

(19)日本国特許庁 ( J P )

(12) **公表特許公報** ( A ) (11)特許出願公表番号

**特表2002 - 536339**

(P2002 - 536339A)

(43)公表日 平成14年10月29日(2002.10.29)

(51) Int.Cl <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マ-ド <sup>*</sup> ( 参考 )
A 6 1 K 39/00		A 6 1 K 39/00	A 2 G 0 4 5
39/02		39/02	4 C 0 8 4
39/106		39/106	4 C 0 8 5
39/108		39/108	
39/112		39/112	

審査請求 未請求 予備審査請求 ( 全113数 ) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2000 - 596959(P2000 - 596959)	(71)出願人	ザ リ-ジェンツ オブ ザ ユニバーシ ティ オブ カリフォルニア アメリカ合衆国 カリフォルニア 94607 - 5200,オークランド,12ティーエイチ フロ ア,フランクリン ストリート 1111
(86)(22)出願日	平成12年2月2日(2000.2.2)	(72)発明者	マ-ン, マイケル ジェイ. アメリカ合衆国 カリフォルニア 93111, サンタ バーバラ, カメオ パセオ 5 333
(85)翻訳文提出日	平成13年8月1日(2001.8.1)	(74)代理人	弁理士 山本 秀策
(86)国際出願番号	PCT/US00/02866		
(87)国際公開番号	W000/45840		
(87)国際公開日	平成12年8月10日(2000.8.10)		
(31)優先権主張番号	09/241,951		
(32)優先日	平成11年2月2日(1999.2.2)		
(33)優先権主張国	米国(US)		
(31)優先権主張番号	09/305,603		
(32)優先日	平成11年5月5日(1999.5.5)		
(33)優先権主張国	米国(US)		

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 細菌毒性におけるDNAメチル化の必須な役割に基づいて病原性細菌感染を処置および予防するための組成物および方法

(57)【要約】

本発明は、DNAアデニンメチラーゼ ( Dam ) の活性を変更する非復帰遺伝子変異を有する *Salmonella* のような病原性細菌を含むワクチン組成物、ならびに免疫応答を誘発するためにこれらの組成物を使用する方法に関する。本発明はまた、ワクチンを調製するための方法、ならびに抗細菌活性を有し得る薬剤を同定するためのスクリーニング方法を提供する。代表的には、上記病原性細菌としては、*S. typhimurium*、*S. enteritidis*、*S. typhi*、*S. abortus-ovi*、*S. abortus-equi*、*S. dublin*、*S. gallinarum*、および *S. pullorum* が挙げられる。

**【特許請求の範囲】**

【請求項1】 薬学的に受容可能な賦形剤中に生弱毒化病原性細菌を含む免疫原性組成物であって、該病原性細菌は、該病原性細菌が弱毒化されるようにDNAアデニンメチラーゼ(Dam)活性を変更する変異を含む、免疫原性組成物。

【請求項2】 前記変異がDam活性を減少させる、請求項1に記載の免疫原性組成物。

【請求項3】 前記変異がDam活性を除去する、請求項2に記載の免疫原性組成物。

【請求項4】 前記変異がdam遺伝子の欠失である、請求項3に記載の免疫原性組成物。

【請求項5】 前記変異がDamの発現において増加を引き起こす、請求項1に記載の免疫原性組成物。

【請求項6】 前記病原性細菌がSalmonellaである、請求項1に記載の免疫原性組成物。

【請求項7】 前記病原性細菌が、S.typhimurium、S.enteritidis、S.typhi、S.abortusovi、S.abortus-equi、S.dublin、S.gallinarum、およびS.pullorumからなる群より選択される、請求項6に記載の免疫原性組成物。

【請求項8】 前記変異がDam活性を除去する、請求項6に記載の免疫原性組成物。

【請求項9】 前記変異がdam遺伝子の欠失である、請求項8に記載の免疫原性組成物。

【請求項10】 前記変異がDamの発現において増加を引き起こす、請求項6に記載の免疫原性組成物。

【請求項11】 前記病原性細菌がS.typhimuriumである、請求項7に記載の免疫原性組成物。

【請求項12】 前記変異がdam遺伝子の欠失である、請求項11に記載

の免疫原性組成物。

【請求項13】 前記病原性細菌が*S. dublin*である、請求項7に記載の免疫原性組成物。

【請求項14】 前記変異が*dam*遺伝子の欠失である、請求項13に記載の免疫原性組成物。

【請求項15】 前記病原性細菌が*S. enteritidis*である、請求項7に記載の免疫原性組成物。

【請求項16】 前記変異が*dam*遺伝子の欠失である、請求項15に記載の免疫原性組成物。

【請求項17】 前記病原性細菌が*Escherichia*である、請求項1に記載の免疫原性組成物。

【請求項18】 前記病原性細菌が*E. coli*である、請求項17に記載の免疫原性組成物。

【請求項19】 前記病原性細菌が*Vibrio*である、請求項1に記載の免疫原性組成物。

【請求項20】 前記細菌が*V. cholerae*である、請求項19に記載の免疫原性組成物。

【請求項21】 前記細菌が*Yersinia*である、請求項1に記載の免疫原性組成物。

【請求項22】 前記細菌が*Y. pseudotuberculosis*である、請求項21に記載の免疫原性組成物。

【請求項23】 前記細菌が*Shigella*、*Haemophilus*、*Bordetella*、*Neisseria*、*Pasteurella*および*Treponema*からなる群より選択される、請求項1に記載の免疫原性組成物。

【請求項24】 アジュバントをさらに含む、請求項1に記載の免疫原性組成物。

【請求項25】 異種抗原をさらに含む、請求項1に記載の免疫原性組成物。

【請求項26】 前記病原性細菌が、異種抗原をコードするポリヌクレオチド配列を含む発現カセットをさらに含む、請求項1に記載の免疫原性組成物。

【請求項27】 前記変異が非復帰性である、請求項1に記載の免疫原性組成物。

【請求項28】 前記細菌が該細菌の弱毒化を引き起こす第2の変異を含む、請求項1に記載の免疫原性組成物。

【請求項29】 請求項1に記載の免疫原性組成物を含む、キット。

【請求項30】 薬学的に受容可能な賦形剤中に死滅した病原性細菌を含む免疫原性組成物であって、該病原性細菌が、DNAアデニンメチラーゼ(Dam)活性を変更する変異を含む、免疫原性組成物。

【請求項31】 前記変異が非致死性であり、そして前記病原性細菌を弱毒化させる、請求項30に記載の免疫原性組成物。

【請求項32】 前記変異が致死性である、請求項30に記載の免疫原性組成物。

【請求項33】 前記病原性細菌がSalmonellaである、請求項30に記載の免疫原性組成物。

【請求項34】 前記変異がdam遺伝子を欠失させる、請求項33に記載の免疫原性組成物。

【請求項35】 前記変異がDamの過剰発現を引き起こす、請求項33に記載の免疫原性組成物。

【請求項36】 病原性細菌の弱毒化株であって、該細菌が弱毒化されるように該細菌がDam活性を変更させる変異を含む、株。

【請求項37】 前記変異がDam活性を減少させる、請求項36に記載の弱毒化株。

【請求項38】 前記変異がDam活性を除去する、請求項37に記載の弱毒化株。

【請求項39】 前記変異がdam遺伝子の欠失である、請求項38に記載の弱毒化株。

【請求項40】 前記変異がDamの発現において増加を引き起こす、請求

項36に記載の弱毒化株。

【請求項41】 前記細菌が *Salmonella* である、請求項36に記載の弱毒化株。

【請求項42】 前記細菌が *Salmonella* である、請求項39に記載の弱毒化株。

【請求項43】 前記細菌が *Salmonella* である、請求項40に記載の弱毒化株。

【請求項44】 個体において免疫応答を誘発する方法であって、免疫応答を誘発するに十分な量において、請求項1に記載の免疫原性組成物を該個体に投与する工程を包含する、方法。

【請求項45】 個体において免疫応答を誘発する方法であって、免疫応答を誘発するに十分な量において、請求項12に記載の免疫原性組成物を該個体に投与する工程を包含する、方法。

【請求項46】 個体において免疫応答を誘発する方法であって、免疫応答を誘発するに十分な量において、請求項14に記載の免疫原性組成物を該個体に投与する工程を包含する、方法。

【請求項47】 個体において免疫応答を誘発する方法であって、免疫応答を誘発するに十分な量において、請求項16に記載の免疫原性組成物を該個体に投与する工程を包含する、方法。

【請求項48】 前記免疫応答が投与後に約4週間を超えて持続する、請求項45に記載の方法。

【請求項49】 前記免疫応答が投与後に約4週間を超えて持続する、請求項46に記載の方法。

【請求項50】 前記免疫応答が投与後に約4週間を超えて持続する、請求項47に記載の方法。

【請求項51】 前記個体がヒトである、請求項44に記載の方法。

【請求項52】 前記個体が家畜動物である、請求項44に記載の方法。

【請求項53】 前記動物がニワトリである、請求項52に記載の方法。

【請求項54】 前記動物がウシである、請求項52に記載の方法。

【請求項55】 個体において病原性細菌による感染を予防する方法であって、該病原性細菌による感染の際の該病原性細菌による感染に関連する症状を減少させるに十分な量において、請求項1に記載の免疫原性組成物を該個体に投与する工程を包含する、方法。

【請求項56】 個体において病原性細菌感染を処置する方法であって、該個体において該病原性細菌による感染に関連する症状を減少させるに十分な量において、請求項1に記載の免疫原性組成物を該個体に投与する工程を包含する、方法。

【請求項57】 個体において*Salmonella*感染を予防する方法であって、*Salmonella*による感染の際に該個体において*Salmonella*感染に関連する症状を減少させるに十分な量において、請求項6に記載の免疫原性組成物を該個体に投与する工程を包含する、方法。

【請求項58】 個体において*Salmonella*感染を処置する方法であって、該個体において*Salmonella*感染に関連する症状を減少させるに十分な量において、請求項6に記載の免疫原性組成物を該個体に投与する工程を包含する、方法。

【請求項59】 病原性細菌に感染した個体を処置する方法であって、*Dam*活性を変更する薬剤を含む組成物を該個体に投与する工程を包含する、方法。

【請求項60】 個体において*Salmonella*の第2の種に対する免疫応答を誘発する方法であって、*Salmonella*の弱毒化した第1の種を含む免疫原性組成物を該個体に投与する工程であって、該第1の種は、*Salmonella*の第1の種が弱毒化されるように*Dam*活性を変更する変異を含む、工程を包含する、方法。

【請求項61】 前記第1の*Salmonella*種が、*S. typhimurium*である、請求項60に記載の方法。

【請求項62】 前記第1の*Salmonella*種が、*S. enteritidis*である、請求項60に記載の方法。

【請求項63】 抗細菌活性を有し得る薬剤を同定する方法であって、薬剤をインビトロ転写系に添加した場合に*dam*遺伝子からの転写レベルを変更する

薬剤を、該インビトロ転写系を使用して、検出する工程であって、薬剤は、薬剤が添加されない場合の転写レベルと比較して、該dam遺伝子からの転写レベルを変更するその能力によって同定される、工程を包含する、方法。

【請求項64】 前記dam遺伝子がSalmonella由来である、請求項63に記載の方法。

【請求項65】 抗細菌活性を有し得る薬剤を同定する方法であって、薬剤をインビトロ転写系に添加した場合にDamをコードするRNA転写物からの翻訳レベルを変更する薬剤を、該インビトロ翻訳系を使用して、検出する工程であって、薬剤は、薬剤が添加されない場合の翻訳レベルと比較して、Damをコードする該RNA転写物からの翻訳レベルを変更するその能力によって同定される、工程を包含する、方法。

【請求項66】 前記DamがSalmonella由来である、請求項65に記載の方法。

【請求項67】 抗細菌活性を有し得る薬剤を同定する方法であって、該薬剤がDamに結合するか否かを決定する工程であって、薬剤がDamに結合するその能力によって同定される、工程を包含する、方法。

【請求項68】 前記DamがSalmonella由来である、請求項67に記載の方法。

【請求項69】 抗細菌活性を有し得る薬剤を同定する方法であって、以下の工程：

(a) Dam結合部位を含む非メチル化オリゴヌクレオチドとDam、S-アデノシルメチオニンおよび薬剤とをインキュベートする工程であって、該非メチル化オリゴヌクレオチドがシグナルをさらに含む、工程；

(b) 全ての非メチル化標的部位を消化して、それによって該非メチル化オリゴヌクレオチドを放出する、工程；ならびに

(c) 該非メチル化標的部位の消化に起因する該シグナルにおける増加として、DNAアデニンメチラーゼの阻害を検出する工程、を包含し、ここで薬剤が、薬剤の非存在下での工程(a)、(b)および(c)の実施と比較して、シグナルにおける増加を引き起こすその能力によって同定さ

れる、方法。

【請求項70】 前記オリゴヌクレオチドが固体表面に係留される、請求項69に記載の方法。

【請求項71】 前記固体表面が、アビジンを含むマイクロタイタープレートであり、前記オリゴヌクレオチドがビオチンを含む、請求項70に記載の方法。

【請求項72】 前記Dam結合部位がGATC配列である、請求項69に記載の方法。

【請求項73】 前記DamがSalmonella由来である、請求項69に記載の方法。

【請求項74】 薬剤が、ポリペプチド、有機化合物および無機化合物より選択される群からなるインヒビターライブラリーより選択される、請求項69に記載の方法。

【請求項75】 抗細菌活性を有し得る薬剤を同定する方法であって、以下の工程：

(a) 試験されるべき薬剤と、Dam機能を有する適切な宿主細胞とを接触させる工程；および

(b) Dam機能の変更と関連する少なくとも1つの特徴を分析する工程であって、薬剤が少なくとも1つの該特徴を誘発するその能力によって同定される、工程、

を包含する、方法。

【請求項76】 前記宿主細胞が細菌である、請求項75に記載の方法。

【請求項77】 前記細菌がSalmonellaである、請求項76に記載の方法。

【請求項78】 請求項1に記載の免疫原性組成物を調製する方法であって、薬学的賦形剤と、病原性細菌が弱毒化されるようにDNAアデニンメチラーゼ(Dam)活性を変更する変異を含む該病原性細菌とを組合せる工程を包含する、方法。

【請求項79】 対応するまたは同様の病原性微生物により引き起こされる

疾患に感受性である宿主による免疫学的応答を誘発し得る弱毒化細菌を調製するための方法であって、該病原性細菌において少なくとも1つの変異を構築する工程であって、第1の変異がD a m機能の変更を生じる、工程を包含する、方法。

【請求項80】 第1の変異がd a m遺伝子に導入される、請求項79に記載の方法。

【請求項81】 第2の変異が、前記第1の変異とは独立した遺伝子において作製され、該第2の変異が前記病原性細菌の弱毒化を引き起こす、請求項80に記載の方法。

【請求項82】 前記第1の変異がD a mの発現を変更する、請求項80に記載の方法。

【請求項83】 前記第1の変異がD a mの発現を除去する、請求項82に記載の方法。

【請求項84】 所望の抗原をコードする1以上の構造遺伝子を含む発現カセットを、前記弱毒化細菌に挿入する工程をさらに包含する、請求項80に記載の方法。

【請求項85】 請求項85に記載の方法であって、前記所望の抗原が、破傷風毒素のフラグメントC、コレラ毒素のBサブユニット、B型肝炎表面抗原、*Vibrio cholerae* LPS、HIV抗原および*Shigella sonnei* LPSからなる群より選択される、方法。

**【発明の詳細な説明】****【0001】**

(他の出願に対する相互参照)

本特許出願は、それらの全体が参考として援用される、米国仮特許出願第 \_\_\_\_\_ 号から変更された米国特許出願第09/241,951号(1999年2月2日出願)および米国仮特許出願第 \_\_\_\_\_ 号から変更された同第09/305,603号(1999年5月5日出願)の優先権の利益を主張する。

**【0002】**

(連邦政府に援助された研究の下でなされた発明に対する権利の声明)

本発明は、国立衛生研究所により与えられた、助成金番号A I 3 6 3 7 3 (M . M a h a n に対する) およびA I 2 3 3 4 8 (D . L o w に対する) の下で政府の援助によりなされた。政府は、本発明に特定の権利を有し得る。

**【0003】**

(発明の分野)

本発明は、微生物病因の予防または改変のために有用なワクチンに関する。特に、本発明は、一般に、DNAアデニンメチラーゼ(Dam)に影響する変異を含む病原性細菌(例えば、Salmonella)を含む免疫原性組成物に関する。本発明はまた、これらの組成物を使用して免疫応答を誘発する方法、およびスクリーニング方法に関する。

**【0004】**

(発明の背景)

食品が原因となる(food-borne)疾患は、我々の健康、国家の食品の供給の安全性、および農産業に対して深刻な脅威を示す。毎年8000万人を超えるアメリカ人が、食中毒に罹り、費用は、医学処置および消費された賃金において年間50億ドルと230億ドルの間であると見積もられている(Snydman, D. R., Food poisoning: Infectious Diseases (第2版)、Gorbash, S. L.ら編、768~781(1998))。食品が原因となる疾患に対する人間の防御は、失敗している。なぜなら、人を衰弱させるより多くの疾患形態を引き起こし得、そして/また

は入手可能な抗生物質によりもはや制御され得ない新たな病原体が出現したからである；例としては、*Escherichia coli* (*E. coli*) O157:H7、*Salmonella enteritidis* (*S. enteritidis*)、および *S. typhimurium* DT104 が挙げられる (Alterkruse, S.F. ら、Emerging food borne disease、3:7月~9月(1997))。サルモネラ症は、一年あたり100~400万の間の症例であると評価される、米国における主要な食品が原因となる疾患のうちの1つである (Shere, K.D. ら、*Salmonella infections: infectious Diseases*、第2版、Gorbach, S.L. ら、編、699~712(1998))。この疾患は、*Salmonella* に汚染された生産物 (動物生産物 (例えば、卵)、牛乳、家禽、または動物の糞便に曝された食品 (果実および野菜を含む) の摂取に曝されることによって引き起こされる。大規模な製造および流通の実施に起因して、サルモネラ症の発生は、大きな集団に影響を与えた (Tauxe, R.V. ら、Emerging food borne diseases: an evolving public health challenge. Emerging infectious diseases、3:10月~12月(1997))。

#### 【0005】

*Salmonella* は、種々の種が急性胃腸炎および腸熱を含む臨床疾患のスペクトルの原因である病原性微生物の主な例である。*Salmonella* 感染は、経口摂取により獲得される。*Salmonella* 感染は、経口摂取により獲得される。微生物は、胃を超えた後に、腸粘膜細胞に侵入し、そして複製する。Hornik ら、*N. Eng. J. Med.*、283:686(1970) を参照のこと。いくつかの種 (例えば、*S. typhi*) は、この粘膜障壁を通過して、そしてパイエル板を介して、固有層および限局性リンパ節に広がる。人間にのみ感染する *Salmonella typhi* は、腸チフスの原因であり、そして非先進国における居住者には重要な公衆健康問題であり続ける。

#### 【0006】

尿路感染 (UTI) は、最も一般的な細菌感染に挙げられる。約20%の女性が、それらの寿命の間に少なくとも1回のUTIを経験すると見積もられる。女性は、UTIの主要な標的であるが、男性および子供もまた、この疾患に接し得る。全てのUTIのうちの約70%が、尿路病原性 (uropathogenic) *Escherichia coli* によって引き起こされる。この疾患は、より低い尿路 (膀胱炎) に限定され得るか、または腎盂 (腎盂腎炎) に関与し得る。腎盂腎炎を患う女性から単離された *E. coli* のうち90%を超えるものが、腎盂腎炎関連毛 (pyelonephritis-associated pili) (pap) 遺伝子クラスターを含む (O'Hanley, P.M. ら、*N. Engl. J. Med.* 313: 414~447 (1985))。 *E. coli* により引き起こされる腎盂腎炎を患うほとんどの患者は、Pap毛に対する強力な免疫応答をマウントする。Pap毛は、それらの先端に、これらの細菌が尿路でコロニー形成することを可能にする付着素を含む。ほとんどのPap毛-付着素複合体は、P式血液型レセプターに結合する。このレセプターは、腸、膀胱および尿管の管壁の上皮細胞に発現される。UTIの病因における接着の役割の本発明者らの理解にもかかわらず、ワクチンは、UTIに対して利用可能ではない。これはまた、有意な罹病率および死亡率を引き起こす、多くの他の重要な微生物病原体についてあてはまる。

#### 【0007】

微生物病原体または疾患生成微生物は、いくつかの機構のうちの1つによって宿主に感染し得る。それらは、皮膚における傷を通して侵入し得るか、それらは、ベクターの伝達によって導入され得るか、またはそれらは、粘膜表面と相互作用し得る。病原体が正常な身体機能を破壊する能力が十分に発現される場合、疾患は、宿主の感染後に続いて起こる。

#### 【0008】

各疾患生成微生物は、それらの病原性を増強し、かつそれらが宿主またはヒト組織に侵入してそして正常な身体機能を破壊することを可能にする、毒性因子の収集物を保有する。感染性疾患は、過去数千年にわたる主要な殺し屋であり、そしてワクチンおよび抗菌剤が感染性疾患の発生における劇的な減少に重要な役割

を果たしつつ、感染性疾患はなお、世界規模の死の第1位の原因である。

#### 【0009】

宿主内の環境状態は、ほとんどの既知の毒性因子の発現を調節することを担う (Mekalanos, J. J., Bacteriol. 174:1 (1992))。過去、科学者は、毒性因子をコードし、そしてその因子の産生を担う遺伝子を同定する試みにおいて、宿主内の環境条件を、インビトロで模倣することを試みた。結果として、多くの毒性因子の同定は、研究者らが実験室内で宿主の環境因子を模倣する能力に依存し、そしてそれによって制限される。しかし、Mahalan, M. J.らにより発見され、そして米国特許第5,434,065号に開示されるインビボ発現技術 (IVET) の出現とともに、どの遺伝子が宿主内に発現されるか、および遺伝子が発現される宿主の組織を決定することが現在可能である。結果として、宿主 (ヒト身体) 免疫系を回避し、そして疾患プロセスに固有の生理学的変化を開始することを可能にする、特定の病原性微生物の分子機構が、解明され、それによって、病原性微生物に対するより良好な治療アプローチおよび診断アプローチを開発することを可能にする。

#### 【0010】

水の衛生とともに、ワクチン接種による感染性疾患の予防は、疾患の予防の最も効率的、経済的、かつ現実的な方法である。他の治療様式 (抗生物質でさえも) は、死亡率の減少および集団増殖に対するこのような主要な効果を有しなかった。世界の人々の健康に対するワクチン接種の影響は、誇張しがたい。少なくとも世界の一部でのワクチン接種は、以下の9つの主要な疾患を制御した: 痘瘡、ジフテリア、破傷風、黄熱病、百日咳、ポリオ、麻疹、おたふくかぜおよび風疹。痘瘡の場合には、この疾患は、世界から全て根絶された。ワクチンの有効性は、以下に一般的に記載されている、保護免疫応答を誘発するその能力に依存する。

#### 【0011】

脊椎動物、特に鳥類および哺乳動物が微生物病原性を克服する手段は、複雑である。宿主に侵入する病原体は、多くの高度に多方面の系および保護系を引き起こす。微生物病原体またはその毒素が、身体の外側の防御を首尾よく突き抜け、

そして血流に達する場合、脾臓、肝臓および骨髄のリンパ組織は、これらの器官を通る血液循環として外来物質を除去し、そして破壊する。リンパ組織は、重なり合っている細網細胞および細網線維の網状構造から主に構成される。組織の隙間への接着は、多数の白血球、より詳細には、リンパ球、および分化の種々の段階における他の細胞（例えば、形質細胞、リンパ芽球、単球 - マクロファージ、好酸球および肥満細胞）である。2つの主要なリンパ球（T細胞およびB細胞）は、抗原特異的免疫応答の媒介において異なりかつ補完的な役割を有する。

#### 【0012】

免疫応答は、非常に複雑であり、そして外来病原体を認識する能力を有する有益なホメオスタシス機構である。外来病原体に対する初期応答は、「生来の免疫」と呼ばれ、そして外来病原体の部位に対するナチュラルキラー細胞、マクロファージ、好中球、および他の白血球の迅速な移動によって特徴付けられる。これらの細胞は、貪食するか、消化するか、溶解するか、または短期間で病原体を溶解するサイトカインを分泌するかのいずれかであり得る。生来の免疫応答は、抗原特異的ではなく、そして一般に、「順応 (adaptive) 免疫応答」が生成され得るまで外来病原体に対する防御の第1のラインとしてみなされる。T細胞およびB細胞の両方は、順応免疫応答に関与する。種々の機構が、順応性免疫応答の生成に関与する。順応性免疫応答を生成する全ての可能な機構の議論は、この節の範囲を超えるが、十分に特徴付けられているいくつかの機構は、抗原のB細胞認識、ならびにその後の、抗原特異的抗体を分泌する活性化および抗原提示細胞に結合することによるT細胞活性化を含む。

#### 【0013】

微生物は、免疫系により外来として認識される細胞膜を有し得る。さらに、微生物はまた、宿主の免疫系によりまた外来としてみなされる毒素またはタンパク質を産生し得る。上記の第1の機構は、B細胞上の表面免疫グロブリンレセプターに対する抗原（例えば、細菌細胞壁または細菌毒素）の結合を含む。レセプターの結合は、B細胞の内部にシグナルを伝達する。これは、「第1シグナル」として当該分野において一般的にいわれるものである。いくつかの場合、1つのシグナルのみが、B細胞を活性化するために必要とされる。T細胞の補助に依存す

ることなくB細胞を活性化し得るこれらの抗原は、一般に、T独立抗原（または胸腺独立抗原）といわれる。他の場合において、「第2シグナル」が必要とされ、そしてこれは、B細胞に結合するTヘルパー細胞によって通常提供される。T細胞の補助が、特定の抗原へのB細胞の活性化に必要とされる場合、この抗原は、T依存抗原（または胸腺依存抗原）といわれる。B細胞上の表面レセプターへと結合に加えて、この抗原はまた、B細胞によってインターナライズされ、次いで、B細胞内でより小さなフラグメントに消化され、そして抗原性ペプチド-MHCクラスII分子の状況においてB細胞の表面上に提示され得る。これらのペプチド-MHCクラスII分子は、いくつかの抗原に必要とされる「第2シグナル」を提供するためにB細胞に結合するTヘルパー細胞によって認識される。一旦、B細胞が活性化されると、B細胞は、抗原の不活性化を最終的には導く、抗原に対する抗体を分泌し始める。活性化されるべきB細胞の別の様式は、リンパ節および脾臓の胚中心内での、濾胞性樹状細胞（follicular dendritic cell）（FDC）との接触によってである。濾胞性樹状細胞は、リンパ節および脾臓を通過して循環する抗原-抗体（Ag-Ab）複合体を捕捉し、そしてFDCは、これらをB細胞に提示して、これらを活性化する。

#### 【0014】

抗原に対する順応性免疫応答の十分に特徴付けられた別の機構は、抗原提示細胞（例えば、マクロファージおよび樹状細胞）への結合によるT細胞の活性である。マクロファージおよび樹状細胞は、強力な抗原提示細胞である。マクロファージは、微生物成分（例えば、マクロファージマンノースレセプターおよびスカベンジャーレセプター）を認識する種々のレセプターを有する。これらのレセプターは、微生物を結合し、そしてマクロファージは、それらを飲み込み、そしてエンドソームおよびリソソーム内で微生物を分解する。いくつかの微生物は、この様式で直接破壊される。他の微生物は、小さなペプチドに消化されて、このペプチドは、次いで、MHCクラスII-ペプチド複合体の状況においてマクロファージの表面上でT細胞に提示される。これらの複合体に結合するT細胞は、活性化される。樹状細胞もまた、強力な抗原提示細胞であり、そしてT細胞を活性化するために、ペプチド-MHCクラスI分子およびペプチド-MHCクラスII

I分子を提示する。

【0015】

B細胞が遭遇したことのない抗原に結合する場合、この細胞は、「アイソタイプスイッチング」と呼ばれる発達経路を受ける。発達変化の間に、形質細胞は、一般的なIgM型抗体の産生から非常に特異的なIgG型抗体の産生にスイッチする。細胞のこの集団において、いくつかは、「クローン性増殖」と呼ばれるプロセスにおいて反復する分裂を受ける。これらの細胞は成熟して、血液中に免疫グロブリンを放出する抗体工場になる。それらが十分に成熟である場合、それらは、一般に、成熟に達した後2日または3日以内に、形質細胞（それらが死ぬまで、毎秒あたり約2,000個の同一の抗体を放出し得る細胞）を同定した。クローンのこの群における他の細胞は、抗体を産生しないが、特定の抗原に遭遇する際にこの抗原を認識かつ結合する記憶細胞として機能する。

【0016】

抗原による最初のチャレンジの結果として、本来のB細胞または親細胞に同一なはるかに多くの細胞が存在し、これらの各々は、本来のB細胞として、いくつかの様式において、抗原に応答し得る。結果的に、抗原が2回目に出現した場合に、これは、すぐに正確なB細胞のうちの1つに遭遇し、そしてこれらのB細胞は、特定のIgG抗体についてプログラムされるので、この免疫応答は、すぐに開始し、急速に加速し、より特異的であり、そしてより多数の抗体を産生する。この事象は、第2または既往応答とみなされる。図1は、一次応答および二次応答の結果として存在する抗体力価の比較を示す。免疫は、数年持続し得る。なぜなら、記憶細胞は、数ヶ月または数年生存するからであり、そしてまた、外来物質は、時折、低レベルの免疫応答を絶えず誘発するに十分であるわずかな用量において再導入されるからである。この様式において、記憶細胞は、定期的に補充される。

【0017】

抗原に1回目に曝した後に、応答は、しばしば、抗体をゆっくりと生成し、そして産生される抗体の量は、少ない（すなわち、一次免疫）。同じ抗原での2回目のチャレンジの際には、応答（すなわち、二次免疫）は、より迅速であり、そ

して非常に強く、それによってワクチンによって誘導されるべきである目標である、病原性微生物での再感染後に、促進された二次応答に等しい免疫状態を達成する。

#### 【0018】

一般に、活性なワクチンは、2つの一般的なクラス(サブユニットワクチンおよび生物全体のワクチン)に分けられる。サブユニットワクチンは、生物全体の成分から調製され、そして通常、以下にさらに詳細に議論されるように、疾患を引き起こし得る生きている生物の使用を回避するためか、または生物全体のワクチンに存在する毒性成分を回避するために、開発される。ヒトにおいてH. influenza b型により引き起こされる髄膜炎に対するワクチンとしてこの生物の精製されたカプセルポリサッカリド物質を使用することは、抗原性成分に基づくワクチンの例である。Parksら、J. Inf. Dis. 136(補遺):551(1997)、Andersonら、J. Inf. Dis. 136(補遺):563(1977);およびMakelaら、J. Inf. Dis. 136(補遺):543(1977)を参照のこと。

#### 【0019】

古典的には、サブユニットワクチンは、部分的に精製された毒素の化学的な不活性化によって調製されており、それ故、トキシイドと呼ばれている。ホルムアルデヒドまたはグルタルアルデヒドは、細菌毒素を解毒するための選り抜きの化学物質であった。ジフテリアおよび破傷風毒素の両方は、ホルムアルデヒドで首尾よく不活性化されており、ジフテリアおよび破傷風を管理するために、40年を超えて使用されている安全かつ有効なトキシイドワクチンを生じる。Pappenhaimer, A.M., Diphtheria.: Bacterial Vaccines (R. Germanier, 編), Academic Press, Orlando, FL. 1~36頁(1984); Bizzini, B., Tetanus. 同書37~68頁。しかし、化学トキシイドは、所望の特性ではない。実際、この型のワクチンは、開発するのがより困難であり得る。なぜなら、保護抗原が最初に同定されなければならない、次いで、手順が抗原を効率的に単離するために開発されなければならない。さらに、いくつかの場合、サブユ

ニットワクチンは、そうでなければ保護抗原をマスクするかまたは免疫優勢である物質の除去に起因してより免疫原性である外因性物質（例えば、膜または内毒素）の欠如に起因して生物全体のワクチンが誘発するのと同じ強さの免疫応答を誘発しない。

#### 【0020】

一方、生物全体のワクチンは、ワクチン接種のために生物全体を利用する。この生物は、殺傷され得るか、または保護免疫を誘発する要件に依存して生存している（通常、弱毒化される）。百日咳ワクチンは、例えば、殺傷され、細胞全体のワクチンが、ホルムアミドでの *Bordetella pertussis* 細胞の処理によって調製される。細菌 *B. pertussis* は、気道の上皮内層でコロニー形成し、幼児および幼い子供に対して最も高い罹病率および死亡率を有する、ヒトにおける高度に伝染性呼吸疾患である百日咳 (*pertussis*) または百日咳 (*whooping cough*) を生じる。コロニー形成はさらに、*B. pertussis* により産生される毒素によって大部分において引き起こされる局所組織損傷および全身効果を生じる。Manclarkら, *Pertussis*, 同書, 64~106頁。これらの毒素としては、内毒素またはリポポリサッカリド、気管細胞毒素と呼ばれるペプチドグリカンフラグメント、熱不安定性皮膚壊死性毒素、アデニル酸シクラーゼ毒素、およびタンパク質外毒素百日咳毒素が挙げられる。ワクチン接種は、百日咳を制御するための最も効果的な方法であり、そしてジフテリアおよび破傷風トキソイド (DPTワクチン) とともに投与される殺傷された細胞全体のワクチンは、多くの国々において疾患を制御するに効果的であった。Fineら、*Reflections on the Efficacy of Pertussis Vaccines*, *Rev. Infect. Dis.*, 9: 866~883 (1987) を参照のこと。不幸なことに、百日咳ワクチンに含まれる、上記の大量の内因性産物に起因して、多くの子供は、注射の際に有害な反応を経験する。グラム陰性生物（ならびに全ての他のグラム陰性生物）の外膜の必須成分である内毒素は、軽度から重篤な広範な範囲の副作用（発熱、ショック、白血球増加症、および流産を含む）を誘導し得る。百日咳ワクチンと関連する副作用は、通常、軽度であるが、それら

は、非常に重篤であり得る。しかし、インフルエンザウイルスワクチンに存在する毒素成分は、強力な発熱物質応答を誘導し得、そしてギャン - バレー症候群の生成を担っている。インフルエンザワクチンは、ニワトリ胚におけるウイルスの増殖によって調製されるので、胚または卵の成分は、この毒性に寄与するようである。

#### 【0021】

殺傷されたワクチンの使用はまた、ブタにおける *Bordetella bronchiseptica* 感染に対するワクチンの調製にこのような方法を適用した Switzerら、米国特許第4,016,253号によって記載されている。Brownら、*Br. Med. J.* 1:263(1959)による技術論文において、殺傷された細胞全体の使用は、*Haemophilus influenzae*により引き起こされる慢性気管支炎に対するワクチンを調製するために開示される。しかし、殺傷された細胞の使用は、通常、免疫原性能力の付きまとう損失によって達成される。なぜなら、殺傷のプロセスは、通常、宿主における特異的な抗体の誘導に必要な、多くの表面抗原決定基を破壊または変更し得るからである。殺傷されたワクチンは、多くの病原性細菌 (*Salmonella* spp. および *V. cholerae* を含む) に効果がないか、またはわずかに効果がある。*Salmonella typhi* についての現在の使用における親の殺傷された細胞全体のワクチンは、適度に効果的であるのみであり、そして受け入れることのできない高い頻度で、顕著な全身のおよび局所的な有害反応を引き起こす。

#### 【0022】

*Salmonella* のような細胞内病原体の場合には、生存しているが弱毒化された微生物に基づくワクチン (生ワクチン) が、非常に効果的な型の免疫性応答を誘導することが、一般に同意されている。生弱毒化ワクチンは、良性であるが代表的に宿主組織において複製し得、そして好ましくは天然の感染に類似する免疫系にプロセッシングおよび提示される多くの天然標的免疫原を恐らく発現する、生存生物からなる。この相互作用は、その免疫化個体が以前にその疾患に曝露されたかのように、保護応答を惹起する。生細菌ワクチンの構築のために弱毒

化変異を規定する研究の大部分は、S . s p p . において実施されている。なぜなら、これらは消化管関連リンパ系組織 ( G A L T ) との直接的相互作用によって感染を樹立し、強い体液免疫性応答をもたらすからである。これらはまた、宿主細胞に侵入し、従って強い細胞媒介応答を惹起し得る。Eisenstein (1999) Intracellular Bacterial Vaccine Vectors (Paterson編、Wiley-Liss, Inc.) 51~109頁; Honeら (1999) Intracellular Bacterial Vaccine Vectors (Paterson編、Wiley-Liss, Inc.) 171~221頁; Sirardら (1999) Immun. Rev. 171: 5~26。理想的には、これらの弱毒化微生物は、特異的な抗体誘導のために必要である細胞表面成分の完全な一体性を維持するが、依然として疾患を引き起こし得ない。なぜなら、例えば、これらは宿主において、毒性因子を産生しないか、非常に遅く増殖するか、または全く増殖しないからである。さらに、これらの弱毒化株は、ビルレント野生型株を復帰変異させる可能性を実質的に有さないべきである。伝統的に、生ワクチンは、抗原的に関連するウイルスを別の種から単離すること、非標的種もしくは組織培養物における、継代および適応による弱毒化を選択すること、または温度感受性改変体を選択することのいずれかによって、得られた。最初のアプローチは、痘瘡に対してヒトを予防接種するためにウシポックスウイルスを使用した、Edward Jennerにより使用された。

#### 【0023】

非標的種において系列継代による弱毒化を選択することは、生ワクチンを得る際に広く成功している第二のアプローチである。例えば、Parkmanら、N . Engl . J . Med .、275: 569~574 (1966) は、ミドリザル腎臓細胞での系列増殖後に弱毒化風疹ワクチンを開発した。麻疹ワクチンが、ニワトリ胚線維芽細胞においてウイルスを継代させることによって、調製された。ポリオ、A型肝炎、B型日本脳炎、デング熱、およびサイトメガロウイルスに対するワクチンは、類似の手順に従って、全て調製されている。

#### 【0024】

動物モデル、特にサルが、系列継代および選択による生ワクチンの開発において有用であるが、ワクチンが本当に非病原性であるかどうかの大きな不確実性が、ヒトに接種されるまで残る。例えば、感染された幼い (suckling) マウス脳から産生される黄熱病の Daker 株は、1%のワクチンにおいて脳炎を誘導した。別の重大な問題は、細胞培養物または動物 (特に、サル) における継代の間の外因性ウイルスによる、可能なワクチンの汚染である。動物からヒトへと伝達され得るウイルスの潜在的な危険に関するより最近の知見から、生ワクチンを開発するこの選択は、非常に疑わしい。

#### 【0025】

上述の、生ワクチンを選択するいくらか危険なアプローチとは対照的に、現代の開発アプローチは、病原体が疾患を誘導する能力に影響を与える特異的な変異を、その病原体のゲノムに導入する。規定された遺伝子操作は、病原性微生物により引き起こされる種々の疾患に対する生ワクチンを開発する試みにおいて取られる、現在のアプローチである。

#### 【0026】

より安全であり、より高い免疫性応答を惹起する生ワクチンを開発する努力において、研究者らは、特異的な遺伝的変異を有する生ワクチンを開発する努力に焦点を当てた。Curtissは、米国特許第5,294,441号において、S. typhiが、cya (アデニレートシクラーゼ) 遺伝子およびcrp (環状3',5'-AMP [cAMP] レポータータンパク質) 遺伝子のいずれかまたは両方の欠失 ( ) を構築することによって弱毒化され得ることを開示する。cAMPおよびcAMPレセプタータンパク質 (それぞれ多面性遺伝子cyaおよびcrpの産物) は、互いに組み合わさって機能して、調節性複合体を形成し、これは、多数の遺伝子およびオペロンの転写に影響を与える。その結果、これらの遺伝子のいずれかを変異させることによって、弱毒化微生物が得られる。さらに、cya遺伝子またはcrp遺伝子のいずれかにおいて単一の変異を有する微生物は、これらの遺伝子産物を予防接種されるべき宿主から清掃することによって、その欠損を補充し得ない。crp遺伝子産物は、哺乳動物組織においては利用可能ではなく、そして一方で、cya遺伝子産物により産生される代謝物 (

cAMP)は、哺乳動物細胞内に存在し、*S. typhi*が侵入する細胞内に存在する濃度は、*cya*が変異して野生型表現型を発現し得るために必要な濃度より低い。Curtissら、*Infect. Immun.*、55:3035~3043(1987)を参照のこと。

【0027】

cAMPは、いくらかのレベルで宿主組織に存在するので、Curtissらは、変異を*crp*遺伝子に導入することによって、*cya*微生物を安定化させた。Tackettら、*Infect. Immun.*、60(2):563~541(1992)は、健康な成人入院患者志願者での研究を行い、この研究は、*cya*遺伝子および*crp*遺伝子に欠失を有する弱毒化*S. typhi*が熱および菌血症(血液中の細菌)を生成する傾向を有することを明らかにした。

【0028】

生ワクチンを開発するための試みにおける類似のアプローチが、Dr. B. A. D. Stockerによりなされた。Stockerにより変異された遺伝子は、これもまた宿主組織において生存不可能である産物を産生する。Stockerは、米国特許第5,210,035号において、完全かつ非復帰変異ブロックを生合成経路に導入することによって非ビルレントにされ、宿主組織において利用不可能な代謝産物の要件を引き起こす、病原性微生物由来のワクチン株の構築を記載する。具体的には、Stockerは、*Salmonella*をp-アミノ安息香酸(PABA)および2,3-ジヒドロキシベンゾエート(哺乳動物組織中の細菌に対して利用可能ではない物質)に対して栄養素要求性(すなわち、栄養依存性)にする芳香族(*aro*)代謝産物の生合成のための経路を中断することによって、*S. typhi*が弱毒化され得ることを教示する。これらの*aro*変異は、コリスミ酸(芳香族化合物PABAおよび2,3-ジヒドロキシベンゾエートの前駆体)の合成を不可能にし、そして*Salmonella*には、この欠損を克服し得る他の経路が存在しない。この栄養素要求性の結果として、*aro*欠失細菌は、宿主内で増殖し得ない;しかし、これらは、保護的な免疫性応答を刺激するに十分に長く、細胞内で生存および増殖する。上述のTackettらにより著作された技術論文において、*S. typhi*の弱毒化株もまた、*S*

t o c k e r に従って、a r o C 遺伝子およびa r o D 遺伝子に欠失を導入することによって、ワクチンとしての使用のために構築された。しかし、健康な入院患者志願者に投与されたこれらの弱毒化株は、熱および菌血を生成する傾向を有する (Honeら (1987)、Hormaechera (1996) Vaccine 14:251~259; HassanおよびCurtiss (1997) Avian Dis. 41:783~791; ならびにMillerら (1990) Res. Microbiol. 141:817~821)。

#### 【0029】

これらのワクチン間の比較研究は、厳密には試験されておらず、従って、これらの現在の株の互いに対する効力は、不明確なままである。さらに、現在の生細菌ワクチン候補の毒性 (例えば、下痢のような症状)、およびヒト集団における多くの個体が免疫無防備状態であることの現実性は、より良好な保護を与え、より長く続き、そしてより低い毒性を有する、さらなるワクチンの検索を明らかに正当化する。

#### 【0030】

ワクチン開発に関する別の重要な問題は、多くの病原性種が、類似の病原性株に対して予防接種された動物宿主において疾患を引き起こし得る、複数の血清型からなるという事実である。長期にわたる相互保護的な *Salmonella* ワクチンの開発の以前の試みは、しばしば疑問であった。例えば、生弱毒化 a r o A *Salmonella* 株は、異種の血清型 (例えば、B群株 (typhimurium) およびD群株 (enteritidis および dublin)) に対する相互保護応答を惹起することが示されたが、この相互保護的な能力は、このワクチンが免疫化された動物から除去された後に、事実上は排除される。Hormaechera (1996)。

#### 【0031】

多くの細胞高分子と同様に、DNAは、インタクトなポリマーに小さな化学部分を付加することによって、合成後「改変」に曝される。種々の生物において、これは、図2に示すように、シトシンのC5位またはアデノシンのN6位のいずれかでの、DNAへのメチル (-CH<sub>3</sub>) 基の酵素的付加を伴う。DNAへのメ

チル基の付加の原因となる酵素は、DNAメチルトランスフェラーゼまたはDNAメチラーゼとして公知である。DNAメチラーゼは、以下の2つの分類に分割され得る：(1)シトシンをメチル化するもの(DNAシトシンメチラーゼ)；および(2)アデニンをメチル化するもの(DNAアデニンメチラーゼ)。

#### 【0032】

DNAアデニンメチラーゼ(Dam)によるアデニン残基でのメチル化は、重要な生物学的プロセス(例えば、DNA複製、メチル指向ミスマッチ塩基対修復、および転移)のタイミングおよび標的化を制御する(Marinus、E. coli and Salmonella: Cellular and Molecular biology、第2版、782~791(1996))。さらに、E. coliにおいて、Damは、上尿路感染症の重要な毒性決定因子である腎盂腎炎関連毛(pap)のようなオペロンの発現を調節する(Rogertsら、J. Urol.、133:1068~1075(1985)；van der Woudeら、Trends Microbiol.、4:5~9(1996))。後者の調節機構は、遺伝性DNAメチル化パターンの形成を包含し、これは、調節タンパク質の結合を改変することによって、遺伝子発現を制御する。

#### 【0033】

生の病原性微生物から調製されるワクチンであって、安全であり、宿主に投与されるとその宿主に効果的な型の免疫性応答を誘導する、ワクチンに対する重大な必要性が残っている。異なる株(すなわち、ヘテロ血清型または種)に対する免疫性応答を刺激し得る単一のワクチン株を開発することもまた、非常に所望される。病原性微生物により引き起こされる疾患に苦しむ患者を処置するために使用され得る、安全かつ効果的な抗菌性薬物に対するさらなる必要性もまた、存在する。

#### 【0034】

本願に引用する全ての参考文献および特許出願は、その全体が本明細書中に参考として援用される。

#### 【0035】

(発明の要旨)

本発明は、DNAアデニンメチラーゼ(Dam)がSalmonellaの病  
因に必須であるという発見、ならびにDam-Salmonellaがマウス腸  
チフスに対する生弱毒化ワクチンとして効果的であり、そしてSalmonel  
laの第二種に対する免疫性応答を惹起するという発見に基づく。DNAアデニ  
ンメチラーゼは、有意な罹病率および死亡率を引き起こす多くの病原性細菌にお  
いて高度に保存されるので、これらの病原体のDam誘導体は、生弱毒化ワクチ  
ンとして効果的であり得る。さらに、DNAアデニン残基のメチル化は、細菌毒  
性のために必須であるので、DNAアデニンメチラーゼの発現を変化させるか、  
またはその活性を阻害する薬物は、恐らく広い抗菌作用を有し、従って、DNA  
アデニンメチラーゼおよびその産物をコードする遺伝子は、抗菌薬物開発のため  
の前途有望な標的である。

【0036】

従って、本発明の目的は、病原性微生物または類似の病原性微生物のスペクト  
ルに対して宿主を予防接種するための、生ワクチンを提供することである。

【0037】

本発明のさらなる目的は、抗原、好ましくは他の病原体の免疫原、特に微生物  
(ウイルス、原核生物、および真核生物を含む)のためのキャリアとして働く、  
生ワクチンを提供することである。

【0038】

本発明のなお別の目的は、DNAアデニンメチラーゼおよびDNAアデニンメ  
チラーゼの産生を担う遺伝子を特異的に阻害する、抗菌薬物を提供することであ  
る。さらに、本発明の組成物は、(i)DNAアデニンメチラーゼ酵素活性、(i  
i)DNAアデニンメチラーゼの発現、(iii)DNAアデニンメチラーゼ  
アクチベーター、(iv)DNAアデニンメチラーゼレセプターに対する活性化  
化合物、および/または(v)DNAアデニンメチラーゼによって調節される毒  
性因子、に対して阻害効果を有する、天然分子ならびに合成分子を含有する。

【0039】

従って、本発明の1つの局面は、薬学的に受容可能な賦形剤中に生弱毒化病原  
性細菌を含有する免疫原性組成物を提供し、この病原性細菌は、DNAアデニン

メチラーゼ (Dam) 活性を変化させる変異を含み、その結果、この病原性細菌が弱毒化される。

【0040】

別の局面において、本発明は、薬学的に受容可能な賦形剤中に殺傷された病原性細菌を含有する免疫原性組成物を提供し、この病原性細菌は、変異DNAアデニンメチラーゼ (Dam) 活性を変化させる変異を含む。

【0041】

別の局面において、本発明は、病原性細菌の弱毒化株を提供し、この細菌は、Dam活性を変化させる変異を含み、その結果、この細菌が弱毒化される。

【0042】

別の局面において、本発明は、個体において免疫性応答を惹起する方法を提供し、この方法は、本明細書中に記載の任意の組成物を、免疫性応答を惹起するに十分な量で個体に投与することを伴う投与を包含する。

【0043】

別の局面において、本発明は、個体において病原性細菌による感染を予防する方法を提供し、この方法は、本明細書中に記載の任意の免疫原性組成物を、病原性細菌による感染の際に、病原性細菌による感染に関する症状を減少させるに十分な量で、個体に投与することを包含する。

【0044】

別の局面において、本発明は、個体において病原性細菌による感染を処置する方法を提供し、この方法は、本明細書中に記載の任意の免疫原性組成物を、病原性細菌による感染に関する症状を個体において減少させるに十分な量で、個体に投与することを包含する。

【0045】

別の局面において、本発明は、病原性細菌に感染した個体を処置する方法を提供し、この方法は、Dam活性を変化させる薬剤を含有する組成物を個体に投与することを包含する。

【0046】

別の局面において、本発明は、個体においてSalmonellaの第二種に

対する免疫性応答を惹起する方法を提供し、この方法は、弱毒化第一種 *Salmonella* を含有する免疫原性組成物を個体に投与することを包含し、この第一種は、Dam活性を変化させる変異を含み、その結果、*Salmonella* が弱毒化される。

【0047】

別の局面において、本発明はまた、スクリーニング方法を提供する。本発明は、抗菌活性を有し得る薬剤を同定する方法を包含し、この方法は、インビトロ転写系を使用して、その薬剤がインビトロ転写系に添加される場合に dam 遺伝子からの転写のレベルを変化させる薬剤を検出することを包含し、ここで、薬剤は、薬剤が添加されない場合の転写のレベルと比較して、dam 遺伝子からの転写のレベルを変化させるその能力によって同定される。

【0048】

別の局面において、本発明は、抗菌活性を有し得る薬剤を同定する方法を提供し、この方法は、インビトロ転写系を使用して、インビトロ転写系にその薬剤が添加される場合に、DamをコードするRNA転写物からの翻訳のレベルを変化させる薬剤を検出する工程を包含し、ここで、薬剤は、薬剤が添加されない場合の翻訳のレベルと比較して、DamをコードするRNA転写物からの翻訳のレベルを変化させるその能力によって、同定される。

【0049】

別の局面において、本発明は、抗菌活性を有し得る薬剤を同定する方法を提供し、この方法は、その薬剤がDamに結合するか否かを決定する工程を包含し、ここで、薬剤は、Damに結合するその能力によって同定される。

【0050】

別の局面において、本発明は、抗菌活性を有し得る薬剤を同定する方法を提供し、この方法は、以下の工程を包含する：(a) Dam結合部位を含む非メチル化オリゴヌクレオチドを、Dam、S-アデノシルメチオニン(S-adenosylmethionine)、および薬剤と共にインキュベートする工程であって、ここでこの非メチル化オリゴヌクレオチドは、シグナルをさらに含む、工程；(b) 全ての非メチル化標的部位を消化する工程であって、これによって

この非メチル化オリゴヌクレオチドを放出する工程；ならびに(c)この非メチル化標的部位の消化に起因するこのシグナルの増加として、DNAアデニンメチラーゼの阻害を検出する工程であって、ここで、薬剤は、工程(a)、(b)、および(c)の薬剤の非存在下での実施と比較して、シグナルの増加を引き起こすその能力によって同定される、工程。

【0051】

別の局面において、本発明は、抗菌活性を有し得る薬剤を同定する方法を提供し、この方法は、以下の工程を包含する：(a)試験されるべき薬剤を、Dam機能を有する適切な宿主細胞と接触させる工程；および(b)Dam機能の変化に関連する少なくとも1つの特徴を分析する工程であって、ここで、薬剤は、この特徴の少なくとも1つを惹起するその能力により同定される、工程。

【0052】

本発明はまた、本明細書中に記載のワクチンおよび株を調製する方法を提供する。1つの局面において、本発明は、本明細書中に記載の免疫原性組成物を調製する方法を提供し、この方法は、薬学的賦形剤を、DNAアデニンメチラーゼ(Dam)活性を変化させる変異を含む病原性細菌と組み合わせる工程を包含し、その結果、病原性細菌が弱毒化される。

【0053】

別の局面において、本発明は、対応するかまたは類似の病原性微生物により引き起こされる疾患に感染しやすい宿主による免疫性応答を惹起し得る弱毒化細菌を調製するための方法を提供し、この方法は、少なくとも1つの変異をこの病原性細菌において構築する工程を包含し、ここで、第一変異が、変化したDam機能をもたらす。

【0054】

本発明の別の目的は、ワクチンが、毒性遺伝子の全体の調節因子の発現を変化させることにより、およびより具体的には、DNAアデニンメチラーゼの発現を変化させることにより産生され得る方法を提供することである。

【0055】

本発明の別の目的は、ワクチンが、DNAアデニンメチラーゼにより調節され

る遺伝子の発現を変化させることによって産生され得る方法を提供することである。

【0056】

別の局面において、本発明は、*Salmonella*のようなビルレント病原性細菌から生ワクチンを調製するための方法を提供し、この方法は、それに対してワクチン化されることが所望される微生物であるか、もしくはそれに類似する病原性細菌のビルレント株において、DNAアデニンメチラーゼの発現および/またはDNAアデニンメチラーゼにより調節される遺伝子の発現を変化させる工程を包含する。

【0057】

本発明のなおさらなる目的は、DNAアデニンメチラーゼの発現を変化させるか、またはその活性を阻害する化合物をその脊椎動物に投与することによって、病原体に感染した脊椎動物のような宿主を処置する方法を提供することである。

【0058】

本発明のさらなる目的、利点および新規特徴は、部分的には以下の詳細な説明に記載され、そして部分的には以下の明細書を調査することによって当業者に明らかとなるか、または本発明の実施により知られ得る。本発明の目的および利点は、添付の特許請求の範囲に特に指摘する器具、組合せ、組成物、および方法によって、理解され、そして達成され得る。

【0059】

(詳細な説明)

本発明者らは、*d a m*遺伝子およびその産物酵素DNAアデニンメチラーゼ(*D a m*)が細菌性毒性のために必要であることを発見した。*D a m*機能に関する以前の研究の努力にも関わらず、細菌性毒性における*D a m*の重要な役割、この役割の発明的意義、および*D a m*変異体ワクチンが保護免疫応答を誘発する能力について報告されていない。以前に他の研究室から*d a m*変異について報告されたもの全ては、腹腔内に送達される場合に、野生型より少なくとも1000倍低い毒性である*Salmonella*株LT2を使用した。この発見の知識と合わせて、本発明は、(a)(i)DNAアデニンメチラーゼの発現のような機能

を変更する遺伝子、および/または ( i i ) DNA アデニンメチラーゼによって調節される遺伝子のいずれかにおける非復帰遺伝子変異を有するワクチン ; ( b ) ( i ) DNA アデニンメチラーゼおよび/またはDNA アデニンメチラーゼをコードする遺伝子、 ( i i ) DNA アデニンメチラーゼのアクチベーターおよび/またはDNA アデニンメチラーゼのリプレッサーのための活性化化合物、ならびに ( i i i ) Dam によって調節される毒性因子、に対する結合特異性を有する天然分子および/または合成分子であるインヒビターのクラス ; ( c ) DNA アデニンメチラーゼが細菌性病因に対して重要であるという知識に基づくワクチンおよびインヒビターを調製するための方法 ; ( d ) 本明細書中に記載される免疫原性組成物を使用して免疫応答を誘発する方法 ; ( e ) ( i ) 病原性微生物で感染される前に本発明のワクチンを用いてか、または ( i i ) 病原性微生物で感染された後に本発明のインヒビターを用いて脊椎動物を処置する方法 ; ( f ) 本明細書中に記載される免疫原性組成物を使用して感染を予防する方法 ; ならびに ( g ) 有用な治療用薬剤であり得る化合物を同定するためのスクリーニング方法、に関する。

#### 【 0 0 6 0 】

実施例に記載されるように、動物の 5 0 % を殺傷するために必要とされる *S . t y p h i m u r i u m* の Dam<sup>-</sup> 変異体 ( dam 遺伝子 ( Mud - Cm ) への挿入によって生成される ) の経口致死量 ( LD<sub>50</sub> ) は、野生型と比較して 1 0 , 0 0 0 倍より大きく増加し、腹腔内 ( i . p . ) LD<sub>50</sub> は、野生型と比較して 1 , 0 0 0 倍より大きく増加した ( 実施例 1 ; 表 1 ) 。 さらに、高度に弱毒化した Dam<sup>-</sup> 変異体は、マウス腸チフスの当該分野で受け入れられたモデルにおいて保護免疫応答を付与することが見出された ( 実施例 2 ; 表 2 ) 。 *S . t y p h i m u r i u m* Dam<sup>-</sup> 挿入株で免疫した全ての 1 7 のマウスは、LD<sub>50</sub> を超える 1 0<sup>+4</sup> の野生型チャレンジを生存させ、一方全ての 1 2 の免疫していないマウスはチャレンジ後に死亡した。 Dam<sup>+</sup> *S a l m o n e l l a* と Dam<sup>-</sup> *S a l m o n e l l a* を比較する生存研究は、Dam<sup>-</sup> 細菌が粘膜部位 ( パイアー班 ) のコロニー形成において完全に秀でていることを示したが、より深い組織部位のコロニー形成において重大な欠陥を示した ( 実施例 2 ; 図 6 ) 。 理論に束縛される

ことを望むことなく、本発明者らは、Dam<sup>-</sup>が保護免疫応答を誘発する理由の1つの可能な説明が、変異体細菌が免疫応答を誘発するのに十分に長く腸粘膜において増殖することであるが、より深い組織に侵入および/またはコロニー形成し得ないからであるということに注目する。

#### 【0061】

なおさらに驚くべきことに、特に*Salmonella*の1種を含有するワクチンが、*Salmonella*の第2の種に対する免疫応答、または第2の株に対する少なくとも有意な持続する免疫応答を誘発し得ないという当該分野において広範囲に支持された見解の点で、特にこれらの種が単一の遺伝子における変異のために弱毒化される場合、本発明者らのデータはこのような交差保護を示す。Dam<sup>-</sup>*S. typhimurium*で免疫したマウス(血清型B)は、免疫の11週間後、*S. enteritidis*および*S. dublin*(血清型D)で異種チャレンジ(100~1000 LD<sub>50</sub>)に対して保護された(実施例3;表3)。この保護は、ワクチン株が免疫された動物から取り除かれた後の6週間より長く持続した(すなわち、6週間を超えても、Dam<sup>-</sup>生物がパイアー班、腸間膜リンパ節、肝臓および脾臓において検出され得なかった)。Salmonella交差保護と対照的に、免疫の5週間後に*Yersinia pseudotuberculosis*に対して保護が観察されなかった。同様に、Dam<sup>-</sup>*S. enteritidis*による免疫は、*S. typhimurium*および*S. dublin*に対する交差保護を付与した。生弱毒化*Salmonella*株が、群B(*typhimurium*)株と群D(*enteritidis*および*dublin*)株(共有の共通LPS抗原性決定基に帰属される)との間の交差保護を誘発することを示したが、この交差保護応答は、非常に短い寿命であり、免疫の10~12週間後、実質的に除去される。Hormaecheら(1996)Vaccine 251~259。

#### 【0062】

実施例1および3に記載されるようなDam誘導体の異所性発現(すなわち、通常は抑制されるタンパク質の発現)は、ワクチン開発に対する広範な適用を有する。多くの病原体のDam誘導体における異所性発現は、親の毒性生物に対す

る保護および/または交差保護応答を生じ得る。Salmonella Dam誘導体は、同族病原体に対する強い保護免疫応答を誘発するパッセンジャー細菌性抗原およびウイルス性抗原を発現するためのプラットフォームとしての有用性を有し得る。Dam<sup>-</sup>免疫したマウスが完全毒性のSalmonella生物の致死細菌負荷を取り除き得るので、Dam<sup>-</sup>ワクチンは予め存在する感染を効果的に処置するための治療的有用性を有し得る。Dam<sup>-</sup>誘導体は、複合タンパク質を異所的に発現するので、ワクチンがヒトに対して害の少ない株中に構築され得る可能性が開かれ、これは、免疫無防備状態の個体に対する感染の危険性を減少する一方で、生ワクチンによって誘発される高レベルの保護の利益を開発する。

#### 【0063】

DNAアデニンメチラーゼが、例えばSalmonellaの細菌性病因論のために必須であるという事実はまた、非常に重要であり、その含意は多い。第1には、dam遺伝子は病原性細菌において高度に保存され、すなわち、ある微生物のdamの遺伝子配列は、同一の種においてのみならず細菌の属にわたる別の微生物のdam遺伝子と配列同一性を共有し；そして第2には、このdam遺伝子は毒性に関与する多くの遺伝子を調節する。DNAアデニンメチラーゼは有意な罹患率および死亡率をもたらす多くの病原性細菌（例えば、Vibrio cholerae (Bandyopadhyay および Das, Gene, 140:67~71 (1994))、Salmonella typhi (1999~3, Sanger Centre)、病原性E. Coli (Blattnerら、Science, 277:1453~1474 (1977))、Yersinia pestis (1999~3, Sanger Centre)、Haemophilus influenzae (Fleischmannら、Science, 269:496~512 (1995))、およびTreponema pallidum (Fraserら、Science, 281:375~388 (1998)) )に高度に保存されるので、これらの病原体のDam誘導体は生弱毒化ワクチンとして有効であり得る。さらに、Damは細菌毒性のために必須であるので、Damインヒビターは広範な抗菌性作用を有すると考えられ、従っ

て、D a mまたはD a mの発現を変更する任意の遺伝子は、抗菌性薬物の開発のための有望な標的である。

#### 【0064】

この含意は、以下の通りである：(1)(i)DNAアデニンメチラーゼおよび/またはd a m遺伝子、(ii)D a m活性因子および/またはD a mリプレッサーのための活性化化合物、ならびに(iii)D a mによって調節される毒性因子、に対して結合特異性を有する天然分子および/または合成分子であるインヒビターのクラスを合理的に開発することが現在において可能である；ならびに(2)(i)DNAアデニンメチラーゼの発現を変更する遺伝子および/または(ii)DNAアデニンメチラーゼによって調節される毒性遺伝子のいずれかにおいて非復帰遺伝子変異を有するワクチンを産生することが現在において可能である。D a mは、遺伝子発現の包括的な調節因子であり、そしてこれらの調節された遺伝子の多くは種々の種および属に保存されるので、DNAアデニンメチラーゼに基づくインヒビターおよびワクチンが交差保護を与えることが非常にあり得る。従って、上で議論されるように、病原体の1つの株、種、血清型および/または群に対するインヒビターまたはワクチンは、病原体の異なる株に対する保護を提供する。

#### 【0065】

本明細書中に記載される組成物は、個体への投与のために使用され得る。それらは、例えば、実験的目的のために、またはS a l m o n e l l a抗体のような抗菌抗体の供給源を得るために、投与され得る。それらはまた、個体の免疫応答を誘発するために、および感染から個体を保護するために、またはS a l m o n e l l aのような毒性細菌に感染された個体を処置するために、投与され得る。

#### 【0066】

(一般的技術)

本発明の実施は、他に示されない限り、以下を採用する：当該分野の技術内にある分子生物学(組換え技術を含む)、微生物学、細胞生物学、生化学および免疫学の従来技術。このような技術は、例えば以下の文献に完全に説明される。

M o l e c u l a r C l o n i n g : A L a b o r a t o r y M a n u a

1、第二版(Sambrookら、1989); Oligonucleotide Synthesis(M. J. Gait編、1984); Animal Cell Culture(R. I. Freshney編、1987); Methods in Enzymology(Academic Press, Inc.); Handbook of Experimental Immunology(D. M. Wei & C. C. Blackwell編); Gene Transfer Vectorら for Mammalian Cells(J. M. Miller & M. P. Caloら編、1987); Current Protocols in Molecular Biology(F. M. Ausubelら編、1987); PCR: The Polymerase Chain Reaction(Mullisら編、1994); Current Protocols in Immunology(J. E. Coliganら編、1991); Short Protocols in Molecular Biology(Wiley & Sons, 1999)。

【0067】

(定義)

「DNAアデニンメチラーゼ」(Dam)は、DNAのアデニン残基をメチル化し得る酵素の群として定義される。Dam遺伝子およびdam遺伝子によってコードされるDam産物は当該分野において公知であり、この定義は、E. coli(gi 118682)およびSalmonella(gi 2500157)由来のDNAアデニンメチラーゼと同様の重要なアミノ酸を共有し、そしてDNAの配列「GATC」を優先的にメチル化し、アデニンのN-6位をメチル化するDam酵素を含む。特に、Damの領域をコードする高度に保存されたDNA配列は、本明細書中に記載されるような配列番号1~4に示される。当該分野で受諾されている表記に従って、「dam」または「dam遺伝子」は、DNAアデニンメチラーゼをコードする遺伝子を示し、そして「Dam」は、DNAアデニンメチラーゼ(すなわち、そのポリペプチド)を示す。本発明の目的のために、遺伝子は、コード領域および/または調節領域を包含すると定義される。

【0068】

D a m「活性」または「機能」は、d a m発現または非発現に関連した任意の生物活性を意味する。D a m活性は、本明細書中に記載される。例えば、d a mの非発現は、D a mによって調節される特定の遺伝子の抑制（または、あるいは、脱抑制）を導き；従って、これらの遺伝子のいずれかの抑制（または、脱抑制）は、D a m活性である。別の例として、D N Aのアデニンのメチル化（例えば、G A T Cのメチル化）は、d a m発現および得られるD a m産物に関する活性であり；従って、アデニンメチル化は、D a m活性である。従って、D a m「活性」または「機能」は、d a m発現に関する生物活性のいずれか1つ以上を包含する。

【0069】

D a m活性の「変更」は、野生型D a m機能と比較した任意のD a m活性の任意の変化である。「変更」は、D a m活性の完全な損失であってもよいし、そうでなくてもよく、D a m活性の増加または減少を含む。D a m活性を変更する変異を含む細菌は、一般に「D a m誘導体」といわれる。

【0070】

「発現」は、転写および/または翻訳、ならびに発現に影響を及ぼす任意の因子または事象（例えば、発現に影響を及ぼす第2の遺伝子のような上流事象）を含む。

【0071】

「ワクチン」は、ヒトの使用または動物の使用のための薬学的組成物、特に、特定の標的または標的の群に対するある程度の特異的な免疫学的反応性（すなわち、特定の標的または標的の群に対する免疫応答を誘発および/または増強する）をレシピエントに付与するという意図で投与される免疫原性組成物である。この免疫反応性または応答は、標的に対して免疫学的に反応性である抗体または細胞（特に、B細胞、形質細胞、Tヘルパー細胞、および細胞傷害性Tリンパ球、ならびにそれらの前駆体）、あるいはそれらの任意の組み合わせであり得る。本発明の目的のために、標的は主にS a l m o n e l l aのような毒性細菌である。弱毒化された細菌がキャリアとして使用される場合、この標的は本明細書中に記載される別の抗原であり得る。免疫学的反応性は、実験的目的、特定の状態の

処置、特定の物質の除去、および/または予防のために所望され得る。

【0072】

「病原性」細菌は、疾患をもたらし得る細菌である。「毒性」は、感染された総数に対する明白な感染のケースの数の比として数で表され得る病原性の程度の指数である。本明細書中に記載されるワクチンに使用される病原性細菌は、実験室で通常使用される無毒株以外であり、そして公知であり、および/または疾患を引き起こし得ることが理解される。

【0073】

本明細書中に記載される組成物に使用される「弱毒化された」細菌は、減少した毒性を示す細菌である。当該分野で十分に理解され、そして上記したように、毒性は、細菌が所与の集団の疾患をもたらし得る程度である。本発明の目的のために、弱毒化された細菌は、一般に適切な政府機関によって指示されるように、適切かつ受容可能な安全レベルに減少される毒性を有する。受容可能である弱毒化の程度は、特に、レシピエント（すなわち、ヒトまたは非ヒト）ならびに例えば米国食品医薬品局（FDA）のような規制機関によって提供される種々の規制および基準に依存する。最も好ましくは、特にヒトの使用の場合、弱毒化された細菌は無毒性であり、これらの生物の投与が疾患症状をもたらさないことを意味する。当該分野において十分に理解されるように、弱毒化された細菌は、少なくとも投与時において生きている。

【0074】

「抗原」は、抗体またはT細胞抗原レセプターによって特異的に認識および結合される物質を意味する。当該分野において十分に理解されるように、抗原は、ペプチド、タンパク質、糖タンパク質、ポリサッカリド、ガングリオシドおよび脂質、ならびにそれらの一部および/または組み合わせを含み得る。抗原は、天然に見出される抗原であり得るか、または合成であり得る。

【0075】

「アジュバント」は、本明細書中に記載される弱毒化された細菌の免疫原性を増強するためにその弱毒化された細菌と組み合わせて与えられる化学的因子または生物学的因子である。当該分野において公知であるように、「アジュバント」

は、抗原に加えられた場合に、レシピエント（宿主）の抗原に対する免疫応答を非特異的に増強させるかまたは強化する物質である。

【0076】

免疫応答（B細胞応答および/またはT細胞応答であり得る）を「刺激する」、「誘発する」、または「惹起する」は、応答の増加を意味し、これは応答の誘発および/増強から生じ得る。

【0077】

「異種」は、比較される実体から誘導されること、および/または比較される実体から異なることを意味する。例えば、細菌株に対する「異種」抗原は、その株に通常かつ天然では関連しない抗原である。

【0078】

「有効量」は、臨床的結果を含む有利なまたは所望の結果をもたらすのに十分な量であり、それ自体、「有効量」は、適用される状況に依存する。有効量は、1以上の用量で投与され得る。本発明の目的のために、D a m誘導体細菌（またはD a m誘導体細菌を含む組成物）の有効量は、免疫応答を誘導する量である。処置に関して、有効量は、細菌性疾患の進行を緩和し、改善し、安定化し、取り消し、または減速するか、さもなくば疾患の病理学的結果を減少させるのに十分な量である。予防に関して、有効量は、曝露および感染の際の1以上の症状を減少させる（または完全に排除する）のに十分な量である。

【0079】

「処置」は、有利なまたは所望の臨床的結果を得るための方法である。有利なまたは所望の臨床的結果として、症状の緩和、疾患の程度の減少、疾患の安定化された（すなわち、悪化ではない）状態、疾患の伝播の予防、疾患進行の遅延または減速、疾患状態の改善または軽減が挙げられるが、これらに限定されない。

【0080】

疾患または感染の「予防」は、組成物を受容することを除いて、他の同じ状態と比較して、本明細書中に記載される組成物を受容する個体の感染の1つ以上の症状の減少（排除を含むが、これに限定されない）を意味する。当該分野において理解されるように、感染の「予防」は、穏やかな症状を含み得るが、必ずしも

感染に関連した症状の排除を意味しない。

【0081】

「宿主」と相互交換可能に使用される「個体」は、脊椎動物、好ましくは哺乳動物、より好ましくはヒトである。哺乳動物として、家畜動物（例えば、ウシ）、競技用動物、およびペットが挙げられるが、これらに限定されない。「個体」はまた、ニワトリのような家禽を含む。「宿主」は、細菌に感染されていないとしても感染されていてもよい。

【0082】

「薬剤」は、単純または複雑な有機または無機の分子、ポリペプチド、ポリヌクレオチド、炭水化物またはリポタンパク質のような生物学的化合物または化学的化合物を意味する。莫大な数の化合物（例えば、オリゴペプチドおよびオリゴヌクレオチドのようなオリゴマー、および種々のコア構造に基づく合成有機化合物）が合成され得、これらも、用語「薬剤」に含まれる。さらに、種々の天然の供給源は、植物または動物の抽出物などのようなスクリーニングのための化合物を提供し得る。化合物は、単一で、または互いに組み合わせて、試験され得る。

【0083】

「抗菌活性」または「毒性制御」は、薬剤が、細菌の疾患をもたらす能力に負に影響を及ぼし得ることを意味する。本発明の目的のために、毒性を制御し得る薬剤は、Dam活性を変更する薬剤であり、そして本明細書中に記載されるスクリーニング法によって選択され得、さらに、さらなる研究において、細菌毒性を制御することを証明し得、そして治療学的活性までも発揮し得る。

【0084】

「含む (comprising)」およびその同語は、「含む (including)」を意味する。

【0085】

「A」「an」および「the」は、他に示されない限り、複数の参照を含む。例えば、「a」Damは、任意の1以上のDNAアデニンメチラーゼを意味する。

【0086】

(本発明の組成物)

記載される組成物は、免疫応答を惹起するため、および/または細菌感染(特に、*Salmonella*感染)に関連する疾患を処置もしくは予防するために有用である。生存している、病原性の細菌から調製されるワクチンは、対応する病原性細菌により、同じ株、種、血清型および/または群の類似の病原性細菌により、あるいは、異なる株、種、血清型および/または群の異なる細菌により、生じる疾患に感受性の宿主の免疫または処置のために提供される。本明細書において生成される生ワクチンはまた、抗原(例えば、他の病原の免疫原)のためのキャリアとして働き得、それにより複数の免疫原性反応を生成する。

【0087】

従って、1つの実施形態において、本発明は、弱毒生病原性細菌(例えば、*Salmonella*)、および薬学的に受容可能な賦形剤を含む免疫原性組成物を提供する。この病原性細菌は、DNAアデニンメチラーゼ(Dam)活性を変更する変異を含有(有する)しており、それにより病原性細菌は、弱毒化される。いくつかの実施形態において、この変異は、DNAアデニンメチラーゼ(Dam)をコードする遺伝子中にあり、ここでこの変異は、DNAアデニンメチラーゼ活性を変更する。

【0088】

Dam活性は、増加または減少され得、そしてDam活性は、転写および/または翻訳を含む任意のレベルで変更され得る。例えば、翻訳に関しては、活性は、多くの方法(産生されるタンパク質の量および/または産生されるタンパク質の性質(すなわち、構造)を含む)において変更され得る。例えば、変異は、細胞により産生されたDamの量を、(翻訳事象および/または転写後事象への影響に起因して)結果として増大または減少させ得る;あるいは、変異は、変化した活性を有する変化したDamを生じさせ得る。Dam活性を変更する変異および変異体の生成には、当該分野で周知の技術を用いる。例としては、Dam産物は、より低いレベルで転写を開始することが公知のプロモーターを用いることにより低下され得る。所定の転写調節エレメント(例えば、プロモーター)からの転写のレベルを決定するためのアッセイは、当該分野で周知である。ネイティブ

な *dam* プロモーターは、より低い翻訳活性のプロモーターで置換され得る；あるいは、*dam*<sup>-</sup>（ここでは、ネイティブな *dam* 遺伝子を取り除かれている）が、より低い活性のプロモーターを含む再操作された *dam* 遺伝子を組み込むための基礎として用いられ、ゲノムへ組み込まれ得る。あるいは、異なる *dam* 遺伝子（例えば、T4 *dam*）が用いられ得る。*dam* オーバープロデューサーの例である、野生型レベルの100倍で *E. coli* *Dam* を産生する pTP166 プラスミドが用いられ得る。変異は、*Dam* 遺伝子自体（転写調節エレメントおよび/または翻訳調節エレメントを含む）、ならびに *Dam* 産生および/または *Dam* 活性に影響する遺伝子（単数または複数）の中にあり得る。

#### 【0089】

任意の病原性（好ましくは、毒性）細菌の株は、本明細書において記載される免疫原性組成物において用いられ得る。いくつかの実施形態において、*E. coli* 以外の病原性細菌が用いられる。他の実施形態においては、病原性 *Escherichia*（好ましくは、*E. coli*）が用いられる。*dam* の過剰発現は有用なワクチンを導き得るので、*dam* 遺伝子は必須であってもなくてもよい（すなわち、*dam* の欠失は、致死的であってもなくてもよい）。

#### 【0090】

本発明は、任意の公知の群、種または株、より好ましくは、群 A、B または D（特定の脊椎動物宿主の特定の病原体であるほとんどの種を含む）を含む広範な種々の *Salmonella* に特に適切である。生ワクチンが産生され得る *Salmonella* が起こす疾患の例としては、*S. typhimurium*；*S. enteritidis*、*S. typhi*；*S. abortus-ovi*；*S. Abortus-equi*；*S. dublin*；*S. gallinarum*；*S. pullorum*；および哺乳動物中で感染を生じることが公知であるかまたは発見され得る他のものがある。

#### 【0091】

本発明が使用され得る他の生物体としては、*Yersinia* 種（特に *Y. pestis*）、*Vibrio* 種（特に *V. cholerae*）、*Shigella* 種（特に *S. flexneri* および *S. sonnei*）；*Haemophi*

lus種(特に*H. influenzae*、より詳細にはB型)、*Bordetella*(特に*B. pertussis*);*Neisseria*(特に*N. meningitidis*および*N. gonorrhoeae*);*Pasteurella*(特に*P. multocida*)、病原性*E. coli*、および*Treponema*(例えば、*T. pallidum*);ならびに哺乳動物において感染を生じることが公知かまたは発見され得る他の生物体が挙げられる。

#### 【0092】

別の実施形態において、本発明は、宿主をワクチン接種するために用いられるワクチンを提供する。このワクチンは、薬学的に受容可能な賦形剤および病原性細菌の弱毒化形態を含む。ここで弱毒化は、少なくとも1つの変異に起因し得る。ここで第1の変異は、(i)1つ以上のDNAアデニンメチラーゼの発現もしくは活性、または(ii)DNAアデニンメチラーゼにより調節される1つ以上の遺伝子の発現のいずれかを変更する。この第1の改変は、好ましくは非復帰であり、そしていくつかの実施形態においては、その遺伝子産物がこのDNAアデニンメチラーゼの1つ以上を活性化する遺伝子中で構築される。この第1の改変は、その遺伝子産物がこのDNAアデニンメチラーゼの1つ以上の活性を不活性化するかまたは減弱する遺伝子中で構築され得る。他の実施形態において、この第1の改変は、その遺伝子産物がこのDNAアデニンメチラーゼの発現抑制する遺伝子中で構築され、そしてこの遺伝子産物はDamを抑制し得る。このワクチンはさらに、この第1の変異と独立の第2の変異を含み得、この第2の変異は、弱毒化された微生物を生じる。この第2の変異は、好ましくは非復帰である。

#### 【0093】

別の実施形態において、本発明は、ワクチン接種されるべき宿主中で免疫学的反応を誘発させるためのワクチンを提供する。このワクチンは、この細菌細胞がdam遺伝子により発現されるDNAアデニンメチラーゼ(Dam)の発現を調節する能力を無効にする、遺伝子に導入された変異を有する細菌細胞を含む。

#### 【0094】

Dam - ワクチンにおける複数のタンパク質の異所性発現は、殺傷されたDam - 生物体が、殺傷されたDam + 生物体よりも有意に強い防御免疫反応を惹起

し得る可能性を示唆する。従って、いくつかの実施形態において、本発明は、殺傷された病原性細菌（Dam活性を変更している変異を含む）および薬学的に受容可能な賦形剤を含む免疫原性組成物を提供する。好ましくは、この変異は、dam遺伝子中であり、そして本明細書において記載されるように、Dam活性の減少または増大を生じ得る。いくつかの実施形態において、dam変異は、細菌の死を生じる。他の実施形態において、この変異は、減弱され、そして細菌は、当該分野で周知の方法（例えば、アジ化ナトリウム処理および/またはUVへの曝露）を用いることにより殺傷される。変異が致死性である場合、細菌は（例えば、アジ化ナトリウムおよび/またはUVを用いる）殺傷のためにさらに処置され得る。これらのワクチンに適切な細菌の例としては、Salmonella、Vibrio（V.choleraeを含む）およびYersinia（Y.pseudotuberculosisを含む）が挙げられるがこれらに限定されない。

#### 【0095】

好ましくは、この組成物は、薬学的に受容可能な賦形剤を含む。薬学的に受容可能な賦形剤は、薬学的に有効な物質の投与を容易にする比較的不活性な物質である。例えば、賦形剤は、ワクチン組成物のための形態またはコンステンシーを与え得るかまたは希釈剤として作用し得る。適切な賦形剤としては、安定化剤、湿潤剤および乳化剤、浸透圧を変化させるための塩、カプセル化剤、緩衝液、ならびに皮膚浸透強化剤が挙げられるがこれらに限定されない。薬学的に受容可能な賦形剤の例は、Remington's Pharmaceutical Sciences（Alfonso R.Gennaro編、第19版、1995）に記載されている。

#### 【0096】

本発明はまた、所定の属（例えば、Salmonella）について、本明細書に記載される変異体株（弱化されていようと殺傷されていようと）の任意の組み合わせを含む免疫原性組成物を含む。2つの異なるワクチン株（例えば、Dam-およびDamオーバープロデューサー）は、可能性として防御的な抗原の2つの異なるレパートリーを生成し得るので、これらの組み合わせでの使用は、優

れた免疫応答を誘発し得る。

【0097】

本発明による病原性細菌は、少なくとも1つの遺伝子において作製される非復帰的変異の結果として、弱毒化、好ましくは無毒化される。それによりDNAアデニンメチラーゼの機能を変更する。本質的に、本発明の好ましい実施形態に従って提供される生ワクチンは、病原性細菌に起源する。非復帰的な変異が、病原体の遺伝子に導入され、従ってDNAアデニンメチラーゼの発現を変更する。「非復帰(non-reverting)」変異は、一般に、細胞分裂 $10^8$ 中約1未満、好ましくは $10^{10}$ 中約1未満、または好ましくは $10^{15}$ 中約1未満、なおより好ましくは、 $10^{20}$ 中約1未満に戻る。好ましくは、この変異は、あてになる(non-leaky)；しかしDamによる遺伝子の調節は、Dam濃度に極めて感受性であるらしい。従って、Damの過剰発現およびDamの過少発現は、病原体の弱毒化を生じる。この変異は、好ましくは、dam遺伝子自体の中で作製されるが、以下にさらに詳細に考察される、本発明の他の実施形態において、本発明によるワクチンは、その産物がdam遺伝子を活性化するかまたは抑制する、damの「上流」または「下流」のいずれかの関連の遺伝子(単数または複数)を変異させることにより産生され得ることことが意図される。または、代替的には、変異は、DNAアデニンメチラーゼにより調節される少なくとも1つの毒性遺伝子中で構築される。変異は、非復帰である。なぜなら正常な遺伝子機能の回復は、1つより多い事象(このような事象のそれぞれは、非常にまれである)の無作為の偶発的な発生によってのみ生じ得るからである。例えば、Damメチラーゼ活性は、下方制御され得るか、そして/あるいはプロモーターもしくはコード領域への欠失の導入、プロモーターもしくはコード領域へのトランスポゾンもしくは介在DNAの挿入により、dam遺伝子の発現をブロックするアンチセンスオリゴヌクレオチドの使用、またはdam遺伝子発現を妨げるリボザイムの使用により遮られ得る。あるいは、この変異は、非復帰を生じるのに十分な程度のインサクションおよび/または欠失であり得る。

【0098】

欠失変異の場合、遺伝子情報の回復は、失われた遺伝子情報を回復するため、

直列で、多くの同時発生的な無作為のヌクレオチドインサーションを必要とする。インサーションプラス反転の場合、遺伝子機能の回復は、挿入された配列の正確な欠失および隣接する逆位配列の正確な再反転の同時発生を必要とする。これらの事象のそれぞれは、発現の頻度が極めてわずかで、検出不能なほど低い。従って、「非復帰」変異の2種類のそれぞれは、原栄養体への復帰の可能性は、実質的に全くない。

#### 【0099】

Dam遺伝子におけるインサーションを構築する他の方法は、当業者に周知でありかつ明白である。

#### 【0100】

単一の非復帰変異は、毒性に対する復帰可能性に対して高い程度の安全性を提供するが、発生の有限の可能性を（希ではあるが）有する事象がなお存在する。微生物が、接合により、非毒性生物体へ遺伝能力をトランフアーし得る宿主に存在する場合、復帰の機会が存在する。あるいは、まれな変異によりまたはストレス下で作動性になり得る、DNAアデニンメチラーゼの産生のための微小な代替的経路が存在し得る。従って、いくつかの実施形態においては、本明細書に記載される弱毒化細菌は、さらに第2の変異体を含む。2つの別のかつ関連しない変異を有する生ワクチンは、生存し得、そして宿主中で合理的に長く生存し、宿主への投与の際に強力な免疫応答を提供し、そして、それらは他の病原体の抗原（例えば、他の病原体の抗原）のキャリアとしても働き、このような病原体からの免疫防御を提供し得る。

#### 【0101】

生弱毒化ワクチン候補物のための第2の変異として働き得る *Salmonella typhimurium* 弱毒化変異体の例は、galE（ガラクトース誘導毒性）、purおよびaro（インビボで利用不可能な芳香族化合物）、crpおよびcya（異化生成物制御を介する遺伝子発現における全体的変化）、ならびにphoP（毒性遺伝子発現における全体的変化）である（Honeら（1987）、Hormaecheら（1996）；HassanおよびCurtiss（1997）；ならびにMillerら（1990））。これらのワクチン

の間の比較研究は、厳格に試験されておらず、従ってお互いに対するこれらの現在の株の効力は未解明のままである。さらに、現在の生細菌ワクチン候補物の毒性（例えば、下痢のような症状）、およびヒト集団内の多くの個体が、明白に免疫無防備状態であるという事実は、良好な防御を提供し、より永続的であり、そして毒性が低い、さらなるワクチンについて検索する正当な理由となる。

#### 【0102】

上記の変異に加えて、生ワクチンとしての使用のための細菌が、1つ以上の遺伝「マーカー特徴」を有することが所望され得る。この「マーカー特徴」は、同じ種の他の細菌（野生型または他の生ワクチン株のいずれか）からこの細菌を容易に識別可能にする。従って、望ましくは、この株の他のメンバーから生成されるべきDam-変異体を識別するためのマーカーを有する、病原体の株を選択する。あるいは、このようなマーカーは、ワクチン株に導入され得る。以前に考察したように、種々のマーカーが使用され得る。用いられるマーカーは、細菌の免疫原性特徴に影響してはならず、そして生ワクチンを産生するための細菌の処理を妨害してもならない。このマーカーは、目的の細菌の認識を可能にするために、表現型を変えるのみである。例えば、Dam変異体は、塩基のアナログ 2-アミノプリンに感受性である（Miller「Experiments in Molecular Genetics」CSHL 1972）。dam遺伝子はcysGに遺伝的に連結されるので、当業者は、トランスポゾンインサーションのプールを使用して、cysG+に対してcysG-レシピエントを形質導入し得る。これらの原栄養体は、2-アミノプリン感受性についてスクリーニングされる。dam遺伝子中にインサーションが存在することを確実にするため、インサーションをクローニングし、そして隣接する領域を配列決定する。このマーカーは、いくつかの他の栄養必要量でもあり得る。このようなマーカーは、野生型株からのワクチン株を識別するにおいて有用である。

#### 【0103】

次いで、対象の細菌を処理し、1つ以上の非復帰変異体を提供する。第1の変異は、好ましくは（必須ではないが）dam遺伝子を変異することにより、Dam機能（例えば、発現）を変化する。第2の変異が所望される場合、その損失が

弱毒化を生じることが公知の遺伝子が、さらに変異される。この変異は、欠失、挿入、もしくは反転、またはその組み合わせであり得る。種々の技術が、damの変更された発現を生じる所望の「あてになる(non-leaky)」非復帰な変異を有する細菌を得るための欠失、挿入、または反転を導入するために使用され得る。2つの完全に独立した変異体(そのそれぞれは、復帰の可能性がかなり低い)の存在は、ワクチン株が毒性になり得ないことをほぼ完全に保証する。

#### 【0104】

遺伝子を無効にするかまたは変異するために使用され得る多数の周知技術(例えば、PCR技術、転座エレメント、変異原性因子、形質導入ファージ、およびDNA媒介形質転換、ならびに/または接合、の使用)が存在する。組換えDNA技術のような当業者にまた公知である他の方法が、またワクチンとして使用されるべき、単一の宿主株へ、1つ以上の変異遺伝子を首尾よく導入するために使用され得る。

#### 【0105】

集団のいくつかのメンバーへの1つ以上の非復帰変異を導入するために細菌を操作した後、この細菌を所望の変異体の単離を容易にする条件下で、このような変異が親の細菌を上回る選択的利点を有する条件下、または未変更細菌または他の型の変異体からの所望の細菌の容易な認識を可能にする条件下のいずれかで増殖させる。次いで、単離された自己栄養性変異体をクローニングし、毒性、復帰の不能性、および毒性病原性株から宿主を防御するその変異体の能力についてスクリーニングする。

#### 【0106】

このワクチンは、広範な種々の家畜動物およびヒトで用いられ得る。ワクチンにより今日処置されるか、または処置され得る(細菌性疾患に感受性である場合)家畜動物のなかには、(より重要な家畜動物を挙げれば)ニワトリ、ウシ、ブタ、ウマ、ヤギおよびヒツジが含まれる。

#### 【0107】

本発明に従って、このワクチンは、少なくとも1つの遺伝子において非復帰の変異を導入することにより産生される。ここでそれぞれの変異は、復帰の可能性

が実質的にゼロであることを保証するため、直列で、十分な数の塩基の変異である。好ましくは、この変異は、活性タンパク質の産生を決定するためのその総無能力の意味では、それぞれの変異された遺伝子の非発現を生じる。しかし、本明細書において記載されるように、D a mオーバープロデューサーはまた、作製され得る。さらに、選択される遺伝子は、DNAアデニンメチラーゼの発現に関与し、そして好ましくはこの遺伝子はd a mである。

#### 【0108】

得られた株は、所望の免疫原性を有する非毒性の生ワクチンである。すなわち、この変異は、宿主の天然の免疫応答を誘発する抗原の産生に影響しない。代表的に、野生型病原体が、宿主内の特定の組織に達する場合、特異的毒性因子または毒性因子のセットは、この病原体が曝露される特定の環境の結果として発現される。D a m - 変異体は、多くの毒性因子全てを、同時にかつ特定の組織内でなく、構成的に発現すると考えられている。多くの毒性因子の生理学的効果は組織特異的であるので、悪い組織において構成的に発現される毒性因子は、疾患プロセスにおいて固有の生理学的変化を開始しない。しかし、これらの毒性因子は、宿主からの免疫応答を惹起する。従って、この免疫系は、環境におけるこれらの因子に遭遇する。ここでこの因子は、疾患を生じるための宿主中の必要な生理学的変化を開始し得ず、そしてこの宿主は免疫応答を上昇させ得る。

#### 【0109】

本発明の別の実施形態において、このワクチンは、少なくとも2つの遺伝子において、非復帰変異を導入することにより産生される。ここでこの変異は、それぞれの変異が、復帰の可能性が実質的にゼロであること、およびそれぞれの変異遺伝子の非発現の確実さを保証するのに十分大きい。選択された第1の遺伝子は、DNAアデニンメチラーゼの発現に直接かまたは間接的のいずれかで関与する。選択される第2の遺伝子はまた、第1の遺伝子変異の弱毒化効果にかかわらず、弱毒化を生じ得る；しかし、この第2の変異は、第1の変異の防御効果に影響し得ない。第1の遺伝子および第2の遺伝子における変異は、以前に考察されたように、達成され得る。

#### 【0110】

従って、本発明は、以下を含む、ワクチン接種されるべき宿主における免疫応答を誘発させる（惹起する）ためのワクチンを提供する：DNAアデニンメチラーゼの発現を変更する第1の遺伝子において第1の変異を有する細菌；およびこの第1の変異と独立してこの微生物を弱毒化する、この細菌中の第2の変異。

#### 【0111】

別の実施形態において、本発明は、抗原のためのベクターまたはキャリアとして用いられ得る生ワクチンを提供する。この抗原は、非毒性の病原性ワクチンにおいて用いられる細菌以外の細菌属または種の抗原を含む、任意の抗原であり得る。この抗原は、細菌と付着したかもしくは結合した混合物として、添加され得るか、または所望の抗原をコードする1つ以上の構造遺伝子は、発現カセットとして非毒性病原性ワクチンに導入され得る。従って、本明細書において記載されるワクチンにおける使用のために記載された任意の変異細菌は、所望の抗原をコードする1つ以上の構造遺伝子を有する発現カセットをさらに含み得る。この発現カセットは、転写開始および翻訳開始ならびに終止領域（目的の構造遺伝子に天然に接するかまたはこの構造遺伝子に関して異種である）の調節制御下で、目的の構造遺伝子（単数または複数）を含む。細菌またはバクテリオファージの構造遺伝子が含まれる場合、天然のまたは野生型の調節領域は、通常（常にではないが）十分である。非毒性病原体により認識される調節領域を真核生物（時には、原核生物）から単離された抗原の構造遺伝子に連結することが必要であり得る。抗原としては、破傷風毒素のCフラグメント、コレラ毒素のBサブユニット、B型肝炎表面抗原、*Vibrio cholerae* LPS、HIV抗原および/または*Shigella sonnei* LPSが挙げられるがこれらに限定されない。

#### 【0112】

発現カセットは、組換え構築物であってもよいし、天然に存在するプラスミドの一部の形態であってもよい。発現カセットが組換え構築物の場合、発現カセットは、エピソームの維持のための複製系に連結されてもよいし、非毒性の病原の染色体DNAへの組換えおよび組込みのための条件下で、非毒性の病原性細菌に導入されてもよい。目的の抗原の構造遺伝子は、細菌タンパク質（例えば、毒素

サブユニット)、ウイルスタンパク質(例えば、キャプシド)、または酵素経路(例えば、リポポリサッカリド(LPS)のような糖質抗原の合成に關与する経路)をコードし得る。例えば、他の生弱毒化*Salmonella*ワクチンにおいて発現される抗原の中には、破傷風毒素のフラグメントC、コレラ毒素のBサブユニット、B型肝炎表面抗原、および*Vibrio cholerae* LPSがある。さらに、HIV抗原のGP120およびGAGは、弱毒化*Mycobacterium bovis* BCGにおいて発現されており、そして*Shigella sonnei* LPSは、弱毒化*Vibrio cholerae*において発現されている。この構築物またはベクターは、多数の周知の方法(例えば、形質導入、連結、形質転換、エレクトロポレーション、トランスフェクションなど)を介して宿主株へと導入され得る。

#### 【0113】

別の実施形態において、本発明に従って調製された生ワクチンは、DNAアデニンメチラーゼにより、好ましくは、DNAアデニンメチラーゼ(Dam)により調節される遺伝子における不可逆変異を有するように調製される。これらの不可逆変異は、以前に記載されたように調整され得る。

#### 【0114】

別の実施形態において、ワクチンが提供される。ここで、バクテリアは、好ましくは、DNAアデニンメチラーゼ(Dam)を過剰産生させることにより、Damの過剰産生を生じる、変異を有する。細菌遺伝子を過剰産生する産生の方法は、本明細書中に記載され、かつ当該分野で公知であり、そしてさらなるdam遺伝子；damの転写を制御するプロモーターの変異；フィードバック阻害に対する応答性の低下を生じるdam遺伝子における変異を保有するプラスミド(これは統合されてもよいし、されなくてもよい)の添加を含むが、それらに限定されない。

#### 【0115】

本明細書中に記載される免疫原性組成物は、*Salmonella*のような行限性細菌に対する免疫応答を増大させるアジュバントと共に用いられ得る。アジュバントは、死菌ワクチンに特に適切であるが、この用途に限定される必要はな

い。適切なアジュバントは、当該分野で公知であり、そして以下が挙げられる：水酸化アルミニウム、ミョウバン、QS-21（米国特許第5,057,540号）、DHEA（米国特許第5,407,684号および同第5,077,284号）およびその誘導体および前駆体（例えば、DHEA-S）、 $\gamma$ -2ミクログロブリン（WO91/16924）、ムラミルジペプチド、ムラミルトリペプチド（米国特許第5,171,568号）およびモノホスホリルリピドA（米国特許第4,436,728号；WO92/16231）およびその誘導体（例えば、DETOX™）、ならびにBCG（米国特許第4,726,947号）。他の適切なアジュバントとしては、以下が挙げられるが、それらに限定されない：アルミニウム塩、スクアレン混合物（SAF-1）、ムラミルペプチド、サポニン誘導体、ミコバクテリア壁調製物、ミコール酸誘導体、非イオン性ブロックコポリマー界面活性剤、Quil A、コレラ毒素Bサブユニット、ポリホスファゼンおよび誘導体、ならびに免疫刺激複合体（ISCOM）（例えば、Takahashi (1990) Nature 344: 873-875により記載される複合体）。獣医学的用途のために、および動物における抗体の産生のために、フロイントアジュバントの分裂促進的な成分が使用され得る。アジュバントの選択は、特にヒト用途が意図される場合、アジュバントの存在下でのワクチンの安定性、投与の経路、およびアジュバントの調節の受容性に一部依存する。例えば、ミョウバンは、ヒトにおけるアジュバントとしての用途として、米国食品医薬品局（FDA）により認可される。

#### 【0116】

いくつかの実施形態において、免疫原性組成物はまた、キャリア分子を（アジュバントの有り無しで）含み得る。キャリアは、当該分野で公知である。Plotkin、Vaccines、第3版、Philadelphia、WB Saunders Co. (1990)。細菌キャリア（すなわち、細菌由来のキャリア）としては、コレラ毒素Bサブユニット（CTB）；ジフテリア毒素変異体（CRM197）；ジフテリア毒素；B群連鎖球菌 Cタンパク質；髄膜炎菌外膜タンパク質（OMPc）；ジフテリア；型判別不可能なHaemophilus influenzae（例えば、P6）の外膜タンパク質；組換えクラス3

タンパク質 ( B群髄膜炎菌の r P o r B P ) ; 加熱死菌 *Burcella abortus* ; 加熱死菌 *Listeria monocytogeneis* ; および *Pseudomonas aeruginosa* 組換えエキソプロテイン A 。  
別のキャリアは、キーホールリンペットヘモシアニン ( K L H ) である。

【 0 1 1 7 】

本発明のワクチンは、単位容量形態、滅菌非経口溶液または懸濁液、滅菌非非経口溶液または経口溶液または懸濁液、水中油または油中水エマルジョンなどで個体に全身性投与するのに適切である。処方物または非経口、非非経口薬物送達は、当該分野で公知であり、そして Remington ' s Pharmaceutical Sciences、第 19 版、Mack Publishing ( 1995 ) 。このワクチンは、例えば、皮下注射か、筋肉内注射か、腹腔内注射か、または皮内注射により、非経口投与され得る。投与はまた、経口、鼻内、肺内 ( すなわち、エアロゾルにより ) 、および静脈内であり得る。投与の他の形態に適切なさらなる処方物としては、坐剤および、いくつかの場合では、経口処方物が挙げられる。投与の経路は、個体の状態および所望の臨床的效果に依存する。家畜動物 ( 例えば、ニワトリ ) への投与について、好ましい投与は、経口処方物である。生ワクチンのための処方物は、増大した免疫原性応答を提供する処方物を、広範に、望ましく変化させ得る。

【 0 1 1 8 】

本発明のワクチンおよび抗微生物薬は、広範な種々の脊椎動物に用いられ得る。本発明のワクチンおよび抗微生物薬は、哺乳動物 ( 例えば、ヒトおよび家畜動物 ) での特定の用途を見出す。家畜動物としては、ウシ、ヒツジ、ブタ、ウマ、ヤギ、家禽、ウサギ科 ( *Leporidae* ) ( 例えば、家兔 ( *rabbit* ) ) 、または家畜脊椎動物を冒す疾患にとらわれ得るか、または家畜脊椎動物を冒す疾患についての媒介動物であり得る他の動物が挙げられる。投与のために適切な個体は、細菌 ( 例えば、*Salmonella* ( *S. spp.* ) ) の危険性があるかまたは暴露している個体か、あるいは危険性があるかまたは暴露していると予想される個体、および暴露および/または感染している個体である。ワクチンまたは抗微生物薬の適用の様式は、広範に変化し得、投与のための従来の方

法のいずれかが、適用可能である。これらとしては、固体の生理学的に受容可能な塩基で、または生理学的に受容可能な分散物中での経口適用、注射による非経口適用などを含む。ワクチンまたは抗微生物薬の投薬量は、とりわけ、投与の経路に依存し、そして保護されるべき種に従って変化する。1つ以上の投与が、ブースター投薬として、通常、慣習的な間隔（例えば、2～3週間）で提供され得る。DNAアデニンメチラーゼは、脊椎動物に存在しないので、脊椎動物に投与される場合、DNAアデニンメチラーゼのインヒビターは、0または低い毒性を示すようである。さらに、DNAアデニンメチラーゼは、酵素であるので、これらは、細胞内に低い濃度で存在し；従って、インヒビターのより低い濃度の投与を必要とし、そして全てのDNAアデニンメチラーゼが阻害される可能性を増加させる。

#### 【0119】

（キットおよび株）

本発明はまた、本明細書中に記載されるような弱毒化株を提供する。好ましい株は、Dam活性を変化させる1つ以上の変異を含む*Salmonella*株である。同様の株が、本明細書中に記載される。従って、1つの実施形態では、本発明は、病原性細菌の弱毒化株を提供し、この株は、Dam活性を変化させて、その結果、細菌を弱毒化させる変異を含む。この変異は、本明細書中に記載の変異のいずれかであり得る。好ましくは、この株は、*Salmonella*株である。

#### 【0120】

本発明はまた、安定なパッケージングにおいて本明細書中に記載される任意の1つ以上の株および/またはワクチン処方物を含むキットを含む。このキットは、必要に応じて、（例えば、投与のための）指示書を提供する。いくつかの実施形態において、この指示書は、非ヒト（例えば、ニワトリ、または他の家畜動物）に投与するための指示書である。他の実施形態において、この指示書は、ヒトへの投与のための指示書である。

#### 【0121】

（本発明の方法）

本発明はまた、本明細書中に記載される免疫原性組成物を用いる方法（Dam活性を変化する、潜在的に有用な薬剤を同定するためのスクリーニング方法、および本明細書中に記載の免疫原性組成物を調製する方法）を提供する。

#### 【0122】

本明細書中に記載の組成物のいずれかの投与を伴う任意の方法に関して、組成物の任意の1つ以上が、投与され得る（すなわち、この組成物が、単独か、またはお互いに組み合わせて投与され得る）ことが理解される。さらに、この組成物は、予防および/または処置の目的のために、単独か、または他の様式（すなわち、臨床的介入）と組み合わせて使用され得る。

#### 【0123】

（免疫応答を惹起するための、疾患の予防のための、および疾患を処置するための免疫原性組成物の使用）

いくつかの実施形態において、本発明は、個体において免疫応答を惹起するために本明細書中に記載される免疫原性組成物を用いる方法を提供する。一般に、これらの方法は、免疫応答を惹起するために十分な量で個体に、本明細書中に記載される任意の1つ以上の免疫原性組成物を投与する工程を包含する。この免疫応答は、組成物において、細菌の特定の種および/または株に対する免疫応答であり得るか、または、他の実施形態において、第2の種および/または株に対する免疫応答であり得る。

#### 【0124】

この免疫応答は、B細胞応答および/またはT細胞応答であり得る。好ましくは、この応答は、抗原特異的である（すなわち、この応答は、免疫原性組成物において用いられる細菌に対する応答（すなわち、使用される細菌と関係する抗原に対する応答）が検出される）。好ましくは、この免疫応答は、ワクチン組成物の非存在下で持続する。従って、いくつかの実施形態において、この免疫応答は、本明細書中に記載の免疫原性組成物の投与の後の、およそ以下のいずれかの間持続する（複数の投与形態で与えられる場合、好ましくは、最も最近の投与の後）：4週間、6週間、8週間、3ヶ月、4ヶ月、6ヶ月、1年。

#### 【0125】

本明細書中に記載される免疫原性組成物の投与の効果を決定的に、個体は、抗体（体液性）または細菌に対する細胞性免疫応答のいずれか、またはその組み合わせについて、当該分野において標準的な技術でモニターされ得る。あるいは、このような応答を惹起することをすでに証明される場合、このようなモニタリングは必要ではなくてもよい。

#### 【0126】

免疫応答を惹起する目的のために、本明細書中に記載される免疫原性組成物は、非改変型形態で投与され得る。免疫原性を改善するために、細菌を改変することが、時折、好適であり得る。本明細書中で用いられるように、かつ当該分野で公知なように、「免疫原性」とは、特定の抗体（B細胞）または細胞性（T細胞）免疫応答を惹起するための能力、あるいは両方の能力をいう。免疫原性を改善する方法は、とりわけ、グルタルアルデヒドまたは二官能性カプラーのような試薬と架橋または多価プラットフォーム分子への結合を包含する。免疫原性はまた、タンパク質キャリア（特に、T細胞エピトープおよび/またはB細胞エピトープを含むキャリア）へのカップリングにより改善され得る。

#### 【0127】

組成物を受容するために適切な個体は上述されており、そして同様に、これらの方法に適用される。一般に、このような個体は、感染と関連する症状および/または疾患状態への暴露に感受性であるか、これらの症状および/または疾患状態に暴露されているか、ならびに/あるいはこれらの症状および/または疾患状態を提示する。この個体は、投与の時点で、Salmonellaに暴露されていてもよいし、暴露されていなくてもよく、従って、投与の時点で、Salmonellaに感染していてもよいし、感染していなくてもよい。好ましくは、個体は、Salmonellaに暴露されていない。

#### 【0128】

いくつかの実施形態において、本発明は、個体において、Salmonellaの第2の種、株、血清型、および/または群に対する免疫応答を惹起する方法を提供する。この方法は、Salmonellaの第2の種、株、血清型、および/または群に対する免疫応答を惹起するのに十分な量で、本明細書中に記載の

免疫原性組成物のいずれかを個体に投与する工程を包含する。この個体は、*Salmonella*の第2の種、株、血清型、および/または群に、以前に暴露されていてもよいし、暴露されなくてもよい。いくつかの実施形態において、免疫応答が惹起される第2の*Salmonella*は、(投与された第1の血清型と比較して) A群、B群、またはD群のような第2の群由来である。他の実施形態において、免疫応答が惹起される第2の*Salmonella*は、(投与された第1の血清型と比較して) 第2の血清型由来である。

#### 【0129】

第1の種および第2の種は、*Salmonella*の任意の種であり得、このいくつかは、上述されている。いくつかの実施形態において、第1の種は、*S. typhimurium*であり、そして第2の種は、*S. enteritidis*である。いくつかの実施形態において、第1の種は、*S. typhimurium*であり、そして第2の種は、*S. dublin*である。他の実施形態において、第1の種は、*S. enteritidis*であり、そして第2の種は、*S. typhimurium*である。さらに他の実施形態において、第1の種は、*S. enteritidis*であり、そして第2の種は、*S. dublin*である。同様に、第1の群は、A群、B群、またはD群のような、*Salmonella*の公知の群のいずれかであり得る。この第2の群は、A群、B群、またはD群のような、公知の群のいずれかであり得る(ただし、この第2の群は、第1のからなる群から選択されるとは異なる)。他の実施形態において、第1の血清型は、第2の血清型と異なる。*Salmonella*の血清型は、当該分野で公知である。

#### 【0130】

免疫応答が、1つ以上のさらなる抗原(すなわち、1つ以上のさらなる*Salmonella*の株、群、血清型、および/または種)に対して惹起され得ることが理解される。従って、本発明は、免疫応答が、第3、第4、第5などの*Salmonella*の株、群、血清型、および/または種に対して惹起される、方法を包含する。

#### 【0131】

本発明はまた、個体において、病原性細菌の第2の種、株、血清型、および/または群に対する免疫応答を惹起する方法を提供する。この方法は、病原性細菌の第2の種、株、血清型、および/または群に対する免疫応答を惹起するのに十分なDam誘導体量である、弱毒化細菌を含む免疫原性組成物を個体に投与する工程を包含する。

#### 【0132】

本発明はまた、個体における、細菌（好ましくは、例えば、*Salmonella*）感染を処置する方法を提供する。いくつかの実施形態において、本発明は、毒性細菌（*Salmonella*）の感染に関連する疾患症状を抑制する方法を提供する。この方法は、感染に関連する疾患症状を抑制するのに十分な量で、本明細書中に記載される任意の1つ以上の組成物を投与する工程を包含する。好ましくは、この感染は、*Salmonella*が原因である。他の実施形態において、感染は、*Escherichia*（好ましくは、*E. coli*）が原因である。他の実施形態において、これらの方法は、個体において（非投与と比較して）病原性細菌（例えば、*Salmonella*）の量を減少させる量で、本明細書中に記載される任意の1つ以上の組成物を投与する工程を包含する。

#### 【0133】

ワクチンは、投薬処方物に適合性の様式で、かつ例えば、治療的に有効な量で、投与される。投与される量は、処置される個体、抗体を合成する個体の免疫系の能力、投与の経路、および所望される防御の程度に依存する。投与される必要のある活性成分の正確な量は、処置を管理する開業医の判断に依存し得、個体に特有であり得る。

#### 【0134】

1つの実施形態において、本発明は、Dam活性を変化する薬剤を含む組成物を、個体に投与する工程を包含する、病原性細菌と感染した個体を処置する方法を提供する。他の実施形態において、本発明は、（a）宿主に化合物を投与する工程を包含する、病原性微生物（細菌）に感染した宿主を処置する方法を提供する。ここで、この化合物は、1つ以上のDNAアデニンメチラーゼの発現または活性を変化させる。この化合物は、（a）1つ以上のDNAアデニンメチラーゼ

に結合して、それによりDNAアデニンメチラーゼの活性を変化させ得る；(b) このDNAアデニンメチラーゼを発現する1つ以上の遺伝子に結合して、それによりこのDNAアデニンメチラーゼの発現を変化させ得る。このDNAアデニンメチラーゼの発現は、過度に活動する。あるいは、このDNAアデニンメチラーゼの発現は、抑制される。いくつかの実施形態において、この化合物は、1つ以上のDNAアデニンメチラーゼ遺伝子配列に相補的な配列を有するアンチセンスオリゴヌクレオチドである。

#### 【0135】

本発明はまた、宿主に化合物を投与する工程を包含する病原性微生物(細菌)に感染した宿主を処置する方法を提供する。ここで、この化合物は、DNAアデニンメチラーゼにより調節される1つ以上の毒性因子に結合する。

#### 【0136】

いくつかの実施形態において、本発明は、Salmonella感染のような細菌感染を予防する方法を提供する。これらの実施形態において、免疫原性組成物により惹起される免疫応答は、組成物を受容しない個体と比較して、免疫原性組成物のレシピエントが、感染の1つ以上の減少した症状を提示するという意味で、防御的である。他の実施形態では、防御は、組成物を受容しない個体と比較して、組成物を受容する個体において、Salmonellaのような細菌の量を減少させることにより与えられる。

#### 【0137】

いくつかの実施形態において、本発明は、個体における細菌感染に関連する症状を抑制する方法(あるいは、細菌感染を処置する方法)を提供する。この方法は、Dam活性を変化させる薬剤を含む組成物を、個体に投与する工程を包含する。細菌は、本明細書中に記載される細菌(特に、Salmonella)のいずれかであり得る。

#### 【0138】

別の実施形態において、本発明に関する抗微生物薬調製される。これは、DNAアデニンメチラーゼ、好ましくは、DNAアデニンメチラーゼ(Dam)を阻害する。以下の議論は、dam遺伝子およびその産物であるDamに、特異的に

焦点を合わせるが、この特異性は、ただ単純化および明確さの目的のみであることが理解される。以下に議論される方法および組成物は、(i) DNAアデニンメチラーゼを発現する任意の遺伝子、(ii) DNAアデニンメチラーゼ遺伝子を調節する任意の遺伝子または遺伝子産物、(iii) DNAアデニンメチラーゼにより調節される任意の遺伝子、および/あるいは(iv) DNAメチラーゼに対して適用可能であることが意図される。従って、damおよびDamである、特定の遺伝子および遺伝子産物が、以下で議論されるが、他のDNAアデニンメチラーゼ遺伝子およびDNAアデニンメチラーゼは、それぞれ、damおよびDamの等価物であることが意図され、従って以下の議論に関して交換可能である。

#### 【0139】

Damの阻害は、dam遺伝子翻訳を阻害するアンチセンスオリゴヌクレオチドの使用、Dam酵素活性の直接的インヒビター、Dam活性化因子についての抑制化合物および/またはDamリプレッサーについての活性化化合物の単離によるDamレベルの低下、ならびにDamにより調節される毒性因子の標的化を含む、多数のアプローチにより実行され得る。このアンチセンスアプローチは、哺乳動物細胞由来のシトシンメチルトランスフェラーゼ(MeTase)を阻害するために以前に用いられた(MacLeod, A. R. およびSzyf, M., J. Biol. Chem., 7: 8037-8043 (1995))。アンチセンス核酸の副腎皮質細胞へのトランスフェクションは、DNA脱メチル化を生じ、そしてMeTase活性に関する腫瘍形成能を減少した。

#### 【0140】

別の実施形態において、抗微生物薬は、Damを活性化する。このような化合物は、例えば、damプロモーターを刺激する、リプレッサーを不活化する、および/またはDamの半減期を延長することにより、このような活性化に有効である得る。

#### 【0141】

(スクリーニングアッセイ)

本発明はまた、Dam活性を変化させる能力に基づく抗細菌活性を有し得る(

従って、毒性を調節し得る) 薬剤を同定する方法を包含する。これらの方法は、種々の実施形態において実施され得る。本発明者らは、Dam機能の喪失または増加さえもが、当該分野で受容された(art-accepted) マウスモデルにおけるSalmonellaの有義により低い感染性を生じることを観察している。このことは、Dam機能の調節が、Salmonellaを含むが限定されない、種々の細菌の病原性の制御を生じ得るが、宿主細胞には影響しないことを示唆する。このことは、ヒトは、dam遺伝子に対するホモログを有さないもので、特にあてはまる。さらに、本発明者らは、damが、Vibrio choleraeおよびYersinia pseudotuberculosisにおける本質的遺伝子であることを見出した(実施例7)。このことは、Damが、これらの病原性生物における優れた薬物標的であることを示す。従って、本発明の方法により同定された薬剤は、細菌感染、特に、Escherichia感染、Salmonella感染、Vibrio感染、および/またはYersinia感染の処置に有用であり得る。

#### 【0142】

本明細書において記載される方法は、インビトロスクリーニングアッセイおよび細胞ベーススクリーニングアッセイである。インビトロでの実施形態において、因子は、このDamの機能を調節するその能力について試験される。細胞ベースの実施形態において、Dam機能を有する生存細胞は、因子を試験するために使用される。本発明の目的に関して、因子は、Damの機能の全体の欠失に関連する特徴が好ましいが、Damの機能の任意の改変に基づいて、同定され得る。

#### 【0143】

これらの全ての方法において、Damの機能の改変は、陽性または陰性のいずれにしても、Damの機能に影響する任意のレベルで起こり得る。因子は、Damの転写を減少すること、かまたは妨害することにより、Damの機能を改変し得る。このような因子の例は、ポリヌクレオチド配列またはポリペプチドを含む、上流調節領域に結合する因子である。因子は、Dam RNAの転写を増大させることによりDamの機能を改変し得る。因子は、Dam RNAの翻訳を減少することか、または妨害することによりDamの機能を改変し得る。このよう

な因子の例は、アンチセンスポリヌクレオチドのようなRNAに結合する因子、またはRNAを選択的に分解する因子である。Damを阻害するためのアンチセンスの試みは、上に記載している。因子は、Dam RNAの翻訳を増大することによりDamの機能を改変し得る。因子は、Damに結合することによりDamの機能に欠陥を生じさせ得る。このような因子の例は、ポリペプチドまたはキレート剤である。因子は、Damにより調節される遺伝子の遺伝子発現に影響することにより、Damの機能に欠陥を生じさせ得る。このような因子の例は、上記に議論されたレベルのいずれかでDam調節遺伝子の発現を変化する因子である。

#### 【0144】

スクリーニング方法は、Dam遺伝子を有する任意の病原菌に対して適用可能に記載した。

#### 【0145】

(インビトロスクリーニング法)

本発明のインビトロスクリーニングアッセイにおいて、因子は、以下のいずれかであり得るインビトロ系においてスクリーニングされる：(1) 因子が、damの転写を阻害しているか、または増大しているかを決定するアッセイ；(2) Dam RNAもしくはDamをコードするポリヌクレオチドの翻訳を妨害する因子、または代替的にdamの翻訳を特異的に増大する因子についてのアッセイ；(3) Damに結合する因子についてのアッセイ。

#### 【0146】

因子が、damの転写を阻害するか、または増大するかを決定するアッセイに関して、インビトロ転写系またはインビトロ転写/翻訳系を用い得る。これらの系は、市販され、そして一般的にポジティブコントロール、好ましくは、内部コントロールとしてコード配列を含む。Damをコードするポリヌクレオチドが、導入され、そして転写が起ることを可能にする。いずれの因子も含まないインビトロ発現系(陰性コントロール)と因子を含むインビトロ発現系との間での転写産物の比較は、因子がdamの転写に影響するか否かを示す。コントロールとDamとの間での転写産物の比較は、因子が、このレベルで作用する場合、dam

の転写に選択的に影響するか否かを示す（一般的な様式、非選択的な様式または特異的な様式における転写に影響することとは対照的）。

【0147】

d a m RNAまたはD a mをコードするポリヌクレオチドの翻訳を因子が阻害するかまたは増大するかを決定するアッセイに関して、上記のようなインビトロ転写/翻訳アッセイは、翻訳産物を比較することを除いて、用いられ得る。いずれの因子も含まないインビトロ発現系（陰性コントロール）と因子を含むインビトロ発現系との間での翻訳産物の比較は、因子が、d a mの翻訳に影響するか否かを示す。コントロールとd a mとの間での翻訳産物の比較は、この因子が、このレベルで作用する場合、d a mの翻訳に選択的に影響するか否かを示す（一般的な様式、非選択的な様式または特異的な様式における翻訳に影響することとは対照的）。

【0148】

D a mに結合する因子についてのアッセイに関して、D a mは、まず原核生物発現系または真核生物発現系において、ネイティブタンパク質として、またはD a mが、十分に特徴付けられたエピトープまたはタンパク質と結合体化される融合タンパク質として組換え的に発現される。次いで、組換えD a mは、例えば、抗D a m抗体または抗エピトープ抗体を用いる免疫沈降によるか、またはこの結合体の固定したリガンドに結合することにより精製される。次いで、D a mまたはD a m融合タンパク質製のアフィニティークラムを用いて、適切に標識された化合物の混合物をスクリーニングする。適切な標識としては、蛍光色素、放射性同位体、酵素および化学発光化合物が挙げられるが、これらに限定されない。非結合化合物および結合化合物は、当業者により慣用的に使用される種々の条件（例えば、高塩、界面活性剤）を用いる洗浄により分離され得る。アフィニティークラムに対する非特異的な結合は、単に結合体またはエピトープを含むアフィニティークラムを用いて化合物混合物を前処理することにより最小にし得る。同様の方法は、D a mへの結合に対して競合する因子についてスクリーニングするために用いられ得る。アフィニティークロマトグラフィーに加えて、別の分子への結合の際に変化するタンパク質の融点または蛍光異方性の変化を測定するような

他の技術がある。例えば、ネイティブDamまたはDam融合タンパク質に共有結合するセンサーチップ(Pharmacia Biosensor, Stittら(1995)Cell 80:661-670により供給された)を用いるBIAcoreアッセイを実施して、異なる因子のDam結合活性を決定し得る。

#### 【0149】

Damの結合に関して、Damの適切なフラグメントもまた、用いられることが理解される。例えば、Damの特定の領域が、DNAに結合するために重要であることが公知である場合には、この領域を含むか、またはまさにこの領域からなるこのフラグメントが、用いられ得る。

#### 【0150】

別の実施形態において、インビトロスクリーニングアッセイは、Damに結合する別の物質(大体、ポリヌクレオチド)と競合する因子を検出する。例えば、Damは、特定のDNAモチーフ(すなわち、Dam標的部位であるGATC)に結合することが公知である。アッセイが行われ得、その結果、因子が、このモチーフに対する結合と競合するその能力について、試験される。競合結合アッセイは、当該分野において公知であり、そして本明細書において詳細に記載する必要性はない。簡潔には、このようなアッセイは、推定の競合因子の増加された量の存在下で形成されたDam複合体の量の測定を伴なう。これらのアッセイに関して、反応物質の1つは、例えば、<sup>32</sup>Pを用いて標識される。本発明によりまた包含される1つのこのようなアッセイは、以下でより詳細に記載される。

#### 【0151】

Damのインヒビターまたはアクチベーターの単離は、例えば、Damについて、迅速なハイスループットアッセイを用いて、化学ライブラリー(Neustadtら、Bioorg. Med. Chem. Lett. 8:2395-2398(1998))またはペプチドライブラリー(Lam, K.S., Anticancer Drug. Res., 12:145-167(1997))をスクリーニングすることにより実施し得る。このようなインヒビターライブラリーは、いくつかの酵素の活性をブロックすることにおいて効果的であることがすでに

示されている (Carroll, C. D., Bioorg. Med. Chem. Lett., 8: 3203-3206 (1998))。このDamアッセイは、一方の末端で係留基 (例えば、ビオチン) そして他方の末端にシグナルを有する Dam標的部位 (GATC配列) を含む二本鎖オリゴヌクレオチドからなる。このシグナルは、放射活性化合物 (例えば、リン-32)、蛍光分子 (例えば、フルオレセイン)、または抗原であり得る。Dam標的部位を含む非メチル化オリゴヌクレオチドは、固体表面 (例えば、アビジンを含む96ウェルマイクロタイタープレート) に係留される。(標的オリゴヌクレオチドの全てのGATC部位をメチル化するために十分な活性をちょうど有するようにあらかじめ決定された) Dam酵素を、インヒビターライブラリーとともにプレインキュベートして、次いでS-アデノシルメチオニン (SAM) の存在下で各ウェルに添加する。インキュベーションの後、サンプルウェルを緩衝液で洗浄して、制限酵素MboIを添加して、オリゴヌクレオチド内の全ての非メチル化GATC部位を消化し、従って分子のシグナル末端を遊離する。次いで、プレートウェルは、計数され (放射活性シグナル)、蛍光についてスキャンされる (蛍光シグナル) か、または西洋ワサビペルオキシダーゼのような酵素に結合体化した二次抗体とインキュベートし、続いて、酵素の非放射活性基質とインキュベートされる。Damの阻害は、非メチル化GATC部位の放出が原因であるサンプルウェル内のシグナルの減少として検出される。このアッセイを用いて、阻害活性についての化学ライブラリーおよびペプチドライブラリーを迅速にスクリーニングし得る。このような研究の実施可能性は、MeTase活性のインヒビターであるsinefunginの単離により示された。sinefunginは、S-アデノシル-L-メチオニン (SAM) のアナログであり、そしてDNAのメチル化の競合インヒビターとして作用する。しかし、sinefunginは、メチルドナーとしてSAMが必要である哺乳動物シトシンメチラーゼを含む全てのDNAメチラーゼをブロックするので、この薬物は、細菌に対する化学療法剤として有用ではない。

#### 【0152】

Damのアクチベーターを単離するために、(低いパーセンテージの標的部位 (例えば、GATC部位)、低いパーセンテージの標的オリゴヌクレオチド (例

例えば、20%)をメチル化するために十分な活性を含むようにあらかじめ決定された) Damは、1つ以上の因子(アクチベーターライブラリーを含む)とプレインキュベートされて、次いでSAMの存在下で各ウェルに添加される。Damの活性化は、標的部位(例えば、GATC)のメチル化、従ってMboI制限反応の妨害が原因であるサンプルウェル内のシグナルの増加として検出される。

#### 【0153】

従って、いくつかの実施形態において、本発明は、(a)DNAアデニンメチラーゼ標的部位を含む非メチル化オリゴヌクレオチドを固体表面に係留する工程(ここで、この非メチル化オリゴヌクレオチドは、第1の末端上の係留基および第2末端上のシグナルを有する);(b)十分な活性を有するDNAアデニンメチラーゼをインキュベートして、因子;インヒビターライブラリーを用いて、この非メチル化オリゴヌクレオチド上のこの標的部位、好ましくはこの標的部位の全てをメチル化する工程;(c)このインキュベートされたDNAアデニンメチラーゼを、S-アデノシルメチオニンの存在下でこの係留された非メチル化オリゴヌクレオチドに添加する工程;(d)全ての非メチル化標的部位を消化し、それによって、係留された非メチル化オリゴヌクレオチドを遊離する工程;および(e)この非メチル化標的部位の消化が原因であるこのシグナルの増加としてDNAアデニンメチラーゼの阻害を検出する工程を包含する、改変するかまたは調節する因子(すなわち、Dam機能を改変、好ましくは、Dam機能を阻害する因子)を同定する方法を提供する。好ましくは、この標的配列は、GATC配列である。この係留基は、当該分野において公知の任意の適切な部分(例えば、ビオチン)であり得る。このシグナルは、蛍光、放射活性、または抗原が原因であり得る。いくつかの実施形態において、この固体表面は、アビジンを含むマイクロタイタープレートである。制限酵素(例えば、MboI)を用いて、この非メチル化標的部位を消化し得る。インヒビターライブラリーが、試験されるべき因子の供給源として用いられる場合、このライブラリーは、生体分子(例えば、ペプチド)を含み得るか、または有機化合物もしくは無機化合物を含み得る。

#### 【0154】

本発明のインビトロスクリーニング法が、構造的薬物設計、または理論的薬物

設計を包含することもまた理解され、これらの設計において、D a mのアミノ酸配列、3次元原子構造または他の特性は、D a mに結合することが推測される因子を設計することの基礎を提供する。一般的に、これに関連して因子の設計および/または選択は、いくつかのパラメータ（例えば、D a m標的の理解される機能（ここで、DNAに結合することはこのような機能の一つである）、D a m標的の3次構造（公知かまたは推測される場合）、および理論的薬物設計の他の局面）により決定される。コンビナトリアル化学の技術をまた用いて、候補の因子の多くの置換を生じ得る。本発明の目的に関して、理論的薬物設計により設計されたおよび/または得られた因子はまた、以下に記載された細胞ベースアッセイにおいて試験され得る。

#### 【0155】

（細胞ベーススクリーニング法）

細胞ベーススクリーニングアッセイにおいて、生存細胞、好ましくは、機能するd a m遺伝子を含む細菌、または生存細胞、好ましくは、D a mコード配列を含むポリヌクレオチド構築物を含む細菌は、因子に曝露される。対照的に、従来のインビトロ薬物スクリーニングアッセイ（上記のような）は、代表的に単離された成分（例えば、酵素または他の機能性タンパク質）に対する試験因子の効果を測定した。

#### 【0156】

本明細書中に記載された細胞ベースのスクリーニングアッセイは、従来の薬物スクリーニングアッセイを超えるいくつかの利点を有する：1）因子が所望の治療的效果を達成するために細胞に侵入しなければならない場合、細胞ベースアッセイは、因子が細胞に侵入し得るか否かに関して指標を与え得る；2）細胞ベーススクリーニングアッセイは、因子がこのアッセイ系に添加される段階でD a mの機能を改変することに効果的でない因子であるが、それらが有効な因子になるように一旦、細胞内に入ると細胞の成分により改変される因子を同定し得る；3）最も重大なことは、細胞ベースアッセイ系は、D a mの機能の改変に関連する特徴を最終的に生じる経路の任意の成分に影響する因子の同定を可能にする。

#### 【0157】

1つの実施形態において、因子を、適切な宿主細胞において、Damの機能の  
改変に関連する特徴を誘発するその能力により同定する。これに関連して適切な  
宿主細胞は、任意の宿主細胞である。この宿主細胞においてDamの機能が、観  
察され得る。好ましくは、宿主細胞は、細菌細胞である。適切な宿主細胞として  
は、Dam遺伝子を含む*Salmonella*、*Escherichia*、*Vibrio*、*Yersinia*ならびに他の任意の細菌属および種が挙げられるが  
、これらに限定されない。アッセイの1つの例は、*E. coli*において線毛オ  
ペロン系を用い、*E. coli*において、レポーターの発現のレベルが決定され  
る。メチル化に応答性である任意の細菌オペロン系は、当該分野において公知で  
ある多くのレポーター系のいずれかを用いる細菌ベースアッセイに適切である。  
因子の存在下でのこのような系からの転写および/または翻訳のレベルは、因子  
がDam活性に影響したか否かを示す。

#### 【0158】

1つの実施形態において、本発明は、以下の工程を包含する毒性を制御し得る  
因子の同定をするための方法を提供する：(a) 試験されるべき少なくとも1つ  
の因子をDamの機能を有する適切な宿主細胞と接触する工程；および(b)こ  
の宿主細胞においてDamの機能の改変と関連する少なくとも1つの特徴（これ  
はDamの機能を増大、減少、または欠失をし得る特徴）を分析する工程であっ  
て、ここで因子が、少なくとも1つのこのような特徴を誘発する能力により同定  
された。これらの方法に関して、宿主細胞は、任意の細胞であり得、この細胞に  
おいてDamの機能が実証される。

#### 【0159】

Damの機能の欠失において脱抑制される遺伝子に関して、Damの機能の欠  
失は、レポーター系を用いて測定され得、この系においては、レポーター遺伝子  
配列は、作動可能に目的のDam抑制遺伝子に連結される。このような抑制遺伝  
子は、本明細書中に例を含めて記載される。本明細書中で用いられる場合、用語  
「レポーター遺伝子」は、同定され得る遺伝子産物（すなわち、レポータータン  
パク質）をコードする遺伝子を意味する。レポーター遺伝子としては、アルカリ  
ホスファターゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ、 - ガラ

クトシダーゼ、ルシフェラーゼおよび緑蛍光タンパク質が挙げられるが、これらに限定されない。レポーター遺伝子の産物のための同定方法としては、酵素アッセイおよび蛍光アッセイが挙げられるが、これらに限定されない。これらの産物を検出するためのレポーター遺伝子およびアッセイは、当該分野において周知であり、そして例えば、Current Protocols in Molecular Biology、Ausubelら編、Greene Publishing and Wiley-Interscience: New York (1987) および定期的な更新版、ならびにShort Protocols in Molecular Biology (WileyおよびSons, 1999) に記載される。レポーター遺伝子、レポーター遺伝子アッセイおよび試薬キットはまた、市販の供給源 (Stratagene, Invitrogen など) から容易に入手可能である。

#### 【0160】

別の実施形態において、これらの方法は、以下の工程を包含する：(a) Dam (またはその機能的フラグメント) をコードするポリヌクレオチドを、そうでなければDamの機能を欠失する、適切な宿主細胞に導入する工程であって、Dam機能が、この宿主細胞において回復される、工程；(b) 工程(a)のこの細胞を試験されるべき少なくとも1つの因子と接触させる工程；(c) Damの機能の欠失に関連する少なくとも1つの特徴を分析する工程であって、ここで因子が、少なくとも1つのこの特徴を誘発する能力により同定される、工程。

#### 【0161】

これらの方法のために用いられる宿主細胞は、まずDamの機能を欠失する(すなわち、Damをコードするポリヌクレオチドの導入前にDamの機能を欠失する)。Damの機能を欠失する工程は、完全であることが好まれ得る。Damの機能を欠失する宿主細胞を作り出す工程は、欠失変異誘発、遺伝子の機能的部分の組換え置換、フレームシフト変異、変異体の単離に関する従来のもしくは古典的な遺伝子技術、または調節ドメインの改変のような遺伝子操作が挙げられるが、これらに限定されない種々の方法で達成され得る。Dam (またはこれのホモログ) の機能の欠失が、致死的である細胞に関して、Damの野生型のコピー

を含むプラスミドが、破壊プロセス、または変異誘発プロセスの間、細胞中にある。細胞が、野生型遺伝子を含むプラスミドなしで生存し得ない場合、Damの機能の欠失が、致命的であると仮定される。実施例7は、Dam遺伝子が必須であるか否かを決定するためのアッセイを記載する。

#### 【0162】

Damをコードするポリヌクレオチドまたはその機能的フラグメントの導入は、用いられた特定の宿主細胞に依存し、そして当該分野において公知の多くの方法（例えば、スフェロプラスティング、エレクトロポレーション、CaCl<sub>2</sub>沈殿、酢酸リチウム処理、およびリポフェクタミン処理）のいずれかによってであり得る。

#### 【0163】

適切な宿主細胞に導入されるポリヌクレオチドは、Damをコードするポリヌクレオチドまたはその機能的フラグメントを含むポリヌクレオチド構築物である。これらの構築物は、要素（すなわち、機能的配列）を含み、これは、構築物の導入の際に宿主細胞においてDamアミノ酸配列の発現（すなわち、転写、翻訳、およびもしあれば翻訳後修飾）を可能にする。これらの要素（例えば、適切な選択マーカー）の構成は、用いられる宿主細胞に依存する。

#### 【0164】

宿主細胞におけるDam（またはこれのホモログ）の機能の回復は、Damの機能（すなわち、野生型）に関連する検出可能なパラメータについて宿主細胞を分析することにより決定され得る。これらのパラメータは、用いられた特定の宿主細胞に依存する。Salmonellaに関して、Damの機能は、以下のいずれかに関連する：（a）Dam調節遺伝子の抑制；（b）毒性；（c）paf線毛発現の調節；（d）特定のアミノ酸の感受性の欠失。SalmonellaにおけるDamの存在下で抑制されることが公知の遺伝子は、上に記載されている。レポーター構築物（上記を参照のこと）を作製するための当該分野において周知の方法があれば、これらの遺伝子のいずれかは、レポーター系に適応するために改変され得る。適切なレポーター系の例は、上記で議論されている。

#### 【0165】

いくつかの実施形態において、Damをコードするポリヌクレオチドは、作動可能に誘導性プロモーターに連結される。誘導性プロモーターの使用は、因子がDam経路を介して作用するか否かを決定するための手段を提供する。因子が、誘導性プロモーターが活性化される細胞において現れるDamの機能の欠失を示す特徴を生じる場合、誘導性プロモーターが活性化されない細胞において因子が、同様の結果を誘発しないという観察は、因子が、Damの機能の少なくとも1つの工程または局面に影響することを示す。逆に、Damの機能の欠失を示す特徴がまた、誘導性プロモーターが活性化されない細胞において観察される場合、この因子は、単にDamの機能の経路を介して必ずしも作用しないことを仮定し得る。

#### 【0166】

本発明の細胞ベーススクリーニングアッセイは、例えば、レポータータンパク質（すなわち、容易にアッセイ可能なタンパク質（例えば、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（CAT）、緑蛍光タンパク質（GFP）またはルシフェラーゼ））の発現が、Damの機能に依存する細胞株を構築することにより設計され得る。例えば、Dam制御下の遺伝子は、実施例1に記載されるようにコード領域内に挿入されたレポーター配列を有し得る。この細胞は、試験因子に曝露され、そして $\beta$ -ガラクトシダーゼ発現を行うのに十分な時間および先に発現された $\beta$ -ガラクトシダーゼの枯渇を可能にするのに十分な時間の後、この細胞は、標準的なアッセイ条件下で $\beta$ -ガラクトシダーゼの産生についてアッセイされる。

#### 【0167】

アッセイ方法は、一般的に、薬剤が添加されていないコントロールサンプルに対する比較を必要とする。さらに、コントロールとしてDam機能を部分的または完全に欠如する細胞を使用することは望ましくあり得る。例えば、薬剤がDam経路に沿って作用した場合、当業者は、薬剤で処置したdam細胞と同じ表現型をみると予測し得る。薬剤がDam経路に沿って作用しなかった場合、当業者は、薬剤で処置した場合にdam細胞で生じる他の特徴をみると予測し得る。

#### 【0168】

上記のスクリーニング方法は、抗細菌活性を示し得る任意の薬剤を検出することを表す一次スクリーニングを示す。当業者は、薬剤をさらに評価するために二次試験がおそらく必要であることを認識する。例えば、二次スクリーニングは、一次スクリーニングが細菌ではなく宿主細胞において行われた場合、目的の細菌において薬剤を試験する工程を包含し得る。さらなるスクリーニングは、薬剤で処置した細胞を使用して感染性アッセイを行うことである。マウスを用いる感染性アッセイは、実施例1に記載され、そして他の動物モデル（例えば、ラット）は当該分野で公知である。さらに、細胞傷害性アッセイは、一次スクリーニングにおいて陽性であった薬剤が生体で使用するために適切であるというさらなる確証として行われる。細胞傷害性についての任意のアッセイは、この目的に関して適切であり、このアッセイとしては、例えば、MTTアッセイ（Promega）が挙げられる。

#### 【0169】

（ワクチンおよび弱毒化細菌の調製）

本発明はまた、本明細書中に記載されるワクチンを調製または作製する方法および本明細書中に記載される変異株（すなわち、Dam誘導体）を作製する方法を提供する。ワクチン調製物は上記で十分に議論され、そのためにこれらの方法は、本発明に包含される。本明細書中に記載される変異のいずれか（Dam発現を含むDam活性を増加するか、減少するか、または除去する変異を含む）は、本発明の調製方法において使用され得、そして本節では概して繰り返されない。

#### 【0170】

1つの実施形態において、本発明は、変化したDam機能を有する弱毒化細菌を含む免疫原性組成物を調製するための方法を提供し、この方法は、本明細書中に記載される変異体および/または変異株（すなわち、Dam誘導体）のいずれかを、薬学的に受容可能な賦形剤と合わせる工程を包含する。好適な実施形態は、本明細書中に記載されるようなSalmonella株を含む。Dam活性を除去した変異を有するSalmonella株（例えば、本明細書中に記載の欠失変異体）が特に好適である。

#### 【0171】

1つの実施形態において、本発明は、対応する細菌または類似の病原性細菌により引き起こされる疾患に罹りやすい個体が免疫学的応答を惹起し得る弱毒化病原性細菌（好ましくは、*Salmonella*）を調製する方法を提供し、この方法は、上記の病原性細菌において少なくとも1つの変異を構築する工程を包含し、ここで、第1の変異は、Dam機能の変化（好ましくは、Damの発現の変化）を生じる。好ましくは、第1の変異は、Damを発現する第1の遺伝子に導入される。いくつかの実施形態において、上記の第1の変異は、第1の遺伝子に導入され、その発現は、DNAアデニンメチラーゼ酵素を発現する遺伝子の発現を抑制するかまたは過剰に活性化させる。いくつかの実施形態において、上記の第1の変異は、第1の遺伝子に導入され、その発現は、DNAアデニンメチラーゼにより調節される。他の実施形態において、第2の変異は、上記の第1の変異とは独立した遺伝子において作製され、上記の第2の変異は、細菌の弱毒化を引き起こす。

#### 【0172】

別の実施形態において、本発明は、対応する毒性細菌により引き起こされる疾患に罹りやすい宿主被験体が免疫学的応答を惹起し得る弱毒化細菌を調製するための方法を提供し、この方法は、(a)病原性細菌の毒性株のdam遺伝子において少なくとも1つの変異を構築する工程を包含する。いくつかの実施形態において、第2の変異を、上記の第1の変異とは独立して、上記細菌の弱毒化を生じる第2の遺伝子に導入する。

#### 【0173】

別の実施形態において、対応するか、または類似の病原性細菌により引き起こされる疾患に罹りやすい宿主が免疫学的応答を惹起し得る弱毒化細菌を調製するための方法を提供し、この方法は、(a)上記病原性細菌において第1の非回復変異を構築する工程であって、ここでこの第1の非回復変異は、1つ以上のDNAアデニンメチラーゼの発現またはその活性を変化させる、工程、および(b)上記病原性細菌において第2の非回復変異を構築する工程、であって、ここで、この第2の非回復変異は、上記第1の非回復変異とは独立しており、そして弱毒化することである、工程、を包含する。いくつかの実施形態において、第1の非

回復変異は、その遺伝子遺伝子産物が、上記の1つ以上のDNAアデニンメチラーゼを活性化する遺伝子において構築される。いくつかの実施形態において、この遺伝子産物は、DNAアデニンメチラーゼを活性化する。いくつかの実施形態において、第1の非回復変異は、その遺伝子産物が、上記のDNAアデニンメチラーゼの発現を抑制する遺伝子において構築される。いくつかの実施形態において、上記遺伝子産物は、DNAアデニンメチラーゼを抑制する。他の実施形態において、第1の非回復変異は、その遺伝子産物が、この1つ以上のDNAアデニンメチラーゼに対して直接結合することによりこの1つ以上のアデニンメチラーゼの活性を不活化するか、または低減する遺伝子中に構築する。いくつかの実施形態において、上記DNAアデニンメチラーゼのうちの一つは、DNAアデニンメチラーゼである。いくつかの実施形態において、病原性細菌は、*Salmonella*の株であり、好ましくは、*Salmonella*は、*S. typhimurium*、*S. enteritidis*、*S. typhi*、*S. abortus-ovi*、*S. abortusequi*、*S. dublin*、*S. gallinarum*、*S. pullorum*である。他の実施形態において、病原性細菌は、以下のうちのいずれか一つである：*Yersinia*、*Vibrio*、*Shigella*、*Haemophilus*、*Bordetella*、*Neisseria*、*Pasteurella*、病原性*Escherchia*、*Treponema*。宿主は、脊椎動物（例えば、哺乳動物）、好ましくは、ヒトまたは家畜であり得る。いくつかの実施形態において、脊椎動物は、ニワトリである。

#### 【0174】

いくつかの実施形態において、この調製方法は、抗原の付加を包含する。例えば、この抗原は、単にワクチン中の細菌に付加され得るか、あるいは、所望の抗原をコードする、1つ以上の構造遺伝子を含む発現カセットが弱毒化細菌に挿入され得る。

#### 【0175】

抗原としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：破傷風毒素のフラグメントC、コレラ毒素のBサブユニット、B型肝炎表面抗原、*Vibrio cholerae* LPS、HIV抗原および/または*Shigella* s

oneii LPS。

【0176】

別の実施形態において、本発明は、対応するかまたは類似の病原性微生物により引き起こされる疾患に罹りやすい宿主が免疫学的応答を惹起し得る、弱毒化微生物を調製する方法を提供し、この方法は、(a)上記病原性微生物において第1の非回復変異を構築する工程であって、ここでこの第1の非回復変異は、DNAメチラーゼにより調節される1つ以上の遺伝子の発現またはその活性を変化させる、工程、および(b)上記病原性微生物において第2の非回復変異を構築する工程であって、ここで、この第2の非回復変異は、上記第1の非回復変異とは独立しており、そして弱毒化することである、工程、を包含する。

【0177】

上記の開示は、一般的に本発明を記載する。単に例示を目的として本明細書中に提供され、限定することを意図しない、以下の特定の実施例を参照することによって、より完全な理解が得られ得る。

【0178】

(実施例)

以下の限定しない実施例は、病原性生細菌から調製したワクチンおよび本発明の教示に従う抗微生物薬物についての標的部位を提供し、そして例示であって、限定ではない方法によって提供される。全ての科学技術的用語は、当業者により理解されるような意味を有する、組換えDNA技術は、今や周知かつ広く行き渡っており、慣用的であるとみなされる。最も広くかつ一般的な用語において、これらの技術は、1つの生物の遺伝的物質を第2の生物に移入する工程を包含し、その結果、移入する遺伝的物質が、移入される生物の遺伝的物質の一部になる。これは、代表的には、第1の生物に由来する一片のDNAを、プラスミドまたは染色体DNAのいずれかから得る第1の工程からなる。DNAの一片は、任意のサイズであり得、そしてしばしば、特定の塩基対部位でDNAを認識かつ切断する制限エンドヌクレアーゼ酵素の使用によって得られる。特定のDNAの一片を単離した後、このDNAをプラスミド、ファージまたはコスミドベクターに挿入するか、またはクローニングして、組換え分子を形成し、これは、引き続いて、

形質転換、形質導入、トランスフェクション、および接合のような種々の方法によって宿主細胞に移入され得る。

【0179】

形質転換は、外部環境からの裸のDNAの取り込みを包含し、これは、種々の化学薬剤（例えば、カルシウムイオン）の存在またはエレクトロポレーションにより人工的に誘導され得る。形質導入は、ファージ（例えば、形質導入ファージまたはコスミドベクター）内に組換えDNAのパッケージングを包含する。一旦、組換えDNAが微生物宿主に導入されると、これは、別個の一片として存在し続けるか、または宿主細胞の染色体に挿入または組み込まれ得、そして細胞分裂の間に染色体とともに複製され得る。接合は、古典的な微生物接合技術を包含する。

【0180】

（実施例1：Dam *Salmonella* 誘導体は毒性でない）

（株構築）

使用した全ての *Salmonella typhimurium* 株は、American Tissue Culture Collection (ATCC) 株14028（野生型といわれる *S. typhimurium* のスムーズ毒性株）と同遺伝子系である。以前、他の研究室から報告された全ての *dam* 変異は、*Salmonella* 株LT2を使用した。この *Salmonella* 株LT2は、i.p. で送達された場合、野生型より少なくとも1000倍病原性が低い。表1中のデータを参照のこと。

【0181】

全ての制限酵素および pBR322 は、商業的供給源（例えば、Stratagene, 11099 North Torrey Pines Rd., La Jolla, California 92037）から購入したが、購入し得る。エレクトロポレーションは、BioRad Gene Pulser apparatus Model No. 1652098 を用いて行った。*S. typhimurium* 細胞を製造業者の指示に従って調製した。コンピテント細胞のアリコート、所望のプラスミドのアリコートと混合し、そして1分間氷上に

置いた。この混合物を、キュベット電極(0.2 cm)中に移し、そして製造業者の指示に従って、2.5 KV/cmの電場強度で1回パルスした。

### 【0182】

#### (1. 非極性dam変異の構築)

非極性dam変異の構築のために、S. typhimuriumゲノムDNAを、Pfuポリメラーゼ(Stratagene)を使用するPCRのためのテンプレートとして使用した。damの最初の100コドンを含む、350bpのDNAフラグメントを、以下のオリゴヌクレオチド対：5'-GATTTCTAGAGTAGTCTGCGGAGCTTTC-3'(配列番号1)(5'末端にXbaI部位を含む)および5'-GATTCTCGAGGGTGTTGAACCTCCTCGCG-3'(配列番号2)(5'末端にXhoI部位を含む)を用いて、PCRにより増幅する。2.0mM Mg<sup>2+</sup>を含む緩衝液中で、92で45秒、42で1分および72で1分30秒を30サイクルにわたり、PCRを行った。この手順を、DNAサーマルサイクラー#801-0150(Perkin-Elmer Cetus)において行った。次いで、このPCR産物を、XbaIおよびXhoIで二重消化した。第2のPCR増幅において、damの最後の79コドンを含む、300bpのDNAフラグメントを、以下のオリゴヌクレオチドプライマー：5'-GATTCTCGAGTTTAGCCTGACGCAACAAG-3'(配列番号3)(5'末端にXhoI部位を含む)および5'-GATTGCATGCTCCTTCACCCAGGCGAG-3'(配列番号4)(5'末端にSphI部位を含む)を用いて合成した。次いで、このPCR産物を、XhoIおよびSphIで二重消化した。自殺ベクターpCVD442(Donnenberg, M.S.ら, Infect. Immun., 59:4310-4317(1991))を、XbaIおよびSphIで二重消化し、バンドを精製し、そして2つの注文通りに切断したPCR産物で単一反応物中に連結した。Damの100の内部アミノ酸のインフレーム欠失を作製し、欠失接合点に独特のXhoI部位を残した。次いで、E. coli DH5pirをアンピシリン耐性を選択して形質転換した。次いで、適切なアンピシリン耐性構築物(制限消化により確認した)由来のDNAを用いて、S. ty

phimurium 14028に形質転換した。次いで、組み込まれたpCVD442含有構築物を、LB5%スクロース/塩類無しプレートに分離した。分離物を、プリンティングによりアンピシリン感受性を、そして2-アミノプリン(0.6mg/ml)含有LBプレート上に画線することによりDamを確認した(Dam変異対は、2-AP感受性である)。さらに、PCRを使用して、野生型配列と比較して、サイズにより欠失を確認した。最後に、欠失領域をpGP704にクローニングし、そして欠失接合点(XhoI部位を含む)付近またはそこにおける配列を得て、欠失が実際にインフレームであったことを確認した。

#### 【0183】

dam102挿入(dam102::上記で議論したMud-Cm)により引き起こされた変異を、毒性Salmonella株14028へのP22媒介形質導入により動かして、構築株2を得た。

#### 【0184】

##### (2. マウス毒性アッセイ)

種々のS. typhimurium株全ての毒性特性を、上記のように、雌BALB/cマウスの腹腔内接種または経口接種により試験し、そして結果を以下の表1に示す。

#### 【0185】

雌BALB/cマウスを、Charles River Breeding Laboratories, Inc., (Wilmington, Mass.)から購入し、そして6~8週齢の年齢で最初にチャレンジした。S. typhimurium株を、ルリアブロス(LB)中で定常期まで37℃で一晩増殖させた。細菌を、PBSで1回洗浄し、次いで、おおむね適切な希釈にPBSで希釈した(サンプルを、LBにおけるコロニー形成単位(CFU)のためにプレートして、正確な細菌数を与えた)。マウスを、腹腔内または経口を介してのいずれかで、200µlの適切な細菌希釈物でチャレンジした。経口を介する接種については、細菌を洗浄し、そして遠心分離により濃縮し、次いで、細菌を0.2M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>(pH8.0)中に再懸濁して、胃酸を中和し、そして0.2mlのボラスとしてエーテル麻醉下で動物に投与した。全てのLD<sub>50</sub>決定につい

て、5匹のマウスを、各々、1つの希釈につき接種した。コントロールマウスには、PBSのみを与えた。

#### 【0186】

本研究で使用した全ての細菌株は、*S. typhimurium* 14028 (株1)の誘導体であった。変異株は、野生型と同遺伝子系であり、そして記載のように、得たか、または構築した。(dam102::Mud-CmおよびmutS121::Tn10対立遺伝子は、LT2中にあり(株7)、表2に示したように、高度に弱毒化した(実際に非病原性の)株を、それぞれ、Dr. John Roth (University of Utah)およびDr. Tom Cebula (The Food and Drug Administration)から得た;これらの対立遺伝子(および以下のさらなる対立遺伝子)を、毒性株14028に形質導入し、それぞれ、株2および5を構築した。dam232(株3)を、規定されたdam配列のインフレームの300bp欠失を構築するように設計されたPCRプライマーとして働く内部オリゴヌクレオチドを用いて構築した。dcm1::Kmを(Julio, S.M.ら, Molec. Gen. Genet., 258:178-181(1998))に従って構築した;Km耐性決定因子は、dcm配列の600bpを超える内部欠失と関連する。lrp31::Kmは、lrp遺伝子におけるヌル挿入である(株6)。Dam重複株(株4)は、野生型バックグラウンドにおいて組換えプラスミド(pTP166)上に*E. coli* damを含む(Marinus, ら, Gene, 28:123-125(1984))。

#### 【0187】

インビボ競合研究について、細菌を上記で議論したように処理し、次いで、変異細胞を、野生型細胞と1:1の比で混合した(おおよその投入細菌は、500変異体+500野生型であった)。実際の比を、LBで投入細菌を最初にプレートすることにより決定し、次いで、適切な抗生物質に対する耐性について100コロニーをスコアリングした。細菌を、少なくとも5匹のBALB/Cマウスに腹腔内に注射し(記載のように1:1の変異体:野生型比で)(Conner, C.P.ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 14:4641

- 4645 (1998) )、次いで、4から5日後に、マウスが瀕死状態と見受けられた場合、それらを屠殺し、そしてそれらの脾臓を単離し、ホモジナイズし、希釈し、そしてプレートした。再び、変異体：野生型比を変異体表現型について100のコロニーをスコアリングすることにより決定した。競合指数は、回収された変異体：野生型細菌の比であり、そして本質的には、野生型株と比較される変異株をどのように適合させるかを反映する。従って、0.0001より低い競合指数 (competitive index) を示すそれらの株は、変異株が脾臓から回収されなかったという事実を反映する。結論として、マウスは野生型の結果として死亡した。

#### 【0188】

$LD_{50}$  アッセイの利点は、大きな毒性の欠損を定量することである。この欠点は、感度が不足しており、従ってわずかであるが、重大な毒性寄与がしばしば見落とされるということである。競合指数は、同時接種後に、感染組織から回収した変異体：野生型細菌比である。競合指数は、非常に感度が高く、わずかな毒性寄与の検出を可能にする。しかし、その感度のために、大きな欠損を与える2つの変異体間の毒性における差異を定量することは、問題をはらんでいる。従って、 $LD_{50}$  および競合指数アッセイを協調して使用することは、大きな毒性欠損およびわずかな毒性欠損の両方を定量するに有効な手段である。競合指数は、野生型に対して比較される変異株をどのように適合させるかのさらなる指標であるが、完全な有毒性と必ずしも直接的に相関する必要はない。

#### 【0189】

結果を表1に示す。 $LD_{50}$  は、感染動物の50%を殺傷するに必要な容量である。これらの株の各々についての ( $LD_{50}$ ) アッセイを、野生型 (株1; (ND, 決定せず)) のアッセイと比較した。胃挿管法 (gastrointestinalion) を介しての全ての誘導体に関する経口的  $LD_{50}$  を、少なくとも12匹のBALB/cマウスを感染させることにより決定した; 腹腔内 (i.p.)  $LD_{50}$  を、少なくとも6匹のマウスを感染させることにより決定した。

#### 【0190】

#### 【表1】

表 1

株	遺伝子型	経口 LD <sub>50</sub>	I.P. LD <sub>50</sub>	競合指数 (I.P.)
1	野生型	>10 <sup>+5</sup>	<10	---
2	<i>dam102::Mud-Cm</i>	>10 <sup>+9</sup>	>10 <sup>+4</sup>	<10 <sup>-4</sup>
3	<i>damΔ232</i> (非極性欠失)	>10 <sup>+9</sup>	>10 <sup>+4</sup>	<10 <sup>-4</sup>
4	野生型, (pTP166) (Dam 過剰生成株)	10 <sup>+8</sup>	>10 <sup>+4</sup>	<10 <sup>-4</sup>
5	<i>mutS121::Tn10</i>	10 <sup>+5</sup>	ND	0.9
6	<i>lrp31::Km</i>	10 <sup>+5</sup>	ND	10.0
7	LT2	ND	2 x 10 <sup>+4</sup>	ND

*dam*挿入は下流の遺伝子の発現を減少させ得る（極性効果）ので、インフレームの非極性 *dam*欠失を構築し、そして *dam*挿入として同じ減少した毒性を有することを示した。従って、弱毒化は、具体的には *Dam*の欠如に起因していた。さらに、等しい数の *Dam*<sup>+</sup> *Salmonella* および *Dam*<sup>-</sup> *Salmonella* をマウスに腹腔内接種することは、*Dam*<sup>-</sup> 変異体がマウス中の増殖の間に完全に排除されたことを示した（競合指数アッセイ）。組換えプラスミド由来の *Dam* を過剰生成する株 4（表 1）を用いて、同様の結果を観察した。このことは、正確なレベルの *Dam*メチラーゼが完全な毒性に必要なことを示唆した。これらの結果により、*Dam*メチラーゼが細菌の病原性に必須であることが初めて示された。

## 【0191】

*Dam*は、メチル指向型ミスマッチ修復 (*methyl-directed mismatch repair*) (*MDMR*) の破棄によって引き起こされる変異速度の増加を介して *Salmonella* 毒性に影響を及ぼし得る。*MutS*は、*MDMR*において必須な役割を果たすので、*mutS Salmonella* が毒性を弱毒化したか否かを決定した。表 1（上記）におけるデータは、経口 LD<sub>50</sub> および競合指標毒性アッセイの両方において、*mutS Salmon*

e11aが野生型と同一であったことを示し、これは、Damが、MDMR経路を介する病原性に影響を及ぼさないことを示す。MutS<sup>-</sup>株は、Mus<sup>+</sup>株よりも、種間でより高いレベルのDNA変化を示すので、MutS<sup>-</sup>株は、新たな毒性決定因子を、より容易に獲得する(Marinus, E. coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology、第2版、782-791(1996))。Mus<sup>-</sup>株が十分にビルレントであるという事実は、mutS E. coliおよびSalmonella変異体が臨床的分離菌に見出される高い頻度を説明し得る(LeClercら、Science、274:1208-1211(1996))。

#### 【0192】

DamおよびLrpは、Pap線毛(pili)の発現を直接的に調節し、これらは、尿路疾患性E. coliの毒性について必須である(O'Hanleyら、J. Clin. Invest.、75:347-360(1985);およびRobertsら、J. Urol.、133:1068-1075(1985))。DamがLrp媒介性経路を通してSalmonella毒性に影響を及ぼすか否かを決定するために、Lrp<sup>-</sup>Salmonellaを分析した(表1)。Lrpを欠如するSalmonellaは、LD<sub>50</sub>および競合指標アッセイに基づいて十分にビルレントであった。これらのデータは、Salmonella Lrpがマウスにおいて毒性因子ではないことを示す。

#### 【0193】

上記で議論される結果は、アデニンのメチル化がSalmonella病原性について重大であることを示す。シトシン残基のDNAのメチル化は、植物および動物の両方における生物学的プロセスの調節のために重要であるようである。Salmonellaは、DNAシトシンメチラーゼ(Dcm)を含むが、この生物におけるシトシンのメチル化の役割は、明らかでない。dcm<sup>-</sup>変異体(dcm1::Km)は、LD<sub>50</sub>および競合指標アッセイにおいてビルレントであった(データは示さず)。これらの結果は、シトシン残基ではなくアデニンのメチル化が、Salmonella病原性に必要であることを示す。

#### 【0194】

DNAアデニンのメチル化は、E. coliにおける毒性遺伝子発現を直接的に制御することが示されている(Braatenら、Cell, 76:577-588(1994))。従って、Damが、インビボ誘導性(in vivo induced)(ivi)遺伝子と命名される、マウスにおいて優先的に発現されるSalmonella遺伝子を調節するか否かを決定した。Conner, C.P.ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 14:4641-4645(1998); Heithoff, D.M.ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94:934-939(1997); Mahan, M.J.ら、Science, 259:666-668(1993); Mahan, M.J.ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92:669-673(1995); および米国特許第5,434,065号(これらの全ては、本明細書中で参考として援用される)を参照のこと。富化培地において増殖される場合、Damは、20を超えるivi遺伝子の発現を有意に(2~18倍)抑制し、これらのうちの8つは、図3に提示される。この8つの融合物のうちの4つは、公知の遺伝子であり、これらの全ては、毒性に関与するか、または毒性に関連することが示されている: spvBは、Salmonella毒性プラスミド上に存在し、そして感染の全身性部位で増殖を容易にするために機能する(Guligら、Mol. Microbiol., 7:825~830(1993)); pmrBは、ディフェンシンと名付けられた抗菌性ペプチドに対する耐性に関与する(Rolandら、J. Bacteriol., 75:4154~4164(1993)); mgtAおよびentFは、それぞれ、マグネシウムおよび鉄の輸送に関与する(Earhart、Escherichia coli and Salmonella Cellular and Molecular Biology、第2版、1075~1090(1996)); およびVescovi, G.ら、Cell, 84:165~174(1996))。未知の機能のさらなるivi遺伝子もまた、Dam調節された。これらの結果は、DamがSalmonella遺伝子発現の全体的な調節因子であることを示す。

【0195】

*Salmonella*病原は、PhoP (特定の毒性遺伝子の誘導因子およびレセプターの両方として作用するDNA結合タンパク質)によって制御されることが公知である (GroismanおよびHeffron Two-component signal transduction, 319-332 (1995) に総説される)。Dam調節経路およびPhoP調節経路が共通の遺伝子を共有するか否かを決定するために、Damの効果も、7つのPhoP活性化*iv*i遺伝子 (*spvB*、*pmrB*および*mgta*を含む)で試験した。図4は、Damがこれら3つ遺伝子の発現を2~19倍抑制し、そしてこれらの抑制がPhoPタンパク質に依存しなかったことを示す。Damは、残り4つのPhoP<sup>-</sup>活性化遺伝子の発現に有意に影響を及ぼさなかった (データは示さず)。これらの結果は、DamおよびPhoPが*Salmonella*毒性を制御する全体的な調節ネットワークを構成することを示す。

#### 【0196】

DNAへの調節タンパク質の結合は、特定のDam標的部位 (GATC配列 (van der Woudeら、J. Bacteriol., 180:5913-5920 (1998)) のメチル化をブロックすることによってDNAのメチル化パターンを形成し得る。従って、DamとPhoPとの間の相互作用のさらなる研究を、特定のDNA部位へのPhoP (またはPhoP調節化タンパク質) の結合が、Damによってこれらの部位のメチル化をブロックして、DNAのメチル化パターンにおける変更を生じるか否かを決定するために実施した。PhoP<sup>+</sup>*Salmonella*およびPhoP<sup>-</sup>*Salmonella*の分析は、DNAのメチル化パターンにおいて別個の差異を示した。MboI (これは、メチル化されていないGATC部位でのみ切断する) を有するPhoP<sup>-</sup>細菌由来のゲノムDNAの消化は、PhoP<sup>+</sup>細菌由来のDNA中に存在しないDNAフラグメントの出現を生じた (図5、矢印を参照のこと)。これらの結果は、PhoPタンパク質 (またはPhoP調節化遺伝子産物) が、*Salmonella*ゲノム中の特定のGATC含有部位でDamのメチル化をブロックすることを示す。あるいは、PhoP<sup>+</sup>株およびPhoP<sup>-</sup>株は、異なるレベルのDam活性を有し得、次に、DNAのメチル化パターンに影響を及ぼし得る。しかし、この調節

は、転写レベルで生じない。なぜなら、Damは、PhoP発現を変更せず、PhoPもDam発現を変更しないからである(D. M. HeithoffおよびM. J. Mahan, 未公開資料)。さらなる分析により、これらのPhoP-防御部位が毒性遺伝子の調節領域内にあるか否か、およびDNAのメチル化がDNA-PhoP相互作用を変更することによってPhoP調節に直接的に影響を及ぼすか否かを決定する。

#### 【0197】

(実施例2A: Dam<sup>-</sup>Salmonella弱毒化株の防御効率)

BALB/cマウスの腹腔内チャレンジまたは経口チャレンジの結果として弱毒化を示した株を、さらに、 $10^5$  I.P. または $10^9$ 経口で、野生型株による引き続くチャレンジに対する防御免疫について試験した。BALB/cマウスを、 $10^{+9}$ のDam<sup>-</sup>S. typhimuriumの用量を用いて胃挿管を介して経口的に免疫した。5週間後、免疫したマウスを、記載されるように、 $10^{+9}$ の野生型S. typhimuriumを用いて経口的にチャレンジした。5週間後、生存しているマウスを、表2(以下)に記載されるように野生型14028株を用いてチャレンジした。チャレンジ後4週間の間の生存は、十分な防御とみなした。これらのデータは、ワクチン株の開発における本発明の潜在的な使用を示す。

#### 【0198】

Dam<sup>-</sup>変異体は、非常に弱毒化されたので、Dam<sup>-</sup>Salmonellaが弱毒化生ワクチンとして作用し得るか否かを決定した。表2は、S. typhimurium Dam<sup>-</sup>挿入株を用いて免疫した全ての(17/17)マウスが、LD<sub>50</sub>以上の $10^{+4}$ の野生型チャレンジを生存したことを示し、一方全ての免疫していないマウス(12/12)は、チャレンジ後に死んだ。

#### 【0199】

#### 【表2】

表 2

Dam <sup>-</sup> <i>S. typhimurium</i> を用いた免疫	10 <sup>+9</sup> の <i>S. typhimurium</i> を用いてチャレンジ
なし	12/12 死亡
<i>dam102::Mud-Cm</i>	17/17 生存
<i>damΔ232</i> (非極性欠失)	8/8 生存

## 【0200】

実質的に、Dam<sup>-</sup> *Salmonella* を用いる免疫後に観察された腸チフスの明白な効果はなく、野生型チャレンジ後の明白な効果も存在しなかった。さらに、非極性 *dam* 欠失 (株) を含む *Salmonella* を用いて免疫した全ての (8/8) マウスがチャレンジを生存したので、これらのデータは、防御が Dam メチラーゼの非存在に依存して特異的であったことを示す。ワクチンとしての Dam<sup>-</sup> 変異体の毒性弱毒化および有効性 (表1および2) は、感染の間に *Salmonella* の増殖および/または生存に対して有害なようである毒性決定因子の異所性発現 (表3および4) に起因し得る。従って、異所性発現は、なぜ Dam 変異体が全体的に弱毒化され、さらになお、弱毒化生ワクチンとしての十分な防御を提供するかについての説明を提供する。

## 【0201】

## (コロニー形成の研究)

マウス組織における Dam<sup>+</sup> *Salmonella* および Dam<sup>-</sup> *Salmonella* の生存を、比較した。図6に示されるように、Dam<sup>-</sup> 細菌は、粘膜部位 (パイアー斑) のコロニー形成において十分にうまくいった (proficient) が、より深い組織部位のコロニー形成において激しい欠損を示した。感染の5日後、本発明者らは、腸間膜リンパ節において、(Dam<sup>+</sup> 細菌の数に対して) Dam<sup>-</sup> *Salmonella* の数における3桁の規模の低下、ならびに肝臓および脾臓において、Dam<sup>-</sup> *Salmonella* の数における8桁の規模の低下を観察した。これらのデータは、Dam<sup>-</sup> *Salmonella* が、少なくとも5日間の間、マウス小腸のパイアー斑において生存し、宿主免疫応答の

誘発に対する機会を提供することを示す。しかし、Dam<sup>-</sup>Salmonellaは、疾患を引き起こし得なかった；これらは、全身性組織に侵入し得なかったか、または侵入し得るが生存し得なかったかのいずれかであった。

【0202】

(実施例2B：殺傷されたDam<sup>-</sup>誘導体の防御効率)

(生存しているDam<sup>-</sup>またはDam<sup>-</sup>過剰発現細菌が、十分な防御応答を誘発するために必要であるか否かの決定)

Dam<sup>-</sup>ワクチンにおける複数のタンパク質の異所性発現(上記および下記を参照こと)は、殺傷されたDam<sup>-</sup>生物が、殺傷されたDam<sup>+</sup>生物よりも有意に強力な防御免疫を誘発し得、従って、粘膜ワクチンとして使用され得ることを示唆する。インビトロにおいて増殖されたS. typhimurium Dam<sup>-</sup>細菌を、アジ化ナトリウム(0.02%)および/またはUV光への曝露によって殺傷し、その後、その抗菌剤を、洗浄するか、または殺傷された生物から透析するかのいずれかをする。全細胞の殺傷されたワクチン調製物の効率を、粘膜アジュバント(例えば、コレラ毒素、E. coli不安定毒素、またはビタミンD<sub>3</sub>(1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>))を用いてかまたは用いずに試験する。従って、10<sup>10</sup>の殺傷されたDam<sup>-</sup>Salmonellaを、単独でまたは粘膜アジュバントと合わせて含むワクチン調製物を、BALB/cマウスを経口的に免疫するために使用する(実施例に記載される通り)。用量レジメンのように、マウスを、3週間の間、1週間に1回胃挿管によって免疫する。殺傷された野生型S. typhimuriumは、ネガティブコントロールとして作用する。免疫したマウスを、最後の免疫の2週間後にビルレントS. typhimuriumを用いて経口的にチャレンジして、有効な免疫応答が生成されるか否かを決定する。有効な免疫応答が生成されるならば、殺傷されたワクチン調製物を用いて免疫したマウスはまた、他の病原性Salmonella血清型(例えば、enteritidis、choleraesuis、dublin)を用いてチャレンジして、誘発された免疫が関連する株に対して交差防御性(cross-protective)であるか否かを決定し、同様にDam<sup>-</sup>Salmonella生ワクチンの経口投与の場合についても決定する。死んでいるワクチン調製物を用い

て免疫したマウスが最後の免疫の2週間後（または3週間後）に防御される場合、誘発された免疫が持続性であるか否かは、最後の免疫の7週間後に、免疫したマウスをチャレンジすることによって決定される。

#### 【0203】

Damの過剰発現は、野生型(Dam<sup>+</sup>)またはDam<sup>-</sup>のワクチン株のいずれかにおいて発現されない潜在的な防御抗原の新たなレパートリーの異所性発現を生じ得るので、殺傷されたワクチン実験は、Damの過剰発現株単独か、または殺傷されたDam<sup>-</sup>生物と組合わせて用いて実施される。2つの異なるワクチン株は、潜在的に防御抗原の2つの異なるレパートリーを生成し得るので、組合せにおけるそれらの使用は、優位な免疫応答を誘発し得る。

#### 【0204】

(実施例3: Dam<sup>-</sup>Salmonellaによって誘発される交差防御)

(Dam<sup>-</sup>Salmonellaを用いる免疫は、異種血清型に対する交差防御応答を誘発する)

図7に示され、そして以下で議論されるように、Dam<sup>-</sup>変異体は、通常感染の間にのみ発現される複数の遺伝子(およびおそらくタンパク質)を異所的に発現する。複数の抗原のこのような異所性発現は、異種血清型に対する交差防御免疫応答を生じ得る。BALB/cマウスを、(胃挿管を介して)経口的に投与して、 $1 \times 10^9$ のDam<sup>-</sup>S. typhimurium(血清型B)を用いて免疫し、そして11週間後にビルレントS. enteritidisおよびS. dublin(血清型D)(100~1000LD<sub>50</sub>)を用いてチャレンジした。表3におけるデータは、マウスが、免疫11週間後の異種チャレンジに対して防御されたことを示す。重要なことには、交差防御免疫は、マウス組織においてワクチン株の持続に起因しなかった。なぜなら、マウスは、ワクチン株が免疫した動物から除去された後(すなわち、Dam<sup>-</sup>生物が、パイアー斑、腸間膜リンパ節、肝臓および脾臓において検出され得ない後)、6週間よりも長く異種チャレンジに対して防御されたからである。誘発された交差防御は、免疫の5週間後に全身性病原体Yersinia pseudotuberculosisに対して誘発された防御が存在しないので、Salmonella株に特異的である。

【0205】

【表3】

表3

Dam<sup>-</sup> S. typhimurium を用いる免疫は、交差防御免疫と与える

10 <sup>8</sup> Dam <sup>-</sup> S. <i>typhimurium</i> を用いる経口免疫	10 <sup>8</sup> の 野生型 S. <i>enteritidis</i> を用 いる経口チャレンジ	10 <sup>9</sup> の 野生型 S. <i>dublin</i> を用いる経口 チャレンジ	10 <sup>8</sup> の 野生型 S. <i>dublin</i> を用いる経口チャレンジ	10 <sup>9</sup> の 野生型 S. <i>typhimurium</i> を用いる経口チャレンジ
なし	17/17 死亡	25/25 死亡	11/11 死亡	10/10 死亡
<i>dam</i> Δ232	4/18 生存	4/19 生存	10/19 生存	11/11 生存

【0206】

同様に、Dam<sup>-</sup> S. *enteritidis* (dam102::Mud-Cm、続いて上記の実験プロトコル) を用いる免疫は、5週間後に10<sup>9</sup>のS. *typhimurium*および10<sup>9</sup>のS. *dublin*を用いるチャレンジに対する交差防御を与え、そしてさらに長期間の間、交差防御を与え得る。

【0207】

(Dam<sup>-</sup>誘導体は、インビトロにおいて異所的に複数のタンパク質を発現する)

Dam<sup>-</sup>株における複数のタンパク質の異所性発現は、共通のエピトープを共有する異種血清型に対して誘発される交差防御に寄与し得る。この目的のために、本発明者らは、Dam<sup>-</sup>株が、インビトロにおいて通常抑制される多くの*Salmonella*遺伝子を異所的に発現することを示す。

【0208】

二次元タンパク質ゲル電気泳動を、Luriaブロス中で増殖される対数期のS. *typhimurium*の全細胞タンパク質抽出物に対して、O'Farrell ((1975) J. Biol. Chem. 250: 4007-4021)

の方法によって実施した。pH5~7のアンホライン(BioRad Laboratories, Hercules, CA)を使用する等電点電気泳動を、800Vで17時間実施した。二次元は、5.5時間、175Vで泳動した12.5%ポリアクリルアミドスラブゲルからなった。タンパク質を、銀染色によって可視化した(Merrillら(1984)Methods Enzymol. 104:441-447.)。この結果を、図7に示す。この結果は、インビトロにおいて増殖されたDam<sup>-</sup>株、Dam<sup>+</sup>(野生型)株およびDam過剰産生(OP)株の二次元ゲル電気泳動分析(2-Dタンパク質分析)が、Dam<sup>-</sup>の条件下で発現され、Dam<sup>+</sup>(野生型)またはDam OP(通常よりも約100倍高く発現する)のいずれかの条件下で検出されなかったいくつかのタンパク質の検出を生じること示す。これらのデータは、Dam<sup>-</sup>Salmonellaが、インビトロにおいて(およびおそらくインビボにおいて)複数のタンパク質を異所的に発現することを示し、これは、タンパク質発現の調節不全が、免疫系に対してプロセッシングおよび提示されるべき複数の新規なタンパク質標的を提供し得ることを示唆する。

#### 【0209】

2-Dタンパク質分析は、SalmonellaのDam過剰発現株(野生型レベルの約100倍でE.coli Damを過剰発現するプラスミドpTP166を有するS.typhimurium ATCC 14028)が、研究室の増殖条件下でDam<sup>+</sup>(野生型)SalmonellaまたはDam<sup>-</sup>Salmonellaによって発現されない多くの遺伝子産物を発現することを示す。本発明者らは、Dam<sup>+</sup>によって産生され、Dam<sup>-</sup>またはDam過剰発現株によって産生されないタンパク質を検出していなかった。Dam過剰発現株が防御免疫を弱毒化および誘発する本発明者らの観察をひとまとめにして考えると、これらの結果は、Dam過剰発現がDam<sup>-</sup>株において産生される抗原とは異なるレパートリーの抗原の発現を生じ得ることを示唆する。従って、Dam<sup>-</sup>株と組み合わせるDam過剰発現株からなるワクチンは、2つの異なるレパートリーの潜在的な防御抗原の異所性発現に起因して、非常に交差防御性であり得る。

#### 【0210】

(Dam<sup>-</sup>株によって誘発される免疫は、野生型感染後に誘発される免疫よりも大きい)

病原体の最も有効な毒性特性の1つは、宿主免疫応答を回避する能力である。このような「ステルス (stealth)」戦略は、宿主免疫認識を回避するために多くのその機能を厳密に調節することによって達成される。従って、細菌性防御機構のように、ビルレント生物によって産生される多くの抗原が、十分な量で産生されないようであるか、および/または宿主免疫応答を誘発するために十分な量で産生されないようである。しかし、Dam<sup>-</sup>細菌は、免疫系に対してプロセッシングおよび提示される複数の抗原を異所的に発現し得、従って、Dam<sup>-</sup>ワクチンを用いて免疫した動物は、天然の感染を生存する動物よりも、より強力な免疫応答を誘発し得る。

#### 【0211】

Dam<sup>-</sup>ワクチンによって誘発される免疫を、野生型株を用いる天然の感染後に誘発された免疫と比較した。BALB/cマウスを、ビルレント株 S. typhimurium ( $10^{+5}$ の生物) (すなわち、半分のマウスが野生型免疫を生存した) かまたは  $10^{+5}$ のDam<sup>-</sup>生物のLD<sub>50</sub>で、経口的に免疫した。免疫の5週間後、免疫したマウスを、致死用量のビルレント株を用いてチャレンジした。表5は、Dam<sup>-</sup>ワクチンによって誘発される免疫が、野生型株を用いる免疫を生存したマウスにおいて誘発される免疫 (10匹のマウスのうちの1匹が、 $10^{+7}$ のチャレンジを生存した) よりも、少なくとも100倍多かった (10匹のマウスのうちの3匹が、 $10^{+9}$ のチャレンジを生存した) ことを示す。

#### 【0212】

#### 【表4】

表5.  $Dam^-$  ワクチンを用いて免疫されたマウスは、野生型感染を生存するマウスよりもおたきな防御を誘発する

経口免疫 $10^{10}$ <i>S. typhimurium</i>	$10^7$ の 野生型 <i>S.</i> <i>typhimurium</i> を用いた経口チャレンジ	$10^8$ の 野生型 <i>S.</i> <i>typhimurium</i> を用いた経口チャレンジ	$10^9$ の <i>S. typhimurium</i> を用いた経口 チャレンジ
なし	10/10 死亡	10/10 死亡	10/10 死亡
$Dam^+$ (LD50)	1/10 生存	10/10 死亡	10/10 死亡
<i>dam</i> $\Delta$ 232	5/10 生存	4/10 生存	3/10 生存

#### 【0213】

さらに、 $Dam^-$  生物を用いる免疫は、広範なチャレンジ用量 ( $10^{+7} \sim 10^{+9}$ ) にわたって、比較的類似のレベルを示した。これは、 $10^{+5}$  の  $Dam^-$  細菌の免疫用量が、全ての免疫した動物における防御免疫応答を確実にするために必要とされる最小閾値の生物よりも少ないことを示唆する。 $Dam^-$  株によって誘発される増強された免疫は、 $Dam$  抑制抗原の異所性発現に一部起因し得るようであり、この抗原は、野生型感染の間の十分な量および/または期間において産生し得ない。

#### 【0214】

免疫化動物は、全身の組織において毒性細菌の増殖を阻害する。 $Dam^-$  サルモネラは、マウスの小腸のパイアー斑のコロニー形成には十分に優れているが、深部組織の部位（肝臓および脾臓）のコロニー形成には非常に劣ることが見出された（実施例1）。*S. typhimurium* の  $Dam^-$  変異体はまた、M細胞に対してより細胞毒性ではなく、上皮浸潤に劣り、そしてタンパク質分泌において欠陥を示す。Pucciarelliら (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 11578~11583。まとめると、これらのデータは、 $Dam^-$  変異体が、疾患は生じ得ないが、完全な保護免疫応答を

誘発し得る理由に関する可能な説明を提供する。Dam<sup>+</sup>サルモネラで免疫化されたマウスは、毒性生物体でのチャレンジの後に、疾患の顕著な症状を事実上示さなかったため、野生型サルモネラの運命を、免疫化マウス対非免疫化マウスにおいて比較した。図8中のデータは、Dam<sup>+</sup>免疫化マウスが、 $10^9$ の生物体の野生型チャレンジの後に、粘膜組織および全身の組織の両方において、少なくとも5日間、高負荷( $10^4$ )の毒性細菌を保有することを示す。しかし、免疫化マウスは、これらの毒性生物体の増殖を単に阻害するだけではない能力を有し、免疫化マウスは、粘膜組織および全身の組織の両方から毒性生物体を除去することが可能である(4匹のマウスのうち2匹は、チャレンジ後28日間で、パイア一斑、腸間膜リンパ節、肝臓、および脾臓から全ての毒性生物体を除去した)。肝臓および脾臓から $10^4$ の毒性生物体を除去するこの能力は、腹腔内LD<sub>50</sub>が10生物体未満であるという事実を考慮すると重要である。従って、Dam<sup>+</sup>サルモネラを用いた免疫化は、試験された全ての組織において野生型生物体の増殖を阻害する。毒性細菌の致死負荷を全身から除去する能力は、Dam<sup>+</sup>ワクチンが、既存の微生物感染の処置への治療的適用を有し得る可能性を示唆する。

#### 【0215】

(実施例4: *S. enteritidis* に対するニワトリのワクチン接種)

家禽における*S. enteritidis*感染の動力学を完全に理解することは、産卵雌鶏からヒト消費者への、*S. enteritidis*の、卵から生じる感染を防ぐための、有効なストラテジーの処方に必須である。サルモネラは、腸の上皮にコロニー形成し、そして侵入することによって疾患を生じる。いくつかの場合において、サルモネラが腸の粘膜を通過して血流へ侵入した後は、広範な播種および全身性の疾患が続く。*S. enteritidis*は、ニワトリにおいて侵襲性の血清型であるが、他のパラチフスサルモネラ血清型とは明らかに異なる、あるレベルの病原性をニワトリに対して示さなかった。PopielおよびTurnbull(1985) *Infect. Immun.* 47(3): 786-792。ニワトリは、汚染された飼料からの*S. enteritidis*に容易に感染し得、腸でのコロニー形成、および肝臓のような内部の組織(issue)に達する侵入の両方を伴う。Hintonら(1989) *Vet. Rec*

. 124 : 223。

【0216】

成体雌鶏の、いくつかの*S. enteritidis*株での実験的な感染は、腸でのコロニー形成(数ヶ月間持続した)をもたらしたが、他の*S. enteritidis*株を用いた研究においては、排泄物の排泄の期間はかなり短かった。(GastおよびBeard、1990)、GastおよびBeard(1990) *Avian Dis.* 34:991-993; Shivaprasadら(1990) *Avian Dis.* 34:548-557。1つの研究において、静脈内で感染した鳥類は、経口で感染した鳥類よりも長い間、*S. enteritidis*を排泄する。Shivaprasadら(1990)。

【0217】

卵および卵製品中の*S. enteritidis*を破壊する種々の方法の有効性は、公衆衛生当局および卵産業にとって益々重要な話題となってきた。このような情報は、消費者および卵の商業的利用者または施設利用者に、卵含有食品の安全な調製に関する教示を与えるために極めて必要とされる。Shivaprasadら(1990)は、種々の調理法による、卵の中の*S. enteritidis*を破壊するための、時間/温度の必要条件は、*S. typhimurium*について以前に決定された類似の必要条件と有意には異なることを観察した。Bakerら(1983) *Poult. Sci.* 72:1211-1216。Humphreyらは、ファージ4型*S. enteritidis*、*S. typhimurium*、および*S. senftenberg*の株は、卵黄に植え付けた場合、幾分か卵黄が液体のままである調理の形態からは生き延び得ることを見出した。Humphreyら(1989) *epidemiol. Infect.* 103:35-45。さらに、卵を、室温で、植え付け後2日間保存した場合、*S. enteritidis*の個体数は、卵黄中で、いずれの標準的な調理方法も完全には*Salmonella*を除去しない程の高レベルまで増加した。一方、冷蔵庫の温度での*S. enteritidis*培養物の貯蔵は、熱に対する感受性を増加することが見出された。Humphrey(1990) *J. Appl. Bacteriol.* 69:493-497。別の研究において、均質化

された全卵中の*S. enteritidis*ファージ4型は、ファージ8型またはファージ13a型および*S. typhimurium*よりも熱耐性であるが、非常に熱耐性な*S. senftenberg*株775Wよりは熱耐性でないことが測定された。試験した全ての*Salmonella*株は、卵全体またはアルブミン中よりも、卵黄中で、より熱耐性であった。Humphreyら(1990) *Epidemiol. Infect.* 104: 237-241。

#### 【0218】

本発明のワクチン、特にStrain 3は、卵および卵製品中の*S. enteritidis*を除去する際に有効であり得る。Dam-*S. typhimurium*ワクチンを、以前に記載したように調製する。ワクチンを、経口投与によって(すなわち、ニワトリの飼料および/または水と混合されて)ニワトリに導入する。一旦ワクチンを投与すると、代表的にDamによって抑制される毒性要素が発現され、そしてニワトリは免疫応答を誘導する。これらのDam制御遺伝子のいくつかは、*S. enteritidis*によって共有される遺伝子のホモログであり、Dam-*S. typhimurium*は、実施例3のデータが示すように、*S. enteritidis*に対する交差保護(cross protection)を誘導し得る。

#### 【0219】

(実施例5: Dam誘導性サルモネラワクチンの、ウシへの投与)

サルモネラは、最も一般的に単離された、乳牛の感染性の腸の細菌性病原菌であり、そしてヒトの、牛肉および日用品の消費に関連した、最も一般的な人獣共通伝染病の疾患である。近年、サルモネラ症のヒト症例の発生率および重篤度は、部分的には、ウシの個体群における抗菌耐性な*S. typhimurium* DT104の出現に起因して、上昇してきた。有病率の研究は、米国の酪農場の16~73%がサルモネラに感染しており、そして選別された乳牛の50%までが屠殺時にサルモネラに汚染されている。農場でのサルモネラ制御は、生産損失およびヒトの食品から生じる疾患を減少させるために重要である。

#### 【0220】

大規模な商業用農場では、ウシが複数のサルモネラ血清型に曝露され、そして

子ウシが生後間もなく感染されることは非常に一般的である。このような状況下で、異種サルモネラ血清型に対する免疫性を刺激することが可能なサルモネラワクチンを有することは大変望ましい。

#### 【0221】

(A. ウシのサルモネラ感染に関するDamの必要性、および生ウシワクチンとしてのDam誘導体の有効性)

1～3日齢のホルスタイン雄子ウシを、全ての実験のために使用する。子ウシの受動免疫性を評価するために、総血漿タンパク質の測定値を用いた。5.5以上の総血漿タンパク質を有する子ウシのみを使用する。供給源である酪農場のサルモネラ感染状態を、排泄物サンプルおよび環境サンプルをサルモネラについて培養することによって、子ウシを購入する前に決定する。子ウシのサルモネラ陰性状態を、毎日の排泄物のサルモネラ培養によって、購入後に確認する。

#### 【0222】

子ウシを、動物バイオセーフティーレベル(Animal Biosafety) 2の施設で飼育し、飼養する。子ウシに、2クォートの20:20の牛乳(1日に2回取り替える)を与え、そして新鮮な子ウシ用穀物および新鮮な水に、1日24時間アクセスできる。各日の給餌の時間に、全ての子ウシに食欲および態度のスコアを与える。食欲スコアは、1～4の段階(1=2クォートのミルクを消費した、2=2クォート未満で1クォートより多いミルクを消費した、3=1クォート未満のミルクを消費した、および4=ミルクを消費しなかった)である。態度スコアはまた、1～4の段階(1=立っている、2=励ますと立つ、3=補助すると立つ、4=立てない)である。全てのチャレンジ実験に続いて、子ウシを1日に3回調べ、そして1日に2回バイタルパラメーターを記録した。立てない子ウシはいずれも末期であると考えられ、そして安楽死させる。サルモネラチャレンジ後は、実験結果の混乱を避けるために、子ウシに対してどんな抗菌処置または抗炎症処置も行わない。

#### 【0223】

ホルスタイン雄子ウシにおける生Damサルモネラワクチンの安全性の決定。1～3日齢の子ウシにおけるDam S. typhimuriumの安全性を

、以下のように決定する。1～3日齢の子ウシ18頭を、6頭ずつ3グループに分ける。第1のグループの6頭を $10^9$ のDam<sup>-</sup>サルモネラを用いて、第2のグループを $10^{10}$ のDam<sup>-</sup>サルモネラを用いて、第3のグループを $10^{11}$ のDam<sup>-</sup>サルモネラを用いて経口でチャレンジする。チャレンジ後の3週間、研究における各子ウシを、脈拍数および呼吸数、直腸温度、食欲、ならびに態度を測定するために、1日に2回評価する。サルモネラ培養のために、排泄物サンプルを、毎日、各子ウシから収集する。チャレンジの3週間後に、子ウシを安楽死させ、器官（肝臓、胆汁、脾臓、腸間膜リンパ節、回腸粘膜、小腸の内容物、盲腸粘膜、および盲腸の内容物）をサルモネラについて培養した。

#### 【0224】

サルモネラDam<sup>-</sup>ベースのワクチンが粘膜組織および/または全身の組織をコロニー形成しうるか否かの決定。ウシ組織のコロニー形成の動力学を、経口投与の後、Dam<sup>+</sup>およびDam<sup>-</sup>S. typhimuriumの両方について決定する。小腸の内容物、回腸粘膜、パイアー斑、盲腸粘膜、盲腸の内容物、腸間膜リンパ節、肝臓、および脾臓中の「細菌負荷」を、感染後の時間の関数として子ウシにおいて測定する。24頭のホルスタイン雄子ウシを、 $10^9$ のDam<sup>-</sup>S. typhimuriumを用いて経口でチャレンジする。6頭を、無作為に、4グループに割り当て、チャレンジの24時間後ならびに5日後、14日後、および28日後に安楽死させる。定量的なサルモネラ培養のために、死体解剖で、各子ウシから組織を収集する。 $10^9$ のDam<sup>+</sup>S. typhimuriumを用いて経口でチャレンジした24頭のホルスタイン雄子ウシを全く同様に処理し、そしてそれらはこれらの実験のための陽性コントロールとして役立つ。

#### 【0225】

Dam<sup>-</sup>サルモネラが理想的なウシのワクチンであるためには、Dam<sup>-</sup>サルモネラは、パイアー斑にコロニー形成し、M細胞中で、複製し、そして持続するべきであり、そしてパイアー斑リンパ濾胞を含む内在する免疫細胞（例えば、マクロファージ、B細胞、およびT細胞）に抗原を提示するべきである。重要なことには、Dam<sup>-</sup>サルモネラは、肝臓および脾臓のような深部組織にコロニー形成するべきではなく、そして最終的にはパイアー斑から除去されるべきである。こ

これらの基準が満たされる場合、おそらくサルモネラ Dam<sup>-</sup>S . typhimurium 変異体は、安全で有効なウシのワクチンのための基礎として役立つ。

#### 【0226】

同種野生型チャレンジに対する Dam<sup>-</sup>S . typhimurium ワクチン接種の防御効果。1～3日齢の20頭の子ウシを、無作為に、10頭ずつの2グループに分ける。第1のグループに、1～3日齢で、Dam<sup>-</sup>S . typhimurium を用いて、経口でワクチン接種した。残りの10頭のワクチン接種されていない子ウシは、コントロールとして役立つ。全ての子ウシを、5週齢で、 $10^{11}$ の毒性 S . typhimurium を用いて経口でチャレンジする。チャレンジ後の3週間、各子ウシを1日に3回評価し、脈拍数および呼吸数、直腸温度、食欲スコア、ならびに態度スコアを1日に2回記録する。サルモネラ培養のために、排泄物サンプルを、毎日、各子ウシから収集する。チャレンジ後に死亡する全ての子ウシを死体解剖し、そして器官（肝臓、胆汁、脾臓、腸間膜リンパ節、回腸粘膜、小腸の内容物、盲腸粘膜、および盲腸の内容物）を、サルモネラについて培養した。毒性サルモネラチャレンジから生き残っている子ウシを、チャレンジの3週間後に安楽死させ、死亡解剖し、そして器官（肝臓、胆汁、脾臓、腸間膜リンパ節、回腸粘膜、小腸の内容物、盲腸粘膜、および盲腸の内容物）をサルモネラについて培養した。

#### 【0227】

子ウシにおける効能のために必要とされる最小用量のレジメン、およびウシの組織における減少したワクチン持続性。任意のワクチンレジメンの3つの重要な特性は、i) ワクチンの用量、ii) 動物の齢、およびiii) 免疫化された動物におけるワクチンの持続性である。完全な保護を誘導するために必要とされる最小の用量 ( $LD_{50}$  の10,000倍)、ならびにパイアー斑、腸間膜リンパ節、肝臓および脾臓のようなマウスの組織における持続性の減少を測定する。

#### 【0228】

( B . Dam 誘導体は、関連する ( 異種サルモネラ血清型 ) 病原体株に対する交差防御を誘導する )

( 異種野生型チャレンジに対する Dam<sup>-</sup>S . typhimurium ワクチン

ン接種の保護効果) 3つの類似の毒性サルモネラチャレンジ実験を、3つの異なるチャレンジ生物体を使用して行う。各実験は、1~3日齢でDam<sup>-</sup>S<sup>-</sup>typhimuriumを使用する仔ウシの経口免疫化および5週齢での毒性サルモネラを使用するチャレンジを含む。第1の実験において、S<sup>-</sup>montevideo(血清群C1)を、このチャレンジ生物体として使用し、第2の実験においては、S<sup>-</sup>dublin(血清群D)、最後の実験においては、S<sup>-</sup>anatum(血清群E1)を使用する。異なる仔ウシを、各実験のために使用する。各々のこれらの3つの実験に関して、20頭の1~3日齢の仔ウシを、10頭の2つの群に無作為に分ける。この第1の群を、1~3日齢でDam<sup>-</sup>S<sup>-</sup>typhimuriumを使用して経口でワクチン接種する。残りの10頭の非ワクチン接種仔ウシは、コントロールとして役に立つ。全ての仔ウシを、5週齢で10<sup>11</sup>の毒性サルモネラを用いて経口でチャレンジする。

#### 【0229】

チャレンジ後3週間、各仔ウシを、1日3回評価して、そして脈拍、呼吸数、直腸温度、食欲スコア、および態度スコアを1日2回記録する。糞便サンプルを、サルモネラ培養のために毎日各仔ウシから集める。チャレンジの後死亡した全ての仔ウシを、検死して、そして器官(肝臓、胆汁、脾臓、腸間膜リンパ節、回腸粘膜、小腸内容物、盲腸粘膜および盲腸内容物)を、サルモネラについて培養する。毒性サルモネラチャレンジから生き残っている仔ウシを、チャレンジから3週間後に安楽死させて、検死し、そして器官(肝臓、胆汁、脾臓、腸間膜リンパ節、回腸粘膜、小腸内容物、盲腸粘膜および盲腸内容物)を、サルモネラについて培養する。Dam<sup>-</sup>過剰産生株、単独およびDam<sup>-</sup>変異体と組み合わせて誘導される交差保護免疫の比較をまた、行う。

#### 【0230】

(C. サルモネラの殺されたDam<sup>-</sup>誘導体)

インビトロで増殖したS<sup>-</sup>typhimurium Dam<sup>-</sup>細菌を、アジ化ナトリウム(0.02%)および/またはUV線光に曝露することにより殺して、その後、抗菌物質を、殺された生物体から洗浄かまたは透析する。殺された細胞全体ワクチンの効果を、経口投与および非経口投与で試験する。非経口ワクチ

ン群に関して、殺された $10^6$ のDam<sup>-</sup>サルモネラを、水酸化アルミニウムおよびクイル (quill) Aアジュバントと混合し、そして筋肉内注射を介して仔ウシに投与する。経口ワクチン接種群に関して、殺された $10^{10}$ のDam<sup>-</sup>サルモネラを、粘膜アジュバントとしてビタミンD3とともに経口投与する。投薬レジメンとして、新生仔ウシを、3週間、週に1度免疫する。同じアジュバントとともに、そして同じ経路によって殺された野生型*S. typhimurium*を投与した新生仔ウシは、ネガティブコントロールとして役立つ。免疫化した仔ウシを、上記の同様のプロトコルを使用して、最後の免疫化から2週間後、毒性*S. typhimurium*を用いてチャレンジして、効果的な免疫応答が生じるか否かを決定する。この場合、殺されたワクチン調製物で免疫した仔ウシをまた、他の病原体サルモネラ血清型 (例えば、montevideo, *S. dublin*, および*S. anatum*) でチャレンジして、この誘導された免疫が、関連する株に対して交差防御性であるか否かを決定する。この実験を、Dam過剰産生株を、単独または殺されたDam<sup>-</sup>生物体と組み合わせて使用して繰り返す。

#### 【0231】

Dam過剰産生は、野生型 (Dam<sup>+</sup>) ワクチン株またはDam<sup>-</sup>ワクチン株のいずれにおいても発現されない潜在的防御抗原の新しいレパートリーの異所性発現を生じ得るので、殺ワクチン実験を、Dam過剰産生株を、単独および殺されたDam<sup>-</sup>生物体と組み合わせて使用して繰り返す。

#### 【0232】

(実施例6: *Vibrio cholerae*におけるdam<sup>-</sup>変異体の構築)

(*A. V. cholerae* dam変異体の構築)

*V. cholerae* dam変異体は、現在利用可能ではない。公知の*V. cholerae* dam配列を使用して、プライマーを設計して、dam遺伝子をPCR増幅する。これをプローブとして使用して、*V. cholerae* ラムダクローンバンクに対してハイブリダイズさせて、野生型*V. cholerae* damクローンを回収する。ハイブリダイズするクローンのDNAの両末端

を、配列決定して、*V. cholerae* dam領域を含むか否かを決定する。サブクローニングし、そしてこれらのサブクローンをベクターの両末端からさらに配列決定することは、*V. cholerae* dam配列全体を含む最も小さなDNA制限断片を同定する。抗生物質耐性マーカーと関連する復帰できないdam欠失変異体を、最近確立された方法に従い構築する(Julio, S.M.ら、Molec. Gen. Genet., 258:178-181(1998))。

#### 【0233】

*V. cholerae*病原性におけるdam変異体の役割を、マウスコレラ(乳獣マウスモデル)、LD<sub>50</sub>および競合的指標について2つの異なる毒性アッセイにおいて試験する。これらは実施例1に記載した。

#### 【0234】

(*B. V. cholerae*に対するヒト生弱毒化ワクチンを構築する目的のためのdam変異体の保護能力の決定)

上記で詳細に議論されるように、サルモネラDam変異体は、腸チフス発熱のためのマウスモデルにおいて生弱毒化ワクチンとして役立つ。この実験の目的は、これらの所望の効果が、サルモネラDNAアデニンメチル化に対して特異的であるか否か、またはDam変異体がまた、*V. cholerae*に対する防御を提供するか否かを認識することであり、従って、生弱毒化ワクチンの新しい生成についての基礎を提供し得る。

#### 【0235】

ヒト生弱毒化ワクチンは、野生型へ復帰する危険を制限し、かつこれらの株が、新生病原体に対する抗生物質耐性の蔓延のための貯蔵所として役立たないことを確実にするように設計しなければならない。従って、この分析の次の工程は、適切な復帰しない抗生物質感受性誘導体を構築することである。damにおける無極性の欠失(オペロン内の下流遺伝子に対する影響はない)を、標準的なPCRベースのアプローチ、自殺ベクターへの連結、および生じたインフレーム欠失株の回収によってこれらの遺伝子の内部配列を除去することで構築する。各遺伝子の欠失を、標準的な陽性選択自殺ベクターストラテジーを使用して個々に導入し

(Donnenberg, M. S.ら、Infect. Immun., 59: 4310-4317 (1991))、所望の復帰しない弱毒化した抗生物質感受性ワクチン株を得る。このワクチンの効力を、上記のように再試験する。Damが、改変(すなわち、完全には欠失および/または無力化されていない)されるように構築された株を試験し、Dam過剰産生株も同様に試験する。

#### 【0236】

(実施例7: *Vibrio cholerae*および*Yersinia pseudotuberculosis*におけるdam遺伝子の不可欠性)

damの重複を、Dam変異体を含む組換えプラスミドを野生型Dam遺伝子座に組み込むことにより構築した。生じた重複は、damの2つのコピー(変異体コピーおよび野生型コピー)を含んだ。通常、組換えプラスミドは、所定の頻度で分離し、そして組換え体(分離体)は、変異体遺伝子または野生型遺伝子のいずれかを含むというおおよそ等しい可能性がある。遺伝子が必須である場合、この重複の全ての分離体(このプラスミドによって再組換えする)は、野生型である;変異体遺伝子を有する組換え体は死ぬ。この遺伝子を含む組換えプラスミドが存在する場合、重複は、変異型または野生型のいずれかへ分離し得る。*Vibrio cholerae*および*Yersinia pseudotuberculosis*に関して、野生型および変異体の両方を含むこのdam遺伝子の重複は、野生型dam遺伝子を提供する組換えプラスミドが存在しない限り、変異体に分離し得ない。

#### 【0237】

前述の説明は、本発明の原理の例示としてのみ考慮される。さらに多数の改変および変化が、当業者に容易に考えられるので、上記のように示された正確な構築およびプロセスに本発明を限定することは所望されない。従って、全ての適切な改変および等価物が、上記の特許請求の範囲により規定される本発明の範囲内にあるように戻され得る。

#### 【図面の簡単な説明】

本明細書中に援用され、そして明細書の一部を形成する添付の図面は、本発明を例示する際に補助し、記載と一緒に本発明の原理を説明することに役立つ

つ。添付の図面は、一定の縮尺率で描かれていない。

【図1】

図1は、一次免疫応答および二次免疫応答に従って存在する抗体のレベルのグラフである。

【図2】

図2は、シトシンおよびアデニンにおいて生じるメチル化の部位の概略図である。

【図3】

図3は、Damがインビボ誘導遺伝子を調節することを例示するグラフである。LB内で増殖されたDam<sup>+</sup>およびDam<sup>-</sup>株中の*S. typhimurium* *ivi*融合物由来の -ガラクトシダーゼ発現。縦軸は、 -ガラクトシダーゼ活性（細胞懸濁液×10<sup>3</sup>の1mlあたりのA<sub>600</sub>ユニットの1分間あたりに形成されるo-ニトロフェノール(ONP)のμ-モル)を示す。

【図4】

図4は、DamがPhoP活性化された遺伝子を発現することを例示するグラフである。最少培地中で増殖した*S. typhimurium* *ivi*融合物由来の -ガラクトシダーゼ発現。縦軸は、 -ガラクトシダーゼ活性（細胞懸濁液×10<sup>3</sup>の1mlあたりのA<sub>600</sub>ユニットの1分間あたりに形成されるo-ニトロフェノール(ONP)のμ-モル)を示す。dam遺伝子型は横軸の下に示され、phoP遺伝子型は、黒四角(PhoP<sup>+</sup>)および灰色四角(phoP<sup>-</sup>)として示される。

【図5】

図5は、PhoPが*Salmonella* DNAメチル化パターンの形成に影響をおよぼすことを示す。最少培地内で増殖するPhoP<sup>+</sup>株およびPhoP<sup>-</sup>株内に形成されたDNAメチル化パターン。矢印は、PhoP<sup>-</sup>*Salmonella*に存在するが、PhoP<sup>+</sup>*Salmonella*に存在しないDNAフラグメントを示す。

【図6】

図6は、1日目および5日目にDam<sup>-</sup>変異体(黒四角)で免疫されるかまた

は免疫されない(白四角)マウス中のSalmonellaの量および組織分布を示すグラフである。PP、パイア一班;MLN、腸間膜リンパ節;CFU、コロニー形成単位。

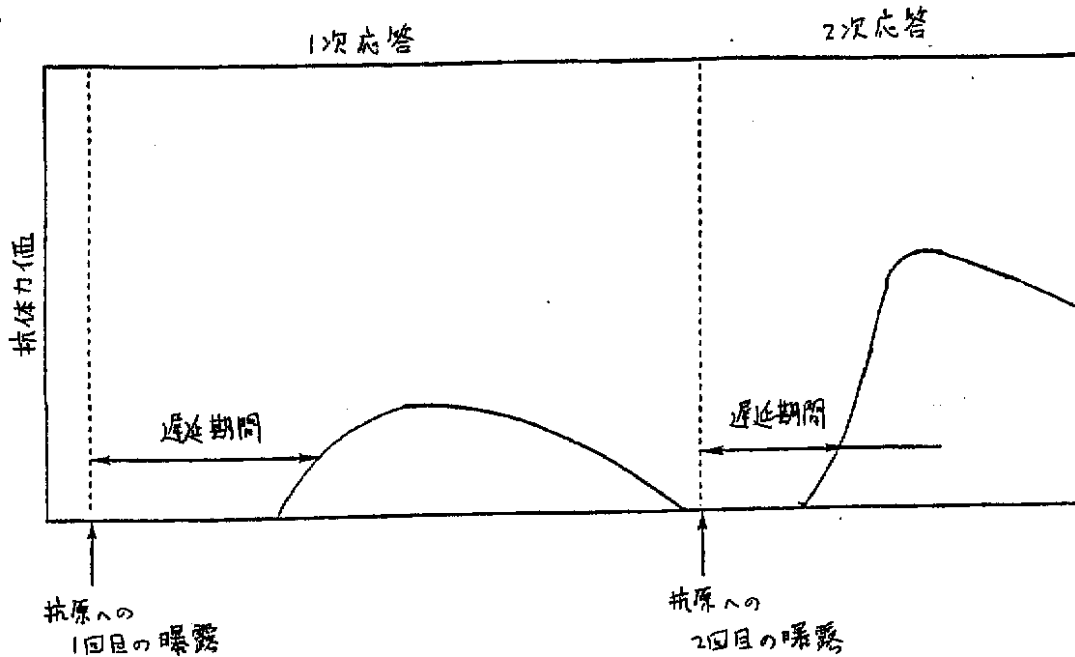
【図7】

図7は、1日目、5日目、14日目および28日目にDam<sup>-</sup>変異体(黒四角)で免疫されるかまたは免疫されない(白四角)マウス中のSalmonellaの量および組織分布を示すグラフである。PP、パイア一班;MLN、腸間膜リンパ節;CFU、コロニー形成単位。

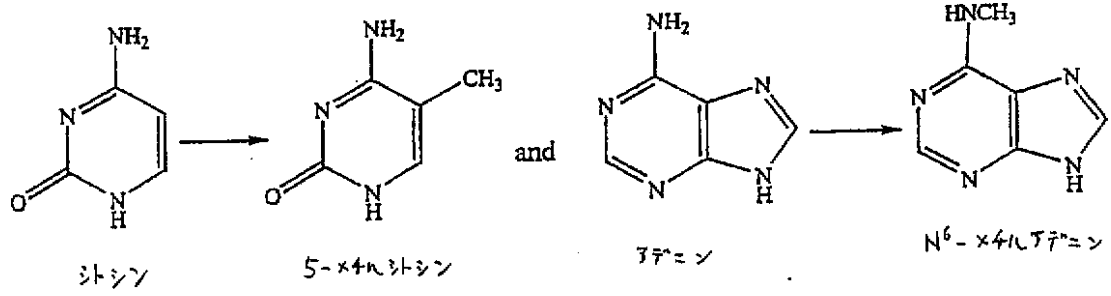
【図8】

図8(A)~(C)は、Dam<sup>-</sup>株(dam非極性欠失、MT2188;(A));Dam<sup>+</sup>株(野生型、ATCC 14028(B));およびDam<sup>+++</sup>株(過剰産生株、MT2128)中で産生されるタンパク質を示すS.typhimuriumの全細胞タンパク質抽出物の2Dゲル電気泳動の半色調複写物である。

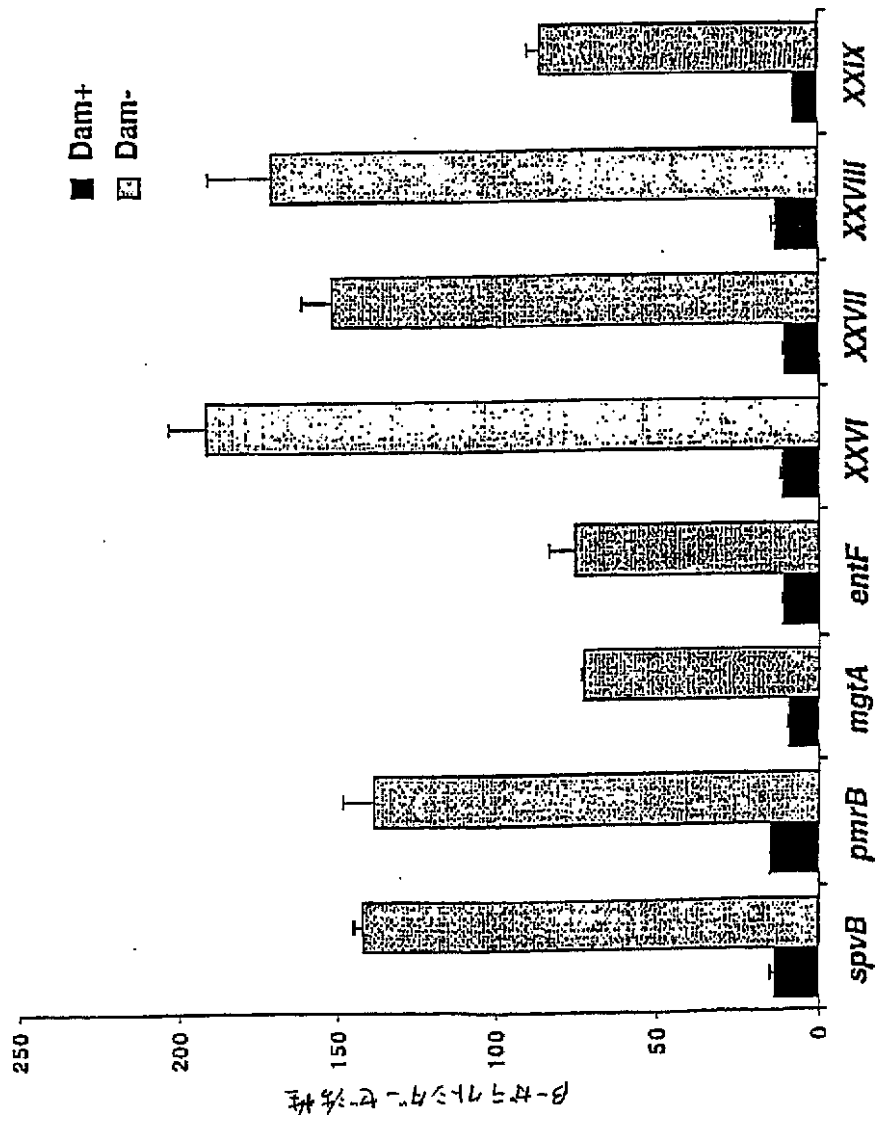
【図1】



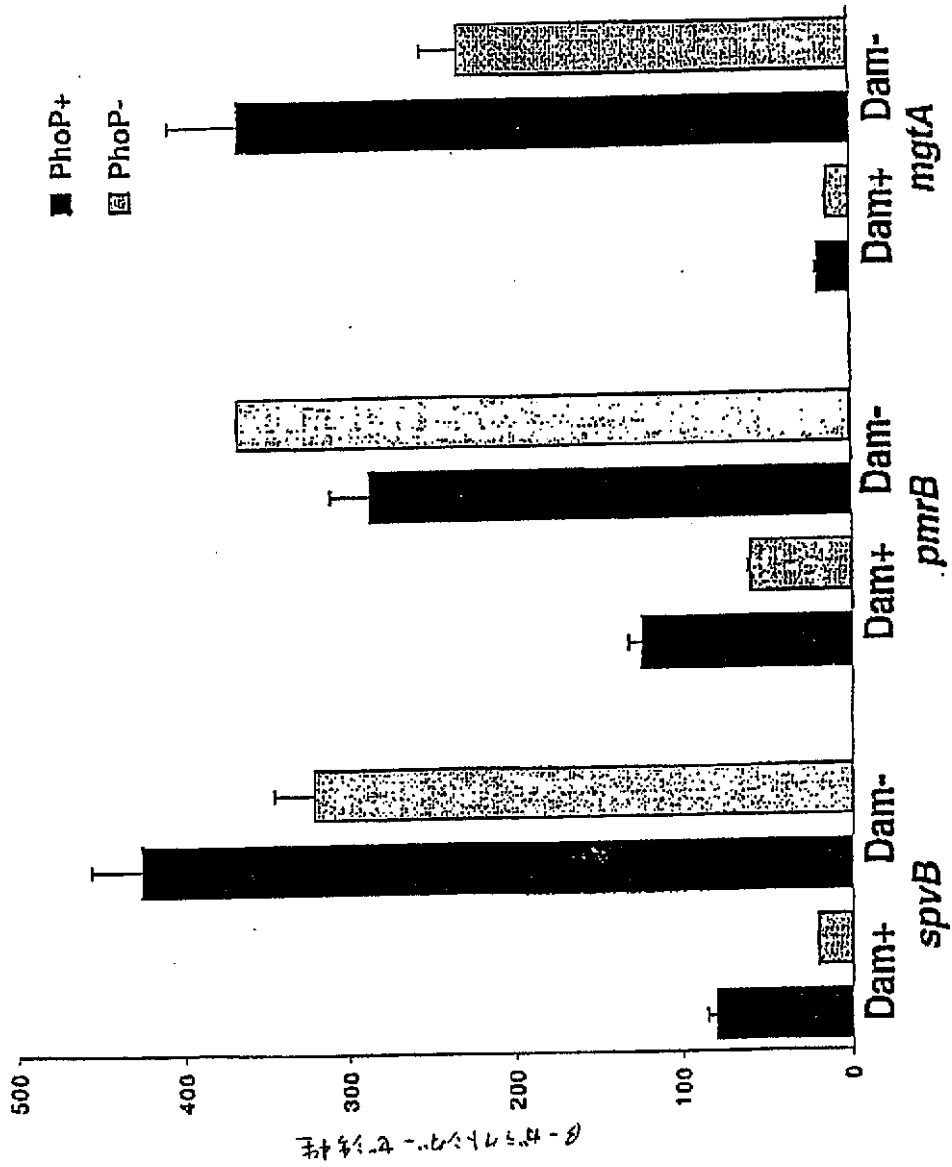
【図2】



【図3】



【图4】



【図5】

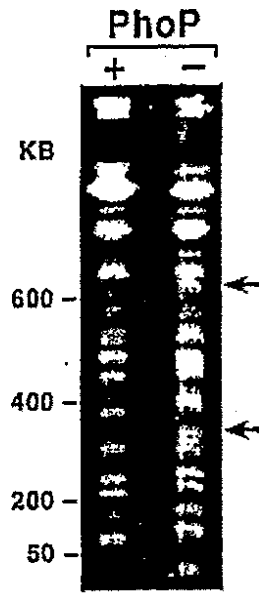
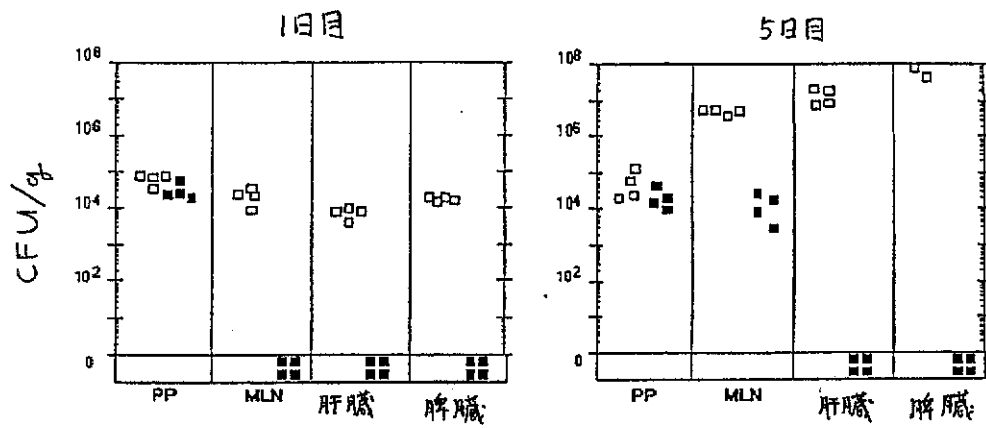
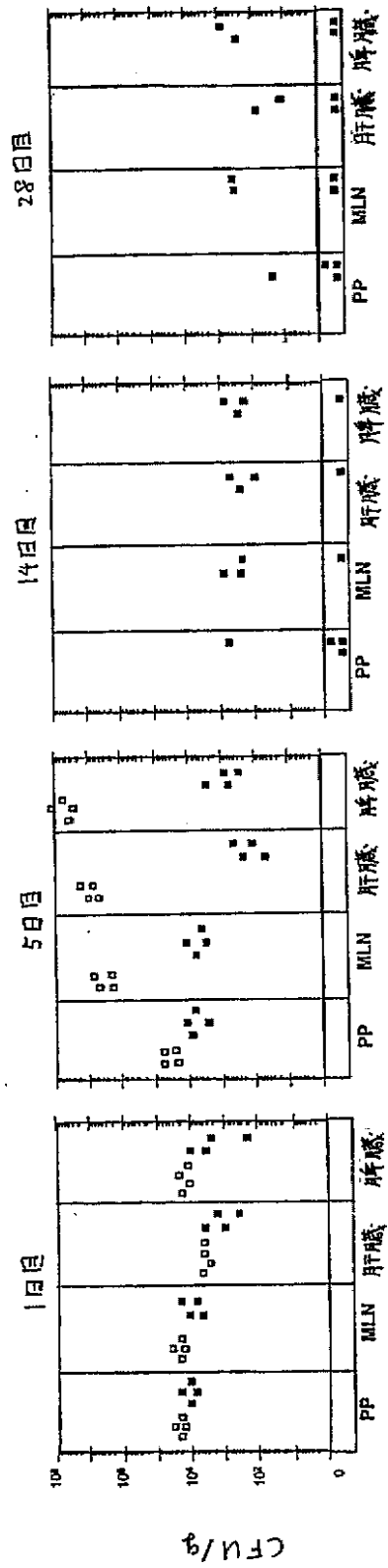


FIGURE 5

【図6】



【図7】



【図 8 A】

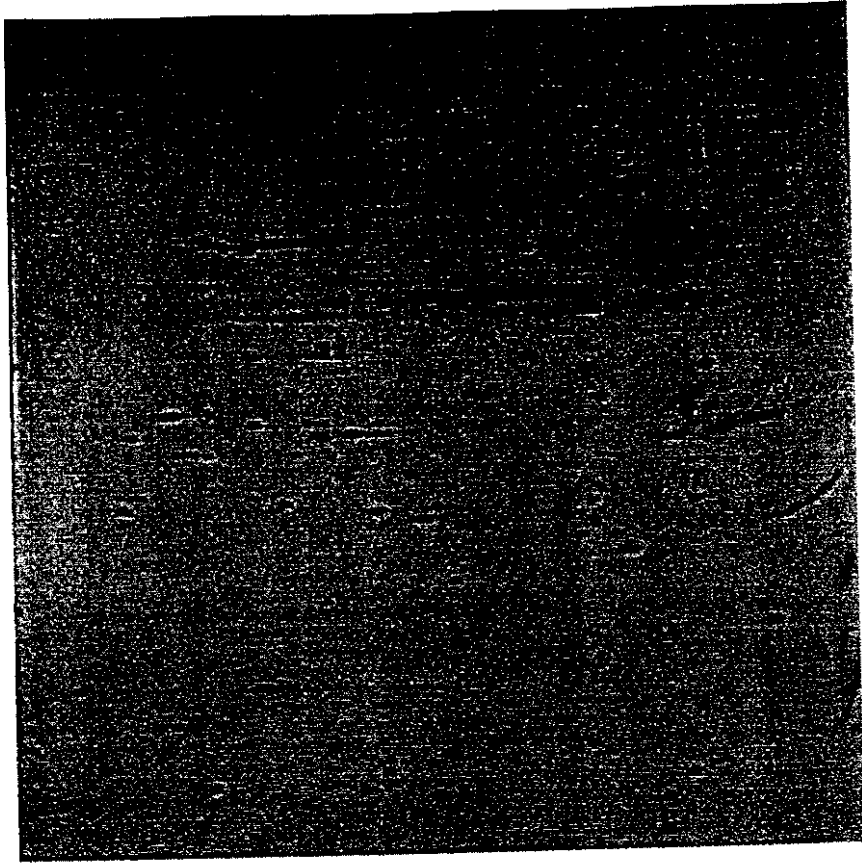


FIGURE 8A

【図 8 B】

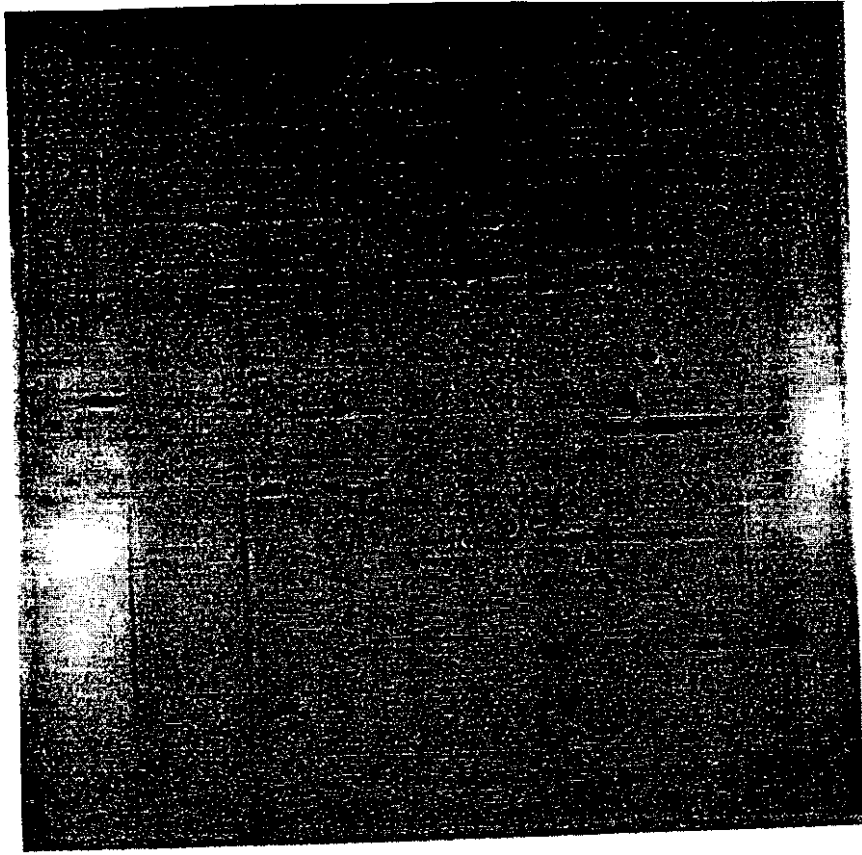


FIGURE 8B

【図 8 C】

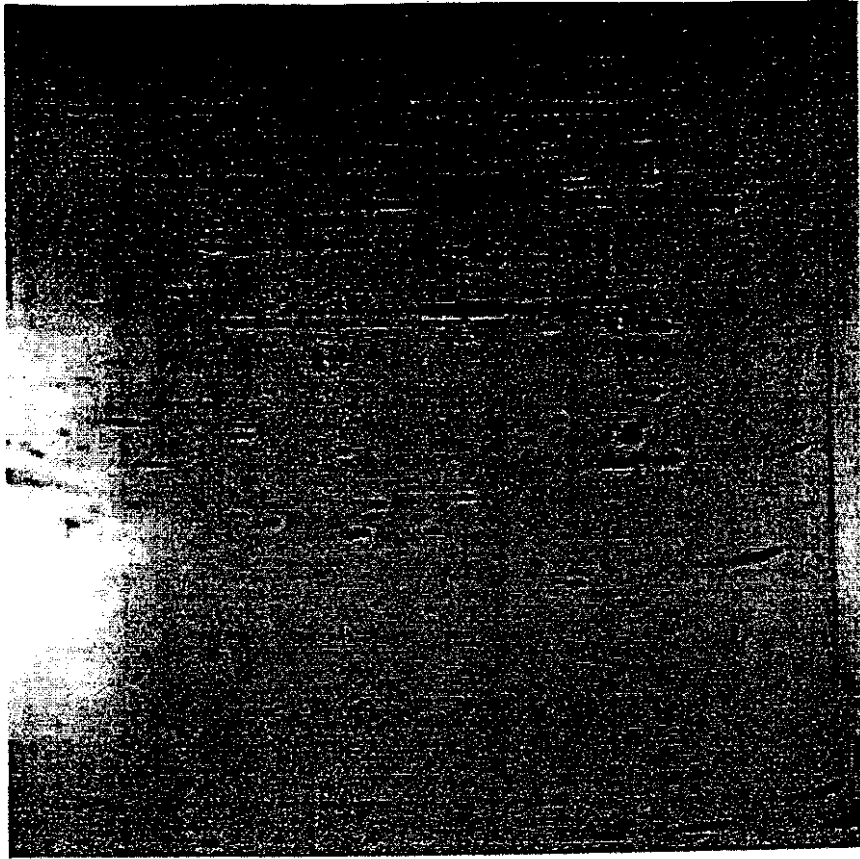


FIGURE 8C

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PCT/US 00/02866					
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 A61K39/112 A61K39/02 A61K39/108 A61K39/106 A61K39/102 A61K39/10 A61K39/095 C12N1/20 C12N1/21 C12N1/36 C12N15/74 A61P31/04 //(C12N1/20,C12R1:42)					
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) IPC 7 A61K C12R					
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 practical, search terms used)					
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT					
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages				Relevant to claim No.
X	BRAATEN BRUCE A ET AL: "Methylation patterns in pap regulatory DNA control pyelonephritis-associated pili phase variation in E. coli." CELL 1994, vol. 76, no. 3, 1994, pages 577-588, XP000887279 ISSN: 0092-8674 page 577				1-85
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.					
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "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 "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 "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. "&" document member of the same patent family					
Date of the actual completion of the international search  31 May 2000			Date of mailing of the international search report 24 05 00		
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016			Authorized officer  von Ballmoos, P		

2

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/US 00/02866

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BRAWER ROLANDO ET AL: "A temperature-sensitive DNA adenine methyltransferase mutant of Salmonella typhimurium." ARCHIVES OF MICROBIOLOGY JUNE, 1998, vol. 169, no. 6, June 1998 (1998-06), pages 530-533, XP000886607 ISSN: 0302-8933	1-43, 78-85
Y	abstract page 532, right-hand column, paragraph 2	44-77
X	TORREBLANCA JOAQUIN ET AL: "DNA adenine methylase mutants of Salmonella typhimurium and a novel dam-regulated locus." GENETICS 1996, vol. 144, no. 1, 1996, pages 15-26, XP000886604 ISSN: 0016-6731 abstract table I	1-43, 78-85
Y	CARDENAS L ET AL: "ORAL IMMUNIZATION USING LIVE ATTENUATED SALMONELLA SPP. AS CARRIERS OF FOREIGN ANTIGENS" CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS, US, WASHINGTON, DC, vol. 5, no. 3, 1 July 1992 (1992-07-01), pages 328-342, XP000579484 ISSN: 0893-8512 p. 333, paragraph bridging left and right column	44-77
P, X	HEITHOFF DOUGLAS M ET AL: "An essential role for DNA adenine methylation in bacterial virulence." SCIENCE (WASHINGTON D C) MAY 7, 1999, vol. 284, no. 5416, 7 May 1999 (1999-05-07), pages 967-970, XP000887268 ISSN: 0036-8075 the whole document	1-85
P, X	GARCIA-DEL PORTILLO FRANCISCO ET AL: "DNA adenine methylase mutants of Salmonella typhimurium show defects in protein secretion, cell invasion, and M cell cytotoxicity." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA SEPT. 28, 1999, vol. 96, no. 20, pages 11578-11583, XP000887265 ISSN: 0027-8424 the whole document	1-85

2

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US 00/02866**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Although claims 44-62 are directed to a method of treatment of the human body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the composition.
2.  Claims 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.  Claims 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:

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.

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マ-コ-ト' (参考)
A 6 1 K	48/00	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 P	31/04	A 6 1 P 31/04	
	37/00	37/00	
G 0 1 N	33/02	G 0 1 N 33/02	
	33/15	33/15	Z
	33/50	33/50	Z
	33/53	33/53	M
	33/566	33/566	
(31)優先権主張番号	0 9 / 4 9 5 , 6 1 4		
(32)優先日	平成12年2月1日(2000.2.1)		
(33)優先権主張国	米国(US)		
(81)指定国	E P ( A T , B E , C H , C Y , D E , D K , E S , F I , F R , G B , G R , I E , I T , L U , M C , N L , P T , S E ) , O A ( B F , B J , C F , C G , C I , C M , G A , G N , G W , M L , M R , N E , S N , T D , T G ) , A P ( G H , G M , K E , L S , M W , S D , S L , S Z , T Z , U G , Z W ) , E A ( A M , A Z , B Y , K G , K Z , M D , R U , T J , T M ) , A E , A L , A M , A T , A U , A Z , B A , B B , B G , B R , B Y , C A , C H , C N , C R , C U , C Z , D E , D K , D M , E E , E S , F I , G B , G D , G E , G H , G M , H R , H U , I D , I L , I N , I S , J P , K E , K G , K P , K R , K Z , L C , L K , L R , L S , L T , L U , L V , M A , M D , M G , M K , M N , M W , M X , N O , N Z , P L , P T , R O , R U , S D , S E , S G , S I , S K , S L , T J , T M , T R , T T , T Z , U A , U G , U S , U Z , V N , Y U , Z A , Z W		
(72)発明者	ヘイソフ, ダグラス エム. アメリカ合衆国 カリフォルニア 93117, ゴレタ, アパートメント 320, カ ミノ デル サー 785		
(72)発明者	ロー, デイビッド エイ. アメリカ合衆国 カリフォルニア 93117, ゴレタ, ラ ゴレタ ロード 6089		
(72)発明者	シンシェイマー, ロバート エル. アメリカ合衆国 カリフォルニア 93110, サンタ パーバラ, ピア カイアント 4606		
Fターム(参考)	2G045 AA28 AA29 CB21 DA20 FB03 FB05 FB06 FB07 JA20 4C084 AA13 NA14 ZB072 ZB352 4C085 AA03 BA07 BA20 BA21 BA23 BA24 CC01 CC07 DD23 FF02 FF11 FF21 GG06		

专利名称(译)	基于DNA甲基化在细菌毒性中的重要作用，用于治疗 and 预防病原性细菌感染的组合物和方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2002536339A</a>	公开(公告)日	2002-10-29
申请号	JP2000596959	申请日	2000-02-02
[标]申请(专利权)人(译)	加利福尼亚大学董事会		
申请(专利权)人(译)	加州大学董事会		
[标]发明人	マーンマイケルジェイ ハイソフダグラスエム ローデイビッドエイ シンシェイマーロバートエル		
发明人	マーン, マイケル ジェイ. ハイソフ, ダグラス エム. ロー, デイビッド エイ. シンシェイマー, ロバート エル.		
IPC分类号	G01N33/50 A61K39/00 A61K39/02 A61K39/095 A61K39/10 A61K39/102 A61K39/106 A61K39/108 A61K39/112 A61K48/00 A61P31/04 A61P37/00 A61P37/04 C12N1/20 C12N1/21 C12N1/36 C12N15 /74 C12R1/42 G01N33/02 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/566		
CPC分类号	A61K39/025 A61K39/0275 A61K39/107 A61K2039/522 A61P31/04 A61P37/00 A61P37/04 Y02A50 /482		
FI分类号	A61K39/00.A A61K39/02 A61K39/106 A61K39/108 A61K39/112 A61K48/00 A61P31/04 A61P37/00 G01N33/02 G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.M G01N33/566		
F-TERM分类号	2G045/AA28 2G045/AA29 2G045/CB21 2G045/DA20 2G045/FB03 2G045/FB05 2G045/FB06 2G045 /FB07 2G045/JA20 4C084/AA13 4C084/NA14 4C084/ZB072 4C084/ZB352 4C085/AA03 4C085/BA07 4C085/BA20 4C085/BA21 4C085/BA23 4C085/BA24 4C085/CC01 4C085/CC07 4C085/DD23 4C085 /FF02 4C085/FF11 4C085/FF21 4C085/GG06		
优先权	09/241951 1999-02-02 US 09/305603 1999-05-05 US 09/495614 2000-02-01 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

### 摘要(译)

本发明提供了包含具有改变DNA腺嘌呤甲基化酶 (Dam) 活性的非回复突变的病原细菌如沙门氏菌的疫苗组合物，以及使用这些组合物引发免疫应答的方法。关于本发明还提供了制备疫苗的方法，以及用于鉴定可能具有抗菌活性的试剂的筛选方法。通常，致病细菌包括鼠伤寒沙门氏菌，肠炎沙门氏菌，鼠伤寒沙门氏菌，产气链球菌，产气链球菌，都柏林链球菌，gallinarum和链霉菌。

株	遺伝子型	経口 LD <sub>50</sub>	I.P. LD <sub>50</sub>	競合指数 (I.P.)
1	野生型	>10 <sup>15</sup>	<10	---
2	<i>dam102::Mud-Cm</i>	>10 <sup>19</sup>	>10 <sup>14</sup>	<10 <sup>-4</sup>
3	<i>damΔ232</i> (非極性欠失)	>10 <sup>19</sup>	>10 <sup>14</sup>	<10 <sup>-4</sup>
4	野生型, (pTP166) (Dam 過剰生成株)	10 <sup>+8</sup>	>10 <sup>14</sup>	<10 <sup>-4</sup>
5	<i>mutS121::Tn10</i>	10 <sup>+5</sup>	ND	0.9
6	<i>lrp31::Km</i>	10 <sup>+5</sup>	ND	10.0
7	LT2	ND	2 x 10 <sup>14</sup>	ND