(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第4091112号
(P4091112)

(45)発行日　平成20年5月28日(2008.5.28)　(24)登録日　平成20年3月7日(2008.3.7)

(51)Int.Cl.		F I		
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA
C07K 14/195	(2006.01)	C07K	14/195	
C07K 14/315	(2006.01)	C07K	14/315	
C07K 19/00	(2006.01)	C07K	19/00	
C12P 21/00	(2006.01)	C12P	21/00	C

請求項の数 18　(全 31 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願平9-500268
(86)(22)出願日　平成8年6月5日(1996.6.5)
(65)公表番号　特表平11-514841
(43)公表日　平成11年12月21日(1999.12.21)
(86)国際出願番号　PCT/IB1996/000633
(87)国際公開番号　WO1996/040718
(87)国際公開日　平成8年12月19日(1996.12.19)
審査請求日　平成15年6月5日(2003.6.5)
(31)優先権主張番号　08/475,781
(32)優先日　平成7年6月7日(1995.6.7)
(33)優先権主張国　米国(US)
(31)優先権主張番号　08/486,373
(32)優先日　平成7年6月7日(1995.6.7)
(33)優先権主張国　米国(US)

微生物の受託番号　ATCC　69750

(73)特許権者
コノート　ラボラトリーズ　インコーポレーテッド
アメリカ合衆国　ペンシルバニア州　１８３７０　スウィフトウォーター　ピーオー　ボックス　１８７　ルート　６１１
(74)復代理人
弁理士　河野　香
(74)代理人
弁理士　柳田　征史
(74)代理人
弁理士　佐久間　剛

最終頁に続く

(54)【発明の名称】リポタンパク質の発現

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

リポタンパク質のシグナル配列をコードしている第一の核酸配列、および該第一の核酸配列によってコードされているリポタンパク質とは異種である成熟タンパク質をコードしている第二の核酸配列を含むハイブリッド核酸分子であって、前記第一の配列は前記第二の配列に隣接しており、前記シグナル配列がボレリア（Borrelia）種のOspAタンパク質のシグナル配列であり、さらに前記成熟タンパク質がボレリア（Borrelia）種のOspCリポタンパク質であることを特徴とするハイブリッド核酸分子。

【請求項２】

前記第一と第二の配列とが結合して、転写オープンリーディングフレームを形成していることを特徴とする請求の範囲第１項記載のハイブリッド核酸分子。

【請求項３】

前記OspCリポタンパク質がボレリア・ブルグドルフェリ（B. burgdorferi）の菌株由来のものであることを特徴とする請求の範囲第１項または第２項記載のハイブリッド分子。

【請求項４】

前記ボレリア・ブルグドルフェリ（B. burgdorferi）の菌株が、OspCサブタイプの菌株から選択されることを特徴とする請求の範囲第３項記載のハイブリッド分子。

【請求項５】

前記OspAタンパク質がボレリア・ブルグドルフェリ（B. burgdorferi）の菌株由来のものであることを特徴とする請求の範囲第１項記載のハイブリッド分子。

【請求項６】
前記ボレリア・ブルグドルフェリ（B. burgdorferi）の菌株が、B31、ACA1およびIp90の菌株から選択されることを特徴とする請求の範囲第５項記載のハイブリッド分子。
【請求項７】
前記成熟タンパク質の発現プロモーターの制御下に請求の範囲第１項記載のハイブリッド核酸分子を含むことを特徴とする発現ベクター。
【請求項８】
組換えタンパク質を形成する方法であって、
請求の範囲第5項記載の発現ベクターを非ヒト宿主生物に組み込み、
該非ヒト宿主生物において前記成熟タンパク質を発現させることを特徴とする方法。
【請求項９】
前記宿主生物が大腸菌（E. coli）であることを特徴とする請求の範囲第８項記載の方法。
【請求項１０】
組換えリポタンパク質を産生する方法において、
リポタンパク質のシグナル配列をコードしている第一の核酸配列、および該第一の核酸配列によってコードされているリポタンパク質とは異種である成熟タンパク質をコードしている第二の核酸配列を含むハイブリッド核酸分子であって、前記第二の核酸配列は前記第一の配列に隣接しており、前記シグナル配列がボレリア（Borrelia）種のOspAタンパク質のシグナル配列であり、さらに前記成熟タンパク質がボレリア（Borrelia）種のOspCリポタンパク質であるハイブリッド核酸分子を構築し、
前記成熟タンパク質の発現プロモーターの制御下に前記ハイブリッド核酸分子を含む発現ベクターを形成し、
前記発現ベクターを非ヒト宿主生物に組み込み、
前記非ヒト宿主生物において前記組換えリポタンパク質を発現させ、
前記非ヒト宿主生物の細胞を溶解し、
界面活性剤で前記溶解細胞を処理することにより、バクテリアタンパク質およびその他のタンパク質に優先して前記組換えリポタンパク質を選択的に可溶化し、さらに界面活性剤相の相分離を行うことができるようにし、
前記可溶化された組換えリポタンパク質を含有する界面活性剤相、バクテリアタンパク質およびその他のタンパク質を含有する水性相、ならびに細胞残査を含有する固体相に対して相分離を行い、
前記固体相および水性相から界面活性剤相を分離、回収し、
前記組換えリポタンパク質以外のタンパク質を結合させるような条件で、前記界面活性剤相を第一のクロマトグラフィーカラムにかけ、該第一のクロマトグラフィーカラムから組換えリポタンパク質を含む通過流出分を得て、該第一のクロマトグラフィーカラムから該通過流出分を回収し、
第二のクロマトグラフィーカラムに前記第一のクロマトグラフィーカラム由来の通過流出分をかけ、第二のクロマトグラフィーカラムを素通りする混入タンパク質およびリポ多糖類に優先して組換えタンパク質をカラムに結合させ、
前記第二のクロマトグラフィーカラムから前記組換えリポタンパク質を溶出させて、実質的にリポ多糖類および混入タンパク質を含まない組換えリポタンパク質を含む溶出物を得る、ことを特徴とする方法。
【請求項１１】
前記第一と第二の配列とが結合して、転写オープンリーディングフレームを形成していることを特徴とする請求の範囲第10項記載の方法。
【請求項１２】
前記界面活性剤がトライトン（TRITON）（登録商標）X-114であることを特徴とする請求の範囲第11項記載の方法。
【請求項１３】

溶解細胞の処理を０℃～10℃の温度で行い、得られた混合物を35℃～40℃まで加温して界面活性剤相を分離させ、遠心分離によって水性相および固体相から界面活性剤相を分離することを特徴とする請求の範囲第12項記載の方法。

【請求項１４】

前記第一のクロマトグラフィーカラムに特定のpHの緩衝液を流し、第一のクロマトグラフィーカラム由来の組換えOspCリポタンパク質を含む液体を得るとともに、他のタンパク質は第一のクロマトグラフィーカラムに残留させ、得られた通過流出分を、先に第一のクロマトグラフィーカラムから得られたものとあわせ、このあわせた通過流出分を第二のクロマトグラフィーカラムにかけることを特徴とする請求の範囲第12項記載の方法。

【請求項１５】

前記非ヒト宿主生物の溶解を該宿主生物の凍結融解によって行うことを特徴とする請求の範囲第10項記載の方法。

【請求項１６】

請求の範囲第10項記載の方法に従って産生され、ボレリア（Borrelia）種のOspAタンパク質のシグナル配列およびボレリア（Borrelia）種の成熟OspCリポタンパク質を含むことを特徴とする、組換え単離精製リポタンパク質。

【請求項１７】

ATCC受託番号第69750号のリポタンパク質融合ベクターpLF100。

【請求項１８】

請求の範囲第16項記載のリポタンパク質を含有することを特徴とする免疫応答誘導のための組成物。

【発明の詳細な説明】

関連出願の参照

特に組み換えボレリア（Borrelia）タンパク質に関して1992年10月29日に出願された出願番号07/973,338号；1995年１月17日に出願された出願番号08/373,455号（米国特許出願番号07/973,338号の規則62による継続出願）；1992年５月27日に出願された出願番号07/888,765号；1992年10月16日に出願された出願番号08/211,891号（PCT/US92/08697号の国内段階）；および1991年10月18日に出願された出願番号07/779,048号の各々を参照する。

肺炎球菌タンパク質の構造遺伝子、それらのエピトープ領域、および肺炎球菌タンパク質の投与に関しては、各々、1991年２月15日に出願された出願番号第656,773号、1992年２月12日に出願された出願番号第835,698号、1993年６月３日に出願された出願番号第072,065号；1993年６月３日に出願された出願番号第072,068号；1994年３月17日に出願された出願番号第214,222号；1994年３月17日に出願された出願番号第214,164号；1994年５月23日に出願された出願番号第247,491号；1993年４月20日に出願された出願番号第048,896号；1994年５月20日に出願された出願番号第246,636号；1994年10月７日に出願された出願番号第＿＿＿号（出願番号第246,636号の一部継続出願）；1995年６月２日に出願された出願番号第＿＿＿号（代理人における整理番号第454312-2040号、ブリル（Briles）ら、発明の名称「肺炎球菌抗原の経口投与（”ORAL ADMINISTRATION OF PNEUMOCOCCAL ANTIGENS”）」；1995年５月19日に出願された出願番号第＿＿＿号（代理人における整理番号第454312-2018号）；1994年９月30日に出願された出願番号第08/312,949号；1995年６月７日に出願された出願番号第＿＿＿号（代理人における整理番号第454312-2051号、ベッカー（Becker）ら、発明の名称「免疫組み合わせ組成物および方法（”IMMUNOGENIC COMBINATION COMPOSITIONS AND METHODS”）」を特に参照する。

1995年６月７日に出願された出願番号第＿＿＿号（代理人における整理番号第454312-2017号、ヒューブナー（Huebner）ら、発明の名称「リポタンパク質の発現（”EXPRESSION OF LIPOPROTEINS”）」をも参照する。

上記の各出願を参考として本明細書に引用しておく。

発明の分野

本発明は、リポタンパク質をコードしている核酸分子を含有するベクターからリポタンパク質を発現させる遺伝子工学に関するものである。より詳しくは、本発明は、その脂質化

（lipidation）が第１の核酸配列の発現由来であり、そのタンパク質が第２の核酸配列の発現由来であり、天然では同時に発現することのない第１と第２の核酸配列が隣接している組み換えリポタンパク質の発現に関するものである。本発明はさらに、第１の核酸配列がボレリア（Borrelia）リポタンパク質のリーダー配列をコードしているようなリポタンパク質の発現に関するものである。本発明はまた、OspAリーダー配列をコードしている核酸配列を用いて発現した組換え脂質化タンパク質、その組成物を製造する方法並びに使用する方法に関するものである。本発明はさらに、組換えリポタンパク質をコードしている核酸配列、該配列を含有および／または発現するベクター、前記リポタンパク質を発現する方法並びに前記核酸配列およびベクターを製造する方法；好ましくは改善された免疫原性を有する組成物のような、免疫原性またはワクチン組成物を含むリポタンパク質を用いた組成物；およびそのような組成物を用いて免疫または防御応答を誘発する方法に関するものである。

本明細書の全体に亘り、本発明が関連する従来技術をより完全に記載するために、様々な文献を参照する。これらの文献の各々を参考として本明細書中に引用しておく。

発明の背景

ライムボレリア症（Lyme borreliosis）は、米国中で最も流行しているダニ媒介病であり、世界的に最も重要なダニ媒介感染病のうちの１つである。スピロヘータであるボレリア・ブルグドフェリ（Borrelia burgdorferi）は、ライム病の原因因子である。ボレリア・ブルグドフェリ（B. burgdorferi）に感染すると、局所および全身の症状発現が生じる。感染後の初期に見られる局所症状は、地図状紅斑（遊走性紅斑）（erythema migran）と称される、ダニに噛まれた部位の皮膚病斑である。感染から数週間から数ヶ月後に、リウマチ性、心臓性および神経性の症状を含む全身症状発現が見られる。ボレリア・ブルグドフェリ（B. burgdorferi）感染の初期の局所段階は、抗生物質により容易に治療できる。しかしながら、その後の全身段階では、抗生物質に対してより抗療性であることが示されている。

ライム病のワクチンの開発に関しては、たゆまぬ努力が払われてきた。ワクチン開発については、２つのアプローチがとられている。ひとつは、ジョンソン（Johnson）によって米国特許第4,721,617号に記載されているような、不活化全スピロヘータを成分とするワクチンを用いることである。不活化全ワクチンは、チャレンジに対してハムスターを防御することが示されており、イヌに対する使用が認可されている。

全細胞調製における交差反応抗原に関する懸念から、ヒトのワクチンの研究においては、ボレリア・ブルグドフェリ（B. burgdorferi）によって発現される非交差反応性の防御抗原の同定および開発に的を絞っている。今日までに、数個の抗原の候補が同定されている。外表面タンパク質Ａ（OspA）と呼ばれる、ボレリア・ブルグドフェリ（B. burgdorferi）に非常に豊富に存在する表面タンパク質（本出願の出願者に帰属する、公開されたPCT特許出願WO 92/14488に記載）に関して多くの研究がなされている。このタンパク質のいくつかの変形種では、マウス、ハムスターおよびイヌのチャレンジ試験において防御免疫を誘導することが示されている。ヒトにおける臨床試験では、OspAの製剤がヒトにおいて安全かつ免疫原性であることが示されている（ケラー（Keller）ら、JAMA（1994）271: 1764-1768）。実際のところ、上述のWO 92/14488に記載されている組換え脂質化OspAを含むひとつの製剤に関しては、現在、ヒトにおける第III相安全性／有効性試験が進行中である。

北アメリカにおけるボレリア・ブルグドフェリ（B. burgdorferi）の臨床単離株の大多数においてはOspAを発現するが、ヨーロッパにおけるボレリア（Borrelia）の臨床単離株の例からは、異なる構図が明らかになっている。ヨーロッパにおいては、ライム病は、ボレリア（Borrelia）の３つの遺伝子種、すなわち、ボレリア・ブルグドフェリ（B. burgdorferi）、ボレリア・ガリニ（B. garinii）、ボレリア・アフゼリ（B. afzelli）によって起こる。ヨーロッパの単離株の約半数においては、OspAは、最も優勢な外表面タンパク質ではない。これらのスピロヘータにおいては、第二の外表面タンパク質Ｃ（OspC）が主要な表面抗原である。実際、OspAを発現しない多数のヨーロッパ臨床単離株が同定されてい

る。精製組換えOspCを用いた野ネズミおよびマウスに対する免疫においては、相同なOspCタンパク質を発現するボレリア・ブルグドフェリ（B. burgdorferi）株に対する防御免疫を発生する（V.プリーク－ムルシック（Preac-Mursic）ら、INFECTION（1992）20: 342-349; W.S.プロバート（Probert）ら、INFECTION AND IMMUNITY（1994）62: 1920-1926）。現在、OspCタンパク質は、第二世代のライム病ワクチン製剤の有力成分と考えられている。

組換えタンパク質は、ワクチンまたは免疫組成物の候補として有望であるが、これは、高収率、高純度、高増幅産生が可能であり、所望する活性を最大限に、所望しない活性を最小限にするからである。しかしながら、免疫原性が乏しいため、ワクチンまたは免疫組成物の開発においては、組換えタンパク質の免疫応答を増幅する方法が重要である。

非常に有望な免疫刺激剤は、Ｎ－パルミトイル－Ｓ－（２ＲＳ）－２，３－ビス－（パルミトイルオキシ）プロピルシステイン、略称Pam_3Cysの脂質部位である。この部位はバクテリアのリポタンパク質のアミノ末端において発見され、シグナルペプチダーゼIIによる脂質の結合および解裂を特定するシグナル配列と共に合成される。それ自身は免疫原性ではない合成ペプチドは、Pam_3Cysと共有結合した場合に強力な抗体応答を誘導する（ベスラー（Bessler）ら、Research Immunology（1992）143: 548-552）。

抗体応答に加えて、しばしば、細胞性免疫応答、特に細胞毒性Ｔリンパ球（CTLs）を誘導する必要がある。Pam_3Cys結合合成ペプチドは、非常に強力なCTLの誘導剤であるが、大きな組換えリポタンパク質によるCTL誘導に関してはまだ報告されていない。

OspAに関する核酸配列およびコードしているアミノ酸配列については、いくつかのボレリア・ブルグドフェリ（B. burgdorferi）の臨床単離株において既知であり、例えば、ボレリア・ブルグドフェリ（B. burgdorferi）のB31株については、公開されているPCT出願WO 90/04411（シンビコム（Symbicom）AB）に、地理的に異なる起源を有するB31、ACA1およびIp90と呼ばれるボレリア・ブルグドフェリ（B. burgdorferi）の３つの単離株のOspAオペロンの比較については、ジョンソン（Johnson）ら、Infect. Immun. 60: 1845-1853に記載されている。

WO 90/04411に記載しているように、B31株のDNA配列の解析から、OspAは、DNA配列の151番目から始まり、DNA配列の970番目で終了する819個のヌクレオチドから構成されるオープンリーディングフレームによってコードされていることが示されている（図１を参照）。OspAの最初の16個のアミノ酸残基は、OspAの疎水性シグナル配列を構成している。ボレリア・ブルグドフェリ（B. burgdorferi）の全遺伝子の一次転写産物には、疎水性のＮ末端シグナル配列が含まれており、これは、隣接するシステイン残基のスルフヒドリル側鎖にジアシルグリセロールが結合するための基質である。この結合に続いて、シグナルペプチダーゼIIによる解裂、およびＮ末端への三級脂肪酸の結合が起こる。完全な脂質部位は、Pam_3Cysで終了する。OspAの脂質化は免疫原性に必須であることが示されており、これは、Ｎ末端にPam_3Cys部位を有するOspAリポタンパク質は強力な免疫応答を刺激するのに対し、一方、脂質が結合していないOspAは、目立った量の抗体を誘導しないからである（アーディル（Erdile）ら、Infect. Immun.,（1993），61: 81-90）。

公開されている国際特許出願WO 91/09870（マイクロゲン・モレキュラーバイオロギッシェ・エントウィックラングス（Mikrogen Molekularbiologische Entwicklungs）社）には、ボレリア・ブルグドフェリ（B. burgdorferi）のPko株のOspC遺伝子のDNA配列および分子量22kDaのOspC（本引用文献中ではpCと表わされている）タンパク質について記載している。この配列から、OspCは、OspAに存在するものと類似のシグナル配列を有するリポタンパク質であることが明らかである。OspAに関する知見から、組換えOspCを脂質化することは、免疫原性の増強に有効であると期待できる、がしかし、以下に記載しているように、本発明者らは、組換えOspCを検出可能量発現することが困難であることを経験している。

イノウエらの米国特許第4,624,926号は、プラスミドクローニングベクターに関し、グラム陰性バクテリアの外膜のリポタンパク質遺伝子由来の１個またはそれ以上の機能性断片に結合した、所望するポリペプチドをコードしているDNA配列を含んでいる。形質転換し

た大腸菌（E. coli）宿主細胞によって発現されたポリペプチドは、リポタンパク質のシグナルペプチドを含み、リポタンパク質の最初の８個のアミノ酸残基が続き、、さらにそれに、所望するタンパク質のアミノ酸配列が続いている。次に、シグナルペプチドは、通常は細胞質膜を通過して転移し、リポタンパク質の最初の８個のアミノ酸残基は、さらに処理を受け、リポタンパク質が外膜に正常挿入される場合と同様の方法で外膜に挿入される。発現したタンパク質の免疫原性については示されていない。さらに、イノウエは、組換え脂質化、特に免疫原性の増強に関しては全く考察していない。

公開されている国際特許出願WO 91/09952は、脂質化タンパク質の発現用のプラスミドについて記載している。そのようなプラスミドには、リポタンパク質のシグナルペプチドをコードしているDNA配列を含んでおり、該シグナル配列は、β－回折している４個のペプチド、ＱＡＮＹまたはＩＥＧＲのうちのひとつのコドンに結合し、さらに該コドンが、所望するタンパク質をコードしているDNA配列に結合している。この出願においても、発現したタンパク質の免疫原性については示していない。

肺炎連鎖球菌（Streptococcus pneumoniae）は、世界中で、他の如何なる病原体よりも致死的な感染を引き起こす。アメリカ合衆国においては、肺炎連鎖球菌（S. pneumoniae）による死亡者数は、AIDSによる死亡者数に匹敵する。アメリカ合衆国における最も致死的な肺炎球菌感染は65才以上の高齢者に起こり、この人々の間では、肺炎連鎖球菌（S. pneumoniae）が集団感染肺炎の最も一般的な原因である。先進国においては、肺炎球菌による死亡は、高齢者または、鎌型赤血球症を含む免疫不全の患者において起こる。発展途上国においては、肺炎球菌感染は、５才未満の子供の最大の死亡原因のひとつである。肺炎球菌内での複数の抗生物質に対する抵抗株の出現頻度の増加、貧しい国においては薬剤治療が非常に高価であることから、肺炎球菌性疾患を制圧するという現在の展望は問題が多い。

ヒトに感染する肺炎球菌の保有宿主は、基本的には、鼻咽頭の保有者を介して維持される。ヒトはまず、エアロゾルを通して、または直接接触により肺炎球菌を獲得する。肺炎球菌は最初に気道上部に定着し、鼻粘膜に数週間から数カ月留まる。低年齢の子供および高齢者においては、50％またはそれ以上に定着している。ほとんどの場合には、この定着からはっきりとした感染に至ることはない。しかしながら、一部のヒトにおいては、鼻咽腔に運ばれた菌が中耳の感染を伴う副鼻腔炎の症状を引き起こすことがある。もし、肺炎球菌が、特に食物片または粘液と共に肺に吸引された場合には、肺炎を引き起こす。一般的に、この部位における感染では、肺炎球菌のいくつかは血液中に混じり、特に感染の発生場所から大量に続けて流入する場合には、敗血症を起こすことになる。血中の肺炎球菌は脳に達し、そこで髄膜炎を引き起こす。肺炎球菌性髄膜炎は、バクテリアによる他の感染症に比べて一般的ではないが、特に破壊的である；約１０％の患者が死亡し、50％以上において神経性の余病が生涯残る。

高齢者においては、現行の23価のカプセル性多糖類ワクチンの有効率は、ワクチンに含まれているカプセル型の株による侵入性肺炎球菌性疾患に対しては約60％である。23価のワクチンは、２才未満の子供に対しては有効ではなく、これは、ほとんどの多糖類に対して適切な応答をすることができないためである。肺炎球菌による侵入感染に対して、子供と大人の両方を防御することができる改良ワクチンは、この疾患の最も有害な点のいくつかを減らすことになるであろう。

肺炎連鎖球菌（S. pneumoniae）細胞の表面タンパク質PspAは、毒性（ビルレンス）因子であり、防御抗原であることが示されている。公開されている国際特許出願WO 92/14488においては、肺炎連鎖球菌（S. pneumoniae）Rx1由来のPspA遺伝子のDNA配列、遺伝子工学によるPspA断片の産生、ならびにそのようなPspA断片が、生きた肺炎球菌を用いたマウスに対するチャレンジにおいて防御をもたらすという実験について記載している。

PspAに基づくワクチンまたは免疫原性組成物を開発する試みにおいては、大腸菌（E. coli）内で組換えによってPspAを発現させている。PspAを効率的に発現するためには、Rx1株の成熟PspA分子である589個のアミノ酸からなる正常の長さのものから、アミノ酸番号１番～314番に相当する314個のアミノ酸からなるものを切り出すことが有効である。PspA分

子のこの領域には、PspAの防御エピトープを全部ではないが、ほとんど含んでいる。しかしながら、マウスにおける免疫原性および防御試験においては、PspAの断片組換え体は、実験に使用したことのないマウスに対して免疫原性ではないことが示されている。従って、組換えPspAおよびそれらの断片の免疫原性を向上させることが重要である。

肺炎連鎖球菌（S. pneumoniae）、ヘリコバクター・ピロリ（Helicobacter pylori）、HIV、ヘルペス、およびパピローマウイルスなどのような、多くのバクテリア性およびウイルス性病原体は、粘膜表面に付着し、透過侵入する。粘膜表面における特異的免疫の主要な決定因子は分泌IgA（S-IgA）であり、循環性免疫系とは生理的にも機能的にも別のものである。粘膜性S-IgA応答は、一般的な粘膜免疫系（CMIS）によって優先的に発生し（メステキー（Mestecky），J. Clin. Immunol.（1987），7: 265-276）、このとき、免疫原は、粘膜関連リンパ組織（MALT）と呼ばれる特定のリンパ上皮構造によって取り込まれる。一般的な粘膜性免疫系とは、任意の粘膜部位に免疫を行っても他の全ての粘膜部位に免疫応答を誘発することができることをさしている。故に、腸管に免疫を行うことにより、上気道において粘膜性免疫を誘発することができ、逆もまた可能であるということである。さらに、特筆すべきことは、経口免疫においては、粘膜性IgA抗体に加えて、全身性の抗原特異的IgG応答を誘導することができることである（マクジー（McGhee）J.R.ら、（1993），Infect. Agents and Disease 2: 55-73）。

非常に可溶性で非反復性の抗原は、特に経口的経路で投与した場合には、粘膜性免疫原性が弱いが、これはおそらく、消化酵素によって分解され、ごくわずかしか、あるいは全く粘膜関連リンパ組織（MALT）に到達しないためである。故に、有効な粘膜性免疫原、ならびにそれらを含有するワクチンおよび免疫組成物を製造する方法が所望されている。

特に興味があるのは、らせん状のバクテリアであるヘリコバクター・ピロリ（H. pylori）であり、これは、ヒトの胃のムチン分泌細胞に選択的に定着し、ヒトの非びらん性胃炎のほとんどの場合における原因因子である。最近の研究により、ウレアーゼ活性が高いヘリコバクター・ピロリ（H. pylori）は、ほとんどの消化性潰瘍ならびに多くの胃癌に関与していることが示されている。多くの研究から、ウレアーゼ（これは、ureA遺伝子およびureB遺伝子の産物のコンプレックス）は防御抗原であることが示唆されているが、これまでのところ、どのようにしてウレアーゼに対する十分な粘膜免疫応答を産生するかはわかっていない。

OspC、PspA、UreA、UreBまたはそれらの免疫原性断片などのような抗原は、宿主に投与した場合に免疫応答を刺激する。そのような抗原は、特に組換えによって産生した場合には、アジュバントと共に投与した際に、より強力な応答を誘発する。現在のところ、アルムがヒトへの使用が認められている唯一のアジュバントであるが、多数の実験用アジュバント（コレラ毒素Bなど）に関して試験が行われている。しかしながら、これらのアジュバントは、不十分である。例えば、コレラ毒素Bは、コレラを発病するという点に関しては毒性ではないが、一般的には、特に不純物が含まれている可能性がわずかでもある場合には、コレラと同様の危険な疾患に関連する毒素を投与することは容易ではない。

故に、特に一価の製剤においては、アジュバントを用いる以外の方法によって、抗原の免疫原性を増強することが、また、多価の製剤においては、より高い免疫応答を得るために、アジュバントによって免疫原性を増強することができることが望ましい。

組換えタンパク質の発現に関しては、発現に用いることのできるさまざまなベクター系、例えば、大腸菌（E. coli）などのバクテリアなどは、当業者には既知である。

以下の事柄は、従来技術において教示されたことも、示唆されたこともない：組換えリポタンパク質の発現であって、その脂質化部位は第一の核酸配列の発現に由来し、そのタンパク質部位は第二の核酸配列の発現に由来し、天然では同時には存在しない第一と第二の配列が連続して存在しており、特に、そのようなリポタンパク質において、第一の配列が、ボレリア（Borrelia）リポタンパク質のリーダー配列、好ましくはOspAリーダー配列、より好ましくは、第一の配列がOspAリーダー配列をコードしており、第二の配列がOspC、PspA、UreA、UreBまたはそれらの免疫原性断片をコードしているもの；そのような配列を含む遺伝子；そのような配列を含むベクター；そのような発現のための方法；そのような

組換えリポタンパク質；そのような組換えリポタンパク質を含有する組成物；そのような組成物を使用する方法；リポタンパク質のタンパク質部位をコードしている核酸配列とは天然には共存しない核酸配列による脂質化によってタンパク質の免疫原性を増強する方法。

発明の目的および概要

本発明の目的は、その脂質化が第１の核酸配列の発現からであり、そのタンパク質部分が第２の核酸配列の発現からであり、第１と第２の配列が天然では同時には生じない組換えリポタンパク質；特に第１の配列がボレリア（Borrelia）リポタンパク質のリーダー配列、好ましくはOspAリーダー配列をコードしており、より好ましくは第２の配列がOspC、PspA、UreA、UreB、またはそれらの免疫原性断片からなるタンパク質部分をコードしている、そのようなリポタンパク質を提供することにある。

本発明の別の目的は、そのような組換えリポタンパク質をコードしている遺伝子および／または配列の発現、そのためのベクターおよびそのような発現を行う方法を提供することにある。

本発明のさらなる目的は、組換えリポタンパク質および／またはその発現のためのベクターを含有する、ワクチンを含む免疫組成物を提供することにある。

天然のリポタンパク質シグナル配列をコードしている領域が存在する場合には、免疫原性組換え脂質化タンパク質、好ましくはOspCまたはそれらの一部は、ベクター系、好ましくは大腸菌（E. coli）において発現することが可能であり、その際、ベクター系に対して毒性を与えることはないというのは驚くべき発見である。この結果は、リポタンパク質の天然のリーダーまたはシグナル配列をコードしているヌクレオチド配列を、他のリポタンパク質、好ましくはボレリア（Borrelia）リポタンパク質、より好ましくはOspAのリーダーまたはシグナル配列をコードしているヌクレオチド配列と置き換えることによって得られた。天然では脂質化されていないタンパク質、例えば、PspA、UreAおよびUreBなどは、所望するタンパク質の最初のアミノ酸にリポタンパク質のシグナル配列を融合することによって、組換え脂質化タンパク質として発現させることができる。これらの組換え脂質化タンパク質は、粘膜性免疫応答を含む免疫応答を誘発することが示されている。

タンパク質をコードしているDNAに、リポタンパク質のリーダー配列をコードしているDNAを、介在ヌクレオチド配列なしに直接融合することにより、天然のリーダー配列に毒性を与えることなく、大量の免疫原性組換えリポタンパク質を発現することができることは驚くべきことである。なぜなら、これまでの組換え脂質化タンパク質発現の試みは失敗に終わっていたからである。例えば、フッチュ（Fuchs）らは、天然のリーダータンパク質を有する組換えによって作成したOspC（本引用文献中ではpCと表記されている）は、大腸菌（E. coli）内でごくわずかしか発現しなかったと報告している（Mol. Microbiology（1992）6（4）：503-509））。フッチュ（Fuchs）に続いて発明者らは、OspAの発現およびpDS12プラスミド系の使用について記載した上掲のWO 92/14488中のpETベクター系を用いて大腸菌（E. coli）内でOspCをコードしている配列を発現させることによって、脂質化組換えOspCを発現させる試みについて記載している。しかしながら、これらの系を用いて発現したOspCについて、細胞抽出物のイムノブロットを行ってもOspCはほとんど検出できない。

さらに、既に述べているように、組換えリポタンパク質の発現には、追加のヌクレオチド配列、好ましくは、β－回折を形成するペプチド配列をコードしているヌクレオチド配列が必要であると考えられており、これまでに発現している組換えリポタンパク質の免疫原性については示されていない。

故に、本発明の方法を用いることにより、これまで不可能だった純粋な組換え免疫原性脂質化タンパク質、例えば、OspC、PspA、UreA、UreBおよびそれらの断片などを大量に得ることができる。本発明において得られた組換え脂質化タンパク質は、非脂質化組換えアナログよりも免疫原性が著しく高い。

本発明は、天然に存在しない、好ましくはボレリア（Borrelia）、より好ましくはOspAリーダー配列を用いた異型脂質化タンパク質の発現に関する最初の例である。それ故、本発

明は、天然に存在しない、好ましくはボレリア（Borrelia）、より好ましくはOspAリーダー配列を用いて、該リーダー配列とは異型のタンパク質を発現することを含む。
従って、ひとつの実施態様においては、本発明は、シグナル配列、好ましくはボレリア（Borrelia）種のOspAタンパク質をコードしている第一の核酸配列が、シグナル配列とは異型の成熟タンパク質、好ましくはOspCまたはPspAをコードしている第二の核酸配列と結合して、転写オープンリーディングフレームを形成しているものを含む、単離されたハイブリッド核酸分子、好ましくはDNAを提供する。より好ましくは、成熟タンパク質が天然に脂質化されている場合には、第一と第二の配列は連続しており、成熟タンパク質が天然に脂質化されていない場合には、１個のアミノ酸、好ましくはシステインをコードしているひとつのコドンによって分離されている。
一般的には、第二の核酸配列によってコードされている成熟タンパク質は、リポタンパク質、好ましくは抗原性リポタンパク質、より好ましくはボレリア（Borrelia）種の成熟OspCリポタンパク質であり、好ましくはボレリア・ブルグドフェリ（B. burgdorferi）のひとつの菌株、より好ましくはOspCサブタイプ族から選択されるボレリア・ブルグドフェリ（B. burgdorferi）のひとつの菌株の成熟OspCリポタンパク質である。別の好ましい実施態様においては、成熟タンパク質は、肺炎連鎖球菌（S. pneumoniae）のひとつの菌株の成熟PspAタンパク質、またはそれらの免疫原性断片である。さらに別の好ましい実施態様においては、成熟タンパク質は、ヘリコバクター・ピロリ（H. pylori）のひとつの菌株のUreAまたはUreBタンパク質である。同様に、第一の核酸配列によってコードされているボレリア（Borrelia）株のOspAタンパク質のシグナル配列は、ボレリア・ブルグドフェリ（B. burgdorferi）のひとつの菌株のものであることが好ましく、より好ましくは、B31、ACA1およびIp90の中から選択されたボレリア・ブルグドフェリ（B. burgdorferi）のひとつの菌株のものである。
本明細書で用いられるハイブリッド遺伝子は、好ましくは成熟リポタンパク質発現のための適切なプロモーターの制御下に発現ベクター内に組み込まれ、本発明のさらに別の実施態様に従い、適切な宿主、例えば、大腸菌（E. coli）などにおいて、好ましくは成熟リポタンパク質発現のための適切なプロモーターの制御下に発現ベクター内に組み込まれ、リーダー配列および脂質化された所望する異型タンパク質を含むキメラ分子の初期転写が起こり、続いて、シグナルペプチダーゼIIによるキメラ分子の解裂およびタンパク質の新しい末端への脂質部位の結合が生じ、宿主内で成熟リポタンパク質が発現する。
本発明は、組換え脂質化タンパク質、例えば、ボレリア（Borrelia）種の組換え脂質化OspC、肺炎連鎖球菌（S. pneumoniae）のひとつの菌株の組換え脂質化PspA、またはヘリコバクター・ピロリ（H. pylori）のひとつの菌株の組換え脂質化UreAもしくはUreBなどを産生することができるハイブリッド核酸分子を初めて提供するものである。従って、本発明の別の実施態様においては、ハイブリッド核酸分子を提供し、これは、リポタンパク質、好ましくはボレリア（Borrelia）種のOspCリポタンパク質、より好ましくはボレリア・ブルグドフェリ（B. burgdorferi）のひとつの菌株のリポタンパク質、さらに好ましくは、OspCのサブタイプ族から選択されるボレリア・ブルグドフェリ（B. burgdorferi）のひとつの菌株のリポタンパク質をコードしている、または、肺炎連鎖球菌（S. pneumoniae）のひとつの菌株のPspAリポタンパク質もしくはそれらの免疫原性断片をコードしている、またはヘリコバクター・ピロリ（H. pylori）のひとつの菌株のUreAもしくはUreBリポタンパク質をコードしている第一の核酸配列、ならびに、第一の核酸配列によってコードされているタンパク質とは異型のタンパク質を発現するシグナル配列をコードしており、該第一の核酸配列と結合して転写オープンリーディングフレームを形成している第二の配列を含み、該第二の配列は、好ましくはボレリア（Borrelia）種のOspAタンパク質のシグナル配列をコードしている。
上述したように、ハイブリッド遺伝子は、適切な宿主、例えば、大腸菌（E. coli）などにおいて、リポタンパク質発現のための適切なプロモーターの制御下に発現ベクター内に組み込まれ、宿主内でリポタンパク質を発現する。
リポタンパク質が、リーダーまたはシグナル配列をコードしている第一の核酸配列とリポ

タンパク質のタンパク質部位をコードしている第二の核酸配列とを含み、ここで、該第一および該第二の配列は天然では同時に存在しないようなハイブリッドまたはキメラ遺伝子によって発現する場合には、組換えリポタンパク質によって免疫原性が増幅することは驚くべきことである。

従って、本発明はまた、リーダーまたはシグナル配列をコードしている第一の核酸配列と、それに続く、リポタンパク質のタンパク質部位をコードしている第二の核酸配列とを含み、ここで、該第一および該第二の配列は天然では同時に存在しないようなハイブリッドまたはキメラ遺伝子によって発現する組換えリポタンパク質を提供する。第一および第二の配列は結合して、転写オープンリーディングフレームを形成していることが好ましい。第一の配列は、ボレリア（Borrelia）リポタンパク質のリーダー配列、好ましくはOspAのリーダー配列をコードしており、第二の配列は、抗原、好ましくはOspC、PspA、UreA、UreBまたはそれらの免疫原性断片を含むタンパク質をコードしている。第一および第二の配列はひとつの遺伝子内に存在し、該遺伝子ならびに／または該第一もしくは第二の配列は、発現のための適切なベクターに導入することができる。

ベクターは、例えば、プラスミド、バクテリオファージおよび挿入DNAなどの形態の核酸であり、バクテリアとして発現に最も好ましいのは、例えば、大腸菌（E. coli）、枯草菌（Bacillus subtilis）、サルモネラ（Salmonella）、ブドウ球菌（スタフィロコッカス）（Staphylococcus）、連鎖球菌（ストレプトコッカス）（Streptcoccus）などであり、生きたベクターとして用いる場合に最も好ましいのは、例えば、乳酸菌（ラクトバシルス）（Lactobacillus）、ミコバクテリウム（Mycobacterium）、サルモネラ（Salmonella）、連鎖球菌（ストレプトコッカス）（Streptcoccus）などである。発現宿主を用いる場合には、インビトロ（in vitro）において発現した産物を回収、例えば、バクテリア抽出物から組換えリポタンパク質を単離するなどによって、組換えリポタンパク質を得る。遺伝子は適切なプロモーターの制御下にあることが好ましく、機能できるように結合する。また、プロモーターはベクター内在性のものであっても、遺伝子と共にベクターに挿入されてもよい。

本発明はさらに、組換えリポタンパク質をコードしている核酸を含むベクター、該組換えリポタンパク質を得るための方法、および該ベクターを調製する方法を提供する。

既に述べているように、組換えリポタンパク質は免疫原性を増幅することができる。故に、本発明のさらなる実施態様においては、単離された組換えリポタンパク質、もしくはそれらのインビボ（in vivo）発現のための適切なベクター、もしくはそれらの両方、ならびに適切な基剤を含む、免疫応答誘導のための免疫原性またはワクチン組成物を提供し、かつ、単離された組換えリポタンパク質、組換えリポタンパク質を発現するベクター、または組換えリポタンパク質もしくはベクターを含む組成物を応答の誘発に十分な量、宿主に投与することを含む、免疫または防御応答を誘導する方法を提供する。

上掲の出願を含む、本明細書に引用した文献には、そのような組成物に用いる一般的な任意追加成分が記載されており、当業者においては、本明細書の組成物の調製にあたって、不要な実験を要しない。そのような組成物においては、一定量の組換えリポタンパク質または適切な応答を誘発するのに十分量の発現を行うベクターを含んでいることが好ましい。組換えリポタンパク質またはベクターの量は、投与される抗原について既知である量に基づいて決められる。例えば、本発明の組換えリポタンパク質を発現する第二の配列に対応するある抗原の投与量が既知である場合には、組換えリポタンパク質の量はその既知の量に基づいて計算でき、ベクターの量は、その既知の量の組換えリポタンパク質をインビボ（in vivo）発現するような十分なコロニー形成ユニット（cfu）を産生する量である。同様に、以下の実施例および本明細書中に引用している文献において、動物に投与した抗原の量に基づいて、不要な実験をすることなく、組換えリポタンパク質の量を決めることができる。

別の観点からみると、本発明はまた、発現ベクターの組み合わせによる組換えリポタンパク質の発現、発現ベクターを有する宿主細胞からのリポタンパク質の発現、ならびに任意過程として、該発現リポタンパク質の単離および／もしくは精製を含む。単離／精製は、

リポ多糖類およびその他のバクテリアタンパク質などの不純物が混入していない組換えリポタンパク質を得るために行う。
さらに本発明は、組換えリポタンパク質を含有するワクチンなどの免疫組成物、ならびに免疫応答を誘導する方法を含む。

【図面の簡単な説明】

以下の詳細な説明において、添付の図面を参照する。
図１は、プラスミドpLF100を構築する方法を示す図である。
図２は、プラスミドベクターpPko9a（菌株Pko）およびpB319a（菌株B31）を構築する方法を示す図である。
図３は、脂質化OspCの単離および精製に用いられる方法を示す図である。
図４は、比較目的のために、非脂質化OspCの単離および精製に用いられる方法を示す図である。
図５は、図３に示した精製方法の様々な段階における、本明細書に基づいて産生した脂質化OspCのＳＤＳ－ＰＡＧＥ分析を示している。
図６は、WO91/09870に記載されているような精製方法の様々な段階における、本明細書に基づいて産生された非脂質化OspCのＳＤＳ－ＰＡＧＥ分析を示している。
図７は、抗OspC ELISA検定において測定した、２つのOspCのサブタイプ由来の抗原を含有するOspC配合物を用いて免疫したマウスの免疫応答を示すグラフである。
図８は、抗OspC ELISA検定において測定した、ミョウバン（アルム）アジュバントを含有する２つのOspCのサブタイプ配合物を用いて免疫したマウスの免疫応答を示すグラフである。
図９は、プラスミドベクターpPA321-Lを構築する方法を示す図である。
図10は、プラスミドベクターpPA321-NLを構築する方法を示す図である。
図11は、脂質化PspAの単離および精製に用いられた方法を示す図である。
図12は、比較目的のために、非脂質化PspAの単離および精製に用いられた方法を示す図である。
図13は、図11に図示した発現および宿主細胞分画方法の様々な段階における、本明細書に基づいて産生した脂質化PspAのＳＤＳ－ＰＡＧＥ分析を示している。
図14は、図12に図示した発現および宿主細胞分画方法の様々な段階における、本明細書に基づいて産生した非脂質化PspAのＳＤＳ－ＰＡＧＥ分析を示している。
図15は、図11および12に図示したPspAのカラムクロマトグラフィーの結果に関するＳＤＳ－ＰＡＧＥ分析を示している。

発明の詳細な説明

上述したように、本発明は、OspAシグナル配列をコードしている核酸配列を使用して、OspAタンパク質とは異種の脂質化タンパク質、好ましくは、ボレリア（Borrelia）種のOspCタンパク質、肺炎連鎖球菌（S. pneumoniae）のひとつの菌株のPspAタンパク質またはその一部、ヘリコバクター・ピロリ（H. pylori）のひとつの菌株のUreAまたはUreBタンパク質を発現すること、および発現すべきタンパク質とは異種のタンパク質のシグナル配列をコードしている核酸配列を用いて、ボレリア（Borrelia）種の脂質化OspCタンパク質もしくは肺炎連鎖球菌（S. pneumoniae）のひとつの菌株の脂質化PspAタンパク質を発現することに関するものである。
ボレリア・ブルグドフェリ（Borrelia burgdorferi）のACA株のリーダーアミノ酸配列およびそれををコードしているDNA配列は次の通りである：

M K K Y L L G I G L I L A L I A C

（配列番号：１）

ATG AAA AAA TAT TTA TTG GGA ATA GGT CTA ATA TTA GCC TTA ATA GCA TGC

（配列番号：２）

ボレリア・ブルグドフェリ（Borrelia burgdorferi）のその他の菌株のOspAに対応するリ

ーダーアミノ酸配列およびそれををコードしているDNA配列は、当業者においては既知であり、不要な実験をすることなく、本明細書の開示に従って本明細書に取り入れることができる。

ハイブリッド遺伝子分子とは、配列をコードしているOspAリーダー、および、発現されるタンパク質とは異種のタンパク質をコードしている遺伝子、好ましくはospCもしくはpspA遺伝子が、ospA遺伝子断片と共に転写リーディングフレームを形成するように組み合わさったものである。

脂質化タンパク質を産生するには、適切なハイブリッド遺伝子分子を適切な発現ベクターに組み込み、得られたプラスミドを大腸菌（E. coli）の発現菌株またはその他の適切な宿主細胞に組み込むことである。ベクターには、バクテリオファージまたは組み込みDNAを用いることもできる。

脂質化タンパク質は、宿主細胞が増殖する間に細胞内で発現する。脂質化タンパク質は、該脂質化タンパク質を変性しない状態で分離する任意の従来からの方法によって、精製した状態で宿主細胞から回収することができる。本発明のこの態様に従う一つの工程を図３に図示する。

細胞増殖およびタンパク質の誘導に続いて、細胞に対して、凍結融解による溶解、およびDNase I処理を行う。溶解物は、溶解物中の他のバクテリアタンパク質よりはむしろ組換え脂質化タンパク質を選択的に溶解する界面活性剤を用いて処理する。本発明においては、界面活性剤として、ポリエチレングリコールtert－オクチルフェニルエーテル、構造式は$t\text{-}Oct\text{-}C_6H_4\text{-}(OCH_2CH_2)_xOH$、ここでｘ＝７～８（市販されており、本明細書では以後、トライトン（TRITON）（登録商標）X-114と表す）をよく用いるが、脂質化タンパク質に対して同様の選択的溶解性を有し、下記に記載しているような緩和な条件下で相分離するようなその他の材料も使用することができる。

トライトン（TRITON）（登録商標）X-114の添加に続いて、該混合物を中温程度、好ましくは約35℃～40℃まで温め、この時、相分離が起こって溶液が混濁しはじめる。そのような相分離に対する精製工程は、組換えリポタンパク質の実質的な変性、またはその他の免疫機能の実質的な損傷を伴わない条件で行う。

混濁した混合物を遠心分離することにより、該混合物は３相に分かれ、すなわち、組換え脂質化タンパク質の50％以上および少量（約５％）の他のタンパク質を含む界面活性剤相、残りのタンパク質を含む水相、および細胞残査の固体ペレットである。界面活性剤相を水相および固体ペレットから分離し、さらに処理を行った。

タンパク質の最終精製は、界面活性剤相を処理することによって行われ、純度か少なくとも約８０重量％である組換え脂質化タンパク質を提供することが好ましく、このとき、バクテリアタンパク質およびリポ多糖類（LPS）などの他の夾雑物を実質的に含まず、エンドトキシンのレベルは、ヒトへの投与に対応できるものである。

そのような精製は、カラムクロマトグラフィーによって簡便に行うことができる。そのようなクロマトグラフィー精製には、バクテリアタンパク質は結合するが、組換え脂質化タンパク質は結合しないようなpH、イオン強度および疎水性を有する一次クロマトグラフィーカラムを用いる、一次カラム精製が含まれる。

そのような一次クロマトグラフィー精製は、界面活性剤相を一次クロマトグラフィー用カラムにかけることによって行い、通過流出分（フロースルー画分）（この中に精製脂質化タンパク質を含む）を集める。結合フラクションには、界面活性剤相由来の実質的に全てのバクテリアタンパク質不純物を含む。そのような一次精製操作に用いるクロマトグラフィー担体としては、DEAE－セファセル（Sephacel）またはDEAE-セファロース（Sepharose）カラムがある。

一次クロマトグラフィー精製操作によって得られた通過流出分は、二次クロマトグラフィーカラムにかけてさらに精製する。組み換え脂質化タンパク質が二次クロマトグラフィーカラムに選択的に結合し、一方、バクテリア由来の夾雑物およびLPSはカラムを通過するようなpH、イオン強度および疎水性を有するカラムに該通過流出分をかける。二次クロマトグラフィーカラム用のクロマトグラフィー担体としては、Ｓ－セファロース（Sepharos

e）がある。
組換えリポタンパク質は、純度80％、または純度80％以上、例えば、85～90％、もしくは90～95％、もしくは純度95％以上に精製することが好ましい。脂質化タンパク質材料は、免疫原性組成物、好ましくはワクチンに配合することができる。
ワクチンまたは免疫原性組成物は、免疫学的応答、例えば、オプソニン作用、または殺菌作用のある抗体などを産生する宿主内で免疫応答を誘発する。本発明の組換えリポタンパク質を用いて免疫を行った対象については、次にチャレンジを行うが、そのような免疫学的応答がチャレンジした菌を不活化することができる。さらに、オプソニン作用または殺菌作用のある抗体は、別のメカニズムにより防御を提供することもできる。
ワクチンを含む免疫組成物は、液状溶液もしくは乳化剤のような注射可能な状態に調製することができ、または、経口、経鼻、もしくはその他の開口部、例えば、膣もしくは肛門などからの投与用に製剤化することができる。経口製剤は、液状溶液、乳化剤およびその他（例えば、エリキシルなど）、または、錠剤、カプレット剤、カプセル剤、丸剤、液体充填カプセル剤、ゼラチンなどの固体製剤とすることができる。経鼻製剤は液状であり、エアロゾル、押し出しスプレーまたはポンプディスペンサーにより投与することができる。本明細書において引用している文献においては、上述した応用を含む、剤形例およびそれらの成分について記載している。
免疫原は、薬剤学的に許容される賦形剤と混合することができ、これは免疫原と相溶性である。そのような賦形剤としては、水、生理食塩水、デキストロース、グリセロール、エタノールおよびそれらの組み合わせが挙げられる。さらに、免疫組成物およびワクチンは、湿潤もしくは乳化剤、pH緩衝剤、またはそれらの効果を増強するアジュバントなどの補助的物質を含んでいてもよい。免疫組成物およびワクチンは、非経口的に、皮下または筋肉内注射によって投与することができる。免疫組成物およびワクチンは、投与剤形を適切な方法で、治療的に有効、免疫原性もしくは防御的な量を投与する。投与する量は治療の対象によって異なるが、例えば、抗体を合成する、および必要な場合には、細胞性免疫応答を産生する個々の免疫系の能力などを考慮する。投与に要する活性成分の明確な量は、医療従事者の判断にゆだねられ、年齢、体重、性別、投与される宿主または患者の状態などの因子をを考慮に入れる。しかしながら、適切な投与量の範囲は、当業者によって容易に決定することができ、抗原量はμg単位である。初回投与およびブースター投与のための適切な方法もまたさまざまであるが、初回投与に続いて順次投与を行うことが含まれる。投与量は投与の経路によっても異なり、また、宿主の大きさに応じて変わる。
本発明に従う免疫原性組成物中の免疫原の濃度は、一般的に、約１～95％である。１種の病原体についての抗原性材料を含有するワクチンまたは免疫組成物は、１価のワクチンである。多価の、または数種の病原体についての抗原性材料を含有するワクチンまたは免疫組成物（組み合わせワクチンまたは組み合わせ免疫組成物としても知られている）も本発明の範ちゅうに含まれる。そのような組み合わせワクチンまたは免疫組成物は、例えば、さまざまな病原体由来、もしくは同じ病原体のさまざまな菌株由来の、またはさまざまな病原体の組み合わせ由来の材料を含有している。
免疫刺激剤またはアジュバントは、長年にわたって使用され、例えば、ワクチンまたは免疫組成物に対する宿主の免疫応答を増強する。通常、リポ多糖類などの内在性のアジュバントは、ワクチンまたは免疫組成物として用いられる死菌（killed）または弱毒バクテリアの成分である。外在性のアジュバントは免疫調節剤であり、一般的には抗原と非共有結合しており、宿主の免疫応答を増強するために配合される。しかしながら、これらのアジュバントのうちのいくつかは毒性であり、所望しない副作用を起こすため、ヒトおよび多くの動物への使用には不適切である。実際、ヒトおよび家畜のワクチンにおいては、アルムのみがアジュバントとして日常的に使用されている。
アジュバントの使用に関連する困難という観点から、組換え脂質化タンパク質が非常に免疫原性を有する形態であり、アジュバントがない場合においても、また、アルムが存在する場合においても免疫応答を誘発することができるという本発明は有利である。
以下の実施例は例示であり、本明細書に開示されている本発明を制限するものではない。

実施例

実施例１

OspAリーダー配列をコードしている遺伝子を含有するベクターの構築

プラスミドpBluescript KS+（ストラタジーン（Stratagene）社）をXbaIおよびBamHIで切断し、ボレリア・ブルグトフェリ（B. burgdorferi）のACA1株のospA遺伝子を完全にコードしている領域を含有する900bpのXbaI-BamHI ＤＮＡ断片に結合して、リポタンパク質融合ベクターpLF100を形成した。この方法は図１に示されている。

ベクターpLF100を、1995年２月２日にメリーランド州、ロックビルのアメリカンタイプカルチャーコレクション（American Type Culture Collection）に番号69750として寄託した。この寄託は、ブダペスト条約の条件の下で行われた。

実施例２

ハイブリッドospA-ospC遺伝子を含むpET9a発現ベクターの構築

ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）用に特に設計されたオリゴヌクレオチドプライマーを用いて、ボレリア・ブルグトフェリ（B. burgdorferi）のPko株およびB31株由来のospC遺伝子の内の、シグナルペプチド認識をコードしている配列を終了するシステインをコードしているコドンから下流に向かって、該コード領域のＣ末端までの部分を増幅した。

Pko株およびB31株の５’末端プライマーは、それぞれ以下のようなヌクレオチド配列を有していた：

5′-GGC GCG CAT GCA ATA ATT CAG GGA AAG G-3′ (Pko)（配列番号：３）

5′-GGC GCG CAT GCA ATA ATT CAG GGA AAG A-3′ (B31)（配列番号：４）

一方、３’末端は以下のようなヌクレオチド配列を有していた：

5′-CGC GGA TCC TTA AGG TTT TTT TGG-3′ (B31 & Pko)（配列番号：５）

PCR増幅はDNAサーマル・サイクラー（パーキンーエルマー・セツス（Perkins-Elmer Cetus）社）を用い、94℃、30秒間変性、37℃、１分間アニーリングおよび72℃、１分間伸長を25サイクル繰り返して行った。最終伸長は、サイクルを完了するため、72℃、５分間行った。産生物はジーン・クリーンII・キット（Gene Clean II Kit）（バイオ（Bio）101社）を用いて精製し、精製した材料をSphIおよびBamHIで切断した。この工程により、Pko株のospC遺伝子内にサイレント突然変異が生じ、成熟タンパク質の60番目のアミノ酸のためのコドンがＡＴＴからＡＴＡに変化した。

ボレリア・ブルグトフェリ（B. burgdorferi）のPko株およびB31株用に産生した材料は、ここから別々に取り扱うため、以後、Pko株のospC材料についての操作に関してのみ記載する。

プラスミドpLF100（実施例１）をSphIおよびBamHIで切断し、増幅したPko配列を該プラスミドに結合して、ハイブリッドospA/ospC遺伝子を含むプラスミドpPko100（B31株用のものはpB31）を形成した。NdeIおよびBamHIを用いて切断することによってプラスミドpPko100から遺伝子を切り出し、プラスミドベクターpET9aのNdeIおよびBamHI部位にクローン化して、図２に示すように、ospA/ospCハイブリッド遺伝子を、T7プロモーターおよびバクテリオファージT7由来の有効な転写開始シグナルの制御下においた。得られたプラスミドをpPko9a（B31株用のものはpB319a）とする。

実施例３

脂質化OspCの発現および精製

実施例２の記載に従って調製したプラスミドpPko9aを用いて、大腸菌（E. coli）のBL21（DE3）株（pLysS）およびHMS174（DE3）株（pLysS）に形質転換した。30μg/mlの硫酸カナマイシンおよび25μg/mlのクロラムフェニコールを含むLB培地中に、１リットルあたり12mlの割合で形質転換した大腸菌（E. coli）を接種した。培養は、37℃、フラスコシェーカー内で一晩行った。

翌朝、一晩培養したものの内の10mlを、30μg/mlの硫酸カナマイシンを含む１ＬのLB培地に移し、37℃、フラスコシェーカー内でOD_{600}＝0.6～1.0のレベルに達するまで（OD_{600}＝

1.5まで増殖させることができるが）、約３～５時間増殖させた。
該培養培地に最終濃度が0.5mMとなるようにイソプロピルチオガラクトシド（IPTG）を添加し、約30℃でさらに２時間増殖させた。培養物を回収し、クーマジー（Coomassie）染色SDS-PAGEゲルで分析した（図５）。培養培地を約４℃に冷却し、10,000×Ｇで10分間遠心分離した。上清を除去し、細胞ペレットを集めた。図３に示している工程および下記の記載に従って、ペレットから精製脂質化OspCを回収した。
最初に、細胞ペレットを１／10量のPBSに再懸濁した。細胞懸濁液を冷凍し、－20℃、または所望するならばそれ以下の温度に保存した。細胞懸濁液の凍結に続いて、室温（約20～25℃）で細胞を融解し、細胞を溶解した。溶解した材料に濃度が１μg/mlとなるようにDNase Iを添加し、混合物を室温で30分間インキュベートすると、材料の粘度が減少した。
インキュベートした材料を氷層中で10℃以下に冷却し、トライトン（Triton）（登録商標）X-114の10重量％保存液を最終濃度が0.3～１重量％になるように添加した。混合物は氷槽中に20分間放置した。次に、冷却した混合物を約37℃まで加温し、そのままの温度で10分間放置した。
溶液は非常に混濁し、相分離が起こった。次に混濁した混合物を約20℃、12,000×Ｇで10分間遠心分離し、該混合物を界面活性剤の下層、透明な水性の上層、および固体ペレットに分離した。分画した相をSDS-PAGEによって分析したところ（図５）、OspCは界面活性剤相に分配されていることが明らかになり、これは、脂質化体であることを示している。界面活性剤相を他の２相から分取し、ペレットを含まない状態で４℃に冷却した。
50mMのTris（pH7.5）、２mMのEDTAおよび10mMのNaCl、ならびに界面活性剤として0.3％のポリエチレングリコール　tert－オクチルフェニルエーテル（構造式はt-Oct-C_6H_4－（OCH_2CH_2）$_x$OH、ここでｘ＝９～10、市販されており、以後本明細書においてはトライトン（Triton）（登録商標）X-100と表す）からなる緩衝液Ａを冷却した界面活性剤相に加え、もとの量の１／３に戻した。得られた溶液は、以下に記載するようなその後の工程のために凍結、保存することができ、またはすぐにそのような工程に用いてもよい。
界面活性剤相10mlあたり１mlの割合でDEAE－セファロース（Sepharose）CL-6Bカラムを用意し、50mMのTris（pH7.5）、２mMのEDTA、１MのNaCl、0.3重量％のトライトン（Triton）（登録商標）X-100からなる緩衝液Ｃの２カラム容量、次に、50mMのTris（pH7.5）、２mMのEDTA、0.3重量％のトライトン（Triton）（登録商標）X-100からなる緩衝液Ｂの４カラム容量を用いてカラムを洗浄した。
次に、界面活性剤相を該カラムにかけ、OspCを含む通過流出分を集めた。２カラム容量の緩衝液Ｂでカラムを洗浄し、通過流出分を再度集めた。あわせた通過流出分は、精製OspCの水性溶液であり、保存のために凍結することができる。
４カラム容量の緩衝液Ｃを用いて流出を行うことにより、カラムからバクテリアのタンパク質は除去され、再使用できる。
DEAE－セファロース（Sepharose）カラムからの通過流出分のさらなる最終精製は、迅速流出Ｓ－セファロース（Sepharose）カラムを用いて行った。まず、DEAE－セファロース（Sepharose）カラムからの通過流出分に１Ｍのクエン酸を添加してpH4.3まで酸性化し、該酸性化した材料をＳ－セファロース（Sepharose）カラムにかけた。迅速流出Ｓ－セファロース（Sepharose）カラムは、３カラム容量の緩衝液Ａで洗浄し、次にpHを4.3に調整した５カラム容量の緩衝液Ａで洗浄した。OspCはカラムに結合している。この結合しているカラムを、pH4.3の５カラム容量の緩衝液Ａで洗浄し、続いてpH5.5の４カラム容量の緩衝液Ａで洗浄した。
非常に精製されたOspCは、１NのHClを用いてpH6.0に調製した緩衝液Ａを用いてカラムから溶出させた。本実施例の精製工程の図式は、図３に示す。
クロマトグラフィー手法によって得られた非常に精製された脂質化OspCの水性溶液は、クーマジー（Coomassie）染色ゲルによって分析し（図５）、ウサギ抗OspCポリクローナル抗血清を用いたイムノブロット分析から、OspCが非常に精製された状態であることが確認された。精製物の純度は80％以上であることがわかった。

この手法により、BL21宿主の１リットルの培養液から約２～４mgの純粋なOspCが回収され、また、HMS174宿主の１リットルの培養液から約１～２mgの純粋なOspCが回収された。

実施例４

非脂質化OspCの発現および精製

非脂質化OspCをコードしている染色体遺伝子断片を含有するプラスミドベクターを含む大腸菌（E. coli）のJM109株の形質転換体は、WO 91/09870の記載に従って調製および増殖した。培養物を回収し、培養培地を４℃、10,000×Ｇで10分間遠心分離し、上清を除去し、ペレットを集めた。

まず、50nMのTris-HCl（pH8.0）、２mMのEDTA、0.1mMのDTT、５％のグリセロール、および0.4mg/mlのリゾチームを含む溶解緩衝液Ａ中に細胞ペレットを再懸濁し、該懸濁液を室温で20分間撹拌した。次に、該細胞懸濁液に１重量％となるようにトライトン（Triton）（登録商標）X-100を添加し、DNase Ｉを１μｇ/mlとなるように添加し、該懸濁液を室温でさらに20分間撹拌し、細胞を溶解した。次に、塩化ナトリウムを１Ｍの濃度になるように該細胞懸濁液に添加し、懸濁液は、４℃でさらに20分間撹拌した。次に、該懸濁液を20,000×Ｇで30分間遠心分離し、得られた上清をペレットと分離し、ペレットの方は捨てた。

分離した上清は、50mMのTris（pH８）、２mMのEDTAを含む緩衝液に対して透析した。次に、上清をDEAE－セファロース（Sepharose）CL-6Bカラムにかけ、カラムの通過流出分中の非脂質化OspCを集めた。該通過流出分を0.1Mのリン酸緩衝液（pH6.0）に対して透析した。

次に、0.1Mのリン酸緩衝液（pH6.0）を用いて平衡化した迅速流出Ｓ－セファロース（Sepharose）カラムに透析した通過流出分を結合した。0.15MのNaClを添加した透析緩衝液を用いて、Ｓ－セファロース（Sepharose）カラムから精製非脂質化OspCを流出させた。

精製工程の図式は図４に示す。

非常に精製された非脂質化OspCの水性溶液は、クーマジー（Coomassie）染色ゲルによって分析した（図６）。精製物の純度は80％以上であることがわかった。

実施例５

組換え脂質化OspCの免疫原性

実施例３において調製した精製組換え脂質化OspCのマウスにおける免疫原性を調べ、実施例４において調製した組換え非脂質化OspCのそれと比較した。本試験においては、４～８週令のメスのC3H/HeマウスをＯ日目に免疫し、21および42日目にブースター投与した。全てのマウスには、B31遺伝子およびPko遺伝子から発現したそれぞれのOspCを一回の投与あたり１μｇ投与した。抗原の脂質化体および非脂質化体の両方に関して調べた。製剤は、アジュバントとしてのアルムを含むまたは含まない場合について調べた。

21、42、63および91日目に代表マウスについて採血した。精製非脂質化OspCを被覆抗原として用い、これらの血清についてELISA試験を行った。

アジュバントを含まない抗原を用いて免疫したマウスの試験結果（図７）は、脂質化抗原を用いて免疫したマウスにおいてのみ、検出可能なELISA応答をすることを示している。しかしながら、アルムに吸着させた抗原を用いて免疫したマウスの免疫応答（図８）は、２種の抗原が同程度のELISA応答をし、これらの応答はより迅速に生じることを示している。

実施例６

ハイブリッドospA/pspA遺伝子を含むpET9a発現ベクターの構築

PCR反応用に特に設計されたオリゴヌクレオチドプライマーを用いて、肺炎連鎖球菌（S. pneumoniae）のRX１株由来のpspA遺伝子について関心のある部分（この場合はアミノ酸番号１～321番まで）を増幅した。

５’末端プライマーは、以下のようなヌクレオチド配列を有していた：

5′-GGG ACA GCA TGC GAA GAA TCT CCC GTA GCC AGT-3′ (PspN1)

（配列番号：６）

３’末端は以下のようなヌクレオチド配列を有していた：

5′-GAT GGA TCC TTT TGG TGC AGG AGC TGG TTT-3′ (PspC370)

（配列番号：７）

PCR増幅は次のように行った：94℃、30秒間変性；42℃、１分間アニーリング；および72℃、１分間伸長。これを25サイクル行い、続いて、72℃、５分間伸長を行った。この工程では、アミノ酸の315番目に停止コドンを導入した。PCR産物はジーン・クリーンII（Gene Clean II）（バイオ（Bio）101社）法を用いて精製し、SphIおよびBamHIで切断した。プラスミドpLF100（実施例１）をSphIおよびBamHIで切断し、増幅したpspA遺伝子をこのプラスミドに結合して、ハイブリッドospA-pspA遺伝子を含むプラスミドpLF321を形成した。NdeIおよびBamHIを用いて切断することによってpLF321から該ハイブリッド遺伝子を切り出し、プラスミドベクターpET9aのNdeIおよびBamHI部位にクローン化し、ハイブリッドospA-pspA遺伝子をT7プロモーターの制御下においた。得られたプラスミドをpPA321-Lとした。この過程は図９に図示している。

実施例７

pspA遺伝子を含むpET9a発現ベクターの構築

PCR反応用に特に設計されたオリゴヌクレオチドプライマーを用いて、肺炎連鎖球菌（S. pneumoniae）のRX1株由来のpspA遺伝子について関心のある部分（この場合はアミノ酸番号１～321番まで）を実施例６のプラスミドpPA321-Lを用いて増幅した。

５’末端プライマーは、以下のようなヌクレオチド配列を有していた：

5′-GCT CCT GCA TAT GGA AGA ATC TCC CGT AGC C-3′ (PspNL-2)

（配列番号：８）

３’末端は以下のようなヌクレオチド配列を有していた：

5′-GAT GGA TCC TTT TGG TGC AGG AGC TGG TTT-3′ (PspC370)

（配列番号：７）

PCR増幅は次のように行った：94℃、30秒間変性；72℃、１分間アニーリングおよび伸長。これを25サイクル行い、続いて、72℃、５分間伸長を行った。この工程では、アミノ酸の315番目に停止コドンを導入した。PCR産物はジーン・クリーンII（Gene Clean II）（バイオ（Bio）101社）法を用いて精製し、NdeIおよびBamHIで切断した。プラスミドベクターpET9aのNdeIおよびBamHI部位に切断したPCR産物をクローン化し、pspA遺伝子をT7プロモーターの制御下においた。得られたプラスミドをpPA321-NLとした。この過程は図10に図示している。

実施例８

脂質化PspAの発現および精製

プラスミドpPA321-Lを用いて、大腸菌（E. coli）のBL21（DE3）株（pLyS）に形質転換した。30μg/mlの硫酸カナマイシンおよび25μg/mlのクロラムフェニコールを含むLB培地中に形質転換した大腸菌（E. coli）を接種した。培養は、37℃、フラスコシェーカー内で一晩行った。

翌朝、一晩培養したものの内の50mlを、30μg/mlの硫酸カナマイシンを含む１ＬのLB培地に移し、37℃、フラスコシェーカー内でOD_{600}＝0.6～1.0のレベルに達するまで、約３～５時間増殖させた。該培養培地に最終濃度が0.5mMとなるようにIPTGを添加し、30℃でさらに２時間増殖させた。培養物を４℃、10,000×Ｇで遠心分離することにより回収し、細胞ペレットを集めた。細胞ペレットから脂質化PspAを回収した。

PBS　１リットルあたり30ｇの湿潤細胞ペーストをを含有するように、細胞ペレットをPBSに再懸濁した。細胞懸濁液を冷凍し、－20℃で保存した。室温（約20～25℃）で細胞を融解し、細胞を溶解した。溶解した材料に濃度が１μg/mlとなるようにDNase Iを添加し、混合物を室温で30分間インキュベートすると、材料の粘度が減少した。

該材料を氷層中で10℃以下に冷却し、トライトン（Triton）（商標登録）X-114の10重量

％保存液を最終濃度が0.3～１重量％になるように添加した。混合物は、氷槽中に20分間放置した。次に、冷却した混合物を約37℃まで加温し、そのまま10分間放置した。溶液は非常に混濁し、相分離が起こった。次に混濁した混合物を約20℃、12,000×Ｇで10分間遠心分離し、該混合物を界面活性剤の下層、透明水性の上層、およびペレットに分離した。脂質化PspAは界面活性剤相に分配されていた。界面活性剤相を他の２相から分取し、50mMのTris、2mMのEDTA、10mMのNaCl（pH7.5）を含む緩衝液で１：10に希釈し、－20℃で保存した。

希釈した界面活性剤相５mlあたり１mlの割合でＱ－セファロース（Sepharose）カラムを用意した。カラムは、50mMのTris、２mMのEDTA、0.3％のトライトン（Triton）（商標登録）X-100、１MのNaCl（pH4.0）を含む緩衝液を２カラム容量用いて洗浄し、50mMのTris、２mMのEDTA、0.3％のトライトン（Triton）（商標登録）X-100、10mMのNaCl（pH4.0）を含む緩衝液を５～10カラム容量用いて平衡化した。希釈した界面活性剤相材料のpHを4.0に調整すると沈澱が生じた。この材料を0.2μMの酢酸セルロースのフィルターユニットに通し、沈澱した材料を除去した。ろ過した希釈界面活性剤相をＱ－セファロース（Sepharose）カラムにかけ、通過流出分（PA321-Lを含む）を集めた。この段階のSDS-PAGE分析を図15に示す。50mMのTris、２mMのEDTA、0.3％のトライトン（Triton）（商標登録）X-100、10mMのNaCl（pH4.0）を含む緩衝液を１～２カラム容量用いてカラムを洗浄し、通過流出分を先の通過流出フラクションとあわせた。通過流出分をあわせたもののpHを7.5に調整した。大腸菌（E. coli）のタンパク質が混入している結合材料は、50mMのTris、2mMのEDTA、0.3％のトライトン（Triton）（商標登録）X-100、１MのNaCl（pH4.0）を含む緩衝液を２カラム容量用いてＱ－セファロース（Sepharose）カラムから溶出した。本実施例に記載している精製工程の図式は、図11に示す。

実施例９

非脂質化PspAの発現および精製

プラスミドpPA321-NLを用いて、大腸菌（E. coli）のBL21（DE3）株（pLyS）に形質転換した。30μg/mlの硫酸カナマイシンおよび25μg/mlのクロラムフェニコールを含むLB培地中に形質転換した大腸菌（E. coli）を接種した。培養は、37℃、フラスコシェーカー内で一晩行った。

翌朝、一晩培養したものの内の50mlを、30μg/mlの硫酸カナマイシンを含む１ＬのLB培地に移し、37℃、フラスコシェーカー内でOD_{600}nm＝0.6～1.0のレベルに達するまで、約３～５時間増殖させた。該培養培地に最終濃度が0.5mMとなるようにIPTGを添加し、30℃でさらに２時間増殖させた。培養物を４℃、10,000×Ｇで遠心分離することにより回収し、細胞ペレットを集めた。細胞ペレットから非脂質化PspAを回収した。

PBS　１リットルあたり30ｇの湿潤細胞ペーストをを含有するように、細胞ペレットをPBSに再懸濁した。細胞懸濁液を冷凍し、－20℃で保存した。室温で細胞を融解し、細胞を溶解した。溶解した材料に濃度が１μg/mlとなるようにDNase Iを添加し、混合物を室温で30分間インキュベートすると、材料の粘度が減少した。混合物を４℃、10,000×Ｇで遠心分離し、非脂質化PspAを含有する細胞上清を分取した。ペレットをPBSで洗浄し、４℃、10,000×Ｇで遠心分離し、細胞上清を先の細胞上清とあわせた。

細胞上清２mlあたり１mlの割合でモノＱ（MonoQ）カラム（ファルマシア（Pharmacia）社）を用意した。カラムは、50mMのTris、2mMのEDTA、１MのNaCl（pH7.5）を含む緩衝液を２カラム容量用いて洗浄し、50mMのTris、２mMのEDTA、10mMのNaCl（pH7.5）を含む緩衝液を10カラム容量用いて平衡化した。プールした細胞上清をＱ－セファロース（Sepharose）カラムにかけ、通過流出分を集めた。50mMのTris、２mMのEDTA、10mMのNaCl（pH7.5）を含む緩衝液を２～５カラム容量用いてカラムを洗浄し、通過流出分を先の通過流出分とあわせた。

結合タンパク質の溶出は、50mMのTris、２mMのEDTA、100mMのNaCl（pH7.5）を含む緩衝液を５～10カラム容量用いてカラムを洗浄する第一段階ではじまった。溶出の第二段階では、50mMのTris、２mMのEDTA、200mMのNaCl（pH7.5）を含む緩衝液を５～10カラム容量用いて洗浄した。非脂質化PspAはこのフラクションに含まれていた。この段階のSDS-PAGEを図

15に示す。残留している結合混入タンパク質は、50mMのTris、２mMのEDTA、pH7.5、および300mM～１MのNaClを含む緩衝液を用いて除去した。
本実施例に記載している精製工程の図式を図12に示す。

実施例10

組換え脂質化PspAの免疫原性

実施例８で調製した精製組換え脂質化PspAのマウスにおける免疫原性を調べ、実施例９で調製した非脂質化PspAのそれと比較した。本試験においては、示されているPspA抗原濃度における下記の製剤の0.5mlをCBA/Nマウスの首の後ろの皮下に免疫した。

製剤	PspA抗原濃度
RX1株の天然PspA分子（天然RX1）	200ng/ml
非脂質化組換えPspA（pPA-321-NL）単独、PBS中*	200および1000ng/ml
非脂質化組換えPspA（pPA-321-NL）、アルム吸着	200および1000ng/ml
脂質化組換えPspA（pPA-321-L）単独、PBS中	200および1000ng/ml
脂質化組換えPspA（pPA-321-L）、アルム吸着*	200および1000ng/ml
アルム*	0 ng/ml
PBS	0 ng/ml

*アルムは濃度200μg/mlのハイドロゲル

製剤の各投与量について、０および21日目に４匹のマウスを免疫した。マウスは35日目に採血し、続いて肺炎連鎖球菌（S. pneumoniae）のA66株を用いてチャレンジを行った。チャレンジ後のマウスの生存日数を記録し、生存しているマウスは、36、37、42および46日目に採血した。これらの連続採血によって得られた血液について、１mlあたりの肺炎連鎖球菌（S. pneumoniae）のコロニー形成ユニット（CFU）を分析した。35日目に採取した血清について、ELISAを用いてPspA抗体のELISA分析を行った。チャレンジしたマウスの死亡日数を下記の表に示す。

免疫および非免疫CBA/Nマウスの生存

群	免疫			効果			
	抗原	投与量（μg）	アルム	死亡日数	死亡日に関するP値*	生存：死亡	生存日数に関するP値*
#1A	pPA-321-L	1.0	-	4x>14	0.01	4:0	0.01
#1B	pPA-321-L	0.2	-	4x>14	0.01	4:0	0.01
#2A	pPA-321-L	1.0	+	4x>14	0.01	4:0	0.01
#2B	pPA-321-L	0.2	+	4x>14	0.01	4:0	0.01
#3A	pPA-321-NL	1.0	-	1,1,2,2	n.s.	0:4	n.s.
#3B	pPA-321-NL	0.2	-	1,1,2,≥15	n.s.	1:3	n.s.
#4A	pPA-321-NL	1.0	+	4x>14	0.01	4:0	0.01
#4B	pPA-321-NL	0.2	+	4x>14	0.01	4:0	0.01
#5	FL-Rx1	0.2	-	4x>14	0.01	4:0	0.01
#6	なし	0.0	+	1,1,3,6	n.s.	0:4	n.s.
#7	なし	0.0	-	1,1,1,≥15	n.s.	1:3	n.s.
	なしを集めたもの	0.0		5x1,3,6,≥15	--	1:7	

注：*は、対照に対する値を示す；死亡日に対しては、１分散２サンプル評価法を用いた；生存日数に関しては、１分散フッシャー・イグザクト(Fisher Exact)法を用いた。抗PspA免疫が一様に感受性を高めることは観察されていないため、「１分散」を用いて計算を行った。

マウスの血中のCFU数は、下記の表に示す。

免疫および非免疫CBA/Nマウス中のバクテリア血

群	免疫 抗原	投与量 (μg)	アルム	$Cog_{10}CFU$ 1日目	2日目	6日目	7日目
#1A	pPA-321-L	1.0	-	≦1.6,1.9,2.1, 2.5	4x≦1.6	4x≦1.6	n.d.
#1B	pPA-321-L	0.2	-	3x≦1.6,1.7	4x≦1.6	4x≦1.6	n.d.
#2A	pPA-321-L	1.0	+	2x≦1.6,1.7,2.9	3x≦1.6,1.7	4x≦1.6	n.d.
#2B	pPA-321-L	0.2	+	2x≦1.6,1.7,1.7	4x≦1.6	4x≦1.6	n.d.
#3A	pPA-321-NL	1.0	-	≦1.6,1.7,d,d	d,d,d,d	d,d,d,d	d,d,d,d
#3B	pPA-321-NL	0.2	-	2x>7,d,d	≦1.6, d,d,d	≦1.6,d,d,d	n.d.,d,d,d
#4A	pPA-321-NL	1.0	+	2x≦1.6,6.7,>7	3x ≦1.6,1.7	4x≦1.6	n.d.
#4B	pPA-321-NL	0.2	+	≦1.6,1.7,2.1, 2.4	4x≦1.6	4x≦1.6	n.d.
#5	FL-Rx1	0.2	-	2x≦1.6,2.6,2.7	4x≦1.6	4x≦1.6	n.d.
#6	なし	0.0	+	≦1.6,4.1,>7,d	≦1.6, 5.1,d,d	6.1, d,d,d	d,d,d,d
#7	なし	0.0	-	1.7,>7,>7,d	≦1.6, d,d,d	≦1.6, d,d,d	n.d,d,d,d
	なしは集めたもの	0.0		≦1.6,4.1,>7, >7,d	2x≦1.6,5.1, d,d,d,d,d	≦1.6, 6.1 d,d,d,d,d	n.d,d, d,d,d,d

注：最高血中濃度における1コロニーは、47CFUまたはLog1.7と計算された。故に、”1.6以下”とは、コロニーが計数されなかったことを示す。10^7より多いということは、マウスは生存しているが、コロニー数は、最高希釈においても多すぎて計数できなかったことを示す。”d”は、分析前にマウスが死亡したことを示す。

これらの結果から、組換えタンパク質は、単独投与した場合には防御性ではないことが示される。アルムをアジュバントとして用いた、および／またはPAM_3cysで脂質化した組換えタンパク質は、免疫原性および防御性であった。天然全PspA抗原は、アジュバントを要することなく防御性であった。CFUの結果から、免疫によって防御されたマウスにおいては、２日目の血中からチャレンジした肺炎連鎖球菌（S. pneumoniae）が消失していた。35日目に採取した血清のELISA分析から、肺炎連鎖球菌（S. pneumoniae）のチャレンジに対するマウスの防御と顕著な抗体応答の誘導との間には良好な相関があることが示された。生理食塩水に溶解した非脂質化抗原（pPA-321-NL）を用いて免疫したマウスの血清、またはPspA抗原を含まない対照群のマウスの血清においては、目立った抗体応答は観察されなかった（下記の表に示す）。天然のRX1 PspA抗原、ならびにPAM_3cysによる脂質化および／もしくはアルムに吸着した組換えPspAについては、良好な抗体応答が検出された。

35日目のマウス血清のELISA分析

PspA抗原	アルム吸着	PspA投与量 (μg/マウス)	抗血清の希釈時のOD*					
			600	1200	2400	4800	9600	19200
pPA-321-L	なし	0.1	0.885 (0.082)	0.497 (0.043)	0.271 (0.025)	0.146 (0.017)	0.075 (0.012)	0.039 (0.009)
pPA-321-L	なし	0.5	1.857 (0.060)	1.437 (0.137)	1.108 (0.150)	0.750 (0.139)	0.459 (0.092)	0.284 (0.057)
pPA-321-L	あり	0.1	1.373 (0.325)	1.048 (0.376)	0.745 (0.362)	0.490 (0.304)	0.288 (0.197)	0.171 (0.147)
pPA-321-L	あり	0.5	1.202 (0.162)	0.787 (0.184)	0.472 (0.187)	0.296 (0.102)	0.162 (0.061)	0.087 (0.035)
pPA-321-NL	なし	0.1	0.022 (0.035)	0.030 (0.060)	0.014 (0.024)	0.007 (0.018)	0.006 (0.005)	0.001 (0.001)
pPA-321-NL	なし	0.5	0.029 (0.035)	0.014 (0.014)	0.008 (0.007)	0.003 (0.004)	0.002 (0.002)	0.002 (0.002)
pPA-321-NL	あり	0.1	0.822 (0.181)	0.481 (0.166)	0.278 (0.085)	0.154 (0.051)	0.082 (0.029)	0.042 (0.015)
pPA-321-NL	あり	0.5	1.017 (0.139)	0.709 (0.128)	0.447 (0.101)	0.253 (0.057)	0.141 (0.034)	0.075 (0.020)
天然RX1	なし	0.1	1.367 (0.084)	1.207 (0.060)	0.922 (0.070)	0.608 (0.077)	0.375 (0.048)	0.209 (0.029)
なし	なし	0	0.018 (0.003)	0.012 (0.008)	0.009 (0.003)	0.005 (0.002)	0.005 (0.002)	0.005 (0.002)
なし	あり	0	0.013 (0.006)	0.009 (0.008)	0.004 (0.004)	0.004 (0.003)	0.001 (0.001)	0.000 (0.000)

*ODは４匹の被験動物の結果の平均であり、標準偏差をかっこ内に示す。

防御の少なくとも一部が抗PspA抗体応答によるものであるか否かを確認するために、受動実験を行った。組換え脂質化PspA単独もしくはアルム吸着、またはアルム吸着した組換え非脂質化PspAの0.5μｇを用いて、０および21日目にBALB/cマウスを免疫し、35日目に採血した。抗血清を生理食塩水で１：３または１：15に希釈し、各々の希釈の各0.1mlを２匹のマウスにi.p.投与した。正常BALB/cマウスの血清を１／３希釈したものを対照として用いた。受動免疫の１時間後に、肺炎連鎖球菌（S. pneumoniae）のWU2株（15,000CFU）を用いてi.v.チャレンジした。以下の表に示すように、抗PspA血清を用いて受動免疫したマウスは、正常マウス血清を希釈したものを投与されたマウスと比較すると防御された。

WU2に対するBALB/cの受動防御

免疫製剤 PspA抗原	アルム	PspA投与量 (μg/動物)	血清の希釈	チャレンジ後の死亡日数
pPA-321-L	なし	0.5	3	4, >7
			15	2, 4
pPA-321-L	あり	0.5	3	>7, >7
			15	4, >7
pPA-321-NL	あり	0.5	3	2, 4
			15	>7, >7
なし	なし	0	3	2,2

本発明の好ましい実施態様について詳細に記載したが、本発明は上述の特定の詳細によって限定されるものではなく、請求の範囲によって定められるものであり、それらのさまざまな応用もまた、本発明の範ちゅうに含まれる。

以下、本発明の好ましい実施態様を項分け記載する。

（実施態様）

１．宿主内で免疫応答を誘導する方法であって、

該宿主に少なくとも１種類の抗原を投与し、

該宿主にリポタンパク質を投与する

工程からなることを特徴とする方法。

２．抗原とリポタンパク質とを同時に投与することを特徴とする実施態様１記載の方法。

３．抗原がバクテリアタンパク質のエピトープを有することを特徴とする実施態様１記載の方法。

４．抗原がウレアーゼであることを特徴とする実施態様３記載の方法。

５．抗原が、OspA以外のボレリア（Borrelia）抗原であることを特徴とする実施態様３記載の方法。

６．抗原がOspCであることを特徴とする実施態様５記載の方法。

７．リポタンパク質が天然に脂質化されたものであることを特徴とする実施態様１記載の方法。

８．リポタンパク質が本来脂質化されたものではないことを特徴とする実施態様１記載の方法。

９．リポタンパク質がハイブリッド核酸分子の発現産物であり、該ハイブリッド分子は、リポタンパク質のシグナル配列をコードしている第一の核酸配列、および第一の核酸配列によってコードされているリポタンパク質とは異種である成熟タンパク質もしくはそれらの断片をコードしている第二の核酸配列を含んでいることを特徴とする実施態様１記載の方法。

10．ハイブリッド核酸分子中において、シグナル配列は、ボレリア（Borrelia）種のOspAタンパク質のシグナル配列であり、かつ、配列は連続していることをリッド核酸分子。

10．該OspAタンパク質がボレリア・ブルグドフェリ（B. burgdorferi）に属する菌株由来であることを特徴とする実施態様９記載のハイブリッド分子。

11．該ボレリア・ブルグドフェリ（B. burgdorferi）の菌株が、B31、ACA1およびIp90族から選択されることを特徴とする実施態様10記載のハイブリッド分子。

12．該成熟タンパク質がヘリコバクター・ピロリ（H. pylori）に属する菌株のUreAタンパク質またはそれらの断片であることを特徴とする実施態様３記載のハイブリッド核酸分子。

13．該OspAタンパク質がボレリア・ブルグドフェリ（B. burgdorferi）に属する菌株由来であることを特徴とする実施態様12記載のハイブリッド分子。

14．該ボレリア・ブルグドフェリ（B. burgdorferi）の菌株が、B31、ACA1およびIp90族から選択されることを特徴とする実施態様13記載のハイブリッド分子。

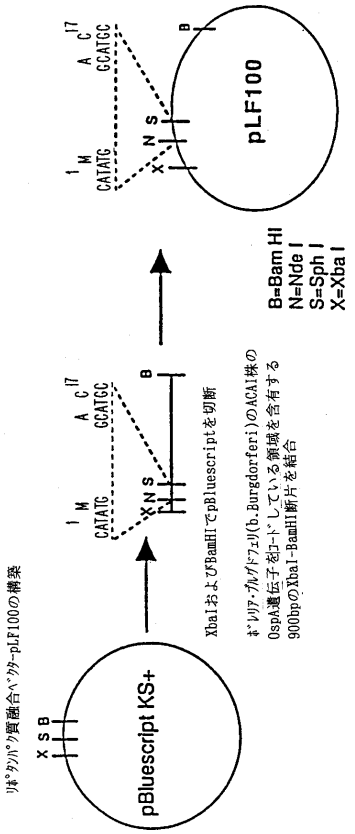
15．該成熟タンパク質がヘリコバクター・ピロリ（H. pylori）に属する菌株のUreBタンパク質またはそれらの断片であることを特徴とする実施態様３記載のハイブリッド核酸分子。
16．該OspAタンパク質がボレリア・ブルグドフェリ（B. burgdorferi）に属する菌株由来であることを特徴とする実施態様15記載のハイブリッド分子。
17．該ボレリア・ブルグドフェリ（B. burgdorferi）の菌株が、B31、ACA1およびIp90族から選択されることを特徴とする実施態様16記載のハイブリッド分子。
18．ボレリア（Borrelia）種のOspCリポタンパク質をコードしている第一の核酸配列、およびOspCとは異種のタンパク質を発現するシグナル配列をコードしている第二の核酸配列を含み、第二の核酸配列が該第一の核酸配列と結合して、転写オープンリーディングフレームを形成していることを特徴とするハイブリッド核酸分子。
19．該OspCリポタンパク質がボレリア・ブルグドフェリ（B. burgdorferi）に属する菌株由来であることを特徴とする実施態様18記載のハイブリッド核酸分子。
20．該ボレリア・ブルグドフェリ（B. burgdorferi）に属する菌株が、OspCサブタイプ族から選択されることを特徴とする実施態様19記載のハイブリッド核酸分子。
21．肺炎連鎖球菌（S. pneumoniae）に属する菌株のPspAタンパク質をコードしている第一の核酸配列、およびPspAとは異種のタンパク質を発現するシグナル配列をコードしている第二の核酸配列を含み、第二の核酸配列が該第一の核酸配列と結合して、転写オープンリーディングフレームを形成していることを特徴とするハイブリッド核酸分子。
22．ヘリコバクター・ピロリ（H. pylori）に属する菌株のUreAタンパク質をコードしている第一の核酸配列、およびUreAとは異種のタンパク質を発現するシグナル配列をコードしている第二の核酸配列を含み、第二の核酸配列が該第一の核酸配列と結合して、転写オープンリーディングフレームを形成していることを特徴とするハイブリッド核酸分子。
23．ヘリコバクターピロリ（H. pylori）に属する菌株のUreBタンパク質をコードしている第一の核酸配列、およびUreBとは異種のタンパク質を発現するシグナル配列をコードしている第二の核酸配列を含み、第二の核酸配列が該第一の核酸配列と結合して、転写オープンリーディングフレームを形成していることを特徴とするハイブリッド核酸分子。
24．該成熟タンパク質の発現プロモーターの制御下にある実施態様１記載のハイブリッド核酸分子を含むことを特徴とする発現ベクター。
25．該成熟タンパク質がボレリア（Borrelia）種のOspCリポタンパク質であることを特徴とする実施態様24記載の発現ベクター。
26．該成熟タンパク質が肺炎連鎖球菌（S. pneumoniae）に属する菌株のPspAリポタンパク質であることを特徴とする実施態様24記載の発現ベクター。
27．該成熟タンパク質がヘリコバクター・ピロリ（H. pylori）に属する菌株のUreAタンパク質であることを特徴とする実施態様24記載の発現ベクター。
28．該成熟タンパク質がヘリコバクター・ピロリ（H. pylori）に属する菌株のUreBタンパク質であることを特徴とする実施態様24記載の発現ベクター。
29．該OspCリポタンパク質の発現プロモーターの制御下にある実施態様18記載のハイブリッド核酸分子を含むことを特徴とする発現ベクター。
30．該PspAタンパク質の発現プロモーターの制御下にある実施態様21記載のハイブリッド核酸分子を含むことを特徴とする発現ベクター。
31．該UreAタンパク質のの発現プロモーターの制御下にある実施態様22記載のハイブリッド核酸分子を含むことを特徴とする発現ベクター。
32．該UreBタンパク質のの発現プロモーターの制御下にある実施態様23記載のハイブリッド核酸分子を含むことを特徴とする発現ベクター。
33．組換えタンパク質を形成する方法であって、
実施態様24記載の発現ベクターを宿主細胞に組み込み、
宿主細胞において該成熟タンパク質を発現させる
ことを特徴とする方法。
34．該成熟タンパク質がボレリア（Borrelia）種のOspCリポタンパク質であることを特徴

とする実施態様33記載の方法。
35．該宿主細胞が大腸菌（E. coli）であることを特徴とする実施態様34記載の方法。
36．該成熟タンパク質が肺炎連鎖球菌（S. pneumoniae）に属する菌株のPspAタンパク質であることを特徴とする実施態様33記載の方法。
37．該宿主細胞が大腸菌（E. coli）であることを特徴とする実施態様36記載の方法。
38．該成熟タンパク質がヘリコバクター・ピロリ（H. pylori）に属する菌株のUreAタンパク質であることを特徴とする実施態様33記載の方法。
39．該宿主細胞が大腸菌（E. coli）であることを特徴とする実施態様38記載の方法。
40．該成熟タンパク質がヘリコバクター・ピロリ（H. pylori）に属する菌株のUreBタンパク質であることを特徴とする実施態様33記載の方法。
41．該宿主細胞が大腸菌（E.coli）であることを特徴とする実施態様40記載の方法。
42．組換えOspCリポタンパク質を形成する方法であって、
実施態様29記載の発現ベクターを宿主細胞に組み込み、
宿主細胞において該OspCリポタンパク質を発現させる
ことを特徴とする方法。
43．該宿主細胞が大腸菌（E. coli）であることを特徴とする実施態様42記載の方法。
44．組換えPspAリポタンパク質を形成する方法であって、
実施態様30記載の発現ベクターを宿主細胞に組み込み、
宿主細胞において該PspAリポタンパク質を発現させる
ことを特徴とする方法。
45．該宿主細胞が大腸菌（E. coli）であることを特徴とする実施態様44記載の方法。
46．組換えUreAリポタンパク質を形成する方法であって、
実施態様31記載の発現ベクターを宿主細胞に組み込み、
宿主細胞において該UreAリポタンパク質を発現させる
ことを特徴とする方法。
47．該宿主細胞が大腸菌（E. coli）であることを特徴とする実施態様46記載の方法。
48．組換えUreBリポタンパク質を形成する方法であって、
実施態様32記載の発現ベクターを宿主細胞に組み込み、
宿主細胞において該UreBリポタンパク質を発現させる
ことを特徴とする方法。
49．該宿主細胞が大腸菌（E. coli）であることを特徴とする実施態様48記載の方法。
50．組換えリポタンパク質を産生する方法であって、
リポタンパク質のシグナル配列をコードしている第一の核酸配列、および該第一の核酸配列によってコードされているリポタンパク質とは異種である成熟タンパク質もしくはその断片をコードしている第二の核酸配列を含み、該第二の核酸配列は該第一の配列と連続しているハイブリッド核酸分子を構築し、
該成熟タンパク質の発現プロモーターの制御下にある該ハイブリッド核酸分子を含む発現ベクターを形成し、
該発現ベクターを宿主細胞に組み込み、
該宿主細胞において該組換えリポタンパク質を発現させ、
宿主細胞を溶解し、
界面活性剤で該溶解細胞を処理することにより、バクテリアタンパク質およびその他のタンパク質に優先して該組換えリポタンパク質を選択的に可溶化し、かつ、緩和な条件下で界面活性剤相の相分離を行うことができるようにし、
可溶化された組換えリポタンパク質を含有する界面活性剤相、バクテリアタンパク質およびその他のタンパク質を含有する水性相、ならびに細胞残査を含有する固体相に対して相分離を行い、
該固体相および該水性相から該界面活性剤相を分離、回収し、
該組換えリポタンパク質以外のタンパク質を結合させるような条件で、該界面活性剤相を第一のクロマトグラフィーカラムにかけ、該第一のクロマトグラフィーカラムから該組換

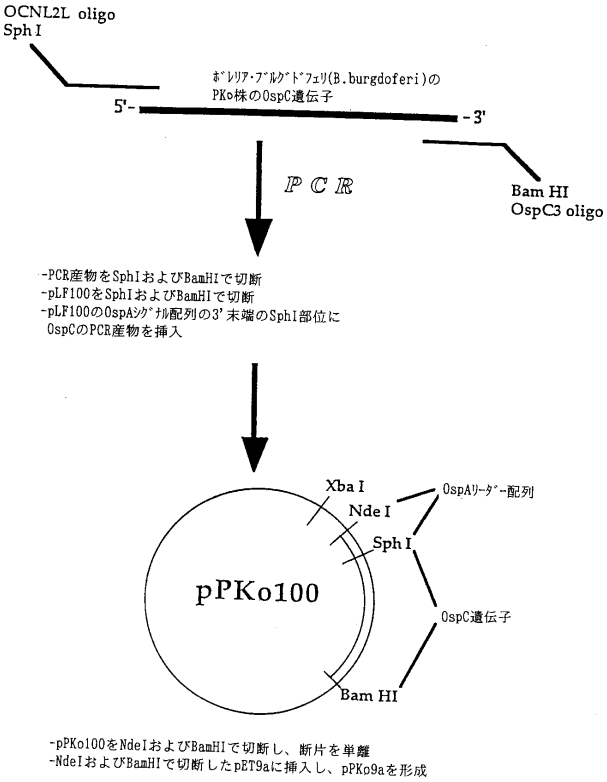
えリポタンパク質を含む通過流出分を得て、該第一のクロマトグラフィーカラムから該通過流出分を回収し、
第二のクロマトグラフィーカラムに該第一のクロマトグラフィーカラム由来の通過流出分をかけ、第二のクロマトグラフィーカラムを素通りする混入タンパク質およびリポ多糖類に優先して組換えタンパク質をカラムに結合させ、
該第二のクロマトグラフィーカラムから該組換えリポタンパク質を溶出させて、実質的にリポ多糖類および混入タンパク質を含まない該組換えリポタンパク質を含む溶出物を得る、
ことを特徴とする方法。
51．該シグナル配列が、ボレリア（Borrelia）種のOspAタンパク質のシグナル配列であることを特徴とする実施態様50記載の方法。
52．該第一と該第二の配列とが結合して、転写オープンリーディングフレームを形成していることを特徴とする実施態様51記載の方法。
53．該界面活性剤がトライトン（TRITON）X-114であることを特徴とする実施態様52記載の方法。
54．溶解細胞の処理を約０℃～約10℃の温度で行い、得られた混合物を約35℃～約40℃まで緩やかに加温して該界面活性剤相を分離させ、遠心分離によって、該水性相および該固体相から該界面活性剤相を分離することを特徴とする実施態様53記載の方法。
55．該成熟タンパク質がボレリア（Borrelia）種のOspCリポタンパク質であることを特徴とする実施態様52記載の方法。
56．該第一のクロマトグラフィーカラムに特定のpHの緩衝液を流し、第一のクロマトグラフィーカラム由来の組換えOspCリポタンパク質を含む液体を得るとともに、ほかのタンパク質は第一のクロマトグラフィーカラムに残留させ、得られた通過流出分を先に該第一のクロマトグラフィーカラムから得られたものとあわせ、このあわせた通過流出分を該第二のクロマトグラフィーカラムにかけることを特徴とする実施態様55記載の方法。
57．該成熟タンパク質が肺炎連鎖球菌（S．pneumoniae）に属する菌株のPspAリポタンパク質であることを特徴とする実施態様52記載の方法。
58．該第一のクロマトグラフィーカラムに特定のpHの緩衝液を流し、第一のクロマトグラフィーカラム由来の組換えPspAリポタンパク質を含む液体を得るとともに、他のタンパク質は第一のクロマトグラフィーカラムに残留させ、得られた通過流出分を先に該第一のクロマトグラフィーカラムから得られたものとあわせ、このあわせた通過流出分を該第二のクロマトグラフィーカラムにかけることを特徴とする実施態様57記載の方法。
59．該成熟タンパク質がヘリコバクター・ピロリ（H．pylori）に属する菌株のUreAタンパク質であることを特徴とする実施態様52記載の方法。
60．該第一のクロマトグラフィーカラムに特定のpHの緩衝液を流し、第一のクロマトグラフィーカラム由来の組換えUreAリポタンパク質を含む液体を得るとともに、他のタンパク質は第一のクロマトグラフィーカラムに残留させ、得られた通過流出分を先に該第一のクロマトグラフィーカラムから得られたものとあわせ、このあわせた通過流出分を該第二のクロマトグラフィーカラムにかけることを特徴とする実施態様59記載の方法。
61．該成熟タンパク質がヘリコバクター・ピロリ（H．pylori）に属する菌株のUreBタンパク質であることを特徴とする実施態様52記載の方法。
62．該第一のクロマトグラフィーカラムに特定のpHの緩衝液を流し、第一のクロマトグラフィーカラム由来の組換えUreBリポタンパク質を含む液体を得るとともに、他のタンパク質は第一のクロマトグラフィーカラムに残留させ、得られた通過流出分を先に該第一のクロマトグラフィーカラムから得られたものとあわせ、このあわせた通過流出分を該第二のクロマトグラフィーカラムにかけることを特徴とする実施態様61記載の方法。
63．該宿主細胞の溶解を宿主細胞の凍結融解によって行うことを特徴とする実施態様52記載の方法。
64．実施態様50記載の方法に従って産生されたことを特徴とする組換え、単離精製リポタンパク質。

65．純度が少なくとも約80％、ならびに実質的に混入タンパク質およびリポ多糖類を含まないことを特徴とするボレリア（Borrelia）種の組換え単離精製OspCリポタンパク質。
66．純度が少なくとも約50％、ならびに実質的に混入タンパク質およびリポ多糖類を含まないことを特徴とする肺炎連鎖球菌（S．pneumoniae）に属する菌株の組換え単離精製PspAリポタンパク質。
67．純度が少なくとも約80％、ならびに実質的に混入タンパク質およびリポ多糖類を含まないことを特徴とするヘリコバクター・ピロリ（H．pylori）に属する菌株の組換え単離精製UreAリポタンパク質。
68．純度が少なくとも約80％、ならびに実質的に混入タンパク質およびリポ多糖類を含まないことを特徴とするヘリコバクター・ピロリ（H．pylori）に属する菌株の組換え単離精製UreBリポタンパク質。
69．ATCC受理番号が第69750号であることを特徴とするリポタンパク質融合ベクターpLF100。
70．実施態様64項または第65記載のリポタンパク質を含有する組成物をヒトまたは動物に投与する工程を含むことを特徴とするヒトまたは動物において免疫応答を誘導する方法。
71．実施態様64項または第65記載のリポタンパク質を含有することを特徴とする免疫応答誘導のための組成物。
72．実施態様64項または第66記載の脂質化PspAタンパク質を含有する組成物をヒトまたは動物に投与する工程を含むことを特徴とするヒトまたは動物において免疫応答を誘導する方法。
73．実施態様64項または第66記載の脂質化PspAタンパク質を含有することを特徴とする免疫応答誘導のための組成物。
74．実施態様67記載の脂質化UreAタンパク質を含有する組成物をヒトまたは動物に投与する工程を含むことを特徴とするヒトまたは動物において免疫応答を誘導する方法。
75．実施態様67記載の脂質化UreAタンパク質を含有することを特徴とする免疫応答誘導のための組成物。
76．実施態様68記載の脂質化UreBタンパク質を含有する組成物をヒトまたは動物に投与する工程を含むことを特徴とするヒトまたは動物において免疫応答を誘導する方法。
77．実施態様68記載の脂質化UreBタンパク質を含有することを特徴とする免疫応答誘導のための組成物。
78．タンパク質の免疫原性を増強する方法であって、
リポタンパク質のシグナル配列をコードしている第一の核酸配列、および該第一の核酸配列によってコードされているリポタンパク質とは異種である成熟タンパク質もしくはその断片をコードしている第二の核酸配列を含み、該第一の核酸配列は該第二の配列と連続しているハイブリッド核酸分子を構築し、
該ハイブリッド核酸分子を発現ベクターに組み込み、
該発現ベクターを宿主細胞に組み込み、
該宿主細胞において該成熟タンパク質を発現させる、
各工程を含むことを特徴とする方法。

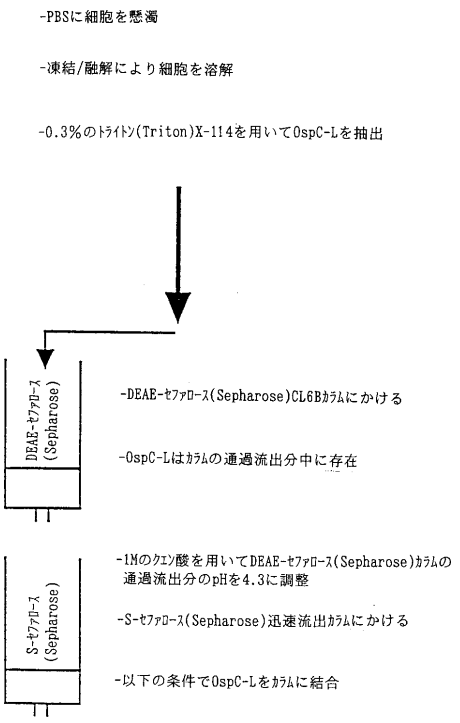
【図１】


pLF100
B=BamHI
N=NdeI
S=SphI
X=XbaI
pBluescript KS+
XbaIおよびBamHIでpBluescriptを切断
ﾎﾞﾚﾘｱ・ﾌﾞﾙｸﾞﾄﾞﾌｪﾘ(B.burgdorferi)のACA1株のOspA遺伝子ｺｰﾄﾞしている領域を含有する900bpのXbaI-BamHI断片を結合
ﾘﾎﾟﾀﾝﾊﾟｸ質融合ﾍﾟﾌﾟﾀｰpLF100の構築

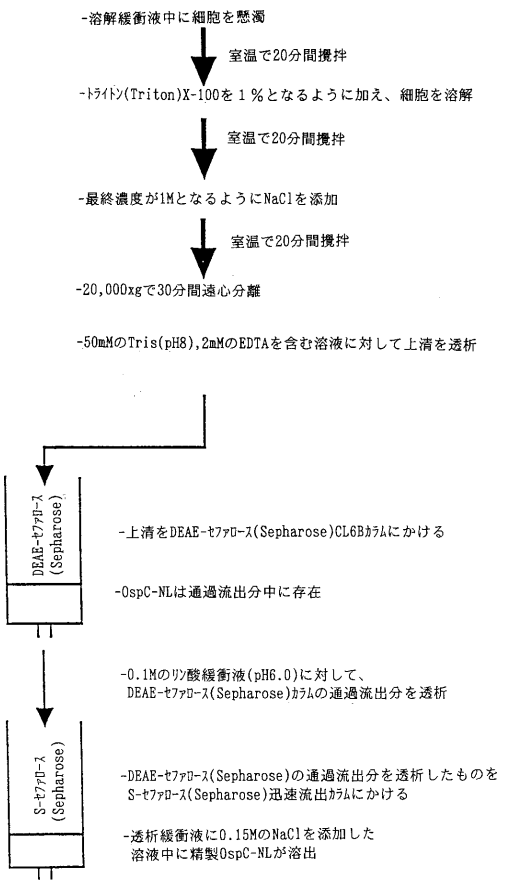
【図２】


OCNL2L oligo
SphI
ﾎﾞﾚﾘｱ・ﾌﾞﾙｸﾞﾄﾞﾌｪﾘ(B.burgdoferi)の
PKo株のOspC遺伝子
5'-
-3'
PCR
Bam HI
OspC3 oligo
-PCR産物をSphIおよびBamHIで切断
-pLF100をSphIおよびBamHIで切断
-pLF100のOspAｼｸﾞﾅﾙ配列の3'末端のSphI部位に
OspCのPCR産物を挿入
Xba I
Nde I
Sph I
OspAﾘｰﾀﾞｰ配列
pPKo100
OspC遺伝子
Bam HI
-pPKo100をNdeIおよびBamHIで切断し、断片を単離
-NdeIおよびBamHIで切断したpET9aに挿入し、pPKo9aを形成

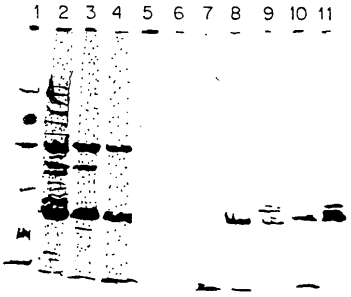
【図３】


-PBSに細胞を懸濁
-凍結/融解により細胞を溶解
-0.3%のﾄﾗｲﾄﾝ(Triton)X-114を用いてOspC-Lを抽出
DEAE-ｾﾌｧﾛｰｽ (Sepharose)
-DEAE-ｾﾌｧﾛｰｽ(Sepharose)CL6Bｶﾗﾑにかける
-OspC-Lはｶﾗﾑの通過流出分中に存在
S-ｾﾌｧﾛｰｽ (Sepharose)
-1Mのｸｴﾝ酸を用いてDEAE-ｾﾌｧﾛｰｽ(Sepharose)ｶﾗﾑの通過流出分のpHを4.3に調整
-S-ｾﾌｧﾛｰｽ(Sepharose)迅速流出ｶﾗﾑにかける
-以下の条件でOspC-Lをｶﾗﾑに結合
-ｶﾗﾑをpH5.5の緩衝液で洗浄
-pH6.0の緩衝液でOspC-Lを溶出

【図４】

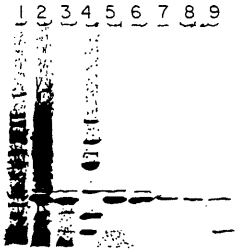

-溶解緩衝液中に細胞を懸濁
室温で20分間撹拌
-ﾄﾗｲﾄﾝ(Triton)X-100を１％となるように加え、細胞を溶解
室温で20分間撹拌
-最終濃度が1MとなるようにNaClを添加
室温で20分間撹拌
-20,000xgで30分間遠心分離
-50mMのTris(pH8),2mMのEDTAを含む溶液に対して上清を透析
DEAE-ｾﾌｧﾛｰｽ (Sepharose)
-上清をDEAE-ｾﾌｧﾛｰｽ(Sepharose)CL6Bｶﾗﾑにかける
-OspC-NLは通過流出分中に存在
-0.1Mのﾘﾝ酸緩衝液(pH6.0)に対して、
DEAE-ｾﾌｧﾛｰｽ(Sepharose)ｶﾗﾑの通過流出分を透析
S-ｾﾌｧﾛｰｽ (Sepharose)
-DEAE-ｾﾌｧﾛｰｽ(Sepharose)の通過流出分を透析したものを
S-ｾﾌｧﾛｰｽ(Sepharose)迅速流出ｶﾗﾑにかける
-透析緩衝液に0.15MのNaClを添加した
溶液中に精製OspC-NLが溶出

【図５】



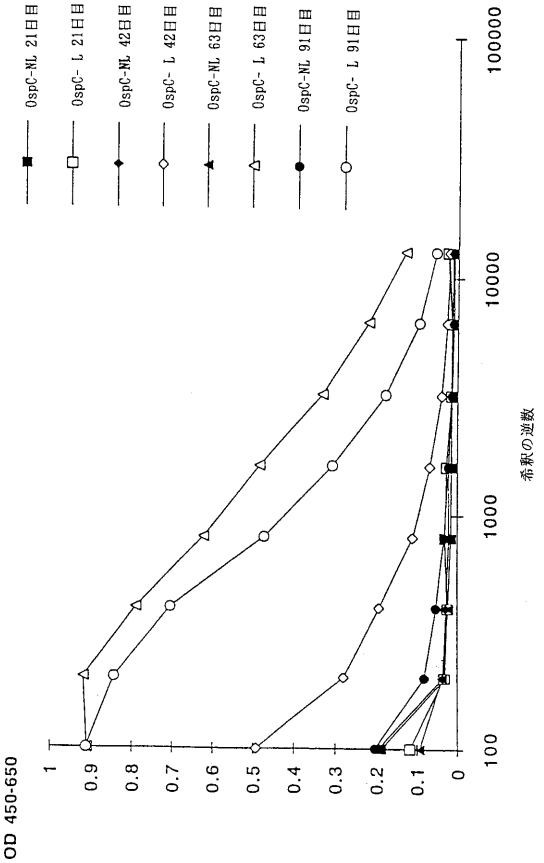
1．低分子量標準
2．OspC-L/BL21の溶解物
3．OspC-L/BL21の界面活性剤相
4．OspC-L/BL21のDEAEｶﾗﾑの通過流出分/洗浄分をあわせたもの
5．OspC-L/BL21のS-ｾﾌｧﾛｰｽ(Sepharose)ｶﾗﾑの通過流出分
6．OspC-L/BL21のS-ｾﾌｧﾛｰｽ(Sepharose)ｶﾗﾑの洗浄分
7．OspC-L/BL21のS-ｾﾌｧﾛｰｽ(Sepharose)ｶﾗﾑからのpH5.5における溶出物
8．OspC-L/BL21のS-ｾﾌｧﾛｰｽ(Sepharose)ｶﾗﾑからのpH6.0における溶出物
9．OspC-L/BL21のS-ｾﾌｧﾛｰｽ(Sepharose)ｶﾗﾑからのpH7.5における溶出物
10．OspC-L/BL21のS-ｾﾌｧﾛｰｽ(Sepharose)ｶﾗﾑからのpH5.7における溶出物
11．OspC-L/BL21のS-ｾﾌｧﾛｰｽ(Sepharose)ｶﾗﾑからのpH7.5における溶出物

【図６】

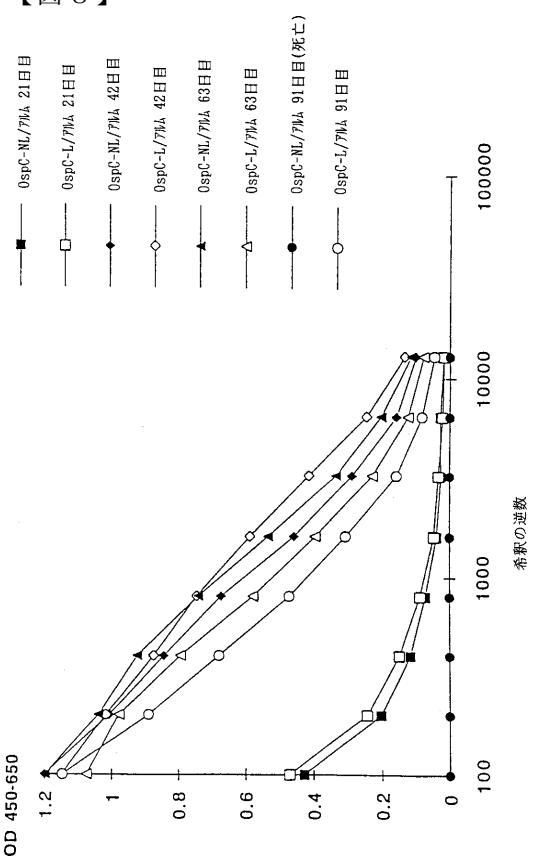


1．OspC-NL/JM109 T=0
2．OspC-NL/JM109 T=３時間
3．OspC-NL/JM109DEAEｶﾗﾑの通過流出分と洗浄分をあわせたもの
4．低分子量標準
5．OspC-NL/JM109をS-ｾﾌｧﾛｰｽ(Sepharose)ｶﾗﾑにかけたもの
6．OspC-NL/JM109のS-ｾﾌｧﾛｰｽ(Sepharose)ｶﾗﾑからの通過流出分
7．OspC-NL/JM109のS-ｾﾌｧﾛｰｽ(Sepharose)ｶﾗﾑの洗浄分
8．OspC-NL/JM109のS-ｾﾌｧﾛｰｽ(Sepharose)ｶﾗﾑからの150mMのNaClを用いた場合の溶出物
9．OspC-NL/JM109のS-ｾﾌｧﾛｰｽ(Sepharose)ｶﾗﾑからの500mMのNaClを用いた場合の溶出物

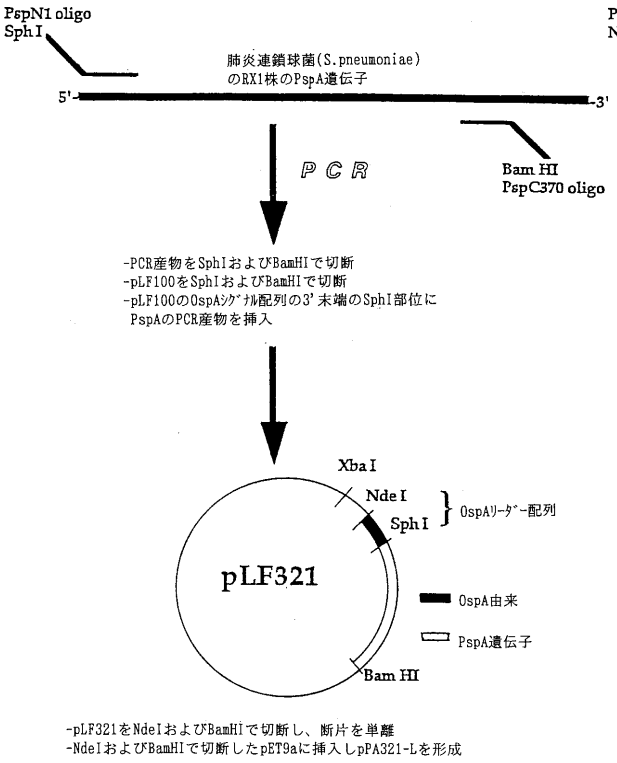
【図７】



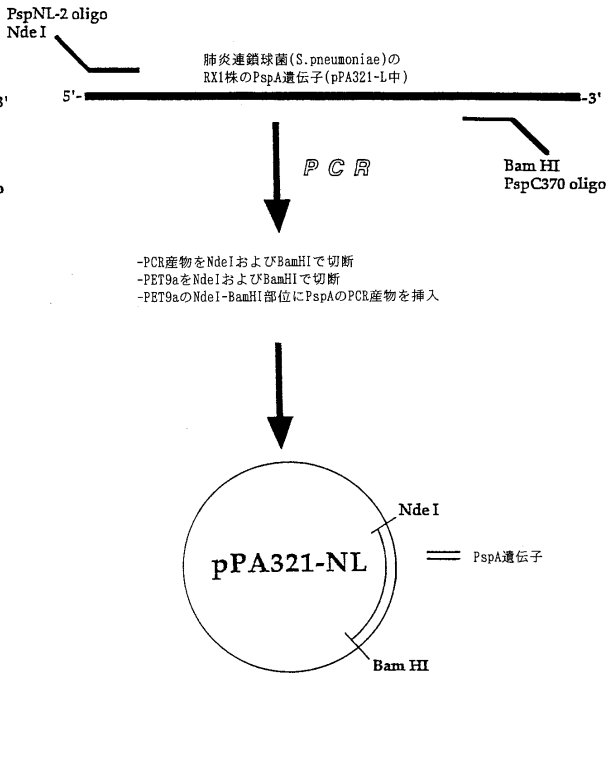
【図８】



【図９】

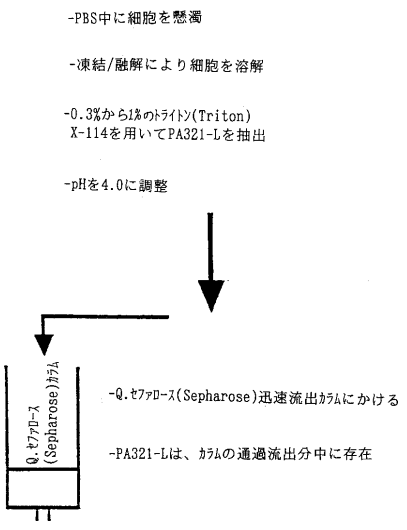


【図１０】

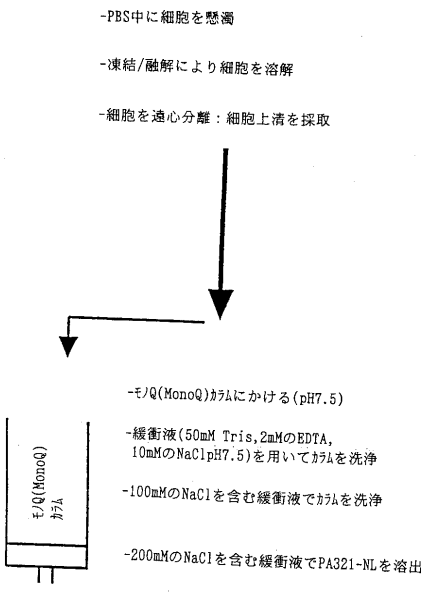


【図１１】

PA321-Lの精製



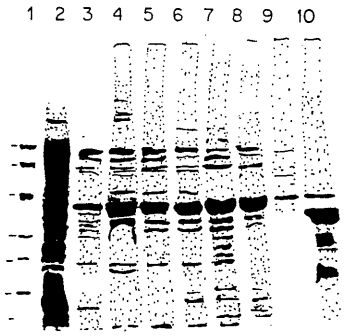
【図１２】



PA321-NLの精製

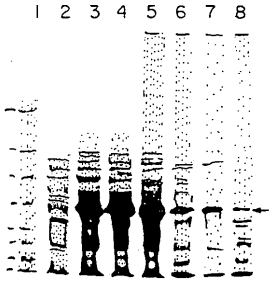
【図１３】

PA321-Lの精製画分



1．事前に染色した低分子量標準
(106,80,49.5,32.5,27.5,および18.5kDa)
2．PA321-L/BL21(DE3)pLysS；T=0
3．PA321-L/BL21(DE3)pLysS；T=IPTG添加１時間後
4．PA321-L/BL21(DE3)pLysS；T=IPTG添加２時間後
5．PA321-L/BL21(DE3)pLysS；T=IPTG添加３時間後
6．PA321-L/BL21(DE3)pLysS；T=IPTG添加４時間後
7．PA321-L/BL21(DE3)pLysS；細胞溶解物
8．PA321-L/BL21(DE3)pLysS；水性相
9．PA321-L/BL21(DE3)pLysS；界面活性剤相
10．PA321-L/BL21(DE3)pLysS；ペレット

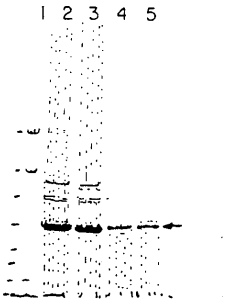
【図１４】



PA321-NLの精製画分

1．事前に染色した広域分子量標準
(200,118,78,47.1,31.4,25.5,18.8および8.3kDa)
2．PA321-NL/BL21(DE3)pLysS；T=0
3．PA321-NL/BL21(DE3)pLysS；T=IPTG添加１時間後
4．PA321-NL/BL21(DE3)pLysS；T=IPTG添加２時間後
5．PA321-NL/BL21(DE3)pLysS；T=IPTG添加３時間後
6．PA321-NL/BL21(DE3)pLysS；細胞溶解物
7．PA321-NL/BL21(DE3)pLysS；細胞上清およびﾍﾟﾚｯﾄ洗浄液を集めたもの
8．PA321-NL/BL21(DE3)pLysS；ペレット

【図１５】



PA321-NLおよびPA321-Lの精製サンプル

1．事前染色した広域分子量標準
(200,118,78,47.1,31.4,25.5,18.8および8.3kDa)
2．PA321-NLのﾓﾉQ(MonoQ)ｶﾗﾑからの溶出物(0.2MのNaCl添加)；ﾛｯﾄ#354A-146
3．PA321-NLのﾓﾉQ(MonoQ)ｶﾗﾑからの溶出物(0.2MのNaCl添加)；ﾛｯﾄ#354A-147
4．PA321- LのQ-ｾﾌｧﾛｰｽ(Sepharose)ｶﾗﾑからのpH4.0 における通過流出分：ﾛｯﾄ#354A-148
5．PA321- LのQ-ｾﾌｧﾛｰｽ(Sepharose)ｶﾗﾑからのpH4.0 における通過流出分：ﾛｯﾄ#354A-150

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C12R 1/19 (2006.01) C12P 21/00 C
C12R 1:19

(72)発明者 ヒューブナー，ロバート シー
アメリカ合衆国 ペンシルバニア州 １８９６０－１９４１ ストローズバーグ クイーン ストリート ８６０
(72)発明者 エルディール，ロルヌ エフ
アメリカ合衆国 ペンシルバニア州 １８３６０ ストローズバーグ ドレハー アヴェニュー １３１８
(72)発明者 ワラコンスキ，ドナルド ジェイ
アメリカ合衆国 ペンシルバニア州 １８３７２ タンナーズヴィル ボックス １５９ アールアール １
(72)発明者 ベッカー，ロバート エス
アメリカ合衆国 ペンシルバニア州 １８３３２ ヘンリーヴィル シルヴァン カスケイズ ロード ボックス ５４５エイ アールアール １
(72)発明者 グレイ，マリアン ビー
アメリカ合衆国 ペンシルバニア州 １８３２１ バートンズヴィル ボックス ３１ エイチシーアール １
(72)発明者 パイル，デレック エル
アメリカ合衆国 ペンシルバニア州 １８３０１ イースト ストローズバーグ イースト ブロード ストリート ８６

審査官 福間 信子

(56)参考文献 特表平０７－５０２６４６（ＪＰ，Ａ）
J. Exp. Med.，１９９３年，vol.178，no.1，p.197-209
Infect. Immun.，１９９３年，vol.61，no.1，p.81-90

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
C12N 15/00 - 90
BIOSIS/WPIDS(STN)
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
SwissProt/PIR/Geneseq
PubMed