

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6839199号
(P6839199)

(45) 発行日 令和3年3月3日(2021.3.3)

(24) 登録日 令和3年2月16日(2021.2.16)

(51) Int.Cl.	F 1
C 12 P 1/04	(2006.01)
A 61 K 39/09	(2006.01)
A 61 K 39/39	(2006.01)
A 61 P 31/04	(2006.01)
A 61 P 37/04	(2006.01)
	C 12 P 1/04
	A 61 K 39/09
	A 61 K 39/39
	A 61 P 31/04
	A 61 P 37/04

請求項の数 15 (全 28 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2018-538841 (P2018-538841)
(86) (22) 出願日	平成29年2月14日 (2017.2.14)
(65) 公表番号	特表2019-504623 (P2019-504623A)
(43) 公表日	平成31年2月21日 (2019.2.21)
(86) 國際出願番号	PCT/EP2017/053306
(87) 國際公開番号	W02017/140683
(87) 國際公開日	平成29年8月24日 (2017.8.24)
審査請求日	令和2年2月13日 (2020.2.13)
(31) 優先権主張番号	16382060.8
(32) 優先日	平成28年2月15日 (2016.2.15)
(33) 優先権主張国・地域又は機関	歐州特許庁 (EP)

(73) 特許権者	517209868 ヒプラ シエンティフィック エセ. エレ . ウ. スペイン国 17170 アマール, 13 5, アヴェニダ. ラ セルヴァ
(74) 代理人	110000659 特許業務法人広江アソシエイツ特許事務所
(72) 発明者	コリヤード ギンペール, ロサ マリア スペイン王国 ジローナ 17002, 2 エネ 2アー, セー. ジュアン マラガイ 17
(72) 発明者	プレナフェタ イー アマルゴス, アントニ スペイン王国 アメール 17170, 2 2, セー. ランブラ カタルーニャ
	最終頁に続く

(54) 【発明の名称】免疫原性剤としてのストレプトコッカス・ウベリス抽出物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

- a) バイオフィルムを得るために、バイオフィルム產生 S . ウベリス株を培地でインキュベートする工程と、
 b) 前記培地から前記バイオフィルムを回収する工程と、
 c) 前記工程 b) で得られた前記バイオフィルムに 80 ~ 130 の温度で熱処理を施す工程と、
 d) 前記工程 c) の前記熱処理後に得られた不溶性画分を廃棄し、可溶性抽出物を保存する工程と、
 を含むことを特徴とする、免疫原性剤の調製方法。

【請求項 2】

前記インキュベーションが 1 % ~ 10 % の二酸化炭素を含む雰囲気中で行われることを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記工程 c) において、前記熱処理が 5 ~ 75 分の期間行われることを特徴とする、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 4】

請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の方法により得ることができる、免疫原性剤。

【請求項 5】

ストレプトコッカス種によって引き起こされる乳腺炎及び / 又は感染症の予防及び / 又

10

20

は治療に使用するための、請求項 4 に記載の免疫原性剤。

【請求項 6】

前記ストレプトコッカス種によって引き起こされる乳腺炎及び／又は感染症の予防に使用するための、請求項 5 に記載の免疫原性剤。

【請求項 7】

免疫学的に有効な量の請求項 4 に記載の免疫原性剤を含む、ワクチン。

【請求項 8】

薬学的に許容されるビヒクル及び／又は薬学的に許容されるアジュバントを更に含むことを特徴とする、請求項 7 に記載のワクチン。

【請求項 9】

水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウム、酸化アルミニウム、ムラミルジペプチド、ビタミン E、スクワラン、スクワレン、チョウセンニンジン、ザイモサン、グルカン、ジメチルアミノエチル - デキストラン、デキストラン、非イオン性blockポリマー、モノホスホリルリピド A、サボニン、及びこれらの混合物から選択されるアジュバントを含むことを特徴とする、請求項 8 に記載のワクチン。

10

【請求項 10】

モノホスホリルリピド A を含むことを特徴とする、請求項 9 に記載のワクチン。

【請求項 11】

皮内、皮下、筋肉内、腹腔内、静脈内、又は乳房的経路によって投与されることを特徴とする、請求項 7 ~ 10 のいずれか 1 項に記載のワクチン。

20

【請求項 12】

2 回以上投与されることを特徴とする、請求項 7 ~ 11 のいずれか 1 項に記載のワクチン。

【請求項 13】

ストレプトコッカス種によって引き起こされる乳腺炎及び／又は感染症の予防及び／又は治療に使用するための、請求項 7 ~ 12 のいずれか 1 項に記載のワクチン。

【請求項 14】

バイオフィルム産生細菌によって引き起こされる乳腺炎及び／又は感染症の予防及び／又は治療に使用するための、請求項 7 ~ 12 のいずれか 1 項に記載のワクチン。

【請求項 15】

30

免疫学的に有効な量の請求項 4 に記載の免疫原性剤又は請求項 7 ~ 10 のいずれか 1 項に記載のワクチンを含む容器を含むことを特徴とする、ワクチン接種キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

この出願は、2016年2月15日に出願された欧州特許出願第16382060.8号の利益を主張する。

【0002】

本発明は、ワクチンの分野に関し、具体的には、S. ウベリス (S. u b e r i s) 細菌に基づく新規な免疫原性剤、並びに特に家畜のウシにおいて、ストレプトコッカス種によって及びバイオフィルム産生細菌によって引き起こされる乳腺炎及び感染症の予防及び／又は治療のためのワクチン組成物に使用するためのタイコ酸含有組成物に関する。

40

【背景技術】

【0003】

乳腺炎は、乳腺の炎症を特徴とし、一般に家畜、特にウシ、ヒツジ、及びヤギに広く影響を及ぼす細菌感染症によって一般に引き起こされる病状であり、その発生は、世界的水準で乳業に重大な経済的損失を伴うため乳牛において特に重大である。

【0004】

乳腺炎の臨床的徴候は、おそらくは乳腺の痛み及び炎症を伴うタンパク質凝集物又は凝固物等、乳中の何らかの目に見える異常の出現から、主としてタンパク質凝集物からなる

50

分泌物の產生、菌血症、敗血症まで様々であり得、動物の死亡も発生し得る。乳腺炎はまた、乳腺の炎症が乳又は乳房に目に見える変化を生じない亜臨床形態で存在する場合もあり、亜臨床的に感染したウシは乳產生が減少し、品質が低下する。

【0005】

乳腺炎は、異なる病原体によって引き起こされることがあり、顯著なものには、スタフイロコッカス (*Staphylococcus*) 属及びストレプトコッカス (*Streptococcus*) 属、特にストレプトコッカス・ウベリス (*Streptococcus uberis*; 以下、*S. ウベリス*という。) が含まれる。*S. ウベリス*は、スタフイロコッカス種の細胞壁及びストレプトコッカス種の細胞壁と同様の細胞壁を有するグラム陽性菌であり、その中ではストレプトコッカス・アガラクティエ (*S. agalactiae*) 及びストレプトコッカス・ディスガラクティエ (*S. dysgalactiae*) も顯著である。*S. ウベリス*は、ストレプトコッカス属の中で乳腺炎の臨床的及び亜臨床的症例からより一般的に単離された病原体である。近年、*S. ウベリス*は世界中のほとんどの地域で、臨床的及び亜臨床的乳腺炎の主な原因の1つとなっている。*S. ウベリス*は環境細菌であると考えられており、乳房の内部及び外部で生存及び複製が可能であり、家畜施設内の非常に広範囲に存在するため、闘うのが困難である。乳腺炎を引き起こす他の病原体は、ストレプトコッカス・ディスガラクティエ、黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*)、ストレプトコッカス・アガラクティエ、マイコプラズマ・ボビス (*Mycoplasma bovis*)、肺炎桿菌 (*Klebsiella pneumoniae*) 及び大腸菌 (*Escherichia coli*) である。

10

【0006】

現在、乳腺炎を予防するため、更にその発生率を減少させるため、又はその効果を緩和するために、様々な戦略が追求されている。主に、予防戦略は衛生学及び搾乳手順を改善することに焦点を当てているが、抗生物質による治療が治療アプローチの好ましい選択肢である。

【0007】

更に近年では、ワクチンの投与に基づく予防戦略の開発に关心が高まっており、この意味で、*S. ウベリス*に基づく様々な免疫原性剤が乳腺炎、特にウシ乳腺炎の予防におけるその使用について最新技術に記載されている。

【0008】

30

いくつかの文献は、例えば、乳腺炎の予防のための未精製の「粗」ワクチンの使用を記載しており、これらのワクチンは完全な*S. ウベリス*細菌又はそのタンパク質抽出物に基づく。

【0009】

例えば、Finch らによる論文では、死滅した*S. ウベリス*を用いた局所ワクチン接種は、同種株 *Infect* による実験的な乳房内試行に対してウシ乳腺を保護する。非特許文献 1 に開示されている研究では、不活化*S. ウベリス*細菌を複数回乳房内投与する家畜のウシのワクチン接種によって、その後の同種株の感染症に対して動物内にある種の防御が得られる。

【0010】

40

非特許文献 2 (Hill らによる論文「乳牛における*S. ウベリス*乳腺炎の病因の免疫修飾 (Immune modification of the pathogenesis of *Streptococcus uberis* mastitis in the dairy cow)」) には、ウシの皮下ワクチン接種は、菌株 014J の*S. ウベリス*生菌及び / 又はムタノリシン及び X ヒアルロニダーゼで細菌を処理して、細胞壁及びカプセルを除去し、続いて遠心分離によってプロトプラストを除去して得られた同じ菌株に由来する可溶性抽出物が記載されている。*S. ウベリス*の可溶性抽出物のみでの処置は動物に免疫を与えないが、乳牛に生菌を皮下経路でワクチン接種した後、細菌性抽出物の乳房内注射と組み合わせると、乳腺炎の発生率低下を示すことが分かった。

【0011】

50

S. ウベリスのワクチンに関するより最近の研究の大部分は、S. ウベリスに起因する感染症に対する防御を提供することができる特定の細菌サブユニットの探索に焦点を当てている。

【0012】

従って、例えば、特許文献1では、泌乳牛にS. ウベリスによって誘発された乳腺炎の予防及び治療用ワクチンにおけるS. ウベリスのコヘモリジンポリペプチド(CAMP因子)の使用が開示されている。

【0013】

非特許文献3(Leighらによる論文「S. ウベリス由来のプラスミノーゲン活性剤を含むワクチン接種は阻害応答を誘発し乳牛を実験感染から防御する(Vaccination with the plasminogen activator from *Streptococcus uberis* induces an inhibitory response and protects against experimental infection in the dairy cow)」)では、プラスミノーゲン活性剤S. ウベリス含有粗タンパク質濃縮物(PauA)をアジュバントと組み合わせて皮下投与によりワクチン接種した乳牛が、その後のS. ウベリス病原性株の投与に対してどのように防御を備えたかが記載されている。10

【0014】

特許文献2には、 streptococcus・ディスガラクティエ、streptococcus・アガラクティエ、S. ウベリス、streptococcus・パラウベリス(streptococcus paruberis)、及びstreptococcus・イニアエ(streptococcus iniae)のプラスミン結合GapCタンパク質の組換え生成、並びに細菌感染症、特に乳腺炎の予防及び治療のためのワクチン組成物としてのそれらの使用が記載されている。20

【0015】

非特許文献4(Pradoらによる論文「ウシ乳房上皮細胞へのS. ウベリスの付着及び内在化を低減する組換えS. ウベリス付着分子抗体を用いた乳牛の予防接種(Vaccination of dairy cows with recombinant *Streptococcus uberis* adhesion molecule antibodies that reduce adherence to and internalization of *S. uberis* into bovine mammary epithelial cells)」)では、インビトロで乳腺の上皮細胞へのバクテリアの付着を低減するように生成された抗体で観察される能力に基づく、乳腺炎に対する乳牛のワクチン接種について、組換えS. ウベリス付着分子(SUAM)の使用が示唆されている。30

【0016】

特許文献3では、S. ウベリス表面に固定されたソルターゼタンパク質に基づく免疫原性組成物、及びS. ウベリスによって引き起こされる感染症に対する予防的又は治療的ワクチンとしてのその使用が開示されている。

【0017】

特許文献4には、streptococcusによって引き起こされる感染症に対するワクチンが、抗原としてのS. ウベリスの特定のタンパク質、具体的にはフェリクローム結合タンパク質、TU伸長因子、リボタンパク質、及びセリンプロテアーゼを含むと記載されている。40

【0018】

現在、S. ウベリスによって引き起こされたウシ乳腺炎における特定の適応症を有するワクチンはヨーロッパ市場には存在しない。米国市場には、「*Streptococcus uberis Bacterin*」(条件付きライセンスの下で販売されているHygieia Biological Laboratories社(米国)の製品コード2851.00)と呼ばれるワクチンが存在する。このワクチンは、S. ウベリスの不活50

化培養物から得られた古典的なバクテリンに基づくものであり、その分離株は臨床症例に由来し、S.ウベリスに起因するウシ乳腺炎に対する主張が有効性試験によって裏付けられるまで審議中である。

【0019】

とりわけS.ウベリスによって引き起こされるウシ乳腺炎に対する残りの市販のワクチンは、多価ワクチンである。これらのワクチンは、古典的不活化バクテリンの混合物に基づく抗原組成物を含み、例えば、MASTIVAC（登録商標）（Laboratorios Ovejero S.A., (スペイン)）が挙げられ、これはスペインで市販されているウシ乳腺炎に対する多価ワクチンであり、黄色ブドウ球菌、大腸菌J5、S.アガラクティエ、S.ディスガラクティエ、S.ウベリス、ストレプトコッカス・ピオゲネス（*Streptococcus pyogenes*）、及びアルカノバクテリウム・ピオゲネス（*Arcanobacterium pyogenes*）由来のバクテリンを含む。別の例としては、Mastiplus（登録商標）BR（Laboratorio Vitarfort Ind. e Com. de Productos Veterinarios Ltda.（ブラジル））が挙げられ、これはブラジルで市販されており、組成物はストレプトコッカス・アガラクティエ、ストレプトコッカス・ディスガラクティエ、S.ウベリス、黄色ブドウ球菌、スタフィロコッカス・アルバス（*Staphylococcus albus*）、大腸菌、アルカノバクテリウム（コリネバクテリウム）・ピオゲネス、サルモネラ種、シュードモナス種、クレブシエラ種、枯草菌（*Bacillus subtilis*）、エロバクター・エロゲネス（*Aerobacter aerogenes*）、及びパステツレラ・ボビス（*Pasteurella bovis*）のバクテリンである。これらのワクチンは、S.ウベリスに起因する臨床的及び亜臨床的乳腺炎の問題を解決しないため、ストレプトコッカス種属によって引き起こされる乳腺炎と戦い、特にS.ウベリスに対して特異的に戦うために新規な開発及び新しいワクチンが必要である。10

【0020】

従って、従来技術において利用可能な様々な提案にも関わらず、ストレプトコッカス種、特にS.ウベリスによって引き起こされる感染症を予防及び／又は治療するのに有効であり、特に一般に乳腺炎及び特にウシ乳腺炎の予防及び／又は治療に有効である新しい免疫原性産物を提供する必要がまだある。30

【先行技術文献】

【特許文献】

【0021】

【特許文献1】国際特許出願WO96/41879号公報

【特許文献2】国際特許出願WO01/96381号公報

【特許文献3】国際特許出願WO2010/041056号公報

【特許文献4】国際特許出願WO2015/042449号公報

【非特許文献】

【0022】

【非特許文献1】Immuno., 1994, 62, 3599-60340

【非特許文献2】FEMS Immunol. Med. Microbiol., 1994, 8, 109-118

【非特許文献3】Vaccine, 1999, 17, 851-857

【非特許文献4】Vet. Immunol. Immunopathol., 2011, 141, 201-208

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0023】

本発明の目的は、免疫原性剤の調製方法である。

【課題を解決するための手段】

50

30

40

50

【0024】

本発明の別の態様は、バイオフィルム産生 S. ウベリス株の培養物からのバイオフィルムを含む免疫原性剤に関する。

【0025】

本発明の別の態様は、この方法によって得ることができる免疫原性剤に関する。

【0026】

本発明の別の態様は、ストレプトコッカス種によって引き起こされる乳腺炎及び／又は感染症の予防及び／又は治療に使用するための免疫原性剤に関する。

【0027】

本発明の別の態様は、この免疫原性剤を含むワクチンに関する。

10

【0028】

本発明の別の態様は、ストレプトコッカス種によって引き起こされる乳腺炎及び／又は感染症の予防及び／又は治療に使用するためのワクチンである。

【0029】

本発明の別の態様は、バイオフィルム産生細菌によって引き起こされる乳腺炎及び／又は感染症の予防及び／又は治療に使用するためのワクチンである。

【0030】

本発明の別の態様は、本発明の免疫原性剤又はワクチンを含むワクチン接種キットに関する。

【0031】

20

本発明の別の態様は、ストレプトコッカス種によって引き起こされる乳腺炎及び／又は感染症の予防及び／又は治療に使用するためのタイコ酸を含む医薬組成物に関する。

【0032】

本発明の別の態様は、バイオフィルム産生細菌によって引き起こされる乳腺炎及び／又は感染症の予防及び／又は治療に使用するためのタイコ酸を含む医薬組成物に関する。

【図面の簡単な説明】

【0033】

【図1】横座標として示すワクチン接種群 (GV) 及び対照群 (GC) における感染の24時間後の体温上昇の平均()で表す)を縦座標として示す。ワクチン接種群は、より小さな体温上昇を示すことが観察される。

30

【図2】横座標として示すワクチン接種群 (GV) 及び対照群 (GC) における感染の24時間後の乳腺組織の $10g_{10}CFU/g$ の平均値を縦座標として示す。S. ウベリス数が少ない群は本発明の免疫原性因子でワクチン接種した群に対応することが観察される。

【図3】横軸として示すワクチン接種群 (GV) 及び対照群 (GC) における感染の24時間後の感染腺の感受性パーセンテージの平均値を示す。低い感受性を有する群は本発明の免疫原性剤でワクチン接種した群に対応することが観察される。

【図4】直腸温度の平均値を縦座標として で示し、ワクチン接種群()及び対照群()の感染後日数を横座標として示す(0日目を感染日とする)。実験感染後の日々の間にワクチン接種群において温度低下の明らかな傾向が観察された。

40

【図5】横座標として示すワクチン接種群()及び対照群()について、感染後の日々における乳の $10g_{10}CFU/m1$ の平均値を縦座標として示す。S. ウベリス数が少ない群は本発明の免疫原性因子でワクチン接種した群に対応することが観察される。感染日は、横座標の0日に相当する。

【図6】ワクチン接種群()及び対照群()について横座標として示す感染(0日)後のリットルで表した乳産生の平均値を縦座標として示す。感染後、本発明の免疫原性剤でワクチン接種した群は、ほぼ毎日、対照群よりも多い乳産生を示すことが明らかに観察される。

【図7】ワクチン接種群()及び対照群()の横軸として示す感染後の日々における、乳 $1m1$ 当たりの体細胞数(SC/m1)の平均値を縦座標として示す。感染日は0日

50

に相当する。研究の20日目に、本発明の免疫原性剤でワクチン接種した群では、対照群と比較して乳のCS/m1の数が明らかに少ないことが観察される。結果は、両方の群において体細胞の数が増加するという事実にも関わらず、ワクチン接種群は非ワクチン接種群よりも有意により迅速に正常値に戻ることを示している。

【図8】異なる濃度(1:10及び1:25希釈)のモノクローナル抗体抗LTAの存在下及びその非存在下(対照群、GC)におけるS.ウベリスのインビトロ培養物に対応する595nmでの光学密度が示されている。結果は、S.ウベリスのインビトロ培養物におけるこれらのモノクローナル抗体抗LTAの存在が、このようなモノクローナル抗体を含まない培養物と比較して、バイオフィルムの形成を有意に阻害することを示す。

【図9】本発明の免疫原性剤でワクチン接種した動物の血清の存在下(ワクチン接種群、GV)及び非存在下(対照群、CG)における、S.ウベリスのインビトロ培養物に対応する595nmでの光学密度が示されている。この結果は、本発明の免疫原性剤でワクチン接種した動物の血清の存在が、このような血清を含まない培養物と比較して、S.ウベリスによるインビトロ条件下でのバイオフィルムの形成を有意に阻害することを示す。

【発明を実施するための形態】

【0034】

本発明の目的は、a)バイオフィルム産生S.ウベリス菌株をインキュベートしてバイオフィルムを得る工程と、b)工程a)で得られたバイオフィルムに熱的加熱処理を施す工程と、を含む免疫原性剤の調製方法である。

【0035】

本発明の発明者らは、S.ウベリスのバイオフィルム抽出物の調製方法を開発し、この方法は驚くべきことに、ストレプトコッカス種によって引き起こされる感染症に対する、特に、一般に動物、特に家畜のウシにS.ウベリスによって引き起こされる乳腺炎の予防のためのワクチン組成物に有効な免疫原性剤をもたらす。

【0036】

本明細書及び特許請求の範囲を通して、冠詞「a」又は「the」によって先行される単数形の表現は、文脈が明らかに反対を示さない限り、広義には複数形への言及も含むと理解される。

【0037】

本発明の文脈において、決定された値に言及する「およそ」という用語は、値の一定の変動が受け入れられ、一般に+/-5%であることを示すことが理解される。

【0038】

免疫原性剤の調製方法

【0039】

本発明は、S.ウベリス細菌のバイオフィルムから得られ熱処理された免疫原性剤が、病原性ストレプトコッカス種、好ましくはS.ウベリス、菌株、及びバイオフィルム産生細菌による感染に対して動物において免疫を誘導することができる優れた免疫原性を有するという驚くべき発見に基づいている。

【0040】

バイオフィルムは、当業者に周知であるように、微生物、例えば細菌の凝集物であり、表面に付着して形成され、高分子化合物、主に多糖類の混合物から作られる細胞外マトリックスによって覆われて、一般に細胞外重合物質(EPS)として知られている。

【0041】

バイオフィルムの組成は、基本的には、他の細胞外生成物の中でも微生物細胞、多糖類、及び水を含み、I. W. Sutherlandによる「バイオフィルムマトリックス-固定化されているが動的である微生物環境(The biofilm matrix-an immobilized but dynamic microbial environment)」, Trends in Microbiol., 2001, 9(5), 222-227に記載されているように、これらはマトリックスが多数の微小環境及び状況に適合することを可能にする。

10

20

30

40

50

【0042】

本発明の方法では、バイオフィルム産生 S. ウベリス菌株を使用する。バイオフィルムを産生することができる任意の S. ウベリス菌株は、この方法で使用するのに適している。

【0043】

バイオフィルム産生細菌を同定する方法は、当業者に周知である。例えば、マイクロプレート試験を使用することができ、G. E. ムーア、「乳房内感染症に関する S. ウベリスによるバイオフィルム産生 (Biofilm production by *Streptococcus uberis* associated with intramammary infections)」, 2009, University of Tennessee Honors Thesis Projects、又は Stepanovicら、「マイクロタイタープレート内のバイオフィルムの定量：ブドウ球菌によるバイオフィルム生産の評価のための試験条件と実践的推奨の概説 (Quantification of biofilm in microtiter plates: Overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by *staphylococci*)」, APMIS, 2007, 115, 891-899 に記載されている。

【0044】

本発明の方法の工程 a) では、バイオフィルム産生 S. ウベリス菌株をインキュベートしてバイオフィルムを得る。バイオフィルム産生菌株で起こるように、この菌株は、インキュベーション中にバイオフィルムを産生し、バイオフィルムは本発明の方法を実施する容器の表面に付着する。

【0045】

細菌は、例えば、トリプチカーゼ大豆プロス (T S B)、トリプチカーゼ大豆寒天 (T S A)、とりわけミルク寒天、又はこれらの混合物（全て市販されており当業者には明らかである）から選択される通常の培地を用いてインキュベートすることができる。必要に応じて、培地には、例えば、血液、酵母エキス、グルコース若しくはカゼイン、又はそれらの混合物等の追加成分を補充することができる。

【0046】

本発明の好ましい実施形態では、培地は、トリプトン及びペプトン大豆を含有するトリプチカーゼ大豆プロス (T S B) を含む。T S B に酵母エキス (Y E) を補充するが好ましく、より好ましくは 0.1% ~ 2%、より好ましくは 0.5% ~ 1.5% の酵母エキスを補充し、更に好ましくは 1.2% の酵母エキスを補充した T S B を使用し、パーセンテージは w / v で表される。

【0047】

バイオフィルム産生 S. ウベリス細菌は、通常、慣習的な雰囲気でインキュベートされるが、好ましくは 1% ~ 10% の二酸化炭素、より好ましくは約 5% の二酸化炭素を含む雰囲気中でインキュベーションを実施する。

【0048】

インキュベーションは、一般に 30 ~ 45 、好ましくは 35 ~ 40 、更により好ましくは約 37 を含む温度で行う。

【0049】

S. ウベリス細菌を、バイオフィルムの発生に適した期間、一般に 24 時間 (1 日) ~ 168 時間 (7 日間) を含む、好ましくは 36 時間 (1.5 日) ~ 120 時間 (5 日) を含む、より好ましくは 48 時間 (2 日) ~ 72 時間 (3 日間) を含む期間インキュベートする。

【0050】

バイオフィルム産生 S. ウベリス菌株は、当業者に周知のように、細胞培養に適した任意の支持体又は表面上でインキュベートすることができる。例えば、他の可能な支持体の

20

30

40

50

中でも培養プレート、培養ボトル、ウェルプレート、又は培養チューブを使用することができる。支持体は、例えば、Falcon(登録商標)の名称でCorning又はDD Biolog社によって商業的に入手することができる。

【0051】

本発明の方法は、工程a)の後に追加の工程を含むことができ、この工程は、懸濁液中に残っている細菌細胞を含む培地からバイオフィルムを回収することを含む。方法のこの任意選択的工程では、S.ウベリスのバイオフィルムの形成後、デカンテーションによって懸濁液中の細菌細胞と共に培地を除去し、廃棄する。形成されたバイオフィルムを回収し、次の工程のために保存する。

【0052】

好ましい実施形態では、本発明の方法は工程a)の後、且つ工程b)の前に追加の工程を含み、この工程は、媒質に懸濁液中の細菌細胞を含む培地からバイオフィルムを回収することを含む。

【0053】

S.ウベリス細菌株によって産生されるバイオフィルムは、一般に、それが産生された表面に付着し、この表面から分離しなければならない。バイオフィルムを表面から分離することは、物理的手段、例えば、必要であればスパチュラ又はデフレーカーの助けを借りて簡単に行うことができる。

【0054】

代替的に又は追加的に、物質を使用してバイオフィルムの分離を容易にすることができ、特にプロテアーゼを、典型的には同じ培養物支持体内でバイオフィルム上に水溶液の形態で添加し、これによりバイオフィルムが表面から分離し、水性懸濁液の形態で得られる。その後、例えば遠心分離によって分離することができる。

【0055】

例えば、バイオフィルムを回収するために、バイオフィルムの分離を容易にする目的で、典型的には水溶液の形態でトリプシンを使用することもできる。このようにして、バイオフィルムは、溶液中にトリプシンを含有する水性懸濁液の形態で回収される。バイオフィルムによって形成された不溶性の沈降残留物を遠心分離によって分離し、トリプシン溶液を含有する上清を廃棄する。

【0056】

好ましい実施形態では、本発明の方法は、工程a)の後、且つ工程b)の前に追加の工程を含み、この工程は、トリプシンを使用して、工程a)で形成されたバイオフィルムを回収することを含む。場合により、バイオフィルムは、例えば遠心分離法により、典型的には10,000~20,000gに相当する速度で5~25分間、トリプシン溶液から精製し、不溶性画分を保存することができる。

【0057】

好ましい実施形態では、本発明の方法は、回収されたバイオフィルムを水性溶液、典型的には注射用水に懸濁する工程を含むが、とりわけPBS又は類似の緩衝溶液も使用することができる。

【0058】

続いて、本発明の方法の工程b)では、好ましくは培地から分離され、より好ましくは水溶液中に懸濁された、前の工程a)で得られたバイオフィルムを、典型的には80~130を含む、好ましくは100~125を含む、より好ましくは約121である温度で熱処理に供する。熱処理は、一般に、5~75分を含む、好ましくは15~50分を含む、より好ましくは約45分の期間行われる。

【0059】

工程b)の後、本発明の方法は、不溶性画分を可溶性抽出物から分離する追加の工程を含み得る。不溶性画分は廃棄し、本発明の方法から得られた免疫原性剤を含む可溶性抽出物を保存し、これがストレプトコッカス種、好ましくはS.ウベリスによって引き起こされる乳腺炎及び/又は感染症の治療及び/又は予防に驚くほどに適している。

【0060】

好ましい実施形態では、本方法は、工程 b) の熱処理後に得られた不溶性画分を廃棄し、本発明の免疫原性剤を含む可溶性抽出物を保存する工程を含む。

【0061】

両方の画分の分離は、例えば、典型的には 10 , 000 g ~ 20 , 000 g に相当する速度で、5 ~ 30 分、好ましくは 10 ~ 25 分を含む期間遠心分離することによって実施することができる。

【0062】

不溶性画分は、典型的には、不活化細菌及び細胞外マトリックスの不溶性成分を含有する。上清は、本発明の方法により得られた免疫原性剤を含む可溶性抽出物を含む。

10

【0063】

この追加の工程は、不活化細菌及び細胞外マトリックスの不溶性成分を含まないためにより純粋な免疫原性剤を提供するのに寄与する。除去することができるこれらの成分を含む免疫原性剤の使用は、免疫防御応答も生じるが、その量は当業者に周知の方法で調整しなければならない。

【0064】

必要に応じて、例えば凍結乾燥によって水分を除去することができ、これにより免疫原性剤は固体形態で乾燥抽出物として得られる。

【0065】

免疫原性剤

20

【0066】

本発明の別の態様は、本発明の方法によって得ることができる免疫原性剤に関する。この免疫原性剤は、本発明の免疫原性剤と以下で言及される。

【0067】

バイオフィルム産生 S . ウベリス菌株の培養物由来の熱的加熱処理されたバイオフィルムを含む免疫原性剤も本発明の一部である。

【0068】

免疫原性剤は、好ましくは、水性懸濁液、水溶液、又は凍結乾燥の形態である。

【0069】

免疫原性生成物若しくは剤、又は抗原は、ワクチン又は医薬組成物の成分として理解され、動物に投与された場合に免疫応答を誘発することができ、病原体によるその後の感染及び / 又はその感染に関連する病状から動物を保護する。免疫応答は、当業者に周知のように、細胞型であろうと体液型であろうと、任意のタイプの免疫を含むことが理解される。

30

【0070】

本発明の枠組みにおいて、動物という用語は、ストレプトコッカス種によって、特に S . ウベリスによって引き起こされる感染症に対して感受性のある任意の動物を広く指し、より詳細には、ヒトを含む哺乳動物を指す。好ましくは、動物は反芻動物であり、より好ましくは乳牛（又はウシ）、ヒツジ（又は o v i n e ）、ブタ（又は p o r c i n e ）、あるいはヤギ（又は c a p r i n e ）である。特に好ましい実施形態では、本発明の免疫原性剤は、家畜のウシの免疫化に使用される。

40

【0071】

防御免疫応答は、未処理の動物と比較して、処理動物の S . ウベリスによるその後の感染、特に免疫原性生成物の調製に使用されるものとは異なる S . ウベリス菌株及び / 又はその関連病理、特に乳腺炎へのその後の感染に対する感受性の低さによって決定することができる。

【0072】

実施例のセクションに開示されている有効性試験に示されているように、本剤が S . ウベリスによって引き起こされる感染症の予防に有効であることは、驚くほどに確認されている。

50

【 0 0 7 3 】

特に、実施例のセクションでは、出産前の乳牛に本発明の免疫原性剤でワクチン接種を行ったときに得られた結果が提供されている。感染2日後の体温の明確な低下、乳中のC F U / m l の実質的な減少、対照群と比較した泌乳量の増加、及び研究の終了時に乳中の体細胞数 (S C / m l) の低下が観察された。

【 0 0 7 4 】

従って、ストレプトコッカス種によって引き起こされる乳腺炎及び／又は感染症の予防及び／又は治療のための、好ましくはストレプトコッカス種によって引き起こされる乳腺炎及び／又は感染症の予防のためのワクチンの調製のための本発明の免疫原性剤の使用も本発明の一態様である。

10

【 0 0 7 5 】

好ましい実施形態では、本発明の免疫原性剤は、S . ウベリスによって引き起こされる乳腺炎及び／又は感染症の予防及び／又は治療のための、好ましくはS . ウベリスによって引き起こされる乳腺炎及び／又は感染症の予防のためのワクチンの調製に使用される。

【 0 0 7 6 】

別の好ましい実施形態において、本発明の免疫原性剤は、臨床的乳腺炎の予防及び／又は治療のためのワクチンの調製に使用される。

【 0 0 7 7 】

別の好ましい実施形態において、本発明の免疫原性剤は、亜臨床的乳腺炎の予防及び／又は治療のためのワクチンの調製に使用される。

20

【 0 0 7 8 】

従って、本発明の一態様は、ストレプトコッカス種によって引き起こされる乳腺炎及び／又は感染症の予防及び／又は治療に使用するため、好ましくは、ストレプトコッカス種によって引き起こされる乳腺炎及び／又は感染症の予防のため、好ましくは、S . ウベリスによって引き起こされる乳腺炎及び／又は感染症の予防及び／又は治療に使用するため、好ましくは、S . ウベリスによって引き起こされる乳腺炎及び／又は感染症の予防のため、好ましくは、臨床的乳腺炎及び／又は亜臨床的乳腺炎の予防及び／又は治療に使用するための本発明の免疫原性剤である。

【 0 0 7 9 】

臨床的乳腺炎の場合、ワクチン接種動物と比較した場合の非ワクチン接種動物において、以下の兆候、とりわけ乳腺の炎症又は直腸温度の上昇、乳中の目に見える異常の出現、例えば、痛み及び乳腺の炎症を伴う可能性のあるタンパク質凝集物又は凝固物、更には主としてタンパク質凝集物からなる分泌物産生を確認することができる。乳腺炎の亜臨床的徵候に関しては、とりわけ、乳又は乳房に目に見える変化を生じさせない乳腺の炎症、乳產生の低下及び乳品質の低下が示され得る。

30

【 0 0 8 0 】

タイコ酸によるバイオフィルム形成の阻害

【 0 0 8 1 】

本発明の免疫原性剤は、複合組成の生成物である。この組成物は、バイオフィルムを得るためにバイオフィルム産生 S . ウベリス菌株のインキュベーション及び S . ウベリス菌株によって産生されたバイオフィルムの熱処理を含む、その調製に使用される方法によって決定される。本発明の免疫原性剤は、莢膜多糖類を含み、また、成分の中にリポタイコ酸等のタイコ酸が同定されている。抗 L T A 抗体の存在の実質的な増加が、血漿中及び本発明の免疫原性剤に基づくワクチンを受けた乳牛の乳中に検出されることも観察される。

40

【 0 0 8 2 】

Brownら、「グラム陽性細菌の壁タイコ酸 (Wall Teichoic Acids of Gram-Positive Bacteria) 」、Annu. Review Microbiol., 2013, 67, 313 - 336 に開示されているように、タイコ酸は、糖脂質を介して細菌膜に固定されるリポタイコ酸 (L T A) 及びペプチドグリカンに共有結合する壁タイコ酸 (W T A) の両方を含む。

50

【0083】

リポタイコ酸（LTA）はグラム陽性細菌の細胞壁の構成成分であり、その構造は種の関数として変化し、一般に、細胞膜に結合する繰り返し単位として長いグリセロールリン酸鎖を含み、例えばCzabanskaによる論文、「ウシ乳腺炎ストレプトコッカス・ウベリス233、ストレプトコッカス・ディスガラクティエ20333、及びストレプトコッカス・アガラクティエ0250から単離したリポタイコ酸の構造解析（Structural analysis of the lipoteichoic acids isolated from bovine mastitis Streptococcus uberis 233, Streptococcus dysgalactiae 20333 and Streptococcus agalactiae 0250）」Carbohydrate Res., 2012, 361, 200-205に記載されているように、糖及びアミノ酸、特にD-アラニンで更に置換することができる。

【0084】

実施例に示すように、S.ウベリスによるインビトロでのバイオフィルムの形成は、モノクローナル抗体抗LTAの存在下及び本発明の免疫原性剤でワクチン接種した動物由來の血清の存在下で有意に阻害されることが観察される。

【0085】

従って、モノクローナル抗体抗LTAの存在による、及び本発明の免疫原性剤でワクチン接種した動物由來の血清の存在下におけるバイオフィルム形成の阻害は、上皮細胞への微生物付着の阻害をもたらし、結果としてS.ウベリスによるコロニー形成／感染の可能性を減少させる。

【0086】

従って、本発明の別の態様は、ストレプトコッカス種によって引き起こされる乳腺炎及び／又は感染症の予防及び／又は治療に使用するため、好ましくは、ストレプトコッカス種によって引き起こされる乳腺炎及び／又は感染症の予防に使用するためのタイコ酸、好ましくはリポタイコ酸を含む医薬組成物に関する。本発明の一実施形態では、医薬組成物は、薬学的に許容されるビヒクル及び／又は薬学的に許容されるアジュバントも含む。適切なビヒクル及びアジュバントは、ワクチンに対応する次のセクションに開示されている。

【0087】

好ましい実施形態では、本発明は、S.ウベリスによって引き起こされる乳腺炎及び／又は感染症の予防及び／又は治療に使用するため、好ましくはS.ウベリスによって引き起こされる乳腺炎及び／又は感染症の予防に使用するためのタイコ酸、好ましくはリポタイコ酸を含む医薬組成物に関する。

【0088】

本発明の別の態様は、バイオフィルム産生細菌によって引き起こされる乳腺炎及び／又は感染症の予防及び／又は治療に使用するためのタイコ酸、好ましくはリポタイコ酸を含む医薬組成物に関する。

【0089】

既に言及したように、バイオフィルム産生細菌を同定するための当業者に周知の方法がある。バイオフィルム産生細菌の例には、とりわけ、ストレプトコッカス・ウベリス、緑膿菌、表皮ブドウ球菌、大腸菌、黄色ブドウ球菌、エンテロバクター・クロアカエ（Enterobacter cloacae）、アクチノミセス・イスラエリ（Actinomycetes israelii）、ヘモフィルス・インフルエンザ（Haemophilus influenzae）、肺炎桿菌、及びブルホルデリア・セパシア（Burkholderia cepacia）等がある。

【0090】

好ましい実施形態において、本発明は、臨床的乳腺炎の予防及び／又は治療に使用するためのタイコ酸、好ましくはリポタイコ酸を含む医薬組成物に関する。

10

20

30

40

50

【0091】

別の好ましい実施形態では、本発明は、亜臨床的乳腺炎の予防及び／又は治療に使用するためのタイコ酸、好ましくはリポタイコ酸を含む医薬組成物に関する。

【0092】

好ましい実施形態では、医薬組成物は、ストプレトコッカスウベリス由来のリポタイコ酸を含む。より好ましい実施形態では、リポタイコ酸は、バイオフィルム産生S.ウベリス菌株の培養物から熱処理されたバイオフィルムを含む免疫原性剤に由来する。

【0093】

ワクチン

【0094】

本発明の一態様は、本発明の免疫原性剤の免疫学的に有効な量を含むワクチンに関する。

【0095】

このワクチンは、S.ウベリスによって引き起こされる感染症に対する、及び／又はS.ウベリスによる感染に由来する病状、特に乳腺炎に対する免疫防御応答を提供するのに適している。

【0096】

実施例で提供する実験結果に示されるように、このワクチンはまた、バイオフィルム産生細菌のバイオフィルム形成を阻害するのに適している。

【0097】

「免疫学的に有効」という表現は、ワクチン接種手順において投与される免疫原性剤の量が、単回投与又は様々な投与に関わらず、ストレプトコッカス種、好ましくはS.ウベリスの病原性形態の感染に対してワクチン接種動物に有効な免疫防御応答を誘導するのに十分であることを意味する。

【0098】

防御応答は、例えば、病原性細菌の不在又は排除によって、あるいは非ワクチン接種動物に対してワクチン接種動物における病原性細菌の数が減少することによって、あるいは感染の臨床徴候の不在、即ち、臨床的又は亜臨床的乳腺炎の兆候が現れていないことによって、あるいはワクチン接種動物においてこれらの徴候が弱化又は減少していることによって評価することができる。臨床的乳腺炎の場合、乳腺の炎症又は直腸温度の上昇、乳中の目に見える異常の出現、例えば、痛み及び乳腺の炎症を伴う可能性のあるタンパク質凝集物又は凝固物、更には主としてタンパク質凝集物からなる分泌物産生の兆候をとりわけ確認することができる。乳腺炎の亜臨床的徴候に関しては、とりわけ、乳又は乳房に目に見える変化を生じさせない乳腺の炎症、乳産生の低下及び乳品質の低下が示され得る。

【0099】

一般に、ワクチンは、1用量当たり1～50mgの乾燥抽出物、好ましくは1用量当たり2～25mg、より好ましくは1用量あたり4～12mgを含む量の本発明の免疫原性剤を含む。

【0100】

本発明の抗原の免疫学的に有効な量は、ワクチン接種動物の種、年齢、及び体重の関数として、またその健康状態及び身体状態並びに投与方法の関数として変わることがある。通常、免疫学的に有効な量は特定の範囲内で変動し、当業者が日常的な試験によって量を決定することに何ら困難はない。

【0101】

本発明の一実施形態では、ワクチンはまた、薬学的に許容されるビヒクル及び／又は薬学的に許容されるアジュバントを含む。

【0102】

特にワクチンが水性相及び油性相を含みエマルジョンの形態である場合に、担体自体がアジュバントとして作用することもできる。

【0103】

10

20

30

40

50

ワクチンは、一般に液体の形態で、溶液、エマルジョン、又は懸濁液として投与され、好ましくはエマルジョンの形態である。また、ワクチンは、投与前に液体ビヒクル中に溶解、懸濁、又は乳化される固体形態であってもよい。

【0104】

液体形態のワクチンを調製するのに適したビヒクルには、水、又は等張性生理食塩溶液、即ち、生理学的細胞媒質の塩濃度に等しい塩濃度を有する溶液、又は脂、又は細菌が培養される培養液、あるいはこれらの混合物が含まれる。

【0105】

更に、所望に応じて、ビヒクルは他の補助物質又は薬学的に許容される賦形剤を含むことができ、例えば、湿潤剤、分散剤、乳化剤、緩衝剤（例えばリン酸緩衝剤）、安定剤、10 例えば炭水化物（例えばグルコース、スクロース、マンニトール、ソルビトール、デンプン、若しくはデキストラン）、又はタンパク質（例えば、アルブミン、カゼイン、ウシ血清、若しくは脱脂乳）が挙げられる。

【0106】

賦形剤の物理化学的特性及びそれらが市販されている市販製品の名称は、R . C . R o w e ら、「医薬品添加物ハンドブック (Hand book of Pharmaceutical Excipients)」、第4版、Pharmaceutical Press、London、2003 [ISBN : 0 - 85369 - 472 - 9] の本に見出すことができる。

【0107】

アジュバントは、当該技術分野において周知であるように、免疫系の非特異的な覚醒剤であり、抗原と共に投与され、免疫応答をより有効にする。アジュバントの例には、水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウム、酸化アルミニウム、ムラミルジペプチド、ビタミンE、スクワラン、スクワレン、チョウセンニンジン、ザイモサン、グルカン、ジメチルアミノエチル - デキストラン、デキストラン、非イオン性プロックポリマー、モノホスホリルリピドA、植物油、サポニン、フロイント完全アジュバント、W / O、O / W、W / O / W型エマルジョン、及びこれらの混合物が挙げられる。

【0108】

エマルジョンは、分散相を作る液体の分散物として、第1の相が混和しない連続相である第2の液体中に定義され、特に相は水及び油である。エマルジョンは、乳化剤として使用される界面活性剤のタイプの関数として、また2つの相の間の関係の関数として、W / O、O / W、W / O / W型のものであり得る。

【0109】

本発明の一実施形態では、ワクチンは、水性相、油性相、及び乳化剤として作用する界面活性剤を含むようなエマルジョンの形態である。本発明の免疫原性剤は、典型的には、水性相に溶解される。

【0110】

特に好ましい実施形態では、ワクチンは、鉛油と、脂肪酸及び糖アルコールから得られた製品（例えば、S E P P I C 社によって商品名Montanide（登録商標）で市販されているもの）との組み合わせに基づくアジュバントを含む。このアジュバントを用いてW / O / W型のエマルジョンを調製することができる。

【0111】

また、ワクチンは、好ましくは、水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウム、酸化アルミニウム、ムラミルジペプチド、ビタミンE、スクワラン、スクワレン、チョウセンニンジン、ザイモサン、グルカン、ジメチルアミノエチル - デキストラン、デキストラン、非イオン性プロックポリマー、モノホスホリルリピドA、サポニン、及びこれらの混合物から選択される追加のアジュバントを含む。

【0112】

本発明のより好ましい態様において、ワクチンはモノホスホリルリピドAを含む。

【0113】

10

20

30

40

50

モノホスホリルリピドa (MPLA又はMPL) は、細菌リポ多糖、通常はサルモネラミネソタのリポ多糖から得られるワクチンを調製するための既知のアジュバントであり、例えば、シグマ (SIGMA) 社から「リピドA、Salmonella minnesota Re 595 (Re変異体) 由来のモノホスホリル」(製品L6895) で市販されているものなどがある。本発明の文脈において、モノホスホリルリピドAはまた、アジュバントとしても適しているその誘導体及びその合成類似体を含む。アジュバントとして使用されるモノホスホリルリピドAの誘導体の中で、誘導体3-脱アシル化 (3D-MPL又は3D-MPLA) が顕著であり、例えば、シグマ (SIGMA) 社からMPL (登録商標) の名称で市販されているものがある。モノホスホリルリピドAの合成類似体も使用することができ、例えば国際特許出願第2008/153541-A1に記載されているもの、又はAvanti Polar Lipids社 (製品PHAD (登録商標)) 若しくはAdipoGen社 (製品AG-CU1-0002) によって市販されているものが使用できる。10

【0114】

ワクチンは、経口、局所、経皮、経粘膜、皮内、皮下、筋肉内、腹腔内、静脈内、又は乳房内の経路によって投与することができ、好ましくは、皮内、皮下、筋肉内、腹腔内、静脈内又は乳房内、より好ましくは、筋肉内経路によって投与される。

【0115】

このワクチンは、例えばレミントンのマニュアル「薬学の科学と実践 (The Science and Practice of Pharmacy)」第20版、Lippincott Williams & Wilkins、Philadelphia、2000 [ISBN: 0-683-30647-2] に記載されているように、様々な投与形態に適した医薬製剤の調製のために当業者が使用する通常の方法に従って調製することができる。20

【0116】

本発明のような注射用ワクチンの用量の通常量は、0.5mL～5mL、好ましくは1mL～3mL、より好ましくは1mL～2mLである。

【0117】

実施例の有効性試験に記載されているように、本発明によるワクチンは、S.ウベリス病原性株による感染から妊娠泌乳牛を防御するのに有効であり、このことは、感染の14日後及び19日後の乳中のバクテリア数の明らかな減少により、また乳腺炎の臨床的徴候の改善により確認されている。ワクチンはウサギの実験モデルにおいても有効であり、非ワクチン接種動物に対して、感染後24時間又は48時間に臨床的徴候の減少、及び乳房組織内のS.ウベリス数の顕著な減少が観察されている。30

【0118】

乳房組織におけるS.ウベリス数の減少は、ホルムアルデヒド処理によって不活化したS.ウベリス菌株から得られた古典的なバクテリンでワクチン接種した動物と比較して、本発明のワクチンでワクチン接種した動物では感染後24時間でも観察された。

【0119】

従って、本発明の別の態様は、ストレプトコッカス種によって引き起こされる乳腺炎及び/又は感染症の予防及び/又は治療に使用するため、好ましくはストレプトコッカス種によって引き起こされる乳腺炎及び/又は感染症の予防に使用するための、本発明の免疫原性剤を含むワクチンに関する。40

【0120】

好ましい実施形態では、本発明は、S.ウベリスによって引き起こされる乳腺炎及び/又は感染症の予防及び/又は治療に使用するため、好ましくはS.ウベリスによって引き起こされる乳腺炎及び/又は感染症の予防に使用するためのワクチンに関する。

【0121】

別の好ましい実施形態では、本発明は、バイオフィルム産生細菌によって引き起こされる乳腺炎及び/又は感染症の予防及び/又は治療に使用するためのワクチンに関する。50

【0122】

別の好ましい実施形態において、本発明は、臨床的乳腺炎の予防及び／又は治療に使用するためのワクチンに関する。

【0123】

別の好ましい実施形態では、本発明は、亜臨床的乳腺炎の予防及び／又は治療に使用するためのワクチンに関する。

【0124】

本発明の枠組みにおいて、予防という用語は予防的又は予防的目的、即ち、 streptococcus 種、特に *S. 費リス* によって引き起こされる乳腺炎及び／又は感染症の出現を予防又は遅延させることを目的としたワクチンの投与に関する。「治療」という用語は、治療目的、即ち、 streptococcus 種、特に *S. 費リス* による乳腺炎及び／又は感染の症状を排除、軽減、改善、あるいは既にそれらを呈している場合には緩和することを目的としたワクチンの投与に関連する。

10

【0125】

本発明の枠組みにおいて、 streptococcus 種、特に *S. 費リス* によって引き起こされる乳腺炎及び／又は感染症は、これまでに示したように、 streptococcus 種、特に *S. 費リス* によって引き起こされる感染症に対して感受性の任意の動物、典型的には哺乳類、好ましくは反芻動物、より好ましくは乳牛（又はウシ）、ヒツジ（又は *o v i n e*）、ブタ（又は *p o r c i n e*）、あるいはヤギ（又は *c a p r i n e*）に対するその一般的な影響に関する。

20

【0126】

好ましい実施形態では、本発明の免疫原性剤を含むワクチンは、家畜のウシの乳腺炎（又はウシ乳腺炎）、より好ましくは *S. 費リス* によって引き起こされる乳腺炎の予防及び／又は治療に使用され、さらにより好ましくは、乳牛におけるウシ乳腺炎の予防及び／又は治療のために使用される。

【0127】

動物は任意の適切な時期にワクチン接種を受けることができる。従って、ワクチンは、 streptococcus 種、特に *S. 費リス* に感染する危険性がある動物に予防的に投与することができる。

【0128】

30

特に好ましい実施形態では、本発明の免疫原性剤を含むワクチンは、乳腺炎の予防のために予防的に使用される。

【0129】

ワクチンは、1回以上投与することができる。当技術分野で周知であるように、複数回用量ワクチン接種は、第1の免疫化用量に続いて、ブースター量として作用する1回以上の追加用量を投与することから構成される。ワクチン接種に最も適した投与回数及びこれらの時間間隔は、日常的な試験に従って決定することができる。

【0130】

本発明の一実施形態では、ワクチンは単回投与である。

【0131】

40

本発明の別の実施形態では、ワクチンは2回以上、好ましくは2回又は3回、より好ましくは3回投与される。異なる用量が、好ましくは10～70日、より好ましくは20～60日を含む投与の時間間隔で投与される。

【0132】

ワクチンは、本発明の方法によって得られる免疫原性剤と1種以上の更なる免疫原性剤との組み合わせを更に含むことができる。

【0133】

本発明の免疫原性剤と組み合わせることができる免疫原性剤は、 streptococcus ・アガラクティエ、 streptococcus ・ディスガラクティエ、大腸菌、クレブシエラ種、マイコプラズマ・ボビス、及び黄色ブドウ球菌、とりわけ、好ましくは streptococcus

50

ス・アガラクティエ、黄色ブドウ球菌及び／又は大腸菌を含む。

【0134】

本発明の別の態様は、ストレプトコッカス種によって引き起こされる乳腺炎及び／又は感染症の予防及び／又は治療にワクチンとして使用するため、好ましくはストレプトコッカス種によって引き起こされる乳腺炎及び／又は感染症の予防にワクチンとして使用するためのタイコ酸、好ましくはリポタイコ酸を含む医薬組成物に関する。

【0135】

好ましい実施形態では、本発明は、S.ウベリスによって引き起こされる乳腺炎及び／又は感染症の予防及び／又は治療にワクチンとして使用するため、好ましくは、S.ウベリスによって引き起こされる乳腺炎及び／又は感染症の予防にワクチンとして使用するためのタイコ酸、好ましくはリポタイコ酸を含む医薬組成物に関する。 10

【0136】

本発明の別の態様は、バイオフィルム産生細菌によって引き起こされる乳腺炎及び／又は感染症の予防及び／又は治療にワクチンとして使用するためのタイコ酸、好ましくはリポタイコ酸を含む医薬組成物に関する。

【0137】

好ましい実施形態において、本発明は、臨床的乳腺炎の予防及び／又は治療にワクチンとして使用するためのタイコ酸、好ましくはリポタイコ酸を含む医薬組成物に関する。

【0138】

別の好ましい実施形態において、本発明は、亜臨床的乳腺炎の予防及び／又は治療にワクチンとして使用するためのタイコ酸、好ましくはリポタイコ酸を含む医薬組成物に関する。 20

【0139】

ワクチン接種キット

【0140】

本発明の別の態様は、S.ウベリスによる感染に対して動物にワクチン接種するための、特に乳腺炎に対して動物にワクチン接種するためのワクチン接種キットに関する。

【0141】

このワクチン接種キットは、免疫学的に有効な量の本発明の免疫原性剤又は本発明のワクチンを含む容器を含む。 30

【0142】

好ましい実施形態では、免疫原性剤又はワクチンは、すぐに使用できる単一の容器内にある。

【0143】

好ましい実施形態では、免疫原性剤は凍結乾燥形態である。

【0144】

別の好ましい実施形態では、キットはまた、薬学的に許容されるビヒクリ又は希釈剤を含有する第2の容器を含む。この実施形態は、免疫原性剤を凍結乾燥形態で使用する場合に特に適切である。

【0145】

別の好ましい実施形態では、キットはまた、本発明の免疫原性剤又はワクチンの投与のための情報を含む有益なマニュアル又はリーフレットを含む。 40

【0146】

したがって、本発明の一態様は、ストレプトコッカス種又はバイオフィルム産生バクテリアによって引き起こされる乳腺炎及び／又は感染症の予防及び／又は治療に使用するため、好ましくはストレプトコッカス種又はバイオフィルム産生バクテリアによって引き起こされる乳腺炎及び／又は感染症の予防のため、好ましくはS.ウベリスによって引き起こされる乳腺炎及び／又は感染症の予防及び／又は治療に使用するため、好ましくはS.ウベリスによって引き起こされる乳腺炎及び／又は感染症の予防のため、好ましくは臨床的乳腺炎及び／又は亜臨床的乳腺炎の予防及び／又は治療に使用するためのワクチンキット 50

トであり、好ましくは、本発明の免疫原性剤又はワクチンの投与のための情報を含む有益なマニュアル又はリーフレットを伴う。

【0147】

本発明は、以下の実施形態を含む。

【0148】

1. a) バイオフィルムを得るためにバイオフィルム産生 S. ウベリス株をインキュベートする工程と、b) 工程 a) で得られたバイオフィルムに熱的加熱処理を施す工程と、を含むことを特徴とする免疫原性剤の調製方法。

【0149】

2. インキュベーションが 1 % ~ 10 % の二酸化炭素を含む雰囲気中で行われることを特徴とする、実施形態 1 に記載の方法。 10

【0150】

3. 工程 a) において、培地が、0.1 ~ 2 % w / v の酵母抽出物を補充した TSB であることを特徴とする、実施形態 1 又は 2 に記載の方法。

【0151】

4. 工程 a) において、培養が 30 ~ 45 時間の温度で行われることを特徴とする、実施形態 1 ~ 3 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0152】

5. 工程 a) において、培養が 24 時間 ~ 168 時間の期間に行われることを特徴とする、実施形態 1 ~ 4 のいずれか 1 つに記載の方法。 20

【0153】

6. 工程 b) において、熱処理が 80 ~ 130 の温度で行われることを特徴とする、実施形態 1 ~ 5 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0154】

7. 工程 b) において、熱処理が 5 ~ 75 分の期間に行われることを特徴とする、実施形態 1 ~ 6 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0155】

8. 工程 a) の後、且つ工程 b) の前に、培地からバイオフィルムを回収する追加の工程を含むことを特徴とする、実施形態 1 ~ 7 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0156】

9. 工程 a) で形成されたバイオフィルムを回収するためにトリプシンを使用することを特徴とする、実施形態 8 に記載の方法。 30

【0157】

10. 回収したバイオフィルムを水溶液中に懸濁させることを特徴とする、実施形態 8 又は 9 に記載の方法。

【0158】

11. 工程 b) の熱処理後に得られた不溶性画分を廃棄し、可溶性抽出物を保存する工程を含むことを特徴とする、実施形態 1 ~ 10 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0159】

12. 実施形態 1 ~ 11 のいずれか 1 つの方法によって得ることができる免疫原性剤。 40

【0160】

13. バイオフィルム産生 S. ウベリス菌株の培養物由来の熱的加熱処理されたバイオフィルムを含む免疫原性剤。

【0161】

14. 水性懸濁液、水溶液又は凍結乾燥の形態であることを特徴とする、実施形態 12 又は 13 に記載の免疫原性剤。

【0162】

15. ストレプトコッカス種によって引き起こされる乳腺炎及び / 又は感染症の予防及び / 又は治療に使用するための、実施形態 12 ~ 14 のいずれか 1 つに記載の免疫原性剤。

【0163】

16. ストレプトコッカス種によって引き起こされる乳腺炎及び／又は感染症の予防に使用するための、実施形態15に記載の免疫原性剤。

【0164】

17. ストレプトコッカス種がS.ウベリスであることを特徴とする、実施形態15又は16に記載の免疫原性剤。

【0165】

18. 臨床的乳腺炎の予防及び／又は治療に使用するための、実施形態15又は17に記載の免疫原性剤。

【0166】

19. 亜臨床的乳腺炎の予防及び／又は治療に使用するための、実施形態15又は17に記載の免疫原性剤。 10

【0167】

20. 免疫学的に有効な量の実施形態12～14のいずれかに記載の免疫原性剤を含むワクチン。

【0168】

21. 薬学的に許容されるビヒクル及び／又は薬学的に許容されるアジュバントも含むことを特徴とする、実施形態20に記載のワクチン。

【0169】

22. エマルジョン、懸濁液、又は溶液の形態であることを特徴とする、実施形態20又は21に記載のワクチン。 20

【0170】

23. 水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウム、酸化アルミニウム、ムラミルジペプチド、ビタミンE、スクワラン、スクワレン、チョウセンニンジン、ザイモサン、グルカン、ジメチルアミノエチル-デキストラン、デキストラン、非イオン性ブロックポリマー、モノホスホリルリピドA、サポニン、及びこれらの混合物から選択されるアジュバントを含むことを特徴とする実施形態21に記載のワクチン。

【0171】

24. モノホスホリルリピドAを含むことを特徴とする、実施形態23に記載のワクチン。 。

【0172】

25. 追加の免疫原性剤を含むことを特徴とする、実施形態20～24のいずれか1つに記載のワクチン。 30

【0173】

26. ストレプトコッカス・アガラクティエ、黄色ブドウ球菌、クレブシエラ種、マイコプラズマ・ボビス、及び大腸菌で構成される群から選択される追加の免疫原性剤を含むことを特徴とする、実施形態25に記載のワクチン。

【0174】

27. 皮内、皮下、筋肉内、腹腔内、静脈内、又は乳房的経路によって投与されることを特徴とする、実施形態20～26のいずれか1つに記載のワクチン。

【0175】

28. 筋肉内経路によって投与されることを特徴とする、実施形態27に記載のワクチン。 40

【0176】

29. 1回又は複数回で投与されることを特徴とする、実施形態20～28のいずれかに記載のワクチン。

【0177】

30. 2回又は3回で投与されることを特徴とする、実施形態29に記載のワクチン。

【0178】

31. ストレプトコッカス種によって引き起こされる乳腺炎及び／又は感染症の予防及び／又は治療に使用するため、好ましくはストレプトコッカス種によって引き起こされる乳 50

腺炎及び／又は感染症の予防に使用するための、実施形態 20～30 のいずれか 1 つに記載のワクチン。

【0179】

32. S. ウベリスによって引き起こされる乳腺炎及び／又は感染症の予防及び／又は治療、好ましくは S. ウベリスによって引き起こされる乳腺炎及び／又は感染症の予防に使用するための、実施形態 31 に記載のワクチン。

【0180】

33. バイオフィルム産生細菌によって引き起こされる乳腺炎及び／又は感染症の予防及び／又は治療に使用するための、実施形態 20～30 のいずれか 1 つに記載のワクチン。

【0181】

34. 臨床的乳腺炎の予防及び／又は治療に使用するための、実施形態 31～33 のいずれか 1 つに記載のワクチン。

【0182】

35. 亜臨床的乳腺炎の予防及び／又は治療に使用するための、実施形態 31～33 のいずれか 1 つに記載のワクチン。

【0183】

36. 免疫学的に有効な量の実施形態 12～14 のいずれかに記載の免疫原性剤又は実施形態 20～26 のいずれかに記載のワクチンを含む容器を含むことを特徴とする、ワクチン接種キット。

【0184】

37. 免疫原性剤又はワクチンがすぐに使用できる単一の容器内にあることを特徴とする、実施形態 36 に記載のキット。

【0185】

38. 免疫原性剤が凍結乾燥形態であることを特徴とする、実施形態 36 に記載のキット。

【0186】

39. 薬学的に許容されるビヒクル又は希釈剤を含有する第 2 の容器も含むことを特徴とする、実施形態 38 に記載のキット。

【0187】

40. 実施形態 12～14 のいずれかに記載の免疫原性剤又は実施形態 20～26 のいずれかに記載のワクチンの投与のための情報を含む有益なマニュアル又はリーフレットも含むことを特徴とする、実施形態 36～39 のいずれか 1 つに記載のキット。

【0188】

41. ストレプトコッカス種、好ましくは S. ウベリスによって引き起こされる乳腺炎及び／又は感染症の予防及び／又は治療に使用するためのタイコ酸を含む医薬組成物。

【0189】

42. ストレプトコッカス種、好ましくは S. ウベリスによって引き起こされる乳腺炎及び／又は感染症の予防に使用するための、実施形態 41 に記載の医薬組成物。

【0190】

43. バイオフィルム産生細菌によって引き起こされる乳腺炎及び／又は感染症の予防及び／又は治療に使用するためのタイコ酸を含む医薬組成物。

【0191】

44. 臨床的乳腺炎の予防及び／又は治療に使用するための、実施形態 41～43 のいずれか 1 つに記載の医薬組成物。

【0192】

45. 亜臨床的乳腺炎の予防及び／又は治療に使用するための、実施形態 41～43 のいずれか 1 つに記載の医薬組成物。

【0193】

46. タイコ酸がリポタイコ酸であることを特徴とする、実施形態 41～45 のいずれか 1 つに記載の医薬組成物。

10

20

30

40

50

【0194】

47. リポタイコ酸がS.ウベリス由来であることを特徴とする、実施形態46に記載の医薬組成物。

【0195】

48. リポタイコ酸が、バイオフィルム産生S.ウベリス菌株の培養物由来の熱的加熱処理されたバイオフィルムを含む免疫原性剤に由来することを特徴とする、実施形態47に記載の医薬組成物。

【0196】

49. ストレプトコッカス種、好ましくはS.ウベリスによって引き起こされる乳腺炎及び／又は感染症の予防及び／又は治療にワクチンとして使用するためのタイコ酸を含む、医薬組成物。 10

【0197】

50. ストレプトコッカス種、好ましくはS.ウベリスによって引き起こされる乳腺炎及び／又は感染症の予防にワクチンとしての使用するための、実施形態49に記載の医薬組成物。

【0198】

51. バイオフィルム産生細菌によって引き起こされる乳腺炎及び／又は感染症の予防及び／又は治療にワクチンとして使用するためのタイコ酸を含む医薬組成物。

【0199】

52. 臨床的乳腺炎の予防及び／又は治療にワクチンとして使用するための、実施形態49～51のいずれか1つに記載の医薬組成物。 20

【0200】

53. 亜臨床的乳腺炎の予防及び／又は治療にワクチンとして使用するための、実施形態49～51のいずれか1つに記載の医薬組成物。

【0201】

54. タイコ酸がリポタイコ酸であることを特徴とする、実施形態49～53のいずれか1つに記載の医薬組成物。

【0202】

55. リポタイコ酸がストレプトコッカス・ウベリス由来であることを特徴とする、実施形態54に記載の医薬組成物。 30

【0203】

56. リポタイコ酸が、バイオフィルム産生ストレプトコッカス種、好ましくはS.ウベリス菌株の培養物由来の熱的加熱処理されたバイオフィルムを含む免疫原性剤に由来することを特徴とする、実施形態55に記載の医薬組成物。

【実施例】

【0204】

実施例1 免疫原性剤の調製

【0205】

この方法ではS.ウベリスの菌株5616を使用して本発明の免疫原性剤を調製し、この菌株はスペインで臨床的ウシ乳腺炎の症例から得られたフィールド分離物である。この菌株は、G. E. Moore、「乳房内感染症に関連するS.ウベリスによるバイオフィルム産生(Biofilm production by Streptococcus uberis associated with intramammary infections)」、2009年、テネシー大学栄誉研究プロジェクトに記載されたマイクロプレート試験で確認したところ、バイオフィルム産生株であった。 40

【0206】

接種物は、最初に凍結乾燥細菌を水中に滅菌注射用に懸濁して 10^9 細菌/m1の濃度が得られるまで培養し、続いてT S B + 0 . 5 % Y E 培地を1 / 1 0 0 の割合でこの懸濁液に感染させ、16時間37でインキュベートして調製した。

【0207】

次いで 225 cm^2 のFalcon(登録商標)型細胞培養瓶(DDBiolab)を、前もって調製した接種物とTSB+0.5%YE培地とで調製した1:100の割合の混合物 100 ml に感染させ、オープン内で37及び二酸化炭素含有量約5%の雰囲気下で4日間インキュベートした。

【0208】

培養の完了後、懸濁液中に細菌細胞を含む培養瓶から媒質を除去し、 40 ml のトリプシン水溶液(トリプシン溶液 $1\times$ 、Sigma-Aldrich)を添加し、温度37で15分間攪拌しながら維持した。

【0209】

瓶の内容物を空にし、得られた懸濁液を $15,300\text{ g}$ で15分間遠心分離し、上清を10廃棄した。

【0210】

沈降した残留物を 0.5 ml の注射用水に再懸濁し、次いでこの懸濁液を 121 で45分間加熱した。次いで $15,300\text{ g}$ で15分間遠心分離し、上清を保存し、沈降した残渣を廃棄した。

【0211】

上清溶液を凍結乾燥して乾燥した免疫学的薬剤を得た。

【0212】

実施例2 妊娠泌乳ウサギにおけるワクチンの有効性試験

【0213】

20匹の妊娠ウサギの群を、実施例1に記載の方法と類似の方法により得られた免疫原性剤の溶液を $4\text{ mg}/\text{ml}$ の濃度で含有するワクチン 1 ml にMontanide(登録商標)(SEPPIC)シリーズの油性アジュバントを水溶液とアジュバントの比率1:1で配合して、妊娠13日及び27日に皮下投与することにより免疫化した。20匹のウサギ対照群と差異を比較した。感染は、最後のウサギの出産の $15\sim20$ 日後に $10^3\text{ CFU}/\text{ml}$ の速度でS.ウベリス病原性株の懸濁液 $100\mu\text{l}$ を注射することにより、乳房内経路によって実施した。

【0214】

ワクチンの有効性を決定するために、非ワクチン接種感染対照群に対するワクチン接種感染群について、直腸温度、感染24時間後の組織の CFU/g 及び感染した乳腺の局所臨床徴候のパラメータを決定した。

【0215】

実験データを、SPSS14.0プログラムによって統計的に処理した。結果が正規分布に従う場合にはANOVA分析を行い、そうでなければ、2群の場合のマンホイットニーユ検定又はカイニ乗検定などのノンパラメトリック検定を用いた。

【0216】

- ・感染後24時間の平均温度の低下(図1)、
- ・感染後24時間の組織の CFU/g の減少(図2)、及び
- ・感染後の罹患腺の感受性の低下(図3)

が観察されたため、結果は、S.ウベリスによって引き起こされる感染症を予防するための本発明の免疫原性剤の有効性を明らかに示した。

【0217】

実施例3 妊娠泌乳牛におけるワクチンの有効性試験

【0218】

10頭の妊娠牛の群を、実施例1に記載の方法と類似の方法により得られた免疫原性剤の溶液を $4\text{ mg}/\text{ml}$ の濃度で含有するワクチン 2 ml にMontanide(登録商標)(SEPPIC)シリーズの油性アジュバントを水溶液とアジュバントの比率1:1で配合して、推定出産日の31日前及び10日前に筋肉内経路によって投与して免疫化した。10頭の乳牛によって形成された対照群と差異を比較した。感染は、推定出産日の16日後に $10^2\text{ CFU}/\text{ml}$ の割合でS.ウベリス病原性株の懸濁液 5 ml を注射すること50

により、乳房内経路によって行った。

【0219】

ワクチンの有効性を決定するために、非ワクチン接種感染対照群に対するワクチン接種感染群について、直腸温度、感染後の乳中の C F U / m l 及び S C / m l (S C = 体細胞) の数、並びに感染した乳房の局所臨床徴候のパラメータを決定した。

【0220】

免疫化された乳牛において誘導された血清学的応答も、実験ワクチンを用いて分析した。血清を E L I S A により分析して、S . ウベリスに対する抗体の存在を検出した。

【0221】

ワクチン接種の安全性を確認するために、免疫化後に乳牛で観察される可能性のある臨床的徴候を評価した。動物に対するワクチン接種の可能性のある否定的効果を除外するために、出生後の臨床徴候及び子牛の死亡率も評価した。 10

【0222】

実験データを、 S P S S 1 4 . 0 プログラムによって統計的に処理した。結果が正規分布に従う場合には A N O V A 分析を行い、そうでなければ、2群の場合のマンホイットニー U 検定又はカイニ乗検定などのノンパラメトリック検定を用いた。

【0223】

ワクチン接種中の直腸温度に関して、ワクチン接種の前日及び再ワクチン接種の前日も、温度を記録したその後の3日間も群間差は認められなかった。

【0224】

感染後に、対照群に対してワクチン接種群において、
 ・感染2日後の温度低下(図4)、
 ・乳中の C F U / m l の減少(図5)、
 ・対照群と比較した乳産生量の増加(図6)、及び
 ・研究終了時の乳中の体細胞数(S C / m l)の減少(図7)
 が観察されたことから、結果は、S . ウベリスによって引き起こされる感染症を予防するための本発明の免疫原性剤の有効性を明らかに示した。 20

【0225】

従って、本発明の免疫原性剤は、S . ウベリスによって引き起こされる乳腺炎の予防に有効であり、ストレプトコッカス種、好ましくはS . ウベリスによって引き起こされる乳腺炎及び/又は感染症の予防及び/又は治療に適していると結論することができる。 30

【0226】

実施例4 S . ウベリスの培養物中のモノクローナル抗体抗 L T A の存在によるインピトロでのバイオフィルム產生の阻害

【0227】

この試験では、S . ウベリス菌株を、 S t e p a n o v i c ら(前掲)に開示されている方法に実質的にしたがって、96ウェルマイクロプレート中で4種の濃度のモノクローナル抗体抗 L T A の存在下で培養した。

【0228】

この研究では、5616と称されるS . ウベリス菌株を使用した。この菌株を、37 及び 5 % C O ₂ に設定したインキュベーター中で、 T S B + 0 . 5 % Y E を使用して pH 7 . 5 で 20 時間及び 24 時間繁殖させ培養した。 40

【0229】

モノクローナル抗体抗 L T A は、0 . 0 2 % アジ化ナトリウムを含有する低エンドトキシンレベルを有する培地で > 2 0 0 μ g / m l の濃度を示すカタログ N r . H M 2 0 4 8 を H y c u l t B i o t e c h (オランダ) から購入した。

【0230】

この試験で使用したモノクローナル抗体希釈液は、1 : 1 0 、1 : 2 5 、1 : 5 0 、及び 1 : 1 0 0 であった。

【0231】

50

モノクローナル抗体が存在しない S. ウベリスの対照培養物も調製した。

【0232】

菌株は振盪せずにウェル中でインキュベートした。各リファレンスについて 8 ウェルを使用した。

【0233】

インキュベーション後に、550 nm での光学密度を記録して、微生物の増殖能力を確認した。グループ間に有意差は認められなかった。

【0234】

その後、ウェルをデカントし、PBS (pH 7.3) で洗浄し、37°C で約 1 時間乾燥させた。乾燥させた管をクリスタルバイオレット (0.1%) で染色した。過剰の染色液を除去し、ウェルを滅菌水で洗浄した。 10

【0235】

色素を 95% エタノールで可溶化し、595 nm での光学濃度を記録して、バイオフィルム産生の阻害を評価した。

【0236】

各群について得られた結果を表 I に示す。

【0237】

【表 1】

表 I

群	OD ₅₉₅
MAB1 : 10	0.503*
MAB1 : 25	0.975*
MAB1 : 50	1.216
MAB1 : 100	1.265
対照群 (GC)	1.138

20

30

【0238】

* は、ソフトウェア SPSS v22 (IBM Analytics) を用いた 1 因子 ANOVA 分析により、対照群と比較して、結果が p 値 < 0.05 で統計的に有意であったことを示す。

【0239】

図 8 は、異なる濃度 (1 : 10 希釈に対する 1 : 25 希釈) のモノクローナル抗体抗 LT A の存在下及びその非存在下 (対照群、GC) における S. ウベリスのインビトロ培養物に対応する 595 nm での光学密度を表す。 40

【0240】

結果は、1 : 10 及び 1 : 25 希釈の培養物におけるこれらのモノクローナル抗体抗 LT A の存在が、このようなモノクローナル抗体が存在しない培養物と比較して、インビトロ条件下でバイオフィルムの形成を有意に阻害することを示す。

【0241】

実施例 5 S. ウベリス培養物中の実施例 1 の免疫原性剤でワクチン接種した動物由来の血清の存在によるインビトロでのバイオフィルム産生の阻害

【0242】

この試験では、実施例 1 の免疫原性剤でワクチン接種した動物由来の血清の存在下で、S. ウベリス株を培養した。この研究では、5616 と称される S. ウベリス菌株を使用

40

50

した。この菌株を、37及び5%CO₂に設定したインキュベーター中で、T S B + 0.5%YEを使用してpH7.5で20時間及び24時間繁殖させ培養した。

【0243】

実施例3に開示した手順に従って免疫原性剤でワクチン接種した動物由来の血清を、ワクチン接種グループ(GV)として指定したリファレンスに1:2000の希釈で使用した。

【0244】

ワクチン接種動物由来の血清を含まないS.ウベリスの対照培養物(GC)も調製した。

【0245】

菌株は振盪せずにウェル中でインキュベートした。各リファレンスについて8ウェルを使用した。

10

【0246】

インキュベーション後に、550nmでの光学密度を記録して、微生物の増殖能力を確認した。2群の間に有意差は見られなかった。

【0247】

その後、ウェルをデカントし、PBS(pH7.3)で洗浄し、37で約1時間乾燥させた。乾燥させた管をクリスタルバイオレット(0.1%)で染色した。過剰の染色液を除去し、ウェルを滅菌水で洗浄した。

【0248】

20

色素を95%エタノールで可溶化し、595nmでの光学濃度を記録して、バイオフィルム産生の阻害を評価した。

【0249】

図9は、本発明の免疫原性剤でワクチン接種した動物の血清の存在下(ワクチン接種群、GV)及び非存在下(対照群、CG)における、S.ウベリスのインビトロ培養物に対応する595nmでの光学密度を表す。

【0250】

結果は、本発明の免疫原性剤でワクチン接種した動物の血清の存在が、このような血清を含まない培養物と比較して、インビトロ条件下でバイオフィルムの形成を有意に阻害することを示す(p値<0.05、t-ステュードント検定)。

30

【図1】

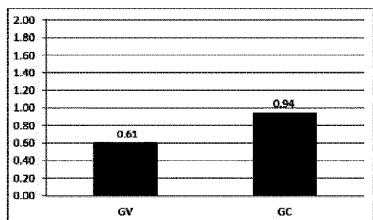


FIGURE 1

【図3】

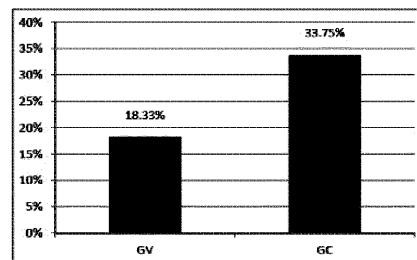


FIGURE 3

【図2】

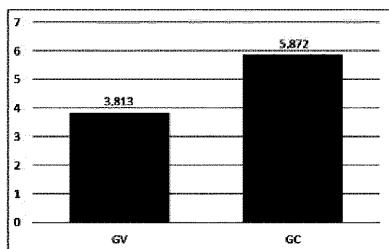


FIGURE 2

【図4】

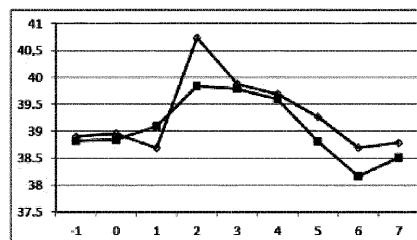


FIGURE 4

【図5】

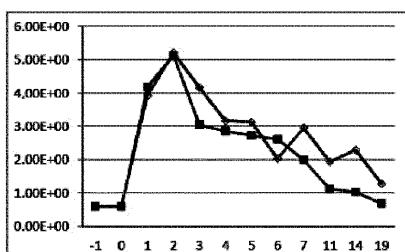


FIGURE 5

【図7】

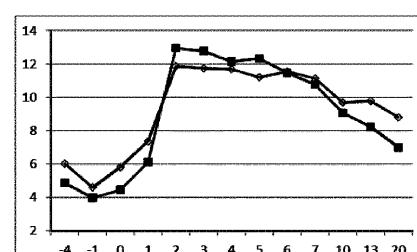


FIGURE 7

【図6】

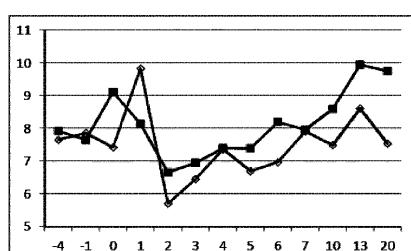


FIGURE 6

【図8】

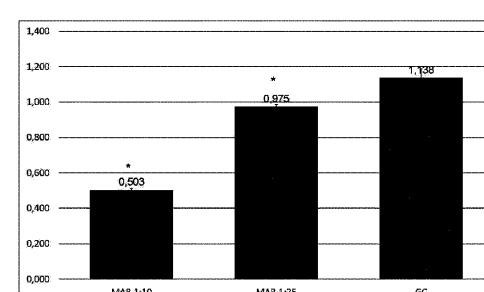


FIGURE 8

【図9】

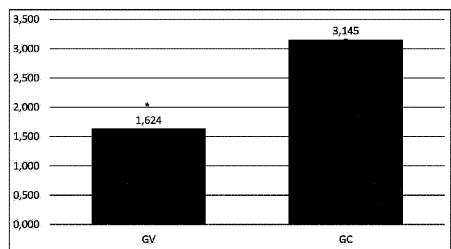


FIGURE 9

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
A 6 1 P	15/00	(2006.01) A 6 1 P 15/00
A 6 1 P	29/00	(2006.01) A 6 1 P 29/00
A 6 1 K	31/7028	(2006.01) A 6 1 K 31/7028
C 1 2 R	1/46	(2006.01) C 1 2 R 1:46

審査官 佐久 敏

- (56)参考文献 特開昭60-243024(JP,A)
特開平05-148157(JP,A)
特表2012-530785(JP,A)
特表2014-516950(JP,A)
国際公開第2012/116447(WO,A1)
特表2009-514788(JP,A)
特表2014-523873(JP,A)
米国特許出願公開第2011/0028407(US,A1)
Finch,J.M. et al , Local vaccination with killed Streptococcus uberis protects the bovine mammary gland against experimental intramammary challenge with the homologous strain , Infection and Immunity , 1994年 9月 , 62(9) , 3599-3603
Guenther J. et al , Streptococcus uberis strains isolated from the bovine mammary gland evade immune recognition by mammary epithelial cells, but not of macrophages , Veterinary Research , 2016年 1月 7日 , 47(13) , 1-14
Moor, G.E. , Biofilm Production by Streptococcus uberis Associated with Intramammary Infections , Trace: Tennessee Research and Creative Exchange , 2009年 , pp.1-14 , http://trace.tennessee.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=2299&context=utk_chanhonoproj

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 N
C 1 2 P
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
C A p l u s / / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)