

(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2006-506615

(P2006-506615A)

(43) 公表日 平成18年2月23日(2006.2.23)

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53	(2006.01)	GO 1 N 33/53	Z N A N	4 B O 6 3
A 6 1 K 39/00	(2006.01)	GO 1 N 33/53	D	4 C O 8 5
A 6 1 K 39/108	(2006.01)	A 6 1 K 39/00	J	
A 6 1 K 39/39	(2006.01)	A 6 1 K 39/108		
A 6 1 P 31/00	(2006.01)	A 6 1 K 39/39		
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 29 頁) 最終頁に続く				

(21) 出願番号	特願2004-551102 (P2004-551102)	(71) 出願人	397067152
(86) (22) 出願日	平成15年11月10日 (2003.11.10)		ファイザー・プロダクツ・インク
(85) 翻訳文提出日	平成17年7月6日 (2005.7.6)		アメリカ合衆国コネチカット州グロトン市
(86) 国際出願番号	PCT/IB2003/005103		イースタン・ポイント・ロード
(87) 国際公開番号	W02004/043286	(74) 代理人	100089705
(87) 国際公開日	平成16年5月27日 (2004.5.27)		弁理士 社本 一夫
(31) 優先権主張番号	60/426,421	(74) 代理人	100076691
(32) 優先日	平成14年11月14日 (2002.11.14)		弁理士 増井 忠次
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100075270
			弁理士 小林 泰
		(74) 代理人	100080137
			弁理士 千葉 昭男
		(74) 代理人	100096013
			弁理士 富田 博行
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 ワクチンのためのマーカー抗原として、およびAmphigenと共同的なアジュバントとしての r m L T の使用

(57) 【要約】

本発明は、動物の所有者または動物性食品の生産者が、難なく動物がワクチン接種された状態を確立できる方法を提供する。より具体的には、本発明は、免疫原でワクチン接種された動物を同定する方法であって、免疫原および大腸菌の熱不安定性エンテロトキシンの実質的に非毒性な変異体の組換え体 (r m L T) を含むワクチン組成物を作り；動物対象にワクチン組成物を投与し；そして、免疫原での動物の以前のワクチン接種の指標として、 r m L T に対する特異的な抗体または免疫細胞の動物内での存在を検出することによる、前記方法を提供する。本発明は、免疫原および実質的に非毒性な r m L T を含むワクチン組成物でワクチン接種されたか否かを同定する方法であって、動物が、免疫原での動物の以前のワクチン接種の指標として、 r m L T に特異的な抗体または免疫原の動物内での存在を検出することによる、前記方法を提供する。さらに、本発明は、ワクチン組成物をマークするまたは同定する方法であって、ワクチン組成物に実質的に非毒性な r m L T を含ませ、そのようなワクチン組成物を投与された動物内の抗体または免疫細胞の存在の検出することによる、前記方法を提供する。そのうえ、本発明は、ワクチン組成物において免疫原の免疫防御の効果を増進する方法であって、ワクチン組成物に実質的に非毒性な r m L T を含むことによる、前記方法を提供する。免疫原、実質的に非毒性な r m L T および A M P H I G E N (アンフィゲン) (登録商標) のような水中油型乳剤アジュバントを含有するワクチン組成物も、提供される。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

免疫原でワクチン接種された動物を同定する方法であって、

- a. 前記免疫原、および実質的に非毒性な大腸菌の熱不安定性エンテロトキシンの変異体である組換え体 (r m L T) を含むワクチン組成物を提供し；
- b. 動物対象に前記ワクチン組成物を投与し；そして
- c. 前記動物における前記 r m L T に特異的な抗体または免疫細胞の存在を検出し、それにより前記ワクチン調製液でワクチン接種された前記動物を同定することを含む、前記方法。

【請求項 2】

免疫原および実質的に非毒性な r m L T を含むワクチン組成物でワクチン接種された動物を同定する方法であって、前記動物において、前記 r m L T に特異的な抗体または免疫細胞の存在の検出することを含む、前記方法

10

【請求項 3】

免疫原を含有するワクチン組成物をマークしまたは同定する方法であって、

- a. 前記ワクチン組成物に、実質的に非毒性な r m L T を添加し；
- b. 動物に前記ワクチン組成物を投与し；そして
- c. 前記動物における前記 r m L T に特異的な抗体または免疫細胞の存在を検出し、それにより前記ワクチン組成物を同定することを含む、前記方法。

20

【請求項 4】

前記動物が、ウシ、ヒツジ、ブタおよび鳥類からなる群より選択された食用動物である、請求項 1 - 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5】

前記免疫原が、不活性化された全体または一部のマイコプラズマ・ハイオニューモニエ (M y c o p l a s m a h y o p n e u m o n i a e) の細胞調製液を含んでなる、マイコプラズマ・ハイオニューモニエ免疫原である、請求項 1 - 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

前記 r m L T が、192 番目のアミノ酸部位での G l y の A r g への置換、または 211 番目のアミノ酸部位での A l a の L e u への置換を少なくとも 1 つを含む、請求項 1 - 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

30

【請求項 7】

前記 r m L T に特異的な前記抗体が、前記動物の血液もしくはミルク中、または処理後の前記動物からの肉汁中に検出される、請求項 1 - 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8】

前記抗体が、前記 r m L T の A サブユニットのペプチド断片を使用した免疫アッセイで検出され、前記ペプチド断片が、配列番号 1 - 9 のいずれか 1 つから選択される、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

動物への投与のための、ワクチン組成物中の免疫原の免疫防御的效果を増強する方法であって、前記ワクチン組成物に実質的に非毒性な r m L T を添加することを含んでなる、方法。

40

【請求項 10】

水中油型乳剤のアジュバントがワクチン組成物にさらに追加される、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

前記水中油型乳剤のアジュバントがアンフィゲン (A M P H I G E N) (登録商標) である、請求項 10 に記載の方法

【請求項 12】

50

前記免疫原が、不活性化された全体または一部のマイコプラズマ・ハイオニューモニエの細胞調製液を含んでなる、マイコプラズマ・ハイオニューモニエ免疫原である、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 13】

前記 r m L T が、192 番目のアミノ酸部位での G l y の A r g への置換、または 211 番目のアミノ酸部位での A l a の L e u への置換を少なくとも 1 つを含んでなる、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 14】

免疫原、実質的に非毒性な r m L T、および水中油型乳剤のアジュバント含んでなる、動物に投与するためのワクチン組成物。

10

【請求項 15】

前記免疫原が、不活性化された全体または一部のマイコプラズマ・ハイオニューモニエ細胞調製液を含んでなる、マイコプラズマ・ハイオニューモニエ免疫原であり、前記 r m L T が、192 番目のアミノ酸部位での G l y の A r g への置換、または 211 番目のアミノ酸部位での A l a の L e u への置換を少なくとも 1 つを含んでなり、前記水中油型乳剤のアジュバントがアンフィゲン (A M P H I G E N) (登録商標) である、請求項 14 のワクチン組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

20

本発明は、ワクチンのためのマーカー抗原として、大腸菌の熱不安定なエンテロトキシンの、実質的に非毒性な変異体の使用に関する。本発明は、さらに大腸菌の熱不安定なエンテロトキシンの非毒性な変異体、および免疫原の免疫防御的効果を増進するために、ワクチンにアジュバントとしてのアンフィゲン (A M P H I G E N) (登録商標) の使用に関する。免疫原、実質的に非毒性な r m L T、およびアジュバント (アンフィゲン (登録商標) のような) を含むワクチンの組成物も、本発明により提供される。

【背景技術】

【0002】

微生物が原因となる感染からウシやブタなどの有用な動物を守るため、多くのワクチンが、近年開発され販売されている。しかしながら、動物のワクチン接種歴は、常に動物の付属文書に記録されとは限られない。免疫原への動物特異的な抗体の存在の検出は、動物が、製品ラベルの指示、規定された指針または指令書、および取扱説明書に従ってワクチン接種されたか否かを同定することにしばし決定的ではない。それゆえに、そこには動物のワクチン摂取状況を同定するため方法を開発する必要性が存在する。

30

【0003】

腸管毒素産生大腸菌株は、エンテロトキシンの産生を通じて下痢および腸の障害を引き起こす。これらの毒素は 2 種類あり、そのうちの 1 つは 100 での処理で生き残るので、熱耐性毒素 (S T) と言われている。二つ目の毒素は熱に不安定 (L T) で、コレラ毒素に非常に類似する。L T は 1 つの A サブユニットと、5 つの同一の B サブユニットからなる。A サブユニットは毒素の生物学的および酵素的な活性に重要であるが、その標的受容体に単独では結合できない。B サブユニットは腸上皮細胞に結合しすることで作用し、それにより A サブユニットの侵入を促進する。A サブユニットは細胞膜に侵入し、G T P 結合タンパクの N A D 依存的 A D P リボース化によるアデニル酸シクラーゼの活性化を引き起こす。この作用の臨床的効果は、腸内への大量の液体の分泌を引き起こす。

40

【0004】

L T のバクテリア染色体型は、P i c k e t t C . L . らにより同定され配列が決められた (J . B a c t e r i o l . 169 , 5180 - 5187 , (1987)) 。努力により、腸管毒素原性バクテリアに対して防御的免疫応答の誘導ができる無毒化した L T 毒素の開発がされた。H a r f o r d ら (E u r . J . B i o c h e m . 183 : 311 , 1989) は、ブタの病原性 L T の A サブユニットにおける、S e

50

r - 61 - Phe置換、およびGly - 79 - Lys置換を含有する、トキシイドの産生を記載した。Tsujira (J. Biol. Chem. 265: 22520, 1990) は、毒性に影響を及ぼすが、タンパク質の免疫原性が変化しない、Glu - 112 - Lysの単一置換をAサブユニット中に含有する変異体LTを記載する。Clementsの米国特許6,019,982は、Aサブユニット中に、Arg - 192 - Gly、単一置換を含有する、実質的に非毒性な変異体LTを記載する。Clementsに対する米国特許6,033,673は、Aサブユニットの、Arg - 192 - Glyの置換、およびLeu - 211 - Alaの置換を含有する、実質的に非毒性な変異体LTを記載する。Domenighiniらに対する米国特許6,149,919においては、Arg - 7、Asp - 9、Arg - 11、His - 44、Arg - 54、Ser - 61、His - 70、His - 107、Glu - 110、Glu - 112、Ser - 114、Trp - 127、Arg - 146、またはArg - 192の1つまたはそれより多くの置換を含有する、無毒化された、免疫原性のある変異体LTタンパクを記載する。

10

【0005】

免疫原であることに加えて、LTはアジュバント活性を持つことも報告された。Tumuraらの米国特許5,182,109号は、鼻腔内に投与されたLTは、共に投与した抗原に対する抗体の力価を増強したことを記載する。Clementsらは、また無関係な抗原と経口的に投与した時の、LTのアジュバント活性も実証した (Vaccine 6: 269 - 277, 1988; Abstract No. B91, 88th Ann. Meet. Am. Soc. Microbiol., 1988)。米国特許6,019,982および米国特許6,033,673はいずれも、無関係な抗原と経口的に投与したとき、実質的には非毒性であるが野生型LTのアジュバント活性を保持する、変異体LTタンパク質を記載する。

20

【0006】

本発明以前は、ワクチンのマーカー抗原として、またはアンフィゲン（登録商標）のような水中油型乳剤と共同的なアジュバントとしての、実質的に非毒性な変異体LTの使用の報告はされていなかった。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

30

発明の概要

1つの態様において、本発明は、免疫原でワクチン接種された動物を同定する方法であって、免疫原および大腸菌の熱不安定性エンテロトキシンの実質的に非毒性な変異体の組換え体 (rmLT) を含むワクチン組成物を形成し；動物対象へワクチン組成物を投与し；そして、免疫原での以前の動物のワクチン接種の指標として、rmLTに対する特異的な抗体または免疫細胞の動物内での存在を検出する工程を含む前記方法を提供する。

【0008】

もう1つの態様において、本発明は、動物が免疫原および実質的に非毒性なrmLTの組換え体を含むワクチン組成物でワクチン接種されたか否かを同定する方法であって、そのワクチン組成物での以前の動物のワクチン接種の指標として、rmLTに対する特異的な抗体または免疫細胞の動物内での存在の検出することによる、前記方法を提供する。

40

【0009】

さらにもう1つの態様において、本発明は、免疫原を含有するワクチン組成物をマークするまたは同定するための方法であって、ワクチン組成物にマーカー抗原として実質的に非毒性なrmLTを含み、そして、次いでワクチン組成物でワクチン接種された動物におけるrmLT特異的な抗体または免疫細胞の存在を検出することによる、前記方法を提供する。

【0010】

さらなる態様において、本発明は、ワクチン組成物にアジュバントとして実質的に非毒性なrmLTを含むことにより、ワクチン組成物中の免疫原の免疫防御的效果を増強する

50

方法を提供する。好ましくは、ワクチン組成物は、アンフィゲン（登録商標）などの水中油型乳剤のアジュバントを含む。

【0011】

免疫原、実質的に非毒性な r m L T、およびアンフィゲン（登録商標）などのアジュバントを含むワクチン組成物も、また、本発明によって提供される。

【課題を解決するための手段】

【0012】

発明の詳細な説明

本発明は、動物の所有者または動物性食品生産者が、容易に動物のワクチン接種された状態を確立し、動物が製品ラベルの指示、規定された指針または指令書、および取扱説明書に従ってワクチン接種されたか否かを同定することができる方法を提供する。

10

【0013】

1つの態様において、本発明は、免疫原でワクチン接種された動物を同定する方法を提供する。そのような方法は、免疫原および大腸菌の熱不安定性エンテロトキシンの実質的に無毒な変異体の組換え体（r m L T）を含むワクチン組成物を提供し；動物対象へのワクチン組成物の投与し；そして、免疫原での動物の以前のワクチン接種の指標として、r m L Tに対して特異的な抗体または免疫細胞の動物内での存在を検出する、工程を含む。

【0014】

もう1つの態様において、本発明は、動物が免疫原および実質的に無毒な r m L T の変異体を含むワクチン組成物でワクチン接種されたか否かを同定する方法を提供する。その同定は、そのワクチン組成物での動物の以前のワクチン接種の指標として、r m L T に対して特異的な抗体または免疫細胞の動物内での存在の検出に基づく。

20

【0015】

さらにもう1つの態様において、本発明は、免疫原を含有するワクチン組成物をマークするまたは同定するための方法であって、ワクチン組成物にマーカー抗原として実質的に非毒性な r m L T を含ませ、そして、次いでワクチン組成物でワクチン接種された動物における r m L T 特異的な抗体または免疫細胞の存在を検出することによる、前記方法を提供する。

【0016】

さらなる態様において、本発明は、ワクチン組成物にアジュバントとして実質的に非毒性な r m L T を含むことにより、ワクチン組成物の免疫原の免疫防御的效果を増強する方法を提供する。好ましくは、ワクチン組成物は、またアンフィゲン（登録商標）などの水中油型乳剤のアジュバントを含む。

30

【0017】

免疫原、実質的に非毒性な r m L T、およびアンフィゲン（登録商標）などのアジュバントを含むワクチン組成物もまた、本発明によって提供される。

明瞭な開示のために、限定の手段ではないが、発明の詳細な説明は、発明の特定の特徴、態様、または応用を記載しまたは説明する、続くサブセクションに分割する。

【0018】

定義および略称

40

本明細書で使用される「動物」および「動物対象」の用語は、ウシ、ヒツジ、ブタ、および鳥類などの食用動物を含む、すべての非ヒト動物を言う。

【0019】

本明細書で使用される「ウシ」の用語は、非限定的に去勢牛（s t e e r）、雄牛（b u l l s）、雌牛（c o w s）および仔牛（c a l v e s）を含む、ウシ属動物を言う。

本明細書で使用される「L T」の用語は、大腸菌の熱不安定性エンテロトキシンを言う。L T は、1つの A サブユニットと5つの同一の B サブユニットからなる。B サブユニットは、腸上皮細胞への結合し、それにより A サブユニットの侵入を促進する。A サブユニットは、細胞膜に侵入し、そして G T P 結合タンパクの N A D 依存的 A D P リボース化によるアデニル酸シクラーゼの活性化を引き起こす。A および B サブユニットは、L T 遺伝

50

子にコードされ、LT遺伝子中でBサブユニットをコードする部分は、Aサブユニットをコードする部分に近接し、そして下流にあたる。

【0020】

「野生型LT」の用語は、自然に発生する毒性の大腸菌の熱不安定性エンテロトキシンを言う。ある動物種に対して病原性があり、そしてその動物種から単離された大腸菌により作られた野生型LTは、他の動物種に病原性があり、そしてその他の種の動物から単離された大腸菌により作られた、他の野生型のLTとアミノ酸配列でわずかに異なる場合がある。Domenighiniらの米国特許6,149,919を参照されたい。

【0021】

「mLT」の用語は、自然発生したLTの変異体型で、一般に遺伝子工学により作製されたものを言う。 10

「rmLT」の用語は、自然発生したLTの組換えにより作製された変異体型を言う。

【0022】

rmLTに関連して使われる「実質的に非毒性」の用語は、野生型のものと比べて実質的により低い毒性を意味する。「実質的に低い」によっては、rmLTは、野生型LTに比べて2%以下、望ましくは1%、さらに望ましくは0.1%の毒性を持つことを意味する。毒性は、Y1細胞または野生型LTの影響を受けやすい他の細胞種および細胞株の誘導された形態変化の評価で測定されることが可能である。Y1細胞は、LTを含む溶液で処理すると顕著に丸くなる副腎腫瘍上皮細胞である(Yasamura Cancer res. 26: 529-535, 1966)。あるいは、毒性は、Clement 20
sへの米国特許6,019,982に記載されるように、実験マウスにおいてrmLTにより誘導される体液分泌を評価することにより評定することもできる。

【0023】

「ワクチン組成物のマークするまたは同定する」は、ワクチン組成物が、成分として実質的に非毒性のrmLTを有することにより同定可能にでき、結果としてそのワクチン組成物を投与された動物は、血清中におけるその動物のrmLTに特異的な抗体または免疫細胞の存在の検出することにより、同定されることが可能であることを意味する。

【0024】

本明細書で使用される「免疫細胞」の用語は、免疫応答の開始および指揮に關与する動物の免疫系の細胞を言い、特にT細胞およびB細胞を含む。 30

抗体または免疫細胞と関連して使われる「rmLTに特異的」の用語は、rmLTまたはrmLTの一部もしくは断片を認識し反応するが、ワクチン組成物の無関係な抗原もしくは免疫原、またはそのような免疫原もしくは無関係な抗原の一部は認識し反応しない、抗体および免疫細胞を意味する。

【0025】

タンパク質またはポリペプチドと関連して使われる「一部」および「断片」の用語は、少なくとも7または8アミノ酸の長さのポリペプチド配列を言う。

本明細書で使用される「免疫原」の語は、動物における免疫原性のLTまたはrmLTに無関係の抗原または組成物のいずれかを言う。

【0026】

免疫原または組成物と関連して使われる「免疫原性」の用語は、動物における免疫原および組成物（または組成物の成分）への免疫応答を引き起こす、免疫原または組成物の能力を意味する。免疫応答は、主として細胞障害性T細胞により仲介される細胞性免疫応答、または主としてヘルパーT細胞を仲介し、次にそのヘルパーT細胞がB細胞を活性化して抗体産生に至る体液性免疫応答であってよい。

【0027】

「免疫原の免疫防御的効果の増強する」は、免疫原により誘導される防御的免疫応答が大きさにおいて（たとえば、抗体産生の増加）、持続時間において（たとえば、検出できる抗体が存在する総時間）、または種類において（たとえば、新たな抗体のアイソタイプまたはサブタイプの産生）のいずれかで増進されることを意味する。免疫原により誘導さ 50

れる免疫応答における増強は、当業者により難なく同定される。

【0028】

r m L T の調製

本発明の方法およびワクチン組成物の使用に適した r m L T は、実質的に非毒性、すなわち野生型 L T と比較して実質的に低い毒性を示すが、野生型 L T の免疫学的特性（免疫原性およびアジュバント活性など）を保持したものを含む。実質的により低い毒性とは、ワクチン組成物に使用される r m L T が下痢などの重大な副作用を招くことなく、十分に低いものであるべきである。「実質的により低い」は、r m L T が野生型 L T の 2 %、または好ましくは 1 %、またはさらに好ましくは 0.1 % 以下の毒性を有することを意味する。

10

【0029】

変異体 L T (m L T) は、野生型 L T 遺伝子配列中に 1 つまたはそれより多くのヌクレオチド変化を導入することで作製され、その結果 A または B サブユニットのアミノ酸の 1 つまたはそれより多くの置換、欠失、フレームシフト変異体、または切断が生じる。野生型 L T の配列が当該技術分野で知られている。たとえば、Domenighiniらの米国特許 6,149,919 を参照されたい。ランダムな突然変異誘発または部位特異的突然変異誘発のいずれかによる、遺伝子配列のヌクレオチド変化を導入する方法もまた、当該技術分野でよく知られており、Sambrookら(2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第3版 Cold Spring Harbor Laboratory Press: ニューヨーク州コールドスプリングハーバー、に一般的に記載されている。

20

【0030】

好ましくは、変異体 A サブユニットを作製するために、1 つまたはそれより多くのヌクレオチド変化が、A サブユニットをコードする配列に導入される。本発明において、A サブユニットの好ましい変異体は以下のアミノ酸部位に 1 つまたはそれより多くの置換を含む: Arg - 7、Asp - 9、Arg - 11、His - 44、Arg - 54、Ser - 61、His - 70、His - 107、Glu - 110、Glu - 112、Ser - 114、Trp - 127、Arg - 146、および Arg - 192。アミノ酸部位は、Domenighiniらの米国特許 6,149,919 に開示される A サブユニット、LT1-1A、のアミノ酸配列に基づいて数えられる。とりわけ好ましい変異体 A サブユニットは、Clementsの米国特許 6,019,982 に記載されるように、たとえば Arg - 192 - Gly などの、Arg - 192 の置換を含む。もう 1 つの好ましい変異体 A サブユニットは Arg - 192 の置換、並びにたとえば Leu - 211 などのもう 1 つのアミノ酸部位の置換を含む。そのような二重の変異体の例は、Clementsの米国特許 6,033,673 に記載されているような、R192G - L221A である。

30

【0031】

望ましい変異体を含む L T 遺伝子配列は、大腸菌株のような適切な宿主細胞において変異体 L T の組換え発現をできるベクターに置かれる。高レベルの発現を達成するために、強力なプロモーターが、L T 遺伝子の天然のプロモーターの代わりに使用可能である。たとえば、米国特許 6,019,982 は、天然の L T プロモーターの制御下で野生型 L T を発現する組換えプラスミド、pDF82、および lac プロモーター下で r m L T R192G を発現する組換えプラスミド、pBD95 (ATCC 寄託番号 69683) を記載する。産生された組換え変異体タンパク質は、次いで任意の周知な精製手順を使用して精製可能である。

40

【0032】

r m L T の非毒性は、たとえば Clements の米国特許 6,019,982 に記載されているように、その Y1 細胞の形態変化の誘導を欠くこと、またはその実験マウスの最終的な液体分泌の誘導を欠くことにより立証可能である。

【0033】

マーカー抗原としての r m L T の使用

50

1つの態様において、本発明は、免疫原でワクチン接種された動物を同定する方法であって、免疫原および実質的に非毒性な r m L T の両方を含むワクチン組成物を提供し；動物対象にワクチン組成物を投与し；そして、免疫原でワクチン接種された動物の指標として、動物において r m L T に特異的な抗体および免疫細胞の存在を検出する方法を提供することによる、前記方法を提供する。

【0034】

もう1つの態様において、本発明は、動物が免疫原および実質的に非毒性な r m L T を含有するワクチン組成物でワクチン接種されたか否かを同定する方法であって、ワクチン組成物でワクチン接種された動物の指標として、動物において r m L T 特異的な抗体または免疫細胞の存在を検出することによる、前記方法を提供する。

10

【0035】

さらにもう1つの態様において、本発明は、免疫原を含有するワクチン組成物をマークするまたは同定するための方法であって、マーカー抗原としてワクチン組成物に実質的に非毒性な r m L T を含むことによって、そして次いでワクチン組成物を投与された動物における r m L T 特異的な抗原または免疫細胞の存在を検出することによる、前記方法を提供する。

【0036】

本発明の使用に適切な免疫原は、以下のものから調製された抗原を含む；マイコプラズマ ハイオニューモニエ (*Mycoplasma hyopneumonia*)、ヘモフィルス ソムナス (*Haemophilus somnus*)、ヘモフィルス パラスイス (*Haemophilus parasuis*)、ボルデテラ ブロンチセプティカ (*Bordetella bronchiseptica*)、アクチノバチルス プレウロニューモニエ (*Actinobacillus pleuropneumonie*)、パストレラ ムルトシーダ (*Pasteurella multocida*)、マンヘミア ヘモリティカ (*Manheimia hemolytica*)、マイコプラズマ ボビス (*Mycoplasma bovis*)、マイコプラズマ ガラナシウム (*Mycoplasma galanacium*)、マイコバクテリウム ボビス (*Mycobacterium bovis*)、マイコバクテリウム パラツベルクロシス (*Mycobacterium paratuberculosis*)、クロストリジウム属の種 (*Clostridial spp.*)、ストレプトコッカス ウベリス (*Streptococcus uberis*)、ストレプトコッカス スイス (*Streptococcus suis*)、スタフィロコッカス アウレウス (*Staphylococcus aureus*)、エリシペロトリックス ルソパトイエ (*Erysipelothrix rhusopathiae*)、カンピロバクター属の種 (*Campylobacter spp.*)、フソバクテリウム ネクロフィラム (*Fusobacterium necrophorum*)、エシェリキア コリ (*Escherichia coli*)、サルモネラ エンテリカ セロバルス (*Salmonella enterica serovars*)、レプトスピラ属の種 (*Leptospira spp.*) などの病原性バクテリア；カンジダ (*Candida*) などの菌類；クロプトスポリジウム パルバム (*Cryptosporidium parvum*)、ネオスポラ カニウム (*Neospora canium*)、トキソプラズマ ゴンデイ (*Toxoplasma gondii*)、アイメリア属の種 (*Eimeria spp.*) などの原生動物；オステルタジア属 (*Ostertagia*)、クーベリア属 (*Cooperia*)、捻転胃虫属 (*Haemonchus*)、ファスキオラ属 (*Fasciola*) の蠕虫、の不活性化された全体もしくは一部の細胞調製液の形で、または遺伝子組換え技術もしくは化学合成により得られる抗原性の分子の形のいずれかのもの。さらなる免疫原は、ウシヘルペスウイルス - 1, 3, 6、ウシウイルス性下痢ウイルスタイプ1および2、ウシパラインフルエンザウイルス、ウシ呼吸器合胞体ウイルス、ウシ白血病ウイルス、牛痘ウイルス、脚および口疾患ウイルス、狂犬病ウイルス、豚痘ウイルス、アフリカ豚痘ウイルス、ブタパルボウイルス、PRRSウイルス、ブタサーコウイルス、インフルエンザウイルス、ブタ水疱性疾患ウイ

20

30

40

50

ルス、テクネ熱ウイルス (T e c h e n f e v e r v i r u s)、偽性狂犬病ウイルス、の不活性化された全体もしくは一部のウイルス調製液の形で、または遺伝子組換え技術もしくは化学合成により得られる抗原性分子の形のいずれか、などの病原性ウイルスを含む。

【 0 0 3 7 】

好ましい免疫原はマイコプラズマ ハイオニューモニエ (M y c o p l a s m a h y o p n e u m o n i a e) (あるいはM . h y o) 免疫原であり、即ち動物において抗原に対する免疫反応を誘導できる、M . h y o から調製された抗原である。

【 0 0 3 8 】

本発明で使用可能であるM . h y o 免疫原は、たとえば不活性化された全体もしくは一部のM . h y o 調製液、1つもしくはそれより多くのM . h y o 由来ポリペプチド、またはそのようなポリペプチドの免疫原性断片、または1つもしくはそれより多くのM . h y o 由来ポリペプチドをコードする1つもしくはそれより多くのM . h y o 核酸、またはその免疫原性断片を含んでもよく、ここで核酸は動物内の i n v i v o で発現することができる。

【 0 0 3 9 】

本発明の方法の使用に好ましいM . h y o 免疫原は、M . h y o バクテリンである。

M . h y o バクテリンは、M . h y o 分離株から調製できる。多くのM . h y o 分離株が当業者に知られており、たとえば American Type Culture Collection、10801 University Boulevard、ヴァージニア州マナッサス 20110 - 2209 から入手できる。これらはたとえば：ATTC NO. 25095、25617、25934、27714、および27715を含む。M . h y o 分離株は、また知られた技術を使用して自然にまたは実験的に肺病変に感染した動物 (たとえば、ブタ) から直接入手可能である。M . h y o バクテリンを入手するために、M . h y o 分離株の細胞は、たとえば米国特許 5,565,205 に記載の二元エチレンイミン (b i n a r y e t h y l e n e i m i n e) (B E I)、あるいはホルマリン、熱、ベータプロプリオラクトン (B P L)、照射またはグルタルアルデヒドのような多くの知られた方法を使用して不活性化可能である。

【 0 0 4 0 】

本発明の方法に免疫原としての使用に適したM . h y o バクテリンは、また多くの商業的ソースを通じて入手可能である。そのようなソースは、限定されないが、RESPIFEND (Fort Dodge、American Home Products)、HYORESP (Merial Ltd)、M+PAC (Schering Plough)、PROSYSTEM M (Intervet)、INGLEVAC M (Boehringer)、RESPISURE (登録商標) (Pfizer Inc.)、RESPISURE ONE^{T M}、STELLAMUNE^{T M} Mycoplasma (Pfizer Inc.)、および STELLAMUNE ONE^{T M} Mycoplasma (Pfizer Inc.) を含む。

【 0 0 4 1 】

本発明の方法の使用に好ましいM . h y o バクテリンのソースは、RESPISURE (登録商標) (Pfizer Inc.)、RESPISURE ONE^{T M} (Pfizer Inc.)、STELLAMUNE^{T M} Mycoplasma (Pfizer Inc.)、および STELLAMUNE ONE^{T M} Mycoplasma (Pfizer Inc.) である。

【 0 0 4 2 】

本発明の方法の使用に特に好ましいM . h y o バクテリンのソースは、好ましくはB E I 処理により不活性化された、Purdue University、米国、から入手された、P - 5722 - 3 (NL1 042) 株を含有するRESPISURE ONE^{T M} (Pfizer Inc.) である。

【 0 0 4 3 】

10

20

30

40

50

本発明に本方法の使用に適したM・hyo免疫原はまた、限定はされないが、P46, P65, P97, P102, P70, P50およびP44などのM・hyoポリペプチド、またはそのようなポリペプチドの免疫原性断片を含む。好ましくは、M・hyoポリペプチドの免疫原性断片は、少なくとも7または8、好ましくは少なくとも25、より好ましくは少なくとも50アミノ酸の連続した部分のポリペプチドを含む。

【0044】

あるいは、M・hyo免疫原は、限定はされないが、P46, P65, P97, P102, P70, P50およびP44などのM・hyoポリペプチド、またはそのようなポリペプチドの免疫原性断片をコードする核酸分子を含む。

【0045】

本発明において、免疫原およびrmLTマーカー抗原は、ワクチン組成物を作るために獣医学的に許容できる担体と組み合わせられる。「獣医学的に許容できる担体」の用語は、溶媒、分散媒、コート剤、アジュバント、安定剤、希釈剤、保存料、抗菌および抗真菌剤、等張剤、吸収遅延剤などのいずれかおよびすべてを含む。希釈剤は、水、生理食塩水、デキストロース、エタノール、グリセロールおよび同種のものを含んでよい。等張剤は、特に塩化ナトリウム、デキストロース、マンニトール、ソルビトール、およびラクトースを含んでもよい。安定剤は、特にアルブミンを含む。

【0046】

本発明における使用に適したアジュバントは、限定されないが、RIBIアジュバントシステム(Ribi Inc.)、ミョウバン、水酸化アルミニウムゲル、コレステロール、アンフィゲン(登録商標)(Hydronics, 米国)などの水中油型乳剤;たとえばフロイント完全および不完全アジュバントなどの油中水型乳剤;ブロック共ポリマー(CytRx、ジョージア州アトランタ);SAF-M(Chiron、カリフォルニア州エメリービル);たとえばQuil A、QS-21(Cambridge Biotech Inc., マサチューセッツ州ケンブリッジ)、GPI-0100(Galenica Pharmaceuticals, Inc., アラバマ州バーミングハム)または他のサポニン画分のようなサポニン;モノホスホイノシチド脂質A;アブリディン(Avridine)脂質アミンアジュバント;コレラ毒素;またはムラミールジペプチドなど、を含む。

【0047】

本発明のワクチン組成物の使用に好ましいアジュバントは、水中油型乳剤、特にアンフィゲン(登録商標)(Hydronics, 米国)である。

免疫原、rmLTマーカー抗原および獣医学的に許容できる担体は、たとえば混合、溶解、懸濁、乳化、カプセル化、吸収などによって、ワクチン組成物を作るための簡便で実用的ないずれかの方法で組み合わせることが可能であり、注射、移植、吸入、摂取などに適した錠剤、カプセル、粉末、シロップや、懸濁剤のような処方に製造可能である。適切な場合、本発明の製薬の組成物はよく知られた手順で無菌的に製造されるべきである。

【0048】

ワクチン組成物のrmLTの量は、免疫するのに効果的にすべきであり、一般的に投与量あたり1-500 μ gの幅で、好ましくは投与量あたり20-200 μ gの幅で、そしてより好ましくは投与量あたりおよそ100 μ gにすべきである。

【0049】

ワクチン組成物の免疫原の量は、動物において防御的免疫反応を誘導するのに効果的にすべきであり、免疫原の性質に依存する。一般的に言えば、免疫原として効果的なM・hyoバクテリアの量は、投与量当たりおよそ 1×10^6 からおよそ 5×10^{10} の呈色変化単位(CCU)、好ましくはおよそ 5×10^8 から 5×10^{10} CCU/投与量を含む。M・hyoポリペプチドまたは免疫原として効果的なそのようなポリペプチドの免疫原性断片の量は、一般的に投与量当たりおよそ0.01 μ gからおよそ200 μ gの範囲内にしてもよい。M・hyoポリペプチドまたは免疫原として効果的なそのようなポリペプチドの免疫原性断片をコードする核酸分子の量は、一般的に投与量当たりおよそ0.

10

20

30

40

50

0.1 μ g からおよそ 200 μ g の範囲内にしてもよい。

【0050】

本発明において、ワクチン組成物は、経口、鼻腔内、粘膜局所、経皮、および非経口（たとえば、静脈内、腹腔内、皮内、皮下、または筋肉内）を含むよく知られた経路によって動物に投与可能である。投与は、また針のない運搬システムを使用して実現してもよい。投与は、たとえば非経口の経路を使用した第一投与、およびそれに続く粘膜経路を使用した投与のような、経路の組み合わせを使用して実現してもよい。投与の好ましい経路は筋肉投与である。

【0051】

動物における r m L T に特異的な抗体または免疫細胞の存在を同定するために、試料がその動物から採取される。特異的な抗体を検出するために使用可能な試料は、動物の血液、血液の血清画分、ミルク、胆汁および他の体液を含む。あるいは、屠殺された動物からの肉汁も使用可能である。特異的な免疫細胞、特に T リンパ球を検出するために使用可能な試料は、血液、リンパ節、脾臓または全身中のその他のリンパ組織を含む。

【0052】

L T の A サブユニット抗原または L T を産生する大腸菌株は、普通の家畜管理において、食物連鎖ではなく、ワクチンまたは薬剤としては至らず、それに対する抗体や免疫細胞が動物において自然に作られないことは留意すべきである。従って、好ましい態様において、本方法の検出段階は、L T の A サブユニット特異的な抗体または免疫細胞の検出を含む。

【0053】

特異的な抗体の検出は、D I P S T I C K、E L I S A（酵素結合免疫吸着剤アッセイ）、E I A（酵素免疫アッセイ）、R I A（放射性免疫アッセイ）、ウエスタンブロット解析、免疫組織学染色などの、酵素免疫学的または免疫化学的検出方法を使用することによって実行可能である。使用したアッセイに依存して、抗原または抗体は、酵素、蛍光体または放射性同位元素によりラベルしてもよい。たとえば、C o l i g a n r a C u r r e n t P r o t o c o l s i n i m m u n o l o g y、J o h n W i l e y a n d S o n s I n c . , ニューヨーク州ニューヨーク（1994）；および F r y e r a O n c o g e n 4 : 1153 - 1157、1987を参照されたい。好ましくは、検出はD I P S T I C Kを使用して実行され、ここで標識された抗原は試験スティック上に固定され、当該スティックを屠殺された動物から自然に放出された肉汁などの動物からの体液の試料中に浸ける。

【0054】

抗体の検出において使用可能な抗原は、野生型もしくは変異体 L T の A サブユニットもしくは B サブユニット、または野生型もしくは変異体 L T の A サブユニットもしくは B サブユニットの抗原性断片であってよい。抗原性断片は一般的に、少なくとも7または8アミノ酸の A または B サブユニットの連続断片を含む。

【0055】

本発明によると、L T の A サブユニット抗原に対する抗体の検出に使用の好ましい抗原は、L T の A サブユニットのペプチド断片を含む。より好ましくは、検出に使用される抗原は、配列番号 1 - 9 のいずれか 1 つに示したような配列を有する。2 またはそれより多くの抗原の組み合わせは検出のために採用可能である。

【0056】

たとえばリンパ球のような特定の免疫細胞の検出は、全細胞アッセイ、細胞の活性化マーカー発現、遺伝子活性化マーカー発現、サイトカインおよびホルモンの放出、結合アッセイ（たとえば4量体）、遅延型過敏性（皮膚反応試験）、抗原特異的免疫細胞の同定のためのフローサイトメトリーの技術により実行可能である。

【0057】

アジュバントとしての r m L T の使用

もう一つの態様において、本発明は、実質的に非毒性な r m L T をワクチン組成物に含

10

20

30

40

50

むことにより、ワクチン組成物において免疫原の免疫防御的效果を増強する方法を提供する。

【0058】

本発明において、多様な免疫原の免疫防御的效果は、rmLTにより増進可能であり、そのような免疫原は以下から調製された抗原を含む；マイコプラズマ ハイオニューモニエ (*Mycoplasma hyopneumonia*)、ヘモフィルス ソムナス (*Haemophilus somnus*)、ヘモフィルス パラスイス (*Haemophilus parasuis*)、ボルデテラ ブロンチセプティカ (*Bordetella bronchiseptica*)、アクチノバチルス プレウロニューモニエ (*Actinobacillus pleuropneumoniae*)、パストレルラ ムルトシーダ (*Pasteurella multocida*)、マンヘミア ヘモリティカ (*Mannheimia hemolytica*)、マイコプラズマ ボビス (*Mycoplasma bovis*)、マイコプラズマ ガラナシウム (*Mycoplasma galanacium*)、マイコバクテリウム ボビス (*Mycobacterium bovis*)、マイコバクテリウム パラツベルクロシス (*Mycobacterium paratuberculosis*)、クロストリジウム属の種 (*Clostridial* spp.)、ストレプトコッカス ウベリス (*Streptococcus uberis*)、ストレプトコッカス スイス (*Streptococcus suis*)、スタフィロコッカス アウレウス (*Staphylococcus aureus*)、エリシペロトリックス ルソパトイエ (*Erysipelothrix rhusopathiae*)、カンピロバクター属の種 (*Campylobacter* spp.)、フソバクテリウム ネクロフィラム (*Fusobacterium necrophorum*)、エシェリキア コリ (*Escherichia coli*)、サルモネラ エンテリカ セロバルス (*Salmonella enterica* serovars)、レプトスピラ属の種 (*Leptospira* spp.) のような病原性バクテリア；カンジダ (*Candida*) などの菌類；クロプトスポリジウム パルバム (*Cryptosporidium parvum*)、ネオスポラ カニウム (*Neospora caninum*)、トキソプラズマ ゴンデイ (*Toxoplasma gondii*)、アイメリア属の種 (*Eimeria* spp.) などの原生動物；オステルタジア属 (*Ostertagia*)、クーペリア属 (*Cooperia*)、捻転胃虫属 (*Haemonchus*)、ファスキオラ属 (*Fasciola*) の蠕虫、の不活性化された全体もしくは一部の細胞調製液の形で、または遺伝子組換え技術もしくは化学合成により得られる抗原性の分子の形のいずれかのもの。さらなる免疫原は、ウシヘルペスウイルス - 1, 3, 6、ウシウイルス性下痢ウイルスタイプ1および2、ウシパラインフルエンザウイルス、ウシ呼吸器合胞体ウイルス、ウシ白血病ウイルス、牛痘ウイルス、脚および口疾患ウイルス、狂犬病ウイルス、豚痘ウイルス、アフリカ豚痘ウイルス、ブタパルボウイルス、PRRSウイルス、ブタサーコウイルス、インフルエンザウイルス、ブタ水疱性疾患ウイルス、テクネ熱ウイルス (*Techen fever virus*)、偽性狂犬病ウイルス、の不活性化された全体もしくは一部のウイルス調製液の形で、または遺伝子組換え技術もしくは化学合成により得られる抗原性分子の形のいずれか、などの病原性ウイルスを含む。

【0059】

好ましい態様において、実質的に非毒性なrmLTは、M. hyo免疫原、即ち動物において抗原に対する免疫反応を誘導できるM. hyoから調製された抗原、の免疫防御的效果を増進するために使用される。そのようなM. hyo免疫原は、たとえば不活性化された全体または一部のM. hyo細胞調製液、1つもしくはそれより多くのM. hyo由来ポリペプチド、またはそのようなポリペプチドの免疫原性断片、または1つもしくはそれより多くのM. hyo由来ポリペプチドをコードする1つもしくはそれより多くのM. hyo核酸、またはその免疫原性断片、および動物においてin vivoで発現できる核酸を含んでもよい。

【0060】

さらに好ましい態様において、M . h y o 免疫原は、本明細書で以上に記載したように入手可能なM . h y o バクテリアで、たとえばRESPIFEND (Fort Dodge, American Home Products)、HYORES P (Merial Ltd)、M + P A C (Schering Plough)、PROSYSTEM M (Intervet)、INGLEVEEC M (Boehringer)、RESPISURE (登録商標) (Pfizer Inc.)、RESPISURE ONE^{T M}、STELLAMUNE^{T M} Mycoplasma (Pfizer Inc.)、およびSTELLAMUNE ONE^{T M} Mycoplasma (Pfizer Inc.)のような市販のものを含む。

【0061】

10

本発明の方法の使用に好ましいM . h y o バクテリアソースはRESPISURE (登録商標) (Pfizer Inc.)、RESPISURE ONE^{T M} (Pfizer Inc.)、STELLAMUNE^{T M} Mycoplasma (Pfizer Inc.)、およびSTELLAMUNE ONE^{T M} Mycoplasma (Pfizer Inc.)である。

【0062】

本発明において、免疫原とrmLTは、ワクチン組成物を作るために獣医学的に許容できる担体と組み合わせられる。適した獣医学的に許容できる担体は、本明細書で上述し、溶媒、分散媒、コート剤、アジュバント、安定剤、希釈剤、保存料、抗菌および抗真菌剤、等張剤、吸収遅延剤などのいずれかおよびすべてを含む。

20

【0063】

本発明のワクチン組成物の使用に適したアジュバントも、本明細書で上述した。好ましいアジュバントは、水中油型乳剤アジュバント、アンフィゲン (登録商標) (Hydronics, 米国) である。

【0064】

免疫原、rmLT抗原および獣医学的に許容できる担体は、混合、溶解、懸濁、乳化、カプセル化、吸収などによって、ワクチン組成物を作るための簡便で実用的ないずれかの方法で組み合わせ可能であり、注射、移植、吸入、摂取などに適した錠剤、カプセル、粉末、シロップや、懸濁剤のような処方に製造可能である。

【0065】

30

ワクチン組成物のrmLTの量は、一般的に投与量あたり1 - 500 μ gの範囲内で；好ましくは投与量あたり20 - 200 μ gの範囲内で；より好ましくは投与量あたりおよそ100 μ gにすべきである。

【0066】

ワクチン組成物の免疫原の量は、動物において防御的免疫反応の誘導に効果的にすべきであり、免疫原の性質に依存する。一般的に言えば、免疫原として効果的なM . h y o バクテリアの量は、投与量あたりおよそ 1×10^6 からおよそ 5×10^{10} の呈色変化単位(CCU)、好ましくはおよそ 5×10^8 からおよそ 5×10^{10} CCU / 投与量を含む。M . h y o ポリペプチドまたは免疫原として効果的なそのようなポリペプチドの免疫原性断片の量は、一般的に投与量あたりおよそ0 . 01 μ gからおよそ200 μ gの範囲内であってよい。M . h y o ポリペプチドまたは免疫原として効果的なそのようなポリペプチドの免疫原性断片をコードする核酸分子の量は、一般的に投与量あたりおよそ0 . 01 μ gからおよそ200 μ gの範囲内であってよい。

40

【0067】

本発明と合致して、ワクチン組成物は、本明細書で上述したような公知の経路により動物に投与可能である。投与に好ましい経路は、筋内投与である。

免疫原、大腸菌の熱不安定性エンテロトキシンの実質的に無毒な変異体およびアンフィゲン (登録商標) (Hydronics, 米国) などの水中油型乳剤アジュバントを含むワクチン組成物もまた、本発明で提供される。

【0068】

50

本発明は、以下の非限定的な例によりさらに説明される。

【実施例】

【0069】

実施例 1

M . h y o バクテリアの調製

マイコプラズマ・ハイオニューモニエ産生培養培地は、続く製法および手順に従って調製した：

クリスタルバイオレットなしの p p L o ブロス	8 1 . 0 0 % ± 2 %	
塩酸システイン	0 . 0 1 % ± 0 . 0 0 5 %	
酵母エキス	6 . 2 5 % ± 0 . 2 %	10
デキストロース（技術的または分析的グレード）	1 . 0 0 % ± 0 . 2 %	
放射線照射、熱処理されたブタ血清	1 0 . 0 0 % ± 1 %	

p p L o ブロスの pH は 7 . 0 ± 0 . 4 に調整され、そして 0 . 2 ミクロンフィルターを使用してフィルター滅菌した。酵母エキスおよび p p L o ブロスは、最小限の 1 2 1 で 1 5 から 6 0 分加熱滅菌され、そして 6 0 未満まで冷却させた。上述の他の成分は、滅菌添加物として加えた。

【0070】

抗原産生培養は、産生培地中にマイコプラズマ・ハイオニューモニエ細菌のストックの冷凍バイアルを溶かすことにより始めた。すべての培養物は 3 7 ± 2 でインキュベートした。はじめの培養物の拡大はフラスコ中（1リットルまで）で実行し、そして次いでその後、およそ 7 . 0 に調節された pH および最高の 2 5 % の溶存酸素下で、発酵容器中で実行した。培養物はおよそ 1 8 0 0 リットルまで拡大した。不活性化の前に、培養物を位相差顕微鏡下で特徴的な形態を検査し、そしてグラム染色した調製物でコンタミネーションの存在を検査した。

【0071】

培養物にはコンタミネーションがなく、そして呈色変化単位滴定により決定されたおよそ 5×10^9 C C U / m L の抗原濃度を生じた。増殖期間の終わりに、発酵槽中または保持容器中で培養物を不活性化した。培養物の pH は 7 . 8 ± 0 . 2 まで上昇し、そしてこの範囲内で 1 時間、pH は維持された。この時に、2 - プロモエチルアミン臭化水素酸塩（B E A）のフィルター滅菌された水溶液を、およそ 4 . 0 m M の最終濃度で加えた。高められた pH の存在下で、B E A は使用する二元エチレンイミン（B E I）に化学変化する。培養物は 3 7 ± 2 で、一定の振動で 2 4 時間、インキュベートした。2 4 時間のインキュベーション後、過剰な B E I を中和するためにチオ硫酸ナトリウムのフィルター滅菌された水溶液を、およそ 4 m M の最終濃度で加えた。培養物は、一定の振動でさらに 2 4 時間、3 7 ± 2 でインキュベートした。

【0072】

不活性化された培養物は滅菌保存容器に移され、そして 2 - 8 で集合するまで保存した。

実施例 2

r m L T 抗原の調製

プラスミド p U K 2 1 は、r m L T R 1 9 2 G の組換え体産生のために以下のように生成された。プラスミド p C S 9 5 は L T 遺伝子の天然調節要素を含有し、そして大腸菌宿主でタンパク質 r m L T R 1 9 2 G を構成的に発現する。このプラスミドは p U C に基づいたベクター中に構築され、そのベクターはアンピシリン耐性マーカーを持つ。天然調節配列を含む r m L T 遺伝子は p C S 9 5 プラスミドから切り出され、そしてもう一つの p U C に基づくカナマイシン耐性ベクター、p U K 2 1、の中にクローニングし、コンストラクト p U K 2 1 / r m L T を生じた。プラスミド p U K 2 1 / r m L T は、A m e r i c a n T y p e C u l t u r e C o l l e c t i o n （A T C C）、1 0 8 0 1 U n i v e r s i t y B l v d . , ヴァージニア州マナッサス 2 0 1 1 0 - 2 2 0 9 に 2 0 0 3 年 9 月 1 8 日に寄託され、そして寄託番号、A T C C # P T A - 5 5

10

20

30

40

50

46を割り当てられた。

【0073】

プラスミドpUK21/rmLTは、大腸菌宿主株JM83（遺伝子型F⁻φ80dlacZΔM15Δ(lac-proAB)ara^{rps}L）の中に形質転換した。2つのトリプトース大豆寒天プレートは、形質転換体（JM83/pUK21/rmLT）の密集的増殖のためにストリークし、そして37℃で18時間インキュベートした。1つのプレートは10mlのエバンス培地中に回収し、そしてこの回収物は滅菌された10リットル発酵容器に植菌するために使用した。エバンス培地は以下を含有する（リットル基準毎）：

カザミノ酸 - 20 g m

酵母エキス - 6 g m

NaCl - 2.5 g m

K₂HPO₄ - 8.7 g m

微量元素塩溶液 - 1 ml

50%グルコース - 10 ml

微量元素塩溶液は、5% MgSO₄・7H₂O、0.5% MnCl₂・4H₂Oおよび0.5% FeCl₃・6H₂O（すべて質量/体積）を含有した。培地はリットル毎に100μgの硫酸カナマイシンも含有した。発酵培養は37℃で18時間、穏やかなエアレーションで維持した。細胞集団は、ウエストファリア（Westfalia）遠心分離機を使用した遠心分離により除去された。アフィニティークロマトグラフィーによる精製の前に、濃縮液を0.2μmのデプスフィルターにより浄化した。粗製rmLT画分を精製し、そしてα-D-ガラクトース樹脂のアフィニティークロマトグラフィーにより効果的に濃縮した。TEAN溶出緩衝液（pH=7.5）は以下であった：

0.05 M トリス

0.001 M EDTA

0.003 M アジ化ナトリウム

0.2 M NaCl

溶出されたrmLTは、アザイドを除去するために、TEN緩衝液に対する10K A/G Tech hollow fiber filterでダイアフィルトレーション（diafiltration）をした。TEN緩衝液（pH=7.35）は以下であった：

0.05 M トリス

0.001 M EDTA

0.2 M NaCl

ダイアフィルトレーションは0.2μmフィルターを通じてろ過した。ラクトースを5%（質量/体積）まで加え、そして調製物を凍結乾燥した。ワクチン中に処方されるまで、凍結乾燥された原料は室温で保存された。

【0074】

実施例 3

アジュバントの油層は、AMPHIGEN（登録商標）ベース（40%大豆レシチン、60%ミネラル油）、ドラケオール（Drakeol）（100%ミネラル油）、並びに2種の界面活性剤スパン80（Span80）およびトゥween80（Tween80）からなった。体積で25%のアンフィゲン（登録商標）と75%のドラケオールを用いて、AMPHIGEN（登録商標）ベースをドラケオールと混和した。体積で、これら2つの油はワクチンの最終体積の5±0.5%を含んでなった。Span80は最終連続体積の1.2±0.3%で加えた。Tween80は最終連続体積の2.8±0.3%で加えた。産物（乳化を経由）の水層を添加する前に、油層は2時間、37±2℃で混ぜたままにした。ワクチンの水層は、実施例1で調製された塊のM・ハイオニューモニエ抗原を含んだ。塊のM・ハイオニューモニエ抗原をPBSに加えた。油層への添加の前に、十分なrmLTタンパク質を水層に加え、ワクチンの用量毎に10, 20または50μgの最終

10

20

30

40

50

濃度になるようにした。ワクチンの処方は：

r m L T あり / なしの P B S - 8 3 . 7 5 %

塊の M . ハイオニューモニエ抗原 - 1 1 . 2 5 %

オイルアジュバント - 5 . 0 0 %

水性成分を暖かい油層に加え、そして高速混合により乳化した。

【 0 0 7 5 】

実施例 4

r m L T 複合体の A サブユニットに対する血清抗体の検出は、ウエスタン免疫ブロットの手順により達成した。これは、A および B サブユニットに特異的なモノクローナル抗体の使用により促進した。サブユニットはポリアクリルアミドゲル電気泳動クロマトグラフ 10
イーにより分離した。30 μg の r m L T は、10 % ポリアクリルアミドビストリス S D S ゲルの上に、適した分子量の単量体標準品と共にロードした。ゲルは、45 分間 150 V で電気泳動した。ゲルからニトロセルロース膜への r m L T タンパク質の転写は、電気化学的勾配を使用して達成した。膜をすすぎ、そして T B S 中の 5 % 無脂肪乾燥ミルクで 2 時間ブロッキングし、続いてもう 1 回すすいだ。試験される血清試料は 5 % 無脂肪乾燥 20
ミルク / T B S で 1 : 800 で希釈し、そして続いてパイオラッド@マルチスクリーン装置 (B i o r a d @ m u l t i - s c r e e n a p p a r a t u s) を使用して膜の上にロードし、そして穏やかな振動で一晩インキュベートした。311 および 30 として同定された試料は、それぞれ正および負のコントロールとして使用された。次いで膜をすすぎ、そして抗ブタ - A P 結合体は 5 % 無脂肪乾燥ミルク / T B S で 1 : 2000 で希釈した。2 時間のインキュベーション後、膜をすすぎ、そして発色団で発色し抗体により認識されたタンパク質の可視化をした。この場合、もし A サブユニットの抗体が血清試料中に存在したならば、バンドが染色として観察された。もし適切な発色の後に A サブユニットバンドが見えるならば、血清サンプルは陽性と考えられた。

【 0 0 7 6 】

実施例 5

M . ハイオニューモニエ抗原に対する抗体の検出は、慣用の間接 E L I S A 試験を使用して達成した。抗原は界面活性剤 (リン酸で緩衝された生理食塩水中の T w e e n 20) により洗浄された M . ハイオニューモニエ細胞から抽出した。抽出された抗原は使用する 30
まで - 70 で保存した。抗原は 96 ウェルプレート (I m m u n o 1 2 , B i o t e k など) のウェルに加えた。試験の結果は、正のコントロール試料シグナルに対する未知の試験試料に由来するシグナルの比率として記録した。負の試験および希釈されたウェルも、このアッセイの負のコントロールとして使用した。

【 0 0 7 7 】

実施例 6

動物

およそ 12 から 16 日齢の M . ハイオニューモニエが原因の病歴または同じ生物に対するワクチン歴のない、外見上健康な 50 頭の交雑種のブタ (それぞれ 10 頭のブタの 11 群) は、クリスタル リーン 牧場 (C r y s t a l L e a n F a r m s) 、ミネソタ州ヴィラードより入手した。研究の開始の前に、動物に同一の連続数で 2 つ耳にタグを 40
付けた。ファイザーバイオメトリクスおよびデータマネージメントにより提供されたランダムな処理割り振り計画に従って、ブタに処理と檻を割り振った。ブタを、ブロッキング因子として体重を使用して、任意抽出の完全ブロックデザインに従った処理群に任意抽出し、そして檻のなかでブロックにより飼育された。

【 0 0 7 8 】

テレポート (T e r r e H a u t e) に到着時、ストレプトコッカス スイスなどのストレスに関係する感染を予防し、そしてヘモフィルス パラスイスの発生率を減らすために、ブタに標識の指示に従ってセフチオフルナトリウム (N a x c e l ^{T M}) を 3 日間連続して腿の筋肉の筋肉内に処理した。研究の開始前に、ブタを最低 5 日間慣らした。ブタにはいずれか公知の汚染物または殺虫剤のない濃縮された薬用飼料を与え、そして水に 50

自由にアクセスをさせた。チャレンジの前のおよそ2週間、ブタを濃縮された非薬用飼料に転換した。

【0079】

ワクチン接種

本研究で使用される実験ワクチンを下の表1に示す。

【0080】

【表1】

表1				
群	シリアル	抗原	マーカー★	マーカー濃度★★
T04	TBD	M. ハイオニューモニエ	rmLT	10 μ g/用量
T05	TBD	M. ハイオニューモニエ	rmLT	20 μ g/用量
T06	TBD	M. ハイオニューモニエ	rmLT	50 μ g/用量
T07	TBD	M. ハイオニューモニエ	なし	なし
T08	TBD	なし	なし	なし

★:認可された製品、RESPISURE(登録商標)に相当

★★:それぞれのマーカーの3つの濃度が評価された。正確な濃度が記録される。

10

【0081】

ブタがおよそ3週齢の時である0日目(右首の筋肉)に、およびブタがおよそ5週齢の時である14日目(左首の筋肉)に、動物を筋肉内の経路により2mLの適切なワクチンまたは偽薬で2回ワクチン接種した。

20

【0082】

血液サンプリング

- 1または0、13または14、28、42、62または63および91日目に、血液試料(血清分離チューブ中のおよそ10mL)はすべてのブタから近位大静脈/頸静脈の刺し傷によって収集した。91日目に、深い麻酔を与えた後に、血液試料を腋窩血管から回収した。M. ハイオニューモニエおよびrmLT抗原への抗体活性が評価されるまで、それぞれの血液試料からの血清は、-20℃で保存された。

【0083】

攻撃

処理群06、07および08のブタを下に記載されているように攻撃した。

30

2回目のワクチン接種に続くおよそ7週目(63日目)に、ブタを経鼻投与の経路により攻撃した。3日間連続して、5mLのM. ハイオニューモニエ接種材料で、鼻孔毎には2.5mLで、ブタを経鼻で攻撃した。攻撃の前に、kg毎に4.4mgのキシラジン並びにkg毎に4.4mgのチレタミンおよびゾラゼパン(Telazol(登録商標)、Fort Dodge Laboratory Inc.; アイオワ州フォートダッジ)の筋肉内注射により、ブタを麻酔した。

【0084】

攻撃接種材料は、肺ホモジェネート中のM. ハイオニューモニエ懸濁液(M. ハイオニューモニエ株11の誘導体を含む)であった。接種材料は滅菌フリス(Friss)マイコプラズマ培地で希釈し、1:50希釈を達成し、それはmL毎におよそ10⁵呈色変化単位(CCU)を含むした。接種材料の攻撃に続いて、すべてのブタを毎日観察し、そしていくらかの異常を記録した。

40

【0085】

検視

攻撃後およそ4週目(91日目)、すべての残った動物を、致死のペントバルビタールナトリウム(3-10mL)の静脈注射で安楽死させ、そして両方の腋窩動脈を切断することにより放血した。中枢神経系を除くすべての主要器官を獣医師または有資格者により十分に検査し、そしてすべての検視所見を記録した。肺を除去し、そしてM. ハイオニューモニエ感染に起因する特徴的損傷を十分に評価した。損傷は標準な肺の図表上にスケッチした。

50

【 0 0 8 6 】

血清学

血清学的力価データは、それぞれの時点で r m L T マーカに対する抗体の正または負の検出に従って分類した。時点までのマーカ-の正 / 負の状態の発生は処理により要約された。実験ワクチンの M . ハイオニューモニエ成分への血清学的反応は、試験の固相としての T w e e n 2 0 で抽出された抗原調製物を使用した E L I S A により決定した。反応の指標が生み出され、それは周知の正のまたは負のコントロール血清と比べた抗体反応を示唆する。

【 0 0 8 7 】

ウエスタンブロット解析

組換え体 r m L T を S D S - P A G E に供し、そして電気泳動的にナイロン膜に転写した。ブロットは、これらの研究からの抗血清とともにモノクローナル抗体で探査し (p r o b e)、A および B 両方のサブユニット特異的な抗体活性の証拠を提供した。

10

【 0 0 8 8 】

損傷のある全肺のパーセンテージ

それぞれの肺葉毎の全体関与のパーセントを要約し、そして次いで全肺質量に対する個々の肺葉の続く比率を使用して重さを量った：左頭方部 1 0 %、左中間部 1 0 %、左尾側部 2 5 %、右頭方部 1 0 %、右中間部 1 0 %、右尾側部 2 5 %、および副肺 1 0 %。次いで重さを量った肺葉の値を肺葉にわたって合計し、損傷のある全肺のパーセンテージを生じた。解析の前に、アークサイン平方根変換を損傷のある全肺のパーセンテージに適用した。損傷のある全肺のパーセンテージを、ブロックおよび処理の効果を含んだ混合線形モデル (m i x e d l i n e a r m o d e l) を使用して解析した。パラメーター推定の一次結合 (モデルから得られる) は、偽薬 (T 0 8) およびワクチン接種の平均 (T 0 4 - T 0 7) の間の有意差 (P 0 . 0 5、片側検定) を試験した後に、事前対比 (p r i o r i c o n t r a s t s) において使用した。比較を処理群間で行った。5 % レベルの有意 (P 0 . 0 5、片側検定) を使用して、統計学上の差異を評価した。逆の変換された (B a c k t r a n s f o r m e d) 損傷のある全肺の平均パーセンテージを、アークサイン平方根 (損傷のある全肺 %) の最小二乗平均から計算した。

20

【 0 0 8 9 】

【表 2】

30

イベントのスケジュール

0日目	1回目のワクチン接種／血液試料／T04-08
13日目	2回目のワクチン接種／血液試料
28日目	血液試料
43日目	血液試料
63日目	T06、T07、T08攻撃／血液試料
91日目	検視／血液試料

【 0 0 9 0 】

結果

血清学的結果を図 1 および図 2 に表わした。処理群 0 6 および 0 7 のウエスタン免疫ブロットは図 3 に示した。これらのデータは、r m L T タンパク質は R E S P I S U R E (登録商標) 処方中で抗原性があり、そしてタンパク質の A サブユニットに対する抗体を恒常的に刺激することを示唆する。加えて、マイコプラズマ抗原に対する抗体反応は損なわれていない。

40

【 0 0 9 1 】

肉眼で見える肺損傷のスコアを表 2 に要約した。これらの結果は、A M P H I G E N (登録商標) アジュバントと共の r m L T マーカ-タンパク質および M . ハイオニューモニエ抗原の組み合わせは、相乗的で深い防御に帰着することを明確に示唆した。

【 0 0 9 2 】

50

【表 3】

処理	N	表2 損傷のある全肺		
		LS平均	SE	幅
6	10	0.3	0.25	0-3
7	9	4.0	2.62	0-29.5
8	10	1.7	1.31	0-19.5

【0093】

実施例 7

ワクチン接種

マウス（12週齢のCF-1メス）を、0日目および14日目に0.2mlの実験ワクチンを皮下に2回ワクチン接種した。血清を21日目に回収した。本研究で使用した実験ワクチンを下の表3に示す。

【0094】

【表 4】

表3				
群	シリアル	抗原	マーカー★	マーカー濃度★★
G2	TBD	M. ハイオニューモニエ	rmLT	10 μ g/用量
G3	TBD	M. ハイオニューモニエ	rmLT	20 μ g/用量
G16	TBD	M. ハイオニューモニエ	rmLT	50 μ g/用量
G4、G5	TBD	M. ハイオニューモニエ	なし	なし
G13	TBD	なし	なし	なし

★：認可された製品、RESPISURE（登録商標）に相当

★★：それぞれのマーカーの3つの濃度が評価された。正確な濃度が記録される。

【0095】

血清学

血清学的力価データは、21日目に回収された血清中のrmLTマーカーに対する抗体の正または負の検出に従って分類した。図4からわかるように、rmLTのAサブユニットに対する抗体の産生により、マウスはRESPISURE（登録商標）ワクチン処方中のrmLTにも反応する。

【0096】

実施例 8

rmLT Aサブユニットのエピトープを同定するために、ペプチド毎に5アミノ酸を重複した完全なrmLTのサブユニット配列をスキャンした一連のペプチド（15マー）を構築した。たとえば、ペプチド1はアミノ酸数1から15の連続配列であり；そしてペプチド2はアミノ酸数10から25の連続配列であった。このパターンを続け、rmLTの完全な一次配列をカバーした。ペプチドを樹脂のピンに共有的に結合した。切断できないピンを支持棒に固定し、96ウェル中へのピンの沈降を促進した。こうして、ピン上のそれぞれのペプチドは、ELIZAアッセイの固相となり、試験されたモノクローナル抗体の結合を評価した。ピンのセットを、ブタの免疫付与前および免疫付与後からの血清並びに選択したモノクローナル抗体に対して試験した。結果を図5A-5Cに示した。

【0097】

図5A-5Bに示すように、ペプチド9、12、15、27、31および37および50が、rmLT配列からのマーカーペプチドとして使用することができるエピトープであることを表す。これらのペプチドの配列は以下である：

9 - M P R G H N E Y F D R G T Q M（配列番号1）

12 - N I N L Y D H A R G T Q T G F（配列番号2）

15 - V R Y D D G Y V S T S L S L R（配列番号3）

27 - V S A L G G I P Y S Q I Y G W（配列番号4）

10

20

30

40

50

3 1 - G V I D E R L H R N R E Y R D (配列番号 5)

3 6 - G Y R L A G F P P D (配列番号 6)

3 7 - P P D H Q A W R E E (配列番号 7)

3 6 / 3 7 ハイブリッド - G Y R L A G F P P D H Q A W R E E (配列番号 8)

5 0 - Y Q S E V D I Y N R I R N E L (配列番号 9)

実施例 9

1 7 3 の研究からの結果

これは、A サブユニットに対する正の血清学的反応を確認した、以上に例証されたはじめのブタの研究の反復である。図 6 および表 4 のデータは、rmLT マーカー抗原は、マイコプラズマ・ハイオニューモニエからの肺炎の予防のための RESPISURE (登録商標) の有効性または血清学的反応を干渉せず、そして平均肺損傷スコアが RESPISURE (登録商標) 単独で観察されたものよりも低い追加のアジュバント効果を有することを実証した。

【0098】

【表 6】

表4
肺損傷—173のRCMV研究

	LSM	SE	幅
偽薬	18.1	5.59	0. 1—67
古いrmLT	0.7	0.35	0—7. 1
新しいrmLT	0.6	0.35	0—13. 5
RESPISURE(登録商標)	1.1	0.47	0—4. 95

【図面の簡単な説明】

【0099】

【図 1 A】マイコプラズマ・ハイオニューモニエ (*Mycoplasma hyopneumoniae*) の血清学的結果。処理群 4、5 および 6 は rmLT マーカーを伴うワクチンを受けた。処理群 1 - 3 もマイコプラズマ・ハイオニューモニエのワクチンを受けた。

【図 1 B】マイコプラズマ・ハイオニューモニエ (*Mycoplasma hyopneumoniae*) の血清学的結果。処理群 4、5 および 6 は rmLT マーカーを伴うワクチンを受けた。処理群 1 - 3 もマイコプラズマ・ハイオニューモニエのワクチンを受けた。

【図 2】処理群 6 および 7 よりの血清試料の応答を % で表したウェスタン・ブロット解析。

【図 3 A】図 2 の処理群 6 および 7 の実際のウェスタン・ブロット。

【図 3 B】図 2 の処理群 6 および 7 の実際のウェスタン・ブロット。

【図 4】マウス血清のウェスタン・ブロット解析。

【図 5 A】ELISA による、免疫付与前および後の血清またはモノクローナル抗体での rmLT ペプチドの反応性。

【図 5 B】ELISA による、免疫付与前および後の血清またはモノクローナル抗体での rmLT ペプチドの反応性。

【図 5 C】ELISA による、免疫付与前および後の血清またはモノクローナル抗体での rmLT ペプチドの反応性。

【図 6】0 または 14 日に異なったマイコプラズマ・ハイオニューモニエワクチンまたは偽薬でワクチン接種されたブタの平均 rmLT S / P 比。S / P 比 > 0. 364 は陽性とみなされる。結果は T 0 1、T 0 2、T 3 および T 0 6 のみを示す。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Mcvey, David Scott

<120> Use of rmlT as a Marker Antigen for Vaccines and as a Synergistic Adjuvant with Amphigen

<130> P15827 (PC25075)

<140> 60/426,421

<141> 2002-11-14

<160> 9

10

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 15

<212> PRT

<213> Unknown

<220>

<223> Marker peptides from the rmlT sequence

<400> 1

Met Pro Arg Gly His Asn Glu Tyr Phe Asp Arg Gly Thr Gln Met
1 5 10 15

<210> 2

20

<211> 15

<212> PRT

<213> Unknown

<220>

<223> Marker peptides from the rmlT sequence

<400> 2

Asn Ile Asn Leu Tyr Asp His Ala Arg Gly Thr Gln Thr Gly Phe
1 5 10 15

<210> 3

<211> 15

<212> PRT

<213> Unknown

<220>

30

<223> Marker peptides from the rmlT sequence

<400> 3

Val Arg Tyr Asp Asp Gly Tyr Val Ser Thr Ser Leu Ser Leu Arg
1 5 10 15

<210> 4

<211> 15

<212> PRT

<213> Unknown

<220>

40

<223> Marker peptides from the rMLT sequence

<400> 4

Val Ser Ala Leu Gly Gly Ile Pro Tyr Ser Gln Ile Tyr Gly Trp
1 5 10 15

<210> 5

<211> 15

<212> PRT

<213> Unknown

<220>

<223> Marker peptides from the rMLT sequence

<400> 5

Gly Val Ile Asp Glu Arg Leu His Arg Asn Arg Glu Tyr Arg Asp
1 5 10 15

10

<210> 6

<211> 10

<212> PRT

<213> Unknown

<220>

<223> Marker peptides from the rMLT sequence

<400> 6

Gly Tyr Arg Leu Ala Gly Phe Pro Pro Asp
1 5 10

20

<210> 7

<211> 10

<212> PRT

<213> Unknown

<220>

<223> Marker peptides from the rMLT sequence

<400> 7

Pro Pro Asp His Gln Ala Trp Arg Glu Glu
1 5 10

<210> 8

<211> 17

<212> PRT

<213> Unknown

30

<220>

<223> Marker peptides from the rMLT sequence

<400> 8

Gly Tyr Arg Leu Ala Gly Phe Pro Pro Asp His Gln Ala Trp Arg Glu
1 5 10 15

Glu

<210> 9
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Unknown

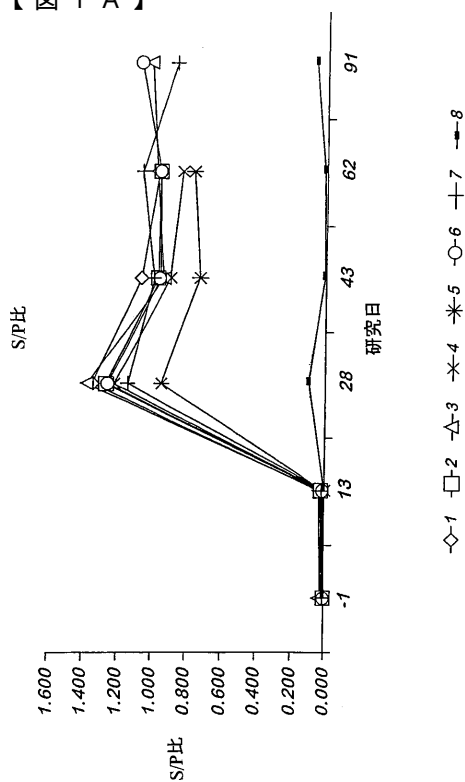
<220>
 <223> Marker peptides from the rMLT sequence

<400> 9

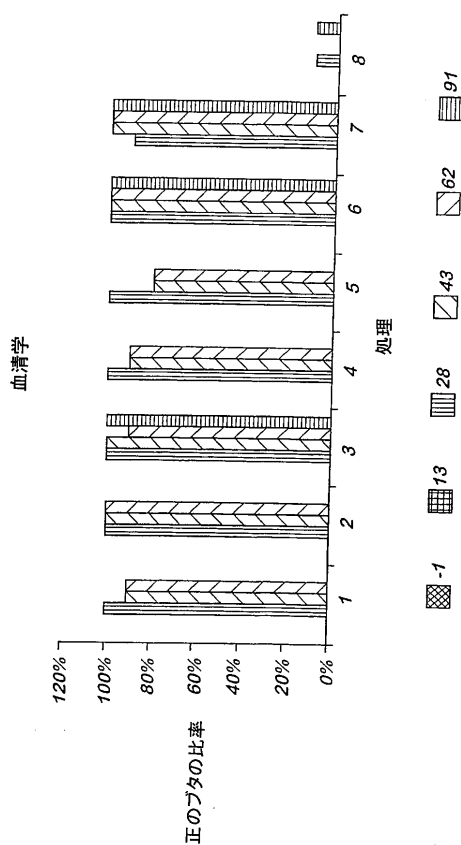
Tyr Gln Ser Glu Val Asp Ile Tyr Asn Arg Ile Arg Asn Glu Leu
 1 5 10 15

10

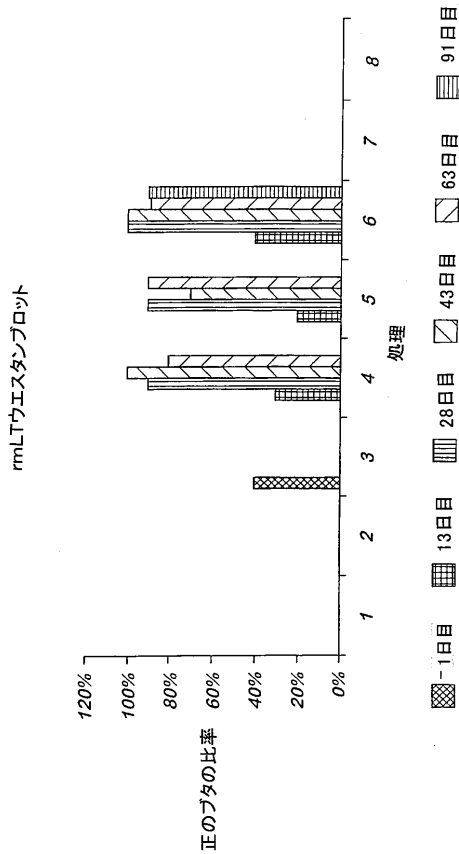
【図 1 A】



【図 1 B】



【図 2】



【図 3 A】

rmLTウエスタンブロット(コントロールを除き、
すべてのサンプルは1:800に希釈された)

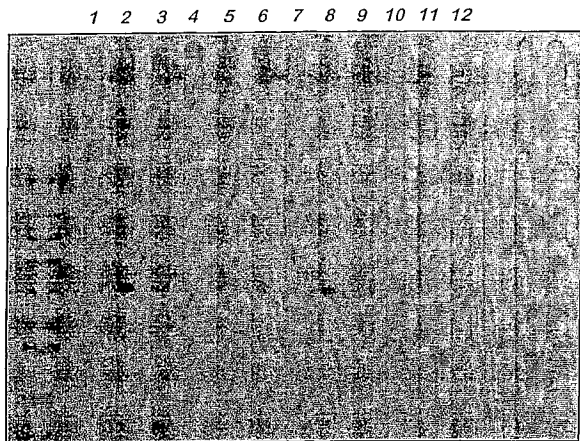


図3A、群6、91日目

- 1- 30 (ポジティブコントロール、1:1600)
- 2- 311 (ネガティブコントロール、1:1600)
- 3- 409
- 4- 414
- 5- 416
- 6- 419
- 7- 425
- 8- 428
- 9- 432
- 10- 439
- 11- 442
- 12- 445

【図 3 B】

rmLTウエスタンブロット(コントロールを除き、
すべてのサンプルは1:800に希釈された)

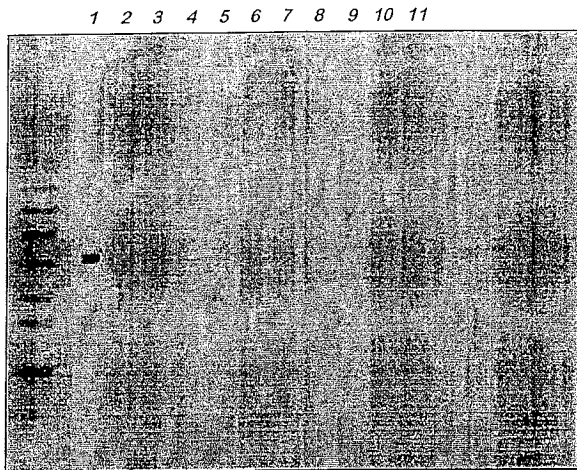


図3B、群7、91日目

- 1- 311 (ポジティブコントロール、1:1600)
- 2- 30 (ネガティブコントロール、1:1600)
- 3- 410
- 4- 418
- 5- 423
- 6- 424
- 7- 430
- 8- 435
- 9- 438
- 10- 441
- 11- 446

【図 4】

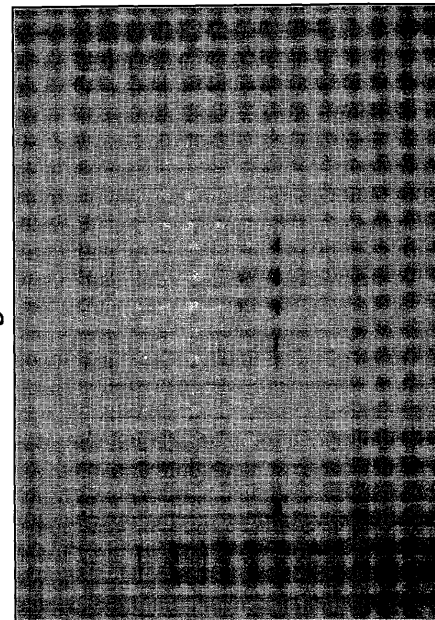
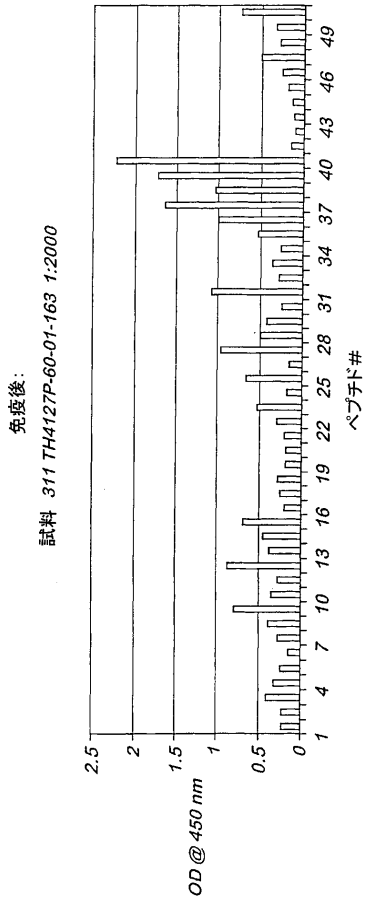
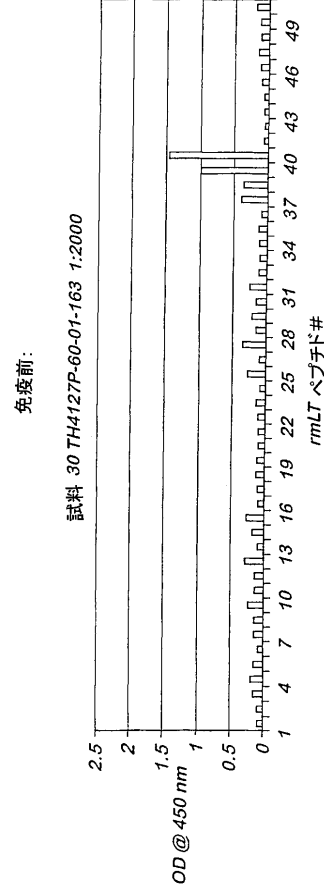


Fig. 4

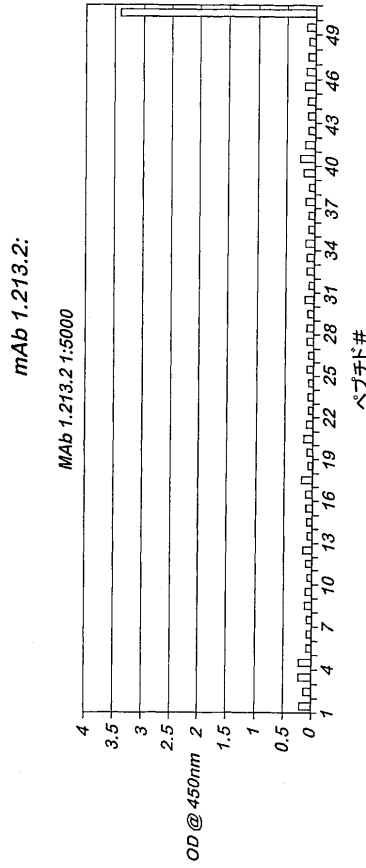
【図 5 A】



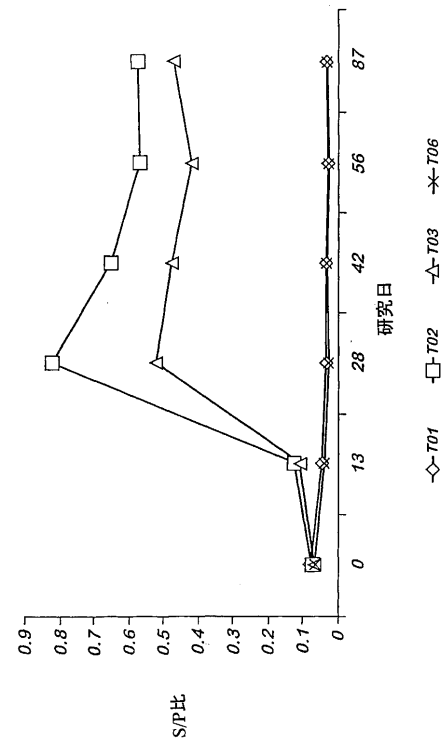
【図 5 B】



【図 5 C】



【図 6】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/IB03/05103										
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : A61K 39/02, 39/00, 45/00 US CL : 424/234.1, 236.1, 184.1, 190.1, 264.1, 282.1 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC												
B. FIELDS SEARCHED												
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 424/234.1, 236.1, 184.1, 190.1, 264.1, 282.1												
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched												
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Please See Continuation Sheet												
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT												
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.										
X	US 6,033,673 A (CLEMENTS) 07 March 2000 (07.03.2000), abstract; claims; and Examples.	9, 12 and 13										

Y		1-8, 10, 11, 14 and 15										
Y	US 6,436,407 B1 (CLEMENTS et al) 20 August 2002 (20.08.2002), abstract; claims; and Examples.	1-15										
Y	MARCHETTI et al. Protection against Helicobacter pylori infection in mice by intragastric vaccination with H. pylori antigens is achieved using a non-toxic mutant of E. coli heat-labile enterotoxin (LT) as adjuvant. Vaccine, 1998, Vol. 16, No. 1, pages 33-37, abstract; Materials and Methods; and Results.	1-15										
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.												
* Special categories of cited documents: <table border="0"> <tr> <td>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</td> <td>"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</td> </tr> <tr> <td>"E" earlier application or patent published on or after the international filing date</td> <td>"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</td> </tr> <tr> <td>"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)</td> <td>"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</td> </tr> <tr> <td>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td> <td>"Z" document member of the same patent family</td> </tr> <tr> <td>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td> <td></td> </tr> </table>			"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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	"E" earlier application or patent published on or after the international filing date	"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	"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)	"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	"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"Z" document member of the same patent family	"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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											
"E" earlier application or patent published on or after the international filing date	"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											
"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)	"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											
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"Z" document member of the same patent family											
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed												
Date of the actual completion of the international search 04 June 2004 (04.06.2004)		Date of mailing of the international search report 23 JUL 2004										
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703)872-9306		Authorized officer S. Devi, Ph.D. <i>J. Roberts for</i> Telephone No. (571) 272-1600										

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/IB03/05103

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

This international 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.:
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:
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 II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
Please See Continuation Sheet

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 an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
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 claims 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 claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/IB03/05103

BOX II. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I, claim(s) 1-8, drawn to a method of identifying an animal vaccinated with an immunogen and a non-toxic *E. coli* heat-labile enterotoxin mutant (rmLT).

Group II, claim(s) 9-15, drawn to a method for enhancing the immunoprotective effects of an immunogen comprising adding a non-toxic rmLT; and a vaccine comprising rmLT, an immunogen and an oil-in-water emulsion adjuvant.

The inventions listed as Groups I and II do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

The special technical feature of invention I is a method of identifying an animal vaccinated with an immunogen and a non-toxic *E. coli* heat-labile enterotoxin mutant (rmLT) comprising administering an rmLT-containing vaccine. The special technical feature of invention II is a method for enhancing the immunoprotective effects of an immunogen comprising adding a non-toxic rmLT to a vaccine; and a vaccine comprising an immunogen, rmLT and an oil-in-water emulsion adjuvant. The latter method does not involve *in vivo* administration unlike the method of invention I. The latter method is already disclosed in the prior art, for example, by US patent 6,033,673 (see claims). The methods of the two inventions do not share significant common steps or objectives.

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:

DIALOG, WEST, EMBASE, MEDLINE, TOXLINE, BIOSIS, Sequence databases

mutant heat-labile toxin (LT); SEQ ID NO: 1-9; *Mycoplasma hyopneumoniae*; inventor's name

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 P 31/00 1 7 1	
A 6 1 P 33/00 (2006.01)	A 6 1 P 31/04 1 7 1	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 33/00 1 7 1	
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 2 1	
	C 1 2 Q 1/02	

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, 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, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(74) 代理人 100107386

弁理士 泉谷 玲子

(72) 発明者 マクヴェイ, デーヴィッド・スコット

アメリカ合衆国コネチカット州 0 6 3 4 0, グロトン, イースタン・ポイント・ロード, ファイザー・グローバル・リサーチ・アンド・ディベロプメント

F ターム(参考) 4B063 QA18 QQ02 QQ79 QQ96 QR48 QS33 QX01

4C085 AA03 AA04 AA38 BA21 BA48 CC07 CC31 DD62 DD86 EE03

EE06 FF11 FF17

专利名称(译)	使用rmLT作为疫苗的标记抗原并与Amphigen联合使用		
公开(公告)号	JP2006506615A	公开(公告)日	2006-02-23
申请号	JP2004551102	申请日	2003-11-10
[标]申请(专利权)人(译)	美国辉瑞有限公司		
申请(专利权)人(译)	辉瑞产品公司		
[标]发明人	マクヴェイデーヴィッドスコット		
发明人	マクヴェイ,デーヴィッド・スコット		
IPC分类号	G01N33/53 A61K39/00 A61K39/108 A61K39/39 A61P31/00 A61P31/04 A61P33/00 A61P43/00 C12Q1/02 A61K39/02 G01N33/569 G01N33/68		
CPC分类号	A61K39/0241 A61K2039/522 A61K2039/55544 A61K2039/55566 G01N33/56933 G01N33/6854 G01N2469/20		
FI分类号	G01N33/53.ZNA.N G01N33/53.D A61K39/00.J A61K39/108 A61K39/39 A61P31/00.171 A61P31/04.171 A61P33/00.171 A61P43/00.121 C12Q1/02		
F-TERM分类号	4B063/QA18 4B063/QQ02 4B063/QQ79 4B063/QQ96 4B063/QR48 4B063/QS33 4B063/QX01 4C085/AA03 4C085/AA04 4C085/AA38 4C085/BA21 4C085/BA48 4C085/CC07 4C085/CC31 4C085/DD62 4C085/DD86 4C085/EE03 4C085/EE06 4C085/FF11 4C085/FF17		
代理人(译)	小林 泰 千叶昭夫		
优先权	60/426421 2002-11-14 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了一种方法，通过该方法，动物的所有者或动物食品的生产者可以毫无困难地建立动物疫苗接种条件。更具体地，本发明提供了鉴定与免疫原，重组免疫原和大肠杆菌的热不稳定肠毒素的基本上无毒突变体接种疫苗的动物的方法（RMLT制备包含的疫苗组合物；将疫苗组合物给予动物受试者；并检测动物中对rmLT特异性抗体或免疫细胞的存在，作为用免疫原预先接种动物的指标，提供。本发明提供了鉴定是否用包含免疫原和基本无毒的rmLT的疫苗组合物接种的方法，其中所述动物用作先前用免疫原接种动物的指示物。），检测动物中对rmLT特异的抗体或免疫原的存在。此外，本发明提供或识别疫苗组合物标记的方法，基本上与在疫苗组合物无毒RMLT，在接收到这样的疫苗组合物的动物的抗体或润湿并检测免疫细胞的存在。此外，本发明提供了一种疫苗组合物，以增强免疫原的免疫保护作用，由于在疫苗组合物中包括基本上无毒RMLT的，以提供该方法的方法。还提供了含有免疫原，基本上无毒的rmLT和水包油乳剂佐剂如AMPHIGEN的疫苗组合物。

表1

群	シリアル	抗原	マーカー★	マーカー濃度★★
T04	TBD	M. ハイオニューモニエ	rmLT	10 μg/用量
T05	TBD	M. ハイオニューモニエ	rmLT	20 μg/用量
T06	TBD	M. ハイオニューモニエ	rmLT	50 μg/用量
T07	TBD	M. ハイオニューモニエ	なし	なし
T08	TBD	なし	なし	なし

★:認可された製品、RESPISURE(登録商標)に相当

★★:それぞれのマーカーの3つの濃度が評価された。正確な濃度が記録される。