

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6734274号
(P6734274)

(45) 発行日 令和2年8月5日(2020.8.5)

(24) 登録日 令和2年7月13日(2020.7.13)

(51) Int.Cl.

F 1

C 12 N 15/31	(2006.01)	C 12 N	15/31	Z N A
A 61 K 39/09	(2006.01)	A 61 K	39/09	
A 61 K 39/39	(2006.01)	A 61 K	39/39	
A 61 P 31/04	(2006.01)	A 61 P	31/04	
C 07 K 14/315	(2006.01)	C 07 K	14/315	

請求項の数 23 (全 46 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2017-527259 (P2017-527259)
 (86) (22) 出願日 平成27年11月20日 (2015.11.20)
 (65) 公表番号 特表2017-536124 (P2017-536124A)
 (43) 公表日 平成29年12月7日 (2017.12.7)
 (86) 國際出願番号 PCT/US2015/061859
 (87) 國際公開番号 WO2016/081839
 (87) 國際公開日 平成28年5月26日 (2016.5.26)
 審査請求日 平成30年11月19日 (2018.11.19)
 (31) 優先権主張番号 62/082,848
 (32) 優先日 平成26年11月21日 (2014.11.21)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(73) 特許権者 512213332
 ザ ボード オブ リージェンツ オブ
 ザ ユニヴァーシティ オブ オクラホマ
 アメリカ合衆国, 73019 オ克拉ホマ
 州, ノーマン, ルーム 119, パリント
 ン オーヴァル 660
 (74) 代理人 110000958
 特許業務法人 インテクト国際特許事務所
 (72) 発明者 トゥウェテン, ロドニー, ケイ.
 アメリカ合衆国, 73003 オ克拉ホマ
 州, エドモンド, ディア パーク ドライ
 ヴ 1701

審査官 松浦 安紀子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】ニューモリシン突然変異体とその利用方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 1 の 458、459 及び 460 のアミノ酸位置の少なくとも 1 つにおけるアミノ酸置換と、

配列番号 1 の 293 及び 294 のアミノ酸位置の少なくとも 1 つにおけるアミノ酸置換と、

を有し、且つ配列番号 1 と少なくとも 90 % の同一性を示すアミノ酸配列を有することを特徴とする、

精製された突然変異ニューモリシンポリペプチド。

【請求項 2】

請求項 1 に記載の精製された突然変異ニューモリシンポリペプチドにおいて、

前記アミノ酸配列が、配列番号 1 と少なくとも 95 % の同一性を示すことを特徴とする精製された突然変異ニューモリシンポリペプチド。

【請求項 3】

請求項 1 又は請求項 2 に記載の精製された突然変異ニューモリシンポリペプチドにおいて、

当該突然変異ニューモリシンポリペプチドは、G 293S 配列及び L 460D 配列を有することを特徴とする精製された突然変異ニューモリシンポリペプチド。

【請求項 4】

請求項 1 又は請求項 2 に記載の精製された突然変異ニューモリシンポリペプチドにおいて、

10

20

て、

293及び458のアミノ酸位置のアミノ酸置換を有することを特徴とする精製された突然変異ニューモリシンポリペプチド。

【請求項5】

請求項1又は請求項2に記載の精製された突然変異ニューモリシンポリペプチドにおいて、

293及び459のアミノ酸位置のアミノ酸置換を有することを特徴とする精製された突然変異ニューモリシンポリペプチド。

【請求項6】

請求項1又は請求項2に記載の精製された突然変異ニューモリシンポリペプチドにおいて、

293及び460のアミノ酸位置のアミノ酸置換を有することを特徴とする精製された突然変異ニューモリシンポリペプチド。

【請求項7】

請求項1又は請求項2に記載の精製された突然変異ニューモリシンポリペプチドにおいて、

294及び458のアミノ酸位置のアミノ酸置換を有することを特徴とする精製された突然変異ニューモリシンポリペプチド。

【請求項8】

請求項1又は請求項2に記載の精製された突然変異ニューモリシンポリペプチドにおいて、

294及び459のアミノ酸位置のアミノ酸置換を有することを特徴とする精製された突然変異ニューモリシンポリペプチド。

【請求項9】

請求項1又は請求項2に記載の精製された突然変異ニューモリシンポリペプチドにおいて、

294及び460のアミノ酸位置のアミノ酸置換を有することを特徴とする精製された突然変異ニューモリシンポリペプチド。

【請求項10】

請求項1又は請求項2に記載の精製された突然変異ニューモリシンポリペプチドにおいて、

460のアミノ酸位置に置換を有することを特徴とする精製された突然変異ニューモリシンポリペプチド。

【請求項11】

請求項1又は請求項2に記載の精製された突然変異ニューモリシンポリペプチドにおいて、

293のアミノ酸位置に置換を有することを特徴とする精製された突然変異ニューモリシンポリペプチド。

【請求項12】

請求項1又は請求項2に記載の精製された突然変異ニューモリシンポリペプチドにおいて、

293のアミノ酸位置にセリン又はスレオニンを有し、460のアミノ酸位置にアスパラギン酸、グルタミン酸又はアスパラギンを有することを特徴とする精製された突然変異ニューモリシンポリペプチド。

【請求項13】

請求項1又は請求項2に記載の精製された突然変異ニューモリシンポリペプチドにおいて、

当該突然変異ニューモリシンポリペプチドの前記アミノ酸配列が、配列番号40のものであることを特徴とする精製された突然変異ニューモリシンポリペプチド。

【請求項14】

10

20

30

40

50

薬学的に許容できる賦形剤中に配された、1又はそれ以上の請求項1から請求項13のいずれか一項に記載の突然変異ニューモリシンポリペプチドを有することを特徴とする免疫原性組成物。

【請求項15】

請求項14に記載の免疫原性組成物において、当該免疫原性組成物がワクチンであることを特徴とする免疫原性組成物。

【請求項16】

請求項14又は請求項15に記載の免疫原性組成物において、アジュバントを更に含むことを特徴とする免疫原性組成物。

【請求項17】

請求項1から請求項13のいずれか一項に記載の突然変異ニューモリシンポリペプチドをコード化するスクレオチド配列を含むことを特徴とする核酸分子。

10

【請求項18】

請求項17に記載の核酸分子を有することを特徴とする宿主細胞。

【請求項19】

肺炎連鎖球菌 (Streptococcus pneumoniae) によって引き起こされる症状、疾患又は感染の発生の治療、予防、又は防止に用いられる医薬の製造における、請求項1から請求項13のいずれか一項に記載の突然変異ニューモリシンポリペプチドの一又は複数の使用。

【請求項20】

肺炎連鎖球菌によって引き起こされる症状、疾患又は感染の発生の治療、予防、又は防止に用いられる免疫原性組成物であって、請求項1から請求項13のいずれか一項に記載の突然変異ニューモリシンポリペプチドを一又は複数含むことを特徴とする免疫原性組成物。

20

【請求項21】

請求項14又は請求項15に記載の免疫原性組成物の調製方法であって、一又は複数の前記突然変異ニューモリシンポリペプチドと、薬学的に許容できる賦形剤と、を組み合わせることを含むことを特徴とする調整方法。

【請求項22】

請求項16に記載の免疫原性組成物の調製方法であって、

一又は複数の前記突然変異ニューモリシンポリペプチドと、薬学的に許容できる賦形剤と、を組み合わせること、及び、

前記一又は複数の前記突然変異ニューモリシンポリペプチドを前記アジュバントと混合すること、

を含むことを特徴とする調整方法。

30

【請求項23】

請求項1から請求項13のいずれか一項に記載の突然変異ニューモリシンポリペプチドの調製方法であって、

請求項17に記載の前記核酸分子を含む発現ベクター又は請求項18に記載の宿主細胞からポリペプチドを発現させること、及び、

前記発現されたポリペプチドを単離すること、

を含むことを特徴とする調製方法。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の参照 / 関連による引用

本出願は、2014年11月21日に出願された米国シリアル番号第62/082,848号の35USC119(e)の下で利益を主張する。上記関連出願の全内容は関連により本明細書に明確に引用される。

【0002】

米国連邦政府によって寄託された研究または開発に関するの言明

50

この発明は、国立衛生研究所（N I H）によって認められた契約番号 A I 0 3 7 6 5 7 で政府の支援の下になされたものである。合衆国政府は、本発明の特定の権限を持ちます。

【 0 0 0 3 】

背景

コレステロール依存性細胞溶解素（C D C）群は、クロストリジウム属、ストレプトコッカス属、リステリア属、バシラス属、およびアルカノバクテリウム属からの20種以上によって產生される孔形成性毒素（pore-forming toxin）の大きなファミリーである。これらの毒素の孔形成機構は、2つの際立った特性、すなわち、膜コレステロールの存在への絶対的依存性と非常に大きい孔の形成、を示す。それぞれのC D Cは、1つの例外を除いて、タイプIIの分泌システムによって分泌された、可溶性の単量体タンパク質として產生されている。真核細胞に遭遇した際、C D Cは、可溶性の単量体タンパク質から膜に埋め込まれた超分子孔複合体への形質転換変換を受ける。単量体から、オリゴマーで、膜に埋め込まれた孔複合体への転換は、単量体の構造におけるいくつかの特別な変化を必要とする。

10

【 0 0 0 4 】

C D C群は、-溶血性タンパク質としてよく知られているが、細菌性病原体がこれらのタンパク質を、単純な溶血毒や一般的な細胞溶解剤としてよりもはるかに洗練された方法で使用することが、ますます明白になってきている。C D C構造はまた、基本的な孔形成機構を損なうことなく、いくつかのC D C群に関してユニークな特徴の進化を可能とする柔軟性も示している。これらの特徴のいくつかは、C D C群において、補体を活性化する、非ステロール受容体を利用する、p H依存性を示す孔形成機構を示す、またはタンパク質のトランスロケーションチャネルとして機能し得ることに反映される。

20

【 0 0 0 5 】

C D C群は、-シートリッチな、4ドメインのタンパク質である。ドメイン4には、高度に保護されたトリプトファン-リッチなウンデカペプチドが存在し、コレステロールリッチな膜へのいくつかのC D C群の結合において関与している。加えて、ドメイン4の先端で当該ウンデカペプチドに並置された3つのその他の短い疎水性ループ（ループL1、L2およびL3）は、また膜表面に挿入され、そして垂直方向において膜にC D Cをアンカーすることが示されている。膜結合後に、C D Cモノマーは、横方向に拡散し、膜オリゴマーの形成を開始する。

30

【 0 0 0 6 】

プレ孔複合体（prepore complex）が大きなサイズ、おそらく完全な環構造、に達すると、これは、孔複合体へと変化する。膜貫通孔は、プレ孔複合体内でそれぞれのモノマーのドメイン3における2つの-螺旋状バンドル（-helical bundle）が、2つの延長された両親媒性の膜貫通-ヘアピン（transmembrane -hairpin、T M H）に転換される際に形成される。プレ孔の孔への転換に際して、プレ孔構造体の高さは、約40オングストロームの垂直崩壊を受ける。プレ孔構造体の崩壊は、膜表面の著しい距離内でドメイン3 T M Hをもたらし、この位置においてこれらは膜中への協調した挿入をなし、その結果大きな膜貫通-バレル型孔が形成される。このC D C孔は大きく、これは35ないし50の単量体で構成されていて、250ないし300 オングストロームの直径を示す。

40

【 0 0 0 7 】

膜とのC D C単量体の相互作用のプロセスの間に、ドメイン4-サンドイッチの先端での当該ウンデカペプチドと3つその他の短いループ（L1、L2、L3）は、膜表面とのC D Cモノマーの相互作用において膜中に膜に挿入される。これらのループは、膜に深く貫通せず、明らかに貫通孔の構造に直接に関与しない。これらのループの1つの機能は、直立した位置で膜にモノマーを固定するためであると思われる。ドメイン4は膜に垂直方向に存在しており、オリゴマーの状態であっても、水系の環境に囲まれている。

【 0 0 0 8 】

I L Y （インターメディリシン、I n t e r m e d i l y s i n ）の場合、C D Cの

50

ドメイン4は、コレステロールまたは別の受容体を介しているかどうか、膜認識を仲介する。

【0009】

CDC群はまた、インビトロ(生体外)で、広範な有核細胞型の溶解が可能で、この能力が、結果として、多くの研究者によって、CDC群で各種真核細胞を透過処理するために用いられている。インビトロでの一般的な細胞溶解剤としての発揮するこれらの毒素の能力にもかかわらず、細胞溶解が感染の間のCDC群に主要な機能であるということは未だ実証されていない。感染へのCDC群の貢献は、例えば、リストリアモノサイトゲネス(*Listeria monocytogenes*)、ストレプトコッカスピオゲネス(*Streptococcus pyogenes*) (化膿連鎖球菌)、ストレプトコッカスニューモニエ(*Streptococcus pneumoniae*) (肺炎連鎖球菌)、アルカノバクテリウムピオゲネス(*Arcanobacterium pyogenes*)、及びクロストリジウムペルフリングエンス(*Clostridium perfringens*) (ウェルシュ菌)において研究されている。これらの研究のいくつかの結果は、細菌が一般的な細胞溶解剤としてよりもより高度な方法でCDCを使用していることを示唆するものである。またCDCの構造はこれらの菌種の病原性の機構を容易にするいくつかの進化的な形質転換を受けていることを表している。10

【0010】

肺炎連鎖球菌は、人間、特に、幼児、高齢者、慢性疾患者、免疫不全者における、疾患の重要な原因物質である。これは、高い罹患率と死亡率を有する、菌血症/敗血症、肺炎、髄膜炎などの侵襲性疾患有する患者から世界中で頻繁に単離された細菌である。適切な抗生物質の治療しても肺炎連鎖球菌感染症はまだ多くの死の結果をもたらしている。抗菌薬の出現で、肺炎連鎖球菌疾患からの全体的な死亡率が減少しているにもかかわらず、耐性肺炎連鎖球菌株の存在が今日の世界の主要な問題となっており、抗菌薬以外の方法での肺炎連鎖球菌感染症を治療するおよび防ぐ必要性が強調されている。効果的な肺炎連鎖球菌ワクチンは、肺炎連鎖球菌感染症に関連付けられる罹患率と死亡率に大きな影響を与える可能性がある。このようなワクチンはまた乳児および幼児の中耳炎を防ぐために有用である。長期の免疫を提供する新しい免疫原性の肺炎連鎖球菌ワクチンが明らかに必要であり、特に、2歳未満の子供に必要である。なぜなら、この年齢層のグループにおいて疾患の発生率が高く、そして多糖類ワクチン抗原に対する抗体応答は、この年齢層のグループにおいて貧しい。20

【0011】

アメリカ合衆国で毎年肺炎連鎖球菌感染症は、推定、髄膜炎の3,000例、菌血症の50,000例、肺炎の500,000例、および中耳炎の700万例に原因となっている。

【0012】

重症肺炎連鎖球菌感染症は血流および中枢神経系への細菌の播種に起因します。1997年には、地域社会ベースの研究からのデータは、米国における肺炎連鎖球菌菌血症の全体の年間発生率は100,000人あたり推定1530例であることを示した。この割合は、65歳以上の高齢者(100,000人あたり5083例)および2歳以下の子供(100,000人当たり160例)により高いものであった。成人では、肺炎連鎖球菌菌血症の60%-87%が肺炎と関連していました。幼い子どもたちに、感染のプライマリサイトが頻繁に同定されなかった。40

【0013】

米国では、菌血症を取得するリスクは、白人の間で、他の人種/民族グループ(すなわち、黒人、アラスカ先住民、およびアメリカインディアン)の間ににおける人々よりも低くなっている。黒人の大人は、白人よりも3倍~5倍高い菌血症の全体的な発生率(100,000人あたり4958例)を有している。侵襲性肺炎連鎖球菌疾患の発生率は、アラスカ先住民とアメリカインディアンの間で非常に高い。アラスカ先住民および2歳未満のアラスカ先住民の子供たちの間で侵襲性肺炎連鎖球菌感染症の年齢調整年間発生率は、100,000人あたりそれぞれ74例と624例であることが予測監視研究によって決定された。髄膜炎や菌血症肺炎の割合は、他の米国の人口グループに関するよりも、すべての年齢層のアラスカ先住50

民に関して8倍～10倍高いとされている。すべての米国の人団体に関しての最高の発生率は、特定のアメリカンインディアンのグループ（例えば、アパッチ）の間で報告されている。そのようなグループの全体的な年間発生率は、100,000人あたり156例である。これらのグループにおける12歳の子供に関する発生率は、100,000人あたり2396例である。

【0014】

米国では、肺炎連鎖球菌性髄膜炎の推定全体の年間発生率は、100,000人あたり1～2例である。肺炎連鎖球菌性髄膜炎の発生率は、6-24ヶ月齢の子どもや65歳以上の歳の人の間で最も高い。黒人に関する割合は、白人とヒスパニック系のものの2倍である。小児のインフルエンザ菌b型（Hib）（*Haemophilus influenzae type b*）髄膜炎の発生率はHib共役ワクチンの導入後に急速に減少したので、肺炎連鎖球菌は、米国における細菌性髄膜炎の最も一般的な原因となっている（26）。

10

【0015】

薬剤耐性ストレプトコッカス ニューモニエ（DRSP）の株は、米国および世界の他の部分でますます一般的になってきた。いくつかの地域では、肺炎連鎖球菌分離株の35%程の多くが、中間レベル（0.1～1.0 μg/mLに等しい最小阻止濃度{MIC}）または高レベル（2 μg/mL以上のMIC）のペニシリン耐性を有することが報告されている。ペニシリン耐性肺炎連鎖球菌の多くは、他の抗菌薬（例えば、エリスロマイシン、トリメトプリム・スルファメトキサゾール、および拡張スペクトルセファロスポリン）に耐性である。高レベルのペニシリン耐性および多剤耐性は、多くの場合、肺炎連鎖球菌感染症の管理を複雑にし、髄膜炎、肺炎および中耳炎の疑いがある場合の経験的抗菌薬治療を選択することをますます困難にする。非感受性生物に感染した患者を治療することは、高価な代替抗菌剤の使用を必要とするかもしれないし、長期の入院や医療費の増加をもたらすこととなり得る。死亡率における抗菌剤耐性の影響は明確に定義されていない。出現抗菌耐性は、ワクチン接種によって肺炎連鎖球菌感染症を防ぐための必要性をさらに強調するものである。

20

【0016】

現在利用可能な肺炎連鎖球菌ワクチン、PNEUMOVAX（登録商標）23（Merck & Co., Inc., Kenilworth, N.J.）およびPNU-IMMUNE（登録商標）23（Lederle-Praxis Biologicals, Pearl River, NY）は、ストレプトコッカス ニューモニエの23個の精製された莢膜多糖抗原を含む（血清型1、2、3、4、5、6B、7F、8、9N、9V、10A、11A、12F、14、15B、17F、18C、19A、19F、20、22F、23F、および33F）。これらのワクチンは、1983年に米国で認可され、1977年に認可された以前の14価製剤を置き換えた。23価ワクチンの1回投与（0.5 mL）は、フェノール（0.25%）又はチメロサール（0.01%）を防腐剤として添加された等張食塩水に溶解し、各莢膜多糖類抗原の25 μgを含み、アジュバントを含まないものである。1997年では、当該ワクチンの23莢膜タイプは、米国における子供と大人の間で侵襲性肺炎連鎖球菌感染症を引き起こす血清型の少なくとも85%～90%を表していた。1997年において米国で侵襲性薬剤耐性肺炎連鎖球菌感染を最も頻繁に引き起こした6種の血清型（6B、9V、14、19A、19F、および23F）は、当該23価ワクチンに表されている。以下に述べるように、莢膜多糖のみから構成されるワクチンの望ましさには限界がある。

30

【0017】

特にニューモリシンは、全世界で年間100万以上の人間を殺す連鎖球菌性肺炎の病因における重要な成分である。肺炎連鎖球菌肺感染症や中耳炎のためのワクチンの一部としてのニューモリシンの使用は、莢膜多糖に基づくワクチンが遺伝的変異に有効性を失い、ストレプトコッカス ニューモニエの90以上の異なる莢膜血清型があるゆえに、生成することが困難であることから、重要な利点を提供することができます。1つの莢膜タイプに対する免疫は、別の莢膜タイプを防ぐことはできない。最も頻繁に病気を引き起こす株からの23種の莢膜多糖を含んでいる、上述の現在利用可能な肺炎連鎖球菌ワクチンは、いくつかの莢膜多糖の貧しい、免疫原性、血清型の多様性、ならびに経時の血清型、地理的な領域、および年齢別グループにおける血清型の分布の違いが主に関連する重大な欠点を持っている。現在、ニューモリシンの点変異異型体が、ワクチン開発のために使用されている。このニューモリシン変異体（「PD-B」と呼ぶ。）は位置433における単一の変異を含む

40

50

ものである（天然のトリプトファン残基がフェニルアラニンに変更されている。）。ニューモリシンにおけるこの変異は、哺乳類の膜への結合を媒介すると長い間考えられていたコレステロール依存性細胞溶解素（CDC）内の構造である、ドメイン4の保存ウンデカペプチドにおけるものである。

【0018】

ニューモリシンのPd-B変異体は、従来よりワクチン開発に使用されているが、このタンパク質は、依然として哺乳動物細胞の膜への結合後に生じる多様な構造転移を受け得る。これらの変化は劇的にその構造を変更し、患者に効果的な中和免疫応答を刺激する能力を減少させる得る。これは主に、患者の免疫系が「見る」ことができるニューモリシンの構造が、可溶性の単量体ニューモリシンの初期構造に代わって端末細胞に結合したオリゴマー複合体の構造となるためである。さらに重要なことは、現在の遺伝的に毒化したニューモリシンは依然として毒性の許容できないレベルによって妨げられることである。この毒性の基礎はまだ明らかではないが、このトキソイドはまだに哺乳動物の細胞に結合し、オリゴマー化することができるという事実からの結果からのようである。

10

【0019】

したがって、例えばニューモリシン（特にこれに限定されるわけではない。）のような、コレステロール依存性細胞溶解素群の変異体群であって、低減された毒性、低減された溶血活性を有し、未だ対応する疾患生物に対する免疫応答を刺激するものは、非常に有益であろう。

【図面の簡単な説明】

20

【0020】

本発明のいくつかの実施形態は添付の図面に示されている。それは留意されるべきではある。しかし、添付の図面はいくつかの典型的な実施形態を示すのみであり、従って本開示の範囲の限定とみなされることを意図するものではない。さらに、添付の図面において、類似したあるいは同一の参照数字は、共通または類似した要素を識別するために使用されているものの、すべての要素についてこのように数字を付しているわけではない。図面は必ずしも縮尺に従ったものではなく、また、図面におけるある特徴およびある視野は、明快さと簡潔さの利益のため、縮尺において誇張されて、または概略的にしめさえつる場合がある。

【0021】

30

【図1A】

【図1B】

【図1C】

【図1D】および

【図1E】は、様々なコレステロール依存性細胞溶解素の天然アミノ酸のアミノ酸の配置比較を含むものである。本明細書において同定された各タンパク質のアミノ酸配列は、本明細書の表1の配列番号群に対応する。たとえば、図1A-E中のセレオリシン(Celeolysin)は、表1の配列番号2に対応し、そして表1中の配列番号18(PAF)は図1A-E中のヴィリダノリシン(Viridanolysin)に対応する。

【0022】

40

【図2】はILY（インターメディリシン）の結晶構造、およびILYとPFO（バープリンゴリシン、Perfringolysin）のD4結晶構造の比較を示している。（a）に示されるものは、これらの研究で呼ばれる種々の構造および残基の位置を示したILY25の結晶構造のリボンの描写である。（b）に示されるものは、双方のタンパク質23, 24の結晶構造に基づくILYとPFOとのD4構造のリボン描写のオーバーレイである。図示したものは、双方のタンパク質に関するウンデカペプチド、およびILYとPFOのL1-L3ループ残基（後者は括弧内に表示）の相対的位置である。この構造的イメージはVMD2.5を使用して作成した。

【0023】

【図3】は、ILYウンデカペプチドが、コレステロール欠乏膜群に挿入されることを示

50

したものである。ILY残渣A1a-486は、システイン(ILYA486C)に変異し、NBD(インドアセタミド-N,N'-ジメチル-N-(7-ニトロベンズ-2-オキサ-1,3-ジアゾールイル)エチレン-ジアミン)で変性された。当該NBDの蛍光発光が、ILYA486C-NBDのみでインキュベートされた場合(実線)、および、ヒト赤血球(hRBC-破線)、またはコレステロールの欠乏したhRBC(点線)と共にインキュベートされた場合において、測定された。

【0024】

【図4】は、ILYのループL1、L2およびL3が、コレステロール欠乏膜群に挿入されないことを示したものである。膜に挿入することが知られている各D4ループ残基がシステインを置換され、そしてNBDで修飾された。ILYA428C-NBD(a)、ILYA464C-NBD(b)またはILYL518C-NBD(c)がそれのみで(実線)、および、hRBC(破線)、またはコレステロールの欠乏したhRBC(点線)とインキュベートされた。膜コレステロールが次いで、回復され、ループL1、L2、L3の挿入が測定された。ILYA428C-NBD(d)、ILYA464C-NBD(e)、またはILYL518C-NBD(f)がそれのみで(実線)、および、コレステロールの欠乏したhRBC(点線)とインキュベートされた。

10

【0025】

【図5】は、L1-L3ループが、コレステロール-リッチなリポソームに対するPFOの結合を仲介することを示すものであり、(a)天然(実線)およびNEM修飾PFO(破線)の結合のSPR分析、(b)天然PFO(実線)、PFOA401D(長い破線)、PFOA437D(短い破線)、PFOOL491D(点線)の結合のSPR分析である。

20

【0026】

【図6】は、PFOウンデカペプチド システイン スルフヒドリルの化学修飾が、ウンデカペプチド トリプトファン群の膜挿入、当該プレ孔の孔への転換を阻害することを示すものである。PFOウンデカペプチド トリプトファン群の内部蛍光発光における増加は、それらの膜への挿入を測定するために用いられている20、21。(a)天然PFOにおけるトリプトファンの内部蛍光発光の増加は、その可溶性形態(実線)からその膜結合状態(破線)へと移動するときに示される。(b)この(a)に示したのと同じ実験が、Cys-459においてNEMで修飾された天然PFOで繰り返された。

30

【0027】

【図7】は、突然変異ニューモリシン ペプチドないしは野生型ニューモリシンで免疫し、その後ストレプトコッカス・ニューモニエを接種したマウスにおける免疫応答を示すものである。

【発明を実施するための形態】

【0028】

本発明の概念群の少なくとも1つの実施形態を、例示的な図面、実験、結果、および実験室の手順によって詳細に説明するに先立ち、本発明の概念群は、以下の説明に記載しましたは図面、実験および/または結果に例示された構成の詳細および構成要素の配置にその適用が何ら限定されるものではないことが理解されるべきである。本開示は、その他の実施形態のものであり得、また種々の方法において実施ないし実行され得るものである。したがって、本明細書で使用される言語は、最も広い可能な範囲および意味を与えられることが意図されており、また実施形態は、例示的なものであって、網羅的でないことを意味する。また、本明細書で使用される表現および専門用語は、説明の目的のためのものであり、限定するものと見なされるべきではないことが理解されるべきである。

40

【0029】

本明細書で特に定義されない限り、本開示において使用される科学的および技術的用語は、当業者に一般的に理解される意味を有するものである。さらに、文脈によって特に要求されない限り、単数の用語は、複数の用語を含み、複数の用語は、単数を含むものとする。一般に、本明細書において述べる、細胞および組織培養、分子生物学、およびタンパ

50

ク質およびオリゴまたはポリヌクレオチドの化学並びにハイブリダイゼーションに関連した用いられる、命名法、および技術は、周知であり、当分野において一般的に用いられている。標準的な技術が、組換えDNA、オリゴヌクレオチド合成、ならびに組織培養および形質転換（例えば、エレクトロポレーション、リポフェクション）のために使用される。酵素反応および精製技術は、製造業者の仕様書に従って、または当該技術分野において一般的に行われているように、もしくは本明細書に記載のように行われる。前述の技術および手順は、当技術分野において周知である、および本明細書を通じて引用および議論される様々な一般的なおよびより具体的な参考文献において記載されているような従来の方法に従って一般的に行われる。例えば、サムブルックら、分子クローニング：実験マニュアル（第4版、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリ－・プレス、ニューヨーク州コールドスプリングハーバー、ニューヨーク州（2012）[Sambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (4th ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2012))、およびコリガンら、免疫学における最新プロトコル（カレント プロトコルス、ワiley－インターライエンス（1994））[Coligan et al. Current Protocols in Immunology (Current Protocols, Wiley Interscience (1994)]を参照のこと。これらは関連により本明細書に取り込まれる。本明細書において記載される、分析化学、合成有機化学、並びに医薬および薬学的化学に、関連して用いられる命名法、並びにこれらの実験室手順および技術は、当該技術分野で周知であり、一般に使用されるものである。標準的な技術は、化学合成、化学分析、薬学的調製、製剤、および供給、ならびに患者の治療に関して用いられる。

10

20

【0030】

本明細書において記載された全ての特許、公開された特許出願および非特許文献は、本開示が関係する当業者の技術レベルを示すものである。本出願の任意の箇所において引用された全ての特許、公開された特許出願および非特許文献は、これらそれぞれの特許または出版物が明確に個別的に関連により本明細書に組み込まれると示されているのと同じ程度をもって、関連によりこれらの完全性をもって本明細書中に明確に組み込まれるものである。特に、次の特許および特許出願の完全な内容が関連により本明細書に明確に組み込まれるものである：2012年2月21日に出願された米国シリアル番号第13/401,460号、2008年4月14日に出願された米国シリアル番号第12/102,696号で現在は2012年3月6日に発行された米国特許第8,128,939号、2007年4月13日に出願された米国シリアル番号第60/923,281号、2014年11月21日に出願された米国シリアル番号第62/082,848号。

30

【0031】

本明細書に開示されたおよび／またはその他に意図された組成物および／または方法の全ては、本開示に照らして、過度の実験を行うことなく製造および実行することができる。本明細書に開示されたおよび／またはその他に意図された組成物および方法は、特定の非限定的な実施形態について説明されているが、当該組成物および／または方法に、並びに方法の各工程にまたは工程の順序に、ここに開示されたおよび／またはその他に意図された本開示の概念、本質および範囲から逸脱することなく、変更を加えることは、当業者にとって、明白なことであろう。このような同様な代替および変更はすべて、当業者にとって明らかのように、添付の特許請求の範囲によって定義される本発明の概念の本質、範囲およびその概念の範囲内のものであるとみなされるものである。

40

【0032】

本開示に従って利用される場合、以下の用語は、特に断らない限り、以下の意味を有するものと理解されるべきである。

【0033】

請求の範囲および／または明細書において「～から構成される」[comprising]という用語と共に用いられる単語 "a" または "an" の使用は、「1つ」を意味するものであるかもしれないが、また、それは「1つまたはそれ以上」、「少なくとも1つ」、および「1つまたは1以上」の意味と一致するものもある。請求の範囲における用語「または」

50

["or"] の使用は、代替手段のみに関する事を明示的に示すまたは代替手段が相互に排他的である場合以外には、「および / または」["and/or"] を意味するために使用される。なお、開示は、代替手段および「および / または」["and/or"] である定義を支持するものではある。この出願全体を通じて、用語「約」["about"] は、ある値が、装置、ないし値を測定するために用いられる方法に関する誤差の固有の変動、または研究対象群の中に存在する変動を含むものであることを示すために用いられる。特に限定するものではないが、例えば、「約」という用語が利用される場合、指定された値は、± 1 2 % または ± 1 1 % または ± 1 0 % または ± 9 % または ± 8 % または ± 7 % または ± 6 % または ± 5 % または ± 4 % または ± 3 % または ± 2 % または ± 1 % で特定値から変動し得る。
 「少なくとも1つ」["at least one"] という用語の使用は、1つ並びに、2、3、4、5、10、15、20、30、40、50、100などを含むがこれらに何ら限定されるわけではない、1つ以上の任意の量を包含するものであると理解されるべきである。「少なくとも1つ」という用語は、それが付されている用語に応じて、100あるいは1000ないしそれ以上まで広がり得、さらに、100または1000の量は、より高い限度もまた満足な結果を生じ得るゆえに、これらが限度であると考慮されるべきではない。さらに、「X, YおよびZの少なくとも1つ」["at least one of X, Y and Z"] という用語の使用は、Xのみ、Yのみ、およびZのみ、並びにX、YおよびZの任意の組合せを含むものであると理解されるべきである。順序番号用語（すなわち、「第1」["first"]、「第2」["second"]、「第3」["third"]、「第4」["fourth"]等）の使用は、2つまたはそれ以上の項目を単に区別する目的のためのものであり、任意の順序または順番を意味することを意図するものではなく、また1つの項目の他に対する重要度、または追加の任意の順序を意図するものでもない。
 10
 20

【0034】

明細書および請求の範囲において用いられる場合、「～から構成される」["comprising"]（および "comprise" および "comprises" のような、「～から構成される」["comprised"]の任意の形態）、「～を有する」["having"]（および "have" および "has" のような、「～を有する」["having"]の任意の形態）、「～を含む」["including"]（および "includes" および "include" のような、「～を含む」["included"]の任意の形態）、または「～を包含する」["containing"]（および "contains" および "contain" のような、「～を包含する」["contained"]の任意の形態）の語群は、非排他的ないし解放端的なものであり、付加的な、言及されていない要素または方法工程を排除するものではない。
 30

【0035】

本願において用いられる「またはそれらの組合せ」["or combination thereof"] の用語は、この用語に先行する列挙された項目の全ての順列および組合せを意味するものである。例えば、「A、B、C、またはそれらの組み合わせ」は、Aか、Bか、Cか、ABか、ACか、BCか、またはABCかの、少なくとも1つを含むことを意図するものであり、そしてある特定の文脈において順序が重要である場合には、さらにまたBA、CA、CB、CBA、BCA、ACB、BAC、またはCABも含まれる。この実施例で続けると、明白に含まれているのは、1ないしそれ以上の項目ないし用語の反復を含む組合せ、例えば、BB、AAA、MB、BBC、AAABCC、CBBAAA、CABABBなど、である。当業者は、文脈から明らかである場合以外では、どんな組み合せにも項目ないし用語の数に何ら制限が通常ないことを理解するであろう。
 40

【0036】

明細書および請求の範囲の全体を通じて、特に文脈が要求しない限り、「実質的に」["substantially"] および「約」["about"] という用語は、これらの形容詞 / 副詞によって修飾されていた特定の用語を限定するものと理解されるべきではなく、ある値が、装置、ないし値を測定するために用いられる方法に関する誤差の固有の変動、および / または研究対象群の中に存在する変動を含むものであることを示すことが理解されるべきである。従って、これらの用語は、これらに顕著な影響とならないマイナーな変動および / またはマイナーな偏差を許容するものである。例えば、ある例において、用語「約」は、ある値が、装置、ないし値を測定するために用いられる方法に関する誤差の固有の変動、および /
 50

または研究対象群の中に存在する変動を含むものであることを示すために用いられる。同様に、用語「実質的に」は、また、例えば、80%ないしそれ以上、例えば、85%ないしそれ以上、あるいは、90%ないしそれ以上、あるいは、95%ないしそれ以上、あるいは99%ないしそれ以上、などに関連するものである。

【0037】

本願において用いられる用語「精製されたタンパク質」("purified protein")または「単離されたタンパク質」("isolated protein")は、タンパク質またはフラグメントは汚染物質あるいは細胞成分の十分にないものであって、これによってタンパク質は通常汚染物質または細胞成分からタンパク質を区別するように生じることを意味する。「精製された」が技術的に全く純粋(均質)である調製を有することを必要とすることを意図するものではないが、本願において用いられる「精製された」は、タンパク質またはポリペプチド フラグメントが、免疫沈降法やELISAなどの分析で利用される可能性がある状態でタンパク質を提供するために通常生じるような汚染物質および細胞成分から十分に分離されていることを意味するものである。たとえば、精製されたタンパク質は電気泳動ゲルにおいて得ることができます。10

【0038】

本願においてポリペプチドを述べるにおいて用いられる場合、用語「突然変異体」("mutant")は、対応する野生型(天然)ポリペプチドのアミノ酸配列に100%未満の同一性を有するポリペプチドを意味し、特に野生型ポリペプチドの1つないしそれ以上のアミノ酸残基位置が置換されている合成または組換えポリペプチドに関するものである。用語「異型体」("variant")は、用語「突然変異体」と置き換えて使用することがある20

【0039】

本願で記載する突然変異体CDC群は、免疫原性組成物を形成するために、1つまたはそれ以上の製薬上許容できる賦形剤、例えば、担体、ビヒクリ、希釈剤など組み合わせることが可能である。本願で使用される用語「薬学的に許容できる賦形剤」("pharmaceutically-acceptable excipient")は、本願で開示する突然変異体CDC群(例えば突然変異ニューモリシンポリペプチド)が、溶解性、デリバラビリティ、分散性、安定性、および/または構造的整合性を改善するために配され得る、溶剤あるいはその他物質を意味するものである。このような薬学的に許容できる賦形剤の例は、特に限定されるわけではないが、例えば、水、食塩水(生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水(PBS))などの中性pHでの緩衝化食塩水など)、エタノール、砂糖、ブドウ糖、グリセロール、および/または多価アルコール(マンニトール、ソルビトールなど)などを含む。担体の他のタイプには、リポソームや高分子などが含まれる。30

【0040】

「製薬上許容できる」という用語は、生物学的にまたはそれ以外の場合に望ましくないものではない物質、すなわち、当該物質は、任意の望ましくない生物学的影響の原因やそれを含む医薬組成物の他の成分のいずれかに好ましくない方法で相互作用を起こすことなく、選択された化合物と共に個々に投与され得る物質を意味する。

【0041】

突然変異体CDC群、または当該突然変異体CDC群を含む免疫原性組成物は、フロイント不完全アジュバント、フロイント完全アジュバント、ミョウバン、モノホスホリルリピドA、ミョウバンのリン酸または水酸化物、QS-21、塩類、すなわち、AIK(SO₄)₂、AlNa(SO₄)₂、AlNH₄(SO₄)₂、シリカ、カオリン、および/または炭素ポリヌクレオチド(すなわち、ポリICおよびポリAU)などのよう(特にこれらに限定されるわけではない。)アジュバントとさらに組み合わせることができる。アジュバントの非限定的な例としては、Quillia、アルヒドロゲル(Alhidrogel)などが挙げられる。「アジュバント」という用語は、組成物の免疫原と共に与えられた場合に、免疫応答を強化、加速、または延長することができる物質を指す。任意に、本開示において考察する突然変異体CDC群は、特にこれらに限定されるわけではないが、例えば、インターロイキン、インターフェロン等のような免疫調節剤および免疫刺激剤などと組み合わせることができます。多くのワクチンおよ4050

び他の薬学的製剤は、当業者に知られているものである。

【0042】

「生物学的に活性」(“biologically active”)とは、ある生物の生理的なシステムを修飾する能力を意味します。分子は、それ自体の機能を介して生物学的に活性であり得るか、または独自の生物学的活性を有する分子を活性化または阻害するその能力に基づいて、生物学的に活性であってもよい。

【0043】

本明細書で使用される用語「免疫原性」(“immunogenic”)は、免疫応答を惹起する物質の能力を指すことを意図している。例えば、「免疫原性組成物」(“immunogenic composition”)は、突然変異ニューモリシンポリペプチドのような、突然変異体CDCを含む組成物であり、被験体動物に投与された場合、抗体の產生のような、被験体動物において免疫応答を誘発することができるものである。用語「ワクチン」は、特定の抗原に対する免疫応答を誘発するために被験体に投与するための免疫原性組成物を指す。例えば、本明細書に開示された突然変異ニューモリシンポリペプチドの1つ以上を含むワクチンは、細菌ストレプトコッカス ニューモニエによって引き起こされる疾患または状態の治療に使用するためのワクチンである。

10

【0044】

本明細書で使用される用語「患者」("patient")または「被験体」("subject")は、ヒトおよび獣医学的対象を含む。治療の目的のための「哺乳動物」は、哺乳動物として分類される任意の動物を指し、例えば、これらに何ら限定されないが、ヒト、家畜(これらに何ら限定されないがイヌおよびネコなど)、農場動物(これらに何ら限定されないが、例えば、ウシ、ウマ、ブタ、ヤギ、ヒツジなど)、実験動物(これらに何ら限定されないが、例えば、マウス、ラット、ウサギ、モルモット、およびチンチラなど)、ヒト以外の霊長類、および乳腺組織を持っている他の動物を指すものである。

20

【0045】

「処置」(“treatment”)は、治療的処置および予防的または防止的手段の両方を指す。処置を必要とするものとしては、特に限定されるものではないが、特定の状態または障害を既に有する個体、ならびに特定の状態または障害を獲得する危険性のある個体(例えば、予防/防止措置が必要なもの)を含むものである。「処置する」(“treating”)という用語は、治療および/または予防的/防止的目的のために患者に薬剤を投与することを指す。

30

【0046】

「治療組成物」または「医薬組成物」は、治療および/または予防的/防止的効果をもたらすためにイン ビボ(in vivo)で投与することができる薬剤を指す。

【0047】

用語「治療的有効量を投与すること」または「予防的有効量を投与すること」は、処置中の疾患において治療上の利益を提供すること、あるいは発生の低下、予防、又は疾患の管理の低下を提供することを目的とします。治療上有効である具体的な量は、日常的に医師により容易に決定することができ、そのような疾患/癌のタイプ、患者の病歴および年齢、疾患のステージ、及び同時投与される他の薬剤のタイプなどの当技術分野で公知の要因に応じて変更することができる。

40

【0048】

「障害」(“disorder”)とは、ポリペプチドを用いた処置から利益を得る任意の症状である。これは、問題の疾患に哺乳動物を罹り易くする病理学的状態を含む、慢性および急性の障害または疾患を含む。

【0049】

「治療的有効量」(“therapeutically effective amount”)という用語は、本発明概念群の方法で使用された場合に、妥当な利益/リスク比率に対応して、過度の有害な副作用(例えば、毒性、炎症およびアレルギー反応など)を起こすことなしに、望まれた治療的効果を發揮するのに十分な生物学的に活性な分子またはコンジュゲートまたはそれらの

50

誘導体の量を指す。治療的效果は、特に限定されるものではないが、例えば、望まれない組織または悪性細胞の増殖を阻害することが、含まれ得る。ある患者にとっての有効量は、患者の種類、患者の大きさおよび健康状態、処置すべき状態の種類および重篤度、投与の方法、処置の期間、同時療法の種類(もある場合)、用いられた特定の処方などに依存するものである。これゆえ、あらかじめ正確な有効量を特定することは不可能である。しかしながら、当業者であれば、本明細書において与えられる情報に基づき、慣用的な実験をおこなうことによって、与えられた状況に関しての有効量を決定することは可能であろう。

【0050】

本明細書において用いられる場合、「同時療法」(" concurrent therapy ")という用語は、「組合せ療法」および「付加療法」という用語群と、互換性を持って使用されるものであり、処置を必要とする被験者が、本開示の治療的組成物と共に、症状を治療するための他の薬剤で処置されるないしはこれを与えられることを意味するものであると理解されるべきである。この同時療法は、患者が最初に一方の薬剤で治療され、次いで他方の薬剤で治療されるといった連続的治療であっても、あるいは2つの薬剤が同時に与えられるものであってもよい。

10

【0051】

本明細書で使用される用語「投与」及び「投与する」は、例えば、経口、局所、経皮、非経口、皮下、鼻腔内、筋肉内、腹腔内、硝子体内および静脈内の経路が、局部的および全身的適用の双方を含んで、を含むがこれらに限定されない。加えて、本開示の組成物(及び/又は同一の投与の方法)は、当該技術分野で当分野で周知の処方技術を用いて、遅延、制御、または持続的放出をもたらすように設計され得る。

20

【0052】

用語「置換」、「挿入」、「付加」および「欠失」、ならびにこれらの任意の組合せは、アミノ酸又は塩基配列に関連して本明細書で使用される。「置換」は、1つ又はそれ以上のヌクレオチドまたはアミノ酸の、それぞれ、異なるヌクレオチドまたはアミノ酸による置き換えを指す。「挿入」または「付加」は、天然に存在する配列と比較して、それぞれ1つの以上のヌクレオチドまたはアミノ酸残基の追加を生じたヌクレオチドまたはアミノ酸配列における変化である。「欠失」は、1つ以上のヌクレオチドまたはアミノ酸残基がそれぞれ存在しない、ヌクレオチドまたはアミノ酸配列のいずれかにおける変化として定義される。

30

【0053】

アミノ酸置換は、典型的には単一残基のものである。挿入は、かなり大きな挿入が許容され得るが、通常、約120個のアミノ酸のオーダーであろう。いくつかの場合において欠失ははるかに大きくてよいが、欠失は、通常、約1から約20残基の範囲である。

【0054】

置換、欠失、挿入、またはこれらの任意の組合せは、最終的な突然変異体ポリペプチドに到達するために使用されてもよい。一般的に、いくつかのアミノ酸は、分子の変容を最小にするように変更されます。しかし、より大きな変更は、特定環境において許容さえれる。

40

【0055】

特定の実施態様において、アミノ酸置換は、例えば、イソロイシンのバリンとの置換のような、1個のアミノ酸を同様の構造的および/または化学的特性を有する別のアミノ酸と置換した結果、すなわち、保存的アミノ酸置換であることができる。挿入または欠失は任意に15個のアミノ酸の範囲内とすることができます。

【0056】

実施形態において、置換は、公知の「保存的置換」従って行うことができる。「保存的置換」は、1つのクラスにおけるアミノ酸の、同じクラスのアミノ酸による置換を指し、ここで1つのクラスは、共通の物理化学的なアミノ酸側鎖の性質及び天然に見出される相

50

同タンパク質における高い置換頻度によって定義されものである。

【0057】

対照的に、特定の実施形態において、置換は、非保存的である。「非保存的置換」とは、1つのクラスにおけるアミノ酸の、別のクラスのアミノ酸による置換を指します。

【0058】

本明細書で使用する用語「ポリペプチド」は、ペプチド結合によって連結されたアミノ酸残基の単鎖から構成される化合物を指す。本明細書で使用する用語「タンパク質」は、用語「ポリペプチド」と同義であってもよいし、あるいはさらに、2以上のポリペプチドの複合体を、加えて意味するものとすることができます。

【0059】

用語「核酸分子」は、RNA、DNAおよびcDNA分子を含む。遺伝子コードの縮重の結果として、与えられた突然変異体CDCタンパク質をコード化する多数のヌクレオチド配列が製造され得るということが理解されるであろう。本開示は、それらの全ての可能な変異体又クレオチド配列であって、これらの全てが遺伝子コードの縮重を与えるものであるものを含むものである。

【0060】

「異種」核酸構築物または配列は、それが発現される細胞に対して天然でないそれらの部分を有する。コントロール配列に関して、用語「異種」は、それが現在規制されている発現が同じ遺伝子を調節するために天然には機能しないコントロール配列（すなわち、プロモーターまたはエンハンサー）を指す。一般に、異種核酸配列は、細胞に対して内因性でないか、またはそれらが存在するゲノムの一部ではなく、むしろ、異種配列は、感染、トランスフェクション、形質転換、マイクロインジェクション、エレクトロポレーション、などによって、細胞に追加されたものである。「異種」核酸構築物は、天然の細胞中に見出されるコントロール配列/DNAコード配列の組み合わせと、同じまたは異なるコントロール配列/DNAコード配列の組み合わせを含んでいてもよい。

【0061】

本明細書中で使用される用語「ベクター」は、異なる宿主細胞間の転送のために設計された核酸構築物を指す。「発現ベクター」は、外来細胞中の異種DNA断片を組み込み、発現する能力を有するベクターを指す。多くの原核及び真核発現ベクターは市販されている。適切な発現ベクターの選択は、当業者の知識の範囲内である。

【0062】

したがって、「発現カセット」または「発現ベクター」は、標的細胞において特定の核酸の転写を許容する一連の特定の核酸エレメントを有して、組換え的または合成的に生成された核酸構築物である。組換え発現カセットは、プラスミド、染色体、ミトコンドリアDNA、プラスチドDNA、ウイルス、又は核酸断片に組み入れることができる。典型的には、発現ベクターの組み換え発現カセット部分は、他の配列の中で、転写される核酸配列及びプロモーターを含む。

【0063】

本明細書中で使用される用語「プラスミド」は、クローニングベクターとして用いる環状二本鎖(ds)DNA構築体を意味し、これは多くの細菌及びいくつかの真核生物で染色体外自己複製遺伝子エレメントを形成します。

【0064】

本明細書で使用される、用語「選択マーカーをコード化するヌクレオチド配列」("selectable marker-encoding nucleotide sequence")は、細胞中で発現可能であり、その選択マーカーの発現は、発現される遺伝子を含む細胞に、対応する選択剤の存在下で、あるいは対応する選択的成长条件下で、成長する能力を与えるものであるヌクレオチド配列を指す。

【0065】

本明細書中で使用される用語「プロモーター」は、下流遺伝子の転写を指示する機能を有する核酸配列を指す。プロモーターは、一般に、標的遺伝子が発現される宿主細胞に適

10

20

30

40

50

切であろう。プロモーターは、他の転写及び翻訳調節核酸配列（「コントロール配列」ともいう。）とともに、与えられた遺伝子を発現するために必要である。一般に、転写および翻訳調節核酸配列は、特に限定されるものではないが、プロモーター配列、リボソーム結合部位、転写開始および停止配列、翻訳開始および停止配列、およびエンハンサーまたはアクチベーター配列を含むものである。

【0066】

本明細書で使用される用語「キメラ遺伝子」または「異種核酸構築物」は、調節エレメントを含んで、異なる遺伝子群の部分群で構成ができる非天然遺伝子（すなわち、宿主に導入されたもの）を指す。宿主細胞の形質転換のためのキメラ遺伝子構築物は、典型的には、異種タンパク質コード配列に操作可能に連結され、または、選択マーカーキメラ遺伝子において、形質転換された細胞へ抗菌耐性を与えるタンパク質をコード化する選択マーカー遺伝子へと操作可能に連結された、転写調節領域（プロモーター）から構成されている。本開示の典型的なキメラ遺伝子は、宿主細胞への形質転換のために、構成的または誘導性である転写調節領域、タンパク質コード配列、及びターミネーター配列を含む。キメラ遺伝子構築物はまた、標的タンパク質の分泌が所望される場合、シグナルペプチドをコードする第二のDNA配列を含んでいてもよい。

10

【0067】

核酸が別の核酸配列と機能的な関係にあるとき、当該核酸は「操作可能に連結される」。例えば、それがポリペプチドの分泌に関与するプレタンパク質として発現される場合、
20 例えば、分泌リーダーをコードするDNAは、ポリペプチドのDNAに操作可能に連結されている。それが配列の転写に影響を及ぼす場合、プロモーターまたはエンハンサーは、コード配列に操作可能に連結されている。翻訳を促進するように配置されている場合またはリボソーム結合部位はコード配列に操作可能に連結されます。一般的に、「操作可能に連結された」結合されているDNA配列は連続しており、分泌リーダーの場合には、連続しつゝ読み替り内にあることを意味します。しかし、エンハンサーは隣接する必要はない。連結は、都合の良い制限部位でのライゲーションにより達成される。そのような部位が存在しない場合、PGRのための合成オリゴヌクレオチドアダプター、リンクマーまたはプライマーが、従来の慣行に従って使用される。

【0068】

30

本明細書中で使用される用語「遺伝子」は、例えば、5' 非翻訳（5' UTR）または「リーダー」配列および3' UTRまたは「トレーラー」配列、並びに個々のコードセグメント（エキソン）間の介在配列(イントロン)のような、コード領域に先立つおよび続く領域を含んでも含まなくてもよい、ポリペプチド鎖の産生に関与するDNAのセグメントを意味する。

【0069】

本明細書で使用される、用語「組換え」は、異種核酸配列の導入により修飾された細胞またはベクターへの言及を含むように、加えて、用語「組換え」はまたこのように修飾された細胞に由来する細胞を指すことができる。従って、例えば、組換え細胞は、細胞の天然（非組換え）においては同一の形で見出されない遺伝子を発現するか、あるいは意図的な人間の介入によって、その他において異常に発現される、発現が低い、または全く発現されない天然遺伝子を発現する。

40

【0070】

本明細書中で細胞に関して使用される用語「形質転換された」、「安定に形質転換された」または「トランスジェニック」は、細胞が、非天然（異種）核酸配列をそのゲノム中に有している、または複数世代を通じて維持されるエピソームプラスミドを有していることを指す。

【0071】

本明細書中で使用される用語「発現」は、遺伝子の核酸配列に基づいてポリペプチドが生成されるプロセスを指す。プロセスは、転写と翻訳の両方を含んでいる。

50

【0072】

細胞内に核酸配列を挿入する文脈における用語「導入」("introduced")は、細胞への核酸配列の挿入の任意の方法を指すが、特に限定されるものではないが、例えば、「トランスクレクション」、「形質転換」および/または「形質導入」方法を含むものである。この用語「導入」はまた、核酸配列が細胞(例えは、染色体、プラスミド、プラスチド、又はミトコンドリアDNA) のゲノムに組み込まれ、自律レプリコンに転化され、あるいは一時的に発現される(例えは、トランスクレクト化mRNA) 、ことができる真核細胞または原核細胞への核酸配列の組み込みへの言及を含むものである。

【0073】

さて、本開示を参照すると、特定の実施形態では、コレステロール依存性細胞溶解素(CDC)群の1つまたは複数の非毒性変異体を含む組成物に関するものである。組成物は、対応する疾患の病原体に対して向けられたワクチンにおいて、または診断またはスクリーニング方法、またはそのような検出法のような他の分析方法に使用することができる。10

【0074】

CDCの天然型を産生する生物は、下記のものを含むがこれらに限定されず、種々の病理学的効果を有します。

【0075】

クロストリジウム パーフリンジエンス (*Clostridium perfringens*) は、多くの場合、エンテロトキセミアまたはガス壊疽などの軟部組織感染症によって特徴付けられる、種々のヒトおよび動物疾患の原因物質である。実験的証拠は、好中球機能に影響を与えることによって、免疫応答を鈍化してパーフリンゴリシン (perfringolysin O) の役割を示唆している。20

【0076】

バチルス セレウス (*Bacillus cereus*) (セレオリシン (Cereolysin O) の源) は、深刻な非消化器官系感染症、特に麻薬中毒者に、免疫抑制、新生児、および術後患者においての、特に心室シャントなどの補綴インプラントが挿入されている場合は、まれな原因である。眼感染症は通常、角膜リング膿瘍の特性形成と、眼内炎、全眼球炎、および角膜炎を含む重篤な感染症の最も一般的なタイプである。

【0077】

バチルス アルベイ (*Bacillus alvei*) は、眼内炎を引き起こす可能性があり、肺炎と膿胸の原因になります。30

【0078】

ストレプトコッカス・ディスガラクティエクイシミリス (*Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*) は、ヒト疾患症候群の多くの異なる種類に関与することが示されている。

【0079】

ストレプトコッカス カニス (*Streptococcus canis*) は、一般的に動物、主に犬の病気の原因となる。これは、ヒトに病気を引き起こす可能性があり、ほとんどの場合、軟部組織感染症、菌血症、尿路感染症、骨感染症や肺炎である。

【0080】

連鎖球菌は、連鎖球菌性咽頭炎、リウマチ熱、軟部組織感染症(すなわち、肉食細菌) 、および多くの他を含む種々の疾患の原因となります。ストレプトリジンOは、これらの疾患の多くの主要な病原因子であることが示されている。

【0081】

テタノリジン (Tetanolysin) は、破傷風の原因であるクロストリジウム テタナス (*Clostridium tetanuss*) によって生成される。

【0082】

リステリア イバノビイ (*Listeria ivanovii*) は、動物の感染症であり、主にヒツジにおいて流産を引き起こす。

【0083】

50

20

30

40

50

リステリア モノサイトゲネス (*Listeria monocytogenes*) は、ヒトの食中毒の原因となる。これに起因する最も深刻な食中毒は、髄膜炎である。これは、感染が母親で無症状であるが胎児で致命的かもしれない妊娠中の女性に関して特に問題となる。リステリオリンは、細菌が無毒であることなしに、これらの疾患の重要な病原性要因である。

【 0 0 8 4 】

ストレプトコッカス スイス (*Streptococcus suis*) は、敗血症、髄膜炎、心内膜炎、関節炎の原因であり、時折、ブタの他の感染症の原因となる、そして、ヒトでのますますの問題であり、より多くの流行が、高熱、倦怠感、吐き気、嘔吐を含めた症状が報告されている、そして、神経症状、皮下出血、敗血症性ショックと昏睡に繋がる。

【 0 0 8 5 】

本開示の特定の実施形態は、ストレプトコッカス ニューモニエの天然（野生型）ニューモリシン（ "PLY" 配列番号 1 ）の非毒性変異体（配列番号20の変異体によってコード化された）を提供する。これらPLY変異体は、それらが野生型PLYタンパク質と比較して溶血活性を実質的に欠くという点で特に、以前にワクチン開発のために使用されてきたニューモリシン変異体（Pd-B）を超えるいくつかの潜在的利点を示す。例えば、本開示のPLY変異体は、哺乳動物の膜に結合する能力を欠き、従って野生型PLY毒素が膜に結合したとき通常生じる（上記Pd-B変異体（Trp433Phe）では生じる）構造変化のいずれも受けない。

【 0 0 8 6 】

特定の非限定的な実施形態において、本開示は、位置293および294（配列番号 1 ）の少なくとも1つのアミノ酸、及び位置458、459及び460の少なくとも1個のアミノ酸が、野生型PLY配列（配列番号 1 ）に見出されるものとは異なるアミノ酸で置換されているニューモリシン突然変異体を含むものである。より具体的には、位置293と294のGly残基のいずれかまたは両方が、側鎖を有するアミノ酸、特に限定されるものではないが、例えば、ala, leu, ile, val, pro, trp, asn, gln, phe, tyr, met, cys, thr, ser, asp, glu, arg, his, および lysで置換され得る。さらに、位置458及び459でのThr残基のいずれか又は両方がgly, ala, leu, ile, val, pro, trp, asn, gln, phe, tyr, met, cys, ser, asp, glu, arg, his, および lysで置換され得る。さらに、位置460でのLeu残基がgly, ala, ile, val, pro, trp, asn, gln, phe, tyr, met, cys, thr, ser, asp, glu, arg, his, および lysで置換され得る。例えば、非限定的な一実施形態では、位置293のグリシンがala, leu, ile, val, pro, trp, asn, gln, phe, tyr, met, cys, thr, ser, asp, glu, arg, his, および lysのいずれかで置換されており、かつ位置460のロイシンがgly, ala, ile, val, pro, trp, asn, gln, phe, tyr, met, cys, thr, ser, asp, glu, arg, his, および lysのいずれかで置換されている。突然変異体ニューモリシンの非限定的な特定の実施形態では、少なくとも位置293と294におけるグリシン残基の少なくとも1つが、セリンまたはスレオニン残基に変異されており、位置458、459、及び460のスレオニン、スレオニン、ロイシン残基の少なくとも1つが、それぞれ、アスパラギン酸、アスパラギン、またはグルタミン酸残基に変異している。例えば、位置293がセリンに変異されており、位置460のロイシンがアスパラギン酸に変異された場合、ニューモリシン変異体は、PLY-G293S/L460D（又はPLY-L460D/G293S）と命名されている。このアミノ酸配列は配列番号40として提供される。非限定的な代替の実施形態において、位置460はD、E又はNで置換することができ、そして位置293はSまたはTで置換され得、位置460でD、E、またはNを含み、位置293でSまたはTを含む二重変異体が構成され得る。

【 0 0 8 7 】

ニューモリシンの変異体に加えて、本開示はセレオリシン（バチルス セレウス）、アンスロリシン(Anthrolysin)（バチルス アントラシス (*Bacillus anthracis*)）、ツーリングオリシン (Thuringiolysin)（バチルス ツーリングエンシス (*Bacillus thuringiensis*)）、パーフリンゴリシン (クロストリジウム パーフリンジェンス)、アルベオリシン(Alveolysin)（バチルス アルベイ）、カニオリシン（ストレプトコッカス カニス）、エクイシミリシン (Euisimilysin)（ストレプトコッカス エワイシミリス）、ストリプトリシンO（ストレプトコッカス ピゲネス (*Streptococcus pyogenes*)）、テタノ

10

20

30

40

50

リシン (Tetanolysin) (*Clostridium tetani*)、イバノリシン (リステリア イバノバイ)、リステリオリシン (リステリア モノサイトゲネス)、シーリゲリオリシン (Seeligeriolysin) (リステリア シーリゲリ (*Listeria seeligeri*))、スイリシン (Suirlysin) (ストレプトコッカス スイス)、ミチリシン (Mitilysin) (ストレプトコッカス ミティス (*Streptococcus Mitis*))、血小板凝集因子 (a.k.a. PAF およびヴィリダノリシン (Viridanolysin)) (ストレプトコッカス ミティス)、インターメディリシン (Intermediolysin) (ストレプトコッカス インターメディウス (*Streptococcus intermedius*))、ピオリシン (Pyolysin) (アルカノバクテリウム ピヨゲネス (*Arcanobacterium pyogenes*))、およびノビオリシン (Novyiolysin)、別名、テタノリシン (*tetanolysin*) NT (クロストリジウム ノビイ (*Clostridium novyi*)) の突然変異体を含む、ドメイン4のループ1、ループ2及び/又はループ3に相同した位置に置換を有する他のCDCの変異体を提供する。
10

【 0 0 8 8 】

セレオリシン、アンスロリシン、ツーリングオリシン (別名ツーリングオリシン またはセレオリシン形態BT)、パークリンゴリシン、アルベオリシン、カニオリシン、エクイシミリシン、ストリプトリシンO、テタノリシン、イバノリシン、リステリオリシン、シーリゲリオリシン、スイリシン、ミチリシン、インターメディリシン、血小板凝集因子 (a.k.a. PAF およびヴィリダノリシン)、およびピオリシンの野生型アミノ酸配列は、それぞれ、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号11、配列番号12、配列番号13、配列番号14、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、および配列番号19に示される。
20

【 0 0 8 9 】

本発明の別の実施形態は、配列番号9の位置561及び562の少なくとも一方、並びに位置395および396の少なくとも一方に置換を含み、野生型ストレプトリシンOと少なくとも90%の同一性を有するのストレプトリシンOの突然変異体に関するものである。位置561及び562における置換は、PLY (配列番号1) の位置458~460で行うことができるものとして本明細書に記載した任意の置換であって良く、位置395および396における置換は、PLYの位置293または294で行うことができるものとして本明細書に記載した任意の置換であつて良い。
30

【 0 0 9 0 】

配列番号18 (血小板凝集因子) の突然変異体もまた、本開示に従つて変異させることができるまた、ストレプトコッカス・ミティスから得られるレシノリシン (Leciinolysin) である。L1、L2およびL3のアミノ酸配列はPAFと同じである。レシノリシンは、位置67、158、211、303、305307、311、319、327、447、及び556を含む12点の位置においてPAFと異なり、レシノリシンにおいてこれらの位置のアミノ酸は、それぞれ、T、D、T、H、E、N、K、N、E、K、TおよびIである。本開示は、このように本明細書で意図される他の変異体と同様であるレシノリシンの変異体、及びこれらの変異体をコードする核酸、およびこれらの変異体を含む組成物を含む。
30

【 0 0 9 1 】

本明細書で開示するニューモリシン変異体群はまた、それらは、哺乳動物細胞に結合することができないので、毒素の毒性活性を排除します。ニューモリシン変異体のPd-Bは天然ニューモリシンより約21,000倍低い毒性であるが、それはまだそれを含むいずれかのワクチンの開発に問題が生じるのに十分な毒性を示す。肺炎連鎖球菌に対する現代のワクチン開発は、他の肺炎連鎖球菌由来のタンパク質でニューモリシンを使用することに集約され、ワクチンに使用される他のタンパク質を無視して行うようであるが、それにもかかわらず、ニューモリシンが原因疾患の確立および進行に重要であるゆえに、肺炎球菌に対するすべての有効なワクチンに含まれることが表示されます。
40

【 0 0 9 2 】

後述するように、ニューモリシンに関連する毒素である、パークリンゴリシンにおいて、そのタンパク質のウンデカペプチドは、従来の常識に反して、哺乳動物細胞へのこれら
50

の毒素の結合を媒介しないことを示した。結合を媒介する構造がウンデカペプチドに並置されている3つの短い疎水性のループである。本開示の一部として、今までCDCの結合は、負に帯電したアスパラギン酸またはグルタミン酸残基（たとえば）が（既にアスパラギン酸またはグルタミン酸を含まない位置に）任意の単一の疎水性ループ内に配置された場合、CDCの膜への結合が膜がブロックされる。したがって、この单一点突然変異は、哺乳動物膜に、ニューモリシンを含んで、CDCの結合を排除します。例えば、ニューモリシンのロイシン460の代わりに、単一のアスパラギン又はグルタミン酸残基は、事実上完全に溶血活性を抑止します。それはこの突然変異体が細胞の膜に結合する他のシステム（後述する）で知られているので、実質的に任意の毒性活性（例えばPd-B変異体よりも少なくとも200倍低い毒性）を排除するだけでなく、それは、哺乳動物の膜の表面に結合することによって引き起こされる可能性のある副作用のいずれも排除する。

10

【0093】

特定の実施形態では、本開示の突然変異体ニューモリシンは、天然肺炎連鎖球菌ニューモリシン中に存在する溶血活性と孔形成活性を欠いていることが示される。一般に、当該ポリペプチド成分は、天然肺炎連鎖球菌ニューモリシンの溶血活性の約30%未満、約20%未満、約10%未満、約5%未満、約1%未満、約0.1%未満、約0.001%未満の溶血活性を呈する。

【0094】

特定の実施形態では、本開示の突然変異体ニューモリシンが位置293、370、406または460のいずれかの側に隣接する3つの残基の位置（位置290、291、292、294、295、296、367、368、369、371、372、373、403、404、405、407、408、409、457、458、459、461、462、および463を含む）の1ないし3つにおいて置換を有する。

20

【0095】

例えば、これらの残基は、（既にアスパラギン酸を含む位置403を除いて）負に荷電したアミノ酸、グルタミン酸、またはアスパラギンで置換され、又は（既にヒスチジン残基を含む位置367及び407を除いて）正に荷電したアミノ酸、リジン、アルギニン、またはヒスチジンで置換され得る。あるいは、これらの残基は変異体の結合活性、孔形成活性、及び/又は溶血活性を抑制する他の任意の天然アミノ酸（gly, ala, leu, ile, val, pro, trp, asn, gln, phe, tyr, met, cys, thr, またはserを含む）で置換されていてもよい。

30

【0096】

上述したように、野生型ニューモリシンのアミノ酸配列は配列番号1、および配列番号1のニューモリシンをコード化するcDNAの逆相補は配列番号20として示されている。本開示はさらに、突然変異体ニューモリシン（及びその逆相補）ならびに置換タンパク質（変異体）をコードするために必要に応じて置換されて本明細書に記載の他の変異体の、cDNAを含むものであり、ひいてはこのような変異体をコードするcDNAを作る任意の保存的塩基（ヌクレオチド）置換を含んでいてもよい。

【0097】

また、依然として本発明の変異ポリペプチドをコードする本明細書において企図されるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列はまだ縮重コドンで改変されてもよいことが理解されるであろう。従って、本開示は、さらに、本明細書に記載のポリヌクレオチド配列（またはその相補配列）にハイブリダイズするポリヌクレオチド配列間に少なくとも90%の同一性、または少なくとも95%の同一性、または少なくとも99%の同一性を有するものを提供する。

40

【0098】

図1A - 1Eは、本明細書中で同定された天然型CDCのアミノ酸配列のアラインメントを示します。配列は、図1 A - 1Eに位置586から592（第2ループL2）、622から628（第3ループ、L3）、及び676から682（第1ループ、L1）として表される、ニューモリシンの位置367-373（第2ループ、L2）、403-409（第3ループ、L3）及び457-463（第1ループ、L1）に対応する3つの疎水性ループに沿って並んでいる。上述したように、これらのCDCの変異体のある特定の（非限定的）実施形態は、（アルギニン酸をすでに有している位置を除いて

50

) 負に帯電したアミノ酸、グルタミン酸、またはアスパラギン酸によって、または(リジンをすでに有している位置においてリジンを除いて、スチジンを既に有している位置においてヒスチジンを除いて、またはアルギニンをすでに有している位置においてアルギニンを除いて)正に荷電したアミノ酸、ヒスチジン、リジン、またはアルギニンによって、または他の15個の天然アミノ酸のいずれかにより、本開示に従って、1ないしそれ以上の位置においてさらに置換を有し得、得られた変異体の機能は本開示に従うものとなる。

【0099】

変異体はさらに、単一のループ(L1、L2、L3)で1、2、3、4、5、6、又は7つの置換された残基を有する変異体、または2つのループ(例えば、L1およびL2、L1およびL3、L2およびL3)で1つ以上の置換された残基(17)を有する変異体、または、3つのループのそれぞれで1つ以上の置換された残基(17)を有する変異体となるような置換を有するものであっても良い。この置換は、本明細書に列挙されるものから選択される。例えば、変異体は、最初のループ(L1)で1~7置換、及び/又は第二のループ(L2)で1~7置換、及び/又は第3のループ(L3)で17の置換を有していてもよいものである。例えば、天然の残基は正に帯電している特定の実施形態において、置換された残基は、負に帯電してもよく、天然の残基が負に帯電している場合、置換された残基は、正に帯電されても良い。あるいは、アスパラギン酸は、グルタミン酸、ヒスチジン、アルギニン、又はリシンで置換されていてもよく、又はグルタミン酸は、アスパラギン酸、リジン、ヒスチジン、またはアスパラギンで置換されていてもよく、又はアルギニンは異なる正に帯電したアミノ酸で置換されてもよいものである。

【0100】

本明細書に記載の各CDCのループ1、ループ2、及びループ3のアミノ酸位置は、表1に記載されている。

【表1】

	配列番号.	ループ1	ループ2	ループ3
Pneumolysin	1	457-463	367-373	403-409
Cereolysin	2	498-504	408-414	444-450
Anthrolysin	3	501-507	411-417	447-453
Thuringiolysin	4	501-507	411-417	447-453
Perfringolysin	5	488-494	398-404	434-440
Alveolysin	6	490-496	400-406	436-442
Caniolysin	7	562-568	472-478	508-514
Equisimilysin	8	559-565	469-475	505-511
Streptolysin O	9	559-565	469-475	505-511
Novyiolysin	10	502-508	412-418	448-454
Tetanolysin	11	514-520	424-430	460-466
Ivanolysin	12	512-518	422-428	458-464
Listeriolysin O	13	513-519	423-429	459-465
Seeligeriolytin	14	514-520	424-430	460-466
Suilysin	15	484-490	395-401	431-437
Mitilysin	16	457-463	367-373	403-409
Intermedilysin	17	515-521	425-431	461-467
PAF	18	651-657	561-567	597-603
Pyolysin	19	521-527	431-437	467-473

【0101】

このように、タンパク質変異体の精製されたまたは単離された形態、およびその抗原性フラグメント、一つ以上を含む医薬的に許容される賦形剤、アジュバント、および/または免疫刺激剤を含むこれらの変異体の免疫原性組成物、および開示されたまたは本明細書においてその他に企画されたこれらの変異体の少なくとも1つ以上を含むワクチンおよび血清が開示される。変異体またはその抗原性フラグメントは、例えばELISAのような、当該分野で公知の技術を用いて生物学的サンプル中のタンパク質の代替形態の存在を検出するための分析方法において使用することができる。本開示はさらに、本明細書で提供される変異体のいずれかをコード化するcDNAを含む核酸、宿主細胞、およびベクター、および本明細書で企図される変異体を生成するためのそれらの使用の方法を提供します。本開示はさらに、本明細書に記載のCDC産生生物によって引き起こされる状態、疾患、および感染症の治療のための免疫原性組成物を投与する方法を提供します。

【0102】

上述したように本開示はまた、本明細書において企図される変異体のCDCをコード化する核酸配列に関するものである。本開示は、タンパク質変異体の対立遺伝子変異体は、少なくとも85%、例えば、それらのアミノ酸同一性の15%未満によってタンパク質変異体とは異なる、本明細書に開示されるタンパク質変異体の対立遺伝子変異体をコードする核酸を提供する。対立遺伝子変異体のアミノ酸は、タンパク質変異体と同一であり、第1、第2、および第3のループ(L1、L2、およびL3)中のアミノ酸の100%は、タンパク質変異体のものと同じである。例えば、対立遺伝子変異体は、それらのアミノ酸同一性の12%未満によって、それらのアミノ酸同一性10%未満によって、それらのア

10

20

30

40

50

ミノ酸同一性の8%未満によって、それらのアミノ酸同一の6%未満によって、それらのアミノ酸同一の4%未満によって、それらのアミノ酸同一の2%未満によって、それらのアミノ酸同一の1%未満によって、本明細書に記載のタンパク質変異体から異なっていてもよい。さらに、本開示は、本明細書に記載の変異体のCDCをコード化する核酸と、あるいは本明細書に記載の変異体のCDCをコード化する拡散の相補体と、ストリンジエントな条件下でハイブリダイズされる核酸に関するものである。

【0103】

一の態様では、本開示のCDC変異体ポリペプチド又はタンパク質は少なくとも90%、または少なくとも91%、または少なくとも92%、または少なくとも93%、または少なくとも94%、または少なくとも95%、または少なくとも96%、または少なくとも97%、または少なくとも98%、または少なくとも99%、それ以上の割合で、配列番号1として表される配列に同一性を有し(配列アラインメントプログラムによって決定される)、また、本明細書の他の箇所に記載の突然変異のうちの少なくとも1つを有する、アミノ酸配列で構成される。

10

【0104】

2つ以上の配列間の「パーセント同一性」を決定するために選択された配列のアラインメントは、例えば、10.0のオープンギャップペナルティー、0.1の拡張ギャップペナルティ、およびBLOSUM 30類似性マトリックスを含み、デフォルトパラメータで操作されるMacVectorバージョン6.5におけるCLUSTAL-Wプログラムを用いて、実行することができる。

20

【0105】

別の実施形態では、本明細書で用いる用語「配列同一性」は、次のように配列を比較することを意味します。配列は、Genetic Computing Group's Gapのバージョン9(グローバルアライメントプログラム)を用い、(ギャップの最初の空白調整のための)-12のギャップオープンペナルティーと-4(ギャップ中の各追加の連続空白当たり)のギャップ伸長ペナルティを使って、デフォルト(BLOSUM62)マトリックス(値-4 +11まで)を使用して、整列される。アラインメント後、パーセント同一性は、特許請求の範囲に記載の配列中のアミノ酸の数の百分率として適合の数を表すことによって計算される。

【0106】

30

本明細書において記載あるいはその他に企画された免疫原性組成物は、(刺激)動物における防御免疫応答を誘発するのに有効な量で使用することができるワクチン製剤を含し得る。例えば、防御免疫応答の発生が抗体の展開によって測定することができる。特定の非限定的な実施形態では、防御免疫応答を形成することができ、本明細書で企図された変異体のCDCの量は、典型的には、体重1kgあたり約0.001μg~100mgの単位投与量形態であるが、これらに限定されまるものではなく、例えば、免疫化の間に約1~6週間の間隔で、体重1kgあたり約0.01μg~1mg、体重1kgあたり約0.1μg~10μgであり得る。、

【0107】

本開示は、少なくとも1つの疾患生物に対する免疫応答を刺激する方法を提供する。この方法では、本明細書に開示される免疫原性組成物のいずれかは、疾患の生物に感染または疾患の生物による感染症にかかりやすい患者に投与することができる。非限定的な実施形態では、免疫原性組成物は、PLYL460D/G293S(配列番号40)のような位置293及び460における突然変異を有するニューモリシン突然変異体を含むものである。この方法では、免疫原性組成物は、実質的に非溶血性であり、実質的に非毒性(又は天然PLYタンパク質と比較して、実質的に非毒性)、実質的に細胞膜に結合しないものであり、及び/又はPLYタンパク質より同じくらい安定であるか、または実質的により安定である。

40

【0108】

本開示はさらに、患者における感染症の発生及び/又は重症度を減少させる少なくとも

50

一つの方法を対象とします。この方法では、本明細書に開示されたあるいは他で企図された免疫原性組成物のいずれかは、感染した患者又は感染症の素因を有する患者に投与されます。非限定的な実施形態では、免疫原性組成物は、P L Y L 4 6 0 D / G 2 9 3 S (配列番号 4 0)などの位置 2 9 3 及び 4 6 0 に突然変異を有するニューモリシン変異体を含みます。この方法では、免疫原性組成物は、(天然 P L Y タンパク質と比較して、又は実質的に非毒性) 実質的に非毒性であり、実質的に、細胞膜に結合する実質的に非溶血性であり、及び / 又は同じくらい安定であるか、または実質的にありませんネイティブ P L Y タンパク質よりも安定。特定の実施形態において、本明細書に開示された変異体ニューモリシンポリペプチドは、野生型ニューモリシンポリペプチドよりも約 1 0 0 , 0 0 0 倍低い溶血活性を有します。他の実施形態では、本明細書に開示された変異体ニューモリシンポリペプチドは、野生型ニューモリシンポリペプチドよりも約 1 5 万倍低い溶血活性を有します。他の実施形態では、本明細書に開示された変異体ニューモリシンポリペプチドは、約野生型ニューモリシンポリペプチドよりも低い溶血活性を 2 0 万倍有します。さらに他の実施形態において、本明細書に開示された変異体ニューモリシンポリペプチドは、野生型ニューモリシンポリペプチドよりも約 2 5 万倍低い溶血活性を有します。少なくとも特定の実施形態では、アミノ酸中の少なくとも 2 個の置換を有する本明細書に開示された精製された突然変異ニューモリシンポリペプチドは、位置 2 9 3 、 2 9 4 、 4 5 8 、 4 5 9 、及び 4 6 0 のアミノ酸位置の少なくとも 2 つの置換を有し、また位置 2 9 3 、 2 9 4 、 4 5 8 、 4 5 9 、及び 4 6 0 のアミノ酸位置の 1 つのみに置換を有する突然変異ニューモリシンポリペプチドよりも精製によって増加した収量を有する。増加する組換体の収率は、例えば、少なくとも約 1 0 倍、少なくとも約 1 5 倍、少なくとも約 1 7 倍、少なくとも約 2 0 倍である。
10

【 0 1 0 9 】

本明細書に開示される免疫原性組成物は、本明細書に記載の疾患生物に感染しているあるいは感染し得る動物に投与することができ、特に限定されるものではないが、例えば、イヌ、ネコ、ウサギ、齧歯類、ウマ、家畜(例えば、ウシ、ヒツジ、ヤギ、および豚を含むがこれらに限定されない)、動物に投与することができるヤギ、および豚)、動物園の動物、有蹄類、靈長類、およびヒトが挙げられます。

【 0 1 1 0 】

変異体は、ニューモリシン変異体である場合、本開示は、対象における免疫応答を刺激するために対象に投与することができる(ワクチンが、これらに限定されるものなどではなく)免疫原性組成物を含んでいるが。一つ以上のニューモリシン変異体に加えて、免疫原性組成物 / ワクチンは、肺炎球菌由来の他のタンパク質またはタンパク質サブユニットを含んでもよく、あるいはまたは免疫原性組成物 / ワクチン中のニューモリシン変異体又は他のタンパク質と組み合わされた、またはコンジュゲートされた莢膜多糖材料を含むことができる。例えば、莢膜材料は、肺炎連鎖球菌の血清型 1 、 2 、 3 、 4 、 5 、 6 A 、 6 B 、 7 F 、 8 、 9 M 、 9 V 、 1 0 A 、 1 1 A 、 1 2 F 、 1 4 、 1 5 B 、 1 7 F 、 1 8 C 、 1 9 A 、 1 9 F 、 2 0 , 2 2 F 、 2 3 F 、 2 4 F 、 2 7 、 3 3 F 、または 3 4 、または当技術分野で公知の他のもののいずれかの 1 またはそれ以上から誘導され得る。述べたように、免疫原性組成物 / ワクチンは、アジュバントおよび / または他の薬学的に許容できる賦形剤を含んでもよい。多糖類は、例えば、単量体結合(多糖類の一端のみがポリペプチドに結合されている)、ループ結合(单一のポリペプチドがループ多糖類に取り付けられている)、または架橋(複数のポリペプチドに付着された多糖類)を介して、変異体にコンジュゲートすることができる。
30

【 0 1 1 1 】

本開示の変異体ニューモリシンポリペプチドまたはそのフラグメントを含む免疫原性組成物またはワクチンは、特に限定されることはないが例えば肺炎、髄膜炎、菌血症、および中耳炎のような、肺炎連鎖球菌に関連する疾患および状態を処置するために使用される。
40

【 0 1 1 2 】

50

特定の実施形態において、本明細書に開示された変異体の C D C は、T 細胞増殖を刺激する、または B 細胞の刺激を介しての抗体の産生を引き起こすために有用である。

【 0 1 1 3 】

上記のように、本発明の免疫原性組成物は、中性 pH の生理食塩水（例えば、リン酸緩衝生理食塩水など）または緩衝生理食塩水（これらに限定されない）のような、薬学的に（生理学的に）許容される賦形剤と本明細書で企図される変異体の C D C を組み合わせることによって形成することができる。

【 0 1 1 4 】

本開示はまた、本明細書で記載されたまたは意図された変異体の C D C の抗原性フラグメントを含みます。例えば、ワクチン組成物のために、フラグメントは、防御免疫応答を刺激するのに十分な大きさである。ポリペプチド成分は、増強された免疫応答を誘導するのに十分な長さでなければなりません。天然 C D C タンパク質のフラグメントに関しては、フラグメントは、少なくとも約 8、少なくとも約 10、少なくとも約 25、少なくとも約 50、少なくとも約 75、少なくとも約 100、少なくとも約 125、少なくとも約 150、少なくとも約 175、少なくとも約 200、少なくとも約 250、少なくとも約 300、少なくとも約 350、少なくとも約 400、少なくとも約 425、少なくとも約 450、少なくとも約 460、少なくとも約長さ 465、またはそれ以上のアミノ酸長さである。

10

【 0 1 1 5 】

フラグメントは、一緒に結合されている変異体の異なる位置からのペプチド部分を含んでいてもよい。ある特定の（非限定的）実施形態では、断片は、本明細書で説明した 3 つのループのうちの 1 つ以上を含みます。

20

【 0 1 1 6 】

本明細書で記載されたまたは意図された変異体の C D C また、患者の症状を治療または改善するために受動免疫血清として使用することができる中和抗体を生成するのに有用である。中和抗体応答が生成されるまで、上記のように免疫原性組成物（例えば、ウマ又はヒト）動物に投与することができる。これらの中和抗体は、その後、採取し精製し、症状を示す患者を治療するために利用することができる。

【 0 1 1 7 】

このような中和抗体は、病原体の効果を中和するのに有效的な量で、疾患の症状を示す患者に投与されます。中和抗体は、静脈内、筋肉内、皮内、皮下などを投与することができる。特定の経路は、静脈内で、又は局所感染のために、局所的に組織損傷の部位で壞死組織除去された部位である。中和抗体はまた、抗生物質治療と併用して投与することができる。ショックまたは組織損傷の減少は、単一用量または複数用量で得られるまで中和抗体を投与することができる。典型的には投与中和抗体の量は、体重 1 kgあたり約 1 mg ~ 約 1000 mg の抗体、特に限定されるものではないが、体重 1 kgあたり約 50 mg ~ 約 200 mg のような値である。

30

【 0 1 1 8 】

本開示の免疫原性組成物は、非毒性および滅菌薬学的に許容される賦形剤中に本明細書に開示される変異体タンパク質の少なくとも一つの免疫防御、非毒性の量を含有する医薬組成物として調製することができる。

40

【 0 1 1 9 】

本発明の免疫原性組成物は、特に限定されるものではないが例えば、経口、筋肉内、静脈内、舌下粘膜的、動脈内、皮内、腹腔内、鼻腔内、肺内、眼内、膣内、直腸内、および/または皮下を含む、当技術分野で公知の任意の適切な方法で適切な被験体に投与することができる。これらは、免疫原性組成物を含む溶液または粉末の吸入により、例えば、消化管や気道に導入することができる。非経口投与は、使用される場合、一般に注射によって特徴づけられる。注射剤は、注射前に液体中の溶液または懸濁液に適した液体溶液または懸濁液、固体形態として、またはエマルジョンとしてのいずれかで、従来の形態で調製することができる。

50

【 0 1 2 0 】

免疫原性組成物（例えば、ワクチン）は、免疫応答の一部として抗体の產生を誘発するのに十分な量で投与される。任意の患者のための投薬量は、患者のサイズ、一般的な健康、性別、体表面積、年齢、投与される特定の化合物、投与の時間および経路、および同時に投与される他の薬剤を含む多くの要因に依存する。最適な投与量の決意は十分に通常の技術の薬理学者の能力の範囲内である。特定の実施形態では、被験体に投与することができる変異体 C D C の有効量の非限定的な範囲は、例えば、体重 1 k g 当たりそのようなタンパク質の約 1 0 n g ~ 1 0 0 m g 、例えば、体重 1 k g 当たりそのようなタンパク質の約 0 . 1 μ g ~ 1 m g で投与ある。少なくとも 1 つの非限定的な実施形態において、提供される投与量は、アジュバントありまたはなしで、約 0 . 2 5 μ g ~ 約 2 5 μ g のタンパク質の範囲である。10

【 0 1 2 1 】

免疫原性組成物が、筋肉内または深い皮下経路を介して、非経口投与される場合、変異体タンパク質は、（ある特定の、しかし、非限定的な実施形態において）免疫応答を引き起こすまたは高めるために、任意の従来のアジュバントと混合されるまたは吸着され得る。このようなアジュバントとしては、水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウム、ムラミルジペプチド、細菌リポ多糖および誘導体、ならびに Q u i i A から精製されたサポニンが含まれるがこれに限定されるものではありません。タンパク質はまた、リポソームまたは免疫刺激複合体（ I S C O M ）のような微粒子内に免疫系に提示することができる。先に述べたように、本開示の変異体タンパク質 / ペプチドフラグメントを含有する製剤は経口または鼻腔内摂取のために設計され得る。20

【 0 1 2 2 】

本発明の免疫原性組成物の治療上有効かつ非毒性用量は、当業者によって決定することができる。例えば、任意の対象に対する特定の用量を含む種々の要因に依存し得る。特に限定されるものではないが、年齢、一般的な健康状態、患者の食事、投与の時間および経路、他の薬剤との相乗効果、免疫原性組成物が反復投与されるか否かを含む要因に依存する、。必要であれば、免疫原性組成物は、各投与の間及び後の時間に任意のブースター用量で 1 3 ヶ月の間隔で繰り返し投与されます。適切な剤形を調製する実際の方法は当業者に知られており、又は明らかであろう。例えば、レミントンの「薬学」最新版（ Remington's Pharmaceutical Sciences, latest edition ）を参照のこと。30

【 0 1 2 3 】

上述したように、本開示は、本明細書に記載の変異体ポリペプチドおよび本発明の活性なフラグメントをコードするポリヌクレオチドを含みます。ポリヌクレオチドは、 R N A の形態または D N A の形態（特に限定されないが、、 c D N A 、ゲノム D N A 、及び合成 D N A を含む。）の形態であり得る。 D N A は、二本鎖または一本鎖であり得、そして一本鎖である場合、コード鎖または非コード（アンチセンス）鎖であってもよい。

【 0 1 2 4 】

表 2 に示すものは、本明細書において企画した C D C の天然配列を直接コード化した（あるいは逆相補を介してコード化した） D N A 配列（および対応するアミノ酸配列）である。そして、それゆえ、これらは、本明細書に記載したあるいはそ例外で企画した突然変異体を形成するように突然変異させることができる。40

【表2】

	配列番号: (アミノ酸)	配列番号 (核酸)
Pneumolysin	1	20
Cereolysin	2	21
Anthrolysin	3	22
Thuringiolysin	4	23
Perfringolysin	5	24
Alveolysin	6	25
Caniolysin	7	26
Equisimilysin	8	27
Streptolysin O	9	28
Novyiolysin	10	29
Tetanolysin	11	30
Ivanolysin	12	31
Listeriolysin O	13	32
Seeligeriolyisin	14	33
Suilysin	15	34
Mitilysin	16	35
Intermedilysin	17	36
PAF	18	37
Pyolysin	19	38

10

20

30

【0125】

本発明の変異型ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含むベクターを用いて宿主細胞は、遺伝子操作された（形質導入、形質転換、および／またはトランスフェクト）。ベクターは、例えば、プラスミド、ウイルス粒子、ファージ等の形態であり得る。遺伝子工学された宿主細胞は、プロモーターの活性化、形質転換体を選択し、又はこのようなポリペプチドをコード化するポリヌクレオチド増幅するために適切に変更することができる公知の栄養培地で培養することができる。温度、pHなどの培養条件は、発現のために選択された宿主細胞で使用されるものであり、当業者には明らかであろう。ベクターは、染色体、非染色体、および合成DNA配列、例えば、SV40の誘導体；細菌プラスミド；ファージDNA；バキュロウイルス：酵母プラスミド；例えばワクシニア、アデノウイルス、鶏痘ウイルス、および仮性狂犬病などのウイルスDNAプラスミドとファージDNAの組み合わせに由来するベクターなどが挙げらる。しかしながら、任意の他のベクターは、それが宿主において複製可能かつ生存可能であるとして使用されてもよい。

40

【0126】

適切なDNA配列は、種々の手順によりベクターに挿入することができる。一般に、DNA配列は、当技術分野で公知の手順により適切な制限エンドヌクレアーゼ部位に挿入されます。そのような手順および他のものは、当業者の範囲内であると考えられます。

【0127】

発現ベクター中のDNA配列は、mRNA合成を指示する適切な発現制御配列（プロモ

50

ーター)に連結されている。このようなプロモーターの代表例としては、以下が挙げられるを得る: LTRまたはSV40プロモーター、大腸菌lacまたはtrp、ファージP1プロモーター、及び原核細胞または真核細胞またはそれらのウイルスにおける遺伝子の発現を制御することが知られている他のプロモーター。発現ベクターは、翻訳開始および転写終止のためのリボソーム結合部位を含んでいる。ベクターはまた、発現を増幅するための適切な配列を含むことができる。

【0128】

また、特定の非限定的な実施形態において、発現ベクターは、ジヒドロ葉酸レダクターゼまたは真核細胞培養のためのネオマイシン耐性のような形質転換された宿主細胞の選択のための表現型形質を提供する1つまたは複数の選択マーカー遺伝子を含む、またはテトラサイクリンなどの又は大腸菌におけるアンピシリン耐性を含む。10

【0129】

上述のような適切なDNA配列ならびに適切なプロモーターまたは制御配列を含むベクターは、タンパク質を発現するホストを可能にする適切な宿主を形質転換するために使用することができる。

【0130】

適当な宿主の代表的な(非限定的な)例として、以下のものが挙げられる: 例えば、大腸菌、ストレプトミセス、ネズミチフス菌(Salmonella typhimurium)などの細菌細胞; 酵母などの真菌細胞; ショウジョウバエ(Drosophila)S2およびスピードpteラ(Spodoptera)8f9などの昆虫細胞; 例えばCHO、COSまたはBowesメラノーマなどの動物細胞; アデノウイルス: 植物細胞などの適切な宿主細胞の選択は、本明細書の教示から当業者の範囲内であるとみなされる。20

【0131】

より具体的には、本開示はまた、本明細書に記載されおよび可能である配列の1つ以上を含む組換え構築物を含む。構築物は、ポリヌクレオチド配列が順方向または逆方向に挿入されたプラスミドまたはウイルスベクターなどのベクターを含みます。非限定的な一実施形態において、構築物はさらに、例えば、プロモーターは、配列に連結された、などの調節配列を含みます。多数の適切なベクターおよびプロモーターは、当業者に公知であり、市販されている。以下のベクターは、非限定的な例として提供されます。細菌:pQE70、pQE60、pQE-9(Qiagen、Inc.、Hilden、Germany)、pBS、pD10、phagescript、psiX174、pluescript SK、pBS、pNH8A、pNH16a、pNH18A、pNH46A(Stratagene、San Diego、CA)ptrc99a、pKK223-3、pKK233-3、pDR540、pRIT5(Pharmacia、Stockholm、Sweden)。真核生物:pWLNEO、pSV2CAT、pOG44、pXT1、pSG(Stratagene、San Diego、CA)pSVK3、pBPV、pMSG、pSVL(Pharmacia、Stockholm、Sweden)。しかしながら、それらが宿主において複製可能かつ生存可能である限り、任意の他のプラスミドまたはベクターを使用することができる。30

【0132】

プロモーター領域は、選択マーカーを有するCAT(クロラムフェニコールトランスフェラーゼ)ベクターまたは他のベクターを使用して、任意の所望の遺伝子から選択することができる。2つの適切なベクターは、pKK232-8およびpCM7である。特定の名前の細菌プロモーターには、lacI、lacZ、T3、T7、gpt、ラムダPR、PLおよびTRPが含まれる。真核生物プロモーターは、CMV前初期、HSVチミジンキナーゼ、初期および後期SV40、レトロウイルス由来のLTR、およびマウスマタロチオネイン-Iを含む。40

【0133】

さらなる実施形態において、本開示は、上記の構築物を含む宿主細胞を含みます。宿主50

細胞は、哺乳動物細胞（ただしこれに限定されない）のような高等真核細胞であってもよく、酵母細胞（ただしこれに限定されない）のような下等真核細胞；（例えば、限定されないが）細菌細胞のような原核細胞であってもよい。構築物の宿主細胞への導入は、リン酸カルシウムトランスフェクション、DEAE-デキストラン媒介トランスフェクション、エレクトロポレーション（Davisら、Basic Methods in Molecular Biology (1986) Elsevier Science Publishing Co., Inc.）、または任意の他の適切な技術を使用して、行うことができる。

【0134】

宿主細胞中の構築物は、組換え配列によりコードされる遺伝子産物を產生するために従来の方法で使用することができる。あるいは、本発明のポリペプチドは、合成的に、従来のペプチド合成によって製造することができる。10

【0135】

成熟タンパク質は、適切なプロモーターの制御下で、哺乳動物細胞、酵母、細菌、または他の細胞中で発現させることができる。無細胞翻訳系もまた、本開示のDNA構築物に由来するRNAを用いてこのようなタンパク質を产生するために使用することができる。原核生物および真核生物宿主での使用に適切なクローニングおよび発現ベクターは、グリーンおよびSambrook（モレキュラークローニング：アラボラトリーマニュアル、第4版、コールドスプリングハーバー、NY、(2012)）によって記載されており、その全内容は関連により本明細書に組み込まれる。

【0136】

高等真核生物による本開示の変異体ポリペプチドをコードするDNAの転写は、エンハンサー配列をベクターに挿入することによって増加させることができる。エンハンサーはDNAのシス作用性エレメントであり、通常約10300bpであり、その転写を増加させるためにプロモーターに作用する。例としては、複製起点bp100270の後期側の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、複製起点の後期側の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含まれる。20

【0137】

一般的に、組換え発現ベクターは、宿主細胞の形質転換を可能にする複製起点および選択マーカー、例えば大腸菌およびS.セレビシエTRP1遺伝子のアンピシリン耐性遺伝子および高発現遺伝子由来のプロモーターを含むであろう下流の構造配列の転写を指示する。このようなプロモーターは、とりわけ、3-ホスホグリセレートキナーゼ（PGK）、-因子、酸性ホスファターゼまたは熱ショックタンパク質などの解糖系酵素をコードするオペロンに由来し得る。異種構造配列は、翻訳開始および終止配列と適切な相で組み立てられる。所望により、異種配列は、所望の特性、例えば発現された組換え産物の安定化または単純化された精製を付与するN末端同定ペプチドを含む融合タンパク質をコードすることができる。30

【0138】

細菌使用のための有用な発現ベクターは、所望のタンパク質をコードする構造DNA配列を、適切な翻訳開始および終結シグナルとともに、機能的プロモーターを用いて作動可能な読み取り段階で挿入することによって構築される。ベクターは、ベクターの維持を確実にするために、そして望ましい場合には、宿主内で增幅を提供するために、1つまたは複数の表現型選択マーカーおよび複製起点を含む。40

【0139】

代表的であるが非限定的な例として、細菌の使用に有用な発現ベクターは、（A T C C 3 7 0 1 7）を選択マーカーおよび周知のクローニングベクターpBR322の遺伝子エレメントを含む市販のプラスミドに由来する細菌の複製起点を含むことができる。このような市販のベクターには、例えば、pKK223-3（アマシャムファルマシアバイオテック、ピスカタウェイ、NJ、USA）及びpGEM1含む（プロメガ、マディソン、ウィスコンシン州、米国）、これらのpBR322「骨格」部分は、適切なプロモーターと組み合わせ、構造されている表現するシーケンスである。50

【0140】

適切な細胞密度に適した宿主株および宿主株の成長の形質転換後、選択したプロモーターを適切な手段（例えば、温度シフトまたは化学的誘導）によって誘導され、そして細胞はさらなる期間培養される。

【0141】

細胞は、典型的には、物理的または化学的手段により破壊し、遠心分離によって回収し、そして得られた粗抽出物をさらなる精製のために保持されている。

【0142】

タンパク質の発現に用いられる微生物細胞は、凍結融解サイクル、超音波処理、フレンチプレス、機械的破壊、または細胞溶解剤の使用を含む任意の好都合な方法によって破壊することができ、そのような方法は当業者に周知であるアート。しかしながら、本開示のポリペプチドを分泌する宿主細胞を使用し、培養培地からポリペプチドを回収することが可能であることが望ましい（しかし、非限定的であり得る）。 10

【0143】

種々の哺乳動物細胞培養系を用いて、組換えタンパク質を発現させることもできる。哺乳動物発現系の例には、Gluzman (Cell (1981) 23 : 175) によって記載されたサル腎線維芽細胞のCOS-7系、および適合性ベクター、例えばC127, 3T3、CHO、HeLaおよびBHK細胞株。哺乳類発現ベクターは、複製起点、適切なプロモーターおよびエンハンサー、ならびに任意の必要なリボソーム結合部位、ポリアデニル化部位、スプライスドナーおよびアクセプター部位、転写終結配列、および5'隣接非転写配列を含む。SV40スプライスおよびポリアデニル化部位に由来するDNA配列は、必要とされる非転写遺伝要素を提供するために使用され得る。 20

【0144】

ポリペプチドを回収および／または既知のタンパク質回収}」及び精製方法により、組換え細胞培養物から精製することができる。そのような方法は、硫酸アンモニウムまたはエタノール沈殿、酸抽出、陰イオンまたは陽イオン交換クロマトグラフィー、ホスホセルロースクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、アフィニティーコロマトグラフィー、ヒドロキシリアルアバタイトクロマトグラフィー、およびレクチンクロマトグラフィーを含むことができる。手順をリフォールディングタンパク質は、成熟タンパク質の立体配置を完成して、必要に応じて、使用することができる。この点において、シャペロンは、リフォールディング手順において使用することができる。最後に、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を最終精製工程に用いることができる。 30

【0145】

本開示において免疫原として有用な突然変異体ポリペプチドは、化学合成手順の産物、または原核または真核宿主からの組換え技術の産物（例えば、細菌、酵母、高等植物、昆虫および哺乳動物培養中の細胞）である。組換え生産手順で使用される宿主に依存して、本開示の突然変異体ポリペプチドはグリコシル化されていてもよいし、非グリコシル化されていてもよい。

【0146】

個々に発現されたポリペプチドは、当技術分野で周知の組換え発現/単離方法によって単離することができる。そのような単離方法の典型的な例は、タンパク質の保存領域に対する抗体、またはタンパク質構造の一部として発現されるHisタグまたは切断可能ナリーダーまたはテールを利用することができる。 40

【0147】

上記のように、本明細書中に開示されているかまたは企図されているCDC変異体タンパク質のフラグメントおよび変異体は、本開示の一部であると考えられる。フラグメントは、天然または変異体ポリペプチドのアミノ酸配列の一部ではあるが全部ではないアミノ酸配列を有する変異体ポリペプチドである。フラグメントは、自立しているか、またはフラグメントが部分または領域を形成するより大きなポリペプチド（例えば、单一の連続領域としてであるが、これに限定されない）内に含まれ得る。特定の非限定的なフラグメント 50

は、類似の活性または改善された活性を有するものまたは減少した活性を有するものを含む、本開示のポリペプチドの活性を媒介するフラグメントである生物学的に活性なフラグメントである。また、動物、特にヒトにおいて抗原性または免疫原性であるフラグメントも含まれる。この態様では、本開示は、(i) 变異型CDCのフラグメント、例えば、長さが少なくとも約20100アミノ酸、または長さが約100200アミノ酸である（但し、これに限定されない）(ii) 該突然変異フラグメントを含む医薬組成物。

【0148】

一実施形態では、本明細書に記載のCDC変異体をコードする核酸は、高ストリンジエンシーハイブリダイゼーション条件下で対応する天然配列とハイブリダイズすることができる。高ストリンジエンシー条件の一例は、50% ホルムアミド、5×SSC、5×デンハルト溶液、0.5% SDSおよび100 μg/ml 变性キャリアDNA中で約42°でのハイブリダイゼーション、続いて2×SSCおよび0.5% SDS中、42°で0.1×SSCおよび0.5% SDS中でさらに2回洗浄した。10

【0149】

核酸構築物/発現ベクター

【0150】

前述したように、本明細書で企図される核酸は、宿主細胞に導入され得、そして複製することができる異種核酸構築物またはベクターに組み込まれ得る。ベクターは、そのベクターが導入された細胞において複製可能かつ生存可能である限り、使用され得る。多数の適切なベクターおよびプロモーターが当業者に公知であり、市販されている。適切なDNA配列は、様々な手順によってプラスミドまたはベクター（本明細書では「ベクター」と総称する）に挿入することができる。一般に、DNA配列は、標準的な手順によって適切な制限エンドヌクレアーゼ部位に挿入される。そのような手順および関連するサブクローニング手順は、当業者の知識の範囲内であるとみなされる。20

【0151】

本開示の異種核酸構築物は、本明細書で企図される変異型CDCまたはその断片のコード配列を含み得る：(i) 单離された；(ii) 突然変異CDCコード配列が優性コード配列である融合タンパク質またはシグナルペプチドコード配列（ただしこれに限定されない）のような追加のコード配列と組み合わせて；(iii) イントロンおよび制御エレメント（例えば、プロモーターおよびターミネーターエレメントまたは5'および/または3'非翻訳領域）のような非コード配列（ただしこれに限定されない）と組み合わせて、適切な宿主；および/または(iv) 变異型CDCコード配列が異種遺伝子であるベクターまたは宿主環境において。

【0152】

適切なベクターは、典型的には、選択マーカーをコードする核酸配列、挿入部位、およびプロモーターおよび終結配列などの適切な制御エレメントを備えている。ベクターは、例えば、宿主細胞中のコード配列の発現に有効なイントロンおよびコントロールエレメント、すなわちプロモーターおよびターミネーターエレメントまたは5'および/または3'非翻訳領域などの非コード配列を含む調節配列を含むことができる（および/または改変された可溶性タンパク質抗原コード配列が正常に発現されていないベクターまたは宿主細胞環境において）、コード配列に作動可能に連結される。多数の適切なベクターおよびプロモーターが当業者に知られており、その多くは市販されている。30

【0153】

例示的なプロモーターには、CMVプロモーター、SV40初期プロモーター、RSVプロモーター、EF-1プロモーター、tet-反応性エレメントにtet応答性エレメント(TRE)を含むプロモーター、特定の金属塩を添加することによってアップレギュレートされるベータアクチンプロモーターおよびメタロチオネインプロモーターを含む。プロモーター配列は、発現のために宿主細胞によって認識されるDNA配列である。これは、突然変異体ポリペプチドをコードするDNA配列に作動可能に連結される。

【0154】

50

他に示されない限り、本開示の組成物および方法の実施は、当業者の技術範囲内の分子生物学、微生物学、組換えDNAおよび免疫学の従来の技術を用いる。

【実施例】

【0155】

実施例は、以下に提供されます。しかしながら、本開示の実施形態は、本明細書に記載される特定の実験結果と実験手順への適用に限定されるものではない。実施例は、単に様々な実施形態のうちのように提供され、網羅的ではなく、例示的であることを意味しており、本開示の教示の追加の異なる実施形態が確かに当業者に示唆されるであろうことは理解されるであろう。従って、そのような他の実施形態は、本開示の本明細書から推測されてきたと考えられる。

10

【0156】

実施例1

コレステロール依存性細胞溶解素(CDC)は、20種を超える異なるグラム陽性細菌によって産生される細孔形成ポリペプチド毒素の大きなファミリーである(文献1)。最初、細菌はこれらの毒素を安定な水溶性モノマーとして分泌する。モノマーは膜に結合し、オリゴマー化および細孔形成を促進する構造変化の特定のシーケンスを受ける。名前が示すように、CDC細孔形成機構は、その細孔形成機構のために膜コレステロールに絶対に依存している。数十年の間のドグマは、コレステロールがこれらの毒素の受容体であり、CDCのドメイン4(D4)(図2)に位置する保存されたウンデカペプチドが、CDCとコレステロール²⁻⁴との相互作用に重要であるということでした。しかしながら、他の研究は、ウンデカペプチドがこれらのCDCのコレステロールに富む膜への最初の結合を媒介しないことを示唆している^{5,6}。したがって、コレステロールへのそれらの結合を媒介するこれらのCDCの構造的成分は、現在の研究に先立って曖昧であった。

20

【0157】

CDC機構の酸化に対する感受性は80年以上にわたり知られており、この特性は元来これらの毒素に与えられた「チオール活性化細胞溶解素」の名称であった(文献8参照)。このチオール基の酸化は、しばしば>99%²の細胞溶解活性の有意な喪失をもたらす。これは、大部分の配列決定されたCDCに存在する唯一のシステインであるため、保存されたウンデカペプチド(ECTGLAWEWR-配列番号39)に敏感なチオール基を有するシステインが存在するという多数のCDCの配列分析によって続いて示された。このチオール基の酸化に関連する細胞溶解活性の喪失は、コレステロールが豊富な膜への結合の変化から生じ、膜結合とウンデカペプチドの間の推定上の結合を確立することが示唆されている。ウンデカペプチドの高度に保存された性質は、おそらく膜コレステロールとの直接相互作用を媒介する高度に保存された機能を示唆した。

30

【0158】

コレステロールがCDCの受容体であるというドグマは、ストレプトコッカス インターメディウス(*Streptococcus intermedius*)によって分泌されるCDCであるインターメディリン(ILY)の発見によって複雑化した。他のCDCとは対照的に、ILYは、ヒト細胞特異的な^{9,10}であり、コレステロールが豊富な膜ではなく補体膜攻撃複合体^{11,12}の種特異的阻害剤であるヒトCD59に特異的に結合する能力によって説明される。したがって、特定の非ステロール受容体に結合するILYおよびコレステロールが豊富な膜に直接結合するPFO様CDCの少なくとも2つのクラスのCDCが存在する。しかし、両方のタイプのCDCの細胞溶解機構は、膜コレステロールに対して感受性であり、どちらもコレステロールを実質的に枯渇させた膜では活性ではない¹⁴。したがって、これらの研究は謎を提示した。コレステロールはPFO様CDCとは著しく異なる方法でILY機構に寄与するか、または両方のクラスのCDCにコレステロールが寄与するための統一分子基盤があるか?

40

【0159】

Giddingsら¹⁴は、hRBC膜のコレステロール枯渇が、全てのCDCについてプレコア細孔転換を阻止したが、PFO様CDCの膜への結合にも影響を及ぼすことを示した。Soltaniらは、ILYのL1-L3 D4ループ(図2)の膜挿入を破壊することにより、プレポアから細孔への変換

50

も阻害されることを示した。したがって、2つの異なる現象は、ILYにおけるプレコア - 細孔変換、膜コレステロールの枯渇¹⁴およびL1-L3ループの膜挿入の破壊をブロックする¹⁵。

【0160】

これらの観察に基づいて、D4ループとILYおよびPFOのウンデカペチドとの膜の相互作用の詳細な研究を行った。これらの研究の結果は、ドメイン4の塩基のL1-L3ループが、ウンデカペチドではなく、コレステロールが豊富な膜を認識する一次構造であることを示している。これらのループとコレステロールが豊富な膜との相互作用は、PFOとコレステロールが豊富な膜との相互作用を媒介するのに対して、膜へのそれらの挿入は、プレコアがPFOおよびILYの両方の孔を変換するために必要である。したがって、これらの結果は、現在、CDCのコレステロール感受性の構造的基礎を提供し、異なる膜受容体を使用するILYおよびPFO様CDCの両方に対するコレステロールの影響に関する統一的説明を提供する。
10

【0161】

材料および実施例の方法

【0162】

細菌株、プラスミド、および化学物質

【0163】

ILYおよびPFOの遺伝子を、先に記載したようにpTrcHisA (Invitrogen) にクローニングした (^{14, 16})。全ての突然変異は天然のILY (天然システインレス) またはシステインレスPFO (PFOC459A) のバックグラウンドで行った。ネイティブPFOは、システインレスPFO誘導体PFOC459Aを生成するためにアラニンに変更された残基459にシステインを含む。PFOとPFOC459Aはいずれも同様の細胞溶解活性を示す¹⁶。すべての化学物質および酵素は、Sigma、VWRおよびResearch Organicsから入手した。すべての蛍光プローブは、Molecular Probes (Invitrogen) から得た。
20

【0164】

ILYおよびその誘導体の生成および精製

【0165】

PCR QuikChange突然変異誘発 (Stratagene) を用いて、天然のILYまたはPFO^{C459A}において種々のアミノ酸置換を行った。ILY遺伝子の突然変異体バージョンのDNA配列をオクラホマ医学研究財団コアDNA配列決定施設により分析した。組換えILYおよびその誘導体の大腸菌 (Escherichia coli) からの発現および精製は、記載の通りに実施した^{15, 16}。溶出したタンパク質を4℃で一晩、緩衝液 (300mM NaCl、10mM MES、1mM EDTA、pH6.5) に透析した。次いで、タンパク質を5mM DTTおよび10% (vol / vol) 滅菌グリセロール中に-80℃で保存した。
30

【0166】

スルフヒドリル特異的試薬によるILYおよびPFOならびにそれらの誘導体の化学修飾

【0167】

ILYのシステイン誘導体を、スルフヒドリルを介して環境感受性プローブであるヨードアセトアミド-N、N'-ジメチル-N- (7-ニトロベンズ-2-オキサ-1,3-ジアゾリル) エチレンジアミン (NBD) で修飾したグループ。反応は以前に記載されたようにして行った¹⁴。修飾されたタンパク質を10% (vol / vol) 滅菌グリセロール中に保存し、液体窒素中で急速凍結し、-80℃で保存した。タンパク質を75%以上の効率で標識した。
40

【0168】

蛍光測定

【0169】

全ての蛍光強度測定は、前述のSLM-8100光子計数分光蛍光計を用いて行った。NBD測定のために、460~480nmの励起波長および540nmの発光波長を4nmのバンドパスで使用した。各試料について500600nmの放出走査を1nmの分解能で1秒の積分時間で実施した。全毒素10μgを含む試料を、PBS (10mM Na₂HPO₄、2mM KH₂PO₄、137mM NaCl、3mM KCl (pH7.5)) 中のヒト赤血球 (hRBC) ゴースト膜 (膜タンパク質303.25μgに相当) とともにインキュベ
50

ートした。スペクトル測定を行う前に37 °Cで510分間インキュベートする。

【0170】

リポソーム調製

【0171】

1-パルミトイール-2-オレオイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン (POPC; Avanti Polar Lipids) と45:55モル%のコレステロールとを含有するリポソームを記載のように調製した¹⁶。

【0172】

HRBCゴースト膜の調製

【0173】

10

HRBCゴーストメンブレンを前述のように調製した。膜タンパク質含量は、Bradford法 (Bio-Rad Protein Assay, Bio-Rad Laboratories, Inc.) を用いて定量した。

【0174】

コレステロール枯渇および充実

【0175】

コレステロール抽出は、先に記載したようにメチル-β-シクロデキストリン (M CD) を用いて行った。手短に言えば、ヒトhuRBCゴースト膜を、37 °Cで2時間、最終濃度20mM 40 mMのM CD (使用ごとに新鮮にした) でインキュベートした。膜を繰り返し遠心分離 (14,000rpm、4 °Cで20分間) して3回洗浄し、過剰のM CDを除去するためにPBSに再懸濁した。ゴースト膜を最終的にPBSに懸濁させた。コレステロール/コレステリルエステル定量キット (Calbiochem, Billerica, MA) を用いて、コレステロール含量を測定した。典型的には、この方法により、膜のコレステロール含量は> 90% 減少した。

20

【0176】

コレステロール負荷M CDを用いてコレステロール補充を行った。この方法は先に説明されている¹⁴。簡単に述べると、新たに作製したM CDを最終濃度が5mMになるように緩衝液A (140mM NaCl、5mM KCl、5mM KH₂PO₄、1mM MgSO₄、10mM HEPES、5mMグルコース、pH6.5) に添加した。コレステロールの100mMストックを1:2 (体積/体積) のクロロホルム:メタノール中で作製した。緩衝液A + MのBCDをガラス容器中で80 °Cに加熱した。一旦80 °Cに加熱すると、懸濁したコレステロールを最終濃度が4mMになるように添加した。溶液を超音波処理 (4 × 20秒) によりホモジナイズした。次いで、溶液を0.22 μmのフィルターを用いて濾過した。コレステロールを負荷したM CDを、ペレット化したコレステロール枯渇ゴースト膜に加え、37 °Cで2時間インキュベートした。膜を前と同じように繰り返し遠心分離して洗浄し、最後にPBSに再懸濁した。

30

【0177】

L1 SPRセンサーチップへのリポソームの固定化

【0178】

表面プラズモン共鳴 (SPR) は、L1センサーチップ (BIAcore, Uppsala, Sweden) を用いてBIAcore 3000システムで測定した。L1センサーチップは、疎水性残基が共有結合されたデキストランマトリックスを含み、そして日常的にリポソームの固定化に使用されている。リポソーム用L1チップの調製では、10 μlの20mM CHAPSを10 μl/分の流速で注入した。次いで、リポソーム (0.5mMの最終脂質濃度) を同じ流速で10分間注入した。リポソームの注入後、50mMのNaOHを3分間注入して、複数の脂質層を除去した。その後、0.1mg / mlのBSAを注射して非特異的結合部位をコートした。すべての注射は25 °Cで行った。元のRUの読みに達するまで、L1チップを再生し、20mMのCHAPSおよび50mMのNaOHを繰り返し注入することによってリポソームをストライピングした。再生手順では、センサーチップの結合能力が失われなかつた。

40

【0179】

SPR解析

【0180】

25 °Cで野生型PFO (50 ng / μl) とPFOアスパラギン酸変異体 (50

50

N G / μ l) で H B S 中で実施したリポソームおよび P F O 誘導体との間の相互作用のすべての分析は、 A T リポソームコーティングされたチップ上に 4 分間 3 0 μ l / 分の流速で注入した。

【 0 1 8 1 】

実施例 1 の結果

【 0 1 8 2 】

実験的戦略： ILYは、膜のコレステロールに依存して天然の膜に結合しないが、そのメカニズムは依然としてコレステロールに敏感なままである。コレステロールを欠く膜に結合しないPFO様CDCとは異なり、ILYの受容体結合およびオリゴマー化は依然としてコレステロール枯渇膜に生じる¹⁴。したがって、ILYは、そのコレステロール依存性に関与する構造を最初に同定するために使用された。膜コレステロールに感受性であるILYの構造が同定されると、PFOにおいて、これらの構造を破壊する効果が、コレステロールが豊富なりポソーム膜に結合する能力について調べられた。このようにして、ILYおよびPFOの両方ににおける同じ構造がそれらのコレステロール依存性の原因であるかどうかを決定することができた。

10

【 0 1 8 3 】

コレステロールは、ILYウンデカペプチドの膜挿入のために必要とされない。ILYを用いたこれまでの研究は、ブレコアを形成するためにウンデカペプチドが膜に挿入されなければならないことを示している¹⁵。したがって、その挿入が膜コレステロールに感受性であるか否かが決定された。ウンデカペプチド内に位置し、そのスルフヒドリル基を介してNBDで標識されたAla-486の代わりにシステイン残基を用いた。この残渣は、天然のILY15中の膜に挿入されることが示されている。ILYA486C-NBD中のNBDの蛍光強度を、コレステロール含有膜またはコレステロール枯渇膜の非存在下および存在下で測定した。図2に示すように、図3に示すように、hRBCゴースト膜の存在下で、ウンデカペプチドは、可溶性状態でILYについて観察されたものと比較して、蛍光発光強度の増加によって示されるように膜に挿入される。膜がコレステロールを枯渇させると、蛍光発光の同じ増加が観察される。これらの結果は、Ala-486付近のウンデカペプチド領域の膜挿入が、膜コレステロール含量とは無関係であることを実証する。

20

【 0 1 8 4 】

ループL1、L2およびL3の挿入にはコレステロールが必要である。D4(図2)の先端にある3つの短い疎水性ループの膜挿入は、一斉に起こり、膜上にCDCモノマーを固定し、適切に配向させることが要求される^{15, 17}。それらの挿入は、ウンデカペプチドの挿入と並行して、トランスメンブラン-バレル孔¹⁵の形成を導くD3膜貫通-ヘアピン(TMH)のその後の膜挿入に必要である。コレステロールは、TMHの挿入および細孔複合体の形成にも必要である¹⁴。したがって、膜コレステロールおよびL1-L3ループの膜挿入の両方が、ブレドアから細孔への変換のための前提条件である^{14, 15}。L1-L3ループの膜挿入がD3 TMHの挿入に先行するので、膜コレステロールの枯渇がL1-L3ループの挿入を阻止し、D3 TMHの挿入を妨げ、ロックするブレボアから細孔への移行。したがって、L1-L3ループの膜挿入にはコレステロールが必要であると仮定された。

30

【 0 1 8 5 】

この仮説を試験するために、天然およびコレステロール枯渇hRBCゴースト膜へのL1-L3ループの膜挿入を個々に測定した。最近、ループL1、L2、およびL3内に位置するILY残基Leu-518、Ala-424およびAla-464が膜に挿入されることが最近示された¹⁷。各ループの挿入を測定するために、各ループの残基をシステイン(ILY^{A428C}、ILY^{A464C}、ILY^{L518C})¹⁵およびNBDで誘導体化したスルフヒドリル基に変異させた。これらの部位に位置するNBDが膜に入るので、その蛍光発光強度は有意に15, 17增加する。可溶性単量体毒素、hRBCゴースト膜に結合した毒素、およびコレステロール枯渇ゴースト膜に結合した毒素の間で、NBDの発光強度を比較した。

40

【 0 1 8 6 】

各ループが天然のhRBCゴーストの膜に挿入されるときに見られる蛍光発光強度の増加と

50

は対照的に、コレステロールの膜の約90%の枯渇は、3つのループすべての膜挿入を無効にする（図4、パネルac）。コレステロールをコレステロール枯渇膜に回復させると、ループが膜に挿入される能力が回復する（図4、パネルdf）。したがって、膜コレステロールは、L1-L3ループの挿入に必要であり、以前に示されたように、この挿入は、プレドア細孔への変換に必要である^{14, 15}。

【0187】

PFOのループL1～L3中の残基のアスパラギン酸置換は、コレステロールが豊富な膜へのその結合を防止する。ILYのL1～L3ループの膜挿入は、天然の膜におけるコレステロール枯渇に対して感受性であり、PFOにおいて、これらの同じループが、コレステロールに富む膜へのその結合を直接媒介する可能性があることを示唆している。しかし、この問題は、コレステロール枯渇がPFOの膜への結合を減少させるため、ILYと同様の方法でPFOに近づくことができなかった。したがって、PFOのコレステロールが豊富なリポソームへの結合にこれらの同じループを変異させる効果が決定された。これはアスパラギン酸のループL1～L3へのPFOの導入によって達成された。これはILYに膜中への挿入を阻止することが以前に示されている¹⁵。ループL1L3の挿入はILYに結合し、任意の単一ループ残基、Ala-428(L2)、Ala-464(L3)またはLeu518(L1)に対するアスパラートの導入は、膜挿入をブロックした。したがって、PFO、Ala-401、Ala-437またはLeu-491の類似残基のいずれか1つをアスパラギン酸に置換すると、PFOのコレステロールが豊富なリポソームへの結合が破壊されることが予測された。

【0188】

PFO、Ala-401(L2)、Ala-437(L3)およびLeu-491(L1)における類似残基の個々の置換は、各変異体の溶血活性の99.7%を超える損失をもたらした（データは示されていない）。コレステロール-PCリポソームへのPFO変異体の結合を表面プラズモン共鳴(SPR)によって測定した。図2に示すように、図5aに示すように、これらの突然変異は、SPRによって検査した場合、コレステロール-PCリポソームへの結合を有意に減少させた。Ala-401(L2)またはLeu-491(L1)に対するアスパラギン酸の置換は、PFOのリポソーム膜への結合を完全に排除し、アスパラギン酸置換Ala-437(L3)による結合は野生型のそれより7%未満であった（図5b）。この結果は、D4 L1～L3ループが、PFO様CDCとコレステロール豊富な膜との相互作用にとって重要であることを示している。

【0189】

PFOのCys-459の修飾は、ウンデカペプチドトリプトファン残基の膜挿入をブロックするが、PFOの膜結合はブロックしない。主として、ウンデカペプチドの天然システィン(Cys-459)のスルフヒドリル基の化学修飾がPFO結合に有意に影響を及ぼすことが報告されているため、PFO様CDCの保存されたウンデカペプチドは、コレステロールが豊富な膜へのそれらの結合に関与すると長い間考えられてきた羊の赤血球の細胞数は低いが、高い細胞数は示さない²。しかし、他のものは、その修飾が他のCDCの細胞への結合に影響しないようであることを示している^{5, 6}。したがって、ウンデカペプチドのCys-459のスルフヒドリル基を介して修飾された天然のPFOおよびPFOの、SPRを介したコレステロール-PCリポソームとの結合能力を比較した。

【0190】

スルフヒドリル特異的試薬であるN-エチルマレイミド(NEM)を用いたPFOウンデカペプチドCys-459チオールの変換は、PFOおよびSL0のシスティンスルフヒドリルが化学的に修飾された他の報告^{2, 18}と同様に、溶血活性を99%低下させた（データは示していない）。しかしながら、NEM変換毒素の結合速度および程度は、SPR分析（図6A～B）によって決定されるように、天然の毒素のそれよりも増加した。したがって、Cys-459の化学修飾は、PFOの膜への結合を破壊しなかった。

【0191】

Cys-459の変換が結合に影響を及ぼさなかった場合、それは、この変換がPFOに及ぼす作用の効果的に遮断するPFOの問題を提起した。ほぼ90年前にCDCが発見されて以来、その細胞溶解機構は酸化に敏感であることが知られている。酸化感受性残基は、最終的に

10

20

30

40

50

高度に保存されたウンデカペプチドシステイン残基1に結合した。PFOに対するシステム修飾の構造的影響をさらに調べて、その修飾がその活性に影響を及ぼすPFOの構造変化を防止するかどうかを決定した。ウンデカペプチドトリプトファン464,466および467の膜挿入は、D3 TMHの挿入に立体構造的に結合している。以前の研究は、挿入速度を増加させるD3 TMH1残基の突然変異が、ウンデカペプチドトリプトファン残基の膜挿入速度を増加させることも示している¹⁹。Cys-459はトリプトファン残基に並置されているので、システムチオール基の化学修飾がトリプトファン残基の膜挿入をブロックするかどうかを決定した。

【0192】

ウンデカペプチドトリプトファン残基の膜挿入は、それらが膜の非極性環境に移動する際のその固有の蛍光強度の増加によってモニターすることができる^{20,21}。これらのトリプトファンの挿入をNEM改変および天然PFOで測定した(図6 aおよび6 b)。Cys-459の改変は、ウンデカペプチドトリプトファンの挿入を阻止したが、天然のPFOと同様のSDS耐性オリゴマーの形成を阻害しなかった(データ示さず)。したがって、これらのデータは、ウンデカペプチドトリプトファン残基の挿入の喪失によって反映されるPFO構造における立体配座の変化が、その後のプレポリマーオリゴマーの孔複合体への変換に影響を与えることを示す。

【0193】

ニューモリシン変異体L e u 4 6 0 A s pによる免疫化

【0194】

0日目および14日目にアラム(水酸化アルミニウム)をアジュバントとして使用して、CBA / CAHN-XIDマウスを5 μgのニューモリシンまたはニューモリシン変異体で皮下免疫した。21日目に、希釈液中でマウスを免疫した単独(アジュバントなし)。全ての注射は0.2mI容量で行った。35日目に、マウスに莢膜型19F株EF3030をチャレンジした。7日後、マウスを二酸化炭素ガスで安樂死させた。肺を均質化し、各マウスの肺におけるコロニー形成単位(CFU)の数を、血液寒天プレート上に均質化した組織をプレーティングすることによって決定した。マウスも採血した。血液中に肺炎球菌は観察されず、これは肺炎のモデルであり、肺炎および敗血症ではないことが実証された。結果は、野生型および突然変異型ニューモリシンの両方が、マウスの局所肺炎モデルにおいて肺炎を防御することができたことを示している(図7)。

【0195】

CDCの2つの長年にわたる顕著な特徴は、膜コレステロールの存在に対するそれらの細孔形成機構の依存性およびウンデカペプチドシステインの酸化による大部分のCDCの可逆的不活性化である。本明細書の研究は、両方の現象の分子的基礎を解決する。理論に縛られることを望むものではないが、ドメイン4の基部に位置するL1~L3ループの膜挿入は、ILYについて膜コレステロールの存在に感受性である主要な事象であるようである。コレステロール枯渇時に、これらのループは膜に挿入されず、以前に示されたように、hRBC膜からのコレステロール抽出15により、プレコアがILYの孔転換を妨げる。これらの結果は、両方の効果が、これらのループがコレステロール枯渇膜に挿入できないことにも起因することを示している。これらのデータはさらに、PFOおよびおそらく他のPFO様CDC中の保存されたシステムの酸化が、プリフィオア状態でPFOを捕捉するトリプトファン残基の膜挿入を阻止するが、コレステロールが豊富なリポソームへの結合に影響しないことを示す。

【0196】

ヒト細胞特異的毒素であるILYの発見は、コレステロールがその受容体である場合、ILYがヒト細胞と動物細胞とどのように弁別できるかの難点を提示した。ILYのヒト細胞特異性は、後期段階の種特異的補体阻害剤であるヒトCD59がその受容体であるという発見によって説明された¹³。コレステロールがILY受容体ではないにもかかわらず、その細孔形成機構は膜コレステロール¹⁴に依然として感受性があり、コレステロールはILYの孔形成機構のかなり後の段階に必要であることが示された。膜コレステロールが実質的に枯渇し、プレコアが細孔に変換された。興味深いことに、これは、コレステロールが豊富な膜に

10

20

30

40

50

直接結合することができる2つのCDCであるSL0およびPF014についても観察された。 hRBCからの膜コレステロールの枯渇は、プレコアがPF0の細孔転換を妨げたが、PF0結合も減少した。したがって、コレステロールは、3つ全てのCDCについてプレコア細孔転換に必要であり、さらにPF0様CDCによる膜結合にも寄与する。

【 0 1 9 7 】

最近、Soltaniら¹⁵は、ILYのL1～L3 D4ループの膜挿入が、プレポアから細孔への変換に必要であることを示した。したがって、L1-L3ループのコレステロールおよび膜挿入の両方が、ILYのプレポアから細孔への変換に必要であった。理論に拘泥するものではないが、本明細書中に提示されるデータは、これらの観察の統一的な説明は、これらのループの膜挿入がコレステロールが豊富な膜においてのみ生じることであり、この挿入は、ILYおよびPF0様CDCが含まれる。さらに、これらのループがコレステロールが豊富な膜に挿入する能力は、PF0および恐らくPF0様CDCのコレステロールが豊富な膜表面への初期結合を媒介する。したがって、これらのデータは、ILYおよびPF0様CDCの両方において、L1～L3ループが細孔複合体の形成を成功させるために膜に挿入されなければならないことを示している。ILYの場合、最初にhuCD59によって結合が媒介され、続いてL1-L3ループがコレステロールが豊富な膜に挿入されるが、これらの2つの事象（結合および挿入）はPF0において1つであり、主にL1～L3ループによって介在される。

【 0 1 9 8 】

PF0様CDCのウンデカペプチドが、コレステロールが豊富な膜の認識に寄与したか、またはそれを直接媒介することが伝統的に受け入れられている^{2,3,21}。本明細書の研究は、L1～L3ループが、CDCとコレステロール富化膜との間の相互作用を媒介する主要な構造であることを示している。NEMによるPF0ウンデカペプチドシスティンの化学修飾は、その溶血活性を99%以上低下させるが、コレステロール-PCリボソームへの結合はほとんど損なわれない。したがって、既存のドグマとは対照的に、PF0と他のPF0様CDCとの相互作用は、主としてループL1～L3によって媒介され、ウンデカペプチドではない。ウンデカペプチド内の突然変異は、L1～L3とコレステロールが豊富な膜との相互作用に影響を及ぼし得る。ILYのウンデカペプチドTrp-491の突然変異がL1～L3¹⁵の挿入をブロックし、天然のILYウンデカペプチドの改変された構造が明らかにL1-L3とコレステロール豊富な膜との直接的相互作用を妨げることが示されており、huCD59に結合する。この後者の考え方は、コンセンサスウンデカペプチド構造がILYに導入されたとき、それが非ヒト細胞に結合することを可能にしたという事実によって補強されている²²。

【 0 1 9 9 】

なぜILYのL1-L3ループがPF0と同様にコレステロールが豊富な膜への結合を媒介しないのか不思議である。上記のように、ドメイン4の主な違いは、高度に保存されたウンデカペプチドの一次構造であると思われる。ILYは、コレステロールが豊富な膜に直接結合する能力を失っていることは明らかである。さもなければ、huCD59を介して媒介されるヒト細胞特異性を示さないであろう。ILYおよびPF0のD4の結晶構造は、これらの2つのCDCのコレステロールが豊富な膜への直接結合を媒介するL1-L3ループにおけるこの差についての説明を提供し得る。ILYのL1-L3残基（Leu-518、Ala-428およびAla-464）の位置および配向は、PF0の類似残基（Leu-491、Ala-401、およびAla-437）とほぼ同一である（図4 b）。実際、2つのCDCのD4構造の大部分は、ドメイン4の上部にウンデカペプチドループおよび-舌構造を除いて、ほぼ同一である（rms偏差が0.6オングストローム未満、参考文献23）。ILYのウンデカペプチドループはPF4ウンデカペプチドよりもD4 4～5オングストロームの塩基から下方に伸びている。したがって、ILYウンデカペプチドは、ILYのL1-L3ループとコレステロールに富む表面との相互作用を立体的に妨害し得る。おそらく、受容体に結合した後でさえ、L1-L3ループの挿入を可能にするようにILYウンデカペプチド構造が変化するだけである。

【 0 2 0 0 】

本開示は、ウンデカペプチドシスティンの酸化がPF0およびおそらく他のPF0様CDCの細胞溶解機構に対して示す活性に対する重大な影響の構造的根拠を明らかにする。もともと

10

20

30

40

50

CDCはこの特徴によりチオール活性化細胞溶解素と呼ばれていたが、この効果の分子的基礎は不明であった。初期の研究は、RBCへの結合は影響を受けるが、同時にコレステロールへの結合は影響を受けず、細胞の表面上に依然として非溶解オリゴマーが観察されたことを示唆した²。本明細書に示すように、この修飾は、ウンデカペプチドトリプトファンの挿入を妨げ、プレポアトラップオリゴマー構造をもたらす。この効果の正確な構造的基礎は知られていないが、これまでの研究は、トランスマンプランのバレル孔を形成するドメイン3 TMHの膜挿入が、ドメイン4のウンデカペプチドトリプトファン残基の膜挿入に構造的に結合していることを示している。したがって、これらのトリプトファンの膜挿入を防止することにより、ドメイン3 TMHの挿入を妨げ、かくしてプレコア状態でPFOを捕捉することができる。

10

【0201】

実施例 2

Hisタグ化PLY_{wildtype}およびPLY変異体（PLY_{L460D}およびPLY_{L460D / G293S}）を、アフニティーカラムを用いて精製した。平均タンパク質収量は、PLY_{wildtype}：1mg / ml、PLY_{L460D}：1mg / ml、およびPLY_{L460D / G293S}：4mg / mlであった。精製されたタンパク質を、ヒト赤血球（RBC）と連続滴定された毒素のインキュベーションによって溶血活性について試験した。非線形シグモイド用量反応曲線から、各タンパク質についてEC50（50% RBCを溶解するのに必要な有効濃度）を計算した。野生型PLYからの倍数変化を各突然変異体について決定した（倍率変化= EC₅₀野生型 / EC₅₀突然変異体）。2つのPLY突然変異体の結果は、これらの誘導体の最高タンパク質濃度では正確な用量応答曲線に必要とされる100% RBC溶解が達成できないため、野生型PLYよりもある程度低い活性を有すると報告されている。PLY_{L460D}の野生型タンパク質（PLY_{wildtype}よりも折りたたみ活性が低い）と比較した突然変異体の溶血活性の低下は、> 10,000倍であり、PLY_{L460D / G293S}> 260,000倍であった。

20

【0202】

タンパク質の相対的安定性は、タンパク質の50%が折り畳まれていない温度である融解温度（TM Celsius）を計算することから推測される。タンパク質融解曲線は、Protein Thermal Shift Assay Dye Kit (Applied Biosystems) を用いて生成した。温度が上昇するにつれて、タンパク質は広がり、色素は露出した疎水性領域に結合し、蛍光を発することができる。PLY_{wildtype}、PLY_{L460D}、およびPLY_{L460D / G293S}のTmはそれぞれ47.50±0.2, 47.69±0.2, 47.97±0.2であった。3つのPLYタンパク質について報告されたTMのわずかな差異は、示された突然変異をPLY_{wildtype}に導入することは、タンパク質の安定性に影響しないことを示す。

30

【0203】

上記のように、1つの非限定的な実施形態において、本開示のニュー・モリシン変異体は、位置460のLがDで置換されたPLY-L460D / G293S (PLY_{L460D / G293S})と命名された二重変異体であり、Gの293位がSで置換されている。それ自体G293S置換は、PLY突然変異体の溶血活性を約50倍低下させるのみである。L460D置換はそれだけでPLY変異体の活性を約5000倍低下させる。しかし、両方の置換を有するPLY突然変異体では、活性の低下は天然のPLY毒素よりも26万分の1を超えており、これは幾何学的減少であり、単に活性の「加法的」減少ではない。

40

【0204】

理論に縛られることを望まないが、この活性の急激な低下は、PLYの2つの本質的な機能の閉塞によるものである。第1に、L460D置換はコレステロールに結合するブロックを阻止し、第2に、G293S置換は、バレル孔を挿入できないプレポア状態でPLYをトラップする（プレ孔は、リング様構造でオリゴマー化しているが、-バレル孔）。したがって、阻害効果は幾何学的である：50 X 5000-10,000> 250,000倍少ない毒性（溶血性がより低い）であり、これは天然PLYよりも26万倍低い毒性を示す測定値に従う。G293S置換はまた、L460D変異体タンパク質の単量体構造を安定化させ、精製時の収率を増加させる。例えば、1.0リットルのE.coli培養物から精製すると、PLY-L460D / G293S突然変異体の収量は

50

PLY-L460D突然変異体（約17Xより大きい）3mgに対して約52mgであった。

【0205】

したがって、ある実施形態では、本開示は、配列番号1と少なくとも約90%同一であり、かつ少なくともアミノ酸置換を有するアミノ酸配列を含む、精製または単離された変異型ニューモリシンポリペプチドに関する。変異型ニューモリシンポリペプチドは、野生型ニューモリシンポリペプチドと比較して、溶血活性が低下し、細孔形成活性が低下している可能性がある。アミノ酸配列は、少なくとも約91%同一、少なくとも約92%同一、少なくとも約93%同一、少なくとも約94%同一、少なくとも約95%同一、少なくとも約96%同一、少なくとも約97%同一、少なくとも約98%同一、または少なくとも約99%同一である配列を含む。変異型ニューモリシンポリペプチドは、アミノ酸位置293および458におけるアミノ酸置換を含み得る。293および459；293および460；294および458。294および459。変異体ニューモリシンポリペプチドは、アミノ酸位置293, 458および459におけるアミノ酸置換を含み得る。293, 459および460。変異型ニューモリシンポリペプチドは、アミノ酸294位、458位および459位のアミノ酸置換を含み得る。294, 459、および460。変異型ニューモリシンポリペプチドは、アミノ酸293位、294位、458位、および459位のアミノ酸置換を含み得る。293、294、459、および460；突然変異ニューモリシンポリペプチドは、アミノ酸位置293, 294, 458, 459、および460にアミノ酸置換を含み得る。突然変異ニューモリシンポリペプチドは、アミノ酸位置293にセリンまたはスレオニンを含み得、アミノ酸460位のアスパラギン酸、グルタミン酸またはアスパラギンである。精製された変異型ニューモリシンポリペプチドのアミノ酸配列は、配列番号40であり得る。突然変異ニューモリシンポリペプチドは、野生型ニューモリシンに対して、またはアミノ酸位置293, 294, 458, 459、および460のうちの1つのみの置換を有する突然変異ニューモリシンポリペプチドに対して増加した収率を有し得る。突然変異ニューモリシンポリペプチドは、約250,000倍野生型ニューモリシンポリペプチドよりも少ない溶血活性を有する。

【0206】

別の実施形態では、上記の本明細書中に記載されるか、または本明細書で意図される1つ以上の変異型ニューモリシンポリペプチドは、免疫原性組成物を形成するために薬学的に許容される賦形剤中に配置され得る。別の実施形態は、免疫原性組成物を含み、必要に応じてアジュバントを含み得るワクチンを含む。さらに別の実施形態は、本明細書に記載されているかそうでなければ企図されている突然変異ニューモリシンポリペプチドのいずれかをコードする核酸配列である。さらなる実施形態は、前記核酸配列を含む宿主細胞に関する。なおさらなる実施形態は、肺炎連鎖球菌によって引き起こされる状態、疾患、または感染の発生を治療、予防、または予防する方法であって、この方法では、本明細書に記載されているか、そうでなければ企図されている免疫原性組成物の治療有効量を被験体に投与する。

【0207】

他の実施形態では、本開示は、配列番号9と少なくとも90%同一であり、かつ配列番号9と少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を含む、精製または単離された変異型ストレプトリジン0ポリペプチドに関する。アミノ酸位置561および562、ならびにアミノ酸位置395および396の少なくとも1つに存在する。変異体ストレプトリジン0ポリペプチドは、野生型ストレプトリジン0ポリペプチドと比較して、溶血活性が低下し、細孔形成活性が低下している可能性がある。アミノ酸配列は、少なくとも約91%同一、少なくとも約92%同一、少なくとも約93%同一、少なくとも約94%同一、少なくとも約95%同一、少なくとも約96%同一、少なくとも約97%同一、少なくとも約98%同一、または少なくとも約99%同一である。変異体ストレプトリジン0ポリペプチドは、アミノ酸位置395および561にアミノ酸置換を含み得る。395および562；396および561；変異体ストレプトリジン0ポリペプチドは、アミノ酸位置395, 561、および562におけるアミノ酸置換を含み得る。396, 561, 562；395、396、および561；395、396、および562；突然変異体ストレプトリジン0ポリペプチドは、野生型ストレプトリジン0またはアミノ酸位置395, 396, 561、および562のうちの1つのみの置換を有する突然変異体ストレプトリジン0ポリペプチドを超える増加した収率を

有し得る変異型ストレプトリジンOポリペプチドは、野生型ストレプトリジンOポリペプチドよりも約25万倍少ない溶血活性を有し得る。

【0208】

別の実施形態では、上記の本明細書中に記載されているか、または本明細書で企図されている変異型ストレプトリジンOポリペプチドの1つまたは複数を、薬学的に許容される賦形剤中に配置して免疫原性組成物を形成することができる。別の実施形態は、免疫原性組成物を含み、必要に応じてアジュバントを含み得るワクチンを含む。さらに別の実施形態は、本明細書中に記載されているか、そうでなければ企図されている変異型ストレプトリジンOポリペプチドのいずれかをコードする核酸配列である。さらなる実施形態は、前記核酸配列を含む宿主細胞に関する。なおさらなる実施形態は、ストレプトコッカス ピオゲネス (*Streptococcus pyogenes*) によって引き起こされる状態、疾患、または感染の発生を治療、予防、または予防する方法であって、この方法では、本明細書に記載されているか、そうでなければ企図されている免疫原性組成物の治療有効量を被験体に投与する。10

【0209】

本開示を詳細に説明したが、様々な変更、置換および代替が、ここに記載した実施形態において、本開示の精神および範囲から逸脱することなく、可能であることが理解されるべきである。さらに、本開示の範囲は、本願明細書に記載された、プロセス、物質の組成、手段、方法、および工程に関する、特定の非限定的な実施形態に限定されることを意図するものではない。当業者であれば、本開示、プロセス、物質の組成、手段、方法、および工程から、現在存在しているまたは実質的に同じ機能を実施するまたは本願明細書に記載の対応する実施形態と実質的に同じ結果を達成するように後に開発されるものが、本開示に従って利用可能であることが容易に理解できるであろう。したがって、添付の請求の範囲は、その範囲内に、そのようなプロセス、物質の組成、手段、方法、工程、アミノ酸配列、および拡散配列を含むことを意図するものである。20

【0210】

参考文献

以下に示す参考文献は、関連により本明細書中に明確に取り込まれるものであり、特に、本明細書中において記載したものとの代用的な手順やその他の詳細な補足に関しての内容である。

1. Alouf, J.E., Billington, S.J. & Jost, B.H. *Repertoire and general features of the cholesterol-dependent cytolsins in Bacterial Toxins: A Comprehensive Sourcebook* (eds. Alouf, J.E. & Popoff, M.R.) 643-658 (Academic Press, London, 2005).30
2. Iwamoto, M., Ohno-Iwashita, Y. & Ando, S. Role of the essential thiol group in the thiol-activated cytolsin from *Clostridium perfringens*. *Eur J Biochem* 167, 425-430 (1987).
3. Sekino-Suzuki, N., Nakamura, M., Mitsui, K.I. & Ohno-Iwashita, Y. Contribution of individual tryptophan residues to the structure and activity of theta-toxin (perfringolysin O), a cholesterol-binding cytolsin. *Eur J Biochem* 241, 941-947 (1996).40
4. Jacobs, T. et al. The conserved undecapeptide shared by thiol-activated cytolsins is involved in membrane binding. *FEBS Lett.* 459, 463-466 (1999).
5. Vazquez-Boland, J.A., Dominguez, L., Rodriguez-Ferri, E.F., Fernandez-Garayzabal, J.F. & Suarez, G. Preliminary evidence that different domains are involved in cytolytic activity and receptor (cholesterol) binding in listeriolysin O, the *Listeria monocytogenes* thiol-activated toxin. *FEMS Microbiol Lett* 53, 95-9 (1989).
6. Saunders, F.K., Mitchell, T.J., Walker, J.A., Andrew, P.W. & Boulinos, G.J. Pneumolysin, the thiol-activated toxin of *Streptococcus pneumoniae*, does not require a thiol group for in vitro activity. *Infect. Immun.* 57, 2547-2552 (1989).50

7. Neill, J.M. & Fleming, W.L. Studies on the oxidation and reduction of immuno logical substances: II The hematoxin of the Welch bacillus. *J. Exp. Med.* 44, 2 15-226 (1926).
8. Alouf, J.E. & Geoffrey, C. Structure activity relationships in the sulphydry l-activated toxins. in *Bacterial Protein Toxins* (eds. Alouf, J.E., Fehrenbach, F .J., Freer, J.H. & Jeljaszewicz, J.) 165-171 (Academic Press, London, 1984).
9. Nagamune, H. et al. Intermedilysin. A cytolytic toxin specific for human cel ls of a *Streptococcus intermedius* isolated from human liver abscess. *Adv Exp Med Biol* 418, 773-775 (1997).
10. Nagamune, H. et al. Intermedilysin, a novel cytotoxin specific for human ce llis secreted by *Streptococcus intermedius* UNS46 isolated from a human liver absc ess. *Infect Immun* 64, 3093-3100 (1996).
11. Rollins, S.A., Zhao, J., Ninomiya, H. & Sims, P.J. Inhibition of homologous complement by CD59 is mediated by a species-selective recognition conferred thr ough binding to C8 within C5b-8 or C9 within C5b-9. *J Immunol* 146, 2345-51 (1991).
12. Rollins, S.A. & Sims, P.J. The complement-inhibitory activity of CD59 resid es in its capacity to block incorporation of C9 into membrane C5b-9. *J Immunol* 1 44, 3478-83 (1990).
13. Giddings, K.S., Zhao, J., Sims, P.J. & Tweten, R.K. Human CD59 is a recepto r for the cholesterol-dependent cytolysin intermedilysin. *Nat Struct Mol Biol* 12 , 1173-1178 (2004).
14. Giddings, K.S., Johnson, A.E. & Tweten, R.K. Redefining cholesterol's role in the mechanism of the cholesterol-dependent cytolysins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 11315-11320 (2003).
15. Soltani, C.E., Hotze, E.M., Johnson, A.E. & Tweten, R.K. Specific protein-m embrane contacts are required for prepore and pore assembly by a cholesterol-de pendent cytolysin. *J. Biol. Chem.* Paper is press 282 (21), 15709-15716, April 5, 2007.
16. Shepard, L.A. et al. Identification of a membrane-spanning domain of the th iol-activated pore-forming toxin *Clostridium perfringens* perfringolysin O: an 30

[1 A]

Cerebral	VNRTYPAQV LANKAFADIQ PSELLVARKP LANKAFADIQ VDOLVSTWNE 177
Anthrobin	RKENTITVOQ NPTYGNVAGA UDLVSTWNE 180
Thuringebian	KRNTTVOQ NPTYGNVAGA UDLVSTWNE 180
Perrinogebian	RKNTTVOQ NPTYGNVAGA UDLVSTWNE 180
Caribobian	RKNTTVOQ NPTYGNVAGA UDLVSTWNE 180
Equilimbiyan	RKNTTVOQ NPTYGNVAGA UDLVSTWNE 180
Steprobolan	RKNTTVOQ NPTYGNVAGA UDLVSTWNE 180
Noyebolan	RKNTTVOQ NPTYGNVAGA UDLVSTWNE 180
Teabobolan	RKNTTVOQ NPTYGNVAGA UDLVSTWNE 180
Reabobolan	RKNTTVOQ NPTYGNVAGA UDLVSTWNE 180
Lisabobolan	RKNTTVOQ NPTYGNVAGA UDLVSTWNE 180
Sedigebolan	RKNTTVOQ NPTYGNVAGA UDLVSTWNE 180
Pheumebolan	RKNTTVOQ NPTYGNVAGA UDLVSTWNE 180
Mihyebolan (PT)	RKNTTVOQ NPTYGNVAGA UDLVSTWNE 180
Intermediate	RKNTTVOQ NPTYGNVAGA UDLVSTWNE 180
Virdanobian	RKNTTVOQ NPTYGNVAGA UDLVSTWNE 180
Popbolan	RKNTTVOQ NPTYGNVAGA UDLVSTWNE 180

Cereblop	KYSTTH-TLP ARMQYTESWV YSKSQAISL NIVARYLDNS 246
Anthrobin	KYSTTH-TLP ARMQYTESWV YSKSQAISL NIVARYLDNS 249
Thuringebian	KYSTTH-TLP ARMQYTESWV YSKSQAISL NIVARYLDNS 249
Perrinogebian	KYSTTH-TLP ARMQYTESWV YSKSQAISL NIVARYLDNS 249
Caribobian	KYSTTH-TLP ARMQYTESWV YSKSQAISL NIVARYLDNS 249
Equilimbiyan	KYSTTH-TLP ARMQYTESWV YSKSQAISL NIVARYLDNS 249
Steprobolan	KYSTTH-TLP ARMQYTESWV YSKSQAISL NIVARYLDNS 249
Noyebolan	KYSTTH-TLP ARMQYTESWV YSKSQAISL NIVARYLDNS 249
Teabobolan	KYSTTH-TLP ARMQYTESWV YSKSQAISL NIVARYLDNS 249
Reabobolan	KYSTTH-TLP ARMQYTESWV YSKSQAISL NIVARYLDNS 249
Lisabobolan	KYSTTH-TLP ARMQYTESWV YSKSQAISL NIVARYLDNS 249
Sedigebolan	KYSTTH-TLP ARMQYTESWV YSKSQAISL NIVARYLDNS 249
Pheumebolan	KYSTTH-TLP ARMQYTESWV YSKSQAISL NIVARYLDNS 249
Mihyebolan (PT)	KYSTTH-TLP ARMQYTESWV YSKSQAISL NIVARYLDNS 249
Intermediate	KYSTTH-TLP ARMQYTESWV YSKSQAISL NIVARYLDNS 249
Virdanobian	KYSTTH-TLP ARMQYTESWV YSKSQAISL NIVARYLDNS 249
Popbolan	KYSTTH-TLP ARMQYTESWV YSKSQAISL NIVARYLDNS 249

[1 B]

Cereblop	RKEFLACILVS LCTINNSYLS 19
Anthrobin	RKEFLACILVS LCTIHYSSLS 32
Thuringebian	RKEFLACILVS LCTLYNSYLS 32
Perrinogebian	RKEFLACILVS LCLFSQPVLS 16
Akebolan	RKEFLACILVS LCLFSQPVLS 16
Caribopan	RKEFLACILVS LCLFSQPVLS 16
Equilimbiyan	RKEFLACILVS LCLFSQPVLS 16
Steprobolan	RKEFLACILVS LCLFSQPVLS 16
Noyebolan	RKEFLACILVS LCLFSQPVLS 16
Teabobolan	RKEFLACILVS LCLFSQPVLS 16
Reabobolan	RKEFLACILVS LCLFSQPVLS 16
Lisabobolan	RKEFLACILVS LCLFSQPVLS 16
Sedigebolan	RKEFLACILVS LCLFSQPVLS 16
Pheumebolan	RKEFLACILVS LCLFSQPVLS 16
Mihyebolan (PT)	RKEFLACILVS LCLFSQPVLS 16
Intermediate	RKEFLACILVS LCLFSQPVLS 16
Virdanobian	RKEFLACILVS LCLFSQPVLS 16
Popbolan	RKEFLACILVS LCLFSQPVLS 16

Figure 1A

[1 C]

Cereblop	LNIDNANAN GEKKOMVAY KQJFTYNSA 246
Anthrobin	LNIDNANAN GEKKOMVAY KQJFTYNSA 249
Thuringebian	LNIDNANAN GEKKOMVAY KQJFTYNSA 249
Perrinogebian	LNIDNANAN GEKKOMVAY KQJFTYNSA 249
Caribopan	LNIDNANAN GEKKOMVAY KQJFTYNSA 249
Equilimbiyan	LNIDNANAN GEKKOMVAY KQJFTYNSA 249
Steprobolan	LNIDNANAN GEKKOMVAY KQJFTYNSA 249
Noyebolan	LNIDNANAN GEKKOMVAY KQJFTYNSA 249
Teabobolan	LNIDNANAN GEKKOMVAY KQJFTYNSA 249
Reabobolan	LNIDNANAN GEKKOMVAY KQJFTYNSA 249
Lisabobolan	LNIDNANAN GEKKOMVAY KQJFTYNSA 249
Sedigebolan	LNIDNANAN GEKKOMVAY KQJFTYNSA 249
Pheumebolan	LNIDNANAN GEKKOMVAY KQJFTYNSA 249
Mihyebolan (PT)	LNIDNANAN GEKKOMVAY KQJFTYNSA 249
Intermediate	LNIDNANAN GEKKOMVAY KQJFTYNSA 249
Virdanobian	LNIDNANAN GEKKOMVAY KQJFTYNSA 249
Popbolan	LNIDNANAN GEKKOMVAY KQJFTYNSA 249

Figure 1C

[1 D]

Cereblop	LNIDNANAN GEKKOMVAY KQJFTYNSA 246
Anthrobin	LNIDNANAN GEKKOMVAY KQJFTYNSA 249
Thuringebian	LNIDNANAN GEKKOMVAY KQJFTYNSA 249
Perrinogebian	LNIDNANAN GEKKOMVAY KQJFTYNSA 249
Caribopan	LNIDNANAN GEKKOMVAY KQJFTYNSA 249
Equilimbiyan	LNIDNANAN GEKKOMVAY KQJFTYNSA 249
Steprobolan	LNIDNANAN GEKKOMVAY KQJFTYNSA 249
Noyebolan	LNIDNANAN GEKKOMVAY KQJFTYNSA 249
Teabobolan	LNIDNANAN GEKKOMVAY KQJFTYNSA 249
Reabobolan	LNIDNANAN GEKKOMVAY KQJFTYNSA 249
Lisabobolan	LNIDNANAN GEKKOMVAY KQJFTYNSA 249
Sedigebolan	LNIDNANAN GEKKOMVAY KQJFTYNSA 249
Pheumebolan	LNIDNANAN GEKKOMVAY KQJFTYNSA 249
Mihyebolan (PT)	LNIDNANAN GEKKOMVAY KQJFTYNSA 249
Intermediate	LNIDNANAN GEKKOMVAY KQJFTYNSA 249
Virdanobian	LNIDNANAN GEKKOMVAY KQJFTYNSA 249
Popbolan	LNIDNANAN GEKKOMVAY KQJFTYNSA 249

Figure 1D

Figure 1B

Figure 1D

Cereblop VETSYQVOKI FEESTFTAVW LGDDAKHINK VYTKDNFNEIR NI KONKAELS LNPNPAYSY TSTFLNDNST 382

Anthrobin VETSYQVOKI FEESTFTAVW LGDDAKHINK VYTKDNFNEIR NI KONKAELS LNPNPAYSY TSTFLNDNST 385

Thuringebian VETSYQVOKI FEESTFTAVW LGDDAKHINK VYTKDNFNEIR NI KONKAELS LNPNPAYSY TSTFLNDNST 385

Perrinogebian VETSYQVOKI FEESTFTAVW LGDDAKHINK VYTKDNFNEIR NI KONKAELS LNPNPAYSY TSTFLNDNST 385

Caribopan VETSYQVOKI FEESTFTAVW LGDDAKHINK VYTKDNFNEIR NI KONKAELS LNPNPAYSY TSTFLNDNST 385

Equilimbiyan VETSYQVOKI FEESTFTAVW LGDDAKHINK VYTKDNFNEIR NI KONKAELS LNPNPAYSY TSTFLNDNST 385

Steprobolan VETSYQVOKI FEESTFTAVW LGDDAKHINK VYTKDNFNEIR NI KONKAELS LNPNPAYSY TSTFLNDNST 385

Noyebolan VETSYQVOKI FEESTFTAVW LGDDAKHINK VYTKDNFNEIR NI KONKAELS LNPNPAYSY TSTFLNDNST 385

Teabobolan VETSYQVOKI FEESTFTAVW LGDDAKHINK VYTKDNFNEIR NI KONKAELS LNPNPAYSY TSTFLNDNST 385

Reabobolan VETSYQVOKI FEESTFTAVW LGDDAKHINK VYTKDNFNEIR NI KONKAELS LNPNPAYSY TSTFLNDNST 385

Lisabobolan VETSYQVOKI FEESTFTAVW LGDDAKHINK VYTKDNFNEIR NI KONKAELS LNPNPAYSY TSTFLNDNST 385

Sedigebolan VETSYQVOKI FEESTFTAVW LGDDAKHINK VYTKDNFNEIR NI KONKAELS LNPNPAYSY TSTFLNDNST 385

Pheumebolan VETSYQVOKI FEESTFTAVW LGDDAKHINK VYTKDNFNEIR NI KONKAELS LNPNPAYSY TSTFLNDNST 385

Mihyebolan (PT) VETSYQVOKI FEESTFTAVW LGDDAKHINK VYTKDNFNEIR NI KONKAELS LNPNPAYSY TSTFLNDNST 385

Intermediate VETSYQVOKI FEESTFTAVW LGDDAKHINK VYTKDNFNEIR NI KONKAELS LNPNPAYSY TSTFLNDNST 385

Virdanobian VETSYQVOKI FEESTFTAVW LGDDAKHINK VYTKDNFNEIR NI KONKAELS LNPNPAYSY TSTFLNDNST 385

Popbolan VETSYQVOKI FEESTFTAVW LGDDAKHINK VYTKDNFNEIR NI KONKAELS LNPNPAYSY TSTFLNDNST 385

Figure 1B

Figure 1B

Figure 1D

Figure 1D

Figure 1B

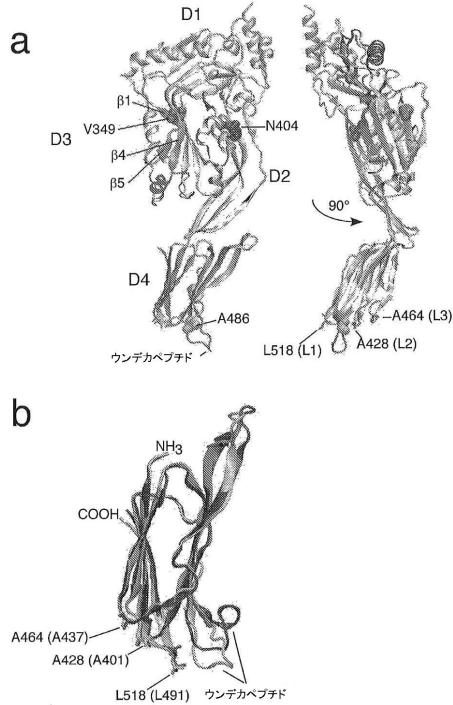
Figure 1B

Figure 1D

Figure 1B

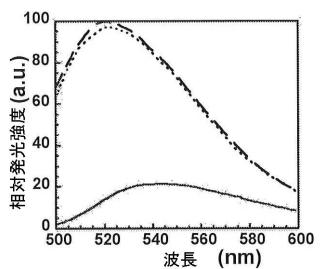
【図1E】

【図2】



四 2

(3)



3

(4)

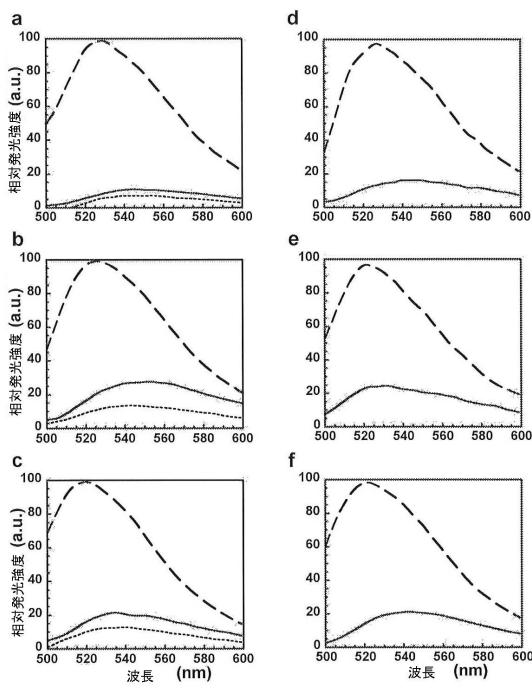
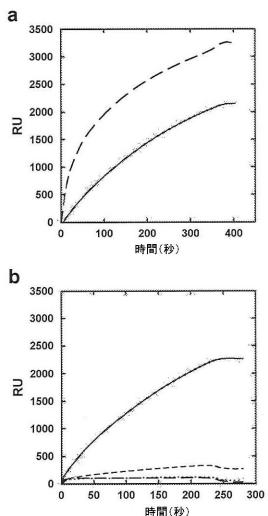


图 4

【図5】



۱۵

【 四 6 】

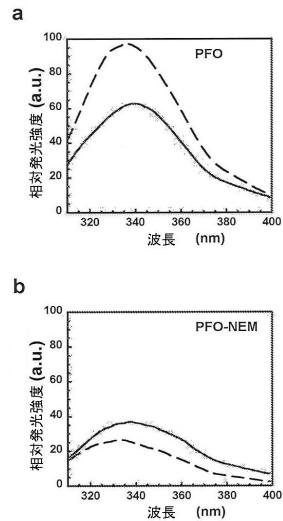
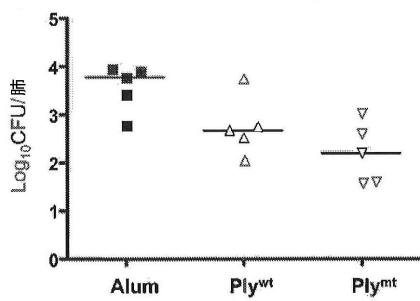


図 6

【 図 7 】



7

【配列表】

0006734274000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I
C 12 N 1/15 (2006.01)	C 12 N 1/15
C 12 N 1/19 (2006.01)	C 12 N 1/19
C 12 N 1/21 (2006.01)	C 12 N 1/21
C 12 N 5/10 (2006.01)	C 12 N 5/10

(56)参考文献 米国特許出願公開第2014/0341942(US, A1)
米国特許出願公開第2012/0148624(US, A1)
米国特許第08128939(US, B1)
米国特許出願公開第2014/0023674(US, A1)
Harvey R. et al., PLOS ONE, 2014年 8月, Vol. 9, No. 8, e103625, p.1-9

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 12 N 15 / 09
C 07 K 14 / 315
UniProt / GeneSeq
REGISTRY (STN)