

(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2005-519872
(P2005-519872A)

(43) 公表日 **平成17年7月7日(2005.7.7)**

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 39/112	A 6 1 K 39/112 Z N A	4 B O 2 4
A 6 1 P 31/04	A 6 1 P 31/04	4 C O 8 5
// C 1 2 N 15/09	A 6 1 P 31/04 1 7 1	
	C 1 2 N 15/00 A	

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 29 頁)

(21) 出願番号	特願2003-543621 (P2003-543621)	(71) 出願人	502167267
(86) (22) 出願日	平成13年11月12日 (2001.11.12)		ファルマシア アンド アップジョン カンパニー リミティド ライアビリティーカンパニー
(85) 翻訳文提出日	平成16年7月8日 (2004.7.8)		アメリカ合衆国, ミシガン 49001, カラマズー, ヘンリエッタ ストリート 301
(86) 国際出願番号	PCT/IB2001/002127	(74) 代理人	100081422
(87) 国際公開番号	W02003/041734		弁理士 田中 光雄
(87) 国際公開日	平成15年5月22日 (2003.5.22)	(74) 代理人	100106231
(81) 指定国	AP (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, 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, DE, 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, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW	(72) 発明者	デイビッド・イー・ローワリー
			アメリカ合衆国49024 ミシガン州ポーテッジ、ウッドランド・ドライブ1207番
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 サルモネラ・ワクチン

(57) 【要約】

不活性化された病原性遺伝子を含む弱毒化変異株サルモネラ菌が、ワクチン中の使用のために提供される。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

免疫学的保護量の第一の弱毒化された、不活性化waaK遺伝子を含む非復帰性変異株サルモネラ菌を含むワクチン組成物。

【請求項 2】

該waaK遺伝子とその遺伝子のコード領域の一部分の欠失により不活性化された請求項 1 記載のワクチン組成物。

【請求項 3】

該waaK遺伝子が挿入性突然変異により不活性化された請求項 1 記載のワクチン組成物。

【請求項 4】

不活性化遺伝子が、
(a) 配列番号： 1 に記載のwaaK遺伝子；
(b) 配列番号： 1 の非コード相補体にハイブリダイズする全長ヌクレオチド配列、および
(c) 配列番号 1 に対して 95 % 配列同一性を有する全長サルモネラヌクレオチド配列よりなる群から選択される請求項 1 記載のワクチン組成物。

10

【請求項 5】

1 以上の病原性遺伝子が不活性化された第二の弱毒化変異株サルモネラ菌をさらに含む請求項 4 記載のワクチン組成物。

【請求項 6】

第一および第二の該変異株サルモネラ菌が異なる血清型からのものである請求項 5 記載のワクチン組成物。

20

【請求項 7】

該サルモネラ菌がサルモネラ _____ である請求項 5 記載のワクチン組成物。

【請求項 8】

該サルモネラ菌が血清型 A、B、C₁、C₂、D₁ または E₁ のいずれかからのものである請求項 5 記載のワクチン組成物。

【請求項 9】

該第一の弱毒化変異株サルモネラ菌が、非サルモネラポリペプチドをコードするポリペプチドをさらに含む請求項 1 記載のワクチン組成物。

30

【請求項 10】

哺乳動物に感染防御免疫を与える方法であって、不活性化waaK遺伝子を含む免疫学的保護量の弱毒化された非復帰性変異株サルモネラ菌を含むワクチン組成物を該動物に投与する工程を含むことを特徴とする該方法。

【請求項 11】

該免疫学的保護量の該弱毒化細菌が、死亡率、症候性下痢、身体状態またはミルク生産における改善を供する請求項 10 記載の方法。

【請求項 12】

該遺伝子が、waaK遺伝子のコード領域の一部分の欠失により不活性化された請求項 10 記載の方法。

40

【請求項 13】

該哺乳動物が、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ウマ、ブタ、家禽および他のトリ、ネコ、イヌおよびヒトよりなる群から選択される請求項 10 記載の方法。

【請求項 14】

該動物がブタである請求項 10 記載の方法。

【請求項 15】

該動物がウシである請求項 10 記載の方法。

【請求項 16】

ポリペプチド抗原を動物に送達する方法であって、請求項 4 記載のワクチン組成物を該動物に投与する工程を含むことを特徴とする該方法。

50

【発明の詳細な説明】

【発明の詳細な説明】

【0001】

発明の分野

本発明は、一般的に、生ワクチンとして有用である遺伝子操作したサルモネラに関する。

【0002】

発明の背景

サルモネラ菌により惹起される疾患は、ヒトおよび動物における緩和で、自己限定的な下痢ないし重篤な胃腸および敗血性の疾患の範囲にある。サルモネラは、非孢子形成性であるグラム陰性の、ロッド (rod) 型の運動性細菌 (非運動性の例外には、*S.gallinarum* および *S. pullorum* が含まれる) である。その微生物の環境源 (environmental source) には、水、土壌、昆虫、工場表面 (factory surface)、台所表面、動物の糞便、生肉、生鶏肉および生魚介類が含まれる。

10

【0003】

サルモネラ感染は、動物、特に、家禽およびブタにおいて広範囲に発生し、食品製造用の動物に影響する腸および敗血性の疾患の最も経済的に有害なものの一つである。多数の血清型のサルモネラが動物から単離されているが、*S. choleraesuis* および *S. typhimurium* がブタにおける臨床的なサルモネラ症と関連した2つの最も頻繁に単離される血清型である。ブタにおいて、*S. typhimurium* は、典型的には、腸疾患を惹起するが、(ブタに宿主適合した) *S. choleraesuis* は、しばしば、消化管の関与がほとんどない致死的な敗血性疾患の病原学的な病因である。*S. dublin* および *S. typhimurium* は、ウシにおいて共通した感染原因であり；それらのうちの *S. dublin* は、ウシに対して宿主適合性であって、しばしば致死的な敗血性疾患の病原学的病原体となる。*S. gallinarum* および *S. pullorum* のごとき他の血清型は、鳥類および他の種においてサルモネラ症の重要な病原学的な病原体である。これらの血清型は動物に主に感染するが、*S. dublin* および *S. choleraesuis* はしばしばヒト疾患も惹起する。

20

【0004】

種々のサルモネラ種は、卵黄の内側に一樣に存在し得る *S. enteritidis* を含めて卵殻の外側から単離されている。それは、その卵黄中の微生物 (organism) の存在が、殻沈積に先立つ雌鳥の感染層からの感染のためであることを示唆する。また、卵以外の食物は、ヒトにおいて *S. enteritidis* 疾患の発生を引き起こした。

30

【0005】

S. typhi および *S. paratyphi* A、B および C は、ヒトにおける腸チフスおよび腸チフス様発熱を引き起こす。サルモネラでの初期感染は、典型的には、胃腸管を通して惹起されるが、腸チフスはその宿主を通して広がる全身性疾患であり、多臓器部位に感染できる。腸チフスの致死率は、(大部分の形態のサルモネラ症での1%未満に比較して) 10%の高さであり得る。*S. dublin* は、高齢者においてその微生物が敗血症を引き起こす場合には15%の死亡率を有し、*S. enteritidis* は、病院/ナーシングホーム発生で約3.6%の死亡率を有し、高齢者が特に発症する。

【0006】

多数の試みが、様々なワクチンを用いた免疫によりヒトおよび動物を保護するためになされてきた。多数のワクチンは、保護を緩和するのに貧弱さを供し、完全に効果的である高用量を必要としている。従前に用いられたサルモネラおよび他の感染性病原体に対するワクチンは、4つのカテゴリー：(i) 細胞画分または細胞可溶化物、無傷の抗原、その断片、あるいは天然に発生する抗原またはエピトープの合成アナログを含めた病原学的な病原体からの特異的成分 (しばしば、サブユニットワクチンといわれる)；(ii) 抗イデオタイプ抗体；(iii) 全死滅病原学的病原体 (しばしば、死菌ワクチンといわれる)；または (iv) 生ワクチンとして用いる病原学的病原体の非病原性 (弱毒化) 誘導体に一般的に分類される。

40

【0007】

50

文献における報告では、弱毒化生ワクチンが、感染防御免疫 (protective immunity) を誘導するために死菌ワクチンまたはサブユニットワクチンより有効であることが示されている。これにも拘わらず、高用量の生ワクチンが、しばしば、有効性のために必要とされ、生 - 弱毒化サルモネラワクチンはほとんど商業的に利用されていない。理想的には、有効な弱毒化生ワクチンは、重篤な疾患を惹起せずその宿主に感染する能力を保持し、かつ病原性細菌によっていずれかのさらなる感染に対して抵抗性を提供するのに十分な体液性 (抗体ベースの) 免疫および細胞性免疫も刺激できる。

【 0 0 0 8 】

いくつかの弱毒化戦略は、サルモネラを非病原性とさせるために用いられてきた [Cardeñasら, *Clin Microbial Rev.* 5:328-342 (1992); Chatfieldら, *Vaccine* 7:495-498 (1989); Curtiss, in Woodrowら, eds., *New Generation Vaccines*, Marcel Dekker, Inc., New York, p. 161 (1990); Curtissら, in Kohlerら, eds., *Vaccines: new concepts and developments. Proceedings of the 10th Int'l Convocation of Immunology*, Longman Scientific and Technical, Harlow, Essex, UK, pp. 261-271 (1987); Curtissら, in Blankenshipら, eds., *Colonization control of human bacterial enteropathogens in poultry*, Academic Press, New York, pp. 169-198 (1991)]。これらの戦略には、温度感受性変異株 [例えば、Germanierら, *Infect Immun.* 4:663-673 (1971)]、芳香族性でかつ栄養要求性の変異株 (例えば、-aroA, -asd, -cys, or -thy [Galanら, *Gene* 94:29-35 (1990); Hoisethら, *Nature* 291:238-239 (1981); Robertssonら, *Infect Immun.* 41:742-750 (1983); Smithら, *Am J Vet Res.* 45:59-66 (1984); Smithら, *Am J Vet Res.* 45:2231-2235 (1984)])、プリンまたはジアミノピメリン酸合成において欠損する変異株 (例えば、purおよび dap [Clarkeら, *Can J Vet Res.* 51:32-38 (1987); McFarlandら, *Microb Pathog.* 3:129-141 (1987); O'Callaghanら, *Infect Immun.* 56:419-423 (1988)])、炭水化物の利用または合成において変更された株 (例えば、galE [Germanierら, *Infect Immun.* 4:663-673 (1971); Honeら, *J Infect Dis.* 156:167-174 (1987)])、リポ多糖を合成する能力において変更された株 (例えば、galE, pmi, rfa) または 1 以上の病原性遺伝子中に突然変異を持つ株 (例えば、invA) ならびに包括的な遺伝子発現において変更された変異株 (例えば、-cya, -crp, ompR または -phoP [Curtiss (1990), 前記; Curtissら (1987), 前記; Curtissら (1991)], 前記) の使用が含まれる。

【 0 0 0 9 】

加えて、ランダム突然変異誘発手法を用いて、動物モデルにおいて感染中に発現した病原性遺伝子が同定されてきている。例えば、Signature-Tagged Mutagenesis (STM) のごとき、様々なアプローチを用いて、ランダム突然変異誘発が細菌に対して実施され、動物モデルまたは組織培養系におけるその変異株を評価する [米国特許第 5,876,931 号参照]。

【 0 0 1 0 】

しかしながら、発表された報告書では、これらおよび他の方法によりサルモネラを弱毒化するための試みが、成功割合の変動に導くことが示され、病原性および免疫原性の双方において差を示す [Chatfieldら, *Vaccine* 7:495-498 (1989); Clarkeら, *Can J Vet Res.* 51:32-38 (1987); Curtiss (1990), 前記; Curtissら (1987), 前記; Curtissら (1991), 前記]。安全でかつ効果的な生ワクチンを提供するための弱毒化方法を用いる従前の試みは、多数の問題に遭遇してきた。

【 0 0 1 1 】

最初に、病原性における部分的または完全な低下を呈するサルモネラの弱毒化株は、ワクチンとして与えられる場合に感染防御応答を誘導する能力を保持できない。例えば、UD P-ガラクトースエピメラーゼ活性を欠く *S. typhimurium* の aroA 変異株および galE 変異株がマウスにおいて免疫原性であることが判明し [Germanierら, *Infect Immun.* 4:663-673 (1971), Hohmannら, *Infect Immun.* 25:27-33 (1979); Hoisethら, *Nature*, 291:238-239 (1981); Honeら, *J. Infect Dis.* 156:167-174 (1987)]、一方、*S. typhimurium* の asd, thy および pur 変異株では判明していない [Curtissら (1987), 前記, Nnalue た, *Infect Immun.* 55: 955-962 (1987)]。それにも拘わらず、これらの全ての株は、野生型の親

株でマウスを殺すのに十分な用量にて経口または非経口的に与える場合にマウスにつき弱毒化された。同様に、*S. choleraesuis*の *aroA*、*asd*、*thy*および *pur*変異株は、マウスにおいて非病原性であり、*aroA*変異株だけが十分に非病原性であったが、生ワクチンとして有効なものはなかった [Nnalueら, *Infect Immun.* 54:635-640 (1986); Nnalueら, *Infect Immun.* 55:955-962 (1987)]。

【0012】

第2に、*phoP*、*phoP crp*、*[crp-cdt]* *cya*、*crp cya*において突然変異を運ぶ *S. dublin* の弱毒化株は、ウシではなく、マウスにおいて免疫原性であることが判明した [Kennedyら, *Abstracts of the 97th General Meeting of the American Society for Microbiology* . B-287:78 (1997)]。同様に、遺伝子 *aroA* に影響する欠失を持つ *S. dublin* のもう一つの株の SL5631 は、マウスにおける異種チャレンジ株への致死性チャレンジに対して高度に保護的であったが [Lindbergら, *Infect Immun.* 61:1211-1221 (1993)]、ウシでは高度に保護的ではなかった [Smithら, *Am J Vet Res.* 54:1249-1255 (1993)]。

10

【0013】

第3には、単一遺伝のみに突然変異を含む遺伝子改変されたサルモネラ株は、自然発生的に変異でき、その病原性状態に「反転する」ことができる。2以上の遺伝子中の突然変異の導入は、組換えによる病原性の回復に対して高度なレベルの安全性を提供する傾向にある [Tacketら, *Infect Immun.* 60:536-541 (1992)]。しかしながら、二重または複数の遺伝子破壊の使用は、病原性および免疫原性に対するその効果を予測不可能とし；複数の突然変異の導入は特定の宿主について細菌を過剰に弱毒化し得る [Lindeら, *Vaccine* 8:278-282 (1990); Zhangら, *Microb. Pathog.*, 26 (3):121-130 (1999)]。

20

【0014】

本発明は、その病原性を全てまたは一部分の *waaK* (以前は、*rfaK*) 遺伝子の破壊または欠失により弱毒化されるサルモネラ細胞に関する。サルモネラ *waaK* 遺伝子に対するホモログは、*Neisseria meningitidis* *rfaK* 遺伝子を含めたいくつかのグラム陰性菌において発見され (Rahmanら, *Glycoprotein* 11 :703-709.2001)、*N. meningitidis* リポ多糖 (LOS) 蛋白質の適切な組み立てに關与する *N*-アセチルグルコサミン転移酵素につき暗号化することが示された。*N. meningitidis* のその *rfaK* 遺伝子と同様に、サルモネラ *waaK* 遺伝子は、LOS蛋白質より構造的に異なるグラム陰性菌リポ多糖 (LPS) の適切な組み立てにおいて役割を演じるようである。

30

【0015】

現在まで、大部分のサルモネラワクチンは、典型的には血清型に特異的な強力な保護を与えるが、サルモネラの異なる血清型に対して限定された保護を提供するか、あるいは交差保護を提供しない。サルモネラの多数の血清型に共通し、かつ細菌の病原性に必要な遺伝子において破壊を示す本発明は、サルモネラ血清型および可能な他のグラム陰性の腸内細菌病原体にわたる広範囲の交差保護ワクチンを提供できる。本特許出願に概説された細菌よりなるワクチンは抗原またはDNAの送達用のベクターとしてサルモネラのごとき他の用途を与え得る。

【0016】

理想的には非常に高用量にて投与される必要がないより安全でかつ有効な弱毒化生ワクチンについて存在する要求が継続している。また、本発明は、腸内細菌科、特に、サルモネラ属に属する様々なグラム陰性病原体に対する家禽および哺乳動物のワクチン接種用のかかる弱毒化菌ワクチンを含むワクチンを要旨とする。

40

【0017】

発明の簡単な概要

本発明は、弱毒化変異株グラム陰性菌の1以上の株を使用する安全でかつ有効なワクチンに關し、ここに、サルモネラ *waaK* (以前は、*rfaK*) の遺伝子に相同性の1以上の遺伝子は、好ましくは、その遺伝子の約5%ないし約100%の欠失により、最も好ましくは、その遺伝子の約50%以上の欠失により不活性化された。特に検討されるのは、弱毒化変異株サルモネラ菌の1以上の種を含むワクチンであり、ここに、*waaK* に相同性の1以上の遺

50

伝子、好ましくは、2以上の遺伝子が不活性化された。また、本発明により検討されるのは、病原性遺伝子への挿入により生成された突然変異である。好ましい具体例において、特に、waaK遺伝子は、その変異株細菌中で不活性化された。好ましくは、本発明のワクチン組成物は、不活性化遺伝子が以下：

a) 配列番号：1：

【0018】

【化1】

```
ctcaatcact tatcaaacca gtttttcatt tgttcctcga aacgctgctc tacatcttcc
caactgtatt ttgaaaacac cagggatttt gctttttcgg caatctggtg gcgttcotta
tcagcaagcg cacgggttaat atcattaatt atactgtcgc tcgacatagg ttctgcgagg
tgatagcccg ttatgccatc taacacaaat tcgctaatac cccctttttt gctggcaaga
accgcttttc ctgctgccat cgcttctaca gccaccatgc aaaatgcttc ttcaacctga
gatggcacia taaccagatc ggctatatga tagaagttat gcatctggtc aggagattgc
ccccagcca taatacaatc cgttccaatc tcttttgagg cgtccagtac tttcttttga
tactctgctt tttcaccett gcggcttgca taagggctgc caacaacgac aagtttaata
ttacttttta aggtacgtaa ttgtttgaac gcctgcaaaa gcaacaggat gcctttatca
ggcgaaattc tcccggcata caagagaacg gtggcatctt ccgcaatatt taattgctga
cgaagattat cttgtgggtt tcttttataa gtctcagcac aaaaaccatt aggcacaata
ctaacagcag cggcgggcaa tctttcttca taaaacgctt taagaaactg actgggcacg
ataatctttg catcattatc aggaagttct ggttcaaagt cattatgcat gtgcataacc
agttttgcat tcggattgcg ctctctgatc tgccgatata gtttcatact attatgaata
acaatgacgc tatcttctcg ggtagtcact ttatctctaa tattaaggat gcgctgggaa
tagggtagtg ggtcgagacg agtccatttc tgaaaaagac gcttataaac tttactaac
ccgatgtaat gaatatcaca gttatcgttt attttattat attcaggata gccagcattc
tttatacaag caatagcatt cggatttgat agtcgttttg caacctggta aatccagggt
tctaccgcag ccgcaccacg aggaggaatt gaaaatatag gagtaacagt aatatgatt
tttttaataca taatagctat aatcc
```

10

20

【0019】

30

に記載のwaaK遺伝子

b) 配列番号：1の非コード相補体にハイブリダイズする全長ヌクレオチド配列および

c) 配列番号：1に対して95%の配列同一性を有する全長サルモネラヌクレオチド配列よりなる群から選択されるワクチンを含む。

【0020】

本発明は、ウシおよびブタを含めた齧歯類以外の動物種における1を超える血清型のサルモネラを含有するワクチンを含めたこれらのワクチンの広範囲な安全性および効力の結果に基づいている。

40

【0021】

本発明の一つの態様により、ワクチン組成物は、免疫学的保護量の第一の弱毒化された変異株サルモネラ菌を含むワクチン組成物が提供され、ここに、1以上のwaaK遺伝子は不活性化される。一つ具体例において、その遺伝子は、waaKよりなる群から選択される。適当な量は変化し、約 10^9 個以下の細菌を含み得る。これらの突然変異株細菌において、(複数の)不活性化された遺伝子は、好ましくは、その遺伝子のコード領域の一部分の欠失により不活性化される。別法として、不活性化は、挿入性の突然変異により影響される。いずれかの種のサルモネラ菌、特に、*S. enterica*亜種およびサブタイプは、血清型A、B、C₁、C₂、D₁およびE₁からのサルモネラを含めて、本発明により突然変異できる。全てのそのサルモネラ血液型亜型は、2つの種：*S. bongori*および*S. enterica*

50

に属する。S. entericaの6つの亜種は：S. enterica亜種enterica (Iもしくは1)、S. enterica亜種salamae (IIもしくは2)、S. enterica亜種arizona (III aもしくは3 a)、S. enterica亜種diarizonae (III bもしくは3 b)、S. enterica亜種houtenae (IVもしくは4)、S. enterica亜種indica (VIもしくは6)である。例示的な亜種には：S. Choleraesuis、S. Typhimurium、S. Typhi、S. Paratyphi、S. Dublin、S. Enteritidis、S. Gallinarum、S. Pullorum、Salmonella Anatum、Salmonella Hadar、Salmonella Hamburg、Salmonella Kentucky、Salmonella Miami、Salmonella Montevideo、Salmonella Ohio、Salmonella Sendai、Salmonella Typhisuisが含まれる。

【0022】

2以上の病原性遺伝子は、変異株サルモネラ菌において不活性化でき、そのうち少なくとも1つの遺伝子はwaaK遺伝子である。 10

【0023】

好ましくは、第一および第二の変異株サルモネラ菌は、異なる血清型のものである。ウシでは、S. dublinおよびS. typhimuriumの双方を含むワクチンが好ましい。

【0024】

また、本発明は、本発明のワクチン組成物を投与することにより動物を免疫する、すなわち、動物に感染防御免疫を与える方法を提供し、ここに、その免疫学的保護量の弱毒化細菌は死亡率、症候性下痢 (symptomatic diarrhea)、身体状態またはミルク生産において改善を供する。本発明は、さらに、感染中に排出する細菌の量または期間を低下させるのに十分な量にて本発明のワクチンを投与することにより感染の伝染を低下する方法を提供する。かかるワクチンの適当な受容者である動物には、限定されるものではないが、ウシ、ヒツジ、ウマ、ブタ、家禽および他のトリ、ネコ、イヌおよびヒトが含まれる。本発明の方法は、本発明のいずれかのワクチン組成物に利用し、好ましくは、ワクチンは、その遺伝子の一部分を欠失することによるか、あるいは別法として挿入性突然変異によるかのいずれかにより1以上のwaaK遺伝子を不活性化した、有効量の弱毒化した非復帰性 (non-reverting) 変異株サルモネラ菌を含む。 20

【0025】

本発明のもう一つの態様により、弱毒化変異株サルモネラ菌は、さらに、非サルモネラポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含み得る。かくして、突然変異細菌またはその突然変異細菌を含むワクチン組成物の投与は、免疫原性ポリペプチド抗原を動物に送達する方法を提供する。 30

【0026】

本発明の多数のさらなる態様および有利さは、現在その好ましい具体例を記載する以下の発明の詳細な記載の考慮に際して当業者に明らかとなるであろう。

【0027】

発明の詳細な記載

本発明は、1以上の病原性遺伝子、特にそのwaaK遺伝子が欠失された1以上の種の弱毒化変異株サルモネラ菌を含むワクチンまたは免疫原性組成物を提供する。本発明のワクチンの有利さは、その生の弱毒化変異株細菌が適当な量のワクチンとして、様々な異なる経路を介して投与でき、ワクチン接種された動物において、依然として感染防御免疫を誘導することにある。もう一つの有利さは、2つの異なる遺伝子中に不活性化を含む変異株細菌が非復帰性であるか、あるいは少なくとも病原性状態へ反転しそうにないことにある。 40

【0028】

反転のリスクは、細菌を複数回 (例えば、5継代) 継代し、次いで、得られた細菌を動物に投与することにより評価できる。非復帰性変異株は、弱毒化であり続けるであろう。

【0029】

本明細書中の例は、そのwaaK遺伝子の不活性化または欠失の結果、野生型細菌による感染に関連付けられる有害な兆候および症状における観察可能な低下により示される安全で有効なワクチンを生じることが示す。本発明の例示的なワクチンは、生の弱毒化細菌、例えば、SalmoShield^R TD (Grand Laboratories, Inc.) および cyaA crp 突然変異 (378 50

1)を含めた変異株サルモネラ菌を含む他のワクチンに比較して優れた感染防御免疫を与えることが示された。

【0030】

*S. typhimurium*からのwaaKのヌクレオチド配列は、配列番号：1に記載される。本明細書に用いた「waaK」には、配列番号：1およびそれと等価な他のサルモネラ種、例えば、ストリンジェントな条件下の配列番号：1の非コード相補体にハイブリダイズする全長サルモネラヌクレオチド配列（例えば、Sheaら、Proc.Nat'l. Acad. Sci. USA, 93:2593-2597 (1996)の図4中に記載され、ここに出典明示して本明細書の一部とみなす）、ならびに配列番号：1または2に90%配列同一性を有する全長サルモネラヌクレオチド配列が含まれる。サルモネラ種等価体は、当業者により容易に識別でき、例えば、配列番号：1に90%、95%、98%および99%の同一性を持つヌクレオチド配列も含む。

10

【0031】

また、本発明は、他のグラム陰性菌中の等価な遺伝子（例えば、80%を超える相同性）が有効なワクチンを提供するために単に不活性化できることを考える。

【0032】

本明細書に用いた「不活性化」遺伝子は、その突然変異がコードされた遺伝子産物の発現および/または生物学的な活性を阻害または消滅させるように、その遺伝子が、ヌクレオチド配列の挿入、欠失または置換により突然変異したことを意味する。その突然変異はその遺伝子またはそのmRNAの転写または翻訳に影響することを通して作用できるか、あるいは、その突然変異はそれを不活性とさせるように、そのポリペプチド遺伝子産物自体に影響できる。

20

【0033】

好ましい具体例において、不活性化は、欠失突然変異が、その変異株が病原性状態に復帰するであろうリスクを低下させるために、その遺伝子のコード領域の一部分の欠失により運ばれる。例えば、いくらかの、大部分（例えば、半分以上）または事実上全てのそのコード領域を欠失できる（例えば、約5%ないし約100%のその遺伝子、好ましくは約20%以上のその遺伝子、最も好ましくは、約50%以上の遺伝子を欠失し得る）。別法として、その突然変異は、オープン・リーディング・フレーム中のフレームシフトを引き起こし、今度は、コード化されたポリペプチドの中途の終止または完全に不活性なポリペプチドの発現を引き起こす単一のヌクレオチドでさえ挿入または欠失できる。また、突然変異は、外来遺伝子配列の挿入、例えば、抗生物質耐性をコードする遺伝子の挿入を通して生成できる。

30

【0034】

欠失変異株は、当該技術分野においてよく知られ、ルーチン的に実施されるいずれかの多数の手法を用いて構築できる。一例において、多数の細菌中の遺伝子を欠失させるのに一般的に利用されるカウンター選択可能（counterselectable）なマーカーを用いる戦略が使用できる。総説については、例えば、Reyratら、Infection and Immunity 66:4011-4017 (1998)（ここに出典明示して本明細書の一部とみなす）を参照されたい。この手法において、選択可能およびカウンター選択可能なマーカーの双方をコードし、所望の欠失の両側から由来するフランキングDNA配列を持つプラスミドが構築される二重選択戦略がしばしば使用される。その選択可能なマーカーを用いて、そのプラスミドが適当な位置および方法でゲノムに組み込まれた細菌につき選択する。そのカウンター選択可能なマーカーを用いて、組み込まれたプラスミドを自然に消失させた非常に小さなパーセントの細菌について選択する。次いで、これらの細菌の画分は、他の外来性DNAが存在しないその所望の欠失のみを含むであろう。この手法の使用に対する鍵は、適当なカウンター選択可能なマーカーの入手可能性である。

40

【0035】

もう一つの手法において、そのcre-lox系をDNAの部位特異的な組換えに用いる。その系は、細菌creリコンビナーゼ遺伝子により認識される34塩基対のlox配列よりなる。そのlox部位がそのDNA中で適当な配向にて存在するならば、そのlox部位により隣接し

50

て挟まれたDNAは、そのcreリコンビナーゼにより切り取られる結果、そのlox配列の一つの残存するコピーを除いて全配列を欠失するであろう。標準的な組換え技術を用いて、サルモネラゲノム中の注目する標的遺伝子を欠失させ、次いで、それを、lox部位により隣接して挟まれる選択的なマーカー（例えば、カナマイシン耐性をコードする遺伝子）で置換することができる。そのcreリコンビナーゼのサルモネラ中で機能するプロモーターの制御下のそのcre遺伝子を含む自殺プラスミド（suicide plasmid）のエレクトロポレーションによる一過性発現の結果、そのloxで隣接して挟まれたマーカーが有効に消失するであろう。このプロセスは、所望の欠失突然変異および1コピーのlox配列を含む変異株を生じるであろう。

【0036】

10

もう一つのアプローチにおいて、緑色蛍光タンパク質(GFP)、 β -ガラクトシダーゼまたはルシフェラーゼのごときマーカー遺伝子を持つサルモネラゲノム中の所望の欠失された配列を直接的に置換できる。この手法において、所望の欠失を隣接するDNA断片はPCRにより調製され、サルモネラについての自殺（非置換の）ベクターにクローニングされる。サルモネラ中で活性なプロモーターおよび適当なマーカー遺伝子を含む発現カセットを、そのフランキング配列間でクローニングする。そのプラスミドを野生型サルモネラに導入する。そのマーカー遺伝子を（おそらく、非常に低頻度にて）組み込み次いで発現する細菌を単離し、適当な組換え事象（すなわち、そのマーカー遺伝子での野生型遺伝子の置換）について評価する。

【0037】

20

修飾された株をワクチン処方において有効とするために、その弱毒化は、その病原体が重篤な臨床症状を起こすのを防止するのにかなり十分でなければならないが、また、その受容者においてその細菌の限定された複製および増殖を可能とするのに不十分でなければならない。その受容者は、サルモネラまたは他の病原性微生物の病原性形態により惹起された疾患からの保護を必要としている対象である。免疫されるべき対象は、ヒトまたは他の哺乳動物もしくは動物、例えば、ウシ、ヒツジ、ブタ、ウマ、ヤギおよび家禽（例えば、ニワトリ、七面鳥、カモおよびガチョウ）を含めた家畜ならびにイヌおよびネコのごとき伴侶動物；外来および/または動物園の動物であり得る。齧歯類および非齧歯類の動物の双方の免疫が考えられる。

【0038】

30

弱毒化変異株細菌の「免疫学的保護量」は、野生型サルモネラ菌での感染により惹起された有害な健康への影響またはその合併症を含めた疾患の兆候または症状を防止または緩和するのに適当である受容者において免疫学的応答を誘導するのに有効な量である。液性免疫もしくは細胞性免疫または双方のいずれかを誘導できる。ワクチン組成物に対する動物の免疫応答は、例えば、野生型株でのチャレンジ後の抗体力価の測定、リンパ球増殖アッセイを通して間接的に、あるいは兆候および症状をモニターすることを通して直接的に評価できる。

【0039】

ワクチンにより与えられた感染防御免疫は、例えば、死亡率、罹患率、体温数、および対象の下痢日数の%、ミルク生産および収量、平均毎日体重増加 $[ADG = (\text{接種体重} - \text{ワクチン接種体重}) / (\text{接種日} - \text{ワクチン日})]$ 、身体状態および全般的健康および行動のごとき臨床的兆候における低下を測定することにより評価できる。

40

【0040】

2以上の異なる血清型の細菌の組合せを投与する場合、宿主が、投与された2以上の血清型のうちの一つに対する感染防御免疫応答を発生するのを防止しないように、その血清型間にほとんどまたは全く干渉がないことが高度に望ましい。干渉は、例えば、一つの株が宿主において優位を占めるならば、他の株に対する保護的免疫応答の発生から宿主を防止または限定する点まで上昇できる。あるいは、一つの株は、その他の株を直接的に阻害できる。

【0041】

50

また、その受容者を免疫することに加えて、本発明のワクチンは、その受容者の成長を促し、および/または受容者の免疫をブーストし、および/または受容者の全般的な健康状態を改善できる。本発明のワクチンまたは細菌産物の成分は、免疫系の態様を阻害または増強できる免疫調節物質として作用できる。例えば、本発明のワクチンは、その宿主に全般的な正の利益を有するサイトカインを補充する経路を伝達できる。

【0042】

また、本発明のワクチンは、感染した動物による病原性細菌の排出を低下させることにより獣医学的およびヒトの地域医療 (community health) 利益を提供する。排出されるべき細菌負荷 (細菌の量、例えば、CFU/ml 糞便) または排出期間 (例えば、排出日数の%数) のいずれか、または双方を低下できる。好ましくは、排出負荷は、ワクチン接種していない動物と比較して約10%以上、好ましくは20%以上低下させ、および/または排出期間を少なくとも1日、またはより好ましくは、2または3日まで10%以上または20%以上低下させる。

10

【0043】

本発明の弱毒化細菌を単独にて投与できるが、1以上のかかる変異株細菌は、好ましくは、適当な医薬上許容される (複数の) 賦形剤、(複数の) 希釈剤、(複数の) アジュバントまたは (複数の) 担体と組み合わせて投与される。その (複数の) 担体は、本発明の弱毒化変異株細菌と適合性がある意味で「許容でき」、免疫されるべき対象に有害であってはならない。典型的には、その担体は、無菌およびパイロジェンフリーであろう水およびセーラインであろう。

20

【0044】

フロイント完全アジュバントおよびフロイント不完全アジュバント、ミコール酸塩ベースのアジュバント (例えば、トレハロースジミコレート)、細菌リポ多糖 (LPS)、ペプチドグリカン (すなわち、ムレイン、ムコペプチド、またはN-Opaca、ムラミルジペプチド [MDP] もしくは MDP アナログのごとき糖タンパク質)、プロテオグリカン (例えば、Klebsiella pneumoniae から抽出)、連鎖球菌の調製物 (例えば、OK432)、BiostimTM (例えば、01K2)、EP 109 942、EP 180 564 および EP231 039 の「Iscoms」、水酸化アルミニウム、サポニン、DEAE-デキストラン、中性油 (例えば、ミグリオール (miglyol)、植物油 (例えば、ラッカセイ油)、リポソーム、Pluronic^R ポリオール、そのRibiアジュバント系 (例えば、GB-A-2 189 141 参照)、またはインターロイキン、特に、細胞性免疫を刺激するものを含めた当該技術分野において知られているいずれのアジュバントもワクチン組成物中で用いることができる。その放線菌目における細菌属の Amycolata の抽出物よりなる別法のアジュバントは、米国特許第4,877,612号に記載されている。加えて、専売のアジュバント混合物が商業的に入手可能である。用いたアジュバントは、部分的にその受容生物に依存するであろう。投与されるアジュバントの量は、動物のタイプおよびサイズに依存するであろう。最適な用量はルーチン的な方法により容易に決定できる。

30

【0045】

そのワクチン組成物は、医薬のビヒクル、賦形剤または媒体として機能するワクチン適合性の医薬上許容される (すなわち、無菌でかつ非毒性の) 液体、半固体または固体の希釈剤が含まれ得る。当該技術分野において知られたいずれの希釈剤も用いることができる。例示的な希釈剤には、限定されるものではないが、ポリオキシエチルソルビタンモノラウレート、ステアリン酸マグネシウム、ヒドロキシ安息香酸メチルおよびヒドロキシ安息香酸プロピル、タルク、アルギン酸塩、デンプン、ラクトース、スクロース、デキストロース、ソルビトール、マンニトール、アラビアガム、リン酸カルシウム、鉱油、カカオ脂およびシオプローマの油が含まれ得る。

40

【0046】

ワクチン組成物は、送達に都合のよい形態にて包装できる。その組成物は、カプセル、カプレット、サテエ (sachet)、カシエ、ゼラチン、紙および他の容器内に入れられる。受容生物への免疫原性組成物の移行と適合する場合、特に、免疫原性組成物が単一用量形態にて送達される場合にこれらの送達形態は好ましい。その用量単位は、例えば、錠剤、

50

カプセル剤、坐剤またはカチュエ剤に詰めることができる。

【0047】

ワクチン組成物は、例えば、静脈内、皮内、筋肉内、乳房内、腹腔内または皮下注射；経口、経皮、鼻腔内、肛門、経膈送達によることを含めて、いずれかの通常の方法により免疫に付すべき対象に導入できる。処置は、単一または経時的な複数用量よりなる。

【0048】

投与経路に依存して、適当量の投与されるべき変異株細菌には、約 10^9 個以下の細菌が含まれ、但し、適切な免疫原性応答はワクチンにより誘導される。約 10^{10} 個以下または約 10^{11} 個以下の用量は、所望の応答を達成するために必要であり得る。約 10^{11} 個よりかなり高い用量は、商業上望ましくないかもしれない。

10

【0049】

本発明のもう一つの態様は、異種のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列をさらに含む弱毒化変異株細菌の構築を含む。例えば、サルモネラでは、「異種」ポリペプチドは、サルモネラ菌により通常は発現しない非サルモネラポリペプチドであり得る。かかる弱毒化変異株細菌は、異種ポリペプチドまたはDNAを送達する方法において用いることができる。例えば、サルモネラは、かなりのダメージを生じることなく真核宿主細胞の細胞質に入るのに際して溶解し、それによって、細胞ヘプラスミドDNAの導入用のベクターとなるように設計できる。適当な異種ポリペプチドには、受容者における感染防御免疫応答を導入し、そのワクチン中の変異株細菌によるポリペプチド抗原の発現がその受容者がその抗原に対する免疫されるのを可能とする（グラム陰性菌、グラム陽性菌およびウイルスを含めた）他の感染性病原体からの免疫原性抗原が含まれる。変異株サルモネラを用いて導入できる他の異種ポリペプチドには、免疫調節性分子、例えば、サイトカイン、または成長ホルモン、GRHおよびGDF-8のごとき「パフォーマンス (performance)」蛋白質が含まれる。

20

【0050】

実施例 1

waaKの欠失を含むサルモネラ変異株の構築

A. pCVD442:: 遺伝子プラスミドの構築

各 *S. typhimurium* waaK遺伝子では、プラスミドpCVD442に基づく陽性選択自殺ベクター [DonnenbergおよびKaper, *Infect Immun* 59:4310-17 (1991)] が構築され、それは、各遺伝子に隣接して挟む5'および3'の染色体領域の一部を含むが、遺伝子自体の中に実質的な内部欠失（典型的には、> 95%）を持つ。オーバーラップ伸長による遺伝子スプライシング（「遺伝子SOEイング」）[Hortonら, *Biotechniques* 8:528-535 (1990)] を用いて、欠失すべき遺伝子に相補的であるが、大部分の内部ヌクレオチド配列を欠如するDNA断片を生成した。これらの内部欠失遺伝子を含むプラスミドは、各々、pCVD442::ssaJ, およびpCVD442::rfaKと命名された。次いで、これらのベクターを用いて、対立遺伝子交換により *S. typhimurium* および *S. dublin* 欠失変異株を生成した。また、これらのプラスミドは、WO 01/70247A2（ここに出典明示して本明細書の一部とみなす）に記載されている。 *S. dublin* を欠失した遺伝子を含むプラスミドを用いて、 *S. dublin* 中の欠失を生成し、 *S. typhimurium* 配列を含むプラスミドを用いて、 *S. typhimurium* 中の欠失を生成した（実施例 1 B 参照）。

30

40

【0051】

要約すると、2セットのPCRプライマーを所望の遺伝子の5'および3'側に隣接するDNAに相補的である約600bpの断片を合成するように設計した。プライマーAおよびD（表1）は、所望の遺伝子の各々、上流および下流の染色体配列を含有し、各々は所望の制限酵素エンドヌクレアーゼ部位についてのヌクレオチド配列も含む。プライマーBは、その遺伝子の5'側に直ぐ隣接する配列と、その遺伝子自体との間の上流連結部にわたり、その遺伝子の5'端のいくらかの部分（いくらかの場合に、停止コドンのみ）を含む。同様に、プライマーCは、その遺伝子の3'側に直ぐ隣接する配列と、その遺伝子自体との間の下流連結部にわたり、その遺伝子の3'端の一部（いくらかの場合に、開始コドンのみ

50

)を含む。*S. typhimurium*または*S. dublin*のゲノムDNAとプライマーAおよびBまたはプライマーCおよびDのいずれかとのPCR反応を行い、各々、所望の遺伝子上流または下流の隣接して挟まれる領域に対応する配列を持つ約600bpの(各々、断片ABおよびCDという)PCR産物を得た。また、各ABまたはCD断片は、所望の制限酵素部位(*rfaK*につき*SalI*)を含んだ。また、断片ABおよびCDを用いるプライマーAおよびDとの第二のPCR反応を行い、断片ADと指定されるPCR産物を得た。断片ADは、標的遺伝子の周囲のヌクレオチド配列に相補的であるが、*waaK*につき標的配列の本質的に完全な欠失(>95%欠失)、および*ssaJ*につき、C末端の半分の欠失(約50%欠失)を含む。次いで、*S. dublin*または*S. typhimurium waaK*遺伝子の各々につき得られたPCR産物を種々のベクターおよび宿主株を通してクローニングし、最終的に、宿主株SM10 pir中のベクターpCVD442の複数のクローニング部位に挿入した。

【0052】

【表 1】

表 1. 修飾された *S. typhimurium* 遺伝子*の構築に用いたプライマー

遺伝子	プライマー番号 (文字)	配列番号:	プライマー配列	制限酵素部位
<i>rfaK</i>	882 (A)	2	5'-GCCAAGTCGACATAGTAGGTGTTCTGTGGCAATA-3'	<i>SalI</i>
	883 (B)	3	5'-TTCTGGATTATAGCTATTATGATTGTTTGATAAGTGATGAGTCCTGA-3'	----
	884 (C)	4	5'-TCAGGACTCAATCACTTATCAAAACAATCATAATAGCTATAATCCAGAA-3'	----
	885 (D)	5	5'-GCCAAGTCGACGTGTACGAACAGGCTTCAGTGGAT-3'	<i>SalI</i>

*PCR プライマーは、その *rfaK* 遺伝子の左 (5') および右 (3') フランキング領域を生成するのに用いた。プライマー A/B および C/D は、各々、その遺伝子についての 5' および 3' プライマーセットである。プライマー A および D は、その遺伝子からさらに上流および下流であるプライマーであり、その PCR 産物に示された制限酵素部位を組み込むように設計された。

S.dublinおよびS. typhimurium遺伝子は、同一プライマーが両血清型に用いることができるのに十分に類似する。

【 0 0 5 4 】

B. typhimuriumおよびS. dublinの欠失変異株の構築

前記の実施例 1 A中で構築されたそのpCVD442:: 遺伝子プラスミドを用いて、適当なサルモネラ株を持つ同種の組換えによる欠失変異株を生成し、すなわち、S. dublin欠失遺伝子を含むプラスミドを用いて、S. dublin中に欠失を生成し、S. typhimurium配列を含むプラスミドを用いて、S. typhimurium中に欠失を生成した。そのプラスミドpCVD442は、陽性選択自殺ベクターである。それは、R6Kプラスミド用の複製起源(ori)、RP4プラスミド用の流動(mobilization)遺伝子、アンピシリン耐性用の遺伝子(bla)、レバンスクラゼおよび複数のクローニング部位用の遺伝子をコードするB. subtilisからのsacB遺伝子を含む。

10

【 0 0 5 5 】

プラスミドpCVD442は、細菌株中だけに染色体外で維持でき、次いで、蛋白質、そのpir遺伝子産物(例えば、E. coliSM10 pirまたはDH5 pir)を生成できる。Ap(アンピシリン)およびNal(ナリジクス酸)に対する抱合および選択による非許容の宿主株(S. typhimuriumまたはS. dublin)へのpCVD442ベースのベクターの導入は、Ap^R部分二倍体の単離を可能とし、ここに、そのプラスミドは、その野生型遺伝子と同種の組換えにより標的株のゲノムに組み込まれた。

【 0 0 5 6 】

要約すると、S. typhimuriumまたはS. dublin ssaT、ssaJ、ssaC、rfaKまたはglnA遺伝子(SM10Apir/pCVD442:: 遺伝子と指定される)を持つpCVD442を運ぶE. coli株SM10 pir(thi thr leu tonA lacY supE recA::RP4-2-Tc::Mu km) [(DonnenbergおよびKaper, Infect Immun 59:4310-17(1991)]をNal^R S. typhimurium MK315NまたはS. dublin B94-058Nと対合させ、組換え体をApおよびNalで選択した。MK315NおよびB94-058Nの双方は、(各々、ウシおよびヒト対象から臨床的に単離された)50 μg/ml NaIを含むLB寒天上で各々の親株をプレーティングすることにより調製された自然Nal^R株である。回収されたそのAp^R Nal^R組換え体は、そのプラスミドが染色体外に維持できないために、その染色体に組み込まれたプラスミドを有しなければならない。この結果、その染色体上のその遺伝子座に組み込まれたpCVD442:: 遺伝子プラスミドを含む部分二倍体株を形成する。

20

30

【 0 0 5 7 】

次いで、Ap^R Nal^R S. typhimurium MK315N::pCVD442:: 遺伝子およびS. dublin B94-058N::pCVD442:: 遺伝子組換え体を、非選択的な条件に続いて、LA(-スクロース)およびTYES(+スクロース)寒天上で成長させた。選択的な圧力が不存在の場合には、自然組み換え事象が生じ、ここに、そのpCVD442プラスミドおよび野生型またはその欠失遺伝子のいずれかは、染色体から切り取られる。pCVD442プラスミドを保持する細胞は、sacB遺伝子によりコードされたレバンスクラゼによるスクロースの分解から生成された毒性産物によるTYES寒天上のカウンター選択された。結果的に、TYES寒天上のコロニー数は、LA上の数に対してかなり低下する。TYES寒天上で単離されたコロニーのそのAp^S表現型を確認後、その組換え体をPCRにより分析して、その野生型遺伝子または欠失遺伝子が保持されたかを決定した。

40

【 0 0 5 8 】

最初の実験において、その供与体および受容体は、LB寒天上で5時間対合(mate)させ、次いで、Nal(20または100 μl/ml)およびAp(20または100 μl/ml)を含有するLB寒天上で選択した。初期の選択プレート上に高成長が出現したが、もしあればその単離コロニーは、Ap^R Nal^Rとして確認できた。組み換え成長を単離するための無力さは、供与体細胞からの-ラクタマーゼの遊離によるアンピシリンの分解の結果としての受容体の成長のためのものであった。この問題を克服するために、組換え体を支持し、供与体および受容体株に対して選択した対合および選択条件を設計した。特に、受容

50

体および供与体株を一晩、LB寒天または修飾M9寒天(Difco Laboratory, Detroit, MI)上で対合させ、選択的(NaIおよびAp(75 μl/ml))LBブロス(Difco Laboratory, Detroit, MI)中で成長により組換え体を富化し、選択的(NaIおよびAp(75 μl/ml))寒天培地上で選択した。修飾M9寒天上の対合は、包合が生じるのを可能とし、複製に限定されるものではないが、選択ブロスに導入された供与体および受容体細胞の数を低下させた。選択ブロス中の初期の対数相までの増殖は、組み換え体の複製を支持したが、供与体および受容体株はそうではなかった。さらに、LB寒天NaI Ap(各75 μg/ml)上の引き続いての選択は、供与体および受容体にわたる組み換え体を支持し、ほとんど全ての単離コロニーがAp^R NaI^Rである場合にそれが確認された。適当なプラスミドpCVD442: 遺伝子を運ぶ部分二倍体*S. typhimurium*または*S. dublin*組み換え体をそのゲノムに挿入した。 10

【0059】

次いで、部分二倍体単離体を非選択条件下増殖させて、対数相を遅延させ、LB寒天およびTYES寒天に接種した。非選択的増殖中に、自然組み換え事象は、部分二倍体状態において二重配列間に生じることができ、その染色体中の野生型または欠失遺伝子のいずれかのコピーを残した。pCVD442プラスミド上のsacB遺伝子によりコードされたレバンスクラーズの産物がグラム陰性細胞に毒性であるためにスクロースに対する増殖は、第二の組み換え事象を受けないそれらの細胞に対して選択する。結果的に、TYES寒天上のコロニー数は、LA上より非常に低い。我々の手において、選択を成功させるための温度にてTYESプレートをインキュベートすることは非常に重要である。高温(30または37)のインキュベーションは、LAに対しTYES上のコロニー数を低下せず、これはpCVD442陰性細胞に対する選択が生じないことを示す。 20

【0060】

TYESで成長したコロニーを単一コロニーにつき線状とし、そのNaI^R Ap^S表現型を確認した。次いで、各遺伝子につき前記の適当なプライマーAおよびDを用いたそのコロニーのゲノムDNAのPCR分析を行い、欠失または野生型遺伝子とその染色体に保持されたかを決定した。waaKでは、(野生型遺伝子につき2400bpに対して)1300bpのPCR産物は、その遺伝子が欠失したことを示した。

【0061】

C. S. choleraesuis変異株の構築

*S. choleraesuis*変異株を、米国特許第5,876,931号(ここに出典明示して本明細書の一部とみなす)に一般的に記載されたSTMプロセスを用いて構築した。要約すると、生成された各挿入性突然変異は、異なるDNAシグナチャー・タグ(signature tag)を運び、それは変異株が相互に区別されるのを可能とする。そのタグは、その中央部分がPCRにより共増幅されうのを可能とする20bpの不変「アーム」により隣接して挟まれた40bpの変中央領域を含む。タグ付けされた変異株をマイクロタイター皿中で組み立て、次いで、合わせて、感染試験用の「接種プール」を形成する。接種後の適当な時間に、細菌を動物から単離し、プールして、「回収プール」を形成させる。回収プール中のタグおよび接種プール中のタグを別々に増幅し、標識し、次いでそれらを用いて、その接種物中に変異株を示す異なるタグで整列したフィルターを探查する。弱毒化病原性を持つ変異株は、回収プールからタグで探查された場合ではなく、接種プールからタグで探查された場合に、ハイブリダイゼーション・シグナルを与えるタグを持つものである。STMは、多数の挿入性変異株が病原性の喪失につき単一動物において同時にスクリーニングされるのを可能とする。この方法を用いて、特定の遺伝子を妨害するミニ-tn5トランスポゾンを含む*S. choleraesuis*の挿入性変異株を作成した。各トランスポゾンの周囲のその遺伝子の一部分を配列決定して、公知の*S. typhimurium*遺伝子の対応する配列を持つ配列の整列により挿入部位を同定した。 30 40

【0062】

実施例 2

マウスにおける変異株弱毒化の*S. Choleraesuis*およびLD₅₀の決定

弱毒化の度合を決定するために、6匹のマウス(BALB/c)の群を個々の変異株で、経口投与では 8×10^2 ないし 8×10^6 個の用量範囲で、腹腔内(IP)投与では10倍少ない範囲で感染させた。弱毒化変異株は、野生型株に比較する場合、 LD_{50} 値に基づき異なる弱毒化の度合を与える。Tn5トランスポゾン挿入を含む変異株D1およびH5は、野生型より3ないし4のオーダーの度合小さい弱毒化を示す。変異株D1は、経口の 1.1×10^3 およびIPで与えた場合の 2.6×10^2 の野生型 LD_{50} 値に比較して、経口で与えた場合の 5.2×10^7 およびIP投与した場合の 3.9×10^3 の LD_{50} を有する。そのH5変異株は、経口で 7.9×10^4 およびIPワクチンとして 3.0×10^4 を与える。BALB/cマウスからのこれらの結果は、そのD1およびD5のwaaK変異株が、かなり低下した LD_{50} と、野生型*S. choleraesuis*に比較した細菌の50倍を超える測定された弱毒化を示す。

10

【0063】

実施例3waaK欠失変異株の安全性および効力

A. ブタにおけるワクチンとしての*S. choleraesuis* waaK変異株の効力(試験番号 704-7923-1-MJK-96-012)

ワクチンとしての弱毒化した生*S. choleraesuis* waaK変異株の安全性および効力をブタ(1群当たり8匹のブタ、ワクチン接種にて18~24日齢)において決定した。基礎体温を1~4日記録した。各動物についての体温、糞便軟度(fecal consistency)および身体状態についてのベースライン値をワクチン接種の直前の4日間集め、ワクチン接種後の値と比較して、各ワクチンの安全性を評価した。そのブタを体温、体重、糞便軟度スコア、身体状態、平均毎日体重増加および死亡率につき毎日モニターした。また、動物をワクチンの排出(shedding)およびチャレンジ微生物につきモニターした。全動物を試験の終了時に屠殺し、組織をチャレンジ微生物につき培養した。

20

【0064】

【表2】

表2. 細菌株、種類および用量

株	関連遺伝子型	種類	用量 (CFU/動物)
D1	Tn::waaK	LPS 変異株	9.8×10^8
H5	Tn:waa	LPS 変異株	9.7×10^8
χ 378 1	$\Delta cya \Delta(crp-cdt)$ vpl+	xx 変異株	8.1×10^8
P93- 558	野生型	野生型チャレンジ 株	8.0×10^9

30

40

【0065】

そのブタを飲料水を介して経口的にワクチン接種した。細菌培養は、最終濃度の 1×10^9 CFU/mlまで無菌蒸留水で希釈した。動物は、1時間水を介して100mlのワクチン製剤を与え、この期間中に消費した水の量を測定し、その正確な用量レベルを決定した。そのブタを臨床症状(%死亡率、%罹患率、%下痢日数、%排出日数および平均1日増体量)につき毎日モニターした。ワクチンに対するブタの応答を表3にまとめた。有害反応または疾患の臨床兆候は、所与のワクチンに拘わらずこれらの動物において観察されなかった。動物はそのワクチンを寛容し、良好に食餌し続け、体重を増加した。ワクチン接種し観察された観察可能な臨床兆候は、3781をワクチン接種した動物について

50

(ワクチン接種後24ないし72時間にて)直腸温度における短時間の上昇、H5でワクチン接種した動物についての一過性の軟便(1~2日)だけであった。

【0066】

ワクチン接種後に採取されたサルモネラの死前単離体を同定のためにタイプ決定し、血清型C1であることを確認した。表5に記載のごとく、ワクチン血清型の回収は投与したワクチンと関連した。チャレンジ後の期間中に未処置動物または3781でワクチン接種したものからサルモネラは回収されなかった。8匹の動物のうち1匹(12.5%)だけが、この期間中に株D1を排出し、これは単一日(ワクチン接種後6日目)であった。株H5をワクチン接種した大部分(75.0%)の動物は、ワクチン接種後に一過性の排出を示した。これらの動物において、排出は、ワクチン接種後2日から始まり、16の試料日数のうち1(4匹の動物)、2(1匹の動物)または13(1匹の動物)につき生じた。これらの動物14.8%で排出日数の全期間、その大部分は、その動物のうち1匹だけにより説明された。

【0067】

次いで、ブタは、サルモネラ症のケースから得られたフィールド単離体である高度に病原性の野生型*S. choleraesuis* (P93-558)でチャレンジした。ワクチン接種後28日の24時間絶食後、動物の経口チャレンジ-曝露は、10mlの細菌培養物を 8×10^9 病原性*S. Choleraesuis*の最終チャレンジ濃度につき約50%の食餌および50%の非塩素処理水よりなる200グラムの粥混合物へ混合した食餌を介した。

【0068】

かかるチャレンジ曝露に対する動物の応答を表3にまとめる。プラセボを与えた全動物は、重篤な水様便を伴う発熱を示した。それらは、拒食症、無関心および脱水となり、チャレンジの3ないし8日以内に50%が死亡した。これらの動物は、大部分のチャレンジ後の期間チャレンジ株を排出した(80.4%の排出日数)。対照的に、ワクチン接種したものは、未処理動物より感染により抵抗性であった(表3)。所与のワクチンに依存して、重篤度、および罹患率、死亡率、不活発、下痢およびチャレンジした微生物の排出の日の双方においてかなりの低下が存在した。全体的には、waa変異株(株D1およびH5)でワクチン接種した動物は、チャレンジ曝露に対して最も難治性であり、最も体重増加、および最も少ない数の排出日数を有した(表5)。チャレンジ曝露後の排出日数および臨床スコアの数の双方における低下が注目され、株3781で観察された。しかしながら、これらの動物についての臨床スコアおよび体重増加は、未処理のチャレンジされた動物のものと、waa変異株でワクチン接種されたものとの間にあった(表4)。このワクチンは、体温スパイクを低下させず(表4)、より全体的な排出(50%排出日数)が、3781でワクチン接種した動物においてチャレンジに対する応答(表5)において観察された。

【0069】

【表 3】

表 3. ワクチン接種前後の臨床スコア

ワクチン	時間	N=	% 死亡率	% 罹患率	% 下痢日数	体温に おける シフト	平均 1 日 増体量
なし	前	8	0	0	0	39.0	0.38 ± 0.07
	後		0	0	1.9	39.3	
WaaK D1	前	8	0	0	0	39.0	0.33 ± 0.06
	後		0	0.2	1.5	39.4	
Waa H5	前	8	0	0	0	38.8	0.32 ± 0.12
	後		0	1.5	6.7	39.2	
χ3781	前	8	0	0	0	39.1	0.34 ± 0.06
	後		0	0	1.8	40.7	

前 = (ベースラインスコアを決定するために用いた) チャレンジに先立つ 3 日間。後 = 第 28 日の
ワクチン接種期間。

【 0 0 7 0 】

【表 4】

表 4. チャレンジ期間前後の臨床スコア

ワクチン	時間	N=	% 死亡率	% 罹患率	% 下痢日数	体温に おける シフト	平均 1 日 増体量
なし	前	8	0	0	2.9	39.0	0.05 ± 0.5
	後		50	34.6	62.7	40.3	
DI	前	8	0	0	4.2	39.2	0.69 ± 0.10
	後		0	10.1	19.0	39.9	
H5	前	8	0	3.6	7.1	39	0.67 ± 0.14
	後		0	8.3	20.8	39.9	
χ3781	前	8	0	0	4.8	39.2	0.56 ± 0.19
	後		0	23.2	37.5	40.3	

前 = (ベースラインスコアを決定するために用いた) チャレンジに先立つ 3 日間。後 = 第 28 日の
ワクチン接種期間。

【 0 0 7 1 】

10

20

30

40

50

【表 5】

表 5. ワクチンおよびチャレンジ微生物の糞便排泄

ワクチン	(ワクチンの) %排出日数	(チャレンジ微生物の) %排出日数
なし	0	80.4
D1	0.8	34.6
H5	14.8	30.9
χ3781	0	50.0

10

【0072】

B. 剖検での細菌学的検査

剖検での腸の組織および内容物、腸間膜リンパ節ならびに内部器官からチャレンジ微生物を回収する頻度を表 6 に示す。未処理動物からのチャレンジ微生物は、試験した 8 匹の動物のうち 7 匹 (87.5%) から回収した。加えて、剖検で培養陽性であった器官数の分析は全体で 4.5 であった。対照的に、全てのワクチン接種がチャレンジ微生物でコロニー化されたほぼ同数の動物を有したが (各々、株 D1、H5 または 3781 でワクチン接種した動物の 75、62.5 および 75%)、その全体の組織負担 (tissue burden) は未処理動物より 2.8 ないし 3.6 倍低かった (表 6)。

20

【0073】

【表 6】

表 6. 剖検での組織中の *S. enterica* 血液型亜型 Choleraesuis チャレンジ微生物の回収%

ワクチン	肺	肝臓	脾臓	MLN	ICV	盲腸	平均組織数	直腸 塗布
なし	25	50	25	50	87.5	75	4.5	50
D1	0	0	12.5	0	12.5	12.5	1.25	12.5
H5	0	0	0	12.5	25	12.5	1.375	12.5
χ3781	0	0	0	12.5	25	37.5	1.625	12.5

30

MLN= 腸間膜リンパ節; ICV= 回盲弁; Col Con= 結腸内容物

【0074】

D. ウシにおけるワクチンとしての *S. Typhimurium* waaK 変異株の効力 (2051-7923-I-MJ K-98-006)

40

ワクチンとしての生 - 弱毒化した *S. Typhimurium* waaK 変異株の安全性および効力をウシ (1 群当たり 6 匹のウシ、ワクチン接種にて 10 ~ 14 日齢) において決定した。37 にて 18 ~ 24 時間インキュベーション後、高成長領域からのコロニーを滅菌ループで塗布し、LB プロスに接種した。37 にて 14 時間の静置培養後、1.0 ml のこの培養物を用いて、250 ml 無菌ポリカーボネート製エルレンマイヤープラスチック中で 22.5 ml の新鮮な LB プロスを接種した。37 にて 6 時間の静置培養後、2.5 ml の得られた非希釈のプロス培養物を各ウシへの投与のために 3.0 リットルのミルク・リプレサー (replacer) に添加した。血液寒天上の希釈および生存プレートカウントは、調製

50

時点にて各株について「生存細菌数」を決定した。各ワクチンは室温にて維持し、調製後できる限り速やかに（約30分以内に）動物に送達させた。基礎体温および臨床スコア（死亡率、身体状態、不活発、下痢（糞便スコア）、および細菌の排出）を第1～4日に記録した。そのウシを、野生型または変異株細菌のいずれかを用いて、約 1×10^9 CFU / ウシの用量にて、第4日にミルク・リプレーサーを介して経口的にワクチン接種した。経口ワクチン接種では、1mlの実験室成長ワクチン培養物をウシのミルク・リプレーサー中で接種した。ml当たりのCFU数は、最終処方連続的な10倍希釈を行い、寒天上にプレーティングすることにより決定した。次いで、動物当たりの用量は、最終ワクチン用量の約 1×10^9 CFU / ウシを与える動物により消費されたml数によりCFU / mlの数を掛けることにより決定した。各ウシがワクチン接種の日にその全量のミルク・リプレーサーを消費したために、動物当たりのCFU数は培養のCFU / mlの数と同一であった。

10

【0075】

ワクチン接種後28日間（第5～32日）の臨床症状（%死亡率、身体状態、%不活発日数、糞便スコアおよび5排出日数）につきウシを毎日モニターし、そのうち第29～32日は、野生型細菌でのチャレンジ前のベースラインと考えられた。ウシが注目する期間中に死亡したならば、死亡率変数につき「1」のスコアを指定し、そうでなければ、その死亡率変数は「0」と指定した。その身体状態は、1ないし5のスケールでスコア付けされ、「1」は、正常な被毛状態を持つ健康な活発な動物であり；「2」は、活動において中間である軽度に元気がない動物であり；「3」は、不活発/無気力なおよび/または被毛状態に関係なくやせた中程度ないし重度の元気がない動物であり；「4」は瀕死の動物であって；「5」は死亡した動物であった。ウシが死亡したならば、その身体状態は死亡日に（または死亡日より次の日に）「5」を指定し、それ以後の値は抜かした。平均身体状態は、各ウシの注目する期間内の毎日のスコアの平均として利用した。次いで、その平均身体スコアを用いて、以下の方法：リスケイリング・スコア = $100 \times (\text{平均身体状態スコア} - 1) / 4$ で設計し直したスコアを計算した。これは、その1～5のスケールを0～100スケールに変換した。その%不活発日数スコアを、ウシが身体状態スコアにおいて2を超えるスコアを有する注目する期間の日数のパーセントを計算することにより決定した。その糞便スコアは、1～4のスケールでスコア付けし「1」は正常に固体形成されるか、形態を持ち柔らかく；「2」は柔らかく非形成であり；「3」は固体物質を含む水様性であって；「4」はほとんどまたは全く固体物質を含まない水様性/噴出性（projectile）である。その%排出日数は、ウシがサルモネラに陽性な直腸塗布を有する注目する期間中の日数のパーセントとして計算された。

20

30

【0076】

次いで、そのウシは、ワクチン接種後28日（第32日）にて高度に病原性の異種野生型*S. typhimurium* (B94-019)でチャレンジされた。そのウシは、ワクチン接種後さらに14日間（第33～46日）に臨床症状につきモニターし続けた。ワクチン接種後（およびチャレンジ前）の結果を後記の表7に示す。チャレンジ後の結果を後記の表8に示す。剖検を第46日または死亡時に行い、組織および糞便試料をそのチャレンジ微生物の培養のために得た。

40

【0077】

waaK変異株でワクチン接種した動物は、不活発となり、体重減少、発熱発生し、感染後2ないし7日以内に大量の下痢を有した。この群からの2匹の動物は、この期間中に死亡した。低用量の野生型親株を与えたウシは下痢を発生し、わずかに元気がないが、他の臨床兆候を示さなかった。直腸温度における平均最大増加は、waaK変異株および野生型株を与えた動物について、各々、1.74および1.59であった。

【0078】

【表 7】

表 7. *waaK* 変異株 *S. typhimurium* ワクチンでのワクチン接種に対するウシの
応答

ワクチン /株	時間	N =	死亡率 (%)	身体状態	% 不活発 日数	糞便 スコア	% 排出 日数
なし	前	6	0	0.0	0	1.0	0.0
	後(1-28)		0	0.4	0	1.4	7.6
<i>WaaK</i>	前	6	0	0.0	0	1.2	0.0
	後(1-28)		33.3	1.5/11.5	14.2	1.6	72.4
<i>AssaJ</i>	前	6	0	0.0	0	1.3	0.0
	後(1-28)		0	0.0	0	1.4	57.6
野生型	前	6	0	1.0	0	1.0	0.0
	後(1-28)		0	0.0	0	1.6	58.8

10

20

【 0 0 7 9 】

E. ウシにおけるワクチンとしての *S. typhimurium waaK* 変異株の効力

(2051-7923-I-MJK-98-006)

S. typhimurium waaK 変異株でのワクチン接種後 28 日に、ウシを高用量 (1.3×10^9) の病原性株の *S. typhimurium* でチャレンジした。この極度のチャレンジ曝露に対するウシの応答を表 8 に示す。全ての未処理動物は、重篤な水様性下痢、無関心さ、食欲不振および脱水症を伴う発熱を示した。全ての非ワクチン接種動物は、チャレンジ後それら

30

【 0 0 8 0 】

対照的に、*waaK* 変異株でワクチン接種した動物は、より少ない日数の不活発、下痢の期間、低い体温応答を有し、チャレンジ微生物の排出における低下を示した。

【 0 0 8 1 】

【表 8】

表 8. *S. typhimurium* ワクチンの効力を示すチャレンジ後のワクチン接種における臨床兆候における低下

ワクチン/ 株	N=	死亡率 (%)	身体状態	% 不活発 日数	糞便 スコア	% 排出日数
なし	6	100.0	50.5	73.9	3.0	100
<i>waaK</i>	6	75.0	43.2	41.7	2.7	94.6
<i>AssaJ</i>	6	83.3	38.6	43.1	2.8	94.0
野生型	6	66.7	51.8	61.0	3.1	91.7

10

【0082】

組織 (> 2 g) または糞便 (> 2 g) 試料の培養からのデータは、未処理対照と比較して、*waaK* 変異株でワクチン接種した動物からの組織中のチャレンジ株の低下が存在し (表 9)、ワクチンとしてこれらの3種の各変異株の経口投与が、実験的に誘導されたサルモネラ症に対して安全でかつ有効であることを示した。

20

【0083】

【表 9】

表 9. 剖検での組織中の種々の *S. Typhimurium* の回収率 (%)

ワクチン	N	盲腸	糞便	MLN	肺	肝臓	脾臓
なし	6	100.0	83.3	100.0	100.0	100.0	100.0
<i>waaK</i>	6	50.0	50.0	50.0	66.7	50.0	50.0
<i>ssaJ</i>	6	100	83.3	83.3	83.3	83.3	83.3
野生型	6	100	100.0	100.0	83.3	83.3	83.3

30

【0084】

当業者には、前記の発明の多数の修飾および変形が生じることが予期される。従って、添付された特許請求の範囲に出現するかかる限定だけを本明細書に記載するであろう。

40

【手続補正書】

【提出日】平成16年7月8日(2004.7.8)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】変更

【補正の内容】

【配列表】

2005519872000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成16年7月15日(2004.7.15)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

免疫学的保護量の第一の弱毒化された、不活性化waaK遺伝子を含む変異株サルモネラ菌を含むワクチン組成物。

【請求項2】

該waaK遺伝子とその遺伝子の一部分の破壊により不活性化された請求項1記載のワクチン組成物。

【請求項3】

該破壊が、挿入性突然変異により生じた請求項2記載のワクチン組成物。

【請求項4】

該破壊が、欠失突然変異により生じた請求項2記載のワクチン組成物。

【請求項5】

該破壊が、置換突然変異により生じた請求項2記載のワクチン組成物。

【請求項6】

不活性化遺伝子が、

(a) 配列番号：1に記載のwaaK遺伝子；

(b) 配列番号：1の非コード相補体にハイブリダイズする全長ヌクレオチド配列、および

(c) 配列番号1に対して80%配列同一性を有する全長サルモネラヌクレオチド配列よりなる群から選択される請求項1記載のワクチン組成物。

【請求項7】

該菌が、不活性化waaK遺伝子および第二の不活性化された病原性遺伝子を含む請求項1記載のワクチン組成物。

【請求項8】

1以上の病原性遺伝子が不活性化された第二の弱毒化変異株サルモネラ菌をさらに含む請求項6記載のワクチン組成物。

【請求項9】

第一および第二の該変異株サルモネラ菌が異なる血清型からのものである請求項8記載のワクチン組成物。

【請求項10】

該サルモネラ菌が、血清型A、B、C、DまたはEのいずれかからのものである請求項8記載のワクチン組成物。

【請求項11】

該血清型が、血清型A、B、C₁、C₂、D₁またはE₁のいずれかから選択された請求項10記載のワクチン組成物。

【請求項12】

該弱毒化された変異株サルモネラ菌が、非サルモネラポリペプチドをコードするポリヌクレオチドをさらに含む請求項1記載のワクチン組成物。

【請求項13】

動物に感染防御免疫を与える方法であって、不活性化waaK遺伝子を含む免疫学的保護量の弱毒化された変異株サルモネラ菌を含むワクチン組成物を該動物に投与する工程を含むことを特徴とする該方法。

【請求項14】

該弱毒化された変異株サルモネラ菌が、非復帰性である請求項13記載の方法。

【請求項 15】

該免疫学的保護量の該弱毒化細菌が、死亡率、症候性下痢、身体状態またはミルク生産における改善を供する請求項 13 記載の方法。

【請求項 16】

該 waaK 遺伝子が、遺伝子の一部分の破壊により不活性化された請求項 13 記載の方法。

【請求項 17】

該破壊が、挿入性突然変異により生じた請求項 13 記載の方法。

【請求項 18】

該破壊が、欠失突然変異により生じた請求項 13 記載の方法。

【請求項 19】

該破壊が、置換突然変異により生じた請求項 13 記載の方法。

【請求項 20】

該動物が、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ウマ、ブタ、家禽および他のトリ、ネコ、イヌおよびヒトよりなる群から選択される請求項 13 記載の方法。

【請求項 21】

該動物が、哺乳動物である請求項 13 記載の方法。

【請求項 22】

該動物がブタである請求項 13 記載の方法。

【請求項 23】

該動物がウシである請求項 13 記載の方法。

【請求項 24】

該動物がトリである請求項 13 記載の方法。

【請求項 25】

該動物がウマである請求項 13 記載の方法。

【請求項 26】

ポリペプチド抗原を動物に送達する方法であって、請求項 6 記載のワクチン組成物を該動物に投与する工程を含むことを特徴とする該方法。

【請求項 27】

該サルモネラ菌が、Salmonella typhimuriumである請求項 6 記載のワクチン組成物。

【請求項 28】

該サルモネラ菌が、Salmonella choleraesuisである請求項 6 記載のワクチン組成物。

【請求項 29】

該サルモネラ菌が、Salmonella dublinである請求項 6 記載のワクチン組成物。

【請求項 30】

該弱毒化された変異株サルモネラ菌が、非復帰性である請求項 1 記載のワクチン組成物。

【請求項 31】

該哺乳動物が、ヒトである請求項 21 記載の方法。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No PCT/IB 01/02127
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 A61K39/112		
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 C12N 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, BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 98 02523 A (LOVELL MARGARET ANN ;TURNER ARTHUR KEITH (GB); BARROW PAUL ANDREW) 22 January 1998 (1998-01-22) abstract page 5, line 19 - line 30	1-16
A	TURNER ARTHUR K ET AL: "Identification of Salmonella typhimurium genes required for colonization of the chicken alimentary tract and for virulence in newly hatched chicks" INFECTION AND IMMUNITY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, WASHINGTON, US, vol. 66, no. 5, May 1998 (1998-05), pages 2099-2106, XP002172457 ISSN: 0019-9567 abstract page 2101, right-hand column, paragraph 1 -/--	1-16
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" 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 20 August 2002		Date of mailing of the international search report 28/08/2002
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2260 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Mata Vicente, T.

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/IB 01/02127

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>MACLACHLAN P R ET AL: "CLONING CHARACTERIZATION AND DNA SEQUENCE OF THE RFALK REGION FOR LIPOPOLYSACCHARIDE SYNTHESIS IN SALMONELLA-TYPHIMURIUM LT2" JOURNAL OF BACTERIOLOGY, vol. 173, no. 22, 1991, pages 7151-7163, XP008006767 ISSN: 0021-9193 abstract</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/IB 01/02127

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 10-16 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/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.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/IB 01/02127

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9802523 A	22-01-1998	AU 3552797 A	09-02-1998
		EP 0912721 A1	06-05-1999
		WO 9802523 A1	22-01-1998
		GB 2331521 A , B	26-05-1999

フロントページの続き

(72)発明者 マイケル・ジェイ・ケネディ

アメリカ合衆国 4 9 0 2 4 ミシガン州ポーターズ、クインシー・アベニュー 2 3 6 4 番

Fターム(参考) 4B024 AA01 BA31 CA03 CA05 DA05 GA25

4C085 AA03 AA04 BA24 DD01 DD62 EE01 EE03 GG08