(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2014-505477
(P2014-505477A)
(43)公表日　平成26年3月6日(2014.3.6)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA	4B024
C12N 1/15	(2006.01)	C12N	1/15		4B064
C12N 1/19	(2006.01)	C12N	1/19		4B065
C12N 1/21	(2006.01)	C12N	1/21		4H045
C12N 5/10	(2006.01)	C12N	5/00	101	

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 106 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2013-551388 (P2013-551388)
(86)(22)出願日　平成24年1月27日 (2012.1.27)
(85)翻訳文提出日　平成25年9月20日 (2013.9.20)
(86)国際出願番号　PCT/US2012/022997
(87)国際公開番号　WO2012/103496
(87)国際公開日　平成24年8月2日 (2012.8.2)
(31)優先権主張番号　61/437,531
(32)優先日　平成23年1月28日 (2011.1.28)
(33)優先権主張国　米国 (US)

(71)出願人　504333972
メディミューン，エルエルシー
アメリカ合衆国　２０８７８　メリーランド州，ゲイサーズバーグ，ワン　メディミューン　ウェイ
(74)代理人　100091096
弁理士　平木　祐輔
(74)代理人　100118773
弁理士　藤田　節
(74)代理人　100122389
弁理士　新井　栄一
(74)代理人　100111741
弁理士　田中　夏夫

最終頁に続く

(54)【発明の名称】哺乳類細胞中の可溶性ウイルス融合糖タンパク質の発現

(57)【要約】
本技術は、一つには、組換えウイルス融合糖タンパク質の生成（すなわち発現）と、このようなウイルス融合糖タンパク質をコードする核酸とに関する。いくつかの実施形態では、ヒト呼吸器合胞体ウイルス融合タンパク質（ＲＳＶ－Ｆ）およびヒトパラインフルエンザウイルス３融合タンパク質（ｈＰＩＶ３－Ｆ）が発現される。
【選択図】なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
配列番号７と９０％以上同一であるアミノ酸配列を含んでなる、可溶性ウイルス融合タンパク質をコードする、約５１％以上のＧＣ含量を有するヌクレオチド配列を含んでなる、単離核酸。
【請求項２】
前記ヌクレオチド配列が、配列番号７と９５％以上同一であるアミノ酸配列を含んでなるタンパク質をコードする、請求項１に記載の単離核酸。
【請求項３】
前記ヌクレオチド配列が、配列番号７のアミノ酸配列を含んでなるタンパク質をコードする、請求項１に記載の単離核酸。
【請求項４】
前記可溶性ウイルス融合タンパク質が機能性膜結合領域を欠く、請求項１～３のいずれか一項に記載の単離核酸。
【請求項５】
前記可溶性ウイルス融合タンパク質が、配列番号２のアミノ酸５２５～５７４に相当するＣ末端膜貫通領域アミノ酸を欠く、請求項４に記載の単離核酸。
【請求項６】
前記タンパク質がタグを含んでなる、請求項１～５のいずれか一項に記載の単離核酸。
【請求項７】
前記タンパク質がタグを含まない、請求項１～５のいずれか一項に記載の単離核酸。
【請求項８】
前記ヌクレオチド配列のＧＣ３含量が約７６％以上である、請求項１～７のいずれか一項に記載の単離核酸。
【請求項９】
配列番号６のヌクレオチド配列を含んでなる、請求項８に記載の単離核酸。
【請求項１０】
前記ヌクレオチド配列のＧＣ含量が約５８％以上である、請求項１～９のいずれか一項に記載の単離核酸。
【請求項１１】
前記ヌクレオチド配列のＧＣ３含量が約１００％である、請求項１０に記載の単離核酸。
【請求項１２】
配列番号５のヌクレオチド配列を含んでなる、請求項１０または１１に記載の単離核酸。
【請求項１３】
前記ヌクレオチド配列が配列番号３と６５％以上同一である、請求項１～１２のいずれか一項に記載の単離核酸。
【請求項１４】
前記ヌクレオチド配列が配列番号３と７３％以上同一である、請求項１３に記載の単離核酸。
【請求項１５】
前記ヌクレオチド配列が配列番号３と７７％以上同一である、請求項１４に記載の単離核酸。
【請求項１６】
前記ヌクレオチド配列と機能的に結合するシス調節因子をさらに含んでなる、請求項１～１５のいずれか一項に記載の単離核酸。
【請求項１７】
前記シス調節因子が転写後プロセッシング因子を含んでなる、請求項１６に記載の単離核酸。

【請求項１８】
前記転写後調節因子がウッドチャック肝炎ウイルスに由来する、請求項１７に記載の単離核酸。
【請求項１９】
発現ベクターである、請求項１～１８のいずれか一項に記載の単離核酸。
【請求項２０】
請求項１９に記載の単離核酸を含んでなる細胞。
【請求項２１】
細胞ＤＮＡに組み込まれた、請求項１～１５のいずれか一項に記載のヌクレオチド配列を含んでなる細胞。
【請求項２２】
１ミリリットルの細胞あたり少なくとも２マイクログラムの前記タンパク質を発現する、請求項２０または２１に記載の細胞。
【請求項２３】
１ミリリットルの細胞あたり少なくとも６マイクログラムの前記タンパク質を発現する、請求項２２に記載の細胞。
【請求項２４】
１ミリリットルの細胞あたり少なくとも２００マイクログラムの前記タンパク質を発現する、請求項２３に記載の細胞。
【請求項２５】
１ミリリットルの細胞あたり少なくとも５００マイクログラムの前記タンパク質を発現する、請求項２４に記載の細胞。
【請求項２６】
１ミリリットルの細胞あたり少なくとも１ミリグラムの前記タンパク質を発現する、請求項２５に記載の細胞。
【請求項２７】
１ミリリットルの細胞あたり少なくとも１．３ミリグラムの前記タンパク質を発現する、請求項２６に記載の細胞。
【請求項２８】
１ミリリットルの細胞あたり少なくとも１．６ミリグラムの前記タンパク質を発現する、請求項２７に記載の細胞。
【請求項２９】
前記可溶性ウイルス融合タンパク質を分泌する、請求項２０～２８のいずれか一項に記載の細胞。
【請求項３０】
哺乳類細胞である、請求項２０～２９のいずれか一項に記載の細胞。
【請求項３１】
前記細胞が非接着細胞である、請求項３０に記載の細胞。
【請求項３２】
前記細胞がＣＨＯ細胞またはＣＨＯ由来細胞である、請求項３０または３１に記載の細胞。
【請求項３３】
前記細胞がＣＡＴ－Ｓ細胞である、請求項３２に記載の細胞。
【請求項３４】
前記細胞がＣＨＯ－Ｓ細胞である、請求項３２に記載の細胞。
【請求項３５】
前記細胞がＶｅｒｏ細胞である、請求項３０に記載の細胞。
【請求項３６】
前記細胞がＭＲＣ－５細胞である、請求項３０に記載の細胞。
【請求項３７】

前記細胞がＢＳＲ－Ｔ７細胞である、請求項３０に記載の細胞。
【請求項３８】
前記細胞が、前記核内の前記ウイルス融合タンパク質をコードする核酸を合成する、請求項２０～３７のいずれか一項に記載の細胞。
【請求項３９】
前記ヌクレオチド配列と機能的に結合する、請求項１６～１８のいずれか一項に記載のシス調節因子をさらに含んでなる、請求項２０～３８のいずれか一項に記載の細胞。
【請求項４０】
その下で前記タンパク質が生成される条件に、請求項１～１５のいずれか一項に記載のヌクレオチド配列を含んでなる複数の細胞を接触させるステップを含んでなる、可溶性ウイルス融合タンパク質を発現させる方法。
【請求項４１】
前記ヌクレオチド配列が前記細胞の発現ベクター中にある、請求項４０に記載の方法。
【請求項４２】
前記ヌクレオチド配列が前記細胞の細胞ＤＮＡ中にある、請求項４０に記載の方法。
【請求項４３】
前記細胞が哺乳類細胞である、請求項４０～４２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４４】
前記細胞が非接着細胞である、請求項４３に記載の方法。
【請求項４５】
前記細胞がＣＨＯ細胞またはＣＨＯ由来細胞である、請求項４４に記載の方法。
【請求項４６】
前記細胞がＣＡＴ－Ｓ細胞である、請求項４５に記載の方法。
【請求項４７】
前記細胞がＣＨＯ－Ｓ細胞である、請求項４５に記載の方法。
【請求項４８】
前記細胞がＶｅｒｏ細胞である、請求項４３に記載の方法。
【請求項４９】
前記細胞がＭＲＣ－５細胞である、請求項４３に記載の方法。
【請求項５０】
前記細胞がＢＳＲ－Ｔ７細胞である、請求項４３に記載の方法。
【請求項５１】
１ミリリットルの細胞あたり少なくとも２マイクログラムのタンパク質が生成される、請求項４０～５０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５２】
１ミリリットルの細胞あたり少なくとも６マイクログラムの前記タンパク質が生成される、請求項５１に記載の方法。
【請求項５３】
１ミリリットルの細胞あたり少なくとも２００マイクログラムの前記タンパク質が生成される、請求項５２に記載の方法。
【請求項５４】
１ミリリットルの細胞あたり少なくとも５００マイクログラムの前記タンパク質が生成される、請求項５３に記載の方法。
【請求項５５】
１ミリリットルの細胞あたり少なくとも１ミリグラムの前記タンパク質が生成される、請求項５４に記載の方法。
【請求項５６】
１ミリリットルの細胞あたり少なくとも１．３ミリグラムの前記タンパク質が生成される、請求項５５に記載の方法。
【請求項５７】

１ミリリットルの細胞あたり少なくとも１．６ミリグラムの前記タンパク質が生成される、請求項５６に記載の方法。
【請求項５８】
前記細胞が前記タンパク質を分泌する、請求項４０～５７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５９】
前記タンパク質が７日間以上にわたり生成される、請求項４０～５７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６０】
前記細胞が畜産物を含まない培養条件下で培養される、請求項４０～５９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６１】
前記細胞によって生成されるタンパク質量を測定するステップをさらに含んでなる、請求項４０～６０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６２】
前記タンパク質を単離するステップをさらに含んでなる、請求項４０～６１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６３】
前記細胞が、前記核内の前記ウイルス融合タンパク質をコードする核酸を合成する、請求項４０～６２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６４】
前記細胞が、請求項１～１５のいずれか一項に記載のヌクレオチド配列と機能的に結合する、請求項１６～１８のいずれか一項に記載のシス調節因子をさらに含んでなる、請求項４０～６３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６５】
請求項１～１５のいずれか一項に記載のヌクレオチド配列を前記細胞核内に導入するステップを含んでなる、請求項４０～６４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６６】
請求項１～１５のいずれか一項に記載のヌクレオチド配列と機能的に結合する、請求項１６～１８のいずれか一項に記載のシス調節因子を前記細胞核内に導入するステップを含んでなる、請求項６５に記載の方法。
【請求項６７】
前記細胞核への前記導入が核形質移入による、請求項６５または６６に記載の方法。
【請求項６８】
（ｉ）約５１％以上のＧＣ含量を有して、（ｉｉ）配列番号１と７３％以上同一であり、（ｉｉｉ）配列番号２と９０％以上同一であるアミノ酸配列を含んでなるウイルス融合タンパク質をコードする、ヌクレオチド配列を含んでなる核酸。
【請求項６９】
前記ヌクレオチド配列が、配列番号２と９５％以上同一であるアミノ酸配列を含んでなるタンパク質をコードする、請求項６８に記載の単離核酸。
【請求項７０】
前記ヌクレオチド配列が、配列番号２のアミノ酸配列を含んでなるタンパク質をコードする、請求項６８に記載の単離核酸。
【請求項７１】
前記タンパク質がタグを含んでなる、請求項６８～７０のいずれか一項に記載の単離核酸。
【請求項７２】
前記タンパク質がタグを含まない、請求項６８～７０のいずれか一項に記載の単離核酸。
【請求項７３】

前記ヌクレオチド配列のＧＣ３含量が約７６％以上である、請求項６８～７２のいずれか一項に記載の単離核酸。
【請求項７４】
前記ヌクレオチド配列のＧＣ含量が約５８％以上である、請求項６８～７３のいずれか一項に記載の単離核酸。
【請求項７５】
前記ヌクレオチド配列のＧＣ３含量が約１００％である、請求項７４に記載の単離核酸。
【請求項７６】
配列番号１７のヌクレオチド配列を含んでなる、請求項７４または７５に記載の単離核酸。
【請求項７７】
前記ヌクレオチド配列が配列番号１と７７％以上同一である、請求項７６に記載の単離核酸。
【請求項７８】
前記ヌクレオチド配列と機能的に結合するシス調節因子をさらに含んでなる、請求項６８～７７のいずれか一項に記載の単離核酸。
【請求項７９】
前記シス調節因子が転写後プロセッシング因子を含んでなる、請求項７８に記載の単離核酸。
【請求項８０】
前記転写後調節因子がウッドチャック肝炎ウイルスに由来する、請求項７９に記載の単離核酸。
【請求項８１】
発現ベクターである、請求項６８～８０のいずれか一項に記載の単離核酸。
【請求項８２】
請求項８１に記載の単離核酸を含んでなる細胞。
【請求項８３】
細胞ＤＮＡに組み込まれた、請求項６８～７７のいずれか一項に記載のヌクレオチド配列を含んでなる細胞。
【請求項８４】
前記タンパク質が前記細胞膜内に保持される、請求項８２または８３に記載の細胞。
【請求項８５】
前記ウイルス融合タンパク質を分泌する、請求項８２または８３に記載の細胞。
【請求項８６】
哺乳類細胞である、請求項８２～８５のいずれか一項に記載の細胞。
【請求項８７】
前記細胞が非接着細胞である、請求項８６に記載の細胞。
【請求項８８】
前記細胞がＣＨＯ細胞またはＣＨＯ由来細胞である、請求項８６または８７に記載の細胞。
【請求項８９】
前記細胞がＣＡＴ－Ｓ細胞である、請求項８８に記載の細胞。
【請求項９０】
前記細胞がＣＨＯ－Ｓ細胞である、請求項８８に記載の細胞。
【請求項９１】
前記細胞がＶｅｒｏ細胞である、請求項８６に記載の細胞。
【請求項９２】
前記細胞がＭＲＣ－５細胞である、請求項８６に記載の細胞。
【請求項９３】

前記細胞がＢＳＲ－Ｔ７細胞である、請求項８６に記載の細胞。
【請求項９４】
前記細胞が、前記核内の前記ウイルス融合タンパク質をコードする核酸を合成する、請求項８２～９３のいずれか一項に記載の細胞。
【請求項９５】
前記ヌクレオチド配列と機能的に結合する、請求項７８～８０のいずれか一項に記載のシス調節因子をさらに含んでなる、請求項８２～９４のいずれか一項に記載の細胞。
【請求項９６】
その下で前記タンパク質が生成される条件に、請求項６８～７７のいずれか一項に記載のヌクレオチド配列を含んでなる複数の細胞を接触させるステップを含んでなる、前記ウイルス融合タンパク質を発現させる方法。
【請求項９７】
前記ヌクレオチド配列が前記細胞の発現ベクター中にある、請求項９６に記載の方法。
【請求項９８】
前記ヌクレオチド配列が前記細胞の細胞ＤＮＡ中にある、請求項９６に記載の方法。
【請求項９９】
前記細胞が哺乳類細胞である、請求項９６～９８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１００】
前記細胞が非接着細胞である、請求項９９に記載の方法。
【請求項１０１】
前記細胞がＣＨＯ細胞またはＣＨＯ由来細胞である、請求項１００に記載の方法。
【請求項１０２】
前記細胞がＣＡＴ－Ｓ細胞である、請求項１０１に記載の方法。
【請求項１０３】
前記細胞がＣＨＯ－Ｓ細胞である、請求項１０１に記載の方法。
【請求項１０４】
前記細胞がＶｅｒｏ細胞である、請求項９９に記載の方法。
【請求項１０５】
前記細胞がＭＲＣ－５細胞である、請求項９９に記載の方法。
【請求項１０６】
前記細胞がＢＳＲ－Ｔ７細胞である、請求項９９に記載の方法。
【請求項１０７】
前記タンパク質が前記細胞膜内に保持される、請求項９６～１０６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１０８】
前記細胞が前記タンパク質を分泌する、請求項９６～１０６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１０９】
前記タンパク質が７日間以上にわたり生成される、請求項９６～１０８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１１０】
前記細胞が畜産物を含まない培養条件下で培養される、請求項９６～１０９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１１１】
前記細胞によって生成されるタンパク質量を測定するステップをさらに含んでなる、請求項９６～１１０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１１２】
前記タンパク質を単離するステップをさらに含んでなる、請求項９６～１１１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１１３】

前記細胞が、前記核内の前記ウイルス融合タンパク質をコードする核酸を合成する、請求項９６～１１２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１１４】
前記細胞が、請求項６８～７７のいずれか一項に記載のヌクレオチド配列と機能的に結合する、請求項７８～８０のいずれか一項に記載のシス調節因子をさらに含んでなる、請求項９６～１１３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１１５】
請求項６８～７７のいずれか一項に記載のヌクレオチド配列を細胞核内に導入するステップを含んでなる、請求項９６～１１４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１１６】
請求項６８～７７のいずれか一項に記載のヌクレオチド配列と機能的に結合する、請求項７８～８０のいずれか一項に記載のシス調節因子を前記細胞核内に導入するステップを含んでなる、請求項１１５に記載の方法。
【請求項１１７】
前記細胞核への導入が核形質移入による、請求項１１５または１１６に記載の方法。
【請求項１１８】
配列番号１２と９０％以上同一であるアミノ酸配列を含んでなる、ウイルス融合タンパク質をコードする、約５１％以上のＧＣ含量を有するヌクレオチド配列を含んでなる、単離核酸。
【請求項１１９】
前記ヌクレオチド配列が、配列番号１２と９５％以上同一であるアミノ酸配列を含んでなるタンパク質をコードする、請求項１１８に記載の単離核酸。
【請求項１２０】
前記ヌクレオチド配列が、配列番号１２のアミノ酸配列を含んでなるタンパク質をコードする、請求項１１８に記載の単離核酸。
【請求項１２１】
前記タンパク質がタグを含んでなる、請求項１１８～１２０のいずれか一項に記載の単離核酸。
【請求項１２２】
前記タンパク質がタグを含まない、請求項１１８～１２０のいずれか一項に記載の単離核酸。
【請求項１２３】
前記ヌクレオチド配列のＧＣ含量が約６０％以上である、請求項１１８～１２２のいずれか一項に記載の単離核酸。
【請求項１２４】
前記ヌクレオチド配列のＧＣ３含量が約１００％である、請求項１２３に記載の単離核酸。
【請求項１２５】
配列番号１１のヌクレオチド配列を含んでなる、請求項１２３または１２４に記載の単離核酸。
【請求項１２６】
前記ヌクレオチド配列が配列番号１０と６５％以上同一である、請求項１２５に記載の単離核酸。
【請求項１２７】
前記ヌクレオチド配列が配列番号１０と７５％以上同一である、請求項１２５に記載の単離核酸。
【請求項１２８】
前記ウイルス融合タンパク質が機能性膜結合領域を欠く、請求項１１８～１２７のいずれか一項に記載の単離核酸。
【請求項１２９】

前記可溶性ウイルス融合タンパク質が、配列番号９のアミノ酸４８９～５３９に相当するＣ末端膜貫通領域アミノ酸を欠く、請求項１２８に記載の単離核酸。
【請求項１３０】
前記ヌクレオチド配列と機能的に結合するシス調節因子をさらに含んでなる、請求項１１８～１２９のいずれか一項に記載の単離核酸。
【請求項１３１】
前記シス調節因子が転写後プロセッシング因子を含んでなる、請求項１３０に記載の単離核酸。
【請求項１３２】
前記転写後調節因子がウッドチャック肝炎ウイルスに由来する、請求項１３１に記載の単離核酸。
【請求項１３３】
発現ベクターである、請求項１１８～１３２のいずれか一項に記載の単離核酸。
【請求項１３４】
請求項１３３に記載の単離核酸を含んでなる細胞。
【請求項１３５】
細胞ＤＮＡに組み込まれた、請求項１１８～１２９のいずれか一項に記載のヌクレオチド配列を含んでなる細胞。
【請求項１３６】
前記ウイルス融合タンパク質が前記細胞中に保持される、請求項１３４～１３５のいずれか一項に記載の細胞。
【請求項１３７】
前記ウイルス融合タンパク質を分泌する、請求項１３４～１３５のいずれか一項に記載の細胞。
【請求項１３８】
哺乳類細胞である、請求項１３４～１３７のいずれか一項に記載の細胞。
【請求項１３９】
前記細胞が非接着細胞である、請求項１３８に記載の細胞。
【請求項１４０】
前記細胞がＣＨＯ細胞またはＣＨＯ由来細胞である、請求項１３８または１３９に記載の細胞。
【請求項１４１】
前記細胞がＣＡＴ－Ｓ細胞である、請求項１４０に記載の細胞。
【請求項１４２】
前記細胞がＣＨＯ－Ｓ細胞である、請求項１４０に記載の細胞。
【請求項１４３】
前記細胞がＶｅｒｏ細胞である、請求項１３８に記載の細胞。
【請求項１４４】
前記細胞がＭＲＣ－５細胞である、請求項１３８に記載の細胞。
【請求項１４５】
前記細胞がＢＳＲ－Ｔ７細胞である、請求項１３８に記載の細胞。
【請求項１４６】
前記細胞が、前記核内の前記ウイルス融合タンパク質をコードする核酸を合成する、請求項１３４～１４５のいずれか一項に記載の細胞。
【請求項１４７】
前記ヌクレオチド配列と機能的に結合する、請求項１３０～１３２のいずれか一項に記載のシス調節因子をさらに含んでなる、請求項１３４～１４６のいずれか一項に記載の細胞。
【請求項１４８】
その下で前記タンパク質が生成される条件に、請求項１１８～１２９のいずれか一項に

記載のヌクレオチド配列を含んでなる複数の細胞を接触させるステップを含んでなる、ウイルス融合タンパク質を発現させる方法。
【請求項１４９】
前記ヌクレオチド配列が前記細胞の発現ベクター中にある、請求項１４８に記載の方法。
【請求項１５０】
前記ヌクレオチド配列が前記細胞の細胞ＤＮＡ中にある、請求項１４８に記載の方法。
【請求項１５１】
前記細胞が哺乳類細胞である、請求項１４８～１５０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１５２】
前記細胞が非接着細胞である、請求項１５１に記載の方法。
【請求項１５３】
前記細胞がＣＨＯ細胞またはＣＨＯ由来細胞である、請求項１５２に記載の方法。
【請求項１５４】
前記細胞がＣＡＴ－Ｓ細胞である、請求項１５３に記載の方法。
【請求項１５５】
前記細胞がＣＨＯ－Ｓ細胞である、請求項１５３に記載の方法。
【請求項１５６】
前記細胞がＶｅｒｏ細胞である、請求項１５１に記載の方法。
【請求項１５７】
前記細胞がＭＲＣ－５細胞である、請求項１５１に記載の方法。
【請求項１５８】
前記細胞がＢＳＲ－Ｔ７細胞である、請求項１５１に記載の方法。
【請求項１５９】
前記タンパク質が前記細胞内に保持される、請求項１４８～１５８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１６０】
前記細胞が前記タンパク質を分泌する、請求項１４８～１５８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１６１】
前記タンパク質が７日間以上にわたり生成される、請求項１４８～１６０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１６２】
前記細胞が、畜産物を含まない培養条件下で培養される、請求項１４８～１６１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１６３】
前記細胞によって生成されるタンパク質量を測定するステップをさらに含んでなる、請求項１４８～１６２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１６４】
前記タンパク質を単離するステップをさらに含んでなる、請求項１４８～１６３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１６５】
前記細胞が、前記核内の前記ウイルス融合タンパク質をコードする核酸を合成する、請求項１４８～１６４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１６６】
前記細胞が、請求項１１８～１２９のいずれか一項に記載のヌクレオチド配列と機能的に結合する、請求項１３０～１３２のいずれか一項に記載のシス調節因子をさらに含んでなる、請求項１４８～１６５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１６７】
請求項１１８～１２９のいずれか一項に記載のヌクレオチド配列を前記細胞核内に導入

するステップを含んでなる、請求項１４８～１６６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１６８】
請求項１１８～１２９のいずれか一項に記載のヌクレオチド配列と機能的に結合する、請求項１３０～１３２のいずれか一項に記載のシス調節因子を細胞核内に導入するステップを含んでなる、請求項１６７に記載の方法。
【請求項１６９】
前記細胞核への導入が核形質移入による、請求項１６７または１６８に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願の相互参照
本出願は、その内容全体を参照によって援用する、２０１１年1月２８日に出願された、先行する米国仮特許出願第６１／４３７，５３１号明細書の優先権を主張する。
【０００２】
本技術は、一つには、組換えウイルス融合糖タンパク質の生成（すなわち発現）と、このようなウイルス融合糖タンパク質をコードする核酸とに関する。いくつかの実施形態では、組換えヒト呼吸器合胞体ウイルス融合タンパク質（ＲＳＶ－Ｆ）およびヒトパラインフルエンザウイルス３融合タンパク質（ｈＰＩＶ３－Ｆ）、そしてこのようなタンパク質をコードする核酸を生成する方法が提供される。
【背景技術】
【０００３】
ウイルス感染症においては、ウイルス融合糖タンパク質が、宿主細胞へのウイルス侵入を媒介する。ウイルス融合タンパク質は、ウイルス外被表面から三量体として突出し、ウイルス外被と細胞膜間の融合を誘導することで、細胞への侵入を媒介する。Ｉ型およびＩＩ型の２種類のウイルス融合タンパク質がある。Ｉ型ウイルス融合タンパク質としては、パラミクソウイルス、レトロウイルス、コロナウイルス、オルソミクソウイルス、およびフィロウイルスの融合タンパク質が挙げられるが、これに限定されるものではない。ＩＩ型ウイルス融合タンパク質としては、アルファウイルスおよびフラビウイルスの融合タンパク質が挙げられるが、これに限定されるものではない。Ｉ型およびＩＩ型双方のウイルス融合タンパク質は、融合時に三量体として配置される。Ｉ型ウイルス融合タンパク質はモノマーとして合成され、小胞体膜への同時翻訳挿入、グリコシル化、および折り畳み後に、三量体化する。三量体化に続いて、Ｉ型ウイルス融合前駆型（F_0）タンパク質は、宿主プロテアーゼによって切断され活性化される。パラミクソウイルスでは、例えば活性化Ｉ型ウイルス融合タンパク質は、それぞれＦ１およびＦ２と称される、膜固定型サブユニットおよび膜遠位サブユニットから構成される。膜固定型サブユニットは、膜貫通ドメインと、融合ペプチドとして知られる新しい疎水性アミノ末端を含有する。
【０００４】
パラミクソウイルスの融合タンパク質としては、例えば呼吸器合胞体ウイルス（ＲＳＶ）、およびヒトパラインフルエンザウイルス（ｈＰＩＶ）などのウイルスからの融合タンパク質が挙げられる。ＲＳＶ感染は、特に未熟児で深刻な下気道疾患を引き起こす。ＲＳＶを中和するモノクローナル抗体であるパリビズマブによる予防法は、未熟児におけるＲＳＶによって引き起こされる下気道感染症を予防し得るが、認可されたＲＳＶのワクチンはない。ｈＰＩＶはまた、小児における下気道感染症の一般的原因でもある。ｈＰＩＶには、ｈＰＩＶ－１（クループおよびその他の上および下気道疾患の最も一般的な原因）；ｈＰＩＶ－２（クループおよびその他の上および下気道疾患を引き起こす）；ｈＰＩＶ－３（細気管支炎および肺炎と関連付けられている）；およびｈＰＩＶ－４をはじめとする、４つの血清型がある。ＲＳＶと同様、認可されたｈＰＩＶのワクチンはない。
【発明の概要】
【課題を解決するための手段】
【０００５】

いくつかの実施形態では、配列番号７と９０％以上同一であるアミノ酸配列を含んでなる、可溶性ウイルス融合タンパク質をコードする、約５１％以上のＧＣ含量を有するヌクレオチド配列を含んでなる、単離核酸が提供される。

【０００６】

いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列は、配列番号７と９１％以上同一であるアミノ酸配列を含んでなる、タンパク質をコードする。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列は、配列番号７と９２％以上同一であるアミノ酸配列を含んでなる、タンパク質をコードする。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列は、配列番号７と９３％以上同一であるアミノ酸配列を含んでなる、タンパク質をコードする。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列は、配列番号７と９４％以上同一であるアミノ酸配列を含んでなる、タンパク質をコードする。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列は、配列番号７と９５％以上同一であるアミノ酸配列を含んでなる、タンパク質をコードする。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列は、配列番号７と９６％以上同一であるアミノ酸配列を含んでなる、タンパク質をコードする。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列は、配列番号７と９７％以上同一であるアミノ酸配列を含んでなる、タンパク質をコードする。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列は、配列番号７と９８％以上同一であるアミノ酸配列を含んでなる、タンパク質をコードする。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列は、配列番号７と９９％以上同一であるアミノ酸配列を含んでなる、タンパク質をコードする。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列は、配列番号７のアミノ酸配列を含んでなる、タンパク質をコードする。

【０００７】

いくつかの実施形態では、可溶性ウイルス融合タンパク質は、機能性膜結合領域を欠く。時には、可溶性ウイルス融合タンパク質は、配列番号２のアミノ酸５２５～５７４に相当する、Ｃ末端膜貫通領域アミノ酸を欠く。

【０００８】

いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列のＧＣ含量は約４５％以上である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列のＧＣ含量は約４６％以上である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列のＧＣ含量は約４７％以上である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列のＧＣ含量は約４８％以上である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列のＧＣ含量は約４９％以上である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列のＧＣ含量は約５０％以上である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列のＧＣ含量は約５１％以上である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列のＧＣ含量は約５２％以上である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列のＧＣ含量は約５３％以上である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列のＧＣ含量は約５４％以上である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列のＧＣ含量は約５５％以上である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列のＧＣ含量は約５６％以上である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列のＧＣ含量は約５７％以上である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列のＧＣ含量は約５８％以上である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列のＧＣ含量は約５９％以上である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列のＧＣ含量は約６０％以上である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列のＧＣ含量は約６１％以上である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列のＧＣ含量は約６２％以上である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列のＧＣ含量は約６３％以上である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列のＧＣ含量は約６４％以上である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列のＧＣ含量は約６５％以上である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列のＧＣ含量は約７０％以上である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列のＧＣ含量は約７５％以上である。いくつかの実施形態では、ＧＣ含量は約８０％以上である。いくつかの実施形態では、ＧＣ含量は約８５％以上である。いくつかの実施形態では、ＧＣ含量は約９０％以上である。いくつかの実施形態では、ＧＣ含量は約９５％以上である。いくつかの実施形態では、ＧＣ含量は約９９％以上である。

【０００９】
いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列のＧＣ３含量は約７０％以上である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列のＧＣ３含量は約７５％以上である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列のＧＣ３含量は約７６％以上である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列のＧＣ３含量は約７７％以上である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列のＧＣ３含量は約７８％以上である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列のＧＣ３含量は約７９％以上である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列のＧＣ３含量は約８０％以上である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列のＧＣ３含量は約８５％以上である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列のＧＣ３含量は約９０％以上である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列のＧＣ３含量は約９５％以上である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列のＧＣ３含量は約９６％以上である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列のＧＣ３含量は約９７％以上である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列のＧＣ３含量は約９８％以上である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列のＧＣ３含量は約９９％以上である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列のＧＣ３含量は約１００％である。特定の実施形態は、配列番号６のヌクレオチド配列を含んでなる核酸を対象とする。特定の実施形態は、配列番号５のヌクレオチド配列を含んでなる核酸を対象とする。

【００１０】
いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列は、配列番号３と６０％以上同一である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列は、配列番号３と６１％以上同一である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列は、配列番号３と６２％以上同一である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列は、配列番号３と６３％以上同一である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列は、配列番号３と６４％以上同一である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列は、配列番号３と６５％以上同一である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列は、配列番号３と６６％以上同一である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列は、配列番号３と６７％以上同一である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列は、配列番号３と６８％以上同一である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列は、配列番号３と６９％以上同一である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列は、配列番号３と７０％以上同一である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列は、配列番号３と７１％以上同一である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列は、配列番号３と７２％以上同一である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列は、配列番号３と７３％以上同一である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列は、配列番号３と７４％以上同一である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列は、配列番号３と７５％以上同一である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列は、配列番号３と７６％以上同一である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列は、配列番号３と７７％以上同一である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列は、配列番号３と７８％以上同一である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列は、配列番号３と７９％以上同一である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列は、配列番号３と８０％以上同一である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列は、配列番号３と８５％以上同一である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列は、配列番号３と９０％以上同一である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列は、配列番号３と９５％以上同一である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列は、配列番号３と９９％以上同一である。

【００１１】
いくつかの実施形態では、核酸は、ヌクレオチド配列と機能的に結合するシス調節因子をさらに含んでなる。時折、シス調節因子は、転写後プロセッシング因子を含んでなる。時には、転写後調節因子は、ウッドチャック肝炎ウイルスに由来する。いくつかの実施形態では、核酸は発現ベクター中にある。場合によっては、核酸は、タグを含んでなるタンパク質をコードする。

【００１２】

いくつかの実施形態では、核酸はコドン最適化され、（ｉ）約４６％以上のＧＣ含量を有して、（ｉｉ）配列番号７と約９０％以上同一である可溶性ウイルス融合タンパク質をコードする、ヌクレオチド配列を含んでなる。

【００１３】

いくつかの実施形態では、核酸は、配列番号４のヌクレオチド配列を有する。

【００１４】

特定の実施形態では、（ｉ）約５１％以上のＧＣ含量を有して、（ｉｉ）配列番号１と７３％以上同一であり、（ｉｉｉ）配列番号２と９０％以上同一であるアミノ酸配列を含んでなるウイルス融合タンパク質をコードする、ヌクレオチド配列を含んでなる単離核酸もまた提供される。

【００１５】

いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列は、配列番号２と９１％以上同一であるアミノ酸配列を含んでなる、タンパク質をコードする。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列は、配列番号２と９２％以上同一であるアミノ酸配列を含んでなる、タンパク質をコードする。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列は、配列番号２と９３％以上同一であるアミノ酸配列を含んでなる、タンパク質をコードする。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列は、配列番号２と９４％以上同一であるアミノ酸配列を含んでなる、タンパク質をコードする。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列は、配列番号２と９５％以上同一であるアミノ酸配列を含んでなる、タンパク質をコードする。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列は、配列番号２と９６％以上同一であるアミノ酸配列を含んでなる、タンパク質をコードする。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列は、配列番号２と９７％以上同一であるアミノ酸配列を含んでなる、タンパク質をコードする。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列は、配列番号２と９８％以上同一であるアミノ酸配列を含んでなる、タンパク質をコードする。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列は、配列番号２と９９％以上同一であるアミノ酸配列を含んでなる、タンパク質をコードする。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列は、配列番号２のアミノ酸配列を含んでなる、タンパク質をコードする。

【００１６】

いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列のＧＣ含量は約４５％以上である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列のＧＣ含量は約４６％以上である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列のＧＣ含量は約４７％以上である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列のＧＣ含量は約４８％以上である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列のＧＣ含量は約４９％以上である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列のＧＣ含量は約５０％以上である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列のＧＣ含量は約５１％以上である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列のＧＣ含量は約５２％以上である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列のＧＣ含量は約５３％以上である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列のＧＣ含量は約５４％以上である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列のＧＣ含量は約５５％以上である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列のＧＣ含量は約５６％以上である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列のＧＣ含量は約５７％以上である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列のＧＣ含量は約５８％以上である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列のＧＣ含量は約５９％以上である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列のＧＣ含量は約６０％以上である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列のＧＣ含量は約６１％以上である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列のＧＣ含量は約６２％以上である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列のＧＣ含量は約６３％以上である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列のＧＣ含量は約６４％以上である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列のＧＣ含量は約６５％以上である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列のＧＣ含量は約７０％以上である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列のＧＣ含量は約７５％以上である。いくつかの実施形態では、ＧＣ含量は約８０％以上である。いくつかの実施形態では、ＧＣ含量は約８５％以上で

ある。いくつかの実施形態では、ＧＣ含量は約９０％以上である。いくつかの実施形態では、ＧＣ含量は約９５％以上である。いくつかの実施形態では、ＧＣ含量は約９９％以上である。

【００１７】

いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列のＧＣ３含量は約７０％以上である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列のＧＣ３含量は約７５％以上である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列のＧＣ３含量は約７６％以上である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列のＧＣ３含量は約７７％以上である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列のＧＣ３含量は約７８％以上である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列のＧＣ３含量は約７９％以上である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列のＧＣ３含量は約８０％以上である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列のＧＣ３含量は約８５％以上である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列のＧＣ３含量は約９０％以上である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列のＧＣ３含量は約９５％以上である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列のＧＣ３含量は約９６％以上である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列のＧＣ３含量は約９７％以上である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列のＧＣ３含量は約９８％以上である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列のＧＣ３含量は約９９％以上である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列のＧＣ３含量は約１００％である。特定の実施形態は、配列番号１７のヌクレオチド配列を含んでなる核酸を対象とする。

【００１８】

いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列は、配列番号１と６０％以上同一である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列は、配列番号１と６１％以上同一である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列は、配列番号１と６２％以上同一である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列は、配列番号１と６３％以上同一である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列は、配列番号１と６４％以上同一である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列は、配列番号１と６５％以上同一である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列は、配列番号１と６６％以上同一である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列は、配列番号１と６７％以上同一である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列は、配列番号１と６８％以上同一である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列は、配列番号１と６９％以上同一である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列は、配列番号１と７０％以上同一である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列は、配列番号１と７１％以上同一である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列は、配列番号１と７２％以上同一である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列は、配列番号１と７３％以上同一である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列は、配列番号１と７４％以上同一である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列は、配列番号１と７５％以上同一である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列は、配列番号１と７６％以上同一である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列は、配列番号１と７７％以上同一である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列は、配列番号１と７８％以上同一である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列は、配列番号１と７９％以上同一である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列は、配列番号１と８０％以上同一である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列は、配列番号１と８５％以上同一である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列は、配列番号１と９０％以上同一である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列は、配列番号１と９５％以上同一である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列は、配列番号１と９９％以上同一である。

【００１９】

いくつかの実施形態では、核酸は、ヌクレオチド配列と機能的に結合するシス調節因子をさらに含んでなる。時折、シス調節因子は、転写後プロセッシング因子を含んでなる。時には、転写後調節因子は、ウッドチャック肝炎ウイルスに由来する。いくつかの実施形態では、核酸は発現ベクター中にある。場合によっては、核酸は、タグを含んでなるタン

パク質をコードする。
【００２０】
配列番号１２と９０％以上同一であるアミノ酸配列を含んでなる、ウイルス融合タンパク質をコードする、約５１％以上のＧＣ含量を有するヌクレオチド配列を含んでなる、単離核酸もまた提供される。
【００２１】
いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列は、配列番号１２と９１％以上同一であるアミノ酸配列を含んでなる、タンパク質をコードする。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列は、配列番号１２と９２％以上同一であるアミノ酸配列を含んでなる、タンパク質をコードする。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列は、配列番号１２と９３％以上同一であるアミノ酸配列を含んでなる、タンパク質をコードする。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列は、配列番号１２と９４％以上同一であるアミノ酸配列を含んでなる、タンパク質をコードする。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列は、配列番号１２と９５％以上同一であるアミノ酸配列を含んでなる、タンパク質をコードする。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列は、配列番号１２と９６％以上同一であるアミノ酸配列を含んでなる、タンパク質をコードする。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列は、配列番号１２と９７％以上同一であるアミノ酸配列を含んでなる、タンパク質をコードする。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列は、配列番号１２と９８％以上同一であるアミノ酸配列を含んでなる、タンパク質をコードする。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列は、配列番号１２と９９％以上同一であるアミノ酸配列を含んでなる、タンパク質をコードする。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列は、配列番号１２のアミノ酸配列を含んでなる、タンパク質をコードする。
【００２２】
いくつかの実施形態では、可溶性ウイルス融合タンパク質は、機能性膜結合領域を欠く。時には、可溶性ウイルス融合タンパク質は、配列番号９のアミノ酸４８９～５３９に相当する、Ｃ末端膜貫通領域アミノ酸を欠く。
【００２３】
いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列のＧＣ含量は約４５％以上である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列のＧＣ含量は約４６％以上である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列のＧＣ含量は約４７％以上である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列のＧＣ含量は約４８％以上である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列のＧＣ含量は約４９％以上である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列のＧＣ含量は約５０％以上である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列のＧＣ含量は約５１％以上である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列のＧＣ含量は約５２％以上である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列のＧＣ含量は約５３％以上である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列のＧＣ含量は約５４％以上である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列のＧＣ含量は約５５％以上である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列のＧＣ含量は約５６％以上である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列のＧＣ含量は約５７％以上である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列のＧＣ含量は約５８％以上である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列のＧＣ含量は約５９％以上である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列のＧＣ含量は約６０％以上である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列のＧＣ含量は約６５％以上である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列のＧＣ含量は約７０％以上である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列のＧＣ含量は約７５％以上である。いくつかの実施形態では、ＧＣ含量は約８０％以上である。いくつかの実施形態では、ＧＣ含量は約８５％以上である。いくつかの実施形態では、ＧＣ含量は約９０％以上である。いくつかの実施形態では、ＧＣ含量は約９５％以上である。いくつかの実施形態では、ＧＣ含量は約９９％以上である。
【００２４】
いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列のＧＣ３含量は約７０％以上である。いく

つかの実施形態では、ヌクレオチド配列のＧＣ３含量は約７５％以上である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列のＧＣ３含量は約７６％以上である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列のＧＣ３含量は約７７％以上である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列のＧＣ３含量は約７８％以上である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列のＧＣ３含量は約７９％以上である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列のＧＣ３含量は約８０％以上である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列のＧＣ３含量は約８５％以上である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列のＧＣ３含量は約９０％以上である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列のＧＣ３含量は約９５％以上である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列のＧＣ３含量は約９６％以上である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列のＧＣ３含量は約９７％以上である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列のＧＣ３含量は約９８％以上である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列のＧＣ３含量は約９９％以上である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列のＧＣ３含量は約１００％である。特定の実施形態は、配列番号１１のヌクレオチド配列を含んでなる核酸を対象とする。

【００２５】

いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列は、配列番号１０と６０％以上同一である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列は、配列番号１０と６１％以上同一である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列は、配列番号１０と６２％以上同一である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列は、配列番号１０と６３％以上同一である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列は、配列番号１０と６４％以上同一である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列は、配列番号１０と６５％以上同一である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列は、配列番号１０と６６％以上同一である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列は、配列番号１０と６７％以上同一である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列は、配列番号１０と６８％以上同一である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列は、配列番号１０と６９％以上同一である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列は、配列番号１０と７０％以上同一である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列は、配列番号１０と７１％以上同一である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列は、配列番号１０と７２％以上同一である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列は、配列番号１０と７３％以上同一である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列は、配列番号１０と７４％以上同一である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列は、配列番号１０と７５％以上同一である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列は、配列番号１０と７６％以上同一である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列は、配列番号１０と７７％以上同一である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列は、配列番号１０と７８％以上同一である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列は、配列番号１０と７９％以上同一である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列は、配列番号１０と８０％以上同一である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列は、配列番号１０と８５％以上同一である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列は、配列番号１０と９０％以上同一である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列は、配列番号１０と９５％以上同一である。いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列は、配列番号１０と９９％以上同一である。

【００２６】

いくつかの実施形態では、核酸は、ヌクレオチド配列と機能的に結合するシス調節因子をさらに含んでなる。時折、シス調節因子は、転写後プロセッシング因子を含んでなる。時には、転写後調節因子は、ウッドチャック肝炎ウイルスに由来する。いくつかの実施形態では、核酸は発現ベクター中にある。場合によっては、核酸は、タグを含んでなるタンパク質をコードする。

【００２７】

対応する実施形態のいずれかを含んでなる、上の核酸のいずれかを含んでなる、細胞もまた提供される。時に細胞は、細胞ＤＮＡに組み込まれるヌクレオチド配列を含んでなる

。時に細胞は、可溶性ウイルス融合タンパク質を分泌する。時にウイルス融合タンパク質は、細胞中に保持される。時にウイルス融合タンパク質は、細胞膜内に保持される。場合によっては、細胞は、１ミリリットルの細胞あたり少なくとも１マイクログラムのタンパク質を発現する。場合によっては、細胞は、１ミリリットルの細胞あたり少なくとも２マイクログラムのタンパク質を発現する。場合によっては、細胞は、１ミリリットルの細胞あたり少なくとも３マイクログラムのタンパク質を発現する。場合によっては、細胞は、１ミリリットルの細胞あたり少なくとも４マイクログラムのタンパク質を発現する。場合によっては、細胞は、１ミリリットルの細胞あたり少なくとも５マイクログラムのタンパク質を発現する。場合によっては、細胞は、１ミリリットルの細胞あたり少なくとも６マイクログラムのタンパク質を発現する。場合によっては、細胞は、１ミリリットルの細胞あたり少なくとも７マイクログラムのタンパク質を発現する。場合によっては、細胞は、１ミリリットルの細胞あたり少なくとも８マイクログラムのタンパク質を発現する。場合によっては、細胞は、１ミリリットルの細胞あたり少なくとも９マイクログラムのタンパク質を発現する。場合によっては、細胞は、１ミリリットルの細胞あたり少なくとも１０マイクログラムのタンパク質を発現する。場合によっては、細胞は、１ミリリットルの細胞あたり少なくとも１００マイクログラムのタンパク質を発現する。場合によっては、細胞は、１ミリリットルの細胞あたり少なくとも２００マイクログラムのタンパク質を発現する。場合によっては、細胞は、１ミリリットルの細胞あたり少なくとも３００マイクログラムのタンパク質を発現する。場合によっては、細胞は、１ミリリットルの細胞あたり少なくとも４００マイクログラムのタンパク質を発現する。場合によっては、細胞は、１ミリリットルの細胞あたり少なくとも５００マイクログラムのタンパク質を発現する。場合によっては、細胞は、１ミリリットルの細胞あたり少なくとも６００マイクログラムのタンパク質を発現する。場合によっては、細胞は、１ミリリットルの細胞あたり少なくとも７００マイクログラムのタンパク質を発現する。場合によっては、細胞は、１ミリリットルの細胞あたり少なくとも８００マイクログラムのタンパク質を発現する。場合によっては、細胞は、１ミリリットルの細胞あたり少なくとも９００マイクログラムのタンパク質を発現する。場合によっては、細胞は、１ミリリットルの細胞あたり少なくとも１ミリグラムのタンパク質を発現する。場合によっては、細胞は、１ミリリットルの細胞あたり約１．３ミリグラム以上のタンパク質を発現する。場合によっては、細胞は、１ミリリットルの細胞あたり約１．６ミリグラム以上のタンパク質を発現する。場合によっては、細胞は、１ミリリットルの細胞あたり少なくとも２ミリグラムのタンパク質を発現する。

【００２８】

場合によっては、細胞は哺乳類細胞である。時には、細胞は非接着細胞である。時に細胞は、ＣＨＯ細胞またはＣＨＯ由来細胞である。時に細胞は、ＣＡＴ－Ｓ細胞である。時に細胞は、ＣＨＯ－Ｓ細胞である。場合によっては、細胞はＶｅｒｏ細胞である。場合によっては、細胞はＭＲＣ－５細胞である。場合によっては、細胞はＢＳＲ－Ｔ７細胞である。

【００２９】

場合によっては、細胞は、核内のウイルス融合タンパク質をコードする核酸を合成する。

【００３０】

特定の実施形態では、その下でタンパク質が生成される条件に、上で提供されるヌクレオチド配列およびそれらの対応する実施形態のいずれかを含んでなる複数の細胞を接触させるステップを含んでなる、可溶性ウイルス融合タンパク質を発現させる方法もまた提供される。方法のいくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列は細胞の発現ベクター中にある。時にヌクレオチド配列は、細胞の細胞ＤＮＡ中にある。

【００３１】

方法のいくつかの実施形態では、細胞は哺乳類細胞である。特定の実施形態では、細胞は非接着細胞である。時に細胞は、ＣＨＯ細胞またはＣＨＯ由来細胞である。時に細胞は、ＣＡＴ－Ｓ細胞である。時に細胞は、ＣＨＯ－Ｓ細胞である。場合によっては、細胞は

Ｖｅｒｏ細胞である。場合によっては、細胞はＭＲＣ－５細胞である。場合によっては、細胞はＢＳＲ－Ｔ７細胞である。

【００３２】

方法のいくつかの実施形態では、細胞はタンパク質を分泌する。方法のいくつかの実施形態では、タンパク質は細胞中に保持される。方法のいくつかの実施形態では、タンパク質は細胞膜内に保持される。場合によっては、細胞は、１ミリリットルの細胞あたり少なくとも１マイクログラムのタンパク質を発現する。場合によっては、細胞は、１ミリリットルの細胞あたり少なくとも２マイクログラムのタンパク質を発現する。場合によっては、細胞は、１ミリリットルの細胞あたり少なくとも３マイクログラムのタンパク質を発現する。場合によっては、細胞は、１ミリリットルの細胞あたり少なくとも４マイクログラムのタンパク質を発現する。場合によっては、細胞は、１ミリリットルの細胞あたり少なくとも５マイクログラムのタンパク質を発現する。場合によっては、細胞は、１ミリリットルの細胞あたり少なくとも６マイクログラムのタンパク質を発現する。場合によっては、細胞は、１ミリリットルの細胞あたり少なくとも７マイクログラムのタンパク質を発現する。場合によっては、細胞は、１ミリリットルの細胞あたり少なくとも８マイクログラムのタンパク質を発現する。場合によっては、細胞は、１ミリリットルの細胞あたり少なくとも９マイクログラムのタンパク質を発現する。場合によっては、細胞は、１ミリリットルの細胞あたり少なくとも１０マイクログラムのタンパク質を発現する。場合によっては、細胞は、１ミリリットルの細胞あたり少なくとも１００マイクログラムのタンパク質を発現する。場合によっては、細胞は、１ミリリットルの細胞あたり少なくとも２００マイクログラムのタンパク質を発現する。場合によっては、細胞は、１ミリリットルの細胞あたり少なくとも３００マイクログラムのタンパク質を発現する。場合によっては、細胞は、１ミリリットルの細胞あたり少なくとも４００マイクログラムのタンパク質を発現する。場合によっては、細胞は、１ミリリットルの細胞あたり少なくとも５００マイクログラムのタンパク質を発現する。場合によっては、細胞は、１ミリリットルの細胞あたり少なくとも６００マイクログラムのタンパク質を発現する。場合によっては、細胞は、１ミリリットルの細胞あたり少なくとも７００マイクログラムのタンパク質を発現する。場合によっては、細胞は、１ミリリットルの細胞あたり少なくとも８００マイクログラムのタンパク質を発現する。場合によっては、細胞は、１ミリリットルの細胞あたり少なくとも９００マイクログラムのタンパク質を発現する。場合によっては、細胞は、１ミリリットルの細胞あたり少なくとも１ミリグラムのタンパク質を発現する。場合によっては、細胞は、１ミリリットルの細胞あたり少なくとも１．３ミリグラムのタンパク質を発現する。場合によっては、細胞は、１ミリリットルの細胞あたり約１．６ミリグラム以上のタンパク質を発現する。場合によっては、細胞は、１ミリリットルの細胞あたり約２ミリグラム以上のタンパク質を発現する。

【００３３】

方法のいくつかの実施形態では、タンパク質は５日間以上にわたり生成される。方法のいくつかの実施形態では、タンパク質は６日間以上にわたり生成される。方法のいくつかの実施形態では、タンパク質は７日間以上にわたり生成される。方法のいくつかの実施形態では、タンパク質は８日間以上にわたり生成される。方法のいくつかの実施形態では、タンパク質は１０日間以上にわたり生成される。

【００３４】

方法のいくつかの実施形態では、細胞は、畜産物を含まない培養条件下で培養される。方法は、時に、細胞によって生成されるタンパク質量を測定するステップをさらに含んでなる。場合によっては、方法は、タンパク質を単離するステップをさらに含んでなる。

【００３５】

方法のいくつかの実施形態では、細胞は、核内のウイルス融合タンパク質をコードする核酸を合成する。核酸は、時に細胞核内に導入される。特定の実施形態では、核酸は、核形質移入によって細胞核内に導入される。

【００３６】

以下の説明、実施例、特許請求の範囲、および図面において、特定の実施形態をさらに詳しく説明する。

【００３７】

図面は本技術の実施形態を例証し、制限は意図されない。例証の明確さと容易さのために、図面は原寸に比例せず、場合によっては、様々な側面を誇張または拡大して示し、特定の実施形態の理解を促進することもある。

【図面の簡単な説明】

【００３８】

【図１Ａ】組換えＲＳＶ－Ｆタンパク質発現カセットの概略図を示す。

【図１Ｂ】コンストラクトF_{A2}、F_{OPT}、およびF_{GC}について、ＲＳＶ－Ｆタンパク質のＧＣ含量の比較を提供する。

【図２】ｐＣＬＤ５５０ｖ４合成ＭＣＳ－ＳＶ４０ｐＡ発現ベクターの例証を提供する。

【図３】ＦｓｅｌおよびＳｂｆｌ制限酵素認識部位にクローンされた可溶性ＧＣ３コンストラクトがある、ｐＣＬＤ５５０ｖ４合成ＭＣＳ－ＳＶ４０ｐＡ発現ベクターの例証を提供する。

【図４】組換えＲＳＶ－Ｆタンパク質の発現が、ＧＣ存在量の増大によって改善されることを示す。ｐＣＭＶｓｃｒｉｐｔ　ＲＳＶ－Ｆタンパク質発現ベクターによる形質移入の３６時間後のＢＳＲ－Ｔ７、ＭＲＣ－５、およびＶｅｒｏ細胞系に由来する溶解産物の三連のＲＳＶ－Ｆタンパク質について、ウエスタンブロットを提示する。各細胞型について、F_{A2}（野生型）、F_{opt}（コドン最適化）、およびF_{GC}（ＧＣ富化）コンストラクトを試験した。タンパク質負荷は、βアクチンについて正規化した。

【図５】野生型（Ｆ）、コドン最適化（F_{opt}）、およびＧＣ富化（F_{xgc}）配列で形質移入された、細胞系のＲＳＶ－Ｆの発現を示す。同一ＲＳＶ－Ｆタンパク質をコードする３つのヌクレオチドのバージョンをｐＣＭＶｓｃｒｉｐｔ発現ベクター中で構築し、ＢＳＲＴ７、ＭＲＣ－５、およびＶｅｒｏ細胞に形質移入した。野生型配列で形質移入された細胞のいずれにおいてもＲＳＶ－Ｆ（４８ｋＤａ）のレベルが検出されなかった一方で、ＭＲＣ－５およびＢＳＲＴ７細胞中では、コドン最適化配列について、それぞれ低から中程度のレベルでタンパク質が発現された。ＲＳＶ－Ｆタンパク質レベルは、ＧＣ富化配列で形質移入された場合に、全ての細胞系内で最大であった。

【図６】組換えＲＳＶ－Ｆタンパク質の発現が、ＧＣ存在量の増大によって改善され、ＷＰＲＥの存在によって向上することを示す。ｐＥＢＮＡＲＳＶ－Ｆタンパク質発現ベクターで形質移入された２９３Ｆ細胞由来溶解産物のＲＳＶ－Ｆタンパク質について、ウエスタンブロットを提示する。溶解産物を最初に希釈し、βアクチンを基準にしてタンパク質負荷について正規化した。次にブロット上部に記載されるように、比較を容易にするため、装入に先だってこれらの正規化溶解産物をさらに希釈し、より高レベルのＲＳＶ－Ｆタンパク質を有する溶解産物（F_{opt}、$F_{opt-WPRE}$、F_{GC}、および$F_{GC-WPRE}$）は、より低いＲＳＶ－Ｆタンパク質を有するもの（F_{Long}、$F_{Long-WPRE}$、F_{A2}、および$F_{A2-WPRE}$）よりさらに１０倍希釈した。感染ＨＥｐ－２細胞からの溶解産物に、同一様式で実施されたウエスタンブロットを比較のために含める。星印は、４８ｋＤａで観察された薄いバンドを標識するために使用される。ウエスタンブロットは、各実験の少なくとも３つの複製を代表する。

【図７Ａ】ＧＣ存在量の増大が、組換えｂ／ｈＰＩＶ３細胞質発現ベクターからの組換えＲＳＶ－Ｆタンパク質の発現を改善しないことを示す。図７Ａは、ｂ／ｈＰＩＶ３＋ＲＳＶ－Ｆ発現ベクターの概略図を提供する。図７Ｂは、０．１のＭＯＩで感染させて、感染４８時間後に収集されたｂ／ｈＰＩＶ３－ＲＳＶ－Ｆ組換えウイルス感染Ｖｅｒｏ細胞からの溶解産物のＲＳＶ－Ｆタンパク質のウエスタンブロットを示す。タンパク質負荷は、ＰＩＶ３ＨＮ遺伝子発現について正規化した。ウエスタンブロットは、各実験の少なくとも３つの複製に相当する。

【図７Ｂ】ＧＣ存在量の増大が、組換えｂ／ｈＰＩＶ３細胞質発現ベクターからの組換えＲＳＶ－Ｆタンパク質の発現を改善しないことを示す。図７Ａは、ｂ／ｈＰＩＶ３＋ＲＳ

Ｖ－Ｆ発現ベクターの概略図を提供する。図７Ｂは、０．１のＭＯＩで感染させて、感染４８時間後に収集されたｂ／ｈＰＩＶ３－ＲＳＶ－Ｆ組換えウイルス感染Ｖｅｒｏ細胞からの溶解産物のＲＳＶ－Ｆタンパク質のウエスタンブロットを示す。タンパク質負荷は、ＰＩＶ３ＨＮ遺伝子発現について正規化した。ウエスタンブロットは、各実験の少なくとも３つの複製に相当する。

【図８Ａ】組換えＲＳＶ－Ｆタンパク質発現中に起きる、早期ポリアデニル化を示す。図８Ａは、各ＲＳＶ－Ｆタンパク質配列に見られる、ポリアデニル化シグナル配列の概要を提供する。図８Ｂは、ｐＥＢＮＡ　ＲＳＶ－Ｆタンパク質発現ベクターで形質移入された２９３Ｆ細胞から精製されたＲＮＡについて実施された、３’ＲＡＣＥ　ＲＴ－ＰＣＲの１％アガロースゲル分析を示す。比較を容易にするために、２マイクロリットルの野生型ｃＤＮＡをＰＣＲで使用した一方、０．５マイクロリットルのF_{opt}およびF_{GC}ｃＤＮＡをＰＣＲで使用した。ＲＴステップなしの対照は、ゲルの下半分に含まれる。完全長転写物は示されるように、およそ１，７００ヌクレオチドの長さであるべきである。

【図８Ｂ】組換えＲＳＶ－Ｆタンパク質発現中に起きる、早期ポリアデニル化を示す。図８Ａは、各ＲＳＶ－Ｆタンパク質配列に見られる、ポリアデニル化シグナル配列の概要を提供する。図８Ｂは、ｐＥＢＮＡ　ＲＳＶ－Ｆタンパク質発現ベクターで形質移入された２９３Ｆ細胞から精製されたＲＮＡについて実施された、３’ＲＡＣＥ　ＲＴ－ＰＣＲの１％アガロースゲル分析を示す。比較を容易にするために、２マイクロリットルの野生型ｃＤＮＡをＰＣＲで使用した一方、０．５マイクロリットルのF_{opt}およびF_{GC}ｃＤＮＡをＰＣＲで使用した。ＲＴステップなしの対照は、ゲルの下半分に含まれる。完全長転写物は示されるように、およそ１，７００ヌクレオチドの長さであるべきである。

【図９】形質移入時のシンシチウム形成の増大と相関する、ＲＳＶ－Ｆタンパク質発現の増大を示す。ｐＥＢＮＡ　ＲＳＶ－Ｆタンパク質発現ベクターによる、形質移入の２４時間後の２９３Ａｄ細胞の顕微鏡画像。緑色蛍光タンパク質（ｇｆｐ）をコードするｐＥＢＮＡベクターを含めて、形質移入効率を近似した。画像は、各実験の少なくとも３つの複製に相当する。

【図１０】ｓＲＳＶ－ＦコンストラクトのＣＡＴ－Ｓ試験を示す。ＣＡＴ－Ｓ形質移入体上清のウエスタンブロットを提示する。上清を１ｍＬの各細胞集団あたり2×10^{6}個の生存細胞に、正規化した。タンパク質は示されるように、モタビズマブまたはヤギ抗ＲＳＶのいずれかによって視覚化した。番号付けされた各ウェルに、以下のサンプルを装入した。１．野生型；２．コドン最適化；３．ＧＣ富化；４．ＨＬ２（中程度のＧＣ３）；５．ＧＨ５；６．ｇｆｐ。

【図１１】ｓＲＳＶ－ＦコンストラクトのＣＡＴ－Ｓ試験を示す。１／１０，０００希釈のモタビズマブ、および１／１０００希釈の抗ヒトＨＲＰ、またはヤギ抗ＲＳＶによる、１２％還元ＳＤＳ－ＰＡＧＥウエスタンブロットを提示する。上清を１ｍＬの各細胞集団あたり2×10^{6}個の生存細胞に、正規化した。タンパク質は示されるように、モタビズマブまたはヤギ抗ＲＳＶのいずれかによって視覚化された。番号付けされた各ウェルに、以下のサンプルを装入した。１．ＭＡＧＩＣ　ＭＡＲＫ；２．ＳＥＥＢＬＵＥ　ＰＬＵＳ；３．野生型；４．コドン最適化；５．ＧＣ富化；６．ＨＬ２（中程度のＧＣ３）；７．ＧＨ５；８．ｇｆｐ。３つの異なる露出のブロットを提示する。

【図１２】ｓＲＳＶ－ＦコンストラクトのＣＨＯ－Ｓ試験を示す。ＣＨＯ－Ｓ形質移入体のウエスタンブロットを提示する。上清を１ｍＬの各細胞集団あたり2×10^{6}個の生存細胞に、正規化した。タンパク質は示されるように、モタビズマブまたはヤギ抗ＲＳＶのいずれかによって視覚化された。番号付けされた各ウェルに、以下のサンプルを装入した。１．野生型；２．コドン最適化；３．ＧＣ富化；４．ＨＬ２（中程度のＧＣ３）；５．ＧＨ５；６．ｇｆｐ；７．ｓＲＳＶ－Ｆクローン１０（対照として使用されるＣＡＴ－Ｓ生成ｓＲＳＶ－Ｆタンパク質）。

【図１３】ｓＲＳＶ－ＦコンストラクトのＣＨＯ－Ｓ試験を示す。ＣＨＯ－Ｓ形質移入体のウエスタンブロットを提示する。タンパク質は、モタビズマブによって視覚化された。番号付けされた各ウェルに、以下のサンプルを装入した。１．ＭＡＧＩＣ　ＭＡＲＫ；２

．ＳＥＥＢＬＵＥ　ＰＬＵＳ２；３．野生型；４．コドン最適化；５．ＧＣ富化；６．ＨＬ２（中程度のＧＣ３）；７．ＧＨ５；８．ｇｆｐ；９．ｓＲＳＶ－Ｆクローン１０（対照として使用されるＣＡＴ－Ｓ生成ｓＲＳＶ－Ｆタンパク質）。露出２分間、５分間、および１０分間のブロットを提示する。

【図１４】ＥＬＩＳＡによるＣＡＴ－ＳおよびＣＨＯ－Ｓ細胞からのｓＲＳＶ－Ｆ生成レベルを示す。各形質移入体上清について、ｓＲＳＶ－Ｆタンパク質のＥＬＩＳＡ力価を示す。上清を１ｍＬの各細胞集団あたり２×１０^{6}個の生存細胞に正規化し、ｓＲＳＶ－Ｆ定量化について定量的ＥＬＩＳＡによって分析した。

【図１５】ＣＡＴ－Ｓ（左）およびＣＨＯ－Ｓ（右）細胞中のｓＲＳＶ－Ｆ発現のＦＡＣＳ分析を示す。各形質移入体について、様々なレベルのｓＲＳＶ－Ｆタンパク質を呈示する細胞数を提示する。

【図１６Ａ】ＣＡＴ－Ｓ細胞中のｓＲＳＶ－Ｆ発現のＦＡＣＳ分析を提示する。各形質移入体について、平均蛍光強度が提供される。ＣＡＴ－Ｓ細胞の平均蛍光強度の規模は、１５０～７５０である。

【図１６Ｂ】ＣＨＯ－Ｓ細胞中のｓＲＳＶ－Ｆ発現のＦＡＣＳ分析を提示する。各形質移入体について、平均蛍光強度が提供される。ＣＨＯ－Ｓ細胞の平均蛍光強度の規模は、０～３００である。

【図１７】ＣＡＴ－ＳおよびＣＨＯ－Ｓ細胞中のｓＲＳＶ－Ｆ発現のＦＡＣＳ分析を提示する。各細胞型の蛍光強度の並列比較を提供するために、図１６Ａおよび図１６Ｂに提示されるグラフのデータを図１７にマージした。

【図１８】定量的ＥＬＩＳＡによる、ＣＡＴ－Ｓ親クローン中のｓＲＳＶ－Ｆタンパク質レベルの測定を示す。定量的サンドイッチＥＬＩＳＡを使用して、組換えタンパク質の発現について、可変形態のｓＲＳＶ－Ｆヌクレオチド配列で形質移入された、最初の９６ウェルプレートＣＡＴ－Ｓコロニーからの培養液をスクリーニングした。最初のスクリーニングは、最高レベルのｓＲＳＶ－Ｆが、ＧＣ富化コード配列を含有する細胞によって生成されたことを示し、それはコドン最適化または野生型配列のいずれかによって示されたよりも概して１０倍超高かった。

【図１９】最高値のＣＡＴ－Ｓ（ＧＣ富化）親クローンによる、ｓＲＳＶ－Ｆ生成を示す。定量的サンドイッチＥＬＩＳＡを使用して、組換えｓＲＳＶ－Ｆタンパク質発現について、最高値の４つのＣＡＴ－Ｓ親クローンの最初の振盪フラスコ過成長培養からの培養液をスクリーニングした。結果は、これらの細胞によって、最高９０マイクログラム／ｍＬのｓＲＳＶ－Ｆのピーク生成が生じ得ることを示し、それは以前達成されたよりも少なくとも６倍高い。

【図２０】最高値のＣＡＴ－Ｓ（ＧＣ富化）親クローンの抗ＲＳＶ－Ｆウエスタンブロット分析を示す。ＳＤＳ－ＰＡＧＥによって、非還元および還元条件下で、最高値の４つのＣＡＴ－Ｓ親クローンの最初の振盪フラスコ過成長培養からの培養液を分析し、ヤギ抗ＲＳＶポリクローナル抗体で検出した。ｓＲＳＶ－Ｆのレベルは、振盪フラスコ培養過程において劇的に増大し、タンパク質の高分子量凝集体は、非還元条件下で明白であった。

【図２１】ｈＰＩＶ３－ＦコンストラクトのＣＡＴ－Ｓ試験を示す。ＣＡＴ－Ｓ形質移入体溶解産物のウエスタンブロットを提示する。同一形質移入混合物からの細胞を接種した３個の独立したウェルから、溶解産物が生成された。タンパク質は示されるように、ポリクローナル抗ＰＩＶ３、抗ＨＩＳ、または抗Ｃ末端ＨＩＳによって視覚化された。

【図２２】遺伝コードの表を提示する。表は、本明細書で参照によって援用する、ｈｔｔｐアドレスｗｗｗ．ｍｕｎ．ｃａ／ｂｉｏｌｏｇｙ／ｓｃａｒｒ／ＭＧＡ２＿０３－２０．ｈｔｍｌから修正された。

【図２３】定量的ＥＬＩＳＡによって測定された、ＣＡＴ－Ｓ親クローンのｓＲＳＶ－Ｆタンパク質レベルを示す。スケールアップ工程において、変動形態のｓＲＳＶ－Ｆヌクレオチド配列で形質移入されたＣＡＴ－Ｓクローンからの培養液を定量的ＥＬＩＳＡによりスクリーニングした。灰色で強調表示されたクローンは、さらなる増殖のために選択されなかった。反復スクリーニングは、最高レベルのｓＲＳＶ－Ｆが、ＧＣ富化コード配列を

含有する細胞によって生成されたことを示し、それはコドン最適化クローンによって示されたのよりも概して１０倍超高かった。

【発明を実施するための形態】

【００３９】

本明細書で提供されるのは、組換え的に発現されたウイルス融合タンパク質、それらをコードする核酸、このような核酸のヌクレオチド配列を含有する細胞、そしてこのような細胞から融合タンパク質を生成する方法である。発現された組換えウイルス融合タンパク質は、ウイルス融合タンパク質の構造研究と、それらの膜融合活性の研究のために使用し得る。ウイルス融合タンパク質は、特定のウイルス表面に見られることが多い糖タンパク質であり、したがって免疫監視が容易にアクセスできるので、これらのタンパク質は、中和抗体の標的としての役割を果たし得る。ウイルス融合タンパク質は、ウイルス表面に見られるその他の糖タンパク質よりも変動性に劣ることが多く、ウイルス融合タンパク質の発現は、これらの糖タンパク質を発現する特定ウイルスに対するワクチンの開発に有用たり得る。前述の用途は、本明細書に記載される組成物および方法によって提供される、特定のウイルス融合タンパク質の適切な発現レベルに依存し得る。

【００４０】

ウイルス融合糖タンパク質

ウイルス融合糖タンパク質は、ウイルス感染において、膜融合誘導を介して、宿主細胞へのウイルス侵入を媒介する。本明細書で提供されるのは、組換え的に発現されるウイルス融合タンパク質である。本明細書の用法では、「ウイルス融合タンパク質」は、天然ウイルス融合タンパク質、組換えウイルス融合タンパク質、合成的に生成されるウイルス融合タンパク質、および細胞から抽出されるウイルス融合タンパク質をはじめとするが、これに限定されるものではない、あらゆるウイルス融合タンパク質を指す。本明細書の用法では、「天然ウイルス融合タンパク質」は、自然界に存在する、天然ウイルス遺伝子またはウイルスＲＮＡによってコードされる、ウイルス融合タンパク質を指す。本明細書の用法では、「組換えウイルス融合タンパク質」という用語は、改変ヌクレオチド配列に由来して、生体外および／または生体内発現系で生成される、ウイルス融合タンパク質を指す。ウイルス融合タンパク質に対して同義的に使用される代案の名称としては、「ウイルス融合糖タンパク質」および「Ｆタンパク質」が挙げられる。ウイルス融合タンパク質としては、ヒトおよび非ヒト分類のウイルス株をはじめとするが、これに限定されるものではない、異なるウイルスおよびウイルス系からの関連タンパク質が挙げられる。ウイルス融合タンパク質は、アミノ酸配列、タンパク質構造、および／または機能によって関連し得る。ウイルス融合タンパク質としては、Ｉ型およびＩＩ型ウイルス融合タンパク質に割り当てられた構成員をはじめとするが、これに限定されるものではない、ウイルス融合タンパク質の全クラスに割り当てられた構成員が挙げられる。

【００４１】

ウイルス融合タンパク質としては、シグナルペプチドありまたはなしの前駆型（F_0）タンパク質、およびＦ１およびＦ２サブユニットを含む活性化および／または成熟断片が挙げられる。本明細書の用法では、「成熟」および「活性化」という用語は、宿主プロテアーゼによって、前駆型タンパク質から成熟融合タンパク質に変換されたウイルス融合タンパク質を指す。典型的に活性化ウイルス融合タンパク質は、特定の種類のウイルスにおいて、それぞれＦ１およびＦ２と称される、膜固定型および膜遠位サブユニットから構成される。活性Ｆ１およびＦ２サブユニットは、ジスルフィド結合を介して共に結合されることが多い。ウイルス融合タンパク質は、例えば、モノマー、二量体、三量体または六量体などのあらゆる三次構造であり得る。

【００４２】

組換えウイルス融合タンパク質はあらゆる長さであり得て、ウイルス融合タンパク質が、天然完全長成熟ウイルス融合タンパク質対応物に典型的な少なくとも１つの機能特性および／または抗原特性を保持するという条件で、あらゆる修飾、融合、変異、置換、アミノ酸変化、欠失、挿入または付加を含み得る。例えば組換えウイルス融合タンパク質は、

ウイルス融合タンパク質が、天然完全長成熟ウイルス融合タンパク質対応物に典型的な少なくとも１つの機能特性および／または抗原特性を保持するという条件で、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０個以上のアミノ酸修飾を有し得る。例えばウイルス融合タンパク質の機能特性は、膜融合を誘発する能力である。機能特性は、天然完全長成熟ウイルス融合タンパク質対応物によって呈示されるのと同一のレベル、または活性でなくてもよい。いくつかの実施形態では、組換えウイルス融合タンパク質は、天然完全長成熟ウイルス融合タンパク質対応物の少なくとも約２０％の機能特性活性を保持する（例えば対応物の約２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％の機能特性活性）。

【００４３】

組換えウイルス融合タンパク質活性は、当該技術分野で公知の融合タンパク質機能アッセイのいずれかによって評価され得る。例えばウイルス融合タンパク質を発現する細胞は、例えば本明細書の実施例２に記載される細胞融合アッセイなど、細胞と細胞の融合および／またはシンシチウム形成の顕微鏡検査によってモニターし得る。その他の膜融合アッセイとしては、例えば蛍光／消光系を伴うアッセイ、または別個の小胞内に存在する相乗的蛍光成分を用いるアッセイが挙げられ、その結果、膜融合は検出可能なシグナルを生じる。このようなアッセイは市販され、例えばＡＮＴＳ／ＤＰＸによる蛍光消光アッセイ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）、およびＴｂ３＋／ＤＰＡによる蛍光促進アッセイ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）が挙げられる。

【００４４】

ＡＮＴＳ／ＤＰＸ蛍光消光アッセイを使用して、ウイルス融合タンパク質による、膜融合活性を判定し得る。このアッセイは、カチオン性失活剤ＤＰＸによる、ポリアニオン系フルオロフォアＡＮＴＳの衝突消光に基づく。片方または双方がウイルス融合タンパク質を発現する、別個の小胞集団に、それぞれＡＮＴＳまたはＤＰＸを装入する。小胞融合は、ＡＮＴＳ蛍光の消光をもたらす。このタイプのアッセイで用い得るその他の蛍光／失活剤ペアとしては、ＨＰＴＳ／ＤＰＸ、ピレンテトラスルホン酸／ＤＰＸ、ＡＮＴＳ／タリウム（ＴＩ＋）、ＡＮＴＳ／セシウム（Ｃｓ＋）、ピラニン（ＨＰＴＳ、Ｈ３４８）／タリウム（ＴＩ＋）、ピラニン（ＨＰＴＳ、Ｈ３４８）／セシウム（Ｃｓ＋）、ピレンテトラスルホン酸（Ｐ３４９）／タリウム（ＴＩ＋）、およびピレンテトラスルホン酸（Ｐ３４９）／セシウム（Ｃｓ＋）が挙げられるが、これに限定されるものではない。

【００４５】

Ｔｂ３＋／ジピコリン酸（ＤＰＡ）アッセイもまた、ウイルス融合タンパク質による膜融合活性を判定するのに使用し得る。Ｔｂ３＋／ＤＰＡアッセイでは、ウイルス融合タンパク質を発現する別個の小胞集団に、$TbCl_3$またはＤＰＡを装入する。小胞融合は、遊離Ｔｂ３＋よりもおよそ１０，０００倍蛍光性が高い、Ｔｂ３＋／ＤＰＡキレートの形成をもたらす。

【００４６】

組換えウイルス融合タンパク質は、化学修飾、または翻訳後修飾などによってさらに修飾し得る。このような修飾としては、ＰＥＧ化、アルブミン化、グリコシル化、ファルネシル化（ｆａｒｎｙｓｙｌａｔｉｏｎ）、カルボキシル化、ヒドロキシル化、ＨＥＳ化（ｈａｓｙｌａｔｉｏｎ）、カルバミル化、硫酸化、リン酸化、および当該技術分野で公知のその他のポリペプチド修飾が挙げられるが、これに限定されるものではない。本明細書で提供されるウイルス融合タンパク質は、１つまたは複数のアミノ酸の欠失、付加、または置換による一次アミノ酸配列の修飾によって、さらに修飾され得る。組換えウイルス融合タンパク質は、例えば翻訳後のグリコシル化によって修飾され得る。組換えウイルス融合タンパク質は、完全にグリコシル化され、部分的にグリコシル化され、脱グリコシル化され得て、またはグリコシル化されない。いくつかの実施形態では、組換えウイルス融合タンパク質（例えばＲＳＶ－Ｆ融合タンパク質、可溶性ＲＳＶ－Ｆ融合タンパク質、可溶性ｈＰＩＶ－３融合タンパク質）は、天然対応物タンパク質のグリコシル化プロファイル

と同様の、実質的に同一の、または同一のグリコシル化プロファイルを有し得る。（例えばＲｉｘｏｎ ｅｔ ａｌ．，２００２ Ｊ．Ｇｅｎ．Ｖｉｒｏｌ．８３：６１－６６）。本明細書の用法では「グリコシル化プロファイル」という用語は、グリコシル化されたタンパク質上のアミノ酸部位と、各部位のグリコシル化部分または部分群のタイプに言及する。本明細書の用法では、「グリコシル化部位」とは、それに炭水化物部分が付着し得る、ポリペプチド中のアミノ位置を指す。典型的にグリコシル化タンパク質は、１つまたは複数の炭水化物部分に付着し得る、アスパラギンまたはセリンなどの１つまたは複数のアミノ酸残基を含有する。本明細書の用法では、「天然グリコシル化部位」とは、自然界における天然ポリペプチドの生成時に、天然ポリペプチド中で炭水化物部分に付着するアミノ酸位置を指す。本明細書の用法では、「完全グリコシル化」組換えウイルス融合タンパク質は、ポリペプチド中の全ての天然グリコシル化部位でグリコシル化されたポリペプチドである。本明細書の用法では、「脱グリコシル化」組換えウイルス融合タンパク質は、例えば変異によって最大で全て除去されていることによりグリコシル化部位が少数であり、ポリペプチドに付着する炭水化物部分がより少ないので、天然グリコシル化ウイルス融合タンパク質と比較して、グリコシル化が低下している。脱グリコシル化ウイルス融合タンパク質にはまた、化学的または酵素的切断によって、１つまたは複数の炭水化物部分が除去され、または部分的に除去されたポリペプチドが含まれる。本明細書の用法では、「非グリコシル化」組換えウイルス融合タンパク質は、グリコシル化されていない（すなわちタンパク質中のグリコシル化部位に付着する炭水化物部分を含有しない）ポリペプチドである。非グリコシル化ポリペプチドは、ポリペプチドをグリコシル化しない宿主（例えば原核生物宿主）によって、全てのグリコシル化部位の除去（例えばグリコシル化部位アミノ酸の変異）によって、またはグリコシル化タンパク質からのグリコシル化部分除去によって、生成され得る。

【００４７】

組換えウイルス融合糖タンパク質としては、Ｎ－グリコシド結合（例えばＧｌｃＮＡｃ－β－Ａｓｎ、Ｇｌｃ－β－Ａｓｎ、Ｒｈａ－Ａｓｎ、およびＧｌｃ－β－Ａｒｇ結合）；Ｏ－グリコシド結合（例えばＳｅｒ、Ｔｈｒ、Ｔｙｒ、Ｈｙｐ［ヒドロキシプロリン］、およびＨｙｌ［ヒドロキシリジン］との結合；ＧａｌＮＡｃ－Ｓｅｒ／Ｔｈｒ、ＧａｌＮＡｃ－β－Ｓｅｒ／Ｔｈｒ、Ｇａｌ－Ｓｅｒ／Ｔｈｒ、Ｍａｎ－Ｓｅｒ／Ｔｈｒ、Ｆｕｃ－Ｓｅｒ／Ｔｈｒ、Ｇｌｃ－β－Ｓｅｒ、Ｐｓｅ－Ｓｅｒ／Ｔｈｒ、ＤｉＡｃトリデオキシヘキソース－Ｓｅｒ／Ｔｈｒ、ＦｕｃＮＡｃ－β－Ｓｅｒ／Ｔｈｒ、Ｘｙｌ－β－Ｓｅｒ、Ｇｌｃ－Ｔｈｒ、ＧｌｃＮＡｃ－Ｔｈｒ、Ｇａｌ－β－Ｈｙｌ、Ｇａｌ－Ｈｙｐ、Ｇａｌ－β－Ｈｙｐ、Ａｒａ－ＨｙｐＡｒａ－β－Ｈｙｐ、ＧｌｃＮＡｃ－Ｈｙｐ、Ｇｌｃ－Ｔｙｒ、およびＧｌｃ－β－Ｔｙｒ結合）；Ｃ－マンノシル結合（例えばＣ－Ｃ結合を通じたＴｒｐのＣ－２とのマンノシル結合）；ホスホグリコシル結合（例えばリン酸ジエステル結合を介した糖（例えばＧｌｃＮＡｃ、Ｍａｎ、Ｘｙｌ、およびＦｕｃ）のタンパク質への付着；ＧｌｃＮＡｃ－１－Ｐ－Ｓｅｒ、Ｍａｎ－１－Ｐ－Ｓｅｒ、Ｘｙｌ－１－Ｐ－Ｓｅｒ、Ｆｕｃ－β－１－Ｐ－Ｓｅｒ結合）；およびＧＰＩ結合（例えばＭａｎがホスホエタノールアミンと結合し、それは次にタンパク質の末端カルボキシル基に付着する）をはじめとするが、これに限定されるものではない、当該技術分野で公知の複数のグリコシド結合のいずれかが挙げられる。グリコシル化の程度は、当該技術分野で公知の方法を使用して評価し得る。（例えばＳｐｉｒｏ，Ｇｌｙｃｏｂｉｏｌｏｇｙ １２：４３Ｒ－５６Ｒ（２００２））。

【００４８】

組換えウイルス融合タンパク質としては、融合タンパク質を発現する、あらゆるウイルスまたはそのウイルス株からのタンパク質が挙げられる。Ｉ型ウイルス融合タンパク質は、パラミクソウイルス、レトロウイルス、コロナウイルス、オルソミクソウイルス、およびフィロウイルスをはじめとするが、これに限定されるものではない、ウイルスによって発現される。ＩＩ型ウイルス融合タンパク質は、アルファウイルスおよびフラビウイルスをはじめとするが、これに限定される、ウイルスによって発現される。Ｉ型ウイルス融合

タンパク質としては、例えばパラミクソウイルス融合タンパク質が挙げられる。パラミクソウイルスは、いくつかのヒトおよび動物疾患を引き起こし得る、マイナスセンス一本鎖ＲＮＡウイルスである。パラミクソウイルス融合タンパク質は、ウイルス外被表面から三量体として突出し、ウイルス外被と細胞膜間の融合を誘導することで細胞への侵入を媒介し、融合活性のために中性ｐＨを要することが多い。パラミクソウイルス科のウイルスとしては、ニューカッスル病ウイルス、ヘンドラウイルス、ニパウイルス、麻疹ウイルス、おたふく風邪ウイルス、牛疫ウイルス、イヌジステンパーウイルス、アザラシジステンパーウイルス、小反芻獣疫ウイルス（ＰＰＲ）、センダイウイルス、ヒトパラインフルエンザウイルス１、２、３、および４、感冒ウイルス、サルパラインフルエンザウイルス５、メナングルウイルス、ティオマンウイルス、ツホコウイルス１、２、および３、ヒト呼吸器合胞体ウイルス（ＲＳＶ）、ウシ呼吸器合胞体ウイルス、トリニューモウイルス、ヒトメタニューモウイルス、フェルドランスウイルス、ナリバウイルス、ツパイパラミクソウイルス、セーレムウイルス、Ｊウイルス、モスマンウイルス、およびベイロングウイルスが挙げられるが、これに限定されるものではない。

【００４９】

組換えウイルス融合タンパク質は、例えば呼吸器合胞体ウイルス融合タンパク質（ＲＳＶ－Ｆ）であり得る。ＲＳＶ－Ｆタンパク質は、あらゆるＲＳＶ株、または例えばＡ２、Ｌｏｎｇ、ＡＴＣＣＶＲ－２６、１９、６２６５、Ｅ４９、Ｅ６５、Ｂ６５、ＲＳＢ８９－６２５６、ＲＳＢ８９－５８５７、ＲＳＢ８９－６１９０、およびＲＳＢ８９－６６１４などのヒト株；またはＡＴｕｅ５１９０８、３７５、およびＡ２Ｇｅｌｆｉなどのウシ株；またはヒツジ株をはじめとする、当該技術分野で公知の分離株に由来し得る。ＲＳＶ－Ｆアミノ酸配列は、本明細書で提供されるあらゆるＲＳＶ－Ｆアミノ酸配列であり得て、または本明細書で提供されるＲＳＶ－Ｆアミノ酸配列の最高１０％までの変動があるあらゆる配列であり得る（例えば変種アミノ酸配列は、本明細書で提供されるアミノ酸配列と、約９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％または９９％同一であり得て、または本明細書で提供されるアミノ酸配列と比較して、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９または２０個のアミノ酸修飾を含み得る）。例えば野生型ＲＳＶ－Ｆヒト株Ａ２のアミノ酸配列は、配列番号２で記載される。

【００５０】

組換えウイルス融合タンパク質としてはまた、例えばｈＰＩＶ３融合タンパク質（ｈＰＩＶ３－Ｆ）が挙げられる。本明細書で提供されるｈＰＩＶ３－Ｆタンパク質は、あらゆるｈＰＩＶ３株、または例えば１４７０２、ＺＨＹＭｇｚ０１、ＬＺ２２、Ｔｅｘａｓ／１２０８４／１９８３、およびＷａｓｈ／４７８８５／５７などの株をはじめとする、当該技術分野で公知の分離株に由来し得る。ｈＰＩＶ３－Ｆアミノ酸配列は、本明細書で提供されるあらゆるｈＰＩＶ３－Ｆアミノ酸配列であり得て、または本明細書で提供されるｈＰＩＶ３－Ｆアミノ酸配列の最高１０％までの変動があるあらゆる配列であり得る（例えば変種アミノ酸配列は、本明細書で提供されるアミノ酸配列と、約９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％または９９％同一であり得て、または本明細書で提供されるアミノ酸配列と比較して、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９または２０個のアミノ酸修飾を含み得る）。例えば野生型ｈＰＩＶ３－Ｆ株Ｔｅｘａｓ／１２０８４／１９８３のアミノ酸配列は、配列番号９で記載される。

【００５１】

可溶性ウイルス融合タンパク質

本明細書では、組換え可溶性ウイルス融合タンパク質もまた提供される。天然完全長ウイルス融合タンパク質は、典型的に膜結合領域を含み、組換え可溶性ウイルス機能タンパク質は、概して、天然タンパク質のＣ末端領域に位置することが多い機能的膜結合領域を欠く。組換え可溶性ウイルス融合タンパク質は、ウイルス融合タンパク質の機能的膜結合領域の欠失、変異、または当該技術分野で公知のあらゆる様式の中断によって生成され得

る。例えば膜結合領域が、検出可能に機能的でなく（例えば領域がもはや膜内に存在しない）、（ｉｉ）膜結合領域の一定百分率が保持され（例えば約５０％以下が保持される）、除去され（例えば約５０％以上が除去され）または修飾される（例えば約５０％以上が修飾される）という条件で、膜結合領域のあらゆる一部または全部を除去または修飾し得る。タンパク質の原形質膜への結合をもはやもたらさない膜結合領域の中断の程度は、タンパク質の膜結合を評価し得る、当該技術分野で公知のあらゆる技術によって判定し得る。例えばウイルス融合タンパク質と、既知の膜結合タンパク質の共免疫染色法を実施して、膜内のタンパク質保持を視覚化し得る。本明細書では、可溶性ウイルス融合タンパク質の例が提供され、制限なしに可溶性ＲＳＶ－Ｆおよび可溶性ｈＰＩＶ３－Ｆが挙げられる。例えば可溶性ＲＳＶ－Ｆは、配列番号２のアミノ酸５２５～５７４に相当する、ＲＳＶ－Ｆタンパク質の５０アミノ酸Ｃ末端膜貫通ドメインの欠失によって生成され得る。可溶性ＲＳＶ－Ｆの本例のアミノ酸配列は、配列番号７で記載される。例えば可溶性ｈＰＩＶ３－Ｆは、配列番号９のアミノ酸４８９～５３９に相当するＣ末端５１アミノ酸の欠失によって生成され得る。本例の可溶性ｈＰＩＶ３－Ｆのアミノ酸配列は、配列番号１２で記載される。

【００５２】

組換え可溶性ウイルス融合タンパク質は、あらゆる細胞構成要素内で生成され得る。可溶性ウイルス融合タンパク質は、例えば細胞質内で生成される。組換え可溶性ウイルス融合タンパク質はまた、細胞分泌経路と併せて発現され得て、例えば小胞体、ゴルジ体、原形質膜、および細胞外培地内で発現され得る。したがって組換え可溶性ウイルス融合タンパク質は、細胞質、細胞中小胞、および／または原形質膜をはじめとする、様々な細胞および細胞外構成要素から単離され得る。組換え可溶性ウイルス融合タンパク質はまた、細胞外培地中に分泌され得て、分泌ウイルス融合タンパク質は、完全に分泌され、または部分的に分泌されて、タンパク質残部が細胞中に保持され得る。

【００５３】

核酸

核酸は、あらゆる起源または組成物に由来し得て、例えばデオキシリボ核酸（ＤＮＡ）、相補的ＤＮＡ（ｃＤＮＡ）、ゲノムＤＮＡ（ｇＤＮＡ）、リボ核酸（ＲＮＡ）、阻害的ＲＮＡ（ＲＮＡｉ）、阻害的低分子ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）、移転ＲＮＡ（ｔＲＮＡ）またはメッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）であり得る。核酸は、制限なしに、直鎖、環状、超らせん、一本鎖、二本鎖などをはじめとする、あらゆる適切な形態であり得る。「核酸」という用語は、それ自体は、特定長のポリヌクレオチド鎖を指さずまたは暗示しないものと理解され、したがってポリヌクレオチドおよびオリゴヌクレオチドもまた、定義に含まれる。

【００５４】

デオキシリボヌクレオチドとしては、デオキシアデノシン、デオキシシチジン、デオキシグアノシン、およびデオキシチミジンが挙げられる。ＲＮＡでは、ウラシル塩基はウリジンである。

【００５５】

核酸は、時に、プラスミド、ファージ、自己複製配列（ＡＲＳ）、セントロメア、人工染色体、酵母人工染色体（例えばＹＡＣ）であり、または宿主細胞中で複製できまたは複製されることができるその他の核酸である。いくつかの実施形態では、核酸は単一染色体に由来する（例えば核酸サンプルは、二倍体生物から得られるサンプルの１本の染色体に由来してもよい）。特定の実施形態では、核酸は、ライブラリーに由来し得て、または対象生物から酵素消化され、剪断されまたは超音波分解されたゲノムＤＮＡ（例えば断片化）から得られ得る。

【００５６】

いくつかの実施形態では、核酸は、例えば約５～約５００ヌクレオチドまたは塩基対の長さであってもよい（例えば約１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、１００、１１０、１２０、

１３０、１４０、１５０、１６０、１７０、１８０、１９０、２００、２１０、２２０、２３０、２５０、３００、３５０、４００、４５０、または最高約５００ヌクレオチドまたは塩基対の長さ）。特定の実施形態では、核酸は、約５～約３００ヌクレオチドまたは塩基対のサイズ、または約５～約２００ヌクレオチドまたは塩基対のサイズであり得る。特定の実施形態では、核酸は、約２００ヌクレオチドまたは塩基対の長さを上回り得て、時に約３００、４００、５００、６００、７００、８００、９００、１０００、１１００、１２００、１３００、１４００、１５００、１６００、１７００、１８００、１９００、２０００、２５００、３０００、３５００、４０００、４５００、５０００、５５００、６０００、６５００、７０００、７５００、８０００、９０００、１００００、１１０００、１２０００、１３０００、１４０００、１５０００、１６０００、１７０００、１８０００、１９０００または２００００ヌクレオチドまたは塩基対の長さである。本明細書の用法では、核酸鎖の長さに関する「ヌクレオチド」という用語は、一本鎖核酸を指す。本明細書の用法では、核酸鎖の長さに関する「塩基対」という用語は、二本鎖核酸を指す。

【００５７】

核酸は、ＤＮＡまたはＲＮＡアナログまたは修飾を含んでなり得る（例えば塩基アナログ、修飾塩基、糖アナログおよび／または非天然主鎖などを含有する）。「修飾塩基」とは、１’位置、またはそれらの同等物における、アデニン、グアニン、シトシン、およびウラシル以外のヌクレオチド塩基を意味する。核酸は、いくつかの実施形態では、１種または複数種の修飾塩基を含有してもよく、独立して核酸に導入し得る塩基修飾の非限定的例としては、イノシン、プリン、ピリジン－４－オン、ピリジン－２－オン、フェニル、プソイドウラシル、２，４，６－トリメトキシベンゼン、３－メチルウラシル、ジヒドロウリジン、ナフチル、アミノフェニル、５－アルキルシチジン（例えば５－メチルシチジン）、５－アルキルウリジン（例えばリボチミジン）、５－ハロウリジン（例えば５－ブロモウリジン）または６－アザピリミジンまたは６－アルキルピリミジン（例えば６－メチルウリジン）、プロピンなどが挙げられる。

【００５８】

ベクター核酸

核酸は、例えばウイルス融合タンパク質（例えば可溶性ウイルス融合タンパク質）をコードする配列などの翻訳可能なヌクレオチド配列を含有することが多い。翻訳可能なヌクレオチド配列は、開始コドン（リボ核酸中のＡＵＧおよびデオキシリボ核酸中のＡＴＧ）と停止コドン（例えばリボ核酸中のＵＡＡ（ｏｃｈｒｅ）、ＵＡＧ（ａｍｂｅｒ）またはＵＧＡ（ｏｐａｌ）、およびデオキシリボ核酸中のＴＡＡ、ＴＡＧまたはＴＧＡ）の間に位置することが多く、時に本明細書で「読み取り枠」（ＯＲＦ）と称される。ベクター核酸は、時に１つまたは複数のＯＲＦを含んでなる。ＯＲＦは、あらゆる適切な起源に由来してもよく、時にゲノムＤＮＡ、ｍＲＮＡ、逆転写ＲＮＡまたは相補的ＤＮＡ（ｃＤＮＡ）、または前述の１つまたは複数を含んでなる核酸ライブラリーに由来し、例えばウイルス、原核生物、酵母、真菌、ヒト、昆虫、線虫、ウシ、ウマ、イヌ、ネコ、ラットまたはマウスなどのあらゆる生物種に由来してもよい。

【００５９】

ウイルス融合タンパク質をコードするＯＲＦは、ベクター複製、ベクターの一部転写（例えばＯＲＦ転写）、および／または細胞中のタンパク質発現のために、ベクターに挿入またはクローンされてもよい。ベクターは、例えばＯＲＦまたはその他の核酸要素のクローニング、複製、転写、翻訳、および選択の１つまたは複数を促進する要素を含むことが多い。したがってベクター核酸は、以下の非限定的ヌクレオチド要素の１つまたは複数または全てを含み得る。１つまたは複数のプロモーター要素、１つまたは複数の５’非翻訳領域（５’ＵＴＲ）、その中に標的ヌクレオチド配列が挿入されてもよい１つまたは複数の領域（「挿入配列」）、１つまたは複数のＯＲＦ、１つまたは複数の３’非翻訳領域（３’ＵＴＲ）、および選択要素。

【００６０】

いくつかの実施形態では、ベクター核酸は、ＯＲＦまたは別の要素を挿入できるようにする、１つまたは複数の要素を含む。当該技術分野で公知のあらゆる都合良いクローニングストラテジーを利用して、ベクター核酸にＯＲＦなどの要素を組み込んでもよい。（１）１つまたは複数の既存の制限酵素部位でベクターを切断し、対象要素を連結し、（２）１つまたは複数の適切な制限酵素部位を含むオリゴヌクレオチドプライマーをハイブリダイズすることで、制限酵素部位をベクターに付加し、（本明細書でより詳細に記載される）ポリメラーゼ連鎖反応によって増幅するなどの既知の方法を利用して、挿入要素から独立して、ベクターに要素を挿入し得る。その他のクローニングストラテジーは、例えばＰＣＲのためのオリゴヌクレオチドプライマーハイブリダイゼーション部位など、ベクター核酸に存在し、またはその中に挿入された、１つまたは複数の挿入部位、および以下に記載されるその他の部位を活用する。

【００６１】

いくつかの実施形態では、ベクター核酸は、１つまたは複数のリコンビナーゼ挿入部位を含む。リコンビナーゼ挿入部位は、組換えタンパク質による組み込み／組換え反応に関与する、核酸分子上の認識配列である。例えばＣｒｅリコンビナーゼの組換え部位はｌｏｘＰであり、それは８塩基対コア配列側面に位置する、２つの１３塩基対逆方向反復（リコンビナーゼ結合部位の役割を果たす）を含んでなる３４塩基対配列である。（例えばＳａｕｅｒ，Ｂ．，Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｂｉｏｔｅｃｈ．５：５２１－５２７（１９９４）の図１）。組換え部位のその他の例としては、組換えタンパク質λ　Ｉｎｔによって、および補助タンパク質組み込み宿主因子（ＩＨＦ）、ＦＩＳ、および除去酵素（Ｘｉｓ）によって認識される、ａｔｔＢ、ａｔｔＰ、ａｔｔＬ、およびａｔｔＲ配列、およびその変異体、断片、変種、および誘導体が挙げられる。（例えば米国特許第５，８８８，７３２号明細書；米国特許第６，１４３，５５７号明細書；米国特許第６，１７１，８６１号明細書；米国特許第６，２７０，９６９号明細書；米国特許第６，２７７，６０８号明細書；および米国特許第６，７２０，１４０号明細書；米国特許出願公開第２００２－００７０５１－Ａ１号明細書；Ｌａｎｄｙ，Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｂｉｏｔｅｃｈ．３：６９９－７０７（１９９３）。全ての参考文献は、参照によって本明細書に援用する）。リコンビナーゼクローニング核酸の例は、生体内または生体外における、所望の核酸分子のクローニングのための少なくとも１つの組換え部位を含むＧａｔｅｗａｙ（登録商標）システム（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａ）にある。いくつかの実施形態では、システムは、バクテリオファージλ系（例えばａｔｔ１およびａｔｔ２）ベースであることが多く、野生型（ａｔｔ０）部位から変異された、少なくとも２つの異なる部位特異的組換え部位を含有するベクターを利用する。各変異部位は、同一タイプのその同族のパートナーａｔｔ部位（すなわちその結合パートナー組換え部位）に対して固有の特異性を有し（例えばａｔｔＢ１とａｔｔＰ１、またはａｔｔＬ１とａｔｔＲ１）、別の変異型の組換え部位、または野生型ａｔｔ０部位とは交差反応しない。異なる部位特異性は、定方向性クローニングまたは所望の分子の連結を可能にし、したがって所望の配向のクローン分子が提供される。組換え部位で挟まれる核酸断片は、Ｇａｔｅｗａｙ（登録商標）システムを使用して、時に目的ベクターと称される、受容体プラスミド分子上のａｔｔ部位で挟まれる選択可能なマーカー（例えばｃｃｄＢ）を置換することで、クローニングおよびサブクローニングされる。次にｃｃｄＢ感受性宿主株の形質転換と、受容体分子上のマーカーの正の選択によって、所望のクローンを選択する。哺乳類および昆虫におけるチミジンキナーゼ（ＴＫ）などのように、負の選択（例えば毒性遺伝子の使用）に対する同様のストラテジーをその他の生物で使用し得る。

【００６２】

特定の実施形態では、ベクター核酸は、１つまたは複数のトポイソメラーゼ挿入部位を含む。トポイソメラーゼ挿入部位は、部位特異的トポイソメラーゼが認識して結合する、確定されたヌクレオチド配列である。例えばヌクレオチド配列５’－（Ｃ／Ｔ）ＣＣＴＴ－３’は、ワクシニアウイルスＤＮＡトポイソメラーゼＩをはじめとする、ほとんどのポックスウイルストポイソメラーゼが特異的に結合する、トポイソメラーゼ認識部位である

。認識配列への結合後、トポイソメラーゼは、認識部位の最も３’側のチミジンで鎖を切断し、トポイソメラーゼ中のチロシンを介して３’リン酸塩に共有結合するトポイソメラーゼの複合体である、５’－（Ｃ／Ｔ）ＣＣＴＴ－ＰＯ$_4$－ＴＯＰＯを含んでなるヌクレオチド配列を生じる。（例えば米国特許第５，７６６，８９１号明細書；ＰＣＴ／ＵＳ９５／１６０９９号明細書；およびＰＣＴ／ＵＳ９８／１２３７２号明細書）。比較すると、ヌクレオチド配列５’－ＧＣＡＡＣＴＴ－３’は、ＩＡ型大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）トポイソメラーゼＩＩＩのトポイソメラーゼ認識部位である。挿入される要素は、トポイソメラーゼと反応したベクターと組み合わせられることが多く、その結果ベクター核酸に組み込まれる（例えばｈｔｔｐアドレスｗｗｗ．ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ．ｃｏｍ／ｄｏｗｎｌｏａｄｓ／Ｆ－１３５１２＿Ｔｏｐｏ＿Ｆｌｙｅｒ．ｐｄｆ；ｈｔｔｐアドレスｗｗｗ．ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ．ｃｏｍ／ｃｏｎｔｅｎｔ／ｓｆｓ／ｂｒｏｃｈｕｒｅｓ／７１０＿０２１８４９％２０＿Ｂ＿ＴＯＰＯＣｌｏｎｉｎｇ＿ｂｒｏ．ｐｄｆ；ＴＯＰＯ ＴＡ Ｃｌｏｎｉｎｇ（登録商標）Ｋｉｔ ａｎｄ Ｚｅｒｏ Ｂｌｕｎｔ（登録商標） ＴＯＰＯ（登録商標）Ｃｌｏｎｉｎｇ Ｋｉｔ ｐｒｏｄｕｃｔ ｉｎｆｏｒｍａｔｉｏｎ）。

【００６３】

ベクター核酸は、時に１つまたは複数の複製起点（ＯＲＩ）要素を含有する。いくつかの実施形態では、ベクターは２つ以上のＯＲＩを含んでなり、一方は１つの生物（例えば細菌）中で効率的に機能して、他方は別の生物（例えば真核生物）中で効率的に機能する。いくつかの実施形態では、一方のＯＲＩは、細菌細胞中で効率的に機能してもよく、他方のＯＲＩは、哺乳類細胞中で効率的に機能してもよい。ベクター核酸はまた、時に１つまたは複数の転写調節部位を含む。

【００６４】

５’ＵＴＲは、それが由来するヌクレオチド配列に内在性の１つまたは複数の要素を含んでなってもよく、時に１つまたは複数の外来性要素を含む。５’ＵＴＲは、例えばあらゆる適切な生物（例えばウイルス、細菌、酵母、真菌、植物、鳥類、昆虫または哺乳類）からのゲノムＤＮＡ、プラスミドＤＮＡ、ＲＮＡまたはｍＲＮＡなどのあらゆる適切な核酸に由来し得る。当業者は、利用される転写および／または翻訳系に基づいて、５’ＵＴＲに適する要素を選択してもよい。５’ＵＴＲは、時に以下の要素の１つまたは複数を含んでなる。翻訳エンハンサー配列、転写開始部位、転写因子結合部位、翻訳調節部位、翻訳開始部位、翻訳因子結合部位、リボソーム結合部位、レプリコン、エンハンサー要素、配列内リボソーム進入部位（ＩＲＥＳ）、およびサイレンサー要素。

【００６５】

３’ＵＴＲは、それが由来するヌクレオチド配列に内在性の１つまたは複数の要素を含んでなってもよく、時に１つまたは複数の外来性要素を含む。３’ＵＴＲは、例えばあらゆる適切な生物（例えばウイルス、細菌、酵母、真菌、植物、昆虫または哺乳類）からのゲノムＤＮＡ、プラスミドＤＮＡ、ＲＮＡまたはｍＲＮＡなどのあらゆる適切な核酸に由来してもよい。当業者は、利用される転写および／または翻訳系に基づいて、３’ＵＴＲに適する要素を選択し得る。３’ＵＴＲは、時に以下の要素の１つまたは複数を含んでなる。転写調節部位、転写開始部位、転写終結部位、転写因子結合部位、翻訳調節部位、翻訳終結部位、翻訳開始部位、翻訳因子結合部位、リボソーム結合部位、レプリコン、エンハンサー要素、サイレンサー要素、およびポリアデノシンテール。３’ＵＴＲは、ポリアデノシンテールを含むことが多く、時に含まず、ポリアデノシンテールが存在する場合は、それに１つまたは複数のアデノシン部分を付加し、またはそれから欠失させてもよい（例えば約５、約１０、約１５、約２０、約２５、約３０、約３５、約４０、約４５または約５０個のアデノシン部分を付加し、または取り去ってもよい）。

【００６６】

ベクター核酸は、１つまたは複数のＯＲＦと機能的に結合させ得る、プロモーター要素を含み得る。プロモーター要素は、典型的に、ＤＮＡ合成および／またはＲＮＡ合成に必要である。プロモーターは、ＲＮＡポリメラーゼと相互作用することが多い。ポリメラー

ゼは、既存の核酸テンプレートを使用して、核酸の合成を触媒する酵素である。テンプレートがＤＮＡテンプレートである場合、タンパク質が合成される前にＲＮＡ分子が転写される。適切なポリメラーゼ活性を有する酵素としては、タンパク質を合成する選択されたベクターがある選択されたシステム中で活性である、あらゆるポリメラーゼが挙げられる。ポリメラーゼの非限定的例としては、ＲＮＡポリメラーゼＩＩ、ＳＰ６ＲＮＡポリメラーゼ、Ｔ３ＲＮＡポリメラーゼ、Ｔ７ＲＮＡポリメラーゼ、ＲＮＡポリメラーゼＩＩＩ、およびファージ由来ＲＮＡポリメラーゼが挙げられる。これらおよびその他のポリメラーゼは既知であり、それらが相互作用する核酸配列は既知である。このような配列は、例えば１つまたは複数の公共または私的データベースの検索などにより、当業者によって容易にアクセスでき、配列は、本明細書に記載されるベクター核酸に容易に適応される。プロモーターの非限定的例は、誘導性、被抑制、非誘導性、構成的、強力および弱いプロモーターであり、あらゆる適切な生物（例えばウイルス、原核生物、酵母、真菌、哺乳類）から得られ得る。プロモーター要素は、プロモーターがＯＲＦからの転写物ＲＮＡ生成を機能的に駆動するという条件で、ベクター核酸内で、時にＯＲＦに直接隣接して配置され、時に１つまたは複数のヌクレオチドによってＯＲＦから隔てられる。

【００６７】

プロモーターが、形質移入細胞系内における高レベルのタンパク質生成に適する転写物生成レベルを提供しさえすれば、本明細書に記載されるあらゆる適切なプロモーターを核酸ベクター中で使用し得る。本明細書に記載される核酸ベクターと共に使用するのに適するプロモーターの非限定的例としては、ヒトＣＭＶ主要中間体初期遺伝子（ｈＣＭＶ－ＭＩＥ）プロモーター、ＳＶ４０プロモーター、ＣａＭＶプロモーター、ＭＭＴＶプロモーター、Ｐｏｌ　Ｉプロモーター、Ｐｏｌ　ＩＩプロモーター、Ｐｏｌ　ＩＩＩプロモーターなどが挙げられる。

【００６８】

ベクター核酸は、１つまたは複数の選択要素を含むことが多い。ベクター核酸が細胞に含まれるかどうかを判定する既知の方法を使用して、選択要素が利用されることが多い。いくつかの実施形態では、ベクター核酸は、２つ以上の選択要素を含み、一方は１つの生物（例えば原核生物）の細胞中で効率的に機能し、他方は別の生物（例えば哺乳類）の細胞中で効率的に機能する。選択要素の例としては、（１）そうでなければ毒性である化合物（例えば抗生物質）に対する耐性を提供する生成物をコードする核酸断片；（２）そうでなければ受容体細胞を欠く生成物をコードする核酸断片（例えば必須生成物、ｔＲＮＡ遺伝子、栄養要求性マーカー）；（３）遺伝子産物の活性を抑制する生成物をコードする核酸断片；（４）容易に同定され得る生成物をコードする核酸断片（例えば抗生物質（例えばβ－ラクタマーゼ）、β－ガラクトシダーゼ、緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）、黄色蛍光タンパク質（ＹＦＰ）、赤色蛍光タンパク質（ＲＦＰ）、シアン蛍光タンパク質（ＣＦＰ）、および細胞表面タンパク質などの表現型マーカー）；（５）そうでなければ細胞生存および／または機能に有害な生成物に結合する核酸断片；（６）そうでなければ上の１～５に記載される核酸断片のいずれかの活性を阻害する核酸断片（例えばアンチセンスオリゴヌクレオチド）；（７）基質を改変する生成物に結合する核酸断片（例えば制限エンドヌクレアーゼ）；（８）所望の分子（例えば特異的タンパク質結合部位）を分離または同定するのに使用し得る核酸断片；（９）そうでなければ（例えば分子亜集団のＰＣＲ増幅にとって）非機能性であり得る特定のヌクレオチド配列をコードする核酸断片；（１０）不在の場合、特定の化合物に、直接または間接的に耐性または感受性を与える核酸断片；（１１）受容体細胞中で、毒性である（例えばジフテリア毒素）、または比較的無毒の化合物を毒性化合物に変換する（例えば単純ヘルペスチミジンキナーゼ、シトシンデアミナーゼ）のいずれかである、生成物をコードする核酸断片；（１２）それらを含有する核酸分子の複製、分割または遺伝力を阻害する核酸断片；および／または（１３）例えば特定宿主または宿主細胞系内における、または特定環境条件（例えば温度、栄養条件など）下における、複製などの条件的複製機能をコードする核酸断片が挙げられるが、これに限定されるものではない。

【００６９】
ＯＲＦの終わりの停止コドンは、時に上述のａｍｂｅｒ停止コドンなどの別の停止コドンに修飾される。いくつかの実施形態では、停止コドンは、時に既存のコドンの挿入または変異によって、ＯＲＦ内に導入される。修飾末端停止コドンおよび／または内部停止コドンを含んでなるＯＲＦは、停止コドンを認識するサプレッサーｔＲＮＡを含んでなるシステム中で翻訳されることが多い。停止コドンを含んでなるＯＲＦは、標的タンパク質または標的ペプチドの翻訳中に非天然アミノ酸を組み込むサプレッサーｔＲＮＡを含んでなるシステム中で、時に翻訳される。非天然アミノ酸を標的タンパク質またはペプチドに組み込む方法は既知であり、例えばｔＲＮＡがａｍｂｅｒ停止コドンを認識して非天然アミノ酸が装入される、異種ｔＲＮＡ／シンセターゼ対を利用する方法が挙げられる（例えばｈｔｔｐアドレスｗｗｗ．ｉｕｐａｃ．ｏｒｇ／ｎｅｗｓ／ｐｒｉｚｅ／２００３／ｗａｎｇ．ｐｄｆ）。非天然アミノ酸としては、Ｄ－異性体アミノ酸、オルニチン、ジアミノ酪酸、ノルロイシン、ピリジルアラニン（ｐｙｒｙｌａｌａｎｉｎｅ）、チエニルアラニン、ナフチルアラニンおよびフェニルグリシン、α－およびα－二置換アミノ酸、Ｎ－アルキルアミノ酸、乳酸；トリフルオロチロシン、ｐ－Ｃｌ－フェニルアラニン、ｐ－Ｂｒ－フェニルアラニン、ｐ－Ｉ－フェニルアラニンなどの天然アミノ酸のハロゲン化物誘導体；Ｌ－アリル－グリシン、β－アラニン、Ｌ－α－アミノ酪酸、Ｌ－γ－アミノ酪酸、Ｌ－α－アミノイソ酪酸、Ｌ－ε－アミノカプロン酸、７－アミノヘプタン酸、Ｌ－メチオニンスルホン、Ｌ－ノルロイシン、Ｌ－ノルバリン、ｐ－ニトロ－Ｌ－フェニルアラニン、Ｌ－ヒドロキシプロリン、Ｌ－チオプロリン；４－メチル－Ｐｈｅ、ペンタメチル－Ｐｈｅなどのフェニルアラニン（Ｐｈｅ）のメチル誘導体；Ｌ－Ｐｈｅ（４－アミノ）、Ｌ－Ｔｙｒ（メチル）、Ｌ－Ｐｈｅ（４－イソプロピル）、Ｌ－Ｔｉｃ（１，２，３，４－テトラヒドロイソキノリン－３－カルボキシル酸）、Ｌ－ジアミノプロピオン酸、Ｌ－Ｐｈｅ（４－ベンジル）、２，４－ジアミノ酪酸、４－アミノ酪酸（γ－Ａｂｕ）、２－アミノ酪酸（α－Ａｂｕ）、６－アミノヘキサン酸（ε－Ａｈｘ）、２－アミノイソ酪酸（Ａｉｂ）、３－アミノプロピオン酸、オルニチン、ノルロイシン、ノルバリン、ヒドロキシプロリン、サルコシン、シトルリン、ホモシトルリン、システイン酸、ｔ－ブチルグリシン、ｔ－ブチルアラニン、（例えばＡｕ、重水素、１５Ｎ；Ｘ線結晶学的構造的分析または核磁気共鳴分析に適用できるタンパク質の合成に有用な）重原子または重同位元素で誘導体化されたアミノ酸、フェニルグリシン、シクロヘキシルアラニン、フルオロアミノ酸；β－メチルアミノ酸、Ｃａ－メチルアミノ酸、Ｎａ－メチルアミノ酸、ナフチルアラニンなどのデザイナーアミノ酸などが挙げられるが、これに限定されるものではない。

【００７０】
タグ
核酸（例えばベクター）は、時に、ＯＲＦに隣接する（例えば直接または実質的に隣接する）ヌクレオチド配列を含んでなり、それはＯＲＦと併せて翻訳されて、アミノ酸タグをコードする。タグをコードするヌクレオチド配列は、核酸内のＯＲＦの３’および／または５’に位置し得て、それによってＯＲＦによってコードされるタンパク質またはペプチドのＣ末端またはＮ末端のタグをコードする。転写および／または翻訳を抑止しないあらゆるタグを利用してもよく、適切に選択してもよい。

【００７１】
タグは、時に、例えば分子または固相の部分または検出可能な標識に特異的に結合し、したがってＯＲＦによってコードされるタンパク質またはペプチドを単離、精製するおよび／または検出する効用を有する。いくつかの実施形態では、タグは、以下の要素の１つまたは複数を含んでなる。ＦＬＡＧ（例えばＤＹＫＤＤＤＤＫＧ）、Ｖ５（例えばＧＫＰＩＰＮＰＬＬＧＬＤＳＴ）、ｃ－ｍｙｃ（例えばＥＱＫＬＩＳＥＥＤＬ）、ＨＳＶ（例えばＱＰＥＬＡＰＥＤＰＥＤ）、インフルエンザ赤血球凝集素、ＨＡ（例えばＹＰＹＤＶＰＤＹＡ）、ＶＳＶ－Ｇ（例えばＹＴＤＩＥＭＮＲＬＧＫ）、細菌グルタチオン－Ｓ－トランスフェラーゼ、マルトース結合タンパク質、ストレプトアビジン－またはアビジン－結合タグ（例えばｐｃＤＮＡ（商標）６　ＢｉｏＥａｓｅ（商標）Ｇａｔｅｗａｙ（登録商

標）Ｂｉｏｔｉｎｙｌａｔｉｏｎ Ｓｙｓｔｅｍ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ））、チオレドキシン、β－ガラクトシダーゼ、ＶＳＶ－糖タンパク質、蛍光タンパク質（例えば緑色蛍光タンパク質およびその多数の色彩変種）、ポリリジンまたはポリアルギニン配列、ポリヒスチジン配列（例えばＨｉｓ６）または金属（例えばコバルト、亜鉛、ニッケル、銅）をキレート化するその他の配列、および／またはヒ素含有分子に結合するシステイン富化配列。特定の実施形態では、システイン富化タグは、アミノ酸配列ＣＣ－Ｘｎ－ＣＣを含んでなり、式中、Ｘはあらゆるアミノ酸であり、ｎは１～３であり、システイン富化配列は時にＣＣＰＧＣＣである。特定の実施形態では、タグは、システイン富化要素およびポリヒスチジン要素（例えばＣＣＰＧＣＣおよびＨｉｓ６）を含んでなる。

【００７２】

タグは、好都合には、結合パートナーに結合することが多い。例えばいくつかのタグは、抗体（例えばＦＬＡＧ）に結合し、時に小分子に特異的に結合する。例えばポリヒスチジンタグは、銅、亜鉛、ニッケル、およびコバルトなどの二価の金属を特異的にキレート化し；ポリリジンまたはポリアルギニンタグは、亜鉛フィンガーに特異的に結合し；グルタチオンＳ－トランスフェラーゼタグは、グルタチオンに結合し；システイン富化タグは、ヒ素含有分子に特異的に結合する。ヒ素含有分子としては、ＦｌＡｓＨ（商標）（［４’，５’－ビス（１，３，２－ジチオアルソラン－２－イル）フルオレセイン－（１，２－エタンジチオール）２］）などのＬＵＭＩＯ（商標）作用物質（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａ）、およびＲｅＡｓＨ試薬が挙げられる（例えば「Ｔａｒｇｅｔ Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｆｏｒ Ｓｙｎｔｈｅｔｉｃ Ｍｏｌｅｃｕｌｅｓ」と題されたＴｓｉｅｎ ｅｔ ａｌ．に付与された米国特許第５，９３２，４７４号明細書；「Ｍｅｔｈｏｄｓ ｏｆ Ｕｓｉｎｇ Ｓｙｎｔｈｅｔｉｃ Ｍｏｌｅｃｕｌｅｓ ａｎｄ Ｔａｒｇｅｔ Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ」と題されたＴｓｉｅｎ ｅｔ ａｌ．に付与された米国特許第６，０５４，２７１号明細書；米国特許第６，４５１，５６９号明細書および米国特許第６，００８，３７８号明細書；全てＴｓｉｅｎ ｅｔ ａｌ．に付与され全て「Ｓｙｎｔｈｅｔｉｃ Ｍｏｌｅｃｕｌｅｓ ｔｈａｔ Ｓｐｅｃｉｆｉｃａｌｌｙ Ｒｅａｃｔ ｗｉｔｈ Ｔａｒｇｅｔ Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ」と題された、米国特許出願公開第２００３／００８３３７３号明細書、および国際公開第９９／２１０１３号パンフレット；ヒ素含有染料、ｔｅｔｒａｃｙｓ配列タグ、およびタンパク質検出に関する全ての開示を全て参照によって援用する）。このような抗体および小型分子は、以下でより詳細に記載するように、時に組換えポリペプチドの都合良い単離のために、固相と結合される。タグは、時に、ウイルス融合タンパク質の精製を容易にするポリペプチドなどの、ウイルス融合タンパク質とは異なるポリペプチドである。このようなポリペプチドの非限定的例としては、グルタチオン結合タンパク質、およびマルトース結合タンパク質が挙げられる。

【００７３】

タグは、時に、本明細書で「シグナル配列」または「局在化シグナル配列」と称される、転写および／または翻訳系の構成要素に、翻訳されたタンパク質またはペプチドを局在化させる配列を含んでなる。シグナル配列は、標的タンパク質または標的ペプチドのＮ末端に組み込まれることが多く、時にＣ末端に組み込まれる。シグナル配列の例は、当該技術分野で公知であり、核酸に容易に組み込まれ、ウイルス融合タンパク質がそれから調製される細胞に準じて、選択されることが多い。シグナル配列は、いくつかの実施形態では、翻訳されるタンパク質またはペプチドを細胞膜に局在化させる。シグナル配列の例としては、核標的シグナル（例えばＳＶ４０ウイルス大型Ｔ抗原のステロイド受容体配列およびＮ末端配列）；ミトコンドリア（ｍｉｔｏｃｈｏｎｄｉａ）標的シグナル（例えば両親媒性らせんを形成するアミノ酸配列）；ペルオキシソーム標的シグナル（例えばＳ．セレヴィシエ（Ｓ．ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）からのＹＦＧ中のＣ末端配列）；および分泌シグナル（例えばインベルターゼからのＮ末端配列、接合因子α、Ｓ．セレヴィシエ（Ｓ．ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）中のＰＨＯ５とＳＵＣ２；Ｂ．サブティリス（Ｂ．ｓｕｂｔｉｌｉｓ）タンパク質の複数Ｎ末端配列（例えばＴｊａｌｓｍａ ｅｔ ａｌ．，Ｍｉｃｒｏｂ

ｉｏｌ．Ｍｏｌｅｃ．Ｂｉｏｌ．Ｒｅｖ．６４：５１５－５４７（２０００））；αアミラーゼシグナル配列（例えば米国特許第６，２８８，３０２号明細書）；ペクチン酸リアーゼシグナル配列（例えば米国特許第５，８４６，８１８号明細書）；前コラーゲンシグナル配列（例えば米国特許第５，７１２，１１４号明細書）；ＯｍｐＡシグナル配列（例えば米国特許第５，４７０，７１９号明細書）；ｌａｍ βシグナル配列（例えば米国特許第５，３８９，５２９号明細書）；Ｂ．ブレビス（Ｂ．ｂｒｅｖｉｓ）シグナル配列（例えば米国特許第５，２３２，８４１号明細書）；およびＰ．パストリス（Ｐ．ｐａｓｔｏｒｉｓ）シグナル配列（例えば米国特許第５，２６８，２７３号明細書））が挙げられるが、これに限定されるものではない。

【００７４】

タグは、時にＯＲＦによってコードされるアミノ酸配列に直接隣接し（すなわち介在配列がない）、時にタグは、ＯＲＦがコードするアミノ酸配列に実質的に隣接する（例えば介在配列が存在する）。介在配列は、時に、標的タンパク質またはペプチドからタグを切断するのに有用なプロテアーゼ認識部位を含む。いくつかの実施形態では、介在配列は、例えばＸａ因子（例えば認識部位ｌ（Ｅ／Ｄ）ＧＲ）、トロンビン（例えば認識部位ＬＶＰＲＧＳ）、エンテロキナーゼ（例えば認識部位ＤＤＤＤＫ）、ＴＥＶプロテアーゼ（例えば認識部位ＥＮＬＹＦＱＧ）またはＰｒｅＳｃｉｓｓｉｏｎ（商標）プロテアーゼ（例えば認識部位ＬＥＶＬＦＱＧＰ）によって切断される。

【００７５】

介在配列は、時に、本明細書で「リンカー配列」と称され、あらゆる適切な長さであってもよい。リンカー配列は、時に約１～約２０アミノ酸長であり、時に約５～約１０アミノ酸長である。当業者は、リンカーの長さを選択して、標的タンパク質またはペプチド機能を実質的に保存し（例えばリンカーによって区切られない限り、タグが標的タンパク質またはペプチド機能を低下させることがある）、プロテアーゼ切断部位が存在する場合に標的タンパク質またはペプチドからのタグの断絶を高め（例えばリンカーが存在する場合に、切断が改善されてもよい）、タグ／標的タンパク質生成物と固相の相互作用を高めてもよい。リンカーはあらゆる適切なアミノ酸内容であり得て、比較的短い側鎖を有するアミノ酸（例えばグリシン、アラニン、セリン、およびスレオニン）をより高比率で含んでなることが多い。

【００７６】

核酸は、時にタグ要素と挿入配列またはＯＲＦの間に停止コドンを含み、それはタグありまたはなしでＯＲＦを翻訳するのに有用たり得る。停止コドン（上述）を認識する変異ｔＲＮＡ分子は翻訳終結を抑制し、したがって「サプレッサーｔＲＮＡ」と称される。サプレッサーｔＲＮＡは、アミノ酸挿入と停止コドンを越えた翻訳継続をもたらし得る（例えば「Ｐｒｏｄｕｃｔｉｏｎ ｏｆ Ｆｕｓｉｏｎ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｂｙ Ｃｅｌｌ－Ｆｒｅｅ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ」と題された、２００４年７月１４日に出願された米国特許出願第６０／５８７，５８３号明細書；Ｅｇｇｅｒｔｓｓｏｎ，ｅｔ ａｌ．，（１９８８）Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ Ｒｅｖｉｅｗ５２（３）：３５４－３７４、およびＥｎｇｌｅｅｒｇ－Ｋｕｋｌａ，ｅｔ ａｌ．（１９９６）ｉｎ Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ ａｎｄ Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ Ｃｅｌｌｕｌａｒ ａｎｄ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｃｈａｐｔｅｒ ６０，ｐｐｓ９０９－９２１，Ｎｅｉｄｈａｒｄｔ，ｅｔ ａｌ．ｅｄｓ．，ＡＳＭ Ｐｒｅｓｓ，Ｗａｓｈｉｎｇｔｏｎ，ＤＣ）。ａｍｂｅｒ停止コドンの翻訳終結を抑制するｓｕｐＥ、ｓｕｐＰ、ｓｕｐＤ、ｓｕｐＦ、およびｓｕｐＺサプレッサー；ｏｃｈｒｅ停止コドンの機能を抑制するｓｕｐＢ、ｇＩＴ、ｓｕｐＬ、ｓｕｐＮ、ｓｕｐＣ、およびｓｕｐＭサプレッサー；およびｏｐａｌ停止コドンの機能を抑制するｇｌｙＴ、ｔｒｐＴ、およびＳｕ－９サプレッサーはじめとするが、これに限定されるものではない、いくつかのサプレッサーｔＲＮＡが知られている。一般にサプレッサーｔＲＮＡはｔＲＮＡの抗コドンループ中に１つまたは複数の変異を含有し、それはｔＲＮＡが、通常、停止コドンとして機能するコドンと塩基対形成できるようにする。変異ｔＲＮＡにその同族アミノ酸残基が装入され、同

族アミノ酸残基は、停止コドンとの遭遇時に翻訳ポリペプチド内に挿入される。終結サプレッサーの効率を高める変異（すなわち停止コドン読み過ごしの増大）が同定されている。これらとしては、ｕａｒ遺伝子（ｐｒｆＡ遺伝子としてもまた知られている）内の変異、ｕｐｓ遺伝子内の変異、ｓｕｅＡ、ｓｕｅＢ、およびｓｕｅＣ遺伝子内の変異、ｒｐｓＤ（ｒａｍＡ）およびｐｓＥ（ｓｐｃＡ）遺伝子内の変異、およびｒｐＩＬ遺伝子内の変異が挙げられるが、これに限定されるものではない。

【００７７】

したがってＯＲＦとタグの間に位置する停止コドンを含んでなる核酸は、サプレッサーｔＲＮＡが翻訳系に存在しない場合、翻訳されたＯＲＦのみをもたらし得て、サプレッサーｔＲＮＡがシステム中に存在する場合、翻訳されたＯＲＦ－タグ融合をもたらし得る。いくつかの実施形態では、停止コドンは挿入配列またはＯＲＦの３’およびタグの５’に位置し、停止コドンは時にａｍｂｅｒコドンである。サプレッサーｔＲＮＡは、時に無細胞抽出物中にあり（例えばサプレッサーｔＲＮＡを生成する細胞から無細胞抽出物が調製される）、時に単離分子として無細胞抽出物に添加され、時に別の抽出物の一部として無細胞抽出物に添加される。提供されるサプレッサーｔＲＮＡには、時に２０個の天然アミノ酸または（本明細書に記載される）非天然アミノ酸の１つが装入される。サプレッサーｔＲＮＡは、ｔＲＮＡをコードする核酸が形質移入された細胞中で生成され得る（例えばヒトｔＲＮＡ－Ｓｅｒ抑制遺伝子を含有する、複製能力がないアデノウイルスを細胞に形質移入し得る）。サプレッサーｔＲＮＡを合成するための、およびタグありまたはなしのＯＲＦを翻訳するためのベクターが、当業者に利用可能である（例えばＴａｇ－Ｏｎ－Ｄｅｍａｎｄ（商標）キット（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ，Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａ）；Ｔａｇ－Ｏｎ－Ｄｅｍａｎｄ（商標）Ｓｕｐｐｒｅｓｓｏｒ Ｓｕｐｅｒｎａｔａｎｔ Ｉｎｓｔｒｕｃｔｉｏｎ Ｍａｎｕａｌ，Ｖｅｒｓｉｏｎ Ｂ，２００３年６月６日，ｈｔｔｐアドレスｗｗｗ．ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ．ｃｏｍ／ｃｏｎｔｅｎｔ／ｓｆｓ／ｍａｎｕａｌｓ／ｔａｇｏｎｄｅｍａｎｄ＿ｓｕｐｅｒｎａｔａｎｔ＿ｍａｎ．ｐｄｆ；Ｔａｇ－Ｏｎ－Ｄｅｍａｎｄ（商標）Ｇａｔｅｗａｙ（登録商標）Ｖｅｃｔｏｒ Ｉｎｓｔｒｕｃｔｉｏｎ Ｍａｎｕａｌ，Ｖｅｒｓｉｏｎ Ｂ，２００３年６月２０日，ｈｔｔｐアドレスｗｗｗ．ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ．ｃｏｍ／ｃｏｎｔｅｎｔ／ｓｆｓ／ｍａｎｕａｌｓ／ｔａｇｏｎｄｅｍａｎｄ＿ｖｅｃｔｏｒｓ＿ｍａｎ．ｐｄｆ；およびＣａｐｏｎｅ ｅｔ ａｌ．，Ａｍｂｅｒ，ｏｃｈｒｅ ａｎｄ ｏｐａｌ ｓｕｐｐｒｅｓｓｏｒ ｔＲＮＡ ｇｅｎｅｓ ｄｅｒｉｖｅｄ ｆｒｏｍ ａ ｈｕｍａｎ ｓｅｒｉｎｅ ｔＲＮＡ ｇｅｎｅ．ＥＭＢＯＪ．４：２１３，１９８５）。

【００７８】

ヌクレオチドおよびアミノ酸配列の比較

「同一」という用語は、本明細書の用法では、互いに比較して、実質的に同じヌクレオチド配列を有する、２つ以上のヌクレオチド配列に言及する。「同一」という用語はまた、本明細書の用法では、互いに比較して、実質的に同じアミノ酸配列を有する、２つ以上のアミノ酸配列に言及する。２つのヌクレオチド配列またはアミノ酸配列が実質的に同一かどうかを判定するための１つの試験は、共有される同一ヌクレオチド配列またはアミノ酸配列の百分率を判定することである。

【００７９】

配列同一性の計算は、次のように実施し得る。配列は、最適比較の目的で整列される（例えば最適アラインメントのために第１および第２のアミノ酸または核酸配列の片方または双方にギャップを導入し得て、非相同的な配列は比較目的で無視し得る）。比較目的で整列される参照配列の長さは、時に、参照配列長の３０％以上、４０％以上、５０％以上、６０％以上であることが多く、７０％以上、８０％以上、９０％以上、または１００％であることがより多い。次に対応するヌクレオチドまたはポリペプチド位置のヌクレオチドまたはアミノ酸が、それぞれ２つの整合配列間で比較される。第１の配列内の位置が、第２の配列内の対応する位置と同じヌクレオチドまたはアミノ酸で占められる場合、ヌクレオチドまたはアミノ酸はその位置で同一と見なされる。２つの配列間の％同一性は、２

つの配列の最適整列のために導入されたギャップ数および各ギャップ長を考慮した、配列によって共有される同一位置数の関数である。

【００８０】

２つの配列間の配列比較および％同一性の判定は、数学的アルゴリズムを使用して達成し得る。２つのアミノ酸またはヌクレオチド配列間の％同一性は、ＰＡＭ１２０重量残基表、ｇａｐ　ｌｅｎｇｔｈ　ｐｅｎａｌｔｙ＝１２およびｇａｐ　ｐｅｎａｌｔｙ＝４を使用して、ＡＬＩＧＮプログラム（バージョン２．０）に組み込まれている、Ｍｅｙｅｒｓ　＆　Ｍｉｌｌｅｒ，ＣＡＢＩＯＳ４：１１－１７（１９８９）のアルゴリズムを使用して判定し得る。２つのアミノ酸配列間の％同一性はまた、Ｂｌｏｓｓｕｍ６２行列またはＰＡＭ２５０行列のいずれかを使用して、（ｈｔｔｐアドレスｗｗｗ．ｇｃｇ．ｃｏｍで入手できる）ＧＣＧソフトウェアパッケージ中のＧＡＰプログラムに組み込まれている、Ｎｅｅｄｌｅｍａｎ　＆　Ｗｕｎｓｃｈ，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．４８：４４４－４５３（１９７０）アルゴリズムを使用して判定し得る。Ｂｌｏｓｓｕｍ６２重み行列と共に、使用されることが多いパラメータの組としては、ｇａｐ　ｏｐｅｎ　ｐｅｎａｌｔｙ＝１２、ｇａｐ　ｅｘｔｅｎｄ　ｐｅｎａｌｔｙ＝４、およびｆｒａｍｅｓｈｉｆｔ　ｇａｐ　ｐｅｎａｌｔｙ＝５が挙げられる。２つのヌクレオチド配列間の％同一性は、ＮＷＳｇａｐｄｎａ．ＣＭＰ行列およびｇａｐ　ｗｅｉｇｈｔ＝６０およびｌｅｎｇｔｈ　ｗｅｉｇｈｔ＝４を使用して、（ｈｔｔｐアドレスｗｗｗ．ｇｃｇ．ｃｏｍで入手できる）ＧＣＧソフトウェアパッケージ中のＧＡＰプログラムを使用して判定し得る。

【００８１】

２つの核酸が実質的に同一かどうかを判定する別の様式は、１つの核酸に相同的なポリヌクレオチドが、ストリンジェントな条件下で別の核酸にハイブリダイズするかどうかを評価することである。本明細書の用法では、「ストリンジェントな条件」という用語は、ハイブリダイゼーションおよび洗浄のための条件に言及する。ストリンジェントな条件は当業者に知られており、Ｃｕｒｒｅｎｔ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ　ｉｎ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｊｏｈｎ　Ｗｉｌｅｙ　＆　Ｓｏｎｓ，Ｎ．Ｙ．，６．３．１－６．３．６（１９８９）にある。上の参考文献には水性および非水性の方法が記載され、そのどちらでも使用し得る。ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件の一例は、約４５℃で６×塩化ナトリウム／クエン酸ナトリウム（ＳＳＣ）中のハイブリダイゼーションと、それに続く５０℃で０．２×ＳＳＣ、０．１％ＳＤＳ中での１回または複数回の洗浄である。ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件の別の例は、約４５℃で６×塩化ナトリウム／クエン酸ナトリウム（ＳＳＣ）中のハイブリダイゼーションと、それに続く５５℃で０．２×ＳＳＣ、０．１％ＳＤＳ中での１回または複数回の洗浄である。ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件のさらなる例は、約４５℃で６×塩化ナトリウム／クエン酸ナトリウム（ＳＳＣ）中のハイブリダイゼーションと、それに続く６０℃で０．２×ＳＳＣ、０．１％ＳＤＳ中での１回または複数回の洗浄である。頻繁に、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件は、約４５℃で６×塩化ナトリウム／クエン酸ナトリウム（ＳＳＣ）中のハイブリダイゼーションと、それに続く６５℃で０．２×ＳＳＣ、０．１％ＳＤＳ中での１回または複数回の洗浄である。より頻繁には、ストリンジェンシー条件は、６５℃で０．５Ｍリン酸ナトリウム、７％ＳＤＳと、それに続く６５℃で０．２×ＳＳＣ、１％ＳＤＳ中での１回または複数回の洗浄である。

【００８２】

コドン修飾およびＧＣ含量

本明細書で提供される、ウイルス融合タンパク質をコードする核酸は、ヌクレオチド配列全体にわたり、１つまたは複数のコドン内の１つまたは複数のヌクレオチド塩基を変更することで修飾し得る。本明細書の用法では、「ヌクレオチド塩基」は、４つのデオキシリボ核酸塩基、アデニン（Ａ）、グアニン（Ｇ）、シトシン（Ｃ）、およびチミン（Ｔ）のいずれか、または４つのリボ核酸塩基、アデニン（Ａ）、グアニン（Ｇ）、シトシン（Ｃ）、およびウラシル（Ｕ）のいずれかを指す。本明細書の用法では、「コドン」は、特定アミノ酸をコードする一連の３個のヌクレオチド塩基を指す。遺伝コードは図２２に提

示され、３個のヌクレオチド塩基組み合わせの実質的に全ての可能性が集められ、ほとんどの場合、特定アミノ酸に割り当てられている。概して、各アミノ酸は、１つまたは複数のコドンによってコードされ得る。下の表１は、各アミノ酸の実質的に全てのコドン可能性を提示する。

【表１】

表1: DNAコドン表			
アミノ酸	DNAコドン	アミノ酸	DNAコドン
Ala/A	GCT, GCC, GCA, GCG	Leu/L	TTA, TTG, CTT, CTC, CTA, CTG
Arg/R	CGT, CGC, CGA, CGG, AGA, AGG	Lys/K	AAA, AAG
Asn/N	AAT, AAC	Met/M	ATG
Asp/D	GAT, GAC	Phe/F	TTT, TTC
Cys/C	TGT, TGC	Pro/P	CCT, CCC, CCA, CCG
Gln/Q	CAA, CAG	Ser/S	TCT, TCC, TCA, TCG, AGT, AGC
Glu/E	GAA, GAG	Thr/T	ACT, ACC, ACA, ACG
Gly/G	GGT, GGC, GGA, GGG	Trp/W	TGG
His/H	CAT, CAC	Tyr/Y	TAT, TAC
Ile/I	ATT, ATC, ATA	Val/V	GTT, GTC, GTA, GTG
開始	ATG	停止	TAA, TGA, TAG

【００８３】

本明細書で提供されるヌクレオチド配列は、コードされるウイルス融合タンパク質のアミノ酸配列が、未修飾ヌクレオチド配列によってコードされるタンパク質のアミノ酸配列に類似するように、１つまたは複数のコドン内の１つまたは複数のヌクレオチド塩基を変更することで修飾し得る。コードされるウイルス融合タンパク質は、未修飾配列によってコードされるとタンパク質９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一であり得る。いくつかの実施形態では、修飾ヌクレオチド配列によってコードされるアミノ酸配列は、未修飾ヌクレオチド配列によってコードされるアミノ酸配列と同一である。表１に示されるように、アミノ酸および停止コドンのサブセットは、少なくとも２つのコドン可能性によってコードされ得る。例えばグルタミン酸は、ＧＡＡまたはＧＡＧによってコードされ得る。グルタミン酸のためのコドンが、ＧＡＡとして核酸配列内に存在する場合、三番目の位置におけるＡからＧへのヌクレオチド塩基置換は、依然としてグルタミン酸をコードする修飾コドンをもたらす。したがってコドン内の１つまたは複数のヌクレオチド塩基の特定の変化は、依然として同一アミノ酸のコードをもたらす。この方法は、場合によっては、本明細書でコドン最適化と称される。本明細書で提供されるのは、（配列番号１６および１７で記載される）ＲＳＶ－Ｆのヌクレオチド配列の例であり、それは１つまたは複数のコドン内の１つまたは複数のヌクレオチド塩基を変更することで修飾されており、ＲＳＶ－Ｆアミノ酸配列は、未修飾ヌクレオチド配列によってコードされる（配列番号２で記載される）アミノ酸配列と同一である。本明細書ではまた、例えば（配列番号４、５、および６で記載される）可溶性ＲＳＶ－Ｆのヌクレオチド配列もまた提供され、それは１つまたは複数のコドン内の１つまたは複数のヌクレオチド塩基を変更することで修飾されており、ｓＲＳＶ－Ｆアミノ酸配列は未修飾ヌクレオチド配列によってコードされる（配列番号７で記載される）アミノ酸配列と同一である。本明細書ではまた、例えば（配列番号１１記載される）ｈＰＩＶ３－Ｆのヌクレオチド配列もまた提供され、それは１つまたは複数のコドン内の１つまたは複数のヌクレオチド塩基を変更することで修飾されており、ｈＰＩＶ３－Ｆアミノ酸配

列は未修飾ヌクレオチド配列によってコードされる（配列番号１２で記載される）アミノ酸配列と同一である。

【００８４】

本明細書で提供されるヌクレオチド配列は、ａ）コードされたウイルス融合タンパク質のアミノ酸配列が未修飾ヌクレオチド配列によってコードされるタンパク質のアミノ酸配列に類似しまたは同一であり；ｂ）グアニンとシトシンの合わせた百分率（％ＧＣ）が、未修飾ヌクレオチド配列と比較して修飾ヌクレオチド配列中で増大するように、１つまたは複数のコドン内の１つまたは複数のヌクレオチド塩基を変更することで修飾され得る。例えば％ＧＣは、約４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、６０、６１、６２、６３、６４、６５、６６、６７、６８、６９、７０、７５、８０、８５、９０、９５、または９９％以上であり得る。表１に示されるように、ヌクレオチド塩基は、第１、第２、および／または三番目のコドン位置で変更し得て、それによってアミノ酸および／または停止コドン割り当てを保ちながら、ＡまたはＴをＧまたはＣに変更し得る。本明細書で提供されるのは、１つまたは複数のコドン内で１つまたは複数のヌクレオチド塩基を変更することで修飾されている（配列番号１７で記載される）ＲＳＶ－Ｆのヌクレオチド配列の一例であり、それによってＲＳＶ－Ｆアミノ酸配列は、未修飾ヌクレオチド配列によってコードされる（配列番号２で記載される）アミノ酸配列と同一であり、グアニンとシトシンの合わせた百分率（％ＧＣ）は、未修飾ヌクレオチド配列（３５％ＧＣ；配列番号１で記載される）と比較して、修飾ヌクレオチド配列（５８％ＧＣ）内で増大する。本明細書では一実施形態において、例えば１つまたは複数のコドン内で１つまたは複数のヌクレオチド塩基を変更することで修飾されている、（配列番号４、５、および６で記載される）可溶性ＲＳＶ－Ｆのヌクレオチド配列もまた提供され、それによってｓＲＳＶ－Ｆアミノ酸配列は、未修飾ヌクレオチド配列によってコードされる（配列番号７で記載される）アミノ酸配列と同一であり、グアニンとシトシンの合わせた百分率（％ＧＣ）は、未修飾ヌクレオチド配列（３５％ＧＣ；配列番号３で記載される）と比較して、修飾ヌクレオチド配列（配列番号４では４６％ＧＣ；配列番号６では５１％ＧＣ；配列番号５では５８％ＧＣ）内で増大する。本明細書では、例えば１つまたは複数のコドン内で１つまたは複数のヌクレオチド塩基を変更することで修飾されている（配列番号１１で記載される）ｈＰＩＶ３－Ｆのヌクレオチド配列もまた提供され、それによってｈＰＩＶ３－Ｆアミノ酸配列は、未修飾ヌクレオチド配列によってコードされる（配列番号１２で記載される）アミノ酸配列と同一であり、グアニンとシトシンの合わせた百分率（％ＧＣ）は、未修飾ヌクレオチド配列（３６％ＧＣ；配列番号１０で記載される）と比較して、修飾ヌクレオチド配列（６０％ＧＣ）内で増大する。

【００８５】

本明細書で提供されるヌクレオチド配列は、ａ）コードされたウイルス融合タンパク質のアミノ酸配列が未修飾ヌクレオチド配列によってコードされるタンパク質のアミノ酸配列に類似しまたは同一であり；ｂ）グアニンとシトシンの合わせた百分率（％ＧＣ）が、未修飾ヌクレオチド配列と比較して、修飾ヌクレオチド配列内で増大し；ｃ）三番目のヌクレオチドコドン位置におけるグアニンとシトシンの全体的に合わせた百分率（％ＧＣ３）が、未修飾ヌクレオチド配列と比較して、修飾ヌクレオチド配列内で増大するように、１つまたは複数のコドン内の１つまたは複数のヌクレオチド塩基を変更することで修飾され得る。例えば％ＧＣ３は、約５５、５６、５７、５８、５９、６０、６５、７０、７５、７６、７７、７８、７９、８０、８５、９０、９５、９６、９７、９８、９９、または１００％であり得る。表１に示すように、ほとんどのヌクレオチド塩基置換の可能性は、三番目のヌクレオチドコドン位置にある。いくつかの実施形態では、停止コドンをはじめとする全てのコドンは、アミノ酸割り当てを変更することなく、三番目のヌクレオチドコドン位置において既にＧまたはＣのいずれかを有し、または三番目のヌクレオチドコドン位置においてＧまたはＣを有するように修飾し得る。したがってあらゆる所与のヌクレオチド配列では、ヌクレオチド配列全体にわたり各三番目のヌクレオチドコドン位置（ＧＣ３）において、最高１００％のＧまたはＣを有することが可能である。本明細書で提供さ

れるのは、１つまたは複数のコドン内で１つまたは複数のヌクレオチド塩基を変更することで修飾されている（配列番号１７で記載される）ＲＳＶ－Ｆのヌクレオチド配列の一実施形態であり、それによってＲＳＶ－Ｆアミノ酸配列は、未修飾ヌクレオチド配列によってコードされる（配列番号２で記載される）アミノ酸配列と同一であり、三番目のヌクレオチドコドン位置におけるグアニンとシトシンの全体的に合わせた百分率は、未修飾ヌクレオチド配列（３１％ＧＣ３；配列番号１で記載される）と比較して、修飾ヌクレオチド配列（１００％ＧＣ３）内で増大する。本明細書では、１つまたは複数のコドン内で１つまたは複数のヌクレオチド塩基を変更することで修飾されている、（配列番号４、５、および６で記載される）ｓＲＳＶ－Ｆのヌクレオチド配列もまた提供され、それによってｓＲＳＶ－Ｆアミノ酸配列は、未修飾ヌクレオチド配列によってコードされる（配列番号７で記載される）アミノ酸配列と同一であり、三番目のヌクレオチドコドン位置におけるグアニンとシトシンの全体的に合わせた百分率は、未修飾ヌクレオチド配列（３１％ＧＣ３；配列番号３で記載される）と比較して、修飾ヌクレオチド配列（配列番号４では５８％ＧＣ３；配列番号６では７６％ＧＣ３；配列番号５では１００％ＧＣ３）内で増大する。本明細書で提供されるのは、１つまたは複数のコドン内で１つまたは複数のヌクレオチド塩基を変更することで修飾されている（配列番号１１で記載される）ｈＰＩＶ３－Ｆのヌクレオチド配列の一実施形態であり、それによってｈＰＩＶ３－Ｆアミノ酸配列は、未修飾ヌクレオチド配列によってコードされる（配列番号１２で記載される）アミノ酸配列と同一であり、三番目のヌクレオチドコドン位置におけるグアニンとシトシンの全体的に合わせた百分率は、未修飾ヌクレオチド配列（２９％ＧＣ１；配列番号１０で記載される）と比較して、修飾ヌクレオチド配列（１００％ＧＣ３）内で増大する。

【００８６】

シス調節因子

特定の実施形態では、ヌクレオチド配列は、シス調節因子を含み得る。シス調節因子またはシス因子は、その同一ＤＮＡ分子上に位置する遺伝子の発現を調節する、ＤＮＡまたはＲＮＡの領域である。シス調節因子は、１つまたは複数のトランス作用因子の結合部位であり得る。シス因子は、例えばそれが制御する遺伝子のコード配列の５’側（プロモーター領域内またはさらに上流）、イントロン内、またはＯＲＦの３’側、非翻訳または非転写領域内に位置してもよい。シス調節因子を改変発現コンストラクトに付加して、生体外または生体内発現系におけるｍＲＮＡ転写および／またはｍＲＮＡプロセッシングを調節し得る。シス調節因子の例としては、制限なしに、転写後調節因子（ＰＲＥ）、フレームシフト因子、鉄反応エレメント（ＩＲＥ）、配列内リボソーム進入部位（ＩＲＥＳ）、ＴＡＴＡボックス、Ｐｒｉｂｎｏｗボックス、ＳＯＳボックス、ＣＡＡＴボックス、ＣＣＡＡＴボックス、上流活性化配列（ＵＡＳ）、ポリアデニル化シグナル、ＡＵリッチ領域、および当該技術分野で公知のその他のシス調節ＲＮＡ因子が挙げられる。

【００８７】

いくつかの実施形態では、ヌクレオチド配列は転写後調節因子を含み得る。転写後調節因子は、細胞質ｍＲＮＡレベルを増大させ得る、シス作用ＲＮＡ因子である。ウイルスは、転写後調節因子（ＰＲＥ）を利用して、ｍＲＮＡの安定性と３’末端の形成を可能にすることで、遺伝子発現を高め、宿主細胞核から細胞質へのｍＲＮＡの移行を促進することが多い。ＰＲＥはまた、改変発現コンストラクトに添加されて、生体外または生体内発現系における転写から生じるｍＲＮＡレベルを上昇させるのを助け得る。

【００８８】

転写後調節因子の例としては、制限なしに、Ｂ型肝炎ウイルス（ＨＰＲＥ）およびウッドチャック肝炎ウイルス（ＷＰＲＥ）の転写後調節因子（ＰＲＥ）が挙げられる。どちらのＰＲＥもヘパドナウイルスのシス作用ＲＮＡ因子であり、核から細胞質へのｍＲＮＡ移行を促進し、３’末端プロセッシングと安定性を促進することで、イントロンを含まない遺伝子の細胞質ｍＲＮＡの蓄積を増大させ得る。ＨＰＲＥおよびＷＰＲＥのどちらも、発現ベクターの発現効率を増大させるために使用し得る。いくつかの実施形態では、ＨＰＲＥは発現コンストラクトに付加される。ＷＰＲＥは、時に発現コンストラクトに付加され

る。例えばＷＰＲＥは、本明細書で提供されるヌクレオチド配列のいずれかと、（例えばヌクレオチド配列の５’位で、ヌクレオチド配列の３’位で、または発現ベクター内のあらゆる位置で）機能的に結合させ得る。いくつかの実施形態では、ＷＰＲＥは、本明細書で提供されるヌクレオチド配列のいずれかと、ヌクレオチド配列の３’末端下流の位置で、機能的に結合させ得る。特定の実施形態では、ＷＰＲＥは、発現ベクター内に存在する、ヌクレオチド配列の３’末端下流で、ＳＶ４０ポリＡ領域の５’末端上流の位置で、本明細書で提供されるヌクレオチド配列のいずれかと機能的な位置に配置させ得る。

【００８９】

細胞

発現ベクターは、タンパク質発現のために、あらゆる適切な細胞系内で増殖させ得る。いくつかの実施形態では、発現ベクターは、形質移入発現ベクターからの有用なタンパク質発現レベルを提供する、付着または非付着哺乳類細胞系統で利用し得る。「有用なタンパク質発現レベル」という用語は、本明細書の用法では、タンパク質生成で使用される十分な量のタンパク質が単離できるレベルでの、所望のタンパク質の生成を指す。哺乳類細胞の非限定的例としては、ＣＨＯ細胞、ＣＨＯ－Ｓ細胞、ＣＡＴ－Ｓ細胞、Ｖｅｒｏ細胞、ＢＳＲ－Ｔ７細胞、Ｈｅｐ－２細胞、ＭＢＣＫ細胞、ＭＤＣＫ細胞、ＭＲＣ－５細胞、ＨｅＬａ細胞、およびＬＬＣ－ＭＫ２細胞が挙げられる。

【００９０】

接着細胞

接着細胞は、概して組織培養プラスチックまたはマイクロキャリアなどの表面を必要とし、それは細胞外マトリックス成分で被覆されて、付着性を増大させ、増殖と分化に必要なその他のシグナルを提供してもよい。固形組織に由来する多数の細胞は、付着性である。別のタイプの付着培養は、器官型培養と称される。器官型培養法は、典型的に、二次元（例えば２Ｄ）培養皿とは対照的に、三次元（例えば３Ｄ）環境内での細胞の培養を伴う。３Ｄ培養系は、生体内組織と、生物化学的および生理学的により類似するが、維持することが技術的により困難である。接着細胞系統の非限定的例としては、Ｖｅｒｏ細胞、ＭＲＣ－５細胞、およびＢＳＲ－Ｔ７細胞が挙げられる。

【００９１】

Ｖｅｒｏ細胞

Ｖｅｒｏ細胞は、ウイルスを増殖させてワクチンを製造するために、広く使用されている細胞系である。Ｖｅｒｏ細胞は、１９６２年に、アフリカミドリザル（Ｃｅｒｃｏｐｉｔｈｅｃｕｓ　ａｅｔｈｉｏｐｓ）の腎臓上皮細胞から誘導された。Ｖｅｒｏ細胞は、広範なウイルスに罹患しやすく、これらのウイルスと関連付けられている疾患に対する、ワクチン開発で使用されることが多い。Ｖｅｒｏ細胞は、数多くの目的で使用され、その非限定的例としては、以下が挙げられる。（ｉ）大腸菌（Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ）毒素のスクリーニング（例えば大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）毒素はこの細胞系にちなんで当初「Ｖｅｒｏ毒素」と命名され、後に、志賀赤痢菌（Ｓｈｉｇｅｌｌａ　ｄｙｓｅｎｔｅｒｉａｅ）から単離された志賀毒素との類似性のために「志賀毒素様毒素」と称された）、（ｉｉ）ウイルス培養の宿主細胞として（例えば研究医薬品の存在または不在下における複製を測定するため、狂犬病ウイルスの存在を試験するため、または研究目的でのウイルス系統増殖）、（ｉｉｉ）真核生物寄生生物（例えばトリパノソーマ類）の宿主細胞として。

【００９２】

Ｖｅｒｏ細胞系統は、継続的および異数体である。継続細胞系統は、多数の分裂サイクルを通じて複製され、老化しない。異数体は、異常な染色体数を有することが特徴的である。Ｖｅｒｏ細胞はまた、正常な哺乳類細胞とは異なり、インターフェロンが欠損しており、ウイルス感染時にＶｅｒｏは１型インターフェロンを分泌しないが、Ｖｅｒｏ細胞はインターフェロンα／β受容体を有するので、それらは別の供給源からのインターフェロンが培養に添加されると、正常に反応する。

【００９３】

Ｖｅｒｏ細胞は、異なった系統を有することが示されている。Ｖｅｒｏ「由来」細胞系統の非限定的例としては、Ｖｅｒｏ細胞（例えばＡＴＣＣ番号ＣＣＬ－８１）、Ｖｅｒｏ７６（例えばＡＴＣＣ番号ＣＲＬ－１５８７、１９６８年にＶｅｒｏ細胞から単離された）、およびＶｅｒｏ　Ｅ６細胞（例えばＡＴＣＣ番号ＣＲＬ－１５８６、Ｖｅｒｏ　７６細胞からクローンされた）が挙げられる。Ｖｅｒｏ細胞は、無血清培地中での増殖に適応させられている。

【００９４】

ＭＲＣ－５細胞

ＭＲＣ－５細胞（例えばＡＴＣＣ番号ＣＣＬ－１７１）は、正常な胎児肺組織に由来するヒト雄性二倍体（例えば４６染色体、ＸＹ）細胞系である。ＭＲＣ－５細胞は、概して線維芽細胞様細胞形態を有する。細胞系統は、１９６６年に最初に確立された。ＭＲＣ－５細胞は、概して継続的（例えば不死）であると見なされないが、老化は約４２～４８回の倍加後に起きるので、老化が起きる前に６０～７０回に至る倍加が見られる。ＭＲＣ－５は、広範囲に及ぶヒトウイルスに罹患しやすいので、ウイルス増殖およびワクチン製造のための有用な細胞系である。ＭＲＣ－５細胞が罹患しやすいウイルスの非限定的例としては、アデノウイルス；コクサッキーＡ；サイトメガロウイルス；エコーウイルス；単純ヘルペスウイルス；ポリオウイルス；ライノウイルス；呼吸器合胞体ウイルス；および水痘帯状疱疹ウイルスが挙げられる。ＭＲＣ－５細胞は、時に生体外細胞毒性試験でも使用される。

【００９５】

ＢＳＲ－Ｔ７／５細胞

ＢＳＲ－Ｔ７／５細胞は、Ｔ７ＲＮＡポリメラーゼを恒常的に発現する、ＢＨＫ－２１（Ｃ－１３）由来細胞系である。ＢＳＲ－Ｔ７／５細胞は、ニューカッスル病、ウシ呼吸器合胞体、エボラウイルス、狂犬病ウイルス、リフトバレー熱ウイルスその他を引き起こすウイルスのための動物質を含まないウイルス回収系を確立するために使用されている。ＢＳＲ－Ｔ７／５細胞はまた、ワクシニアウイルス非含有の水疱性口内炎ウイルス（ＶＳＶ）回収系を確立するためにも使用されている。

【００９６】

ＢＨＫ－２１（Ｃ－１３）（例えばＡＴＣＣ番号ＣＣＬ－１０）は、ハムスターおよびヌードマウスに腫瘍を引き起こす、不死化ベビーシリアンゴールデンハムスター（例えばゴールデンハムスター（Ｍｅｓｏｃｒｉｃｅｔｕｓ　ａｕｒａｔｕｓ））腎臓細胞系である。ＢＨＫ－２１（Ｃ－１３）の親系統は、１９６１年に５匹の雌雄選別がされていない１日齢のハムスターの腎臓から誘導された。凍結による８日間の保存のみにより中断された８４日間の継続的培養に続いて、単細胞単離によってクローン１３（例えば（Ｃ－１３））が創始された。ＢＨＫ－２１由来細胞は偽二倍体であり、四倍性が約４％で生じる。ＢＨＫ－２１由来細胞は、線維芽細胞様細胞形態を有する。ＢＨＫ－２１由来細胞は、いくつかのウイルスに罹患しやすく、その非限定的例としては、ヒトアデノウイルス２５、レオウイルス３、水疱性口内炎ウイルス、およびヒトポリオウイルス２が挙げられる。

【００９７】

非接着細胞

非接着細胞は、常態では、表面に付着することなく懸濁状態で存在する。非接着細胞の非限定的例は、概して互いにおよび／または下層のマトリックスに付着する組織細胞とは異なり、常態では血流内に循環して存在する血液細胞である。特定の細胞系は、懸濁培養中で培養するために改変されており、接着状態で通常可能であるよりも高い密度で、細胞が増殖できるようにする。接着哺乳類細胞の非限定的例は、ＣＨＯ由来細胞、ＣＨＯ－Ｓ細胞、およびＣＡＴ－Ｓ細胞である。いくつかの実施形態では、ＣＡＴ－Ｓ細胞中でタンパク質発現ベクターが増殖される。

【００９８】

ＣＨＯおよびＣＨＯ由来細胞

ＣＨＯ細胞（例えばＣＨＯ－Ｋ１、ＡＴＣＣ番号ＣＣＬ－６１、ＥＣＡＣＣ受入番号８

５０５１００５）は、チャイニーズハムスター（例えばチャイニーズハムスター（Ｃｒｉｃｅｔｕｌｕｓ ｇｒｉｓｅｕｓ））卵巣に由来する接着細胞系である。細胞系は、１９５７年に成体チャイニーズハムスターの卵巣生検から創始された親ＣＨＯ細胞系から、サブクローンとして誘導された。細胞は、プロリン栄養要求株であり、表皮成長因子受容体（ＥＧＦＲ）を発現しない。ＣＨＯ細胞は、それらの迅速な増殖と高いタンパク質生成のために、広く使用される細胞系となっている。ＣＨＯ由来細胞系は、研究および生物工学で、特に長期安定遺伝子発現とタンパク質の高収率が必要とされる場合に、頻繁に使用される。

【００９９】

非接着および緩い接着ＣＨＯ細胞系統が単離されている。非接着ＣＨＯ由来細胞系の非限定的例としては、ＣＨＯ－Ｐｒｏ５（例えばＡＴＣＣ番号ＣＲＬ－１７８１）およびＣＨＯ－ＡＡ８（例えばＡＴＣＣ番号ＣＲＬ－１８５９）が挙げられる。追加的なＣＨＯ由来系統が、ＣＨＯ－ＡＡ８から確立されており、その全てでなくとも多数は、懸濁状態で培養し得る（例えばＣＨＯ－ＵＶ４１、ＡＴＣＣ番号ＣＲＬ－１８６０；ＣＨＯ－ＥＭ９、ＡＴＣＣ番号ＣＲＬ－１８６１；ＣＨＯ－ＵＶ２０、ＡＴＣＣ番号ＣＲＬ－１８６２；ＣＨＯ－ＵＶ５、ＡＴＣＣ番号ＣＲＬ－１８６５；ＣＨＯ－ＵＶ２４、ＡＴＣＣ番号ＣＲＬ－１８６６；およびＣＨＯ－ＵＶ１３５、ＡＴＣＣ番号ＣＲＬ－１８６７）。多くのＣＨＯ由来細胞が上皮細胞様形態を有する一方で、いくつかは線維芽細胞様細胞形態を呈示する。

【０１００】

ＣＨＯ－Ｓ細胞

ＣＨＯ－Ｓ細胞（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）は、ＣＨＯ－Ｋ１細胞に由来する安定異数体クローン分離株である。ＣＨＯ－Ｓ親細胞系は、増殖および形質移入効率のために選択された。ＣＨＯ－Ｓ細胞は、組換えタンパク質の一過性のまたは安定発現のために、Ｌ－グルタミンおよびＨＴ補給剤が添加されたＣＤ ＣＨＯ培地（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）中での無血清懸濁培養に適応されている。

【０１０１】

ＣＡＴ－Ｓ細胞

ＣＡＴ－Ｓ細胞は、懸濁状態で増殖して、ＣＨＯ－Ｓ細胞との比較において改善されたタンパク質収率を示す、ＣＨＯ－Ｋ１由来細胞系である。ＣＡＴ－Ｓ細胞（ＥＣＡＣＣ受入番号１００９０２０１）はまた、無血清懸濁培養に適応されている。

【０１０２】

形質移入および形質転換

形質移入は、核酸または生体分子を細胞に導入する非ウイルス性の方法である。この用語は、概して動物由来真核細胞への核酸またはその他の生体分子（例えばタンパク質、抗体、ｓｉＲＮＡ、ＲＮＡ、オリゴヌクレオチド）の導入に言及するのに使用される一方、形質転換という用語は、細菌細胞および非動物性真核生物細胞に言及するのに使用される。真核生物細胞（例えば哺乳類細胞）への核酸またはその他の生体分子導入は、核酸が細胞膜を通過して細胞に入る経路または方法を提供することを頻繁に伴う。宿主細胞に核酸を導入する、あらゆる適切な方法を使用してもよい。形質移入法で使用するのに適した方法の非限定的例としては、電気穿孔、超音波穿通（例えば音波誘導細胞膜孔）、インペールフェクション（例えば細胞へのＤＮＡ被覆ナノファイバー導入）、リポフェクション（例えば核酸含有リポソームと宿主細胞との融合）、リン酸カルシウム沈殿、カチオン性ポリマー媒介エンドサイトーシス（例えばＤＥＡＥ－デキストラン、またはポリエチレンイミン（ｐｏｌｙｅｔｈｙｌｅｎｉｍｉｎｅ）形質移入）、遺伝子銃または生物学的粒子形質移入（例えば細胞核に直接撃ち込まれるＤＮＡ被覆ナノ粒子）、光学的形質移入（例えば細胞膜に一過性のミクロ細孔を生成するレーザーの使用）、熱ショック、マグネトフェクション、デンドリマー形質移入（例えばＤＮＡに結合し、細胞膜を越えて輸送され得る高度分枝有機化合物）、およびＬｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）、Ｌｉｐｏｆｅｃｔｉｎ、Ｄｏｊｉｎｄｏ Ｈｉｌｙｍａｘ、Ｆｕｇｅｎｅ（Ｆｕｇｅｎｔ

，ＬＬＣ）、ｊｅｔＰＥＩ、Ｅｆｆｅｃｔｅｎｅ、Ｎｕｃｌｅｏｆｅｃｔｏｒ、Ｐｒｏｍｏｆｅｃｔｉｎ、Ｕｐｔｉｆｅｃｔｉｎ、ＧＥＮＥｐｏｒｔｅｒまたはＤｒｅａｍＦｅｃｔなどの独自仕様の形質移入試薬、プロトコル、および／または装置の使用が挙げられる。

【０１０３】

安定および一過性形質移入

形質移入は、時に安定形質移入であり、時に一過性に形質移入である。形質移入法で導入される核酸（例えばＤＮＡ、ＲＮＡ、ＰＮＡなどまたはそれらの組み合わせ）は、通常、核ゲノムに挿入されず、したがって導入遺伝物質は、典型的に胞が有糸分裂を起こす前後に、最終的に失われる。形質移入核酸が核ゲノムに入らず、および／または選択的利点（例えばネオマイシン遺伝子を使用した、例えば毒素Ｇ４１８に対する選択）を提供しない方法は、一過性形質移入と称されることが多い。多くの用途（例えば一過性発現分析、規定増殖期間中のバイオリアクター内でのタンパク質、ウイルス、または抗体の製造）では、形質移入遺伝子の一過性発現で十分である。

【０１０４】

安定形質移入は、形質移入核酸（例えばＤＮＡ、ＲＮＡ）が、細胞およびその娘細胞のゲノム中に長期間にわたり残留することが所望される場合に用い得る（例えばゲノムへの組み込み、選択可能なマーカーの選択を通じて維持されるエピジェネティック因子）。ゲノムの組み込みがある安定形質移入体は、規定期間にわたり淘汰圧を除去し、それに続いて淘汰圧を再度かけることでさらに選択し得る。エピジェネティック因子は、淘汰圧が一定期間除去されると失われることが多く、したがって淘汰圧を再度かけることで、エピジェネティックな耐性因子を保有して失った細胞から選択し得る。

【０１０５】

細胞質および核形質移入

形質移入は、いくつかの実施形態では細胞質形質移入であり、または特定の実施形態では核形質移入であり得る。細胞質形質移入は、形質移入物質が選択的利点を提供し、淘汰圧が維持される場合に、時に安定形質移入をもたらし得る。核形質移入は効率に劣るが、形質移入核酸（例えばＤＮＡ）の安定組み込みのより高い発生率を提供する。

【０１０６】

多くの形質移入法が、核酸またはその他の生体分子を宿主細胞の細胞質に挿入する（例えばリポソーム媒介形質移入またはリポフェクション、リン酸カルシウム沈殿など）。細胞は、常態では輸送機序を利用して、ｍＲＮＡを細胞質から核へ輸送する（例えば異成分からなる核リボ核タンパク質－ＡＩ（ｈｎＲＮＰ－Ａ１））。発現コンストラクトにおけるまたはその他の核酸（例えばｍＲＮＡ、ｓｉＲＮＡ、プラスミドＤＮＡ、線状ＤＮＡなど）における特定の核標的化シグナルの使用は、核に輸送される形質移入物質の比率を増大させてもよく、およびまたは核に輸送される細胞質によって転写されたＲＮＡの比率を増大させてもよい。核標的シグナルの非限定的例は、ｈｎＲＮＰ－Ａ１のＭ９成分である。非特異的核キャリアもまた、核形質移入効率を増大させるのに使用し得る。非特異的核キャリアの非限定的例としては、プロタミン、ｐｏｌｙ－リジン／ｐＤＮＡ、およびカチオン性コレステロールが挙げられる。

【０１０７】

細胞ＤＮＡ組み込み

核酸が宿主細胞に形質移入されて、核に輸送された後、遺伝子組換え事象によって、宿主細胞ゲノムへの安定組み込み（例えば染色体への組み込み）が起こり得る。遺伝子組換えは、それによって核酸分子（例えばＤＮＡ、ＲＮＡ）を切断して、次に異なる核酸に連結させる方法である。組換えは、相同的組換えでは同様の核酸配列のＤＮＡ分子間で起き、または非相同的末端結合では異なる核酸配列のＤＮＡ分子間で起こり得る。組換えは、細菌および真核生物の双方において、ＤＮＡ修復の一般的方法である。真核生物では、組換えはまた減数分裂でも起きて、染色体乗換えが促進される。「染色体乗換え」という用語は、本明細書の用法では、概して減数分裂中に生じる、対合染色体間の組換えを指す。

分裂前期Ｉの間、４つの利用できる染色分体は、互いに密な構造にある。この構造中では、２つの染色分体上の相同部位（例えば同様の核酸配列がある部位）が互いに噛み合い、遺伝情報の交換（例えば組換え）を促進し得る。非相同的組換えは、配列が同様でない（例えば配列相同性がない）ＤＮＡ配列間で起こり得て、非相同的末端結合と称されることが多い。非相同的な末端結合（ＮＨＥＪ）は、ＤＮＡ中の二本鎖切断の修復に一般に使用される。ＮＨＥＪは、修復または乗換え移動を導くのに相同配列を要する相同的組換えとは対照的に、切断末端が相同的テンプレートの必要なく直接ライゲートされるため、「非相同的」と称される。不適切なＮＨＥＪは、腫瘍細胞の特徴である転座およびテロメア融合をもたらし得る。

【０１０８】

相同的組換えシグナルを核酸試薬または発現ベクターに組み入れて、形質移入核酸が核へ輸送される際のゲノムの組み込み確率をさらに増大させ得る。いくつかの実施形態では、核酸ベクターは、１つまたは複数のリコンビナーゼ挿入部位を含む。リコンビナーゼ挿入部位は、上述したような、組換えタンパク質による組み込み／組換え反応に関与する、核酸分子上の認識配列である。哺乳類細胞の形質移入に使用される核酸ベクターはまた、上述したような、組換えのためのトポイソメラーゼ組み込み部位も含み得る。

【０１０９】

転写

本明細書に記載される「転写」、「転写活性」、「細胞質転写」、および「核転写」という用語は、出発核酸の核酸コピーを作り出す方法を指す。転写は、ＤＮＡ核酸のＲＮＡコピーの生成を伴うことが多く、時に出発ＲＮＡ核酸のＮＤＡコピーの生成もまた伴い得る（例えば逆転写）。

【０１１０】

転写は、真核生物細胞では、（１）水素結合切断に従ってＤＮＡが巻き戻される／「ほどかれる（ｕｎｚｉｐ）」；（２）遊離ＲＮＡヌクレオチド対が相補的ＤＮＡ塩基と対合する；（３）ＲＮＡポリメラーゼの助けによってＲＮＡ糖リン酸主鎖が形成する；（４）巻かれていないＲＮＡ／ＤＮＡハイブリッドの水素結合が切断されて、新たに転写されたＲＮＡが遊離する；（５）ＲＮＡがさらにプロセッシングされ、次に小さな核孔を通って細胞質に移動するステップによって、特徴付けられ得る。転写はまた、上述のステップと重なる５段階を有すると見なし得る。転写のこれらの５段階は、前初期、開始、プロモータークリアランス、伸長、および終結を含む。

【０１１１】

前初期

真核生物では、ＲＮＡポリメラーゼが、ＤＮＡ中のコアプロモーター配列を認識する。プロモーターは、転写を促進するＤＮＡの領域であり、真核生物では、転写開始部位から－３０、－７５、および－９０塩基対上流に見られることが多い。コアプロモーター配列の変異は、転写開始を消滅させ得ることが示されている。ＲＮＡポリメラーゼはまた、様々な特定の転写因子の存在下において、コアプロモーターに結合できる。真核生物のコアプロモーター配列の非限定的例は、転写開始部位から２５～３０塩基対上流に見られる、ＴＡＴＡボックスとして知られている短鎖ＤＮＡ配列である。コアプロモーターとしてのＴＡＴＡボックスは、それ自体が、転写因子ＩＩ　Ｄ（ＴＦＩＩＤ）と称される別の転写因子のサブユニットである、ＴＡＴＡ結合タンパク質（ＴＢＰ）として知られている転写因子の結合部位である。ＴＦＩＩＤがＴＢＰを介してＴＡＴＡボックスに結合した後、さらに５つの転写因子およびＲＮＡポリメラーゼが、ＴＡＴＡボックス周囲で一連の段階で組み合わされて、前初期複合体が形成される。ヘリカーゼ活性を有する１転写因子であるＤＮＡヘリカーゼは、二本鎖ＤＮＡの対向する鎖の分離（例えば上のステップ（１）の巻き戻し）に関与して、一本鎖ＤＮＡテンプレートへのアクセスを提供する。前初期複合体単独では、低いまたは基底の転写速度のみが促される。活性化因子および抑制因子として知られているその他のタンパク質は、あらゆる付随する共活性化因子または共抑制因子と共に、調節転写速度に関与する。

【０１１２】
開始
前初期複合体が成形されて、遊離ＲＮＡ対が相補的ＤＮＡ塩基と対合した後、最初の結合が合成されてＲＮＡポリメラーゼが移動し、次の塩基における結合形成ができるようになる。
【０１１３】
プロモータークリアランス
最初の結合が合成された後、ＤＮＡに沿って移動することで、ＤＮＡポリメラーゼがプロモーターを除去する。この間、ＲＮＡポリメラーゼは、時にＲＮＡ転写物を遊離して、トランケート型転写物を生成する。これは転写開始の失敗と称され、真核生物および原核生物の双方で一般的である。転写開始の失敗は、σ因子が再配列するまで起き続け、（例えば３５ｂｐの移動するフットプリントを与える）転写伸長複合体がもたらされる。σ因子は、典型的に、８０ヌクレオチドのｍＲＮＡが合成される前に遊離される。転写物がおよそ２３ヌクレオチドに達すると、ポリメラーゼ複合体は、もはやスリップしなくなって伸長が起こり得る。転写におけるステップの多くは、エネルギー依存性であり、形成される各結合についてアデノシン三リン酸（ＡＴＰ）分子を消費する。プロモータークリアランスは、真核生物においてＲＮＡ　Ｐｏｌのカルボキシ末端ドメイン上のセリン５のリン酸化と同時に起こり、それは次にＴＦＩＩＨによってリン酸化される。
【０１１４】
伸長
転写が進行するにつれて、ＲＮＡポリメラーゼはテンプレート鎖を横断して、ＤＮＡテンプレートと相補性の塩基対形成を使用して、ＲＮＡコピーを作り出す。ＲＮＡポリメラーゼは、３’から５’に向けてテンプレート鎖を横断するが、コード（非テンプレート）鎖および新たに成形されたＲＮＡもまた基準点として使用し得るので、転写は５’から３’に向けて起きると記述し得る。これは、チミンのウラシルによる置換以外は、コード鎖の正確なコピーであるＲＮＡ分子を５’から３’に向けて生成する。ｍＲＮＡ転写は、単一ＤＮＡテンプレート上の複数のＲＮＡポリメラーゼと、複数回の転写（特定のｍＲＮＡの増幅）を伴い得るので、多数のｍＲＮＡ分子が遺伝子の単一コピー（例えば単一ｍＲＮＡ分子）から迅速に生成され得る。伸長はまた、誤って組み込まれた塩基を置換し得る、プルーフリーディング機序も伴う。真核生物では、プルーフリーディング機能は、転写中の小休止に相当して、適切なＲＮＡ編集因子を結合させてもよい。これらの休止は、ＲＮＡポリメラーゼに内在性であっても、またはクロマチン構造に起因してもよい。
【０１１５】
終結
真核生物における転写終結は、ポリアデニル化と称されるプロセスにおける、新しいＲＮＡ転写物の切断と、それに続く、新たに生成された３’末端におけるＡヌクレオチドのテンプレート非依存性付加を伴うと考えられる。ポリアデニル化部位上流で生じる推定上の真核生物終結シグナルは、ヌクレオチド配列ＡＡＵＡＡＡである。細菌における転写終結には、特定の終結タンパク質および／またはターミネーター配列が関与する。
【０１１６】
逆転写
特定のウイルスは、ＲＮＡをＤＮＡに転写する能力を有する。ＲＮＡウイルスは、ＤＮＡに複製されるＲＮＡゲノムを有する。結果として生じるＤＮＡは、宿主細胞のゲノムＤＮＡとマージし得る。ＲＮＡテンプレートからのＤＮＡの合成に関与する酵素は、逆転写酵素と称される。
【０１１７】
細胞質および核転写
転写は概して細胞核内で起き、スプライシングされていないヘテロ核ＲＮＡが、スプライシング（例えばイントロン配列の除去）のために細胞質に輸送され、成熟ｍＲＮＡが、タンパク質への翻訳のために核またはその他の細胞小器官（例えば小胞体）に輸送される

。いくつかのＤＮＡウイルス（例えばポックスウイルス）および多数のＲＮＡウイルスの複製、転写、および翻訳は、細胞の細胞質内で起きる。細胞質ウイルス転写には、時にウイルスゲノムがコードするタンパク質の活性が関与する。

【０１１８】

転写の測定および検出

転写は、多様な様式で測定し検出し得る。転写の検出で使用し得るアッセイの非限定的例としては、核ランオンアッセイ（例えば新たに形成された転写物の相対存在量の測定）；ＲＮａｓｅ保護アッセイおよびＲＮＡＰのＣｈＩＰ－Ｃｈｉｐ（例えば活性転写部位の検出）；ＲＴ－ＰＣＲ（例えば全または核ＲＮＡレベルの絶対存在量の測定）；ＤＮＡマイクロアレイ（例えば全体的または核ＲＮＡレベルの相対存在量の測定）；原位置ハイブリダイゼーション（例えば１つまたは複数の特定転写物の存在の検出）；ＭＳ２標識付け（例えばＭＳ２ステムループと高親和性配列特異的相互作用を有するＭＳ２コートタンパク質と、ＧＦＰとの融合を使用した、ＭＳ２　ＲＮＡステムループタグの検出；転写部位へのＧＦＰの動員は単一蛍光スポットとして視覚化される）；ノーザンブロット（例えば核酸ハイブリダイゼーションに基づく、ＤＮＡまたはＲＮＡ相補的プローブによるＲＮＡブロットの探索）；ＲＮＡの相対存在量の測定を可能にする、ＲＮＡ－Ｓｅｑ（例えばトランスクリプトーム全体の配列分析を伴う配列決定技術（例えば遺伝子シグネチャー解析）；および融合遺伝子、翻訳後編集、および新規スプライス部位などの追加的なバリエーションの検出）が挙げられる。

【０１１９】

細胞培養およびタンパク質生成

本技術は、無血清細胞培養液と、高度に再現可能で効率的な規模拡大し得るプロセスとを提供する。特定の実施形態では、制限なしに、単回使用バイオリアクター、および標準再利用可能バイオリアクター（例えばステンレス鋼およびガラス容器バイオリアクター）をはじめとするバイオリアクター内で、比較的大量のタンパク質を生成する方法が提供される。

【０１２０】

いくつかの実施形態では、本技術は、細胞（例えばＣＡＴ－Ｓ細胞）の高細胞密度への増殖を支持する、富化無血清細胞培養液を提供する。細胞を増殖するのに使用される細胞培養液は、非腫瘍形成性である、非発がん性である、付着細胞として培養される、非付着細胞として培養される、上皮性様形態を有する、培養時に様々なウイルスの複製を支持する、および本明細書に記載されるような所望のタンパク質生成物（例えば抗体、ウイルス粒子など）の生成を支持することをはじめとするが、これに限定されるものではない、１つまたは複数の細胞特性に影響を及ぼし得る。タンパク質生産のための組織培養用途における血清または動物抽出物の使用を最小化または排除し、偶発性作用物質（例えばマイコプラズマ、ウイルス、およびプリオン）による汚染の危険を低下させ、プレＧＭＰ条件を満たして、タンパク質精製法を複雑にし得る追加的なタンパク質の導入の排除を確実にする。細胞培養手順で必要な操作数を最小化することで、汚染可能性を顕著に低下させ得る。

【０１２１】

いくつかの実施形態では、細胞は、無血清培養液（本明細書で「無血清培地」とも称される）中で培養される。無血清培地は、時に富化され、時に細胞は、培地交換または補給を利用しない、バッチ培養法で培養される。

【０１２２】

特定の実施形態では、無血清培地は、ＣＤ－ＣＨＯ培地（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）の全ての成分を含んでなる。

【０１２３】

いくつかの実施形態では、無血清培地は、植物加水分解物を含んでなる。植物加水分解物としては、以下の１つまたは複数に由来する加水分解物が挙げられるが、これに限定されるものではない。トウモロコシ、綿実、エンドウマメ、ダイズ、麦芽、ジャガイモ、お

よびコムギ。植物加水分解物は、酵素加水分解によって生成されてもよく、概してペプチド、遊離アミノ酸、および成長因子の混合物を含有する。植物加水分解物は、例えばＭａｒｃｏｒ Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔ、ＨｙＣｌｏｎｅ、およびＯｒｇａｎｏ Ｔｅｃｈｎｉｅをはじめとする、いくつかの市販の供給元から容易に得られる。特定の実施形態ではまた、植物加水分解物の代わりに、またはそれと組み合わせて、酵母加水分解物を利用してもよい。

【０１２４】

酵母加水分解物は、例えばＳｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ、ＵＳＢ Ｃｏｒｐ、Ｇｉｂｃｏ／ＢＲＬその他をはじめとする、市販の供給元から得られる。特定の実施形態では、植物または酵母加水分解物に加えて、またはその代わりに、合成加水分解物を使用し得る。いくつかの実施形態では、無血清培地は、約０．１ｇ／Ｌ～約５．０ｇ／Ｌ、または約０．５ｇ／Ｌ～約４．５ｇ／Ｌ、または約１．０ｇ／Ｌ～約４．０ｇ／Ｌ、または約１．５ｇ／Ｌ～約３．５ｇ／Ｌ、または約２．０ｇ／Ｌ～約３．０ｇ／Ｌの最終濃度で、植物加水分解物を含んでなる。特定の実施形態では、無血清培地は、２．５ｇ／Ｌの最終濃度で植物加水分解物を含んでなる。いくつかの実施形態では、無血清培地は、２．５ｇ／Ｌの最終濃度でコムギ加水分解物を含んでなる。

【０１２５】

特定の実施形態では、無血清培地は、脂質補給剤を含んでなる。培養液に栄養補給するのに使用されてもよい脂質としては、既知組成の動物および植物由来脂質補給剤ならびに合成的に誘導された脂質が挙げられるが、これに限定されるものではない。脂質補給剤中に存在してもよい脂質の非限定的例としては、コレステロール、飽和および／または不飽和脂肪酸（例えばアラキドン酸、リノレン酸、リノレン酸、ミリスチン酸、オレイン酸、パルミチン酸、およびステアリン酸）が挙げられる。コレステロールが、脂質補給剤の１００×原液中に、０．１０ｍｇ／ｍｌ～０．４０ｍｇ／ｍｌの濃度で存在してもよい。脂肪酸が、脂質補給剤の１００×原液中に、１μｇ／ｍｌ～２０μｇ／ｍｌの濃度で存在してもよい。培地調合物に適する脂質は、例えばＨｙＣｌｏｎｅ、Ｇｉｂｃｏ／ＢＲＬ、およびＳｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈをはじめとするいくつかの市販の供給元から容易に得られる。

【０１２６】

いくつかの実施形態では、無血清培地は、既知組成の脂質濃縮物を約０．１Ｘ～約２Ｘ、または約０．２Ｘ～約１．８Ｘ、または約０．３Ｘ～約１．７Ｘ、または約０．４Ｘ～約１．６Ｘ、または約０．５Ｘ～約１．５Ｘ、または約０．６Ｘ～約１．４Ｘ、または約０．７Ｘ～約１．３Ｘ、または約０．８Ｘ～約１．２Ｘの最終濃度で含んでなる。特定の実施形態では、無血清培地は、既知組成の脂質濃縮物（ＣＤＣＬ）溶液を１Ｘの最終濃度で含んでなり、式中、Ｘは特定の実施形態では、約０．０１マイクログラム／ｍｌ～約４０マイクログラム／ｍＬである。いくつかの実施形態では、無血清培地は、既知組成の脂質濃縮物（ＣＤＣＬ）溶液を１Ｘの最終濃度で含んでなる。特定の実施形態では、無血清培地は、微量成分を含んでなる。使用されてもよい微量成分としては、ＣｕＳＣＶＳH_2Ｏ、ＺｎＳＯ４－７H_2Ｏ、セレナイト－２Ｎａ、第二鉄クエン酸、ＭｎＳ（ＶH_2Ｏ、Na_2SiO_3－９H_2Ｏ、モリブデン酸アンモニウム塩、NH_4VO_3、ＮｉＳＯ４－６H_2Ｏ、$SnCl_2$（無水）、Ａ１Ｃ１３－６H_2Ｏ、$AgNO_3$、Ｂａ（$C_2H_3O_2$）$_2$、ＫＢｒ、$CdCl_2$、$CoCl_2$－６H_2Ｏ、$CrCl_3$（無水）、ＮａＦ、GeO_2、ＫＩ、ＲｂＣｌ、$ZrOCl_2$－８H_2Ｏが挙げられるが、これに限定されるものではない。微量成分の濃縮原液は、例えばＣｅｌｌ Ｇｒｏｗ（カタログ番号９９－１８２、９９－１７５、および９９－１７６参照）をはじめとする、いくつかの市販の供給元から容易に得られる。

【０１２７】

特定の実施形態では、無血清培地は、１つまたは複数のホルモン、成長因子および／またはその他の生物学的分子を含んでなる。ホルモンとしては、トリヨードチロニン、インシュリン、およびヒドロコルチゾンが挙げられるが、これに限定されるものではない。成

長因子としては、表皮成長因子（ＥＧＦ）、インシュリン成長因子（ＩＧＦ）、形質転換成長因子（ＴＧＦ）、および線維芽細胞成長因子（ＦＧＦ）が挙げられるが、これに限定されるものではない。いくつかの実施形態では、無血清培地は、表皮成長因子（ＥＧＦ）を含んでなる。その他の生物学的分子としては、サイトカイン（例えば顆粒球－マクロファージコロニー－刺激因子（ＧＭ－ＣＳＦ）、インターフェロン、インターロイキン、ＴＮＦ）、ケモカイン（例えばランテス、エオタキシン、マクロファージ炎症性タンパク質（ＭＩＰ））、およびプロスタグランジン（例えばプロスタグランジンＥ１およびＥ２）が挙げられる。いくつかの実施形態では、無血清培地は、成長因子を約０．０００１～約０．０５ｍｇ／Ｌ、または約０．０００５～約０．０２５ｍｇ／Ｌ、または約０．００１～約０．０１ｍｇ／Ｌ、または約０．００２～約０．００８ｍｇ／Ｌ、または約０．００３ｍｇ／Ｌ～約０．００６ｍｇ／Ｌの最終濃度で含んでなる。特定の実施形態では、無血清培地は、ＥＧＦを０．００５ｍｇ／Ｌの最終濃度で含んでなる。いくつかの実施形態では、無血清培地は、トリヨードチロニンを約１×１０$^{-12}$Ｍ～約１０×１０１０$^{-12}$Ｍ、または約２×１０１０$^{-12}$Ｍ～約９×１０$^{-12}$Ｍ、または約３×１０$^{-12}$Ｍ～約７×１０１０$^{-12}$Ｍ、または約４×１０$^{-12}$Ｍ～約６×１０$^{-12}$Ｍの最終濃度で含んでなる。特定の実施形態では、無血清培地は、トリヨードチロニンを５×１０１０$^{-12}$Ｍの最終濃度で含んでなる。一実施形態では、無血清培地は、インシュリンを約１ｍｇ／Ｌ～約１０ｍｇ／Ｌ、または約２．０～約８．０ｍｇ／Ｌ、または約３ｍｇ／Ｌ～約６ｍｇ／Ｌの最終濃度で含んでなる。いくつかの実施形態では、無血清培地は、インシュリンを５ｍｇ／Ｌの最終濃度で含んでなる。特定の実施形態では、無血清培地は、プロスタグランジンを約０．００１ｍｇ／Ｌ～約０．０５ｍｇ／Ｌ、または約０．００５ｍｇ／Ｌ～約０．０４５ｍｇ／Ｌ、または約０．０１ｍｇ／Ｌ～約０．０４ｍｇ／Ｌ、または約０．０１５ｍｇ／Ｌ～約０．０３５ｍｇ／Ｌ、または約０．０２ｍｇ／Ｌ～約０．０３ｍｇ／Ｌの最終濃度で含んでなる。いくつかの実施形態では、無血清培地は、０．０２５ｍｇ／Ｌの最終濃度でプロスタグランジンを含んでなる。特定の実施形態では、無血清培地は、プロスタグランジンＥ１を０．０２５ｍｇ／Ｌの最終濃度で含んでなる。

【０１２８】

いくつかの実施形態では、無血清培地は、プトレシン、アミノ酸、ビタミン、脂肪酸、およびヌクレオシドからなる群から選択される、１つまたは複数の培地成分で強化される。特定の実施形態では、本技術の無血清培地は、培地成分濃度が、例えばダルベッコ変法イーグル培地／Ｈａｍ’ｓ　Ｆ１２培地（ＤＭＥＭ／Ｆ１２）など、細胞を増殖させるのに慣例的に使用される培地に典型的に見られる濃度よりも約１倍、または約２倍、または約３倍、または約４倍、または約５倍以上高くになるように、１つまたは複数の培地成分で強化される。いくつかの実施形態では、無血清培地はプトレシンで強化される。特定の実施形態では、無血清培地は、プトレシン濃度が、ＤＭＥＭ／Ｆ１２で典型的に見られる濃度よりも約５倍以上高くなるように、プトレシンで強化される。

【０１２９】

無血清培地を強化するのに使用してもよい脂肪酸の非限定的例としては、リノール酸およびα－リノレン酸（必須脂肪酸とも称される）、ミリストレイン酸、パルミトレイン酸、オレイン酸、アラキドン酸、エイコサペンタエン酸、エルカ酸、ドコサヘキサエン酸をはじめとするが、これに限定されるものではない、不飽和脂肪酸；ブタン酸、ヘキサン酸、オクタン酸、デカン酸、ドデカン酸、テトラデカン酸、ヘキサデカン酸、オクタデカン酸、エイコサン酸、ドコサン酸、テトラコサン酸、およびリポ酸をはじめとするイオウ含有脂肪酸をはじめとするが、これに限定されるものではない、飽和脂肪酸が挙げられる。特定の実施形態では、無血清培地は上記の脂質補給剤によって提供されるもの他に、追加の脂肪酸で強化される。特定の実施形態では、無血清培地は、リノール酸およびリノレン酸で強化される。いくつかの実施形態では、無血清培地は、リノール酸およびリノレン酸の濃度が、ＤＭＥＭ／Ｆ１２で典型的に見られる濃度よりも約５倍以上高くなるように、リノール酸およびリノレン酸で強化される。

【０１３０】

無血清培地を強化するのに使用されてもよいアミノ酸の非限定的例としては、２０の標準アミノ酸（アラニン、アルギニン、アスパラギン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン酸、グルタミン、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リジン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、セリン、スレオニン、トリプトファン、チロシン、およびバリン）ならびにシスチンおよび非標準アミノ酸が挙げられる。特定の実施形態では、一般に「必須アミノ酸」と称される、ＣＡＴ－Ｓ細胞またはその他の哺乳類細胞によって合成されない、１つまたは複数のアミノ酸が強化される。例えばフェニルアラニン、バリン、スレオニン、トリプトファン、イソロイシン、メチオニン、ロイシン、およびリジンの８個のアミノ酸は、概してヒトに必須であると見なされる。いくつかの実施形態では、無血清培地は、シスチンおよび標準アミノ酸が、ＤＭＥＭ／Ｆ１２で典型的に見られる濃度よりも約５倍以上高い濃度になるように、シスチンと、グルタミン以外の全ての標準アミノ酸とで強化される（ＤＭＥＭ／Ｆ１２は、グルタミンなしで調合されることが多く、それは別に添加される）。特定の実施形態では、無血清培地は、グルタミンを約１４６ｍｇ／Ｌ～約１０２２ｍｇ／Ｌ、または約２９２ｍｇ／Ｌ～約８７６ｍｇ／Ｌ、または約４３８ｍｇ／Ｌ～約７３０ｍｇ／Ｌの濃度で含んでなる。いくつかの実施形態では、無血清培地は、グルタミンを約５８４ｍｇ／ｍＬの濃度で含んでなる。

【０１３１】

無血清培地を強化するのに使用してもよいビタミンの非限定的例としては、アスコルビン酸（ｖｉｔ　Ａ）、ｄ－ビオチン（ｖｉｔ　Ｂ７およびｖｉｔ　Ｈ）、Ｄ－パントテン酸カルシウム、コレカルシフェロール（ｖｉｔ　Ｄ３）、コリン塩化物、シアノコバラミン（ｖｉｔ　Ｂ１２）、エルゴカルシフェロール（ｖｉｔ　Ｄ２）、葉酸（ｖｉｔ　Ｂ９）、メナキノン（ｖｉｔ　Ｋ２）、ミオイノシトール、ナイアシンアミド（ｖｉｔ　Ｂ３）、ｐ－アミノ安息香酸、パントテン酸（ｖｉｔＢ５）、フィロキノン（ｖｉｔ　Ｋ１）、ピリドキシン（ｖｉｔ　Ｂ６）、レチノール（ｖｉｔ　Ａ）、リボフラビン（ｖｉｔ　Ｂ２）、α－トコフェロール（ｖｉｔ　Ｅ）およびチアミン（ｖｉｔ　Ｂ１）が挙げられる。特定の実施形態では、無血清培地は、示されるビタミンが、ＤＭＥＭ／Ｆ１２で典型的に見られる濃度よりも約５倍以上高い濃度になるように、ｄ－ビオチン、Ｄ－カルシウム、パントテン酸、塩化コリン、シアノコバラミン、葉酸、ミオイノシトール、ナイアシンアミド、ピリドキシン、リボフラビン、およびチアミンで強化される。

【０１３２】

無血清培地を強化するのに使用してもよいヌクレオシドの非限定的例としては、制限なしに、シチジン、ウリジン、アデノシン、グアノシン、チミジン、イノシン、およびヒポキサンチンが挙げられる。いくつかの実施形態では、無血清培地は、ヒポキサンチンおよびチミジンの濃度が、ＤＭＥＭ／Ｆ１２で典型的に見られる濃度よりも約５倍以上高くなるように、ヒポキサンチンおよびチミジンで強化される。

【０１３３】

追加的成分を無血清細胞培養液に添加してもよく、その非限定的例としては、炭酸水素ナトリウム、炭素源（例えばグルコース）、および鉄結合作用物質が挙げられる。一実施形態では、無血清培地は、約１２００ｍｇ／Ｌ～約７２００ｍｇ／Ｌ、または約２４００ｍｇ／Ｌ～約６０００ｍｇ／ｍＬ、または約３６００ｍｇ／ｍＬ～約４８００ｍｇ／ｍＬの最終濃度で、炭酸水素ナトリウムを含んでなる。いくつかの実施形態では、無血清培地は、４４００ｍｇ／ｍＬの最終濃度で、炭酸水素ナトリウムを含んでなる。特定の実施形態では、無血清培地は、炭素源としてグルコースを含んでなる。いくつかの実施形態では、無血清培地は、約１ｇ／Ｌ～約１０ｇ／Ｌ、または約２ｇ／Ｌ～約１０ｇ／Ｌ、または約３ｇ／Ｌ～約８ｇ／Ｌ、または約４ｇ／Ｌ～約６ｇ／Ｌ、または約４．５ｇ／Ｌ～約９ｇ／Ｌの最終濃度で、グルコースを含んでなる。特定の実施形態では、無血清培地は、グルコースを４．５ｇ／Ｌの最終濃度で含んでなる。様々な実施形態では、ＣＡＴ－Ｓ細胞の高密度増殖と、引き続く大量の発現タンパク質生成物の生成とで使用される無血清培地に、追加的なグルコースを添加してもよい。したがって特定の実施形態では、無血清培地は、約５．５ｇ／Ｌ～約１０ｇ／Ｌの最終グルコース濃度に、追加的な１～５ｇ／Ｌのグ

ルコースを含んでなる。

【０１３４】

無血清培地中で利用してもよい鉄結合剤の非限定的例としては、トランスフェリンなどのタンパク質と、トロポロンなどの化合物とが挙げられる（例えば米国特許第５，０４５，４５４号明細書；米国特許第５，１１８，５１３号明細書；米国特許第６，５９３，１４０号明細書；および国際公開第０１／１６２９４号パンフレットを参照されたい）。いくつかの実施形態では、無血清培地は、トランスフェリンの代わりにトロポロン（２－ヒドロキシ－２，４，６－シクロヘパトリエン－１）および鉄供給源（例えばクエン酸第二鉄アンモニウム、第二鉄硫酸アンモニウム）を含んでなる。特定の実施形態では、トロポロンまたはトロポロン誘導体は、約５：１～約１：１のモル比で、培地中に存在する鉄に対して過剰モル濃度で存在する。いくつかの実施形態では、無血清培地は、トロポロンまたはトロポロン誘導体を約５～１、または約３～１、または約２～１、または約１．７５～１、または約１．５～１、または約１．２５～１のモル比で、培地中に存在する鉄に対して過剰なモル濃度で含んでなる。特定の実施形態では、無血清培地は、トロポロンを０．２５ｍｇ／Ｌの最終濃度で、クエン酸第二鉄アンモニウム（ＦＡＣ）を０．２０ｍｇ／Ｌの最終濃度で含んでなる。

【０１３５】

培地調合物への成分の追加は、時に、結果として生じる調合物浸透圧を変化させ得る。特定の実施形態では、ＤＭＥＭ／Ｆ１２で典型的に見られる１つまたは複数の成分の量を低下させて、所望の浸透圧を維持する。一実施形態では、本明細書に記載される無血清培地中の塩化ナトリウム（ＮａＣｌ）濃度を低下させる。いくつかの実施形態では、無血清培地中のＮａＣｌ濃度は、ＤＭＥＭ／Ｆ１２に典型的に見られる濃度の約１０％～約９０％、または約２０％～約８０％、または約３０％～約７０％、または約４０％～約６０％である。特定の実施形態では、無血清培地中のＮａＣｌの最終濃度は、ＤＭＥＭ／Ｆ１２典型的に見られる濃度の５０％である。いくつかの実施形態では、無血清培地中のＮａＣｌの最終濃度は３５００ｍｇ／Ｌである。

【０１３６】

特定の実施形態では、無血清培地中に存在する動物由来成分の数は最小化され、または排除すらされる。例えば動物原料由来タンパク質の代わりに、非動物性原料に由来するインシュリンおよびトランスフェリンなどの市販される組換えタンパク質を利用してもよい（例えばそれぞれＢｉｏｌｏｇｉｃａｌ　Ｉｎｄｕｓｔｒｉｅｓカタログ番号０１－８１８－１およびＭｉｌｌｉｐｏｒｅカタログ番号９７０１）。いくつかの実施形態では、既知組成脂質混合物の成分であってもよいコレステロールを除いて、全ての動物由来成分は、非動物性由来製品で置き換えられる。典型的に動物由来製品に付随するリスクを最小化するために、いくつかの実施形態では、コレステロールは、プリオンをはじめとするが、これに限定されるものではない偶発性作用物質と関連付けられていない地域に位置する羊毛に由来してもよい。

【０１３７】

ウイルス融合タンパク質（例えば可溶性ウイルス融合タンパク質）は、時に、培養ＣＡＴ－Ｓ細胞中で生成される。ＣＡＴ－Ｓ細胞は、富化無血清培養液中での増殖および／または所望のタンパク質製品の生成のために適応される。特定の実施形態では、無血清培地を使用して、ＣＡＴ－Ｓ細胞の増殖を支持し得て、細胞は、無血清培地中で少なくとも２０継代後、または少なくとも３０継代後、または少なくとも４０継代後、または少なくとも５０継代後、または少なくとも６０継代後、または少なくとも７０継代後、または少なくとも８０継代後、または少なくとも９０継代後、または少なくとも１００継代後に生存能力を維持する。いくつかの実施形態では、無血清培地によってＣＡＴ－Ｓ細胞の増殖が、高密度にまで支持される。特定の実施形態では、無血清培地は、少なくとも5×10^5細胞／ｍＬ、少なくとも6×10^5細胞／ｍＬ、少なくとも7×10^5細胞／ｍＬ、少なくとも8×10^5細胞／ｍＬ、少なくとも9×10^5細胞／ｍＬ、少なくとも1×10^6細胞／ｍＬ、少なくとも1.2×10^6細胞／ｍＬ、少なくとも1.4×10^6細胞／ｍ

Ｌ、少なくとも１．６×１０^{6}細胞／ｍＬ、少なくとも１．８×１０^{6}細胞／ｍＬ、少なくとも２．０×１０^{6}細胞／ｍＬ、少なくとも２．５×１０^{6}細胞／ｍＬ、少なくとも５×１０^{6}細胞／ｍＬ、少なくとも７．５×１０^{6}細胞／ｍＬ、または少なくとも１×１０^{7}の密度へのＣＡＴ－Ｓ細胞の増殖を支持する。

【０１３８】

タンパク質生成

本技術は、ウイルス融合タンパク質（例えば可溶性ウイルス融合タンパク質）をコードする発現ベクターで形質移入された細胞系（例えばＣＡＴ－Ｓ細胞系）から、大量のタンパク質を生成する方法を提供する。いくつかの実施形態では、タンパク質生成を誘導するのに先だって、細胞を約５×１０^{5}～約１×１０^{7}の細胞密度に増殖させる。特定の実施形態では、タンパク質生成（例えば発現）は、形質移入ＣＡＴ－Ｓ細胞の対数増殖中に誘導される。いくつかの実施形態では、形質移入コンストラクトから発現されるタンパク質は、構成的である。

【０１３９】

タンパク質生成（例えば形質移入核酸からのタンパク質生成物の発現）は、いくつかの実施形態では、バイオリアクター内で実施し得る。組換えタンパク質は、好気性または嫌気性条件下で、バイオリアクター内で生成され得る。バイオリアクターは、一般に円柱状で、数リットルから数立方メートル範囲のサイズにわたり、ステンレス鋼からできていることが多い。バイオリアクターはまた、細胞培養の文脈で、細胞または組織を増殖することが意図される装置またはシステムを指してもよい。操作方式に基づいて、バイオリアクターは、バッチ、流加または連続（例えば連続的に撹拌されるタンク反応器モデル）に分類されてもよい。連続バイオリアクターの一例は、ケモスタットである。

【０１４０】

連続およびバッチプロセス反応器

反応器は、供給および生成流がシステムに連続的に供給されて抜き取られる場合に、連続反応器と称される。いくつかの実施形態では、連続的な栄養素供給または生成物収集のない、連続的または再循環流を有する反応器は、なおもバッチ反応器と見なされる。バッチ反応器は、工程実行中に培地抜き取りがあってもなくてもよい。バッチプロセスは、それらの単純さと有用性のために、ワクチン製造などの産業で広く使用されることが多い。バッチプロセスと流加プロセスは、選択された培地に、細胞をより低い生存細胞密度で接種する類似プロセスである。細胞は、わずかな外部操作によってまたは外部操作を全くせずに、栄養素がいくらか枯渇して、細胞が定常期に近づくまで、指数関数的に増殖される。培養物の一部を除去して、新鮮培地で置換する。除去および置換工程を数回繰り返す。

【０１４１】

組換えタンパク質の流加生産は、バッチ供給培養と異なり、その中では、細胞が依然として成長し、培地が消耗し始めると、濃縮供給培地（典型的に基礎培地の１０×～２０×の濃度）を連続的にまたは断続的に添加して追加的な栄養素を供給し、より高い最終細胞密度が支持される。新鮮培地の添加を収容するために、流加培養は、所与のサイズのバイオリアクターに対して、概してバッチ培養よりも低い体積で開始される。いくつかの実施形態では、流加培養の最初の体積は、所与のバイオリアクターサイズに対するバッチ供給培養の約４０％～約６０％である。

【０１４２】

連続培養には、バッチおよび流加培養と同じ多くの要素の使用が組み込まれることが多い。連続培養は、同様の培地の使用を伴うことが多く、初期細胞増殖も同様に達成される。ひとたび細胞が一定密度に達したら、流入および収集流が開始され、細胞は定常状態密度に達する。

【０１４３】

最適条件下では、微生物または細胞は、バイオリアクター内で、１００パーセントの成功率でそれらの所望の機能を遂行できる。ガス（すなわち空気、酸素、窒素、二酸化炭素）流速、温度、ｐＨと溶存酸素レベル、および撹拌速度／循環速度などのバイオリアクタ

ーの環境条件はモニターされて、最適化タンパク質生成のために制御されることが多い。
【０１４４】
大規模タンパク質生産のために、細胞を高密度に培養するのに適したバイオリアクターの非限定的例は、Ｗａｖｅ　Ｂｉｏｒｅａｃｔｏｒ　Ｓｙｓｔｅｍ（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）である。Ｗａｖｅバイオリアクターは、単回使用バイオリアクター（例えば使い捨て細胞バッグ）と、恒久的なバイオリアクター（揺動プラットフォームと監視システム）の側面を組み合わせる。
【０１４５】
いくつかの実施形態では、ウイルス融合タンパク質（例えばＲＳＶ－ＦまたはｈＰＩＶ３－Ｆ）は、バイオリアクター内で増殖される形質移入細胞系で発現される。特定の実施形態では、細胞が収集され、所望のタンパク質生成物が分離される。いくつかの実施形態では、所望のタンパク質生成物は、形質移入細胞によって培養液中に分泌され、タンパク質は培養液から収集される。いくつかの実施形態では、１リットルあたり約０．００１グラム～１リットルあたり約４０グラムで、所望のタンパク質生成物が生成される（例えば約０．００１グラム／リットル（ｇ／Ｌ）、０．００２ｇ／Ｌ、０．００６ｇ／Ｌ、０．０１ｇ／Ｌ、０．０５ｇ／Ｌ、０．１ｇ／Ｌ、０．２ｇ／Ｌ、０．３ｇ／Ｌ、０．４ｇ／Ｌ、０．５ｇ／Ｌ、０．６ｇ／Ｌ、０．７ｇ／Ｌ、０．８ｇ／Ｌ、０．９ｇ／Ｌ、１．０ｇ／Ｌ、１．１ｇ／Ｌ、１．２ｇ／Ｌ、１．３ｇ／Ｌ、１．４ｇ／Ｌ、１．５ｇ／Ｌ、１．６ｇ／Ｌ、１．７ｇ／Ｌ、１．８ｇ／Ｌ、１．９ｇ／Ｌ、２．０ｇ／Ｌ、２．５ｇ／Ｌ、３．０ｇ／Ｌ、３．５ｇ／Ｌ、４．０ｇ／Ｌ、４．５ｇ／Ｌ、５．０ｇ／Ｌ、５．５ｇ／Ｌ、６．０ｇ／Ｌ、６．５ｇ／Ｌ、７．０ｇ／Ｌ、７．５ｇ／Ｌ、８．０ｇ／Ｌ、８．５ｇ／Ｌ、９．０ｇ／Ｌ、９．５ｇ／Ｌ、１０．０ｇ／Ｌ、１０．５ｇ／Ｌ、１１．０ｇ／Ｌ、１１．５ｇ／Ｌ、１２．０ｇ／Ｌ、１２．５ｇ／Ｌ、１３．０ｇ／Ｌ、１３．５ｇ／Ｌ、１４．０ｇ／Ｌ、１４．５ｇ／Ｌ、１５．０ｇ／Ｌ、１７．５ｇ／Ｌ、２０．０ｇ／Ｌ、２２．５ｇ／Ｌ、２５．０ｇ／Ｌ、２７．５ｇ／Ｌ、３０．０ｇ／Ｌ、３２．５ｇ／Ｌ、３５．０ｇ／Ｌ、３７．５ｇ／Ｌ、および４０．０ｇ／Ｌ）。
【０１４６】
タンパク質精製
タンパク質精製は、複合混合物からの単一タイプのタンパク質の分離を意図する、１つまたは複数のステップを含む方法である。分離ステップは、タンパク質のサイズ、物理化学的特性および／または結合親和力の差を活用することが多い。いくつかの実施形態では、分離は、サイズ、形状、電荷、疎水性、生物学的活性などまたはそれらの組み合わせに基づく。いくつかの実施形態では、タンパク質は、非特異的精製法、親和性精製法またはそれらの組み合わせを使用して精製し得る。特定の実施形態では、親和性精製法は、特異的タグ認識（例えば６ｘＨｉｓタグ）に基づき、または特異的エピトープ（例えばＦＬＡＧ親和性精製）に基づき得る。
【０１４７】
多数のタンパク質精製形態を、様々な分離培地および様々な種類のクロマトグラフィー（例えばバッチ、カラムＨＰＬＣ、ＦＰＬＣなど）の使用をはじめとする、様々なクロマトグラフィー法と組み合わせ得る。タンパク質精製材料と方法は当該技術分野で公知であり、各タンパク質精製スキームは、サイズ、ｐｉ、疎水性などをはじめとするいくつかの要素に依存する。したがってタンパク質を９０％以上の純度で分離するために、各タンパク質の最適化を要し得る、精製スキームの組み合わせが必要とされることもある。タンパク質を精製するのに使用し得るクロマトグラフィーのタイプの非限定的例としては、イオン交換クロマトグラフィー（例えば化合物をそれらのイオン電荷の性質と程度に従って分離する）、親和性クロマトグラフィー（例えば特定用途向け樹脂を頻繁に利用する、分子立体構造に基づく分離技術。これらの樹脂は、分離される化合物に対して特異的である、それらの表面に付着するリガンドを有する）、金属結合クロマトグラフィー（例えばニッケルおよびコバルトなどの二価の金属イオンと強力に結合するタンパク質のＮまたはＣ末端中の６～８個のヒスチジンの配列。タンパク質はポリヒスチジンタグと結合する固定化

ニッケルイオンを含有するカラムを通過し得る）、免疫親和性クロマトグラフィー（例えば抗体と標的タンパク質との特異的結合を使用して、タンパク質を選択的に精製する。手順は、抗体をカラム材料に固定化し、次に抗体がタンパク質に選択的に結合して、他の全てが通過することを伴う）、高速液体クロマトグラフィー（例えば高圧を施用して溶質をより迅速にカラムに通過させ、拡散を限定的にして分解能を改善するクロマトグラフィー形態）などおよび／またはそれらの組み合わせが挙げられる。一般に使用される形態のＨＰＬＣは、カラム材料が疎水性の「逆相」ＨＰＬＣである。タンパク質は、アセトニトリルなどの有機溶剤の増大する量の勾配によって溶出され、タンパク質は、それらの疎水性に従って溶出される。

【０１４８】

組換えウイルス融合タンパク質（例えば可溶性ウイルス融合タンパク質）は、所望の純度レベルに精製し得る。いくつかの実施形態では、ウイルス融合タンパク質は、９０％以上（例えば約９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、９９．５％、９９．９％、９９．５０％、９９．９５％）の純度に精製される。

【０１４９】

タンパク質定量化

タンパク質の同定と定量化は、精製のあらゆる段階で実施し得る。いくつかの実施形態では、タンパク質サンプルのアリコートが、相対的精製倍数とタンパク質純度の測定のために、精製の各段階で得られる。いくつかの実施形態では、ＳＤＳ－ＰＡＧＥを使用して、精製の各連続的段階後に、サンプル中の汚染物質（例えばその他のタンパク質）数のあらゆる減少を同定することにより、精製の成功をモニターする。ＳＤＳ－ＰＡＧＥゲル上のタンパク質標準曲線の使用もまた、タンパク質濃度測定を容易にし得る。

【０１５０】

タンパク質濃度を測定する方法は、Ｂｒａｄｆｏｒｄタンパク質アッセイである。後者は、Ｂｒａｄｆｏｒｄ総タンパク質量アッセイによって、または２８０ｎｍにおける吸光度によって測定し得る。タンパク質定量化に使用し得る別の方法は、表面プラズモン共鳴（ＳＰＲ）である。ＳＰＲは、チップ表面の標識自由分子の結合を検出し得る。追加的な非限定的タンパク質定量化法としては、Ｌｏｗｒｙアッセイ、Ｆｌｕｏｒｏｐｒｏｆｉｌｅタンパク質定量化、およびマイクロピロガロールレッドタンパク質定量化法が挙げられる。調製品中のタンパク質量は、いくつかの実施形態では、総タンパク質量として、タンパク質濃度、または総タンパク質量の百分率としてのタンパク質活性濃度として表され得る。本明細書で提供されるウイルス融合タンパク質はまた、例えば定量的サンドイッチＥＬＩＳＡをはじめとする本明細書で提供される免疫測定法によって、および例えば間接的ＥＬＩＳＡ、競合的ＥＬＩＳＡ、高感度蛍光性酵素免疫測定法（ＦＥＩＡ）、ナノ免疫測定法（ＮＩＡ）、放射免疫測定法、磁性免疫測定法、およびタンパク質定量化技術分野で公知のあらゆるアッセイをはじめとするその他の免疫測定法によっても定量化し得る。

【０１５１】

検出可能な特性および固体担体

核酸または組換えウイルス融合タンパク質（例えば可溶性ウイルス融合タンパク質）は、いくつかの実施形態では、１つまたは複数の検出可能な特性で修飾されてもよい。核酸は、５’末端、３’末端、５’と３’末端の間、およびそれらの組み合わせにおける検出可能な特徴によって修飾されてもよい。タンパク質は、Ｎ末端、Ｃ末端、Ｎ末端とＣ末端の間、およびそれらの組み合わせにおける、検出可能な特徴によって修飾されてもよい。検出可能な特徴は、合成の一部として組み込まれてもよく、または核酸または組換えタンパク質を検出し、定量し、または使用する前に付加されてもよい。検出可能な特徴の組み込みは、いくつかの実施形態では液相中または固相上で実施されてもよい。

【０１５２】

核酸または組換えタンパク質の検出に適するあらゆる検出可能な特徴を適切に選択し得る。検出可能な特性の例は、フルオレセイン、ローダミン、その他などの蛍光性標識（例えばＡｎａｎｔｈａ，ｅｔ　ａｌ．，Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ（１９９８）３７：２７

０９２７１４；ａｎｄ Ｑｕ ＆ Ｃｈａｉｒｅｓ，Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｅｎｚｙｍｏｌ．（２０００）３２１：３５３３６９）；放射性同位体（例えば１２５Ｉ、１３１Ｉ、３５Ｓ、３１Ｐ、３２Ｐ、３３Ｐ、１４Ｃ、３Ｈ、７Ｂｅ、２８Ｍｇ、５７Ｃｏ、６５Ｚｎ、６７Ｃｕ、６８Ｇｅ、８２Ｓｒ、８３Ｒｂ、９５Ｔｃ、９６Ｔｃ、１０３Ｐｄ、１０９Ｃｄ、および１２７Ｘｅ）；光散乱標識（例えば米国特許第６，２１４，５６０号明細書、および市販される標識（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）；化学発光標識および酵素基質（例えばジオキセタンおよびアクリジニウムエステル）、酵素またはタンパク質標識（例えば緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）またはその色変法、ルシフェラーゼ、ペルオキシダーゼ）；その他の色素産生標識または染料（例えばシアニン）、およびその他の補助因子または生体分子などのジゴキシゲニン、ストレプトアビジン（ｓｔｒｅｐｄａｖｉｄｉｎ）、ビオチン（例えばビオチンおよびアビジンなどの例えば結合対の構成員）、親和性捕捉部分、３’遮断剤（例えばリン酸基、チオール基、ホスホロチオエート、アミノ修飾剤、ビオチン、ビオチン－ＴＥＧ、コレステリル－ＴＥＧ、ジゴキシゲニンＮＨＳエステル、チオール修飾剤Ｃ３Ｓ－Ｓ（二硫化物）、逆ｄＴ、Ｃ３スペーサー）などである。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチド種組成物を親和性捕捉部分で標識してもよい。質量分析法（例えばマトリックス支援レーザー脱離イオン化法（ＭＡＬＤＩ）質量分析法およびエレクトロスプレー（ＥＳ）質量分析法）による検出のための質量変更に有用な標識もまた、検出可能な特性に含まれる。

【０１５３】

核酸または組換えタンパク質は、固体担体に結合し得る。「固体担体」または「固相」という用語は、本明細書の用法では、それに核酸またはタンパク質が結合し得る不溶性物質を指し、これらの用語は同義的に使用し得る。固体担体の例としては、制限なしに、シリカゲル、ガラス（例えば制御孔ガラス（ＣＰＧ））、ナイロン、Ｓｅｐｈａｄｅｘ（登録商標）、Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）、セルロース、金属表面（例えば鋼鉄、金、銀、アルミニウム、ケイ素、および銅）、磁性物質、プラスチック（例えばポリエチレン、ポリプロピレン、ポリアミド、ポリエステル、ポリフッ化ビニリデン（ＰＶＤＦ））、チップ、平面フィルター、１つまたは複数の毛細管および／または繊維、アレイ、フィルター、ビーズ、ビーズ（例えば常磁性ビーズ、磁性ビーズ、ミクロビーズ、ナノビーズ）、および粒子（例えば微粒子、ナノ粒子）が挙げられる。ビーズおよび／または粒子は、遊離であってもよく、または互いに結合していてもよい（例えば焼結）。いくつかの実施形態では、固相は粒子の集まりであってもよい。特定の実施形態では、粒子はシリカを含んでなり得て、シリカは二酸化ケイ素を含んでなってもよい。いくつかの実施形態では、シリカは多孔性であり得て、特定の実施形態ではシリカは非多孔性であり得る。いくつかの実施形態では、粒子は、粒子に常磁性を与える作用物質をさらに含んでなる。特定の実施形態では、作用物質は金属を含んでなり、特定の実施形態では作用物質は金属酸化物（例えば鉄または酸化鉄、酸化鉄はFe^{2+}およびFe^{3+}の混合物を含有する）である。

【実施例】

【０１５４】

下記の実施例は特定の実施形態を例証し、技術を限定しない。

【０１５５】

実施例１：材料と方法

本実施例に記載される材料と方法は、特に断りのない限り、実施例２～５で記載される実験を実施するために使用された。

【０１５６】

Ａ．完全長ＲＳＶ－Ｆ発現

以下の方法は、完全長ＲＳＶ－Ｆ発現コンストラクトを使用して実施される実験に適用される。

【０１５７】

１．細胞およびウイルス

ＢＳＲ－Ｔ７、ＭＲＣ－５、Ｖｅｒｏ、およびＨＥｐ－２細胞は、５～１０％のＦＢＳ

と、以下の補給剤のいくつかを含有するＭＥＭ中で維持された。２％トリプトースホスフェートブロス（Ｓｉｇｍａ）、２～４ｍＭのＬ－グルタミン、５０μｇ／ｍｌのゲンタマイシン、１ｍＭのナトリウムピルビン酸、２ｍＭのＬ－グルタミン（非必須アミノ酸）、５０Ｕ／ｍｌのペニシリン、および５０μｇ／ｍｌのストレプトマイシン。２９３Ｆ細胞は、２９３ＦＲＥＥＳＴＹＬＥ中で維持された。２９３Ａｄ細胞は、１０％ＦＢＳ、１００Ｕ／ｍｌペニシリン、および１００μｇ／ｍｌストレプトマイシンを添加したＤＭＥＭ中で維持された。Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎから入手できるＦＬＰ－ＩＮ　ＴＲＥＸシステムを使用して、２９３由来細胞系内で、$F_{GC-WPRE}$およびF_{GC}の安定したテトラサイクリン誘導性発現を生じさせた。これらの細胞は、１０％Ｔｅｔ－ａｐｐｒｏｖｅｄ　ＦＢＳ（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ）、１００Ｕ／ｍｌのペニシリンおよび１００μｇ／ｍｌのストレプトマイシン、１５μｇ／ｍｌのブラストサイジン、および１５０μｇ／ｍｌのハイグロマイシンを添加した、高グルコースと２ｍＭのグルタミン酸とを含有するＤＭＥＭ中で維持された。Ｆタンパク質発現の誘導のために、テトラサイクリン（Ｔｅｋｎｏｖａ）を１５μｇ／ｍｌの最終濃度で培地に添加した。８％CO_2で維持された２９３Ｆ細胞以外は、３７℃で５％CO_2の中に細胞系を維持した。細胞培養試薬は、特に断りのない限りＩｎｖｉｔｒｏｇｅｎから得られた。ＲＳＶ　Ａ　Ｌｏｎｇ株をＨＥｐ－２細胞中で増殖させ、新鮮に調製されたＨＥｐ－２細胞のコンフルエントな単層に０．２のＭＯＩで感染させて、ウイルス株を生成し、感染の４８時間後にウイルスを収集して、細胞を上清中に擦り取り、細胞と上清を試験管に入れて、５０％出力で２回超音波処理し、遠心分離によって細胞残骸をペレット化した。等容積の５０％スクロース水溶液（ｗ／ｖ）をウイルス収集物に添加してアリコートにし、ドライアイス／エタノール浴中で急速冷凍して、－８０℃で保存した。ウエスタンブロットのためのＲＳＶ　Ａ　Ｌｏｎｇ感染は、０．５のＭＯＩで実施して、感染の２４時間後に収集した。第２の遺伝子位置からＲＳＶ　Ｆを発現する、キメラウシ／ヒトパラインフルエンザウイルスである組換えｂ／ｈＰＩＶ３／ＲＳＶＦ２を以前記載されたようにして増殖した。（Ｔａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，２００３Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．７７，１０８１９－１０８２８）。

【０１５８】

２．Ｆタンパク質発現ベクター

本試験で使用されるＲＳＶ－Ｆ遺伝子配列はＲＳＶサブタイプＡに由来し、ＲＴ－ＰＣＲによって感染ＨＥｐ－２細胞から直接クローンされたＬｏｎｇ株からの野生型Ｆ遺伝子配列（F_{Long}）、同様にしてクローンされたＡ２株からの野生型Ｆタンパク質遺伝子配列（F_{A2}）、モンテカルロアルゴリズムを使用してＤＮＡ　２．０　Ｉｎｃ．によってコドン最適化されたＡ２株Ｆ遺伝子配列（F_{opt}）（Ｖｉｌｌａｌｏｂｏｓ　ｅｔ　ａｌ．，２００６　ＢＭＣ　Ｂｉｏｉｎｆｏｒｍ．７，２８５）が含まれ、アミノ酸配列保存様式でＧまたはＣヌクレオチド百分率について富化されたＡ２株Ｆ遺伝子配列（F_{GC}）は、ＤＮＡ　２．０，Ｉｎｃ．によって合成された。F_{Long}およびF_{A2}配列は、ヌクレオチドおよびアミノ酸レベルの双方で、９８％同一である。F_{A2}、F_{opt}、およびF_{GC}配列は、最初にｐＣＭＶｓｃｒｉｐｔ発現ベクター（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ）にクローンされた。F_{A2}、F_{opt}、およびF_{GC}配列はまた、以前記載されているｂ／ｈＰＩＶ３組換えウイルスベクターにもクローンされた（Ｔａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，２００３Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．７７，１０８１９－１０８２８）。これに加えて、CMV_{IE}プロモーター、ＳＶ４０ポリアデニル化配列、およびエプスタイン・バーウイルス核抗原（ＥＢＮＡ）配列を含有する発現ベクターｐＥＢＮＡに、F_{Long}、F_{A2}、F_{opt}、およびF_{GC}配列をクローンした。ｐＥＢＮＡＦタンパク質発現ベクターは、Ｆタンパク質遺伝子開始コドンのすぐ上流の最適コザック配列ｇｇｃｇｇｃａｃｃを含む。図１Ａで例証されるように、Ｓｙｓｔｅｍ　ＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓプラスミドｐＣＤＨ１－ＭＣＳ１－Ｅｆ１－Ｐｕｒｏからクローンされ
ＷＰＲＥ配列をＦ遺伝子停止コドンの後で、ＳＶ４０ポリアデニル化配列の前に、配置させた。配列は、ジデオキシ配列解析（Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，Ｉｎｃ．）によって確認された。Ｑｉａｇｅｎ　ＤＮＡ精製キットを使用して、形質移入で使用するためにプラスミドを精製した。

【０１５９】
３．形質移入
ＢＳＲ－Ｔ７、ＭＲＣ－５、およびＶｅｒｏ細胞系を形質移入時に８０％の密集度で、６ウェルプレートに接種した。形質移入では、１μｇのプラスミドＤＮＡと４μｌのＬＩＰＯＦＥＣＴＡＭＩＮＥ２０００（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）をＩｎｖｉｔｒｏｇｅｎのプロトコルに従って使用した。翌日、形質移入培地を２ｍｌのＯＰＴＩ　ＭＥＭ＋ゲンタマイシンで置き換えて、細胞をさらに培養した。場合によっては、細胞を溶解産物の収集前に最高７２時間培養し、下述するように、ウエスタンブロットによってタンパク質発現について分析した。

【０１６０】
ＷＰＲＥ含有プラスミドの大きなサイズを考慮して、各発現ベクターが同一モル量でありまたは約３０μｇである、３０ｍｌの培養物中で、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎのプロトコルに従って、1×10^{6}細胞／ｍｌの４０μｌの２９３ＦＥＣＴＩＮ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）によって２９３Ｆ細胞を形質移入した。２９３Ｆ細胞の形質移入の均一性を考慮して、Ｃｌｏｎｔｅｃｈのプロトコルに従って、ＲＥＡＤＹ－ＴＯ－ＧＬＯＷ分泌ルシフェラーゼレポーターキット（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ）からの１．５μｇのｐＭｅｔＬｕｃ２－対照ベクターをＦタンパク質をコードする発現ベクターで同時形質移入して、形質移入の２４時間後に分泌ルシフェラーゼのアッセイを実施した。６ウェルプレート内で、同一モル量の各発現ベクターまたは約４μｇおよび５μｌのＬＩＰＯＦＥＣＴＡＭＩＮＥ２０００によって、２９３Ａｄ細胞を1×10^{6}細胞／ウェルで形質移入した。

【０１６１】
４．ウエスタンブロット
培地を取り出し、Ｌａｅｍｍｌｉ緩衝液へのβ－メルカプトエタノールの添加、またはＮＰ－４０含有溶解緩衝液の添加と、それに続く残骸の遠心分離によって、タンパク質溶解産物を収集した。１２％トリス－グリシンＲＥＡＤＹゲルまたは１０％ＮＵ－ＰＡＧＥゲル（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）上で細胞溶解産物を分離し、ＰＶＤＦまたはニトロセルロース膜（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）に転写した。リン酸緩衝食塩水（ＰＢＳ）またはトリス緩衝食塩水、および５％脱脂粉乳含有０．０１％ＴＷＥＥＮ　２０（ＴＢＳ－Ｔ）中で、膜をブロックした。Ｆタンパク質検出では、高親和性抗ＲＳＶＦタンパク質モノクローナル抗体（モタビズマブ）（Ｗｕ　ｅｔ　ａｌ．，２００７Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏ．３６８，６５２－６６５）を一次検出抗体として使用した。ＰＢＳおよび０．０５％ＴＷＥＥＮ２０（ＰＢＳ－Ｔ）またはＴＢＳ－Ｔで、洗浄を実施した。ＨＲＰ－コンジュゲートウサギまたはロバ抗ヒト抗体（ＤＡＫＯまたはＪａｃｋｓｏｎ　ＩｍｍｕｎｏＲｅｓｅａｒｃｈ）を添加し、二次検出抗体としてＰＢＳ－ＴまたはＴＢＳ－Ｔ中でブロットした。ブロットをＰＢＳ－ＴまたはＴＢＳ－Ｔで洗浄し、ＥＣＬキット（Ａｍｅｒｓｈａｍ　Ｐｈａｒｍａｃｉａ）またはＬＵＭＩＧＬＯ（ＫＰＬ）で発色させて、ＫＯＤＡＫフィルムを曝露させた。βアクチン検出では、使用された一次抗体が抗βアクチンモノクローナル抗体（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ　ＭＡＢ１５０１）または抗βアクチンウサギポリクローナル抗体（Ｓｉｇｍａ）であり、使用された二次抗体がヤギ抗マウス抗体（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｐｒｏｂｅｓ）またはヤギ抗ウサギ抗体（Ｓｉｇｍａ）であったこと以外は、ブロッティング手順は同一であった。

【０１６２】
場合によっては、ウェルあたり０．３ｍＬのβメルカプトエタノール含有Ｌａｅｍｍｌｉ緩衝液を添加することで、細胞を形質移入後、溶解産物生成前に最高７２時間培養した。溶解産物を収集し、１２％ＳＤＳポリアクリルアミドゲル上で分離して、タンパク質をＰＶＤＦ膜に転写した。ブロットを５％脱脂粉乳中でブロックし、次に１％脱脂粉乳含有ＰＢＳ－ＴＷＥＥＮ　２０中の１μｇ／ｍｌモタビズマブと共に、インキュベートした。１：５０００希釈の抗ヒトＨＲＰコンジュゲート二次抗体とのインキュベーションに続いて、タンパク質バンドをＥＣＬ基質（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）、およびＫＯＤＡＫ　Ｂｉｏｍａｘフィルムの様々な曝露時間によって、視覚化した。引き続いてタンパク質

負荷の正規化を考慮に入れて、ブロットを抗アクチンモノクローナル抗体によって再探索した。

【０１６３】

５．ＲＴ－ＰＣＲ

Ｑｉａｇｅｎのプロトコルに従って、ＲＮＥＡＳＹ　ＲＮＡ精製キット（Ｑｉａｇｅｎ）により、形質移入２９３Ｆ細胞からＲＮＡを精製した。Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎのプロトコルに従って、増幅等級デオキシリボヌクレアーゼ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を使用して、プロトコルの終わりの追加的なエタノール沈殿ステップと共に、ＲＮＡをデオキシリボヌクレアーゼ処理に曝露した。Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎのプロトコルに従って、オリゴ（ｄＴ）Ｎおよびモロニーマウス白血病ウイルス（ＭＭＬＶ）逆転写酵素（ＲＴ）（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）により、第１鎖の合成を実施した。第２鎖の合成は、ＣＭＶプロモーター内の転写開始部位の下流領域に相補的な順方向プライマーと、停止コドンを含む各Ｆ遺伝子配列の最後の２１個のヌクレオチドに相補的な逆方向プライマーとを含んだ第２鎖の合成では、熱プロファイルは、次のとおりであった。９５℃で３分間と、それに続く３０サイクルの９５℃で３０秒間、４８℃で３０秒間、および７２℃で２分間と、それに続く７２℃で１０分間の最終伸長ステップ。

【０１６４】

６．ｃＤＮＡ３’末端の迅速増幅（ＲＡＣＥ）ＲＴ－ＰＣＲ

先に記載されるようにして、ＲＮＡを形質移入２９３Ｆ細胞から精製した。非ネステッド第２鎖合成オプションのために、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎのプロトコルに従って、３’ＲＡＣＥキット（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）によって３’ＲＡＣＥ分析を実施した。第２鎖の合成のためのキットに含まれない順方向遺伝子特異的プライマーは、開始コドンを含む各Ｆ遺伝子配列の最初の２１個のヌクレオチドに相補的である。第２鎖の合成では、熱プロファイルは、ＲＴ－ＰＣＲについて記載されたのと同じであった。

【０１６５】

７．ＴＯＰＯ　ＴＡクローニングおよび配列決定

ゲル抽出キット（Ｑｉａｇｅｎ）を使用して、３’ＲＡＣＥ　ＲＴ－ＰＣＲ反応からの主要ＤＮＡ種をアガロースゲルから抽出した。Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎのプロトコルを使用したＴＯＰ１０細胞（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）の形質転換前に、提供される１μｌの緩衝液と共に、４マイクロリットルのゲル抽出ＰＣＲ断片を１μｌのＴＯＰＯ　ＴＡ　ｐＣＲ２．１ベクター（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）に添加して、３０分間室温でインキュベートした。ＤＮＡミニプレップキット（Ｑｉａｇｅｎ）を使用して、細菌コロニーからプラスミドＤＮＡを単離した。Ｍ１３プライマーおよびＢｉｇ　Ｄｙｅターミネーターキットを使用して、精製プラスミドをジデオキシ配列解析に曝露した。先に記載されるようにして、配列決定反応を実施した。

【０１６６】

８．顕微鏡検査

１０９　ＮＡ　０．２５対物レンズ付きＮＩＫＯＮ　ＴＥ２０００－Ｅ顕微鏡（Ｎｉｋｏｎ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ　Ｉｎｃ．）を使用して、画像を記録した。システムにＭＥＴＡＭＯＲＰＨ、バージョン７．１．３．０（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｄｅｖｉｃｅｓ）によって駆動されるＣＯＯＬ　ＳＮＡＰ　ＥＳ２カメラ（Ｐｈｏｔｏｍｅｔｒｉｃｓ）を装着した。ＧＦＰ発現を視覚化するために、４６５～４９５ｎｍの励起で、ＮＩＫＯＮ　Ｂ－２Ｅ／Ｃ　ＦＩＴＣフィルターを使用した。

【０１６７】

９．Ｆタンパク質発現細胞系に結合する抗体の測定

ＤＥＬＦＩＡ　Ｅｕ－Ｎ１－ＩＴＣ標識キレートを使用して、モタビズマブと、陰性対照モノクローナル抗体であるＲ３－４７とをEu^{3+}で標識し、製造会社の指示（Ｐｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ）に従って特性解析した。ＲＳＶ－Ｆタンパク質を精製するためのＯｃｔｅｔモノクローナル抗体親和性アッセイ（ＦｏｒｔｅＢｉｏ）を実施して、Eu^{3+}標識がモノクローナル抗体結合特性を変化させないことを確認した。

【０１６８】
ＴＲＥｘ－Ｆ$_{ＧＣ－ＷＰＲＥ}$および－Ｆ$_{ＧＣ}$細胞系をコンフルエンスに増殖させ、記載されるようにテトラサイクリンでＦタンパク質発現を誘導した。誘導の２０および４４時間後に細胞を収集し、５０％培地／５０％ＬＲ結合緩衝液（トリスベースの緩衝系、Ｐｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ）中で、約１×１０^{7}生存細胞／ｍｌに再懸濁した。およそ１×１０^{5}個の細胞を、１００μｌの反応容積のＬＲ結合緩衝液中の２５ｎＭのＥｕ$^{3+}$標識モタビズマブまたはＲ３－４７と混合した。細胞とモノクローナル抗体とを４℃で１時間培養し、次にＰａｌｌ　ＧＨＰ真空濾過プレートに入れた。ＤＥＬＦＩＡアッセイ洗浄緩衝液（Ｐｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ）による５×２００μｌの洗浄で、非結合モノクローナル抗体を洗い流し、２００μｌのＥｎｈａｎｃｅｍｅｎｔ　Ｓｏｌｕｔｉｏｎ（Ｐｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ）の添加によって、Ｅｕ$^{3+}$蛍光を放出させた。穏やかに振盪して３７℃で１時間インキュベーションした後に、Ｅｎｖｉｓｉｏｎ　Ｒｅａｄｅｒ（Ｐｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ）上で時間分解蛍光を読み取った。Ｅｕ$^{3+}$カウントを結合ｎｇ　ＩｇＧに変換し、全結合モタビズマブからＲ３－４７非特異的結合を差し引いて、特異的結合モタビズマブを計算した。

【０１６９】
Ｂ．可溶性ＲＳＶ－ＦおよびｈＰＩＶ３－Ｆ発現
以下の方法は、可溶性ＲＳＶ－Ｆおよび／またはｈＰＩＶ３－Ｆ発現コンストラクトを使用して実施された実験に適用される。

【０１７０】
１．発現コンストラクト生成
ａ．可溶性ＲＳＶ－Ｆ発現コンストラクト
可溶性ＲＳＶ－Ｆタンパク質（ｓＲＳＶ－Ｆ）の発現について、いくつかの修飾ヌクレオチド配列を評価した。以前記載されているようにして、同一ｓＲＳＶ－Ｆアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を野生型ＲＳＶ－ＦサブタイプＡ２株から生成し、ｐＣＭＶｓｃｒｉｐｔ組換えベクターにクローンした。（Ｈｕａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，２０１０　Ｖｉｒｕｓ　Ｇｅｎｅｓ　４０：２１２－２２１）。ＰＣＲによって、Ａ２株からＲＳＶ－Ｆコンストラクトの野生型配列を増幅した。配列番号２のアミノ酸５２５～５７４に相当する、ＲＳＶ－Ｆタンパク質の５０個のアミノ酸Ｃ末端膜貫通ドメインをコードするヌクレオチドを欠失させて、タンパク質を細胞培養液中に分泌させた。コドン最適化コンストラクト（ＯＰＴ）のために、野生型配列のコドン最適化と遺伝子合成が、ＤＮＡ２．０（Ｍｅｎｌｏ　Ｐａｒｋ，ＣＡ）によって実施された。高グアニン／シトシン含量（ＧＣ３）コンストラクトもまた、ＤＮＡ２．０によって合成され、野生型配列の３番目の塩基対を全てグアニンまたはシトシンのいずれかに変更して生成された。３番目の塩基対が既にグアニンまたはシトシンであるコドンには、変更を加えなかった。ＧＣ３コンストラクトと同様にして、中程度のグアニン／シトシン含量（ＨＬ２）のコンストラクトがＤＮＡ２．０によって生成されたが、全てのコドンがＨＬ２コンストラクトに変更されたわけではない。ＧＨ５合成ＲＳＶ－Ｆコンストラクトは、コード領域の５’および３’末端で、それぞれＦｓｅｌおよびＳｂｆｌ制限酵素認識部位を収容するようにデザインされ、Ｉｎｔｅｇｒａｔｅｄ　ＤＮＡ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ（Ｃｏｒａｌｖｉｌｌｅ，ＩＡ）によって生成された。ｐＣＭＶベクターへの最初のクローニングのために使用されたＰＣＲプライマーを下の表２に提示する。

【表２】

表2: RSV-F増幅とpCMVへのクローニングのためのプライマー配列		
	5'プライマー配列	3'プライマー配列
野生型コンストラクト	5'-gcatgagctcatggagttg ctaatcctcaaagc-3' (配列番号18)	5'-gcatctcgaggttactaaatg caatattatttataccac-3' (配列番号19)
コドン最適化コンストラクト (OPT)	5'-gcatgagctcatggaacttctt attctcaaagccaatgcg-3' (配列番号20)	5'-gcatctcgagctaatttgaaaa ggctatgttattgatcccagac-3' (配列番号21)
GC富化コンストラクト(GC3)	5'-gcatgctagcatggagtt gctcatcctcaaggc-3' (配列番号22)	5'-gcataagcttttagttgctg aacgcgatgttgttg-3' (配列番号23)

【表３】

表3				
可溶性RSV-F コンストラクト	以下による合成	%GC 含量	%GC3 含量	配列番号
野生型	PCR	35	31	3
OPT	DNA2.0	46	58	4
GC3	DNA2.0	58	100	5
HL2	DNA2.0	51	76	6
GH5	組み込まれたDNA	59	95	--

【０１７１】

ＣＡＴ－Ｓ細胞中におけるこれらの可溶性ＲＳＶ－Ｆコンストラクト発現のために、各コンストラクトをｐＣＬＤ５５０ｖ４－合成ＭＣＳ　ｐＡベクターにサブクローニングした。簡単に述べると、全てｐＣＭＶｓｃｒｉｐｔベクター内にある、野生型可溶性、コドン最適化（ＯＰＴ）、ＧＣ富化コンストラクト（ＧＣ３）、中程度ＧＣコンストラクト（ＨＬ２）およびＧＨ５を含む、上述のＲＳＶ－Ｆコンストラクトを使用してＰＣＲ反応を実施した。増幅断片の５’および３’末端にＦｓｅｌおよびＳｂｆｌ制限酵素認識部位を導入し、下流サブクローニングを容易にするようにＰＣＲプライマーをデザインした（下の表４を参照されたい）。停止コドンも各ｃＤＮＡの膜貫通ドメインの近位に、同様に導入された。このストラテジーを使用して、野生型タンパク質中に存在する膜貫通アンカーの前で転写を停止させることで、結果として生じるタンパク質が細胞から分泌されることを確実にした。各増幅反応液の２μｌをＴＯＰＯ　ＴＡベクター（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）にライゲートし、制限酵素消化と配列分析によってクローンをスクリーニングした。Ｆｓｅｌ　＆　Ｓｂｆｌでの消化によって、適切な配列がある代表的ｓＲＳＶ－Ｆクローンをを ＴＯＰＯ　ＴＡベクターから切断し、同様に切断されたｐＣＬＤ５５０ｖ４合成ＭＣＳ－ｐＡベクターにライゲートした（図２）。ｐＣＬＤベクターにクローンされた可溶性高ＧＣコンストラクト（ＧＣ３）を図３に示す。クローンを大規模な制限酵素消化によってスクリーニングし、代表的なクローンをＤＮＡ配列決定によって確認した。

【表４】

表4: sRSV-F増幅とpCLDへのクローニングのためのプライマー配列		
	5'プライマー配列	3'プライマー配列
野生型可溶性コンストラクト	5'-GGC CGG CCA TGG AGT TGC TAA TCC TCA AAG C-3' (配列番号24)	5'-CCT GCA GGT TAA TTT GTG GTG GAT TTA CCG GC-3'(配列番号25)
コドン最適化コンストラクト (OPT)	5'-GGC CGG CCA TGG AAC TTC TTA TTC TCA AAG CC-3'(配列番号26)	5'-CCT GCA GGT TAG TTT GTG GTG GAT TTA CCG GC-3'(配列番号27)
GC富化コンストラクト (GC3)	5'-GGC CGG CCA TGG AGT TGC TCA TCC TCA AGG CC-3'(配列番号28)	5'-CCT GCA GGT TAG TTC GTG GTG GAC TTG CCG GCG-3'(配列番号29)

表4: 3つのsRSV-Fコンストラクトの増幅および構築のために利用された、5'および3'プライマー配列がここで提示される。5'プライマー配列内にはFseI制限酵素認識部位が、3'プライマー配列内にはSbfI制限酵素認識部位が組み込まれた(下線付き)。各コンストラクトで、早期停止コドン (TTA; 太字で示される)が膜貫通ドメイン近位に挿入されて、タンパク質のトランケート形態が生成された。

【０１７２】

クローン細胞系の開発では、ＳｓｐＩ（ｐＣＬＤ中のＧＣ富化ｓＲＳＶ－Ｆ）またはＰｖｕＩ（野生型可溶性）およびｐＣＬＤ中のコドン最適化ｓＲＳＶ－Ｆ）のいずれかを使用して、制限酵素消化による形質移入前に発現コンストラクトを直線化した。動物成分非含有ＳｓｐＩおよびＰｖｕＩをＲｏｃｈｅから得て、ｃＧＭＰ規格に確実に適合するようにした。直線化ＤＮＡをフェノール・クロロホルム精製し、ゲル電気泳動と分光光度計によって分析し、直線化および量をそれぞれ判定した。

【０１７３】

場合によっては、配列確認された各ＤＮＡプラスミドをＱｉａｇｅｎ　ＭａｘｉＰｒｅｐ法（Ｑｉａｇｅｎ）によって調製し、Ｎａｎｏｄｒｏｐ（Ｔｈｅｒｍｏ－Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）分析により定量化した。アンピシリン耐性ＯＲＦ近くに１つの切断部位のみを有し、したがって融合タンパク質とグルタミン酸シンセターゼコード領域の双方から遠く離れた、ＳａｐＩ酵素（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ）を使用して、制限消化切断によってプラスミドを引き続き直線化した。直線化プラスミドＤＮＡをエタノール沈殿させ、Ｎａｎｏｄｒｏｐ分析によって定量化し、引き続いて懸濁ＣＡＴ－Ｓおよび／またはＣＨＯ－Ｓ細胞の形質移入のために使用した。

【０１７４】

ｂ．可溶性ｈＰＩＶ３－Ｆ発現コンストラクト

Ｔｅｘａｓ／１２０８４／１９８３株からの野生型ｈＰＩＶ３－ＦＯＲＦを保有する、以前誘導されたプラスミドからの野生型ｈＰＩＶ３－Ｆのためのテンプレートを使用して、ｈＰＩＶ３融合タンパク質（ｈＰＩＶ３－Ｆ）野生型配列をＰＣＲによって増幅した。ＦｓｅＩ（順方向プライマー）およびＳｂｆＩ（逆方向プライマー）制限部位配列を保有するプライマーを使用して、ＰＣＲ増幅を実施した。可溶性分泌タンパク質を生成するために、配列番号９のアミノ酸４８９～５３９に相当するＣ末端の５１個のアミノ酸を欠失させた。野生型配列中の３番目のコドンを全てグアニンまたはシトシンのいずれかに変更することで、ＨＬ１コンストラクトが生成された。３番目の塩基対が既にグアニンまたはシトシンであるコドンには、変更を加えなかった。遺伝子合成は、ＤＮＡ２．０によって実施された。この生成物を引き続いて、ＰＣＲ増幅およびｐＣＬＤへのサブクローニングのためのテンプレートとして使用した。野生型およびＧＣ富化（ＨＬ１）ｈＰＩＶ３－Ｆコンストラクトの ＰＣＲ増幅と、ｐＣＬＤベクターへのサブクローニングのためのプライマーを下の表６に提示する。野生型およびＧＣ富化（ＨＬ１）ｈＰＩＶ３－Ｆコンストラクトのための追加的なＰＣＲプライマー（表６で提示される）を使用して、Ｈｉｓタグを

含有するコンストラクトを生成した。

【表５】

表5:				
可溶性hPIV-F コンストラクト	以下による合成	%GC 含量	%GC3 含量	配列番号
野生型	PCR	36	29	10
HL1	DNA 2.0	60	100	11
野生型6xHisタグ	PCR	36	30	13
HL1 6xHisタグ	DNA 2.0およびPCR	60	100	14

【表６】

表6: hPIV3-F増幅とクローニングのためのプライマー配列		
	5'プライマー配列	3'プライマー配列
野生型可溶性コンストラクト	5'-gcatggccggccatgccaacttc aatactgctaattattacaac-3' (配列番号30)	5'-gcatcctgcaggttaatgccaa tttccaatggaatctag-3' (配列番号31)
GC富化可溶性コンストラクト (HL1)	5'-gcaggccggccatgccgacgtc catcctgc-3' (配列番号32)	5'-gcacctgcaggttagtgccag ttgccgatggag-3' (配列番号33)
野生型可溶性6xHisタグ	5'-gcatggccggccatgccaacttc aatactgctaattattacaac-3' (配列番号34)	5'-gcatcctgcaggttagtgatggtg atggtggtgatgccaatttccaatgga atctag-3' (配列番号35)
HL1可溶性6xHisタグ	5'-gcaggccggccatgccgacgtc catcctgc-3' (配列番号36)	5'-gcatcctgcaggttagtgatgg tgatggtggtggtgccagttgccga tggag-3' (配列番号37)

【０１７５】

配列確認された各ＤＮＡプラスミドをＱｉａｇｅｎ　ＭａｘｉＰｒｅｐ法（Ｑｉａｇｅｎ）によって調製し、Ｎａｎｏｄｒｏｐ（Ｔｈｅｒｍｏ－Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）分析により定量化した。アンピシリン耐性ＯＲＦ近くに１つの切断部位のみを有し、したがって融合タンパク質とグルタミン酸シンセターゼコード領域の双方から遠く離れた、Ｓａｐｌ酵素（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ）を使用して、制限消化切断によってプラスミドを引き続き直線化した。直線化プラスミドＤＮＡをエタノール沈殿させ、Ｎａｎｏｄｒｏｐ分析によって定量化し、引き続いて懸濁ＣＨＯ（例えばＣＡＴ－Ｓ）細胞の形質移入のために使用した。

【０１７６】

２．細胞培養条件

ＲＳＶ－Ｆ発現を最適化するために、高力価の可溶性ＲＳＶ－Ｆタンパク質を効率的に生成でき、調査研究およびワクチン開発の双方を容易にする産生細胞が選択された。この目的を達成するために、動物成分非含有培地および補給剤で培養し得ることから、ＣＡＴ－Ｓ細胞を用いて、プレＧＭＰ条件に確実に適合するようにした。さらに血清なしで培養した細胞系の利用は、培養液からの望まれないタンパク質を最小化することで、精製法を簡単にする。

【０１７７】

ＣＡＴ－Ｓ懸濁ＣＨＯ細胞（受入番号１００９０２０１）を６ｍＭのＬ－グルタミン（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を添加した既知組成のＣＨＯ培地（ＣＤ－ＣＨＯ；Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）内で維持した。培養成分は動物成分非含有と決定され、将来の臨床等級組換え

タンパク質生産のために、品質保証要件に確実に適合するようにした。１４０ｒｐｍに設定された加湿振盪インキュベーター内で、細胞を５％CO_2および３７℃で培養して、懸濁培養の連続的で適切な混合を確実にした。細胞増殖および生存度は、ＶｉＣｅｌｌ分析（Ｂｅｃｋｍａｎ　Ｃｏｕｌｔｅｒ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ）によって３～４日毎に測定され、概して親ＣＡＴ－Ｓ細胞系の９５～９８％の生存度の範囲であった。一箇所におけるＣＡＴ－Ｓ細胞増殖は、細胞生存度と密度の双方に関して、別の箇所から得られたＣＡＴ－Ｓ細胞増殖を並行して模倣した。細胞は、５％CO_2および３７℃で維持された。

【０１７８】

Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎの懸濁ＣＨＯ－Ｓ細胞は、８ｍＭＬグルタミン添加ＣＤ－ＣＨＯ培地内で維持された。ＣＨＯ－Ｓ細胞は、ＣＡＴ－Ｓ細胞について上述されたのと同じ条件を使用して、培養されることが多い。場合によっては、およそ３～４日毎に、密度が１ｍｌあたり約2×10^6個の生存細胞に達した時に、ＣＡＴ－ＳおよびＣＨＯ－Ｓ細胞系の双方を二次培養し、その時点で細胞を新鮮培地に１：１０（最終濃度0.2×10^6細胞／ｍＬ）で分割した。培養試薬はＩｎｖｉｔｒｏｇｅｎから得られた。

【０１７９】

３．形質移入

３００ｇで１０分間の遠心分離によって、９０％を上回る生存度で、懸濁ＣＨＯ培養物、ＣＡＴ－Ｓ、およびＣＨＯ－Ｓを収集した。ｃＧＭＰ等級Ａｍａｘａ　Ｎｕｃｌｅｏｆｅｃｔｏｒ　Ｓｏｌｕｔｉｏｎ　Ｖ（Ａｍａｘａ）中の１００μｌのアリコートＣＡＴ－Ｓ（そして場合によってはＣＨＯ－Ｓ）細胞（1×10^8細胞／ｍｌ）を２μｇの直線化ＤＮＡ（上述）と混合した。場合によっては、形質移入あたり1×10^7個のペレット化細胞を１００μＬのＡｍａｘａ　Ｎｕｃｌｅｏｆｅｃｔｏｒ　Ｓｏｌｕｔｉｏｎ　Ｖに再懸濁して、１０μｇの直線化プラスミドＤＮＡ（上述）を含有するＮｕｃｌｅｏｆｅｃｔｉｏｎキュベットに添加した。キュベットを引き続いて個々にＡｍａｘａ　Ｎｕｃｌｅｏｆｅｃｔｉｏｎ装置に入れて、Ｍｅｄｌｍｍｕｎｅによってあらかじめ定められたプログラム＃１１０２４で、電気穿孔した。５０ｍｌの予備加温（３７℃）Ｌ－グルタミン非含有ＣＤ－ＣＨＯ培地内で、細胞を即座に希釈した。５０μｌの細胞溶液アリコートを１０枚の９６ウェルプレートの各ウェルに入れて、５％ＣＯ２および加湿条件下で一晩、静止培養して細胞回収を促進した。翌日、１５０μｌの選択培地、ＣＤ－ＣＨＯ含有メチオニンスルホキシイミン（ＭＳＸ；Ｓｉｇｍａ）を各ウェルに添加した。選択のためのＭＳＸの最終濃度は、６５μＭであった。細胞を２１日間静止培養して、コロニーを発発生させた。約２１日間の選択後に、ＭＳＸ選択培地中で、細胞培養物を生存度百分率について分析し、上清を取り出して、各形質移入体の生存細胞密度について正規化した（１ｍＬあたり2×10^6個の生存細胞）。引き続いて、単一コロニーがあるウェルを同定し、ウエスタンブロット分析（還元および非還元条件の双方での実施）および／または定量的ＥＬＩＳＡによるタンパク質定量化のために、２０μｌのアリコートの培養液を各ウェルから取り出して、ＲＳＶまたはＰＩＶ３融合タンパク質の発現を判定した。

【０１８０】

４．ウエスタンブロット分析

ＣＡＴ－Ｓクローン細胞系によるｓＲＳＶ－Ｆ生成を評価するために、培養液をプレートから取り出して３００ｇで１０分間遠心分離し、残留細胞または細胞残骸を除去した。結果として生じた上清を、１体積の４×ＳＤＳサンプル緩衝液（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）に対して3体積の培地で混合し、非還元サンプルのために、４～１２％トリス－グリシンＮｏｖｅｘゲル（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）に装入した。還元タンパク質バンド形成パターンの判定では、４～１２％トリス－グリシンゲルへの装入前に、サンプルを１０％還元溶液（ＤＴＴ；Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）と共に７０℃で１５分間インキュベートした。タンパク質ゲルを室温で１５０ボルトで1時間泳動した。分離タンパク質をＰＶＤＦ膜に転写して、次に５％脱脂粉乳含有ＰＢＳ中でブロックした。ブロットを最初にポリクローナルヤギ抗ＲＳＶ抗体（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ　ＭＡＢ１１２８）と共に、次にウサギ抗ヤギＨＲＰコンジュゲート二次抗体（Ｄａｋｏ）と共にインキュベートした。インキュベーショ

ン後、ＳｕｐｅｒＳｉｇｎａｌ　ＥＣＬ基質（Ｐｉｅｒｃｅ）、およびＫｏｄａｋ　Ｂｉｏｍａｘフィルムへの曝露によって、タンパク質バンドを視覚化した。レーンには等量の細胞培養上清を装入したので、各ｓＲＳＶ－Ｆコンストラクトに由来する複数クローン全体にわたり比較ができた。

【０１８１】

場合によっては、以下のプロトコルに従ってウエスタンブロットを実施した。

【０１８２】

ａ．還元ＳＤＳ－ＰＡＧＥ

β－メルカプトエタノールを含有するＬａｅｍｍｌｉ緩衝液中で、サンプルを希釈し、１０分間煮沸して、１２％トリス－グリシンゲル（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）で分離した。ＸＣｅｌｌ－ＩＩ　Ｂｌｏｔシステム（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を使用してタンパク質をＰＶＤＦに転写し、モタビズマブ（Ｍｅｄｉｍｍｕｎｅ）またはヤギ抗ＲＳＶ（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ）抗体のいずれかを使用して探索した。ブロットをＨＲＰ－コンジュゲート抗ヒトおよび抗ヤギ抗体で、それぞれ探索した。シグナルは、ＥＣＬ　Ｐｌｕｓ（ＧＥ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）およびオートラジオグラフィーフィルムを使用して検出した。

【０１８３】

ｂ．非還元ＳＤＳ－ＰＡＧＥ

サンプルを１／４体積の４×ＬＤＳ装入緩衝液（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）で希釈し、４～１２％トリス－グリシン勾配ゲル（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）に直接装入した。ＸＣｅｌｌ－ＩＩ　Ｂｌｏｔシステム（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を使用して分離タンパク質をＰＶＤＦ（０．４５μＭ孔径）に転写し、次にモタビズマブ（Ｍｅｄｉｍｍｕｎｅ）またはヤギ抗ＲＳＶ（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ）抗体のいずれかを使用して探索した。ブロットをＨＲＰ－コンジュゲート抗ヒトおよび抗ヤギ抗体で、それぞれ探索した。シグナルは、ＳＵＰＥＲＳＩＧＮＡＬ　Ｆｅｍｔｏ　ＥＣＬ試薬（Ｐｉｅｒｃｅ）およびオートラジオグラフィーフィルムを使用して検出した。

【０１８４】

５．ＥＬＩＳＡスクリーニング

研究で精製したタンパク質を標準として使用し、定量的ＥＬＩＳＡによって、コロニー成長がある形質移入細胞を含有するウェルをｓＲＳＶ－Ｆ発現についてスクリーニングした。簡単に述べると、炭酸－炭酸水素塩緩衝液（ｐＨ９．０）中のポリクローナルヤギ抗ＲＳＶ抗体（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ　ＭＡＢ１１２８）の１：１０００希釈によって、９６ウェルＩｍｍｕｌｏｎ　４Ｂプレート（高結合）を４℃で一晩被覆した。プレートを０．０５％ＴＷＥＥＮ　２０（ＰＢＳ－ＴＷＥＥＮ）含有リン酸緩衝食塩水で繰り返し洗浄してから、プレートを２００μｌのＳｕｐｅｒｂｌｏｃｋ溶液（Ｐｉｅｒｃｅ）で室温で１時間ブロックした。ＥＬＩＳＡプレートをＰＢＳ－ＴＷＥＥＮで繰り返し洗浄してから、コロニー成長を呈示するウェルから取り出された細胞培養液の１：１０希釈液（ＰＢＳ中の１０％Ｓｕｐｅｒｂｌｏｃｋ）を添加した。サンプルプレートを室温で２時間インキュベートしてから、洗浄し、一次検出抗体、モノクローナルマウス抗ＲＳＶ（ＭｉｌｌｉｐｏｒｅからのＭＡＢ８２６２）の１：１０００希釈と共にインキュベートした。引き続いて、非結合一次抗体を取り出して、プレートを抗マウスＨＲＰ二次抗体（Ｄａｋｏ）と共にインキュベートし、次にＴＭＢ基質を使用して発色させた。ＨＣｌの添加によってＴＭＢの発色を停止させ、ＳｏｆｔＭａｘＰｒｏソフトウェア（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｄｅｖｉｃｅｓ）を使用して、ＳｐｅｃｔｒａＭａｘ　５プレートリーダー上で、プレートを４５０ｎｍの吸光度についてアッセイした。ｂ／ｈＰＩＶ３を発現して研究で精製されたｓＲＳＶ－Ｆから作成された標準曲線と、個別サンプルのＡ４５０値を比較した。

【０１８５】

場合によっては、以下のＥＬＩＳＡプロトコルを使用した。各形質移入細胞集団から上清培地を取り出して、生存細胞密度について正規化した（１ｍＬあたり２×10^6個の生存細胞）。次に上清サンプルを酵素結合免疫吸着測定（ＥＬＩＳＡ）によって、ＲＳＶ融合タンパク質の発現について分析した。上清を無希釈のサンプル（出発培地）から１：２

～１：２０４８に希釈した、９６ウェルプレートの複製ウェル内で試験して、既知量の精製ｓＲＳＶ－Ｆから誘導された標準曲線と比較した。簡単に述べると、プレートを１μｇ／ｍＬのモタビズマブ（ＰＢＳ中）で一晩被覆し、次に試験サンプル添加前に、３００μＬ／ウェルのＳｕｐｅｒｂｌｏｃｋ（Ｐｉｅｒｃｅ）で１時間ブロックした。場合によっては、１００μｌの体積中の１５０ｎｇのモタビズマブを使用して、各ウェルを被覆した。モノクローナルマウス抗ＲＳＶ抗体（ＭＡＢ８２６２；Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ）の１：１０００希釈を使用して、ｓＲＳＶ－Ｆ結合を引き続いて検出し、１：１００００のウサギ抗マウスペルオキシダーゼと、ペルオキシダーゼ基質ＴＭＢの添加がそれに続いた。プレートをＳｐｅｃｔｒａＭａｘプレートリーダー上で読み取り、１：３に希釈した４μｇ／ｍＬ～０．２ｎｇ／ｍＬの精製ｓＲＳＶ－Ｆから作成された標準曲線から、各サンプル中に存在するｓＲＳＶ－Ｆを計算した。

【０１８６】

場合によっては、より厳密に精製され定量化されたｂ／ｈＰＩＶ３発現ｓＲＳＶ－Ｆ（０．４ｍｇ／ｍｌ）の開発精製形態を使用して、標準曲線（４～０．０３１ｎｇ／ｍｌの範囲）を作成した。これらの改善が実装され、引き続いてｓＲＳＶ－Ｆ生成レベルアッセイにおいて、より大きなＣＶ値とより低い誤り率、すなわちより大きな信頼性が提供された。

【０１８７】

６．細胞培養スケールアップ（ＣＡＴ－Ｓ細胞）

最初の９６ウェルコロニーを組換えタンパク質発現レベルに対して格付けし、検出可能なタンパク質があるクローンを細胞拡大のために２４ウェルプレートに移した。２４ウェルプレート培養物についてＥＬＩＳＡおよびウエスタンブロットを繰り返してから、６ウェル培養プレートに、最終的には１０ｍｌの選択培養液の入った１２５エルレンマイアー振盪フラスコに移した。エルレンマイアーフラスコへの接種に続いておよそ１週間で、培養細胞を静止インキュベーターから振盪インキュベーターに移して、８０ｒｐｍで７日間混合を開始した。１週間の穏やかな振盪に続いて、各振盪フラスコ培養について、細胞密度と生存度のためのＶｉＣｅｌｌ分析を判定する。次に振盪を４日間１００ｒｐｍにし、その後、最終的に１４０ｒｐｍの最適化維持速度に増大させた。個々のクローンの格付けを判定するために、振盪フラスコ内のタンパク質発現および細胞密度／生存度を周期的に分析して、生産性と増殖を判定する。発現レベルが、最高値のクローンの１０％未満のクローンは、スケールアップ過程で周期的に廃棄して、最高産生培養物を選択した。

【０１８８】

１ｍｌの選択培地あたり０．２×10^6個の細胞を振盪フラスコに装入し、周期的にタンパク質発現と細胞増殖のための試料を採取して、流加および非流加バッチ条件の双方で、過成長培養生成を判定した。バイオリアクター中のＣＡＴ－Ｓ増殖のために、Ｍｅｄｌｍｍｕｎｅ培養液ＣＤＣ－３（既知組成のＣＨＯ－３）を使用し、流加培養物の補足供給のためにＭｅｄｌｍｍｕｎｅ　Ｍ２０Ａ供給を使用した。

【０１８９】

７．フローサイトメトリー

ＲＳＶ－Ｆタンパク質発現の染色前に、３００ｇで１０分間の遠心分離によって、ＣＡＴ－ＳおよびＣＨＯ－Ｓ細胞培養物を収集した。サンプルあたり約３×10^6個の生存細胞を含有する細胞ペレットを５００μＬの固定化溶液（Ｂｅｃｔｏｎ　Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ　Ｃｙｔｏｆｉｘ／Ｃｙｔｏｐｅｒｍキット；Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ）に再懸濁し、４℃で一晩インキュベートした。製造会社のプロトコルに従って、Ｂｅｃｔｏｎ　Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ’ｓ　Ｃｙｔｏｐｅｒｍ溶液で固定細胞を透過処理し、次に１μｇ／ｍＬのモタビズマブと共に、４℃で１時間インキュベートした。細胞を洗浄して非結合モタビズマブを除去し、引き続いて抗ヒトＦＩＴＣコンジュゲート検出抗体（Ｄａｋｏ　Ｃｙｔｏｍａｔｉｏｎ）の１：１０００希釈と共に、４℃で１時間インキュベートした。次に細胞を洗浄し、ＬＳＲ　ＩＩまたはＦａｃｓＣａｌｉｂｕｒフローサイトメトリー装置のいずれかの上で分析して、それぞれＦＡＣＳＤＩＶＡまたはＣＥＬＬＱＵＥＳＴソフトウェ

アによって発現を分析した。

【０１９０】

実施例２：完全長ＲＳＶ－Ｆ発現の最適化

ヌクレオチド配列が完全長ＲＳＶ－Ｆタンパク質の発現に及ぼし得る影響を評価するために、完全長ＲＳＶ－Ｆヌクレオチド配列の野生型、コドン最適化、またはＧＣ富化バージョンのいずれかを含有するＤＮＡコンストラクトを細胞系に形質移入した。実施例１に記載される方法に従って、同一ＲＳＶ－Ｆタンパク質をコードするヌクレオチドコンストラクトをｐＣＭＶｓｃｒｉｐｔ発現ベクターにクローンして、ＢＳＲＴ７、ＭＲＣ－５、およびＶｅｒｏ細胞に形質移入した。完全長ＲＳＶ－Ｆタンパク質発現に対する、ヌクレオチド配列バリエーションおよびシス作用核外輸送因子の効果については下述する。

【０１９１】

Ａ．組換えＲＳＶ－Ｆタンパク質発現レベルは、ＧＣ存在量増大およびシス作用核外移行因子によって改善される

最初の試験を実施し、ＧＣ存在量を増大させて、核外移行に対するウイルス転写物のＡＵに富む性質の悪影響を克服することが、組換えＦタンパク質発現レベルを改善し得るかどうかを判定した。野生型ＲＳＶ　Ａ２　Ｆ遺伝子配列（F_{A2}）、コドン最適化ＲＳＶ　Ａ２　Ｆ配列（F_{opt}）、およびＧまたはＣヌクレオチド百分率が富化されているが同一アミノ酸配列をコードするＲＳＶ　Ａ２　Ｆ配列（F_{GC}）をｐＣＭＶｓｃｒｉｐｔ発現ベクターにクローンした。図１Ｂで示されるように、これらのＲＳＶ－Ｆ配列のＧＣ含量の差は、１０％を上回る。各発現ベクターをＢＳＲ－Ｔ７、ＭＲＣ－５、またはＶｅｒｏ細胞に形質移入した。これらの細胞型は、それぞれ組換えウイルスをレスキューし、弱毒生ＲＳＶワクチンを増殖させ、ＲＳＶを増殖させるのに慣例的に使用されることから、選択された。形質移入の３６時間後に収集した細胞溶解産物に対して、Ｆタンパク質発現のウエスタンブロットを実施し、βアクチンについて正規化した。Ｆタンパク質は、４８ｋＤａに移行するＦタンパク質のF_1断片を認識し、約２２ｋＤａに移行するさらに小さい未同定の断片を一貫して認識する、高親和性モノクローナル抗体を使用して検出される（Ｗｕ　ｅｔ　ａｌ．，２００７　Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏ．３６８，６５２－６５５）。F_{opt}の発現レベルは、ＢＳＲ－Ｔ７細胞中の天然F_{A2}を上回るが、この観察はＭＲＣ－５およびＶｅｒｏ細胞では検出され得なかった（図４および５）。Ｆタンパク質転写物のＧＣ存在量（F_{GC}）を改善することは、全ての細胞型で、F_{A2}およびF_{opt}と比較して、改善されたＦタンパク質発現レベルをもたらした（図４および５）。これらの結果は、標準哺乳類発現ベクターからの組換え発現のためのＲＳＶ－Ｆタンパク質遺伝子配列のコドン最適化の効果が、一つにはＧＣ存在量の改善である可能性を高める。

【０１９２】

Ｆタンパク質の組換え発現が、芳しくない核外移行によって妨げられるかどうかをさらに評価するために、図１Ａに示されるように、ＷＰＲＥをｐＥＢＮＡＦタンパク質発現ベクターに導入した。形質移入に対して高度に許容的であることから選択された２９３Ｆ細胞に、同一モル量の各発現ベクターを形質移入した。いくつかの実験では、分泌ルシフェラーゼをコードするベクターをｐＥＢＮＡＦタンパク質発現ベクターで同時形質移入し、形質移入に続いて２４時間目に上清のアリコートを収集した。これらの上清中のルシフェラーゼ活性のアッセイは、形質移入の効率が、全てのコンストラクトで同様であったことを示した。形質移入の４８時間後に細胞溶解産物を収集し、図４および５で使用されたＦタンパク質検出のための同一高親和性抗体を使用して、ウエスタンブロットを実施した。溶解産物を最初に希釈し、βアクチンを基準にしてタンパク質負荷について正規化し、比較を容易にするために、より大きなＦタンパク質発現を示した溶解産物が、より軽度のＦタンパク質発現がる溶解産物よりも１０倍希釈されるように、これらの正規化した溶解産物を装入前にさらに希釈した（図６）。ｐＣＭＶｓｃｒｉｐｔベクタークローンで観察されたのと同じ傾向が、ｐＥＢＮＡベクタークローンについても観察され（図４および５）、コドン最適化によって、およびＧＣ最適化の増大によって、Ｆタンパク質発現が改善された（図６）。Ｆタンパク質のF_1部に相当する４８ｋＤａにおける透明な淡いバンドと

、Ｆタンパク質発現時にウエスタンブロットによってのみ検出される明白な２２ｋＤａバンドの出現によって観察されるように、Ｆタンパク質発現は、F_{Long}およびF_{A2}発現ベクターへのＷＰＲＥの添加によって改善された（図６）。ＷＰＲＥがF_{opt}およびF_{GC}発現ベクターに含まれていた場合、ＷＰＲＥによる増強は、あまり明白でない（図６）。比較目的でＲＳＶ感染ＨＥｐ－２細胞からの溶解産物に、同一様式で実施したウエスタンブロットを示す（図６）。Ｆタンパク質特異的抗体によって同じ２本のバンドが検出され、未同定のバンドが、組換えＦタンパク質発現の特別な結果でないことが示唆された（図６）。ＷＰＲＥおよびＧＣ存在量増大が、Ｆタンパク質発現を改善するという観察は、Ｆタンパク質の低い組換え発現レベルが、恐らく少なくとも部分的に、Ｆタンパク質転写物の非効率的な核外移行に起因することを示唆する。

【０１９３】

Ｂ．ＧＣ存在量の増大は、細胞質組換えウイルス発現ベクターの文脈で、組換えＦタンパク質発現を改善しない

標準哺乳類発現ベクターからの低レベルのＦタンパク質発現が、芳しくない核外移行の結果であるならば、転写が細胞質で起きる場合、F_{A2}、F_{opt}、およびF_{GC}のＲＳＶ－Ｆ発現レベルはほぼ同じであるべきである。しかしＦ遺伝子のコドン最適化またはＧＣ存在量の増大によるＦタンパク質発現の改善が、核外移行改善の結果でないとすれば、転写が細胞質で起きる場合、F_{opt}およびF_{GC}の発現レベルは、野生型F_{A2}レベルよりも高くあるべきである。そのため、ウシパラインフルエンザウイルス３型（ｂＰＩＶ３）に由来して、先に記載されている（Ｔａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，２００３　Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．７７，１０８１９－１０８２８）組換えウイルス発現ベクターであるｂ／ｈ　ＰＩＶ３から、F_{A2}、F_{opt}、およびF_{GC}を発現させて、この筋書きを試験した（図７Ａ）。ｂ／ｈ　ＰＩＶ３からのＲＳＶ－Ｆ遺伝子の発現は、ＲＳＶ感染細胞中のＲＳＶ－Ｆ遺伝子の発現と同様にして、感染細胞の細胞質で起きる。図７Ａに示されるように、ＲＳＶ－Ｆ遺伝子は、ｂＰＩＶ３　ＮとＰ遺伝子間の第２の遺伝子位置にクローンされた。ウエスタンブロット法のために、異なるバージョンの遺伝子を発現する、ｂ／ｈ　ＰＩＶ３／ＲＳＶ－Ｆ組換えウイルスを感染させたＶｅｒｏ細胞からの溶解産物を感染の４８時間後に収集した。ウエスタンブロット分析は、ＧＣ存在量の増大が、このウイルスベクターの文脈で、Ｆタンパク質発現レベルを改善しなかったことを示した（図７Ｂ）。これらのデータは、芳しくない核外移行が、標準プラスミドベースの哺乳類発現ベクターからの低レベルのＦタンパク質発現に寄与することをさらに示唆する。

【０１９４】

Ｃ．早期ポリアデニル化は低レベルの組換えＲＳＶ－Ｆタンパク質発現に寄与する

核外移行を評価するのに加えて、試験を実施して、ＲＮＡポリメラーゼＩＩによる組換えＦタンパク質転写が、常態ではこの遺伝子を転写するウイルスポリメラーゼとの対比で、不正確なスプライシングおよび／または早期ポリアデニル化を受けた転写物をもたらすかどうかを判定した。Ｆ遺伝子のＲＮＡポリメラーゼＩＩ由来転写物が、スプライスされたかどうかを判定するために、同一モル量の各ｐＥＢＮＡＦタンパク質発現ベクターによる形質移入の４８時間後に、２９３Ｆ細胞から全ＲＮＡを精製した。各サンプルで、CMV_{IE}プロモーター内の転写開始部位からＦタンパク質の停止コドンに及ぶＲＴ－ＰＣＲを実施した。ＲＴ－ＰＣＲのゲル分析は、完全長転写物が、全てのバージョンのＦ遺伝子で形質移入された２９３Ｆ細胞中で発現される、主要転写物であることを示した。したがってスプライシングは、低レベルの組換えＦタンパク質発現に寄与する主要因ではない。

【０１９５】

組換え発現中のＦ遺伝子転写物の早期ポリアデニル化については、以前報告された（Ｔｅｒｎｅｔｔｅ　ｅｔ　ａｌ．，２００７　Ｖｉｒｏｌ．Ｊ．４，５１）。ＲＡＣＥ分析が慣例的に使用されて、転写開始部位ならびに転写終了部位が同定されることにより、転写物の５’または３’末端のいずれかが特性解析される。そのため３’ＲＡＣＥ分析を使用して、早期ポリアデニル化Ｆ転写物を試験した。図８Ａに要約されるように、F_{Long}、F_{A2}、およびF_{opt}配列内で同定されたポリアデニル化シグナル配列に基づいて

、これらの遺伝子が早期ポリアデニル化を受けるのに対し、F_{GC}配列は、ポリアデニル化シグナル配列の欠如のために、早期ポリアデニル化を受けないことが予期された。同一モル量の各ｐＥＢＮＡＦタンパク質発現ベクターによる形質移入の４８時間後に、全ＲＮＡを２９３Ｆ細胞から精製して、３’ＲＡＣＥ分析を実施した。３’ＲＡＣＥ　ＰＣＲは、ＷＰＲＥのない転写物ではおよそ１，７００ヌクレオチド長、ＷＰＲＥのある転写物ではおよそ２，３２５ヌクレオチド長であるべきである、完全長Ｆ転写物を増幅するようにデザインされた。３’ＲＡＣＥ分析は、F_{Long}およびF_{A2}発現ベクターで形質移入された２９３Ｆ細胞中で検出されたＦタンパク質転写物の大部分が、ゲル濃度測定による定量化で、１，７００または２，３２５ヌクレオチドよりも小さかったことを明らかにした（図８Ｂ）。ＷＰＲＥを含むF_{Long}およびF_{A2}タンパク質発現ベクターで形質移入された細胞では、スプライシングのＰＣＲ分析によって完全長転写物が検出され、ウエスタンブロットによって完全長Ｆタンパク質の生成が検出されたので、これらのサンプル中には完全長転写物が存在すると思われるが（図６）、３’ＲＡＣＥ分析による検出限界未満であった。対照的に、F_{opt}発現ベクターで形質移入された２９３Ｆ細胞中で検出されるより小型の転写物は、大幅に量が少ない（F_{opt}および$F_{opt-WPRE}$でそれぞれ３および４０％）。これらのより小型の転写物のサイズは、F_{Long}、F_{A2}、およびF_{opt}中のポリアデニル化シグナル配列と相関する（図８Ａ）。Ｆタンパク質がウイルスポリメラーゼによって転写されるウイルス複製中に、これらのトランケート型転写物は検出されなかったので（図８Ｂ）、早期ポリアデニル化はＲＮＡポリメラーゼＩＩに対して特異的であった。トランケート型転写物を明らかにするのに加えて、３’ＲＡＣＥ　ＲＴ－ＰＣＲは、転写物存在量に差があることを実証する。同一量のＲＮＡをＲＡＣＥ分析の各ＲＴステップに入れたが、F_{Long}およびF_{A2}サンプルの２μｌと比較して、F_{opt}およびF_{GC}サンプルでは、０．５μｌのみの第１鎖反応液が第２鎖の合成に入って、図８Ｂに示される結果が達成される。したがってF_{Long}およびF_{A2}転写物の存在量は、F_{opt}およびF_{GC}転写物よりも低いようであった。

【０１９６】

主要３’ＲＡＣＥ　ＰＣＲ産物をＴＯＰＯ　ＴＡ　ｐＣＲ２．１にクローンして、配列決定し、ポリアデニル化事象の存在と正確な位置を同定した。配列決定結果は、F_{Long}およびF_{A2}トランケート型転写物が、Ｆ遺伝子内のヌクレオチド配列の１２８２位に位置するポリアデニル化シグナル配列と相関性がある、早期ポリアデニル化事象の結果であることを確認した一方、F_{opt}およびF_{GC}では、完全長転写物が同定された。これらの結果は、早期ポリアデニル化が、低レベルの組換えＦタンパク質発現に寄与し、この問題に完全に対抗するには、コドン最適化（F_{opt}）だけでは十分でないことが示唆される。しかしＧＣ含量の増大（F_{GC}）は、全ての早期ポリアデニル化シグナル配列ＡＡＴＡＡＡの除去と、組換えＲＳＶ－Ｆタンパク質のより良い発現をもたらした。

【０１９７】

Ｄ．組換えＲＳＶ－Ｆタンパク質発現の増大はより大きな融合活性と相関する

組換えＦタンパク質発現の改善が、機能に影響するがかどうかを判定するために、一過性および安定発現の双方のアプローチを使用して、Ｆタンパク質媒介細胞－対－細胞融合、またはシンシチウム形成を評価した。一過性発現では、同一モル相当量の各ｐＥＢＮＡＦタンパク質発現ベクターで、２９３Ａｄ細胞を形質移入した。形質移入２４時間後に、顕微鏡検査によって、Ｆタンパク質が媒介する細胞－対－細胞融合を分析した。外観検査は、Ｆタンパク質発現レベルの増大（図４～６）と良好な相関性がある、シンシチウム形成の程度を示した（図９）。最多のシンシチウム形成は、$F_{GC-WPRE}$発現ベクターで形質移入された細胞中で一貫して観察された（図９）。Ｆタンパク質の安定発現を分析するために、テトラサイクリン誘導時にF_{GC}または$F_{GC-WPRE}$を発現する、２９３由来細胞系を生成した。これらの細胞系に結合するＲＳＶ－Ｆタンパク質に対して特異的な抗体量を判定するアッセイが開発された（Ｗｕ　ｅｔ　ａｌ．，２００７　Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．３６８，６５２－６５５）。誘導の４４時間後に、F_{GC}細胞系と比較して、平均で６．３１倍±０．５８（ＳＥＭ）より多量の$F_{GC-WPRE}$細胞系に結合す

る抗体があり、より多量のＦタンパク質発現が示唆された。シンシチウム形成は$F_{GC-WPRE}$細胞系のみで観察され、F_{GC}細胞系で観察されなかったことから、このＦタンパク質発現レベルの差は、Ｆタンパク質の機能に著しい影響を及ぼした。

【０１９８】

実施例３：ＣＡＴ－ＳおよびＣＨＯ－Ｓ細胞中の可溶性ＲＳＶ－Ｆタンパク質の生成

可溶性バージョンのＲＳＶ－Ｆタンパク質（ｓＲＳＶ－Ｆ）発現に、ヌクレオチド配列ヌクレオチド配列が及ぼし得る影響を評価して、いずれの細胞系がｓＲＳＶ－Ｆタンパク質生成に最適かを判定するために、様々なバージョンのｓＲＳＶ－Ｆヌクレオチド配列を含有するＤＮＡコンストラクトをＣＡＴ－ＳおよびＣＨＯ－Ｓ細胞系に核内導入した。具体的には、同一ｓＲＳＶ－Ｆアミノ酸配列（配列番号７）をコードする、可溶性野生型（配列番号３）、可溶性コドン最適化（ＯＰＴ；配列番号４）、可溶性ＧＣ富化（ＧＣ３；配列番号５）、可溶性培地ＧＣ３（ＨＬ２；配列番号６）、および可溶性ＧＨ５のコンストラクトを使用した。本実施例で使用されるｓＲＳＶ－Ｆヌクレオチドコンストラクトは、ＲＳＶ－Ｆタンパク質のエクトドメインをコードする実施例１に記載されるように、各コンストラクトから、タンパク質の膜貫通および内部ドメインを含有する、カルボキシ末端の５０個のアミノ酸をコードするヌクレオチド配列を欠失させた。実施例１に記載される方法に従って、ＣＡＴ－ＳおよびＣＨＯ－Ｓ細胞に、ｐＣＬＤｖ４５５０合成ＭＣＳ－ｐｏｌｙ　Ａ発現ベクターにサブクローニングされた各ｓＲＳＶ－Ｆコンストラクトを Ａｍａｘａ　Ｎｕｃｌｅｏｆｅｃｔｏｒで核内導入した。実施例１に記載される方法に従って細胞を培養し、ウエスタンブロット、ＥＬＩＳＡ、およびＦＡＣＳを使用して、ｓＲＳＶ－Ｆタンパク質について培養物をアッセイした。

【０１９９】

実施例１で提示される方法に従って、ウエスタンブロットを実施した。ＣＡＴ－Ｓ細胞中のｓＲＳＶ－Ｆ生成ウエスタンブロットの結果を図１０および１１に提示する。ＣＨＯ－Ｓ細胞中のｓＲＳＶ－Ｆ生成のウエスタンブロットの結果を図１２および１３に提示する。実施例１に提示される方法に従って、ＥＬＩＳＡ分析を実施した。ＣＡＴ－ＳおよびＣＨＯ－Ｓ細胞中のｓＲＳＶ－Ｆ生成のＥＬＩＳＡの結果を図１４に提示する。ＥＬＩＳＡ分析によれば、ｓＲＳＶ－Ｆタンパク質の発現は、高ＧＣコンストラクト（ＧＣ３）で形質移入されたＣＡＴ－Ｓ細胞中で最大であり、中程度ＧＣ（ＨＬ２）およびコドン最適化コンストラクトがそれに続いた。全体的にタンパク質生成は、ＣＨＯ－Ｓ細胞系と比較して、ＣＡＴ－Ｓ細胞系で２倍を超えて高かった。実施例１に提示される方法に従って、ＦＡＣＳ分析を実施した。ＣＡＴ－ＳおよびＣＨＯ－Ｓ細胞のｓＲＳＶ－Ｆ生成のＦＡＣＳの結果を図１５、１６、および１７に提示する。ＦＡＣＳ分析によれば、いずれの細胞系が利用されたかにかかわりなく、ｓＲＳＶ－Ｆタンパク質の発現は、高ＧＣコンストラクト（ＧＣ３）での形質移入に続いて最高と格付けされ、中程度ＧＣ含量（ＨＬ２）がそれに続いた。野生型、コドン最適化（ＯＰＴ）、およびＧＨ５バージョンは、背景レベルを顕著に超えなかった。

【０２００】

実施例４：ＣＡＴ－Ｓ細胞中の可溶性ＲＳＶ－Ｆヌクレオチド配列の最適化

可溶性バージョンのＲＳＶ－Ｆタンパク質（ｓＲＳＶ－Ｆ）発現に、ヌクレオチド配列が及ぼし得る影響を評価するために、全て同一ｓＲＳＶ－Ｆアミノ酸配列（配列番号７）をコードする、野生型、コドン最適化、またはＧＣ富化バージョンのｓＲＳＶ－Ｆヌクレオチド配列（それぞれ配列番号３、４、および５）のいずれかを含有するＤＮＡコンストラクトをＣＡＴ－Ｓ細胞系に核内導入した。３つのｓＲＳＶ－Ｆヌクレオチドコンストラクトは全て、ＲＳＶ－Ｆタンパク質のエクトドメインをコードする。実施例１に記載されるように、各コンストラクトから、タンパク質の膜貫通および内部ドメインを含有する、カルボキシ末端の５０個のアミノ酸をコードするヌクレオチド配列を欠失させた。ＣＡＴ－Ｓ細胞に、ｐＣＬＤｖ４５５０合成ＭＣＳ－ｐｏｌｙ　Ａ発現ベクターにサブクローニングされた各ｓＲＳＶ－ＦコンストラクトをＡｍａｘａ　Ｎｕｃｌｅｏｆｅｃｔｏｒで核内導入した。

【０２０１】
Ａ．安定クローン細胞系生成
クローン細胞系生成のために、核内導入ＣＡＴ－Ｓ細胞を９６ウェルプレート中で希釈した。３週間の選択的増殖に続いて、各コンストラクト形質移入プレート全体にわたり、コロニーが発達した。野生型可溶性プレート中で１２７個のコロニーを手動で同定し、これらの１１６個のクローン（９１．３％）は、単一細胞クローンから生じたものに相当するコロニー形態を有した。コドン最適化プレート内で１１１個のコロニーが同定され、その内９９個は、単一細胞クローンの結果のようであった（８９．２％）。最終的に、ＧＣ富化形質移入プレート内で、２７個のウェルのみに顕著な細胞増殖があったが、これらのコロニーの全て（１００％）が単細胞に起因する所望の形態を有した。

【０２０２】
Ｂ．ｓＲＳＶ－Ｆタンパク質生成およびＥＬＩＳＡスクリーニング
この実験では、各ｓＲＳＶ－Ｆヌクレオチドコンストラクトについてタンパク質生成をアッセイした。上のパートＡに記載される、単一細胞クローンからの増殖を呈示するウェルから、２０μｌのアリコート培養液を取り出して、定量的ＥＬＩＳＡによりタンパク質生成について試験した。野生型可溶性コンストラクトからのコロニー発現転写物中のｓＲＳＶ－Ｆタンパク質レベルは、概して検出レベル未満、または良くても検出レベルぎりぎりであった（約０．１μｇ／ｍＬ）。組換え発現レベルは、コドン最適化クローンでわずかに改善されたが（約０．２～１．１μｇ／ｍＬの範囲）、ＧＣ富化クローンで最も強力であり（０．１～１０μｇ／ｍＬを超える範囲）、その多くがアッセイで利用された標準曲線を上回った（図１８）。

【０２０３】
細胞増殖率に応じて、２１～２８日間にわたり、検出可能なｓＲＳＶ－Ｆレベルを発現する全てのウェルからの細胞を２４ウェル培養プレートに、次に６ウェルプレートにスケールアップした。このスケールアップ過程の複数の時点で、ＥＬＩＳＡによりｓＲＳＶ－Ｆ生成をアッセイした。様々な時点で生成したｓＲＳＶ－Ｆタンパク質の量を図２３に提示する。

【０２０４】
主要産生クローンは、アッセイした全ての時点において、ＧＣ富化コンストラクトで形質移入された細胞中のみに一貫して認められた。コドン最適化クローンによって生成されたｓＲＳＶ－Ｆレベルは、ＧＣ富化系統と比較して中程度であり、野生型可溶性系統ではわずかに検出された。その結果、野生型可溶性系統は、試験から体系的に排除され、ＧＣ富化およびコドン最適化親系統のみで開発を進めた。

【０２０５】
Ｃ．選択された親クローン中のｓＲＳＶ－Ｆタンパク質生成
ｓＲＳＶ－Ｆの発現レベルおよび細胞増殖特性の双方に基づいて、親クローンを生産能力について格付けし、最高値の２２個のクローン（具体的には、ＧＣクローン３Ｇ１、３Ｄ１２、４Ｃ６、８Ｄ４、３Ｂ６、１Ｄ７、４Ｃ３、５Ｈ９、４Ｃ１０、２Ｆ１１、９Ａ５、２Ｈ１０、６Ｇ１１、６Ｅ１０、および２Ｅ７、およびＣＯクローン１Ｅ６、４Ｆ１２、６Ａ３、６Ａ５、５Ｂ８、８Ａ６、および３Ｂ３）を１４０ｒｐｍでの振盪フラスコ培養に入れた。これらの条件は懸濁ＣＡＴ－Ｓ系統の増殖に最適であり、産生力価と細胞増殖レベルを静止プレート増殖によって得られるものより高く押し上げることが予想された。引き続いて、最高値の９つの親系統を過成長振盪フラスコ培養に入れて、最良の産生系統である可能性が高いものを評価した。この培養様式は、０日目にクローン細胞を同一レベルで接種し（１ｍｌあたり０．２×10^6個の細胞）、追加的な培地変更または供給なしに、１４日間のさらなる培養にわたって、細胞生存度／密度とｓＲＳＶ－Ｆ生成の双方をアッセイした。この方法は、個々の系統が、増殖ストレスをどのように切り抜けたかアセスメントできるようにした。細胞密度が、およそ７日目にピークに達すると、培地構成物が細胞増殖の制限になることが予期された。最高値の４つのクローンの発現力価および生存度データが図１９に例証され、最高９０μｇ／ｍｌのｓＲＳＶ－Ｆレベルが達成さ

れたことが明らかである。これらの結果は、以前利用された最適産生系である、Ｖｅｒｏ細胞バイオリアクター内で達成可能なよりも、少なくとも６倍高いレベルに相当する。振盪フラスコ過成長結果をウエスタンブロット分析によりさらに確認した（図２０）。

【０２０６】

Ｄ．バイオリアクターｓＲＳＶ－Ｆタンパク質生成

バイオリアクターおよび流加バイオリアクターデータは、８Ｄ４親サブクローンでは５００μｇ／ｍｌを超えるｓＲＳＶ－Ｆ生成レベルが、クローン３Ｂ６では３４０μｇ／ｍｌを超えるｓＲＳＶ－Ｆ生成レベルが、クローン３Ｇ１では２８０μｇ／ｍｌを超えるｓＲＳＶ－Ｆ生成レベルが達成されることを実証した。さらにデータは、クローン１Ｄ７では約１．３ｍｇ／ｍｌのｓＲＳＶ－Ｆ生成レベル、クローン８Ｄ４では約１．６ｍｇ／ｍｌのｓＲＳＶ－Ｆ生成レベルを実証した。

【０２０７】

実施例５：ＣＡＴ－Ｓ細胞中のｈＰＩＶ３－Ｆ生成

ＲＳＶ－Ｆ以外のその他のウイルス糖タンパク質に、高ＧＣ３アプローチが適用され得るかどうかを判定するために、修飾ヌクレオチド配列コンストラクトを使用して、ＣＡＴ－Ｓ細胞中のｈＰＩＶ３－Ｆ生成を試験した。本実施例で使用されるｈＰＩＶ３－Ｆコンストラクトとしては、可溶性野生型（配列番号１０）、可溶性高ＧＣ（ＨＬ１；配列番号１１）、Ｈｉｓ－標識可溶性野生型（配列番号１３）、およびＨｉｓ－標識高ＧＣ（配列番号１４）が挙げられる。高ＧＣコンストラクトは、１００％ＧＣ３コンストラクトとして生成され、各コドンは全ての三番目の塩基対でグアニンまたはシトシンを含有する。ウエスタンブロット法で使用するために利用できる、抗ｈＰＩＶ３－Ｆ抗体の欠乏のために、６Ｘ　ｈｉｓタグを添加した。実施例１でＲＳＶ－Ｆについて記載される方法を使用して、ｈＰＩＶ３－ＦコンストラクトをｐＣＬＤプラスミドにクローンして、ＣＡＴ－Ｓ細胞に形質移入した。細胞を記載されるように培養し、ＣＡＴ－Ｓ形質移入体溶解産物上でウエスタンブロットを実施した。

【０２０８】

ポリクローナル抗ＰＩＶ３抗体（ＶＭＲＤ　ＰＩ－３ウイルス（ウシ）抗血清、ヤギ起源；ロットＧ１９７／０３１３０６）、抗ＨＩＳ抗体（Ｓｉｇｍａカタログ番号Ｈ１０２９；マウス中で生成されたモノクローナル抗ポリヒスチジン抗体）、および抗Ｃ末端ＨＩＳ抗体（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎカタログ番号Ｒ９３０－２５抗ｈｉｓ（Ｃ－ｔｅｒｍ）抗体）を使用して、（各形質移入混合物からの細胞が接種された）３個の独立したウェルから採取されたＣＡＴ－Ｓ形質移入体溶解産物に、ウエスタンブロットを実施した。ｈｉｓ標識Ｆ０前駆タンパク質の予想サイズはおよそ５５ｋＤａであり、ｈｉｓ標識Ｆ１タンパク質はおよそ４０ｋＤａであった。ウエスタンブロットの結果を図２１に提示する。結果は、高ＧＣ３　ｈＰＩＶ３－Ｆの発現が、野生型配列の発現よりも顕著に高いことを示す。したがってこのアプローチは、ＲＳＶ－Ｆに加えて、ウイルス糖タンパク質にも適用し得る。

【０２０９】

実施例６：配列の例

以下に提供されるのは、特定のヌクレオチドおよびアミノ酸配列の非限定的例である。

【表７】

表7: 配列の例

名称	タイプ	wt*との%同一性	GC含量	GC3含量	配列番号	配列
RSVA2						
WT (完全長)	NA	--	35	30	1	atggagttgctaatcctcaaagcaaatgcaattaccacaatcctcactgcagtc acattttgttttgcttctggtcaaaacatcactgaagaatttttatcaatcaaca tgcagtgcagttagcaaaggctatcttagtgctcttgagaactggttggtataacc agtgttataactatagaattaagtaatatcaagaaaaataagtgtaatggaaca gatgctaaggtaaaattgataaaacaagaattagataaatataaaaatgctgta acagaattgcagttgctcatgcaaagcacacaagcaacaaacaatcgagccaga agagaactaccaaggtttatgaattatatcactcaacaatgccaaaaaaaccaat gtaacattaagcaagaaaaggaaaagaagatttcttggtttttttgttaggtgtt ggatctgcaatcgccagtggcgttgctgtatctaaggtcctgcacctagaaggg gaagtgaacaagatcaaaagtgctctactatcccacaaacaaggctgtagtcagc ttatcaaatggagtcagtgtcttaaccagcaaagtgttagacctcaaaaactat atagataaacaattgttacctattgtgaacaagcaaagctgcagcatatcaaat atagaaactgtgatagagttcccaacaaaagaacaacagactactagagattacc agggaatttagtgttaatgcaggtgtaactcacacctgtaagcacttacatgtta actaatagtgaattattgtcattaatcaatgatatgcctataacaaatgatcag aaaaagttaatgtccaacaatgttcaaatagttagacagcaaagttactctatc atgtccataataaaagaggaagtcttagcatatgtagtacaattaccactatat ggtgttatagatacacccctgttggaaactacacacatcccctctatgtacaacc aacacaaagaagggtccaacatctgtttaacaagaactgacagaggatggtac tgtgacaatgcaggatcagtatcttctttcccacaagctgaaacatgtaaagtt caatcaaatcgagtatttttgtgacacaatgaacagtttaacattaccaagtgaa gtaaatctctgcaatgttgacatattcaacccaaatatgattgtaaaattatg

10

20

30

40

表7: 配列の例

名称	タイプ	wt*との%同一性	GC含量	GC3含量	配列番号	配列
						acttcaaaaacagatgtaagcagctccgttatcacatcctctaggagccattgtg tcatgctatggcaaaactaaatgtacagcatccaataaaaatcgtggaatcata aagacatttctaacgggtgcgattatgtatcaaataaagggtggacactgtg tctgtaggtaacacattatattattgtaaataagcaagaaggtaaaagtctctat gtaaaaggtgaaccaataaataaatttctatgacccattagtattcccctctgat gaatttgatgcatcaatatctccaagtcaacgagaagattaaccagagcctagca tttattcgtaaaatccgatgaattatttacataatgtaaatgccggtaaatcccacc acaaatatcatgataactactataattatagtgattatagtaaatattgttatca ttaattgctgttggactgctcttatactgtaaggccagaagcacaccagtcaca ctaagcaaagatcaactgagtggtataaaataaatattgcatttagtaactaa
WT (完全長)	AA	--	--	--	2	mellilkanaittiltavtfcfasgqniteefyqstcsavskgylsalrtgwyt svitielsnikknkcngtdakvklikqeldkyknavtelqllmqstpatnnrar relprfmnytlnnakktnvtlskkrkrrflgfllgvgsaiasgvavskvlhleg evnkiksallstnkavvslsngvsvltskvldlknyidkqllpivnkqscsisn ietviefgqknnrlleitrefsvnagvttpvstymltnsellslindmpitndq kklmsnnvqivrqqsysimsiikeevlayvvqlplygvidtpcwklhtsplctt ntkegsnicltrtdrgwycdnagsvsffpqaetckvqsnrvfcdtmmsltlpse vnlcnvdifnpkydckimtsktdvsssvitslgaivscygktkctasnknrgii ktfsngcdyvsnkgvdtvsvgntlyyvnkqegkslyvkgepiinfydplvfpsd efdasisqvnekinqslafirksdellhnvnagksttnimittiiiviviills liavglllyckarstpvtlskdqlsginniafsn
コドン最適化 (完全長)	NA	73	46	58	16	atggaacttcttattctcaaagccaatgcgattacaacaatccttactgctgta accttctgcttcgcatctggacagaatatcaccgaggaattctatcaatcccacc tgcagcgcggtgtcaaagggtatctttccgcattgagaacaggttggtataca tccgttattactattgagctgtctctaacatcaagaagaataaatgtaatggaact gacgcaaaagtgaagcttgatcaagcaggagcttgataagtacaaaaaacgctgtg acagaactccagctcctcatgcagagcaccccggcgacgaacaatagagcgcgg cgcgagctgcctaggtttatgaattatacccttaacaacgctaagaagacaaac gtgacgctctcaaagaagaggaaacgaaggtttcttggattcctgctcgggtg ggatccgctattgcaagcggcgtggcggttcaaaggtcctccacctggagggg gaagtgaacaagattaagtcagcactcctgagtacaaacaaagcagtggtttct

表7: 配列の例

名称	タイプ	wt*との%同一性	GC含量	GC3含量	配列番号	配列
						ctgagcaacggagtgtcagtattgacgagcaaggtgcttgacctcaagaactac attgacaaacagctgctgcccatagtgaacaaacagtcatgctcccatctccaat atcgagacagtcatcgaattccagcagaagaacaacagactcctggaaatcaca cgggagtttagcgtgaatgcgggcgtaacaactcccgtgtcccacctacatgctg acaaattctgagctgctgagtcttgataaatgatatgcctattacaaatgaccag aagaagttgatgtccaacaatgtgcaaatagtcagacagcagtcttatagtatt atgagcatcatcaaagaggaagttcttgcctatgttgtacaactgcccctctac ggggtcatcgacacacccctgttggaagctgcacacctcacctctgtgcaccacc aacacgaaagagggtagcaacatctgtctgactaggactgacagggttggtac tgcgataacgccggtagcgtgtcatttttcccacaagcagagacttgtaaagta cagtccaacagggtctttttgtgacacaatgaattcttcttaccctgcccagcgaa gttaatctgtgtaacgtcgatatctttaatccaaagtacgattgtaaaatcatg acatctaaaaccgatgtgagcagcagcgttattacaagtctttggcgctatcgtc agctgttacggaaaaaccaagtgcacggcatccaacaagaataggaggcattata aagaccttcagtaatgggtgtgactacgttagcaataaggcgtagacaccgtc tccgtaggaaacacactgtactatgtaaataaacaagaaggcaaatccctttat gtgaaggggagcctatcattaatttctacgaccctctggttttcccgagtgac gagttcgatgccagcatatcccaagtgaatgagaaaatcaaccagtccttggcc ttataaggaaaagcgatgagctctgcacaacgtgaatgccggtaaatccacc acaaacataatgatcaccactatcattatcgtcattatttgtgatcttgctgagc ctcatcgctgtgggctcctcttgtattgcaaagcccgctcaaccccagtcact ctctctaaagaccaactgtctgggatcaataacatagcctttttcaaattag
コドン最適化(完全長)	AA	100	--	--	2	上記参照
高GC(GCに富む完全長)	NA	76	58	100	17	atggagttgctcatcctcaaggccaacgccatcaccacgatcctcacggccgtc acgttctgcttcgcgtccggccagaacatcaccgaggagttctaccagtcgacg tgcagcgccgtgagcaaggctacctcagcgcgctgaggacgggctggtacacc agcgtcatcacgatcgagttgagcaacatcaagaagaacaagtgcaacggcacc gacgcgaaggtcaagttgatcaagcaggagttggacaagtacaagaacgccgtg

表7: 配列の例

名称	タイプ	wt*との%同一性	GC含量	GC3含量	配列番号	配列
						accgagttgcagttgctcatgcagagcacgccggcgacgaacaaccgcgcccagg agggagctcccgaggttcatgaactacacgctcaacaacgccaagaagaccaac gtgaccttgagcaagaagaggaagaggagttcctcggcttcttgttgggcgtc ggctcggccatcgccagcggcgtggccgtctcgaaggtcctgcacctggagggc gaggtgaacaagatcaagagcgcgctgctctccacgaacaaggccgtcgtcagc ttgtccaacggcgtcagcgtcttgaccagcaaggtgttggacctcaagaactac atcgacaagcagttgttgccgatcgtgaacaagcagagctgcagcatctcgaac atcgagaccgtgatcgagttccagcagaagaacaacaggctgctcgagatcacc agggagttcagcgtcaacgccggcgtcacgacgccggtcagcacctacatgttg accaacagcgagttgttgtcctttgatcaacgacatgccgatcaccaacgaccag aagaagttgatgtccaacaacgtgcagatcgtcaggcagcagagctactcgatc atgtccatcatcaaggaggaggaggtcttggcctacgtcgtgcagttgccgctgtac ggcgtcatcgacacgccctgctggaagctgcacacgtcccccgctgtgcacgacc aacacgaaggagggggtccaacatctgcttgaccaggacccgacagggggctggtac tgcgacaacgccggctccgtgtcgttcttcccgcagggccgagacctgcaaggtc cagtccaaccgcgtcttctgcgacacgatgaacagcttgacgttgccgagcgag gtcaacctctgcaacgtcgacatcttcaaccccaagtacgactgcaagatcatg acgtccaagaccgacgtcagcagctccgtgatcacgtcgctcggcgccatcgtg tcctgctacggcaagaccaagtgcaccgcgtccaacaagaaccgcggcatcatc aagacgttctcgaacgggtgcgactacgtctcgaacaaggggggtggacaccgtg tccgtcggcaacacgttgtactacgtcaacaagcaggagggcaagagcctctac gtcaagggcgagccgatcatcaacttctacgacccgttggtcttccccctcggac gagttcgacgcgtcgatctcgcaggtcaacgagaagatcaaccagagcctggcg ttcatccggaagtccgacgagttgttgcacaacgtgaacgccggcaagtccacc acgaacatcatgatcacgacgatcatcatcgtgatcatcgtgatcttgttgtcg ttgatcgccgtcggcctgctttgtactgcaaggccaggagcacgcccgtcacg ctgagcaaggaccagctgagcggcatcaacaacatcgcgttcagcaactaa				--	--	2	上記参照
高GC(GCに富む完全長)	AA	100	--	--	2	上記参照

表7: 配列の例

名称	タイプ	wt*との%同一性	GC含量	GC3含量	配列番号	配列
WT可溶性	NA	99	35	31	3	atggagttgctaatcctcaaagcaaatgcaattaccacaatcctcactgcagtc acattttgttttgcttctggtcaaaacatcactgaagaatttttatcaatcaaca tgcagtgcagttagcaaaggctatcttagtgctctgagaactggttggtataccc agtgttataactatagaattaagtaatatcaagaaaaataagtgtaatggaaca gatgctaaggtaaaattgataaaacaagaattagataaataaaaatgctgta acagaattgcagttgctcatgcaaagcaccaccagcaaacaaacaatcgagccaga agagaactaccaaggtttatgaattatacactcaacaatgccaaaaaaaaccaat gtaacattaagcaagaaaaggaaaagaagatttcttggtttttgttaggtgtt ggatctgcaatcgccagtggcgttgctgtatctaaggtcctgcacctagaaggg gaagtgaacaagatcaaaagtgctctactatcccacaaacaaggctgtagtcagc ttatcaaatggagtcagtgtcttaaccagcaaagtgttagacctcaaaaactat atagataaacaattgttacctattgtgaacaagcaaagctgcagcatatcaaat atagaaactgtgatagagttcccaacaaaagaacaacagactactagagattacc agggaatttagtgttaatgcaggtgtaactacacctgtaagcacttacatgtta actaatagtgaattattgtcattaatcaatgatatgcctataacaaatgatcag aaaaagttaatgtccaacaatgttcaaatagttagacagcaaagttactctatc atgtccataataaaagaggaagtcttagcatatgtagtacaattaccactatat ggtgttatagatacaccctgttggaaactacacacatcccctctatgtacaacc aacacaaaagaagggtccaacatctgtttaacaagaactgacagaggatggtac tgtgacaatgcaggatcagtatctttctttcccacaagctgaaacatgtaaagtt caatcaaatcgagtatttgtgacacaatgaacagtttaacattaccaagtgaa gtaaatctctgcaatgttgacatattcaaccccaaatatgattgtaaaattatg acttcaaaaacagatgtaagcagctccgttatcacatctctaggagccattgtg tcatgctatggcaaaactaaatgtacagcatccaataaaaatcgtggaatcata aagacatttctaacgggtgcgattatgtatcaaataaagggtgggacactgtg tctgtaggtaacacattatattatgtaaataagcaagaaggtaaaagtctctat gtaaaaggtgaaccaataataaatttctatgacccattagtattccctctgat gaatttgatgcatcaatatctcaagtcaacgagaagattaaccagagcctagca tttattcgtaaatccgatgaattattacataatgtaaatgccggtaaatccacc acaaattaa	
WT可溶性	AA	100	--	--	7	mellilkanaittiltavtfcfasgqniteefyqstcsavskgylsalrtgwyt

表7: 配列の例

名称	タイプ	wt*との%同一性	GC含量	GC3含量	配列番号	配列
						svitielsnikknkcngtdakvkklikqeldkyknavtelqllmqstpatnnrar relprfmnytlnnakktnvtlskkrkrrflgfllgvgsaiasgvavskvlhleg evnkiksallstnkavvslsngvsvltskvldlknyidkqllpivnkqscsisn ietviefqqknnrlleitrefsvnagvttpvstymltnsellslindmpitndq kklmsnnvqivrqqsysimsiikeevlayvvqlplygvidtpcwklhtsplctt ntkegsnicltrtdrgwyccdnagsvsffpqaetckvqsnrvfcdtmnsltlpse vnlcnvdifnpkydckimtsktdvsssvitslgaivscygktkctasnknrgii ktfsngcdyvsnkgvdtvsvgntlyyvnkqegkslyvkgepiinfydplvfpsd efdasisqvnekinqslafirksdellhnvnagksttn
コドン-最適化可溶性	NA	74	46	58	4	atggaacttcttattctcaaagccaatgcgattacaacaatccttactgctgta accttctgcttcgcatctggacagaatatcaccgaggaattctatcaatccacc tgcagcgcggtgtcaaagggtatctttccgcattgagaacaggttggtataca tccgttattactattgagctgtctaacatcaagaagaataaatgtaatggaact gacgcaaaagtgaagctgatcaagcaggagcttgataagtacacaaaaacgctgtg acagaactccagctcctcatgcagagcacccggcgacgaacaatagagcgcgg cgcgagctgcctaggtttatgaattatacccttaacaacgctaagaagacaaac gtgacgctctcaaagaagaggaaacgaaggtttcttggattcctgctcgggtg ggatccgctattgcaagcggcgtggcggttcaaaggtcctccacctggagggg gaagtgaacaagattaagtcagcactcctgagtacaaacaaagcagtggtttct ctgagcaacggagtgtcagtattgacgagcaaggtgcttgacctcaagaactac attgacaaacagctgctgcccatagtgaacaaacagtcatgctccatctccaat atcgagacagtcatcgaattccagcagaagaacaacagactcctggaaatcaca cgggagtttagcgtgaatgcgggcgtaacaactcccgtgtccacctacatgctg acaaattctgagctgctgagtctgataaatgatatgcctattacaaatgaccag aagaagttgatgtccaacaatgtgcaaatagtcagacagcagtcttatagtatt atgagcatcatcaaagaggaagttcttgcctatgttgtacaactgccccctctac gggtcatcgacacacccctgttggaagctgcacacctcacctctgtgcaccacc aacacgaaagagggtagcaacatctgtctgactaggactgacagggttggtac tgcgataacgccggtagcgtgtcatttttcccacaagcagagacttgtaaagta cagtccaacagggtctttttgtgacacaatgaattcttcttaccctgcccagcgaa gttaatctgtgtaacgtcgatatcttttaatccaaagtacgattgtaaaatcatg

10

20

30

40

表7: 配列の例

名称	タイプ	wt*との%同一性	GC含量	GC3含量	配列番号	配列
						acatctaaaaccgatgtgagcagcagcgttattacaagtcttggcgctatcgtc agctgttacggaaaaaccaagtgcacggcatccaacaagaatagaggcattata aagaccttcagtaatgggtgtgactacgttagcaataagggcgtagacaccgtc tccgtaggaaacacactgtactatgtaaataaacaagaaggcaaaatcccttat gtgaagggggagcctatcattaatttctacgaccctctggttttcccgagtgac gagttcgatgccagcatatcccaagtgaatgagaaaatcaaccagtccttggcc ttttataaggaaaagcgatgagcttctgcacaacgtgaatgccggtaaatccacc acaaactag
コドン最適化(完全長)	AA	100	--	--	7	上記参照
高GC(GCに富む可溶性)	NA	77	58	100	5	atggagttgctcatcctcaaggccaacgccatcaccacgatcctcacggccgtc acgttctgcttcgcgtccggccagaacatcaccgaggagttctaccagtcgacg tgcagcgccgtgagcaagggctacctcagcgcgctgaggacgggctggtacacc agcgtcatcacgatcgagttgagcaacatcaagaagaacaagtgcaacggcacc gacgcgaaggtcaagttgatcaagcaggagttggacaagtacaagaacgccgtg accgagttgcagttgctcatgcagagcacgccggcgacgaacaaccgcgccagg agggagctcccgaggttcatgaactacacgctcaacaacgccaagaagaccaac gtgaccttgagcaagaagaggaagaggagttcctcggcttcttgttgggcgtc ggctcggccatcgccagcggctggccgtctcgaaggtcctgcacctggagggc gaggtgaacaagatcaagagcgcgctgctctccacgaacaaggccgtcgtcagc ttgtccaacggcgtcagcgtcttgaccagcaaggtgttggacctcaagaactac atcgacaagcagttgttgccgatcgtgaacaagcagagctgcagcatctcgaac atcgagaccgtgatcgagttccagcagaagaacaacagggctgctcgagatcacc agggagttcagcgtcaacgccggcgtcacgacgccggtcagcacctacatgttg accaacagcgagttgttgtcctttgatcaacgacatgccgatcaccaacgaccag aagaagttgatgtccaacaacgtgcagatcgtcaggcagcagagctactcgatc atgtccatcatcaaggaggagaggtcttggcctacgtcgtgcagttgccgctgtac ggcgtcatcgacacgccctgctggaagctgcacacgtcccccgctgtgcacgacc aacacgaagggagggtcccaacatctgcttgaccaggaccgacagggggctggtac

表7: 配列の例

名称	タイプ	wt*との%同一性	GC含量	GC3含量	配列番号	配列
						tgcgacaacgccggctccgtgtcgttcttcccgcaggccgagacctgcaaggtc cagtccaaccgcgtcttctgcgcacacgatgaacagcttgacgttgccgagcgag gtcaacctctgcaacgtcgacatcttcaacccaagtacgactgcaagatcatg acgtccaagaccgacgtcagcagctccgtgatcacgtcgctcggcgccatcgtg tcctgctacggcaagaccaagtgcaccgcgtccaacaagaaccgcggcatcatc aagacgttctcgaacgggtgcgactacgtctcgaacaagggggtggacaccgtg tccgtcggcaacacgttgtactacgtcaacaagcaggagggcaagagcctctac gtcaagggcgagccgatcatcaacttctacgacccgttggtcttccctcggac gagttcgacgcgtcgatctcgcaggtcaacgagaagatcaaccagagccctggcg ttcatccggaagtccgacgagttgttgcacaacgtgaacgccggcaagtcccacc acgaactaa
高GC (GCに富む 可溶性)	AA	100	--	--	7	上記参照
中程度GC (HL2) 可溶性	NA	85	51	76	6	atggagttgctcatcctcaaggccaacgccatcaccacgatcctcacggcagtc acattctgtttcgcttctggtcagaacatcactgaggaattctaccaatcgacg tgcagtgcagttagcaagggctatctcagtgctctgagaacgggttggtatacc agtgtcatcactatcgagttgagtaacatcaagaagaacaagtgtaacggaacc gatgcgaaggtaaagttgatcaagcaggagttggacaagtacaagaacgctgta acagagttgcagttgctcatgcagagcacaccagcgacgaacaaccgagccagg agagagctaccaaggttcatgaactacacgctcaacaacgccaagaagaccaac gtgacattgagcaagaagaggaagaggagattcctcggtttcttgttgggtgtc ggatctgcaatcgccagtggcgttgctgtctcgaaggtcctgcacctagaaggg gaagtgaacaagatcaagagtgctctgctatccacgaacaagaggctgtcgtcagc ttgtcaaacggagtcagttgtcttgaccagcaagaggtgttggacctcaagaactac atcgacaagcagttgttacctatcgtgaacaagcaaagctgcagcatctcaaac atcgagactgtgatcgagttccagcagaagaacaacagactactagagatcacc agggagttcagtgtcaacgcaggtgtaacgacacctgtcagcacttacatgttg actaacagtgagttgttgtcattgatcaacgacatgcctatcaccaacgatcag aagaagttgatgtccaacaacgtgcagatcgtcagacagcagagctactcgatc

10

20

30

40

表7: 配列の例

名称	タイプ	wt*との%同一性	GC含量	GC3含量	配列番号	配列
						atgtccatcatcaaggaggaagtcttggcatacgtagtacagttgccactgtat ggtgtcatcgacacacccctgctggaagctgcacacgtcccctctatgtacgacc aacacgaaggaagggtccaacatctgcttgaccaggactgacagaggatggtac tgcgacaacgcaggatccgtgtcgttcttcccacaggctgagacctgcaaggtc cagtccaaccgagtcttctgcgacacgatgaacagcttgacgttgccgagtgag gtaaacctctgcaacgtcgacatcttcaacccccaagtacgactgcaagatcatg acgtccaagaccgatgtcagcagctccgtgatcacatcgctcggagccatcgtg tcatgctacggcaagaccaagtgcacagcgtccaacaagaaccgtggaatcatc aagacgttctcgaacgggtgcgactacgtctcaaacaagggggtggacactgtg tctgtaggcaacacattgtactacgtaaacaagcaggaaggtaagagcctctac gtcaagggtgaaccaatcatcaacttctacgacccgttggtcttccccctctgac gagttcgacgcatcgatctctcaggtcaacgagaagatcaaccagagcctagca ttcatccggaagtccgacgagttgttgcacaacgtgaatgccggtaaggtccacc acaaactaa
高GC(GCに富む可溶性)	AA	100	--	--	7	上記参照
hPIV3/Texas/12084/1983						
WT	NA	--	35	29	8	atgccaacttcaatactgctaattattacaaccatgatcatggcatctttctgc caaatagatatcacaaaactacagcatgtaggtgtattggtcaatagtcccaaa ggaatgaagatatcacacaaaacttgaaacaagatatctgattttgagcctcata ccaaaaatagaagactctaactcttgtggtgaccaacagatcaagcaatacaag aagctattggatagactgatcatcccttttatatgatggattaagattacagaaa gatgtgatagtaaccaatcaagaatccaatgaaaacactgatcccagaacaaaa cgattctttggaggggtaattggaactattgctctgggagtagcaacctcagca caaattacagcggcagttgctttggttgaagccaaggcaagatcagacatc gaaaaactcaaagaagcaattagggacacaaataaagcagtgcagtcagttcag agctccataggaaatctaatagtagcaattaaatcagtccaggattatgttaac aaagaaatcgtgccatcgattgcgaggctaggttgtgaagcagcaggacttcaa

表7: 配列の例

名称	タイプ	wt*との%同一性	GC含量	GC3含量	配列番号	配列
						ttaggaattgcattaacacagcattactcagaattaacaaacatatttggtgat aacataggatcgttacaagaaaaaggaataaaattacaaggtatagcatcatta taccgcacaaatatcacagaaatatttacaacatcaacagttgataaaatatgat atttatgatctgttatttacagaatcaataaaggtgagagttatagatgttgac ttgaatgattactcaatcaccctccaagtcagactcccttttattaactaggctg ctgaacactcagatctacaaagtagattccatatcatataacattcaaaacaga gaatggtatatcccctcttcccagccatatcatgacaaaaaggggcatttctaggt ggagcagatgtcaaagaatgtatagaagcattcagcagctatatatgcccttct gatccaggatttgtattaaaccatgaaatagagagctgcttatcaggaaacata tctcaatgtccaagaaccacagtcacatcagacattgttccaagatatgcattt gtcaatggaggagtggttgcaaactgtataacaaccacttgtacatgcaacgga atcggtaatagaatcaatcaaccacctgatcaaggaataaaaattatataacat aaagaatgtagtacaatagggtatcaacggaatgctgttcaatacaaataaagaa ggaactcttgcattctacacaccaaatgatataacactaaacaattctgttgca cttgatccaattgacatatcaatcgagctcaacaaggccaaatcagatctagaa gaatcaaaagaatggataagaaggtcaaatcaaaaactagattccattggaaat tggcatcaatcttagcactacagtcatataattatttgataatgatcattatattg tttataatta
WT	AA	--	--	--	9	mptsillittmimasfcqiditklqhvgvlvnspkgmkisqnfetrylilsli pkiedsnscgdqgikqykklldrliiplydglrlqkdvivtnqesnentdprtk rffggvigtialgvatsaqitaavalveakqarsdieklkeairdtnkavqsvq ssignlivaiksvqdyvnkeivpsiarlgceaaglqlgialtqhyseltnifgd nigslqekgiklqqgiaslyrtnitеiftstvdkydiydllftesikvrvidvd lndysitlqvrlplltrllntqiykvdsisyniqnrewyiplpshimtkgaflg gadvkecieafssyicpsdpgfvlnheiesclsgnisqcprttvtsdivpryaf vnggvvancitttctcngignringnppdqgikithkecstigingmlfntnke gtlafytpnditlnnsvaldpidisielnkaksdleeskewirrsnqkldsign whqsstviiillimiiilfiinvtiitiaikyyriqkrnrvdqndkpyvltnk
可溶性(hTexFsol)	NA	99	36	29	10	atgccaacttcaatactgctaattattacaaccatgatcatggcatctttctgc caaatagatatcacaaaactacagcatgtaggtgtattggtcaatagtcccaaa ggaatgaagatatcacaaaacttgaaacaagatatcctgatttgagcctcata

表7: 配列の例

名称	タイプ	wt*との%同一性	GC含量	GC3含量	配列番号	配列
						ccaaaaatagaagactctaactcttgtggtgaccaacagatcaagcaatacaag aagctattggatagactgatcatccctttatatgatggattaagattacagaaa gatgtgatagtaaccaatcaagaatccaatgaaaacactgatcccagaacaaaa cgattcttggagggtaattggaactattgctctgggagtagcaacctcagca caaattacagcggcagttgctttggttgaagccaagcaggcaagatcagacatc gaaaaactcaaagaagcaattagggacacaaataaagcagtgcagtcagttcag agctccatagggaaatctaatagtagcaattaaatcagtccaggattatgttaac aaagaaatcgtgccatcgattgcgaggctaggttgtgaagcagcaggacttcaa ttaggaattgcattaacacagcattactcagaaattaacaaacatatttggtgat aacataggatcgttacaagaaaaaggaataaaattacaaggtatagcatcatta taccgcacaaatatcacagaaatatttacaacatcaacagttgataaatatgat atttatgatctgttatttacagaatcaataaaggtgagagttatagatgttgac ttgaatgattactcaatcaccctccaagtcagactccctttattaactaggctg ctgaacactcagatctacaaagtagattccatatcatataacattcaaaacaga gaatggtatatccctcttcccagccatatcatgacaaaaagggcatttctaggt ggagcagatgtcaaagaatgtatagaagcattcagcagctatatatgcccttct gatccaggatttgtattaaaccatgaaatagagagctgcttatcaggaaacata tctcaatgtccaagaaccacagtcacatcagacattgttccaagatatgcattt gtcaatggaggagtggttgcaaactgtataacaaccacttgtacatgcaacgga atcggtaatagaatcaatcaaccacctgatcaaggaataaaaattataacacat aaagaatgtagtacaataggtatcaacggaatgctgttcaatacaaataaagaa ggaactcttgcattctacacaccaaatgatatataacactaaacaattctgttgca cttgatccaattgacatatcaatcgagctcaacaaggccaaatcagatctagaa gaatcaaaagaatggataagaaggtcaaatcaaaaactagattccattggaaat tggcattaa
可溶性(hTexFsol)	AA	100	--	--	12	mptsilliittmimasfcqiditklqhvgvlvnspkgmkisqnfetrylilsli pkiedsnscgdqqikqykklldrliiplydgirlqkdvivtnqesnentdprtk rffggvigtialgvatsaqitaavalveakqarsdieklkeairdtnkavqsvq ssignlivaiksvqdyvnkeivpsiarlgceaaglqlgialtqhyseltnifgd nigslqekgiklqqgiaslyrtniteiftstvdkydiydllftesikvrvividvd lndysitlqvrlpiltrllntqiykvdsisyniqnrewyiplpshimtkgaflg

表7: 配列の例

名称	タイプ	wt*との%同一性	GC含量	GC3含量	配列番号	配列
						gadvkecieafssyicpsdpgfvlnheiesclsgnisqcprttvtsdivpryaf vngvvancitttctcngigrinqppdqqgikiithkecstigingmlfntnke gtlafytpnditlnnsvaldpidisielnkaksdleeskewirrsnqkldsign wh
高GC (HL1sol)	NA	77	60	100	11	atgccgacgtccatcctgctgatcatcacgaccatgatcatggcgtcgttctgc cagatcgacatcacgaagctccagcacgtcggcgtcttggtcaacagccccaag ggcatgaagatctcgcagaacttcgagaccaggtacctgatcttgagcctcatc ccgaagatcgaggactcgaactcctgcggcgaccagcagatcaagcagtacaag aagtcttggacaggctgatcatcccgttgtacgacggcttgaggttgcagaag gacgtgatcgtcaccaaccaggagtccaacgagaacaccgaccccaggacgaag cgcttcttcggcgggggtcatcggcacgatcgcgctgggggtcgccacctcggcc cagatcaccgcggcggtcgcgttggtcgaggccaagcaggcgaggtccgacatc gagaagctcaaggaggccatcagggacacgaacaagccgtgcagtccgtccag agctccatcggcaacctgatcgtcgcgatcaagtccgtccaggactacgtgaac aaggagatcgtgccgtcgatcgcgaggctcggctgcgaggccgccggcctgcag ttgggcatcgcgcgttgacgcagcactactcggagttgaccaacatcttcggcgac aacatcggctcgttgcaggagaagggcatcaagttgcagggcatcgcgtcctttg taccgcacgaacatcacggagatcttcacgacctcgaccgtcgacaagtacgac atctacgacctgttgttcacggagtcgatcaaggtgagggtcatcgacgtggac ttgaacgactactcgatcacctccaggtcaggctcccctttgttgaccaggctg ctgaacacgcagatctacaaggtcgactccatcctcgtacaacatccagaacagg gagtggtacatcccgctgcccagccacatcatgaccaagggggccttcctcggc ggcgccgacgtcaaggagtgcatcgaggcgttcagcagctacatctgcccgtcg gacccggcttcgtgttgaaccacgagatcgagagctgcttgtcgggcaacatc tcgcagtgcccgaggaccacggtcacgtccgacatcgtgccgaggtacgccttc gtcaacgggcggcgtggtcgcgaactgcatcacgaccacgtgcacgtgcaacggc atcggcaacaggatcaaccagccgccggaccagggcatcaagatcatcacgcac aaggagtgcagcaccatcggcatcaacgggatgctgttcaacacgaacaaggag ggcacgctggcgttctacacgccgaacgacatcacgctgaacaactcggtcgcg ctcgacccgatcgacatctcgatcgagctcaacaaggccaagtcggacctcgag gagtccaaggagtggatcaggaggtcgaaccagaagctcgactccatcggcaac

10

20

30

40

表7: 配列の例

名称	タイプ	wt*との%同一性	GC含量	GC3含量	配列番号	配列
						tggcactaa
高GC (HL1sol)	AA	100	--	--	12	上記参照
6xhis タグのある可溶性 (hTexFsolhis)	NA	100	36	29	13	atgccaacttcaatactgctaattattacaaccatgatcatggcatctttctgc caaatagatatcacaaaactacagcatgtaggtgtattggtcaatagtcccaaa ggaatgaagatatcacaaaactttgaaacaagatatctgattttgagcctcata ccaaaaatagaagactctaactcttgtggtgaccaacagatcaagcaatacaag aagctattggatagactgatcatcccttttatatgatggattaagattacagaaa gatgtgatagtaaccaatcaagaatccaatgaaaacactgatcccagaacaaaa cgattctttggagggtaattggaactattgctctgggagtagcaacctcagca caaattacagcggcagttgcttggttgaagccaagcaggcaagatcagacatc gaaaaactcaaagaagcaattagggacacaaataaagcagtgcagtcagttcag agctccataggaaatctaatagtagcaattaaatcagtccaggattatgtttaac aaagaaatcgtgccatcgattgcgaggctagttgtgaagcagcaggacttcaa ttaggaattgcattaacacagcattactcagaattaacaaacatatttggtgat aacataggatcgttacaagaaaaaggaataaaattacaaggtatagcatcatta taccgcacaaatatcacagaaatatttacaacatcaacagttgataaaatatgat atttatgatctgttatttacagaatcaataaaggtgagagttatagatgttgac ttgaatgattactcaatcacccctccaagtcagactcccttattaactaggctg ctgaacactcagatctacaaaagtagattccatatcataaacattcaaaacaga gaatggtatatcccctcttcccagccatatcatgacaaaaggggcatttctaggt ggagcagatgtcaaagaatgtatagaagcattcagcagctatatatgcccttct gatccaggatttgtattaaaccatgaatagagagctgcttatcaggaaacata tctcaatgtccaagaaccacagtcacatcagacattgttccaagatatgcattt gtcaatggaggagtggttgcaaactgtataacaaccaccacttgtacatgcaacgga atcggtaatagaatcaatcaaccacctgatcaaggaataaaaattataacacat aaagaatgtagtacaataggtatcaacggaatgctgttcaatacaaataaagaa ggaactcttgcattctacacaccaaatgatataacactaaaacaattctgttgca cttgatccaattgacatatcaatcgagctcaacaaggccaaatcagatctagaa gaatcaaaagaatggataagaaggtcaaatcaaaaactagattccattggaaat

10

20

30

40

表7: 配列の例

名称	タイプ	wt*との%同一性	GC含量	GC3含量	配列番号	配列
						tggcatcaccaccatcaccatcactaa
6xhisタグのある可溶性(hTexFsolhis)	AA	100	--	--	15	mptsillittmimasfcqiditklqhvgvlvnspkgmkisqnfetrylilsli pkiedsnscgdqqikqykklldrliiplydglrlqkdvivtnqesnentdprtk rffggvigtialgvatsaqitaavalveakqarsdieklkeairdtnkavqsvq ssignlivaiksvqdyvnkeivpsiarlgceaaglqlgialtqhyseltnifgd nigslqekgiklqgiaslyrtnlteifttstvdkydiydllftesikvrvidvd lndysitlqvrlpllirllntqiykvdsisyniqnrewyiplpshimtkgaflg gadvkecieafssyicpsdpgfvlnheiesclsgnisqcprttvtsdivpryaf vnggvvancitttctcngignringppdqggikiithkecstigingmlfntnke gtlafytpnditlnnsvaldpidisielnkaksdleeskewirrsnqkldsign whhhhhh
6xhisタグのある高(hi)GC(HL1solhis)	NA	77	60	100	14	atgccgacgtccatcctgctgatcatcacgaccatgatcatggcgtcgttcttgc cagatcgacatcacgaagctccagcacgtcggcgtcttggtcaacagccccaag ggcatgaagatctcgcagaacttcgagaccaggtacctgatcttgagcctcatc ccgaagatcgaggactcgaactcctgcggcgaccagcagatcaagcagtacaag aagctcttggacaggctgatcatcccgttgtacgacggcttgaggttgcagaag gacgtgatcgtcaccaaccaggagtccaacgagaacaccgacccagggacgaag cgcttcttcggcgcgggtcatcggcacgatcgcgctgtgggctcgccacctcggcc cagatcaccgcggcggtcgcgttggtcgaggccaagcaggcgaggtccgacatc gagaagctcaaggaggccatcagggacacgaacaaggccgtgcagtccgtccag agctccatcggcaacctgatcgtcgcgatcaagtccgtccaggactacgtgaac aaggagatcgtgccgtcgatcgcgaggctcggctgcgaggccgcccggcctgcag ttgggcatcgcgttgacgcagcactactcggagttgaccaacatcttcggcgac aacatcggctcgttgcaggagaaggcatcaagttgcagggcatcgcgtcttg taccgcacgaacatcacggagatcttcacgacctcgaccgtcgacaagtacgac atctacgacctgttgttcacggagtcgatcaaggtgagggtcatcgacgtggac ttgaacgactactcgatcacccttccaggtcagggctcccttgttgaccaggctg ctgaacacgcagatctacaaggtcgactccatctcgtacaacatccagaacagg gagtggtacatcccgctgcccagccacatcatgaccaaggggccttcctcggc ggcgccgacgtcaaggagtgcatcgaggcgttcagcagctacatctgcccgtcg gacccgggcttcgtgttgaaccacgagatcgagagctgcttgtcgggcaacatc

表7: 配列の例

名称	タイプ	wt*との%同一性	GC含量	GC3含量	配列番号	配列
						tcgcagtgcccgaggaccacggtcacgtccgacatcgtgccgaggtacgccttc gtcaacggcggcgtggtcgcgaactgcatcacgaccaccacgtgcacgtgcaacggc atcggcaacaggatcaaccagccgccggaccagggcatcaagatcatcacgcac aaggagtgcagcaccatcggcatcaacgggatgctgttcaacacgaacaaggag ggcacgctggcgttctacacgccgaacgacatcacgctgaacaactcggtcgcg ctcgacccgatcgacatctcgatcgagctcaacaaggccaagtcggacctcgag gagtccaaggagtggatcaggaggtcgaaccagaagctcgactccatcggcaac tggcaccaccaccatcaccatcactaa
6xhisタグのある高GC (HL1solhis)	AA	100	--	--	15	上記参照

【０２１０】

実施例７：実施形態の例

技術の特定の実施形態の非限定的例を以下に提供する。

【０２１１】

Ａ１．配列番号７と９０％以上同一であるアミノ酸配列を含んでなる、可溶性ウイルス融合タンパク質をコードする、約５１％以上のＧＣ含量を有するヌクレオチド配列を含ん

でなる、単離核酸。
【０２１２】
Ａ２．ヌクレオチド配列が、配列番号７と９５％以上同一であるアミノ酸配列を含んでなるタンパク質をコードする、実施形態Ａ１の単離核酸。
【０２１３】
Ａ３．ヌクレオチド配列が、配列番号７のアミノ酸配列を含んでなるタンパク質をコードする、実施形態Ａ１の単離核酸。
【０２１４】
Ａ４．可溶性ウイルス融合タンパク質が機能性膜結合領域を欠く、実施形態Ａ１～Ａ３のいずれか１つの単離核酸。
【０２１５】
Ａ５．可溶性ウイルス融合タンパク質が、配列番号２のアミノ酸５２５～５７４に相当するＣ末端膜貫通領域アミノ酸を欠く、実施形態Ａ４の単離核酸。
【０２１６】
Ａ６．タンパク質がタグを含んでなる、実施形態Ａ１～Ａ５のいずれか１つの単離核酸。
【０２１７】
Ａ６．１タンパク質がタグを含まない、実施形態Ａ１～Ａ５のいずれか１つの単離核酸。
【０２１８】
Ａ７．ヌクレオチド配列のＧＣ３含量が７６％以上である、実施形態Ａ１～Ａ６．１のいずれか１つの単離核酸。
【０２１９】
Ａ８．配列番号６のヌクレオチド配列を含んでなる、実施形態Ａ７の単離核酸。
【０２２０】
Ａ９．ヌクレオチド配列のＧＣ含量が約５８％以上である、実施形態Ａ１～Ａ８のいずれか１つの単離核酸。
【０２２１】
Ａ１０．ヌクレオチド配列のＧＣ３含量が約１００％である、実施形態Ａ９の単離核酸。
【０２２２】
Ａ１１．配列番号５のヌクレオチド配列を含んでなる、実施形態Ａ９またはＡ１０の単離核酸。
【０２２３】
Ａ１２．ヌクレオチド配列が配列番号３と６５％以上同一である、実施形態Ａ１～Ａ１１のいずれか１つの単離核酸。
【０２２４】
Ａ１３．ヌクレオチド配列が配列番号３と７３％以上同一である、実施形態Ａ１２の単離核酸。
【０２２５】
Ａ１４．ヌクレオチド配列が配列番号３と７７％以上同一である、実施形態Ａ１３の単離核酸。
【０２２６】
Ａ１５．ヌクレオチド配列と機能的に結合するシス調節因子をさらに含んでなる、実施形態Ａ１～Ａ１４のいずれか１つの単離核酸。
【０２２７】
Ａ１６．シス調節因子が転写後プロセッシング因子を含んでなる、実施形態Ａ１５の単離核酸。
【０２２８】
Ａ１７．転写後調節因子がウッドチャック肝炎ウイルスに由来する、実施形態Ａ１６の

単離核酸。
【０２２９】
Ａ１８．発現ベクターである、実施形態Ａ１～Ａ１７のいずれか１つの単離核酸。
【０２３０】
Ｂ１．実施形態Ａ１８の単離核酸を含んでなる細胞。
【０２３１】
Ｂ２．細胞ＤＮＡに組み込まれた、実施形態Ａ１～Ａ１４のいずれか１つのヌクレオチド配列を含んでなる細胞。
【０２３２】
Ｂ３．１ミリリットルの細胞あたり少なくとも２マイクログラムのタンパク質を発現する、実施形態Ｂ１またはＢ２の細胞。
【０２３３】
Ｂ４．１ミリリットルの細胞あたり少なくとも６マイクログラムのタンパク質を発現する、実施形態Ｂ３の細胞。
【０２３４】
Ｂ５．１ミリリットルの細胞あたり少なくとも２００マイクログラムのタンパク質を発現する、実施形態Ｂ４の細胞。
【０２３５】
Ｂ６．１ミリリットルの細胞あたり少なくとも５００マイクログラムのタンパク質を発現する、実施形態Ｂ５の細胞。
【０２３６】
Ｂ７．１ミリリットルの細胞あたり少なくとも１ミリグラムのタンパク質を発現する、実施形態Ｂ６の細胞。
【０２３７】
Ｂ８．１ミリリットルの細胞あたり少なくとも１．３ミリグラムのタンパク質を発現する、実施形態Ｂ７の細胞。
【０２３８】
Ｂ９．１ミリリットルの細胞あたり少なくとも１．６ミリグラムのタンパク質を発現する、実施形態Ｂ８の細胞。
【０２３９】
Ｂ１０．可溶性ウイルス融合タンパク質を分泌する、実施形態Ｂ１～Ｂ９のいずれか１つの細胞。
【０２４０】
Ｂ１１．哺乳類細胞である、実施形態Ｂ１～Ｂ１０のいずれか１つの細胞。
【０２４１】
Ｂ１２．細胞が非接着細胞である、実施形態Ｂ１１の細胞。
【０２４２】
Ｂ１３．細胞がＣＨＯ細胞またはＣＨＯ由来細胞である、実施形態Ｂ１１またはＢ１２の細胞。
【０２４３】
Ｂ１４．細胞がＣＡＴ－Ｓ細胞である、実施形態Ｂ１３の細胞。
【０２４４】
Ｂ１５．細胞がＣＨＯ－Ｓ細胞である、実施形態Ｂ１３の細胞。
【０２４５】
Ｂ１６．細胞がＶｅｒｏ細胞である、実施形態Ｂ１１の細胞。
【０２４６】
Ｂ１７．細胞がＭＲＣ－５細胞である、実施形態Ｂ１１の細胞。
【０２４７】
Ｂ１８．細胞がＢＳＲ－Ｔ７細胞である、実施形態Ｂ１１の細胞。
【０２４８】

Ｂ１９．細胞が、核内のウイルス融合タンパク質をコードする核酸を合成する、実施形態Ｂ１～Ｂ１８のいずれか１つの細胞。

【０２４９】

Ｂ２０．ヌクレオチド配列と機能的に結合する、実施形態Ａ１５～Ａ１７のいずれか１つのシス調節因子をさらに含んでなる、実施形態Ｂ１～Ｂ１９のいずれか１つの細胞。

【０２５０】

Ｃ１．その下でタンパク質が生成される条件に、実施形態Ａ１～Ａ１４のいずれか１つのヌクレオチド配列を含んでなる複数の細胞を接触させるステップを含んでなる、可溶性ウイルス融合タンパク質を発現させる方法。

【０２５１】

Ｃ２．ヌクレオチド配列が細胞の発現ベクター中にある、実施形態Ｃ１の方法。

【０２５２】

Ｃ３．ヌクレオチド配列が細胞の細胞ＤＮＡ中にある、実施形態Ｃ１の方法。

【０２５３】

Ｃ４．細胞が哺乳類細胞である、実施形態Ｃ１～Ｃ３のいずれか１つの方法。

【０２５４】

Ｃ５．細胞が非接着細胞である、実施形態Ｃ４の方法。

【０２５５】

Ｃ６．細胞がＣＨＯ細胞またはＣＨＯ由来細胞である、実施形態Ｃ５の方法。

【０２５６】

Ｃ７．細胞がＣＡＴ－Ｓ細胞である、実施形態Ｃ６の方法。

【０２５７】

Ｃ８．細胞がＣＨＯ－Ｓ細胞である、実施形態Ｃ６の方法。

【０２５８】

Ｃ９．細胞がＶｅｒｏ細胞である、実施形態Ｃ４の方法。

【０２５９】

Ｃ１０．細胞がＭＲＣ－５細胞である、実施形態Ｃ４の方法。

【０２６０】

Ｃ１１．細胞がＢＳＲ－Ｔ７細胞である、実施形態Ｃ４の方法。

【０２６１】

Ｃ１２．１ミリリットルの細胞あたり少なくとも２マイクログラムのタンパク質が生成される、実施形態Ｃ１～Ｃ１１のいずれか１つの方法。

【０２６２】

Ｃ１３．１ミリリットルの細胞あたり少なくとも６マイクログラムのタンパク質が生成される、実施形態Ｃ１２の方法。

【０２６３】

Ｃ１４．１ミリリットルの細胞あたり少なくとも２００マイクログラムのタンパク質が生成される、実施形態Ｃ１３の方法。

【０２６４】

Ｃ１５．１ミリリットルの細胞あたり少なくとも５００マイクログラムのタンパク質が生成される、実施形態Ｃ１４の方法。

【０２６５】

Ｃ１６．１ミリリットルの細胞あたり少なくとも１ミリグラムのタンパク質が生成される、実施形態Ｃ１５の方法。

【０２６６】

Ｃ１７．１ミリリットルの細胞あたり少なくとも１．３ミリグラムのタンパク質が生成される、実施形態Ｃ１６の方法。

【０２６７】

Ｃ１８．１ミリリットルの細胞あたり少なくとも１．６ミリグラムのタンパク質が生成される、実施形態Ｃ１７の方法。

【０２６８】
Ｃ１９．細胞がタンパク質を分泌する、実施形態Ｃ１～Ｃ１８のいずれか１つの方法。
【０２６９】
Ｃ２０．タンパク質が７日間以上にわたり生成される、実施形態Ｃ１～Ｃ１９のいずれか１つの方法。
【０２７０】
Ｃ２１．細胞が畜産物を含まない培養条件下で培養される、実施形態Ｃ１～Ｃ２０のいずれか１つの方法。
【０２７１】
Ｃ２２．細胞によって生成されるタンパク質量を測定するステップをさらに含んでなる、実施形態Ｃ１～Ｃ２１のいずれか１つの方法。
【０２７２】
Ｃ２３．タンパク質を単離するステップをさらに含んでなる、実施形態Ｃ１～Ｃ２２のいずれか１つの方法。
【０２７３】
Ｃ２４．細胞が、核内のウイルス融合タンパク質をコードする核酸を合成する、実施形態Ｃ１～Ｃ２３のいずれか１つの方法。
【０２７４】
Ｃ２５．細胞が、実施形態Ａ１～Ａ１４のいずれか１つのヌクレオチド配列と機能的に結合する、実施形態Ａ１５～Ａ１７のいずれか１つのシス調節因子をさらに含んでなる、実施形態Ｃ１～Ｃ２４のいずれか１つの方法。
【０２７５】
Ｃ２６．実施形態Ａ１～Ａ１４のいずれか１つのヌクレオチド配列を細胞核内に導入するステップを含んでなる、実施形態Ｃ１～Ｃ２５のいずれか１つの方法。
【０２７６】
Ｃ２７．実施形態Ａ１～Ａ１４のいずれか１つのヌクレオチド配列と機能的に結合する、実施形態Ａ１５～Ａ１７のいずれか１つのシス調節因子を細胞核内に導入するステップを含んでなる、実施形態Ｃ２６の方法。
【０２７７】
Ｃ２８．細胞核への導入が核形質移入による、実施形態Ｃ２６またはＣ２７の方法。
【０２７８】
Ｄ１．（ｉ）約５１％以上のＧＣ含量を有して、（ｉｉ）配列番号１と７３％以上同一であり、（ｉｉｉ）配列番号２と９０％以上同一であるアミノ酸配列を含んでなるウイルス融合タンパク質をコードする、ヌクレオチド配列を含んでなる単離核酸。
【０２７９】
Ｄ２．ヌクレオチド配列が、配列番号２と９５％以上同一であるアミノ酸配列を含んでなるタンパク質をコードする、実施形態Ｄ１の単離核酸。
【０２８０】
Ｄ３．ヌクレオチド配列が、配列番号２のアミノ酸配列を含んでなるタンパク質をコードする、実施形態Ｄ１の単離核酸。
【０２８１】
Ｄ４．タンパク質がタグを含んでなる、実施形態Ｄ１～Ｄ３のいずれか１つの単離核酸。
【０２８２】
Ｄ４．１タンパク質がタグを含まない、実施形態Ｄ１～Ｄ３のいずれか１つの単離核酸。
【０２８３】
Ｄ５．ヌクレオチド配列のＧＣ３含量が７６％以上である、実施形態Ｄ１～Ｄ４．１のいずれか１つの単離核酸。
【０２８４】

Ｄ６．ヌクレオチド配列のＧＣ含量が約５８％以上である、実施形態Ｄ１～Ｄ５のいずれか１つの単離核酸。

【０２８５】

Ｄ７．ヌクレオチド配列のＧＣ３含量が約１００％である、実施形態Ｄ６の単離核酸。

【０２８６】

Ｄ８．配列番号１７のヌクレオチド配列を含んでなる、実施形態Ｄ６またはＤ７の単離核酸。

【０２８７】

Ｄ９．ヌクレオチド配列が配列番号１と７７％以上同一である、実施形態Ｄ８の単離核酸。

【０２８８】

Ｄ１０．ヌクレオチド配列と機能的に結合するシス調節因子をさらに含んでなる、実施形態Ｄ１～Ｄ９のいずれか１つの単離核酸。

【０２８９】

Ｄ１１．シス調節因子が転写後プロセッシング因子を含んでなる、実施形態Ｄ１０の単離核酸。

【０２９０】

Ｄ１２．転写後調節因子がウッドチャック肝炎ウイルスに由来する、実施形態Ｄ１１の単離核酸。

【０２９１】

Ｄ１３．発現ベクターである、実施形態Ｄ１～Ｄ１２のいずれか１つの単離核酸。

【０２９２】

Ｅ１．実施形態Ｄ１３の単離核酸を含んでなる細胞。

【０２９３】

Ｅ２．細胞ＤＮＡに組み込まれた、実施形態Ｄ１～Ｄ９のいずれか１つのヌクレオチド配列を含んでなる細胞。

【０２９４】

Ｅ３．タンパク質が細胞膜内に保持される、実施形態Ｅ１～Ｅ２のいずれか１つの細胞。

【０２９５】

Ｅ４．ウイルス融合タンパク質を分泌する、実施形態Ｅ１～Ｅ２のいずれか１つの細胞。

【０２９６】

Ｅ５．哺乳類細胞である、実施形態Ｅ１～Ｅ４のいずれか１つの細胞。

【０２９７】

Ｅ６．細胞が非接着細胞である、実施形態Ｅ５の細胞。

【０２９８】

Ｅ７．細胞がＣＨＯ細胞またはＣＨＯ細由来胞である、実施形態Ｅ５またはＥ６の細胞。

【０２９９】

Ｅ８．細胞がＣＡＴ－Ｓ細胞である、実施形態Ｅ７の細胞。

【０３００】

Ｅ９．細胞がＣＨＯ－Ｓ細胞である、実施形態Ｅ７の細胞。

【０３０１】

Ｅ１０．細胞がＶｅｒｏ細胞である、実施形態Ｅ５の細胞。

【０３０２】

Ｅ１１．細胞がＭＲＣ－５細胞である、実施形態Ｅ５の細胞。

【０３０３】

Ｅ１２．細胞がＢＳＲ－Ｔ７細胞である、実施形態Ｅ５の細胞。

【０３０４】

Ｅ１３．細胞が、核内のウイルス融合タンパク質をコードする核酸を合成する、実施形態Ｅ１～Ｅ１２のいずれか１つの細胞。

【０３０５】

Ｅ１４．ヌクレオチド配列と機能的に結合する、実施形態Ｄ１０～Ｄ１２のいずれか１つのシス調節因子をさらに含んでなる、実施形態Ｅ１～Ｅ１３のいずれか１つの細胞。

【０３０６】

Ｆ１．その下でタンパク質が生成される条件に、実施形態Ｄ１～Ｄ９のいずれか１つのヌクレオチド配列を含んでなる複数の細胞を接触させるステップを含んでなる、ウイルス融合タンパク質を発現させる方法。

【０３０７】

Ｆ２．ヌクレオチド配列が細胞の発現ベクター中にある、実施形態Ｆ１の方法。

【０３０８】

Ｆ３．ヌクレオチド配列が細胞の細胞ＤＮＡ中にある、実施形態Ｆ１の方法。

【０３０９】

Ｆ４．細胞が哺乳類細胞である、実施形態Ｆ１～Ｆ３のいずれか１つの方法。

【０３１０】

Ｆ５．細胞が非接着細胞である、実施形態Ｆ４の方法。

【０３１１】

Ｆ６．細胞がＣＨＯ細胞またはＣＨＯ由来細胞である、実施形態Ｆ５の方法。

【０３１２】

Ｆ７．細胞がＣＡＴ－Ｓ細胞である、実施形態Ｆ６の方法。

【０３１３】

Ｆ８．細胞がＣＨＯ－Ｓ細胞である、実施形態Ｆ６の方法。

【０３１４】

Ｆ９．細胞がＶｅｒｏ細胞である、実施形態Ｆ４の方法。

【０３１５】

Ｆ１０．細胞がＭＲＣ－５細胞である、実施形態Ｆ４の方法。

【０３１６】

Ｆ１１．細胞がＢＳＲ－Ｔ７細胞である、実施形態Ｆ４の方法。

【０３１７】

Ｆ１２．タンパク質が細胞膜内に保持される、実施形態Ｆ１～Ｆ１１のいずれか１つの方法。

【０３１８】

Ｆ１３．細胞がタンパク質を分泌する、実施形態Ｆ１～Ｆ１１のいずれか１つの方法。

【０３１９】

Ｆ１４．タンパク質が７日間以上にわたり生成される、実施形態Ｆ１～Ｆ１３のいずれか１つの方法。

【０３２０】

Ｆ１５．細胞が畜産物を含まない培養条件下で培養される、実施形態Ｆ１～Ｆ１４のいずれか１つの方法。

【０３２１】

Ｆ１６．細胞によって生成されるタンパク質量を測定するステップをさらに含んでなる、実施形態Ｆ１～Ｆ１５のいずれか１つの方法。

【０３２２】

Ｆ１７．タンパク質を単離するステップをさらに含んでなる、実施形態Ｆ１～Ｆ１６のいずれか１つの方法。

【０３２３】

Ｆ１８．細胞が、核内のウイルス融合タンパク質をコードする核酸を合成する、実施形態Ｆ１～Ｆ１７のいずれか１つの方法。

【０３２４】

Ｆ１９．細胞が、実施形態Ｄ１～Ｄ９のいずれか１つのヌクレオチド配列と機能的に結合する、実施形態Ｄ１０～Ｄ１２のいずれか１つのシス調節因子をさらに含んでなる、実施形態Ｆ１～Ｆ１８のいずれか１つの方法。

【０３２５】

Ｆ２０．実施形態Ｄ１～Ｄ９のいずれか１つのヌクレオチド配列を細胞核内に導入するステップを含んでなる、実施形態Ｆ１～Ｆ１９のいずれか１つの方法。

【０３２６】

Ｆ２１．実施形態Ｄ１～Ｄ９のいずれか１つのヌクレオチド配列と機能的に結合する、実施形態Ｄ１０～Ｄ１２のいずれか１つのシス調節因子を細胞核内に導入するステップを含んでなる、実施形態Ｆ２０の方法。

【０３２７】

Ｆ２２．細胞核への導入が核形質移入による、実施形態Ｆ２０またはＦ２１の方法。

【０３２８】

Ｇ１．配列番号１２と９０％以上同一であるアミノ酸配列を含んでなる、ウイルス融合タンパク質をコードする、約５１％以上のＧＣ含量を有するヌクレオチド配列を含んでなる、単離核酸。

【０３２９】

Ｇ２．ヌクレオチド配列が、配列番号１２と９５％以上同一であるアミノ酸配列を含んでなるタンパク質をコードする、実施形態Ｇ１の単離核酸。

【０３３０】

Ｇ３．ヌクレオチド配列が、配列番号１２のアミノ酸配列を含んでなるタンパク質をコードする、実施形態Ｇ１の単離核酸。

【０３３１】

Ｇ４．タンパク質がタグを含んでなる、実施形態Ｇ１～Ｇ３のいずれか１つの単離核酸。

【０３３２】

Ｇ４．１タンパク質がタグを含まない、実施形態Ｇ１～Ｇ３のいずれか１つの単離核酸。

【０３３３】

Ｇ５．ヌクレオチド配列のＧＣ含量が約６０％以上である、実施形態Ｇ１～Ｇ４．１のいずれか１つの単離核酸。

【０３３４】

Ｇ６．ヌクレオチド配列のＧＣ３含量が約１００％である、実施形態Ｇ５の単離核酸。

【０３３５】

Ｇ７．配列番号１１のヌクレオチド配列を含んでなる、実施形態Ｇ５またはＧ６の単離核酸。

【０３３６】

Ｇ８．ヌクレオチド配列が配列番号１０と６５％以上同一である、実施形態Ｇ７の単離核酸。

【０３３７】

Ｇ９．ヌクレオチド配列が配列番号１０と７５％以上同一である、実施形態Ｇ７の単離核酸。

【０３３８】

Ｇ１０．ウイルス融合タンパク質が機能性膜結合領域を欠く、実施形態Ｇ１～Ｇ９のいずれか１つの単離核酸。

【０３３９】

Ｇ１１．ウイルス融合タンパク質が、配列番号９のアミノ酸４８９～５３９に相当するＣ末端膜貫通領域アミノ酸を欠く、実施形態Ｇ１０の単離核酸。

【０３４０】

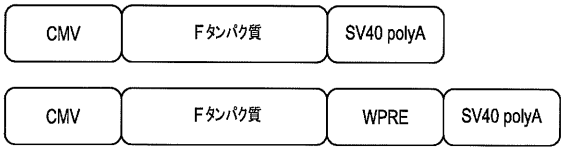
Ｇ１２．ヌクレオチド配列と機能的に結合するシス調節因子をさらに含んでなる、実施

形態Ｇ１～Ｇ１１のいずれか１つの単離核酸。
【０３４１】
Ｇ１３．シス調節因子が転写後プロセッシング因子を含んでなる、実施形態Ｇ１２の単離核酸。
【０３４２】
Ｇ１４．転写後調節因子がウッドチャック肝炎ウイルスに由来する、実施形態Ｇ１３の単離核酸。
【０３４３】
Ｇ１５．発現ベクターである、実施形態Ｇ１～Ｇ１４のいずれか１つの単離核酸。
【０３４４】
Ｈ１．実施形態Ｇ１５の単離核酸を含んでなる細胞。
【０３４５】
Ｈ２．細胞ＤＮＡに組み込まれた、実施形態Ｇ１～Ｇ１１のいずれか１つのヌクレオチド配列を含んでなる細胞。
【０３４６】
Ｈ３．ウイルス融合タンパク質が細胞中に保持される、実施形態Ｈ１～Ｈ２のいずれか１つの細胞。
【０３４７】
Ｈ４．ウイルス融合タンパク質を分泌する、実施形態Ｈ１～Ｈ２のいずれか１つの細胞。
【０３４８】
Ｈ５．哺乳類細胞である、実施形態Ｈ１～Ｈ４のいずれか１つの細胞。
【０３４９】
Ｈ６．細胞が非接着細胞である、実施形態Ｈ５の細胞。
【０３５０】
Ｈ７．細胞がＣＨＯ細胞またはＣＨＯ由来細胞である、実施形態Ｈ５またはＨ６の細胞。
【０３５１】
Ｈ８．細胞がＣＡＴ－Ｓ細胞である、実施形態Ｈ７の細胞。
【０３５２】
Ｈ９．細胞がＣＨＯ－Ｓ細胞である、実施形態Ｈ７の細胞。
【０３５３】
Ｈ１０．細胞がＶｅｒｏ細胞である、実施形態Ｈ５の細胞。
【０３５４】
Ｈ１１．細胞がＭＲＣ－５細胞である、実施形態Ｈ５の細胞。
【０３５５】
Ｈ１２．細胞がＢＳＲ－Ｔ７細胞である、実施形態Ｈ５の細胞。
【０３５６】
Ｈ１３．細胞が、核内のウイルス融合タンパク質をコードする核酸を合成する、実施形態Ｈ１～Ｈ１２のいずれか１つの細胞。
【０３５７】
Ｈ１４．ヌクレオチド配列と機能的に結合する、実施形態Ｇ１２～Ｇ１４のいずれか１つのシス調節因子をさらに含んでなる、実施形態Ｈ１～Ｈ１３のいずれか１つの細胞。
【０３５８】
Ｉ１．その下でタンパク質が生成される条件に、実施形態Ｇ１～Ｇ１１のいずれか１つのヌクレオチド配列を含んでなる複数の細胞を接触させるステップを含んでなる、ウイルス融合タンパク質を発現させる方法。
【０３５９】
Ｉ２．ヌクレオチド配列が細胞の発現ベクター中にある、実施形態Ｉ１の方法。
【０３６０】

Ｉ３．ヌクレオチド配列が細胞の細胞ＤＮＡ中にある、実施形態Ｉ１の方法。
【０３６１】
Ｉ４．細胞が哺乳類細胞である、実施形態Ｉ１～Ｉ３のいずれか１つの方法。
【０３６２】
Ｉ５．細胞が非接着細胞である、実施形態Ｉ４の方法。
【０３６３】
Ｉ６．細胞がＣＨＯ細胞またはＣＨＯ由来細胞である、実施形態Ｉ５の方法。
【０３６４】
Ｉ７．細胞がＣＡＴ－Ｓ細胞である、実施形態Ｉ６の方法。
【０３６５】
Ｉ８．細胞がＣＨＯ－Ｓ細胞である、実施形態Ｉ６の方法。
【０３６６】
Ｉ９．細胞がＶｅｒｏ細胞である、実施形態Ｉ４の方法。
【０３６７】
Ｉ１０．細胞がＭＲＣ－５細胞である、実施形態Ｉ４の方法。
【０３６８】
Ｉ１１．細胞がＢＳＲ－Ｔ７細胞である、実施形態Ｉ４の方法。
【０３６９】
Ｉ１２．タンパク質が細胞中に保持される、実施形態Ｉ１～Ｉ１１のいずれか１つの方法。
【０３７０】
Ｉ１３．細胞がタンパク質を分泌する、実施形態Ｉ１～Ｉ１１のいずれか１つの方法。
【０３７１】
１１４．タンパク質が７日間以上にわたり生成される、実施形態Ｉ１～Ｉ１３のいずれか１つの方法。
【０３７２】
Ｉ１５．細胞が畜産物を含まない培養条件下で培養される、実施形態Ｉ１～Ｉ１４のいずれか１つの方法。
【０３７３】
Ｉ１６．細胞によって生成されるタンパク質量を測定するステップをさらに含んでなる、実施形態Ｉ１～Ｉ１５のいずれか１つの方法。
【０３７４】
Ｉ１７．タンパク質を単離するステップをさらに含んでなる、実施形態Ｉ１～Ｉ１６のいずれか１つの方法。
【０３７５】
Ｉ１８．細胞が、核内のウイルス融合タンパク質をコードする核酸を合成する、実施形態Ｉ１～Ｉ１７のいずれか１つの方法。
【０３７６】
Ｉ１９．細胞が、実施形態Ｇ１～Ｇ１１のいずれか１つのヌクレオチド配列と機能的に結合する、実施形態Ｇ１２～Ｇ１４のいずれか１つのシス調節因子をさらに含んでなる、実施形態Ｉ１～Ｉ１８のいずれか１つの方法。
【０３７７】
Ｉ２０．実施形態Ｇ１～Ｇ１１のいずれか１つのヌクレオチド配列を細胞核内に導入するステップを含んでなる、実施形態Ｉ１～Ｉ１９のいずれか１つの方法。
【０３７８】
Ｉ２１．実施形態Ｇ１～Ｇ１１のいずれか１つのヌクレオチド配列と機能的に結合する、実施形態Ｇ１２～Ｇ１４のいずれか１つのシス調節因子を細胞核内に導入するステップを含んでなる、実施形態Ｉ２０の方法。
【０３７９】
Ｉ２２．細胞核への導入が核形質移入による、実施形態Ｉ２０またはＩ２１の方法。

【０３８０】
本明細書で言及される各特許、特許出願、刊行物、および文献は、その全体を参照によって本明細書に援用する。上の特許、特許出願、刊行物、および文献の引用は、前述のいずれかが、関連性がある先行技術であることの承認ではなく、またはそれは、これらの刊行物または文献の内容または日付のいかなる承認も構成しない。
【０３８１】
技術の基本的側面を逸脱することなく、前述したことに修正を加えてもよい。１つまたは複数の特定の実施形態を参照して技術をかなり詳細に記載したが、当業者は、本出願で具体的に開示される実施形態に変更を加えてもよいことを認識し、これらの修正および改善は、なおも技術の範囲と精神内にある。
【０３８２】
本明細書に例証として記載される技術は、本明細書で具体的に開示される、あらゆる要素の不在下で適切に実施されてもよい。したがって例えば各場合の「を含んでなる」という用語は、「から本質的になる」または「からなる」という用語を包含する。用いられる用語および表現は、説明的の用語として使用されて限定的でなく、このような用語および表現の使用は、示され記載される特性のいかなる均等物またはその部分も除外せず、様々な修正は特許請求される技術の範囲内で可能である。「ａ」または「ａｎ」という用語は、要素のいずれか１つ、または要素の２つ以上が記載されることが文脈上明らかな場合を除いて、それが修飾する要素の１つまたは複数を指し得る（例えば「試薬（ａ　ｒｅａｇｅｎｔ）」は、１つまたは複数の試薬を意味し得る）。一連の値の最初の「約」という用語の使用は、各値を修飾する（すなわち「約１、２、および３」は、約１、約２、および約３を指す）。場合によっては、単位および書式はＨｙｐｅｒＴｅｘｔ　Ｍａｒｋｕｐ　Ｌａｎｇｕａｇｅ（ＨＴＭＬ）形式で表され、それは当業者によって別の従来の形式に翻訳され得る（例えば「．ｓｕｐ．」は上付き書式を指す）。したがって本技術は、代表的実施形態によって具体的に開示されているが、当業者は、本明細書で開示される概念の任意の特性、修飾、および変法に頼ってもよく、このような修正および変更は、本技術の範囲内と見なされるものと理解すべきである。
【０３８３】
本技術の特定の実施形態を続く請求項に記載する。

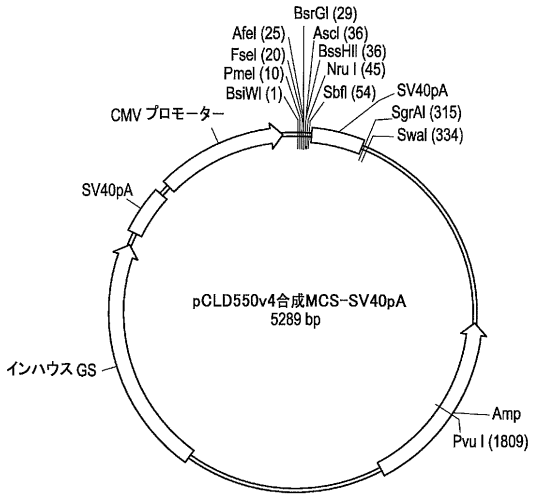
【図１Ａ】



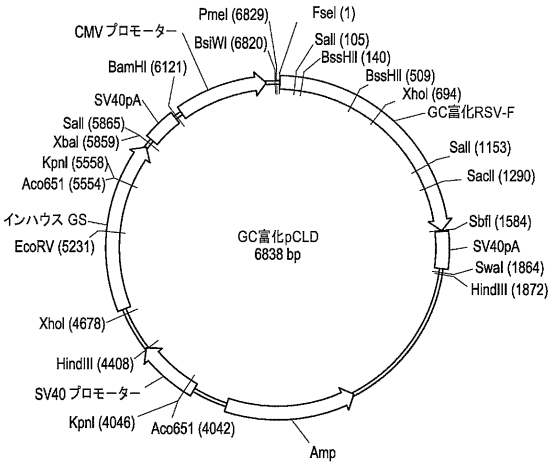
【図１Ｂ】

	% GC
F_{A2}	35
F_{opt}	46
F_{GC}	58

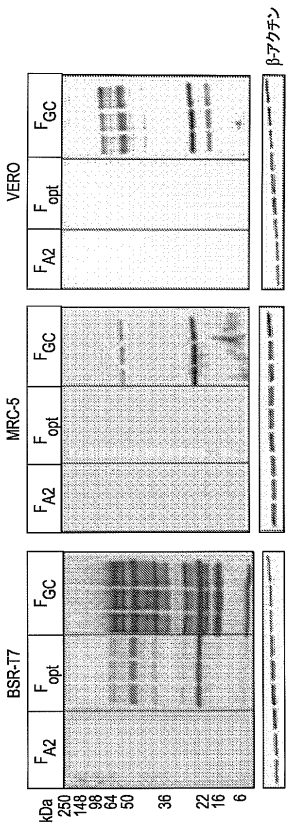
【図２】



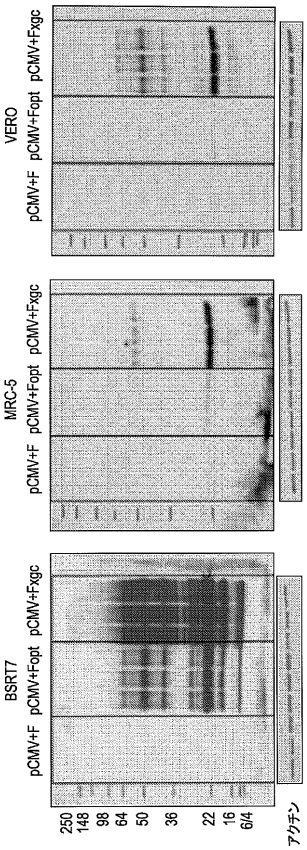
【図３】



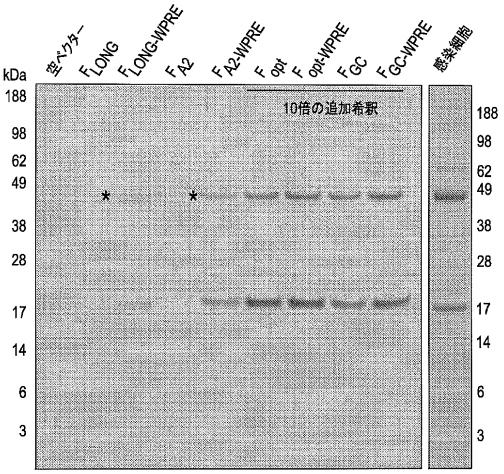
【図４】



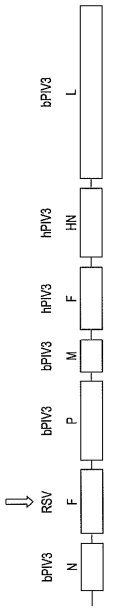
【図５】



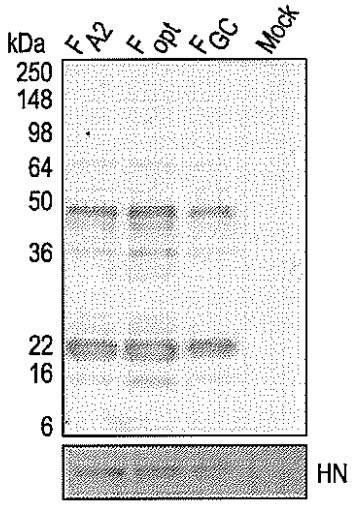
【図６】



【図７Ａ】



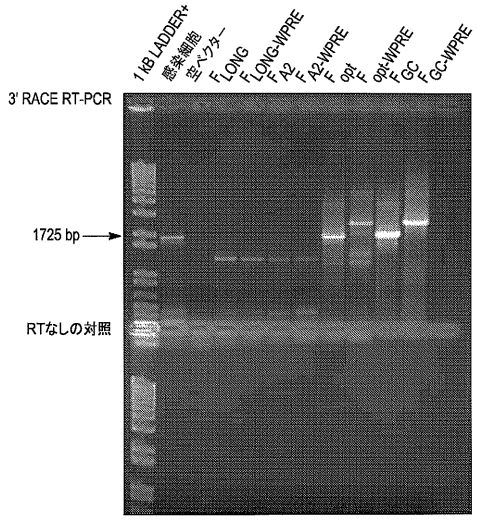
【図７Ｂ】



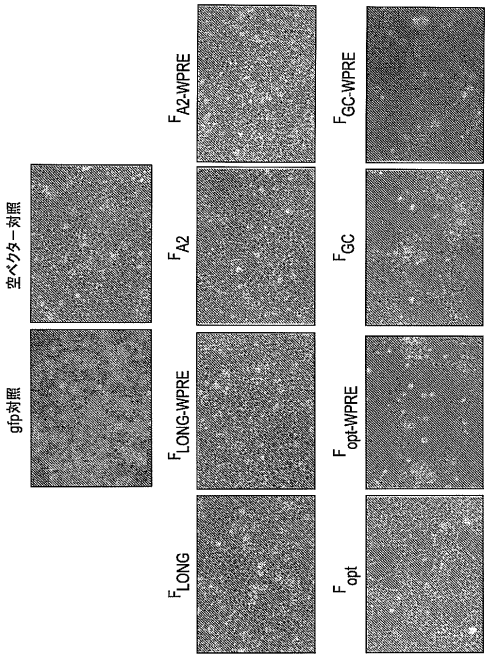
【図８Ａ】

	AATAAAのNT.位置
F_{LONG}	877, 1282, 1336, 1428
F_{A2}	877, 1282, 1336, 1428
F_{opt}	203, 1382
F_{GC}	なし

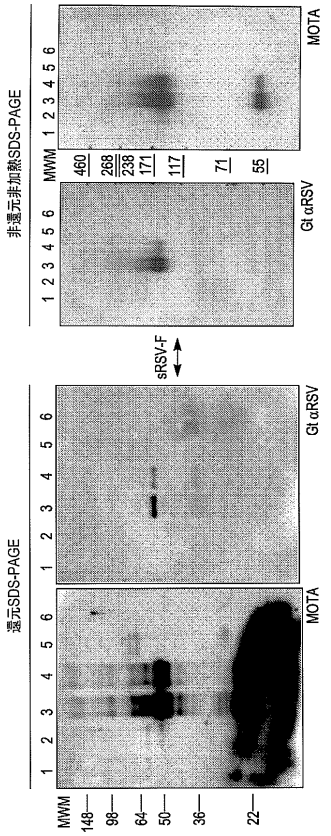
【図８Ｂ】



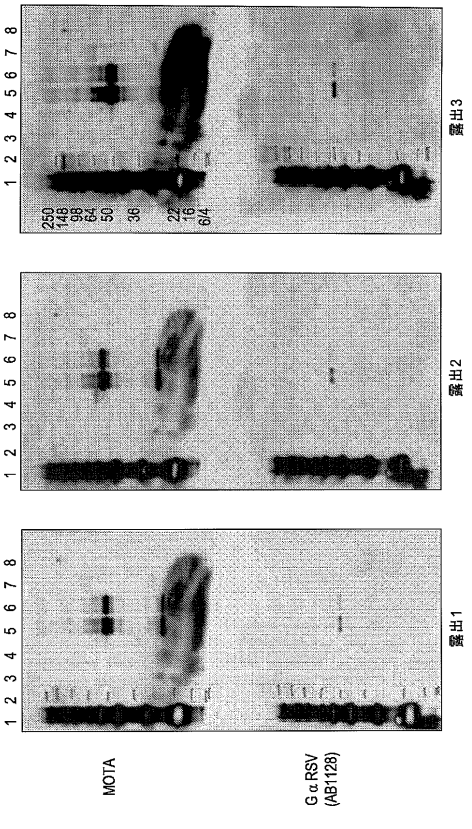
【図９】



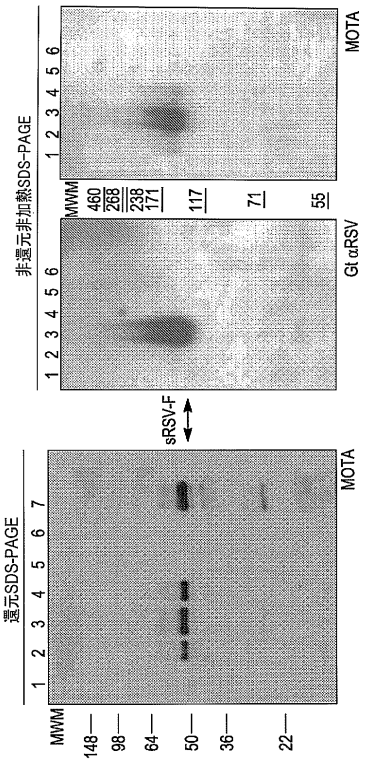
【図１０】



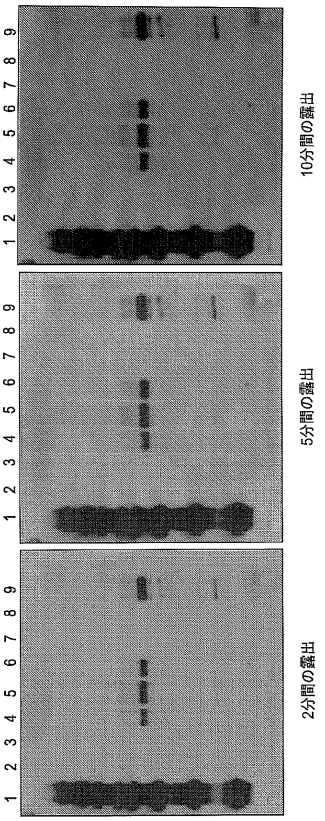
【図１１】



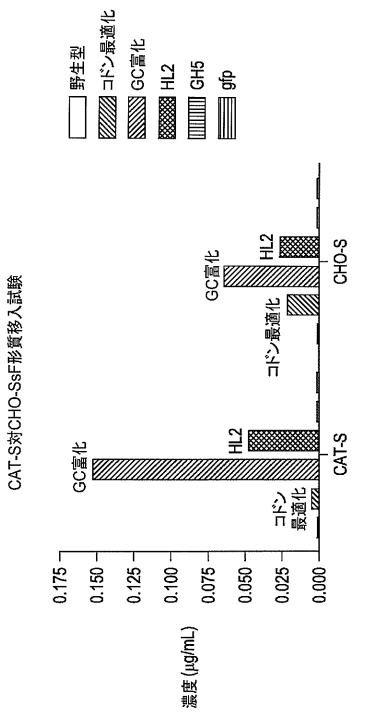
【図１２】



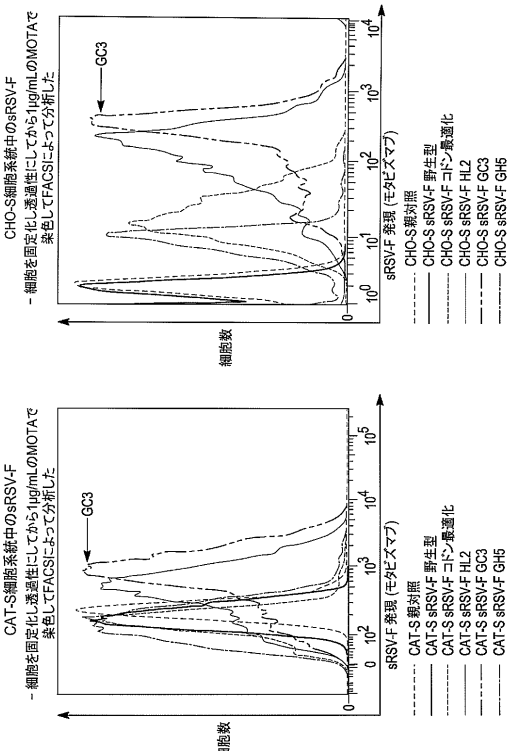
【図１３】



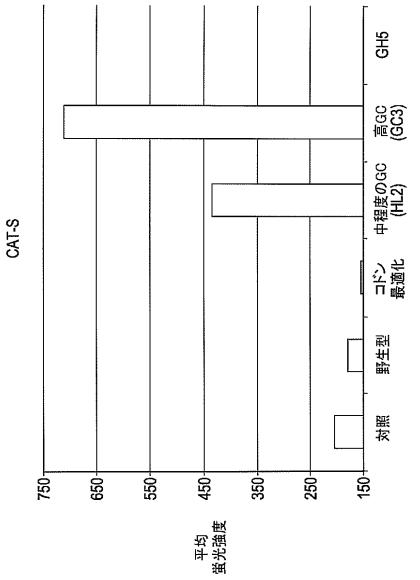
【図１４】



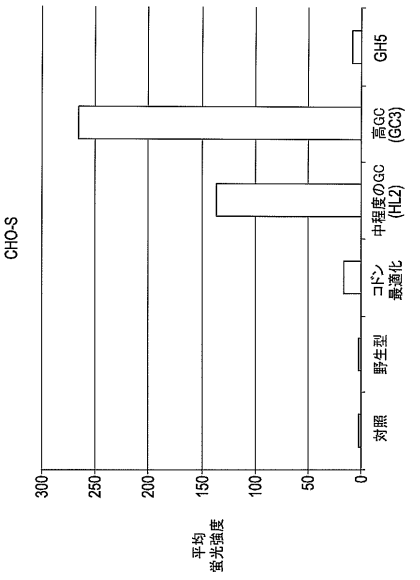
【図１５】



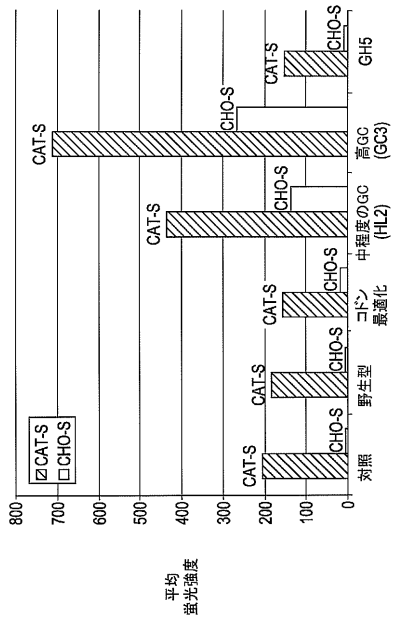
【図１６Ａ】



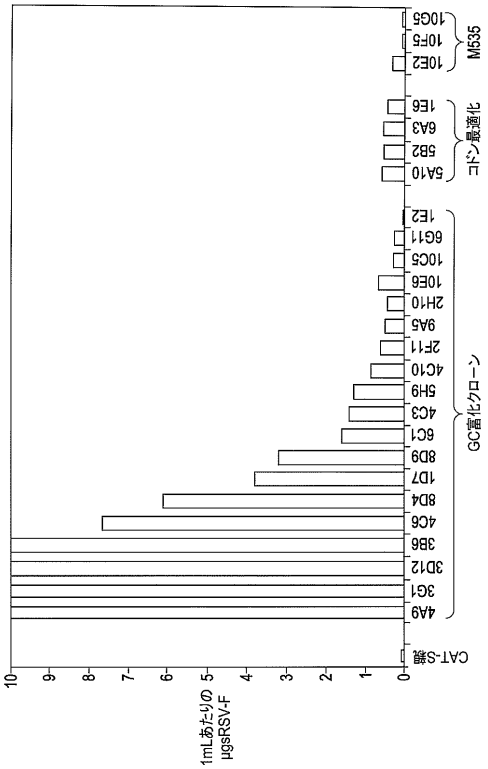
【図１６Ｂ】



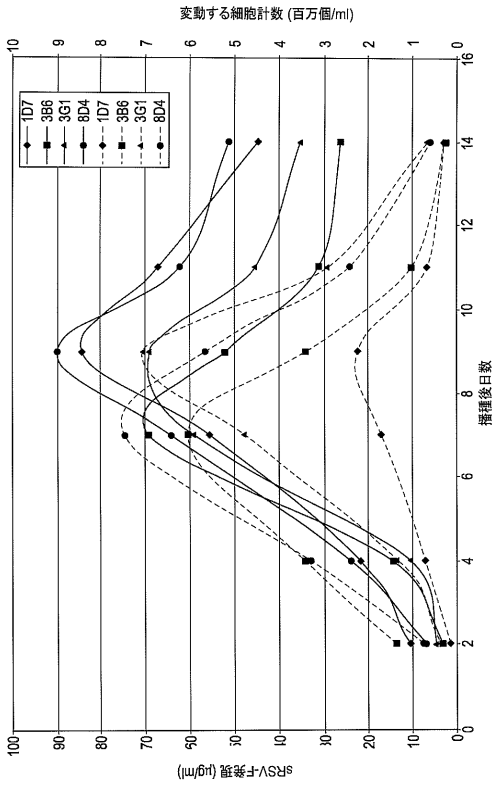
【図１７】



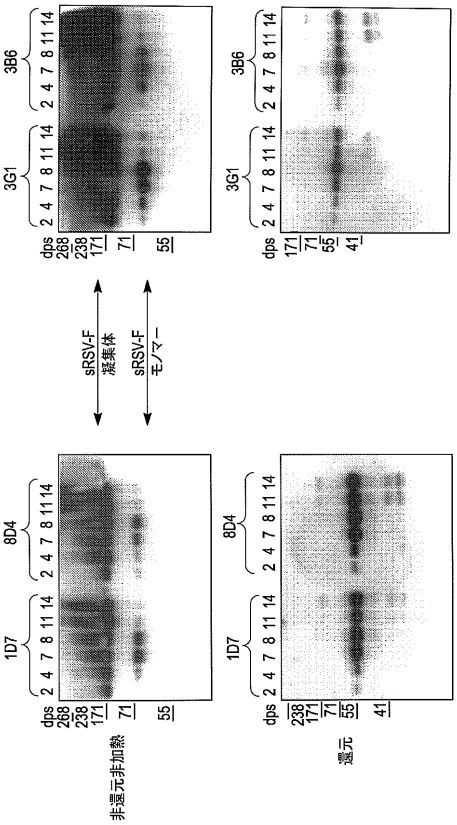
【図１８】



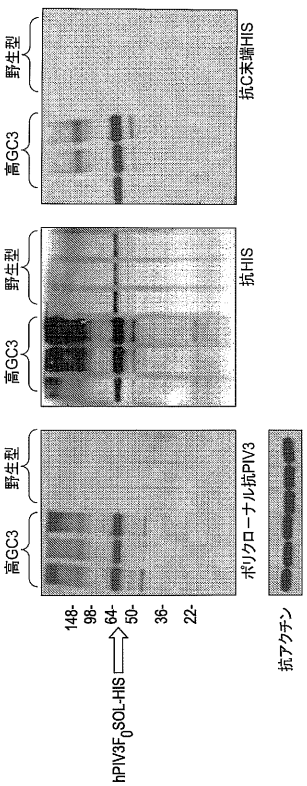
【図１９】



【図２０】



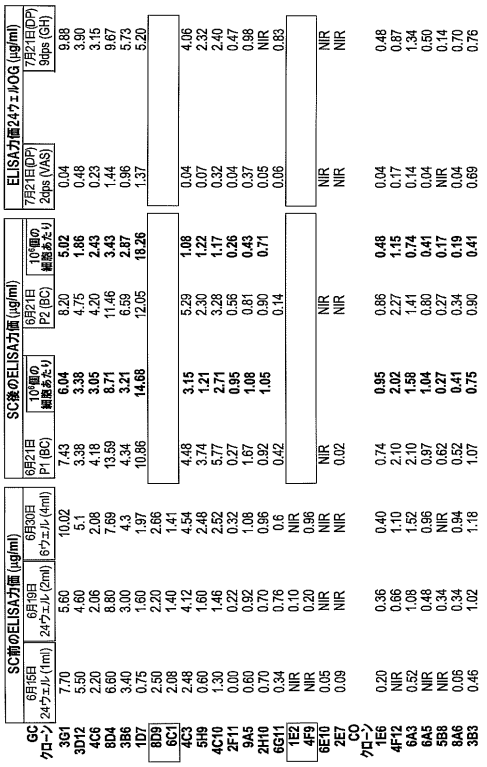
【図２１】



【図２２】

1番目の文字	2番目の文字 U		C		A		G		
U	UUU	Phe	UCU	Ser	UAU	Tyr	UGU	Cys	U
	UUC		UCC		UAC		UGC		C
	UUA	Leu	UCA		UAA	停止	UGA	Trp	A
	UUG		UCG		UAG	停止	UGG	Trp	G
C	CUU	Leu	CCU	Pro	CAU	His	CGU	Arg	U
	CUC		CCC		CAC		CGC		C
	CUA		CCA		CAA	Gln	CGA		A
	CUG		CCG		CAG		CGG		G
A	AUU	Ile	ACU	Thr	AAU	Asn	AGU	Ser	U
	AUC		ACC		AAC		AGC		C
	AUA		ACA		AAA	Lys	AGA	停止	A
	AUG	Met	ACG		AAG		AGG	停止	G
G	GUU	Val	GCU	Ala	GAU	Asp	GGU	Gly	U
	GUC		GCC		GAC		GGC		C
	GUA		GCA		GAA	Glu	GGA		A
	GUG		GCG		GAG		GGG		G

【図２３】



GC クローン	SC前のELISA力価 (μg/ml)				SC後のELISA力価 (μg/ml)				ELISA力価247±μOG (μg/ml)	
	6月15日 24ウェル (1ml)	6月19日 24ウェル (2ml)	6月30日 6ウェル (4ml)		6月21日 P1 (BC)	10^6個の細胞あたり	6月21日 P2 (BC)	10^6個の細胞あたり	7月21日(DP) 2dps (VAS)	7月21日(DP) 9dps (GH)
3G1	7.70	5.60	10.02		7.43	**6.04**	8.20	**5.02**	0.04	9.88
3D12	5.50	4.60	5.1		3.38	**3.38**	4.75	**1.86**	0.48	3.90
4C6	2.20	2.06	2.08		4.18	**3.05**	4.20	**2.43**	0.23	3.15
8D4	6.60	8.80	7.69		13.59	**8.71**	11.46	**3.43**	1.44	9.67
3B6	3.40	3.00	4.3		4.34	**3.21**	6.59	**2.87**	0.96	5.73
1D7	0.75	1.60	1.97		10.86	**14.68**	12.05	**18.26**	1.37	5.20
8D9	2.50	2.20	2.66							
6C1	2.08	1.40	1.41							
4C3	2.48	4.12	4.54		4.48	**3.15**	5.29	**1.08**	0.04	4.06
5H9	0.60	1.60	2.48		3.74	**1.21**	2.30	**1.22**	0.07	2.32
4C10	1.30	1.46	2.52		5.77	**2.71**	3.28	**1.17**	0.32	2.40
2F11	0.00	0.22	0.32		0.27	**0.95**	0.56	**0.26**	0.04	0.47
9A5	0.60	0.92	1.08		1.67	**1.08**	0.81	**0.43**	0.37	0.98
2H10	0.70	0.70	0.86		0.92	**1.05**	0.90	**0.71**	0.05	NIR
6G11	0.34	0.76	0.6		0.42		0.14		0.06	0.83
1E2	NIR	0.10	NIR							
4F9	NIR	0.20	0.96							
6E10	0.05	NIR	NIR		NIR		NIR		NIR	NIR
2E7	0.09	NIR	NIR		0.02		NIR		NIR	NIR
CO クローン										
1E6	0.20	0.36	0.40		0.74	**0.95**	0.86	**0.48**	0.04	0.48
4F12	NIR	0.66	1.10		2.10	**2.02**	2.27	**1.15**	0.17	0.87
6A3	0.52	1.08	1.52		2.10	**1.58**	1.41	**0.74**	0.14	1.34
6A5	NIR	0.48	0.96		0.97	**1.04**	0.80	**0.41**	0.04	0.50
5B8	NIR	0.34	NIR		0.62	**0.27**	0.27	**0.17**	NIR	0.14
8A6	0.06	0.34	0.94		0.52	**0.41**	0.34	**0.19**	0.04	0.70
3B3	0.46	1.02	1.16		1.07	**0.75**	0.90	**0.41**	0.69	0.76

【配列表】

2014505477000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 12/22997

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing filed or furnished:

   a. (means)

   ☐ on paper

   ☒ in electronic form

   b. (time)

   ☐ in the international application as filed

   ☒ together with the international application in electronic form

   ☐ subsequently to this Authority for the purposes of search

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

GenCore 6.3; SEQ ID NOS: 1, 2, 6, 7, 11, 12 and 17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 12/22997

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☒ Claims Nos.: 6-67, 73-117, 123-169
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 12/22997

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC(8) - C07H 21/04; C12P 21/02 (2012.01)
USPC - 536/23.4, 435/69.7
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC(8): C07H 21/04; C12P 21/02 (2012.01)
USPC: 536/23.4, 435/69.7

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
USPC: 536/23.1; 435/6.1; 435/69.1; 435/41
Virus Genes, 2010, Vol 40

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
WEST (PGPB,USPT,EPAB,JPAB); Google Web; Google Scholar; esp@cenet; GenCore 6.3: RSV-F, RSV, GC, GC content, high, greater, fusion, viral fusion, tag, transmembrane, Respiratory Syncytial Virus, terminal, deletion, C-terminal, domain amino acids 525-574, Medimmune, Roderick Tang, fusion, glycoprotein, SEQ ID NOS: 1, 2, 6, 7, 11, 12, 17

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2008/114149 A2 (BLAIS et al.) 25 September 2008 (25.09.2008), abstract; para [006], [0072], SEQ ID NO: 17; Fig 4	1-5, 68-72
Y	HUANG et al. Recombinant respiratory syncytial virus F protein expression is hindered by inefficient nuclear export and mRNA processing. Virus Genes, 2010, Vol 40, Pages 212-221, especially page 212, abstract; page 213, col 1, para 1; page 214, Fig 1b.	1-5, 68-72, 118, 119, 121/(118, 119), 122/(118, 119)
Y	WO 2009/128951 A2 (PRICE et al.) 22 October 2009 (22.10.2009), abstract; pg 16, ln 20-25; pg 30, ln 27-pg 31, ln 2. This document can be viewed by entering the doc number at the following url: http://worldwide.espacenet.com/numberSearch?locale=en_EP	4, 5
Y	US 2004/0161846 A1 (MASON et al.) 19 August 2004 (19.08.2004), abstract; para [0123], SEQ ID NO: 1	68-72
Y — A	WO 2010/0149743 A2 (BLAIS et al.) 29 December 2010 (29.12.2010), abstract; [009], [024], [033]; SEQ ID NO: 8.	118, 119, 121/(118,119), 122/(118,119) --- 120, 121/(120), 122/(120)

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
3 May 2012 (03.05.2012)	28 JAN 2013
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201	Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2009)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｐ 21/02	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	5/00	１０２	
Ｃ０７Ｋ 14/005	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｐ	21/02	Ｃ	
		Ｃ０７Ｋ	14/005		

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

(72)発明者 タング，ロデリック
アメリカ合衆国 ９４０４３ カリフォルニア州，マウンテン ビュー，ノース バーナード アベニュー ２９７
(72)発明者 ヘイズ，グレゴリー，エム.
アメリカ合衆国 ９４０４３ カリフォルニア州，マウンテン ビュー，ノース バーナード アベニュー ３１９
(72)発明者 ロウラー，ヘザー
アメリカ合衆国 ９４０４３ カリフォルニア州，マウンテン ビュー，ノース バーナード アベニュー ２９７
(72)発明者 チェン，ペイフェン
アメリカ合衆国 ９５０５４ カリフォルニア州，サンタ クララ，パトリック ヘンリー ドライブ ３０５５
(72)発明者 リュウ，イ
アメリカ合衆国 ９５０５４ カリフォルニア州，サンタ クララ，パトリック ヘンリー ドライブ ３０５５

Ｆターム(参考) 4B024 AA01 AA14 BA80 CA06 DA02 EA04 FA17 GA11 HA06
4B064 AG01 CA19 CC24 DA01 DA13
4B065 AA90X AA95Y AB01 AC14 BA01 BB40 CA26 CA44 CA46
4H045 AA10 AA20 AA30 BA10 BA53 CA01 DA50 EA20 EA53 FA74