

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5576792号
(P5576792)

(45) 発行日 平成26年8月20日(2014.8.20)

(24) 登録日 平成26年7月11日(2014.7.11)

(51) Int.Cl.

F I

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C O 7 K 14/245 (2006.01)

C O 7 K 14/245

C 1 2 N 1/15 (2006.01)

C 1 2 N 1/15

C 1 2 N 1/19 (2006.01)

C 1 2 N 1/19

C 1 2 N 1/21 (2006.01)

C 1 2 N 1/21

請求項の数 16 (全 14 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2010-516967 (P2010-516967)
 (86) (22) 出願日 平成19年8月13日(2007.8.13)
 (65) 公表番号 特表2010-533489 (P2010-533489A)
 (43) 公表日 平成22年10月28日(2010.10.28)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2007/075801
 (87) 国際公開番号 W02009/011707
 (87) 国際公開日 平成21年1月22日(2009.1.22)
 審査請求日 平成22年7月2日(2010.7.2)
 (31) 優先権主張番号 11/779,419
 (32) 優先日 平成19年7月18日(2007.7.18)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

前置審査

(73) 特許権者 509285861
 ディベロップメント センター フォー
 バイオテクノロジー
 台湾, 221, シージー シティ, タイペ
 イ カウンティ, カンニン ストリート,
 レーン 169, ナンバー 101
 (74) 代理人 110000671
 八田国際特許業務法人
 (72) 発明者 シュ, ユーシェン
 台湾, 221, シージー シティ, タイペ
 イ カウンティ, カンニン ストリート,
 レーン 169, ナンバー 101

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 変異型大腸菌易熱性エンテロトキシン

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

大腸菌易熱性エンテロトキシンの変異サブユニット A を含む単離ポリペプチドであって、

前記変異サブユニット A は、野生型のものと比較して、配列番号 5 の 61 位に位置する R であるただ 1 つの変異残基を有し、

前記変異サブユニット A を含む大腸菌易熱性エンテロトキシンが、配列番号 5 のアミノ酸配列を含む野生型大腸菌易熱性エンテロトキシンと比較して低い毒性を有する、単離ポリペプチド。

【請求項 2】

前記変異サブユニット A を含む大腸菌易熱性エンテロトキシンの毒性が、前記野生型大腸菌易熱性エンテロトキシンの毒性の 10^{-6} 倍未満である、請求項 1 に記載の単離ポリペプチド。

【請求項 3】

前記変異サブユニット A が、配列番号 4 のアミノ酸配列を有する、請求項 1 に記載の単離ポリペプチド。

【請求項 4】

抗原とアジュバントとを含むワクチンであって、

前記アジュバントが、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の単離ポリペプチドである、ワクチン。

【請求項 5】

前記抗原が、細菌またはウイルス由来である、請求項 4 に記載のワクチン。

【請求項 6】

前記細菌が、肺炎連鎖球菌、大腸菌、ヘリコバクター・ピロリ、髄膜炎菌、およびインフルエンザ菌 b 型からなる群から選択される、請求項 5 に記載のワクチン。

【請求項 7】

前記ウイルスが、インフルエンザウイルス、ヒト免疫不全ウイルス、A 型肝炎ウイルス、B 型肝炎ウイルス、C 型肝炎ウイルス、ヒト・パピローマウイルス、エンテロウイルス、およびロタウイルスからなる群から選択される、請求項 5 に記載のワクチン。

【請求項 8】

前記変異サブユニット A を含む大腸菌易熱性エンテロトキシンの毒性が、前記野生型大腸菌易熱性エンテロトキシンの毒性の 10^{-6} 倍未満である、請求項 4 に記載のワクチン。

10

【請求項 9】

前記変異サブユニット A が、配列番号 5 の 61 位に対応する位置に R を含む、請求項 4 に記載のワクチン。

【請求項 10】

前記変異サブユニット A が、配列番号 4 のアミノ酸配列を有する、請求項 4 に記載のワクチン。

【請求項 11】

L T のサブユニット B をさらに含み、前記変異サブユニット A と前記サブユニット B とが全長の腸菌易熱性エンテロトキシンを形成する、請求項 4 に記載のワクチン。

20

【請求項 12】

大腸菌易熱性エンテロトキシンの変異サブユニット A をコードするヌクレオチド配列を有する単離核酸であって、

前記変異サブユニット A は、野生型のものと比較して、配列番号 5 の 61 位に位置する R であるただ 1 つの変異残基を有し、

前記変異サブユニット A を含む大腸菌易熱性エンテロトキシンの配列番号 5 のアミノ酸配列を含む野生型大腸菌易熱性エンテロトキシンと比較して低い毒性を有する、単離核酸。

30

【請求項 13】

前記変異サブユニット A を含む大腸菌易熱性エンテロトキシンの毒性が、前記野生型大腸菌易熱性エンテロトキシンの毒性の 10^{-6} 倍未満である、請求項 12 に記載の核酸。

【請求項 14】

前記ヌクレオチド配列が、配列番号 3 で表される、請求項 12 または 13 に記載の核酸。

【請求項 15】

請求項 12 ~ 14 のいずれか 1 項に記載の核酸を含む、ベクター。

【請求項 16】

請求項 15 に記載のベクターを含む、形質転換細胞。

40

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

関連出願のクロスリファレンス

この出願は、2007 年 7 月 18 日に提出された、米国特許出願第 11 / 779,419 号からの優先権を主張する。当該出願の内容は全体が参照により本明細書に引用される。

【0002】

背景

腸管毒素原性大腸菌 (*Escherichia coli*) 株は、2 種のエンテロトキ

50

シン（すなわち、易熱性トキシン（LT）および耐熱性トキシン（ST））を産生することにより、ヒトおよび家畜において下痢を引き起こす（Hofstra et al., 1984, J. Bio. Chem. 259:15182-15187）。LTは、機能的に、構造的に、そして免疫学的に、コレラトキシン（CT）と関連している（Clements et al., 1978, Infect. Immun. 21:1036-1039）。LTおよびCTは、5つの同一のサブユニットBと、酵素活性を有するサブユニットAとからなるホロ毒素分子（AB₅）として合成される（Spangler, 1992, Microbio. Rev. 56(4):622-647）。サブユニットBの5量体は、小腸上皮細胞またはGM1を含む他の細胞の膜内でガングリオシドGM1に結合する（van Heyningen, 1974, Science183:656-657）。細胞表面上でサブユニットBがGM1に結合すると、サブユニットAが細胞質中に挿入され、タンパク質分解によって切断され、単一のジスルフィド結合部位で還元されて、酵素活性を有するA1ペプチドと、より短いA2ペプチドが産生される（Fishman PH, 1982, J. Membr. Biol. 69:85-97; Mekalanos et al., 1979, J. Biol. Chem. 254:5855-5861; Moss et al., 1981, J. Biol. Chem. 256:12861-12865）。このA1ペプチドはNADに結合し、アデニル酸シクラーゼに関連したGTP結合制御タンパク質であるGs α のADP-リボシル化を触媒することができる（Spangler, 1992, Microbio. Rev. 56(4):622-647）。これによりcAMPが増加すると、最終的には感染した細胞から電解質および細胞液が放出される（Cheng et al., 2000, Vaccine18:38-49）。

【0003】

LTは、粘膜アジュバントとして機能し、粘膜に共投与された抗原に対する免疫応答を誘導することが示されている（Clements et al., 1988, Vaccine6:269-277; Elson CO. 1989, Immunol. Today 146:29-33; Spangler, 1992, Microbio. Rev. 56(4):622-647）。しかしながら、野生型のLTは毒性が高いため、臨床用途は限られていた。よって、免疫原性を保持しつつ毒性が低減された変異LTを作り出すことが望まれている。

【0004】

本明細書で用いられる「大腸菌易熱性エンテロトキシン」または「LT」との語は、任意の腸管毒素原性の大腸菌株により産生される易熱性エンテロトキシンを意味する。「大腸菌易熱性エンテロトキシンサブユニットA」または「LT_A」との語は、LTのサブユニットAを意味する。このLT_Aには、シグナルペプチドを含む前駆体LT_A、およびシグナルペプチドが除去された成熟LT_Aの双方が含まれる。

【発明の概要】

【0005】

概要

本発明は、変異LT_Aを含むLTでは、免疫原性を保持しつつ野生型よりも毒性が低減されるという予期せぬ発見に基づいている。この変異LT_Aは、野生型LT_Aの61位に対応する位置にアミノ酸置換を有する。当該野生型LT_Aのアミノ酸配列（配列番号5）については後述する。

【0006】

このように、本発明は、配列番号5の61位に対応する位置にS、T、およびF以外のアミノ酸残基を有する変異LT_Aを含む単離ポリペプチドを特徴とする。置換するアミノ酸残基は、D、E、H、I、K、L、N、P、Q、R、Y、またはWでありうる。置換するアミノ酸残基は、天然のアミノ酸であってもよいし、天然でないアミノ酸（例えば、D-アミノ酸またはβ-アミノ酸）であってもよい。一例では、LT_Aは配列番号2、4、8、または10のアミノ酸配列を有する。この変異LT_Aを含むLTは、配列番号5を含む野生型のLTよりも低減された（すなわち、10⁻⁵倍未満の）毒性を示す。

【0007】

他の形態では、本発明は、抗原および上述した変異LT_Aを含むワクチンを特徴とする。当該ワクチンはLTのサブユニットBをさらに含んでもよく、このサブユニットBは、変異LT_Aとともに全長LTタンパク質を形成する。抗原は、細菌またはウイルスのいずれかを由来とするものでありうる。

【0008】

さらに他の形態では、本発明は、上述した LT_A の変異体をコードするヌクレオチド配列を含む単離核酸を特徴とする。一例では、当該ヌクレオチド配列は配列番号1、3、7、または9である。上述した核酸を含むベクターや、当該ベクターを含む形質転換細胞もまた、本発明の範囲に包含される。

【0009】

本発明の1つ以上の実施形態の詳細について以下に記載する。本発明の他の特徴、目的、および利点は、以下の説明および特許請求の範囲から明らかである。

【発明を実施するための形態】

【0010】

詳細な説明

解毒された LT （例えば、変異 LT_A を含むもの）は、免疫原性が高いため、望ましいワクチンアジュバントである。この目的を達成するために設計された本発明の変異 LT_A は、配列番号5の61位に対応する位置で、 LT_A にアミノ酸置換を導入することにより作製される。異なる腸管毒素原性大腸菌株から作製された LT_A 群は、相溶性が高い。よって、当業者であれば、 LT_A のアミノ酸配列を配列番号5と比較することにより、当該 LT_A のどの位置が配列番号5の61位に対応するかを把握することができる。配列番号5の LT_A と同様に、ほとんどすべての野生型 LT_A は、配列番号5の61位に対応する位置にセリンを有している。例えばサイズや極性などの点でセリンとは異なるアミノ酸が、置換するアミノ酸として用いられうる。かような置換アミノ酸の例としては、疎水性アミノ酸残基（例えば、IおよびL）、荷電アミノ酸残基（例えば、D、E、K、R、およびH）、または嵩高い側鎖を有するアミノ酸残基（例えば、N、Q、Y、およびW）が挙げられる。プロリンは、一般的にポリペプチドの局所構造を変化させることから、同様に置換アミノ酸として用いられうる。かような置換アミノ酸には、天然でないアミノ酸（例えば、D-アミノ酸または β -アミノ酸）も含まれる。

【0011】

本発明の LT_A 変異体は、本技術分野において周知の方法により調製されうる。例えば、当該変異体は、以下のような組換え法により作製される。まず、腸管毒素原性大腸菌株から野生型 LT_A をコードするcDNAを単離し、部位特異的突然変異誘発法に供して、所望の LT_A 変異体をコードするcDNAを作製する。Ho et al., Gene, 77:51-59, 1989を参照のこと。次いで、この変異を有するcDNAを、細胞に形質転換するための発現ベクター中に挿入する。最後に、形質転換された細胞において産生された LT_A 変異体を精製し、 LT サブユニットBと会合させて、全長 LT タンパク質を形成させる。

【0012】

上述した LT_A 変異体を含む LT の毒性は、Y-1副腎細胞アッセイ等のアッセイを用いて評価されうる。Cheng et al., Vaccine, 18:38-49, 2000を参照のこと。

【0013】

本発明の LT_A 変異体は、ワクチンにおけるアジュバントとして用いられうる。ワクチン（すなわち、ヒトワクチンまたは動物ワクチン）は、抗原および、 LT_A 変異体そのもの、または LT_A 変異体を含む LT を含有しうる。抗原は、細菌（例えば、化膿連鎖球菌（*Streptococcus pyogenes*）、肺炎連鎖球菌（*Streptococcus pneumoniae*）、淋菌（*Neisseria gonorrhoea*）、髄膜炎菌（*Neisseria meningitidis*）、ジフテリア菌（*Corynebacterium diphtheriae*）、ボツリヌス菌（*Clostridium botulinum*）、ウェルシュ菌（*Clostridium perfringens*）、破傷風菌（*Clostridium tetani*）、インフルエンザ菌（*Haemophilus influenzae*）、肺炎桿菌（*Klebsiella pneumoniae*）、クレブシエラ・オザナエ（*Klebsiella ozaenae*）、黄色ブドウ球菌（*Staphylococcus aureus*）、コレラ菌（*Vibrio cholerae*）、大腸菌（*Escherichia coli*）、緑膿菌（*Pseudomonas aeruginosa*）、カンピロバクター・ジェジュニ（*Campylobacter jejuni*）、アエロモナス・ヒドロフィラ（*Aeromonas hydrophila*）、セレウス菌（*Bacillus cereus*）、腸炎エルシニア菌（*Yersinia enterocolitica*）、ペスト菌（*Yersinia pestis*）、サルモネラ（*Salmonella typhimurium*）、梅毒トレポネーマ（*Treponema pallidum*）、スピロヘータ（*Borrelia vincentii*）、ライ

ム病ボレリア (*Borrelia burgdorferi*)、結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*)、ニューモシスチス・カリニ (*Pneumocystis carinii*)、マイコプラズマ (*Mycoplasma* spp.)、発疹チフスリケッチア (*Rickettsia prowazeki*)、クラミジア (*Chlamydia* spp.)、ヘリコバクター・ピロリ (*Helicobacter pylori*) 由来のものでありうる。抗原はまた、ウイルス (例えば、インフルエンザ、単純ヘルペスウイルス、ヒト免疫不全ウイルス、サイトメガロウイルス、C型肝炎ウイルス、デルタ肝炎ウイルス、ポリオウイルス、A型肝炎ウイルス、B型肝炎ウイルス、エプスタイン・バーウイルス、水痘帯状疱疹ウイルス、呼吸器合胞体ウイルス、エンテロウイルス、または日本脳炎ウイルス) 由来のものであってもよい。

【0014】

10

ワクチンは、リン酸緩衝生理食塩水または炭酸水素塩溶液などの製薬上許容されうる担体をさらに含んでもよい。当該担体は、投与の形態および経路のほか、標準的な薬学上の実務に基づいて選択される。適当な医薬担体や希釈剤、並びにこれらの使用のための薬学的に必須の成分については、Remington's Pharmaceutical Sciencesに記載されている。

【0015】

ワクチンを調製する方法は、米国特許第4,601,903号、米国特許第4,599,231号、米国特許第4,599,230号、および米国特許第4,596,792号に例示されるように、本技術分野において一般的に周知である。ワクチンは、溶液やエマルションのような注射可能な形態で調製されうる。抗原および、 LT_A 変異体またはこれを含むLTは、生理学的に許容されうる賦形剤と混合されうる。当該賦形剤としては、水、生理食塩水、デキストロース、グリセロール、エタノール、およびこれらの組み合わせが挙げられる。ワクチンは、湿潤化剤もしくは乳化剤、またはワクチンの有効性を向上させるためのpH緩衝剤といった追加成分を少量含有しうる。ワクチンは、皮下または筋肉内への注射によって、非経口的に投与されうる。あるいは、坐薬製剤、経口製剤、または局所製剤などの他の投与形態が好ましいこともある。坐薬用の結合剤および担体としては、例えば、ポリアルキレングリコール類またはトリグリセリド類が挙げられる。経口製剤は、例えば医薬グレードの多糖、セルロース、炭酸マグネシウムなどの通常用いられている賦形剤を含みうる。これらの組成物は、溶液、懸濁液、錠剤、丸剤、カプセル、徐放性製剤または散剤の形態をとる。

20

【0016】

30

ワクチンは、投与剤形と適合するように、治療上有効で、保護的であり、免疫原性を示す量で投与される。投与量は、処置される対象 (例えば、個体の免疫系の抗体合成能や、必要な場合には細胞媒介性免疫応答の能力など) に依存する。投与が必要な有効成分の正確な量は、医師の判断に委ねられている。しかしながら、当業者であれば適当な用量範囲を容易に決定することができ、これは本発明のポリペプチドのmgオーダーでありうる。初回投与および追加投与のための適切な処方計画もまた、変動するものであるが、初回投与とそれに続く追加投与を含みうる。また、ワクチンの用量は、投与経路にも依存し、宿主のサイズによっても変動する。

【0017】

40

後述する具体的な実施例は、単に例示のためのものであって、本明細書の開示以外の形態をいかようにも限定するものではないと解釈されるべきである。さらなる努力を必要とすることなく、当業者であれば、本明細書の開示に基づき、本発明を完全に実施することができるものと考えられる。本明細書において引用されている文献についてはすべて、その全体が参照により本明細書に引用されている。

【実施例】

【0018】

実施例1：野生型 LT_A および、変異型 LT_A を含むLTをコードする遺伝子の構築
LT遺伝子の1.8kb DNA断片 (サブユニットAおよびサブユニットBを含む) を、ヒト腸管毒素原性大腸菌H10407株から単離し、pBluescript II KS(-)ベクター中にクローニングした (pBluescript-LThWT)。この

50

LT遺伝子（サブユニットA、Bの双方をコードする）のヌクレオチド配列（配列番号6）、およびこのLT遺伝子のサブユニットAのアミノ酸配列（配列番号5）を以下に示す：

【0019】

【表1】

LTのヌクレオチド配列（サブユニットA：1～777；サブユニットB：774～1148）

```
atgaaaaata taactttcat ttttttatt ttattagcat cgccattata tgcaaatggc 60
gacaaattat accgtgctga ctctagaccc ccagatgaaa taaaacgttc cggaggtctt 120
atgcccagag ggcataatga gtacttcgat agaggaactc aaatgaatat taatctttat 180
gatcacgcga gaggaacaca aaccggcttt gtcagatatg atgacggata tgtttccact 240
tctcttagtt tgagaagtgc tcacttagca ggacagtcta tattatcagg atattccact 300
tactatatat atgttatagc gacagcacca aatatgttta atgttaatga tgtattaggc 360
gtatacagcc ctacccata tgaacaggag gtttctgcgt taggtggaat accatattct 420
cagatatatg gatggtatcg tgttaatttt ggtgtgattg atgaacgatt acatcgtaac 480
agggaatata gagaccggtg ttacagaaat ctgaatatag ctccggcaga ggatggttac 540
agattagcag gtttcccacc ggatcaccaa gcttggagag aagaaccctg gattcatcat 600
gcaccacaag gttgtggaaa ttcataaaga acaattacag gtgatacttg taatgaggag 660
accagaatc tgagcacaat atatctcagg aaatatcaat caaaagttaa gaggcagata 720
ttttcagact atcagtcaga ggttgacata tataacagaa ttcggaatga attatgaata 780
aagtaaaatg ttatgtttta ttacggcgt tactatcctc tctatgtgca tacggagctc 840
cccagtctat tacagaacta tgttcggaat atcgcaacac acaaatatat acgataaatg 900
acaagatact atcatatacg gaatcgatgg caggcaaaag agaatgggtt atcattacat 960
ttaagagcgg cgcaacattt caggtcgaag tcccgggcag tcaacatata gactcccaaa 1020
aaaaagccat tgaaaggatg aaggacacat taagaatcac atatctgacc gagaccaaaa 1080
ttgataaatt atgtgtatgg aataataaaa cccccaattc aattgoggca atcagtatg 1140
aaaactag
```

【0020】

【表2】

成熟LT_Aのアミノ酸配列（配列番号5）

```
NGDKLYRADS RPPDEIKRSG GLMPRGHNEY FDRGTQMNIN LYDHARGTQT GFVRYDDGYV 60
STSLSLRSAH LAGQSILSGY STYYIYVIAT APNMFNVNDV LGVYSPHPYE QEVSA LGGIP 120
YSQIYGWYRV NFGVIDERLH RNREYRDRYY RNLNIAPAED GYRLAGFPPD HQAWREEPWI 180
HHAPQGCGNS SRTITGDTCN EETQNLSTIY LRKYQSKVKR QIFSDYQSEV DIYNRIRNEL 240
```

【0021】

部位特異的突然変異誘発法を用いて、種々のLT_A変異体が構築された（Ho et al., 1989, Gene77, 51-59）。より具体的には、配列番号5の61位のセリンをK、R、H、Y、およびFでそれぞれ置換することにより、LT_A（S61K）、LT_A（S61R）、LT_A（S61H）、LT_A（S61Y）、およびLT_A（S61F）などのLT_A変異体が構築された。これらの変異体の構築には、以下のオリゴヌクレオチドプライマーが用いられている：LT_A（S61K）[5' TCT CAA ACT AAG AGA AGT TTT AAC ATA TCC GTC ATC ATA 3']（配列番号11）、LT_A（S61R）[5' ACT TCT CAA ACT AAG AGA AGT TCT AAC ATA TCC GTC ATC 3']（配列番号12）、LT_A（S61F）[5' ACT TCT CAA ACT AAG AGA AGT

10

20

30

40

50

G A A A A C A T A T C C G T C A T C 3'] (配列番号13), L T_A (S61Y) [5' A C T T C T C A A A C T A A G A G A A G T A T A A A C A T A T C C G T C A T C 3'] (配列番号14), L T_A (S61H) [5' A C T T C T C A A A C T A A G A G A A G T A T G A A C A T A T C C G T C A T C 3'] (配列番号15)。これらのL T_Aのヌクレオチド配列およびアミノ酸配列を以下に示す：

【 0 0 2 2 】

【表3】

L T_A(S61K)のヌクレオチド配列(配列番号1)

atgaaaaata taactttcat ttttttatt ttattagcat cgccattata tgcaaatggc 60
gacaaattat accgtgctga ctctagaccc ccagatgaaa taaaacgttc cggaggtctt 120
atgcccagag ggcataatga gtacttcgat agaggaactc aatgaatat taatctttat 180
gatcacgcga gaggaacaca aaccggcttt gtcagatatg atgacggata tgtaaaaact 240
tctcttagtt tgagaagtgc tcacttagca ggacagtcta tattatcagg atattccact 300
tactatatat atgttatagc gacagcacca aatatgttta atgttaatga tgtattaggc 360
gtatacagcc ctcaccata tgaacaggag gttctgcgt tagtggaat accatattct 420
cagatatatg gatggatcg tgtaatttt ggtgtgattg atgaacgatt acatcgtaac 480
agggaatata gagaccgga ttacagaaat ctgaatatag ctccggcaga ggatggttac 540
agattagcag gttcccacc ggatcaccaa gcttgagag agaaccctg gattcatcat 600
gcaccacaag gttgtgaaa ttcatcaaga acaattacag gtgatacttg taatgaggag 660
accagaatc tgagcacaat atatctcagg aaatatcaat caaaagttaa gaggcagata 720
tttccagact atcagtcaga ggttgacata tataacagaa ttcggaatga attatga 777

10

20

【 0 0 2 3 】

【表4】

L T_A(S61K)のアミノ酸配列(配列番号2)

NGDKLYRADS RPPDEIKRSG GLMPRGHNEY FDRGTQMNIN LYDHARGTQT GFVRYDDGYV 60
KTSLSLRSAH LAGQSILSGY STYYIYVIAT APNMFNVNDV LGVYSPHPYE QEVSA LGGIP 120
YSQIYGWYRV NFGVIDERLH RNREYRDRYY RNLNIAPAED GYRLAGFPD HQAWREEPWI 180
HHAPQCGGNS SRTITGDTN EETQNLSTIY LRKYQSKVKR QIFSDYQSEV DIYNRIRNEL 240

30

【 0 0 2 4 】

【表 5】

LT_A(S61R)のヌクレオチド配列(配列番号3)

atgaaaaata taactttcat tttttttatt ttattagcat cgccattata tgcaaatggc 60
 gacaaattat accgtgctga ctctagaccc ccagatgaaa taaaacgttc cggaggtctt 120
 atgccagag ggcataatga gtacttcgat agaggaactc aatgaatat taatctttat 180
 gatcacgcga gaggaacaca aaccggcttt gtcagatatg atgacggata tgttagaact 240
 tctcttagtt tgagaagtgc tcaacttagca ggacagtcta tattatcagg atattccact 300
 tactatatat atgttatagc gacagcacca aatatgttta atgttaatga tgtattaggc 360
 gtatacagcc ctacccata tgaacaggag gtttctgcgt taggtggaat accatattct 420
 cagatatatg gatggatcgc tgtaatttt ggtgtgattg atgaacgatt acatcgtaac 480
 agggaatata gagaccggtg ttacagaaat ctgaatatag ctccggcaga ggatgggttac 540
 agattagcag gtttcccacc ggatcaccaa gcttggagag aagaaccctg gattcatcat 600
 gcaccacaag gttgtggaaa ttcatacaaga acaattacag gtgatacttg taatgaggag 660
 acccagaatc tgagcacaat atatctcagg aatatcaat caaaagttaa gaggcagata 720
 ttttcagact atcagtcaga ggttgacata tataacagaa ttcggaatga attatga 777

10

【 0 0 2 5 】

20

【表 6】

LT_A(S61R)のアミノ酸配列(配列番号4)

NGDKLYRADS RPPDEIKRSG GLMPRGHNEY FDRGTQMNIN LYDHARGTQT GFVRYDDGYV 60
 RTSLSLRSAH LAGQSILSGY STYYIYVIAT APNMFNVNDV LGVYSPHPYE QEVSA LGGIP 120
 YSQUIGWYRV NFGVIDERLH RNREYRDRYY RNLNIAPAED GYRLAGFPPD HQAWREEPWI 180
 HHAPQCGGNS SRTITGDTGN EETQNLSTIY LRKYQSKVKR QIFSDYQSEV DIYNRIRNEL 240

【 0 0 2 6 】

【表 7】

LT_A(S61H)のヌクレオチド配列(配列番号7)

atgaaaaata taactttcat tttttttatt ttattagcat cgccattata tgcaaatggc 60
 gacaaattat accgtgctga ctctagaccc ccagatgaaa taaaacgttc cggaggtctt 120
 atgccagag ggcataatga gtacttcgat agaggaactc aatgaatat taatctttat 180
 gatcacgcga gaggaacaca aaccggcttt gtcagatatg atgacggata tgttcatact 240
 tctcttagtt tgagaagtgc tcaacttagca ggacagtcta tattatcagg atattccact 300
 tactatatat atgttatagc gacagcacca aatatgttta atgttaatga tgtattaggc 360
 gtatacagcc ctacccata tgaacaggag gtttctgcgt taggtggaat accatattct 420
 cagatatatg gatggatcgc tgtaatttt ggtgtgattg atgaacgatt acatcgtaac 480
 agggaatata gagaccggtg ttacagaaat ctgaatatag ctccggcaga ggatgggttac 540
 agattagcag gtttcccacc ggatcaccaa gcttggagag aagaaccctg gattcatcat 600
 gcaccacaag gttgtggaaa ttcatacaaga acaattacag gtgatacttg taatgaggag 660
 acccagaatc tgagcacaat atatctcagg aatatcaat caaaagttaa gaggcagata 720
 ttttcagact atcagtcaga ggttgacata tataacagaa ttcggaatga attatga 777

30

40

【 0 0 2 7 】

【表 8】

LT_A(S61H)のアミノ酸配列(配列番号8)

NGDKLYRADS RPPDEIKRSG GLMPRGHNEY FDRGTQMNIN LYDHARGTQT GFVRYDDGYV 60
 HTLSLSRSAH LAGQSILSGY STYYIYVIAT APNMFNVNDV LGVYSPHPYE QEVSAALGGIP 120
 YSQUIGWYRV NFGVIDERLH RNREYRDRYY RNLNIAPAED GYRLAGFPPD HQAWREEPWI 180
 HHAPQGCGNS SRTITGDTN EETQNLSTIY LRKYQSKVKR QIFSDYQSEV DIYNRIRNEL 240

【0028】

【表 9】

LT_A(S61Y)のヌクレオチド配列(配列番号9)

atgaaaaata taactttcat ttttttatt ttattagcat cgccattata tgcaaatggc 60
 gacaaattat accgtgctga ctctagaccc ccagatgaaa taaaacgttc cggaggtctt 120
 atgcccagag ggcataatga gtacttcgat agaggaactc aatgaatat taatctttat 180
 gatcacgcga gaggaacaca aaccggcttt gtcagatatg atgacggata tgtttatact 240
 tctcttagtt tgagaagtgc tcacttagca ggacagtcta tattatcagg atattccact 300
 tactatatat atgttatagc gacagcacca aatatgttta atgttaatga tgtattaggc 360
 gtatacagcc ctcaccata tgaacaggag gtttctgcgt taggtggaat accatattct 420
 cagatatatg gatggtatcg tgtaatttt ggtgtgattg atgaacgatt acatcgtaac 480
 agggaatata gagaccggtta ttacagaaat ctgaatatag ctccggcaga ggatggttac 540
 agattagcag gtttcccacc ggatcaccaa gcttgagag aagaaccctg gattcatcat 600
 gcaccacaag gttgtggaaa ttcataaga acaattacag gtgatacttg taatgaggag 660
 acccagaatc tgagcacaat atatctcagg aaatatcaat caaaagttaa gaggcagata 720
 ttttcagact atcagtcaga ggttgacata tataacagaa ttcggaatga attatga 777

【0029】

【表 10】

LT_A(S61Y)のアミノ酸配列(配列番号10)

NGDKLYRADS RPPDEIKRSG GLMPRGHNEY FDRGTQMNIN LYDHARGTQT GFVRYDDGYV 60
 YTSLSLRSAH LAGQSILSGY STYYIYVIAT APNMFNVNDV LGVYSPHPYE QEVSAALGGIP 120
 YSQUIGWYRV NFGVIDERLH RNREYRDRYY RNLNIAPAED GYRLAGFPPD HQAWREEPWI 180
 HHAPQGCGNS SRTITGDTN EETQNLSTIY LRKYQSKVKR QIFSDYQSEV DIYNRIRNEL 240

【0030】

比較のために、サブユニット A の 63 位のアミノ酸であるセリンをリシンで置換することにより、EWD299 (Dallas et al., 1979, J. Bacteriol. 139, 850-859) 由来の別の LT 変異体である LT_p(S63K) も構築した。

【0031】

実施例 2：野生型 LT、および変異型 LT_Aを含む LT の調製

天然の LT 遺伝子または変異型 LT 遺伝子(サブユニット A およびサブユニット B の双方の遺伝子を含む)を含む pBlue-script II KS(-)ベクターを、大腸菌 HB101 株に形質転換した。100 μg/mL のアンピシリンを添加した L 培地を含有する 3 L フラスコ中で一晩培養した培地から、天然および変異型の LT を精製した。遠心分離により細胞を回収し、TEANバッファ(0.2 M NaCl、50 mM Tris、1 mM EDTA、および 3 mM NaN₃、pH 7.4)に再懸濁させ、マイクロフルイダイザー(microfluidizer)(Microfluidics Corporation, USA)を用いて溶解させた。遠心分離によって溶解物を清澄化した後、固体状硫酸アンモニウムを 65% 飽和まで添加することにより、LT を分画した。次いでこれを TEAN バッファに懸

10

20

30

40

50

濁させ、同一のバッファに対して十分に透析し、粗LTとして用いた。この粗LTを、4にてTEANバッファで平衡化した固定化D-ガラクトース（ピアース、ロックフォード、イリノイ州）カラムによるクロマトグラフィに供した（Uesaka et al., 1994, Microbial Pathogenesis 16:71-76）。0.3MガラクトースのTEAN溶液を用いて、天然および変異型のLTを溶出させた。精製された各毒素をPBSバッファに対して透析し、生物学的アッセイおよび免疫学的アッセイに用いた。

【0032】

精製された野生型および変異型LTを、SDS-PAGEにより分離した。この際、LTサブユニットAの分子量は約28~29kDaであり、LTサブユニットBの分子量は約12~13kDaであった。LT_A（S61K）を含む全長LT（すなわち、LTh（S61K））およびLT_A（S61R）を含む全長LT（すなわち、LTh（S61R））の収率は、配列番号5のLT_Aを含むLTと同等であった。

【0033】

pH3~10の等電点分画ゲル（isoelectric focusing gel）（インビトロジェン）により、LTのAB₅ヘテロヘキサマーおよびB₅ペンタマーを分離した。UVIBandソフトウェア（UVItect Limited）によりAB₅タンパク質およびB₅タンパク質のバンドの強度を分析し、AB₅ヘテロヘキサマーおよびB₅ペンタマーの百分率を算出した（AB₅の等電点（pI）の値は8.0~7.8であり、B₅のpIの値は8.3~8.1であった）。これらの結果を表1に示す。

【0034】

【表11】

表1. 野生型LT、および変異型LT_Aを含むLTの調製

大腸菌易熱性エンテロトキシン(LT)	AB ₅ /AB ₅ +B ₅ の比 (%)
LTh(WT)	91(%)
LTh(S61K)	92(%)
LTh(S61R)	85(%)
LTh(S61H)	60(%)
LTh(S61F)	70(%)
LTh(S61Y)	57(%)

精製されたLTh(S61K)およびLTh(S61R)のAB₅の百分率は約90~100%であった。

【0035】

実施例3：野生型LTおよび変異型LT_Aを含むLTの細胞内cAMPレベルに与える影響の評価

24ウェルプレートに、20%FBSを添加したMEM-α培地中でCaco-2細胞（ATCC HTB-37）を5×10⁴細胞/ウェルの濃度で維持し、コンフルエント近くまで培養し、1%FBSおよび1mM 3-イソブチル-1-メチルキサンチン（IBMX）を含有するMEM-α中、5%CO₂下にて30分間インキュベートし、その後に毒素を添加した（Grant et al., 1994, Infection and Immunity 62: 4270-4278）。天然のLTまたは変異型のLTを各ウェルに添加し、4時間インキュベートした。次いで、冷PBSで細胞を2回洗浄した。200μLの0.1N HClを各ウェルに添加することにより細胞内cAMPを抽出し、室温にて15分間インキュベートした。0.1N NaOHを各ウェルに添加した後に、細胞溶解物の上清を回収した（Cheng et al., 2000, Vaccine18: 38-49; Park et al., 1999, Experimental and Molecular Medicine 31: 101-107）。cAMP酵素イムノアッセイキット（アッセイデザイン；Correlate

- E I A) を用いて、c A M P を定量した。本実施例から得られた結果によれば、L T h (S 6 1 K) は細胞内 c A M P 濃度を増加させなかったことがわかる。

【 0 0 3 6 】

実施例 4 : Y 1 副腎腫瘍細胞アッセイを用いた、変異型 L T_A を含む L T の毒性の評価
この試験では、L T サンプル (野生型 L T 、 L T の活性部位変異体 (h 6 1 K) 、およびサブユニット B 複合体 (B₅)) について、腸管毒性作用を評価した。15 % ウマ血清、2.5 % 胎児ウシ血清、2 mM L - グルタミン、および 1.5 g / L 炭酸水素ナトリウムを添加した Ham ' s F 1 2 培地中で維持したマウス Y - 1 副腎腫瘍細胞 (A T C C C C L - 7 9) を、96 ウェル平底プレート中、 2×10^4 細胞 / ウェル (200 μ L / ウェル) の濃度で、5 % C O₂ 下、37 にて 48 時間播種した。96 ウェル平底プレート中の細胞を 1 $\times$ P B S (p H 7.4) で 2 回洗浄し、次いで、5 % C O₂ 下、37 にて一晩、順次希釈 L T サンプル (10 μ g / 200 μ L ~ 10^{-10} μ g / 200 μ L) で処置した。毒素処理の 24 時間後、典型的な細胞の円形化を、光学顕微鏡により観察した。活性は、細胞の円形化を開始させるのに要した毒素の最小濃度 (E C_i) または 50 % の細胞の円形化に要した毒素の濃度 (E C₅₀) として定義される。David et al., 1975, Infection and Immunity, 11:334-336; Cheng et al., 1999, Vaccine 18:38-49 を参照のこと。野生型 L T と比較して、L T h (S 6 1 K) 、L T h (S 6 1 R) 、L T h (S 6 1 H) の毒性は有意に低い (すなわち、 10^{-6} 対 1) 。以下の表 2 を参照のこと。L T h (S 6 1 F) の毒性も低い (すなわち、 10^{-5}) が、その低下は他の変異体ほど有意なものではない。

【 0 0 3 7 】

【 表 1 2 】

表 2 野生型または変異型 L T_A を含む L T の毒性

大腸菌易熱性 エンテロトキシン(LT)	LT 量 (pg/ウェル)	毒性の強度 (野生型LTを1とする)
LTh(WT)	0.1	1
LTh(S61K)	100,000	10^{-6}
LTh(S61R)	100,000	10^{-6}
LTh(S61H)	100,000	10^{-6}
LTh(S61F)	10,000	10^{-5}
LTh(S61Y)	100,000	10^{-6}
LTh(S63K)	10,000	10^{-5}

【 0 0 3 8 】

実施例 5 : ラビット回腸ループアッセイによる、変異型 L T_A を含む L T の毒性の評価
本アッセイは、従来の開示に従って行った (Giannelli et al., 1997, Infection and Immunity 65: 331-334; Giuliani et al., 1998, J. Exp. Med. 187:1123-1132) 。本アッセイでは、成体ニュージーランドラビット (それぞれ ~ 2.5 k g) を用いた。ラビットの小腸の末端から開始し、胃へと向かって長さがそれぞれ 5 c m のループを作製した。種々の量の L T または L T 変異体を含む 0.5 m L サンプルを各ループに注入し、次いで腹部を閉鎖した。18 時間後、各ループに蓄積した液体を回収し、定量した。この実験を 3 回行ない、結果を c m あたりの m L で示した。本実験からの結果によれば、500 μ g の L T h (S 6 1 K) では 1 m L の液体がラビット回腸ループに蓄積したのみであり、蓄積した液体の体積は天然のコントロールと同等であった。0.1 μ g の野生型 L T を用い

たときには、野生型 L T の蓄積した液体の体積は L T h (S 6 1 K) よりもかなり多かった。また、別の L T p (S 6 3 K) での液体の蓄積もまた、L T h (S 6 1 K) よりもかなり多かった。

【 0 0 3 9 】

実施例 6：鼻腔内免疫における変異型 L T_A を含む L T のアジュバント効果の評価

本実施例では、不活化インフルエンザウイルスである A / P u e r t o R i c o / 8 / 3 4 (H 1 N 1) (P R 8) (A T C C V R - 9 5) を用いた。従来開示されているように、ウイルス粒子を調製した (A i t k e n e t a l . , 1980, Eur. J. Biochem. 107:51-56; Gallagher et al., 1984, J. Clin. Microbiol. 20:89-93; Johansson et al., 1989, J. Virol. 63:1239-1246)。簡単に言えば、10 日齢の孵化鶏卵の尿膜腔中で、35 にて 2 日間、ウイルスを増殖させた。P R 8 で感染させた卵由来の尿膜腔液を、まず低速で遠心分離し、次いで 9 6 , 0 0 0 × g にて 1 時間遠心分離してウイルス粒子を沈殿させて、これをリン酸緩衝生理食塩水 (P B S) 中に再懸濁させた。これらの粒子を 3 0 ~ 6 0 % ショ糖密度勾配上にロードし、9 6 , 0 0 0 × g にて 5 時間遠心分離した。ウイルスを含む画分を回収し、P B S で希釈した。さらに 9 6 , 0 0 0 × g にて 1 時間、ウイルスをペレット化し、P B S 中に再懸濁させた。精製したウイルスを、4 にて 1 週間、0 . 0 2 5 % ホルマリンで処理した。光学密度 (B i o - R a d P r o t e i n A s s a y) に基づいてタンパク質濃度を測定して標準化し、S D S - ポリアクリルアミドゲル電気泳動によってヘマグルチニン (H A) 量を定量した (O x f o r d e t a l . , 1981, J. Biol. St and. 9:483-491)。

【 0 0 4 0 】

台湾国家実験動物センター (Taiwan National Laboratory Animal Center) から、6 ~ 8 週齢のメス B A L B / c マウスを入手した。5 匹のマウスからなる群をそれぞれ、麻酔下で、2 0 μ g の不活化インフルエンザウイルス (f l u . A g) を単独でまたは 8 μ g の天然もしくは変異型の L T とともに含有する 2 5 μ L の P B S で鼻腔内に免疫した。これらのマウスを 3 週間後に再度免疫した。コントロールマウスには、同一条件下で P B S を投与した。最後の免疫の 2 週間後に、各群のマウスを屠殺して血清を採取して、血球凝集抑制 (H I) アッセイを行なった。不活化ウイルスワクチンを単独で用いて鼻腔内に免疫したマウスと比べて、不活化ウイルスワクチンを L T h (S 6 1 K) または L T p (S 6 3 K) と併用して鼻腔内に免疫したマウスで、H I 力価の有意な向上が検出された。不活化ウイルスと併用した L T h (S 6 1 K) の H I 力価は、大幅に上昇した。ウイルスと併用した L T h (S 6 1 K) の H I 力価は 8 1 3 であり、これはウイルスと併用した L T h (S 6 3 K) の値と同等であるが、ウイルス単独の値よりも大きい。

【 0 0 4 1 】

実施例 7：筋肉内免疫における、変異型 L T_A を含む L T のアジュバント効果の評価

筋肉内投与によって免疫を行なったこと以外は、実施例 6 で行なった手法を繰り返した。筋肉内ワクチンについては、1 0 μ g の不活化ワクチンを単独でまたは 4 μ g の天然もしくは変異型の L T とともに含有する 5 0 μ L の P B S として調製し、大腿後部の筋肉に注入した。上述したように、免疫処理およびサンプリングのプログラムを行なった。不活化ワクチンと併用した L T h (S 6 1 K) の H I 力価は、大幅に上昇した。

【 0 0 4 2 】

ウイルスと併用した L T h (S 6 1 K) の H I 力価は 5 1 2 であり、これはウイルスと併用した野生型 L T の値、またはウイルス単独の値よりも有意に大きい。

【 0 0 4 3 】

他の実施形態

本明細書に開示された全ての特徴は、任意の組み合わせで組み合わせられる。本明細書に開示されたそれぞれの特徴は、同一の、等価な、または類似の目的に資する他の特徴により置換される。よって、そうでないと明記しない限り、開示されたそれぞれの特徴は、等価な、または類似の上位概念の一連の特徴の例示にすぎない。

【 0 0 4 4 】

上述の記載から、当業者は、本発明の本質的な特徴を容易に把握することができ、その思想および範囲から逸脱することなく、本発明を種々の用途および条件に適合させる目的で種々の変更および修飾を加えることが可能である。よって、他の実施形態もまた、後述する特許請求の範囲に含まれる。

【配列表】

0005576792000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
C 1 2 N 5/10 (2006.01)		C 1 2 N 5/00 1 0 1
A 6 1 K 39/39 (2006.01)		A 6 1 K 39/39
A 6 1 K 39/108 (2006.01)		A 6 1 K 39/108
A 6 1 K 39/02 (2006.01)		A 6 1 K 39/02
A 6 1 K 39/12 (2006.01)		A 6 1 K 39/12
A 6 1 P 31/04 (2006.01)		A 6 1 P 31/04
A 6 1 P 31/12 (2006.01)		A 6 1 P 31/12

(72)発明者 リン, ヨン - スン
 台湾, 2 2 1, シージー シティ, タイペイ カウンティ, カンニン ストリート, レーン 1 6
 9, ナンバー 1 0 1

(72)発明者 ユアン, タ - ツン
 アメリカ合衆国, カリフォルニア州 9 1 1 0 8, サン マリノ, ゲインズバラ ドライブ 2 9
 4 0

審査官 野村 英雄

(56)参考文献 米国特許出願公開第 2 0 0 4 / 0 1 7 1 5 6 5 (U S , A 1)
 Microbiological Reviews , 1 9 9 2 年 , Vol.56, No.4 , P.622-647
 The Journal of Biological Chemistry , 1 9 9 5 年 , Vol.270, No.51 , p.30545-30550
 Eur.J.Biochem. , 1 9 8 9 年 , Vol.183 , p.311-316

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)
 C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0
 MEDLINE / BIOSIS / WPIDS (STN)
 JSTPlus / JMEDPlus / JST7580 (J D r e a m I I I)
 UniProt / GeneSeq
 GenBank / EMBL / DDBJ / GeneSeq