

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2012-522522

(P2012-522522A)

(43) 公表日 平成24年9月27日(2012.9.27)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
C 12 N 15/09 (2006.01)	C 12 N 15/00 Z N A A	4 B 0 2 4
C 07 K 14/245 (2006.01)	C 07 K 14/245	4 B 0 6 4
C 07 K 19/00 (2006.01)	C 07 K 19/00	4 B 0 6 5
C 12 N 1/15 (2006.01)	C 12 N 1/15	4 C 0 8 4
C 12 N 1/19 (2006.01)	C 12 N 1/19	4 C 0 8 5

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 72 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2012-503839 (P2012-503839)	(71) 出願人	511242410 ユニバーシティ オヴ サスカチュワン UNIVERSITY OF SASKA TCHEWAN カナダ国 エヌエヌ 5イー3 サスカ チュワン サスクトゥーン ヴェテリナリ ーロード 120
(86) (22) 出願日	平成22年4月6日 (2010.4.6)	(71) 出願人	511242432 バイオニッシュ ライフ サイエンシズ イ ンク. Bioniche Life Sciences Inc.
(85) 翻訳文提出日	平成23年11月28日 (2011.11.28)	(71) 出願人	カナダ国 ケイ8エヌ 1イー2 オンタ リオ ベルヴィル ダンダストリートイ ースト 231
(86) 國際出願番号	PCT/CA2010/000516		
(87) 國際公開番号	W02010/115278		
(87) 國際公開日	平成22年10月14日 (2010.10.14)		
(31) 優先権主張番号	61/211, 989		
(32) 優先日	平成21年4月6日 (2009.4.6)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		
(31) 優先権主張番号	61/216, 608		
(32) 優先日	平成21年5月19日 (2009.5.19)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】志賀毒素産生大腸菌感染を処置及び予防するための方法並びに組成物

(57) 【要約】

志賀毒素産生大腸菌 (S T E C) 抗原に対する免疫応答を刺激するための組成物及び方法が開示される。前記組成物は、1を超えるS T E Cセロタイプ由来の免疫原性S T E Cタンパク質の1を超えるエピトープを含む複数エピトープ融合タンパク質を含む。追加の組成物は、少なくとも2つの精製されたS T E Cタンパク質を含み、前記S T E Cタンパク質は、完全長S T E Cタンパク質、その免疫原性断片又はバリアントから選択され、前記S T E Cタンパク質のうちの少なくとも1つは、S T E C O 1 5 7 及び少なくとも1つの他のS T E Cセロタイプと反応する抗体を生み出す。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

1を超える志賀毒素産生大腸菌（S T E C）セロタイプ由来の免疫原性S T E Cタンパク質の1を超えるエピトープを含む、複数エピトープ融合タンパク質。

【請求項 2】

S T E Cセロタイプが、S T E C O 1 5 7、S T E C O 2 6、S T E C O 1 0 3及びS T E C O 1 1 1から選択される、請求項1に記載の複数エピトープ融合タンパク質。

【請求項 3】

S T E Cセロタイプが、S T E C O 1 5 7 : H 7、S T E C O 2 6 : H 1 1、S T E C O 1 0 3 : H 2 及びS T E C O 1 1 1 : N Mから選択される、請求項2に記載の複数エピトープ融合タンパク質。 10

【請求項 4】

少なくとも1つのエピトープがS T E C O 1 5 7 : H 7 Tirに由来する、請求項1～3のいずれかに記載の複数エピトープ融合タンパク質。

【請求項 5】

エピトープがS T E C O 1 5 7 : H 7 Tir、S T E C O 2 6 : H 1 1 Tir、S T E C O 1 0 3 : H 2 Tir及びS T E C O 1 1 1 : N M Tir由来のエピトープを含む、請求項4に記載の複数エピトープ融合タンパク質。 20

【請求項 6】

タンパク質が、図5Bに示すアミノ酸の配列に少なくとも80%同一のアミノ酸の配列を含む、請求項5に記載の複数エピトープ融合タンパク質。

【請求項 7】

タンパク質が、図5Bに示すアミノ酸配列を含む、請求項6に記載の複数エピトープ融合タンパク質。

【請求項 8】

担体分子に連結されている、請求項1～7のいずれかに記載の複数エピトープ融合タンパク質。

【請求項 9】

担体分子がRTX毒素である、請求項8に記載の複数エピトープ融合タンパク質。 30

【請求項 10】

担体分子がロイコトキシンポリペプチドである、請求項9に記載の複数エピトープ融合タンパク質。

【請求項 11】

ロイコトキシンポリペプチドがLKT352である、請求項10に記載の複数エピトープ融合タンパク質。

【請求項 12】

タンパク質が、図6Bに示すアミノ酸の配列に少なくとも80%同一のアミノ酸の配列を含む、請求項11に記載の複数エピトープ融合タンパク質。

【請求項 13】

タンパク質が、図6Bに示すアミノ酸配列を含む、請求項12に記載の複数エピトープ融合タンパク質。

【請求項 14】

請求項1～13のいずれかに記載の複数エピトープ融合タンパク質及び薬学的に許容されるビヒクルを含む組成物。

【請求項 15】

請求項1～13のいずれかに記載の複数エピトープ融合タンパク質を薬学的に許容されるビヒクルと組み合わせることを含む、組成物を作製する方法。

【請求項 16】

請求項1～13のいずれかに記載の複数エピトープ融合タンパク質をコードするコード 50

配列を含むポリヌクレオチド。

【請求項 17】

(a) 請求項16に記載のポリヌクレオチド；及び

(b) 前記ポリヌクレオチドに作動可能に連結し、それによりコード配列が宿主細胞において転写され翻訳されることが可能である制御エレメントを含む組換えベクター。

【請求項 18】

請求項17に記載の組換えベクターで形質転換される宿主細胞。

【請求項 19】

(a) 請求項18に記載の宿主細胞の集団を提供すること、及び

(b) 組換えベクター中に存在するコード配列によりコードされるタンパク質が発現される条件下で、前記細胞の集団を培養することを含む、複数エピトープ融合タンパク質を作製する方法。

【請求項 20】

請求項1～13のいずれかに記載の複数エピトープ融合タンパク質に特異的な抗体。

【請求項 21】

ポリクローナルである、請求項20に記載の抗体。

【請求項 22】

モノクローナルである、請求項20に記載の抗体。

【請求項 23】

(a) 生体試料を提供すること、

(b) STEC抗体が、前記生体試料中に存在するときは、前記STEC抗体が複数エピトープ融合タンパク質に結合して抗体／抗原複合体を形成することを可能にする条件下で、前記生体試料を、請求項1～13のいずれかに記載の複数エピトープ融合タンパク質と反応させること、及び

(c) 前記複合体の存在又は非存在を検出し、それにより前記試料中におけるSTEC抗体の存在又は非存在を検出することを含む、生体試料においてSTEC抗体を検出する方法。

【請求項 24】

請求項1～13のいずれかに記載の複数エピトープ融合タンパク質及び免疫診断試験を行うための使用説明書を含む、STEC感染を検出するための免疫診断試験キット。

【請求項 25】

少なくとも2つの精製された免疫原性志賀毒素產生大腸菌(STEC)タンパク質を含み、前記STECタンパク質が、完全長STECタンパク質、その免疫原性断片及びバリアントから選択され、前記STECタンパク質のうちの少なくとも1つがSTEC O157及び少なくとも1つの他のSTECセロタイプと反応する抗体を產生する、組成物。

【請求項 26】

STECタンパク質のうちの少なくとも1つが、STEC O157及び少なくとも2つの他のSTECセロタイプと反応する抗体を產生する、請求項25に記載の組成物。

【請求項 27】

STECタンパク質のうちの少なくとも1つが、STEC O157及び少なくとも3つの他のSTECセロタイプと反応する抗体を產生する、請求項26に記載の組成物。

【請求項 28】

Tir、EspA、EspB、EspD、EspRI、NleA、TccP、EspG、EspF、NleE、NleA、NleH及びNleH2-1から選択される1を超えるSTECタンパク質を含む、請求項25～27のいずれかに記載の組成物。

【請求項 29】

STECタンパク質がSTEC O157:H7由来である、請求項28に記載の組成物。

【請求項 30】

10

20

30

40

50

請求項 1 ~ 13 のいずれかに記載の複数エピトープ融合タンパク質をさらに含む、請求項 25 ~ 29 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 31】

免疫アジュvantをさらに含む、請求項 25 ~ 30 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 32】

哺乳動物に請求項 14 及び 25 ~ 31 のいずれかに記載の治療有効量の組成物を投与することを含む、哺乳動物において S T E C 抗原に対して免疫応答を誘発するための方法。

【請求項 33】

哺乳動物が反芻動物である、請求項 32 に記載の方法。

【請求項 34】

反芻動物がウシ対象である、請求項 33 に記載の方法。

【請求項 35】

反芻動物に、請求項 14 及び 25 ~ 31 のいずれかに記載の治療有効量の組成物を投与することを含む、反芻動物における S T E C のコロニー形成を低減するための方法。

【請求項 36】

反芻動物に、請求項 14 及び 25 ~ 31 のいずれかに記載の治療有効量の組成物を投与することを含む、反芻動物からの S T E C 排出を低減するための方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、35 U . S . C . § 119 (e) (1) の下で、2009年4月6日に提出された米国仮出願番号第 61 / 211, 989 号及び 2009 年 5 月 19 日に提出された米国仮出願番号第 61 / 216, 608 号の利益を主張する。この 2 つの仮出願は参照によりその全体を本明細書に組み込まれている。

【0002】

本発明は、志賀毒素産生大腸菌 (S T E C , Shiga toxin-producing Escherichia coli) に対する哺乳動物における免疫応答を誘発するための組成物及び方法に関する。特に、本発明は、哺乳動物の S T E C 疾患及び S T E C 定着を処置及び予防するための、1 を超える S T E C セロタイプ由来のエフェクタータンパク質由来の複数のエピトープ、及び / 又は前記セロタイプ由来の構造タンパク質由来の複数のエピトープ、並びに 1 を超えるセロタイプと交差反応性であるエピトープの使用に関する。

【背景技術】

【0003】

志賀毒素産生大腸菌 (S T E C) は腸管出血性大腸菌 (E H E C , Enterohemorrhagic E . coli) 及びベロ毒素産生大腸菌 (V T E C , vertotoxigenic E . coli) とも呼ばれるが、ヒトにおいて下痢、出血性大腸炎、溶血性尿毒症症候群 (H U S , hemolytic uremic syndrome) 、腎不全及び死を引き起こす病原菌である。ウシは多くの S T E C セロタイプの主要な保有宿主であり、食物生産品又は環境の汚染 (contamination) を通して大半の疾患の発生に関係してきた。とりわけ、セロタイプ O 157、O 26、O 103、O 111 を含む、多くの S T E C セロタイプはヒトにおいて疾患を引き起こすことができる。

【0004】

S T E C 生物は、転座インチミン受容体、すなわち T i r を含むタイプ III 分泌装置 (T T S S , type III secretion system) を介していくつかの病原性決定基が宿主細胞に送達される独特の機構によりウシ及びヒトの大腸にコロニーを形成する (DeVinney et al ., Infect. Immun. (1999) 67:2389)。特に、これらの病原菌は T i r を腸細胞膜内に送達することができる病原性決定基である E s p A、E s p B 及び E s p D を分泌する。T i r は宿主細胞膜に組み込まれ、そこで細菌外膜タンパク質であるインチミンに対する受容体としての働きをする。T i r - インチミン結合は S T E C を腸細胞表面に付着させ、接着 S T E C 下におけるアクチン細胞骨格再編成を誘発し、これがペデスタル形成をもたらす。E s p A、E s p B、T i r 及びインチミンは、それぞれ S T E C による腸への定着

10

20

30

40

50

の成功のためには不可欠である。

【0005】

S T E C は反芻動物及び他の哺乳動物の腸に定着するが、一般にはこれらの動物に顯性疾患を引き起こすことはない。しかし、S T E C セロタイプによる食肉及び水の汚染は、米国及びカナダでは毎年、ヒトにおいて約 50,000 症例の S T E C 感染の原因となり、約 500 人が亡くなっている。1994 年、ヒトにおける S T E C 感染に伴う経済的損失は 50 億ドルを超えると見積もられていた。

【0006】

ウシ、乳牛及びヒツジを含むがこれらに限定されない健康な反芻動物は、S T E C セロタイプに感染するおそれがある。実際、U S D A 報告書では、最大 50% のウシがその生涯の一時期に S T E C 保菌体であり、したがって、その排泄物に S T E C を排出することが示されている。10

【0007】

畜殺されたウシはまとめて加工されており、ヒトに感染するのに必要な S T E C の数は小さい（10 ~ 100）ため、健康なウシにおける S T E C 定着は依然深刻な健康問題である。この問題に取り組むため、畜殺時に S T E C を検出しその後 S T E C を死滅させるための改良された方法、腸内 S T E C の数を低減するためのウシ食餌の変更及び S T E C 定着を妨げるための動物の免疫化に研究は集中してきた（Zacek D. Animal Health and Veterinary Vaccines, Alberta Research Counsel, Edmonton, Canada, 1997）。最近、組換え E s p A（国際公開第 97 / 40063 号パンフレット）、組換え T I R（国際公開第 99 / 24576 号パンフレット）、組換え E s p B 及び組換えインチミン（Li et al., Infec. Immun. (2000) 68:5090-5095）を含む S T E C O 157 : H 7 タンパク質の組換え產生及び使用が記載されている。20

【0008】

Babiuk et al., Microbial Pathogen. (2008) 45:7-11 は、S T E C セロタイプ O 157 : H 7 由来のタイプ III 分泌タンパク質（T T S P, type III secreted proteins）を使用するマウスモデルの皮下及び鼻腔免疫化を記載している。米国特許第 7,300,659 号明細書は、S T E C の定着を低減するための S T E C 抗原を含有する細胞培養上清の使用を記載している。Potter et al., Vaccine (2004) 22:362-369 は、T T S P を用いたワクチン接種に続くウシによる S T E C セロタイプ O 157 : H 7 の排出の減少を報告している。Asper et al., Vaccine (2007) 25:8262-8269 は、セロタイプ O 26 : H 11、O 103 : H 2、O 111 : NM 及び O 157 : H 7 の T T S P の交差反応性を調べ、これらのセロタイプのそれから產生される T T S P を用いてウシをワクチン接種した。著者は、該動物が相同セロタイプの T T S P に対する抗体に良好に応答することを見出しつたが、その他のセロタイプに対しては限定された交差反応性を観察した。セロタイプ O 157 : H 7 の T i r 及び E s p A に対して交差反応性は観察されなかった。30

【先行技術文献】

【特許文献】

【0009】

【特許文献 1】国際公開第 97 / 40063 号パンフレット

【特許文献 2】国際公開第 99 / 24576 号パンフレット

【特許文献 3】米国特許第 7,300,659 号明細書

【非特許文献】

【0010】

【非特許文献 1】DeVinney et al., Infect. Immun. (1999) 67:2389

【非特許文献 2】Zacek D. Animal Health and Veterinary Vaccines, Alberta Research Counsel, Edmonton, Canada, 1997

【非特許文献 3】Li et al., Infec. Immun. (2000) 68:5090-5095

【非特許文献 4】Babiuk et al., Microbial Pathogen. (2008) 45:7-11

【非特許文献 5】Potter et al., Vaccine (2004) 22:362-369

10

20

30

40

50

【非特許文献 6】Asper et al., Vaccine(2007)25:8262-8269

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

上に述べたことにもかかわらず、S T E C 疾患を処置及び予防するため、並びに S T E C 汚染食肉及び水に伴う健康問題の発生を減らすことを目的に、哺乳動物の S T E C 定着を低減するための新たな組成物及び方法の必要性が依然として存在する。

【0012】

本発明は、そのような組成物及び方法を提供することにより上記の必要性を満たす。特に、本発明の方法は、1又は2以上のS T E C セロタイプ由来の1又は2以上のS T E C 抗原に対する免疫応答を誘発し、それによってS T E C 感染を処置及び／若しくは予防するため、並びに／又は哺乳動物におけるS T E C 定着を低減するために、1又は2以上のS T E C セロタイプ由来のエピトープの組合せ、及び1を超えるS T E C セロタイプと交差反応性の抗体を産生するエピトープを含む組成物を利用する。1を超えるセロタイプ由来の複数エピトープ、又は他のS T E C セロタイプと交差反応性の抗体を産生する少なくとも1セロタイプ由来のS T E C 抗原を提供することにより、S T E C により引き起こされる疾患に対する広範にわたる予防を実現することが可能である。該組成物は同時投与されるアジュバントと一緒に又はアジュバントなしで送達することが可能である。

【0013】

したがって、S T E C 抗原に対する免疫応答を刺激するのに効果的なワクチンを提供し、それによって哺乳動物におけるS T E C 疾患を処置及び／又は予防することが本発明の目的である。

【0014】

別の目的は、反芻動物又は他の哺乳動物のS T E C 定着を低減、予防及び／又は除去するのに効果的なワクチンを提供することである。

【0015】

別の目的は、環境にS T E C を排出する動物の数を低減することである。

【0016】

別の目的は、感染動物により環境に排出されるS T E C の数を低減することである。

【0017】

別の目的は、S T E C が感染動物により環境に排出される時間を低減することである。

【0018】

別の目的は、環境のS T E C 汚染を低減することである。

【0019】

別の目的は、食肉及び／又は水のS T E C 汚染を低減することである。

【0020】

別の目的は、ヒトにおけるS T E C 感染を処置、予防及び／又は低減することである。

【0021】

別の目的は、他の生物学的抗S T E C 剤の補助剤として効果的なワクチンを提供することである。

【0022】

別の目的は、化学的抗S T E C 剤の補助剤として効果的なワクチンを提供することである。

【0023】

別の目的は、生物学的に操作された抗S T E C 剤の補助剤として効果的なワクチンを提供することである。

【0024】

別の目的は、核酸ベースの抗S T E C 剤の補助剤として効果的なワクチンを提供することである。

【0025】

10

20

30

40

50

別の目的は、組換えタンパク質抗S T E C 剤の補助剤として効果的なワクチンを提供することである。

【0026】

別の目的は、反芻動物のS T E C 定着を低減するのに効果的なワクチン接種スケジュールを提供することである。

【0027】

別の目的は、反芻動物により排出されるS T E C を低減するのに効果的なワクチン接種スケジュールを提供することである。

【0028】

別の目的は、ウシにおけるS T E C O 1 5 7 の定着、例えばO 1 5 7 : H 7 及び / 又はO 1 5 7 : NM の定着の他にも、O 2 6 : H 1 1 などのS T E C O 2 6 の定着、O 1 0 3 : H 2 などのS T E C O 1 0 3 の定着、O 1 1 1 : NM などのS T E C O 1 1 1 の定着、S T E C 1 2 1 : H 1 9 、S T E C O 1 4 5 : NM 、S T E C O 9 1 : H 2 1 、S T E C O 1 0 4 : H 2 1 及び / 又はS T E C O 1 1 3 : H 2 1 などの定着、しかしこれらに限定されないS T E C セロ病原型A 及びB の他のメンバーの定着などを予防、低減又は除去するのに効果的なワクチンを提供することである。 10

【0029】

別の目的は、環境にS T E C を排出するウシの数を低減することであり、S T E C の排出としては、例えばO 1 5 7 : H 7 及び / 又はO 1 5 7 : NM の排出の他にも、O 2 6 : H 1 1 などのS T E C O 2 6 の排出、O 1 0 3 : H 2 などのS T E C O 1 0 3 の排出、O 1 1 1 : NM などのS T E C O 1 1 1 の排出、S T E C 1 2 1 : H 1 9 、S T E C O 1 4 5 : NM 、S T E C O 9 1 : H 2 1 、S T E C O 1 0 4 : H 2 1 及び / 又はS T E C O 1 1 3 : H 2 1 などの排出、しかしこれらに限定されないS T E C セロ病原型A 及びB の他のメンバーの排出などが挙げられる。 20

【0030】

別の目的は、感染ウシにより環境に排出されるS T E C の数を低減することであり、S T E C の排出としては、例えばO 1 5 7 : H 7 及び / 又はO 1 5 7 : NM の排出の他にも、O 2 6 : H 1 1 などのS T E C O 2 6 の排出、O 1 0 3 : H 2 などのS T E C O 1 0 3 の排出、O 1 1 1 : NM などのS T E C O 1 1 1 の排出、S T E C 1 2 1 : H 1 9 、S T E C O 1 4 5 : NM 、S T E C O 9 1 : H 2 1 、S T E C O 1 0 4 : H 2 1 及び / 又はS T E C O 1 1 3 : H 2 1 などの排出、しかしこれらに限定されないS T E C セロ病原型A 及びB の他のメンバーの排出などが挙げられる。 30

【0031】

別の目的は、感染ウシによりS T E C が環境に排出される時間を低減することであり、S T E C の排出としては、例えばO 1 5 7 : H 7 及び / 又はO 1 5 7 : NM の排出の他にも、O 2 6 : H 1 1 などのS T E C O 2 6 の排出、O 1 0 3 : H 2 などのS T E C O 1 0 3 の排出、O 1 1 1 : NM などのS T E C O 1 1 1 の排出、S T E C 1 2 1 : H 1 9 、S T E C O 1 4 5 : NM 、S T E C O 9 1 : H 2 1 、S T E C O 1 0 4 : H 2 1 及び / 又はS T E C O 1 1 3 : H 2 1 などの排出、しかしこれらに限定されないS T E C セロ病原型A 及びB の他のメンバーの排出などが挙げられる。 40

【0032】

別の目的は、他の抗S T E C O 1 5 7 、O 2 6 、O 1 0 3 及び / 又はO 1 1 1 剤の他にも、S T E C 1 2 1 、S T E C O 1 4 5 、S T E C O 9 1 、S T E C O 1 0 4 及び / 又はS T E C O 1 1 3 などの、しかしこれらに限定されないS T E C セロ病原型A 及びB の他のメンバーの補助剤として効果的なワクチンを提供することである。

【0033】

別の目的は、ウシにおけるS T E C O 1 5 7 、O 2 6 、O 1 0 3 及び / 又はO 1 1 1 定着の他にも、ウシにおけるS T E C 1 2 1 、S T E C O 1 4 5 、S T E C O 9 1 、S T E C O 1 0 4 及び / 又はS T E C O 1 1 3 などの定着、しかしこれらに限定されないS T E C セロ病原型A 及びB の他のメンバーによるウシにおける定着を低減するのに 50

効果的なワクチン接種スケジュールを提供することである。

【0034】

別の目的は、ウシによるS T E C O 1 5 7、O 2 6、O 1 0 3 及び / 又はO 1 1 1 排出の他にも、ウシによるS T E C 1 2 1、S T E C O 1 4 5、S T E C O 9 1、S T E C O 1 0 4 及び / 又はS T E C O 1 1 3などの排出、しかしこれらに限定されないS T E C セロ病原型A及びBの他のメンバーのウシによる排出を低減するのに効果的なワクチン接種スケジュールを提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0035】

したがって、一実施形態では、本発明は、1を超えるS T E C セロタイプ由来の免疫原性志賀毒素産生大腸菌(S T E C)タンパク質の1を超えるエピトープを含む複数エピトープ融合タンパク質を対象とする。ある種の実施形態では、S T E C セロタイプは、S T E C O 1 5 7 : H 7、S T E C O 2 6 : H 1 1、S T E C O 1 0 3 : H 2 又はS T E C O 1 1 1 : NMなどのS T E C O 1 5 7、S T E C O 2 6、S T E C O 1 0 3 及びS T E C O 1 1 1から選択される。

10

【0036】

追加の実施形態では、複数エピトープ融合タンパク質における少なくとも1つのエピトープはS T E C O 1 5 7 : H 7 Tir に由来する。追加の実施形態では、エピトープは、S T E C O 1 5 7 : H 7 Tir、S T E C O 2 6 : H 1 1 Tir、S T E C O 1 0 3 : H 2 Tir 及びS T E C O 1 1 1 : NM Tir 由来のエピトープを含む。

20

【0037】

さらに追加の実施形態では、複数エピトープ融合タンパク質は、図5Bに示すアミノ酸の配列に少なくとも90%同一のアミノ酸配列、又は図5Bに示すアミノ酸の配列に100%までも同一のアミノ酸配列などの、図5Bに示すアミノ酸の配列に少なくとも80%同一のアミノ酸配列を含む。

【0038】

上記の実施形態のうちのいずれにおいても、複数エピトープ融合タンパク質は、R T X 毒素などの担体分子に連結されることが可能である。ある種の実施形態では、R T X 毒素は、L K T 3 5 2などのロイコトキシンポリペプチドである。

30

【0039】

ある種の実施形態では、タンパク質は、図6Bに示すアミノ酸の配列に少なくとも90%同一のアミノ酸配列、又は図6Bに示すアミノ酸の配列に100%までも同一のアミノ酸配列などの、図6Bに示すアミノ酸の配列に少なくとも80%同一のアミノ酸配列を含む。

【0040】

追加の実施形態では、本発明は、上記の実施形態のうちのいずれか1つの複数エピトープ融合タンパク質及び薬学的に許容されるビヒクルを含む組成物を対象とする。

【0041】

追加の実施形態では、本発明は、上の複数エピトープ融合タンパク質のうちのいずれか1つと薬学的に許容されるビヒクルを組み合わせることを含む、組成物を作製する方法を対象とする。

40

【0042】

追加の実施形態では、本発明は、上の複数エピトープ融合タンパク質のうちのいずれか1つをコードするコード配列を含むポリヌクレオチドと、該ポリヌクレオチド及び該ポリヌクレオチドに作動可能に連結されている制御エレメントを含み、前記コード配列が宿主細胞において転写され翻訳されることができ可能な組換えベクターとを対象とする。追加の実施形態では、本発明は、該組換えベクターで形質転換されている宿主細胞と、該宿主細胞の集団を提供し、該組換えベクター中に存在するコード配列によりコードされるタンパク質が発現される条件下で前記細胞集団を培養することを含む、複数エピトープ融合タンパ

50

ク質を作製する方法を対象とする。

【0043】

追加の実施形態では、本発明は、ポリクローナル又はモノクローナル抗体などの抗体、しかしこれらに限定されない、上の複数エピトープ融合タンパク質のうちのいずれか1つに特異的な抗体を対象とする。

【0044】

追加の実施形態では、本発明は、生体試料を提供し；S T E C抗体が、該生体試料中に存在するときは、複数エピトープ融合タンパク質に結合して抗体／抗原複合体を形成することを可能にする条件下で、該生体試料を、上の複数エピトープ融合タンパク質のうちのいずれか1つと反応させ；該複合体の存在又は非存在を検出し、それによって試料中のS T E C抗体の存在又は非存在を検出することを含む、生体試料中のS T E C抗体を検出すする方法を対象とする。

10

【0045】

追加の実施形態では、本発明は、上の複数エピトープ融合タンパク質のうちのいずれか1つ及び免疫診断試験を行うための使用説明書を含む、S T E C感染を検出するための免疫診断試験キットを対象とする。

【0046】

他の実施形態では、本発明は、少なくとも2つの精製された免疫原性志賀毒素産生大腸菌（S T E C）タンパク質を含み、該S T E Cタンパク質が、完全長S T E Cタンパク質、その免疫原性断片及びバリアントから選択され、該S T E Cタンパク質のうちの少なくとも1つがS T E C O 1 5 7及び少なくとも1つの他のS T E Cセロタイプと反応する抗体を產生する、組成物を対象とする。ある種の実施形態では、S T E Cタンパク質のうちの少なくとも1つが、S T E C O 1 5 7並びに少なくとも2つ及び／若しくは3つ又はそれ以上の他のS T E Cセロタイプと反応する抗体を產生する。

20

【0047】

追加の実施形態では、組成物は、T i r、E s p A、E s p B、E s p D、N l e A、T c c p、E s p G、N l e E及びN l e Hから選択される1を超えるS T E Cを含む。ある種の実施形態では、S T E Cタンパク質はS T E C O 1 5 7：H 7由来である。

【0048】

追加の実施形態では、上記組成物は上記の複数エピトープ融合タンパク質のうちのいずれか1つをさらに含む。

30

【0049】

特定の実施形態では、上記組成物は免疫アジュバントを含む。

【0050】

追加の実施形態では、本発明は、治療的有効量の上記組成物のうちのいずれか1つを哺乳動物に投与することを含む、哺乳動物においてS T E C抗原に対して免疫応答を誘発するための方法を対象とする。特定の実施形態では、哺乳動物はウシ対象などの反芻動物である。

【0051】

さらに追加の実施形態では、本発明は、治療的有効量の上記組成物のうちのいずれか1つを反芻動物に投与することを含む、反芻動物においてS T E Cの定着を低減するための方法及び／又は反芻動物からのS T E Cの排出を低減するための方法を対象とする。

40

【図面の簡単な説明】

【0052】

【図1A - 1B】代表的S T E C O 1 5 7：H 7 T i rのそれぞれヌクレオチド配列及びアミノ酸配列（配列番号44及び45）を示す図である。

【図2A - 2B】代表的S T E C O 2 6：H 1 1 T i rのそれぞれヌクレオチド配列及びアミノ酸配列（配列番号46及び47）を示す図である。

【図3A - 3B】代表的S T E C O 1 0 3：H 2 T i rのそれぞれヌクレオチド配列及びアミノ酸配列（配列番号46及び47）を示す図である。

50

【図 4 A - 4 B】代表的 S T E C O 1 1 1 : N M T i r のそれぞれヌクレオチド配列及びアミノ酸配列（配列番号 49 及び 50）を示す図である。

【図 5 A - 5 B】代表的キメラ T i r 構築物のそれぞれヌクレオチド配列及びアミノ酸配列（配列番号 51 及び 52）を示す図である。

【図 6 A - 6 B】ロイコトキシン担体に融合された代表的キメラ T i r 構築物のそれぞれヌクレオチド配列及びアミノ酸配列（配列番号 53 及び 54）を示す図である。

【図 7】S T E C O 1 5 7 : H 7 、 O 2 6 : H 1 1 、 O 1 0 3 : H 2 及び O 1 1 1 : N M T T S P に対して産生されたウサギ抗血清との S T E C O 1 5 7 : H 7 ペプチドの反応性を示す図である。

【図 8 A - 8 D】S T E C O 1 5 7 : H 7 、 O 2 6 : H 1 1 、 O 1 0 3 : H 2 及び O 1 1 1 : N M T T S P に対して産生された S T E C ポリクローナル抗体と、 O 1 0 3 : H 2 T i r ペプチド（8A）； O 2 6 : H 1 1 T i r ペプチド（8B）； O 1 1 1 : N M T i r ペプチド（8C）；及び O 1 5 7 : H 7 T i r ペプチド（8D）との交差反応性を示す図である。

【図 9 A - 9 C】代表的なキメラ T i r タンパク質の構築のために使用されるクローニング模式図である。図 9 A は、制限部位並びに G l y 及び S e r 残基で構成されるスペーサーの位置を含むクローニングされた個々の断片を示している。図 9 B は、代表的なキメラ T i r 構築物の図を示している。図 9 C は、ロイコトキシン L K T 3 5 2 担体に融合された代表的キメラ T i r 構築物の図を示している。

【図 10】プラスミド pAA352 の構造を示す図である。 t a c は大腸菌由来のハイブリッド t r p : : l a c プロモーターであり； b 1 a は ラクタマーゼ遺伝子（アンピシリン耐性）を表し； o r i は C o l E 1 ベースのプラスミド複製起点であり； l k t A はパストレラ・ヘモリチカ（ *Pasteurella haemolytica* ）ロイコトキシン構造遺伝子であり； l a c 1 は大腸菌 l a c オペロンリプレッサーである。ロイコトキシン遺伝子の転写 / 翻訳の方向は矢印により示されている。各成分のサイズは縮尺通りに描かれていない。

【図 11 A - 11 I】プラスミド pAA352 由来のロイコトキシン 3 5 2 (L K T 3 5 2) のヌクレオチド配列及び予想されるアミノ酸配列（配列番号 55 、 56 及び 218 ）を示す図である。 L K T 3 5 2 の構造遺伝子も隣接ベクター領域の配列も示されている。

【図 12 A - 12 J】キメラ T i r タンパク質及び個々の非 O 1 5 7 免疫原性ペプチドでワクチン接種されたウサギ由来の血清を使用した E L I S A 結果を示す図である。図 12 A は、該キメラ T i r タンパク質に対する力価結果を示している。図 12 B は、該 L K T 3 5 2 / キメラ T i r タンパク質に対する力価結果を示している。図 12 C ~ 12 H は、以下の例； 図 12 C 、 O 2 6 ペプチド 2 ； 図 12 D 、 O 2 6 ペプチド 3 ； 図 12 E 、 O 1 0 3 ペプチド 5 ； 図 12 F 、 O 1 1 1 ペプチド 3 ； 図 12 G 、 O 1 1 1 ペプチド 4 ； 図 12 H 、 O 1 1 1 ペプチド 5 の表 2 からの個々の非 O 1 5 7 ペプチドに対する力価結果を示している。図 12 I は、負の対照ペプチド S N 1 1 に対する力価結果を示している。図 12 J は、 S T E C O 1 5 7 : H 7 由来の T i r タンパク質に対する力価結果を示している。

【図 13】S T E C O 1 5 7 分泌タンパク質に対する S T E C O 1 5 7 : H 7 を実験的に感染させたウシ由来の血清の抗体応答を示す図である。動物 1 は灰色バーで表されている。動物 2 は斑点バーで表されている。

【図 14】S T E C O 1 5 7 : H 7 T i r 抗原に対するウォーカートン（ Walkerton ）自然感染ヒト血清試料を使用する E L I S A の結果を示す図である。

【図 15】S T E C O 1 5 7 分泌タンパク質に対する H U S 患者由来のヒト血清の抗体応答を示す図である。

【図 16 A - 16 B】代表的な S T E C O 1 5 7 : H 7 E s p A のそれぞれヌクレオチド配列及びアミノ酸配列（配列番号 197 及び 198 ）を示す図である。

【図 17 A - 17 B】代表的な S T E C O 1 5 7 : H 7 E s p B のそれぞれヌクレオチド配列及びアミノ酸配列（配列番号 199 及び 200 ）を示す図である。

【図 18 A - 18 B】代表的な S T E C O 1 5 7 : H 7 E s p D のそれぞれヌクレオチド配列及びアミノ酸配列（配列番号 201 及び 202 ）を示す図である。

10

20

30

40

50

チド配列及びアミノ酸配列(配列番号201及び202)を示す図である。

【図19A-19B】代表的なS T E C O 1 5 7 : H 7 N l e Aのそれぞれヌクレオチド配列及びアミノ酸配列(配列番号203及び204)を示す図である。

【図20A-20B】代表的なS T E C O 1 5 7 : H 7 E s p Gのそれぞれヌクレオチド配列及びアミノ酸配列(配列番号205及び206)を示す図である。

【図21A-21B】代表的なS T E C O 1 5 7 : H 7 N l e Eのそれぞれヌクレオチド配列及びアミノ酸配列(配列番号207及び208)を示す図である。

【図22A-22B】代表的なS T E C O 1 5 7 : H 7 N l e H - 1のそれぞれヌクレオチド配列及びアミノ酸配列(配列番号209及び210)を示す図である。

【図23A-23B】代表的なS T E C O 1 5 7 : H 7 N l e H 2 - 1のそれぞれヌクレオチド配列及びアミノ酸配列(配列番号211及び212)を示す図である。

【図24A-24B】代表的なS T E C O 1 5 7 : H 7 E s p Fのそれぞれヌクレオチド配列及びアミノ酸配列(配列番号213及び214)を示す図である。

【図25A-25B】代表的なS T E C O 1 5 7 : H 7 E s p R Iのそれぞれヌクレオチド配列及びアミノ酸配列(配列番号215及び216)を示す図である。

【図26】プラセボ() ; O 1 5 7 T T S P () 並びに組換えO 1 5 7 : H 7 E s p G , N l e H 2 - 1、N l e A、E s p R I、E s p F、E s p B、E s p D、E s p A及びキメラT i rの混合物()を用いて処置されたマウスにおける大腸菌O 1 5 7 排泄物排出の量を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0053】

本発明の実行は、他の方法で指示されていなければ、分子生物学、微生物学、組換えDNA技術及び免疫学の従来の技法を用いることになり、これらの技法は当技術分野の技術の範囲内である。このような技法は文献において十分に説明されている。例えば、Sambrook, Fritsch & Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Vols. I, II and III, Second Edition (1989); Perbal, B., A Practical Guide to Molecular Cloning (1984); the series, Methods In Enzymology (S. Colowick and N. Kaplan eds., Academic Press, Inc.); 及びHandbook of Experimental Immunology, Vols. I-IV (D.M. Weir and CC. Blackwell eds., 1986, Blackwell Scientific Publications)を参照されたい。

【0054】

本明細書で引用されているすべての出版物、特許及び特許出願は、上記のものでも下記のものでも、参照によりその全体を本明細書に組み込まれている。

【0055】

A . 定義

本発明を説明する際に、以下の用語が用いられることになり、下に指示される通りに定義されることが意図されている。

【0056】

本明細書及び添付の特許請求の範囲において使用されるように、単数形で記載した用語は、内容が他の方法で明確に指示していかなければ、複数の指示対象を含むことに留意されなければならない。したがって、例えば、「1つのS T E C細菌」への言及は、2又はそれ以上のそのような細菌の混合物及び同類のものを含む。

【0057】

本明細書で使用されるように、用語S T E C「エフェクタータンパク質」又はそのタンパク質と同一のものをコードするヌクレオチド配列とは、それぞれ様々なS T E Cセロタイプのうちのいずれかの由来であり、かつ腸細胞消失遺伝子座(L E E, locus for enterocyte effacement)病原性アイランドにより転位置される、タンパク質又はヌクレオチド配列を意味する。この遺伝子座は、S T E C細菌の病原性にとって決定的に重要なE s c - E s p タイプIII分泌装置をコードする。しかし、エフェクタータンパク質は、L E E 病原性アイランドの内部でも外側でもコードされることが可能である。複数のS T E Cエフェクタータンパク質が公知であり、様々な配列が本明細書及び本技術分野において記載

10

20

30

40

50

されている。例えば、LEEと非LEE S T E C エフェクタータンパク質の両方の考察では、Tobe et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2006) 103:14941-14946の他にも本明細書の開示も参照されたい。S T E C エフェクタータンパク質の非限定的例には、T i r 、N l e A 、T c c P 、E s p M 2 及びE s p B が挙げられる。

【0058】

本明細書で使用されるように、用語S T E C 「構造タンパク質」又はそのタンパク質と同一のものをコードするヌクレオチド配列とは、それぞれ様々なS T E C セロタイプのうちのいずれかの由来であり、かつエフェクタータンパク質の細胞内への分泌に必要な物理的複合体の一部であるタンパク質又はヌクレオチド配列を意味する。構造タンパク質は、通常は細菌細胞と関連して見出される。そのような構造タンパク質の例には、ニードルの基部と先端などのニードル成分；外部膜成分及びフィラメント成分が挙げられる。いくつかのS T E C 構造タンパク質は公知であり、その配列は本明細書及び当技術分野において記載されている。S T E C 構造タンパク質の非限定的例には、E s p A 及びE s p D が挙げられる。

10

【0059】

本明細書で使用されるように、r T i r 、r E s p A 、r E s p B 、r E s p D 、r E s p F 、r E s p G 、r E s p R I 、r N l e A 、r N l e H 2 - 1 、r E s p M 2 及びr T c c p の他にもr インチミンなどの、しかしこれらには限定されない「組換え」S T E C タンパク質とは、組換えポリヌクレオチドの発現により產生されるタンパク質を意味する。一般には、下にさらに記載されているように、所望の遺伝子はクローニングされ、次に形質転換された生物において発現される。宿主生物は、発現条件下で外来遺伝子を発現してタンパク質を產生する。「組換えタンパク質」とは、そのタンパク質が少なくとも1つの特異的エピトープ又は活性を保持している限り、完全長ポリペプチド配列、参照配列の断片、又は参照配列の置換、欠失及び／若しくは付加を指す。一般に、参照配列のアナログは、完全長参照配列に少なくとも約50%配列同一性、好ましくは少なくとも約75%～85%配列同一性、さらに好ましくは約90%～95%又はそれ以上の配列同一性を示すことになる。

20

【0060】

用語「複数エピトープ融合タンパク質」とは、S T E C エフェクタータンパク質及び／又はS T E C 構造タンパク質の1を超えるエピトープを含み、該エピトープが天然に存在する順序では存在しないタンパク質を意味する。したがって、複数エピトープ融合タンパク質は、同一エピトープの1を超える繰返しの他にも同一タンパク質由来の1を超えるエピトープ又は1を超えるタンパク質由来の1を超えるエピトープを含む。該エピトープは互いに直接連結されている必要はなく、天然では同じように繰り返されておらず、さらに、S T E C エピトープではない他のアミノ酸を含むさらに大きな配列内に存在していてよい。本発明の目的のために、融合体中に存在するエピトープ配列は、野生型エピトープ配列の正確なコピーでも、それと「機能的に等価」である配列、すなわち、そのエピトープが由来する元の完全長分子又はその免疫原性部分のどちらかと同一性を有するエピトープにより誘発される応答と比べた場合、本明細書に定義されるように、実質的に等価な若しくは増強された免疫応答を誘発することになる配列でもよい。さらに、複数エピトープ融合タンパク質は、完全長分子又はその免疫原性断片を含み得る。

30

【0061】

用語「ポリペプチド」及び「タンパク質」とは、アミノ酸残基のポリマーのことであり、最小長の該生成物に限定されない。したがって、ペプチド、オリゴペプチド、二量体、多量体及び同類のものがこの定義に含まれる。完全長タンパク質とその断片の両方が定義に包含される。この用語はポリペプチドの発現後修飾、例えば、グリコシル化、アセチル化、リン酸化及び同類のものを含む。さらに、本発明の目的のために、「ポリペプチド」とは、天然のタンパク質配列の他にも、タンパク質が望ましい活性を維持している限り、天然配列に対する欠失、付加及び置換などの改変を含むタンパク質を指す。これらの改変は、部位特異的変異誘発を通じてのような計画的でもよく、又はタンパク質を產生する宿

40

50

主の変異若しくは P C R 増幅のためのエラーを通じてなどの偶発的でもよい。

【 0 0 6 2 】

本明細書で使用される用語「ペプチド」とは、ポリペプチドの断片を指す。したがって、ペプチドは、全タンパク質配列が存在しない限り、天然ポリペプチドの C 末端欠失、N 末端欠失及び / 又は内部欠失を含むことが可能である。ペプチドは一般に、完全長分子の少なくとも約 3 ~ 10 連続アミノ酸残基を含むことになり、問題のペプチドが望ましい生物学的応答を誘発する能力を保持しているという条件で、完全長分子の少なくとも約 15 ~ 25 連続アミノ酸残基又は完全長分子の少なくとも約 20 ~ 50 若しくはそれ以上の連続アミノ酸残基又は 3 アミノ酸と完全長配列におけるアミノ酸の数の間の任意の整数を含むことが可能である。

10

【 0 0 6 3 】

S T E C 「ペプチド」は、S T E C タンパク質の完全長配列未満を含むポリペプチドである。さらに、S T E C ペプチドは、免疫応答を生じることができるように少なくとも 1 つのエピトープを含むことになる。S T E C ペプチドは、下に記載される様々な S T E C セロタイプのうちのいずれの由来でも可能である。

【 0 0 6 4 】

本明細書で使用されるように、「ワクチン」とは、S T E C エフェクタータンパク質及び / 又は S T E C 構造タンパク質などの S T E C 抗原に対する免疫応答を刺激する働きをする組成物を指す。該免疫応答は、S T E C 感染に対して又は S T E C の定着及び排出に対して完全な予防及び / 又は処置を提供する必要はない。S T E C 細菌の定着及び排出に対する部分的予防でも、排出及び汚染食肉生産をなお低減することになるので、本明細書では利用法がある。いくつかの場合、ワクチンは、免疫応答を増強するために免疫アジュバントを含むことになる。用語「アジュバント」とは、特定の抗原又は抗原の組合せに対する免疫応答を増加する非特異的な形で作用し、したがって、いかなるワクチンにおいても必要な抗原の量及び / 又は所望の抗原に対して適切な免疫応答を生み出すために必要な注射の頻度を低減する薬剤を指す。例えば、A. C. Allison J. Reticuloendothel. Soc. (1979) 26:619-630 を参照されたい。そのようなアジュバントは下にさらに記載されている。

20

【 0 0 6 5 】

本明細書で使用されるように、「定着 (colonization)」とは、反芻動物などの哺乳動物の腸管における S T E C の存在を指す。

30

【 0 0 6 6 】

本明細書で使用されるように、「排出」とは、排泄物における S T E C の存在を指す。

【 0 0 6 7 】

本明細書で使用されるように、「免疫化」又は「免疫する」とは、組成物中に存在する抗原のうちの 1 又は 2 以上に対する免疫応答を誘発するために、組成物を投与される動物の免疫系を刺激するのに効果的な量で S T E C 組成物を投与することである。

【 0 0 6 8 】

用語「エピトープ」とは、特異的な B 細胞及び / 又は T 細胞が応答する抗原又はハプテン上の部位を指す。この用語は「抗原決定基」又は「抗原決定基部位」とも互換的に使用される。好ましくは、エピトープは、タンパク質抗原に由来する又はタンパク質抗原の一部としての短いペプチドである。いくつかの異なるエピトープは、单一抗原性分子により坦持され得る。用語「エピトープ」は、生物全体を認識する応答を刺激するアミノ酸の改変された配列も含む。エピトープは、過度の実験をしなくても、ペプチド又はポリペプチドのアミノ酸配列及び対応する D N A 配列についての知識からの他にも特定のアミノ酸の性質（例えば、サイズ、電荷など）及びコドン辞書から生成することが可能である。例えば、Ivan Roitt, Essential Immunology, 1988; Kendrew (同上); Janis Kuby, Immunology, 1992 e.g., pp. 79-81 を参照されたい。

40

【 0 0 6 9 】

組成物又はワクチンに対する「免疫学的応答」とは、宿主における、所望の組成物又は

50

ワクチンに対する細胞及び／又は抗体媒介免疫応答の発生を指す。通常、「免疫学的応答」は、以下の効果：所望の組成物又はワクチンに含まれる抗原（単数又は複数）に特異的に向けられる、抗体、B細胞、ヘルパーT細胞、サブレッサーT細胞及び／又は細胞障害性T細胞及び／又はT細胞の産生のうちの1又は2以上を含むがこれらに限定されない。好ましくは、宿主は、S T E C疾患が和らげられる及び／若しくは予防される；S T E Cの定着に対する腸の抵抗性が受けられる；S T E Cを排出する動物の数が減少する；動物により排出されるS T E Cの数が減少する；並びに／又は動物によるS T E C排出の期間が減少するように、治療的又は予防的免疫学的応答のいずれかを示すことになる。

【0070】

用語「免疫原性」タンパク質又はポリペプチドとは、上記の免疫学的応答を誘発するアミノ酸配列を指す。「免疫原性」タンパク質又はポリペプチドは、本明細書で使用されるように、問題の特定のS T E Cタンパク質の完全長配列、そのアナログ、凝集体又はその免疫原性断片を含む。「免疫原性断片」とは、1又は2以上のエピトープを含み、したがって上記の免疫学的応答を誘発するS T E Cタンパク質の断片を意味する。そのような断片は、当技術分野で周知のいかなる数のエピトープマッピング技法を使用しても同定されることが可能である。例えば、*Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66* (Glenn E. Morris, Ed., 1996) Humana Press, Totowa, New Jerseyを参照されたい。例えば、直鎖状エピトープは、例えば、タンパク質分子の一部に一致している多数のペプチドを固体支持体上で同時に合成し、ペプチドを、支持体にまだ付着している間に抗体と反応させることにより決定し得る。そのような技法は当技術分野で公知であり、例えば、米国特許第4,708,871号明細書；Geysen et al. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:3998-4002；Geysen et al. (1986) *Molec. Immunol.* 23:709-715に記載されている。これらの文献はすべて参考によりその全体を本明細書に組み込まれている。同様に、立体構造的エピトープは、例えば、X線結晶学及び2次元核磁気共鳴によりなどのアミノ酸の空間的立体構造を決定することにより容易に同定される。例えば、*Epitope Mapping Protocols* (同上)を参照されたい。タンパク質の抗原領域も、例えば、Oxford Molecular Groupから入手可能なOmiga version 1.0 software programを使用して計算されるプロットなどの標準抗原性及びヒドロパシープロットを使用して同定することが可能である。このコンピュータプログラムは、抗原性プロファイルを決定するためにHopp/Woods法 (Hopp et al., *Proc. Natl. Acad. Sci USA*(1981) 78:3824-3828) を及び、ヒドロパシープロットのためにKyte-Doolittle法 (Kyte et al., *J. Mol. Biol.* (1982) 157: 105-132) を用いる。

【0071】

本発明の目的のための免疫原性断片は、通常、親S T E Cタンパク質分子の少なくとも約3アミノ酸、好ましくは少なくとも約5アミノ酸、さらに好ましくは少なくとも約10～15アミノ酸、もっとも好ましくは25又はそれ以上のアミノ酸を含むことになる。断片の長さに決定的な上限はなく、タンパク質配列のほぼ完全長、又は特定のS T E Cタンパク質の2又はそれ以上のエピトープを含む融合タンパク質でさえ含み得る。

【0072】

「抗原」とは、宿主免疫系を刺激して体液性及び／又は細胞性抗原特異的応答を作り出すことになる1又は2以上のエピトープ（直鎖状、立体構造的のいずれか、又は両方）を含有するタンパク質、ポリペプチド又はその断片などの分子を指す。この用語は、用語「免疫原」と互換的に使用される。抗原又は抗原決定基を模倣することが可能な、抗イディオタイプ抗体又はその断片、及び合成ペプチドミモトープなどの抗体も、本明細書で使用される抗原の定義下に収まる。同様に、DNA免疫化適用におけるなどのインビボで抗原又は抗原決定基を発現するオリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチドも、本明細書での抗原の定義に含まれる。

【0073】

「担体」とは、所望の抗原に関連する場合、抗原に免疫原性を与えるいかなる分子でも意味する。

10

20

30

40

50

【0074】

用語「RTX」毒素とは、本明細書で使用されるように、カルボキシ末端コンセンサスアミノ酸配列 Gly - Gly - X - Gly - X - Asp (XはLys、Asp、Val又はAsnである)により特徴付けられる分子のファミリーに属するタンパク質のことである (Highlander et al., DNA (1989) 8:15-28)。そのようなタンパク質には、とりわけ、パスツレラ・ヘモリチカ及びアクチノバチルス・ブルロニューモニア (Actinobacillus pleuropneumoniae) 由来のロイコトキシンの他にも大腸菌アルファ溶血素が挙げられる (Strathdee et al., Infect. Immun. (1987) 55:3233-3236; Lo, Can. J. Vet. Res. (1990) 54:S33-S35; Welch, Mol. Microbiol. (1991) 5:521-528)。毒素のこのファミリーは毒素の「RTX」ファミリーとして知られている (Lo, Can. J. Vet. Res. (1990) 54: S33-S35)。さらに、用語「RTX毒素」とは、化学的に合成される、RTX毒素と同一のものを発現している生物から単離されるRTXファミリーのメンバー、又は組換え的に產生されるRTXファミリーのメンバーを指す。さらに、この用語は、特定の天然RTX分子に見られる連續アミノ酸配列に実質的に相同なアミノ酸配列を有する免疫原性タンパク質を意味する。したがって、この用語は完全長配列と部分的配列の両方の他にもアナログを含む。天然の完全長RTX毒素は細胞毒性活性を示すが、用語「RTX毒素」は、依然免疫原性であるが、天然分子の細胞毒性特徴を欠く分子も意味する。本発明に従って作製されるキメラでは、選択されるRTXポリペプチド配列は、融合STECタンパク質又は複数エピトープ融合タンパク質に増強された免疫原性を与える。

10

【0075】

用語「ロイコトキシンポリペプチド」又は「LKTポリペプチド」とは、上記に定義されるように、とりわけ、パスツレラ・ヘモリチカ及びアクチノバチルス・ブルロニューモニア由来のRTX毒素を意味する。いくつかのロイコトキシンのヌクレオチド配列及び対応するアミノ酸配列は公知である。例えば、米国特許第4,957,739号明細書及び米国特許第5,055,400号明細書; Lo et al., Infect. Immun. (1985) 50:667-677; Lo et al., Infect. Immun. (1987) 55:1987-1996; Strathdee et al., Infect. Immun. (1987) 55:3233-3236; Highlander et al., DNA (1989) 8:15-28; Welch, Mol. Microbiol. (1991) 5:521-528を参照されたい。選択されたロイコトキシンポリペプチド配列は、融合STECタンパク質又は複数エピトープ融合タンパク質に増強された免疫原性を与える。

20

【0076】

担体に連結されているSTECタンパク質は、それが対応するタンパク質単独よりも免疫応答を誘発する大きな能力を有する場合「増強された免疫原性」を示す。そのような増強された免疫原性は、特定のタンパク質/担体複合体及びタンパク質対照を動物に投与し、当技術分野で周知の放射性免疫アッセイ及びELISAなどの標準アッセイを使用してこれら2つに対する抗体力値を比較することにより決定することが可能である。

30

【0077】

用語「精製された」とは、物質がそれが属する試料中の大多数の割合を含むように物質(化合物、ポリヌクレオチド、タンパク質、ポリペプチド、ポリペプチド組成物)を単離することである。典型的には、試料中では、精製された成分は、試料の50%、好ましくは80%~85%、さらに好ましくは90~95%を含む。本明細書の「精製された」の定義から明確に除外されるのは、米国特許第7,300,659号明細書に記載されるなどの、増殖培地に分泌されているSTEC抗原の混合物を含有する細胞培養上清の成分である。所望のポリヌクレオチド及びポリペプチドを精製するための技法は当技術分野では周知であり、例えば、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティーコロマトグラフィー及び密度に従った沈降が挙げられる。

40

【0078】

「単離された」とは、ポリペプチドに言及する場合、指示された分子はその分子と一緒に天然に見出される生物全体から分離し別個である、又は実質的に同種の他の生物学的巨大分子の非存在下で存在していることを意味する。ポリヌクレオチドに関する用語「単離

50

された」は、天然には通常その核酸に付隨する配列、若しくは天然に存在する配列であるが異種配列が一緒に付隨している配列を全体的にも部分的にも欠く核酸分子、又は染色体から解離した分子である。

【0079】

「抗体」とは、抗原中に存在する所望のエピトープを「認識する」、すなわち該エピトープに特異的に結合する分子を意味する。「特異的に結合する」とは、抗体と例えば該抗体と反応する被験物質を含む混合物中の成分間で起こることがある非特異的結合とは対照的に、抗体が「錠と鍵」タイプの相互作用でエピトープと相互作用して抗原と抗体の間で複合体を形成することを意味する。したがって、例えば、抗 S T E C エフェクター抗体は、問題の S T E C エフェクタータンパク質のエピトープに特異的に結合する分子である。本明細書で使用される用語「抗体」には、ポリクローナルとモノクローナル調製物の両方から得られる抗体の他にも以下の：ハイブリッド（キメラ）抗体分子（Winter et al., Nature (1991) 349:293-299; 及び米国特許第 4,816,567 号明細書参照）；F(a b')₂ 及び F(a b) 断片；Fv 分子（非共有ヘテロ二量体、例えば、Inbar et al., Proc Natl Acad Sci USA (1972) 69:2659-2662; and Ehrlich et al., Biochem (1980) 19:4091-4096 参照）；一本鎖 Fv 分子（s Fv）（例えば、Huston et al., Proc Natl Acad Sci USA (1988) 85:5879-5883 参照）；二量体及び三量体抗体断片構築物；ミニボディー（例えば、Pack et al., Biochem (1992) 31:1579-1584; Cumber et al., J Immunology (1992) 149B:120-126 参照）；ヒト化抗体分子（例えば、Riechmann et al., Nature (1988) 332:323-327; Verhoeyen et al., Science (1988) 239:1534-1536; 及び 1994 年 9 月 21 日公開の英国特許出願第 G B 2,276,169 号参照）；並びにそのような分子から得られ、親抗体分子の免疫学的結合特性を保持しているいかかる機能的断片も挙げられる。

10

20

30

【0080】

本明細書で使用されるように、用語「モノクローナル抗体」とは、均一な抗体集団を有する抗体組成物を指す。この用語は、抗体の種又は供給源に関して限定されておらず、抗体が作られる方法によって限定されることを意図されてもいい。この用語は、全免疫グロブリンの他にも、Fab、F(ab')₂、Fv 及び他の断片などの断片の他にも、親モノクローナル抗体分子の免疫学的結合特性を示すキメラ及びヒト化均一抗体集団を包含する。

30

【0081】

「天然」タンパク質又はポリペプチドとは、タンパク質が天然に存在する供給源から単離されるタンパク質又はポリペプチドを指す。「組換え」ポリペプチドとは、組換え DNA 技法により産生される、すなわち、望ましいポリペプチドをコードする外来性 DNA 構築物により形質転換された細胞から産生されるポリペプチドを指す。「合成」ポリペプチドは、化学合成により調製されるポリペプチドである。

40

【0082】

「相同性」とは、2つのポリヌクレオチド又は2つのポリペプチド部分間のパーセント同一性を指す。2つの核酸又は2つのポリペプチド配列は、該配列が該分子の限定された長さにわたり少なくとも約 50%、好ましくは少なくとも約 75%、さらに好ましくは少なくとも約 80% ~ 85%、好ましくは少なくとも約 90%、もっとも好ましくは少なくとも約 95% ~ 98% 配列同一性を示す場合は、互いに「実質的に相同である」。本明細書で使用されるように、実質的に相同であるとは、特定の配列に完全な同一性を示す配列のことである。

40

【0083】

一般に、「同一性」とは、2つのポリヌクレオチド又はポリペプチド配列のそれぞれ正確なヌクレオチド - ヌクレオチド又はアミノ酸 - アミノ酸一致を指す。パーセント同一性は、配列を整列させ、2つの整列された配列間の適合の正確な数を計数し、参照配列の長さで除し、該結果に 100 を掛けることによる 2 つの分子（参照配列と参照配列に対する % 同一性が未知である配列）間配列情報の直接比較により決定することが可能である。ペ

50

プチド解析については、Smith and Waterman Advances in Appl. Math. 2:482-489, 1981 の局所相同性アルゴリズムを応用したALIGN, Dayhoff, M.O. in Atlas of Protein Sequence and Structure M.O. Dayhoff ed., 5 Suppl. 3:353-358, National biomedical Research Foundation, Washington, DCなどの容易に入手可能なコンピュータープログラムを使用すれば解析に役立つことが可能である。ヌクレオチド配列同一性を決定するためのプログラムは、Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8 (Genetics Computer Group社, Madison, WIから入手可能)、例えば、the BESTFIT, FASTA and GAP プログラムにおいて入手可能であり、これらのプログラムもSmith and Watermanアルゴリズムに依拠している。これらのプログラムは、製造業者により推奨され上に引用されるWisconsin Sequence Analysis Packageに記載されているデフォルトパラメータを用いて容易に利用される。例えば、参照配列に対する特定のヌクレオチド配列のパーセント同一性は、デフォルトスコアリング表及び6ヌクレオチド位置のギャップペナルティーを用いるSmith and Watermanの相同性アルゴリズムを使用して決定することが可能である。

10

【0084】

本発明の文脈においてパーセント同一性を確立するもう1つの方法は、エディンバラ大学に著作権があり、John F. CollinsとShane S. Sturrokが開発し、IntelliGenetics, Inc. (Mountain View, CA)から配給されるプログラムのMPSRCHパッケージを使用することである。この一揃いのパッケージから、スコアリング表にデフォルトパラメータが使用されているSmith-Watermanアルゴリズムを用いることが可能である(例えば、ギャップ開始ペナルティー12、ギャップ伸長ペナルティー1及びギャップ6)。生み出されるデータから、「マッチ(Match)」値は「配列同一性」を反映する。配列間のパーセント同一性又は類似性を計算するための他の適切なプログラムは、当技術分野では一般に公知であり、例えば、別のアラインメントプログラムはBLASTでありデフォルトパラメータを用いて使用される。例えば、BLASTN及びBLASTPは、以下のデフォルトパラメータ: 遺伝コード=標準; フィルター=なし; 鎖=両方; カットオフ(cutoff)=60; エクスペクト(expect)=10; マトリックス=BLOSUM62; デスクリプション(descriptions)=50配列; ソートバイ(sort by)=HIGH SCORE; データベース=非重複、ジエンバンク+EMBL+DDBJ+PDB+ジエンバンクCDS翻訳+Swiss protein+Supupdate+PIRを使って、使用することが可能である。これらのプログラムの詳細は容易に入手可能である。

20

【0085】

代わりに、相同領域間で安定な二重鎖を形成する条件下でポリヌクレオチドをハイブリダイズさせ、続いて一本鎖特異的ヌクレアーゼ(複数可)を用いて消化し、消化された断片をサイズ決定することにより相同性を決定することが可能である。実質的に相同なDNA配列であれば、例えば、その特定の系のために定義される厳密な条件下でサザンハイブリダイゼーション実験において同定することが可能である。適切なハイブリダイゼーション条件を定義するのは当技術分野の技術の範囲内である。例えば、Sambrook et al. (同上); DNA Cloning (同上); Nucleic Acid Hybridization (同上)を参照されたい。

30

【0086】

核酸分子を記載するために本明細書で使用される「組換え」とは、その起源又は操作により、天然では関連しているポリヌクレオチドのすべて又は部分とは関連していないゲノム、cDNA、ウイルス、半合成又は合成起源のポリヌクレオチドを意味する。

40

【0087】

用語「形質転換」とは、挿入のために使用される方法とは無関係に、外来性ポリヌクレオチドを宿主細胞に挿入することである。例えば、直接取り込み、形質導入又はf-交配が挙げられる。外来性ポリヌクレオチドは、非組込みベクター、例えば、プラスミドとして維持されてもよく、又は、代わりに宿主ゲノムに組み込まれてもよい。

【0088】

「組換え宿主細胞」、「宿主細胞」、「細胞」、「細胞株」、「細胞培養物」及び単細胞体として培養される微生物又は高等真核細胞株を意味する他のそのような用語とは、組

50

換えベクター又は他の移入されたDNAのためのレシピエントとして使用することが可能な又は使用されてきた細胞のことであり、トランスフェクトされた原細胞の初代後代を含む。

【0089】

「コード配列」又は選択されたポリペプチドを「コードする」配列は、適切な調節配列（又は「制御エレメント」）の制御下に置かれている場合には、インビオで転写される（DNAの場合）及びポリペプチドに翻訳される（mRNAの場合）核酸分子である。コード配列の境界は、5'（アミノ）末端では開始コドンにより、3'（カルボキシ）末端では翻訳停止コドンにより決定される。コード配列には、ウイルス、原核生物又は真核生物mRNA由来のcDNA、ウイルス又は原核生物DNA由来のゲノムDNA配列、及び合成DNA配列までも挙げることが可能であるが、これらに限定されない。転写終止配列はコード配列の3'側に位置し得る。

10

【0090】

典型的な「制御エレメント」には、転写プロモーター、転写エンハンサー要素、転写終結シグナル、ポリアデニル化配列（翻訳終止コドンの3'側に位置する）、翻訳の開始を最適化するための配列（コード配列の5'側に位置する）及び翻訳終結配列が挙げられるが、これらに限定されない。

20

【0091】

「核酸」分子には、原核生物塩基配列、真核生物mRNA、真核生物mRNA由来のcDNA、真核生物（例えば、哺乳動物）DNA由来のゲノムDNA配列、及び合成DNA配列までも挙げることが可能であるが、これらに限定されない。この用語は、DNA及びRNAの既知の塩基アナログのうちのいずれでも含む配列も取り込む。

20

【0092】

「作動可能に連結されている」とは、そのように記載されている成分が、その通常の機能を果たすように形成されているエレメントの配置を指す。したがって、コード配列に作動可能に連結されている所とのプロモーターは、適切な酵素が存在する場合にはコード配列の発現を達成することができる。プロモーターは、それがコード配列の発現を指示するよう機能する限り、コード配列と連続している必要はない。したがって、例えば、介在する非翻訳であるが転写されている配列がプロモーター配列とコード配列間に存在することが可能であり、プロモーター配列はそれでもコード配列に「作動可能に連結されている」と見なすことが可能である。

30

【0093】

「によりコードされている」とは、ポリペプチド配列又はその部分が、核酸配列によりコードされるポリペプチド由来の少なくとも3～5アミノ酸、さらに好ましくは少なくとも8～10アミノ酸、さらに好ましくは少なくとも15～20アミノ酸のアミノ酸配列を含有するポリペプチド配列をコードする核酸配列を指す。該配列にコードされるポリペプチドと免疫学的に同一視することが可能なポリペプチド配列も包含される。

【0094】

用語「トランスフェクション」は、細胞による外来DNAの取込みを指すのに使用される。細胞は、外来性DNAが細胞膜内部に導入されてしまうと「トランスフェクト」されていることになる。いくつかのトランスフェクション技法が当技術分野では一般に公知である。例えば、Graham et al. (1973) *Virology*, 52:456, Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning, a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratories, New York, Davis et al. (1986) *Basic Methods in Molecular Biology*, Elsevier, and Chu et al. (1981) *Gene* 13:197を参照されたい。そのような技法を使用すれば、1又は2以上の外来性DNA部分を適切な宿主細胞に導入することが可能である。この用語は、遺伝物質の安定でもあり一過的でもある取込みを指し、ペプチド連結DNA又は抗体連結DNAの取込みを含む。

40

【0095】

「ベクター」は、遺伝子配列を標的細胞へ導入することができる（例えば、ウイルスベ

50

クター、非ウイルスベクター、粒子性担体及びリポソーム）。典型的には、「ベクター構築物」、「発現ベクター」及び「遺伝子導入ベクター」とは、所望の遺伝子の発現を指示することができ、遺伝子配列を標的細胞導入することが可能いかなる核酸構築物でも意味する。したがって、この用語はクローニング及び発現ビヒクルの他にもウイルスベクターを含む。

【0096】

本明細書で使用されるように、「生体試料」とは、対象から単離される組織又は体液の試料を意味し、例えば、限定はされないが、血液、血漿、血清、排泄物、尿、骨髓、胆汁、髄液、リンパ液、皮膚の試料、皮膚、呼吸器、腸管及び尿生殖管の外分泌物、涙、唾液、乳、血液細胞、臓器、生検等が挙げられる。また、限定されないが、培地中での細胞及び組織の増殖から生じる条件培地をはじめとするインビトロ細胞培養成分の試料、例えば、組換え細胞及び細胞成分等を挙げることができる。10

【0097】

本明細書で使用されるように、用語「標識」とび「検出可能標識」とは、放射性同位元素、蛍光剤（fluorescer）、化学発光剤（chemiluminescer）、酵素、酵素基質、酵素補因子、酵素阻害剤、発色団、色素、金属イオン、金属ゾル、リガンド（例えば、ビオチン又はハプテン）及び同類のものが挙げられるがこれらに限定されない検出可能な分子を指す。用語「蛍光剤」とは、検出可能範囲で蛍光を示すことができる物質又はその部分を指す。本発明下で使用し得る標識の特定の例には、フルオレセイン、ローダミン、ダンシル、ウンベリフェロン、テキサスレッド、ルミノール、NADPH及び20-ガラクトシダーゼが挙げられる。

【0098】

本明細書で使用される用語「処置（treatment）」とは、（i）感染若しくは再感染の予防（予防法）又は（ii）所望の疾患の症状の減少若しくは除去（治療）のいずれかを指す。処置は、反芻動物などの哺乳動物のSTEC定着の予防若しくは減少；及び／又は動物により排出させるSTECの数の減少；及び／又は動物によるSTEC排出の期間を減少することも包含する。20

【0099】

本明細書で使用されるように、「治療量」、「有効量」及び「に効果的な量」とは、組成物中に存在するSTEC抗原に対する免疫応答を誘発し、それによって反芻動物などの哺乳動物のSTEC疾患及び／若しくはSTEC定着を低減する若しくは予防する；並びに／又はSTECを排出する動物の数を低減する；並びに／又は動物により排出されるSTECの数を低減する；並びに／又は動物によるSTEC排出の期間を低減するのに有効なワクチンの量を指す。30

【0100】

「哺乳動物対象」とは、ヒト並びに、ウシ、ブタ及びヒツジ属（ヒツジとヤギ）種を含むがこれらに限定されない反芻動物などの他のあらゆる乳腺所有動物（雄と雌の両方）を含む哺乳綱の任意のメンバーを意味する。該用語は特定の年齢を示さない。したがって、成体、新生仔及び胎仔が含まれるよう意図されている。

【0101】

B. 一般的方法

本発明の中核をなすのは、1を超えるSTECセロタイプ由来の1を超えるSTECエピトープを含む複数エピトープ融合タンパク質が、それが投与される動物において免疫応答を生じるという発見である。さらに、1を超えるSTECセロタイプ由来のタンパク質と反応する抗体を産生させるSTECエフェクタータンパク質由来のエピトープ、及び1を超えるSTECセロタイプ由来のタンパク質と反応する抗体を産生させるSTEC構造タンパク質由来のエピトープが発見されている。キメラ構築物及び交差反応性STECセロタイプはワクチン組成物において使用され、定着に対する防御などの広範にわたるSTEC感染の予防及び処置を提供する。したがって、複数のSTECセロタイプ由来の様々なSTECエフェクタータンパク質、及び複数のSTECセロタイプ由来の様々なSTEC

10

20

30

40

50

C構造タンパク質は、本組成物及び方法において利用法がある。そのようなエピトープは、1又は2以上のサブユニットワクチン組成物において個々に提供するか、又は都合が良いのは、融合タンパク質として組換え発現させたキメラタンパク質として提供するか、若しくは個々に発現させ、その後融合が可能のことである。

【0102】

ある種の実施形態では、組成物は、複数のSTECセロタイプ由来のTirの複数のエピトープなどの、1を超えるSTECセロタイプ由来の1を超えるエピトープを含む複数エピトープ融合タンパク質を含む。他の実施形態では、組成物は、精製されたSTECエフェクタータンパク質及び/又は精製されたSTEC構造タンパク質の混合物を含み、前記タンパク質は、EspA、EspB、EspD、EspG、EspF、EspRI、NleA、NLeH2-1、TccP、Tirから選択されるSTECタンパク質などの、しかしこれらに限定されない1を超えるSTECセロタイプ由来のタンパク質、及び/又は複数のTirエピトープを有するタンパク質などの複数エピトープ融合タンパク質と反応する抗体を産生する。

10

【0103】

いくつかの実施形態では、STEC構築物又は精製されたSTECタンパク質は免疫原性を増強する担体分子に連結されている。薬学的に許容されるアジュバントを組成物と一緒に投与してもよい。組成物は抗原のうちの1又は2以上に対して免疫応答を誘発し、それによってSTEC感染を低減する又は除去するのに有効な量で投与される。いくつかの例では、動物におけるSTEC定着は減少され除去される。好ましい実施形態では、動物はウシ又はヒツジ又は他の反芻動物である。

20

【0104】

本発明の組成物を用いた免疫化は、免疫された動物の免疫系を刺激して、EspA、EspB、EspD、EspG、EspF、EspRI、NleA、NLeH2-1、TccP及び/又はTirなどの1又は2以上のSTEC抗原に対して、腸上皮細胞へのSTEC付着を遮断し、STEC定着を妨げ、それによって動物によるSTEC排出を低減する抗体を産生する。STEC排出のこのような減少により、食物及び水のSTEC汚染は減少しヒトにおけるSTECが引き起こす疾患は減少する。さらに、STEC定着及びウシによる排出を予防し、減少し除去する免疫化の能力は、医学分野における長年にわたる切実な満たされない要求に取り組み、ヒトに重要な利益をもたらす。

30

【0105】

さらに、本発明の組成物を使用すれば、ヒトなどの他の哺乳動物におけるSTEC感染を処置する又は予防することが可能である。組換えて産生されるタンパク質などの精製された抗原、例えば、毒性を減少させるために志賀毒素1及び2のうちの1つ又は両方を欠く組成物を使用すれば、発現する抗原(antigens present)を制御することが可能になる。

【0106】

STEC組成物の治療有効性は、天然若しくは合成担体、アジュバントを使用することにより及び/又は別の抗STEC剤の前に、同時に、若しくは後に該組成物を投与することにより、増強することが可能である、そのような薬剤には、生物学的、生物学的に操作された、化学的、核酸ベースの及び組換えタンパク質抗STEC剤が挙げられるが、これらに限定されない。

40

【0107】

本発明の理解を促進するために、STECタンパク質及びキメラ、その産生物、それらと同一のものを含む組成物、並びに感染の処置又は予防の他にも感染の診断におけるそのような組成物の使用法に関して、下においてさらに詳細な考察が提供される。

【0108】

I. キメラ構築物及び組合せワクチンにおける使用のためのポリペプチド

上で説明されたように、本発明のタンパク質は、1を超えるセロタイプ由来の1又は2以上のSTECエフェクタータンパク質由来の1を超えるエピトープ、及び/又は1を超

50

えるセロタイプ由来の1又は2以上のS T E C構造タンパク質由来の1を超えるエピトープを含む、キメラ構築物の使用により1を超えるS T E Cセロタイプに対する広範な予防を提供する。代わりの実施形態では、組成物は、1を超えるS T E Cセロタイプ由来の抗原と反応する抗体を産生する、精製されたS T E Cタンパク質、その免疫原性断片及び/又はバリエントを含むことが可能である。

【0109】

本発明で使用するためのタンパク質及びエピトープは、血清型O 1 5 7、O 1 5 8、O 5、O 8、O 1 8、O 2 6、O 4 5、O 4 8、O 5 2、O 5 5、O 7 5、O 7 6、O 7 8、O 8 4、O 9 1、O 1 0 3、O 1 0 4、O 1 1 1、O 1 1 3、O 1 1 4、O 1 1 6、O 1 1 8、O 1 1 9、O 1 2 1、O 1 2 5、O 2 8、O 1 4 5、O 1 4 6、O 1 6 3、O 1 6 5由来のS T E Cセロタイプを限定することなく含む様々なS T E Cセロタイプのいずれからでも入手し得る。そのようなS T E Cセロタイプは感染動物の血清から容易に入手される。S T E Cを単離するための方法は当技術分野では周知である。例えば、Elder et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2000) 97:2999; Van Donkersgoed et al., Can. Vet. J. (1999) 40:332; Van Donkersgoed et al., Can. Vet. J. (2001) 42:714を参照されたい。一般に、そのような方法は、セフィキシム及びテルル酸を補充されているソルビトールマッコンキー寒天上に直接蒔く、又は免疫磁気濃縮に続いて同一培地に蒔く必要がある。さらに、S T E Cタンパク質及びエピトープは、毒性を減らすために志賀毒素1及び/又は2の発現をノックアウトするように遺伝的に操作されているS T E Cセロタイプから入手し得る。

10

20

30

40

50

【0110】

複数エピトープ融合タンパク質及び、S T E Cタンパク質を含む組成物が由来するタンパク質としては、各種の任意のS T E C構造タンパク質及び任意の公知のL E E及び非L E Eエフェクターを挙げることができる。そのようなタンパク質には、E s p A、E s p D、T i r、N l e A、E s p B、T c c P、L e r、O r f 2、C e s A / B、O r f 4、O r f 5、E s c S、E s c T、R o r f 1 3、G r l R、G r l A、C e s D、E s c C、S e p D、E s c J、O r f 8、S e p Z、O r f 1 2、E s c N、O r f 1 6、S e p Q、E s p H、C e s F、M a p、C e s T、E s c D、S e p L、C e s D 2、E s c F、O r f 2 9、E s p F、E s p G、N l e B、N l e B 2 - 1、N l e C、N l e E、N l e F、N l e G、N l e H、N l e H 1 - 2、N l e H 2 - 1、N l e I、N l e G 2 - 1、N l e G 2 - 2、N l e G 3、N l e G 5 - 1、N l e G 6 - 1、N l e G 8 - 2、N l e G 9、E s p K、E s p L 2、E s p M 2、E s p R 1、E s p V、E s p W、E s p X 2、E s p X 7、E s p Y 1、E s p Y 2及びE S p Y 3が限定することなく挙げられる。

【0111】

様々なS T E Cタンパク質の配列は公知であり及び/又は本明細書に記載されている。大腸菌O 1 5 7 : H 7ゲノムの完全な配列については、例えば、ジェンバンク受託番号A E 0 0 5 5 9 4、A E 0 0 5 5 9 5、A P 0 0 2 5 6 6、A E 0 0 5 1 7 4、N C _ 0 0 2 6 9 5、N C _ 0 0 2 6 5 5の他にも、米国特許第6,855,814号明細書(参照によりその全体を本明細書に組み込まれている)を参照されたい。これには様々なO 1 5 7 : H 7構造タンパク質及びO 1 5 7 : H 7エフェクタータンパク質の配列が含まれている。S T E C O 2 6 : H 1 1及びO 1 0 3 : H 2のL E E病原性アイランドの配列については、それぞれジェンバンク受託番号A J 2 7 7 4 4 3及びA J 3 0 3 1 4 1を参照されたい。これには様々なS T E Cタンパク質の配列が含まれる。S T E C O 1 1 1 : H t i r、インチミン及びシャペロンの配列についてはジェンバンク受託番号A F 0 2 5 3 1 1を参照されたい。

【0112】

いくつかの大腸菌セロタイプ由来のE s p Aのヌクレオチド及びアミノ酸配列については、例えば、国際公開第97/40063号パンフレットの他にもジェンバンク受託番号A E 0 0 5 1 7 4、Y 1 3 0 6 8、U 8 0 9 0 8、U 5 6 8 1、Z 5 4 3 5 2、A J 2 2

5021、AJ225020、AJ225019、AJ225018、AJ225017
 、AJ225016、AJ225015、AF022236、AF200363、NC_011601、NC_002695、BA000007及びAJ303141を参照されたい。図16A～16Bは、代表的STECo157:H7EspAのそれズクレオチド配列及びアミノ酸配列を示している。

【0113】

STECo157:H7Tirのヌクレオチド配列及びアミノ酸配列については、例えば、それぞれ図1A～1Bを；STECo26:H11Tirのヌクレオチド配列及びアミノ酸配列については、それぞれ図2A～2Bを；STECo103:H2Tirのヌクレオチド配列及びアミノ酸配列については、それぞれ図3A～3Bを；STECo111:NMTirのヌクレオチド配列及びアミノ酸配列については、それぞれ図4A～4Bを；他にもいくつかの大腸菌セロタイプ由来のTirのヌクレオチド及びアミノ酸配列については国際公開第99/24576号パンフレット、並びにジェンバンク受託番号AF125993、AF132728、AF045568、AF022236、AF70067、AF070068、AF013122、AF200363、AF113597、AF070069、AB036053、AB026719、U5904及びU59502を参照されたい。

10

【0114】

いくつかの大腸菌セロタイプ由来のインチミンのヌクレオチド及びアミノ酸配列については、例えば、ジェンバンク受託番号U32312、U38618、U59503、U66102、AF081183、AF081182、AF130315、AF339751、AJ308551、AF301015、AF329681、AF319597、AJ275089-AJ275113を参照されたい。

20

【0115】

いくつかの大腸菌セロタイプ由来のEspBのヌクレオチド及びアミノ酸配列については、例えば、ジェンバンク受託番号AE005174、U80796、U65681、Y13068、Y13859、X96953、X99670、X96953、Z21555、AF254454、AF254455、AF254456、AF254457、AF054421、AF059713、AF144008、AF144009、NC_011601、NC_002695、BA000007及びAJ303141を参照されたい。図17A～17Bは、代表的なSTECo157:H7EspBのそれズクレオチド配列及びアミノ酸配列を示している。

30

【0116】

いくつかの大腸菌セロタイプ由来のEspDのヌクレオチド及びアミノ酸配列については、例えば、ジェンバンク受託番号AE005174、Y13068、Y13859、Y17875、Y17874、Y09228、U65681、AF054421、AF064683、NC_011601、NC_002695、BA000007及びAJ303141を参照されたい。図18A～18Bは、代表的なSTECo157:H7EspDのそれズクレオチド配列及びアミノ酸配列を示している。

40

【0117】

いくつかの大腸菌セロタイプ由来のNleAの配列については、例えば、ジェンバンク受託番号AE005174、BAF9651、CAM11325、CAM11324、CAM11323、CAM11322、CAM11321、CAM11320、CAM11319、CAM11318、CAM11317、CAM11316、CAM11315、CAM11314、CAM11313及びNC_011601を参照されたい。図19A～19Bは、代表的なSTECo157:H7NleAのそれズクレオチド配列及びアミノ酸配列を示している。

【0118】

いくつかの大腸菌セロタイプ由来のTccpの配列については、例えば、ジェンバンク受託番号AE005174、AB356000、AB355999、AB355998、

50

A B 3 5 5 9 9 7、A B 3 5 5 9 9 6、A B 3 5 5 9 9 5、A B 3 5 5 6 5 9、A B 2 5 3 5 4 9、A B 2 5 3 5 4 8、A B 2 5 3 5 4 7、A B 2 5 3 5 4 6、A B 2 5 3 5 4 5、A B 2 5 3 5 4 4、A B 2 5 3 5 4 3、A B 2 5 3 5 4 2、A B 2 5 3 5 4 1、A B 2 5 3 5 4 0、A B 2 5 3 5 3 9、A B 2 5 3 5 3 8、A B 2 5 3 5 3 7、D Q 2 0 6 4 5 6 を参照されたい。

【0119】

いくつかの大腸菌セロタイプ由来の E s p G、N 1 e E 及び N 1 e H の配列については、例えば、ジェンバンク受託番号 A E 0 0 5 1 7 4、N C _ 0 1 1 6 0 1、N C _ 0 0 2 6 9 5、B A 0 0 0 0 0 7 及び A J 3 0 3 1 4 1 を参照されたい。図 2 0 A ~ 2 0 B は、代表的な S T E C O 1 5 7 : H 7 E s p G のそれぞれヌクレオチド配列及びアミノ酸配列を示している。図 2 1 A ~ 2 1 B は、代表的な S T E C O 1 5 7 : H 7 N 1 e E のそれぞれヌクレオチド配列及びアミノ酸配列を示している。図 2 2 A ~ 2 2 B は、代表的な S T E C O 1 5 7 : H 7 N 1 e H 1 - 1 のそれぞれヌクレオチド配列及びアミノ酸配列を示している。10

【0120】

いくつかの大腸菌セロタイプ由来の E s p F のヌクレオチド及びアミノ酸配列については、例えば、ジェンバンク受託番号 A F 0 2 2 2 3 6、A J 3 0 3 1 4 1、N P _ 2 9 0 2 5 0 . 1、Y P _ 0 0 2 3 3 1 3 9 2 . 1、N P _ 3 1 0 7 4 2 . 1、A A G 5 8 8 1 4 . 1 を参照されたい。図 2 4 A ~ 2 4 B は、代表的な S T E C O 1 5 7 : H 7 E s p F のそれぞれヌクレオチド配列及びアミノ酸配列を示している。20

【0121】

代表的な S T E C O 1 5 7 : H 7 N 1 e H 2 - 1 のそれぞれヌクレオチド配列及びアミノ酸配列については、例えば、図 2 3 A ~ 2 3 B を参照されたい。代表的な S T E C O 1 5 7 : H 7 E s p R I については、例えば、図 2 5 A ~ 2 5 B を参照されたい。

【0122】

組成物における使用のための交差反応性エピトープの他に本発明のキメラにおける使用のためのエピトープは、例えば、上に収載される S T E C セロタイプのうちの 2 又はそれ以上に由来する S T E C タンパク質の配列を整列させ、可変及び保存領域を捜すことにより容易に同定することが可能である。通常、様々な細菌に対する広範な予防を与えるためには S T E C 分子の可変領域由来のエピトープを含むのが望ましい。例えば、S T E C O 1 5 7 から分化したが、それでも宿主免疫系により認識される非 O 1 5 7 S T E C セロタイプにおいても有用なエピトープを同定することが可能である。例えば、T i r の場合、アミノ酸 2 5 9 ~ 3 6 3 にまたがる部分は、これらのアミノ酸が宿主表皮細胞の表面に曝露されており、該宿主表皮細胞をワクチン開発のための主要標的にすることが明らかにされているので、特に興味深い。30

【0123】

追加のエピトープは、標準抗原性及びハイドロパシープロット、例えば、Oxford Molecular Group から入手可能な Omiga version 1.0 software program を使用して、例えば、計算されるプロットを使用するなどの当技術分野で周知の技法を使用して同定することが可能である。このコンピュータプログラムは、抗原性プロファイルを決定するために Hopp/Woods 法 (Hopp et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA(1981) 78:3824-3828) を、ハイドロパシープロットには Kyte-Doolittle 法 (Kyte et al., J Mol. Biol. (1982) 157: 105-132) を用いる。このプログラムは、以下のパラメータ：7 のウィンドウにわたる結果を平均化する；Emini に従って表面確率を決定する；Karplus-Schulz に従ったチェイン柔軟性；Jameson-Wolf に従った抗原性指標；Garnier-Osguthorpe-Robson に従った二次構造；Chou-Fasman に従った二次構造；及び予想されるグリコシル化部位を同定することを用いて使用することが可能である。当業者であれば、本明細書の教唆と組み合わせて得られる情報を使用して、本発明の組成物中で用い得る抗原性領域を容易に同定することが可能である。40

【0124】

10

20

30

40

50

特に好ましい実施形態では、組成物は、S T E C O 1 5 7 : H 7 及び / 若しくは O 1 5 7 : N MなどのS T E C O 1 5 7、並びに少なくとも1つの他のS T E Cセロタイプ、好ましくは少なくとも2つの他のS T E Cセロタイプ、さらに好ましくは、S T E C O 2 6、例えば、O 2 6 : H 1 1、O 1 0 3 : H 2などのS T E C O 1 0 3、及び / 若しくは O 1 1 1 : N MなどのS T E C O 1 1 1などの少なくとも3つの他のS T E Cセロタイプ、又はS T E C O 1 5 7に加えて上記のS T E Cセロタイプのうちのいずれかと反応する抗体を產生するS T E Cタンパク質若しくはその免疫原性断片を含有する。実施例において記載されるように、S T E C O 1 5 7 : H 7由来のT i r、E s p A、E s p B、E s p D、N l e A及びT c c pはそれぞれが、S T E C O 1 5 7 : H 7の他にS T E C O 2 6 : H 1 1、S T E C O 1 0 3 : H 2及びS T E C O 1 1 1 : N Mと反応する抗体を產生する(表5参照)。さらに、S T E C O 1 5 7 : H 7由来のE s p G、N l e E及びN l e Hのそれぞれは、S T E C O 1 5 7 : H 7の他にS T E C O 1 0 3 : H 2及びS T E C O 1 1 1 : N Mと反応する抗体を產生する(表5参照)。

【0125】

ある種の実施形態では、本発明は、1又は2以上のS T E Cエフェクタータンパク質及び / 又は1又は2以上のS T E C構造タンパク質由来の1を超えるエピトープを含む複数エピトープ融合タンパク質を対象とする。エピトープは、同一大腸菌S T E Cセロタイプ由来、又は好ましくは複数のS T E Cセロタイプ由来であることが可能である。さらに、エピトープは、同一S T E Cタンパク質由来である、又は同一若しくは異なるS T E Cセロタイプ由来の異なるS T E Cタンパク質由来であることが可能である。

【0126】

さらに具体的には、キメラは複数のエピトープ、同一若しくは異なるセロタイプ由來のいくつかの異なるS T E Cタンパク質の他にも複数の若しくはタンデム反復の選択されたS T E C配列、複数の若しくはタンデム反復の選択されたS T E Cエピトープ又はそのいかなる考え得る組合せでも含み得る。実施例において記載されるように、エピトープは、上記の技法を使用して同定し得る、又はS T E Cタンパク質の断片は、免疫原性及び全ポリペプチドに代わって組成物中で使用される活性断片について試験され得る。エピトープはスペーサーにより分離されていてもよい。選択されるS T E Cポリペプチド間の様々なスペーサー配列の戦略的使用は、対象構築物に増加した免疫原性を与えることが可能である。したがって、本発明下では、選択されるスペーサー配列は、1又は2以上のアミノ酸長の多種多様な部分をコードし得る。選択されるスペーサー群は、発現されるキメラがインビオにおいてタンパク質分解酵素により(A P C又は同様のものにより)プロセシングされていくつかのペプチドを生じることができるように、酵素切断部位も提供し得る。さらに、免疫原性ヘルパーT細胞エピトープを提供するような、一般に当技術分野で認識されている両親媒性及び / 又はらせん状ペプチド配列をコードする配列などのT細胞抗原性を提供するようにスペーサー配列を構築し得る。含まれる場合には、そのようなスペーサー配列により提供されることになる特定のT細胞エピトープの選択は、ワクチン接種されることになる特定の種に応じて変わり得る。

【0127】

特に好ましいのはアミノ酸スペーサー配列である。そのようなスペーサーは典型的には、1~500アミノ酸、好ましくは1~100アミノ酸、さらに好ましくは1~50アミノ酸、好ましくは1~25アミノ酸、もっとも好ましくは1~10アミノ酸、又は1~500の間の任意の整数を含むことになる。スペーサーアミノ酸は、様々なエピトープ間で同一でも異なっていてもよい。スペーサーとしての使用のために特に好ましいアミノ酸は、セリン、アラニン、グリシン及びバリンなどの小側鎖基のアミノ酸である。

【0128】

本明細書ではスペーサー配列を含む特定のキメラが例証されているが、融合構築物中に存在するエピトープのうちの1又は2以上が、介在スペーサー配列なしで別のエピトープに直に隣接することが可能であることも理解されるべきである。

【0129】

10

20

30

40

50

特定の S T E C 複数エピトープ融合タンパク質のスクレオチド及びアミノ酸配列は、それぞれ図 5 A 及び 5 B (配列番号 5 1 及び 5 2) に示されており、該配列の図表示は図 9 B に示されている。図 9 A 及び図 9 B に示されるように、このタンパク質には、4 つの異なる S T E C セロタイプ由来のエフェクタータンパク質 T i r 由来のエピトープが含まれる。その D N A 配列には、S T E C O 1 5 7 : H 7 の完全長コード配列の他に 2 4 0 塩基対の S T E C O 1 1 1 : N M T i r 、1 6 5 塩基対の S T E C O 2 6 : H 1 1 T i r 及び 9 0 塩基対の O 1 0 3 : H 2 T i r が含まれる。これらの配列は、アミノ酸 G l y と S e r の様々な組合せを含むスペーサーにより分離されている。

【 0 1 3 0 】

上記タンパク質には、N 末端から C 末端への順に、完全長 O 1 5 7 T i r 配列 (図 5 B のアミノ酸 1 ~ 5 5 8)、続いてリンカ - G l y - S e r - G l y - S e r 、続いて O 1 1 1 T i r のアミノ酸 2 7 9 ~ 3 5 8 (図 5 B におけるアミノ酸 5 6 5 ~ 6 4 4 に一致する)、続いてリンカ - S e r - G l y - S e r - G l y 、続いて O 2 6 T i r のアミノ酸 2 4 3 ~ 2 9 6 (図 5 B におけるアミノ酸 6 5 1 ~ 7 0 5 に一致する)、続いてリンカ - S e r - S e r - G l y - G l y 、続いて O 1 0 3 のアミノ酸 3 1 8 ~ 3 4 7 (図 5 B におけるアミノ酸 7 1 2 ~ 7 4 1 に一致する) が含まれる。図 5 B におけるアミノ酸 5 5 9 ~ 5 6 4 、6 4 5 ~ 6 5 0 及び 7 0 6 ~ 7 1 1 は、T i r 断片を挿入するのに使用される制限部位を表す。

【 0 1 3 1 】

I I . タンパク質コンジュゲート

S T E C タンパク質と複数エピトープ融合分子の免疫原性を増強するために、これに担体をコンジュゲートし得る。「担体」とは、所望の抗原と会合しているときに該抗原に免疫原性を与える任意の分子である。適切な担体の例には、タンパク質などの大きなゆっくり代謝される巨大分子；セファロース、アガロース、セルロース、セルロースビーズ及び同類のものなどの多糖類；ポリグルタミン酸、ポリリシン及び同類のものなどのポリマー-アミノ酸；アミノ酸コポリマー；不活性ウイルス粒子；破傷風トキソイドなどの細菌毒素、血清アルブミン、キーホールリンペットヘモシアニン、サイログロブリン、卵白アルブミン、血清クジラミオグロブリン及び当業者に周知の他のタンパク質が挙げられる。本発明の抗原に対する他の適切な担体には、米国特許第 5 , 0 7 1 , 6 5 1 号明細書に開示されるようなロタウイルスの V P 6 ポリペプチド又はその機能的断片が挙げられる。

【 0 1 3 2 】

これらの担体はその天然型で使用してもよく、又はその官能基含有量を、例えば、リシン残基のサクシニル化若しくは C y s チオラクトンとの反応により改変してもよい。スルフヒドリン基は、例えば、アミノ官能基と 2 - イミノチオラン又は 3 - (4 - プロピオン酸ジチオピリジルの N - ヒドロキシサクシニミドエステルとの反応により担体 (又は抗原) に組み込まれてもよい。適切な担体は、ペプチドの付着のためにスペーサーアーム (例えば、ヘキサメチレンジアミン又は類似の大きさの他の二機能性分子) を組み込むように改変され得る。

【 0 1 3 3 】

S T E C タンパク質と複数エピトープ融合分子は、パストレラ・ヘモロチカロイコトキシン (L K T , *Pasteurella haemolytica* leukotoxin) ポリペプチドなどの毒素の R T X ファミリーのメンバー (下にさらに記載される) にコンジュゲートすることも可能である。例えば、1 9 9 3 年 4 月 2 9 日出願の国際公開第 9 3 / 0 8 2 9 0 号パンフレットの他にも米国特許第 5 , 2 3 8 , 8 2 3 号明細書、米国特許第 5 , 2 7 3 , 8 8 9 号明細書、米国特許第 5 , 7 2 3 , 1 2 9 号明細書、米国特許第 5 , 8 3 7 , 2 6 8 号明細書、米国特許第 5 , 4 2 2 , 1 1 0 号明細書、米国特許第 5 , 7 0 8 , 1 5 5 号明細書、米国特許第 5 , 9 6 9 , 1 2 6 号明細書、米国特許第 6 , 0 2 2 , 9 6 0 号明細書、米国特許第 6 , 5 2 1 , 7 4 6 号明細書及び米国特許第 6 , 7 9 7 , 2 7 2 号明細書を参照されたい。これら特許文献はすべて参照によりその全体を本明細書に組み込まれている。

【 0 1 3 4 】

10

20

30

40

50

ロイコトキシンポリペプチド担体は、カルボキシ末端コンセンサスアミノ酸配列 G 1 y - G 1 y - X - G 1 y - X - A s p により特徴付けられる分子のファミリーに属するタンパク質由来であり (Highlander et al., DNA (1989) 8:15-28) 、 X は L y s 、 A s p 、 V a l 又は A s n である。そのようなタンパク質は、とりわけ、 P . ヘモリチカ及びアクチノバチルス・ブルロニューモニア由来のロイコトキシンの他にも大腸菌アルファ溶血素を含む (Strathdee et al., Infect. Immun. (1987) 55:3233-3236; Lo, Can. J. Vet. Res. (1990) 54:S33-S35; Welch, Mol. Microbiol. (1991) 5:521-528) 。毒素のこのファミリーは、毒素の「 R T X 」ファミリーとして知られている (Lo, Can. J. Vet. Res. (1990) 54:S33-S35) 。いくつかのロイコトキシンのヌクレオチド配列及び対応するアミノ酸配列は公知である。例えば、米国特許第 4 , 9 5 7 , 7 3 9 号明細書及び米国特許第 5 , 0 5 5 , 4 0 0 号明細書 ; Lo et al., Infect. Immun. (1985) 50:667-67; Lo et al., Infect. Immun. (1987) 55:1987-1996; Strathdee et al., Infect. Immun. (1987) 55:3233-3236; Highlander et al., DNA (1989) 8:15-28; Welch, Mol. Microbiol. (1991) 5:521-528 を参照されたい。本明細書で使用するための免疫原性ロイコトキシンポリペプチドの特定の例には、 L K T 3 4 2 、 L K T 3 5 2 、 L K T 1 1 1 、 L K T 3 2 6 及び L K T 1 0 1 が挙げられるが、これらは下により詳細に記載されている。

10

【 0 1 3 5 】

「 L K T 3 5 2 」とは、プラスミド pAA352 中に存在する 1 k t A 遺伝子 (図 1 0) 由来であり、米国特許第 5 , 4 7 6 , 6 5 7 号明細書に記載されているタンパク質を意味する。この特許文献は参照によりその全体を本明細書に組み込まれている。 L K T 3 5 2 は天然ロイコトキシン配列の N 末端短縮を有し、その天然分子のアミノ酸 3 8 ~ 9 5 1 を含む。したがって、プラスミド pAA352 中の遺伝子は、該分子の細胞障害性部分を欠く、 9 1 4 アミノ酸を有する短縮されたロイコトキシンをコードしている。 L K T 3 5 2 のヌクレオチド及びアミノ酸配列は図 1 1 A ~ 1 1 I に示されている。

20

【 0 1 3 6 】

「 L K T 1 1 1 」とは、プラスミド pCB111 中に存在する 1 k t A 遺伝子由来のロイコトキシンポリペプチドを意味する。該プラスミド及びこの遺伝子のヌクレオチド配列及び対応するアミノ酸配列は、米国特許第 5 , 7 2 3 , 1 2 9 号明細書及び米国特許第 5 , 9 6 9 , 1 2 6 号明細書に記載されており、これらの特許文献は参照によりその全体を本明細書に組み込まれている。該遺伝子は、約 1 3 0 0 b p 長の内部の D N A 断片を取り除くことにより、プラスミド pAA352 中に存在する組換えロイコトキシン遺伝子から開発されたロイコトキシンの短縮版をコードする。 L K T 1 1 1 ポリペプチドは 5 2 k D a (9 9 k D a の L K T 3 5 2 ポリペプチドと比べて) の推定分子量を有し、担体分子として機能する能力を保持しており、本発明の融合タンパク質を作製するのに使用するための都合のよい制限部位を含有している。

30

【 0 1 3 7 】

「 L K T 1 0 1 」とは、プラスミド pAA101 中に存在する 1 k t A 遺伝子由来のロイコトキシンポリペプチドを意味する。該プラスミド及び L K T 1 0 1 の配列は米国特許第 5 , 4 7 6 , 6 5 7 号明細書 (その図 3 参照) に記載されており、この特許文献は参照によりその全体を本明細書に組み込まれている。 L K T 1 0 1 ポリペプチドは、該遺伝子の 5 ' 末端から独自の PstI 制限エンドヌクレアーゼ部位までを含有する C 末端短縮型の 1 k t A 遺伝子から発現される。したがって、 L K T 1 0 1 は、天然完全長 P . ヘモリチカロイコトキシンの最初の 3 7 7 アミノ酸を含む。

40

【 0 1 3 8 】

「 L K T 3 4 2 」とは、米国特許第 5 , 4 7 6 , 6 5 7 号明細書に記載されるプラスミド pAA342 中に存在する 1 k t A 遺伝子由来のロイコトキシンポリペプチドを意味する。この特許文献は参照によりその全体を本明細書に組み込まれている。 L K T 3 4 2 は、天然ロイコトキシン配列の N 末端と C 末端短縮を有し、天然ロイコトキシンのアミノ酸 3 8 ~ 3 3 4 を含む。

【 0 1 3 9 】

50

上記の様々な LKT 分子は代表的なものであり、STEC タンパク質及び融合物の免疫原性を増強する他のロイコトキシン分子も本明細書において利用法があることになる。さらに、ロイコトキシン分子は対応するプラスミド中に存在する配列に物理的に由来する必要はないが、例えば、下記のように、化学的合成又は組換え産生による方法を含むいかなる方法において生み出しててもよい。

【0140】

さらに、STEC タンパク質と複数エピトープ融合分子を、担体分子のカルボキシル末端若しくはアミノ末端のどちらかに又は両方に、又は内部の部位で担体に融合させることができ可能である。

【0141】

担体は、標準カップリング反応を使用して所望のタンパク質に物理的にコンジュゲートさせることができ可能である。代わりに、キメラ分子は、選択される STEC タンパク質又は STEC 複数エピトープ融合分子をコードする遺伝子の 1 若しくは 2 以上のコピー又はその断片に、適切なポリペプチド担体をコードする遺伝子を融合させることなどによる、本発明において使用するために組換えることが可能である。

【0142】

ロイコトキシン担体を含む例となるキメラ構築物のスクレオチド及びアミノ酸配列は、それぞれ図 6A 及び 6B に示されており、該配列の図表示は図 9C に示されている。この構築物は、ロイコトキシン担体分子が N 末端に存在すること以外は上記キメラ Tir 構築物と同一である。

【0143】

該タンパク質は、N 末端から C 末端への順に、pAA352 由来の短いベクター配列（図 6B のアミノ酸 1 ~ 9 に一致する）、LKT352（図 6B のアミノ酸 10 ~ 923 に一致する）、pAA352 由来の短いベクター配列（図 6B のアミノ酸 924 ~ 926）、O157 Tir のアミノ酸 2 ~ 558（図 6B におけるアミノ酸 927 ~ 1483 に一致する）、続いてリンカ - G1y - Ser - G1y - Ser、続いて O111 Tir のアミノ酸 279 ~ 358（図 6B におけるアミノ酸 1490 ~ 1569 に一致する）、続いてリンカ - Ser - G1y - Ser - G1y、続いて O26 Tir のアミノ酸 243 ~ 296（図 6B においてアミノ酸 1576 ~ 1630 に一致する）、続いてリンカ - Ser - Ser - G1y - G1y、続いて O103 のアミノ酸 318 ~ 347（図 6B においてアミノ酸 1635 ~ 1666 に一致する）を含む。図 6B におけるアミノ酸 1484 ~ 1489、1570 ~ 1575 及び 1631 ~ 1634 は、Tir 断片を挿入するのに使用される制限部位を表している。

【0144】

III. STEC タンパク質、複数エピトープ融合構築物及びコンジュゲートの作製
STEC タンパク質及びその免疫原性断片並びに担体分子とのコンジュゲートは、いかなる適切な方法でも（例えば、組換え発現、細胞培養からの精製、化学的合成、等）及び様々な形態で（例えば、天然、変異体、融合物、等）調製することが可能である。そのようなタンパク質及びコンジュゲートを調製するための手段は当技術分野ではよく理解されている。タンパク質及びコンジュゲートは、好ましくは実質的に純粋な形態で（すなわち、他の宿主細胞又は非宿主細胞タンパク質が実質的でない）調製される。

【0145】

タンパク質及びそのコンジュゲートは、ペプチド技術分野の当業者に公知であるいくつかの技法のうちのいずれによっても、都合よく、化学的に合成することが可能である。一般に、これらの方法は、伸長しているペプチド鎖への 1 又は 2 以上のアミノ酸の連続付加を用いる。通常、第 1 アミノ酸のアミノ基又はカルボキシル基のどちらかは適切な保護基により保護されている。次に、保護された又は誘導体化されたアミノ酸を不活性固体支持体に付着させる、又はアミド連鎖の形成を可能にする条件下で、相補（アミノ若しくはカルボキシル）基が適切に保護されている配列において次のアミノ酸を付加することにより溶液中で利用することが可能である。次に、保護基は、新たに付加されたアミノ酸残基か

ら取り除かれ、その後次のアミノ酸（適切に保護されている）が付加される、など。望ましいアミノ酸が正しい配列に連結された後、残っている保護基はいずれも（固相合成法が使用される場合はいずれの固体支持体でも）順次又は同時に取り除かれて最終ポリペプチドを与える。この一般的な手順の簡単な改変により、例えば、保護されたトリペプチドを適切に保護されたジペプチドと（キラル中心をラセミ化しない条件下で）カップリングさせて脱保護後ペニタペプチドを形成させることにより、一度に1を超えるアミノ酸を伸長している鎖に付加することが可能である。例えば、固相ペプチド合成法については、J. M. Stewart and J. D. Young, *Solid Phase Peptide Synthesis* (Pierce Chemical Co., Rockford, IL 1984) 及び G. Barany and R. B. Merrifield, *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology*, editors E. Gross and J. Meienhofer, Vol. 2, (Academic Press, New York, 1980), pp. 3-254を参照し、古典的な溶液合成法については、M. Bodansky, *Principles of Peptide Synthesis*, (Springer-Verlag, Berlin 1984) 及び E. Gross and J. Meienhofer, Eds., *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology*, Vol. 1を参照されたい。

【0146】

典型的な保護基には、t - ブチルオキシカルボニル (Boc, butyloxycarbonyl)、9 - フルオレニルメトキシカルボニル (Fmoc, fluorenylmethoxycarbonyl) ベンジルオキシカルボニル (Cbz, benzyloxycarbonyl)；p - トルエンスルホニル (Tsx, toluenesulfonyl)；2, 4 - ジニトロフェニル；ベンジル (BzI, benzyl)；ビフェニルイソプロピルオキシカルボキシカルボニル、t - アミルオキシカルボニル、イソボルニルオキシカルボニル、o - ブロモベンジルオキシカルボニル、シクロヘキシリル、イソプロピル、アセチル、o - ニトロフェニルスルフォニル及び同類のものが挙げられる。典型的な固形支持体は架橋ポリマー支持体である。これらには、ジビニルベンゼン架橋スチレンベースポリマー、例えば、ジビニルベンゼン - ヒドロキシメチルスチレン共重合体、ジビニルベンゼン - クロロメチルスチレン共重合体及びジビニルベンゼン - ベンズヒドリルアミノポリスチレン共重合体を挙げることが可能である。

【0147】

本発明のタンパク質及びコンジュゲートは、同時複数ペプチド合成の方法などによる他の方法によって化学的に調製することも可能である。例えば、Houghten Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1985) 82:5131-5135; 米国特許第4,631,211号明細書を参照されたい。代わりに、上記タンパク質及びコンジュゲートは組換え的に作製することが可能である。例えば、代表的な組換えS T E Cタンパク質の作製の説明については、国際公開第97/40063号パンフレット及び国際公開第99/24576号パンフレット及び米国特許第7,300,659号明細書を参照されたい。これら広報及び特許は参考によりその全体を本明細書に組み込まれている。本発明のタンパク質は、発現のためにN末端メチオニンを有していてもよいが、必ずしも含む必要はない。

【0148】

望ましいタンパク質のコード配列が単離され又は合成されると、発現のためにいかなる適切なベクター又はレプリコンにもクローニングすることが可能である。数多くのクローニングベクターが当業者には公知であり、適切なクローニングベクターの選択は好みによる。当技術分野では種々の細菌、酵母、植物、哺乳動物及び昆虫発現系が利用可能であり、そのような発現系のいずれでも使用することが可能である。随意に、これらのタンパク質をコードするポリヌクレオチドを無細胞翻訳系において翻訳させることができある。そのような方法は当技術分野では周知である。

【0149】

クローニングのための組換えDNAベクター及びそのベクターが形質転換することが可能な宿主細胞の例には、バクテリオファージ（大腸菌）、pBR322（大腸菌）、pACYC177（大腸菌）、pKT230（グラム陰性菌）、pGV1106（グラム陰性菌）、pLAFR1（グラム陰性菌）、pME290（非大腸菌グラム陰性菌）、pHV14（大腸菌及びバチルス・スブチリス (*Bacillus subtilis*)）、pBD9（バチルス (*Bacillus*)）、pIJ61（ストレプトマイセス (*Streptomyces*)）。

10

20

30

40

50

eptomyces))、pUC6(ストレプトマイセス)、YIp5(サッカロミセス(Saccharomyces))、YCp19(サッカロミセス)並びにウシパピローマウイルス(哺乳動物細胞)が挙げられる。一般的には、DNA Cloning: Vols. I & II(同上); Sambrook et al. (同上); B. P. erbal(同上)を参照されたい。

【0150】

バキュロウイルス系などの昆虫細胞発現系も使用することが可能であり、当業者には公知であり、例えば、Summers and Smith, Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No. 1555(1987)に記載されている。バキュロウイルス/昆虫細胞発現系のための材料及び方法は、とりわけ、Invitrogen社製、San Diego Calif.からキットの形態('MaxBac' kit)で市販されている。10

【0151】

植物発現系を使用して免疫原性タンパク質を作製することも可能である。一般に、そのような系はウイルスベースのベクターを使用して植物細胞に異種遺伝子をトランスフェクトさせる。そのような系の説明は、例えば、Porta et al., Mol. Biotech. (1996) 5:209-221; and Hackland et al., Arch. Virol. (1994) 139:1-22を参照されたい。

【0152】

Tomei et al., J. Virol. (1993) 67:4017-4026 and Selby et al., J. Gen. Virol. (1993) 74:1103-1113に記載されるワクシニアベースの感染/トランスフェクション系などのウイルス系も、本発明に関して利用法があることになる。この系では、細胞は先ず、バクテリオファージT7 RNAポリメラーゼをコードするワクシニアウイルス組換え体をインビトロでトランスフェクトされる。このポリメラーゼは、T7プロモーターを抱える錆型のみを転写する点で、精巧な特異性を示す。感染に続いて、細胞は、T7プロモーターにより推進される所望のDNAをトランスフェクトされる。細胞質においてワクシニアウイルス組換え体から発現されるポリメラーゼは、トランスフェクトされたDNAをRNAに転写し、その後RNAは宿主翻訳機械によりタンパク質に翻訳される。該方法は、大量のRNA及びその翻訳産物(複数可)の高レベル一過性細胞質産生を提供する。20

【0153】

望ましい免疫原性ペプチドをコードするDNA配列が、この発現構築を含有するベクターにより形質転換される宿主細胞においてRNAに転写されるように、コード配列を、プロモーター、リボソーム結合部位(細菌発現のために)及び隨意にオペレーター(本明細書では、全体では「制御」エレメントと呼ばれる)の制御下に置くことが可能である。コード配列は、シグナルペプチド又はリーダー配列を含有していてもしてもよい。リーダー配列は、翻訳後プロセシングにおいて宿主により取り除かれることが可能である。例えば、米国特許第4,431,739号明細書、米国特許第4,425,437号明細書、米国特許第4,338,397号明細書を参照されたい。30

【0154】

宿主細胞の増殖に関連してペプチド配列の発現を調節することを可能にする他の調節配列も望ましい場合がある。そのような調節配列は当業者には公知であり、例には、調節化合物の存在を含む化学的又は物理的刺激に応答して遺伝子の発現にスイッチを入れる又は切る調節配列が挙げられる。他の種類の調節エレメント、例えば、エンハンサー配列もベクター内に存在し得る。40

【0155】

制御配列及び他の調節配列は、ベクターへの挿入に先立ってコード配列にライゲートされ得る。代わりに、コード配列を、すでに制御配列及び適切な制限部位を含有する発現ベクターに直接クローニングすることが可能である。

【0156】

いくつかの場合、コード配列が適切な配向を有する制御配列に結合され得るように、すなわち正しい読み枠を維持するために、コード配列を改変することが必要になる場合がある。免疫原性タンパク質の変異体又はアナログを作製することが望ましい場合もある。変異体又はアナログは、タンパク質をコードする配列の一部の欠失により、配列の挿入によ50

り、及び／又は配列内の 1 若しくは 2 以上のヌクレオチドの置換により調製し得る。部位特異的突然変異誘発などのヌクレオチド配列を改変するための技法は当業者には周知である。例えば、Sambrook et al. (同上); DNA Cloning, Vols. I and II (同上); Nucleic Acid Hybridization (同上)を参照されたい。

【 0 1 5 7 】

次に、発現ベクターを使用して適切な宿主細胞を形質転換する。いくつかの哺乳動物細胞株が当技術分野では公知であり、チャイニーズハムスター卵巣 (C H O , Chinese hamster ovary) 細胞、HeLa 細胞、ベビーハムスター腎臓 (B H K , baby hamster kidney) 細胞、サル腎臓細胞 (C O S) 、ヒト肝細胞癌細胞 (例えは、Hep G2) の他にも他の細胞などの、しかしこれらに限定されないアメリカ培養細胞株保存機関 (A T C C , American Type Culture Collection) から入手可能な不死化細胞株が挙げられる。同様に、大腸菌、バチルス・スプチリス及び連鎖球菌 (Streptococcus) 菌種などの細菌宿主は、本発現構築物に関して利用法があることになる。本発明において有用な酵母宿主には、とりわけ、サッカロマイセス・セレビシエ (Saccharomyces cerevisiae) 、カンジダ・アルビカンス (Candida albicans) 、カンジダ・マルトーサ (Candida maltosa) 、ハンゼヌラ・ポリモルファ (Hansenula polymorpha) 、クルイベロマイセス・フラギリス (Kluyveromyces fragilis) 、クルイベロマイセス・ラクチス (Kluyveromyces lactis) 、ピキア・ギリエルモンディ (Pichia guillermondii) 、ピキア・パストリス (Pichia pastoris) 、シゾサッカロミセス・ポンベ (Schizosaccharomyces pombe) 及びヤロウイア・リポリティカ (Yarrowia lipolytica) が挙げられる。バキュロウイルス発現ベクターを用いて使用するための昆虫細胞には、とりわけ、ネッタイシマカ (Aedes aegypti) 、オートグラファ・カリフォルニカ (Autographa californica) 、カイコ (Bombyx mori) 、キイロショウジョウバエ (Drosophila melanogaster) 、ヨトウガ (Spodoptera frugiperda) 及びイラクサギンウワバ (Trichoplusia ni) が挙げられる。

【 0 1 5 8 】

選択される発現系及び宿主に応じて、本発明のペプチドは、所望のタンパク質が発現される条件下で上記の発現ベクターにより形質転換された宿主細胞を培養することにより产生される。適切な培養条件の選択は当技術分野の範囲内である。次に該細胞は、細胞は溶解させるがペプチドは実質的に無傷のままにしておく化学的、物理的又は機械的手段を使用して、破壊される。細胞壁又は膜から成分を取り除くことにより、例えは、免疫原性ポリペプチドの漏出が起こるように、洗浄剤又は有機溶剤を使用することにより、細胞内タンパク質を得ることも可能である。そのような方法は当業者には公知であり、例えは、Protein Purification Applications: A Practical Approach, (E. L. V. Harris and S. A ngal, Eds., 1990) に記載されている。

【 0 1 5 9 】

例えは、本発明に関して使用するための細胞を破壊する方法には、音波処理又は超音波処理；攪拌；液体又は固体押出；熱処理；凍結融解；乾燥；爆発的減圧；浸透圧衝撃；トリプシン、ノイラミニダーゼ及びリゾチームなどのプロテアーゼを含む溶解酵素を用いた処理；アルカリ処理；並びに胆汁塩、ドデシル硫酸ナトリウム、Triton、NP40及びCHAPSなどの界面活性剤及び溶剤の使用が挙げられるがこれらに限定されない。細胞を破壊するに使用される特定の技法は、主に選択の問題であり、ポリペプチドが発現される細胞型、培養条件及び任意の使用される前処理に依拠することになる。

【 0 1 6 0 】

細胞の破壊に続いて、細胞残屑は一般に遠心分離により取り除かれ、細胞内產生タンパク質は、カラムクロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、電気泳動、HPLC、免疫吸着剤法、アフィニティークロマトグラフィー、免疫沈降及び同類のものなどの、しかしこれらに限定されない標準精製法を使用してさらに精製される。

【 0 1 6 1 】

例えは、本発明の細胞内タンパク質を得るための 1 つの方法は、特異的抗体を使用する

10

20

30

40

50

免疫アフィニティークロマトグラフィーなどによるアフィニティー精製を含む。適切なアフィニティー樹脂の選択は当技術分野の範囲内である。アフィニティー精製後、ペプチドは、上記の技法のうちのいずれかなどによる、当技術分野で周知の従来技法を使用してさらに精製することが可能である。

【0162】

IV. STC 抗体

本発明のSTCタンパク質及び複数エピトープ融合タンパク質を使用して、治療目的、診断目的及び精製目的の抗体を作製することが可能である。これらの抗体はポリクローナル若しくはモノクローナル抗体調製物、単特異性抗血清、ヒト抗体でもよく、又は、ヒト化抗体、改变抗体、 $F(ab')_2$ 断片、 $F(ab)$ 断片、 Fv 断片、單一ドメイン抗体、二量体若しくは三量体抗体断片構築物、ミニボディー、又は問題の抗原に結合するその機能的断片などのハイブリッド又はキメラ抗体でもよい。抗体は当業者に周知であり、例えば、米国特許第4,011,308号明細書、米国特許第4,722,890号明細書、米国特許第4,016,043号明細書、米国特許第3,876,504号明細書、米国特許第3,770,380号明細書及び米国特許第4,372,745号明細書に開示されている技法を使用して作製される。

10

【0163】

例えば、該タンパク質を使用して、診断アッセイ及び検出アッセイにおける使用のために、精製のために、並びに受動免疫のためなどの治療法としての使用のためにSTC特異的ポリクローナル及びモノクローナル抗体を作製することが可能である。そのようなポリクローナル及びモノクローナル抗体は、問題のSTCタンパク質に特異的に結合する。特に、STCタンパク質を使用して、マウス、ラット、ウサギ、ヤギ又はウマなどの哺乳動物に該タンパク質を投与することによりポリクローナル抗体を產生することが可能である。免疫動物由来の血清は採取され、例えば、硫酸アンモニウムを用いた沈殿、続いてクロマトグラフィー、好ましくはアフィニティークロマトグラフィーにより、抗体は血漿から精製される。ポリクローナル抗血清を作製し処理するための技法は当技術分野では公知である。

20

【0164】

細胞表面抗原に存在するエピトープに対して向けられるマウス及び/又はウサギモノクローナル抗体も容易に產生することが可能である。そのようなモノクローナル抗体を產生するために、抗原を生理食塩水に、好ましくは、フロイント完全アジュvant（「FCA」, Freund's complete adjuvant）などのアジュvantに混合する又は乳化し、混合液又は乳濁液を非経口的に（一般には、皮下に若しくは筋肉内に）注射することなどにより、ウサギ又はマウスなどの所望の哺乳動物を免疫する。動物は、生理食塩水中の抗原の1又は2以上の注射で、好ましくはフロイント不完全アジュvant（「FIA」, Freund's incomplete adjuvant）を使用して、一般に2~6週間後にブーストされる。

30

【0165】

抗体は、当技術分野で公知の方法を使用して、インビトロ免疫化によっても生み出され得る。例えば、James et al., J. Immunol. Meth. (1987) 100:5-40を参照されたい。

【0166】

次に、ポリクローナル抗血清は免疫動物から得られる。しかし、余分な血清まで動物から採血するのではなく、脾臓（及びいくつかの大きなリンパ節でもよい）を取り除き、単細胞に解離させる。必要であれば、脾臓細胞（脾細胞）を、抗原を用いて被膜されたプレート又はウェルに細胞懸濁液を適用させることによりスクリーニングし得る（非特異的接着細胞の除去後）。B細胞は、抗原に特異的な膜結合免疫グロブリンを発現しているが、プレートに結合することになり、残りの懸濁液を用いても洗い流されない。次に、こうして得られるB細胞又はすべての解離された脾細胞は、不死化細胞株（「融合パートナー」とも呼ばれる）由来の細胞と融合しハイブリドーマを形成するよう誘導される。典型的には、融合パートナーは、特異的な媒体を使用する得られたハイブリドーマの選択を可能にする特性を含む。例えば、融合パートナーは、ヒポキサンチン/アミノブテリン/チミジ

40

50

ン (H A T , hypoxanthine/aminopterin/thymidine) 感受性であることが可能である。

【 0 1 6 7 】

ウサギ - ウサギハイブリドーマが望まれる場合、不死化細胞株はウサギ由来であることになる。そのようなウサギ由来融合パートナーは当技術分野では公知であり、例えば、Spieker-Polet et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA (1995) 92:9348-9352 及び米国特許第 5,675,063 号明細書に記載されるウサギ形質細胞腫由来の細胞などのリンパ系起源の細胞又は米国特許第 4,859,595 号明細書に記載される T P - 3 融合パートナーが挙げられる。これらの文献は参照によりその全体を本明細書に組み込まれている。ウサギ - マウスハイブリドーマ又はラット - マウス若しくはマウス - マウスハイブリドーマ又は同様のものが望ましい場合は、マウス融合パートナーは、リンパ系起源の細胞などのマウス由来の、典型的にはマウス骨髄腫細胞株由来の不死化細胞株由来になる。いくつかのそのような細胞株は当技術分野では公知であり、ATCC から入手可能である。

10

【 0 1 6 8 】

融合は、当技術分野で周知の技法を使用して実現される。融合を促進する化学物質は一般にフソゲン (fusogen) と呼ばれる。これらの薬剤は極端に親水性であり膜接触を促進する。細胞融合の 1 つの特に好ましい方法は、ポリエチレングリコール (P E G , polyethylene glycol) を使用する。細胞融合の別の方法は、電気融合である。この方法では、細胞は、細胞膜電位を変化させる前もって決められた放電に曝露される。細胞融合のための追加の方法は、プリジッド融合法が挙げられる。この方法では、抗原はビオチン化され、融合パートナーはアビジン化される。これらの細胞を 1 つに合わせると、抗原反応性 B 細胞 - 抗原 - ビオチン - アビジン - 融合パートナー架橋が形成される。これにより、抗原反応性細胞と不死化細胞との特異的融合が可能になる。該方法は、細胞融合を促進するために化学的又は電気的手段をさらに用い得る。

20

【 0 1 6 9 】

融合に続いて、細胞は選択培地（例えば、H A T 培地）で培養される。抗体分泌を増強するために、I L - 6 などの分泌刺激効果を有する薬剤を使用してもよい。例えば、Ligori et al., Hybridoma (2001) 20: 189-198 を参照されたい。得られたハイブリドーマは限界希釈により薄くことが可能であり、免疫抗原に特異的に結合し（無関係な抗原には結合しない）抗体の産生についてアッセイされる。次に、選択されるモノクローナル抗体分泌ハイブリドーマはインビトロで（例えば、組織培養瓶若しくは中空線維反応器（hollow fiber reactor）において）又はインビボで（例えば、マウスにおける腹水として）培養される。例えば、S T E C タンパク質特異的抗体を産生しているハイブリドーマは、R I A 又は E L I S A を使用して同定し、半流動寒天におけるクローニングにより又は限界希釈により単離することが可能である。望ましい抗体を産生しているクローンは、スクリーニングをもう一巡行うことにより単離することが可能である。

30

【 0 1 7 0 】

本発明のモノクローナル抗体を産生するための代わりの技法は、選択リンパ球抗体法 (S L A M , selected lymphocyte antibody method) である。この方法は、大集団のリンパ球細胞内で望ましい特異性又は機能を有する抗体を産生している単一リンパ球を同定する。次に、抗体の特異性をコードする遺伝情報（すなわち、免疫グロブリン V_H 及び V_L D N A ）はレスキューされクローニングされる。この方法の説明については、例えば、Babcock et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1996) 93:7843-7848 を参照されたい。

40

【 0 1 7 1 】

ウサギモノクローナル抗体並びにウサギ - ウサギ及びウサギ - マウス融合体からウサギモノクローナル抗体を作る方法の追加の説明については、例えば、米国特許第 5,675,063 号明細書（ウサギ - ウサギ）、米国特許第 4,859,595 号明細書（ウサギ - ウサギ）、米国特許第 5,472,868 号明細書（ウサギ - マウス）及び米国特許第 4,977,081 号明細書（ウサギ - マウス）を参照されたい。従来のマウスモノクローナル抗体の作製の説明については、例えば、Kohler and Milstein, Nature (1975) 256:495-497 を参照されたい。

50

【0172】

キメラ抗体を提供するのが望ましい場合がある。「キメラ抗体」とは、好ましくは組換え技法を使用して得られ、ヒト（免疫学的に「関係のある」種、例えば、チンパンジーを含む）と非ヒト成分の両方を含む抗体を指す。そのような抗体は「ヒト化抗体」とも呼ばれる。好ましくは、ヒト化抗体は非ヒト免疫グロブリン配列由来の最小配列を含有する。大部分、ヒト化抗体は、レシピエントの超可変領域由来の残基が、望ましい特異性、親和性及び能力を有するマウス、ラット、ウサギ又は非ヒト靈長類などの非ヒト種の超可変領域由来の残基（ドナー抗体）で置き換えられているヒト免疫グロブリン（レシピエント抗体）である。例えば、米国特許第5,225,539号明細書、米国特許第5,585,089号明細書、米国特許第5,693,761号明細書、米国特許第5,693,762号明細書、米国特許第5,859,205号明細書を参照されたい。いくつかの例では、ヒト免疫グロブリンのフレームワーク残基は対応する非ヒト残基で置き換えられている（例えば、米国特許第5,585,089号明細書、米国特許第5,693,761号明細書、米国特許第5,693,762号明細書参照）。さらに、ヒト化抗体は、レシピエント抗体にもドナー抗体にも存在しない残基を含み得る。これらの改変物は、抗体性能をさらに洗練するために（例えば、望ましい親和性を得るために）作られる。一般に、ヒト化抗体は、超可変領域のすべて又は実質的にすべてが非ヒト免疫グロブリンの超可変領域に一致しており、フレームワーク領域のすべて又は実質的にすべてがヒト免疫グロブリン配列のフレームワーク領域である、少なくとも1つの典型的には2つの可変ドメインの実質的にすべてを含むことになる。ヒト化抗体は、免疫グロブリン定常領域（Fc）、典型的にはヒト免疫グロブリンの定常領域の少なくとも一部を含むことになってもよい。さらに詳細な点は、Jones et al., Nature (1986) 331:522-525; Riechmann et al., Nature (1988) 332:323-329; and Presta, Curr. Op. Struct. Biol. (1992) 2:593-596を参照されたい。

【0173】

非ヒト哺乳動物宿主、さらに具体的には、不活性化された内在性免疫グロブリン（Ig）座により特徴付けられるトランスジェニックマウスにおいて產生される異種又は改変抗体も包含される。そのようなトランスジェニック動物では、宿主免疫グロブリンの軽鎖及び重鎖サブユニットの発現のためのコンピテント内在性遺伝子は、非機能性にされ類似のヒト免疫グロブリン座で置換されている。これらのトランスジェニック動物は、軽鎖又は重鎖宿主免疫グロブリンサブユニットの実質的非存在下でヒト抗体を产生する。例えば、米国特許第5,939,598号明細書を参照されたい。

【0174】

所望のタンパク質を認識する能力を保持している抗体断片も本明細書において利用法があることになる。無傷の抗体分子の免疫学的結合特性を示すことができる抗原結合部位を含むいくつかの抗体断片は当技術分野では公知である。例えば、機能的抗体断片は、例えば、ペプシンを使用して抗体分子から抗原結合に関与しない定常領域を切断してF(ab')2断片を作製することにより作製することが可能である。これらの断片は、2つの抗原結合部位を含有するが、重鎖のそれぞれ由来の定常領域の一部を欠くことになる。同様に、必要であれば、1つの抗原結合部位を含むFab断片を、例えば、パパインを用いてポリクローナル又はモノクローナル抗体を消化することにより、作製することが可能である。重鎖と軽鎖の可変領域のみを含む機能的断片を、組換え產生又は免疫グロブリン分子の優先的タンパク質切斷などの標準技法を使用して作製することも可能である。これらの断片はFvとして知られている。例えば、Inbar et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA (1972) 69:2659-2662; Hochman et al., Biochem. (1976) 15:2706-2710; and Ehrlich et al., Biochem. (1980) 19:4091-4096を参照されたい。

【0175】

ファージディスプレイ法を使用して、インビトロで抗体分子集団を拡大することが可能である。Saiki, et al., Nature (1986) 324:163; Scharf et al., Science (1986) 233:1076; 米国特許第4,683,195号明細書及び米国特許第4,683,202号明細

10

20

30

30

40

50

書; Yang et al., J Mol Biol. (1995) 254:392; Barbas, III et al., Methods: Comp. Meth Enzymol. (1995) 8:94; Barbas, III et al., Proc Natl Acad Sci USA(1991) 88:7978.

【0176】

產生されると、ファージディスプレイライブラリーを使用して、F a b 分子の免疫学的結合親和性を公知の技法を使用して改良することが可能である。例えば、Figini et al., J. Mol. Biol (1994) 239:68を参照されたい。ファージジディスプレイライブラリーから選択される F a b 分子の重鎖と軽鎖部分のコード配列は、単離する又は合成し、発現のためのいかなる適切なベクター又はレプリコンにでもクローニングすることが可能である。上記の発現系を含むいかなる適切な発現系でも使用することが可能である。

10

【0177】

一本鎖抗体も作製することが可能である。一本鎖 F v (「 s F v 」又は「 s c F v 」) ポリペプチドは、ペプチドコードリンカーにより連結された V H - 及び V L - コード遺伝子を含む遺伝子融合体から発現される共有結合 V H - V L ヘテロ二量体である。Huston et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA (1988) 85:5879-5883。抗体 V 領域由来の自然に凝集しているが化学的に分離された軽鎖及び重鎖ポリペプチド鎖を、抗原結合部位の構造に実質的に類似している三次元構造に折り畳まれることになる s F v 分子に変換するための化学的構造体(リンカー)を識別し発達させるいくつかの方法がすでに記載されている。例えば、米国特許第 5,091,513 号明細書、米国特許第 5,132,405 号明細書及び米国特許第 4,946,778 号明細書を参照されたい。s F v 分子は当技術分野に記載される方法を使用して作製され得る。例えば、Huston et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA (1988) 85:5879-5883; 米国特許第 5,091,513 号明細書、米国特許第 5,132,405 号明細書及び米国特許第 4,946,778 号明細書を参照されたい。設計基準は、リンカーが丸くなる、又は二次構造を形成する傾向がない小親水性アミノ酸残基から一般に形成される 1 つの鎖の C 末端ともう一方の鎖の N 末端間の距離をまたがるのに適切な長さを決定することを含む。そのような方法は当技術分野すでに記載されている。例えば、米国特許第 5,091,513 号明細書、米国特許第 5,132,405 号明細書及び米国特許第 4,946,778 号明細書を参照されたい。適切なリンカーは一般に、グリシンとセリン残基が交互になったセットのポリペプチド鎖を含み、可溶性を増強するために挿入されるグルタミン酸及びリシン残基を含んでもよい。

20

【0178】

「ミニ抗体」又は「ミニボディー」も本発明に関して利用法があることになる。ミニボディーは、ヒンジ領域により s F v から分離されているその C 末端にオリゴマー形成ドメインを含む s F v ポリペプチド鎖である。Pack et al., Biochem. (1992) 31: 1579-1584。オリゴマー形成ドメインは、追加のジスルフィド結合によりさらに安定化することが可能である自己会合性ヘリックス、例えば、ロイシンジッパーを含む。オリゴマー形成ドメインは、膜を横切るベクトルフォールディング、すなわち機能的結合タンパク質へのポリペプチドのインビオフォールディングを促進すると考えられるプロセス、と適合するように設計される。一般に、ミニボディーは、当技術分野で周知の組換え法を使用して作製される。例えば、Pack et al., Biochem. (1992) 31: 1579-1584; Cumber et al., J Immunology (1992) 149B:120-126 を参照されたい。

30

【0179】

上記の抗体及びその免疫反応性断片をコードするポリヌクレオチド配列は、S T E C タンパク質の組換え産生に関する上記の技法などの、当技術分野で周知の標準技法を使用して容易に得られる。

40

【0180】

S T E C 疾患を有すると分かっている対象では、抗 S T E C タンパク質抗体は治療効果を有する可能性があり、これを使用して問題の対象に受動免疫を与えることが可能である。代わりに、抗体は、さらに下に記載される診断的適用においての他に S T E C タンパク質の精製のためにも使用することが可能である。

50

【0181】

V. 免疫原性組成物

上のタンパク質、コンジュゲート、抗体、並びに必要であれば追加の組換え及び／又は精製タンパク質が作製されると、哺乳動物対象への送達のために組成物に処方される。活性成分は典型的には薬学的に許容されるビヒクル又は賦形剤と混合される。適切なビヒクルは、例えば、水、生理食塩水、ブドウ糖、グリセリン、エタノール又は同類のもの及びその組合せである。さらに該ビヒクルは、湿潤剤若しくは乳化剤、pH緩衝剤、又はワクチン組成物の場合は、ワクチンの有効性を増強するアジュバントなどの少量の補助剤を含有し得る。適切なアジュバントはさらに下に記載されている。本発明の組成物は、薬剤、サイトカイン、又は他の生物学的応答調節剤などの補助物質も含むことが可能である。

10

【0182】

上記に説明されるように、本発明のワクチン組成物は、STEC抗原のうちの1又は2以上の免疫原性をさらに増加するためのアジュバントを含み得る。そのようなアジュバントには、STEC抗原又は抗原の組合せに対する免疫応答を増加するように作用し、したがって、ワクチンにおいて必要な抗原の量及び／又は十分な免疫応答を生み出すために必要な注射の回数を低減するいかなる化合物又は複数の化合物でも挙げられる。アジュバントは、例えば、乳化剤、ムラミルジペプチド、アブリジン、水酸化アルミニウムなどの水溶性アジュバント、キトサンベースのアジュバント、並びに様々なサポニン、オイル、及びアンフィゲン (Amphigen)、LPS、細菌細胞壁抽出物、細菌DNA、合成オリゴヌクレオチド及びその組合せなどの当技術分野で公知の他の物質のいずれでも (Schijns et al., Curr. Opin. Immunol. (2000) 12:456)、マイコバクテリウム・フレイ (M. phlei, Mycobacterial phlei) 細胞壁抽出物 (MCWE, Mycobacterial phlei cell wall extract) (米国特許第4,744,984号明細書)、M. phlei DNA (M-DNA)、M-DNA-M. phlei 細胞壁複合体 (MCC, M-DNA-M. phlei cell wall complex) が挙げられ得る。例えば、本明細書において乳化剤として働き得る化合物には、天然及び合成乳化剤の他にアニオン性、カチオン性及び非イオン性化合物が挙げられる。合成化合物のうち、アニオン性乳化剤には、例えば、ラウリン酸とオレイン酸のカリウム、ナトリウム及びアンモニウム塩、脂肪酸のカルシウム、マグネシウム及びアルミニウム塩 (すなわち、金属セッケン) 並びにラウリル硫酸ナトリウムなどの有機スルホン酸が挙げられる。合成カチオン剤には、例えば、セチルトリメチルアンモニウム臭化物が挙げられ、合成非イオン剤は、グリセリルエステル (例えば、モノステアリン酸グリセリン)、ポリオキシエチレングリコールエステル及びエーテル、並びにソルビタン脂肪酸エステル (例えば、ソルビタンモノパルミチン酸) 及びそのポリオキシエチレン誘導体 (例えば、ポリオキシエチレンソルビタンモノパルミチン酸) により例示される。天然乳化剤には、アカシア、ゼラチン、レシチン及びコレステロールが挙げられる。

20

30

40

【0183】

他の適切なアジュバントは、單一オイル、オイルの混合物、油中水型乳剤、又は水中油型乳剤などのオイル成分を用いて形成することが可能である。オイルは、鉛油、植物油又は動物油でもよい。鉛油又はオイル成分が鉛油である水中油型乳剤が好ましい。この点に関して、「鉛油」は、本明細書では、蒸留法を介してワセリンから得られる液化炭化水素の混合物として定義されており、この用語は「流動パラフィン」、「流動ワセリン」及び「ホワイト鉛油」と同義である。この用語は、「軽油」、すなわちワセリンの蒸留から同様に得られるが、ホワイト鉛油より比重がわずかに低いオイルを含むことも意図されている。例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences (同上)を参照されたい。特に好ましいオイル成分は、MVP Laboratories社製、Ralston, Nebraskaから入手可能なEMULSIGEN PLUS (商標) (軽油の他に保存剤として0.05%ホルマリン及び30mcg/mlゲンタマイシンを含む) の商品名で販売されている水中油型乳剤である。本明細書において使用するための別の好ましいアジュバントは、DDAを含む改質型のEMULSIGEN PLUS (商標) アジュバントである「VSA3」として知られるアジュバントである (米国特許第5,951,988号明細書参照)。この特許は参考によりその全体を本明細書に組み込まれて

50

いる）。適切な動物油には、例えば、タラ肝油、ハリバ油、メンヘーデン油、オレンジラフィー油及びサメ肝油が挙げられ、すべて市販されている。適切な植物油には、ナタネ油、アーモンド油、綿実油、トウモロコシ油、オリーブ油、ピーナッツ油、サフラワー油、ゴマ油、大豆油及び同類のものが限定されることなく挙げられる。

【0184】

代わりに、いくつかの脂肪族窒素含有塩基は、ワクチン製剤と一緒にアジュバントとして使用することが可能である。例えば、公知の免疫アジュバントは、アミン類、四級アンモニウム化合物、グアニジン、ベンズアミジン及びチオウロニウムを含む (Gall, D. (1966) *Immunology* 11:369-386)。特定の化合物は、ジメチルジオクタデシルアンモニウム臭化物 (DDA, dimethyldioctadecylammonium bromide) (Kodak社から入手可能) 及び N, N - ジオクタデシル - N, N - ビス (2 - ヒドロキシエチル) プロパンジアミン ('アブリジン') を含む。免疫アジュバントとしての DDA の使用はすでに記載されており、例えば、the Kodak Laboratory Chemicals Bulletin 56(1):1-5 (1986); Adv. Drug Dev. Rev. 5(3):163-187 (1990); J. Controlled Release 7:123-132 (1988); Clin. Exp. Immunol. 78(2):256-262 (1989); J. Immunol. Methods 97(2): 159-164 (1987); Immunology 58(2):245-250 (1986); 及び Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 68(3):201-208 (1982) を参照されたい。アブリジンも周知のアジュバントである。N, N - 高級アルキル - N', N' - ビス (2 - ヒドロキシエチル) プロパンジアミン一般の、及び特にワクチンアジュバントとしてのアブリジンの使用を記載している、Wolff, III et al.への米国特許第 4,310,550 号明細書を参照されたい。Babiukへの米国特許第 5,151,267 号明細書及び Babiuk et al. (1986) *Virology* 159:57-66 も、ワクチンアジュバントとしてのアブリジンの使用に関する。

【0185】

ワクチン組成物は、ミキシング、音波処理及び顕微溶液化を含むがこれらに限定されない当業者には周知の技法を使用して、STECタンパク質調製物とアジュバントを均一で密に会合させることにより調製することが可能である。アジュバントは、好ましくはワクチンの約 10 ~ 50% (v/v)、さらに好ましくは約 20 ~ 40% (v/v)、もっとも好ましくは約 20 ~ 30% 若しくは 35% (v/v) 又はこれらの範囲内の任意の整数を含むことになる。

【0186】

本発明の組成物は、通常は、液体溶液若しくは懸濁液としての注射剤として、又は注射に先立つ液体ビヒクル中の溶液若しくは懸濁液に適した固体形態として調製される。調製物は、固体形態に、乳化されて又は徐放性送達のために使用されるリポソームビヒクル若しくは他の微粒子担体に被包された活性成分にも調製し得る。例えば、ワクチンは、ワクチンの徐放を可能にする、油乳剤、油中水型乳剤、水中油中水型乳剤、部位特異的乳剤、長期滞留乳剤、粘着性乳剤、マイクロエマルジョン、ナノエマルジョン、リポソーム、微小粒子、マイクロスフィア、ナノスフィア、ナノ粒子、並びに酢酸エチレンビニル共重合体と Hytre17 共重合体などの非吸収性不透過性ポリマー、ハイドロゲルなどの膨潤性ポリマー又はコラーゲンなどの吸収性ポリマー、及び吸収性縫合糸を作るのに使用されるポリ酸又はポリエステルなどのある種のポリ酸又はポリエステルなどの様々な天然又は合成ポリマーの形態であり得る。

【0187】

さらに、ポリペプチドは、中性又は塩の形態で組成物に処方し得る。薬学的に許容される塩には、例えば、塩酸若しくはリン酸などの無機酸又は酢酸、シュウ酸、酒石酸、マンデル酸及び同類のものなどの有機酸で形成される酸付加塩（活性ポリペプチドの遊離のアミノ基で形成される）が挙げられる。遊離のカルボキシル基から形成される塩は、例えば、ナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム、又は水酸化第二鉄などの無機塩基、並びにイソプロピルアミン、トリメチルアミン、2 - エチルアミノエタノール、ヒスチジン、プロカイン及び同類のものなどの有機塩基由来でもよい。

【0188】

10

20

30

40

50

そのような剤形を調製する実際の方法は当業者には公知であり、又は明らかであろう。例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania, 18th edition, 1990を参照されたい。

【0189】

組成物は、望ましいS T E Cタンパク質又は複数エピトープ融合体の有効量を含有するように処方され、その正確な量は当業者であれば容易に決定され、この量は処置される動物及び抗体を合成する動物の免疫系の能力に依拠する。投与される組成物又は製剤は、処置を受けている対象において望ましい状態を実現するのに十分な本明細書に記載されるS T E C抗原のうちの1又は2以上の量を含有することになる。本発明の目的のために、添加される組換え及び／又は精製S T E C抗原と一緒に又はなしでS T E Cタンパク質を含む治療的有効量のワクチンは、約0.05～1500μgのS T E Cタンパク質、好ましくは約10～1000μgの該タンパク質、さらに好ましくは約30～500μg、もっとも好ましくは約40～300μg、例えば、50～200μg若しくはこれらの値間の任意の整数を含有する。投与経路には、経口、局所的、皮下、筋肉内、静脈内、皮下、皮内、経皮的及び真皮下が挙げられるが、これらに限定されない。投与経路に応じて、用量当たりの容量は、好ましくは約0.001～10ml、さらに好ましくは約0.01～5ml、もっとも好ましくは約0.1～3mlである。ワクチンは、単回投与処置で又は計画に基づいて、対象の年齢、体重及び状態、使用される特定のワクチン製剤並びに投与経路に適合している期間にわたり複数回投与処置（ブースト）で投与することが可能である。

10

20

30

40

50

【0190】

脊椎動物対象へ組成物を送達するためには、いかなる適切な医薬品送達手段でも用い得る。例えば、従来の針注射器、スプリング又は圧縮ガス（空気）注入器（Smootへの米国特許第1,605,763号明細書；Laurensへの米国特許第3,788,315号明細書；Clark et al.への米国特許第3,853,125号明細書；Morrow et al.への米国特許第4,596,556号明細書；及びDunlapへの米国特許第5,062,830号明細書）、液体ジェット注入器（Schererへの米国特許第2,754,818号明細書；Gordonへの米国特許第3,330,276号明細書；及びLindmayer et al.への米国特許第4,518,385号明細書）並びに粒子注入器（McCabe et al.への米国特許第5,149,655号明細書；及びSanford et al.への米国特許第5,204,253号明細書）はすべてが組成物の送達に適している。

【0191】

ジェット注入器が使用される場合、液体ワクチン組成物の単回ジェットは、高圧及び速度、例えば、1200～1400PSI下で駆出され、それによって皮膚に開口を作り免疫化に適した深さまで貫通させる。

【0192】

VI. 核酸ベースの免疫化法

一般に、本発明に関して使用するための核酸ベースのワクチンは、望ましいS T E Cタンパク質又は融合体をコードする関連領域を、適切な制御配列、及び随意に補助的治療又クレオチド配列と一緒に含むことになる。核酸分子は、上記のように、レシピエント細胞において転写及び翻訳を指示するのに必要なエレメントを含むベクターの形態で調製される。

【0193】

免疫対象における免疫応答を増強するために、核酸分子は、薬物、アジュバントなどの補助物質と併せて又はサイトカイン及び同類のものなどの生物学的応答調節剤をコードするベクターの送達と併せて投与することが可能である。

【0194】

調製されると、核酸ワクチン組成物は、公知の方法を使用して対象に送達することが可能である。この点に関して、抗原コードDNAを用いる免疫化のための様々な技法はすでに記載されている。例えば、Felgner et al.への米国特許第5,589,466号明細書

; Tang et al. (1992) Nature 358:152; Davis et al. (1993) Hum. Molec. Genet. 2:18 47; Ulmer et al. (1993) Science 258:1745; Wang et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:4156; Eisenbraun et al. (1993) DNA Cell Biol. 12:791; Fynan et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:12476; Fuller et al. (1994) AIDS Res. Human Retrovir. 10:1433; 及びRaz et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:9519を参照されたい。リポソーム媒介遺伝子移入などの、核酸分子をインビトロで細胞まで送達するための、それに続く宿主への再導入のための一般的方法も使用することが可能である。例えば、Hazinski et al. (1991) Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 4:206-209; Brigham et al. (1989) Am. J. Med. Sci. 298:278-281; Canonico et al. (1991) Clin. Res. 39: 219A; 及びNabel et al. (1990) Science 249:1285-1288を参照されたい。10したがって、核酸ワクチン組成物は、種々の公知の技法を使用して、液体又は微粒子形態で送達することが可能である。典型的なワクチン組成物は上に記載されている。

【0195】

VII. 免疫応答の有効性を判定するための試験

治療的処置及び予防の有効性を評価する1つの方法は、本発明の組成物におけるS T E Cタンパク質及び融合物に対する免疫応答を、組成物の投与後にモニターすることを含む。有効性を評価する別の方法は、本発明の組成物の投与後の感染をモニターすることを含む。さらに、組成物の有効性は、対象における腸管中のS T E Cの量の減少が実現され、したがって細菌の排泄物排出の量を低減することにより疾患の伝染を減少する、及び/又は動物によるS T E C排出の期間を低減するかどうかを評価することにより決定することが可能である。20

【0196】

本発明の免疫原性組成物のタンパク質の免疫原性を評価する別 の方法は、該タンパク質を組換え的に発現させ、免疫プロットにより対象の血清をスクリーニングすることである。タンパク質と血清間で陽性反応が起これば、対象が問題のタンパク質に対する免疫応答をすでに開始しており、したがって該タンパク質が免疫原であることを示している。この方法は、免疫優性タンパク質及び/又はエピトープを同定するのにも使用し得る。

【0197】

有効性を検証する別の方法は、本発明の組成物の投与後に感染をモニターすることを含む。有効性を検証する1つの方法は、組成物の投与後に本発明の組成物中の抗原に対する免疫応答を全身的にも（例えば、IgG1及びIgG2a産生のレベルをモニターする）粘膜的にも（例えば、IgA産生のレベルをモニターする）モニターすることを含む。典型的には、血清特異的抗体応答は、免疫化後、但しチャレンジ前に決定されるが、粘膜特異的抗体身体応答は免疫化後及びチャレンジ後に決定される。30

【0198】

本発明の免疫原性組成物は、宿主投与に先立ってインビトロ及びインビボ動物モデルにおいて評価することが可能である。

【0199】

本発明の免疫原性組成物の有効性は、免疫原性組成物を用いて感染の動物モデルをチャレンジすることによりインビボにおいて決定することも可能である。免疫原性組成物は、チャレンジ株と同じ株由来でもよく、同じ株由来でなくてもよい。好ましくは、免疫原性組成物はチャレンジ株と同じ株から誘導できる。40

【0200】

免疫応答は、T H 1免疫応答とT H 2応答のうちの1つでも又は両方でもよい。免疫応答は、改良された又は増強された又は改変された免疫応答であり得る。免疫応答は、全身免疫応答と粘膜免疫応答のうちの1つでも又は両方でもよい。好ましくは、免疫応答は、増強された全身及び/又は粘膜応答である。

【0201】

増強された全身及び/又は粘膜免疫は、増強されたT H 1及び/又はT H 2免疫応答に反映される。好ましくは、増強された免疫応答は、IgG1及び/又はIgG2a及び/50

又は IgA の産生の増加を含む。好ましくは、粘膜免疫応答は TH2 免疫応答である。好ましくは、粘膜免疫応答は、 IgA の産生の増加を含む。

【 0202 】

活性化された TH2 細胞は抗体産生を増強し、したがって細胞外感染に対する応答に価値がある。活性化された TH2 細胞は、 IL-4 、 IL-5 、 IL-6 及び IL-10 のうちの 1 又は 2 以上を分泌し得る。 TH2 免疫応答は IgG1 、 IgE 、 IgA 及び将来の防御のための記憶 B 細胞を産生し得る。

【 0203 】

TH2 免疫応答は、 TH2 免疫応答に伴うサイトカイン（例えば、 IL-4 、 IL-5 、 IL-6 及び IL-10 ）のうちの 1 若しくは 2 以上の増加、又は IgG1 、 IgE 、 IgA 及び記憶 B 細胞の産生の増加のうちの 1 又は 2 以上を含み得る。好ましくは、増強された TH2 免疫応答は、 IgG1 産生の増加を含むことになる。10

【 0204 】

TH1 免疫応答は、 CTL の増加、 TH1 免疫応答に伴うサイトカイン（例えば、 IL-2 、 IFN 及び TNF ）のうちの 1 若しくは 2 以上の増加、活性化されたマクロファージの増加、 NK 活性の増加、又は IgG2a の産生の増加のうちの 1 又は 2 以上を含み得る。好ましくは、増強された TH1 免疫応答は、 IgG2a 産生の増加を含むことになる。

【 0205 】

本発明の免疫原性組成物は、好ましくは持続性（例えば、中和）抗体及び、 1 又は 2 以上の感染性抗原に曝露されると迅速に応答することが可能な細胞性免疫を誘導することになる。実施例によって、対象由来の血液試料中の中和抗体の証拠は、防御の代替パラメータと見なされる。20

【 0206 】

VIII. 診断アッセイ

上記に説明されるように、 STEC タンパク質、そのバリアント、免疫原性断片及び融合物は、感染の存在を決定するために生体試料において STEC の反応性抗体の存在を検出するための診断法としても使用し得る。例えば、 STEC タンパク質と反応する抗体の存在は、標準電気泳動法及び競合、直接反応又はサンドイッチ型アッセイなどの免疫アッセイを含む免疫診断技法を使用して検出することが可能である。そのようなアッセイには、ウェスタンプロット；凝集試験；ELISA などの酵素標識及び媒介免疫アッセイ；ビオチン / アビジン型アッセイ；放射性免疫アッセイ；免疫電気泳動法；免疫沈降法、等が挙げられるが、これらに限定されない。反応は、一般に、蛍光、化学発光、放射性、酵素標識若しくは色素分子などの露出標識、又は抗原とそれと反応した抗体若しくは複数の抗体間の複合体の形成を検出するための他の方法を含む。30

【 0207 】

前述のアッセイは、一般に、抗原 - 抗体複合体が結合している固相支持体からの液相中の非結合抗体の分離を含む。本発明の実施において使用することが可能な固体支持体には、ニトロセルロース（例えば、膜又はマイクロタイターウェル形態で）；ポリ塩化ビニル（例えば、シート又はマイクロタイターウェル）；ポリスチレンラテックス（例えば、ビーズ又はマイクロタイターブレート）；ポリフッ化ビニリデン；ジアゾ化ペーパー；ナイロン膜；活性化ビーズ；磁気応答ビーズ；及び同類のものなどの基材が挙げられる。典型的には、固形支持体は、成分が支持体に十分に固定化されるように、適切な結合条件下で固相成分（例えば、 1 又は 2 以上の STEC タンパク質又は融合物）と先ず反応させる。抗原の支持体への固定化は、先ず抗原を結合特性がより良好なタンパク質にカップリングさせることにより増強することが可能な場合もある。適切なカップリングタンパク質には、ウシ血清アルブミン（ BSA , bovine serum albumin ）を含む血清アルブミンなどの巨大分子、キーホールリンペットヘモシアニン、免疫グロブリン分子、サイログロブリン、卵白アルブミン、及び当業者に周知の他のタンパク質が挙げられるが、これらに限定されない。抗原を支持体に結合させるのに使用することが可能な他の分子には、多糖類、ポリ40

乳酸、ポリグリコール酸、ポリマーアミノ酸、アミノ酸共重合体、及び同類のものが挙げられる。そのような分子及びそのような分子を抗原にカップリングする方法は当業者には周知である。例えば、Brinkley, M.A. *Bioconjugate Chem.* (1992) 3:2-13; Hashida et al., *J. Appl. Biochem.* (1984) 6:56-63; 及びAnjaneyulu and Staros, *International J. of Peptide and Protein Res.* (1987) 30:117-124を参照されたい。

【0208】

固体支持体を固相成分と反応させた後、いかなる非固定化固相成分でも、洗浄することにより支持体から取り除かれ、次に、支持体結合成分は、リガンド部分（例えば、固定化された抗原に向かう抗体）を含有すると疑われる生体試料に適切な結合条件下で接触させる。洗浄していかなる非結合リガンドも取り除いた後、二次結合剤が結合したリガンドと選択的に会合することができる適切な結合条件下で二次結合剤部分が添加される。次に、二次結合剤の存在は当技術分野で周知の技法を使用して検出することが可能である。10

【0209】

さらに具体的には、マイクロタイタープレートのウェルがS T E Cタンパク質又は融合物で被膜されているE L I S A法を使用することが可能である。次に、抗腸炎菌（*S. Enteritidis*）免疫グロブリン分子を含有する又は含有すると疑われる生体試料は、被膜ウェルに添加される。抗体を固定化抗原に結合させるのに十分なインキュベーション期間後、プレート（複数可）を洗浄して、非結合部分及び添加された検出可能に標識された二次結合分子を取り除くことが可能である。二次結合分子をいかなる捕獲された試料抗体とも反応させ、プレートは洗浄され、二次結合分子の存在は、当技術分野で周知の方法を使用して検出される。20

【0210】

したがって、一特定の実施形態では、生体試料由来の結合した抗S T E Cリガンドの存在は、抗体リガンドに対して向けられる抗体を含む二次結合剤を使用して容易に検出することが可能である。当業者に公知の方法を使用して、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ又はウレアーゼなどの検出可能酵素標識に容易にコンジュゲートさせることができないいくつかの免疫グロブリン（Ig, immunoglobulin）分子が当技術分野では公知である。次に、適切な酵素基質を使用して、検出可能シグナルを生じさせる。他の関連する実施形態では、競合型E L I S A法は、当業者に公知の方法を使用して実行することが可能である。30

【0211】

S T E Cタンパク質及びそれらのタンパク質に特異的な抗体は、沈降条件下で複合体を形成するように、アッセイを溶液中で行うことも可能である。一特定の実施形態では、S T E Cタンパク質は、直接化学的又は間接的カップリングなどによる当技術分野で公知のカップリング法を使用して、固相粒子（例えば、アガロースビーズ又は同類のもの）に付着させることができる。次に、抗原被膜粒子は、適切な結合条件下で、S T E Cタンパク質に対する抗体を含有すると疑われる生体試料に接触させる。結合した抗体間の交差結合は、粒子-抗原-抗体複合体凝集体の形成を引き起こし、この凝集体を洗浄及び/又は遠心分離を使用して試料から沈殿させ分離することが可能である。反応混合物を解析して、上記の免疫診断法などのいくつかの標準法のいずれかを使用して、抗体-抗原複合体の存在又は非存在を決定することが可能である。40

【0212】

さらに追加の実施形態では、抗S T E C分子を含有すると疑われる生体試料由来の抗体のポリクローナル集団が基材に固定化される、免疫アフィニティーマトリックスを提供することが可能である。この点に関して、試料の最初のアフィニティー精製は、固定化された抗原を使用して実施することが可能である。したがって、こうして得られる試料調製物は抗S T E C部分のみを含有し、親和性支持体における潜在的非特異的結合特性を回避することになる。高収率で及び抗原結合活性を良好に保持して免疫グロブリン（無傷のもの又は特異的断片において）を固定化するいくつかの方法は当技術分野では公知である。いかなる特定の方法によっても限定されることなく、固定化されたプロテインA又はプロテ50

インGを使用すれば免疫グロブリンを固定化することが可能である。

【0213】

したがって、免疫グロブリン分子が固定化されて免疫アフィニティーマトリックスを提供すると、標識S T E Cタンパク質を、適切な結合条件下で結合した抗体に接触させる。いかなる非特異的に結合している抗原でも免疫親和性支持体から洗浄された後は、結合している抗原の存在は、当技術分野で公知の方法を使用して標識についてアッセイすることにより決定することが可能である。

【0214】

さらに、タンパク質それ自体ではなく、S T E Cタンパク質に対して産生された抗体は、所与の試料中のタンパク質に対する抗体の存在を検出するために、上記のアッセイにおいて使用することが可能である。これらのアッセイは、実質的に上記の通りに実施され、当業者には周知である。

10

【0215】

IX. キット

本発明は、本発明の組成物の1又は2以上の容器を含むキットも提供する。組成物は、個々の抗原と同じように、液体の形態であることが可能であり、又は凍結乾燥されることが可能である。組成物のための適切な容器には、例えば、瓶、バイアル、注射器及び試験管が挙げられる。容器は、ガラス又はプラスティックを含む種々の材料から形成することが可能である。容器は無菌点検口を有し得る（例えば、容器は、静脈内溶液バッグ又は皮下注射針により突き通せるストッパー付きのバイアルであり得る）。

20

【0216】

キットは、リン酸緩衝食塩水、リングル液又はブドウ糖溶液などの薬学的に許容される緩衝液を含む第二の容器をさらに含むことが可能である。キットは、緩衝液、希釈剤などの他の薬学的に許容される製剤溶液、フィルター、針、及び注射器を含む、最終使用者にとり有用な他の材料又は他の送達デバイスも含有することが可能である。キットは、アジュバントを含む第三の成分をさらに含み得る。

30

【0217】

キットは、免疫を誘導する方法のための又は感染を処置するための書面使用説明書を含有する添付文書も含むことが可能である。添付文書は、未認可草案添付文書であることが可能であり、又は食品医薬品局（F D A, Food and Drug Administration）若しくは他の取締機関により認可された添付文書であることが可能である。

30

【0218】

本発明は、本発明の免疫原性組成物が前もって充填されている送達デバイスも提供する。

【0219】

同様に、抗体は、上記の免疫アッセイを行うために適切な使用説明書及び他の必要な試薬と共にキットで提供することが可能である。キットは、使用される特定の免疫アッセイに応じて、適切な標識並びに他のパッケージ化された試薬及び材料（すなわち、洗浄緩衝液と同類のもの）も含有することが可能である。上記の免疫アッセイなどの標準免疫アッセイは、これらのキットを使用して行うことが可能である。

40

【0220】

C. 実験

以下は、本発明を実施するための特定の実施形態の実施例である。実施例は説明目的のためだけに提供され、いかなる点でも本発明の範囲を限定することを意図されていない。

【0221】

使用される数（例えば、量、温度、等）に関しては正確さを確保するよう努力が払われてきたが、ある程度の実験誤差及び逸脱は、当然許容されるべきである。

【実施例1】

【0222】

T I Rエピトープの構築及び同定

50

Tirエピトープを同定するために、STEC O157:H7 Tirタンパク質を表す5アミノ酸オーバーラップを有する22の30merペプチドが構築された（表1参照）。ウサギポリクローナル抗血清が、STEC O157:H7由来のTTSP及び非O157 TTSP（O26:H11、O103:H2及びO111:NM）に対して産生され、22のO157:H7 Tirペプチドに対して20分の1の希釀度で試験された。図7に示されるように、非O157血清により認識されるペプチドはごくわずかであった。抗O103:H2は、複数のペプチドを認識する唯一の血清であった。

【0223】

キメラTirタンパク質を構築するために、STEC O157:H7から分化したが、それでも宿主免疫系により認識される非O157セロタイプ由来のTirタンパク質においてエピトープが同定された。特に興味深いのは、Tirのうちアミノ酸259～363にまたがる部分であった。これらのアミノ酸は、宿主上皮細胞の表面に曝露されていることが明らかにされており、該上皮細胞をワクチン開発のための主要標的としている。非O157 EHECセロタイプ（O26:H11、O103:H2及びO111:NM）とともに、総数で7の30merペプチドが構築された（表1）。様々なセロタイプ由来のTTSPに対するSTECポリクローナル抗体の交差反応性は上記の通りに試験された。

10

【0224】

非O157及び非O157ペプチドに対するO157:H7 TTSPポリクローナル抗体は、STEC O157:H7ペプチドに関して見られるパターンに類似するパターンを示した。相同血清は、最良の結果を示した（図8A～8D）。様々なセロタイプ由来のペプチド番号3は、非O157血清に対してもっとも大きな反応性を示した。これらの結果は、STECセロタイプ中のTirタンパク質内に見られる可変性を実証した。しかし、いくつかのペプチドは、他のセロタイプでは認識しない相同血清により認識された。

20

【0225】

【表1】

表1

	配列番号	ペプチド
O157		
1-MPIGNLGHNPNVNSIPPAPPLPSQTDGAG	1	Tir O157 AA 1-30
2-TDGAGGRGQLINSTGPLGSRALFTPVRNSM	2	Tir O157 AA 26-55
3-VRNSMADSGDNRASDVPGPVNPMLAASE	3	Tir O157 AA 51-80
4-LAASEITLNDGFEVLHDHGPLDTLNQIGS	4	Tir O157 AA 76-105
5-RQIGSSVFRVETQEDGKHIAVGQRNGVETS	5	Tir O157 AA 101-130
6-GVETSVVLSQDQEYARLQSIDPEGKDKFVFT	6	Tir O157 AA 126-155
7-KFVFTGRRGGAGHAMVTVASDITEARQRIL	7	Tir O157 AA 151-180
8-RQRILELLEPKGTGESKGAGESKGVGELRE	8	Tir O157 AA 176-205
9-GELRESNSGAENTTETQTSTSTSSLRSDPK	9	Tir O157 AA 201-230
<u>10-RSDPKLWLALGTVATGLIGLAATGIVQALA</u>	10	<u>Tir O157 AA 226-255</u>
<u>11-VQALALTPEPDSPTTDPDAAASATETATR</u>	11	<u>Tir O157 AA 251-280</u>
<u>12-ETATRDQLTKEAFQNPNDNQKVNIDELGNAI</u>	12	<u>Tir O157 AA 276-305</u>
<u>13-LGNAIPSGVLKDDVVANIEQAKAAGEEAK</u>	13	<u>Tir O157 AA 301-330</u>
<u>14-GEEAKQQAIENNAQAQKKYDEQQAKRQEEL</u>	14	<u>Tir O157 AA 326-355</u>
<u>15-RQEELKVSSGAGYGLSGALILGGGIGVAVT</u>	15	<u>Tir O157 AA 351-380</u>
<u>16-GVAVTAALHRKNQPVEQTTTTTTTSA</u>	16	<u>Tir O157 AA 376-405</u>
17-TTSARTVENKPANNTPAQGNVDTPGSEDT	17	Tir O157 AA 401-430
18-GSEDTMESRRSSMASTSSTFFDTSSIGTVQ	18	Tir O157 AA 426-455
19-IGTVQNPYADVKTSLHDSQVPTSNSNTSVQ	19	Tir O157 AA 451-480
20-NTSVQNMGNTDSVVYSTIQHPPRDTTDNGA	20	Tir O157 AA 476-505
21-TDNGARLLGNGPSAGIQSTYARLALSGGLRH	21	Tir O157 AA 501-530
22-GLRHDMGGLTGGNSAVNTSNNPPAPGSHRF V	22	Tir O157 AA 526-558
O26		
1-RADPKLWLSLGTIAAGLIGMAATGIAQAVA	23	Tir O26 AA 218-247
2-AQAVALTPEPDDPITTDPDAAANTAEAAAK	24	Tir O26 AA 243-272
3-EAAAKDQLTKEAFQNPNDNQKVNIENGNAI	25	Tir O26 AA 268-297
4-NGNAIPSGELKDDVVVAQIAEQAKAAGEQAR	26	Tir O26 AA 293-322
5-GEQARQEAIIESNSQAQKKYDEQHAKREQEM	27	Tir O26 AA 318-347
6-REQEMSLSSGVGYGISGALILGGGIGAGVT	28	Tir O26 AA 343-372
7-GAGVTAALHRKNQPAEQTTTRTVVDNQPT	29	Tir O26 AA 368-397
O103		
1-RADPKLWLSLGTIAAGLIGMAATGIAQAVA	30	Tir O103 AA 218-247
2-AQAVALTPEPDDPITTDPDTAASTAATK	31	Tir O103 AA 243-272
3-EAATKDRLTQEAFQDPDKQKVNIENGNAI	32	Tir O103 AA 268-297
4-NGNAIPSGELIDDVVVAQIAEQAKAAGEQAR	33	Tir O103 AA 293-322
5-GEQARQEAIIESNSQAQKKYDEQHAKREQEM	34	Tir O103 AA 318-347
5-GEQARQEAIIESNSQAQKKYDEQHAKREQEM	35	Tir O103 AA 343-372
7-GAGVTAALHRKNQPAEQTTTRTVVDNQPT	36	Tir O103 AA 368-397

10

20

30

40

O111			
1-RSDPKFWVSIGAIAAGLAGLAATGITQALA	37	Tir O111 AA	229-258
2-TQALALTPEPDDPTTDPEQAASAAESATR	38	Tir O111 AA	254-283
3-ESATRDQLTQEAFKNPENQKVSIIDEIGNSI	39	Tir O111 AA	279-308
4-IGNSIPSGELKDDVVAKIEEQAKEAGEAAR	40	Tir O111 AA	304-333
5-GEAARQQAVESNAQAQQRYDTQYARRQEEL	41	Tir O111 AA	304-333
6-RQEELELSSGIGYSLSSALIVGGGIGAGVT	42	Tir O111 AA	354-383
7-GAGVTTALHRRNQPAEQTTPHTVVQQQ	43	Tir O111 AA	379-408

10

表1. 構築されたSTEC O157:H7 Tir及び非O157 Tirペプチドの配列

O157セクションの下線が施されたペプチドは、インチミン結合ドメインを表す。

【実施例2】

【0226】

キメラTIRタンパク質の構築

実施例1において試験されたペプチドから、各セロタイプに特異的な6つの独自の非O157セロマーペプチドが選択された。表2を参照されたい。

【0227】

【表2】

ペプチド	大腸菌非O157ペプチド 標的		
	セロタイプ		
	O103:H2	O26:H11	O111:NM
1			
2		X	
3		X	X
4			X
5	X		X
6			
7			

20

X=選択されたペプチド

表2. STEC O157:H7 Tirタンパク質に融合するために選択される標的

【0228】

これらの非O157ペプチドをコードするDNAは、STEC O157:H7 Tirタンパク質をコードするDNAの3'末端に連結された。プライマー及び制限部位は表3に示されている。各ペプチドは、タンパク質の可動性を改善するためにGlyとSerから選択される4アミノ酸により分離されるよう設計された(図9A及び9B参照)。キメラTirタンパク質のヌクレオチド配列及びアミノ酸配列は、それぞれ図5A及び5Bに示されている(配列番号51及び配列番号52)。該タンパク質はN末端からC末端の順に、完全長O157 Tir配列(図5Bのアミノ酸1~558)、続いてリンカーGly-Ser-Gly-Ser、続いてO111 Tirのアミノ酸279~358(図5Bにおけるアミノ酸565~644に一致する)、続いてリンカーSer-Gly-Ser-Gly、続いてO26 Tirのアミノ酸243~296(図5Bにおけるアミノ酸651~705に一致する)、続いてリンカーSer-Ser-Gly-Gly、続いてO103のアミノ酸318~347(図5Bにおけるアミノ酸712~741に一致する)を含む。図5Bにおけるアミノ酸559~564、645~650及び706~711は、Tir断片を挿入するのに使用される制限部位を表す。

40

【0229】

50

【表3】

(1)TirO157-PEP-F kpnI

CGGGGTACCCCTATTGTAATCTGGTCATAATCCAATGTGAATAATT

(配列番号189)

TirO157-PEP-F GSGS-AgeI-PstI

AAAAC TGCAG ACCGGTGGAGCCAGAACCGACGAAACGATGGGATCCCG

(配列番号190)

10

(2)TirO111-PEP-F AgeI

GGCTACCGGTGAAAGT GCGACAAGAGATCAGTTAACGCAAGAACGATTCAAG

(配列番号191)

TirO111-PEP-R SGSG-SpeI-GS-HindIII

CCCAAGCTTAGAACCACTAGTCCCCGATCCTGATAATT CCTCCTGACGTCTGGCATAC

(配列番号192)

20

(3)TirO26-PEP-F SpeI

GGACTAGTGCACAGGCTGTTGCGTTGACTCCAGAGCCGGATG

(配列番号193)

TirO26-PEP-R SSGG-NsiI

CCAATGCATTCCGCCGGATGAAATTGCATTCCGTTCTCATCG

(配列番号194)

30

(4)TirO103-PEP-F NsiI

CCAATGCATGGGAACAGGCCAGACAGGAAG

(配列番号195)

Tir103-PEP-R HindIII

CCCAAGCTTCATTCCTGTTCGCGTTAGC

(配列番号196)

表3. STEC Tir及び非O157 Tirペプチドの増幅のために使用されるオリゴヌクレオチドプライマー。ヌクレオチド配列は5'から3'方向である。

40

【0 2 3 0】

これらのペプチドを使用して、ロイコトキシン担体 L K T 3 5 2 に融合されることを除けば第一のキメラタンパク質と同一の第二のキメラタンパク質も構築した(図9C)。これを実現するため、上記のキメラTir構築物は、米国特許第5,476,657号明細書、米国特許第5,422,110号明細書、米国特許第5,723,129号明細書及び米国特許第5,837,268号明細書に記載されるプラスミドpAA352にライゲートされた。これらの特許は参照によりその全体を本明細書に組み込まれている。プラスミドpA352は図10に描かれており、L K T 3 5 2 を発現し、L K T 3 5 2 の配列を図11に示す。

50

す。LKT352はパストレラ・ヘモリチカロイコトキシンのLktA遺伝子に由来し、914アミノ酸及び推定分子量約99kDaを有するが、該分子の細胞障害性部分を欠く切断型ロイコトキシン分子である。キメラTir融合タンパク質は、Lktタンパク質のC末端融合物として発現された。

【0231】

LKT352 / キメラTir融合タンパク質のヌクレオチド配列及びアミノ酸配列は図6A及び6Bに示されている（配列番号53及び配列番号54）。該タンパク質はN末端からC末端の順に、pAA352由来の短いベクター配列（図6Bのアミノ酸1～9に一致する）、LKT352（図6Bのアミノ酸10～923に一致する）、pAA352由来の短いベクター配列（図6Bのアミノ酸924～926）、O157 Tirのアミノ酸2～558（図6Bにおけるアミノ酸927～1483に一致する）、続いてリンカ-Gly-Ser-Gly-Ser、続いてO111 Tirのアミノ酸279～358（図6Bにおけるアミノ酸1490～1569に一致する）、続いてリンカ-Ser-Gly-Ser-Gly、続いてO26 Tirのアミノ酸243～296（図6Bにおけるアミノ酸1576～1630に一致する）、続いてリンカ-Ser-Ser-Gly-Gly、続いてO103のアミノ酸318～347（図6Bにおけるアミノ酸1635～1666に一致する）を含む。図6Bにおけるアミノ酸1484～1489、1570～1575及び1631～1634は、Tir断片を挿入するのに使用される制限部位を表す。

10

【0232】

両タンパク質は精製され、12%SDS-PAGEクーマシー染色ゲル上に流され、STEC O157 : H7抗Tirモノクローナル抗体に対してウェスタンプロットにおいて使用されて、適切なタンパク質が精製されたことを確認した。

20

【実施例3】

【0233】

キメラTIRタンパク質の免疫原性

キメラTIRタンパク質の免疫原性を試験し、該タンパク質に応答して抗体陽転が起きるかどうかを決定するために、ウサギの別個の群を（1）キメラTir構築物、（2）LKT352 / キメラTir融合物、（3）表2からO26ペプチド#2、（4）表2からO26ペプチド#3、（5）表2からO103ペプチド#5、（6）表2からO111ペプチド#3、（7）表2からO111ペプチド#4、（8）表2からO111ペプチド#5、（9）STEC O157 : H7由来のTirタンパク質、及び（10）負の対照としてのペプチドSN11を用いてワクチン接種した。ウサギは3回ブーストされた（21日目、42日目及び57日目）。ワクチンには、アジュバントとして30%EMULSIGEN D（MVP Laboratories社製、Ralston, NE）を含む製剤中50マイクログラムの各タンパク質が含まれていた。

30

【0234】

初回のブーストの2週間後、動物から採血し、血清は抗体陽転を決定するためにELISAにおいて使用された。図12A～12Jにおいて見ることができるように、ウサギは全キメラタンパク質に良好に応答し、個々の非O157ペプチドにも応答することができた。ウサギは、LKT352 / Tir融合物よりもキメラTirタンパク質上のO111ペプチド#5及びO103ペプチド#5により良好に応答したと思われる。

40

【実施例4】

【0235】

STEC O157 : H7分泌タンパク質のクローニング、発現及び精製

インビトロ阻害付着アッセイを使用して、抗O157 : H7 TTSPポリクローナル抗体は、STEC O157 : H7がHEp-2上皮細胞へ付着するのを阻害することができることが明らかにされた。しかし、抗Tir O157 : H7ポリクローナル抗体又はいくつかの濃度の精製されたTirタンパク質が試験されると、どちらもSTEC O157 : H7のHEp-2細胞への付着を遮断することはできなかった。抗EspA O157 : H7ポリクローナル抗体も試験され、抗Tir O157 : H7ポリクローナル

50

抗体と同じ結果を生じた。

【0236】

これらの結果は、抗O157:H7 TTSPポリクローナル抗体には、何か定着を阻害することができるものが存在していることを示している。ウェスタンプロット上で、抗O157:H7 TTSPポリクローナル抗体と反応するTir及びEspAは、抗Tir O157:H7 TTSPポリクローナル抗体及び抗EspA O157:H7 TTSPポリクローナル抗体が試験されたときには、STEC O157:H7のHEp-2細胞への定着を阻害することはできなかった。特定の理論に縛られることなく、抗O157:H7 TTSPポリクローナル抗体による定着が阻害されたことは、抗体の組合せによるものである、又は培地に分泌された未同定のタンパク質によるものである可能性がある。

10

【0237】

抗体を産生するために使用されるSTEC O157:H7 TTSPは、大部分がM9最少培地に分泌される未同定のタンパク質の混合物であった。はじめ、分泌されるタンパク質の大部分は腸細胞消失遺伝子座(LEE)病原性アイランド由来であると考えられた。しかし、最近、TTSSを通して分泌されるがLEEアイランドに位置していない非LEEエフェクター(NLE, non-LEE effector)と呼ばれるいくつかのタンパク質が同定されている。Tobe et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2006) 103:14941-14946は、39の非LEEエフェクターがTTSSを通して分泌されることを報告した。

【0238】

抗O157:H7 TTSPポリクローナル抗体及び抗非O157 TTSPポリクローナル抗体に対して、ELISA及びウェスタンプロットにおいてタンパク質を試験するために、LEE病原性アイランド上に見出される遺伝子由来の40のタンパク質(インチミンは除く)の他に29の非LEEエフェクターが過剰発現され精製された。

20

【0239】

特に、69の遺伝子すべてが、Qiagen pQE-30 HIS-タグ付きベクタークローニングシステム(プライマー及び制限部位は表4に見られる)を使用してクローニングされ塩基配列決定された。重力流動クロマトグラフィーによる6×His-タグ付きタンパク質の精製のためにNi-NTAアガロースが使用された。これらのタンパク質のうち66が精製された。残りの3つは精製するのが困難であった膜タンパク質である。これら3つのタンパク質は、分泌装置の内膜複合体のメンバーである。しかし、これらのタンパク質は、その位置及び役割に基づく分泌免疫原性タンパク質の同定には関連性がない可能性がある。

30

【0240】

【表4】

表4

LEE遺伝子		
ler	F	CGCGGATCCCGGAGATTATTATTATGAATATGGAAAATAATTAC (配列番号57)
	R	CCCAAGCTTTAAATATTTTCAAGCGGTATTATTCTTCAGTGTCC (配列番号58)
orf2	F	CGCGGATCCATAACGATAACTGAGCTGGAAGATG (配列番号59)
	R	CCCAAGCTTCTATTATTATAATCCTGATTTCG (配列番号60)
cesA/B	F	CGCGGATCCAGTATTGTGAGCCAAACAAGAAATAAG (配列番号61)
	R	CCCAAGCTTCATACTATTTCATTATTCTATTCCG (配列番号62)
orf4	F	CGCGGATCCACAATTAAATAAAATAGAC (配列番号63)
	R	CCCAAGCTTCATAAAAGTTCTAAAGGC (配列番号64)
orf5	F	CGCGGATCCCTACAGAAGATATCATACCAGAGG (配列番号65)
	R	CCCAAGCTTCATTCTGAATAATGCTAAG (配列番号66)
escS*	F	CGCGGATCCCC GTTATCGGTATTATTAGTCTGG (配列番号67)
	R	ACGCGTCGACTTAGCCGTTCACCTCGGAATC (配列番号68)
escT	F	CGCGGATCCAATGAGATAATGACGGTCAGTATC (配列番号69)
	R	CCCAAGCTTCACTCATTAATCATGCTCGTAAC (配列番号70)
orf13	F	CGCGGATCCAAAAAAATAACTGAGCATCATTCTC (配列番号71)
	R	CGCGGATCCAAAAAAATAACTGAGCATCATTCTC (配列番号72)
grlR	F	CGCGGATCCATTATGAAGGATGGCATCTATAGC (配列番号73)
	R	CCCAAGCTTTATTTAAATAAACTGTGGCATTCTGTG (配列番号74)
grlA	F	CGCGGATCCGAATCTAAAAATAAAATGGCGAC (配列番号75)
	R	CGCGGATCCGAATCTAAAAATAAAATGGCGAC (配列番号76)
cesD	F	CGCGGATCCAGCAGGAAATTAGCTCTCTAG (配列番号77)
	R	CCCAAGCTTTACTCTGTATTACCTAAC (配列番号78)
escC	F	CGCGGATCCAAAAAAATAAGTTTTATTTTACAGCACTATT TGCTGCAGTCACAAGCTGCC (配列番号79)
	R	CCCAAGCTTTATCGCTAGATGCAGATTATCGGGTTGCTTT AATTAAAAAGAGTCGAACAC (配列番号80)
sepD	F	CGCGGATCCAACAATAATGGCATAGCAAAGAATG (配列番号81)
	R	CCCAAGCTTTACACAATTGTCCTATATCAGAAAAC (配列番号82)
escJ	F	CGCGGATCCAAAAACACATTAAAACCTTTTATTGGCTGC (配列番号83)
	R	CCCAAGCTTTACCCGTCCTGCTGAGGATGACTTGATAACAAAC (配列番号84)
orf8	F	CGCGGATCCGATGTATTATGCCCTGCCTCTTCATAAAAAG (配列番号85)
	R	CGCGGATCCGATGTATTATGCCCTGCCTCTTCATAAAAAG (配列番号86)
sepZ	F	CGCGGATCCGAAGCAGCAAATTAAAGTCCTTC (配列番号87)
	R	CCCAAGCTTTAGGCATATTCATCGCTAATGCAC (配列番号88)
orf12	F	CGCGGATCCAATCTTGTAAAGAAACGTTG (配列番号89)
	R	CCCAAGCTTCATGATGTATCCTGCGAACG (配列番号90)
escN	F	CGCGGATCCATTTCAGAGCATGATTCTGTATTG (配列番号91)
	R	CGCGGATCCATTTCAGAGCATGATTCTGTATTG (配列番号92)
orf15	F	CGCGGATCCCTGGACAGAATTATCTATTCTG (配列番号93)
	R	CCCAAGCTTCTAGTCAAAGTAATGTTCTTATGGC (配列番号94)
orf16	F	CGCGGATCCGCTTATGGAGAGATTGTTACTCCTCGGG (配列番号95)
	R	CCCAAGCTTTAATTTCATATTCAATTGTGAACTCAATGGC (配列番号96)

10

20

30

40

sepQ	F	CGCGGATCCAAGCCATTGAGTCACAATTG (配列番号97)	BamHI
	R	CCCAAGTTTAATCACATACTATGCTAACAG (配列番号98)	HindIII
espH	F	CGCGGATCCTCGTTATCAGGAGCGGTATTCAAG (配列番号99)	BamHI
	R	CCCAAGTTTACATAACGCTATAAGAGGAAGC (配列番号100)	HindIII
cesF	F	CGCGGATCCAATGAGAAATTGACAGACCTTG (配列番号101)	BamHI
	R	CCCAAGTTCAAGGTAAGGATCTGTAGGTCTGG (配列番号102)	HindIII
map	F	CGGGGTACCTTAGTCCAATGACAATGGCAGGC (配列番号103)	KpnI
	R	CCCAAGCTTCTACAATCGGGTATCCTGTACATG (配列番号104)	HindIII
tir	F	CGGGGTACCCCTATTGGTAATCTGGTCATAATC (配列番号105)	KpnI
	R	CCCAAGTTTAGACGAAACGATGGGATCCC (配列番号106)	HindIII
cesT	F	CGCGGATCCTCATCAAGATCTGAACCTTATTAG (配列番号107)	BamHI
	R	CCCAAGTTTATCTCCGGCGTAATAATG (配列番号108)	HindIII
escD	F	CGCGGATCCTTATCCTCATATAAAATAAAAC (配列番号109)	BamHI
	R	CGCGGATCCTTATCCTCATATAAAATAAAAC (配列番号110)	HindIII
sepL	F	CGCGGATCCGCTAATGGTATTGAATTAAATC (配列番号111)	BamHI
	R	AAACTGCAGTCAAATAATTCCCTCCTTATAGTCG (配列番号112)	PstI
espA	F	CGCGGATCCGATACATCAAATGCAACATCCGTTG (配列番号113)	BamHI
	R	AAACTGCAGTTATTACCAAGGGATATTGCTG (配列番号114)	PstI
espD	F	CGCGGATCCCTAACGTAATAACGATACCCCTG (配列番号115)	BamHI
	R	CGGGGTACCTTAAATTGCCACTAACATACG (配列番号116)	KpnI
espB	F	CGCGGATCCAATACTATTGATAATACTCAAGTAACGATGG (配列番号117)	BamHI
	R	AAACTGCAGTTACCCAGCTAACGACCCGATTGCC (配列番号118)	PstI
cesD2	F	CGCGGATCCGTCGATACGTTAATGATGAAGTG (配列番号119)	BamHI
	R	AAACTGCAGTTAACTATTACGTTATTACGAACC (配列番号120)	PstI
escF	F	CGCGGATCCAATTATCTGAAATTACTCAAC (配列番号121)	BamHI
	R	CCCAAGTTTAAAAACTACGGTTAGAAATGG (配列番号122)	HindIII
orf29	F	CGCGGATCCGTTAATGATAATTCTGCTAATAAGATACTGG (配列番号123)	BamHI
	R	AAACTGCAGTTAAATCCTCGTACCCAGCCACTACC (配列番号124)	PstI
espF	F	CGCGGATCCCTTAATGGAATTAGTAACGCTGC (配列番号125)	BamHI
	R	CCCAAGTTTACCCCTTCTCGATTGCTCATAGG (配列番号126)	HindIII
orf1*	F	CGCGGATCCCCCTCACCTCAAGAACACTCACTTTC (配列番号127)	BamHI
	R	ACGCGTCGACTTACTTATTAGGGACAAATTTC (配列番号128)	SalI
espG	F	CGCGGATCCATACTTGTGCCAAATTGTC (配列番号129)	BamHI
	R	AAACTGCAGTTAAGTGTGTTGTAAGTACGTTCAGATGCGG (配列番号130)	HindIII
<hr/>			
非LEE			
nleA	F	GGAAGATCTAACATTCAACCGACCATAATC (配列番号131)	BglIII
	R	TCCCCCCGGTTAGACTCTGTTCTGG (配列番号132)	XmaI
nleB	F	CGCGGATCCTTATCTCATTAATGTCCTCAATCCAGC (配列番号133)	BamHI
	R	CCCAAGTTTACCATGAACGTGCAGGTATACACTG (配列番号134)	HindIII
nleB-1	F	CGCGGATCCCTTCACCGATAAGGACAACCTTC (配列番号135)	BamHI
	R	CGGGGTACCTTACCATGAACGTGCATGTACTG (配列番号136)	KpnI
nleC	F	CGCGGATCCAAAATTCCCTCATTACAGTCCAAC (配列番号137)	BamHI
	R	CCCAAGTTTACCATGCTGATTGTGTTGTCCAC (配列番号138)	HindIII

10

20

30

40

nleD	F	CGCGGATCCGCCCTACGTCCCTCAACTTGGTATTAC (配列番号139)	BamHI
	R	CCCAAGCTTCAAAGCAATGGATGCAGTCCTACCTG (配列番号140)	HindIII
nleE	F	CGCGGATCCATTAACTCCTGTTACTAATACTCAGGGCGTGCCCC TATAAAACTAAATATGCTGAACATG (配列番号141)	BamHI
	R	CCCAAGCTTCACTCAATTAGAAAGTTATTATTTATGTATT CATATAACTGTCTATTCCCCAGGC (配列番号142)	HindIII
nleF	F	CGCGGATCCTTACCAACAAGTGGTCTTCAGC (配列番号143)	BamHI
	R	CCCAAGTTTACCCACATTGTAAAGATCCTTG (配列番号144)	HindIII
nleG	F	CGCGGATCCCCTGTCATATTAAACTTTGAGTG (配列番号145)	BamHI
	R	CCCAAGTTCAAATTCTAGTGCATATATTGTGTGGC (配列番号146)	HindIII
nleH1-2	F	CGCGGATCCTTACGCCCTCTCTATAAAATTGGGATGTCATGG (配列番号147)	BamHI
	R	CCCAAGTTTATATCTTACTTAATACTACACTAATAAGATCCAGC (配列番号148)	HindIII
nleI	F	CGCGGATCCCAGGTTCTCGTGTCAAATGG (配列番号149)	BamHI
	R	CCCAAGTTTACAAATACATTGTTCTTGAC (配列番号150)	HindIII
nleG2-1	F	CGCGGATCCAATGTCCTCGAGCTCAAGTAGCATCTAG (配列番号151)	BamHI
	R	CCCAAGTTTAACTATCTTTATAATGAAGTTCCC (配列番号152)	HindIII
nleG2-2	F	CGCGGATCCCCATTAACCTCAGATATTAGATCAC (配列番号153)	BamHI
	R	CCCAAGTTCAATTACCCATTAAACGAAGTTCC (配列番号154)	HindIII
nleG3	F	CGCGGATCCGTAATGCCTGGATTAGTATC (配列番号155)	BamHI
	R	CCCAAGTTTAAATGCAATTGAAATAAAAG (配列番号156)	HindIII
nleG5-1	F	CGCGGATCCCCTGTAGATTAAACGCCATTACCTGGG (配列番号157)	BamHI
	R	CCCAAGTTTAAATTAAACGAAGTTACCTCTGTCAAGGG (配列番号158)	HindIII
nleG6-1	F	CGCGGATCCCCTGTTACCACCTTAAGTATCCC (配列番号159)	BamHI
	R	CGGGGTACCTCACTAACAAAAAGCTTCTC (配列番号160)	KpnI
nleG8-2	F	CGCGGATCCCCAGTCATATTAAATTCTAATGGAAGTG (配列番号161)	BamHI
	R	CCCAAGTTTAAATACTGTTGAGTGGTATATG (配列番号162)	HindIII
nleG9	F	CGCGGATCCGACGTTTATTGTAGATCCTGTT (配列番号163)	BamHI
	R	CCCAAGTTTACACTGAATAACAATCACTCC (配列番号164)	HindIII
espK	F	CGCGGATCCCATGCTCCTACATCGCAATTACGAC (配列番号165)	BamHI
	R	CCCAAGTTTAAAGAATATTATATGTGAAACCAGAG (配列番号166)	HindIII
espL2	F	CGGATCCCCATAATAACAAATCGGCATCAAATTATG (配列番号167)	BamHI
	R	CCCAAGTTCAATTGGAATAATAATTATACATCGAGG (配列番号168)	HindIII
espM2	F	CGCGGATCCCCGATGAATACTACAGGTATGTC (配列番号169)	BamHI
	R	CCCAAGTTTACCCCTGTATAGCACGCATC (配列番号170)	HindIII
espR1	F	CGCGGATCCAATTCCCTCAATATTAAACAAAATAACC (配列番号171)	BamHI
	R	CGGGGTACCTAGTGATAAAAAGGCCATGAGCTGGAGG (配列番号172)	KpnI
tccp	F	CGCGGATCCATTAAACAATGTTCTTCACTTTTCC (配列番号173)	BamHI
	R	CCCAAGTTTACGAGCGTTAGATGTATTAATG (配列番号174)	HindIII
espV	F	CGCGGATCCAGCGGAACCTCAGGTTCTCG (配列番号175)	BamHI
	R	CCCAAGTTTACAAAAAGATTGGGGAGG (配列番号176)	HindIII
espW	F	CGCGGATCCCCAAAATATCATCAGTTGTATCATC (配列番号177)	BamHI
	R	CCCAAGTTTAACTAACCAAGGGGTCCCAGT (配列番号178)	HindIII
espX2	F	CGCGGATCCGATTGTTAAAATGCAATGGTTATG (配列番号179)	BamHI
	R	CCCAAGTTTACAGCCATGCGTCTGGCGTCCAC (配列番号180)	HindIII
espX7	F	CGCGGATCCAAACATATAGAAGGTTCTTCCTG (配列番号181)	BamHI

10

20

30

40

	R	CGGGGTACCTAACGCCACGCAACAGGATAATAC (配列番号182)	KpnI
espY1	F	CGCGGATCCAAGTATCAGTCCAGGCATGC (配列番号183)	BamHI
	R	CCCAAGTTTCATTCAATAATTGCGTTGTCAG (配列番号184)	HindIII
espY2	F	CGCGGATCCAAGTAAGAAACCCAGAACAGATTAG (配列番号185)	BamHI
	R	CCCAAGCTTCAGTCATACCAACGGCTATTGTTCG (配列番号186)	HindIII
espY3	F	CGCGGATCCATGAAAACCACCAACAAACACCG (配列番号187)	BamHI
	R	CCCAAGCTTCAGTCGACGAACTCATAATAATTGCTC (配列番号188)	HindIII

表4. LEE及び非LEE遺伝子の増幅のために使用されるオリゴヌクレオチドプライマー
ヌクレオチド配列は5'から3'方向である。プライマーに組み込まれている制限部位は収載されている。*=GST融合遺伝子

10

【実施例5】

【0241】

抗TTSP STEC O157:H7及び非O157:H7血清を使用するウェスタンプロット及びELISA

次に、実施例4の精製されたタンパク質は、STEC O157:H7及び非O157セロタイプ由来のTTSPに対して産生された血清を使用してウェスタンプロットにおいて試験された。ウサギ抗TTSP STEC O157:H7、ウシ抗TTSPa STEC O157:H7及び抗Hrisタグモノクローナル抗体を使用して、LEE病原性アイランドタンパク質と非LEE精製タンパク質の両方の上でウェスタンプロットは実施された。ウェスタンプロットは、STEC O26、O111及びO103由来のTTSPに対する血清も使用して実施された。すべてのタンパク質が、12% SDS-PAGEゲル上に流された。

20

【0242】

総数で20のタンパク質が、少なくとも1つのセロタイプ由来の血清と反応した。反応性タンパク質の概要は表5Aに見られる。

【0243】

【表5】

A

タンパク質	O157:H7	O26:H11	O103:H2	O111:NM
EscC				
SepD				
Tir				
EspA				
EspD				
EspB				
EspF				
Rorf1				
EspG				
NleA				
NleE				
NleF				
EspR1				
NleH				
NleI				
NleG2-1				
NleG2-2				
EspM2				
TccP				
EspY1				

10

B

タンパク質	STEC O157:H7 TTSP で ワクチン接種された	STEC O157:H7 で 実験的に感染された
Tir		
EspA		
EspD		
EspB		
EspG		
EspM2		
NleA		
TccP		

20

表5. ウサギ O26-、O103-、O111-及び O157 特異的血清、並びに O157 実験的に感染された及び O157 ワクチン接種されたウシ由来の血清に対する反応性組換え STEC O157 TTSP の概要

A)O26-、O103-、O111-及び O157 特異的血清に対して反応した LEE 及び非 LEE タンパク質。O157:H7=ウサギ抗 O157 TTSP ポリクローナル抗体;(Pre)免疫前血清;O26:H11=ウサギ抗 O26 TTSP ポリクローナル抗体;O103:H2=ウサギ抗 O103 TTSP ポリクローナル抗体;O111:NM=ウサギ抗 O111 TTSP ポリクローナル抗体

30

B)O157 実験的に感染された及び O157 ワクチン接種されたウシ由来の血清に対して反応した LEE 及び非 LEE タンパク質。灰色欄は陽性反応性を表す。

【0244】

ウェスタンプロットの結果をさらに確証するために、組換え精製 S T E C O 1 5 7 : H 7 タンパク質も、S T E C O 1 5 7 : H 7 及び非 O 1 5 7 セロタイプ由来の T T S P に対して産生された血清を使用して E L I S A において試験された。すべての試料は三通り行われた。タンパク質の大多数がウェスタンプロットと同一結果を生じた（免疫前と比べた力値の 2 - ログ差に基づいて陽性）（表6）。しかし、いくつかのタンパク質は適合する結果を生じなかった、又は免疫前と比べて 1 - ログ差を示すのみであった。タンパク質 M a p 及び N l e G 6 - 1 は、これらのタンパク質がウェスタンプロットで陰性結果を与えたので負の対照として使用された。これらの入り交じった結果は、E L I S A と比べてウェスタンプロットにおいてタンパク質が受けた変性のレベルと関係付けることができる。

40

【0245】

【表6】

	157	前	26	103	111
NleE	6398±131	1151±66	1242±295	2342±494	5648±225
EspD	410558±103216	227±8	5742±120	384613±152955	264134±59212
EspRI	153555±38091	2907±978	6552±303	3595±1619	6744±923
EspY1	1834±86	1926±58	7368±195	6560±3340	6493±334
Tir	569786±11321	425±24	516982±15432	109109±11176	496833±37645
EspF	960±79	335±16	6985±130	30124±8674	84486±14868
NleI	5626±199	412±31	2266±965	23108±6365	5224±230
EscC	6721±270	1539±75	22634±1565	7120±438	17003±1047
NleH	24066±1788	4185±382	5930±191	18694±1033	2597±917
TccP	1447±81	368±14	132429±44422	27261±1093	6875±67
EspM2	6522±707	921±725	4723±1637	6785±122	6064±950
EspA	637500±162376	234±29	297646±53126	299648±133401	395028±14921
EspB	511393±139707	179±27	99719±734	474865±3983	497104±29944
EspG	386863±61345	397±4	5643±352	1123±69	422629±47581
NleA	460507±14720	128±4	6389±1094	55801±43319	20062±2411
NleF	1362±59	314±33	392±23	512229±51334	4155±815
NleG2.1	4566±518	388±9	2587±1555	121235±31162	6563±591
nleG2.2	6719±527	953±695	2573±1422	84860±12521	7027±6
SepD	6453±362	265±28	760±469	197773±47988	1381±49
NleG6-1	4446±137	674±484	1357±189	1476±125	1409±79
Map	4617±181	385±15	470±14	1269±91	1577±105

表6. 組換え精製 STEC O157:H7 タンパク質に対する抗 TTSP STEC O157:H7 及び非O157 血清を使用して完了させた ELISA の力価結果

データは平均±標準偏差として示されている。

(157)ウサギ抗 O157 TTSP ポリクローナル抗体;(前)免疫前血清;(26)ウサギ抗 O26 TTSP ポリクローナル抗体;(103)ウサギ抗 O103 TTSP ポリクローナル抗体;(111)ウサギ抗 O111 TTSP ポリクローナル抗体

【実施例6】

【0246】

STEC O157:H7 を用いて実験的に感染させたウシ由来の血清を使用するウェスタンプロト及びELISA

実験的に感染させたウシ由来の血清も、実施例4の組換え精製 STEC O157:H7 タンパク質に対して試験された。総数で6つのタンパク質がTir、EspA、EspD、EspB、EspM2 及びTccPからなる実験的に感染させた血清と反応した(表5B)。組換え精製 STEC O157:H7 タンパク質は、実験的に感染させたウシ由来の血清を使用してELISAにおいても試験された。タンパク質ごとに血清の単一ウェル希釈液が使用された。免疫前ウシ血清を使用して、各タンパク質に対するバックグラウンド値が計算された。ELISA OD値は、感染ウシの値から免疫前値を引くことにより測定された。重複している値は平均を取り、3つの標準偏差は引き算前に計算された。

【0247】

試験された全66のタンパク質のうち、5つのタンパク質が陽性結果を与えた。図13を参照されたい。図13に示されていない陰性タンパク質には、Ler、Orf2、CesA/B、Orf4、Orf5、EscS、EscT、Rorf13、Gr1R、Gr1A、CesD、EscC、SepD、EscJ、Orf8、SepZ、Orf12、EscN、Orf16、SepQ、EspH、CesF、Map、CesT、EscD、SepL、CesD2、EscF、Orf29、EspF、EspG、NleB、NleB2-1、NleC、NleE、NleF、NleG、NleH1-2、NleI、NleG2-1、NleG2-2、NleG3、NleG5-1、NleG6-1、NleG8-50

2、N1eG9、EspK、EspL2、EspM2、EspR1、TccP、EspV、EspW、EspX2、EspX7、EspY1、EspY2及びEspY3が挙げられる。

【0248】

ELISAについての5つの陽性タンパク質のうちの4つはウェスタンプロットにおいても陽性であった(Tirr、EspB、EspD及びEspA)。

【実施例7】

【0249】

ヒトHUSタンパク質由来の血清を使用するELISA結果

A. 2000年のウォルカートン集団発生から採取された陽性及び陰性ヒト患者由來の16の血清試料。試料は集団発生の2年後に採取された。試料は、STEC O157:H7による感染と相關する免疫原性抗原(Tirr)に対して試験された(図14)。一組の陰性試料も採取され、陰性試料の余分な組として使用された。全体では、3組の血清に関して有意差は観察されず、採取時にはそのような抗原に対する抗体はもはや存在していなかったことを意味していた。

【0250】

B. 第2の実験では、STEC O157:H7感染からHUSを発症した6人の追加の患者由來の血清は、66の組換え精製大腸菌O157:H7タンパク質に対して試験された。試験された66のうち総数で12のタンパク質がヒト血清に対して反応した。タンパク質ごとに1対500のヒト血清单一ウェル希釈液が使用された。各タンパク質のバックグラウンドを測定するために未処置のヒト血清が計算された。ELISA OD値は、HUS陽性ヒト血清から未処置値を引くことにより測定された。重複値は平均を取り、3つの標準偏差は引き算前に計算された。

【0251】

一般に、4つのタンパク質が試験された血清の大多数と一貫して反応した(Tirr、EspD、EspA及びN1eA)。図15を参照されたい。興味深いことに、これらは、実施例6における実験的に感染させたウシ由來の血清に対して反応したのと同一タンパク質である。図15に示されていない陰性タンパク質には、Ler、Orf2、CesA/B、Orf4、Orf5、EscT、Rorf13、Gr1R、Gr1A、CesD、EscC、SepD、EscJ、Orf8、SepZ、Orf12、EscN、Orf16、EspH、CesF、Map、CesT、EscD、SepL、CesD2、EscF、Orf29、EspF、N1eB、N1eB2-1、N1eC、N1eE、N1eG、N1eH1-2、N1eI、N1eG2-2、N1eG3、N1eG5-1、N1eG6-1、N1eG8-2、N1eG9、EspK、EspL2、EspR1、TccP、EspV、EspW、EspX2、EspX7、EspY1、EspY2及びEspY3が挙げられる。

【実施例8】

【0252】

組換えSTECタンパク質を使用するマウスのワクチン接種

3群の10マウス(下参照)が以下の通りにワクチン接種された。
群1 - プラセボ(0.1Mリン酸緩衝食塩水(PBS, phosphate buffered saline))
群2 - 30%EMULSIGEN D(MVP Laboratories社製、Ralston, NE)中O157:H7-TTSP(大部分が未同定タンパク質の混合物であるM9培地に分泌されたTTSP)
群3 - 組換えO157:H7 EspG、N1eH2-1、N1eA、EspRI、EspF、EspB、EspD、EspA及び上記のキメラTirrプラス30%EMULSIGEN D

【0253】

マウスは最初、0.5μgの抗原を用いて皮下にワクチン接種され、血液試料が採取された。21日後、マウスは再び上のワクチン接種をされ、血液試料が採取された。19日後、マウスは5g/Lストレプトマイシンを含有する水で24時間処置されて通常の腸管細菌叢を取り除いた。次に、18時間餌と水を取り除かれ、血液試料が再び採取されて、

10

20

30

40

50

マウスは 20% ショ糖中 1×10^9 CFU / ml を $100 \mu\text{l}$ 経口用量でチャレンジされた。2 日後に開始して、排泄物試料は 2 週間の間 2 日置きに採取され、S T E C の排泄物排出が調べられた。

【 0 2 5 4 】

特に、1ペレットのマウス排泄物試料（約0.1g）を1mlのルリアプロスと組み合わされ、室温で2~4時間インキュベートされ、ペレットを軟化させた。試料はボルテックスされてペレットを分散させ、PBS中に希釈された試料と25μlドットはCT-SMAC寒天プレート（Mackonkey寒天+セフィキシム0.05mg/L+テルル酸2.5mg/L+ナリジクス酸1.5mg/L）上に3通りに蒔かれた。プレートは37℃で一晩インキュベートされ、コロニーは計数され、大腸菌O157の存在は凝集検査により確認された。

1

【 0 2 5 5 】

データは時間をかけて合計された。総計は正規分布していなかったために、総計は対数変換され、一方向ANOVAに続いて、テューキー比較及びミーンズテストが行われた。結果は図26に示されている。生データの中央値はデータ点として使用された。群間には有意差が存在していた ($P < 0.0001$)。群2及び群3の両方から採取された以前の試料は、群1よりも排泄物排出が有意に少なかった。

〔 0 2 5 6 〕

したがって、哺乳動物の腸管出血性大腸菌定着を処置及び予防するための組成物及び方法が開示された。本発明の好ましい実施形態はある程度詳細に説明されたが、特許請求の範囲により定義される本発明の精神及び範囲から逸脱することなく、明らかな変化をさせることができあることは理解されている。

10

20

【 図 1 】

【 図 2 】

1 MPTGNLGHNVNNSSIPPAVPLPSQTDGAGGRQLINSTGLPLSRAIFTP
51 VRNSMADSGDRNRSASDVEPGVLPVNPMRLLAESTLTNDGWFHLDNGDLTIN
101 RQJSSGVFVERQEDGKHA1VQCRNGQVETSWLSDQEYARLQSIDPEGGK
151 KFVFTGRRGAGHAMVTASDITEEARQIRLELLEPKTGIGSKGAGEKGV
201 GEIRESNSGAENTTGTSTSSRDLPKWLALGTVATGLIGLALTG1
251 VQALALTFEPEDFSTTPDPAASATETRDQUTQECIAFQNPDQXNVKME
301 LGNALP1GSVLKDHDVANNAEQQAKAEEQAQKQIAENNAQKQYKDEQAK
351 RQEKLXVSCSAGCYLGSLAIIQCGAAVTAHLRKNQPCVTTTTTTT
401 TTTSAERTVKENPANTNPAGPNVDTGPGSEDMTTSRNSMASTSTFDTSS
451 IGTVNQVYPAVDKTLSDHSVPNTSNSTSNTSVQNMGNQTDVSWSVQTHQPRD
501 TDNGDLNLGNPSAGIQSTYARLALSGLGRHDMGGLTGGSNSAVTSNNPP
551 AGPSHBFV

1 MPIGNLGHNPVRALIAPPAPLPSQTDGAGGARNQLINSNPGMSRLFT
51 PIRNSVADAOADSRASDIPGIPNPLRFAASEVSLIGALEVLHDKGGLDT
101 NSAIGKSLLSFRVEPRTDDGSWAHQIGKNGLETTWLSQESEFFSLSLDPLKG
151 NKFVFTGRRGGCAGHAMVTASDIAEQRORIDKLEPKTKEPCPDNS
201 GEKGKJIEIHTSTTSSRLAOPPLWLSLGTAAEIQHAGMJAQAVALTP
251 EDPPTTTDPAANAAATTAACQDQTLKIAFQNNPDKQVNIIDENNAIPSG
301 ELKDWWAQIAEQAAKAGEQARQEAIESNSAQOQKYDEQHAKREQSMSL
351 SGVYGISLGLGGGAGTAUHLRRNQKAQPTITTRVVUNQPNINNA
401 SAQNTDTSGPEESPASRNSNLSASLNGSUDTSSTTGVENYAPDVGMRPA
451 DLSARIESEPIPYDPMAPNSVYQHGSNSFVPTGRVLUTPGGQIYSTYA
501 LLASSGLRLGCMGLTGGESVASSTANAATPTGPFRV

FIGURE 1

〔 図 3 〕

61 gcccccccgg qttatacttcg ccataactaa acgeatccg cccgtcgctt ccagaagctg
121 ataaggactt tggatgcctt gcccgtgggt tcccaactaa cticgcgtat ttgggttgt
181 ccctggaaaa ttgttgatga cgcttaattt aggttgcggc ggcgatctt catabataatgg
241 ttcttcggta atacagcoca ggtcaatcat ttgcggatcc caeacgtcad catabaggat
301 ctccatcggtt ccggactgtt aggttacaga cccgtgtt gcaaggctgg cattcggat
361 ggccgtctt gccggggact ctcttcggcc acttgttgcgat ttatggccctt tgccatggat
421 gtatgttgcg ggtctgtttt cgactactgtt acgttgatgg attgtttgtt ctggccgttg
481 ttttttccgg tgaaagccatg cgttaacatc ggccaaattt ccccccggccaaat gatccacgg
541 ccactataa ccgtatggaaa cccccggatgtt agaaagatcc ttccgttgcg ttgttagatcg
601 ctgttcatac tattttttctt ggcgtctggaa attactttca ataggcttctt ttgttgcgtc
661 ttccccccgg gcgtttagottt gtttcgatcat ttgcgcaca acatcatcta ttaatccccc
721 tgccggattt gtatccgtt ctccatcgatc attaaatttt ttgtttttttc gatccgtggaa
781 tgcccttcgtt tgaaaggat tttttgcgtc agctttcgatg ttgttgcgtg catcatacgat
841 atccgttgcgat tggttgcattt ccggctttcggtt agcaacggcc acacgttgcgta caatccgg
901 cgcacatcc ccttacagac gtcggatcatc agttttccaa gacaacaaad ttgttagatcg
961 tgcacgggg cttagaaaggat aggttgcgtt agttaaatccat atgtttttcc ttccggccact
1021 attttggatc ctctggctct tgcgttccctt ttgttccctt ggtttttttt latatctat
1081 ccttcgtccgg gttccggccggat tttccgttgcgaa ataccgttgcg accatggatcc ttccggcc
1141 ggccgtccctt ttatccatcaaataa atttttttt acctttccggat tcaaggatcc gaaatggatcg
1201 aaacctttgtt acttcaataaa ccacaggatcc ttccggccggat ttttttttcc gatagatccaa
1261 atccgttgcgg tttccatccggat ttcccaacaggat gaaatccatggat gatccatag catggatcc
1321 agtatcaagaat ccccccctttat catggaaagac ttcaaggccaa ccatggaaat atttccggat
1381 ccgcacaaagg ccggatgtttt ttgttgcgtt ccggggatcc ttacttgcggat gaaatggatcg
1441 acatccggatcc acagatccatcc ttataggatcc aaatggaaatcc ccggacccat tggccgtt
1501 tggtatccatcc agccgttgcggatcc ttccggccggatcc ttccggccggat ttgttgcgtt gaaatggccg
1561 tgccggatcc ttatccatggat ccatccatggat ttgttgcgtt ccggatccatccatggat

【 図 4 】

六

1 MEIQLNCHNPVNVRALIPIPAPPPLPSQTDAGGARNQLINNSPGMSRLRIFT
51 PIRNSVADADRSASDINGLPNTFLRFASESVLGFALWFLHDKGDLT
101 NSAAIGSLFWRVETDRDGHVAI1QKNGLETFITVLSQDQEFSLLQSLEDP
151 NKVFVTPYGRGGAHAMTVVASDIAERARTRIDLPRODTKEKFEGPDPNS
201 GEKGKIE11HTSTTSRADPLWLSQLTCAACLGMAATGIAQAVALP
251 EPPDDPDTTAAESTAATKDRTLQEAFDPRQVNKNDENGNA1PSG
301 ELIDVVQAQIAQKAQAGEQARAEISNSQACKYQEDEHQAREQEMSL
351 SGVGVYIGSALGLGGIGVAGTAALHRRKQNPQAOTITTTTVDNPOTNTA
401 SAQNDTGTDPGEESPAVRNNSRNSGSDTSTC7VNPENYAQDVPMR
451 DLSARIPEPYIPEPDIAPNNSVIIHFGSGNVPVTRLGPCTGQCGIQSTYA
501 LLASSGGRLLGMGGVLTGGESAVSTANASTPTGCPARF

FIGURE 3

【 四 5 】

A

1 MP1GNLGHNPVNNS1PPAPPLSPSQTGDAGGRGL1NSTGPLGSRALFTPVNRNSMADS1
61 NRASDVGFLPVNPMRLAASE1T1NDGFLFVHDHLDGLTLNRSQGSSVERTEQDGKH1
121 VQGRNGVETSVLSD1EYARLSD1PDEGKDFVTGRRGAGHAMWTVSD1TEARQL1
181 ELLPETRGKESGAGKESGVRSRNSGAENTTETST1TS1LSRSPDMLALGTV1
241 GLIGLAAT1VQALAT1TPEDPSFTT1DPAASAT1TARQL1KEAFONDNQKVNIDE1
301 LSGNA1PSGLV1KUDWDUNVANIEQPKAAAGEAKQQ1NNAAQKYY1DQEKAQKFEELKVSS1
361 AGYGLSVGLLGGG1VQAVTAHLHKNQPVPEVTTT1TTTTT1ARTVENKPNPNT1PAGG1
421 NVTDPGMSVEMTMSRSMASSTTFD1S1CTV1YADWV1LTS1HD1SQVTS1NNTNSV1
481 NGMNTGDS1VTS1QH1PRDTT1GARL1LPGN1PAG1QSTYARV1LGLR1MDGLGTLT1
541 SAVNTNSV1PAGSH1FVRQGGS1PAG1S1Q1D1Q1T1Q1P1Q1S1P1G1L1
601 DDDVVAKE1BQEAKE1PAG1QVAESE1NSAQAO1QY1D1T1Q1R1EEL1S1G1S1P1G1L1
661 DDP1TT1DPA1DAA1K1D1Q1D1L1K1T1E1A1Q1N1P1D1Q1N1V1D1E1N1A1S1G1M1G1C1Q1R1E1A1
721 ESS1NOOK1D1O1H1K1P1F1M1R1

FIGURE 6

1 MPIGNLNNSNNSLNLAPPPLPSQTDGASRGGAQQLINSTGALGSRLLF
51 SPLRNISADSVSRSRDLPGGSRSLRATLATECILCGFLVFLHDKGFLDFT
101 LNKIGAQSFAFRIEQPSQDSYAAIGEKGNEVEWSVILNQSQELSLQAIDED
151 KGRFVTFCCGRGGHMSMVTIPASDAAEAKARAKLADNENHHNGGSQRNVDT
201 RSVGVSGLACMSDDDSWSVSETTSSTASSVRSPDKFWPSVIAIGAAGLACLA
251 TGITOALALTPPEPDPTTDPPECAASAEATRDOLQEFKPNENPKVWS
301 IDEIGNSIPISEKLGDWWVKATIEQAEKAAGRAARQEVNSAQAQDRYDTQ
351 YARQQEELELSLLSSTGIGSYLSSALIVGGGIGGVTIALHRNRQPAEQTTT
401 THITVWVQQGTGNTTQAEGGDTDAIRAESTDLSNRDSCKRSTASTHWDTSLSAV
451 VNPAVEGEARNSSPAREQEEHYYDEVAADPNVSYUNFGNSQNGVTRML
501 GPTGGCQICSTAYLTNTNSAG1RLGMGLTGTSGSSAVNTANAAPTPGPGRF
551

5

【 図 6 A - 1 】

FIGURE 6A

【図 6 A - 2】

FIGURE 6A (CONT'D)

【 囮 6 B 】

FIGURE 6B

【 8 A - 8 B 】

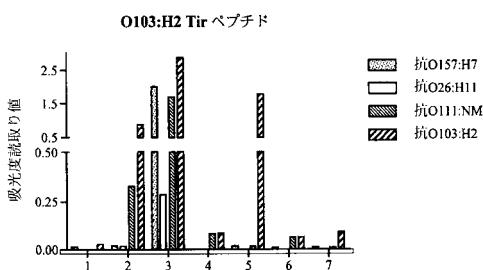


Fig. 8A

【 8 C - 8 D 】

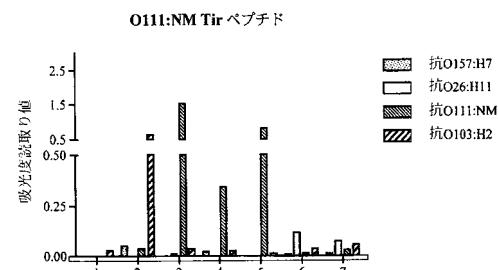


Fig. 8C

O26:H11 Tir ペプチド

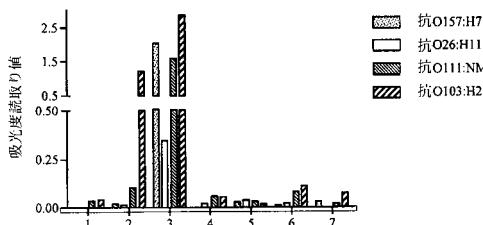


Fig. 8B

Q155_HALT: ペゴモド

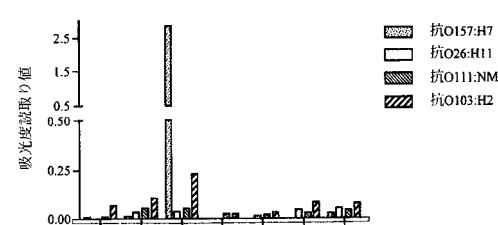


Fig. 8D

【図 9 A】

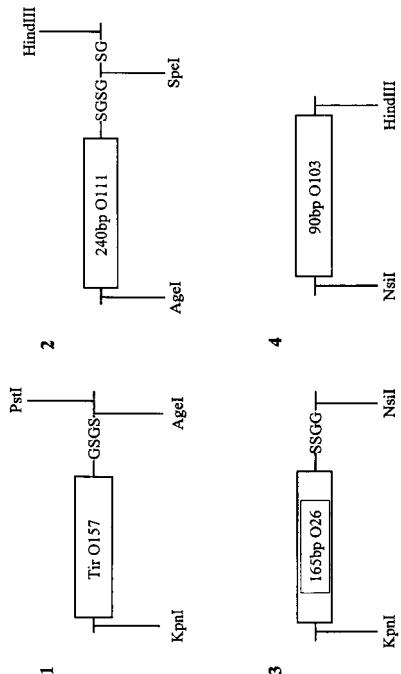


Fig. 9A

【図 9 B - 9 C】

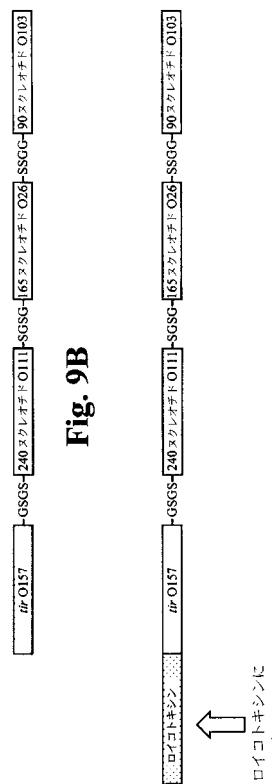


Fig. 9B

Fig. 9C

【図 10】

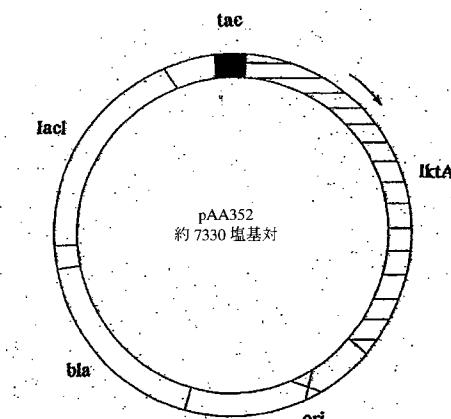


FIG. 10

【図 11 A】

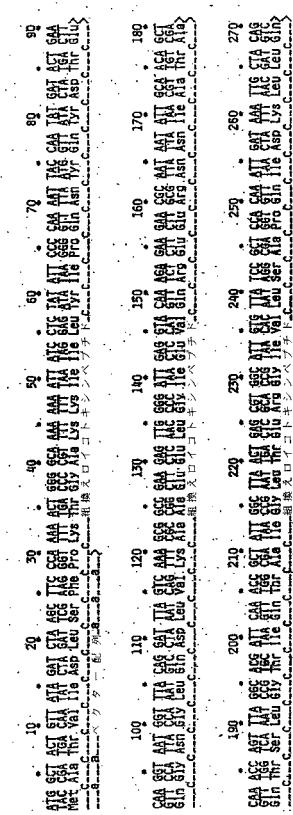


FIG. 11A

【 义 1 1 B 】

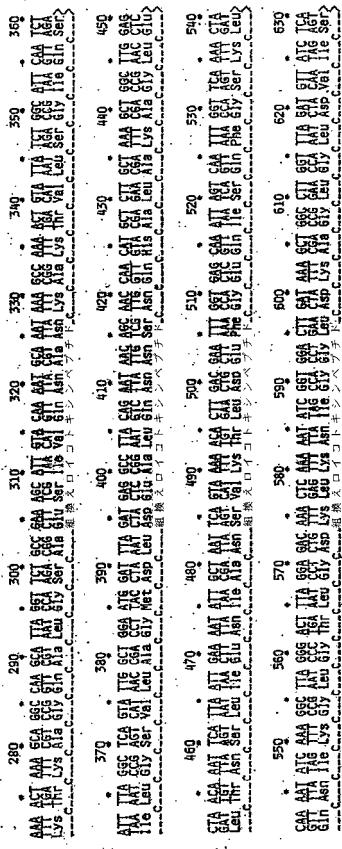


FIG. 11B

【図11D】

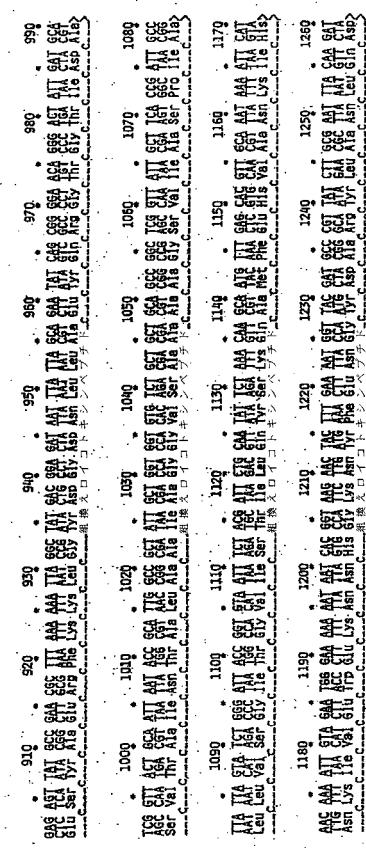
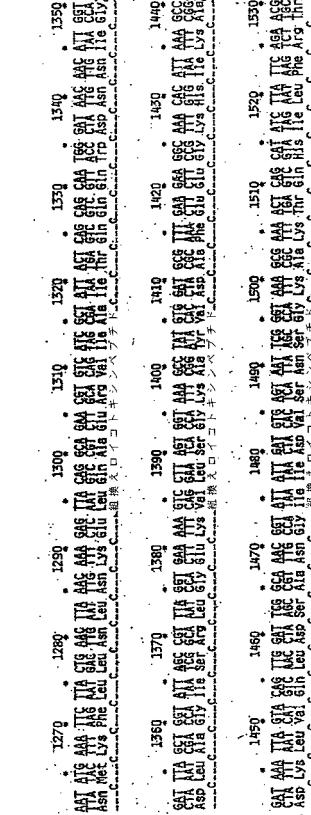


FIG. 11D

【 図 1 1 E 】



ETG 117

【図11C】

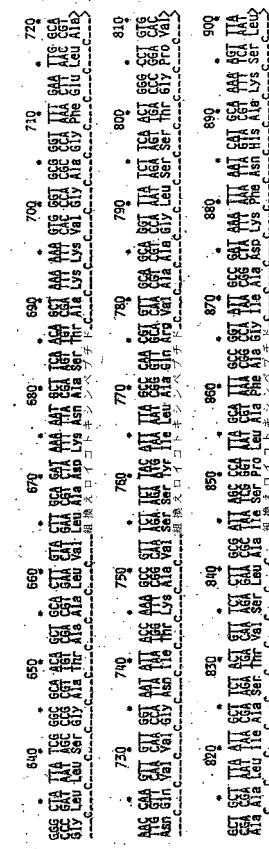


FIG. 11C

【 図 1 1 F 】

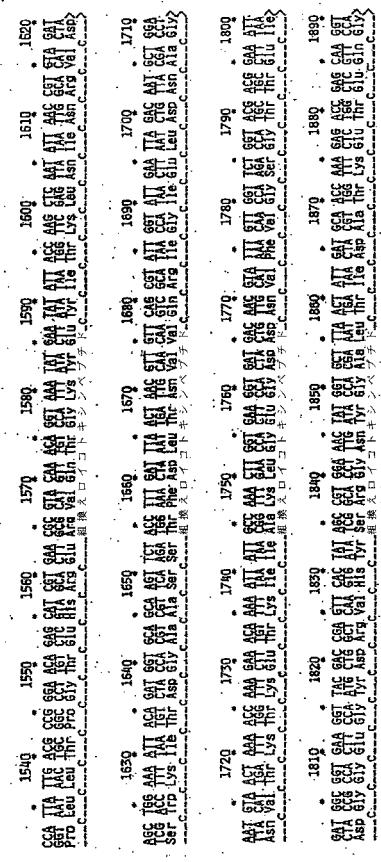


FIG. 11F

【 义 1 1 H 】

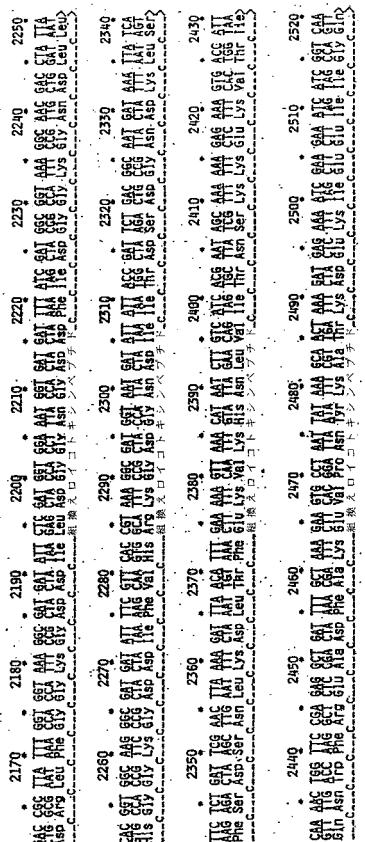
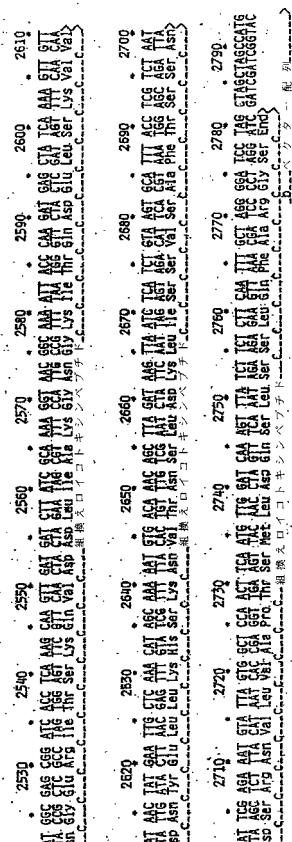


FIG. 11H

【 図 1 1 I 】



ETG 111

【 図 1 1 F 】

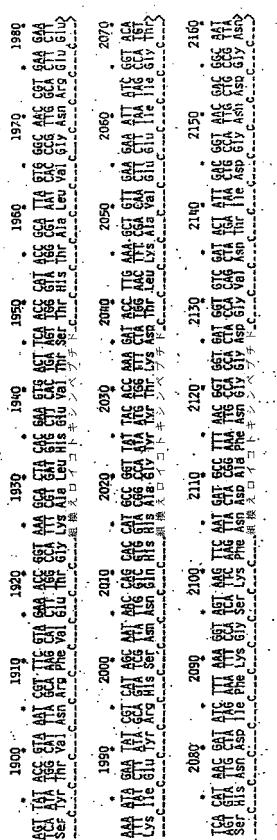
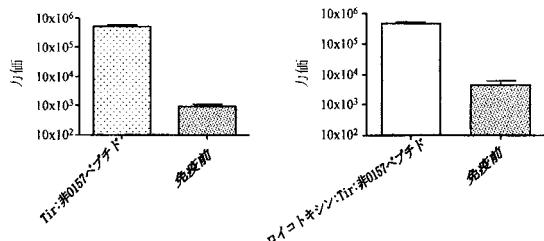
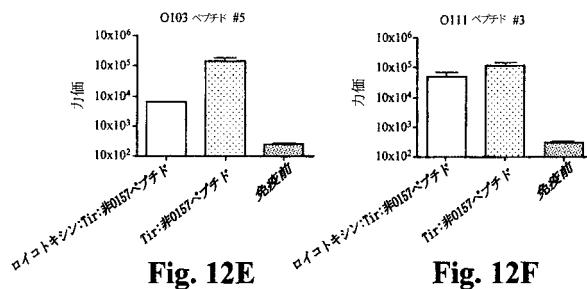
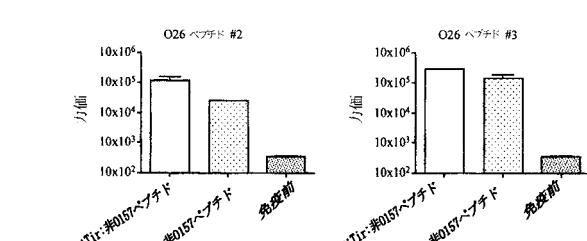


FIG. 11G.

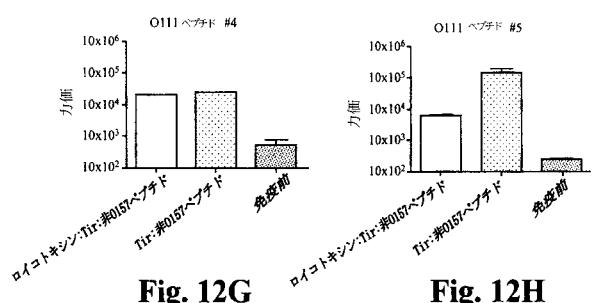
【図 1 2 A - 1 2 B】



【図 1 2 C - 1 2 F】



【図 1 2 G - 1 2 J】



【図 1 3】

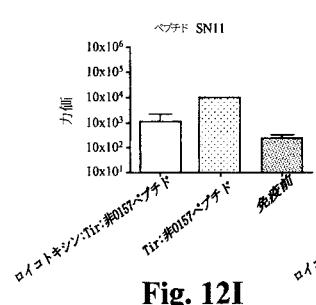
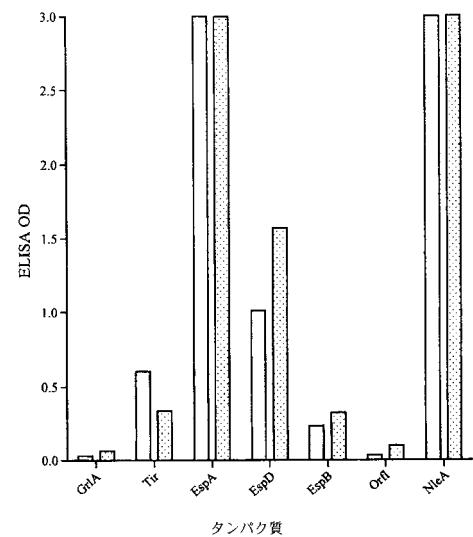


Fig. 13

〔 図 1 4 〕

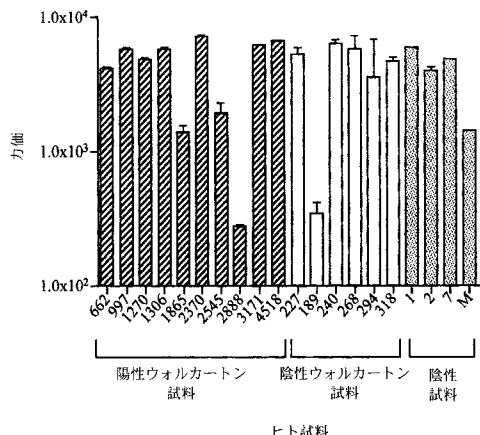


Fig. 14

(15)

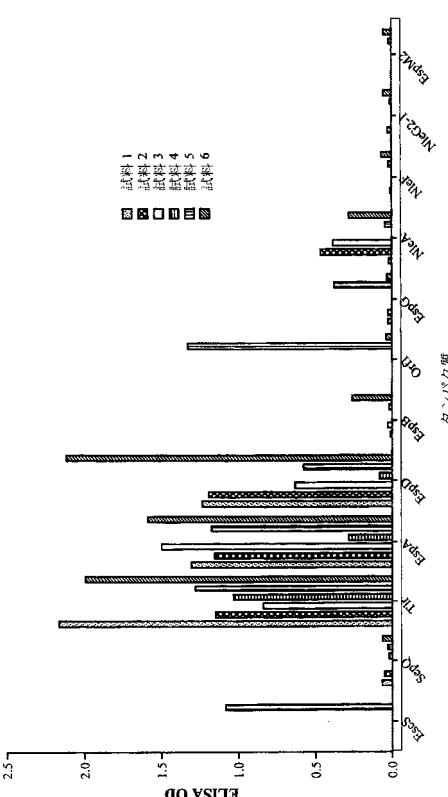


Fig. 15

〔 四 16 〕

3

1 MDTNSATSVNVSAASSSTIYDLGNSKDEVVLFEEGLVFQAAILMFS
51 YMYQAQSLSNIAKFADMEASAKTAAQRMANLVDAKIADVQSSTDKNAK
101 AKLQPDVYDIDNPDRNDSITVGTRIYGLDLSGLSDAQLTVKAIASAKNNLT
151 THUNNOLSELOOMSNTTNTGSPQVQLOXPTAISICK

1

〔 四 17 〕

1

```
1 MNTIDNTQTVMSASESTTGASSAVAASALSIDSSSLTDGKVDICKIML  
51 EIQKLGGWNNLTLDDYQQKQLASQYICQAQFESQAAIEKKAAATAAL  
100 VGCIGISALGLTQSFAAMNAAGKEAKASSKASSKAAGAESENANKA  
150 LVKATVTTTAAEVAEASSAMQAMNATTTKAASRGSVWDVAKASDFEADL  
200 ADAAEKTTSRINKLNLNSVVKLTNTTAFTAVVTSLEACTLTPTTVEVSKT  
250 2HEVNTTAAEKSRLNFQGQNLELYKQDVVRTQDDITTRLRDITSAVRDLLEV  
300 ONRNGMOSQRLLAG
```

1

FIGURE 16

FIGURE 17

【 図 1 8 】

A

1 MLNVNNNTLTSVTSGVNTASCTGSIQTSETGLSLDLQVLKSMNSAAGWTES
5 SPLTFPTPAGSVAHLSPLAAEVDLKLFGGIVCEVTSRTEAEAPQRSTSYLP
10 101 SVQNTTDPQMMVMTLSSLDTSQAVKQSVLSNLSENRTEADMGTKQALEKNTQ
15 151 EYKKLQEKEQAAEKSQKSXQVQVQFWGLVALTAVAANFPALWAVVAI
20 201 GATAMALQTAVDWMNAGPQCLTKAAQVFGGISMASILTAGVGVSSLL
25 251 SKFGNVANKIGSSVVVKVKEAAELBLVNKFVAKISTEVGVTNGRLSAGTT
30 301 ALNNNEAQALQMSLAAFAVONLTQSESESILGESAKLELDKAASELQNQAS
35 351 YLQSVSQMSLDSARVSNSVSGRI

I

FIGURE 18

【 四 19 】

1 atggacatcaa aaccggcatt acaaatccgtt atcaatccat aaacaatccat acatcatcat
61 acagaacaaa tacccttcgtt acataatccagg caattccggat cttactccgtt atgcggaaatgt
121 ggatgttgtt ttatatatcc agtgatgatata cggcaacatg cacccggatg cgggtgaacaa
181 acatgtctac tgatgttgtt aaaaatggaa ggttctgtctt cgggtcgta cggatataat
241 gctccctacc ttggaaaggaa atccatagtagaaaaaaatcat gttatgtatgt tggtttatcc
301 aatgttgaa aatgttgtt agatagactt agttccgtt cggatgtt cggatgtt tggtttatcc
361 gggttccggc ttacatgtt aaaaatccat atactccat cttccatggaa ttatgtttatcc
421 catggatatt ctctgcgtat tttatgtatgtt ttatgtttatcc agatgttcc tcggccgtt
481 aaaaatgtat taacaaacatg tttatataatcc accatcttcgatc tgccgtatcc tgccgtatcc
541 ggaacatccg ccataacttcg gacgggttaccc accggcccaa aacccggatc accatgttt
601 ggatgttgtt ctcggatgtt tttatgtatgtt cttccatgtat cttatgtatcc aaaaatccat
661 aatggatgtt agttccgtt aaaaacaccaatc ttactccgtt agtccggca aaccaatgtt
721 acggagggtt ggtttatccat ccggccggaa acggatgtt aatatgtgtt atccatgtt
781 cggccaaactt tttatgtatgtt gtttccggca cttatgtatcc aatgttccat aacccgtt
841 actaaatccat ccgttccatcc catatgttcc acatgttcc gcaatggcc ttgggttccgtt
901 cggatgttccca gatgttgttccat cttatgtatcc atgttccatcc ttccatgttcc
961 gggccatccat cggggccatcc catatgttccat aatataccgtt gatataatcc gtttccatgtt
1021 ttatgttgtt ctgtgttgttcc acatgggggttcc gccgtatataa acaaggccca gtttccatgtt
1081 gctatgttcc ctgtatgttcc tttatgtatgtt ccggccatcc aaaaatccatcc tttatgtatcc
1141 aataaaatccat atatgtgttcc tttatgtatgttcc gatgttccat gtttccatgtt
1201 ctgttgttcc acggccatcc aatataccgtt gatgttgtt ccgtatgttcc aacaaatccat
1261 ttatccatccat aataatccatcc aatataccgtt gatgttgttcc atataatcc aaaaacaaatcc
1321 gtttccat

A

1 MNQJPTQISGSITQSNNQQHQTQEIQPSTQIPQSEPLPLCGQAGFVVNIPD1
50 QHQAEPCPQSLLSLTDKKGKLGLSDTAYTAPEHLGEGS1GKTHLLMFLGGF
100 NVTQWMALEPTPSSVSGTSQGYCWLNUVNPDKPDTGNSYFLQFLPDEB1G
150 FNFKDLPGLPKLNALNSNISTAVSTIASTGTSAATTSTVTEPKDPIPW1F
200 GLTAQVVRNHRGVLPVLTKEWNGKLVUGPTEPLTPDGPKANYEWTVEIRPGE
250 ADKFYKGASPLQATIGLEFGAHFWDNLDNPNTYQAVLNAANALGLGF
300 AVSFRAESTPDLMSPHIGAMVQQAHGAIQNTGPKDITWLWAGATLG1A
350 ADLNAKFEAVWPDTYDPRWHRHAREGAFLPKNADIEHATGADIRAMEEGI
400 PVGQRHNPEDVVIDIESNGLPHHNPSNHWDIFDIIQZETRV

1000

【 図 20 】

1 atgatggatc ttggccaaat gttcattaca aaccagatag gagaatcttc catgataaat
61 ggacttaatc atgtacccgc acatctttgtt ctatgtatgc caatggaaat taatcttggg
121 tttaaaaaaa gctggggata gaatgtatcgcatc gtggaaatgtt taatgttgg
181 ggtttatggc atcccaacgtt cagtgttgat gaaacaaatc cattttttgc tggtttttaa
241 gtttttagadg ctgttatccc accttcccaatc gaatttgcggc gatgtatgc tggtttttca
301 gatgttgtcc cttaaaatgtt cttcgccact aacggacggc ttgttgaaat cgagatccgc
361 acagcaataat atggaaatgtt atgtatgcgc ctggatgtac acggacaaaata taggttttt
421 caatcttttccatcatgtcc ccacatgcgc taatccatggc ttcatccgtc ctatcttgg
481 atggccgttgc ctgtatctacatc ctatccatggc aatctatccgtc ttgttgcgtc aaatctatcc
541 acaaacctttt ttcctccatgtt atgtccaaatc gatccgtttcc cccggccatc accatccgc
601 ttctatctttt tggatcatgc tccggggatcc ggcataatcc agtttccatc acatgttttt
661 gatataatcc caatgtgcaca aaaaatgttcc cccatgtcc taggactttaa agacacatcat
721 tcatcaccaa cccggatgtt ttagatgcat gttatccatc cccatgtcc agacacatcat
781 gcaagaaatgg gcaatggccatc tgatataacatc aaaaatgttcc ttgttggat tttatgtcc
841 ccagaacggc caaayccgtcc atgtccgttcttccatcatc ctttccatgc ggcacccatc
901 acgttgcacatc atggaaatgtt ctatccaaatc agtggaaatctt acatgtttcc
961 accatccatca ctgttggatcc atgtatccatc tttatccatc catgtggaaa cattttttgtt
1021 accggccatca ctgggggtttt gataatgtccgc ccggaaatcc cccggccatca tggttgcgt
1081 ttggacacca gaaatgttcc tgaatgtccgc caatgttgc tggttgcgt
1141 gtatgtccgc lacaaccaatc gatgtccgcga tttatccatc acatgtttcc
1201

A

1 MILVKALIFTINQIGESMLINGLNNDSSASLVLDAAMKVNNSGFKKSWEDEMS
51 AEKLFLFRVLSFGLNWNPYTSRSERSQSFEELTTLVLEPVYPLNELGRVSRARFS
101 DGSSELVSRVNSELNEAIEARTTANNEKITVLLNESNRQNLSSPQLIDRHM
151 YIQVHRAISEMLDDTTSMRMLNGLFKTSKLSTLPHNAPQDTPSLCPPTPS
201 SIFMDCTRCGLNKAHLNLGVNDIIPANAQKLLRDALGLKDTHHSPTRNVIDH
251 SHDRBATOPIAFRSGSCLDKQRAEWKQHSDWVQHJLWVQHJLWVQHJLWVQHJL
301 TLTHERLSKASEYNAERSLDTPNACINISISQSDEDGNTTCAVSFIQSNPVAL
351 DEEDDNMOMSNSDQHJLWVQHJLWVQHJLWVQHJLWVQHJLWVQHJLWVQHJL
401

FIGURE 20

【 四 2 1 】

7

五

FIGURE 21

【 図 2 2 】

A

1 MJSYPSVNLGSNSLTLRNLSPDNRLVSSVRDAAVHSNDGQVKVGVRNT
5 YRVVATDNCFCVTRHSSGCFNLHLRGPKGEKSRKIEVMNLNAPSVA
10 AMEVIGVHSNRDLPFVVYAPEPLFSDVYRNLSVPGVNKGCKGNNAYVED
15 AEDATDKNGSLMLTTSQSSENEVTFQYAGASAKIYGNGNDIYJIR
20 MDKINGESLNNLTTQSSENEVTFQYAGASAKIYGNGNDIYJIR
25 KNEFNPIDISSYNSVSDRSWSSESQIMQSYHGGQKDLSWLSKI

FIGURE 22

【 図 2 3 】

A

1 MLSPSVNLNCGSNSLTLRNTSPDNRVLSSVRDAVHSNDGAQVKVGMR
5 YRVATVDNCFVCTRESHSGCFTNLRLHRGPKWEISRKIEVLMNNSPVS
10 AMERGIYHVSNRNPLDPWYUAPPFELPSVDYNRNLSVPVNIGKGGNNAVEY
15 AEDATKVLKMFETTSVNRNTEVSEFRCPNQQYGGASAEKIYGNNGNDIIGIR
20 MDKINGLSELNLNISSLPAAEHAITYDMFRLEQKGTLFVDTTEINLVYDRAK
25 NEFPNPIDISSYNNVSDRSWSSEQSQMGSYHGKKQDLISVVLSTI

FIGURE 23

(図 2-4)

8

1 MLNGISNAASTLGRQLVGIASRVSSAGGTGFSVAPQAVRLTPVKVHSRPF
51 PGCSNNVNRATI FVNWSQVTSFTSPRFAPPPTSGQASGSRLPPIAQALKE
101 KEHLAAYEKSKGPEALGFKPQARQAPPPTSGQASGSRLPPIAQALKEH
151 LAAYEKSKGPEALGFKPQARQAPPPTSGQASGSRLPPIAQALKEH
161

FIGURE 24

【図25】

A

FIGURE 25

【図 26】

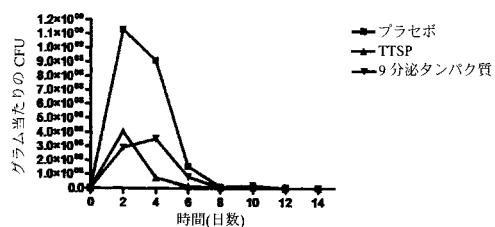


FIGURE 26

【配列表】

2012522522000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/CA2010/000516									
<p>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</p> <p>IPC: C07K 19/00 (2006.01), A61K 39/108 (2006.01), A61K 39/385 (2006.01), A61P 31/04 (2006.01), A61P 37/04 (2006.01), C07K 14/245 (2006.01) (more IPCs on the last page)</p> <p>According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC</p>											
<p>B. FIELDS SEARCHED</p> <p>Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)</p> <p>IPC: C07K 19/00 (2006.01), A61K 39/108 (2006.01), A61K 39/385 (2006.01), A61P 31/04 (2006.01), A61P 37/04 (2006.01), C07K 14/245 (2006.01), C07K 16/12 (2006.01), C12N 15/62 (2006.01), G01N 33/564 (2006.01), C12N 15/31 (2006.01)</p>											
<p>Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched</p>											
<p>Electronic database(s) consulted during the international search (name of database(s) and, where practicable, search terms used)</p> <p>Canadian Patent Database, EPODOC, Total Patent, Scopus, GenomeQuest, PubMed. terms: Tir, translocated intimin receptor, Esp*, Nle*, TccP, fusion, chimeric, enterohemorrhagic, shiga toxin, cross-react, STEC, EHEC, multiple epitope, type 3 secreted proteins, immun*.</p>											
<p>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category*</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A</td> <td> PATON, A.W. et al. "Translocated intimin receptors (Tir) of Shiga-toxigenic Escherichia coli isolates belonging to serogroups O26, O111, and O157 react with sera from patients with hemolytic-uremic syndrome and exhibit marked sequence heterogeneity" November 1998 (11-1998) INFECTION AND IMMUNITY 66(11):5580-86 ISSN:0019-9567 *whole document* </td> <td>1-36</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td> WO 2007/101337 A1 (BABIUK, S. et al.) 13 September 2007 (13-09-2007) *whole document* </td> <td>25-29, 31-36</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	A	PATON, A.W. et al. "Translocated intimin receptors (Tir) of Shiga-toxigenic Escherichia coli isolates belonging to serogroups O26, O111, and O157 react with sera from patients with hemolytic-uremic syndrome and exhibit marked sequence heterogeneity" November 1998 (11-1998) INFECTION AND IMMUNITY 66(11):5580-86 ISSN:0019-9567 *whole document*	1-36	X	WO 2007/101337 A1 (BABIUK, S. et al.) 13 September 2007 (13-09-2007) *whole document*	25-29, 31-36
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.									
A	PATON, A.W. et al. "Translocated intimin receptors (Tir) of Shiga-toxigenic Escherichia coli isolates belonging to serogroups O26, O111, and O157 react with sera from patients with hemolytic-uremic syndrome and exhibit marked sequence heterogeneity" November 1998 (11-1998) INFECTION AND IMMUNITY 66(11):5580-86 ISSN:0019-9567 *whole document*	1-36									
X	WO 2007/101337 A1 (BABIUK, S. et al.) 13 September 2007 (13-09-2007) *whole document*	25-29, 31-36									
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.									
<p>* Special categories of cited documents :</p> <ul style="list-style-type: none"> "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "B" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>											
Date of the actual completion of the international search 18 June 2010 (18-06-2010)		Date of mailing of the international search report 12 July 2010 (12-07-2010)									
Name and mailing address of the ISA/CA Canadian Intellectual Property Office Place du Portage I, C114 - 1st Floor, Box PCT 50 Victoria Street Gatineau, Quebec K1A 0C9 Facsimile No.: 001-819-953-2476		Authorized officer Mary Murphy (819) 994-4066									

INTERNATIONAL SEARCH REPORTInternational application No.
PCT/CA2010/000516**Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing filed or furnished:
 - a. (means)
 on paper
 in electronic form
 - b. (time)
 in the international application as filed
 together with the international application in electronic form
 subsequently to this Authority for the purposes of search
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments :

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/CA2010/000516
--

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of the first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons :

1. Claim Nos. : because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely :

2. Claim Nos. : 1-3 because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically :

Claims 1-3 encompass products that are not defined in terms of clear and/or distinguishing technical features as required under Rule 6.3(a) of the PCT. The description provides support within the meaning of Article 6 of the PCT for only a limited number of the products. [continued on extra sheet]
3. Claim Nos. : because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows :

Group I: Claims 1-24 (wholly) and 30-36 (partially) are directed to a multiple epitope fusion protein comprising epitopes of an immunogenic Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) protein from more than one STEC serotype, wherein the epitope may be derived from Tir, a composition comprising said fusion, method of producing said fusion, a polynucleotide, vector or host cell encoding said fusion; antibodies specific for the fusion; and methods of using said fusion to immunize or treat a mammal containing STEC.

Group II: Claims 25-29 (wholly) and 30-36 (partially) are directed to a composition comprising at least two purified immunogenic STEC proteins, wherein at least one protein generates antibodies that react with STEC O157 and at least one other STEC serotype, and methods of using the composition to immunize or treat a mammal containing STEC.

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claim Nos. :

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claim Nos. :

Remark on Protest The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/CA2010/000516
C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ASPER, D.J. et al. "Cross reactivity of enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7-specific sera with non-O157 serotypes" electronic publication 12 October 2007 (12-10-2007) VACCINE 25(49):8262-69 ISSN:0264-410X *see especially paragraph 3.1 on page 8264*	25-29, 31-36
A	KARPMAN, D. et al. "Antibodies to intimin and Escherichia coli secreted proteins A and B in patients with enterohemorrhagic Escherichia coli infections" March 2002 (03-2002) PEDIATRIC NEPHROLOGY 17(3):201-11 ISSN:0931-041X *see especially Table 6 on page 207 and Discussion on page 208*	25-29, 31-36
P,X	MCNEILLY, T.N. et al. "Immunization of cattle with a combination of purified intimin-531, EspA and Tir significantly reduces shedding of Escherichia coli O157:H7 following oral challenge" electronic publication 10 November 2009 (10-11-2009) VACCINE 28(5):1422-28 ISSN:0264-410X *whole document*	25-29, 31-36

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CA2010/000516

Patent Document Cited in Search Report	Publication Date	Patent Family Member(s)	Publication Date
WO2007101337A1	13-09-2007	WO2007101337A1	13-09-2007

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/CA2010/000516
--

Continuation of Box II

In the present case, the claims lack clarity and/or support, and a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Consequently, the search has been established for the parts of the application which appear to be clear and supported, namely the multiple epitope fusion protein wherein at least one epitope is derived from STEC O157:H7 Tir.

Continuation of: CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 16/12 (2006.01), *C12N 15/62* (2006.01), *G01N 33/564* (2006.01), *C12N 15/31* (2006.01)

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	4 H 0 4 5
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00	1 0 1
C 1 2 P 21/02 (2006.01)	C 1 2 P 21/02	C
C 0 7 K 16/12 (2006.01)	C 0 7 K 16/12	
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	
A 6 1 P 37/04 (2006.01)	A 6 1 P 37/04	
A 6 1 K 39/108 (2006.01)	A 6 1 K 39/108	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	N

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,SE,S,I,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,I,N,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PE,PG,PH,PL,PT,RO,RS,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

(74)代理人 100107984

弁理士 廣田 雅紀

(72)発明者 ポター アンドリュー エイ.

カナダ国 エス 7 エヌ 5 イー 3 サスカチュワン サスカトゥーン ヴェテリナリーロード 1 2
0 ユニバーシティー オヴ サスカチュワン ヴァクシン アンド インフェクシャス ディシ
ース オーガニゼーション 気付

(72)発明者 アスパー デイヴィッド

カナダ国 ヴィ 8 ティー 4 ゼット 5 ブリティッシュコロンビア ヴィクトリア ペンブローク
ストリート 2 1 1 - 9 0 9

(72)発明者 ローガン ドラガン

カナダ国 ケイ 8 エヌ 1 イー 2 オンタリオ ベルヴィル ダンダスストリートイースト 2 3 1
バイオニッシュ ライフ サイエンシズ インク. ア ボディ コーポレート パースアント
トウ ザ ロウズ オヴ カナダ 気付

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA13 BA61 BA80 CA01 GA11 HA01

4B064 AG31 CA19 CC24 DA01

4B065 AA26Y AB01 AC14 BA02 CA24 CA25 CA44

4C084 AA01 AA02 BA44 CA04 DC50 MA02 NA05 NA14 ZB091 ZB351

ZC611

4C085 AA03 BA21 CC07 EE01 EE06 FF24

4H045 AA11 BA10 CA11 CA40 DA76 DA86 EA29 EA52 FA74