコードする付加的なポリヌクレオチドを含有してもよい。これらの付加的なポリヌクレオチドは発現に好適な制御下に置かれている。

【0080】

同じ組成物に含まれる本発明のDNA分子および/または付加的なDNA分子は同じプラスミドに存在することが有利である。

30

【0081】

本発明のポリヌクレオチド治療薬の製造に分子生物学におけるポリヌクレオチドの調製および精製標準手法を用いる。ワクチンとして用いるための本発明のポリヌクレオチドは以下に概略を記した種々の方法により処方される。

【0082】

一つの方法ではポリヌクレオチドはいずれの送達ビヒクルも用いない裸の形態で使用される。かかるポリヌクレオチドは単に滅菌生理食塩水または滅菌緩衝溶液などの生理学上許容される溶液に、担体を用いてまたは用いずに希釈する。担体が存在する場合には、担体が等張性、低張性、または弱高張性であることが好ましく、スクロース溶液、例えば20%スクロース含有溶液により得られるような比較的低いイオン強度を有する。

40

【0083】

別法では細胞の取り込みを助ける薬剤と結合したポリヌクレオチドを使用する。かかる薬剤の例は(i)ブピバカインなどの細胞透過性を改変する化学物質(例えばWO94/16737参照)、(ii)ポリヌクレオチドをカプセル封入するリポソーム、または(iii)それ自身がポリヌクレオチドと結合する陽イオン脂質またはシリカ、金、もしくはタングステン微粒子である。

【0084】

陰イオンおよび中性リポソームは当技術分野では十分に公知であり(例えばリポソーム作

50

製方法の詳細な説明に関する、Liposomes: A Practical Approach, Rpc New Ed, IRL press (1990)参照)、ポリヌクレオチドをはじめとする広範囲の産物を送達するのに有用である。陽イオン脂質もまた当技術分野では公知であり、遺伝子送達には常用されている。かかる脂質には、DOTMA (N-[1-(2,3-ジオレイルオキシ)プロピル]-N,N-トリメチルアンモニウムクロリド)としても知られるリポフェクチン(商標)、DOTAP(1,2-ビス(オレイルオキシ)-3-(トリメチルアンモニオ)プロパン)、DDAB(ジメチルジオクタデシルアンモニウムブロミド)、DOGS(ジオクタデシルアミドログリシルスペルミン)およびDC-Chol(3-(N-(N',N'-ジメチルアミノメタン)-カルバモイル)コレステロール)などのコレステロール誘導体が挙げられる。これらの陽イオン脂質の記載はEP187,702、WO90/11092、米国特許第5,283,185号、WO91/15501、WO95/26356、および米国特許第5,527,928号に見出すことができる。遺伝子送達用の陽イオン脂質は、例えばWO90/11092に記載されるようにDOPE(ジオレイルホスファチジルエタノールアミン)のような中性脂質と結合させて用いることが好ましい。

【0085】

陽イオンリポソームを含有する製剤は所望により他のトランスフェクション促進化合物を含有してもよい。それらの多くはWO93/18759、WO93/19768、WO94/25608、およびWO95/2397に記載されている。それらには核膜を通るDNAの輸送を促進するのに有用なスペルミン誘導体(例えばWO93/18759参照)およびGALA、グラミシジンS、ならびに陽イオン胆汁酸塩などの膜透過性化合物(例えばWO93/19768参照)が挙げられる。

【0086】

金またはタングステン微粒子はWO91/00359、WO93/17706、およびTang et al. (Nature (1992) 356:152)に記載されるように遺伝子送達に用いられる。米国特許第4,945,050号、米国特許第5,015,580号、およびWO94/24263に記載されるもののように、微粒子で被覆したポリヌクレオチドを無針注入装置(「遺伝子銃」)を用いて皮内または表皮内経路で注入する。

【0087】

ワクチン受容者に用いるDNA量は、例えばDNA構築に用いるプロモーターの強さ、発現遺伝子産物の免疫原性、投与をしようとする哺乳類の条件(例えば哺乳類の体重、年齢、および全身の健康状態)、投与様式、および剤型による。一般に、治療または予防上有効な量、約1μg~約1mg、好ましくは約10μg~約800μg、およびさらに好ましくは約25μg~約250μgをヒト成人に投与してもよい。1回の投与で投与を果たしてもよいし、または間隔をおいて反復してもよい。

【0088】

投与経路はワクチン分野で用いるいずれの便宜な経路であってもよい。一般的な指針として、本発明のポリヌクレオチドは粘膜表面、例えば目、鼻腔内、肺、口腔、腸、直腸、膈、および尿管表面により;または非経口経路、例えば静脈内、皮下、腹膜内、皮内、表皮内、または筋肉内経路により投与する。投与経路の選択は選択される製剤による。プピバカインと結合させて処方したポリヌクレオチドは筋肉投与が有利である。中性もしくは陰イオンリポソームまたはDOTMAまたはDC-Cholなどの陽イオン脂質を用いる場合、製剤は静脈内、鼻腔内(エアゾル化)、筋肉内、皮内、および皮下経路により注入することが有利であろう。裸の形態のポリヌクレオチドは筋肉内、皮内、または皮下経路により投与することが有利であろう。

【0089】

必ずしも必要ではないが、かかる組成物はアジュバントを含有していてもよい。もしそうであれば、アジュバント作用を示すために同時投与する必要のない浸透性アジュバント、例えば米国特許第5,057,546号に記載されるQS21などが好ましい。

【0090】

本願で提供される配列情報により診断目的で用いる特異的なヌクレオチドプローブおよび

10

20

30

40

50

プライマーの設計が可能になる。従って、本発明の第五の態様によれば、配列番号 1 に示される配列の遺伝子コードの縮重で見られる、または縮重により誘導された配列を有するヌクレオチドプローブまたはプライマーが提供される。

【0091】

本願において使用される「プローブ」とは、上記のように、ストリンジェント条件下で、配列番号 1 を有する核酸分子と、または配列番号 1 と相同な配列と、またはその相補もしくはアンチセンス配列とハイブリダイズする DNA (好ましくは一本鎖) または RNA 分子 (または改変体もしくはその組合せ) をいう。一般に、プローブは全長配列よりかなり短い。かかるプローブは約 5 ~ 約 100 個、好ましくは約 10 ~ 約 80 個のヌクレオチドを含有する。特にプローブは配列番号 1 の一部と少なくとも 75%、好ましくは少なくとも 85%、さらに好ましくは 95% 相同である、またはかかる配列と相補的である配列を有する。プローブはイノシン、メチル - 5 - デオキシシチジン、デオキシウリジン、ジメチルアミノ - 5 - デオキシウリジン、またはジアミノ - 2, 6 - プリンなどの改変塩基を含有してもよい。糖またはリン酸残基も改変または置換してもよい。例えばデオキシリボース残基をポリアミドで置き換えてもよく (Nielsen et al., Science (1991) 254:1497)、リン酸残基をジホスフェート、アルキル、アリアルホスホネートおよびホスホロチオエートエステルなどのエステル基で置き換えてもよい。さらにリボヌクレオチドの 2' - ヒドロキシ基をアルキル基のような官能基などで改変してもよい。

10

【0092】

本発明のプローブは捕捉または検出プローブとして診断試験に用いられる。便宜にはかかる捕捉プローブは共有結合手段によりまたは受動的吸着により固相支持体に直接的または間接的に固定する。検出プローブは放射性同位元素、ペルオキシダーゼ、アルカリ性ホスファターゼ、ならびに発色性、蛍光性、または発光性基質を加水分解し得る酵素、発色性、蛍光性、または発光性化合物、ヌクレオチド塩基類似体、およびビオチンから選択される検出マーカーで標識する。

20

【0093】

本発明のプローブをドットプロット法 (Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (1982) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York)、サザンプロット法 (Southern, J. Mol. Biol. (1975) 98:503)、ノーザンプロット法 (RNA を標的として用いることを除いて、サザンプロットと同じ)、またはサンドイッチ手法 (Dunn et al., Cell (1977) 12:23) などのいずれの通常のハイブリダイゼーション手法にも用いてよい。後の手法では互いに少なくとも部分的に異なるヌクレオチド配列を有する特異的な捕捉プローブおよび/または特異的な検出プローブの使用が含まれる。

30

【0094】

プライマーは増幅プロセス (例えば PCR)、伸長プロセス、または逆転写法における酵素的 DNA 重合を開始するのに用いる、通常約 10 ~ 約 40 個のヌクレオチドのプローブである。PCR をはじめとする診断法に用いるプライマーを当技術分野で公知な方法で標識する。

【0095】

本明細書において記載されるように、本発明はまた (i) 生物学的材料においてクラミジアの存在を検出および/または同定する本発明のプローブを含んでなる試薬; (ii) (a) 該生物学的材料からサンプルを採取または誘導し、(b) 該材料から DNA または RNA を抽出して変性させ、さらに (c) ストリンジェントハイブリダイゼーション条件下で、ハイブリダイゼーションが検出されるように本発明のプローブ、例えば捕捉、検出プローブもしくはその両方に曝す、生物学的材料においてクラミジアの存在を検出および/または同定する方法; および (iii) (a) 該生物学的材料からサンプルを採取または誘導し、(b) そこから DNA を抽出し、(c) 抽出した DNA に少なくとも 1 つ、および好ましくは 2 つの本発明のプライマーを提供してポリメラーゼ鎖反応により増幅し、さらに (d) 増幅した DNA 断片を生産する、生物学的材料においてクラミジアの存在を検出および/または同定する方法も包含する。

40

50

【0096】

配列番号1ポリヌクレオチド配列、その相同体、および各々の部分配列の開示によりそれらの対応するアミノ酸配列が使用可能になることは明らかである。従って本発明の第六の態様によれば、本発明のポリヌクレオチドによりコードされるアミノ酸配列を有する、実質的に精製されたポリペプチドまたはポリペプチド誘導体が提供される。

【0097】

本明細書において使用される「実質的に精製されたポリペプチド」はそれが天然に存在する環境から選別されたポリヌクレオチド、および/またはそれが合成される環境に存在する多数のポリヌクレオチドから遊離したポリペプチドと定義される。例えば、実質的に精製されたポリペプチドは細胞質ポリペプチドから遊離したものである。本発明のポリペプチドが天然源、すなわちクラミジア株から精製され得る、または組換え手段により生産され得ることは当業者には容易に理解されよう。

10

【0098】

本発明の第六の態様によれば、ポリペプチド、相同体または断片がクラミジアに対する感染防御をすると考えられる標的動物において、その免疫原性を向上させるために改変されたまたは処理されたポリペプチド、相同体または断片が提供される。かかる改変または処理には：3-メチルヒスチジン、4-ヒドロキシプロリン、5-ヒドロキシリジンなどのアミノ酸誘導体によるアミノ酸置換、アミノ酸の遊離アミノ、カルボキシルまたはヒドロキシル側基の改変などのポリペプチド、相同体または断片の調整後に行われる改変または欠失が挙げられる。

20

【0099】

特異的抗原性を有する本発明のポリヌクレオチドによりコードされる相同ポリペプチドまたはポリペプチド誘導体の同定は、配列番号1のアミノ酸配列を有する参照ポリペプチドに対して作製した抗血清との交差反応性によるスクリーニングにより達成される。の手順は次の通りである：単一特異性高度免疫抗血清を、精製参照ポリペプチド、融合ポリペプチド（例えばMBP、GST、またはHis-tag系の発現産物、その使用に関する記載および説明についてはpcDNA3.1/Myc-His(+)A、BおよびCに関する、またXpress(商標)系タンパク質精製に関するInvitrogen製品マニュアルに含まれている)、または抗原性であると推測される合成ペプチドに対して作製する。抗血清を融合ポリペプチドに対して作製する場合、2つの異なる融合系を使用する。特異性抗原性は以下のようにウエスタンブロット法(Towbin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1979) 76:4350)、ドットブロット法、およびELISA法などのいくつかの方法により求めることができる。

30

【0100】

ウエスタンブロットアッセイでは、スクリーニングする産物を精製調製物または大腸菌全抽出物のいずれかとして、Laemmli(Nature (1970) 227:680)により記載されたSDS-PAGE電気泳動法に付す。ニトロセルロース膜に移した後、この材料を約1:5~約1:5000、好ましくは約1:100~約1:500の希釈範囲で、希釈した単一特異性高度免疫抗血清とともにさらにインキュベートする。その産物に対応する一つのバンドが上記の希釈範囲のいずれかで反応性を呈すれば、特異的抗原性が示される。

40

【0101】

ELISA法では、スクリーニングする産物を被覆抗原として用いることが好ましい。全細胞抽出物を用いてもよいが、精製調製物が好ましい。要するに、約10μgタンパク質/mlの調製物約100μlを96-ウェルポリカーボネートELISAプレートに分注する。このプレートを37で2時間、次いで4で一晩インキュベートする。プレートを0.05%Tween 20含有リン酸緩衝生理食塩水(PBS)(PBS/Tweenバッファー)で洗浄する。ウェルを1%ウシ血清アルブミン(BSA)含有PBS 250μlで飽和させ、非特異的抗体結合を妨げる。37で1時間インキュベーションした後、プレートをPBS/Tweenバッファーで洗浄する。抗血清は0.5%BSA含有PBS/Tweenバッファーで連続的に希釈する。各ウェルに希釈物100μlを加える

50

。プレート₃₇で90分間インキュベートし、洗浄して標準法により評価する。例えば、特異的抗体をウサギで生産した場合、ヤギ抗ウサギペルオキシダーゼ複合体をウェルに加える。インキュベーションを₃₇で90分間で行い、プレートを洗浄する。適当な基質により反応物を顕出させ、この反応物を比色定量（分光光度計により測定された吸光度）により測定する。上記の試験条件下で、O.D.値が非免疫対照血清より大きい場合に陽性反応を示す。

【0102】

ドットプロット法でも、全細胞抽出物を用いてもよいが、精製産物が好ましい。要するに、約100 μg/mlの産物の溶液を50 mM Tris-HCl (pH 7.5)で連続的に2倍希釈する。各希釈物100 μlを96-ウェルドットプロット装置(Biorad)にセットしたニトロセルロース膜0.45 μmに塗布する。系を減圧してバッファーを除去する。50 mM Tris-HCl (pH 7.5)を加えてウェルを洗浄し、膜を風乾する。膜をブロッキングバッファー(50 mM Tris-HCl (pH 7.5)、0.15 M NaCl、10 g/L脱脂乳)で飽和させ、約1:50~約1:5000、好ましくは約1:500の抗血清希釈物とともにインキュベートする。反応物を標準手順により調べる。例えば、ウサギ抗体を用いる場合、ヤギ抗ウサギペルオキシダーゼ複合体をウェルに加える。インキュベーションを₃₇で90分間で行い、プロットを洗浄する。適当な基質により反応物を顕出させて停止させる。この反応物を発色スポットの様子から、例えば比色定量により視覚的に測定する。上記の試験条件下で、発色スポットが少なくとも約1:5、好ましくは少なくとも約1:500の希釈物と結合する場合に陽性反応を示す。

【0103】

本発明のポリペプチドまたは誘導体の治療または予防効力は下記のように評価できる。本発明の第七の態様によれば、(i)本発明のポリペプチドとともに希釈剤または担体を含んでなる材料の組成物；とりわけ(ii)治療または予防上有効な量の本発明のポリペプチドを含有する医薬組成物；(iii)免疫上有効な量の本発明のポリペプチドを哺乳類に投与してクラミジアに対する感染防御免疫応答を誘導することにより哺乳類のクラミジアに対する免疫応答を誘導する方法；さらに詳しくは(iv)感染した個体に予防または治療量の本発明のポリペプチドを投与することにより、クラミジア(例えばC.トラチョマチス、C.プシタチ、肺炎クラミジア、またはC.ペコラム)感染症を予防および/または治療する方法が提供される。さらに本発明の第七の態様によれば、クラミジア感染症を予防および/または治療する医薬の製造における本発明のポリペプチドの使用が含まれる。

【0104】

本明細書において、本発明の免疫原性組成物はワクチン分野で知られる便宜な経路、特に粘膜(例えば目、鼻腔内、肺、口腔、胃、腸、直腸、膣、または尿管)表面にまたは非経口(例えば皮下、皮内、筋肉内、静脈内、または腹腔内)経路により投与する。投与経路の選択はポリペプチドと結合したアジュバントなどのいくつかのパラメーターによる。粘膜アジュバントを用いる場合には鼻腔内または口腔経路が好ましい。脂質処方またはアルミニウム化合物を用いる場合には非経口経路が好ましく、皮下または筋肉内経路が最も好ましい。この選択もまたワクチン薬剤の性質による。例えば、CTBまたはLTBと融合した本発明のポリペプチドは粘膜表面に投与することが最もよい。

【0105】

本明細書において、本発明の組成物は1つまたはいくつかの本発明のポリペプチドまたは誘導体を含有する。所望により組成物は少なくとも一つの付加的なクラミジア抗原、またはそのサブユニット、断片、相同体、変異体もしくは誘導体を含有してもよい。

【0106】

本発明の組成物における使用では、ポリペプチドまたはその誘導体をリポソーム、好ましくは中性または陰イオンリポソーム、ミクロスフェア、ISCOMS、またはウイルス様粒子(VLP)中にまたはそれとともに処方して、送達を促進および/または免疫応答を増強する。当業者はこれらの化合物を容易に入手できる；例えばLiposomes: A Practical Approach, RCP New Ed, IRL press(1990)参照。

10

20

30

40

50

【0107】

リポソームなど以外のアジュバントも用いられ、当技術分野では公知である。アジュバントは抗原を局所デポジットに封鎖することにより、それを急速な分散から守る、またはそれらは宿主を刺激して免疫系のマクロファージまたは他の成分に対し化学走性である因子を分泌する物質を含有すると考えられる。一般的には当業者によって、例えば以下に記載されるもの（本発明の第11の態様に基づくもの）から適当な選択がなされるであろう。

【0108】

当業者ならば容易に決定できるが、治療は1回の投与で果たしてもよいし、または必要に応じて間隔をおいて反復してもよい。例えば、開始用量の後、週単位または1ヶ月単位の間隔をおいて3回の追加免疫抗原投与を続ける。好適な用量は当業者には容易に決定できるが、受容者（例えば成人または小児）、個々のワクチン抗原、投与経路または頻度、アジュバントの有無またはタイプ、および所望の効果（例えば感染防御および/または治療）を含む種々のパラメーターによって異なる。一般に、本発明のワクチン抗原を粘膜経路によって約10 μ g～約500mg、好ましくは約1mg～約200mgの量を投与する。投与が非経口経路の場合、通常用量は約1mg、好ましくは約100 μ gの限度を超えない。

10

【0109】

ワクチン薬剤として用いる場合、本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチドを多段階免疫化プロセスの要素として連続的に用いてもよい。例えば、まず哺乳類にポックスウイルスなどの本発明のワクチンベクターを、例えば非経口経路により注入し、次いでワクチンベクターによりコードされるポリペプチドで2回、例えば粘膜経路により追加免疫抗原を加える。また別の例では本発明のポリペプチドまたは誘導体と結合したリポソームを開始に用い、粘膜アジュバント（例えばLT）と組み合わせた本発明の可溶性ポリペプチドまたは誘導体を用いて粘膜により追加免疫抗原刺激を行う。

20

【0110】

本発明の第七の態様によれば、本発明のポリペプチド誘導体はまた、例えば血液サンプルにおいて抗クラミジア抗体の存在を検出する診断試薬として用いられる。かかるポリペプチドの長さは約5～約80個、好ましくは約10～約50個のアミノ酸である。診断方法により、それらを標識するまたは標識しないのいずれかである。かかる試薬を含む診断方法を以下に記載する。

30

【0111】

公知の実験室手法を用い、本発明のDNA分子の発現においてポリペプチドまたはポリペプチド誘導体を生産し精製する。以下に記載されるように、ポリペプチドまたはポリペプチド誘導体は精製を促進する融合テールを有した融合タンパク質として生産される。融合産物を用いて小型哺乳類、例えばマウスまたはウサギを免疫化し、ポリペプチドまたはポリペプチド誘導体に対する抗体（単一特異性抗体）を作製する。よって本発明の第八の態様によれば、本発明のポリペプチドまたはポリペプチド誘導体と結合する単一特異性抗体が提供される。

【0112】

「単一特異性抗体」とは特異な天然に存在するクラミジアポリペプチドと反応し得る抗体を意味する。本発明の抗体はポリクローナルまたはモノクローナル抗体のいずれかである。単一特異性抗体は組換え体、例えばキメラ（例えば、ヒト不変部と結合したネズミ由来の可変部により構成された）、ヒト化型（動物、例えばネズミ由来の超可変部とともにあるヒト免疫グロブリン不変主鎖）および/または一本鎖であってよい。ポリクローナルおよび単一特異性抗体は双方とも免疫グロブリン断片、例えばF(ab)²またはFabフラグメントの形であってよい。本発明の抗体はいずれのイソ型のもの、例えばIgGまたはIgAであってよいが、ポリクローナル抗体は単一イソ型またはイソ型の混合物ある。

40

【0113】

本発明のポリペプチド、相同体または断片に対する抗体はそのポリペプチド、相同体また

50

は断片を含んでなる組成物による哺乳類の免疫化により産生される。かかる抗体はポリクローナルまたはモノクローナル抗体であってよい。ポリクローナルまたはモノクローナル抗体の産生方法は当技術分野では十分に公知である。例えば、"Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Eds. E. Harlow and D. Lane (1988)、およびD. E. Yelton et al., 1981. Ann. Rev. Biochem. 50: 657-680参照。モノクローナル抗体についてはKohl and Milstein (1975) Nature 256:495-497参照。

【0114】

本発明のポリペプチドまたはポリペプチド誘導体に対して作製される本発明の抗体を標準免疫学的アッセイ法、例えばウエスタンブロット解析法、ドットブロットアッセイ法、またはELISA法(例えばColigan et al., Current Protocols in Immunology (1994) John Wiley & Sons, Inc., New York, NY参照)を用いて作製して同定する。抗体は生物学的サンプルなどのサンプルにおいてクラミジア抗原の存在を検出する診断法に用いられる。また抗体は本発明のポリペプチドまたはポリペプチド誘導体を精製するアフィニティークロマトグラフィーにも用いられる。以下でさらに考察するように、かかる抗体を予防および治療的受動的免疫化方法に用いてもよい。

10

【0115】

よって本発明の第九の態様によれば、(i)本発明の抗体、ポリペプチド、またはポリペプチド誘導体を含有する生物学的サンプルにおいてクラミジアの存在を検出する試薬；および(ii)免疫複合体が形成されるように生物学的サンプルと本発明の抗体、ポリペプチド、またはポリペプチド誘導体とを接触させて、かかる複合体を検出してサンプルまたはサンプルが誘導される生物体においてクラミジアの存在を示すことにより、生物学的サンプルにおいてクラミジアの存在を検出する方法が提供される。

20

【0116】

いずれを用いるとしても免疫複合体がサンプルの成分と抗体、ポリペプチド、またはポリペプチド誘導体とで形成されること、および結合していない材料がいずれも複合体の検出前に除去されることは当業者には容易に理解されるであろう。ポリペプチド試薬がサンプル、例えば血液サンプルにおいて抗クラミジア抗体の存在を検出するのに有用であり、本発明の抗体が胃抽出物または生検などのサンプルをクラミジアポリペプチドの存在についてスクリーニングするのに有用であることは明らかである。

30

【0117】

診断適用では、試薬(すなわち本発明の抗体、ポリペプチド、またはポリペプチド誘導体)は遊離状態にあるか、またはチューブ、ビーズ、または当分野において用いられるいずれかの他の通常の支持体などの固相支持体に固定されているかである。固定は直接的または間接的手段によりなし遂げられる。直接的手段としては受動的吸着(非共有結合)または支持体と試薬との共有結合が挙げられる。「間接的手段」とは試薬と相互作用する抗試薬化合物が固相支持体に最初に付着することを意味する。例えば、ポリペプチド試薬を用いる場合に、それが生物学的サンプルにおいて抗体の認識に関係していないエピトープと結合するのであれば、それに結合する抗体が抗試薬として作用し得る。間接的手段にはまた、例えばビタミンなどの分子がポリペプチド試薬に接合され、その対応する受容体が固相に固定されるリガンド-受容体系も用いられる。これはビオチン-ストレプトアビジン系によって例示される。あるいは、ペプチドテールを化学的にまたは遺伝子操作により試薬に加え、接合または融合された産物をペプチドテールの受動的吸着または共有結合により固定する。

40

【0118】

使用説明書も含んでなるキットにかかる診断薬が含まれていてもよい。この試薬はそれがその標的と結合した場合に試薬の検出がなされる検出手段によって標識される。検出手段はフルオレセインイソシアネートまたはフルオレセインイソチオシアネートなどの蛍光剤、またはセイヨウワサビペルオキシダーゼもしくはルシフェラーゼ、またはアルカリ性ホスファターゼなどの酵素、または¹²⁵Iまたは⁵¹Crなどの放射性元素であってよい。

50

【0119】

従って本発明の第10の態様によれば、生物学的サンプルについて本発明の単一特異性抗体に基づくアフィニティークロマトグラフィーを行うことを含む、生物学的サンプルから、本発明のポリペプチドまたはポリペプチド誘導体を精製する方法が提供される。

【0120】

本発明の精製法における使用に関し、抗体はポリクローナルまたは単一特異性抗体のいずれか、および好ましくはIgG型である。精製IgGは常法により抗血清から調製する(Coligan et al., Current Protocols in Immunology (1994) John Wiley & Sons, Inc., New York, NY.)。一般的なクロマトグラフィー支持体、ならびに抗体を接合する標準方法については、例えばAntibodies: A Laboratory Manual, D. Lane, E. Harlow, Eds. (1988)に記載されている。以下に概略を記す。

10

【0121】

要するに、好ましくはバッファー溶液中の肺炎クラミジア抽出物などの生物学的サンプルを、本発明のポリペプチドまたはポリペプチド誘導体(すなわち抗原)をクロマトグラフィー材に吸着させるように、好ましくは生物学的サンプルの希釈に用いるバッファーで平衡化した材料に適用する。本発明の抗体と結合したゲルまたは樹脂などのクロマトグラフィー材はバッチ型またはカラムのいずれかである。結合しない成分を洗い流し、次いで抗原をグリシンバッファー、またはカオトロピック剤、例えばグアニジンHCl、もしくは高塩濃度(例えば、3M MgCl₂)を含有するバッファーなどの好適な溶出バッファーで溶出する。溶出画分を回収し、例えば280nmにおける吸光度を測定することにより抗原の存在を検出する。

20

【0122】

本発明の第11の態様によれば、(i)本発明の単一特異性抗体とともに希釈剤または担体を含んでなる材料の組成物；(ii)治療または予防上有効な量の本発明の単一特異性抗体を含んでなる医薬組成物；および(iii)感染した個体に治療または予防量の本発明の単一特異性抗体を投与することにより、クラミジア(例えばC.トラチョマチス、C.ブシタチ、肺炎クラミジア、またはC.ペコラム)感染症を治療または予防する方法が提供される。さらに本発明の第11の態様によれば、クラミジア感染症を治療または予防する医薬の製造における本発明の単一特異性抗体の使用が含まれる。

【0123】

単一特異性抗体はポリクローナルまたはモノクローナルのいずれか、好ましくはIgAイソ型のもの(優勢)である。受動的免疫化では抗体を重炭酸バッファーの存在下で哺乳類の粘膜表面、例えば胃粘膜に、例えば経口または胃内投与することが有利である。また全身投与は重炭酸バッファーを用いずに行われる。本発明の単一特異性抗体を単一有効成分として、または異なるクラミジアポリペプチドに対して特異的な少なくとも一つの単一特異性抗体との混合物として投与する。用いる抗体量および特定の管理方法は当業者により容易に決定される。大部分の目的には、例えば抗体約100~1,000mgを1週間毎日投与、または抗体約100~1,000mgを2または3日間1日当たり3回投与が有効な管理法である。

30

【0124】

治療または予防効力を当技術分野の常法を用いて、例えば粘膜免疫応答の誘導または感染防御および/または治療的免疫の誘導を、例えば肺炎クラミジアマウスモデルを用いて測定することにより評価する。モデルの肺炎クラミジア株を別のクラミジア株と置き換えてもよいことは当業者に容易に理解されるであろう。例えば、肺炎クラミジア由来のDNA分子およびポリペプチドの効果は、好ましくはマウスモデルにおいて肺炎クラミジア株を用いて評価する。感染防御はクラミジア感染症の程度を対照群のものと比較して求める。感染症が対照群に比べて軽減されている場合に感染防御を示す。本発明のポリヌクレオチド、ワクチンベクター、ポリペプチドおよびその誘導体、ならびに抗体に対してかかる評価がなされる。上記のいずれのワクチン組成物においても有用なアジュバントは以下の通りである。

40

50

【 0 1 2 5 】

非経口投与用アジュバントには、水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウム、およびヒドロキシリン酸アルミニウムなどのアルミニウム化合物が挙げられる。標準プロトコールに従い、抗原をアルミニウム化合物で沈降させる、またはそれに吸着させる。R I B I (ImmunoChem, Hamilton, MT)などの他のアジュバントも非経口投与に用いられる。

【 0 1 2 6 】

粘膜投与用アジュバントには細菌毒、例えばコレラ毒 (C T)、大腸菌易熱性毒 (L T)、クロストリジウム・ディフィシル (Clostridium difficile) 毒 A および百日咳毒 (P T)、もしくはその組合せ、サブユニット、変性毒素、または天然コレラ毒サブユニット B (C T B) の精製製剤などのその変異体が挙げられる。これらの毒素のいずれに対する断片、相同体、誘導體、および融合物もアジュバント活性を保有している場合にはそれらもまた適当である。好ましくは弱毒化した変異体を用いる。好適な変異体は、例えば W O 9 5 / 1 7 2 1 1 (A r g - 7 - L y s C T 変異体)、W O 9 6 / 0 6 6 2 7 (A r g - 1 9 2 - G l y L T 変異体)、および W O 9 5 / 3 4 3 2 3 (A r g - 9 - L y s および G l u - 1 2 9 - G l y P T 変異体) に記載される。本発明の方法および組成物において用いられるさらなる L T 変異体には、例えば S e r - 6 3 - L y s、A l a - 6 9 - G l y、G l u - 1 1 0 - A s p、および G l u - 1 1 2 - A s p 変異体が挙げられる。例えば大腸菌、サルモネラ・ミネソタ (Salmonella minnesota)、ネズミチフス菌、またはシゲラ・フレクスネリ (Shigella Flexneri) の細菌モノホスホリル脂質 A (M P L A) ; サポニン、またはポリアクチドグリコリド (P L G A) ミクロスフェアなどの他のアジュバントも粘膜投与に用いられる。

10

20

【 0 1 2 7 】

粘膜および非経口投与の双方に有用なアジュバントには、ポリホスファゼン (W O 9 5 / 0 2 4 1 5)、D C - c h o l (3 b - (N - (N ' , N ' - ジメチルアミノメタン) - カルバモイル) コレステロール ; 米国特許第 5 , 2 8 3 , 1 8 5 号および W O 9 6 / 1 4 8 3 1) および Q S - 2 1 (W O 8 8 / 0 9 3 3 6) が挙げられる。

【 0 1 2 8 】

本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、ポリペプチド誘導體、または抗体を含有する本発明の医薬組成物は常法で製造される。特に医薬上許容される希釈剤または担体、例えば水またはリン酸緩衝生理食塩水などの生理食塩水とともに処方される。一般に希釈剤または担体は投与形ならびに経路、および医薬上の標準法に基づき選択される。好適な医薬上の担体または希釈剤、ならびに医薬製剤における使用に医薬上必要不可欠なものは、Remington's Pharmaceutical Sciences、当分野における標準的な参考文献および U S P / N F に記載されている。

30

【 0 1 2 9 】

本発明はまた、本発明のクラミジアポリペプチドおよび粘膜アジュバントと抗生物質、制酸剤、スクラルファート、またはその組合せとを併用した経口投与によりクラミジア感染症を治療する方法も含む。ワクチン抗原およびアジュバントとともに投与し得るかかる化合物の例としては、例えばマクロライド、テトラサイクリン、およびその誘導體 (用い得る抗生物質の特異例として、アジトロマイシンもしくはドキシサイクリンまたはサイトカインもしくはステロイド類などの免疫調節剤が挙げられる) などの抗生物質がある。さらにも結合した 1 種を超える上記成分を含有する化合物を用いる。本発明はまたこれらの方法を行うための組成物、すなわち医薬上許容される担体または希釈剤中に本発明のクラミジア抗原 (または抗体)、アジュバント、および 1 種以上の上記の化合物を含有する組成物も含む。

40

【 0 1 3 0 】

最近、60kDa のシステイン豊富な外膜タンパク質は、ヒトにおいて保存されているエピトープ、ネズミ ミオシン重鎖エピトープ M 7 A - と交差反応する配列を含んでいることが示されている (Bachmaier et al., Science (1999) 283:1335)。この交差反応性は心血管疾患の発症の一因であることを示しているので、ワクチンとして使用される場合は

50

そのタンパク質からこのエピトープおよびヒト抗原と交差反応するその他のエピトープのいずれもを除去するのが有効であり得る。従って、本発明のさらなる具体例は、例えばタンパク質をコードするポリヌクレオチドからエピトープをコードするヌクレオチドを欠失させるまたは置換して、ワクチンとしてのタンパク質の有効性と安全性を向上させることでコード配列を改変することを含む。ヒト抗原との望ましくない相同性または交差反応性を持つことがわかっているいずれの防御抗原に対しても同様のアプローチが適当であり得る。

【0131】

本発明の方法および組成物において用いられる上記化合物の量については当業者ならば容易に求められる。治療/免疫化計画についても公知であり、当業者によって容易に計画される。例えば、非ワクチン成分を1～14日目に投与して、ワクチン抗原+アジュバントを7、14、21、および28日目に投与することが可能である。

【0132】

【実施例】

上記の開示は一般に本発明を説明するものである。さらに完全な理解は以下の具体的な例により得られる。これらの例は単に例示のために記載されるものであって、本発明の範囲を限定しようとするものではない。状況が提案されまたは便宜となる限り、形態の変更および同等物との置換も考えられる。ここでは特定の用語が用いられているが、かかる用語は説明を意図したものであって、限定しようとするものではない。

【0133】

例1:

この例はomp P6前駆体ATP/ADPトランスロカーゼ遺伝子を含むプラスミドベクターpCABk831の調製を示すものである。

omp P6前駆体遺伝子を5'プライマー(5'ATAAGAATGCGGCCGCCACCATGAATATACATTCCCTATGGAAAC 3')(配列番号3)および3'プライマー

(5'GCGCCGGATCCCGCGTGCATGAATCTTAAACTCTGTACGGC 3')(配列番号4)を用いるポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によって、肺炎クラミジア・ゲノムDNAから増幅した。5'プライマーはNotI制限部位、リボゾーム結合部位、開始コドン、およびomp P6前駆体コード配列の5'末端配列を含む。3'プライマーはomp P6前駆体のC末端配列をコードする配列およびBamHI制限部位を含む。停止コドンを除き、さらなるヌクレオチドを挿入してヒスチジンタグとのフレーム内融合物を得た。

増幅後、QIAquick(商標)PCR精製キット(Qiagen)を用いてPCR断片を精製し、その後NotIおよびBamHIで消化し、ヒトCMVプロモーターの制御下で転写する例2に記載のpCA-Myc-His真核生物発現ベクター(図3)へ挿入した。

【0134】

例2:

この例は真核生物発現ベクターpCA/Myc-Hisの調製を示す。

プラスミドpcDNA3.1(-)Myc-HisC(Invitrogen)をSpeIおよびBamHIで制限処理してCMVプロモーターを除去し、残りのベクター断片を単離した。プラスミドVR-1012(Vical)由来のCMVプロモーターおよびイントロンAをSpeI/BamHI断片上に単離した。これらの断片を連結してプラスミドpCA/Myc-Hisを作出した。omp P6前駆体遺伝子を含んだPCR断片をNotI/BamHIで制限処理したものをNotIおよびBamHIで制限処理したプラスミドpCA/Myc-Hisと連結してプラスミドpCABk831を作出した(図3)。

【0135】

得られたプラスミドpCABk831をエレクトロポレーションによって大腸菌XL-1ブルー(Stratagene)へトランスフェクトし、これを50μg/mlのカルベニシリンを含むLB培地で増殖させた。プラスミドはエンド・フリー・プラスミド・ギガ・キット(商標)(Qiagen)大スケールDNA精製系によって単離した。DNA濃度は260nmの吸光度で求め、ゲル電気泳動に付して臭化エチジウム染色し、分子量標準と比較してプラスミ

10

20

30

40

50

ドを確認した。遺伝子の5'および3'末端はLiCorモデル4000LDNAシーケンサーおよびIRD-800標識プライマーを用いた配列決定によって確認した。

【0136】

例3:

この例は肺炎クラミジアの鼻腔攻撃に対する防御を達成するためのマウスの免疫化を示す。

これまでに、マウスが肺炎クラミジアの種々の単離物による鼻腔内感染に感受性があることが示されている(Yang et al., Infect. Immun. May 1993.61(5):2037-40. AR-39株(Grayston et al., (1990) Journal of Infections Diseases 161:618-625)は、裸のDNAとして送達されたクラミジア遺伝子産物の致死下の肺炎クラミジアの肺感染に対する防御応答を誘起する能力を調べるための抗原投与感染モデルとしてBal/cマウスにおいて用いた。防御免疫は肺感染の加速化されたクリアランスと定義される。

10

【0137】

7~9週齢の雄Bal/cマウス群(8~10匹/群)を例1および2に記載の肺炎クラミジアomp P6前駆体のコード配列を含むプラスミドDNAで筋肉内(i.m.)および鼻腔内(i.n.)感作させた。対照個体群には生理食塩水またはクラミジア遺伝子の挿入物を欠いたプラスミドベクターを与えた。

【0138】

i.m.感作では、0、3および6週の3回、PBS50μl中DNA100μgを左、右の四頭筋に交互に注射した。i.n.感作では、0、3および6週の3回、DNA50μgを含むPBS50μlを麻酔したマウスに吸入させた。8週目に、致死下の肺炎クラミジア抗原投与の増殖を制限する能力を試験するために、免疫化しマウスにSPGバッファ-100μl中の肺炎クラミジアAR39株 5×10^5 IFUを鼻腔内接種した。

20

【0139】

抗原投与後9日目にマウスから肺を摘出し、直ちにSPGバッファ(7.5%スクロース、5mMグルタミン酸塩、12.5mMリン酸塩 pH7.5)中で本発明ホモジネートした。このホモジネートはアッセイまで-70で凍結保存した。ホモジネート希釈物を感受性細胞の単層に接種することで感染性クラミジアの存在に関してアッセイした。この接種物を3000rpmで1時間細胞上へ遠心分離した後、シクロヘキシミド1μg/mlの存在下で35にて3日間インキュベートした。単層のインキュベーション後、ホルマリンおよびメタノールで固定し、次ぎに肺炎クラミジアおよびペルオキシダーゼ基質として金属で増強したDABを感染させたウサギからの回復期血清を用いてクラミジア封入体の存在に対して免疫ペルオキシダーゼ染色した。

30

【0140】

図4および表1は、pCABk831をi.n.およびi.m.感作させたマウスの肺のクラミジア力価が、9日目で6例中5例で39,500未満(平均24,933)であり、一方、生理食塩水を感作させた偽性の対照マウスの値の範囲は、9日目で13,500~178,700IFU/肺(平均69,782)であった。別のプラスミドDNA構築物のpCABk1106では防御できず、感作マウスの肺の力価は生理食塩水を感作させた対照マウスで得られたもの(平均62,516)と同等であったので、DNAの感作自体は認められた防御効果の一因ではなかった。構築物pCABk1106は推定omp P6前駆体をコードするヌクレオチド配列が非関連推定タンパク質をコードする肺炎クラミジアヌクレオチド配列に置換されていること以外はpCABk831と同一である。

40

【0141】

【表1】

マウス	種々のDNA感作構築物で免疫化したBalb/Cマウスの肺における細菌存在量(封入体形成単位/肺)		
	感作構築物		
	生理食塩水	pCABk1106	pCABk831
	9日目	9日目	9日目
1	17300	137900	39100
2	88800	43700	68200
3	90000	105200	3300
4	45000	45800	11800
5	156500	27600	8300
6	69700	14900	18900
7	13500		
8	14100		
9	71700		
10	103000		
11	112100		
12	59500		
13	90200		
14	178700		
15	55400		
16	23800		
17	66700		
18	66800		
19	53800		
20	38700		
21	127000		
22	28000		
23	35200		
24	78900		
平均値	69782.61	62516.67	24933.33
標準偏差	44216.7	48217.32	24601.84
Wilcoxon P		0.6594	0.0119

10

20

30

40

【図面の簡単な説明】

【図1A】 肺炎クラミジア由来のomp P6前駆体遺伝子のヌクレオチド配列(配列番号1)およびomp P6前駆体の推定アミノ酸配列(配列番号2)を示す。

【図1B】 上記図1Aのつづきである。

【図2A】 肺炎クラミジアomp P6前駆体遺伝子の制限酵素解析を示す。

【図2B】 上記図2Aのつづきである。

【図2C】 上記図2Aのつづきである。

【図3】 プラスミドpCABk831の構成および構成要素を示す。

50

【図4】 DNA感作後のpCABk831による肺炎クラミジア感染に対する防御を示す。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Aventis Pasteur Limited

<120> Chlamydia antigens and corresponding DNA fragments and uses thereof

<130> 77813-36

<140>

<141>

10

<150> US 60/171,525

<151> 1999-12-22

<160> 4

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 779

<212> DNA

<213> Chlamydia pneumoniae

<220>

<221> CDS

<222> (101)..(676)

20

<400> 1

gtctagtcac caaaaaaact aacaaaattg ctataggagt aggagaaaaa cggttccct 60

cctgggggtgc tttccctcag caaccgataa agagaacact atg aat ata cat tcc 115
Met Asn Ile His Ser
1 5

cta tgg aaa ctt tgt act tta ttg gct tta ctt gca ttg cca gca tgt 163
Leu Trp Lys Leu Cys Thr Leu Leu Ala Leu Leu Ala Leu Pro Ala Cys
10 15 20

agc ctt tcc cct aat tat ggc tgg gag gat tcc tgt aat aca tgc cat 211
Ser Leu Ser Pro Asn Tyr Gly Trp Glu Asp Ser Cys Asn Thr Cys His
25 30 35

30

cat aca aga cga aaa aag cct tct tct ttt ggc ttt gtt cct ctc tat 259
His Thr Arg Arg Lys Lys Pro Ser Ser Phe Gly Phe Val Pro Leu Tyr
40 45 50

acc gaa gag gac ttt aac cct aat ttt acc ttc ggt gag tat gat tcc 307
Thr Glu Glu Asp Phe Asn Pro Asn Phe Thr Phe Gly Glu Tyr Asp Ser
55 60 65

aaa gaa gaa aaa caa tac aag tca agc caa gtt gca gca ttt cgt aat 355
Lys Glu Glu Lys Gln Tyr Lys Ser Ser Gln Val Ala Ala Phe Arg Asn
70 75 80 85

atc acc ttt gct aca gac agc tat aca att aaa ggt gaa gag aac ctt 403
Ile Thr Phe Ala Thr Asp Ser Tyr Thr Ile Lys Gly Glu Glu Asn Leu
90 95 100

40

gcg att ctc acg aac ttg gtt cac tac atg aag aaa aac ccg aaa gct 451
 Ala Ile Leu Thr Asn Leu Val His Tyr Met Lys Lys Asn Pro Lys Ala
 105 110 115

aca ctg tac att gaa ggg cat act gac gag cgt gga gct gca tcc tat 499
 Thr Leu Tyr Ile Glu Gly His Thr Asp Glu Arg Gly Ala Ala Ser Tyr
 120 125 130

aac ctt gct tta gga gca cga cga gcc aat gcg att aaa gag cat ctc 547
 Asn Leu Ala Leu Gly Ala Arg Arg Ala Asn Ala Ile Lys Glu His Leu
 135 140 145

cga aag cag gga atc tct gca gat cgt cta tct act att tcc tac gga 595
 Arg Lys Gln Gly Ile Ser Ala Asp Arg Leu Ser Thr Ile Ser Tyr Gly
 150 155 160 165

aaa gaa cat cct tta aat tcg gga cac aac gaa cta gca tgg caa caa 643
 Lys Glu His Pro Leu Asn Ser Gly His Asn Glu Leu Ala Trp Gln Gln
 170 175 180

aat cgc cgt aca gag ttt aag att cat gca cgc taagctaagc ttttttattc 696
 Asn Arg Arg Thr Glu Phe Lys Ile His Ala Arg
 185 190

ttctaagtct gttattttca ggaatagatt gcagtcgttt gcatgctgct ggaaggtctc 756

cttctctaca aggagtcctt gca 779

<210> 2
 <211> 192
 <212> PRT
 <213> Chlamydia pneumoniae

<400> 2
 Met Asn Ile His Ser Leu Trp Lys Leu Cys Thr Leu Leu Ala Leu Leu
 1 5 10 15

Ala Leu Pro Ala Cys Ser Leu Ser Pro Asn Tyr Gly Trp Glu Asp Ser
 20 25 30

Cys Asn Thr Cys His His Thr Arg Arg Lys Lys Pro Ser Ser Phe Gly
 35 40 45

Phe Val Pro Leu Tyr Thr Glu Glu Asp Phe Asn Pro Asn Phe Thr Phe
 50 55 60

Gly Glu Tyr Asp Ser Lys Glu Glu Lys Gln Tyr Lys Ser Ser Gln Val
 65 70 75 80

Ala Ala Phe Arg Asn Ile Thr Phe Ala Thr Asp Ser Tyr Thr Ile Lys
 85 90 95

Gly Glu Glu Asn Leu Ala Ile Leu Thr Asn Leu Val His Tyr Met Lys
 100 105 110

Lys Asn Pro Lys Ala Thr Leu Tyr Ile Glu Gly His Thr Asp Glu Arg
 115 120 125

10

20

30

Gly Ala Ala Ser Tyr Asn Leu Ala Leu Gly Ala Arg Arg Ala Asn Ala
 130 135 140

Ile Lys Glu His Leu Arg Lys Gln Gly Ile Ser Ala Asp Arg Leu Ser
 145 150 155 160

Thr Ile Ser Tyr Gly Lys Glu His Pro Leu Asn Ser Gly His Asn Glu
 165 170 175

Leu Ala Trp Gln Gln Asn Arg Arg Thr Glu Phe Lys Ile His Ala Arg
 180 185 190

<210> 3
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220> primer
 <223> 5' PCR primer

<400> 3
 ataagaatgc ggccgccacc atgaatatac attccctatg gaaac 45

<210> 4
 <211> 41
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220> primer
 <223> 3' PCR primer

<400> 4
 gcgccggatc ccgogtgc atgaatctaaa ctctgtacgg c 41

10

20

【 図 1 A 】

図1: 肺炎クラミジアomp P6前駆体遺伝子のヌクレオチドおよびアミノ酸配列 (配列番号1および2)

```

gtctagtcac caaaaaaact acaaaaattg ctataggagt agggaaaaa cggttccocct 60
cctgggggtgc ttccotcag caaccgataa agagaacct atg aat ata cat tcc 115
Met Asn Ile His Ser
1 5

cta tgg aaa ctt tgt act tta ttg gct tta ctt gca ttg cca goa tgt 163
Leu Trp Lys Leu Cys Thr Leu Leu Ala Leu Leu Leu Pro Ala Cys
10 15 20

agc ctt tcc cct aat tat ggc tgg gag gat tcc tgt aat aca tgc cat 211
Ser Leu Ser Pro Asn Tyr Gly Trp Glu Asp Ser Cys Asn Thr Cys His
25 30 35

cat aca aga cga aaa aag cct tct tct ttt ggc ttt gtt cct etc tat 259
His Thr Arg Arg Lys Lys Pro Ser Ser Phe Gly Phe Val Pro Leu Tyr
40 45 50

acc gaa gag gac ttt aac cct aat ttt acc ttc ggt gag tat gat tcc 307
Thr Glu Glu Asp Phe Asn Pro Asn Phe Thr Phe Gly Glu Tyr Asp Ser
55 60 65

aaa gaa gaa aaa caa tac aag tca agc caa gtt gca gca ttt cgt aat 355
Lys Glu Glu Lys Gln Tyr Lys Ser Ser Gln Val Ala Ala Phe Arg Asn
70 75 80 85

atc acc ttt gct aca gac agc tat aca att aaa ggt gaa gag aac ctt 403
Ile Thr Phe Ala Thr Asp Ser Tyr Thr Ile Lys Gly Glu Glu Asn Leu
90 95 100

gcg att etc acg aac ttg gtt cac tac atg aag aaa aac ccg aaa gct 451
Ala Ile Leu Thr Asn Leu Val His Tyr Met Lys Lys Asn Pro Lys Ala
105 110 115

aca ctg tac att gaa ggg cat act gac gag cgt gga gct gca tcc tat 499
Thr Leu Tyr Ile Glu Gly His Thr Asp Glu Arg Gly Ala Ala Ser Tyr
120 125 130

aac ctt gct tta gga cga cga gcc aat gcg att aaa gag cat etc 547
Asn Leu Ala Leu Gly Ala Arg Arg Ala Asn Ala Ile Lys Glu His Leu
135 140 145

cga aag cag gga atc tct gca gat cgt cta tct act att tcc tac gga 595
Arg Lys Gln Gly Ile Ser Ala Asp Arg Leu Ser Thr Ile Ser Tyr Gly
150 155 160 165

```

【 図 1 B 】

```

aaa gaa cat cct tta aat tgg gga cac aac gaa cta gca tgg caa caa 643
Lys Glu His Pro Leu Asn Ser Gly His Asn Glu Leu Ala Trp Gln Gln
170 175 180

aat cgc cgt aca gag ttt aag att cat gca cgc taagctaagc ttttttatto 696
Asn Arg Arg Thr Glu Phe Lys Ile His Ala Arg
185 190

ttctaagtgt gttattttca ggaatagatt gcagtcggtt gctcgtcgtt ggaaggtctc 756
ctctctaca aggaagcctt gca 779

```

【 図 2 A 】

図2: 肺炎クラミジアomp P6前駆体遺伝子の制限酵素解析

```

MaeIII Tsp45I Ngo9V
BstX I NlaIV
Tsp509I SfcI Taal I EcoRII
GTCTAGTCACCAAAAAAATAACAATAATTGCTATAGGAGTAGGAGAAAACGGTCCOCCT
1 CAGATCAGTGGTTTTTTTGTATTGTTTTTACGATATCCTCATCCTCTTTTGCACAGGGGA
60

BclI BbvCI
BstII Bpu10I BseMII
BsaJI MnlI DdeI MnlI
CCTGGGGTGGTTTTCCCTCAGCAACCGATAAAGAGAACACTATGAATACATTCCTATG
61 GGACCCACGAAAGGGAGTCTTGCTATTCTCTGTGTACTTATATATGTAAGGGATAC
120

RsaI BarDI NlaIII
TatI CviJI MwoI MwoI NspI Tsp509I
GAACTTTGTACTTTTATTGGCTTACTTGCATTCGACAGCAGTAGCCCTTCCOCTAATTA
123 CTTTGAACATGAATAACCGAATGAACGTACCGTCTACATCGGAAGGGGATTAAT
180

CviJI HinfI NciII CviJI
MnlI FflI NspI MboI
TGCGTGGGAGGATTCCTGTATAATACATGCCATCATACAGACGCAAAAAGCCTCTCTCTT
181 ACCGACCCCTTAGGACATTATGACGGTAGTATGTTCTCTTTTTCGGAAGAGAAA
240

MnlI Tsp509I
MnlI MboI
CviJI EarI MseI
TGCGTTTGTCTCTCTATACCGAAGGAGCTTTACCCCTAATTTTACCTTGGTGAGTA
241 ACCGAAACAGGAGAGATATGCTCTCTCTGAAATGGGRTTAAATGGAGCCACAT
300

```

フロントページの続き

- (74)代理人 100111730
弁理士 伊藤 武泰
- (72)発明者 アンドリュー、ディー・モーディン
カナダ国オンタリオ州、リッチモンド、ヒル、フォレスト、ヒル、ドライブ、11
- (72)発明者 レイモンド、ピー・オーメン
カナダ国オンタリオ州、オーロラ、ケネディイ、ストリート、ウエスト、29
- (72)発明者 ジョー、ワン
カナダ国オンタリオ州、トロント、アスペンウッド、ドライブ、51
- (72)発明者 パメラ、ダン
カナダ国オンタリオ州、ウッドブリッジ、ローズベリー、レイン、97

審査官 伊藤 基章

(56)参考文献 国際公開第99/027105(WO, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K 39/118

A61K 48/00

CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

专利名称(译)	衣原体抗原和相应的DNA片段及其用途		
公开(公告)号	JP4864264B2	公开(公告)日	2012-02-01
申请号	JP2001547133	申请日	2000-12-20
申请(专利权)人(译)	安万特, 巴斯德有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	赛诺菲巴斯德有限公司		
[标]发明人	アンドリューディーモーデン レイモンドピーオーメン ジョーワン パメラダン		
发明人	アンドリュー、ディー.モーデン レイモンド、ピー.オーメン ジョー、ワン パメラ、ダン		
IPC分类号	A61K39/118 A61K48/00 A61K39/39 A61P31/04 G01N33/50 A61K38/00 A61K38/16 A61K39/00 C07K14/295 C07K16/12 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12P21/02 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/566		
CPC分类号	C07K14/295 A61K38/164 A61K39/00 A61K48/00 A61K2039/505 A61K2039/53 C07K2319/00 C07K2319/02 Y02A50/476		
FI分类号	A61K39/118.ZNA A61K48/00 A61K39/39 A61P31/04		
代理人(译)	耀希达凯贤治 中村KoTakashi		
优先权	60/171525 1999-12-22 US		
其他公开文献	JP2003517844A JP2003517844A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了一种疫苗,用于免疫宿主(包括人)免于由衣原体菌株,特别是肺炎衣原体感染引起的疾病。该疫苗含有多肽,该多肽包含肺炎衣原体菌株的omp P6前体序列和该序列的变体。在本发明的范围内可以进行修改。

マウス	種々のDNA感作構築物で免疫化したBalb/cマウスの肺における細菌存在量(対人体形成単位/肺)		
	生理食塩水 9日目	感作構築物 pCABk1106 9日目	pCABk831 9日目
1	17300	137900	39100
2	88800	43700	68200
3	90000	105200	3300
4	45000	45800	11800
5	156500	27600	8300
6	69700	14900	18900
7	13500		
8	14100		
9	71700		
10	103000		
11	112100		
12	59500		
13	90200		
14	178700		
15	55400		
16	23800		
17	66700		
18	66800		
19	53800		
20	38700		
21	127000		
22	28000		
23	35200		
24	78900		
平均値	69782.61	62516.67	24933.33
標準偏差	44216.7	48217.32	24601.84
Wilcoxon P		0.6594	0.0119