

(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2010-511408

(P2010-511408A)

(43) 公表日 平成22年4月15日(2010.4.15)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 15/09 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
<b>A 6 1 K 48/00 (2006.01)</b>	A 6 1 K 48/00	4 B O 6 5
<b>A 6 1 K 38/00 (2006.01)</b>	A 6 1 K 37/02	4 C O 8 4
<b>A 6 1 P 35/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 35/00	4 C O 8 7
<b>A 6 1 K 35/74 (2006.01)</b>	A 6 1 K 35/74 Z	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 69 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2009-540425 (P2009-540425)	(71) 出願人	500106802 ザ・ボード・オブ・トラスティーズ・オブ ・ザ・ユニバーシティ・オブ・イリノイ アメリカ合衆国、イリノイ州 61801 、アーバナ、ライト・ストリート 506 、ヘンリー・アドミニストレーション・ビルディング 352
(86) (22) 出願日	平成19年12月4日 (2007.12.4)	(74) 代理人	100058479 弁理士 鈴江 武彦
(85) 翻訳文提出日	平成21年8月4日 (2009.8.4)	(74) 代理人	100108855 弁理士 蔵田 昌俊
(86) 国際出願番号	PCT/US2007/086393	(74) 代理人	100091351 弁理士 河野 哲
(87) 国際公開番号	W02008/070672	(74) 代理人	100088683 弁理士 中村 誠
(87) 国際公開日	平成20年6月12日 (2008.6.12)		
(31) 優先権主張番号	60/872, 471		
(32) 優先日	平成18年12月4日 (2006.12.4)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 癌をCpGリッチDNAおよびキュプレドキシソで治療するための組成物および方法

(57) 【要約】

本発明は、緑膿菌からのCpGリッチ DNAを含んでいる組成物に関する。前記組成物は、任意でキュプレドキシソを含む。本発明は、患者の癌および他のコンディションを治療するために有用である緑膿菌からの特定のCpG DNAsを含む。これらの組成物は、任意で薬学的に許容される担体中にある、また任意でキュプレドキシソも含む。本発明は、さらに癌細胞の近くでタンパク質を発現する方法に関する。これらの方法を、癌または他のコンディションに罹患している患者における癌細胞の近くに治療上または診断上のタンパク質を発現するために使用しえる、および患者における癌を診断するために使用しえる。この方法は、緑膿菌 (P. aeruginosa) からのアズリンに関する遺伝子を緑膿菌または異種の細胞におけるアズリンまたは異種性のタンパク質のための発現系に使用する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

(a) 配列番号26-62からなる群から選択される配列および(b) 配列番号26-62からなる群から選択される配列と少なくとも 90% 同一である配列からなる群から選択されるポリヌクレオチド配列を含んでいる単離された核酸分子。

## 【請求項 2】

前記ヌクレオチド配列が配列番号 26である、請求項1に記載の単離された核酸。

## 【請求項 3】

請求項1に記載の単離された核酸の配列を薬学的に許容される担体に含んでいる薬学的組成物。

10

## 【請求項 4】

追加的に少なくとも一つのキュブレドキシソペプチドを含む、請求項3に記載の薬学的組成物。

## 【請求項 5】

前記薬学的組成物が静脈内投与のために製剤化される、請求項3に記載の薬学的組成物。

## 【請求項 6】

前記薬学的組成物が皮下投与のために製剤化される、請求項3に記載の薬学的組成物。

## 【請求項 7】

前記薬学的組成物が局所投与のために製剤化される、請求項3に記載の薬学的組成物。

20

## 【請求項 8】

前記キュブレドキシソペプチドは緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*), *Alcaligenes faecalis*, *Achromobacter xylosoxidans*, *Bordetella bronchiseptica*, *Methylobacterium* sp., *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoea*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas chlororaphis*, *Xylella fastidiosa*および*Vibrio parahaemolyticus*からなる群から選択される生物体由来する、請求項4に記載の薬学的組成物。

## 【請求項 9】

請求項4に記載の薬学的組成物であって、前記キュブレドキシソペプチドは、アズリン、シュードアズリン (*pseudoazurin*), プラストシアニン, ラスティシアニン, Laz, アウラシアニン, ステラシアニンおよびキュウリ塩基性タンパク質 (*cucumber basic protein*) からなる群から選択されるタンパク質の一部または全てである薬学的組成物。

30

## 【請求項 10】

請求項4に記載の薬学的組成物であって、前記キュブレドキシソペプチドは、配列番号1-25からなる群から選択されるペプチドの一部または全てを含む薬学的組成物。

## 【請求項 11】

患者を治療する方法であって、前記患者に請求項 3に記載の薬学的組成物を投与すること、およびキュブレドキシソペプチドを共投与することを含む方法。

## 【請求項 12】

前記患者がコンディションに罹患している、請求項11に記載の方法。

## 【請求項 13】

前記患者が癌に罹患している、請求項12に記載の方法。

40

## 【請求項 14】

患者を治療する方法であって、前記患者に請求項 4に記載の薬学的組成物を投与することを含む方法。

## 【請求項 15】

前記患者がコンディションに罹患している、請求項14に記載の方法。

## 【請求項 16】

前記患者が癌に罹患している、請求項15に記載の方法。

## 【請求項 17】

請求項11に記載の方法であって、前記薬学的組成物が静脈内注射、筋肉内注射、皮下注

50

射，吸入，局所的投与，経皮性のパッチ，坐剤，硝子体注射および経口投与からなる群から選択される様式で投与される方法。

【請求項 18】

投与の様式が静脈内注射である、請求項17に記載の方法。

【請求項 19】

請求項11に記載の患者を治療する方法であって、さらに付加的な予防薬または治療薬を共投与することを含む方法。

【請求項 20】

緑膿菌のアズリンに関して異種性の遺伝子を保持し、癌細胞と接触する際にアズリンを発現する細胞。

10

【請求項 21】

請求項20に記載の細胞であって、アズリンに関して異種性の遺伝子におけるアズリンのコード配列は標的タンパク質のコード配列で置換されており、癌細胞で収縮する際に前記標的タンパク質を発現する細胞。

【請求項 22】

ゲノムにおけるアズリンのコード配列は標的タンパク質のコード配列で置換されており、癌細胞との接触に際して前記標的タンパク質を発現する緑膿菌細胞。

【請求項 23】

請求項21に記載の細胞であって、前記標的タンパク質は、予防的なタンパク質，治療上のタンパク質，細胞毒性タンパク質，および診断上のタンパク質からなる群から選択される細胞。

20

【請求項 24】

患者を治療する方法であって、請求項20～23に記載の細胞を投与することを含む方法。

【請求項 25】

前記患者がコンディションに罹患している、請求項24に記載の方法。

【請求項 26】

前記患者が癌に罹患している、請求項25に記載の方法。

【請求項 27】

前記癌がメラノーマ，乳房癌，膵臓癌，グリア芽細胞腫，星細胞腫，肺癌，結腸直腸癌，首および頭部癌（neck and head），膀胱癌，前立腺癌，皮膚癌，および子宮頸癌から選択される、請求項26に記載の方法。

30

【請求項 28】

患者の癌を診断する方法であって、診断上の標的タンパク質を発現する請求項 21に記載の細胞を投与することを含む方法。

【請求項 29】

請求項24に記載の方法であって、前記薬学的組成物が静脈内注射，筋肉内注射，皮下注射，吸入，局所的投与，経皮性のパッチ，坐剤，硝子体注射および経口投与からなる群から選択される様式で投与される方法。

【請求項 30】

投与の様式が静脈内注射である、請求項29に記載の方法。

40

【請求項 31】

請求項22に記載の細胞であって、前記標的タンパク質は、予防的なタンパク質，治療上のタンパク質，細胞毒性タンパク質，および診断上のタンパク質からなる群から選択される細胞。

【請求項 32】

請求項28に記載の方法であって、前記薬学的組成物が静脈内注射，筋肉内注射，皮下注射，吸入，局所的投与，経皮性のパッチ，坐剤，硝子体注射および経口投与からなる群から選択される様式で投与される方法。

【発明の詳細な説明】

50

## 【関連出願】

## 【0001】

本出願は、2006年12月4日に出願された米国仮出願番号60/872,471に関して35 U.S.C. § 119 および 120の優先権を請求する出願である。

## 【0002】

## [政府の利益に関する陳述]

本出願の主題は、米国メリーランド州ベセスダの国立衛生研究所 (NIH) からの研究助成金 (助成金番号AI 16790-21, ES 04050-16, AI 45541, CA09432 およびN01-CM97567) によって助成された。米国政府は、本発明に特定の権利を有している。

## 【0003】

## [発明の分野]

本発明は、緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) からのCpGリッチ DNAおよび (任意で) キュブレドキシンを含んでいる組成物に関する。本発明は、特に癌のコンディションに罹患している患者を治療する及び癌を予防するために有用な緑膿菌からの特定のCpG DNAsを含む。これらの組成物は、任意で薬学的に許容される担体中にある、また任意でキュブレドキシンを含む。本発明は、さらに癌細胞の近くでタンパク質を発現する方法に関する。これらの方法を、特に癌のコンディションに罹患している患者における癌細胞の近くに治療上または診断上のタンパク質を発現する、癌を予防する、および患者における癌を診断するために使用しえる。この方法は、緑膿菌 (*P. aeruginosa*) からのアズリンに関する遺伝子を緑膿菌または異種の細胞におけるアズリンまたは異種性のタンパク質のための発現系に使用する。

## 【0004】

## [発明の背景]

DNAワクチン接種および遺伝子治療に生菌 (live bacteria) を使用することによって癌治療において有望な可能性が示されている、また別の手段にはリポリサカライド、ペプチドグリカン、または寧ろ裸のDNA (naked DNA) などの細菌性の産物の使用が存在する。Vassaux等 [Vassaux et al., J. Pathol. 208:290-298 (2006)]。早くも1984年には、マイコバクテリウム - ボビス BCGからのDNAが抗腫瘍特性を有することが知られていた。実際、Tokunaga等は、マウスで有意な腫瘍退縮 (tumor regression) およびヒトの皮膚での悪性化において実質的な退縮反応が実証されたBCGからの精製DNAの単離を記載した。Tokunaga等 [Tokunaga et al., Japan J. Infect. Dis. 52:1-11 (1999)]。

## 【0005】

BCG DNAの腫瘍退縮を誘導する免疫賦活活性は、非メチル化CpG ジヌクレオチドが豊富なDNAストレッチの存在によるものである。メチル化されていない CpG 配列は、哺乳類DNAと比較して細菌DNAで20倍共通して認められる。また、特定のメチル化されていない CpG 配列 (モチーフ) の存在は、Toll-様レセプター (TLR) 9によって認識される。この細菌性CpG DNA モチーフ および TLR9の間の相互作用によって、単球 および 樹状細胞が活性化されて、次にT-ヘルパー 1細胞を活性化するインターロイキン-12を産生される。CpG DNAとは対照的に、細菌性のリポ多糖はTLR4によって認識され、対応するリポタンパク質はTLR2によって認識される。Modlin [Modlin, Nature 408:659-660 (2000); Krieg, Nature Med. 9:831-835 (2003)]。メチル化されていない CpG 配列が豊富な細菌性のDNAはヒトでの臨床試験のために精製することが困難であるので、8 ~ 30 塩基で一または二以上のCpG モチーフを含んでいる合成オリゴデオキシヌクレオチド (ODNs) が、ウイルスの免疫療法、細菌性および寄生虫性の感染、同様に基底細胞癌またはメラノーマの患者におけるヒトでの限定的な第一相臨床試験に使用され有望な結果が得られた。Krieg (Id)。

## 【0006】

細菌性のCpG モチーフとは対照的に、哺乳類細胞 DNAはシトシン残基が高度にメチル化されたCpG 配列を含む。例えば、ヒト DNA シトシン残基の約 6 ~ 8%は、DNA メチルトランスフェラーゼ [そのレベルは正常細胞よりもヒト腫瘍において中等度に高い (modestly higher)] によってメチル化されると信じられている。幾つかのヒト遺伝子のプロモ-

10

20

30

40

50

ター領域は、過剰メチル化 (hypermethylated) されたCpGアイランドを有しており、これによって下流の遺伝子のサイレンシングが誘導される。このような下流の遺伝子 (特に、p16Ink4a, BRCA1またはhMLH1などの腫瘍抑制因子の遺伝子) の後成的なサイレンシングによって腫瘍形成が惹起され、そして特定のDNA-脱メチル化因子を開発することによって抗腫瘍薬として利用できる。Herman およびBaylin [Herman and Baylin, *New Eng. J. Med.* 349:2042-2054 (2003)] ; Feinberg およびTycko [Feinberg and Tycko, *Nature Rev. Cancer* 4:143-153 (2004)]。幾つかの乳癌細胞株の転写プロファイリングは、原発腫瘍で及び細胞株で高度にメチル化されたCpGアイランドの存在を示したが、健常者の乳房上皮または癌患者からのマッチしたリンパ球からのDNAにおいては示されなかった。乳癌細胞株をDNAメチル化インヒビター 5-アザシチジンで処理することによって癌細胞の成長抑制 (growth arrest) を生じ、腫瘍成長におけるプロモーター CpGアイランドメチル化の重要性を実証している。Wang等 [Wang et al., *Oncogene* 24:2705-2714 (2005)]。

10

【0007】

特に、コンディション (具体的には癌) に罹患している患者の新しい治療および癌の予防的な治療が必要とされている。このような治療は、新しい治療法、または以前に記載された治療法のバリエーションまたは改善法であってもよい。このような癌治療は、哺乳類患者における腫瘍の成長を遅くする及び/又は哺乳類患者における腫瘍のサイズを減少させる能力があるべきである。患者における癌細胞に治療上の分子を送達する方法、同様に、患者における腫瘍の存在および位置を診断する方法も必要とされている。

20

【0008】

[発明の概要]

本発明は、緑膿菌からのCpGリッチ DNAポリヌクレオチドを含んでいる組成物に関する。特に、これらの組成物は、緑膿菌からのCpGリッチ DNA, および任意でキュブレドキシンペプチド、例えば、緑膿菌からのアズリン, および/またはアズリンの50-77残基領域 (p28) を含んでいてもよい。さらに、本発明は、患者 (特に癌のコンディションに罹患している哺乳類患者) を処置するための、および癌を予防するための本発明の組成物の使用に関する。さらに、本発明は、癌細胞との接触に際してタンパク質を発現する細胞および方法、および癌を診断する及び処置するために細胞を投与方法に関する。

30

【0009】

本発明の一側面において、単離された核酸分子はポリヌクレオチド配列を含んでおり、これは以下からなる群から選択される、

(a) 配列番号: 26-62からなる群から選択される配列および

(b) 配列番号: 26-62からなる群から選択される配列と少なくとも 90%同一である配列。

40

【0010】

特定の態様において、ポリヌクレオチドは、配列番号26である。単離された核酸配列は、薬学的に許容される担体中であってもよい。また、この薬学的組成物は、少なくとも一つのキュブレドキシンペプチドを含んでもよい。幾つかの態様において、薬学的組成物は、静脈内、皮下または局所投与のために処方される。幾つかの態様において、薬学的組成物におけるキュブレドキシンペプチドは、*Pseudomonas aeruginosa*, *Alcaligenes faecalis*, *Achromobacter xylosoxidans*, *Bordetella bronchiseptica*, *Methylobacterium* sp., *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoea*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas chlororaphis*, *Xylella fastidiosa*, and *Vibrio parahaemolyticus* からなる群から選択される生物体からのものであってもよい。幾つかの態様において、薬学的組成物におけるキュブレドキシンペプチドは、アズリン, シュードアズリン (pseudoazurin), プラストシアンin, ラスティシアンin, Laz, アウラシアンin, ステラシアンinまたはキュウリ塩基性タンパク質 (cucumber basic protein) からなる群から選択されるタンパク質の一部 (part) または全て (all) であってもよい。また、薬学的組成物は、配列番号1-25からなる群から選択されるペプチドの一部または全てを含んでもよい。

40

【0011】

50

また、本発明は方法を含む。本発明による任意の方法を使用してある種のコンディションを罹患した患者を治療できる。本発明の方法の態様において、患者は癌に罹患している。

【0012】

本発明で治療された癌には、限定されることなく、メラノーマ、乳房癌、膵臓癌、グリア芽細胞腫、星細胞腫、肺癌、結腸直腸癌、首および頭部癌 (neck and head)、膀胱癌、前立腺癌、皮膚癌、および子宮頸癌が含まれる。

【0013】

投与経路には、限定されることなく、静脈内注射、筋肉内注射、皮下注射、吸入、局所投与、経皮性パッチ、坐剤、硝子体注射 (vitreous injection) および経口が含まれる。

10

【0014】

一態様において、前記方法には患者を治療する方法が含まれ、該方法は患者に以下からなる群から選択されるポリヌクレオチド配列を含んでいる単離された核酸分子を投与することを含む、

(a) 配列番号：26-62からなる群から選択される配列および

(b) 配列番号：26-62からなる群から選択される配列と少なくとも 90%同一である配列 (ここで、単離された核酸分子は薬学的に許容される担体中にあり、キュブレドキシン ペプチドと共投与される)。

【0015】

本発明の方法の別の態様において、前記方法は、患者に薬学的に許容される担体、少なくとも一つのキュブレドキシン ペプチド および以下のものからなる群から選択されるポリヌクレオチド配列を含んでいる単離された核酸分子を含んでいる薬学的組成物を投与することを含む、

20

(a) 配列番号：26-62からなる群から選択される配列および

(b) 配列番号：26-62からなる群から選択される配列と少なくとも 90%同一である配列。

【0016】

本発明の方法の別の態様において、前記薬学的組成物は、静脈内注射、筋肉内注射、皮下注射、吸入、局所的投与、経皮パッチ (transdermal patch)、坐剤、硝子体注射 (vitreous injection) および経口投与からなる群から選択される様式で投与される。

30

【0017】

本発明の方法の別の態様において、前記方法は、以下のものからなる群から選択されるポリヌクレオチド配列を含んでいる単離された核酸分子を患者に投与することを含む、

(a) 配列番号：26-62からなる群から選択される配列および

(b) 配列番号：26-62からなる群から選択される配列と少なくとも 90%同一である配列 (ここで、単離された核酸分子は薬学的に許容される担体中にあり、キュブレドキシン ペプチドと共投与され、さらに付加的な予防薬 (prophylactic) または治療薬と共投与される)。

【0018】

また、本発明は細胞を含む。一態様において、細胞は、緑膿菌のアズリンに関して異種性の遺伝子 (heterologous gene) を保持する (ここで、前記細胞は、癌細胞と接触する際にアズリンを発現する)。別の態様において、アズリンに関して異種性の遺伝子におけるアズリンのコード配列は、標的タンパク質のコード配列で置換されている (ここで、前記細胞は、癌細胞で収縮 (contract) する際に前記標的タンパク質を発現する)。別の態様において、前記細胞は、緑膿菌細胞である (ここで、ゲノムにおけるアズリンのコード配列は、標的タンパク質のコード配列で置換されており、癌細胞との接触に際して前記標的タンパク質を発現する)。別の態様において、アズリンに関して異種性の遺伝子におけるアズリンのコード配列は、標的タンパク質のコード配列で置換されている (ここで、前記細胞は癌細胞で収縮する際に前記標的タンパク質を発現し、前記標的タンパク質は予防的なタンパク質 (prophylactic protein)、治療上のタンパク質 (therapeutic protein

40

50

), 細胞毒性タンパク質 (cytotoxic protein), および診断上のタンパク質 (diagnostic protein) からなる群から選択される]。

【0019】

また、本発明は、先行する段落に記載された細胞を用いる方法を含む。これらの態様において、一または二以上の記載の細胞型を投与することにより患者を治療することを含む。また、本発明は、先行する段落に記載された細胞型を用いて患者の癌を診断する方法を含む。一態様において、前記方法は、一般に緑膿菌のアズリンに対して異種性の遺伝子を保持する細胞を投与することを含む(ここで、前記細胞は癌細胞と接触する際にアズリンを発現し、アズリンに関して異種性の遺伝子におけるアズリンのコード配列は、標的タンパク質のコード配列で置換されており、前記細胞は癌細胞で収縮する際に前記標的タンパク質を発現し、および前記標的タンパク質は診断上のタンパク質である)。他の態様において、標的タンパク質は、予防的なタンパク質、治療上のタンパク質、細胞毒性タンパク質、および診断上のタンパク質からなる群から選択される。さらなる態様において、前記薬学的組成物は、静脈内注射、筋肉内注射、皮下注射、吸入、局所的投与、経皮性のパッチ、坐剤、硝子体注射および経口投与からなる群から選択される様式で投与できる。また、これらの方法において、患者はある種のコンディションおよび/または癌に罹患してもよい。本発明のこれらの及び他の側面、効果、および特性は、添付される図面および特定の態様の詳細な記述から明らかである。

【0020】

[配列の簡単な説明]

配列番号1; 緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) からのアズリンのアミノ酸配列。

【0021】

配列番号2; p28, 緑膿菌のアズリン残基50~77のアミノ酸配列。

【0022】

配列番号3; *Phormidium laminosum*からのプラストシアニンのアミノ酸配列。

【0023】

配列番号4; *Thiobacillus ferrooxidans*からのラスティシアニンのアミノ酸配列。

【0024】

配列番号5; *Achromobacter cycloclastes*からのシュードアズリンのアミノ酸配列。

【0025】

配列番号6; *Alcaligenes faecalis*からのアズリンのアミノ酸配列。

【0026】

配列番号7; *Achromobacter xylosoxidans* ssp. *denitrificans* Iからのアズリンのアミノ酸配列。

【0027】

配列番号8; *Bordetella bronchiseptica*からのアズリンのアミノ酸配列。

【0028】

配列番号9; *Methylomonas* sp. Jからのアズリンのアミノ酸配列。

【0029】

配列番号10; *Neisseria meningitidis* Z2491からのアズリンのアミノ酸配列。

【0030】

配列番号11; *Pseudomonas fluorescens*からのアズリンのアミノ酸配列。

【0031】

配列番号12; *Pseudomonas chlororaphis*からのアズリンのアミノ酸配列。

【0032】

配列番号13; *Xylella fastidiosa* 9a5cからのアズリンのアミノ酸配列。

【0033】

配列番号14; *Cucumis sativus*からのステラシアニンのアミノ酸配列。

【0034】

配列番号15; *Chloroflexus aurantiacus*からのアウラシアニンAのアミノ酸配列。

【 0 0 3 5 】

配列番号16； *Chloroflexus aurantiacus*からのアウラシアニンBのアミノ酸配列。

【 0 0 3 6 】

配列番号17； *Cucumis sativus*からのキュウリ塩基性タンパク質 (cucumber basic protein) のアミノ酸配列。

【 0 0 3 7 】

配列番号18； *Neisseria gonorrhoeae* F62からのLazのアミノ酸配列。

【 0 0 3 8 】

配列番号19； *Vibrio parahaemolyticus*からのアズリンのアミノ酸配列。

【 0 0 3 9 】

配列番号20； *Chloroflexus aurantiacus*のアウラシアニンBのアミノ酸57～89のアミノ酸配列。

【 0 0 4 0 】

配列番号21； *Bordetella pertussis*のアズリンのアミノ酸51～77のアミノ酸配列。

【 0 0 4 1 】

配列番号22； *Neisseria meningitidis* Lazのアミノ酸89～115のアミノ酸配列。

【 0 0 4 2 】

配列番号23； *Pseudomonas syringae*のアズリンのアミノ酸51～77のアミノ酸配列。

【 0 0 4 3 】

配列番号24； *Vibrio parahaemolyticus*のアズリンのアミノ酸52～78のアミノ酸配列。

【 0 0 4 4 】

配列番号25； *Bordetella bronchiseptica*のアズリンのアミノ酸51～77のアミノ酸配列。

【 0 0 4 5 】

配列番号26； *Neisseria*のLazと類似するポリペプチドをコード化する*P. aeruginosa*から放出される15 kb バンドにおけるポリヌクレオチドのDNA 配列。

【 0 0 4 6 】

配列番号27-62； *P. aeruginosa*から放出される15 kb バンドにおけるポリヌクレオチドのDNA 配列。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 4 7 】

【 図 1 】 図 1は、癌細胞の存在下での緑膿菌株 8821 および 8822によるアズリンの分泌を示す。図1A： 二つの緑膿菌株(8822, 8821)を、癌細胞の存在下(MCF-7)または非存在下(コントロール)で成長させた。細胞外分画におけるアズリンの分泌を、抗-アズリン抗体を用いたウエスタンブロッティングで検査した。パネル a： 濁度を600 nmで測定した緑膿菌細胞の成長。四角形および菱形は、それぞれ癌細胞の存在下および非存在下のアズリンの分泌レベルを示す。0 minでの癌細胞の存在下および非存在下の間の濁度の差は、癌細胞の添加が原因である。パネル b： ウエスタンブロッティングプロフィールでのシグナル強度の測定によるアズリンの分泌レベルの図である。四角形および菱形は、それぞれ癌細胞の存在下および非存在下のアズリンの分泌レベルを示す。パネル c： ウエスタンブロッティング。細胞外分画を、癌細胞の添加後0, 15, 30 および 60 minで調製し、SDS-PAGEに供試し、ウエスタンブロッティングを行った。矢印は、アズリンのポジションを示す。図1B： 定量的ウエスタンブロッティング。ウエスタンブロッティング プロフィールにおけるシグナル強度は、標準アズリンの増加(0～20 ng)とともに直線的に増加する。図1C： 緑膿菌株 8821 および 8822におけるアズリンの産生。指数増殖期で収穫した係る細胞(8821, 8822)からの細胞内分画を、SDS-PAGEに供試し、抗アズリン(auzrin)抗体を用いてウエスタンブロッティングを行った。標準アズリンは、左のレーンに示される。図1D： ウエスタンブロッティングによるMCF-7細胞抽出物(100 μg タンパク質)におけるアズリンの検出の欠如。

【 図 2 】 図 2は、癌細胞の存在下での緑膿菌の細胞溶解物の欠如を示す。図2A： lacZ

10

20

30

40

50

遺伝子を含んでいるプラスミド pQF47で形質転換した系統8822細胞を、癌細胞の存在下(MCF-7)または非存在下(コントロール)で成長させた。細胞外および細胞内の分画を、SDS-PAGEに供試し、抗-LacZ抗体を用いたウエスタンブロッティングを行った。サンプルの調製を、図1のとおり実施した。標準LacZは、左のレーンに示される。アスタリスクは、癌細胞と60 minインキュベーションした親系統 8822 細胞(pQF47プラスミドなし)の細胞内分画を示す。図2B: pQF47で形質転換した系統 8822細胞の細胞外分画を、SDS-PAGEに供試し、抗アズリン抗体を用いてウエスタンブロッティングを行った。図2C: pQF47で形質転換した系統 8822細胞におけるLacZの機能的な発現。

【図3】図3は、アズリン(チトクロム  $c_{551}$  ではない)がエネルギー非依存性の様式でヒト乳癌 MCF-7細胞の存在に反応して、大腸菌(*E. coli*)細胞の細胞膜周辺腔から分泌されることを示す。サンプルの調製を、図1のとおり実施した。アスタリスク(0\*)は、癌細胞とインキュベーションする直前の細胞内分画を示す。アズリン および チトクロム  $c_{551}$  (*cyt c<sub>551</sub>*)のポジションは、矢印で示される。図3A、大腸菌JM109から分泌されたアズリン; 図3B、大腸菌JCB7120から分泌されたチトクロム  $c_{551}$ ; 図3C、0, 50 または250  $\mu$ MのCCCPで1 hプレインキュベーションされた際の緑膿菌8822から分泌されたアズリン; 図3D、250  $\mu$ Mの濃度のCCCPでMCF-7 乳癌細胞に暴露される(又は暴露されない)前に1 hプレインキュベーションされた際の大腸菌JM109から分泌されたアズリン。図3E、緑膿菌 8822 (左のパネル) および 大腸菌JM109 (右のパネル)の細胞の成長におけるCCCPの効果。示した濃度のCCCPを成長の早期ないし中期対数期に添加し、成長速度を次の60 minで600 nmの光学密度で追跡した。

【図4】図4は、緑膿菌 8822 系統が染色体外DNAを培養培地に分泌することを示す。図4A、緑膿菌 8822 系統は、15 kbの染色体外DNA断片を分泌する。DNAは培養培地の濾過物から核タンパク質分画のイソプロパノール沈殿で精製され、続いてQiagen(登録商標)カラム(Qiagen, Inc., Valencia CA)をとおしてDNA精製を行なった。図4B、異なるタイムポイントでの染色体外DNAの分泌。DNAは早くも5 minで分泌され、分泌はそれぞれ15, 30 および 60 minで増強された。DNAは、全てのタイムポイントでMCF-7 ヒト 乳癌細胞の存在下で効率的に分泌された。図4C、緑膿菌 系統 8822は、MCF-7 癌細胞の存在下でアズリン および 15 kb DNA断片の両方を培養培地濾過物(culture medium filtrate)に分泌する。系統 8822はMCF-7 癌細胞の存在下で成長した。また、アズリンおよび染色体外DNAの細胞外分画への分泌を、抗-アズリン抗体を用いたウエスタンブロッティングおよびPA クローンに対するプライマーおよび沈殿したDNAを鋳型として用いたPCRで検査した。アズリン および DNAの分泌は、時間依存的である。図4D、分泌されたDNAはCpGリッチである。DNAは、EcoRI, HindIII, MspI および PvuI 酵素での制限酵素消化に供試された。MspI および PvuI (CpGリッチ DNAを切断することが知られている)によってDNAバンドのスメア(smear)が発生し、DNAに高い比でCG配列が存在することを示している。

【図5】図5は、放出されたCpGリッチ DNAにおいて高度にCおよびG-リッチなDNAのストレッチのDNA配列およびアミノ酸翻訳を示す。図5A、このDNAのストレッチは、データベース中の他の配列とホモロジーはなく、オープンリーディングフレームの一部ではないようだ。図5B、CpGリッチ放出DNA(8822)に存在する推定上のアズリン遺伝子および緑膿菌 PAO1 および 淋菌 (NG) および 髄膜炎菌 (NM)からの対応する配列の比較アミノ酸配列ホモロジー。

【図6】図6は、染色体外のCpGリッチ緑膿菌DNAによるNF- $\kappa$ Bの誘導を示す。図6A、NF- $\kappa$ B 誘導は、TLR9依存性であり、染色体外のCpGリッチDNAを必要とする。TLR9-発現プラスミド および NF- $\kappa$ Bプロモーター誘導性SEAP (secreted embryonic alkaline phosphatase) レポータープラスミド (Invitrogen, Inc. Carlsbad, CA)でトランスフェクションしたHEK293細胞を、様々な濃度の CpGリッチの15 kb DNAで処理した。NF- $\kappa$ B 活性化に続くSEAP 発現を、トランスフェクトされた細胞の上清で測定した。SEAPレベルを、HEK-Blue TM SEAPレポーターアッセイキット(Invitrogen, Inc. Carlsbad, CA)を用いて定量的に評価した。HEK293細胞をCpGリッチ DNAで刺激することによって、NF- $\kappa$ Bが誘導され、用量依存的な様式でSEAP活性が誘導される。図6B、異なる癌細胞株は、広範囲のToll-様レセプタ

10

20

30

40

50

ー (TLRs) を発現する。TLRs の発現を、定量的な RT-PCR で分析した。データは、サイクロフィリン B の発現に対して標準化された。図 6C, MCF-7 乳癌細胞の細胞増殖における CpG リッチ DNA 処理の効果。細胞を様々な濃度の 15 kb の CpG リッチ DNA (0.5, 1, 3 および 5  $\mu$ g) で 12 および 24 h 処理し、細胞生存を決定した。以前の記載 (Yamada et al., 2002) のとおり MTT アッセイを行って生細胞の程度を測定して、細胞毒性 (パーセント細胞死) を計算した。細胞毒性のパーセンテージを計算するために、無処置の生細胞の値を 100% として使用して 2.5  $\mu$ g の子ウシ胸腺 DNA および異なる濃度の CpG リッチ DNA で処理した生細胞の数を決定した。

【図 7】 図 7 は、癌細胞との接触の際に緑膿菌から放出される CpG リッチ DNA 配列の表である。

【0048】

[ 発明の詳細な記載 ]

定義

本願の明細書等で使用される「細胞」の用語には、特に「単一細胞 (single cell)」として記載されないかぎり、該用語の単数形または複数形のいずれかが含まれる。

【0049】

本願の明細書等で使用される、「ポリペプチド」、「ペプチド」、および「タンパク質」の用語は、アミノ酸残基のポリマーを意味させるために互換的に使用される。前記用語は、一または二以上のアミノ酸残基が対応する天然のアミノ酸の人工的な化学的アナログであるアミノ酸ポリマーに適用される。前記用語は、天然のアミノ酸ポリマーにも適用される。「ポリペプチド」、「ペプチド」、および「タンパク質」の用語は、糖鎖形成、脂質付着 (lipid attachment)、硫酸化、グルタミン酸残基のガンマ-カルボキシル化、ヒドロキシル化、および ADP-リボシル化を含む修飾をも包括的に含むが、これらに限定されない。ポリペプチドは、必ずしも全体的に直線状であるとはかぎらない。一例を挙げると、ポリペプチドは、ユビキチン化の結果として分枝してもよく、環状であってもよく (分枝の有無)、これは一般的には天然のプロセッシングを含む翻訳後修飾イベントおよび天然では生じないヒトの操作によって生じるイベントの結果である。環状の、分枝状の、および分枝環状 (branched circular) のポリペプチドは、非翻訳的な天然のプロセスによって及び完全に合成的な方法によって合成しえる。

【0050】

本願の明細書等で使用される、「ポリヌクレオチド」、「オリゴヌクレオチド」、「オリゴ」および「DNA」の用語は、核酸残基のポリマーを意味させるために互換的に使用される。

【0051】

本願の明細書等で使用される「薬理的な活性 (pharmacologic activity)」の用語は、生物系 (biological system) における薬または他の化学物質の効果を意味する。化学物質の効果は、有益 (治療的) または有害 (毒性) であってもよい。純粋な化学薬品 (pure chemical) または混合物は、天然起源 (植物, 動物, またはミネラル) であってもよい又は合成の化合物であってもよい。

【0052】

本願の明細書等で使用される「病理学的コンディション (pathological condition)」の用語には、生きている動物又はその一部の正常状態を失うこと、身体機能の実行の中断または修正、および様々な因子 (栄養不良, 工業災害, または気候) への、特定の感染性の因子 (寄生虫, 寄生性の原生動物, 細菌, またはウイルス) への、生物体の遺伝性の欠陥 (遺伝的な異常) への、又はこれらの因子の組み合わせへの応答から構成される正常からの解剖的な及び生理的な逸脱 (deviations) が含まれる。

【0053】

本願の明細書等で使用される「コンディション (condition)」の用語には、生きている動物又はその一部の正常状態を失うこと、身体機能の実行の中断または修正から構成される正常からの解剖的な及び生理的な逸脱が含まれる。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 5 4 】

本願の明細書等で使用される「に罹患している (suffering from)」の用語には、病理学的コンディションからの回復における又は病理学的コンディションから回復した、現在観察可能な症状 (symptoms) なしであっても病理学的コンディションを有している病理学的コンディションの症状を呈していることが含まれる。

## 【 0 0 5 5 】

本願の明細書等で使用される「治療 (treatment)」の用語には、前記コンディションの又は治療されるコンディションに関連している症状の進行または重症度を、予防すること、低下させること、停止させること、又は好転させること (reversing) が含まれる。同様に、本願の明細書等で使用される「治療」の用語には、必要に応じて、医療的 (medical) な、療法的 (therapeutic) な、および / または予防的 (prophylactic) な投与が含まれる。治療には、コンディション (例えば、癌) の発生の予防 (preventing) または軽減 (lessening) が含まれてもよい。

10

## 【 0 0 5 6 】

本願の明細書等で使用される「細胞成長を阻害する (inhibit cell growth)」の用語は、細胞分裂および / または細胞増大 (cell expansion) の緩徐化または中止 (ceasing) を意味する。本用語には、細胞発生の阻害または細胞死の増加も含まれる。

## 【 0 0 5 7 】

「治療上効果的な量 (therapeutically effective amount)」は、被験者が治療される特定のコンディションの発生を効果的に予防する、低下させる、停止させる、又は好転させるために或いは係るコンディションに存在している症状を部分的に又は全体的に軽減するために効果的な量である。治療上効果的な量の決定は、当業者の能力の範囲内である。

20

## 【 0 0 5 8 】

本発明のタンパク質または他の細胞の産物を修飾するために使用する場合、本願の明細書等で使用される「実質的に純粋 (substantially pure)」の用語は、例えば、増殖培地または細胞内容物 (cellular contents) から単離され、他のタンパク質および / または他の化合物から実質的に遊離されるか又は混ぜられていない (unadulterated) 形態のタンパク質を意味する。「実質的に純粋 (substantially pure)」の用語は、単離された分画の少なくとも約 75% の乾燥重量または少なくとも「75% 実質的に純粋」な量の因子を意味する。より具体的には、「実質的に純粋」の用語は、単離された分画の乾燥重量の少なくとも約 85% の又は少なくとも「85% の実質的に純粋」な化合物を意味する。最も具体的には、「実質的に純粋」の用語は、単離された分画の乾燥重量の少なくとも約 95% の又は少なくとも「95% の実質的に純粋」な化合物を意味する。また、「実質的に純粋」の用語は、例えば、合成タンパク質が試薬から単離される及び合成反応の副産物である場合、合成的に作出された本発明のタンパク質または化合物 (compound) を修飾するためにも使用しえる。

30

## 【 0 0 5 9 】

本発明のペプチドまたは化合物を意味する場合、本願の明細書等で使用される「医薬品グレード」の用語は、通常その天然の状態で見出される物質に伴う成分から実質的 (substantially) に又は本質的 (essentially) に単離されたペプチドまたは化合物 (合成試薬および副産物が含まれる) であり、医薬品としての使用を損なわれないだろう成分から実質的に又は本質的に単離される。例えば、「医薬品グレード」のペプチドは、発癌物質から単離してもよい。幾つかの例において、「医薬品グレード」は、患者への静脈内投与に不適切な組成を与えるだろう任意の物質から実質的に又は本質的に単離されたペプチドまたは化合物を特定するための、意図した投与方法によって修飾されてもよい (例えば、静脈内医薬品グレード)。例えば、「静脈内医薬品グレード」のペプチドは、洗剤 (例えば、SDS)、および抗細菌剤 (例えば、アジド) から単離されてもよい。

40

## 【 0 0 6 0 】

「単離された (isolated)」、「精製された (purified)」、または「生物学的に純粋 (biologically pure)」の用語は、通常本来の状態 (native state) で見出される物質

50

にともなう成分から実質的に又は本質的に遊離した物質を意味する。従って、本発明の単離されたポリヌクレオチドまたはペプチドは、好ましくは前記ポリヌクレオチドまたはペプチドとそれらのインサイチュウ環境で通常関連する物質を含有しない。ポリヌクレオチドまたはポリペプチドの「単離された」領域は、前記領域が由来するポリヌクレオチドまたはポリペプチドの全配列 (whole sequence) を含まない領域を意味する。「単離された」核酸、タンパク質、またはそれぞれのその断片は、当業者にヌクレオチドシーケンシング、制限消化、部位特異的突然変異誘発、および核酸断片の発現ベクターへのサブクローニング、同様に、タンパク質またはタンパク質フラグメントの実質的に純粋な品質での取得など(しかし、限定されない)によって操作されえるように、そのインビボ環境から実質的に除去される。

10

**【0061】**

ペプチドに関連して本願の明細書等で使用される「バリエント (variant)」の用語は、野生型ポリペプチドと比較して、置換され、欠失され、または挿入されたアミノ酸を有しえるアミノ酸配列バリエントを意味する。バリエントは、野生型ペプチドの短縮型 (truncations) であってもよい。「欠失 (deletion)」はポリペプチド内からの一または二以上のアミノ酸の除去であり、「短縮 (truncation)」は前記ポリペプチドの一または両方の末端 (ends) からの一または二以上のアミノ酸の除去である。従って、バリエントペプチドは、前記ポリペプチドをコード化している遺伝子进行操作することによって作出されてもよい。バリエントは、基礎の組成物またはポリペプチドの特性を、変更させることで作出しえる(少なくとも幾つかのその薬理的な活性は変更させない)。例えば、アズリンの「バリエント」は、前悪性 (pre-malignant) の哺乳類細胞の発生を阻害する能力を保持している変異アズリンであってもよい。幾つかのケースにおいて、バリエントペプチドは、-(3-ジニトロベンゾイル)-Lys残基などの非天然のアミノ酸で合成される。Ghadiri & Fernholz [Ghadiri & Fernholz, J. Am. Chem. Soc., 112:9633-9635 (1990)]。幾つかの態様において、前記バリエントは、野生型ペプチド又はその部分と比較して20アミノ酸以下が置換され、欠失され、または挿入される。幾つかの態様において、前記バリエントは、野生型ペプチド又はその部分と比較して15アミノ酸以下が置換され、欠失され、または挿入される。幾つかの態様において、前記バリエントは、野生型ペプチド又はその部分と比較して10アミノ酸以下が置換され、欠失され、または挿入される。幾つかの態様において、前記バリエントは、野生型ペプチド又はその部分と比較して6アミノ酸以下が置換され、欠失され、または挿入される。幾つかの態様において、前記バリエントは、野生型ペプチド又はその部分と比較して5アミノ酸以下が置換され、欠失され、または挿入される。幾つかの態様において、前記バリエントは、野生型ペプチド又はその部分と比較して3アミノ酸以下が置換され、欠失され、または挿入される。

20

30

**【0062】**

本願の明細書等で使用される「アミノ酸」の用語は、任意の天然の又は非天然の又は合成のアミノ酸残基〔即ち、直接的に1、2、3以上の炭素原子、典型的には1つの( )炭素原子によって連結された少なくとも1つのカルボキシルおよび少なくとも1つのアミノ残基を含んでいる任意の部分〕を含むアミノ酸部分 (amino acid moiety) を意味する。

**【0063】**

ペプチドに関連して本願の明細書等で使用される「誘導体 (derivative)」の用語は、被験者のペプチドに由来するペプチドを意味する。誘導 (derivation) には、なおも前記ペプチドがある程度の基礎的な活性を維持するようなペプチドの化学的な修飾が含まれる。例えば、アズリンの「誘導体」は、例えば、哺乳類細胞の血管形成を阻害する能力を保持している化学的に修飾されたアズリンであってもよい。所望の化学的な修飾には、ペプチドのアミド化、アセチル化、硫酸化 (sulfation)、ポリエチレングリコール (PEG) 修飾、リン酸化またはグリコシル化が含まれるが、これらに限定されない。加えて、誘導体ペプチドは、化学物質にポリペプチド又はその断片を融合させたものであってもよく、例えば、別のペプチド、薬分子 (drug molecule) または他の療法的なもしくは薬学的な剤又は検出可能なプローブであるが、これらに限定されない。

40

50

## 【 0 0 6 4 】

「パーセント (%)ヌクレオチド配列同一性 [percent (%) nucleotide sequence identity]」の用語は、2つの配列が整列された場合に、候補配列中のヌクレオチドと同一であるポリヌクレオチド中のヌクレオチドのパーセンテージとして規定される。%ヌクレオチド同一性を決定するために、配列が整列され、必要であれば、ギャップが導入されて最大の%配列同一性が達成される。パーセント同一性を決定するためのヌクレオチド配列アライメント処理は、当業者に周知である。しばしば、公共で利用可能なコンピュータソフトウェア〔例えば、BLAST, BLAST2, ALIGN2またはMegalign(DNASTAR)ソフトウェア〕を使用して、ヌクレオチド配列が整列される。特定の態様において、Blastn (National Center for Biotechnology Information, Bethesda MDから利用可能)を、初期設定パラメータ [low complexity filter, expect 10, and word size 11] で使用してもよい。

10

## 【 0 0 6 5 】

「宿主細胞 (host cell)」の用語は、任意の組換え型のベクター(s)または本発明の単離されたポリヌクレオチドのレシピエントである個々の細胞または細胞培養を含む。宿主細胞には、たった一つの宿主細胞の子孫が含まれる。その子孫は、天然の、偶発的な (accidental), または意図的 (deliberate) な変異 (mutation) および / または変化 (change) が原因でオリジナルの親細胞と〔形態において又は全体のDNAの全量 (total DNA complement) において〕必ずしも完全に同一でなくてもよい。宿主細胞には、組換え型のベクターまたは本発明のポリヌクレオチドでインピボまたはインピトロでトランスフェクトまたは感染された細胞が含まれる。本発明の組換え型のベクターを含む宿主細胞は、「組換え型の宿主細胞」である。

20

## 【 0 0 6 6 】

「形質転換 (transformation)」の用語は、「遺伝的な修飾 (genetic modification)」と互換的 (interchangeably) に使用され、新しいDNA (即ち、細胞に対して外因性のDNA) の導入にしたがって細胞に導入される永久のまたは一過性の遺伝的な変化を意味する。遺伝的な変化 (「修飾 (modification)」) は、新しいDNAを宿主細胞のゲノムへ取り込ませること又は新しいDNAをエピソーム因子として一過性に又は安定に維持することの何れかによって達成できる。

## 【 0 0 6 7 】

アミノ酸配列が整列される場合に、所与のアミノ酸配列 A の、所与のアミノ酸配列 B と (所与のアミノ酸配列 B で、又は、所与のアミノ酸配列 B に対して) の %アミノ酸配列同一性〔これは、所与のアミノ酸配列 B と (所与のアミノ酸配列 B で、又は、所与のアミノ酸配列 B に対して) 特定の %アミノ酸配列同一性を有する又は具備する所与のアミノ酸配列 A として、代替的に表現してもよい〕は、以下のように計算することができる：

30

$$\% \text{アミノ酸配列同一性} = X/Y * 100$$

式中で

Xは、配列アラインメントプログラムの又はアルゴリズムのAおよびBのアライメントによって、同一性マッチ (identical matches) であると評価されたアミノ酸残基の数であり、

Yは、B中のアミノ酸残基の総数である。

40

## 【 0 0 6 8 】

アミノ酸配列 A の長さがアミノ酸配列 B の長さとは等しくない場合、A と B との %アミノ酸同一性は B と A との %アミノ酸同一性と等しくない。長配列 (longer sequences) と短配列 (shorter sequences) とを比較する場合、短配列は「B」配列である。例えば、短縮型ペプチド (truncated peptides) を対応する野生型ポリペプチドと比較する場合、短縮型ペプチドが「B」配列である。

## 【 0 0 6 9 】

ヌクレオチド配列が整列される場合に、所与のヌクレオチド配列 A の、所与のヌクレオチド配列 B と (所与のヌクレオチド配列 B で、又は、所与のヌクレオチド配列 B に対して) の %ヌクレオチド配列同一性〔これは、所与のヌクレオチド配列 B と (所与のヌクレオ

50

チド配列 B で、又は、所与のヌクレオチド配列 B に対して) 特定の %ヌクレオチド配列同一性を有する又は具備する所与のヌクレオチド配列 A として、代替的に表現してもよい) は、以下のように計算することができる：

$$\% \text{ヌクレオチド配列同一性} = X/Y * 100$$

式中で

Xは、配列アラインメントプログラムの又はアルゴリズムのAおよびBのアライメントによって、同一性マッチ (identical matches) であると評価されたヌクレオチド残基の数であり、

Yは、B中のヌクレオチド残基の総数である。

#### 【0070】

ヌクレオチド配列 A の長さがヌクレオチド配列 B の長さとは等しくない場合、A と B との %ヌクレオチド同一性は B と A との %ヌクレオチド同一性と等しくない。長配列 (longer sequences) と短配列 (shorter sequences) とを比較する場合、短配列は「B」配列である。例えば、ポリヌクレオチドの領域を対応する完全長ポリヌクレオチドと比較する場合、そのポリヌクレオチドの領域は「B」配列である。

#### 【0071】

一般

本発明は、緑膿菌からの CpG リッチ DNA を含んでいる単離されたポリヌクレオチドを含んでいる組成物を提供する。また、本発明は、緑膿菌からの CpG リッチ DNA および任意で少なくとも一つのキュブレドキシネペプチドを含んでいる薬学的組成物を提供し、これを患者 (特に癌のコンディションに罹患している患者) を治療するために、または癌を予防するために効果的に使用しえる。本発明は、さらに患者 (特に癌のコンディションに罹患している患者) を治療するための、または癌を予防するための方法を提供し、該方法は緑膿菌からの CpG リッチ DNA を任意でキュブレドキシネペプチドと組み合わせて投与することを含む。また、本発明は、緑膿菌からのアズリン遺伝子を用いて、癌細胞と接触される場合に特定のタンパク質を発現させるために導入される細胞を提供する。これらの細胞は、特に癌のコンディションに罹患している患者を治療するため、または癌を予防するため、または患者の癌を診断するための方法に使用されえる。

#### 【0072】

本発明の第一の側面に関連して、Pseudomonas aeruginosa によって同化された酸化還元タンパク質 (キュブレドキシネアズリン) が、選択的に J774 肺癌細胞に進入するが、正常細胞に進入せず、アポトーシスを誘導することが以前に知られていた。Zaborina 等 [Zaborina et al., Microbiology 146:2521-2530 (2000)]。また、アズリンは、選択的にヒトメラノーマ UI50-Mel-2 またはヒト乳癌 MCF-7 細胞に進入し、そして殺傷できる。Yamada 等 [Yamada et al., PNAS 99:14098-14103 (2002)] ; Punj 等 [Punj et al., Oncogene 23:2367-2378 (2004)]。P. aeruginosa からのアズリンは、優先的に J774 マウス細網肉腫細胞に進入し、腫瘍抑制因子タンパク質 p53 と複合体を形成し、安定化し、p53 の細胞内濃度を増加させ、アポトーシスを誘導する。Yamada 等 [Yamada et al., Infection and Immunity 70:7054-7062 (2002)]。アズリン分子の様々なドメインの詳細な研究によって、次の事項が示された；その事項とは、アミノ酸 50-77 (p28) (配列番号 2) が、インターナリゼーションおよび引き続くアポトーシス活性に重大な意味を持つタンパク質伝達ドメイン (PTD) を表すことである。Yamada 等 [Yamada et al., Cell. Microbiol. 7:1418-1431 (2005)]。

#### 【0073】

また、緑膿菌は、細胞外の培地に癌細胞の存在によって増強される様式で特定の DNA 配列を放出することも知られている。例 5 を参照されたい。この DNA は癌細胞との接触 5 分間後すぐ緑膿菌から放出され、放出された DNA は染色体外起源であることを示唆している。例 6 を参照されたい。放出された DNA の制限酵素での消化によって、DNA が G+C ヌクレオチドリッチであり、「CpG リッチ DNA」であることが指摘された。例 7 を参照されたい。放出された DNA の間で認められる DNA 配列は一つの配列 (配列番号 26) であり、これは Cp

10

20

30

40

50

Gリッチであり、髄膜炎菌Lazのアズリン遺伝子からのヌクレオチド配列と95% 同一である。例8を参照されたい。最終的に、この緑膿菌のCpGリッチ DNA調製物は、現在TLR9- 依存的な様式でNF-κBを活性化する能力として記録された抗腫瘍特性を有することが知られている。例9を参照されたい。

【0074】

特に癌のコンディションに罹患している患者を治療するため、または癌を予防するため緑膿菌 CpGリッチ DNAをキュブレドキシンと共に投与しえることが企図される。具体的には、ナイセリアのlaz遺伝子に非常に類似する配列（配列番号 26）を有する緑膿菌から放出されるポリヌクレオチドを、癌、AIDS、マラリア、不適切な血管形成または癌が生じるリスクを治療している患者のキュブレドキシン単独の有効性を改善するために、キュブレドキシン、例えば、緑膿菌からのアズリン、および/またはアズリンの50-77 残基の領域(p28)と共投与（coadministered）しえることが企図される。この治療方法の機能は何れか一つの手段に限定されないが、緑膿菌により放出されるCpGリッチ DNAによって患者の免疫系が共投与されたキュブレドキシンペプチドを攻撃する度合が減少することが企図される。緑膿菌が哺乳類種に寄生して進化すること及び哺乳類種での腫瘍成長が緑膿菌の成長を阻害することが企図される。さらに、緑膿菌が癌細胞に曝露される際に癌に対する兵器としてアズリンを活発に分泌すると考えられる。アズリンが抗体形成のために宿主の免疫系に狙われるので、緑膿菌 系統 8822がCpGリッチ DNAを進化させ、癌細胞に曝露される際に放出されることにより、それを餌として使用してアズリンのターゲティングから免疫系の注意をそらすことができると考えられる。CpGリッチ DNAは任意で共投与されるキュブレドキシンを防御すると考えられるので、治療される疾患またはコンディションにかかわらず、キュブレドキシンの投与に関連する治療方法の有効性の改善に効果的である。さらに、CgG リッチな DNAが免疫系によるターゲティングから任意の共投与された化学物質を防御することに有用であることが企図される。

【0075】

本発明の第二側面に関連して、緑膿菌からのアズリンが増殖の後期段階で増殖培地に分泌されるペリプラスムタンパク質であることが知られていた。Zaborina等〔Zaborina et al., Microbiology 146:2521-2530 (2000)〕。その細胞外放出は、高細胞密度でクオラムセンシング（quorum sensing）に依存적であり、GacAまたは二つの小さいRNA産物RsmY および RsmZによって調整される。Kay等〔Kay et al., J. Bacteriol. 188:6026-6033 (2006)〕。

【0076】

現在、ヒト癌細胞の存在によって緑膿菌を誘導してアズリンを細胞外の培地に放出させることが知られている。癌細胞株MCF-7 および Mel-2の存在下で緑膿菌は癌細胞への曝露の20~30 min以内にアズリンを培地（medium）に放出するが、分泌は癌細胞の非存在下で観察されない。例1を参照されたい。さらに、アズリンの放出は、細胞溶解が原因ではなく、癌細胞が実際に存在することが必要とされる（癌細胞からの拡散性の因子ではない）。例2を参照されたい。さらに現在、癌細胞が緑膿菌のアズリン遺伝子を保持している大腸菌からのアズリンの放出を誘発することが知られている。例3を参照されたい。最終的に、エネルギーは、緑膿菌または大腸菌からのアズリンの放出に必要とされない。例4を参照されたい。

【0077】

今日、M. bovisの生細胞（Live cells）は、表在性の膀胱癌の治療に広く使用され、癌に対抗する治療の可能性として減弱した細菌の使用が広く注目を集めている。Chakrabarty〔Chakrabarty, J.Bacteriol.185:2683-2686 (2003)〕；Minton〔Minton, Nature Rev.Microbiol.1:237-243 (2003)〕；Dang等〔Dang et al., Cancer Biol.Therap., 3:326-337 (2004)〕；Vassaux等〔Vassaux et al., J.Pathol.208:290-298 (2006)〕。緑膿菌からのアズリン遺伝子を緑膿菌に又は別の細胞（例えば、大腸菌）に使用して、癌細胞と接触する際にアズリンまたは異種性のタンパク質を発現できることが企図される。アズリンを発現するアズリン遺伝子または異種性のタンパク質を保持している細胞は、発現したタン

10

20

30

40

50

パク質を癌細胞の部位に送達することによって癌を治療するために又は癌の位置がタンパク質の発現によって診断できる手段を提供するために有用である。

【0078】

[発明の組成物]

本発明は、緑膿菌から放出され、特にコンディション（具体的には、癌）に罹患している患者を治療するために有用である単離されたポリヌクレオチドを提供する。幾つかの態様において、単離されたポリヌクレオチドは、CpGリッチ DNAである。幾つかの態様において、単離されたポリヌクレオチドは、癌細胞と接触する場合に緑膿菌によって放出され、例5で提供される手順にしたがって調製されるものである。他の態様において、単離したCpGリッチ DNAは、配列番号26-62に提供される配列を有する一または二以上の単離されたポリヌクレオチドを含んでいてもよい。特定の態様において、単離したCpGリッチ DNAは、配列番号26の配列を有する単離されたポリヌクレオチドを含む。他の特定の態様において、CpGリッチ DNAは、配列番号26-62の配列を有する単離されたポリヌクレオチドからなる。

10

【0079】

本発明は、緑膿菌からの単離したCpGリッチ DNA、任意で少なくとも一つの単離したキユブレドキシン ペプチドをともに含んでいる組成物を提供する。幾つかの態様において、これらの組成物は、薬学的に許容される担体も含む。特定の態様において、組成物は、経口、腹腔内、または静脈内などの特定の投与の様式（mode）で設計されるが、これらに限定されない。係る組成物を、水で水和してもよい又は水和の後で乾燥（例えば、凍結乾燥）してもよい。係る組成物は、アルコールなどの水以外の溶媒に存在してもよいが、これらに限定されない。

20

【0080】

CpGリッチ DNAは、安定化したDNA（stabilized DNA）の形態であってもよい。一態様において、前記DNAは、小さい（約 50 nm）トロイド同様に大きな（約 300 nm）ロッド（rods）および球体（即ち、DNAの凝縮した粒子）を形成させるために塩化カルシウムを20%（v/v）tert-ブタノールに含むもので処理してDNAを濃縮することによって安定化できる。凝縮した粒子は陰性の表面電荷を保持し、カルシウムの不足当量（sub-stoichiometric concentrations）を示している。より具体的には、一態様において、約0.1 μg/mL ~ 約1 mg/mLの濃度の精製され、脱イオン化されたDNAは、約17% ~ 約25%（v/v）の濃度範囲のt-ブタノールの水溶液に溶解できる。約 0.2 mM ~ 約 2 mMの濃度でCa<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>、またはZn<sup>2+</sup>からなる適切な二価陽イオンを、t-ブタノール共溶媒溶液に添加してDNAを凝縮できる。一態様において、DNAバックボーンの陰イオン性のホスフェートと二価陽イオンとの化学量論比は、（陰イオン/陽イオン）約 0.1 および 約 1.0の間であり、約 0.3が最も好適な比である。溶液を約 45 分間平衡化し、熱力学的平衡の凝縮が達成される。ロッド、トロイドおよび球体のDNA微粒子は、約 20 ~ 約 500 nmのサイズ範囲である。凝縮したDNAを含んでいる溶液は、限定されることなく、0.22 μmフィルターをとおした無菌濾過、噴霧乾燥（spray-drying）、または凍結乾燥などの下流のプロセス単位の操作に移行できる。

30

【0081】

無菌濾過した凝縮したDNAは、凍結乾燥または噴霧乾燥で処理されて安定な薬学的な剤形を得ることができる。凍結乾燥の前、DNAは、スクロース、マンニトール、トレハロース、ラクトース、または他の共通の充填剤などの充填剤と混合できる。t-ブタノール溶液は凍結し、t-ブタノールの昇華特性による凍結乾燥を受け入れられる単一相を形成する。乾燥した凍結乾燥ケーキにおいて、DNAのトロイドおよびロッドは無傷（intact）で残る。再構成に際して、凍結乾燥ケーキ（lyophile cake）は急速に溶解し、DNAは陽イオンの当初の処理の微量成分および添加された充填剤のみを有する投薬の準備が整った未凝縮の本来（native）のプラスミド DNAに完全に溶解される。この処理段階で実質的にt-ブタノールはない。

40

【0082】

DNAをプロセッシングする代替的なアプローチは、噴霧乾燥を利用することである。噴霧

50

乾燥は、三つは基礎的な単位プロセス：液体微粒化、ガス液滴混合、および液体の液滴からの乾燥を含みえる。微粒化 (Atomization) は、通常三つの微粒化装置 [ 高圧力ノズル、二流体ノズル (two-fluid nozzles)、および高速度遠心ディスク (high-speed centrifugal disks) ] のうちのひとつで達成される。これらの微粒化で、薄い溶液を約 2 μm 程度に小さい液滴に分散してもよい。大きな液滴サイズは、稀に約 500 μm (35 メッシュ) を超える。作られた大きな全乾燥表面および小さい液滴サイズのために、噴霧乾燥機における実際の乾燥時間は典型的には約 30秒以下である。

【 0 0 8 3 】

噴霧乾燥の主な利点の一つは、通常他の乾燥法で取得できない球状粒子の産生である。球状粒子は、材料、フィード条件 (feed condition)、および乾燥条件に応じてソリッドまたは中空であってもよい。液滴に対する高い熱伝達率のために、粒子の中央で液体が気化し、外側のシェルが拡大し、中空の球が形成される。

【 0 0 8 4 】

乾燥したDNA 粒子を、静脈内、筋肉内 および 腹腔内の投与を含むが、これらに限定されない非経口投与のための水和溶液に再構成させる準備が整ったDNAの粉末形態として使用できる。また、再構成させたDNAを、皮下および眼内に投与できる。また、再構成させたDNAは、エアロゾル手段で投与できる、またエアロゾルまたは他の吸入投与手段で直接に粉末中に乾燥させた粒子形態で送達することができる。投薬のための粉末化したDNAの組成物は、構造を修飾するために使用される溶媒が実質的にない。

【 0 0 8 5 】

単離されたポリヌクレオチドは、癌細胞と接触する場合に緑膿菌によって放出されるDNAにおいて見つけられる一または二以上のDNA配列と類似してもよく、同一でなくてもよい。一態様において、単離されたポリヌクレオチドは、一または二以上の配列番号26-62と約 80%をこえるヌクレオチド配列同一性を有していてもよい。別の態様において、単離されたポリヌクレオチドは、一または二以上の配列番号26-62と約 90%をこえるヌクレオチド配列同一性を有していてもよい。別の態様において、単離されたポリヌクレオチドは、一または二以上の配列番号26-62と約 95%をこえるヌクレオチド配列同一性を有していてもよい。

【 0 0 8 6 】

本発明の組成物は、さらに所望の抗腫瘍活性または他の薬理的な活性を有するキュブレドキシシン ペプチドを含んでいてもよい。キュブレドキシシン ペプチドは、米国特許出願第10/047,710、(2002年1月15日出願) (現在、米国特許第7,084,105号) および 米国特許出願第10/720,603号、(2003年11月11日出願); 米国特許出願第11/244,105号、(2005年10月6日出願)、米国特許出願第11/488,695号、(2006年7月19日出願); 米国特許出願第11/436,592号、(2006年5月19日出願); 米国特許出願第11/488,693号、(2006年7月19日出願); 米国特許出願第11/436,590号 (2006年5月19日出願); 米国特許出願第11/436,591号、(2006年5月19日出願); 米国仮出願第60/843,388号、(2006年9月11日出願); および 米国仮出願第60/844,358号、(2006年9月14日出願) [ これらの文献の各々は本明細書中に参照によって援用される ] に提供されるキュブレドキシシン、バリエーション、誘導体または構造上の均等物であってもよい。特定の態様において、キュブレドキシシンペプチドは、キュブレドキシシンの少なくとも一つの薬理的な活性を有していてもよい。

【 0 0 8 7 】

所望の特定の薬理的な活性には、次の事項が含まれる：

- (1) 哺乳類の癌細胞に進入すること、
- (2) 非癌性の哺乳類細胞に進入しないこと、
- (3) 前癌状態 (pre-malignant) の哺乳類細胞に進入すること、
- (4) 哺乳類の癌細胞を死滅させること、
- (5) 前癌状態の哺乳類細胞を死滅させること、
- (6) 哺乳類の癌細胞の成長を阻害すること、
- (7) HIV-1感染を阻害すること、

10

20

30

40

50

- (8) マラリア感染した赤血球細胞の寄生虫血症を阻害すること、
- (9) エフリン情報伝達系に干渉すること、
- (10) 血管形成を阻害すること、および
- (11) 前悪性の傷害 (lesions) の発生を阻害すること。

## 【 0 0 8 8 】

キュブレドキシソ ペプチドは、全長の野生型キュブレドキシソ、または哺乳類の細胞、組織および/または動物において一または二以上の薬理的な活性を示すキュブレドキシソのバリエーション、誘導体または構造上の均等物であってもよい。幾つかの態様において、キュブレドキシソペプチドは単離される。幾つかの態様において、キュブレドキシソペプチドは、実質的に純粋または医薬品グレードである。他の態様において、キュブレドキシソペプチドは、前記ペプチドを含む又は前記ペプチドから本質的になる (consists essentially of) 組成物に存在する。別の特定の態様において、キュブレドキシソペプチドは、哺乳類 (より具体的には、ヒト) の免疫応答を生じさせない。幾つかの態様において、キュブレドキシソペプチドは、完全長キュブレドキシソ未満であり、幾つかのキュブレドキシソの薬理的な活性を保持する。

10

## 【 0 0 8 9 】

キュブレドキシソの間での高い構造上の相同性のために、キュブレドキシソはP28と同じ抗血管形成活性を有すると考えられる。幾つかの態様において、前記キュブレドキシソペプチドは、アズリン、シュードアズリン、プラストシアニン、ラスティシアニン (rusticyanin)、アウラシアニン (auracyanin) またはLazであるが、これらに限定されない。幾つかの態様において、前記アズリンは、緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、*Alcaligenes faecalis*、*Achromobacter xylosoxidans* ssp. *denitrificans* I、*Bordetella bronchiseptica*、*Methylomonas* sp.、*Neisseria meningitidis*、*Neisseria gonorrhoea*、*Pseudomonas fluorescens*、*Pseudomonas chlororaphis*、*Xylella fastidiosa* または *Vibrio parahemolyticus* から由来するものである。特定の態様において、前記アズリンは、緑膿菌からのものである。他の特定の態様において、キュブレドキシソペプチドは、配列番号1、3~19のアミノ酸配列を含む。

20

## 【 0 0 9 0 】

キュブレドキシソペプチドは、野生型キュブレドキシソと比較して、置換され、欠失され、または挿入されたアミノ酸を有するアミノ酸配列バリエーションであってもよい。キュブレドキシソペプチドは、野生型キュブレドキシソの短縮型であってもよい。幾つかの態様において、キュブレドキシソペプチドは、完全長の野生型ポリペプチド未満であるキュブレドキシソの領域を含む。幾つかの態様において、キュブレドキシソペプチドは、短縮型キュブレドキシソの約10残基以上、約15残基以上、または約20残基以上を含む。幾つかの態様において、キュブレドキシソペプチドは、短縮型キュブレドキシソの約100残基以下、約50残基以下、約40残基以下、約30残基以下または約20残基以下を含む。幾つかの態様において、キュブレドキシソペプチドは、前記ペプチド (より具体的には、配列番号1~19) に対し、少なくとも約 70% アミノ酸配列同一性、少なくとも約 80% アミノ酸配列同一性、少なくとも約 90% アミノ酸配列同一性、少なくとも約 95% アミノ酸配列同一性または少なくとも約 99% アミノ酸配列同一性を有する。

30

40

## 【 0 0 9 1 】

特定の態様において、キュブレドキシソペプチドは、緑膿菌のアズリン残基50~77、アズリン残基50~67、またはアズリン残基36~88を含む。他の態様において、キュブレドキシソペプチドは、緑膿菌のアズリン残基50~77、アズリン残基50~67、またはアズリン残基36~88からなる。他の特定の態様において、キュブレドキシソペプチドは、アズリンではないキュブレドキシソの均等な残基からなる。他のキュブレドキシソペプチドがアズリン残基50~77、アズリン残基50~67、またはアズリン残基36~88と類似する活性を有するように設計できることが企図される。これを行うために、BLAST、BLAST2、ALIGN2 または Megalign (DNASTAR) を用いて、対象のキュブレドキシソのアミノ酸配列を緑膿菌のアズリン配列と整列させ、緑膿菌アズリンのアミノ酸配列に局在する関連性のある残基、および

50

対象のキュブレドキシンの配列に見出される均等な残基、および均等なキュブレドキシンのペプチドが設計される。

【0092】

本発明の一態様において、キュブレドキシンのペプチドは、*Chloroflexus aurantiacus* のアウラシアニンBの少なくともアミノ酸57~89を含む(配列番号20)。本発明の別の態様において、キュブレドキシンのペプチドは、*Bordetella pertussis* のアズリンの少なくともアミノ酸51~77(配列番号21)を含む。本発明の別の態様において、キュブレドキシンのペプチドは、*Pseudomonas syringae* のアズリンの少なくともアミノ酸51~77(配列番号23)を含む。本発明の別の態様において、キュブレドキシンのペプチドは、髄膜炎菌Lazの少なくともアミノ酸89~115(配列番号22)を含む。本発明の別の態様において、キュブレドキシンのペプチドは、腸炎ピブリオ菌のアズリンの少なくともアミノ酸52~78(配列番号24)を含む。本発明の別の態様において、キュブレドキシンのペプチドは、*Bordetella bronchiseptica* のアズリンの少なくともアミノ酸51~77(配列番号25)を含む。

10

【0093】

キュブレドキシンのペプチドには、合成のアミノ酸で作出された天然ではないペプチドも含まれる。例えば、非天然のアミノ酸をキュブレドキシンのペプチドへと統合して、血流中の組成物の半減期を延長又は最適化しえる。係るバリエーションには、D,L-ペプチド類(ジアステレオマー)、(例えば、Futaki et al., *J. Biol. Chem.* 276(8):5836-40 (2001); Papo et al., *Cancer Res.* 64(16):5779-86 (2004); Miller et al., *Biochem. Pharmacol.* 36(1):169-76, (1987).; 異常なアミノ酸を含んでいるペプチド(例えば、Lee et al., *J. Pept. Res.* 63(2):69-84 (2004)), オレフィン含有している非天然アミノ酸を炭化水素ステープリング(hydrocarbon stapling)したもの(例えば、Schafmeister et al., *J. Am. Chem. Soc.* 122:5891-5892 (2000); Walenski et al., *Science* 305:1466-1470 (2004)), および -(3,5-ジニトロベンゾイル)-Lys残基を含んでいるペプチドが含まれるが、これらに限定されない。

20

【0094】

他の態様において、キュブレドキシンのペプチドは、キュブレドキシンの誘導体である。キュブレドキシンの誘導体は、なおも前記ペプチドがある程度の基礎的な活性を維持するようなペプチドの化学的な修飾体である。例えば、アズリンの「誘導体」は、哺乳類の癌細胞、組織、または動物を殺傷する能力を保持している化学的に修飾されたアズリンであってもよい。所望の化学的な修飾には、ペプチドの炭化水素ステープリング、アミド化、アセチル化、硫酸化(sulfation)、ポリエチレングリコール(PEG)修飾、リン酸化およびグリコシル化が含まれるが、これらに限定されない。加えて、キュブレドキシンのペプチドは、化学物質(chemical compound)にキュブレドキシンのペプチドを融合させたものであってもよく、例えば、別のペプチド、薬分子(drug molecule)または他の療法的なもしくは薬学的な剤又は検出可能なプローブであるが、これらに限定されない。所望の誘導体には、本発明のペプチドおよび組成物の血流中の半減期を当業者に周知の幾つかの方法などによって延長させる又は最適化することができる化学的な修飾体が含まれ、これには環状化ペプチド〔例えば、Monk et al., *BioDrugs* 19(4):261-78, (2005); DeFree et al., *J. Pept. Res.* 63(5):409-19 (2004)〕、N-およびC末端の修飾〔例えば、Labrie et al., *Clin. Invest. Med.* 13(5):275-8, (1990)〕、およびオレフィン含有非天然アミノ酸(olefin-containing non-natural amino acid)を炭化水素ステープリングしたもの〔例えば、Schafmeister et al., *J. Am. Chem. Soc.* 122:5891-5892 (2000); Walenski et al., *Science* 305:1466-1470 (2004)〕が含まれるが、これらに限定されない。

30

40

【0095】

加えて、キュブレドキシンのペプチドは、カーゴ(cargo)にキュブレドキシンのペプチドを融合させたものであってもよく、例えば、別のペプチド、薬分子(drug molecule)または他の療法的なもしくは薬学的な剤又は検出可能なプローブを含む化学物質であるが、これらに限定されない。一態様において、検出可能な物質、例えば、蛍光物質(例えば、緑色蛍光タンパク質); 発光物質; 酵素(例えば、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ); または放射

50

線標識した又はビオチン化したタンパク質が送達されて、検出可能な表現型を細胞に与える。同様に、検出可能な物質（例えば、蛍光物質）で標識された微粒子またはナノ粒子を、送達することができる。適切なナノ粒子の一例は、2002年5月7日に発行された米国特許第6,383,500号（本明細書中に参照によって援用される）に記載されている。多くのこのような検出可能な物質は、当業者に知られている。

#### 【0096】

幾つかの態様において、カーゴ化合物は、X線コンピュータ断層撮影法、磁気共鳴映像法、超音波画像処理または放射性核種シンチグラフィ（radionuclide scintigraphy）に適切な検出可能な物質である。これらの態様において、カーゴ化合物は、患者に診断目的で投与される。造影剤（contrast agent）は、X線CT、MRI、および超音波で得られた画像を増強するために、カーゴ化合物として投与される。腫瘍組織を標的とする放射性核種カーゴ化合物の、キュブレドキシン進入ドメイン（cupredoxin entry domain）を介した投与を、放射性核種シンチグラフィのために使用することができる。幾つかの態様において、キュブレドキシン進入ドメインは、カーゴ化合物が存在する又は非存在の放射性核種を含有してもよい。他の態様において、カーゴ化合物は、ガンマ線もしくは陽電子放出放射性同位元素（positron emitting radioisotope）、磁気共鳴映像法の造影剤、X線の造影剤、または超音波の造影剤である。

10

#### 【0097】

カーゴ化合物としての使用に適切な超音波造影剤には、生体適合性ガスのマイクロバブル、液体担体、および界面活性剤マイクロスフェア（surfactant microsphere）が含まれ、更に任意で標的成分およびマイクロバブルの間の連結成分（Ln）を含むが、これらに限定されない。本発明において、「液体担体（liquid carrier）」の用語は水溶液（aqueous solution）を意味し、「界面活性剤（surfactant）」の用語は溶液の界面の張力を減少させる任意の両親媒性物質を意味する。界面活性剤マイクロスフェアを形成させるための適切な界面活性剤のリストは、EP0727225A2（本明細書中に参照によって援用される）に開示される。界面活性剤マイクロスフェアの用語には、ナノスフェア（nanospheres）、リボソーム、ベシクルなどが含まれる。生体適合性ガスは、空気またはC<sub>3</sub>-C<sub>5</sub>パーフルオロアルカンなどのフルオロカーボンであってもよい（これはエコー発生性に差異を与えて、超音波画像にコントラストを与える）。前記ガスは、キュブレドキシン進入ドメインを付着（任意で、結合基を介して）させたマイクロスフェア中に封入（encapsulated）または含有される。付着は、共有結合性、イオン性、またはファンデルワールス力によるものであってもよい。係る造影剤の具体例には、複数の腫瘍血管新生レセプター結合ペプチド、ポリペプチド、またはペプチドミメティクス（peptidomimetics）を伴う、脂質封入パーフルオロカーボン（lipid encapsulated perfluorocarbons）が含まれる。

20

30

#### 【0098】

カーゴ化合物としての使用に適切なX線造影剤には、1以上のX線吸収剤または原子番号20以上の「重」原子が含まれ、更に任意でキュブレドキシン進入ドメインおよびX線吸収原子の間の連結成分（Ln）を含むが、これらに限定されない。X線造影剤に頻繁に使用される重原子は、ヨウ素である。最近、金属キレート剤（例えば、米国特許第5,417,959号）および複数の金属イオンから構成されるポリキレート剤（例えば、米国特許第5,679,810号）が開示された。最近、多核性クラスター複合体（multinuclear cluster complexes）が、X線造影剤として開示された（例えば、米国特許第5,804,161, PCT WO91/14460, およびPCT WO92/17215）。

40

#### 【0099】

カーゴ化合物としての使用に適切なMRI造影剤には、1以上の常磁性の金属イオンが含まれ、更にキュブレドキシン進入ドメインおよび常磁性の金属の間の任意の連結成分（Ln）が含まれるが、これらに限定されない。常磁性の金属イオンは、金属複合体または金属酸化物粒子（metal oxide particles）の形態で存在する。米国特許第5,412,148および5,760,191は、MRI造影剤に使用する常磁性の金属イオンのためのキレターの例を記載している。米国特許第5,801,228号、米国特許第5,567,411号、および米国特許第5,281,704号は

50

、MRI造影剤に使用する2以上の常磁性の金属イオンを錯化 (complexing) するために有用なポリキレーター (polychelants) の例を記載している。米国特許第5,520,904は、MRI造影剤に使用する常磁性の金属イオンから構成される微粒子組成物 (particulate compositions) を記載している。

【0100】

別の態様において、カーゴ化合物は、細胞を殺傷する又は細胞 (例えば、癌細胞) における細胞周期進行を遅延させるために送達される。係る癌細胞は、例えば、骨肉腫細胞、肺の癌腫細胞、結腸の癌腫細胞、リンパ腫細胞、白血病細胞、軟部組織の肉腫細胞または乳房、肝臓、膀胱、または前立腺の癌腫細胞であってもよい。例えば、カーゴ化合物は、細胞周期制御タンパク質、例えば、p53;サイクリン依存性キナーゼインヒビター、例えば、p16、p21、またはp27;自殺タンパク質、例えば、チミジンキナーゼ、またはニトロ還元酵素;サイトカインまたは他の免疫調節性のタンパク質、例えば、インターロイキン1、インターロイキン2、または顆粒球マクロファージ・コロニー刺激因子 (GM-CSF);または毒素、例えば、緑膿菌外毒素Aであってもよい。他の態様において、上記クラスの化合物の1つの生物学的に活性な断片が送達される。

10

【0101】

なお別の態様において、カーゴ化合物は、上記クラスの化合物のうちの1つをコード化している核酸である。なお別の態様において、カーゴ化合物は、癌を治療するために使用される薬物である。係る薬物には、5-フルオロウラシル;インターフェロン;メトトレキセート;タモキシフェン;およびビンクリスチン (Vincristine) などが含まれる。上記の例は説明の目的でのみ記載され、多くの他の係る化合物は当業者に知られている。

20

【0102】

癌を治療するために適切なカーゴ化合物には、アルキル化剤、例えば、ナイトロジェンマスタード、スルホン酸アルキル、ニトロソ尿素、エチレンイミン、およびトリアゼン (triazenes); 抗代謝剤、例えば、葉酸アンタゴニスト、プリンアナログ、およびピリミジンアナログ;抗生物質、例えば、アントラサイクリン、ブレオマイシン、マイトマイシン、ダクチノマイシン、およびプリカマイシン;酵素、例えば、L-アスパラギナーゼ;ファルネシル-タンパク質トランスフェラーゼ阻害剤;5.アルファ.-レダクターゼ阻害剤;17-β-水酸化ステロイドデヒドロゲナーゼ3型の阻害剤;ホルモン剤、例えば、糖質コルチコイド、エストロゲン/抗エストロゲン、アンドロゲン/抗アンドロゲン、プロゲステロン、および黄体形成ホルモン放出ホルモンアンタゴニスト、酢酸オクトレオチド (octreotide acetate);微小管破壊剤、例えば、エクテイナスチジン (ecteinascidins) 又はそのアナログおよび誘導体;微小管安定化剤、例えば、タキサン、例えば、パクリタキセル (タキソール<sup>TM</sup>)、ドセタキセル (タキソテール<sup>TM</sup>)、及びそのアナログ、およびエポチロン (epothilones)、例えば、エポチロンA-F及びそのアナログ;植物由来産物、例えば、ピンカアルカロイド、エピポドフィロトキシン、タキサン;およびトポイソメラーゼ阻害剤;プレニルタンパク質トランスフェラーゼ阻害剤;および種々の剤、例えば、ヒドロキシ尿素、プロカルバジン、ミトタン、ヘキサメチルメラミン、プラチナ配位複合体 (platinum coordination complexes)、例えば、シスプラチンおよびカルボプラチン;および抗癌および細胞毒性剤として使用される他の剤、例えば、生物学的応答調節剤 (biological response modifiers)、成長因子;免疫調整剤 (immune modulators) およびモノクローナル抗体が含まれるが、これらに限定されない。

30

40

【0103】

これらのクラスの抗癌および細胞毒性剤の代表的な例には、塩酸メクロレタミン、シクロホスファミド、クロランブシル、メルファラン、イホスファミド、ブスルファン、カルムスチン、ロムスチン、セムスチン、ストレプトゾシン、チオテパ、ダカルバジン、メトトレキセート、チオグアニン、メルカプトプリン、フルダラビン (fludarabine)、ペントスタチン (pentastatin)、クラドリビン (cladribin)、シタラビン、フルオロウラシル、塩酸ドキシソルピシン、ダウノルピシン、イダルピシン、硫酸ブレオマイシン、マイトマイシンC、アクチノマイシンD、サフラシン (safracins)、サフラマイシン (saframycin)

50

ns), キノカルシン (quinocarcins), ディスコデルモライド (discodermolides), ビンクリスチン, ビンブラスチン, 酒石酸ビノレルビン (vinorelbine tartrate), エトポシド, リン酸エトポシド, テニポシド, パクリタキセル, タモキシフェン, エストラムスチン, リン酸エストラムスチンナトリウム, フルタミド, プセレリン, ロイプロリド, プテリジン, ダイネース (diynesenes), レバミゾール, アフラコン (aflacon), インターフェロン, インターロイキン, アルデスロイキン, フィルグラスチム, サルグラモスチム, リツキシマブ, BCG, トレチノイン, 塩酸イリノテカン, ベタメゾン (betamethosone), 塩酸ゲムシタピン, アルトレタミン, およびトポテカ (topoteca) 並びにその任意のアナログまたは誘導体が含まれるが、これらに限定されない。

#### 【0104】

10

これらのクラスの好適なメンバーには、パクリタキセル, シスプラチン, カルボプラチン, ドキソルピシン, カルミノマイシン, ダウノルピシン, アミノプテリン, メトトレキサート, メトプテリン, マイトマイシン C, エクテナサイジン743, またはポフィロマイシン (pofiromycin), 5-フルオロウラシル, 6-メルカプトプリン, ゲムシタピン, シトシンアラビノシド, ポドフィロトキシンまたはポドフィロトキシン誘導体、例えば、エトポシド, リン酸エトポシドまたはテニポシド, メルファラン, ビンブラスチン, ビンクリスチン, リューロシジン (leurosidine), ビンデシンおよびリューロシン (leurosine) が含まれるが、これらに限定されない。

#### 【0105】

20

カーゴ化合物として有用な抗癌及び他の細胞毒性剤には、以下のものが含まれる：次の文献に記載のエポチロン (epothilone) 誘導体、独国特許第4138042.8; WO97/19086, WO98/22461, WO98/25929, WO98/38192, WO99/01124, WO99/02224, WO99/02514, WO99/03848, WO99/07692, WO99/27890, WO99/28324, WO99/43653, WO99/54330, WO99/54318, WO99/54319, WO99/65913, WO99/67252, WO99/67253およびWO00/00485; WO99/24416 (米国特許第6,040,321号をも参照されたい)に記載のサイクリン依存性キナーゼインヒビター;およびWO97/30992およびWO98/54966に記載のプレニル-タンパク質トランスフェラーゼインヒビター;および米国特許第6,011,029号に包括的かつ具体的に記載されている薬剤〔米国特許を、任意のARモジュレーター, ERモジュレーターなどのNHRモジュレーター (本発明のものを含むが、これらに限定されない)をLHRHモジュレーターと又は外科的な性腺摘除と共に、特に癌治療において実施することができる化合物〕などである。

30

#### 【0106】

本発明の化合物と共にカーゴ化合物として用いた場合、上記の他の治療剤を使用してもよい;この際の量はPhysicians' Desk Reference(PDR)で指摘された量または当業者によって決定された量などである。

#### 【0107】

別の態様において、キュブレドキシンペプチドは、キュブレドキシンの構造上の均等物である。キュブレドキシンおよび他のタンパク質の間の有意な構造上の同一性を決定する試験の例には、Toth等 [Developmental Cell 1:82-92 (2001)] が含まれる。具体的には、キュブレドキシンおよび前記構造上の均等物の間の有意な構造上の同一性は、VASTアルゴリズムを用いて決定される。Gibrat等 [Gibrat et al., Curr Opin Struct Biol 6:377-385 (1996)]; Madej等 [Madej et al., Proteins 23:356-3690 (1995)]。特定の態様において、キュブレドキシンおよびキュブレドキシンペプチドの構造比較からのVAST p値は、約 $10^{-3}$ 未満、約 $10^{-5}$ 未満、または約 $10^{-7}$ 未満である。他の態様において、キュブレドキシンおよびキュブレドキシンペプチドの間の有意な構造上の同一性は、DALIアルゴリズムを用いて決定される。Holm & Sander [Holm & Sander, J. Mol. Biol. 233:123-138 (1993)]。特定の態様において、ペアワイズ構造比較に関するDALI Zスコアは、少なくとも約3.5, 少なくとも約7.0, または少なくとも約10.0である。

40

#### 【0108】

キュブレドキシンペプチドが、2以上のキュブレドキシンのバリエーション、誘導体、および/または構造上の均等物であってもよいことが企図される。例えば、キュブレドキシン

50

ペプチドは、PEG化されているアズリンの短縮型であってもよく、このようにしてバリエーションおよび誘導体の双方が作出される。一態様において、キュブレドキシペプチドは、オレフィン含有拘束鎖 (olefin-bearing tethers) を含んでいる、 $\alpha$ -二置換型の非天然のアミノ酸で合成され、そしてルテニウム触媒性オレフィンメタセシス (ruthenium catalyzed olefin metathesis) による全炭化水素ステーピングが行われる。Scharmeister等 [Scharmeister et al., J.Am.Chem.Soc.122:5891-5892 (2000)]; Walensky等 [Walensky et al., Science 305:1466-1470 (2004)]。加えて、アズリンの構造上の均等物であるキュブレドキシペプチドは他のペプチドに融合されて、構造上の均等物および誘導体の双方であるペプチドが作出される。これらの例は、説明のための記載であり、本発明を限定するものではない。キュブレドキシペプチドは、銅に結合してもしなくてもよい。

10

## 【0109】

幾つかの態様において、キュブレドキシペプチドは、幾つかの緑膿菌アズリン (特に、p28) の機能的な特性を有する。特定の態様において、キュブレドキシペプチドは、具体的にはHUVECsであるが限定されない哺乳類の細胞、組織、または動物の血管形成を阻害しえる。また、キュブレドキシペプチドは、具体的にはメラノーマ、乳房、膵臓、グリア芽細胞腫、星細胞腫、または肺癌細胞であるが、これらに限定されない哺乳類の癌細胞の成長を阻害する能力を有しえる。キュブレドキシペプチドは、前悪性の哺乳類細胞の発生を阻害する能力を有しえる。また、キュブレドキシペプチドは、具体的にはメラノーマ、乳房、膵臓、グリア芽細胞腫、星細胞腫、または肺癌細胞であるが、これらに限定されない相当する非癌細胞と比較して哺乳類の癌細胞へ進入する能力を有しえる。血管形成または癌細胞の成長の阻害は、コントロールの処理と比較して統計的に有意な活性の任意の減少または増加の割合の軽減 (lessening) である。細胞への侵入は、任意の対応する正常細胞への侵入の割合と比較した場合に、統計的に有意である細胞への侵入の割合である。

20

## 【0110】

幾つかの態様において、キュブレドキシペプチドは、アズリン、シュードアズリン、プラストシアニン、ラスティシアニン (rusticyanin)、アウラシアニン (auracyanin)、ステラシアニン、キュウリ塩基性タンパク質またはLazから由来するが、これらに限定されない。幾つかの態様において、前記アズリンは、緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*), *Alcaligenes faecalis*, *Achromobacter xylosoxidans* ssp. *denitrificans* I, *Bordetella bronchiseptica*, *Methylomonas* sp., *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoea*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas chlororaphis*, *Xylella fastidiosa*, *Ulva pertussis*または*Vibrio parahaemolyticus*から由来するものである。特定の態様において、前記アズリンは、緑膿菌から由来する。他の特定の態様において、キュブレドキシペプチドは、配列番号1-25のアミノ酸配列を含む。

30

## 【0111】

幾つかの態様において、キュブレドキシペプチドは、幾つかの緑膿菌アズリン (特に、p28) の薬理的な活性を有する。特定の態様において、キュブレドキシペプチドは、腫瘍の発生を阻害、腫瘍の成長を減少または哺乳類の細胞、組織または動物における腫瘍細胞を殺傷しえる。幾つかの態様において、哺乳類の腫瘍は、メラノーマ、乳房癌、膵臓癌、グリア芽細胞腫、星細胞腫、肺癌、結腸直腸癌、首および頭部癌 (neck and head)、膀胱癌、前立腺癌、皮膚癌、および子宮頸癌から構成されるが、これらに限定されない。腫瘍の発生の阻害は、コントロールの処理と比較して統計的に有意な腫瘍の発生の任意の減少または増加の割合の軽減 (lessening) である。

40

## 【0112】

## [発明の細胞]

本発明は、癌細胞によって接触される際に選択されたタンパク質を発現する細胞を提供する。本発明の本側面は、癌細胞との接触によって誘導性の本願の明細書等が開示されている緑膿菌からのアズリン遺伝子を使用する。一態様において、本発明の細胞は、緑膿菌か

50

らのものであり、そのゲノムにおいてアズリンのコード配列が標的タンパク質のコード配列で置換されており、癌細胞との接触に際して前記標的タンパク質を発現する緑膿菌アズリン遺伝子のコピーを保持している。別の態様において、前記細胞は緑膿菌以外の種であってもよく、そのゲノムにおいてアズリンのコード配列が標的タンパク質のコード配列で置換されており、癌細胞との接触に際して前記標的タンパク質を発現する緑膿菌アズリン遺伝子のコピーを保持している。

#### 【0113】

所望の標的タンパク質には、治療上のタンパク質、細胞毒性タンパク質および診断上のタンパク質、および癌細胞の近くで産生されることが有利であろう任意の他のタンパク質が含まれる。所望の治療上のタンパク質には、本願の明細書等に提供されるキュブレドキシソペプチドが含まれる。係る細胞を作出する方法は当業者に周知であり、Sambrook等 [Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Mass. (2001))] を含む説明マニュアルが利用可能である。さらに、次の非限定的な細胞の調製およびトランスレーションの処理方法が提供される。

#### 【0114】

例示的な宿主細胞の調製方法。形質転換される宿主細胞は、任意の成長助成培地 (growth conducive medium) において成長させてもよい。このような培地の例には、Luria プロス、20 mM MgCl<sub>2</sub>、0.001% チアミン、および 0.2% グルコースを補充した Luria プロス; 0.001% PPG を含んでいる SOB 培地 (下記で提供されるレシピ); および 15/10 培地 (下記で提供されるレシピ) が含まれるが、これらに限定されない。他の適切な培地は、当業者に容易に認識される。

#### 【0115】

細胞の成長のためのインキュベーション温度は、約 10° ~ 約 42° C で変動しえる。一態様において、前記温度は、約 12° ~ 約 37° C の範囲である。別の態様において前記温度は約 15° C ~ 約 32° C の範囲であり、別の態様において約 20° ~ 約 25° C である。一つの特定の態様において、前記細胞は、約 23° C で成長されてもよい。

#### 【0116】

通常の当業者が理解するであろうとおり、成長条件および培養齢 (culture age) は、生存度および凍結保存後の細胞の形質転換効率の両方に影響する。振盪フラスコ培養で成長した細胞は、一般に静的なプロス培養 (static broth cultures) よりもフリーズドライのストレスに対する耐性が高い。さらにまた、培養の齢は、フリーズドライで生存する培養の能力に影響する。一般に、後期対数期または早期定常成長期 (late log or early stationary growth) に収穫した細胞は、フリーズドライが企図される場合にフリーズドライに対する抵抗性が最大である。

#### 【0117】

従って、フリーズドライが企図される場合、前記細胞は、好ましくは振盪フラスコで成長させられるが、他の成長手段を使用してもよい (発酵器を含む)。使用される振盪フラスコは、任意のサイズおよび任意のタイプであってもよい。一態様において、バッフル (baffled) の 2.8 リットルの振盪フラスコを、この処理に使用しえる。インキュベーション時間は、使用される条件 (温度、培地、通気、など) および細胞型にしたがって変動するだろう。フラスコにおける通気は、使用される毎分回転数 (rpm) にしたがって変動するだろう (高い rpms は、高い通気を生じる)。特定の態様において、フラスコは、典型的に 100-500 rpms, 200-400 rpms, および 200-300 rpms で振盪されるが、当業者は他の好適な範囲を決定しえる。細胞は、典型的に 550 nm の光学密度 (OD) で約 0.1 ~ 約 2.0 の間に達するために十分な時間および条件下で成長させられる。一態様において、前記 OD は、約 0.1 ~ 約 1.0 の範囲である。別の態様において、前記 OD は、約 0.3 ~ 約 0.8 の範囲である。別の態様において、前記 OD は、約 0.5 ~ 約 0.8 の範囲である。別の態様において、前

10

20

30

40

50

記ODは、約 0.5 ~ 約 0.7の範囲である。別の態様において、前記ODは、約 0.6 ~ 約 0.8の範囲である。また、なお別の態様において、前記ODは、約 0.66 ~ 約 0.75の範囲である。

#### 【0118】

細胞が所望のODに到達した後、細胞をさらなる処理のために収集してもよい。所望のODに到達しない又は超える場合、細胞を再び再接種でき、成長プロセスを培養で十分な光学密度が得られるまで繰り返される。

#### 【0119】

細胞を収集（限定されることなく、遠心分離、濾過、などで）した後、それらを任意で冷却（例えば、0° ~ 4° Cで5分間~2時間）してもよい。細胞の採集は、細胞を遠心分離し、細胞ペレットを得ることによって達成される。また、採集は、細胞を濃縮し、濃縮された培養物を遠心分離して細胞ペレットを得ることによって達成される。細胞を遠心分離する方法には、培養物の脱水（dewatering）、濾過、または培養物をサイズ排除クロマトグラフィーに供試すること〔例えば、Centricon™ カラム(Amicon Corp., Lexington, Mass.)を用いる〕が含まれるが、これらに限定されない。

10

#### 【0120】

細胞を収集した後、細胞をコンピテンス緩衝液（competence buffer）に再懸濁してもよい。コンピテンス緩衝液は、細胞で外因性DNA（exogenous DNA）を取り込み樹立することが可能な任意の溶液である。コンピテンス緩衝液の非限定の例には、50 mM CaCl<sub>2</sub>、10 mM Tris/HCl (Maniatis, T. et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)); 0.1 M MOPS (pH 6.5), 50 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM RbCl<sub>2</sub>, 23% V/V DMSO; CCMB80 緩衝液(10 mM 酢酸カリウム pH 7.0, 80 mM CaCl<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O, 20 mM MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 10 mM MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 10% グリセロールを0.1 N HClでpH 6.4に調整); TFB 緩衝液(Liu et al., *Biotechniques* 8(1):23-25 (1990)); および 1776 緩衝液(Maniatis, T. et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd ed., Cold Spring Harbor, N.Y. (1989))が含まれる。他の適切な緩衝液は、文献〔Tang et al., *Nucl. Acids Res.* 22(14):2857-2858 (1994); Chung et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86:2172-2175 (1989); M. Dagert and S. D. Ehrlich, *Gene* 6:23-28 (1974); Kushner, S. R., In: *Genetic Engineering* (H. W. Boyer and S. Nicosia, eds.) pp. 17-23, Elsevier/North Holland, Amsterdam (1978); Mandel and Higa, *J. Mol. Biol.* 53:159-162 (1970); Jessseeによる米国特許第4,981,797号; および Hanahan, D., *J. Mol. Biol.* 166:557-580 (1983)、これらは参照によって本明細書中に援用される〕に開示されている。

20

30

#### 【0121】

コンピテンス緩衝液に懸濁された細胞は、DNA取り込みにコンピテントな細胞を作るために十分な時間および温度でインキュベーションされる。一態様において、前記細胞は、低温(0~4° C.)で約 0~約 3 時間インキュベーションされる。別の態様において、前記細胞は、低温(0~4° C.)で約 5分間~約 1 時間インキュベーションされる。別の態様において、前記細胞は、低温(0~4° C.)で約 5分間~約 30 分間インキュベーションされる。

#### 【0122】

細胞をコンピテントとした後、凍結保護物質を細胞懸濁液に直接添加してもよい。一態様において、前記細胞を、収集し、凍結保護物質に再懸濁してもよい。凍結保護物質の濃度は、細胞型、使用した緩衝剤、凍結保護物質の型および他の因子に応じて変動できる。至適な条件は、過度に実験することなく通常の当業者が決定できる。使用した場合、凍結保護物質によって、凝固点の降下、細胞に対して外部の溶液の変化の影響の最小化、溶質濃度の影響に対する防御のための細胞の浸透、および/または最適冷却割合をより低値にシフトすることによる凍結プロセスの間の細胞の保護が提供される〔F. P. Simone, *Journal of Parenteral Science & Technology*, 46(6):226-232 (1992)〕。もちろん、凍結保護物質は、細胞に毒性があってはならない。

40

#### 【0123】

50

任意の凍結保護物質及びその組み合わせは明らかであろう、使用される型および量は使用される細胞型および条件に応じて変動しえる。本発明に使用することができる凍結保護物質には、炭水化物および炭水化物誘導体、例えば、トレハロース、スクロース、ラクトース、マルトース、マンニトール、ガラクトース、リボース、果糖、キシロース、マンノース、デキストロース、グルコース、およびソルビトール、およびポリマー、例えば、ポリエチレンアミン (polyethyleneamine)、ポリビニルピロリドン (PVP)、フィコール、などが含まれるが、これらに限定されない。本発明に基づき使用できる他の凍結保護物質 (例えば、アカシアゴム、アルブミン、ゼラチン、および糖アルコール) は、当業者に容易に認識されるだろう。

#### 【 0 1 2 4 】

細胞を凍結保護物質と混合させた後、細胞懸濁液を凍結乾燥および貯蔵に使用される容器 [例えば、冷却したクリオバイアル、例えば、NUNCチューブ (Gibco BRL, Gaithersburg, Md., Cat. No. 366656)、またはガラスバイアル (Wheaton, Millville, N.J.)] に分配 (aliquoted) してもよい。凍結乾燥前、一態様において、前記細胞は、約  $-20^{\circ}\text{C}$  ~ 約  $-180^{\circ}\text{C}$  で凍結されてもよい。別の態様において、それらを、約  $-80^{\circ}\text{C}$  ~ 約  $-180^{\circ}\text{C}$  で凍結してもよい。特定の態様において、それらを、約  $-80^{\circ}\text{C}$  で凍結してもよい。

#### 【 0 1 2 5 】

サンプルを約  $-80^{\circ}$  ~ 約  $-180^{\circ}\text{C}$  の温度に凍結する方法は、当該技術分野において周知である。これらには、細胞を含むバイアルを  $-80^{\circ}\text{C}$  フリーザーに一晩貯蔵 (約 16 時間) すること、または細胞を含むバイアルをドライアイスまたは低温バス (例えば、ドライアイスエタノール、または液体窒素を含んでいるバス) に浸漬することが含まれる。他のこのようなシステムは、文献 [The Chemist's Companion: A Handbook of Practical Data, Techniques, and References, Gordon, A. J., et al., eds., John Wiley and Sons, NY (1972)、この文献は本明細書中に参照によって援用される] に開示されている。

#### 【 0 1 2 6 】

必要に応じて、前記細胞は、当該技術分野において周知の技術によって凍結乾燥できる。凍結乾燥は、氷 および / または 水分が凍結した細胞から減圧下で低い零下温度 (例えば、 $-40^{\circ}$  ~  $-50^{\circ}\text{C}$ ) での昇華によるプロセスで除去される。「乾燥した」調製物の残留水分は、次第に温度を上昇させ、蒸発を生じることによって除去される。従って、凍結乾燥は、凍結した細胞を該細胞から水分 および / または 氷を実質的に除去するために十分な減圧条件下に供試することを含む (本願の明細書等において実質的に乾燥した細胞とも称される)。実質的に乾燥した細胞は、多様な温度 (室温 ~ 約  $-180^{\circ}\text{C}$ 、および特定の態様において、約  $4^{\circ}\text{C}$  ~ 約  $-80^{\circ}\text{C}$ 、約  $-20^{\circ}\text{C}$  ~ 約  $-80^{\circ}\text{C}$ 、および一つの特定の態様において、約  $-20^{\circ}\text{C}$ ) で貯蔵されえる。

#### 【 0 1 2 7 】

細胞の凍結乾燥プロセスの一つの限定されることのない例には、次の工程が含まれる：

- (a) 凍結した細胞を含んでいる容器を約  $-40^{\circ}$  ~ 約  $-50^{\circ}\text{C}$  の温度の凍結乾燥器にロードすること (loading) ;
- (b) 前記細胞を減圧にかけること ; および
- (c) 実質的に前記細胞を乾燥すること。

#### 【 0 1 2 8 】

一態様において、減圧は約 100  $\mu\text{m}$  未満であり、前記細胞は次のことによって乾燥される：

- (i) チャンバーの温度を約  $-45^{\circ}\text{C}$  で約 2 時間保持すること ; および
- (ii) チャンバーの温度を約  $-45^{\circ}\text{C}$  ~ 約  $10^{\circ}\text{C}$  の温度に約  $0.1^{\circ}$  ~ 約  $1.0^{\circ}\text{C}/\text{hr}$  (一態様において約  $0.5^{\circ}$  ~ 約  $0.8^{\circ}\text{C}/\text{hr}$ 、および特定の態様において約  $0.6^{\circ}$  ~ 約  $0.8^{\circ}\text{C}/\text{hr}$ ) の割合で増加させること。

#### 【 0 1 2 9 】

細胞の容器は、封止され、延長時間 (extended time) を様々な温度で貯蔵されてもよい。

10

20

30

40

50

## 【0130】

記載の方法によって産生されるコンピテント細胞の生存可能な宿主細胞数は、 $-20^{\circ}\text{C}$ で約0日～約450日の任意の期間で貯蔵された場合に約 $1 \times 10^7$ ～約 $1 \times 10^9$ 細胞/mlよりも多く残るべきである。前記細胞は、少なくとも約 $1 \times 10^5$ および好ましくは少なくとも約 $1 \times 10^9$ の形質転換体/マイクログラムDNA(T/ $\mu\text{g}$ )の形質転換効率を保持する可能性がある。適切な貯蔵温度は、およそ室温～約 $-180^{\circ}\text{C}$ で変動する。一態様において、貯蔵温度は、約 $4^{\circ}\text{C}$ ～約 $-80^{\circ}\text{C}$ の範囲である。別の態様において、貯蔵温度は、約 $-20^{\circ}\text{C}$ ～約 $-80^{\circ}\text{C}$ の範囲である。別の特定の態様において、貯蔵温度は、約 $-20^{\circ}\text{C}$ の範囲である。貯蔵の期間または時間は約0日～約45日、約0日～約90日、約0日～約150日、約240日～約365日、または約365日～約450日の範囲であってもよいが、長い貯蔵時間は約 $-20^{\circ}\text{C}$ 以下の温度で使用しえる。この方法によって産生されるコンピテント宿主細胞は、 $-20^{\circ}\text{C}$ で少なくとも一年間、実質的に彼等の形質転換効率を保持している間で貯蔵しえる。

10

## 【0131】

例示的な宿主細胞の形質転換方法。当業者に理解されるであろうとおり、宿主細胞を形質転換するために、一般的に細胞を所望のDNA分子と混合し、細胞を前記DNA分子で形質転換するために十分な条件下でインキュベーションしてもよい。任意のDNA分子(例えば、ベクター、プラスミド、ファージミド、発現ベクター、など)を使用してもよい。好ましくは、前記細胞は、コンピテンス緩衝液の存在下でDNA分子と混合される。コンピテンス緩衝液をDNA分子を添加する前に添加してもよい、又はDNA分子およびコンピテンス緩衝液はコンピテント宿主細胞に同時に添加してもよい。コンピテント宿主細胞をDNA分子およびコンピテンス緩衝液と混合することが好適であるが、任意の溶液を使用して再水和し、前記細胞を所望のDNA分子と混合してもよい。係る溶液は、水、生理食塩水、または任意の適切な緩衝剤を含む。

20

## 【0132】

以下の詳細な限定されることのない例も提供される。約25 - 200  $\mu\text{l}$ の細胞は、解凍され、氷上で保持される。細胞は、ガラスチューブに配置されるべきではない(ガラスは、所望のDNAを吸着するので)。DNAは細胞混合物に穏やかにピペットされ、DNAの容量は細胞容量の約5%未満に維持される。細胞は、所望のDNAと約5～約30分間インキュベーションされる。次に、細胞は、約 $42^{\circ}\text{C}$ で約30秒インキュベーションされ、氷上で約2分間インキュベーションされる。この段階で、約4容量のSOC培地が添加される(しかし、この添加は、形質転換の成功に重大な意味を持たないはずである)。細胞は、約30分間～約1時間振盪機で $37^{\circ}\text{C}$ でインキュベーションされる。インキュベーション後、約100-300  $\mu\text{l}$ の細胞/DNA混合物は、必要に応じて、適切な抗生物質とともに作出されたプレートに広げられる。

30

## 【0133】

一旦細胞が所望のDNA分子で形質転換されれば、形質転換した細胞は成長助成培地で成長されてもよい。典型的には、このような成長助成培地は、抗生物質を含み形質転換した細胞の選択を補助する。換言すれば、形質転換されるDNA分子は選択マーカー(例えば、抗生物質の耐性遺伝子)を含んでもよく、対応する抗生物質が培地に使用される際に形質転換した細胞の選択が許容される。しかしながら、このプロセスのこれらの事項はあまり必要とされない。

40

## 【0134】

形質転換した宿主細胞(および凝縮したDNA)は、本発明による治療として使用される。特に有用な投与方法には、限定されることなく、カテーテルおよび薬ポンプ系(drug pump system)をとおした局所的な送達、直接の局所注射またはポリマーの使用による送達が含まれる。一態様において、直接的および局所的な投与システムを含む「制御投与システム」を使用できる。制御投与システムは、デポー(depot)またはポンプシステム(例えば、限定されることなく、浸透圧ポンプまたは輸液ポンプ)であってもよい。輸液ポンプは、移植可能なものであってもよく、限定されることなく、プログラム可能なポンプ(programmable pump)、固定割合ポンプ(fixed rate pump)などである。カテーテルは、ポ

50

ンプに動作可能に連結され、本発明の細胞を被験者の標的組織領域に送達するために配置される。明細書の別の部分に記載される他の送達方法も、適切である。

【0135】

使用の方法

本発明は、患者（特に癌のコンディションに罹患している患者）を治療するための、または患者における癌を予防するための方法を提供し、該方法は前記患者に緑膿菌からのCpGリッチ DNAおよび少なくとも一つのキュブレドキシン ペプチドを共投与することを含む。係る治療は、本発明の少なくとも一つの単離されたCpGリッチ ポリヌクレオチドを投与することによって実施できる。本発明の組成物で治療によって予防または治療しえる癌には、限定されることなく、メラノーマ、乳房癌、膵臓癌、グリア芽細胞腫、星細胞腫、肺癌、結腸直腸癌、首および頭部癌（neck and head）、膀胱癌、前立腺癌、皮膚癌、および子宮頸癌が含まれる。他の態様において、患者は、AIDS、マラリア、不適切な血管形成に罹患する、または一般的な集団よりも癌を発生するリスクが高い。幾つかの態様において、前記患者はヒトであってもよい。他の態様において、前記患者はヒトではない。

10

【0136】

緑膿菌からのCpGリッチ DNAおよび少なくとも一つのキュブレドキシン ペプチドを含んでいる組成物を、当業者に周知の多くの経路および多くの措置（regimens）によって前記患者に投与できる。特定の態様において、緑膿菌からのCpGリッチ DNAおよびキュブレドキシン ペプチドは、静脈内に、筋肉内に、皮下に、局所的に、口腔に、または吸入によって投与される。前記組成物は、ポリヌクレオチドおよびポリペプチドを患者に送達する任意の手段によって患者に投与されてもよい。幾つかの態様において、患者は癌に罹患しており、前記組成物はポリヌクレオチド および ポリペプチドを腫瘍の部位に送達する様式で投与される。特定の態様において、緑膿菌からのCpGリッチ DNAおよびキュブレドキシン ペプチドは、静脈内に投与される。

20

【0137】

幾つかの態様において、本発明の方法は、患者に一単位用量のキュブレドキシン ペプチドおよび一単位用量の緑膿菌のCpGリッチ DNAを含む少なくとも一つの組成物を投与することを含む。

【0138】

他の態様において、前記方法は、患者にキュブレドキシンペプチドを含んでいる少なくとも一つの組成物の一単位用量および緑膿菌からのCpGリッチ DNAを含んでいる少なくとも一つの組成物の一単位用量を共投与することを備えてもよく、いずれかの順序で、他のものを投与後におよそ同時又はおよそ所与の時間内（例えば、他の薬の投与後の約一分間～約60分間または他の薬の投与後の約1時間～約12時間）に投与される。

30

【0139】

他の態様において、前記方法は、患者にキュブレドキシンペプチドを含んでいる少なくとも一つの組成物の一単位用量、緑膿菌からのCpGリッチ DNAを含んでいる少なくとも一つの組成物の一単位用量および別の予防薬または治療薬を含んでいる組成物の一単位用量を共投与することを備えてもよく、いずれかの順序で、他のものを投与後におよそ同時又はおよそ所与の時間内（例えば、他の薬の投与後の約一分間～約60分間または他の薬の投与後の約1時間～約12時間）に投与される。追加的な治療薬は、一般に患者が患っているコンディションまたは治療の副作用を治療するために使用される多くのもののうち一または二以上であってもよい。このような治療薬（therapeutic drugs）は、癌、AIDS、マラリア、不適切な血管形成、炎症性の腸疾患、ウイルス性疾患、心血管疾患、末梢性の脈管性疾患（peripheral vascular diseases）、中枢神経系の障害、中枢神経系の変性（degeneration of the central nervous system）およびアルツハイマー病を治療するため及び癌を予防するために使用されるものが含まれるが、これらに限定されない。このような治療薬の例は、米国特許出願第10/047,710、（2002年1月15日出願）（現在、米国特許第7,084,105号）および 米国特許出願第10/720,603号、（2003年11月11日出願）；米国特許出願第11/244,105号、（2005年10月6日出願）、米国特許出願第11/488,695号、（2006年7

40

50

月19日出願)；米国特許出願第11/436,592号，(2006年5月19日出願)；米国特許出願第11/488,693号，(2006年7月19日出願)；米国特許出願第11/436,590号(2006年5月19日出願)；米国特許出願第11/436,591号，(2006年5月19日出願)；米国仮出願第60/843,388号，(2006年9月11日出願)；および米国仮出願第60/844,358号，(2006年9月14日出願)〔これらの文献の各々は本明細書中に参照によって援用される〕に提供される。さらに、所望の治療薬は、Thomson Physician's Desk Reference (Thomson Healthcare, Stamford CT, 2006), および通常の当業者に周知である他の文献に見つけられる。

#### 【0140】

癌を治療するための薬物には、塩酸メクロレタミン，シクロホスファミド，クロランブシル，メルファラン，イホスファミド，ブスルファン，カルムスチン，ロムスチン，セムスチン，ストレプトゾシン，チオテパ，ダカルバジン，メトトレキセート，チオグアニン，メルカプトプリン，フルダラビン (fludarabine)，ペントスタチン (pentastatin)，クラドリビン (cladribin)，シタラビン，フルオロウラシル，塩酸ドキシソルピシン，ダウノルピシン，イダルピシン，硫酸プレオマイシン，マイトマイシンC，アクチノマイシンD，サフラシン (safracins)，サフラマイシン (saframycins)，キノカルシン (quinocarcins)，ディスコデルモライド (discodermolides)，ピンクリスチン，ピンブラスチン，酒石酸ビノレルビン (vinorelbine tartrate)，エトボシド，リン酸エトボシド，テニボシド，パクリタキセル，タモキシフェン，エストラムスチン，リン酸エストラムスチンナトリウム，フルタミド，ブセレリン，ロイプロリド，プテリジン，ダイネース (diynes)，レバミゾール，アフラコン (aflacon)，インターフェロン，インターロイキン，アルデスロイキン，フィルグラスチム，サルグラモスチム，リツキシマブ，BCG，トレチノイン，塩酸イリノテカン，ベタメゾン (betamethosone)，塩酸ゲムシタピン，アルトレタミン，およびトポテカ (topotecan) 並びにその任意のアナログまたは誘導体が含まれるが、これらに限定されない。

#### 【0141】

これらのクラスの好適なメンバーには、パクリタキセル，シスプラチン，カルボプラチン，ドキシソルピシン，カルミノマイシン，ダウノルピシン，アミノプテリン，メトトレキセート，メトプテリン，マイトマイシン C，エクテナサイジン743，またはポフィロマイシン (pofiromycin)，5-フルオロウラシル，6-メルカプトプリン，ゲムシタピン，シトシンアラビノシド，ポドフィロトキシンまたはポドフィロトキシン誘導体、例えば、エトボシド，リン酸エトボシドまたはテニボシド，メルファラン，ピンブラスチン，ピンクリスチン，リュージン (leurosidine)，ピンデシンおよびリュージン (leurosine) が含まれるが、これらに限定されない。

#### 【0142】

癌を治療するための薬物には、以下のものが含まれる：次の文献に記載のエポチロン (epothilone) 誘導体、独国特許第4138042.8；WO97/19086，WO98/22461，WO98/25929，WO98/38192，WO99/01124，WO99/02224，WO99/02514，WO99/03848，WO99/07692，WO99/27890，WO99/28324，WO99/43653，WO99/54330，WO99/54318，WO99/54319，WO99/65913，WO99/67252，WO99/67253およびWO00/00485；WO99/24416(米国特許第6,040,321号をも参照されたい)に記載のサイクリン依存性キナーゼインヒビター；およびWO97/30992およびWO98/54966に記載のプレニル-タンパク質トランスフェラーゼインヒビター；および米国特許第6,011,029号に包括的かつ具体的に記載されている薬剤〔米国特許を、任意のARモジュレーター，ERモジュレーターなどのNHRモジュレーター(本発明のものを含むが、これらに限定されない)をLHRHモジュレーターと又は外科的な性腺摘除と共に、特に癌治療において実施することができる化合物〕などである。

#### 【0143】

HIV 感染を治療する薬物には、逆転写酵素インヒビター：AZT (ジドブジン [レトロビル])，ddC (ザルシタピン [ハイビッド])，ジデオキシイノシン，d4T (スタブジン [ゼリット])，および3TC (ラミブジン [エピビル])，非ヌクレオシドの逆転写酵素インヒビター (NNRTIS)：デラビルジン (レスクリプター) およびネビラピン (ピラミューン)，プロ

テアーゼインヒビター：リトナビル（ノービア）、ロピナビルおよびリトナビルの組み合わせ（カレトラ）、サキナビル（インビラーゼ）、硫酸インジナビル（クリキシバン）、アンプレナビル（アジェネラーゼ）、およびネルフィナビル（ピラセプト）が含まれるが、これらに限定されない。現在、高活性抗レトロウイルス療法（HAART）と称されるいくつかの薬物の組み合わせは、HIVを有する人々を治療するために使用される。

【0144】

マラリアを治療する薬物には、プログアニル、クロルプログアニル、トリメトプリム、クロロキン、メフロキン、ルメファントリン、アトバコン、ピリメタミン-スルファドキシシン、ピリメタミン-ダブソン、ハロファントリン、キニーネ、キニジン、アモジアキン、アモピロキン、スルホンアミド、アルテミシニン、アルテフレノ、アルテメテル、アルテスナート、プリマキン、ピロナリジン、プログアニル、クロロキン、メフロキン、ピリメタミン-スルファドキシシン、ピリメタミン-ダブソン、ハロファントリン、キニーネ、プログアニル、クロロキン、メフロキン、1,16-ヘキサデカメチレンbis(N-メチルピロリジニウム)ジプロミド、及びその組み合わせが含まれるが、これらに限定されない。

10

【0145】

炎症性の腸疾患（inflammatory bowel disease）を治療する薬物には、アミノサリチル酸（aminosalicylates）、例えば、スルファサラジン（Azulfidine（登録商標））、オルサラジン（Dipentum（登録商標））、メサラミン（Asacol（登録商標） Pentasa（登録商標））、およびバルサラジド（Colazal（登録商標））；コルチコステロイド、例えば、プレドニゾン、Medrol（登録商標）、メチルプレドニゾロン、ヒドロコルチゾン、ブデソニド（Entocort EC）；免疫調節薬（immunomodulators）、例えば、アザチオプリン（Imuran（登録商標））、6-メルカプトプリン（6-MP, Purinethol（登録商標））およびシクロスポリン A（Sandimmune（登録商標）、Neoral（登録商標））；抗生物質、例えば、メトロニダゾール（Flagyl（登録商標））およびシプロフロキサシン（Cipro（登録商標））；生物学的なセラピー、例えば、インフリキシマブ（Remicade（登録商標））；および種々のセラピー、例えば、タクロリムス（FK506）およびミコフェノレート・モフェチルが含まれるが、これらに限定されない。

20

【0146】

HIV 感染を治療する薬物には、逆転写酵素インヒビター：AZT（ジドブジン [レトロビル（登録商標）]）、ddC（ザルシタピン [ハイビッド（登録商標）]）、ジデオキシイノシン（d4T（スタブジン [ゼリット（登録商標）]）、および3TC（ラミブジン [エビビル（登録商標）]）、非ヌクレオシドの逆転写酵素インヒビター（NNRTIS）：デラビルジン（レスクリプター（登録商標））およびネビラピン（ピラミューン（登録商標））、プロテアーゼインヒビター：リトナビル（ノービア（登録商標））、ロピナビルおよびリトナビルの組み合わせ（カレトラ（登録商標））、サキナビル（インビラーゼ（登録商標））、硫酸インジナビル（クリキシバン（登録商標））、アンプレナビル（アジェネラーゼ（登録商標））、およびネルフィナビル（ピラセプト（登録商標））が含まれるが、これらに限定されない。

30

【0147】

ウイルス性疾患を治療する薬物には、アシクロビル、水痘帯状疱疹（varicella zoster）の免疫グロブリン（VZIG（登録商標））、ペグインターフェロン、リバビリン、アシクロビル（Zovirax（登録商標））、パラシクロビル（Valtrex（登録商標））、ファミシクロビル（Famvir（登録商標））、アマンタジン、リマンタジン、ザナミビル、オセルタミビル、およびアルファインターフェロンが含まれるが、これらに限定されない。

40

【0148】

心臓血管障害を治療する薬物には、抗凝固剤、抗血小板剤、血栓溶解剤、アドレナリン作動性ブロッカー、アドレナリン作動性刺激因子、アルファ/ベータアドレナリン作動性ブロッカー、アンジオテンシン変換酵素（ACE）インヒビター、アンジオテンシン変換酵素（ACE）インヒビターとカルシウムチャンネルブロッカー、アンジオテンシン変換酵素（ACE）インヒビターと利尿薬、アンギオテンシンII レセプター アンタゴニスト、カルシウム

50

チャンネルブロッカー，利尿薬（カルボニックアンヒドラーゼ インヒビター，ループ 利尿薬，カリウム保持性の利尿薬，チアジド系化合物 および 関連する利尿薬を含む），血管拡張因子，血管収縮因子（vasopressors），などが含まれるが、これらに限定されない。

【0149】

末梢血管疾患を治療する薬物には、ペントキシフィリン（Trental（登録商標）），経口のメチルキサンチン誘導体，およびシロスタゾール（Pletal（登録商標）），ホスホジエステラーゼ III インヒビター；抗血小板/抗血栓性の治療薬、例えば、アスピリン；抗凝固剤、例えば、ヘパリンおよびワルファリン（登録商標）（Coumadin（登録商標））；コレステロール低下薬、例えば、ナイアシン，スタチン，フィブラート（fibrates），lopid（登録商標）錠（ゲムフィプロジル；Parke-Davis）；trikor 錠（fenofibrate；Abbott）胆汁酸金属イオン封鎖剤（bile acid sequestrants），colestid（登録商標）錠（微粉化塩酸コレステロール；ファルマシアおよびアップジョン）；welchol（登録商標）錠（塩酸コレセベラム；三共）；カルシウムチャンネル ブロッカー；ビタミンおよび食事のサプリメント、例えば、葉酸塩，B-6，B-12，L-アルギニンおよび  $\omega$ -3 脂肪酸；およびHMG-COA レダクターゼ インヒビター、例えば、advicor（登録商標）錠（Niacin/Lovastatin；Kos）；al tocor（登録商標）延長放出錠（lovastatin；Andriyx labs）；lescol（登録商標）カプセル（fluvastatin ナトリウム；ノバルティス & Reliant）；lipitor（登録商標）錠（atorvastatin；Parke-DavisおよびPfizer）；mevacor（登録商標）錠（lovastatin；Merck）；pravachol（登録商標）錠（プラバスタチン ナトリウム；Bristol-Myers Squibb）pravigard（登録商標）PAC 錠（緩衝アスピリンおよびプラバスタチン ナトリウム；Bristol-Myers Squibb）；zocor（登録商標）錠（シンバスタチン；Merck）；ニコチン酸剤、例えば、advicor（登録商標）錠（Niacin/Lovastatin；Kos（HMG-COA レダクターゼ インヒビターとしてリストされるもの））；niaspan（登録商標）（niacin；Kos）；および種々の剤、例えば、zetia（登録商標）錠（ezetimibe；Merck/Schering Plough）が含まれるが、これらに限定されない。

【0150】

中枢神経系の障害を治療する薬物には、精神治療薬（psychotherapeutic agents）、例えば、多様なベンゾジアゼピン製剤および併用剤，抗不安剤，抗うつ薬（モノアミンオキシダーゼ インヒビター（MAOI），選択的なセロトニン再取り込み阻害剤（SSRIs），三環系抗うつ薬を含む），抗躁病剤（antimanic agents），抗パニック剤（antipanic agents），抗精神病剤，精神刺激剤，および強迫性障害管理剤（obsessive-compulsive disorder management agents）；片頭痛製剤、例えば、ベータ アドレナリン作動性ブロッキング剤，イソメテプテンおよびセロトニン レセプター アゴニスト，同様に、種々の片頭痛製剤、depakote（登録商標）錠（Divalproex ナトリウム；Abbott）およびexcedrin（登録商標）片頭痛錠（アセトアミノフェン；BMS Products）における活性な構成成分を含む；鎮静薬および催眠薬；抗痙攣薬；およびピモジド（登録商標）が含まれるが、これらに限定されない。パーキンソン病を治療する薬物には、抗コリン作用薬，カテコール-o-メチル基転移酵素インヒビター，ドーパミン剤（dopamine agents）およびモノアミンオキシダーゼ（MAO）インヒビターが含まれるが、これらに限定されない。

【0151】

中枢神経系（CNS）の変性障害を治療する薬物には次のものが含まれるが、これらに限定されない： 多発性硬化症を治療する薬物には、avonex（登録商標）（インターフェロンベータ-1a；Biogen Neurology）における活性な構成成分；Betaseron（登録商標）のSC注射用剤（インターフェロンベータ-1bの修飾型；Berlex）；copaxone（登録商標）の注射用剤（グラチラマー・アセテート；Teva Neuroscience）；depo-medrol（登録商標）の注射可能な懸濁液（酢酸メチルプレドニゾロン；Pharmacia & Upjohn）；Novantrone（登録商標）の濃縮注射用剤（塩酸ミトキサントロンとして供給されるミトキサントロン；Serono）；Orapred（登録商標）経口溶液（プレドニゾロン リン酸ナトリウムの経口溶液；Ascen t）；および Rebif（登録商標）注射（インターフェロンベータ-1a；Pfizer & Serono）が含まれるが、これらに限定されない。ハンチントン舞蹈病を治療する薬物には、トランキ

ライザー、例えば、クロナゼパム (Klonopin (登録商標)); 抗精神病薬、例えば、ハロペリドール (Haldol (登録商標)) および クロザピン (Clozaril (登録商標)); フルオキセチン (Prozac (登録商標), Sarafem (登録商標)), セルトラリン (Zoloft (登録商標)), ノルトリプチリン (Aventyl (登録商標), Pamelor (登録商標)), および リチウム (Eskalith (登録商標), Lithobid (登録商標))が含まれるが、これらに限定されない。

【0152】

アルツハイマー病を治療する薬物には、aricept (登録商標) 錠(塩酸Donepezil; エーザイまたはPfizer); exelon (登録商標) カプセル [rivastigmine (酒石酸水素として); Novartis]; exelon (登録商標) 経口溶液 (酒石酸rivastigmine; Novartis); reminyl (登録商標) 経口溶液 (臭化水素酸ガランタミン; Janssen)またはreminyl (登録商標) 錠(臭化水素酸ガランタミン; Janssen)が含まれるが、これらに限定されない。

10

【0153】

所望の化学防御薬 (Chemopreventive drugs) には、タモキシフェン, アロマターゼ インヒビター、例えば、レトロゾールおよびアナストロゾール (Arimidex (登録商標)), レチノイド、例えば、N-[4-ヒドロキシフェニル] レチンアミド (4-HPR, フェンレチニド), 非ステロイド性抗炎症薬 (NSAIDs)、例えば、アスピリンおよびスリンダク, セレコキシブ (COX-2 インヒビター), defluoromethylornithing (DFMO), ウルソデオキシコール酸, 3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリル 補酵素 A レダクターゼ インヒビター, EK1-785 (EGFR インヒビター), ベパシズマブ (VEGF-レセプターに対する抗体), セツキシマブ (EGFRに対する抗体), レチノール、例えば、ビタミン A, ベータカロチン, 13-シスレチノイン酸, イソトレチノインおよびレチニル・パルミテート (retinyl palmitate), -トコフェロール, インターフェロン, 腫瘍崩壊性のアデノウイルス dl1520 (ONYX-015), ゲフィチニブ, エトレチナート, フィナスチリド, インドール-3-カルビノール, レスベラトロール, クロロゲン酸, ラロキシフェン, およびオルチプラズが含まれるが、これらに限定されない。

20

【0154】

本発明の方法は、さらに本発明の細胞を投与する方法を含む。係る方法には、患者 (特に癌のコンディションに罹患している患者) を治療するための方法、および患者における癌を診断するための方法が含まれる。幾つかの態様において、癌を罹患している患者は、癌細胞と接触させた場合にアズリンを発現している、または癌細胞と接触させた場合に治療上または細胞毒性の標的タンパク質を発現している細胞の何れかを投与することによって治療されてもよい。他の態様において、前記患者は、メラノーマ, 乳房癌, 膵臓癌, グリア芽細胞腫, 星細胞腫, 肺癌, 結腸直腸癌, 首および頭部癌 (neck and head), 膀胱癌, 前立腺癌, 皮膚癌, および子宮頸癌などの癌に罹患しているが、これらの癌に限定されない。他の態様において、前記方法は、患者における癌を癌細胞により接触された場合に診断上のタンパク質を発現している細胞を投与すること、および次に血流またはその発現の部位のいずれかで診断上のタンパク質を検出することによって診断する。

30

【0155】

本発明の細胞は、適切な任意の手段で患者に投与されてもよく、これには静脈内注射, 筋肉内注射, 皮下注射, 吸入, 局所投与, 坐剤, 硝子体注射および経口投与が含まれるが、これらに限定されない。特定の態様において、前記細胞は、静脈内に投与される。

40

【0156】

CpGリッチのDNAまたは細胞を含んでいる薬学的組成物

本発明の緑膿菌からのCpGリッチ DNAまたは細胞を含んでいる薬学的組成物は、従来の混合、溶解、顆粒化、ドラジェー製造 (dragee-making)、乳化、封入 (encapsulating)、エントラッピング (entrapping)、または凍結乾燥処理などの任意の適切な従来の様式にしたがって製造することができる。実質的に純粋または医薬品グレードの本発明の緑膿菌からのCpGリッチ DNAまたは細胞は、当該技術分野において周知の薬学的に認容される担体と容易に組み合わせることができる。係る担体によって、錠剤, ピル, ドラジェー, カ

50

プセル剤、液体、ゲル、シロップ、スラリー、懸濁液などとして製剤化する調製が可能となる。適切な担体または賦形剤には、充填剤およびセルロース調製物なども含まれてもよい。他の賦形剤には、香味剤 (flavoring agents)、発色剤、粘着防止剤 (detackifiers)、増粘剤 (thickeners)、および他の認容される添加物、アジュバント、または結合剤などが含まれてもよい。ある態様において、薬学的調製物 (pharmaceutical preparation) は、実質的に保存剤なしである。他の態様において、前記薬学的調製物は、少なくとも1つの保存剤を含有してもよい。薬学的剤形 (pharmaceutical dosage forms) の一般的な方法論は、Ansel等 [Ansel et al., *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems* (Lippencott Williams & Wilkins, Baltimore MD (1999))] に見つけられる。

【0157】

本発明の緑膿菌からのCpGリッチ DNAまたは細胞を含んでいる組成物は、注射(例えば、皮内、皮下、筋肉内、腹腔内など)による、吸入による、局所的投与による、坐剤による、経皮性パッチによる又は口による様式を含む様々な様式で投与しえる。薬物送達システム (drug delivery systems) の一般的な情報は、Ansel等(Id.)に見つけられる。幾つかの態様において、本発明の緑膿菌からのCpGリッチ DNAまたは細胞を含んでいる組成物は、とりわけ、皮下および静脈内注射のために製剤化し、直接的に注射可能剤 (injectibles) として使用できる。特に、注射可能な製剤は、化学防御薬治療に適切な患者を治療するために効果的に使用することができる。また、本発明の緑膿菌からのCpGリッチ DNAまたは細胞を含んでいる組成物は、任意に保護剤 (例えば、ポリプロピレングリコールまたは類似のコート剤) と混合した後に経口的に摂取できる。

【0158】

投与が注射によるもの場合、本発明の緑膿菌からのCpGリッチ DNAまたは細胞は、水溶液中に製剤化され、具体的には生理学的に適合する緩衝液 (例えば、ハックス液、リンゲル溶液、または生理食塩緩衝液 (physiological saline buffer) 中に製剤化しえる。前記溶液は、懸濁化剤、安定化剤および/または分散化剤などの製剤化の薬剤を含有してもよい。或いは、緑膿菌からのCpGリッチ DNAは、使用前に、滅菌したパイロジェンが存在しない水などの適切なビヒクルで構成するための粉末形態であってもよい。幾つかの態様において、前記薬学的組成物は、前記ポリヌクレオチドによって刺激される免疫応答を増強するために添加されるアジュバントまたは任意の他の物質を含まない。幾つかの態様において、前記薬学的組成物は、前記ポリヌクレオチドに対する免疫応答を阻害する物質を含む。

【0159】

投与が静脈内流体 (intravenous fluids) による場合、本発明の緑膿菌からのCpGリッチ DNAまたは細胞の投与に使用する静脈内流体は、クリスタロイド (crystalloids) またはコロイド (colloids) から構成されてもよい。本明細書中に使用されるクリスタロイドは、ミネラル塩または他の水溶性の分子の水溶液 (aqueous solutions) である。本明細書中に使用されるコロイドは、大きな不溶性の分子 (例えば、ゼラチン) を含む。静脈内流体は、無菌 (sterile) であってもよい。

【0160】

静脈内投与に使用しえるクリスタロイド流体には、表1に記載される通常の生理食塩水 (0.9%の濃度の塩化ナトリウム溶液)、リンゲル乳酸またはリンゲル溶液、および5%デキストロース水溶液 (時々、D5Wと称される) が含まれるが、これらに限定されない。

【0161】

【表 1】

表 1. 共通のクリスタロイド溶液 (Common Crystallloid Solutions)

の組成

溶液	他の名称	[Na <sup>+</sup> ]	[Cl <sup>-</sup> ]	[グルコース]
D5W	5%デキストロース	0	0	252
2/3 & 1/3	3.3%デキストロース/0.3%生理食塩水	51	51	168
半定位の生理食塩水 (Half-normal saline)	0.45% NaCl	77	77	0
通常の生理食塩水	0.9% NaCl	154	154	0
リンゲル乳酸 (Ringer's lactate) *	リンゲル溶液	130	109	0

\*リンゲル乳酸は、28 mmol/L 乳酸、4 mmol/L K<sup>+</sup>および 3 mmol/LCa<sup>2+</sup>も有する。

## 【0162】

投与が吸入によるものである場合、本発明の緑膿菌からのCpGリッチ DNAまたは細胞は、適切な噴霧剤（例えば、ジクロロジフルオロメタン、トリクロロフルオロメタン、二酸化炭素または他の適切なガス）を使用することによって、加圧パックからのエアロゾルスプレーまたはネブライザーの形態で送達しえる。加圧されたエアロゾルの場合、投与量単位（dosage unit）は、一定量を送達するためのバルブを提供することによって決定されてもよい。吸入器（inhaler）または注入器（insufflator）に使用するためのゼラチンなどのカプセルまたはカートリッジを、ポリヌクレオチドの粉末混合物および適切な粉末基剤（例えば、ラクトースまたはデンプン）を含有するよう製剤化しえる。

## 【0163】

投与が局所的投与によるものである場合、本発明の緑膿菌からのCpGリッチ DNAまたは細胞を、当該技術分野において周知の溶液剤、ゲル、軟膏、クリーム、ゼリー、懸濁剤などとして製剤化してもよい。幾つかの態様において、投与は経皮パッチ（transdermal patch）の手段による。投与が坐剤（例えば、直腸または膣）である場合、本発明の緑膿菌からのCpGリッチ DNAまたは細胞の組成物は、従来の坐剤基剤を含有している組成物に製剤化してもよい。

## 【0164】

投与が経口投与である場合、本発明の緑膿菌からのCpGリッチ DNAまたは細胞は、本発明の緑膿菌からのCpGリッチ DNAまたは細胞に当該技術分野において周知の薬学的に許容

10

20

30

40

50

される担体を組み合わせることによって容易に製剤化できる。固形担体（例えば、マンニトール、ラクトース、マグネシウムステアレート、など）を用いてもよい；係る担体によって、本発明の緑膿菌からのCpGリッチ DNAまたは細胞を、治療される対象による経口摂取のための、錠剤、丸剤、ドラジェ剤、カプセル剤、液剤、ゲル剤、シロップ剤、スラリー剤、懸濁剤などとして製剤化することが可能となる。経口の固形製剤（例えば、粉剤、カプセル、および錠剤）に関して、適切な賦形剤には、充填剤（例えば、糖、セルロース調製物、顆粒化剤、および結合剤）が含まれる。

#### 【0165】

当該技術において周知の他の便利な担体には、多価担体、例えば、細菌性のカプセル性のポリサッカライド、デキストラン、または遺伝的に操作されたベクターも含まれる。加えて、緑膿菌からのCpGリッチ DNAを含む徐放性製剤によって、長時間にわたる前記CpGリッチ DNAの放出が許容される；持続性放出製剤無しでは、緑膿菌からのCpGリッチ DNAは、対象の系から排出される可能性がある、および/または治療効果を惹起する又は増強する前にプロテアーゼおよび単純な加水分解などによって分解される可能性がある。

10

#### 【0166】

様々な態様において、前記薬学的組成物は、担体および賦形剤（緩衝剤、炭水化物、マンニトール、タンパク質、ポリペプチドまたはアミノ酸、例えば、グリシン、抗酸化剤、静菌剤、キレート剤、懸濁剤、増粘剤および/または保存剤を含むが、これらに限定されない）、水、油、生理食塩水、水性のデキストロースおよびグリセロール溶液、生理的なコンディションに近づけるために必要とされる他の薬学的に許容される補助的な物質（例えば、緩衝作用剤、張性調整剤、湿潤剤など）を含む。当業者に既知の適切な任意の担体を本発明の組成物を投与するために使用できるが、担体のタイプは投与のモード（mode）に依存して変化するだろうことが認識されている。化合物を、周知の技術を用いてリポソーム内に被包（encapsulated）させてもよい。生分解性マイクロスフェアを、本発明の薬学的組成物のための担体として用いてもよい。適切な生分解性マイクロスフェアは、米国特許第4,897,268；5,075,109；5,928,647；5,811,128；5,820,883；5,853,763；5,814,344および5,942,252号などに開示される。

20

#### 【0167】

CpGリッチ DNAを含んでいる薬学的組成物は、従来の周知の滅菌技術によって滅菌されてもよい又は濾過滅菌されてもよい。生じる水溶液は、使用のためにパックされるか、又は無菌条件下で濾過して凍結乾燥されてもよく、凍結乾燥された調製物は投与の前に滅菌水溶液と混合されてもよい。

30

#### 【0168】

CpGリッチ DNAまたは細胞の投与

本発明の緑膿菌からのCpGリッチ DNAまたは細胞を、薬学的組成物として製剤化し、口、頬、吸入、舌下、直腸、膣、尿道、鼻、局所、経皮（percutaneous）、即ち、経皮（transdermal）または非経口〔静脈内、筋肉内、皮下および冠内（intracoronary）を含む〕または硝子体投与などの任意の適切な経路によって投与することができる。その薬学的製剤（pharmaceutical formulation）は、その意図する目的を達成するために効果的な任意の量で投与することができる。より具体的には、前記組成物は、予防上または治療上の効果的な量で投与される。特定の態様において、予防上または治療上の効果的な量は、一般的に約0.01~20mg/日/kg体重である。

40

#### 【0169】

本発明の緑膿菌からのCpGリッチ DNAまたは細胞を含んでいる化合物は、単独または他の活性剤（active agents）と組み合わせて、コンディション（具体的には癌）を治療するため、および癌を予防するため有用である。適切な投与量は、使用する本発明の緑膿菌からのCpGリッチ DNAまたは細胞、宿主、投与のモード、およびコンディションの性質および重症度などに応じて変化するだろう。しかしながら、一般に、ヒトで満足な結果は、約0.01-20 mg/kg体重の一日投与量（daily dosages）で得られることが指摘された。ヒトで指摘された1日投与量は、本発明の緑膿菌からのCpGリッチ DNAまたは細胞の化合物の

50

約0.7mg～約1400mgの範囲であり、一日用量（daily doses）、週用量（weekly doses）、月用量（monthly doses）、および/または連続的な用量などで便利に投与される。一日用量は、1～12回/日の別々の投与量であってもよい。代わりに、用量は、隔日、三日毎、四日毎、五日毎、六日毎、週毎、及び31日以上まで同様に日を増加させて投与することができる。代わりに、投薬（dosing）には、パッチ、i.v.投与などを用いる連続的なものであってもよい。

【0170】

正確な製剤化、投与の経路、及び投与量は、患者のコンディションに応じて主治医によって決定される。投与量およびインターバルを個々に調整して、予防または治療効果を維持するために十分である緑膿菌からのCpGリッチ DNAおよびキュブレドキシペプチドの血漿レベルを提供することができる。一般に、所望の緑膿菌からのCpGリッチ DNAは、意図する投与経路および標準的な薬務（pharmaceutical practice）に関して選択される薬学的な担体との混合物として投与される。本発明の細胞の場合において、用量およびインターバルを個々に調整して、予防または治療の効果または診断上の存在を維持するために十分な癌細胞の部位での標的タンパク質またはアズリンのレベルを提供することができる。

10

【0171】

CpGリッチのDNAまたは細胞を含んでいるキット

一側面において、本発明は、パッケージまたは容器に一または二以上の次のものを含んでいる措置（regimens）またはキットを提供する：

20

- (1) 緑膿菌からのCpGリッチ DNAを含んでいる薬学的組成物；
- (2) 少なくとも一つのキュブレドキシペプチドを含んでいる薬学的組成物；
- (3) 追加の予防的または治療的な薬物；および
- (4) 生物学的に活性な組成物を患者に投与する装置（例えば、シリンジ、ネブライザーなど）。

【0172】

別の側面において、本発明は、パッケージまたは容器に一または二以上の次のものを含んでいる措置またはキットを提供する：

- (1) 本発明の細胞；および
- (2) その細胞を患者に投与する装置。

30

【0173】

キットが供給される場合、前記組成物の異なる成分を別々の容器にパッケージし（適切な場合）、使用前に直ちに混合してもよい。成分のこのようなパッケージングによって、活性成分の機能を失うことなく、長期間の保存が別々に許容される。

【0174】

キットに含まれる試薬を、異なる成分の寿命が長くなり、容器の材料によって吸収させられない又は変化させられない任意の種類に供給することができる。例えば、封止されたガラスアンプルは、凍結乾燥されたCpGリッチ DNAを、又は中性で非反応性のガス（例えば、窒素）でパッケージされている緩衝剤を含有してもよい。アンプルは、任意の適切な材料からなるものでよく、例えば、ガラス、有機物ポリマー、例えば、ポリカーボネート、ポリスチレンなど、セラミック、金属、または類似する試薬を保持するために典型的に用いられる他の材料である。適切な容器の他の例には、アンプルなどの類似する物質から製造されえる単純なボトルおよびアルミニウムまたは合金などのホイル裏打ちされた内装を備えるエンベロープが含まれる。他の容器には、検査チューブ、バイアル、フラスコ、ボトル、シリンジなどが含まれる。容器は、無菌のアクセスポートを有してもよく、例えば、皮下注射針で突き刺すことが可能なストッパーを有しているボトルである。他の容器は、除去する際に成分が混合されることを許容する容易に除去可能な膜によって分離された2つの区画を有してもよい。除去可能な膜は、ガラス、プラスチック、ゴムなどであってもよい。

40

【0175】

50

キットには、説明用物品 (instructional materials) が供給されていてもよい。説明書は、紙または他の物質に印刷されてもよく及び / 又はフロッピー (登録商標) ディスク、CD-ROM、DVD-ROM、Zipディスク、ビデオテープ、録音テープ、フラッシュメモリー装置などの電子的に読み込み可能な媒体として提供されてもよい。詳細な説明書は、キットに物理的に付属していなくてもよい; 代わりに、使用者がキットの製造者またはディストリビューターによって特定されたインターネットウェブサイトに接続してもよい又は電子メールとして供給されてもよい。

【 0 1 7 6 】

本発明の更に完全なる理解は、以下の特定の例を参照することによって得ることができる。例は、説明の目的でのみ記載され、本発明の範囲を限定するものではない。形態における変化および均等物での置換は、状況 (circumstances) が手段 (expedient) を示唆 (suggest) する又は与える (render) ものとして企図される。特定の用語が本明細書中に用いられるが、係る用語は、説明の意味が企図され、限定することを目的としていない。本願の明細書等に記載した本発明の修飾およびバリエーションを、発明の精神および範囲から逸脱することなくすることができる。

10

【 0 1 7 7 】

[ 例 ]

例 1: 緑膿菌は、MCF-7細胞の存在下でアズリンを培地に放出する

緑膿菌からのアズリンは、ペリプラスムタンパク質であるが、成長の遅い段階で成長培地に分泌されることが知られている。Zaborina等 [Zaborina et al., Microbiology 146:25 21-2530 (2000)]。その細胞外放出は、高細胞密度でクオラムセンシング (quorum sensing) に依存的であり、GacAまたは二つの小さいRNA産物RsmY および RsmZによって調整される。Kay等 [Kay et al., J. Bacteriol. 188:6026-6033 (2006)]。実験を行なって、癌細胞に接触した際に緑膿菌がアズリンを細胞外培地に放出するかどうかを決定した。

20

【 0 1 7 8 】

嚢胞性線維症患者からの緑膿菌のムコイド分離株8821及びその自然発生的 (spontaneous) な非ムコイド (非アルギナート分泌) 派生体 8822を、以前にDarzins など (J. Bacteriol. 161:249-257 (1985)) により記載されたとおり使用した。グルコース最少培地 (ヒスチジンを添加) 中で成長させた場合に、系統 8822は、アズリンを成長の4時間後中期対数増殖期に成長培地に分泌した。アズリンは、遅滞または成長の約2時間の早期対数期 (the lag or very early log phase of about 2 hours of growth) の間の成長培地で認められなかった。ムコイド株8821は、後期対数期または早期定常期でさえもアズリン分泌が欠乏していた。ムコイド株は、アルギン酸エキソポリサッカライドのおびただしい分泌のために細胞外のタンパク質分泌が欠乏することが知られている。OhmanおよびChakrabarty [Ohman and Chakrabarty, Infect. Immun. 37:662-669 (1982); Woods et al., J. Infect. Dis. 163:143-149 (1991)]。

30

【 0 1 7 9 】

ヒト乳癌細胞株 MCF-7の $1.6 \times 10^4 \sim 4 \times 10^5$ 細胞を、8821および8822細胞 (光学密度は660 nmで約0.3) に加え、数時間成長させ、細胞の遠心分離および0.22  $\mu\text{m}$ のメンブランフィルターをとおした成長培地の濾過の後にアズリンのレベルを細胞外成長培地において抗-アズリン抗体を用いるウエスタンブロッティングで測定した。Punj等 [Punj et al., Oncogene 23:2367-2378 (2004)]。MCF-7細胞は存在しないが、成長培地の均等量を有するコントロールが使用された。

40

【 0 1 8 0 】

MCF-7細胞をムコイド系統8821または非ムコイド系統8822のいずれかに加えることによって、シュードモナス属細胞の成長速度に非常に小さな効果が示された (図 1A, a)。しかしながら、極めて興味深いことに、MCF-7細胞への曝露によって、有意な量のアズリン分泌が細胞外の成長培地へ20 min以内に引き起こされた (図 1A, b); ウエスタンブロッティングでの決定 (図 1A, c)、しかし、これは系統8822からのみ認められた。アズリンの分泌は、MCF-7細胞の非存在下 (図 1A, b および c) で細胞外のタンパク質分泌が

50

欠乏していることが知られているムコイド 系統 8821で一時間または数時間まで認められなかった。ウエスタンブロッティングでのアズリン分泌の定量を、標準曲線を用いて行った(図 1B)。類似する結果は、別のヒト癌細胞株メラノーマ Mel-2で得られた(データ示さず)。MCF-7 および Mel-2の両方の場合において、アズリンの分泌は、癌細胞への曝露の20~30 min以内に観察されたが、癌細胞の非存在下で分泌されず、系統 8822がヒト癌細胞の存在をセンシングする能力があり、これらの存在に反応してアズリンの分泌を開始することが強く示された。

#### 【0181】

類似する分泌(但し、40 min程度遅延する)が、不死化した正常な乳房上皮細胞であるMCF-10A 細胞の存在下で認められた。また、アズリン分泌の程度は、癌細胞の濃度に依存的である： $1 \times 10^8$ /ml 8822 細胞が $1.6 \times 10^4$ /ml MCF-7 細胞(< 0.1 nM アズリン)または $8 \times 10^4$  細胞/ml (0.7 nM アズリン)に暴露される場合よりも $2 \times 10^6$ /ml 癌細胞 (1.4 nM アズリン)に暴露される場合に高レベルのアズリンが成長培地に認められ、MCF-7 細胞への曝露におけるアズリン分泌の用量依存性を示している。

10

#### 【0182】

ムコイド 系統 8821がアズリン産生を欠いていないことを保証するために、アズリンの細胞内レベルを系統8821 および 8822 (図 1C)の両方で、細胞溶解物を作ること及びアズリンを溶解物のタンパク質の固定量(50  $\mu$ g)を用いSDS-PAGEで分離することによって測定した。系統8821 および 8822の両方によって、細胞内(ペリプラスム)アズリンの存在が実証されたが、分泌は非ムコイド細胞からのみ観察された。標準曲線(図 1B)からのMCF-7 細胞の非存在下(コントロール)または存在下で成長させた系統 8822の細胞内および細胞外分画におけるアズリンの定量によって、約 6 ~8%の細胞内アズリンが60 minのインキュベーション期間に外部に放出されることが実証された。

20

#### 【0183】

例 2: MCF-7 細胞は、細胞溶解なしで緑膿菌からのアズリン放出を誘発する癌細胞の添加が緑膿菌に溶解を誘発し、アズリン および 他のタンパク質が成長培地に放出されるかどうかを決定するために、系統 8822に  $\beta$ -ガラクトシダーゼをコード化している機能的な lacZ遺伝子を保持する宿主範囲が広いプラスミドpQF47を導入した。成長培地におけるアズリン および  $\beta$ -ガラクトシダーゼ(LacZ)の放出を、MCF-7 細胞の非存在下および存在下で60 minの期間で評価した。

30

#### 【0184】

MCF-7 細胞の非存在下(コントロール)および存在下のいずれかで60 minのインキュベーション期間にLacZの細胞外の成長培地への測定可能な放出は存在しなかった(図 2A)。細胞溶解物の検査によって、癌細胞の非存在下または存在下のいずれでも細胞内LacZの存在が実証され(図 2A)、非常にわずかな細胞の溶解が示され、外部の成長培地への細胞内LacZの放出が非常にわずかであったことを示している。

#### 【0185】

しかしながら、成長培地におけるアズリン存在の検査によって、明らかにMCF-7 細胞の存在下でアズリンが分泌され検出されたが、その非存在下(図 2B)では非常にわずかなアズリンが検出されることが示され、細胞からのアズリン分泌の誘導におけるMCF-7 細胞の役割を実証しているが、LacZ 放出では実証されなかった。系統 8822 単独およびpQF47 プラスミドを保持している系統 8822 (8822/pQF47) の両方における細胞内LacZの見積りによって、予想どおり緑膿菌系統 8822が機能的な lacZ 遺伝子を欠いており、LacZ タンパク質を産生しないが、8822/pQF47が有意な量の細胞内LacZを産生したことが実証された(図 2C)。外部の培地におけるアズリンの存在が溶解によるものではないことは、通常タンパク質分泌を欠くムコイド 系統 8821がアズリン分泌も欠いているとの事実によって確認された(図 1A): 細胞の溶解によってアズリンがその成長培地に放出されるだろう。

40

#### 【0186】

MCF-7 細胞の濃縮され滅菌された成長培地を使用して、緑膿菌 系統 8822が癌細胞からの任意の拡散可能な代謝産物に反応するかどうか決定された。アズリンの分泌は係る条

50

件下で観察されず、アズリン分泌が接触依存的であり、分泌に関してエネルギー非依存性であることが実証された。このような様式の分泌は、癌細胞への曝露におけるアズリン分泌を他の様式のタンパク質分泌から区別する。Kostakioti等〔Kostakioti et al., J. Bacteriol.187:187:4306-4314 (2005)〕; Thanassi等〔Thanassi et al., Mol.Membr.Biol. 22:63-72 (2005)〕。

#### 【0187】

例 3: MCF-7 細胞は、大腸菌からのアズリンの放出を特異的に誘発する。アズリンは、緑膿菌におけるペリプラズムタンパク質である。緑膿菌のアズリン遺伝子が大腸菌 JM109で発現される場合、結果として生じるアズリンタンパク質は、ペリプラズムに見出され、大腸菌細胞のペリプラズム分画から精製された。Goto等〔Goto et al., Mol .Microbiol.47:549-559 (2003)〕。別の緑膿菌のペリプラズムタンパク質は、インビトロで電子伝達の際にアズリンのパートナーとして作用し、嫌気性条件下で成長させた大腸菌 JCB7120 細胞のペリプラズム分画から精製できるチトクロム  $c_{551}$ である (Id.)。

10

#### 【0188】

MCF-7 細胞の非存在下または存在下における緑膿菌および大腸菌系統の両方からのアズリンおよびチトクロム  $c_{551}$ の分泌が調査された。この調査によって、MCF-7 乳癌細胞への曝露が細菌外膜の破砕を許容して任意のペリプラズムタンパク質を放出するかどうか又はアズリンの分泌に特異性が存在するかどうか決定された。さらに、この調査によって、アズリン分泌が緑膿菌に特異的であるかどうか又は他の細菌 (例えば、大腸菌) から生じるかどうか決定された。

20

#### 【0189】

好気性成長の規定の条件下で緑膿菌 8822における細胞内または細胞外のチトクロム  $c_{551}$ のレベルは、低くすぎてウエスタンブロッティングで検出可能ではなかった。しかしながら、アズリンおよびチトクロム  $c_{551}$ の両方は、タンパク質を高発現した大腸菌細胞の抽出物において明らかに検出可能であった (図 3, A および B, 時間0\*)。緑膿菌と類似して、緑膿菌 *azu* 遺伝子を保持している大腸菌細胞をMCF-7 細胞に曝露することによって、アズリンの外部培地への有意な分泌が引き起こされ、これは癌細胞の存在下でのみ認められた (図. 3A)。しかしながら、興味深いことに、ペリプラズムのチトクロム $c_{551}$ を保持している大腸菌細胞がMCF-7 細胞に暴露された場合、非常に僅かなチトクロム  $c_{551}$ が外部の成長培地で検出され (図. 3B)、MCF-7 細胞への曝露によってアズリンを特異的に誘導するが、細胞内チトクロム $c_{551}$ が明らかに検出可能であっても大腸菌から分泌されるチトクロム $c_{551}$ は誘導しなかったことを示唆している (図. 3B)。

30

#### 【0190】

例 4: 緑膿菌または大腸菌からのアズリンの分泌は、エネルギー非依存性である。緑膿菌 8822または大腸菌JM109のいずれかからのアズリン分泌がエネルギーを必要とするかどうかを決定するために、細菌をプロトノフォアカルボニルシアニドクロロフェニルヒドラゾン (CCCP; protonophore carbonyl cyanide chlorophenylhydrazine)の存在下でMCF-7 癌細胞への曝露の前に二つの異なる濃度 (緑膿菌 8822に関して50 および 250  $\mu$ M; 大腸菌JM109に関して250  $\mu$ M)で1 hrインキュベーションした。CCCPは、酸化リン酸化の脱共役因子 (uncoupler) であり、使用された濃度で細菌の成長を阻害した (図 3E; 左パネル, 緑膿菌 8822; 右パネル, 大腸菌 JM109)。しかし、CCCPは緑膿菌 8822 (図 3C) または大腸菌 JM109 (図 3D)の何れかによるアズリン分泌に非常にわずかな効果を有しており、アズリン分泌のエネルギー独立性を示している。

40

#### 【0191】

例 5: MCF-7 細胞は、緑膿菌から15 kb DNAの放出を誘導した。細菌のDNAは、細胞の要求に応答し、I V型分泌系で接合 (conjugation) の間に放出または移行されることが知られている。CascalesおよびChristie〔Cascales and Christie, Nature Rev.Microbiol.1:137-149 (2003)〕。係る系において、タンパク質およびDNAの直接の伝達は、標的宿主細胞において細胞質から同様にドナー細菌のペリプラズムから生じえる。しかしながら、宿主細胞の存在または宿主細胞接触の依存性は、必須ではない。と

50

いうのも、宿主細胞の非存在下でI V型分泌系による成長培地へのタンパク質または染色体DNAの分泌も実証されているからである。Burns [Burns, *Curr.Opin.Microbiol.*2:25-29, 1999; Hamilton et al., *Mol.Microbiol.*55: 1704-1721 (2005)]。緑膿菌において、放出されたDNAは、嚢胞性線維症の患者の肺における感染の間またはバイオフィルムの形成の間の炎症誘発性のプロセスに寄与することが知られている。Delgado等 [Delgado et al., *Infect.Immun.*74: 2975-2984 (2006)]; Whitchurch等 [Whitchurch et al., *Science* 295:1487 (2002)]。しかしながら、特異的な CpGリッチ 染色体外DNAの放出は、報告されていない。

#### 【0192】

緑膿菌 系統 8822が成長培地にアズリンのみならずゲノムDNAも放出するかどうかを見出す取り組みにおいて、系統 8822の成長培地を非常にわずかなアズリンがMCF-7 細胞への曝露の非存在で認められる条件下で1または2 hr成長させた間に検査した。核タンパク質複合体の存在を検出するために、3容量のノルマルイソプロパノールを成長培地に添加し、-80°C で1 hrインキュベーションした。核タンパク質のペレットを遠心分離し、再蒸留水に再懸濁し、再蒸留水で溶出する前にQiagen (登録商標) DNA調製キット (Qiagen, Inc., Valencia, CA)を通過させた。0 h (実験の開始時)でDNAは検出されなかったが、約 15 kb サイズの特異的なバンドはMCF-7 細胞の非存在下または存在下の両方で1 および 2 hで検出された (図 4A)。

#### 【0193】

癌細胞の存在下でDNAの量は高く、アズリンの場合のような放出の増強を示唆しているが、アズリンと対照的にDNAは癌細胞の非存在下でさえも検出でき、それはおそらくPicoGreen (登録商標) (Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA)およびPCR反応を用いる検出の感度が非常に高いとの理由であろう。興味深いことに、他の有意なDNAバンドは認められず、このバンドは繰り返される実験条件下で高度に再現可能であり、ランダムな染色体のDNA消化の産物ではないことを示唆している。

#### 【0194】

例 6: 放出プロフィールは、15 kb DNAが染色体外であることを示唆するビルレンス関連遺伝子を保持しているゲノムアイランドは、緑膿菌においてよく知られている。Kiewitz 等 [Kiewitz et al., *Microbiology* 146: 2365-2373 (2000)]; He等 [He et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.* 101:2530-2535 (2004)]; Klockgether等 [Klockgether et al., *J.Bacteriol.*186:518-534 (2004)]; Kulasekara等 [Kulasekara et al., *J.Bacteriol.*188:4037-4050 (2006)]。また、生体異物に汚染した環境で選択的な成長の優位性を与える生分解性の遺伝子クラスターは、しばしばファージ遺伝子と関連するシュードモナス属の種における移動性の遺伝因子 (mobile genetic elements) としても知られる。van der Meer等 [van der Meer et al., *Arch.Microbiol.*175:79-85 (2001)]。活性酸素種の解毒に関与する遺伝子とともにG+C 含有量 63.7% および 54.9%の少なくとも二つの異なるDNAセグメントを有している単一のゲノムアイランド (PAGI-1) が、緑膿菌の幾つかの臨床分離株に存在することが示されている。Liang等 [Liang et al., *J.Bacteriol.*185:843-853 (2001)]。

#### 【0195】

アズリン分泌に類似して、このDNA断片の放出のカイネティクスは、MCF-7 細胞の非存在下でさえも早くも5 minで細胞外に存在を示した (図 4B)。他のDNAバンドは、係る条件下で認められなかった。MCF-7 細胞に曝露において他の染色体のDNA断片の非存在下でのアズリンおよび15 kb DNA断片の放出の動態試験によって、放出の時間経過が類似することが示され (図 4C)、そのDNAが染色体外エレメントであり、おそらく染色体から水平方向にループ状にとられたゲノムアイランドであることを示唆している。

#### 【0196】

例 7: 緑膿菌からの15 kb DNA 放出物は、CpGリッチ DNAである。放出されたDNAの性質を検査するために、そのDNAを様々な制限酵素消化に供試した。興味深いことに、G および C残基の間を切断することが知られているMSP-1 および PvuIのみ

10

20

30

40

50

が、DNAの広範な消化を誘発し、DNAがG+Cに富んでいることが指摘された（図 4D）。これらの制限酵素の部分的な消化断片（または機械的に剪断された断片）がシーケンスされた際に、配列ホモロジーがデータベースのものと比較され、緑膿菌PAO ゲノムに存在および非存在の幾つかのDNA配列が認められ、図 7および配列番号26-62、放出されたDNAが系統 8822中のゲノムアイランドからきたことが示唆された。通常の単離方法によって単離されるプラスミド DNAは得られなかった。CpGリッチ DNAに存在する興味深い配列は、シトシンのストレッチ（図 5A）とそのなかの多くのCpG ジヌクレオチド配列である。

#### 【 0 1 9 7 】

例 8: 15 kbのCpGリッチ DNAバンドは、アズリンに類似する配列を含む存在する興味深い配列は、アズリン遺伝子の配列であるが、ナイセリア属からのアズリン遺伝子に類似し、それと95%ヌクレオチド配列同一性を示している配列である。アミノ酸配列比較は、図5Bに示される。ナイセリア (*Neisseria*) のアズリン遺伝子はアズリンのN末端で39アミノ酸のH.8エピトープをコード化している5'-端の付加的なDNA配列を有するので、CpGリッチ放出DNAをテンプレートとして使用し、H.8およびアズリン遺伝子配列の両方が*laz*と称されるナイセリアH.8-アズリン遺伝子からの全体遺伝子 (whole gene) と同様に使用された。Hong等 [Hong et al., *Cell Cycle* 5:1633-1641 (2006)]。三つの断片の全てをPCRで増幅できたことは、CpGリッチ DNAにおけるナイセリア*laz*遺伝子の両方の成分の存在を示している。

10

#### 【 0 1 9 8 】

例 9: 放出されたCpGリッチ DNAは、TLR9-媒介性NF- $\kappa$ Bを活性化し、抗腫瘍性を有するCpGデオキシオリゴヌクレオチドは、抗腫瘍性を有することが報告されている。Krieg [Krieg, *Nature Med.* 9:831-835 (2003)] ; Krieg [Krieg, *Curr. Oncol. Rep.* 6:88-95 (2004)]。緑膿菌 系統 8822から放出される15 kb CpGリッチ DNAがCpG合成オリゴデオキシヌクレオチド (ODNs) と類似する特性を有するかどうかを決定するために、TLR9-依存的様式でNF- $\kappa$ Bを活性化するDNAの能力を試験した。HEK293細胞 (TLR9を欠く) は、TLR9-発現プラスミドでトランスフェクトされた。Kandimalla等 [Kandimalla et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102:6925-6930 (2005)]。次に、NF- $\kappa$ B誘導性のELAM1複合性プロモーターの制御下でSEAP (分泌型胚性アルカリホスファターゼ) を発現するpNIFtyプラスミド (Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA) を使用した。NF- $\kappa$ B 活性化につづくSEAP発現を、トランスフェクトされたHEK293細胞の上清でSEAP レポーター アッセイ キット (Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA) を用いて測定した。SEAP レポーター アッセイは、Schindler および Baichwal [Mol. Cell. Biol. 14:5820-5831 (1994)] に記載のとおり行った。

20

30

#### 【 0 1 9 9 】

TLR9-欠損HEK293細胞においてNF- $\kappa$ B-プロモーター誘導性SEAPの非常に僅かな発現が存在した（図6A）。しかしながら、TLR9-発現HEK293細胞において、SEAP活性の増加とCpGリッチ 15 kb DNAの量の増加がともなって生じ、DNAがTLR9-上昇 (proficient) 細胞でのみNF- $\kappa$ B プロモーターを活性化できたことが示唆される（図6A）。

#### 【 0 2 0 0 】

TLR9-依存性NF- $\kappa$ Bの活性化によって腫瘍細胞死が生じるかどうかを決定するために、TLR9の発現を特定範囲 (a range of) の癌細胞で測定した。基本的に、全ての癌細胞株、前立腺癌DU145、乳癌MCF-7および肺癌H23およびA549は、TLR9および他のToll様レセプター様TLR4を発現した（図6B）。CpGリッチ DNAを肺癌細胞A549と濃度を増加させて12 および 24 hインキュベーションした場合、細胞死は増加したが限定的であり、CpGリッチ DNAは低い抗腫瘍性の活性を有していたことを示唆している（図6C）。

40

#### 【 0 2 0 1 】

##### 例 10: 有効性試験

二重盲検法、プラセボ無作為化試験は、六月の期間にわたって行われる。合計80人の癌を有する被験者 (45~60歳) が、研究のために選択される。被験者の一次的な募集は、医師の照会で行われる。首尾よく前選別された被験者は、電話で連絡して、スクリーニング/オリエンテーションセッションに招待される。予定される被験者は、試験および参加に必

50

要とされる条件を口頭および書面で提供される。書面でのインフォームドコンセントが各参加者からスクリーニング/オリエンテーションセッションで得られ、また診療記録が得られ、プロジェクトの腫瘍学者によって検討される。同意をえた参加者は、試験ID番号を割当られる。スクリーニングセッションの間に次の情報が収集される：

人口統計 (Demographics) : 名前, アドレス, 電話番号, 主な医師および腫瘍学者, 誕生日, 人種, 民族性, 職業および受けた教育の年数。

【0202】

病歴: 現在および過去の医学的なコンディション (癌状態の評価を含む), 薬物療法およびサプリメント, 入院, 外科, アレルギー, タバコ, アルコールおよび違法な薬の使用。

【0203】

基礎的な理学的検査: 身長, 体重, 血圧, 脈拍記録 (pulse readings), および乳房, 心臓, 肺 および 腹部の検査。

【0204】

血液サンプル: 妊娠陰性検査 (Negative pregnancy test) および正常な肝機能検査 (ALT, AST) およびヘモグロビン。

【0205】

80人の被験者は、40人の被験者の2つの別々の群に分けられる。第一の群は、配列番号 26 および薬学的に許容される担体を含んでいる一用量を一日一回投与される。第二の群は、プラセボの一用量を一日一回投与される。体重 および 腫瘍容積 [腫瘍の進行, 静止 (stasis), 退行 (regression) および増殖 (multiplicity) を含む] は、治療期間の間に三日毎にモニターされる。次の腫瘍容積のカテゴリーがスコアリングに使用される:

進行: 腫瘍が治療の開始と比較して領域において40%以上成長する;

静止: 腫瘍が治療の経過をとおして初期の領域から40%以上変動しない;

退行: 腫瘍の初期の領域からの40%以上の退行;

増殖: 治療の間の新しい腫瘍の出現。

【0206】

体重。配列番号 26 および薬学的に許容される担体 対 プラセボを受けている被験者の間の体重に観察可能な差が存在する。配列番号 26 および薬学的に許容される担体を受けているものは、身長および性が調整した場合に平均でプラセボを受けているものよりも重くなる。

【0207】

腫瘍容積。治療開始時では、両群の腫瘍サイズは、匹敵するものであり、互いに有意に異なっていない。平均で、プラセボ被験者の腫瘍容積は、変動比率 (variable rate) で増加する。配列番号 26 および薬学的に許容される担体を受けている被験者は、プラセボ処理の被験者と比較した場合に腫瘍サイズの成長の減少が示される。

【0208】

腫瘍進行。進行する腫瘍のパーセントは、上記のとおり計算される。配列番号 26 および薬学的に許容される担体を受けている被験者は、プラセボを受けている被験者よりも試験経過での腫瘍進行が低いことが実証される。

【0209】

腫瘍静止。静止したままの腫瘍のパーセントは、上記のとおり計算される。配列番号 26 および薬学的に許容される担体を受けている被験者は、腫瘍成長と比較して腫瘍静止がプラセボを受けている被験者よりも高いことが実証される。

【0210】

腫瘍退行。退行する腫瘍のパーセントは、上記のとおり計算される。配列番号 26 および薬学的に許容される担体を受けている被験者は、腫瘍退行がプラセボを受けている被験者よりも高いことが実証される。

【0211】

腫瘍増殖。増殖する腫瘍のパーセントは、上記のとおり決定される。配列番号 26 およ

10

20

30

40

50





85 90 95  
 Ala Asn Leu Glu Ala Val Lys Gly Ala Lys Asn Pro Lys Lys Ala Gln  
 100 105 110  
 Glu Arg Leu Asp Ala Ala Leu Ala Ala Leu Gly Asn  
 115 120

<210> 6

<211> 128

<212> PRT

<213> *Alcaligenes faecalis*

<400> 6

10

Ala Cys Asp Val Ser Ile Glu Gly Asn Asp Ser Met Gln Phe Asn Thr  
 1 5 10 15  
 Lys Ser Ile Val Val Asp Lys Thr Cys Lys Glu Phe Thr Ile Asn Leu  
 20 25 30  
 Lys His Thr Gly Lys Leu Pro Lys Ala Ala Met Gly His Asn Val Val  
 35 40 45  
 Val Ser Lys Lys Ser Asp Glu Ser Ala Val Ala Thr Asp Gly Met Lys  
 50 55 60

Ala Gly Leu Asn Asn Asp Tyr Val Lys Ala Gly Asp Glu Arg Val Ile  
 65 70 75 80

20

Ala His Thr Ser Val Ile Gly Gly Gly Glu Thr Asp Ser Val Thr Phe  
 85 90 95

Asp Val Ser Lys Leu Lys Glu Gly Glu Asp Tyr Ala Phe Phe Cys Ser  
 100 105 110

Phe Pro Gly His Trp Ser Ile Met Lys Gly Thr Ile Glu Leu Gly Ser  
 115 120 125

<210> 7

<211> 129

<212> PRT

<213> *Achromobacter xylosoxidans* ssp. *denitrificans* I

30

<400> 7

Ala Gln Cys Glu Ala Thr Ile Glu Ser Asn Asp Ala Met Gln Tyr Asn  
 1 5 10 15  
 Leu Lys Glu Met Val Val Asp Lys Ser Cys Lys Gln Phe Thr Val His  
 20 25 30  
 Leu Lys His Val Gly Lys Met Ala Lys Val Ala Met Gly His Asn Trp  
 35 40 45  
 Val Leu Thr Lys Glu Ala Asp Lys Gln Gly Val Ala Thr Asp Gly Met  
 50 55 60

Asn Ala Gly Leu Ala Gln Asp Tyr Val Lys Ala Gly Asp Thr Arg Val  
 65 70 75 80

40

Ile Ala His Thr Lys Val Ile Gly Gly Gly Glu Ser Asp Ser Val Thr  
 85 90 95

Phe Asp Val Ser Lys Leu Thr Pro Gly Glu Ala Tyr Ala Tyr Phe Cys  
 100 105 110

Ser Phe Pro Gly His Trp Ala Met Met Lys Gly Thr Leu Lys Leu Ser  
 115 120 125

Asn

<210> 8

50

<211> 129  
 <212> PRT  
 <213> *Bordetella bronchiseptica*  
 <400> 8  
 Ala Glu Cys Ser Val Asp Ile Ala Gly Thr Asp Gln Met Gln Phe Asp  
 1 5 10 15  
 Lys Lys Ala Ile Glu Val Ser Lys Ser Cys Lys Gln Phe Thr Val Asn  
 20 25 30  
 Leu Lys His Thr Gly Lys Leu Pro Arg Asn Val Met Gly His Asn Trp  
 35 40 45 10  
 Val Leu Thr Lys Thr Ala Asp Met Gln Ala Val Glu Lys Asp Gly Ile  
 50 55 60  
 Ala Ala Gly Leu Asp Asn Gln Tyr Leu Lys Ala Gly Asp Thr Arg Val  
 65 70 75 80  
 Leu Ala His Thr Lys Val Leu Gly Gly Gly Glu Ser Asp Ser Val Thr  
 85 90 95  
 Phe Asp Val Ala Lys Leu Ala Ala Gly Asp Asp Tyr Thr Phe Phe Cys  
 100 105 110  
 Ser Phe Pro Gly His Gly Ala Leu Met Lys Gly Thr Leu Lys Leu Val  
 115 120 125 20  
 Asp

<210> 9  
 <211> 129  
 <212> PRT  
 <213> *Methylomonas* sp. J.  
 <400> 9  
 Ala Ser Cys Glu Thr Thr Val Thr Ser Gly Asp Thr Met Thr Tyr Ser  
 1 5 10 15  
 Thr Arg Ser Ile Ser Val Pro Ala Ser Cys Ala Glu Phe Thr Val Asn  
 20 25 30 30  
 Phe Glu His Lys Gly His Met Pro Lys Thr Gly Met Gly His Asn Trp  
 35 40 45  
 Val Leu Ala Lys Ser Ala Asp Val Gly Asp Val Ala Lys Glu Gly Ala  
 50 55 60  
 His Ala Gly Ala Asp Asn Asn Phe Val Thr Pro Gly Asp Lys Arg Val  
 65 70 75 80  
 Ile Ala Phe Thr Pro Ile Ile Gly Gly Gly Glu Lys Thr Ser Val Lys  
 85 90 95  
 Phe Lys Val Ser Ala Leu Ser Lys Asp Glu Ala Tyr Thr Tyr Phe Cys  
 100 105 110 40  
 Ser Tyr Pro Gly His Phe Ser Met Met Arg Gly Thr Leu Lys Leu Glu  
 115 120 125  
 Glu

<210> 10  
 <211> 166  
 <212> PRT  
 <213> *Neisseria meningitidis*  
 <400> 10 50

Cys Ser Gln Glu Pro Ala Ala Pro Ala Ala Glu Ala Thr Pro Ala Ala  
 1 5 10 15  
 Glu Ala Pro Ala Ser Glu Ala Pro Ala Ala Glu Ala Ala Pro Ala Asp  
 20 25 30  
 Ala Ala Glu Ala Pro Ala Ala Gly Asn Cys Ala Ala Thr Val Glu Ser  
 35 40 45  
 Asn Asp Asn Met Gln Phe Asn Thr Lys Asp Ile Gln Val Ser Lys Ala  
 50 55 60  
 Cys Lys Glu Phe Thr Ile Thr Leu Lys His Thr Gly Thr Gln Pro Lys  
 65 70 75 80  
 Thr Ser Met Gly His Asn Ile Val Ile Gly Lys Thr Glu Asp Met Asp  
 85 90 95  
 Gly Ile Phe Lys Asp Gly Val Gly Ala Ala Asp Thr Asp Tyr Val Lys  
 100 105 110  
 Pro Asp Asp Ala Arg Val Val Ala His Thr Lys Leu Ile Gly Gly Gly  
 115 120 125  
 Glu Glu Ser Ser Leu Thr Leu Asp Pro Ala Lys Leu Ala Asp Gly Glu  
 130 135 140  
 Tyr Lys Phe Ala Cys Thr Phe Pro Gly His Gly Ala Leu Met Asn Gly  
 145 150 155 160  
 Lys Val Thr Leu Val Asp  
 165

10

20

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 128

&lt;212&gt; PRT

<213> *Pseudomonas fluorescens*

&lt;400&gt; 11

Ala Glu Cys Lys Thr Thr Ile Asp Ser Thr Asp Gln Met Ser Phe Asn  
 1 5 10 15  
 Thr Lys Ala Ile Glu Ile Asp Lys Ala Cys Lys Thr Phe Thr Val Glu  
 20 25 30  
 Leu Thr His Ser Gly Ser Leu Pro Lys Asn Val Met Gly His Asn Leu  
 35 40 45  
 Val Ile Ser Lys Gln Ala Asp Met Gln Pro Ile Ala Thr Asp Gly Leu  
 50 55 60  
 Ser Ala Gly Ile Asp Lys Asn Tyr Leu Lys Glu Gly Asp Thr Arg Val  
 65 70 75 80  
 Ile Ala His Thr Lys Val Ile Gly Ala Gly Glu Lys Asp Ser Leu Thr  
 85 90 95  
 Ile Asp Val Ser Lys Leu Asn Ala Ala Glu Lys Tyr Gly Phe Phe Cys  
 100 105 110  
 Ser Phe Pro Gly His Ile Ser Met Met Lys Gly Thr Val Thr Leu Lys  
 115 120 125

30

40

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 128

&lt;212&gt; PRT

<213> *Pseudomonas chlororaphis*

&lt;400&gt; 12

Ala Glu Cys Lys Val Asp Val Asp Ser Thr Asp Gln Met Ser Phe Asn  
 1 5 10 15

50

Thr Lys Glu Ile Thr Ile Asp Lys Ser Cys Lys Thr Phe Thr Val Asn  
 20 25 30  
 Leu Thr His Ser Gly Ser Leu Pro Lys Asn Val Met Gly His Asn Trp  
 35 40 45  
 Val Leu Ser Lys Ser Ala Asp Met Ala Gly Ile Ala Thr Asp Gly Met  
 50 55 60  
 Ala Ala Gly Ile Asp Lys Asp Tyr Leu Lys Pro Gly Asp Ser Arg Val  
 65 70 75 80  
 Ile Ala His Thr Lys Ile Ile Gly Ser Gly Glu Lys Asp Ser Val Thr  
 85 90 95  
 Phe Asp Val Ser Lys Leu Thr Ala Gly Glu Ser Tyr Glu Phe Phe Cys  
 100 105 110  
 Ser Phe Pro Gly His Asn Ser Met Met Lys Gly Ala Val Val Leu Lys  
 115 120 125

10

<210> 13  
 <211> 129  
 <212> PRT  
 <213> Xylella fastidiosa 9a5c  
 <400> 13

Lys Thr Cys Ala Val Thr Ile Ser Ala Asn Asp Gln Met Lys Phe Asp  
 1 5 10 15  
 Gln Asn Thr Ile Lys Ile Ala Ala Glu Cys Thr His Val Asn Leu Thr  
 20 25 30  
 Leu Thr His Thr Gly Lys Lys Ser Ala Arg Val Met Gly His Asn Trp  
 35 40 45  
 Val Leu Thr Lys Thr Thr Asp Met Gln Ala Val Ala Leu Ala Gly Leu  
 50 55 60  
 His Ala Thr Leu Ala Asp Asn Tyr Val Pro Lys Ala Asp Pro Arg Val  
 65 70 75 80  
 Ile Ala His Thr Ala Ile Ile Gly Gly Gly Glu Arg Thr Ser Ile Thr  
 85 90 95  
 Phe Pro Thr Asn Thr Leu Ser Lys Asn Val Ser Tyr Thr Phe Phe Cys  
 100 105 110  
 Ser Phe Pro Gly His Trp Ala Leu Met Lys Gly Thr Leu Asn Phe Gly  
 115 120 125

20

30

Gly  
 <210> 14  
 <211> 138  
 <212> PRT  
 <213> Cucumis sativus  
 <400> 14

40

Met Gln Ser Thr Val His Ile Val Gly Asp Asn Thr Gly Trp Ser Val  
 1 5 10 15  
 Pro Ser Ser Pro Asn Phe Tyr Ser Gln Trp Ala Ala Gly Lys Thr Phe  
 20 25 30  
 Arg Val Gly Asp Ser Leu Gln Phe Asn Phe Pro Ala Asn Ala His Asn  
 35 40 45  
 Val His Glu Met Glu Thr Lys Gln Ser Phe Asp Ala Cys Asn Phe Val  
 50 55 60

50

Asn Ser Asp Asn Asp Val Glu Arg Thr Ser Pro Val Ile Glu Arg Leu  
65 70 75 80  
Asp Glu Leu Gly Met His Tyr Phe Val Cys Thr Val Gly Thr His Cys  
85 90 95  
Ser Asn Gly Gln Lys Leu Ser Ile Asn Val Val Ala Ala Asn Ala Thr  
100 105 110  
Val Ser Met Pro Pro Pro Ser Ser Ser Pro Pro Ser Ser Val Met Pro  
115 120 125  
Pro Pro Val Met Pro Pro Pro Ser Pro Ser  
130 135

10

<210> 15  
<211> 162  
<212> PRT  
<213> Chloroflexus aurantiacus  
<400> 15

Met Lys Ile Thr Leu Arg Met Met Val Leu Ala Val Leu Thr Ala Met  
1 5 10 15  
Ala Met Val Leu Ala Ala Cys Gly Gly Gly Gly Ser Ser Gly Gly Ser  
20 25 30  
Thr Gly Gly Gly Ser Gly Ser Gly Pro Val Thr Ile Glu Ile Gly Ser  
35 40 45  
Lys Gly Glu Glu Leu Ala Phe Asp Lys Thr Glu Leu Thr Val Ser Ala  
50 55 60  
Gly Gln Thr Val Thr Ile Arg Phe Lys Asn Asn Ser Ala Val Gln Gln  
65 70 75 80  
His Asn Trp Ile Leu Val Lys Gly Gly Glu Ala Glu Ala Ala Asn Ile  
85 90 95  
Ala Asn Ala Gly Leu Ser Ala Gly Pro Ala Ala Asn Tyr Leu Pro Ala  
100 105 110  
Asp Lys Ser Asn Ile Ile Ala Glu Ser Pro Leu Ala Asn Gly Asn Glu  
115 120 125  
Thr Val Glu Val Thr Phe Thr Ala Pro Ala Ala Gly Thr Tyr Leu Tyr  
130 135 140  
Ile Cys Thr Val Pro Gly His Tyr Pro Leu Met Gln Gly Lys Leu Val  
145 150 155 160  
Val Asn

20

30

<210> 16  
<211> 140  
<212> PRT  
<213> Chloroflexus aurantiacus  
<400> 16

Ala Ala Asn Ala Pro Gly Gly Ser Asn Val Val Asn Glu Thr Pro Ala  
1 5 10 15  
Gln Thr Val Glu Val Arg Ala Ala Pro Asp Ala Leu Ala Phe Ala Gln  
20 25 30  
Thr Ser Leu Ser Leu Pro Ala Asn Thr Val Val Arg Leu Asp Phe Val  
35 40 45  
Asn Gln Asn Asn Leu Gly Val Gln His Asn Trp Val Leu Val Asn Gly  
50 55 60

40

50

Gly Asp Asp Val Ala Ala Ala Val Asn Thr Ala Ala Gln Asn Asn Ala  
 65 70 75 80  
 Asp Ala Leu Phe Val Pro Pro Pro Asp Thr Pro Asn Ala Leu Ala Trp  
 85 90 95  
 Thr Ala Met Leu Asn Ala Gly Glu Ser Gly Ser Val Thr Phe Arg Thr  
 100 105 110  
 Pro Ala Pro Gly Thr Tyr Leu Tyr Ile Cys Thr Phe Pro Gly His Tyr  
 115 120 125  
 Leu Ala Gly Met Lys Gly Thr Leu Thr Val Thr Pro  
 130 135 140 10

<210> 17  
 <211> 96  
 <212> PRT  
 <213> Cucumis sativus  
 <400> 17

Ala Val Tyr Val Val Gly Gly Ser Gly Gly Trp Thr Phe Asn Thr Glu  
 1 5 10 15  
 Ser Trp Pro Lys Gly Lys Arg Phe Arg Ala Gly Asp Ile Leu Leu Phe  
 20 25 30  
 Asn Tyr Asn Pro Ser Met His Asn Val Val Val Val Asn Gln Gly Gly  
 35 40 45 20  
 Phe Ser Thr Cys Asn Thr Pro Ala Gly Ala Lys Val Tyr Thr Ser Gly  
 50 55 60  
 Arg Asp Gln Ile Lys Leu Pro Lys Gly Gln Ser Tyr Phe Ile Cys Asn  
 65 70 75 80  
 Phe Pro Gly His Cys Gln Ser Gly Met Lys Ile Ala Val Asn Ala Leu  
 85 90 95

<210> 18  
 <211> 166  
 <212> PRT  
 <213> Neisseria gonorrhoeae F62  
 <400> 18

Cys Ser Gln Glu Pro Ala Ala Pro Ala Ala Glu Ala Thr Pro Ala Gly  
 1 5 10 15  
 Glu Ala Pro Ala Ser Glu Ala Pro Ala Ala Glu Ala Ala Pro Ala Asp  
 20 25 30  
 Ala Ala Glu Ala Pro Ala Ala Gly Asn Cys Ala Ala Thr Val Glu Ser  
 35 40 45  
 Asn Asp Asn Met Gln Phe Asn Thr Lys Asp Ile Gln Val Ser Lys Ala  
 50 55 60 40  
 Cys Lys Glu Phe Thr Ile Thr Leu Lys His Thr Gly Thr Gln Pro Lys  
 65 70 75 80  
 Ala Ser Met Gly His Asn Leu Val Ile Ala Lys Ala Glu Asp Met Asp  
 85 90 95  
 Gly Val Phe Lys Asp Gly Val Gly Ala Ala Asp Thr Asp Tyr Val Lys  
 100 105 110  
 Pro Asp Asp Ala Arg Val Val Ala His Thr Lys Leu Ile Gly Gly Gly  
 115 120 125  
 Glu Glu Ser Ser Leu Thr Leu Asp Pro Ala Lys Leu Ala Asp Gly Asp  
 130 135 140 50

Tyr Lys Phe Ala Cys Thr Phe Pro Gly His Gly Ala Leu Met Asn Gly  
 145 150 155 160  
 Lys Val Thr Leu Val Asp  
 165

<210> 19  
 <211> 150  
 <212> PRT  
 <213> *Vibrio parahaemolyticus*  
 <400> 19

Met Ser Leu Arg Ile Leu Ala Ala Thr Leu Ala Leu Ala Gly Leu Ser 10  
 1 5 10 15  
 Phe Gly Ala Gln Ala Ser Ala Glu Cys Glu Val Ser Ile Asp Ala Asn  
 20 25 30  
 Asp Met Met Gln Phe Ser Thr Lys Thr Leu Ser Val Pro Ala Thr Cys  
 35 40 45  
 Lys Glu Val Thr Leu Thr Leu Asn His Thr Gly Lys Met Pro Ala Gln  
 50 55 60  
 Ser Met Gly His Asn Val Val Ile Ala Asp Thr Ala Asn Ile Gln Ala  
 65 70 75 80  
 Val Gly Thr Asp Gly Met Ser Ala Gly Ala Asp Asn Ser Tyr Val Lys 20  
 85 90 95  
 Pro Asp Asp Glu Arg Val Tyr Ala His Thr Lys Val Val Gly Gly Gly  
 100 105 110  
 Glu Ser Thr Ser Ile Thr Phe Ser Thr Glu Lys Met Thr Ala Gly Gly  
 115 120 125  
 Asp Tyr Ser Phe Phe Cys Ser Phe Pro Gly His Trp Ala Ile Met Gln  
 130 135 140  
 Gly Lys Phe Glu Phe Lys  
 145 150

<210> 20 30  
 <211> 33  
 <212> PRT  
 <213> *Chloroflexus aurantiacus*  
 <400> 20

His Asn Trp Val Leu Val Asn Gly Gly Asp Asp Val Ala Ala Ala Val  
 1 5 10 15  
 Asn Thr Ala Ala Gln Asn Asn Ala Asp Ala Leu Phe Val Pro Pro Pro  
 20 25 30  
 Asp 40

<210> 21  
 <211> 28  
 <212> PRT  
 <213> *Bordetella pertussis*  
 <400> 21

Leu Thr Lys Thr Ala Asp Met Gln Ala Val Glu Lys Asp Gly Ile Ala  
 1 5 10 15  
 Ala Gly Leu Asp Asn Gln Tyr Leu Lys Ala Gly Asp  
 20 25

<210> 22

<211> 27  
 <212> PRT  
 <213> *Neisseria meningitidis*  
 <400> 22  
 Ile Gly Lys Thr Glu Asp Met Asp Gly Ile Phe Lys Asp Gly Val Gly  
 1 5 10 15  
 Ala Ala Asp Thr Asp Tyr Val Lys Pro Asp Asp  
 20 25

<210> 23  
 <211> 27  
 <212> PRT  
 <213> *Pseudomonas syringae*  
 <400> 23  
 Ser Lys Lys Ala Asp Ala Ser Ala Ile Thr Thr Asp Gly Met Ser Val  
 1 5 10 15  
 Gly Ile Asp Lys Asp Tyr Val Lys Pro Asp Asp  
 20 25

<210> 24  
 <211> 27  
 <212> PRT  
 <213> *Vibrio parahaemolyticus*  
 <400> 24  
 Ala Asp Thr Ala Asn Ile Gln Ala Val Gly Thr Asp Gly Met Ser Ala  
 1 5 10 15  
 Gly Ala Asp Asn Ser Tyr Val Lys Pro Asp Asp  
 20 25

<210> 25  
 <211> 27  
 <212> PRT  
 <213> *Bordetella bronchiseptica*  
 <400> 25  
 Thr Lys Thr Ala Asp Met Gln Ala Val Glu Lys Asp Gly Ile Ala Ala  
 1 5 10 15  
 Gly Leu Asp Asn Gln Tyr Leu Lys Ala Gly Asp  
 20 25

SEQ ID NO: 26  
 > *Neisserial Laz*  
 CGTGGCAGGCATACAGCATTTCAATCGGTTTCGGCAAAGGTAACGCTTTG  
 GGTTC AAGCGCATGTGCCTGTTTCGCTACTCCACCGGCACGTTTAAAGG  
 CGGACGTTCTATAATAGAACATCCTGCACAAAGCACGCTGGTTGTCCCTT  
 TCACACATTTAGCAGAACTACGGCAACTGCCTCACTTGGCTGCTTGTCAA  
 AGCACCGTGACCCGGGAAGGTGCACGCAAATTTGTAGTCGCCGTCAGCCA  
 ATTTGGCAGGATCCAAAAGTCAGGGAAGACTCTTCGCCGCCGCGATCAGT  
 TTGGTGTGGGCAACAACGCGCATCATCAGGTTTGACATAGTCAGTATC  
 GGCAGCACCTACGCCGTCTTTAAATACGCCGTCCAAGACTTCAGCTCAGG  
 CAAACACAATGTTGTGACCAATGCTGGCTTTGGGTTGCATACCAAAATGA  
 TTAAGATATATAAAAAATCATAAAAAATTAATTAGTAAAATAATTATA  
 TTATAAACTACATATAGAGCGCTAAGAAAAACATTGGATAAAAAAGAAAGA  
 GATCATTTGTGCAATATATATATAATAAAATGTATTTTAAT

SEQ ID NO: 27

10

20

30

40

50

## &gt; bacteriophage transposase

ATACCTGCCGGTACTTCTGGAACAGCGTCGTACCTTATCGGGAGATAC  
 CGAGTAGGTGATGCCGACGGCGCCGCCGACCTTCATGCCCTCAACGGTCT  
 GGAAGCTGATCGCTTCCCTCGCCGCCCCAGGTCTCGGTCTGCGTGAAGGTG  
 GGAACAGGTAGAGTCCCTCGTTACGCCTACCCAGTAGCGCCAGTTCC  
 GACCTCACGCGTCTCCACACCCTTCTCGGAGCCGTAGAGATTGACGATCA  
 CGCCGACGTTGCCGGCAGGCACCTTGAACAGCCCGCCAGGACGGCGAGC  
 AGGCACAGCATTGCAGCAGCGGAATCCGCTTCATTGGTCTTTCTCCTTG  
 CTGGTGGTGGCCGCTTGTTCGCGGGGGTGTGGCGAGGTGGACGCCGAG  
 GCAGACCGAGGCGATCAACCAGACGCCAGGGATGGCGAATCCCGCGAAAA  
 CCAGAACGTCGTCGCGACTGCTGACCAGGGCCGGCCCAATGCCGCCACC  
 AGGGCGACTGACAGTCCGGCATAGGCCAGCAGCGGATACAGATCAGGAA  
 GAGCTTCCCGGGCTTGATGAGAGGTTTCTTGTCCATGCTTTCCTCCAGGC  
 AAGCCGATGGCC

SEQ ID NO: 28

## &gt; Putative retroelement

ATATCCCCGTATTTCCCTCATATTTGGGATATCGTCGCTTTCACCGCT  
 CTCTTAGTTACTCGCCCCCTCTCCCGCCTCCCCCTCCTCCCCCTCTCCC  
 TCCCTCCGACTTCCCTGCGCGCATCCCGCATCCCTCTCCCCTTTTCGGAT  
 TGCCCCCTTACCAACGCGTCCGTCGCCACCGCTTTTCTCGCCCGCTCAG  
 CGGGCCCTACGCGCCCCCTCCTCCCCGCAT

SEQ ID NO: 29

## &gt; PA01 genome

TGAGACCGGGTACGAGCTTCCAACTGGAACCCCGTTCGCTGGGAACTGC  
 GCCACCTGCTGATCGCCCTGCGCACCCCTCGCCCCCGCCCGGACAGCCCG  
 CTGCACGCCGGCTACAACGGCATCTCGCCGTACAAGCTGGGCGAACACAA  
 CATCAAGTTCCGCGTCGTCCCCGCCCCGGAGAAGTGCCCCGGCTACCAGC  
 TACCGAAGCAGAACCAGGACCTGCCAACTTCTCCGCGCCGCCCTGTAC  
 CAGCAACTCTCCATCGACCGCACCCCGCCTGCTACGCCCTTCCAGGTGCA  
 GCGCCAGGACCCGGCCAAGTACATGCCCATCGAAGACACCAGCGTCAAT  
 GGAAGGAGTCGGACGCGCCCTTCGCTACCATAGCCGACATCATTGTGCCA  
 GCTCAGGATTTTCGATAGCCGGGAACAGAACCTGTTCTGTGACAACTTTT  
 GTTCAACCCCTGGCACGCGCTGCCGGAGCATCGGCCGATCGGCCGGATCA  
 ACCGGTTGCGGAAGGCGGTTTACGAGGCGGTCAGTGGGTATAGGTTGGGG  
 AGGAATGGGTGAGGGTTTAGGGGGAGGAGTGCTTGGTGTACGTTGATCG  
 GGAATGGCCAGAAATCGGCCAGAAACGGCCATTTCGATCAACGCGCTTTCAG  
 GTCTATCAAGCACGTGGCGGTCACCGTTGAGCACCTTAACTAGAACGCG  
 TTCCTACCGATTGATACACGACCATCAACTTACAGTGTCTGGCAGGTAAC  
 AAAGACTCGAATCGCCCTAAGGAGTCGTTTCAT

SEQ ID NO: 30

## &gt; Burkholderia xenovorans LB400 genome

AGTTCACGCAGGAACCGGTGAGCGGTACGGCAGCATCGATGCGGGGTTC  
 CGGGATCCCGCCGCAATGGCTGGAAGATGATCCAGTCGCCCGCAGGCGC  
 CTCCTGACGAATAGG

SEQ ID NO: 31

> Archaeal/vacuolar-type H<sup>+</sup>-ATPase subunit B

TAGTCCCGGTACGAGAACCAGGACCGGTTACCTCCTTCTCCTTG  
 GTGATGATGCCAGTGATCGCTCCAGACGTAATGCCCCAATACGCACGGC  
 CGCCCCCTGCCGTACCGTCACGGTCGTGCGTGGATTGTCTTCAGGGTAGT  
 CGTAGGGTTCGGAACGCGGCACAGCGGGCGCTATTGTTGCTAAGCGCC

10

20

30

40

50

ACAATCCAAATCTGATGCTGATCTTGGTAATCAAGTAGGTTCTCCCGTT  
 GTCGTCAAACCACTCATAACTCACCACGGTATTGCAGACGTGCAGGCCTG  
 GAGGGAATGTTGCCGGCGCATCAAGCTTTACGCCGCGATATCGATCGGCC  
 TGCAAGAAACTCGTCACATCATCCGATTTCGCCAGTGCATTGAATCGTTTCG  
 AGTCACAGAGAACCCAGTATCGGGCGAGGCCTGCGCCTCCAATATCTCCT  
 TCAGCTCAATATGATCTGCAACTTGTCCAGAGTCCGTTATGAGTTCAAGA  
 ACGCTGGCGCGCTCCATTCTGCTGTGCTCAACATCCTGCTCATATCGGTA  
 AGTCCTCGTACCATAATGTTGACGGTTATATCTAGCCGACCGAACATTTTC  
 CCTGTGCGTCATACCACGCTGTGATCAATGCCGAGGTCTGAGTCCACTCG  
 TCACGAAGATCGCCGTCACAACAGGGCTCGTACCCGGG

10

SEQ ID NO: 32

> *Mycobacterium avium*

ATCAGTCGCTATCCTATGTATTTTGGATGGCGTCTTCCCTTTTATAGAGA  
 CGGATTGTAATATGAAGTGCACAGCTAGGAAAAAGAAAAGGCCCATNGC  
 TGGCATCGTGACAATGGAAGTTACCATACTAACCATTTTGTACAGGAGG  
 ACCAACATGAGCTACTCCCATCTTAGCATAATCGAGCGTGGACAACCTAG  
 AAATTTGCATCGACTCGGTTGGTCATGCCGGGCTATCGGACTTGAACCTA  
 GGCCGTCATCCTTCTACCATCGCTCGAGAATTAAGCGAGGCAGCGACAA  
 TGAGGGCTACTCCGCTGAATCCGCTCAGCAAGCGTCTTACGAGCGAAGAA  
 CGACATGCGTGCCCTGCTGGAAAGTACACACCCGAGCTTGCCGATGAAATC  
 AACCTGAAGCTAAAGGAAACCTGGTCACCCGAGCAGATCGCGGAAAAAAG  
 ACGGGCGACAGGGCGTTTTTCGTATGCTTCAAAACAATCTACAGATGGC  
 TCTACTCCGGGCGCCTTGCAGCCGGAGAGGTTACGGTTCTACGGCACAAG  
 GGGAAAGCGCAGAAGCCGGTGGAAACACGCGGCCGATTCCGGGTGGGCAC  
 CCCGATTAGCAAACGTCGAAAGAAAGTCCGCACACGCACGTCAATTCGGCC  
 ATTGGGAACTCGATACGGTTGTCTCCAGCCGAGGAAAAAGCCGGGCTTGT  
 GCCGCCACCTTTATGAAAGGAAGACGCGCCTGTACATGGCTGGAAAATG  
 CCGGCTCGATTGCCCCTATAGGAGTCG

20

SEQ ID NO: 33

> *B. Cenocepacia*

30

ACTGGTCGGTGCGGCGTTCGCCTGGAGCGTCTGGCCGTGCCGG

SEQ ID NO: 34

> *Bacillus respiratory reducate*

ATGATCGACTCCTTAGGGCGAATCGAGTGAATTATCACTGCGGCTTTAAA  
 AAGTTGGCCAATTTGCTAAGGATACTGGCAGAATCATTGCGTCATGGAAT  
 TCACTGATCGCCTACGCTGAATACATTAGTGATGCCCAAAATTTGGTGGT  
 CTGACGAGAACGGCTCCAGATGGTGGGTCATCAACTTTTCGGAATACTTAG  
 TCCTTTATATTAGCGATCCAAAGTTTTATTAGGTGAAATCGAATGTCATA  
 TCACGGAGTAGTGCCACAATATCGCTGGATTTAATCGCTTTGGAAGATAT  
 GGATCATCTAATGATAGCAATGTCGCCAAGTGTGGTTGGTAAAATCATTT  
 CGTAATGGAGTTCACGTAACGCCCTTCGCTCCAAAACATTGGTGATAATGC  
 AATATCAAGTCGTTGGAATTGCAATAATTCATCAGTTACATTTCGGCAAAC  
 CCGCAACATCAACACAATATGTAGAATAGCATTTCATTTTTCGGAAGAAG  
 GCAAGTCGCTTCACTTATAAACAATATGATTTAATTACTTAACGCAC  
 TAAAGTGATGTAACCTCTCGCTCTCGGTATTTGCAGTAATCCTCAAGTTGC  
 TTA

40

SEQ ID NO: 35

> Stage II sporulation protein

TGATCGACTCCTTAGGGCGAATCGAGAAGCTTACAGTTAACAAATTTTTTA  
 CTTTTCCCTATTCCATCAGGTTTATGCACCGAAAAAGTGGTGATACTGGT

50

GGATGAGGTGATAAAAAATGGAAGATCAAAAAATCCAAATCAACCGATT  
 CCTTTGAAGAAGTCAAAATCCTGGAAAACCTTTCTGGGGAAGAAGTGGGC  
 GTTTCCCGCAATCTACATCGGCTTAGCAGCAATCATCCTCGCATTCGTGA  
 TGTGGTATCAGGGCAACGTGTTTCATGCAGTAAGCGATGAGCTTAGCAAG  
 CAGCCGACGCCAGTCGCACAGAACCAACCGGAAACAACGGCACCAAACAC  
 AGAAGTTTCGCAAGATGATGCAGTACCAGTCAGCAAGGCAACACAACCGC  
 TCGCATGGCCAGTGGCAGCAAGCGTGAGCTACTCCAAAGCCATGGATTTT  
 TTCAATGATGCAGCTGCGAAAAGAAGAGCAAGCCAAAGCGTTGGTCAAGTA  
 CAACAACCTGTACATCCCGCACACAGGGATCGACATTGTCTCCACGGATA  
 AAAAAGGATTTGATGTCGCCGCTGCCCTCGATGGCAAGGTGAAAAAGTGG  
 AAAATGATCCGTTGGTAGGCA

10

SEQ ID NO: 36

> phosphoenol pyruvate carboxykinase

ATAAGTACCTGGTACGAGCACTTACTGACGACTTTCTGCGGCAGTACAC  
 AATACAATCTTTCGGTAGCTCAACTGGTCGAGATTGCTGTTAAGCGGGGA  
 GAAGGTGTGCTCACAGACAAGGGTGCACCTAACCGGTTGACAGGCAAGTT  
 CACCGGTCGTTCCCGAAAAGACAAAATTCGTTGTGGACGAAGCATCCGTT  
 ATGACAAAATCAACTGGGGACCTGTGAACCAACCGATTTCCCGTGAAAAA  
 TTCGACATTCTCTACGCGGATGTGATGGAGCATCTGCAAGGCAAAGATCT  
 GTTTGTTTTGACGGTTTTGCGGGTGCAGGAGAAGACATTCCGTCTGCCGA  
 TCCGTGTAGTAAATGAATATGCATGGCACAACCTGTTTGCTCGCCAATTG  
 TTCGTTCCGCCATCCGAGGCGGAATTGGCTGATCATAAAGCGGAATTCAC  
 CCGTCGTATATGCACCTAGCTACAAGGCGAATCCTGCGGTTACGGCACC  
 GACTCCGAGACGTTTCATGCTTATGAGCTTTGGGCAAAGAGTGGTGCTGAT  
 CTGCGGAACCGAATACGCCGGCGAAAAGGTAAGAATCGATCTGCAGCGTGA  
 TGGGCTGGCTCCCGCCTTGACAAAAATGTTTTGTGATGCCCTGCTCGGC  
 AAACGTTGCGCAGCGAAGTAGATGTCCCTCTGATCTTCGGTCTTGCCGGC  
 ACAGGCAGATGGACGCTATCGGGGTGAGCCCGGTCATGAGCAGATTCCGG  
 GGAAGCAATTCGGATGGTCGGTAAGACGTGCGTATTTGAGGGGAGCGAG  
 TGGGGCCCGCGCGAGACGGTGCAGGACTGTGGGAAAAGGTAATCCCCAA  
 TATATGGCGCCTCTTATCCTCTTAAT

20

30

SEQ ID NO: 37

> Unknown

CACCCAGCTCGATACGGTGTGAGCATGTACATGTCCCGGGGCGCAGGT

SEQ ID NO: 38

> Bcatreriophage F10

TATCGACTCCTATAGGGCGAATCGAGGCTCGAATTACCCTCTGACGGGGG  
 CACCTCCGGGAGGACCCGCCAAATTTTCAAACCTTGTGCTGGACAACAAGA  
 ATTCGCACCACTTTGGTGCACCTTTCAGCGCCTCGCGGCGAACCGAGCGG  
 CAACGCCGCGCATCGCCACCTCGAACTCACGCGGCAGGTTCTCGTCGGTG  
 TACTGCTGCGCGATCTCGAAGAAGCTCAGCCGGCGGCGATACGAAGGGCG  
 TGACACGAAGGCCATGATGATCGAGACAGCATCCCGGCCCTCGGCCGTTC  
 GCTCAGCAATGCCAATGGGCTGGCCCTTGCGGGTCATGACGAAGTAGCGG  
 CGAGCATTACCCTTCGCCCTGCTCCGTCTGCTATCGGTGCGGTTTCGCGTT  
 GTACCCGGCCTGAGTGAAGCCCCGAATACCGCTCAGCGCTCTGGTCACTT  
 GACCTCGCCTGATGTTCCCGTAGCGATCAAGATCAGCACCGGCGCCGGGC  
 ACCACGTACTTACCTTCGGGCAGGATCCCCTTGCCCTGAGCTGAAGCTC  
 GGCCGGCTTGTTCGACGCGGCCACCGTAGACCTCGGGGGCAATCCACA  
 CCGATGCAGGCTGCGCACCGTCCGCTTCGTA

40

SEQ ID NO: 39

50

> *Rhodopseudomonas Palustris* genome

GATATTGCTCGACAGGTAGGTGCGGTGCACGCCGATCACCGGATCGCCCC  
 AGTTGAAGACCAGGTGCGGTGGTCATGTCGAAATCATGGCTGGCGATGCGC  
 TTGGCCCAGGTGCGGAAAGTCTGGGCGAAGCGCGCACCTGCACCGCGATC  
 SEQ ID NO: 40

> PA01 genome

TGAGACCCGGGTACGAGCAGCGGCAGTTCGCGCAGACCACGCGCCAGTGC  
 GATGGACGGCGGGTCCCGGCGCGTCCGCCTGAGTAGTTCTCCAGGCCGA  
 TGTGGATAAGTCCGCGGAGGAAGGTGCCGGTAGTCAGGACCACGTTGTCTG  
 GCATGGAAGCGCAGTCCCATCTGGGTCACTACGCCGCGGACCTGATCCTG  
 CTCGACGATCAGGTGCTCGCAGGCCCTGCTGGAATATCCACAGGTTGCGCT  
 GGTTTTCCAGTGTATGGCGGATAGCGGCCTTATAGAGCACGCGATCGGCT  
 TGTGCACGAGTGGCGCGCACTGCCGGCCCCCTTGC GGCTGTTAAGGATGCG  
 GAACTGGATACCGCCCTTGTGCGGTGGCTTCGGCCATGGCGCCGCAAGGG  
 CGTCGATTTCTTGACCAGATGGCTCTTGCCGATGCCCGGATGGCGGGG  
 TTGCAGCTCATCTGCCCCAGGGTTTCCACATTGTGGGTCAACAGCAGGGT  
 TTTCACACCCATGCGCGCAGCCGCGAGTGGGCTTCGGTGCCTGCATGGC  
 CACCGCCGATCACGATTACGTCAAAACGGGTAGGGAAATCCACCACGCAC  
 CTCGGCCTGTTCAAGCA

10

SEQ ID NO: 41

20

> Purine NTPase

ACTACCTACTGCTACTGACCTTTTATCCATCGTTGCCTCTAAGTTTCTGT  
 ACCGAGATATATCTCCGGTGAGCAGTAACTCAAGAGCATCAAAAAATGAG  
 GTTTTCCAAAAGCCATTCGGTCCATCAAGGACAGTTAGGTTCTTTGAGCC  
 AATATTGAAAACCTGAAATCGAAATGCCTTAAAATTCCTCAGAGCAACCT  
 TATTTATAATTAACCTCATAACCTGCCTCGGCGATAGCATCTACCAAATC  
 AGCCAGTGTCTTTACCGGGCTATCTGTTAGATCCATATTTAGAACGAAGG  
 ACTCTATAAATGAAAGAAGTTCGGGCTGCCTTGTACCAAGAACTCTTTGG  
 GTATGTTTTGAGTGCAGTCCCTCAATGTCGACTGGAGTACCGTCTCCAAT  
 ATCAATAAAGCTAAGTTTTATAACAATTCTATAGAGCAGTTCATTCCAAC  
 TCTCCAACCAATCATCTCCTTATAGCGAGAGAAGGTGTCAGGATCATTT  
 ATCAGAACACTCAATATATCGCTCAGGCTCTCAAAACCAATTCTCGCCTT  
 CAGATTATCAAGCTCAGAGGGGTGTAATATAGAACA

30

SEQ ID NO: 42

> PA14 genome

CGGCCAGCGCCTGAAGGATCTCTGCTCCAGGGGCGTGATGTGGATCGCCG  
 AGACCTGGGCGGAGATCGACAAGTGGATCTTCGCCACCTGCACGCCGACG  
 GTCTGGGACGTGCGCGGCGCCGGCGACCTGCGCCAGGACACCTCGTACCT  
 GGTGGTGAGCAACCACAGTCCTGGGTGACATCCCCGCC

SEQ ID NO: 43

40

> Broad host range recombinase

AGCTTAGAACCTTTACCAAAGGTGATGCGGAGAGATGGGTAAGCACAACC  
 AAAAAAGCCAGTGATTCTGCATTCTGGCTTGAGGTTGAAGGTAATTCAT  
 GACCGCACCAACAGGCTCCAAGCCAAGCT

SEQ ID NO: 44

> Bcateriophage F10 complete sequence

TGAGACCCGGGTACCGAGGTAATTCGAGCCCCGCTCGCCAAATATGTAT  
 GACCATTTTTCGGAGGTTGGTTGTTGTTTAGTCATGAGCAAAAACGAAAC  
 AACCAAACAGCGCGGATGGTTGAACAAGTCCGAGATGGCCGCGAGCCTCG  
 GGATTTCTCCGCAAGCCTTTGATAAATGGGGCGTTCAACCAATCGAGCGA

50

ATAGGTCGAGAGGCCCTTCTACACGGTGGCGGATGTGGTCGAAAACCGCAT  
 CCAGCACGCCGCTCGGAAACAACAACCTGAGGGGGAGCTACCGGAAGGTC  
 TCGATCCCTACGCTGAAGCCAAGCTGACACAGGAGCGACTCCGGCTCACC  
 AAGGCCCAGGCCTACGCCCAAGAGCAGAAGAACCAGGTCCAGGACAAGCT  
 CCTGGTCCCGTCCCGTTCGCCACTTTCGCCCTTGGCGAAGATCGCCGCCA  
 AGATTGGCTCGGCGCTGGAGACCGTCTGCAAAACGGTCAGTCGCCGCCAC  
 CCGGATGCTGATCCCTTGCTGATGGAGTCCTTCGAGCGGGAGATCGCCTT  
 GGC GCGAAAACCTTTCCGCTGAGTTCAGCGACGACATCCC GGG AATCCTTG  
 ATGAGTACCTTGCAACCCT

SEQ ID NO: 45

10

> 16S ribosomal RNA gene

ATACAATAAACGTCGAGACGTTTATTGCTTTAACCTTTGGAGAATCACTC  
 TCCGCCTGGCAACGTCTACTCTCCAGTCCCCTTCGGGACAAGTACCAT  
 CGGCGCTGGAGGGCTTAACGGCCGTGTTCCGGTATGGGAACGGGTGTGTCC  
 CCTCCGCCATCATCACCAGACGATGCACATGGATGTGCTAGTGTGACGCT  
 TGGGACAGGATGTCGCGCACTTAGCTGACCTTATTGATTCTTTTTGCTAA  
 AAGCGACAGGCACTAATGTATCACATCTGCACCATCGCAATCAAGCACTT  
 TTTAAGAAAAATGGTGGAGCTGAACGGGATCGAACCGATGACCTCCTGC  
 TTGCAAGGCAGGCGCTCTCCAACTGAGCTACAGCCCCATAATGGGTATA  
 TGAAGGCGAAAATGGTGGGCTAGGCTGACTCGAACAGCCGACCTCACGC  
 TTATCAGGCGTGCCTCTAACCAACTGAGCTATAGGCCCGAGTTTCGGGT  
 GCCCTTACATGCTCCCTCAAACTGAACAGCGAGCGAAAAGATCTCCATAG  
 AAAGGAGGTGATCCATCCGCACCTTCCGGTACGGATACCTTGTTACGACT  
 TCACCCAGTCATCTACCCACCTTCGGCGGCTGGCTCCTTACGGTTACC  
 TCACCGACTTCGGGGTTGCAAACTCCCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTA  
 CAAGGCCCGGAACGTATTCACCGCGCATGCTGATCCGCGATTACTAGC  
 GATTCCGACTTCATGCAGGCGAGTTGCAGGCTGCGATCCGAACTGAGACT  
 GGTTTTAAGAGATTTGCGAAGTCTCGGGAGCGAACATCCC GGTGCACCAG  
 GCATTGGAGCACGTGTGGACGCCCGGCC TAGGGGGGATGATGGTTTGGC  
 CTCGACCCCGGC

SEQ ID NO: 46

20

30

> Bortedella avium 197 N genome

GGGACAGCTGACCGTGAACCTGGGTGCCGTGCAGAACCGTCTGGAATCGA  
 CCATCGCAACCTGAACAACGTGGTTAACAACCTGTGGAACGCCCGTTCCG  
 CGCATCCAGGACGCCGACTACGCCACGGAAGTGTGGAACATGTGGAAGGC  
 CCAGATCCTGCAACAGGCTGGCACCTCGGTTCTGGCGCAAGCCAACCAAG  
 TGCCGCAAACCGTTCTGTGCTGCTGCGTTAATTCACGGCAAAGCAGTAC  
 GGACGGGGGAAGCTCCGGC

SEQ ID NO: 47

> outer membrane like protein

TGAGATCCGGGTACGAGGTCACGACCGAAAATGTTCTCCCTGTTGACTGCC  
 TTGTTGTA CTGGTTTTCCGTTTTGGT CAGCTCTTCCCTCCGCCTGCACAAC  
 ATCCAGAGAAGTGGACAACCCGTTCTCATAGCGAATCTGTGCTGCGCGGA  
 AATTTTCTTCCGCCATAGCCTGCGACTCCTTGTACATGTGACGCTGGAC  
 AGGGATGCTTCCATATTGAAATACGCCTGTTTTACTTCCACTTCAATGCT  
 GCGTTTCGTATCCTCCAGATCGATTTTCGTGCGCTCCAGATCATTTTTTG  
 CCATGGAGCCTTGATAGGTCGACAAGGCCGAATACTTTTGGAAACAGCTCG  
 ACATTCAATTCGGCGAGCTGGATCTCGTTTTGCTTTTGTGAATTTGTA  
 ACGCTTTTCGCCAGCTTGCTTCAATGCCTCATCCAGGCTGCCAATTGTG  
 GCTTCGTCAGCTGCGTTTCCTTGACCAACGTCCACTTTTTGTCCAAATCG

40

50

ACACCCAGGTAGTTGTTCAAGTTCAAGAATGCGACCGGTACCGCATTTTG  
CGCGCTGAGCAAAGATGCCTTCGCATTTCATCACGCTCACGCTGTGCGGAC  
GGCAAGTC

SEQ ID NO: 48

> putative ABC transporter

CGTTTCATGCGCGTTATTTTCGCGATTAATATCGGCGGTGCGATCGGGCCG  
CTTGTGGCTTGAAGCTCGGCGCCGAGGGTCCGCCTCGTTTTTTGCCGTT  
TTTGGTCAGCAGCGCGATC

SEQ ID NO: 49

> CG rich repeat

CTCCCCCCCCCGCGACCGCCCTCCCCGCGCCCGGGTGCATGCTGCGGT  
CGTTTCGCGCGCTCCCCGCGCCCCCGCCCCCCTCCGTCCCCGCCCC  
CGCGCTCCCCTCTCCTCACTCTCCCCCGCTCCCTCCGCGCACCCGTTC  
GCCCCGCGCCCCCGCCCCCGCCCCCCTCCTCTCTTCCCACCCC  
GCCGCTCACGTTTCTTAACCGTCAGCGGCTCACTGACCCCCACCCGAC  
CCCACCTCACTACCTCCCCCCTCAGGCCCCCCACGCCTTCCCCCCCCAT  
CCTTC

SEQ ID NO: 50

> Unknown

CAATTCTAATATGAGAATGGTTTTTCATTAATAAATTGAGAGCGGGCGGCGC  
CGCGCACGGGGCGCGGTAGTC

SEQ ID NO: 51

> Glutamate-1-semialdehyde-2,1-aminomutase

ATCGTGGAGCCTGTGATGGGGCTGCCGCGTCATTCTCCTTTGCCGGG  
ATATTTGGAGGATTGCGCGAGCTTGCGAACCCTATGACGTCCTTTTGA  
TTTTTGACGAGGTGCAGACATTGCGCTTAAGCACAG

SEQ ID NO: 52

> hypothetical protein PaerP\_01000783

TACTCAATGGCGAAATGGCGCATGCCAGTGAACACCATCGCGATATCC

SEQ ID NO: 53

> Bacteriophage F10

ATCTCGTCCGCCTGCTGCGAAGTGCCATCGATGGCGCGCTCGGCCCACTC  
GGGGAGCTGCCTTTGCAACCGCATTTCGTTGAGGATCGTCCAGAGCGCG  
AGGTCAGGTCGCGCTCTGCCCGGATCCCGTGGCGGAGCATGGTGATTGAG  
GAGTTCATTGCTGGTCCCTCCTCACGCAGGGAGTCGAGCGCGCGTCAACC  
AAATCGCCAGCCATCTCTGCAGCAATCTCCAAGGCATACAAGCACGCGTG  
CTCTTCGTGCGGAGGTGGTCAAGGCTCCTCAACCGTCTGTTGCGGGTGA  
TCAGGGCGATGGCCGTGCTCAAGGCTCCTCAACCGTCTGTTGCGGGTGA  
ATCGCTGCGAATCTTCGCGGCGGAAGCTGAGACACCGGCGCCTTCAGTAC  
GGCCGGCCCGAGCTTGAGCGCGCTCATGCCGCACCGCCTTCGTGTCGCGA  
CACGTTTTTCAGCATTTCTGGATTGGGTCGCGACACCAGCCCAGCAAGCTC  
TGAGCAATGCGCCAGCCATGCTCCCCAGCAGGGCGAGAGTATTGAGTTCC  
TGAGAGAGCAGCGGCTCGCCGCATCGTCCATCGCCGGGTCATTCTCAA  
AATAATCAGGGGAACCGCCTCGGTGATGTGCTCGGGGGGGTGCCGAGTCC  
CGTCAACCTGGCGGGCCGTAACACTGTAGAACAACAACCTCGTCCCCGGTG  
AGCGGATCTCAGGAAATGTGCGGGGGCGAGGGGGCGGGCGCCTGGGGAGA  
GGAGGGCGTGGGTGATGTGGGCTCGGGGGGGCGAGGGGGGAG

SEQ ID NO: 54

> putative lipoprotein

TTCGTCGTGCACGTAGACCTTCTGCACCTGTACCTGGTTGCTCATCAGGA

10

20

30

40

50

CCAGGTCGTTGGCGCCGACGATCTCGTAGTTGATCGTGTTGGTCAGCTCG  
AACTCCGCGCCGCGCGGGAACCGGTGTAGCTGACGGTGCGCTGCTGGTT  
GTCCTCGCGACCAGCACCGGTGGTAGGGCGCGTTGCTGGTGACCTTCA  
CGCCGCTGTTTTCCAGGGTTTCCTTCAGT

SEQ ID NO: 55

> glucose inhibited division protein

ATGATCGACTCCTTAGGGCGAATCGAGCAACTACTACAGCCCACAGCCTC  
GTTATCCGAGGCAACTACGTATAACTGCTCCCGAGATACCCGCCTCGCTC  
CGCGATGAATATTCGCCGGAGATAGGCGCGTCTTCCGCGTCTCGGTTCC  
TGATGATTTGCTGGAGATGTAGCCATGGGCCAACGCTGGATCAACAACCTG  
GCAGACAGAGCTCTCGGGTCCGCTATCGGCGGGTGGGTTTTCTCTTACCA  
TCCCCGCTGCCGCGGCTGATCTTCTGCCATCTCGGCTCCTTCTGATTTT  
ATCCTGCTCACTCTTGCCGATGAGTCAGGCTCTGTTTACGAAGTGGTCAA  
GGCGACGGCAAAGAGCGGCGGAATATCACTGTTGCGAGAGCCTCTGAGG  
GTGTGCCGTTGAGTGGCCATCGGGCTCGAAAGTGTACGCGGCGGCGACG  
GCGGGAACTCTCGCAAGCATCGAGAACCGAATCACCATCCTCGAGCAGGC  
TGGTCCTGGGCTGGTGGCGGCACGTTCAAGGCGCAGGAGGTCAACGACT  
CGACTCCGGTAGCCCTCGCCTCGGATACAACGATCGTGCGCGTATCCGCA  
TCGTTTGATGGG

10

SEQ ID NO: 56

> azobacter Avop

ATCTACCTTTCCGCGATGCATCCCCGGCGTTTTGTTCTATCACCGCTGAG  
CGTGCCATCAAGGTGCGAAGTGGCCACCGGTGGCGCCGCTCACTCGCTTCGA  
GCTCAGGCCGACATCGATTGGGGCGGCTGCCGGCTGGCAGCGTTGCC  
CCGACCTTGAGCAAATCGTAGCTGCACCGAGCGTGATGGTGCAGGGTGT  
GGTAGTGCTGTTTCCAGGCATCCAGTGCCGAGGTGGCGCCGTGACTTTTCTT  
TCGAAGATGGCTCGCTTCCCTCGGGCTGGATGTTTACGCGTGATCGGATCGC  
GGCCGCTGGCGCGGGCAGGGCTTTGAGGCTGGTGTCAATTTACGACGAAG  
CAGAGATTCTGCGCGTCTTGGCTGGCGTGAACAGCTTCAACGGCGACTT  
CGACAAGTTCTCCGGTGGTTCCGGTTTATCAGCATCGCCATCCCCTTGTG  
TCTAGGGCGCCGCGCACCGAGTCCCCAATCCGAAGCTCGCCAACCAGCAC  
ATCAACGATCGCAAACCATCGTCCGGTGCGAATCGCATAGCGAGGAAGGT  
TAGCGTGATAGCCGCATACCACTCCCATTACTGCGATACCTCG

20

SEQ ID NO: 57

> Cytochrome ubiquinol oxidase

CACCCTTGGCGTCGCCTTGCTGCTCGTACTTGGTGAGGATGTGGCCGAA  
CAGTTCCGGGCTGACCGAAGAGAAGTAGGTGCGCGGAACGTTCTCGCTCG  
GCTTGACCAGTTCCGGATAGGTGCCGATCGACAGGCTGGCCGGTGCCGCC  
TTGAC

30

SEQ ID NO: 58

> Unknown

1CGCCCTTCGCTGACCGCCGGGCTGGACGGTGCATCAACCGCGCCAAGGTTCGATCCCGCC  
CGCGCCGAGCAGGCCGACGCATGCAGCAGGCGGCCAGCAGCAGATGCAGCAA 114

40

SEQ ID NO: 59

> Unknown

1CGCCCTTTGCCCTATGCGCTCTACTACATCCGCAAGGGAATCGCTAAGGTACAGTCCGA  
GGCGGAG 67

SEQ ID NO: 60

> PAO suh gene, a virulence determinant

ATGGCCTGGGGCATGGGAAAGAGTAGCCTAGCGTGCCCTGCGCATTGAGAAAGGGGAGAAGTGCCAGCGACGCGCTGCG

50

GATCATGCAGCCGATACTTGTGTACAGGCCGATCACGCAGATCGCACCGACCGCGCCTGTCCGGCTGACCATCCCTGGGC  
ACGGGTTGCCTGGCACGTGGCTGGCCTGGGCTGATGGTGTCCAGGGCATGCCCGAACTGAACCGCGCTCGACTTCGGCAA  
TTGCCTCACCGTGTGCGTCCATCGACGACGACACGATCGAGATCAACCTGCTGTCAGCCGTTGGGCTGGCGCCTGTTGG  
CGGACAGTTGATCTACCAGCCACCTGTTGACCTGGCTGGCGCCGAGGTACGAATGCAGATCCGCGAAGCGCCAGGCGGGA  
CTGTGCTGATGACGCTGGCGCTCGGCTCTGGCCTGGATCTCGCCGGCGCCGGAACGATCTCGCGGGAGATATCGGCCCTCC  
GCTACCTCGGAGCTGATGTGGTGTGCGGCGGTCTACGACCTGGACGTGACATACCCGGATGGAACGGTCCACCGCTATTA  
CAGCGGGCCGATCAGTGTGAGCCATGGGGGAGGGTGCTATGG

SEQ ID NO: 61

> In vivo induced gene important for survival

TAACAGCTTTCTGATCAATCCTCAGCCTGTAACGTGACCGTCATAGGAGGGACGTGCGCAAGCCCTACCTGTTCCAGGGG  
AGGGTATGAGCGAGACCTCCGTAAGCCAGGGTCCAGGGCAAGGAAGTTCCCGGCATGTCCAGAGAAGAGGTGGAAAGCA  
TTTATGGGAAGGCCAACCAGGAATGGCAGCACTGCTGGTGCCGGGGCCGTTACCTACTGGAATGACAAGTACATCGATCAG  
ACCACGGTTTCTTTTCGACCGAAACGGTTGCGTTCAAGGCTCATACCAGTCGGGCCACAAAACTGATCCACCGTCGTCAA  
TCACCCCGCTCCGGCGGGGTTTTTATTTTTGGAGCCCTCAATCATGAAGCCTGCCTGCGTGCCCTGCGCATTGAGAAAAGG  
GGCGACGTTCCGCGACGCGCTGCGTTTCATGTAGCCGATACTTGTGTACAGGCCGATCACGCAGATCGCACCGACCGCGC  
CT

10

SEQ ID NO: 62

>RNA dependent DNA polymerase, RT

TCTCGCCCCAGTGTAGGCGTGGCTTCATATGCGGTAAGTCCTCGTACCATAATGTTGAAGGAAAAGGCTAGCCGACCGAA  
CATTTCCCTGTGCGTCATACCACCCCTGTGATCAATGCCGAGGTCTGAGTCCACTCGTCACGATAACTCGCCGTCACAAC  
AGGGTCCTCAGGAAGGCTGGACTCATCGATATGCACGTGAGCAGGGCTTCCCATCGCTTGACCGCGCTCTCAATGACGG  
TCATTGTCAGCACCTTGGATCGATCCGCATCAGGATCTCGTATCGACGGAGAGACAGTGATTTCAATCAATCCATAGAAG  
CCCACGGGAGCACCGGAATTCGATGAGCCACTAATCCACGATGTTCCAGGCGGTTGCTCAATTGGTGACAAATCGGTAGT  
TCGAACGTAACACCCGAAAAGGAGACGATTTTGATAGACCCCAAGCATTGATAGCTCGCTCAACACAACCTTTGTTGTCGTA  
GTTGCCAGCCGTCAAATGAAACATCTTTTGCCTGACAGCGCATGCTGGTTGTTCTTCTCCCTGACCAATTAATCTGCA  
CCCAAGTCGAGCGTGGCCATGGTGTGAGGTCAATTTCCAACCCATAGGCGAAACTGCGGTGTACCTGCCTCGTCCCCTTA  
AATCAT

20



【 図 5 】

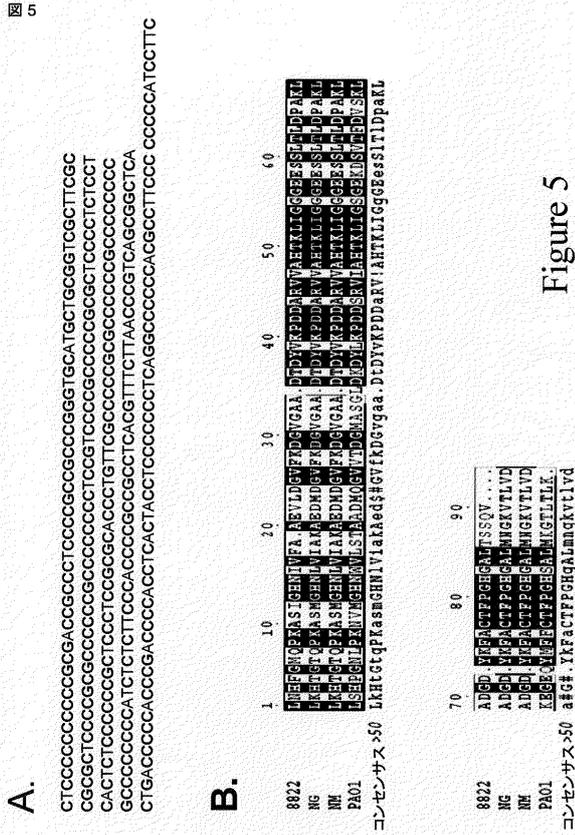


Figure 5

【 図 6 】

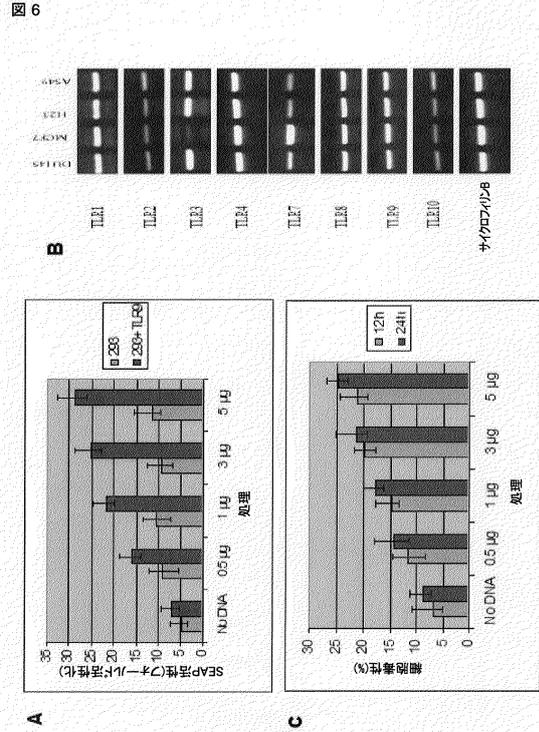


Figure 6

【 図 7 】

図 7

クローニング #	既知の配列に対するホモロジー	アイデンティティ %	参照
1	PAO1 配列セクション 523-529	99	Stover等 (2000)
2	バクテリオファージ F10 配列	94	Kwan等 (2006)
3	PAO <i>Suh</i> 遺伝子, ビルレンス決定因子	84	直接提出
4	生存に重要なインピボ誘導遺伝子	61	直接提出
5	バクテリオファージ F10 配列	96	Kwan等 (2006)
6	DNAJ, タンパク質シャペロン	57	直接提出
7	RNA依存性DNAポリメラーゼ, RT	38	直接提出
8	グルタチオン スペルミジン シンターゼ	59	直接提出
9	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> アズリン遺伝子	85	直接提出
10	PAO1 ゲノム配列	98	Stover等 (2000)
11	フラゲリン <i>Bordetella avium</i>	87	Sebahia等 (2006)
12	<i>Brevibacillus borstelensis</i> 16S リボソームRNA	94	Kop等 (1984)
13	温度感受性ラムダープレッサー	100	直接提出
14	1-アシル-sn-グリセロール-3-リン酸 アシルトランスフェラーゼ	100	直接提出
15	プリン NTPase [ <i>Marinomonas</i> sp. MED121]	41	直接提出
16	グルコース阻害性分裂プロテインA	98	Lee等 (2006)
17	推定上のABCトランスポーター	75	直接提出
18	推定上のリボタンパク質	47	Parkhill等 (2001)
19	ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ (ATP)	64	直接提出
20	ステージII 胞子形成タンパク質 Q	42	Ivanova等 (2003)
21	IS858 [ <i>Bacillus halodurans</i> ]のトランスポザゼ	61	Takami等 (2000)
22	原始/バクテリオール型H+-ATPase サブユニット B	59	直接提出
23	推定上のタンパク質 Bxe_AT1507	79	直接提出
24	カタラーゼ [ <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA14]	98	直接提出
25	膜プロテアーゼ, ストマチン/プロヒピチン	72	直接提出

Figure 7

## 【配列表】

2010511408000001.app

## 【手続補正書】

【提出日】平成21年10月15日(2009.10.15)

## 【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0046

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0046】

配列番号27-62； *P. aeruginosa*から放出される15 kb バンドにおけるポリヌクレオチドのDNA 配列。

配列番号63； 8822のアズリンのCpGリッチ DNA領域のアミノ酸配列。

配列番号64； *Neisseria gonorrhoeae*のアズリンのCpGリッチ DNA領域のアミノ酸配列

。

配列番号65； *Neisseria meningitidis*のアズリンのCpGリッチ DNA領域のアミノ酸配列。

配列番号66； *Pseudomonas aeruginosa* PA01のアズリンのCpGリッチ DNA領域のアミノ酸配列。

## 【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0047

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0047】

【図1】図1は、癌細胞の存在下での緑膿菌株 8821 および 8822によるアズリンの分泌を示す。図1A： 二つの緑膿菌株(8822, 8821)を、癌細胞の存在下(MCF-7)または非存在下(コントロール)で成長させた。細胞外分画におけるアズリンの分泌を、抗-アズリン抗体を用いたウエスタンブロッティングで検査した。パネル a： 濁度を600 nmで測定した緑膿菌細胞の成長。四角形および菱形は、それぞれ癌細胞の存在下および非存在下のアズリンの分泌レベルを示す。0 minでの癌細胞の存在下および非存在下の間の濁度の差は、癌細胞の添加が原因である。パネル b： ウエスタンブロッティングプロフィールでのシグナル強度の測定によるアズリンの分泌レベルの図である。四角形および菱形は、それぞれ癌細胞の存在下および非存在下のアズリンの分泌レベルを示す。パネル c： ウエスタンブロッティング。細胞外分画を、癌細胞の添加後0, 15, 30 および 60 minで調製し、SDS-PAGEに供試し、ウエスタンブロッティングを行った。矢印は、アズリンのポジションを示す。図1B： 定量的ウエスタンブロッティング。ウエスタンブロッティング プロフィールにおけるシグナル強度は、標準アズリンの増加(0~20 ng)とともに直線的に増加する。図1C： 緑膿菌株 8821 および 8822におけるアズリンの産生。指数的増殖期で収穫した係る細胞(8821, 8822)からの細胞内分画を、SDS-PAGEに供試し、抗アズリン(auzrin)抗体を用いてウエスタンブロッティングを行った。標準アズリンは、左のレーンに示される。図1D： ウエスタンブロッティングによるMCF-7細胞抽出物(100 μg タンパク質)におけるアズリンの検出の欠如。

【図2】図2は、癌細胞の存在下での緑膿菌の細胞溶解物の欠如を示す。図2A： *lacZ* 遺伝子を含んでいるプラスミド pQF47で形質転換した系統8822細胞を、癌細胞の存在下(MCF-7)または非存在下(コントロール)で成長させた。細胞外および細胞内の分画を、SDS-PAGEに供試し、抗-LacZ抗体を用いたウエスタンブロッティングを行った。サンプルの調製を、図1のとおり実施した。標準LacZは、左のレーンに示される。アスタリスクは、癌細胞と60 minインキュベーションした親系統 8822 細胞(pQF47プラスミドなし)の細胞内分画を示す。図2B： pQF47で形質転換した系統 8822細胞の細胞外分画を、SDS-PAGEに供試

し、抗アズリン抗体を用いてウエスタンブロッティングを行った。図2C: pQF47で形質転換した系統 8822細胞におけるLacZの機能的な発現。

【図3】図3は、アズリン(チトクロム  $c_{551}$ ではない)がエネルギー非依存性の様式でヒト乳癌 MCF-7細胞の存在に応答して、大腸菌(*E. coli*)細胞の細胞膜周辺腔から分泌されることを示す。サンプルの調製を、図1のとおり実施した。アステリスク(0\*)は、癌細胞とインキュベーションする直前の細胞内分画を示す。アズリン および チトクロム  $c_{551}$  (cyt  $c_{551}$ )のポジションは、矢印で示される。図3A、大腸菌JM109から分泌されたアズリン; 図3B、大腸菌JCB7120から分泌されたチトクロム  $c_{551}$ ; 図3C、0, 50 または250  $\mu$ MのCCCPで1 hプレインキュベーションされた際の緑膿菌8822から分泌されたアズリン; 図3D、250  $\mu$ Mの濃度のCCCPでMCF-7 乳癌細胞に暴露される(又は暴露されない)前に1 hプレインキュベーションされた際の大腸菌JM109から分泌されたアズリン。図3E、緑膿菌 8822 (左のパネル) および 大腸菌JM109 (右のパネル)の細胞の成長におけるCCCPの効果。示した濃度のCCCPを成長の早期ないし中期対数期に添加し、成長速度を次の60 minで600 nmの光学密度で追跡した。

【図4】図4は、緑膿菌 8822 系統が染色体外DNAを培養培地に分泌することを示す。図4A、緑膿菌 8822 系統は、15 kbの染色体外DNA断片を分泌する。DNAは培養培地の濾過物から核タンパク質分画のイソプロパノール沈殿で精製され、続いてQiagen(登録商標)カラム(Qiagen, Inc., Valencia CA)をとおしてDNA精製を行なった。図4B、異なるタイムポイントでの染色体外DNAの分泌。DNAは早くも5 minで分泌され、分泌はそれぞれ15, 30 および 60 minで増強された。DNAは、全てのタイムポイントでMCF-7 ヒト乳癌細胞の存在下で効率的に分泌された。図4C、緑膿菌 系統 8822は、MCF-7 癌細胞の存在下でアズリン および 15 kb DNA断片の両方を培養培地濾過物(culture medium filtrate)に分泌する。系統 8822はMCF-7 癌細胞の存在下で成長した。また、アズリンおよび染色体外DNAの細胞外分画への分泌を、抗-アズリン抗体を用いたウエスタンブロッティングおよびPA クローンに対するプライマーおよび沈殿したDNAを鋳型として用いたPCRで検査した。アズリン および DNAの分泌は、時間依存的である。図4D、分泌されたDNAはCpGリッチである。DNAは、EcoR1, HindIII, MspI および PvuI 酵素での制限酵素消化に供試された。MspI および PvuI (CpGリッチ DNAを切断することが知られている)によってDNAバンドのスミア(smear)が発生し、DNAに高い比でCG 配列が存在することを示している。

【図5】図5は、放出されたCpGリッチ DNAにおいて高度にCおよびG-リッチなDNAのストレッチのDNA配列およびアミノ酸翻訳を示す。図5A、このDNAのストレッチ(配列番号49)は、データベース中の他の配列とホモロジーはなく、オープンリーディングフレームの一部ではないようだ。図5B、CpGリッチ放出DNA(8822)(配列番号63)に存在する推定上のアズリン遺伝子および緑膿菌 PAO1 (配列番号66)および淋菌(NG)(配列番号64)および髄膜炎菌(NM)(配列番号65)からの対応する配列の比較アミノ酸配列ホモロジー。

【図6】図6は、染色体外のCpGリッチ緑膿菌DNAによるNF- $\kappa$ Bの誘導を示す。図6A、NF- $\kappa$ B 誘導は、TLR9依存性であり、染色体外のCpGリッチDNAを必要とする。TLR9-発現プラスミド および NF- $\kappa$ Bプロモーター誘導性SEAP (secreted embryonic alkaline phosphatase) レポータープラスミド (Invitrogen, Inc. Carlsbad, CA)でトランスフェクションしたHEK293細胞を、様々な濃度の CpGリッチの15 kb DNAで処理した。NF- $\kappa$ B 活性化に続くSEAP 発現を、トランスフェクトされた細胞の上清で測定した。SEAPレベルを、HEK-Blue TM SEAPレポーターアッセイキット(Invitrogen, Inc. Carlsbad, CA)を用いて定量的に評価した。HEK293細胞をCpGリッチ DNAで刺激することによって、NF- $\kappa$ Bが誘導され、用量依存的な様式でSEAP活性が誘導される。図6B、異なる癌細胞株は、広範囲のToll-様レセプター(TLRs)を発現する。TLRsの発現を、定量的なRT-PCRで分析した。データは、サイクロフィリン Bの発現に対して標準化された。図6C、MCF-7 乳癌細胞の細胞増殖におけるCpGリッチ DNA処理の効果。細胞を様々な濃度の15 kbのCpGリッチ DNA(0.5, 1, 3 および 5  $\mu$ g)で12 および 24 h処理し、細胞生存を決定した。以前の記載(Yamada et al., 2002)のとおりMTT アッセイを行って生細胞の程度を測定して、細胞毒性(パーセント細胞死)を

計算した。細胞毒性のパーセンテージを計算するために、無処置の生細胞の値を100%として使用して2.5  $\mu$ gの子ウシ胸腺DNAおよび異なる濃度のCpGリッチ DNAで処理した生細胞の数を決定した。

【図7】図7は、癌細胞との接触の際に緑膿菌から放出されるCpGリッチ DNA配列の表である。

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US07/86393
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC: Please See Continuation Sheet  USPC: Please See Continuation Sheet According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : Please See Continuation Sheet  Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched  Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Please See Continuation Sheet		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2005/018662 A1 (BOARD OF TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF ILLINOIS) 03 March 2005 (03.03.2005), see entire document.	1-32
A, P	WO 2007/024368 A2 (THE BOARD OF TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF ILLINOIS) 01 March 2007 (01.03.2007), see entire document.	1-32
A	US 7084105 B2 (CHAKRABARTY et al) 01 August 2006 (01.08.2006), see entire document.	1-32
A	US 2006/0149037 A1 (CHAKRABARTY et al) 06 July 2006 (06.07.2006), see entire document.	1-32
A, T	US 7381701 B2 (CHAKRABARTY et al) 03 June 2008 (03.06.2008), see entire document.	1-32
A, P	US 2006/0292136 A1 (CHAKRABARTY et al) 28 December 2006 (28.12.2006), see entire document.	1-32
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* 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 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 31 August 2008 (31.08.2008)		Date of mailing of the international search report <b>12 DEC 2008</b>
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Att: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (571) 273-3201		Authorized officer N. M. Minnifield <i>M. Minnifield</i> Telephone No. 571-272-0500

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US07/86393

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WU. H.J. Azurin of pathogenic <i>Neisseria</i> ssp. is involved in defense against hydrogen peroxide and survival within cervical epithelial cells. <i>Infection and Immunity</i> . December 2005, Vol 73. No. 12, pages 8444-8448, see entire document.	1-32
A	PUNJ. V. Microbial-based therapy of cancer. <i>Cancer Biology and Therapy</i> . August 2004, Vol 3. Issue 8, pages 708-714, see entire document.	1-32
A	PUNJ. V. Bacterial cupredoxin azurin and its interactions with the tumor suppressor protein p53. <i>Biochemical and Biophysical Research Communications</i> . 2003, Vol 312, pages 109-114, see entire document.	1-32
Y, P	MAHFOUZ. M. Bacterial proteins and CpG-rich extrachromosomal DNA in potential cancer therapy. <i>Plasmid</i> . 2007, Vol 57, pages 4-17, see entire document.	1-32
A	PUNJ. V. Bacterial cupredoxin azurin as an inducer of apoptosis and regression in human breast cancer. <i>Oncogene</i> . 2004, Vol. 23, pages 2367-2378, see entire document.	1-32
A	YAMADA. T. Bacterial redox protein azurin, tumor suppressor protein p53, and regression of cancer. <i>PNAS</i> . October 29, 2002, Vol 99. No. 22, pages 14098-14103, see entire document.	1-32
Y	YAMADA. T. Internalization of bacterial redox protein azurin in mammalian cells: entry domain and specificity. <i>Cellular Microbiology</i> . 2005, Vol 7. No. 10, pages 1418-1431, see entire document.	1-32

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/US07/86393

## Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 1:

536/23.1, 23.4, 23.7; 514/2, 12, 8, 44; 435/6; 424/184.1, 190.1, 234.1, 93.2, 93.4, 93.47, 260.1; 530/300, 324, 325, 326, 327, 350

## Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:

WEST, PALM, SCIENCEDIRECT, PUBMED, BIOSIS, MEDLINE, BIOTECHDS, CA, CABA, CAPLUS, DISSABS, AGRICOLA, CONFSCI, LIFESCI, SCISEARCH

search terms: inventor names pseudomonas aeruginosa, nucleic acid, dna, peptide, cupredoxin, cancer, melanoma, azurin, treatment, CpG, bacterial dna, copper redox protein, neisseria, vibrio bordetella, laz, plastocyanin, stellacyanin, detect, diagnosis, fusion protein, heterologous, breast cancer, lung, colorectal, prostate, pancreas, pharmaceutical

## Continuation of IPC:

C07H 21/02(2006.01), 21/04(2006.01); C07K 14/00(2006.01), 16/00(2006.01), 17/00(2006.01), 2/00(2006.01), 4/00(2006.01), 5/00(2006.01), 7/00(2006.01), 1/00(2006.01); A01N 63/00(2006.01), 37/18(2006.01), 43/04(2006.01); C12Q 1/68(2006.01); A61K 48/00(2006.01), 39/00(2006.01), 39/38(2006.01), 39/02(2006.01), 39/108(2006.01), 38/00(2006.01), 38/16(2006.01), 31/70(2006.01), 38/04(2006.01)

## Continuation of USPC:

536/23.1, 23.4, 23.7; 514/2, 12, 8, 44; 435/6; 424/184.1, 190.1, 234.1, 93.2, 93.4, 93.47, 260.1; 530/300, 324, 325, 326, 327, 350

## フロントページの続き

(51) Int. Cl. F I テーマコード (参考)  
**C 1 2 N 1/21 (2006.01) C 1 2 N 1/21**

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, 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, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(74) 代理人 100109830  
 弁理士 福原 淑弘

(74) 代理人 100075672  
 弁理士 峰 隆司

(74) 代理人 100095441  
 弁理士 白根 俊郎

(74) 代理人 100084618  
 弁理士 村松 貞男

(74) 代理人 100103034  
 弁理士 野河 信久

(74) 代理人 100140176  
 弁理士 砂川 克

(74) 代理人 100100952  
 弁理士 風間 鉄也

(72) 発明者 ダス・グプタ、タパス  
 アメリカ合衆国、イリノイ州 60305、リバー・フォレスト、ジャクソン・アベニュー 1317

(72) 発明者 チャクラバーティ、アナンダ  
 アメリカ合衆国、イリノイ州 60181、ピラ・パーク、ジュリア・ドライブ 206

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 CA01 CA09 CA11 CA20 DA05 DA06 DA09 GA11  
 HA01 HA11 HA17  
 4B065 AA01X AA01Y AA12Y AA26X AA42X AA42Y AA43X AA43Y AB01 AC14  
 BA01 CA44 CA46  
 4C084 AA02 AA13 BA01 BA08 BA22 MA66 NA14 ZB262  
 4C087 AA01 AA02 AA03 BC41 CA08 CA12 CA16 MA52 MA58 MA60  
 MA66 NA14 ZB26