

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6316448号
(P6316448)

(45) 発行日 平成30年4月25日(2018.4.25)

(24) 登録日 平成30年4月6日(2018.4.6)

(51) Int.Cl.	F I	
A 6 1 K 39/39 (2006.01)	A 6 1 K 39/39	
A 6 1 K 39/385 (2006.01)	A 6 1 K 39/385	
A 6 1 K 39/02 (2006.01)	A 6 1 K 39/02	Z N A
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 P 31/04	
A 6 1 P 1/04 (2006.01)	A 6 1 P 1/04	
請求項の数 20 (全 35 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2016-557173 (P2016-557173)	(73) 特許権者	516165815
(86) (22) 出願日	平成26年7月30日(2014.7.30)		シャンハイ・ユナイテッド・セル・バイオ
(65) 公表番号	特表2017-504655 (P2017-504655A)		テクノロジー・カンパニー・リミテッド
(43) 公表日	平成29年2月9日(2017.2.9)		中華人民共和国・201206・チャイナ
(86) 国際出願番号	PCT/CN2014/083291		・(シャンハイ)・パイロット・フリー・
(87) 国際公開番号	W02015/081711		トレード・ゾーン・グイチャオ・ロード・
(87) 国際公開日	平成27年6月11日(2015.6.11)		1150
審査請求日	平成28年6月22日(2016.6.22)	(74) 代理人	100108453
(31) 優先権主張番号	201310655338.6		弁理士 村山 靖彦
(32) 優先日	平成25年12月6日(2013.12.6)	(74) 代理人	100110364
(33) 優先権主張国	中国 (CN)		弁理士 実広 信哉
(31) 優先権主張番号	201410217707.8	(74) 代理人	100133400
(32) 優先日	平成26年5月20日(2014.5.20)		弁理士 阿部 達彦
(33) 優先権主張国	中国 (CN)		
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 抗原キメラ、抗原組合せ、ワクチン、それらを調製する方法、及びそれらのキット

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

抗原と、多量体を形成することが可能な粘膜免疫アジュバントタンパク質単量体との、融合タンパク質;及び

前記多量体を形成することが可能な前記粘膜免疫アジュバントタンパク質単量体を含む、抗原キメラであって、

前記多量体を形成することが可能な前記粘膜免疫アジュバントタンパク質単量体は、コレラ毒素Bサブユニット(CTB)及びE.coli熱不安定性エンテロトキシンBサブユニット(LTB)から選択される単量体であり、

前記多量体は、五量体であり、

前記キメラにおいて、前記融合タンパク質と、前記多量体を形成することが可能な前記粘膜免疫アジュバントタンパク質単量体とのモル比は、1:4であり、

前記抗原キメラが安定であるpHは、7.0よりも高く、

前記抗原が、Helicobacter pyloriウレアーゼBサブユニット(UreB)、Helicobacter pylori細胞毒関連遺伝子A(CagA)及び好中球活性化タンパク質(NAP)から選択される少なくとも1つである、

抗原キメラ。

【請求項 2】

前記抗原キメラの前記コレラ毒素Bサブユニット及びE.coli熱不安定性エンテロトキシンBサブユニットが、それらの天然の構造である、又は前記五量体を形成することが可能

な変異体である、請求項1に記載の抗原キメラ。

【請求項3】

前記融合タンパク質が、前記抗原と前記粘膜免疫アジュバントタンパク質単量体との間に配置された3個のG4Sリンカーを含む、請求項1に記載の抗原キメラ。

【請求項4】

前記抗原キメラが安定であるpHが8.0である、請求項1に記載の抗原キメラ。

【請求項5】

請求項1から4のいずれか一項に記載の抗原キメラを含む、抗原組成物。

【請求項6】

請求項5に記載の抗原組成物とワクチンに適切な賦形剤とを含む、ワクチン。

10

【請求項7】

経口ワクチン、経鼻投与のためのワクチン又は直腸投与のためのワクチンである、請求項6に記載のワクチン。

【請求項8】

請求項1から4のいずれか一項に規定の融合タンパク質を発現するベクター、及び請求項1から4のいずれか一項に規定の多量体を形成することが可能な粘膜免疫アジュバントタンパク質単量体を発現するベクターを含む、抗原組成物を調製するためのカセット。

【請求項9】

前記ベクターが、原核生物発現ベクターである、請求項8に記載のカセット。

【請求項10】

20

請求項1から4のいずれか一項に記載の抗原キメラを調製するための方法であって、前記方法は、前記融合タンパク質、及び前記多量体を形成することが可能な前記粘膜免疫アジュバントタンパク質単量体を、請求項8に記載のカセット中の前記ベクターを用いてそれぞれ発現させる工程、次いで、これら2つのタンパク質を結合させて、再生方法を介して前記キメラを形成する工程を含み、前記再生方法は、「尿素及びジチオスレイトール(DTT)」を含有する又は「尿素及びメルカプトエタノール」を含有する再折り畳み溶液中に前記2つのタンパク質を共に配置することによる、それらの再生を含み、前記再折り畳み溶液のpHが、7.0よりも高い、方法。

【請求項11】

前記再折り畳み溶液中の尿素の濃度が、1.0M～2.5Mである、請求項10に記載の方法。

30

【請求項12】

DTT又はメルカプトエタノールの濃度が、0.2mM～1.0mMである、請求項10又は11に記載の方法。

【請求項13】

前記再生の工程の前に、前記タンパク質単量体が、6M～9Mの尿素を含み、3.0～4.0のpHを有する緩衝液中で0.5～3時間にわたって予め再折り畳みされる、請求項10から12のいずれか一項に記載の方法。

【請求項14】

前記再折り畳み溶液のpHが8.0である、請求項10に記載の方法。

【請求項15】

40

前記タンパク質単量体が前記再生の工程の前に予め再折り畳みされる際の緩衝液が、8Mの尿素を含む、請求項13に記載の方法。

【請求項16】

前記タンパク質単量体が前記再生の工程の前に予め再折り畳みされる際の緩衝液が、3.0～4.0のpHを有し、前記タンパク質単量体が、1時間にわたって予め再折り畳みされる、請求項13に記載の方法。

【請求項17】

再生によってキメラを調製するための方法であって、前記キメラは、(1)タンパク質と、多量体を形成することが可能なタンパク質単量体との融合タンパク質、及び(2)前記多量体を形成することが可能な前記タンパク質単量体とを含み、前記キメラは、前記多量体

50

を形成するための、(1)前記融合タンパク質の前記タンパク質単量体と(2)前記タンパク質単量体との融合によって形成され、

(2)前記多量体を形成することが可能な前記タンパク質単量体が、6M～9Mの尿素を含み、3.0～4.0のpHを有する緩衝溶液中で0.5～3時間にわたって予め再折り畳みされること；並びに

(1)前記融合タンパク質及び(2)前記多量体を形成することが可能な前記タンパク質単量体が、前記キメラの形成のために、1.0M～2.5Mの尿素及び0.2mM～1.0mMのDTT又はメルカプトエタノールを含む再折り畳み溶液中で再折り畳みされ、前記再折り畳み溶液のpHは、7.0よりも高いこと、
を含み、

10

前記キメラは、請求項1から4のいずれか一項に記載の抗原キメラである、
方法。

【請求項18】

前記再折り畳み溶液のpHが8.0である、請求項17に記載の方法。

【請求項19】

(2)前記多量体を形成することが可能な前記タンパク質単量体が予め再折り畳みされる際の緩衝溶液が、8Mの尿素を含む、請求項17に記載の方法。

【請求項20】

(2)前記多量体を形成することが可能な前記タンパク質単量体が、緩衝溶液中で1時間にわたって予め再折り畳みされる、請求項17に記載の方法。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、免疫化の分野、特に、粘膜免疫抗原、ワクチン及び調製方法、並びにそれらのカセットに関する。

【背景技術】

【0002】

粘膜免疫系は、呼吸器、胃腸管及び尿生殖器管の粘膜下、並びに外分泌腺の一部におけるリンパ系組織内に広く分布し、局所的な特異的免疫機能を果たすための主要な場所である。

30

【0003】

身体関連感染の95%超が、粘膜において発生し、又は粘膜を介して身体に侵入することによって起こるので、粘膜は、身体に侵入するために、病原体にとって最も大きな扉である。現在、主要な感染性疾患、動物の生命及び健康にとって大きな危険がある疾患、並びに制御するのに大きな困難がある疾患、例えば、インフルエンザ、結核、鼻疽及びサルモネラ症は、粘膜を介して侵入する疾患又は粘膜関連疾患に属し、生じた粘膜傷害及び粘膜免疫機能の障害は、日和見病原体感染又は更には腫瘍形成の重要な機構となる場合が多い。

【0004】

粘膜免疫系は、侵入してくる病原体に対する、身体にとって最初の免疫障壁であり、特徴的な構造及び機能を有するこの独立した免疫系は、病原体のコロニー形成及び侵入の防止にとって肯定的な意味を有する。伝統的な系統的免疫系とは異なり、粘膜免疫系は、粘膜上皮若しくは粘膜下固有層中に分散した多数の免疫細胞及び免疫分子からなる散在性のリンパ系組織、又は単一若しくは複数の凝集したリンパ濾胞によって形成される粘膜関連リンパ系組織を含む。身体のリンパ系組織の50%超、及び免疫細胞の80%超は、粘膜免疫系に集中した。更に、粘膜分泌における抗体は、主に、分泌型sIgA抗体及びsIgM抗体である。粘膜免疫系は、その機能によって、2つの部分：誘導部位及び実効部位に分割され得る。誘導部位と実効部位との間の連絡は、リンパ球のホーミングを介して主に生じる。粘膜免疫系の主な機能は、吸入された又は粘膜表面から摂取された、多数の広範な抗原を認識し、それに応答することである。粘膜免疫系は、多数の無害な抗原に対する免疫応答を低減

40

50

させ、又はかかる抗原に対する寛容を生じさせることができるだけでなく、有害な抗原又は病原体に対する高度に効率的な体液性免疫及び細胞性免疫を生じさせ、有効な免疫拒絶又は除去を実施することもできる。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0005】

【非特許文献1】Cold Spring Harbor Laboratory編集の「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」[(US) J. Sambrookら、Huang PeiTangらによる翻訳、Beijing、Science Press]

【非特許文献2】「Cell Laboratory Manual」[(US) DL Spectorら、Huang PeiTangらによる翻訳、Beijing、Science Press]

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

粘膜免疫は、理論的には、粘膜感染による病原性の役割を引き起こす病原体を防止するための免疫化の最も有効な経路であるが、それは、免疫化の他の方法では、ワクチンによって顕著な粘膜免疫応答を誘導することが困難だからである。しかし、これまで、承認された又は臨床研究中のワクチンのほとんどは、免疫化のために注射経路をなおも使用しており、粘膜免疫のための経路を使用するのは、そのうち一部にすぎない。その理由を研究するために、局所的な粘膜免疫特異的抗体の検出の困難さに加えて、粘膜免疫ワクチン製品の開発を悩ます主な困難は、身体の宿主防御の役割についてであり、粘膜免疫の間、注射免疫化方法の場合ほど、身体中への抗原のレベルを正確に制御できない。経口又は局所投与の後、抗原は、粘膜表面に達し、次いで、粘膜分泌物による希釈、粘液ゲル吸着、プロテアーゼ/ヌクレアーゼ加水分解、及び子宮内膜障壁によって取り除かれることを経る。非常に少量の抗原のみが、粘膜を介して身体中に至り、有効な粘膜免疫応答を果たすことができる。一般に、水溶性抗原及び粘膜機能なしの抗原についての粘膜取り込み速度は低く、それらの一部は、腸において免疫寛容現象を引き起こし得る。低い粘膜取り込み速度を解決するための最も有効な方法は、天然の粘膜病原体の特徴を模倣すること、及び有効な粘膜アジュバントを適用すること、並びに身体の粘膜表面との結合(好ましくは、M細胞に選択的に接着した)のレベルを増強することである。より有効な粘膜ワクチンが、なおも必要とされている。

【課題を解決するための手段】

【0007】

粘膜免疫のために抗原の免疫原性を改善するために、本発明は、抗原と、多量体を形成することが可能な粘膜免疫アジュバントタンパク質単量体との、融合タンパク質;及びこの多量体を形成することが可能な粘膜免疫アジュバントタンパク質単量体を含む、抗原キメラを提供し、この多量体を形成することが可能な粘膜免疫アジュバントタンパク質単量体は、コレラ毒素Bサブユニット(CTB)及びE.coli熱不安定性エンテロトキシンBサブユニット(LTB)から選択される単量体であり、この多量体は、五量体であり、このキメラにおいて、この融合タンパク質と、この多量体を形成することが可能な粘膜免疫アジュバントタンパク質単量体との間のモル比は、1:4であり、キメラ抗原が安定であるpHは、7.0よりも高く、好ましくはpH8.0である。CTB及びLTBの両方が、非常に有効な粘膜免疫アジュバントであり、安定な五量体を形成することが可能である。この性質を使用して調製された抗原キメラは、その粘膜免疫アジュバント特性を維持できるだけでなく、抗原提示細胞(APC)によって容易に取り込まれるように、抗原の体積を増加させ、更に、粘膜免疫系及び全身性免疫の刺激を改善する。更に、キメラの安定性は、pH値に密接に関連する。本発明では、抗原キメラの安定な存在のためのpHは、7.0よりも高く、好ましくはpH8.0である。この条件下のキメラ、特に、CTB五量体から形成されたキメラは、粘膜免疫効果を最も効率的に増強し得る。

【0008】

本発明の一実施形態では、この抗原キメラのCTB及びLTBは、それらの天然の構造である、又は五量体を形成することが可能な変異体である。グリコシル化の発生を伴う真核生物発現からのCTB及びLTBと比較して、原核生物発現ベクターによって発現されたCTB及びLTB並びにそれらの変異体は、天然の構造を有し、抗原に対する免疫応答をより効率的に刺激でき、アジュバントのその機能を示し得る。

【0009】

本発明の一実施形態では、この抗原キメラ中の抗原は、10～100kDの範囲の、好ましくは16kD～65kDの範囲の分子量を有する。10～100kDの範囲では、抗原は、CTB又はLTBが正確な高次構造へと折り畳まれることをより確実にし、安定な五量体を容易に形成し得る。抗原の分子量が小さすぎる場合、CTB又はLTBによって影響され、次いで、融合タンパク質自体の多量体を形成するように促進される恐れがあり、従って、正確に折り畳まれることができない。分子量が大きすぎる場合、LTB又はCTB五量体の形成を妨げるように立体障害を生じる恐れがある。

10

【0010】

本発明の一実施形態では、抗原は、粘膜免疫に適切な抗原、とりわけ、*H. pylori* 抗原、腸チフス抗原、インフルエンザHA抗原が含まれるがこれらに限定されない、粘膜経路を介してヒト又は動物の身体に感染する病原体由来の抗原であり得る。

【0011】

本発明の好ましい一実施形態では、*H. pylori* 抗原は、*Helicobacter pylori* ウレアーゼBサブユニット(UreB)、*Helicobacter pylori* 細胞毒関連遺伝子A(CagA)及び好中球活性化タンパク質(NAP)から選択される少なくとも1つである。これらの抗原は、強く免疫原性であり、非毒性であり、従って、ワクチンのための良好な候補抗原である。

20

【0012】

本発明の一実施形態では、融合タンパク質は、抗原と粘膜免疫アジュバントタンパク質単量体との間に配置された3個のG4S(Gly-Ser-Ser-Ser-Ser)リンカーを含む。この可動性リンカーの付加は、再折り畳みによる再生の間の抗原タンパク質とCTB又はLTBとの間のタンパク質相互作用を回避でき、従って、正確な高次構造の形成に寄与し得る。

【0013】

本発明は、上記のような抗原キメラを含む抗原組成物もまた提供し、この抗原キメラが安定であるpHは、7.0よりも高く、好ましくはpH8.0である。

30

【0014】

本発明は、この抗原組成物とワクチンに適切な賦形剤とを含む、ワクチンもまた提供する。好ましくは、ワクチンは、経口ワクチン、経鼻投与のためのワクチン又は直腸投与のためのワクチンである。

【0015】

本発明は、上記融合タンパク質を発現するベクター、及び多量体を形成することが可能な粘膜免疫アジュバントタンパク質単量体を発現するベクターを含む、抗原組成物を調製するためのカセットもまた提供する。好ましくは、ベクターは、全て原核生物発現ベクターである。

【0016】

本発明は、抗原キメラを調製するための方法もまた提供し、この方法は、融合タンパク質、及び多量体を形成することが可能な粘膜免疫アジュバントタンパク質単量体を、上述のカセット中のベクターを用いてそれぞれ発現させる工程、次いで、これら2つのタンパク質を結合させて、再生方法を介してキメラを形成する工程を含み、この再生方法は、尿素及びDTT(又はメルカプトエタノール)を含有する再折り畳み溶液中にこれら2つのタンパク質を共に配置することによる、それらの再生を含む。好ましくは、再折り畳み溶液中の尿素の濃度は、1.0M～2.5Mである。DTT又はメルカプトエタノールの濃度は、0.2mM～1.0mMである。

40

【0017】

本発明は、再生によってキメラを調製するための方法もまた提供し、このキメラは、(1

50

)タンパク質と、多量体を形成することが可能なタンパク質単量体との融合タンパク質、及び(2)多量体を形成することが可能なタンパク質単量体を含み、このキメラは、多量体を形成するための、(1)融合タンパク質のタンパク質単量体と(2)タンパク質単量体との融合によって形成され、この方法は、

(2)多量体を形成することが可能なタンパク質単量体が、6M~9M、好ましくは8Mの尿素を含み、3.0~4.0のpHを有する緩衝溶液中で0.5~3時間にわたって予め再折り畳みされ、好ましくは1時間にわたって予め再折り畳みされること;並びに

(1)融合タンパク質及び(2)多量体を形成することが可能なタンパク質単量体が、キメラの形成のために、1.0M~2.5Mの尿素及び0.2mM~1.0mMのDTT又はメルカプトエタノールを含む再折り畳み溶液中で再折り畳みされること、

10

【0018】

好ましくは、再折り畳み溶液のpHは、7.0よりも高く、より好ましくは、再折り畳み溶液のpHは、8.0である。

【0019】

本発明では、本発明者らは、それら自体で多量体を形成することが可能な単量体タンパク質のホモ五量体の形成を効率的に防止し得る、再折り畳み溶液における特定の濃度の尿素及びDTT(又はメルカプトエタノール)を維持することを選択した。更に、この特定のpH条件下では、キメラの形成を促進し、キメラアセンブリ効率を改善でき、それによって、従来の再生手順において生じる低いアセンブリ効率の欠点を効率的に克服する。この再生方法は、本明細書に記載されるワクチンの分野に限定されない、タンパク質キメラを形成することを必要とする複数の領域で使用され得る。

20

【図面の簡単な説明】

【0020】

【図1】コレラ毒素(CT)のコンピューターシミュレーション透視立体配置図を示す図である。

【図2】CTBホモ五量体のコンピューターシミュレーション透視立体配置図を示す図である。

【図3】CTB-UreB融合タンパク質のコンピューターシミュレーション透視図を示す図である。

30

【図4】CTB-UreB/4CTBキメラタンパク質のコンピューターシミュレーション透視立体配置図を示す図である。

【図5】本発明の一実施形態に従うPET-28a-CTB-Xプラスミドの二重消化の電気泳動結果のフォトグラムを示す図である。それぞれのレーンのサンプルは、以下の通りである:M:DL 10000 DNAマーカー;レーン1、2、3:PET-28a-CTB-UreB二重消化;レーン4、5、6:PET-28a-CTB-CagA二重消化;レーン7:PET-28a-CTB-NAP二重消化。

【図6】本発明の一実施形態に従って調製されたCTB-UreB融合タンパク質のタンパク質電気泳動結果のフォトグラムを示す図である。それぞれのレーンのサンプルは、以下の通りである:M:予め染色されたFermentas社タンパク質マーカー;レーン1、2、3、4、5、6及び7:IPTGで誘導した後のPET-28a-CTB-UreB/BL21-DE3の葉状体。

40

【図7】本発明の一実施形態に従って調製されたCTB-CagA融合タンパク質及びCTB-NAP融合タンパク質のタンパク質電気泳動結果のフォトグラムを示す図である。それぞれのレーンのサンプルは、以下の通りである:M:予め染色されたFermentas社タンパク質マーカー;レーン1、2、3及び4:IPTGで誘導した後のPET-28a-CTB-CagA/BL21-DE3の葉状体;レーン5、6、7及び8:IPTGで誘導した後のPET-28a-CTB-NAP/BL21-DE3の葉状体。

【図8】本発明の一実施形態に従って調製されたCTB-UreB融合タンパク質の精製のタンパク質電気泳動結果のフォトグラムを示す図である。それぞれのレーンのサンプルは、以下の通りである:M:予め染色されたFermentas社タンパク質マーカー;レーン1:SP HPピークから溶出したピークの前に収集したサンプル;レーン2及び3:SP HPから溶出したピークのサンプル;レーン4:SP HPから溶出したピークの後に収集したサンプル。

50

【図 9 A】本発明の一実施形態に従って調製されたCTB-UreB/4CTBキメラタンパク質の精製のタンパク質電気泳動結果のフォトグラムを示す図である。それぞれのレーンのサンプルは、以下の通りである:M:予め染色されたFermentas社タンパク質マーカー;レーン1、2、3及び4:QHPから溶出したピーク。

【図 9 B】本発明の一実施形態に従って調製されたCTB-UreB/4CTBキメラタンパク質の安定性試験についてのタンパク質電気泳動結果のフォトグラムを示す図である。それぞれのレーンのサンプルは、以下の通りである:M:予め染色されたFermentas社タンパク質マーカー;レーン1~7は、それぞれ、pH9.0、8.0、7.0、6.0、5.0、4.0、3.0の条件下で処理後のサンプルである。

【図 1 0】本発明の一実施形態に従って調製されたCTB-CagA融合タンパク質の精製のタンパク質電気泳動結果のフォトグラムを示す図である。それぞれのレーンのサンプルは、以下の通りである:M:予め染色されたFermentas社タンパク質マーカー;レーン1、2、3及び4:QHPから溶出したピーク。

10

【図 1 1 A】本発明の一実施形態に従って調製されたCTB-CagA/4CTBキメラタンパク質の精製のタンパク質電気泳動結果のフォトグラムを示す図である。それぞれのレーンのサンプルは、以下の通りである:M:予め染色されたFermentas社タンパク質マーカー;レーン1、2及び3:SP HPから溶出したピーク。

【図 1 1 B】本発明の一実施形態に従って調製されたCTB-CagA/4CTBキメラタンパク質の安定性試験についてのタンパク質電気泳動結果のフォトグラムを示す図である。それぞれのレーンのサンプルは、以下の通りである:M:予め染色されたFermentas社タンパク質マーカー;レーン1~7:それぞれ、pH9.0、8.0、7.0、6.0、5.0、4.0、3.0の条件下での処置後のサンプルである。

20

【図 1 2】本発明の一実施形態に従って調製されたCTB-NAP融合タンパク質の精製のタンパク質電気泳動結果のフォトグラムを示す図である。それぞれのレーンのサンプルは、以下の通りである:M:予め染色されたFermentas社タンパク質マーカー;レーン1:封入体(8M尿素中);レーン2、3及び4:QHPから溶出したピーク。

【図 1 3】本発明の一実施形態に従って調製されたCTB-NAP/4CTBキメラタンパク質の精製のタンパク質電気泳動結果のフォトグラムを示す図である。それぞれのレーンのサンプルは、以下の通りである:M:予め染色されたFermentas社タンパク質マーカー;レーン1、2及び3:QHPから溶出したピーク。

30

【図 1 4】本発明の一実施形態に従うCTB-UreB/4CTBキメラタンパク質によってマウスを免疫化することによって得られた血清特異的IgGの測定結果を示す図である。

【図 1 5】本発明の一実施形態に従うCTB-UreB/4CTBキメラタンパク質によってマウスを免疫化することによって得られた腸粘膜特異的sIgAの測定結果を示す図である。

【図 1 6】本発明の一実施形態に従うCTB-CagA/4CTBキメラタンパク質によってマウスを免疫化することによって得られた血清特異的IgGの測定結果を示す図である。

【図 1 7】本発明の一実施形態に従うCTB-CagA/4CTBキメラタンパク質によってマウスを免疫化することによって得られた腸粘膜特異的sIgAの測定結果を示す図である。

【図 1 8】本発明の一実施形態に従うCTB-NAP/4CTBキメラタンパク質によってマウスを免疫化することによって得られた血清特異的IgGの測定結果を示す図である。

40

【図 1 9】本発明の一実施形態に従うCTB-NAP/4CTBキメラタンパク質によってマウスを免疫化することによって得られた腸粘膜特異的sIgAの測定結果を示す図である。

【図 2 0】本発明の一実施形態に従うCTB-UreB/4CTBキメラタンパク質によってマウスを免疫化し、次いで、免疫化したマウスをHPSS1で負荷することによって得られた血清特異的IgG抗体の測定結果を示す図である。

【図 2 1】本発明の一実施形態に従うCTB-UreB/4CTBキメラタンパク質によってマウスを免疫化し、次いで、免疫化したマウスをHPSS1で負荷することによって得られた腸粘膜特異的sIgA抗体の測定結果を示す図である。

【図 2 2 A】本発明の一実施形態に従うCTB-UreB/4CTBキメラタンパク質によって免疫化し、次いで、HPSS1で負荷したマウスの胃組織の病理学的切片の結果を示す図である。CTB

50

-UreB/4CTBキメラタンパク質群中のマウスの胃組織の代表的病理学的切片(×250)。

【図2 2 B】本発明の一実施形態に従うCTB-UreB/4CTBキメラタンパク質によって免疫化し、次いで、HPSS1で負荷したマウスの胃組織の病理学的切片の結果を示す図である。Ure B群中のマウスの胃組織の代表的病理学的切片(×250)。

【図2 2 C】本発明の一実施形態に従うCTB-UreB/4CTBキメラタンパク質によって免疫化し、次いで、HPSS1で負荷したマウスの胃組織の病理学的切片の結果を示す図である。Ure B群中のマウスの胃組織の代表的病理学的切片(×400)。

【図2 3 A】UreB-CTA₂/5CTBのアセンブリ効率比較のための電気泳動結果である。レーン1は、比較例1についての実験結果である。

【図2 3 B】CTB-UreB/4CTBのアセンブリ効率比較のための電気泳動結果である。レーン2は、本発明に従う実施例についての実験結果である。

【発明を実施するための形態】

【0021】

本発明をより明確に説明するために、本発明は、本発明の種々の好ましい実施形態、並びにこれらの実施形態の技術的效果について、以下に詳細に記載される。

【0022】

本発明は、増強された免疫原性を有する抗原及びその調製方法を提供する。一方では、免疫応答が、粘膜アジュバントの使用を介して強化される;他方では、五量体CTB又はLTBを形成する特徴が、粘膜免疫アジュバント効果を改善するため、並びにAPCによって容易に摂取され、従って、免疫応答の発生をより促すように、抗原の体積を増加させるために、使用される。更に、本発明者らは、五量体を形成することが可能な単量体のホモ五量体の形成を効率的に防止でき、従って、キメラ形成に寄与し得る、再折り畳み溶液における特定の濃度の尿素及びDTT(又は「尿素及びメルカプトエタノール」)を維持することを選択し、キメラをアセンブルする効率が改善され得る。従来の再生条件において生じるキメラの低いアセンブリ効率の欠点が、効率的に克服される。

【0023】

本発明の態様は、ここで、免疫アジュバントの選択、抗原の選択及び再折り畳み方法を含め、いくつかの態様からより詳細に記載される。

【0024】

免疫アジュバントについて

抗原の免疫原性を増強するために、本発明は、抗原と共に使用され、新たな抗原組成物を形成するために、それぞれ、LTB又はCTBを選択した。

【0025】

コレラ毒素は、1つのAサブユニット及び5つのBサブユニット(図1を参照のこと)成分からなる強力な粘膜免疫アジュバントである。5つのBサブユニットは、一緒に非共有結合されて、非常にコンパクト且つ安定な円柱形状の五量体を形成する(図2を参照のこと)。Bサブユニット単量体は、そのそれぞれの側に3つの逆平行シートの側鎖を有する。五量体中では、隣接単量体は、シート及び多数の塩結合(salt bond)を介して互いに相互作用し、それによって、Bサブユニット五量体は、最も安定なタンパク質複合体の1つになる。CTAは、コレラ毒素の活性部分であるが、CTBは非毒性であり、その主要な機能は、哺乳動物腸上皮細胞上のシアル酸ガングリオシド(GM1)と結合することであり、CTAを細胞中に入れ、免疫応答を生じさせる。CTBは、強い免疫原性を有するが、それは、GM1を結合することを介してCTBによって補助される、経口ワクチンを腸管が取り込む速度を改善できることに加えて、CTBは、浸透性を増加させ、小腸粘膜において経口ワクチンが消化されるのを防止し、抗原性を維持するように、小腸粘膜細胞間のタイトジャンクション又は閉鎖帯構造に特異的に影響を与えることもでき、それによって、良好な免疫応答が身体において生じ得るように、身体によって産生される抗体の力価を増強するからである。今日、CTBは、これまでで、最も有効且つ最も安全な粘膜免疫アジュバントの1つと考えられている。

【0026】

LTBもまた、効率的な粘膜免疫アジュバントである。Escherichia coli熱不安定性エン

10

20

30

40

50

テロトキシン(LT)は、エンテロトキシン産生*Escherichia coli*細胞によってペリプラズム中に分泌される熱不安定性ペリプラズム外毒素である。LTは、ADP-リボシルトランスフェラーゼ活性を有するAサブユニット、並びにガングリオシドと結合されるBサブユニットからなる、AB₅型タンパク質ヘキサマーであり、このAサブユニットは、その毒性の主要単位であり、Bサブユニットは、免疫原性及びアジュバント機能を有する。LTは、免疫原性であるだけでなく、有効な粘膜アジュバントでもあり、候補抗原に対する身体のIgA応答及びIgG応答を顕著に増強できるが、候補抗原に対する身体の免疫寛容を低減させ、それらに対する長期記憶を誘導する。従って、粘膜アジュバントLTBは、広く粘膜アジュバントとみなされている。

【0027】

10

本発明は、以下を含む組換え抗原組成物を提供する：抗原とCTB又はLTB単量体との融合タンパク質；及び対応するCTB又はLTB単量体タンパク質。5つのCTB又はLTB単量体の非共有結合の特徴を使用することによって、4つの対応する単量体CTB又はLTB複合体を有するこの融合タンパク質のキメラ構造を形成することができ、それによって、抗原の有効体積を増加させ、APCによって容易に取り込まれる。その一方で、CTB及びLTBは、候補抗原に対する身体の免疫寛容を低減させ得、従って、免疫を促進することにおけるその役割を効率的に果たすことができる、強力な免疫アジュバントであることが公知である。抗原と5つのCTB又はLTB単量体とのキメラタンパク質の形成以降、より高い効力を有する抗原が形成されており、それによって、抗原組成物全体の免疫原性が増強される。

【0028】

20

抗原について

粘膜免疫の役割をより良く果たすために、*H. pylori*抗原、腸チフス抗原及びインフルエンザHA抗原を含むがこれらに限定されない、粘膜を介して感染する病原体の抗原が、本発明には好ましい。本発明の調製されたキメラ抗原を使用することによって、抗原の免疫原性を増強できるが、これは、より有効なワクチンを開発の助けとなるであろう。

【0029】

本明細書で以下、*Helicobacter pylori*は、本発明の検証された技術的解法及び技術的効果を詳細に記述するために、一例として使用される。

【0030】

Helicobacter pylori(HP)は、胃上皮細胞表面上に寄生した微好気性グラム陰性細菌であり、ヒト胃粘膜から、オーストラリアの学者Marshall及びWarrenによって1983年に最初に単離された。HPは、酸性環境においてコロニー形成及び生存でき、身体に炎症及び免疫応答を生じさせ得、胃粘膜障壁に損傷を与え得、その結果、胃上皮細胞のアポトーシスと増殖との間の不均衡を引き起こす。HPは、ヒト胃腸疾患についての重要な病原体であり、慢性胃炎、胃潰瘍及び十二指腸潰瘍の主要な原因である。1994年に、WHOは、HPが胃癌と密接に関連することを確認しており、HPをAクラスの発癌物質として列挙した。HPは、世界で最も高い蔓延した細菌の1つであり、アジア人の90%及びヨーロッパ人の60%がHPに感染していることが報告され、HP感染の予防及び処置が世界的な注目の的となっている。

【0031】

30

現在、臨床において、2又は3抗生物質処置が、HP感染を処置するために、一般に使用されている。しかし、以下の短所があることが明らかである：1)薬物耐性株の生成；2)再発及び再感染の容易さ；3)高い有害反応及び経費；4)集団制御効果(population control effect)を達成できず、HPの広がり及び感染を効率的に制御できない。従って、HP感染の予防及び制御についての明確な効果を有するワクチンの開発は、非常に重要である。現在研究されているHPワクチンには、主に、全細胞ワクチン、サブユニットワクチン(遺伝子操作されたワクチン)、生ベクターワクチン及びDNAワクチンが含まれる。研究のほとんどは、全細胞HP若しくは全細菌溶解物、又はHP毒性タンパク質、例えば、ウレアーゼ、空胞化細胞毒、CagA、好中球活性化タンパク質を、単独で、又は接種のために異なるアジュバントと組み合わせて使用し、動物モデルでは、それらの全てが、防御応答を引き起こし得る。

【0032】

40

50

予防ワクチンは、身体の免疫応答によって役割を果たし、従って、身体を免疫化するために妥当なHP抗原を選択することによって、身体を、防御免疫応答を生じるように刺激でき、従って、このワクチンは、HPの感染から身体を防御することに役割を果たすことができよう。HPの病原性の徹底的な技術的研究、並びに分子生物学の発展により、遺伝子操作株の構築及び適用は、有効な抗原スクリーニングに好ましい条件を提供し、並びにHP感染の予防及び根絶が、重大な一歩を進める。

【0033】

Helicobacter pyloriワクチンの調製を一例にとって、本発明者らは、Helicobacter pyloriについての有効な抗原として、Helicobacter pyloriウレアーゼ、Helicobacter pylori CagAタンパク質及びHelicobacter pylori NAPを選ぶ。本発明は、遺伝的生物工学技術を適用し、HP抗原とCTBとの融合タンパク質3つ[CTB-X(X=UreB、CagA、NAP)]を調製し(図3を参照のこと)、5つのCTBが非共有結合した特徴という特徴の使用によって、キメラ構造CTB-X(X=UreB、CagA、NAP)-4CTBが形成され(図4を参照のこと)、それによって、HP抗原と5つのCTB単量体とのキメラタンパク質を介して、より高い効力を有する抗原を形成し、立証のために、適切な動物免疫原性実験を実施した。

【0034】

ウレアーゼ

コロニー形成及び感染のプロセスにおいて、ウレアーゼ(Ure)HPは、胃酸を中和する、尿素の分解の効果を有し、病原性HPにとって重要である。HPウレアーゼは、コロニー形成因子及び病原性因子の両方である。ウレアーゼ遺伝子は、強いウレアーゼ活性を有するタンパク質をコードし、全てのHP株によって共有で所有される。ウレアーゼは、HP表面上に分布し、全細菌タンパク質の総量の5~10%を占める。現在、ウレアーゼの遺伝子サイズは、約7.5kbであり、合計9つのオープンリーディングフレーム(ORF)、即ち、UreA、UreB、UreC、UreD、UreE、UreF、UreG、UreH及びUreIが存在することが見出されている。UreA及びUreBは、高度に保存された2つの構造的ウレアーゼサブユニットであり、これらは、HP感染のPCR検出における標的遺伝子及び候補遺伝子ワクチンとして選択される場合が多い。

【0035】

UreBは、HPの外膜抗原の主要成分であり、569アミノ酸残基をコードすることによって産生され、非毒性で、強い抗原性特徴を有し、比較的保存的な、HPにおける最も強い防御抗原タンパク質である。HPの病原プロセスにおいて、これは重要な役割を果たす。異なる株間で比較することによって、ウレアーゼBサブユニットは、97.9%超の相同性を有することが見出され、これは、異なるHP株間でのHP UreB抗原のバリエーションが最小であることを示している。更に、UreBの主要な活性部分は、その細胞表面上に位置し、その大きい分子量及び粒状構造は、粘膜免疫化を容易にし、従って、ウレアーゼ分子は、ワクチン抗原としての合理的な選択肢として使用され得る。その一方で、in vivoでのHP表面は、細胞質タンパク質に対する接着特徴を有し、自己分解から生細胞の表面へとウレアーゼを放出でき、これはまた、HPワクチン研究のための重要な理論的基礎を提供した。実験により、粘膜免疫化の経路を介したUreBタンパク質ワクチンの投与は、身体の防御免疫応答を誘導及び刺激できることが確認され、これは、UreBが、HP感染についての重要な候補防御抗原であることを示している。これはまた、遺伝子操作されたワクチンのための好ましい抗原であり、顕著な利点を有する。

【0036】

多数の文献が、組換えウレアーゼサブユニットB(rUreB)を有するネコ胃Helicobacter(Helicobacter Felis、Hf)に以前に感染したマウスの経口免疫化によって、マウスにおいてHf感染が排除されただけでなく、マウスにおいて再感染もまた予防できたことが見出されることを報告している;Kleanthousらは、マウス免疫化のためにrUreB+粘膜アジュバントLTを使用し、対照群と比較した場合に、以下であることを見出した:免疫化したマウスの群において、胃におけるウレアーゼ活性は、有意に減少し、胃組織の定量培養は、HPの97%超が低減されたことを示した;Michettiらは、異なる経口用量(180mg、60mg、20mg、4回/

日)のウレアーゼ及びLT (5 µg)の安全性及び免疫原性に関する臨床研究を実施し、以下であることを見出した:全ての志願者が寛容され、ワクチンは、胃のHPコロニー形成を低減でき、従って、胃炎の程度を低減させた;Saldingerらは、Hfに以前に感染したBALB/cマウスを免疫するために、rUreBと組み合わせてコレラ毒素(CT)を使用し、以下であることを見出した:免疫化群中の全てのマウスにおいて、Hfは根絶されていた;更なる分析によって、増加したIL-4及び低減されたIFN-γを伴う、脾臓CD⁴⁺T細胞の増殖、増加した血清IgG1が明らかとなり、こうして、rUreBが、HPを除去することを助け得るTh2 CD⁴⁺T細胞増殖を誘導し得ることが提唱される。一部の学者は、LTと組み合わせたUreBによる免疫化によって、HP感染した志願者に対する第I相臨床試験を実施し、HP感染の密度における有意な低減もまた見出した。Leeらは、他の非ヒト霊長類に対して同様の研究を実施し、胃のHPの密度を低減させることで、胃炎の程度を低減させることを助け得ることもまた示した。しかし、Solnickは、経口投与及び筋内投与を介したウレアーゼによるアカゲザルに対する免疫化研究と、その後のHP負荷試験とを報告しており、以下を見出した:UreBは、体液性免疫化を誘導することが可能であり、HP負荷を与えた全てのアカゲザルにHPを感染させたが、細菌密度は、実験群と対照群との間で統計的に有意ではなかった。これらの結果は、現在のUreB関連HPワクチンが未だ完全ではなく、更なる研究を要することを示している。

10

【0037】

CagAタンパク質

細胞毒関連遺伝子としても公知のCagA遺伝子、その遺伝子発現産物は、CagAタンパク質である。細菌によって分泌される毒素として、これは、IV型分泌系Cag病原性アイランド(Cag pathogenicity island)(PAI)によって、細菌から宿主細胞に移行され、宿主細胞においてリン酸化されてシグナル伝達に関与し、細胞骨格構造の再編成を引き起こす。研究により、cagA陽性HPが、HPの病原性株であり、萎縮性胃炎、胃癌及び消化性潰瘍並びに他の一般的な胃腸疾患に密接に関連することが示されている。臨床単離されたHPの90%超において、CagAの発現が陽性であった。CagA遺伝子を有するHPのほぼ全ての型が、CagAタンパク質を発現し、測定可能な抗体応答を誘導する。文献によれば、CagA陽性株は、胃上皮細胞を直接又は間接的に(NF-KBを介して)誘導してIL-8を分泌させることが可能であり、IL-8は、好中球の走化性及び活性化のプロセスにおいて重要な役割を果たし、胃粘膜傷害を引き起こし得る。動物実験により、CagA遺伝子及びCagAタンパク質は、胃炎、消化性潰瘍、とりわけ胃癌との良好な相関を有することが見出された。Marchettiらは、組換えCagAを用いたHP感染マウス免疫化によるモデルを使用して、誘導された防御免疫応答を生じ得、防御率が70%に達したことを示した。Crabtreeらは、胃を介して、HPに慢性に感染したマウスを免疫するために、抗原として組換えCagAを適用し、HPを首尾よく取り除き、マウスを、再感染から効率的に防御した。HPワクチンのための防御抗原としてのCagAは、より高い実行可能性を有するが、この抗原の防御効果は、CagAを産生する株に限定され、CagAを産生しない株については防御効果が生じないことが示唆された。CagAタンパク質についての満足できるワクチンは、今でも存在しないことが理解され得る。

20

30

【0038】

NAP

Evansらは、HPの水溶性抽出物中の1種類のNAPが、好中球を惹起及び活性化でき、胃上皮細胞への好中球接着を促進でき、好中球を活性化して反応性酸素代謝物を放出させ得、胃粘膜の炎症病変をもたらすことを見出した。

40

【0039】

NAPは、高度に保存されている。臨床研究において、NAPに対する特異的抗体が、HP感染患者由来の血清サンプルの60%において見出されることが見出されている。NAPは、フェリチンであり、これをコードする遺伝子は、ほとんど全ての種類のHPにおいて検出され得るが、in vitro発現後にはNAP活性において大きな差異はない。NAPは、CD11a/CD18及びCD11b/CD18を介して内皮細胞接着分子(ICAM-1)と相互作用でき、白血球と内皮細胞との間の接着をもたらす。NAPは、好中球の酸性スフィンゴ糖脂質を選択的に結合し、白血球機能を更に調節する機能を有し、胃上皮細胞におけるHPコロニー形成の可能性を提供するよう

50

に、ムチンと結合され得る。従って、NAPは、HPの接着及び病原プロセスにおいて重要な役割を果たす。Satinらは、経口免疫化を介して、精製された組換えNAPを用いて10匹のマウスを免疫化し、結果は、8匹のマウスが防御免疫を獲得したことを示した。これは、NAPが、HP感染に対するワクチンのための有効な防御抗原として使用され得ることを示唆している。

【0040】

本発明の好ましい一実施形態では、本発明は、*Helicobacter pylori* 抗原とCTB単量体との融合タンパク質、及びCTB単量体を含む、組換え*H.pylori* 抗原組成物を提供する。CTB単量体がそれ自体と五量体を形成することができるという特性によって、抗原のサイズは増加され、APCによって容易に摂取される。更に、CTBは、良好な免疫アジュバントである。従って、本発明の組換え*H.pylori* 抗原組成物は、*H.pylori* 抗原の免疫原性を効率的に増強でき、これが、より有効なワクチンを開発することを助ける。

10

【0041】

更なる一実施形態では、この抗原は、*Helicobacter pylori* UreBタンパク質、*Helicobacter pylori* CagAタンパク質及びNAPのうちの少なくとも1つから選択される。これらの抗原は、全て非毒性であり、強い免疫原性を有し、現在公知の*H.pylori* 抗原の中で比較的保存的な抗原であり、ワクチンにおける使用により適切である。

【0042】

抗原及び免疫アジュバントの結合様式の選択

慣用的な免疫アジュバントは一般に、抗原と直接混合されることによって使用され、次いで、免疫応答を刺激するために抗原と同時に投与されるが、抗原の免疫原性を増強するアジュバントの効果は、理想的ではない。本発明は、抗原と粘膜免疫アジュバントタンパク質単量体との融合タンパク質を調製し、次いで、キメラタンパク質が、融合タンパク質と粘膜免疫アジュバントタンパク質単量体との間の非共有結合によって形成され、こうして、その粘膜免疫アジュバント特性が維持されるだけでなく、抗原提示細胞による取り込みが容易になるように、抗原の体積もまた増加される。

20

【0043】

融合タンパク質の調製のために、本発明では、可動性タンパク質リンカーを、抗原とCTB(又はLTB)との間に付加し、その結果、融合後、抗原及びCTB(又はLTB)の折り畳みは、互いに影響を受けず、それぞれが正確な高次構造を形成する。一実施形態では、本発明は、3連G4Sリンカーを選択した。しかし、本発明は、かかるリンカーの使用に限定されず、他のリンカー、例えば、らせん形態のリンカーペプチド(A(EAAAK)_nA)及びグルコースアウレウス(*glucose aureus*)プロテインA(PA)もまた、本発明において使用され得る。

30

【0044】

更に、2つの部分の高次構造、とりわけCTB(又はLTB)の高次構造を確実にすることに基づいて、これは、五量体の適切な形成を形成することを促し、五量体形成効率にとって有利となり得る。

【0045】

抗原キメラの調製方法

本発明は、上記抗原とCTB(又はLTB)との融合タンパク質を発現するベクター、及び対応する粘膜免疫アジュバントタンパク質CTB(又はLTB)を発現するベクターを含む、カセットもまた提供する。当業者に公知のように、目的のタンパク質に加えて、この発現ベクターは、目的のタンパク質の発現に必要なエレメント、例えば、プロモーター、ターミネーター、任意選択のマーカー遺伝子等もまた、含むべきである。

40

【0046】

この発現ベクターは、好ましくは、原核生物発現ベクター、例えば、pETシリーズの原核生物ベクターである。原核生物発現ベクターを用いて目的のタンパク質を調製するための方法及び試薬は、当該分野で公知であり、当該分野で一般に使用される参考書籍、例えば、Cold Spring Harbor Laboratory編集の「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」[(US) J. Sambrookら、Huang PeiTangらによる翻訳、Beijing、Science Press]、「Cel

50

l Laboratory Manual」[(US) DL Spectorら、Huang PeiTangらによる翻訳、Beijing、Science Press]等において見出され得る。

【0047】

キメラの調製について、一部に技術的問題があった。融合タンパク質とのキメラを形成する前に、単量体がホモ五量体を形成することを回避する方法が、キメラの収量にとって重要な点である。一般に、原核生物細胞を用いて発現されたほとんどのタンパク質は、封入体を形成し、洗浄後に尿素の溶液で溶解することが必要である。尿素溶液によって溶解されたタンパク質は、基本的に変性状態にあり、このとき、その天然の高次構造を生じさせることは困難である。しかし、従来の再折り畳みプロセスは、正確な高次構造を形成するために、段階的にそれを再折り畳みするための、尿素の除去の段階的なプロセスである。多量体を形成することが可能な単量体に関して、尿素の除去のプロセスにおいて、融合タンパク質中の単量体とのヘテロ多量体ではなく、それら自体がホモ多量体を自発的に形成しがちである。従って、キメラが従来の方法で産生される場合、収量は非常に低い。

10

【0048】

本発明者らは、単量体自体からのホモ五量体の形成を効率的に防止することが可能であるように、再折り畳み溶液における特定の濃度の尿素及びDTT(又は「尿素及びメルカプトエタノール」)を維持することを選択し、キメラの形成を促進し、キメラのアセンブリ効率を改善する。従って、従来の再生から生じるより低いアセンブリ効率の欠点は、効率的に克服される。

【0049】

20

本発明はまた、再生によってキメラを調製するプロセスも提供し、このキメラは、(1)タンパク質と、多量体を形成することが可能なタンパク質単量体との融合タンパク質、及び(2)多量体を形成することが可能なタンパク質単量体を含み、このキメラは、多量体を形成するための、(1)融合タンパク質のタンパク質単量体と(2)タンパク質単量体との融合によって形成され、この方法は、(2)多量体を形成することが可能なタンパク質単量体が、6M~9M、好ましくは8Mの尿素を含み、3.0~4.0のpHを有する緩衝溶液中で0.5~3時間にわたって予め再折り畳みされ、好ましくは1時間にわたって予め再折り畳みされること;並びに(1)融合タンパク質及び(2)多量体を形成することが可能なタンパク質単量体が、キメラの形成のために、1.0M~2.5Mの尿素及び0.2mM~1.0mMのDTT又はメルカプトエタノールを含む再折り畳み溶液中で再折り畳みされること、を含む。

30

【0050】

従来の再折り畳み溶液とは異なり、本発明は、特定の濃度の尿素及び還元試薬を有する再折り畳み溶液を使用し、その結果、融合タンパク質及びタンパク質単量体は、緩徐に再折り畳みするプロセスの間に、所望のキメラへと再結合され得る。好ましいプロセスでは、予め再折り畳みは、特定のpH条件下で実施され、次いで、還元試薬の存在下で実施され、より低い濃度の尿素において、融合タンパク質及びタンパク質単量体は、緩徐に再折り畳みされ、高い収量のキメラが、予想外に得られる。

【0051】

大規模産生について、収量は、産生の費用に直接影響を与え、更には、大規模産生の可能性に対して直接影響する。本発明の方法の使用によって、キメラの収量は、大量産生のためのレベルに達し得る。

40

【0052】

次に、本発明の好ましい実施形態は、具体的実施例の詳細な説明を通じて、以下に記載される。

【実施例1】

【0053】

1. 抗原の調製

1.1 CTB-UreB/4CTBの調製:

1.1.1 組換え操作細菌:PET-28a-CTB-UreB BL21-DE3の構築

1.1.1.1 融合遺伝子CTB-UreBの構築:

50

UreBのDNA配列は、HP株MEL-HP27由来であり、CTBのDNA配列は、*Vibrio cholerae* 0395由来であり、グリシン/セリンに富み、可動性を有する(G4S)₃リンカー配列(イタリック且つ下線)を、UreBの配列とCTBの配列との間で融合DNA断片中に導入し、CTB-UreBコドン合成する。

【0054】

その遺伝子配列は、配列番号1である：

ATGACACCTCAAAATATTACTGATTTGTGTGCAGAATACCACAACACACA	50	
AATACATACGCTAAATGATAAGATATTTTCGTATACAGAATCTCTAGCTG	100	
GAAAAAGAGAGATGGCTATCATTACTTTTAAGAATGGTGCAACTTTTCAA	150	
GTAGAAGTACCAGGTAGTCAACATATAGATTACAAAAAAAAGCGATTGA	200	
AAGGATGAAGGATACCCCTGAGGATTGCATATCTTACTGAAGCTAAAGTCG	250	
AAAAGTTATGTGTATGGAATAATAAAACGCCTCATGCGATTGCCGCAATT	300	
AGTATGGCAAATGGTGGTGGTGGTTCTGGTGGTGGTGGTTCTGGTGGTGG	350	
<u>TGGTTCT</u> ATGAAAAAGATTAGCAGAAAAAGAATATGTTTCTATGTATGGCC	400	
CTACTACAGGCGATAAAGTGAGATTGGGCGATACAGACTTGATCGCTGAA	450	10
GTAGAACATGACTACACCATTTATGGCGAAGAGCTTAAATTCGGTGGCGG	500	
TAAAACTTTGAGAGAAGGCATGAGCCAATCCAACAACCCTAGCAAAGAAG	550	
AACTGGATTTAATCATCACTAACGCTTTAATCGTGGATTACACCGGTATT	600	
TATAAAGCGGATATTGGTATTAAAGATGGCAAAATCGCTGGCATTGGCAA	650	
AGGCGGCAACAAAGACATGCAAGATGGCGTTAAAAACAATCTTAGCGTGG	700	
GTCCTGCTACTGAAGCCTTAGCTGGTGAAGGTTTGATCGTAACTGCTGGT	750	
GGTATTGACACACACATCCACTTCATCTCCCCCAACAAATCCCTACAGC	800	
TTTTGCAAGCGGTGTAACAACGATGATTGGTGGCGGAAGTGGCCCTGCTG	850	
ATGGCACTAACGCAACCACTATCACTCCAGGCAGAAGAAATTTAAAATGG	900	20
ATGCTCAGAGCGGCTGAAGAATATTCTATGAATTTAGGTTTCTTAGCTAA	950	
AGGTAACGCTTCTAATGATGCGAGCTTAGCCGATCAAATTGAAGCCGGTG	1000	
CGATTGGCTTTAAAATCCATGAAGACTGGGGAACAACCTCCTTCTGCAATC	1050	
AATCATGCGTTAGATGTTGCGGACAAATACGATGTGCAAGTCGCTATCCA	1100	
TACGGACACTTTGAATGAAGCCGGTTGTGTAGAAGACACTATGGCAGCCA	1150	
TTGCCGGACGCACTATGCACACTTTCCACACTGAAGGCGCTGGTGGCGGA	1200	
CACGCTCCTGATATCATTAAAGTAGCCGGCGAACACAACATTCTGCCCGC	1250	
TTCCACTAACCCCACTATCCCTTTCACTGTGAATACAGAAGCAGAACACA	1300	30
TGGACATGCTTATGGTGTGCCACCACTTGGATAAAAGCATTAAAGAAGAT	1350	
GTTCAAGTTCGCTGATTCAAGGATCCGCCCTCAAACCATTCGGGCTGAAGA	1400	
CACTTTGCATGACATGGGGATTTTCTCAATCACTAGTTCTGACTCTCAAG	1450	
CTATGGGTCGTGTGGGTGAAGTTATCACCAGAACTTGGCAAACAGCTGAC	1500	
AAAAACAAAAAGAATTTGGCCGCTTGAAAGAAGAAAAAGGCGATAACGA	1550	
CAACTTCAGAATCAAACGCTACTTGTCTAAATACACCATTAAACCCAGCGA	1600	
TCGCTCATGGGATTAGCGAGTATGTAGGTTCTGTAGAAGTGGGCAAAGTG	1650	
GCTGACTTGGTATTGTGGAGTCCAGCATTCTTTGGCGTGAAACCCAACAT	1700	
GATCATCAAAGGTGGGTTTATTGCATTGAGTCAAATGGGCGATGCGAACG	1750	40
CTTCTATCCCTACCCCAACCAAGTTTATTACAGAGAAATGTTTCGCTCAT	1800	
CATGGTAAAGCCAAATACGATGCAAACATCACTTTTGTGTCTAAAGCGGC	1850	
TTATGACAAAGGCATTAAAGAAGAATTAGGGCTTGAAAGACAAGTGTTGC	1900	
CGGTAAAAAATTGCAGAAACATCACTAAAAAAGACATGCAATTCAACGAC	1950	
ACTACCGCTCACATTGAAGTCAATCCTGAACTTACCATGTGTTTCGTGGA	2000	
TGGCAAAGAAGTAACTTCTAAACCAGCCACTAAAGTGAGCTTGGCGCAAC	2050	
TCTTTAGCATTTTCTAA	2067	

1.1.1.2 発現ベクターPET-28a-CTB-UreBの構築:

発現ベクターPET-28a及びHP UreB-CTB融合遺伝子断片を、それぞれ、NdeI及びHindIIIで消化した。目的のDNA断片を、アガロースゲル電気泳動のゲルから回収及び精製し、その後、ライゲーション反応した。目的の断片及びベクターのモル比が1:3~1:10であるという原則に従って、ライゲーション反応を、16℃で16時間実施した。ライゲーション反応系を、以下のように設計した:

【0056】

【表1】

目的のDNA断片	15μl
PET-28aベクター	3μl
ライゲーション緩衝溶液 10×	2.5μl
ddH ₂ O	3.5μl
T4 リガーゼ	1μl
総体積	25μl

10

【0057】

1.1.1.3 E.coliのコンピテント細胞の調製(CaCl₂法)

-70℃グリセロールで保存したDH5α細菌から、少量の細菌を、画線接種するために取り、シングルコロニーのE.coli DH5αレシピエント株を取って、5mlのLB培地を含む栓付きチューブ中に接種し、37℃で10~12時間振盪(200rpm)しながら培養して、種菌液を得た。5mlの種菌液を、振盪(200rpm)下で培養するために、100mlの新鮮なLB培地中に接種した。培養培地のOD600が0.4~0.9であった場合、1.5mlの培養培地を、Eppendorfチューブ中に取り、氷上に10分間置き、次いで、4℃で4000rpmで10分間遠心分離し、上清を注意深く廃棄した。最初の2つの工程をもう一度反復して、細胞を収集した。300μlの氷冷0.1mol/L CaCl₂溶液を穏やかに添加して細胞を再懸濁し、氷上に30分間置き、4℃で4000rpmで10分間遠心分離し、上清を廃棄し、沈殿物中に100μlの氷冷0.1mol/L CaCl₂溶液を穏やかに添加して細胞を懸濁し、コンピテント細胞を得た。後の使用のためにコンピテント細胞を貯蔵する必要がある場合、予め冷却した30μlの50%グリセロール及び70μlの0.1mol/L CaCl₂溶液(15%グリセロールの最終濃度)が、細胞を再懸濁するために必要であり、それを後の使用のために-70℃で保存した(6カ月間の貯蔵のために利用可能)。

20

30

【0058】

1.1.1.4 ライゲーション産物を、E.coliコンピテント細胞中に形質転換した。

コンピテント細胞懸濁物を、-70℃の冷蔵庫から取り、室温で解凍し、解凍した後、即座に氷上に置いた。ライゲーション反応溶液(50ng以下を含み、体積は10μlを超えない)をそこに添加し、軽く攪拌することによって均一に混合した。この混合物を、氷上に30分間置き、熱ショックのために90秒間42℃の水浴中に置き、次いで、氷上に迅速に置いて5分間冷却し、次いで、800μlのLB液体培地をチューブに添加し、混合し、37℃で150rpmの振盪培養で1.5時間培養した。生成物を、カナマイシン(Kan)を含むスクリーニングプレート上に広げ、37℃で一晩培養した。

40

【0059】

1.1.1.5 融合タンパク質コロニーの構築及びスクリーニング:

単一の形質転換されたDH5αコロニーを取って、その中のプラスミドを抽出した。二重消化後の断片は、2067bpのサイズを示し(図5を参照のこと)、これは、設計のサイズと一致しており、組換えプラスミドの構築の成功が確認された。

【0060】

1.1.1.6 融合タンパク質操作株の構築及びスクリーニング:

コンピテント細菌E.coli BL21-DE3形質転換の調製のための方法、及び組換え細菌のプラスミド抽出は、クローニングのための細菌の構築及びスクリーニングにおけるものと同じであった。

50

【0061】

Kanを含むスクリーニングプレートから、単一コロニーを取り、5mlのLBを含む試験チューブに添加し、37℃で150rpmの振盪で4時間培養した。次いで、1mMのIPTGを、誘導のために添加し、発現結果を図6に示す。

【0062】

1.1.2 組換え操作細菌PET-28a-CTB-UreB/BL21(DE3)の発酵

1.1.2.1 種菌活性化

種菌活性化は、LB(トリプトン10g/L;酵母抽出物5g/L;NaCl 10g/L)培地を使用し、その体積は50mLであった。20分間にわたる121℃の無菌化の後、培地を冷却し、Kan(50mg/L)及び作用種菌用ロット細菌(各50μl)を添加した。生成物を、37℃±1℃で15～16時間インキュベートした。

10

【0063】

1.1.2.2 種菌の調製

3mlの種菌液を培地に添加する前に、培地を、121℃で20分間無菌化した。これらの種菌を、2YT培地(トリプトン(tryptone)16g/L、酵母抽出物10g/L、NaCl 5g/L)で3Lの体積に配合した。生成物を、37±1℃で4～6時間培養した。

【0064】

1.1.2.3 発酵槽を用いた発酵

1.1.2.3.1 基本培地

【0065】

20

【表2】

トリプトン	500g
酵母抽出物(Yeast extract)	250g
(NH ₄) ₂ SO ₄	75 g
グリセロール	250g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	50g
KH ₂ PO ₄	100g
K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	200g
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	350g

30

【0066】

上記基本培地を精製水で溶解した後、生成物に精製水を添加して50Lにした。

【0067】

1.1.2.3.2 供給補充物

【0068】

【表3】

グリセロール	2400g
トリプトン	600g
酵母抽出物	600g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	24g

40

【0069】

供給補充物を、上記供給配合物に従って配合した。精製水で溶解した後、生成物に精製水を添加して4Lにし、使用前に、121℃で20分間無菌化した。

【0070】

1.1.2.3.3 アルカリの補充

1Lの4M水酸化ナトリウムを、そこで調製した。

【0071】

1.1.2.3.4 IPTG溶液

5.0gのIPTGを、無菌精製水で溶解し、0.22μmの膜濾過後、生成物を、後の使用のため

50

に、24時間の貯蔵期間で、2～8℃の冷蔵庫に入れた。

【0072】

1.1.2.3.5 培養パラメーター

発酵槽における培養パラメーターを、以下のように設定する：

【0073】

【表4】

培養温度	37℃
攪拌速度	200rpm
アルカリ制御	pH7.0
ロタメーター	3m ³ /h
容器圧力	0.03-0.05 Mpa
溶存酸素	溶存酸素濃度が 30%未満である場合、攪拌速度を増加させ、純粋酸素の割合を増加させることによって、溶存酸素濃度を 30%以上に維持する。

10

【0074】

【表5】

供給補充物		
OD ₆₀₀	炭素供給の速度(ml/L*h)	窒素供給の速度(ml/L*h)
4-5	5	5
9-11	10	10
20-25	12	12

20

【0075】

培養物のOD₆₀₀が20と30との間である場合、IPTG溶液を添加し、培養を3時間継続し、次いで、生成物を発酵槽から取り出した。

【0076】

1.1.2.3.4 遠心分離

培養の最後に、発酵ブロス、予め冷却した貯蔵タンクに移した。発酵ブロスを15℃未満に冷却した後、細胞を、チューブ型遠心機を用いた遠心分離によって収集した。

30

【0077】

1.1.3 CTB-UreB/4CTBの調製

1.1.3.1 CTB-UreBの調製

(1)封入体の調製

細菌培養の最後に、発酵ブロスを、予め冷却した貯蔵タンクに移した。発酵ブロスを15℃未満に冷却した後、細胞を、チューブ型遠心機を用いた遠心分離によって収集した。

【0078】

これらの細胞を、1:10(W/V)の比率で、50mM Tris-HCl、0.5% Triton X-100、150mM NaCl、1mM EDTA、pH8.0の緩衝液で再懸濁した。4℃で予め冷却した後、懸濁物を、900バールの高圧下で3回ホモジナイズして、細菌を破壊した。14000gで20分間の遠心分離後、沈殿物を収集した。

40

【0079】

収集した封入体沈殿物を、それぞれ、50mM Tris-HCl、0.5% Triton X-100、2M尿素、1mM EDTA及びpH8.0を含む緩衝液で1:10(W/V)の比率で3回洗浄し、50mM Tris-HCl、5mM DTT、pH8.0を含む緩衝液で1回洗浄した。洗浄条件：室温で30分間の攪拌、20分間の6000gでの遠心分離。

【0080】

(2)CTB-UreBタンパク質の変性

これらの封入体を、50mM Tris-HCl、8M尿素、10mM DTT、10%グリセロール、pH8.0を含

50

む封入体溶解溶液で溶解し、4℃で一晩攪拌し、12000rpmで30分間遠心分離し、次いで、上清を使用のために収集した。

【0081】

(3)CTB-UreBタンパク質の精製

精製されたCTB-UreBは、DEAE及びSPHPクロマトグラフィーの後に得られた。

【0082】

DEAEカラム精製

平衡化緩衝液:20mM Tris-HCl、8M尿素、10mM DTT、10%グリセロール、pH8.0

溶出緩衝液:20mM Tris-HCl、8M尿素、250mM NaCl、10mM DTT、10%グリセロール、pH8.0

【0083】

SPHP精製

平衡化緩衝液:20mM PB+8M尿素+5mM DTT+10%グリセロール、pH7.2

洗浄緩衝液:20mM PB、8M尿素、30mM NaCl、5mM DTT、10%グリセロール、pH7.2、3.7ms/m未満の伝導率

溶出緩衝液:20mM PB、8M尿素、0.3M NaCl、5mM DTT、10%グリセロール、pH7.2

不純物洗浄緩衝液:20mM PB、8M尿素、1M NaCl、5mM DTT、10%グリセロール、pH7.2

【0084】

CTB-UreBの精製についての電気泳動の写真を、図8に示す。

【0085】

1.1.3.2. CTB-UreB/4CTBの調製

CTBバルク物質を、50mM Tris-HCl、8M尿素、pH8.0を含む希釈緩衝液で希釈し、次いで、そのpHをpH3.~4.0に調整した。生成物を、室温で1時間インキュベートし、次いで、pHをpH8.0に調整した。生成物を、4℃で待ち状態に保った。

【0086】

2つのタンパク質、CTB-UreB及びCTB単量体を、1:4のモル比で混合し、次いで、最終再折り畳み溶液(50mM Tris-HCl pH8.0+10%グリセロール+150mM NaCl)で5倍体積に希釈した。DTTの濃度を、0.2~1.0mMの範囲で制御し、尿素の濃度を、1.0M~2.5Mの範囲で制御した。生成物を、室温で一晩静置させた。

【0087】

上記溶液を、キレート化FF及びQHPを介して精製し、精製されたCTB-UreB/4CTBを得た。

【0088】

キレート化FF

平衡化緩衝液:20mM Tris-HCl+5%グリセロール+20mMイミダゾール、pH8.0、

溶出緩衝液:20mM Tris-HCl+5%グリセロール+目的のタンパク質の溶出のための200~300mMイミダゾール、完全ピークを収集した;

不純物洗浄緩衝液:20mM Tris-HCl+5%グリセロール+500mMイミダゾール、pH8.0

【0089】

QHP精製

緩衝液A:20mM Tris-HCl+5%グリセロール、pH7.5

緩衝液B:20mM Tris-HCl+5%グリセロール+0.3M NaCl、pH7.5

目的のタンパク質の溶出のための、0~100% B 10CV。

【0090】

CTB-UreB/4CTBの精製についての電気泳動の結果を、図9Aに示す。

【0091】

1.1.3.3. 安定性に関する研究

精製されたCTB-UreB/4CTBキメラ抗原バルク物質の各サンプルにおけるpHを、塩酸を用いて異なる値に調整した。室温で1時間静置した後、サンプルを、SDS-PAGE電気泳動のために取った。電気泳動結果を図9Bに示し、図中、種々のレーンのサンプルは、以下の通りである:M:予め染色されたFermentas社タンパク質;レーン1~7は、それぞれ、pH9.0、8.0、7.0、6.0、5.0、4.0、3.0の条件下での処理後のサンプルである。

【0092】

pHの減少により、キメラの位置にあるタンパク質の濃度が、電気泳動ディスプレイにおいて次第に低減し、このキメラより小さい分子量を有するいくつかのタンパク質バンドが出現したことが、図9Bの結果から分かるが、これは、より小さい分子量の分解産物の生成を示唆する。しかし、pH7.0より高い、とりわけpH8.0のpHにおけるキメラタンパク質は、安定であり、キメラタンパク質の分子量よりも小さい分子量のタンパク質バンドは出現しなかった。これは、CTB-UreB/4CTB抗原キメラが、中性～僅かにアルカリの環境において安定であり、酸性環境下では、容易に解離されることを示している。具体的には、pH>7.0、好ましくはpH8.0の場合、これは、比較的安定である。

【0093】

10

1.2 CTB-CagA/4CTBの調製

1.2.1 組換え操作細菌PET-28a-CTB-CagA/BL21-DE3の構築

CTB-CagAを、UreB遺伝子の代わりにCagA遺伝子を使用したことを除いて、実施例1と同じ手順の使用によって調製した。二重消化した後の、構築された操作株プラスミドの断片のサイズは、1266bpであり(図5を参照のこと)、融合タンパク質の発現は図7に示される。

【0094】

リンカーが下線且つイタリックで示される、遺伝子配列配列番号2:

ATGACACCTCAAAATATTACTGATTTGTGTGCAGAATACCACAACACACA	50	
AATACATACGCTAAATGATAAGATATTTTCGTATACAGAATCTCTAGCTG	100	
GAAAAAGAGAGATGGCTATCATTACTTTTAAAGATGGTGCAACTTTTCAA	150	
GTAGAAGTACCAGGTAGTCAACATATAGATTACAAAAAAGCGATTGA	200	
AAGGATGAAGGATACCCTGAGGATTGCATATCTTACTGAAGCTAAAGTCG	250	
AAAAGTTATGTGTATGGAATAATAAACGCCTCATGCGATTGCCGCAATT	300	
AGTATGGCAAATGGTGGTGGTGGTCTGGTGGTGGTGGTCTGGTGGTGG	350	
<u><i>TTGGTCT</i></u> ATGAAATTATTTGGAAATTCCAATAACAATAATAATGGACTCA	400	
AAAACGAACCCATTTACGCTCAAGTTAATAAAAAGAAAGCAGGACAAGCA	450	
ACTAGCCCTGAAGAGCCCATTTACGCTCAAGTTGCTAAAAAGGTGAGTGC	500	
AAAAATTGACCAACTCAACGAAGCTACATCAGCAATAAATAGAAAAATTG	550	
ACCGGATTAACAAAATTGCATCAGCAGGTAAAGGAGTGGGCGGTTTCAGT	600	
GGAGCAGGGCGAICAGCTAGTCCCTGAACCCATTACGCTACAAATGATTT	650	
TGATGAGGCAAATCAAGCAGGCTTCCCTCTTAGGAGAAGCACTGCAGTTA	700	
ATGATCTCAGTAAAGTAGGGCTTTCAAGGGAACAAGAATTGACTCGTAGA	750	
ATTGGCGATCTCAATCAGGCAGTGTGAGAAGCTAAAAACAGGTCATTTTGA	800	
CAAACTAGAACAAAAGATGGATGAAGCTCAAAGATTCTACAAAAAAGAATG	850	
CTTTGAAGCTATGGGCTGAAAGCACGAAACAAGTGCCTACTGGTTTGCAG	900	
GCGAAATTGGACAATTACGCTACTAACAGCCACACACGCATTAACAGTAA	950	
TGTCCAAAATGGAGCAGTCAATGAGAAAGTGACCGGTATGCTAACGCAAA	1000	
AAAACCCTGAGTGGCTCAAGCTCGTGAATGATAAGATAGTTGCACATAAT	1050	
GTGGGAAGCGCTCATTTGTGAGAGTATGATAAAATTGGATTCAACCAAAA	1100	
GAATATGAAAGATTATTCTGATTCTGTTCAAGTTTTCCACCAAGTTGAACA	1150	
ATGCCGTAAAAGACATTAAGTCTAGCTTTGTGCAATTTTAAACCAATACA	1200	
TTTTCTACAGGATCTTACAGCTTGATGAAAGCAAATGCGGAACATGGAGT	1250	
CAAAAATACTACAAAATAA	1269	

20

30

40

【0095】

1.2.2 組換え操作細菌PET-28a-CTB-CagA/BL21(DE3)の発酵

組換え操作細菌PET-28a-CTB-CagA/BL21(DE3)を、実施例1と同じように発酵させた。

【0096】

50

1.2.3 CTB-CagA/4CTBの調製

1.2.3.1 CTB-CagAの調製

(1)CTB-CagA封入体を、実施例1と同じ方法で抽出した。

【0097】

(2)封入体を、1:20(W/V)の比率で封入体溶解溶液と混合し、4℃で3時間攪拌し、一晚静置し、上清を、30分間の12000rpmでの遠心分離によって収集した。

【0098】

(3)Q FFカラム精製

緩衝液A:20mM Tris-HCl+8M尿素+5mM DTT+5%グリセロール、pH7.5

緩衝液B:20mM Tris-HCl、8M尿素、1.0M NaCl、5mM DTT、5%グリセロール、pH7.5

カラムを、緩衝液Aで平衡及びリンスし、緩衝液Bで溶出した。

【0099】

(4)SP Bigビーズ精製

緩衝液A:20mM Tris-HCl、8M尿素、5mM DTT、5%グリセロール、pH7.5

緩衝液B:20mM Tris-HCl、8M尿素、150mM NaCl、5mM DTT、5%グリセロール、pH7.5

カラムを、緩衝液Aで平衡及びリンスし、緩衝液Bで溶出した。

【0100】

CTB-CagA精製についての電気泳動写真を、図10に示す。

【0101】

1.2.3.2 CTB-CagA/4CTBの調製

CTBバルク物質を、50mM Tris-HCl、8M尿素、pH8.0を含む希釈緩衝液で希釈し、次いで、そのpHをpH3.~4.0に調整した。生成物を、室温で1時間インキュベートし、次いで、pHをpH8.0に調整した。生成物を、4℃で待ち状態に保った。

【0102】

2つのタンパク質、CTB-CagA及びCTB単量体を、1:4のモル比で混合し、次いで、最終再折り畳み溶液(50mM Tris-HCl pH8.0+10%グリセロール+150mM NaCl)で5倍体積に希釈した。DTTの濃度を、0.2~1.0mMの範囲で制御し、尿素の濃度を、1.0M~2.5Mの範囲で制御した。生成物を、室温で一晩静置させた。

【0103】

上記溶液を、キレート化FF及びSP HPを介して精製し、精製されたCTB-CagA/4CTBを得た。

【0104】

キレート化FFカラム精製

緩衝液A:20mM Tris-HCl+5%グリセロール+20mMイミダゾール、pH8.0

緩衝液B:20mM Tris-HCl+5%グリセロール+目的のタンパク質の溶出のための200mMイミダゾール

不純物を、100%緩衝液Bで洗浄した。

【0105】

SP HPカラム精製

緩衝液A:20mM Tris-HCl+5%グリセロール、pH7.5

緩衝液B:20mM Tris-HCl+5%グリセロール+0.3M NaCl、pH7.5

【0106】

CTB-CagA/4CTBキメラタンパク質の精製についての電気泳動写真を、図11Aに示す。

【0107】

1.2.3.3 安定性に関する研究

精製されたCTB-CagA/4CTBキメラ抗原バルク物質のサンプルにおけるpHを、塩酸を用いて希釈することによって異なる値に調整した。室温で1時間静置した後、サンプルを、SDS-PAGE電気泳動のために取った。電気泳動結果を図11Bに示し、図中、種々のレーンのサンプルは、以下の通りである:M:予め染色されたFermentas社タンパク質;レーン1~7は、それぞれ、pH9.0、8.0、7.0、6.0、5.0、4.0、3.0の条件下での処理後のサンプルである。

【0108】

pHの減少により、キメラの位置にあるタンパク質の濃度は、電気泳動ディスプレイにおいて次第に低減し、このキメラより小さい分子量を有するいくつかのタンパク質バンドが出現したことが、図11Bの結果から分かるが、これは、より小さい分子量の分解産物の生成を示唆する。しかし、pH7.0より高い、とりわけpH8.0のpHにおけるキメラタンパク質は、安定であり、キメラタンパク質の分子量よりも小さい分子量のタンパク質バンドは出現しなかった。これは、CTB-CagA/4CTB抗原キメラが、中性～僅かにアルカリの環境において安定であり、酸性環境下では、容易に解離されることを示している。具体的には、pH>7.0、好ましくはpH8.0の場合、これは、比較的安定である。

【0109】

10

1.3 CTB-NAP/4CTBの調製

1.3.1 組換え操作細菌PET-28a-CTB-NAP/BL21-DE3の構築

CTB-NAPを、UreB遺伝子の代わりにNAP遺伝子を使用したことを除いて、実施例1と同じ手順の使用によって調製した。二重消化した後の、構築された操作株プラスミドの断片のサイズは、789bpであり(図5を参照のこと)、融合タンパク質の発現は図7に示される。

【0110】

リンカーが下線且つイタリックで示される、遺伝子配列配列番号3:

ATGACACCTCAAAATATTACTGATTTGTGTGCAGAATACCACAACACACA	50	
AATACATACGCTAAATGATAAGATATTTTCGTATACAGAATCTCTAGCTG	100	20
GAAAAAGAGAGATGGCTATCATTACTTTTAAAGAATGGTGCAACTTTTCAA	150	
GTAGAAGTACCAGGTAGTCAACATATAGATTACAAAAAAAAGCGATTGA	200	
AAGGATGAAGGATACCCTGAGGATTGCATATCTTACTGAAGCTAAAGTCG	250	
AAAAGTTATGTGTATGGAATAATAAAACGCCTCATGCGATTGCCGCAATT	300	
AGTATGGCAAATGGTGGTGGTGGTCTGGTGGTGGTGGTCTGGTGGTGG	350	
<u>TGGTCT</u> ATGAAAACATTTGAAATTTTAAAAACATTTGCAAGCGGATGCGA	400	
TCGTGTTGTTTATGAAAGTGCATAACTTCCATTGGAATGTGAAAGGCACG	450	
GATTTTTTTAATGTACATAAAGCTACTGAAGAAATTTATGAAGAGTTTGC	500	30
GGACATGTTTGATGATCTCGCTGAAAGGATCGTTCAATTAGGACACCACC	550	
CCTTAGTCACTTTATCCGAAGCGATCAAACCTCACTCGTGTTAAAGAAGAA	600	
ACTAAAACGAGCTTCCACTCTAAAGACATTTTTTAAAGAAATTCTAGAGGA	650	
CTATAAACACCTAGAAAAAGAATTTAAAGAGCTCTCTAACACCGCTGAAA	700	
AAGAAGGCGATAAAGTCACCGTAACCTTATGCGGATGATCAATTGGCCAAG	750	
TTGCAAAAATCCATTTGGATGCTGCAAGCCCATTAGCTTAA	792	

【0111】

1.3.2 組換え操作細菌PET-28a-CTB-NAP/BL21(DE3)の発酵

40

組換え操作細菌PET-28a-CTB-NAP/BL21(DE3)を、実施例1と同じように発酵させた。

【0112】

1.3.3 CTB-NAP/4CTBの調製

1.3.3.1 CTB-NAPの調製

(1)CTB-NAP封入体を、実施例1と同じ方法で抽出した。

【0113】

(2)CTB-NAP封入体を、20mM Tris-HCl、8M尿素を含むpH8.0緩衝液で溶解し、一晚インキュベートし、次いで、上清を、30分間の12000rpmでの遠心分離によって収集した。

【0114】

(3)QFFクロマトグラフィー:

50

緩衝液A:20mM Tris-HCl+5%グリセロール、pH7.5

緩衝液B:20mM Tris-HCl+5%グリセロール+0.3M NaCl、pH7.5

カラムを、緩衝液Aで平衡及びリンスし、緩衝液Bで溶出した。CTB-NAP融合タンパク質の精製についての電気泳動の写真を、図12に示す。

【0115】

1.3.3.2 CTB-NAP/4CTBの調製

(1)CTB-NAPの処理:CTB-NAPサンプルを、20mM Tris-HCl、8M尿素を含むpH8.0緩衝液で希釈し、次いで、そのpHをpH8.0に調整した。次いで、メルカプトエタノールを添加して、3mMの最終濃度にした。

【0116】

(2)CTBの処理:CTBバルク物質を、20mM Tris-HCl、8M尿素を含むpH8.0希釈緩衝液で希釈し、次いで、そのpHをpH3.5～3.7に調整した。生成物を、室温で1時間インキュベートし、次いで、pHをpH8.0に調整した。メルカプトエタノールを添加して、3mMの最終濃度にした。

【0117】

(3)再生:

2つの処理されたタンパク質CTB-NAP及びCTB単量体を、1:4のモル比で混合し、次いで、50mM Tris-HCl、5%グリセロール、0.03mM GSSGのpH8.0緩衝液で、1:6の比率で希釈した。メルカプトエタノールの濃度を、0.2～1.0mMの範囲で制御し、尿素の濃度を、1.0M～2.5Mの範囲で制御した。生成物を、21℃で一晩静置させた。

【0118】

(4)NI FF精製:

緩衝液A:50mM Tris-HCl+5%グリセロール+20mMイミダゾール、pH8.0

緩衝液B:50mM Tris-HCl+5%グリセロール+300mMイミダゾール、pH8.0

イミダゾールを再生のためにサンプルに添加して、20mMの最終濃度にした。サンプルを、NI FFカラム上に添加し、流速は8ml/分であり、カラムを、緩衝液Aでリンスし、緩衝液Bで溶出した。

【0119】

(5)QHP精製

緩衝液A:50mM Tris-HCl+5%グリセロール、

緩衝液B:50mM Tris-HCl+5%グリセロール+1M NaCl、pH8.0

NI FFカラムの溶出されたサンプル(4と5との間の伝導率を有する)を、3ml/分の流速で、QHPカラム上に添加した。次いで、カラムを、緩衝液Aで平衡及びリンスし、1ml/分の流速で、30%の緩衝液Bで溶出した。

【0120】

CTB-NAP/4CTBキメラタンパク質の精製についての電気泳動写真を、図13に示す。

【0121】

2. マウスに対する組換えH.Pylori(rHP)ワクチンの免疫原性に関する研究

2.1 キメラタンパク質CTB-UreB/4CTBの免疫原性に関する研究

2.1.1 BALB/cマウスのための免疫化方法

2.1.1.1 試験系:8～10週齢、体重18～20g、SPFグレードの雌性BALB/cマウス。

【0122】

2.1.1.2 試験物品:UreB、CTB-UreB融合タンパク質、CTB-UreB/4CTBキメラタンパク質を、それぞれ、Tris-HCl緩衝液(pH8.0)で希釈した。UreBタンパク質免疫化のための用量は、20 µg/マウスであり、CTB-UreB融合タンパク質及びCTB-UreB/4CTBキメラタンパク質を、UreBタンパク質群におけるUreBと等モル濃度の量で投与する。制酸薬を、PBSで50mg/mlに希釈した。

【0123】

2.1.1.3 4つの群を、この研究において配置した:UreB群、CTB-UreB群、CTB-UreB/4CTB群及び生理食塩水群(又はブランク対照群(CON、対照)と命名した)。

【0124】

2.1.1.4 マウスのための免疫化プログラム:マウスを、それらの間に各々7日間の間隔を設けて、合計4回免疫化した。各動物に、経管栄養法により、0.2mlの実験医薬を経口投与した。投与の10分前に、0.2mlの制酸薬を投与した。全ての動物は、投与前12時間、水以外絶食した。水及び食物を、投与の1時間後に再度給餌した。

【0125】

2.1.1.5 サンプルの収集及び試験:

マウスの各群の血液を、血清IgG及びIgA抗体レベルの測定のために、免疫化の1日前、及び最初の免疫化の2週間、4週間、6週間、8週間、10週間後に収集した。最後の収集を眼球を介して得たことを除いて、血液の他の収集は、マウスの尾から得た。全ての血液サンプルを、4℃で一晩置き、次の日、全てのサンプルを4℃で5000rpmで15分間遠心分離し、血清の上清を取り、-20℃で保存した。

【0126】

全ての動物を、最初の免疫化の10週間後の眼球を介した血液収集後に屠殺した。開腹手術後、回盲部の末端近傍の10cmの回腸を切り取り、PBSで3回洗浄し、腸粘膜を、無菌ブレードでこすり取って、1mlの0.01mol/L PBS緩衝液(50mmol/L EDTA、20nmol/Lプロテアーゼ阻害剤ロイペプチン及びペプスタチンを含む、pH7.4)中に溶解した。生成物を、10000rpmで10分間遠心分離し、上清を取り、20µlの100mmol/L PMSF(Sigma社)をその中に添加した。血清IgG抗体及び腸粘膜sIgA抗体のレベルを、ELISAで測定した。96ウェルマイクロタイタープレートにおいて、各ウェルに、100µl UreB抗原(1.25µg/ml)を添加し、4℃で一晩コーティングした。ウェル中の溶液を、次の日に廃棄し、ウェルを、PBSTで3回洗浄した;各ウェルに、ブロッキング溶液200µl(2%BSAを含む)を添加し、37℃で2時間ブロッキングし、PBSTで3回洗浄した;100µl血清(1:300希釈)を各ウェルに添加し、ウェルを、37℃で1時間の反応後にPBSTで3回洗浄し、各ウェルに、100µl HRP標識ヤギ抗マウスIgG(1:2000~1:50000)/HRP標識ヤギ抗マウスIgA(1:4000~1:8000)を添加し、37℃で1時間接種し、次いで、PBSTで6回洗浄した;新たに調製した基質溶液を、1ウェル当たり100µl、即座に添加し、室温で15分間反応させ、停止溶液50µlをその中に添加した;各ウェルの吸光度OD450値を、マイクロプレート検出器で測定した。

【0127】

2.1.2 結果

HPワクチン経口免疫化後のBALB/Cマウスの血清IgG及び腸粘膜抗体sIgA応答を、図14及び図15に示した。対照群及びUreBタンパク質群中のマウスの抗体レベルは、投与後に増加しなかったが、対照的に、CTB-UreB融合タンパク質群及びCTB-UreB/4CTBキメラタンパク質群中のマウスの血清IgG抗体レベルは、最初の免疫化の4週間後に有意に増加し、8週間でピークに達し、比較により、両方の群について、対照群と比較して、有意差(P<0.001)が存在したことが示された;これら2つの群についてのsIgA腸粘膜抗体のレベルは、明らかに増加し、対照群との比較により、有意差が示された(P<0.001)。ここで、融合タンパク質CTB-UreB群のマウスにおける抗UreB抗体について、セロコンバージョン率は60%であった;CTB-UreB/4CTBキメラタンパク質群のマウスにおける抗UreB抗体について、セロコンバージョン率は95%であり、これは、CTB-UreB/4CTBキメラタンパク質ワクチンが、有意な免疫応答を誘導できることを示している。

【0128】

2.1.3 結論

組換えCTB-UreB融合タンパク質及びCTB-UreB/4CTBキメラタンパク質の経口投与は、身体を刺激して、UreB抗原に対する特異的抗体を産生させることができる。しかし、CTB-UreB/4CTBキメラタンパク質によって引き起こされた免疫応答は、CTB-UreB融合タンパク質によって引き起こされた免疫応答よりも有意に良好であり、これは、CTB-UreB/4CTBキメラタンパク質が、より良好な免疫応答及び免疫原性を有し、従って、H.pyloriの予防ワクチンのための候補として使用され得ることを示している。

【0129】

2.2 CTB-CagA/4CTBキメラタンパク質の免疫原性

2.2.1 BALB/cマウスのための免疫化方法

この免疫化方法は、セクション2.1.1に記載した方法と同じであった。ここで、CagAタンパク質、CTB-CagA融合タンパク質、CTB-CagA/4CTBキメラタンパク質を、それぞれ、Tris-HCl緩衝液(pH8.0)で希釈した。CagAタンパク質免疫化のための用量は、200 µg/マウスであり、CTB-CagA融合タンパク質及びCTB-CagA/4CTBキメラタンパク質を、CagAタンパク質群におけるCagAと等モル濃度の量で、0.2ml/マウスの体積で投与する。ELISAにおいて、ウェルを、CagA抗原でコーティングした。血清IgG及び腸粘膜sIgA抗体の応答を、図16及び図17に示した。

【0130】

10

2.2.2 結論

組換えCTB-CagA/4CTBキメラタンパク質の経口投与は、身体を刺激して、特異的抗CagA抗原抗体を産生させることができる。これらの結果は、CTB-CagA/4CTBキメラタンパク質が、より良好な免疫応答及び免疫原性を有し、従って、*Helicobacter pylori*の予防のためのワクチン候補として使用され得ることを示している。

【0131】

2.3 CTB-NAP/4CTBキメラタンパク質の免疫原性

2.3.1 BALB/cマウスのための免疫化方法

この免疫化方法は、セクション2.1.1に記載した方法と同じであった。ここで、試験物品NAPタンパク質、CTB-NAP融合タンパク質、CTB-NAP 4CTBキメラタンパク質を、それぞれ、Tris-HCl緩衝液(pH8.0)で希釈した。NAPタンパク質免疫化のための用量は、200 µg/マウスであり、CTB-NAP融合タンパク質及びCTB-NAP/4CTBキメラタンパク質を、NAPタンパク質群におけるNAPと等モル濃度の量で投与し、その体積は、0.2ml/マウスであった。ELISAにおいて、ウェルを、NAP抗原でブロッキングした。

20

【0132】

2.3.2 結果

HPワクチンによって免疫化した後の、BALB/cマウスにおける血清IgG及び腸粘膜sIgA抗体の応答を、図18及び図19に示した。

【0133】

2.3.3 結論

30

組換えCTB-NAP/4CTBキメラタンパク質の経口投与は、身体を刺激して、特異的抗NAP抗原抗体を産生させることができる。これらの結果は、CTB-NAP/4CTBキメラタンパク質が、より良好な免疫応答及び免疫原性を有し、従って、*Helicobacter pylori*の予防のためのワクチン候補として使用され得ることを示している。

【0134】

3. BALB/cマウスにおけるH.pylori SS1株感染に対する組換えH.pyloriワクチンの免疫防御

3.1 試験方法

3.1.1 この免疫化方法は、セクション2.1.1の方法と同じであった。

【0135】

40

3.1.2 HP SS1細菌負荷:

最後の免疫化の2週間後、試験群及び陰性対照群の動物に、経管栄養法により、連続する3日間にわたって、1日1回、0.2ml (1×10^9 CFU/ml)のHP SS1細菌を経口投与した。0.2mlの制酸薬を、HP SS1細菌の投与の10分前に、経管栄養法により経口投与した。

【0136】

3.1.3 サンプルの収集及び試験

血清及び腸粘膜についてのサンプルの収集及び試験方法は、セクション2.1.1.5の方法と同じであった。

【0137】

全ての動物を、HPSS1細菌で負荷した4週間後に屠殺し、その胃を、開腹手術後に取り出

50

し、縦軸に沿って胃組織を3つの区画に分割し、各区画は、胃底部、胃体部及び幽門洞の3つの部分を含む。1つの区画を使用して、その中の細菌の定量培養を実施した:幽門洞組織を、無菌ピンセットで掴み、その粘膜下表面を使用して、選択的HP培養プレートに37℃でコーティングし、次いで、このプレートを、約1日間にわたって微好気性条件下で培養した。透明で平滑な小さい針様のコロニーが見られた場合、これを、陽性サンプルとみなした。

【0138】

第2の区画を、96ウェルプレートにおける迅速ウレアーゼ試験のために使用した:ウレアーゼ試験溶液を、ラット胃組織を含む96ウェルプレートの各ウェルに添加し、各ウェルを100 μ lに定量し、室温で0.5時間にわたって密封して静置した。試験の色が黄色から赤に変化した場合、これを、陽性サンプルとみなす、即ち、このサンプルは、Hp感染を有した。

10

【0139】

第3の区画を、4%パラホルムアルデヒドで固定し、パラフィン包埋し、スライスし、HE染色し、Giemsa染色し、HP SSI細菌コロニー形成及び炎症性組織を、顕微鏡で観察した。

【0140】

3.2 結果

3.2.1 免疫化/負荷後のマウスにおける毒性効果及び有害効果の観察

マウスの各群は、良好な精神状態にあり、気力低下、下痢及び他の有害効果は見られなかった。

20

【0141】

3.2.2 血清/腸粘膜IgG/sIgA抗体結果

ブランク対照群、UreBタンパク質群及びUreB+CTB群のマウスの抗体は、投与後に増加しなかったが、CTB-UreB融合タンパク質群のマウス及びCTB-UreB/4CTBキメラタンパク質群のマウスでは、血清IgG抗体及び腸粘膜抗体sIgAは、最初の当該投与の9.5週間後に有意に増加し、ブランク対照群との比較で有意差が示された。これらの結果を、図20及び図21に示す。

【0142】

3.2.3 組織スメア及びウレアーゼの迅速検出

マウスの各群を、負荷の4週間後に、迅速ウレアーゼ試験及び組織スメアで試験し、その結果は以下を示した:モデル群の8匹全ての動物に、HPSS1を感染させたところ、ウレアーゼ試験及び組織スメアの両方が、陽性結果を示した;ブランク対照群(HPSS負荷を与えていない)の全ての動物について、ウレアーゼ試験及び組織スメアは、陰性結果を示した;UreB群中の7匹の動物が、ウレアーゼ試験及び組織スメア試験の陽性結果を示した;CTB-UreB群中の5匹の動物が、ウレアーゼ陽性結果を示し、ここで、4匹の動物のスメア結果は、陽性である;CTB-UreB/4CTB群中の1匹の動物だけが、ウレアーゼ試験について陽性結果を示し、CTB-UreB/4CTB群中の全ての動物が、陰性スメア結果を示した。これらの結果を、Table 1(表6)に示す。

30

【0143】

【表 6】

Table 1:本発明の実施形態に従う rHP ワクチンを経口投与し、その後 HPSS1 を負荷したマウスの試験結果

群	動物の数(n)	HP 試験の陽性率(%)			防御率(%)
		迅速ウレアーゼ試験	組織スメア	組織切片	
UreB	8	87.5(7/8)	87.5(7/8)	87.5(7/8)	12.5
CTB-UreB	8	62.5(5/8)	50(4/8)	62.5(5/8)	37.5
CTB-UreB/4CTB	8	12.5(1/8)	0(0/8)	12.5(1/8)	87.5
モデル対照 (陽性対照)	8	100(8/8)	100(8/8)	100(8/8)	0
ブランク対照 (陰性対照)	8	0(0/8)	0(0/8)	0(0/8)	-

【0144】

3.2.4 病理組織学染色の結果

対照群のマウスは、その胃小窩において、多くの球状*H. pylori*コロニー形成を示し、胃粘膜固有層の中央の深部における多数のマクロファージ及び好中球浸潤を示した。CTB-UreB融合タンパク質群のマウスは、胃小窩における少量の*Helicobacter pylori*コロニー形成、胃粘膜固有層の深部における中程度のマクロファージ及び好中球浸潤並びに軽度の炎症を示した；CTB-UreB/4CTBキメラタンパク質群のマウスは、胃小窩における非常に少量の*Helicobacter pylori*コロニー形成を示し、その組織切片上ではマクロファージ及び好中球浸潤は示されなかった(図22を参照のこと)。

【0145】

3.3 結論

実験を通じて、CTB-UreB/4CTBキメラタンパク質の免疫化を受けているマウスは、有害効果を示さず、病理学的検査は、免疫化したマウスが、胃における有意な炎症性変化を有していないことを示し、これは、抗原成分としてCTB-UreB/4CTBキメラタンパク質を含むHPワクチンが、試験用量での免疫化に使用される場合、良好な安全性を有していることを示した。

【0146】

経口免疫化によるCTB-UreB/4CTBキメラタンパク質は、有効な免疫応答を誘導でき、HPSSI細菌負荷で負荷したマウスに対する良好な防御効果を有する。従って、これは、抗HP感染経口ワクチンとして良好な見込みを有する。

【0147】

検出の実施例の上記結果は、組換えCTB-UreB融合タンパク質及びCTB-UreB/4CTBキメラタンパク質の経口投与が、身体を刺激して、UreB抗原に対する特異的抗体を産生させることを示した；ここで、CTB-UreB/4CTBキメラタンパク質で免疫化したマウスから得られた血清特異的IgG及び胃粘液s-IgA抗体の力価及びセロコンバージョン率は、CTB-UreB融合タンパク質のものよりも有意に高く、対照群と比較した場合に有意差が存在し、これは、上記抗原が、良好な免疫反応性及び抗原性を有し、HPの候補ワクチンとして使用され得ることを示している。

【0148】

これらの結果は、CTB-UreB/4CTBキメラタンパク質によって産生された抗体レベルが、UreBのみでの免疫化によって生じた抗体よりも有意に高かったことを示した。血清中の抗体及び分泌型抗体における両方の抗体について、CTB-UreB/4CTBキメラタンパク質が、抗体レベルにおける有意な増加を誘導したことが観察された。これは、本発明の抗原組成物が、元の抗原の免疫原性を有意に改善し、身体の免疫応答を増強し、より有効なワクチンの調製に寄与することを示している。Table 1(表6)及び図14における分泌型IgA試験の結果はまた、本発明の組換えタンパク質抗原を用いて構築されたキメラタンパク質が、腸粘

膜を透過し、粘膜を刺激して分泌型IgAを生成させるために、この抗原を支持することを示した。

【0149】

(比較例1)

本発明者らは、発現ベクターを構築して、UreB及びコレラ毒素のA₂サブユニット(CTA₂)等のH.pylori抗原の融合タンパク質を発現させ、この融合タンパク質を、in vitroで発現させたCTBタンパク質と結合させて、UreB-CTA₂-/5CTBのキメラタンパク質を形成することを試みた。

【0150】

先行技術によれば、CTA₂とCTBとの結合様式及びCTB自体の結合様式は、全て非共有結合であり、その結果、同じ方法は類似の収量を有するはずである。

【0151】

しかし、これらの結果は、UreB-CTA₂/5CTBキメラタンパク質アセンブリ効率<5%(図23Aを参照のこと)であるが、CTB-UreB/4CTBキメラタンパク質アセンブリ効率>90%(図23Bを参照のこと)であることを示しており、本発明のCTB-UreB/4CTBのアセンブリ効率は、UreB-CTA₂/5CTBのアセンブリ効率よりもかなり高い。CTB-UreB/4CTBキメラタンパク質は、そのアセンブリの低い効率に起因する、UreB-CTA₂/5CTBの産生規模拡大の可能性が低いという欠点を顕著に克服できる。

【0152】

(比較例2)

本発明者らは、所望の効果を有する天然に形成されたキメラ構造を得ることを希望して、CTB-抗原融合タンパク質及びCTBの同時発現のために、真核生物発現系の代表として酵母を使用することを試みた。本発明者らは、酵母系において発現させた場合、CTBは、5つの同一のCTB単量体から構成されるホモ五量体構造を正確に形成できたが、発現されたCTBの分子量(約65KD)は、天然状態の分子量(55KD)よりも有意に大きいことを見出し、これは、真核生物系において発現させた場合に、CTBグリコシル化が、翻訳後修飾として生じ得、発現されたCTBと天然CTB分子との間に大きな差異が存在し、それによって、GM1受容体との結合力に有害に影響することを示唆した。同時に、キメラをこのように調製した場合、抗原をCTBと融合させるためには、厳格なサイズ要求が存在する。更に、この様式で発現させた場合、融合タンパク質及びCTBの天然のアセンブリについての効率は低く、系全体の発現が非常に低い収量を有し、従って、ワクチンの大規模調製に適用可能でないという結果を生じる。

【0153】

(比較例3)

本発明者らは、キメラの天然の形成を得ることを希望して、Escherichia coliにおいて、CTB-抗原融合タンパク質及びCTBを、原核生物発現系の代表として同時に発現させることを試みた。コレラ毒素Bサブユニットの五量体アセンブリ機構は未知であるので、種々の研究の中で、キメラのアセンブリが透過プロセスにおいて生じることが、現在同意されている。E.coli発現系では、シグナルペプチドを有するCTB-抗原融合タンパク質は、細胞膜を適切に透過できず、所望のキメラ構造を形成できない。更に、細胞内で発現された融合タンパク質のほとんどは、封入体を形成し、CTBは、開始アミノ酸メチオニンの存在に起因して、いずれも、天然のCTB五量体を形成できず、従って、所望のキメラ構造を形成できない。

【0154】

上記説明は、H.pylori関連抗原を一例として単に挙げて、抗原の免疫原性を増強させることに対する、本発明のCTB-X-4CTB系の適用及び影響を示している。当業者の経験及び理解に基づいて、本発明のCTB-X-4CTB系はまた、H.pylori抗原、腸チフス抗原、インフルエンザHA抗原が含まれるがこれらに限定されない種々の他の粘膜免疫抗原に適用され、これらの抗原の免疫原性を改善し、高効力のワクチンを調製することができると推論され得る。対応する担体の選択及び調製、タンパク質の発現及び精製は、当該分野で公知の技術で

あり、当業者は、本発明のポイントを理解した後に、対応する融合タンパク質及び抗原組成物を調製し、免疫原性の対応する増加を検出するために、本発明のCTB-X-4CTB系を利用できる。

【0155】

従って、上記説明は、本発明の好ましい実施形態に過ぎず、本発明を限定する意図はない。本発明の精神及び原則内の、任意の改変、等価な置換及び改善は、本発明の保護の範囲内に含まれるべきである。

【図1】



图 1

【図2】

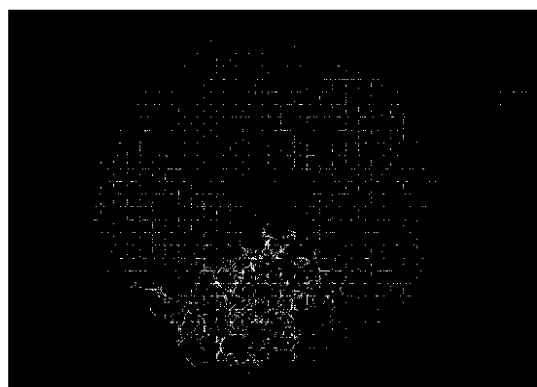


图 2

【图 3】



图 3

【图 4】



图 4

【图 5】

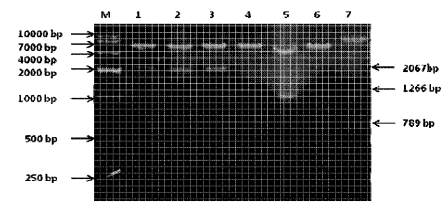


图 5

【图 6】

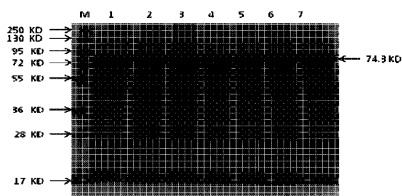


图 6

【图 9 A】

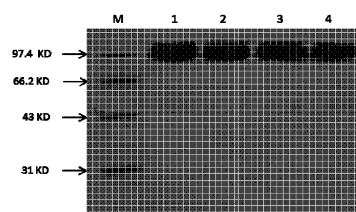


图 9A

【图 7】

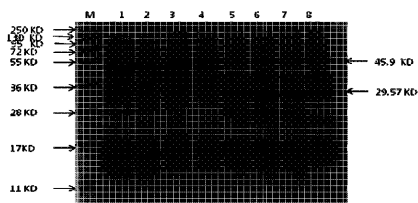


图 7

【图 9 B】

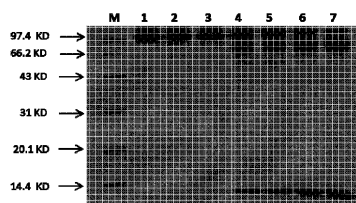


图 9B

【图 8】

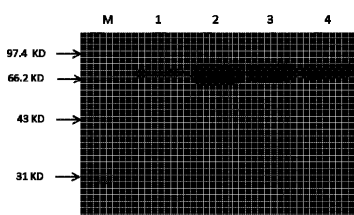


图 8

【图 10】

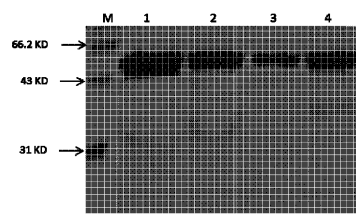


图 10

【图 1 1 A】

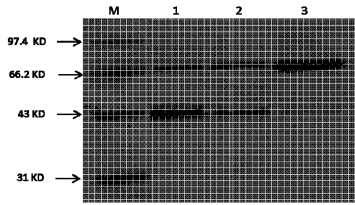


图 11A

【图 1 3】

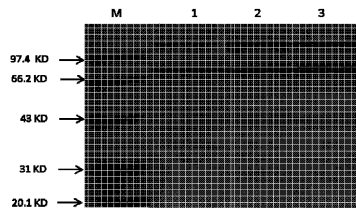


图 13

【图 1 1 B】

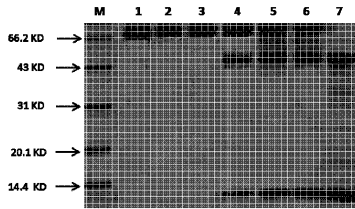


图 11B

【图 1 4】

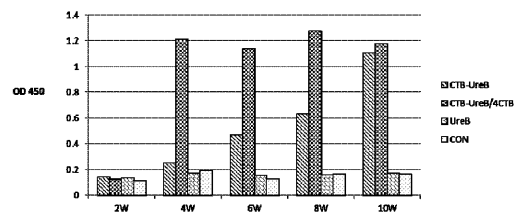


图 14

【图 1 2】

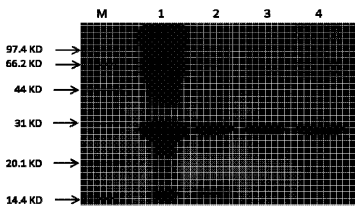


图 12

【图 1 5】

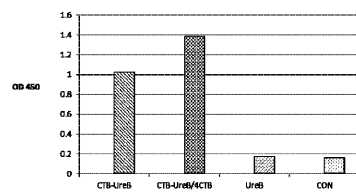


图 15

【图 1 6】

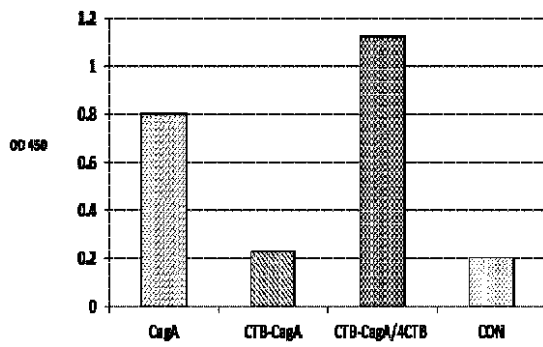


图 16

【图 1 7】

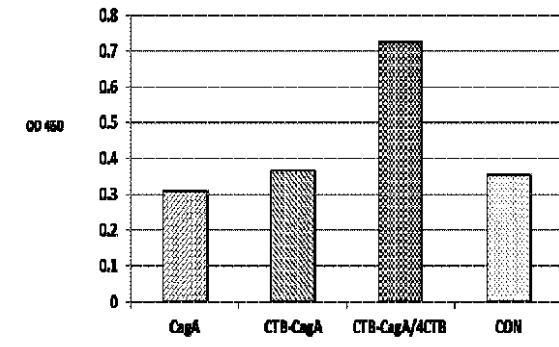


图 17

【図 18】

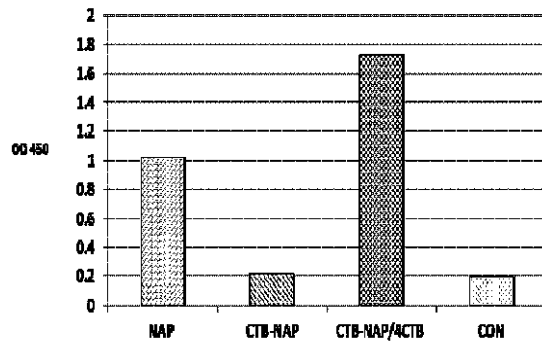


图 18

【図 19】

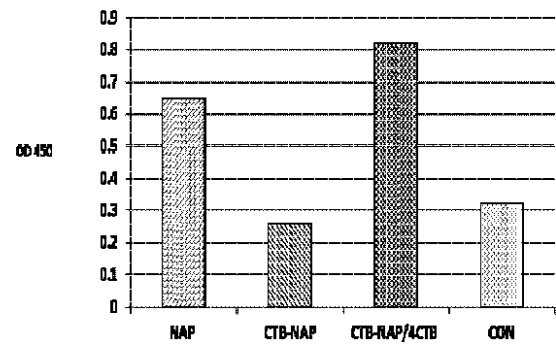


图 19

【図 20】

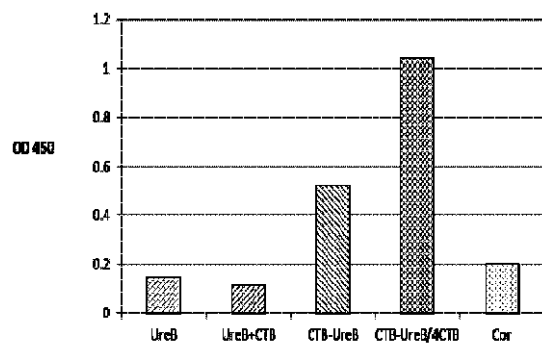


图 20

【図 21】

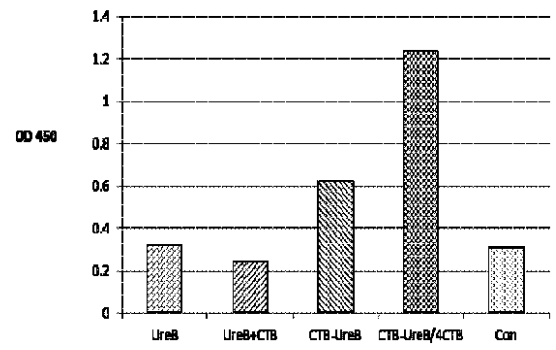


图 21

【図 2 2 A】

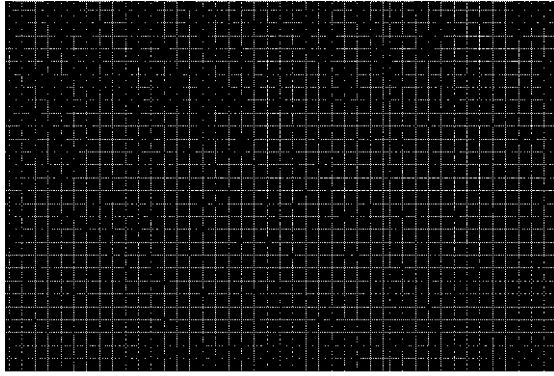


图 22A

【図 2 2 B】

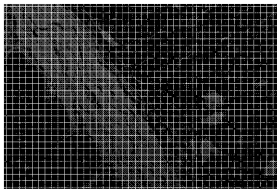


图 22B

【図 2 2 C】

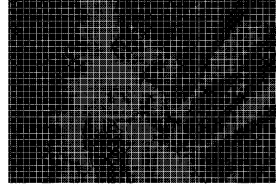


图 22C

【図 2 3 A】

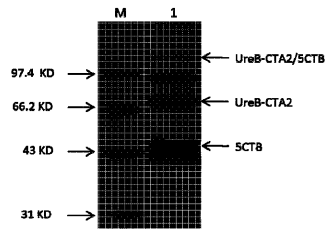


图 23A

【図 2 3 B】

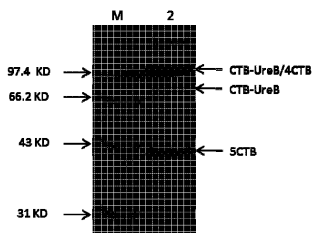


图 23B

【配列表】

0006316448000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
C 1 2 N	15/09 (2006.01)	C 1 2 N	15/00 A
C 1 2 P	21/02 (2006.01)	C 1 2 P	21/02 A
C 0 7 K	14/195 (2006.01)	C 0 7 K	14/195
A 6 1 P	37/04 (2006.01)	A 6 1 P	37/04

(72)発明者 ケーリン・リー
中華人民共和国・201206・チャイナ・(シャンハイ)・パイロット・フリー・トレード・ゾ
ーン・グイチャオ・ロード・1150

(72)発明者 ▲ゲン▼ 兩▲紅▼
中華人民共和国・201206・チャイナ・(シャンハイ)・パイロット・フリー・トレード・ゾ
ーン・グイチャオ・ロード・1150

審査官 馬場 亮人

(56)参考文献 特表2008-500008 (JP, A)
特開2005-052135 (JP, A)
中国特許出願公開第103127498 (CN, A)
国際公開第2010/092963 (WO, A1)
国際公開第2013/041966 (WO, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
A 6 1 K 39/39
A 6 1 K 39/02
A 6 1 K 39/385
A 6 1 P 1/04
A 6 1 P 31/04
A 6 1 P 37/04
C 0 7 K 14/195
C 1 2 N 15/09
C 1 2 P 21/02
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)
CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)