

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号
特許第5665541号
(P5665541)

(45) 発行日 平成27年2月4日(2015.2.4)

(24) 登録日 平成26年12月19日(2014.12.19)

(51) Int.Cl.

F I

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 1/21 (2006.01)

A 6 1 K 39/04 (2006.01)

A 6 1 P 31/00 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 1 2 N 1/21

A 6 1 K 39/04

A 6 1 P 31/00

請求項の数 16 (全 40 頁)

(21) 出願番号	特願2010-524977 (P2010-524977)	(73) 特許権者	510054577
(86) (22) 出願日	平成20年9月11日 (2008.9.11)		エーラス グローバル ティービー ワク
(65) 公表番号	特表2010-538649 (P2010-538649A)		チン ファウンデーション
(43) 公表日	平成22年12月16日 (2010.12.16)		アメリカ合衆国 メアリーランド州 20
(86) 国際出願番号	PCT/US2008/075972		850 ロックヴィル, リサーチ プール
(87) 国際公開番号	W02009/036137		ヴァード 1405, サード フロア
(87) 国際公開日	平成21年3月19日 (2009.3.19)	(74) 代理人	100065916
審査請求日	平成23年8月23日 (2011.8.23)		弁理士 内原 晋
(31) 優先権主張番号	11/854,027	(72) 発明者	サドフ, ジェラルド シー,
(32) 優先日	平成19年9月12日 (2007.9.12)		アメリカ合衆国 ワシントン, ディーシー
(33) 優先権主張国	米国 (US)		20012 ノース ウェスト, カルミ
			ア ロード 1622

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 真核生物 I 型インタフェロン応答サブプレッサー類の共発現による細菌ベースデリバリシステムからのトランスジーン発現の増強方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

1 種以上のパッセンジャー遺伝子と、
哺乳類 I 型インタフェロン応答を阻害する 1 種以上の因子と
をコードする核酸配列を含む遺伝子工学作製細菌であって、
前記 1 種以上のパッセンジャー遺伝子をコードする前記核酸配列が少なくとも 1 種の真核細胞プロモータに読み取り可能に連結されているとともに、哺乳類 I 型インタフェロン応答を阻害する前記 1 種以上の因子をコードする前記核酸配列が少なくとも 1 種の真核細胞プロモータに読み取り可能に連結されており、
前記 1 種以上のパッセンジャー遺伝子をコードする前記核酸配列が、真核細胞プロモータに読み取り可能に連結されており、哺乳類 I 型インタフェロン応答を阻害する前記 1 種以上の因子をコードする前記核酸配列が、真核細胞プロモータに読み取り可能に連結されていることを特徴とする遺伝子工学作製細菌。

【請求項 2】

哺乳類 I 型インタフェロン応答を阻害する前記 1 種以上の因子をコードする前記核酸配列が、真核細胞プロモータに読み取り可能に連結されている請求項 1 記載の遺伝子工学作製細菌。

【請求項 3】

哺乳類 I 型インタフェロン応答を阻害する前記 1 種以上の因子をコードする前記核酸配列が、原核細胞プロモータに読み取り可能に連結されている請求項 1 記載の遺伝子工学作

製細菌。

【請求項 4】

哺乳類 I 型タフェロン応答を阻害する前記 1 種以上の因子をコードする核酸配列が、前記遺伝子工学作製細菌の染色体上に存在する請求項 1 記載の遺伝子工学作製細菌。

【請求項 5】

i) 前記 1 種以上のパッセンジャー遺伝子をコードする核酸配列と、

ii) 哺乳類 I 型インタフェロン応答を阻害する前記 1 種以上の因子をコードする核酸配列と

の一方または両方が、プラスミド上に存在する請求項 1 記載の遺伝子工学作製細菌。

【請求項 6】

哺乳類 I 型インタフェロン応答を阻害する前記 1 種以上の因子がウイルス起源である請求項 1 記載の遺伝子工学作製細菌。

【請求項 7】

前記 1 種以上のパッセンジャー遺伝子が結核抗原をコードする請求項 1 記載の遺伝子工学作製細菌。

【請求項 8】

前記遺伝子工学作製細菌がシゲラ (Shigella) 菌である請求項 1 記載の遺伝子工学作製細菌。

【請求項 9】

前記遺伝子工学作製細菌がマイコバクテリウム (Mycobacterium) 菌である請求項 1 記載の遺伝子工学作製細菌。

【請求項 10】

前記 1 種以上のパッセンジャー遺伝子が非相同性トランスジーンである請求項 1 記載の遺伝子工学作製細菌。

【請求項 11】

宿主細胞または組織 I 型インタフェロン (IFN) 応答サプレッサー因子をコードする 1 種以上の遺伝子工学作製核酸配列と、

1 種以上の宿主細胞または組織活性アミノ酸配列をコードする 1 種以上の遺伝子工学作製核酸と

により遺伝的に形質転換された細菌を含む組換え細菌ベクターであって、

前記 1 種以上の宿主細胞または組織活性アミノ酸配列をコードする 1 種以上の遺伝子工学作製核酸が、前記細菌が前記宿主細胞または組織に侵入すると過剰発現されることを特徴とする組換え細菌ベクター。

【請求項 12】

前記宿主細胞または組織 I 型 IFN 応答サプレッサー因子が、ロタウイルス NSP 1 またはインフルエンザウイルス NS 1 である請求項 11 記載の組換え細菌ベクター。

【請求項 13】

前記 1 種以上の宿主細胞または組織活性アミノ酸配列が結核抗原およびマラリア抗原から選択される請求項 11 記載の組換え細菌ベクター。

【請求項 14】

前記宿主細胞または組織活性アミノ酸配列が、ロタウイルス、インフルエンザウイルス、エクトロメリアウイルス、肝炎ウイルス、ワクチニアウイルス、アデノウイルス、パラミキソウイルス、HPV, HIV, HTLV, エンテロウイルス、ヘルペスウイルス、EVE, VEE, 西ナイルウイルス、ノーウォークウイルス、パルボウイルス、デングウイルス、および出血熱ウイルスの 1 種以上に由来する 1 種以上の免疫刺激アミノ酸配列を含む請求項 11 記載の組換え細菌ベクター。

【請求項 15】

前記 1 種以上の宿主細胞または組織活性アミノ酸配列が、ホルモン、酵素、抗癌剤、およびアポトーシス因子から選択される請求項 11 記載の組換え細菌ベクター。

【請求項 16】

前記宿主細胞または組織 I 型 I F N 応答サプレッサー因子が、ロタウイルス N S P 1、インフルエンザ - ウイルス N S 1、エクトロメリアウイルス C 1 2 R たんぱく質、C 型肝炎ウイルス N S 3 / 4 A プロテアーゼ、ワクチニアウイルス I F N - / R c たんぱく質、アデノウイルス E 1 A たんぱく質、パラミキソウイルスの C たんぱく質およびヒトパピローマウイルス (H P V) E 6 オンコプロテインから構成される群から選択される請求項 1 1 記載の組換え細菌ベクター。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【 0 0 0 1 】

本発明は、概括的には、自然の I 型インタフェロン応答を阻害することによって、真核細胞中における向上したトランスジーン発現を促進する細菌デリバリシステムに関する。本発明は、より詳しくいうと、真核細胞に対して、i) トランスジーン類および i i) 真核細胞 I 型インタフェロン応答サプレッサー類を運搬する組換え細菌デリバリシステムを提供する。

10

【背景技術】

【 0 0 0 2 】

数種の病原性菌の生の弱毒化変異体が、粘膜経路により非相同性抗原運搬のための潜在的ワクチンベクターとして開発されている。このような生ベクターは経口で、経鼻でまたは吸入による単回投与で哺乳類細胞および組織に対する巨大分子の標的化デリバリにより、全身および粘膜免疫応答の両者を刺激するという利点を提供する。ワクチン抗原および / または治療分子をコードするプラスミド D N A の細菌媒介運搬という大きな潜在力が、感染性疾患、腫瘍および遺伝的欠陥の実験的動物モデルにおいて、実証されている。

20

【 0 0 0 3 】

残念なことに、哺乳類における外来たんぱく質または阻害性 R N A の発現のためのパッセンジャー R N A / D N A および他の分子の細菌ベクターによる放出の結果、I 型インタフェロン (I F N) 応答が起こる。侵入する病原体のための宿主サーベイランスシステムの重要な成分は、細胞壁成分から核酸にわたるパターン化された微生物 / ウイルスリガンド類を結合する病原体認識レセプター類 (P R R) の進化上保存されたファミリーである。P R R シグナル伝達の結果、ニュークリアファクター B (N u c l e a r F a c t o r - B) (N F - B) およびインタフェロン制御因子 3 (I R F - 3) のような転写因子の活性化が起こり、それらは、宿主防御の迅速活性化のための炎症性文脈を提供する。前記の N F - B 経路は、I L - 1 および腫瘍壊死因子 - のような前炎症性サイトカイン類の発現を制御し、一方、I R F - 3 経路は、I 型インタフェロン (I F N - および I F N -) の産生を導く。この最初に産生された “ 第一波 ” I F N は、関連因子 I R F - 7 の発現を惹起し、それは通常、極めて低濃度でほとんどの細胞中に存在している (非特許文献 1) 。I R F - 3 は I R F - 7 と協働する可能性が非常に高く、数種の I F N - サブタイプを “ 第二波 ” I F N s として合成開始する正のフィードバックループに関与している (非特許文献 2 および非特許文献 3) 。I 型 I F N s は、オートクリンおよびパラクリンシグナル伝達によって数百種の I F N 刺激遺伝子 (I S G s) を活性化し (非特許文献 4 ; 非特許文献 5) 、それらのいくつかには、抗ウイルスたんぱく質をコードする。今日まで、3 種の I F N 刺激経路が完璧に樹立されている。これらには、プロテインキナーゼ R (P K R) (非特許文献 6) 、2 ' - 5 ' オリゴアデニレートシンセターゼ (2 ' - 5 ' O A S) (非特許文献 7) 、および M X たんぱく質 (非特許文献 8) が含まれる。この I 型 I F N 応答は、P K R および 2 ' - 5 ' O A S により外来遺伝子または阻害性 R N A s の発現を限定する。活性化 P K R は、真核細胞開始因子 e I F 2 のサブユニットをリン酸化することによって翻訳を妨害する。一方、2 - 5 A シンセターゼ類は、m R N A およびリボソーム R N A を消化する一重鎖特異的エンドリボヌクレアーゼである R N A s e L を活性化させる短い 2 ' - 5 ' O A S 関連オリゴアデニレート類を産生する。ある R N A ウイルスに感染した後の宿主生存における M X たんぱく質の重要性が、十分に実証されている (非特許文献 9) が、作用の正確な様式は、未だ不明である。この I 型 I F N 応

30

40

50

答は、従って、RNA産生と安定性を低下させる機構によって外来核酸の発現を限定し、また、細菌ベクターによって運搬されたパッセンジャー核酸からのメッセージ翻訳を阻害する。

【0004】

さまざまな細菌ベクターの成分は、宿主細胞でIFN応答を惹起する。この細菌自体は、トル様レセプター類を介してIFN応答を惹起できる。転写時においてパッセンジャー核酸により産生された二重鎖RNAはI型IFNsを誘発させるばかりでなく、PKRおよび2'-5' OASを直接的に活性化する。哺乳類細胞の細胞質に運搬されると、プラスミドDNAは、しばしば、mRNAとアニールしてdsRNAを形成するアンチセンスRNAを産生する陰性プロモータ類を含有する。細菌ベクターのこれらの成分全てが、従って、生体医療手段としての細菌ベクターの有効性を低下させる。

10

【0005】

特許文献1は、アデノウイルスベクターのような組換えベクターに対する免疫応答を阻害する方法を記載している。しかし、この技術は、ベクターによりコードされた遺伝子の長期発現に対する液性応答（例 抗体）および前記ベクターの免疫系によるクリアランスを防止することに関しており、細菌ベクターまたはそのパッセンジャー核酸に対するI型IFN応答の防止については記載していない。

【0006】

【特許文献1】米国特許6,525,029 (Falck - Perersenら、2月25日、2003年)

20

【0007】

【非特許文献1】Sato Mら、Immunity, 13(4)539-548; 2000

【非特許文献2】Marieら、EMBO J 17(22)、6660-6669; 1998

【非特許文献3】Sato Mら、FEBS Lett 441(1)106-110; 1998

【非特許文献4】de Veerら、J Leukocyte Biol 69(6)912-920、2001

【非特許文献5】Derら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95(26)15623-15628; 1998

30

【非特許文献6】Williams, Oncogene 18(45)6112-6120; 1999

【非特許文献7】Silverman, J Interferon Res 14(3)101-104; 1994

【非特許文献8】Haller and Kochs, Traffic 3(10)710-714; 2002

【非特許文献9】Heftriら、J Virology 73(8)6984-6991; 1999

【発明の概要】

40

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

前記先行技術は従って、これまで、宿主細胞のI型IFN応答を消去させるかまたは減弱させる細菌ベクターを提供できなかった。

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明は、細菌発現ベクターによる侵入に対する応答で哺乳類宿主細胞によって通常開始されるI型IFN応答の消去または減弱に成功した組換え細菌発現ベクターを提供する。前記組換え細菌発現ベクターは、宿主細胞中でI型IFN応答を阻害するかまたは抑制する因子をコードすることによって、通常のIFN応答を回避する。このIFNサプレッ

50

サーは、i) たんぱく質として運搬するために細菌細胞中で、または、ii) 前記細菌細胞によって運搬される塩基配列から真核細胞中で、発現する。I F N 応答の阻害は、細菌ベクターによって運搬されたパッセンジャー遺伝子のより確実な発現を可能とし、発現は、I 型 I F N 応答が抑制された真核細胞中でのみ増強される。例えば、本発明の組換え細菌発現ベクターが免疫応答を望む抗原をコードするパッセンジャー塩基配列を運搬する時、哺乳類細胞によるこれらの抗原の産生が、宿主 I F N 系による妨害が少なくなるかまたは全く妨害されず（または、妨害程度が低下する）、抗原が発現され、前記抗原に対する所望の免疫応答が産生できる。これとは別に、前記パッセンジャー核酸配列が酵素、ホルモン類または治療または栄養性因子のような所望のたんぱく質産物のためである時、前記哺乳類細胞によるこれらのたんぱく質産物の産生は、宿主 I F N 系による妨害が少ないかまたは全く妨害されない。

10

【0010】

本発明の目的は、i) 1 種以上のパッセンジャー遺伝子；および ii) 哺乳類インタフェロン応答を阻害する 1 種以上の因子をコードする核酸配列、を含む遺伝子工学作製細菌を提供することである。前記 1 種以上のパッセンジャー遺伝子をコードする核酸配列は真核細胞プロモータに読み取り可能に連結され、哺乳類 I 型インタフェロン応答を阻害する 1 種以上の因子をコードする核酸配列は、真核細胞プロモータまたは原核細胞プロモータに読み取り可能に連結されている。さらに別の態様では、哺乳類インタフェロン応答を阻害する前記 1 種以上の因子をコードする前記発現可能な核酸配列は、前記遺伝子工学作製細菌の染色体上に存在する。さらなる態様では、i) 1 種以上のパッセンジャー遺伝子をコードする真核細胞で発現可能である核酸配列；および ii) 哺乳類インタフェロン応答を阻害する前記 1 種以上の因子をコードする核酸配列の一方または両方が、プラスミド上に存在する。さらに、哺乳類インタフェロン応答を阻害する前記 1 種以上の因子細胞は、ウイルス起源であり得る。いくつかの態様において、前記 1 種以上のパッセンジャー遺伝子は、結核またはマラリア抗原をコードする。さらなる態様において、前記遺伝子工学作製細菌は、シゲラ菌であるかまたはマイコバクテリウムである。さらに、前記パッセンジャー遺伝子は、非相同性トランスジーンであることもできる。

20

【0011】

本発明はさらに、細胞または組織中において 1 種以上の問題の遺伝子産物の産生を増大させる方法を提供する。前記方法は、前記細胞または組織に対して、i) 問題の 1 種以上の遺伝子産物および ii) 哺乳類インタフェロン応答を阻害する 1 種以上の因子をコードする核酸配列を含む遺伝子工学作製細菌を投与することを含む。前記 1 種以上のパッセンジャー遺伝子をコードする核酸配列は、真核細胞プロモータに読み取り可能に連結され、哺乳類 I 型インタフェロン応答を阻害する 1 種以上の因子をコードする前記核酸配列は、真核細胞プロモータまたは原核細胞プロモータに読み取り可能に連結されている。投与段階は、前記の遺伝子工学作製細菌が前記細胞または組織に侵入して、問題の 1 種以上の遺伝子産物および前記 1 種以上の因子を細胞内または組織内で産生できるようにする条件下で行われる。1 態様において、前記発現可能な核酸配列の転写は、真核細胞プロモータによって制御される。別の態様において、哺乳類インタフェロン応答を阻害する前記 1 種以上の因子をコードする前記発現可能な核酸配列の転写は、原核細胞プロモータによって制御される。さらに別の態様において、哺乳類インタフェロン応答を阻害する前記 1 種以上の因子をコードする前記発現可能な核酸配列は、遺伝子工学作製細菌の染色体上に存在する。さらなる態様において、i) 前記 1 種以上の問題の遺伝子産物をコードする発現可能な核酸配列、および ii) 哺乳類インタフェロン応答を阻害する前記 1 種以上の因子をコードする発現可能な核酸配列の一方または両方が、プラスミド上に存在する。さらに、哺乳類インタフェロン応答を阻害する前記 1 種以上の因子は、ウイルス起源であることができる。いくつかの態様において、前記問題の 1 種以上の遺伝子産物は、結核抗原であることができる。さらなる態様において、前記遺伝子工学作製細菌は、シゲラ菌またはマイコバクテリウムである。

30

40

【0012】

50

本発明はさらに、哺乳類中に問題の抗原に対する免疫応答を誘発する方法を提供する。前記方法は、前記哺乳類に対して問題の抗原をコードする核酸配列；および哺乳類インタフェロン応答を阻害する１種以上の因子をコードする核酸配列、を含む遺伝子工学作製細菌を投与する過程を含む。前記１種以上のパッセンジャー遺伝子をコードする核酸配列は、真核細胞プロモータに読み取り可能に連結されており、および哺乳類Ⅰ型インタフェロン応答を阻害する前記１種以上の因子をコードする核酸配列は、真核細胞プロモータまたは原核細胞プロモータに読み取り可能に連結されている。本発明の１態様において、問題の抗原は、マイコバクテリウム・チューバキュロシス (*Mycobacterium tuberculosis*) 抗原である。いくつかの態様において、前記発現可能な核酸配列の転写は、真核細胞プロモータによって制御されている。他の態様において、哺乳類インタフェロン応答を阻害する前記１種以上の因子をコードする前記発現可能な核酸配列の転写は、原核細胞プロモータによって制御されている。さらに他の態様において、哺乳類インタフェロン応答を阻害する前記１種以上の因子をコードする発現可能な核酸配列は、前記遺伝子工学作製細菌の染色体上に存在する。いくつかの態様において、i) 問題の抗原をコードする発現可能な核酸配列および ii) 哺乳類インタフェロン応答を阻害する前記１種以上の因子をコードする発現可能な核酸配列の一方または両方は、プラスミド上に存在する。さらなる態様において、哺乳類インタフェロン応答を阻害する前記１種以上の因子は、ウイルス起源であることができる。

10

【発明の効果】

【0013】

20

結核ワクチン剤のワクチン性質を改善し、そのワクチン剤の製造を効率化する。

【発明を実施するための最良の形態】

【0014】

本発明の組換え細菌発現ベクターは、細菌侵入に対する応答において哺乳類宿主細胞によって通常開始されるⅠ型インタフェロン応答を消去、減弱または抑制する因子をコードするように遺伝子工学で作製されている。これらの因子は、前記細菌ベクター細胞によって発現されることもあるし、真核宿主細胞によって翻訳される核酸中にコードさせることもできる。真核宿主細胞中におけるⅠFN応答の減弱または消去は、ベクターに導入された核酸から問題のたんぱく質およびペプチドを効率的に転写および翻訳させる。このようなベクターに入れた分子は、菌の繁殖および生存に必要なペプチドおよびたんぱく質、ならびに、菌内部に含まれる問題の“パッセンジャー”分子をコードすることもできる。問題のパッセンジャー核酸の例には、例えば、遺伝子工学で細菌がコードするようにさせた抗原を含むが、それらに限定されない。真核宿主細胞Ⅰ型インタフェロン応答は減弱しているので、前記抗原は、持続的にかつ宿主細胞が前記抗原に対して免疫応答を開始させるだけ十分なレベルで発現される。本発明の細菌発現ベクターは、従って、ワクチン調製物における使用に理想的である。

30

【0015】

本発明の細菌発現ベクターは、Ⅰ型インタフェロン応答を消去、減弱、阻害または抑制する因子をコードするように遺伝子工学で作製されている。当業者は、ⅠFN応答の特異的メディエータを標的とする因子を多くのウイルスがコードすることを理解するであろう。これらの因子は、ⅠFN応答拮抗剤と称することもできる。最も特性解析のすすんだウイルス標的の中でも、プロテインキナーゼR (PKR)、RNase L 活性化 (2' - 5') オリゴアデニレートシンセターゼおよびたんぱく質のインタフェロン制御因子 (IRF) ファミリーがある。

40

【0016】

免疫応答を“阻害する”または“抑制する”とは、真核細胞中で惹起された典型的または通常の免疫応答が、完全または部分的に阻害され、低下され、減弱され、妨害される等を意味している。このような阻害は、当業者に思い浮かぶだろう数種の方法のいずれによっても検出しかつ測定でき、それらは、前記免疫応答の指標であるかまたはそれに特徴的であるかまたはそれに関連している物質 (例 ⅠFN、ⅠFN 等) の量、活性または

50

属性の低下を検出することを含むが、それらに限定されない。障害レベルは、一般的に、少なくとも約 25 %、好適には約 50 %、およびさらに好適には約 60、70、80、90 または 100 % である。障害レベルは、典型的には、本発明のベクター（1 種以上のトランスジーンプラス 1 種以上の免疫系障害剤をコードするベクター）を移入した宿主細胞中で産生される 1 種以上の物質の量を、対照細胞（前記 1 種以上のトランスジーンをコードするが免疫系障害剤はコードしないベクターを移入された細胞）で産生された同一物質の量と比較し、その差を検出することで、通常、測定する。

【0017】

同様に、トランスジーンの発現を“増大”または“増加”させるとは、一般的に、対照細胞に比較して、本発明のベクターを移入した宿主細胞中において発現（すなわち、転写ならびに翻訳）したトランスジーンの量の増大、増加等を意味する。このような増大は、例えば前記ベクターから産生されるトランスジーン産物の量、活性または属性の増大を検出すること；産生されるトランスジーン産物に関連する物質（例 mRNA、前記トランスジーン産物により産生される物質または効果、前記トランスジーン産物に対する抗体）の量、活性または属性の増大を検出すること等、当業者に思い浮かぶいくつかの方法のいずれによっても、測定できる。増大レベルは、一般的に、少なくとも約 25 %、好適には約 50 %、およびさらに好適には約 60、70、80、90 または 100 %、またはそれをはるかに超えている。

【0018】

本発明での使用に適した免疫応答障害たんぱく質は、さまざまなウイルスによってコードされ、それらの例には、ロタウイルス非構造たんぱく質 1（NSP1）；インフルエンザ - A ウイルス非構造たんぱく質 1（NS1）；アデノウイルス関連 RNA I および II（VA I および II）；ワクチニアウイルス E3L または IFN- γ Rc たんぱく質；C 型肝炎ウイルス非構造たんぱく質 5A（NS5A）または NS3/4A プロテアーゼ；シミアンウイルス - V たんぱく質；センダイウイルス C たんぱく質；エクトロメリアウイルス C12R たんぱく質；アデノウイルス E1A たんぱく質、パラミキソウイルスの C たんぱく質、またはヒトパピローマウイルス（HPV）E6 オンコプロテインが含まれるが、それらに限定されない。

【0019】

ウイルス感染に対する宿主防御としての IFN 系の基本的重要性は、さらに、いくつかのウイルスが IFN 誘発抗ウイルス応答に拮抗する遺伝子産物をコードするという知見によって例示される。ウイルスは、IFN 誘発可能たんぱく質の誘発および作用を妨害するために、数種の異なる戦略を用いる。DNA および RNA ウイルスは両者ともに、IFN シグナル伝達経路の活性を不完全にするたんぱく質をコードする。複数の機構類が関与しているようである。これらの中には、模倣が含まれる。IFN シグナル伝達経路の細胞成分を模倣する産物をウイルスがコードする 2 - 3 の例がある。この分子的模倣が、IFN シグナル伝達過程に対する拮抗をもたらすことができる。例えば、ボックスウイルスは、可溶性 IFN レセプターホモログ類をコードする（IFN- γ Rc）。これらの IFN- γ Rc ホモログ類は、ボックスウイルス感染細胞から分泌され、IFN を結合し、それによって、それらの天然レセプターを介してそれらが抗ウイルス応答を惹起するように作用するのを妨害する。IFN- γ Rc たんぱく質は、ワクチニアウイルスおよび他のいくつかのオルソボックスウイルスにより分泌される。IFN- γ レセプターホモログ、ウェスタンリザーブ（Western Reserve）株中の B18R 遺伝子産物およびコペンハーゲン（Copenhagen）株中における B19R 産物は、数種の異なる IFN- γ サブタイプならびに IFN- α を結合し、IFN- γ / シグナル伝達活性を妨害する。IFN シグナル伝達に悪影響を及ぼす他の 3 種の DNA ウイルスは、アデノウイルス、パピローマウイルスおよびヒトヘルペスウイルス 8（HHV-8）である。前記アデノウイルス E1A たんぱく質は、ISGF-3 活性化上流のあるところで IFN 媒介シグナル伝達を妨害する。ISGF-3 の DNA 結合活性は、E1A により阻害される。宿主細胞質で複製するパラミキソウイルスである SeV（SeV）の C たんぱく質

10

20

30

40

50

は、I F N誘発可能細胞性遺伝子の転写活性化に干渉することにより、I F N誘発抗ウイルス応答を回避させる。センダイ (S e n d a i) ウイルスの場合、前記Cたんぱく質は、少なくとも2種の方法でI F N作用に干渉する。Cたんぱく質はS T A T - 1の合成を防止し、それらはまた、S T A T - 1ターノオ - バーの亢進を誘発する。ヒトパピロマウイルス (H P V) E 6オンコプロテインは選択的にI R F - 3に結合するが、しかし、I R F - 2およびI R F - 9を含む他の細胞性I R F類には非常に弱くしか結合しない。E 6がI R F - 3に会合してトランス活性化を阻害しそれによってI F N応答を回避する機構を、H P Vに付与する。アデノウイルスE 1 Aたんぱく質はまた、p 3 0 0を結合するE 1 A能力に依存性の機構によってI R F - 3媒介転写活性化を阻害する。H H V - 8はカポジ肉腫に関連するガンマヘルペスウイルスであり、I F N - / により誘発された転写活性化のリプレッサーとして機能するI R Fホモログ (I R F) を合成する。H H V - 8にコードされた I R Fたんぱく質はまた、I R F - 1媒介転写活性化を抑制する。2種の他のヘルペスウイルスである帯状疱疹ウイルス (V Z V) およびサイトメガロウイルス (C M V) もまた、I F Nシグナル伝達経路の機能を破壊する。V Z Vは、S T A T - 1およびJ A K - 2たんぱく質の発現を阻害するが、J A K - 1に対してはほとんど効果を有していない。異なる拮抗戦略がC M V感染細胞で起こり、M H CクラスI I 発現もまた、そこで阻害される。C M V感染線維芽細胞中でたんぱく質分解が増大するためJ A K - 1レベルが特異的に低下する。I型I F Nレセプター類からのI F Nレセプター媒介シグナル伝達に関与する遺伝子産物を、数種の非セグメント化マイナス鎖RNAウイルスがコードする。例えば、シミアンウイルス5またはおたふくかぜウイルスによる感染は、S T A T - 1のプロテオゾーム媒介分解増加につながり、一方、2型パラインフルエンザウイルスに感染した細胞中では、S T A T - 2の分解が起こる。マイナス鎖RNAウイルスであるエボラウイルスのV P 3 5たんぱく質は、I型I F N拮抗剤として作用するが、前記拮抗作用の詳細な生化学的機構は未だ明らかになっていない。V P 3 5は、I F N - プロモータのウイルス誘発およびI S R E駆動遺伝子発現のd s RNA - およびウイルス媒介活性化を阻害する。3種の例示阻害剤 (インフルエンザウイルスからのN S 1、ロタウイルスからのN S P 1およびアデノウイルスからのV A I) をコードする核酸配列を、図9のA - Cに示した。

【 0 0 2 0 】

I F N抑制因子はまた、他の非ウイルス起源からも得ることができ、例えば、宿主細胞からも得ることができ (例 サイトカインシグナル伝達サプレッサー (S O C S)、優性P K Rネガティブおよび優性R N a s e Lネガティブ)、本発明の実施において利用することができる。このI F N応答を抑制するかまたは減弱させかつウイルス発現ベクター中に遺伝子工学で作製できかつウイルス発現ベクターから発現に成功した核酸配列によりコードされるいかなる因子 (例 インタフェロン刺激遺伝子に対するs i R N A s) も、本発明の実施において使用できる。例には、上記に述べたようなもの、ならびにRNA依存性プロテインキナーゼ (P K R) ; 2 , 5 ' - オリゴアデニレートシンセターゼ (O A S) ; R N a s e L ; M xたんぱく質G T P a s e類; I F N誘発可能RNA特異的アデノシンデアミナーゼ (A D A R 1) ; I R F - 5およびI R F - 7のようなI F N制御因子; T L R 3、T L R 4、T L R 7およびT L R 9のような (I R F) ファミリの転写因子; I R A K 1 / 4およびT R A F 6のような因子; R L R、M y D 8 8、T A K 1、T O L L I P、T I F A等のような、I型I F N類の抗ウイルス作用に必須のさまざまなオートクリンI F N誘発エフェクターおよびモジュレータたんぱく質が含まれるが、それらに限定されない。

【 0 0 2 1 】

“ 細菌発現ベクター ” とは、問題の核酸配列を含有しかつ運搬し、および / または発現するように遺伝子工学で作製された細菌細胞を意味する。このように利用できる菌の例には、カンピロバクター種 (C a m p y l o b a c t e r s p p .)、ナイセリア種 (N e i s s e r i a s p p .)、ヘモフィラス種 (H a e m o p h i l u s s p p .)、アエロモナス種 (A e r o m o n a s s p p .)、フランシセラ種 (F r a n c i s

10

20

30

40

50

ella spp.), イエルシニア種 (*Yersinia* spp.), クレブシエラ種 (*Klebsiella* spp.), ボルデテラ種 (*Bordetella* spp.), レジオネラ種 (*Legionella* spp.), コリネバクテリウム種 (*Corynebacterium* spp.), シトロバクター種 (*Citrobacter* spp.), クラミジア種 (*Chlamydia* spp.), ブルセラ種 (*Brucella* spp.), シュードモナス種 (*Pseudomonas* spp.), ヘリコバクター種 (*Helicobacter* spp.), またはビブリオ種 (*Vibrio* spp.) を含むが、それらに限定されない。

【0022】

使用した特定の *Campylobacter* 株は、本発明にとって重大ではない。本発明に使用できる *Campylobacter* 株の例には、カンピロバクター・ジェジュニ (*C. jejuni*) (ATCC Nos. 43436, 43437, 43438)、カンピロバクター・ヒョインテスチナリス (*C. hyointestinalis*) (ATCC No. 35217)、カンピロバクター・フィータス (*C. fetus*) (ATCC No. 19438) カンピロバクター・フェカリス (*C. fecalis*) (ATCC No. 33709)、カンピロバクター・ドレイ (*C. doylei*) (ATCC No. 49349) およびカンピロバクター・コリ (*C. coli*) (ATCC Nos. 33559, 43133) を含むが、それらに限定されない。

【0023】

使用した特定のイエルシニア (*Yersinia*) 株は、本発明にとって重大ではない。本発明に使用できる *Yersinia* 株の例には、イエルシニア・エンテロコリチカ (*Y. enterocolitica*) (ATCC No. 9610) またはイエルシニア・ペスチス (*Y. pestis*) (ATCC No. 19428)、イエルシニア・エンテロコリチカ (*Y. enterocolitica*) Ye03-R2 (al Hendy ら、Infect. Immun., 60:870; 1992) または *Y. enterocolitica aroA* (O'Gaora ら、Micro. Path., 9:105; 1990) を含む。

【0024】

使用した特定のクレブシエラ (*Klebsiella*) 株は、本発明にとって重大ではない。本発明に使用できる *Klebsiella* 株の例には、クレブシエラ・ニューモニアエ (*K. pneumoniae*) (ATCC Nos. 13884) を含む。

【0025】

使用した特定のボルデテラ (*Bordetella*) 株は、本発明にとって重大ではない。本発明に使用できる *Bordetella* 株の例には、ボルデテラ・ペルツシス (*B. pertussis*) およびボルデテラ・ブロンチセプチカ (*B. bronchiseptica*) (ATCC No. 19395) が含まれる。

【0026】

使用した特定のナイセリア (*Neisseria*) 株は、本発明にとって重大ではない。本発明に使用できる *Neisseria* 株の例には、ナイセリア・メニンギチジス (*N. meningitidis*) (ATCC No. 13077) およびナイセリア・ゴノルホエアエ (*N. gonorrhoeae*) (ATCC No. 19424)、*N. gonorrhoeae* MSII aro 変異体 (Chamberlain ら、Micro. Path., 15:51-63; 1993) が含まれる。

【0027】

使用した特定の *Aeromonas* 株は、本発明にとって重大ではない。本発明に使用できる *Aeromonas* 株の例には、*A. salmonicida* (ATCC Nos. 33658)、*A. schubertii* (ATCC No. 43700)、*A. hydrophila*、*A. aeromonas*・ユークレノフィラ (*A. eucrenophila*) (ATCC No. 23309) が含まれる。

10

20

30

40

50

【0028】

使用した特定のフランシセラ (*Francisella*) 株は、本発明にとって重大ではない。本発明に使用できる *Francisella* 株の例には、フランシセラ・ツラレンシス (*F. tularensis*) (ATCC Nos. 15482) が含まれる。

【0029】

使用した特定のコリネバクテリウム (*Corynebacterium*) 株は、本発明にとって重大ではない。本発明に使用できる *Corynebacterium* 株の例には、コリネバクテリウム・シュードチューバキュロシス (*C. pseudotuberculosis*) (ATCC No. 19410) を含むが、それらに限定されない。

【0030】

使用した特定のシトロバクター (*Citrobacter*) 株は、本発明にとって重大ではない。本発明に使用できる *Citrobacter* 株の例には、シトロバクター・フロウンジ (*C. freundii*) (ATCC Nos. 8090) を含む。

【0031】

使用した特定のクラミジア (*Chlamydia*) 株は、本発明にとって重大ではない。本発明に使用できる *Chlamydia* 株の例には、クラミジア・ニューモニアエ (*C. pneumoniae*) (ATCC No. VR1310) を含むが、それらに限定されない。

【0032】

使用した特定のヘモフィラス (*Haemophilus*) 株は、本発明にとって重大ではない。本発明に使用できる *Haemophilus* 株の例には、ヘモフィラス・インフルエンザエ (*H. influenzae*) (Leeら、*J. Biol. Chem.* 270: 27151; 1995)、ヘモフィラス・ソムナス (*H. somnus*) (ATCC No. 43625) を含むが、それらに限定されない。

【0033】

使用した特定のブルセラ (*Brucella*) 株は、本発明にとって重大ではない。本発明に使用できる *Brucella* 株の例には、ブルセラ・アボルツス (*B. abortus*) (ATCC No. 23448) を含む。

【0034】

使用した特定のレジオネラ (*Legionella*) 株は、本発明にとって重大ではない。本発明に使用できる *Legionella* 株の例には、レジオネラ・ニューモフィラ (*L. pneumophila*) (ATCC No. 33156) または *L. pneumophila* mip 変異体 (Ott, *FEMS Micro. Rev.*, 14: 161; 1994) を含む。

【0035】

使用した特定のシュードモナス (*Pseudomonas*) 株は、本発明にとって重大ではない。本発明に使用できる *Pseudomonas* 株の例には、シュードモナス・アエルギノサ (*P. aeruginosa*) (ATCC No. 23267) を含む。

【0036】

使用した特定のヘリコバクター (*Helicobacter*) 株は、本発明にとって重大ではない。本発明に使用できる *Helicobacter* 株の例には、ヘリコバクター・ピロリ (*H. pylori*) (ATCC No. 43504)、ヘリコバクター・ムステラエ (*H. mustelae*) (ATCC No. 43772) を含む。

【0037】

使用した特定のビブリオ (*Vibrio*) 株は、本発明にとって重大ではない。本発明に使用できる *Vibrio* 株の例には、ビブリオ・コレラエ (*Vibrio cholerae*) (ATCC No. 14035)、ビブリオ・シンシナチエンシス (*Vibrio cincinnatiensis*) (ATCC No. 35912)、ビブリオ・コレラエ (*V. cholerae*) RSI 強毒性変異体 (Taylorら、*J. Infect. Dis.*, 170: 1518-1523; 1994) および *V. cholerae*

10

20

30

40

50

ctxA、ace、zot、cep変異体(Waldor Jら、Infect. Dis. , 170:278-283;1994)を含む。

【0038】

好適な実施の態様において、本発明においてベクター株を展開した細菌株には、担体としておよびワクチンベクターとしての両者として作用する能力を有するエンテロバクテリアセアエ(Enterobacteriaceae)のような菌が含まれ、エスシェリチア種(Escherichia spp.)、シゲラ種(Shigella spp.)、およびサルモネラ種(Salmonella spp.)を含むがそれらに限定されない。グラム陽性でかつ抗酸ベクター株も、同様に、リステリア・モノサイトゲネス(Listeria monocytogenes)またはマイコバクテリウム種(Mycobacterium spp.)から構築できる。

10

【0039】

使用した特定のエスシェリチア(Escherichia)株は、本発明にとって重大ではない。本発明に使用できるエスシェリチア株の例には、大腸菌(Escherichia coli)株DH5、HB101、HS-4、4608-58、1184-68、53638-C-17、13-80および6-81(例えば、Sambrookら、同上;Grantら、同上;Sansone et al.、Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)、132A:351;1982を参照)、エンテロトキシン原性の大腸菌(例えば、Evansら、Infect. Immun. , 12:656;1975参照)、腸管病原性の大腸菌(例えば、Donnenburgら、J. Infect. Dis. , 169:831;1994を参照)、腸管侵入性大腸菌(例えば、Smallら、Infect. Immun. , 55:1674;1987を参照)、および腸管出血性大腸菌(例えば、McKeeおよびO'Brien、Infect. Immun. , 63:2070;1995を参照)が含まれる。

20

【0040】

使用した特定のサルモネラ(Salmonella)株は、本発明にとって重大ではない。本発明に使用できるSalmonella株の例には、サルモネラ・チフィ(S. typhi)(例えば、ATCC No. 7251参照)、サルモネラ・チフィムリウム(S. typhimurium)(例えば、ATCC No. 13311を参照)、サルモネラ・ガリナルム(Salmonella gallinarum)(ATCC No. 9184)、サルモネラ・エンテリジチス(Salmonella enteritidis)(例えば、ATCC No. 4931参照)およびサルモネラ・チフィムリウム(Salmonella typhimurium)(例えば、ATCC No. 6994参照)、サルモネラ・チフィ(S. typhi)aroC、aroD二重変異体(例えば、Honeら、Vacc. , 9:810-816;1991参照)、S. typhimurium aroA変異体(例えば、Mastroeniら、Micro. Pathol. , 13:477-491;1992参照)が含まれる。

30

【0041】

使用した特定のシゲラ(Shigella)株は、本発明にとって重大ではない。本発明に使用できるShigella株の例には、Shigella flexneri(例えば、ATCC No. 29903参照)、Shigella flexneri CV D1203(例えば、Noriegaら、Infect. Immun. 62:5168;1994)、Shigella flexneri 15D(例えば、Sizemoreら、Science 270:299;1995)、シゲラ・ソンネイ(Shigella sonnei)(例えば、ATCC No. 29930参照)、およびシゲラ・ジゼテリアエ(Shigella dysenteriae)(例えば、ATCC No. 13313参照)が含まれる。

40

【0042】

使用した特定のマイコバクテリウム(Mycobacterium)株は、本発明にとって重大ではない。本発明に使用できるマイコバクテリウム株の例には、マイコバクテリ

50

ウム・チューバキュローシス (*M. tuberculosis*) CDC 1551 株 (例えば、Griffithら、*Am. J. Respir. Crit. Care Med.* Aug; 152 (2): 808; 1995 参照)、*M. tuberculosis* Beijing 株 (Soolingenら、1995) H37Rv 株 (ATCC#: 25618)、*M. tuberculosis* パントテン酸栄養素要求株 (Sambandamurthy, *Nat. Med.* 2002 8 (10): 1171; 2002)、*M. tuberculosis* rpoV 変異体株 (Collinsら、*Proc Natl Acad Sci USA* 92 (17): 8036; 1995)、*M. tuberculosis* ロイシン栄養素要求株 (Hondalusら、*Infect. Immun.* 68 (5): 2888; 2000)、バシレ・カルメッテ - ゲリン (*Bacille Calmette - Guerin* (BCG)) Danish 株 (ATCC#: 35733)、BCG 日本株 (ATCC#: 35737)、BCG、シカゴ株 (ATCC#: 27289)、BCG コペンハーゲン株 (ATCC#: 27290)、BCG パスツール株 (ATCC#: 35734)、BCG グラクソ株 (ATCC#: 35741)、BCG Connaught 株 (ATCC#: 35745)、BCG モントリオール (ATCC#: 35746) が含まれる。

10

【0043】

使用した特定のリステリア・モノサイトゲネス (*Listeria monocytogenes*) 株は、本発明にとって重大ではない。本発明に使用できる *Listeria monocytogenes* 株の例には、*L. monocytogenes* 株 10403S (例えば、Stevensら、*J. Virol* 78: 8210 - 8218; 2004) または (i) actA plcB 二重変異体 (Petersら、*FEMS Immunology and Medical Microbiology* 35: 243 - 253; 2003); (Angelakopoulousら、*Infect and Immunity* 70: 3592 - 3601; 2002); (ii) アラニンラセマーゼ遺伝子および D - アミノ酸アミノトランスフェラーゼ遺伝子のための dal dat 二重変異体 (Thompsonら、*Infect and Immunity* 66: 3552 - 3561; 1998) のような変異 *L. monocytogenes* 株が含まれる。

20

【0044】

本発明のいくつかの実施の態様において、前記菌は、特に、*Shigella* 種であり、特に、弱毒化侵入性 *Shigella flexneri* 2a である。これらの株、MPC51 および NCD1 は、asd および murI 欠失変異を導入した *S. flexneri* 株 2457T の誘導体である。この asd 欠損は、発現ベクターコード asd 対立遺伝子によって補完されており、murI 変異の結果、前記株が D - グルタメートを合成できなくなる; 従って、これらの株は、ジアミノピメリン酸および D - グルタメート不在下で適切な細胞壁を合成できなくなり、そのことが、真核細胞の侵入後の細菌細胞の溶解を促進する。ゲンタミシン保護アッセイにより測定されるように、asd、murI 二重変異体 MPC51 の HeLa 細胞侵入挙動は、親株および MPC51 pYA3342 (asd をコードするプラスミド) のそれと類似していた。前記株はさらに、先に染色体 asd 座に挿入したカナマイシン耐性遺伝子の除去により、さらに改変されている。生成した株 *Shigella flexneri* NCD1 は、従って、抗生物質耐性マーカー類を含んでおらず、asd および murI 遺伝子の染色体欠損をまだ保持しており、現在の法的要件下でヒトにおける薬理用途のために許容できる。NCD1 はまた、親株と同様の様式で HeLa および Caco-2 細胞に侵入性であることが明らかとなっている。

30

40

【0045】

一般的に、本発明の細菌発現ベクターは、IFN 阻害因子および 1 種以上の問題の他の遺伝子すなわちパッセンジャー遺伝子の両方をコードし運搬するように遺伝子工学で作製されている。前記パッセンジャー遺伝子は、典型的には、別の菌または病原体のような別の生物由来の非相同性トランスジーンであり、いかなる生物由来であってもよい。しかし、前記“パッセンジャー遺伝子”はまた、細菌ベクターそれ自体に自然に出現する遺伝子

50

sitory Cat#827; Genbank 寄託番号#M13137)、Tat-31-45 (Agwaleら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99:10037; 2002) のような Tat の変異誘導体、Rev (National Institute of Allergy and Infectious Disease HIV Repository Cat. #2088; Genbank 寄託番号#L14572)、および Pol (National Institute of Allergy and Infectious Disease HIV Repository Cat. #238; Genbank 寄託番号#AJ237568) および gp120 の T および B 細胞エピトープ (Hanke and McMichael, AIDS Immunol Lett., 66:177; 1999); (Hankeら、Vaccine, 17:589; 1999); (Palmerら、J. Immunol., 142:3612-3619; 1989) 限定されるわけではないが gp120 と CD4 の融合体 (Foutsら、Virology, 2000, 74:11427-11436; 2000) のような HIV-1 Env と gp120 のキメラ誘導体; 限定されるわけではないが gp140 (Stamatouら、J. Virology, 72:9656-9667; 1998) または HIV-1 Env の誘導体および/またはその gp140 (Binleyら、J. Virology, 74:5091-5100 (2000)); (Sandersら、J. Virology, 74:627-643; 2000) のような HIV-1 env の短く切断されたかまたは修飾された誘導体、B型肝炎抗原 (Genbank 寄託番号#AF043578); (Wuら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:4726-4730; 1989); VP4 (Genbank 寄託番号#AJ293721); (Mackowら、Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 87:518-522; 1990) および VP7 (Genbank 寄託番号#AY003871); (Greenら、J. Virology, 62:1819-1823; 1988) のような口タウイルス抗原、ヘマグルチニンまたは (GenBank 寄託番号#AJ404627); (Pertmer および Robinson, Virology, 257:406; 1999); ヌクレオプロテイン (GenBank 寄託番号#AJ289872); (Linら、Proc. Natl. Acad. Sci., USA 97:9654-9658; 2000) のようなインフルエンザウイルス抗原、チミジンキナーゼ (GenBank 寄託番号#AB047378; (Whitleyら、New Generation Vaccines, 825-854 ページ) のような単純ヘルペスウイルス抗原が含まれるが、それらに限定されない。

【0048】

前記細菌抗原が由来する菌病原体には、マイコバクテリウム種 (*Mycobacterium* spp.), ヘリコバクター・ピロリ (*Helicobacter pylori*), サルモネラ種 (*Salmonella* spp.), シゲラ種 (*Shigella* spp.), 大腸菌 (*E. coli*), リケッチア種 (*Rickettsia* spp.), リステリア種 (*Listeria* spp.), レジオネラ・ニューモニアエ (*Legionella pneumoniae*), シュードモナス種 (*Pseudomonas* spp.), ビブリオ種 (*Vibrio* spp.), バシラス・アンスラシス (*Bacillus anthracis*) およびボレリア・ブルグドルフェリ (*Borrelia burgdorferi*) が含まれるが、それらに限定されない。

【0049】

細菌病原体の防御性抗原の例には、CFA/I フィンブリエ抗原 (Yamamotoら、Infect. Immun., 50:925-928; 1985) および熱不安定性トキシンの無毒性 B サブユニット (ら、Infect., Immun., 40:888-893; 1983) のようなエンテロトキシン原性大腸菌の体性抗原; ボルデテラ・ペルツシス (*Bordetella pertussis*) のパータクチン (Robertsonら、Vacc., 10:43-48; 1992)、B. pertussis のアデニレートシクラーゼヘモライシン (Guisoら、Micro. Path., 11:423-43

10

20

30

40

50

1 ; 1991)、クロストリジウム・テタニ(*Clostridium tetani*)の破傷風毒素のC断片(Fairweatherら、*Infect. Immun.* 58: 1323-1326; 1990)、ボレリア・ブルグドルフェリ(*Borellia burgdorferi*)のOspA(Sikandra、*Pediatrics*, 108: 123-128; 2001); (Wallichら、*Infect. Immun.*, 69: 2130-2136; 2001)、リケッチア・プロワゼキ(*Rickettsia prowazekii*)およびリケッチア・チフィ(*Rickettsia typhi*)の防御性バラクリスタリン表面層たんぱく質(Carlら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 8237-8241; 1990)、リステリア・モノサイトゲネス(*Listeria monocytogenes*)のリステリオライシン(“Llo”および“Hly”としても公知)および/またはスーパーオキシドジスムターゼ(“SOD”および“p60”としても公知)(Hess、J.ら、*Infect. Immun.* 65: 1286-92; 1997); Hess、J.ら、*Proc. Natl. Acad. Sci.* 93: 1458-1463; 1996); (Bouwerら、*J. Exp. Med.* 175: 1467-71; 1992)、ヘリコバクター・ピロリ(*Helicobacter pylori*)のウレアーゼ(Gomez-Duarteら、*Vaccine* 16: 460-71; 1998); (Corthesy-Theulazら、*Infection & Immunity* 66: 581-6; 1998)およびバシラス・アンスラシス(*Bacillus anthracis*)防御性抗原および致死因子レセプター結合ドメイン(Priceら、*Infect. Immun.* 69: 4509-4515; 2001)が含まれる。

【0050】

寄生体抗原が由来する寄生体病原体には、プラスモジウム・ファルシパルム(*Plasmodium falciparum*)(ATCC#: 30145)のような*Plasmodium*種; トリパノゾーマ・クルジ(*Trypanosoma cruzi*)(ATCC#: 50797)のような*Trypanosoma*種; ジアルジア・インテスチナリス(*Giardia intestinalis*)(ATCC#: 30888D)のような*Giardia*種; プーフィラス(*Boophilus*)種、バベシア・ミクロチ(*Babesia microti*)(ATCC#: 30221)のような*Babesia*種; エンタメーバ・ヒストリチカ(*Entamoeba histolytica*)(ATCC#: 30015)のような*Entamoeba*種; エイメリア・マキシマ(*Eimeria maxima*)(ATCC#: 40357)のような*Eimeria*種; リューシュマニア(*Leishmania*)種(Taxonomy ID: 38568); シストゾーム(*Schistosoma*)種、ブルギア(*Brugia*)種、ファスシダ(*Fasciola*)種、ジロフィラリア(*Dirofilaria*)種、ウチエレリア(*Wuchereria*)種、およびオンコセレア(*Onchocerca*)種を含むがそれらに限定されない。

【0051】

寄生体病原体の防御性抗原の例には、プラスモジウム・ベルゲイ(*P. berghei*)のサーカムスポロゾイト抗原またはプラスモジウム・ファルシパルム(*P. falciparum*)のサーカムスポロゾイト抗原のような*Plasmodium*種のサーカムスポロゾイト抗原(Sadoffら、*Science*, 240: 336-337; 1988); *Plasmodium*種のメロゾイト表面抗原(Spetzlerら、*Int. J. Pept. Prot. Res.*, 43: 351-358; 1994); エンタメーバ・ヒストリチカ(*Entamoeba histolytica*)のガラクトース特異的レクチン(Mannら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 3248-3252; 1991)、*Leishmania*種のgp63(Russellら、*J. Immunol.*, 140: 1274-1278; 1988); (XuおよびLiew、*Immunol.*, 84: 173-176; 1995)、リューシュマニア・メジャー(*Leishmania major*)のgp46(Handmanら、*Vaccine*

10

20

30

40

50

、18:3011-3017;2000)ブルギア・マライ(*Brugia malayi*)のパラミオシン(Liら、*Mol. Biochem. Parasitol.*, 49:315-323;1991)、シストソマ・マンソニ(*Schistosoma mansoni*)のトリオースーホスフェートイソメラーゼ(Shoemakerら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:1842-1846;1992);トリチオストロンギラス・コルブリホルミス(*Trichostrongylus colubriformis*)の分泌グロビン様たんぱく質(Frenkelら、*Mol. Biochem. Parasitol.*, 50:27-36;1992)、フランシオラ・ヘパチカ(*Frasciola hepatica*)(Hillyerら、*Exp. Parasitol.*, 75:176-186;1992)、シストゾーマ・ボビス(*Schistosoma bovis*)およびシストゾーマ・ジャポニクム(*S. japonicum*)(Bashirら、*Trop. Geogr. Med.*, 46:255-258;1994)のグルタチオン S 転移フェラーゼ類;および*Schistosoma bovis*および*S. japonicum*のKLH(Bashirら、同上、1994)が含まれる。

【0052】

これとは別に、例えば、癌細胞、アルツハイマー病、1型糖尿病、心疾患、クローン病、多発性硬化症等関連抗原のような感染性物質関連でない抗原に対する免疫応答を惹起するのが望ましい。

【0053】

さらに、前記細菌によって保有されるパッセンジャー遺伝子は、抗原をコードする必要はないが、問題のいかなるペプチドまたはたんぱく質もコードすることができる。例えば、本発明の方法は、先天性障害の矯正のためのパッセンジャー分子の運搬のために用いることができる。このような遺伝子には、例えば、嚢胞性線維症のための嚢胞性線維症膜貫通型コンダクタンズレギュレータ(CFTR)遺伝子のような欠損遺伝子の配置;またはHIV治療のためのインテグラーゼアンチセンス遺伝子のような新規遺伝子の導入;またはインタロイキン-27(IL-27)のようなI型T細胞応答を増強するための遺伝子;またはコレステロールとコレステロールレセプターまたはインシュリンとインシュリンレセプターのようなあるレセプター、代謝物またはホルモンの発現を修飾する遺伝子;または腫瘍壊死因子(TNF)関連アポトーシス誘発リガンド(TRAIL)のような癌細胞を死滅させることができる産物をコードする遺伝子;または骨吸収を阻害する天然のたんぱく質オステオプロテジェリン(OPG);または完全長ヒト化抗体類を効率的に発現させるための例えば癌細胞上のHER2/neu(erbB2)レセプターに作用するヒト化モノクローナル抗体を含む。

【0054】

さらに、前記パッセンジャー遺伝子は、“小型阻害性”siRNAsのような阻害性RNAsをコードすることもできる。当該技術で公知のように、このようなRNAsは、問題のmRNAに対して相補性であり、例えば、遺伝子産物発現を防止する手段としてmRNAに結合してその翻訳を防止する。

【0055】

同様の方法をパッセンジャー分子の運搬のために用いて、自己免疫疾患または他の免疫系疾患を予防または制御するために、免疫系を下方制御できる。例には、糖尿病、多発性硬化症、紅班性狼そうおよびクローン病、さらに炎症性関節皮膚疾患の予防または治療が挙げられる。他の例には、癌および他の疾患に対する治療的免疫応答をそらす免疫応答類の下方制御のような特定の免疫応答を妨害する免疫応答の微細調整が含まれる。Th1応答が、癌、リウマチ、結核、およびHIVの予防および治療に適している時、例えば、Th2応答の下方制御である。このことは、適切な免疫応答の刺激と不適切な免疫応答の阻害のための適切なサイトカイン環境を発現させる能力と組み合わせた免疫系の免疫抑制性の性質を操作することにより、現技術によって達成できる。

【0056】

好適な実施の態様において、本発明は、宿主細胞中にＩＦＮ耐性遺伝子を導入する方法に関する。このような方法は、問題の遺伝子すなわち核酸配列をコードする配列とともに細菌ベースデリバリシステムに所望のＩＦＮ耐性遺伝子を導入することを含み、ＩＦＮ耐性たんぱく質および問題の核酸配列が、前記菌を宿主に投与する時発現するようにする。前記ＩＦＮ阻害剤は、前記菌（例 シゲラ）によってまたは宿主細胞によって産生されることができる。すなわち、ＩＦＮ耐性遺伝子は、原核細胞プロモータからまたは真核細胞プロモータから発現させることができる。問題の前記遺伝子または核酸配列（パッセンジャー遺伝子）は、宿主細胞中で発現される。さらに、遺伝子配列は全て、連続的にまたは一時的に発現させるかまたは誘発させることもできる。

【００５７】

10

さらに別の好適な実施の態様において、本発明は、１種以上の問題の遺伝子とともにインビトロで細胞中にＩ型ＩＦＮ耐性遺伝子を導入する方法を提供する。このような方法は、例えば、弱毒化または減弱／不活性化シゲラ類中に１種以上のＩＦＮ耐性遺伝子とともに問題の１種以上のたんぱく質をコードする遺伝子の導入を含み、前記所望のたんぱく質／ペプチドは、前記シゲラを細胞に投与すると産生される。シゲラは、ＢＨＫ（ベビーハムスター腎細胞）、ＨｅＬａ（ヒト頸部エピセロイドカルシノーマ）、ＣａＣｏ－２（ヒト結腸アデノカルシノーマ）のような数種の異なる細胞型に感染し、従って、細胞中に所望のパッセンジャー分子を運搬可能である。シゲラ感染細胞中における遺伝子発現は、Ｉ型ＩＦＮ応答の阻害剤によって増強される。核酸運搬後、細胞を治療目的のため、遺伝子療法のため移植でき、または、診断アッセイの試薬として使用する。

20

【００５８】

いくつかの場合、前記菌は、細胞に対して、所望の物質をコードする核酸配列を運搬し、細胞中でその産生を媒介することによって、“遺伝子療法”物質として作用する。例えば、シゲラベクターを用いて腸内にＣＸＣＲ４／またはＣＣＲ５結合ケモカインコード遺伝子を運搬することは、ＨＩＶ－Ｉ感染治療のためとみなすことができる。遺伝子工学作製菌のための操作は当業者に周知であり、このような操作を行う指針も、周知である。Ｅ．coli, Salmonella, Mycobacteria, Shigella, および Listeria を弱毒化させる方法も、当業者に周知である（Evansら、J of Immunol., Vol. 120, 1978, p. 1423）；（Noriegaら、Infect. Immun., 62 (11): 5168 - 5172 1994）；（Honeら、Vacc., 9: 810 - 816; 1991）。

30

【００５９】

例えば、細胞中に所望の遺伝子または遺伝子を運搬するための方法には、菌株中に問題の遺伝子を導入することを含め得る。本発明によれば、抗ＩＦＮ応答遺伝子または遺伝子は、菌染色体または強毒性プラスミド中に、当業者に周知の方法によって導入でき、またはこれとは別に、複製性または非複製性のプラスミド中に保有させることができる。問題のベクターは、例えば、形質転換、エレクトロポレーション、移入、結合等により、細菌中に導入できる。前記株および細菌ベクター構築に用いた組換えＤＮＡ操作には、ポリメラーゼチェーン反応（ＰＣＲ）、制限エンドヌクレアーゼ（本文で“ＲＥ”と称する）消化、ＤＮＡ連結、アガロースゲル電気泳動、ＤＮＡ精製、およびジデオキシヌクレオチド配列決定を含むが、それらに限定されず、それらは、他所に記載されており（Miller, A Short Course in Bacterial Genetics (細菌遺伝学の短期コース), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; 1992）；（Botwellら、Methods for Cloning and Analysis of Eukaryotic Genes (真核細胞遺伝子のクローニングと分析のための方法), Eds., Jones and Bartlett Publishers, Boston, Mass. 1990）；および（Ausubelら、Current Protocols in Molecular Biology (分子生物学のカレントプロトコール), vol. 2: 10.8.1 - 10.8.13, 1992）, バクテリ

40

50

オフージ媒介形質導入 (de Boer ら、Cell, 56: 641-649; 1989); (Miller, 同上、1992) および (Ausubel ら、同上)、または化学的 (Bothwell ら、同上); (Ausubel ら、同上); (Felgner ら、同上); および (Farhood, 同上)、エレクトロポレーション (Bothwell ら、同上); (Ausubel ら、同上); (Sambrook、Molecular Cloning: A Laboratory Manual (モレキュラークローニング: ラボラトリマニュアル)、Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; 1992) および物理的形質転換技術 (Bothwell ら、同上) を含むが、それらに限定されない。前記遺伝子は、ファージ類 (de Boer ら、同上)、プラスミドベクター (Curtis 10
ss、New Generation Vaccines (新世代ワクチン類): The Molecular Approach (分子のアプローチ), Ed., Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 161-188 ページおよび 269-288 ページ、1989) 中に取り込ませることができるし、または、標的株の染色体中にスプライシングする (Hone ら、同上) こともできる。

【0060】

例えば、Applied Biosystems ABITM 3900 ハイスループット (High-Throughput) DNA シンセサイザー (Foster City, CA 94404 U.S.A.) を用い、かつ製造業者が示した操作を用いて、遺伝子配列を合成により作製できる。約 200 bp を超える大きな配列を合成するため、完全長配列の 1 連のセグメント類を PCR により作製し、それらを結合し、当該技術で周知の操作を用いて、完全長配列を形成させる。しかし、約 200 bp より小さい小型配列も、一回で合成できる。 20

【0061】

組換えプラスミド類を、例えば、バイオラッドジーンパルサー (BioRad Gene-Pulser) を用いてエレクトロポレーションにより菌株中に導入することもできる。ヌクレオチド配列決定による cDNA 配列の確認は、標準的自動化配列決定技術を用いて (例 Applied Biosystems 自動シーケンサー、モデル 373A を用いて) 達成できる。DNA 配列決定およびポリメラーゼチェーン反応 (本文で "PCR" と称する) のための DNA プライマー類は、合成で調製できる。 30

【0062】

本発明のいくつかの実施の態様において、遺伝子工学作製菌は、弱毒化侵入性 *Shigella flexneri* であり、前記菌中に導入する遺伝子は、アデノウイルス VAI 遺伝子、ロタウイルスの NSP1 および / またはインフルエンザウイルスの NS1 であり、それらは、真核細胞プロモータ制御下にクローニングされ、エレクトロポレーションによって前記細菌中に導入される。

【0063】

本発明はまた、本発明の組換え細菌発現ベクターを投与するための調製物を提供する。例えば、免疫応答惹起において使用するためのワクチン調製物を提供する。前記調製物には、本文に記載のような少なくとも 1 種の遺伝子工学作製菌株、および薬理学的に適切な担体を含む。このような組成物 (例 ワクチンとしての用途用) の調製は、当業者に周知である。典型的には、このような組成物は液体溶液または懸濁物のいずれかとして調製されるが、錠剤、丸剤、粉剤等のような固体形状も同様に考えられる。固体形状または投与前溶液または懸濁液との混合に適した濃縮形状も同様に調製することができる。前記調製物も乳化できる。前記活性成分は、薬学的に許容でき前記の活性成分と相溶性の賦形剤と混合することもできる。適切な賦形剤は、例えば、水、生理食塩水、デキストロース、グリセロール、エタノール等またはそれらの組み合わせである。さらに、前記組成物は、湿潤剤または懸濁化剤、pH 緩衝剤等のような少量の助剤を含むことができる。本発明のワクチン調製物はさらに、アジュバントを含むことができ、その例には、セピック (Sep 40
pic), クイル A (Quil A), アルヒドロゲル (Alhydrogel) 等が含 50

まれるが、それらに限定されない。

【0064】

もし前記組成物の経口形態を投与することを望むならば、さまざまな粘稠剤、着香料、希釈剤、懸濁化剤、分散剤または結合剤等を添加することができる。本発明の組成物は、投与に適した形状で前記組成物を提供するため、いかなる上記のような追加成分をも含むこともできる。前記製剤中の組換え菌の最終的量は変化してもよい。しかし、一般的に前記製剤中の前記量は、約1 - 99%であろう。さらに、本発明の調製物は、単一タイプの組換え菌または1種を超える組換え菌を含むことができる。最初、前記細菌ベクター株を約 $10^2 - 10^9$ cfuの用量で投与し、適切な経路で投与する。投与回数は、それぞれのベクター株の強度、および問題のコードされた組換え産物の価数、特定用途等に応じて変化させることができる。

10

【0065】

ワクチン調製物の場合、本発明は、前記細菌によってコードされた抗原に対する免疫応答を惹起する方法および前記抗原関連疾患または状態に対して哺乳類にワクチン接種する方法を提供する。免疫応答を惹起するとは、本発明のワクチン調製物投与が特異的抗体の合成（約1乃至 1×10^6 の範囲、好適には 1×10^3 、さらに好適には約 1×10^3 乃至約 1×10^6 の範囲、最も好適には 1×10^6 を超える力価）および/または例えば、³Hチミジンキナーゼによって測定するような細胞性増殖を引き起こすことを意味している。本方法は、本発明の菌株を薬理的に許容できる担体中に含む組成物を、哺乳類に投与することを含む。本発明のワクチン調製物は、当業者に周知の多くの適切な手段のいずれによって投与でき、それらは、注射によって、経口的に、経鼻的に、吸入によって、組換え菌を含む食品を摂取することによって等を含むがそれらに限定されない。好適な態様において、投与様式は、経口、皮下、皮膚内または筋肉内である。

20

【0066】

本発明をさらに、下記の非限定的実施例によって例示する。

【実施例1】

【0067】

組換えシゲラベクターによる宿主細胞中におけるI型IFN応答の誘発

I型インタフェロン応答を哺乳類細胞中で誘発する菌の能力を試験し、前記応答の性質を分析した。実験条件は、下記のものであった：セミコンフルエンスのHeLa細胞単層を、RNAパッセンジャー分子を有する*Shigella flexneri*に1時間、感染多重度(MOI)100で37℃の6ウェルプレート中で暴露させた。細胞を、ダルベッコ改良イーグル培地(DMEM)で2回洗浄した。150 μg/mlゲンタミシンを含有する培地を1時間、前記細胞に添加し、細胞外菌を死滅させた。その後、細胞を2回洗浄し、10%ウシ胎児血清(FBS)添加DMEMを添加し、感染細胞を20時間、インキュベーションした。細胞を次にリン酸緩衝生理食塩水(PBS)で2回洗浄し、総RNAをRNeasyミニキット(Qiagen)により単離した。ヒトインタフェロンおよびレセプター類RT²ProfilerTM PCRアレイ(Superaarray Biosciences)を利用し、84種のインタフェロン関連遺伝子の発現の上方制御または下方制御を明らかにした。

30

40

【0068】

結果を、表1に示した。この表からわかるとおり、シゲラベクターのヒト細胞への侵入は、I型IFNsおよび2'-5'オリゴアデニレートシンセターゼ(2'-5'OAS)のようなIFN刺激遺伝子の転写誘発につながった。調べた89種の遺伝子中、74種が、転写において2倍を超える増大を示した。

【0069】

さらに、実験を行い、シゲラにより運搬されたプラスミドDNAパッセンジャー分子由来のレポーター遺伝子のIFN- / 欠失細胞中における発現が、自然のIFN系を有する細胞に比較して増強している(図1)ことを示した。

【0070】

50

これらの結果は、IFN刺激遺伝子が細菌ベクターにより哺乳類細胞に運搬されたパッセンジャー分子からの遺伝子発現を抑制することを示している。

【0071】

【表1】

表1. 特徴的IFN関連遺伝子発現：シグマ侵入HeLa細胞対非侵入HeLa細胞

遺伝子	誘発倍率
ADAR (RNA上で作用するアデノシンデアミナーゼ)	3.37
CNTFR (絨毛性神経栄養因子レセプター)	3.54
CRLF2 (サイトカインレセプター様2)	3.10
CSF2RA (コロニー刺激因子2レセプター)	2.80
CSFR3 (コロニー刺激因子3レセプター)	5.44
CXCL10 (ケモカイン (C-X-Cモチーフ) リガンド10)	649.87
EBI3 (エプスタインバーウイルス誘発遺伝子3)	4.30
F3凝固因子III (トロンボプラスチン、組織因子)	2.90
IL20RB (インタロイキン20レセプターベータ)	1.35
ISG15 (インタフェロンで刺激された遺伝子15)	13.87
IFI6 (インタフェロン、アルファ誘発可能たんぱく質6)	18.69
IFI16 (インタフェロン、ガンマ誘発可能たんぱく質16)	5.11
IFI27 (インタフェロン、アルファ誘発可能たんぱく質27)	52.13
IFI30 (インタフェロン、ガンマ誘発可能たんぱく質30)	1.56
IFI35 (インタフェロン誘発たんぱく質35)	4.54
IFI44 (インタフェロン誘発たんぱく質44)	5.22
IFI44L (インタフェロン誘発たんぱく質44様)	7.33
IFIH1 (ヘリカーゼCドメイン1により誘発されたインタフェロン)	65.53
IFIT1 (テトラトリコペプチドリピート1を有するインタフェロン誘発たんぱく質)	12.94
IFIT1L (テトラトリコペプチドリピート1様を有するインタフェロン誘発たんぱく質)	13.21
IFIT2 (テトラトリコペプチドリピート2を有するインタフェロン誘発たんぱく質)	6.47
IFIT3 (テトラトリコペプチドリピート3を有するインタフェロン誘発たんぱく質)	19.08
IFITM1 (インタフェロン誘発膜貫通たんぱく質1)	3.47
IFITM2 (インタフェロン誘発膜貫通たんぱく質2)	0.85
IFNA1 (インタフェロン、アルファ1)	2.34
IFNA14 (インタフェロン、アルファ14)	3.02
IFNA2 (インタフェロン、アルファ2)	19.48
IFNA21 (インタフェロン、アルファ21)	14.66
IFNA4 (インタフェロン、アルファ4)	7.86
IFNA5 (インタフェロン、アルファ5)	37.90
IFNA6 (インタフェロン、アルファ6)	3.28
IFNA8 (インタフェロン、アルファ8)	3.77
IFNAR1 (インタフェロン (アルファ、ベータおよびオメガ) レセプター1)	2.44
IFNAR2 (インタフェロン (アルファ、ベータおよびオメガ) レセプター2)	3.72

10

20

30

40

IFNB1 (インタフェロン、ベータ 1)	21.92
IFNE1 (インタフェロン イプシロン 1)	1.72
IFNG (インタフェロン、ガンマ)	6.21
IFNGR1 (インタフェロン・ガンマレセプター1)	8.08
IFNGR2 (インタフェロン・ガンマレセプター2)	3.13
IFNK (インタフェロン、カッパ)	5.40
IFNW1 (インタフェロン、オメガ 1)	18.18
IFRD1 (インタフェロン関連発生レギュレータ 1)	8.36
IFRD2 (インタフェロン関連発生レギュレータ 2)	1.07
IL10RA (インタロイキン 10 レセプター、アルファ)	9.67
IL10RB (インタロイキン 10 レセプター、ベータ)	3.28
IL11RA (インタロイキン 11 レセプター、アルファ)	2.02
IL12B (インタロイキン 12、ベータ)	31.00
IL13RA1 (インタロイキン 13 レセプター、アルファ-1)	1.64
IL15 (インタロイキン 15)	2.59
IL20RA (インタロイキン 20 レセプター、アルファ)	2.82
IL21R (インタロイキン 21 レセプター)	6.21
IL22RA2 (インタロイキン 22 レセプター、アルファ-2)	8.78
IL28A (インタロイキン 28、アルファ)	5.26
IL28RA (インタロイキン 28 レセプター、アルファ)	1.94
IL29 (インタロイキン 29)	25.71
IL2RB (インタロイキン 2 レセプター、ベータ)	9.47
IL2RG (インタロイキン 2 レセプター、ガンマ)	26.61
IL31RA (インタロイキン 31 レセプター、アルファ)	5.22
IL3RA (インタロイキン 3 レセプター、アルファ)	12.85
IL4R (インタロイキン 4 レセプター)	4.33
IL5RA (インタロイキン 5 レセプター、アルファ)	3.24
IL6 (インタロイキン 6)	42.34
IL6R (インタロイキン 6 レセプター)	11.91
IL7R (インタロイキン 7 レセプター)	22.38
IL9R (インタロイキン 9 レセプター)	1.91
IRF1 (インタフェロン制御因子 1)	20.03
IRF2 (インタフェロン制御因子 2)	3.85
IRF2BP1 (インタフェロン制御因子 2 結合たんぱく質 1)	2.32
IRF2BP2 (インタフェロン制御因子 2 結合たんぱく質 2)	4.94
IRF3 (インタフェロン制御因子 3)	1.88
IRF4 (インタフェロン制御因子 4)	49.32
IRF5 (インタフェロン制御因子 5)	5.75

10

20

30

IRF6 (インタフェロン制御因子 6)	5.67
IRF7 (インタフェロン制御因子 7)	3.02
IRF8 (インタフェロン制御因子 8)	30.36
IRGM (免疫関連 GTPase ファミリ、M)	350.68
LEPR (レプチンレセプター)	2.23
MRL (骨髄増殖性白血病たんぱく質)	4.64
MX1 (ミキソウイルス (インフルエンザ) 耐性 1)	13.40
OAS1 (2'-5'オリゴアデニレートシンセターゼ)	8.66
PSME1 (プロテオソーム (プロソーム、マクロペイン) アクチベータサブユニット 1)	1.13
PYHIN1 (ピリンおよび HIN ドメイン)	2.63
SP110 (核ポディプロテイン)	1.82
TTN (中央筋節性たんぱく質タイタンをコードする)	45.07
B2M (ベータ-2-ミクログロブリン)	2.21
HPRT1 (ヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ 1)	0.68
RPL13A (リボソームたんぱく質 L13a)	0.49
GAPDH (グリセルアルデヒド-3-ホスフェートデヒドロゲナーゼ)	0.98
ACTB (アクチン、ベータ)	1.39

10

20

【実施例 2】

【0072】

I 型 IFN 応答抑制細菌デリバリシステムの構築および細菌ベクターにより運搬されたパッセンジャー核酸の発現に及ぼす効果

この実施例は、I 型 IFN 応答を抑制する 2 種の細菌デリバリシステムの構築とその利用、ならびに、パッセンジャー核酸発現に及ぼすその効果を記載している。両者の場合において、核酸は、エレクトポレーションによって弱毒化、侵入性 *Shigella flexneri* 中に遺伝子工学で作製した。*Shigella flexneri* は多くの組織培養細胞株中および動物モデル中で自然に侵入性であるので、それを選択した。このシゲラ株は導入された染色体変異を有しており、真核細胞侵入後それを溶解させ、エンドサイトーシス性小胞から逃れさせ、パッセンジャー分子の真核細胞の細胞質への放出を可能とする。

30

【0073】

実験第 1 セットにおいて、電氣的に受容能力がある *Shigella flexneri* 株 NCD1 を調製し、市販の *E. coli* ベータ-ガラクトシダーゼ発現レポーターベクター pCDNA3.1/His/lacZ (Invitrogen) によりエレクトポレーションした。レポーターベクター pCDNA3.1/His/lacZ は、哺乳類細胞中でヒトサイトメガロウイルス (CMV) プロモータ制御下に大腸菌 (*E. coli*) ベータ-ガラクトシダーゼを発現させ、前記ベクターの運搬後、哺乳類媒介遺伝子発現の簡易分析を可能とする。この実験に用いた前記インタフェロン耐性遺伝子は、アデノウイルス関連 I (VAI) RNA 遺伝子であった。このアデノウイルス RNA 遺伝子は、アデノウイルス感染後大量の RNA ポリメラーゼ I II により転写されることが公知となっている (Reichら、J. Mol. Biol. 17, 428, 1996; Priceら、J. Virol. 9, 62, 1972; Weinmannら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 3426; Solderlundら、Cell 7, 585, 1976)。アデノウイルスは、インタフェロン誘発二重鎖 RNA 活性化プロテインキナーゼ PKR の活性化をブロックすることによって細胞性抗ウイルス性応答に対する

40

50

防御として、ウイルスコードウイルス関連RNAを用いる (Galabru J、Katz MG、Robert N、Hovanesian AG. Eur. J Biochem. 1989 Jan 2; 178 (3): 581-9)。アデノウイルスウイルス関連I (VAI) RNA遺伝子を1724bp挿入体上に有するpAdVAntagベクターを同様に、Shigella flexneri NCD1株中にエレクトロポレーションによって入れた。Shigella flexneri株によるエレクトロポレーションによって、実施例1に記載のようにしてHeLa細胞に侵入させた。簡単に述べると、VAI遺伝子の抗インタフェロン効果を試験するため、HeLa細胞に、1) ベータ-ガラクトシダーゼレポーターベクター (pcDNA3.1/His/lacZ) を含むShigella flexneri NCD1およびpAdVAntagベクターを含むShigella flexneri NCD1; または2) ベータ-ガラクトシダーゼレポーターベクターのみを含むShigella flexneri NCD1株のいずれかを感染させた。24時間後、ベータ-ガラクトシダーゼアッセイ試薬 (Stratagene) を、細胞溶解のためおよび細胞抽出物中におけるベータ-ガラクトシダーゼ活性をアッセイするための両者のため、用いた。結果を、図2に示した。この図からわかるとおり、ベータ-ガラクトシダーゼ活性の大幅な増加が、ベータ-ガラクトシダーゼレポーターベクターおよびVAI抗インタフェロンベクターの両者を含むシゲラが侵入したHeLa細胞中で観察された。

【0074】

同様に、第二セットの実験で、レポーター遺伝子グリーンフルオレセントプロテイン (Green Fluorescent Protein) (GFP) 含有組換え二重鎖RNAヌクレオカプシド類 (rdsRN) を保有するシゲラベクターを、真核細胞発現ベクターpcDNA3.1zeo(+) (Invitrogen) 中にクローニングしたインフルエンザ-A NS1または口タウイルスNSP1のいずれかをコードする配列によってエレクトロポレーションした。生成したシゲラ株は、従って、RNAヌクレオカプシド (rdsRN) 中にGFP遺伝子およびpcDNA中にNSP1またはNS1のいずれかの両者を含んでいた。BHK-21およびHeLa細胞は、GFPおよびNSP1またはNS1発現プラスミド保有シゲラ株に感染させ、または、GFP発現プラスミドのみを保有するシゲラ株に感染させた。16時間後、侵入を受けたHeLa細胞を緑色蛍光について試験し、HeLa細胞溶解物をイムノブロットングによってGFPたんぱく質について分析した。蛍光結果は、GFP遺伝子のみを有するShigella株による侵入を受けた細胞に比較して、GFPたんぱく質の発現がNS1またはNSP1発現プラスミド保有Shigella株の侵入を受けた細胞中で増強していることを示していた (データを示さず)。真核細胞により産生された総たんぱく質のイムノブロットングは、NS1またはNSP1発現プラスミド保有Shigella株の侵入を受けた細胞中でGFP発現が高いことを確認した (図3)。

【0075】

これらの知見は、哺乳類細胞内部における細菌ベクターによるI型インタフェロン応答阻害剤をコードする遺伝子 (例 VAI、NS1またはNSP1) の発現が、問題のたんぱく質 (例 ベータ-ガラクトシダーゼまたはGFP) をコードするトランスジーンの共発現を増強することを示している。この実施例に述べた結果は、問題のたんぱく質の発現増強が、細菌ベースのデリバリシステムを用いてIFN応答を減弱させることによって得ることができることを示す最初のエビデンスである。

【実施例3】

【0076】

組換えShigellaベクターによるI型インタフェロン応答の哺乳類宿主細胞における誘発が、インタフェロンアンタゴニスト類によって抑制される

この実施例では、哺乳類細胞中で菌によって誘発されたインタフェロン刺激遺伝子 (ISGs) の発現を抑制するインタフェロンアンタゴニスト類の能力を述べている。これらの実験で用いたShigella flexneri株は、真核細胞に侵入した後にそれ

を溶解させる染色体変異を有している。このシゲラは、宿主細胞中で十分に長く生存し、エンドサイトーシス小胞を逃れ、インタフェロンアンタゴニスト類を含むプラスミド分子の、哺乳類細胞の細胞質への放出を可能とする。前記 *Shigella* 株は、レポーター遺伝子緑色蛍光たんぱく質 (GFP) をコードする組換えヌクレオカプシドを含みかつ発現させる。この *S. flexneri* 株は、プラスミドベクター pCDNA3.1zeo (+) および pCR-BluntII-TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA) にそれぞれクローニングされたインフルエンザ-A NS1 遺伝子またはアデノウイルスVAI RNA 遺伝子によりエレクトロポレーションした。これらの *S. flexneri* 株は、NS1 遺伝子またはVAI RNA 遺伝子のいずれかを保有し、これらを用いて、哺乳類細胞中における遺伝子発現を調べた。

10

【0077】

実験条件は、下記のものであった：セミコンフルエンスのHeLa細胞単層を、IFN サプレッサー遺伝子を有する *Shigella flexneri* に1時間、感染多重度 (MOI) 100 で37 °C の6ウェルプレート中で暴露させた。細胞を、イーグル最小必須培地 (EMEM) で2回洗浄し、150 µg/ml ゲンタミシン含有EMEMを細胞に対して1時間、添加し、細胞外菌を死滅させた。その後、細胞を2回洗浄し、新鮮EMEMを添加し、侵入細胞を20時間、インキュベーションした。細胞を次にリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で2回洗浄し、総RNAをRNeasyミニキット (Qiagen) により単離した。ヒトインタフェロンおよびレセプターRT² ProfilerTM PCR アレイ (Superarray Biosciences) を利用し、84種のインタフェロン関連遺伝子の発現の上方制御または下方制御を明らかにした。

20

【0078】

結果を、表2に示した。この表からわかるとおり、*S. flexneri* のヒト細胞への侵入は、I型IFNsおよび2'-5'オリゴアデニレートシンターゼ (2'-5' OAS) のようなIFN刺激遺伝子の転写誘発につながった。誘発された遺伝子は、*S. flexneri* によりベクターとしたパッセンジャー核酸の転写と翻訳の阻害に関与している。しかし、図4に示したように、*S. flexneri* のみの侵入を受けた細胞に比較して、インタフェロンアンタゴニストNS1遺伝子を保有する *S. flexneri* の侵入を受けたHeLa細胞は、ISGs発現レベルが低いことを示した。これらの結果は、NS1が哺乳類細胞における細菌誘発ISGs発現を抑制することを明確にしている。

30

【実施例4】

【0079】

インタフェロンアンタゴニストによるインタフェロン刺激遺伝子 (ISGs) 発現の抑制

この実施例は、哺乳類細胞中で菌によって誘発されたインタフェロン刺激遺伝子 (ISGs) の発現を抑制するインタフェロンアンタゴニスト類の能力を述べている。これらの実験で用いた *Shigella* 株は、真核細胞に侵入した後にそれを溶解させエンドサイトーシス小胞を逃れる染色体変異を有し、インタフェロンアンタゴニスト類を含むパッセンジャープラスミド分子の、哺乳類細胞の細胞質への放出を可能とする。*Shigella flexneri* 株NCDは、プラスミドベクター pCDNA3.1zeo (+) および pCR-BluntII-TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA) にそれぞれクローニングしたインフルエンザ-A NS1 遺伝子またはアデノウイルスVAI RNA 遺伝子によりエレクトロポレーションした。NS1 遺伝子またはVAI RNA 遺伝子を保有する *Shigella* 株を用いて、I型IFN応答の誘発と抑制を調べた。

40

【0080】

実験条件は、下記のものであった：セミコンフルエンスのHeLa細胞単層を、IFN サプレッサー遺伝子 (NS1またはVAI) を有する *Shigella flexneri* に1時間、感染多重度 (MOI) 100 で37 °C の6ウェルプレート中で暴露させた。細胞をイーグル最小必須培地 (EMEM) で2回洗浄し、150 µg/ml ゲンタミシン

50

含有新鮮 E M E M を細胞に対して 1 時間、添加し、細胞外菌を死滅させた。その後、H e L a 細胞を E M E M で 2 回洗浄し、新鮮 E M E M を添加し、侵入後前記細胞を 2 0 時間、インキュベーションした。H e L a 細胞を次にリン酸緩衝生理食塩水 (P B S) で 2 回洗浄し、総 R N A を R N e a s y ミニキット (Q i a g e n) により単離した。ヒトインタフェロンおよびレセプター R T ² P r o f i l e r ^{T M} P C R アレイ (S u p e r a r r a y B i o s c i e n c e s) を利用し、8 4 種のインタフェロン関連遺伝子の発現の上方制御または下方制御を明らかにした。表 2 に示したように、S h i g e l l a のヒト細胞への侵入は、非侵入細胞に比較して、I 型 I F N s および 2 ' - 5 ' オリゴアデニレートシンセターゼ (2 ' - 5 ' O A S) のような I F N 刺激遺伝子の転写誘発につながった。しかし、図 4 に示したように、I 型インタフェロンアンタゴニスト N S 1 遺伝子を保有する S h i g e l l a 株の侵入を受けた H e L a 細胞は、S h i g e l l a のみに比較して、細菌誘発 I S G s 発現レベルが低いことを示した。これらの結果は、実際、N S 1 が I S G s の細菌誘発発現を抑制することを明確にしている。同様に、アデノウイルス V A I R N A 遺伝子発現 S h i g e l l a 感染 H e L a 細胞の q R T - P C R 発現研究は、C X C L 1 0 および M X 2 のような I S G s の発現もまた、インタフェロンアンタゴニスト類によって抑制されることを示唆している (図 5) 。上記結果は、I F N 応答阻害の原因となる分子機構を例示しており、それは、細菌ベクターによってコードされた非相同性パッセンジャー遺伝子のより強い発現を可能とする。

【 0 0 8 1 】

これらの結果は、細菌ベクターからの I 型 I F N 応答のウイルスサプレッサー類の発現が、感染細胞の I F N 応答を阻害することを示している。

【 0 0 8 2 】

【 表 2 】

表 2. シゲラ (Shigella) ベクターに入れたパッセンジャー核酸の転写および翻訳阻害に関与する分子の過剰発現 : Shigella 侵入 HeLa 細胞対非侵入 HeLa 細胞

遺伝子記号	誘発倍率
CXCL10	1987
ISG15	30
IF16	40
IF127	225
IFI44L	23
IFIH1	35
IFIT1	25
IFT2	28
IFIT3	30
IFN6	17
IFNB1	12
IFN12B	10
IL 12RG	32
IRF4	9
OAS	13

【 実施例 5 】

【 0 0 8 3 】

I F N アンタゴニストの共発現による改良された細菌ベースのトランスジーン発現デリバリスシステムの構築

プラスミドベクターを、レポーター遺伝子緑色蛍光たんぱく質 (GFP) を発現するように構築した。この GFP 遺伝子は、アクプライム (Accuprime) DNA ポリメラーゼ (Invitrogen, Carlsbad, CA) ならびに HpaI および NotI 制限酵素部位を含むプライマーを用いて、PCR 増幅させた。増幅された配列の大きさは、アガロースゲル電気泳動によって確認し、QIAquick PCR 精製キットを用い製造業者の指示に従って (Qiagen, Cat. No. 28106, Valencia, CA) 精製した。この GFP 遺伝子を、哺乳類発現プラスミド pShooter (Invitrogen, Carlsbad, CA) の HincII および NotI 部位 (New England Biolabs, Beverly, MA) にクローニングした。pShooter ベクター中における発現は、強く構成的なヒト EF-1 プロモータによって駆動される。この実験で用いたインタフェロン耐性遺伝子は、RNA ポリメラーゼ III プロモータによって駆動されるアデノウイルス関連 I (VAI) RNA 遺伝子であった。RNA ポリメラーゼ III プロモータ下流の VAI RNA 遺伝子をコードする遺伝子を、PCR で増幅し、GFP pShooter ベクターの EcoRI 部位にクローニングした。生成した構築体のマップを、図 6 に示した。

10

【0084】

適切な挿入物を保有する組換えプラスミドを同定し、新規プラスミドを pAdgfp と命名した。pAdgfp ベクターを、Shigella flexneri NCD1 株中にエレクトロポレーションした。HeLa 細胞の侵入は、実施例 3 に記載のように実行した。簡単に述べると、VAI 遺伝子の発現増強効果を試験するため、HeLa 細胞に、pAdgfp プラスミド (GFP および VAI をコードする) を有する Shigella flexneri NCD1 株、または GFP のみをコードする pShooter プラスミド (pGFP) を有する Shigella flexneri NCD1 株を侵入させた。24 時間後各ウェルの細胞を溶解させ、GFP 特異的抗血清によるイムノブロットイングにより分析した。結果を図 7 に示した。この図からわかるとおり、GFP 発現の増加が、GFP と抗インタフェロン VAI RNA 遺伝子の両者を含む Shigella が侵入した HeLa 細胞中で観察された。

20

【実施例 6】

【0085】

真核細胞に運搬された時のプラスミドコードベータ - ガラクトシダーゼの、インフルエンザインタフェロン阻害剤 NS1 発現弱毒化 Shigella flexneri による発現増強

30

CMV プロモータの翻訳制御下においてベータ - ガラクトシダーゼコードプラスミド (pCDNA-lacZ) を、Shigella flexneri NCD にエレクトロポレーションした。インフルエンザ A NS1 遺伝子をコードする第二のプラスミド (pEF NS1) も同様に、別の Shigella flexneri NCD 株にエレクトロポレーションした。pEF NS1 ベクター中で、NS1 遺伝子発現は、強い構成的ヒト EF-1 プロモータによって駆動される。Shigella flexneri 株による HeLa 細胞の侵入は、実施例 1 に記載のように行った。簡単に述べると、NS1 遺伝子の抗インタフェロン効果を試験するため、HeLa 細胞に、ベータ - ガラクトシダーゼレポーターベクター (pCDNA3.1/His/lacZ) を含む Shigella flexneri NCD および pEF NS1 ベクターを含む Shigella flexneri NCD によるか、または、Shigella flexneri NCD 株単独 (ベクターなし) で共侵入させた。18 時間後、HeLa 細胞溶解のためおよび細胞抽出物中のベータ - ガラクトシダーゼ活性アッセイのための両者のために、ベータ - ガラクトシダーゼアッセイ試薬類 (Stratagene) を用いた。結果を、表 3 に示した。わかるように、ベータ - ガラクトシダーゼ活性の大幅な増加が、ベータ - ガラクトシダーゼレポーターベクターと NS1 遺伝子の両者を含む Shigella による共侵入を受けた HeLa 細胞で観察された。

40

【0086】

50

【表 3】

表 3. 哺乳類細胞中におけるベータ-ガラクトシダーゼ活性

株	プロモータタイプ	β-ガラクトシダーゼ特異的活性 (OD)
HeLa 対照細胞	NA	0.047
NCD	NA	0.03
NCD pcDNA3.1-lacZ	CMV プロモータ	0.46
NCDpEF-NS1	EF-1αプロモータ	0.050
NCD pcDNA3.1-lacZ+pEFNS1	CMV EF-1 αプロモータ	1.8

10

【実施例 7】

【0087】

インフルエンザインタフェロン阻害剤 NS1 発現弱毒化 *Shigella flexneri* により運搬された時のカプシドでコードされた MTB 抗原 85A の発現

S および M RNA セグメントの両者上で *M. tuberculosis* 抗原 85A を発現する組換えヌクレオカプシドを構築した (51 MS85A)。侵入アッセイは、CMV プロモータの制御下に哺乳類プラスミド上これらのカプシド類 + インフルエンザ NS1 遺伝子を発現する *Shigella flexneri* および抗原 85A を発現する *Shigella flexneri* 株 (pcDNA-85A) を用いて実施した。菌は、28 または 37 において初期対数相になるまで増殖させ、37 で 1 時間、振とうせずにインキュベーションし、*S. flexneri* 強毒性遺伝子の発現を誘発させた。前記菌は、イーグルの最小必須培地 (EMEM) 中に再懸濁させ、37 + 5% CO₂ 中 MOI 100 で、10⁶ 細胞/ウェルで 6 ウェルプレートに接種しておいた BHK 21 細胞と 1 時間インキュベーションした。細胞を PBS で 3 回洗浄し、EMEM + ゲンタミシン (150 μg/ml) とともにインキュベーションし、細胞外菌を全て死滅させた。細胞を次に PBS で 3 回洗浄し、EMEM 培地中で 20 時間インキュベーションした。細胞を PBS で 1 回洗浄し、250 μl の MPER マンリアンプロテインエクストラクションリジェント (Mammalian Protein Extraction Reagent) (Pierce) により溶解させた。各細胞抽出物 30 μl を SDS-PAGE ゲル上に流し、ニトロセルロース膜に移し、抗原 85A に対する抗血清によりイムノプロットした (図 8)。抗原 85A の発現は、28 で増殖させた NS1 遺伝子発現プラスミド (MS85A pNS1) 含有 85A カプシド株 MS85A 中でのみ BHK-21 細胞中に見られた (レーン 3)。pNS1 なしで 28 または 37 で増殖させた MS85A または 37 で増殖させた MS85A pNS1 からは、発現が見られなかった (レーン 1, 2 & 4)。このことは、NS1 たんぱく質の発現が、*S. flexneri* 株によって運搬された組換えヌクレオカプシドによりコードされた抗原の発現に必要であることを示している。

20

30

40

【実施例 8】

【0088】

菌および哺乳類細胞の両者中でインタフェロン耐性遺伝子を発現しかつ哺乳類細胞でのみ問題のたんぱく質を発現させる発現ベクターの構築

HIV-1 のイムノドミナント Gag ペプチドを発現するプラスミドベクターを構築する。600 bp の断片を、合成 gag 遺伝子から PCR 増幅する。配列は、Accuprime DNA ポリメラーゼ (Invitrogen, Carlsbad, CA) および HpaI および NotI RE 部位を含むプライマー類を用いて増幅する。増幅させた配列の大きさは、アガロースゲル電気泳動によって確認し、QIAquick PCR 精製キットを用い製造業者の指示に従って (Qiagen, Cat. No. 28106, V

50

a l e n c i a , C A) 精製した。この 600bp の g a g 遺伝子を、発現ベクタープラスミド p c D N A 3 . 1 z e o (+) (I n v i t r o g e n 、 C a r l s b a d , C A) の E c o R V および N o t I 部位 (N e w E n g l a n d B i o l a b s , B e v e r l y , M A) にクローニングした。適切な挿入物を有する組換えプラスミド類を同定し、新規プラスミドを p G A G 4 X と命名する。

【0089】

インタフェロン耐性遺伝子 (例 N S 1 または N S P 1) をこの p G A G 4 X ベクター中に適切な真核細胞プロモータ (例 S V 40 プロモータ) または原核細胞プロモータ (例 a r g 1 のハウスキーピングプロモータ) または両者の制御下にクローニングし、二重発現ベクターを作製する。 (本文に記載の特定の真核細胞および原核細胞プロモータ配列は、前記ベクターの構築に重大ではなく、当業者は、他の適切なプロモータを思い浮かべであろう。) 従って、この発現ベクターは、細菌および哺乳類細胞の両方でインタフェロン耐性遺伝子を発現する ; しかし、問題のたんぱく質 (例 H I V - 1 の G a g) は、哺乳類細胞中でのみ発現する。この手法は、転写安定性とその後のパッセンジャー R N A / D N A および問題の外来たんぱく質の発現のための他の分子または哺乳類細胞における阻害性 R N A s の翻訳を向上させる。

【実施例 9】

【0090】

I F N 応答を抑制するために遺伝子工学で作製された組換え細菌発現ベクターのワクチンとしての使用

いかなる細菌性の生ベクターワクチンであってもその有効性は、ヒト免疫系に対して十分な外来性抗原を提示し、所望の防御性免疫応答を開始させるその能力にある。しかし、パッセンジャー D N A / R N A 分子は、宿主防御系すなわち I F N 応答により、インビボで不安定になり、その結果、外来性遺伝子の損失と目的とした免疫応答の低下が起こる。この発明は、I F N 防御系を減弱させることによって宿主細胞内部で高レベルの抗原を合成するための解決策を提供する。

【0091】

I F N 耐性および問題の抗原をコードする遺伝子の運搬と発現は、標的細胞 (組織、生体等) に、問題のトランスジーンおよび I 型 I F N 応答のサプレッサーをコードする核酸を保有する非病原性のすなわち弱毒化細菌ワクチンベクターを接種することによって、達成できる。問題の生体応答は、防御性または調節性の免疫応答類 ; 治療応答類 ; および宿主たんぱく質遺伝子発現 (例 s i R N A) の下方制御および遺伝子発現 (例 サイトカイン発現) の上方制御を含むが、それらに限定されない。

【0092】

いったん非病原性のすなわち弱毒化細菌ワクチンベクター株を選択すると、その株を修飾し、インタフェロン応答抑制株として機能させる。このことは、前記株中に 1 種以上の I F N 耐性遺伝子を導入することを含む上記に述べた戦略類を用いて達成される。

【0093】

I 型インタフェロン耐性遺伝子と問題の抗原を含む株を作製するため、インビトロで合成した遺伝子 (類) をエレクトロポレーションによって前記株中に導入し、形質転換体を、組換えプラスミド中に正の選択対立遺伝子 (例 抗生物質耐性または栄養素要求性の補完) を保有しかつ発現させる株の増殖のみを可能とする条件下において固体培地上で単離する。生ベクターによる発現プラスミドの遺伝形質の増強方法は、細菌染色体中における導入変異を補完するように設計されたパッセンジャー核酸の構築を含む。プラスミドベースの補完システムにおいて、細菌の細胞質で複製するプラスミドは、前記細菌が増殖し複製するために必要な重要たんぱく質を発現させる ; このようなプラスミドが損失すると、前記細菌が前記重要たんぱく質を発現する能力を取り去り、細胞死が結果として起こる。 (細菌複製中におけるプラスミド損失という現象はまた “ 隔離後死滅 ” とも称され、その結果、プラスミドを有していない全ての細菌の死が起こる。) このようなシステムは、S a l m o n e l l a t y p h i m u r i u m 中で使用に成功し、アスパルテート - セ

10

20

30

40

50

ミアルデヒドデヒドロゲナーゼ (A s d) をコードする遺伝子 a s d の発現に基づいている (G a l e n ら、G e n e , 1990 ; 49 : 29 - 35)。A s d は、グラム陰性菌中細胞壁の形成に必須の構造成分の合成に関与する重要酵素である。従って、このような重要酵素をコードするプラスミド類がないことは、染色体から A s d を合成できないいかなる細菌にとっても致命的であろう。

【 0 0 9 4 】

投与するこの組換え菌の量は、対象種、ならびに治療しようとしている疾患または状態に応じて、変化する。一般的に、使用した投与量は、生菌体約 10^3 から 10^{11} 、好適には生菌体約 10^3 から 10^9 である。前記 DNA / RNA パッセンジャー分子を保有する細菌ベクターは、一般的に、薬学的に許容できる担体または希釈剤とともに投与される。使用した特定の薬学的に許容できる担体または希釈剤は、本発明にとって重要ではない。希釈剤の例には、リン酸緩衝生理食塩水、ショ糖含有クエン酸緩衝液 (pH 7.0)、重炭酸緩衝液 (pH 10) 単独 (L e v i n e ら、J . C l i n . I n v e s t . , 79 : 888 - 902 ; 1987) ; (B l a c k ら、J . I n f e c t . D i s . , 155 : 1260 - 1265 ; 1987) ; またはアスコルビン酸、ラクトースおよび任意のアスパルテート含有重炭酸緩衝液 (pH 7.0) のような胃中の胃液に対する緩衝作用のための緩衝液 (L e v i n e ら、L a n c e t , I I : 467 - 470 ; 1988) が含まれる。担体の例には、スキムミルク中に見られるもののようなたんぱく質、ショ糖のような糖類またはポリビニルピロリドンが含まれる。典型的には、これらの担体類は、約 0.1 - 90 (w / v) % の濃度で使用されるであろうが、好適には 1 - 10 (w / v) % の範囲である。

【 0 0 9 5 】

ベクター株の生物活性は、適切な動物モデル (例 マウス、ウサギ、モルモット、またはアカゲザル) で評価する。当初、前記細菌ベクター株を用量 10^2 - 10^9 c f u で投与し、適切な経路 (例 E . c o l i , S a l m o n e l l a および S h i g e l l a は、胃中または鼻腔中に投与できる) により投与する。投与回数は、それぞれのベクター株の能力、および問題のコードされた組換え産物の価数に応じて、変化するであろう。

【 0 0 9 6 】

動物モデル中でコードされた産物に対する免疫および他の生物応答を測定する方法は、当業者に周知である。抗原に対する I g G および I g A 応答を測定するため、血清を、ワクチン接種前および接種後 10 , 20 , 30 , 40 , 50 , 60 , 70 および 80 日後に採取する。血液約 400 - 500 μ l を各試験管に採取し、氷上で 4 時間インキュベーションし血餅とする。5 分間ミクロ遠心管中で遠心した後、血清を新しい試験管に移し、-80 で保存する。問題の遺伝子により発現した抗原に対する粘膜 I g G および I g A 応答を、ワクチン接種前および接種後定期的に採取する糞便ペレットおよび膣洗浄物を用いて、決定する (S r i n i v a s a n ら、B i o l . R e p r o d . 53 : 462 ; 1995) ; (S t a a t s ら、J . I m m u n o l . 157 : 462 ; 1996)。標準的 E L I S A を用いて、前記血清および粘膜サンプル中問題の抗原に対する I g G および I g A 応答を定量する (A b a c i o g l u ら、A I D S R e s . H u m . R e t r o v i r . 10 ; 371 ; 1994) ; (P i n c u s ら、A I D S R e s . H u m . R e t r o v i r . 12 : 1041 ; 1996)。マイナス対照抗原として各 E L I S A で卵アルブミンを含めることができる。さらに、各 E L I S A は、プラス対照血清、糞便ペレットまたは膣洗浄サンプルを適切なものとして含むことができる。記載されているように (Y a m a m o t o ら、P r o c . N a t l . A c a d . S c i . 94 : 5267 ; 1997)、コレラトキシン 10 μ g と混合した問題の遺伝子により発現した抗原 10 μ g を経鼻的にワクチン接種した動物から、前記プラス対照サンプルを採取する。終点での力価は、490 nm における吸光度がマイナス対照列の平均プラス 3 標準誤差値を超える増加を示す最終血清希釈の逆数を得ることで、計算する。

【 0 0 9 7 】

細胞免疫は、細胞内サイトカイン染色 (細胞内サイトカインサイトメトリとも称される

10

20

30

40

50

によってまたはELISPOT (Letsch A.ら、Methods 31:143-49; 2003) によって測定することができる。両者の方法とも抗原特異的免疫応答の定量を可能とするが、ただし、ICSは、抗原特異的CD4+およびCD8+T細胞の表現型を特性解析する同時能力を付加する。このようなアッセイは、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10およびIFN- (Wuら、AIDS Res. Hum. Retrovir. 13:1187; 1997) を分泌する抗原特異的T細胞の数を評価する。ELISPOTアッセイは、市販の捕捉および検出mAb (R&D Systems and Pharmingen) を用いて、記載されたように (Wuら、Infect. Immun. 63:4933; 1995) および先に使用されているように (Xu-Amanoら、J. Exp. Med. 178:1309; 1993) ; (Okahashiら、Infect. Immun. 64:1516; 1996)、行う。各アッセイは、マイトジェン (ConA) および卵アルブミン対照を含む。本文に記載の抗IFN細菌ベースデリバリシステムは、IFN耐性遺伝子を有していないデリバリシステムよりもいくつか利点を有している。前記抗原遺伝子は、より高いレベルでかつより長い時間発現され、従って、より活発な免疫応答を誘発する。動物モデル中で有効性を示し無毒性である細菌ベクターを、さらに臨床試験で評価する。

【実施例10】

【0098】

結核ワクチンの開発

BCGバクテリアを本文に記載のとおり遺伝子工学で作製し、1) パッセンジャー遺伝子としての1種以上の結核抗原、および2) 哺乳類宿主細胞I型インタフェロン応答を阻害するかまたはそれに干渉する1種以上の因子、をコードする核酸を含ませる。哺乳類宿主 (例 ヒト) に投与すると、前記の遺伝子工学作製BCGは、宿主細胞に侵入し、エンドソームを逃れ、溶解し、パッセンジャー遺伝子を放出し、前記1種以上の結核抗原を産生する。さらに、前記BCGはまた、宿主細胞IFN応答を阻害する前記1種以上の因子を産生する。前記因子は宿主細胞IFN応答を減弱させるが、それは、そうでない場合にはTB抗原の産生を低下させるであろう。結果として、十分なTB抗原が産生され、その結果、TB抗原に対する明確な免疫応答がおこる。

【0099】

本発明を好適な態様の観点から説明してきたが、当業者は、本発明が付属の請求の範囲の真意と範囲内で修飾して実行できることを認識するであろう。従って、本発明は、上記に記載のような態様に限定されるべきではなく、本文の明細書の真意と範囲の中でその修飾物ならびにその均等物全てを含むことになる。

【産業上の利用可能性】

【0100】

性質を改善した結核ワクチン剤の製造、およびその製造の効率化に有用である。

【図面の簡単な説明】

【0101】

【図1】 - ガラクトシダーゼの真核細胞発現をコードするプラスミドを有するシゲラ・フレクスネリ (Shigella flexneri) NCD1によるHeLaまたはBHK-21細胞 (IFN欠失) の侵入後における細胞溶解物のベータ-ガラクトシダーゼ活性。黒棒は、lacZ遺伝子をコードするプラスミドを有する菌株による侵入後の細胞由来 - ガラクトシダーゼ活性を示し；白棒は、菌株マイナスlacZプラスミドの侵入後における細胞由来の - ガラクトシダーゼ活性を示す。

【図2】 - ガラクトシダーゼをコードするプラスミドを有するShigella flexneri NCD1による侵入後およびPKRのアデノウイルス由来阻害剤 (アデノウイルス関連I、VAI) をコードするShigella flexneri NCD1との共侵入後におけるHeLa細胞溶解物の - ガラクトシダーゼ活性。

【図3】 真核細胞GFPレポーター遺伝子のみ (レーン4) またはGFPプラスNS1 (レーン5) またはNSP1 (レーン2) を有するShigella flexneri株

MPC51による侵入後HeLa細胞中緑色蛍光たんぱく質(GFP)のトランスジーン発現を示すイムノプロット。レーン1：正の対照；レーン3：非侵入HeLa細胞。

【図4】HeLa細胞中IFN- γ 経路に及ぼすNS1たんぱく質の効果。NS1(黒棒)は、シグマ誘発IFN関連遺伝子の発現(灰色棒)を抑制する。

【図5】HeLa細胞中IFN- γ 経路に及ぼすVAI RNA遺伝子の効果。VAI RNA遺伝子(黒棒)は、シグマ誘発IFN関連遺伝子の発現(白棒)を抑制する。

【図6】レポーターベクターをコードするIFN拮抗剤の概略図。IFN拮抗剤遺伝子を、GFPレポーターベクターの骨格にクローニングする。RNAポリメラーゼIIIプロモータ制御下におけるVAI RNA遺伝子の転写のためならびにプロモータPeftaによる宿主細胞によるGFP遺伝子の発現のための単一プラスミド系。

【図7】GFPコードプラスミド(pGFP)またはGFPおよびVAI IFNサプレッサーをコードするプラスミド(pAdgfp)を有するShigella flexneriによるHeLa細胞侵入。GFP発現は、ウサギ抗GFP抗血清を用いるイムノプロット分析により決定した。GFPたんぱく質発現増強が、GFPおよびVAI RNA遺伝子の両者を含むシグマ(pAdgfp)による侵入を受けたHeLa細胞中で観察された。2種の独立した実験の結果を示す。

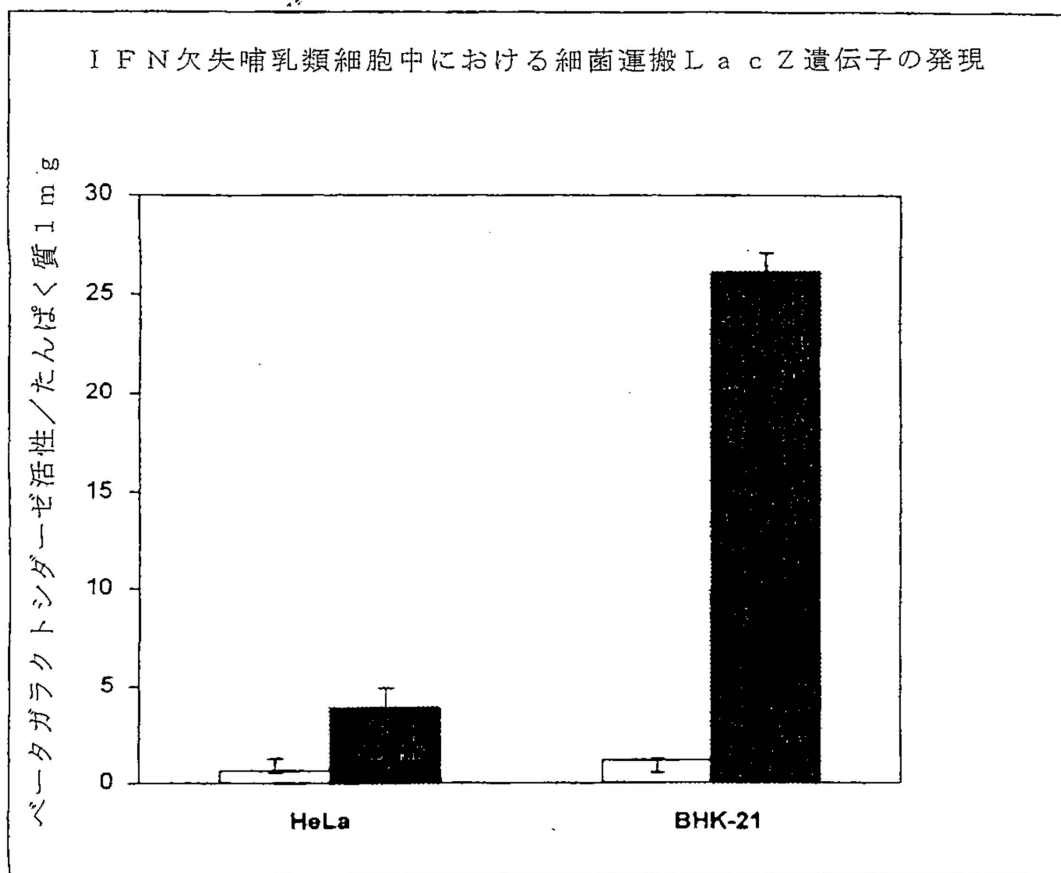
【図8】IFNサプレッサーNS1をコードするプラスミドを有するか有していないMtb抗原85AをコードするRNAを有するシグマによる侵入を受けたBHK21細胞の溶解物のウェスタンブロット。レーン1、51 MS85A 28；レーン2、51 MS85A 37；レーン3、51 MS85A pNS1 28；レーン4、51 MS85A pNSI 37；レーン5、51 MS85A pNSI 37；レーン6、S. flexneri NCD pcDNA-85A；レーン7、MPC51 pLM2653；レーン8、BHK21細胞；レーン9、pcDNA-85A移入BHK21細胞。

【図9】A乃至Cは抗ウイルス免疫応答阻害剤の配列。A、インフルエンザウイルス由来のNS1のDNA配列(SEQ ID NO:1)；B、ロタウイルス由来のNSP1のDNA配列(SEQ ID NO:2)；C、アデノウイルス由来VAIのRNA遺伝子配列(SEQ ID NO:3)。

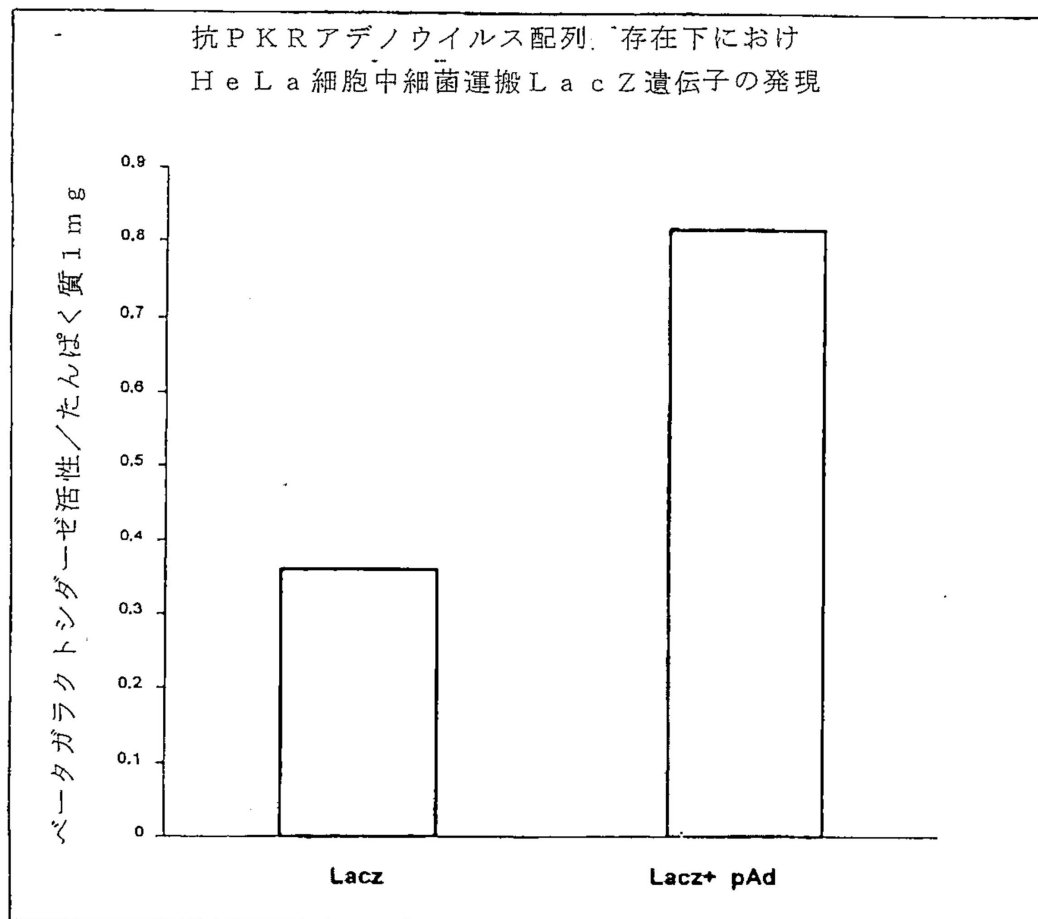
10

20

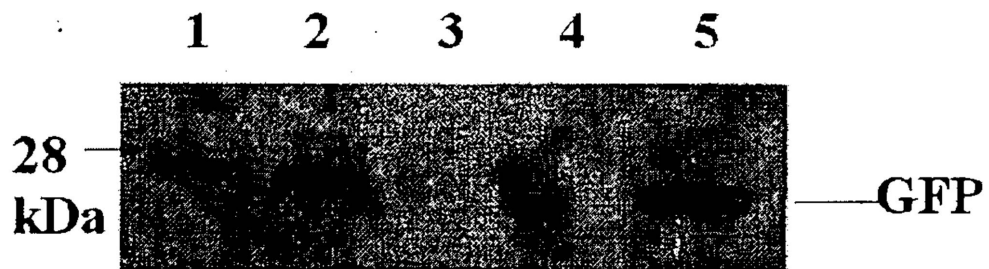
【図 1】



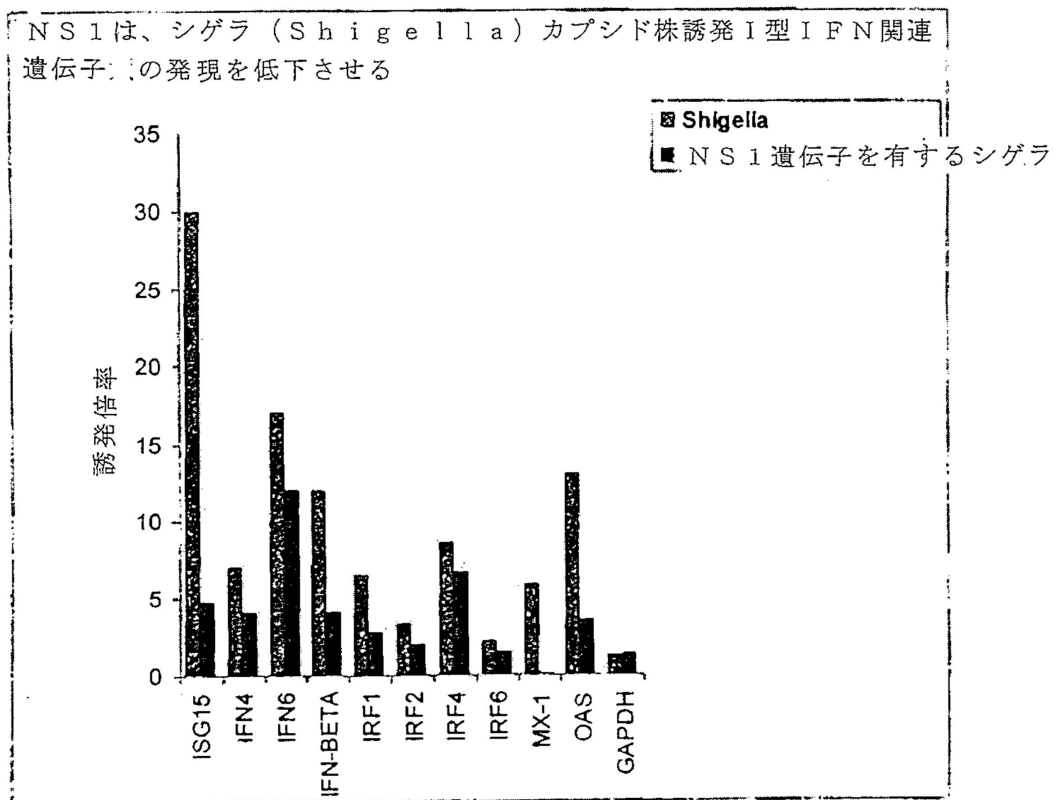
【図 2】



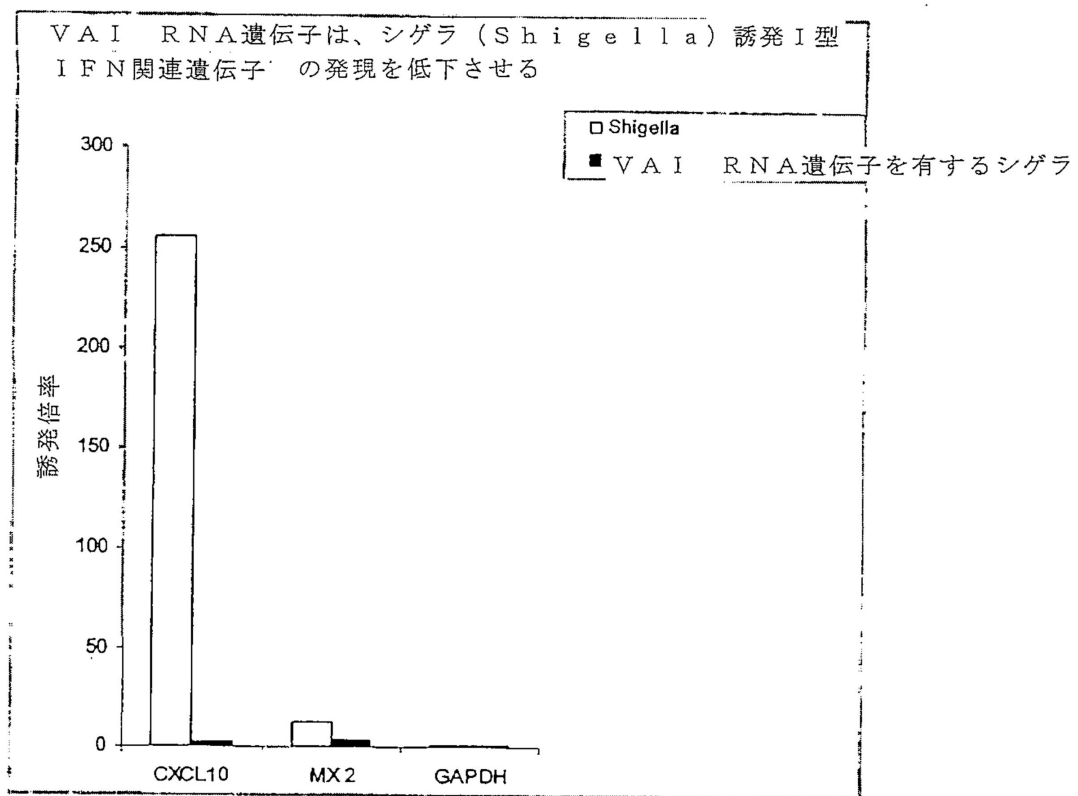
【図 3】



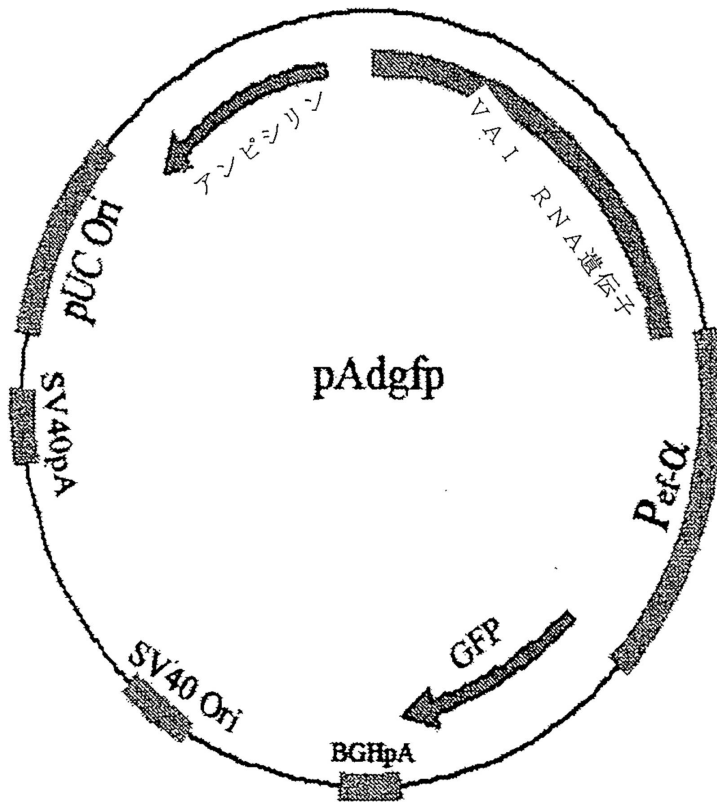
【図4】



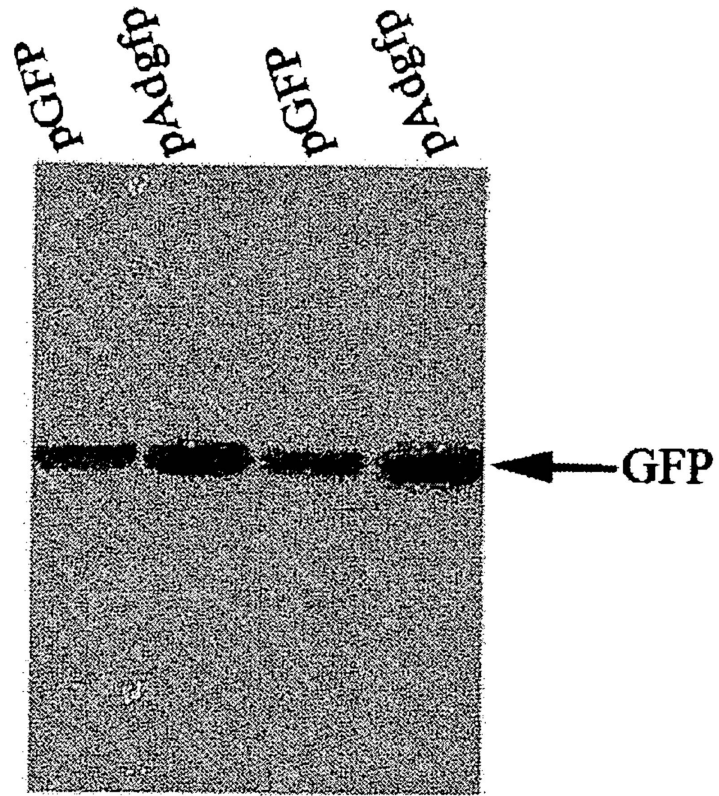
【図5】



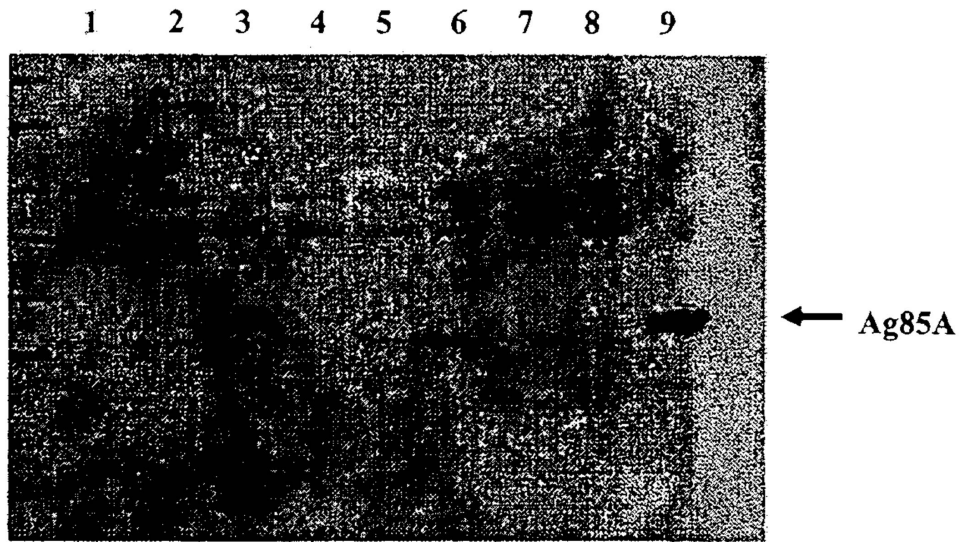
【図 6】



【図 7】



【図 8】



【 図 9 】

ACACGTGCTGGAAAGCAGATAGTGGAGCGGATTCTGAAAGAAGAATCCGATGAGGC
 ACTTAAATGACCATGGCCTCTGTACCTGCGTCGCGTTACCTAACTGACATGACTCTT
 GAGGAAATGTCAAGGGACTGGTCCATGCTCATACCCAAGCAGAAAGTGGCAGGCC
 TCTTTGTATCAGAATGGACCAGGCGATCATGGATAAGAACATCATACTGAAAGCGAA
 CTTCAGTGTGATTTTTGACCGGCTGGAGACTCTAATATTGCTAAGGGCTTTACCCGAA
 GAGGGAGCAATTGTTGGCGAAATTTACCATTGCCTTCTCTCCAGGACATACTGCTG
 AGGATGTCAAAAATGCAGTTGGAGTCCTCATCGGAGGACTTGAATGGAATGATAAC
 ACAGTTCGAGTCTCTGAAACTCTACAGAGATTGCTTGGAGAAGCAGTAATGAGAAT
 GGGAGACCTCCACCTCACTCCAAAACAGAAACGAGAAATGGCGGGAACAATTAGGTC
 AGAAGTTTGA

B.

ATGGCAACCTTTAAGGATGCTTGTGTTTTATTATAGAAGGATTACAAAACCTAAACAGG
 GAATTACTGAGAAATGGAGCAAACTCAGTATGGACTCCAGTTTCTTCAAATAAAATT
 AGAGGATGGTGCATTGAGTGTGTCATTGACTGAATTGACCTTTTGTATGGATGCT
 CATTGGCTCACGTTTGTCAATGGTGCATTCAAAACAAACGTTGCTTCTTAGACAATGA
 ACCACATCTTTTAAAGTTAAGAACCCTTGAATCTCCAATAACAAAGGAAAAATTGCA
 GTGCATTATTGATTTATATAATCTACTATTTCCAATCAGCCCTGGTATCATAAATAGA
 TTTAAAAAAGCAGTTAAACAAAGAAAGTGTAGAAATGAAAGTGATAAATCGTGGTA
 TAATCAATTACTTCCAATTACTCTAAATGCCGCGAGTTTTTAAATTTTATTTCGAGG
 GAAATTTACATTTTTGGATTTTATGAAGGATCATCAGCATGCATAGATTTACCATATA
 GACTTGTAATTTGCATTGACTTATATGATAAATTGCTGTTAGATCAAATAAAATTTGA
 AAGAATGAGTTGTCTCCAGATAAGTTACAATCTATCTATGCAAATAATTATTTTAA
 TTGAGCAGACTTCCTTCAATGAAGTTGAAACAAGTTTATTATTCAGACTTCTCCAAAC
 AAAATTTGATTAATAAGTATAAACTAAGAGTCGCATAGTACTTAGAAATCTGACTG
 AATTCATTGGGATTCTCAAATTGATTTGCATCATGATCTAATCAATAACAAAGATA
 AAATACTTGACGATTATCAACATCATCGTTAAAACAATTGAAACACATGATTTAA
 ATTTAGGAAGAGTAAAAGCTGACATTTTTGAACTTGGACATCATTGCAAACCAAATT
 ATATTTTATCAAATCATTGGCAACCGGCATCAAAAATTTTCCAGTGTAAGTGGTGCA
 ATGTAAAGTATGCATTTAGAGATATGGATTGGAAGATGGAATCAATGTATAATGAAC
 TCTTAAGTTTTCTACAGTCCTGTTACAAAAGTAATGTTAATGTAGGGCATTGTAGTTC
 AATTGAAAGTGTTTATCCACTAGTCAAAGATATGCTTTGGCATTCAATTACAAAATAT
 ATTGATCAAACTAATTGAGAAATTATTTGATGCAATGAATCCGGTGCAAGTGAATGAG
 CAACTTGTAATTAACCTTCTATTGGCAAATAGATATCGCTCTGTACACTCACATCAAAA
 TGATACTAAAACTGAAGCTCTCCGTTTACTTTCACACTTAACCAGTTCAATTCTAT
 AATTAAGGGAATCATTAAACCAATGGTGTGACGTCGCTGAATTGGATCTTTTACCGTT
 ATGCACTGAACAAACCGACAAATTGGTTAACTGAAAGAAGAAGGGAAACTGTCTG
 AAGAGTATGAGCTCCTAATCTCGGATTCCGAAGACGACGACTGA

C.

GGCTCGACTC CGTGGCCTGG AGGCTAAGCG AACGGGTTGG GCTGCGCGTG
 TACCCCGGTTTCAATCTCGA ATCAGGCTGG AGCCGCGAGCT AACGTGGTAC
 TGGCACTCCC GTCTCGACCCAGGCCTGCAC AAAACCTCCA GGATACGGAG
 GCGGGTCG

フロントページの続き

- (72)発明者 ファクルティン - ジャミルディン, モハマド
アメリカ合衆国 メアリーランド州 21703 フレデリック, オーペリン サークル 710
7
- (72)発明者 アナンサ, ラビ ピー.
アメリカ合衆国 メアリーランド州 20877 ゲイザースバーグ, リー ストリート 205
, アpartment 208
- (72)発明者 フルカーソン, ジョン エフ., ジュニア
アメリカ合衆国 メアリーランド州 20901 シルヴァー スプリング, レキシントン ドラ
イブ 207

審査官 名和 大輔

- (56)参考文献 特表2001-521743(JP, A)
米国特許出願公開第2007/0160609(US, A1)
Infect. Immun., 72[10](2004) p.5535-5547

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C12N 15/00 - 15/90
PubMed
CAPLUS/MEDLINE/BIOSIS(STN)
Thomson Innovation