

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6145046号
(P6145046)

(45) 発行日 平成29年6月7日 (2017.6.7)

(24) 登録日 平成29年5月19日 (2017.5.19)

(51) Int. Cl.

F I

A 6 1 K 39/10 (2006.01)
 A 6 1 K 39/295 (2006.01)
 A 6 1 K 39/00 (2006.01)
 A 6 1 K 39/39 (2006.01)
 A 6 1 P 31/04 (2006.01)

A 6 1 K 39/10
 A 6 1 K 39/295
 A 6 1 K 39/00
 A 6 1 K 39/39
 A 6 1 P 31/04

H

請求項の数 11 (全 30 頁)

(21) 出願番号 特願2013-545520 (P2013-545520)
 (86) (22) 出願日 平成23年12月21日 (2011.12.21)
 (65) 公表番号 特表2014-500302 (P2014-500302A)
 (43) 公表日 平成26年1月9日 (2014.1.9)
 (86) 国際出願番号 PCT/IB2011/003100
 (87) 国際公開番号 W02012/085642
 (87) 国際公開日 平成24年6月28日 (2012.6.28)
 審査請求日 平成26年12月12日 (2014.12.12)
 (31) 優先権主張番号 61/425,855
 (32) 優先日 平成22年12月22日 (2010.12.22)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 11152829.5
 (32) 優先日 平成23年2月1日 (2011.2.1)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(73) 特許権者 510000976
 インターベット インターナショナル ベー.
 フェー.
 オランダ国、5831・アー・エヌ・ボツ
 クスメール、ウイム・ドウ・コルベルスト
 ラート・35
 (74) 代理人 100114188
 弁理士 小野 誠
 (74) 代理人 100119253
 弁理士 金山 賢敦
 (74) 代理人 100124855
 弁理士 坪倉 道明
 (74) 代理人 100129713
 弁理士 重森 一輝

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 全身投与用の生細菌単離株を含むワクチン

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

生 a r o 変異 B . b r o n c h i s e p t i c a 株および芳香族栄養補給物を含む、B o r d e t e l b r o n c h i s e p t i c a (B . b r o n c h i s e p t i c a) 感染に起因する臨床疾患から動物を保護するためのワクチンであって、ここでワクチンが全身投与に適し、前記芳香族栄養補給物が、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、パラアミノ安息香酸、及び 2 , 3 ジヒドロキシ安息香酸を含む、ワクチン。

【請求項 2】

生 a r o 変異 B . b r o n c h i s e p t i c a 株が生 a r o A 変異 B . b r o n c h i s e p t i c a 株である請求項 1 のワクチン。

【請求項 3】

アジュバントをさらに含む請求項 2 のワクチン。

【請求項 4】

アジュバントがアルミニウム塩を含む請求項 3 のワクチン。

【請求項 5】

アルミニウム塩がリン酸アルミニウム、硫酸アルミニウムカリウムおよび水酸化アルミニウムから成る群より選択される請求項 4 のワクチン。

【請求項 6】

イヌインフルエンザウイルス抗原、イヌパラインフルエンザウイルス抗原、またはイヌインフルエンザウイルス抗原およびイヌパラインフルエンザウイルス抗原の双方をさらに

含む請求項 5 のワクチン。

【請求項 7】

イヌインフルエンザウイルス抗原が不活化イヌインフルエンザウイルスおよびイヌパラインフルエンザウイルス抗原が改変型生イヌパラインフルエンザウイルスである請求項 6 のワクチン。

【請求項 8】

生 *aroA* 変異 *B. bronchiseptica* 株および改変型生イヌパラインフルエンザウイルスが凍結乾燥球体中にありおよび不活化イヌインフルエンザウイルスが希釈剤中にある請求項 7 のワクチン。

【請求項 9】

イヌインフルエンザウイルス H3 赤血球凝集素タンパク質をコードする核酸またはその抗原性フラグメントを含む生 *aro* 変異 *Bordetella bronchiseptica* (*B. bronchiseptica*) 株を含む多価ワクチンであって；ここで前記核酸が操作可能にプロモーターに連結されており；およびそれによって前記生 *aro* 変異 *B. bronchiseptica* 株がイヌインフルエンザウイルス H3 赤血球凝集素またはその抗原性フラグメントを発現することができ、前記ワクチンが、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、パラアミノ安息香酸、および 2, 3 ジヒドロキシ安息香酸を含む芳香族栄養補給物を含む、多価ワクチン。

【請求項 10】

請求項 2 のワクチンをイヌに全身的に投与することを含む、*B. bronchiseptica* 感染に起因する臨床疾患からのイヌの保護における救援方法。

【請求項 11】

請求項 1 のワクチンを非ヒト動物に全身的に投与することを含む、*B. bronchiseptica* 感染に起因する臨床疾患からの非ヒト動物の保護における救援方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、弱毒化生細菌単離株を含む、全身投与用のワクチンに関する。また本発明は、当該ワクチンの製造および動物検体のワクチン接種方法にも関する。

【背景技術】

【0002】

Bordetella bronchiseptica (*B. bronchiseptica*) (気管支敗血症菌) は、広い範囲の宿主種において呼吸器感染症を引き起こさせ得る、線毛を有する健常呼吸器粘膜に効率的にコロニーを形成することができる、非常に感染力の強いグラム陰性細菌である。従って *B. bronchiseptica* は、ブタの萎縮性鼻炎およびイヌの伝染性気管気管支炎 (ケンネルコフ) 双方の病原体である。

【0003】

しかし人間は特に、人間を自然界の唯一の標的とする周知の *Bordetella pertussis* (*B. pertussis*) (百日咳菌) にはるかに感染し易い (Stevenenson および Roberts, FEMS Immunology and Medical Microbiology 37:121-128 (2003) を参照)。加えて、*B. pertussis* と違って *B. bronchiseptica* は百日咳毒素を発現しない。さらに、*B. pertussis* 感染が上気道に遷延性のコロニー形成をもたらさないことが知られているのに対して、*B. bronchiseptica* はかなりの異なった動物種の上気道に慢性感染を引き起こす。生 *B. pertussis* ワクチンの全身投与がヒト検体用に最近提案されたのに対して (米国特許公開第 2009/0246222 A1 号を参照)、今まで、例えば Nobivac (登録商標) KC および Intra Trac II (Merck Animal Health から入手可能)、Recombitek (登録商標) KC2 (Merck から入手可能) および Bronchi Shield III (Fort Dodge から入手可能) などの、弱毒化

10

20

30

40

50

生 *B. bronchiseptica* ワクチンは、一貫して非ヒト動物への局所的な鼻腔内投与用に設計されてきた。

【0004】

弱毒化生細菌を作成するための特定の方法の1は、当該細菌の1または複数の鍵遺伝子を改変することである。多くの微生物においてコリスミ酸は、葉酸およびフェニルアラニン、チロシンおよびトリプトファンの3の芳香族アミノ酸、を含む重要な芳香族化合物の生合成における決定的な中間体である (Moatら、*Microbial Physiology* (2002) Wiley Liss、第15章、525-527ページ)。それ故に、コリスミ酸の生合成経路内の、例えば *aroA* 等の遺伝子の不活化が、弱毒化生細菌株を作成するために使用されてきた。従って、*Mannheimia haemolytica* (ウシ肺炎原因菌)、*Pasteurella multocida* (人獣共通感染症菌)、*Hemophilus somnus* (牛ヘモフィルス・ソムラス感染症菌) (例えば、BriggsおよびTatum、*Applied and Environmental Microbiology*、71(11)7187-7195 (2005)); TatumおよびBriggs、*Applied and Environmental Microbiology*、71(11)7196-7202 (2005); 米国特許第5,840,556号を参照)、*Salmonella typhimurium* (ネズミチフス菌) (Douganら、*Molecular and General Genetics*、207(2-3)402-405 (1987)) および *B. pertussis* (Robertsら、*Infectious Immunology* 58: 732-739 (1990)) を含む、多数の細菌が *aroA* 遺伝子に遺伝子欠失を含むように構築された。しかし今までに、当該 *aroA* 変異細菌を含むワクチンは、たとえあるとしても大部分は最小の成功しか示していないが、米国特許公開第2009/0246222 A1号の段落[0133]を参照すると、それは *aroA* 欠失を有する *B. pertussis* を含むワクチンに関するかなり限定的な成功に明確に言及しており、しかもその代りに *B. pertussis* の3の主要毒素の一をコードする遺伝子内の変異を有する非病原性の生 *B. pertussis* 構築物の使用を強く推奨している。

【0005】

また *B. bronchiseptica* の *aroA* 欠失株も構築された (StevensonおよびRoberts、*Vaccine* 20、2325-2335 (2002))。この研究者たちは、欠失体の *aroA* *B. bronchiseptica* 株を単独で鼻腔内ワクチンに使用した。しかし鼻腔内ワクチンは、しばしばその鼻孔へのいかなる物質の投与にも抵抗する、特にイヌまたはネコ等の成体動物に対して投与するのには不便である。またこのような鼻腔内ワクチンの投与は、投与の間に動物がくしゃみでもすれば、動物によって摂取されるワクチン量が保護的であると示される用量に顕著に満たないであろうというリスクも引き起こす。これに反して、生 *B. bronchiseptica* の全身投与は、弱毒化されたときでさえ重篤な膿瘍形成をもたらすことが知られているので、その時点まで生ワクチンの全身投与は安全な選択肢とはみなされなかった (例えばToshachら、*J Am Anim Hosp Assoc* 33:126-128 (1997) を参照)。

【0006】

また、Pfizer Animal Healthから入手可能である不活化全細胞 *B. bronchiseptica* ワクチンである Bronchicine (登録商標) CAeを含む、いくつかの不活化全細胞およびサブユニット *B. bronchiseptica* ワクチンもイヌに対する非経口投与に関し記載されてきた。残念ながら、また当該不活化 *B. bronchiseptica* ワクチンについてもいくつかの欠点がある。例えばリポ多糖 (LPS) はグラム陰性細菌に固有であり、それ故に、不活化 *B. bronchiseptica* ワクチンの全身投与はLPSによる内毒素ショックをもたらすかもしれない。従って、不活化ワクチンはLPS量を最小限にするために高度に精製する必要がある。このような精製は、ワクチン製造をより複雑にし、しばしば有効な抗原の損失をま

10

20

30

40

50

ねき、それによって総体的な製造コストを増加させる。それ故に、*B. bronchiseptica* に対して安全かつ有効である全身投与用のワクチンを獲得する必要がある。

【0007】

本明細書のいかなる参考文献の引用も、当該参考文献が本出願に対する「先行技術」として利用可能であることを認めるものと解釈されるものではない。

【発明の概要】

【0008】

上に例示した現行ワクチンの欠陥に打ち勝つために本発明は、細菌感染に対する新規ワクチンならびにそれらに対応する免疫原性組成物を提供する。また本発明は、当該ワクチンを動物に投与する方法も提供する。本発明は、本発明のワクチンを投与することによって、動物における疾患を予防する方法をさらに提供する。特定の実施態様において、動物はイヌである。他の実施態様において、動物はネコである。さらに他の実施態様において、動物はブタである。

10

【0009】

特定の実施態様において、ワクチンは全身投与に適した形態である生 *aro* 変異細菌を含む。一定の実施態様において、生 *aro* 変異細菌は生 *aroA* 変異細菌である。特定の実施態様において、細菌は *B. bronchiseptica* である。このタイプの一定の実施態様において、ワクチンは生 *aroA* 変異 *B. bronchiseptica* 株を含む。本発明の特定の実施態様において、ワクチンは、動物の保護を救援することが可能でありおよび/または当該動物を *B. bronchiseptica* 感染に起因する障害および/または臨床疾患から保護することが可能である。

20

【0010】

本発明のワクチンは、生 *aro* 変異細菌および芳香族栄養補給物を含むことが可能である。特定の実施態様において、本発明のワクチンの芳香族栄養補給物はチロシンを含む。一定の実施態様において、本発明のワクチンの芳香族栄養補給物はトリプトファンを含む。特定の実施態様において、本発明のワクチンの芳香族栄養補給物はフェニルアラニンを含む。一定の実施態様において、本発明のワクチンの芳香族栄養補給物はパラアミノ安息香酸を含む。特定の実施態様において、本発明のワクチンの芳香族栄養補給物は2, 3ジヒドロキシ安息香酸を含む。一定の実施態様において、本発明のワクチンの芳香族栄養補給物は葉酸を含む。特定の実施態様において、本発明のワクチンの芳香族栄養補給物はエンテロバクチンを含む。

30

【0011】

特定の実施態様において、本発明のワクチンの芳香族栄養補給物は複数の芳香族化合物を含む。2以上の当該芳香族化合物の任意の組み合わせからなる実施態様が、本発明のワクチンの芳香族栄養補給物によって含まれ得る。一定の実施態様において、本発明のワクチンの芳香族栄養補給物はフェニルアラニンおよびトリプトファンを含む。特定の実施態様において、本発明のワクチンの芳香族栄養補給物はフェニルアラニンおよびチロシンを含む。一定の実施態様において、本発明のワクチンの芳香族栄養補給物はチロシンおよびトリプトファンを含む。特定の実施態様において、本発明のワクチンの芳香族栄養補給物はフェニルアラニン、チロシンおよびトリプトファンを含む。

40

【0012】

特定の実施態様において、本発明のワクチンの芳香族栄養補給物はパラアミノ安息香酸および2, 3ジヒドロキシ安息香酸を含む。一定の実施態様において、本発明のワクチンの芳香族栄養補給物は2, 3ジヒドロキシ安息香酸および葉酸を含む。特定の実施態様において、本発明のワクチンの芳香族栄養補給物は葉酸およびエンテロバクチンを含む。一定の実施態様において、本発明のワクチンの芳香族栄養補給物はパラアミノ安息香酸およびエンテロバクチンを含む。

【0013】

特定の実施態様において、本発明のワクチンの芳香族栄養補給物はフェニルアラニン、チロシン、トリプトファンおよびパラアミノ安息香酸を含む。一定の実施態様において、

50

本発明のワクチンの芳香族栄養補給物はフェニルアラニン、チロシン、トリプトファンおよび葉酸を含む。特定の実施態様において、本発明のワクチンの芳香族栄養補給物はフェニルアラニン、チロシン、トリプトファンおよび2,3-ジヒドロキシ安息香酸を含む。一定の実施態様において、本発明のワクチンの芳香族栄養補給物はフェニルアラニン、チロシン、トリプトファンおよびエンテロバクチンを含む。特定の実施態様において、本発明のワクチンの芳香族栄養補給物はフェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、パラアミノ安息香酸および2,3-ジヒドロキシ安息香酸を含む。

【0014】

一定の実施態様において、本発明のワクチンはアジュバントを含む。このタイプの特定の実施態様において、アジュバントはアルミニウム塩である。一定の実施態様において、アルミニウム塩はリン酸アルミニウムである。他の実施態様において、アルミニウム塩は水酸化アルミニウムである。さらに他の実施態様において、アルミニウム塩は硫酸アルミニウムカリウムである。特定の実施態様において、本発明のワクチンは芳香族栄養補給物およびアジュバントの双方を含む。特定の実施態様において、本発明のワクチンの芳香族栄養補給物はフェニルアラニン、チロシン、トリプトファンおよびパラアミノ安息香酸を含み、ならびにアジュバントは水酸化アルミニウムである。このタイプの特定の実施態様において、本発明のワクチンの芳香族栄養補給物はフェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、パラアミノ安息香酸および2,3-ジヒドロキシ安息香酸を含み、ならびにアジュバントは水酸化アルミニウムである。

【0015】

また本発明は多価ワクチンも提供する。本発明の全てのワクチンに当てはまることだが、本発明の多価ワクチンは芳香族栄養補給物および/またはアジュバントを含むことが可能である。一定の実施態様において、ワクチンは生 *B. bronchiseptica* の *aroA* 変異株およびイヌパラインフルエンザウイルス (CPI) 抗原を含む。特定の実施態様において、イヌパラインフルエンザウイルス抗原は改変型生パラインフルエンザウイルスである。一定の実施態様において、ワクチンは生 *aroA* 変異 *B. bronchiseptica* およびイヌインフルエンザウイルス (CIV) 抗原を含む。特定の実施態様において、イヌインフルエンザウイルス抗原は不活化イヌインフルエンザウイルスである。一定の実施態様において、ワクチンは生 *aroA* 変異 *B. bronchiseptica* および、イヌインフルエンザウイルス抗原およびイヌパラインフルエンザウイルス抗原の双方を含む。このタイプの特定の実施態様において、イヌインフルエンザウイルス抗原は不活化イヌインフルエンザウイルスであり、およびイヌパラインフルエンザウイルス抗原は改変型生パラインフルエンザウイルスである。

【0016】

本発明の特定の多価ワクチンは、異種抗原 (例えば、別の病原菌由来の抗原) をコードする異種核酸を含む生 *B. bronchiseptica* の *aroA* 変異株を含むことが可能である。異種核酸は操作可能にプロモーターに連結され、それによって *B. bronchiseptica* の *aroA* 変異株が当該異種抗原を発現することを可能とする。このタイプの一定の実施態様において、異種核酸はウイルス抗原をコードする。このタイプの特定の実施態様において、ウイルス抗原はインフルエンザウイルス抗原である。関連する実施態様において、インフルエンザウイルス抗原はイヌインフルエンザウイルス由来である。他の実施態様において、インフルエンザウイルス抗原はネコインフルエンザウイルス由来である。さらに他の実施態様において、インフルエンザウイルス抗原はブタインフルエンザウイルス由来である。一定の実施態様において、インフルエンザウイルス抗原は赤血球凝集素である。他の実施態様において、インフルエンザウイルス抗原はノイラミニダーゼである。

【0017】

より特別な実施態様において、ウイルス抗原はイヌインフルエンザウイルス H3 赤血球凝集素である。他の実施態様において、異種核酸はイヌインフルエンザウイルス H3 赤血球凝集素の抗原性フラグメントをコードする。さらに他の実施態様において、異種核酸は

イヌインフルエンザウイルスN 8 ノイラミニダーゼをコードする。さらに他の実施態様において、異種核酸はイヌインフルエンザウイルスN 2 ノイラミニダーゼをコードする。さらに他の実施態様において、*B. bronchiseptica*のaro A変異株は複数の異種核酸を含む。このタイプの特定の実施態様において、*B. bronchiseptica*のaro A変異株は、イヌインフルエンザウイルスH 3 赤血球凝集素をコードする異種核酸およびイヌインフルエンザウイルスN 8 ノイラミニダーゼをコードする異種核酸の双方を含む。さらにこのタイプの他の実施態様において、異種核酸はイヌインフルエンザウイルスのH 3 赤血球凝集素およびN 2 ノイラミニダーゼの双方をコードする。

【0018】

より特別な実施態様において、当該多価ワクチンは芳香族栄養補給物および/またはアルミニウム塩アジュバントをさらに含む。1の当該実施態様において、多価ワクチンは芳香族栄養補給物および/またはアルミニウム塩アジュバント、および操作可能にプロモーターに連結されているイヌインフルエンザウイルスH 3 赤血球凝集素を含む生*B. bronchiseptica*のaro A変異株を含む。一定の実施態様において、当該多価ワクチンは改変型生パラインフルエンザウイルスをさらに含む。

【0019】

本発明の全てのワクチンは、凍結乾燥することが可能でありおよび/またはその凍結乾燥部分(例えば、画分)を有する。特定の実施態様において、凍結乾燥ワクチンまたはその一部分は凍結乾燥ケーキの形態である。関連する実施態様において、凍結乾燥ワクチンまたはその一部分は凍結乾燥球体の形態である。さらに他の実施態様において、凍結乾燥ワクチンまたはその一部分は凍結乾燥卵形体および/または楕円体の形態である。

【0020】

従って、本発明のワクチンは少なくともその1が凍結乾燥画分であり、2以上の異なる部分(例えば、画分)となることが可能である。このタイプの実施態様において、少なくとも1の他の部分は液体である。このタイプの一定の実施態様において、少なくとも1部分は凍結乾燥体であり、しかも少なくとも他のもう一つは液体の希釈剤である。特定の実施態様において、本発明の多価ワクチンの凍結乾燥部分は、1または複数の抗原を含み、一方では希釈剤は1または複数の異なる抗原を含む。このタイプのより特定の実施態様において、多価ワクチンの凍結乾燥部分は生*B. bronchiseptica*のaro A変異株を含む。このタイプの特別な実施態様において、多価ワクチンの凍結乾燥部分は改変型生イヌパラインフルエンザウイルスに加えて生*B. bronchiseptica*のaro A変異株を含む。関連する実施態様において、希釈剤は不活化イヌインフルエンザウイルスを含む。特定の実施態様において、希釈剤は芳香族栄養補給物および/またはアジュバントを含む。一定の実施態様において、多価ワクチンの凍結乾燥部分は芳香族栄養補給物および/またはアジュバントをさらに含む。特定の実施態様において、多価ワクチンの凍結乾燥部分および希釈剤の双方は芳香族栄養補給物および/またはアジュバントを含む。特定の実施態様において、多価ワクチンの凍結乾燥部分は芳香族栄養補給物と共に生*B. bronchiseptica*のaro A変異株およびイヌパラインフルエンザウイルスを含み、一方で希釈剤は不活化イヌインフルエンザウイルスおよびアジュバントを含む。より特別の実施態様において、アジュバントは2ないし5%水酸化アルミニウムである。

【0021】

本発明は、*B. bronchiseptica*感染に起因する臨床疾患に対する動物(人間を含む)の保護における救援方法をさらに提供する。特定の実施態様において、当該方法は本発明のワクチンを動物に全身的に投与することを含む。一定の実施態様において、動物は哺乳動物である。特定の実施態様において、哺乳動物はブタである。他の実施態様において、哺乳動物はイヌである。さらに他の実施態様において、哺乳動物はネコである。一定の実施態様において、本発明のワクチンの全身投与は皮下接種によって行われる。

【0022】

10

20

30

40

50

また本発明は、*B . b r o n c h i s e p t i c a*感染に起因する臨床疾患から動物を保護するワクチンを製造するための、生 *a r o* 変異 *B . b r o n c h i s e p t i c a*の使用をも提供する。好ましくは、ワクチンは全身投与に適した形態である。このタイプの一定の実施態様において、ワクチンはアジュバントをさらに含む。特定の実施態様において、アジュバントはアルミニウム塩である。より特定の実施態様において、アルミニウム塩は水酸化アルミニウムである。より他の実施態様において、アルミニウム塩はリン酸アルミニウムである。他の実施態様において、アルミニウム塩は硫酸アルミニウムカリウムである。

【 0 0 2 3 】

一定の実施態様において、ワクチンは芳香族栄養補給物をさらに含む。特定の実施態様において、ワクチンはアジュバントおよび芳香族栄養補給物の双方を含む。より特別の実施態様において、アジュバントは水酸化アルミニウムであり、ならびに芳香族栄養補給物はフェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、パラアミノ安息香酸および 2 , 3 ジヒドロキシ安息香酸を含む。

【 0 0 2 4 】

本発明に関するこれらおよび他の態様は、以下の詳細な記載への言及によってよりの確に認識されるであろう。

【発明が解決しようとする課題】

【 0 0 2 5 】

不活化抗原と対照的に、本発明の生 *a r o* 変異細菌は弱毒化される。従ってワクチンを調剤するときには、弱毒化細菌の力価を重大な有害事象がもたらされるよりも低い安全なレベルに維持するように注意しなければならない。しかし当該安全レベルの達成は、しばしば弱毒化生ワクチンの効果の低下をもたらす。本発明はワクチンに添加される弱毒化生細菌抗原の力価を増加することなく、ワクチンの効力を増加させることによってこの問題を克服した。加えて本発明は、安全かつ効果的なワクチンの作成に必要な弱毒化生細菌の量を顕著に減少させることによって、提供されるワクチンの製造コストを低減するための方法をも提供する。

【課題を解決するための手段】

【 0 0 2 6 】

従って本発明は、全身投与に適した形態で生 *a r o* 変異細菌を含む、安全かつ効果的なワクチンを提供する。1の態様において、本発明は生 *a r o* 変異細菌および芳香族栄養補給物を含むワクチンを提供する。特定の実施態様において、生 *a r o* 変異細菌は *a r o A* 変異細菌である。驚いたことに、生 *a r o A* 変異細菌を含むワクチンの効力は、芳香族栄養補給物が当該ワクチン組成物に添加されたときに、許容できない注射部位反応を引き起こすことなく顕著に増加することが見出された。

【 0 0 2 7 】

別の態様において、本発明はアジュバントの存在のためにより大きな効力を示す弱毒化生ワクチンを提供する。しばしばこのような効力の改善は、負の副作用を激しく増幅するアジュバントの添加によって達成された。それ故に、一方ではその安全性が許容可能なレベルに維持されると同時に、*B o r d e t e l l a b r o n c h i s e p t i c a* の *a r o* 変異株を含むワクチンの効力がアジュバントの添加によって改善することができる事は、思いがけなく見出された。この結果は、特に当該ワクチンに対する有効量の範囲の増加をもたらす。

【 0 0 2 8 】

さらに別の態様において、本発明は、一方ではワクチンの安全性が許容可能なレベルになお維持されると同時に、アジュバントおよび芳香族栄養補給物の双方の存在のためにより大きな効力を示す、弱毒化生 *a r o* 変異細菌ワクチンを提供する。

【 0 0 2 9 】

本発明は、*B . b r o n c h i s e p t i c a*感染に起因する臨床疾患から動物を保護するために、全身投与用ワクチンを製造するための生 *a r o* 変異 *B . b r o n c h i s e*

10

20

30

40

50

p t i c a を使用する方法をさらに提供する。また本発明は、B . b r o n c h i s e p t i c a 感染に起因する臨床疾患から動物を保護するための方法にも関係し、該方法は生 a r o 変異 B . b r o n c h i s e p t i c a 株を含むワクチンの全身投与を含む。

【 0 0 3 0 】

本明細書において用いる場合、以下の用語は以下に提示する定義を有するものとする。

【 0 0 3 1 】

本明細書において用いる場合、「ワクチン」とは、典型的には水を含む液体等の薬理学的に許容可能な担体と組み合わせられた 1 または複数の抗原を含む、動物（一定の実施態様において人間を含む）への施用に適した組成物であり、それは動物へ投与されると、野生型の微生物感染に起因する臨床疾患から保護する最小限の救援にとって十分強力な、すなわち、臨床疾患の予防における救援、および / または臨床疾患の予防、寛解または治癒における救援にとって十分強力な、免疫応答を誘導する。

【 0 0 3 2 】

本明細書において用いる場合、「多価ワクチン」とは 2 以上の異なる抗原を含むワクチンである。このタイプの特定の実施態様において、多価ワクチンは 2 以上の異なる病原体に対する受容者の免疫系を刺激する。

【 0 0 3 3 】

本明細書において用いる場合、用語「保護 (p r o t e c t i n g) 」または「保護の提供 (p r o v i d i n g p r o t e c t i o n t o) 」および「保護における救援 (a i d s i n t h e p r o t e c t i o n) 」とは、任意の感染徴候からの完全な保護を要求するものではない。例えば、「保護における救援」とは、感染後に潜在的な感染の徴候が少なくとも減少するように、および / または潜在的な細胞性、生理学的または生化学的な原因または症状を引き起こす機構の 1 または複数が増加および / または除去されるように、保護が十分であることを意味することがある。この文脈で用いられる場合「減少」とは、感染の分子状態を含むが感染の生理学的状態を含まない、感染の状態に係する意味である。

【 0 0 3 4 】

本明細書において用いる場合、用語「薬理学的に許容可能」は、修飾される名詞が医薬製品の使用に適していることを意味するために形容詞的に使用される。例えば、医薬ワクチン中の賦形剤を記載するためにそれが使用される場合、それは組成物の他の原料と共存できる、しかも所期の受容者に不利や有害ではないものとして賦形剤を特徴づける。

【 0 0 3 5 】

用語「担体」とは、それと共に化合物が投与される希釈剤、アジュバント、賦形剤または媒介物 (v e h i c l e) をいう。薬理学的に許容可能な担体は、石油、動物、植物または合成起源の液体、例えばピーナッツ油、大豆油、鉱物油、ゴマ油等を含む、水および / または油等の無菌の液体であることが可能である。水または水溶液、生理食塩水およびブドウ糖水溶液およびグリセリン溶液が担体として、特に注射可能な溶液用に使用し得る。

【 0 0 3 6 】

本明細書において用いる場合、「アジュバント」とは、免疫事象の連鎖 (c a s c a d e) を促進または増大することができ、究極的には良好な免疫応答、即ち抗原に対する統合した身体的な応答をもたらすことのできる物質である。アジュバントは、免疫応答を起こさせるためには一般的には必要とされないが、当該応答を促進または増大する。

【 0 0 3 7 】

本明細書において用いる場合、「全身投与」は、身体の循環系（心血管系およびリンパ系を含む）への投与であり、従って、例えば消化管（例えば、経口投与または直腸投与による）および呼吸系（例えば、鼻腔内投与による）等の特定部位よりは身体全体に影響を及ぼす。全身投与は、例えば、筋肉組織の中（筋肉内）、皮膚の中（皮内、経皮または上皮）、皮膚の下（皮下）、粘膜の下（粘膜下）、静脈の中（静脈内）等へ投与することによって実施され得る。

【0038】

「非経口投与」には、皮下注射、粘膜下注射、静脈注射、筋肉内注射、皮内注射および点滴が含まれる。

【0039】

本明細書において用いる場合、「イヌ (canine)」には、特に指示のない限り全てのイエイヌ、*Canis lupus familiaris* または *Canis familiaris* が含まれる。

【0040】

本明細書において用いる場合、用語「ネコ」とは、ネコ科の任意のメンバーをいう。この科のメンバーには、亜科 *Felinae* の任意のメンバー、例えば、ネコ、ライオン、トラ、ピューマ、ジャガー、ヒョウ、ユキヒョウ、黒ヒョウ、クーガー、チータ、オオヤマネコ、ボブキャット、カラカルまたはその任意の雑種等の野生、動物園飼育および家庭飼育のメンバーが含まれる。またネコには、イエネコ、純血種および/または雑種の愛玩用ネコ、見世物用ネコ、実験用ネコ、クローンネコおよび野生またはノラネコも含まれる。

10

【0041】

本明細書において用いる場合、細菌における遺伝子の「遺伝子変異」は、突然変異および/または欠失および/または遺伝子への挿入の結果であり得て、自然におよび/または実験室場面においておよび継代培養により、および/または1または複数の遺伝子組換え方法による設計によって起こる遺伝子事象を含むことが可能である。

20

【0042】

本明細書において用いる場合、「aro変異」細菌とは、コリスミ酸を合成することができないか、または対応する野生型細菌よりも顕著に少ないコリスミ酸しか合成できない細菌であり、そのことは結果的に栄養補給されない培地、自然環境または環境において細菌増殖の顕著な阻害および/または遮断をもたらす。aroA変異細菌は、その対応する遺伝子産物（即ち、その遺伝によってコードされた酵素）に対応する阻害および/または不活性化をもたらす、コリスミ酸生合成経路内の遺伝の遺伝子変異および/または翻訳後機能不全から生じ得る。

【0043】

本明細書において用いる場合、「aroA変異」細菌とは、遺伝子変異がaroA遺伝子内にあり、および/または対応するaroA遺伝子産物の同様の阻害および/または不活性化をもたらす翻訳後機能不全による、aro変異細菌である。

30

【0044】

本明細書において用いる場合、「芳香族栄養補給物 (aromatic supplement)」とは、aro変異細菌（例えば、aroA変異株）の非効率的な増殖を少なくとも部分的に代償することのできる、1又は複数の芳香族化合物を含む組成物である。従って、培地、自然環境および/または環境に芳香族栄養補給物が存在すれば、aro変異細菌がより効率的に増殖することを可能とする。このように、芳香族栄養補給物には、コリスミ酸が中間体（例えば、フェニルアラニン等の芳香族アミノ酸）である生合成経路の1または複数の最終産物が含まれ得、および/またはさもなければコリスミ酸を含む生合成経路においてコリスミ酸の後に生合成される中間体（例えば、葉酸の生合成経路の中間体であるパラアミノ安息香酸）が含まれ得る。また芳香族栄養補給物には、コリスミ酸の代替資源および/またはaro変異細菌において不利な影響を及ぼしてきたコリスミ酸生合成経路内の1または複数の中間体の代替資源も含まれ得る。

40

【発明を実施するための形態】

【0045】

コリスミ酸経路：コリスミ酸は、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、葉酸、ユビキノンおよびエンテロバクチン（シデロホア）生合成における中心的な中間体である（Moatら、*Microbial Physiology* (2002) Wiley-Liss、第15章、525-527ページを参照）。ホスホエノルピルビン酸とD-エ

50

リトロース 4 リン酸との組み合わせから出発するコリスミ酸以前の生合成経路の反応物質、関連酵素の遺伝子コードおよび代謝産物、ならびにコリスミ酸生合成の終末を以下に提示する。

【0046】

ここで：

PEPはホスホエノールピルビン酸であり；

DAHPは3 ハイドロキシ L アラビノ 7 ホスホプツロン酸であり；

3 P シキミ酸は3 ホスホシキミ酸であり；および

EEPKは3 エノイル ピルビル 3 ホスホシキミ酸である。

【表 1】

反応物	遺伝子	生産物
・ D - エリトロース - 4 - リン酸	- - a r o (F , G , H) - →	DAHP
・ DAHP	- - a r o B - →	3 - ジヒドロキナ酸
・ 3 - ジヒドロキナ酸	- - a r o D - →	3 - ジヒドロシキミ酸
・ 3 - ジヒドロシキミ酸	- - a r o E - →	シキミ酸
・ シキミ酸 + ATP	- - a r o (K , L) - →	3 - P - シキミ酸 + ADP
・ 3 - P - シキミ酸 + PEP	- - a r o A - →	EEPK
・ EEPK	- - a r o C - →	コリスミ酸

【0047】

明らかな通り、a r o 遺伝子は、F , G , H 由来アイソザイムのコード、、B、D、E、K , L 由来アイソザイムのコード、AおよびCという順番で、B . b r o n c h i s e p t i c a におけるコリスミ酸合成に関与している。B . b r o n c h i s e p t i c a におけるコリスミ酸の生合成においてバイパスは存在しないように思われる。それ故に、これらのa r o 遺伝子の任意の1または対応する遺伝子産物の不活性化は、重要な芳香族化合物の生合成における同様の遮断をもたらすはずである。

【0048】

特定の実施態様において、上述の通りB . b r o n c h i s e p t i c a の他のa r o 遺伝子における欠失もコリスミ酸合成での同様の遮断をもたらす得、従って変異細菌と同じ表現型をもたらす得とはいえ、B . b r o n c h i s e p t i c a 細菌のa r o 変異株はa r o A 変異株である。

【0049】

ワクチン

本発明は、全身投与用の弱毒化生細菌を含む安全かつ効果的なワクチンを提供する。当該ワクチンは、アジュバント（下記を参照）、他の免疫応答賦活剤、および/または媒介物（集合的に「賦形剤（e x c i p i e n t）」と称する）を含む、従来の薬理学的に許容可能な1または複数の担体をさらに含んでもよいと考えられる。当該賦形剤は、一般的にワクチン中の活性成分に適合するように選択される。賦形剤の使用は、ワクチン開発分野の当業者に周知である。安定剤の構成成分には、糖類および糖アルコール（例えば、砂糖、グルコース、トレハロース、ソルビトール等）、ゼラチンタンパク質加水分解物（ラクトアルブミン加水分解物、NZアミン）、血清アルブミン（ウシ血清アルブミン、卵白アルブミン）および緩衝剤（b u f f e r i n g c o m p o u n d）が含まれてよい。選択的におよび/または加えて、例えば安定剤および粘度調整剤等の他の物質が、ワクチンの使用目的または要求性状に依存してワクチンに添加されてよい。ワクチンの多数の形態、例えば、溶解、乳化または懸濁した抗原を有する液剤等、および例えば、移植片または液体に懸濁した固形抗原担体等の固形剤等が全身性のワクチン接種に適している。全身

10

20

30

40

50

性のワクチン接種および当該ワクチン接種用の適合した物理的ワクチン形態は、多年にわたって知られてきた。

【 0 0 5 0 】

また、ワクチンは貯蔵のために凍結乾燥かさもなければ液量を減少し、それから投与の前または投与時に液体希釈剤で再構成してもよいとも考えられる。当該再構成は、例えばワクチングレードの水を使用して行ってよい。以下に例示する通り一定の実施態様において、多価ワクチンの凍結乾燥部分は1または複数の抗原を含むことが可能であり、一方では希釈剤は1または複数の異なる抗原を含むことが可能である。

【 0 0 5 1 】

特定の実施態様において、本発明のワクチン（またはその一部）は凍結乾燥形態であり得る。当該凍結乾燥形態の例には、ケーキ、錠、球体および／または楕円体が含まれ、後者の3形態はその内容をすべて本明細書に援用するWO 2010/125084に記載された方法によって作成することが可能である。特に、急速崩壊する錠／球体／楕円体を生産する方法を記載する、WO 2010/125084の15ページ28行目から27ページの9行目までは実施例に援用する。当該凍結乾燥形態は、ワクチンの全身投与を可能とするために希釈剤に容易に溶解することができる。また当該希釈剤はワクチンの1または複数の追加の活性成分をさらに含むことも可能である。

10

【 0 0 5 2 】

アジュバント：上述の通り、本発明のワクチンはアジュバントを含むことが可能である。より特定の実施態様において、アジュバントはアルミニウム塩を含む。アジュバントとしてのアルミニウム塩の使用は、ワクチン開発の技術分野において周知である。アルミニウム塩は特に類毒素を含むワクチン用に開発されてきたが、また他のサブユニットワクチンおよび不活化（ホール）微生物を含むワクチンと併用して使用されてもきた。また生ウイルスワクチンと併用するアルミニウム塩の使用も記載されてきたが、にもかかわらず一般的にアルミニウム塩は生細菌ワクチンの効力を改善するために使用されていない。しかし驚いたことに、アルミニウム塩が生菌の*B. bronchiseptica*に結合するかもしれないという事実は、これらの塩の生菌の*B. bronchiseptica*のaro変異株に対するアジュバント特性に負の効果を有さないように思われる。このことが、当該アジュバントの周知の安全記録と重なり、例えば炭化水素油、サポニン等の他のアジュバントよりもその応用をより望ましくしている。改良された実施態様において、アルミニウム塩はリン酸アルミニウム、硫酸アルミニウムカリウムおよび水酸化アルミニウムから成る群より選択される。

20

30

【 0 0 5 3 】

本発明の所定のワクチンに添加すべきアジュバントの最適量は、例えばワクチン中に含まれる抗原およびワクチン接種される菌種等のいくつかの可変要素に依存して変動し得るが、ワクチン開発分野の当業者によって本開示を用いて容易に決定され得る。本発明の一定の実施態様において、ワクチン中の水酸化アルミニウム、硫酸アルミニウムカリウムおよび／またはリン酸アルミニウムの量は0.5ないし15%の間であり得る。より特定の実施態様において、水酸化アルミニウム、硫酸アルミニウムカリウムおよび／またはリン酸アルミニウムの量は1.0ないし10%の間であり得、さらにより特定の実施態様において、ワクチン中の水酸化アルミニウム、硫酸アルミニウムカリウムおよび／またはリン酸アルミニウムの量は1.5ないし7.5%の間であり得る。以下に例示する通り、ワクチン中の水酸化アルミニウムまたはリン酸アルミニウムの量は約2%、もしくは約5%だった。

40

【 0 0 5 4 】

aroA混合物：上述の通り、本発明のaro変異細菌ワクチンは芳香族栄養補給物を含み得る。芳香族栄養補給物は1または複数の芳香族化合物を含み得る。当該芳香族化合物の例には、限定されるものではないが、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、プレフェン酸、アントラニル酸、インドール、パラアミノ安息香酸、葉酸、2,3ジヒドロキシ安息香酸およびエンテロバクチンが含まれる（例えば、Moatら、Micro

50

bial Physiology (2002) Wiley Liss、第15章、525
527ページを参照)。また芳香族栄養補給物には、コリスミ酸の代替資源および/または *aroA* 変異株において不利に影響を及ぼされてきたコリスミ酸生合成経路内の1または複数の中間体の代替脂源も含まれ得る。一定の実施態様において、抗酸化剤および/またはキレート剤が芳香族栄養補給物と共に含まれ得る。

【0055】

本発明の所定のワクチンに添加されるべき芳香族栄養補給物に含まれる芳香族化合物の最適量は、例えば、芳香族化合物それ自体、芳香族化合物と共に使用される溶媒系、ワクチン中に含まれる抗原およびワクチン接種される菌種等のいくつかの可変要素に依存して変動し得るが、ワクチン開発分野の当業者によって本開示を用いて容易に決定され得る。本発明の一定の実施態様において、芳香族栄養補給物を含むワクチン中の各々の芳香族アミノ酸の量は $4 \mu\text{g/mL}$ から 0.4 mg/mL まで変動し得る。特定の実施態様において、ワクチン中の各々の芳香族アミノ酸の量は $10 \mu\text{g/mL}$ から 0.2 mg/mL まで変動し得る。より特定の実施態様において、ワクチン中の各々の芳香族アミノ酸の量は $20 \mu\text{g/mL}$ から 0.1 mg/mL まで変動し得る。さらにより特定の実施態様において、ワクチン中の各々の芳香族アミノ酸の量は $30 \mu\text{g/mL}$ から $60 \mu\text{g/mL}$ まで変動し得る。以下に例示する通り、ワクチン中のフェニルアラニン、チロシンおよびトリプトファンの個々の量は約 $40 \mu\text{g/mL}$ だった。

【0056】

本発明の一定の実施態様において、芳香族アミノ酸の生合成経路に存在しないワクチン中の任意の芳香族化合物の付与量は、 $1 \mu\text{g/mL}$ から 0.1 mg/mL まで変動し得る。特定の実施態様において、当該芳香族化合物の量は、ワクチン中で $2.5 \mu\text{g/mL}$ から $50 \mu\text{g/mL}$ まで変動し得る。より特定の実施態様において、ワクチン中の当該芳香族化合物の量は、ワクチン中で $5 \mu\text{g/mL}$ から $20 \mu\text{g/mL}$ まで変動し得る。以下に例示する通り、ワクチン中の2, 3 ジヒドロキシ安息香酸およびパラアミノ安息香酸の個々の量は5ないし $10 \mu\text{g/mL}$ であった。

【0057】

多価ワクチン：また本発明は多価ワクチンも提供する。1の実施態様において、本発明の *B. bronchiseptica* の弱毒化生 *aro* 変異株を含むワクチンは、イヌインフルエンザウイルス (CIV) 抗原および/またはイヌパラインフルエンザウイルス (CPI) 抗原をさらに含む。この実施態様によるワクチンは、イヌにおけるイヌ伝染性気管気管支炎および/またはイヌ伝染性呼吸器病 (CIRD) 症候群に対する防御を提供するはずである。

【0058】

本発明の弱毒化生 *aro* 変異 *B. bronchiseptica* 株 (および/または別の弱毒化生 *aro* 変異 *B. bronchiseptica* 株) および/またはイヌインフルエンザウイルス抗原および/またはイヌパラインフルエンザウイルス抗原と組み合わせ得る多価ワクチンを形成するための他の抗原の例には、次のイヌジステンパーウイルス、イヌアデノウイルス2型、イヌパルボウイルス、イヌ肺炎ウイルス、イヌコロナウイルス、イヌヘルペスウイルス、狂犬病ウイルス、マイコプラズマ種、イヌエーリキア症原因菌、*Anaplasma* 種、イヌレプトスピラ、*Leptospira grippotyphosa*、*Leptospira hardjo*、黄だん出血病レプトスピラ、*Leptospira pomona*、*Leptospira interrogans*、*Leptospira autumnalis*、*Leptospira bratislava* の1または複数が含まれる。加えて、本発明の弱毒化生 *aro* 変異 *B. bronchiseptica* 株を含むワクチンには、次のネコ病原菌、即ちネコヘルペスウイルス (FHV)、ネコカリシウイルス (FCV)、ネコ肺炎ウイルス (FPN)、ネコクラミジア、ネコ汎血球減少症ウイルス (FPV)、ネコ白血病ウイルス (FeLV)、ネコ伝染性腹膜炎ウイルス (FIPV)、ネコ免疫不全ウイルス (FIV)、ボルナ病ウイルス (BDV)、ネコインフルエンザウイルス、トリインフルエンザおよび *Bartonella* 種

10

20

30

40

50

(例えば、ネコ引っ掻き病原菌)の1または複数が含まれ得る。

【0059】

組換えベクターとしての *B. bronchiseptica* の *aroA* 変異株の使用：ワクチンにおける組換え *aroA* 変異 *B. bronchiseptica* ベクターの使用を含む (Stevenson および Roberts, Vaccine 20, 2325-2335 (2002); Stevenson および Roberts, FEMS Immunology and Medical Microbiology 37:121-128 (2003); Stevenson および Roberts, Vaccine 22:4300-4305 (2004))、生非病原性変異 *Bordetella* ベクターの構築が報告されている (例えば、米国特許公開第 2008/0254062 号を参照)。それ故に、当該構築物の作成のための方法は既に準備されていた。

10

【0060】

さらに、対応する異種抗原を発現するために異種核酸 (DNA) を本発明の *aroA* 変異 *B. bronchiseptica* 株に挿入することは、例えば、異種核酸および *B. bronchiseptica* の双方の末端が対合する制限部位を含む場合には容易に達成される。あるいは、平滑末端を作成するために制限エンドヌクレアーゼ切断によって生じた一本鎖 DNA の突出末端を消化することによって、異種核酸および/または *B. bronchiseptica* の末端を修飾するか、または適切な DNA ポリメラーゼにより一本鎖末端を埋め込むことによって同様の結果を達成するかの必要があるかもしれない。さらに別の方法において、望ましい部位は、例えば末端にヌクレオチド配列 (リンカー) を連結することによって作成してもよい。当該リンカーは、望ましい制限部位を定められた特異的なオリゴヌクレオチド配列を含んでよい。また制限部位は、ポリメラーゼ連鎖反応法 (PCR) の使用により作成することも可能である (例えば、Saikiら, Science 239:487 (1988) を参照)。必要であればまた、開裂したベクターおよび核酸フラグメントは、ホモポリマーテーリング法によって修飾してもよい。

20

【0061】

異種核酸は内在性プロモーターかまたは異種プロモーター (例えば、組換え *B. bronchiseptica* に対し内在性) に操作可能に連結することが可能である。従って、異種核酸は、それ自身の自然発生プロモーターを含むことができるか、またはそれがコードする抗原を発現するプロモーター (例えば、常に発現し得る、*E. coli* の *lac* プロモーター等の細菌プロモーター) を含むように改変することができる。特に、Stevenson および Roberts は (Vaccine 22:4300-4305 (2004))、*B. bronchiseptica* 由来の繊維状赤血球凝集素 (*fha*) の使用を明確に例証した。あるいは異種核酸は、*aroA* 変異 *B. bronchiseptica* に既に存在するプロモーターが異種抗原を発現できるようにするために、生 *aroA* 変異 *B. bronchiseptica* に配列することが可能である。

30

【0062】

異種核酸は、いくつかの病原菌由来の抗原をコードすることが可能であり、限定されるものではないが、イヌインフルエンザウイルス、イヌパラインフルエンザウイルス、イヌジステンパーウイルス、イヌアデノウイルス 2 型、イヌパルボウイルス、イヌ肺炎ウイルス、狂犬病ウイルス、イヌコロナウイルス、マイコプラズマ種、イヌエリキア症原因菌、*Anaplasma* 種、ネコヘルペスウイルス (FHV)、ネコカリシウイルス (FCV)、ネコ肺炎ウイルス (FPN)、ネコインフルエンザウイルスおよび/またはネコクラミジアを含む。

40

【0063】

本発明で考慮した実施態様において、異種核酸は、上に列挙したネコまたはイヌの病原菌由来のタンパク質抗原をコードする。より特定の実施態様において、タンパク質抗原はイヌインフルエンザウイルスから得られる (米国特許第 7,959,929 B2 号を参照。その内容は全てを本明細書に援用する)。他の実施態様において、タンパク質抗原はネコインフルエンザから得られる。このタイプの一定の実施態様において、異種核酸はイ

50

ヌインフルエンザウイルスの赤血球凝集素をコードする。このタイプの特定の実施態様において、異種核酸はイヌインフルエンザウイルスのノイラミニダーゼをコードする。このタイプのさらに他の実施態様において、異種核酸はイヌインフルエンザウイルスの赤血球凝集素およびノイラミニダーゼの双方をコードする。

【 0 0 6 4 】

本明細書において用いる場合、用語「ポリペプチド」は用語「タンパク質」と同じ意味で使用し、さらにペプチドを包含することを意味する。それ故に、本明細書において用いる場合、ポリペプチドとは、2以上のアミノ酸がペプチド結合で連結したポリマーである。好ましくは、用語「ポリペプチド」は、ペプチド結合で連結した20以上のアミノ酸残基を含むポリマーを指すが、一方でペプチドはペプチド結合で連結した2ないし20のアミノ酸残基を含む。

10

【 0 0 6 5 】

本明細書において用いる場合、特定のタンパク質に関する用語「抗原性フラグメント」とは、抗原性である、即ち、例えば免疫グロブリン（抗体）またはT細胞抗原受容体等の免疫系の抗原認識分子と特異的に相互作用することのできる、当該タンパク質のフラグメントである（完全長タンパク質からわずかな単一のアミノ酸が欠失しているほどの大きなフラグメントをも含む）。

【 0 0 6 6 】

「ポリヌクレオチド」または「核酸」は、限定されるものではないがRNA、cDNA、ゲノムDNAおよび合成DNA配列までをも含む分子である。また用語は、DNAおよびRNAの当該技術分野で既知の任意の塩基類似体を含む核酸を包含することも意図する。

20

【 0 0 6 7 】

本明細書において用いる場合、「異種ヌクレオチド配列」とは、自然界において自然には形成されない構築物を形成するために、遺伝子組換え法によってヌクレオチド配列および/またはゲノムに付加されるヌクレオチド配列である。また当該核酸は、融合（例えば、キメラ）タンパク質をコードし得る。異種ヌクレオチド配列は、抗原特性、制御特性および/または構造特性を有するペプチドおよび/またはタンパク質をコードし得る。異種ヌクレオチド配列は、制限部位、調節部位、プロモーター等を含む非コード配列を含み得る。

30

【 0 0 6 8 】

本明細書において用いる場合、用語「操作可能に連結している（operably linked）」および「効果を生むように連結している（operatively linked）」とは同じ意味で使用され、このように記載された成分がその通常の機能を果たすため配置されている遺伝子要素の配列を意味する。従って、コード配列に操作可能に連結している制御要素は、コード配列の発現に影響を及ぼし得る。制御要素は、それがその発現を指揮するために機能する限り、コード配列と隣接する必要はない。例えば、転写された非翻訳の介在配列はプロモーターとコード配列の間に存在し得て、プロモーターはコード配列に「操作可能に連結している」と考え得る。

【 0 0 6 9 】

40

本明細書において用いる場合、用語「制御配列」および「制御要素」は、同じ意味で用いられる。転写および翻訳調節配列は、宿主細胞のコード配列の発現を準備する、例えばプロモーター、エンハンサー、ターミネーター等のDNA制御配列である。真核細胞において、ポリアデニル化信号は調節配列である。発現調節配列がそのヌクレオチド配列の転写および翻訳を調節または制御するとき、コード配列は発現調節配列に操作可能に連結している。操作可能に連結しているという用語には、適切な開始信号を有するが含まれ得る。

【 0 0 7 0 】

RNAポリメラーゼがコード配列をmRNAに転写し、それからそれが適切な条件、時期および場所でトランススプライシングされ、コード配列によってコードされたタンパク

50

質に翻訳されるとき、コード配列は細胞において転写および翻訳調節配列の制御下にある。

【0071】

ワクチン投与：本発明のワクチン（多価ワクチンを含む）は、例えば全身投与により併用療法、即ちワクチン自身に加えて1または複数の追加の活性成分、治療法等を含む治療法の一部として投与してよい。その場合には、「治療的に有効な」量を構成するワクチン量は、ワクチンが単独で投与されるならば「治療的に有効な」量を構成するだろうワクチン量よりも多くまたは少なくなり得ることを認識すべきである。他の治療には、例えば、抗ウイルス剤、鎮痛剤、解熱剤、去痰薬、抗炎症剤、抗ヒスタミン剤、*B. bronchiseptica* 感染治療用抗生物質および/または液体の投与等の、当該分野において既知の10治療が含まれてよい。いくつかの実施態様において、本発明のワクチンは次の、インフルエンザワクチン、パラインフルエンザワクチン、ネコヘルペスウイルスワクチン、ネコカリシウイルスワクチン、ネコクラミジアワクチン、鼻気管炎ワクチン、汎白血球減少症ワクチン、免疫不全ウイルスワクチン、白血病ウイルスワクチンまたは狂犬病ワクチンの1または複数と併用して投与される。特別の実施態様において、本発明のワクチンは皮下に投与される（皮下注射）。

【0072】

免疫原性レベルは、当該技術分野において一般に知られているチャレンジ用量滴定研究法によって実験的に決定してよい。当該技法には一般的に、最小保護用量を決定するために、いくつかの動物検体を異なる投与量のワクチンで接種し、それから毒性ウイルスまたは細菌で動物検体を攻撃感染することが含まれる。20

【0073】

好ましい投与計画に影響を及ぼす要因には、例えば、種または品種（例えば、イヌまたはネコの）、年齢、体重、性別、飼料、活動度、肺サイズおよび検体の状態；投与経路；使用される特定のワクチンの効力、安全性および免疫性の持続プロファイル；送達システムの使用有無；ならびに薬剤および/またはワクチン併用の一部としてのワクチンの投与有無、が含まれ得る。従って、実際に使用される投与量は、特定の動物に対し変動し得、それ故に上述の典型的な投与量からはずれ得る。当該投与量の調整を決定することは、一般的にワクチン開発分野の当業者の従来法を使用する技術範囲内である。以下の実施例4において使用された特別の条件下で、*aroA*変異*B. bronchiseptica*株の安全かつ効果的な用量は、アジュバントおよび/または芳香族栄養補給物の存在下で 5×10^5 ないし 5×10^7 cfu/mLの間であると決定された。30

【0074】

同様に、当該用量を投与し得る容量は、典型的には（典型的には皮内または経皮施用に対し）0.1 mLおよび5.0 mLの間である。投与量に対する典型的な範囲は、筋肉内投与または皮下投与に対しては0.2および2.0 mLの間、好ましくは約1.0ないし2.0 mLである。

【0075】

ワクチンは、単回もしくは日、週、月または年にわたって2回以上ワクチン受容者に対して投与されてよいと考えられる。いくつかの実施態様において、ワクチンは少なくとも2回投与される。一定の当該実施態様において、例えば、2回目の用量（例えば、追加免疫）が初回用量の少なくとも2週間後に投与されるという状況で、ワクチンは少なくとも2回投与される。特定の実施態様において、2回目の用量が初回用量の長くても8週間後に投与されるという状況で、ワクチンは2回投与される。他の実施態様において、2回目の用量は初回用量の1週間後ないし2年後、初回用量の1.5週間ないし8週間後または初回用量の2ないし4週間後に投与される。他の実施態様において、2回目の用量は初回用量の約3週間後に投与される。40

【0076】

上述の実施態様において、初回およびその後の投与量は、量および/または形態において変動し得る。しかし、しばしば投与量は量および形態において同じ程度である。単一用50

量だけが投与されるとき、その用量単独におけるワクチン量は一般的にワクチンの治療的に有効な量を含む。しかし、2用量以上が投与されるとき、これらを合わせた用量中のワクチン量が治療的に有効な量を構成してよい。加えて、上で論じた通り、ワクチンが初期に投与され、それから2ないし12週間後に追加免疫が投与されてもよい。しかし、ワクチンの後の投与は、追加免疫が投与されたか否かに関係なく、1年毎または2年毎に実施してよい。

【0077】

本発明は、本発明の例示として提供する以下の非限定的な実施例を参照することによってより良く理解され得る。以下の実施例は、本発明の実施態様をより完全に説明するために提示する。実施例は、しかしながら、本発明の広い範囲を限定するものと解釈されては

10

【0078】

実施例

【実施例1】

【0079】

Bordetella bronchisepticaのaroA変異株の構築

B. bronchisepticaのaroA欠失変異株は、最小限の副作用を有する効果的なワクチンを製剤化する目的で構築した。aroA遺伝子における欠失は、外因的に供給する1または複数の重要な芳香族化合物なしで増殖するためのB. bronchisepticaの能力を顕著に損なう。

20

【0080】

使用したB. bronchiseptica株は、もともと上気道疾患に罹患したイヌから単離した。B. bronchisepticaにおいて必須芳香族化合物を合成するために必須とされる代謝経路中の酵素をコードするaroA遺伝子は(上を参照)、隣接配列と共に、B. bronchisepticaのクロモソームからPCR法によってクローン化した。その後、クローン化遺伝子を酵素SalIで制限酵素処理して90塩基対(bp)の欠失を作成した。aroA遺伝子の欠失変異体(version)(aroA)は、次にMannheimia haemolytica(ウシ肺炎原因菌)、Pasteurella multocida(動物パスレラ症病原菌)およびHemophilus somnus(ウシ感染症原因菌)のaroA欠失株を作成するために記載されたベクターツールおよび選択方法を使用してB. bronchisepticaに再導入した。(BriggsおよびTatum、Applied and Environmental Microbiology、71(11)7187-7195(2005); TatumおよびBriggs、Applied and Environmental Microbiology、71(11)7196-7202(2005); 米国特許第5,840,556号。その内容は本明細書でその全体を援用する。)

30

要するに、これらの方法は、Mannheimia haemolyticaにおいて発見されたプラスミド中の複製起点の温度感受性(Ts)変異体(version)の作成に依存する。これらのTsプラスミドは高温(39℃以上)では効率的に増殖することができない。これらのプラスミドは、カナマイシン耐性およびE. coli中での増殖のためのE. coliの複製起点ColE1を含むようにさらに修飾した。いったんaroAを含むプラスミドがB. bronchisepticaに導入されると、ネイティブなaroA領域とプラスミドのaroA領域との間で相同組換え現象が起こり、その結果プラスミドの部分が宿主B. bronchisepticaに一定の頻度で導入される。抗生物質カナマイシンによる形質転換体の選択により、これらの特定の形質転換体の単離が可能となる。aroA遺伝子の挿入の確認はPCR法によって行い、DNAサイズはアガロースゲル電気泳動によって測定した。

40

【0081】

ネイティブなaroA遺伝子、カナマイシン耐性遺伝子および任意の他のベクター配列等の不必要な配列のクロモソームからの除去は、さらなる組換え現象で起こる。望ましい

50

組換え体の選択は、プラスミド複製の非許容温度で抗生物質を添加せずに細胞の継代によって行った。カナマイシン感受性単離株は、*aroA* 遺伝子に関し、およびネイティブな *aroA* 遺伝子の欠損に関し PCR 法および DNA アガロース電気泳動法によって選別した。*aroA* 欠失領域周辺の *B. bronchiseptica* クロモソームの配列解析は、ベクターの外来 DNA が *aroA* 変異 *B. bronchiseptica* 単離株の中に保持されていないことを証明するために使用した。

【実施例 2】

【0082】

非弱毒化親株に対する *B. bronchiseptica* の *aroA* 変異株のマウス LD_{50} の比較

その LD_{50} を測定するために、*B. bronchiseptica* の *aroA* 変異株（上述の実施例 1 を参照）かまたはその非弱毒化親株かの段階希釈液の用量 0.5 mL により、マウス 8 匹の群を腹腔内接種した。マウスの死亡数を毎日記録してマウスを 7 日間観察した（以下の表 1 を参照）。親株の 2.8×10^7 cfu/dose（コロニー生成ユニット/用量）以上（ $LD_{50} 8.9 \times 10^6$ ）および *aroA* 変異株の 1.2×10^9 cfu/dose 以上（ $LD_{50} 3.8 \times 10^8$ ）でワクチン接種した群において 100% の死亡率だった。特に、親株でも *aroA* 変異株でも低い希釈液では、それぞれ死亡は認められなかった。これらの結果は、*aroA* 遺伝子における失欠が *B. bronchiseptica* を顕著に弱毒化し、親株よりもマウスにおいて約 40 倍弱毒化することを証明している。

【表 2】

表 1

ワクチン接種後のマウス死亡率

群	菌株	cfu/dose	1 日 目	2 日 目	3 日 目	4 日 目	5 日 目	6 日 目	7 日 目	計
A1	親株	2.8×10^8	1	7	---	---	---	---	---	8/8
A2	親株	2.8×10^7	0	1	4	2	1	---	---	8/8
A3	親株	2.8×10^6	0	0	0	0	0	0	0	0/8
A4	親株	2.8×10^5	0	0	0	0	0	0	0	0/8
A5	親株	2.8×10^4	0	0	0	0	0	0	0	0/8
B1	$\Delta aroA$	1.2×10^{10}	8	---	---	---	---	---	---	8/8
B2	$\Delta aroA$	1.2×10^9	0	8	---	---	---	---	---	8/8
B3	$\Delta aroA$	1.2×10^8	0	0	0	0	0	0	0	0/8
B4	$\Delta aroA$	1.2×10^7	0	0	0	0	0	0	0	0/8
B5	$\Delta aroA$	1.2×10^6	0	0	0	0	0	0	0	0/8

【実施例 3】

【0083】

安全かつ効果的なワクチン用量の決定

安全かつ効果的な用量範囲を見出そうとして、実施例 1 の *B. bronchiseptica* の *aroA* 変異（*aroA*）株を含む試験ワクチンを 3 の異なる（通常の適用）投与量レベルでイヌに皮下投与した。従って、*aroA* の *B. bronchiseptica* 株の生培養液の用量 1 mL を処理群 A、B および C（各々の 8 匹のイヌ）に以下の

通り投与した。即ち試験0日および21日目に、細菌をトリプトースフォスフェイトブロス(TPB)で12時間培養し、それからそれぞれの標的用量の 1.0×10^8 cfu/mL(A群)、 1.0×10^7 cfu/mL(B群)、および 1.0×10^6 cfu/mL(C群)に希釈して投与した。対照のD群のイヌには(イヌ9匹)、無菌のTPBを与えた。

【0084】

ワクチン接種

各々のイヌは、無菌針22G1“を有する注射器を使用して、試験の0および21日目にそれぞれのワクチンの用量1mLで首の付け根に皮下接種した。最初のワクチン接種は右側、および2回目のワクチン接種は左側に行った。投与用量を決定するために、各々のワクチン接種の前後に細菌の平板計数を行った。

10

【0085】

ワクチン接種後モニタリング

ワクチン接種後に、抗体価を測定するために全血を採取した。注射部位反応が感じられなくなるまで、毎日、注射部位を触診した。ノギスを使用してセンチメートル(cm)単位で注射部位反応の高さ、幅および深さを測定した。注射部位反応は、肥厚した、柔らかい、硬いまたは敏感のようにさらに特徴付けを行った。

【0086】

攻撃感染

攻撃感染は以下の材料により実施した。B. bronchiseptica D 2株(Musserら、Journal of Bacteriology、169(6): 2793-2803(June 1987))をトリプトースフォスフェイトブロス(TPB)寒天平板培地(平板当たり200μL)にワクチン接種し、平板を 36 ± 2 で約16~18時間インキュベートした。純粋な細菌増殖物を平板当たりTPB10mLで寒天平板から洗い落とし、それから密度を 1.0×10^{10} cfu/mL以上に調整した。各々の攻撃感染の日に対し、調製したての攻撃感染材料を準備した。試験35および36日目に、塗布器付の3mLの注射器を使用して鼻孔当たり0.5mLを点滴することによって、攻撃感染材料の鼻腔内投与を実施した。

20

【0087】

攻撃感染後モニタリング

イヌは、限定されるものではないが抑うつ、嗜眠、食欲不振、咳嗽、鼻漏および呼吸困難を含む臨床徴候に対して攻撃感染後の21日間、毎日観察した。イヌは、咳嗽を誘発するために軽い気管触診を毎日受けた。臨床徴候「粘液排出」、「粘液膿性鼻漏」、「誘発咳嗽」、「自発咳嗽」、「悪心を伴う自発咳嗽」および「呼吸困難」を記録した。攻撃感染微生物の排出を測定するために3週間にわたり週に2回、各々のイヌから鼻腔拭い試料を採取した。

30

【0088】

データ解析:

重要な臨床結果変量は、疾患の臨床徴候および/または細菌排出だった。本研究の実験単位は個々のイヌだった。臨床所見に従って行動特性および身体的特性に対して数値化スコアを選定した。各々のイヌに関し、各日に臨床スコアを合計し、スコアの中央値を計算した。排出データに対しては、(i)各々の処理群の、(ii)各々の鼻腔拭い試料採取物に対する、(iii)排出の日数における、鼻腔拭い試料から単離された微生物B. bronchisepticaの平均cfu/mLを算出した。

40

【0089】

結果

ワクチン接種前に、全てのイヌはB. bronchisepticaに対し低い抗体価(64以下)を有し、鼻腔拭い試料単離によって測定した通りB. bronchiseptica感染に対して陰性だった。 1.0×10^6 cfu/mLのB. bronchisepticaのaroA-(処理群C)およびプラセボ(処理群D)によるワクチン接

50

種は、*B. bronchiseptica* に特異的な抗体の増強を誘発しなかった。対照的に試験 28 日目に、 1.0×10^8 の用量（処理群 A）によるワクチン接種は、イヌの 100%（8/8）において 256 以上の抗体力価を誘発し、ならびに 1.0×10^7 c f u / m L の用量によるワクチン接種は、イヌの 25%（2/8）において 128 以上の力価を誘発した。試験 28 日目における処理群 A、B、C および D に対する幾何平均はそれぞれ 470、76、35 および 40 だった（表 2）。

【表 3】

表 2

B. bronchiseptica に対するワクチン接種前／後の幾何平均血清
抗体力価

処理群	試験 4 日前	試験 20 日目	試験 28 日目
A 1.0×10^8 c u f / m L	17	70	470
B 1.0×10^7 c u f / m L	25	41	76
C 1.0×10^6 c u f / m L	29	35	35
D プラセボ	25	30	40

【0090】

処理群 A のイヌは、注射部位にワクチン接種後 9 ~ 13 日以内に回復した腫脹を発生した。処理群 A において測定された最大の注射部位反応は、 $2 \times 2 \times 1.5$ c m であり、イヌ 8 匹中 2 匹が触診のさいに圧痛のある注射部位反応を有した。処理群 B のイヌは、注射部位にワクチン接種後 3 ~ 6 日以内に回復した腫脹を発生し、 $2 \times 2 \times 1.5$ c m と測定される最大の注射部位反応を有した。処理群 C においては 1 匹のイヌだけが軽度の腫脹を発生し（ $0.5 \times 0.5 \times 0.5$ c m）、それは 1 日間だけ測定可能だった。処理群 D において注射部位反応は観察されなかった。最初のワクチン接種後の各々のイヌに対する最大サイズの注射部位反応を使用して算出した各々の処理群に対する平均注射部位反応を表 3 に示す。どのワクチンも接種後にいかなる有害な全身反応も引き起こさなかったとはいえ、群 A および B における腫脹の大きさと特性は獣医学治療において通常許容可能ではないだろう。

【表 4】

表 3

平均注射部位反応サイズ

処理群	平均注射部位反応サイズ (c m ²)
A 1. 0 x 1 0 ⁸ c f u / m L	2. 1
B 1. 0 x 1 0 ⁷ c f u / m L	1. 0
C 1. 0 x 1 0 ⁶ c f u / m L	0
D プラセボ	0

10

【 0 0 9 1 】

攻撃感染後に、各々のイヌに対し臨床徴候をスコア化し、21日間の観察期間にわたり合計した。1. 0 x 1 0⁸ c f u / m Lおよび1. 0 x 1 0⁷ c f u / m LでのB. b r o n c h i s e p t i c aのa r o A - 株によるワクチン接種は、B. b r o n c h i s e p t i c a感染に付随する臨床徴候を減少させた。プラセボ接種対照群（処理群D）のイヌ9匹中7匹（78%）および処理群C（1. 0 x 1 0⁶ c f u / m L）のイヌ8匹中5匹（63%）は、21日間の観察期間の間、1以上の咳嗽スコアを有したが、一方では1. 0 x 1 0⁸ c f u / m L（処理群A）によりワクチン接種したイヌ8匹中1匹（13%）および処理群Bのイヌ8匹中2匹（25%）だけが、21日間の観察期間の間の1日間に1以上の咳嗽スコアを有した。実施例1の生a r o A変異B. b r o n c h i s e p t i c a株によりワクチン接種しそれから病原性のB. b r o n c h i s e p t i c aにより攻撃感染したイヌの各々の群に対し、臨床スコアの中央値を表4に示す。

20

30

【 0 0 9 2 】

攻撃感染微生物の排出を測定するために、攻撃感染後21日間の観察期間の6の時点で鼻腔拭い試料を採取した。攻撃感染後21日目に、処理群Aのイヌ8匹中4匹（50%）および処理群Bの8匹中5匹（63%）がまだ排出していたのと比較すると、処理群CおよびDの全てのイヌ（100%）が多数のB. b r o n c h i s e p t i c aを排出していた。群A、BおよびCのイヌの鼻から単離されたB. b r o n c h i s e p t i c a微生物の平均菌数は、群Dのイヌから単離された微生物の平均菌数より少なかった（表4）。

。

【表 5】

表 4

攻撃感染後臨床スコアおよびB. bronchiseptica排出

処理群	臨床スコアの中 央値	咳嗽スコアが1以上の イヌ数	排出されたB. bronchiseptica微生物の平均 菌数
A 1.0×10^8 cfu /mL	0	1 / 8 (13%)	2, 261
B 1.0×10^7 cfu /mL	0.5	2 / 8 (25%)	32, 592
C 1.0×10^6 cfu /mL	3.5	5 / 8 (63%)	46, 341
D プラセボ	3.0	7 / 9 (78%)	73, 656

【0093】

結論として、生B. bronchisepticaのaroA変異株は、イヌへの全身投与用の生ワクチンとして使用し得る。しかし、生B. bronchisepticaのaroA変異株が最も効果的な力価において、またワクチンは許容できない注射部位反応も引き起こした。

【実施例 4】

【0094】

安全なレベルでの効力の改善

たとえあったとしても注射部位反応を最小限に維持する一方で、試験した最低用量 (1×10^6 cfu) の効力を顕著に改善することが可能かどうかを評価するために引き続き研究を行った。新処理群A、B、CおよびD (各々イヌ5匹) に対する試験ワクチンは、用量1mLで投与される実施例1のaroA変異B. bronchiseptica株の生培養物を含んでいた。処理群Eのイヌは、いかなる抗原も含まない無菌DMEMを受容した。aroA変異B. bronchiseptica株をトリプトースフォスフェートブロス (TPB) で5Lファーメンター中17時間増殖し、OD580_{nm}が1.0ないし2.0に達したときに収穫した。発酵培養液を安定剤と共に混合し凍結乾燥した。

【0095】

凍結乾燥ケーキを、処理群Aに対し標的用量 1.0×10^8 cfu/mL に滅菌水で再水和した。処理群B、CおよびDに対し凍結乾燥ケーキを標的用量 1.0×10^6 cfu/mL に滅菌水で再水和した：

ここで、

群Bに対し2%リン酸アルミニウムを；

群Cに対し2%水酸化アルミニウムを；または

群Dに対し芳香族化合物ミックスを添加した。

【0096】

処理群Eに対し凍結乾燥ケーキを滅菌水で再水和した。以下の表6参照。

【0097】

使用した2%リン酸アルミニウムアジュバントは2%Rehydraphos（登録商標）であり、一方で使用した2%水酸化アルミニウムアジュバントは2%Rehydorogel（登録商標）LVだった。これらアジュバントの双方は、Reheis Inc. , Berkeley Heights , NJ , USAから市販されている。芳香族化合物ミックス（芳香族栄養補給物）は以下の表5に記載する。試験0および21日目に、イヌを上述のワクチンまたはDMEMプラセボにより接種した。

【表6】

表5

芳香族化合物ミックス

成分	芳香族栄養補給物 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
L - チロシン	40
2, 3 - ジヒドロキシ安息香酸	5
L - トリプトファン	40
L - フェニルアラニン	40
パラアミノ酸安息香酸	10

10

【0098】

ワクチン接種

各々のイヌは、試験0および21日目に無菌針22G1"を有する注射器を使用して、それぞれのワクチンの用量1mLにより首の付け根に皮下接種した。最初のワクチン接種は右側、2回目のワクチン接種は左側に行った。細菌の平板計数は、投与用量を決定するために各々のワクチン接種の前後に実施した。

30

【0099】

ワクチン接種後モニタリング

ワクチン接種後に、抗体価を測定するために全血を採取した。注射部位反応が感じられなくなるまで、毎日、注射部位を触診した。ノギスを使用してセンチメートル（cm）単位で注射部位反応の高さ、幅および深さを測定した。注射部位反応は、肥厚した、柔らかい、硬いまたは敏感のようにさらに特徴付けを行った。

【0100】

攻撃感染

攻撃感染は以下の材料により実施した。B. bronchiseptica D 2株をトリプトースフォスフェイトブロス（TPB）寒天平板培地（平板当たり200 μL ）にワクチン接種し、平板を 36 ± 2 で約16~18時間インキュベートした。純粋な細菌増殖物を平板当たりTPB10mLで寒天平板から洗い落とし、それから密度を $1.0 \times 10^{10} \text{ cfu/mL}$ 以上に調整した。各々の攻撃感染の日に対し、調製したての攻撃感染材料を準備した。試験42日目に、塗布器付の3mLの注射器を使用して鼻孔当たり0.5mLを点滴することによって、調製したての攻撃感染培養物を鼻腔内に投与した。試験43日目に、電動ポンプ付きの噴霧器を使用して鼻孔当たり0.5mLを点滴することによって、調製したての攻撃感染培養物を鼻腔内に投与した。

40

【0101】

攻撃感染後モニタリング

50

イヌは、限定されるものではないが抑うつ、嗜眠、食欲不振、咳嗽、鼻漏および呼吸困難を含む臨床徴候に対して攻撃感染後の21日間、毎日観察した。イヌは、咳嗽を誘発するために軽い気管触診を毎日受けた。臨床徴候「粘液排出」、「粘液膿性鼻漏」、「誘発咳嗽」、「自発咳嗽」、「悪心を伴う自発咳嗽」および「呼吸困難」をスコア化した。

【0102】

結果

ワクチン接種前に、全てのイヌは *B. bronchiseptica* に対し低い抗体力価(64以下)を有し、鼻腔拭い試料単離によって測定した通り *B. bronchiseptica* 感染に対し陰性だった。対照のイヌは(処理群E)、試験28日目に100%のイヌ(5匹中5匹)において32以下の抗体力価を有した。対照的に、 1.0×10^8 cfu/mLのaroA変異 *B. bronchiseptica* 株によるワクチン接種は(処理群A)、80%のイヌ(5匹中4匹)において256以上の抗体力価を誘発し、 1.0×10^6 cfu/mL + 2% Rehydraphos(登録商標)によるワクチン接種は(処理群B)、80%のイヌ(5匹中4匹)において128以上の抗体力価を誘発し、 1.0×10^6 cfu/mL + 2% Rehydragel(登録商標)LVによるワクチン接種は(処理群C)、40%のイヌ(5匹中2匹)において128以上の抗体力価を誘発し、 1.0×10^6 cfu/mL + 1X Aro Mixによるワクチン接種は(処理群D)、60%のイヌ(5匹中3匹)において128以上の抗体力価を誘発した。試験28日目における処理群A、B、C、DおよびEに対する幾何平均力価はそれぞれ338、111、84、97および14だった(表6)。

【表7】

表6

B. bronchiseptica に対するワクチン接種前後の幾何平均血清抗体力価

処理群	コロニー形成 単位(cfu)	添加	試験4日 前	試験20 日目	試験28 日目
A	1×10^8	- - -	37	64	338
B	1×10^6	2%リン酸アルミニウム	32	49	111
C	1×10^6	2%水酸化アルミニウム	32	37	84
D	1×10^6	芳香族化合物ミックス	32	56	97
E	- - -	- - -	28	28	14

【0103】

イヌはワクチン接種後、熱がないことも含め臨床的に正常のままだった。処理群Aのイヌは、注射部位にワクチン接種後16~19日以内に回復した中等度の腫脹を発生した。処理群Aにおいて測定された最大の反応は $3.0 \times 3.0 \times 0.5$ cmであり、イヌ5匹中3匹が触診のさいに圧痛のある反応を有した。処理群Bのイヌは(5匹中4匹)、注射部位にワクチン接種後9~11日以内に回復した軽度の腫脹を発生し、 $1.0 \times 1.0 \times 0.5$ cmと測定される最大反応を有し、イヌ5匹中1匹は触診のさいに圧痛のある反応を有した。処理群Cのイヌは(5匹中5匹)、注射部位にワクチン接種後9~10日以内に回復した軽度の腫脹を発生し、 $1.0 \times 1.0 \times 0$ cmを測定する最大反応を有した。処理群Dのイヌ5匹中2匹だけが、注射部位にワクチン接種後5~8日以内に回復した軽度の腫脹を発生し、 $0.5 \times 0.5 \times 0$ cmを測定する最大反応を有した。処理群Eにおいて注射部位反応は観察されなかった。最初のワクチン接種後の各々のイヌに対する最大サイズ注射部位反応を使用して算出した各々の処理群に対する平均注射部位反応を表7に示

す。これらの結果は、ワクチン用量 1.0×10^8 cfu/mL は若いイヌにおける使用にとって安全でないという以前の観察を確認するが、一方ではアジュバントと共に投与されたときでも、用量 1.0×10^6 cfu/mL は、獣医学治療において許容可能と考えられるより安全なプロファイルを提供する。

【表 8】

表 7

平均注射部位反応サイズ

処理群	コロニー形成単位 (cfu)	添加	平均注射部位反応サ イズ (cm ²)
A	1×10^8	- - -	4.5
B	1×10^6	2%リン酸アルミニウム	0.2
C	1×10^6	2%水酸化アルミニウム	0.4
D	1×10^6	芳香族化合物ミックス	0.1
E	- - -	- - -	0

10

20

【0104】

攻撃感染後に、各々のイヌに対し臨床徴候をスコア化し、21日間の観察期間にわたり合計した。少なくとも50%の対照イヌが疾患の臨床徴候および/または細菌排出を示したので、攻撃感染用量はワクチンの効力を測定するために適切であると判断した。もし、攻撃感染後の観察期間のあいだに、不連続の3日以上に自発咳嗽または悪心を伴う自発咳嗽が観察されたならば、イヌは持続性咳嗽を発生した（罹患イヌ）と定義された。表 8 に示す通り、aroA変異 B. bronchiseptica 株の 1.0×10^6 cfu/mL の力価を含むワクチンへのアジュバントかまたは芳香族化合物ミックス（芳香族栄養補給物）の添加は、結果として病原性の B. bronchiseptica による攻撃感染からワクチン接種されたイヌを保護した。処理群 A、B および D のイヌ中 0 匹、および

30

【0105】

攻撃感染微生物の排出を測定するために、攻撃感染後 21 日間の観察期間の 6 の時点で鼻腔拭い試料を採取した。攻撃感染後 21 日目に（試験 63 日目）、処理群 E の全てのイヌ（100%）が多数の B. bronchiseptica を排出していた。試験 63 日目に鼻腔拭い試料から単離された B. bronchiseptica 攻撃感染微生物の平均 cfu/mL は、処理群 A、B、C、D よび E に対してそれぞれ 726、5,048、17,400、594 および 135,840 だった。全ての試験日に鼻腔拭い試料から単

40

【表 9】

表 8

攻撃感染後臨床スコアおよび *B. bronchiseptica* 排出

処理群	コロニー形成単 位 (c f u)	添加	臨床スコア の中央値	罹患イヌ数	排出 <i>B. bronchiseptica</i> 微生物平均数
A	1×10^8	- - -	2	0 / 5 (0%)	6 8 9 9
B	1×10^6	2%リン酸アルミニウム	1	0 / 5 (0%)	3 6 6 2
C	1×10^6	2%水酸化アルミニウム	3	1 / 5 (20%)	6 6 7 1
D	1×10^6	芳香族化合物ミックス	1	0 / 5 (0%)	8 0 6 0
E	- - -	- - -	1 3	4 / 5 (80%)	2 4 0 6 7

【0106】

結論として、異なる4の弱毒化生 *aroA* 変異 *B. bronchiseptica* ワクチン製剤の安全性および効力が評価された。力価 1.0×10^6 の *aroA* 変異 *B. bronchiseptica* 株に水酸化アルミニウムアジュバントか、リン酸アルミニウムアジュバントか、または芳香族栄養補給物を加えたワクチンは、注射部位に顕著な腫脹を起こすことなくイヌを疾患の臨床徴候から保護するのに役立った。それ故に、本研究は、*B. bronchiseptica* 株の弱毒化生 *aroA* 変異株を含むワクチンへのアジュバントおよび/または芳香族栄養補給物の添加が当該ワクチンにとって効果的であるために必要とされる用量を顕著に減少させ、同様にワクチンの投与のために生じる任意の注射部位反応をも最小化するのに役立つことを最小限証明している。

【実施例 5】

【0107】

Bordetella bronchiseptica、イヌインフルエンザウイルスおよびイヌパラインフルエンザウイルスに対するワクチン

イヌインフルエンザウイルス (CIV)、イヌパラインフルエンザウイルス (CPI) および *Bordetella bronchiseptica* (*B. bronchiseptica*) に対する多価ワクチンを製剤化した。イヌワクチンには実施例 1 記載の通り、改変型生イヌパラインフルエンザウイルス、不活化イヌインフルエンザウイルスおよび *B. bronchiseptica* の弱毒化生 *aroA* 変異株が含まれる。ワクチンは皮下投与用に設計される。生産物は、*B. bronchiseptica*、イヌパラインフルエンザウイルスに起因する疾患の予防における救援、およびイヌインフルエンザウイルスに起因する疾患の制御における救援として推奨される。ワクチンの各々の用量は、 $10^5 \cdot 7$ TCID₅₀ (50%組織培養感染量) の CPI、 1×10^6 cfu の *B. bronchiseptica* および 1000 HAU (ヘマグルチニン単位) の CIV を少なくとも含むことが期待される。

【0108】

B. bronchiseptica の産生培養液はファーメンター中で冷却し、以下の表 9 に記載した通りの芳香族化合物ミックス (芳香族栄養補給物) を培養液に添加した。

それから改変型生C P Iを、安定剤、5 %グルタチオン溶液、表9の芳香族化合物ミックス（芳香族栄養補給物）およびD M E M培地と共に、生a r o A変異B . b r o n c h i s e p t i c a株と混合した。この混合物は次に凍結乾燥し貯蔵した。凍結乾燥ケーキは、不活化C I Vおよび2 %水酸化アルミニウムアジュバントかまたは5 %水酸化アルミニウムアジュバントかを含む希釈剤で再水和した。

【表10】

表9

芳香族化合ミックス

成分	容量 (ハーベストL当たり)
L - チロシン (16 mg / mL)	2.5 mL
2, 3 - ジヒドロキシ安息香酸 (5 mg / mL)	1 mL
L - トリプトファン (4 mg / mL)、L - フェニルアラニン (4 mg / mL) およびパラアミノ安息香酸 (1 mg / mL)	10 mL

10

【0109】

20

処理群BおよびCのイヌは、生a r o A変異B . b r o n c h i s e p t i c a株の標的用量 5.0×10^5 cfu / mLに滅菌水で再水和した、生a r o A変異B . b r o n c h i s e p t i c a株およびC P Iを含む凍結乾燥ワクチンによりワクチン接種した：ここで、

B群に対してはC I Vおよび2 %水酸化アルミニウムアジュバントを加え；またはC群に対してはC I Vおよび5 %水酸化アルミニウムアジュバントを加えた。

【0110】

処理群Dのイヌは、C I Vに2 %水酸化アルミニウムアジュバントを加えただけのワクチンにより接種した。全3処理群において使用した水酸化アルミニウムはR e h y d r a g e l（登録商標）LVだった。

30

【0111】

ワクチン接種

各々のイヌは、無菌針22 G 1"を使用して、試験の0および21日目にそれぞれのワクチンの用量1 mLで首の付け根に皮下接種した。最初のワクチン接種は右側、および2回目のワクチン接種は左側に行った。投与用量を決定するために、各々のワクチン接種の前後に細菌の平板計数を行った。

【0112】

ワクチン接種後モニタリング

ワクチン接種後に、抗体価を測定するために全血を採取した。注射部位反応が感じられなくなるまで、毎日、注射部位を触診した。ノギスを使用してセンチメートル (cm) 単位で注射部位反応の高さ、幅および深さを測定した。注射部位反応は、肥厚した、柔らかい、硬いまたは敏感のようにさらに特徴付けを行った。

40

【0113】

攻撃感染

攻撃感染は以下の材料により実施した。B . b r o n c h i s e p t i c a D 2株をトリプトースフォスフェイトブロス (T P B) 寒天平板培地 (平板当たり200 μ L) にワクチン接種し、平板を 36 ± 2 で約16 ~ 18時間インキュベートした。純粋な細菌増殖物を平板当たりL T B 10 mLで寒天平板から洗い落とし、それから密度を 1.0×10^{10} cfu / mL以上に調整した。各々の攻撃感染の日に対し、調製したての攻撃感染材料を準備した。試験35日目に、塗布器付の3 mLの注射器を使用して鼻孔当たり

50

0.5 mLを点滴することによって、攻撃感染材料を鼻腔内経路で投与した。試験36日目に、噴霧器および電動ポンプを使用して鼻孔当たり約0.5 mLを点滴することによって、攻撃感染材料を鼻腔内経路で投与した。

【0114】

攻撃感染後モニタリング

イヌは、限定されるものではないが抑うつ、嗜眠、咳嗽および鼻漏を含む臨床徴候に対して攻撃感染後の21日間、毎日観察した。攻撃感染微生物の排出を測定するために攻撃感染後3週間にわたり3～4日の採取間隔で週に2回、各々のイヌから鼻腔拭い試料を採取した。

【0115】

結果

ワクチン接種前に、全てのイヌは*B. bronchiseptica*に対し低い抗体力価(64以下)を有し、鼻腔拭い試料単離によって測定した通り*B. bronchiseptica*感染に対し陰性だった。試験28日目に、プラセボ接種対照イヌ(処理群D)の5匹中4匹(80%)は64以下の抗体力価を有した。対照的に、aroA変異*B. bronchiseptica*株 5.0×10^5 cfu/mL、CPI、CIVおよび2% Rehydralgel LV(処理群B)または5% Rehydralgel LV(処理群C)を含む試験ワクチンを受容した全てのイヌは64以上の抗体力価を有した。試験28日目における処理群B、CおよびDに対する幾何平均力価はそれぞれ111、111および64だった(表10)。

【表11】

表10

*B. bronchiseptica*に対するワクチン接種前/後の幾何平均血清

抗体力価

処理群	<i>B. bronchiseptica</i> cfu	ワクチンへの添加物	試験1日前	試験28日目
B	5.0×10^5	CPI、CIVおよび 2%水酸化アルミニウム	28	111
C	5.0×10^5	CPI、CIVおよび 5%水酸化アルミニウム	42	111
D	- - -	CIVおよび2%水酸化 アルミニウム	42	64

【0116】

イヌはワクチン接種後、熱がないことも含め臨床的に正常のままだった。処理群Bのイヌ5匹中3匹は、 $1.0 \times 1.0 \times 0.5$ cmを測定する最大注射部位反応を有し、ワクチン接種後1～5日以内に回復した軽度の腫脹を注射部位に有した。処理群Cの全てのイヌは、 $1.0 \times 1.0 \times 0.5$ cmを測定する最大注射部位反応を有し、ワクチン接種後7～11日以内に回復した軽度の腫脹を注射部位に発生した。処理群Dのイヌ5匹のどれも、いずれのワクチン接種後にも注射部位反応を発生しなかった。最初のワクチン接種後の各々のイヌに対する最大注射部位反応を使用して算出した各々の処理群に対する平均注射部位反応を表11に示す。

【表 1 2】

表 1 1

平均注射部位反応サイズ

処理群	B. b r o n c h i s e p t i c a c f u	ワクチンへの添加物	平均注射部位反応サ イズ (c m ²)
B	5 . 0 x 1 0 ⁵	C P I、C I Vおよび2 %水酸化 アルミニウム	0 . 2
C	5 . 0 x 1 0 ⁵	C P I、C I Vおよび5 %水酸化 アルミニウム	0 . 3
D	- - -	C I Vおよび2 %水酸化アルミ ニウム	0

10

【 0 1 1 7 】

20

攻撃感染後に、各々のイヌに対し臨床徴候をスコア化し、21日間の観察期間にわたり合計した。攻撃感染が効果的であることを示しているが、プラセボ接種対照群イヌの5匹中4匹は、攻撃感染後に自発性咳嗽を含む疾患の臨床徴候を発生した。対照的に、対照イヌと比較したとき2の試験ワクチンは、B . b r o n c h i s e p t i c a 感染に付随する臨床徴候、特に咳嗽を減少させた。処理群B、CおよびDに対する咳嗽スコアの中央値はそれぞれ1、0および2であり(表12)、臨床疾患を発生したイヌのパーセントはそれぞれ20%、20%および40%だった。

【 0 1 1 8 】

30

攻撃感染微生物の排出を測定するために、攻撃感染後21日間の観察期間の6の時点で鼻腔拭い試料を採取した。攻撃感染後21日目に(試験55日目)、処理群Dの全てのイヌ(100%)が多数のB . b r o n c h i s e p t i c a 微生物を排出していたが、一方ではいずれの2のワクチン群においても排出は顕著に少なかった。試験55日目に鼻腔拭い試料から単離されたB . b r o n c h i s e p t i c a D2攻撃感染微生物の平均c f u / m Lは、処理群B、CおよびDに対してそれぞれ15,494、26,802および150,620だった。総体的に、処理群Bのイヌは、処理群CおよびDのイヌよりも少ないB . b r o n c h i s e p t i c a 微生物を排出した。全試験日において鼻腔拭い試料から単離されたB . b r o n c h i s e p t i c a D2攻撃感染微生物の総平均c f u / m Lは、処理群B、CおよびDに対しそれぞれ38,642、206,713および178,609だった(表12)。

【表 1 3】

表 1 2

攻撃感染後臨床スコアおよび *B. bronchiseptica* 排出

処理群	ワクチン	臨床スコアの中央値	臨床徴候を伴うイヌの%	<i>B. bronchiseptica</i> 微生物平均排出数
B	5.0 x 10 ⁵ cfu / mL の <i>B. b</i> 、C P I、C I V および 2 % 水酸化アルミニウム	1	20 %	38,642
C	5.0 x 10 ⁵ cfu / mL の <i>B. b</i> 、C P I、C I V および 5 % 水酸化アルミニウム	0	20 %	206,713
D	C I V および 2 % 水酸化アルミニウム	2	40 %	178,609

10

20

【0 1 1 9】

結論として、異なる 2 の弱毒化生 *aroA* 変異 *B. bronchiseptica* + C P I + C I V ワクチン製剤の安全性および効力が評価された。*aroA* 変異 *B. bronchiseptica* 株の 1.0 x 10⁵ に芳香族栄養補給物および 2 % かまたは 5 % の水酸化アルミニウムアジュバントを加えた力価を有するワクチンは、注射部位に顕著な腫脹を起こすことなくイヌを疾患の臨床徴候から保護するのに役立った。それ故に、本研究は、*B. bronchiseptica* 株の弱毒化生 *aro* 変異株を含むワクチンへのアジュバントおよび芳香族栄養補給物の添加が、当該ワクチンにとって効果的であるために必要とされる用量を顕著に減少させ、同様にワクチンの投与のために生じる任意の注射部位反応をも最小化するのに役立つことを最小限証明している。

30

【0 1 2 0】

本発明は本明細書に記載された特定の実施態様による範囲に限定されるものではない。実際のところ、本明細書の記載物に加えた本発明の種々の改変は、前述の記載より当業者にとって明白であろう。当該改変は、添付の特許請求の範囲に属することを意図するものである。

40

フロントページの続き

- (31)優先権主張番号 61/556,975
(32)優先日 平成23年11月8日(2011.11.8)
(33)優先権主張国 米国(US)

前置審査

- (74)代理人 100137213
弁理士 安藤 健司
(74)代理人 100143823
弁理士 市川 英彦
(74)代理人 100151448
弁理士 青木 孝博
(74)代理人 100183519
弁理士 櫻田 芳恵
(74)代理人 100146318
弁理士 岩瀬 吉和
(74)代理人 100127812
弁理士 城山 康文
(72)発明者 オコーネル, ケビン・エー
アメリカ合衆国、ネブラスカ・68022、エルクホーン、ウエスト・センター・ロード・21401
(72)発明者 ラフルール, ロンダ
アメリカ合衆国、ネブラスカ・68022、エルクホーン、ウエスト・センター・ロード・21401
(72)発明者 ハチヤツパ, ゴウダ, ジャヤツパ
アメリカ合衆国、ネブラスカ・68022、エルクホーン、ウエスト・センター・ロード・21401
(72)発明者 ワスモーン, テリー, リー
アメリカ合衆国、ネブラスカ・68022、エルクホーン、ウエスト・センター・ロード・21401

審査官 上條 のぶよ

- (56)参考文献 韓国公開特許第10-2008-0082883(KR,A)
FEMS Microbiology Letters, 2003年, Vol.221, No.1, p.7-16
American Journal of Veterinary Research, 1981年, Vol.42, No.2, p.266-270

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
A61K 39/00-44
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)
Caplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)