

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-517457

(P2005-517457A)

(43) 公表日 平成17年6月16日(2005.6.16)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	Z N A A 4 B O 2 4
A 6 1 K 39/00	A 6 1 K 39/00	H 4 B O 6 5
A 6 1 K 39/108	A 6 1 K 39/108	4 C O 8 5
A 6 1 P 31/04	A 6 1 P 31/04	4 H O 4 5
C O 7 K 14/245	C O 7 K 14/245	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 14 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2003-569878 (P2003-569878)  
 (86) (22) 出願日 平成15年2月13日 (2003. 2. 13)  
 (85) 翻訳文提出日 平成16年10月5日 (2004. 10. 5)  
 (86) 国際出願番号 PCT/DE2003/000469  
 (87) 国際公開番号 W02003/070987  
 (87) 国際公開日 平成15年8月28日 (2003. 8. 28)  
 (31) 優先権主張番号 102 08 175.1  
 (32) 優先日 平成14年2月20日 (2002. 2. 20)  
 (33) 優先権主張国 ドイツ (DE)

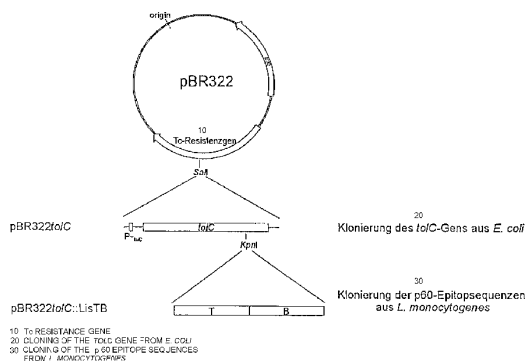
(71) 出願人 504316207  
 メディノヴァ ジェスレスチャフト フル  
 メディジニステュ インヴァシオネン  
 アウス アカデミステュアー フォースチ  
 ユング エムピーエー  
 ドイツ国 3 5 0 3 7 マーバーグ, ビエ  
 ジェンストラーセ 4  
 (74) 代理人 100091683  
 弁理士 ▲吉▼川 俊雄  
 (72) 発明者 ゴーベル, ワーナー  
 ドイツ国 9 7 2 1 8 ジャーブラン, エ  
 ーエム ハパッチ 1 2  
 (72) 発明者 ジェントスチュブ, イヴァイロ  
 ドイツ国 9 7 2 7 0 キスト, ボウウェ  
 グ 5

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 異種のアミノ酸配列を含むT O L Cをコードするヌクレオチド配列

(57) 【要約】

本発明は、T o l Cをコードするヌクレオチド配列および一定のアミノ酸配列、T o l Cの許容膜外側領域の中に挿入される前記一定のアミノ酸配列およびそれらの、特にヌクレオチド配列のような細菌を含む幾つかの使用に関する。



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

T o l C をコードするヌクレオチド配列ならびに一定のアミノ酸配列において、この一定のアミノ酸配列が T o l C の許容膜外側領域の中に挿入されるヌクレオチド配列。

## 【請求項 2】

T o l C が A C C E S S I O N X 5 4 0 4 9 による T o l C タンパク質または好ましくはその N 末端部分配列またはタンパク質の突然変異体または部分配列であり、N 末端部分配列または突然変異体に対してトランスポート機能性を得た、請求項 1 記載のヌクレオチド配列。

## 【請求項 3】

一定のアミノ酸配列が片側または両側にスペーサー配列を介して挿入された、請求項 1 または 2 記載のヌクレオチド配列。

## 【請求項 4】

一定のアミノ酸配列が T o l C の N 末端領域で、特にアミノ酸 5 2 ないし 6 1、および / または 2 5 7 ないし 2 7 9 の領域 (それぞれ T o l C タンパク質を基準) に挿入される、請求項 1 ないし 3 のいずれか一項記載のヌクレオチド配列。

## 【請求項 5】

請求項 1 ないし 4 のいずれか一項記載のヌクレオチド配列を含むプラスミド。

## 【請求項 6】

請求項 1 ないし 4 のいずれか一項記載のヌクレオチド配列によってコードしたタンパク質またはペプチド。

## 【請求項 7】

T o l C が一定のアミノ酸配列のトランスポートを細菌の膜上に生じる、請求項 1 ないし 4 のいずれか一項記載のヌクレオチド配列を含む細菌。

## 【請求項 8】

一定のアミノ酸配列が、ペプチド、タンパク質、作用物質、抗原、抗体、またはリガンドを表す、請求項 7 記載の細菌。

## 【請求項 9】

サルモネラ属 (*Salmonella* spp)、大腸菌 (*Escherichia coli*)、コレラ菌 (*Vibrio cholerae*)、緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、赤痢菌 (*Shigella* spp.) およびエルシニア属 (*Yersinia* spp.) からなるグループから選択された、請求項 7 または 8 のいずれか一項記載の細菌。

## 【請求項 10】

請求項 7 ないし 9 のいずれか一項記載の細菌ならびに、別法により、少なくとも 1 種の生理学的に親和性のある担体物質を含む製薬組成物において、一定のアミノ酸配列が所定の生物体中の被結合物質に応じて選択された製薬組成物。

## 【請求項 11】

請求項 7 ないし 9 のいずれか一項記載の細菌ならびに、別法により、少なくとも 1 種の生理学的に親和性のある担体物質を含む製薬組成物において、一定のアミノ酸配列が免疫配列である製薬組成物。

## 【請求項 12】

請求項 7 ないし 9 のいずれか一項記載の細菌を含む診断キットにおいて、一定のアミノ酸配列が被決定マーカー物質を特異的に結合する診断キット。

## 【請求項 13】

請求項 7 ないし 9 のいずれか一項記載の細菌を含む調製結合剤において、一定のアミノ酸配列が溶液から分離される標的物質を特異的に結合する調製結合剤。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

10

20

30

40

50

本発明は、T o l Cをコードするヌクレオチド配列、このようなヌクレオチド配列を含むプラスミド、このようなヌクレオチド配列によってコードするタンパク質またはペプチド、このようなヌクレオチド配列を含む細菌ならびにこのような細菌の様々な使用に関する。

【背景技術】

【0002】

その菌力において減弱された、細胞内に定住する細菌は、生ワクチンとして長く持続する免疫性を誘導することができる。これまで特にチフス菌 (*Salmonella Typhi*) TY 1 a (Levineら、Lancet 1:1049-1052、1987)、ウシ型結核菌 (*Mycobacterium bovis*) BCG (FineおよびRodrigues、Lancet 335:1016-1020、1990) およびコレラ菌 (*Vibrio cholerae*) (LevineおよびKaper、Vaccine 11:207-212、1993) が生ワクチンとして使用された。

【0003】

たとえば、リステリア・モノサイトゲネス (*Listeria monocytogenes*) サルモネラ・エンテリカ・エスヴェー (*Salmonella enterica* sv) ティフィムリウム (*Typhimurium*) およびチフス菌 (*Typhi*)、ならびにBCGによってこの種の変形体が発疹チフスおよび結核症に対して良好な親和性の生接種物質として使用された。その減弱した突然変異体を含む前記細菌は一般に免疫刺激性であって、良好な細胞免疫反応を誘発することができるため、接種物質担体として使用された。

【0004】

接種物質担体としての前記細菌の長所は、該細菌が特にいわゆるTh1免疫反応を誘導することである (HessおよびKaufmann、FEMS Immunol Med Microbiol 23:165-173、1999)。この免疫反応は細胞毒のリンパ球 (CTL) ならびに分泌するCD4+T細胞 (T補佐細胞、Thとも呼ぶ) の特異的IFNガンマの存在を特徴とする (Abbasら、Nature 383:787-793、1996)。

【0005】

たとえばリステリア・モノサイトゲネス (*L. monocytogenes*) は特にTH1細胞の活性を介して細胞毒のTリンパ球 (CTL) の増殖を刺激する。この細菌は分泌抗原を直接サイトソル抗原表出細胞 (APC; マクロファージおよび樹状細胞) の中に供給し、この細胞が該細胞側で協同刺激性分子を発現し、T細胞の効果的な刺激を誘発する。そのためリステリア属は一部食作用胞の区画に分解され、前記担体細菌によって産生される抗原は、一方でMHCクラスII分子を介して表出され、それによってT補佐細胞の誘導を惹起することができる。他方、リステリア属は食作用胞から遊離後APCのサイトソル内で複写する; 従って前記細菌から産生かつ分泌された抗原は有利にMHCクラスI経路を介して表出され、それによってこの抗原に対するCTL反応が誘導される。さらに、マクロファージ、天然キラー細胞 (NK) および好中球とリステリア属の相互作用によって、このようなサイトカイン (TNF-alpha、IFN-gamma、IL-2、IL-12; Unanue、Curr Opin Immunol、9:35-43、1997; Mata and Paterson、J Immunol 163:1449-14456、1999) の発現が誘導されることを示すことができ、それに対する抗腫瘍作用が検出された。

【0006】

組換え細菌はそれに応じて異種腫瘍に対して保護することができた (Medinaら、Eur J Immunol 29:693-699、1999; Panら、Cancer Res 59:5264-5269、1999; Woodlockら、J Immunother 22:251-259、1999; Pagliaら、Blood 92:3172-3176、1998; Pagliaら、Eur J Immunol 27: 50

1570 - 1575、1997; Panら、Nat Med 1:471 - 477、1995; Panら、Cancer Res 55:4776 - 4779、1995)。

【0007】

このように形質導入されたリステリア・モノサイトゲネスの投与によって腫瘍抗原の発現のために抗原特異的に発現した腫瘍の成長を阻止することができた (Panら、Nat Med 1:471 - 477、1995; Cancer Res 59:5264 - 5269、1999; Voseyら、Nat'l Cancer Inst 87:581 - 586、1995; BeattyおよびPaterson、J Immunol 165:5502 - 5508、2000)。

【0008】

腫瘍抗原をコードするヌクレオチド配列を導入した菌力減弱サルモネラ・エンテリカ (*Salmonella enterica*) 株は、腫瘍抗原発現細菌担体として経口投与後種々の発現腫瘍に対する特異的保護を生ぜしめることができた (Medinaら、Eur J Immunol 30:768 - 777、2000; ZollerおよびChrist J Immunol 166:3440 - 34450、2001; Xiangら、PNAS 97:5492 - 5497、2000)。

【0009】

組換えサルモネラ株は、ウイルス感染に対する予防ワクチン (HPV; Benyacoubら、Infect Immun 67:3674 - 3679、1999) として、および腫瘍ウイルス (HPV) によって不死化したマウス腫瘍の治療的処置のためにも効果的であった (Revazら、Virology 279:354 - 360、2001)。

【0010】

接種物質担体として使用するために、細菌の中に導入した核酸配列の発現産物を前記細菌の細胞膜上に発現し、または前記細菌から分泌させる方法が開発された。この方法の基礎はグラム陰性菌のI型分泌系のプロトタイプを表す大腸菌 (*Escherichia coli*) 溶血素系HlyAsである。このHlyAsによってサルモネラ・エンテリカ (*Salmonella enterica*)、エルシニア・エンテロコリチカ (*Yersinia enterocolitica*) およびコレラ菌 (*Vibrio cholerae*) 中のタンパク質抗原の効果的な排出を可能にする分泌ベクターが開発された。この種の分泌ベクターはHlyAsシグナルペプチド、溶血素分泌器官、hlyBおよびhlyDおよびhly特異的プロモーターのためのヌクレオチド配列に結合した任意のタンパク質抗原のcDNAを含む。この分泌ベクターによってタンパク質を、たとえば前記細菌の表面上で発現させることができる。この種の遺伝子修飾細菌は、ワクチンとして、導入された核酸によって発現されたタンパク質が細胞内にとどまる細菌として非常に強力な免疫保護を誘発する (DonnerらEP 1015023A; Gentschevら、Gene 179:133 - 140、1996; Vaccine 19:2621 - 2618、2001; Hessら、PNAS 93:1458 - 1463、1996)。しかしながらこの系の欠点は、Hly特異的プロモーターの使用によって細菌により発現されたタンパク質の量が少なくなることである。

【0011】

細菌中のその他のトランスポート系は、たとえばi) 分泌および膜位発現のためにC末端Rsa Aトランスポートシグナルが使用される (Umelo-Njakaraら、Vaccine 19:1406 - 1415、2001) カウロバクター・クレセントゥス (*Caulobacter crescentus*) のS層タンパク質 (Rsa A) およびii) リステリア・モノサイトゲネス (*Listeria monocytogenes*) のインターナリンAのためのトランスポートシグナルである。分泌のためにN末端トランスポートシグナルと膜位発現のためにN末端トランスポートシグナルと一緒に細胞壁係留に重要なLPXTGモチーフを含むC末端部分に必要である (Dharら、Biochemistry 39:3725 - 3733、2000)。

【0012】

10

20

30

40

50

その他の関連性から大腸菌 (*E. coli*) の不可欠な膜タンパク質 TolC が知られている。これは、たとえばコリシン E1 (Morona ら、*J Bacteriol* 153:693-699、1983) の吸収およびコリシン V (Fath ら、*J Bacteriol* 173:7549-7556、1991) の分泌のような機能のほか U3 ファージのためのレセプターとしても用いられる (Austin ら、*J Bacteriol* 172:5312-5325、1990) 大腸菌の外部膜の多機能性多孔形成タンパク質である。このタンパク質は大腸菌の中に見出されるだけでなく、多数のグラム陰性菌の中にも見出される (Wiener、*Structure Fold Des*、8:171-5、2000)。

【0013】

10

TolC タンパク質の結晶構造は、これがホモトリマーとして約 120 オングストロームの長さをもつトンネルチャネルを形成し、ホモジマーの大部分、トンネルドメインがペリプラズマの中に局在定位されていて、2つの小さなループ (アミノ酸 52-61 および 257-279) のみが細菌の表面上に定住している (Koronakis ら、*Nature* 405:914-919、2000)。tolC 遺伝子は Niki ら、*Nucleotide sequence of the tolC gene of Escherichia coli*、*Nucleic Acids Res.* 18(18)、5547 (1990) によって公表されたヌクレオチド配列を有する。TolC は、細菌性タンパク質のエクスポートが可能になる膜トンネルを表すことによって、少なくとも 4 つの異なる細菌性エクスポート系の一部である。たとえば、HlyA トランスポート系において HlyD と TolC のペリプラズマ末端との間の結合は TolC の膜トンネルの中への HlyD の溶血素のエクスポートを可能にする (Gentschev ら *Trends in Microbiology* 10:39-45、2002)。

20

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0014】

本発明は、トランスポート系によって細菌の外部細胞膜上に高い効率を有する発現産物を出せるトランスポート系を提示する技術的問題を基礎においている。

【課題を解決するための手段】

【0015】

30

この技術的問題の解決のために、本発明は TolC をコードするヌクレオチド配列ならびに一定のアミノ酸配列を教示し、この一定のアミノ酸配列が TolC の許容膜外側領域の中に挿入される。

【0016】

本発明により、新規トランスポート系によって従来公知のトランスポート系で可能であったよりも多量の細菌内部の遺伝子によって発現されたタンパク質を細菌の外部細胞膜上にトランスポートできる新規のトランスポート系がグラム陰性菌の中に構築される。驚くべきことに、大腸菌の TolC タンパク質のためのトランスポート系は、従来のトランスポートタンパク質から知られていた多数のグラム陰性菌よりもはるかに強力な (任意の) ペプチドまたはタンパク質の膜位発現を可能にする。一定のアミノ酸配列もしくは遺伝子産物の膜位発現は、この場合、単独で TolC によって達成される。

40

【0017】

一定のアミノ酸配列は、任意の所定のペプチドまたはタンパク質、任意の薬剤作用物質、任意の抗原、任意の抗体、または任意のリガンドとしてよい。

【0018】

TolC は、本特許と明確に関係する ACCESSION X54049 による (野生型) TolC タンパク質またはその (好ましくは N 末端の) 部分配列またはタンパク質の突然変異体または部分配列としてよく、この部分配列または突然変異体にはトランスポート機能性が含まれている。N 末端部分配列とは、この場合、N 末端領域で TolC タンパク質のアミノ酸 1 ないし 50 で開始し、細菌の表面上に定住しているループの C 末端の最

50

後で終了する部分配列である。従って有利には、T o l CのN末端トランスポートシグナル、さらにT o l Cの細胞外領域を表すタンパク質の中央部分である。突然変異体は、そのトランスポート機能性が明らかに低減されない限り、挿入、欠質または置換を含んでよい。

#### 【0019】

特定の適用事例に対しては、一定のアミノ酸配列が片側または両側にスペーサー配列を介して挿入されている場合に推奨することができる。しかしこれは、一定のアミノ酸配列が特定の空間的構造を、たとえば抗原の場合で表示されるべきであるが、これが一定のアミノ酸配列自体によって立体的または構成上の理由から望ましい範囲で行われる場合にのみ役立つであろう。その場合はスペーサー配列を特に自然に一定のアミノ酸配列に接続される配列によって形成することができ、それによって一定のアミノ酸配列は天然の抗原の中のように折りたたまれる。さらにスペーサー配列は、それによって一定のアミノ酸配列の所望の表示および/または折りたたみが達成される場合、人工的にしてもよい。これはT o l Cの中の挿入部位で空間的条件を考慮した理論的方法によって容易に計算することができる。

10

#### 【0020】

個別的には、一定のアミノ酸配列がT o l CのN末端領域で、特にアミノ酸52ないし61、および/または257ないし279の領域(それぞれT o l Cタンパク質を基準)に挿入される場合に有利である。

#### 【0021】

本発明の目的は、さらに本発明によるヌクレオチド配列を含むプラスミドならびに本発明によるヌクレオチド配列によってコードしたタンパク質またはペプチドである。

20

#### 【0022】

本発明は、さらに本発明によるヌクレオチド配列を含む細菌を教示し、T o l Cは一定のアミノ酸配列のトランスポートを細菌の膜上に生じる。別の言葉で表現すると、細菌の中に遺伝子産物の膜位発現がT o l Cタンパク質によって生ぜしめられる。従って本発明の目的は、少なくとも1種の一定のアミノ酸配列と少なくとも1種の大腸菌T o l C遺伝子産物をコードする少なくとも1種のヌクレオチド配列を含むグラム陰性菌でもある。この大腸菌T o l C遺伝子産物は、有利には野生型である。しかしながら本発明の目的は、トランスポートシグナル活性を得て残留する突然変異した大腸菌T o l C遺伝子産物でも

30

#### 【0023】

本発明によるヌクレオチド配列もしくは細菌は様々な適用に使用可能である。そこで本発明は、本発明による細菌ならびに、別法により、少なくとも1種の生理学的に親和性のある担体物質を含む製薬組成物も教示し、一定のアミノ酸配列は所定の生物体中の被結合物質に応じて選択されている。このような製薬組成物によって、通常細胞物質代謝を妨害する物質、たとえば外来性毒物または腫瘍形成遺伝子のような突然変異限定性内因性物質に結合し、そのように阻止することができる。また特定の細胞標的物質の結合によって通常または疾病限定性の高調節錯体パートナーの除去によって物質代謝を調節することもできる。それによって、たとえば一定の会合が阻止され、それに関係するシャトルが下方調節される。このようなプロセスは再びその他の結合したプロセスの上方調節に利用することができる。その限りにおいて一定のアミノ酸配列は高い特異性で禁止される標的分子に応じて選択する必要があるだけである。従ってこのような製薬組成物は最終的に治療目的に利用される。

40

#### 【0024】

接種に好適な製薬組成物は本発明による細菌ならびに、別法により、少なくとも1種の

50

生理学的に親和性のある担体物質を含み、その一定のアミノ酸配列は免疫配列である。免疫配列は生物体の中で部分配列として免疫配列を含みまたはそれらからなる天然の抗原に対する抗体の形成を刺激する。

#### 【0025】

診断目的のために、本発明は請求項7ないし9のいずれか一項記載の細菌を含む診断キットを教示し、一定のアミノ酸配列は被決定マーカー物質を特異的に結合する。たとえば生物体から組織 - または流体試料が抽出され、この試料を、必要な場合は、望ましくない試料成分の分離による前処理後、細菌と共にインキュベートされる場合、結合発生を一定のアミノ酸配列で検出することができ、結合発生の場合は、一定のアミノ酸配列に特異的に結合する物質が試料中に含まれていることが確認されている。この場合、結合発生の検出は種々の、一般当業者によく知られている方法で行なうことができる。

10

#### 【0026】

最後に本発明は、本発明による細菌を含む調製結合剤を教示し、一定のアミノ酸配列は溶液から分離される標的物質を特異的に結合する。このような結合剤により、一方で細菌を含む溶液がインキュベートされ、細菌が分離後に投棄されることによって、受け器から望ましくない物質を特異的に除去することができる。他方、対応する方法で、すなわちインキュベーション後に標的物質が細菌から分離されることによって、標的物質の分離もしくは濃縮を行うことができる。この関係においても本発明は、抗原、抗体、ペプチド、タンパク質またはリガンドの分離および/または濃縮に使用することができる。

#### 【発明を実施するための最良の形態】

20

#### 【0027】

##### (実施例1) TolCベクターの製造

大腸菌由来のtolC遺伝子とその野生型プロモーターを含みポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によって(1分間94、1分間66、1分30秒間72)オリゴヌクレオチド5' TolC (5' - T A A C G C C C T A T G T C G A C T A A C G C C A A C C T T - 3') および3' TolC (5' - A G A G G A T G T C G A C T C G A A A T T G A A G C G A G A - 3') を用いてプラスミドpAX629 (C. Wandersman, Institute Pasteur, Paris) から増幅した。この場合、両端に付加的なSalIインタフェースを導入した。洗浄したPCR生成物(QIAquick PCR精製キット - キアゲン社、ヒルデン、ドイツ)は、制限エンドヌクレアーゼSalIによって消化させ、SalIで前分裂したベクターpBR322でクローニングした。このように構成したベクターはpBR322tolCと呼ぶ。クローンtolC遺伝子の機能性はそれに続き複数の試験で検査した。

30

#### 【0028】

##### (実施例2) TolCタンパク質の配列の中への抗原配列の挿入

細胞外ループの1つをコードするtolC配列の中でKpnIインタフェースを同定した。これはリステリア・モノサイトゲネス(Listeria monocytogenes)のp60タンパク質(iap遺伝子)の抗原ペプチド配列のクローニングに使用し、成熟したTolCタンパク質のアミノ酸271による外部抗原の挿入を可能にした。

#### 【0029】

B細胞エピトープ(アミノ酸291 - 301)およびp60タンパク質のCD4収縮T細胞エピトープ(アミノ酸301 - 312)をコードするiap配列は、KpnI断片としてKpnI前切断ベクターpBR322tolCでクローニングした(図1)。このように生成したプラスミドはpBR322tolC::LiSTBと呼ぶ。

40

#### 【0030】

図1は、ベクターpBR322上の野生型プラスミドコード大腸菌tolC遺伝子の中へp60特異的エピトープ配列の挿入のためのクローニング方式である。これは次のとおりである: blaアンピシリン抵抗遺伝子; Tcテトラシクリン; Tリステリア・モノサイトゲネスp60T細胞エピトープ(AS 301 - 312); Bリステリア・モノサイトゲネスp60B細胞エピトープ(AS 291 - 301); PtolC野生型大腸菌t

50

o1C - プロモータ。

【0031】

(実施例3) グラム陰性菌(エッシャリキア・コリ)の膜上の抗原の発現

TolCタンパク質内部のリステリア・モノサイトゲネス由来のp60タンパク質のエピトープの発現はウェスタン・ブロット法で検出した。そのために大腸菌CC118tolC、大腸菌CC118tolC/pBR322tolCおよび大腸菌CC118tolC/pBR322tolC::ListBの細胞溶解物タンパク質を後の対数相で単離した。塗布した全細胞タンパク質は約1億の細菌に相当した。タンパク質は15%SDSポリアクリルアミドゲル中で分離し、キメラTolCタンパク質もしくは挿入したエピトープの発現は一方でTolCタンパク質に対するポリクロナール血清を用いて、他方では特異的にリステリア・モノサイトゲネス(図2B)由来のB細胞エピトープに向けたモノクロナール抗体K317(Rowanら、J Clin Microbiol 38:2643-2648、2000)を用いて検出した。

10

【0032】

予想どおり大腸菌CC18tolCの細胞溶解物の中にTolCタンパク質を検出できず、これは前記株中の染色体tolC遺伝子中の突然変異に還元される(Schlorら、Mol Gen Genet 256:306-319、1997)。pBR322tolCとの相補性は前記株中で52kDaの大きいTolCタンパク質の発現を惹起した。TolCタンパク質へのリステリア・モノサイトゲネス-エピトープの挿入はTolCの発現に影響を与えず、約3kDaのキメラタンパク質の僅かな大きさの変化をもたらした。

20

【0033】

大腸菌CC118tolC/pBR322tolC::ListB中のp60特異的エピトープの発現は、モノクロナールp60抗体K317で確認することができた。

【0034】

(実施例4) 腸炎菌(Salmonella enteritidis)SM6T(tolC)中のリステリア・モノサイトゲネスp60エピトープの露出局在定位の検出

両方のリステリア属p60エピトープの挿入部位は成熟したタンパク質のアミノ酸271の後のTolCの細胞外ループにあるので、前記p60エピトープは腸炎菌SM6T(Stoneら、Mol Microbiol 17:701-712、1995)の表面に露出して存在するものとみられる。腸炎菌SM6T中のp60特異的エピトープの決定的な細胞外定位は間接的な免疫蛍光法によって検査した。

30

【0035】

腸炎菌SM6T/pBR322tolCおよび腸炎菌SM6T/pBR322tolC::ListBの一晚培養液各25μlをスライド上に滴下し、空気乾燥した。この細胞をモノクロナールp60抗体K317(1:200)で染色し、結合した抗体をそれに続きFITC標識した2次抗マウス血清(ディアノバ社、ドイツ、ワークタイター:1:40)で検出した。

【0036】

蛍光顕微鏡解析は、腸炎菌株SM6T/pBR322tolC::ListBの中のリステリア・モノサイトゲネス特異的エピトープの細胞外定位を確認した。

40

【0037】

(実施例5) グラム陰性菌による免疫試験および野生型リステリア・モノサイトゲネスによる感染後の保護免疫反応の解析

ネズミ科のリステリア症モデル中のリステリア・モノサイトゲネスのp60タンパク質由来のT細胞エピトープの露出發現が保護をもたらすか否かを検査するため、6週齢の8メスバルブ/c-マウス(チャールズ・リバー社、ズルツフェルト、ドイツ)を1×10<sup>7</sup>腸炎菌/pBR322tolC::ListBの用量で経口的に免疫した。対照のために5メスマウスを腸炎菌SM6Tで経口的に免疫した。これらの動物は3週間後同じ細菌用量で2回目の免疫をした。

50

## 【0038】

免疫の成果は第1回の免疫から5週間後リステリア・モノサイトゲネスの上清タンパク質を塗布した免疫プロットで検査した。ここで抗p60特異的抗体を腸炎菌/pBR322tolC::LisTBで免疫したマウスの血清で検出できた。

## 【0039】

第2回目の免疫より3週間後、この動物に $5 \times 10^4$ リステリア・モノサイトゲネスEGDを、5倍LD50で静脈接種した。腸炎菌/pBR322tolC::LisTBで免疫したバルブ/c-マウスにおける生存率がリステリア・モノサイトゲネスEGDで静脈接種後88%になったのに対し、対照グループにおける生存率はわずか20%であった。

10

## 【0040】

それによってp60特異的エピトープの発現はTolCの細胞外ループの内部で減弱した腸炎菌担体株SM6Tに、バルブ/c-マウスを一般的な致死感染に対して保護できたリステリア・モノサイトゲネス特異的免疫反応の誘導をもたらした。p60タンパク質由来のB細胞エピトープに対する抗体の誘導は、ウェスタン・プロット法で検出できたので、免疫反応が抗体の参加によってここで観察されたリステリア・モノサイトゲネスによるそれ以外は致死感染からマウスの保護を生ぜしめたことは想到容易である。

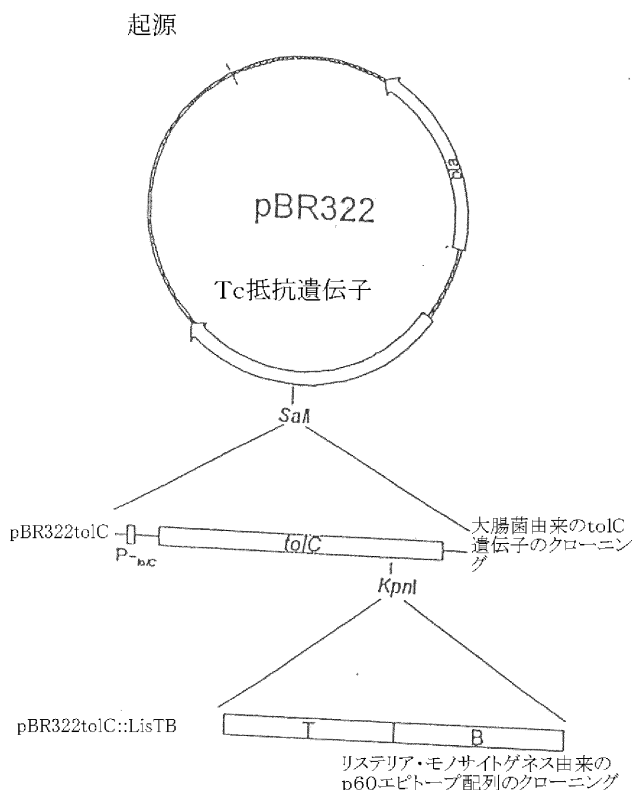
## 【図面の簡単な説明】

## 【0041】

【図1】ベクターpBR322上の野生型プラスミドコード大腸菌tolC遺伝子の中へp60特異的エピトープ配列の挿入のためのクローニング方式を示す。

20

## 【図1】



## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/DE 03/00469

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12R1/42 C12R1/19 C07K14/195 A61K39/02		
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 C12R C07K A61K		
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) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, CHEM ABS Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KORONAKIS V ET AL: "Crystal structure of the bacterial membrane protein TolC central to multidrug efflux and protein export." NATURE, vol. 405, no. 6789, 22 June 2000 (2000-06-22), pages 914-919, XP002246208 ISSN: 0028-0836 cited in the application figure 1C --- -/--	1-13
<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 2 July 2003		Date of mailing of the international search report 17/07/2003
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. 31 851 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Mandl, B

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/DE 03/00469

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	HORMAECHE C E ET AL: "SALMONELLA VACCINES: MECHANISMS OF IMMUNITY AND THEIR USE AS CARRIERS OF RECOMBINANT ANTIGENS" MOLECULAR AND CLINICAL ASPECTS OF BACTERIAL VACCINE DEVELOPMENT, 1995, pages 119-153, XP002054901 page 135, paragraph 2	1-13
A	GENTSCHEV I ET AL: "Development of antigen-delivery systems, based on the Escherichia coli hemolysin secretion pathway" GENE, vol. 179, no. 1, 7 November 1996 (1996-11-07), pages 133-140, XP002078662 ISSN: 0378-1119 cited in the application abstract	
A	GENTSCHEV I ET AL: "Delivery of protein antigens and DNA by virulence-attenuated strains of Salmonella typhimurium and Listeria monocytogenes" JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY, vol. 83, no. 1-2, 29 September 2000 (2000-09-29), pages 19-26, XP004212147 ISSN: 0168-1656 abstract	

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 03/00469

<b>A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES</b>		
IPK 7	C12R1/42	C12R1/19 C07K14/195 A61K39/02
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK		
<b>B. RECHERCHIERTE GEBIETE</b>		
Recherchiertes Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole )		
IPK 7 C12R C07K A61K		
Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)		
EPO-Internal, WPI Data, PAJ, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, CHEM ABS Data		
<b>C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN</b>		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Bez. Anspruch Nr.
Y	KORONAKIS V ET AL: "Crystal structure of the bacterial membrane protein TolC central to multidrug efflux and protein export." NATURE, Bd. 405, Nr. 6789, 22. Juni 2000 (2000-06-22), Seiten 914-919, XP002246208 ISSN: 0028-0836 in der Anmeldung erwähnt Abbildung 1C --- -/--	1-13
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen <input type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie		
* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist *E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist *T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist *X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden *Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist *&* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche		Absenddatum des internationalen Recherchenberichts
2. Juli 2003		17/07/2003
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HW Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Bediensteter  Mandl, B

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 03/00469

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Beir. Anspruch Nr.
Y	HORMAECHE C E ET AL: "SALMONELLA VACCINES: MECHANISMS OF IMMUNITY AND THEIR USE AS CARRIERS OF RECOMBINANT ANTIGENS" MOLECULAR AND CLINICAL ASPECTS OF BACTERIAL VACCINE DEVELOPMENT, 1995, Seiten 119-153, XP002054901 Seite 135, Absatz 2 ---	1-13
A	GENTSCHEV I ET AL: "Development of antigen-delivery systems, based on the Escherichia coli hemolysin secretion pathway" GENE, Bd. 179, Nr. 1, 7. November 1996 (1996-11-07), Seiten 133-140, XP002078662 ISSN: 0378-1119 in der Anmeldung erwähnt Zusammenfassung ---	
A	GENTSCHEV I ET AL: "Delivery of protein antigens and DNA by virulence-attenuated strains of Salmonella typhimurium and Listeria monocytogenes" JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY, Bd. 83, Nr. 1-2, 29. September 2000 (2000-09-29), Seiten 19-26, XP004212147 ISSN: 0168-1656 Zusammenfassung -----	

## フロントページの続き

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/21	
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53	D

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

(72) 発明者 スプレング, シモネ

スイス国 3 0 1 8 ベルン, プランナーストラーセ 5 9

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA80 CA02 CA07 CA09 DA05 DA06 DA09 EA04  
 HA11  
 4B065 AA01X AA01Y AA26X AA26Y AA42X AA46X AA55X AB01 BA02 CA24  
 CA44 CA46  
 4C085 AA03 BA15 BA21 CC07 CC32 DD62 EE01 GG01  
 4H045 AA10 BA10 BA40 CA11 EA60 FA74

专利名称(译)	编码含有异源氨基酸序列的TOLC的核苷酸序列		
公开(公告)号	<a href="#">JP2005517457A</a>	公开(公告)日	2005-06-16
申请号	JP2003569878	申请日	2003-02-13
[标]申请(专利权)人(译)	RAPP R ULF PROF DR		
申请(专利权)人(译)	MEDI新皇杰西少饮茶转变全Medijinisuche Inovashionen澳元科学院扫描椅子部队菊包装Emubie		
[标]发明人	ゴーベルワナー ジェントスチェブイヴァイロ スプレングシモネ		
发明人	ゴーベル,ワナー ジェントスチェブ,イヴァイロ スプレング,シモネ		
IPC分类号	G01N33/53 A61K39/00 A61K39/108 A61K39/112 A61P31/04 C07K14/195 C07K14/245 C12N1/21 C12N15/09 C12N15/31		
CPC分类号	C12R1/42 A61K2039/523 C07K14/195 C12R1/19		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K39/00.H A61K39/108 A61P31/04 C07K14/245 C12N1/21 G01N33/53.D		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA80 4B024/CA02 4B024/CA07 4B024/CA09 4B024/DA05 4B024/DA06 4B024/DA09 4B024/EA04 4B024/HA11 4B065/AA01X 4B065/AA01Y 4B065/AA26X 4B065/AA26Y 4B065/AA42X 4B065/AA46X 4B065/AA55X 4B065/AB01 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA46 4C085/AA03 4C085/BA15 4C085/BA21 4C085/CC07 4C085/CC32 4C085/DD62 4C085/EE01 4C085/GG01 4H045/AA10 4H045/BA10 4H045/BA40 4H045/CA11 4H045/EA60 4H045/FA74		
优先权	10208175 2002-02-20 DE		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本发明涉及编码TolC和某些氨基酸序列的几种核苷酸序列的用途，所述某些氨基酸序列插入TolC的许可跨膜区及其用途，特别是细菌如核苷酸序列上。

