

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6873151号
(P6873151)

(45) 発行日 令和3年5月19日(2021.5.19)

(24) 登録日 令和3年4月22日(2021.4.22)

(51) Int. Cl.	F I
A 6 1 K 39/39 (2006.01)	A 6 1 K 39/39 Z N A
A 6 1 K 38/46 (2006.01)	A 6 1 K 38/46
A 6 1 K 35/74 (2015.01)	A 6 1 K 35/74 A
A 6 1 K 35/76 (2015.01)	A 6 1 K 35/76
A 6 1 P 31/00 (2006.01)	A 6 1 P 31/00

請求項の数 19 (全 30 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2018-551519 (P2018-551519)	(73) 特許権者	511017287
(86) (22) 出願日	平成28年12月21日 (2016.12.21)		インスティテュート・フォー・リサーチ・
(65) 公表番号	特表2019-505574 (P2019-505574A)		イン・バイオメディシン
(43) 公表日	平成31年2月28日 (2019.2.28)		INSTITUTE FOR RESEA
(86) 国際出願番号	PCT/EP2016/082155		RCH IN BIOMEDICINE
(87) 国際公開番号	W02017/108935		スイス国 6500 ベルリンツォーナ
(87) 国際公開日	平成29年6月29日 (2017.6.29)		ヴィア ヴィンチェンツォ ヴェラ 6
審査請求日	令和1年11月21日 (2019.11.21)	(74) 代理人	100107515
(31) 優先権主張番号	1522541.0		弁理士 廣田 浩一
(32) 優先日	平成27年12月21日 (2015.12.21)	(74) 代理人	100107733
(33) 優先権主張国・地域又は機関	英国 (GB)		弁理士 流 良広
		(74) 代理人	100115347
			弁理士 松田 奈緒子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 組成物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

被験体における免疫応答の増強及び/又は惹起において使用するための、A T P の P 2 X 7 受容体への結合レベルを低減することができる剤を含む、I g A 免疫応答及び/又は I g G 免疫応答を増強することができる組成物であって、前記組成物は経口投与用であり、前記剤が A T P 加水分解酵素を含み、前記組成物が免疫原を更に含むことを特徴とする組成物。

【請求項 2】

前記 A T P 加水分解酵素が、アピラーゼである請求項 1 に記載の通り使用するための組成物。

【請求項 3】

前記アピラーゼが、フレキシネル菌 (Sh i g e l l a f l e x n e r i) アピラーゼである請求項 2 に記載の通り使用するための組成物。

【請求項 4】

前記免疫原が、消化器病原体又は全身病原体に対する免疫応答を惹起することができる請求項 1 から 3 のいずれかに記載の通り使用するための組成物。

【請求項 5】

前記免疫原が、細菌抗原、寄生虫抗原、又はウイルス抗原である請求項 1 から 4 のいずれかに記載の通り使用するための組成物。

【請求項 6】

前記免疫原が、コレラ菌 (Vibrio cholerae)、ディフィシル菌 (Clostridium difficile)、ボツリヌス菌 (Clostridium botulinum)、大腸菌 (Escherichia coli)、ボイド菌 (Shigella boydii)、赤痢菌 (Shigella dysenteriae)、フレキシネル菌 (Shigella flexneri)、ソンネ菌 (Shigella sonnei)、サルモネラ・エンテリカ (Salmonella enterica)、サルモネラ・ボグノリ (Salmonella bongori)、回虫等の蠕虫類、ランブル鞭毛虫又は赤痢アメーバ等の原生動物、ポリオウイルス、ロタウイルス、アデノウイルス、A型肝炎及びヒト免疫不全ウイルスからなる群から選択される病原体に対する免疫応答を惹起することができる請求項5に記載の通り使用するための組成物。

10

【請求項7】

前記組成物が、前記ATPのP2X7受容体への結合を低減することができる剤をコードしている核酸を含む組み換え細菌を含む請求項1から6のいずれかに記載の通り使用するための組成物。

【請求項8】

前記組み換え細菌が、免疫原をコードしている核酸を更に含む請求項7に記載の通り使用するための組成物。

【請求項9】

前記細菌が、大腸菌又は弱毒化サルモネラ・エンテリカである請求項7から8のいずれかに記載の通り使用するための組成物。

20

【請求項10】

前記組成物が、前記ATPのP2X7受容体への結合を低減することができる剤をコードしている核酸を含むバクテリオファージを含む請求項1から6のいずれかに記載の通り使用するための組成物。

【請求項11】

前記バクテリオファージが、免疫原をコードしている核酸を更に含む請求項10に記載の通り使用するための組成物。

【請求項12】

前記組成物が、前記ATPのP2X7受容体への結合を低減することができる剤をコードしている核酸を含むウイルスベクターを含む請求項1から6のいずれかに記載の通り使用するための組成物。

30

【請求項13】

前記ウイルスベクターが、免疫原をコードしている核酸を更に含む請求項12に記載の通り使用するための組成物。

【請求項14】

前記IgA免疫応答及び/又は前記IgG免疫応答が、粘膜応答である請求項1から13のいずれかに記載の通り使用するための組成物。

【請求項15】

前記IgA免疫応答及び/又は前記IgG免疫応答が、胃腸で生じる請求項1から14のいずれかに記載の通り使用するための組成物。

40

【請求項16】

感染性疾患の予防又は治療において使用するための請求項1から15のいずれかに記載の組成物。

【請求項17】

前記感染性疾患が、消化器病原体によって引き起こされる請求項16に記載の通り使用するための組成物。

【請求項18】

前記組成物が、ナノカプセルで投与するために製剤化される請求項1から17のいずれかに記載の通り使用するための組成物。

【請求項19】

50

前記組成物が、ワクチンである請求項 1 から 18 のいずれかに記載の通り使用するための組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、組成物の分野である。具体的には、本発明は、ワクチンとして使用することができる免疫学的組成物に関する。

【背景技術】

【0002】

胃腸は、食品の形態の多数の外来抗原の侵入口として作用する。粘膜免疫系は、食品抗原に対する不要な免疫応答を確実に回避すると同時に、任意の病原菌に対する免疫応答を確実に惹起しなければならない。更に、胃腸は、宿主と共生して生存している約 10^{14} の共生微生物を含む。粘膜免疫系は、共生が可能になるように制御された様式でこれら生物に対する免疫応答を確実に生じさせなければならない。したがって、粘膜免疫応答は、病原体に対して応答することができると同時に、多数の非自己抗原に対しては寛容でなければならない。

10

【0003】

粘膜系にみられる抗体の主なクラスは、免疫グロブリン A (IgA) である。胃腸管腔で分泌される IgA 抗体は、共生を可能にすると同時に、粘液に微生物を捕捉することによって粘膜を保護する。

20

【0004】

前記生物が定着した胃腸は、一般的に、ワクチンとして経口的に送達される免疫原に対して非感受性であるので、経口ワクチン接種を使用して種特異的高親和性 IgA 応答を誘導することは、粘膜免疫における大きな課題である。したがって、粘膜病原体に対して特異的な高力価 IgA (及び IgG 抗体) を提供するために、適応粘膜系の天然不応性を克服することができる特定の組成物及び免疫付与プロトコールが当技術分野において必要とされている。

【0005】

ヒトでの使用が認可されている経口細菌ワクチンは 2 種のみ、即ち、弱毒生チフス菌 (*Salmonella Typhi*) 及び死菌コレラ菌 (*Vibrio cholerae*) である。

30

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

本発明の目的は、粘膜免疫応答、具体的には IgA 及び IgG 免疫応答を惹起及び / 又は増強することができ、且つ経口投与することができる組成物を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0007】

胃腸における IgA 応答は、抗原特異的 B 細胞の IgA 分泌形質細胞への成熟を促進する濾胞性ヘルパー T (Tfh) 細胞によって制御される。Tfh 細胞は、B 細胞の増殖を促進し、Ig クラススイッチ及び体細胞超変異を促進する活性化誘導シチジンデアミナーゼ (AID) の発現を促進する。本発明者らは、アデノシン三リン酸 (ATP) 開口イオンチャネル型 P2X7 受容体が、Tfh 細胞量の調節において役割を有していることを既に報告している¹。細胞外 ATP は、P2X7 受容体に結合して Tfh 細胞死を誘発することが示されている。マウスにおける P2X7 の欠失は、腸内 IgA レベルを増大させ、続いて、共生生物を枯渇させることが示されている。本発明者による新たなデータは、共生生物によって放出される ATP が、腸上皮を透過して Tfh 細胞活性を制限することを示す。

40

【0008】

本発明者らは、驚くべきことに、ATP の P2X7 受容体への結合レベルを低減するこ

50

とができる剤を含む組成物が、経口投与されたときに有効な免疫応答を惹起するのに有益であることを見出した。前記組成物は、前記組成物の送達後に I g A 及び / 又は I g G 免疫応答の増大が惹起され、それが免疫原に対して特異的であるような免疫原を更に含み得る。

【 0 0 0 9 】

したがって、本発明は、被験体における免疫応答を増強及び / 又は惹起する方法であって、A T P の P 2 X 7 受容体への結合レベルを低減することができる剤を含む、I g A 免疫応答及び / 又は I g G 免疫応答を増強することができる組成物を被験体に投与することを含み、前記組成物が、前記被験体に経口投与される方法を提供する。

【 0 0 1 0 】

また、本発明は、被験体における免疫応答の増強及び / 又は惹起において使用するための、A T P の P 2 X 7 受容体への結合レベルを低減することができる剤を含む、I g A 免疫応答及び / 又は I g G 免疫応答を増強することができる組成物であって、経口投与するための組成物を提供する。

【 0 0 1 1 】

また、本発明は、本発明の方法を含む、感染性疾患を予防又は治療する方法を提供する。

【 0 0 1 2 】

また、本発明は、感染性疾患の予防又は治療において使用するための、本発明に従って使用するための組成物を提供する。

【 0 0 1 3 】

本発明の組成物

本発明の組成物は、免疫応答を増強することができる。

【 0 0 1 4 】

前記組成物が増強することができる免疫応答は、前記組成物によって惹起することもできる。例えば、幾つかの実施形態では、前記組成物は、例えば、前記組成物が免疫原を含む場合、免疫応答を惹起することができる。一方、他の実施形態では、前記組成物は、それ自体特異的免疫応答を惹起することはできない。例えば、前記組成物は、任意で、免疫原を含んでいなくてもよい（したがって、免疫応答を惹起することはできない）が、本発明の組成物とは別々に投与された免疫原によって惹起された免疫応答を増強することはでき得る。この場合、前記組成物は、複合組成物が特異的免疫応答を惹起及び増強することができるように、使用前に免疫原を含む第 2 の組成物と合わせてよい。

【 0 0 1 5 】

代替案として、本発明の組成物は、免疫応答を惹起することができる第 2 の組成物と同時に又は近接する時点で被験体に投与してもよく、その結果、本発明の組成物は、第 2 の組成物によって惹起される免疫応答を増強することができる。

【 0 0 1 6 】

前記組成物が免疫原を含まない場合、単独で投与してもよく、そして、被験体内に既に存在する免疫原によって惹起される免疫応答を増強することができ得る。例えば、前記組成物は、前記組成物が投与される被験体内に既に存在する共生生物又は病原体に対する免疫応答を増強することができ得る。

【 0 0 1 7 】

前記組成物は、I g A 免疫応答及び / 又は I g G 免疫応答を増強、及び任意で惹起することができる。好ましくは、前記組成物は、I g A 免疫応答を増強、及び任意で惹起することができる。

【 0 0 1 8 】

前記組成物は、好ましくは、粘膜免疫応答の増強、及び任意で惹起において使用するもののである。消化器、生殖器、及び呼吸器の粘膜表面は、外部環境に曝露されるので、病原体による侵入を非常に受けやすい。これら粘膜表面は、粘膜免疫応答の惹起及び増強によって保護される。前記組成物は、消化器、生殖器、又は呼吸器の粘膜表面における

10

20

30

40

50

免疫応答の増強、及び任意で惹起において使用するためのものであり得る。好ましくは、前記組成物は、消化器の粘膜表面における免疫応答の増強、及び任意で惹起において使用するためのものである。かかる消化器の粘膜表面は、胃腸の粘膜表面を含む。胃腸は、胃、小腸、及び大腸を含む。

【0019】

A T PのP 2 X 7受容体への結合レベルを低減することができる剤

本発明の組成物は、A T PのP 2 X 7受容体への結合レベルを低減することができる少なくとも1つの剤を含む。前記組成物は、A T PのP 2 X 7受容体への結合レベルを低減することができる複数の剤を含んでいてもよい。例えば、前記組成物は、A T PのP 2 X 7受容体への結合レベルを低減することができる2、3、又は4以上の剤を含み得る。

10

【0020】

これら剤は、A T PのP 2 X 7受容体への結合レベルを低減することができる。T f h細胞死は、通常、A T PのP 2 X 7受容体への結合後に生じる。したがって、A T PのP 2 X 7受容体への結合を低減すると、T f h細胞死の誘発が減少する。T f h細胞は、B細胞のI g A分泌形質細胞への成熟を支援する。したがって、T f h細胞死の誘発が減少すると、B細胞の成熟及びB細胞のI g A分泌形質細胞への分化の増加につながることを本発明者によって示されている。

【0021】

A T PのP 2 X 7受容体への結合レベルを低減することができる剤は、P 2 X 7受容体のA T P結合部位に結合することができるリガンドの形態であってよい。前記リガンドは、P 2 X 7受容体のA T P結合部位に競合的に結合し得る。P 2 X 7受容体のA T P結合部位に競合的に結合するリガンドは、A T Pが結合するのを阻止して、下流のT f h細胞死を防ぐ。前記リガンドは、A T Pアナログであってよい。

20

【0022】

A T PのP 2 X 7受容体への結合レベルを低減することができる剤は、P 2 X 7受容体に結合することができる抗体の形態であってよい。前記抗体は、P 2 X 7受容体のA T P結合部位に結合し得る。

【0023】

A T PのP 2 X 7受容体への結合レベルを低減することができる剤は、P 2 X 7受容体の発現を低減することができる剤の形態であってよい。前記剤は、P 2 X 7受容体をコードしている遺伝子の転写レベルを低減してよい。代替案として、前記剤が、P 2 X 7受容体をコードしているm R N Aの翻訳レベルを低減してもよい。更に代替案として、前記剤が、P 2 X 7受容体をコードしているm R N A前駆体のm R N A前駆体プロセシングレベルを低減してもよい。かかる剤は、s i R N A又はアンチセンスオリゴヌクレオチドの形態をとり得る。

30

【0024】

A T PのP 2 X 7受容体への結合レベルを低減することができる剤は、細胞外A T Pの濃度を低下させることができ得る。具体的には、前記剤は、A T P加水分解活性を有し得る。前記剤は、A T P加水分解酵素であってよい。

【0025】

前記剤は、ポリペプチドとして前記組成物中に存在してもよい。代替案として、前記剤は、核酸として前記組成物中に存在していてもよい。前記剤が核酸として前記組成物中に存在する場合、前記核酸は、ポリペプチドをコードし得る。

40

【0026】

A T P加水分解酵素

好ましくは、A T PのP 2 X 7受容体への結合レベルを低減することができる剤は、A T P加水分解酵素である。

【0027】

任意のA T P加水分解酵素を、本発明の組成物においてA T PのP 2 X 7受容体への結合レベルを低減することができる剤として使用してよい。A T P加水分解酵素とは、A T

50

PのADPへの、ATPのAMPへの、及び/又はADPのAMPへの加水分解を触媒する任意の酵素を指す。かかる酵素としては、アピラーゼ、ATPase、ATPジホスファターゼ、アデノシンジホスファターゼ、ADPase、ATPジホスホヒドロラーゼ、及びCD39（エクトヌクレオシド三リン酸ジホスホヒドロラーゼ1、ENTPD1）が挙げられるが、これらに限定されない。

【0028】

好ましくは、ATP加水分解酵素は、アピラーゼである。ATP加水分解酵素がアピラーゼである場合、アピラーゼは、任意の生物由来のアピラーゼの配列を有し得る。好ましくは、アピラーゼは、シゲリ・フレックスネリ（*Shigella flexneri*）アピラーゼである。代替案として、アピラーゼは、ソラナム・チュベロサム（*Solanum tuberosum*）（ジャガイモ）アピラーゼであってもよい。

10

【0029】

アピラーゼは、ATP、無機リン、及びシグナル伝達分子等のエネルギー担体の比を変化させる非エネルギー結合型NTPaseである。アピラーゼは、膜結合型及び分泌可溶性型の両方で全ての真核生物においてみられる。

【0030】

アピラーゼは、任意の手段によって生成することができる。好ましくは、ATP加水分解酵素は、組み換えによって生成される。好ましくは、ATP加水分解酵素は、組み換えによって生成されたアピラーゼである。好ましくは、アピラーゼは、Genbankアクセッション番号U04539として提供される配列（配列番号1として本明細書に援用される）を有する組み換えによって生成されたアピラーゼである。

20

【0031】

代替案として、アピラーゼは、その天然源から直接精製してもよい。アピラーゼは、植物源、動物源、又は細菌源から精製してよい。好ましくは、アピラーゼは、ジャガイモから精製される。

【0032】

担体

上記剤は、前記組成物において担体中に存在し得る。ATPのP2X7受容体への結合レベルを低減することができる剤の送達及び/又は生成を可能にする任意の担体が、本発明の組成物に含まれていてよい。

30

【0033】

担体は、発現ベクターであってよい。代替案として、担体は、細胞であってもよい。担体は、発現ベクターを含み、それを発現させることができる細胞であってよい。

好ましくは、前記剤は、核酸であり、発現ベクターに組み込まれている。本発明の組成物において使用することができる発現ベクターを以下に記載する。発現ベクターは、組成物に直接含まれてよい。代替案として、発現ベクターは、前記組成物中に含まれる宿主細胞に形質転換されてもよい。

【0034】

発現ベクター

発現ベクターは、ベクターに挿入又はクローニングされている1以上の分子の発現を増強することができる。かかる発現ベクターの例としては、バクテリオファージ、自律複製配列（ARS）、セントロメア、及びインピトロで若しくは細胞内で複製し得るか若しくは複製され得る、又は動物の細胞内の特定の位置に核酸セグメントを輸送することができる他の配列が挙げられる。本発明において有用な発現ベクターとしては、染色体、エピソーム、及びウイルス由来のベクター、例えば、細菌プラスミド若しくはバクテリオファージ由来のベクター、並びにこれらの組合せ由来のベクター、例えば、コスミド及びファージミド、又はウイルススペースのベクター、例えば、アデノウイルス、AAV、レンチウイルスが挙げられる。

40

【0035】

発現ベクターは、プラスミドであってよい。宿主において複製可能且つ生存可能である

50

ターはバクテリオファージである。発現ベクターがプラスミド又はバクテリオファージである場合、発現ベクターは、細菌細胞に形質転換され得、前記細菌細胞は、本発明の組成物に含まれる。細菌細胞は、大腸菌 (*E. coli*) であってよい。代替案として、細菌担体は、弱毒化サルモネラ・エンテリカ (*Salmonella enterica*) であってよい。弱毒化サルモネラ・エンテリカは、血清型ネズミチフス菌 (*Salmonella Typhimurium*) であってよい。

【0045】

免疫原

本発明の組成物は、特異的免疫応答を誘導することができる免疫原を含み得る。本発明は、広範な疾患を治療する又は前記疾患から保護するために、広範な免疫原を使用してよい。前記免疫原は、ウイルス疾患 (例えば、エンベロープ又は非エンベロープウイルスに起因)、細菌疾患 (例えば、グラム陰性又はグラム陽性細菌に起因)、真菌疾患、寄生虫疾患、又は任意の他の疾患から保護する免疫応答を惹起することができる。

10

【0046】

前記免疫原は、例えば、生物全体、外膜小胞、タンパク質、糖、リポ糖、(例えば、担体とヘプテンとの、又は担体と糖若しくはリポ糖との) コンジュゲート等の様々な形態をとり得る。

【0047】

好ましい実施形態では、前記免疫原は、ATPのP2X7受容体への結合を低減することができる剤をコードしている核酸を含む細菌担体の形態をとり得る。この場合、細菌担体は、ATPのP2X7への結合レベルを低減することができる剤の担体として、及び免疫原として作用する。例えば、前記組成物は、ATPのP2X7受容体への結合を低減することができる剤をコードしている核酸を含む大腸菌又は弱毒化サルモネラ・エンテリカ等の組み換え細菌を含み得る。弱毒化サルモネラ・エンテリカは、血清型ネズミチフス菌であってよい。

20

【0048】

特に好ましい実施形態では、前記免疫原は、ATP加水分解酵素、好ましくはアピラーゼをコードしている核酸を含む細菌担体の形態をとり得る。前記免疫原は、フレキシネル菌 (*Shigella flexneri*) アピラーゼをコードしている核酸を含む細菌担体の形態をとり得る。

30

【0049】

代替案として、免疫原は核酸を含んでいてもよい。前記核酸は、ポリペプチド免疫原をコードし得る。前記核酸は、上記の通り担体中に存在し得る。例えば、前記核酸は、発現ベクター中に存在し得る。かかる発現ベクターは、細胞内に存在し得る。

【0050】

免疫原とATPのP2X7受容体への結合を低減することができる剤とを同じ発現ベクターに組み込んでよい。代替案として、免疫原とATPのP2X7受容体への結合を低減することができる剤とを別々の発現ベクターに組み込んでよい。更なる代替案として、免疫原及びATPのP2X7受容体への結合を低減することができる剤のうちの一方は発現ベクター中に存在してよいが、他方は発現ベクター中に存在していない。例えば、免疫原は発現ベクター中に存在してよいが、ATPのP2X7受容体への結合を低減することができる剤は存在していない。代替案として、ATPのP2X7受容体への結合を低減することができる剤は発現ベクター中に存在してよいが、ATPのP2X7受容体への結合を低減することができる剤は存在していない。

40

【0051】

前記免疫原は、本発明の組成物中に含まれていなくてもよい。代替案として、免疫原を本発明の組成物とは別々に投与してもよい。本発明の組成物は、使用前に免疫原を含む第2の組成物と合わせてもよく、本発明の組成物は、免疫原を含む第2の組成物と同時に又は近接する時点で投与してもよい。

【0052】

50

更なる代替案として、前記免疫原は、本発明の組成物又は第2の組成物のいずれにおいても投与されなくてもよい。前記免疫原は、本発明の組成物を投与する前に被験体中に既に存在していてもよい。

【0053】

免疫原の特異性

好ましくは、前記免疫原は、消化器病原体又は全身病原体に対する免疫応答を惹起する。好ましくは、全身病原体は、経粘膜伝達される全身病原体である。

【0054】

前記免疫原は、任意の消化器細菌病原体に対する免疫応答を惹起し得る。消化器細菌病原体としては、腸毒性大腸菌 (ETEC)、腸管侵入性大腸菌 (EIEC)、ペロトキシン産生大腸菌 (EHEC)、腸病原性大腸菌 (EPEC)、チフス性及び非チフス性サルモネラ菌を含むサルモネラ菌、例えば、腸チフス菌 (*Salmonella Typhi*)、腸炎菌 (*Salmonella Enteritidis*)、パラチフス菌 (*Salmonella Paratyphi*)、ネズミチフス菌、及び豚コレラ菌 (*Salmonella Choleraesuis*)、カンピロバクター、コレラ菌 (*Vibrio cholerae*)、ボイド菌 (*Shigella boydii*)、赤痢菌 (*Shigella dysenteriae*)、フレキシネル菌、ディフィシル菌 (*Clostridium difficile*)、ウェルシュ菌 (*Clostridium perfringens*)、ボツリヌス菌 (*Clostridium botulinum*)、セレウス菌 (*Bacillus cereus*)、腸炎ビブリオ菌 (*Vibrio parahaemolyticus*)、エンテロコリチカ菌 (*Yersinia enterocoliticia*)、ピロリ菌 (*Helicobacter pylori*)、黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*)、及びリステリア菌 (*Listeria monocytogenes*) が挙げられるが、これらに限定されない。

【0055】

前記免疫原は、任意の消化器ウイルス病原体に対する免疫応答を惹起し得る。消化器ウイルス病原体としては、ポリオウイルス、ロタウイルス、アデノウイルス、カリシウイルス、アストロウイルス、パルボウイルス、コロナウイルス、A型、D型、及びE型肝炎、トガウイルスが挙げられるが、これらに限定されない。

【0056】

前記免疫原は、任意の消化器原生動物病原体に対する免疫応答を惹起し得る。消化器原生動物病原体としては、ランブル鞭毛虫 (*Giardia lamblia*)、小形クリプトスポリジウム (*Cryptosporidium parvum*)、戦争イソスポーラ (*Isospora belli*)、赤痢アメーバ (*Entamoeba histolytica*)、大腸アメーバ (*Entamoeba coli*)、小形アメーバ (*Endolimax nana*)、ヨードアメーバ (*Iodamoeba butschlii*)、二核アメーバ (*Dientamoeba fragilis*)、大腸バランチジウム (*Balantidium coli*)、及び腸トリコモナス (*Trichomonas hominis*) が挙げられるが、これらに限定されない。

【0057】

前記免疫原は、任意の消化器蠕虫病原体に対する免疫応答を惹起し得る。消化器蠕虫病原体としては、回虫 (*Ascaris lumbricoides*)、ズビニ鉤虫 (*Ancylostoma duodenale*)、アメリカ鉤虫 (*Necator americanus*)、糞線虫 (*Strongyloides stercoralis*)、無鉤条虫 (*Taenia saginata*)、旋毛虫 (*Trichinella spiralis*)、フィリピン毛頭虫 (*Capillaria philippinensis*)、有鉤条虫 (*Taenia solium*)、広節裂頭条虫 (*Diphyllobothrium latum*)、小型条虫 (*Hymenolepis nana*)、縮小条虫 (*Hymenolepis diminuta*)、肥大吸虫 (*Fasciolopsis buski*)、横川吸虫 (*Metagonimus yokogawi*)、エジプト

10

20

30

40

50

吸虫 (Heterophyes heterophyes)、ヒト胃盤虫 (Gastrodiscoides hominis)、蟯虫 (Enterobius vermicularis)、及び鞭虫 (Trichuris trichiura) が挙げられるが、これらに限定されない。

【0058】

前記免疫原は、任意の経粘膜伝達全身病原体、例えば、ヒト免疫不全ウイルス (HIV) に対する免疫応答を惹起し得る。

【0059】

前記免疫原は、任意の動物において免疫応答を惹起し得る。動物は、脊椎動物又は非脊椎動物であってよい。脊椎動物は、哺乳類であってよい。脊椎哺乳類は、ヒトであってよい。哺乳類の例としては、マウス、ラット、ブタ、イヌ、ネコ、ウサギ、ウマ、ウシ、ヒツジ、霊長類等が挙げられるが、これらに限定されない。動物は、霊長類であってよい。好ましくは、動物はヒトである。前記免疫原は、動物に感染することができる任意の病原体に対する免疫応答を惹起し得る。特定の動物又は動物群に感染することができる病原体に対する免疫応答を惹起することができる免疫原を使用する場合、前記免疫原を含む組成物が、前記特定の動物又は動物群に投与するのに好適である。

10

【0060】

医薬組成物

本明細書に開示される組成物は、上記剤及び免疫原以外の追加成分を含んでいてもよい。例えば、典型的には、1以上の薬学的に許容し得る成分を含む。かかる成分の総論は、参照文献3において入手可能である。

20

【0061】

組成物は、チオメルサル又は2-フェノキシエタノール等の保存剤を含んでいてもよい。

【0062】

組成物は、好ましくは無菌である。組成物は、好ましくは、パイロジェンフリーであり、例えば、1用量当たり < 1 EU (エンドトキシン単位、標準尺度)、好ましくは1用量当たり < 0.1 EUしか含有しない。組成物は、好ましくはグルテンフリーである。

【0063】

本発明の組成物は、ワクチンであってよい。

30

【0064】

キット

また、ATPのP2X7受容体への結合レベルを低減することができる剤を含む第1の区画を含むキットも本明細書に開示される。

【0065】

前記キットは、免疫原を含む第2の区画を更に含んでいてもよい。

【0066】

治療及び免疫原性組成物の投与の方法

本発明の組成物は、動物被験体に投与することを意図する。したがって、本発明は、被験体における免疫応答を増強及び/又は惹起する方法であって、前記被験体に本発明の組成物を投与する工程を含む方法を提供する。動物被験体は、任意の動物であってよい。動物は、脊椎動物又は非脊椎動物であってよい。脊椎動物は、哺乳類であってよい。脊椎哺乳類は、ヒトであってよい。哺乳類の例としては、マウス、ラット、ブタ、イヌ、ネコ、ウサギ、ウマ、ウシ、ヒツジ、霊長類等が挙げられるが、これらに限定されない。動物は、霊長類であってよい。好ましくは、動物はヒトである。本発明の方法は、本発明の組成物を投与することを含む、動物における感染性疾患を予防又は治療する方法を含む。

40

【0067】

被験体における免疫応答を増強及び/又は惹起する方法は、本発明の組成物で前記被験体を免疫することを含み得る。したがって、本発明は、ATPのP2X7受容体への結合レベルを低減することができる剤を含む組成物で被験体を免疫する方法を提供する。

50

【0068】

また、本発明は、例えば被験体における免疫応答の増強及び/又は惹起に使用するための医薬としての、本発明の組成物又はキットの使用を提供する。本発明は、被験体における免疫応答を増強及び/又は惹起する方法において使用するための、ATPのP2X7受容体への結合レベルを低減することができる剤を含む組成物を提供する。更に、本発明は、感染性疾患の予防又は治療において使用するための、ATPのP2X7受容体への結合レベルを低減することができる剤を含む組成物を提供する。また、本発明は、被験体における免疫応答を増強するための医薬の製造における、ATPのP2X7受容体への結合レベルを低減することができる剤の使用を提供する。更に、本発明は、感染性疾患を予防又は治療するための医薬の製造における、ATPのP2X7受容体への結合レベルを低減することができる剤の使用を提供する。また、前記医薬は、免疫原を含んでいてもよい。代替案として、前記医薬は、免疫原と組み合わせて投与するためのものであってもよい。

10

【0069】

本発明は、被験体を免疫する方法において使用するための、ATPのP2X7受容体への結合レベルを低減することができる剤を含む組成物を提供する。また、本発明は、被験体を免疫するための医薬の製造における、ATPのP2X7受容体への結合レベルを低減することができる剤の使用を提供する。本発明の方法及び組成物によって予防又は治療され得る感染性疾患は、病原体によって引き起こされる任意の疾患であってよい。病原体は、消化器病原体又は全身病原体であってよい。全身病原体は、経粘膜伝達全身病原体であってよい。前記疾患は、細菌、ウイルス、原生動物、又は蠕虫病原体によって引き起こされ得る。

20

【0070】

消化器細菌病原体としては、腸毒性大腸菌(ETEC)、腸管侵入性大腸菌(EIEC)、ペロトキシン産生大腸菌(EHEC)、腸病原性大腸菌(EPEC)、チフス性及び非チフス性サルモネラ菌を含むサルモネラ菌、例えば、腸チフス菌、腸炎菌、パラチフス菌、ネズミチフス菌、及び豚コレラ菌、カンピロバクター、コレラ菌、ボイド菌、赤痢菌、フレキシネル菌、ディフィシル菌、ウェルシュ菌、ボツリヌス菌、セレウス菌、腸炎ビブリオ菌、エンテロコリチカ菌、ピロリ菌、黄色ブドウ球菌、及びリステリア菌が挙げられるが、これらに限定されない。

30

【0071】

消化器ウイルス病原体としては、ポリオウイルス、ロタウイルス、アデノウイルス、カリシウイルス、アストロウイルス、パルボウイルス、コロナウイルス、A型、D型、及びE型肝炎、トガウイルスが挙げられるが、これらに限定されない。

【0072】

消化器原生動物病原体としては、ランブル鞭毛虫、小形クリプトスポリジウム、戦争イソスポーラ、赤痢アメーバ、大腸アメーバ、小形アメーバ、ヨードアメーバ、二核アメーバ、大腸バランチジウム、及び腸トリコモナスが挙げられるが、これらに限定されない。

【0073】

消化器蠕虫病原体としては、回虫、ズビニ鉤虫、アメリカ鉤虫、糞線虫、無鉤条虫、旋毛虫、フィリピン毛頭虫、有鉤条虫、広節裂頭条虫、小型条虫、縮小条虫、肥大吸虫、横川吸虫、エジプト吸虫、ヒト胃盤虫、蟯虫、及び鞭虫が挙げられるが、これらに限定されない。

40

【0074】

経粘膜伝達全身病原体としては、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)が挙げられる。

【0075】

本発明の組成物は、腸炎を予防又は治療するために使用することができる。

【0076】

本発明の組成物は、アジュバントとして使用してもよい。代替案として、本発明の組成物は、ワクチンとして使用してもよい。

【0077】

50

本発明の方法、組成物、及び使用は、一般的に、被験体における抗体応答、好ましくは I g A 免疫応答及び / 又は I g G 免疫応答を生じさせるために使用される。

【 0 0 7 8 】

本発明の方法、組成物、及び使用は、好ましくは、被験体における免疫保護応答、好ましくは、免疫保護 I g A 応答を提供する。

【 0 0 7 9 】

本発明の方法、組成物、及び使用は、好ましくは、A T P の P 2 X 7 受容体への結合レベルを低減することができる剤を含む組成物の非存在下で免疫原によって提供される免疫応答と比べて改善された免疫応答を提供する。好ましくは、本発明の方法、組成物、及び使用は、A T P の P 2 X 7 受容体レベルへの結合を低減することができる剤を含む組成物の非存在下で免疫原によって提供される I g A 免疫応答と比べて改善された I g A 免疫応答を提供する。

10

【 0 0 8 0 】

本発明の組成物は、様々な方法で投与することができる。通常免疫経路は、経口投与によるが、他の利用可能な経路としては、鼻腔内、頬側、舌下等が挙げられる。したがって、好ましくは、前記組成物は経口投与用に製剤化される。

【 0 0 8 1 】

前記組成物を経口投与用に製剤化する場合、前記組成物は、錠剤、カプセル剤、サシェ剤、糖衣錠、散剤、顆粒剤、ロゼンジ、再構成用粉末、液状製剤、又は坐剤の形態であってよい。

20

【 0 0 8 2 】

経口投与の場合、本発明の組成物は、錠剤又はカプセル剤の形態で、又は液剤、乳剤、又は懸濁剤として提供され得る。

【 0 0 8 3 】

経口錠剤は、不活性希釈剤、崩壊剤、結合剤、滑沢剤、甘味剤、着香剤、着色剤、及び保存剤等の薬学的に許容し得る賦形剤と混合された本発明に係る組成物を含み得る。好適な不活性充填剤としては、炭酸ナトリウム及びカルシウム、リン酸ナトリウム及びカルシウム、ラクトース、デンプン、糖、グルコース、メチルセルロース、ステアリン酸マグネシウム、マンニトール、ソルビトール等が挙げられる。例示的な液体経口賦形剤としては、エタノール、グリセロール、水等が挙げられる。デンプン、ポリビニルピロリドン (P V P)、デンプングリコール酸ナトリウム、微結晶性セルロース、及びアルギン酸が好適な崩壊剤である。結合剤は、デンプン及びゼラチンを含み得る。滑沢剤は、存在する場合、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸、又はタルクであってよい。必要に応じて、錠剤は、消化管における吸収を遅らせるためにモノステアリン酸グリセリル又はジステアリン酸グリセリル等の物質でコーティングされてもよく、腸溶性コーティングでコーティングされてもよい。

30

【 0 0 8 4 】

経口投与用のカプセルとしては、硬質及び軟質のゼラチンカプセルが挙げられる。硬質ゼラチンカプセルを調製するために、本発明の化合物を固体、半固体、又は液体の希釈剤と混合してもよい。軟質ゼラチンカプセルは、水、落花生油又はオリーブ油等の油、流動パラフィン、短鎖脂肪酸のモノグリセリドとジグリセリドとの混合物、ポリエチレングリコール 4 0 0、又はプロピレングリコールを本発明の化合物と混合することによって調製することができる。

40

【 0 0 8 5 】

経口投与用の液体は、懸濁剤、液剤、乳剤、若しくはシロップ剤の形態であってよく、使用前に水又は他の好適なビヒクルで再構成するための乾燥製品として凍結乾燥又は提示されてもよい。かかる液体組成物は、任意で、薬学的に許容し得る賦形剤、例えば、懸濁化剤 (例えば、ソルビトール、メチルセルロース、アルギン酸ナトリウム、ゼラチン、ヒドロキシエチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、ステアリン酸アルミニウムゲル等) ; 非水性ビヒクル、例えば油 (例えば、アーモンド油又は分画ヤシ油)、プロピ

50

レングリコール、エチルアルコール、又は水；保存剤（例えば、p - ヒドロキシ安息香酸メチル若しくはプロピル、又はソルビン酸）；湿潤剤、例えば、レシチン；及び必要に応じて着香剤又は着色剤を含有していてもよい。

【0086】

本発明に従って調製された組成物は、小児及び成人の両方を治療するためのワクチンとして使用してよい。被験体は、1歳未満、1歳～5歳、5歳～15歳、15歳～55歳、又は少なくとも55歳であってよい。ワクチンを投与する被験体は、高齢者（例えば、50歳以上、60歳以上、好ましくは65歳以上）、若年層（例えば、5歳以下）、入院している被験体、医療従事者、軍人、妊婦、慢性病を患っている免疫不全患者、海外渡航者等であってよい。

10

【0087】

治療は、単回投与スケジュール又は複数回投与スケジュールによって行ってよい。複数回投与は、一次免疫スケジュール及び/又は追加免疫スケジュールにおいて使用してよい。複数回投与スケジュールでは、様々な用量を同一の又は異なる経路によって投与してよく、例えば、初回刺激は非経口経路で、追加刺激は粘膜経路で行う、初回刺激は粘膜経路で、追加刺激は非経口経路で行う等である。免疫学的にナイーブな被験体では、1回超（典型的には、2回）投与することが特に有用である。複数回投与は、典型的には、少なくとも1週間（例えば、約2週間、約3週間、約4週間、約6週間、約8週間、約12週間、約16週間等）間隔で投与される。

【0088】

概論

用語「含む (comprising)」は、「含む (including)」及び「からなる」を包含し、例えば、Xを「含む」組成物は、Xのみからなってもよく、追加成分を含んでもよい（例えば、X + Y）。

20

【0089】

数値xに関連する用語「約」は、任意であり、例えば $x \pm 10\%$ を意味する。

【0090】

特に指定しない限り、2以上の成分を混合する工程を含むプロセスは、特定の順序で混合することを必要としない。したがって、成分を任意の順序で混合してよい。3成分が存在する場合、2成分を互いに組み合わせ、次いで、組合せ物を第3の成分と組み合わせるとよい。

30

【0091】

細胞の培養において動物（特にウシ）材料を使用する場合、伝達性海綿状脳症 (TSE) を含まない、特に、ウシ海綿状脳症 (BSE) を含まない起源から入手しなければならない。全体的に、動物由来の材料の完全な非存在下で細胞を培養することが好ましい。

【0092】

化合物を組成物の一部として身体に投与する場合、その化合物を代わりに好適なプロドラッグに置換してもよい。

【図面の簡単な説明】

【0093】

【図1a】細菌起源の腸内ATP。SPF及び無菌マウス (GF) 由来の回腸の内腔、胆汁、尿、及び血清におけるATP濃度。

【図1b】細菌起源の腸内ATP。小腸から単離された指定の細菌種の培養培地中のATP濃度（棒グラフ）及び細胞増殖 (OD₆₀₀)。

【図1c】細菌起源の腸内ATP。（左から右へ）門静脈、頸静脈、及び下大静脈、並びに心臓由来の血清中のATP濃度。

【図1d】細菌起源の腸内ATP。膜損傷 (DIBAC⁺細胞、上のドットプロット)、細胞死 (SybrGreen⁺DAPI⁺細胞、下のドットプロット) についての、未処理 (LB) 又はVAMで処理された (VAM) 回腸細菌のFACS分析。

【図1e】細菌起源の腸内ATP。未処理 (LB) 培養物及びVAM処理培養物における

40

50

A T P 濃度 (上図) 及び回腸細菌の増殖 (下図)。

【図 1 f】細菌起源の腸内 A T P。P B S (左バー) 又は V A M (右バー) を経管栄養したマウス由来の回腸 A T P 濃度。

【図 1 g】細菌起源の腸内 A T P。未処理 (左バー) 又は V A M を経口経管栄養した (右バー) W T 及び p 2 r x 7 マウスの P P 由来の T f h 細胞内の アネキシン V + 細胞の F A C S による分析。

【図 2 a】アピラーゼによる分泌抗大腸菌 I g A 応答の効率的な誘導。大腸菌による A T P 分泌の概略図 (O M、外膜、P S、細胞膜周辺腔、I M、内膜、C y t、サイトゾル)。p B A D 2 8 組み換え体についての経時的な培養培地中の A T P 濃度 (棒グラフ) 及び細菌増殖 (O D₆₀₀)。

10

【図 2 b】アピラーゼによる分泌抗大腸菌 I g A 応答の効率的な誘導。アピラーゼの影響の概略図。p H N D 1 0 形質転換体についての経時的な培養培地中の A T P 濃度 (棒グラフ) 及び細菌増殖 (O D₆₀₀)。

【図 2 c】アピラーゼによる分泌抗大腸菌 I g A 応答の効率的な誘導。p B A D 2 8 又は p H N D 1 0 形質転換体で免疫したマウス由来の腸洗浄液中の抗大腸菌 I g A についての F A C S 分析。

【図 2 d】アピラーゼによる分泌抗大腸菌 I g A 応答の効率的な誘導。p B A D 2 8 をトランスフェクトした大腸菌で免疫し、それぞれの細菌株で試験したマウスにおける腸内抗大腸菌 I g A の定量。

【図 2 e】アピラーゼによる分泌抗大腸菌 I g A 応答の効率的な誘導。p H N D 1 0 をトランスフェクトした大腸菌で免疫し、相互の細菌株で試験したマウスにおける腸内抗大腸菌 I g A の定量。

20

【図 2 f】アピラーゼによる分泌抗大腸菌 I g A 応答の効率的な誘導。細菌の経管栄養前及び後 (12 時間) に C A (右バー) 又は P S V (左バー) で処理したマウスにおける回腸 A T P の増加倍数。

【図 2 g】アピラーゼによる分泌抗大腸菌 I g A 応答の効率的な誘導。p B A D 2 8 形質転換体に応答する抗大腸菌 I g A の定量。

【図 2 h】アピラーゼによる分泌抗大腸菌 I g A 応答の効率的な誘導。p H N D 1 0 形質転換体に応答する抗大腸菌 I g A の定量 (y 軸の目盛が異なる)。

【図 2 i】アピラーゼによる分泌抗大腸菌 I g A 応答の効率的な誘導。指定の細菌種における p B A D 2 8 又は p H N D 1 0 をトランスフェクトした大腸菌を経管栄養したマウスの腸液中の I g A についての F A C S 分析。

30

【図 3 a b】アピラーゼによる分泌抗大腸菌 I g A 応答の効率的な誘導。(a) 腸洗浄液の連続希釈液中の I g A による大腸菌染色。(b) この表は、腸内 I g A 濃度及び大腸菌特異的抗体の幾何平均を示す。

【図 3 c】アピラーゼによる分泌抗大腸菌 I g A 応答の効率的な誘導。合計腸内 I g A 濃度に対してプロットした F A C S による抗大腸菌 I g A の幾何平均及びフィッティング曲線の相対関数。

【図 3 d】アピラーゼによる分泌抗大腸菌 I g A 応答の効率的な誘導。様々な抗生物質群の存在下における大腸菌の経管栄養及び A T P 測定の時点を示す図。

40

【図 3 e】アピラーゼによる分泌抗大腸菌 I g A 応答の効率的な誘導。C A の存在下における、非免疫マウス (U n i m ; 左バー) における又は p B A D 2 8 (右バー) 及び p H N D 1 0 (中央バー) 形質転換体に応答する抗大腸菌 I g A の定量。

【図 3 f】アピラーゼによる分泌抗大腸菌 I g A 応答の効率的な誘導。P S V の存在下における、非免疫マウス (U n i m ; 左バー) における又は p B A D 2 8 (右バー) 及び p H N D 1 0 (中央バー) 形質転換体に応答する抗大腸菌 I g A の定量。

【図 4】p B A D 2 8 保有大腸菌 (中央バー)、p H N D 1 0 保有大腸菌 (右バー)、及び対照無菌マウス (G F ; 左バー) が単独定着した (m o n o c o l o n i z e d) 無菌マウスにおける腔内 A T P レベル。

【図 5】p B A D 2 8 保有大腸菌 (中央バー)、p H N D 1 0 保有大腸菌 (右バー)、及

50

び対照無菌マウス（GF；左バー）が単独定着した動物におけるTfh細胞数（左のグラフ）及び胚中心細胞数（右のグラフ）の分析。

【図6】pBAD28保有大腸菌が単独定着した無菌マウス、pHND10保有大腸菌が定着した無菌マウス、及び対照無菌マウス（GF）由来の合計腸内IgA濃度に対してプロットした、FACSによる腸液中の抗大腸菌IgAの幾何平均。

【図7A】pBAD28保有非毒性ネズミチフス菌についての経時的な培養培地中のATP濃度（棒グラフ）及び細菌増殖（OD₆₀₀）。

【図7B】pHND10保有非毒性ネズミチフス菌についての経時的な培養培地中のATP濃度（棒グラフ）及び細菌増殖（OD₆₀₀）。

【図8】対照マウス（左バー）、pHND10保有弱毒化ネズミチフス菌で免疫したマウス（中央バー）、及びpBAD28保有弱毒化ネズミチフス菌で免疫したマウス（右バー）由来の合計腸内IgA濃度に対してプロットした、FACSによる腸液中の抗ネズミチフス菌IgAの幾何平均。

10

【図9】対照非免疫マウス（左バー）、pHND10保有弱毒化ネズミチフス菌で免疫したマウス（中央バー）、及びpBAD28保有弱毒化ネズミチフス菌で免疫したマウス（右バー）におけるPP、腸間膜リンパ節（MLN）、脾臓、及び肝臓からの毒性サルモネラ菌の回収。CFU、コロニー形成単位；CTRL、非免疫マウス。

【図10a】対照未処理マウスと比較した、pBAD28又はpHND10を保有する弱毒化サルモネラ菌で免疫し、次いで、毒性サルモネラ菌でチャレンジしたマウスにおける脾臓サイズ。

20

【図10b】対照未処理マウス（左バー）、pHND10を保有する弱毒化サルモネラ菌で免疫し、次いで、毒性サルモネラ菌でチャレンジしたマウス（中央バー）、及びpBAD28を保有する弱毒化サルモネラ菌で免疫し、次いで、毒性サルモネラ菌でチャレンジしたマウス（右バー）の脾臓重量。CTRL、未処理マウス。

【図11a】pBAD28を保有する弱毒化サルモネラ菌又はpHND10を保有する弱毒サルモネラ菌で免疫し、次いで、毒性サルモネラ菌でチャレンジしたマウス及び対照未処理マウスにおける肝臓組織の画像。

【図11b】pBAD28を保有する弱毒化サルモネラ菌（右バー）又はpHND10を保有する弱毒化サルモネラ菌（中央バー）で免疫し、次いで、毒性サルモネラ菌でチャレンジしたマウスにおける肝臓の組織学的スコア。左バーは、対照未処理マウスにおける肝臓の組織学的スコアを示す。

30

【図12】毒性ネズミチフス菌を感染させた後に、pHND10保有弱毒化ネズミチフス菌で免疫したマウス（中央バー）、非免疫マウス（CTRL；左バー）、及びpBAD28保有弱毒化ネズミチフス菌で免疫したマウス（右バー）におけるデキストラン量。

【図13】毒性サルモネラ菌でチャレンジした48時間後における、リコンビナーゼ活性化遺伝子-1（Rag-1）欠損マウス由来の腸間膜リンパ節（MLN）、肝臓、及び脾臓に回収された毒性サルモネラ菌コロニー形成単位（CFU）の数。非免疫マウス（CTRL）は左バーによって表され、pBAD28を保有する弱毒化ネズミチフス菌で免疫したマウスは右バーによって表され、pHND10を保有する弱毒化ネズミチフス菌で免疫したマウスは中央バーによって表される。

40

【図14】未処理マウス（左バー、三角形によって表される）、pBAD28保有大腸菌由来の周辺質タンパク質で処理したマウス（中央バー、菱形によって表される）、及びpHND10保有大腸菌由来の周辺質タンパク質で処理したマウスにおける糞便IgA濃度。

【発明を実施するための形態】

【0094】

マウス及び抗生物質の投与

C57BL/6J及びp2rx7^{-/-}（B6.129P2-P2rx7tm1Gab/J、Jackson Lab）マウスをInstitute for Research in Biomedicine（Bellinzona, Switzerland）

50

における特定病原体除去 (s p f) 施設で飼育した。C 5 7 B L / 6 J 無菌マウスを C l e a n A n i m a l F a c i l i t y (U n i v e r s i t y o f B e r n , S w i t z e r l a n d) における可撓性フィルム隔離飼育器で維持した。抗生物質処理のために、飲用水中で以下の抗生物質群を4週間マウスに与えた：1 g / L アンピシリン及び0.5 g / L クロラムフェニコール (内因性叢に対しては活性であるが、p B A D 2 8 で形質転換された大腸菌に対しては活性でない殺菌剤群)、又は1 g / L ストレプトマイシン、1 g / L ペニシリン、及び0.5 g / L バンコマイシン (内因性及び p B A D 2 8 で形質転換された細菌の両方に対して殺菌性である)。

【0095】

A T P の定量

回腸 A T P を定量するため、腸洗浄バッファ (P B S 、 0 . 5 M E D T A 、 ダイズトリプシン阻害剤、 P M S F) 1 0 m L により洗浄することによって腸内容物を回収し、滅菌チューブ内にて 1 4 ' 0 0 0 r p m でスピンド、濾過 (0 . 2 2 μ m) して、任意の細菌サイズの夾雑物を除去し、直ちにドライアイスで凍結させた。腸洗浄液中の A T P 濃度に希釈係数を乗じて、真の腔内 A T P 濃度を得た。3 4 G 針による穿刺を通じて胆嚢及び膀胱から胆汁及び尿を回収した。培養下の共生細菌によって分泌される A T P を定量するために、腸内容物を B H I アガーにプレーティングし、3 7 ° C で 1 6 時間培養した。シングルコロニーをピックし、B H I プロスで培養した。シングルコロニーの 1 6 時間培養物から得られた培地を遠心分離し (1 5 , 0 0 0 × g) 、上清を回収し、濾過 (0 . 2 2 μ m) した。循環部分における A T P を定量するため、下大静脈、頸動脈、及び門静脈、並びに心臓を露出させ、3 4 G 針による穿刺を通じて血液を回収した。血液を 1 , 0 0 0 × g で遠心分離し、血清を回収し、1 , 0 0 0 × g で 2 回目の遠心分離を行った。溶血血清は廃棄した。製造業者のプロトコールに従って組み換えホタルルシフェラーゼ及びその基質である D - ルシフェリンを用いた生物発光アッセイによって細胞外 A T P 濃度を評価した。

【0096】

抗生物質による細菌培養物の処理

アンピシリン (2 . 5 μ g / m L) 、バンコマイシン (1 μ g / m L) 、メトロニダゾール (1 μ g / m L) を、0.5 O D の腸内細菌培養物に添加した。抗生物質を添加した 3 時間後、4 時間後、及び 5 時間後に細菌培養物から上清を回収し、滅菌チューブ内にて 1 4 ' 0 0 0 r p m でスピンド、濾過 (0 . 2 2 μ m) した。生物発光アッセイによって A T P 濃度を評価した (上記を参照) 。

【0097】

抗体及びフローサイトメトリー

以下の m A b は B D B i o s c i e n c e s から購入した：ピオチンをコンジュゲートした抗 C X C R 5 (クローン 2 G 8 、カタログ番号 5 5 1 9 6 0) 及びフィコエリトリン (P E) をコンジュゲートした抗 I C O S (クローン 7 E . 1 7 G 9 、カタログ番号 5 5 2 1 4 6) から購入した。P E - C y 7 をコンジュゲートした抗 C D 4 (C l o n e : G K 1 . 5 、カタログ番号 1 0 0 4 2 2) 及び A P C をコンジュゲートしたストレプトアビジン (カタログ番号 4 0 5 2 0 7) は、B i o l e g e n d . P e r c p - e F l u o r 7 1 0 をコンジュゲートした抗 C D 3 (クローン : 1 7 A 2 、カタログ番号 4 6 - 0 0 3 2 - 8 0) は、e B i o s c i e n c e から入手した。アネキシン V 染色は、製造業者のプロトコールに従って B i o l e g e n d アネキシン V 結合バッファ (カタログ番号 4 2 2 2 0 1) (1 × 1 0 ⁶ 細胞 / m L) 中で実施した。F l o w J o ソフトウェア (T r e e S t a r , A s h l a n d , O R) 又は F A C S D i v a ソフトウェア (B D B i o s c i e n c e s) を用いてデータを解析した。

【0098】

プラスミド

フレキシネル菌の完全長 p h o N 2 : : H A 融合物を、P B A D L - アラビノース誘導性プロモータの制御下にあるプラスミド p B A D 2 8 (A T C C 8 7 3 9 3 8 7 4 0 2

10

20

30

40

50

)のポリリンカー部位にクローニングして、プラスミドpHND10(参照文献8)を複製した。

【0099】

大腸菌による経口免疫及び抗大腸菌IgAを検出するためのフローサイトメトリー

pBAD28又はpHND10で形質転換した大腸菌を、アラビノース(0.3%)及びアンピシリン(100µg/mL)を含有するLB培地に無菌的に接種し、37°Cで18時間インキュベートした。遠心分離によって細胞を収集し、滅菌PBSで洗浄し、PBS中 2×10^{10} CFU/mLの密度に濃縮した。細菌懸濁液(300µL中 10^{10} CFU)を胃に経管栄養した。3日間毎に3週間手順を繰り返して、28日目にマウスを屠殺した。腸洗浄バッファ(PBS、0.5M EDTA、ダイズトリプシン阻害剤、PMSF)5mLで洗浄することによって腸内容物を回収し、滅菌チューブ内にて14,000rpmでスピンド、濾過(0.22µm)して、任意の細菌サイズの夾雑物を除去した⁴。抗大腸菌IgAをフローサイトメトリー分析するために、LBプロス3mLにシングルコロニーを接種し、37°Cで一晩培養した。次いで、培養物を遠心分離し(7,000rpmで3分間)、滅菌濾過したPBS、2%BSA、0.005%NaN₃で3回洗浄し、約 10^7 細菌/mLの密度で再懸濁させた。次いで、腸内容物及び細菌を混合し、4°Cで1時間インキュベートした。細菌を2回洗浄した後、モノクローナルFITC抗マウスIgA(Southern Biotech、カタログ番号1040-02、作業希釈1:200)に再懸濁させた。1時間インキュベートした後、細菌を2回洗浄し、対数モードのFSC及びSSCパラメータを用いてFACSCantoで取得するためにPBS中2%パラホルムアルデヒドに再懸濁させた。分析した各動物について、ELISAを用いて、大腸菌の表面染色用に用いられる同じ腸洗浄サンプルの未希釈アリコート中の合計IgA濃度を求めた。この値を用いて、大腸菌のフローサイトメトリー用に用いられる腸洗浄液の各希釈物における合計IgA濃度を計算し、フローサイトメトリーで得られた幾何平均蛍光に対してプロットした。

【0100】

弱毒化ネズミチフス菌による経口免疫及び抗ネズミチフス菌IgAを検出するためのフローサイトメトリー

pBAD28又はpHND10で形質転換した無毒gyrA1816 cya1 crp1ネズミチフス菌(cya及びcrp遺伝子に変異を有し、機能性アデニル酸シクラーゼ及び環状AMP受容体タンパク質を産生することができない)(ATCC(登録商標)53648(商標))を、アラビノース(0.05%)及びクロラムフェニコール(30µg/mL)を含有するLB培地に無菌的に接種し、37°Cで18時間インキュベートした。遠心分離によって細胞を収集し、滅菌PBSで洗浄し、PBS中 5×10^{10} CFU/mLの密度に濃縮した。細菌懸濁液(100µL中 5×10^9 CFU)を、3日間毎に3回、正常に定着したC57BL/6マウスの胃に経管栄養した。pHND10形質転換体によりアピラーゼを確実に最大限発現させるために、アラビノース0.05%を飲用水に添加した。最後の免疫の1ヶ月間後、大腸菌が定着したマウスについて上記した通り、抗サルモネラ菌分泌型IgAについてマウスを試験した。

【0101】

実施例1 - 正常に定着したマウスにおける大腸菌

共生生物によって産生される細胞外ATPレベルの検出

細胞外ATPは、マウス糞便に由来するインビトロで培養された腸内共生生物の上清中で既に検出されている^{5、6}。共生生物の代謝活性が腸内ATPのレベルに寄与しているかどうかを調べるために、特定病原体除去施設のマウス及び完全無菌マウスにおいて小腸内のATPレベルを観察した。特定病原体除去マウスではマイクロモル濃度のATPが検出されたが、完全無菌マウスではATPがほぼ検出不可能であった。尿、胆汁、及び無菌(又はほぼ無菌)の上皮又は内皮器官由来の血清等の流体は、実質的な量の腔内ATPを示さないことが見出された(図1(a)を参照)。この知見は、共生生物による粘膜定着が細胞外ATPレベルの増大において役割を果たしていることを示す。

10

20

30

40

50

【0102】

小腸に存在する細菌がATPを放出するかどうかを試験するために、マウス回腸から単離された好気性及び嫌気性のコロニーの培養物を培地中のATPについて試験し、細胞増殖と比較した。図1(b)は、培地中のATPが細菌増殖に比例して増加することが見出されたことを示す。したがって、これらデータは、小腸に存在する細菌が腔内ATPの生成に寄与することを示す。

【0103】

また、本発明者らは、細菌の細胞死の結果、細胞溶解中のATP放出に起因して細胞外ATPが更に増加するかどうかについても調べた。回腸細菌細胞培養物を、バンコマイシン、アンピシリン、及びメトロニダゾール(VAM)で処理した。DAPI(4',6-ジアミジノ-2-フェニルインドール)染色を用いて細胞死をモニタリングし、参照文献7に記載の通りフローサイトメトリーにおいてDIBAC(ビス-(1,3-ジブチルバルビツール酸)トリメチンオキソノール)を用いて膜損傷をモニタリングした。図1(d)~(f)は、細菌の細胞死及び膜透過性が顕著なATP放出に関連していたことを示す。また、VAMのインピボ経口投与の結果、野生型マウスのパイエル板由来のTfh細胞におけるホスファチジルセリン露出(細胞死のシグナル)の増加に伴って、図1gに示す通り腔内ATPが急激に且つ著しく増加したが、P2rx7^{-/-}マウスでは増加しなかった。これは、殺菌死によるATPの放出がP2X7を介してTfh細胞の存在量に影響を与えることを示す。

【0104】

ATPの上皮透過性

小腸におけるATPの上皮透過性を評価するために、毎日ATP_S(ATPの非加水分解性アナログ)をマウスに経管栄養した。Tfh細胞はP2X7を介して細胞外ATPに感受性であるので、本発明者らは、処理の2週間後のパイエル板におけるTfh細胞の回復を分析した。ATP_Sを投与した結果、野生型マウスではTfh細胞が著しく減少したが、P2rx7^{-/-}マウスでは減少しなかった。この知見は、内腔ATPがパイエル板を透過することができ、P2X7を介してTfh細胞の存在量に影響を与える得ることを示唆する。

【0105】

門静脈又は頸静脈、大静脈及び心臓から回収した血液中のATP濃度の分析によって、他のサンプルと比べて門静脈由来の血液中のATP濃度が30倍~50倍増加することが明らかになった(図1(c)を参照)。これは、ATPが小腸に容易に吸収されることを示す。

【0106】

アピラーゼを用いる腔内ATPレベルの低下

本発明者らは、フレキシネル菌⁹由来のpHND10(周辺質アピラーゼ(ATPジホスホヒドロラーゼ)をコードしているphoN2::HA融合物⁸を保有しているpBAD28ベースの組み換えプラスミド)を発現している組み換え大腸菌K-12株を用いた。

【0107】

大腸菌の増殖に付随して放出される細胞外ATPは、図2(a)及び(b)に示す通り、pHND10を保有する細菌において検出不可能であった。これは、アピラーゼがATP分泌を効率的に抑制したことを示す。

【0108】

pHND10を発現している大腸菌がマウスに定着した結果、VAM投与後に小腸におけるATP濃度が著しく低下した。これは、細菌の細胞死後のPhoN2(アピラーゼ)の放出が、腔内ATPを効率的に加水分解したことを示す。

【0109】

抗原特異的免疫応答の増強

PhoN2を用いる抗大腸菌IgA応答の増強が、本発明者らによって立証された。p

10

20

30

40

50

HND10プラスミド及びpBAD28プラスミド（アピラーゼPhoN2をコードしていない）を保有する大腸菌をC57BI/6マウスに経管栄養した。pHND10（アピラーゼをコードしている）をトランスフェクトした細菌を経管栄養したマウスで、大腸菌特異的IgAのレベルが著しく増大した。したがって、細菌によるATP放出は高親和性IgA応答の発現を制限し、立証されている通り、アピラーゼの発現によるATPレベルの低下は、図2(c)及び3に示すような高親和性IgA応答を生じさせる。アピラーゼを発現している細菌によって惹起される抗大腸菌IgAは、pBAD28含有細菌及びpHND10含有細菌の両方に対して等しく反応性であった。これは、アピラーゼが「アピラーゼ特異的」IgA応答を促進しなかったことを示す（図2(d)及び(e)を参照）。

10

【0110】

本発明者らは、クロラムフェニコール及びアンピシリン（CA；内因性叢に対しては活性であるが、pBAD28で形質転換された大腸菌に対しては活性ではない）又はペニシリン/ストレプトマイシン/バンコマイシン（PSV；内因性及びpBAD28で形質転換された細菌の両方に対して殺菌性である）の経口投与後に腔内ATP及び抗大腸菌IgAを測定することによって、高親和性IgA応答のためのアジュバントとしてのアピラーゼの役割について調べた。pBAD28で形質転換された細菌を経管栄養したマウスにおける抗大腸菌IgAは、腔内ATPの増加に付随して、PSV投与によって減少したが、CA投与では減少しなかった。腔内ATPも抗大腸菌IgA応答も、pHND10を保有する細菌が定着したマウスではCA又はPSVによる影響を受けなかった（図2(f)～

20

【0111】

上に説明した知見は、アピラーゼが送達される、細菌に特異的であることが見出され、即ち、他の細菌種に特異的な大腸菌IgA抗体について試験したところ、図2(i)に示す通りpBAD28を保有する大腸菌を投与したときと比べて、pHND10を保有する大腸菌をマウスに投与したときに増加は記録されなかった。

【0112】

したがって、本明細書に提供されるデータは、アピラーゼ、又はATPのP2X7受容体への結合レベルを低減することができる別の剤を含む組成物が、前記組成物に含まれる免疫原に対する特異的IgA応答を増加させることができることを示す。したがって、本発明の組成物は、ワクチンとして有用であり得る。

30

【0113】

実施例2 - 無菌単独定着マウスにおける大腸菌

本発明者らは、細胞外ATPとは別に胃腸内に同量の細菌刺激が存在する制御された環境設定における、腔内ATPレベル、Tfh及び胚中心細胞の数、並びに抗大腸菌IgAレベルに対するアピラーゼの効果を立証するために、無菌マウスに単独定着させた。

【0114】

単独定着マウスにおけるアピラーゼの存在下の腔内ATPの減少

pHND10又はpBAD28で形質転換された大腸菌を無菌マウスに単独定着させた。図4は、pHND10保有大腸菌が単独定着したマウスが、pBAD28保有大腸菌が単独定着したマウス及び対照マウスと比べて、腸内の腔内ATP濃度の著しい低下を示したことを示す。大腸菌が定着していない無菌マウスを対照として用いた。

40

【0115】

Tfh細胞及び胚中心B細胞の数は、単独定着マウスにおいてアピラーゼの存在下で増加する

パイエル板における合計細胞数を数え、FACSにおける頻度によってTfh細胞及びGC B細胞の相対存在量を推定することによって、pHND10又はpBAD28のいずれかで形質転換された大腸菌が単独定着した無菌マウスを、Tfh細胞(CD3⁺CD4⁺CXCR5⁺ICOS⁺)の数及び胚中心B細胞(CD19⁺Fas⁺PNA⁺)の数について試験した。図5は、pBAD28保有大腸菌が単独定着しているマウス又は対

50

照マウスと比べて、pHND10保有大腸菌が単独定着しているマウスでは、Tfh細胞及び胚中心B細胞の数が増加したことを示す。

【0116】

この知見は、小腸のパイエル板におけるTfh細胞及び胚中心B細胞の制御において腔内ATPが役割を有することと一致している。pHND10保有大腸菌で発現したアピラーゼの存在が腔内ATPのレベルを低下させ、これによってATPがTfh細胞及び胚中心細胞の数を減少させるのが阻止される。

【0117】

抗大腸菌IgAは、単独定着マウスにおいてアピラーゼの存在下で増加する

pHND10又はpBAD28のいずれかで形質転換された大腸菌が単独定着している無菌マウスを、上記の通り抗大腸菌IgAについて試験した。図6は、pBAD28が単独定着しているマウス又は対照マウスと比べて、pHND10が単独定着しているマウスにおいて大腸菌特異的IgAのレベルが著しく増加したことを示す。

【0118】

この知見は、アピラーゼの存在の結果として産生されるIgAが、アピラーゼと同時に投与された免疫原に特異的であることを確認する。

【0119】

実施例3 - 正常に定着したマウスにおける弱毒化ネズミチフス菌

アピラーゼを発現するネズミチフス菌の作製

肝臓弱毒化ネズミチフス菌におけるアピラーゼ発現が特異的IgA応答を増加させ、毒性株による感染からの保護を増強し得るかどうかを調べるために、本発明者らは、モデルワクチンとして無毒gyrA1816 cya1 crp1ネズミチフス菌(ATCC(登録商標)53648(商標))(cya及びcrp遺伝子に変異を含み、機能性アデニル酸シクラーゼ及び環状AMP受容体タンパク質を産生することができない)を用いた。本発明者らは、上記の通り、pBAD28又はpHND10のいずれかでネズミチフス菌を形質転換した。大腸菌で観察される通り、図7は、pHND10を保有する(したがって、アピラーゼを発現する)ネズミチフス菌の培養培地ではATPが検出不可能であった(図7bを参照)が、pBAD28を保有する(したがって、アピラーゼを発現しない)ネズミチフス菌では細菌細胞密度と相関して増加する量で検出された(図7aを参照)ことを示す。

【0120】

抗ネズミチフス菌IgAはアピラーゼの存在下で増加する

pHND10又はpBAD28のいずれかで形質転換した無毒ネズミチフス菌 5×10^9 個を3日間毎に3回経管栄養することによって、正常に定着したマウスを免疫した。動物の飲用水にアラビノース0.05%を添加して、免疫中にpHND10形質転換体によってアピラーゼを確実に最大限発現させた。最後の免疫の1ヶ月間後、大腸菌が定着したマウスについて上記した通り、抗サルモネラ菌分泌型IgAについてマウスを試験した。図8は、pBAD28を保有する弱毒化ネズミチフス菌又は対照マウスと比べて、pHND10を保有する弱毒化ネズミチフス菌で経口免疫したマウスにおいて、サルモネラ菌特異的IgA応答が著しく増加したことを示す。

【0121】

この知見は、アピラーゼの存在の結果として産生されるIgAが、アピラーゼと同時に投与された免疫原に特異的であることを確認する。

【0122】

アピラーゼを保有する弱毒化ネズミチフス菌による免疫は、毒性ネズミチフス菌に対する保護を提供する

共生細菌叢による定着抵抗性は、毒性ネズミチフス菌の感染を制限する。対照的に、ストレプトマイシンでマウスを前処理すると、腸炎及腸チフスを効率的に発現させる。最後の免疫の1ヶ月間後にストレプトマイシンを投与した際に 5×10^7 個の毒性サルモネラ菌(S.Tm^{w t}:ストレプトマイシンに対して抵抗性のSB300サルモネラ・エンテ

10

20

30

40

50

リカ血清型 *Thyphimurium* SL1344 (野生型)、参照文献10に開示)による感染から保護する能力について、pHND10又はpBAD28のいずれかで形質転換された弱毒化ネズミチフス菌によるマウスの免疫を試験した。pHND10を保有する無毒サルモネラ菌で既に免疫されているマウスに感染させた結果、感染の48時間後にpBAD28形質転換体で免疫したマウス又は対照非免疫マウスと比較したとき、パイエル板からの毒性サルモネラ菌の回収が著しく減少し、腸間膜リンパ節(MLN)、脾臓、及び肝臓において毒性サルモネラ菌がほぼ検出不可能なレベルになった(図9を参照)。

【0123】

これは、pBAD28含有ネズミチフス菌で免疫したマウス又は非免疫マウスと比べて、pHND10含有弱毒化ネズミチフス菌で免疫したマウスにおいて感染後の病態生理学的変化の減少が観察されたことと一致している。図10は、未処理マウスの対照脾臓と比べて、pBAD28含有ネズミチフス菌で免疫した感染マウスでは脾臓のサイズ及び重量が大きく増大したが、pHND10含有弱毒化ネズミチフス菌で免疫した感染マウスでは増大しなかったことを示す。図11は、未処理マウスの対照肝臓と比べて、pBAD28含有ネズミチフス菌で免疫した感染マウスでは肝臓の組織診断が悪化したが、pHND10含有弱毒化ネズミチフス菌で免疫した感染マウスでは悪化しなかったことを示す。

10

【0124】

pHND10含有弱毒化ネズミチフス菌で免疫した結果毒性サルモネラ菌から保護されることを本発明者らが立証した更なる方法は、毒性サルモネラ菌による感染が胃腸内皮バリアの漏出を引き起こす程度をモニタリングすることによるものであった。この漏出は、経管栄養によってマウスに投与されたデキストランに対する胃腸の透過性を分析することによってモニタリングした。この目的のために、無毒サルモネラ菌で免疫したC57BL/6Jマウスに 5×10^7 個の毒性サルモネラ菌を経口感染させ、70kDa FITC-デキストラン5mgを経管栄養した。4時間後、末梢血を回収し、血清中のフルオロフォアの存在について試験した。各値から、未処理マウスから回収された血清のバックグラウンド蛍光値を減じた。

20

【0125】

毒性サルモネラ菌感染の作用から有効に保護されたマウスは、デキストランの胃腸の透過性を示さず、したがって、かかるマウス由来の血清は、デキストランをそれほど含有しておらず、マウスは毒性サルモネラ菌感染の作用を受けた(即ち、それほど効率的に保護されなかった)。

30

【0126】

図12は、対照非免疫マウス及びpBAD28含有弱毒化ネズミチフス菌で免疫したマウスと比べて、毒性ネズミチフス菌に感染させた後にpHND10含有弱毒化ネズミチフス菌で免疫したマウス由来の血清が含有するデキストランの量が著しく減少したことを示す。これら結果は、アピラーゼ発現細菌による免疫によって提供されたIgA応答が、サルモネラ菌の全身伝播からの保護を付与することを示す。

【0127】

適応IgAはアピラーゼの存在下で観察された保護に関与している

本発明者らは、下記免疫が成熟B又はTリンパ球を産生することができないマウスに対して有する効果を観察するために、C57BL/6マウスについて上記した通り、pBAD28又はpHND10のいずれかを保有する弱毒化ネズミチフス菌でリコンビナーゼ活性化遺伝子-1(Rag-1)欠損マウスを免疫した。(pHND10を保有する弱毒化ネズミチフス菌で免疫したマウスにおける)対照非免疫マウス又は毒性サルモネラ菌によるチャレンジの48時間後にpBAD28又はpHND10を保有するネズミチフス菌で免疫したマウスに由来する腸間膜リンパ節(MLN)、肝臓、及び脾臓に回収された毒性サルモネラ菌コロニー形成単位(CFU)の数が同等であることによって図13に示されているように、アピラーゼの存在の結果、毒性サルモネラ菌による感染からの保護は増強されなかった。これら結果は、リンパ球(例えば、適応IgA)が野生型マウスにおいて観察された免疫による保護に関与していることを示す。

40

50

【0128】

本発明は、一例として説明しただけであり、本発明の範囲及び趣旨の範囲内で変更を行い得ることが理解される。

【0129】

実施例4 - 細菌担体の形態の免疫原の非存在下におけるアピラーゼ組成物によるマウスの処理

周辺質タンパク質の抽出

pBAD28又はpHND10で形質転換された大腸菌を、アラビノース(0.3%)及びアンピシリン(100µg/mL)を含有するLB培地に無菌的に接種し、37°Cで18時間インキュベートした。細菌(10¹¹個)を4°Cで20分間6,000rpmでスピンドルし、PBSで2回洗浄し、30mM Tris-HCl(pH8.0)、4mM EDTA、1mM PMSF、20%スクロース、及び0.5mg/mLリゾチーム1mLに再懸濁させ、30°Cで3分間インキュベートし、次いで、最終濃度10mMになるようにMgCl₂を添加し、30°Cで1時間細菌をインキュベートした。細菌懸濁液を4°Cで10分間10,000rpmで遠心分離し、上清(即ち、周辺質タンパク質)100µLをC57BL/6マウスに経管栄養によって投与した。

10

【0130】

アピラーゼを保有する大腸菌由来の周辺質タンパク質で処理したマウスにおいて糞便IgAが増加した

未処理マウス又はアラビノース誘導性のpBAD28(空ベクター)若しくはpHND10(アピラーゼ保有ベクター)大腸菌形質転換体由来の周辺質タンパク質を15日間毎日経管栄養したマウスにおいて、糞便IgA濃度を測定した。

20

【0131】

図14は、未処理マウス又は非アピラーゼ含有組成物で処理したマウスと比較して、アピラーゼ含有組成物で処理したマウスの糞便IgAが増加したことを示す。これらデータは、アピラーゼが、(pBAD28形質転換体由来の周辺質タンパク質によってIgA濃度が変化しないことによって示される通り)胃腸内及び細菌担体の形態の免疫原の非存在下で、免疫学的に不活性な組成物内でIgA免疫応答を提供できることを示す。

【0132】

参照文献

[1] Proietti et al. (2014) *Immunity* 41, 789-801

[2] Kay et al. (2003) *Nature*. 424:251

[3] Gennaro (2000) *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*. 20th edition, ISBN: 0683306472.

[4] Hapfelmeier et al., (2010)

[5] Atarashi, K. et al. (2008) *Nature* 455, 808-812

[6] Iwase, T. et al. (2010) *J Clin Microbiol* 48, 1949-1951

[7] Maurice, C. F. & Turnbaugh, P. J. (2013) *Methods in enzymology* 531, 91-107

[8] Scribano, D. et al. (2014) *PloS one* 9, e90230

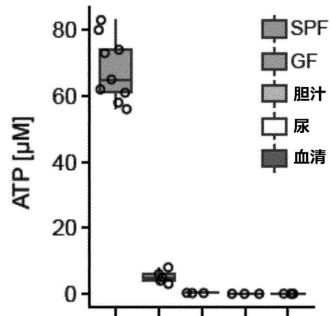
[9] Santapaola, D. et al. (2006) *Journal of bacteriology* 188, 1620-1627

[10] Hoiseth, S. K. and Stocker, B. A. (1981) *Nature* 291: 238-239

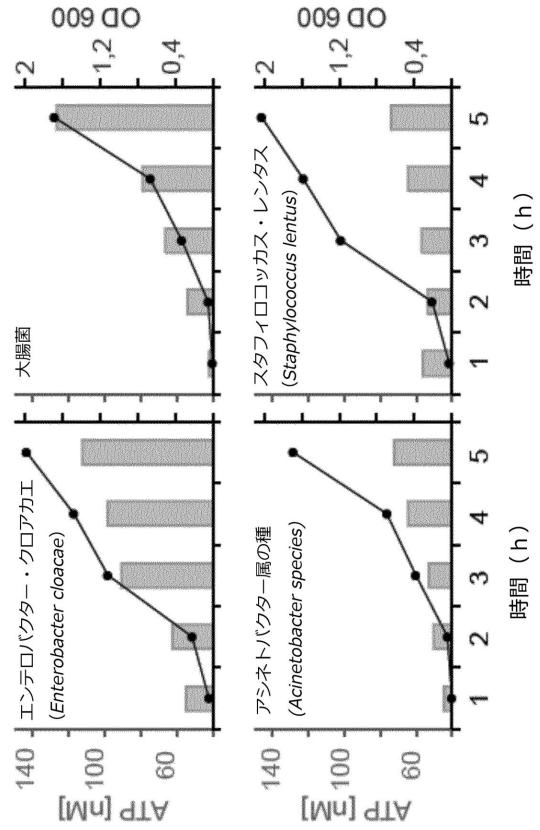
30

40

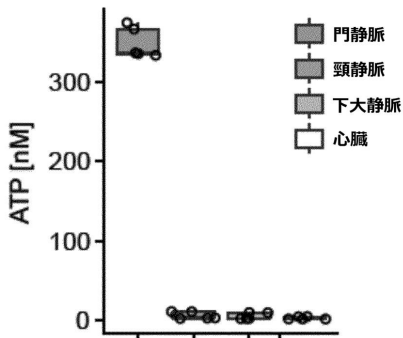
【図 1 a】



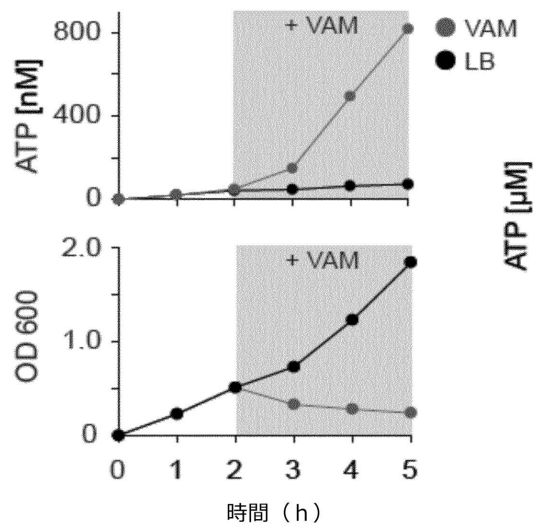
【図 1 b】



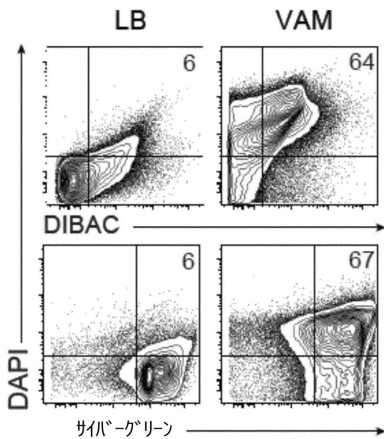
【図 1 c】



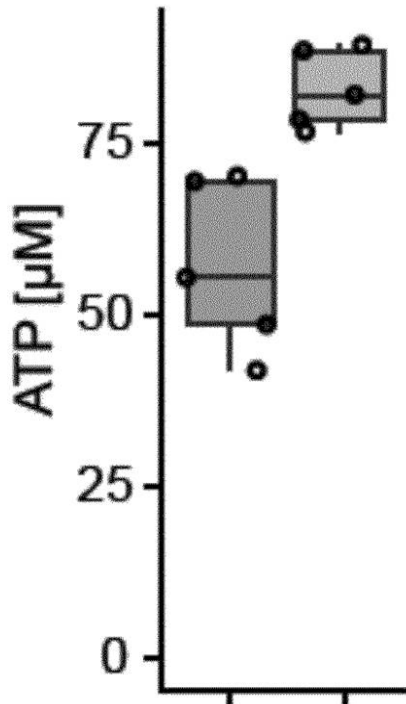
【図 1 e】



【図 1 d】

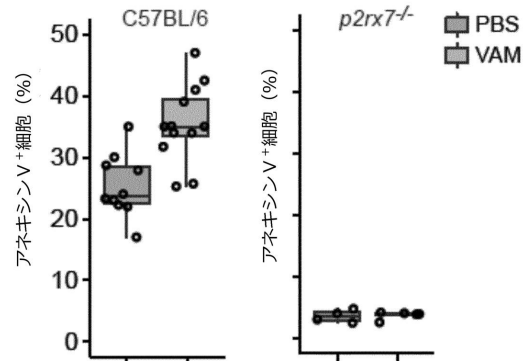


【 図 1 f 】

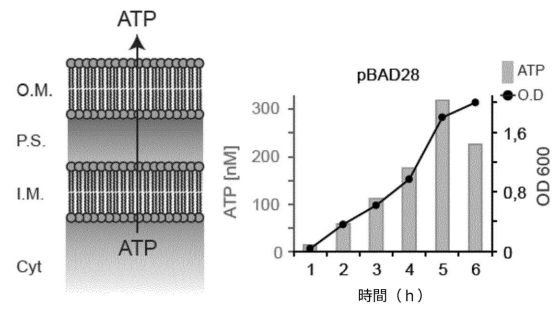


【 図 1 g 】

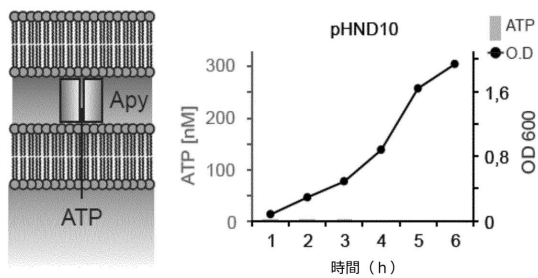
CD3⁺CD4⁺CXCR5⁺ICOS⁺にゲートをかけた



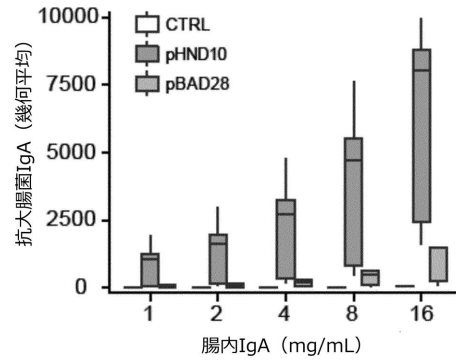
【 図 2 a 】



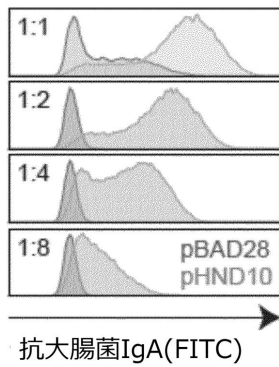
【 図 2 b 】



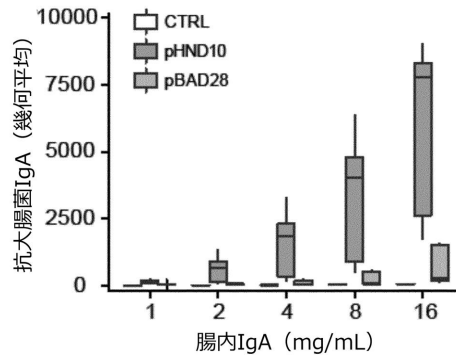
【 図 2 d 】



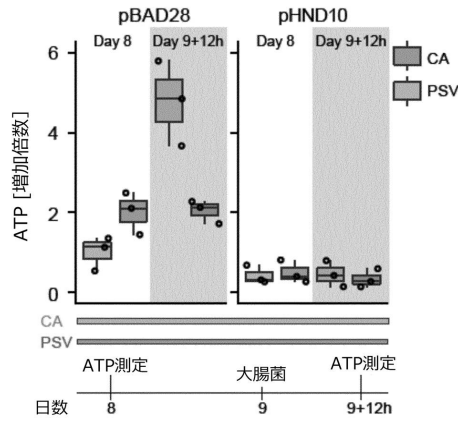
【 図 2 c 】



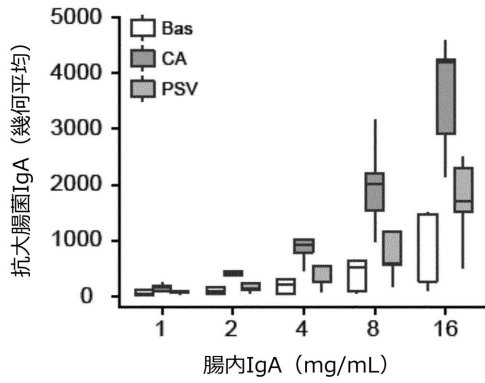
【 図 2 e 】



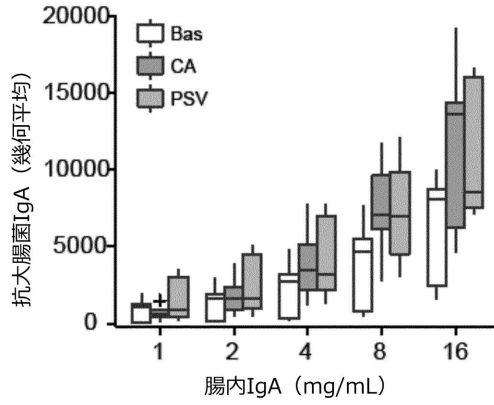
【 図 2 f 】



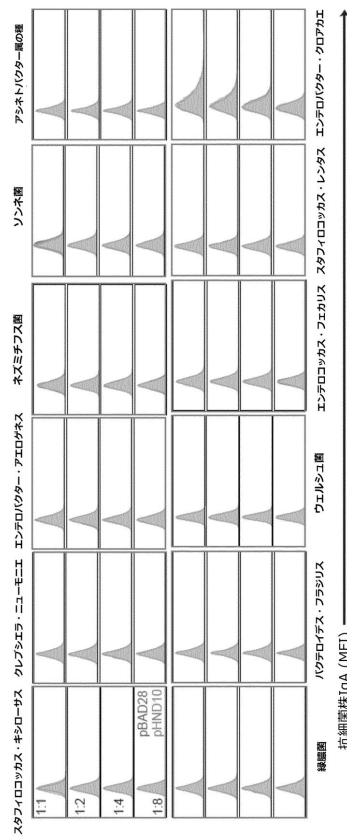
【 図 2 g 】



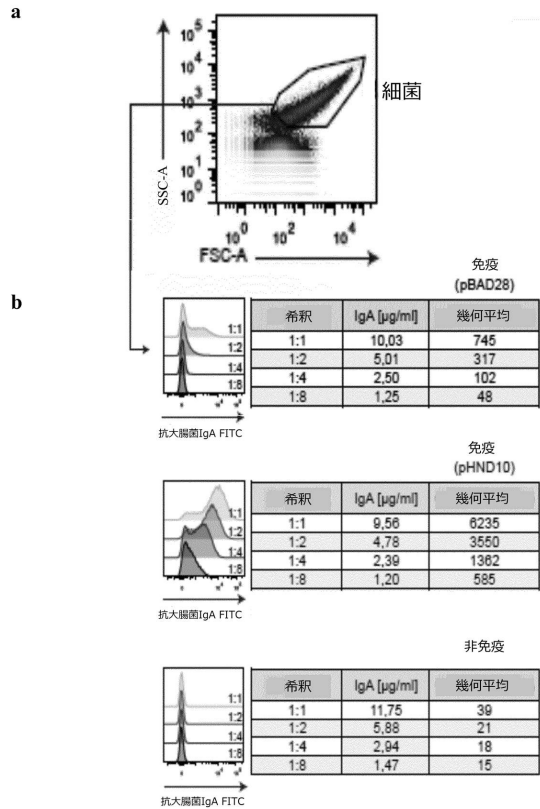
【 図 2 h 】



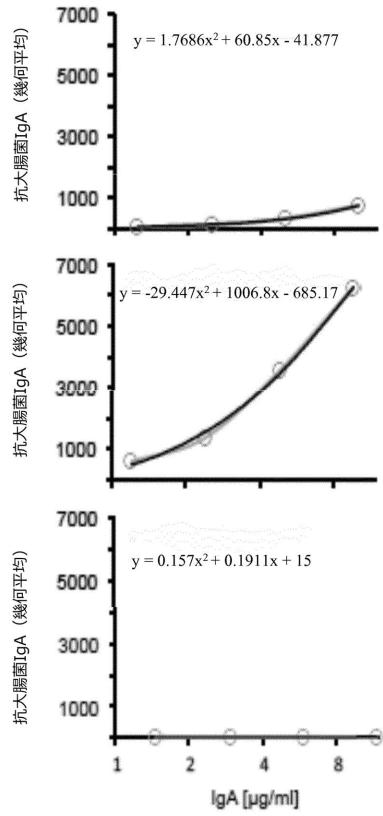
【 図 2 i 】



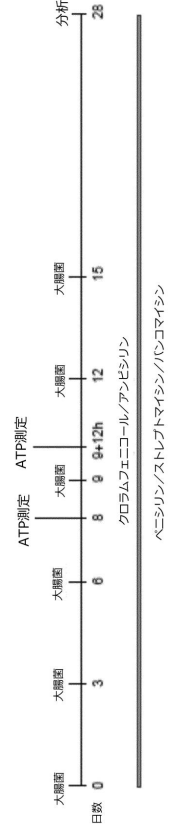
【 図 3 a b 】



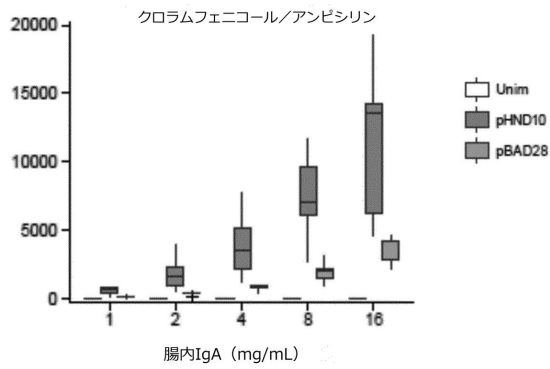
【 図 3 c 】



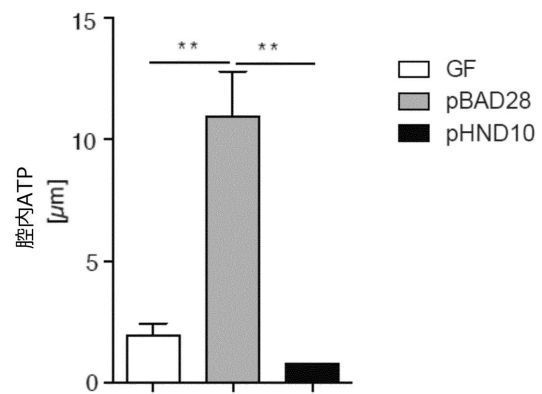
【 図 3 d 】



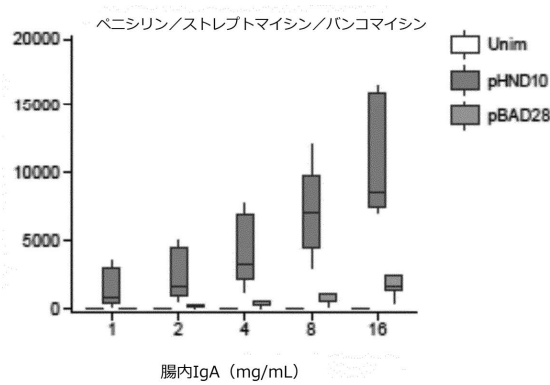
【 図 3 e 】



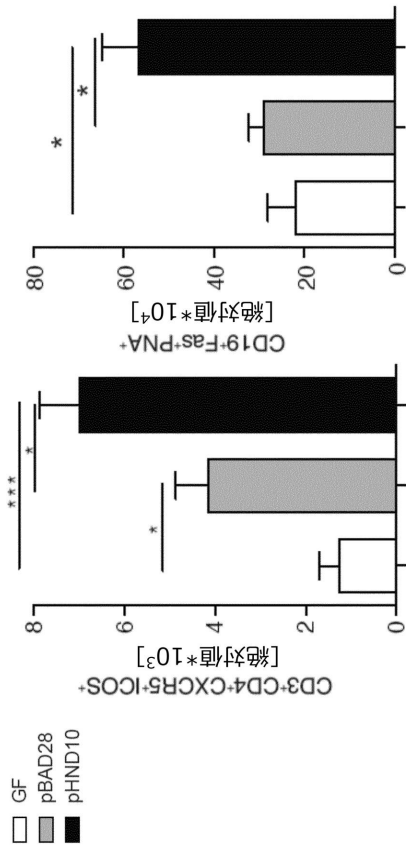
【 図 4 】



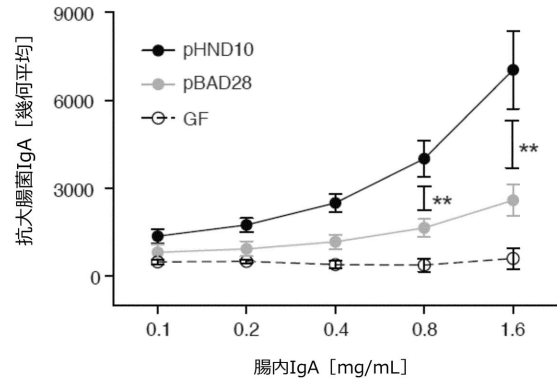
【 図 3 f 】



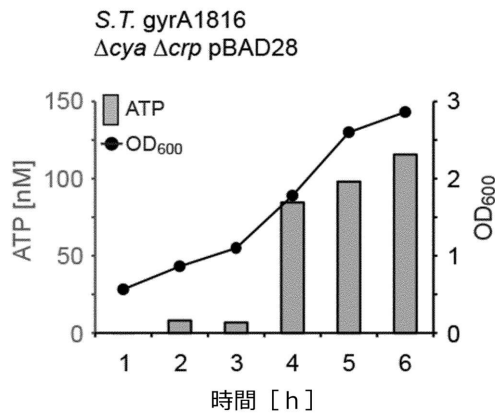
【 図 5 】



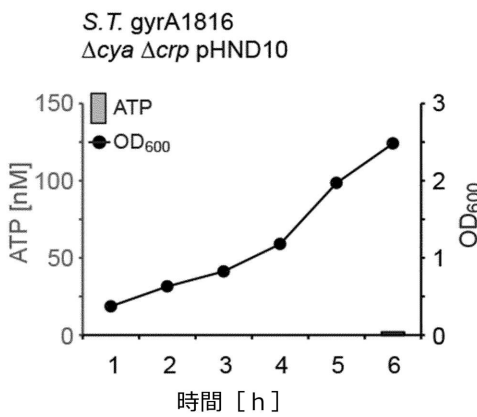
【 図 6 】



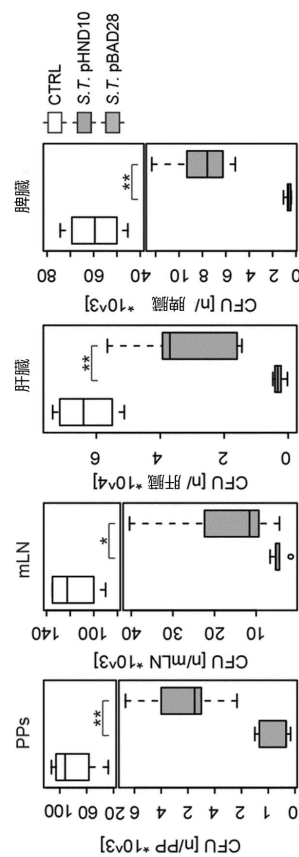
【 図 7 A 】



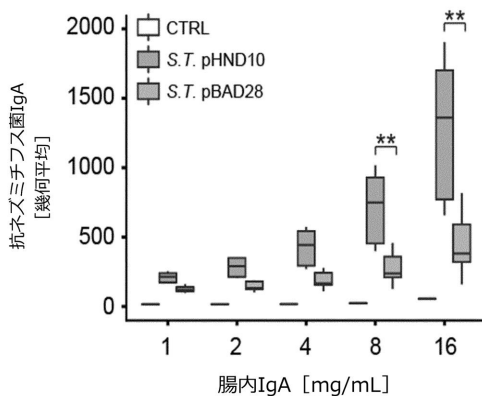
【 図 7 B 】



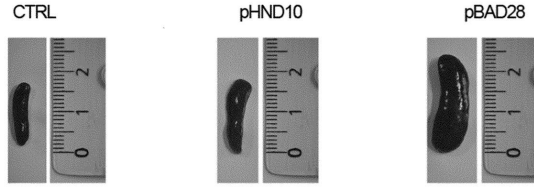
【 図 9 】



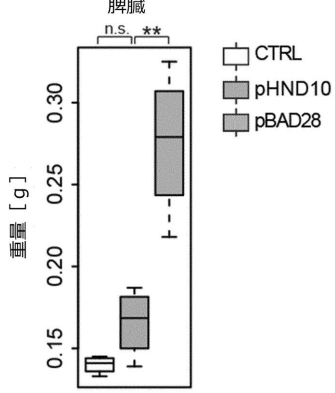
【 図 8 】



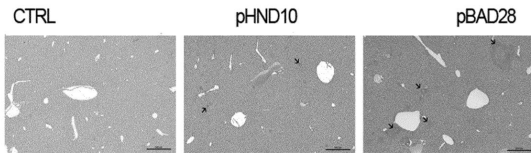
【図 1 0 a】



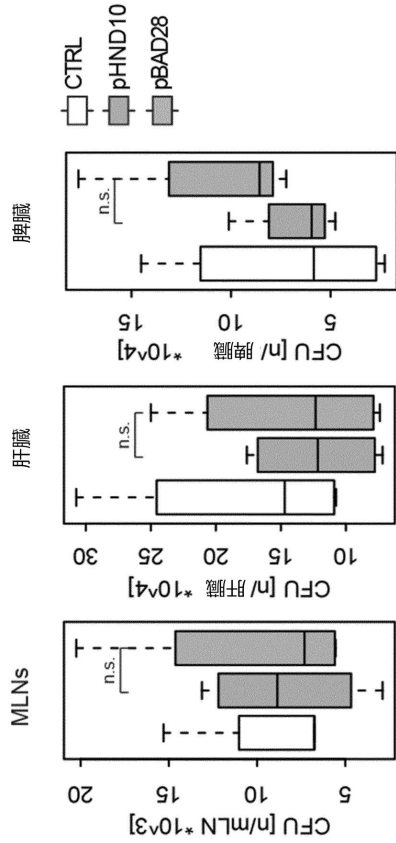
【図 1 0 b】



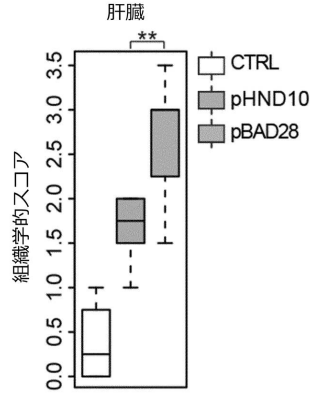
【図 1 1 a】



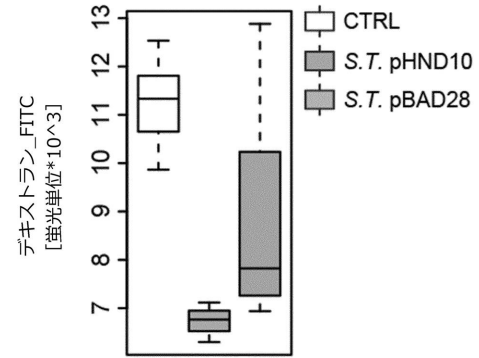
【図 1 3】



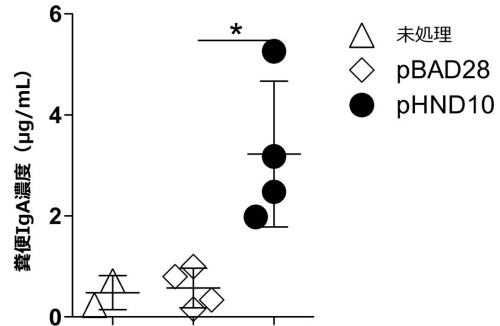
【図 1 1 b】



【図 1 2】



【図 1 4】



【配列表】

0006873151000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
A 6 1 K 9/51 (2006.01)		A 6 1 K 9/51
A 6 1 K 39/108 (2006.01)		A 6 1 K 39/108
A 6 1 K 39/112 (2006.01)		A 6 1 K 39/112
A 6 1 K 45/00 (2006.01)		A 6 1 K 45/00

(72)発明者 ファビオ・グラッシ
 スイス連邦 6500 ベリンツォーナ ヴィア ベルソッジョルノ 1

(72)発明者 ミケーレ・プロイエッティ
 イタリア共和国 01100 ヴィテルボ ヴィア モンティ チミニ 75

審査官 深草 亜子

(56)参考文献 国際公開第2014/052848(WO,A1)
 国際公開第2014/026078(WO,A1)
 特表2013-540698(JP,A)
 IMMUNITY, 米国, 2014年11月, VOL:41, NR:5, PAGE(S):789 - 801, URL, <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2014.10.010>

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A 6 1 K 3 9 / 0 0 - 3 9 / 4 4
 C A / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S / W P I D S (S T N)