(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2008-516614
(P2008-516614A)
(43)公表日　平成20年5月22日(2008.5.22)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12N 1/20	(2006.01)	C12N	1/20	A	4B064
C12N 1/21	(2006.01)	C12N	1/21		4B065
A61P 31/04	(2006.01)	A61P	31/04		4C085
C12P 21/02	(2006.01)	C12P	21/02	C	
A61K 39/02	(2006.01)	A61K	39/02		

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 40 頁）

(21)出願番号　特願2007-537041 (P2007-537041)
(86)(22)出願日　平成17年10月18日 (2005.10.18)
(85)翻訳文提出日　平成19年6月14日 (2007.6.14)
(86)国際出願番号　PCT/US2005/038237
(87)国際公開番号　WO2006/045110
(87)国際公開日　平成18年4月27日 (2006.4.27)
(31)優先権主張番号　60/620,133
(32)優先日　平成16年10月18日 (2004.10.18)
(33)優先権主張国　米国(US)

(71)出願人　504333972
メディミューン，インコーポレーテッド
アメリカ合衆国　２０８７８　メリーランド州，ゲイサーズバーグ，ワン　メディミューン　ウェイ
(74)代理人　100097456
弁理士　石川　徹
(72)発明者　パメラ　スウェエネイ
アメリカ合衆国　２０８７４　メリーランド州　ゲルマンタウン　アプト．２２６　ベント　ウィルロウ　サークル　１８８３６

最終頁に続く

(54)【発明の名称】リステリア増殖のための高細胞密度法

(57)【要約】
【課題】　本発明は、約２．２よりも高いＯＤ$_{600}$を有する培養物を産生する、リステリアの高細胞密度増殖ための流加培養方法に関するものである。
【解決手段】　詳細には、本発明はｐＨ制御バイオリアクター内での増殖、及び、任意選択で、初期培養物中の増殖がほとんど完了するか完了するときのグルコースなどの炭素源の漸次的な添加を含み、ビタミンなどの１つ又は複数の更なる栄養素を添加するか若しくはしない、リステリアの高細胞密度増殖のための方法を提供する。一実施態様では、本発明の方法は、過剰増殖性細胞に対して免疫応答を誘発するために、リステリアベースの組成物、例えば、EphA2抗原性ペプチドなどの腫瘍関連抗原を発現するリステリアを含むワクチンを産生するのに用いられる。
【選択図】　なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
リステリアの高細胞密度増殖のための方法であって、２．２よりも高いＯＤ$_{600}$を達成するのに十分な条件下及び十分な時間、培地でリステリア細胞の流加培養を行うことを含む、前記方法。
【請求項２】
前記培養は前記リステリア培養が定常期に到達した後に更なる炭素源を給餌することを含む、請求項１記載の方法。
【請求項３】
約８．０より高いＯＤ$_{600}$が達成される、請求項１又は２記載の方法。
【請求項４】
約１５．０より高いＯＤ$_{600}$が達成される、請求項１又は２記載の方法。
【請求項５】
約２５．０より高いＯＤ$_{600}$が達成される、請求項１又は２記載の方法。
【請求項６】
前記ＯＤ$_{600}$は培地の濃縮なしに達成される、請求項１、２、３、４又は５記載の方法。
【請求項７】
前記炭素源はグルコース、酵母抽出物又はその組合せである、請求項２記載の方法。
【請求項８】
前記更なる炭素源は指数関数的に増加する速度で加えられる、請求項２記載の方法。
【請求項９】
１つ以上の更なる栄養素が前記更なる炭素源と共に加えられる、請求項２記載の方法。
【請求項１０】
前記１つ以上の更なる栄養素はビタミン又はアミノ酸である、請求項９記載の方法。
【請求項１１】
前記培地はトリプシン大豆培地又は酵母増殖培地である、請求項１又は２記載の方法。
【請求項１２】
前記培地はタンパク質抽出物を含まない、請求項１又は２記載の方法。
【請求項１３】
前記培地は化学的に規定される、請求項１又は２記載の方法。
【請求項１４】
前記リステリアは弱毒化される、請求項１又は２記載の方法。
【請求項１５】
前記リステリアは異種ペプチドを組換えで発現する、請求項１又は２記載の方法。
【請求項１６】
前記異種ペプチドは腫瘍関連抗原である、請求項１５記載の方法。
【請求項１７】
前記腫瘍関連抗原はＥｐｈＡ２である、請求項１６記載の方法。
【請求項１８】
前記異種ペプチドは融合タンパク質である、請求項１５記載の方法。
【請求項１９】
リステリアベースのワクチンの製造方法であって、ａ）２．２よりも高いＯＤ$_{600}$を達成するのに十分な条件下及び十分な時間、培地でリステリア細胞の流加培養を行うこと、及びｂ）リステリアベースのワクチンを前記培地から回収することを含む、前記方法。
【請求項２０】
前記培養は前記リステリア培養が定常期に到達した後に更なる炭素源を給餌することを含む、請求項１９記載の方法。
【請求項２１】
約８．０より高いＯＤ$_{600}$が達成される、請求項１９又は２０記載の方法。

【請求項２２】
約１５．０より高いＯＤ$_{６００}$が達成される、請求項１９又は２０記載の方法。
【請求項２３】
約２５．０より高いＯＤ$_{６００}$が達成される、請求項１９又は２０記載の方法。
【請求項２４】
前記ＯＤ$_{６００}$は培地の濃縮なしに達成される、請求項１９、２０、２１、２２又は２３記載の方法。
【請求項２５】
前記炭素源はグルコース、酵母抽出物又はそれらの組合せである、請求項２０記載の方法。
【請求項２６】
前記更なる炭素源は指数関数的に増加する速度で加えられる、請求項２０記載の方法。
【請求項２７】
１つ以上の更なる栄養素が前記更なる炭素源と共に加えられる、請求項２０記載の方法。
【請求項２８】
前記１つ以上の更なる栄養素はビタミン又はアミノ酸である、請求項２７記載の方法。
【請求項２９】
前記培地はトリプシン大豆培地又は酵母増殖培地である、請求項１９又は２０記載の方法。
【請求項３０】
前記培地はタンパク質抽出物を含まない、請求項１９又は２０記載の方法。
【請求項３１】
前記培地は化学的に規定される、請求項１９又は２０記載の方法。
【請求項３２】
前記リステリアは弱毒化される、請求項１９又は２０記載の方法。
【請求項３３】
前記リステリアベースのワクチンは腫瘍関連抗原を含む、請求項１９又は２０記載の方法。
【請求項３４】
前記腫瘍関連抗原はＥｐｈＡ２である、請求項３３記載の方法。
【請求項３５】
前記リステリアベースのワクチンは融合タンパク質を含む、請求項１９又は２０記載の方法。
【請求項３６】
リステリアベースのワクチンの収量を高める方法であって、ａ）２．２よりも高いＯＤ$_{６００}$を達成するのに十分な条件下及び十分な時間、培地でリステリア細胞の流加培養を行うこと、及びｂ）リステリアベースのワクチンを前記培地から回収することを含み、前記リステリアベースのワクチンの収量は、同じリステリア細胞を用いたバッチ培養によって達成されるものと比較して少なくとも２倍高い、前記方法。
【請求項３７】
前記培養は前記リステリア培養が定常期に到達した後に更なる炭素源を給餌することを含む、請求項３６記載の方法。
【請求項３８】
前記収量は少なくとも３倍高い、請求項３６又は３７記載の方法。
【請求項３９】
前記収量は少なくとも５倍高い、請求項３６又は３７記載の方法。
【請求項４０】
（１）流加培養が行われたか、（２）２．２を超えるＯＤ$_{６００}$を有するリステリア培養物。

【請求項４１】
約８．０より高いＯＤ$_{６００}$を有する、請求項４０記載のリステリア培養物。
【請求項４２】
約１５．０より高いＯＤ$_{６００}$を有する、請求項４０記載のリステリア培養物。
【請求項４３】
約２５．０より高いＯＤ$_{６００}$を有する、請求項４０記載のリステリア培養物。
【請求項４４】
前記ＯＤ$_{６００}$は培地の濃縮なしに達成される、請求項４０、４１、４２又は４３記載のリステリア培養物。
【請求項４５】
前記リステリアは弱毒化される、請求項４０又は４１記載のリステリア培養物。
【請求項４６】
前記リステリアは異種ペプチドを組換えで発現する、請求項４０又は４１記載のリステリア培養物。
【請求項４７】
前記異種ペプチドは腫瘍関連抗原である、請求項４６記載のリステリア培養物。
【請求項４８】
前記腫瘍関連抗原はＥｐｈＡ２である、請求項４７記載のリステリア培養物。
【請求項４９】
前記異種ペプチドは融合タンパク質である、請求項４６記載のリステリア培養物。
【請求項５０】
少なくとも１００リットルである、請求項４０記載のリステリア培養物。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本出願は、本明細書に完全に参照により組み込まれている２００４年１０月１８日出願の米国仮出願第６０／６２０１３３号への優先権を請求する。
【０００２】
（1．発明の分野）
本発明は、高細胞密度のリステリアのバイオリアクター産生のための、流加法に関する。詳細には、本発明は、リステリアの高細胞密度増殖、特に２．２よりも高いＯＤ$_{６００}$を達成するのに十分な条件下及び十分な時間の、培地でのリステリア細胞の流加培養のための方法を提供する。ある実施態様では、流加培養は、前記リステリア培養が定常期に到達した後に、更なる炭素源を給餌することを含む。本発明は、更に、本発明の方法によって産生されるリステリアの高細胞密度培養物に関するものである。リステリアは、ワクチンで全細胞として用いることができる。
【背景技術】
【０００３】
（2．発明の背景）
リステリアモノサイトゲネス（リステリア）は、生得的及び適応性のＴ細胞依存性抗菌免疫を刺激するためのモデルとして長年研究されてきた、グラム陽性通性細胞内細菌である。細胞性免疫を効果的に刺激するリステリアの能力は、その細胞内生活環に基づく。宿主に感染すると、細菌はマクロファージ及び樹状細胞を含む貪食細胞によって、即座にファゴリソソームのコンパートメントに取り込まれる。大部分の細菌は、その後分解される。感染ＡＰＣのファゴソーム内での病原体のタンパク質分解から生じるペプチドはＭＨＣクラスＩＩ分子上へ直接加えられ、これらのＭＨＣＩＩ－ペプチド複合体は抗体産生を刺激するＣＤ４＋「ヘルパー」Ｔ細胞を活性化し、処理された抗原はクラスＩＩエンドソーム経路を通して抗原提示細胞の表面で発現される。酸性コンパートメント内では、ファゴリソソームを分解して生存リステリアが増殖する宿主細胞のサイトゾルコンパートメントに細菌を放出することができるコレステロール依存性シトリシンであるＬＬＯを含む、あ

る種の細菌遺伝子が活性化される。ＭＨＣクラスＩ経路を経た異種抗原の効率的な提示は、リステリアによる新規の内因性タンパク質発現を必要とする。抗原提示細胞（ＡＰＣ）内では、リステリアによって合成及び分泌されるタンパク質は、プロテアソームによって採取及び分解される。結果として生じるペプチドはＴＡＰタンパク質によって小胞体に運ばれ、ＭＨＣクラスＩ分子の上へ加えられる。ＭＨＣＩ－ペプチド複合体は細胞表面に送達され、それは十分な同時刺激（シグナル２）と組み合わさって、ＭＨＣＩ－ペプチド複合体を増殖した後に認識するために、コグネイトＴ細胞受容体を有する細胞傷害性Ｔリンパ球（ＣＴＬ）を活性化及び刺激する。

【０００４】

ＭＨＣクラスＩ及びクラスＩＩ抗原提示経路を通して強力なＣＤ４＋／ＣＤ８＋Ｔ細胞媒介反応の準備を整える(prime)その能力のために、リステリアは抗原特異性ワクチンでの用途のために開発されている。リステリアベースのワクチン及びリステリアで発現されるタンパク質などの製品は、臨床用途又は商用用途で利用できるようになってきているので、益々重要になっている。リステリアベースのワクチンは、結核菌（Mikiらの論文（2004, Infect Immun. 72:2014-21））、ヒト乳頭腫ウイルス（Sewellらの論文（2004, Arch Otolaryngol Head Neck Surg. 130:92-7））及びヒト免疫不全ウイルス（Liebermanらの論文（2002, Vaccine 20:2007-10））など、多種多様な病原体に対する利用可能性について研究されてきた。リステリアベースのワクチンは、様々な癌の治療及び予防のためにも研究されてきた。リステリアベースのワクチンは、正常な健常ボランティアの間でのヒト治験で、ワクチンのベクターとして最近試験された。

【０００５】

リステリアベースのワクチンの大規模での使用は、例えば十分な量のリステリアを得ることが困難なために、限定されている。リステリアの増殖のために今日利用できる方法は低密度（OD_{600}は約２．２未満）産生であり、したがって工程が長引き、治療的又は予防的な用途のために十分な量のリステリアを産生するために、原材料の非能率的な利用が要求されるものである。長引く産生工程は高い製造費用をもたらし、その結果利用できる療法への多くの個人のアクセスを制限し、リステリアベースのワクチンの供給不足をもたらすことにもなる。

【０００６】

細菌の大量産生は、一般に発酵槽又はバイオリアクターを含む。細菌の増殖のために今日利用できる方法としては、バッチ培養、連続培養及び流加法がある。しかし、これらの方法は、組換えタンパク質の調製で用いるために、大腸菌、酵母、シュードモナス属菌及び桿菌のために開発された。最近まで、リステリアは必要性がなかったため、大規模増殖の候補ではなかった。したがって、リステリアの大規模増殖のための最適条件は、まだ決定されていない。更に、大腸菌と異なりリステリアは無機窒素を用いるだけでは増殖できず、４種のビタミン（Welshimerの論文（1963, J. Bacteriol. 85:1156-1159））及び少なくとも１つのアミノ酸、すなわちシステイン（Tsaiらの論文（2003, Appl. Environ. Microbiol. 69:6943-6945））を外部から供給する必要がある。リステリアはＴＣＡサイクル全体を所有せず、炭素利用の柔軟性を制限する可能性のある「分割した経路」（Trivettらの論文（1971,J. Bacteriol. 107:770-779））を有する。

【０００７】

リステリアベースのワクチンの最近の発見は、リステリアの大規模産生に対する関心を引き起こした。したがって、リステリアの効率的な高収率増殖のための費用対効果の大きい方法の必要性が存在する。そのような方法はリステリアベースのワクチンを利用する療法に伴う医療費を低減させ、供給を改善し、したがって、一般大衆がそのような療法をより広く利用できるようにする。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【０００８】

（3．発明の要旨）

本発明は、流加培養法を用いる高細胞密度（例えば、約２．２より大きなＯＤ$_{600}$）のリステリアを産生するための方法に関するものである。本発明は、更に、流加法によって産生されるリステリアの高細胞密度培養物に関するものである。詳細には、本発明はリステリアの高細胞密度増殖、特に２．２よりも高いＯＤ$_{600}$を達成するのに十分な条件下及び十分な時間の、培地でのリステリア細胞の流加培養のための方法を提供する。ある実施態様では、流加培養は、前記リステリア培養が定常期に到達した後に、更なる炭素源で給餌することを含む。本発明の方法で用いることができる他のパラメーターとしては出発培養基、並びに他の炭素源と一緒に加えるタンパク質抽出物、アミノ酸及びビタミンなどの他の栄養素がある。一実施態様では、リステリア細胞は増殖が完了するかほぼ完了するまで、すなわち、培養が安定期に入るまでｐＨ制御されたバイオリアクターで増殖させ、その後、１つ又は複数の更なる栄養素を徐々に加える。本発明は、本発明の方法によって産生される培養物からリステリアを回収することによる、リステリアベースのワクチンの高収率産生のための特定の流加細胞培養法も提供する。

【０００９】

また本発明は、特に商業規模でのリステリアベースのワクチン産生の収率を増加させる方法に関するが、それには限定されない。本発明は、治験及び治療用途のために十分な多量のリステリアベースのワクチンを産生する際の問題点に対処する。また、本発明は、ワクチンの大規模産生（例えばベンチスケールより大きい）のコスト、時間及び効率を改善する。

【課題を解決するための手段】

【００１０】

ある実施態様では、本発明の培養方法は、増殖が完了するかほとんど完了するまでリステリア細胞を適当な細胞培養培地で培養し、任意選択で、少なくとも１つの更なる栄養素を徐々に追加することを含む。本発明の方法により、更なる炭素源の添加後、例えば更なる炭素源を添加してから２、３、４、５、６、８、１０又は１２時間後の測定で、培地のＯＤ$_{600}$は２．２、２．５、３．０、３．５、４．０、４．５、５．０、５．５、６．０、６．５、７．０、７．５、８．０、９．０、１０．０、１５．０、２０．０、２５．０、３０．０、３５．０より大きくなる。他の実施態様では、本発明の方法により、１．０×１０^{8}、５．０×１０^{8}、１．０×１０^{9}、５．０×１０^{9}、１．０×１０^{10}、１．４×１０^{10}、１．５×１０^{10}、２．０×１０^{10}、２．５×１０^{10}又は２．８×１０^{10}又はそれ以上のコロニー形成単位（ｃｆｕ）／ｍｌを含むリステリア培養物が生じる。一般には、追加する栄養素はグルコース、酵母抽出物又は両者の組合せなどの炭素源となる。それらには限定されないがビタミン混合物及びアミノ酸など、他の栄養素を加えることができる。阻害的有機酸の蓄積を予防するために、更なる炭素源を徐々に培地に加える。それは、一定速度で、次第に（徐々に、段階的に若しくは直線的に）速くして、又は指数関数的に増加する速度で加えることができる。好ましい一実施態様では、更なる炭素源は指数関数的に増加する速度で加えられる。

【００１１】

リステリアの増殖のために適当であればいかなる培地でも用いることができる。好ましい一実施態様では、培地はトリプシン大豆培地又は酵母増殖培地である。ある実施態様では、培地はタンパク質抽出物を含まない。他の実施態様では、培地は化学的に規定される。

【００１２】

本発明の方法は、天然であろうが組換え型であろうが任意のリステリア菌株の培養のために用いることができる。好ましい一実施態様では、リステリア菌株は弱毒化される。他の好ましい実施態様では、リステリア菌株は組換えにより異種ペプチドを発現する。ある実施態様では、異種ペプチドはＥｐｈＡ２などの腫瘍関連抗原である。異種ペプチドは、ＥｐｈＡ２などの腫瘍関連抗原を含む融合タンパク質でもよい。

【００１３】

本発明の方法は、リステリア細胞を培養するための当技術分野で公知のバッチ培養方法

と比較して、リステリアベースのワクチンの収率のかなりの向上をもたらす（例えば、少なくとも２倍、３倍、４倍、５倍、１０倍、１５倍又は２０倍の収率増）。

【００１４】

本発明は、培地OD_{600}が２．２、２．５、３．０、３．５、４．０、４．５、５．０、５．５、６．０、６．５、７．０、７．５、８．０、９．０、１０．０、１５．０、２０．０、２５．０、３０．０又は３５．０より大きな、リステリアの高細胞密度培養物を提供する。他の実施態様では、本発明は、$１．０×１０^{８}$、$５．０×１０^{８}$、$１．０×１０^{９}$、$５．０×１０^{９}$、$１．０×１０^{１０}$、$１．４×１０^{１０}$、$１．５×１０^{１０}$、$２．０×１０^{１０}$、$２．５×１０^{１０}$又は$２．８×１０^{１０}$又はそれ以上のコロニー形成単位（ｃｆｕ）／ｍｌを含むリステリア培養物を提供する。リステリア菌株は、天然のものでも又は組換え型でもよい。好ましい一実施態様では、リステリア菌株は弱毒化される。他の好ましい実施態様では、リステリア菌株は組換えにより異種ペプチドを発現する。ある実施態様では、異種ペプチドはＥｐｈＡ２などの腫瘍関連抗原である。異種ペプチドは、ＥｐｈＡ２などの腫瘍関連抗原を含む融合タンパク質でもよい。

【００１５】

３．１　定義

本明細書で使用するように、用語「バイオリアクター」は、いかなる種類のバイオプロセスを実行するために用いられる装置を意味し、その例としては、発酵槽又は酵素反応器がある。

本明細書で使用するように、用語「細胞培養培地」は、細胞を培養するために必ずしも十分ではないが適当な培地を意味する。

【００１６】

本明細書で使用するように、用語「化学的に規定された培地」又は「既知組成培地」は、その正確な組成が既知である、精製成分から調製された細胞培養培地を意味する。

本明細書で使用するように、用語「流加方法」は、培地を取り除かずに（蒸発及び試料採取によるものを除く）細胞を培養し、したがって、培養法の間用いる培地の総量は実質的に一定であるか、又は栄養素供給の追加により増加する培養方法を意味する。

【００１７】

本明細書で使用するように、用語「高密度」は、２．２、より好ましくは２．５、３．０、３．５、４．０、４．５、５．０、５．５、６．０、６．５、７．０、７．５、８．０、９．０、１０．０、１５．０、２０．０、２５．０、３０．０、３５．０より高いOD_{600}を意味する。ある実施態様では、OD_{600}は１１未満、１５未満、２０未満、２５未満又は３０未満である。培養物は、$１．０×１０^{８}$、$５．０×１０^{８}$、$１．０×１０^{９}$、$５．０×１０^{９}$、$１．０×１０^{１０}$、$１．４×１０^{１０}$、$１．５×１０^{１０}$、$２．０×１０^{１０}$、$２．５×１０^{１０}$又は$２．８×１０^{１０}$又はそれ以上のコロニー形成単位（ｃｆｕ）／ｍｌを含むことができる。ある実施態様では、ｃｆｕ／ｍｌは$１．３×１０^{９}$、$１．５×１０^{９}$、$２．０×１０^{９}$、$２．５×１０^{９}$、$３．０×１０^{９}$、$５．０×１０^{９}$、$１．０×１０^{１０}$、$１．４×１０^{１０}$、$１．５×１０^{１０}$、$２．０×１０^{１０}$、$５．０×１０^{１０}$又は$１．０×１０^{１１}$未満である。

【００１８】

本明細書で使用するように、用語「リステリアベースのワクチン」は、抗原性のペプチドを発現するように操作されたリステリア細菌、又はそのような細菌を含む組成物を指す。有効量で投与されると、リステリアベースのワクチンは抗原性ペプチドに対する免疫応答を誘発する。好ましい一実施態様では、リステリアはリステリアモノサイトゲネス（Listeria monocytogenes）である。

【００１９】

本明細書で使用するように、用語「タンパク質」はペプチド及びポリペプチドを含み、融合タンパク質並びにタンパク質、ポリペプチド及び抗体の断片（細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、細胞質ドメイン及び免疫グロブリンドメインなどのドメインを含む）を包含する。

【００２０】
本明細書で使用されているように、用語「対象」と「患者」は互換的に使用される。本明細書で使用されているように、対象は好ましくは哺乳類、例えば非霊長類（例えばウシ、ブタ、ウマ、ネコ、イヌ、ラット、その他）及び霊長類（例えばサル及びヒト）、最も好ましくはヒトである。
【発明を実施するための最良の形態】
【００２１】
（４．発明の詳細な説明）
本発明者は、本明細書で開示される流加法を用いることにより、リステリアの高細胞密度培養物が得られることを発見した。更に、培養されたリステリア細胞からのリステリアベースのワクチンの収量及び産生は、当技術分野で報告されている方法によって過去に得られたものよりも、大きく改善される。
【００２２】
本発明は、ｐＨ制御バイオリアクターで培養して、任意選択で培地を補完することによる、高細胞密度のリステリアを産生するための流加法に関するものである。培地の補完を含む実施態様では、初期培地で給餌が完了するかほとんど完了した後、１つ又は複数の追加の栄養素の給餌が開始される。この追加の給餌は、バイオリアクター内で、初期培地単独で達成されるものよりも高いリステリアの密度を可能にする。いかなる理論によっても縛られないが、追加の栄養素を徐々に給餌することは、細胞が過剰な炭素を乳酸などの抑制性有機酸の形成に流用することを予防すると考えられる。光学密度（６００ｎｍで測定）は、１５、３０、３９又はそれ以上にも達する可能性がある（以前の報告で得られた２．０に相似のOD_{600}と比較）。培養物は、1.0×10^{8}、5.0×10^{8}、1.0×10^{9}、5.0×10^{9}、1.0×10^{10}、1.4×10^{10}、1.5×10^{10}、2.0×10^{10}、2.5×10^{10}又は2.8×10^{10}又はそれより大きなコロニー形成単位（ｃｆｕ）／ｍｌを含むことができる。好ましい実施態様では、達成される光学密度及び／又はｃｆｕ／ｍｌ数値は、遠心又は濾過などのいかなる濃縮工程の前に得られる。
【００２３】
本発明の方法は、リステリア細胞の培養を含む流加培養法（小及び大規模、好ましくは大規模（例えば１００Ｌから１５０００Ｌの培地が細胞培養工程で用いられる））を含む。好ましい一実施態様では、リステリア細胞は異種タンパク質を発現する。好ましい一実施態様では、リステリア細胞はリステリアベースのワクチンとして用いることができる。リステリアベースのワクチンで用いられるものを含む、本発明の方法によって産生することができる例示的なタンパク質は、下のセクション４．３で列記する。更に、リステリアの用途は、下のセクション４．６で記載する。
【００２４】
具体的な実施態様において、本発明はリステリアベースのワクチンを含むリステリアを産生するための生産規模の方法を対象とし、その方法は、例えばOD_{600}による測定で従来法より高い細胞密度を達成する。これらの収率は、（ａ）培地総容積あたりのリステリアバイオマスの量が過去に報告された方法で達成されたものよりも多く、且つ／又は（ｂ）リステリアベースのワクチンの最終濃度は過去に報告されたものよりも高いという点で、先行技術の方法よりも改善されている。いかなる理論によっても制限されないが、以下の因子は個々に、また総合的に、本発明の方法の有意な利点に寄与する：（１）バイオリアクター操作パラメーター、例えば温度、ｐＨ、その他、（２）栄養素供給追加、（３）給餌タイミング、及び（４）それらの組合せ。
【００２５】
流加法は、通常、適当な細胞培養培地内のある量の細胞培養から開始する。その後、１つ又は複数の栄養素、例えばグルコースなどの炭素源及び／又は酵母抽出物、及び任意選択でビタミン類、アミノ酸など（「栄養素供給食物」は、これらの物質のいずれか又は全てを含むことができる）を含む餌が、培養物に定期的に加えられる。したがって、流加法

において、培養量は培地への追加物（例えば栄養素供給食物）だけによって増加する。

【００２６】

いくつかの栄養素は比較的低い濃度で細胞増殖を抑制するか、又は乳酸などの抑制性副産物を速やかに蓄積させることができる。更に、栄養素の消費は、組換えタンパク質の発現、その他のために、バッチ培養の過程で変動する可能性がある。追加の栄養素を徐々に給餌することは、細胞が過剰な炭素を抑制性有機酸の形成に流用することを予防する。したがって、流加培養法で行われるように培養法の過程で栄養素を徐々に加えることは、細胞培養収量を増加させる。ある実施態様では、本発明の方法は、抑制性副産物のレベル、１つ又は複数の炭素源のレベル、又は追加の補助食のレベルをモニターすることを含む。

【００２７】

本発明は、ワクチンの産生のためにリステリア細胞を培養することを含む。好ましい一実施態様では、リステリアモノサイトゲネスが用いられる。好ましい一実施態様では、リステリアモノサイトゲネスの弱毒菌株が用いられる。好ましい一実施態様では、抗原性のペプチドを発現するように組換えで操作されたリステリアモノサイトゲネスの菌株が用いられる。

【００２８】

リステリア細胞は、好ましくは、組換えＤＮＡ技術を通して例えばワクチンを発現するように操作された細胞の後代であり、そのワクチンをコードする核酸ポリマーがそのタンパク質の高発現を促進する異種調節領域に作動可能的に結合される。ワクチンの組換え産生の手法は、下のセクション４．２．３で提供される。

【００２９】

４．１　本発明の培養法

本明細書で記載される流加法は、リステリア細胞の流加培養のために当技術分野で通常用いる任意の槽又は容器、例えば試験管、フラスコ、ビン、又は限定ではなく例示が目的であるが撹拌槽若しくはエアーリフトバイオリアクター（懸濁反応器）などのバイオリアクターで実行することができる。

【００３０】

懸濁反応器は大規模な混合、細胞塊の直接採取、並びに温度、溶存酸素及びｐＨの正確なモニタリング及び制御を可能にする。撹拌槽反応器内では、細胞は高さと直径の比率が１：１から約３：１のステンレス鋼製容器内で増殖する。細胞培地は、翼のついた円盤又は海洋プロペラ型に基づく１つ又は複数の撹拌器で混合される。この系を用いて、細胞培養に十分な酸素を供給する様々な方法が開発された。より一般的な方法の１つは、培地内に直接空気又は酸素を散布することである。他の酸素供給法としては、中空糸膜通気装置を使用する無気泡ばっ気システムがある。培養微生物のためには、懸濁反応器が通常好ましい。

【００３１】

エアーリフト反応器では、ガス流体は細胞培養を混合及び通気する。エアーリフト反応器の高さと径の比は通常１０：１であり、撹拌槽のそれより大きい。エアーリフト反応器の利点の１つは、それらがモーター及び撹拌機を利用しないことである。更に、エアーリフト反応器は酸素伝達が比較的効率的であり、培養物に対するずり応力は撹拌槽型反応器より少ない。

バイオリアクターを用いない場合は、温度などの培養条件を維持するために当技術分野で用いるインキュベータなど任意の装置を用いることができる。

【００３２】

本明細書で記載される流加培養法は、５ｍｌから１５０００Ｌ、又はそれ以上の総量の使用培地（栄養素供給食物を含む）を使って実行することができる。より具体的には、リステリアの大量産生のために、本発明の方法は、５００から１５０００Ｌの総量の使用培地を使って実行することができる。本発明は、本発明の流加過程で用いる培地の総量は１リットル未満である具体的な実施態様において、ベンチスケール産生も企図する。本発明は、本発明の方法が１Ｌから５００Ｌの総量の培地（栄養素供給食物を含む）を使って実

行することができるように、本発明の方法の規模可変性も企図する。本発明の特定の実施態様では、本明細書で記載される流加培養法は、５ｍｌ、１０ｍｌ、２０ｍｌ、５０ｍｌ、１００ｍｌ、２００ｍｌ、５００ｍｌ、１Ｌ、２Ｌ、３Ｌ、４Ｌ、５Ｌ、１０Ｌ、１００Ｌ、５００Ｌ、１０００Ｌ、５０００Ｌ、１００００Ｌ又は１５０００Ｌの総量の使用培地（栄養素供給食物を含む）を用いて実行することができる。

【００３３】

リステリアの増殖に好適な当技術分野で公知の任意の細胞培養培地ならば、本発明で用いるために適当であり、当技術分野で公知の方法を使って決定することができる。一実施態様では、培地はトリプシン大豆ブロス又は酵母抽出物培地である。他の適当な培地としては、それらには限定されないが、脳心臓浸出物、リステリアフレーザー培地（Fraserらの論文（1988, J. Food Prot. 51:762-765））、その他がある。

【００３４】

ある実施態様では、培地はタンパク質抽出物を含む。好ましくは、培地がタンパク質抽出物を含む場合は、それは酵母タンパク質抽出物を含み、好ましくは、その培養法では他のいかなるタンパク質抽出物も使用されない。他の実施態様では、培地は小麦麦芽抽出物、米抽出物、エンドウマメ抽出物、綿実抽出物若しくは大豆抽出物などの植物タンパク質抽出物；それらには限定されないが哺乳類、鳥類、魚類、爬虫類及び両生類などの動物から得られる動物タンパク質抽出物；又は昆虫タンパク質抽出物を含む。好ましくは、本明細書で具体化されるタンパク質抽出物は、ヒト治療剤の産生に適当である。本発明に適当な酵母抽出物は、販売会社（例えばUniversal Flavors、イタリア国ミラノ、又はInvitrogen Corp.、カリフォルニア州Carlsbad）から得ることができる。好ましくは、酵母抽出物は乾燥粉末として又は無菌の液体として供給され、動物由来の成分を含まない製造工程を通して産生される。好ましい培地は、限外濾過イーストレート（Yeastolate）（２５ｇ／Ｌ）、無水ブドウ糖（１０ｇ／Ｌ）、KH_2PO_4（９ｇ／Ｌ）及び１０Ｎ　ＮａＯＨ（５ｍｌ／Ｌ）を含むInoculum Expansion Mediumである。より好ましい培地は、限外濾過イーストレート（２５g／L）、無水ブドウ糖（５ｇ／Ｌ）、KH_2PO_4（９ｇ／Ｌ）及び１０Ｎ　ＮａＯＨ（５ｍｌ／Ｌ）を含む種菌拡大培地（Inoculum Expansion Medium）である。

【００３５】

他の実施態様では、タンパク質抽出物を含まない既知組成培地が用いられる。既知組成培地は、Friedmanらの論文（1961, J. Bacteriol. 82:528-537）、Welshimerの論文（1963, J. Bacteriol. 85:1156-1159）、Trivettらの論文（1971, J. Bacteriol. 107:770-779）（Ｄ１０培地）、Ralovichらの論文（1977, Med. Microbiol. Immunol. 163:125-139）、Siddiqiらの論文（1989, Zentralblatt fur Bakteriologie 271:146-152）、Premaratneらの論文（1991, Applied Environ, Microbiol. 57:3046-3048）（ＭＷＢ）、Jonesらの論文（1995, J. Appl. Bacteriol. 78:66-70）及びTsaiらの論文（2003, Appl. Environ. Microbiol. 69:6943-6945）（ＨＴＭ培地）で記載され、これらの全ては本明細書に参照により完全に組み込まれている。任意選択で、用いる特定のリステリア菌株によって、追加のアミノ酸又はビタミン補助剤を加えることができる。

【００３６】

初期のスターターカルチャーは、任意の適当な培地を用いてリステリアの小培養物（例えば１ｍｌ、５ｍｌ、１０ｍｌ、５０ｍｌ、１００ｍｌ、２５０ｍｌ又は５００ｍｌ）を接種することによって調製される。通常、接種時で少なくとも１．０～２．０又は４．０若しくは５．０までのOD_{600}の接種材料密度が望ましい。

【００３７】

培養で用いる槽又は容器内の細胞培養培地を、次に、当技術分野で公知の任意の手法を用いて本発明における使用に適当なリステリア細胞で接種する。温度、ｐＨ、撹拌、エアレーション及び接種材料密度は変えることができるが、以下のパラメーターは例示のために示され、限定するものではない。細胞培養は、２５から４５℃の間、又は３０から４５℃の間の温度に維持しなければならない。好ましい一実施態様では、温度は３６から３９

℃の間、より好ましくは３７℃から３８℃の間で維持され、より好ましい実施態様においては、温度は３７℃に維持される。更に、培地のｐＨは６．０から８．０の間にあるように、培養工程中モニターしなければならない。本発明の好ましい一実施態様において、ｐＨは６．８から７．６の間、より好ましくは７．０から７．４の間で維持しなければならない。通常、適当なｐＨ、好ましくは７．０から７．３の間のｐＨを維持するために、水酸化アンモニウム、水酸化ナトリウム又は重炭酸ナトリウムを培地に加えることができる。好ましい一実施態様では、適当なｐＨを維持するために水酸化ナトリウムが培地に加えられる。細胞が増殖の最大能力を発揮して、ことによると抑制性の有機酸の産生をしばしば伴う嫌気的代謝を避けることを確実にするために、溶存酸素は高濃度に維持される。培養内で約２０～８０％、好ましくは約４０～６０％、より好ましくは約５０％の空気飽和溶存酸素濃度を維持するために、十分なエアレーションを提供する。

【００３８】

リステリア細胞は、静的に、又は振盪により増殖させることができる。好ましい一実施態様では、細胞は振盪される。特定の実施態様では、インペラ駆動混合がこれらの培養方法のために用いられる。他の実施態様では、インペラ回転速度は約５０～２００ｃｍ／秒先端速度、最大で５００ｃｍ／秒、好ましくは約１００ｃｍ／秒先端速度、より好ましくは２００～３００ｃｍ／秒である。他の実施態様では、エアーリフト又は他の混合／ばっ気システムを用いることができる。いくつかの実施態様では、培養は静的である。

【００３９】

バイオリアクター又は他の培養容器からのリステリア細胞は、バイオリアクター又は他の容器の接種から２、３時間から３日以降の間に収集することができるが、培地の接種から１日から２日の間が好ましい。

【００４０】

４．１．１　栄養素の追加

細胞の培養の間、追加の細胞並びに任意の異種ペプチドを産生するために栄養素が消費される。リステリア細胞の高細胞密度の増殖を誘導するだけでなく栄養素の消耗に対処するために、ある実施態様では、１つ又は複数の「栄養素供給食物」がバイオリアクターに加えられる。好ましい一実施態様では、リステリア細胞の増殖が完了するかほとんど完了したとき、すなわち安定期に入ったときに追加の栄養素がバイオリアクターに加えられる。好ましくは、追加の栄養素は、グルコースなどの炭素源である。他の適当な炭素源としては、それらには限定されないが、ブドウ糖、フルクトース、グリセリン、マンノース、トレハロース、セロビオース、マルトース、グルコサミン、Ｎ－アセチルグルコサミン及びＮ－アセチルムラミン酸がある。炭素源は、炭水化物、アミノ酸及びビタミンの混合物を含む複合栄養源、例えば先に述べたようなタンパク質抽出物の部分でもよい。好ましいタンパク質抽出物は、酵母抽出物である。炭素源の組合せも使うことができる。

【００４１】

一部の成分の濃度が高過ぎると有毒になる可能性があるので、栄養素供給食物は通常、増殖周期の間複数の用量で加えられるか、徐々に加えられる。栄養素の漸次添加とは、栄養素が一度に加えられないことを意味する。既知組成培地を用いるならば、細胞代謝能の低下のために、供給食物の添加速度は遅くする必要があるかもしれない。栄養素は２、３、４、５、６、７、８、９、１０又はそれ以上に分割して加えることができる。栄養素は０．５、１．０、２．０、５．０、１０．０、２５．０ｍｌ／時間若しくはそれ以上、又は約０．５～２００ｍｌ／時間、０．５～１００ｍｌ／時間、１．０～５０ｍｌ／時間、２．０～２５ｍｌ／時間の流速で連続的に加えることもできる。

【００４２】

連続的に加えるとき、栄養素は一定速度で、段階的に増加する速度で、直線的に増加する速度で、又は指数関数的に増加する速度で加えることができる。好ましくは、過度の給餌を行わずに過剰分が抑制性有機酸の産生に回されるように、栄養素を指数関数的に増加する速度で加えて有効栄養素を増加させる。これらの影響を最小にするために、グルコース濃度は１．０ｇ／Ｌ未満に維持される。ある実施態様では、増加速度は特定の倍加時間

を与えるように計算することができる。

【００４３】

栄養素供給食物は、アミノ酸及び／又はビタミンを任意選択で含むこともできる。通常、栄養素供給食物の総量は、ベース培地の量の５～４０％、５～１５％である。好ましくは、栄養素供給食物の量は、ベース培地の量の２５～３３％又は１０％未満である。アミノ酸及びビタミンは、濃縮液で加えられる。好ましい一実施態様では、供給食物は１００ｍｇ／Ｌビオチン、１ｇ／Ｌリボフラビン、１ｇ／Ｌチアミン及び１ｍｇ／Ｌチオクト酸を含む１０００倍のビタミン溶液を使って調製される。加えられる１００倍のアミノ酸溶液は、１００ｍｇ／Ｌロイシン、７７ｍｇ／Ｌシステイン、並びにイソロイシン、バリン、メチオニン、アルギニン及びヒスチジンをそれぞれ２００ｍｇ／Ｌ含む。他の適当な濃縮液は、当業者ならば決定することができる。

希少金属及びミネラルも、バッチ培地に存在する量を超えて加えることができる。これらは、一度の補助食品として又は供給食物への添加物として加えることができる。好ましい添加物は、硫酸マグネシウムである。

【００４４】

適当な濃度の栄養素を維持するために、複数の栄養素供給食物を細胞に投与することができる。例えば、細胞培養の接種の後、栄養素供給食物を細胞培養に対して２、３時間に１回、１日１回、３６時間に１回、又は２日に１回投与することができる。本発明の培養方法は、１から９の栄養素供給食物を、又は必要に応じてそれ以上でも利用することができる。

ある実施態様では、栄養素供給がより早く開始されるように、バッチ培地中のグルコースの量を低減することが好ましい。このように、好ましい栄養素供給食物、例えば酵母抽出食の存在下で全てのバッチ相が起こり、より速い増殖が維持される。

【００４５】

４．１．２　タイミング

ある実施態様では、本発明の方法は、初期培地内の増殖が完了するかほとんど完了するときに、１つ又は複数の栄養素を添加することを含む。OD_{600}及び／又は生細胞濃度（ｃｆｕ／ｍｌで測定される）が増加を停止するかその増加速度が低下して好ましくない栄養への変換を示すときに、増殖は完了するかほとんど完了すると考えられる。

【００４６】

細菌増殖は、当業者に公知の標準の方法、例えばそれには限定されないが、６００ｎｍでの光学密度（OD_{600}）で測定することができる。細菌増殖は核酸比率（Milnerらの論文（2001, Microbiol. 147:2689-2696））を測定することによって測定することもできる。

培地内の炭素源のレベルがあるレベル以下に下がるときは、グルコースなどの炭素源を加えることもできる。例えば、グルコースレベルが５．０、４．５、４．０、３．５、３．０、２．５ｇ／Ｌ又はそれ以下に低下するときは、追加の栄養素を加えることができる。

【００４７】

４．２　リステリア菌株

４．２．１　野生型リステリア菌株

本発明の方法では、野生型リステリア菌株を用いることができる。好ましい一実施態様では、リステリア菌株はリステリアモノサイトゲネスである。

【００４８】

４．２．２　弱毒化リステリア

野生型リステリア菌株を本発明の方法で用いることができるが、ヒト対象への投与などの用途で用いられる好ましいリステリア菌株は、例えばそれらの組織屈性（例えばｉｎｌＢ突然変異体）又は細胞から細胞へ伝播する能力（例えばａｃｔＡ突然変異体）が弱毒化される。

【００４９】

ヒト及び動物の治療でリステリアの安全な使用を可能にするために、細菌は疾患を引き起こすそれらの病原性が弱毒化されるのが好ましい。最終結果は、患者へのリステリアの投与に起因する毒性ショック又は他の副作用のリスクを低下させることである。そのような弱毒化リステリアは、いくつかの手法によって単離することができる。そのような方法としては、微生物の抗生物質感受性菌株の使用、微生物の突然変異誘発、病原性因子を欠いている微生物突然変異体の選択、及び細胞壁リポポリサッカライドが変化した新しい微生物菌株の構築がある。

【００５０】

ある実施態様では、病原性のために宿主細胞、特にマクロファージ及び好中球内でのリステリアの生存を保証する病原因子をコードするＤＮＡ配列の、例えば相同組換え手法及び化学的又はトランスポゾン突然変異による欠失又は破壊によってリステリアを弱毒化することができる。研究された病原性因子の全てではないが多くはマクロファージ内での生存と関連し、これらの因子は酸性化などのストレスのためにマクロファージ内で特異的に発現されるか、又は、マクロピノサイトーシスなどの特異的な宿主細胞反応を誘導するのに用いられる（Fieldsらの論文（1986. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:5189-5193））。

【００５１】

弱毒化表現型を保証する方法として、また非弱毒化表現型への復帰を避けるために、例えばリピドＡ産生経路における変異並びに１つ又は複数の栄養素若しくは代謝産物への栄養素要求性、例えばウラシル生合成、プリン生合成及びアルギニン生合成の１つ又は複数の変異など、２つ以上の方法で弱毒化されるようにリステリアを操作することができる。

【００５２】

本発明の好ましい一実施態様では、弱毒化細菌の起こす炎症反応は、感染マウスでの測定で野生型株より例えば少なくとも５０％、好ましくは７０％、より好ましくは９０％少ない。

好ましい一実施態様では、弱毒化細菌は、野生型株と同程度の効率で宿主に侵入して感染細胞のサイトゾル内に放出されるリステリアモノサイトゲネスの突然変異体であるが、それは病原性でなく、すなわち疾患を引き起こさない。

【００５３】

４．２．３　組換えリステリア－構築物

当業者ならば、異種遺伝子発現カセットの構築のための使用に適当である、様々なプラスミド構築骨格が入手可能であることを認めよう。細菌染色体又は染色体外エピソームからの異種遺伝子の発現が所望であるかに基づき、特定のプラスミド構築骨格が選択される。付属配列を含むリステリアベースのワクチンの構築は、「ＥｐｈＡ２ワクチン」との表題でそれぞれ２００３年１２月２４日、２００４年８月１８日、２００４年１０月１日及び２００４年１０月７日に出願の米国特許仮出願６０／５３２６９６、６０／６０２５８８、６０／６１５５４８及び６０／６１７５６４、「リステリアベースのＥｐｈＡ２ワクチン」との表題で２００４年３月２６日、２００４年１０月１日及び２００４年１０月７日に出願の米国特許仮出願６０／５５６６３１、６０／６１５４７０及び６０／６１７５４４、並びに国際公開２００５／０６７４６０及び国際公開２００５／０３７２３３で詳細に提供され、それぞれは本明細書に参照により完全に組み込まれている。

【００５４】

関心のタンパク質をコードするヌクレオチド配列は、当業者が利用できるいかなる配列情報源からでも得られる（例えば、Genbankから、文献から、又は通常のクローニングにより）。関心のタンパク質をコードするＤＮＡは、次に、ＤＮＡ増幅、分子クローニング又は化学合成によって構築することができる。タンパク質をコードするヌクレオチド配列は、当業者に公知の方法を使って、適当な発現ベクター、すなわち挿入されたタンパク質のコード配列の転写及び翻訳のために必要な要素を含むベクターへ挿入することができる。これらの方法としては、例えば、インビトロ組換えＤＮＡ技術、合成手法及びインビボ遺伝子組換えがある。例えば、Sambrookらの著書（2001, Molecular Cloning: A Laborat

ory Manual, 第３版, Cold Spring Harbor Laboratory Press）及びAusubelら（2001, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons）を参照。或いは、ＥｐｈＡ２抗原性ポリペプチド配列をコードすることができるＲＮＡは、例えば、シンセサイザー（例えばOligonucleotide Synthesis, 1984, Gait, M.J.編, IRL Press, Oxfordで記載される手法を参照）を使って化学的に合成することができる。

具体的な実施態様において、タンパク質の発現は構成プロモーターによって調節される。他の実施態様では、タンパク質の発現は誘導可能なプロモーターによって調節される。

【００５５】

ペプチド、ポリペプチド、タンパク質又は融合タンパク質をコードする遺伝子のインサートを含む発現ベクターは、（ａ）核酸ハイブリダイゼーション、（ｂ）「マーカー」遺伝子機能の有無、及び（ｃ）挿入配列の発現、の３つの一般手法によって特定することができる。第１の手法では、発現ベクター内でのペプチド、ポリペプチド、タンパク質又は融合タンパク質をコードする遺伝子の存在は、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質又は融合タンパク質をコードする挿入遺伝子とそれぞれ相同性である配列を含むプローブを使って、核酸ハイブリダイゼーション法によって検出することができる。第２の手法では、組換えベクター／宿主系は、ベクター内でのポリペプチド又は融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列の挿入に起因するある種の「マーカー」遺伝子機能の有無に基づいて、特定及び選択することができる。例えば、融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列がベクターのマーカー遺伝子配列内に挿入される場合、融合タンパク質インサートをコードする遺伝子を含む組換え体はマーカー遺伝子機能の欠如によって特定することができる。第３の手法では、組換え発現ベクターは組換え体によって発現される遺伝子産物（例えば融合タンパク質）を分析することによって特定することができる。そのような分析は、例えば、インビトロアッセイ系で融合タンパク質の物理的又は機能的特性に基づいて行うことができる。

【００５６】

非限定例として、リステリアモノサイトゲネス（リステリア）の細菌染色体への異種遺伝子発現カセットの組込みは、リステリア染色体へのベクターの配列特異的組込みを触媒するリステリオファージインテグラーゼのための発現カセットを含む組込み型ベクターで達成される。例えば、ｐＰＬ１及びｐＰＬ２として知られる組込み型ベクターは、細菌ゲノムの無害領域内の異種タンパク質（例えばＥｐｈＡ２抗原性ペプチド）発現カセットの安定的単一コピー組込みをプログラムし、それらは文献（Lauerらの論文（2002, J. Bacteriol. 184:4177-4178））に記載されている。組込み型ベクターは大腸菌内でプラスミドとして安定であり、コンジュゲーションを通して所望のリステリアバックグラウンドに導入される。各ベクターはリステリア特異的複製起点を欠き、ファージインテグラーゼをコードするので、ベクターは染色体のファージ付着部位に組み込まれたときだけ安定する。所望のプラスミド構築物から出発すると、所望のタンパク質を発現する組換えリステリア菌株を生成する過程は約１週を要する。ｐＰＬ１及びｐＰＬ２組込み型ベクターは、それぞれ、Ｕ１５３及びＰＳＡリステリオファージに基づく。ｐＰＬ１ベクターはｃｏｍＫ遺伝子の読取り枠内に組み込まれ、ｐＰＬ２は遺伝子の元の配列が組込みの成功後に復元されるようにｔＲＮＡ　Ａｒｇ遺伝子内に組み込まれ、したがってその元の発現機能がそのまま保たれる。ｐＰＬ１及びｐＰＬ２組込み型ベクターは、異種タンパク質発現カセットを含むプラスミドの構築を促進するために、マルチクローニングサイト配列を含む。或いは、リステリア染色体への抗原性ペプチド発現カセットの組込みは、当業者に公知の対立遺伝子の交換法を通して達成することができる。詳細には、異種遺伝子発現カセットを含む構築物の一部として抗生物質耐性タンパク質をコードする遺伝子を組み込まないことが望まれる組成物では、対立遺伝子の交換法が望ましい。例えば、ｐＫＳＶ７ベクター（Camillらの論文（1993, Mol. Microbiol. 8:143-157））は温度感受性リステリアグラム陽性菌複製起点を含み、それはリステリア染色体へ組み込まれたｐＫＳＶ７プラスミドに相当する組換え体クローンを非許容温度で選択するために利用される。ｐＫＳＶ７対立遺伝子交換プラスミドベクターは、異種タンパク質発現カセットを含むプラスミドの構築を促

進するためにマルチクローニングサイト配列を、また、クロラムフェニコール耐性遺伝子も含む。リステリア染色体への挿入のために、異種抗原性ペプチド発現カセット構築物は、所望の組込みの正確な位置に対応する約１ｋｂの染色体ＤＮＡ配列に最適に隣接されている。ｐＫＳＶ７－異種タンパク質発現カセットプラスミドは、グラム陽性菌のエレクトロポレーションのための標準の方法に従って、エレクトロポレーションによって所望の細菌菌株に最適に導入される。つまり、ｐＫＳＶ７－異種タンパク質発現カセットプラスミドでエレクトロポレーションされた細菌は、クロラムフェニコール（１０μｇ／ｍｌ）を含むＢＨＩ寒天培地上での平板培養によって選択され、３０℃の許容温度でインキュベートされる。細菌染色体への単一のクロスオーバー組込みは、いくつかの個々のコロニーをクロラムフェニコールを含む培地で４１℃の非許容温度で複数世代にわたって経代培養することによって選択される。最後に、プラスミドの切出し及びキュアリング（二重クロスオーバー）が、いくつかの個々のコロニーをクロラムフェニコールを含まないＢＨ１培地で３０℃の許容温度で複数世代にわたって経代培養することによって達成される。細菌染色体への異種タンパク質（例えばＥｐｈＡ２－抗原性ペプチド）発現カセットの組込みの検証は、異種タンパク質発現カセット内からの既定の領域をｐＫＳＶ７プラスミドベクター構築物に含まれない細菌染色体標的配列に増幅するプライマー対を利用して、ＰＣＲによって遂行することができる。

【００５７】

他の組成物では、安定したプラスミドエピソームから異種タンパク質を発現することが望まれるかもしれない。複数世代にわたる経代培養を通してのプラスミドエピソームの維持は、プラスミド含有細菌に選択的優位性を与えるタンパク質の共発現を必要とする。それには限定されない例として、プラスミドから異種タンパク質と一緒に共発現されるタンパク質はクロラムフェニコールなどの抗生物質耐性タンパク質、又は、選択的優位性を与えることができる細菌タンパク質（野生型細菌で染色体から発現される）でもよい。細菌タンパク質のそれには限定されない例としては、プリン若しくはアミノ酸の生合成に必要な酵素（関連するアミノ酸若しくは他の必要な前駆体高分子を欠く既定培地での選択）、又は、インビトロ又はインビボで選択的優位性を与える遺伝子の発現に必要な転写因子（Gunnらの論文（2001，Ｊ．Immuol．167:6471-6479））がある。それには限定されない例として、ｐＡＭ４０１は、多様なグラム陽性細菌属において選択された異株タンパク質のエピソーム発現のための適当なプラスミドである（Wirthらの論文（1986，Ｊ．Bacterial 165:831-836））。

【００５８】

４．３　発現されるタンパク質

本発明の方法は、組換えにより異種タンパク質を発現するように設計されていない野生型又は弱毒化菌株のために用いられることは当然である。例えば、大量のリステリアを市販のために作ることができる。また、非特異性抗原効果は、リステリアが腫瘍増殖を減速するアジュバント効果を有することを示した（Panらの論文（1999，Cancer Res．59:5264-5269））。

本発明の好ましい実施態様では、本発明の方法は、リステリアベースのワクチンとしての用途を含む、異種タンパク質を産生するために用いられる。

【００５９】

上記のように、ある実施態様において、本発明は抗原性ペプチドを発現するように操作されたリステリアの使用に関するものである。いかなる機構によっても束縛されないが、そのようなリステリアは、抗原性ペプチドの過剰発現を伴う疾患を有する対象へ投与された後に、その抗原性ペプチドに対する免疫応答を誘発して、その内因性の抗原に対する細胞性又は体液性の免疫応答をもたらすことができる。

【００６０】

原則的に、本発明の方法及び組成物で用いられる抗原性ペプチド（「抗原性ポリペプチド」と称すこともある）は、過剰増殖性障害に関係する抗原発現細胞に対して免疫応答の誘発が可能な、任意の抗原性ペプチドでよい。したがって、抗原性ペプチドは、（１）抗

原性（抗抗原抗体と結合するかそれとの結合をめぐって抗原と競合する能力）を示すか、（２）抗原の免疫原性（抗原に結合する抗体を生成する能力）を示すか、又は（３）抗原の１つ又は複数のエピトープを含む、完全長ポリペプチド又は抗原性ポリペプチドの断片若しくは誘導体でよい。

【００６１】

ある実施態様では、ペプチドは、癌細胞では露出するが非癌細胞では遮蔽されている抗原エピトープと対応するか、それを含む。好ましい一実施態様では、抗原性ペプチドは、癌細胞上で選択的に露出若しくは増加するが非癌化細胞ではそうではないエピトープを、優先的に抗原上に含む。

【００６２】

本発明は、本発明の組成物及び方法において、更に複数の抗原性ペプチドの使用を包含する。

本発明の方法及び組成物で有用な抗原の断片は、アミノ酸配列の中でアミノ酸残基の欠失、付加又は置換を含むことができる。好ましくは、変異は潜在的変化をもたらし、したがって機能的に同等な抗原を生じる。

【００６３】

本発明の方法は、多種多様なタンパク質、例えばそれらには限定されないが、可溶タンパク質、分泌タンパク質、膜貫通タンパク質、細胞内タンパク質、サイトカイン、サイトカイン受容体、転写因子、シグナル伝達因子、ＤＮＡ結合タンパク質、ＲＮＡ結合タンパク質、キナーゼ、毒素及び抗体分泌タンパク質の産生のために用いることができ、本発明の組成物はそれらを含むことができる。

【００６４】

本発明の流加培養方法を用いて産生されるか、本発明の組成物に含まれるタンパク質は、本明細書又は先行技術で開示されている手法を使って回収及び精製することができる。

タンパク質は、いかなる種類の動物、例えば非霊長類及び霊長類（例えばヒト）などの哺乳類、並びに感染性の生物（例えばウイルス、細菌、寄生虫及び真菌類）からのものであってもそれらに由来してもよい。

【００６５】

タンパク質、ポリペプチド及び抗体の断片（細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、細胞質ドメイン、免疫グロブリンドメインなどのドメインを含む）も、本発明の方法によって産生することができるか本発明の組成物に含まれてもよい。

以下のセクションは、本発明によって産生することができるか本発明の組成物に含ませることができるタンパク質のリストを、限定ではなく例示のために提供する。

【００６６】

４．３．１　腫瘍関連抗原

腫瘍関連抗原は、Berzofskyらの論文（2004, J. Clin. Invest. 113:1515-1525）及びSrinivasanらの論文（2004, J. Transl. Med. 2:12-23）で概説されており、これらは本明細書に参照により完全に組み込まれている。他の腫瘍関連抗原の例としては、それらには限定されないが、黒色腫のチロシナーゼ、前立腺癌のＰＳＡ及びＰＳＭＡ、並びにリンパ腫におけるｂｃｒ／ａｂｌなどの染色体クロスオーバーがある。しかし、特定された多くの腫瘍関連抗原は複数の腫瘍型で見られ、実際に形質転換事象を引き起こす腫瘍発生タンパク質などいくつかは、ほとんど全ての腫瘍型で見られる。例えば、ｐ５３及びＨＥＲ－２／ｎｅｕなどの細胞増殖及び分化を制御する通常の細胞タンパク質は、変異を蓄積してこれらの遺伝子産物の発現のアップレギュレーションをもたらすことができ、それによりそれらは発癌性になる（McCarteyらの論文（Cancer Research 1998 15:58 2601-5）、Disisらの論文（Ciba Found. Symp. 1994 187:198-211））。これらの変異タンパク質は、複数の種類の癌における腫瘍特異性免疫応答の標的となることができる。腫瘍ウイルスからの形質転換タンパク質、例えばＨＰＶからのＥ６及びＥ７又はエプスタインバーウイルス（Epstein Barr virus（ＥＢＶ））からのＥＢＮＡ１は多くの腫瘍型で見られ、複数の種類の癌における腫瘍特異性免疫応答の標的となることができる（McKaigらの論文（Head N

eck 1998 20（3）：250-65）、Punwaneyらの論文（Head Neck 1999 21（1）：21-9）、Serthらの論文（Cancer Res. 1999 15:59（4）：823-5）、Pagano, J. S.の論文（Proc. Assoc. Am. Physicians 1999 111（6）：573-80））。ＭＡＧＥ及びＭＵＣファミリーなどの非腫瘍発生性の宿主タンパク質も遍在する。具体的には、ＭＡＧＥファミリーの抗原は、乳癌、肺癌、食道癌、肝癌、甲状腺癌、神経芽細胞腫、胃癌、多発性骨髄腫及び黒色腫を含む多くの異なる癌で発見された（Gillespie, A. M.及びColeman, R. E.の論文（Cancer Treat. Rev. 1999 25（4）：219-27））。ＭＵＣファミリーの抗原は、卵巣／子宮内膜癌、乳癌、多発性骨髄腫、膵臓癌及び結腸／直腸癌と関連していた（Segal-Eiras, A.及びCroce, M. V.の論文（1997, Allergol. Immunopathol. 25（4）：176-81））。

【００６７】

好ましい一実施態様では、腫瘍関連抗原はＥｐｈＡ２である。ＥｐｈＡ２は成人の上皮で発現される１３０ｋＤａの受容体チロシンキナーゼであり、そこでは低レベルで見られるが細胞間接着部位内では高濃度である（Zantekらの論文（1999, Cell Growth & Differentiation 10:629）、Lindbergらの論文（1990, Molecular & Cellular Biology 10:6316））。この細胞下局在化は重要であり、その理由はＥｐｈＡ２が細胞膜に固定されるリガンド（エフリンＡ１からＡ５として知られる）と結合するからである（Eph Nomenclature Committee, 1997, Cell 90:403）、Galeらの論文（1997, Cell & Tissue Research 290:227）。リガンド結合の第１の結果は、ＥｐｈＡ２自己リン酸化である（Lindbergらの論文（1990）、前掲）。しかし、他の受容体チロシンキナーゼと異なり、ＥｐｈＡ２は、リガンド結合又はホスホチロシン含量が存在しないときも酵素活性を保持する（Zantekらの論文（1999）、前掲）。ＥｐｈＡ２は、攻撃的な癌細胞を含む多数の過剰増殖性細胞上で上方制御される。

【００６８】

他の実施態様では、哺乳類で同定された他のＥｐｈ受容体（ＥｐｈＡ１、ＥｐｈＡ３、ＥｐｈＡ４、ＥｐｈＡ５、ＥｐｈＡ６、ＥｐｈＡ７、ＥｐｈＡ８、ＥｐｈＢ１、ＥｐｈＢ２、ＥｐｈＢ３、ＥｐｈＢ４、ＥｐｈＢ５及びＥｐｈＢ６）のいずれか又はエフリンリガンド（エフリンＡ１、エフリンＡ２、エフリンＡ３、エフリンＡ４、エフリンＡ５、エフリンＢ１、エフリンＢ２及びエフリンＢ３）のいずれかを用いることができる（例えば、Zhouらの論文（1998, Pharmacol. Ther. 77:151-181）を参照）。

【００６９】

４．３．２　サイトカイン

リステリアはサイトカインを産生することができることが示された（Gossenらの論文（1995, Biologicals, 23:135-43））。サイトカインの例としては、それらには限定されないが、インターロイキン（「ＩＬ」）－１、ＩＬ－２、ＩＬ－３、ＩＬ－４、ＩＬ－５、ＩＬ－６、ＩＬ－７、ＩＬ－８、ＩＬ－９、ＩＬ－１０、ＩＬ－１１、ＩＬ－１２、ＩＬ－１３、ＩＬ－１４、ＩＬ－１５、ＩＬ－１６、ＩＬ－１７、ＩＬ－１８、ＩＬ－１９、ＩＬ－２０、ＩＬ－２１、ＩＬ－２２、ＩＬ－２３、インターフェロン（「ＩＦＮ」、例えばＩＦＮ－α、ＩＦＮ－β及びＩＦＮ－γ）、腫瘍壊死因子（「ＴＮＦ」、例えばＴＮＦ－α及びＴＮＦ－β）、神経成長因子（「ＮＧＦ」）、血小板由来成長因子（「ＰＤＧＦ」）、上皮成長因子（「ＥＧＦ」）、組織プラスミノーゲンアクチベータ（「ＴＰＡ」、例えばＡＣＴＩＶＡＳＥ（登録商標）（アルテプラーゼ）及びＴＮＫａｓｅ（商標）（テネクテプラーゼ）、Genentech）、血管内皮細胞増殖因子（「ＶＥＧＦ」）、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（「ＧＭ－ＣＳＦ」）、顆粒球コロニー刺激因子（「Ｇ－ＣＳＦ」；ＮＥＵＰＯＧＥＮ（登録商標）（フィルグラスチム、Amgen）及びNEULASTA（商標）（ペグフィルグラスチム、Amgen）のメチオニルヒトＧ－ＣＳＦ成分を含む）、線維芽細胞成長因子（「ＦＧＦ」、例えば、酸性ＦＧＦ及び塩基性ＦＧＦ）、エリスロポエチン（「ＥＰＯ」、例えば、ＥＰＯＧＥＮ（登録商標）（エポエチンアルファ）及びＡＲＡＮＥＳＰ（登録商標）（ダーベポエチンアルファ）、Amgen）、成長ホルモン（「ＧＨ」）、成長ホルモン放出ホルモン（「ＧＨＲＨ」）、ＢＮＤＦ、結合組織成長因子（「ＣＴＧＦ」）及びコルチコトロピン放出因子がある。

【００７０】
４．３．３　ウイルスタンパク質
ワクチン反応を導き出すために有用なウイルスタンパク質の例としては、それらには限定されないが、インフルエンザ核タンパク質（Panらの論文（1999, Cancer Res. 59:5264-5269））、ヒト乳頭腫ウイルス核タンパク及びリンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス（ＬＣＭＶ）核タンパク質、及びｇａｇなどのＨＩＶタンパク質がある。
他のウイルス標的としては、呼吸器合胞体ウイルス（respiratory syncytial virus（ＲＳＶ）、ヒト乳頭腫ウイルス(human papillomavirus（ＨＰＶ））、Ｃ型肝炎ウイルス(hepatitis C virus（ＨＣＶ））、ヒトメタニューモウイルス(Human metapneumovirus（ｈＭＰＶ））、パラインフルエンザウイルス(parainfluenza virus（ＰＩＶ））、重症急性呼吸器症候群(Severe Acute respiratory Syndrome（ＳＡＲＳ）)がある。
【００７１】
４．３．４　融合タンパク質
本発明のある実施態様では、リステリアベースのワクチンは融合タンパク質である抗原性ペプチドを発現する。したがって、本発明は抗原性ペプチドが異種ペプチドなどの異種成分と動作可能に結合した抗原の全て、又は断片、又は誘導体を含む融合タンパク質である、組成物及び方法を包含する。異種成分としては、それらには限定されないが、融合タンパク質の単離及び精製を促進する配列がある。異種成分としては、抗原性ペプチドに安定性を付与する配列を挙げることもできる。そのような融合パートナーは、当業者には公知である。
【００７２】
本発明は、抗原性ポリペプチド及び異種ポリペプチド（すなわち、無関係なポリペプチド又はその断片、好ましくはそのポリペプチドの少なくとも１０、少なくとも２０、少なくとも３０、少なくとも４０、少なくとも５０、少なくとも６０、少なくとも７０、少なくとも８０、少なくとも９０若しくは少なくとも１００のアミノ酸）を含む融合タンパク質の使用を包含する。融合は直接でもよいが、リンカー配列を介したものでもよい。異種ポリペプチドは、抗原性ポリペプチドのＮ末端又はＣ末端に融合することができる。或いは、異種ポリペプチドは、抗原性ポリペプチド配列に連結させることができる。好ましい実施態様では、融合タンパク質はＥｐｈＡ２を含む。
【００７３】
融合タンパク質は、異種シグナル配列にそのＮ末端で融合した抗原性ポリペプチドを含むことができる。様々なシグナル配列が市販されている。本発明の方法に役立つ原核生物異種シグナル配列としては、それらには限定されないが、ｐｈｏＡ分泌シグナル（Sambrookら編（1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第２版, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY））及びプロテインＡ分泌シグナル（Pharmacia Biotech、ニュージャージー州Piscataway）がある。
【００７４】
抗原性ポリペプチドは、標識配列、例えば、中でもｐＱＥベクター（QIAGEN,Inc. カリフォルニア州Chatsworth）で提供されている標識などのヘキサヒスチジンペプチドと融合することができ、この多くは市販されており本発明の方法で利用できる。例えばGentzらの論文（1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86: 821-8241）で記載されているように、ヘキサヒスチジンは融合タンパク質の便利な精製手段を提供する。ペプチド標識の他の例は、インフルエンザ赤血球凝集素タンパク質に由来するエピトープに対応する赤血球凝集素「ＨＡ」標識（Wilsonらの論文（1984, Cell, 37:767））、及び「フラグ」標識（Knappikらの論文（1994, Biotechniques, 17（4）: 754-761））である。これらの標識は、特にＥｐｈＡ２などの組換えで産生された抗原性ポリペプチドの精製に役立つ。
【００７５】
発現される融合タンパク質に特異的又は選択的である抗体を利用することによって、いかなる融合タンパク質でも容易に精製することができる。例えば、Janknechtらが記載す

る系は、ヒト細胞系で発現される非変性融合タンパク質の精製を容易にする（Janknechtらの論文（1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:8972））。この系では、遺伝子の読取り枠が６つのヒスチジン残基から成るアミノ末端標識に翻訳的に融合するように、関心の遺伝子がワクシニア組換えプラスミドにサブクローニングされる。組換えワクシニアウイルスに感染した細胞からの抽出物をNi^{2+}ニトリロ酢酸－アガロースカラムに加え、ヒスチジン標識タンパク質をイミダゾール含有緩衝液で選択的に溶出させる。

【００７６】

本発明の方法での使用のために、アフィニティ標識はそのアミノ末端で、抗原性ポリペプチドのカルボキシル末端に融合することもできる。カルボキシル末端で融合が形成される正確な部位は、重要でない。最適部位は、日常用いる実験で決定することができる。本発明の方法及び組成物での使用のために、アフィニティ標識をそのカルボキシル末端で、抗原性ポリペプチドのアミノ末端に融合することもできる。

【００７７】

当技術分野で公知の様々なアフィニティ標識を用いることができ、その例としては、それらには限定されないが、免疫グロブリン定常部（Pettyの論文（1996, Metal-chelate affinity chromatography, in Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 2, Ed. Ausubelら編, Greene Publish. Assoc. & Wiley Interscience））、グルタチオンＳトランスフェラーゼ（ＧＳＴ；Smithの論文（1993, Methods Mol. Cell Bio. 4: 220-229））、大腸菌マルトース結合タンパク質（Guanらの論文（1987, Gene 67:21-30））及び様々なセルロース結合ドメイン（米国特許第５４９６９３４号、５２０２２４７号、５１３７８１９号、Tommeらの論文（1994, Protein Eng. 7: 117-123））、その他がある。他のアフィニティ標識は特異的結合パートナーによって認識され、したがって固体支持体上へ固定化できる結合パートナーとの親和性結合による単離を容易にする。一部のアフィニティ標識は、ＥｐｈＡ２抗原性ポリペプチドに新規構造特性、例えば多量体を形成する能力を与えることができる。これらのアフィニティ標識は、通常、ホモポリマーとして通常存在するタンパク質に由来する。ＣＤ８（Shiueらの論文（1988, J. Exp. Med. 168: 1993-2005））若しくはＣＤ２８（Leeらの論文（1990, J. Immunol. 145:344-352））の細胞外ドメインなどのアフィニティ標識、又は鎖間ジスルフィド結合のための部位を含む免疫グロブリン分子の断片は、多量体の形成に導くことができた。

【００７８】

当業者によって理解されるように、前述アフィニティ標識のコード領域を得るために多くの方法を用いることができ、その例としては、それらには限定されないが、ＤＮＡクローニング、ＤＮＡ増幅及び合成法がある。アフィニティ標識のいくつか、及びそれらの検出／単離のための試薬は市販されている。

【００７９】

当技術分野で公知の様々なリーダー配列を、リステリアなどの細菌細胞からの抗原性ポリペプチドの効果的な分泌のために用いることができる（von Heijneの論文（1985, J. Mol. Biol. 184:99-105））。細菌細胞での抗原性ポリペプチドの発現を標的にするための適当なリーダー配列としては、それらには限定されないが、大腸菌タンパク質ＯｍｐＡ（Hobomらの論文（1995, Dev. Biol. Stand. 84:255-262））、Ｐｈｏ　Ａ（Okaらの論文（1985, Proc. Natl. Acad. Sci 82:7212-16））、ＯｍｐＴ（Johnsonらの論文（1996, Protein Expression 7:104-113））、ＬａｍＢ及びＯｍｐＦ（Hoffman & Wrightの論文（1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:5107-5111））、βラクタマーゼ（Kadonagaらの論文（l984, J. Biol. Chem. 259:2149-54））、エンテロトキシン（Morioka-Fujimotoらの論文（1991, J. Biol. Chem. 266:1728-32））及び黄色ブドウ球菌プロテインＡ（Abrahmsenらの論文（1986, Nucleic Acids Res. 14: 7487-7500））及び枯草菌エンドグルカナーゼ（Loらの論文（Appl. Environ. Microbiol. 54:2287-2292））のリーダー配列、並びに人工及び合成のシグナル配列（MacIntyreらの論文（1990, Mol. Gen. Genet. 221:466-74）、Kaiserらの論文（1987, Science, 235:312-317））がある。

【００８０】

ある実施態様では、融合パートナーは、治療的又は予防的免疫が望まれる細胞型と関連する抗原に対応する非抗原性ポリペプチドを含む。例えば、ＥｐｈＡ２では、非ＥｐｈＡ２ポリペプチドは腫瘍関連抗原、例えば、それらには限定されないが、ＭＡＧＥ－１、ＭＡＧＥ－２、ＭＡＧＥ－３、ｇｐ１００、ＴＲＰ－２、チロシナーゼ、ＭＡＲＴ－１、β－ＨＣＧ、ＣＥＡ、Ｒａｓ、β－カテニン、ｇｐ４３、ＧＡＧＥ－１、ＢＡＧＥ－１、ＰＳＡ及びＭＵＣ－１、２、３などのエピトープを含むことができる。

【００８１】

融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、標準の組換えＤＮＡ技術によって産生することができる。例えば、融合タンパク質をコードする核酸分子は、自動ＤＮＡ合成装置を含む従来の手法によって合成することができる。或いは遺伝子フラグメントのＰＣＲ増幅は、２つの連続的な遺伝子フラグメントの間で相補性のオーバーハングを生成するアンカープライマーを用いて実行でき、それらはその後アニール／再増幅してキメラ遺伝子配列を生成することができる（例えば、Current Protocols in Molecular Biology, Ausubelら編, John Wiley & Sons, 1992を参照）。

【００８２】

融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列は適当な発現ベクターへ、すなわち挿入されたタンパク質のコード配列の転写及び翻訳のために必要な要素を含むベクターへ挿入することができる。融合タンパク質の発現は、構成的、誘導可能な、又は組織特異的若しくは選択的なプロモーターによって調節することができる。溶解性及び／又は発現を促進し、且つ抗原性ポリペプチドのインビボ半減期を増加させることができる融合タンパク質は、したがって本発明の方法に役立つことが当業者によって理解されよう。抗原性のポリペプチド又はそのペプチド断片、又は融合タンパク質は、特定の抗原性ポリペプチドを検出又は測定する任意のアッセイで、或いは、そのようなアッセイの校正及び標準化において用いることができる。

【００８３】

発明の方法は、当技術分野で公知の手法を用いて組換えＤＮＡ技術によって産生することができる、抗原性のポリペプチド又はそのペプチド断片の使用を包含する。したがって、抗原性の遺伝子配列を含む核酸を発現することによって本発明の抗原性ポリペプチドを調製するための方法は、本明細書で記載される。例えば、ＥｐｈＡ２抗原性ポリペプチドコード配列（ポリペプチドの全て又はその抗原性部分をコードする核酸を含むがこれに限らず）及び適当な転写／翻訳調節シグナルを含む発現ベクターを構築するのに、当業者に公知の方法を用いることができる。これらの方法としては、例えば、インビトロ組換えＤＮＡ手法、合成手法及びインビボ遺伝子組換えがある。例えば、Sambrookらの著書（1989、前掲）、及びAusubelらの著書（1989、前掲）、で記載される手法を参照。或いは、ＥｐｈＡ２抗原性ポリペプチド配列をコードすることができるＲＮＡは、例えば、シンセサイザー（例えばOligonucleotide Synthesis, 1984, Gait, M.J.編, IRL Press, Oxfordで記載される手法を参照）を使って化学的に合成することができる。

【００８４】

ある実施態様では、抗原性ポリペプチドは、「タンパク質トランスダクションドメイン」とも称され細胞核へのその取り込みを可能にする、内部移行シグナルペプチドに機能的に結合する。ある具体的な実施態様では、内部移行シグナルはアンテナペディア（Prochiantzによるレビュー（1996, Curr. Opin. Neurobiol. 6:629 634））、Ｈｏｘ　Ａ５（Chatelinらの論文（1996. Mech. Dev. 55:111 117））、ＨＩＶ　ＴＡＴタンパク質（Vivesらの論文（1997, J. Biol. Chem. 272:16010 16017））又はＶＰ２２（Phelanらの論文（1998, Nat.Biotechnol. 16:440 443））のそれである。

【００８５】

４．３．５　他のタンパク質

細胞表面受容体の例としては、それらには限定されないが、ＣＤ２、ＣＤ３、ＣＤ４、ＣＤ５、ＣＤ６、ＣＤ７、ＣＤ８、ＣＤ９、ＣＤ１０、ＣＤ１１ａ、ＣＤ１１ｃ、ＣＤ１４、ＣＤ１７、ＣＤ１９、ＣＤ２５、ＣＤ２８、ＣＤ３６、ＣＤ４０、ＣＤ４０リガンド

、ＣＤ４１、ＣＤ４２、ＣＤ５１、ＣＤ６１、ＣＤ７０、ＣＤ７８、ＣＴＬＡ－４、ＩＣＡＭ（例えば、ＩＣＡＭ－１）、インテグリン（例えば、インテグリン$\alpha_v\beta_3$）、ボンベシン受容体、補体受容体（例えば、Ｃ１ｑ補体受容体）、ケモカイン受容体（例えば、ケモカイン（Ｃ－Ｃ）受容体及びケモカイン（Ｃ－Ｘ３－Ｃ）受容体１（「ＣＸ３ＣＲ１」））、嚢胞性線維症膜コンダクタンス制御因子（「ＣＦＴＲ」）及びサイトカイン受容体がある。

【００８６】

サイトカイン受容体としては、それらには限定されないが、ＩＬ－１受容体（ＩＬ－１Ｒ）、ＩＬ－２Ｒ、ＩＬ－３Ｒ、ＩＬ－４Ｒ、ＩＬ－５Ｒ、ＩＬ－６Ｒ、ＩＬ－７Ｒ、ＩＬ－８Ｒ、ＩＬ－９Ｒ、ＩＬ－１０Ｒ、ＩＬ－１１Ｒ、ＩＬ－１２Ｒ、ＩＬ－１３Ｒ、ＩＬ－１４Ｒ、ＩＬ－１５Ｒ、ＩＬ－１６Ｒ、ＩＬ－１７Ｒ、ＩＬ－１８Ｒ、ＩＬ－１９Ｒ、ＩＬ－２０Ｒ、ＩＬ－２１Ｒ、ＩＬ－２２Ｒ、ＩＬ－２３Ｒ、ＩＦＮ－α受容体、ＩＦＮ－β受容体、ＩＦＮ－γ受容体、ＴＮＦ－α受容体、ＴＮＦ－β受容体、ＮＧＦ受容体、ＰＤＧＦ受容体、ＥＧＦＲ、ＴＰＡ受容体、ＶＥＧＦＲ、ＧＭ－ＣＳＦ受容体、Ｇ－ＣＳＦ受容体、ＦＧＦ受容　体、ＥＰＯ受容体、ＧＨ受容体、及びＧＨＲＨ受容体がある。本発明の方法によって産生されるタンパク質は、１つを超える受容体からの配列から成ることもできる。そのような技術はRegeneron,Inc.によって用いられるように、ＩＬ－４／ＩＬ－１３トラップを含むトラップによって例証される。

【００８７】

他のタンパク質の具体例としては、それらには限定されないが、ａｂｌ、アセチル補酵素Ａカルボキシラーゼベータ、Ｅ－カドヘリン、ゴナドトロピン、性腺刺激ホルモン放出ホルモン、アセチルコリンエステラーゼ（「ＡＣＨＥ」）、Ｄ－１ドーパミン受容体（「ＤＲＤ１」）、エフェクター細胞プロテアーゼ受容体（「ＥＰＲ１」）、エストロゲン受容体、ＧＡＢＡ受容体、グルカゴン受容体（「ＧＣＧＲ」）、インスリン受容体（「ＩＮＳＲ」）、α心臓アクチン、アシル－ＣｏＡデヒドロゲナーゼ（「ＡＣＡＤＶＬ」）、アディポネクチン（「ＡＣＲＰ３０」）、ＡＤＰリボシル化因子４、αグルコシダーゼ、アンギオゲニン、血管新生因子１（「ＡＮＧ１」）、血管新生因子２（「ＡＮＧ２」）、アンギオスタチン、アンギオテンシン１変換酵素（「ＤＣＰ１」）、殺菌性／透過性増加タンパク質（「ＢＰＩ」）、ｂｃｌ－２、βカテニン（「ＣＴＮＮＢ１」）、β部位ＡＰＰ開裂酵素２（「ＢＡＳＥ２」）、胆汁酸塩エクスポートポンプ、ＢＭＰ、ｂｒｃａ１、ｂｒｃａ２、ｃ－ｆｍｓ、ｃ－ｍｙｃ、カルシトニン、マクロファージ内のカルシウム結合タンパク質（「ＭＲＰ１４」）、カルセニリン（「ＤＲＥＡＭ／ＣＳＥＮ」又は「ＣＲＥＡＭ」又は「ＫＣｈ　ＩＰ３」）、カルニチンｏ－パルミトイルトランスフェラーゼ（「ＣＰＴ２」）、カテコール－ｏ－メチルトランスフェラーゼ（「ＣＯＭＴ」）、カテプシンＫ、ＣＬＣＡホモログ（「ｈＣＬＣＡ２」）、補体崩壊加速因子（「ＤＡＦ／ＣＤ５５」）、サイクリンＤ１、サイクリンＥ、サイクリンＴ１、サイクリン依存性キナーゼ阻害剤１Ａ（「ｐ２１」又は「ＷＡＦ１」又は「ＣＤＫＮ１Ａ」又は「Ｃｉｐ１」）、サイクリン依存性キナーゼ阻害剤２Ａ（「ＣＤＫＮ２Ａ」）、チトクロームＰ－４５０、Ｄアミノ酸オキシダーゼ（「ＤＡＯ」）、ＤＮＡ結合タンパク質（「ＤＤＢ１」を含む）、ＤＣＣ、デスモグレイン１（「ＤＳＧ１」）、ジヒドロ葉酸レダクターゼ（「ＤＨＦＲ」）、ジスインテグリン及びメタロプロテイナーゼドメイン３３（「ＡＤＡＭ３３」）、組換えＤＮＡ分解酵素（例えばＰＵＬＭＯＺＹＭＥ（登録商標）（ドルナーゼα、Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈ））、ＤＮＡメチルトランスフェラーゼ（「ＤＮＭＴ３ｂ」）、ＤＰＰ－ＩＶ、ドレブリン－１樹状突起棘タンパク質（「ＤＢＮ１」）、エンドスタチン、エオタキシン（「ＣＣＬ１１」）、第ＩＸ因子、第ＶＩＩＩ因子、ファルネシルトランスフェラーゼ、フィブリリン（「ＦＢＮ１」）、ＦＭＳ関連チロシンキナーゼ１（「ＦＬＴ１」）、フォークヘッドボックスＣ２（「ＦＯＸＣ２」）、ｆｏｓ、ガラニン（「ＧＡＬ」）、胃抑制ポリペプチド（「ＧＩＰ」）、神経膠細胞系由来神経栄養因子（「ＧＤＮＦ」）、神経膠成長因子（「ＧＧＦ」）、ＧＧＲＰ、グレリン（「ＧＨＲＬ」）、グルカゴン、グルカゴン様ペプチド１（「ＧＬＰ１」）、グルコキナーゼ（「ＧＣＫ」）、グルタミン酸脱炭酸酵

素２、グルタミン酸脱炭酸酵素３、グルタミン酸脱炭酸酵素、脳、膜形、グリコーゲン合成酵素キナーゼ３Ａ（「ＧＳＫ－３Ａ」）、グリコーゲン合成酵素キナーゼ３Ｂ（「ＧＳＫ－３Ｂ」）、ＧＲＯ２オンコジーン又はマクロファージ炎症性タンパク質－２－α前駆体（「ＣＸＣＬ２」）、ｇｓｐ、Ｈ－ｒａｓ、熱ショックタンパク質（「ＨＳＰ」）－７０、ヘパラナーゼ（「ＨＰＡ」）、Ａ型肝炎ウイルス細胞受容体（「ＨＡＶＣＲ」）、Ｂ型肝炎ウイルスＸ相互作用タンパク質（「ＨＢＸＩＰ」）、ヘプシン（「ＨＰＮ」）、Ｈｅｒ－２（「ＥＲＢＢ２」）、ＨＧＦ、高移動度グループボックス染色体タンパク質１（「ＨＭＧＢ－１」）、ヒストンアセチルトランスフェラーゼ（「ＨＡＴ１」）、ヒストンデアセチラーゼ１（「ＨＤＡＣ１」）、ヒストンデアセチラーゼ３（「ＨＤＡＣ３」）、ＨＩＶ　Ｔａｔ特異因子１（「ＨＴＡＴＳＦ１」）、ＨＭＧ　ＣｏＡシンセターゼ、ＨＳＰ－９０、３－ヒドロキシ－３－メチルグルタリル－ＣｏＡ還元酵素（「ＨＭＧＣＲ」）、低酸素症誘導性因子１（「ＨＩＦ－１Ａ」）、低酸素症誘導性因子１－α阻害剤（「ＨＩＦ１ＡＮ」）、イズロネート２－サルファターゼ（「ＩＤＳ」）、ＩＧＦ－１、ＩＧＦ－１Ｒ、ＩＧＦ－２、ＩＧＦ結合タンパク質２（「ＩＧＦＢＰ２」）、ＩｋＢキナーゼ（「ＩＫＢＫＢ」）、イノシトールポリリン酸ホスファターゼ様１（「ＳＨＩＰ－２」）、インスリン、インターフェロン誘導性タンパク質（「ＣＸＣＬ１０（ＩＰ１０）」）、ＩＮＩ１／ｈＳＮＦ５、ＩＬ－1Ｒアンタゴニスト（ＩＬ－1Ｒａ、例えばＫＩＮＥＲＥＴ（商標）（アナキンラ、Amgen））、ｊｕｎ、カリクレイン６（「ＫＬＫ６」）、ＫＧＦ、ｋｉ－ｒａｓ、ｋｉｔリガンド、幹細胞因子（「ＳＣＦ」）、ｋｌｏｔｈｏ（「ＫＬ］）、Ｌ－ｍｙｃ、大腫瘍サプレッサー（「ＬＡＴＳ１」）、ＬＤＬ受容体（「ＬＤＬＲ」）、レプチン（「ＬＥＰ」）、レプチン受容体（「ＬＥＰＲ」）、ロイシンアミノペプチダーゼ３（「ＬＡＰ３」）、白血病抑制因子（「ＬＩＦ」）、白血病抑制因子受容体（「ＬＩＦＲ」）、ｌｉｖｉｎ、黄体形成ホルモン、黄体ホルモン放出ホルモン、マクロファージ遊走阻止因子（「ＭＩＦ」）、主要組織適合複合体クラスＩ鎖関連遺伝子Ａ（「ＭＩＣＡ」）、主要組織適合複合体クラスＩ鎖関連遺伝子Ｂ（「ＭＩＣＢ」）、マトリックスメタロプロテイナーゼ９（「ＭＭＰ９」）、マトリックスメタロプロテイナーゼ１２（「ＭＭＰ１２」）、ｍａｘ相互作用タンパク質１（「ＭＸＩ１」）、ＭＣＣ、ＭＤＭ２、ＭＥＴＨ－１、ＭＥＴＨ－２、メチル－ＣｐＧ結合エンドヌクレアーゼ（「ＭＢＤ４」）、モノアミンオキシダーゼＡ（「ＭＡＯＡ」）、モノアミンオキシダーゼＢ（「ＭＡＯＢ」）、単球化学走性タンパク質１（「ＭＣＰ１」）、ｍｏｓ、ＭＴＳ１、ｍｙｃ、ミオトロフィン（myotrophin）、Ｎ－アセチルトランスフェラーゼ、Ｎ－カドヘリン、Ｎ－メチルＤ－アスパラギン酸（「ＮＭＤＡ」）受容体、ＮＡＤ（Ｐ）依存性ステロイドデヒドロゲナーゼ（「ＮＳＤＨＬ」）、自然抵抗性関連マクロファージタンパク質（「ＮＲＡＭ　Ｐ」）、神経細胞付着分子１（「ＮＣＡＭ１」）、ニューロン増殖関連タンパク質４３（「ＧＡＰ－４３」）、ＮＦ１、ＮＦ２、ｎｍ２３、Ｂ細胞内のκ軽ポリペプチド遺伝子エンハンサーの核因子１（「ＮＦＫＢ１」）、ＯＳＭ、オステオポンチン（「ＯＰＮ」）、Ｐ－糖タンパク質１（「ＰＧＹ１」）、ｐ３８ＭＡＰキナーゼ（「ｐ３８」又は「ＭＡＰＫ１４」）、ｐ５３、ｐ３００／ＣＢＰ関連因子（「ＰＣＡＦ」）、副甲状腺ホルモン、ペルオキシン－１（「ＰＥＸ１」）、ペルオキシソーム構築因子－２（「ＰＥＸ６」）、ペルオキシゾーム増殖因子活性化受容体γ（「ＰＰＡＲｇ」）、フェニルアラニンヒドロキシラーゼ、ホスホジエステラーゼ、ホスホチロシル－タンパクホスファターゼ（「ＰＴＰ－１Ｂ」）、胎盤成長因子（「ＰＧＦ」）、プラスミノーゲン活性化因子阻害タンパク質（「ＰＡＩ１」）、プレイオトロフィン（「ＰＴＮ」）、ポリ（ｒＣ）結合タンパク質２（「ＰＣＢＰ２」）、プログラヌリン（「ＰＣＤＧＦ」又は「ＧＲＮ」）、プロラクチン（「ＰＲＬ」）、増殖性細胞核抗原（「ＰＣＮＡ」）、プロテインキナーゼＢ／Ａｋｔ（「ＡＫＴ１」）、プロテインキナーゼＣγ（「ＰＫＣｇ」）、プロテイン－チロシンホスファターゼ、４Ａ、３（「ＰＴＰ４Ａ３」）、ソリアシン（psoriasin）（「ＰＳＯＲ１」）、ｒａｓ、レジスチン、網膜芽細胞腫（「Ｒｂ」）、網膜芽細胞腫１（「Ｒｂ１」）、網膜芽細胞腫結合タンパク質１様１（「ＲＢＢＰ１Ｌ１」）、リボヌクレアーゼ／アンギオゲニン阻害剤（「ＲＮＨ」）、Ｓ１００カルシウム結合タンパク質Ａ８（「ＭＲＰ８」

）、シグナル伝達物質及び転写活性化剤（「ＳＴＡＴ」）－１、ＳＴＡＴ－２、ＳＴＡＴ－３、ＳＴＡＴ－４、ＳＴＡＴ－５、ＳＴＡＴ－６、可溶性型ポリペプチドＦＺＤ４Ｓ（「ＦＺＤ４Ｓ」）、ソマトトロピン、ｓｒｃ、ｓｕｒｖｉｖｉｎ、Ｔ細胞リンパ腫侵襲及び転移１（「ＴＩＡＭ１」）、ＴＥＫチロシンキナーゼ（「ＴＩＥ２」）、テロメラーゼ、トロンボモジュリン（「ＴＨＢＤ」又は「ＴＨＲＭ」）、トロンボポエチン（「ＴＨＰＯ」又は「ＴＰＯ」）、ヒトトリオースリン酸イソメラーゼ（「ＴＰＩ１」）、甲状腺ホルモン、甲状腺刺激ホルモン、組織因子、金属プロテアーゼ組織阻害剤１（「ＴＩＭＰ１」）、金属プロテアーゼ組織阻害剤２（「ＴＩＭＰ２」）、金属プロテアーゼ組織阻害剤４（「ＴＩＭＰ４」）、脱共役タンパク質２（「ＵＣＰ２」）、ウロキナーゼプラスミノーゲン活性化因子（「ｕＰＡ」）、ウトロフィン（utrophin）（「ＵＴＲＮ」）、ｖ－ｍｙｃ骨髄球腫症ウイルス癌遺伝子ホモログ、バニロイド（vanilloid）受容体サブユニット１（「ＶＲ１」）、ＥｐｈＡ２、ビリオン感染因子（「ＶＩＦ」）、ＶＬＡ－４、ＨＩＶ　ｇｐ１２０、ＨＩＶ　ｎｅｆ、ＲＳＶ　Ｆ糖タンパク質、ＲＳＶ　Ｇ糖タンパク質、インフルエンザウイルスノイラミニダーゼ、インフルエンザウイルス血球凝集素、ＨＴＬＶ　ｔａｘ、単純疱疹ウイルス糖タンパク質（例えば、ｇＢ、ｇＣ、ｇＤ及びｇＥ）並びにＢ型肝炎表面抗原がある。

【００８８】

４．４　関心タンパク質の特性

ある実施態様では、本発明の方法及び組成物は高発現量の関心タンパク質だけでなく、安定していて純粋且つ／又は生物活性がある若しくは機能性の関心タンパク質を提供する。この点で、本発明は本発明の方法によって発現される関心タンパク質の特徴を明らかにする方法を提供し、その方法は一般に、発現される関心タンパク質、特に抗体の完全性、安定性及び／又は純度をモニターすることを含む。例えば、本発明のある実施態様では、純度を調査するためにＳＤＳ－ＰＡＧＥを、完全性及び凝集を検査するためにサイズ排除高速液体クロマトグラフィーを、効力及び／又は効力を測定するために活性検定又は生物学的検定を、濃度を調査するために紫外吸光を、同定のためにアイソタイピングアッセイを用いることができる。更に、工程中の混在物を調査するために、酵素結合免疫吸着測定法（ＥＬＩＳＡ）、ウェスタンブロット法及びＤＮＡハイブリダイゼーション又はポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）を用いることができる。最後に、本発明は、その一次、二次若しくは三次構造、その炭水化物含量、その荷電アイソフォーム又はその疎水性相互作用を決定することによって、タンパク質の特徴を明らかにする方法を包含する。

【００８９】

抗体製剤を含むタンパク質製剤の安定性を、それらのタンパク質の物理化学的構造並びに生物的活性に基づいて評価するために利用できる、様々な方法がある。例えば、タンパク質の変性を研究するために、電荷移動吸収、熱分析、蛍光分光法、円二色性、ＮＭＲ及び高速サイズ排除クロマトグラフィー（ＨＰＳＥＣ）などの方法を利用できる。例えば、Wangらの論文（1988, J. of Parenteral Science & Technology 42 （Suppl）: S4-S26）を参照。

【００９０】

レデュースト（reduced）キャピラリーゲル電気泳動（ｒＣＧＥ）及びＨＰＳＥＣは、タンパク質凝集体の形成、タンパク質分解及びタンパク質断片化を評価するために、最も一般的で最も単純な方法である。したがって、本発明の液状製剤の安定性は、これらの方法によって評価することができる。

【００９１】

例えば、本発明によって産生されるか本発明の組成物に含まれるタンパク質の安定性は、ピークの面積割合が非分解タンパク質を表すＨＰＳＥＣ又はｒＣＧＥで評価することができる。例えば、約２５０μｇのタンパク質（１０ｍｇ／ｍｌの前記抗体又は抗体断片を含む液状製剤の約２５μｌ）を、TSK SW XLガードカラム（６．０ｍｍ×４．０ｃｍ）を備えたTosoH Biosep TSK G3000SW_{XL}カラム（７．８ｍｍ×３０ｃｍ）上へ注入する。タンパク質は、０．１Ｍ硫酸ナトリウム及び０．０５％アジ化ナトリウムを含む０．１Ｍ二塩

基性リン酸ナトリウムで、０．８～１．０ｍｌ／時間の流速でアイソクラチックに溶出させる。溶出したタンパク質は、２８０ｎｍでＵＶ吸光法を使って検出される。対比試験片はアッセイで対照として実行、結果は、約１２～１４分で観察される含まれる量ピークを除外して、他の全てのピークと比較した生成物モノマーピークの面積比率として報告される。モノマーピークより早くに溶出するピークは、凝集割合として報告される。

【００９２】

一実施態様では、本発明によって産生されるか本発明の組成物に含まれるタンパク質は、ＨＰＳＥＣ又はｒＣＧＥによる測定でタンパク質重量の多くても５％以下、４％以下、３％以下、２％以下、１％以下、最も好ましくは０．５％以下の低レベルから検出されないレベルの凝集を示し、また、無傷のタンパク質を表すピークの総ピーク面積の８０％以上、８５％以上、９０％以上、９５％以上、９８％以上、又は９９％以上、又は９９．５％以上の低レベルから検出されないレベルの断片化を示す。SDS-PAGEの場合、放射性同位体で染色又は標識された各バンドの密度又は放射能を測定することができ、非分解タンパク質を表すバンドの密度又は放射能の割合を得ることができる。

【００９３】

本発明によって産生されるか本発明の組成物に含まれるタンパク質の安定性は、そのタンパク質の生物的活性を測定する任意のアッセイによって評価することもできる。抗体の生物的活性の例としては、それらには限定されないが、抗原結合活性、補体活性化活性、Ｆｃ受容体結合活性、その他がある。抗体の抗原結合活性は、当業者に公知の任意の方法、例えばそれらには限定されないが、ＥＬＩＳＡ、ラジオイムノアッセイ、ウェスタンブロット、などで測定することができる。補体活性化活性は、補体成分の存在下でエピトープに免疫特異的に結合する抗体がそのエピトープを発現する細胞と構成する系において、Ｃ３ａ／Ｃ４ａアッセイで測定することができる。また、本明細書に参照により完全に組み込まれているHarlowらの著書（Antibodies: A Laboratory Manual, （Cold Spring Harbor Laboratory Press, 第２版, 1988））を参照。ELISAに基づくアッセイは、例えば、対比試験片と免疫特異的に結合する抗体又はその断片の能力を比較するのに用いることができる。

【００９４】

本発明によって産生されるか本発明の組成物に含まれるタンパク質の純度は、当業者に公知の任意の方法、例えばＨＰＳＥＣで測定することができる。抗体の無菌性は、例えば以下の通りに調査することができる。無菌の大豆－カゼイン消化物培地及び液状チオグリコール酸培地は、試験液体抗体製剤を０．４５μｍの公称孔を有する無菌フィルタで濾過して接種する。Sterisure（商標）又はSteritest（商標）法（Millipore、マサチューセッツ州Billerica）を使うとき、各濾過装置を約１００ｍｌの無菌大豆－カゼイン消化物培地又は液体チオグリコール酸培地で無菌的に満たす。従来法を使うとき、チャレンジフィルタを１００ｍｌの無菌大豆－カゼイン消化物培地又は液体チオグリコール酸培地へ無菌的に移す。培地は適当な温度でインキュベートして、１４日間で３回、細菌又は糸状菌の増殖の証拠を観察する。

【００９５】

特定の実施態様では、タンパク質の安定性、純度及び／又は完全性は本発明の流加法の間に定期的に、例えば２４時間ごとに一度調査する。他の実施態様では、関心のタンパク質の安定性、純度及び／又は完全性は、その方法がスケールアップされるたびに評価する。

【００９６】

４．４．１　抗原性ペプチドのアッセイ

本発明は、抗原性ペプチドを発現するように操作されたリステリア細菌を含むリステリアベースのワクチンを提供する。ペプチドがＴ細胞エピトープであるか又はＢ細胞エピトープであるかを判断するための当技術分野で公知のいかなるアッセイでも、抗原性ペプチドを本方法及び組成物での適合性について試験する際に用いることができる。

【００９７】

例えば、細胞内サイトカイン染色のためのELISPOTアッセイ及び方法は、抗原特異性ＣＤ４$^{+}$及びＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞の計数及び特性評価のために用いることができる。Lalvaniらの論文（（1997） J. Exp. Med. 186: 859-865）、Waldropらの論文（（1997） J. Clin Invest. 99:1739-1750）。

【００９８】

抗原性ペプチドは、抗原の部分に対応する合成ペプチドをスクリーニングすることにより決定することができる。候補抗原性ペプチドは、それらの配列又は予測された構造に基づいて特定することができる。いくつかのアルゴリズムを、この目的のために利用できる。

そのようなアッセイのための例示的なプロトコルを、下で示す。

【００９９】

４．４．１．１　抗原の免疫原性を示すペプチド

哺乳動物で特異抗体反応を誘発する抗原性ペプチドの能力は、例えば、フロイントアジュバントで乳状化した個々の抗原ペプチドで動物（例えばマウス、モルモット又はウサギ）を免疫化することにより、検査することができる。

【０１００】

３回の注射（注射１回につき５～１００μｇのペプチド）の後、ＩｇＧ抗体反応をペプチド特異的ＥＬＩＳＡ及びイムノブロッティングによって抗原に対して試験する。

関心の抗原性ペプチドと特異的に反応する抗血清を産生する抗原性のペプチド、及びイムノブロットで認識される完全長抗原タンパク質は、関心の抗原性ペプチドの抗原性を示すと言われる。

【０１０１】

４．４．１．２　ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞増殖アッセイ

例えば、そのようなアッセイとしては、末梢血単核細胞（「PBMC」）がEphA2などの抗原性ペプチドの過剰発現を伴う疾患の患者の新鮮血から得られて、基本的にはKruse及びSebaldの論文（1992, EMBO J. 11:3237-3244）で記載されているFICOLL-PLAQUE PLUS（Pharmacia、Upsalla、スウェーデン）を用いた遠心によって精製される、インビトロ細胞培養アッセイがある。末梢血単核細胞を７～１０日間、候補EphA2抗原性ペプチドとインキュベートする。抗原を処理して提示するために、任意選択で、抗原提示細胞をアッセイの２４～４８時間前に培養物に加えることができる。細胞は次に遠心により収集し、ＲＰＭＩ　１６４０培地（GibcoBRL、メリーランド州Gaithersburg）で洗浄する。５×１０^{4}の活性化されたＴ細胞／ウェルを、９６穴プレート内の１０％ウシ胎仔血清、１０ｍＭ　ＨＥＰＥＳ、ｐｈ７．５、２ｍＭ　Ｌ－グルタミン、１００単位／ｍｌペニシリンＧ及び１００μｇ／ｍｌ硫酸ストレプトマイシンを含むＲＰＭＩ　１６４０培地内に３７℃で７２時間置き、１μＣｉ^{3}Ｈ－チミジン（DuPont NEN、マサチューセッツ州ボストン）／ウェルで６時間パルスし、収集して、放射能はＴＯＰＣＯＵＮＴシンチレーションカウンター（Packard Instrument Col.、コネチカット州Meriden）で測定する。

【０１０２】

４．４．１．３　細胞内サイトカイン染色（ＩＣＳ）

Ｔ細胞の抗原特異性細胞内サイトカイン反応の測定は、基本的にWaldropらの論文（1997, J. Clin. Invest. 99:1739-1750）、Openshawらの論文（1995, J. Exp. Med. 182: 1357-1367）又はEstcourtらの論文（1997, Clin. Immunol. Immunopathol. 83:60-67）で記載されているように実施することができる。例えば、EphA2を過剰発現する細胞を伴う疾患の患者からの精製PBMCを、１×１０^{6}細胞／管の濃度で１２×７５ミリメートルのポリスチレン組織培養管（Becton Dickinson、ニュージャージー州Lincoln Park）に置く。０．５ミリリットルのＨＬ－１無血清培地、１００単位／ｍｌのペニシリン、１００単位／ｍｌのストレプトマイシン、２ミリモルのＬグルタミン（Gibco BRL）、個々のEphA2抗原性候補ペプチドの様々な量、及び１単位の抗ＣＤ２８　ｍＡｂ（Becton-Dickinson、ニュージャージー州Lincoln Park）を含む溶液を、各管に加える。抗ＣＤ３　ｍＡｂを、正常なＰＢＭＣ培養物２セットに陽性対照として加える。培養試験管は、１時間インキュベー

トする。ブレフェルジンＡを１マイクログラム／ｍｌの濃度で個々の管に加え、管を更なる１７時間インキュベートする。

【０１０３】

先に述べたように刺激したＰＢＭＣを、ダルベッコのリン酸緩衝食塩水（ｄＰＢＳ）及び１０単位のブレフェルジンＡを含む溶液で細胞を２回洗浄することによって収集する。洗浄したこれらの細胞は、０．５ミリリットルの４％パラホルムアルデヒド及びｄＰＢＳを含む溶液中で１０分の間インキュベートすることによって固定する。細胞は、ｄＰＢＳ及び２％ウシ胎仔血清（ＦＣＳ）を含む溶液で洗浄する。次に、細胞は細胞内サイトカイン及び表面マーカーの染色のために直ちに用いるか、記載されているように多くて３日間、凍結培地で冷凍する（Waldropらの論文（1997, J. Clin. Invest. 99:1739-1750））。

【０１０４】

細胞標品を３７℃の水浴で素早く解凍し、ｄＰＢＳで一度洗浄した。新鮮又は凍結された細胞を０．５ミリリットルの透過性向上溶液（Becton Dickinson Immunocytometry systems、San Jose、Calif.）で再懸濁して、１０分の間遮光室温条件下でインキュベートする。透過性が向上した細胞はｄＰＢＳで２回洗浄し、直接コンジュゲートされたｍＡｂｓと２０分の間遮光室温条件下でインキュベートする。抗体の最適濃度は、標準の方法によってあらかじめ決める。染色後、細胞を洗浄し、ｄＰＢＳ１％パラホルムアルデヒドを含む溶液中でのインキュベーションによって再固定し、フローサイトメトリー分析のために４℃の遮光条件下で保存した。

【０１０５】

４．４．１．４　ELISPOTアッセイ

ELISPOTアッセイは、リステリアワクチン接種後のマウス脾細胞におけるＴｈ１－サイトカイン特異的誘導を測定する。ELISPOTアッセイは内因性の抗原性ペプチド刺激に応じて出現するＴリンパ球の頻度を測定するために実施され、Geginatらの論文（2001, J. Immunol. 166:1877-1884）で記載されている。Ｂａｌｂ／ｃマウス（１群３匹）に、候補抗原性ペプチド又は対照としてＨＢＳＳを発現するＬ．モノサイトゲネスをワクチン接種する。ワクチン接種の５日後に、全マウス脾臓を収集してプールする。マウス脾細胞の単個細胞懸濁液を、様々な抗原の存在下で３７℃のインキュベータ内で一晩、平板培養する。

【０１０６】

アッセイは、ラット抗マウスＩＦＮ－γ　ｍＡｂでコーティングされ、ニトロセルロースで裏打ちされた９６穴マイクロタイタープレートで実施する。候補抗原性ペプチドの試験のために、1×10^{-5}Ｍペプチド溶液を調製する。丸底９６穴マイクロタイタープレートにおいて、各ウェルにつき、１３５μｌの培地（１０％ＦＣＳ、１００Ｕ／ｍｌペニシリン、１００μｇ／ｍｌストレプトマイシン、1×10^{-5}Ｍ　２－ＭＥ及び２ｍＭグルタミンを補充したα変法イーグル培地（Life Technologies、Eggenstein、ドイツ））中の6×10^{5}の非分離脾細胞を１５μｌの1×10^{-5}Ｍペプチド溶液と混合して、最終ペプチド濃度を1×10^{-6}Ｍとする。３７℃で６時間のインキュベーションの後、激しいピペット操作によって細胞を再懸濁し、細胞懸濁液の１００μｌ又は１０μｌ（それぞれ4×10^{5}／ウェル又は4×10^{4}／ウェル）をＡｂコーティングされたELISPOTプレートへ移して、３７℃で一晩インキュベートする。ELISPOTプレートにおいて、細胞の分布を確実に均質にするために最終的な量は１５０μｌに調節した。

【０１０７】

精製されたＣＤ４$^{+}$又はＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞は、修正アッセイで以下の通りに試験する。１５μｌの前希釈ペプチド（1×10^{-5}Ｍ）をＡｂコーティングされたELISPOTプレートに直接加え、ＡＰＣとして非免疫動物からの4×10^{5}の脾細胞と混合して最終的な量を１００μｌとする。ＡＰＣの３７℃で４時間のプレインキュベーションの後、Ｌ．モノサイトゲネス免疫マウスから精製した1×10^{5}のＣＤ４$^{+}$又はＣＤ８$^{+}$細胞を各ウェルに５０μｌの量で加え、プレートを３７℃で一晩インキュベートする。特異的ＭＨＣクラスＩ分子を発現する細胞系に1×10^{-6}Ｍのペプチドを３７℃で２時間添加した後に、ELISPOTに基づく生体外でのＭＨＣ制限解析を実施する。その後、応答体脾細胞へのペプチ

ドの結合を予防するために、未結合のペプチドを洗い流す（４回）。ELISPOTプレートの各ウェルにつき、１×１０^{5}のペプチド添加ＡＰＣを、４×１０^{5}又は４×１０^{4}の応答体脾細胞と１５０μｌの最終量で混合する。３７℃で一晩のインキュベーションの後、ELISPOTプレートを接種脾細胞につき、ビオチン標識ラット抗マウスＩＦＮ－γ　ｍＡｂ、ＨＲＰストレプトアビジンコンジュゲート体、及びアミノエチルカルバゾール色素滴で展開する。ELISPOTアッセイの特異性及び感度は、対照の抗原に特異的なＩＦＮ－γ分泌ＣＤ８Ｔ細胞系で制御される。

【０１０８】

４．５　発現タンパク質の回収及び精製

本発明の方法によって生成される発現タンパク質は、当技術分野で公知の任意の方法を使って回収及び精製することができる。以下のセクションは、限定ではなく例示のために、関心のタンパク質の回収及び精製の方法を提供する。

治療タンパク質は、ウイルス、発熱物質、ＤＮＡ断片及び免疫原性タンパク質などの有害な汚染因子を含む危険性が非常に低いように調製しなければならない。同時に、タンパク質の活性及び特異性を維持することが望ましい。

【０１０９】

４．５．１　回収

本発明の方法によって生成される関心のタンパク質は、当技術分野で公知の任意の手法を使って回収することができる。収集した細胞培養培地の清澄化のために、遠心及び濾過がしばしば用いられる。連続流遠心機は大容積に役立つ。この方法を使って、固体を容器に収集して容器は定期的に空にすることができる。数百又は数千リットルの収集された培地を生産する大規模商業又は産業用の培養方法のために、容器を空にするために作業を中止する必要がないように、容器に固体を収集して中身を定期的に排出する断続排出遠心機が利用できる。

【０１１０】

或いは、従来のデッドエンドフィルタ又はクロスフローフィルタを使用して、濾過による清澄化を利用できる。クロスフロー濾過では、培地は濾過膜を通して連続的に再循環され、固体（細胞及び細胞片）を回収し、膜を再使用できる利点を有する。デッドエンド濾過法では固体をフィルタから解放することができないので、フィルタは使用ごとに交換しなければならない。更に、しばしばいくつかのデッドエンドフィルタが直列に配置され、それらの孔径は次第に小さくなり、第１のフィルタは固体を保持し、通常、最後のフィルタは流体を滅菌する。

或いは、それらには限定されないが中空糸カートリッジ（Amersham Biosciences）及び中空糸膜の使用を含む中空ファイバ技術を、収集で用いることができる。

【０１１１】

４．５．２　精製

本発明の方法によって産生されるタンパク質は、限定ではなく例示として挙げると、クロマトグラフィー（例えばイオン交換、アフィニティ及びサイジングカラムクロマトグラフィー）、遠心、示差溶解性及びダイアフィルトレーションを含む、当技術分野で公知の任意の手法を使って精製することができる。そのような手法の例は、Harlow及びLaneの論文（1988, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Harbor Spring Press, New York）及び（Strategies for Protein Purification and Characterization; A Laboratory Manual, Marshakら編, Cold Spring Harbor Press, New York, 1996）で詳細に提示され、それらの開示は本明細書に参照により完全に組み込まれている。

【０１１２】

４．６　リステリアワクチン組成物の使用

４．６．１　ワクチン組成物

リステリアの組換え形態は、ワクチンとして役立つ。リステリアの組換え形態は腫瘍関連抗原、ウイルスタンパク質又は腫瘍関連抗原若しくはウイルスタンパク質を含む融合タンパク質、及びリステリオリシンなどのリステリアタンパク質を発現することができる。

この形態での腫瘍関連抗原の使用は、腫瘍に対する免疫応答を誘導することができる。そのような使用は、本明細書に参照により完全に組み込まれている米国特許第6565852号で記載されている。

【０１１３】

ほとんどの癌は、１つを超える抗原と関連している。１つを超える腫瘍抗原を発現する腫瘍の例としては、それらには限定されないが、ＭＵＣ－１、ＨＥＲ－２／ｎｅｕ、ＭＡＧＥ、ｐ５３、Ｔ／Ｔｎ及びＣＥＡと関連することが示された乳癌、ＭＵＣ－２、ＭＵＣ－４、ＣＥＡ、ｐ５３及びＭＡＧＥファミリーと関連することが明らかになった結腸癌、ＭＡＧＥファミリーのメンバー、ＭＡＲＴ－１及びｇｐ１００と関連することが明らかになった黒色腫、並びにＧＭ２、Ｔｎ、ｓＴｎ、Thompson-Friedenreich抗原（ＴＦ）、ＭＵＣ１、ＭＵＣ２、ヒト絨毛性性腺刺激ホルモンのβ鎖（ｈＣＧベータ）、ＨＥＲ２／ｎｅｕ、ＰＳＭＡ及びＰＳＡと関連していた前立腺癌がある。実際、腫瘍の抗原消失変異体は免疫系のプレッシャーの下で発現ことができる（Zhangらの論文（Clin. Cancer Res. 1998 4:2669）、Kawashimaらの論文（Hum. Immunol. 1998 59:1））という事実を補償するために、複数群の抗原が癌に対する免疫療法での使用のために提案された。したがって、ワクチンは、それぞれ異なる腫瘍関連抗原又は融合タンパク質の混合物を発現する組換えＬ．モノサイトゲネスの混合物を含むことができ、各融合タンパク質はリステリオリシンの切断型に融合した異なる腫瘍関連抗原を含む。

【０１１４】

リステリア生菌を含むワクチンの調製のためには、弱毒化突然変異株を使うことが好ましい。本発明の好ましい一実施態様では、弱毒化細菌は、野生型株と同程度の効率で宿主に侵入して感染細胞のサイトゾル内に放出される野生型リステリアの突然変異体であるが、それは細胞内及び細胞間の移動において減衰する。突然変異体細菌は、したがって、１感染細胞から隣接細胞（細胞から細胞への拡散）へ移動することができない。これは、細胞内及び細胞間の移動能力の減少（例えば、野生株と比較して）を例示する。

好ましい一実施態様では、本発明はEphA2などの抗原性ペプチドを発現するように操作されたリステリア細菌、及び、EphA2などの抗原性ペプチドの過剰発現と関連する疾患の管理、治療又は予防のためのそのようなリステリアの使用を提供する。

【０１１５】

リステリアベースのEphA2ワクチンは、EphA2抗原性ペプチドを発現するリステリアの１つ又は複数の菌株を含むことができる。他の実施態様では、リステリアベースのEphA2ワクチンは、１つ又は複数のEphA2抗原性ペプチドを発現するように操作されたリステリア菌株を含むことができる。

好ましい一実施態様では、本発明のリステリアベースのEphA2ワクチンは、リステリアモノサイトゲネス種を含む。

【０１１６】

４．６．２　治療及び予防用途

本発明の方法を用いて発現されるワクチンは、疾患又は障害の治療又は予防のための療法上の活性を有することができる。そのようなワクチンで治療又は予防することができる疾患及び障害の例としては、決してそれらに限定されないが、癌、自己免疫の疾患及び障害、感染性疾患及び障害、並びに異常な血管形成を伴う疾患がある。過剰増殖性疾患及び障害の代表例としては、それらには限定されないが、癌、ムチン関連の障害、例えば喘息、慢性閉塞性肺疾患（COPD）、慢性気管支炎、気管支拡張症及び嚢胞性線維症、再狭窄、並びに新生内膜過形成がある。異常な血管形成を伴う疾患の代表例としては、それらには限定されないが、黄斑変性症、糖尿病性網膜症、未熟児網膜症、血管再狭窄、小児血管腫、尋常性疣贅、乾癬、カポジ肉腫、神経線維腫症、劣性栄養障害性表皮水疱症、関節リウマチ、強直性脊椎炎、全身紅斑性、乾癬性関節炎、ライター症候群、及びシェーグレン症候群、子宮内膜症、子癇前症、アテローム性動脈硬化症及び冠状動脈疾患がある。

【０１１７】

ある実施態様では、過剰増殖性疾患は癌である。ある実施態様では、癌は上皮細胞起源

のものであり、且つ／又は前記癌細胞の組織型を有する非癌細胞と比較してEphA2を過剰発現する細胞を含む。具体的な実施態様では、癌は皮膚、肺、結腸、乳腺、卵巣、食道、前立腺、膀胱又は膵臓の癌であるか、腎細胞癌又は黒色腫である。他の実施態様では、癌はＴ細胞起源である。具体的な実施態様では、癌は白血病又はリンパ腫である。他の実施態様では、過剰増殖性障害は非腫瘍性である。具体的な実施態様では、非腫瘍性の過剰増殖性障害は、上皮細胞障害である。例示的な非腫瘍性の過剰増殖性障害は、喘息、慢性肺閉塞性疾患、肺線維症、気管支過剰反応症、乾癬及び脂漏性皮膚炎である。

【０１１８】

限定するのではなく例示として、本発明は、非限定例として、ヒト、家庭のペット及び家畜を含む哺乳動物の治療、及び爬虫類、鳥類及び魚類の治療を包含する。

また、本発明は、本発明の方法を用いて産生される関心のタンパク質が、疾患又は障害の治療又は予防のために、当技術分野で公知の他の治療剤と同時、又はその前後に投与される併用療法を企図する。

【０１１９】

４．６．３　タンパク質産生

本発明の方法は、リステリア細胞からのタンパク質の産生も包含する。リステリアはグラム陽性であるので、分泌されるいかなるタンパク質も増殖培地内で見られ、標準の方法を用いて容易に収集することができる。

【０１２０】

４．７　医薬製剤

一実施態様では、本発明の方法を用いて産生されたいかなるタンパク質も、医薬組成物に組み込むことができる。本発明に従う使用のための医薬組成物は、１つ又は複数の生理的に許容し得る担体又は賦形剤を用いて、従来の方法で製剤化することができる。

このように、本発明のタンパク質は、吸入若しくは吹入法（経口若しくは経鼻）による投与、又は経口、非経口若しくは経粘膜（口内、膣、直腸、舌下など）投与のために製剤化することができる。特定の一実施態様では、局所又は全身の非経口投与が利用される。

【０１２１】

経口投与のためには、医薬組成物は、例えば錠剤又はカプセルのような、医薬として許容し得る賦形剤を用いる従来の手段で調製される剤型が可能で、このような賦形剤としては、結合剤（例えば、アルファ化されたトウモロコシデンプン、ポリビニルピロリドン若しくはヒドロキシプロピルメチルセルロース）、充填剤（例えばラクトース、ミクロ結晶セルロース若しくはリン酸水素カルシウム）、潤滑剤（例えば、ステアリン酸マグネシウム、タルク若しくはシリカ）、崩壊剤（例えば、ジャガイモデンプン若しくはグリコール酸デンプンナトリウム）、又は湿潤剤（例えばラウリル硫酸ナトリウム）がある。錠剤は当業界周知の方法によってコーティングすることができる。経口投与のための液状製剤は、例えば液剤、シロップ又は懸濁液の剤形でもよく、或いはそれらは使用時に水又は他の適当な溶媒で再構成するための乾燥品として提供されてもよい。そのような液状製剤は、医薬として許容し得る添加物、例えば、懸濁剤（例えばソルビトールシロップ、セルロース誘導体又は水素化食用脂）、乳化剤（例えばレシチン又はアカシア）、非水性溶媒（例えば、アーモンドオイル、油性エステル、エチルアルコール又は分別植物油）及び防腐剤（例えば、メチル－若しくはプロピル－ｐ－ヒドロキシベンゾアート又はソルビン酸）などを用いて、従来の手段で調製することができる。製剤は適宜、緩衝塩、香料、着色剤及び甘味剤を含むこともできる。

【０１２２】

経口投与のための製剤は、活性化合物の放出を制御できるように適切に製剤化することができる。

口内投与では、組成物は従来の方法で製剤化した錠剤又はロゼンジの剤型をとることができる。

【０１２３】

吸入による投与では、タンパク質は、適当な噴射剤、例えばジクロロジフルオロメタン

、トリクロロフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタン、二酸化炭素又は他の適当なガスを使った加圧パック又は噴霧器からの、エアゾール噴霧の形で便利に送達される。加圧式エアゾールの場合、用量単位は、計量した量を送達するためのバルブを備えることにより決めることができる。例えば吸入器又は吹入器に用いられるゼラチンのカプセル及びカートリッジは、化合物と例えばラクトース又はデンプンなどの適当な粉状基剤との粉状混合物を含むように製剤化することができる。

【０１２４】

タンパク質は、注射、例えばボーラス注射又は連続注入による非経口投与のために製剤化することができる。注射用の剤型は保存剤を加えた用量単位の剤型、例えばアンプル又は多用量容器の形で提供してもよい。組成物は、油性又は水性溶媒中の懸濁液、液剤又は乳剤のような形態をとることができ、それらは懸濁剤、安定化剤及び／又は分散剤のような製剤用の剤を含むことができる。或いは、活性成分は、適当な溶媒、例えば発熱性物質を含まない無菌水で使用時に再構成するための粉末の形態でもよい。

タンパク質は、例えば、カカオ脂又は他のグリセリドなどの従来の坐剤基剤を含有する坐薬又は停留浣腸などの直腸組成物の形態で製剤化することもできる。

【０１２５】

前記剤形に加えて、予防剤又は治療剤は、デポー製剤として製剤化することもできる。このような長時間作用性剤型は、植込み（例えば、経皮的若しくは筋肉内）、又は筋肉内注射により投与することができる。このように、例えば、タンパク質は適当な重合物質又は疎水材料（例えば、許容し得る油に溶かした乳剤として）、又はイオン交換樹脂で製剤化でき、或いは難溶性誘導体、例えば難溶性塩として製剤化することができる。

【０１２６】

本発明は、タンパク質製剤が、その量を表示しているアンプル又はサッシェなどの密封容器に封入されることを規定する。一実施態様では、タンパク質製剤は密封容器に入っている乾燥した滅菌凍結乾燥粉末又は無水濃縮物として供給され、それらは例えば水又は生理食塩水で、対象への投与に適当な濃度に再構成することができる。

【０１２７】

本発明のある実施態様では、タンパク質は静脈内注射のために１ｍｇ／ｍＬ、５ｍｇ／ｍＬ、１０ｍｇ／ｍＬ、２５ｍｇ／ｍＬ、５０ｍｇ／ｍＬ、７５ｍｇ／ｍＬ、１００ｍｇ／ｍＬ、１２５ｍｇ／ｍＬ、１５０ｍｇ／ｍＬ、１７５ｍｇ／ｍＬ、２００ｍｌ／ｍｌ、２２５ｍｇ／ｍＬ、２５０ｍｇ／ｍＬ、２７５ｍｇ／ｍＬ、及び３００ｍｇ／ｍＬで、また、静脈内注射又は反復皮下投与のために５ｍｇ／ｍＬ、１０ｍｇ／ｍＬ、２５ｍｇ／ｍＬ、５０ｍｇ／ｍＬ、７５ｍｇ／ｍＬ、１００ｍｇ／ｍＬ、１２５ｍｇ／ｍＬ、１５０ｍｇ／ｍＬ、１７５ｍｇ／ｍＬ、２００ｍｌ／ｍｌ、２２５ｍｇ／ｍＬ、２５０ｍｇ／ｍＬ、２７５ｍｇ／ｍＬ及び３００ｍｇ／ｍＬで製剤化される。

【０１２８】

ある実施態様では、本発明の抗原性ペプチド発現リステリアは、静脈内注射のために１ｍｇ／ｍｌ、５ｍｇ／ｍｌ、１０ｍｇ／ｍｌ及び２５ｍｇ／ｍｌで、反復皮下投与及び筋肉内注射のために５ｍｇ／ｍｌ、１０ｍｇ／ｍｌ及び８０ｍｇ／ｍｌで製剤化される。他の実施態様では、本発明の抗原性ペプチド発現リステリアは約1×10^{2}ＣＦＵ／ｍｌから約1×10^{12}ＣＦＵ／ｍｌの範囲の量で、例えば1×10^{2}ＣＦＵ／ｍｌ、5×10^{2}ＣＦＵ／ｍｌ、1×10^{3}ＣＦＵ／ｍｌ、5×10^{3}ＣＦＵ／ｍｌ、1×10^{4}ＣＦＵ／ｍｌ、5×10^{4}ＣＦＵ／ｍｌ、1×10^{5}ＣＦＵ／ｍｌ、5×10^{5}ＣＦＵ／ｍｌ、1×10^{6}ＣＦＵ／ｍｌ、5×10^{6}ＣＦＵ／ｍｌ、1×10^{7}ＣＦＵ／ｍｌ、5×10^{7}ＣＦＵ／ｍｌ、1×10^{8}ＣＦＵ／ｍｌ、5×10^{8}ＣＦＵ／ｍｌ、1×10^{9}ＣＦＵ／ｍｌ、5×10^{9}ＣＦＵ／ｍｌ、1×10^{10}ＣＦＵ／ｍｌ、5×10^{10}ＣＦＵ／ｍｌ、1×10^{11}ＣＦＵ／ｍｌ、5×10^{11}ＣＦＵ／ｍｌ又は1×10^{12}ＣＦＵ／ｍｌで製剤化される。

【０１２９】

組成物は、必要に応じて、活性成分を含有する１つ又は複数の単位用量剤形を含むこと

ができるパック又はディスペンサー器具で提供されてもよい。このパックは、例えば、ブリスターパックのような金属又はプラスチックのホイルを含むことができる。このパック又はディスペンサー器具には、投与のための指示書が添付されてもよい。

【０１３０】

ある好ましい実施態様では、パック又はディスペンサーは１つ又は複数の単位用量剤形を含み、特定の疾患又は障害の治療のためにPhysician's Desk Reference （第56版、 2002、本明細書に参照により完全に組み込まれる）で定められた推奨投薬量製剤以外のものは含まない。

【０１３１】

４．７．１　投薬量

疾患又は障害又はその１つ又は複数の症状の治療、予防、管理又は改善に有効な本発明の組成物の量は、標準の研究手法で決定することができる。例えば、癌又はその１つ又は複数の症状の治療、予防、管理又は改善に有効な本組成物の投薬量は、当業者に公知の動物モデルなどの動物モデルに本組成物を投与することによって決定することができる。更に、最適投薬量範囲の特定を容易にするために、インビトロアッセイを任意選択で用いることができる。

【０１３２】

好ましい有効量の選択は、当業者に公知のいくつかの要素を考慮して（例えば、治験を通して）、当業者は決定することができる。そのような要素としては、治療又は予防する疾患、関係する症状、患者の体重、患者の免疫状態及び投与される医薬組成物の精度を反映することが当業者によって知られている他の要素がある。

【０１３３】

製剤で使用される正確な用量は、投与経路、及び癌又は他の疾患若しくは障害の重症度に依存するので、臨床医の判断及び各々の患者の状況によって決定されなければならない。有効量は、インビトロ又は動物モデルの試験系から導かれた用量反応曲線から推定できる。

【０１３４】

ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、融合タンパク質及び抗体については、患者に投与される投薬量は、一般的に患者の体重に対して０．０１ｍｇ／ｋｇから１００ｍｇ／ｋｇである。好ましくは、患者に投与される投薬量は、患者の体重に対して０．１ｍｇ／ｋｇから２０ｍｇ／ｋｇの間にあり、より好ましくは患者の体重に対して１ｍｇ／ｋｇから１０ｍｇ／ｋｇの間にある。通常、外来ポリペプチドへの免疫応答のために、ヒト及びヒト化抗体の人体内の半減期は他種に由来する抗体よりも長い。このように、ヒトの抗体ではより低い投薬量と少ない投与回数がしばしば可能である。

【０１３５】

好ましい一実施態様では、抗体又は抗体断片の用量は通常０．１～１０ｍｇ／ｋｇ／週であり、好ましくは１～９ｍｇ／ｋｇ／週、より好ましくは２～８ｍｇ／週、より好ましくは３～７ｍｇ／ｋｇ／週、最も好ましくは４～６ｍｇ／ｋｇ／週である。他の実施態様では、対象、好ましくはヒトは、抗体又は抗体断片の予防的又は治療的有効量の１用量又は複数用量を投与され、前記対象に投与される液状製剤中の抗体又は抗体断片の予防的又は治療的有効量の用量は、治療が進むに従い、例えば０．０１μｇ／ｋｇ、０．０２μｇ／ｋｇ、０．０４μｇ／ｋｇ、０．０５μｇ／ｋｇ、０．０６μｇ／ｋｇ、０．０８μｇ／ｋｇ、０．１μｇ／ｋｇ、０．２μｇ／ｋｇ、０．２５μｇ／ｋｇ、０．５μｇ／ｋｇ、０．７５μｇ／ｋｇ、１μｇ／ｋｇ、１．５μｇ／ｋｇ、２μｇ／ｋｇ、４μｇ／ｋｇ、５μｇ／ｋｇ、１０μｇ／ｋｇ、１５μｇ／ｋｇ、２０μｇ／ｋｇ、２５μｇ／ｋｇ、３０μｇ／ｋｇ、３５μｇ／ｋｇ、４０μｇ／ｋｇ、４５μｇ／ｋｇ、５０μｇ／ｋｇ、５５μｇ／ｋｇ、６０μｇ／ｋｇ、６５μｇ／ｋｇ、７０μｇ／ｋｇ、７５μｇ／ｋｇ、８０μｇ／ｋｇ、８５μｇ／ｋｇ、９０μｇ／ｋｇ、９５μｇ／ｋｇ、１００μｇ／ｋｇ又は１２５μｇ／ｋｇ増加する。他の実施態様では、対象、好ましくはヒトは、抗体又は抗体断片の予防的又は治療的有効量の１用量又は複数用量を投与され、前記対象に投与さ

れる本発明の液状製剤中の抗体又は抗体断片の予防的又は治療的有効量の用量は、治療が進むに従い、例えば０．０１μｇ／ｋｇ、０．０２μｇ／ｋｇ、０．０４μｇ／ｋｇ、０．０５μｇ／ｋｇ、０．０６μｇ／ｋｇ、０．０８μｇ／ｋｇ、０．１μｇ／ｋｇ、０．２μｇ／ｋｇ、０．２５μｇ／ｋｇ、０．５μｇ／ｋｇ、０．７５μｇ／ｋｇ、１μｇ／ｋｇ、１．５μｇ／ｋｇ、２μｇ／ｋｇ、４μｇ／ｋｇ、５μｇ／ｋｇ、１０μｇ／ｋｇ、１５μｇ／ｋｇ、２０μｇ／ｋｇ、２５μｇ／ｋｇ、３０μｇ／ｋｇ、３５μｇ／ｋｇ、４０μｇ／ｋｇ、４５μｇ／ｋｇ、５０μｇ／ｋｇ、５５μｇ／ｋｇ、６０μｇ／ｋｇ、６５μｇ／ｋｇ、７０μｇ／ｋｇ、７５μｇ／ｋｇ、８０μｇ／ｋｇ、８５μｇ／ｋｇ、９０μｇ／ｋｇ、９５μｇ／ｋｇ、１００μｇ／ｋｇ又は１２５μｇ／ｋｇ減少する。

【０１３６】

小分子（ペプチド又はポリペプチド）の用量の例としては、対象又はサンプル重量のキログラムにつき小分子のミリグラム又はマイクログラムの量がある（例えば、１キログラムにつき約１マイクログラムから１キログラムにつき約５００ミリグラム、１キログラムにつき約１００マイクログラムから１キログラムにつき約５ミリグラム、又は１キログラムにつき約１マイクログラムから１キログラムにつき約５０マイクログラム）。

【０１３７】

本発明のリステリアベースのワクチン中のリステリアの投薬量に関しては、投薬量はコロニー形成単位（ｃ．ｆ．ｕ．）の量に基づく。通常、様々な実施態様で、投薬量範囲は約１．０ｃ．ｆ．ｕ．／ｋｇから約1×10^{10}ｃ．ｆ．ｕ．／ｋｇ、約１．０ｃ．ｆ．ｕ．／ｋｇから約1×10^{8}ｃ．ｆ．ｕ．／ｋｇ、約1×10^{2}ｃ．ｆ．ｕ．／ｋｇから約1×10^{8}ｃ．ｆ．ｕ．／ｋｇ、及び約1×10^{4}ｃ．ｆ．ｕ．／ｋｇから約1×10^{8}ｃ．ｆ．ｕ．／ｋｇである。有効量は、動物モデル試験系から導かれた用量反応曲線から推定できる。ある例示的な実施態様では、投薬量範囲は、マウスLD_{50}の０．００１倍から１０，０００倍、マウスLD_{50}の０．０１倍から１，０００倍、マウスLD_{50}の０．１倍から５００倍、マウスLD_{50}の０．５倍から２５０倍、マウスLD_{50}の１倍から１００倍、及びマウスLD_{50}の５倍から５０倍である。ある具体的な実施態様では、投薬量範囲は、マウスLD_{50}の０．００１倍、０．０１倍、０．１倍、０．５倍、１倍、５倍、１０倍、５０倍、１００倍、２００倍、５００倍、１，０００倍、５，０００倍又は１０，０００倍である。

予防的又は治療的剤の投薬量は、Physicians' Desk Reference（だい56版，2002）で記載される。

【０１３８】

４．８　キット

本発明は、本発明のリステリアベースのワクチン又は本発明のリステリアベースのワクチンの成分で満たした１つ又は複数の容器を含むパック又はキットを提供する。更に、癌又は他の過剰増殖性障害の治療に役立つ１つ又は複数の他の予防又は治療剤を、パック又はキットに含ませることもできる。そのような容器に任意に付随することができるのは、医薬品又は生物製剤の製造、使用又は販売を規制する政府機関が規定した様式の注意書であり、これはその機関による人へ投与するための製造、使用又は販売の承認を表すものである。

【実施例】

【０１３９】

（５．実施例）

５．１　一般方法

実施例は、特記されている場合を除いて以下の通りに実施した。

【０１４０】

装置の準備

加圧滅菌可能な７Ｌのバイオリアクター容器（Applikon）を、プローブ、供給ビン及び他の器材を含む全ての周辺装置と連結し、全てのポートは閉鎖換気系を形成するために密封した。バイオリアクターに含まれたのは、１Ｌの培養バッチ量につき０．５ｍｌのＡｎ

ｔｉｆｏａｍ　２０４、Ｓｉｇｍａカタログ番号Ａ６４２６、である。容器は、１２１℃を超える温度で３０分の間加圧滅菌した。処理サイクルが完了すると、無菌の容器は室温に冷却した。次に容器に、０．２２μｍフィルタを通して４Ｌのバッチ増殖培地を投入した。３つのラシュトン型インペラを備えるリアクターを、１０００ｒｐｍで撹拌した。リアクター内に空気を４Ｌ／分の流速で拡散させた。リアクターは、３７℃に加熱した。温度が定常状態に達したとき、溶存酸素プローブを１００％飽和空気で較正した。

【０１４１】

【表１】

表1:接種材料増殖培地

成分	濃度
イーストレート(Yeastolate)、限外濾過する	25 g/L
無水ブドウ糖(グルコース)	10 g/L
KH_2PO_4	9 g/L
10 N NaOH	5 mL/L

【０１４２】

バイアル解凍及び接種材料増殖

１ｍＬバイアルのリステリアを－８０℃から解凍し、５００ｍＬの通気キャップ振盪フラスコ内の５０～１００ｍＬの接種材料増殖培地に入れた。この培養物は、振盪機／インキュベータ内で、３７℃及び２００ｒｐｍで一晩増殖させた。３～５のＯＤ単位の濃度に到達した後に、接種材料は滅菌注射器を使ってバッチ培養の０．５％の量でバイオリアクターに導入した。

【０１４３】

バイオリアクターバッチ相

バイオリアクター内の基本培地は、接種材料のために用いたのと同じ酵母抽出物ベースの培地であった。（２５ｇ／Ｌ酵母抽出物、９ｇ／Ｌ　KH_2PO_4、１０ｇ／Ｌグルコース）リステリア培養物の増殖は、定期的な光学密度測定を用いて細胞増殖について分析した。培養物は定期的に平板培養して、生菌濃度をＣＦＵ／ｍＬの単位で測定した。培養物は、増殖のために必要な炭素源が消耗するかほとんど消耗するまで、バッチ相で増殖させた。リアクターのｐＨは、３ＭのNH_4OH溶液を用いて７．２に調節した。溶存酸素セットポイントは５０％であり、それ以下では酸素をバイオリアクターに吹き込んだ。培養物は、１０００ｒｐｍの速度で撹拌した。温度は、３７℃に調節した。グルコース及びラクトースは、YSI 2300 STAT Plus Glucose & Lactate Analyzer（YSI Incorporated、オハイオ州Yellow Springs）を使って測定した。

【０１４４】

フィーディングスキーム

バッチ培地の炭素源が消耗したかほとんど消耗したとき、グルコースからなり、また、恐らく他の成分を含む連続供給食物を、２．８ｇグルコース／時間の初速度でバイオリアクターに導入した。供給速度は指数関数的に増加し、倍加時間は１０時間、ｍｕ＝０．０７（１／時間）であった。

【０１４５】

コロニー形成単位の測定

リステリア培養物を、ダルベッコのリン酸緩衝食塩水を含む緩衝液で希釈した。希釈した培養物は、トリプチケース大豆寒天プレート上に広げた。室温又は３７℃でのインキュベーション期間の後、コロニーを計数して、ＣＦＵ／ｍＬの単位の生菌濃度のための希釈係数を掛けた。

【０１４６】

（５．２　実施例１）

以下の例は、本発明の流加方法は、７Ｌバイオリアクター（Applikon）を用いて少なくとも２．２のOD_{600}のリステリア培養物を産生することを実証する。

１バイアルのリステリアａｃｔＡ　ｉｎｌＢを、１００ｍｌの合成培地（ｗ／１０ｇ／Ｌグルコース）に解凍して入れた。この培地は、８．５ｇ／Ｌ　K_2HPO_4、１．５ｇ／Ｌ　NaH_2PO_4、０．５ｇ／Ｌ　NH_4Cl、０．４１ｇ／Ｌ　$MgSO_4-7H_2O$、０．０４８ｇ／Ｌ　$FeCl_3-6H_2O$、０．４８ｇ／Ｌニトリロ酢酸、１ｍｇ／Ｌリボフラビン、１ｍｇ／Ｌチアミン－ＨＣｌ、１００μｇ／Ｌ　Ｄ－ビオチン、１μｇ／Ｌチオクト酸、７６．８ｍｇ／Ｌ　Ｌ－システイン（遊離塩基）、それぞれ２００ｍｇ／ＬのＬ－ロイシン、Ｌ－イソロイシン、Ｌ－バリン、Ｌ－メチオニン、Ｌ－アルギニン及びＬ－ヒスチジン－ＨＣｌを含み、Labline Environ-Shaker内で３７℃及び１２０ｒｐｍでインキュベートする。

【０１４７】

翌朝、接種材料のＯＤは２．１３と測定された。１００ｍｌの接種材料を用いてバイオリアクターに接種した。バイオリアクターの基礎培地は、１０ｇ／Ｌグルコースを含む、４Ｌのトリプシン大豆ブロス（Becton Dickinson Bacto（商標）トリプシン大豆ブロス、ニュージャージー州Franklin Lakes）であった。回転速度は、５００ｒｐｍまで上げた。

【０１４８】

９５分後に、撹拌機速度を１０００ｒｐｍまで高くし、ｐＨを７．２に維持するために３Ｍ　NH_4OHを用いてｐＨ調節を開始した。８５５分後に、１００ｍｇ／Ｌビオチン、１ｇ／Ｌリボフラビン、１ｇ／Ｌチアミン及び１ｍｇ／Ｌチオクト酸を含む１０００倍のビタミン溶液の５ｍｌを加えた。この時点で、溶存酸素（ｄＯ）は低下し始めた。８７５分後に、食物供給を開始した（グルコース６５０ｇ／Ｌ）。初期供給速度は４５ｇグルコース／時間であり、１４時間（ｍｕ＝０．０５１／時間）の倍加時間で増加させた。約１４０５分後に、供給食物を中止した。１４９０分後に、１０００倍のビタミン液の５ｍｌを加えたが、培養物は復活しなかった。

【０１４９】

【表２】

表2:実施例1の結果

時間(分)	溶存酸素 (DO;%)	OD_{600}	グルコース (g／L)	乳酸 (g／L)
0	100			
75	92.35	0.264	9.36	0.088
235	104.9	0.78	8.83	0.231
310	69.15	1.62	7.87	0.273
445	60.5	2.56	6.49	0.382
505	69.85	4.0	5.49	0.462
805	73.0	7.6	3.33	1.32
1365	70.45	10.9	63.3	2.95
1635	70.55	8.5	60.9	3.67

最高１０．９のOD_{600}が達成された。

【０１５０】

（５．３　実施例２）

この実施例は、セクション５．１で概説される標準法により厳密に従う。食物供給は１４時間の倍加時間にプログラムされ、初期供給速度は、与えられた時間内に細胞が２倍に

なるために必要なグルコース量の推定に基づき、約２．０ｇグルコース／時間に調節された。リステリアの初期接種材料は、ＯＤが１．１であった。食物供給は、６９０分後に開始された（６５０ｇ／Ｌ、５０ｍｌのビタミン１０００倍液）。２０９５分後に、５０ｍｌのビタミン１０００倍液を加えた。

【０１５１】

【表３】

表3:実施例2の結果

時間(分)	溶存酸素(DO;%)	OD_{600}	グルコース(g／L)	ラクトース(g／L)	添加した供給食物／基本(ml)	供給食物分数／基本　分数
0	100					
630	69.1	7.3	0.107	1.15		
780	88.85	7.1	0.094	0.827		
960	75.8	8.0	0.285	0.823		
1090	107.95	7.9				
1210	107.95	10.7	0.113	0.618	100/260	4.01/1.6
1445	108.0	14.0	0.124	0.830	140/340	5.3/3.3
2015	108.0	14.2	0.371	2.94	220/510	8.02/7.4
2275	107.95	14.2	0.500	4.24	9.52/10.1	270/600

最高１４．２のOD_{600}が達成された。

【０１５２】

（５．４　実施例３）

以下の相違点を除いてセクション５．１で概説されるプロトコルを繰り返した。食物供給は、７０５分後に開始された（６５０ｇ／Ｌグルコース、５０ｍｌのビタミン１０００倍液）。２２０５分後に、５０ｍｌのビタミン１０００倍液を更に加えた。

【０１５３】

【表４】

表4:実施例3の結果

時間(分)	溶存酸素(DO;%)	OD_{600}	グルコース(g／L)	ラクトース(g／L)	添加した供給食物／基本(ml)	供給食物分数／基本　分数
0	100					
645	120.45	8.0	1.21	0.654		0/0
795	126.85	8.4	1.071	0.645		1.5/248.9
975	139.9	9.1	1.083	0.468		3.7/250.7
1095	110.55	10.1				6.1/252.3
1195	137.7	14.8	0.101	0.534	70/300	8.1/253.6
1560	114.25	16.1	0.200	0.891	120/380	17.6/258.8
2130	115.65	18.7	1.71	2.35	270/540	44.1/267.9
2385	120.05	17.7	5.70	3.31	320/620	63.4/272.5

最高１８．７のＯＤ$_{600}$が達成された。

【０１５４】

（実施例４～９）

以下の実施例は本発明の流加方法を示し、バッチ培地及び供給食物中の酵母抽出物及びグルコースの濃度は変化させている。

上述の方法を用いてリステリアモノサイトゲネスをバイオリアクターに接種した。バッチ培地は、９ｇ／ＬのＫＨ$_2$ＰＯ$_4$及び５ｍｌ／Ｌの１０Ｎ　ＮａＯＨに加えて、表５で示す濃度の酵母抽出物及びグルコースを含んでいた。供給食物溶液は、表５で示すようなグルコース及び酵母抽出物の濃度からなった。

【０１５５】

【表５】

表5:実施例4～9の概要

実施例	バッチ酵母抽出物(g／L)	バッチグルコース(g／L)	供給酵母抽出物(g／L)	供給グルコース(g／L)	最大細胞濃度	最大OD
4	25	5	250	50	1.41E+10	11.9
5	25	0	0	650	7.10E+09	11.9
6	50	0	0	650	1.80E+10	18.3
7	50	0	0	650	2.07E+10	26.1
8	100	0	0	650	2.57E+10	39
9	100	5	0	650	2.60E+10	39

【０１５６】

実施例４及び５の比較は、酵母抽出物の供給は最大ＯＤ（両方とも、１１．９の最大ＯＤ）を向上させなかったが、最大生細胞密度を７．１×１０^{9}から１．４１×１０^{10}コロニー形成単位／ｍＬへ向上させることを示す。実施例６～９では、供給食物の代わりに更なる酵母抽出物をバッチ培地に取り込ませた。これらの実施例は、最高２．６×１０^{10}ｃｆｕ／ｍＬ及びＯＤ６００値３９までの、光学細胞密度及び生菌濃度の増加を示した。詳細な実施例データを、表６から１１で示す。

【０１５７】

【表６】

表6:実施例4の結果

時間（分）	光学密度（600nm）	CFU/mL ($x10^9$)
310	4.2	7.3
390	5.7	7.7
530	7.5	9.1
620	7.9	9.4
765	9.3	11.3
940	11.3	14.1
1125	11.5	13.5
1820	11.9	10.2

【０１５８】
【表７】

表7:実施例5の結果

時間（分）	光学密度（600nm）	CFU/mL ($x10^9$)
240	0.3	0.3
340	1.58	1.8
430	4.3	5.1
735	8.2	6.1
1410	11.9	7.1
1665	11.7	4.6

【０１５９】

【表８】

表8:実施例6の結果

時間（分）	光学密度（600nm）	CFU/mL ($x10^9$)
10	0.277	0.04
100	0.27	0.05
230	0.65	0.63
295	1.37	該当なし
400	4	7.2
580	8.4	13.27
1465	18.3	17.9
1740	21.5	16
1900	23.2	11
2250	23.1	7.43
2910	20.8	2.23

【０１６０】
【表９】

表9:実施例7の結果

時間（分）	光学密度（600nm）	CFU/mL ($x10^9$)
165	0.21	該当なし
265	0.67	0.7
380	1.99	3.1
465	4.5	7.3
1440	16.4	20.7
1695	19	18.3
1915	21.9	20.4
2295	26.1	17.3

【０１６１】

【表１０】

表10:実施例8の結果

時間（分）	光学密度（600nm）	CFU/mL ($x10^9$)
165	0.3	0.0033
300	0.46	0.0767
515	2.5	2.07
580	4.9	23.3
1455	23	23.1
1805	39	25.7
3255	36	該当なし

【０１６２】
【表１１】

表11:実施例9の結果

時間（分）	光学密度（600nm）	CFU/mL ($x10^9$)
185	0.3	0.02
315	0.41	0.0933
530	3.9	3.8
1480	25	26
1830	39	23.3
3260	38	該当なし

【０１６３】
本発明は、記載されている具体的な実施態様によってその範囲が限定されるものではなく、それらは本発明の個々の態様の例示だけが目的であり、機能的に同等な方法及び構成要素は本発明の範囲内である。実際、本明細書で提示及び記載されているものに加えて、本発明の様々な修正が上の説明及び添付図面から当業者には明らかになろう。そのような修正は、添付の特許請求の範囲に入るものとする。
様々な参考文献が本明細書で引用されているが、それらの開示は参照により完全に組み込まれる。

フロントページの続き

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

(72)発明者 ブリアン エー. ルッセルル
アメリカ合衆国 ２０８７４ メリーランド州 ゲルマンタウン アムバッサドル ドライブ １３６０８

Ｆターム(参考) 4B064 AG01 CA02 CA19 CC09 CD21 DA01
4B065 AA01X AA93Y AB01 AC14 BB15 BB20 BB27 BB29 BC13 CA45
4C085 AA03 BA08 DD23 EE01