

發明專利說明書

PD1083807(5) 本

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動) ※記號部分請勿填寫

※申請案號： 9710-9570

(2009年10月12日修正) 頁

※申請日期： 97.3.19

※IPC 分類：

A61K 9/48 (2006.01)
A61K 35/744 (2015.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

經口疫苗

ORAL VACCINE

二、申請人：(共1人)

姓名或名稱：(中文/英文)(簽章) ID：

森下仁丹股份有限公司(森下仁丹株式会社)

MORISHITA JINTAN CO., LTD.

代表人：(中文/英文)(簽章)

駒村純一

KOMAMURA, JUNICHI

住居所或營業所地址：(中文/英文)

日本國大阪府大阪市中央區玉造1丁目2番40號

2-40, Tamatsukuri 1-chome, Chuo-ku, Osaka-shi, Osaka, Japan

國籍：(中文/英文)

日本

Japan

三、發明人：(共 7 人)

姓 名：(中文/英文) ID：

1. 白川利朗/SHIRAKAWA, TOSHIRO
2. 川端真人(川端真人)/KAWABATA, MASATO
3. 高田哲男/TAKATA, TETSUO
4. 谷口道子/TANIGUCHI, MICHIKO
5. 岡本明子/OKAMOTO, ASAKO
6. 淺田雅宣(淺田雅宣)/ASADA, MASANORI
7. 中辻雅章/NAKATSUJI, MASAACKI

國 籍：(中文/英文)

- 1.~7. 日本/Japan

四、聲明事項：

主張專利法第二十二條第二項 第一款或 第二款規定之事實，其事實發生日期為： 年 月 日。

申請前已向下列國家(地區)申請專利：

【格式請依：受理國家(地區)、申請日、申請案號 順序註記】

有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

日本 2007/3/19 特願 2007-070626

無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號 順序註記】

主張專利法第三十條生物材料：

須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼 順序註記】

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼 順序註記】

不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

五、中文發明摘要：

本發明提供一種對細菌感染性疾病(例如傷寒、霍亂、或痢疾)之經口疫苗。本發明之經口疫苗是經由耐酸性皮膜，使包含表現抗原蛋白質鞭毛蛋白或分泌於菌體外之轉形微生物之膠囊製劑。該微生物可使用雙歧桿菌(Bifidobacterium)屬、乳酸菌(Lactobacillus)屬、乳酸球菌(Lactococcus)屬等腸內細菌。膠囊製劑的形態可為無縫膠囊製劑、軟膠囊製劑、硬膠囊製劑任一種形態。

六、英文發明摘要：

This invention provides an oral vaccine against bacterial infectious diseases such as typhoid fever, cholera, and dysentery. The oral vaccine is a capsule preparation including a transformed microorganism by an acid-resistant film, wherein the transformed microorganism can express or secrete a flagellin protein as antigen. The microorganism is enteric bacteria such as Bifidobacterium, Lactobacillus, and Lactococcus. The capsule preparation is a seamless capsule preparation, soft capsule preparation, or hard capsule preparation.

七、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：無。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

無。

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

無。

九、發明說明：

【發明所屬之技術區域】

本發明是關於可用於預防及治療細菌感染症之經口疫苗及其製造方法。

【先前技術】

傷寒(typhoid fever)是由沙門氏菌之一種的腸道沙門氏菌(*Salmonella enterica var. Typhi*)所引起之感染症的一種，經由攝取被污染的飲水及食物等造成感染。傷寒於全世界常有發生，特別是在亞洲、中東、東歐、非洲以及中南美區域。1年內有1,600萬人罹患傷寒，60萬人失去性命，受害犧牲者主要為開發中國家的嬰幼兒。目前對於傷寒病原菌沙門氏菌的疫苗，已進行減毒化沙門氏菌(Ty21a)等的經口投與，但因伴隨腹瀉及嘔吐等副作用而無法投與於5歲以下的嬰幼兒。一旦感染到傷寒，雖於體內製造出抗體而獲得免疫，但此效果無法長期持續。

霍亂是由弧菌屬(*Vibrio cholerae* 01 或 0139)所引起之感染症的一種。霍亂於全世界常有發生，特別是在亞洲、中東以及非洲。典型的霍亂沒幾度反覆大流行，但由於其強病原性(死亡率20%)已造成幾百萬人犧牲。現在雖已進行預防接種，但效果較低，僅達約50%。

細菌性痢疾是廣泛分布於世界之細菌性感染症，尤其常見於衛生狀態差的國家。細菌性痢疾是由屬於志賀氏菌屬(*Shigella*)之腸內細菌所引起，依病原性強度順序為志賀氏痢疾桿菌(*Shigella dysenteriae*)、副痢疾志賀菌(*S.*

flexneri)、鮑氏志賀菌 (*S. boydii*)、以及宋內氏志賀桿菌 (*S. sonnei*) 4 群。

如上所述，存有細菌引起之各種感染症，因此清楚看出對於細菌性感染症有效之疫苗的需要。特別是需要防禦人類傳染給人類之感染症的疫苗。舉例而言，目前可從市售商品得到各種沙門氏菌種的一些疫苗。但這些疫苗雖有時有效，但有重大缺點。這些疫苗通常為誘導同等於野生型細菌感染時之抗體群，而迫使患者受到過大的負荷。

為解決此問題，專注於研究細菌的鞭毛。鞭毛是從細胞表面突出之長型構造體，在運動性以及對宿主細胞的入侵上扮演重要角色。鞭毛是由稱為鞭毛蛋白 (flagellin) 之蛋白質所構成。已知該鞭毛蛋白質可誘導高程度的抗體。鼠傷寒桿菌 (*Salmonella typhimurium*) 的抗原性蛋白質鞭毛蛋白已記載於 McClelland M. 等人之 *Nature*, 413 卷, 852 頁 (2001)。霍亂弧菌 (*Vibrio cholerae*) 的抗原性蛋白質鞭毛蛋白已記載於 Heiderberg 等人之 *Nature*, 406 卷, 477 頁 (2000)。此外，志賀氏痢疾桿菌 (*Shigella dysenteriae*) 的抗原性蛋白質鞭毛蛋白已記載於 Tominaga A. 等人之 *Genes Genet. Syst.*, 76 卷, 111 頁 (2001)。但仍未提供使用對此等鞭毛之抗體的有效疫苗。

【發明內容】

由於僅有來自引起感染症之細菌的鞭毛蛋白質無法開始感染症，因此本發明目的是提供活用該鞭毛蛋白質作為疫苗之手段。

本發明提供對細菌感染性疾病之經口疫苗，上述經口疫苗為膠囊製劑之形態，上述膠囊製劑是由膠囊皮膜與表現抗原蛋白質鞭毛蛋白之轉形微生物所構成，上述膠囊皮膜是耐酸性，且經由上述膠囊皮膜包含上述轉形微生物。

此外本發明提供對細菌感染性疾病之經口疫苗的第一種製造方法；該方法包括製備表現抗原蛋白質鞭毛蛋白之轉形微生物之步驟，以及經由耐酸性膠囊皮膜封入上述轉形微生物產生耐酸性膠囊製劑之步驟。

此外本發明提供對細菌感染性疾病之經口疫苗的第二種製造方法；該方法包括製備表現抗原蛋白質鞭毛蛋白之轉形微生物之步驟，經由膠囊皮膜封入上述轉形微生物產生膠囊製劑之步驟，以及使上述所產生膠囊製劑之膠囊皮膜變成耐酸性之步驟。

在一實施態樣中，上述抗原蛋白質鞭毛蛋白是表現於上述微生物的菌體內。

在另一實施態樣中，上述抗原蛋白質鞭毛蛋白是被分泌於上述微生物的菌體外。

在一實施態樣中，上述微生物是選自由雙歧桿菌 (*Bifidobacterium*) 屬、乳酸菌 (*Lactobacillus*) 屬、乳酸球菌 (*Lactococcus*) 屬、足球菌 (*Pediococcus*) 屬、鏈球菌 (*Streptococcus*) 屬、腸球菌 (*Enterococcus*) 屬、明串球菌 (*Leuconostoc*) 屬、四體球菌 (*Tetragenococcus*) 屬、酒球菌 (*Oenococcus*) 屬、以及魏斯氏菌 (*Weissella*) 屬所組微生物群之至少 1 種。

在一實施態樣中，上述經口疫苗是對傷寒、霍亂或痢疾之疫苗。

在一實施態樣中，上述膠囊製劑為無縫膠囊(seamless capsule)製劑、軟膠囊製劑或硬膠囊製劑。

依據本發明，表現抗原性蛋白質鞭毛蛋白之轉形微生物是含於耐酸性膠囊製劑中。因此，轉形微生物被保護免除胃酸而能有效將產生之轉形微生物送達腸。此製劑在腸內被溶解，放出之轉形微生物產生具抗原性蛋白質之鞭毛蛋白。鞭毛蛋白本身沒有感染性，但在體內會產生抗體。特別是使用雙歧桿菌(bifi)及乳酸菌等所謂益菌之腸內細菌製備轉形微生物時，腸內細菌可於腸內生長。因此，在腸內產生鞭毛蛋白蛋白質，以所產生之鞭毛蛋白蛋白質為抗原在體內誘導抗體產生。因此，能抑制感染症。

因此，依據本發明可提供抗體負荷小之細菌性感染症的預防以及治療方法。

【實施方式】

實施本發明之最佳形態

本發明對細菌感染性疾病之經口疫苗為膠囊製劑之形態。本說明書中，含有內容物於其中之膠囊稱為「膠囊製劑」。本發明之膠囊製劑由膠囊皮膜與表現抗原蛋白質鞭毛蛋白之轉形微生物所構成，該膠囊皮膜為耐酸性。所謂耐酸性膠囊皮膜與表現抗原蛋白質鞭毛蛋白之轉形微生物所構成之膠囊製劑，是具有耐酸性膠囊皮膜且只要含有以表現抗原蛋白質鞭毛蛋白之轉形微生物為膠囊內容物，可採取任意

構成以及形狀；該膠囊製劑不排除包含另外的構成要素。因此，表現抗原蛋白質鞭毛蛋白之轉形微生物是經由耐酸性膠囊皮膜將其包含或封入(亦即以耐酸性皮膜包含於所形成的膠囊內部區域)。本說明書中，此等膠囊製劑稱為「耐酸性膠囊製劑」。

以下依序說明製備經口疫苗用鞭毛蛋白基因的取得、鞭毛蛋白表現載體的製備、表現鞭毛蛋白之轉形微生物的製備、含有轉形微生物之耐酸性膠囊製劑的製造、以及對細菌感染性疾病之經口疫苗。

1. 鞭毛蛋白基因的取得

根據公知的基因序列可獲得編碼鞭毛蛋白之基因。編碼鞭毛蛋白之基因，例如以製備自感染症病原細菌(例如沙門氏菌、霍亂菌或痢疾菌)之基因體 DNA 或 cDNA 為模板，使用依據該細菌鞭毛蛋白的構造基因之序列資料所製作之引子對，經由聚合酶連鎖反應(PCR)增幅可取得之。

編碼傷寒鞭毛蛋白之基因，可獲自記載於 McClelland M. 等人，Nature，413 卷，852 頁(2001)之沙門氏菌(*S. typhimurium*)的鞭毛蛋白構造基因序列。舉例而言，可以鼠傷寒桿菌(*S. typhimurium*)的染色體 DNA 或 cDNA 為模板，以序列表之序列編號 1 及 2 的序列為引子，經由聚合酶連鎖反應(PCR)增幅得到。

編碼霍亂鞭毛蛋白之基因，可從記載於 Heiderberg 等人，Nature，406 卷，477 頁(2000)之霍亂菌(*Vibrio cholerae*)的鞭毛蛋白構造基因獲得。例如可以霍亂菌(*Vibrio*

cholerae) 染色體 DNA 或 cDNA 為模板，以序列表之序列編號 3 以及 4 的序列為引子，經由 PCR 增幅獲得。

編碼痢疾鞭毛蛋白之基因，可從記載於 Tominaga A. 等人，*Genes Genet. Syst.*, 76 卷，111 頁 (2001) 之痢疾菌 (*Shigella dysenteriae*) 鞭毛蛋白的構造基因獲得。例如可以痢疾菌 (*S. dysenteriae*) 的染色體 DNA 或 cDNA 為模板，序列表之序列編號 5 以及 6 的序列為引子，經由 PCR 增幅獲得。

2. 鞭毛蛋白表現載體之製備

將如上述 1. 製備之鞭毛蛋白基因導入質體，製備表現載體。用於製備表現載體之質體只要是可在腸內細菌表現之質體，則無特別限制。可使用來自雙歧桿菌 (*Bifidobacterium*) 屬微生物之質體 (例如 pTB4、pTB6、pTB10、pBL67 或 pBL78)、來自鏈球菌 (*Streptococcus*) 屬微生物之質體 (例如、質體 pC194) 等。亦可使用這些質體與大腸菌質體之複合質體 (例如參照特開平 5-130876 號公報)。

從表現安定性以及製備轉形株用 DNA 之製備容易性觀點，在上述質體中以龍根雙歧桿菌 (*B. longum*) 的質體與大腸菌的質體所合成之複合質體為佳。

從篩選轉形株之觀點，表現載體以具有抗生素耐藥性、胺基酸要求性等篩選記號為佳。

為表現鞭毛蛋白或使表現有利，表現載體以添加調節序列為佳。調節序列可舉出例如啓動子序列 (promoter sequence)、領導序列 (leader sequence)、前肽序列 (propeptide sequence)、增強子序列 (enhancer sequence)、訊息序列 (signal

sequence)、終止序列(terminator sequence)等。這些調節序列只要是可在腸內細菌中表現，則其來源無特別限制。

啓動子序列只要是可在腸內細菌表現，則無特別限制。從表現效率的觀點，使用龍根雙歧桿菌(*B. longum*)之類似組蛋白蛋白質(histone-like)(HU)的啓動子序列(以下稱爲 HU 啓動子)爲佳。例如以龍根雙歧桿菌(*B. longum*)的染色體 DNA 或 cDNA 爲模板，以序列表序列編號 7 及 8 的序列爲引子，增幅序列表序列編號 9 及 10 的 HU 基因序列(Biosci. Biotechnol. Biochem. 66 (3), 598-603 (2002))中鹼基序列 1~192 位置的序列，經由回收得到 HU 啓動子基因。在引子序列添加適當的限制酶位置(在序列編號 7 爲 HindIII、在序列編號 8 爲 NcoI)，可容易地併入質體。

此外，從提高表現效率的觀點，較佳具有終止序列。終止序列較佳可使用上述 HU 基因的終止序列，即序列表序列編號 9 之 475~600 位置的鹼基序列。

此外，視需要可置入領導序列、前肽序列、增強子序列、訊息序列等。例如製備分泌用之領導序列及訊息序列，可將鞭毛蛋白分泌於微生物菌體外爲佳。

如此視需要導入啓動子序列、終止序列等調節序列、以及篩選記號基因於上述質體，製備選殖用載體。在選殖用載體的啓動子下游，較佳具備有多選殖位置之連接子(linker)等等。經由使用此等連接子，可將編碼鞭毛蛋白的基因(DNA)併入在啓動子下游且在框架內(in frame)表現鞭毛蛋白。

作爲選殖用載體用質體，可舉出 pBLES100、pBLEM100

等。第 1 圖顯示 pBLES100 的構造模式圖。該質體 pBLES100 包括來自大腸菌載體 pBR322 的 PstI-EcoRI 片段及 PstI-HindIII 片段(合計 4.4kbp: 第 1 圖的直線部分)、來自龍根雙歧桿菌 (*B. longum*) 載體 pTB6 的 PstI-PstI 片段 (3.6kbp: 第 1 圖的黑帶部分)、以及來自糞腸球菌 (*Enterococcus faecalis*) 之編碼觀黴素腺苷轉移酶 (spectinomycin adenyltransferase: SpR) 的區域 (1.1kbp: 第 1 圖的白色箭頭)。

舉例而言，質體 pBLES100 如下製備。以 PstI 切斷來自龍根雙歧桿菌 (*B. longum*) 之質體 pTB6，然後導入大腸菌選殖用載體 pBR322 (Takara Bio Inc. 製) 之 PstI 位置。進一步將編碼糞腸球菌 (*Enterococcus faecalis*) SpR 之 HindIII-EcoRI 片段區域插入 pBR322 的 EcoRI-HindIII 位置。

上述取得之 HU 啟動子序列以及鞭毛蛋白基因(以下稱爲 FliC 基因) 片段，以在框架內 (in frame) 併入該質體 pBLES100，可得到表現鞭毛蛋白之載體。作爲具體例，以具有 NcoI 切斷位置之序列編號 1 的序列與具有 BamHI 切斷位置之序列編號 2 的序列爲一對引子，以沙門氏菌 (*S. typhimurium*) 的染色體 DNA 爲模板，經由 PCR 增幅，以 NcoI 及 BamHI 切斷增幅之片段，製備鞭毛蛋白基因片段。另一方面，以具有 HindIII 位置之序列編號 7 的引子與具有 NcoI 位置之序列編號 8 的引子爲一對引子，以龍根雙歧桿菌 (*B. longum*) 的染色體 DNA 爲模板進行 PCR，以 HindIII 及 NcoI 切斷增幅之片段，製備 HU 啟動子片段。經由連接此等片段

與以 HindIII 及 BamHI 切斷之 pBLES100，可得到在 HU 啟動子基因(第 2 圖中「hupP」)的下游併入沙門氏菌鞭毛蛋白基因(第 2 圖中「鞭毛蛋白」)之鞭毛蛋白表現載體 pBLES-FliC。該表現載體 pBLES-FliC 示於第 2 圖。以如此方法得到鞭毛蛋白表現載體，可用於腸內細菌的轉形。

為分泌表現於菌體外，可使用以在框架內(in frame)將分泌訊息胜肽基因片段以及鞭毛蛋白基因(FliC 基因)片段併入質體 pBLES100 所製作之載體。具體例為以具有 NcoI 切斷位置之序列編號 1 的序列與具有 BamHI 切斷位置之序列編號 2 的序列為一對引子，以鼠傷寒桿菌(*S. typhimurium*)的染色體 DNA 為模板，經由 PCR 增幅，以 NcoI 及 BamHI 切斷增幅之片段，製備鞭毛蛋白基因片段。另一方面，以具有 HindIII 位置之序列編號 11 的引子與具有 NcoI 位置之序列編號 12 的引子為一對引子，以兩歧雙歧桿菌(*B. bifidum*)的染色體 DNA 為模板進行 PCR，以 HindIII 及 NcoI 切斷增幅之片段，製備分泌訊息胜肽基因片段。經由混合這些片段與以 BamHI 及 HindIII 切斷之 pBLES100，可得到沙門氏菌的鞭毛蛋白基因併入在分泌訊息胜肽基因片段下游之鞭毛蛋白分泌型表現載體 pBLES-SP-FliC。以此方法得到之鞭毛蛋白表現載體可用於腸內細菌的轉形。

3. 表現鞭毛蛋白之轉形微生物的製備

作為表現鞭毛蛋白之宿主微生物，只要是可在人類或動物大腸以及小腸內生長之細菌(腸內細菌)，則無特別限制。藉由宿主細菌在腸內生長，使鞭毛蛋白表現。所表現之鞭毛

蛋白，從腸被吸收於血液中，發揮抗原性而誘發抗體。因此可方便合宜地使用例如雙歧桿菌(bifi)及乳酸菌等所謂益菌之可在腸內生長的細菌(亦即腸內細菌)。

作為較佳微生物可舉出例如屬於雙歧桿菌(*Bifidobacterium*)屬、乳酸菌(*Lactobacillus*)屬、乳酸球菌(*Lactococcus*)屬、足球菌(*Pediococcus*)屬、鏈球菌(*Streptococcus*)屬、腸球菌(*Enterococcus*)屬、明串球菌(*Leuconostoc*)屬、四體球菌(*Tetragenococcus*)屬、酒球菌(*Oenococcus*)屬、以及魏斯氏菌(*Weissella*)屬之微生物(這些亦統稱為「乳酸菌」)。

屬於雙歧桿菌屬之微生物(這些亦統稱為「雙歧桿菌(bifi)」)可舉出例如青春雙歧桿菌(*Bifidobacterium adolescentis*)、角雙歧桿菌(*B. angulatum*)、動物雙歧桿菌動物亞種(*B. animalis* subsp. *animalis*)、動物雙歧桿菌乳亞種(*B. animalis* subsp. *lactis*)、星狀雙歧桿菌(*B. asteroides*)、兩歧雙歧桿菌(*B. bifidum*)、心形雙歧桿菌(*B. boum*)、短雙歧桿菌(*B. breve*)、鏈狀雙歧桿菌(*B. catenulatum*)、柯寧雙歧桿菌(*B. choerinum*)、棒狀雙歧桿菌(*B. coryneforme*)、兔雙歧桿菌(*B. cuniculi*)、寓齒雙歧桿菌(*B. denticolens*)、齒雙歧桿菌(*B. dentium*)、高盧氏雙歧桿菌(*B. gallicum*)、鶉雞雙歧桿菌(*B. gallinarum*)、球雙歧桿菌(*B. globosum*)、印度雙歧桿菌(*B. indicum*)、嬰兒雙歧桿菌(*B. infantis*)、奇異雙歧桿菌(*B. inopinatum*)、乳雙歧桿菌(*B. lactis*)、龍根雙歧桿菌(*B. longum*)、馬根雙歧桿菌(*B. magnum*)、馬西雙歧桿菌(*B.*

merycicum)、最小雙歧桿菌 (*B. minimum*)、短小雙歧桿菌 (*B. parvulorum*)、偽鏈狀雙歧桿菌 (*B. pseudocatenulatum*)、偽龍根雙歧桿菌球亞種 (*B. pseudolongum* subsp. *globosum*)、偽龍根雙歧桿菌偽龍根亞種 (*B. pseudolongum* subsp. *pseudolongum*)、家禽雙歧桿菌 (*B. pullorum*)、類反芻雙歧桿菌 (*B. ruminale*)、反芻雙歧桿菌 (*B. ruminantium*)、沙隆雙歧桿菌 (*B. saeculare*)、斯卡維雙歧桿菌 (*B. scardovii*)、纖細雙歧桿菌 (*B. subtile*)、小豬雙歧桿菌 (*B. suis*)、嗜熱酸雙歧桿菌 (*B. thermacidophilum*)、以及嗜熱雙歧桿菌 (*B. thermophilum*)。

其中較佳使用青春雙歧桿菌 (*Bifidobacterium adolescentis*)、動物雙歧桿菌動物亞種 (*B. animalis* subsp. *animalis*)、動物雙歧桿菌乳亞種 (*B. animalis* subsp. *lactis*)、兩歧雙歧桿菌 (*B. bifidum*)、短雙歧桿菌 (*B. breve*)、乳雙歧桿菌 (*B. lactis*)、龍根雙歧桿菌 (*B. longum*)、以及偽龍根雙歧桿菌偽龍根亞種 (*B. pseudolongum* subsp. *pseudolongum*)。

屬於乳酸菌屬之微生物可舉出例如嗜酸乳酸菌 (*Lactobacillus acidophilus*)、食澱粉乳酸菌 (*L. amylovorus*)、動物乳酸菌 (*L. animalis*)、短乳酸菌 (*L. brevis*)、短乳酸菌重亞種 (*L. brevis* subsp. *gravesensis*)、布氏乳酸菌 (*L. buchneri*)、保加利亞乳酸菌 (*L. bulgaricus*)、乾酪乳酸菌 (*L. casei*)、乾酪乳酸菌乾酪亞種 (*L. casei* subsp. *casei*)、乾酪乳酸菌植物亞種 (*L. casei* subsp. *plantarum*)、乾酪乳酸菌耐性亞種 (*L. casei* subsp. *tolerans*)、纖維二糖乳酸菌 (*L.*

cellobiosus)、彎曲乳酸菌 (*L. curvatus*)、德氏乳酸菌 (*L. delbrueckii*)、德氏乳酸菌保加利亞亞種 (*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*)、德氏乳酸菌德氏亞種 (*L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii*)、德氏乳酸菌乳亞種 (*L. delbrueckii* subsp. *lactis*)、叉枝乳酸菌 (*L. divergens*)、發酵乳酸菌 (*L. fermentum*)、果糖乳酸菌 (*L. fructosus*)、加氏乳酸菌 (*L. gasseri*)、希氏乳酸菌 (*L. hilgardii*)、克菲爾乳酸菌 (*L. kefir*)、來門乳酸菌 (*L. leichmannii*)、副乾酪乳酸菌 (*L. paracasei*)、副乾酪乳酸菌副乾酪亞種 (*L. paracasei* subsp. *paracasei*)、戊糖乳酸菌 (*L. pentosus*)、植物乳酸菌 (*L. plantarum*)、雷特氏乳酸菌 (*L. reuteri*)、鼠李糖乳酸菌 (*L. rhamnosus*)、燒酒乳酸菌 (*L. sakei*)、燒酒乳酸菌燒酒亞種 (*L. sakei* subsp. *sakei*)、舊金山乳酸菌 (*L. sanfrancisco*)、凡西乳酸菌 (*L. vaccinostreus*)、以及乳酸菌 (*Lactobacillus* sp.)。

屬於乳酸球菌屬之微生物可舉出例如格氏乳酸球菌 (*Lactococcus garvieae*)、乳酸乳酸球菌 (*L. lactis*)、乳酸乳酸球菌何氏亞種 (*L. lactis* subsp. *hordniae*)、乳酸乳酸球菌乳酸亞種 (*L. lactis* subsp. *lactis*)、植物乳酸球菌 (*L. plantarum*)、以及棉子糖乳酸球菌 (*L. raffinolactis*)。

屬於足球菌屬之微生物可舉出例如戊糖足球菌 (*Pediococcus pentosaceus*) 以及酸性乳酸足球菌 (*P. acidilactici*)。

屬於鏈球菌屬之微生物可舉出例如牛鏈球菌 (*Streptococcus bovis*)、乳鏈球菌 (*S. cremoris*)、糞鏈球菌 (*S.*

faecalis)、乳酸鏈球菌 (*S. lactis*)、化膿性鏈球菌 (*S. pyogenes*)、以及嗜熱鏈球菌 (*S. thermophilus*)。

屬於腸球菌屬之微生物可舉出例如酪黃腸球菌 (*Enterococcus casseliflavus*)以及糞腸球菌 (*E. faecalis*)。

屬於明串球菌屬之微生物可舉出例如檸檬明串球菌 (*Leuconostoc citreum*)、腸膜明串珠菌 (*Leuconostoc mesenteroides*)、腸膜明串珠菌腸膜亞種 (*L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides*)、以及腸膜明串珠菌葡聚糖亞種 (*L. mesenteroides* subsp. *dextranicum*)。

屬於四體球菌屬之微生物可舉出例如嗜鹽四體球菌 (*Tetragenococcus halophilus*)以及妙利四體球菌 (*T. muriaticus*)。

屬於酒球菌屬之微生物可舉出例如酒酒球菌 (*Oenococcus oeni*)。

屬於魏斯氏菌屬之微生物可舉出例如偉立魏斯氏菌 (*Weissella vilidescens*)。

鞭毛蛋白表現載體導入腸內細菌之方法無特別限制，可使用當業者常用之方法。可舉出例如電穿孔法、磷酸鈣法、脂質體轉染法 (Lipofection)、使用鈣離子之方法、原生質 (protoplast)法等。使用電穿孔法較佳。經由電穿孔法時，可以 0.5~20 kV/cm、0.5 μ sec~10 msec 的條件進行。更佳可以 2~10 kV/cm、50 μ sec~5 msec 進行。

轉形株是選擇有篩選記號之鞭毛蛋白表現載體。作為培養轉形株之培養基，各適於宿主微生物之培養基可舉出例如

葡萄糖血液肝臟(BL)瓊脂培養基、迪蔓羅莎(MRS ; deMan Rogosa Sharpe)瓊脂培養基、岐阜大學厭氧性(GAM ; Gifu Anaerobic Medium)瓊脂培養基、改良 GAM(TGAM)瓊脂培養基、布利格氏(Briggs)瓊脂培養基、以及酵母萃取物葡萄糖蛋白胨(YGP)瓊脂培養基。視篩選記號添加抗生素、或缺乏或添加胺基酸於此等培養基作為篩選壓力。

所得轉形微生物之鞭毛蛋白表現的確認，可例如以西方點墨法進行。首先，例如使用非離子性界面活性劑溶解轉形微生物。作為非離子性界面活性劑可舉出聚氧乙烯山梨醇酐酯(Tween(註冊商標)20、40、60、65、80、85)、山梨醇酐酯(Span(註冊商標)20、40、60、65、80、85)。然後使用磷酸緩衝液、檸檬酸緩衝液、硼酸緩衝液、參(羥甲基)胺甲烷(Tris)-鹽酸緩衝液等稀釋，使用十二烷基硫酸鈉聚丙烯胺膠體(SDS-PAGE)、三-甘胺酸聚丙烯胺膠體等進行電泳。然後轉印於硝基纖維素、聚偏二氟乙烯(PVF)膜等，使與對鞭毛蛋白之抗體(免疫球蛋白 G(IgG))反應，進一步經由與具螢光標識之二級抗體反應可確認鞭毛蛋白的表現。轉形微生物的鞭毛蛋白分泌表現，是篩選轉形株後離心分離得到上清液，經由對該上清液同樣地進行上述之西方點墨法來確認。

經確認之鞭毛蛋白表現之轉形微生物，以當業者常用之方法培養、回收，可原樣用於製劑的製造。或亦可乾燥後使用。乾燥是經由凍乾、低溫乾燥等低溫處理，使曝露在腸內環境或培養基等生長條件下時可生長之處理方法來進行。

4.含有轉形微生物之耐酸性膠囊製劑的製造

爲使表現鞭毛蛋白蛋白質之轉形微生物作用爲經口疫苗，該轉形微生物通過胃到達腸時，必須可在該處生長。而胃的 pH 爲 1~3，由於爲顯著低的 pH，經口攝取之乳酸菌等腸內細菌大部分在此死亡。已知仍具有增殖能力的腸內細菌到達腸時，通常變爲投與量的 10000 之 1 以下。因此，爲使本發明所用之轉形微生物仍存活到達人類腸內，且在腸內增殖表現鞭毛蛋白，轉形微生物必須盡可能不受胃酸影響。

爲此，本發明中以耐酸性的膠囊皮膜將轉形微生物包含或封入，換言之，耐酸性的皮膜膠囊內側含有轉形微生物。膠囊製劑的構成、形狀等，只要皮膜對胃酸有耐性之外，並無特別限制。亦即希望以胃酸浸入膠囊內時不會接觸到轉形微生物來構成。膠囊皮膜爲在 pH 4 以下不會溶解之皮膜，以 pH 1~3 爲佳。膠囊化法無特別限制。

(無縫膠囊製劑)

作爲對胃酸有耐性之膠囊的形狀，較佳可舉出如無縫膠囊。所謂「無縫膠囊」是軟膠囊的一種，是以無接縫的皮膜封入內容物形態之膠囊。無縫膠囊可爲二層以上的多層構造，以具有三層或以上的多層構造爲佳。通常最內層能含有內容物(在本發明爲轉形微生物)，以及外層(或最外層)可成爲皮膜。換言之，其係爲經由皮膜包含轉形微生物之形態。

以下說明三層構造之無縫膠囊製劑的製備。第 3 圖爲三層構造之無縫膠囊製劑的模式斷面圖。該三層構造由最內層、覆蓋該最內層之內皮層、以及覆蓋該內皮層之外層所組成。

最內層由上述轉形微生物及懸浮/混合該轉形微生物用之非水性溶劑或固體成分(以下，該成分稱為最內層用物質)所組成。最內層用物質無特別限制。可舉出例如各種油脂類、脂肪酸類、糖之脂肪酸酯、脂肪族碳氫化合物、芳香族碳氫化合物、鏈狀醚、高級脂肪酸酯、高級醇、萜烯類(terpene)。具體而言，大豆油、胡麻油、棕櫚油、棕櫚核油、玉米油、綿子油、椰子油、油菜油、可可脂、牛脂、豬脂、馬油、鯨油、熔點為 40°C 以下之上述天然油脂的氫化油脂、人造奶油、起酥油、甘油脂肪酸酯、蔗糖脂肪酸酯、樟腦油、薄荷油、 α -蒎烯(α -pinene)、D-檸檬烯(D-Limonene)等，但不限於此。此等最內層用物質可單獨或混合 2 種以上使用。

作為內皮層的材料，可使用上述最內層用物質中熔點為 20°C ~50°C 且與最內層不同之物質。更佳為使用常溫下是固體的物質。以下實施例中，可使用熔點為 34°C 的氫化棕櫚核油作為最內層用物質，以及使用熔點為 43°C 的氫化棕櫚核油作為內皮層材料，可使用熔點不同且經氫化處理之同種油脂分別作為最內層用物質以及內皮層的材料。該內皮層可抑制水分及氧的透過，能防止與胃酸的接觸。選擇哪種物質可考慮膠囊的保存期間等來決定。

作為外層(三層構造以上時為最外層)的材料，可舉出蛋白質與水溶性多元醇之混合物、蛋白質與水溶性多元醇及多糖類之混合物、多糖類與水溶性多元醇之混合物等。作為蛋白質可舉出例如明膠以及膠原蛋白。作為水溶性多元醇可舉出例如山梨糖醇、甘露醇、甘油、丙二醇以及聚乙二醇。作

為多糖類可舉出瓊脂、結蘭膠(gellan gum)、黃原膠(xanthan gum)、刺槐豆膠(locust bean gum)、果膠(pectin)、藻酸鹽、鹿角菜膠(Carrageenan)、阿拉伯膠、糊精、變性糊精、澱粉、化工澱粉、普路蘭(pullulan)、果膠、以及羧甲基纖維素鹽。使用果膠、藻酸鹽、結蘭膠或鹿角菜膠時，較佳添加適宜的鹼金屬鹽或鹼土金屬鹽。

上述三層構造之無縫膠囊製劑的製備為當業者熟知之技術，例如特許第 1398836 號說明書記載之使用三噴嘴進行滴下法。在該滴下法中，同時吐出來自同心三噴嘴最內側噴嘴之轉形微生物(例如凍乾菌體)與一起之最內層用物質(較佳為轉形微生物(較佳為凍乾菌體)在 20~50℃ 為非流動性疏水性溶劑物質中的懸浮液)、來自中間噴嘴之構成內皮層之物質(例如常溫下為固體之物質溶解液)、以及來自最外側噴嘴之由外層(皮膜)構成之物質的溶液，經由冷卻下滴下於流動之載劑液(例如玉米油、油菜油等)中形成最內層含轉形微生物之三層構造之「無縫」膠囊。因此，經由無接縫之外層皮膜包含或封入轉形微生物。

然後乾燥如上述形成之膠囊。乾燥方法，例如使其常溫通風乾燥。通常乾燥是以例如 5℃~30℃ 的空氣乾燥之方法。乾燥時間以 2~12 小時較適宜。特開平 07-069867 號公報中記載，對如上述施以一般乾燥之膠囊，較佳可適當地進一步施以真空乾燥或真空凍乾法。真空度保持在 0.5~0.02 torr，真空凍乾是在 -20℃ 以下凍乾之方法。真空乾燥或真空凍乾所需時間無特別限定，一般為 5~60 小時，較佳為 24~48 小

時。5 小時以下者，乾燥不充分而使存在於膠囊內的水分對內容物質有不良影響。

經由特開平 07-069867 號公報記載之方法所得之膠囊，該膠囊內的水分經由真空凍乾充分的除去， A_w 值可為 0.20 以下，熱傳導率 $0.16\text{kcal/mh}^\circ\text{C}$ 以下。當然經由真空乾燥或真空凍乾水分會降低，同時膠囊也十分乾燥，由於變得多孔質，熱傳導率也比僅以一般乾燥所得者更大大地降低。

A_w 值不是存在於試料中水分的絕對量，而是由水分的存在狀態所決定的值，亦即代表試料中水的自由度，表示可直接參與化學反應或微生物生長之水分的指標，可以電阻式水分活性測定法(例如水分活性測定儀 WA-360，(株)芝浦電子製作所)測定。熱傳導率可以 Fitch 法等測定。 A_w 值較佳為 0.20 以下，熱傳導率較佳為 $0.02\sim 0.08\text{kcal/mh}^\circ\text{C}$ 。

為賦予無縫膠囊製劑之膠囊皮膜耐酸性，使形成耐酸性的外層，或使形成之無縫膠囊的皮膜(最外層)為耐酸性來處理。

形成耐酸性外層之方法，可舉出對具有能凝膠化之明膠、瓊脂、鹿角菜膠(Carrageenan)等，添加佔 0.01~20 質量%(以 0.1~10 質量%為佳)之果膠、藻酸鹽、阿拉伯膠等之方法。

作為賦予所形成無縫膠囊皮膜(最外層)耐酸性之方法，可舉出例如無縫膠囊外層(最外層)之交聯處理以及無縫膠囊表面之塗覆處理。這些處理可單獨或組合進行。

交聯處理含蛋白質外層之情形時，首先，製備無縫膠囊

後充分地水洗。添加經水洗之無縫膠囊於含交聯劑之水溶液，使外層的表面交聯。交聯劑可使用習知之交聯劑。交聯劑可舉出例如甲醛、乙醛、丙醛、乙二醛(glyoxal)、戊醛、肉桂醛、香草醛、丙酮、甲基乙基酮、環氧乙烷、環氧丙烷、鉀鋁礬、以及硫酸鋁。通常將 1 質量份無縫膠囊添加於 50~100 質量份之含 0.1~2 w/v% 交聯劑(較佳為 0.5~2 w/v%)之水溶液，經由攪拌 10~300 秒進行外層的处理。此外，交聯劑的使用量、作用之時間隨交聯劑而異。交聯處理外皮膜表面之後，經由充分地水洗去除含有交聯劑之水溶液，使含於外層中的水分乾燥。

此外，含有上述蛋白質之外層之交聯處理，可經由使用轉麩醯胺酶(transglutaminase)之酵素處理進行交聯。於此情形，添加 1 質量份所產生之無縫膠囊於 50~100 質量份含 0.1~10 w/v% 酵素(以 0.5~2 w/v% 為佳)之水溶液，攪拌 1~300 分鐘處理外層，同樣如上述水洗、乾燥。

進行塗覆處理時，使產生之溼無縫膠囊乾燥後，使用蟲膠(shellac)、乙基纖維素、羥丙基甲基纖維素、羥丙基纖維素、聚乙烯吡咯酮、纖維素 TC-5、乙烯吡咯酮-乙酸乙烯共聚物、玉蜀黍蛋白質、乙烯蠟等為基材，蓖麻油、油菜油、鄰苯二甲酸二丁酯、聚乙二醇、甘油、硬脂酸、脂肪酸酯、棕櫚酸山梨糖醇、聚氧乙烯硬脂酸酯、乙醯化單甘油酯等為可塑劑，依照常用方法塗覆無縫膠囊。

再者，經由賦予膠囊皮膜腸溶性，保護膠囊免除胃內的酸性溶液(例如胃酸)等，然後在腸內崩壞，以在腸內放出膠

囊內部的轉形微生物，而能在腸內充分產生抗原。腸溶性的賦予，可以當業者一般製造腸溶性膠囊之方法進行。此外，經由使用含明膠以及果膠之混合物作為無縫膠囊的外層材料，能成為腸溶化皮膜。對具有能凝膠化之明膠、瓊脂、鹿角菜膠 (Carrageenan) 等，添加佔 0.01~20 質量%(較佳為 0.1~10 質量%)的果膠、藻酸鹽、阿拉伯膠等，所製備之耐酸性外層也具有腸溶性。

無縫膠囊製劑因其製法，可得形狀為球狀。無縫膠囊的平均粒徑為 0.3~10mm，較佳為 1.5~8.0mm。

如此所得無縫膠囊製劑，在室溫能保存 6 個月以上仍保持轉形微生物的活性，保存在 10℃ 以下時能長期保存 1 年以上。

(軟膠囊製劑)

軟膠囊製劑與無縫膠囊製劑之情形一樣，以於非水性溶劑中之轉形微生物懸浮液為內容物，而以皮膜片包含者。皮膜片的材料與無縫膠囊的外層材料一樣。

軟膠囊製劑為已知技術，例如可以專利第 2999535 號說明書記載之方法製備。例如使用旋轉式模具注入內容物並一邊填充，皮膜片通過模、經由加熱封入得到膠囊化。為使在腸中放出轉形微生物且仍維持機能，以極性溶劑(例如甲醇、乙醇、丙醇、異丙醇)洗淨，從所得軟膠囊除去脫模劑的油。之後與無縫膠囊之情形一樣，組合進行交聯處理以及塗覆處理，或進行任一方之處理得到耐酸性。

對具有能凝膠化之明膠、瓊脂、鹿角菜膠 (Carrageenan)

等添加佔 0.01~20 質量%(較佳為 0.1~10 質量%)的果膠、藻酸鹽、阿拉伯膠等，依據已知方法可製備耐酸性皮膜片。或組合進行皮膜片的交聯處理以及塗覆處理，或進行任一方之處理得到耐酸性。使用如此所得耐酸性皮膜片，例如經由已知技術進行膠囊的成形並導入內容物於膠囊內，然後經由結合膠囊的縫、封入內容物，可製造以耐酸性皮膜包圍轉形微生物之軟膠囊製劑。

軟膠囊製劑可為球狀、橢圓狀、或矩形狀的構造。軟膠囊的長徑為 3~16mm 以及短徑為 2~10mm 較佳，長徑為 5~7mm 以及短徑為 2~3mm 更佳。

如此所得軟膠囊製劑，在室溫能保存 6 個月以上仍保持轉形微生物的活性，保存在 10℃ 以下時能長期保存 1 年以上。

(硬膠囊製劑)

預先將膠囊皮膜成型為主體與套蓋，填充內容物於膠囊主體，然後經由組合膠囊套蓋可製造硬膠囊製劑。

硬膠囊製劑的皮膜材料，可舉出明膠、纖維素、普路蘭(pullulan)、鹿角菜膠(Carrageenan)、以及經丙基甲基纖維素等纖維素衍生物。硬膠囊的成型可以當業者常用方法進行。成型膠囊可為市售的膠囊。以皮膜包圍內容物，亦可封入。

內容物可為轉形微生物與賦型劑(例如矽酸酐、合成矽酸鋁、乳糖、玉米澱粉、結晶纖維素)充分混合者，或含有轉形微生物之乾燥菌粉末。

內容物填入膠囊內後，可塗覆膠囊皮膜。對於該塗覆，

適用無縫膠囊外層所說明之材料及方法，藉此賦予耐酸性以及較佳之腸崩壞性(腸溶性)。該塗覆具有封入膠囊皮膜以包含內容物的角色。

對具有能凝膠化之明膠、瓊脂、鹿角菜膠(Carrageenan)等，添加佔 0.01~20 質量%(較佳為 0.1~10 質量%)之果膠、藻酸鹽、阿拉伯膠等，依據已知方法可製備耐酸性皮膜片。或組合進行皮膜片的交聯處理以及塗覆處理，或進行任一方之處理得到耐酸性。使用如此所得耐酸性皮膜片，例如經由已知技術進行硬膠囊的成型並導入內容物於該成型之硬膠囊內部，經由結合膠囊的縫、封入內容物，可製造經由耐酸性皮膜包含轉形微生物之硬膠囊製劑。

如此所得硬膠囊製劑，在室溫能保存 6 個月以上仍保持轉形菌的活性，保存在 10℃ 以下時能長期保存 1 年以上。

5. 對於細菌感染性疾病之經口疫苗

上述 4. 中製備之耐酸性膠囊製劑(無縫膠囊製劑、軟膠囊製劑以及硬膠囊製劑)，使經口投與，通過 pH1~3 的胃內到達腸，而在腸中溶解。經由溶解從製劑放出之轉形微生物，在腸內環境生長，產生鞭毛蛋白，較佳為分泌至菌體外。鞭毛蛋白從腸被吸收，辨識為抗原後以產生抗體。因此成為對具有鞭毛蛋白的微生物有效之經口疫苗。

實施例

以下舉出實施例說明本發明，但本發明不限定於這些實施例。

(實施例 1：含有產生傷寒抗原之雙歧桿菌(bifi)之耐酸性膠

囊製劑的製備)

A. 經由 PCR 增幅來自鼠傷寒桿菌 (*S. typhimurium*) 的鞭毛蛋白基因

以 LB 培養基 (Invitrogen 製) 在 37°C 培養鼠傷寒桿菌 (*S. typhimurium*) ATCC 14028 菌株 12 小時。培養終了後，經由常用方法萃取鼠傷寒桿菌 (*S. typhimurium*) 的基因體 DNA。依照 PCR 反應套組 (Applied Biosystems 製) 的操作說明書，使用 0.5 單位的 Ampli Taq DNA 聚合酶增幅萃取之基因體 DNA。使用序列表之序列編號 1 (前置)：5'-CATGCCATGGATGGCACAGTCATTAATACA-3' (從位置 5 至位置 10 之 CCATGG 為 NcoI 切斷位置)，以及序列編號 2 (反置)：5'-CGCGGATCCTTAACGCAGTAAAGAGAGGAC-3' (從位置 5 至位置 10 之 GATCCT 為 BamHI 切斷位置) 作為引子。使用 125ng 模板 DNA、各 0.5 μ mol 的引子、2.5 單位 Pfu DNA 聚合酶、4 μ L 的 Pfu DNA 聚合酶用 $\times 10$ 緩衝液、含各 200 μ mol 之 dNTP 的反應液 40 μ L，在 94°C 1 分鐘、55°C 1 分鐘、72°C 1 分鐘之步驟重複 30 回後，72°C 10 分鐘保溫的條件下進行 PCR。PCR 終了後，以 NcoI 及 BamHI 切斷，製備鞭毛蛋白基因片段。

B. 經由 PCR 增幅 HU 啟動子

以 MRS 培養基 (日本 Becton, Dickinson and Company 製) 在 37°C 培養龍根雙歧桿菌 (*B. longum*) ATCC 15703 菌株 12 小時。培養終了後，經由常用方法萃取龍根雙歧桿菌 (*B. longum*) 的基因體 DNA。以上述 A 同樣的條件進行 PCR。所

用引子是使用序列編號 7(前置)：5'-CGCCAAGCTTTGGGCGCGGCCATGAAG-3'(從位置 5 至位置 10 之 AAGCTT 為 HindIII 切斷位置)，以及序列編號 8(反置)：5'-CGCGCCATGGAAAGCATCCTTCTTGGGTCA-3'(從位置 5 至位置 10 之 CCATGG 為 NcoI 切斷位置)。PCR 終了後，以 HindIII 及 NcoI 切斷，製備 HU 啓動子基因片段。

C. 表現載體的製備

以 BamHI 及 HindIII 切斷質體 pBLES100，經由混合、連接上述 A. 所得沙門氏菌之鞭毛蛋白基因片段以及 B. 所得 HU 啓動子基因片段，得到表現載體 pBLES-FliC。

D. 導入表現載體於動物雙歧桿菌 (*B. animalis*)

將動物雙歧桿菌 (*B. animalis*) ATCC 27536 接種於 MRS 培養基，在 37°C 含 10% 二氧化碳之氮氣環境中靜置培養至對數增殖期中期 12 小時。離心分離所得培養液，回收菌體，以 PBS (1L 蒸餾水稀釋氯化鈉 8g、氯化鉀 0.2g、磷酸氫二鈉 1.44g、磷酸氫二鉀 0.24g 為 pH7.4) 洗淨 3 回。然後添加 PBS 使成 5×10^8 細胞/mL 得到動物雙歧桿菌 (*B. animalis*) 之懸浮液。添加 $5 \mu\text{L}$ ($1 \mu\text{g}$ DNA/ $5 \mu\text{L}$) 上述 B. 製備之 pBLES-FliC 於 $50 \mu\text{L}$ 此懸浮液中，將此置入 0.2cm 寬的電穿孔用玻璃管，以 $5 \mu\text{s}$ 、1000V 的條件進行轉形。

以含有鏈黴素 ($50 \mu\text{g/ml}$) 之 BL 瓊脂培養基 (日水製藥公司製)，在 37°C 含 10% 二氧化碳之氮氣環境中培養，得到轉形之動物雙歧桿菌 (*B. animalis*)。

E. 西方點墨法

轉形之動物雙歧桿菌 (*B. animalis*) 有否表現鞭毛蛋白質，可如下確認。以含 1w/v% Tween 80(註冊商標)之磷酸緩衝液 (pH6.8) 以及緩衝液 A (Tris-HCl 126mm、20w/v% 甘油、4w/v% 十二烷基硫酸鈉、1.0w/v% 2-硫氫乙醇、0.05w/v% 溴酚藍、pH6.8) 稀釋動物雙歧桿菌 (*B. animalis*)。取其中 5 μ g 進行電泳 (三甘胺酸聚丙烯醯胺凝膠)。將分離之蛋白質電轉漬到硝基纖維素膜。然後，使用沙門氏菌種共通的鞭毛蛋白之特有 IgG1 (Biostart 公司製) 以及山葵過氧化酶 (HRP) 標識之二級抗體 (1:500) 經由 ELISA 確認鞭毛蛋白的表現。

F. 轉形微生物凍乾菌粉末之製備

取 2 接種環之轉形雙歧桿菌 (bifi) (*B. animalis*) 接種菌於 1L 含 50 μ M 鏈黴素之 MRS 培養基 (日本 Becton, Dickinson and Company 製)，在 37°C 一邊吹入含 10% 二氧化碳之氮氣下培養 18 小時。途中，發現 pH 低下時，使用 pH 自動調整器以 10M 氫氧化鈉水溶液調整至 pH5.5 來培養。15 小時培養後之菌數，是以適度的厭氧性稀釋液稀釋所得菌液，塗布於含 50 μ M 鏈黴素之 BL 瓊脂培養基，從菌落的生長數求出。此外，厭氧性稀釋液是將磷酸氫二鈉 6.0g、磷酸氫二鉀 4.5g、L-半胱胺酸鹽酸鹽 0.5g、Tween 80(註冊商標) 0.5g、以及瓊脂 1.0g 溶解於 1L 蒸餾水中，在 121°C 蒸氣滅菌 15 分鐘。

培養後，離心分離 (15000 \times g, 20 分鐘)，回收菌體。添加蒸餾水 120g、檸檬酸鈉 12g、磷酸鈉 8g 於所得菌體以懸浮菌體。對該懸浮液添加 8g 的 Avicel FD-101 (旭化成公

司)，充分攪拌後使凍結、真空乾燥。之後，對所得粉末加入 2 倍量糊精得到凍乾菌粉末。

G.耐酸性無縫膠囊製劑之製備

如以下說明，使用裝備同心三噴嘴之膠囊製造裝置製備含有轉形菌體之耐酸性無縫膠囊製劑。

融解硬化油(熔點 34°C 氫化棕櫚核油)400g，將上述 F. 所得凍乾菌粉末 100g 分散於其中。來自同心三噴嘴內側噴嘴之該分散物、來自其外側中間噴嘴之融解硬化油(熔點 43°C 氫化棕櫚核油)、又來自最外側噴嘴之明膠溶液(將明膠 600g、甘油 300g、以及果膠 100g 溶解於純化水 4kg 中者)同時吐出，使滴下於 15°C 冷卻下流動之油菜油中，製備直徑 2.5mm 三層構造之無縫膠囊內包含轉形菌體之製劑。該膠囊製劑在 20°C 通氣乾燥 10 小時後，進一步在常溫進行真空乾燥，使膠囊中的水分活性 A_w 值低至 0.20 以下以及熱傳導率至 0.16kcal/mh°C 以下。

H.耐酸性軟膠囊製劑之製備

將上述 F. 所得凍乾菌粉末 50g 懸浮於油菜油 300g，製備軟膠囊內容液。添加明膠 400g 以及甘油 100g 於蒸餾水 200g，在 60°C 攪拌溶解，經由成形為片狀得到明膠膜，使用此作為軟膠囊的皮膜。將該明膠膜傳送至一對旋轉圓筒型模具間，使用與此連接之泵將內容液噴出於明膠膜間而膠囊化。

將所得膠囊化物 400g 置入轉動造粒器，將蟲膠 10g 以及蓖麻油 1g 溶解於 400g 甲醇-乙酸乙酯(1:1, v/v)混液之溶

液進行噴霧於軟膠囊的全表面上使成爲塗覆膜厚 0.3mm。經此得到長徑 4mm 以及短徑 3mm 大小之包含轉形菌體且經耐酸性塗覆之軟膠囊製劑 400g。

I.耐酸性硬膠囊製劑之製備

以上述 F.所得凍乾菌粉末作爲硬膠囊的內容物。硬膠囊皮膜可使用市售藥典 5 號的膠囊。將該內容物填充於膠囊的主體，將套蓋合起而膠囊化。

將所得膠囊化物 100g 置入轉動造粒器，將蟲膠 10g 以及蓖麻油 1g 溶解於 400g 甲醇-乙酸乙酯(1:1, v/v)混液之溶液進行噴霧於硬膠囊的全表面上使成爲塗覆膜厚 0.3mm，得到包含轉形菌體且經耐酸性塗覆之硬膠囊製劑 100g。

(實施例 2:含有產生霍亂抗原之乳酸菌之耐酸性膠囊製劑的製備)

將產生霍亂抗原之霍亂弧菌(*V. cholerae*)ATCC 11628 於 LB 培養基在 37°C 培養 12 小時。培養終了後，經由常用方法萃取霍亂弧菌(*V. cholerae*)的基因體 DNA。以序列編號 3(前置)以及序列編號 4(反置)的序列爲引子，以萃取之基因體 DNA 爲模板，與實施例 1 同樣地進行 PCR。回收得到之增幅片段，以 NcoI 及 BamHI 切斷製備霍亂鞭毛蛋白基因片段。以 NcoI 及 BamHI 分解實施例 1 製備之 pBLES-FliC，回收大的片段。經由連接該片段與霍亂鞭毛蛋白基因片段得到表現霍亂抗原之表現載體 pBLES-Vc。

使用所得霍亂鞭毛蛋白之表現載體 pBLES-Vc 轉形植物乳酸菌(*Lb. Plantarum*) ATCC BAA-793，得到產生霍亂抗原

之植物乳酸菌 (*Lb. Plantarum*)。霍亂抗原的表現與實施例 1 之 E. 記載一樣，使用抗原抗體反應經由 ELISA 確認。

使用已確認表現霍亂鞭毛蛋白蛋白質的植物乳酸菌 (*Lb. Plantarum*)，以與實施例 1 之 F. 同樣的方法製備凍乾菌粉末，且分別與實施例 1 之 G.、H. 以及 I. 同樣地製備含有該凍乾菌粉末之無縫膠囊製劑、軟膠囊製劑以及硬膠囊製劑。所得無縫膠囊製劑、軟膠囊製劑以及硬膠囊製劑的皮膜具耐酸性。

(實施例 3：含有產生痢疾抗原之雙歧桿菌 (*bifi*) 之耐酸性膠囊製劑的製備)

將產生痢疾抗原之志賀氏痢疾桿菌 (*S. dysenteriae*) ATCC 29026 於 LB 培養基在 37°C 培養 12 小時。培養終了後，經由常用方法萃取志賀氏痢疾桿菌 (*S. dysenteriae*) 的基因體 DNA。以序列編號 5 (前置) 以及序列編號 6 (反置) 的序列為引子，萃取之基因體 DNA 為模板，與實施例 1 同樣地進行 PCR。回收得到之增幅片段，以 NcoI 及 BamHI 切斷製備痢疾鞭毛蛋白基因片段。以 NcoI 及 BamHI 分解實施例 1 製備之 pBLES-FliC，回收大的片段。經由連接該片段與痢疾鞭毛蛋白基因片段得到表現痢疾抗原之表現載體 pBLES-Sd。

使用所得痢疾鞭毛蛋白表現載體 pBLES-Sd 轉形龍根雙歧桿菌 (*B. longum*) ATCC 15697，得到產生痢疾抗原之龍根雙歧桿菌 (*B. longum*)。痢疾抗原的表現與實施例 1 之 E. 記載一樣，使用抗原抗體反應經由 ELISA 確認。

使用已確認表現痢疾鞭毛蛋白之龍根雙歧桿菌 (*B. longum*)，以與實施例 1 之 F. 同樣的方法製備凍乾菌粉末，且分別與實施例 1 之 G.、H. 以及 I. 同樣地製備含有該凍乾菌粉末之無縫膠囊製劑、軟膠囊製劑以及硬膠囊製劑。所得無縫膠囊製劑、軟膠囊製劑以及硬膠囊製劑的皮膜具耐酸性。
(比較例 1)

在實施例 1 之 G. 中，除構成皮膜之明膠溶液的組成改變為明膠 600g、甘油 300g、以及山梨糖醇 100g 溶解於純化水 4kg 以外，與實施例 1 進行同樣的操作製備無縫膠囊製劑。所得製劑的皮膜不具耐酸性。
(比較例 2)

在實施例 1 之 H. 軟膠囊的製備中，除不進行塗覆以外，與實施例 1 進行同樣的操作製備軟膠囊製劑。所得製劑的皮膜不具耐酸性。
(比較例 3)

在實施例 1 之 I. 硬膠囊製備中，除不進行塗覆以外，與實施例 1 進行同樣的操作製備硬膠囊製劑。所得製劑的皮膜不具耐酸性。
(比較例 4~6)

比較例 4~6 是以實施例 2 中製備之表現霍亂鞭毛蛋白之轉形微生物替換微生物以外，與比較例 1~3 同樣地分別製備無縫膠囊製劑、軟膠囊製劑、以及硬膠囊製劑。所得無縫膠囊製劑、軟膠囊製劑以及硬膠囊製劑的皮膜不具耐酸性。
(比較例 7~9)

比較例 7~9 是以實施例 3 中製備之表現痢疾菌鞭毛蛋白之轉形微生物替換微生物以外，與比較例 1~3 同樣地分別製備無縫膠囊製劑、軟膠囊製劑、以及硬膠囊製劑。所得無縫膠囊製劑、軟膠囊製劑以及硬膠囊製劑的皮膜不具耐酸性。(實施例 4：投與表現傷寒鞭毛蛋白之轉形微生物(重組動物雙歧桿菌(*B. animalis*))誘發抗體之確認)

購買 8~12 週齡 BALB/c 雌小鼠(日本 Charles River 公司)，以標準飼料馴化 1 週。將小鼠分為 9 組(一組 5~7 隻)，有 3 組群分別經口投與實施例 1 製備之含有表現傷寒鞭毛蛋白之轉形微生物的無縫膠囊製劑、軟膠囊製劑以及硬膠囊製劑。另 3 組，分別經口投與比較例 1~3 製備之含有表現傷寒鞭毛蛋白之轉形微生物之無耐酸性無縫膠囊製劑、軟膠囊製劑以及硬膠囊製劑。另外，剩餘的 3 組作為對照組，分別投與表現鞭毛蛋白之轉形微生物(重組動物雙歧桿菌(*B. animalis*))生菌、作為宿主之動物雙歧桿菌(*B. animalis*)生菌、以及磷酸緩衝液。這些膠囊製劑、生菌等以 1 日 1 回，攝取 3 週。

3 週後，經由以下方法測定血清中以及大便中 IgA 的量。添加含有鞭毛蛋白抗原之 PBS 於 96 井平板(Nunc Immunoplate Maxisorb F96、Nalge Nunc International 公司製)，在 4℃ 塗覆平板表面 16 小時。之後，以含有牛血清白蛋白 1w/v% 之 PBS 在室溫 2 小時進行封阻。以 PBS 洗淨 3 回後，加入血清或大便樣品，在室溫反應 3 小時。以 PBS 洗淨 3 回後，加入二級抗體(來自山羊-抗小鼠 IgA、IgG、

IgM(Santa Cruz 公司製)，在室溫培育 3 小時。以 PBS 洗淨 3 回後，加入三級抗體(螢光異硫氰酸鹽(FITC)標識之來自兔子-抗山羊 IgG(QED Bioscience 公司製))，在室溫培育 3 小時。以 FluoroscanII(大日本製藥公司製)測定螢光。所得螢光值示於表 1。

表 1

投與樣品	BALB/c 數	1 日投與量 10 ⁷ cfu/日	大便中 IgA 量 (OD±標準誤差)	血清中 IgA 量 (OD±標準誤差)
實施例 1：無縫膠囊	7	2.5	0.16±0.012	0.40±0.145
實施例 1：軟膠囊	7	3.2	0.15±0.013	0.38±0.151
實施例 1：硬膠囊	7	3	0.14±0.014	0.37±0.120
比較例 1：無縫膠囊	5	2.5	0.05±0.011	0.12±0.038
比較例 2：軟膠囊	5	3.2	0.06±0.010	0.14±0.041
比較例 3：硬膠囊	5	3	0.06±0.010	0.13±0.028
轉形微生物生菌	5	2.5	0.04±0.012	0.11±0.041
宿主微生物生菌	5	12	0.02±0.008	0.10±0.038
磷酸緩衝液	5	-	0.02±0.006	0.14±0.032

攝取實施例 1 所得耐酸性之無縫膠囊、軟膠囊、以及硬膠囊之各製劑時，使用任一形態之耐酸性膠囊製劑，相較於無耐酸性之比較例 1~3 的膠囊製劑、或僅攝取生菌之例，在大便中、血中之 IgA 量皆多，可知誘發抗體之效果高。

(實施例 5：投與表現霍亂鞭毛蛋白之轉形微生物誘發抗體之確認)

關於含有實施例 2 所得表現霍亂鞭毛蛋白之轉形微生物(重組植物乳酸菌(*Lb. Plantarum*))之無縫膠囊製劑、軟膠囊製劑、以及硬膠囊製劑，以及比較例 4~6 之膠囊製劑，與實施例 4 同樣地進行抗體誘發之確認。

此外，分別投與表現霍亂鞭毛蛋白之轉形微生物生菌、作為宿主之植物乳酸菌 (*Lb. Plantarum*) 生菌、以及磷酸緩衝液作為對照。結果示於表 2。

表 2

投與樣品	BALB/c 數	1 日投與量 10 ⁷ cfu/日	大便中 IgA 量 (OD±標準誤差)	血清中 IgA 量 (OD±標準誤差)
實施例 2：無縫膠囊	7	2.8	0.15±0.012	0.42±0.133
實施例 2：軟膠囊	7	3.3	0.13±0.013	0.41±0.142
實施例 2：硬膠囊	7	3.2	0.13±0.014	0.39±0.140
比較例 4：無縫膠囊	5	2.8	0.05±0.011	0.13±0.038
比較例 5：軟膠囊	5	3.3	0.06±0.010	0.12±0.052
比較例 6：硬膠囊	5	3.2	0.06±0.010	0.11±0.028
轉形微生物生菌	5	2.8	0.03±0.012	0.12±0.032
宿主微生物生菌	5	8.3	0.02±0.008	0.10±0.022
磷酸緩衝液	5	-	0.02±0.006	0.15±0.033

攝取實施例 2 所得耐酸性之無縫膠囊、軟膠囊、以及硬膠囊之各製劑時，使用任一形態之耐酸性膠囊製劑，相較於無耐酸性之比較例 4~6 的膠囊製劑、或僅攝取生菌之例，在大便中、血中之 IgA 量皆多，可知誘發抗體之效果高。

(實施例 6：投與表現痢疾鞭毛蛋白之轉形微生物誘發抗體之確認)

關於含有實施例 3 所得表現痢疾菌鞭毛蛋白之轉形微生物(重組龍根雙歧桿菌 (*B. longum*))之無縫膠囊製劑、軟膠囊製劑、以及硬膠囊製劑，以及比較例 7~9 之膠囊製劑，與實施例 4 同樣地進行抗體誘發之確認。

此外，分別投與表現痢疾鞭毛蛋白之轉形微生物生菌、作為宿主之龍根雙歧桿菌 (*B. longum*) 生菌、以及磷酸緩衝液

作為對照。結果示於表 3。

表 3

投與樣品	BALB/c 數	1 日投與量 10 ⁷ cfu/日	大便中 IgA 量 (OD±標準誤差)	血清中 IgA 量 (OD±標準誤差)
實施例 3：無縫膠囊	7	3.2	0.13±0.012	0.38±0.142
實施例 3：軟膠囊	7	3.9	0.12±0.013	0.37±0.153
實施例 3：硬膠囊	7	4	0.13±0.014	0.39±0.131
比較例 7：無縫膠囊	5	3.2	0.06±0.011	0.11±0.038
比較例 8：軟膠囊	5	3.9	0.05±0.010	0.12±0.051
比較例 9：硬膠囊	5	4	0.06±0.010	0.11±0.028
轉形微生物生菌	5	3.2	0.02±0.012	0.11±0.038
宿主微生物生菌	5	10.1	0.03±0.008	0.13±0.036
磷酸緩衝液	5	-	0.03±0.006	0.14±0.031

攝取實施例 3 所得耐酸性之無縫膠囊、軟膠囊、以及硬膠囊之各製劑時，使用任一形態之耐酸性膠囊製劑，相較於無耐酸性之比較例 7~9 的膠囊製劑、或僅攝取生菌之例，在大便中、血中之 IgA 量皆多，可知誘發抗體之效果高。

(實施例 7：含有分泌傷寒抗原於菌體外之雙歧桿菌(*bifi*)之耐酸性膠囊製劑的製備)

A. 經由 PCR 增幅來自鼠傷寒桿菌(*S. typhimurium*)之鞭毛蛋白基因

與實施例 1 之 A. 記載的方法同樣地製備來自鼠傷寒桿菌(*S. typhimurium*)之鞭毛蛋白基因片段。

B. 經由 PCR 增幅分泌訊息胜肽 DNA

兩歧雙歧桿菌(*B. bifidum*) ATCC 29521 於 MRS 培養基(日本 Becton, Dickinson and Company 製)在 37°C 培養 12 小時。培養終了後，經由常用方法萃取兩歧雙歧桿菌(*B. bifidum*)的基因體 DNA(Access# AJ224435)。與實施例 1 之

A. 同樣地進行 PCR。本 PCR 中，以兩歧雙歧桿菌 (*B. bifidum*) 的基因體 DNA 為模板，使用序列表之序列編號 11(前置)：5'-CGGCAAGCTTTATGGGGGATACAGGATTGGCGAT-3'(從位置 5 至位置 10 之 AAGCTT 為 HindIII 切斷位置)以及序列編號 12(反置)：5'-GCGCCCATGGAAATCGGGTGGCGTCCTCGACCG-3'(從位置 5 至位置 10 之 CCATGG 為 NcoI 切斷位置)為引子對。PCR 終了後，以 HindIII 及 NcoI 切斷製備分泌訊息胜肽基因片段。

C. 分泌型表現載體之製備

以 BamHI 及 HindIII 切斷質體 pBLES100，混合、連接上述 A. 所得鞭毛蛋白基因片段以及上述 B. 所得分泌訊息胜肽基因片段，得到分泌型表現載體 pBLES-SP-FliC。

D. 導入分泌型表現載體於短雙歧桿菌 (*B. breve*)

以上述 C. 所得 pBLES-SP-FliC 作為表現載體，並使用短雙歧桿菌 (*B. breve*) ATCC 15700 為應轉形之菌體以外，與實施例 1 之 D. 同樣地進行轉形，得到轉形短雙歧桿菌 (*B. breve*)。

E. 分泌之確認

上述 D. 所得轉形短雙歧桿菌 (*B. breve*) 於含大理石之 MRS 培養液，在 37°C 培養 12 小時後，在 4°C 以 12,000rpm 離心分離得到上清液。該離心上清液與上述實施例 1 之 E. 所記載同樣地進行西方點墨法，確認轉形短雙歧桿菌 (*B. breve*) 之鞭毛蛋白蛋白質分泌於菌體外。

F. 轉形微生物凍乾菌粉末之製備

使用已確認分泌傷寒鞭毛蛋白之短雙歧桿菌 (*B. breve*)，以與實施例 1 之 F. 同樣的方法製備凍乾菌粉末。

G. 耐酸性無縫膠囊製劑、軟膠囊製劑以及硬膠囊製劑的製備

使用上述 F. 所得凍乾菌粉末，分別依據實施例 1 之 G.、H. 以及 I. 之方法製備無縫膠囊製劑、軟膠囊製劑以及硬膠囊製劑。所得無縫膠囊製劑、軟膠囊製劑以及硬膠囊製劑的皮膜具耐酸性。

(比較例 10~12)

比較例 10~12 是以實施例 7 之表現分泌傷寒鞭毛蛋白之轉形微生物替換微生物以外，與比較例 1~3 同樣地分別製備無縫膠囊製劑、軟膠囊製劑、以及硬膠囊製劑。所得無縫膠囊製劑、軟膠囊製劑以及硬膠囊製劑的皮膜不具耐酸性。

(實施例 8)

關於含有實施例 7 所得表現分泌傷寒鞭毛蛋白之轉形微生物 (重組短雙歧桿菌 (*B. breve*)) 之無縫膠囊製劑、軟膠囊製劑、以及硬膠囊製劑，以及比較例 10~12 之膠囊製劑，與實施例 4 同樣地進行抗體誘發之確認。

此外，分別投與表現分泌傷寒鞭毛蛋白轉形微生物 (重組短雙歧桿菌 (*B. breve*)) 生菌、作為宿主之短雙歧桿菌 (*B. breve*) 生菌、以及磷酸緩衝液作為對照。結果示於表 4。

表 4

投與樣品	BALB/c 數	1 日投與量 10 ⁷ cfu/日	大便中 IgA 量 (OD±標準誤差)	血清中 IgA 量 (OD±標準誤差)
實施例 7：無縫膠囊	7	3.5	0.18 ± 0.015	0.44 ± 0.155
實施例 7：軟膠囊	7	4.1	0.16 ± 0.013	0.42 ± 0.148
實施例 7：硬膠囊	7	3.6	0.20 ± 0.014	0.38 ± 0.140
比較例 10：無縫膠囊	5	3.5	0.05 ± 0.012	0.12 ± 0.033
比較例 11：軟膠囊	5	4.1	0.04 ± 0.011	0.11 ± 0.046
比較例 12：硬膠囊	5	3.6	0.06 ± 0.013	0.14 ± 0.034
轉形微生物生菌	5	3.4	0.05 ± 0.011	0.13 ± 0.036
宿主微生物生菌	5	10.5	0.03 ± 0.009	0.12 ± 0.039
磷酸緩衝液	5	—	0.02 ± 0.007	0.13 ± 0.040

攝取實施例 7 所得含有表現分泌傷寒鞭毛蛋白之轉形微生物之耐酸性無縫膠囊、軟膠囊、以及硬膠囊之各製劑時，使用任一形態之耐酸性膠囊製劑，相較於無耐酸性之比較例 10~12 的膠囊製劑、或僅攝取生菌之例，在大便中、血中之 IgA 量皆多，可知誘發抗體之效果高。

產業上之可利用性

經由將表現鞭毛蛋白之轉形微生物置入耐酸性膠囊內之製劑，可提高抗鞭毛蛋白抗體的產生量。如此作為對傷寒、霍亂、痢疾等細菌性感染症之經口疫苗具有效果，因此可提供細菌性感染症的預防以及治療方法。若考慮近年來耐藥性感染症病菌的蔓延，對流行地區居民及往該地區工作或旅行的人經口投與疫苗，將成為理想的預防及治療策略。

【圖式簡單說明】

第 1 圖顯示質體 pBLES100 之構造模式圖。

第 2 圖顯示製備作為鞭毛蛋白表現載體之 pBLES-FliC 的構造的模式圖。

第 3 圖為三層構造之含有表現鞭毛蛋白之轉形微生物之無縫膠囊製劑的構成模式斷面圖。

【主要元件符號說明】

無。

序列表

<110> 森下仁丹股份有限公司(Morishita Jintan Co., Ltd.)
 GMJ股份有限公司(GMJ, Inc.)

<120> 經口疫苗

<130> P2-08M03023

<150> JP 2007-70626
 <151> 2007-03-19

<160> 12

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> 人造

<220>
 <223> 鼠傷寒桿菌(*Salmonella typhimurium*)前置引子

<400> 1
 catgcatgg atggcacagt cattaataca 30

<210> 2
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> 人造

<220>
 <223> 鼠傷寒桿菌(*Salmonella typhimurium*)反置引子

<400> 2
 cgcgatcct taacgcagta aagagaggac 30

<210> 3
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> 人造

<220>
 <223> 霍亂弧菌(*Vibrio cholerae*)前置引子

<400> 3
 catgcatgg atggcaatta atgtaaacac g 31

<210> 4
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> 人造

<220>
 <223> 霍亂弧菌(*Vibrio cholerae*)反置引子

<400> 4
 cgcgatcct ttatcccaat aagctcagag c 31

<210> 5
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> 人造

<220>
 <223> 志賀氏痢疾桿菌(*Shigella dysenteriae*)前置引子

<400> 5
 catgcatgg atggcacaag tcattaatac 30

PD1083807中文序列表

<210> 6
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> 人造

<220>
 <223> 志賀氏痢疾桿菌(*Shigella dysenteriae*)反置引子

<400> 6
 cgcgatcct ttaaccctgc tgcagagaca 30

<210> 7
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> 人造

<220>
 <223> hup前置引子

<400> 7
 cgccaagctt tggcgcggc ggccatgaag 30

<210> 8
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> 人造

<220>
 <223> hup反置引子

<400> 8
 cgcgcatgg aaagcatcct tcttgggtca 30

<210> 9
 <211> 600
 <212> DNA
 <213> 龍根雙歧桿菌(*Bifidobacterium longum*)

<220>
 <221> 啓動子
 <222> (1)..(192)
 <223>

<220>
 <221> CDS
 <222> (193)..(474)
 <223>

<220>
 <221> 終止序列
 <222> (475)..(600)
 <223>

<400> 9
 tggcgcggc ggccatgaag tggcttgaca agcataatct tgtctgattc gtctattttc 60
 ataccccctt cggggaaata gatgtgaaaa cccttataaa acgcggttt tcgcagaaac 120
 atgcgctagt atcattgatg acaacatgga ctaagcaaaa gtgcttgacc cctgacccaa 180
 gaaggatgct tt atg gca tac aac aag tct gac ctc gtt tcg aag atc gcc 231
 Met Ala Tyr Asn Lys Ser Asp Leu Val Ser Lys Ile Ala
 1 5 10

cag aag tcc aac ctg acc aag gct cag gcc gag gct gct gtt aac gcc 279
 Gln Lys Ser Asn Leu Thr Lys Ala Gln Ala Glu Ala Ala Val Asn Ala
 15 20 25

ttc cag gat gtg ttc gtc gag gct atg aag tcc ggc gaa ggc ctg aag 327
 Phe Gln Asp Val Phe Val Glu Ala Met Lys Ser Gly Glu Gly Leu Lys
 30 35 40 45

PD1083807中文序列表

ctc acc ggc ctg ttc tcc gct gag cgc gtc aag cgc ccg gct cgc acc 375
 Leu Thr Gly Leu Phe Ser Ala Glu Arg Val Lys Arg Pro Ala Arg Thr
 50 55 60

ggc cgc aac ccg cgc act ggc gag cag att gac att ccg gct tcc tac 423
 Gly Arg Asn Pro Arg Thr Gly Glu Gln Ile Asp Ile Pro Ala Ser Tyr
 65 70 75

ggc gtt cgt atc tcc gct ggc tcc ctg ctg aag aag gcc gtc acc gag 471
 Gly Val Arg Ile Ser Ala Gly Ser Leu Leu Lys Lys Ala Val Thr Glu
 80 85 90

tga cctctgctc gtacgatta ctccagacat tactgacgac aaagaccccg 524

accgagatgg tcggggctct tttgttgg tgctgtgacg tgtgtccaa ccgtattatt 584

ccggactagt tcagcg 600

- <210> 10
- <211> 93
- <212> PRT
- <213> 龍根雙歧桿菌(*Bifidobacterium longum*)

<400> 10
 Met Ala Tyr Asn Lys Ser Asp Leu Val Ser Lys Ile Ala Gln Lys Ser
 1 5 10 15

Asn Leu Thr Lys Ala Gln Ala Glu Ala Ala Val Asn Ala Phe Gln Asp
 20 25 30

Val Phe Val Glu Ala Met Lys Ser Gly Glu Gly Leu Lys Leu Thr Gly
 35 40 45

Leu Phe Ser Ala Glu Arg Val Lys Arg Pro Ala Arg Thr Gly Arg Asn
 50 55 60

Pro Arg Thr Gly Glu Gln Ile Asp Ile Pro Ala Ser Tyr Gly Val Arg
 65 70 75 80

Ile Ser Ala Gly Ser Leu Leu Lys Lys Ala Val Thr Glu
 85 90

- <210> 11
- <211> 34
- <212> DNA
- <213> 人造

- <220>
- <223> 兩歧雙歧桿菌(*Bifidobacterium bifidum*)前置引子

<400> 11
 cggcaagctt tatgggggat acaggattgg cgat 34

- <210> 12
- <211> 33
- <212> DNA
- <213> 人造

- <220>
- <223> 兩歧雙歧桿菌(*Bifidobacterium bifidum*)反置引子

<400> 12
 gcgcccattg aaatcgggtg gcgtcctcga ccg 33



104.1.30

十、申請專利範圍：

1. 一種對細菌感染性疾病之經口疫苗，其中該經口疫苗為膠囊製劑之形態，該膠囊製劑是由膠囊皮膜與表現抗原蛋白質鞭毛蛋白之轉形微生物所構成，該膠囊皮膜是耐酸性，經由該膠囊皮膜包含該轉形微生物，該細菌感染性疾病為傷寒、霍亂、或痢疾，且該微生物為雙歧桿菌 (*Bifidobacterium*) 屬、或乳酸菌 (*Lactobacillus*) 屬。
2. 如申請專利範圍第 1 項之經口疫苗，其中該抗原蛋白質鞭毛蛋白表現於該微生物的菌體內。
3. 如申請專利範圍第 1 項之經口疫苗，其中該抗原蛋白質鞭毛蛋白分泌於該微生物的菌體外。
4. 如申請專利範圍第 1 至 3 項中任一項之經口疫苗，其中該膠囊製劑為無縫膠囊 (*seamless capsule*) 製劑、軟膠囊製劑、或硬膠囊製劑。
5. 一種製造對細菌感染性疾病之經口疫苗之方法，其包括：
取得鞭毛蛋白基因，製備含該鞭毛蛋白基因之表現載體，並且藉由該表現載體轉形微生物，而製備表現抗原蛋白質鞭毛蛋白之轉形微生物之步驟；以及
經由耐酸性膠囊皮膜封入該轉形微生物而產生耐酸性膠囊製劑之步驟；
其中該細菌感染性疾病為傷寒、霍亂、或痢疾，該微生物為雙歧桿菌 (*Bifidobacterium*) 屬、或乳酸菌 (*Lactobacillus*) 屬。
6. 如申請專利範圍第 5 項之方法，其中該轉形微生物表現抗

原蛋白質鞭毛蛋白於菌體內。

7. 如申請專利範圍第 5 項之方法，其中該轉形微生物分泌抗
原蛋白質鞭毛蛋白於菌體外。

8. 如申請專利範圍第 5 至 7 項中任一項之方法，其中該膠囊
製劑為無縫膠囊製劑、軟膠囊製劑、或硬膠囊製劑。

9. 一種製造對細菌感染性疾病之經口疫苗之方法，其包括：
取得鞭毛蛋白基因，製備含該鞭毛蛋白基因之表現載體，
並且藉由該表現載體轉形微生物，而製備表現抗原蛋白質
鞭毛蛋白之轉形微生物之步驟；

經由膠囊皮膜封入該轉形微生物而產生膠囊製劑之
步驟；以及

使該所產生之膠囊製劑的膠囊皮膜變成耐酸性之步
驟；

其中該細菌感染性疾病為傷寒、霍亂、或痢疾，該微
生物為雙歧桿菌 (*Bifidobacterium*) 屬、或乳酸菌
(*Lactobacillus*) 屬。

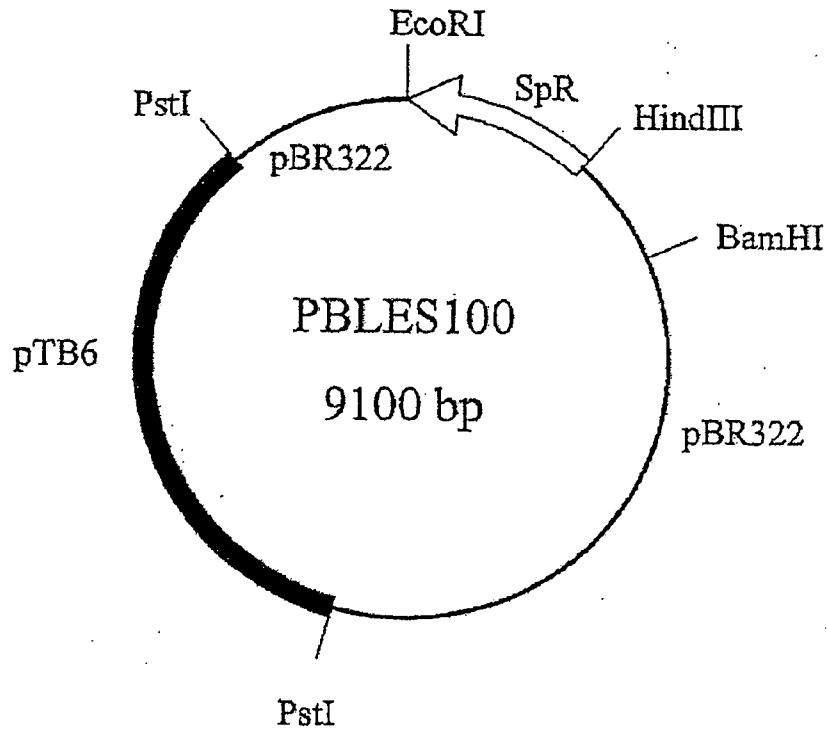
10. 如申請專利範圍第 9 項之方法，其中該轉形微生物表現抗
原蛋白質鞭毛蛋白於菌體內。

11. 如申請專利範圍第 9 項之方法，其中該轉形微生物分泌抗
原蛋白質鞭毛蛋白於菌體外。

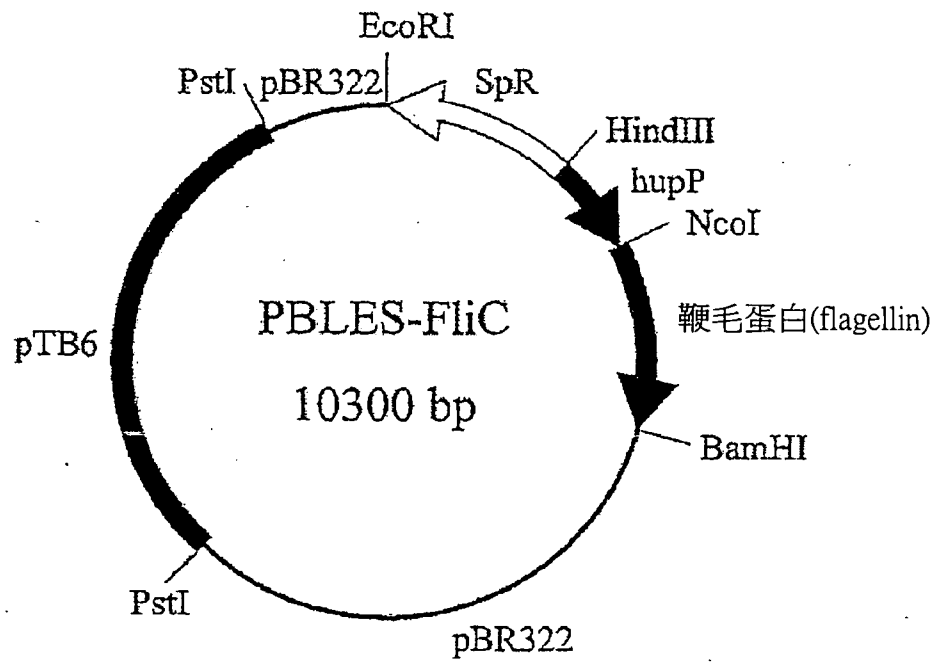
12. 如申請專利範圍第 9 至 11 項中任一項之方法，其中該膠囊
製劑為無縫膠囊製劑、軟膠囊製劑、或硬膠囊製劑。

十一、圖式：

第 1 圖



第 2 圖



第 3 圖

