

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6563937号
(P6563937)

(45) 発行日 令和1年8月21日(2019.8.21)

(24) 登録日 令和1年8月2日(2019.8.2)

(51) Int.Cl.	F 1
A 61 K 38/16	(2006.01)
A 61 K 45/00	(2006.01)
A 61 K 39/35	(2006.01)
A 61 P 37/08	(2006.01)
A 61 P 11/06	(2006.01)
A 61 K	38/16
A 61 K	45/00
A 61 K	39/35
A 61 P	37/08
A 61 P	11/06

請求項の数 12 (全 32 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2016-549420 (P2016-549420)
(86) (22) 出願日	平成27年1月30日 (2015.1.30)
(65) 公表番号	特表2017-509597 (P2017-509597A)
(43) 公表日	平成29年4月6日 (2017.4.6)
(86) 國際出願番号	PCT/IB2015/050703
(87) 國際公開番号	W02015/114575
(87) 國際公開日	平成27年8月6日 (2015.8.6)
審査請求日	平成30年1月18日 (2018.1.18)
(31) 優先権主張番号	14153365.3
(32) 優先日	平成26年1月31日 (2014.1.31)
(33) 優先権主張国・地域又は機関	歐州特許庁 (EP)

(73) 特許権者	508290633 ユニヴァーシテ チューリッヒ スイス ツェーハー8006 チューリッヒ レミシュトラーセ 71 プロレクト ラート エムエンヴェー
(73) 特許権者	504369557 ライデン ユニバーシティ メディカル センター オランダ国 エヌエル - 2333 ゼ ットエイ ライデン、アルビヌスドレーフ 2
(74) 代理人	100094640 弁理士 紺野 昭男
(74) 代理人	100103447 弁理士 井波 実

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 寛容原性組成物およびその使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 1、2、4、5、6、7、8、9、10 および 11 から選択されるアミノ酸配列を含んでなる V a c A タンパク質、その断片または変異形から選択されるポリペプチドを有効成分として含む、アレルギー性疾患の予防および/または治療に用いるための医薬組成物であって、前記 V a c A タンパク質が、他の免疫原性成分をおよそ含まない程度に未変性の H . ピロリ菌死細胞由来の抽出物から精製されたものであり、前記断片または変異形が、前記 V a c A タンパク質と少なくとも 98 % 同一のアミノ酸配列を有するものである、医薬組成物。

【請求項 2】

H . ピロリ菌株が、ATCC 49503 / 60190 である、請求項 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 3】

V a c A が組換え V a c A である、請求項 1 または 2 に記載の医薬組成物。

【請求項 4】

配列番号 1、2、4、5、6、7、8、9、10 および 11 から選択されるアミノ酸配列を含んでなる V a c A タンパク質、その断片または変異形から選択されるポリペプチドを有効成分として含む、アレルゲンに対する寛容化応答の誘導に用いるための医薬組成物であって、前記 V a c A タンパク質が、他の免疫原性成分をおよそ含まない程度に未変性の H . ピロリ菌死細胞由来の抽出物から精製されたものであり、前記断片または変異

10

20

形が、前記 V a c A タンパク質と少なくとも 9 8 % 同一のアミノ酸配列を有するものである、医薬組成物。

【請求項 5】

V a c A タンパク質、その断片または変異形から選択される前記ポリペプチドが、投与されるものである、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 6】

前記アレルギー性疾患がアトピー性喘息である、請求項 1 ~ 3、5 のいずれか一項に記載の医薬組成物。 10

【請求項 7】

前記アレルギー性疾患が食物アレルギーである、請求項 1 ~ 3、5 のいずれか一項に記載の医薬組成物。 10

【請求項 8】

経口、鼻腔内、非経口、肺内または全身性の経路によって投与される、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の医薬組成物。 10

【請求項 9】

配列番号 1、2、4、5、6、7、8、9、10 および 11 から選択されるアミノ酸配列を含んでなる V a c A タンパク質、その断片または変異形、および少なくとも 1 つの薬剤的に許容される担体、希釈剤または賦形剤を含んでなり、ここで前記 V a c A タンパク質が、その他の免疫原性成分をおよそ含まない程度に未変性の H . ピロリ菌死細胞由来の抽出物から精製されたものである、寛容原性医薬製剤であって、 20

前記 V a c A タンパク質、その断片または変異形が、アレルギー性疾患またはアレルギー性の応答の予防および / または治療、またはアレルゲンに対する寛容化応答の誘導に有用な少なくとも 1 つの共薬剤と組み合わされてなり、

前記断片または変異形が、前記 V a c A タンパク質と少なくとも 9 8 % 同一のアミノ酸配列を有するものである、医薬製剤。 10

【請求項 10】

経口用の医薬製剤である、請求項 9 に記載の医薬製剤。 10

【請求項 11】

アレルゲン、特に少なくとも 1 つの食物アレルゲンをさらに含む、請求項 9 または 10 に記載の医薬製剤。 30

【請求項 12】

請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の医薬組成物の製造方法であって、

前記 H . ピロリ菌死細胞由来の抽出物を、

(i) 生菌細胞の培養物を回収し、

(i i) 当該回収した細菌を、水中または塩の水溶液中での、数回の凍結 / 融解サイクルに付し、

(i i i) 前記細菌細胞を高圧下で破碎し、

(i v) 細胞抽出物を収集すること

を含んでなる方法によって得る工程を含む、製造方法。 40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【 0 0 0 1 】

本発明は、アレルギー性疾患、特に喘息および食物アレルギーの予防または治療に関し、とりわけアレルゲンに対する過敏症、特に喘息疾患の予防および / またはアレルゲンに対する脱感作のために有用な組成物に関する。 40

【背景技術】

【 0 0 0 2 】

アレルギー性喘息およびアレルギー性疾病の有病割合は、先進国および開発途上国において成人および小児ともに流行 (e p i d e m i c) の域に達している (E d e r e t a l . , 2 0 0 6 , N . E n g l . J . M e d . 3 5 5 : 2 2 2 6 - 2 2 3 5) 。この 50

のような公衆衛生上の重要な傾向の主要因としては、衛生設備の改良によって小児の早期感染または微生物への曝露がみられなくなったこと、および常細菌叢の段階的な減少の双方が提示されている (Blaser, 2009, *Nat. Rev. Microbiol.*, 7: 887-894)。2011年には、全世界で2億3500万人から3億人の人々が喘息と診断されており、25万人が死に至った。

【0003】

現在、発展途上国において小児に最も蔓延している慢性疾患は喘息であり、全世界ではおよそ3億人がこれに罹患している。喘息は、遺伝因子および環境因子の組み合わせによって引き起こされる。喘息管理の国際指針 (Global Initiative of Asthma) によれば、喘息は、気道における慢性の炎症性疾患と定義されている。慢性肺炎症は気道過敏症に付随し、喘息の古典的な症状である喘鳴、息切れ、胸部絞扼感および咳を反復性に起こす。最も一般的な臨床像はアレルギー性喘息である。小児の重篤な喘息患者のうち、アレルギー性のものは90%を超えており、成人の喘息患者では60%が空中アレルゲンに感作されている (Holgate et al., 2003, *Eur. Respir. J.* 2003; 22: 470-477)。アレルギー性喘息では、アトピー性の個体がアレルゲンに曝露されることによって、炎症および気道閉塞が誘発される。この疾患の基礎をなす病態生理は予想以上に複雑である。アレルギー性気道疾患の発生の基礎をなす炎症過程については、ヒトにおいても、およびこの疾患の動物モデルにおいても研究されてきた。ここ10年間に、喘息の発生に関連する様々な細胞型およびメディエーターについての理解は深まった。実際に、アレルゲン誘導性の炎症および気道過敏症 (AHR) の発生に対して、Th2細胞およびTh2サイトカイン (IL-4、IL-5 および IL-13) が重要な役割を果たすことを支持する知見が存在する。

【0004】

喘息の急性症状に対する最新の免疫調節性治療には、副腎皮質ステロイドの吸入または経口投与が含まれる。喘息患者は一般に、平滑筋細胞を弛緩させる 2アドレナリン受容体アゴニスト (例えばサルブタモール) およびロイコトリエンに対して応答する。非常に重篤な症例では、副腎皮質ステロイド、またはインターロイキンに対する中和抗体のような免疫調節性薬物の静脈内投与、および入院が必要とされ得る。現在、抗IL-13、抗IL-5 および抗IL-9モノクローナル抗体のすべてについて、喘息に対する治験が行われている。

【0005】

ヘリコバクター・ピロリは、ヒトの胃粘膜にコロニーを形成する持続性の細菌病原体である。ヘリコバクター・ピロリは、典型的には小児期の早期に獲得され、抗生素療法を行わなければ、その宿主の生涯にわたって持続し得る。大部分がTh1および/またはTh17に偏ったエフェクターT細胞によって駆動される活発な獲得免疫応答に対するH.ピロリの強力な抵抗能は、ヒトの自然免疫および獲得免疫系へのH.ピロリの適応、およびH.ピロリによるヒトの自然免疫および獲得免疫系の操作によるものと考えられてきた。H.ピロリはそのヒト宿主に少なくとも6万年の間コロニーを形成しており、この長期間にわたる共進化の間に、獲得免疫応答を全身的に操作するため、およびTエフェクター細胞応答を介した免疫原性のT細胞応答を超えた、調節性T細胞 (Treg) の優先的な誘導を通してH.ピロリの残留を促進するための、入念な方法が発達した。Treg優勢の応答は大量にコロニー形成された場合の特性であるが、保菌者は無症状である。

【0006】

H.ピロリの生菌を、特に新生児期の間に実験的に感染させると、アレルゲンによる感作および誘発によって誘導されるアレルゲン誘導性喘息を効果的に防御可能であることが示されている (Arnold et al., 2011, *The Journal of Clinical Investigation*, 121: 3088-3093)。機構的に、喘息の防御はH.ピロリに対する (Tregを介した) 免疫寛容の発達によるものであり、これによってアレルゲン特異的なTh2応答も交差防御される。H.ピロリ生菌による防御効果は、抗生素を用いた細菌の根絶療法によって無効となる (Arnold 50

d et al. , 2011 , 上記)。同様に、防御性 T reg の誘導には in vivo での生きた細菌が必要とされ、死菌の抽出物ではこれを達成できなかった。

【0007】

免疫寛容に必要とされる決定的な細胞型として、T reg の他には、樹状細胞 (DC) が明らかとなった。In vitro および in vivo において H. ピロリに遭遇した DC は、寛容性を促進する表現型へと再プログラムされる (Oertli et al. , 2013 , PNAS , 110 (8) , 3047 - 3052)。DC の再プログラムには、H. ピロリによって分泌される 2 種のタンパク質 (病原性の決定要因または決定因子) である、空胞化サイトトキシン (VacA) および グルタミルトランスペプチダーゼ (GGT) が必要であることが観察されたが (Oertli et al. , 2013 , 上記)、このことは、これら 2 種の病原性因子のうちの 1 つを欠失する (しかしそ他の点では野生型である) H. ピロリの変異体は in vivo および in vitro においてマウスの DC を再プログラムさせることができず、抑制活性を有する T reg が誘導されないためである (Oertli et al. , 2013 , 上記)。結果として、両方の H. ピロリ変異株はマウスによって効果的に除去される (Oertli et al. , 2013 , 上記)。さらに、GGT および VacA の両方は、H. ピロリに対するワクチン誘導性の防御免疫を引き起こすために使用されてきたか、または使用されるべきであると報告されているが、これはすなわち本発明の目標とは逆の目標 (T reg の応答というよりも、強力な T エフェクター) である (Malfertheiner et al. , 2008 , Gastroenterology 135 (3) : 787 - 95)。

【0008】

H. ピロリは胃潰瘍および十二指腸潰瘍を誘発し (Marshall et al. , 1984 , Lancet 1 : 1311 - 1315)、かつ H. ピロリが胃腺癌の主な原因であることも広く認識されていることから (Parsonnet et al. , 1991 , N. Engl. J. Med. , 325 : 1127 - 1131)、この生物による慢性感染に発癌性の可能性があることは十分に報告されているため、H. ピロリの生菌を治療的介入または予防手段に用いることは、興味をそそられるものではない。さらに、H. ピロリを用いたこのようなワクチン接種戦略は、被験体の H. ピロリ感染を防御し、かつ免疫系の応答を回避するかまたは迂回する H. ピロリの能力を相殺し得るような免疫応答の誘導を目指していることへの留意が重要である。

【0009】

今日の喘息治療は、すべてが多かれ少なかれ重篤な副作用を起こすため、その代わりとなる治療戦略が是非とも必要とされている。したがって、特に過敏反応を呈する素因のある小児および若年者の喘息発生を予防するため、および喘息が引き起こす症状を治療するための新しい戦略に対する重要な必要性がある。

【発明の概要】

【0010】

本発明は、H. ピロリの VacA を含む組成物の経口、鼻腔内または腹腔内 (すなわち全身性の) 投与を規則的な間隔で行うことにより (投与は、例えば圧力式細胞破碎機「フレンチプレス」を用いて、対数増殖期にある H. ピロリを機械的に破碎することによって調製した死細胞抽出物の形で、または精製タンパク質もしくは組換えタンパク質の形で行った)、アレルゲン誘導性喘息を防御できるという、予想外の知見に基づく。残留および T reg の誘導に必要とされる、この病原性の決定要因または決定因子の存在は以前から見出されていたが、これは病原性の決定要因である GGT と生きた状態の細菌との組み合わせによるものであり、喘息の防御には単独で十分であるということは予想できなかった。さらに、H. ピロリ特異的なワクチン接種についてのヒトの前臨床試験および第 1 相臨床試験に VacA を含めることに成功したという事実は、VacA が免疫原性であり (少なくとも適切なアジュバントとの組み合わせにおいて)、かつ T 細胞および / または抗体を介した免疫を引き起こすことを立証するものである。アレルゲン特異的な免疫応答に必要とされる強力な免疫原性および強力な免疫調節性は、通常は相互排他的であり、典型的

10

20

30

40

50

には同一のタンパク質に見出されるものではないことから、本発明の組成物の寛容原性は特に顕著である。本発明はさらに、V a c Aの使用を通して、H. ピロリ感染に対する免疫応答を回避する末梢の寛容性を誘導することが可能であり、これによって、寛容原性による免疫調節の、どちらかと言えば非特異的な形を達成できるという予想外の知見に基づく。

【0011】

本発明の第1の態様によれば、アレルギー性疾患、特にアレルゲン誘導性喘息もしくはアトピー性喘息の予防および/または治療に用いられる、V a c Aタンパク質、その断片もしくは変異形から選択されるポリペプチド、またはその製剤が提供される。

【0012】

本発明の第2の態様は、アレルゲンに対する寛容化応答を誘導するための、V a c Aタンパク質、その断片または変異形から選択されるポリペプチドに関する。

10

【0013】

本発明の第3の態様は、アレルギー性疾患、特にアトピー性喘息の予防および/または治療のため、および/またはアレルゲンに対する寛容化応答の誘導のための薬剤を調製するための、V a c Aタンパク質、その断片または変異形から選択されるポリペプチドの使用に関する。

【0014】

本発明の第4の態様は、V a c Aタンパク質、その断片または変異形、および少なくとも1つの、その薬剤的に許容される担体、希釈剤または賦形剤を含む医薬製剤に関する。

20

【0015】

本発明の第5の態様は、アレルゲンに対する寛容化応答を被験体に誘導するための方法に関し、前記方法は、V a c Aタンパク質、その断片もしくは変異形から選択されるポリペプチド、またはその医薬製剤の有効量を、それを必要とする被験体へ投与することを含む。

【0016】

本発明の第6の態様は、被験体におけるアレルギー性の応答、特にアレルギー性疾患を予防、阻止または治療するための方法に関し、前記方法は、V a c A、その断片もしくは変異形から選択されるポリペプチド、またはその医薬製剤の治療上有効な量を、それを必要とする被験体へ投与することを含む。

30

【0017】

本発明の第7の態様は、V a c Aタンパク質、その断片または変異形から選択されるポリペプチドと、アレルギー性疾患、特にアトピー性喘息の予防および/もしくは治療ならびに/またはアレルゲンに対する寛容化応答の誘導に有用な少なくとも1つの共薬剤と、少なくとも1つの、その薬剤的に許容される担体、希釈剤または賦形剤とを組み合わせて含む医薬製剤に関する。

【0018】

本発明の第8の態様は、V a c Aタンパク質、その断片または変異形、またはアレルギー性疾患、特に喘息の予防および/もしくは治療のため、ならびに/またはアレルゲンに対する寛容化応答の誘導のための、その医薬製剤に関する。

40

【図面の簡単な説明】

【0019】

【図1A B】実施例1に記載する本発明の組成物を用いた処置によって、実験的に誘導した喘息が緩和されたことを示す図である。H. ピロリの抽出物に接触させた群（- - -）を、陽性対照（治療をしていない感作マウス）（- - -）および陰性対照（モックによる感作マウス）（- - -）に比較して示す。A、B：それぞれ、メタコリンの漸増用量（[C]、mg / ml によって示す）および100mg / ml の最高用量に対する気道過敏症の応答を示す（基線からの変化を%によって示しており、これはすべてのマウスについて個々に決定した）。C、D：1ml のBALFに含まれる全細胞数および好酸球数を示す。E ~ G：H & EおよびP A S染色した組織切片における2回の盲検実験によってスコア

50

化した、組織炎症および杯細胞化生を示す。元の倍率を $100 \times$ (H & E) および $400 \times$ (P A S) として撮影した、代表的な顕微鏡写真を G に示す。A ~ F には、5回の独立した試験からプールしたデータを示す。H、I : 卵白アルブミンによって再刺激した単一の肺細胞調製物からの IL - 5 および IL - 13 の分泌を、実施例 1 に記載するように E L I S A によって評価した。2回の試験からプールしたデータを示す。

【図 1 C D E F】図 1 A B 参照

【図 1 G H I】図 1 A B 参照

【図 2 A B C D】死細胞抽出物によって誘導された喘息の防御には、IL - 10 のシグナル伝達が必要であることを示す図である。A、B : 実施例 2 に記載する本発明の H. ピロリ死細胞抽出物に、表示する量 ([C]) にて曝露した後の、マウス骨髄由来の DC、および 6 名の健常志願者から得たヒト単球由来の DC による IL - 10 の分泌を示す。A : 3回の実験のうちの、代表的な 1 回について示す。B : 6 名のドナーすべてについてプールしたデータを示す。C ~ F : 図 1 の記載に従って処置したマウスについて示す。表示する群は、実施例 2 に記載するプロトコルによる誘発期の間に、抗 IL - 10 R 抗体の用量を 3 回投与された。C、D : 1 ml の BALF に含まれる全細胞および好酸球を示す。E、F : 組織炎症および杯細胞化生を示す。散布図において、各記号は 1 匹のマウスを示し、水平な線は中央値を示す。

【図 2 E F】図 2 A B C D 参照

【図 3 A B】アレルゲン誘導性喘息のモデルにおけるアレルギー性気道疾病の防御に対し、V a c A は必要かつ十分であることを示した図である。アレルゲンによって感作および誘発されたマウスを、気管支肺胞および肺の炎症、好酸球增多症ならびに杯細胞化生から防御するために、V a c A 遺伝子を欠損する H. ピロリ変異体からの抽出物 (「ext . V a c A」) は、野生型からの抽出物 (「ext . wt」) よりも常に効率的ではなかった (図 3 A ~ D)。防御のためには V a c A 単独で十分であるか否かについて調べるため、実施例 1 に記載するように、H. ピロリの培養上清から精製したオリゴマー V a c A を、7 日齢から毎週 1 回腹腔内投与した。最初の投与時の日齢が若かったにもかかわらず、どのマウスにも有害作用はみられなかった。V a c A は、喘息に対し、抽出物による処置と同程度の著しい防御を示した (図 3 A ~ D)。V a c A の細胞傷害性に必須であると報告されている 3 個のタンデムリピートのアミノ末端の疎水性領域 (V i n i o n - D u b i e l e t a l . , 1999, 上記) を欠損した陰性対照 V a c A タンパク質、すなわち配列番号 3 (図 5) に示す陰性対照 V a c A タンパク質は、喘息を防御できなかった (図 3 A ~ D)。

【図 3 C D】図 3 A B 参照

【図 4】アレルギー性喘息に対する、精製した V a c A の様々な濃度、投与経路および投薬計画による有益な効果を示した図である。上記のように調製した V a c A を、様々な濃度および間隔によって、マウスに腹腔内投与または胃内投与した。7 日齢から誘発の 2 週間前まで毎週 1 回 $5 \mu g$ の V a c A を腹腔内投与すると (下付きの「a」によって示す)、気管支肺胞の炎症および好酸球增多症の防御に対して $20 \mu g$ の V a c A と同程度に有効であった (図 4 A、B)。胃内に (経口的に、p. o.) 投与した V a c A もまた (再び、7 日齢から誘発の 2 週間前まで毎週 1 回送達した)、有意な防御を誘導した (図 4 A、B)。V a c A の用量を 3 回腹腔内送達した場合 (生涯の 1、2 および 3 週に送達、図 4 に下付きの「b」によって示す)、完全な防御には不十分であった (図 4 A、B)。卵白アルブミンによる誘発の間に、中和抗体の用量を 2 回腹腔内に送達して IL - 10 のシグナル伝達を遮断すると、防御は無効となった (図 4 A、B)。これらのデータは、精製した形の V a c A の単独投与が、喘息に対して全細胞抽出物と同程度の防御を誘導し得ることから、アレルギー性喘息を阻止するためには、精製した形での投与が可能であることを予想外に支持するものである。

【図 5 A B】本明細書に記載する V a c A ポリペプチドのアミノ酸配列の例を示した図である。A : 配列番号 1 の s 1 m 1 V a c A (Q 4 8 2 4 5 H. ピロリ株 A T C C 4 9 5 0 3 / 6 0 1 9 0)。B : 配列番号 2 の s 2 m 2 V a c A。C : 配列番号 3 の陰性

10

20

30

40

50

対照変異体(6 - 27) V a c A 。 D ~ K : 配列番号 4 ないし配列番号 11 。

【図 5 C D 】図 5 A B 参照

【図 5 E F 】図 5 A B 参照

【図 5 G H 】図 5 A B 参照

【図 5 I J 】図 5 A B 参照

【図 5 K 】図 5 A B 参照

【図 6 A B 】実施例 5 に記載する、食物アレルギーの臨床スコア(A)および全身性パラメータ(C ないし F)に基づいた、 H . ピロリ抽出物および H p V a c A の有益な効果を示した図である。これらのデータは、精製した形の V a c A の単独投与が、食物アレルギーに対して全細胞抽出物と同程度の防御を誘導し得ることから、アレルギー性喘息を阻止するためには、精製した形での投与が可能であることを予想外に支持するものである。 10

【図 6 C D 】図 6 A B 参照

【図 6 E F 】図 6 A B 参照

【発明を実施するための形態】

【 0020 】

用語「アレルギー性疾患」は、アレルゲン誘導性またはアトピー性喘息、アトピー性皮膚炎(湿疹)、アトピー性鼻炎(枯草熱)、アレルギー性結膜炎、食物アレルギー、職業性アレルギー、アレルギー性気管支・肺アスペルギルス症および過敏性肺炎のような、アレルゲンに対するアレルギー性の状態および過敏症を指す。

【 0021 】

用語「喘息」は、気管支平滑筋系をけいれんさせ、かつ上気道および下気道の両方に影響を及ぼす、気道炎症、過敏症および閉塞によって特徴付けられる気道疾患を指す。喘息には、重症度の違いによって特徴付けられる幾つかの型がある。例えば軽度の喘息は、呼吸困難もしくは咳を伴うかまたは伴わない、短時間の喘鳴の発症として定義される。中程度に重篤な喘息は、喘鳴および呼吸困難として定義され、咳および喀痰を伴うかまたは伴わないが、一般に日常活動および/または睡眠が妨げられる。重篤な喘息は、呼吸困難がもたらす無能力によって特徴付けられ、悪化した患者は、典型的には通常のように食事をしたり睡眠をとることが不可能になり、非常に不安であり、しばしば消耗する。喘息発作重積状態として知られる状態は、喘息の最も重篤な形であり、一般には入院による集中治療が必要とされ、致死的と判明することもある。この疾病は、アレルギー性および非アレルギー性両方の機構の結果として起こり得る。 30

【 0022 】

用語「アレルゲン誘導性喘息」または「アトピー性喘息」は、抗原/アレルゲンに対する過敏症からもたらされる喘息を指す。これには、限定はされないが、樹木、草地、雑草もしくは薬草に由来する花粉、またはチリダニ、動物のフケ、ゴキブリ、真菌およびカビのようなその他のアレルゲン群を含む、吸入可能なすべてのアレルゲンが含まれる。さらに、小麦粉、大豆、ラテックスおよび様々なダニ(ケナガコナダニ、サヤアシニクダニ、アシブトコナダニ)のような、職業性アレルゲンも含まれる。アレルゲンに対する過敏症、特に抗原/アレルゲン誘導性喘息は通常、咳、くしゃみ、鼻または眼の刺激/かゆみ、流涙および鼻水の増大、湿疹による皮膚のかゆみ、ならびに食物アレルギーによる恶心、嘔吐、腹痛および腹部不快感および下痢のような症状のパターンに基づいて診断される。アトピー性喘息は、症状の頻度、努力呼気肺活量の 1 秒量(F E V 1)または最大呼気流量(ピークフロー)の減少、ピークフローのばらつきの増大、気道過敏症、およびアレルゲン特異的な I g E 濃度の増大に従って臨床的に分類される。 40

【 0023 】

用語「食物アレルギー」は、ある食物タンパク質に対する免疫系の反応によって引き起こされる、無害の食物に対するヒト免疫系の異常な応答を指し、これは通常、食物中に見出される特異的なアレルゲンに対して產生されるヒト抗体に関連する。一般的な食物アレルゲンの例としては、乳、大豆、魚類および甲殻類、種実類、ピーナッツ類、コムギ(グルテン)および卵の成分が挙げられる。 50

【0024】

本明細書で用いられる用語「ポリペプチド」は、その従来の意味、すなわちアミノ酸配列に対して用いられる。ポリペプチドは、産物の特定の長さに限定されない。したがって、ポリペプチドの定義の範囲内にはペプチド、オリゴペプチドおよびタンパク質が含まれ、特に指示のない限り、本明細書においてこれらの用語は互換的に使用され得る。この用語はまた、ポリペプチドの発現後の修飾、例えばグリコシル化、アセチル化、リン酸化など、ならびに当該技術分野において公知である、天然および非天然両方のその他の修飾を意味しないか、または除外する。ポリペプチドはタンパク質全体であってよいか、またはそのサブ配列であってよい。本発明に関連して、関心のもたれる特定のポリペプチドは、寛容原性の断片を含む、アミノ酸のサブ配列である。

10

【0025】

用語「断片」は、本明細書で説明されるポリペプチドの連続するアミノ酸に対応するペプチド配列の一部を含むポリペプチドを指し、この用語には、すべての中間的な長さおよびその変異形が含まれる。

【0026】

用語「V a c A」には、s 1 m 1 V a c A (配列番号 1、4 ~ 11) および s 2 m 2 V a c A (配列番号 2) が含まれる。Cover et al., 1992, J. Biochem., 267: 10570 - 1057 および Cover et al., 1997, J. Cell. Biol., 138: 759 - 769 の記載参照。特定の実施態様によれば、V a c A は配列番号 1 の s 1 m 1 V a c A である。別の実施態様によれば、V a c A は配列番号 2 の s 2 m 2 V a c A である。別の実施態様によれば、V a c A は配列番号 9 の s 1 m 1 V a c A である。

20

【0027】

用語「変異形」は、ポリヌクレオチドまたはポリペプチドの両方に適用される。本明細書で用いられる用語としてのポリペプチドの「変異形」は、参照とするペプチド配列と実質的に相同であるが、その参照とは異なるアミノ酸配列を有するペプチドまたはポリペプチドである。このような変異形は天然のものであってよいか、または例えば、当該技術分野において公知の多くの技術のうちのいずれかを用いて、本明細書に記載される、上記本発明のポリペプチド配列の 1 つ以上を改変することによって合成されてもよい。多くの場合、変異形は保存された置換を含み得る。実質的に相同とは、数個のアミノ酸、例えば 1、2、3、4、5、または 6 アミノ酸の欠失、挿入および / または置換を除いて、参照ペプチド配列と同一である、変異形のアミノ酸配列を意味する。実質的に相同とは、参照アミノ酸配列と、少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98% または少なくとも 99% 同一である、変異形のアミノ酸配列を意味する。変異形の核酸配列は、参照核酸配列と、少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98% または少なくとも 99% 同一であってよい。2 つのアミノ酸配列または 2 つの核酸配列の同一性は、目視および / または数学的算出によるか、またはさらに容易には、Clustal パッケージバージョン 1.83 のような、配列比較のために用いられる既知のコンピュータプログラムを用いた配列情報の比較によって決定できる。

30

【0028】

変異形は、少なくとも 1 つの保存的に置換されたアミノ酸を有する配列を含んでよい。「保存された置換」とは、ペプチド化学の当業者が、ポリペプチドの二次構造および疎水性親水性指標の性質が実質的に変化しない（例えば同様の生理化学特性を有する）ことを予想し得るような、アミノ酸の、同様の性質を有する別のアミノ酸への置換である。本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチドの構造には改変が為されてよく、この改変によって、所望の特性、例えば寛容原性を有する変異形または誘導体ポリペプチドをコードする機能的分子がなお得られる。同等か、または改良された、本発明のポリペプチドの寛容原性の変異形または部分を作り出すために、ポリペプチドのアミノ酸配列を変更すること

40

50

が望ましい場合、当業者は、典型的にはコードするDNA配列のコドンを1つ以上変更するであろう。このような変更においては、アミノ酸の疎水性親水性指標、極性、電荷、溶解度、疎水性、親水性および/または両親媒性の性質が考慮される。タンパク質に相互作用的な生物作用を付与するための、アミノ酸の疎水性親水性指標の重要性は、当該技術分野において一般的に理解されている(Kyte, et al., 1982, J. Mol. Biol., 157: 105-131)。保存された置換の例としては、1つの脂肪族残基の、別の脂肪族残基への置換、例えばIle、Val、Leu、もしくはAlaの互いの置換、または1つの極性残基の、別の極性残基への置換、例えばLysとArgとの間、GluとAspとの間、もしくはGlnとAsnとの間の置換が挙げられる。その他のこのような保存された置換としては、例えば、同様な疎水性を有する領域全体の置換が知られている(Kyte, et al., 1982, 上記)。例えば「保存されたアミノ酸の置換」には、その位置のアミノ酸残基の極性もしくは電荷への影響が見られないかまたは少ないような、未変性のアミノ酸残基の変性残基による置換が含まれ得る。所望のアミノ酸の置換(保存されたかまたは保存されていない)は、このような置換の必要時に当業者によって決定され得る。代表的なアミノ酸の置換を以下の表1に示す。用語「変異形」にはまた、参照ペプチド配列と実質的に相同であるが、1つ以上のアミノ酸が化学的に改変されているか、またはアミノ酸類似体によって置換されているために、参照配列のアミノ酸配列とは異なるアミノ酸配列を有するペプチドまたはポリペプチドも含まれる。この用語にはグリコシル化されたポリペプチドも含まれる。

【表1】

元の残基	置換例
Ala (A)	Val, Leu, Ile
Arg (R)	Lys, Gln, Asn
Asn (N)	Gln
Asp (D)	Glu
Cys (C)	Ser, Ala
Gln (Q)	Asn
Glu (E)	Asp
Gly (G)	Pro, Ala
His (H)	Asn, Gln, Lys, Arg
Ile (I)	Leu, Val, Met, Ala, Phe
Leu (L)	Ile, Val, Met, Ala, Phe
Lys (K)	Arg, Gln, Asn
Met (M)	Leu, Ile, Phe
Phe (F)	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr
Pro (P)	Ala, Gly
Ser (S)	Thr, Ala, Cys
Trp (W)	Phe, Tyr
Thr (T)	Ser
Tyr (Y)	Trp, Phe, Thr, Ser
Val (V)	Ile, Met, Leu, Phe, Ala

【0029】

一般に、元のポリペプチドに存在する1つ以上のアミノ酸に対する置換は、保存的に為されなければならない。本発明のポリペプチド、そのポリペプチド断片および変異形は、投与の際に、抗原／アレルゲンに対する寛容性を誘導することができる。

【0030】

「寛容原性の断片」は、本出願に記載する抗原／アレルゲンに対する寛容性を誘導できる断片を意味する。特定の実施態様において、寛容原性の断片は、少なくとも完全長V a c Aポリペプチドと同程度に、抗原／アレルゲンに対する寛容性を誘導でき、また特定の実施態様において、寛容原性の断片は、寛容性の誘導において完全長V a c Aポリペプチドよりもさらに効果的であり得る。しかしながら特定の実施態様において、寛容原性の断片は、抗原／アレルゲンに対する寛容性を誘導するが、完全長V a c Aポリペプチドほど効果的には寛容性を誘導し得ない。このような寛容原性の断片は特に、限定はされないが、完全長V a c Aポリペプチドに比較して調製または精製が容易であることのような、その他の好都合な性質を有している場合に、本発明においてなお有用であり得る。当業者が認識し得るように、遅延型過敏症(D T H)応答の測定、E L I S Aまたはその他の方法によるサイトカイン産生の測定、T細胞増殖または細胞傷害性アッセイ、B細胞増殖アッ

10

20

30

40

50

セイ、抗体産生などを含む様々な公知のアッセイを、寛容性の誘導を評価するために用いることができる。このようなアッセイは当該技術分野において公知であり、例えば、Current Protocols in Immunology, Edited by: Coligan et al., 2001 John Wiley & Sons, NY, N.Y.; Ausubel et al., 2001, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publ. Assc. Inc. & John Wiley & Sons, Inc., NY, N.Y. に記載されている。

【0031】

本発明のポリペプチドは、様々な公知の合成および/または組換え技術のいずれかを用いて調製されるものであり、後者については以下に詳しく述べる。一般に150アミノ酸よりも短い、ポリペプチド、部分およびその他の変異形は、当業者に公知の技術を用いた合成手段によって產生できる。一実例によれば、このようなポリペプチドは、伸長するアミノ酸鎖にアミノ酸を連續的に付加するメリフィールド固相合成法のような (Merrifield, 1963, J. Am. Chem. Soc., 85: 2149 - 2146)、市販の固相技術を用いて合成される。

【0032】

用語「薬剤的に許容される」は、生物学的に、またはその他の点で、望ましくないものではない物質によって構成される担体を指す。

【0033】

用語「担体」は、医薬製剤中に存在する有効薬剤以外のいずれかの成分を指すことから、希釈剤、結合剤、潤滑剤、崩壊剤、注入剤、着色料、湿潤剤または乳化剤、pH緩衝剤、保存料などがこれに含まれる。

【0034】

本明細書で用いられる、「治療」および「治療する」などは、一般に所望の薬理学的および生理的な効果を得ることを意味する。この効果は、疾病、その症状もしくは状態の予防または部分的予防の点から、予防的であってよく、かつ/または、疾病、状態、症状もしくは疾病に起因する有害作用の、部分的または完全な治癒の点から、治療的であってよい。本明細書で用いられる用語「治療」は、哺乳類、特にヒトにおける疾病的いずれの治療も網羅し、この用語は必ずしも治癒または症状の完全な消滅を意味することが意図されるものではないが、患者に利益を与えるどのような型の治療も指し、この用語には、(a) 例えは家族歴、過体重状態または年齢に基づいて疾病にかかりやすい可能性があるが、まだ診断されていない被験体が、その疾病にかかるのを予防すること、(b) 疾病を抑制すること、すなわちその発生を停止させること、または疾病を軽減すること、すなわち損傷の改善または矯正のような、疾病および/またはその症状もしくは状態の後退を引き起こすことが含まれる。

【0035】

特に、本発明によるアレルギー性疾患の予防および/または治療には、個体の抗原/アレルゲンに対する感受性を正常化させることまたは減少させることが含まれる。用語「治療」は、対象アレルゲン/アレルゲンに対する過敏な免疫応答をこうむっているか、またはそれを起こすリスクがある被験体に利益を与えるどのような型の治療または予防も指し、この用語には、被験体の(例えは1つ以上の症状における)状態の改善、症状の開始の遅延または症状の進行の遅延などが含まれる。特定の態様によれば、本発明によるアレルギー性疾患の予防および/または治療には、アレルゲンに対する末梢の寛容性を誘導することが含まれる。

【0036】

一つの態様によれば、本発明による治療の効果は、気道過敏症の予防または減少、気管支内への細胞侵入の予防または減少(典型的には、Th2細胞から產生され、アレルギー反応の炎症機構に関連するサイトカインであるIL-4の產生を阻害する機能的な機構を通して)、アレルゲン誘導性喘息の特徴である、肺炎症、気管支肺胞の好酸球增多症、杯

10

20

30

40

50

細胞化生、粘液産生およびT h 2サイトカイン産生の予防または減少、のうちの1つ以上を通して観察され得る。治療の成功は、調節性リンパ球もしくはその他の細胞、または肺全体（B A L F、痰）もしくは血清における、E L I S Aによって評価可能なI L - 10産生の観察によっても明らかにされ得る。

【0037】

本明細書で用いられる用語「被験体」は哺乳類を指す。例えば、本発明が意図する哺乳類としては、ヒト、霊長類、家畜、例えばウシ、ヒツジ、ブタおよびウマ、実験用げっ歯類などが挙げられる。

【0038】

用語「高リスク」の被験体または個体は、アレルゲン／抗原に対する過敏症を発生するリスク、特にアトピー性またはアレルゲン誘導性喘息を発生するリスクがある被験体である。これらには、近い親類にみられるアトピー性疾患の家族歴のような遺伝的素因、妊娠中の母親の喫煙および出生後の喫煙環境、例えば呼吸器合胞体ウイルスおよびライノウイルスによる、ウイルス性の呼吸器感染症、および既知の職業性アレルゲン（例えば小麦粉）への職業性の曝露が含まれる。アレルゲン／抗原に対する過敏症を発生するリスクまたは素因、特にアトピー性またはアレルゲン誘導性喘息を発生するリスクまたは素因は、患者の家族歴を含む完全な病歴の記録、皮膚穿刺試験、血清I g E、特異的な血清I g E濃度の評価、および気道の反応亢進の測定によって評価できる。

【0039】

本発明による治療または方法についての用語「有効性」は、本発明による使用または方法に応答した、疾病または状態の経過の変化に基づいて測定できる。例えば、本発明による治療または方法の有効性は、例えば以下に述べるように、被験体の寛容性の程度を治療の前後に測定することによって、測定できる。

【0040】

本明細書で参照される用語「寛容性」は、抗原／アレルゲンに対する、通常は疾病の原因に関係する抗原／アレルゲンに対する、免疫の不応答性として定義される。寛容性は、様々な経路から投与された抗原／アレルゲンによって誘導され得るが、経口寛容性は、in vivo投与した際の抗原／アレルゲンに対して寛容性の誘導をもたらす、組成物の経口投与を指す。したがって寛容性の誘導は、皮膚穿刺試験におけるアレルゲンへの応答の測定、アレルゲン特異的なI g Eの評価、およびアレルゲンに対する特異的なT細胞応答の評価（増殖およびサイトカイン産生）を含む、様々な技術によってモニターできる。

【0041】

本明細書で用いられる用語「寛容原性に有効な量」は、V a c A、V a c A断片およびV a c A変異形から選択される少なくとも1つのポリペプチド、または本発明による医薬製剤の、投与された被験体に検出可能な寛容原性応答を誘発する量を指す。

【0042】

本明細書で用いられる用語「抗原」は、体内に入った際に、疾病に対する身体防御の一部として、免疫系の応答を引き起こし、抗体産生をもたらす異物を指す。

【0043】

用語「アレルゲン」は、動物またはヒトのような個体に、過敏な免疫応答（本明細書に記載されるような）を引き起こすことが可能な抗原を指すことが意図される。アレルゲンは感作アレルゲンまたは交差反応アレルゲンであってよい。

【0044】

用語「未変性の」は、タンパク質（例えば構造）に変性が観察されないことを指す。このことは、ゲル電気泳動、ゲル濾過またはマススペクトロメトリーのような、当該技術分野において公知のいずれかの方法によって確認できる。

【0045】

本発明のポリペプチドおよびその製剤は、例えばアレルギー性疾患、特にアレルギー性喘息における寛容化戦略に有用となり得る免疫調節性を有する。本発明のポリペプチドおよびその製剤は、特に、高リスクの個体に対して喘息を予防するための寛容化治療に有用

10

20

30

40

50

となり得る。

【0046】

死細胞抽出物または精製ペプチドの形である、本発明のV a c A ポリペプチド

本発明のV a c A ポリペプチド、その断片および変異形としては、詳細な説明に記載した物質が挙げられ、これらは、V a c A を含む細胞抽出物（死細胞）の形、または精製した合成ポリペプチド（組み換えにより產生したか、または合成により得た）の形を含む、様々な形によって投与することができる。

【0047】

一つの態様において、本発明は、H . ピロリ菌の死細胞抽出物の形である、その断片および変異形を含む本発明のV a c A ポリペプチドを提供する。

10

【0048】

さらなる態様において、本発明は、H . ピロリ菌の細胞抽出物の形であって、細菌細胞が未変性のH . ピロリ菌死細胞である、その断片および変異形を含む本発明のV a c A ポリペプチドを提供する。

【0049】

さらなる態様において、本発明は、H . ピロリ菌の死細胞抽出物の形であって、H . ピロリ菌株が、H . ピロリP M S S 1 (A r n o l d e t a l . 2 0 1 1 , G a s t r o e n t e r o l o g y , 1 4 0 , 1 9 9 - 2 0 9) 、またはその他のいずれかの有用な、ヒト患者からのH . ピロリ分離株、遺伝子欠失もしくは挿入による変異誘発または点突然変異のために1つ以上の遺伝子を欠損した、前記分離株の変異体である、その断片および変異形を含む、本発明のV a c A ポリペプチドを提供する。

20

【0050】

H . ピロリ細胞抽出物を調製するために用いてもよい方法は当業者に公知であり、このような方法としては、未変性の細菌死細胞を產生する物理的手段の使用、すなわち L a e m m l i e t a l . , 1 9 7 0 , N a t u r e , 2 7 7 , 6 8 0 - に記載されるような未変性の条件下での、例えばいわゆる「圧力式細胞破碎機」(K e l e m e n e t a l . , 1 9 7 9 , J . C e l l S c i . 3 5 : 4 3 1 - 1 4 1) の使用が挙げられる。

【0051】

あるいは、超音波処理、または長時間の凍結乾燥、凍結および融解サイクルの反復、凍結乾燥、均質化技術、および物理的な力を用いたその他の細胞破碎技術のようなその他の方法を、それらの方法が、H . ピロリタンパク質を B h a d u r i e t a l . , 1 9 8 3 , A p p l . E n v i r o n . M i c r o b i o l . , 4 6 (4) : 9 4 1 - 3 に記載されるような未変性の形にとどめる限り、応用することができる。

30

【0052】

別のさらなる態様において、本発明は、

(i) 生菌細胞の培養物を回収し、

(i i) 当該回収した細菌を、水中または塩の水溶液中での、数回の凍結 / 融解サイクルに付し、

(i i i) 前記細菌細胞を高圧下で破碎し、

40

(i v) 細胞抽出物を収集すること

を含んでなる方法によって得ることのできる、H . ピロリの細菌細胞抽出物の形である、本発明のV a c A ポリペプチドならびにその断片および変異形を提供する。

【0053】

別のさらなる態様において、本発明は、細胞抽出物の収集後または収集時に細胞片を除去する工程をさらに含む上記の方法によって得ることのできるH . ピロリの細菌細胞抽出物の形である、本発明のV a c A ポリペプチドならびにその断片および変異形を提供する。

【0054】

別の態様において、本発明は、精製したV a c A ポリペプチドの形である、その断片お

50

および変異形を含む本発明のV a c Aポリペプチドを提供する。

【0055】

別のさらなる態様において、本発明は、精製した組換えV a c Aポリペプチドの形である、その断片および変異形を含む本発明のV a c Aポリペプチドを提供する。

【0056】

別のさらなる態様において、本発明は、本質的に純粋な、すなわちC a g Aおよび、またはN A P (好中球活性化タンパク質)のような、抽出物に固有のその他の抗原成分を本質的に含まないV a c Aポリペプチド組成物の形である、その断片および変異形を含む本発明のV a c Aポリペプチドを提供する。例えば、このような本質的に純粋なV a c Aポリペプチド組成物は、単数又は複数の別の成分の遺伝子がノックアウトされた、例えばC a g A遺伝子がノックアウトされた変異H . ピロリ株から得ることができる。

【0057】

本発明による、V a c Aポリペプチド、その断片および変異形の組み換えによる調製は、当該技術分野において公知の様々な技術によって達成できる。前記V a c Aポリペプチド、その断片および変異形をコードする核酸配列は、例えばMOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, Sambrook et al., 4th Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., 2001に記載されるような当業者に公知の方法によって、組換え発現ベクター内に挿入できる。

【0058】

さらなる実施態様において、本発明による組換えベクターを含む宿主細胞が提供される。

【0059】

組換えベクターの宿主細胞への導入は、BASIC METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, Davis et al., 2nd ed., McGraw-Hill Professional Publishing, 1995, およびMOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL(上記)に記載されるような当業者に公知の方法、例えばリン酸カルシウムによるトランスフェクション、DEAEデキストランによるトランスフェクション、トランスフェクション、微量注入法、陽イオン性の脂質によるトランスフェクション、エレクトロポレーション、形質導入または感染によって行うことができる。

【0060】

宿主細胞は、例えば、E. coliのような細菌細胞、酵母細胞およびアスペルギルス、ストレプトマイセスの細胞のような真菌細胞、昆虫細胞、チャイニーズハムスター卵巣細胞 (CHO)、C127マウス細胞株、シリアンハムスター細胞のBHK細胞株、ヒト胎児腎293 (HEK293) 細胞であってよい。特定の実施態様において、宿主細胞はCHO細胞またはHEK293細胞である。

【0061】

宿主細胞は、例えば本発明のポリペプチドを発現させるために用いることができる。標準的な方法による精製後、本発明のポリペプチドは、以下に記載する方法において用いることができる。

【0062】

例えば組換えタンパク質を分泌する発現系を用いる際、培地は最初に、市販のタンパク質濃縮フィルター、例えば限外濾過ユニットを用いて濃縮されてよい。濃縮工程に続いて、濃縮物は、ゲル濾過培地のような精製マトリックスへ添加されてよい。あるいは、陰イオン交換および/またはアフィニティー樹脂を用いてもよい。マトリックスは、アクリルアミド、アガロース、デキストラン、セルロースまたはタンパク質精製に通常用いられるその他の型であってよい。あるいは、陽イオン交換工程を用いてもよい。様々に組み合わせた前述の精製工程の幾つか、またはすべては公知であり、実質的に均質な組換えタンパク質を提供するために用いられてよい。

10

20

30

40

50

【0063】

細菌培養液中に產生された組換えポリペプチドは、最初に宿主細胞を破碎し、遠心分離を行い、不溶性ポリペプチドの場合は細胞ペレットから、また可溶性ポリペプチドの場合は上清から抽出を行い、続いて1回以上の濃縮、塩析、イオン交換、アフィニティー精製またはサイズ排除クロマトグラフィー工程に供することによって分離できる。微生物細胞は、凍結・融解サイクル、超音波処理、機械的破碎、または物理的もしくは界面活性剤を含む化学的細胞溶解剤の使用を含む、いずれかの簡便な方法によって破碎できる。

【0064】

別の態様において、本発明のVacaポリペプチドは、McClain et al., 2003, J. Biol. Chem., 278:12101-12108に記載されるように、完全長タンパク質として組み換えにより調製できるか、またはGonzalez-Rivera et al., 2010, Biochemistry 49:5743-5752およびGangwer et al., 2007, PNAS, 104(41):16293-8に記載されるように、界面活性剤の存在下で、Vacaポリペプチドの2つのドメインであるp33およびp55を再構成することによって調製できる。

10

【0065】

別の態様において、本発明は、本明細書に記載されるVacaポリペプチドの変異形または断片を提供する。通常本発明に包含されるポリペプチドの変異形は、本明細書で説明されるポリペプチド配列に対するその全長に沿って、典型的には少なくとも約70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%もしくは99%またはそれを超えた同一性（以下に述べるように決定した）を示す。

20

【0066】

別の態様において、Vacaポリペプチド、その断片および変異形は、薬剤的に許容される塩または薬剤的に許容される複数の塩の組み合わせと共に用いることができる。

【0067】

組成物

本発明は、Vacaポリペプチド、その変異形または断片、その医薬組成物、およびアレルゲン／抗原に対する過敏症、特にアレルゲン誘導性喘息もしくはアトピー性喘息または食物アレルギーを患っているか、または抗原／アレルゲンに対する過敏症を発症するリスクがある被験体、特に哺乳類被験体、最も特にヒト患者を治療するための方法を提供する。

30

【0068】

別の態様によれば、本発明は、Vacaポリペプチド、その変異形または断片、その医薬組成物、および被験体の抗原／アレルゲンに対する過敏症を制御するため、特に前記抗原／アレルゲンに対する寛容性を誘導するための方法を提供する。

【0069】

特定の実施態様において、本発明は、Vacaポリペプチド、その変異形または断片、および薬剤として使用するための、本発明による医薬製剤を提供する。

【0070】

本発明の医薬組成物は、本明細書に記載されるいづれかの形である、本発明による少なくとも1つのVacaポリペプチド、その変異形または断片を含んでよい。特定の態様によれば、本発明の医薬組成物は寛容原性組成物である。特定の態様において、本発明の医薬組成物は、免疫調節を通して、末梢の寛容性を誘導し、かつ抗原に対する免疫応答を減少させることのできる寛容原性組成物である。特定の実施態様において、本発明の医薬組成物は、免疫原性エピトープまたはアレルゲンのような免疫原性成分を本質的に含まない、少なくとも1つのVacaポリペプチド、その変異形または断片を含む。

40

【0071】

別の特定の態様において、本発明の医薬組成物は、少なくとも1つのVacaポリペプチド、その変異形または断片と、既知のアレルゲン、例えば乳、ピーナッツ、魚類または

50

甲殻類、コムギ（グルテン）、大豆、卵などに由来するアレルゲンのような食物アレルゲンとの組み合わせを含む、寛容原性組成物である。

【0072】

別の特定の態様において、本発明の医薬組成物は、少なくとも1つのV a c Aポリペプチド、その変異形または断片と、既知のアレルゲン、例えば草地、樹木、雑草などに由来する花粉のような、花粉に由来するアレルゲンとの組み合わせを含む、寛容原性組成物である。特定の態様によれば、このような寛容原性組成物は、免疫調節を通して、アレルゲン特異的な免疫寛容を誘導し、かつ免疫応答を減少させる能力を有する（脱感作もしくは減感作または免疫療法として知られる）。

【0073】

特定の態様によれば、本発明の少なくとも1つのV a c Aポリペプチド、その変異形または断片は、既知のアレルゲン、特に食物アレルゲンと組み合わせて投与される。この組み合わせは、前記少なくとも1つのV a c Aポリペプチド、その変異形または断片とアレルゲンとの同時投与、または同じ单一製剤内の、前記少なくとも1つのV a c Aポリペプチド、その変異形または断片とアレルゲンの投与、または前記アレルゲンの一部の免疫原性成分に共有結合させた、前記少なくとも1つのV a c Aポリペプチド、その変異形または断片の投与によって達成され得る。

【0074】

本発明の組成物は、ミョウバン、安定剤、抗菌剤、緩衝液、着色料、香味料、アジュバントなどのような、薬剤的に許容される追加成分を1つ以上さらに含んでよい。

【0075】

本発明による組成物は、従来から用いられるアジュバント、担体、希釈剤または賦形剤と共に、その医薬組成物および単位剤形の形にされてよく、このような形は、錠剤もしくは充填したカプセルのような固体、または溶液、懸濁液、エマルション、エリキシル剤のような液体、またはこれらを充填したカプセルとして、経口用に用いられてよいか、または注射もしくは持続点滴による非経口用（皮下を含む）の無菌注射用溶液の形にされてもよい。注射用組成物は、典型的には、注射用の無菌生理食塩水またはリン酸緩衝食塩水または当該技術分野において公知のその他の注射用担体に基づく。このような医薬組成物およびその単位剤形は、追加の有効化合物または原則が有るかまたは無い状態で、標準的な割合の成分を含んでよく、このような単位剤形は、使用が意図された一日投与量の範囲に釣り合った、有効成分のいずれかの適切な有効量を含んでよい。特定の実施態様によれば、本発明による組成物は注射用である。

【0076】

本発明の組成物は、限定はされないが、水性または油性懸濁液、溶液、エマルション、シロップおよびエリキシル剤のような液体製剤であってよい。該組成物はまた、使用前に水もしくはその他の適切なビヒクルによって再構成するための乾燥製品として処方されてもよい。このような液体製剤は、限定はされないが、懸濁剤、乳化剤、非水性ビヒクルおよび保存料のような添加物を含んでよい。懸濁剤としては、ソルビトールシロップ、メチルセルロース、グルコース／糖シロップ、ゼラチン、ヒドロキシエチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、ステアリン酸アルミニウムゲルおよび食用の水素化脂質が挙げられるが、これらに限定されない。乳化剤としては、レシチン、ソルビタンモノオレエートおよびアカシアが挙げられるが、これらに限定されない。保存料としては、メチルまたはプロピルp-ヒドロキシ安息香酸およびソルビン酸が挙げられるが、これらに限定されない。分散剤または湿潤剤としては、ポリ（エチレングリコール）、グリセロール、ウシ血清アルブミン、Tween（登録商標）、Span（登録商標）が挙げられるが、これらに限定されない。

【0077】

さらなる材料および製剤の加工技術などについては、参照として本明細書に取り込まれる、Remington's "The Science and Practice of Pharmacy", 22nd Edition, 2012, University

10

20

30

40

50

of the Sciences in Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkinsの第5部に説明される。

【0078】

本発明の組成物はまた、埋め込みまたは筋肉内注射によって投与され得るデポ製剤として処方されてもよい。

【0079】

本発明の固体組成物は、従来の様式で処方された錠剤または舐剤の形であってよい。例えば、経口投与のための錠剤およびカプセルは、限定はされないが、結合剤、注入剤、潤滑剤、崩壊剤および湿潤剤のような従来の賦形剤を含んでよい。結合剤としては、シロップ、アカシア、ゼラチン、ソルビトール、トラガカント、デンプンの漿剤およびポリビニルピロリドンが挙げられるが、これらに限定されない。注入剤としては、ラクトース、糖、結晶セルロース、トウモロコシデンプン、リン酸カルシウムおよびソルビトールが挙げられるが、これらに限定されない。潤滑剤としては、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸、タルク、ポリエチレングリコールおよびシリカが挙げられるが、これらに限定されない。崩壊剤としては、ジャガイモデンプンおよびデンブングリコール酸ナトリウムが挙げられるが、これらに限定されない。湿潤剤としては、ラウリル硫酸ナトリウムが挙げられるが、これに限定されない。錠剤は、当該技術分野において公知の方法に従ってコートされてよい。

【0080】

本発明の組成物はまた、吸入のために処方されてもよく、限定はされないが、乾燥粉末として、または噴霧剤を用いるエアロゾルまたはスプレーのような形で投与されてよい、溶液、懸濁液またはエマルションの形であってよい。

【0081】

本発明の化合物は、持続放出剤形によって、または持続放出薬物送達システムから、投与することもできる。

【0082】

特定の実施態様において、単数または複数の治療用化合物は、加圧エアロゾルまたは噴霧製剤として、吸入を通して患者の肺へ直接投与される。このような製剤は肺内および/または鼻腔内吸入投与に有用な、様々な公知のエアロゾル噴霧剤のいずれかを含んでよい。加えて、様々な共溶媒、界面活性剤、安定剤（例えば抗酸化剤、キレート剤、不活性ガスおよび緩衝液）のいずれかと共に、またはこれらなしで、水が含まれ得る。容器から複数回の用量が投与される組成物には、抗菌剤が典型的に添加される。このような組成物はまた、一般に濾過および滅菌され、安定性を増大させ、かつ溶解度を改善するために凍結乾燥され得る。

【0083】

本発明の医薬組成物は、エアロゾルとして投与できる投与量単位からなってよい。エアロゾルとの用語は、コロイド性のシステムから、加圧パッケージからなるシステムまで、広範囲にわたるシステムを意味するために用いられる。送達は、液化もしくは圧縮ガス、または有効成分を分配する適切なポンプシステムによって行われてよい。本発明の化合物のエアロゾルは、単数または複数の有効成分を送達するため、単相性、二相性、または三相性のシステムによって送達され得る。エアロゾルの送達には、共にキットを構成し得る、必要な容器、活性剤、バルブ、副容器などが含まれる。当業者は、過度な実験なしに好みのエアロゾルを決定し得る。

【0084】

一つの態様によれば、本発明は経口用の医薬組成物を提供する。

【0085】

一つの態様によれば、本発明は注射用の医薬組成物を提供する。

【0086】

一つの態様によれば、本発明は吸入用の医薬組成物を提供する。

【0087】

10

20

30

40

50

本明細書の他所に記載するように、特定の実施態様において、本明細書で用いられるV a c A ポリペプチド、その変異形または断片、その医薬組成物の予防上 / 治療上有効な用量は、本明細書に記載される様々な方法のいずれかを用いて測定した、抗原 / アレルゲンに対して寛容性を誘導するために十分な用量である。さらなる実施態様において、本明細書で用いられるV a c A ポリペプチド、その変異形または断片、その医薬組成物の予防上 / 治療上有効な用量は、本明細書に記載される様々な方法、例えばサイトカイン放出アッセイ、細胞内サイトカイン染色およびフローサイトメトリーなどのいずれかを用いて測定した、抗原 / アレルゲンに対してT細胞寛容性を誘導するために十分な用量である。エフェクターT細胞と共に培養することによって増殖またはサイトカイン分泌の抑制を測定する、機能的T細胞アッセイ、T細胞抑制アッセイもまた用いられてよい。

10

【 0 0 8 8 】

投与の方法

本発明のポリペプチドおよび組成物は、静脈内注射、腹腔内注射、皮下注射、経口経路、鼻腔内投与、肺内注入または吸入を含むいずれかの方法によって投与されてよい。特定の実施態様において、異なる経路の組み合わせもまた用いられてよい。

【 0 0 8 9 】

ポリペプチドおよび組成物の正確な用量は、特定のポリペプチドおよび組成物の効力、被験体の年齢、体重、性別および生理的状態と共に、本明細書の教示に基づき、当業者によって容易に決定される。

【 0 0 9 0 】

例として、様々な実施態様において、被験体の寛容性を達成する（または維持する）ために必要とされる寛容化ポリペプチドおよび組成物の投与量は、従来の寛容化療法に比較して少ない。例えば、薬剤のわずか1用量か、または少数の用量（例えば約3用量よりも少ないか、または約5用量よりも少ない）が、寛容性の誘導に十分であり得る。例として、寛容化の効果を達成するためには、毎週1回約5ないし約500mg / 用量が用いられる。

20

【 0 0 9 1 】

一つの実施態様によれば、本発明のポリペプチドおよび組成物は、アレルギーの症状の出現もしくはアレルゲンへの曝露による誘発の前か、またはアレルギーの症状の出現時もしくはアレルゲンへの曝露時に投与される。例えば、本発明のポリペプチドおよび組成物は、典型的には、花粉アレルギーのような季節性アレルギー性疾患にかかるリスクがある患者の場合には、被験体が単数または複数のアレルゲンに曝露される前に、またはアトピー性喘息のようなアレルギー性疾患にかかるリスクがある（例えば遺伝的または環境的リスク）幼児の場合には、患者がアレルギーの症状を示す前に、投与される。例えばP f e f f e r l e e t a l . , 2 0 1 3 , J . A l l e r g y C l i n . I m m u n o l . , 1 3 1 (6) : 1 4 5 3 - 6 3 に記載されるように、アトピーのリスクがある妊婦への投与（経口、鼻腔内またはその他のいずれかの経路を通じた）もまた同様に計画することができ、これは単独で、または新生児に対する継続治療と組み合わせて行われる。

30

【 0 0 9 2 】

さらなる実施態様によれば、本発明のポリペプチドおよび組成物は、通常のアレルゲン曝露期間の前の、少なくとも2週間（例えば約2ないし約12週間）投与される。さらなる実施態様によれば、本発明のポリペプチドおよび組成物は、アレルゲン曝露の前、および/またはアレルゲン曝露まで、および/またはアレルゲン曝露の間を通して、例えば週に約1回または2回ないし月に約1回または2回、繰り返して投与される。新生児の喘息およびアレルギー性のリスクを減少させる目的で妊婦への投与を行う場合、投与は早期に、理想的には妊娠第一期に開始しなければならない（P f e f f e r l e e t a l . , 2 0 1 3 , 上記）。

40

【 0 0 9 3 】

組み合わせ

本発明によるV a c A ポリペプチド、その変異形または断片およびその医薬製剤は、単

50

独で、または過敏症、特にアトピー性喘息のようなアレルギー性疾患の予防および／または治療に有用な共薬剤、例えば気管支拡張薬、抗原／アレルゲンに対する寛容化に有用な共薬剤、例えば抗体または共刺激もしくは共阻害によって干渉する（例えばP D 1、C T L A - 4、C D 2 8、C D 4 0 ならびにリンパ球およびその他の免疫細胞に発現するその他のものを通して）その他の試薬による減感作に用いられる共投与アレルゲンから選択される共薬剤と組み合わせて投与できる。

【0094】

本発明は、個体へのV a c Aポリペプチド、その変異形または断片およびその医薬製剤の投与に先立ち、それと同時にまたは連続的に、抗原／アレルゲン過敏症、特にアトピー性喘息のようなアレルギー性疾患を予防もしくは治療するための、その他の治療上の／予防的な／免疫療法または共薬剤を、治療上有効な量投与すること（例えば併用寛容化措置）を包含する。前記共薬剤と同時に投与されるV a c Aポリペプチド、その変異形または断片およびその医薬製剤は、同じかまたは異なる単数もしくは複数の組成物として、かつ同じかまたは異なる単数もしくは複数の投与経路によって投与できる。

10

【0095】

別の態様によれば、本発明によるV a c Aポリペプチド、その変異形または断片は免疫療法に用いられてよく、ここで本発明によるV a c Aポリペプチド、その変異形または断片は、広範囲の抗原（アレルゲン）のうちの少なくとも1つの抗原に付随する。H. ピロリ抽出物またはV a c Aポリペプチドは、チリダニアアレルゲン、花粉由来のアレルゲン、または上に挙げたいずれかの食物アレルゲン（ピーナッツ、乳、大豆由来の、またはその他の）、またはアレルゲン特異的な様式で脱感作（減感作）を促進するその他のいずれかのアレルゲンと混合し、投与されてよい（K h i n c h i e t a l . , 2 0 0 4 , A l l e r g y , 5 9 (1) : 4 5 - 5 3 ）。

20

【0096】

一つの実施態様によれば、V a c Aポリペプチド、その変異形または断片を、過敏症、特にアトピー性喘息のようなアレルギー性疾患の予防および／または治療に有用な少なくとも1つの共薬剤、および少なくとも1つの、その薬剤的に許容される担体、希釈剤または賦形剤と組み合わせて含む医薬製剤が提供される。

【0097】

単回または複数回の用量として個体へ投与される投与量は、薬物動態特性、患者の状態および特性（性別、年齢、体重、健康状態、大きさ）、症状の程度、併用治療、治療頻度および望まれる効果のような、様々な因子に応じて変動し得る。

30

【0098】

患者

一つの実施態様において、本発明に従った患者は、アレルゲン誘導性またはアトピー性喘息（湿疹）、アトピー性皮膚炎（枯草熱）、アトピー性鼻炎、アレルギー性結膜炎、食物アレルギー、職業性アレルギー、アレルギー性気管支・肺アスペルギルス症および過敏性肺炎のようなアレルギー性疾患から選択される疾患にかかった患者である。

【0099】

別の実施態様において、本発明に従った患者は、アレルギー性疾患にかかるリスクがある患者である。

40

【0100】

別のさらなる実施態様において、本発明に従った患者は、アレルゲン誘導性またはアトピー性喘息にかかった患者である。

【0101】

別の実施態様において、本発明に従った患者は、食物・花粉アレルギーを含む花粉アレルギーのような、季節性アレルギー性疾患にかかるリスクがある患者である。

【0102】

別のさらなる実施態様において、本発明に従った患者は、小児または幼児、例えば約3歳未満の幼児である。

50

【0103】

別のさらなる実施態様において、本発明に従った患者は、アトピーの高リスクがある妊婦、またはアトピーの高リスクがある小児の母である妊婦であって、これらは妊娠期間中に治療されてよい。

【0104】

別のさらなる実施態様において、本発明に従った患者は、アトピー性皮膚炎、アトピー性鼻炎およびアレルギー性結膜炎から選択されるアレルギー性疾患にかかっている。

【0105】

別のさらなる実施態様において、本発明に従った患者は、食物アレルギーを患っている。

10

【0106】**本発明による使用**

本発明の一つの態様において、本明細書に記載されるポリペプチドもしくは製剤または組み合わせの使用により、少なくとも1つの抗原／アレルゲンに対して被験体を寛容化させるか、または前記被験体に寛容化応答を誘導するための方法が提供される。本発明によるポリペプチド、製剤または組み合わせは、被験体に寛容性を誘導するために有効な投与計画に従った量によって投与される。

【0107】

本発明の一つの実施態様において、アレルギー性疾患またはアレルギー性の応答、特にアトピー性喘息の予防、阻止および／または治療のための医薬組成物を調製するための、本発明によるポリペプチドまたはその製剤の使用が提供される。

20

【0108】

本発明の別の実施態様において、アレルゲン過敏症の阻止または治療のための医薬組成物を調製するための、本発明によるポリペプチドまたはその製剤の使用が提供される。

【0109】

本発明の別の実施態様において、被験体を寛容化させるか、または前記被験体に寛容化応答を誘導するための、本発明によるポリペプチドまたはその製剤の使用が提供される。

【0110】

本発明の別の実施態様において、被験体を寛容化させるか、または前記被験体に寛容化応答を誘導するための方法が提供され、前記方法は、本発明によるポリペプチドまたはその製剤の有効量もしくは寛容化する量を、それを必要とする被験体へ投与することを含む。

30

【0111】

別の実施態様において、本発明は、被験体におけるアレルギー性の応答、特にアレルギー性疾患、特にアトピー性喘息を予防、阻止または治療するための方法を提供し、前記方法は、本発明によるポリペプチド、その断片または変異形、または本発明による医薬製剤の、治療上有効な量を、それを必要とする被験体へ投与することを含む。

【0112】

別の実施態様によれば、本発明は、被験体におけるアレルゲン不耐性を治療するための方法を提供し、前記方法は、前記被験体において前記アレルゲンに対する寛容性を誘導するためには有効な量の、本発明によるポリペプチドまたはその組成物と、単数または複数の、アレルゲンもしくは抗原性の成分またはその断片もしくは類似体とを、前記被験体へ連続的または同時に投与することを含む。

40

【0113】

本発明のさらなる実施態様において、本発明による使用または方法が提供され、ここで被験体は、例えば家族歴、過体重状態または年齢に基づいて、アレルギー性疾患、特にアトピー性喘息にかかりやすいか、またはこれを発生するリスクがある。

【0114】

別の実施態様によれば、本発明は、V a c A タンパク質、その断片または変異形から選択されるポリペプチドと、アレルギー性疾患、特にアトピー性喘息の予防、阻止および／

50

もしくは治療ならびに / またはアレルゲンに対する寛容化応答の誘導に有用な少なくとも 1 つの共薬剤と、少なくとも 1 つの、その薬剤的に許容される担体、希釈剤または賦形剤とを組み合わせて含む医薬製剤に関する。

【 0 1 1 5 】

別の実施態様において、本発明による使用または方法が提供され、ここで本発明のポリペプチドまたは組成物は、アレルゲンと組み合わせて用いられる。

【 0 1 1 6 】

別の実施態様において、本発明によるポリペプチド、組成物または方法が提供され、ここで前記ポリペプチドまたはその組成物は、経口、鼻腔内、肺内、非経口または全身性の経路によって投与される。

10

【 0 1 1 7 】

別の実施態様において、本発明によるポリペプチド、組成物または方法が提供され、ここで V a c A は s 1 m 1 V a c A である。

【 0 1 1 8 】

別の実施態様において、本発明によるポリペプチド、組成物または方法が提供され、ここで V a c A は s 2 m 2 V a c A である。

【 0 1 1 9 】

別の実施態様において、本発明によるポリペプチド、組成物または方法が提供され、ここで V a c A は、配列番号 1、2、4、5、6、7、8、9、10 および 11 から選択されるアミノ酸配列を含む V a c A タンパク質である。

20

【 0 1 2 0 】

別の実施態様において、本発明によるポリペプチド、組成物または方法が提供され、ここで V a c A は、配列番号 1 またはその断片もしくは変異形のアミノ酸配列を含む V a c A タンパク質である。

【 0 1 2 1 】

別の実施態様において、本発明によるポリペプチド、組成物または方法が提供され、ここで V a c A は、配列番号 2 またはその断片もしくは変異形のアミノ酸配列を含む V a c A タンパク質である。

【 0 1 2 2 】

別の実施態様において、第 1 区画または一連の区画が、ポリペプチド、その断片もしくは変異形、その組成物を含み、第 2 区画または一連の区画が、アレルゲンもしくはアレルゲン源または抗原性断片、それらの成分または類似体を含む区画の形を、使用説明書と共に含む、医薬キットが提供される。

30

【 0 1 2 3 】

以下、本発明を例証する実施例を、さらに詳細に、図面において説明される実施態様への参照によって記載する。

【 実施例 】

【 0 1 2 4 】

略語は、それぞれ以下のように定義される。

B A L F (気管支肺胞洗浄液) 、 B C A (ビシンコニン酸アッセイ) 、 E D T A (エチレンジアミン四酢酸) 、 F C S (ウシ胎児血清) 、 G M - C S F (顆粒球マクロファージコロニー刺激因子) 、 H & E (ヘマトキシリン・エオシン) 、 i . p . (腹腔内に) 、 M C T P 1 (肥満細胞プロテアーゼ P 1) 、 M L N (腸間膜リンパ節) 、 P A S (過ヨウ素酸シップ) 、 P B S (リン酸緩衝液硫酸塩) 、 R P M I (ロイユアルパーク記念研究所 (培地)) 。

40

【 0 1 2 5 】

実施例 1 : アレルゲン誘導性喘息における H . ピロリ死細胞抽出物

H . ピロリ死細胞抽出物の形で提供される本発明の組成物の定期的な投与によって、喘息のようなアレルゲン誘導性の応答を防御可能であるか否かを評価するため、以下のモデルを使用した。以下に述べるように、マウスに、その 7 日齢から、卵白アルブミンによる

50

感作と、ミョウバンをアジュバントとした卵白アルブミンによる誘発とを行う前まで、死細胞全抽出物（以下に述べるように調製した）の用量を、毎週胃内投与した。卵白アルブミンを投与されたが、H. ピロリ死細胞抽出物は投与されなかった対照マウスは、メタコリンに対して気道過敏症を発生し（図1 A、B）、かつ気管支肺胞洗浄によって回収した細胞の染色および定量化によって測定されたように、気管支肺胞の免疫細胞浸潤および好酸球增多症を示し（図1 C, D）、またH & EおよびP A S染色パラフィン切片を用いた組織学的評価およびスコア化によって決定されたように、肺炎症および杯細胞化生を示した（図1 E ~ G）。肺調製物の単一細胞を卵白アルブミンを用いて再刺激すると、E L I S Aおよびサイトメトリックビーズアレイによって測定されたように（R & D Biosystems、BD Biosciencesの、製造者による指示に従った）、T h 2サイトカインであるIL-5およびIL-13の、高濃度の産生が誘導された（図1 H、I）。対照的に、H. ピロリ死細胞抽出物を投与されたマウスは、気道過敏症から防御され（図1 A、B）、気管支肺胞および肺の炎症、好酸球增多症ならびに杯細胞化生の程度が有意に低下した（図1 C ~ G）。アレルゲンを用いて肺調製物を再刺激した後のT h 2サイトカインの産生については、E L I S Aおよびサイトメトリックビーズアレイによって低下が示された（図1 H、I）。死細胞抽出物によって処置されたマウスが、喘息のアレルゲン誘導性の症状を示さなかつことは、E L I S Aによって測定した卵白アルブミン特異的な血清I g E濃度が、すべての感作マウスにおいて同等であったことから、アレルゲンに対する一次応答の障害によるものではなかった。

【0126】

10

観察された効果の特異性について取り組み、かつ防御の鍵となる必要条件を解明するため、様々な投与経路および投与計画、治療開始時の年齢、およびその他の胃腸病原体からの抽出物について調べた。興味深いことに、H. ピロリ死細胞抽出物の全身性（腹腔内）投与によるアレルゲン誘導性喘息からの防御は、胃内経路と同程度に効率的であった。胃を通した処置を成体マウスに対して開始した場合、新生仔の場合に比較して効果は少なかつた。熱により不活性化したH. ピロリ抽出物、およびE. coliまたはネズミチフス菌の培養から産生した同量の抽出物を用いて試験を行ったが、アレルギー性気道疾病の特徴からの防御はみられなかつた。

【0127】

20

結論として、死細胞抽出物による処置の有益な効果は、H. ピロリ特異的であり、細菌の熱感受性成分を必要とし、若齢マウスに処置を開始した場合に最も顕著である。

【0128】

H. ピロリ死細胞抽出物の調製ならびにG G TおよびV a c Aの精製

s 2 m 2 V a c Aを分泌するH. ピロリ株PMSS1 (Arnold et al. 2011, 上記)を、10% F C Sを加えたブルセラプロス中で培養し、遠心分離によってペレットにした後、P B Sを用いて1回洗浄した。細菌を3回の凍結/融解サイクルに供した後、圧力式細胞破碎機 (Stansted Fluid Power, Cell Pressure Homogenizer)に、30.000 barにて3回通して破碎した。遠心分離によって細胞片を除去した後、上清を2 μmのフィルターを通して濾過し、本実施例で用いる死細胞抽出物を得た。B C Aタンパク質キット (R & D systems)を用いてタンパク質濃度を決定した。

【0129】

以前に公開された手順 (Cover et al., 1992, J. Biol. Chem., 267: 10570 - 1057; Cover et al., 1997, J. Cell. Biol., 138: 759 - 769)を、以下に述べるようにわずかに改変し、これを用いてH. ピロリ培養上清からH. ピロリのV a c Aを精製した。最初に記載されたのが1990年である (Cover et al., 1990, Infect. Immun. 58: 603 - 610)、H. ピロリ株 ATCC49503 / 60190を、コレステロールまたは0.5% チャコールのいずれかを含み、亜硫酸塩を含まないブルセラプロス中で培養した。培養液を遠心分離した後、硫酸アンモニウムの50%飽和溶液を用

30

40

50

いて上清中のタンパク質を沈殿させた。オリゴマーの形であるV a c Aを、S u p e r o s e 6 HR 1 6 / 5 0カラムを用いたゲルfiltrationによって、0.02%アジ化ナトリウムおよび1 mM EDTAを含むP B S中に分離した。

【0130】

動物実験

C 5 7 B L / 6 およびB L / 6 . B A T F 3 - / - マウス (J a c k s o n L a b s) に、H . ピロリ株P M S S 1 (A r n o l d e t a l . , 2 0 1 1 , 上記) を上記のように経口感染させたか、またはH . ピロリ野生型P M S S 1、V a c A遺伝子を欠損した変異株 (P M S S 1 V a c A) (O e r t l i e t a l . , 2 0 1 3 , 上記) 、ネズミチフス菌、もしくはE . c o l iの死細胞抽出物 (上記のように調製した) を、2 0 0 μ gの用量で、毎週1回経口もしくはi . p . 投与したか、または上で説明したように産生したs 1 m 1型V a c A (配列番号1) - 野生型もしくはV i n i o n - D u b i e l e t a l . , 1 9 9 9 , J . B i o l . C h e m . , 2 7 4 : 3 7 7 3 6 - 3 7 7 4 2に記載される、配列番号3の、H . ピロリ株A T C C 4 9 5 0 3 / 0 1 9 0 から精製した欠失変異形 6 - 2 7を、2 5 μ gの用量で、毎週1回i . p . 投与した。 10

【0131】

マウスの8週齢および10週齢時に、ミョウバンをアジュバントとした卵白アルブミン (2 . 2 5 m gの水酸化アルミニウム (A l u m I m j e c t、P i e r c e) に乳化した2 0 μ gの卵白アルブミン (S i g m a - A l d r i c h)) を腹腔内注射することによって感作を行い、感作後3 1、3 2および3 3日目に、超音波噴霧器 (N E - U 1 7、O m r o n) を用いて、1%エアロゾル化卵白アルブミンを1日に2 0 分間噴霧することにより誘発を行った。陰性対照として非感作マウスを用いた。1群には、7日齢から2回目の感作まで、毎週1回2 0 0 μ g用量のH . ピロリ死細胞抽出物を胃内投与した。 20

【0132】

麻酔し、挿管し、機械的に酸素供給したマウスの気道抵抗測定を行い、気道抵抗は、漸増用量のメタコリンの吸入に対する応答によって記録した (測定にはB u x c o E l e c t r o n i c sのF i n e P o i n t e R e s i s t a n c e a n d C o m p l i a n c e S y s t e mを用いた)。 30

【0133】

実施例2に記載する、I L - 1 0シグナル伝達のi n v i v oにおける遮断は、誘発期の間に2 5 0 μ gの抗I L - 1 0 R抗体 (クローン1 B 1 . 3 A、B i o X C e l l 1) を3回i . p . 注射することによって達成した。1 m lのP B Sを用い、気管を通して肺を洗浄した。トリパンブルー色素排除を用いて、気管支肺胞洗浄液 (B A L F) 細胞を計数した。細胞を遠心分離し、M i c r o s c o p y H e m a c o l o r (登録商標) S e t (M e r c k) を用いて染色した調製物に対して、マクロファージ、リンパ球、好中球および好酸球の差次的な細胞計数を行った。肺の病理組織診断のため、肺を膨張させて固定し、1 0 %ホルマリンに浸漬した後、パラフィン中に包埋した。H & Eおよび過ヨウ素酸シッフを用いて組織切片を染色し、B X 4 0オリンパス顕微鏡を用いて盲検を行った。気管支周囲の炎症を0ないし4の基準でスコア化した。基底膜1 m mあたりのP A S陽性杯細胞を数量化した。 40

【0134】

実施例2 : I L - 1 0 產生における細胞抽出物の役割

H . ピロリは、様々な免疫細胞分画にI L - 1 0の產生を誘導すること (S a y i e t a l . , 2 0 1 1 , J . I m m u n o l . , 1 8 6 : 8 7 8 - 8 9 0) 、および胃内の高濃度のI L - 1 0は、H . ピロリを確実に残留させ、かつH . ピロリ特異的な免疫寛容を促進することが知られている (A r n o l d e t a l . , 2 0 1 1 , 上記)。 50

【0135】

D Cが、H . ピロリ死細胞抽出物に応答してI L - 1 0を產生するか否かについて評価するため、上記のように調製した死細胞抽出物の濃度を漸増させ、マウス骨髄 (B M) 由来の培養D Cを処理した。実際に、B M - D Cは大量のI L - 1 0を產生および分泌し、

これは TLR 2 および MyD88 のシグナル伝達に依存するものであった (図 2A)。H. ピロリ死細胞抽出物と共に培養した、6名の独立したドナーから得たヒト血液由来の DC においてもまた、IL-10 のはっきりとした用量依存性の分泌が観察された (図 2B)。死細胞抽出物が誘導する寛容化による喘息の防御に IL-10 が必要であるか否かについて取り組むため、2用量の IL-10 受容体 (IL-10R) 中和抗体を、新生仔期からそれ以降に死細胞抽出物を投与されたマウスへ、プロトコルの誘発期の間に投与したところ、喘息の防御には IL-10 シグナル伝達が必要であることが示された (図 2C~F)。

【0136】

要約すると、H. ピロリ死細胞抽出物はマウスおよびヒト DC の両方に IL-10 産生を誘導することができ、アレルギー性喘息に対する死細胞抽出物を用いた治療の有益な効果は、宿主の IL-10 シグナル伝達能に依存するものである。 10

【0137】

マウスおよびヒト DC の調製ならびに IL-10 ELISA

マウス BM - DC を産生するため、ドナーマウス (BL/6.TLR2-/-、BL/6.TLR4-/-、BL/6.MyD88-/-マウス、すべて Jackson Labs から入手した) の後肢から分離した骨髄を、96 ウェルプレート内の、4ng/ml

GM-CSF を加えた RPMI / 10% FCS 中に、1 ウェルあたり 50,000 細胞まき、5 日間培養した。上記のように調製した H. ピロリ PMS 1 抽出物を、表示する量用いて、DC を 16 時間刺激した後、上清を MIL-10 ELISA (BD Pharmingen) に供した。以下に述べるようにして、末梢血単核細胞からヒト単球由来の樹状細胞を得た。ライデン大学病院治験審査委員会 (Institutional Review Board of Leiden University Medical Center) によって承認されたプロトコルに従い、6名の健常志願者から静脈血を採取した。Ficoll を用いた密度勾配遠心分離後に細胞を収集し、CD14 マイクロビーズを用いた磁気活性化細胞分離 (MACS) (Miltenyi Biotec) により、CD14+ 単球をポジティブに分離した。ペニシリン (100U/ml、Astellas Pharma)、ストレプトマイシン (100μg/ml、Sigma)、ピルビン酸塩 (1mM、Sigma)、グルタミン酸塩 (2mM、Sigma)、10%ウシ胎仔血清 (FCS)、20ng/ml ヒト組換え顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (rGM-CSF、Invitrogen / Life Technologies) および 0.86ng/ml ヒト rIL-4 (R&D Systems) を補充した RPMI-1640 (Invitrogen) 中で、細胞を 6 日間培養した。3 日目に、培地および補充物を新しくした。H. ピロリ死細胞抽出物によって、単球由来の DC を 48 時間刺激した。DC による上清中の IL-10 の分泌を、ELISA (Sanquin) によって測定した。 20

【0138】

新生児および成人の寛容化を成功させるための差次的な感受性は、Treg / Tエフェクター細胞の比が高く、外来抗原に対する応答が Treg 優勢である、未熟な新生児免疫系の全般的な寛容原性バイアスに起因すると考えられる (Arnold et al., 2005, Trends Immunol 26: 406-411)。これまでに報告されている、ヒトについての平行した観察によれば、H. ピロリに感染した小児は、Treg が優勢で、かつ胃の H. ピロリ特異的な T 細胞応答によって特徴付けられるが、成人はそうではない (Harris et al., 2008, Gastroenterology 134: 491-4)。小児は、その喘息リスクの点から、体内に H. ピロリを有することによって、成人よりも利益を得る (Chen et al., 2007, Arch Intern Med 167: 821-827)。同様に、青年期および若年成人における早発性喘息は、成人に発病した喘息よりも、H. ピロリの血清陽性に対してさらに強く逆相関している (Chen et al., 2008, J. Infect. Dis., 198: 553-560)。このように、入手可能な疫学および実験データは、小児期 30

新生児および成人の寛容化を成功させるための差次的な感受性は、Treg / Tエフェクター細胞の比が高く、外来抗原に対する応答が Treg 優勢である、未熟な新生児免疫系の全般的な寛容原性バイアスに起因すると考えられる (Arnold et al., 2005, Trends Immunol 26: 406-411)。これまでに報告されている、ヒトについての平行した観察によれば、H. ピロリに感染した小児は、Treg が優勢で、かつ胃の H. ピロリ特異的な T 細胞応答によって特徴付けられるが、成人はそうではない (Harris et al., 2008, Gastroenterology 134: 491-4)。小児は、その喘息リスクの点から、体内に H. ピロリを有することによって、成人よりも利益を得る (Chen et al., 2007, Arch Intern Med 167: 821-827)。同様に、青年期および若年成人における早発性喘息は、成人に発病した喘息よりも、H. ピロリの血清陽性に対してさらに強く逆相関している (Chen et al., 2008, J. Infect. Dis., 198: 553-560)。このように、入手可能な疫学および実験データは、小児期 40

におけるH.ピロリへの感染、および若年期の感染に伴うTreg優勢な免疫応答が、アレルゲン特異的なT細胞応答の抑制を介して、喘息およびその他のアレルギー性疾患の徴候のリスクを減少させることを示唆している。

【0139】

本明細書に提示するデータは、喘息を発生するリスクの高い小児が、成人よりも、本発明の寛容化戦略から利益を受ける可能性が高いことを示唆している。

【0140】

実施例3：本発明に由来する、精製した形のVacaポリペプチドおよびその切断型変異形の役割

抽出物を用いた寛容化によって付与された喘息の防御には、精製したポリペプチドの形であるVacaが単独で貢献している可能性を支持するため、野生型細菌およびVaca欠損の同質遺伝子変異体（上に述べた）からの細菌抽出物（上記のように調製した）の防御特性を比較した。興味深いことに、アレルゲンによる感作および誘発を受けたマウスを、気管支肺胞および肺の炎症、好酸球增多症および杯細胞化生から防御する点において、変異体の抽出物の効率は、野生型の抽出物よりも一貫して低かった（図3A～D）。防御のためにはVaca単独で十分であるか否かを調べるため、H.ピロリの培養上清から上記のように精製したオリゴマーのVacaを、7日齢以降に毎週1回腹腔内投与した。最初の用量投与時に若齢であったにもかかわらず、いずれのマウスにも有害作用は観察されなかった。Vacaは、抽出物を用いた処置によって与えられた防御作用に匹敵する程度の、喘息に対する著しい防御を提供した（図3A～D）。

10

20

【0141】

Vacaの細胞傷害性に必須であると報告されている3個のタンデムのアミノ末端の疎水性領域（Vinnion-Dubiel et al., 1999, 上記）を欠損した陰性対照Vaca欠失タンパク質、すなわち配列番号3（図5）に示す陰性対照Vacaタンパク質は、喘息を防御できない（図3A～D）。

【0142】

実施例4：本発明に由来する、精製した形のVacaポリペプチドの、様々な濃度および送達経路における役割

最少有効用量、必要とされる用量の回数および至適な送達経路を明らかにするため、上記のように調製した精製Vacaを、上記のように様々な濃度および間隔によって、マウスに腹腔内投与または胃内投与した。7日齢から誘発の2週間前まで毎週1回5μgのVacaを腹腔内投与すると（図4に下付きの「a」によって示す）、気管支肺胞の炎症および好酸球增多症の防御に対して、20μgのVacaと同程度に有効であった（図4A、B）。胃内に（経口的に、p.o.）投与したVacaもまた（再び、7日齢から誘発の2週間前まで毎週1回送達した）、有意な防御を誘導した（図4A、B）。Vacaの用量を3回腹腔内送達した場合（生涯の1、2および3週に送達、図4に下付きの「b」によって示す）、完全な防御には不十分であった（図4A、B）。卵白アルブミンによる誘発の間に、中和抗体の用量を2回腹腔内に送達してIL-10のシグナル伝達を遮断すると、防御は無効となった（図4A、B）。

30

40

【0143】

これらのデータから、精製した形のVacaを単独で投与した場合に、細胞全抽出物と同程度に喘息を防御可能であることが予想外に支持されるため、アレルギー性喘息を阻止するためには、精製した形で投与してもよい可能性がある。

【0144】

これらの所見は、H.ピロリ生菌の抽出物のみがTregの誘導能を示すと考えられていたこと、および、特にggt遺伝子を欠損した変異体はマウスにおいて持続的にコロニーを形成できないことが観察されており、かつこの表現型はGGTによるin vitroおよびin vivoでのDCの寛容化に帰するものであるため（Oertli et al., 2013, 上記）、Vaca単独で、喘息の防御に十分であるとは予想されていなかつたことから、特に予想外であった。

50

【0145】

これらのデータをまとめると、本発明の組成物による喘息の防御は特異性が高く、E. coli またはネズミチフス菌のような、その他のグラム陰性腸管病原体からの抽出物によっては付与されなかった。この処置は、成体マウスよりも若齢のマウスにおいて開始した際に、特に成功した。したがって、Vaca およびその組成物は、リスクの高い個体における喘息の予防および治療のための実行可能な寛容化戦略として、治療目的のために活用できる。

【0146】

実施例5：食物アレルギーの前臨床モデルにおける、H.ピロリ死細胞抽出物および精製した形の本発明のVacaポリペプチドの役割

10

H.ピロリ細胞全抽出物または精製したVacaの、食物アレルギー発生に対する防御効果を評価するため、以下に述べるように、ミョウバンをアジュバントとした卵白アルブミンの用量をマウスに2回腹腔内投与して感作させた後、卵白アルブミンを胃内投与した。食物アレルギーの症状を、臨床スコアによって、かつ血清中の肥満細胞プロテアーゼのELISAならびに卵白アルブミン特異的なIgEおよびIgG1のELISAによって測定した。卵白アルブミンを用いて再刺激したMLNまたは脾臓の単一細胞の培養において、Th2サイトカインを定量化した。

【0147】

ミョウバンをアジュバントとした卵白アルブミンを用い、2週間の間隔をもつてマウスを2回感作した後、最後の感作から2週間後に始まり、3日間連続して卵白アルブミンを胃内へ送達することによって誘発を行った。マウスの1群には、7日齢以降に、毎週1回200μg用量のH.ピロリ株PMSS1野生型抽出物を胃内に投与した（「抽出物p. o.」）。もう1つの群には、H.ピロリ株ATCC49503/60190由来の精製したHpVacaを、毎週1回20μg用量投与した。すべてのマウスに対して、最後の誘発から40分間観察を行い、Sun et al., 2007, J. Immunol., 179: 6696-6703に記載されるような、引っ掻き、目の腫脹、口および鼻ならびにその他のアナフィラキシーの症状についてスコア化した。得られたスコアを図6Aに示す。血清中の卵白アルブミン特異的なIgEおよびIgG1、ならびに肥満細胞プロテアーゼMCP-T1をELISAによって定量化し、相当するレベルを図6BないしDに示した。上記のアレルゲンを用いて脾細胞を3日間再刺激した後、Th2サイトカインであるIL-5ならびにIL-13の産生および分泌をELISAによって測定し、相当するレベルを図6EおよびFに示した。MCP-T1のデータは、陰性対照に対して標準化した。Vacaによって処置した群を除くすべての群について、3回の試験からプールしたデータを示す。

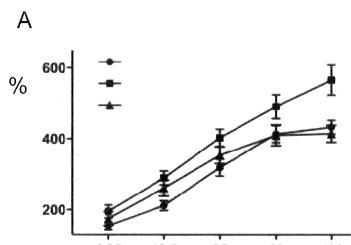
20

【0148】

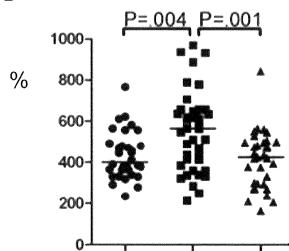
食物アレルギーモデルにおいて得たこれらのデータをまとめると、H.ピロリ抽出物およびVacaタンパク質を用いた処置による防御効果が強く示唆される。

30

【図 1 A B 】

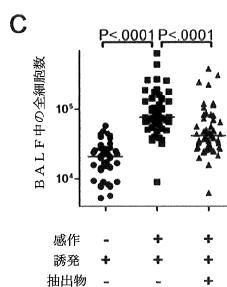


B [C]

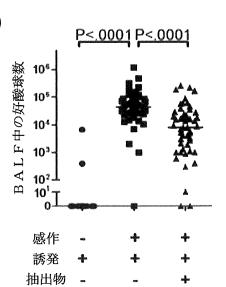


感作	-	+	+
誘発	+	+	+
抽出物	-	-	+

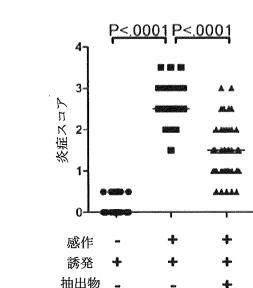
[C]



E

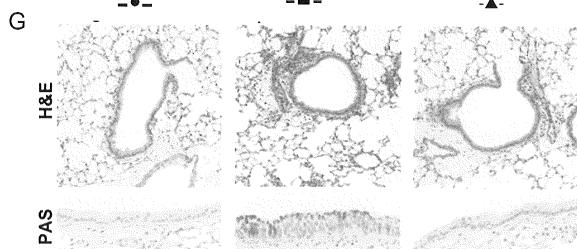


F

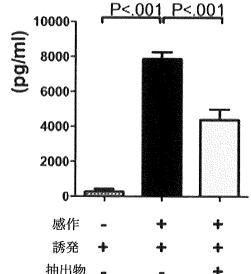


【図1 GHI】

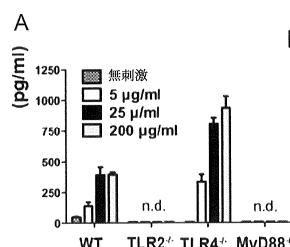
【図2 A B C D】



H

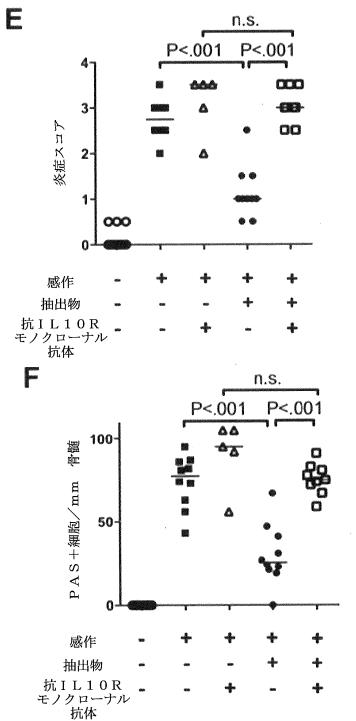


Group	Concentration (pg/ml)
Control	0
Stimulated	~6000
Inhibited	~3000

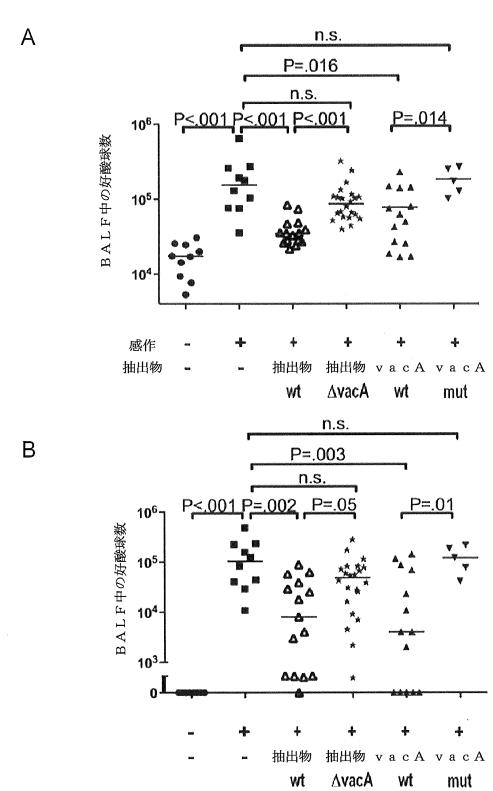


[C] ($\mu\text{g/ml}$)	Response (pg/ml)
0	~100
1	~100
2.5	~100
10	~1000
40	~3500
80	~5500
160	~7500
240	~7500

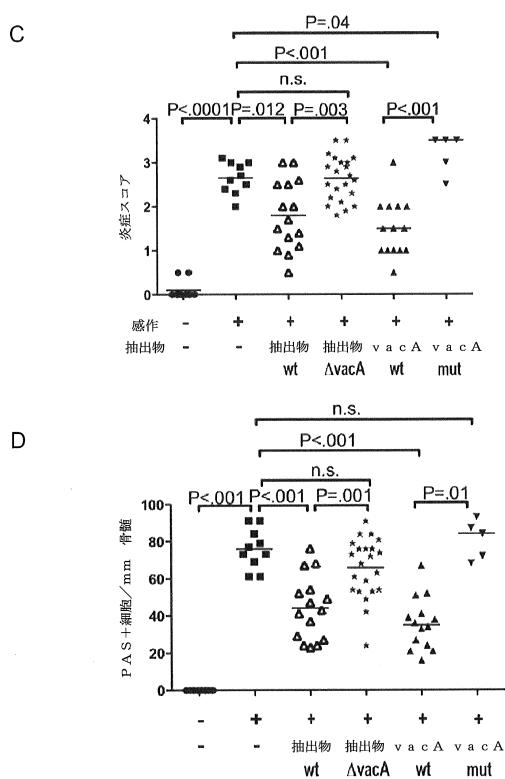
【図2EF】



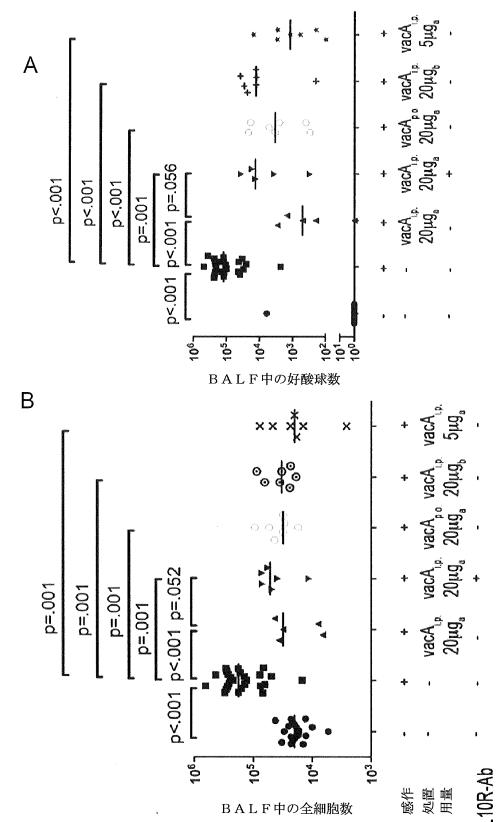
【図3AB】



【図3CD】



【 図 4 】



【図5AB】

【図5CD】

A Q 4 8 2 4 5 H. p y l o r i 株 ATCC 4 9 5 0 3 / 6 0 1 9 0
(Cover e t a l., 1994) (配列番号1)

AFFTTVIIIPAAGVGIATGAVTGVSGLLGWGLKQAAEENAKTPDKPDVKWRIQAGKGFNFEPN
KEYDLYKSSLSSKIDGGWDNWNAATHYWKGGKVNWLKEVDMKDVGTYGLSGLRNFTGG
DLDDVNMQCATLRLQGFGNNSFTSYKTSADRTDRVDFDNKALNDLNFLENNVRLSGGAKRA
SSTVLTLQASEGTTSSNAEISLYDGTNLNLASVNLNGNWMRGLRQYVGAYLAPSYSTIN
TSKVTGEVNHNFLTVDHNAQAQIJAASNTHGTLDLWLGOSNLIAAPPAGEGGYKDKPNNT
SOSGAKNDKQDQESSNNNSNTQVNPNSTQKTEVOPTQV/DCPFAAGKDTVN/DIRINTKAD
GTIKVGGFKSLLTNAAHNLNGKGVNLNSQASGRRTLLEVENLTGNTVDPGLRWNVNO/GGYA
LAGSSANEFKAGVDTKNGTATFNFNDLISLRFLVNLKDAHTANFKGIDTNGGFFNFTLDFSC
VTNKNVNKLINKLITAVNFKNINELVKTNCVGSEYTHFSEDISGQSQRINTVRLETGRTSF
SSGGVKFKSGEKLVIDEYFVSPWNYFDARNKHNIEVTRFKFASSTPENPWPGTSKLMFNMLNLQG
NAVMYDQSFSNLNTIQGDFINNOGTINYLVRGGKVATLNGNAAAMMFNNIDSATGFKYPL
KINSAQDLNKTVEHLLKAAIYGNGVNSTGTNGISNVLNLEOFKERLYLNNNNRMDTCVVRN
TDDIKAGCMAGNMQSMVNPNDKYLYGKAKWNIGKSTANGKSISVYLLGNSPTENGNT
TNLPTNTNNARFASYALIKNAPFAHSATPNLVAINQHDFGTIESVFLANRSKDDTLYANS
GAQGRDLLQTLIISDHAGTYARTMIDASANEITKOLNTATLNNNIASEHKTSSLQLTLSN
AMILNSRLVNLRSRHTNNSFARKALQDKQRFASEAAEYVLYQFA

H. pylori Tx30a株由来のs2m2 VacA (Atherton et al., 1995, J. Biol. Chem. 270 (30), 17771-17777) (配列番号2)

MEIQOTHKRINRPIISLALVGLWMLGTELGANPTNDPHISESRAFFTTVIIPAVGGIATGAAGVT
VSGLSSWLQKAQEQAQNPKADPKVWQRIQAGRDFNDPHKQYDLYKLSLLSKIDGQDWD
GNAARHYWVTKWDQGVNLKEDMUNQAVGTYNSLGLINTFGQDLDVNOMKATLRLQFGNGNS
FTSKFDGKANRTRTNRVFDKAHILNIDFVEINNRVGSGLGKASSTVTLKSESEKTSRENAEIS
YDGATLNLVLSNNSNQSVLDYGVWMGRQYQVAGYLAPSYSTDTSKVNQEGMFNRHLAVGDQ
NAAQAGIAIANKKTNGLDLDWQSAGLSITTPPEGYESKTDKDNQNPKNDAQKTEPQTQVI
DGPFFAGGKTLVNNFHJLHNTKADGTLRAGGK-KA8LSTNAALHFLGEGGVNLNSQAGSRTL
ENLNTGNTVEGTLVNNQVGGAAIAGSANSFEEKAGATEDNNNTATFNDHILGKAVNLRRDA
HTANFNFGNLYIKCSTKLNRVNGHTAHFKNIDATKSDNGLNTSTDGVTDKVNKINLTTAA
VNVIKNFNDIKELVTTVRQSFQGYTIFGENIDKRSRIVGSLQTSYPSAGVTFKGKGLV
IDEYIHPWNYFDARNTDVEINRKILFAGPNNIAKGKTGLMFNNLTLSNSASMDYKGQLDLTI
QGHFTTNQGMFLNFWODGRVATLNAGHOASMFNNLVDSTTGYKPLRIMKINNAQNTKIN
HVLVKARNIDNLYNLVQVGQGASDINASISNLNQEEQPKERLALYLYNNNPKRIMDTCVRKDNLDI
KACGMAQNQSMNNPENPYKLEGAKWNTGKINTNNTTIANVGLNNQSTPTNSTTNTL
PTNTNNARFASYALKINAPKAFAHSATPNLVAIQNHDFGTIESVFLANRSDDITLYANSQA
GRDLCLLTTIDSHDAGYARTMIDASANEITQQLNAATTTLNNSALESHTTKSGLTSLNSNAM
LNSRVLNLSRKHTNHSDFSKRQLAKDQRFASLEASAEEVYLOFPAKEKPTVNWANAIGGT
SLNNGNSNLSYLTSGAVDFTALNGEVEAIVGGFSGYSSFSNSOANLSNGNANTTFGVS
RIFANQHEFDFFEAQAGLSDQSSNLFKSALLDQNLNSQSYHLYASATSTRASYGYDFAFFRNA
LVLKPSVGWSYNHGSTNFNSNQNSNQVALSNGSSQQLHNLNANANEARVYGGDTSYFYMNA
GVLQFEEARTFGSNSAALNTFKVNATRNPNTNTHARVMGGELQLAKEVFNLGVVYHLNLS
NASHFASLNGMRYSF

【図5EF】

【図5GH】

H. pylori 60190株由來の *s 1 m 1* VacA
 (Cover et al., 1994, *J. Biol. Chem.*, 269 (14):
 10566-723) (翻例番号は5)

H. pylori 26695株由來のs1m1 VacA
 (Tomb et al.,
 1997, Nature, 388 (6642): 539-47) (配列番号6)
 MEIQOHTKRINPVLVSLALVGALVSIPTQGSSAHTTTVIIPIAVGIGATAGAATGVTGSSLGWLW
 LKOAEEAKNTPDKPDKVWRQAGKGFNEFPNKYEDLRSLLSKIDGWDWGAATHYWM
 KGGOWNKLVEDMDKDAVGTYLNLRSRNLFTGKDLDVNMQKATLRLQGFGNNSFTSYKSDAD
 RTRVDFAKNLILIDNLEINNRVSGCAGRKASSTVLTQASEGITSKNSKNAEISLYDGATLNLA
 SNSVKLGMGNVWMMGRQLQVYAGYLAPSYSTINTSKVTVFVNFNLHTVGDHNAAQAGIASNKT
 HIGTDLWQSGNLIAAPPEGGYKDKPDKPDKVWVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQVQV
 AQKTEIQTPTVQDGPFGAKKDVTNNDRINTADGTTKVGKYKASLTAAHHLHGKGGNLNSL
 QASGRTLVLNENLTGNTIDPGLVRNLLNQVDFGQYALAGSSANFEFQAGKTDGTNTGKTFNFFN
 RFVNLVDAHTANFKGIDTNGNGFFNTLFGSTVGVKVNKLITASVNAVKFNINELVWVTKN
 GVS/GEYTFHSDEDISGQSRTVTRLELTGTRSFTSGGVFKFSGSKBLVIDEFVYSPWNVYFARDN
 KNEITTRKFASTTPENPWGTSKLMFNMNTLQGNAVMDSYQFSNLNTQGDFNINQGTYLVR
 GGGQVATLWNNAAMFTSNNNDSATGTYQGPLMKNSAQDLIKNKEHVLLKAKIIGYGVNVLG
 TNSNIVNNLIEQFKERLALYNNNNRMDICVTRNRTDDIACGTAQGMSVNPNPDYNYKLIGA
 WKNIGSKTANGKSIWSVYLLNGNSTPEKCGNTTLPNTNTNSVRSAANALAQNAPFAQGSPAT
 PNLVAINOHDFTFESVLELANSRKSDIDTLYTNSAQGGRQLLDTLSDHDAGYARQMDINTS
 TGEITKLNAATTNLNIALEHKTSSLTQSLNSMLRNVLNSRRHTNDSFQAQLQAL
 KDOQKFAESLAEEVLYQFAPKYEKPNTVNAAIGGTSLLNNGNASYLTSQAGDVDAALNGE
 EAIVGGFGSYGYSQV
 KSALLRDNLSNLYASAATRASYGQDFAFRNALVLPKS/VGVSYHLSGNTFKNSNSNQV
 ALKGNSSSHQLFNSVANAEVYQGTYDSVYFMAQGVLQEFQAGFNGSSAALNTFKVNAAH
 NPLSTHARVMMGELKEAVFLNGLVQFVYLNHLSNIGHFASNLGMRYSF

C 陰性对照変異体 ($\Delta 6-27$) V a c A (配列番号3)

AFFFTLWGWLKQAAEANKTPDKPDWVRIQAGKGFNEFPNKELYDLYKSLSSKIDGGWD
WGNAAUTHYWKGGWNKLEVDMKDAGTYKLSSLRNFNTGGDVLNMQKATLRLQGOFN
NSFTSYKDSADRTTRDFDNAKNLDLNFLEINRVRSGAGRKASVTLTQLAQESTIKSKNA
EISLYDGATLNLASNSVNLKNGNWMGRQLQVGYALAPSYSTINTSKTGEVNFNHLTHVGB
HNAAOGAIGISNTHKGTLDWQSGALNIPPEGGYKDPNNTPSQSGAKNDKQESSNN
SNTQV/NPPNSTQTEVOPTQ/IDGPFAGGKDTV/NDRINTKADGTIVKGGFKASLTNTAA
HLNIGKGGVNLNSQASGRTLVLNENLTGNTIDPGLRVNNGVQGYALAGSSQNFEEFKAGVD
TKNGTATFNNDSLGRFVNLDKUAHTANFKGIDTNGGFFNTLDFSVN/TKVNWINKLITA
VAVKFNFIENELVTKTNGVSQEYTHEFSIDSGSQRNTRVLTGTRTSFISGSGVFKSGEKLW
DEFYYSWPWYFNDARNKVETRKFASSTPENWPGTSKLMNFTLNGQNAWDMSYQSFNSL
TIQGDFINNNQGTYLVRGKVTATLNVGNAAMMFNNDDSATGFYKPLKINSAQDLKNT
HVLLKAKIYGGNVNSTGTVNSNVLNEEYQKFLERALYNNNNRMDTCVRNRTDIDKACM
GNQSNVNPNDKTYLQIGKAWKNGISKTANGKISVYLYNNSPTENGNTTLPNTTNTNN
ARFASYALIKNAPFAHSATPNLVAINQHDFGTSIESFELANRSKDDITLYANSGAQGRDLLQ
TLLIDSHDGHARTMDATANSNEITKOLNTATTLNNSIAGHHTSSLTQLTSLSNAMILNSRLV
NLSRRHTNNDMSFAKRLQALKDQRQFASLESAAEYVLYQFAP

D H. pylori G27株由來の s1m1 Vaca
(*B. suis* et al., 2009, J. Bacteriol., 191 (1):
447-8) (配列番号4)

4 4 7 - 8 (配列番号 4)
MEIQQTTHRKMNRPLPSLVLALGALISAIPQESHAFFTTVIIPIAVGIGATGTAVGTVGSLLSWGL
KQAAEANKPDKPDKWVRIQAGKGFNEFPNKKEYDLYKSSLSSKIDGGWDWGNAARHYWVW
GGQWNKLEVMKDAGTVLKGSLRNTFGDVLNMVKMCKTLRQGFGNFSFTSYKAADRR
TTVRVFNNAKNSIDNFVIEINRVSAGGRKASSTVLTQCASEGTSIDKNAEISLYDGAATNLAS
SSVFLKMGVN/WMGRQLQVYGAAYLSPSNTSINTSVTGEVVFNHLTVDKDNAAQAGIAKSNTK
GTLDLWQSAGLNNIAPPAGGYDKDPNTPPSQSGSKNDNEAKNDKQESSONNSNTQVNP
PNSTQKTEIOPQTQVIDGPFPAGGKDTV/NINRINTNADGTIRVGGFKASLTNAAHLHGKGV
NLSNQASGRTTLEVNLTGNTVDPGLRPNVNGVYGAALGSSANQGKBDTNGATTFN
DISLRGVNLVKVDAHTANFKGIDTNGGNGFNTLPSFGVTDVKVNKLITASTVNFKVNINELI
VKTNGISVEYTHEFTSEDIGQSQRINTVRLETGTTSIFSGVVKFKGSEKLVDEFYSSWPNYYD
ARVNKVNVEITRKFASSFTPENPVGTSKLMLNNTLQCNQVMDYSQSNTLQDGFNFQNTIN
YLVRRGGKVATLVSQNAAMMFNNDISATSGYFKPLKINSAQDILKNTHEVFLKKAQYIYGVNS
TGTNSISNLLNEEQFKERLALYNNNNRMDTCVNRNTDDIKAAGMAGNQSMVNPNPDNYKLY
GKAWKNGIISKATNGKSISVYLLGNSTPTENGNTNLPTNTNNARANSANYALVKNAPFAHS
ATPNVLAINOHDFGTIESVFLANRSKDDIYTHTLHSGVGQDRLLQTLIDHSHDAGYAROMDN
TSTGETIQLKNNATAIDLNNIASLEHTKSGQLTQLSNNAMILSRLVNLRSRKHNTHDISQQRCLC
ALKGQRFAASLESAAEVLYQFAPKYYKEPTNWNAAIAGGLNSNGLNGASLYTGSVADYLNG
EVEAIVFGGFSYGSYSSFSNRANLNSGANNANFVGYSVRSIQRNFQHEFDEAQAGLGSQDSSL
NFKSALLQDLNQSYYHLYLAATRASYGVDFFAFLRNALVLPKSVPGVSYNHLGTSNFKVSSS
QVALKNGNSQHFLNANANFVNEA V E A Y Y Q D G T S Y V M I N A G V I Q F A R F G S N N A A S L N T F K V N T
ARPNLTHARVMGGMELQUEKAVFLNLGQVYHLNLSISIGHFASNLGMRYSF

H. pylori J99株のs1m1 VacA
G (Murrell et al., 2003, Infect Immun., 71(1):
65-102) (別表第7)

6 5 1 0 - 2 5) (挑列番号)
MEIQQTHRKRINPVLPSVLAGLALISAIPQESHAFFTTVIIPIAVGJATGAVGTWSGLLWSGL
KQAAEANAKTPDKPDVKWRIQAGKGLFNEFPKEYDLYKSLLSKIDGGDWGNAARHYW
KGGQWNKILEVDMDKAVGTYKLSQLRNTFTGDDLVNMSKATLRLQGFGNTFSVYKSDAS
RTTRVNFNAKNSIDNIEVNNIRVGSGLGRKASSTVLTQSEGITSSKNAEISLYDGTNL
ASNSVKLGNVWMMGRQLYVGAAYLAPLSYNTSTMSKVGQEVDFNHLTVGDNQAAQAGIASIN
THIGTDLWQSLAQNLIAPIEGGYKDKPNSTTSQSGTKNDKKEISNNNSTEVINPNNNT
KTETEPQTVIDGPFGAGKDTVVNIFHLNTKADGTIKVGGFKSALTAAHNGLNKGCVGNLNS
QASGRFTTLEVNLTGNITDPLGRNVLNQVGGYALAGSSANEFKVGADTKNGTATFNNNDISL
GRFVNKLVDKUHTANTFKGDTNGGGFTNLDFTSGVFTDKVNINKLITASTNVAKVNFNINELVKT
NGISVGYEHTFSEDISGQSRTVNTLRETGTRSTFSQGGVFKFSKEGLVINDFVYSSPNYFNDAR
NVKVNKEITRFASTTENPWNPGTSLKMLNNTLQGQNAVMDSQFSNLNTIQGDFINNGTINYL
VRGGKVATLNVNGAAMMFNNIDSATGFYKPLKINSAQDLIKNTEHVLKKAKIYGVNST
TGTNISNVLLEQFKERLALYNNNNRMDTVCVRNTDDIKACGMAGNSQMVNNPDNYKLYL
GKAWNRGNSIKTANGKSIVSYLWGNSTPTEENGNNNPTLTTNNAHSANSYALVNKAFAHS
ATPNLVANIQHDFGTIESVFLANRKSIDDTLYTHSGAQGDRLLQDFTLSDHAGYAROMDN
TSTGEITKOLNAATDNLNVASLEHQSGQLTSLNSNAMLSRVLNSLRSKHTHNHSFQAQLR
OALKGQEFALESAAEVLYQAFPKYKEPNTVNWANAIAGGSNLNSGANANFGVYSRFFANQHEFDEAQAQLGSDQS
GNVIEAVGGFSYGGYSSFSNQANSLNSGANANFGVYSRFFANQHEFDEAQAQLGSDQS
SLNFKSTLLQDLNQSYNLYSATAARASRYGDFAFNRLVLPKSVGVSYNHLGSTNFKS
SQSQVALKASSONGMELLOAKEANVARYYVLDGIVVYUHLNSASHFASNLGRMYSF
NAARSPSTYARAMMGELLOAKEANVARYYVLDGIVVYUHLNSASHFASNLGRMYSF

N C T C 1 1 6 3 7 株由來の s 1 m 1 V a c A
(f t o e t a l . , 1 9 9 8 , J. Infect. Dis. , 1 7 8 (5):
1 2 0 2) (1 9 9 8 年 5 月 2 0 日)

1 3 9 (滑落番号 8)
MEIQQTHRKRINRPLVSLALGVALVSPITQPSQSHAAFTTVIPIAVGIGATGAA/GTVGSLLSWGL
LKQAAEEAKTDPDKPDVYRQAGRRFNNPHKEYDLKSSLLKGDDWWGNAARHYV
VKGQQWNKLEVDMDMADGTVYKLGSNLGFTGDDLDNMQKATLRLQGNGFSNTSYKDA
DRTRVDFNAKNIIDNFLEINNRVSGSGAGRKASSTVLTLQASEGIFTKSSNAEISYDGLATN
LASSVLMGNVWMMGRLQVYGALEYPLSYNTSTKVTGEVNFNHLTVGDHNAQAGAISI
KTHIGTLDLWQSAGLNIALEPPGKYDKDPKDPNSNTQQNNANQNQNSAQNNNTVQINPP
NSAQKTEIQTGVQNGPFGKTVNINRINTADGTVRGGYKASTLQHGGG
LSNQASGRSLLSVNTJNTDVGPLRVRNQVGGLAGNSASNEFKAQDTDKNGTATFNN
DISLGRFVNLKVDUAHTANFKGIDTGGNGFTLDDSGVTVKNUKLITAVNAKFNINN
VKTNGVSVGEYTHFSEIDIGSQRNSRINTVLTETGRSFTSGVFKGSKELVDEFFYSPWNVY
DARNIKNEVITRKFASSTPENWPGTSKLMNFTLQGNAVMDYVPSQNSLNTQGDFQDDNNQGTI
NYLVRGGKATVNLNQAAAMNNFDIDSATGFKYPLKINASQUDKINTEHVLKKIAGYGN
VSTGTGNSVNLEEOFKERALYNNNMRDTCVNTDFTKACGMAIGNSQMVNPNDY
KYLIGKAWKNIGKATANGSKVYLYLNSTPTEGNTNTLPTNTNNARSANVLPKNAV
FAHSATPNLVAQHDFGTIESVFLERANSKRIDLTYTHSGAKGRDLLQTLTIDSDHADYARQ
MIDNTSTEGTQLKQATTNTTNIASLEHKTSSLQSLNSAMILRNVLNSRKHTNNDISFA
KRLAQDKDURFASLESAEVYQFAPKVEKPNTWVANAIAGGSNLNSNSASLYTGSAGD
AYLNGQVEAVGGFSYQSSFSRANLNSGANNNTFVYGRSFRANQFDEEQAQGAL
SDQSSNLSFKSALGDDLQNSYLYASATRASYGDFAFFKANVLKPVSGVSYNHLGST
FKFSNTSKVALNSGSSHLFNASAN/EARYYVGDTSYFVYMMNGLCEFQANFGSSNVA
NTEKVNARAPLINTHARVMWMMGQEJLAKFVFI NI GEVYI HS ISNIGHFASNLGYMSF

【図5IJ】

H. pylori P12株のs1m1 VacA (Fischer et al., 2010, Nucleic Acids Res. 38 (18): 6089-101) (配列番号9)

MEIQQTQRKINRPLVSLALVGALVSITPQQSHAFFTTVIIPIAVGGIAGAAVGTVSGLLGWL KQAEANKTPDKPVWRIQAGKGFNEFPNKEDLYRSLLSKIDGGWDWGNAAATHYWK GGQWNLKLEVDMKDAVGTYVNLSGLRLNFTGGDLDVNMQKATLRLQGQFNGNSFTSYKDSADRT TRVDFNAKNISIDNLFLEINNRVGSAGRKASSTVLTLOASEGITSKNEAISLYDGTALNLASS VKLGMGNVWMLQYVGAYLAPSYSTINTSKVTEGVNFNHLTVGDRAAAGQIAASNKTHIGL DLWQSAGLNIIAPPEGGYKDKPNNTPSQSGAKNDKNEASAKNDKQESSONNSNTQVNPNNPNS AQKTEVOPTOVIDGPFAAGKDTVNNIRINTNADGTVGGYKASLTNNAAHLHIGKGGVNL NQASGRTLVLNENLGNITVQDPLRVNNVQGGYALAGSSANFEFKAGDTKNGTATFNNDISL GRFVNKLVDAAHTANFKIDTGNGGFTNLDFTSGVTDKVNNKLITASTNVIAKFNINELLVKTNG VSVEYTHFSEIDGSQSRINTVRLTGRSLFSGVFKGGKEKLVIDEFYSPWNYFDARNIKN VEITNKLAFQGPQGSQWPWTSKLMFNNLTGQNAVMDSQFSNLTIQGDFVNQHNTLVVRGK VATLSVGNAAAMMFNNNIDSATGFYKPLIKINSAQDLIKNTHEVLLAKKIGYGNVSTGTNGISN VNLEEQFKERLALYNNNNRMDTCVVRNTDDIKACGCTAIGNQSMVNNPDNYKYLIGKAWKNIG ISKTANGSKISVYVLGNSTPTENGNTNLPTNTSNARSANALAQNAQFAQPSATPNLVAI NQHDFGTIESFELANRSKIDTLYANSGAQGRDLLQTLIDSHDAGYARKMIDATSANEITKQ LNTATTNLNNIASLEHKTSGLQTLSSLNAMILNRLVNLSSRHTNNIDSFAKRLQALKDQFAS ESSAEVLYQFAPKYEKPTNVWANAGGTSLNNGSNALYGTSAVGVDAYLNGEVEAIVGGFGF SYGSSFSNQANSLNSGANNTNFGVYSSRLFANLVAQGALGDQSSLNFKSALLRDLNQ SYNQSYNLYASAATRASYGYDFAFFRNALVLKPSVGVSYNHGSTNFKNSTNQVALKNQSSQ QHLFNASANVEARRYYYGDTSYFYMNAGVLQEFANFGSSNAVSNTFKVNAARNPLNTHARVM MMGGELKLAKEVFLNLGFVYVLYHNLISNIGHFASNLGMRYSF

H. pylori 1株のs1m1 VacA (Haas et al., 1994, Mol. Microbiol., 12: 307-319) (配列番号 10)

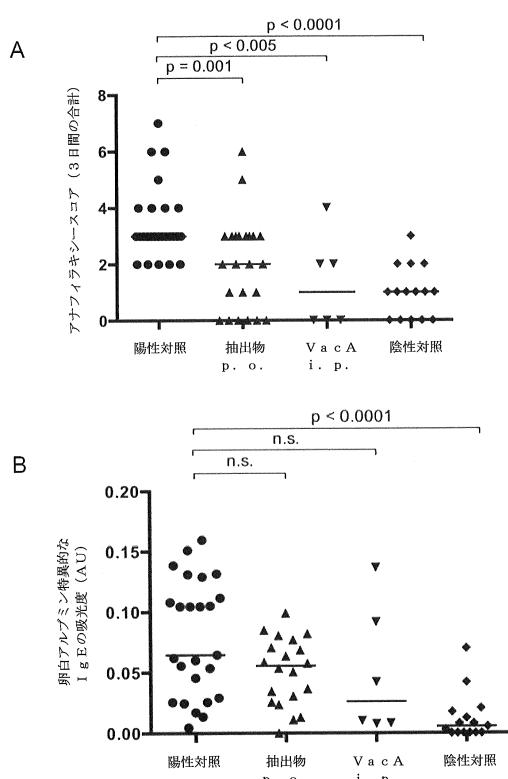
MEIQQTQRKINRPLVSLALVGALVSITPQQSHAFFTTVIIPIAVGGIATGAAVGTVSGLLGWL KQAEANKTPDKPVWRIQAGKGFNEFPNKEDLYRSLLSKIDGGWDWGNAAATHYWK DGQWNLKLEVDMKDAVGTYVNLSGLRLNFTGGDLDVNMQKATLRLQGQFNGNSFTSYKDSADRT TRVDFNAKNISIDNLFLEINNRVGSAGRKASSTVLTLOASEGITSRNEAISLYDGTALNLASS VKLGMGNVWMLQYVGAYLAPSYSTINTSKVTEGVNFNHLTVGDRAAAGQIAASNKTHIGL TLDLWQSAGLNIIAPPEGGYKDKPNNTPSQSGAKNDKNEASAKNDKQESSONNSNTQVNPNNPNS EIQPTQVIDGPFAAGKNTVNNIRINTNADGTVGGFKASLTNNAAHLHIGKGGVNLNQASG RSLLVNLNTVNDTGPGLRVNNQVGGYALAGSSANFEFKAGDTKNGTATFNNDISLGRFVN LKVDAAHTANFKIDTGNGGFTNLDFTSGVTDKVNNKLITASTNVIAKFNINELLVKTNG VSVEYTHFSEIDGSQSRINTVRLTGRSLFSGVFKGGKEKLVIDEFYSPWNYFDARNIKN VEITNKLAFQGPQGSQWPWTSKLMFNNLTGQNAVMDSQFSNLTIQGDFVNQHNTLVVRGK VATLSVGNAAAMMFNNNIDSATGFYKPLIKINSAQDLIKNTHEVLLAKKIGYGNVSTGTNGISN HDFTGIESFELANRSKIDTLYANSGAQGRDLLQTLIDSHDAGYARKMIDATSANEITKQ TATTNLNNIASLEHKTSGLQTLSSLNAMILNRLVNLSSRHTNNIDSFAKRLQALKDQFAS SAAEAEVLYQFAPKYEKPTNVWANAGGTSLNNGSNALYGTSAVGVDAYLNGEVEAIVGGFGF SYGSSFSNQANSLNSGANNTNFGVYSSRLFANLVAQGALGDQSSLNFKSALLRDLNQ SYNQSYNLYASAATRASYGYDFAFFRNALVLKPSVGVSYNHGSTNFKNSTNQVALKNQSSQ QHLFNASANVEARRYYYGDTSYFYMNAGVLQEFANFGSSNAVSNTFKVNAARNPLNTHARVM MMGGELKLAKEVFLNLGFVYVLYHNLISNIGHFASNLGMRYSF

【図5K】

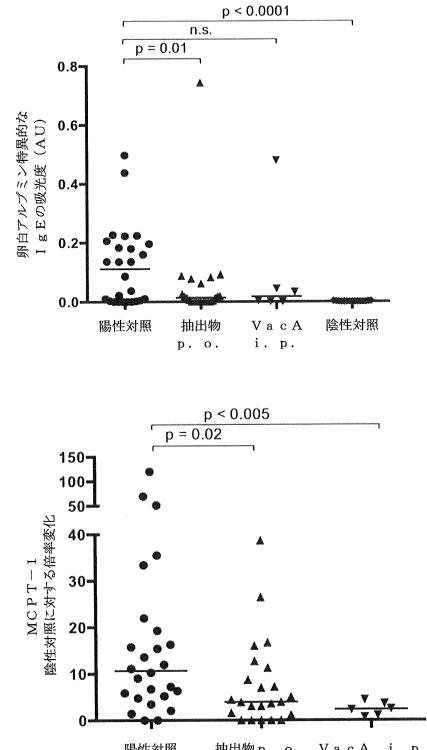
H. pylori NCTC 11638株のs1m1 VacA (Phadnis et al., 1994, Infect. Immun. 62: 1557-1565) (配列番号 11)

MEIQQTQRKINRPLVSLALVGALVSITPQQSHAFFTTVIIPIAVGGIATGAAVGTVSGLLGWL KQAEANKTPDKPVWRIQAGKGFNEFPNKEDLYRSLLSKIDGGWDWGNAAATHYWK GGQWNLKLEVDMKDAVGTYVNLSGLRLNFTGGDLDVNMQKATLRLQGQFNGNSFTSYKDSADRT TRVDFNAKNISIDNLFLEINNRVGSAGRKASSTVLTLOASEGITSKNEAISLYDGTALNLASS VKLGMGNVWMLQYVGAYLAPSYSTINTSKVTEGVNFNHLTVGDRAAAGQIAASNKTHIGL DLWQSAGLNIIAPPEGGYKDKPNNTPSQSGAKNDKNEASAKNDKQESSONNSNTQVNPNNPNS AQKTEVQPTQVIDGPFAAGKNTVNNIRINTNADGTVGGFKASLTNNAAHLHIGKGGVNL NQASGRTLVLNENLGNITVQDPLRVNNVQGGYALAGSSANFEFKAGDTKNGTATFNNDISL GRFVNKLVDAAHTANFKIDTGNGGFTNLDFTSGVTDKVNNKLITASTNVIAKFNINELLVKTNG VSVEYTHFSEIDGSQSRINTVRLTGRSLFSGVFKGGKEKLVIDEFYSPWNYFDARNIKN VEITNKLAFQGPQGSQWPWTSKLMFNNLTGQNAVMDSQFSNLTIQGDFVNQHNTLVVRGK VATLSVGNAAAMMFNNNIDSATGFYKPLIKINSAQDLIKNTHEVLLAKKIGYGNVSTGTNGISN VNLEEQFKERLALYNNNNRMDTCVVRNTDDIKACGMAIGDQSMVNNPDNYKYLIGKAWKNIG ISKTANGSKISVYVLGNSTPTENGNTNLPTNTSNARSANALAQNAQFAQPSATPNLVAI NQHDFGTIESFELANRSKIDTLYANSGAQGRDLLQTLIDSHDAGYARKMIDATSANEITKQ LNTATTNLNNIASLEHKTSGLQTLSSLNAMILNRLVNLSSRHTNNIDSFAKRLQALKDQFAS ESSAEVLYQFAPKYEKPTNVWANAGGTSLNNGSNALYGTSAVGVDAYLNGEVEAIVGGFGF SYGSSFSNQANSLNSGANNTNFGVYSSRLFANLVAQGALGDQSSLNFKSALLRDLNQ SYNQSYNLYASAATRASYGYDFAFFRNALVLKPSVGVSYNHGSTNFKNSTNQVALKNQSSQ QHLFNASANVEARRYYYGDTSYFYMNAGVLQEFANFGSSNAVSNTFKVNAARNPLNTHARVM MMGGELKLAKEVFLNLGFVYVLYHNLISNIGHFASNLGMRYSF

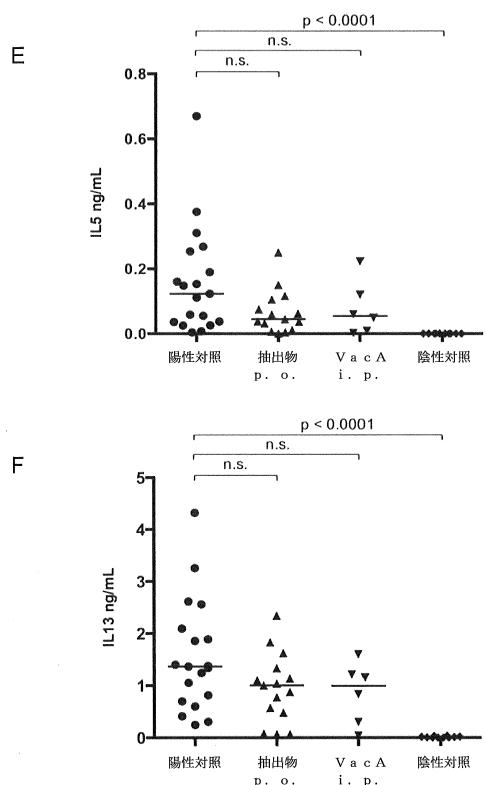
【図6AB】



【図6CD】



【図 6 E F】



【配列表】

0006563937000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C 07 K 14/195 (2006.01) C 07 K 14/195

(74)代理人 100111730
弁理士 伊藤 武泰

(74)代理人 100180873
弁理士 田村 慶政

(72)発明者 ミュラー、アンヌ
スイス国 ツェーハー- 8600 デューベンドルフ、ビュルグリストラッセ 16

(72)発明者 エングラー - アンデルス、ダニエラ
スイス国 ツェーハー- 8050 チューリッヒ、ハーゲンホルツストラッセ 74

(72)発明者 タウベ、クリスティアン
オランダ国 エンエル- 2242 ペーテー ワッセナー、ラーン フェー レーメン フェー
レーメンシュイゼン 14

審査官 渡邊 潤也

(56)参考文献 特開2004-189730 (JP, A)
PNAS, 2013年 2月19日, 110(8), p.3047-3052
Med Sci Monit., 2008年, 14(9), p.CR453-458

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
A 61 K 38/00
A 61 K 39/00
JST Plus / JMED Plus / JST7580 (JDreamIII)
Capplus / MEDLINE / EMBASE / BIOSIS (STN)
UniProt / GeneSeq