

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4733349号  
(P4733349)

(45) 発行日 平成23年7月27日(2011.7.27)

(24) 登録日 平成23年4月28日(2011.4.28)

(51) Int. Cl.		F I	
<b>C 1 2 N</b>	<b>15/09</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 N 15/00 Z N A A
<b>C 1 2 N</b>	<b>5/10</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 N 5/00 1 0 1
<b>A 6 1 P</b>	<b>1/00</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 P 1/00
<b>A 6 1 P</b>	<b>37/02</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 P 37/02
<b>C 1 2 N</b>	<b>1/15</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 N 1/15

請求項の数 53 (全 70 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2003-575917 (P2003-575917)
(86) (22) 出願日	平成15年3月13日(2003.3.13)
(65) 公表番号	特表2005-519617 (P2005-519617A)
(43) 公表日	平成17年7月7日(2005.7.7)
(86) 国際出願番号	PCT/US2003/007775
(87) 国際公開番号	W02003/077863
(87) 国際公開日	平成15年9月25日(2003.9.25)
審査請求日	平成18年1月31日(2006.1.31)
(31) 優先権主張番号	60/364,168
(32) 優先日	平成14年3月13日(2002.3.13)
(33) 優先権主張国	米国 (US)

微生物の受託番号 ATCC PTA-4135

(73) 特許権者	504412945
	ザ ブライハム アンド ウイメンズ ホ スピタル, インコーポレイテッド アメリカ合衆国 マサチューセッツ O 2 1 1 5 ポストン, フランシス ストリ ート 7 5
(74) 代理人	100102842
	弁理士 葛和 清司
(74) 代理人	100135943
	弁理士 三橋 規樹
(74) 代理人	100133134
	弁理士 高河原 芳子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 両性イオン多糖の過剰発現の方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

単離された核酸分子であって、(a) 配列番号 1 に記載のヌクレオチド配列；(b) 配列番号 2 に記載のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列；(c) (a) または (b) の相補体に、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列であって、該ヌクレオチド配列によりコードされるポリペプチドが配列番号 2 に記載のポリペプチドのプロモーターインペルターゼ活性を有する、前記ヌクレオチド配列；および (d) (a) ~ (c) のいずれかに相補的なヌクレオチド配列からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む、単離された核酸分子。

【請求項 2】

単離された核酸分子であって、(a) 配列番号 2 で記載されるポリペプチドと少なくとも 90% 同一のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで該コードされるポリペプチドは、配列番号 2 で記載されるポリペプチドのプロモーターインペルターゼ活性を有する、ヌクレオチド配列；(b) 配列番号 1 または (a) で記載されるヌクレオチド配列の対立遺伝子改変体をコードするヌクレオチド配列であって、ここで該コードされる対立遺伝子改変体は、配列番号 2 で記載されるポリペプチドのプロモーターインペルターゼ活性を有する、ヌクレオチド配列；(c) 少なくとも 20 ヌクレオチドの断片を含む、配列番号 1、(a) または (b) のヌクレオチド配列の領域；(d) (a) または (b) の相補体に、中程度または高度にストリンジェントな条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列であって、該ヌクレオチド配列によりコードされるポリペプチドが配列番

10

20

号 2 に記載のポリペプチドのプロモーターインペルターゼ活性を有する、前記ヌクレオチド配列；および ( e ) ( a ) ~ ( c ) のいずれかに相補的なヌクレオチド配列からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む、単離された核酸分子。

【請求項 3】

単離された核酸分子であって、( a ) 1 ~ 10 個の保存的アミノ酸置換を有する、配列番号 2 で記載されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで該コードされるポリペプチドは、配列番号 2 で記載されるポリペプチドのプロモーターインペルターゼ活性を有する、ヌクレオチド配列；( b ) 1 ~ 10 個のアミノ酸挿入を有する、配列番号 2 で記載されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで該コードされるポリペプチドは、配列番号 2 で記載されるポリペプチドのプロモーターインペルターゼ活性を有する、ヌクレオチド配列；( c ) 1 ~ 10 個のアミノ酸欠失を有する、配列番号 2 で記載されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで該コードされるポリペプチドは、配列番号 2 で記載されるポリペプチドのプロモーターインペルターゼ活性を有する、ヌクレオチド配列；( d ) 1 ~ 10 アミノ酸の C - 末端短縮および/または N - 末端短縮を有する、配列番号 2 で記載されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで該コードされるポリペプチドは、配列番号 2 で記載されるポリペプチドのプロモーターインペルターゼ活性を有する、ヌクレオチド配列；( e ) アミノ酸置換、アミノ酸挿入、アミノ酸欠失、C - 末端短縮、および N - 末端短縮からなる群から選択される 1 ~ 10 個の修飾を有する、配列番号 2 で記載されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで該コードされるポリペプチドは、配列番号 2 で記載されるポリペプチドのプロモーターインペルターゼ活性を有する、ヌクレオチド配列；( f ) 少なくとも 16 ヌクレオチドの断片を含む、( a ) ~ ( e ) のいずれかのヌクレオチド配列；( g ) ( a ) ~ ( f ) のいずれかの相補体に、中程度または高度にストリンジентな条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列であって、該ヌクレオチド配列によりコードされるポリペプチドが配列番号 2 に記載のポリペプチドのプロモーターインペルターゼ活性を有する、前記ヌクレオチド配列；および ( h ) ( a ) ~ ( e ) のいずれかに相補的なヌクレオチド配列からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む、単離された核酸分子。

【請求項 4】

請求項 1、2、または 3 のいずれかに記載の核酸分子を含む、ベクター。

【請求項 5】

請求項 4 に記載のベクターを含む、宿主細胞。

【請求項 6】

配列番号 2 に記載のアミノ酸配列を含む、単離されたポリペプチド。

【請求項 7】

単離されたポリペプチドであって、( a ) 配列番号 2 のアミノ酸配列と少なくとも 90 % 同一であるアミノ酸配列であって、ここで該ポリペプチドは、配列番号 2 で記載されるポリペプチドのプロモーターインペルターゼ活性を有する、アミノ酸配列；および ( b ) 配列番号 2 または ( a ) で記載されるアミノ酸配列の対立遺伝子改変体のアミノ酸配列であって、ここで該対立遺伝子改変体は、配列番号 2 で記載されるポリペプチドのプロモーターインペルターゼ活性を有する、アミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、単離されたポリペプチド。

【請求項 8】

単離されたポリペプチドであって、( a ) 1 ~ 10 個の保存的アミノ酸置換を有する、配列番号 2 で記載されるアミノ酸配列であって、ここで該ポリペプチドは、配列番号 2 で記載されるポリペプチドのプロモーターインペルターゼ活性を有する、アミノ酸配列；( b ) 1 ~ 10 個のアミノ酸挿入を有する、配列番号 2 で記載されるアミノ酸配列であって、ここで該ポリペプチドは、配列番号 2 で記載されるポリペプチドのプロモーターインペルターゼ活性を有する、アミノ酸配列；( c ) 1 ~ 10 個のアミノ酸欠失を有する、配列番号 2 で記載されるアミノ酸配列であって、ここで該ポリペプチドは、配列番号 2 で記載さ

10

20

30

40

50

れるポリペプチドのプロモーターインペルターゼ活性を有する、アミノ酸配列；(d) 1 ~ 10 アミノ酸のC - 末端短縮および/またはN - 末端短縮を有する、配列番号2で記載されるアミノ酸配列であって、ここで該ポリペプチドは、配列番号2で記載されるポリペプチドのプロモーターインペルターゼ活性を有する、アミノ酸配列；および(e) アミノ酸置換、アミノ酸挿入、アミノ酸欠失、C - 末端短縮、およびN - 末端短縮からなる群から選択される、1 ~ 10 個の修飾を有する、配列番号2で記載されるアミノ酸配列であって、ここで該ポリペプチドは、配列番号2で記載されるポリペプチドのプロモーターインペルターゼ活性を有する、アミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、単離されたポリペプチド。

【請求項9】

請求項1、2、または3のいずれかに核酸分子によってコードされる単離されたポリペプチドであって、該ポリペプチドが配列番号2に記載されるポリペプチドのプロモーターインペルターゼ活性を有する、単離されたポリペプチド。

【請求項10】

請求項6、7または8のいずれかに記載のポリペプチドに特異的に結合する抗体、または該ポリペプチドに特異的に結合するその断片。

【請求項11】

請求項10に記載の抗体またはその断片であって、配列番号2に記載されるアミノ酸配列を含むポリペプチドに特異的に結合する、選択的結合剤またはその断片。

【請求項12】

異種のアミノ酸配列に融合した請求項6、7または8のいずれかに記載のポリペプチドを含む、融合ポリペプチド。

【請求項13】

単離された核酸分子であって、(a) 配列番号3に記載のヌクレオチド配列；(b) 配列番号4に記載のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列；(c) (a) または(b) の相補体に、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列であって、該ヌクレオチド配列によりコードされるポリペプチドが配列番号4に記載のポリペプチドの、B . f r a g i l i sにおいてres02との二重欠失によりPSCを発現させる活性を有する、前記ヌクレオチド配列；および(d) (a) ~ (c) のいずれかに相補的なヌクレオチド配列からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む、単離された核酸分子。

【請求項14】

単離された核酸分子であって、(a) 配列番号4で記載されるポリペプチドと少なくとも90%同一のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで該コードされるポリペプチドは、配列番号4で記載されるポリペプチドの、B . f r a g i l i sにおいてres02との二重欠失によりPSCを発現させる活性を有する、ヌクレオチド配列；(b) 配列番号3または(a)で記載されるヌクレオチド配列の対立遺伝子改変体をコードするヌクレオチド配列であって、ここで該コードされる対立遺伝子改変体は、配列番号4で記載されるポリペプチドの、B . f r a g i l i sにおいてres02との二重欠失によりPSCを発現させる活性を有する、ヌクレオチド配列；(c) 少なくとも20%ヌクレオチドの断片を含む、配列番号3、(a) または(b) のヌクレオチド配列の領域；(d) (a) または(b) の相補体に、中程度または高度にストリンジェントな条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列であって、該ヌクレオチド配列によりコードされるポリペプチドが配列番号4に記載のポリペプチドの、B . f r a g i l i sにおいてres02との二重欠失によりPSCを発現させる活性を有する、前記ヌクレオチド配列；および(e) (a) ~ (c) のいずれかに相補的なヌクレオチド配列からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む、単離された核酸分子。

【請求項15】

単離された核酸分子であって、(a) 1 ~ 10 個の保存的アミノ酸置換を有する、配列番号4で記載されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで該コード

10

20

30

40

50

されるポリペプチドは、配列番号4で記載されるポリペプチドの、B . f r a g i l i s において r e s 0 2 との二重欠失により P S C を発現させる活性を有する、ヌクレオチド配列；( b ) 1 ~ 1 0 個のアミノ酸挿入を有する、配列番号4で記載されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで該コードされるポリペプチドは、配列番号4で記載されるポリペプチドの、B . f r a g i l i s において r e s 0 2 との二重欠失により P S C を発現させる活性を有する、ヌクレオチド配列；( c ) 1 ~ 1 0 個のアミノ酸欠失を有する、配列番号4で記載されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで該コードされるポリペプチドは、配列番号4で記載されるポリペプチドの、B . f r a g i l i s において r e s 0 2 との二重欠失により P S C を発現させる活性を有する、ヌクレオチド配列；( d ) 1 ~ 1 0 アミノ酸の C - 末端短縮および/または N - 末端短縮を有する、配列番号4で記載されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで該コードされるポリペプチドは、配列番号4で記載されるポリペプチドの、B . f r a g i l i s において r e s 0 2 との二重欠失により P S C を発現させる活性を有する、ヌクレオチド配列；( e ) アミノ酸置換、アミノ酸挿入、アミノ酸欠失、C - 末端短縮、および N - 末端短縮からなる群から選択される 1 ~ 1 0 個の修飾を有する、配列番号4で記載されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで該コードされるポリペプチドは、配列番号4で記載されるポリペプチドの、B . f r a g i l i s において r e s 0 2 との二重欠失により P S C を発現させる活性を有する、ヌクレオチド配列；( f ) 少なくとも 1 6 ヌクレオチドの断片を含む、( a ) ~ ( e ) のいずれかのヌクレオチド配列；( g ) ( a ) ~ ( f ) のいずれかの相補体に、中程度または高度にストリンジェントな条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列であって、該ヌクレオチド配列によりコードされるポリペプチドが配列番号4に記載のポリペプチドの、B . f r a g i l i s において r e s 0 2 との二重欠失により P S C を発現させる活性を有する、前記ヌクレオチド配列；および( h ) ( a ) ~ ( e ) のいずれかに相補的なヌクレオチド配列からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む、単離された核酸分子。

【請求項16】

請求項13、14、または15のいずれかに記載の核酸分子を含む、ベクター。

【請求項17】

請求項16に記載のベクターを含む、宿主細胞。

【請求項18】

配列番号4に記載のアミノ酸配列を含む、単離されたポリペプチド。

【請求項19】

単離されたポリペプチドであって、( a ) 配列番号4のアミノ酸配列と少なくとも 9 0 % 同一であるアミノ酸配列であって、ここで該ポリペプチドは、配列番号4で記載されるポリペプチドの、B . f r a g i l i s において r e s 0 2 との二重欠失により P S C を発現させる活性を有する、アミノ酸配列；および( b ) 配列番号4または( a ) で記載されるアミノ酸配列の対立遺伝子改変体のアミノ酸配列であって、ここで該対立遺伝子改変体は、配列番号4で記載されるポリペプチドの、B . f r a g i l i s において r e s 0 2 との二重欠失により P S C を発現させる活性を有する、アミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、単離されたポリペプチド。

【請求項20】

単離されたポリペプチドであって、( a ) 1 ~ 1 0 個の保存的アミノ酸置換を有する、配列番号4で記載されるアミノ酸配列であって、ここで該ポリペプチドは、配列番号4で記載されるポリペプチドの、B . f r a g i l i s において r e s 0 2 との二重欠失により P S C を発現させる活性を有する、アミノ酸配列；( b ) 1 ~ 1 0 個のアミノ酸挿入を有する、配列番号4で記載されるアミノ酸配列であって、ここで該ポリペプチドは、配列番号4で記載されるポリペプチドの、B . f r a g i l i s において r e s 0 2 との二重欠失により P S C を発現させる活性を有する、アミノ酸配列；( c ) 1 ~ 1 0 個のアミノ酸欠失を有する、配列番号4で記載されるアミノ酸配列であって、ここで該ポリペプチドは、配列番号4で記載されるポリペプチドの、B . f r a g i l i s において r e s 0 2 と

10

20

30

40

50

の二重欠失によりP S Cを発現させる活性を有する、アミノ酸配列；(d) 1～10アミノ酸のC-末端短縮および/またはN-末端短縮を有する、配列番号4で記載されるアミノ酸配列であって、ここで該ポリペプチドは、配列番号4で記載されるポリペプチドの、B . f r a g i l i sにおいてres 0 2との二重欠失によりP S Cを発現させる活性を有する、アミノ酸配列；および(e)アミノ酸置換、アミノ酸挿入、アミノ酸欠失、C-末端短縮、およびN-末端短縮からなる群から選択される、1～10個の修飾を有する、配列番号4で記載されるアミノ酸配列であって、ここで該ポリペプチドは、配列番号4で記載されるポリペプチドの、B . f r a g i l i sにおいてres 0 2との二重欠失によりP S Cを発現させる活性を有する、アミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、単離されたポリペプチド。

10

## 【請求項21】

請求項13、14、または15のいずれかに核酸分子によってコードされる単離されたポリペプチドであって、該ポリペプチドが配列番号4に記載されるポリペプチドの、B . f r a g i l i sにおいてres 0 2との二重欠失によりP S Cを発現させる活性を有する、単離されたポリペプチド。

## 【請求項22】

請求項18、19または20のいずれかに記載のポリペプチドに特異的に結合する抗体、または該ポリペプチドに特異的に結合するその断片。

## 【請求項23】

請求項22に記載の抗体またはその断片であって、配列番号4に記載されるアミノ酸配列を含むポリペプチドに特異的に結合する、選択的結合剤またはその断片。

20

## 【請求項24】

異種のアミノ酸配列に融合した請求項18、19または20のいずれかに記載のポリペプチドを含む、融合ポリペプチド。

## 【請求項25】

res 0 2発現が不可能である、B . f r a g i l i s細菌細胞。

## 【請求項26】

inv 1 9発現が不可能である、請求項25に記載の細菌細胞。

## 【請求項27】

P S A、P S B、P S D、P S E、P S F、P S G、およびP S Hからなる群から選択される、特定の莢膜多糖を安定に発現するB . f r a g i l i s細菌細胞の集団であって、前記特定の莢膜多糖の発現を制御するプロモーターが、res 0 2を不活性化すること、および/または、該プロモーターをはさむ逆方向反復配列を変化させることにより、オンに固定されている、前記集団。

30

## 【請求項28】

前記特定の莢膜多糖がP S Aである、請求項27に記載の細菌細胞の集団。

## 【請求項29】

請求項27または請求項28に記載の細菌細胞の集団であって、該細菌細胞が、B . f r a g i l i s N C T C 9 3 4 3である、細菌細胞の集団。

## 【請求項30】

請求項27または請求項28に記載の細菌細胞の集団であって、該細菌細胞が、P T A - 4 1 3 5としてAmerican Type Culture Collectionに寄託されているB . f r a g i l i s 9 3 4 3 res 0 2 mut 4 4である、細菌細胞の集団。

40

## 【請求項31】

P S A、P S B、P S D、P S E、P S F、P S G、およびP S Hからなる群から選択される莢膜多糖を安定に発現するB . f r a g i l i s細菌細胞であって、該莢膜多糖の発現を制御するプロモーターは、res 0 2を不活性化すること、および/または、該プロモーターをはさむ逆方向反復配列を変化させることにより、オンに固定されている、細菌細胞。

50

## 【請求項 3 2】

請求項 3 1 に記載の細菌細胞であって、前記莢膜多糖が、P S Aである、細菌細胞。

## 【請求項 3 3】

請求項 3 2 に記載の細菌細胞であって、さらに、P S B、P S D、P S E、P S F、P S G、およびP S Hからなる群から選択される各および全ての莢膜多糖の発現を制御するプロモーターは、オフに固定されている、細菌細胞。

## 【請求項 3 4】

請求項 3 1 に記載の細菌細胞であって、さらに、P S A、P S B、P S D、P S E、P S F、P S G、およびP S Hからなる群から選択される莢膜多糖のいずれか1つまたは組み合わせは、発現されない、細菌細胞。

10

## 【請求項 3 5】

請求項 3 1 に記載の細菌細胞であって、さらに、P S A、P S B、P S D、P S E、P S F、P S G、およびP S Hからなる群から選択される莢膜多糖のいずれか1つまたは組み合わせの発現を制御するプロモーターは、オフに固定されている、細菌細胞。

## 【請求項 3 6】

請求項 3 1 ~ 3 5 のいずれか一項に記載の細菌細胞であって、res 0 2 発現が、不可能である、細菌細胞。

## 【請求項 3 7】

請求項 2 5、2 6 または 3 1 ~ 3 5 のいずれか一項に記載の細菌細胞であって、該細菌細胞が、*B. fragilis* NCTC 9343 である、細菌細胞。

20

## 【請求項 3 8】

請求項 2 5、3 1 または 3 2 のいずれか一項に記載の細菌細胞であって、該細菌細胞が、P T A - 4 1 3 5 として American Type Culture Collection に寄託されている *B. fragilis* 9343 res 0 2 mut 4 4 である、細菌細胞。

## 【請求項 3 9】

莢膜多糖合成遺伝子の、相可変プロモーターをオンに固定する方法であって、以下：

*B. fragilis* 細菌細胞において res 0 2 を不活性化して、莢膜多糖合成遺伝子の相可変プロモーターをオンに固定する工程、  
を包含する、方法。

30

## 【請求項 4 0】

請求項 3 9 に記載の方法であって、さらに、以下：

P S A、P S B、P S D、P S E、P S F、P S G、およびP S Hからなる群から選択される少なくとも1つの莢膜多糖を発現する細菌細胞を選択する工程、  
を包含する、方法。

## 【請求項 4 1】

請求項 3 9 に記載の方法であって、さらに、以下：P S A、P S B、P S D、P S E、P S F、P S G、およびP S Hからなる群から選択される1つの莢膜多糖のみを発現する細菌細胞を選択する工程、

を包含する、方法。

40

## 【請求項 4 2】

請求項 4 1 に記載の方法であって、前記1つの莢膜多糖がP S Aである、方法。

## 【請求項 4 3】

*B. fragilis* 細菌細胞からP S Aを精製する方法であって、改良が、以下：

P S Aのプロモーターがオンに固定されるように該細菌細胞において res 0 2 を不活性化する工程；および

P S Aを発現する細菌細胞を選択する工程、

を包含する、方法。

## 【請求項 4 4】

請求項 3 9 ~ 4 3 のいずれか一項に記載の方法であって、前記細菌細胞が、*B. frag*

50

*i l l i s* N C T C 9 3 4 3である、方法。

【請求項45】

純粋な莢膜多糖を産生する方法であって、以下：

P S A、P S B、P S D、P S E、P S F、P S G、およびP S Hからなる群から選択される、特定の莢膜多糖、または特定の莢膜多糖を含む、限られたセットの莢膜多糖のみを安定に発現するB . f r a g i l i s細菌細胞の集団を増殖させる工程（ここで、特定の莢膜多糖を除く、P S A、P S B、P S D、P S E、P S F、P S G、およびP S Hからなる群から選択される、莢膜多糖のいずれか1つまたは組み合わせの発現を制御するプロモーターは、オフに固定されている）；および

細菌細胞の集団から特定の莢膜多糖を単離して純粋な莢膜多糖を産生する工程、  
を包含する、方法。

10

【請求項46】

請求項45に記載の方法であって、前記特定莢膜多糖は、P S Aである、方法。

【請求項47】

請求項46に記載の方法であって、P S B、P S D、P S E、P S F、P S G、およびP S Hからなる群から選択される、各およびすべての莢膜多糖の発現を調節するプロモーターは、オフに固定されている、方法。

【請求項48】

請求項45～47のいずれか一項に記載の方法であって、前記細菌細胞の集団が、B . f r a g i l i s N C T C 9 3 4 3である、方法。

20

【請求項49】

請求項47に記載の方法であって、前記細菌細胞の集団が、P T A - 4 1 3 5としてA m e r i c a n T y p e C u l t u r e C o l l e c t i o nに寄託されているB . f r a g i l i s 9 3 4 3 r e s 0 2 m u t 4 4である、方法。

【請求項50】

炎症性腸疾患を処置または予防するための薬学的組成物であって、以下：

特定の莢膜多糖を安定に発現する、炎症性腸疾患を処置または予防するために有効な量のB . f r a g i l i s細菌細胞の集団であって、前記特定の莢膜多糖の発現を制御するプロモーターが、r e s 0 2を不活性化すること、および/または、該プロモーターをはさむ逆方向反復配列を変化させることにより、オンに固定されている、前記集団、  
を含有する、薬学的組成物。

30

【請求項51】

請求項50に記載の薬学的組成物であって、前記特定の莢膜多糖が、P S Aである、薬学的組成物。

【請求項52】

請求項50に記載の薬学的組成物であって、前記細菌細胞の集団が、B . f r a g i l i s N C T C 9 3 4 3である、薬学的組成物。

【請求項53】

請求項50に記載の薬学的組成物であって、前記細菌細胞の集団が、P T A - 4 1 3 5としてA m e r i c a n T y p e C u l t u r e C o l l e c t i o nに寄託されているB . f r a g i l i s 9 3 4 3 r e s 0 2 m u t 4 4である、薬学的組成物。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

（本発明の分野）

本発明は、免疫調節効果を有すると報告された、莢膜多糖の産生および単離のための組成物および方法に関連する。具体的には、本発明は、B a c t e r o i d e s f r a g i l i s (B . f r a g i l i s)の莢膜多糖A (P S A)の産生および単離のための組成物および方法に関連する。

【背景技術】

50

## 【0002】

(発明の背景)

*Bacteroides fragilis* NCTC 9343の莢膜多糖A (PSA)は、治療的および予防的適用を有する免疫調節剤であると報告された。米国特許第5,679,654および5,700,787号; *Tzianabos* AOら(2000) *J Biol Chem* 275:6733-40。PSAに加えて、*B. fragilis* NCTC 9343は、少なくとも7つの他の莢膜多糖(PSB-PSH)を合成することが、最近報告された。*Krinos* CMら(2001) *Nature* 414:555-558。*B. fragilis*の8つの莢膜多糖のうち7つの発現は、各多糖生合成遺伝子座のプロモーターを含むDNA部分の逆位によって規定される相の変化のために変動することも、最近報告された。*Krinos* CMら、前出。この系統が、そのように多くの多糖を合成するという事実が、この系統からのPSAの精製を非常に困難にしている。その相変化によるPSAの変動する発現と合わせて、これは多くの場合、その精製のための徹底的な手順の後の、PSAの非常に低い収率を引き起こす。従って、予防的または治療的適用のためのPSAの大規模精製は、技術的障害を提示する。

10

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

## 【0003】

(発明の要旨)

本発明は、部分的には、本発明者による*B. fragilis*の8つの公知の莢膜多糖、PSA、PSB、PSD、PSE、PSF、PSG、およびPSHのうち7つの相変化を調節する方法の発見から生じる。驚くべきことに、新規遺伝子、*res02* (*mpi*、*multiple promoter invertase*とも示される)の不活性化は、各莢膜多糖生合成遺伝子座の逆位可能なプロモーターを、「オン」方向または「オフ」方向のいずれかに固定する効果を有することが発見された。莢膜多糖の逆位可能なプロモーターがオンの方向である場合、そのプロモーターは、莢膜多糖の生合成に関する多糖生合成遺伝子座に関して転写活性である。逆に、莢膜多糖の逆位可能なプロモーターがオフの方向である場合、そのプロモーターは、莢膜多糖の生合成に関する多糖生合成遺伝子座に関して転写不活性である。プロモーターを固定し、そして次いで特定の莢膜多糖のみを構成的に発現する、または特定の莢膜多糖を含む、限られた莢膜多糖のセットのみを発現する細菌細胞を選択することによって、特定の莢膜多糖の収率を増加させることが今や可能であることが、本発明によって発見された。従って、選択された莢膜多糖のあらゆる組み合わせを構成的に発現し、そして他は発現しない、*B. fragilis*の変異系統を産生および選択することが今や可能であることが、本発明によって発見された。さらに、この方法を用いて、1つの特定の莢膜多糖、例えばPSAのみを構成的に発現し、そして他の莢膜多糖を発現しない*B. fragilis*の変異系統を産生および選択することが今や可能である。選択された変異系統はそれぞれ、相変化ができないようにされるので、各細胞によって産生される選択された多糖、例えば、PSAの量は、野生型と比較して増加する。それに加えて、選択された変異系統は、単一の莢膜多糖のみを発現するので、またはそれは望ましい組み合わせの莢膜多糖のみを発現するので、莢膜多糖の精製は非常に単純化され、そしてより効率的である。

20

30

40

## 【0004】

本発明はまた、部分的には、*res02*に近接して位置し、そして奔出願人がこれも*B. fragilis*における莢膜多糖の発現の調節に関与すると考える、2目の新規遺伝子、*inv19*に関連する。*res02*と異なり、*inv19*の不活性化または欠失は、莢膜多糖生合成遺伝子座の相変化プロモーターの固定を引き起こさないようである。しかし、*res02*および*inv19*両方の欠失は、*res02*欠失単独とは異なる遺伝子型を産生し得ることが、本発明によって発見された。例えば、1つの例において、*res02*の欠失単独はPSCを発現しなかったが、*res02/inv19*の二重欠失はPSCを発現した。

50



## 【0005】

下記で詳述するように、本発明は従って、特定の莢膜多糖のみを構成的に発現する *B. fragilis* の新規変異系統を産生および選択する方法；特定の莢膜多糖のみを構成的に発現する *B. fragilis* の新規変異系統に向けられた組成物；個々の莢膜多糖の精製に関する改善された方法；および *res02* および *inv19* 遺伝子およびその遺伝子産物に向けられた新規組成物を含む。

## 【0006】

新規 *res02* 遺伝子によってコードされる新規 *res02* ポリペプチドは、特定の構造的特徴を有する核酸配列に関してインペルターゼとして機能すると考えられる。その特定の構造的特徴は、中央配列をはさむ逆方向反復配列の存在を含み、ここで逆方向反復配列は、*res02* ポリペプチドによって特異的に認識される特定の配列を有する。

10

## 【0007】

1つの局面において、本発明は、*res02*に関連する単離核酸分子を提供する。この局面による核酸は、以下のものからなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む：(a) 配列番号1で記載されるヌクレオチド配列；(b) 配列番号2で記載されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列；(c) (a)または(b)の相補鎖に、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列；および(d) (a) - (c)のいずれかに相補的なヌクレオチド配列。1つの実施態様において、その核酸分子は、配列番号1で記載されるヌクレオチド配列である。1つの実施態様において、その核酸分子は、配列番号2で記載されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列である。配列番号2で記載されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列は、遺伝コードの縮重により、コドン配列において配列番号1で記載されるヌクレオチド配列と異なるヌクレオチド配列を含む。

20

## 【0008】

別の局面において、本発明は、*res02*に関連する単離核酸分子を提供する。この局面による核酸は、以下のものからなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む：(a) 配列番号2で記載されるポリペプチドと少なくとも約70%同一のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、ここでコードされるポリペプチドは、配列番号2で記載されるポリペプチドの活性を有する；(b) 配列番号1番または(a)で記載されるヌクレオチド配列の対立遺伝子改変体をコードするヌクレオチド配列；(c) 少なくとも約9アミノ酸残基のポリペプチドフラグメントをコードする、配列番号1番、(a)、または(b)のヌクレオチド配列の領域、ここでそのポリペプチドフラグメントは、配列番号2で記載されるコードされたポリペプチドの活性を有する、または抗原性である；(d) 少なくとも約16ヌクレオチドのフラグメントを含む、配列番号1番、または(a) - (c)のいずれかのヌクレオチド配列の領域；(e) (a) - (d)のいずれかの相補鎖に、中程度または高度にストリンジェントな条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列；および(f) (a) - (d)のいずれかに相補的なヌクレオチド配列。

30

## 【0009】

さらに別の局面において、本発明は、*res02*に関連する単離核酸分子を提供する。この局面による核酸は、以下のものからなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む：(a) 少なくとも1つの保存的アミノ酸置換を有する、配列番号2で記載されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、ここでコードされるポリペプチドは、配列番号2で記載されるポリペプチドの活性を有する；(b) 少なくとも1つのアミノ酸挿入を有する、配列番号2で記載されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、ここでコードされるポリペプチドは、配列番号2で記載されるポリペプチドの活性を有する；(c) 少なくとも1つのアミノ酸欠失を有する、配列番号2で記載されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、ここでコードされるポリペプチドは、配列番号2で記載されるポリペプチドの活性を有する；(d) C-および/またはN-末端切断を有する、配列番号2で記載されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、ここでコードされるポリペプチドは、配列番号2で記載されるポリペプチドの活性を有する；(e) アミノ酸置換、アミ

40

50

ノ酸挿入、アミノ酸欠失、C - 末端切断、およびN - 末端切断からなる群から選択される少なくとも1つの修飾を有する、配列番号2で記載されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、ここでコードされるポリペプチドは、配列番号2で記載されるポリペプチドの活性を有する；(f)少なくとも約16ヌクレオチドのフラグメントを含む、(a) - (e)のいずれかのヌクレオチド配列；(g)(a) - (f)のいずれかの相補鎖に、中程度または高度にストリンジェントな条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列；および(h)(a) - (e)のいずれかに相補的なヌクレオチド配列。

【0010】

別の局面において、本発明は、上記の局面のいずれかのres02核酸分子を含むベクターを提供する。

10

【0011】

さらなる局面において、本発明は、上記のres02ベクターのいずれかを含む宿主細胞を提供する。

【0012】

別の局面において、本発明は、res02に関連する単離ポリペプチドを提供する。この局面による単離ポリペプチドは、配列番号2で記載されるアミノ酸配列を含む。

【0013】

別の局面において、本発明は、res02に関連する単離ポリペプチドを提供する。この局面による単離ポリペプチドは、以下のものからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む：(a)配列番号2のオルソログのアミノ酸配列；(b)配列番号2のアミノ酸配列と少なくとも約70%同一であるアミノ酸配列、ここでそのポリペプチドは、配列番号2で記載されるポリペプチドの活性を有する；(c)少なくとも約9アミノ酸残基を含む、配列番号2で記載されるアミノ酸配列のフラグメント、ここでそのフラグメントは、配列番号2で記載されるポリペプチドの活性を有する、または抗原性である；および(d)配列番号2、(a)または(b)で記載されるアミノ酸配列の対立遺伝子改変体のアミノ酸配列。

20

【0014】

さらに別の局面において、本発明は、res02に関連する単離ポリペプチドを提供する。この局面による単離ポリペプチドは、以下のものからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む：(a)少なくとも1つの保存的アミノ酸置換を有する、配列番号2で記載されるアミノ酸配列、ここでそのポリペプチドは、配列番号2で記載されるポリペプチドの活性を有する；(b)少なくとも1つのアミノ酸挿入を有する、配列番号2で記載されるアミノ酸配列、ここでそのポリペプチドは、配列番号2で記載されるポリペプチドの活性を有する；(c)少なくとも1つのアミノ酸欠失を有する、配列番号2で記載されるアミノ酸配列、ここでそのポリペプチドは、配列番号2で記載されるポリペプチドの活性を有する；(d)C - および/またはN - 末端切断を有する、配列番号2で記載されるアミノ酸配列、ここでそのポリペプチドは、配列番号2で記載されるポリペプチドの活性を有する；および(e)アミノ酸置換、アミノ酸挿入、アミノ酸欠失、C - 末端切断、およびN - 末端切断からなる群から選択される、少なくとも1つの修飾を有する、配列番号2で記載されるアミノ酸配列、ここでそのポリペプチドは、配列番号2で記載されるポリペプチドの活性を有する。

30

40

【0015】

ある実施態様において、前述のres02核酸分子のいずれかによってコードされる単離ポリペプチドは、配列番号2で記載されるポリペプチドの活性を有する。具体的には、ある実施態様において、その活性はプロモーターインペルターゼ活性である。

【0016】

別の局面において、本発明は、前述の局面のいずれかのres02ポリペプチドに特異的に結合する、選択的結合剤またはそのフラグメントを提供する。1つの実施態様において、選択的結合剤またはそのフラグメントは、配列番号2で記載されるアミノ酸配列を含むポリペプチドまたはそのフラグメントに特異的に結合する。1つの実施態様において、

50

選択的結合剤は、抗体またはそのフラグメントである。

【0017】

さらに別の局面において、本発明は、異種アミノ酸配列に融合した、前述の局面のいずれかのres02ポリペプチドを含む、融合ポリペプチドを提供する。

【0018】

さらなる局面において、本発明は、inv19に関連する単離核酸分子を提供する。この局面による核酸は、以下のものからなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む：(a)配列番号3で記載されるヌクレオチド配列；(b)配列番号4で記載されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列；(c)(a)または(b)の相補鎖に、ストリンジエントな条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列；および(d)(a)-(c)のいずれかに相補的なヌクレオチド配列。1つの実施態様において、その核酸分子は、配列番号3で記載されるヌクレオチド配列である。1つの実施態様において、その核酸分子は、配列番号4で記載されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列である。配列番号4で記載されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列は、遺伝コードの縮重により、コドン配列において配列番号3で記載されるヌクレオチド配列と異なるヌクレオチド配列を含む。

10

【0019】

別の局面において、本発明は、inv19に関連する単離核酸分子を提供する。この局面による核酸は、以下のものからなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む：(a)配列番号4で記載されるポリペプチドと少なくとも約70%同一のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、ここでコードされるポリペプチドは、配列番号4で記載されるポリペプチドの活性を有する；(b)配列番号3番または(a)で記載されるヌクレオチド配列の対立遺伝子改変体をコードするヌクレオチド配列；(c)少なくとも約9アミノ酸残基のポリペプチドフラグメントをコードする、配列番号3番、(a)、または(b)のヌクレオチド配列の領域、ここでそのポリペプチドフラグメントは、配列番号4で記載されるコードされたポリペプチドの活性を有する、または抗原性である；(d)少なくとも約16ヌクレオチドのフラグメントを含む、配列番号3番、または(a)-(c)のいずれかのヌクレオチド配列の領域；(e)(a)-(d)のいずれかの相補鎖に、中程度または高度にストリンジエントな条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列；および(f)(a)-(d)のいずれかに相補的なヌクレオチド配列。

20

30

【0020】

さらに別の局面において、本発明は、inv19に関連する単離核酸分子を提供する。この局面による核酸は、以下のものからなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む：(a)少なくとも1つの保存的アミノ酸置換を有する、配列番号4で記載されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、ここでコードされるポリペプチドは、配列番号4で記載されるポリペプチドの活性を有する；(b)少なくとも1つのアミノ酸挿入を有する、配列番号4で記載されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、ここでコードされるポリペプチドは、配列番号4で記載されるポリペプチドの活性を有する；(c)少なくとも1つのアミノ酸欠失を有する、配列番号4で記載されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、ここでコードされるポリペプチドは、配列番号4で記載されるポリペプチドの活性を有する；(d)C-および/またはN-末端切断を有する、配列番号4で記載されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、ここでコードされるポリペプチドは、配列番号4で記載されるポリペプチドの活性を有する；(e)アミノ酸置換、アミノ酸挿入、アミノ酸欠失、C-末端切断、およびN-末端切断からなる群から選択される少なくとも1つの修飾を有する、配列番号4で記載されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、ここでコードされるポリペプチドは、配列番号4で記載されるポリペプチドの活性を有する；(f)少なくとも約16ヌクレオチドのフラグメントを含む、(a)-(e)のいずれかのヌクレオチド配列；(g)(a)-(f)のいずれかの相補鎖に、中程度または高度にストリンジエントな条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列；および(h)(a)-(e)のいずれかに相補的なヌクレオチド配列。

40

50

## 【0021】

別の局面において、本発明は、上記の局面のいずれかの *inv19* 核酸分子を含むベクターを提供する。

## 【0022】

さらなる局面において、本発明は、上記の *inv19* ベクターのいずれかを含む宿主細胞を提供する。

## 【0023】

別の局面において、本発明は、*inv19* に関連する単離ポリペプチドを提供する。この局面による単離ポリペプチドは、配列番号4で記載されるアミノ酸配列を含む。

## 【0024】

別の局面において、本発明は、*inv19* に関連する単離ポリペプチドを提供する。この局面による単離ポリペプチドは、以下のものからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む：(a) 配列番号4番のオルソログのアミノ酸配列；(b) 配列番号4番のアミノ酸配列と少なくとも約70%同一であるアミノ酸配列、ここでそのポリペプチドは、配列番号4で記載されるポリペプチドの活性を有する；(c) 少なくとも約9アミノ酸残基を含む、配列番号4で記載されるアミノ酸配列のフラグメント、ここでそのフラグメントは、配列番号4で記載されるポリペプチドの活性を有する、または抗原性である；および(d) 配列番号4番、(a) または(b) で記載されるアミノ酸配列の対立遺伝子改変体のアミノ酸配列。

## 【0025】

さらに別の局面において、本発明は、*inv19* に関連する単離ポリペプチドを提供する。この局面による単離ポリペプチドは、以下のものからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む：(a) 少なくとも1つの保存的アミノ酸置換を有する、配列番号4で記載されるアミノ酸配列、ここでそのポリペプチドは、配列番号4で記載されるポリペプチドの活性を有する；(b) 少なくとも1つのアミノ酸挿入を有する、配列番号4で記載されるアミノ酸配列、ここでそのポリペプチドは、配列番号4で記載されるポリペプチドの活性を有する；(c) 少なくとも1つのアミノ酸欠失を有する、配列番号4で記載されるアミノ酸配列、ここでそのポリペプチドは、配列番号4で記載されるポリペプチドの活性を有する；(d) C- および/またはN- 末端切断を有する、配列番号4で記載されるアミノ酸配列、ここでそのポリペプチドは、配列番号4で記載されるポリペプチドの活性を有する；および(e) アミノ酸置換、アミノ酸挿入、アミノ酸欠失、C- 末端切断、およびN- 末端切断からなる群から選択される、少なくとも1つの修飾を有する、配列番号4で記載されるアミノ酸配列、ここでそのポリペプチドは、配列番号4で記載されるポリペプチドの活性を有する。

## 【0026】

ある実施態様において、前述の *inv19* 核酸分子のいずれかによってコードされる単離ポリペプチドは、配列番号4で記載されるポリペプチドの活性を有する。

## 【0027】

別の局面において、本発明は、前述の局面のいずれかの *inv19* ポリペプチドに特異的に結合する、選択的結合剤またはそのフラグメントを提供する。1つの実施態様において、選択的結合剤またはそのフラグメントは、配列番号4で記載されるアミノ酸配列を含むポリペプチドまたはそのフラグメントに特異的に結合する。1つの実施態様において、選択的結合剤は、抗体またはそのフラグメントである。

## 【0028】

さらに別の局面において、本発明は、異種アミノ酸配列に融合した、前述の局面のいずれかの *inv19* ポリペプチドを含む、融合ポリペプチドを提供する。

## 【0029】

本発明のさらに別の局面によって、*res02* の発現が損傷された細菌細胞が提供される。*res02* の発現を、翻訳産物の欠失、切断、またはフレームシフトのいずれかを引き起こす挿入または欠失変異による *res02* 遺伝子配列の変化、または *res02* が細

10

20

30

40

50

胞によって発現されないような、*res02* 遺伝子発現配列の妨害を含むがこれに限らない、多くの可能なメカニズムのいずれかによって損傷し得る。

【0030】

本発明のさらに別の局面によって、*inv19* の発現が損傷された細菌細胞が提供される。*inv19* の発現を、翻訳産物の欠失、切断、またはフレームシフトのいずれかを引き起こす挿入または欠失変異による *inv19* 遺伝子配列の変化、または *inv19* が細胞によって発現されないような、*inv19* 遺伝子発現配列の妨害を含むがこれに限らない、多くの可能なメカニズムのいずれかによって損傷し得る。

【0031】

別の局面において、本発明は、*PSA*、*PSB*、*PSD*、*PSE*、*PSF*、*PSG*、および *PSH* からなる群から選択される、特定の莢膜多糖、または特定の莢膜多糖を含む、限られたセットの莢膜多糖のみを安定に発現する細菌細胞の集団を提供する。1つの実施態様において、特定の莢膜多糖は *PSA* である。ある実施態様において、細菌細胞は、*B. fragilis* *NCTC9343* を含む *B. fragilis* である。1つの実施態様において、細菌細胞は、*B. fragilis* *9343res02mut44* である。別の実施態様において、細菌細胞は、*B. fragilis* *9343res02mut2* である。

10

【0032】

本発明はさらに、*PSA*、*PSB*、*PSD*、*PSE*、*PSF*、*PSG*、および *PSH* からなるグループから選択される莢膜多糖を発現する細菌細胞を提供し、ここでその莢膜多糖の発現を調節するプロモーターは、オンに固定されている。1つの好ましい実施態様において、莢膜多糖は *PSA* である。いくつかの実施態様において、*PSB*、*PSD*、*PSE*、*PSF*、*PSG*、および *PSH* からなるグループから選択される各および全ての莢膜多糖の発現を調節するプロモーターは、オフに固定されている。いくつかの実施態様において、*PSA*、*PSB*、*PSD*、*PSE*、*PSF*、*PSG*、および *PSH* からなるグループから選択される莢膜多糖のいずれか1つまたは組み合わせは、発現されない。またいくつかの実施態様において、*PSA*、*PSB*、*PSD*、*PSE*、*PSF*、*PSG*、および *PSH* からなるグループから選択される莢膜多糖のいずれか1つまたは組み合わせの発現を調節するプロモーターは、オフに固定されており、ここで当該莢膜多糖のいずれか1つまたは組み合わせは発現されない。1つの実施態様において、*res02* の発現は損傷されている。1つの実施態様において、*inv19* の発現は損傷されている。1つの実施態様において、*res02* の発現および *inv19* の発現は、どちらも損傷されている。1つの実施態様において、前述の局面のいずれかによる細菌細胞は、*B. fragilis* である。1つの実施態様において、前述の局面のいずれかによる細菌細胞は、*B. fragilis* *NCTC9343* である。1つの実施態様において、その細菌細胞は、*B. fragilis* *9343res02mut44* である。別の実施態様において、その細菌細胞は、*B. fragilis* *9343res02mut2* である。

20

30

【0033】

さらに別の局面によって、本発明は、莢膜多糖合成遺伝子の、相可変プロモーターをオンに固定する方法を提供する。この局面による方法は、細菌細胞において *res02* を不活性化して、莢膜多糖合成遺伝子の相可変プロモーターをオンに固定することを含む。

40

【0034】

さらなる局面において、本発明は、莢膜多糖合成遺伝子の発現に影響を与える方法を提供する。この局面による方法は、細菌細胞において *inv19* を不活性化して、莢膜多糖合成遺伝子の発現に影響を与えることを含む。ある実施態様において、その方法はさらに、*PSA*、*PSB*、*PSD*、*PSE*、*PSF*、*PSG*、および *PSH* からなるグループから選択される少なくとも1つの莢膜多糖を発現する細菌細胞を選択することを含む。ある実施態様において、その方法はさらに、*PSA*、*PSB*、*PSD*、*PSE*、*PSF*、*PSG*、および *PSH* からなるグループから選択される1つの莢膜多糖のみを発現する細菌細胞を提供する。

50

菌細胞を選択することを含む。1つの実施態様において、その1つの莢膜多糖はP S Aである。

【0035】

別の局面において、本発明は、細菌細胞からP S Aを精製する改善された方法を提供する。その改善は、P S Aのプロモーターがオンまたはオフに固定されるように細菌細胞においてres 02を不活性化し、そしてP S Aを発現する細菌細胞を選択することを含む。1つの実施態様において、細菌細胞は、B . f r a g i l i sである。1つの実施態様において、その細胞は、B . f r a g i l i s N C T C 9 3 4 3である。1つの特定の実施態様において、その細菌細胞は、B . f r a g i l i s 9 3 4 3 r e s 0 2 m u t 4 4である。別の特定の実施態様において、その細菌細胞は、B . f r a g i l i s 9 3 4 3 r e s 0 2 m u t 2である。

10

【0036】

さらに別の局面によって、本発明はさらに、純粋な莢膜多糖を産生する方法を提供する。この局面による方法は、P S A、P S B、P S D、P S E、P S F、P S G、およびP S Hからなるグループから選択される、特定の莢膜多糖、または特定の莢膜多糖を含む、限られたセットの莢膜多糖のみを安定に発現する細菌細胞の集団を増殖させること、および細菌細胞の集団から特定の莢膜多糖を単離して純粋な莢膜多糖を産生することを含む。1つの実施態様において、特定の莢膜多糖を除く、P S A、P S B、P S D、P S E、P S F、P S G、およびP S Hからなるグループから選択される、莢膜多糖のいずれか1つまたは組み合わせの発現を調節するプロモーターは、オフに固定されている。1つの実施態様において、特定の発現される莢膜多糖は、P S Aである。1つの実施態様において、P S B、P S D、P S E、P S F、P S G、およびP S Hからなるグループから選択される、各およびすべての莢膜多糖の発現を調節するプロモーターは、オフに固定されている。1つの実施態様において、その細菌細胞は、B . f r a g i l i sである。1つの実施態様において、その細菌細胞は、B . f r a g i l i s N C T C 9 3 4 3である。1つの特定の実施態様において、その細菌細胞は、B . f r a g i l i s 9 3 4 3 r e s 0 2 m u t 4 4である。別の特定の実施態様において、その細菌細胞は、B . f r a g i l i s 9 3 4 3 r e s 0 2 m u t 2である。

20

【0037】

さらに別の局面において、本発明は、炎症性腸疾患を治療または予防する方法を提供する。この局面による方法は、炎症性腸疾患の治療または予防の必要がある被験体に、特定の莢膜多糖を安定に発現する、有効な量の細菌細胞の集団を投与して、炎症性腸疾患を治療または予防することを含む。1つの実施態様において、特定の莢膜多糖はP S Aである。1つの実施態様において、その細菌細胞は、B . f r a g i l i sである。1つの実施態様において、その細菌細胞は、B . f r a g i l i s N C T C 9 3 4 3である。1つの実施態様において、その細菌細胞は、B . f r a g i l i s 9 3 4 3 r e s 0 2 m u t 4 4 ( m u t 4 4 )である。別の実施態様において、その細菌細胞は、B . f r a g i l i s 9 3 4 3 r e s 0 2 m u t 2 ( m u t 2 )である。

30

【0038】

( 詳細な説明 )

40

この出願において記載される技術は、発明者がB . f r a g i l i s N C T C 9 3 4 3について発見した遺伝的情報を、1つの莢膜多糖を他の7つの多糖から精製する困難、およびその発現における相変化による当該莢膜多糖の低収率をどちらも回避するために利用した。重要なことに、この出願において記載される技術は、他の7つの多糖からP S Aを精製する困難、およびその発現における相変化によるP S Aの低収率をどちらも回避する。

【0039】

本発明の特色となる局面において、莢膜多糖の相変化を排除するように、res 02が不活性化される。res 02活性の欠如は、多糖合成遺伝子座の逆位可能なプロモーターを、オンまたはオフのいずれかの方向に固定する。特定の表現型の選択が、次いで選択

50

された莢膜多糖のプロモーターがオンに固定され、そして他の莢膜多糖のプロモーターがオフに固定された変異体の選択を可能にする。

【0040】

「res02」、「res02 遺伝子」、および「res02 核酸分子」という用語は、配列番号1で記載されるヌクレオチド配列を含む、またはそれから成る核酸分子、配列番号2で記載されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、および本明細書中で定義される核酸分子を指す。

【0041】

「inv19」、「inv19 遺伝子」、および「inv19 核酸分子」という用語は、配列番号3で記載されるヌクレオチド配列を含む、またはそれから成る核酸分子、配列番号4で記載されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、および本明細書中で定義される核酸分子を指す。

10

【0042】

「res02」、「res02 ポリペプチド」、および「res02 遺伝子産物」という用語は、配列番号2のアミノ酸配列を含むポリペプチドおよび関連ポリペプチドを指す。関連ポリペプチドは、res02 ポリペプチドフラグメント、res02 ポリペプチドオルソログ、res02 ポリペプチド改変体、およびres02 ポリペプチド誘導体を含み、それは配列番号2で記載されるポリペプチドの、少なくとも1つの活性を有する。

【0043】

「inv19」、「inv19 ポリペプチド」、および「inv19 遺伝子産物」という用語は、配列番号4のアミノ酸配列を含むポリペプチドおよび関連ポリペプチドを指す。関連ポリペプチドは、inv19 ポリペプチドフラグメント、inv19 ポリペプチドオルソログ、inv19 ポリペプチド改変体、およびinv19 ポリペプチド誘導体を含み、それは配列番号4で記載されるポリペプチドの、少なくとも1つの活性を有する。

20

【0044】

( 莢膜多糖を過剰発現する方法および組成物 )

「res02 発現が損傷された」細菌細胞は、生存能力のある細菌細胞であり、ここで機能的なres02 ポリペプチドのレベルは、同じ条件下でその細菌細胞によって通常発現される機能的res02 ポリペプチドのレベルと比較してごくわずかである。その発現を、機能的でないres02 遺伝子産物を生ずる、または機能的res02 遺伝子産物を生じない、res02 遺伝子における変異の誘導または存在によって損傷し得る。そのような変異は、res02 オープンリーディングフレーム(ORF)に関わる、少なくとも1つのミスセンス変異、ナンセンス変異、切断変異、挿入変異、または欠失変異、またはそのあらゆる組み合わせを含むものを含む。いくつかの実施態様において、損傷されたres02 発現を引き起こす変異は、res02 プロモーターに関わる、少なくとも1つの切断、挿入、または欠失変異、またはそのあらゆる組み合わせを含む。いくつかの実施態様において、res02 の発現は、res02 の発現の上流にある因子の操作によって損傷される。例えば、転写アクチベーター、シグナル伝達、および包括的な調節剤が、res02 の発現に影響を与え得る。例えば、Gally DLら(1993) J Bacteriol 175:6186-93; Blomfield ICら(1993) J Bacteriol 175:27-36; Dorman CJら(1987) J Bacteriol 169:3840-43; Eisenstein BIら(1987) Proc Natl Acad Sci USA 84:6506-10を参照のこと。1つの実施態様において、res02 の発現が損傷された細菌細胞は、res02 遺伝子の染色体欠失を有する。

30

40

【0045】

例えば、res02 発現が損傷された細菌細胞は、配列番号1で示した1番目、2番目、3番目、4番目、5番目、6番目、等のヌクレオチドのいずれか1つまたは組み合わせの欠失が存在する細胞であり得る。1つの実施態様において、その欠失は、3'末端より5'末端の近くで起こる。例えば、配列番号1で示した1番目、2番目、または3番目のヌ

50

クレオチドの欠失は、位置1の「atg」開始コドンを除去し、そして最初の「atg」開始コドンを配列番号1の位置67へ移動させ、配列番号2で示すアミノ酸23-197をコードするORFを産生する。別の例として、配列番号1に示す4番目のヌクレオチドの欠失は、位置1におけるもとの「atg」開始コドンを維持するが、多くの隣接するおよび近くの停止コドンを導入する。

#### 【0046】

さらなる例として、res02の発現が損傷された細菌細胞は、配列番号1で示す1番目、2番目、3番目、4番目、5番目、6番目、等のヌクレオチドのいずれか1つまたは組み合わせの後に、1つまたはそれ以上のヌクレオチドの挿入が存在する細胞であり得る。例えば、その挿入は、配列番号1におけるインフレームの停止コドン(taa、tag、tga)の挿入であり得る。さらなる例として、その挿入は、ポリヌクレオチド、例えば外来性遺伝子産物をコードするポリヌクレオチド配列であり得る。1つの実施態様において、その挿入は、3'末端よりも5'末端の近くで起こる。

10

#### 【0047】

その欠失または挿入は、相同的組換えによって達成し得る。

#### 【0048】

相同的組換えはもともと、転写的に活性な遺伝子において、変異を導入する、または訂正するために遺伝子を標的化するために開発された技術である。Kucherlapati RS (1989) Prog Nucleic Acid Res Mol Biol 36:301-10。基本的な技術は、哺乳類ゲノムの特定の領域に、特定の変異を導入する(Thomas KR (1986) Cell 44:419-28; Thomas KR (1987) Cell 51:503-12; Doetschman TR (1988) Proc Natl Acad Sci USA 85:8583-87)、または欠損遺伝子の特定の変異を訂正する(Doetschman TR (1987) Nature 330:576-78)方法として開発された。典型的な相同的組換えの技術は、米国特許第5,272,071号;欧州特許第9193051および505500号;およびPCT/US90/07642(PCT公開番号WO91/09955)において記載されている。

20

#### 【0049】

相同的組換えによって、ゲノムに挿入されるDNA配列を、標的化DNAに結合させることによって、関心のある遺伝子の特定の領域に向け得る。標的化DNAは、ゲノムDNAの領域に相補的(相同的)なヌクレオチド配列である。ゲノムの特定の領域に相補的な、標的化DNAの小さな部分を、DNA複製過程の間に親鎖と接触させる。共通の相同的領域によって、内因性DNAの他の部分とハイブリダイズ、そして従って組換えを起こすのは、細胞に挿入されたDNAの一般的な性質である。この相補鎖が、変異または異なる配列またはさらなるヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドと結合しているなら、組換えの結果として、それも新規に合成された鎖に組み込まれる。プルーフリーディング機能の結果として、新規DNA配列が鋳型として作用することが可能である。従って、転移されたDNAはゲノムに組み込まれる。

30

#### 【0050】

相同的組換えをまた、ゲノムDNAの領域を欠失させるために使用し得る。この例において、標的化DNAは、欠失させるものに隣接するゲノムDNAの領域に相補的(相同的)なヌクレオチド配列である。標的化DNAは通常、各隣接領域に関して少なくとも1キロベース(1kb)の長さであり、そしてより好ましくは各隣接領域に関して2kb近い。この相補鎖を、DNA複製過程の間に親鎖と接触させると、組換えの結果としてそれは新規に合成された鎖に組み込まれる。プルーフリーディング機能の結果として、相同的な隣接領域間のもとのゲノム配列を欠く、新規のDNA配列が、鋳型として作用することが可能である。従って、転移されたDNAがゲノムに組み込まれる。

40

#### 【0051】

相同的組換えによる欠失は、ダブルクロスオーバー対立遺伝子交換を含む。この方法に

50



において、最初の組換えが1つの隣接領域で起こり、そして次いで2番目の組換えが反対の隣接で起こる。結果として、ダブルクロスオーバー相同的交換は、欠失変異体であるもの、および野生型であるものの、2グループの細胞を生じる。特定の細胞が野生型であるか、または欠失変異体であるかの決定は、野生型遺伝子または野生型遺伝子産物のスクリーニングによって、または染色体欠失の直接スクリーニングによって達成し得る。

【0052】

「inv19発現が損傷された」細菌細胞は、生存能力のある細菌細胞であり、ここで機能的なinv19ポリペプチドのレベルは、同じ条件下でその細菌細胞によって通常発現される機能的inv19ポリペプチドのレベルと比較してごくわずかである。その発現を、機能的でないinv19遺伝子産物を生ずる、または機能的inv19遺伝子産物を生じない、inv19遺伝子における変異の導入または存在によって損傷し得る。そのような変異は、inv19オープンリーディングフレーム(ORF)に関わる、少なくとも1つのミスセンス変異、ナンセンス変異、切断変異、挿入変異、または欠失変異、またはそのあらゆる組み合わせを含むものを含む。いくつかの実施態様において、損傷されたinv19発現を引き起こす変異は、inv19プロモーターに関わる、少なくとも1つの切断、挿入、または欠失変異、またはそのあらゆる組み合わせを含む。いくつかの実施態様において、inv19の発現は、inv19の発現の上流にある因子の操作によって損傷される。例えば、転写アクチベーター、シグナル伝達、および包括的な調節剤が、res02の発現に影響を与え得る。例えば、Gally DLら(1993) J Bacteriol 175:6186-93; Blomfield ICら(1993) J Bacteriol 175:27-36; Dorman CJら(1987) J Bacteriol 169:3840-43; Eisenstein BIら(1987) Proc Natl Acad Sci USA 84:6506-10を参照のこと。1つの実施態様において、inv19の発現が損傷された細菌細胞は、inv19遺伝子の染色体欠失を有する。

【0053】

例えば、inv19発現が損傷された細菌細胞は、配列番号3で示した1番目、2番目、3番目、4番目、5番目、6番目、等のヌクレオチドのいずれか1つまたは組み合わせの欠失が存在する細胞であり得る。1つの実施態様において、その欠失は、3'末端より5'末端の近くで起こる。

【0054】

さらなる例として、inv19の発現が損傷された細菌細胞は、配列番号3で示す1番目、2番目、3番目、4番目、5番目、6番目、等のヌクレオチドのいずれか1つまたは組み合わせの後に、1つまたはそれ以上のヌクレオチドの挿入が存在する細胞であり得る。例えば、その挿入は、配列番号3におけるインフレームの停止コドン(taa、tag、tga)の挿入であり得る。さらなる例として、その挿入は、ポリヌクレオチド、例えば外来性遺伝子産物をコードするポリヌクレオチド配列であり得る。1つの実施態様において、その挿入は、3'末端よりも5'末端の近くに起こる。

【0055】

その欠失または挿入は、相同的組換えによって達成し得る。

【0056】

「細菌細胞の集団」は、細菌細胞の培養である。その培養は、液体培養、半固体培養、例えばゼラチンにおける、または固体培地、例えば栄養添加寒天における培養であり得る。これらの様々な型の細菌培養物の例は、当業者に周知である。液体培養は、好ましくは温度、通気、および攪拌の条件が調節された、試験管、フラスコ、ローラーボトル、バイオリアクター、または他の適当な容器中であり得る。液体培養の容量は、1mLより少ない量から、10Lまたはそれ以上までの範囲であり得る。1つの実施態様において、細菌細胞の集団は、単一の細菌由来、すなわちそれはクローンである。

【0057】

「莢膜多糖を発現する細菌細胞」は、莢膜多糖に関する、細菌細胞の検出可能な表現型

10

20

30

40

50

を指す。その表現型は、遺伝子型と一致し得、または不一致であり得る。例えば、PSEのプロモーターがオンの方向に固定された細菌細胞は、PSEを発現しても良いし、または発現しなくても良い。もちろん、PSEのプロモーターがオフの方向に固定された細菌細胞は、一般的にPSEを発現しない。遺伝子型を、ポリメラーゼ連鎖反応、制限エンドヌクレアーゼ消化、直接シーケンシング、または染色体DNAまたはRNAの関連する部分の配列を決定または推測するために適当な任意の他の方法によって、簡便に評価し得る。表現型は、ウェスタンイムノブロット、イムノアフィニティー、または抗体またはアッセイされる特定の莢膜多糖に特異的な他の莢膜多糖結合剤を用いる他の適当なアッセイによって、簡便に評価し得る。その抗体は、単一特異性抗血清または規定された特異性抗血清、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、前述の抗体の多糖特異的結合断片、およびその誘導体の形式であり得る。

10

## 【0058】

「特定の莢膜多糖を安定に発現する細菌細胞」は、その発現の相変化無しに特定の莢膜多糖を発現する細菌細胞を指す。「特定の莢膜多糖を安定に発現する細菌細胞の集団」は、その発現の相変化無しに特定の莢膜多糖を発現する細菌細胞の集団を指す。ある実施態様において、特定の莢膜多糖は、その細菌細胞または細菌細胞の集団によって発現される唯一の莢膜多糖である。相変化の欠如は、多糖生合成遺伝子の通常は逆位可能なプロモーターが、そのオン方向に固定されるような、res02の不活性化を反映し得る。

## 【0059】

本明細書中で使用される「莢膜多糖の発現を調節するプロモーター」は、莢膜多糖生合成遺伝子の転写に関連する、およびそれを調節する非転写遺伝的エレメントを指す。莢膜多糖生合成遺伝子は、多シストロン性莢膜多糖生合成遺伝子座の一部として存在し得る。当該プロモーターは、関連する莢膜多糖生合成遺伝子座中の、1つ以上の莢膜多糖生合成遺伝子の転写を調節し得る。1つの実施態様において、そのプロモーターは、介在配列によって分離された、逆方向反復領域を含む。1つの実施態様において、そのプロモーターは、介在配列において逆方向反復領域の間に含まれ、そして逆位を受け、1つの方向においてプロモーターは莢膜多糖生合成遺伝子に関して転写的に活性（「オン」）であり、一方反対の、または反転した方向においてそのプロモーターは莢膜多糖生合成遺伝子に関して転写的に不活性（「オフ」）である。逆方向反復配列の間の、逆位可能なプロモーター領域の逆位は、リコンビナーゼまたはインペルターゼと呼ばれる配列特異的な酵素による調節を受ける。1つの実施態様において、リコンビナーゼまたはインペルターゼはres02またはinv19である。B. fragilisの8つの公知の莢膜多糖のうち7つ、PSA、PSB、PSD、PSE、PSF、PSG、およびPSHのプロモーターは、逆方向反復領域にはさまれ、そして逆位を受けることが報告された。Krinovs CMら(2001) Nature 414: 555-58。

20

30

## 【0060】

B. fragilisにおける7つの莢膜多糖それぞれの下流逆方向反復を、表1に示す。太字で示した配列が、プロモーター逆位に必要なコンセンサスres02認識配列を示す。

## 【0061】

(表1. 7つの多糖(PS)生合成遺伝子座の上流の、逆方向反復(IR)領域の特徴。)

40

## 【0062】

【表 1】

PS 遺伝子座	下流 I R の配列	I R 間の塩基対	配列番号
PSA	acgaacggttttttgaaca	193	7
PSB	acgaacggttttttgaaca	181	7
PSD	tagacgatcgtctattgaaaca	189	8
PSE	acgaacggttttttgaaca	168	7
PSF	ttaaacgaacggtctattgaaacact	187	9
PSG	gttcaaatagacgaacggttt	174	10
PSH	acgaacggttttttgaaca	192	7
PSC	なし		

10

「莢膜多糖生合成遺伝子の相可変性プロモーター」は、莢膜多糖生合成遺伝子のプロモーターを指し、それは、今記載したように、介在配列によって分離された逆方向反復領域を含み、そして逆位をうけて1つの方向においてそのプロモーターは莢膜多糖生合成遺伝子に関して転写的に活性（「オン」）であり、一方反対方向においてそのプロモーターは莢膜多糖生合成遺伝子に関して転写的に不活性（「オフ」）である。相変化は、逆位可能なプロモーターの方向に反応して、可変性の莢膜多糖の発現を引き起こす。この相変化は通常、まだ理解されていない理由のために、時間につれて当該細胞で起こり得る。B. f r a g i l i s の 8 つの公知の莢膜多糖のうち7つ、PSA、PSB、PSD、PSE、PSF、PSG、およびPSHは、相変化を受ける。8つの公知の莢膜多糖に関して、当該細胞の表現型は、理論的には時間につれて $2^8$ （256）個の表現型のいずれかに変化し得る。しかし、本明細書中で開示されるように、莢膜多糖の相変化は、相変化の基礎となるプロモーター逆位メカニズムを損傷することによって、固定（fixed）または固定（locked）し得る。

20

## 【0063】

莢膜多糖の発現を調節するプロモーターは、逆位可能なプロモーターが転写的に活性な方向にあり、そしてそれが転写的に不活性な方向に転位できない場合に、「オンに固定」される。そのプロモーターを、通常プロモーターを転位させる配列特異的な酵素が存在しない、または他の方法で損傷されているので、オンに固定し得る。あるいは、そのプロモーターを、逆位が不可能であるように、プロモーターの逆位可能な領域をはさむ、少なくとも1つの逆方向反復が変化している、例えば欠失しているので、オンに固定し得る。

30

## 【0064】

莢膜多糖の発現を調節するプロモーターは、逆位可能なプロモーターが転写的に不活性な方向にあり、そしてそれが転写的に活性な方向に転位できない場合に、「オフに固定」される。そのプロモーターを、通常プロモーターを転位させる配列特異的な酵素が存在しない、または他の方法で損傷されているので、オフに固定し得る。あるいは、そのプロモーターを、逆位が不可能であるように、プロモーターの逆位可能な領域をはさむ、少なくとも1つの逆方向反復が変化している、例えば欠失しているので、オフに固定し得る。

40

## 【0065】

「細菌細胞においてres02を不活性化して、莢膜多糖の生合成遺伝子の相可変性プロモーターを固定する」という語句は、res02遺伝子産物による、細菌細胞の莢膜多糖生合成遺伝子の相可変性プロモーターの逆位を不可能にする、あらゆる介入を指す。その介入は、典型的には本明細書中で記載されるようなres02遺伝子の欠失を含み得る。機能的でないres02遺伝子産物を生じる他のres02遺伝子変異の導入、res02アンチセンス核酸またはres02核酸分子に結合する他の薬剤の導入、およびそうでなければ機能的なres02遺伝子産物の機能を妨害し得る薬剤の細菌細胞への導入を含む、他の介入も企図される。

## 【0066】

50

「細菌細胞において *inv19* を不活性化して、莢膜多糖の生合成遺伝子の相可変性プロモーターを固定する」という語句は、*inv19* 遺伝子産物による、細菌細胞の莢膜多糖生合成遺伝子の相可変性プロモーターの逆位を不可能にする、あらゆる介入を指す。その介入は、典型的には本明細書中で記載されるような *inv19* 遺伝子の欠失を含み得る。機能的でない *inv19* 遺伝子産物を生じる他の *inv19* 遺伝子変異の導入、*inv19* アンチセンス核酸または *inv19* 核酸分子に結合する他の薬剤の導入、およびそうでなければ機能的な *inv19* 遺伝子産物の機能を妨害し得る薬剤の細菌細胞への導入を含む、他の介入も企図される。

【0067】

「純粋な莢膜多糖」は、(1) 全体の莢膜多糖が供給源細胞から単離される場合にそれが本来一緒に見出される、タンパク質、脂質、炭水化物、または他の物質の少なくとも約50%から分離された、および(2) 実質的に他の全ての莢膜多糖を含まない、本発明の莢膜多糖を指す。「実質的に全ての他の莢膜多糖を含まない」は、その関心のある莢膜多糖が、存在する全ての莢膜多糖の少なくとも80%に相当することを意味する。好ましくは、その関心のある莢膜多糖は、存在する全ての莢膜多糖の、少なくとも85%、より好ましくは少なくとも90%、さらにより好ましくは少なくとも95%、そして最も好ましくは少なくとも98%に相当する。1つの実施態様において、本発明の純粋な莢膜多糖は実質的に、その天然の環境で見出される、その治療的、診断的、予防的または研究的使用を妨害するいかなる混入物も含まない。

【0068】

「炎症性腸疾患」は、胃腸管に関わる、未知のまたは自己免疫的原因の慢性炎症性疾患のグループを指す。これらの疾患は、医学的分野において周知であり、そして2つの主なカテゴリー、潰瘍性大腸炎およびクローン病を含む。潰瘍性大腸炎は、粘膜単独に関わる、大腸における継続的な損傷として特徴的に起こり、一方クローン病は、腸管壁の全ての層の炎症を含む、胃腸管のあらゆる場所の非継続的な損傷として特徴的に起こる。炎症性腸疾患の原因ははっきりしないが、基礎となる感染性原因が存在し得ることを示唆する証拠が存在し、そして有効な治療は、局所または全身性の免疫調節剤の使用を含む。Harrison's Principles of Internal Medicine、第14版、Fauci ASら編、New York: McGraw-Hill、1998、第286章におけるGlickman RMを参照のこと。

【0069】

発明者は、PSAを過剰発現する、生きている、または生存能力のある細菌を、炎症性腸疾患を治療または予防するために使用し得ると考える。腸は、通常 *B. fragilis* を含む多くの種の細菌がコロニーを作る。従って、PSAを過剰発現する、生きている、または生存能力のある細菌の腸への導入は、よく許容されると予測される。しかし、PSAの抗炎症性サイトカインインターロイキン-10(IL-10)を誘導する能力と関連すると考えられる、以前に記載した炎症性腸疾患におけるPSAの有益な効果、およびこれらの細菌のPSAを過剰発現する能力のために、これらの生きている、または生存能力のある細菌を腸内に導入し、そして従って炎症性腸疾患を治療および予防し得ることが予測される。PSAを過剰発現する、生きている、または生存能力のある細菌を、炎症性腸疾患の治療の必要がある被験体に、経口または直腸経路で投与し得る。それらの効果を、通常の様式で疾患の活性を追うことによって決定し得る。さらに、PSAを過剰発現する、生きている、または生存能力のある細菌を、もちろん、PSAを過剰発現する、生きている、または生存能力のある細菌が感受性である抗生物質を除いて、炎症性腸疾患の治療に有用なあらゆる他の治療薬と組み合わせて投与し得る。生存能力のある細菌は、具体的には、適当な条件への復帰時に増殖し得る、凍結乾燥された細菌を含む。

*res02* および *inv19* 核酸およびポリペプチド

「ポリペプチド対立遺伝子変異体」という用語は、有機体または有機体の集団の染色体において、当該遺伝子座を占める遺伝子の、1つまたはいくつかの可能な天然に存在する代替形式を指す。

10

20

30

40

50

## 【0070】

「単離核酸分子」という用語は、(1)全体の核酸が供給源細胞から単離される場合に通常一緒に見出されるタンパク質、脂質、炭水化物、または他の物質の少なくとも約50%から分離された、(2)天然においてその「単離核酸分子」が連結しているポリヌクレオチドの全てまたは一部と連結していない、(3)天然においてそれが連結していないポリヌクレオチドに、操作可能に連結している、または(4)より大きなポリヌクレオチド配列の一部として天然に存在しない、本発明の核酸分子を指す。好ましくは、本発明の単離核酸分子は、実質的にあらゆる他の核酸分子、またはそのポリペプチド産生における使用またはその治療的、診断的、予防的または研究的使用を妨害する、天然の環境において見出される他の混入物を含まない。

10

## 【0071】

「核酸配列」または「核酸分子」という用語は、DNAまたはRNA配列を指す。その用語は、天然塩基(アデニン、シトシン、グアニン、チミン、ウラシル)、および4-アセチルシトシン、8-ヒドロキシ-N6-メチルアデノシン、アジリジニル-シトシン、プソイドイソシトシン(pseudoisocytosine)、5-(カルボキシヒドロキシメチル)ウラシル、5-フルオロウラシル、5-プロモウラシル、5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウラシル、5-カルボキシ-メチルアミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、イノシン、N6-イソ-ペンテニルアデニン、1-メチルアデニン、1-メチルプソイドウラシル(methylpseudouracil)、1-メチルグアニン、1-メチルイノシン、2,2-ジメチルグアニン、2-メチルアデニン、2-メチルグアニン、3-メチルシトシン、5-メチルシトシン、N6-メチルアデニン、7-メチルグアニン、5-メチルアミノメチルウラシル、5-メトキシアミノ-メチル-2-チオウラシル、ベータ-D-マンノシルキユーオシン、5'-メトキシカルボニル-メチルウラシル、5-メトキシウラシル、2-メチルチオ-N6-イソペンテニルアデニン、ウラシル-5-オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル-5-オキシ酢酸、オキシプトキソシン(oxybutoxosine)、プソイドウラシル(pseudouracil)、キユーオシン、2-チオシトシン、5-メチル-2-チオウラシル、2-チオウラシル、4-チオウラシル、5-メチルウラシル、N-ウラシル-5-オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル-5-オキシ酢酸、プソイドウラシル、キユーオシン、2-チオミトシン、2,6-ジアミノプリン、およびそのあらゆる組み合わせのような、しかしこれに限定されない、DNAおよびRNAの塩基アナログのいずれかから形成される分子を含む。いくつかの実施態様において、核酸配列または核酸分子は、修飾バックボーン、例えば少なくとも1つのホスホジエステル結合ではないヌクレオシド間結合によって特徴付けられるバックボーンを有し得る。1つの実施態様において、修飾バックボーンは、少なくとも1つの安定化ヌクレオシド間結合、例えばホスホロチオエートまたはホスホロジチオエート結合を含む。

20

30

## 【0072】

「ベクター」という用語は、コードされた情報を宿主細胞へ転移させるために使用する、あらゆる分子(例えば核酸、プラスミド、またはウイルス)を指すために使用される。

## 【0073】

「発現ベクター」という用語は、宿主細胞の形質転換に適当であり、そして挿入された異種由来核酸配列の発現を指示および/または調節する核酸配列を含むベクターを指す。発現は、転写、翻訳、およびもしイントロンが存在する場合RNAスプライシングのような過程を含むがこれに限定されない。

40

## 【0074】

「操作可能に連結された」という用語は、本明細書中において、遺伝子発現配列の転写および/または翻訳調節エレメントおよびコード配列のオープンリーディングフレームが、コード配列の発現または転写および/または翻訳を遺伝子発現配列の影響または調節下に置くような方法で共有結合している、遺伝子発現配列およびコード配列の配置を指すために使用される。従って、もし5'遺伝子発現配列におけるプロモーターの誘導が、コー

50

ド配列の転写を引き起こすなら、そしてもし2つのDNA配列間の結合の性質が(1)フレームシフト変異の導入を引き起こさない、(2)プロモーター領域の、コード配列の転写を指示する能力を妨害しない、または(3)対応するRNA転写物の、タンパク質へ翻訳される能力を妨害しないなら、2つのDNA配列は操作可能に連結されていると言われる。従って、もし遺伝子発現配列が、できた転写物が望ましいタンパク質またはポリペプチドに翻訳されるように、res02またはinv19核酸配列の転写に影響を与え得たなら、遺伝子発現配列は、res02またはinv19核酸配列に操作可能に連結されている。遺伝子発現配列は、それが正しく機能する限り、コード配列と連続的である必要はない。従って、例えば、介在する翻訳されないが転写される配列が、プロモーター配列およびコード配列の間に存在し得、そしてそのプロモーター配列は、依然としてそのコード配列と「操作可能に連結している」と考えられ得る。さらに、エンハンサーは、コード配列の上流または下流であり得、そしてエンハンサーはコード配列と連続的である必要はない。

10

## 【0075】

「宿主細胞」という用語は、形質転換された、または核酸配列で形質転換され、そして次いで選択された関心のある遺伝子を発現し得る細胞を指すために使用される。その用語は、その子孫が形態学において、または遺伝的構成においてもとの親と同一であるかどうかにかかわらず、選択された遺伝子が存在する限り、親細胞の子孫を含む。

## 【0076】

「res02ポリペプチド断片」という用語は、配列番号第2番で記載されたポリペプチドの、アミノ末端における切断および/またはカルボキシル末端における切断を含むポリペプチドを指す。「res02ポリペプチド断片」という用語はまた、res02ポリペプチドオルソログ、res02ポリペプチド誘導体、またはres02ポリペプチド変異体のアミノ末端および/またはカルボキシル末端切断、またはres02ポリペプチド対立遺伝子変異体またはres02ポリペプチドスプライシング変異体によってコードされるポリペプチドのアミノ末端および/またはカルボキシル末端切断を指す。ある実施態様において、切断および/または欠失は、約10アミノ酸、または約20アミノ酸、または約50アミノ酸、または約75アミノ酸、または約100アミノ酸、または約100より多いアミノ酸を含む。そのように産生されたポリペプチド断片は、その間のすべての整数を含んで、約187、または約177、または約147、または約122、または約97、または約9までの数の連続的アミノ酸を含む。そのようなres02ポリペプチド断片は、任意でアミノ末端メチオニン残基を含み得る。そのような断片を、例えばres02ポリペプチドに対する抗体を産生するために使用し得ることが考えられる。

20

30

## 【0077】

「inv19ポリペプチド断片」という用語は、配列番号第4番で記載されたポリペプチドの、アミノ末端における切断および/またはカルボキシル末端における切断を含むポリペプチドを指す。「inv19ポリペプチド断片」という用語はまた、inv19ポリペプチドオルソログ、inv19ポリペプチド誘導体、またはinv19ポリペプチド変異体のアミノ末端および/またはカルボキシル末端切断、またはinv19ポリペプチド対立遺伝子変異体またはinv19ポリペプチドスプライシング変異体によってコードされるポリペプチドのアミノ末端切断および/またはカルボキシル末端切断を指す。ある実施態様において、切断および/または欠失は、約10アミノ酸、または約20アミノ酸、または約50アミノ酸、または約75アミノ酸、または約100アミノ酸、または約100より多いアミノ酸を含む。そのように産生されたポリペプチド断片は、その間のすべての整数を含んで、約296、または約286、または約256、または約231、または約206、または約9までの数の連続的アミノ酸を含む。そのようなinv19ポリペプチド断片は、任意でアミノ末端メチオニン残基を含み得る。そのような断片を、例えばinv19ポリペプチドに対する抗体を産生するために使用し得ることが考えられる。

40

## 【0078】

「res02ポリペプチドオルソログ」という用語は、配列番号第2番で記載されたr

50

res02ポリペプチドアミノ酸配列に対応する、別の種由来のポリペプチドを指す。

【0079】

「inv19ポリペプチドオルソログ」という用語は、配列番号第4番で記載されたinv19ポリペプチドアミノ酸配列に対応する、別の種由来のポリペプチドを指す。

【0080】

「res02ポリペプチド変異体」という用語は、配列番号第2番で記載されたres02ポリペプチドアミノ酸配列と比較して、1つまたはそれ以上のアミノ酸配列置換、欠失（内部欠失および/またはres02ポリペプチド断片のような）、および/または追加（内部追加および/またはres02融合ポリペプチドのような）を有するアミノ酸配列を含むres02ポリペプチドを指す。変異体は、天然に存在し得る（例えばres02ポリペプチド対立遺伝子変異体およびres02ポリペプチドオルソログ）、または人工的に構築し得る。そのようなres02ポリペプチド変異体を、配列番号第1番で記載されたDNA配列からそれに応じて変化しているDNA配列を有する、対応する核酸分子から調製し得る。ある実施態様において、その変異体は、1から3、または1から5、または1から10、または1から15、または1から20、または1から25、または1から50、または1から75、または1から100、または100アミノ酸より多い置換、挿入、追加、および/または欠失を有し、ここでその置換は保存的、または非保存的、またはそのあらゆる組み合わせであり得る。

10

【0081】

「inv19ポリペプチド変異体」という用語は、配列番号第4番で記載されたinv19ポリペプチドアミノ酸配列と比較して、1つまたはそれ以上のアミノ酸配列置換、欠失（内部欠失および/またはinv19ポリペプチド断片のような）、および/または追加（内部追加および/またはinv19融合ポリペプチドのような）を有するアミノ酸配列を含むinv19ポリペプチドを指す。変異体は、天然に存在し得る（例えばinv19ポリペプチド対立遺伝子変異体およびinv19ポリペプチドオルソログ）、または人工的に構築し得る。そのようなinv19ポリペプチド変異体を、配列番号第3番で記載されたDNA配列からそれに応じて変化しているDNA配列を有する、対応する核酸分子から調製し得る。ある実施態様において、その変異体は、1から3、または1から5、または1から10、または1から15、または1から20、または1から25、または1から50、または1から75、または1から100、または100アミノ酸より多い置換、挿入、追加、および/または欠失を有し、ここでその置換は保存的、または非保存的、またはそのあらゆる組み合わせであり得る。

20

30

【0082】

「res02ポリペプチド誘導体」という用語は、化学的に修飾された、配列番号第2番で記載されたポリペプチド、本明細書中で規定されたようなres02ポリペプチド断片、res02ポリペプチドオルソログ、またはres02ポリペプチド変異体を指す。「res02ポリペプチド誘導体」という用語はまた、化学的に修飾された、本明細書中で規定されたようなres02ポリペプチド対立遺伝子変異体によってコードされたポリペプチドを指す。

【0083】

「inv19ポリペプチド誘導体」という用語は、化学的に修飾された、配列番号第4番で記載されたポリペプチド、本明細書中で規定されたようなinv19ポリペプチド断片、inv19ポリペプチドオルソログ、またはinv19ポリペプチド変異体を指す。「inv19ポリペプチド誘導体」という用語はまた、化学的に修飾された、本明細書中で規定されたようなinv19ポリペプチド対立遺伝子変異体によってコードされたポリペプチドを指す。

40

【0084】

「res02融合ポリペプチド」という用語は、配列番号第2番で記載されたポリペプチド、本明細書中で規定されたようなres02ポリペプチド断片、res02ポリペプチドオルソログ、res02ポリペプチド変異体、またはres02誘導体のアミノまた

50

はカルボキシル末端における、1つまたはそれ以上のアミノ酸（異種由来タンパク質またはペプチドのような）の融合を指す。「res02融合ポリペプチド」という用語はまた、本明細書中で規定されたようなres02ポリペプチド対立遺伝子変異体またはres02ポリペプチドスプライシング変異体によってコードされるポリペプチドのアミノまたはカルボキシル末端における、1つまたはそれ以上のアミノ酸の融合を指す。

【0085】

「inv19融合ポリペプチド」という用語は、配列番号第4番で記載されたポリペプチド、本明細書中で規定されたようなinv19ポリペプチド断片、inv19ポリペプチドオルソログ、inv19ポリペプチド変異体、またはinv19誘導体のアミノまたはカルボキシル末端における、1つまたはそれ以上のアミノ酸（異種由来タンパク質またはペプチドのような）の融合を指す。「inv19融合ポリペプチド」という用語はまた、本明細書中で規定されたようなinv19ポリペプチド対立遺伝子変異体またはinv19ポリペプチドスプライシング変異体によってコードされるポリペプチドのアミノ末端またはカルボキシル末端における、1つまたはそれ以上のアミノ酸の融合を指す。

10

【0086】

「生物学的に活性なres02ポリペプチド」という用語は、配列番号第2番のアミノ酸配列を含むポリペプチドに特徴的な少なくとも1つの活性を有するres02ポリペプチドを指す。1つの実施態様において、その活性は、プロモーターインペルターゼ活性である。それに加えて、res02ポリペプチドは、免疫原として活性であり得る、すなわち、そのres02ポリペプチドは、抗体を産生し得る少なくとも1つのエピトープを含む。

20

【0087】

「生物学的に活性なinv19ポリペプチド」という用語は、配列番号第4番のアミノ酸配列を含むポリペプチドに特徴的な少なくとも1つの活性を有するinv19ポリペプチドを指す。それに加えて、inv19ポリペプチドは、免疫原として活性であり得る、すなわち、そのinv19ポリペプチドは、抗体を産生し得る少なくとも1つのエピトープを含む。

【0088】

「単離ポリペプチド」という用語は、(1)供給源細胞から単離される場合にそれとともに天然に見出される、ポリヌクレオチド、脂質、炭水化物、または他の物質の少なくとも約50%から分離された、(2)その「単離ポリペプチド」が天然において連結しているポリペプチドの全てまたは一部と連結していない（共有結合または非共有結合的相互作用によって）、(3)天然においてそれが連結していないポリペプチドと操作可能に連結している（共有結合または非共有結合的相互作用によって）、または(4)天然に存在しない、本発明のポリペプチドを指す。好ましくは、単離ポリペプチドは、その天然環境において見出され、その治療的、診断的、予防的または研究的使用を妨害するあらゆる他のポリペプチドまたは他の混入物を実質的に含まない。

30

【0089】

「同一性」という用語は、当該分野で公知のように、配列を比較することによって決定される、2つまたはそれ以上のポリペプチド分子、あるいは2つまたはそれ以上の核酸分子の配列間の関係を指す。当該分野において、「同一性」はまた、場合により、一連の2つまたはそれ以上のヌクレオチドあるいは2つまたはそれ以上のアミノ酸配列間のマッチによって決定されるような、核酸分子またはポリペプチド間の配列関連性の程度を意味する。「同一性」は、特定の数学的モデルまたはコンピュータープログラム（すなわち「アルゴリズム」）によって扱われる、ギャップアラインメント（もしあるなら）を有する、2つまたはそれ以上の配列のうち小さな方の間の同一のマッチのパーセントを測定する。核酸分子に関する同一性パーセントを、GAP、BLASTN、FASTA、BLASTA、BLASTX、BestFit、およびSmith-Watermanアルゴリズムのような、配列アラインメントアルゴリズムまたはコンピュータープログラムを用いて、簡便に決定し得る。ポリペプチドに関する同一性パーセントを、GAP、BLASTP、

40

50



FASTA、BLASTA、BLASTX、BestFit、およびSmith-Watermanアルゴリズムのような、配列アラインメントアルゴリズムまたはコンピュータプログラムを用いて、簡便に決定し得る。

【0090】

「類似性」という用語は、関連する概念であるが、「同一性」と対照的に、「類似性」は同一のマッチおよび保存的置換マッチを両方含む関連性の測定を指す。もし2つのポリペプチド配列が、例えば10/20の同一アミノ酸を有し、そして残りが全て非保存的置換ならば、同一性および類似性パーセントはどちらも50%である。もし同じ例において、保存的置換である5つ以上の位置がさらに存在するならば、同一性パーセントは50%のままであるが、類似性パーセントは75% (15/20) である。従って、保存的置換が存在する場合には、2つのポリペプチド間の類似性パーセントは、それら2つのポリペプチド間の同一性パーセントよりも高い。

10

【0091】

「単離された」という用語と関連して使用される場合を除いて、「天然に存在する」または「天然の」という用語は、核酸分子、ポリペプチド、宿主細胞等のような生物学的物質と関連して使用される場合、天然において見出される、そしてヒトによって操作されていない物質を指す。「単離された」という用語と関連して使用される場合、「天然に存在する」または「天然の」という用語は、核酸分子、ポリペプチド、宿主細胞等のような生物学的物質と関連して使用される場合、天然において見出されるような野生型構造的特徴を共有する単離された物質を指す。例えば、単離された天然に存在するres02ポリペプチドは、1つの実施態様において、配列番号第2番の配列を有する、単離された野生型res02ポリペプチドである。本明細書中で使用される「天然に存在しない」または「非天然の」という用語は、天然において見出されない、または構造的に修飾された、またはヒトによって合成された物質を指す。

20

【0092】

「有効な量」という用語は、それが使用される目的を達成するのに有用な物質の量を指す。「治療的に有効な量」という用語は、それが使用される治療的効果を達成するのに有用な物質の量を指す。従って、物質の治療的に有効な量は、被験体の状態または疾患を治療または予防するために患者に投与された場合に、被験体の状態または疾患の開始を予防する、その症状を軽減する、またはその進行を停止させる物質の量である。

30

【0093】

本明細書中で使用される「薬剤学的に許容できる担体」または「生理学的に許容できる担体」という用語は、医薬品組成物として薬剤の伝達を達成するまたは増強するために適当な、1つまたはそれ以上の処方物質を指す。

【0094】

「抗原」という用語は、抗体のような選択的結合剤によって結合され得、およびさらに動物においてその抗原のエピトープに結合し得る抗体を産生するために使用され得る分子または分子の一部を指す。抗原は、1つまたはそれ以上のエピトープを有し得る。

【0095】

「選択的結合剤」という用語は、抗原、例えばres02またはinv19ポリペプチドに対する特異性を有する分子または複数の分子を指す。本明細書中で使用される場合、「特異的」および「特異性」という用語は、選択的結合剤の、関心のある抗原に結合し、そして他の抗原に結合しない能力を指す。

40

【0096】

「形質導入」という用語は、通常ファージによる、1つの細菌から別の細菌への遺伝子の転移を指すために使用される。

【0097】

「トランスフェクション」という用語は、細胞による外来性 (foreign) または外来性 (exogenous) DNA の取り込みを指すために使用され、そしてその外来性DNAが、細胞膜内に導入された場合に、細胞は「トランスフェクト」された。多くの

50

トランスフェクション技術が当該分野で周知であり、そして本明細書中で開示される。例えば、Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual (第2版、Cold Spring Harbor Laboratory Press、1989)を参照のこと。そのような技術を使用して、1つまたはそれ以上の外来性DNA部分を、適当な宿主細胞へ導入し得る。

**【0098】**

本明細書中で使用される「形質転換」という用語は、細胞の遺伝的特徴における変化を指し、そして細胞が新規DNAを含むよう修飾された場合に、その細胞は形質転換された。例えば、細胞がその天然の状態から遺伝的に修飾される場合に、その細胞は形質転換される。トランスフェクションまたは形質導入の後、形質転換DNAは細胞の染色体に物理的に組み込まれることによって、細胞のDNAと組換えを起こし得るか、複製されることなくエピソームエレメントとして一時的に維持され得るか、またはプラスミドとして独立に複製し得る。DNAが細胞の分裂と共に複製される場合、細胞は安定に形質転換されたと考えられる。

10

**【0099】**

(核酸分子および/またはポリペプチドの関連性)

関連する核酸分子は、配列番号1または配列番号3いずれかの核酸分子の対立遺伝子改変体を含み、そして上記のヌクレオチド配列のいずれかに相補的な配列を含むことが理解される。関連する核酸分子はまた、配列番号2または配列番号4いずれかのポリペプチドと比較して、1つまたはそれ以上のアミノ酸残基の置換、修飾、追加、および/または欠失を含む、またはそれから実質的に成るポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む。

20

**【0100】**

関連する核酸分子はまた、配列番号2または配列番号4いずれかのres02またはinv19ポリペプチドの、少なくとも約9個の連続的なアミノ酸、または約50アミノ酸、または約75アミノ酸、または約100アミノ酸、または約150アミノ酸、または約200アミノ酸、または約200より多いアミノ酸残基のポリペプチドをコードする、res02またはinv19核酸分子の断片を含む。

**【0101】**

それに加えて、関連するres02またはinv19核酸分子はまた、本明細書中で定義されるような中程度または高度にストリンジентな条件下で、それぞれ配列番号1または配列番号3いずれかのres02またはinv19核酸分子の、または配列番号2または配列番号4いずれかで示したアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする分子の、または本明細書中で定義されるような核酸断片の、または本明細書中で定義されるようなポリペプチドをコードする核酸断片の、完全に相補的な配列にハイブリダイズするヌクレオチド配列を含むそれらの分子を含む。ハイブリダイゼーションプローブを、本明細書中で提供されるres02またはinv19配列を使用して調製して、cDNA、ゲノムまたは合成DNAライブラリーを、関連する配列に関してスクリーニングし得る。公知の配列に対して有意な同一性を示すres02またはinv19ポリペプチドのDNAおよび/またはアミノ酸配列の領域を、本明細書中で記載されたような配列アラインメントアルゴリズムを用いて容易に決定し、そしてそれらの領域を、スクリーニングのためのプローブを設計するために使用し得る。

30

40

**【0102】**

「核酸断片」という用語は、それが由来する配列と、それが由来する配列より少なくとも1塩基短い、少なくとも16個の連続的な塩基のあらゆる配列を共有する核酸分子を指す。その核酸断片は、16、17、18、19、20等、それが由来する配列の全塩基数までであるがそれを含まない塩基長であり得る。例えば、いくつかの実施態様において、配列番号1の核酸断片は、配列番号1の塩基1-16、2-17、3-18、4-19等から塩基579-594までによって規定される16マーである。さらなる例として、いくつかの実施態様において、配列番号1の核酸断片は、配列番号1の塩基1-17、2-

50

18、3-19、4-20等から塩基578-594までによって規定される17マーである。ある好ましい実施態様において、核酸断片は、その断片が由来する全長核酸配列によってコードされる、対応するポリペプチドの免疫原性ペプチドをコードする。免疫原性ペプチドは、一般的に少なくとも9アミノ酸長であることが認識されるので、免疫原性ペプチドをコードする好ましい核酸断片は、少なくとも27塩基長である。本発明の核酸断片はまた、標的DNAのポリメラーゼ連鎖反応増幅のためのプライマーとして、およびDNAハイブリダイゼーションにおけるプローブとして使用するために有用である。いくつかの実施態様において、核酸断片はさらに、連続的な配列には含まれた、非連続的な配列を含む。例えば、その断片は、少なくとも1塩基を追加、少なくとも1塩基を欠失、または少なくとも1塩基を変化させ、そして依然としてプライマーまたはプローブとして有用であり得る。そのような方法は、PCR増幅産物に制限エンドヌクレアーゼ部位を導入する、特定の配列に変異を導入する等の目的のために、当該分野で周知である。

10

【0103】

「高度にストリンジェントな条件」という用語は、その配列が高度に相補的なDNA鎖のハイブリダイゼーションを可能にし、そして有意にミスマッチのDNAのハイブリダイゼーションを排除するよう設計された条件を指す。ハイブリダイゼーションストリンジェンシーは、主に温度、イオン強度、およびホルムアミドのような変性剤の濃度によって決定される。ハイブリダイゼーションおよび洗浄のための「高度にストリンジェントな条件」の例は、65-68で0.015Mの塩化ナトリウム、0.0015Mのクエン酸ナトリウム、または42で0.015Mの塩化ナトリウム、0.0015Mのクエン酸ナトリウム、および50%のホルムアミドである。Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual (第2版、Cold Spring Harbor Laboratory Press、1989); Andersonら、Nucleic Acid Hybridisation: A Practical Approach Ch.4 (IRL Press Limited)を参照のこと。

20

【0104】

よりストリンジェントな条件(より高い温度、より低いイオン強度、より高いホルムアミドまたは他の変性剤のような)を使用し得るが、ハイブリダイゼーションの率が影響される。非特異的および/またはバックグラウンドハイブリダイゼーションを抑制する目的のために、他の薬剤をハイブリダイゼーションおよび洗浄緩衝液に含み得る。例は、0.1%のウシ血清アルブミン、0.1%のポリビニルピロリドン、0.1%のピロリン酸ナトリウム、0.1%のドデシル硫酸ナトリウム(SDS)、フィコール、デンハート溶液、超音波処理したサケ精子DNA(または別の非相補的DNA)、および硫酸デキストランであるが、他の適当な薬剤も使用し得る。これらの添加剤の濃度および型を、ハイブリダイゼーション条件のストリンジェンシーに実質的に影響を与えずに変化させ得る。ハイブリダイゼーション実験は、通常pH6.8-7.4において行なわれるが、典型的なイオン強度条件において、ハイブリダイゼーション率はほとんどpHと独立である。Andersonら、Nucleic Acid Hybridisation: A Practical Approach Ch.4 (IRL Press Limited)を参照のこと。

30

40

【0105】

DNA二重鎖の安定性に影響を与える因子は、塩基の組成、長さ、および塩基対ミスマッチの程度を含む。ハイブリダイゼーション条件を、これらの変数を配慮し、そして異なる配列関連性のDNAがハイブリッドを形成するのを可能にするために、当業者によって調整し得る。完全にマッチしたDNA二重鎖の融解温度を、以下の方程式によって推定し得る:

$$T_m ( ) = 81.5 + 16.6 ( \log [ Na^+ ] ) + 0.41 ( \% G + C ) - 600 / N - 0.72 ( \% \text{ホルムアミド} )$$

ここでNは形成される二重鎖の長さ、[Na<sup>+</sup>]はハイブリダイゼーションまたは洗浄溶

50

液におけるナトリウムイオンのモル濃度、および% G + C は、ハイブリッド中の（グアニン + シトシン）塩基のパーセントである。不完全にマッチしたハイブリッドに関して、融解温度は 1 % のミスマッチごとに約 1 °C 減少する。

【 0 1 0 6 】

「中程度にストリンジェントな条件」という用語は、DNA 二重鎖が、「高度にストリンジェントな条件」下で起こり得るよりも、より高い塩基対ミスマッチの程度で形成し得る条件を指す。典型的な「中程度にストリンジェントな条件」の例は、50 ~ 65 °C で 0 . 0 1 5 M の塩化ナトリウム、0 . 0 0 1 5 M のクエン酸ナトリウム、または 37 ~ 50 °C で 0 . 0 1 5 M の塩化ナトリウム、0 . 0 0 1 5 M のクエン酸ナトリウム、および 20 % のホルムアミドである。例として、0 . 0 1 5 M のナトリウムイオンにおける 50 °C の「中程度にストリンジェントな条件」は、約 21 % のミスマッチを可能にする。

10

【 0 1 0 7 】

「高度にストリンジェントな条件」および「中程度にストリンジェントな条件」の間に、絶対的な区別は無いことが、当業者によって認識される。例えば、0 . 0 1 5 M のナトリウムイオン（ホルムアミドなし）において、完全にマッチした長い DNA の融解温度は約 71 °C である。65 °C における洗浄（同じイオン強度において）によって、これは約 6 % のミスマッチを可能にする。より遠く関連する配列を捕獲するために、当業者は、単純に温度を下げるか、またはイオン強度を上げ得る。

【 0 1 0 8 】

約 20 ヌクレオチドまでのオリゴヌクレオチドプローブに関する、1 M の NaCl、例えば 6 × 塩クエン酸ナトリウム（SSC）における融解温度のよい推定は、以下によって与えられる：

20

$$T_m = A - T \text{塩基対につき } 2 \text{ °C} + G - C \text{塩基対につき } 4 \text{ °C} .$$

【 0 1 0 9 】

オリゴヌクレオチドの高度にストリンジェントな洗浄条件は、通常 6 × SSC、0 . 1 % の SDS において、オリゴヌクレオチドの  $T_m$  より 0 ~ 5 °C 低い温度である。

【 0 1 1 0 】

別の実施態様において、関連する核酸分子は、配列番号 1 または配列番号 3 いずれかで示したヌクレオチド配列と少なくとも約 70 % 同一であるヌクレオチド配列を含むか、またはそれから成る、または配列番号 2 または配列番号 4 いずれかで記載されたポリペプチドと少なくとも約 70 % 同一であるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むまたは実質的にそれから成る。ある実施態様において、そのヌクレオチド配列は、配列番号 1 または配列番号 3 いずれかにおいて示したヌクレオチド配列と約 75 %、または約 80 %、または約 85 %、または約 90 %、または約 95 %、96 %、97 %、98 %、または 99 % 同一であるか、またはそのヌクレオチド配列は、配列番号 2 または配列番号 4 のいずれかで記載されたポリペプチド配列と約 75 %、または約 80 %、または約 85 %、または約 90 %、または約 95 %、96 %、97 %、98 %、または 99 % 同一であるポリペプチドをコードする。関連する核酸分子は、配列番号 2 または配列番号 4 のいずれかで記載されたポリペプチドの、少なくとも 1 つの活性を有するポリペプチドをコードする。

30

【 0 1 1 1 】

核酸配列における相違は、配列番号 2 または配列番号 4 いずれかのアミノ酸配列と比較してアミノ酸配列の保存的および/または非保存的改変を生じ得る。配列番号 2 または配列番号 4 いずれかのアミノ酸配列に対する保存的改変（およびコードするヌクレオチドに対する対応する修飾）は、res02 または inv19 ポリペプチドのものと同様の機能的および化学的特徴を有するポリペプチドを産生する。対照的に、res02 または inv19 ポリペプチドの機能的および/または化学的特徴における実質的な改変を、(a) 例えばシートまたはらせん状配置としての、置換の領域における分子バックボーンの構造、(b) 標的部位における分子の電荷または疎水性、または (c) 側鎖の大きさ (bulk) の維持に対する影響において有意に異なる、配列番号 2 または配列番号 4 いずれかのアミノ酸配列における置換を選択することによって達成し得る。

40

50

## 【0112】

例えば、「保存的アミノ酸置換」は、その位置におけるアミノ酸残基の極性または電荷にほとんど影響がないか、または影響がないような、天然アミノ酸残基の、標準的な残基による置換を含み得る。さらに、以前に「アラニン走査変異誘発 (alanine scanning mutagenesis)」に関して記載されたように、ポリペプチドにおけるあらゆる天然残基をまた、アラニンで置換し得る。保存的アミノ酸置換はまた、生物学的系における合成によってではなく、化学的ペプチド合成によって典型的には組み込まれる、天然に存在しないアミノ酸残基を含み得る。これらは、ペプチド模倣物、およびアミノ酸部分の他の逆転したまたは反転した形式を含む。

## 【0113】

天然に存在する残基は、共通する側鎖の性質に基づいて以下のクラスに分類し得る：(1)疎水性：ノルロイシン、Met、Ala、Val、Leu、Ile；(2)中性親水性：Cys、Ser、Thr；(3)酸性：Asp、Glu；(4)塩基性：Asn、Gln、His、Lys、Arg；(5)鎖の方向に影響を与える残基：Gly、Pro；および(6)芳香族：Trp、Tyr、Phe。

## 【0114】

従って、例えば、保存的アミノ酸置換は、これらのクラスの1つからのメンバーの、同じクラスからの別のメンバーとの交換を含み得る。非保存的アミノ酸置換は、これらのクラスの1つからのメンバーの、別のクラスからのメンバーとの交換を含み得る。

## 【0115】

そのような変化をさせることにおいて、アミノ酸の疎水性親水性指標を考慮し得る。各アミノ酸は、その疎水性および電荷の特徴に基づいて疎水性親水性指標を割り当てられた。疎水性親水性指標は：イソロイシン (+4.5)；バリン (+4.2)；ロイシン (+3.8)；フェニルアラニン (+2.8)；システイン/シスチン (+2.5)；メチオニン (+1.9)；アラニン (+1.8)；グリシン (-0.4)；スレオニン (-0.7)；セリン (-0.8)；トリプトファン (-0.9)；チロシン (-1.3)；プロリン (-1.6)；ヒスチジン (-3.2)；グルタミン酸 (-3.5)；グルタミン (-3.5)；アスパラギン酸 (-3.5)；アスパラギン (-3.5)；リシン (-3.9)；およびアルギニン (-4.5)である。

## 【0116】

タンパク質に相互作用的生物学的機能を与えることにおける、アミノ酸疎水性親水性指標の重要性は、一般的に当該分野において理解される。Kyte Jら (1982) J Mol Biol 157:105-32。あるアミノ酸を、同様の疎水性親水性指標またはスコアを有する他のアミノ酸と置換し、そして依然として同様の生物学的活性を維持し得ることが公知である。疎水性親水性指標に基づいて変化させる場合に、その疎水性親水性指標が+2以内であるアミノ酸の置換が好ましく、+1以内であるものが特に好ましく、そして±0.5以内であるものがさらにより特に好ましい。

## 【0117】

特に、本場合のように、それによって作成した生物学的に機能的に同等のタンパク質またはペプチドを、免疫学的実施態様において使用することを意図する場合に、同様のアミノ酸の置換を、親水性に基づいて効果的に行い得ることも、当該分野において理解される。その隣接するアミノ酸の親水性によって支配される、タンパク質の最も高い局所平均親水性は、その免疫原性および抗原性、すなわちタンパク質の生物学的性質と関連する。

## 【0118】

以下の親水性の値が、これらのアミノ酸残基に割り当てられた：アルギニン (+3.0)；リシン (+3.0)；アスパラギン酸 (+3.0 ± 1)；グルタミン酸 (+3.0 ± 1)；セリン (+0.3)；アスパラギン (+0.2)；グルタミン (+0.2)；グリシン (0)；スレオニン (-0.4)；プロリン (-0.5 ± 1)；アラニン (-0.5)；ヒスチジン (-0.5)；システイン (-1.0)；メチオニン (-1.3)；バリン (-1.5)；ロイシン (-1.8)；イソロイシン (-1.8)；チロシン (-2.

10

20

30

40

50

3) ; フェニルアラニン (- 2 . 5 ) ; およびトリプトファン (- 3 . 4 ) 。同様の親水性の値に基づいて変化させる場合、その親水性の値が  $\pm 2$  以内であるアミノ酸の置換が好ましく、 $\pm 1$  以内であるものが特に好ましく、そして  $\pm 0 . 5$  以内であるものがさらにより特に好ましい。親水性に基づいて、一次アミノ酸配列からエピトープも同定し得る。これらの領域は、「エピトープコア領域」とも呼ばれる。

【 0 1 1 9 】

望ましいアミノ酸置換 ( 保存的または非保存的のいずれにせよ ) を、そのような置換が望ましいときに、当業者が決定し得る。例えば、アミノ酸置換を使用して、res 0 2 または inv 1 9 ポリペプチドの重要な残基を同定し得るか、または本明細書中で記載した res 0 2 または inv 1 9 ポリペプチドの親和性を増加または減少させ得る。典型的な

10

【 0 1 2 0 】

【表 2】

表 2. アミノ酸置換

もとの残基	典型的な置換	好ましい置換
Ala	Val, Leu, Ile	Val
Arg	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn	Gln	Gln
Asp	Glu	Glu
Cys	Ser, Ala	Ser
Gln	Asn	Asn
Glu	Asp	Asp
Gly	Pro, Ala	Ala
His	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile	Leu, Val, Met, Ala, Phe, ノルロイシン	Leu
Leu	Ile, Val, Met, Ala, Phe, ノルロイシン	Ile
Lys	Arg, 1,4 ジアミノ酪酸, Gln, Asn	Arg
Met	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Leu
Pro	Ala, Gly	Gly
Ser	Thr, Ala, Cys	Thr
Thr	Ser	Ser
Trp	Tyr, Phe	Tyr
Tyr	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val	Ile, Met, Leu, Phe, Ala, ノルロイシン	Leu

20

30

40

当業者は、周知の技術を用いて、配列番号 2 または配列番号 4 のいずれかで記載されたポリペプチドの適当な異型を決定し得る。生物学的活性を破壊せずに変化させ得る分子の適当な領域を同定するために、当業者は、活性に重要ではないと考えられる領域を標的化し得る。例えば、同じ種または他の種由来の、同様の活性を有する同様のポリペプチドが公知である場合、当業者は res 0 2 または inv 1 9 ポリペプチドのアミノ酸配列を、そのような同様のポリペプチドと比較し得る。そのような比較によって、同様のポリペプチド間で保存されている残基および分子の部分を同定し得る。そのような同様のポリペプチドと比較して保存されていない、res 0 2 または inv 1 9 分子の領域における変化は、res 0 2 または inv 1 9 ポリペプチドの生物学的活性および / または構造に有害

50

な影響を与える可能性が低いことが認識される。当業者はまた、比較的保存された領域においてさえ、活性を維持したまま、化学的に同様のアミノ酸を天然に存在する残基と置換し得ることを知っている（保存的アミノ酸残基置換）。従って、生物学的活性または構造に重要であり得る領域でさえ、生物学的活性を破壊することなく、またはポリペプチド構造に有害な影響を与えずに、保存的アミノ酸置換を受け得る。

#### 【0121】

さらに、当業者は、活性または構造に重要な同様のポリペプチドの残基を同定する、構造-機能研究を検討し得る。そのような比較の観点において、同様のポリペプチドにおいて活性または構造に重要なアミノ酸残基に対応する、res02またはinv19ポリペプチドにおけるアミノ酸残基の重要性を予測し得る。当業者は、res02またはinv19ポリペプチドの、そのような予測された重要なアミノ酸残基に関して、化学的に同様のアミノ酸置換を選び得る。

10

#### 【0122】

他の実施態様において、関連する核酸分子は、少なくとも1つのアミノ酸挿入を有する、そしてここでそのポリペプチドは配列番号2または配列番号4のいずれかで記載されたポリペプチドの活性を有し、配列番号2または配列番号4のいずれかで記載されたポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、または少なくとも1つのアミノ酸欠失を有し、そしてここでそのポリペプチドは配列番号2または配列番号4のいずれかで記載されたポリペプチドの活性を有する、配列番号2または配列番号4のいずれかで記載されたポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むか、またはそれから成る。関連する核酸分子はまた、ポリペプチドはカルボキシルおよび/またはアミノ末端の短縮を有し、そしてさらにここでそのポリペプチドは配列番号2または配列番号4のいずれかで記載されたポリペプチドの活性を有する、配列番号2または配列番号4のいずれかで記載されたポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むか、またはそれから成る。関連する核酸分子はまた、アミノ酸置換、アミノ酸挿入、アミノ酸欠失、カルボキシル末端の短縮、およびアミノ末端の短縮からなる群から選択される少なくとも1つの改変を有し、そしてここでそのポリペプチドは配列番号2または配列番号4のいずれかで記載されたポリペプチドの活性を有する、配列番号2または配列番号4のいずれかで記載されたポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むか、またはそれから成る。

20

#### 【0123】

それに加えて、配列番号2または配列番号4いずれかのアミノ酸配列を含むポリペプチド、または他のres02またはinv19ポリペプチドを、相同的ポリペプチドと融合してホモダイマーを形成し得るか、または異種ポリペプチドと融合してヘテロダイマーを形成し得る。異種ペプチドおよびポリペプチドとしては、res02またはinv19融合ポリペプチドの検出および/または単離を可能にするエピトープ；膜貫通受容体タンパク質または細胞外ドメインまたは膜貫通および細胞内ドメインのようなその一部；膜貫通受容体タンパク質に結合するリガンドまたはその一部；触媒的に活性な酵素またはその一部；ロイシンジッパードメインのような、オリゴマー化を促進するポリペプチドまたはペプチド；免疫グロブリン定常領域のような、安定性を増加させるポリペプチドまたはペプチド；および配列番号2または配列番号4のいずれかで記載されたアミノ酸配列を含むポリペプチドまたは他のres02またはinv19ポリペプチドと異なる治療的活性を有するポリペプチドが挙げられるがこれらに限らない。

30

40

#### 【0124】

配列番号2または配列番号4のいずれかで記載されたアミノ酸配列を含むポリペプチド、または他のres02またはinv19ポリペプチドのアミノ末端またはカルボキシル末端のいずれかにおいて融合し得る。融合は、リンカーまたはアダプター分子なしで直接であり得るか、またはリンカーまたはアダプター分子により得る。リンカーまたはアダプター分子は、1つまたはそれ以上のアミノ酸残基、典型的には約20から約50アミノ酸残基であり得る。リンカーまたはアダプター分子をまた、融合した部分の分離を可能にするために、DNA制限エンドヌクレアーゼまたはプロテアーゼの切断部位を有して設計し

50

得る。一旦構築されたら、融合ポリペプチドを、本明細書中で記載された方法によって誘導体化し得ることが認識される。

【0125】

本発明のさらなる実施態様において、配列番号2または配列番号4のいずれかのアミノ酸配列を含むポリペプチド、または他のres02またはinv19ポリペプチドを、ヒトIgGのFc領域の1つまたはそれ以上のドメインと融合する。抗体は、2つの機能的に区別できる部分、抗原に結合する「Fab」として知られる可変ドメイン、および補体の活性化および食細胞による攻撃のようなエフェクター機能に關与する「Fc」として知られる定常ドメインを含む。Fcは、長い血清半減期を有し、一方Fabは短命である。Capon DJら(1989) Nature 337:525-31。治療的タンパク質と共に構築された場合、Fcドメインはより長い半減期を提供し得るか、またはFc受容体結合、プロテインA結合、補体の固定、およびおそらく胎盤への移入のような機能さえも組み込み得る。

10

【0126】

1つの例において、ヒトIgGヒンジ、CH2、およびCH3領域を、当業者に公知の方法を用いて、res02ポリペプチドのアミノ末端またはカルボキシル末端いずれかにおいて融合し得る。別の例において、ヒトIgGヒンジ、CH2、およびCH3領域を、res02ポリペプチド断片のアミノ末端またはカルボキシル末端いずれかにおいて融合し得る。

【0127】

できた融合ポリペプチドを、プロテインAアフィニティークラムを用いることによって精製し得る。Fc領域に融合したペプチドおよびタンパク質は、融合していない対応物よりも、インビボにおいて実質的により長い半減期を示すことが見出された。また、Fc領域への融合は、融合ポリペプチドの二量体化/多量体化を可能にする。Fc領域は、天然に存在するFc領域であり得るか、または治療的性質、循環時間、または凝集の抑制のような、ある性質を改善するために、それを変化させ得る。

20

【0128】

關連する核酸分子およびポリペプチドの同一性および類似性は、公知の方法によって容易に計算される。そのような方法は、Computational Molecular Biology (A.M. Lesk編、Oxford University Press 1988); Biocomputing: Informatics and Genome Projects (D.W. Smith編、Academic Press 1993); Computer Analysis of Sequence Data (Part 1, A.M. GriffinおよびH.G. Griffin編、Human Press 1994); G. von Heinle、Sequence Analysis in Molecular Biology (Academic Press 1987); Sequence Analysis Primer (M. GribskovおよびJ. Devereux編、M. Stockton Press 1991); およびCarilloら(1988) SIAM J Applied Math 48: 1073において記載されるものを含むが、これに限らない。

30

40

【0129】

同一性および/または類似性を決定する好ましい方法は、試験する配列間の、最も高いマッチを与えるように設計される。同一性および類似性を決定する方法は、公共で入手可能なコンピュータープログラムにおいて記載される。2つの配列間の同一性および類似性を決定する好ましいコンピュータープログラム方法は、GAP (Devereux Jら(1984) Nucleic Acids Res 12(1 Pt1): 387-95; Genetics Computer Group、University of Wisconsin、Madison、Wis.)を含むGCGプログラムパッケージ、BLASTP、BLASTN、およびFASTA (Altschul SFら(1990) J Mol Biol 215: 403-10)を含むがこれに限らない。BLASTX

50



プログラムは、National Center for Biotechnology Information (NCBI) および他の供給源 (Altschulら、BLAST Manual (NCB NLM NIH, Bethesda, MD); Altschul SFら (1990) J Mol Biol 215:403-10) から、公共で入手可能である。周知のSmith Watermanアルゴリズムも、同一性を決定するために使用し得る。

【0130】

2つのアミノ酸配列を整列させるための、あるアラインメントスキームは、2つの配列の短い領域のみのマッチングを生じ得、そしてこの小さい整列領域は、2つの全長配列間に有意な関連がなくても、非常に高い配列同一性を有し得る。よって、1つの実施態様において、選択されたアラインメント方法 (例えばGAPプログラム) は、請求されたポリペプチドの少なくとも50個の連続的なアミノ酸にわたるアラインメントを生じる。

10

【0131】

例えば、コンピューターアルゴリズムGAP (Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, Wis.) を用いて、配列同一性パーセントを決定する2つのポリペプチドを、それらのアミノ酸それぞれの最適なマッチングのために整列させる (アルゴリズムによって決定される「マッチした範囲」)。gap opening penalty (それは3×平均項として計算される; 「平均項」は、使用される比較マトリックスの項の平均である; 「項」は、特定の比較マトリックスによって完全なアミノ酸マッチのそれぞれに割り当てられるスコアまたは数である) およびgap extension penalty (それは通常0.1×gap opening penaltyである)、およびPAM250またはBLOSUM62のような比較マトリックスを、アルゴリズムと組み合わせて使用する。標準的な比較マトリックスも、アルゴリズムによって使用される。Dayhoffら、5 Atlas of Protein Sequence and Structure (Supp. 3 1978) (PAM250比較マトリックス); Henikoff Sら (1992) Proc Natl Acad Sci USA 89:10915-19 (BLOSUM62比較マトリックス) を参照のこと。

20

【0132】

ポリペプチド配列比較のために好ましいパラメーターは、以下のものを含む: アルゴリズム: Needleman SBら (1970) J Mol Biol 48:443-53; 比較マトリックス: BLOSUM62 (Henikoffら、前出); Gap Penalty: 12; Gap Length Penalty: 4; 類似性の閾値: 0。

30

【0133】

GAPプログラムは、上記のパラメーターで有用である。前述のパラメーターは、GAPアルゴリズムを用いたポリペプチド比較のデフォルトパラメーターである (end gapsに関してはpenaltyなしで)。

【0134】

核酸分子配列比較のために好ましいパラメーターは、以下のものを含む。アルゴリズム: Needlemanら、前出; 比較マトリックス: マッチ = +10、ミスマッチ = 0; Gap Penalty: 50; Gap Length Penalty: 3。

40

【0135】

GAPプログラムはまた、上記のパラメーターで有用である。前述のパラメーターは、核酸分子比較のデフォルトパラメーターである。

【0136】

Program Manual, Wisconsin Package, Version 9、1997年9月において記載されたものを含む、他の典型的なアルゴリズム、gap opening penalties、gap extension penalties、比較マトリックス、および類似性の閾値を使用し得る。なされる特定の選択は、当業者に明らかであり、そしてDNA対DNA、タンパク質対タンパク質、タンパク質

50

対DNAのような、なされる特定の比較；およびさらに、比較が所定の配列のペア間であるか（その場合にはGAPまたはBestFitが一般的に好ましい）、または1つの配列および大きな配列のデータベース間であるか（その場合にはFASTAまたはBLASTAが好ましい）に依存する。

**【0137】**

（核酸分子）

res02またはinv19ポリペプチドのアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする核酸分子を、制限することなく、化学的合成、ゲノムライブラリースクリーニング、発現ライブラリースクリーニング、および/またはゲノムDNAのPCR増幅を含む、様々な方法において容易に得ることができる。

10

**【0138】**

本明細書中で使用される組換えDNA方法は、一般的にSambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual（第2版、Cold Spring Harbor Laboratory Press、1989）および/またはCurrent Protocols in Molecular Biology（Ausubelら編、Green Publishers Inc.およびWiley and Sons 1994）において記載されるものである。本発明は、本明細書中で記載されたような核酸分子およびそのような分子を得る方法を提供する。

**【0139】**

res02またはinv19ポリペプチドのアミノ酸配列をコードする遺伝子が1つの種から同定された場合、その遺伝子の全てまたは一部をプローブとして使用して、オルソログまたは同じ種由来の関連する遺伝子を同定し得る。プローブまたはプライマーを使用して、res02またはinv19ポリペプチドを発現すると考えられる様々な細菌由来のゲノムDNAをスクリーニングし得る。それに加えて、配列番号1または配列番号3のいずれかで記載された配列を有する核酸分子の一部または全てを使用してゲノムライブラリーをスクリーニングし、res02またはinv19ポリペプチドのアミノ酸配列をコードする遺伝子を同定および単離し得る。典型的には、スクリーニングから得られる偽陽性の数を最小限にするために、中程度または高度なストリンジェンシーの条件を、スクリーニングのために採用する。

20

**【0140】**

res02またはinv19ポリペプチドのアミノ酸配列をコードする核酸分子をまた、発現されたタンパク質の性質に基づく陽性クローンの検出を採用する発現クローニングによって同定し得る。典型的には、核酸ライブラリーを、宿主細胞表面に発現および提示されたクローニングされたタンパク質に対する、抗体または他の結合パートナー（例えば受容体またはリガンド）の結合によってスクリーニングする。その抗体または結合パートナーを、検出可能な標識で修飾し、望ましいクローンを発現する細胞を同定する。

30

**【0141】**

下記に記載する説明によって行なわれる組換え発現技術に従って、これらのポリヌクレオチドを産生、およびコードされるポリペプチドを発現し得る。例えば、res02またはinv19ポリペプチドのアミノ酸配列をコードする核酸配列を適当なベクターに挿入することによって、当業者は、大量の望ましいヌクレオチド配列を容易に産生し得る。その配列を、次いで検出プローブまたは増幅プライマーを産生するために使用し得る。あるいは、res02またはinv19ポリペプチドのアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドを、発現ベクターに挿入し得る。その発現ベクターを適当な宿主に導入することによって、コードされたres02またはinv19ポリペプチドを、大量に産生し得る。

40

**【0142】**

適当な核酸配列を得る別の方法は、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）である。この方法において、DNA鋳型を適当な供給源から調製する。典型的にはres02またはinv19ポリペプチドのアミノ酸配列をコードするDNAの2つの別々の領域に相補的な2つのプライマーを、次いでTaqポリメラーゼのようなポリメラーゼと共に鋳型DNAに加

50

え、そしてそのポリメラーゼは2つのプライマー間のDNA領域を増幅する。

【0143】

res02またはinv19ポリペプチドのアミノ酸配列をコードする核酸分子を調製する別の手段は、Engelsら(1989) *Angew Chem Intl Ed* 28:716-34によって記載されたもののような、当業者に周知の方法を用いた化学的合成である。これらの方法はとりわけ、核酸合成のための、ホスホトリエステル、ホスホロアミダイト、およびH-ホスホン酸塩方法を含む。そのような化学的合成の好ましい方法は、標準的なホスホロアミダイト化学を用いた、ポリマー支持合成である。典型的には、res02またはinv19ポリペプチドのアミノ酸配列をコードするDNAは、数百ヌクレオチドの長さである。約100ヌクレオチドより長い核酸を、これらの方法を用いていくつかの断片として合成し得る。その断片を次いでライゲーションして、res02またはinv19遺伝子の全長ヌクレオチド配列を形成し得る。当業者に公知の他の方法も使用し得る。

10

【0144】

ある実施態様において、核酸改変体は、所定の宿主細胞におけるres02またはinv19ポリペプチドの最適な発現のために変化させたコドンを含む。特定のコドン変化は、res02またはinv19ポリペプチドおよび発現のために選択された宿主細胞に依存する。そのような「コドン最適化」を、様々な方法によって、例えば所定の宿主細胞において高度に発現される遺伝子で使用するのに好ましいコドンを選択することによって行ない得る。高度に発現される細菌遺伝子のコドン選択のために、「Eco\_high.cod」のようなコドン頻度表を組み込んだコンピュータアルゴリズムを使用し得、そしてそれはUniversity of Wisconsin Package Version 9.0 (Genetics Computer Group, Madison, Wis.)によって提供される。他の有用なコドン頻度表は、「Celegans\_high.cod」、「Celegance\_low.cod」、「Drosophila\_high.cod」、「Human\_high.cod」、「Maize\_high.cod」および「Yeast\_high.cod」を含む。

20

【0145】

いくつかの場合において、res02またはinv19ポリペプチド改変体をコードする核酸分子を調製することが望ましくあり得る。改変体をコードする核酸分子を、部位特異的突然変異生成、PCR増幅、または他の適当な方法を用いて産生し得、ここでプライマーは望ましい点突然変異を有する(突然変異生成技術の説明に関して、Sambrookら、前出、およびAusubelら、前出を参照のこと)。Engelsら、前出によって記載された方法を用いた化学的合成も、そのような異型を調製するために使用し得る。当業者に公知の他の方法も使用し得る。

30

【0146】

(ベクターおよび宿主細胞)

res02またはinv19ポリペプチドのアミノ酸配列をコードする核酸分子を、標準的なライゲーション技術を用いて適当な発現ベクターへ挿入する。そのベクターは、典型的には採用される特定の宿主細胞において機能的であるように選択される(すなわち、そのベクターは、遺伝子の増幅および/または遺伝子の発現が起こり得るように、宿主細胞の機構と適合性である)。res02またはinv19ポリペプチドのアミノ酸配列をコードする核酸分子を、原核生物、酵母、昆虫(バキュロウイルス系)、および/または真核生物宿主細胞において増幅/発現し得る。宿主細胞の選択は、部分的にはres02またはinv19ポリペプチドが翻訳後修飾(例えば糖鎖付加および/またはリン酸化)されるかどうかによって依存する。もしそうなら、酵母、昆虫、または哺乳類宿主細胞が好ましい。発現ベクターの概説に関しては、Meth.Enz.第185巻(D.V.Goedel編、Academic Press 1990)を参照のこと。

40

【0147】

典型的には、その宿主細胞のいずれかにおいて使用される発現ベクターは、プラスミド

50

の維持および外来性ヌクレオチド配列のクローニングおよび発現のための配列を含む。ある実施態様において集合的に「フランキング配列」と呼ばれるそのような配列は、典型的には1つまたはそれ以上の以下のヌクレオチド配列を含む：プロモーター、1つまたはそれ以上のエンハンサー配列、複製起点、転写終了配列、ドナーおよびアクセプタープライミング部位を含む完全なイントロン配列、ポリペプチド分泌のためのリーダー配列をコードする配列、リボゾーム結合部位、ポリアデニル化配列、発現されるポリペプチドをコードする核酸を挿入するためのポリリンカー領域、および選択マーカーエレメント。res02またはinv19の発現のために、その宿主細胞のいずれかにおいて使用される発現ベクターは、典型的には1つまたはそれ以上の以下のヌクレオチド配列を含む：プロモーター、1つまたはそれ以上のエンハンサー配列、複製起点、転写終了配列、ポリペプチド分泌のためのリーダー配列をコードする配列、リボゾーム結合部位、発現されるポリペプチドをコードする核酸を挿入するためのポリリンカー領域、および選択マーカーエレメント。

10

**【0148】**

任意で、そのベクターは「タグ」をコードする配列、すなわちres02またはinv19ポリペプチドコード配列の5'または3'末端に位置するオリゴヌクレオチド分子；ポリHis(hexaHisのような)または市販で入手可能な抗体が存在するFLAG、HA(ヘマグルチニンインフルエンザウイルス)、またはmycのような別の「タグ」を含み得る。このタグは、典型的にはポリペプチドの発現時にポリペプチドに融合され、そしてres02またはinv19ポリペプチドの宿主細胞からのアフィニティー精製の手段となり得る。アフィニティー精製は、例えばアフィニティーマトリックスとしてタグに対する抗体を使用するカラムクロマトグラフィーによって達成し得る。任意で、そのタグを続いて、切断のために特定のペプチダーゼを使用するような、様々な手段によって精製res02またはinv19ポリペプチドから除去し得る。

20

**【0149】**

フランキング配列は、同種由来(すなわち、宿主細胞と同じ種および/または系統由来)、異種由来(すなわち、宿主細胞種または系統と異なる種由来)、ハイブリッド(すなわち、1つより多くの供給源由来のフランキング配列の組み合わせ)、または合成であり得るか、またはフランキング配列は、res02またはinv19ポリペプチド発現を調節するために通常機能する天然配列であり得る。そのようであるので、フランキング配列の供給源は、そのフランキング配列が宿主細胞の機構において機能的であり、そしてそれによって活性化され得るなら、あらゆる原核生物または真核細生物、あらゆる脊椎または無脊椎生物、またはあらゆる植物であり得る。

30

**【0150】**

本発明のベクターにおいて有用なフランキング配列を、当該分野で周知のいくつかの方法のいずれかによって得ることができる。典型的には、res02またはinv19遺伝子フランキング配列の他に、本明細書中で有用なフランキング配列は、マッピングおよび/または制限エンドヌクレアーゼ消化によって以前に同定され、そして従って適当な制限エンドヌクレアーゼを用いて適当な供給源から単離し得る。いくつかの場合において、フランキング配列の全ヌクレオチド配列が公知であり得る。ここで、そのフランキング配列を、核酸合成またはクローニングに関して本明細書中で記載された方法を用いて合成し得る。

40

**【0151】**

フランキング配列の全てまたは一部のみが公知である場合、PCRを用いて、および/または同じまたは別の種由来の、適当なオリゴヌクレオチドおよび/またはフランキング配列断片によるゲノムライブラリーのスクリーニングによって、それを得ることができる。フランキング配列が未知である場合、フランキング配列を含むDNAの断片を、例えば、コード配列または別の遺伝子または複数の遺伝子さえを含み得るDNAのより大きな部分から単離し得る。適当なDNA断片を産生する制限エンドヌクレアーゼ消化によって、続いてアガロースゲル精製、Qiagen(登録商標)カラムクロマトグラフィー(Ch

50

at swor th、C a l i f . )、または当業者に公知の他の方法を用いた単離によって、単離を達成し得る。この目的を達成するために適当な酵素の選択は、当業者に容易に明らかである。

#### 【 0 1 5 2 】

複製の起点は、典型的には市販で購入される原核生物発現ベクターの一部であり、そしてその起点は宿主細胞におけるベクターの増幅を助ける。ベクターのあるコピー数までの増幅は、ある場合には、res 0 2 または inv 1 9 ポリペプチドの最適な発現のために重要であり得る。選択されたベクターが複製起点部位を含まないなら、公知の配列に基づいて化学的に合成し、そしてベクターにライゲーションし得る。例えば、プラスミド p B R 3 2 2 ( New E n g l a n d B i o l a b s、B e v e r l y、M a s s . ) 由来の複製起点が、ほとんどのグラム陰性細菌に適当であり、そして様々な起点（例えば、S V 4 0、ポリオーマ、アデノウイルス、水疱性口内炎ウイルス ( V S V )、または H P V または B P V のようなパピローマウイルス) が、哺乳類細胞におけるクローニングベクターに有用である。一般的に、複製起点要素は、哺乳類発現ベクターには必要ない（例えば、S V 4 0 起点は、それが初期プロモーターを含んでいるというだけで、多くの場合使用される）。

10

#### 【 0 1 5 3 】

転写終了配列は、典型的にはポリペプチドコード領域の 3 ' 末端に位置し、そして転写を終了させるために作用する。通常、原核細胞における転写終了配列は、G - C リッチ断片に続くポリ T 配列である。その配列は、ライブラリーから容易にクローニングされるか、またはベクターの一部として市販で購入もされるが、本明細書中で記載されたもののような核酸合成の方法を用いて、容易に合成もし得る。

20

#### 【 0 1 5 4 】

選択マーカー遺伝子要素は、選択的培地において増殖する宿主細胞の生存および増殖に必要なタンパク質をコードする。典型的な選択マーカー遺伝子は、( a ) 原核生物宿主細胞に、抗生物質または他の毒素、例えばアンピシリン、テトラサイクリン、またはカナマイシンに対する耐性を与える；( b ) 細胞の栄養要求性欠損を補完する；または( c ) 複合培地から入手可能でない重要な栄養素を供給するタンパク質をコードする。ネオマイシン耐性遺伝子も、原核生物および真核生物宿主細胞における選択のために使用し得る。

30

#### 【 0 1 5 5 】

他の選択遺伝子を使用して、発現される遺伝子を増幅し得る。増幅は、増殖に重要なタンパク質の産生のためにより高い需要がある遺伝子が、組換え細胞の連続的な世代の染色体においてタンデムに反復される過程である。哺乳類細胞に適当な選択マーカーの例は、ジヒドロ葉酸レダクターゼ ( D H F R ) およびチミジンキナーゼを含む。哺乳類細胞形質転換体を、選択プレッシャー下に置き、ここで形質転換体のみが、そのベクターに存在する選択遺伝子によって、生存するよう独特に適応する。培地における選択薬剤の濃度を連続的に変化させる条件下で形質転換細胞を培養することによって、選択プレッシャーをかけ、それによって選択遺伝子および res 0 2 または inv 1 9 ポリペプチドをコードする DNA 両方の増幅を引き起こす。結果として、増加した量の res 0 2 または inv 1 9 ポリペプチドが、増幅された DNA から合成される。

40

#### 【 0 1 5 6 】

リボゾーム結合部位は、通常 mRNA の翻訳開始に必要であり、そしてシャイン - ダルガーノ配列 ( 原核生物 ) またはコザック配列 ( 真核生物 ) によって特徴付けられる。そのエレメントは、典型的にはプロモーターの 3 '、および発現される res 0 2 または inv 1 9 ポリペプチドのコード配列の 5 ' に位置する。シャイン - ダルガーノ配列は様々であるが、典型的にはポリプリンである ( すなわち、高い A - G 含量を有する )。多くのシャイン - ダルガーノ配列が同定され、それらはそれぞれ本明細書中で記載された方法を用いて容易に合成し得、そして原核生物ベクターにおいて使用し得る。

#### 【 0 1 5 7 】

リーダーまたはシグナル配列を使用して、res 0 2 または inv 1 9 ポリペプチドを

50

宿主細胞の外へ向け得る。典型的には、シグナル配列をコードするヌクレオチド配列は、*res02*または*inv19*核酸分子のコード領域に、または*res02*または*inv19*ポリペプチドコード領域の5'末端に直接位置する。多くのシグナル配列が同定され、選択された宿主細胞において機能的であるあらゆるものを、*res02*または*inv19*核酸分子と組み合わせて使用し得る。さらに、シグナル配列を、本明細書中で記載された方法を用いて化学的に合成し得る。ほとんどの場合において、シグナルペプチドの存在による、*res02*または*inv19*ポリペプチドの宿主細胞からの分泌は、分泌された*res02*または*inv19*ポリペプチドからのシグナルペプチドの除去を引き起こす。シグナル配列は、ベクターの構成要素であり得るか、またはそれはベクターに挿入される*res02*または*inv19*核酸分子の一部であり得る。

10

## 【0158】

シグナル配列を有さない天然*res02*または*inv19*ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、または*res02*または*inv19*ポリペプチドコード領域に結合した異種由来シグナル配列をコードするヌクレオチド配列いずれかの使用が、本発明の範囲に含まれる。選択される異種由来シグナル配列は、宿主細胞によって認識および処理される、すなわちシグナルペプチダーゼによって切断されるものであるべきである。原核生物宿主細胞に関して、シグナル配列は、例えばアルカリホスファターゼ、ペニシリナーゼ、または熱安定性エンテロトキシンIIリーダーの群から選択される、原核生物シグナル配列によって提供される。酵母の分泌に関して、シグナル配列は、酵母インベルターゼ、アルファ因子、または酸性ホスファターゼリーダーによって提供され得る。哺乳類細胞発現において、あらゆる適当な哺乳類シグナル配列を採用し得る。

20

## 【0159】

真核生物宿主細胞発現系において糖鎖付加が望ましい場合のような、いくつかの場合において、様々なプレシークエンスを操作して糖鎖付加または収率を改善し得る。例えば、特定のシグナルペプチドのペプチダーゼ切断部位を変化させ得るか、または糖鎖付加にも影響し得るプロシークエンス(*pro-sequences*)を加え得る。最終的なタンパク質産物は、1位置に(成熟タンパク質の最初のアミノ酸と比較して)、1つまたはそれ以上の発現に付随するさらなるアミノ酸を有し得、それは完全に除去されなかったかもしれない。例えば、最終的なタンパク質産物は、アミノ末端に結合した、ペプチダーゼ切断部位に見出される1つまたは2つのアミノ酸残基を有し得る。あるいは、いくつかの酵素切断部位の使用は、もしその酵素が成熟ポリペプチドのそのような領域で切断するならば、望ましい*res02*または*inv19*ポリペプチドのわずかに短縮された形式を生じ得る。

30

## 【0160】

本発明の発現およびクローニングベクターは、典型的には宿主生物によって認識され、そして*res02*または*inv19*ポリペプチドをコードする分子に操作可能に連結したプロモーターを含む。プロモーターは、構造遺伝子の転写を制御する、構造遺伝子の開始コドンの上流(すなわち5')に位置する(一般的には約100から1000bp以内)非転写配列である。プロモーターは、伝統的に2つのクラス:誘導的プロモーターおよび構成的プロモーターのうち1つにグループ分けされる。誘導的プロモーターは、栄養素の存在または欠如、または温度の変化のような、培養条件におけるある変化に反応して、その制御下にあるDNAからの増加したレベルの転写を開始する。他方、構成的プロモーターは、継続的な遺伝子産物の産生を開始する;すなわち、遺伝子発現に対する制御はほとんど存在しない、または存在しない。様々な可能性のある宿主細胞によって認識される、多数のプロモーターが周知である。プロモーターを制限酵素消化によって供給源DNAから除去し、そして望ましいプロモーター配列をベクターに挿入することによって、適当なプロモーターを、*res02*または*inv19*ポリペプチドをコードするDNAに操作可能に連結させる。天然*res02*または*inv19*プロモーター配列を、*res02*または*inv19*核酸分子の増幅および/または発現を指示するために使用し得る。しかし、もし天然プロモーターと比較してより高い転写および発現タンパク質のより高い収率を可

40

50

能にするなら、そしてもし使用するために選択された宿主細胞系と適合性であるなら、異種由来プロモーターが好ましい。

【0161】

原核生物宿主と使用するために適当なプロモーターとしては、ラクタマーゼおよびラクトースプロモーター系；アルカリホスファターゼ；トリプトファン (trp) プロモーター系；および tac プロモーターのようなハイブリッドプロモーターが挙げられる。他の公知の細菌プロモーターも適当である。それらの配列は公開され、それによって当業者が、あらゆる有用な制限部位を提供するために必要に応じてリンカーまたはアダプターを使用して、それらを望ましい DNA 配列にライゲーションすることを可能にする。

【0162】

酵母宿主と使用するために適当なプロモーターも、当該分野で周知である。酵母エンハンサーは、酵母プロモーターと共に有利に使用される。哺乳類宿主細胞と使用するために適当なプロモーターは周知であり、そしてポリオマウイルス、鶏痘ウイルス、アデノウイルス (アデノウイルス 2 のような)、ウシパピロマウイルス、鳥類肉腫ウイルス、サイトメガロウイルス (CMV)、レトロウイルス、B 型肝炎ウイルス、およびシミアンウイルス 40 (SV40) のようなウイルスのゲノムから得られるものが挙げられるがこれに限らない。他の適当な哺乳類プロモーターとしては、異種由来哺乳類プロモーター、例えば熱ショックプロモーターおよびアクチンプロモーターが挙げられる。

【0163】

res02 または inv19 遺伝子発現の調節において関心のあり得るさらなるプロモーターとしては、SV40 初期プロモーター領域 (Benoit C ら (1981) Nature 290:304-10)；CMV プロモーター；ラウス肉腫ウイルスの 3' 長い末端反復に含まれるプロモーター (Yamamoto T ら (1980) Cell 22:787-97)；ヘルペスチミジンキナーゼプロモーター (Wagner MJ ら (1981) Proc Natl Acad Sci USA 78:1441-45)；メタロチオネイン遺伝子の調節配列 (Brinster RL ら (1982) Nature 296:39-42)；ベータラクタマーゼプロモーターのような、原核生物発現ベクター (Villa-Kamaroff ら (1978) Proc Natl Acad Sci USA 75:3727-31)；または tac プロモーター (DeBoer ら (1983) Proc Natl Acad Sci USA 80:21-25) が挙げられるが、これらに限定されない。以下の動物転写調節領域も興味があり、それらは組織特異性を示し、そしてトランスジェニック動物において利用された：膵臓腺房細胞において活性なエラスターゼ I 遺伝子調節領域 (Swift ら (1984) Cell 38:639-46)；Omitz ら (1986) Cold Spring Harbor Symp Quant Biol 50:399-409)；MacDonald (1987) Hepatology 7:425-515)；膵臓ベータ細胞において活性なインスリン遺伝子調節領域 (Hanahan (1985) Nature 315:115-22)；リンパ細胞において活性な免疫グロブリン遺伝子調節領域 (Grosschedl R ら (1984) Cell 38:647-58)；Adams JM ら (1985) Nature 318:533-38)；Alexander WS ら (1987) Mol Cell Biol 7:1436-44)；精巣、乳房、リンパ節および肥満細胞において活性なマウス乳腺癌ウイルス調節領域 (Leder P ら (1986) Cell 45:485-95)；肝臓において活性なアルブミン遺伝子調節領域 (Pinkert CA ら (1987) Genes Dev 1:268-76)；肝臓において活性なアルファフェトプロテイン遺伝子調節領域 (Krumlauf R ら (1985) Mol Cell Biol 5:1639-48)；Hammer RE ら (1987) Science 235:53-58)；肝臓において活性なアルファ 1-アンチトリプシン遺伝子調節領域 (Kelsey GD ら (1987) Genes Dev 1:161-71)；骨髄細胞において活性なベータグロビン遺伝子調節領域 (Magram J ら (1985) Nature 315:338-40)；Kollias G ら (1986) Cell

10

20

30

40

50

46 : 89 - 94) ; 脳の希突起神経膠細胞において活性なミエリン塩基性タンパク質遺伝子調節領域 (Read head Cら (1987) Cell 48 : 703 - 12) ; 骨格筋において活性なミオシン軽鎖2遺伝子調節領域 (Shani M (1985) Nature 314 : 283 - 86) ; および視床下部で活性な性腺刺激ホルモン放出ホルモン遺伝子調節領域 (Mason AJら (1986) Science 234 : 1372 - 78)。

【0164】

エンハンサー配列をベクターに挿入して、高等真核生物による本発明の res02または inv19ポリペプチドをコードするDNAの転写を増加させ得る。エンハンサーは、プロモーターに作用して転写を増加させる、通常約10 - 300bpの長さの、DNAのシス作用エレメントである。エンハンサーは、相対的に方向および位置独立性である。それらは、転写ユニットの5'および3'に見出された。哺乳類遺伝子から入手可能ないくつかのエンハンサー配列が公知である(例えば、グロビン、エラストラーゼ、アルブミン、アルファ-フェトプロテインおよびインスリン)。しかし、典型的には、ウイルス由来のエンハンサーを使用する。SV40エンハンサー、サイトメガロウイルス初期プロモーターエンハンサー、ポリオーマエンハンサー、およびアデノウイルスエンハンサーが、真核生物プロモーターの活性化の、典型的な増強エレメントである。エンハンサーをres02またはinv19核酸分子の5'位または3'位においてベクターにスプライシングし得るが、それは典型的にはプロモーターから5'部位に位置する。

【0165】

本発明の発現ベクターを、市販で入手可能なベクターのような、開始ベクターから構築し得る。そのようなベクターは、全ての望ましい隣接配列を含んでいてもよいし、含まなくてもよい。本明細書中で記載された1つ以上の隣接配列がベクターに既に存在しない場合、それらを個々に得て、そしてベクターにライゲーションし得る。それぞれの隣接配列を得るために使用する方法は、当業者に周知である。

【0166】

本発明を実施するために好ましいベクターは、細菌、昆虫、および哺乳類宿主細胞と適合性であるものである。そのようなベクターは、とりわけ、pCRII、pCR3、およびpcDNA3.1 (Invitrogen、San Diego、CA)、pBSII (Stratagene、La Jolla、CA)、pET15 (Novagen、Madison、WI)、pGEX (Pharmacia Biotech、Piscataway、NJ)、pEGFP-N2 (Clontech、Palo Alto、CA)、pETL (BlueBaclic、Invitrogen)、pDSR-アルファ (PCT公開番号WO90/14363) およびpFastBacDual (Gibco-BRL、Grand Island、NY)を含む。

【0167】

さらなる適当なベクターとしては、コスミド、プラスミド、または改変ウイルスが挙げられるが、これらに限定されず、しかしそのベクターシステムとは選択された宿主細胞と適合性でなければならないことが認識される。そのようなベクターとしては、Bluescript (登録商標) プラスミド誘導体 (高いコピー数のColE1に基づくファージミド、Stratagene Cloning Systems、La Jolla、CA) のようなプラスミド、Taq増幅PCR産物をクローニングするために設計されたPCRクローニングプラスミド (例えばTOPO<sup>TM</sup>TA Cloning (登録商標) キット、PCR2.1.RTM. プラスミド誘導体、Invitrogen、Carlsbad、CA)、およびバキュロウイルス発現システムのような哺乳類、酵母、またはウイルスベクター (pBacPAK プラスミド誘導体、Clontech、Palo Alto、CA) が挙げられるが、これらに限定されない。

【0168】

ベクターが構築され、そしてres02またはinv19ポリペプチドをコードする核酸分子がベクターの適当な部位に挿入された後、完成したベクターを増幅および/または



ポリペプチド発現のために適当な宿主細胞に挿入し得る。res02またはinv19ポリペプチドの発現ベクターの、選択された宿主細胞への形質転換は、トランスフェクション、感染、塩化カルシウム、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、リポフェクション、DEAE-デキストラン法、または他の公知の技術のような方法を含む、周知の方法によって達成し得る。選択される方法は、部分的には使用される宿主細胞の型と相関する。これらの方法および他の適当な方法は、当業者に周知であり、そして例えばSambrookら、前出において記載されている。

【0169】

宿主細胞は、原核生物宿主細胞(E. coliのような)または真核生物宿主細胞(酵母、昆虫、または脊椎動物細胞のような)であり得る。宿主細胞は、適当な条件下で培養した場合、res02またはinv19ポリペプチドを合成し、それを続いて培地から(もし宿主細胞がそれを培地に分泌するなら)、またはそれを産生する宿主細胞から直接(もしそれが分泌されないなら)回収し得る。適当な宿主細胞の選択は、望ましい発現レベル、活性のために望ましいまたは必要なポリペプチド修飾(グリコシル化またはリン酸化のような)および生物学的に活性な分子へのフォールディングの容易さのような、様々な因子に依存する。

【0170】

多くの適当な宿主細胞が、当該分野において公知であり、そして多くがAmerican Type Culture Collection(ATCC)、Manassas、VAから入手可能である。例としては、チャニーズハムスター卵細胞(CHO)、CHO DHFR(-)細胞(Urlaub Gら(1980) Proc Natl Acad Sci USA 97:4216-20)、ヒト胚性腎臓(HEK)293または293T細胞、または3T3細胞のような哺乳類細胞が挙げられるが、これらに限定されない。適当な哺乳類宿主細胞、および形質転換、培養、増幅、スクリーニング、産物の産生、および精製の方法の選択は、当該分野で公知である。他の適当な哺乳類細胞株は、サルCOS-1およびCOS-7細胞株、およびCV-1細胞株である。さらなる典型的な哺乳類宿主細胞としては、形質転換細胞株を含め、霊長類細胞株およびげっ歯類細胞株が挙げられる。正常な二倍体細胞、初代組織のインビトロ培養から得られた細胞株、および初代外植片も適当である。候補細胞は、選択遺伝子において遺伝型的に欠損していてもよいし、支配的に作用する選択遺伝子を含んでいてもよい。他の適当な哺乳類細胞株は、マウス神経芽腫N2A細胞、HeLa、マウスL-929細胞、Swiss、BALB/cまたはNIHマウスから得られた3T3株、BHKまたはHaKハムスター細胞株が挙げられるが、これらに限定されない。これらの細胞株はそれぞれ、タンパク質発現の当業者に公知であり、そして入手可能である。

【0171】

本発明に適当な宿主細胞として同様に有用なのは、細菌細胞である。例えば、E. coliの様々な系統(例えばHB101、DH5、DH10、およびMC1061)は、バイオテクノロジーの分野において宿主細胞として周知である。B. subtilis、Pseudomonas spp.、他のBacillus spp.、Streptomyces spp.等の様々な系統も、本方法において採用し得る。

【0172】

当業者に公知の酵母細胞の多くの株も、本発明のポリペプチドの発現のための宿主細胞として利用可能である。好ましい酵母細胞としては、例えばSaccharomyces cerevisiaeおよびPichia pastorisが挙げられる。

【0173】

さらに、望ましい場合、昆虫細胞システムを本発明の方法において利用し得る。そのようなシステムは、例えばKitts PAら(1993) Biotechniques 14:810-17; Lucklow VA(1993) Curr Opin Biotechnol 4:564-72; およびLucklow VAら(1993) J Virol 67:4566-79において記載されている。好ましい昆虫細胞は、Sf-9

10

20

30

40

50

および Hi5 (Invitrogen) である。

【0174】

グリコシル化 res02 または inv19 ポリペプチドを発現するために、トランスジェニック動物も使用し得る。例えば、トランスジェニック乳産動物（例えばウシまたはヤギ）を使用して、そしてその動物乳中の本グリコシル化ポリペプチドを得ることができる。植物を使用して res02 または inv19 ポリペプチドを産生することもできるが、一般的に、植物において起こるグリコシル化は、哺乳類細胞において産生されるものと異なり、そしてヒト治療的使用には適当でないグリコシル化産物を生じ得る。

【0175】

（ポリペプチド産生）

res02 または inv19 ポリペプチド発現ベクターを含む宿主細胞を、当業者に周知の標準的な培地を用いて培養し得る。培地は、通常、細胞の増殖および生存に必要な全ての栄養素を含む。E. coli 細胞を培養するために適当な培地としては、例えば Luria Broth (LB) および/または Terrific Broth (TB) が挙げられる。真核生物細胞を培養するために適当な培地としては、Roswell Park Memorial Institute 培地 1640 (RPMI 1640)、最少必須培地 (MEM) および/またはダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) が挙げられ、それらは全て培養される特定の細胞株に必要な血清および/または増殖因子が補充される。昆虫培養のために適当な培地は、必要に応じて yeastolate、ラクトアルブミン加水分解産物、および/または胎児ウシ血清を添加したグレース培地である。

【0176】

典型的には、トランスフェクトした、または形質転換した細胞の選択的増殖に有用な抗生物質または他の化合物を、培地に添加物として加える。その使用される化合物は、宿主細胞が形質転換されたプラスミドに存在する選択可能なマーカーエレメントによって規定される。例えば、選択可能なマーカーエレメントがカナマイシン耐性である場合、培地に添加される化合物はカナマイシンである。選択的増殖のための他の化合物としては、アンピシリン、テトラサイクリン、およびネオマイシンが挙げられる。

【0177】

宿主細胞によって産生される res02 または inv19 ポリペプチドの量を、当該分野で公知の標準的な方法を用いて評価し得る。そのような方法は、制限なく、ウェスタンイムノブロット分析、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動、非変性ゲル電気泳動、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 分離、免疫沈降、および/または DNA 結合ゲルシフトアッセイのような活性アッセイを含む。

【0178】

もし res02 または inv19 ポリペプチドが、宿主細胞から分泌されるように設計されたなら、大部分のポリペプチドは細胞培養培地に見出され得る。しかし、もし res02 または inv19 ポリペプチドが宿主細胞から分泌されないなら、それは細胞質および/または核（真核生物宿主細胞に関して）または細胞質ゾル（細菌宿主細胞に関して）に存在する。

【0179】

宿主細胞細胞質および/または核（真核生物宿主細胞に関して）または細胞質ゾル（細菌宿主細胞に関して）に存在する res02 または inv19 ポリペプチドに関して、細胞内物質（グラム陰性細菌については封入体を含む）を、当業者に公知のあらゆる標準的な技術を用いて、宿主細胞から抽出し得る。例えば、宿主細胞を溶解して、フレンチプレス、ホモジナイゼーション、および/または超音波処理後に続く遠心分離によって、ペリプラズム/細胞質の内容物を放出し得る。

【0180】

もし res02 または inv19 ポリペプチドが、細胞質ゾルにおいて封入体を形成したなら、その封入体は多くの場合内側および/または外側細胞膜に結合し得、そして従って遠心分離後、主にペレット物質中に見出される。ペレット物質を次いで、極端な pH で

10

20

30

40

50

処理するか、あるいはアルカリ pH においてジチオトレイトール、または酸性 pH においてトリスカルボキシエチルホスフィンのような還元剤の存在下で、界面活性剤、グアニジン、グアニンジン誘導体、尿素、または尿素誘導体のようなカオトロピックな薬剤で処理し、封入体を放出、分解、および可溶化し得る。可溶化 res 02 または inv 19 ポリペプチドを次いで、ゲル電気泳動、免疫沈降等を用いて分析し得る。res 02 または inv 19 ポリペプチドを単離することが望ましいなら、本明細書中および Marston F A ら (1990) Methods Enzymol 182:264-76 において記載されたもののような、標準的な方法を用いて単離を達成し得る。

#### 【0181】

いくつかの場合において、res 02 または inv 19 ポリペプチドは、単離時に生物学的に活性でないかもしれない。「リフォールディング」またはポリペプチドをその3次構造に変換し、そしてジスルフィド結合を産生する様々な方法を使用して、生物学的活性を回復し得る。そのような方法は、可溶化ポリペプチドを通常より高い pH に、および特定の濃度のカオトロブの存在下に曝すことを含む。カオトロブの選択は、封入体可溶化に使用された選択と非常に似ているが、通常カオトロブはより低い濃度で使用され、そして可溶化に使用されたカオトロブと同じである必要はない。ほとんどの場合において、リフォールディング/酸化溶液はまた、還元剤、または還元剤+その酸化形態を特定の比で含み、特定のレドックス電位を生じ、タンパク質のシステイン架橋の形成においてジスルフィドシャッフリング (disulfide shuffling) が起こることを可能にする。通常使用される酸化還元対のいくつかは、システイン/シスタミン、グルタチオン (GSH) /ジチオビスGSH、塩化第二銅、ジチオトレイトール (DTT) /ジチアンDTT、および2-2-メルカプトエタノール (ME) /ジチオ-(ME) を含む。多くの場合において、共溶媒を使用し得る、またはリフォールディングの効率を上げるために必要であり得、そしてこの目的のために使用されるより通常の試薬としては、グリセロール、様々な分子量のポリエチレングリコール、アルギニン等が挙げられる。

#### 【0182】

res 02 または inv 19 ポリペプチドの発現時に封入体が有意な程度形成されないなら、ポリペプチドは、細胞ホモジネートの遠心分離後、主に上清に見出される。ポリペプチドをさらに、本明細書中で記載されたような方法を用いて、上清から単離し得る。

#### 【0183】

res 02 または inv 19 ポリペプチドの溶液からの精製は、様々な技術を用いて達成し得る。ポリペプチドが、そのカルボキシルまたはアミノ末端のいずれかにおいて、Hexahistidine (res 02 または inv 19 ポリペプチド/hexaHis) または FLAG (Eastman Kodak Co., New Haven, CT) または myc (Invitrogen, Carlsbad, CA) のような他の小さなペプチドのようなタグを含むように合成されたなら、溶液を、カラムマトリックスがタグに対して高い親和性を有するアフィニティーカラムに通すことによって、これらのポリペプチドを1工程の処理で精製し得る。

#### 【0184】

例えば、ポリヒスチジンは、ニッケルに高い親和性および特異性で結合する。従って、ニッケルのアフィニティーカラム (Qiagen (登録商標) ニッケルカラムのような) を、res 02 または inv 19 ポリペプチド/polyHis の精製に使用し得る。例えば、Current Protocols in Molecular Biology 10.11.8 (Ausubel ら編、Green Publishers, Inc. および Wiley and Sons, 1993) を参照のこと。

#### 【0185】

さらに、res 02 または inv 19 ポリペプチドを、res 02 または inv 19 ポリペプチドを特異的に認識および結合し得るモノクローナル抗体の使用によって精製し得る。

10

20

30

40

50

## 【0186】

精製の他の適当な手順としては、制限なしに、アフィニティークロマトグラフィー、イムノアフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、分子ふるいクロマトグラフィー、HPLC、電気泳動（ネイティブゲル電気泳動を含む）に続くゲル溶出、および調製用等電点電気泳動（「Isoprime」機械/技術、Hoefler Scientific, San Francisco, CA）が挙げられる。いくつかの場合において、2つまたはそれ以上の精製技術を組み合わせて、純度の増加を達成し得る。

## 【0187】

res02またはinv19ポリペプチドをまた、Merrifieldら（1963）J Am Chem Soc 85:2149; Houghten RAら（1985）Proc Natl Acad Sci USA 82:5131-35; およびStewartおよびYoung, Solid Phase Peptide Synthesis (Pierce Chemical Co., 1984)によって記載されたもののような、当該分野で公知の技術を用いて、化学的合成方法（固相ペプチド合成のような）によって調製し得る。そのようなポリペプチドを、アミノ末端のメチオニンありまたは無しで合成し得る。化学的に合成されたres02またはinv19ポリペプチドを、これらの参考文献において記載された方法を用いて酸化し、ジスルフィド架橋を形成し得る。化学的に合成されたres02またはinv19ポリペプチドは、組換え的に産生された、または天然の供給源から精製された対応するres02またはinv19ポリペプチドに匹敵する生物学的活性を有することが予測され、そして従って組換えまたは天然res02またはinv19ポリペプチドと交換可能に使用し得る。

## 【0188】

res02またはinv19ポリペプチドを得る別の手段は、res02またはinv19ポリペプチドが天然に見出される、莢膜多糖発現細菌細胞のような生物学的試料からの精製による。そのような精製を、本明細書中で記載されたようなタンパク質精製の方法を用いて行ない得る。精製中のres02またはinv19ポリペプチドの存在を、例えば組換え的に産生されたres02またはinv19ポリペプチドまたはそのペプチド断片に対して調製された抗体を用いてモニターし得る。

## 【0189】

核酸およびポリペプチドを産生する、多くのさらなる方法が当該分野で公知であり、そしてその方法を使用してres02またはinv19ポリペプチドに対する特異性を有するポリペプチドを産生し得る。例えば、Roberts RWら（1997）Proc Natl Acad Sci USA 94:12297-302を参照のこと、これはmRNAとそのコードされるペプチドとの間の融合タンパク質の産生を記載する。また、Roberts RWら（1999）Curr Opin Chem Biol 3:268-73も参照のこと。さらに、米国特許第5,824,469号は、特定の生物学的機能を実行し得るオリゴヌクレオチドを得る方法を記載する。その手順は、それぞれ5'無作為化配列、中央の前もって選択された配列、および3'無作為化配列を有する、オリゴヌクレオチドの不均一なプールを産生することを含む。できた不均一なプールを、望ましい生物学的機能を示さない細胞の集団に導入する。次いで細胞の亜集団を、前もって決定した生物学的機能を示すものに関してスクリーニングする。その亜集団から、望ましい生物学的機能を実行し得るオリゴヌクレオチドを単離する。

## 【0190】

米国特許第5,763,192; 5,814,476; 5,723,323; および5,817,483号は、ペプチドまたはポリペプチドを産生する手順を記載する。これは、確率論的な遺伝子またはその断片を産生すること、および次いでこれらの遺伝子を宿主細胞に導入することによってなされ、それはその確率論的遺伝子によってコードされる1つまたはそれ以上のタンパク質を産生する。宿主細胞を次いでスクリーニングして、望ましい活性を有するペプチドまたはポリペプチドを産生するクローンを同定する。

## 【0191】

ペプチドまたはポリペプチドを産生する別の方法は、Athersys, Inc. によって提出された、PCT/US98/20094 (WO99/15650) において記載される。「Random Activation of Gene Expression for Gene Discovery」(RAGE-GD) として知られるその処理は、インサイチュ組換え方法による、内因性遺伝子発現の活性化または遺伝子の過剰発現を含む。例えば、内因性遺伝子の発現を、調節配列を標的細胞に組み込むことによって活性化または増加させ、それは非相同的または変則的な組換えによって、その遺伝子の発現を活性化し得る。標的DNAは、最初に照射を受け、そして遺伝的プロモーターが挿入される。そのプロモーターは、最終的には遺伝子の前にある分断点(break)を見つけ、遺伝子の転写を開始する。これは、望ましいペプチドまたはポリペプチドの発現を引き起こす。

10

## 【0192】

これらの方法をまた、包括的なres02またはinv19ポリペプチド発現ライブラリーを産生するために使用し得ることが認識され、それを次いで生化学的アッセイ、細胞アッセイ、および有機体全体のアッセイ(例えば植物、マウス等)のような、様々なアッセイにおいて、ハイスループット表現型スクリーニングのために使用し得る。

## 【0193】

(選択的結合剤)

「選択的結合剤」という用語は、res02ポリペプチド、inv19ポリペプチド、PSA、PSB、PSC、PSD、PSE、PSF、PSG、PSH、およびその断片から選択される、1つ以上の抗原に特異性を有する分子を指す。適当な選択的結合剤としては、抗体およびその誘導体、ポリペプチドならびに低分子が挙げられるが、これらに限定されない。適当な選択的結合剤を、当該分野で公知の方法を用いて調製し得る。

20

## 【0194】

res02ポリペプチド、inv19ポリペプチド、PSA、PSB、PSC、PSD、PSE、PSF、PSG、PSH、およびそれらの断片に結合する抗体および抗体断片のような選択的結合剤は、本発明の範囲内である。その抗体は、単一抗原特異的なポリクローナルを含むポリクローナル；モノクローナル(MAbs)；組換え；キメラ；CDR移植のようなヒト化；ヒト；一本鎖；および/または二重特異的；およびその断片、異型、または誘導体であり得る。抗体断片は、抗原のエピトープに結合する抗体の部分を含む。そのような断片の例としては、全長抗体の酵素的切断によって産生された、Fab、F(ab')およびF(ab')<sub>2</sub>断片が挙げられる。他の結合断片は、抗体可変領域をコードする核酸配列を含む組換えプラスミドの発現のような、組換えDNA技術によって産生されたものを含む。

30

## 【0195】

抗原に対するポリクローナル抗体は、一般的に抗原およびアジュバントの複数回の皮下または腹腔内注射によって、動物(例えばウサギまたはマウス)において産生される。抗原を、キーホールリンベットヘモシアニン、アルブミン、ウシチログロブリン、またはダイズトリプシン阻害剤のような、免疫される種において免疫原性の担体タンパク質に結合させることが有用であり得る。また、ミョウバンのような凝集剤を使用して、免疫反応を増強する。免疫後、動物から採血して、そして血清を抗原特異的抗体力価に関してアッセイする。

40

## 【0196】

抗原に対するモノクローナル抗体は、培養中の継続的な細胞株による、抗体分子の産生を提供するあらゆる方法を用いて産生される。モノクローナル抗体を調製する適当な方法の例は、Kohlerら(1975)Nature 256:495-97のハイブリドーマ法およびヒトB細胞ハイブリドーマ法(Kozborら(1984)J Immunol 133:3001-5; Brodeurら, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications 51-63 (Marcel Dekker, Inc., 1987))を含む

50

。res02ポリペプチド、inv19ポリペプチド、PSA、PSB、PSC、PSD、PSE、PSF、PSG、PSH、およびそれらの断片と反応性のモノクローナル抗体を産生する、ハイブリドーマ細胞株も、本発明によって提供される。

【0197】

本発明の抗体を、抗原の検出および定量のために、競合的結合アッセイ、直接および間接サンドイッチアッセイ、ウェスタンイムノブロットアッセイ、および免疫沈降アッセイのような、あらゆる公知のアッセイ方法において採用し得る(Sola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, CRC Press, Inc., 1987, 147-158頁)。抗体は、採用されるアッセイ方法に適当な親和性で抗原に結合する。

10

【0198】

診断的適用に関して、ある実施態様において、抗res02、または抗inv19、または抗莢膜多糖抗体を、検出可能な部分で標識し得る。検出可能な部分は、直接または間接的のいずれかで、検出可能なシグナルを産生し得るあらゆるものであり得る。例えば、検出可能な部分は、<sup>3</sup>H、<sup>14</sup>C、<sup>32</sup>P、<sup>35</sup>S、または<sup>125</sup>Iのような放射性同位体、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、またはルシフェリンのような蛍光または化学発光化合物、またはアルカリホスファターゼ、ベータガラクトシダーゼ、または西洋ワサビペルオキシダーゼのような酵素であり得る(Bayer EA(1990) Methods Enzymol 184:138-60)。

20

【0199】

競合的結合アッセイは、標識した標準物質(例えば、res02またはinv19ポリペプチド、莢膜多糖、またはその免疫学的に反応性の部分)の、限られた量の抗res02、抗inv19、または抗莢膜多糖抗体との結合に関して、試験試料分析物(res02またはinv19ポリペプチドまたは莢膜多糖)と競合する能力に依存する。試験試料中の抗原の量は、抗体に結合した標準物質の量と逆比例する。結合した標準物質の量の決定を容易にするために、抗体は典型的には競合の前または後に不溶化され、抗体に結合した標準物質および分析物を、結合しないままである標準物質および分析物から簡便に分離し得る。

【0200】

サンドイッチアッセイは、典型的にはそれぞれ検出および/または定量されるタンパク質の異なる免疫原性部分、またはエピトープに結合し得る、2つの抗体の使用を含む。サンドイッチアッセイにおいて、試験試料分析物は、典型的には固体支持体に固定化された1番目の抗体に結合し、そしてその後2番目の抗体が分析物に結合し、従って不溶性の3つの部分からなる複合体を形成する。例えば、米国特許第4,376,110号を参照のこと。2番目の抗体を、それ自身検出可能な部分で標識し得るか(直接サンドイッチアッセイ)、または検出可能な部分で標識された抗免疫グロブリン抗体を用いて測定し得る(間接サンドイッチアッセイ)。例えば、1つの型のサンドイッチアッセイは、酵素結合イムノソルベントアッセイ(ELISA)であり、この場合検出可能な部分は酵素である。

30

【実施例】

【0201】

以下の実施例は、実例となるのみであり、そしていかなる方法においても本発明の範囲を制限することを意図しない。

40

【0202】

(実施例1.細菌系統およびB.fragilis多糖の単離)

B.fragilis NCTC9343は、もともとNational Collection of Type Cultures(London, England)から得て、使用まで酵母培養液中に-80°Fで保存し、そして以前に記載されたように嫌氣的に増殖させた。Pantosti A(1991) Infect Immun 59:2075-2082。B.fragilis NCTC9343由来の莢膜多糖を、高温フェノール/水抽出によって単離し、そして続くPSAおよびPSBの精製を以前に記

50

載されたように行なった。T z i a n a b o s A ら ( 1 9 9 2 ) J B i o l C h e m 2 6 7 : 1 8 2 3 0 - 1 8 2 3 5。

【 0 2 0 3 】

( 実施例 2 . r e s 0 2 および i n v 1 9 の同定 )

7つのプロモーター領域のDNA逆位は、DNAの組換えに關与する特定のタンパク質によって調節されると仮説を立て、S a n g e r C e n t r eの微生物病原体グループによって提供されたB . f r a g i l i s N C T C 9 3 4 3ゲノム配列の検索を行い、DNAの逆位に關与するE . c o l iの2つの遺伝子、f i m Bおよびf i m Eと相同性を有するオープンリーディングフレーム(ORF)を探した。5つのORFが回収された。これら5つのB . f r a g i l i s O R Fを、次いでデータベースを再プローブするために使用し、そして25個のホモログを回収し、そして一時的にi n v 1 - i n v 2 5と命名した。続いてさらに3つのホモログを回収し、そして一時的にi n v 2 6 - i n v 2 8と命名した。

10

【 0 2 0 4 】

我々のデータに基づいて、我々は、多糖プロモーターの逆位に關与する遺伝子産物は、全ての系統において保存されていることを知っていた。従って、B . f r a g i l i s系統のコレクションを、これら25個のORFそれぞれの内部部分でプローブするためにDNAハイブリダイゼーションを行なった。

【 0 2 0 5 】

もとの25個のORFのうち7つ(および28個のORFのうち9つ)が、B . f r a g i l i s内で保存されていることが見出された。これらの保存された遺伝子の1つ、i n v 1 9の周りの配列の分析は、セリン部位特異的リコンビナーゼファミリーの分岐して(d i v e r g e n t l y)転写された遺伝子を示し、それはr e s 0 2(今はm p iとも呼ばれる)と命名され、そしてハイブリダイゼーションによってB . f r a g i l i s間で保存されていることも示された。

20

【 0 2 0 6 】

試験された15個のB . f r a g i l i s株のうち15個が、r e s 0 2の内部部分で陽性にプローブされた(表3)。試験された26個のB . f r a g i l i s株のうち25個が、i n v 1 9の内部部分で陽性にプローブされた; 1つの陰性株は1 2 7 9 1 5 5 Iであった(表4)。

30

【 0 2 0 7 】

( 表 3 . r e s 0 2 プローブ陽性 B . f r a g i l i s 株 )

【 0 2 0 8 】

【 表 3 】

1279-2	45703	CM3
13141	B110	CM11
17905	B117	CM12
2429	B124	PA5
26877	B272	US398

40

( 表 4 . i n v 1 9 プローブ陽性 B . f r a g i l i s 株 )

【 0 2 0 9 】

【表 4】

12775L1II	1285531I	2429	B117	CM11
1277810I	1287245I	17905	B124	CM12
1279-2	12905-23V	26877	B272	IL89375II
1281262I	1291662III	45703	B356772I	PA5
1284-2	13141	B110	CM33	US398

これらの保存された遺伝子のいくつかを、PSAプロモーター逆位可能領域とともにベクターにクローニングし、そしてPSAプロモーター領域を逆位させる能力に関して分析した。res02は、PSAプロモーター領域の逆位を引き起こすことが示された。

## 【0210】

(実施例3. B. fragilis 9343染色体から、res02を欠失させる方法)

B. fragilis 9343染色体からres02遺伝子を欠失させるために、ダブルクロスオーバーの発生を伴う相同的組換えを採用して、res02の全長コピーを欠失コピーで置換した。これを行なうために、プラスミドpKGW10を産生した。このプラスミドを構築するために、9343染色体DNAを鋳型として使用して、欠失させる領域を隣接するDNAを増幅させた(図5)。プライマーペアinv19D-1+inv19D-2およびinv19D-5+inv19D-6を、2つの別々のPCRにおいて使用した。表5は、プライマーinv19D-1およびinv19D-6がそれぞれ、BamHI制限エンドヌクレアーゼ部位(下線で示す)を組み込み、一方プライマーinv19D-2およびinv19D-6がそれぞれ、NcoI制限エンドヌクレアーゼ部位(下線で示す)を組み込むことを示す。

## 【0211】

(表5. res02欠失を起こすために使用されたプライマーの配列)

## 【0212】

## 【表5】

inv19-D1	→	5'- <u>ccggatcc</u> agctactgataactccggtgactcc-3'	(SEQ ID NO:11)
inv19-D2	←	5'-atccatggc <u>ccggttt</u> atgaaaacgatgtatta-3'	(SEQ ID NO:12)
inv19-D5	→	5'-cgccatgg <u>ttttcc</u> gtacttactctcaaataagc-3'	(SEQ ID NO:13)
inv19-D6	←	5'-ggggatccatgacatagataaatggggaagagg-3'	(SEQ ID NO:14)

増幅時に、できた増幅産物は、Left Flank、inv19-D1 through inv19-D2、1958bp(図6、配列番号5);およびRight Flank、inv19-D5 through inv19-D6、2540bp(図7、配列番号6)であった。

## 【0213】

594bpのres02オープンリーディングフレームのうち534bpが欠失するよ  
うに、これらのプライマーを置いた。できたPCR産物を、BamHIおよびNcoI(プライマーに構築された制限部位)で消化し、そしてエリスロマイシン耐性をコードしたB. fragilis自殺(suicide)ベクターに3方向反応でライゲーションした。このライゲーション混合物を、E. coliに形質転換し、そして形質転換体を、隣接物の正しいライゲーションに関して、PCRおよびプラスミド消化の両方によって試験した。隣接物の正しいライゲーションを含むプラスミドを、pKGW10と命名した。

## 【0214】

pKGW10を、E. coliからB. fragilis 9343へ接合により移入し、そして相同的組換えで生じた共組換え体(染色体に組み込まれたpKGW10の全てのDNAを含む)を、エリスロマイシン耐性(pKGW10によってコードされる)によ



て選択した。共組換え体を、非選択的培地で継代し、2番目の組換えの発生による共組換え体の分離を可能にした(ここで *res02* の変異体コピーまたは野生型コピーのいずれかが、介在するプラスミドと共に失われた)。細菌を、抗生物質を含まない培地にプレートした(プレートあたり約200コロニー)。コロニーを、エリスロマイシンを含む培地にレプリカプレート作成し、そしてエリスロマイシン感受性( $Em^s$ )コロニーを選択した(これらの  $Em^s$  コロニーは、*res02* の変異体または野生型コピーのみを含み、両方は含まないものを示す)。これらのコロニーを、変異体遺伝子型を含むものに関してPCRによってスクリーニングした。PCRを使用して、7つの多糖逆位可能プロモーター領域のそれぞれが固定され、そして逆位不可能であることを、各 *res02* 変異体において決定した。欠失を、各場合においてサザンプロットによっても確認した。

10

【0215】

#### 実施例4. PSA-PSHの単一抗原特異的抗血清

*B. fragilis* の8つの公知の莢膜多糖それぞれに対する単一抗原特異的抗血清を、以前に記載されたように調製した。Comstock LEら(1999) *Infect Immun* 67:3525-32; Coyne MJら(2000) *Infect Immun* 68:6176-81; Coyne Mら(2001) *Infect Immun* 69:4342-50; Krinos CMら(2001) *Nature* 414:555-8。これらの単一抗原特異的抗血清を、*res02* 変異体のウェスタンイムノプロット表現型分析において使用した。

20

【0216】

(実施例5. *res02* の欠失は、莢膜多糖プロモーターをオンまたはオフに固定する)

*res02* オープンリーディングフレームを、ダブルクロスオーバー対立遺伝子交換によって9343染色体から欠失させ、全て *res02* の染色体欠失を有するいくつかの変異体を生じた。これらの変異体の分析は、7つの多糖プロモーター逆位領域はそれぞれ単一の方向に固定されたことを示し、*Res02* 産物はDNA逆位に關与することを示した。

【0217】

これら変異体のいくつかは、オンに固定されたPSAおよびPSEプロモーター領域およびオフに固定されたPSB、PSD、PSF、PSG、およびPSHのプロモーター領域を有していた。従って、この株は、構成的にPSA、PSC(PSCのプロモーターは逆位を受けない)およびPSEを発現するが、PSB、PSD、PSF、PSG、またはPSHを発現しないことが予測された。

30

【0218】

図8は、これらの変異体のうち1つ、9343 *res02 mut44* (*mut44*) の表現型分析の結果を示す。この分析は、*mut44* は確かにPSAを大量に合成することを示した(野生型の典型的な増殖物(*grow-up*)と比較して、少なくとも10倍以上の精製PSAが単離される)。*mut44* は、PSCおよびPSEを含む他の7つの莢膜多糖のうち6つを産生できないことも示した(ウェスタンプロット分析、免疫電気泳動、および精製莢膜多糖の分析によって決定されたように)。PSFの多糖生合成遺伝子座のプロモーターはオフになっていたという事実にもかかわらず、*mut44* は少量のPSFを発現したことが、予測外にも見出された(図8)。この観察は、DNA逆位によって影響を受けない2次的なプロモーターの存在と一致し得る。しかし、別の変異体、*mut8* は、PSHのみを発現し、そしてPSFを発現しないことが見出された(図8)。*mut44* によって発現される少量のPSFは、この株からのPSAの精製を有意に妨害しない。

40

【0219】

別の *res02* 変異体、9343 *res02 mut2* (*mut2*) が単離され、それもオンに固定されたPSAプロモーター領域を除いて、全ての多糖プロモーター逆転領域が

50

オフに固定されていた。この変異体の表現型は、mut 44と同じであること、すなわちPSAを過剰発現し、そして少量のPSFを発現するが、他の7つの公知の莢膜多糖PSB-PSHは発現しないことが見出された。

#### 【0220】

(実施例6 . mut 44はPSAを過剰発現する)

res 02と呼ばれるオープンリーディングフレームの欠失により、野生型と比較してPSAを過剰発現する、そしてこの株の他の7つの公知の莢膜多糖のほとんどまたは全てを欠くB . fragilis株を産生した。これらの株は、容易に精製するのに十分な量のPSAを産生し、このことは、商業目的のための、強力な両性イオン性多糖、PSAの大規模精製のために魅力的である。

10

#### 【0221】

野生型B . fragilis NCTC 9343から単離される全莢膜多糖(8つの多糖すべてあわせて)の収量は、培養1リットルあたり6.26 - 21.9 mgの範囲である。他の多糖からPSAを精製するための徹底的な方法の後、野生型B . fragilis NCTC 9343から単離される純粋PSAの収量は、培養1リットルあたり0 ~ 3.1 mgの範囲であり、培養1リットルあたり平均1.56 mgである。mut 44の最初の大量増殖物(grow-up)(16リットル)において、培養1リットルあたり21.8 mgの純粋PSAの収量が存在した。その収量は野生型よりも14倍高かっただけでなく、PSAを他の莢膜多糖から単離する必要がないので、抽出および精製方法は、非常により簡単であった。野生型と異なり、この変異体からのPSAの収率は、プロモーターが逆転できないためにPSAの発現はもはや相変化を受けないので、一貫して高いことが予測される。

20

#### 【0222】

(実施例7 . mut 44からのPSAの大規模精製)

mut 44の16リットルのバッチ発酵を、補充基礎培地中で増殖させた。一晚増殖させた後、細菌をペレットにし、そして68 の667 mlのdH<sub>2</sub>O中に再懸濁した。ガラスビーズを再懸濁したペレットに加え、そして4リットルの水浴に置いた。667 mlの75%フェノール(68 に前もって温めた)を混合物に加え、そして少なくとも30分間攪拌した。混合物を次いで低温室で一晩攪拌した。混合物を次いで8000 rpmで20分間遠心分離した。上部の水相を除去し(約500 ml)、そして分離用ろうとにおいて500 mlのエーテルに加えた。混合物を振とうし、そして20分間分離させた。下部の相を保持した。その試料を、エーテルの蒸発および試料の濃縮のために、60 の水浴において回転蒸発装置に置いた。その試料を、透析チューブに入れ、そして10リットルの水に対して、6回緩衝液を交換して透析した。1MのTrisを加え、容量の6.5%にした。MgCl<sub>2</sub>およびCaCl<sub>2</sub>を、20 mMの最終濃度まで加えた。RNアーゼを加えて3.33 mg/mlの濃度にし、そしてDNアーゼを0.07 mg/mlまで加えた。その試料を37 で一晩消化した。試料のpHを、10MのNaOHで7.5に調整した。プロナーゼを0.33 mg/mlまで加え、そして一晚インキュベートした。新しいプロナーゼを加え、そしてさらに2時間インキュベートした。EDTAを加えて溶液を50 mMにし、そして30分間混合した。その試料を、5容量の-20 エタノールを用いて沈殿させた。その試料を、3%のデオキシコール酸中で再懸濁し、そしてセファロース400カラムにかけた。カラム画分を、高分子量莢膜多糖および低分子量LPSの分離に関して、銀染色SDS-PAGEによってモニターした。PSAの純度を、免疫電気泳動およびNMR分析によって試験した。

30

40

#### 【0223】

(実施例8 . inv 19の欠失)

inv 19オープンリーディングフレームを、ダブルクロスオーバー対立遺伝子交換によって9343染色体から欠失させ、全てinv 19の染色体欠失を有するいくつかの変異体を生じた。

#### 【0224】

50

(生物学的寄託)

mut 44 を、American Type Culture Collection、Manassas、VA に、2002年3月11日、Bacteroides fragilis: 9343 res 02 mut 44 の記載のもとに寄託し、そして Patent Deposit Designation PTA - 4135 を割り当てられた。

【0225】

本明細書中で同定された、または引用された全ての参考文献、特許、および特許公報は、その全体が参考として援用される。

【0226】

本発明は特定の実施態様に関して記載されたが、これらの実施形態の詳細は、限定として解釈されない。様々な等価物、変化、および改変が、本発明の趣旨および範囲から離れることなくなされ、そしてそのような等価な実施形態は本発明の一部であることが理解される。

10

【図面の簡単な説明】

【0227】

【図1】図1は、res 02 のヌクレオチド配列である (配列番号1)。

【図2】図2は、res 02 の推定アミノ酸配列である (配列番号2)。

【図3】図3は、inv 19 のヌクレオチド配列である (配列番号3)。

【図4】図4は、inv 19 の推定アミノ酸配列である (配列番号4)。

【図5】図5は、pKGW10 の構築および B. fragilis NCTC 9343 の染色体から res 02 を欠失させるために使用される変異戦略を示す図である。res 02 の翻訳の方向は、図の右から左である。

20

【図6】図6は、Left Flank、inv 19 - D1 through inv 19 - D2、1958 bp のヌクレオチド配列である (配列番号5)。

【図7】図7は、Right Flank、inv 19 - D5 through inv 19 - D6、2540 bp のヌクレオチド配列である (配列番号6)。

【図8】図8は、mut 2 (レーン2) および mut 44 (レーン4) は、PSA を発現するが、PSB、PSC、PSD、PSE、PSG、または PSH を発現しないことを示す、ウェスタンイムノブロット画像の合成物である。少量のPSFが、これらの変異体株のそれぞれによって発現されたが、別の res 02 変異体、res 02 mut 8 によって

30

は発現されなかった。野生型 (レーン1) および res 02 mut 8 (レーン3) も、比較のために示す。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> The Brigham and Women's Hospital, Inc.

<120> METHOD FOR OVEREXPRESSION OF ZWITTERIONIC POLYSACCHARIDES

<130> B00801.70279

<150> US 60/364,168

<151> 2001-03-13

<160> 14

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 594

<212> DNA

<213> Bacteroides fragilis

10

<400> 1

```

atggtaatag cttatttgag agtaagtacg gaaaaacagt ttttgctaa tcagaaggaa    60
gagattatgc gatttcgaga gaagaatggg ttgtcgattg acaagtggta cacagagacc    120
gtaagcggaa gcgtgagcac aaaagacaga aagctatcag agttattgaa gagaatgcat    180
cccggggata cactgattgt aacggagatt tcgagattga gccgtacact gctcgagatt    240
atgactatcc tgaatTTTTG tattaagaag caggtagtgc tctatagcac caaagagggc    300
tatgtgtttc aggacgacat caacagcaag gtgctgggat tcgcttccgg actgatggcg    360
gaaatagaaa ggaacctgat ttcgatgcgt accaaagaag ctctcgacg cagaaagcag    420
gaaggaatga ctttaggccg aaagaaaggg gatagccta aaataaaatt gctgcgtgcc    480
aataagccg tacttaccaa agaacttgac aaaggaacta cttactogga attggcggag    540
aagatggggg tatccagaac aaccctgttc cggtttatga aaacgatgta ttag      594

```

20

<210> 2

<211> 197

<212> PRT

<213> Bacteroides fragilis

30

<400> 2

```

Met Val Ile Ala Tyr Leu Arg Val Ser Thr Glu Lys Gln Phe Leu Ala
1           5           10           15

```

```

Asn Gln Lys Glu Glu Ile Met Arg Phe Ala Glu Lys Asn Gly Leu Ser
          20           25           30

```

```

Ile Asp Lys Trp Tyr Thr Glu Thr Val Ser Gly Ser Val Ser Thr Lys
          35           40           45

```

Asp Arg Lys Leu Ser Glu Leu Leu Lys Arg Met His Pro Gly Asp Thr  
50 55 60

Leu Ile Val Thr Glu Ile Ser Arg Leu Ser Arg Thr Leu Leu Glu Ile  
65 70 75 80

Met Thr Ile Leu Asn Phe Cys Ile Lys Lys Gln Val Val Leu Tyr Ser  
85 90 95

Thr Lys Glu Gly Tyr Val Phe Gln Asp Asp Ile Asn Ser Lys Val Leu  
100 105 110

10

Gly Phe Ala Phe Gly Leu Met Ala Glu Ile Glu Arg Asn Leu Ile Ser  
115 120 125

Met Arg Thr Lys Glu Ala Leu Ala Arg Arg Lys Gln Glu Gly Met Thr  
130 135 140

Leu Gly Arg Lys Lys Gly Asp Thr Pro Lys Ile Lys Leu Leu Arg Ala  
145 150 155 160

Asn Lys Arg Val Leu Thr Lys Glu Leu Asp Lys Gly Thr Thr Tyr Ser  
165 170 175

20

Glu Leu Ala Glu Lys Met Gly Val Ser Arg Thr Thr Leu Phe Arg Phe  
180 185 190

Met Lys Thr Met Tyr  
195

<210> 3  
<211> 921  
<212> DNA  
<213> Bacteroides fragilis

<400> 3  
atggaaatag aaaaattcat taaatcttta gcaagaaaag cgaagttagg cgggcgttac 60  
agcacagcca atacctacct ctacactttg cacagtttcc agaagtttgc gggaaaagcc 120  
tcactgactt ttgaagagat cactcccgag agtatcaagg agtacgagca atacttaatc 180  
ctcaacggga aacggtacaa cacgatctcg ctctacatgc gcatggttgcg ttccatctgc 240  
aatcaggcat cggagcagaa catagcttgc ctcaacaccc gcgagctggt tgagaatggt 300  
tttatcgga acgaaccac tgccaagcgt gccatctcac cggtoctcat ttccgcctg 360

30

ctcgaagcag atttcagcaa gaacagccgg ctcgattttg ccgcgcacct cttcttgcta 420  
 agcttctacc tgaggggaat ccggtttgtc gacctggtac atctccgcaa gaccgatgtg 480  
 cagggaaaca tgctcgttta tttccgccag aaaacgggac agcaacttac ggtaatcata 540  
 gaaaactgcg ccaaagtgat cttgcgtaag tatgcctcgc ttigcaaaga atccgtctat 600  
 ctgctgcccg tcatcagcgc agccggagag gaggggcaca agcagtaccg aagtgcattg 660  
 aggtatata acaaagcct caaccagata tccggaatac tgaaattgaa gactccgctg 720  
 acctcttatg tggcacgcca cagttgggcg accacggccc tgcagaaagg ggttccggtt 780  
 tcagtgatca gtgcaggaat ggggcatgct tcagagaagg tgacatacat ttatctggca 840  
 tcttttgata acaaaaagct cagtaacgca aataaaaaag tgattgcgcg cgtgagattt 900  
 aagaaagagg agggaggatg a 921

10

<210> 4  
 <211> 306  
 <212> PRT  
 <213> *Bacteroides fragilis*  
 <400> 4

Met Glu Ile Glu Lys Phe Ile Lys Ser Leu Ala Arg Lys Ala Lys Leu  
 1 5 10 15

20

Gly Gly Arg Tyr Ser Thr Ala Asn Thr Tyr Leu Tyr Thr Leu His Ser  
 20 25 30

Phe Gln Lys Phe Ala Gly Lys Ala Ser Leu Thr Phe Glu Glu Ile Thr  
 35 40 45

Pro Glu Ser Ile Lys Glu Tyr Glu Gln Tyr Leu Ile Leu Asn Gly Lys  
 50 55 60

Arg Tyr Asn Thr Ile Ser Leu Tyr Met Arg Met Leu Arg Ser Ile Cys  
 65 70 75 80

30

Asn Gln Ala Ser Glu Gln Asn Ile Ala Ser Leu Asn Thr Arg Glu Leu  
 85 90 95

Phe Glu Asn Val Phe Ile Gly Asn Glu Pro Thr Ala Lys Arg Ala Ile  
 100 105 110

Ser Pro Val Leu Ile Ser Arg Leu Leu Glu Ala Asp Phe Ser Lys Asn  
 115 120 125

Ser Arg Leu Asp Phe Ala Arg Asp Leu Phe Leu Leu Ser Phe Tyr Leu  
130 135 140

Arg Gly Ile Pro Phe Val Asp Leu Val His Leu Arg Lys Thr Asp Val  
145 150 155 160

Gln Gly Asn Met Leu Val Tyr Phe Arg Gln Lys Thr Gly Gln Gln Leu  
165 170 175

Thr Val Ile Ile Glu Asn Cys Ala Lys Val Ile Leu Arg Lys Tyr Ala  
180 185 190

Ser Leu Cys Lys Glu Ser Val Tyr Leu Leu Pro Val Ile Ser Ala Ala  
195 200 205

Gly Glu Glu Gly His Lys Gln Tyr Arg Ser Ala Leu Arg Val Tyr Asn  
210 215 220

Lys Arg Leu Asn Gln Ile Ser Gly Ile Leu Lys Leu Lys Thr Pro Leu  
225 230 235 240

Thr Ser Tyr Val Ala Arg His Ser Trp Ala Thr Thr Ala Leu Gln Lys  
245 250 255

Gly Val Pro Val Ser Val Ile Ser Ala Gly Met Gly His Ala Ser Glu  
260 265 270

Lys Val Thr Tyr Ile Tyr Leu Ala Ser Phe Asp Asn Lys Thr Leu Ser  
275 280 285

Asn Ala Asn Lys Lys Val Ile Ala Ala Val Arg Phe Lys Lys Glu Glu  
290 295 300

Glu Glu  
305

<210> 5  
<211> 1958  
<212> DNA  
<213> Bacteroides fragilis

<400> 5  
agtactgata actccgggtga ctcccgccac tgtaaaagaa aatgcccggag aagctcccaca 60  
gggacaagac gtaaacgcta cggtgaaaaa tgacacggtg ttcttcgaca aattgcccgtt 120

10

20

30

aaccgaactt attacctcca ttgtaggcga taaagacaaa gcggaagcca ttgtcaaagc 180  
catcggtgac gtaaaatata aagtaggcta caagccgget ctcaacacag agaaggacag 240  
catctacctt gctttcgate cgaaaccgtt gacccttcaa ctgcctgcag ccgtagaagg 300  
ccaggaagga cagactgtta ccgtaaccat ttcgtctccg gacaaaggca gctttgctta 360  
.caagaaaaat cagttgaagt tgaagctcag cgcgataaaa gtggaactgg caggcgtagc 420  
ggtagctgtt cctcagacc ttgttcgactt cggtagtacc aaaaaagaagt gattgcctgt 480  
tcaacacacg taacaagcag tagtcatagg gggtaaagcc tgtaaagaca ggcttttatac 540  
ccgcatgaaa aagtccgtgc tctcccccgc ggagtgaaca cggactttct gttccttgaa 600  
accattcaaa aaaaaagat tatttcacag cagccaatgc cttttcataa tccggctcct 660  
gagtaatctc cggcacaagc tctgtataag ctactttccc gtcttttcca atcaccacta 720  
ccgcacgggc cagcagtcgc gccagcggtc cgtcagccat cctcaccgca tagctctcgt 780  
cgaagtccga aaagcggaaa tccgacaacg gaatcacgtt ttcgataccc tctgtcgtgc 840  
agaagcgtcc ctgcgcaaac ggcaagtctt tcgaaatggc caataccacg gtatccttca 900  
ttccggctgc ctttttattg aatttacgca ccgaagtggc gcacacaccg gtatccagac 960  
tcgggaaaat attcagaaca atattcttac ctttcagatc ttttagtgcc aaagaagata 1020  
aatcactttt caccagctcg aaatcgggag ccacctttcc aacctgtata aattcgccaa 1080  
tcagctttac cggttgtcct ttgaaatttg ttggtgcat aattgataac tctaagtttt 1140  
atttactata ttctaaacaa tcggtgcaag aactttgttc acgatggaca ataacttaaa 1200  
aaataaaaatt gatatgaaaa ctttattcga cgagatggaa cacgcagtca aaaactggtg 1260  
gttatctctt attctgggta ttctgtacat catcgtggct ctctgtctgc tattegcacc 1320  
gggaagcagt tacattgcc tcagcgtcat cttcagcatt tcgatgctga taagtgggat 1380  
catcgaaatc atcttctcca tcagtaaccg gcgaggcacc tcgtcctggg gatggtacct 1440  
cgcaggcggg atcatcgatc tgatcttagg catctacctg gtagcctatc cgtgctcag 1500  
catggaagtc ataccgttca tagtcgcctt ctggatgatg ttccgcggtt tctccgccac 1560  
aggctattct atggacctga agcgttatgg caccctgag tggggatgg acatgggatt 1620  
cggcatcctc gccatcattt gtctcgtgat catcctgtgg cagccggccg taggtgcct 1680  
ctacgttata tatatgctgg cattcacttt cctgatcacc ggattcttcc gtgcatggt 1740  
gtccttcgaa ctgaaaagcc ttcataaacg atcaacggtg atgaacggta aatgataaac 1800  
attgaatgaa cccctattca ccacagatta cacagattaa cacagatatt ttaattaaac 1860

10

20

30

40



tctcagtaaa ataaattatt aatctgtgag aatctgtgta atctgcggtg aattatgact 1920  
 ccctaaccg ttactaatac atcgttttca taaaccgg 1958

<210> 6  
 <211> 2540  
 <212> DNA  
 <213> *Bacteroides fragilis*

<400> 6  
 ttttccgtac ttactctcaa ataagctatt accataattc atgtttttaa atgattaata 60  
 caccacgaaa aaacggctat tcattcaaat acgggacact tttttacggt cttttttct 120  
 catgccactt gggatattct gaaactttca ttctctata catttatgct attgattttt 180  
 tactaatttc cagcatattt tocaatctgt cactcaaaaat cttttttatt ataaaccgtg 240  
 ttcttgaaca cactaaaaag aacaagaaaa tggaaataga aaaattcatt aaatctttag 300  
 caagaaaagc gaagttaggc gggcgttaca gcacagccaa tacctacctc tacactttgc 360  
 acagttttca gaagtttgcg ggaaaagcct cactgacttt tgaagagatc actcccgaga 420  
 gtatcaagga gtacgagcaa tacttaatcc tcaacgggaa acggtacaac acgatctcgc 480  
 tctacatgcg catgttgcgt tccatctgca atcaggcacc ggagcagaac atagcttcgc 540  
 tcaacaccgc cgagctgttt gagaatgttt ttatcggcaa cgaaccact gccaaagcgtg 600  
 ccattctacc cgtctcatt tcccgcctgc tgaagcaga ttbcagcaag aacagccggc 660  
 tggattttgc cgcgacctc ttcttgetaa gcttctacct gaggggaatc ccgtttgcg 720  
 acctggtaca tctccgcaag accgatgtgc agggaaacat gctcgtttat ttccgccaga 780  
 aaacgggaca gcaacttacg gtaatcatag aaaactgcgc caaagtgatc ttgcgtaagt 840  
 atgcctcgtc ttgcaaagaa tccgtctatc tgetgcccgt catcagcgca gccggagagg 900  
 aggggcacaa gcagtaccga agtgcatgga gggatataca caaacgcctc aaccagatat 960  
 ccggaatact gaaattgaag actccgctga cctcttatgt ggcacgccac agttgggcca 1020  
 ccacggccct gcagaaaggg gttccggttt cagtgatcag tgcaggaatg gggcatgctt 1080  
 cagagaaggt gacatacatt tatctggcat cttttgataa caaacgcctc agtaacgcaa 1140  
 ataaaaagt gattgcgccc gtyagattta agaaagagga ggaggagtga taatagctgt 1200  
 tctcttactt attaggaat agaacagatt catttgttt atcgtcgc aaatagagat 1260  
 aataattgaa actccacaaa caaatgata atttctttc tataaaagtg gattataacc 1320  
 agttgaagta tcagtttgaa ataatttatt cacttaatag aaatattagt cataattcct 1380  
 gtttgatgta attactcaa caggagttta caatttgcaa taatttgaca tcagaattat 1440

10

20

30

ataatccagc ccctgtttta tgttttagtta acctctaaaa gttatatttc atatcttttc 1500  
 gctattccgc attctattac ctaataagta agggatcact ttgttctatt acctaataag 1560  
 taagggaca aattgcaatg cacacagcaa gatggtagtb attcaaacat taacgacaac 1620  
 tatcgcaaac atttctaaaa gtacagtatg aaacaggtat tgcggttcaa taaagtcatt 1680  
 aaaaggattg tattcaccgg agatctcatt ctcttgaatg gcacctttct gtccttgtac 1740  
 accctattgg ggagcaaatt ttttgcatg ccattcattc actcacttcc ccaagtactg 1800  
 gtattgctca acttatgcta cctggtagc aacatgtctt caggtatcat attgcaocgc 1860  
 cgtgtagtac gtcccagca aatcgtatgg cgtgccttac gcaacagtgc gggacacgcc 1920  
 ttgttttttt cctgcgcgct cacttttggg aacttcggca tcctttccgc ccgctttttc 1980  
 ttactgttct acattgcggt cactctgctg ttgggttgbt accggttatt gttccgcaag 2040  
 atcctgaagt cctatcgtaa gcatggaggc aactcccgca gcatcattct ggtgggaagc 2100  
 aatagcaata taatogaact ctaccatcaa atgacggacg acgtcacttc eggattccgt 2160  
 gtcacccgct actttgacga ccagccaggc agccgcttcc ccgaaaaggc gaactatctg 2220  
 ggaaaaccgc gtaagattgt ggaccgcctg aagcaggag gagtcagca ggtttattgt 2280  
 tgcctgcctt cggcccagc cgaagagatt ctcccacatca tgaactattg cgaaaatcac 2340  
 ctgatacgc ttttcagtgt ccccaacgtg cgcagctatc tgaagcggcg catgtacttc 2400  
 gagctcctgg gcaacgtgcc cgtactctgc atccgccagg agccgctcag ttttgccgaa 2460  
 aaccgattca ggaagcgtgt gttcgacatc gctttctcgc tcttgtttct ttgcacctc 2520  
 ttccccatta tctatgtcat 2540

<210> 7  
 <211> 19  
 <212> DNA  
 <213> *Bacteroides fragilis*

<400> 7  
 acgaacgttt tttgaaaca

19

30

<210> 8  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> *Bacteroides fragilis*

<400> 8  
 tagacgatcg tctattgaaa ca

22

<210> 9  
 <211> 25

10

20

<212> DNA		
<213> Bacteroides fragilis		
<400> 9		
ttaaacgaac gtctattgaa acaact	25	
<210> 10		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Bacteroides fragilis		
<400> 10		
gttcaaatac acgaacggtt	20	10
<210> 11		
<211> 32		
<212> DNA		
<213> Artificial sequence		
<220>		
<223> Synthetic oligonucleotide		
<400> 11		
ccggatccag tactgataac tccggtgact cc	32	
<210> 12		
<211> 32		20
<212> DNA		
<213> Artificial sequence		
<220>		
<223> Synthetic oligonucleotide		
<400> 12		
atccatggcc ggtttatgaa aacgatgat ta	32	
<210> 13		
<211> 34		
<212> DNA		
<213> Artificial sequence		
<220>		30
<223> Synthetic oligonucleotide		
<400> 13		
cgccatggtt tccgtactt actctcaaat aagc	34	
<210> 14		
<211> 32		
<212> DNA		
<213> Artificial sequence		
<220>		
<223> Synthetic oligonucleotide		
<400> 14		
gggatccat gacatagata atggggaaga gg	32	40

SEQUENCE LISTING

<110> The Brigham and Women's Hospital, Inc.

<120> METHOD FOR OVEREXPRESSION OF ZWITTERIONIC POLYSACCHARIDES

<130> B00801.70279

<150> US 60/364,168

<151> 2001-03-13

<160> 14

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 594

<212> DNA

<213> Bacteroides fragilis

10

<400> 1

```

atggtaatag cttatlttgag agtaagtacg gaaaaacagt ttttggctaa tcagaaggaa    60
gagattatgc gatttgcaga gaagaatggg ttgtogattg acaagtggta cacagagacc    120
gtaagcggaa gcgtgagcac aaaagacaga aagctatcag agttattgaa gagaatgcat    180
cccggggata cactgattgt aacggagatt tcgagattga gccgtacact gctcgagatt    240
atgactatcc tgaatltttg tattaagaag caggtagtgc tctatagcac caaagagggc    300
tatgtgtttc aggacgacat caacagcaag gtgctgggat tcgcttccgg actgatggcg    360
gaaatagaaa ggaacctgat ttcgatgcgt accaaagaag ctctcgcacg cagaaagcag    420
gaaggaatga ctttaggccg aaagaaaggg gatcgccta aaataaaatt gctgcgtgcc    480
aataagcgcg tacttaccaa agaacttgac aaaggaacta cttactcgga attggcggag    540
aagatggggg tatccagaac aaccctgttc cggtttatga aaacgatgta ttag          594

```

20

<210> 2

<211> 197

<212> PRT

<213> Bacteroides fragilis

30

<400> 2

```

Met Val Ile Ala Tyr Leu Arg Val Ser Thr Glu Lys Gln Phe Leu Ala
1           5           10           15

```

```

Asn Gln Lys Glu Glu Ile Met Arg Phe Ala Glu Lys Asn Gly Leu Ser
20           25           30

```

```

Ile Asp Lys Trp Tyr Thr Glu Thr Val Ser Gly Ser Val Ser Thr Lys
35           40           45

```

Asp Arg Lys Leu Ser Glu Leu Leu Lys Arg Met His Pro Gly Asp Thr  
50 55 60

Leu Ile Val Thr Glu Ile Ser Arg Leu Ser Arg Thr Leu Leu Glu Ile  
65 70 75 80

Met Thr Ile Leu Asn Phe Cys Ile Lys Lys Gln Val Val Leu Tyr Ser  
85 90 95

Thr Lys Glu Gly Tyr Val Phe Gln Asp Asp Ile Asn Ser Lys Val Leu  
100 105 110

Gly Phe Ala Phe Gly Leu Met Ala Glu Ile Glu Arg Asn Leu Ile Ser  
115 120 125

Met Arg Thr Lys Glu Ala Leu Ala Arg Arg Lys Gln Glu Gly Met Thr  
130 135 140

Leu Gly Arg Lys Lys Gly Asp Thr Pro Lys Ile Lys Leu Leu Arg Ala  
145 150 155 160

Asn Lys Arg Val Leu Thr Lys Glu Leu Asp Lys Gly Thr Thr Tyr Ser  
165 170 175

Glu Leu Ala Glu Lys Met Gly Val Ser Arg Thr Thr Leu Phe Arg Phe  
180 185 190

Met Lys Thr Met Tyr  
195

<210> 3  
<211> 921  
<212> DNA  
<213> Bacteroides fragilis

<400> 3  
atggaatag aaaaattcat taaatcttta gcaagaaaag cgaagttagg cgggcgttac 60  
agcacagcca atacctacct ctacactttg cacagtttgc agaagtttgc gggaaaagcc 120  
tcactgactt ttgaagagat cactcccgag agtatcaagg agtacgagca atacttaatc 180  
ctcaacggga aacggtacaa cagatctcg ctctacatgc gcatgttgcg ttccatctgc 240  
aatcaggcat cggagcagaa catagcttcg ctcaacaccc gcgagctgtt tgagaatggt 300  
tttatcggca acgaaccac tgccaagcgt gccatctcac ccgtcctcat ttcccgcctg 360

10

20

30

ctcgaagcag atttcagcaa gaacagccgg ctcgattttg cccgcgacct cttcttgcta 420  
agcttctacc tgaggggaat cccgtttgtc gacctggtac atctccgcaa gaccgatgtg 480  
cagggaaaca tgctcgttta ttccgccag aaaacgggac agcaacttac ggtaatcata 540  
gaaaactgcg ccaaagtgat cttgcgtaag tatgcctcgc ttgcaaaga atccgtctat 600  
ctgctgcccc tcatcagcgc agccggagag gaggggcaca agcagtaccg aagtgcattg 660  
agggataca acaaacgcct caaccagata tccggaatac tgaaattgaa gactccgctg 720  
acctcttatg tggcacgcca cagttgggcg accacggccc tgcagaaagg ggttccggtt 780  
tcagtgatca gtgcaggaat ggggcatgct tcagagaagg tgacatacat ttatctggca 840  
tcttttgata acaaaacgct cagtaacgca aataaaaaag tgattgcccg cgtgagattt 900  
aagaaagagg agggaggagtg a 921

10

<210> 4  
<211> 306  
<212> PRT  
<213> Bacteroides fragilis  
<400> 4

Met Glu Ile Glu Lys Phe Ile Lys Ser Leu Ala Arg Lys Ala Lys Leu  
1 5 10 15

20

Gly Gly Arg Tyr Ser Thr Ala Asn Thr Tyr Leu Tyr Thr Leu His Ser  
20 25 30

Phe Gln Lys Phe Ala Gly Lys Ala Ser Leu Thr Phe Glu Glu Ile Thr  
35 40 45

Pro Glu Ser Ile Lys Glu Tyr Glu Gln Tyr Leu Ile Leu Asn Gly Lys  
50 55 60

Arg Tyr Asn Thr Ile Ser Leu Tyr Met Arg Met Leu Arg Ser Ile Cys  
65 70 75 80

30

Asn Gln Ala Ser Glu Gln Asn Ile Ala Ser Leu Asn Thr Arg Glu Leu  
85 90 95

Phe Glu Asn Val Phe Ile Gly Asn Glu Pro Thr Ala Lys Arg Ala Ile  
100 105 110

Ser Pro Val Leu Ile Ser Arg Leu Leu Glu Ala Asp Phe Ser Lys Asn  
115 120 125

Ser Arg Leu Asp Phe Ala Arg Asp Leu Phe Leu Leu Ser Phe Tyr Leu  
130 135 140

Arg Gly Ile Pro Phe Val Asp Leu Val His Leu Arg Lys Thr Asp Val  
145 150 155 160

Gln Gly Asn Met Leu Val Tyr Phe Arg Gln Lys Thr Gly Gln Gln Leu  
165 170 175

Thr Val Ile Ile Glu Asn Cys Ala Lys Val Ile Leu Arg Lys Tyr Ala  
180 185 190

Ser Leu Cys Lys Glu Ser Val Tyr Leu Leu Pro Val Ile Ser Ala Ala  
195 200 205

Gly Glu Glu Gly His Lys Gln Tyr Arg Ser Ala Leu Arg Val Tyr Asn  
210 215 220

Lys Arg Leu Asn Gln Ile Ser Gly Ile Leu Lys Leu Lys Thr Pro Leu  
225 230 235 240

Thr Ser Tyr Val Ala Arg His Ser Trp Ala Thr Thr Ala Leu Gln Lys  
245 250 255

Gly Val Pro Val Ser Val Ile Ser Ala Gly Met Gly His Ala Ser Glu  
260 265 270

Lys Val Thr Tyr Ile Tyr Leu Ala Ser Phe Asp Asn Lys Thr Leu Ser  
275 280 285

Asn Ala Asn Lys Lys Val Ile Ala Ala Val Arg Phe Lys Lys Glu Glu  
290 295 300

Glu Glu  
305

<210> 5  
<211> 1958  
<212> DNA  
<213> Bacteroides fragilis

<400> 5  
agtactgata actccggtga ctcccgccac tgtaaaagaa aatgccggag aagctcccca 60  
gggacaagac gtaaacgcta cggtgaaaaa tgacacggtg ttcttcgaca aattgccggt 120

10

20

30

aaccgaactt attacctcca ttgtaggcga taaagacaaa gcggaagcca ttgtcaaagc 180  
catcgggtgac gtaaaataca aagtaggcta caagccggct ctcaacacag agaaggacag 240  
catctacctt gctttcgcac cgaaaccggt gaccttcaa ctgcctgcag ccgtagaagg 300  
ccaggaagga cagactgtta ccgtaaccat ttcgtctccg gacaaaggca gctttgctta 360  
caagaaaaat cagttgaagt tgaagctcag ccgcgataaa gtggaactgg caggcgtagc 420  
ggtacctggt cctcagaccc tgttcgactt cggtatgacc aaaaagaagt gattgcctgt 480  
tcaacacacg taacaagcag tagtcatagg gggtaaagcc tgtaaagaca ggctttatac 540  
ccgcatgaaa aagtcggtgc tctccccccc ggagtgaaca cggactttct gttccttgaa 600  
accattcaaa aaaaaaagat tatttcacag cagccaatgc cttttcataa tccggctcct 660  
gagtaatctc cggcacaagc tctgtataag ctactttccc gtctttccca atcaccacta 720  
ccgcacgggc cagcagtcag gccagcggtc cgtcagccat cctcacgcca tagctctcgt 780  
cgaagtccga aaagcggaaa tccgacaacg gaatcacggt ttcgataccc tctgtcgtgc 840  
agaagcgtcc ctgcgcaaac ggcaagtctt tcgaaatggc caataaccacg gtatccttca 900  
ttccggctgc cattttattg aatttacgca ccgaagtggc gcacacaccg gtatccagac 960  
tcgggaaaat attcagaaca atattcttac ctctcagatc ttttagtgcg aaagaagata 1020  
aatcactttt caccagctcg aaatcgggag ccacctttcc aacctgtata aattcgccaa 1080  
tcagctttac cggttgtcct ttgaaatttg ttggttccat aattgataac tctaagtttt 1140  
atttactata ttctaaacaa tcggtgcaag aactttgttc acgatggaca ataatctaaa 1200  
aaataaaaatt gatatgaaaa ctttattcga cgagatggaa caccgagtca aaaactggtg 1260  
gttatctctt attctgggta ttctgtacat catcgtggct ctctgtctgc tattcgcacc 1320  
gggaagcagt tacattgccc tcagcgtcat ctccagcatt tcgatgctga taagtgggat 1380  
catcgaaatc atcttctcca tcagtaaccg gcgaggcacc tcgtcctggg gatggtacct 1440  
cgcaggcggc atcatcgatc tgatcttagg catctacctg gtagcctatc cgctgctcag 1500  
catggaagtc ataccgttca tagtcgcctt ctggatgatg ttcccggggt tctccgccac 1560  
aggctattct atggacctga agcgttatgg caccocgtgag tggggatggc acatgggatt 1620  
cggcatcctc gccatcattt gttcgcgtgat catcctgtgg cagccggccg taggtgccct 1680  
ctacgttata tatatgctgg cattcacttt cctgatcacc ggattcttcc gtgtcatggt 1740  
gtccttcgaa ctgaaaagcc ttcataaacg atcaacggtg atgaacggta aatgataaac 1800  
attgaatgaa cccctattca ccacagatta cacagabtaa cacagatatt ttaattaaac 1860

10

20

30



tctcagtaaa ataaattatt aatctgtgag aatctgtgta atctgcggtg aattatgact 1920  
 ccctaaccg ttactaatac atcgttttca taaaccgg 1958

<210> 6  
 <211> 2540  
 <212> DNA  
 <213> Bacteroides fragilis

<400> 6  
 ttttccgtac ttactctcaa ataagctatt accataattc atgtttttaa atgattaata 60  
 caccacgaaa aaacggctat tcattcaaat acgggacact tttttacgtt cctttttct 120  
 catgccactt gggatlttct gaaactttca ttogtctata cttttatgct attgattttt 180  
 tactaatttc cagcatatltt tccaatctgt cactcaaaaat cttttttatt ataaaccgtg 240  
 ttcttgaaca cactaaaaag aacaagaaaa tggaaataga aaaattcatt aaatctttag 300  
 caagaaaagc gaagttaggc gggcgttaca gcacagccaa tacctacctc tacactttgc 360  
 acagttttca gaagttaggc gggaaaagcct cactgacttt tgaagagatc actcccgaga 420  
 glatcaagga gtacgagcaa tacttaatcc tcaacgggaa acggtacaac acgatctcgc 480  
 tctacatgcg catgttgctg tccatctgca atcaggcacc ggagcagaac atagcttcgc 540  
 tcaacaccgg cgagctgttt gagaatgttt ttatcggcaa cgaaccact gccaaagcgtg 600  
 ccatctcacc cgtcctcatt tcccgcctgc tcgaagcaga tttcagcaag aacagccggc 660  
 tggattttgc ccgcgaacct ttcttgctaa gcttctacct gaggggaaac ccgtttgcg 720  
 acctggtaca tctccgaag accgatgtgc agggaaacat gctcgtttat ttccgccaga 780  
 aaacgggaca gcaacttacg gtaatcatag aaaactgcgc caaagtgatc ttgcgtaagt 840  
 atgcctcgcct ttgcaaagaa tccgtctatc tctgcccgt catcagcgca gccggagagg 900  
 aggggcacaa gcagtaccga agtgcatgga gggatacaa caaacgcctc aaccagatat 960  
 ccggaatact gaaattgaag actccgctga cctcttatgt ggcacgccac agttgggcga 1020  
 ccacggccct gcagaaaggg gttccggttt cagtgatcag tgcaggaatg gggcatgctt 1080  
 cagagaaggt gacatacatt tatctggcat cttttgataa caaacgcctc agtaacgcaa 1140  
 ataaaaaagt gattgccgcc gtgagattta agaaagagga ggaggagtga taatagctgt 1200  
 tctcttactt attaggtaat agaacagatt catttgtttt atcgtgcaa aaatagagat 1260  
 aataattgaa actccacaaa caaatgata atttcttttc tataaaagtg gattataacc 1320  
 agltgaagta tcagtttgaa ataatttatt cacttaatag aaatattagt cataattcct 1380  
 gtttgatgta attactcaaa caggagttta caatttgcaa taatttgaca tcagaattat 1440

10

20

30

ataatccagc ccctgtttta tgtttagtta acctctaaaa gttatatttc atatcttttc	1500	
gctattccgc attctattac ctaataagta agggatcact ttgttctatt acctaataag	1560	
taagggaaaca aattgcaatg cacacagcaa gatggtagtt attcaaacat taacgacaac	1620	
tatcgcaaac atttctaaaa gtacagtatg aacacaggtat tgccggttcaa taaagtcatt	1680	
aaaaggattg tattccaccg agatctcatt ctcttgaatg gcacctttct gtccttgtac	1740	
acctatttgg ggagcaaat ttttgcagat ccattcattc actcacttcc ccaagtactg	1800	
gtatttgcga acttatgcta cctggttagc aacatgtctt caggatcatc attgcaccgc	1860	
cgtgtagtac gtcccagca aatcgtatgg cgtgccttac gcaacagtgc gggacacgcc	1920	10
ttgttttttt cctgcgcgct cacctttgga aacttcggca tcttttccgc ccgctttttc	1980	
ttactgttct acattgcggt cactctgctg ttggtttgtt accggttatt gttccgcaag	2040	
atcctgaagt cctatcgtaa gcatggaggc aactcccgca gcacattct ggtgggaagc	2100	
aatagcaata taatcgaact ctaccatcaa atgacggacg acgtcacttc cggattccgt	2160	
gtcatcggct actttgacga ccagccaggc agccgcttcc ccgaaaagg gaactatctg	2220	
ggaaaaccgc gtaagattgt ggaccgctg aagcagggag gagtcgagca ggtttattgt	2280	
tgctgcctt cggcccgcag cgaagagatt ctcccacatca togactattg cgaaaaacac	2340	
ctgatacgt ttttcagtgt ccccaacgtg cgcagctatc tgaagcggcg catgtacttc	2400	20
gagctcctgg gcaacgtgcc cgtactctgc atccgccagg agccgctcag ttttgccgaa	2460	
aaccgattca ggaagcgtgt gttcgacatc gctttctcgc tcttgtttct ttgcaccctc	2520	
ttcccatta tctatgtcat	2540	

<210> 7

<211> 19

<212> DNA

<213> *Bacteroides fragilis*

<400> 7

acgaacgttt tttgaaaca 19

30

<210> 8

<211> 22

<212> DNA

<213> *Bacteroides fragilis*

<400> 8

tagacgatcg tctattgaaa ca 22

<210> 9

<211> 25

<212> DNA  
 <213> Bacteroides fragilis  
  
 <400> 9  
 ttaaacgaac gtctattgaa aact 25  
  
 <210> 10  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Bacteroides fragilis  
  
 <400> 10  
 gttcaaatac acgaacggtt 20 10  
  
 <210> 11  
 <211> 32  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence  
  
 <220>  
 <223> Synthetic oligonucleotide  
  
 <400> 11  
 ccggatccag tactgataac tccggtgact cc 32  
  
 <210> 12  
 <211> 32  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence 20  
  
 <220>  
 <223> Synthetic oligonucleotide  
  
 <400> 12  
 atccatggcc ggtttatgaa aacgatgat ta 32  
  
 <210> 13  
 <211> 34  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence  
  
 <220> 30  
 <223> Synthetic oligonucleotide  
  
 <400> 13  
 cgccatggtt ttccgtactt actctcaaat aagc 34  
  
 <210> 14  
 <211> 32  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence  
  
 <220>  
 <223> Synthetic oligonucleotide  
 <400> 14  
 ggggatccat gacatagata atggggaaga gg 32 40



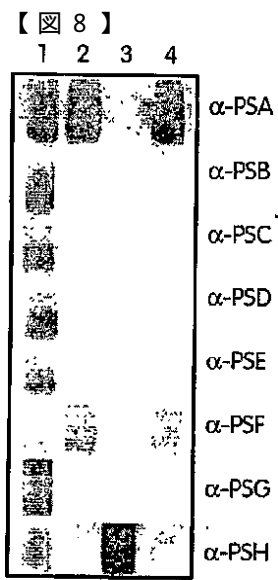


Fig. 8

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
C 1 2 N	1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19
C 1 2 N	1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21
A 6 1 K	38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02
C 1 2 P	19/04 (2006.01)	C 1 2 P 19/04
C 1 2 Q	1/04 (2006.01)	C 1 2 Q 1/04

- (72)発明者 コムストック, ローリー イー.  
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02052, メッドフィールド, ライラック レーン  
1
- (72)発明者 ウェイナット, カトジャ ジー.  
ドイツ国 79211 デンツリンゲン, ベルリナー シュトラッセ 13/2
- (72)発明者 コイネ, マイケル ジェイ.  
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02760, ノース アットレポーロ, パインツリー  
ドライブ 42
- (72)発明者 カスパー, デニス エル.  
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02129, チャールスタウン, モニュメント アベニ  
ュー 48
- (72)発明者 ツィアナボス, アーサー オー.  
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 01867, リーディング, ハンプシャー ロード 3  
7

審査官 濱田 光浩

(56)参考文献 特表平10-507746(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., D B名)

C12N 15/00  
C12N 1/00  
C12N 5/00  
CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)  
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)  
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq  
UniProt/GeneSeq  
SwissProt/PIR/GeneSeq  
PubMed