

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号  
特表2022-533976  
(P2022-533976A)

(43)公表日 令和4年7月27日(2022.7.27)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード ( 参考 )	
A 6 1 K	39/39 (2006.01)	A 6 1 K	39/39	4 C 0 7 6	
A 6 1 K	39/112 (2006.01)	A 6 1 K	39/112	4 C 0 8 4	
A 6 1 K	39/145 (2006.01)	A 6 1 K	39/145	4 C 0 8 5	
A 6 1 K	39/00 (2006.01)	A 6 1 K	39/00	G	4 C 0 8 7
A 6 1 K	47/46 (2006.01)	A 6 1 K	47/46		
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 ( 全32頁 ) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2021-568646(P2021-568646)	(71)出願人	521500100		
(86)(22)出願日	令和2年5月15日(2020.5.15)		クアドラム インスティテュート バイオサイエンス		
(85)翻訳文提出日	令和4年1月13日(2022.1.13)		イギリス国 エヌアール4 7ユーキュー ノーフォーク、ノーウィッチ、ノーウィッチ リサーチ パーク		
(86)国際出願番号	PCT/GB2020/051204		イギリス国 エヌアール4 7ユーキュー ノーフォーク、ノーウィッチ、ノーウィッチ リサーチ パーク		
(87)国際公開番号	WO2020/229846	(74)代理人	110000626弁理士法人英知国際特許商標事務所		
(87)国際公開日	令和2年11月19日(2020.11.19)	(72)発明者	カーディング、サイモン		
(31)優先権主張番号	1906830.3		イギリス国 エヌアール4 7ユーキュー ノーフォーク、ノーウィッチ、ノーウィッチ リサーチ パーク、クアドラム インスティテュート バイオサイエンス 内		
(32)優先日	令和1年5月15日(2019.5.15)	(72)発明者	ステンツ、レギス		
(33)優先権主張国・地域又は機関	英国(GB)		イギリス国 エヌアール4 7ユーキュー		
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,A T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,最終頁に続く		イギリス国 エヌアール4 7ユーキュー		
			最終頁に続く		

(54)【発明の名称】 バクテリア由来の外膜小胞の供給

(57)【要約】  
外膜小胞 ( O M V ) 及び少なくとも 1 つの薬学的に許容可能な担体を含む医薬組成物及び製剤であって、前記 O M V は、グラム陰性共生バクテリアバクテロイデス ( B a c t e r o i d e s ) によって生成される天然 O M V である、医薬組成物及び製剤。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

外膜小胞（OMV）及び少なくとも 1 つの薬学的に許容可能な担体を含む医薬製剤であって、前記 OMV は、グラム陰性共生バクテリアバクテロイデス（*Bacteroides*）によって生成された天然 OMV である、医薬製剤。

## 【請求項 2】

前記薬学的に許容可能な担体は、緩衝生理食塩水である、請求項 1 に記載の医薬製剤。

## 【請求項 3】

感染、組織の炎症、腫瘍の増殖及び／又は他の損傷を防ぐために免疫応答を刺激、活性化及び／又はブーストする、請求項 1 に記載の医薬製剤。

10

## 【請求項 4】

前記 OMV は、生物活性ペプチド、タンパク質及び／又は生物製剤を含む、及び／又は供給する、請求項 3 に記載の医薬製剤。

## 【請求項 5】

前記医薬製剤及び／又は前記 OMV は、前記ペプチド、タンパク質又は生物製剤の胃腸（GI）管及び／又は気道への供給のためのものである、請求項 4 に記載の医薬製剤。

## 【請求項 6】

前記胃腸（GI）管及び／又は気道並びに他の器官系に対する感染、腫瘍の増殖、組織の炎症及び／又は損傷を防ぐためのものである、請求項 5 に記載の医薬製剤。

## 【請求項 7】

前記天然 OMV は、免疫応答を誘起、活性化又はブーストするために 1 つ以上の粘膜部位に供給される、請求項 1 に記載の医薬製剤。

20

## 【請求項 8】

前記 OMV に対する少なくとも 1 つの薬効成分又は 1 つのさらなる薬効成分を含む、請求項 1 に記載の医薬製剤。

## 【請求項 9】

前記少なくとも 1 つの薬効成分は、抗原及び／又は病原体成分などのワクチン剤を含む、請求項 8 に記載の医薬製剤。

## 【請求項 10】

前記 OMV は、防御免疫応答を惹起するために要求されるワクチン剤又は成分の用量数及び／又は量を低減するためのアジュバントである、請求項 9 に記載の医薬製剤。

30

## 【請求項 11】

前記外膜小胞（OMV）の組成物は、アジュバントとして使用するのためのものである、請求項 1 に記載の医薬製剤。

## 【請求項 12】

前記 OMV アジュバントは、ワクチン又は 1 つ以上のワクチン剤の前に供給される、請求項 11 に記載の医薬製剤。

## 【請求項 13】

前記 OMV アジュバントは、1 つ以上のワクチン剤と実質的に同時に又はその後供給され得る、請求項 11 に記載の医薬製剤。

40

## 【請求項 14】

前記ペプチド又はタンパク質は、OMV 内又はその外膜上にある、4 に記載の医薬製剤。

## 【請求項 15】

前記 OMV を生成するバクテロイデス（*Bacteroides*）の種は、*B. アシディファシエンス*（*B. acidifaciens*）、*B. カッカエ*（*B. caccae*）、*B. コプロコラ*（*B. coprocola*）、*B. コプロスイス*（*B. coprosuis*）、*B. エッゲルチイ*（*B. eggerthii*）、*B. フィネゴルジイ*（*B. finegoldii*）、*B. フラジリス*（*B. fragilis*）、*B. ヘルコゲネス*（*B. helcogenes*）、*B. インテスチナリス*（*B. intestinalis*）、*B. マッシリエンシス*（*B. massiliensis*）、*B. ノルジイ*（*B. nordii*）

50

i)、B.オヴァトゥス(B. ovatus)、B.ステルコリス(B. stercoris)、B.テタイオタオミクロン(B. thetaiotaomicron)、B.ヴァルガタス(B. vulgaris)、B.プレベウス(B. plebeius)、B.ユニフォルミス(B. uniformis)、B.サリエルサイ(B. salyersai)、B.ピオゲネス(B. pyogenes)、B.ゴルドステイニイ(B. goldsteini)、B.ドレイ(B. dorei)及びB.ジョンソニイ(B. johnsonii)並びにB.キシラニソルペンズ(B. xylanisolvens)を含む、請求項1～14のいずれか一項に記載の医薬製剤。

【請求項16】

関連するパラバクテロイデス(Parabacteroides)属は、前記OMVを生成するP.ディスタソニス(P. distasonis)及びP.メルダエ(P. merdae)並びにそれらの株を含む、請求項15に記載の医薬製剤。

10

【請求項17】

マンナン誘導性発現系は、任意のバクテロイデス(Bacteroides)において使用される、請求項15又は16に記載の医薬製剤。

【請求項18】

前記OMVは、B.テタイオタオミクロン(B. thetaiotaomicron)(Bt)(VPI-5482)及びGH193、GH359又はGH364を含むその株によって提供される、請求項1に記載の医薬製剤。

【請求項19】

ネズミチフス菌(Salmonella Typhimurium)由来のワクチン抗原を含む、請求項8に記載の医薬製剤。

20

【請求項20】

前記OMVは、ネズミチフス菌(Salmonella Typhimurium)由来のワクチン抗原のアジュバントである、請求項19に記載の医薬製剤。

【請求項21】

インフルエンザAウイルス(IAV)由来のワクチン抗原を含む、請求項8に記載の医薬製剤。

【請求項22】

前記OMVは、インフルエンザAウイルス(IAV)由来のワクチン抗原のアジュバントである、請求項21に記載の医薬製剤。

30

【請求項23】

前記抗原は、粘膜組織内において及び/又は全身的に抗原特異的免疫及び抗体反応を惹起する能力がある形態である、請求項19～22のいずれか一項に記載の医薬製剤。

【請求項24】

免疫は、H5N1株からのIAV H5ヘマグルチニンのコアストーク領域を含有するOMVによるものであり、異型保護を誘導する、請求項8に記載の医薬製剤。

【請求項25】

前記異型保護は、IAVの無関係のサブタイプH1N1を含む、請求項24に記載の医薬製剤。

40

【請求項26】

前記組成物は、異種ペプチド、タンパク質又は生物製剤を含む、請求項1に記載の医薬製剤。

【請求項27】

前記組成物は、ヒト治療用タンパク質ケラチノサイト増殖因子-2(KGF-2)を含む、請求項26に記載の医薬製剤。

【請求項28】

前記組成物は、腸チフスの治療の方法において使用するものである、請求項1に記載の医薬製剤。

【請求項29】

50

前記組成物は、大腸炎の治療の方法において使用するものである、請求項 1 に記載の医薬製剤。

【請求項 3 0】

前記天然 O M V は、鼻腔内又は腹腔内に供給される、請求項 1 に記載の医薬製剤。

【請求項 3 1】

前記天然 O M V は、筋肉内又は静脈内注射のいずれかによって血流に供給される、請求項 1 に記載の医薬製剤。

【請求項 3 2】

前記 O M V の投与は、抗腫瘍特性を提供する、請求項 1 に記載の医薬製剤。

【請求項 3 3】

前記天然 O M V の投与は、樹立された癌又は腫瘍のサイズを減少させる、請求項 3 1 に記載の医薬製剤。

【請求項 3 4】

前記腫瘍は、胃腸、肺及び / 又は乳癌腫瘍である、請求項 3 2 に記載の医薬製剤。

【請求項 3 5】

医薬組成物における使用のための天然 O M V を生成する方法であって、細菌性細胞を増殖させ、それを濾過するステップを含む方法。

【請求項 3 6】

遠心分離、濾過滅菌、限外濾過及び / 又はサイズ排除クロマトグラフィーの任意の 1 つ又は任意の組み合わせをさらに含む、請求項 3 5 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本願が関連する本発明は、薬学的又は薬理学的製剤における共生バクテリア由来の外膜小胞 (O M V) の提供である。O M V は、天然であり、及び / 又は生物製剤の供給、特に哺乳類及びヒトにおける胃腸管及び気道への供給に適する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

組換えバクテリアを使用する、共生バクテリアの外膜に由来する小胞の生成は、参照により本明細書に援用される、本出願人の同時係属出願 P C T / 英国特許出願公開第 2 0 1 7 / 0 5 1 1 9 9 号明細書に開示されている。

【0 0 0 3】

外膜小胞 (O M V) は、大腸菌 (*Escherichia coli*) によって生成される「細胞外糖脂質」として Bishop and Work (1965) によって過去 50 年にわたり記載されており、現在では、大部分のグラム陰性バクテリアによって天然に生成され、分泌されると考えられている。これらの 20 ~ 400 nm の二重層脂質膜球状構造の分析によると、それらは、自らの「親」バクテリアのペリプラズム内容物に加えて、リポ多糖 (L P S) などの外膜の主要成分を含有することが示されている。

【0 0 0 4】

歴史的に、O M V は、ヘリコバクター・ピロリ (*Helicobacter pylori*) (V a c A)、志賀赤痢菌 (*Shigella dysenteriae*) (志賀毒素) 及び腸管出血性大腸菌 (*Escherichia coli*) (C l y A) を含む腸内グラム陰性病原体によって生成される病原性因子の病態形成並びに貯蔵及び輸送に関連している。近年、O M V 機能におけるこのパラダイムは、共生腸細菌によって生成される O M V における非病原性の相利共生的な役割を示す新たな証拠のために疑問視されている。バクテロイデス (*Bacteroides*) 属のメンバーは、基質を他の細菌による利用に提供し、細菌叢の恒常性に寄与することによって「社会的機能」を果たす、O M V 中の炭水化物及びタンパク質ヒドロラーゼを排他的にパッケージングする。

【0 0 0 5】

本発明者らは、これらの観察結果を拡張し、胃腸 (G I) 管の恒常性並びにバクテロイデ

10

20

30

40

50

ス ( *Bacteroides* ) 由来の O M V が宿主免疫及び上皮細胞応答に影響を及ぼす能力における O M V のより広範な役割についての証拠を提供する。O M V は、宿主上皮細胞とのその相互作用を促進し、微飲作用、脂質ラフト及びクラスリン依存性エンドサイトーシスを含む極めて多数の経路を通して、それらがこれらの細胞に侵入することを可能にする、アドヘシン、スルファターゼ及びプロテアーゼを含有し得る。多糖 A を含有するバクテロイデス・フラジリス ( *Bacteroides fragilis* ) O M V は、増強された T 調節性細胞活性及び宿主を実験的大腸炎から保護する抗炎症性サイトカイン ( *IL-10* ) の生成をもたらす T o l l 様受容体 ( *TLR* ) 2 を介して、樹状細胞によって検出される。本発明者らは、ヒト共生バクテリア B . テタイオタオミクロン ( *B. thetaiotaomicron* ) ( *Bt* ) によって生成される O M V が哺乳動物腸管上皮細胞 ( *IEC* ) の細胞内  $Ca^{2+}$  シグナル伝達を活性化し得ることを示している ( *Durant et al., Microbiome 2020* ) 。この宿主細胞の  $Ca^{2+}$  シグナル伝達応答は、*Minpp* ( これらの O M V の新規な成分 ) に依存した。 *Minpp* は、哺乳動物のイノシトールリン酸ポリホスファターゼ細胞シグナル伝達酵素の相同体である。集合的に、これらの知見は、共生バクテロイデス ( *Bacteroides* ) 種によって生成される O M V における非病原性の有利な役割を実証し、O M V 中の生理活性高分子のパッケージングにより、腸内細菌叢のメンバーが宿主細胞生理学に影響を及ぼし、バクテリア - 宿主の相利共生を確立することが可能になるという概念に一致する。

#### 【発明の概要】

#### 【発明が解決しようとする課題】

#### 【0006】

したがって、生物製剤を気道又は胃腸管に供給するために、共生バクテリアから天然 O M V を提供することが本発明の目的である。

#### 【0007】

したがって、感染、腫瘍の増殖、組織の炎症及び損傷に対して哺乳動物の気道及び胃腸管を保護するための O M V 治療剤を作製することが本発明のさらなる目的である。

自己免疫発作に対して哺乳動物の気道及び胃腸管を保護するための O M V 治療剤を作製することが本発明のさらなる目的である。

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0008】

本発明の第 1 の態様では、O M V 及び少なくとも 1 つの薬学的に許容可能な担体を含む医薬製剤であって、前記 O M V は、グラム陰性共生バクテリアバクテロイデス ( *Bacteroides* ) によって生成された天然 O M V である、医薬製剤が提供される。

#### 【0009】

一実施形態では、前記薬学的に許容可能な担体は、リン酸緩衝生理食塩水 ( *PBS* ) である。

#### 【0010】

典型的には、前記医薬製剤は、感染、組織の炎症、腫瘍の増殖及び / 又は他の損傷を防ぐために免疫応答を刺激、活性化及び / 又はブーストするためのものである。

#### 【0011】

さらに典型的には、前記 O M V は、生物活性ペプチド、タンパク質及び / 又は生物製剤を含む、及び / 又は供給する。

#### 【0012】

好ましくは、前記医薬製剤及び / 又は前記 O M V は、前記ペプチド、タンパク質又は生物製剤の胃腸 ( *GI* ) 管及び / 又は気道への供給のためのものである。典型的には、前記製剤は、胃腸 ( *GI* ) 管及び / 又は気道並びに他の器官系に対する感染、腫瘍の増殖、組織の炎症及び / 又は損傷を防ぐためのものである。

#### 【0013】

好ましくは、前記天然 O M V は、免疫応答を誘起、活性化又はブーストするために 1 つ以上の粘膜部位に供給される。

## 【 0 0 1 4 】

一実施形態では、前記製剤は、少なくとも1つの薬効成分を含む。典型的には、前記少なくとも1つの薬効成分は、抗原及び/又は病原体成分などのワクチン剤を含む。

## 【 0 0 1 5 】

典型的には、前記OMVは、防御免疫応答を惹起するために要求されるワクチン剤又は成分の用量数及び/又は量を低減する。さらに典型的には、前記OMVは、アジュバントである。

## 【 0 0 1 6 】

本発明の第2の態様では、アジュバントとしての使用するための外膜小胞(OMV)が提供される。

## 【 0 0 1 7 】

一実施形態では、前記OMVアジュバントは、ワクチン又は1つ以上のワクチン剤の前に供給される。

## 【 0 0 1 8 】

他の実施形態では、前記OMVアジュバントは、1つ以上のワクチン剤と実質的に同時に又はその後供給され得る。

## 【 0 0 1 9 】

好ましくは、OMVは、グラム陰性共生バクテリアバクテロイデス(*Bacteroides*)によって生成された天然OMVである。

## 【 0 0 2 0 】

典型的には、前記ペプチド又はタンパク質は、OMV内又はその外膜上にある。

## 【 0 0 2 1 】

バクテロイデス(*Bacteroides*)の種は、*B.アシディファシエンス*(*B. acidifaciens*)、*B.カッカエ*(*B. caccae*)、*B.コプロコラ*(*B. coprocola*)、*B.コプロスイス*(*B. coprosuis*)、*B.エッゲルチイ*(*B. eggerthii*)、*B.フィネゴルジイ*(*B. finegoldii*)、*B.フラジリス*(*B. fragilis*)、*B.ヘルコゲネス*(*B. helcogenes*)、*B.インテスチナリス*(*B. intestinalis*)、*B.マッシリエンシス*(*B. massiliensis*)、*B.ノルジイ*(*B. nordii*)、*B.オヴァトゥス*(*B. ovatus*)、*B.ステルコリス*(*B. stercoris*)、*B.テタイオタオミクロン*(*B. thetaiotaomicron*)、*B.ヴァルガタス*(*B. vulgatus*)、*B.プレベイウス*(*B. plebeius*)、*B.ユニフォルミス*(*B. uniformis*)、*B.サリエルサイ*(*B. salyersai*)、*B.ピオゲネス*(*B. pyogenes*)、*B.ゴールドステイニイ*(*B. goldsteini*)、*B.ドレイ*(*B. dorei*)及び*B.ジョンソニイ*(*B. johnsonii*)並びに*B.キシラニソルベンス*(*B. xylanisolvens*)を含む。関連するパラバクテロイデス(*Parabacteroides*)属は、*P.ディスタソニス*(*P. distasonis*)及び*P.メルダエ*(*P. merdae*)並びにそれらの株を含む。バクテロイデス(*Bacteroides*)の他種は、例えば、*Clinical Microbiology Reviews*, Vol. 20, no. 4, Oct 2007, p. 593 - 612 及び *Approved List of Bacterial Names from NCBI*, <http://www.bacterio.net/-alintro.html#b> 及び <http://www.ncbi.nlm.gov/books/NBK819/> に記載されている。

## 【 0 0 2 2 】

好適には、本発明に従うマンナン誘導性発現系は、任意のバクテロイデス(*Bacteroides*)において使用され得る。

## 【 0 0 2 3 】

*B.テタイオタオミクロン*(*B. thetaiotaomicron*)(*Bt*)(*VPI-5482*)並びに*GH193*、*GH359*及び*GH364*を含むその株は、本発明に従

10

20

30

40

50

うワクチン / 医薬組成物にとって特に好ましい。

【0024】

一実施形態では、前記医薬製剤は、ネズミチフス菌 (*Salmonella Typhimurium*) 由来のワクチン抗原を含む。

【0025】

一実施形態では、前記OMVは、ネズミチフス菌 (*Salmonella Typhimurium*) 由来のワクチン抗原のアジュバントである。

【0026】

一実施形態では、前記医薬製剤は、インフルエンザAウイルス (IAV) 由来のワクチン抗原を含む。

【0027】

一実施形態では、前記OMVは、インフルエンザAウイルス (IAV) 由来のワクチン抗原のアジュバントである。

【0028】

典型的には、これらの抗原は、粘膜組織内において及び / 又は全身的に抗原特異的免疫及び抗体反応を惹起する能力がある形態である。

【0029】

一実施形態では、H5N1株からのIAV H5ヘマグルチニンのコアストーク (core stalk) 領域を含有するOMVによる免疫は、異型保護を誘導する。一実施形態では、異型保護は、IAVの無関係のサブタイプH1N1を含む。

一実施形態では、医薬製剤は、ブランク由来の抗原を含有するOMVを含む。

【0030】

一実施形態では、異種ペプチド、タンパク質又は生物製剤は、ヒト治療用タンパク質ケラチノサイト増殖因子 - 2 (KGF - 2) を含む。典型的には、KGF - 2 OMVは、疾患重症度を低減し、大腸炎からの腸管上皮修復及び回復を促進した。

【0031】

本発明の第3の態様では、腸チフスの治療の方法において使用するための天然外膜小胞 (OMV) を含む組成物であって、前記OMVは、天然グラム陰性共生バクテリアによって生成される、組成物が提供される。

【0032】

好ましい実施形態では、天然バクテリアは、バクテロイデス (*Bacteroides*) である。好ましくは、天然OMVは、バクテロイデス・テタイオタオミクロン (*Bacteroides thetaiotaomicron*) (Bt) に由来する。

【0033】

本発明のさらなる態様では、インフルエンザの治療の方法において使用するための外膜小胞 (OMV) を含む組成物であって、前記OMVは、天然グラム陰性共生バクテリアによって生成される、組成物が提供される。

【0034】

好ましい実施形態では、天然バクテリアは、バクテロイデス (*Bacteroides*) である。好ましくは、天然OMVは、バクテロイデス・テタイオタオミクロン (*Bacteroides thetaiotaomicron*) (Bt) に由来する。

【0035】

本発明のさらなる態様では、外膜小胞 (OMV) を含む組成物であって、前記OMVは、大腸炎の治療の方法において使用するためのものであり、前記OMVは、天然グラム陰性共生バクテリアによって生成される、組成物が提供される。

【0036】

好ましい実施形態では、天然バクテリアは、バクテロイデス (*Bacteroides*) である。好ましくは、天然OMVは、B・テタイオタオミクロン (*B. thetaiotaomicron*) (Bt) に由来する。

【0037】

10

20

30

40

50

典型的には、ヒト治療用タンパク質は、ケラチノサイト増殖因子である。

【 0 0 3 8 】

一実施形態では、天然 O M V は、鼻腔内に供給される。

【 0 0 3 9 】

典型的には、B t は、表 1 中の以下の B t 誘導体株を含む。

【 0 0 4 0 】

【表 1】

表 1

種	株	プラスミド	発現されたタンパク質	抗体の選択*	参照
大腸菌	Rosetta 2(DE3) pLysS	pGH165	St OmpA	Amp, Cm	本試験
	Rosetta 2(DE3) pLysS	pGH201	St SseB	Amp, Cm	本試験
<i>Bt</i>	VPI-5482				DMSZコレクション
	GH290			Tet	本試験
	GH490	pGH090		Ery	[57]
	GH484	pGH182	St OmpA	Ery	本試験
	GH486	pGH183	St SseB	Ery	本試験
	GH474	pGH173	Hu. KGF-2	Ery	本試験
	GH503	pGH184	IAV H5F	Ery	本試験
ネズミチフス菌	SL1344				DMSZコレクション
L. ラクティス	UKLe10				[22]

\*Amp=アンピシリン; Cm=クロラムフェニコール; Tet=テトラサイクリン; Ery=エリスロマイシン

【 0 0 4 1 】

本発明のさらなる態様では、好適な薬学的担体中の天然 O M V であって、前記 O M V の投与は、抗腫瘍特性を提供する、天然 O M V が提供される。

【 0 0 4 2 】

典型的には、O M V の投与は、樹立された癌又は腫瘍のサイズを減少させる。さらに典型的には、腫瘍は、乳癌腫瘍である。

【 0 0 4 3 】

一実施形態では、O M V 抗腫瘍効果は、用量に依存する。典型的には、最適な用量範囲は、実質的に  $10^7 \sim 10^9$  である。さらに典型的には、実質的にこの範囲を下回るか又は上回ると、O M V は、無効である。

【 0 0 4 4 】

一実施形態では、天然 O M V は、バクテロイデス ( *Bacteroides* ) O M V である。

【 0 0 4 5 】

本発明のさらなる態様では、O M V を生成する方法であって、細菌性細胞を増殖させ、そ



れを濾過するステップを含む方法が提供される。典型的には、方法は、遠心分離、濾過滅菌、限外濾過及び／又はサイズ排除クロマトグラフィーの任意の１つ又は任意の組み合わせをさらに含む。

#### 【 0 0 4 6 】

##### 材料及び方法

##### OMV 製剤

OMVは、Stentz et al., [Stentz et al., 2015] に準じた方法に従って単離した。Btの培養物(500 mL)を嫌気性キャビネット内、嫌気性条件下において37℃で増殖させた。細菌性スターターカルチャーを、15 µMヘミン(Sigma-Aldrich)を添加した20 mLの「ブレインハートインフュージョン」(BHI)培地(Oxoid)(BHIH)中で一晩増殖させた。0.5 mLのスターターカルチャーを使用して、0.75 µMヘミンを添加した500 mLのBHIに接種し、培養物は、磁気攪拌プレートを使用して常に均質化した。細胞は、早期定常期に対応する約4.0 nmのOD600で16時間後に収集した。細胞は、4、5500 gで45分間遠心分離し、ポリエーテルスルホン(PES)膜(0.22 µmの孔径)(Sartorius)を通して上清を濾過し、デブリ及び細胞を除去した。限外濾過(100 kDaの分子量カットオフ、Vivaspin 50R, Sartorius)によって上清を濃縮し、残余分を500 mLのPBS(pH 7.4)で1回リンスし、0.5 mLまで濃縮した。PBS緩衝液中のCL2-Bセファロース(Sigma-Aldrich)カラム(120 cm x 1 cm)を使用したサイズ排除クロマトグラフィーによるOMV懸濁液の分画により、さらなる精製を実施した。画分の吸光度を280 nmで測定し、吸光度ピークを示す第1画分をプールし、Vivaspin 20遠心濃縮器(100 kDaの分子量カットオフ、Sartorius)を用いて1 mLまで濃縮し、0.22 µmのPES膜(Sartorius)を通して濾過した。精製されたOMV懸濁液の小胞濃度は、ナノ粒子追跡分析(NTA)によって測定した。

#### 【 0 0 4 7 】

##### ナノ粒子分析

PBSで100倍希釈された1 mLのOMV懸濁液に対して小胞のサイズ分布を実施した。Nanosightナノ粒子装置(Nanosight Ltd)を使用して動画を作成し、各サンプル中のOMVの数を計数した。1分間のAVIファイルを記録し、NTA (Version 2.3 Build 0011 RC, Nanosight)ソフトウェアを使用して分析し、校正: 166 nm/ピクセル; ぼかし: 自動; 検出閾値: 10、最小追跡長: 自動、温度: 21.9℃、粘度: 0.96 cPの設定を用いてサイズ分布及び小胞濃度を計算した。100 nmの銀ナノ粒子(Sigma-Aldrich)を使用して測定精度を確認した。

##### 健常ドナー及び患者

既知の自己免疫又は炎症性疾患、アレルギー又は悪性腫瘍を有しない健常ボランティアから、インフォームドコンセント(参照番号08.H0717.24及びRD17/095)に従い、ヒト末梢血を収集した。St Marks Hospital, London North West University Healthcare NHS Trustの外来患者診療所においてクローン病患者が認められ、インフォームドコンセント(参照番号08.H0717.24)に従って採血した。

#### 【 0 0 4 8 】

##### 血液DCのバクテリア刺激

Ficoll-Plus (Amersham Biosciences, Chalfont St. Giles, UK) 上での遠心分離により、末梢血単核球(PBMC)を単離した。100 U/mLのペニシリン/ストレプトマイシン、2 mM L-グルタミン、50 µg/mLのゲンタマイシン(Sigma-Aldrich)及び10% ウシ胎仔血清(TCS cell works, Buckingham, UK)を含有するDutch修飾RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, Dorset, UK

）に P B M C を再懸濁し、1 条件あたり  $5 \times 10^5$  個の細胞を 96 ウェル U 底板に蒔いた。P B M C は、 $10^{10} \sim 10$  小胞 / ml の 10 倍増加濃度において、 $2 \times 10^5$  個の熱殺菌された B t V P I - 5482 ( T ) 又は外膜小胞 ( O M V ) のいずれかとともに 37、5 % C O 2 で 20 時間培養した。

#### 【0049】

##### E L I S A

P B M C を上記のようなバクテリア及び O M V とともに培養し、刺激から 20 時間後に細胞上清を採取し、- 80 で貯蔵した。ヒト Duo Set E L I S A キット ( R a n d D s y s t e m s ) を使用して、製造業者の使用説明書に従ってサイトカイン ( I L - 6 及び I L - 10 ) の量を評価した。T e c a n I n f i n i t e F 50 プレー

10

#### 【0050】

##### 結果

B . テタイオタオミクロン ( B . t h e t a i o t a o m i c r o n ) から単離された外膜小胞 ( O M V ) が免疫応答を惹起するか否かを試験するため、本発明者らは、健常ドナーからの全末梢血単核球 ( P B M C ) を、サイズ排除によって 20 時間精製された減少濃度の O M V とともに培養した。陽性対照として、本発明者らはまた、P B M C を、熱殺菌された B t とともに培養した。

#### 【0051】

本発明者らは、B t 又は O M V とともに 20 時間培養した後、P B M C の全上清中の I L - 6 及び I L - 10 の量を試験し、本発明者らは、有意量の I L - 6 及び測定可能量の I L - 10 をさらに認めたが、データは、有意性に達しなかった ( 図 9 A 及び図 9 B ) 。本発明者らは、D C の B t 又は O M V に対する応答が疾患において変化するか否かを理解することにも興味があったため、クローン病を有する患者 ( n = 3 ) から P B M C を得た。m D C による I L - 6 の生成が H C に類似する一方、m D C により I L - 10 の減少傾向が認められるが、これは、有意性に達しなかった ( 図 9 C 及び図 9 D ) 。

20

#### 【0052】

ここで、本発明の具体的な実施形態を、図を参照して説明する。

#### 【図面の簡単な説明】

30

#### 【0053】

【図 1】B t O M V の外観、サイズ、構造及び安定性。( a ) 環境への放出前にその表面から出芽する小胞を示す B t 細胞の電子顕微鏡画像 ( E M ) ( 左パネル中のライン ) 及び細胞培養上清から抽出された O M V の E M 画像 ( 右パネル ) 。( b ) ウサギ抗 B t O m p A 抗血清の結合を検出するため、コロイド状金抗ウサギ I g を使用したナイーブ B t O M V の免疫検出 ( 右パネル ) 。左パネルは、B t の O m p A 欠失突然変異体によって生成された O M V の染色の不在を示す。( c ) ナノ粒子追跡分析によって測定された、B t によって生成された O M V のサイズ分布。( d ) ナイーブ O M V ( O M V ) 又は o m p A 欠失突然変異体の O M V ( O M V - ) 及び非濃縮 ( n e a t ) ( 1 ) 又は 10 倍濃縮 ( 10 ) O M V 貯蔵緩衝液 ( S B ) ( P B S が貯蔵緩衝液であった ) の抽出物中の O m p A を検出するために免疫プロットを使用した測定としての、0 日目の O M V ( O M V D 0 ) 及び 4 又は 40 で 30 日間の O M V 懸濁液の貯蔵後の O M V の熱安定性。

40

【図 2】B t O M V 中の異種タンパク質の発現。( a ) 目的のタンパク質の管腔への輸送における又は O M V の表面膜でのクローニング手順の概略図。B t O m p A の分泌ペプチド ( S P B t o m p A ) は、黄色で示され、目的の遺伝子の N 末端で融合される。( b 及び c ) プロテイナーゼ K ( P K ) による処理後のタンパク質位置の測定。O M V 懸濁液のプロテイナーゼ K での前処理の存在下及び不在下での S t O m p A の免疫プロット ( b ) 及び K G F - 2 の免疫プロット ( c ) 。N T : 非処理 ; P K : + プロテイナーゼ K ; B : P K 緩衝液単独。( d ) O M V 内部の K G F - 2 の定量化。組換え K G F - 2 (  $1 \sim 100$  ng ) と、1 ml の O M V 懸濁液の  $10 \mu$  l ( S ) との比較。

50

【図3】Bt OMVの内因性アジュバント活性。(a)マウス(n=5)にPBS単独、PBS中の天然Bt OMV(OMV)が鼻腔内投与され、5日後、頭部及び胸部組織が免疫組織学的検査のために処理され、鼻関連リンパ組織(a)、肺実質(b)及び縦隔脂肪組織(c)における、CD45R+B細胞(B220)、CD3+T細胞(CD3)及びマクロファージ/樹状細胞(Iba-1)を含有する組織化されたリンパ組織の免疫細胞活性化及び形成が可視化された。赤矢印は、鼻関連リンパ組織(NALT)、気管支関連リンパ組織(BALT)及び脂肪関連リンパ組織(FALC)をそれぞれa、b及びcにおいて規定する。NC:鼻腔、NS:鼻中隔、P:硬口蓋。

【図4】Bt OMVで惹起された全身及び粘膜抗体反応。(a)マウス(n=5~6匹/群)に、材料及び方法セクションに記載の投与計画に従い、経口(OG)、鼻腔内(IN)又は腹腔内(IP)経路を介してサルモネラ(Salmonella)OmpA又はSseBタンパク質を発現するBt OMVが投与された。矢印は、免疫の期間を示す。対照群として、ナイーブOMV(nOMV)及びPBSがマウス(n=5~6匹/群)に投与された。剖検時、血清(b)及び気管支肺胞洗浄液(BAL)(c)は、抗OmpA及び抗SseBのIgG及びIgA抗体価についてそれぞれELISAによって分析された。箱ひげ図は、各治療群中の動物から得られたデータセットにおける平均並びに上位及び下位四分位値を同定する。独立サンプル間の平均の多重比較における分散の分析(分散分析)に続いて、チューキー法が行われた。 $*P < 0.05$ ;  $**P < 0.01$ ;  $***P < 0.001$ ; ns、非有意。動物の各群からの唾液腺組織ホモジネート(d)及びBAL(e)サンプル中の総IgAレベルについても、材料及び方法セクション中に記載のようなIgA標準を用いてELISAによって測定された。

【図5】IAV H5Fタンパク質を発現するBt OMVは、マウスにおけるウイルス感染に対して保護のレベルを与える。(a)マウスは、PBS中のH5F-OMVで鼻腔内免疫され;対照は、ナイーブOMV又はPBS単独(モック)を、指定された時点で鼻腔内投与され;28日後、すべては、10倍致死量のIAV株A/PR/8/34(PR8, H1N1)が鼻腔内にチャレンジされた。剖検時、血清(b)及び気管支肺胞洗浄液(BAL)(c、d)は、IAV IgG及びIgA抗体について、UV不活化PR8ウイルスを使用してELISAによって分析された。BALサンプルは、H5 HAに特異的なIgA抗体について、(e)標的抗原として組換えH5 HAも使用して分析された。PR8 IAV感染マウス(PR8)からの免疫血清及びBALは、参照サンプルとして使用された。(f)各群中の各動物の体重は、毎日評価された。(g)剖検時、肺ホモジネートは、ウイルス負荷(PFU/g肺組織)について評価された。統計分析は、一元配置分散分析とともにチューキーの多重比較検定(パネルb、c、d、e、g)又は二元配置分散分析とともにボンフェローニ事後検定を用いて実施された。ns、非有意; $*P < 0.05$ ;  $**P < 0.01$ ;  $***P < 0.001$ 。

【図6】KGF-2を含有するOMVは、マウスにおけるDSS誘導性大腸炎を寛解させる。(a)マウスの群に2.5%(w/v)DSSの存在下又は不在下で飲料水が7日間提供された。1、3及び5日目、マウスは、PBS、ナイーブOMV又はKGF-2を含有するOMVのいずれかで経口経管栄養が施された。(b)7日目のパーセント体重減少。(c)7日目の結腸長さ。(d)7日目の疾患活性指数(DAI)。(e)結腸の代表的画像。データは、平均±標準偏差(n=5)として表された。統計分析は、一元配置分散分析とともにチューキーの多重比較検定を用いて実施された。PBSで経管栄養が施され、定期的な飲料水を受けるマウスは、統計分析における参照群とみなされた。ns、非有意; $*P < 0.05$ ;  $**P < 0.01$ ;  $***P < 0.001$ 。

【図7】KGF-2を含有するOMVは、DSS誘導性大腸炎を有するマウスにおける杯細胞を保護し、回復させる。(a)剖検時に得られたH&E染色切片の顕微鏡による測定としての結腸組織の組織学的スコア。(b)上皮面積1mm<sup>2</sup>あたりのアルシアンブルー染色杯細胞の数。(c)アルシアンブルーで染色された代表的な結腸切片中の杯細胞分布の顕微鏡画像。データは、平均±標準偏差(n=5)として表された。統計分析は、一元配置分散分析とともにチューキーの多重比較検定を用いて実施された。 $*P < 0.05$ 。

【図 8】B t O M V による D S S 誘導性大腸炎の治療。A . マウスの群に 2 . 2 5 % ( w / v ) D S S の存在下又は不在下で飲料水が 5 日間提供された。5、7 及び 9 日目、マウスは、P B S 又は天然 O M V のいずれかで経口経管栄養 ( O G ) が施された。B . 1 1 日目の疾患活性指数 ( D A I ) 。C . 1 1 日目の体重減少百分率。\*\*\* P < 0 . 0 0 1 ; \* P = 0 . 0 1 7 . O G 。

【図 9】O M V による樹状細胞の刺激。B t から単離された外膜小胞 ( O M V ) が免疫応答を惹起するか否かを試験するため、健常ドナーからの全末梢血単核球 ( P B M C ) は、サイズ排除によって精製された減少濃度の O M V で 2 0 時間刺激された ( 図 9 A 及び B ) 。陽性対照として、P B M C が熱殺菌された B t に曝露された。P B M C の全上清中の I L - 6 及び I L - 1 0 の量が測定された ( 図 9 A 及び B ) 。D C の B t 又は O M V に対する応答も、クローン病を有する患者 ( n = 3 ) からの P B M C を用いて測定された ( 図 9 C 及び D ) 。補足データ

【図 1 0】鼻腔内投与後の樹状細胞による蛍光標識された B t O M V の獲得及びその後のリンパ節への輸送。O M V は、D i O で蛍光標識され、マウスに鼻腔内投与された。1 日目及び 5 日目、接種後マウスは、殺された。鼻関連リンパ組織 ( N A L T ) 、子宮頸部リンパ節 ( C L N ) 及び縦隔リンパ節 ( M L N ) からの細胞が分離され、樹状細胞に対する抗体 ( C D 1 1 c ) 及び樹状細胞サブセットを区別するための抗体 ( C D 1 1 b 及び C D 1 0 3 ) を使用して、F A C S によって分析された。( a ) 単細胞、全樹状細胞 ( D C 、 C D 1 1 c + ) 、O M V を取り込んでいる D C のサブセット ( D i O + 、 C D 1 1 c + ) 及び C D 1 1 b 又は C D 1 0 3 のいずれかを発現する O M V + D C のサブセットにおいて、デブリの左から右へのゲーティングアウトを示す代表的なゲーティング方法。( b ) 投与後 1 日目。グラフは、D C である N A L T 及び C L N 内の細胞の百分率並びに標識された D C 又は標識された C D 1 1 b + である D C の百分率を示す。( c ) 投与後 5 日目。グラフは、D C である C L N 及び M L N 内の細胞の百分率並びに標識された D C 又は標識された C D 1 1 b + 若しくは C D 1 0 3 + である D C の百分率を示す。

【図 1 1】レシピエントの腸内細菌叢に対する経口投与された B t O M V の影響。3、5 及び 7 日目、マウス ( n = 5 ) に天然 O M V の経口経管栄養が施され、0、4、7 及び 8 日目、糞便が収集され、宿主細菌叢に対する O M V の影響が評価された。糞便は、秤量され、P B S 中で均質化され、段階希釈された後、異なる寒天培地上に蒔かれ、全好気性菌 ( 栄養培地上 ) ; 全嫌気性菌 ( ウィルキンス - チャルグレン [ W - G ] 又はブレインハートインフュージョン [ B H I ] 培地上 ) ; 又はバクテロイデス属菌 ( B a c t e r o i d e s s p p . ) ( ゲンタマイシン及びアミカシンが添加された B H I 培地上 ) について選択された。結果は、各日及び増殖培地における各便サンプルの重量に正規化された C F U の対数で表される。データは、平均 ± 標準偏差として表される。統計学的有意差は、O M V 投与後日数と対照 0 日目とを比較するため、ダネット両側事後検定を用いて評価された。\* P < 0 . 0 5 ; \* P < 0 . 0 1 。

【図 1 2】O M V - S t O m p A 免疫マウスのサルモネラ ( S a l m o n e l l a ) チャレンジ後のコロニー形成。経口又は親 ( 腹腔内 ; I P . ) 経路を介してナイーブ B t O M V 又は B t S t O m p A - O M V のいずれかで免疫されたマウス ( n = 5 ~ 6 匹 / 群 ) ( 免疫プロトコルについて材料及び方法を参照 ) は、続いて、経口用量として 1 0 <sup>8</sup> C F U のサルモネラ・エンテリカ血清型チフィムリウム ( S a l m o n e l l a e n t e r i c a s e r . T y p h i m u r i u m ) S L 1 3 4 4 でチャレンジされた。5 日後、動物は、安楽死され、回腸及び結腸内容物 ; 腸間膜リンパ節 ( M L N ) のホモジネート ; 回腸組織 ; 脾臓 ; 及び肝臓における細菌負荷は、5 0 µ g / m l のストレプトマイシンが添加されたキシロースリジンドオキシコール酸寒天プレート上に段階希釈物を蒔くことによって測定された。箱ひげ図は、各治療群中の動物から得られたデータセットにおける平均並びに上位及び下位四分位値を同定する。

【図 1 3】上皮創傷治癒アッセイを用いて、B t O M V 中に含有される K G F - 2 の生物学的活性を評価する。( a ) 7 2 時間の P B S 、ナイーブ O M V 、K G F - 2 O M V 又は組換え K G F - 2 への曝露後の C a c o 2 細胞のコンフルエント単層内でのスクラッ

チ創傷の治癒の代表的な顕微鏡写真。赤点線は、創傷マージンを画定する。(b)ピクセル<sup>2</sup>による測定としての72時間後の創傷面積にわたる細胞増殖のグラフ表示。

【発明を実施するための形態】

【0054】

Bt OMVは、固有のアジュバント活性を有する

多くの従来のワクチンは、それらの免疫原性を増強し、特に免疫不全個体における防御免疫応答を惹起するための用量の数及び抗原（又は病原体成分）の量を低減するために、アジュバントの封入に依存する[2, 39]。Bt OMVのアジュバント特性を正式に評価するため、マウスに鼻腔内経路を介してPBS中の天然OMVを単回用量で投与し、5日後、頭部及び胸部器官を一括除去し、活性免疫応答を意味する組織化されたリンパ様構造及び濾胞の存在について免疫組織学的検査によって分析した。大きい組織化されたリンパ濾胞は、樹状細胞、T細胞及び多数のB細胞を含有する鼻腔（鼻関連リンパ組織又はNALT（図3a））及び肺（気管支関連リンパ組織又はBALT）（図3b）の両方に存在した。これらの構造は、PBS単独が投与されたマウス中に不在であった（図3a、b）。注目すべきことに、OMV（天然）は、縦隔脂肪組織内でのリンパ系クラスター（脂肪関連リンパ系クラスター又はFALC）の形成を惹起する際にも有効であった（図3c）。

10

【0055】

蛍光標識天然OMVの鼻腔内投与から24時間以内のBt OMVの免疫応答のプライミング能力に一致して、NALT及び流出する子宮頸部リンパ節（CLN）においてそれらの取り込みを検出することが可能であった（補足の図10）。5日目、CD11c<sup>+</sup>、CD11b<sup>+</sup>、CD103<sup>+</sup>樹状細胞によってほぼ排他的に媒介される子宮頸部及び腸間膜リンパ節の両方へのOMVの輸送の証拠が認められた（補足の図10）。

20

【0056】

バイオセイフティーの観点から、経口又は鼻腔内投与された天然OMV（又はワクチン抗原の製剤化されたOMV）は、いずれも有害な健康効果を全く有さず、治療動物において、死後に組織病理学的証拠は認められなかった（データは示さず）。経口投与されたOMVはまた、選択培地上で便サンプルの培養からの測定として、腸管微生物に対する効果を全く有しなかったか、又は軽微な及び/若しくは一過性の効果を有した（補足の図11）。

30

【0057】

鼻腔内OMVの製剤化は、肺IAV感染に対して保護する

感染中、すべての感染動物の体重が減少し、体重のほぼ20%を失った対照（PBS投与）動物で最大の体重減少が認められた（図5f）。H5F-OMVで免疫された動物は、感染後、天然OMVで免疫されたものと同様に体重減少におけるより漸進的な減少を示した。

【0058】

Bt OMVは、粘膜抗体反応を惹起する

鼻腔内投与されたOMVは、唾液腺（図4d）及びBAL（図4e）の両方における全体的なIgAレベルを増加させ、これは、Bt OMVのアジュバント特性及びこれらの部位の両方において免疫系を活性化し、多数のB細胞を含有する組織化されたリンパ濾胞及び組織をもたらしその能力に一致している（図3）。

40

【0059】

さらなる方法

Bt及びその誘導體株（表1）を嫌気性条件下、37℃において、細菌前培養のために15µMヘミン（Sigma-Aldrich）（BHIH）又はOMV製剤のために0.75µMヘミンを添加した「ブレインハートインフュージョン」（BHI）培地（Oxoid）中で増殖させた。エリスロマイシン（5µg/ml）及びテトラサイクリン（1µg/ml）を使用して、Bt中の抗生物質耐性マーカーを選択した。

【0060】

50

大腸菌 (*Escherichia coli*) 株を、 $100\text{ }\mu\text{g/ml}$  のアンピシリン (又は株 J53 [pR751] に対して  $200\text{ }\mu\text{g/ml}$  のトリメトプリム) を有する 37 のルリア - ベルターニ (LB) 培地中で増殖させた。ラクトコッカス・ラクティス (*Lactococcus lactis*) 株 UKLc10 及びその誘導体株を、 $5\text{ g/l}$  のグルコースを添加した 30 の M17 培地 (Oxoid) 中で増殖させた。適時、 $200\text{ }\mu\text{g/ml}$  のアンピシリン、 $5\text{ }\mu\text{g/ml}$  のエリスロマイシン及び  $10\text{ }\mu\text{g/ml}$  のクロラムフェニコールといった抗生物質を選択剤として添加した。大腸菌 (*E. coli*) 株 J53 / R751 を増殖させ、18 時間後に  $200\text{ }\mu\text{g/ml}$  のトリメトプリムを添加した。大腸菌 (*E. coli*) 株 GC10 及び L. ラクティス (*L. lactis*) 株 UKLc10 を、Gene Pulser II (Bio-Rad) を使用したエレクトロポレーションによって形質転換した。pUK200 に関する構築物の場合、宿主 L. ラクティス (*L. lactis*) 株 UKLc10 を使用した。

10

**【0061】**

下記の他のプラスミドの構築は、宿主として大腸菌 (*E. coli*) 株 GC10 を使用することで達成された。プラスミドは、ヘルパー株 J53 / R751 を使用する三系フィルター交雑プロトコル [19] に従い、大腸菌 (*E. coli*) から Bt に動員させた。使用したすべてのプライマーを表 2 中に詳細を示す。

**【0062】**

20

30

40

50

## 【表 2】

表 2：本試験で使用するプライマー配列

プライマー	配列 (5'→3')
f-5'ompA_SphI	ATCTGCATGCTTTTCGAGGAAGAACCGATGGTTGC
r-5'ompA_SalI	ATACGTCGACAATATAGCGGACTGCAATCC
f-3'ompA_BamHI	ACTTGGATCCTTCTGAATCGTGTGGTATTGG
r-3'ompA_SacI	ACTAGAGCTCATCTGTAGAGAAGAAACGGG
SPBTOmpA_fwd	CATGTTGCTGGCTTTTGCCGGCGTTGCGTCTGTTCGCTTCTG CGCAGCAAACCGTGACTGTAACCTGAATACGAGGTTATTCATATGTGACG
SPBTOmpA_rev	AATTCGTCACATATGAATAACCTCGTATTCAGTTACAGTCACGG TTTGCTGCGCAGAAGCGACAGACGCAACGCCGGCAAAAGCCAGCAA
OmpA5T_fwd	TGACCATATGGCTCCGAAAGATAACACC
OmpA5T_rev	GTCAGAATTCCTTAAGCCTGCGGCTGAGTTA
SseB_fwd	TGACCATATGTCCTCAGGAAACATCTT
SseB_rev	TGACGAATTCATGAGTACGTTTCTGCG
XhoI_SFOmpA_rev	ATATCTCGAGGAAACTTAAGCCTGCGG
XhoI_SseB_rev	ATATCTCGAGATGAGTACGTTTCTGCG

## 【0063】

BT3852 欠失突然変異体の構築

BT\_\_3852 から上流であり、その 5' 末端領域の最初の 18 ヌクレオチドを含む 1018 bp の染色体 DNA 断片を、プライマー対 f-5'ompA\_\_SphI、r-5'ompA\_\_SalI を使用した PCR によって増幅した。次に、この産物を大腸菌 (E. coli) - バクテロイデス (Bacteroides) 自殺シャトルベクター pGH014 の SphI / SalI 部位にクローン化した [20]。3' 末端領域の最終の 46 ヌクレオチドを含む、BT\_\_3852 から下流である 761 bp の染色体 DNA 断片を、プライマー対 f-3'ompA\_\_BamHI、r-3'ompA\_\_SacI を使用した PCR によって増幅し、pGH014 に基づくプラスミドの BamHI / SacI 部位にクローン化した。得られた BT\_\_3852::tetQ 構築物を有するプラスミドを、ヘルパー株として大腸菌 (E. coli) HB101 (pRK2013) を使用する三系フィルター交雑 [19] により、大腸菌 (E. coli) 株 GC10 から Bt に動員させた。ゲンタマイシン (200 mg / L) 及びテトラサイクリン (1 mg / L) を含有する BHI - ヘミン寒天上で接合完了体を選択した。テトラサイクリン又はエリスロマイシンのいずれかに対する感受性の測定を、テトラサイクリン又は両方の抗生物質を含有する LB 寒天上で

10

20

30

40

50

接合完了体バクテリアを再ストリークした後、テトラサイクリン耐性及びエリスロマイシン感受性である組換え体を同定するために実施した。対立遺伝子交換を確認するため、PCR分析及び配列決定を使用した。さらなる試験のため、Bt染色体に挿入されたBT\_\_3852::tetQ構築物を含有する接合完了体GH290を選択した。

#### 【0064】

##### 組換えBt株の作製

BtサルモネラOmpA/SseB：バクテロイデス(Bacteroides)の発現ベクターpGH090[21]を最初にNdeIで消化し、この部位をクレノウ処理によって除去し、平滑末端化断片が作出され、それを次に再ライゲートさせた。微生物ゲノムデータベース(<http://mbgd.genome.ad.jp/>)から得られたタンパク質のシグナルペプチド配列(SpOmpA)に対応する90bpの(主要な外膜タンパク質OmpAをコードする)BT\_\_3852遺伝子5'末端を有する配列を使用して、相補的オリゴヌクレオチド対SPBTOmpA\_\_fwd及びSPBTOmpA\_\_revを設計した。SignalP(<http://www.cbs.dtu.dk/service/SignalP/>)により、シグナルペプチド予測が得られた。オリゴヌクレオチドのアニーリング後、得られた二本鎖DNAは、各末端にEcoRI及びSpHI 5'オーバーハングを有した。このリンカーをpGH090のNdeI欠失バージョンのEcoRI/SpHI部位にクローン化し、pGH202プラスミドが得られた。1131bpのサルモネラompA(シグナルペプチドなし)及び591bpのsseBコード領域を、OmpAST\_\_fwdとOmpAST\_\_rev及びSseB\_\_fwdとSseB\_\_revといった各プライマー対を使用して、サルモネラ・エンテリカ血清型チフィウム(S. Typhimurium serovar enterica)SL1334のゲノムDNAからのPCRによって増幅した。得られた断片をNdeI及びEcoRIで消化し、NdeI/EcoRIで消化されたpGH202にクローン化し、プラスミドpGH182及びpGH183がそれぞれ得られた。次に、後者のプラスミドを、GenePulser II(Bio-Rad)を使用したエレクトロポレーションによって大腸菌コンピテント細胞(GC10)に形質転換した。クローニングの成功が配列決定によって確認された。プラスミドを、大腸菌(E. Coli)J53(pR751)と一緒に、三系交雑法[19]を用いて大腸菌(E. Coli)からBtに動員させ、pGH182(GH484)を担持するBtの正確な構造が配列決定によって確認された。

#### 【0065】

Bt IAV：BtのOmpAシグナルペプチドのN末端に融合された、合成インフルエンザ(H5F；IAV株H5N1由来[VN/04：A/VietNam/1203/04])融合前ヘッドレスHAミニシステムをコードする635bpの合成遺伝子構築物をインシリコで作出し、そのコドン使用を同じ種における発現のために最適化させた。得られた遺伝子カセットを遺伝子合成によって得て、その後、大腸菌(E. Coli)プラスミドpEX-K168(Eurofins)にクローン化した。カセットは、BspHI及びEcoRI制限部位をその5'及び3'末端にそれぞれ有し、バクテロイデス(Bacteroides)の発現ベクターpGH090における開始コドンへの遺伝子の翻訳融合を可能にした[21]。遺伝子を、BspHI及びEcoRIを用いてpEX-K168から切除し、NcoI/EcoRIで制限されたpGH090発現ベクターにライゲートし、pGH184が得られた。最後に、配列決定により、クローン化断片の配列完全性が確認された。プラスミドを、三系交雑法を通して大腸菌(E. Coli)からBtに動員させた。

#### 【0066】

Bt KGF-2：BtのOmpAシグナルペプチドのN末端に融合されたヒト線維芽細胞増殖因子10/ケラチノサイト増殖因子2(KGF-2)をコードする581bpの合成遺伝子構築物をインシリコで作出し、そのコドン使用を同じ種における発現のために最適化させた。得られた遺伝子カセットを遺伝子合成によって得て、その後、IAV構築物について記載された通り、大腸菌(E. Coli)プラスミドpEX-A2(Eurof



ins) にクローン化した。カセットは、BspHI 及び EcoRI 制限部位をその 5' 及び 3' 末端にそれぞれ有し、バクテロイデス (Bacteroides) の発現ベクター pGH0902 における開始コドンへの遺伝子の翻訳融合を可能にした。遺伝子を、Eco53KI 及び EcoRI を用いて pEX-A2 から切除し、SmaI 及び EcoRI で制限された pUK200 にライゲートし [22]、プラスミド pUK200\_KGF-2 が得られた。次に、KGF-2 カセットを、BspHI 及び EcoRI での制限を通して pUK200\_KGF-2 から切除し、その後、NcoI / EcoRI で制限された pGH090 発現ベクターにライゲートし、pGH173 が得られた。最後に、配列決定により、クローン化断片の配列完全性が確認された。プラスミドを、三系交雑法を用いて大腸菌 (E. coli) から Bt に動員させた。

10

#### 【0067】

組換え StOmpA 及び StSseB の発現及び精製

StOmpA を His6 タグ発現ベクター pET-15b (Novagen) にクローン化した。すなわち、ompA 及び sseB 遺伝子のコード配列を組み込んでいる PCR 断片を pET-15b の NdeI / XhoI 制限部位にクローン化し、得られたプラスミド pGH165 及び pGH201 を Rosetta2 (DE3) pLysS 細胞に形質転換した (表1)。得られた株の培養物は、1mM の IPTG を5時間添加することによって 0.6nm の OD600 で誘起され、その後、細胞を遠心分離 (5500g で20分間) によって収集した。将来的な使用のため、ペレットを -20℃ で貯蔵した。StOmpA 及び StSseB タンパク質は、QIAexpress Ni-NTA Fast Start Hand book (Qiagen) に準じたプロトコルを使用して天然条件下で精製し、回収されたタンパク質の量は、Bio-Rad タンパク質アッセイを用いて測定した。

20

#### 【0068】

OMV の単離及び特徴付け

OMV を Stentzet al. に準じた方法に従って単離した [20]。すなわち、Bt の培養物 (500mL) を 4℃、5500g で45分間遠心分離し、上清を、ポリエーテルスルホン (PES) 膜 (0.22µm の孔径) (Sartorius) を通して濾過し、デブリ及び細胞を除去した。上清を限外濾過 (100kDa の分子量カットオフ、Vivaspin 50R, Sartorius) によって濃縮し、残余分を 500mL の PBS (pH7.4) で1回リンスし、1mL (約700µg/mL の総タンパク質) まで濃縮した。最終の OMV 懸濁液を濾過滅菌した (0.22µm の孔径)。最終の OMV 懸濁液のタンパク質含量を、Bio-Rad タンパク質アッセイを用いて測定した。

30

#### 【0069】

Bt OMV 内部の異種タンパク質の分布は、プロテイナーゼ K 接近性 / 保護アッセイの中で確立された [20]。すなわち、0.1M リン酸 / 1mM EDTA 緩衝液 (pH7.0) 中の 250µg の OMV の懸濁液を 100mg/L のプロテイナーゼ K (Sigma-Aldrich) の存在下において 37℃ で1時間培養した。プロテイナーゼ K 活性は、1mM フッ化フェニルメタンスルホニル (PMSF) の添加によって停止し、サンプルを免疫プロットによって分析した。Bt OMV の SseB 含量は、Proteomics Facility, University Bristol, UK によって実施された標化プロテオミクスによって測定した。

40

#### 【0070】

電子顕微鏡

OMV の懸濁液を、25% グルタルアルデヒドを用いて1時間固定し、次に 13,000g で10分間遠心分離した。OMV ペレットを溶融した2% 低ゲル化温度アガロース (Type VII, Sigma) と1:1 で混合し、冷却によって凝固し、次に約1mm<sup>3</sup> の立方体に切断した。次に、サンプル片を 0.1M PIPES 緩衝液中の2.5% グルタルアルデヒドで4℃において16時間さらに固定し、その後、0.1M PIPES 緩衝液で3回洗浄し、一連のエタノール溶液 (30%、50%、70%、80%、90% 及び

50

100%で3回)を通して脱水し、その後、エタノールを100%エタノール:LR白色培地用グレード樹脂の1:1混合物と交換し、ローテータ上に1時間置いた。これに、100%エタノール:LR白色樹脂混合物の1:2、次いで1:3混合物及び最終的に100%樹脂が続き、各変更間に少なくとも1時間を設けた。樹脂は、新しい100%樹脂とさらに2回変更し、変更間に8時間を設けた。サンプル片の各々は、新しい樹脂を有するBEE M包埋カプセルに移し、60 で16時間重合させた。ガラスナイフによるウルトラミクロトーム(Ultracut E, Reichert-Jung)を使用して、約90nm厚の切片を切断し、フィルム/炭素コーティングされた金グリッド上に収集した。1時間の抗体培養及び洗剤(0.1%Tween)では、修飾バージョンのAurion Immunogold labeling (IGL) プロトコル([http://www.aurion.nl/the\\_aurion\\_method/Post\\_embedding\\_conv](http://www.aurion.nl/the_aurion_method/Post_embedding_conv))を使用した。一次抗Bt OmpA抗血清は、ウサギをペプチドGGPREDDGSYKQRWDYMN(Cambridge Research Biochemical)で免疫することによって得られ、1/500の希釈時に使用した。二次抗ウサギIg(GAR-10, Agar Scientific)を1/50の希釈に使用した。抗体標識後、切片を2%酢酸ウラニルで40分間染色し、200kVでのFEI Tecnai G2 20 Twin透過型電子顕微鏡で画像化した。

10

#### 【0071】

##### 免疫プロット

超音波処理によってBt細胞及びOMV抽出物が得られ、ジチオトレイトール(Invitrogen)を含有するSDS Page 負荷緩衝液(NuPage)に上清を添加した。約7mgの総タンパク質を12%プレキャストトリス-グリシンゲル(Novex)上に負荷し、180ボルトで40分間の電気泳動によって分離した。次に、ゲルを、トリスグリシン転写バッファー(Novex)を含有する溶液中において25ボルトで2時間かけてニフツ化ポリビニリデン(PVDF)膜上に移した。膜は、20 で30分間振盪することにより、TBS-Tween(0.05%Tweenを有するTBS[50mM トリス-HCl; 150mM NaCl; pH7.5])中の10%BSAでブロッキングした。次に、ブロッキング溶液を廃棄し、膜を、一次抗体(抗サルモネラOmpA[Antibody Research Corporation]、抗KGF-2[Peptidech]又は抗IAV若しくは抗ポリヒスチジンクロンHIS-1(Sigma-Aldrich))を含有する5%BSAを有するTBS-Tween中において4 で16~18時間培養した。TBS-Tweenで洗浄した後、膜を、HRPとコンジュゲートされたヤギ抗ウサギIgG(1:1000希釈、ThermoFisher)を含有するTBS-Tween中の5%BSA中において20 で1時間培養した。TBS-Tweenで3回洗浄した後、SuperSignal West Pico化学発光基質(ThermoFisher)を使用して結合抗体を検出した。

20

30

#### 【0072】

##### 哺乳動物細胞の培養

ヒト結腸上皮細胞株Caco-2(ECACC 86010202)を、5%胎児ウシ血清(FBS, Lonza)を添加した、4.5g/Lのグルコース及びL-グルタミン(Lonza, Switzerland)を有するダルベッコ改変イーグル培地(DMEM)中において37 及び5%CO<sub>2</sub>で培養した。

40

#### 【0073】

##### 上皮細胞スクラッチアッセイ

Caco-2細胞を90%の培養密度に達するまでT25フラスコ内で増殖させた。細胞を、トリプシンEDTA(200mg/L、170,000Uトリプシン/L、Lonza)を用いて消化し、8ウェルのマイクロスライド(Ibidi)上に播種した。細胞を、90%コンフルエント単層を形成するまで増殖させ、次に8時間血清不足にした。滅菌チップを使用して単層上にスクラッチを作成し、細胞をPBSで洗浄し、細胞片を除去した。残存細胞は、PBS、天然OMV、KGF-2 OMV又は組換えKGF-2(50

50

0 ng / mL , Pepr oT ech ) の存在下において、ヘパリン ( 3 0 0 μ g / mL のグレード I - A 、 > 1 8 0 USP 単位 / mL ; Sigma - Aldrich ) を添加した 1 % FBS 培地中で 7 2 時間培養した。Invertoskop ID03 倒立顕微鏡 ( Carl Zeiss ) 及びソニー Xperia Z5 コンパクトデジタルカメラ ( ソニー ) を使用して、スクラッチ直後 ( 時間 0 対照 ) 及び 2 4 時間ごとに画像を取得することにより、創傷治癒を監視した。各時点で回収されたスクラッチ面積 ( ピクセル 2 ) の測定値は、ImageJ ソフトウェアを使用して分析した。実験は、3 通りに実施した。

#### 【 0 0 7 4 】

##### 動物実験

すべての動物実験は、University of East Anglia ( UK ) 又は University of Liverpool のいずれかの動物施設内で飼育及び維持された 6 ~ 8 週齢 C57BL / 6 雄マウスを使用して実施した。マウスは、個別換気ケージ内に収容し、12 時間の明 / 暗サイクルに曝露し、標準実験用固形飼料に自由にアクセスさせた。動物実験は、英国内務省 ( HMO ) の承認並びに HMO プロジェクトライセンス 70 / 8232 ( UEA ) 及び 70 / 8599 ( UoL ) の下、動物科学的処置法 ( Animal Scientific Procedures Act ) 1986 に完全に準拠して実施した。

#### 【 0 0 7 5 】

OMV ワクチン及びワクチン接種：経口サルモネラ OMV ワクチン製剤を評価するため、マウスの群 ( n = 5 ~ 6 匹 / 群 ) に PBS 中 100 μ l の StOmpA - OMV 又は天然 OMV のいずれかで経管栄養を施した。各免疫に先立ち、約 4 時間食物を断ち、胃酸性を減少させた。1 月及び 2 月後、ブースターの経口免疫を与えた。動物のさらなる対照群は、StOmpA - OMV で腹腔内経路を介して免疫した。サルモネラ及びインフルエンザウイルス OMV ワクチン製剤での鼻腔内免疫を評価するため、マウスの群 ( n = 5 ~ 10 匹 / 群 ) のマウスに麻酔し、次に StOmpA OMV、StSseB OMV、H5F OMV、天然 OMV ( 約 0.5 μ g ) 又は PBS のいずれかを鼻腔内投与し、7 日及び 14 日後、ブースター免疫を受けさせた。サルモネラ ( Salmonella ) による感染性チャレンジの場合、28 日目、StOmpA - OMV 経口又は腹腔内免疫マウスに 10<sup>8</sup> CFU のネズミチフス菌 ( S. Typhimurium ) SL1344 を経口投与し、5 日後に異なる組織内の細菌負荷を測定した。IAV による感染性チャレンジの場合、28 日目、H5F - OMV 免疫マウスに筋肉内経路を介してケタミンで麻酔し、10 倍の致死量に相当する、50 μ l の滅菌 PBS 中、IAV の 10<sup>3</sup> PFU A / PR / 8 / 34 ( PR8 ) H1N1 株を鼻腔内に接種した。チャレンジ日からマウスが安楽死される 33 日目のエンドポイントにかけて、各動物の体重を記録した。剖検時、抗体及びサイトカイン分析のため、血液 / 血清及び気管支肺泡洗浄液を採取し、肺組織を使用してウイルス力価を測定した。インビボ OMV 輸送試験の場合、マウスに DiO 標識 H5F - OMV を鼻腔内投与し、1 日及び 5 日後、BAL のマクロファージ及び樹状細胞；鼻関連リンパ組織 ( NALT ) ；並びに子宮頸部及び縦隔リンパ節における OMV の獲得及び取り込みを、フローサイトメトリーを用いて測定した。

#### 【 0 0 7 6 】

IAV 定量化：以前に記載された通り、PR8 感染マウスからの肺組織のホモジネートに対してブランクアッセイを実施した [ 23 ]。すなわち、肺からのウイルスサンプルを、TPCK トリプシンを添加した DMEM 中において 10<sup>1</sup>6 ~ 10<sup>1</sup>0 の 10 倍段階希釈で滴定した。各希釈物を 24 ウェルプレートの各ウェル内の MDCK 細胞とともに 37 °C、5 % CO<sub>2</sub> で 1 時間培養した。培地を吸引し、2.4 % アビセルを含有するオーバーレイ培地と交換した。プレートを 37 °C、5 % CO<sub>2</sub> で 72 時間培養した。アビセルを吸引し、プレートを洗浄し、細胞をアセトン：メタノール ( 60 : 40 ) で 10 分間固定した。細胞は、クリスタルバイオレットで染色する前に 10 分間風乾しておき、洗浄し、風乾した。ブランクを計数し、次に蒔かれたウイルスの希釈倍率及び体積を掛けることでウイルス力価 ( PFU / mL ) が得られた。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 7 7 】

急性大腸炎：デキストラン硫酸ナトリウム（DSS）で誘導された急性大腸炎のマウスモデルを使用して、KGF含有OMVの治療的可能性を試験した。マウスを6群（ $n = 5 /$ 群）に分割し、PBS、天然OMV、KGF-OMV、DSS+PBS、DSS+天然OMV又はDSS+KGF-OMVのいずれかを7日間投与した。実験大腸炎は、マウスの適切な治療群において、適宜、7日間の飲料水中の2.5% w/v DSS（36, 000 ~ 50, 000 Da, MP Biomedical, USA）の投与によって誘導した。マウスの他の群は、実験の持続期間全体を通して新鮮な水のみを受けた。PBS及びOMVは、1日目、3日目及び5日目の経口経管栄養（100 mL）によって投与し、7日目にマウスを安楽死させた。寝床材料を有しない空のケージ内に各マウスを5 ~ 15分間配置することにより、新しい糞塊を毎日収集した。大腸炎の程度は、毎日の体重、便の硬さ及び直腸出血の評価を含む疾患活性指数（表S1）を用いて評価した。剖検時、結腸を無菌で抽出し、撮影し、内容物を滅菌バイアル内に収集し、-80℃で貯蔵した。結腸長さを測定し、代表的サンプル（0.5 cmの長さ）を組織学的に遠位領域から採取した。組織学的サンプルは、10%中性緩衝ホルマリン及びパラフィン包埋で固定した。組織切片（5  $\mu$ m）を各ブロックから調製し、ヘマトキシリン（Mayer's hemalum, Merck, Germany）及びエオシン（Y水溶液、0.5%水性、Merck, Germany）（H&E）並びにアルシアンブルー（Sigma-Aldrich, USA）及びNuclear Red（Sigma-Aldrich, USA）で染色し、杯細胞を可視化した。40倍拡大率のDMI3000B顕微鏡（Leica, Germany）下で切片を観察し、盲検様式で評価した。組織学的変化をスコア化し（表S2）、杯細胞は、ImageJソフトウェア（USA）を使用して数え上げた。

## 【 0 0 7 8 】

Bt OMVによるDSS誘導性大腸炎の治療。デキストラン硫酸ナトリウム（DSS）で誘導された急性大腸炎のマウスモデルを使用して、OMVの治療的可能性を試験した。8 ~ 11週齢の雄C57BL/6マウスの群を4群（ $n = 5 \sim 10 /$ 群）に分割し、それらの2群に飲料水中の2.25% w/v DSS（36, 000 ~ 50, 000 MW, MP Biomedical, USA）を5日間投与した。マウスの対照群は、実験期間全体を通して新鮮な水のみを受けた。PBS及びOMVは、5日目、7日目及び9日目の経口経管栄養（100 mL）によって投与し、11日目にマウスを安楽死させた。大腸炎の程度は、毎日の体重、結腸及び盲腸の外観、便の硬さ並びに直腸出血の評価を含む疾患活性指数を用いて評価した。

## 【 0 0 7 9 】

抗体ELISA：ELISAプレートは、0.1 M NaHCO<sub>3</sub>中の標的抗原（UV不活化IAV [PR8] ウイルス又はH5（H5N1）（A/Vietnam/1203/2004）組換えタンパク質（P5060, 2B Scientific Ltd）、サルモネラOmpA又はSseBタンパク質）でコーティングし、4℃で12 ~ 16時間培養した。プレートを、0.05% Tween 20（PT）を添加したPBSで3回洗浄し、次にブロッキング溶液（2% BSAを有するPBS）とともに20℃で3時間培養し、次にPTで6回洗浄した。大豆トリプシン阻害剤（0.5 mg/mL; Sigma）、フッ化フェニルメチルスルホニル（0.25 mg/mL; Sigma）、0.05 M EDTA及び0.05% Tween 20（Sigma）を有するリン酸緩衝生理食塩水（pH 7.2）で糞塊を均質化した。糞便ホモジネート及び気管支肺胞洗浄（BAL）及び血清サンプルを、1% BSA、0.05% Tweenを有するPBS（PBT）で希釈し、プレートウェルに添加し、4℃で12 ~ 16時間培養した。PR8 IAV感染マウスからの免疫血清及びBALは、H5F-OMV免疫動物における抗IAV抗体反応を分析するための参照サンプルとして使用した。次に、プレートをPTで6回洗浄し、HRP抗マウスIgG（1:1000, Thermo-Fisher）又はHRP抗マウスIgA（1:1000, Life Technologies）のいずれかを含有するPBTとともに20℃で20分間培養した。プレートを再びPTで6回洗浄し、次にTMB高感度基質

溶液 (BioLegend) とともに暗所、20 で30分間培養した。反応を2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>の添加によって停止させ、TECANインフィニットf50分光光度計 (Mannedorf, Switzerland) を使用して450nmで光学密度を測定した。AbcamのIgAマウスELISAキットを使用して、唾液腺中の総IgAを測定し、BALフローサイトメトリーにおいて、約1×10<sup>6</sup>個の組織由来細胞を、2%FCSを添加したPBS (PBS-FCS) 中、4 で15分間培養した後、PBS-FCS中の、CD11b (クローンM1/70, eBioscience)、CD11c (クローンN418, eBioscience) 又はCD103 (クローン2E7, eBioscience) に特異的な蛍光色素コンジュゲートモノクローナル抗体を添加し、暗所、4 で30分間培養した。次に、細胞をPBS-FCSで洗浄し、4%パラホルムアルデヒドを添加したPBSにおいて20 で15分間固定した後、MACSQuant Analyzer 10 (Miltenyi Biotec) 上で分析した。データは、FlowJoを用いて分析した。

#### 【0080】

##### 免疫組織学的検査

すべてのマウスから、皮をはがれた頭部全体を10%緩衝ホルマリンで48時間固定した。その後、約2mmの切片を、菱形のこぎり (Exakt Band System 300CL; EXAKT Technologies Inc.) を使用した矢状切片によって調製し、鼻先から大後頭孔まで全部で6つの切片が得られた。切片は、室温で7日間、RDF Mild Decalcifier (CellPath Ltd) で穏やかに脱灰した。同様に、胸部器官 (肺、リンパ節、心臓及び胸腺) を一括除去し、10%緩衝ホルマリンで24時間固定し、トリミングした。次に、頭部及び器官標本をルーチン的にパラフィンワックス包埋した。連続切片 (3~5µm) を調製し、組織学的検査のため、ヘマトキシリン・エオシンで染色するか又は免疫組織学的染色を受けた。免疫組織学的検査 (IH) を、前記のような西洋わさびペルオキシダーゼの方法を用いて実施した [24, 25]。使用した一次抗体は、ラット抗マウスCD45R (クローンB220, BD Biosciences; B細胞)、ウサギ抗CD3 (クローンSP7; Bioscience; T細胞) 及びウサギ抗Iba-1 (Wako; マクロファージ及び樹状細胞) であった。

#### 【0081】

##### 統計分析

データは、ダゴスティーノ・ピアソンのオムニバス正規性検定を受けた。一元配置分散分析、続いてチューキーの多重比較事後検定は、GraphPad Prism5ソフトウェア (USA) を用いて行った。2つの平均値間の統計学的有意差は、P値<0.05によって確立された。データは、平均±標準偏差として提供される。

#### 【0082】

##### 癌OMV

##### 試験設計は、

- ・0日目に乳癌腫瘍細胞を成体マウスに皮下注射すること、
- ・7、10、12日目にBt OMVを腹腔内注射すること、
- ・14日目に腫瘍を収集すること

を含んだ。

#### 【0083】

##### アッセイ：

- ・腫瘍体積測定。
- ・蛍光標識OMVを受けた動物の全身イメージング。
- ・組織学的検査、サイトカイン分析、転写物分析のために腫瘍を急速凍結させた。

#### 【0084】

##### 結果：

- ・腫瘍を切除及び画像化した (図14)

- ・ O M V 用量対腫瘍体積をプロットした ( 図 1 5 )
- ・ 標識された動物からの腫瘍は、腫瘍に対して局在化し、接近する O M V に一致して強く蛍光性であった。

【 0 0 8 5 】

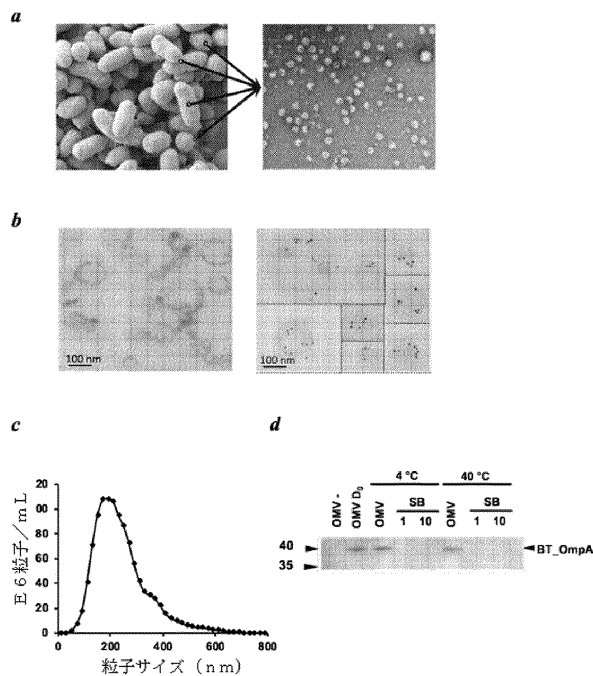
結論：

- ・ 天然 B t O M V は、抗腫瘍特性を有し、樹立された乳癌腫瘍のサイズを有意に低減可能である。
- ・ O M V 抗腫瘍効果は、用量に依存する。最適な用量範囲は、 $10^7 \sim 10^9$  である。この範囲を下回るか又は上回ると、O M V は、無効である。これは、一次免疫細胞を使用し、O M V に対するそれらの応答の性質を評価するインビトロ実験からの知見に一致する。

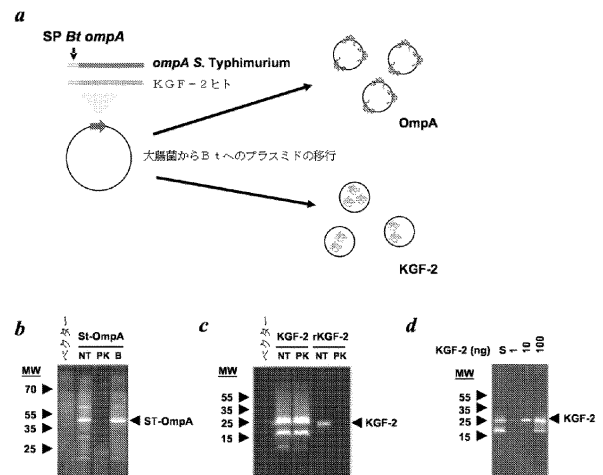
10

【 図 面 】

【 図 1 】



【 図 2 】



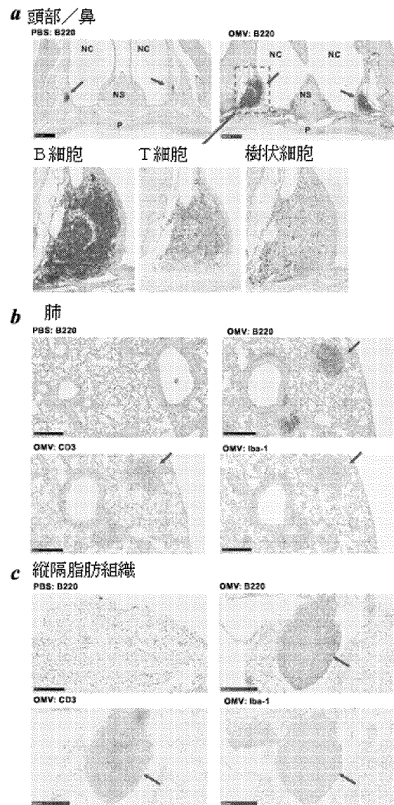
20

30

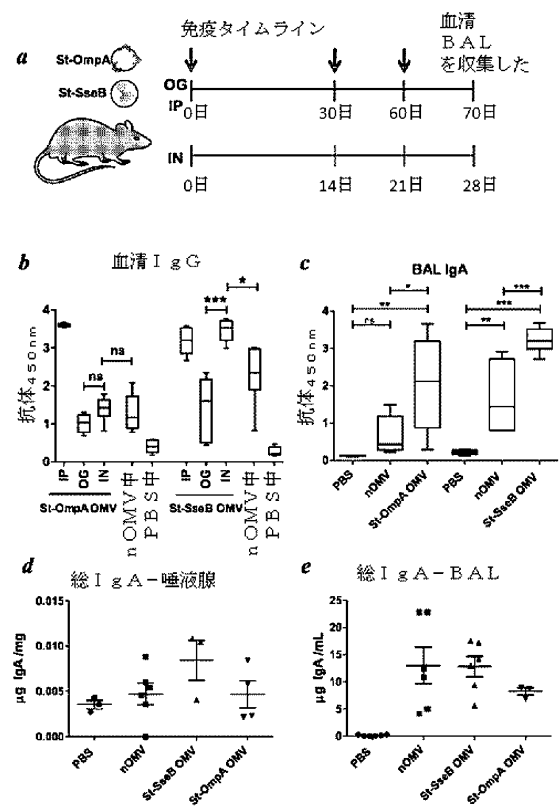
40

50

【図 3】



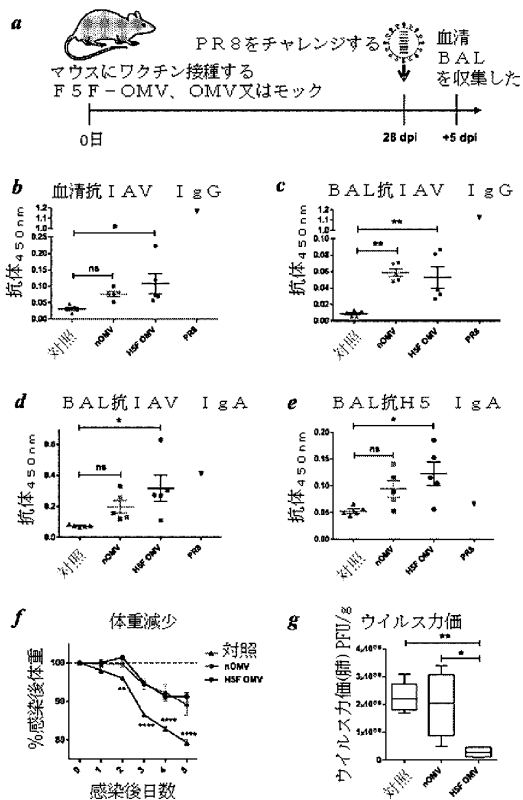
【図 4】



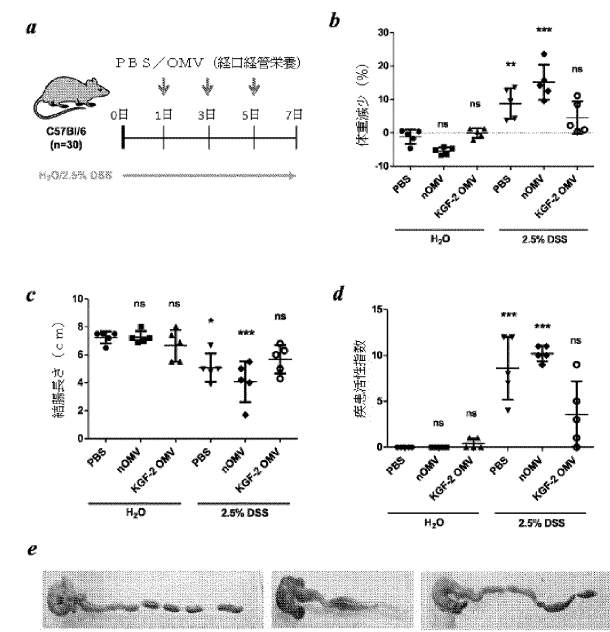
10

20

【図 5】



【図 6】

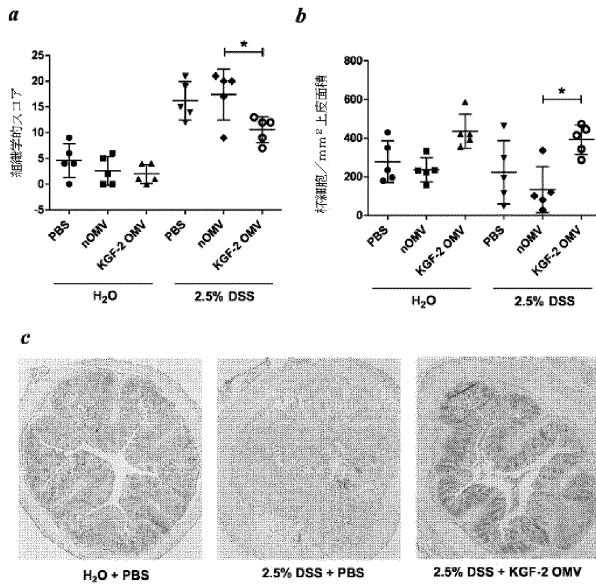


30

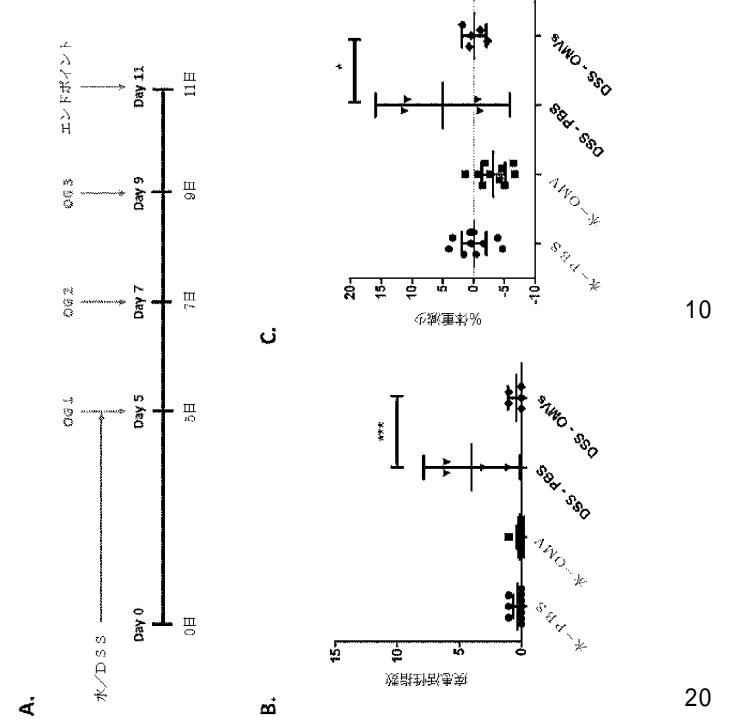
40

50

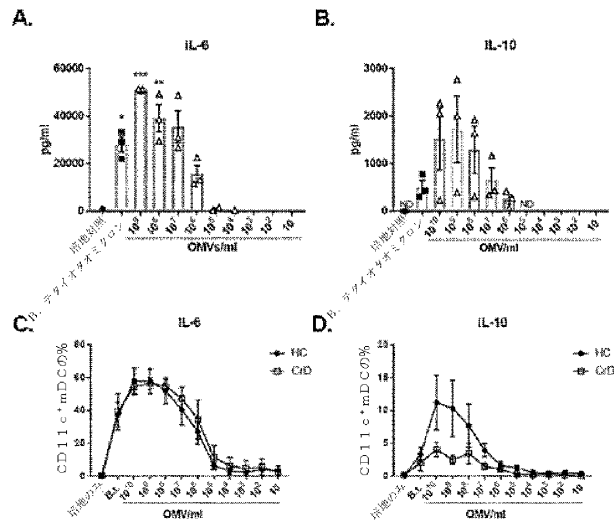
【図 7】



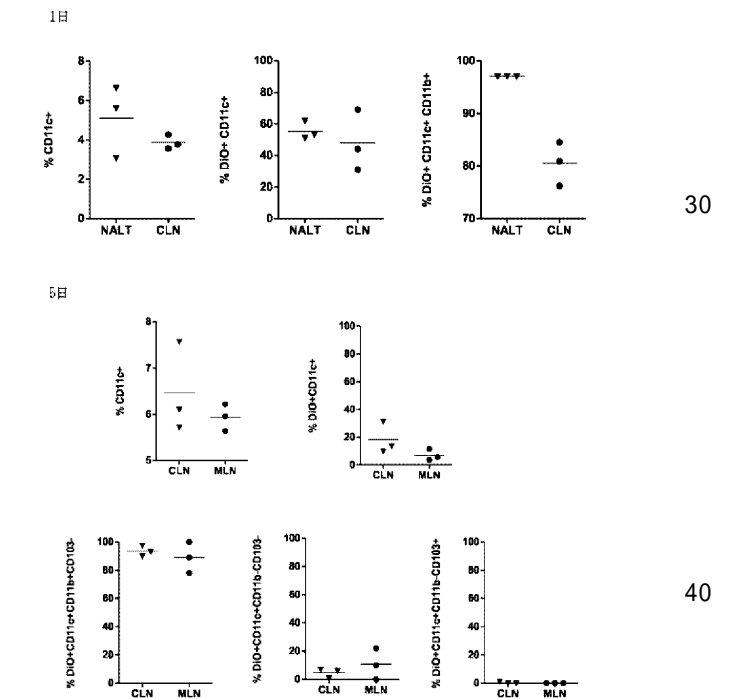
【図 8】



【図 9】



【図 10】



10

20

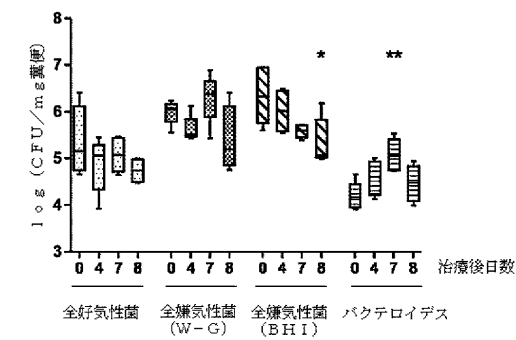
30

40

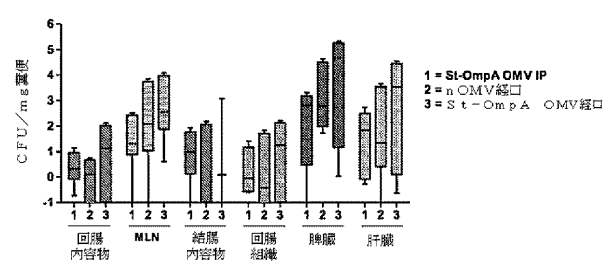
50



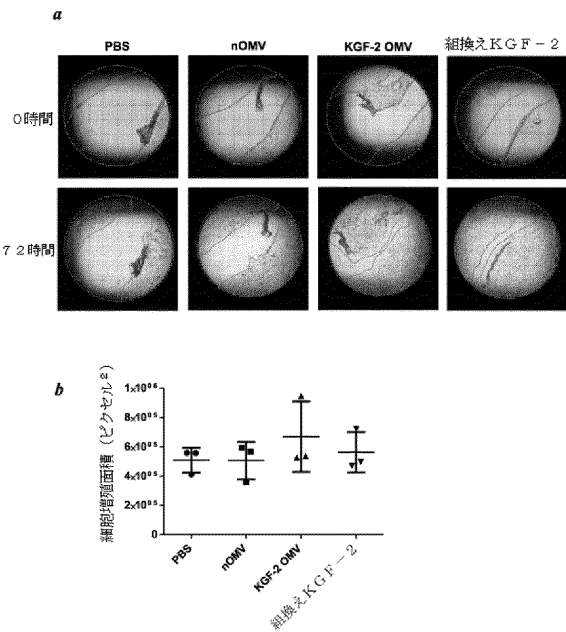
【図 1 1】



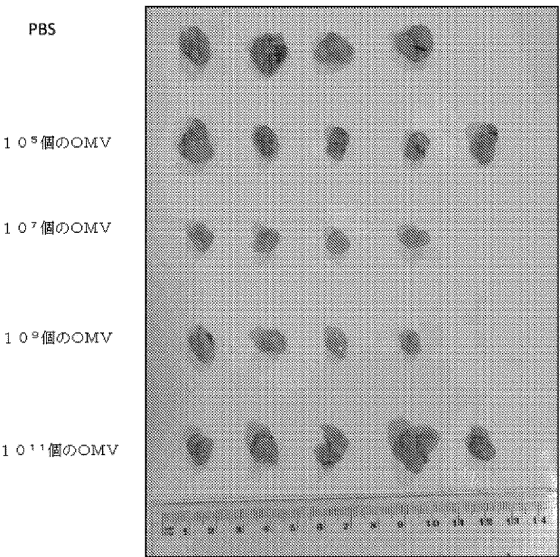
【図 1 2】



【図 1 3】



【図 1 4】



10

20

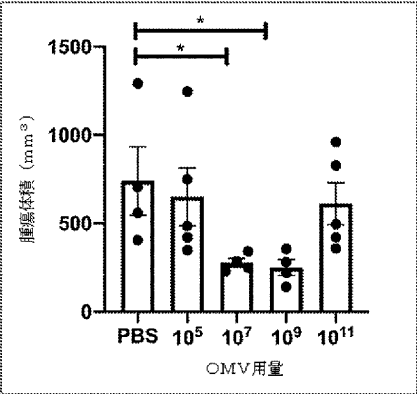
30

40

50

【 図 1 5 】

データ概要



10

20

30

40

50

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/GB2020/051204

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. A61K39/02 A61K39/39 ADD.		
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) A61K		
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) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	A. L. CARVALHO ET AL: "Use of bioengineered human commensal gut bacteria-derived microvesicles for mucosal plague vaccine delivery and immunization", CLINICAL AND EXPERIMENTAL IMMUNOLOGY, vol. 196, no. 3, 15 April 2019 (2019-04-15), pages 287-304, XP055671276, GB	1-11, 13-15, 18,26,30
Y	ISSN: 0009-9104, DOI: 10.1111/cei.13301 the whole document ----- -/--	12
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" 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 but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search  12 October 2020		Date of mailing of the international search report  15/12/2020
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Montero Lopez, B

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/GB2020/051204

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2017/187190 A1 (THE INST OF FOOD RES [GB]; UEA ENTPR LTD [GB]) 2 November 2017 (2017-11-02) cited in the application	1-11, 13-30
Y	page 2, line 31 - page 3, line 12 page 6, line 26 - page 7, line 10 page 11, line 14 - page 15, line 15 -----	12
X	US 2016/143940 A1 (SHEN YUE [US] ET AL) 26 May 2016 (2016-05-26)	1-6,8, 15,26, 29,31 32-34
Y	page 1, paragraph 0015 - page 2, paragraph 0022 page 2, paragraph 0028 - paragraph 0031 page 4, paragraph 0052 - paragraph 0054 page 5, paragraph 0062 - paragraph 0069 page 6, paragraph 0083 - paragraph 0088 page 9, paragraph 0121 page 11, paragraph 0153 - page 12, paragraph 0154 page 12, paragraph 0162 - paragraph 0163; examples 1-5 -----	
Y	KUANG TAN ET AL: "Outer Membrane Vesicles: Current Status and Future Direction of These Novel Vaccine Adjuvants", FRONTIERS IN MICROBIOLOGY, vol. 9, 26 April 2018 (2018-04-26), XP055716033, DOI: 10.3389/fmicb.2018.00783 the whole document -----	12
Y	OH YOUN KIM ET AL: "Bacterial outer membrane vesicles suppress tumor by interferon-[gamma]-mediated antitumor response", NATURE COMMUNICATIONS, vol. 8, no. 1, 20 September 2017 (2017-09-20), XP055738656, DOI: 10.1038/s41467-017-00729-8 abstract page 4, right-hand column, last paragraph - page 5, left-hand column, paragraph 1 -----	32-34
X,P	WO 2020/084295 A2 (QUADRAM INST BIOSCIENCE [GB]) 30 April 2020 (2020-04-30) page 1, line 3 - page 3, line 13 page 5, line 11 - page 7, line 25 page 8, line 25 - page 9, line 24 page 18, line 22 - page 24, line 2 page 51, line 10 - page 52, line 7 page 55, line 1 - page 65, line 14 -----	1-30

1

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/GB2020/051204

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

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

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

10

20

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

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

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

30

40

1-34

**Remark on Protest**

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/ GB2020/ 051204

**FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

10

## 1. claims: 1-34

Pharmaceutical preparation comprising native OMVs produced by commensal Bacteroides and a pharmaceutically acceptable carrier

---

## 2. claims: 35, 36

Method for producing native OMVs including growing bacterial cells and filtering the same

---

20

30

40

50

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/GB2020/051204

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2017187190 A1	02-11-2017	CA 3003561 A1	02-11-2017
		CN 108779482 A	09-11-2018
		EP 3449005 A1	06-03-2019
		US 2019099477 A1	04-04-2019
		WO 2017187190 A1	02-11-2017
-----			
US 2016143940 A1	26-05-2016	DK 2555753 T3	26-11-2018
		EP 2555753 A2	13-02-2013
		ES 2694100 T3	18-12-2018
		HR P20181778 T1	11-01-2019
		HU E040658 T2	28-03-2019
		JP 6027961 B2	16-11-2016
		JP 6296367 B2	20-03-2018
		JP 6674971 B2	01-04-2020
		JP 2013523838 A	17-06-2013
		JP 2017014201 A	19-01-2017
		JP 2018109016 A	12-07-2018
		JP 2020097584 A	25-06-2020
		JP 2020097585 A	25-06-2020
		US 2011251156 A1	13-10-2011
		US 2016143940 A1	26-05-2016
		US 2019314400 A1	17-10-2019
		WO 2011127302 A2	13-10-2011
-----			
WO 2020084295 A2	30-04-2020	NONE	
-----			

## フロントページの続き

## (51)国際特許分類

## F I

## テーマコード ( 参考 )

A 6 1 K	47/02	(2006.01)	A 6 1 K	47/02	
A 6 1 K	38/18	(2006.01)	A 6 1 K	38/18	
A 6 1 K	38/02	(2006.01)	A 6 1 K	38/02	
A 6 1 K	35/12	(2015.01)	A 6 1 K	35/12	
A 6 1 P	31/00	(2006.01)	A 6 1 P	31/00	
A 6 1 P	29/00	(2006.01)	A 6 1 P	29/00	
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 0 5
A 6 1 P	37/04	(2006.01)	A 6 1 P	37/04	
A 6 1 P	1/04	(2006.01)	A 6 1 P	1/04	
A 6 1 P	11/00	(2006.01)	A 6 1 P	11/00	
A 6 1 K	45/00	(2006.01)	A 6 1 K	45/00	
A 6 1 P	31/04	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 2 1
A 6 1 P	31/16	(2006.01)	A 6 1 P	31/04	
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	A 6 1 P	31/16	
			C 1 2 N	15/09	Z Z N A

MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,N  
E,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,  
CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JO,JP,KE,K  
G,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,N  
I,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,  
TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

ノーフォーク、ノーウィッチ、ノーウィッチ リサーチ パーク、クアドラム インスティテュート

## バイオサイエンス 内

F ターム ( 参考 )    4C076    AA12 AA95 BB11 BB13 BB15 BB25 CC04 CC06 CC07 CC16  
CC26 CC27 CC31 CC32 CC35 DD23 EE57 FF11  
4C084    AA02 AA03 AA19 BA03 BA44 DB52 MA02 MA05 MA17 MA59  
MA66 NA05 NA13 ZA591 ZA661 ZB091 ZB111 ZB211 ZB261 ZB311 ZB331  
ZB351 ZC751  
4C085    AA03 AA38 BA24 BA55 CC07 CC08 DD21 DD31 DD35 DD41  
EE01 EE06 FF19 GG02 GG03 GG06 GG10  
4C087    AA01 AA02 CA02 MA02 MA05 MA17 MA59 MA66 NA13 ZA59  
ZA66 ZB09 ZB11 ZB21 ZB26 ZB31 ZB33 ZB35 ZC75