(19)中華民國智慧財產局
(12)發明說明書公開本 (11)公開編號：TW 200946677 A1
(43)公開日： 中華民國 98 (2009) 年 11 月 16 日

(21)申請案號：098103690 (22)申請日： 中華民國 98 (2009) 年 02 月 05 日
(51)Int. Cl.： *C12N15/31 (2006.01)* *C12N15/70 (2006.01)*
A61K39/07 (2006.01) *A61P35/00 (2006.01)*
(30)優先權：2008/02/05 歐洲專利局 08101280.9
2008/02/05 美國 61/026,158
(71)申請人：艾特納辛塔瑞斯有限公司 (德國) AETERNA ZENTARIS GMBH (DE)
德國
(72)發明人：赫茲 克利斯汀 HOTZ, CHRISTIAN (DE)；尖奇夫 艾微洛 GENTSCHEV, IVAYLO (DE)；瑞普 伍爾夫 RAPP, ULF R. (DE)；高貝爾 華納 GOEBEL, WERNER (DE)；芬斯特爾 喬琴 FENSTERLE, JOACHIM (DE)
(74)代理人：林志剛
申請實體審查：無 申請專利範圍項數：21 項 圖式數：5 共 80 頁

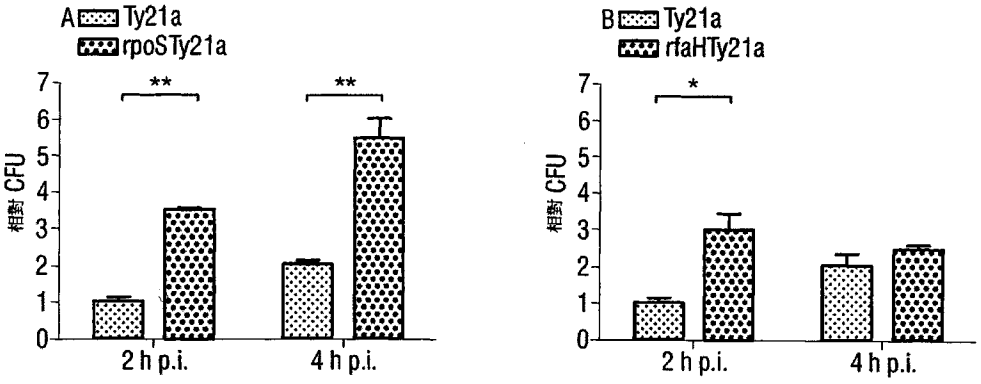
(54)名稱

具有大腸桿菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）溶血素分泌系統及增強之溶血素Ａ（Ｈｌｙ Ａ）表現及／或分泌之重組細菌、製造彼之方法及彼之用途

RECOMBINANT BACTERIA WITH E. COLI HEMOLYSIN SECRETION SYSTEM AND INCREASED EXPRESSION AND/OR SECRETION OF H1YA, PROCESS OF MANUFACTURING AND USES THEREOF

(57)摘要

本發明關於具有大腸桿菌(E.coli)溶血素分泌系統及全長或部分溶血素 A(HlyA)之增強表現及/或增強分泌之重組細菌。本發明亦揭示製造該重組細菌之方法及該重組細菌作為藥物之用途。



(19)中華民國智慧財產局
(12)發明說明書公開本 (11)公開編號：TW 200946677 A1
(43)公開日： 中華民國 98 (2009) 年 11 月 16 日

(21)申請案號：098103690 (22)申請日： 中華民國 98 (2009) 年 02 月 05 日
(51)Int. Cl.： *C12N15/31 (2006.01)* *C12N15/70 (2006.01)*
A61K39/07 (2006.01) *A61P35/00 (2006.01)*
(30)優先權：2008/02/05 歐洲專利局 08101280.9
2008/02/05 美國 61/026,158
(71)申請人：艾特納辛塔瑞斯有限公司 (德國) AETERNA ZENTARIS GMBH (DE)
德國
(72)發明人：赫茲 克利斯汀 HOTZ, CHRISTIAN (DE)；尖奇夫 艾微洛 GENTSCHEV, IVAYLO (DE)；瑞普 伍爾夫 RAPP, ULF R. (DE)；高貝爾 華納 GOEBEL, WERNER (DE)；芬斯特爾 喬琴 FENSTERLE, JOACHIM (DE)
(74)代理人：林志剛
申請實體審查：無 申請專利範圍項數：21 項 圖式數：5 共 80 頁

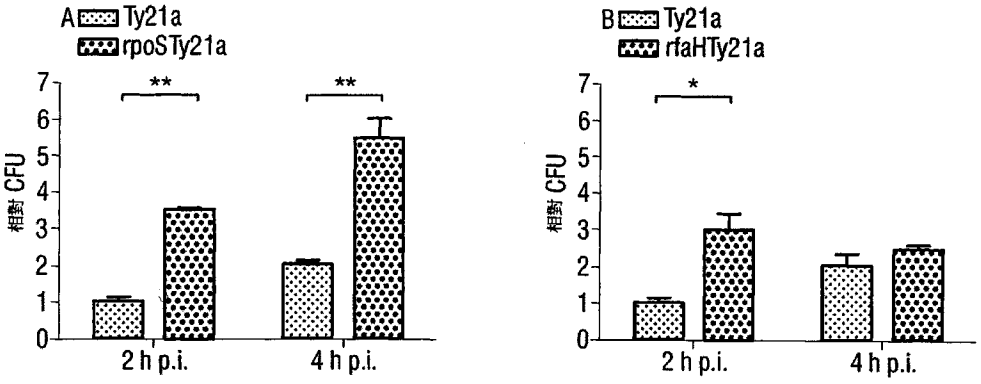
(54)名稱

具有大腸桿菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）溶血素分泌系統及增強之溶血素Ａ（Ｈｌｙ Ａ）表現及／或分泌之重組細菌、製造彼之方法及彼之用途

RECOMBINANT BACTERIA WITH E. COLI HEMOLYSIN SECRETION SYSTEM AND INCREASED EXPRESSION AND/OR SECRETION OF H1YA, PROCESS OF MANUFACTURING AND USES THEREOF

(57)摘要

本發明關於具有大腸桿菌(E.coli)溶血素分泌系統及全長或部分溶血素 A(HlyA)之增強表現及/或增強分泌之重組細菌。本發明亦揭示製造該重組細菌之方法及該重組細菌作為藥物之用途。



六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明關於具有大腸桿菌(E. coli)溶血素分泌系統及全長或部分溶血素 A(HlyA)之增強表現及/或增強分泌之重組細菌及製造彼之方法。該等重組細菌可作爲藥物，特別是用於治療各種不同之腫瘤。

【先前技術】

許可之傷寒疫苗菌株 Ty21a 係一種傷寒沙門氏菌(Salmonella typhi)Ty2 之減毒突變菌株。該疫苗菌株之減毒係由於不可逆之基因缺陷，該基因缺陷係由化學誘變所引起之多重突變所造成[1]。該等突變導致產生對半乳糖敏感(galE 基因突變)、對胺基酸異亮胺酸和纈胺酸呈營養缺陷(ilvD 基因突變)、缺乏多糖莢膜(via 基因突變)且具有降低之應激抗性(rpoS 基因突變)的菌株[2-5]。Ty21a 之多重突變共同地使該 Ty21a 呈基因上安定。於活體外和活體內皆未觀察到毒性之回復。

因利用 Ty21a 之極多經驗，該菌株係作爲異種抗原之載體的明顯候選菌株。兩個最近之臨床試驗評估 Ty21a 作爲幽門螺桿菌(Helicobacter pylori)之多種抗原的載體[6, 7]。於該等試驗中，評估實驗調製劑；令表現幽門螺桿菌之脲酶 A 和 B 次單位的 Ty21a 菌株於以植物爲底質之 Luria Bertani 液體培養基中生長並於新鮮採集之培養液或冷凍整份與碳酸氫鹽緩衝液混合後經口服投遞。經發現於

該兩個研究中該菌株呈安全且具有致免疫性。該細菌引起拮抗傷寒沙門氏菌之體液免疫反應和細胞免疫反應及拮抗脲酶之細胞免疫。令人感到有趣的是，先前利用 Ty21a 進行免疫接種並未對脲酶特異性免疫反應顯現任何負面衝擊[7]。雖然如此，僅有 56%之疫苗顯現拮抗脲酶之細胞免疫，此結果可能是起因於該異種抗原係於細胞質中表現。多數臨床前研究近來顯示與細胞質表現相比較，藉由沙門氏菌分泌或表面顯現異種抗原導致產生優異之免疫原性[8, 9]。於此方向上，最有希望之處理方法之一係使用供抗原投遞之大腸桿菌α-溶血素(HlyA)分泌系統[10]。此轉運機構係第 I 型分泌系統(T1SS)之原型且係由 3 種不同成分(即 HlyB、HlyD 及 TolC)所組成[11]。該 HlyA 於其 C 端攜帶長度爲約 50 至 60 個胺基酸之分泌訊號($HlyA_s$)，該分泌訊號 $HlyA_s$ 係由 HlyB/HlyD/TolC-轉運蛋白所辨識並導致該整個蛋白質被直接分泌至細胞外基質中。該 $HlyA_s$ 與異種抗原之 C 端融合係導致該蛋白質能被該重組細菌有效地分泌。此系統之功能亦於許多不同之革蘭氏陰性細菌(其包括數種實驗減毒之沙門氏菌株)中充分地顯現[10, 12, 13]。

【發明內容】

本發明之目標係提供新穎之腫瘤疫苗，且藉由使用該腫瘤疫苗可達成更爲有效之腫瘤治療。

於一方面，藉由提供一種重組細菌已令人驚訝地解決

本發明之目標，該重組細菌包含編碼大腸桿菌溶血素分泌系統之至少一種核苷酸序列，其中該至少一種核苷酸序列包含於 hly 特異性啓動子或非 hly 特異性之細菌啓動子的控制下之全長或部分 HlyA、HlyB 及 HlyD 基因序列，且該重組細菌進一步包含編碼蛋白質之至少一種核苷酸序列，該蛋白質能達成與正常/野生型 HlyA 之表現及/或分泌相比，全長或部分 HlyA 之增強表現及/或增強分泌。

於一較佳體系中，依據上述方面和較佳體系之重組細菌進一步含有經刪除或失活之 rpoS 基因。

於另一較佳體系中，該進一步所包含之至少一種核苷酸序列包含 rfaH 及/或 rpoN 基因且被整合至細菌染色體中或較佳地係位於質體上。

於另一較佳體系中，依據上述方面和較佳體系之重組細菌係經減毒。

再於另一較佳體系中，該減毒係由刪除至少一種選自下述之基因或使之失活所引起：aroA、aro、asd、gal、pur、cya、crp、phoP/Q 及 omp。

再於另一較佳體系中，該減毒導致生成營養缺陷型細菌。

於另一較佳體系中，依據上述方面和較佳體系之重組細菌係選自革蘭氏陰性細菌或革蘭氏陽性細菌。

於另一較佳體系中，依據上述方面和較佳體系之重組細菌係選自志賀氏菌屬菌種(Shigella spp.)、沙門氏菌屬菌種(Salmonella spp.)、利斯特氏菌屬菌種(Listeria spp.)

、埃希氏菌屬菌種(Escherichia spp.)、分枝桿菌屬菌種(Mycobacterium spp.)、耶爾森氏菌屬菌種(Yersinia spp.)、弧菌屬菌種(Vibrio spp.)或假單胞菌屬菌種(Pseudomonas spp.)。

於另一較佳體系中，依據上述方面和較佳體系之重組細菌係選自弗氏志賀氏菌(Shigella flexneri)、鼠傷寒沙門氏菌(Salmonella typhimurium)、牛分枝桿菌(Mycobacterium bovis)BCG、單核細胞增生利斯特氏菌(Listeria monocytogenes)、傷寒沙門氏菌、小腸結腸炎耶爾森氏菌(Yersinia enterocolitica)、霍亂弧菌(Vibrio cholerae)或大腸桿菌(Escherichia coli)且較佳地係選自傷寒沙門氏菌 Ty2 或傷寒沙門氏菌 Ty21a。

於另一較佳體系中，依據上述方面和較佳體系之重組細菌進一步包含編碼至少一種野生型或突變蛋白質的至少一種完整或部分抗原之至少一種核苷酸序列及編碼至少一種蛋白質毒素及/或至少一種蛋白質毒素次單位之至少一種核苷酸序列。

於另一較佳體系中，依據成分(I)之至少一種野生型或突變蛋白質的至少一種完整或部分抗原係選自下述野生型蛋白質及彼等之習知突變體：受體；受體之細胞外、跨膜或細胞內部分；黏附分子；黏附分子之細胞外、跨膜或細胞內部分；訊號轉導蛋白質；細胞循環蛋白質；轉錄因子；分化蛋白質；胚蛋白質；病毒蛋白質；過敏原；微生物病原體之蛋白質；真核細胞病原體之蛋白質；睪丸癌抗原

蛋白質；腫瘤抗原蛋白質；及/或組織細胞特異性蛋白質，其中該組織細胞係選自副甲狀腺、乳腺、涎腺、淋巴結、乳腺、胃黏膜、腎、卵巢、前列腺、頸、膀胱漿膜或斑痣。

對於該突變蛋白質，該突變可能已呈致癌性且可能已導致該蛋白質之原始細胞功能之喪失或獲得。

該等抗原於細胞中藉由例如第 I 類 MHC 分子進行細胞生長和細胞分化之控制且係呈現於正常細胞之細胞膜上。於腫瘤細胞中，此等抗原經常被過度表現或被特異性突變。結果是該等突變可對癌基因抑制基因有多重功能限制或可活化原始癌基因成爲癌基因，且於腫瘤生長中可單獨或共同地被涉入過度表現。該等細胞抗原係呈現於腫瘤細胞之細胞膜上並因此代表腫瘤細胞上之抗原，然而卻未引起影響病患之腫瘤疾病的免疫反應。Rapp 於 US 5,156,841 已揭露使用腫瘤蛋白(即癌基因之表現產物)作爲腫瘤疫苗之免疫原。

依據本發明之抗原及其(致癌性)突變的實例係 i)受體，諸如 Her-2/neu、雄激素受體、雌激素受體、乳鐵傳遞蛋白受體、軸突生長促進因子(midkine)受體、EGF 受體、ERBB2、ERBB4、TRAIL 受體、FAS、TNFα受體及 TGFβ受體；ii)訊號轉導蛋白質，諸如 c-Raf(Raf-1)、A-Raf、B-Raf、B-Raf V599E、B-Raf V600E、B-Raf KD、B-Raf V600E 激酶結構區、B-Raf V600E KD、B-Raf V600E 激酶結構區 KD、B-Raf 激酶結構區、B-Raf 激酶結構區 KD、

Ras、Bcl-2、Bcl-X、Bcl-W、Bfl-1、Brag-1、Mcl-1、A1、Bax、BAD、Bak、Bcl-Xs、Bid、Bik、Hrk、Bcr/abl、Myb、C-Met、IAP1、IAO2、XIAP、ML-IAP LIVIN、生存素(survivin)及 APAF-1；iii)細胞週期控制蛋白質，諸如細胞週期蛋白 D(1-3)、細胞週期蛋白 E、細胞週期蛋白 A、細胞週期蛋白 B、細胞週期蛋白 H、Cdk-1、Cdk-2、Cdk-4、Cdk-6、Cdk-7、Cdc25C、p16、p15、p21、p27、p18、pRb、p107、p130、E2F(1-5)、GAAD45、MDM2、PCNA、ARF、PTEN、APC、BRCA、p53 及同系物；iv)轉錄因子，諸如 C-Myc、NFkB、c-Jun、ATF-2 及 Spl；v)胚蛋白質，諸如癌胚抗原、α-胎兒蛋白、MAGE、MAGE-1、MAGE-3、NY-ESO-1 及 PSCA；vi)分化抗原，諸如 MART、Gp100、酪胺酸酶、GRP、TCF-4、鹼性髓磷脂、α-乳清蛋白、GFAP、前列腺特異性抗原(PSA)、纖維酸蛋白、酪胺酸酶、EGR-1 及 MUC1；vii)病毒抗原，諸如下述病毒之抗原：HIV、HPV、HCV、HPV、EBV、CMV、HSV、流感病毒、A 型流感病毒、A 型流感病毒(H5N1)和(H3N2)、B 型流感病毒及 C 型流感病毒；血細胞凝集素、血細胞凝集素 H1、血細胞凝集素 H5、血細胞凝集素 H7、血細胞凝集素 HA1(較佳地源自 A 型流感病毒(A/泰國/1(KAN-1)2004(H5N1)))、血細胞凝集素 HA12(較佳地源自 A 型流感病毒(A/泰國/1(KAN-1)2004(H5N1)))、血細胞凝集素 HA12C(較佳地源自 A 型流感病毒(A/泰國/1(KAN-1)2004(H5N1)))、神經胺酸酶；微生物抗原：p60、LLO、脲酶等；真核生

物病原體抗原：CSP(瘧疾)、鞭毛鈣結合蛋白(calflagin)(錐蟲)、CPB(主要是利什曼原蟲(Leishmania))等。

再於另一較佳體系中，依據成分(I)之至少一種野生型或突變蛋白質的至少一種完整或部分抗原係選自下述野生型蛋白質及彼等之習知突變體：Her-2/neu、雄激素受體、雌激素受體、軸突生長促進因子(midkine)受體、EGF 受體、ERBB2、ERBB4、TRAIL 受體、FAS、TNFα受體、TGFβ受體、乳鐵傳遞蛋白受體、鹼性髓磷脂、α-乳清蛋白、GFAP、纖維酸蛋白、酪胺酸酶、EGR-1、MUC1、c-Raf(Raf-1)、A-Raf、B-Raf、B-Raf V599E、B-Raf V600E、B-Raf KD、B-Raf V600E 激酶結構區、B-Raf V600E KD、B-Raf V600E 激酶結構區 KD、B-Raf 激酶結構區、B-Raf 激酶結構區 KD、N-Ras、K-Ras、H-Ras、Bcl-2、Bcl-X、Bcl-W、Bfl-1、Brag-1、Mcl-1、A1、Bax、BAD、Bak、Bcl-Xs、Bid、Bik、Hrk、Bcr/abl、Myb、C-Met、IAP1、IAO2、XIAP、ML-IAP LIVIN、生存素(survivin)、APAF-1、細胞週期蛋白 D(1-3)、細胞週期蛋白 E、細胞週期蛋白 A、細胞週期蛋白 B、細胞週期蛋白 H、Cdk-1、Cdk-2、Cdk-4、Cdk-6、Cdk-7、Cdc25C、p16、p15、p21、p27、p18、pRb、p107、p130、E2F(1-5)、GAAD45、MDM2、PCNA、ARF、PTEN、APC、BRCA、Akt、PI3K、mTOR、p53 及同系物、C-Myc、NFkB、c-Jun、ATF-2、Sp1、前列腺特異性抗原(PSA)、癌胚抗原、α-胎兒蛋白、PAP、PSMA、STEAP、MAGE、MAGE-1、MAGE-3、NY-ESO-1、PSCA、

MART、Gp100、酪胺酸酶、GRP、TCF-4；病毒 HIV、HPV、HCV、HPV、EBV、CMV、HSV、流感病毒、A 型流感病毒、A 型流感病毒(H5N1)和(H3N2)、B 型流感病毒、C 型流感病毒之病毒抗原；血細胞凝集素、血細胞凝集素 H1、血細胞凝集素 H5、血細胞凝集素 H7、血細胞凝集素 HA1(較佳地源自 A 型流感病毒(A/泰國/1(KAN-1)2004(H5N1)))、血細胞凝集素 HA12(較佳地源自 A 型流感病毒(A/泰國/1(KAN-1)2004(H5N1)))、血細胞凝集素 HA12C(較佳地源自 A 型流感病毒(A/泰國/1(KAN-1)2004(H5N1)))、神經胺酸酶、p60、LLO、脲酶、CSP、鞭毛鈣結合蛋白(calflagin)及/或 CPB，或依據成分(I)之至少一種野生型或突變蛋白質的至少一種完整或部分抗原係選自下述野生型蛋白質及彼等之習知突變體(括弧內表示取得編號)的激酶：AAK1(NM 014911)、AATK(NM 004920)、ABL1(NM 005157)、ABL2(NM 005158)、ACK1(NM 005781)、ACVR1(NM 001105)、ACVR1B(NM 020328)、ACVR2(NM 001616)、ACVR2B(NM 001106)、ACVRL1(NM 000020)、ADCK1(NM 020421)、ADCK2(NM 052853)、ADCK4(NM 024876)、ADCK5(NM 174922)、ADRBK1(NM 001619)、ADRBK2(NM 005160)、AKT1(NM 005163)、AKT2(NM 001626)、AKT3(NM 005465)、ALK(NM 004304)、ALK7(NM 145259)、ALS2CR2(NM 018571)、ALS2CR7(NM 139158)、AMHR2(NM 020547)、ANKK1(NM 178510)、ANKRD3(NM 020639)、APEG1(NM 005876)、ARAF(NM 001654)、

ARK5(NM 014840)、ATM(NM 000051)、ATR(NM 001184)、AURKA(NM 003600)、AURKB(NM 004217)、AURKC(NM 003160)、AXL(NM 001699)、BCKDK(NM 005881)、BCR(NM 004327)、BIKE(NM 017593)、BLK(NM 001715)、BMPR1A(NM 004329)、BMPR1B(NM 001203)、BMPR2(NM 001204)、BMX(NM 001721)、BRAF(NM 004333)、BRD2(NM 005104)、BRD3(NM 007371)、BRD4(NM 014299)、BRDT(NM 001726)、BRSK1(NM 032430)、BRSK2(NM 003957)、BTK(NM 000061)、BUB1(NM 004336)、BUB1B(NM 001211)、CABC1(NM 020247)、CAMK1(NM 003656)、CaMK1b(NM 198452)、CAMK1D(NM 020397)、CAMK1G(NM 020439)、CAMK2A(NM 015981)、CAMK2B(NM 001220)、CAMK2D(NM 001221)、CAMK2G(NM 001222)、CAMK4(NM 001744)、CAMKK1(NM 032294)、CAMKK2(NM 006549)、CASK(NM 003688)、CCRK(NM 012119)、CDC2(NM 001786)、CDC2L1(NM 001787)、CDC2L5(NM 003718)、CDC42BPA(NM 014826)、CDC42BPB(NM 006035)、CDC7L1(NM 003503)、CDK10(NM 003674)、CDK11(NM 015076)、CDK2(NM 001798)、CDK3(NM 001258)、CDK4(NM 000075)、CDK5(NM 004935)、CDK6(NM 001259)、CDK7(NM 001799)、CDK8(NM 001260)、CDK9(NM 001261)、CDKL1(NM 004196)、CDKL2(NM 003948)、CDKL3(NM 016508)、CDKL4(NM 001009565)、CDKL5(NM 003159)、

CHEK1(NM 001274)、CHUK(NM 001278)、CIT(NM 007174)、CLK1(NM 004071)、CLK2(NM 003993)、CLK3(NM 003992)、CLK4(NM 020666)、CRK7(NM 016507)、CSF1R(NM 005211)、CSK(NM 004383)、CSNK1A1(NM 001892)、CSNK1D(NM 001893)、CSNK1E(NM 001894)、CSNK1G1(NM 022048)、CSNK1G2(NM 001319)、CSNK1G3(NM 004384)、CSNK2A1(NM 001895)、CSNK2A2(NM 001896)、DAPK1(NM 004938)、DAPK2(NM 014326)、DAPK3(NM 001348)、DCAMKL1(NM 004734)、DCAMKL2(NM 152619)、DCAMKL3(XM 047355)、DDR1(NM 013993)、DDR2(NM 006182)、DMPK(NM 004409)、DMPK2(NM 017525.1)、DYRK1A(NM 001396)、DYRK1B(NM 006484)、DYRK2(NM 006482)、DYRK3(NM 003582)、DYRK4(NM 003845)、EEF2K(NM 013302)、EGFR(NM 005228)、EIF2AK3(NM 004836)、EIF2AK4(NM_001013703)、EPHA1(NM 005232)、EPHA10(NM 001004338)、EPHA2(NM 004431)、EPHA3(NM 005233)、EPHA4(NM 004438)、EPHA5(NM 004439)、EPHA6(XM 114973)、EPHA7(NM 004440)、EPHA8(NM 020526)、EPHB1(NM 004441)、EPHB2(NM 017449)、EPHB3(NM 004443)、EPHB4(NM 004444)、EPHB6(NM 004445)、ERBB2(NM 004448)、ERBB3(NM 001982)、ERBB4(NM 005235)、ERK8(NM 139021)、ERN1(NM 001433)、ERN2(NM 033266)、FASTK(NM 025096)、FER(NM 005246)、FES(NM 002005)、

FGFR1(NM 000604)、FGFR2(NM 022970)、FGFR3(NM 000142)、FGFR4(NM 022963)、FGR(NM 005248)、FLJ23074(NM 025052)、FLJ23119(NM 024652)、FLJ23356(NM 032237)、FLT1(NM 002019)、FLT3(NM 004119)、FLT4(NM 002020)、FRAP1(NM 004958)、FRK(NM 002031)、FYN(NM 002037)、GAK(NM 005255)、GPRK5(NM 005308)、GPRK6(NM 002082)、GPRK7(NM 139209)、GRK4(NM 005307)、GSG2(NM 031965)、GSK3A(NM 019884)、GSK3B(NM 002093)、GUCY2C(NM 004963)、GUCY2D(NM 000180)、GUCY2F(NM 001522)、H11(NM 014365)、HAK(NM 052947)、HCK(NM 002110)、HIPK1(NM 152696)、HIPK2(NM 022740)、HIPK3(NM 005734)、HIPK4(NM 144685)、HRI(NM 014413)、HUNK(NM 014586)、ICK(NM 016513)、IGF1R(NM 000875)、IKBKB(NM 001556)、IKBKE(NM 014002)、ILK(NM 004517)、INSR(NM 000208)、INSRR(NM 014215)、IRAK1(NM 001569)、IRAK2(NM 001570)、IRAK3(NM 007199)、IRAK4(NM 016123)、ITK(NM 005546)、JAK1(NM 002227)、JAK2(NM 004972)、JAK3(NM 000215)、KDR(NM 002253)、KIS(NM 144624)、KIT(NM 000222)、KSR(XM 290793)、KSR2(NM 173598)、LAK(NM 025144)、LATS1(NM 004690)、LATS2(NM 014572)、LCK(NM 005356)、LIMK1(NM 016735)、LIMK2(NM 005569)、LMR3(XM 055866)、LMTK2(NM 014916)、

LOC149420(NM 152835)、LOC51086(NM 015978)、LRRK2(XM 058513)、LTK(NM 002344)、LYN(NM 002350)、MAK(NM 005906)、MAP2K1(NM 002755)、MAP2K2(NM 030662)、MAP2K3(NM 002756)、MAP2K4(NM 003010)、MAP2K5(NM 002757)、MAP2K6(NM 002758)、MAP2K7(NM 005043)、MAP3K1(XM 042066)、MAP3K10(NM 002446)、MAP3K11(NM 002419)、MAP3K12(NM 006301)、MAP3K13(NM 004721)、MAP3K14(NM 003954)、MAP3K2(NM 006609)、MAP3K3(NM 002401)、MAP3K4(NM 005922)、MAP3K5(NM 005923)、MAP3K6(NM 004672)、MAP3K7(NM 003188)、MAP3K8(NM 005204)、MAP3K9(NM 033141)、MAP4K1(NM 007181)、MAP4K2(NM 004579)、MAP4K3(NM 003618)、MAP4K4(NM 145686)、MAP4K5(NM 006575)、MAPK1(NM 002745)、MAPK10(NM 002753)、MAPK11(NM 002751)、MAPK12(NM 002969)、MAPK13(NM 002754)、MAPK14(NM 001315)、MAPK3(NM 002746)、MAPK4(NM 002747)、MAPK6(NM 002748)、MAPK7(NM 002749)、MAPK8(NM 002750)、MAPK9(NM 002752)、MAPKAPK2(NM 032960)、MAPKAPK3(NM 004635)、MAPKAPK5(NM 003668)、MARK(NM 018650)、MARK2(NM 017490)、MARK3(NM 002376)、MARK4(NM 031417)、MAST1(NM 014975)、MAST205(NM 015112)、MAST3(XM 038150)、MAST4(XM 291141)、MASTL(NM 032844)、MATK(NM 139355)、MELK(NM 014791)、MERTK(NM 006343)、MET(NM 000245)、MGC33182(NM

145203)、MGC42105(NM 153361)、MGC43306(C9orf96)、MGC8407(NM 024046)、MIDORI(NM 020778)、MINK(NM 015716)、MKNK1(NM 003684)、MKNK2(NM 017572)、MLCK(NM 182493)、MLK4(NM 032435)、MLKL(NM 152649)、MOS(NM 005372)、MST1R(NM 002447)、MST4(NM 016542)、MUSK(NM 005592)、MYLK(NM 053025)、MYLK2(NM 033118)、MYO3A(NM 017433)、MYO3B(NM 138995)、NEK1(NM 012224)、NEK10(NM 152534)、NEK11(NM 024800)、NEK2(NM 002497)、NEK3(NM 002498)、NEK4(NM 003157)、NEK5(MGC75495)、NEK6(NM 014397)、NEK7(NM 133494)、NEK8(NM 178170)、NEK9(NM 033116)、NLK(NM 016231)、NPR1(NM 000906)、NPR2(NM 003995)、NRBP(NM 013392)、NRBP2(NM 178564)、NRK(NM 198465)、NTRK1(NM 002529)、NTRK2(NM 006180)、NTRK3(NM 002530)、OBSCN(NM 052843)、OSR1(NM 005109)、PACE-1(NM 020423)、PAK1(NM 002576)、PAK2(NM 002577)、PAK3(NM 002578)、PAK4(NM 005884)、PAK6(NM 020168)、PAK7(NM 020341)、PASK(NM 015148)、PCTK1(NM 006201)、PCTK2(NM 002595)、PCTK3(NM 212503)、PDGFRA(NM 006206)、PDGFRB(NM 002609)、PDK1(NM 002610)、PDK2(NM 002611)、PDK3(NM 005391)、PDK4(NM 002612)、PDPK1(NM 002613)、PFTK1(NM 012395)、PHKG1(NM

006213)、PHKG2(NM 000294)、PIK3R4(NM 014602)、PIM1(NM 002648)、PIM2(NM 006875)、PIM3(NM 001001852)、PINK1(NM 032409)、PKE(NM 173575)、PKMYT1(NM 004203)、pknbeta(NM 013355)、PLK(NM 005030)、PLK3(NM 004073)、PRKAA1(NM 006251)、PRKAA2(NM 006252)、PRKACA(NM 002730)、PRKACB(NM 002731)、PRKACG(NM 002732)、PRKCA(NM 002737)、PRKCB1(NM 002738)、PRKCD(NM 006254)、PRKCE(NM 005400)、PRKCG(NM 002739)、PRKCH(NM 006255)、PRKCI(NM 002740)、PRKCL1(NM 002741)、PRKCL2(NM 006256)、PRKCM(NM 002742)、PRKCN(NM 005813)、PRKCQ(NM 006257)、PRKCZ(NM 002744)、PRKD2(NM 016457)、PRKDC(NM 006904)、PRKG1(NM 006258)、PRKG2(NM 006259)、PRKR(NM 002759)、PRKWNK1(NM 018979)、PRKWNK2(NM 006648)、PRKWNK3(NM 020922)、PRKWNK4(NM 032387)、PRKX(NM 005044)、PRKY(NM 002760)、PRPF4B(NM 003913)、PSKH1(NM 006742)、PSKH2(NM 033126)、PTK2(NM 005607)、PTK2B(NM 004103)、PTK6(NM 005975)、PTK7(NM 002821)、PTK9(NM 002822)、PTK9L(NM 007284)、PXK(NM 017771)、QSK(NM 025164)、RAD53(NM 007194)、RAF1(NM 002880)、RAGE(NM 014226)、RET(NM 020975)、RHOK(NM 002929)、RIOK1(NM 031480)、RIOK2(NM 018343)、RIPK1(NM 003804)、RIPK2(NM 003821)、

RIPK3(NM 006871)、RIPK5(NM 015375)、RNASEL(NM 021133)、ROCK1(NM 005406)、ROCK2(NM 004850)、ROR1(NM 005012)、ROR2(NM 004560)、ROS1(NM 002944)、RPS6KA1(NM 002953)、RPS6KA2(NM 021135)、RPS6KA3(NM 004586)、RPS6KA4(NM 003942)、RPS6KA5(NM 004755)、RPS6KA6(NM 014496)、RPS6KB1(NM 003161)、RPS6KB2(NM 003952)、RPS6KC1(NM 012424)、RPS6KL1(NM 031464)、RYK(NM 002958)、SBK(XM 370948)、SCYL1(NM 020680)、SCYL2(NM 017988)、SGK(NM 005627)、SgK069(SU SgK069)、SgK085(XM 373109)、SgK110(SU SgK110)、SGK2(NM 016276)、SgK223(XM 291277)、SgK269(XM 370878)、SgK424(CGP SgK424)、SgK493(SU_SgK493)、SgK494(NM 144610)、SgK495(NM 032017)、SGKL(NM 013257)、SK681(NM 001001671)、SLK(NM 014720)、SMG1(NM 015092)、SNARK(NM 030952)、SNF1LK(NM 173354)、SNF1LK2(NM 015191)、SNK(NM 006622)、SNRK(NM 017719)、SRC(NM 005417)、SRMS(NM 080823)、SRPK1(NM 003137)、SRPK2(NM 003138)、SSTK(NM 032037)、STK10(NM 005990)、STK11(NM 000455)、STK16(NM 003691)、STK17A(NM 004760)、STK17B(NM 004226)、STK18(NM 014264)、STK19(NM 032454)、STK22B(NM 053006)、STK22C(NM 052841)、STK22D(NM 032028)、STK23(NM 014370)、STK24(NM 003576)、STK25(NM 006374)、STK3(NM

006281)、STK31(NM 031414)、STK32B(NM 018401)、STK33(NM 030906)、STK35(NM 080836)、STK36(NM 015690)、STK38(NM 007271)、STK38L(NM 015000)、STK39(NM 013233)、STK4(NM 006282)、STLK5(NM 001003787)、STYK1(NM 018423)、SUDD(NM 003831)、SYK(NM 003177)、TAF1(NM 138923)、TAF1L(NM 153809)、TAO1(NM 004783)、TAOK1(NM 020791)、TAOK3(NM 016281)、TBCK(NM 033115)、TBK1(NM 013254)、TEC(NM 003215)、TEK(NM 000459)、TESK1(NM 006285)、TESK2(NM 007170)、TEX14(NM 031272)、TGFBR1(NM 004612)、TGFBR2(NM 003242)、TIE(NM 005424)、TIF1(NM 003852)、TLK1(NM 012290)、TLK2(NM 006852)、TNIK(NM 015028)、TNK1(NM 003985)、TOPK(NM 018492)、TP53RK(NM 033550)、TRAD(NM 007064)、TRIB1(NM 025195)、TRIB2(NM 021643)、TRIB3(NM 021158)、TRIM28(NM 005762)、TRIM33(NM 015906)、TRIO(NM 007118)、TRPM6(NM 017662)、TRPM7(NM 017672)、TRRAP(NM 003496)、TSSK4(NM 174944)、TTBK1(NM 032538)、TTBK2(NM 173500)、TTK(NM 003318)、TTN(NM 003319)、TXK(NM 003328)、TYK2(NM 003331)、TYRO3(NM 006293)、ULK1(NM 003565)、ULK2(NM 014683)、ULK3(NM 015518)、ULK4(NM 017886)、VRK1(NM 003384)、VRK2(NM 006296)、VRK3(NM 016440)、WEE1(NM

003390)、Wee1B(NM 173677)、YANK1(NM 145001)、YES1(NM 005433)、ZAK(NM 016653)及/或 ZAP70(NM 001079)。

“過敏原”於本發明中係指能引發過敏性及/或過敏反應的本文所定義之完整或部分抗原。實例係 Der p 5(蟎)、Bet v 1(樺樹花粉)、Phl p 1(草花粉)、Asp f I/a(曲霉屬(Aspergillus))、PLA 2(蜜蜂)、Hev b(膠乳)。(參閱文獻 Schmid-Grendelmeier and Crameri, Recombinant allergens for skin testing. Int Arch Allergy Immunol 2001, 125, 96-111)。

微生物病原體和真核生物病原體之抗原及睪丸癌抗原係揭示如上。

再於另一較佳體系中，該至少一種蛋白質毒素及/或至少一種蛋白質毒素次單位係選自：細菌毒素、腸毒素、外毒素、第 I 型毒素、第 II 型毒素、第 III 型毒素、第 IV 型毒素、第 V 型毒素、RTX 毒素、AB 毒素、A-B 毒素、A/B 毒素、A+B 毒素、A-5B 毒素及/或 AB5 毒素。

再於另一較佳體系中，至少一種蛋白質毒素及/或至少一種蛋白質毒素次單位係選自：腺苷酸環化酶毒素、炭疽毒素、炭疽毒素(EF)、炭疽毒素(LF)、肉毒毒素、霍亂毒素(CT, Ctx)、霍亂毒素次單位 B(CTB, CtxB)、白喉毒素(DT, Dtx)、大腸桿菌 LT 毒素、大腸桿菌熱不穩定性腸毒素(LT)、大腸桿菌熱不穩定性腸毒素次單位 B(LTB)、大腸桿菌 ST 毒素、大腸桿菌熱穩定性腸毒素(ST)、紅斑毒素

、脫葉菌素、外毒素 A、產氣腸毒素、百日咳毒素(PT, Ptx)、志賀菌毒素(ST, Stx)、志賀菌毒素次單位 B(STB, StxB)、似志賀菌毒素、葡萄球菌腸毒素、破傷風毒素(TT)、中毒性休克徵候群毒素(TSST-1)、綠猴腎細胞毒素(VT)、艱難梭菌(Clostridium difficile)之毒素 A(TA)和毒素 B(TB)、強毒雙酵素梭菌(Clostridium sordellii)之致命性毒素(LT)和出血性毒素(HT)及諾維氏梭菌(Clostridium novyi)之α毒素(AT)。

再於另一較佳體系中，該至少一種野生型或突變型蛋白質之至少一種完整或部分抗原與該至少一種蛋白質毒素及/或至少一種蛋白質毒素次單位係彼此連接以使由該兩種成分編碼之融合蛋白表現及/或分泌。

再於另一較佳體系中，該融合蛋白係選自：CtxB-PSA、CtxB-B-Raf V600E KD、CtxB-B-Raf V600E 激酶結構區、CtxB-B-Raf V600E 激酶結構區 KD、CtxB-B-Raf、CtxB-B-Raf KD、CtxB B-Raf 激酶結構區 KD、CtxB-HA1 及 CtxB-HA12C。

分泌係自細胞分離、繁複合成及釋出化學物之過程或係指被分泌之化學物或物質量。分泌並不僅存在於真核生物且亦存在於細菌和原始細菌。所有該三種生命領域共同 ATP 結合卡匣(ABC)型轉運蛋白。Sec 系統亦是另一個被保留之分泌系統，其係與真核生物之內質網中的易位子同源，該易位子係由酵母菌之 Sec 61 易位子複合體和細菌之 Sec Y-E-G 複合體所組成。革蘭氏陰性細菌含有兩個膜

，因此使分泌拓樸上更爲複雜。所以，革蘭氏陰性細菌中存有至少五種特定之分泌系統：

(1)第 I 型分泌系統：該分泌系統係與上述之 ATP 結合卡匣轉運蛋白相同。

(2)第 II 型分泌系統：蛋白質跨越內膜係取決於該 Sec 系統且跨越外膜係取決於另一特定系統。細菌纖毛使用該 Sec 系統之修改型，但是該修改型係與該第 I 型系統不同。

(3)第 III 型分泌系統(T3SS)：該分泌系統係與細菌鞭毛基體同源。該分泌系統係如同分子注射器，且細菌(例如志賀氏菌或耶爾森氏菌)透過該分子注射器可將蛋白質注入真核生物細胞中。細胞溶質中之低 Ca^{2+}濃度打開能調控 T3SS 之閘門。植物病原體中之 Hrp 系統透過類似之機構將髮夾(hairpin)注入植物中。

(4)第 IV 型分泌系統：該分泌系統係與細菌(及原始細菌鞭毛)之接合機構同源。該分泌系統能轉運 DNA 和蛋白質。該分泌系統係於根癌土壤桿菌(Agrobacterium tumefaciens)中被發現，且根癌土壤桿菌利用此系統將 Ti 質體和多種蛋白質導入發展冠癭(腫瘤)之宿主內。幽門螺桿菌利用第 IV 型分泌系統將 Cag A 注入胃表皮細胞中。百日咳博德特氏菌(Bordetella pertussis；即引起百日咳之致病劑)係部分透過該第 IV 型系統分泌百日咳毒素。

(5)第 V 型分泌系統(亦稱爲自體轉運蛋白系統)：該分泌系統使用 Sec 系統以跨越內膜。使用此途徑之多種蛋白

質能夠於彼等之 C 端形成β桶並能插入外膜以轉運該肽之其餘部分至膜外。最終該β桶可經切割並遺留在外膜中。某些人士相信該自體轉運蛋白之此等殘餘物導致生成類似β桶之膜孔蛋白。

細菌及粒線體和葉綠體亦使用許多其他特定之轉運系統，諸如攣生精胺酸易位(twin-arginine translocation；Tat)途徑，該 Tat 途徑對比依賴 Sec 系統輸出係轉運完全折疊之蛋白質跨越膜。該系統之名稱係因供標靶此系統所需之訊號序列中需要存有兩個連續精胺酸。革蘭氏陰性細菌之分泌涉及藉由適當之分泌系統(諸如例如 Hly 第 I 型或第 III 型分泌系統或 AIDA 自體轉運蛋白)以克服內膜和外膜。於革蘭氏陽性細菌中，該分泌系統必須克服內膜和細胞壁，且於大多數菌株中藉由與適當之分泌訊號融合可完成該分泌系統。

另一方面，藉由提供一種製造上述方面和較佳體系之重組細菌的方法已令人驚訝地解決本發明之目標，該方法包含下述之步驟：

(a)利用編碼大腸桿菌溶血素分泌系統之至少一種核苷酸序列轉形細菌，其中該至少一種核苷酸序列包含於 hly 特異性啓動子或非 hly 特異性細菌啓動子之控制下的全長或部分 HlyA、HlyB 及 HlyD 基因序列，其中該至少一種核苷酸序列係經整合至細菌染色體中或較佳地係位於質體上；

(b)利用編碼蛋白質之至少一種核苷酸序列補充步驟

(a)之細菌，該蛋白質能達成與正常/野生型 HlyA 之表現及/或分泌相比，全長或部分 HlyA 之增強表現及/或增強分泌，其中該至少一種核苷酸序列較佳地包含 rfaH 及/或 rpoN 基因且係經整合至細菌染色體中或較佳地係位於質體上；

(c)可選擇地，刪除步驟(b)之細菌中的 rpoS 基因或使其失活；

(d)可選擇地，較佳地藉由刪除至少一種選自 aroA、aro、asd、gal、pur、cya、crp、phoP/Q 或 omp 之基因或使之失活使步驟(b)或(c)之細菌減毒；

(e)可選擇地，利用編碼至少一種野生型或突變蛋白質之至少一種完整或部分抗原的至少一種核苷酸序列和編碼至少一種蛋白質毒素及/或至少一種蛋白質毒素次單位之至少一種核苷酸序列轉形步驟(b)、(c)或(d)之細菌，其中該至少一種核苷酸序列係經整合至細菌染色體中或較佳地係位於質體上。

另一方面，藉由提供一種醫藥組成物已令人驚訝地解決本發明之目標，該醫藥組成物包含上述方面和較佳體系之至少一種重組細菌(較佳地至少一種經冷凍乾燥之重組細菌)及藥學上可接受之載體(較佳地膠囊)。

另一方面，藉由提供一種藥物已令人驚訝地解決本發明之目標，該藥物包含上述方面和較佳體系之至少一種重組細菌或上述方面和較佳體系之醫藥組成物。

另一方面，藉由提供一種治療及/或治療性預防生理

及/或病理生理病症之藥物已令人驚訝地解決本發明之目標，該藥物包含上述方面和較佳體系之至少一種重組細菌或上述方面和較佳體系之醫藥組成物，該生理及/或病理生理病症係選自：涉及巨噬細胞發炎之疾病(其中巨噬細胞係與疾病之開始或疾病之進展有關)、腫瘤疾病、未受控制之細胞分裂、惡性腫瘤、良性腫瘤、固體腫瘤、肉瘤、癌瘤、過度增生疾病、類癌、Ewing 氏肉瘤、Kaposi 氏肉瘤、腦腫瘤、源自腦及/或神經系統及/或腦脊髓膜之腫瘤、神經膠瘤、神經母細胞瘤、胃癌、腎臟癌、腎細胞癌瘤、前列腺癌、前列腺癌瘤、結締組織腫瘤、軟組織肉瘤、胰臟腫瘤、肝腫瘤、頭部腫瘤、頸部腫瘤、食道癌、甲狀腺癌、骨肉瘤、視網膜母細胞瘤、胸腺瘤、睪丸癌、肺癌、枝氣管癌瘤、乳癌、乳房癌瘤、腸癌、結腸直腸腫瘤、結腸癌瘤、直腸癌瘤、婦科腫瘤、卵巢腫瘤、子宮癌、頸癌、頸癌瘤、子宮體癌、小體癌瘤、子宮內膜癌瘤、膀胱癌、膜性囊癌、皮膚癌、基底細胞癌、脊髓瘤、黑色素瘤、眼內黑色素瘤、白血病、慢性白血病、急性白血病、淋巴瘤、感染、病毒或細菌感染、流行性感冒、慢性發炎、器官排斥、自體免疫疾病、糖尿病及/或第 II 型糖尿病。

另一方面，藉由提供一種醫藥套組已令人驚訝地解決本發明之目標，該醫藥套組包含上述方面和較佳體系之至少一種重組細菌或上述方面和較佳體系之醫藥組成物或上述方面和較佳體系之藥物及藥學上可接受之緩衝液(較佳

地碳酸鹽緩衝液)。

於本發明中，“營養缺陷型細菌”係指攜帶至少一個突變之細菌，該突變導致於被感染之細胞中生長速率減緩。

於本發明中，“減毒細菌”係指毒性減弱(即與未減毒野生型相對細菌相比較係毒性降低)之細菌，該毒性減弱係藉由至少一種供感染宿主爲必要之毒性因子的功能喪失及/或藉由導致於宿主內生長受損之營養缺陷型突變，例如攜帶經刪除或失活之 aroA、aro、asd、gal、pur、cya、crp、phoP/Q 或 omp 基因或係溫度敏感性突變或抗生素依賴性突變之細菌(Cardenas L. and Clements J.D., Clin Microbiol Rev 1992; 5: 328-342)。

於本發明中，“重組 DNA”係指人造 DNA，其係透過組合、插入或刪除一或多個 DNA 股或彼(等)之部分而經分子/基因上改造，因此結合天然上正常不會一起出現之多個 DNA 序列。以基因改造而言，製造重組 DNA 係藉由將相關 DNA 加入至現存之有機體基因組(諸如細菌之染色體及/或質體)中或刪除現存之有機體基因組(諸如細菌之染色體及/或質體)中的相關 DNA 以爲特殊之目的而編碼或改變不同之特性(諸如免疫性)。DNA 重組係與基因重組不同，因爲經由細胞或核糖體內之過程係不會發生 DNA 重組，且 DNA 重組係限於分子/基因上改造。

於本發明中，“重組質體”係指呈質體型式之重組 DNA。

於本發明中，“重組細菌”係指含有重組 DNA 及/或重

組質體及/或經人工導入之非重組 DNA 的細菌。

於本發明中，“核苷酸序列”係指 dsDNA、ssDNA、dsRNA、ssRNA 或 dsDNA/RNA 雜合體。較佳的是 dsDNA。

於本發明中，“後生漸成之改變(epigenetic changes)”係指 DNA 量之改變，即藉由 DNA 甲基化或去甲基化、結合多蜂房(polycomb)蛋白質、組織蛋白醯化等以影響至少一種基因之表現量。

於本發明中，“調節性 DNA”係指 DNA 中藉由與調節性蛋白質結合或藉由引起後生漸成之改變而影響至少一種基因之表現的區域。

基於本發明之目的，與任一細菌有關之“種(spp.)”欲含括所指屬內之所有成員，其包括種、亞種及其他。例如，“沙門氏菌屬菌種(Salmonella spp.)”欲含括沙門氏菌屬(Salmonella)之所有成員，諸如傷寒沙門氏菌和鼠傷寒沙門氏菌。

於本發明中，“抗原”係指與抗體反應之分子，即能產生抗體之分子。某些抗原本身不會引起抗體產製；僅有能引起抗體產製之抗原被稱爲免疫原。基於本發明之目的，欲含括所有種類之習知抗原。無需過度負荷地藉由資料庫及/或實驗篩選方法取得有關潛在抗原之必要資訊係爲熟習此技藝之人士所習知。抗原之實例尤其是細胞抗原、組織細胞特異性抗原(例如衍生腫瘤之組織細胞)、細胞蛋白質抗原、病毒抗原、病毒蛋白質抗原及類似者。較佳的是

蛋白質抗原。進一步較佳的是異種抗原或外來抗原，即非內源於本發明之各別微生物的抗原或本質上不被本發明之各別微生物表現但係藉由標準分子生物技術方法導入至該等微生物中的抗原。

於本發明中，“完整抗原”係指依據上述之定義與抗體反應之完整分子。完整抗原之實例係例如全長蛋白質，且全長蛋白質亦係較佳的。

於本發明中，“部分抗原”係指依據上述之定義與抗體反應之分子的特定部分。部分抗原可爲例如蛋白質模體(motive)(諸如蛋白質內之胺基酸環)、蛋白質激酶結構區、抗原決定部位及類似者。較佳的是蛋白質激酶結構區和抗原決定部位，其中後者係爲抗體所辨識之抗原特殊部位(亦稱爲抗原決定簇)。

於本發明中，與“蛋白質”有關之“野生型”和“突變”係分別指由“天然”占主要地位之胺基酸序列(由各別核苷酸序列所編碼)所構成之蛋白質和與野生型胺基酸序列相比較於胺基酸序列(由各別核苷酸序列所編碼)上含有一或多個突變之蛋白質。較佳地，野生型及/或突變蛋白質係源自腫瘤細胞。進一步較佳的是部分抗原之胺基酸序列含有突變，即選取較佳地含有一或多個突變之抗原決定部位，例如 B-Raf V600E 抗原決定部位。

細菌感染包含但不限於炭疽、細菌性腦膜炎、臘腸毒菌病、布魯氏菌病(brucellosis)、彎曲桿菌病、貓抓傷病、霍亂、白喉、流行性斑疹傷寒、膿疱病、軍團菌病、麻風

(Hansen 氏疾病)、鉤端螺旋體病、李斯德菌病(listeriosis)、萊姆病(lyme disease)、類鼻疽、MRSA 感染、土壤絲菌病、百日咳、鼠疫、肺炎球菌性肺炎、鸚鵡熱、Q 熱、落磯山斑疹熱(RMSF)、沙門桿菌病、猩紅熱、志賀桿菌病、梅毒、破傷風、沙眼、結核病、土拉菌病(tularemia)、傷寒、斑疹傷寒、泌尿道感染及細菌引起之心臟疾病。

病毒感染包含但不限於 HIV、AIDS、艾滋病(AIDS)相關徵候群(ARC)、水痘、普通感冒、巨細胞病毒感染、科羅拉多壁蝨熱、登革熱(Dengue fever)、Ebola 氏出血熱、手足口病、肝炎、單純疱疹、帶狀疱疹、HPV、流行性感冒、拉沙熱(Lassa fever)、麻疹、馬爾堡(Marburg)氏出血熱、感染性單核細胞增多症、流行性腮腺炎、脊髓灰質炎、進行性多竈性腦白質病、狂犬病、風疹、SARS、天花、病毒性腦脊髓炎、病毒性胃腸炎、病毒性腦膜炎、病毒性肺炎、西尼羅河(West Nile)疾病及黃熱病。

慢性發炎或慢性發炎性疾病包含但不限於慢性膽囊炎、枝氣管擴張症、類風濕性關節炎、橋本(Hashimoto)氏甲狀腺炎、腸發炎疾病(潰瘍性結腸炎和Crohn 氏疾病)、矽肺病及其他塵肺。

自體免疫疾病包含但不限於全身性症狀(諸如 SLE、Sjögren 氏徵候群、硬皮病、類風濕性關節炎及多肌炎)及局部症狀(諸如 IDDM、橋本(Hashimoto)氏甲狀腺炎、Addison 氏疾病、尋常性天疱瘡、銀屑病、異位性皮膚炎、特應性徵候群、氣喘、自體免疫性溶血性貧血及多發性

硬化)。

上述細菌及較佳體系於本文中係指本發明之細菌。

本發明之細菌經由第 I 型分泌系統能較高地表現並分泌溶血素。甚者，rfaH 中介巨噬細胞之較佳攝取及較迅速降解。於小鼠模式中，此導致拮抗溶血素而非拮抗脂多糖(LPS)之較高免疫原性。因此，本發明之細菌理想上係適於投遞本文所描述之異種抗原至已接種疫苗者之免疫系統。特別是對傷寒沙門氏菌 Ty21a，因爲此菌株缺少功能性第 III 型分泌系統，第 I 型分泌似乎是分泌異種抗原之唯一適當方式。再者，與其他沙門氏菌屬菌株之第 I 型分泌相比較，菌株 Ty21a(其係藉由補充 rpoS 訊號途徑之多個因子(即 rpoS、rfaH 及 rpoN)而繞行)之第 I 型分泌係較不有效。

可以習知之方式投服本發明之減毒細菌。投服途徑可爲能有效地運送該細菌至適當或所欲之作用位置的任何途徑，例如經非口服或口服，特別是靜脈內、局部、經皮、經肺、經直腸、陰道內、經鼻或非經腸或藉由植入。較佳的是口服投藥。

非口服投藥可藉由例如無菌水或油溶液、懸浮液或乳化液之靜脈內、皮下或肌內注射、藉由使用移植物或藉由軟膏、乳霜或栓劑。若適當地，持續釋出型式之投藥亦是可能。移植物可包含惰性物質，例如可生物降解之聚合物或合成聚矽氧(諸如例如聚矽氧橡膠)。藉由使用例如陰道環可進行陰道內投藥。藉由使用例如隔板或其他適當之子

宮內裝置可進行子宮內投藥。特別地藉由使用適合經皮投藥之調製劑及/或適當之媒介(諸如例如貼劑)可額外地進行經皮投藥。

口服投藥可藉由使用例如固體型式(諸如藥片、膠囊、明膠膠囊、經塗覆之藥片、顆粒或粉末)和可飲用溶液之型式。供口服投藥的本發明之化合物可與習知且慣用之生理耐受性賦形劑或載體(諸如例如阿拉伯樹膠、滑石、澱粉、糖(諸如例如甘露糖醇、甲基纖維素及乳糖)、明膠、表面活性劑、硬脂酸鎂、環糊精、水溶性或非水溶性載體、稀釋劑、分散劑、乳化劑、潤滑劑、防腐劑及芳香劑(例如香精油))結合。本發明之細菌亦可分散於微粒(例如奈米粒子)組成物中。

較佳之施用模式係口服施用。於一較佳體系中，本發明之沙門氏菌屬菌株係於適當之基質中經醱酵，經離心作用收取並經沖洗且隨後經適當材料調製並經安定且再經冷凍乾燥。該冷凍乾燥物被填充至耐胃液膠囊，其含有較佳地介於 10^9 至 10^{10} 個細菌之活細胞數。該膠囊係隨液體口服。

可替代地，上述經冷凍乾燥之細菌係與含有可中和胃酸的緩衝液之香袋一起被配送(醫藥套組)。於一較佳體系中，該緩衝液係碳酸鹽緩衝液。於使用前立即利用水製備該緩衝液並開始使用，隨後立即令該經冷凍乾燥之細菌與水混合。

另一可替代的是使用經冷凍之細菌。對此，細菌經沖

洗後係經由安定劑(較佳地蔗糖或甘油)安定並隨後經冷凍且於-80°C 下較佳地以濃度介於 10 至 10^{11} 個(較佳地 10^9 至 10^{10} 個)細菌/劑量之方式儲存。此製劑較佳地係於上述之醫藥套組中與碳酸鹽緩衝液同時使用。

製造本發明之細菌的可能模式係：

可將增強第 I 型分泌能力之因子(如 rfaH 和 rpoN)經由質體或基因組整合導入本發明之細菌內。該等因子應被過度表現以分別達到溶血素決定子或異種抗原-Hly 融合體之最佳向上調節。經由質體導入所欲基因之多個複本可達成過度表現。該等質體應能穩定表現彼等之產物並能於活體外和活體內穩定地被複製，諸如質體 pBR322。藉由使用平衡-致死系統(其中染色體上之必要基因係經刪除且藉由質體補充)亦可使質體安定。質體喪失將導致產生不能存活之細菌，此給與質體維持之選擇壓力。藉由於細菌染色體之標的基因的前端整合較強或結構性活性啓動子(如 P_{tac} 或 P_{trp})係促進過度表現之另一種方式。該質體可藉由同源重組製造。

【實施方式】

材料和方法

細菌菌株和質體

所使用之細菌菌株和 DNA 係列示於表 1。於 37℃下且於 Luria Bertani(LB)培養基(Sigma, Schnelldorf, 德國)或 Brain Heart Infusion(BHI)培養基(BD Difco, Sparks,

USA)中培養菌株。利用 1.0(重量(wt)/體積(vol))%瓊脂使培養基固化。若需要，對培養基補充胺苄青黴素(Ap; 100 μg/ml)或/及氯黴素(Cm; 20 μg/ml)。對存活和應激測定，令菌株慣常地於 37℃、好氧及激烈攪拌下且於 CY 培養基(酵母萃取物，12 mg ml^{-1}; Hy-Case, 20 mg ml^{-1}; 肽酶，12 mg ml^{-1}; NaH_2PO_4, 1.25 mg ml^{-1}; NaCl, 3.3 mg ml^{-1}; 葡萄糖，2 mg ml^{-1}; pH 7.2)中生長。

血清型傷寒沙門氏菌 Ty21a $RpoS^+$(rpoSTy21a)和傷寒沙門氏菌 Ty21a $RfaH^+$(rfaHTy21a)之構築

藉由標準聚合酶鏈反應(PCR)技術且利用 pfU 聚合酶(Stratagene, LaJolla, USA)及引子 rpoS_上(5'CATCGCCTGGATCCCCGGGAACG 3')和 rpoS_下(5'GACGCAAAAAGCTTTTGATGACGCGCC 3')產生 rpoS 之 PCR 片段。鼠傷寒沙門氏菌 aroA 之染色體 DNA 作爲模板，退火溫度係 62℃且延伸步驟持續 4 分鐘。經神經網絡啓動子預測規則系統(Neural Network Promoter Prediction algorithm (http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html))測定，1,9kB 片段含有 rpoS 之推定啓動子區域。利用 Phusion Taq(Finnzymes)、引子 rfaH_上(5'GAGGATCCACAGGAAGCTTGATGCGTTTTAG 3')和 rfaH_下(5'CGCAAGATTTAGGGATCCTTCAGAATACGACC 3')及作爲模板之 Ty21a 染色體 DNA 放大 RfaH。PCR 係以下述方式進行：98℃/30 秒，隨後 33 個 98℃/10 秒循環，60℃/90 秒及 72℃/20 秒。

令被放大之基因分別經 BamHI 和 HindIII 酶切並連接至經該等相同酶切之載體 pACYC184 中以生成質體 pRpoS 和 pRfaH。爲構築血清型傷寒沙門氏菌 Ty21a RpoS$^+$和傷寒沙門氏菌 Ty21a RfaH$^+$，於電穿孔小池(0.1 cm)中，利用 Bio-Rad Gene Pulser (Hercules, CA, USA；2.5 kV, 25 微法拉(μF)及 200 Ohm)，藉由電穿孔將該等質體 pRpoS 和 pRfaH 導入傷寒沙門氏菌 Ty21a 中。

藉由正過氧化氫酶反應，測定 rpoS 於 rpoS-陰性傷寒沙門氏菌 Ty21a 株中之表現。藉由當經過氧化氫處理時產生可見之空氣氣泡，可測定 RpoS 陽性選殖系。氣泡量表示不同 rpoS 基因型之菌株未產製過氧化氫酶或減少過氧化氫酶產製[14]。

氧化應激試驗

對氧化應激試驗，將細菌菌株於 CY 培養基中培養至穩定相。令該等細胞經離心收集，再經 0.9% NaCl 沖洗並等量置入兩個管中。隨後將細菌懸浮於未含有 H_2O_2 或含有 3 mM 或 30 mM H_2O_2 之 CY 培養基中。藉由將細胞懸浮液(0.1 ml)塗覆於 BHI 瓊脂上並於 37℃下經培育 20 分鐘後測定存活且於 37℃下經隔夜培育後測定存活。藉由比較經 H_2O_2 處理之細胞與未經 H_2O_2 處理之細胞的菌落形成單位(CFU)的數目，測定存活細菌%。

半定量即時 RT-PCR

利用 RNAeasy 微套組(Qiagen, Hilden，德國)分別對 $5x10^9$ 個細菌(OD_{600}=0.4)和 $1x10^{10}$ 個細菌(OD_{600}=2.5)萃取全部 RNA。室溫下利用 RNase-Free DNase 套組(Qiagen, Hilden, 德國)對管柱上之 DNA 進行酶切 20 分鐘。藉由 PCR 且利用引子 htrB_上(5'GCGAGAATACGGAGAATTG 3')和 htrB2_下(5' GAGGGGAAAAATTGCAG 3')分析是否存有 DNA。利用 DNAfree 套組(Ambion, Austin, 德州)酶切殘餘之 DNA。利用第一股 cDNA 合成套組(Fermentas, Burlington, 加拿大)對全部 RNA(0.5μg)藉由隨機六聚體進行 cDNA 合成。所使用之引子如下。

利用引子 Cat RT(F)和 Cat RT(R)放大對 cat 基因具特異性之 136 bp 片段。利用引子 HlyA RT(F)和 HlyA RT(R)放大對 hlyA 基因具特異性之 121 bp 片段。利用引子 HlyD RT(F)和 HlyD RT(R)放大對 hlyD 基因具特異性之 135 bp 片段。利用引子 RfaH RT(F)和 RfaH RT(R)放大對 rfaH 基因具特異性之 91 bp 片段。

於 Rotor-Gene(Corbett, Sydney，澳洲)上利用 DyNAmo™ HS SYBR® Green qPCR 套組(Finnzymes, Espo，芬蘭)進行定量即時 PCR(qRT-PCR)。對每個樣品(總體積 20μl)進行三重複分析並對每個 qRT-PCR 進行二重複分析。使用經 10 倍稀釋之 cDNA(1μl)進行 qRT-PCR。qRT-PCR 之條件如下：步驟 1-95℃/900 秒；步驟 2-40 個循環：94℃/10 秒，57℃/20 秒，72℃/30 秒；步驟 3-72℃/300 秒；步驟 4-25℃/600 秒；步驟 5-溫度介於 70℃至 95℃間之熔融曲線

。藉由偵測一個熔融溫度峰及經電泳後於 2%瓊脂膠上所預期大小之單一帶，測定是否存在對引子具特異性之擴增子。

利用 Rotor 基因分析軟體 V4.6.70(Corbett, Sydney, 澳洲)測定 Ct 值。藉由對應 Ct 值之力量提高 2，計算供比較之起始 RNA 量的相對單位。經作爲內部對照組之 cat 基因標準化後，計算不同菌株間之基因表現的相對變化。利用 Students T-測試計算調節之顯著水準。

SDS PAGE 和蛋白質印跡

令細菌於含有適當抗生素之 BHI 培養基中生長。於不同之時間點，抽取培養物(20 ml)並於 4℃和 4000 rpm 下經離心(Hereaus 離心機)30 分鐘。令沉降物於 5x Laemmli 緩衝液中經溶菌且被稱爲細胞蛋白質。將上清液(20 ml)轉移至新鮮管中。隨後，加入三氯乙酸(TCA; 2 ml; Applichem, Darmstadt, 德國)；令該液體經混合並於冰上經隔夜培育。經培育後，令懸浮液於 4℃和 4000 rpm 下經離心(Hereaus 離心機)1 小時。傾去上清液並令沉降物經丙酮(1 ml；巴斯德量吸管；Applichem, Darmstadt, 德國)沖洗；令沉澱物於 4℃和 4000 rpm 下經離心(Hereaus 離心機)10 分鐘。令沉降物經空氣乾燥並置入含有或不含有 ß-巯基乙醇之 5x Laemmli 緩衝液(150µl)中[15]且藉由加入飽和 Tris 溶液(1 µl)以中和 pH。於 SDS PAGE 中，每一行使用上清液部分(20 至 25 µl)。經分離之蛋白質被電泳轉移至

Hybond ECL 硝基纖維素膜(Amersham-Pharmacia, Little Chalfont, U.K.)上並經含有 5%脫脂奶之 PBS 溶液阻斷 1 小時。令該膜於 PBS-Tween 0.05%中經沖洗，與 HlyAs 抗體培育[12, 16]並隨後與經 HRP 偶合之抗兔 IgG(1/1,000; Dianova, Hamburg, 德國)培育 1 小時。利用增強之化學發光套組(GE Healthcare Life Science, Munich, 德國)進行蛋白質印跡。

自 Ty21a 純化 LPS

自藉由離心收集後，於 Dyno 研磨機(Bachofen, Basel, 瑞士)中利用玻璃珠和 PBS 機械裂解 Ty21a 細胞。利用 G-1 燒結玻璃濾器令細胞碎物和細胞質與玻璃珠分離。令該玻璃珠經 PBS 沖洗 2 次。集中濾液和沖洗緩衝液並隨後經離心(20000 x g, 4℃, 60 分鐘)。令含有細胞壁碎物之沉降物懸浮於水中並經均質化。

藉由熱酚萃取[17]自細胞壁部分分離 LPS，其中該細胞壁部分係以 1:1.28 之比例與 75℃之熱 80%酚溶液混合。經冷卻至室溫後，令水相與酚分離。該後者(酚)再次如上述般經水萃取。經酚處理後，令結合之水相對水透析以除去殘餘之酚。

藉由超離心(150000 x g, 4℃, 最少 3 小時)沉降該水相部分之 LPS。令沉降物懸浮於水中並經均質化且再經至少兩次超過濾加以進一步純化。令沉降物懸浮於水中並經均質化且隨後於不存在蛋白質和核酸之情況下藉由紫外線

(UV)分光光譜控制[18]。

沙門氏菌感染巨噬細胞、入侵及存活測定

對感染 RAW 264.7 細胞，令細菌生長至穩定相並經 PBS 沖洗。令該細菌經 RPMI 1640 培養基稀釋並隨後於 100 之多重感染下加入至接種於 24 孔槽組織培養盤之該細胞中。令該細菌經離心(500 x g, 5 分鐘)至該細胞上並隨後經培育(37℃, 5%CO_2)2 小時。經感染後，令該巨噬細胞經 PBS 沖洗 2 次並隨後培育於含有 100 μg 慶大黴素/ml(Sigma, Schnelldorf, 德國)之 RPMI 1640 培養基中。經培育 2 小時和 4 小時後，令該巨噬細胞經 PBS 沖洗並經 1% Triton X-100 溶胞。爲計算細胞內細菌，於 LB 瓊脂盤上塗覆系列稀釋液。

利用不同傷寒沙門氏菌 Ty21a 菌株對 Balb/c 小鼠進行鼻內(i.n.)免疫

藉由於含有適當抗生素之 BHI 培養基中且於 37℃下隔夜培養該等菌株以製備感染用整份。隔天，藉由利用 Beckmann-Coulter 離心機經離心以收集細胞，令該細胞於 PBS 中經沖洗並於含有 20%甘油之 PBS 中經濃縮 200 倍且經分裝爲 500 μl 整份部分。於藉由塗覆系列稀釋液於 BHI 瓊脂盤上測定 CFU 之前，將該等整份儲存於-80℃下至少 24 小時。於使用前 30 分鐘令該等小瓶於冰上解凍。令 6 至 8 週大之 C57BL/6 小鼠(Harlan-Winkelmann, Borchem,

德國)於第 0 和 28 天經自該感染用整份之 10-15 μl 中的 8 x 10^8 個沙門氏菌經鼻內免疫 2 次。利用微吸量管將該疫苗施予至未經麻醉之小鼠的鼻孔內。自第 2 次免疫後 21 天殺死該等小鼠並分析血清中拮抗 LPS 和 HlyA 之特異性抗體。

藉由 ELISA 分析拮抗溶血素和 LPS 之抗體反應

藉由 ELISA 測定小鼠血清中之溶血素或 LPS 抗體效價。爲偵測 LPS 抗體，將 1 μg/ml 傷寒沙門氏菌脂多糖(LPS, Berna Biotech Ltd, Berne, 瑞士)於 4℃ 下隔夜塗覆於 NUNC 96 孔槽 MaxiSorp 盤(Nunc A/S, Kamstrup, 丹麥)上。爲偵測 HlyA 特異性抗體，自利用傷寒沙門氏菌 Ty21a 菌株+pANN202-806 之培養上清液沉澱 HlyA，隨後依照該 SDS PAGE 部分之方法。替代 Laemmli 緩衝液，令沉降物再懸浮於 PBS 中並經飽和 Tris 溶液中和。最後，令該溶液以 1:500 之比例經塗覆緩衝液(碳酸鹽緩衝液，pH 9.6)稀釋並經隔夜塗覆至相同之 96 孔槽盤上。

令該等盤經沖洗緩衝液(0.05% Tween(Sigma)之 PBS 溶液)沖洗 2 次並經 1% BSA(Sigma)之 PBS 溶液阻斷。經沖洗 2 次後，令小鼠血清於 100 μl 共軛緩衝液(1% BSA, 0.05% Tween 之 PBS 溶液)中之 3 種稀釋液(1:33; 1:100; 1:300)於 37℃ 下以二重複經培育 1.5 小時。經 4 個沖洗步驟後，加入於 100 μl 共軛緩衝液中經 1:1000 之比例稀釋的與鹼性磷酸酶偶合之羊抗小鼠 IgG 或抗小鼠 IgG 和

IgM(Dianova, Hamburg, 德國)。經於 37℃下 1 小時和兩個沖洗步驟後，加入 50 µl pNPP(Sigma)受質緩衝液。室溫下培育該反應並於 30 分鐘後藉由 50µl 1M NaOH 中止該反應。利用 TECAN Spectra Thermo 微滴量盤讀數計(TECAN, Grödig, 奧地利)於波長 405 nm 下讀取光學密度(OD)值。

結果

1. 不同疫苗沙門氏菌株之溶血素分泌

藉由分析不同之減毒疫苗沙門氏菌株的溶血素分泌效率，發現於相同之條件下，Ty21a 所分泌之蛋白質量係少於所有其他測試菌株者(圖 1)。該疫苗菌株 Ty21a 係一種傷寒沙門氏菌 Ty2 之減毒突變菌株，該減毒係由化學誘變引起之多重突變所達成[1]。因此，某些該等突變可能此效果之原因。爲測試此推定，起啓測試 Ty21a 之單一突變於溶血素分泌上之功效的研究。

2. galE 於 Ty21a 之溶血素表現和分泌上之功效分析

菌株 Ty21a 之決定性特徵係完全缺乏尿苷二磷酸(UDP)-半乳糖-4-差向異構酶活性。該菌株係源於選擇 galE 突變株之經驗，發現該等 galE 突變株顯現半乳糖途徑之其他酶(即半乳糖通透酶、半乳糖激酶及半乳糖-1-磷酸-尿苷醯基轉移酶)的減低之活性[2]。該等 galE 突變株之毒性及引起適當之免疫反應的能力係取決於負責半乳糖

代謝之所有酶的活性及於細菌細胞內之分佈狀態[2]。galE突變之結果係 Ty21a 爲一種粗糙型菌株，其係因爲形成脂多糖(LPS)且無核心多糖和 O-抗原之部分，該脂多糖朝外成爲細胞表面上之主要抗原決定簇。有趣的是，因存在半乳糖(0.1%)，在加入半乳糖後 2 至 3 小時，Ty21a 培養物開始溶胞。當疫苗菌株傷寒沙門氏菌 Ty21a 於含有限制半乳糖(0.001%)之培養基中生長時，該菌株未進行溶胞但會累積 LPS，該 LPS 係該 Ty21a 之免疫原性的必要條件(Kopeco et al. 論文提出)。因此，測試於含有 0.001%半乳糖之不同培養基中的溶血素表現和分泌。發現經於含有 0.001%半乳糖之培養基中培養的帶有編碼 hly 操縱子(hlyCABD)之質體 pANN202-812 的菌株 Ty21a 顯現與經於不含有半乳糖之對應培養基中培養之相同菌株相似量的經表現及分泌之溶血素(未顯現數據)。

3. rpoS 於溶血素表現和分泌上之活體外功效

有趣的是，亦爲構成 Ty21a 菌株之毒性的因素之 rpoS 基因[4]上之另一突變係遺傳自野生型母菌株 Ty2。此基於插入單一鹼基之突變明顯地係 Ty21a 於饑餓狀態下存活及抵抗不同之環境應激條件的能力甚差之原因之一[5]。此 rpoS 基因上之突變與低捨棄速率之組合係降低提出使用 Ty21a 之環境危險。仍未知 RpoS 於傷寒沙門氏菌之毒性中的角色。

爲測試 rpoS 於溶血素分泌上之功效，首先構築編碼

鼠傷寒沙門氏菌 SL7207 之 rpoS 基因的質體。對此，如述於前揭之材料和方法，將編碼全長 rpoS 基因和啓動子區域之 PCR 片段選殖入載體質體 pAYC148 中。藉由應激試驗分析所生成之質體 pRpoS 於 Ty21a 中的功能(材料和方法)。數據證實該 pRpoS 質體能於 Ty21 中顯現功能且該經 rpoS 補充之 Ty21a 菌株比單獨之 Ty21a 較不顯現應激敏感性。如所預期般，鼠傷寒沙門氏菌 SL7207 顯現於此分析中最佳之存活率(表 2)。

此外，發現經補充 pRpoS 後，表現溶血素之 Ty21a/pANN202-812 菌株與不含有 rpoS 質體之相同菌株相比較顯現增加之溶血素表現和分泌(圖 2)。此現象之原因可能係 RpoS 涉及傷寒沙門氏菌之 rfaH 轉錄和 O 抗原表現的取決於生長之調節[19]。RfaH 促進大腸桿菌 hlyCABD mRNA 之延伸[20]及因此溶血素之表現和分泌。因此，藉由即時反轉錄 PCR(RT-PCR)和蛋白質印跡分析 rpoS 和 rfaH 之功效。第一種方法係使用 Rotor 基因系統和 SYBR green I 以測量 hlyA(溶血素)、hlyD(溶血素轉運蛋白)、rfaH 基因及 cat 基因(質體抗生素抗性)之轉錄量。數據證實補充 rfaH 導致 Ty21a 之溶血素表現(圖 3A)和分泌的顯著增加，其最可能地係藉由多順反子 hlyCABD mRNA 之抗終止作用(圖 3B 和 C)。有趣的是，甚至於早期指數生長期，rfaH mRNA 量仍顯著增加(圖 3B)。顯示 rfaH 於傷寒沙門氏菌中之轉錄係取決於生長相且其峰表現係於指數生長期終了時[21]。此緊密調節似乎係經由 pRfaH 導入多個

rfaH 複本而被改變。rpoS 於表現和分泌上之功效並不完全清楚，當 rfaH 之任何向上調節及 hlyA 之兩倍向上調節時，RT-PCR 分析僅透露些許(未顯示)。至少部分藉由與經由 RfaH 之抗終止作用不同之機構，RpoS 可調節 HlyA 分泌和表現。

4. rpoS 和 rfaH 於傷寒沙門氏菌 Ty21a 入侵 RAW 264.7 巨噬細胞及於 RAW 264.7 巨噬細胞中存活上之功效

爲測試血清型傷寒沙門氏菌 Ty21a RpoS$^+$或 RfaH$^+$是否比 Ty21a 更能入侵 RAW 巨噬細胞且更能於 RAW 巨噬細胞中存活，進行如前揭之材料和方法所述之入侵和存活分析(圖 4)。在感染後 2 和 4 小時，發現傷寒沙門氏菌 Ty21a 之 CFU 與傷寒沙門氏菌 Ty21a RpoS$^+$之 CFU 存有顯著之差異。相對地，RfaH 僅於早期數個時間點提供益處。感染後 4 小時，Ty21a 與 rfaHTy21a 之細胞內細菌數相同。雖然 Ty21a 經 2 小時之兩倍時間進行細胞內複製，但是 rfaHTy21a 似乎並未顯現顯著之細胞內生長。

5. 經分泌 HlyA 之傷寒沙門氏菌鼻內免疫後，增強拮抗溶血素而非 LPS 之抗體反應

先前已證實經免疫小鼠後 Ty21a 保有溶血素表現載體 pANN 202-812 且利用 Ty21a/pANN 202-812 鼻內免疫小鼠產生拮抗異種抗原 HlyA 之 IgG 反應[22]。爲測試 rpoS 和 rfaH 之免疫功效，亦評估活體內拮抗 HlyA 和 LPS(Ty21a

之免疫顯性抗原)之體液免疫反應。此實驗中，5 組 Balb/c 小鼠(n=25)係經 rpoSTy21a/pANN202-812、rfaHTy21a/pANN202-812、Ty21a/pANN202-812、Ty21a(對照組)及安慰劑(即天然鼠組)鼻內免疫 2 次。於感染後第 49 天，藉由 HlyA 和 LPS 特異性 ELISA 分析 HlyA 和 LPS 特異性免疫反應之誘導作用(圖 5)。有趣的是，與所有其他組相比較，rfaHTy21a/pANN 202-81 菌株之免疫作用顯示拮抗 HlyA(圖 5A)而非 LPS(圖 5B)之抗體反應的顯著增強現象。再者，藉由單向 ANOVA 及隨後之 Newman-Keuls 多重比較試驗，Hly 特異性抗體反應與經 rfaHTy21a/pANN202-812 和 rpoSTy21a/pANN202-812 免疫之實驗組之間的差異亦具有統計上顯著性($p<0.05$)。血清拮抗 LPS 之整體反應性係略低，即使於此實驗係使用抗 IgG 和 IgM 抗體進行偵測，25 隻小鼠中僅有 4 隻對該抗原有反應。

討論

減毒之活細菌疫苗菌株傷寒沙門氏菌 Ty21a 可爲人體異種蛋白質之適當載體。近來於兩個臨床試驗中測試 Ty21a 中異種抗原之表現，其結果顯示於細胞質中遞送源自幽門螺桿菌之多種抗原的 Ty21a 係安全的且經實驗性調製劑口服免疫後顯現某些免疫原性[6,7]。然而，數個臨床前研究已顯示與上述臨床試驗中所使用細胞質表現相比較[6,7]，表面顯現或分泌更適合減毒之沙門氏菌株遞送異種抗原[8,9,23,24]。因此，近來評估大腸桿菌溶血素分泌系

統以供 Ty21a 遞送異種抗原[22,25]。選擇該溶血素分泌系統係因爲已於許多臨床前研究中使用該溶血素分泌系統以供減毒之沙門氏菌株遞送源自細菌、病毒及寄生蟲之抗原[10]、已於腫瘤之免疫治療中使用該溶血素分泌系統[26,27]、已使用該溶血素分泌系統作爲免疫避孕疫苗之遞送系統[28]及作爲供共同表現和共同遞送多種活性細胞因子之系統[29]。

此外，已證實 Ty21a 經溶血素表現載體轉形後，依照用於製造被許可之 Vivotif®疫苗的方法經生長和調製後，該疫苗菌株能成功地表現並分泌 HlyA[22]。亦可於活體外和活體內穩定地維持編碼該抗原分泌系統之質體。過去，已顯示於減毒之沙門氏菌株中異種抗原之細胞溶質表現係呈現對載體細菌爲強代謝負荷[30]。該代謝負荷進而降低該細菌之活體內持久性及異種抗原表現之穩定性。然而，此數據建議因異種抗原分泌的緣故，可改善疫苗細菌之持久性及抗原之穩定性[22]。

此處，描述改良傷寒沙門氏菌 Ty21a 以供溶血素表現和分泌。發現經補充 pRfaH 後，表現溶血素之 Ty21a/pANN202-812 菌株與不含有 rfaH 質體之相同菌株相比較係顯現高度增強之溶血素表現和分泌(圖 3A)。此等發現之原因似乎是多順反子 mRNA 之抗終止作用。再者，與對照組菌株及甚至 rpoSTy21/pANN202-812 相比較，rfaHTy21a/pANN202-812 於經鼻內免疫之 Bl/6 小鼠體內誘發顯著較高之抗體效價(圖 5)。此結果係令人驚訝的，因爲 rpoSTy21a/pANN202-812

亦顯現增強之 HlyA 表現和分泌(圖 2)。此結果之原因可能是如下說明之於巨噬細胞內之存活增加。

與單獨之 Ty21a 相比較，經補充 rfaH 之 Ty21 於感染巨噬細胞後之前 2 小時內顯現較高之細胞內細菌效價。經 4 小時後此益處消失，因爲 rfaHTy21a 似乎並未複製或殺死細菌與細菌複製間之平衡移向殺死細菌之一方(圖 4B)。不知此結果之原因，可能是 rfaH 中介巨噬細胞之增加攝取及/或中介對巨噬細胞殺死之增加感受性。與各別之野生型相比較，經補充 rpoS 之 Ty21a 顯現於 RAW 巨噬細胞中增加之細胞內存活(圖 4A)。此結果對應 Alama et. al.之研究，其中傷寒沙門氏菌 rpoS-陰性菌株更能感受 RAW 巨噬細胞之細胞內殺死。此殺死係取決於氧化氮合成酶之作用[31]。相對於此，傷寒沙門氏菌 rpoS 刪除突變株於靜止之 THP-I 細胞(一種人急性單核細胞白血病細胞系)中未顯現對該細胞內殺死之感受性。然而，此突變株比各別之野生型較不具細胞毒性[32]。此結果顯示 RpoS 可於多種血清型傷寒菌株之毒性上扮演某一角色。進一步，所觀察到之降低的感受性可能係起因於主要抗原之較不有效率的 MHC 呈現，其進而可導致 RpoS 陽性菌株之免疫原性降低(如同血清型鼠傷寒菌株之 phoP 突變株所顯現者)[33]。因此，對細胞內殺死之抗性可解釋拮抗所檢驗之多種抗原的低抗體效價(圖 5)。

rpoS 和 rfaH 基因皆爲沙門氏菌株之毒性的成因。數個研究評估該等因子之突變體作爲活疫苗載體[4,35-38]。

因此，將此等基因導入減毒之 Ty21a 菌株可增加毒性並影響減毒。然而，rpoS 對傷寒沙門氏菌毒性之貢獻仍不清楚。再者，rfaH 突變對鼠傷寒沙門氏菌之減毒功效主要係藉由使 LPS 合成基因沉默而向下調節毒性因子[39]。相反地，Ty21a 代表一種粗糙表現型之 LPS 缺乏菌株[1,2]。因爲在該調節子下端之全部 LPS 合成被廢除，所以嘗試假定 Ty21a 中 rfaH 之過度表現將不會妨礙安全考量。

本發明之數據清楚地顯示經由 TISS 分泌異種抗原之 rfaHTy21a 可進行疫苗接種以拮抗載體抗原和傷寒。因此，重組 Ty21a/rfaH 菌株可爲能經口服投遞之新一代組合疫苗的基礎。

表 1.細菌菌株和 DNA(Ap^R-胺苄青黴素-抗性；Cm^R-氯黴素-抗性)

名稱	相關特性/序列	來源或參考
細菌菌株：		
大腸桿菌 DH5	F^-, ø80dlacZ M15,(lacZYA-argF)U169 deoR, recA1, endA1, hsdR17(rk^-, mk^+), phoA, supE44, I^-, thi-1, gyrA96, relA1	Invitrogen, Karlsruhe, 德國
傷寒桿菌 Ty21a	傷寒沙門氏菌 Ty2, galE, rpoS, viaB	Berna Biotech Ltd.
鼠傷寒桿菌 aroA SL7207	hisG46, DEL407 [aroA544::Tn10(Tc^s)]	Stocker, B. A. D
都柏林沙門氏菌 aroA SL5928	aroA, fliC::Tn10	Stocker, B. A. D
寡片段：		
rpoS_上	5'CATCGCCTGGATCCCCGGGAACG 3'	本研究
rpoS_下	5'GACGCAAAAAGCTTTTGATGACGCGCC 3'	本研究
rfaH_上	5'GAGGATCCACAGGAAGCTTGATGCGTTTTAG3'	本研究
rfaH_下	5'CGCAAGATTTAGGGATCCTTCAGAATACGACC 3'	本研究

htrB_上	5'GCGAGAATACGGAGAATTG3'	本研究
htrB2_下	5' GAGGGGAAAAATTGCAG3'	本研究
質體：		
pANN202-812	Ap^R, hlyR, C, A, B, D, pBR322 之衍生物	[40]
pACYC184	Cm^R, Tet^R	[41]
pRpoS	pACY184 之 Cm^R 衍生物，編碼鼠傷寒沙門氏菌 SL7207 之 rpoS 基因	本研究
pRfaH	pACY184 之 Cm^R 衍生物，編碼傷寒沙門氏菌 Ty21a 之 rfaH 基因	本研究

表 2.氧化應激試驗

菌株	3mM H_2O_2	30mM H_2O_2
Ty21a	0%	0%
rpoSTy21a	2%	0%
SL7207	15%	0%

經 H_2O_2 處理之細菌培養物的存活率。令細胞生長至中期指數生長期，經所指之 H_2O_2 濃度處理並被塗覆至 BHI 瓊脂上。藉由計數經處理之細胞和未經處理之細胞的 CFU 以測定存活率。

表 3.引子

RT 引子	序列	被偵測之 mRNA
Cat RT(F)	5′ACGTTTCAGTTTGCTCATGG 3′	氯黴素轉乙醯酶 mRNA
Cat RT(R)	5′CCGGCCTTTATTCACATTCT 3′	氯黴素轉乙醯酶 mRNA
HlyA RT(F)	5′CAGCTGCAGGTAGCTTCG 3′	雙順反子 mRNACA 和多順反子 mRNACABD
HlyA RT(R)	5′TATGCTGATGTGGTCAGGGT 3′	雙順反子 mRNACA 和多順反子 mRNACABD
HlyD RT(F)	5′ATTCTTACCCGCTCATCTGG 3′	多順反子 mRNACABD
HlyD RT(R)	5′GTGGCAACAATTTCCACTTG 3′	多順反子 mRNACABD
RfaH RT(F)	5′ AACGTACCTTCGTCAGCGA 3′	rfaH
RfaH RT(R)	5′ GTGGCGTTGATTGTAGTGGT 3′	rfaH

【圖式簡單說明】

圖 1.藉由蛋白質印跡法(Western blot(WB))鑑定溶血素：分析傷寒沙門氏菌 Ty21a(第 1 和 2 行)、傷寒沙門氏菌 Ty21a/pANN202-812(第 3 和 4 行)、鼠傷寒沙門氏菌 SL7207/pANN202-812(第 5 和 6 行)及都柏林沙門氏菌 SL5928/pANN202-812(第 7 和 8 行)之培養物。將細菌培養物(0.05 ml)之細胞蛋白質載入第 1、3、5 及 7 行；將自細菌培養物(2.5 ml)沉澱之上清液蛋白質載入第 2、4、6 及 8 行。利用多株抗 HlyAs 抗體進行免疫印跡[12, 16]。

圖 2.(WB)利用 pRpoS 補充 Ty21a/pANN202-812：分析 Ty21a/pANN202-812(第 1 至 4 行)、rpoSTy21a/paNN202-812(第 5 至 8 行)及單獨 Ty21a(第 9 行)之培養物。將細胞蛋白質(0.12 ml)載入凝膠(第 1、3、5 及 7 行)上。將自培養物(2.5 ml)沉澱之上清液載入第 2、4、6、8 及 9 行。於指數生長期抽取樣品(第 1、2、5 及 6 行)或於穩定期抽取樣品(第 3、4、7、8 及 9 行)。利用多株抗 HlyAs 抗體進行免疫印跡[12, 16]。

圖 3.rfaH 於轉錄、表現及分泌上之功效：WB(A), 半定量 RT-PCR(B,C)：A：分析 Ty21a/pANN202-812(第 1 至 4 行)和 rfaHTy21a/paNN202-812(第 5 至 8 行)之培養物。將細胞蛋白質(0.12 ml)載入凝膠(第 1、3、5 及 7 行)上。將自培養物(2.5 ml)沉澱之上清液載入第 2、4、6、8 及 9 行。於指數生長期抽取樣品(第 1、2、5 及 6 行)或於穩定

期抽取樣品(第 3、4、7 及 8 行)。利用多株抗 HlyAs 抗體進行免疫印跡[12, 16]。B,C：自生長至早期指數生長期(B)或穩定期(C)之 Ty21a/pANN202-812 和 rfaHTy21a/paNN202-812 之培養物分離 RNA 並令該 RNA 經反轉錄成 cDNA。利用 Rotor 基因即時 PCR 分析所指之基因。經作爲內部對照組之貓基因標準化後，計算不同菌株間基因表現上之相對變化。利用 Students T 測試計算調節改變之顯著水準。*=P 值<0.05；**=P 值<0.01；***=P 值<0.001。

圖 4.Ty21a、rpoSTy21a(A)及 rfaHTy21a(B)對 RAW 264.7 巨噬細胞之入侵及細胞內之存活：令細胞經多重感染(100)並於感染後 2 和 4 小時經溶胞作用。藉由於 LB 瓊脂盤上塗覆系列稀釋液以測量 CFU。經感染後 2 小時，藉由比較不同菌株之 CFU 與 Ty21a 之 CFU 以計算相對 CFU。利用 Students T 測試測定相對 CFU 之顯著水準。*=P 值<0.05；**=P 值<0.01。

圖 5.藉由利用抗 IgG(A)和抗 IgG+IgM(B)偵測抗體之 HlyA 或 LPS 特異性 ELISA 測定經 rpoSTy21a/pANN202-812、rfaHTy21a/pANN202-812、Ty21a/pANN202-812 或 Ty21a(對照組)免疫之小鼠及天然小鼠的 HlyA(A)和 LPS 特異性(B)血清抗體反應。使用單向 Anova 及隨後之 Newman-Keuls 多重比較測試分析數據。*=P 值<0.05；**=P 值<0.01。

所有引述之文獻及專利的內容係併入本文作爲參考。本發明係藉由下述之實施例加以詳細說明但絕不受限於該等實施例。

參考文獻

1. Germanier, R. and E. Furer, *Isolation and characterization of Gal E mutant Ty 21a of Salmonella typhi: a candidate strain for a live, oral typhoid vaccine.* J Infect Dis, 1975. **131**(5): p. 553-8.
2. Germanier, R. and E. Furer, *Immunity in experimental salmonellosis. II. Basis for the avirulence and protective capacity of gal E mutants of Salmonella typhimurium.* Infect Immun, 1971. **4**(6): p. 663-73.
3. Fukasawa, T. and H. Nikaido, *Galactose-sensitive mutants of Salmonella. II. Bacteriolysis induced by galactose.* Biochim Biophys Acta, 1961. **48**: p. 470-83.
4. Coynault, C., V. Robbe-Saule, and F. Norel, *Virulence and vaccine potential of Salmonella typhimurium mutants deficient in the expression of the RpoS (sigma S) regulon.* Mol Microbiol, 1996. **22**(1): p. 149-60.
5. Robbe-Saule, V., C. Coynault, and F. Norel, *The live oral typhoid vaccine Ty21a is a rpoS mutant and is susceptible to various environmental stresses.* FEMS Microbiol Lett, 1995. **126**(2): p. 171-6.
6. Bumann, D., et al., *Safety and immunogenicity of live recombinant Salmonella enterica serovar Typhi Ty21a expressing urease A and B from Helicobacter pylori in human volunteers.* Vaccine, 2001. **20**(5-6): p. 845-52.
7. Metzger, W.G., et al., *Impact of vector-priming on the immunogenicity of a live recombinant Salmonella enterica serovar typhi Ty21a vaccine expressing urease A and B from Helicobacter pylori in human volunteers.* Vaccine, 2004. **22**(17-18): p. 2273-7.
8. Hess, J., et al., *Superior efficacy of secreted over somatic antigen display in recombinant Salmonella vaccine induced protection against listeriosis.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(4): p. 1458-63.
9. Russmann, H., et al., *Delivery of epitopes by the Salmonella type III secretion system for vaccine development.* Science, 1998. **281**(5376): p. 565-8.
10. Gentschev, I., G. Dietrich, and W. Goebel, *The E. coli alpha-hemolysin secretion system and its use in vaccine development.* Trends Microbiol, 2002. **10**(1): p. 39-45.
11. Wandersman, C. and P. Delepelaire, *TolC, an Escherichia coli outer membrane protein required for hemolysin secretion.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(12): p. 4776-80.

12. Gentschev, I., et al., *Development of antigen-delivery systems, based on the Escherichia coli hemolysin secretion pathway.* Gene, 1996. **179**(1): p. 133-40.
13. Spreng, S., et al., *The Escherichia coli haemolysin secretion apparatus: a potential universal antigen delivery system in gram-negative bacterial vaccine carriers.* Mol Microbiol, 1999. **31**(5): p. 1596-8.
14. Robbe-Saule, V., et al., *Characterization of the RpoS status of clinical isolates of Salmonella enterica.* Appl Environ Microbiol, 2003. **69**(8): p. 4352-8.
15. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.* Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
16. Gentschev, I., et al., *Mini-TnhlyAs: a new tool for the construction of secreted fusion proteins.* Mol Gen Genet, 1996. **252**(3): p. 266-74.
17. Westphal, O., Lüderitz, O., Bister, F, *Über die Extraktion von Bakterien mit Phenol-Wasser.* Z. Naturforsch., 1952. **7**.
18. Warburg, O., Christian, W., *Isolierung und Kristallisation des Gärungsferments Enolase.* Biochem. Z., 1942. **310**.
19. Bittner, M., et al., *RpoS and RpoN are involved in the growth-dependent regulation of rfaH transcription and O antigen expression in Salmonella enterica serovar Typhi.* Microb Pathog, 2004. **36**(1): p. 19-24.
20. Leeds, J.A. and R.A. Welch, *RfaH enhances elongation of Escherichia coli hlyCABD mRNA.* J Bacteriol, 1996. **178**(7): p. 1850-7.
21. Rojas, G., et al., *The rfaH gene, which affects lipopolysaccharide synthesis in Salmonella enterica serovar Typhi, is differentially expressed during the bacterial growth phase.* FEMS Microbiol Lett, 2001. **204**(1): p. 123-8.
22. Gentschev, I., et al., *Use of the alpha-hemolysin secretion system of Escherichia coli for antigen delivery in the Salmonella typhi Ty21a vaccine strain.* Int J Med Microbiol, 2004. **294**(6): p. 363-71.
23. Spreng, S., et al., *Protection against murine listeriosis by oral vaccination with recombinant Salmonella expressing protective listerial epitopes within a surface-exposed loop of the TolC-protein.* Vaccine, 2003. **21**(7-8): p. 746-52.
24. Gentschev, I., et al., *Delivery of protein antigens and DNA by attenuated intracellular bacteria.* Int J Med Microbiol, 2002. **291**(6-7): p. 577-82.
25. Gentschev, I., et al., *Vivotif--a 'magic shield' for protection against typhoid fever and delivery of heterologous antigens.* Chemotherapy, 2007. **53**(3): p. 177-80.

26. Gentschev, I., et al., *Use of a recombinant Salmonella enterica serovar Typhimurium strain expressing C-Raf for protection against C-Raf induced lung adenoma in mice.* BMC Cancer, 2005. **5**(1): p. 15.

27. Fensterle, J., et al., *Cancer Immunotherapy based on recombinant Salmonella enterica serovar Typhimurium aroA strains secreting prostate-specific antigen (PSA) and cholera toxin subunit B (CtxB).* Cancer Gene Therapy.

28. Donner, P., Goebel, W., Demuth, A., Gentschev, I., Hess, J., Kaufmann, S.H.E., *Use of a secretion vector for fertility control by oral vaccination.* Patent WO-09850067, 1998.

29. Hahn, H.P., et al., *A Salmonella typhimurium strain genetically engineered to secrete effectively a bioactive human interleukin (hIL)-6 via the Escherichia coli hemolysin secretion apparatus.* FEMS Immunol Med Microbiol, 1998. **20**(2): p. 111-9.

30. Galen, J.E. and M.M. Levine, *Can a 'flawless' live vector vaccine strain be engineered?* Trends Microbiol, 2001. **9**(8): p. 372-6.

31. Alam, M.S., et al., *Involvement of Salmonella enterica serovar Typhi RpoS in resistance to NO-mediated host defense against serovar Typhi infection.* Microbial Pathogenesis, 2006. **40**(3): p. 116-125.

32. Khan, A.Q., et al., *Salmonella typhi rpoS mutant is less cytotoxic than the parent strain but survives inside resting THP-1 macrophages.* FEMS Microbiol Lett, 1998. **161**(1): p. 201-8.

33. Wick, M.J., et al., *The phoP locus influences processing and presentation of Salmonella typhimurium antigens by activated macrophages.* Mol Microbiol, 1995. **16**(3): p. 465-76.

34. Curtiss, R., 3rd and C.A. Nickerson, *Recombinant avirulent immunogenic S typhi having rpos positive phenotype.* United States Patent 6024961, 2000.

35. Fang, F.C., et al., *The alternative sigma factor katF (rpoS) regulates Salmonella virulence.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(24): p. 11978-82.

36. Nickerson, C.A. and R. Curtiss, 3rd, *Role of sigma factor RpoS in initial stages of Salmonella typhimurium infection.* Infect Immun, 1997. **65**(5): p. 1814-23.

37. Lee, H.Y., et al., *Evaluation of phoP and rpoS mutants of Salmonella enterica serovar Typhi as attenuated typhoid vaccine candidates: virulence and protective immune responses in intranasally immunized mice.* FEMS Immunol Med Microbiol, 2007. **51**(2): p. 310-8.

38. Nagy, G., et al., *Oral immunization with an rfaH mutant elicits protection against salmonellosis in mice.* Infect Immun, 2004. **72**(7): p. 4297-301.

39. Nagy, G., et al., *Down-regulation of key virulence factors makes the Salmonella enterica serovar Typhimurium rfaH mutant a promising live-attenuated vaccine candidate.* Infect Immun, 2006. **74**(10): p. 5914-25.

40. Vogel, M., et al., *Characterization of a sequence (hlyR) which enhances synthesis and secretion of hemolysin in Escherichia coli.* Mol Gen Genet, 1988. **212**(1): p. 76-84.

41. Chang, A.C. and S.N. Cohen, *Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the P15A cryptic miniplasmid.* J Bacteriol, 1978. **134**(3): p. 1141-56.

序列表

<110> 艾特納辛塔瑞斯有限公司(Aeterna Zentaris GmbH)

<120> 具有大腸桿菌(E. coli)溶血素分泌系統及增強之溶血素A (HlyA)表現及/或分泌之重組細菌、製造彼之方法及彼之用途

<130> TW 08/02 Z

<140>
<141>

<160> 14

<170> PatentIn版本3.3

<210> 1
<211> 23
<212> DNA
<213> 人造

<220>
<223> PCR引子

<400> 1
catcgcctgg atccccggga acg 23

<210> 2
<211> 27
<212> DNA
<213> 人造

<220>
<223> PCR引子

<400> 2
gacgcaaaaa gcttttgatg acgcgcc 27

<210> 3
<211> 31
<212> DNA
<213> 人造

<220>
<223> PCR引子

<400> 3
gaggatccac aggaagcttg atgcgtttta g 31

<210> 4
<211> 32
<212> DNA
<213> 人造

<220>
<223> PCR引子

<400> 4
cgcaagattt agggatcctt cagaatacga cc 32

<210> 5
<211> 19
<212> DNA
<213> 人造

<220>
<223> PCR引子

<400> 5
gcgagaatac ggagaattg 19

<210> 6
<211> 17
<212> DNA
<213> 人造

<220>
<223> PCR引子

<400> 6
gaggggaaaa attgcag 17

<210> 7
<211> 20
<212> DNA
<213> 人造

<220>
<223> PCR引子

<400> 7
acgtttcagt ttgctcatgg 20

<210> 8
<211> 20
<212> DNA
<213> 人造

<220>
<223> PCR引子

<400> 8
ccggccttta ttcacattct 20

<210> 9
<211> 18
<212> DNA
<213> 人造

<220>
<223> PCR引子

<400> 9
cagctgcagg tagcttcg 18

<210> 10
<211> 20
<212> DNA
<213> 人造

<220>
<223> PCR引子

<400> 10
tatgctgatg tggtcagggt 20

<210> 11
<211> 20
<212> DNA
<213> 人造

<220>
<223> PCR引子

<400> 11
attcttaccc gctcatctgg 20

<210> 12
<211> 20
<212> DNA

<213> 人造

<220>
<223> PCR引子

<400> 12
gtggcaacaa tttccacttg 20

<210> 13
<211> 19
<212> DNA
<213> 人造

<220>
<223> PCR Primer

<400> 13
aacgtacctt cgtcagcga 19

<210> 14
<211> 20
<212> DNA
<213> 人造

<220>
<223> PCR引子

<400> 14
gtggcgttga ttgtagtggt 20

200946677

858526

發明專利說明書

（本申請書格式、順序，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫）

※申請案號：98103690

※申請日：98 年 02 月 05 日　　※IPC 分類：C12N 15/31 (2006.01)
C12N 15/70 (2006.01)
A61K 39/07 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

一、發明名稱：（中文／英文）

具有大腸桿菌(E・coli)溶血素分泌系統及增強之溶血素 A(HlyA)表現及/或分泌之重組細菌、製造彼之方法及彼之用途

Recombinant bacteria with E. coli hemolysin secretion system and increased expression and/or secretion of HlyA, process of manufacturing and uses thereof

二、中文發明摘要：

本發明關於具有大腸桿菌(E. coli)溶血素分泌系統及全長或部分溶血素 A(HlyA)之增強表現及/或增強分泌之重組細菌。本發明亦揭示製造該重組細菌之方法及該重組細菌作爲藥物之用途。

三、英文發明摘要：

The invention relates to a recombinant bacterium with *E. coli* hemolysin secretion system and increased expression and/or increased secretion of full length or partial HlyA. Also disclosed are a process of manufacturing thereof and uses of such bacterium as a medicament.

七、申請專利範圍：

1.一種重組細菌，該重組細菌包含編碼大腸桿菌溶血素分泌系統之至少一種核苷酸序列，其中該至少一種核苷酸序列包含於 hly 特異性啓動子或非 hly 特異性之細菌啓動子的控制下之全長或部分 HlyA、HlyB 及 HlyD 基因序列，且該重組細菌進一步包含編碼蛋白質之至少一種核苷酸序列，該蛋白質能達成與正常/野生型 HlyA 之表現及/或分泌相比，全長或部分 HlyA 之增強表現及/或增強分泌。

2.如申請專利範圍第 1 項之重組細菌，其進一步含有經刪除或失活之 rpoS 基因。

3.如申請專利範圍第 1 項之重組細菌，其中該進一步所包含之至少一種核苷酸序列包含 rfaH 及/或 rpoN 基因且被整合至細菌染色體中或較佳地係位於質體上。

4.如申請專利範圍第 1 至 3 項中任一項之重組細菌，其中該細菌係經減毒。

5.如申請專利範圍第 4 項之重組細菌，其中該減毒係由刪除至少一種選自下述之基因或使之失活所引起：aroA、aro、asd、gal、pur、cya、crp、phoP/Q 及 omp。

6.如申請專利範圍第 5 項之重組細菌，其中該減毒導致生成營養缺陷型細菌。

7.如申請專利範圍第 1 至 3 項中任一項之重組細菌，其中該細菌係選自革蘭氏陰性細菌或革蘭氏陽性細菌。

8.如申請專利範圍第 1 至 3 項中任一項之重組細菌，

其中該細菌係選自志賀氏菌屬菌種(Shigella spp.)、沙門氏菌屬菌種(Salmonella spp.)、利斯特氏菌屬菌種(Listeria spp.)、埃希氏菌屬菌種(Escherichia spp.)、分枝桿菌屬菌種(Mycobacterium spp.)、耶爾森氏菌屬菌種(Yersinia spp.)、弧菌屬菌種(Vibrio spp.)或假單胞菌屬菌種(Pseudomonas spp.)。

9.如申請專利範圍第 8 項之重組細菌，其中該細菌係選自弗氏志賀氏菌(Shigella flexneri)、鼠傷寒沙門氏菌(Salmonella typhimurium)、牛分枝桿菌(Mycobacterium bovis)BCG、單核細胞增生利斯特氏菌(Listeria monocytogenes)、傷寒沙門氏菌(Salmonella typhi)、小腸結腸炎耶爾森氏菌(Yersinia enterocolitica)、霍亂弧菌(Vibrio cholerae)或大腸桿菌(Escherichia coli)且較佳地係選自傷寒沙門氏菌 Ty2 或傷寒沙門氏菌 Ty21a。

10.如申請專利範圍第 1 至 3 項中任一項之重組細菌，其中該重組細菌進一步包含編碼至少一種野生型或突變蛋白質的至少一種完整或部分抗原之至少一種核苷酸序列及編碼至少一種蛋白質毒素及/或至少一種蛋白質毒素次單位之至少一種核苷酸序列。

11.如申請專利範圍第 10 項之重組細菌，其中依據成分(I)之該至少一種野生型或突變蛋白質的至少一種完整或部分抗原係選自下述野生型蛋白質及彼等之習知突變體：受體；受體之細胞外、跨膜或細胞內部分；黏附分子；黏附分子之細胞外、跨膜或細胞內部分；訊號轉導蛋白質；

細胞循環蛋白質；轉錄因子；分化蛋白質；胚蛋白質；病毒蛋白質；過敏原；微生物病原體之蛋白質；真核細胞病原體之蛋白質；睪丸癌抗原蛋白質；腫瘤抗原蛋白質；及/或組織細胞特異性蛋白質，其中該組織細胞係選自副甲狀腺、乳腺、涎腺、淋巴結、乳腺、胃黏膜、腎、卵巢、前列腺、頸、膀胱漿膜或斑痣。

12.如申請專利範圍第 11 項之重組細菌，其中依據成分(I)之該至少一種野生型或突變蛋白質的至少一種完整或部分抗原係選自下述野生型蛋白質及彼等之習知突變體：Her-2/neu、雄激素受體、雌激素受體、軸突生長促進因子(midkine)受體、EGF 受體、ERBB2、ERBB4、TRAIL 受體、FAS、TNFα受體、TGFβ受體、乳鐵傳遞蛋白受體、鹼性髓磷脂、α-乳清蛋白、GFAP、纖維酸蛋白、酪胺酸酶、EGR-1、MUC1、c-Raf(Raf-1)、A-Raf、B-Raf、B-Raf V599E、B-Raf V600E、B-Raf KD、B-Raf V600E 激酶結構區、B-Raf V600E KD、B-Raf V600E 激酶結構區 KD、B-Raf 激酶結構區、B-Raf 激酶結構區 KD、N-Ras、K-Ras、H-Ras、Bcl-2、Bcl-X、Bcl-W、Bfl-1、Brag-1、Mcl-1、A1、Bax、BAD、Bak、Bcl-Xs、Bid、Bik、Hrk、Bcr/abl、Myb、C-Met、IAP1、IAO2、XIAP、ML-IAP LIVIN、生存素(survivin)、APAF-1、細胞週期蛋白 D(1-3)、細胞週期蛋白 E、細胞週期蛋白 A、細胞週期蛋白 B、細胞週期蛋白 H、Cdk-1、Cdk-2、Cdk-4、Cdk-6、Cdk-7、Cdc25C、p16、p15、p21、p27、p18、pRb[r1]、p107、p130、

E2F(1-5)、GAAD45、MDM2、PCNA、ARF、PTEN、APC、BRCA、Akt、PI3K、mTOR、p53及同系物、C-Myc、NFkB、c-Jun、ATF-2、Sp1、前列腺特異性抗原(PSA)、癌胚抗原、α-胎兒蛋白、PAP、PSMA、STEAP、MAGE、MAGE-1、MAGE-3、NY-ESO-1、PSCA、MART、Gp100、酪胺酸酶、GRP、TCF-4；病毒 HIV、HPV、HCV、HPV、EBV、CMV、HSV、流感病毒、A型流感病毒、A型流感病毒(H5N1)和(H3N2)、B型流感病毒、C型流感病毒之病毒抗原；血細胞凝集素、血細胞凝集素 H1、血細胞凝集素 H5、血細胞凝集素 H7、血細胞凝集素 HA1(較佳地源自 A 型流感病毒(A/泰國/1(KAN-1)2004(H5N1)))、血細胞凝集素 HA12(較佳地源自 A 型流感病毒(A/泰國/1(KAN-1)2004(H5N1)))、血細胞凝集素 HA12C(較佳地源自 A 型流感病毒(A/泰國/1(KAN-1)2004(H5N1)))、神經胺酸酶、[r2]p60、LLO、脲酶、CSP、鞭毛鈣結合蛋白(calflagin)及/或 CPB，或依據成分(I)之該至少一種野生型或突變蛋白質的至少一種完整或部分抗原係選自下述野生型蛋白質及彼等之習知突變體(括弧內表示取得編號)的激酶：AAK1(NM 014911)、AATK(NM 004920)、ABL1(NM 005157)、ABL2(NM 005158)、ACK1(NM 005781)、ACVR1(NM 001105)、ACVR1B(NM 020328)、ACVR2(NM 001616)、ACVR2B(NM 001106)、ACVRL1(NM 000020)、ADCK1(NM 020421)、ADCK2(NM 052853)、ADCK4(NM 024876)、ADCK5(NM 174922)、ADRBK1(NM 001619)、ADRBK2(NM 005160)、AKT1(NM 005163)、AKT2(NM 001626)、AKT3(NM 005465)

、ALK(NM 004304)、ALK7(NM 145259)、ALS2CR2(NM 018571)、ALS2CR7(NM 139158)、AMHR2(NM 020547)、ANKK1(NM 178510)、ANKRD3(NM 020639)、APEG1(NM 005876)、ARAF(NM 001654)、ARK5(NM 014840)、ATM(NM 000051)、ATR(NM 001184)、AURKA(NM 003600)、AURKB(NM 004217)、AURKC(NM 003160)、AXL(NM 001699)、BCKDK(NM 005881)、BCR(NM 004327)、BIKE(NM 017593)、BLK(NM 001715)、BMPR1A(NM 004329)、BMPR1B(NM 001203)、BMPR2(NM 001204)、BMX(NM 001721)、BRAF(NM 004333)、BRD2(NM 005104)、BRD3(NM 007371)、BRD4(NM 014299)、BRDT(NM 001726)、BRSK1(NM 032430)、BRSK2(NM 003957)、BTK(NM 000061)、BUB1(NM 004336)、BUB1B(NM 001211)、CABC1(NM 020247)、CAMK1(NM 003656)、CaMK1b(NM 198452)、CAMK1D(NM 020397)、CAMK1G(NM 020439)、CAMK2A(NM 015981)、CAMK2B(NM 001220)、CAMK2D(NM 001221)、CAMK2G(NM 001222)、CAMK4(NM 001744)、CAMKK1(NM 032294)、CAMKK2(NM 006549)、CASK(NM 003688)、CCRK(NM 012119)、CDC2(NM 001786)、CDC2L1(NM 001787)、CDC2L5(NM 003718)、CDC42BPA(NM 014826)、CDC42BPB(NM 006035)、CDC7L1(NM 003503)、CDK10(NM 003674)、CDK11(NM 015076)、CDK2(NM 001798)、CDK3(NM 001258)、CDK4(NM 000075)、CDK5(NM 004935)、CDK6(NM 001259)、CDK7(NM 001799)、CDK8(NM 001260)、CDK9(NM 001261)、CDKL1(NM 004196)、CDKL2(NM 003948)、CDKL3(NM 016508)、CDKL4(NM 001009565)、CDKL5(NM 003159)、CHEK1(NM 001274)

、CHUK(NM 001278)、CIT(NM 007174)、CLK1(NM 004071)、CLK2(NM 003993)、CLK3(NM 003992)、CLK4(NM 020666)、CRK7(NM 016507)、CSF1R(NM 005211)、CSK(NM 004383)、CSNK1A1(NM 001892)、CSNK1D(NM 001893)、CSNK1E(NM 001894)、CSNK1G1(NM 022048)、CSNK1G2(NM 001319)、CSNK1G3(NM 004384)、CSNK2A1(NM 001895)、CSNK2A2(NM 001896)、DAPK1(NM 004938)、DAPK2(NM 014326)、DAPK3(NM 001348)、DCAMKL1(NM 004734)、DCAMKL2(NM 152619)、DCAMKL3(XM 047355)、DDR1(NM 013993)、DDR2(NM 006182)、DMPK(NM 004409)、DMPK2(NM 017525.1)、DYRK1A(NM 001396)、DYRK1B(NM 006484)、DYRK2(NM 006482)、DYRK3(NM 003582)、DYRK4(NM 003845)、EEF2K(NM 013302)、EGFR(NM 005228)、EIF2AK3(NM 004836)、EIF2AK4(NM_001013703)、EPHA1(NM 005232)、EPHA10(NM 001004338)、EPHA2(NM 004431)、EPHA3(NM 005233)、EPHA4(NM 004438)、EPHA5(NM 004439)、EPHA6(XM 114973)、EPHA7(NM 004440)、EPHA8(NM 020526)、EPHB1(NM 004441)、EPHB2(NM 017449)、EPHB3(NM 004443)、EPHB4(NM 004444)、EPHB6(NM 004445)、ERBB2(NM 004448)、ERBB3(NM 001982)、ERBB4(NM 005235)、ERK8(NM 139021)、ERN1(NM 001433)、ERN2(NM 033266)、FASTK(NM 025096)、FER(NM 005246)、FES(NM 002005)、FGFR1(NM 000604)、FGFR2(NM 022970)、FGFR3(NM 000142)、FGFR4(NM 022963)、FGR(NM 005248)、FLJ23074(NM 025052)、

FLJ23119(NM 024652)、FLJ23356(NM 032237)、FLT1(NM 002019)、FLT3(NM 004119)、FLT4(NM 002020)、FRAP1(NM 004958)、FRK(NM 002031)、FYN(NM 002037)、GAK(NM 005255)、GPRK5(NM 005308)、GPRK6(NM 002082)、GPRK7(NM 139209)、GRK4(NM 005307)、GSG2(NM 031965)、GSK3A(NM 019884)、GSK3B(NM 002093)、GUCY2C(NM 004963)、GUCY2D(NM 000180)、GUCY2F(NM 001522)、H11(NM 014365)、HAK(NM 052947)、HCK(NM 002110)、HIPK1(NM 152696)、HIPK2(NM 022740)、HIPK3(NM 005734)、HIPK4(NM 144685)、HRI(NM 014413)、HUNK(NM 014586)、ICK(NM 016513)、IGF1R(NM 000875)、IKBKB(NM 001556)、IKBKE(NM 014002)、ILK(NM 004517)、INSR(NM 000208)、INSRR(NM 014215)、IRAK1(NM 001569)、IRAK2(NM 001570)、IRAK3(NM 007199)、IRAK4(NM 016123)、ITK(NM 005546)、JAK1(NM 002227)、JAK2(NM 004972)、JAK3(NM 000215)、KDR(NM 002253)、KIS(NM 144624)、KIT(NM 000222)、KSR(XM 290793)、KSR2(NM 173598)、LAK(NM 025144)、LATS1(NM 004690)、LATS2(NM 014572)、LCK(NM 005356)、LIMK1(NM 016735)、LIMK2(NM 005569)、LMR3(XM 055866)、LMTK2(NM 014916)、LOC149420(NM 152835)、LOC51086(NM 015978)、LRRK2(XM 058513)、LTK(NM 002344)、LYN(NM 002350)、MAK(NM 005906)、MAP2K1(NM 002755)、MAP2K2(NM 030662)、MAP2K3(NM 002756)、MAP2K4(NM 003010)、MAP2K5(NM 002757)、MAP2K6(NM 002758)、MAP2K7(NM 005043)、MAP3K1(XM 042066)、MAP3K10(NM 002446)、

MAP3K11(NM 002419)、MAP3K12(NM 006301)、MAP3K13(NM 004721)、MAP3K14(NM 003954)、MAP3K2(NM 006609)、MAP3K3(NM 002401)、MAP3K4(NM 005922)、MAP3K5(NM 005923)、MAP3K6(NM 004672)、MAP3K7(NM 003188)、MAP3K8(NM 005204)、MAP3K9(NM 033141)、MAP4K1(NM 007181)、MAP4K2(NM 004579)、MAP4K3(NM 003618)、MAP4K4(NM 145686)、MAP4K5(NM 006575)、MAPK1(NM 002745)、MAPK10(NM 002753)、MAPK11(NM 002751)、MAPK12(NM 002969)、MAPK13(NM 002754)、MAPK14(NM 001315)、MAPK3(NM 002746)、MAPK4(NM 002747)、MAPK6(NM 002748)、MAPK7(NM 002749)、MAPK8(NM 002750)、MAPK9(NM 002752)、MAPKAPK2(NM 032960)、MAPKAPK3(NM 004635)、MAPKAPK5(NM 003668)、MARK(NM 018650)、MARK2(NM 017490)、MARK3(NM 002376)、MARK4(NM 031417)、MAST1(NM 014975)、MAST205(NM 015112)、MAST3(XM 038150)、MAST4(XM 291141)、MASTL(NM 032844)、MATK(NM 139355)、MELK(NM 014791)、MERTK(NM 006343)、MET(NM 000245)、MGC33182(NM 145203)、MGC42105(NM 153361)、MGC43306(C9orf96)、MGC8407(NM 024046)、MIDORI(NM 020778)、MINK(NM 015716)、MKNK1(NM 003684)、MKNK2(NM 017572)、MLCK(NM 182493)、MLK4(NM 032435)、MLKL(NM 152649)、MOS(NM 005372)、MST1R(NM 002447)、MST4(NM 016542)、MUSK(NM 005592)、MYLK(NM 053025)、MYLK2(NM 033118)、MYO3A(NM 017433)、MYO3B(NM 138995)、NEK1(NM 012224)、NEK10(NM 152534)、NEK11(NM 024800)、NEK2(NM 002497)

、NEK3(NM 002498)、NEK4(NM 003157)、NEK5(MGC75495)、NEK6(NM 014397)、NEK7(NM 133494)、NEK8(NM 178170)、NEK9(NM 033116)、NLK(NM 016231)、NPR1(NM 000906)、NPR2(NM 003995)、NRBP(NM 013392)、NRBP2(NM 178564)、NRK(NM 198465)、NTRK1(NM 002529)、NTRK2(NM 006180)、NTRK3(NM 002530)、OBSCN(NM 052843)、OSR1(NM 005109)、PACE-1(NM 020423)、PAK1(NM 002576)、PAK2(NM 002577)、PAK3(NM 002578)、PAK4(NM 005884)、PAK6(NM 020168)、PAK7(NM 020341)、PASK(NM 015148)、PCTK1(NM 006201)、PCTK2(NM 002595)、PCTK3(NM 212503)、PDGFRA(NM 006206)、PDGFRB(NM 002609)、PDK1(NM 002610)、PDK2(NM 002611)、PDK3(NM 005391)、PDK4(NM 002612)、PDPK1(NM 002613)、PFTK1(NM 012395)、PHKG1(NM 006213)、PHKG2(NM 000294)、PIK3R4(NM 014602)、PIM1(NM 002648)、PIM2(NM 006875)、PIM3(NM 001001852)、PINK1(NM 032409)、PKE(NM 173575)、PKMYT1(NM 004203)、pknbeta(NM 013355)、PLK(NM 005030)、PLK3(NM 004073)、PRKAA1(NM 006251)、PRKAA2(NM 006252)、PRKACA(NM 002730)、PRKACB(NM 002731)、PRKACG(NM 002732)、PRKCA(NM 002737)、PRKCB1(NM 002738)、PRKCD(NM 006254)、PRKCE(NM 005400)、PRKCG(NM 002739)、PRKCH(NM 006255)、PRKCI(NM 002740)、PRKCL1(NM 002741)、PRKCL2(NM 006256)、PRKCM(NM 002742)、PRKCN(NM 005813)、PRKCQ(NM 006257)、PRKCZ(NM 002744)、PRKD2(NM 016457)、PRKDC(NM 006904)、PRKG1(NM 006258)、PRKG2(NM 006259)

、PRKR(NM 002759)、PRKWNK1(NM 018979)、PRKWNK2(NM 006648)、PRKWNK3(NM 020922)、PRKWNK4(NM 032387)、PRKX(NM 005044)、PRKY(NM 002760)、PRPF4B(NM 003913)、PSKH1(NM 006742)、PSKH2(NM 033126)、PTK2(NM 005607)、PTK2B(NM 004103)、PTK6(NM 005975)、PTK7(NM 002821)、PTK9(NM 002822)、PTK9L(NM 007284)、PXK(NM 017771)、QSK(NM 025164)、RAD53(NM 007194)、RAF1(NM 002880)、RAGE(NM 014226)、RET(NM 020975)、RHOK(NM 002929)、RIOK1(NM 031480)、RIOK2(NM 018343)、RIPK1(NM 003804)、RIPK2(NM 003821)、RIPK3(NM 006871)、RIPK5(NM 015375)、RNASEL(NM 021133)、ROCK1(NM 005406)、ROCK2(NM 004850)、ROR1(NM 005012)、ROR2(NM 004560)、ROS1(NM 002944)、RPS6KA1(NM 002953)、RPS6KA2(NM 021135)、RPS6KA3(NM 004586)、RPS6KA4(NM 003942)、RPS6KA5(NM 004755)、RPS6KA6(NM 014496)、RPS6KB1(NM 003161)、RPS6KB2(NM 003952)、RPS6KC1(NM 012424)、RPS6KL1(NM 031464)、RYK(NM 002958)、SBK(XM 370948)、SCYL1(NM 020680)、SCYL2(NM 017988)、SGK(NM 005627)、SgK069(SU SgK069)、SgK085(XM 373109)、SgK110(SU SgK110)、SGK2(NM 016276)、SgK223(XM 291277)、SgK269(XM 370878)、SgK424(CGP SgK424)、SgK493(SU_SgK493)、SgK494(NM 144610)、SgK495(NM 032017)、SGKL(NM 013257)、SK681(NM 001001671)、SLK(NM 014720)、SMG1(NM 015092)、SNARK(NM 030952)、SNF1LK(NM 173354)、SNF1LK2(NM 015191)、SNK(NM 006622)、SNRK(NM 017719)、

SRC(NM 005417)、SRMS(NM 080823)、SRPK1(NM 003137)、SRPK2(NM 003138)、SSTK(NM 032037)、STK10(NM 005990)、STK11(NM 000455)、STK16(NM 003691)、STK17A(NM 004760)、STK17B(NM 004226)、STK18(NM 014264)、STK19(NM 032454)、STK22B(NM 053006)、STK22C(NM 052841)、STK22D(NM 032028)、STK23(NM 014370)、STK24(NM 003576)、STK25(NM 006374)、STK3(NM 006281)、STK31(NM 031414)、STK32B(NM 018401)、STK33(NM 030906)、STK35(NM 080836)、STK36(NM 015690)、STK38(NM 007271)、STK38L(NM 015000)、STK39(NM 013233)、STK4(NM 006282)、STLK5(NM 001003787)、STYK1(NM 018423)、SUDD(NM 003831)、SYK(NM 003177)、TAF1(NM 138923)、TAF1L(NM 153809)、TAO1(NM 004783)、TAOK1(NM 020791)、TAOK3(NM 016281)、TBCK(NM 033115)、TBK1(NM 013254)、TEC(NM 003215)、TEK(NM 000459)、TESK1(NM 006285)、TESK2(NM 007170)、TEX14(NM 031272)、TGFBR1(NM 004612)、TGFBR2(NM 003242)、TIE(NM 005424)、TIF1(NM 003852)、TLK1(NM 012290)、TLK2(NM 006852)、TNIK(NM 015028)、TNK1(NM 003985)、TOPK(NM 018492)、TP53RK(NM 033550)、TRAD(NM 007064)、TRIB1(NM 025195)、TRIB2(NM 021643)、TRIB3(NM 021158)、TRIM28(NM 005762)、TRIM33(NM 015906)、TRIO(NM 007118)、TRPM6(NM 017662)、TRPM7(NM 017672)、TRRAP(NM 003496)、TSSK4(NM 174944)、TTBK1(NM 032538)、TTBK2(NM 173500)、TTK(NM 003318)、TTN(NM 003319)、TXK(NM 003328)、TYK2(NM 003331)、TYRO3(NM 006293)

、ULK1(NM 003565)、ULK2(NM 014683)、ULK3(NM 015518)、ULK4(NM 017886)、VRK1(NM 003384)、VRK2(NM 006296)、VRK3(NM 016440)、WEE1(NM 003390)、Wee1B(NM 173677)、YANK1(NM 145001)、YES1(NM 005433)、ZAK(NM 016653)及/或 ZAP70(NM 001079)。

13.如申請專利範圍第 10 項之重組細菌，其中該至少一種蛋白質毒素及/或至少一種蛋白質毒素次單位係選自：細菌毒素、腸毒素、外毒素、第 I 型毒素、第 II 型毒素、第 III 型毒素、第 IV 型毒素、第 V 型毒素、RTX 毒素、AB 毒素、A-B 毒素、A/B 毒素、A+B 毒素、A-5B 毒素及/或 AB5 毒素。

14.如申請專利範圍第 13 項之重組細菌，其中該至少一種蛋白質毒素及/或至少一種蛋白質毒素次單位係選自：腺苷酸環化酶毒素、炭疽毒素、炭疽毒素(EF)、炭疽毒素(LF)、肉毒毒素、霍亂毒素(CT, Ctx)、霍亂毒素次單位 B(CTB, CtxB)、白喉毒素(DT, Dtx)、大腸桿菌 LT 毒素、大腸桿菌熱不穩定性腸毒素(LT)、大腸桿菌熱不穩定性腸毒素次單位 B(LTB)、大腸桿菌 ST 毒素、大腸桿菌熱穩定性腸毒素(ST)、紅斑毒素、脫葉菌素、外毒素 A、產氣腸毒素、百日咳毒素(PT, Ptx)、志賀菌毒素(ST, Stx)、志賀菌毒素次單位 B(STB, StxB)、似志賀菌毒素、葡萄球菌腸毒素、破傷風毒素(TT)、中毒性休克徵候群毒素(TSST-1)、綠猴腎細胞毒素(VT)、艱難梭菌(Clostridium difficile)之毒素 A(TA)和毒素 B(TB)、強毒雙酵素梭菌(Clostridium

sordellii)之致命性毒素(LT)和出血性毒素(HT)及諾維氏梭菌(Clostridium novyi)之α毒素(AT)。

15.如申請專利範圍第 10 項之重組細菌，其中該至少一種野生型或突變型蛋白質之至少一種完整或部分抗原與該至少一種蛋白質毒素及/或至少一種蛋白質毒素次單位係彼此連接以使由該兩種成分編碼之融合蛋白表現及/或分泌。

16.如申請專利範圍第 15 項之重組細菌，其中該融合蛋白係選自：CtxB-PSA、CtxB-B-Raf V600E KD、CtxB-B-Raf V600E 激酶結構區、CtxB-B-Raf V600E 激酶結構區 KD、CtxB-B-Raf、CtxB-B-Raf KD、CtxB B-Raf 激酶結構區 KD、CtxB-HA1 及 CtxB-HA12C。

17.一種製造如申請專利範圍第 1 至 16 項中任一項之重組細菌之方法，其包含下述之步驟：

(a)利用編碼大腸桿菌溶血素分泌系統之至少一種核苷酸序列轉形細菌，其中該至少一種核苷酸序列包含於 hly 特異性啓動子或非 hly 特異性細菌啓動子之控制下的全長或部分 HlyA、HlyB 及 HlyD 基因序列，其中該至少一種核苷酸序列係經整合至細菌染色體中或較佳地係位於質體上；

(b)利用編碼蛋白質之至少一種核苷酸序列補充步驟(a)之細菌，該蛋白質能達成與正常/野生型 HlyA 之表現及/或分泌相比，全長或部分 HlyA 之增強表現及/或增強分泌，其中該至少一種核苷酸序列較佳地包含 rfaH 及/或

rpoN 基因且係經整合至細菌染色體中或較佳地係位於質體上；

(c)可選擇地，刪除步驟(b)之細菌中的 rpoS 基因或使其失活；

(d)可選擇地，較佳地藉由刪除至少一種選自 aroA、aro、asd、gal、pur、cya、crp、phoP/Q 或 omp 之基因或使之失活使步驟(b)或(c)之細菌減毒；

(e)可選擇地，利用編碼至少一種野生型或突變蛋白質之至少一種完整或部分抗原的至少一種核苷酸序列和編碼至少一種蛋白質毒素及/或至少一種蛋白質毒素次單位之至少一種核苷酸序列轉形步驟(b)、(c)或(d)之細菌，其中該至少一種核苷酸序列係經整合至細菌染色體中或較佳地係位於質體上。

18.一種醫藥組成物，其包含至少一種如申請專利範圍第 1 至 16 項中任一項之重組細菌(較佳地至少一種經冷凍乾燥之重組細菌)及藥學上可接受之載體(較佳地膠囊)。

19.一種藥物，其包含至少一種如申請專利範圍第 1 至 16 項中任一項之重組細菌或如申請專利範圍第 18 項之醫藥組成物。

20.一種治療及/或治療性預防生理及/或病理生理病症之藥物，該藥物包含至少一種如申請專利範圍第 1 至 16 項中任一項之重組細菌或如申請專利範圍第 18 項之醫藥組成物，該生理及/或病理生理病症係選自：涉及巨噬細胞發炎之疾病(其中巨噬細胞係與疾病之開始或疾病之進

展有關)、腫瘤疾病、未受控制之細胞分裂、惡性腫瘤、良性腫瘤、固體腫瘤、肉瘤、癌瘤、過度增生疾病、類癌、Ewing 氏肉瘤、Kaposi 氏肉瘤、腦腫瘤、源自腦及/或神經系統及/或腦脊髓膜之腫瘤、神經膠瘤、神經母細胞瘤、胃癌、腎臟癌、腎細胞癌瘤、前列腺癌、前列腺癌瘤、結締組織腫瘤、軟組織肉瘤、胰臟腫瘤、肝腫瘤、頭部腫瘤、頸部腫瘤、食道癌、甲狀腺癌、骨肉瘤、視網膜母細胞瘤、胸腺瘤、睪丸癌、肺癌、枝氣管癌瘤、乳癌、乳房癌瘤、腸癌、結腸直腸腫瘤、結腸癌瘤、直腸癌瘤、婦科腫瘤、卵巢腫瘤、子宮癌、頸癌、頸癌瘤、子宮體癌、小體癌瘤、子宮內膜癌瘤、膀胱癌、膜性囊癌、皮膚癌、基底細胞癌、脊髓瘤、黑色素瘤、眼內黑色素瘤、白血病、慢性白血病、急性白血病、淋巴瘤、感染、病毒或細菌感染、流行性感冒、慢性發炎、器官排斥、自體免疫疾病、糖尿病及/或第 II 型糖尿病。

21.一種醫藥套組，其包含至少一種如申請專利範圍第 1 至 16 項中任一項之重組細菌或如申請專利範圍第 18 項之醫藥組成物或如申請專利範圍第 19 至 20 項中任一項之藥物及藥學上可接受之緩衝液(較佳地碳酸鹽緩衝液)。

200946677

圖 4

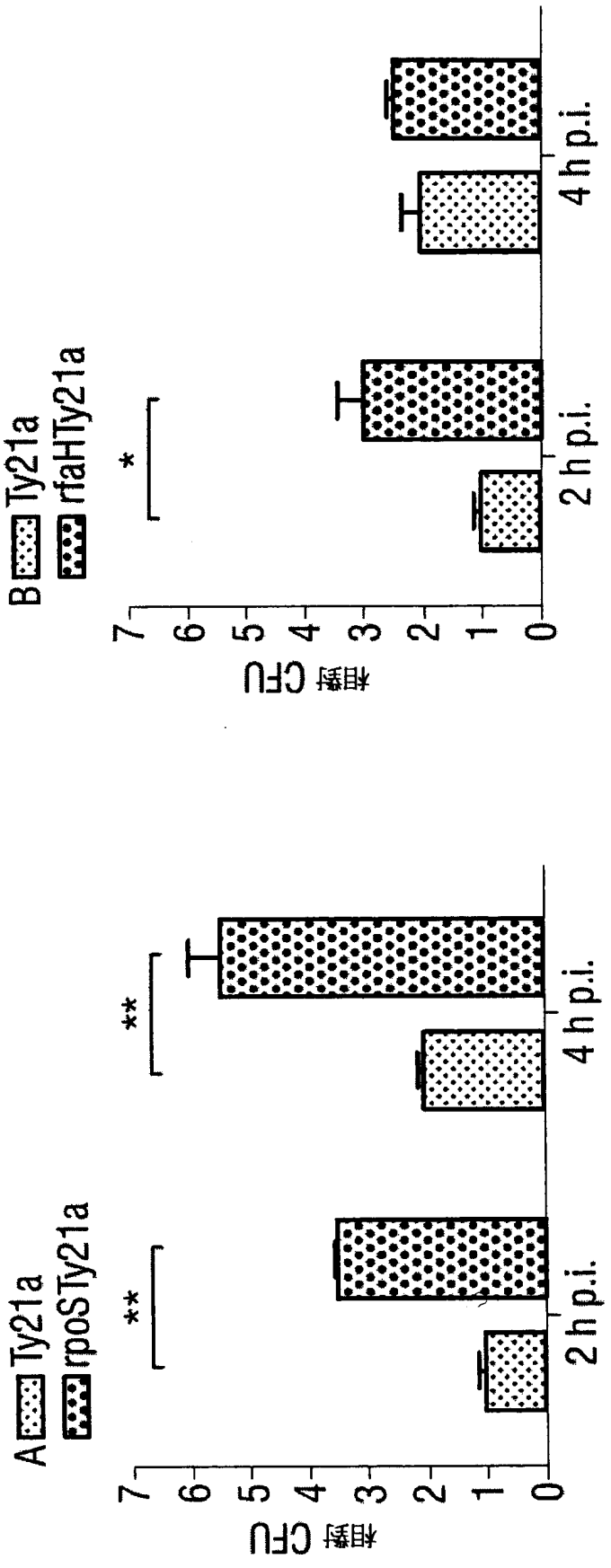
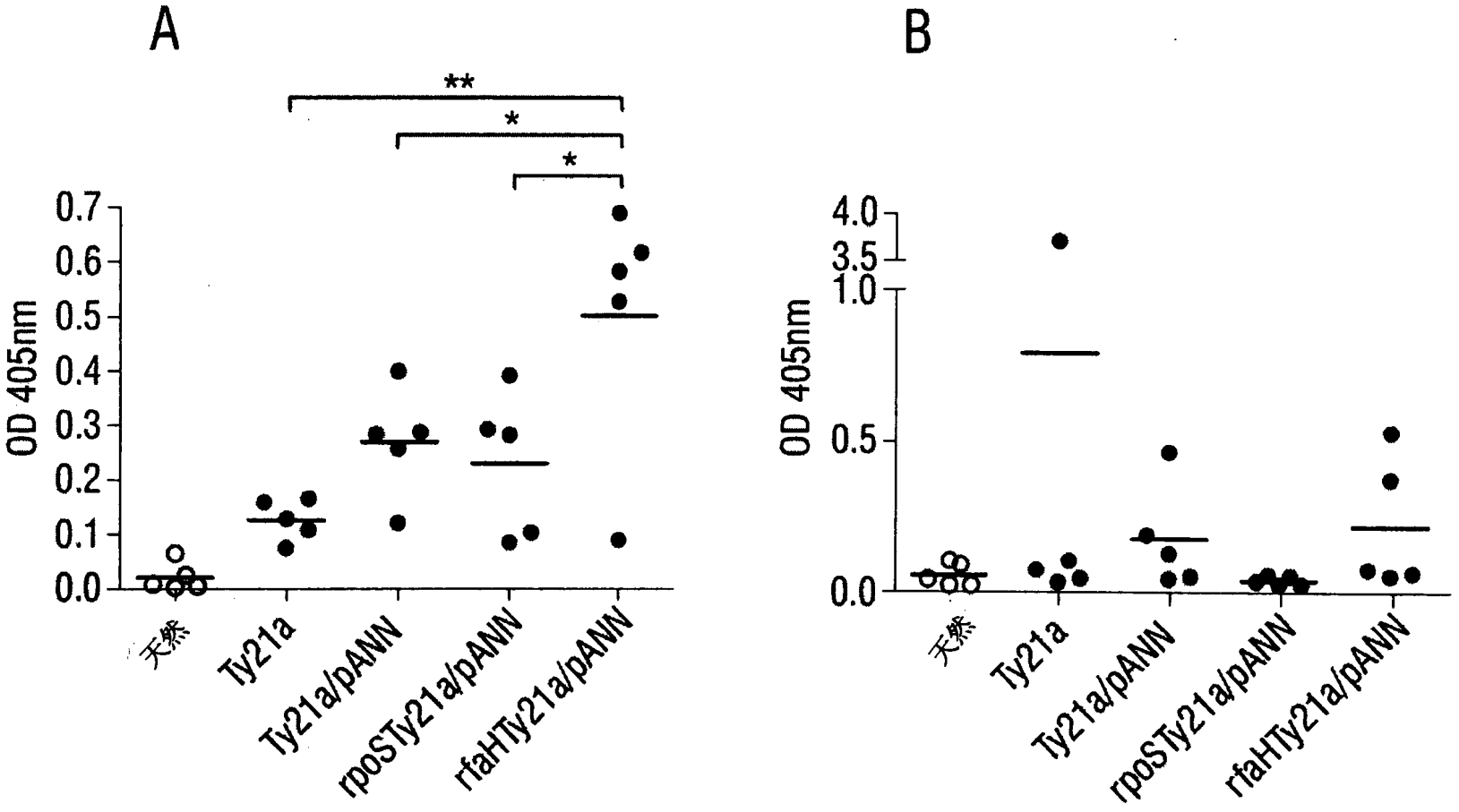


圖5


A
B
OD 405nm
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
4.0
3.5
1.0
0.5
0.0
**
*
*
天然
Ty21a
Ty21a/pANN
rposTy21a/pANN
rfaHTy21a/pANN

四、指定代表圖：

（一）本案指定代表圖為：第（4）圖。

（二）本代表圖之元件符號簡單說明：無

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：無