

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2017-214601

(P2017-214601A)

(43) 公開日 平成29年12月7日(2017.12.7)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C08B 37/00 (2006.01)	C08B 37/00	J 4C076
A61K 47/36 (2006.01)	A61K 47/36	4C085
A61K 47/61 (2017.01)	A61K 47/61	4C090
A61K 39/00 (2006.01)	A61K 39/00	H
A61P 31/00 (2006.01)	A61P 31/00	

審査請求 有 請求項の数 1 O L 外国語出願 (全 63 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2017-174079 (P2017-174079)	(71) 出願人	50438991 ノバルティス アーゲー
(22) 出願日	平成29年9月11日 (2017. 9. 11)		
(62) 分割の表示	特願2015-176253 (P2015-176253) の分割	(74) 代理人	100078282 弁理士 山本 秀策
原出願日	平成22年9月30日 (2010. 9. 30)		
(31) 優先権主張番号	61/247, 518	(74) 代理人	100113413 弁理士 森下 夏樹
(32) 優先日	平成21年9月30日 (2009. 9. 30)	(72) 発明者	フランセスコ ベルティ イタリア国 イー53100 シエナ, ヴィア フィオレンティーナ, 1, ノ バルティス ヴァクシンズ
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 Staphylococcus. aureus 5型および8型莢膜多糖の結合体

(57) 【要約】

【課題】 S . a u r e n s 5 型または8型莢膜多糖とキャリア分子との結合体を調製するためのプロセスを提供すること。

【解決手段】本発明は、 S . a u r e n s 5 型または8型莢膜多糖とキャリア分子との結合体を調製するためのプロセスであって、 (a) 該莢膜多糖を解重合して多糖断片を得る工程と、 (b) 該断片における少なくとも1個の糖残基にアルデヒド基を導入するため、該断片を酸化して、酸化された糖残基を得る工程と、 (c) 該酸化された糖残基を、該アルデヒド基を介してキャリア分子とカップリングし、これにより該結合体を得る工程とを含むプロセスを提供する。工程 (c) におけるカップリングは、直接的であってもリンカー分子を介してもよい。本発明は、このプロセスによって得られるか、または得ることが可能である結合体も提供する。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項1】

図面に記載の発明。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、2009年9月30日に提出された米国仮出願番号61/247,518の利益を主張し、上記米国仮出願番号61/247,518は、その全容が参考として本明細書に援用される。

【0002】

10

技術分野

本発明は、糖結合体 (glycoconjugate) を形成するために細菌莢膜糖、特に *Staphylococcus aureus* 5型または8型莢膜多糖をキャリアへ結合体化する分野内にある。糖結合体は免疫化に有用である。

【背景技術】

【0003】

背景技術

細菌の莢膜糖は、長年、莢膜を有する細菌に対するワクチンに用いられてきた。しかし、糖はT細胞非依存性抗原であるため免疫原性が低い。キャリアへの結合体化は、T細胞非依存性抗原をT細胞依存性抗原へと変換し、これにより記憶応答を増強し、防御免疫を

20

発達させることができる。したがって、最も効果的な糖ワクチンは糖結合体に基づき、プロトタイプの結合体ワクチンは *Haemophilus influenzae* b型 (「Hib」) に対するものであった [例えば、非特許文献1 (参考文献97) の第14章を参照]。

【0004】

結合体ワクチンについて記載されている別の細菌は、*Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) である。糖結合体に用いるために *S. aureus* から様々な多糖が単離されてきた。特に興味深い2種の多糖は、5型および8型莢膜多糖である。ヒト *S. aureus* 株のおよそ60%は8型であり、およそ30%は5型である。5型および8型結合体に関する研究の多くは、Fattomらによってなされており、非特許文献2~10 (参考文献1~9) 等の文書に記載されている。5型および8型多糖結合体化のためのFattomプロセスは通常、シスタミンを用いた精製多糖のチオレーションに

30

関与する。この反応は、莢膜多糖におけるカルボキシレート基の存在に依存する。この基は、カルボジイミド、例えばEDACの存在下でシスタミンと反応する。次に、誘導体化した多糖は、通常はリンカーを介して、*Pseudomonas aeruginosa* エンドトキシンA (ETA) 等、キャリアタンパク質と結合体化する [非特許文献3 (2)]。他の研究者らは、還元的アミノ化 [10および11]、グルタルアルデヒド (*glutaraldehyde*) カップリング [10] または多糖におけるヒドロキシル基とCDAP [12] もしくは三塩化シアヌル [13] のようなシアニル化剤との反応によって、精製された5型および8型莢膜多糖の結合体化を行った。

40

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0005】

【非特許文献1】Plotkin & Orenstein 編. *Vaccines* (2004)

【非特許文献2】Fattom et al. *Infect Immun.* (1990) 58(7): 2367-74.

【非特許文献3】Fattom et al. *Infect Immun.* (1992) 60(2): 584-9.

【非特許文献4】Fattom et al. *Infect Immun.* (199

50

3) 61(3):1023-32.

【非特許文献5】Fattom et al. Infect Immun. (1996) 64(5):1659-65.

【非特許文献6】Welch et al. J Am Soc Nephrol. (1996) 7(2):247-53.

【非特許文献7】Fattom et al. Infect Immun. (1998) 66(10):4588-92.

【非特許文献8】Fattom et al. Vaccine (1993) 17(2):126-33.

【非特許文献9】Fattom et al. N Engl J Med. (2002) 346(7):491-6.

【非特許文献10】Robbins et al. Ann N Y Acad Sci. (2005) 754:68-82.

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

Fattomプロセスによって調製された結合体ワクチンはヒトにおける安全性および免疫原性を示してきたが[5]、依然として*S. aureus* 5型または8型莢膜多糖の結合体を調製するさらに別の、より良い方法に対する必要性が存在する。

【課題を解決するための手段】

【0007】

発明の開示

本発明は、先行技術において開示されている結合体化法に代わって用いることのできる結合体化法に基づく。これら先行技術の方法とは異なり、本発明の方法は、多糖におけるヒドロキシル基またはカルボキシレート基を介した結合体化を伴わない。したがって本方法は、先行技術よりも、より天然の多糖に観察される形態に近い形態にこれらの基を残す。本方法は、これらの基を用いるのではなく、結合体化に用いるための多糖における反応性アルデヒド基の生成に関与する。その結果生じた結合体は、先行技術の結合体と比べて異なる、好ましくは改善された免疫学的特性を有することができる。

【0008】

したがって、本発明は、*S. aureus* 5型または8型莢膜多糖をキャリアタンパク質に結合体化するための代替的または改善された方法およびそれにより得られた結合体を提供する。本発明は、本発明の方法に有用な中間体および該中間体を調製するための方法も提供する。

本発明は以下をも提供する。

(項目1) *S. aureus* 5型または8型莢膜多糖とキャリア分子との結合体を調製するためのプロセスであって、(a)該莢膜多糖を解重合して多糖断片を得る工程と、(b)該断片における少なくとも1個の糖残基にアルデヒド基を導入するために、該断片を酸化して、酸化された糖残基を得る工程と、(c)該酸化された糖残基を、該アルデヒド基を介してキャリア分子とカップリングし、該結合体を得る工程とを含む、プロセス。

(項目2) *S. aureus* 5型莢膜多糖を処理するためのプロセスであって、該莢膜多糖を解重合して、非還元末端に -D-FucNAc-(1 部分を有する多糖断片を得る工程を含む、プロセス。

(項目3) *S. aureus* 8型莢膜多糖を処理するためのプロセスであって、該莢膜多糖を解重合して、非還元末端に -D-FucNAc-(1 部分を有する多糖断片を得る工程を含む、プロセス。

(項目4) 前記解重合が、酢酸を用いた酸加水分解によって行われる、前述の項目のいずれかに記載のプロセス。

(項目5) 前記断片の平均分子量が、5kDa~100kDaである、前述の項目のいずれかに記載のプロセス。

10

20

30

40

50

(項目6) 前記断片のO-アセチル化の程度が、10%~90%である、前述の項目のいずれかに記載のプロセス。

(項目7) 工程(a)が項目2または項目3に記載の工程である、項目1および4~6のいずれかに記載のプロセス。

(項目8) *S. aureus* 5型莢膜多糖誘導体を提供するためのプロセスであって、非還元末端に -D-FucNAc-(1部分を有する*S. aureus* 5型莢膜多糖を酸化して、該 -D-FucNAc-(1部分における2個の隣接するヒドロキシル基を2個のアルデヒド基に変換する工程を含む、プロセス。

(項目9) *S. aureus* 8型莢膜多糖誘導体を提供するためのプロセスであって、非還元末端に -D-FucNAc-(1部分を有する*S. aureus* 8型莢膜多糖を酸化して、該 -D-FucNAc-(1部分における2個の隣接するヒドロキシル基を2個のアルデヒド基に変換する工程を含む、プロセス。

(項目10) 工程(b)が項目8または項目9に記載の工程である、項目7に記載のプロセス。

(項目11) カップリングさせられた*S. aureus* 5型莢膜多糖を提供するためのプロセスであって、非還元末端に -D-FucNAc-(1部分を有する*S. aureus* 5型莢膜多糖をキャリア分子にカップリングする工程であって、該*S. aureus* 5型莢膜多糖は2個の隣接するヒドロキシル基を2個のアルデヒド基に変換するために酸化されており、該カップリングは該アルデヒド基のうちの1個を介するカップリングである、工程を含む、プロセス。

(項目12) カップリングさせられた*S. aureus* 8型莢膜多糖を提供するためのプロセスであって、非還元末端に -D-FucNAc-(1部分を有する*S. aureus* 8型莢膜多糖をキャリア分子にカップリングする工程であって、該*S. aureus* 8型莢膜多糖は2個の隣接するヒドロキシル基を2個のアルデヒド基に変換するために酸化されており、該カップリングは該アルデヒド基のうちの1個を介するカップリングである、工程を含む、プロセス。

(項目13) 項目10に記載のプロセスであって、(a)*S. aureus* 5型莢膜多糖を解重合して、非還元末端に -D-FucNAc-(1部分を有する多糖断片を得る工程と、(b)該 -D-FucNAc-(1部分における2個の隣接するヒドロキシル基を2個のアルデヒド基に変換するために、該断片を酸化する工程と、(c)該酸化された断片を、該アルデヒド基のうちの1個を介してキャリア分子とカップリングし、*S. aureus* 5型莢膜多糖とキャリア分子との結合体を得る工程とを含む、該結合体を調製するためのプロセス。

(項目14) 項目10に記載のプロセスであって、(a)*S. aureus* 8型莢膜多糖を解重合して、非還元末端に -D-FucNAc-(1部分を有する多糖断片を得る工程と、(b)該 -D-FucNAc-(1部分における2個の隣接するヒドロキシル基を2個のアルデヒド基に変換するために、該断片を酸化する工程と、(c)該酸化された断片を、該アルデヒド基のうちの1個を介してキャリア分子とカップリングし、*S. aureus* 8型莢膜多糖とキャリア分子との結合体を得る工程とを含む、該結合体を調製するためのプロセス。

(項目15) 前記カップリングが、前記アルデヒド基を前記キャリアにおけるアミン基と還元的アミノ化により反応させることによる、直接的なカップリングである、項目1および4~7および10~14のいずれかに記載のプロセス。

(項目16) 前記カップリングが、前記アルデヒド基をリンカーにおけるアミン基と還元的アミノ化により反応させることによる、該リンカーを介したカップリングである、項目1および4~7および10~14のいずれかに記載のプロセス。

(項目17) 前記リンカーが前記キャリア分子に連結させられている、項目16に記載のプロセス。

(項目18) 前記カップリングが、1:5から1:2の多糖:タンパク質比(w/w)

10

20

30

40

50

をもたらす、項目1および4～7および10～17のいずれかに記載のプロセス。

(項目19) 前述の項目のいずれかに記載のプロセスによって得られたか、または得ることが可能である、結合体、断片、誘導体またはカップリングさせられた多糖。

(項目20) 項目19に記載の結合体またはカップリングさせられた多糖を含む、免疫原性組成物。

(項目21) c l f A 抗原、c l f B 抗原、s d r E 2 抗原、s d r C 抗原、s a s F 抗原、e m p 抗原、s d r D 抗原、s p a 抗原、e s a C 抗原、e s x A 抗原、e s x B 抗原、s t a 0 0 6 抗原、i s d C 抗原、H l a 抗原、s t a 0 1 1 抗原、i s d A 抗原、i s d B 抗原およびs t a 0 7 3 抗原からなる群より選択される1または複数のS . a u r e u s タンパク質抗原をさらに含む、項目20に記載の組成物。

10

(項目22) 前記1または複数のS . a u r e u s タンパク質抗原が、e s x A 抗原、e s x B 抗原、s t a 0 0 6 抗原、H l a 抗原、s t a 0 1 1 抗原およびs t a 0 7 3 抗原からなる群より選択される、項目21に記載の組成物。

(項目23) 以下の組合せ(1)～(10)：

(1) e s x A 抗原、e s x B 抗原、s t a 0 0 6 抗原およびH l a 抗原、

(2) e s x A 抗原、e s x B 抗原、s t a 0 0 6 抗原およびs t a 0 1 1 抗原、

(3) e s x A 抗原、e s x B 抗原およびs t a 0 1 1 抗原、

(4) e s x A 抗原、e s x B 抗原、H l a 抗原、s t a 0 0 6 抗原およびs t a 0 1 1 抗原、

20

(5) e s x A 抗原、e s x B 抗原およびH l a 抗原、

(6) H l a 抗原、s t a 0 0 6 抗原およびs t a 0 1 1 抗原、

(7) e s x A 抗原およびe s x B 抗原、

(8) e s x A 抗原、e s x B 抗原およびs t a 0 0 6 抗原、

(9) e s x A 抗原、e s x B 抗原、s t a 0 1 1 抗原およびs t a 0 7 3 抗原、ならびに

(10) s t a 0 0 6 抗原およびs t a 0 1 1 抗原

のうちの1つに記載のS . a u r e u s タンパク質抗原を含むものである、項目22に記載の組成物。

【0009】

第一の態様では、本発明は、S . a u r e u s 5型または8型莢膜多糖とキャリア分子との結合体を調製するためのプロセスであって、(a) 該莢膜多糖を解重合して多糖断片を得る工程と、(b) 該断片における少なくとも1個の糖残基にアルデヒド基を導入するため、該断片を酸化して酸化された糖残基を得る工程と、(c) 該酸化された糖残基を、該アルデヒド基を介してキャリア分子とカップリングし、これにより結合体を得る工程とを含むプロセスを提供する。工程(c)におけるカップリングは、直接的であってもリンカー分子を介してもよい。本発明は、このプロセスによって得られたかまたは得ることが可能である結合体も提供する。

30

【0010】

莢膜多糖

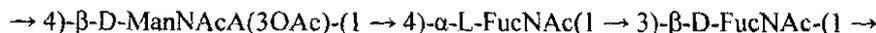
本発明は、S . a u r e u s 5型および8型莢膜多糖に基づく。5型および8型莢膜多糖の構造は、次の通りに参考文献14および15に記載された。

40

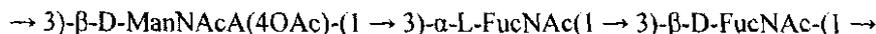
【0011】

【化 1】

5 型



8 型



10

最近の NMR 分光データ [16] は、これらの構造を次の通りに改訂した。

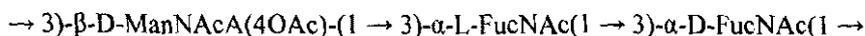
【 0 0 1 2 】

【化 2】

5 型



8 型



20

多糖は、天然で見られる荚膜多糖に比べて化学修飾されたものであり得る。

【 0 0 1 3 】

例えば、多糖は、脱 O - アセチル化（部分的または完全に）、脱 N - アセチル化（部分的または完全に）、N - プロピオン酸化（propionated）（部分的または完全に）等がなされていてよい。脱アセチル化は、結合体化の前、最中または後に起こり得るが、通常は結合体化前に起こる。特定の多糖に依存して、脱アセチル化は免疫原性に影響するか、あるいは影響しない可能性があり、例えば、NeisVac - CTM ワクチンは脱 O - アセチル化多糖を用い、一方、MenjugateTM はアセチル化されているが、どちらのワクチンも効果的である。脱アセチル化等の効果等は、日常的なアッセイによって評価することができる。例えば、S. aureus 5 型または 8 型荚膜多糖における O - アセチル化の関連性は、参考文献 6 において考察されている。この文書において、天然の多糖は、75% の O - アセチル化を有すると記されている。これらの多糖は、多糖骨格および O - アセチル基の両方に対する抗体を誘導した。0% の O - アセチル化を有する多糖もまた、多糖骨格に対する抗体を誘発した。どちらの種類の抗体も、その O - アセチル含量が様々である S. aureus 株に対してオプソニン作用があった。よって、本発明に用いられる 5 型または 8 型荚膜多糖は、0 ~ 100% の間の O - アセチル化を有することができる。例えば、5 型荚膜多糖の O - アセチル化の程度は、10 ~ 100%、10 ~ 100%、20 ~ 100%、30 ~ 100%、40 ~ 100%、50 ~ 100%、60 ~ 100%、70 ~ 100%、80 ~ 100%、90 ~ 100%、50 ~ 90%、60 ~ 90%、70 ~ 90% または 80 ~ 90% であり得る。あるいは、0% O - アセチル化 5 型荚膜多糖が用いられてもよい。同様に、8 型荚膜多糖の O - アセチル化の程度は、10 ~ 100%、10 ~ 100%、20 ~ 100%、30 ~ 100%、40 ~ 100%、50 ~ 100%、60 ~ 100%、70 ~ 100%、80 ~ 100%、90 ~ 100%、50 ~ 90%、60 ~ 90%、70 ~ 90% または 80 ~ 90% であり得る。あるいは、0% O - アセチル化 8 型荚膜多糖が用いられてもよい。一実施形態では、5 型および 8 型荚膜多糖の O - アセチル化の程度は、10 ~ 100%、20 ~ 100%、30 ~ 100%、4

30

40

50

0 ~ 100%、50 ~ 100%、60 ~ 100%、70 ~ 100%、80 ~ 100%、90 ~ 100%、50 ~ 90%、60 ~ 90%、70 ~ 90%または80 ~ 90%であり得る。他の実施形態では、0% O - アセチル化5型および8型莢膜多糖が用いられる。本発明に用いられる5型莢膜多糖のN - アセチル化の程度は、0 ~ 100%、50 ~ 100%、75 ~ 100%、80 ~ 100%、90 ~ 100%または95 ~ 100%であり得る。通常、5型莢膜多糖のN - アセチル化の程度は100%である。同様に、本発明に用いられる8型莢膜多糖のN - アセチル化の程度は、0 ~ 100%、50 ~ 100%、75 ~ 100%、80 ~ 100%、90 ~ 100%または95 ~ 100%であり得る。通常、8型莢膜多糖のN - アセチル化の程度は100%である。一実施形態では、5型および8型莢膜多糖のN - アセチル化の程度は、0 ~ 100%、50 ~ 100%、75 ~ 100%、80 ~ 100%、90 ~ 100%または95 ~ 100%であり得る。通常、5型および8型莢膜多糖のN - アセチル化の程度は100%である。

10

20

30

40

50

【0014】

多糖のO - アセチル化の程度は、本技術分野において公知のいずれかの方法によって、例えばプロトンNMR（例えば、参考文献17、18、19または20に記載）によって決定することができる。さらに別の方法は、参考文献21に記載されている。多糖のN - アセチル化の程度の決定に同様の方法を用いることができる。O - アセチル基は、加水分解によって、例えば、無水ヒドラジン[22]またはNaOH[6]等、塩基による処理によって除去することができる。N - アセチル基の除去に同様の方法を用いることができる。5型および/または8型莢膜多糖における高レベルのO - アセチル化を維持するために、O - アセチル基の加水分解をもたらす処理、例えば、極端なpHにおける処理は最小限に抑えられる。

【0015】

莢膜多糖は、本明細書における参考文献に記載されている公知の技法により精製することができる。通常のプロセスは、S. aureus細胞のフェノール - エタノール不活性化、遠心分離、リソスタフィン処理、RNase/DNase処理、遠心分離、透析、プロテアーゼ処理、さらなる透析、濾過、エタノール/CaCl₂による沈殿、透析、凍結乾燥、陰イオン交換クロマトグラフィー、透析、凍結乾燥、サイズ排除クロマトグラフィー、透析および凍結乾燥を伴う[1]。代替的なプロセスは、S. aureus細胞のオートクレーブ、多糖含有上清の限外濾過、濃縮、凍結乾燥、テイコ酸を除去するためのメタ過ヨウ素酸ナトリウムによる処理、さらなる限外濾過、ダイアフィルトレーション、高速サイズ排除液体クロマトグラフィー、透析および凍結乾燥を伴う[23]。好ましくは、参考文献24に記載されている精製プロセスが用いられる。

【0016】

しかし、本発明は、天然の供給源から精製された多糖に限定されず、多糖は、全合成または部分合成等、他の方法から得ることもできる。

【0017】**キャリア分子**

本発明は、通常はタンパク質であるキャリア分子の使用に關与する。一般に、糖のキャリアへの共有結合による結合体化は、糖をT細胞非依存性抗原からT細胞依存性抗原へと変換し、これにより免疫記憶をプライミングするため、糖の免疫原性を増強する。結合体化は、小児用ワクチンに特に有用であり[例えば、参考文献25]、周知の技法である[例えば、参考文献26 ~ 34に概説されている]。

【0018】

好ましいキャリアタンパク質は、ジフテリアもしくは破傷風毒素等の細菌毒素またはそれらのトキソイドもしくは変異体である。本発明者らは、CRM197ジフテリア毒素変異体[35]が適切であることを見出した。Pseudomonas aeruginosa外毒素A(ETA)およびその無毒性変異体組換えエキソプロテイン(exoprotein)A(REPA)は、S. aureus 5型または8型莢膜多糖のキャリアタンパク質として用いられてきた([1]および[2])。S. aureus - ヘモリシ

ン(- 毒素) ([1 0] および [3 6])、卵白アルブミン [1 3] およびヒト血清アルブミン [1 1] も用いられてきた。これらのキャリアは、本発明において用いることができる。

【 0 0 1 9 】

他の適切なキャリアタンパク質として、*N. meningitidis* 外膜タンパク質複合体 [3 7]、合成ペプチド [3 8、3 9]、熱ショックタンパク質 [4 0、4 1]、百日咳タンパク質 [4 2、4 3]、サイトカイン [4 4]、リンホカイン [4 4]、ホルモン [4 4]、増殖因子 [4 4]、ヒト血清アルブミン(通常は組換え)、様々な病原体由来抗原からの複数のヒト CD 4 + T 細胞エピトープを含む人工タンパク質 [4 5]、例えば、N 1 9 [4 6]、*H. influenzae* のタンパク質 D [4 7 ~ 4 9]、肺炎球菌表面タンパク質 P s p A [5 0]、ニューモリシン [5 1] もしくはその無毒性誘導体 [5 2]、鉄取り込みタンパク質 [5 3]、*C. difficile* の毒素 A もしくは B [5 4]、G B S タンパク質 [5 5] または G A S タンパク質 [5 6] 等が挙げられる。

10

【 0 0 2 0 】

他の適切なキャリアタンパク質として、*S. aureus* タンパク質抗原、例えば下に述べる *S. aureus* タンパク質抗原が挙げられる。

【 0 0 2 1 】

例えばキャリア抑制のリスクを低下させるため、2以上のキャリアタンパク質を用いることができる。このように、5型および8型莢膜多糖に対し異なるキャリアタンパク質を用いることができ、例えば5型多糖は CRM 1 9 7 と結合体化することができ、一方8型多糖は r E P A と結合体化することができる。特定の多糖抗原に対し2以上のキャリアタンパク質を用いることもでき、例えば、5型多糖の2個の基において、一方の基は CRM 1 9 7 と結合体化し、もう一方の基は r E P A と結合体化することができる。しかし通常、多糖全体に対し同一のキャリアタンパク質が用いられる。

20

【 0 0 2 2 】

単一のキャリアタンパク質が2以上の多糖抗原を保有することができる [5 7、5 8]。例えば、単一のキャリアタンパク質が、5型および8型莢膜多糖と結合体化されていてよい。この目標を達成するため、結合体化プロセスに先立ち、異なる多糖を混合することができる。しかし通常、多糖毎に別個の結合体が存在し、結合体化後に異なる多糖が混合される。別個の結合体は同一キャリアに基づいてよい。

30

【 0 0 2 3 】

解重合

本発明のプロセスの工程 (a) において、莢膜多糖が解重合されて多糖断片が得られる。結合体化に先立つ超音波処理による8型莢膜多糖の解重合が報告されている [3]。この著者らは、低分子量の8型は免疫原性を持たないと結論付けている。したがってこの著者らは高分子量の多糖を好んだが、驚くべきことに、本発明は、天然の莢膜多糖よりも分子量の低い多糖断片を活用する。

【 0 0 2 4 】

様々な方法により全長多糖が解重合されて、本発明に用いるためのより短い断片を得ることができる。本発明者らは、5型莢膜多糖における - L - F u c N A c (3 O A c) 残基と - D - F u c N A c 残基との間の (1 3) グリコシド結合の切断をもたらす方法が特に適切であることを見出した。この方法が5型莢膜多糖に適用されると、その非還元末端に - D - F u c N A c - (1 部分) を有する多糖断片を生じる。この部分は、2個の隣接するヒドロキシル基を包含する。同様に、この方法が8型莢膜多糖に適用されると、その非還元末端に - D - F u c N A c - (1 部分) を有する多糖断片を生じると考えられ、この部分もまた、2個の隣接するヒドロキシル基を包含する。5型または8型多糖断片における隣接するヒドロキシル基は、続く後述の断片とキャリア分子との結合体化のためのハンドル (h a n d l e) を提供する。

40

【 0 0 2 5 】

50

よって、さらに別の態様では、本発明は、*S. aureus* 5型莢膜多糖を処理するための、該莢膜多糖を解重合して、その非還元末端に $-D-FucNAc-$ (1 部分を有する多糖断片を得る工程を含むプロセスを提供する。関連する態様では、本発明は、*S. aureus* 8型莢膜多糖を処理するための、該莢膜多糖を解重合して、その非還元末端に $-D-FucNAc-$ (1 部分を有する多糖断片を得る工程を含むプロセスを提供する。莢膜多糖は、上述の「莢膜多糖」に記載されている *S. aureus* 5型または8型莢膜多糖であり得る。本発明は、これらプロセスのいずれかによって得られたか、または得ることが可能である多糖断片も提供する。

【0026】

本発明者らは、解重合が酸加水分解によって行われ得ることを見出した。酸加水分解には、多糖中の他の基における副反応を回避するため、弱酸、例えば酢酸を用いることが好ましい。当業者であれば、加水分解に適切な酸および条件(例えば、濃度、温度および/または時間の条件)を同定することができるであろう。例えば、本発明者らは、2 mg/ml の多糖を2%酢酸(v/v)で90分、3時間処理するのが適切であることを見出した。本発明者らは、2 mg/ml を5%酢酸で90分、30分間、5時間または6時間処理するのが適切であることも見出した。他の酸、例えば、トリフルオロ酢酸または他の有機酸による処理も適切となり得る。特に、本発明者らは、特に8型莢膜多糖には、塩酸を用いることによって解重合効率が増加し得ることを見出した。例えば、本発明者らは、多糖を2 M塩酸で100分、30分間処理するのが適切であることを見出した。本発明者らは、2 M塩酸で100分、1時間、1.5時間、2時間または2.5時間処理するのが適切であることを見出した。このような塩酸による処理は、例えば、後述する多糖の脱O-アセチル化をもたらすことができる。

10

20

【0027】

多糖を解重合するための他の方法が適切となり得る。このような方法として、加熱、マイクロフルイダイゼーション[59]、音波放射[3]、酸化-還元[60]またはオゾン分解[61]が挙げられる。

【0028】

多糖断片は、クロマトグラフィー、例えば、サイズ排除クロマトグラフィーによって同定することができる。特異的な分子量は、Polymer Standard Service[62]から入手できる標準物質等、プルラン標準物質と対比して、ゲル濾過によって測定することができる。通常、本発明の断片は、様々な値の質量を有する断片の混合物である。解重合された5型莢膜多糖に関して、断片の分子量は通常、1~500 kDa、例えば、5~100 kDa、具体的には10~50 kDa、より具体的には20~30 kDaで変動する。同様に、解重合された8型莢膜多糖に関して、断片の分子量は、1~500 kDa、例えば、5~100 kDa、具体的には10~50 kDa、より具体的には20~30 kDaで変動し得る。一部の実施形態では、低分子量の5型および/または8型多糖断片が、本発明における使用のために選択される。例えば、低分子量断片に相当するゲル濾過画分が選択され、プールされてよい。低分子量の多糖断片は通常、5~20 kDaで変動する分子量を有する。

30

40

【0029】

解重合は、莢膜多糖のO-アセチル化の程度に変化を生じ得る。例えば、本発明者らは、酸加水分解が、O-アセチル化の程度の減少を生じ得ることを見出した。一部の実施形態では、断片のO-アセチル化の程度は、10~90%、20~70%、30~50%、具体的には35~45%であり得る。他の実施形態では、断片のO-アセチル化の程度は、0~10%、0~5%、0~2%、具体的には0%であり得る。

【0030】

アルデヒド基の導入

断片における少なくとも1個の糖残基へアルデヒド基を導入するため、プロセスの工程(b)において断片が酸化される。この工程は、2以上のアルデヒド基の糖残基への導入に参与し得る。特に、2個のアルデヒド基を導入することができる。例えば、工程(a)

50

における解重合が、その非還元末端に $-D-FucNAc-$ (1 部分を有する 5 型多糖断片を生じる場合、この部分における 2 個の隣接するヒドロキシル基を酸化して、2 個のアルデヒド基をこの部分へと導入することができる。このようにして、 $-D-FucNAc-$ (1 部分は、工程 (b) の糖残基となり得る。同様に、解重合が、その非還元末端に $-D-FucNAc-$ (1 部分を有する 8 型多糖断片を生じる場合、この部分における 2 個の隣接するヒドロキシル基を酸化して、2 個のアルデヒド基を導入することができる。このようにして、 $-D-FucNAc-$ (1 部分は、工程 (b) の糖残基となり得る。

【0031】

よって、さらに別の一態様では、本発明は、その非還元末端に $-D-FucNAc-$ (1 部分を有する *S. aureus* 5 型莢膜多糖を酸化して、 $-D-FucNAc-$ (1 部分における 2 個の隣接するヒドロキシル基を 2 個のアルデヒド基に変換する工程を含む、*S. aureus* 5 型莢膜多糖誘導体を提供するためのプロセスを提供する。関連する一態様では、本発明は、その非還元末端に $-D-FucNAc-$ (1 部分を有する *S. aureus* 8 型莢膜多糖を酸化して、 $-D-FucNAc-$ (1 部分における 2 個の隣接するヒドロキシル基を 2 個のアルデヒド基に変換する工程を含む、*S. aureus* 8 型莢膜多糖誘導体を提供するためのプロセスを提供する。莢膜多糖は、上述の「解重合」に記載されている多糖断片であり得る。本発明は、これらプロセスのいずれかにより得られたかまたは得ることが可能である *S. aureus* 莢膜多糖誘導体も提供する。

10

20

【0032】

アルデヒドを生成する通常の反応は、隣接するヒドロキシル基を酸化するための過ヨウ素酸塩、特にメタ過ヨウ素酸 (例えば、メタ過ヨウ素酸ナトリウムまたはカリウム、例えば $NaIO_4$) の使用を包含する [63]。当業者であれば、適切な酸化条件を同定することができるであろう。例えば、本発明者らは、 2 mg/ml の多糖の 1 : 1 比 (w/w) の $NaIO_4$ による室温、1 ~ 2 時間、暗所における処理が適切であることを見出した。本発明者らは、 2 mg/ml の多糖の 93 mM $NaIO_4$ による室温、8 時間、暗所における処理が適切であることも見出した。他の酸化条件が用いられてよく、例えば、四酸化オスミウム等が使用されてよい。

30

【0033】

キャリア分子とのカップリング

プロセスの工程 (c) における酸化された糖残基とキャリア分子とのカップリングは、直接的であっても、リンカーを介してもよい。必要に応じて任意の適切なリンカーを用いた、任意の適切な結合体化反応が用いられてよい。

【0034】

工程 (b) における酸化が、2 個のアルデヒド基がその部分に導入されている、その非還元末端に $-D-FucNAc-$ (1 部分を有する 5 型多糖断片を生じる場合、工程 (c) におけるカップリングは、これらアルデヒド基のうちの 1 個を介することができる。このようにして、酸化された $-D-FucNAc-$ (1 部分は、工程 (c) の酸化された糖残基となり得る。同様に、酸化が、2 個のアルデヒド基がその部分に導入されている、その非還元末端に $-D-FucNAc-$ (1 部分を有する 8 型多糖断片を生じる場合、工程 (c) におけるカップリングは、これらアルデヒド基のうちの 1 個を介することができる。このようにして、酸化された $-D-FucNAc-$ (1 部分は、工程 (c) の酸化された糖残基となり得る。

40

【0035】

よって、さらに別の一態様では、本発明は、結合体化された *S. aureus* 5 型莢膜多糖を提供するためのプロセスであって、酸化されて 2 個の隣接するヒドロキシル基が 2 個のアルデヒド基に変換されている、その非還元末端に $-D-FucNAc-$ (1 部分を有する *S. aureus* 5 型莢膜多糖をキャリア分子とカップリングする工程であって、カップリングが該アルデヒド基のうちの 1 個を介するカップリングである工程を含む

50

、プロセスを提供する。関連する一態様では、本発明は、結合体化された *S. aureus* 8型莢膜多糖を提供するためのプロセスであって、酸化されて2個の隣接するヒドロキシル基が2個のアルデヒド基に変換されている、その非還元末端に $-D-FucNAc-(1$ 部分を有する *S. aureus* 8型莢膜多糖をキャリア分子にカップリングする工程であって、カップリングが該アルデヒド基のうち1個を介するカップリングである工程を含む、プロセスを提供する。莢膜多糖は、上述の「アルデヒド基の導入」に記載されている莢膜多糖であり得る。キャリア分子は、上述の「キャリア分子」に記載されているキャリアであり得る。本発明は、これらプロセスのいずれかによって得られたかまたは得ることが可能である、結合体化された莢膜多糖も提供する。

【0036】

酸化された糖残基またはリンカーのキャリアへの連結は通常、例えば、キャリアタンパク質におけるリシン残基の、あるいはアルギニン残基の側鎖におけるアミン ($-NH_2$) 基を介する。キャリアへの連結は、例えば、システイン残基の側鎖におけるスルフィドリル (*sulphydryl*) ($-SH$) 基を介することもできる。本発明者らは、酸化された糖残基におけるアルデヒド基をキャリアにおけるアミン基と還元的アミノ化により反応させることによって、直接的なカップリングが簡便に達成できることを見出した。したがって、本発明において、この性質の直接的なカップリングが好ましい。対照的に、参考文献2は、*S. aureus* 5型および8型結合体において、リンカーが有利となり得ることを示唆する。必要に応じて、例えば、酸化された糖残基におけるアルデヒド基をリンカーにおけるアミン基と還元的アミノ化により反応させることによって、あるいは還元的アミノ化によりアルデヒド基をアミン基へと変換させてリンカー連結のためのアミン基を提供することによって、本発明においてリンカーを介したカップリングを用いることができる。

【0037】

還元的アミノ化は、有機化学における標準技法であり、*S. aureus* 莢膜多糖等、ワクチン用途の莢膜多糖結合体の生産に広範に用いられてきた [10]。一実施形態では、酸化された糖残基におけるアルデヒド基は、キャリアまたはリンカーにおけるアミン基と反応する。この反応は、適正な還元剤 (例えば、シアノ水素化ホウ素ナトリウム $NaBH_3CN$ 等のシアノ水素化ホウ素塩、ボラン-ピリジン、ナトリウムトリアセトキシボロヒドリド、水素化ホウ素交換レジン等) の存在下にて多糖をキャリアまたはリンカーと組み合わせることによって簡便に達成することができる。別の実施形態では、アルデヒド基は還元的アミノ化によりアミン基に変換され、リンカー連結のためのアミン基を提供する。還元的アミノ化は、アンモニウムまたは一級アミン (NH_2R) のいずれかに関与する。これは、適正な還元剤 (例えば、上に列挙した) と組み合わせたアンモニウム塩 (例えば、塩化アンモニウム) を用いることによって、簡便に達成することができる。当業者であれば、還元的アミノ化に適切な条件を同定することができるであろう。例えば、本発明者らは、 10 mg/ml の多糖の、4:1の多糖:タンパク質比 (w/w) のキャリアタンパク質および2:1の多糖: $NaBH_3CN$ 比の $NaBH_3CN$ による処理が適切であることを見出した。

【0038】

任意の公知手順、例えば上述の還元的アミノ化手順を用いて、リンカー基を介したカップリングを行うことができる。一実施形態では、二官能性リンカーを用いて、酸化された糖残基におけるアルデヒド基とのカップリングのための第一の基およびキャリアとのカップリングのための第二の基を提供することができる。例えば、式、 X_1-L-X_2 (式中、 X_1 はアルデヒドと反応することができ、 X_2 はキャリアと反応することができ、 L はリンカーにおける接続部分である) の二官能性リンカーを用いることができる。通常、 X_1 基はアミン基である。通常、 L 基は、1~10個の炭素原子 (例えば、 C_1 、 C_2 、 C_3 、 C_4 、 C_5 、 C_6 、 C_7 、 C_8 、 C_9 、 C_{10}) を有する直鎖アルキル、例えば $-(CH_2)_4-$ または $-(CH_2)_3-$ である。別の実施形態では、二官能性リンカーを用いて、酸化された糖残基におけるアルデヒド基に由来するアミン基 (例えば、上述の還

10

20

30

40

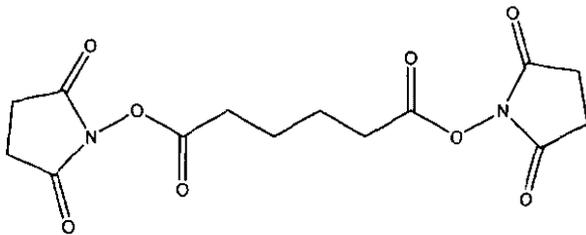
50

元的アミノ化による)とのカップリングのための第一の基およびキャリアとのカップリングのための(通常は、キャリアにおけるアミンとのカップリングのための)第二の基を提供することができる。例えば、式、 $X - L - X$ (式中、2個のX基は互いに同一のものであり、アミンと反応することができ、Lはリンカーにおける接続部分である)のホモ二官能性リンカーを用いることができる。通常、X基はN-オキシスクシンイミドである。Lは通常、式、 $-L^1 - L^2 - L^1 -$ (式中、 L^1 はカルボニルである)を有する。通常、 L^2 基は、1~10個の炭素原子(例えば、 C_1 、 C_2 、 C_3 、 C_4 、 C_5 、 C_6 、 C_7 、 C_8 、 C_9 、 C_{10})を有する直鎖アルキル、例えば、 $-(CH_2)_4-$ である。このため通常、リンカーはアジピン酸N-ヒドロキシスクシンイミドジエステル(SIDEA)である。

10

【0039】

【化3】



20

他のX基は、ノルボラン(norborane)、p-ニトロ安息香酸およびスルホ-N-ヒドロキシスクシンイミド等、 $HO - L - OH$ と組み合わせるとエステルを形成する基である。本発明と共に用いるためのアミンと反応性のさらに別の二官能性リンカーは、ハロゲン化(例えば、塩化)アクリロイル[65]、ハロゲン化ハロアシル[66]、グルタル酸ジスクシンイミジル、スベリン酸ジスクシンイミジル、エチレングリコールビス[コハク酸スクシンイミジル]等を包含する。

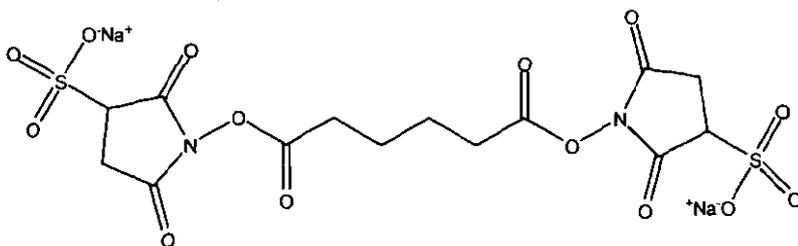
【0040】

リンカーは一般に、多糖に対してモル過剰で加えられる。リンカーは通常、水に不溶性であるため、リンカー/多糖反応は一般に非プロトン溶媒(例えば、DMSO、酢酸エタノール等)において行われる。しかし、水溶性リンカーが用いられる場合、水等、プロトン溶媒を包含するより広範囲の溶媒を利用できる。適切なリンカーは、スルホン化SIDEA等、スルホン化形態を包含する。

30

【0041】

【化4】



40

リンカーが用いられる場合、結合体はリンカー部分を含むことになる。この部分は、多糖もキャリアも起源としないが、結合体調製において用いられる第三の分子であり、最終結合体産物において多糖およびキャリアタンパク質の両方から容易に識別することができる。リンカー部分は、炭素、水素、酸素および/または窒素等の原子を包含することがで

50

きる。炭素および水素を含むリンカーが通常のものであり、酸素および/または窒素をさらに含むリンカーもまた通常用いられる。窒素原子を包含するリンカーは、窒素原子と結合した炭素原子を包含することができ、この窒素原子は他方で第二の炭素原子と結合する(-C-N-C-)。酸素原子を包含するリンカーは通常、該原子をカルボニル基の一部として包含する。30~500Daの分子量を有するリンカー部分が通常のものである。2個のカルボニル基を含有するリンカーも通常のものである。

【0042】

特に有用なリンカー部分は、-NH-C(O)-(CH₂)_n-C(O)-(式中、nは1、2、3、4、5、6、7、8、9または10である)である。nの値は通常4である。このリンカーにおける末端-NH-は通例、多糖部分由来の炭素原子に連結される。末端-C(O)-は通例、キャリアのアミノ酸側鎖における窒素原子に連結される。好ましいリンカー部分は、酸化された糖残基におけるアルデヒドの還元的アミノ化；その結果生じる-NH₂基と、二酸(例えば、アジピン酸、HOOC-(CH₂)₄-COOH)のジエステル(例えば、ジスクシンイミジルエステル)である二官能性リンカーとの反応；および産物の還元的アミノ化を伴うプロセスによって簡便に導入することができる(図6[64]を参照)。

10

【0043】

リンカーを多糖における-NH₂基へと連結するために用いることのできる他の化学として、次のものが挙げられる。

【0044】

-アクリロイル化(例えば、塩化アクリロイルとの反応による)と、続くアミノ酸側鎖の-NH₂またはシステイン側鎖の-SHのいずれかへのマイケル型付加[65]。その結果生じるリンカーは、-NH-C(O)-(CH₂)₂-(プロピオンアミド)である。

20

【0045】

-ハロゲン化ハロアシルとの反応と、続くアミノ酸側鎖の-NH₂またはシステイン側鎖の-SHとの反応[66]。リンカーは-NH-C(O)-CH₂-である。

【0046】

通常、1:20(すなわち、タンパク質過剰)から20:1(すなわち、多糖過剰)の多糖:タンパク質比(w/w)の結合体が、本発明の方法によって産生される。1:10から1:1の比が好ましく、特に1:5から1:2の比、最も好ましくは約1:3である。対照的に、先行技術のプロセスによって作製された5型および8型莢膜多糖結合体は、より高い比、例えば、参考文献1、2および3では0.73:1から1.08:1を有する傾向がある。本発明の特定の実施形態では、5型莢膜多糖結合体の多糖:タンパク質比(w/w)は1:10から1:2であり、および/または8型莢膜多糖結合体の多糖:タンパク質比(w/w)は1:5から7:10である。

30

【0047】

組成物は、少量の遊離キャリアを包含することができる[67]。所定のキャリアタンパク質が本発明の組成物において遊離型および結合体型の両方で存在する場合、非結合体型は、好ましくは組成物全体におけるキャリアタンパク質の総量の5%以下、より好ましくは、2重量%未満で存在する。

40

【0048】

結合体化の後、遊離型および結合体型多糖を分離することができる。疎水性クロマトグラフィー、タンジェンシャル限外濾過、ダイアフィルトレーション等を包含する多くの適切な方法が存在する[参考文献68および69等も参照されたい]。

【0049】

結合体および他の抗原の組合せ

上述の個々の結合体の提供に加え、本発明は、本発明の結合体、および1または複数のさらに別の抗原を含む組成物を提供する。組成物は通常、免疫原性組成物である。

【0050】

50

さらに別の抗原（複数可）は、本発明のさらに別の結合体を含むことができ、そこで本発明は、2以上の本発明の結合体を含む組成物を提供する。特に、本発明は、本発明の5型莢膜多糖結合体および本発明の8型莢膜多糖結合体を含む組成物を提供する。あるいは、さらに別の抗原（複数可）は、本発明の方法以外の方法、例えば、上述の参考文献1～13の方法によって調製された5型または8型莢膜多糖結合体であり得る。同様に、さらに別の抗原（複数可）は、参考文献59、70、71、72、73および74の方法、特にこれらの文書において特に例示されている方法によって調製された5型または8型莢膜多糖結合体であり得る。よって、本発明は、一方の結合体（5型結合体または8型結合体）が本発明の結合体であり、もう一方の結合体が本発明の結合体ではない、5型莢膜多糖結合体および8型莢膜多糖結合体を含む組成物を提供する。

10

【0051】

さらに別の抗原（複数可）は、下に述べるタンパク質および糖抗原を包含する他の *S. aureus* 抗原を含むことができる。

【0052】

さらに別の抗原（複数可）は、非 *S. aureus* 病原体由来の抗原を含むことができる。このように、本発明の組成物は、追加的な細菌、ウイルスまたは寄生生物抗原を包含する1または複数の非 *S. aureus* 抗原をさらに含むことができる。これらは次のものから選択することができる。

【0053】

- タンパク質「287」（後述を参照）および誘導體（例えば、「G287」）が特に有用である、参考文献75～81の抗原等、*N. meningitidis* 血清型B由来のタンパク質抗原

20

- 参考文献82、83、84、85等が開示されている調製物等、*N. meningitidis* 血清型B由来の外膜小胞（OMV）調製物

- 血清型C由来の参考文献86が開示されているオリゴ糖または参考文献87のオリゴ糖等、*N. meningitidis* 血清型A、C、W135および/またはY由来の糖抗原

- *Streptococcus pneumoniae* 由来の糖抗原 [例えば、参考文献88～90；参考文献97の第22および23章]

- 不活性化ウイルス等、A型肝炎ウイルス由来の抗原 [例えば、91、92；参考文献97の第15章]

30

- 表面および/またはコア抗原等、B型肝炎ウイルス由来の抗原 [例えば、92、93；参考文献97の第16章]

- C型肝炎ウイルス由来の抗原 [例えば、94]

- 百日咳ホトキソイド等、*Bordetella pertussis* 由来の抗原および *B. pertussis* 由来の線維状赤血球凝集素（FHA）。これは場合により、パータクチンおよび/または凝集原2および3とも組み合わせる [例えば、参考文献95および96；参考文献97の第21章]

- ジフテリアトキソイド等、ジフテリア抗原 [例えば、参考文献97の第13章]

- 破傷風トキソイド等、破傷風抗原 [例えば、参考文献97の第27章]

40

- *Haemophilus influenzae* B由来の糖抗原 [例えば、参考文献97の第14章]

- *N. gonorrhoeae* 由来の抗原 [例えば、75、76、77]

- *Chlamydia pneumoniae* 由来の抗原 [例えば、98、99、100、101、102、103、104]

- *Chlamydia trachomatis* 由来の抗原 [例えば、105]

- *Porphyromonas gingivalis* 由来の抗原 [例えば、106]

- IPV等、ポリオ抗原（複数可） [例えば、107、108；参考文献97の第24章]

- 凍結乾燥した不活性化ウイルス [例えば、110、RabAvertTM] 等、狂犬

50

病抗原（複数可）[例えば、109]

- 麻疹、ムンプスおよび/または風疹抗原 [例えば、参考文献97の第19、20および26章]

- 赤血球凝集素および/またはノイラミニダーゼ表面タンパク質等、インフルエンザ抗原（複数可）[例えば、参考文献97の第17および18章]

- *Moraxella catarrhalis* 由来の抗原 [例えば、111]

- *Streptococcus pyogenes* (A群連鎖球菌) 由来の抗原 [例えば、112、113、114]

- *Streptococcus agalactiae* (B群連鎖球菌) 由来の抗原 [例えば、56、115~117]

- *SePIDermidis* 由来の抗原 [例えば、参考文献118、119および120に記載されているATCC-31432、SE-360およびSE-10株から得ることのできるI、IIおよび/またはIII型荚膜多糖]。

【0054】

糖または炭水化物抗原が用いられる場合、これは通常、免疫原性を増強するためキャリアと結合体化される。*H. influenzae* B、髄膜炎菌および肺炎球菌糖抗原の結合体化が周知のものである。

【0055】

毒性タンパク質抗原は、必要であれば解毒化することができる（例えば、化学的および/または遺伝的手段による百日咳毒素の解毒[96]）。

【0056】

ジフテリア抗原が組成物に包含される場合、これは通常、破傷風抗原および百日咳抗原も包含することになる。同様に、破傷風抗原が包含される場合、これは通常、ジフテリアおよび百日咳抗原も包含することになる。同様に、百日咳抗原が包含される場合、これは通常、ジフテリアおよび破傷風抗原も包含することになる。

【0057】

抗原は、アルミニウム塩に吸着することができる。

【0058】

好ましい組成物の一型は、免疫無防備状態に影響を及ぼすさらに別の抗原を包含し、よって本発明の*S. aureus* 結合体は、次の非*S. aureus* 病原体由来の1または複数の抗原と組み合わせることができる。*Streptococcus agalactiae*、*Staphylococcus epidermis*、インフルエンザウイルス、*Enterococcus faecalis*、*Pseudomonas aeruginosa*、*Legionella pneumophila*、*Listeria monocytogenes*、*Neisseria meningitidis* およびパラインフルエンザウイルス。

【0059】

好ましい組成物の別の一型は、院内感染に関連する細菌由来のさらに別の抗原を包含し、よって本発明の*S. aureus* 結合体は、次の非*S. aureus* 病原体由来の1または複数の抗原と組み合わせることができる。*Clostridium difficile*、*Pseudomonas aeruginosa*、*Candida albicans* および腸外病原性*Escherichia coli*。

【0060】

組成物における抗原は通常、それぞれ少なくとも1 μg/mlの濃度で存在する。一般に、任意の所定の抗原の濃度は、該抗原に対する免疫応答の誘発に十分なものとなる。

【0061】

本発明の組成物におけるタンパク質抗原の使用の代替法として、抗原をコードする核酸を用いることができる[例えば、参考文献121~129]。よって、本発明の組成物のタンパク質成分は、タンパク質をコードする核酸（通例はDNA、例えばプラスミドの形態）に置き換えることができる。

10

20

30

40

50

【0062】

実際には、本発明の組成物に包含される抗原の数には上限が存在し得る。本発明の組成物における抗原（*S. aureus* 抗原を包含する）の数は、20未満、19未満、18未満、17未満、16未満、15未満、14未満、13未満、12未満、11未満、10未満、9未満、8未満、7未満、6未満、5未満、4未満または3未満であり得る。本発明の組成物における *S. aureus* 抗原の数は、6未満、5未満または4未満であり得る。

【0063】

薬学的組成物および方法

本発明は、(a) 本発明の結合体と、(b) 薬学的に許容されるキャリアとを含む薬学的組成物を提供する。通常、「薬学的に許容されるキャリア」は、組成物を受けた個体にとって有害な抗体の産生をそれ自体は誘導しない任意のキャリアを包含する。適切なキャリアは通常、タンパク質、多糖、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、重合したアミノ酸、アミノ酸コポリマー、ショ糖 [130]、トレハロース [131]、ラクトースおよび脂質凝集体（油滴またはリポソーム等）等、大型のゆっくりと代謝される巨大分子である。このようなキャリアは、当業者にとって周知のものである。ワクチンは、水、生理食塩水、グリセロール等、希釈剤も含有することができる。さらに、湿潤剤または乳化剤、pH緩衝物質その他等、補助物質が存在してよい。無菌の発熱物質不含リン酸緩衝生理食塩水が通常のキャリアである。薬学的に許容される賦形剤についての徹底的な考察は、参考文献132に記されている。

10

20

【0064】

本発明の組成物は、水性形態（すなわち、溶液または懸濁物）でも乾燥形態（例えば、凍結乾燥された）でもよい。乾燥ワクチンが用いられる場合、これはその後、注射に先立ち液体媒質中に再構成されることになる。結合体ワクチンの凍結乾燥は、本技術分野において公知のものであり、例えば *Menjugate*TM 製品は凍結乾燥形態で提示され、一方、*NeisVac-C*TM および *Meningitec*TM は水性形態で提示される。凍結乾燥の間結合体を安定化させるため、通常、組成物中に例えば、1mg/ml から 30mg/ml（例えば、約 25mg/ml）の糖アルコール（例えば、マンニトール）または二糖（例えば、ショ糖もしくはトレハロース）を包含することができる。

30

【0065】

組成物は、バイアル中に提示、あるいは予め充填してあるシリンジ中に提示することができる。シリンジは、針と共にまたは針なしで供給することができる。シリンジは単一用量の組成物を包含するが、一方、バイアルは単一用量または複数用量を包含することができる。

【0066】

本発明の水性組成物は、他のワクチンの凍結乾燥形態からの再構成にも適切である。本発明の組成物がこのような即席の再構成に用いられる場合、本発明は、2個のバイアルを含み得るキット、あるいはシリンジの内容物がバイアルの内容物の注射に先立つ再活性化に用いられる、1個の予め充填してあるシリンジおよび1個のバイアルを含み得るキットを提供する。

40

【0067】

本発明の組成物は、単位用量形態または複数用量形態でパッケージすることができる。複数用量形態のため、充填済みシリンジよりバイアルが好ましい。効果的な投薬容積は日常的に確立することができるが、組成物の通常のヒト用量は、例えば筋肉内注射について 0.5ml の容積である。

【0068】

組成物の pH は通常、6~8の間、例えば約7である。安定的な pH は、バッファーの使用によって維持することができる。組成物が水酸化アルミニウム塩を含む場合、これは通常、ヒスチジンバッファーを用いることになる [133]。組成物は、無菌および/または発熱物質不含であり得る。本発明の組成物は、ヒトに対して等張であり得る。

50

【0069】

本発明の組成物は免疫原性であり、より好ましくはワクチン組成物である。本発明に係るワクチンは、予防用（すなわち感染症の防止）または治療用（すなわち感染症の処置）のいずれであってもよいが、通常は予防用である。ワクチンとして用いた免疫原性組成物は、免疫学的有効量の抗原（複数可）と共に適宜任意のその他の成分を含む。「免疫学的有効量」とは、単一用量、あるいは一連の投薬の一部としてこの量を個体に投与することが処置または防止に効果的であることを意味する。この量は、処置しようとする個体の健康状態および身体条件、年齢、処置しようとする個体の分類群（例えば、非ヒト霊長類、霊長類等）、個体の免疫系が抗体を合成する能力、所望の防御の程度、ワクチンの処方、医学的状态に関する治療医の評価ならびに他の関連因子に応じて変動する。量は比較的広範囲であり、日常的な治験によって決定できることが予想される。

10

【0070】

各用量内において、個々の糖抗原の量は一般に、 $1 \sim 50 \mu\text{g}$ （糖の質量として測定される）、例えば約 $1 \mu\text{g}$ 、約 $2.5 \mu\text{g}$ 、約 $4 \mu\text{g}$ 、約 $5 \mu\text{g}$ または約 $10 \mu\text{g}$ となる。

【0071】

S . a u r e u s は様々な身体領域を冒し、よって本発明の組成物は様々な形態で調製することができる。例えば、組成物は、液体の溶液または懸濁物のいずれかとして注射剤として調製することができる。組成物は、例えば微粉末またはスプレーを用いた吸入器として経肺投与用に調製することができる。組成物は、坐剤または膣坐剤として調製することができる。組成物は、経鼻、経耳または点眼投与用、例えばスプレー、点滴剤、ゲルまたは粉末として調製することができる [例え、参考文献 134 および 135]。肺炎球菌糖 [136、137]、H i b 糖 [138]、M e n C 糖 [139] ならびに H i b および M e n C 糖結合体の混合物 [140] の経鼻投与での成功が報告されている。

20

【0072】

本発明の組成物は、特に複数用量形態でパッケージされる場合、抗菌剤を包含することができる。

【0073】

本発明の組成物は、界面活性剤、例えば T w e e n 80 等、T w e e n（ポリソルベート）を含むことができる。界面活性剤は一般に、低レベル、例えば $< 0.01\%$ で存在する。

30

【0074】

本発明の組成物は、張度を生じるためのナトリウム塩（例えば、塩化ナトリウム）を包含することができる。 $10 \pm 2 \text{mg} / \text{ml}$ 濃度の N a C l が通常のものである。

【0075】

本発明の組成物は一般に、バッファーを包含する。リン酸バッファーが通常のものである。

【0076】

本発明の組成物は一般に、他の免疫調節剤と組み合わせて投与される。特に、組成物は通例、1または複数のアジュバントを包含する。このようなアジュバントとして次のものが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

40

【0077】

A . ミネラル含有組成物

本発明におけるアジュバントとしての使用に適切なミネラル含有組成物は、アルミニウム塩およびカルシウム塩等、ミネラル塩を包含する。本発明は、水酸化物（例えば、オキシ水酸化物）、リン酸塩（例えば、ヒドロキシリン酸塩、オルトリン酸塩）、硫酸塩等、ミネラル塩 [例え、参考文献 141 の第 8 および 9 章を参照] または異なるミネラル化合物の混合物（例えば、リン酸塩アジュバントおよび水酸化物アジュバントの混合物、場合により過剰のリン酸塩を含む）を包含し、化合物は任意の適切な形態（例えば、ゲル、結晶、アモルファス等）を取り、塩（複数可）との吸着が通常である。ミネラル含有組成物は、金属塩の粒子として処方することもできる [142]。

50

【0078】

アルミニウム塩は、 Al^{3+} の用量が投与量当たり0.2~1.0mgとなるように、本発明のワクチンに包含することができる。

【0079】

通常のリン酸アルミニウムアジュバントは、0.84~0.92の PO_4 / Al モル比を有するアモルファスヒドロキシリン酸アルミニウムであり、0.6mg Al^{3+} / ml にて含まれる。例えば、投与量毎の結合体当たり50~100 μg Al^{3+} の、低用量のリン酸アルミニウムによる吸着を用いることができる。リン酸アルミニウムが用いられ、抗原がアジュバントに吸着しないことが望ましい場合、溶液中に遊離リン酸イオンを包含することによって（例えば、リン酸バッファの使用によって）これがもたらされる。

10

【0080】

B. 油性エマルジョン

本発明におけるアジュバントとしての使用に適切な油性エマルジョン組成物は、MF59（5%スクアレン、0.5% Tween 80および0.5% Span 85、マイクロフルダイザー（microfluidizer）を用いてサブミクロン粒子に処方）等、スクアレン-水エマルジョンを包含する[参考文献141の第10章、参考文献143~145も参照されたい]。MF59は、FLUADTMインフルエンザウイルス三価サブユニットワクチンにおけるアジュバントとして用いられる。

20

【0081】

組成物における使用に特に有用なアジュバントは、サブミクロン水中油型エマルジョンである。本明細書における使用のための好ましいサブミクロン水中油型エマルジョンは、4~5%w/vスクアレン、0.25~1.0%w/v Tween 80（ポリオキシエチレンソルビタンモノオレート）および/または0.25~1.0% Span 85（ソルビタントリオレート）と、場合によりN-アセチルムラミル-L-アラニル-D-イソグルタミニル（isogluatminy l）-L-アラニン-2-（1'-2'-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ヒドロキシホスホリルオキシ（hydroxyphosphoryloxy））-エチルアミン（MTP-PE）を含有するサブミクロン水中油型エマルジョン等、場合により変動量のMTP-PEを含有するスクアレン/水エマルジョンである。組成物において用いるためのサブミクロン水中油型エマルジョン、これを作製する方法およびムラミルペプチド等の免疫賦活剤は、参考文献143および146~147において詳細に記載されている。

30

【0082】

フロイント完全アジュバント（CFA）およびフロイント不完全アジュバント（IFA）を本発明におけるアジュバントとして用いることもできる。

【0083】

C. サポニン処方物 [参考文献141の第22章]

サポニン処方物は、本発明におけるアジュバントとして用いることもできる。サポニンは、幅広い植物種の樹皮、葉、茎、根、さらには花に見出されるステロールグリコシドおよびトリテルペノイドグリコシドの異種群である。Quillaja saponaria Molinaの木の樹皮から単離されたサポニンが、アジュバントとして広く研究されてきた。サポニンはまた、Smilax ornata（サルサパリラ（sarsapilla））、Gypsophylla paniculata（ブライズベール（brides veil））およびSaponaria officinalis（ソーブルート（soap root））由来のものが市販されている。サポニンアジュバント処方物は、QS21等の精製された処方物およびISCOM等の脂質処方物を包含する。

40

【0084】

サポニン組成物は、HPLCおよびRP-HPLCを用いて精製された。QS7、QS17、QS18、QS21、QH-A、QH-BおよびQH-C等、これらの技法を用いて特異的な精製画分が同定された。好ましくは、サポニンはQS21である。QS21を

50

生産する方法は、参考文献148に開示されている。サポニン処方物はまた、コレステロール等、ステロールを含むこともできる[149]。

【0085】

サポニンおよびコレステロールの組合せを用いて、免疫刺激複合体 (ISCOM) と称する独自の粒子を生成することができる [参考文献141の第23章]。ISCOMは通常、ホスファチジルエタノールアミンまたはホスファチジルコリン等、リン脂質も包含する。任意の公知サポニンをISCOMにおいて用いることができる。好ましくは、ISCOMは、QuilA、QHAおよびQHCのうち1または複数を含む。ISCOMは、参考文献149~151においてさらに記載されている。場合により、ISCOMは追加的な界面活性剤 (複数可) を欠いてもよい [152]。

10

【0086】

サポニンベースのアジュバントの開発についての概説は、参考文献153および154に見出すことができる。

【0087】

D. ピロソームおよびウイルス様粒子

ピロソームおよびウイルス様粒子 (VLP) を本発明におけるアジュバントとして用いることもできる。これらの構造は一般に、場合によりリン脂質と組み合わせられたか処方された、ウイルス由来の1または複数のタンパク質を含有する。これらは一般に、非病原性かつ非複製性であり、一般に、天然のウイルスゲノムを何ら含有しない。ウイルスタンパク質は、組換えにより産生、あるいはウイルス全体から単離することができる。ピロソームまたはVLPにおける使用に適切なこれらのウイルスタンパク質は、インフルエンザウイルス (HAまたはNA等)、B型肝炎ウイルス (コアまたはカプシドタンパク質等)、E型肝炎ウイルス、麻疹ウイルス、シンドビスウイルス、ロタウイルス、口蹄疫ウイルス、レトロウイルス、ノーウォークウイルス、ヒトパピローマウイルス、HIV、RNA-ファージ、Q-ファージ (コートタンパク質等)、GA-ファージ、fr-ファージ、AP205ファージおよびTy (レトロトランスポゾンTyタンパク質p1等) に由来するタンパク質を包含する。VLPについては、参考文献155~160においてさらに考察されている。ピロソームについては、例えば、参考文献161においてさらに考察されている。

20

【0088】

E. 細菌または微生物の誘導体

本発明における使用に適切なアジュバントは、腸内細菌リポ多糖 (LPS) の非毒性誘導体、リポD誘導体、免疫賦活性オリゴヌクレオチドならびにADPリボシル化毒素およびそれらの解毒化された誘導体等、細菌または微生物の誘導体を包含する。

30

【0089】

LPSの非毒性誘導体は、モノホスホリルリポD (MPL) および3-O-脱アシル化MPL (3dMPL) を包含する。3dMPLは、4、5または6アシル化鎖を有する3脱-O-アシル化モノホスホリルリポDの混合物である。3脱-O-アシル化モノホスホリルリポD由来の好ましい「小粒子」の形態が参考文献162に開示されている。3dMPLのこのような「小粒子」は、0.22 μ mメンブレンを通した滅菌濾過を行うのに十分なほど小さい [162]。他の無毒性LPS誘導体は、アミノアルキルグルコサミニドホスフェート誘導体、例えばRC-529等、モノホスホリルリポD模倣物を包含する [163、164]。

40

【0090】

リポD誘導体は、OM-174等、Escherichia coli由来のリポD誘導体を包含する。OM-174は、例えば、参考文献165および166に記載されている。

【0091】

本発明におけるアジュバントとしての使用に適切な免疫賦活性オリゴヌクレオチドは、CpGモチーフを含有するヌクレオチド配列 (リン酸結合によってグアノシンに接続した

50

非メチル化シトシンを含有するジヌクレオチド配列)を包含する。二本鎖RNAおよびオリゴヌクレオチド、例えば、パルンドロームまたはポリ(dG)配列もまた、免疫賦活性であることを示した。

【0092】

CpGモチーフは、ホスホロチオエート修飾等、ヌクレオチド修飾/アナログを包含することができ、二本鎖であっても一本鎖であってもよい。参考文献167、168および169は、可能性のあるアナログ置換、例えば、グアノシンの2'-デオキシ-7-デアザグアノシンへの置き換えを開示する。CpGオリゴヌクレオチドのアジュバント効果は、参考文献170~175においてさらに考察されている。

【0093】

CpG配列は、モチーフGTCGTTまたはTTCGTT等、TLR9に向けることができる[176]。CpG配列は、CpG-A ODN等、Th1免疫応答の誘導に対し特異的となることができ、CpG-B ODN等、B細胞応答の誘導に対しより特異的であり得る。CpG-AおよびCpG-B ODNは、参考文献177~179において考察されている。好ましくは、CpGはCpG-A ODNである。

【0094】

好ましくは、CpGオリゴヌクレオチドは、5'末端が受容体認識のためにアクセス可能となるように構築される。場合により、2個のCpGオリゴヌクレオチド配列をその3'末端で連結させて、「イムノマー(immunomer)」を形成することができる。例えば、参考文献176および180~182を参照されたい。

【0095】

細菌ADPリボシル化毒素およびその解毒化された誘導体は、本発明におけるアジュバントとして用いることができる。好ましくは、タンパク質は、E.coli(E.coli熱不安定性エンテロトキシン「LT」)、コレラ(「CT」)または百日咳(「PT」)に由来する。解毒化されたADPリボシル化毒素の粘膜アジュバントとしての使用は、参考文献183に記載されており、非経口アジュバントとしては参考文献184に記載されている。毒素またはトキソイドは、好ましくは、AおよびBサブユニットの両方を含むホロ毒素の形態である。好ましくは、Aサブユニットは解毒性変異を含有し、好ましくは、Bサブユニットは変異していない。好ましくは、アジュバントは、LT-K63、LT-R72およびLT-G192等、解毒性LT変異体である。ADPリボシル化毒素およびその解毒性誘導体(derivative)、特にLT-K63およびLT-R72のアジュバントとしての使用は、参考文献185~192に見出すことができる。アミノ酸置換の数値参照は、好ましくは、特に本明細書に参考としてその全体を援用する参考文献193に記載されているADPリボシル化毒素のAおよびBサブユニットのアライメントに基づく。

【0096】

F. ヒト免疫調節物質

本発明におけるアジュバントとしての使用に適切なヒト免疫調節物質は、インターロイキン(例えば、IL-1、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-12[194]等)[195]、インターフェロン(例えば、インターフェロン-)、マクロファージコロニー刺激因子および腫瘍壊死因子等、サイトカインを包含する。

【0097】

G. 生体接着物質および粘膜付着物質

生体接着物質および粘膜付着物質も、本発明におけるアジュバントとして用いることができる。適切な生体接着物質は、エステル化ヒアルロン酸マイクロスフェア[196]、またはポリ(アクリル酸)、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、多糖およびカルボキシメチルセルロースの架橋された誘導体等の粘膜付着物質を包含する。キトサンおよびその誘導体も、本発明におけるアジュバントとして用いることができる[197]。

【0098】

10

20

30

40

50

H. 微粒子

微粒子も、本発明におけるアジュバントとして用いることができる。生分解性かつ非毒性（例えば、ポリ（ α -ヒドロキシ酸）、ポリヒドロキシ酪酸、ポリオルトエステル、ポリ無水物、ポリカプロラクトン等、ポリ（ラクチド-co-グリコリド）が好ましい）材料から形成された微粒子（すなわち、直径約100nm～約150 μ m、より好ましくは直径約200nm～約30 μ m、最も好ましくは直径約500nm～約10 μ mの粒子）が好ましく、これは場合により、負電荷表面（例えば、SDSにより）または正電荷表面（例えば、CTAB等、カチオン性界面活性剤により）を有するよう処理される。

【0099】

I. リポソーム（参考文献141の第13および14章）

アジュバントとしての使用に適切なりポソーム処方物の例は、参考文献198～200に記載されている。

【0100】

J. ポリオキシエチレンエーテルおよびポリオキシエチレンエステル処方物

本発明における使用に適切なアジュバントは、ポリオキシエチレンエーテルおよびポリオキシエチレンエステルを包含する[201]。このような処方物は、オクトキシノールと組み合わせたポリオキシエチレンソルビタンエステルサーファクタント[202]および少なくとも1つのオクトキシノール等の追加的な非イオン性サーファクタントと組み合わせたポリオキシエチレンアルキルエーテルまたはエステルサーファクタント[203]をさらに包含する。好ましいポリオキシエチレンエーテルは、次の群から選択される：ポリオキシエチレン-9-ラウリルエーテル（ラウレス9）、ポリオキシエチレン-9-ステアリル（stearyl）エーテル、ポリオキシエチレン（polyoxyethylene）-8-ステアリルエーテル、ポリオキシエチレン-4-ラウリルエーテル、ポリオキシエチレン-35-ラウリルエーテルおよびポリオキシエチレン-23-ラウリルエーテル。

【0101】

K. ポリホスファゼン（PCPP）

PCPP処方物は、例えば、参考文献204および205に記載されている。

【0102】

L. ムラミルペプチド

本発明におけるアジュバントとしての使用に適切なムラミルペプチドの例として、N-アセチル-ムラミル-L-スレオニル-D-イソグルタミン（thr-MDP）、N-アセチル-ノルムラミル（normuramyl）-L-アラニル-D-イソグルタミン（nor-MDP）およびN-アセチルムラミル-L-アラニル-D-イソグルタミン-L-アラニン-2-(1'-2'-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ヒドロキシホスホリルオキシ)-エチルアミン（MTP-PE）が挙げられる。

【0103】

M. イミダゾキノロン化合物

本発明におけるアジュバントとしての使用に適切なイミダゾキノロン化合物の例として、参考文献206および207にさらに記載されているイミキモド（Imiquimod）およびそのホモログ（例えば、「Resiquimod 3M」）が挙げられる。

【0104】

N. チオセミカルバゾン化合物

本発明におけるアジュバントとしての使用に非常に適切なチオセミカルバゾン化合物ならびに化合物を処方、製造およびスクリーニングする方法の例として、参考文献208に記載されているものが挙げられる。チオセミカルバゾンは、ヒト末梢血単核球のTNF- α 等、サイトカイン産生への刺激に特に効果的である。

【0105】

O. トリプタントリン化合物

本発明におけるアジュバントとしての使用に非常に適切なトリプタントリン化合物なら

10

20

30

40

50

びに化合物を処方、製造およびスクリーニングする方法の例として、参考文献209に記載されているものが挙げられる。トリプタントリン化合物は、ヒト末梢血単核球のTNF- α 等、サイトカイン産生への刺激に特に効果的である。

【0106】

本発明は、上で同定されたアジュバントのうちの1または複数の態様の組合せを含むこともできる。例えば、次の組合せは、本発明におけるアジュバント組成物として用いることができる。(1)サポニンおよび水中油型エマルジョン[210]、(2)サポニン(例えば、QS21)+無毒性LPS誘導体(例えば、3dMPL)[211]、(3)サポニン(例えば、QS21)+無毒性LPS誘導体(例えば、3dMPL)+コレステロール、(4)サポニン(例えば、QS21)+3dMPL+IL-12(場合により+ステロール)[212]、(5)3dMPLと、例えばQS21および/または水中油型エマルジョンとの組合せ[213]、(6)サブミクロンエマルジョンにマイクロフルイダイズされたか、あるいはポルテックスしてより大きな粒子サイズエマルジョンに生成された、10%スクアラン、0.4%Tween80TM、5%プルロニック-ブロックポリマーL121およびthr-MDPを含有するSAF、(7)2%スクアレン、0.2%Tween80、ならびにモノホスホリル(monophosphoryl)リピドA(MPL)、ジミコール酸トレハロース(TDM)および細胞壁骨格(CWS)からなる群の1または複数の細菌細胞壁成分、好ましくはMPL+CWS(DetoxTM)を含有するRibiTMアジュバントシステム(RAS)(Ribi Immunochem)、(8)1または複数のミネラル塩(アルミニウム塩等)+LPSの無毒性誘導体(3dMPL等)。

10

20

【0107】

免疫賦活剤として作用する他の物質は、参考文献141の第7章に開示されている。

【0108】

アルミニウム塩アジュバントの使用は特に有用であり、抗原は一般にこのような塩に吸着させられる。MenjugateTMおよびNeisVacTM結合体は水酸化物アジュバントを用い、一方、MeningitecTMはリン酸塩アジュバントを用いる。本発明の組成物において、いくつかの抗原を水酸化アルミニウムに吸着させ、他の抗原をリン酸アルミニウムに関連させることもできる。しかし通常、単一の塩のみ、例えば水酸化物またはリン酸塩が用いられ、その両方は用いられない。全ての結合体が吸着されている必要はなく、すなわち一部または全部が溶液中に遊離してよい。

30

【0109】

処置方法

本発明は、本発明の薬学的組成物を哺乳動物に投与する工程を含む、哺乳動物において免疫応答を生じさせるための方法も提供する。免疫応答は好ましくは防御的であり、好ましくは抗体に關与する。この方法は、追加免疫応答を生じさせることができる。

【0110】

哺乳動物は、好ましくはヒトである。ワクチンが予防用途である場合、ヒトは好ましくは小児(例えば、幼児もしくは乳児)またはティーンエイジャーであり、ワクチンが治療用途である場合、ヒトは好ましくは成人である。例えば、安全性、投薬量、免疫原性等を評価するため、小児用に企図されたワクチンを成人に投与してもよい。処置のためのヒトの好ましいクラスは、院内感染リスクのある患者、特に末期腎疾患患者および/または血液透析を受けている患者である。院内感染リスクのある他の患者、例えば、免疫不全患者または手術、特に心臓手術もしくは外傷を受けた患者も好ましい。処置のためのヒトの別の好ましいクラスは、菌血症リスクのある患者である。さらに好ましいクラスは、インフルエンザウイルスに罹患したか、あるいは以前にそれに曝露された患者であるが、これはS. aureusがこれらの患者における感染後肺炎とリンクしているためである。

40

【0111】

本発明は、医薬として用いるための本発明の組成物も提供する。医薬は、好ましくは、哺乳動物において免疫応答を生じさせることができ(すなわち、免疫原性組成物である)

50

、より好ましくはワクチンである。

【0112】

本発明は、哺乳動物において免疫応答を生じさせるための医薬の製造における本発明の結合体の使用も提供する。

【0113】

これらの使用および方法は、好ましくは *S. aureus* に起因する疾患、例えば、皮膚感染症、例えば、膿痂疹、腫脹、蜂巣炎、毛包炎、麦粒腫、せつ、よう、熱傷様皮膚症候群および膿瘍、化膿性関節炎、肺炎、乳腺炎、静脈炎、髄膜炎、尿路感染症、骨髄炎、心内膜炎、トキシックショック症候群 (TSS)、敗血症ならびに院内感染を防止および/または処置するためのものである。

【0114】

治療的処置の有効性をチェックする仕方のひとつは、本発明の組成物の投与後の *S. aureus* 感染症のモニタリングに關与する。予防的処置の有効性をチェックする仕方のひとつは、組成物の投与後の *S. aureus* 抗原に対する免疫応答のモニタリングに關与する。

【0115】

本発明の好ましい組成物は、容認できるパーセンテージのヒト被験体について、各抗原成分についてのセロプロテクション (seroprotection) についての判断基準よりも優れた抗体力価を患者に付与することができる。宿主が抗原に対してセロコンバージョンされたと考えられる関連抗体力価を有する抗原は周知であり、このような抗体力価はWHO等の機関によって公表されている。好ましくは、被験体の統計的に有意な試料の80%超がセロコンバージョンされ、より好ましくは90%超、さらにより好ましくは93%超、最も好ましくは96~100%である。

【0116】

本発明の組成物は一般に、患者に直接投与されるであろう。直接的な送達は、非経口注射 (例えば、皮下、腹腔内、静脈内、筋肉内または組織腔への) によって、あるいは直腸、経口、膺、局所、経皮、鼻腔内、点眼、経耳、経肺または他の粘膜投与によって成し遂げることができる。大腿または上腕への筋肉内投与が好ましい。注射は、針 (例えば、皮下針) を經由することができるが、無針注射を代替的に用いることができる。通常の内用量は0.5mlである。

【0117】

本発明は、全身性および/または粘膜性免疫の誘発に用いることができる。

【0118】

投薬処置は、単一投与計画であっても、複数投与計画であってもよい。一次免疫化計画および/または追加免疫化計画において複数投与を用いることができる。一次投与計画に追加免疫化投与計画が続くだろう。一次投与の間 (例えば、4~16週間) および一次投与と追加免疫化との間の適切なタイミングは、日常的に決定することができる。

【0119】

S. aureus 抗原

前述の通り、1または複数のさらに別の *S. aureus* 抗原が本発明の組成物に包含され得る。抗原は、タンパク質または糖抗原であり得る。*S. aureus* タンパク質抗原は、本発明の結合体のためのキャリアタンパク質または他の結合体のためのキャリアタンパク質として、あるいは非結合体化タンパク質抗原として用いることができる。*S. aureus* 糖抗原は、他の結合体のための糖として、あるいは非結合体化糖抗原として用いることができる。

【0120】

適切な *S. aureus* 糖抗原は、ポリ-N-アセチルグルコサミン (PNAG) である *S. aureus* の菌体外多糖 (exopolysaccharide) を包含する。この多糖は、*S. aureus* および *S. epidermidis* の両方に存在し、いずれの供給源からも単離することができる [214、215]。例えば、PNAGは、*S.*

10

20

30

40

50

aureus 株 MN 8 m から単離することができる [2 1 6]。糖抗原は、細菌から菌体外多糖を精製する際に生じるサイズを有する多糖であり得、あるいは、このような多糖の断片化によって達成される多糖とすることができ、例えば、サイズは、4 0 0 k D a 超から 7 5 ~ 4 0 0 k D a もしくは 1 0 ~ 7 5 k D a または最大 3 0 反復単位へと変動し得る。糖抗原は、様々な程度の N - アセチル化を有することができ、参考文献 2 1 7 に記載されている通り、P N A G は、4 0 % 未満の N - アセチル化 (例 例 ば、3 5、3 0、2 0、1 5、1 0 または 5 % 未満の N - アセチル化 ; 脱アセチル化 P N A G は、d P N A G としても公知) であり得る。P N A G の脱アセチル化エピトープは、オプソニンによる死滅を媒介することのできる抗体を誘発することができる。d P N A G の調製は参考文献 2 1 8 に記載されている。P N A G は、O - スクシニル化されていても、されていなくてもよく、例えば、2 5、2 0、1 5、1 0、5、2、1 または 0 . 1 % より少ない残基が O - スクシニル化されていよい。P N A G は、上述の通りキャリア分子と結合体化することができ、あるいは非結合体であり得る。

10

【 0 1 2 1 】

別の適切な *S . aureus* 糖抗原は、O - アセチル化なしの - 結合ヘキソサミンである 3 3 6 型抗原である [2 1 9、2 2 0]。3 3 6 型抗原は、3 3 6 株 (A T C C 5 5 8 0 4) に対して産生された抗体と交差反応性である。3 3 6 型抗原は、上述のキャリア分子と結合体化することができ、あるいは非結合体であり得る。

【 0 1 2 2 】

適切な *S . aureus* タンパク質抗原は、次の *S . aureus* 抗原 (またはその免疫原性断片 (複数可) を含む抗原) を包含する [例 例 ば、参考文献 2 2 1 ~ 2 2 8 を参照]。A h p C、A h p F、自己溶菌酵素アミダーゼ、自己溶菌酵素グルコサミニダーゼ、コラーゲン結合タンパク質 C A N、E b h B、G e h D リパーゼ、ヘパリン結合タンパク質 H B P (1 7 k D a)、ラミニン受容体、M A P、M n t C (S i t C としても公知)、M R P I I、N p a s e、O R F 0 5 9 4、O R F 0 6 5 7 n、O R F 0 8 2 6、P B P 4、R A P (R N A I I I 活性化タンパク質)、S a i - 1、S a s K、S B I、S d r G、S d r H、S S P - 1、S S P - 2 およびピトロネクチン結合タンパク質。

20

【 0 1 2 3 】

さらに適切な *S . aureus* タンパク質抗原は、後述する通り、c l f A 抗原、c l f B 抗原、s d r E 2 抗原、s d r C 抗原、s a s F 抗原、e m p 抗原、s d r D 抗原、s p a 抗原、e s a C 抗原、e s x A 抗原、e s x B 抗原、s t a 0 0 6 抗原、i s d C 抗原、H l a 抗原、s t a 0 1 1 抗原、i s d A 抗原、i s d B 抗原および s t a 0 7 3 抗原を包含する。これら抗原のうち 1 または複数 (すなわち、1、2、3、4、5、6 以上) が、本発明の組成物中に存在することができる。これらの抗原のうち、1 または複数 (すなわち、1、2、3、4、5、6 以上) の e s x A 抗原、e s x B 抗原、s t a 0 0 6 抗原、H l a 抗原、s t a 0 1 1 抗原および / または s t a 0 7 3 抗原の使用が特に想定されている。

30

【 0 1 2 4 】

例えば、本発明の組成物は、次の *S . aureus* タンパク質抗原の組合せのうちの一つをさらに含むことができる。

40

(1) e s x A 抗原、e s x B 抗原、s t a 0 0 6 抗原および H l a 抗原。e s x A および e s x B 抗原は、下に考察する通りハイブリッドポリペプチドとして有用に組み合わせることができる (例 例 ば、e s x B 抗原が e s x A 抗原の下流にある E s x A B ハイブリッド)。H l a 抗原は、例 例 ば H 3 5 L 変異等、解毒化変異体であり得る。

(2) e s x A 抗原、e s x B 抗原、s t a 0 0 6 抗原および s t a 0 1 1 抗原。e s x A および e s x B 抗原は、下に考察する通りハイブリッドポリペプチド、例 例 ば E s x A B ハイブリッドとして組み合わせることができる。

(3) e s x A 抗原、e s x B 抗原および s t a 0 1 1 抗原。e s x A および e s x B 抗原は、下に考察する通りハイブリッドポリペプチド、例 例 ば E s x A B ハイブリッドとして有用に組み合わせることができる。

50

(4) *esx A* 抗原、*esx B* 抗原、*H1a* 抗原、*sta006* 抗原および *sta011* 抗原。*esx A* および *esx B* 抗原は、下に考察する通りハイブリッドポリペプチドとして組み合わせてもよい(例えば、*EsxAB* ハイブリッド)。*H1a* 抗原は、例えば *H35L* 変異等、解毒化変異体となることができる。

(5) *esx A* 抗原、*esx B* 抗原および *H1a* 抗原。*esx A* および *esx B* 抗原は、下に考察する通りハイブリッドポリペプチドとして有用に組み合わせることができる(例えば、*EsxAB* ハイブリッド)。*H1a* 抗原は、例えば *H35L* 変異等、解毒化変異体となることができる。

(6) *H1a* 抗原、*sta006* 抗原および *sta011* 抗原。*H1a* 抗原は、例えば *H35L* 変異等、解毒化変異体となることができる。

(7) *esx A* 抗原および *esx B* 抗原。*esx A* および *esx B* 抗原は、下に考察する通りハイブリッドポリペプチド、例えば *EsxAB* ハイブリッドとして有用に組み合わせることができる。

(8) *esx A* 抗原、*esx B* 抗原および *sta006* 抗原。*esx A* および *esx B* 抗原は、下に考察する通りハイブリッドポリペプチド、例えば *EsxAB* ハイブリッドとして有用に組み合わせることができる。

(9) *esx A* 抗原、*esx B* 抗原、*sta011* 抗原および *sta073* 抗原。*esx A* および *esx B* 抗原は、下に考察する通りハイブリッドポリペプチド、例えば *EsxAB* ハイブリッドとして組み合わせることができる。

(10) *sta006* 抗原および *sta011* 抗原。

【0125】

さらに別の *Staphylococcus aureus* 抗原は、参考文献 229 に開示されている。

【0126】

clfA

「*clfA*」抗原は、「凝集因子 A」と注釈が付けられている。NCTC 8325 株において、*clfA* は SAOUHSC__00812 であり、アミノ酸配列の配列番号 1 (GI: 88194572) を有する。Newman 株においては *nwmn__0756* (GI: 151220968) である。

【0127】

有用な *clfA* 抗原は、配列番号 1 を認識する抗体(例えば、ヒトに投与される場合)を誘発することができ、および/または (a) 配列番号 1 に対し 50% 以上(例えば、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5% 以上)の同一性を有し、かつ/または (b) 配列番号 1 の少なくとも「n」個の連続的アミノ酸の断片を含む(「n」は 7 以上(例えば、8、10、12、14、16、18、20、25、30、35、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250 以上)である)アミノ酸配列を含み得る。これらの *clfA* タンパク質は、配列番号 1 の改変体を包含する。(b) の好ましい断片は、配列番号 1 由来のエピトープを含む。他の好ましい断片は、配列番号 1 の少なくとも 1 個のエピトープを保持しつつ、配列番号 1 の C 末端から 1 または複数のアミノ酸(例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25 以上)および/または N 末端から 1 または複数のアミノ酸(例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25 以上)を欠く。配列番号 1 の最後の 368 個の C 末端アミノ酸は、有用に省略することができる。配列番号 1 の最初の 39 個の N 末端アミノ酸は、有用に省略することができる。他の断片は、1 または複数のタンパク質ドメインを省略する。

【0128】

配列番号 2 は、配列番号 1 の有用な断片である(「*ClfA*₄₀₋₅₅₉」)。この断片は、配列番号 1 の C 末端方向への長い反復領域を省略する。

【0129】

10

20

30

40

50

c l f B

「c l f B」抗原は、「凝集因子B」と注釈が付けられている。N C T C 8 3 2 5 株において、c l f BはS A O U H S C _ 0 2 9 6 3であり、アミノ酸配列の配列番号3 (G I : 8 8 1 9 6 5 8 5) を有する。Newman株においてはn w m n _ 2 5 2 9 (G I : 1 5 1 2 2 2 7 4 1) である。

【0130】

有用なc l f B抗原は、配列番号3を認識する抗体(例えば、ヒトに投与される場合)を誘発することができ、および/または(a)配列番号3に対し50%以上(例えば、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%以上)の同一性を有し、かつ/または(b)配列番号3の少なくとも「n」個の連続的アミノ酸の断片を含む(「n」は7以上(例えば、8、10、12、14、16、18、20、25、30、35、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250以上)である)アミノ酸配列を含み得る。これらのc l f Bタンパク質は、配列番号3の改変体を包含する。(b)の好ましい断片は、配列番号3由来のエピトープを含む。他の好ましい断片は、配列番号3の少なくとも1個のエピトープを保持しつつ、配列番号3のC末端から1または複数のアミノ酸(例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25以上)および/またはN末端から1または複数のアミノ酸(例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25以上)を欠く。配列番号3の最後の40個のC末端アミノ酸は、有用に省略することができる。配列番号3の最初の44個のN末端アミノ酸は、有用に省略することができる。他の断片は、1または複数のタンパク質ドメインを省略する。C l f Bは天然では長いタンパク質であり、よって断片の使用は、例えば精製、取り扱い、融合、発現等に有益である。

10

20

【0131】

配列番号4は、配列番号3の有用な断片である(「C l f B₄₅₋₅₅₂」)。この断片はC l f Bの最も露出したドメインを包含し、工業規模でより容易に用いられる。これは抗原のヒトタンパク質との類似性も低減させる。C l f Bの3ドメインモデルに基づく他の有用な断片は、C l f B₄₅₋₃₆₀(C l f B - N12としても公知; 配列番号5)、C l f B₂₁₂₋₅₄₂(C l f B - N23としても公知; 配列番号6)およびC l f B₃₆₀₋₅₄₂(C l f B - N3としても公知; 配列番号7)を包含する。

30

【0132】

s d r E 2

「s d r E 2」抗原は、「Ser - Aspリッチフィブリノーゲン/骨シアロタンパク質結合タンパク質S d r E」と注釈が付けられている。Newman株においてs d r E 2はN W M N _ 0 5 2 5であり、アミノ酸配列の配列番号8 (G I : 1 5 1 2 2 0 7 3 7) を有する。

【0133】

有用なs d r E 2抗原は、配列番号8を認識する抗体(例えば、ヒトに投与される場合)を誘発することができ、および/または(a)配列番号8に対し50%以上(例えば、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%以上)の同一性を有し、かつ/または(b)配列番号8の少なくとも「n」個の連続的アミノ酸の断片を含む(「n」は7以上(例えば、8、10、12、14、16、18、20、25、30、35、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250以上)である)アミノ酸配列を含み得る。これらのs d r E 2タンパク質は、配列番号8の改変体を包含する。(b)の好ましい断片は、配列番号8由来のエピトープを含む。他の好ましい断片は、配列番号8の少なくとも1個のエピトープを保持しつつ、配列番号8のC末端から1または複数のアミノ酸(例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25以上)および/またはN末端から1または複数のアミノ酸(例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25以上)を欠く。配列番号8の最後の

40

50

38個のC末端アミノ酸は、有用に省略することができる。配列番号8の最初の52個のN末端アミノ酸は、有用に省略することができる。他の断片は、1または複数のタンパク質ドメインを省略する。SdrE2は天然では長いタンパク質であり、よって断片の使用は、例えば精製、取り扱い、融合、発現等にたいへん有益である。

【0134】

配列番号9は、配列番号8の有用な断片である(「SdrE2₅₃₋₆₃₂」)。この断片はSdrE2の最も露出したドメインを包含し、工業規模でより容易に用いられる。これは抗原のヒトタンパク質との類似性も低減させる。

【0135】

sdrC

「sdrC」抗原は、「sdrCタンパク質」と注釈が付けられている。NCTC8325株においてsdrCはSAOUHSC__00544であり、アミノ酸配列の配列番号10(GI:88194324)を有する。

【0136】

有用なsdrC抗原は、配列番号10を認識する抗体(例えば、ヒトに投与される場合)を誘発することができ、および/または(a)配列番号10に対し50%以上(例えば、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%以上)の同一性を有し、かつ/または(b)配列番号10の少なくとも「n」個の連続的アミノ酸の断片を含む(「n」は7以上(例えば、8、10、12、14、16、18、20、25、30、35、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250以上)である)アミノ酸配列を含み得る。これらのsdrCタンパク質は、配列番号10の改変体を包含する。(b)の好ましい断片は、配列番号10由来のエピトープを含む。他の好ましい断片は、配列番号10の少なくとも1個のエピトープを保持しつつ、配列番号10のC末端から1または複数のアミノ酸(例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25以上)および/またはN末端から1または複数のアミノ酸(例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25以上)を欠く。配列番号10の最後の38個のC末端アミノ酸は、有用に省略することができる。配列番号10の最初の50個のN末端アミノ酸は、有用に省略することができる。他の断片は、1または複数のタンパク質ドメインを省略する。SdrCは天然では長いタンパク質であり、よって断片の使用は、例えば精製、取り扱い、融合、発現等に有益である。

【0137】

配列番号11は、配列番号10の有用な断片である(「SdrC5₁₋₅₁₈」)。この断片はSdrCの最も露出したドメインを包含し、工業規模でより容易に用いられる。これは抗原のヒトタンパク質との類似性も低減させる。

【0138】

sasF

「sasF」抗原は、「sasFタンパク質」と注釈が付けられている。NCTC8325株において、sasFはSAOUHSC__02982であり、アミノ酸配列の配列番号12(GI:88196601)を有する。

【0139】

有用なsasF抗原は、配列番号12を認識する抗体(例えば、ヒトに投与される場合)を誘発することができ、および/または(a)配列番号12に対し50%以上(例えば、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%以上)の同一性を有し、かつ/または(b)配列番号12の少なくとも「n」個の連続的アミノ酸の断片を含む(「n」は7以上(例えば、8、10、12、14、16、18、20、25、30、35、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250以上)である)アミノ酸配列を含み得る。これらのsasFタンパク質は、配列番号12の改変体を包含する。(b)の好ましい断片は、配列番号12由来のエピトープを含む。他の好まし

10

20

30

40

50

い断片は、配列番号12の少なくとも1個のエピトープを保持しつつ、配列番号12のC末端から1または複数のアミノ酸（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25以上）および/またはN末端から1または複数のアミノ酸（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25以上）を欠く。配列番号12の最後の39個のC末端アミノ酸は、有用に省略することができる。配列番号12の最初の37個のN末端アミノ酸は、有用に省略することができる。他の断片は、1または複数のタンパク質ドメインを省略する。

【0140】

emp

「emp」抗原は、「細胞外マトリックスおよび血漿結合タンパク質」と注釈が付けられている。NCTC8325株においてempはSAOUHSC__00816であり、アミノ酸配列、配列番号13（GI：88194575）を有する。Newman株において、これはnwmn__0758（GI：151220970）である。

10

【0141】

有用なemp抗原は、配列番号13を認識する抗体（例えば、ヒトに投与される場合）を誘発することができ、および/または（a）配列番号13に対し50%以上（例えば、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%以上）の同一性を有し、かつ/または（b）配列番号13の少なくとも「n」個の連続的アミノ酸の断片を含む（「n」は7以上（例えば、8、10、12、14、16、18、20、25、30、35、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250以上）である）アミノ酸配列を含み得る。これらのempタンパク質は、配列番号13の改変体を包含する。（b）の好ましい断片は、配列番号13由来のエピトープを含む。他の好ましい断片は、配列番号13の少なくとも1個のエピトープを保持しつつ、配列番号13のC末端から1または複数のアミノ酸（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25以上）および/またはN末端から1または複数のアミノ酸（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25以上）を欠く。配列番号13の最初の26個のN末端アミノ酸は、有用に省略することができる。他の断片は、1または複数のタンパク質ドメインを省略する。

20

【0142】

配列番号14、15、16および17は、配列番号13の有用な断片である（それぞれ「Emp₃₅₋₃₄₀」、「Emp₂₇₋₃₃₄」、「Emp₃₅₋₃₃₄」および「Emp₂₇₋₁₄₇」）。

30

【0143】

sdrD

「sdrD」抗原は、「sdrDタンパク質」と注釈が付けられている。NCTC8325株において、sdrDはSAOUHSC__00545であり、アミノ酸配列の配列番号18（GI：88194325）を有する。

【0144】

有用なsdrD抗原は、配列番号18を認識する抗体（例えば、ヒトに投与される場合）を誘発することができ、および/または（a）配列番号18に対し50%以上（例えば、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%以上）の同一性を有し、かつ/または（b）配列番号18の少なくとも「n」個の連続的アミノ酸の断片を含む（「n」は7以上（例えば、8、10、12、14、16、18、20、25、30、35、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250以上）である）アミノ酸配列を含み得る。これらのsdrDタンパク質は、配列番号18の改変体を包含する。（b）の好ましい断片は、配列番号18由来のエピトープを含む。他の好ましい断片は、配列番号18の少なくとも1個のエピトープを保持しつつ、配列番号18のC末端から1または複数のアミノ酸（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10

40

50

、15、20、25以上)および/またはN末端から1または複数のアミノ酸(例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25以上)を欠く。配列番号18の最後の38個のC末端アミノ酸は、有用に省略することができる。配列番号18の最初の52個のN末端アミノ酸は、有用に省略することができる。他の断片は、1または複数のタンパク質ドメインを省略する。sdrDは天然では長いタンパク質であり、よって断片の使用は、例えば精製、取り扱い、融合、発現等にたいへん有益である。

【0145】

配列番号19は、配列番号18の有用な断片である(「SdrD₅₃₋₅₉₂」)。この断片は、SdrDの最も露出したドメインを包含し、より容易に工業規模で用いられる。これはまた、抗原のヒトタンパク質との類似性を低下させる。同一C末端残基を有する別の有用な断片は、SdrD₃₉₄₋₅₉₂(SdrD-N3としても公知;配列番号20)である。

10

【0146】

s p a

「s p a」抗原は、「プロテインA」または「SpA」と注釈が付けられている。NC TC 8325株においてs p aはSAOUHSC__00069であり、アミノ酸配列、配列番号21(GI:88193885)を有する。Newman株において、これはnwmn__0055(GI:151220267)である。あらゆるS. aureus株は十分に特徴付けられたビルレンス因子であるs p aの構造遺伝子を発現し、その細胞壁アンカー型表面タンパク質産物はE、D、A、BおよびCと命名された5個の高度に相同な免疫グロブリン結合ドメインを有する[230]。これらのドメインは、アミノ酸レベルでほぼ80%の同一性を提示し、56~61残基の長さであり、縦列反復として組織化されている[231]。SpAは、N末端シグナルペプチドおよびC末端ソーティングシグナルを有する前駆体タンパク質として合成される[232、233]。細胞壁アンカー型s p aは、ブドウ球菌表面上に非常に大量に提示される[234、235]。その各免疫グロブリン結合ドメインは、3個のヘリックス束へとアセンブルする逆平行-ヘリックスで構成され、免疫グロブリンG(IgG)のFcドメイン[236、237]、IgMのVH3重鎖(Fab)(すなわち、B細胞受容体)[238]、フォンビルブランド因子のA1ドメイン[239]および/またはTNF-受容体I(TNFR1)[240](気道上皮表面上に提示される)と結合することができる。

20

30

【0147】

有用なs p a抗原は、配列番号21を認識する抗体(例えば、ヒトに投与される場合)を誘発することができ、および/または(a)配列番号21に対し50%以上(例えば、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%以上)の同一性を有し、かつ/または(b)配列番号21の少なくとも「n」個の連続的アミノ酸の断片を含む(「n」は7以上(例えば、8、10、12、14、16、18、20、25、30、35、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250以上)である)アミノ酸配列を含み得る。これらのs p aタンパク質は、配列番号21の改変体を包含する。(b)の好ましい断片は、配列番号21由来のエピトープを含む。他の好ましい断片は、配列番号21の少なくとも1個のエピトープを保持しつつ、配列番号21のC末端から1または複数のアミノ酸(例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25以上)および/またはN末端から1または複数のアミノ酸(例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25以上)を欠く。配列番号21の最後の35個のC末端アミノ酸は、有用に省略することができる。配列番号21の最初の36個のN末端アミノ酸は、有用に省略することができる。他の断片は、1または複数のタンパク質ドメインを省略する。参考文献241は、個々のIgG結合ドメインが、単独でまたは組み合わせることによって有用な免疫原となり得ることを示唆する。

40

【0148】

配列番号22は、配列番号21の有用な断片である(「Spa₃₇₋₃₂₅」)。この

50

断片は、5個のSpA-Ig結合ドメインを全て含有し、SpAの最も露出したドメインを包含する。これはまた、抗原のヒトタンパク質との類似性を低下させる。他の有用な断片は、天然のA、B、C、Dおよび/またはEドメインのうち1、2、3または4個を省略することができる。参考文献241に報告されているように、他の有用な断片は、天然のA、B、C、Dおよび/またはEドメインのうち1、2、3または4個のみを包含し得、例えば、SpA(A)ドメインのみを含み、B~Eを含まないか、あるいはSpA(D)ドメインのみを含み、A、B、CまたはEを含まない等である。よって、本発明に有用なspa抗原は、1、2、3、4または5個のIgG結合ドメインを包含することができるが、理想的には4個以下を有する。抗原が、1種類のspadドメインのみ(例えば、Spa(A)またはSpA(D)ドメインのみ)を包含する場合、抗原は、このドメインを2コピー以上、例えば、単一ポリペプチド鎖において複数のSpA(D)ドメインを包含することができる。抗原内の個々のドメインは、配列番号21に対して1、2、3、4、5、6、7、8、9、10以上のアミノ酸が変異してよい(例えば、ドメインDの残基3および/または24、ドメインAの残基46および/または53等における変異を開示する参考文献241を参照)。このような変異体は、配列番号21を認識する抗体を誘発する抗原の能力を除去してはならないが、IgGと結合する抗原の能力を除去することができる。ある態様では、spa抗原は、(a)IgG-Fcとの結合を破壊または減少させる、SpAドメインA、B、C、Dおよび/またはEのIgG-Fc結合サブドメインにおける1または複数のアミノ酸置換ならびに(b)V_H3との結合を破壊または減少させる、SpAドメインA、B、C、Dおよび/またはEのV_H3結合サブドメインにおける1または複数のアミノ酸置換における置換を包含する。ある実施形態では、改変体SpAは、少なくともまたは多くても1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個以上の改変体SpADドメインDペプチドを含む。

10

20

30

40

50

【0149】

e s a C

「e s a C」抗原は、「e s a C」と注釈が付けられている。NCTC 8325株において、e s a CはSAOUHSC__00264であり、アミノ酸配列の配列番号23(GI:88194069)を有する。

【0150】

有用なe s a C抗原は、配列番号23を認識する抗体(例えば、ヒトに投与される場合)を誘発することができ、および/または(a)配列番号23に対し50%以上(例えば、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%以上)の同一性を有し、かつ/または(b)配列番号23の少なくとも「n」個の連続的アミノ酸の断片を含む(「n」は7以上(例えば、8、10、12、14、16、18、20、25、30、35、40、50、60、70、80、90、100以上)である)アミノ酸配列を含み得る。これらのe s a Cタンパク質は、配列番号23の改変体を包含する。(b)の好ましい断片は、配列番号23由来のエピトープを含む。他の好ましい断片は、配列番号23の少なくとも1個のエピトープを保持しつつ、配列番号23のC末端から1または複数のアミノ酸(例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25以上)および/またはN末端から1または複数のアミノ酸(例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25以上)を欠く。他の断片は、1または複数のタンパク質ドメインを省略する。

【0151】

e s x A

「e s x A」抗原は、「タンパク質」と注釈が付けられている。NCTC 8325株において、e s x AはSAOUHSC__00257であり、アミノ酸配列の配列番号24(GI:88194063)を有する。

【0152】

有用なe s x A抗原は、配列番号24を認識する抗体(例えば、ヒトに投与される場合

)を誘発することができ、および/または(a)配列番号24に対し50%以上(例えば、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%以上)の同一性を有し、かつ/または(b)配列番号24の少なくとも「n」個の連続的アミノ酸の断片を含む(「n」は7以上(例えば、8、10、12、14、16、18、20、25、30、35、40、50、60、70、80、90以上)である)アミノ酸配列を含み得る。これらのesxBタンパク質は、配列番号24の改変体を包含する。(b)の好ましい断片は、配列番号24由来のエピトープを含む。他の好ましい断片は、配列番号24の少なくとも1個のエピトープを保持しつつ、配列番号24のC末端から1または複数のアミノ酸(例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25以上)および/またはN末端から1または複数のアミノ酸(例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25以上)を欠く。他の断片は、1または複数のタンパク質ドメインを省略する。

10

【0153】

esxB

「esxB」抗原は、「esxB」と注釈が付けられている。NCTC8325株において、esxBはSAOUHSC_00265であり、アミノ酸配列の配列番号25(GI:88194070)を有する。

【0154】

有用なesxB抗原は、配列番号25を認識する抗体(例えば、ヒトに投与される場合)を誘発することができ、および/または(a)配列番号25に対し50%以上(例えば、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%以上)の同一性を有し、かつ/または(b)配列番号25の少なくとも「n」個の連続的アミノ酸の断片を含む(「n」は7以上(例えば、8、10、12、14、16、18、20、25、30、35、40、50、60、70、80、90、100以上)である)アミノ酸配列を含み得る。これらのesxBタンパク質は、配列番号25の改変体を包含する。(b)の好ましい断片は、配列番号25由来のエピトープを含む。他の好ましい断片は、配列番号25の少なくとも1個のエピトープを保持しつつ、配列番号25のC末端から1または複数のアミノ酸(例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25以上)および/またはN末端から1または複数のアミノ酸(例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25以上)を欠く。他の断片は、1または複数のタンパク質ドメインを省略する。

20

30

【0155】

sta006

「sta006」抗原は、「フェリクローム結合タンパク質」と注釈が付けられ、文献[242]において「FhUD2」とも言われた。NCTC8325株においてsta006はSAOUHSC_02554であり、アミノ酸配列、配列番号26(GI:88196199)を有する。Newman株において、これはnwmn_2185(GI:151222397)である。

40

【0156】

有用なsta006抗原は、配列番号26を認識する抗体(例えば、ヒトに投与される場合)を誘発することができ、および/または(a)配列番号26に対し50%以上(例えば、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%以上)の同一性を有し、かつ/または(b)配列番号26の少なくとも「n」個の連続的アミノ酸の断片を含む(「n」は7以上(例えば、8、10、12、14、16、18、20、25、30、35、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250以上)である)アミノ酸配列を含み得る。これらのsta006タンパク質は、配列番号26の改変体を包含する。(b)の好ましい断片は、配列番号26由来のエピトープを含む。他

50

の好ましい断片は、配列番号26の少なくとも1個のエピトープを保持しつつ、配列番号26のC末端から1または複数のアミノ酸（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25以上）および/またはN末端から1または複数のアミノ酸（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25以上）を欠く。配列番号26の最初の17個のN末端アミノ酸は、有用に省略することができる。他の断片は、1または複数のタンパク質ドメインを省略する。s t a 0 0 6の変異体型は、参考文献243に報告されている。s t a 0 0 6抗原は、例えば、アシル化N末端のシステインにより脂質付加されてよい。

【0157】

i s d C

「i s d C」抗原は、「タンパク質」と注釈が付けられている。N C T C 8 3 2 5株において、i s d CはS A O U H S C _ 0 1 0 8 2であり、アミノ酸配列の配列番号27（G I : 8 8 1 9 4 8 3 0）を有する。

10

【0158】

有用なi s d C抗原は、配列番号27を認識する抗体（例えば、ヒトに投与される場合）を誘発することができ、および/または（a）配列番号27に対し50%以上（例えば、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%以上）の同一性を有し、かつ/または（b）配列番号27の少なくとも「n」個の連続的アミノ酸の断片を含む（「n」は7以上（例えば、8、10、12、14、16、18、20、25、30、35、40、50、60、70、80、90、100、150、200以上）である）アミノ酸配列を含み得る。これらのi s d Cタンパク質は、配列番号27の改変体を包含する。（b）の好ましい断片は、配列番号27由来のエピトープを含む。他の好ましい断片は、配列番号27の少なくとも1個のエピトープを保持しつつ、配列番号27のC末端から1または複数のアミノ酸（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25以上）および/またはN末端から1または複数のアミノ酸（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25以上）を欠く。配列番号27の最後の39個のC末端アミノ酸は、有用に省略することができる。配列番号27の最初の28個のN末端アミノ酸は、有用に省略することができる。他の断片は、1または複数のタンパク質ドメインを省略する。I s d Bの有用な断片は、参考文献249に開示されている。

20

30

【0159】

参考文献244は、I s d BおよびI s d Hの両方に由来するエピトープを有用に包含する抗原を開示する。

【0160】

H 1 a

「H 1 a」抗原は、「アルファ毒素」または単に「溶血素」としても公知の「アルファ-溶血素前駆体」である。N C T C 8 3 2 5株においてH 1 aはS A O U H S C _ 0 1 1 2 1であり、アミノ酸配列、配列番号28（G I : 8 8 1 9 4 8 6 5）を有する。Newman株において、これはn w m n _ 1 0 7 3（G I : 1 5 1 2 2 1 2 8 5）である。H 1 aは、ポア形成および溶血活性を有する、S . a u r e u sの多くの株によって産生される重要なビルレンス決定基である。抗H 1 a抗体は、動物モデルにおいて毒素の有害な影響を中和することができ、H 1 aは肺炎からの防御に特に有用である。

40

【0161】

有用なH 1 a抗原は、配列番号28を認識する抗体（例えば、ヒトに投与される場合）を誘発することができ、および/または（a）配列番号28に対し50%以上（例えば、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%以上）の同一性を有し、かつ/または（b）配列番号28の少なくとも「n」個の連続的アミノ酸の断片を含む（「n」は7以上（例えば、8、10、12、14、16、18、20、25、30、35

50

、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250以上)である)アミノ酸配列を含み得る。これらのH1aタンパク質は、配列番号28の改変体を包含する。(b)の好ましい断片は、配列番号28由来のエピトープを含む。他の好ましい断片は、配列番号28の少なくとも1個のエピトープを保持しつつ、配列番号28のC末端から1または複数のアミノ酸(例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25以上)および/またはN末端から1または複数のアミノ酸(例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25以上)を欠く。配列番号28の最初の26個のN末端アミノ酸は、有用に省略することができる。例えば、50アミノ酸(配列番号28の残基27~76)のみを残したC末端における削除を用いることもできる[245]。他の断片は、1または複数のタンパク質ドメインを省略する。

10

【0162】

化学的不活性化により(例えば、ホルムアルデヒド、グルタルアルデヒドまたは他の架橋試薬を用いた)本発明の組成物におけるH1aの毒性を回避することができる。しかし、その代わりとして、その免疫原性を保持しつつその毒性活性を除去したH1aの変異体を用いることが好ましい。このような解毒化変異体は、既に本技術分野において公知のものである。有用なH1a抗原の一型は、成熟抗原(すなわち、最初の26個のN末端アミノ酸を省略した後)の残基35である配列番号28の残基61に変異を有する。よって、残基61はヒスチジンではなく、その代わりに例えばIle、Valまたは好ましくはLeuであり得る。このポジションにおけるHis-Arg変異を用いることもできる。例えば、配列番号29は成熟変異体H1a-H35L配列であり、有用なH1a抗原は配列番号29を含む。別の有用な変異は、長いループを短い配列に置き換える。例えば、配列番号28の残基136~174の39merを配列番号31(H35L変異も包含する)および配列番号32(H35L変異を包含しない)におけるようなPSGS(配列番号30)等、4merに置き換える。

20

【0163】

さらに別の有用なH1a抗原は、参考文献246および247に開示されている。

【0164】

配列番号33、34および35は、配列番号28の3個の有用な断片である(それぞれ「H1a₂₇₋₇₆」、「H1a₂₇₋₈₉」および「H1a₂₇₋₇₉」)。配列番号36、37および38は、配列番号29由来の対応する断片である。

30

【0165】

sta011

「sta011」抗原は、「リポタンパク質」と注釈が付けられている。NCTC8325株においてsta011はSAOUHSC__00052であり、アミノ酸配列、配列番号39(GI:88193872)を有する。

【0166】

有用なsta011抗原は、配列番号39を認識する抗体(例えば、ヒトに投与される場合)を誘発することができ、および/または(a)配列番号39に対し50%以上(例えば、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%以上)の同一性を有し、かつ/または(b)配列番号39の少なくとも「n」個の連続的アミノ酸の断片を含む(「n」は7以上(例えば、8、10、12、14、16、18、20、25、30、35、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250以上)である)アミノ酸配列を含み得る。これらのsta011タンパク質は、配列番号39の改変体を包含する。(b)の好ましい断片は、配列番号39由来のエピトープを含む。他の好ましい断片は、配列番号39の少なくとも1個のエピトープを保持しつつ、配列番号39のC末端から1または複数のアミノ酸(例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25以上)および/またはN末端から1または複数のアミノ酸(例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25以上)を欠く。配列番号39の最初の23個のN末端アミノ酸は、有用に省略することができる。他の断

40

50

片は、1または複数のタンパク質ドメインを省略する。s t a 0 0 6 抗原は、例えばアシル化N末端システインにより脂質付加されてよい。

【0167】

s t a 0 1 1 抗原の調製に用いることのできる配列番号39の改変体型は、様々なI l e / V a l / L e u 置換を有する配列番号40、41および42を包含するが、これらに限定されるものではない。

【0168】

i s d A

「i s d A」抗原は、「I s d A タンパク質」と注釈が付けられている。N C T C 8 3 2 5 株において、i s d A は S A O U H S C _ _ 0 1 0 8 1 であり、アミノ酸配列の配列番号43 (G I : 8 8 1 9 4 8 2 9) を有する。N e w m a n 株においては n w m n _ _ 1 0 4 1 (G I : 1 5 1 2 2 1 2 5 3) である。

10

【0169】

有用な i s d A 抗原は、配列番号43を認識する抗体（例えば、ヒトに投与される場合）を誘発することができ、および/または (a) 配列番号43に対し50%以上（例えば、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%以上）の同一性を有し、かつ/または (b) 配列番号43の少なくとも「n」個の連続的アミノ酸の断片を含む（「n」は7以上（例えば、8、10、12、14、16、18、20、25、30、35、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250以上）である）アミノ酸配列を含み得る。これらの i s d A タンパク質は、配列番号43の改変体を包含する。(b) の好ましい断片は、配列番号43由来のエピトープを含む。他の好ましい断片は、配列番号43の少なくとも1個のエピトープを保持しつつ、配列番号43のC末端から1または複数のアミノ酸（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25以上）および/またはN末端から1または複数のアミノ酸（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25以上）を欠く。配列番号43の最後の38個のC末端アミノ酸は、有用に省略することができる。配列番号43の最初の46個のN末端アミノ酸は、有用に省略することができる。配列番号43のC末端の38mer (L P K T G モチーフから始まる) を除外するための削除も有用である。他の断片は、1または複数のタンパク質ドメインを省略する。

20

30

【0170】

配列番号44は、天然タンパク質のヘム結合部位を包含し、抗原の最も露出したドメインを包含する、配列番号43の有用な断片（配列番号43のアミノ酸40~184；「I s d A _{40~184}」）である。これはまた、抗原のヒトタンパク質との類似性を低下させる。他の有用な断片は、参考文献248および249に開示されている。

【0171】

I s d A は、水酸化アルミニウムアジュバントに十分に吸着されず、よって組成物中に存在する I s d A は、代替的アジュバント、例えばリン酸アルミニウムに吸着されていないかまたは吸着されている可能性がある。

【0172】

i s d B

「i s d B」抗原は、「ニューロフィラメントタンパク質 i s d B」と注釈が付けられている。N C T C 8 3 2 5 株において i s d B は S A O U H S C _ _ 0 1 0 7 9 であり、アミノ酸配列、配列番号45 (G I : 8 8 1 9 4 8 2 8) を有する。I s d B は、そのままワクチン抗原として使用することを提案された [2 5 0] が、これは肺炎を防止することができないだろう。

40

【0173】

有用な i s d B 抗原は、配列番号45を認識する抗体（例えば、ヒトに投与される場合）を誘発することができ、および/または (a) 配列番号45に対し50%以上（例えば、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%

50

、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%以上)の同一性を有し、かつ/または(b)配列番号45の少なくとも「n」個の連続的アミノ酸の断片を含む(「n」は7以上(例えば、8、10、12、14、16、18、20、25、30、35、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250以上)である)アミノ酸配列を含み得る。これらのisdBタンパク質は、配列番号45の改変体を包含する。(b)の好ましい断片は、配列番号45由来のエピトープを含む。他の好ましい断片は、配列番号45の少なくとも1個のエピトープを保持しつつ、配列番号45のC末端から1または複数のアミノ酸(例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25以上)および/またはN末端から1または複数のアミノ酸(例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25以上)を欠く。配列番号45の最後の36個のC末端アミノ酸は、有用に省略することができる。配列番号45の最初の40個のN末端アミノ酸は、有用に省略することができる。他の断片は、1または複数のタンパク質ドメインを省略する。IsdBの有用な断片、例えば配列番号45の37個の内部アミノ酸を欠く断片は、参考文献249および251に開示されている。

【0174】

一部の実施形態では、本発明の組成物はisdB抗原を包含しない。

【0175】

sta073

「sta073」抗原は、「二機能性自己溶菌酵素前駆体」と注釈が付けられている。NCTC8325株においてsta073はSAOUHSC_00994であり、アミノ酸配列、配列番号46(GI:88194750)を有する。Newman株において、これはnwmn_0922(GI:151221134)である。プロテオミクス分析は、このタンパク質が分泌されるかまたは表面に露出していることを明らかにした。

【0176】

有用なsta073抗原は、配列番号46を認識する抗体(例えば、ヒトに投与される場合)を誘発することができ、および/または(a)配列番号46に対し50%以上(例えば、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%以上)の同一性を有し、かつ/または(b)配列番号46の少なくとも「n」個の連続的アミノ酸の断片を含む(「n」は7以上(例えば、8、10、12、14、16、18、20、25、30、35、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250以上)である)アミノ酸配列を含み得る。これらのsta073タンパク質は、配列番号46の改変体を包含する。(b)の好ましい断片は、配列番号46由来のエピトープを含む。他の好ましい断片は、配列番号46の少なくとも1個のエピトープを保持しつつ、配列番号46のC末端から1または複数のアミノ酸(例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25以上)および/またはN末端から1または複数のアミノ酸(例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25以上)を欠く。配列番号46の最初の24個のN末端アミノ酸は、有用に省略することができる。他の断片は、1または複数のタンパク質ドメインを省略する。

【0177】

Sta073は、水酸化アルミニウムアジュバントに十分に吸着されず、よって組成物中に存在するSta073は、代替的アジュバント、例えばリン酸アルミニウムに吸着されていないかまたは吸着されている可能性がある。

【0178】

ハイブリッドポリペプチド

本発明に用いられるS.aureusタンパク質抗原は、それぞれ別個のポリペプチドとして組成物中に存在することができる。しかし2以上の抗原が用いられる場合、これらは別個のポリペプチドとして存在している必要はない。その代わりに、少なくとも2個の(例えば、2、3、4、5個以上の)抗原が、単一のポリペプチド鎖(「ハイブリッド」ポリペプチド)として発現されてよい。ハイブリッドポリペプチドは、2点の主要な利点

10

20

30

40

50

をもたらす。第一の利点は、そのままでは不安定あるいは発現が低くなり得るポリペプチドを、その問題を克服する適切なハイブリッドパートナーを付加することによって補助できることである。第二の利点は、どちらも抗原として有用な2個のポリペプチドの産生に単一の発現および精製のみが必要とされるため、商業的製造が単純化されることである。

【0179】

ハイブリッドポリペプチドは、上に列挙した抗原それぞれに由来する2以上のポリペプチド配列、あるいは配列が株間の部分的な可変性を有する場合は同一抗原の2以上の改変体を含むことができる。

【0180】

2、3、4、5、6、7、8、9または10個の抗原由来のアミノ酸配列からなるハイブリッドが有用である。特に、2または3個の抗原等、2、3、4または5個の抗原由来のアミノ酸配列からなるハイブリッドが好ましい。

10

【0181】

異なるハイブリッドポリペプチドは、単一処方物において一緒に混合することができる。ハイブリッドは、第一、第二または第三の抗原群から選択された非ハイブリッド抗原と組み合わせることができる。このような組合せのうち、抗原は、2以上のハイブリッドポリペプチドにおいて、および/または非ハイブリッドポリペプチドとして存在し得る。しかし、ある抗原はハイブリッドまたは非ハイブリッドのいずれかとして存在し、その両方としては存在しないことが好ましい。

【0182】

20

ハイブリッドポリペプチドは、式、 $\text{NH}_2 - \text{A} - \{ - \text{X} - \text{L} - \}_n - \text{B} - \text{COOH}$ (式中、Xは上述の*S. aureus*抗原のアミノ酸配列であり、Lは任意選択的なリンカーアミノ酸配列であり、Aは任意選択的なN末端アミノ酸配列であり、Bは任意選択的なC末端アミノ酸配列であり、nは2以上の(例えば、2、3、4、5、6等)整数である)によって表すことができる。通例、nは2または3である。

【0183】

-X-部分が野生型形態のリーダーペプチド配列を有する場合、これはハイブリッドタンパク質において包含されても省略されてもよい。一部の実施形態では、リーダーペプチドは、ハイブリッドタンパク質のN末端に位置する-X-部分のもの以外は欠失させられる。すなわち、 X_1 のリーダーペプチドは保持されるが、 $X_2 \dots X_n$ のリーダーペプチドは省略される。これは、全リーダーペプチドを欠失して X_1 のリーダーペプチドを部分-A-として用いることに相当する。

30

【0184】

$\{ - \text{X} - \text{L} - \}$ の各n例につき、リンカーアミノ酸配列-L-は、存在してもしなくてもよい。例えば、n=2の場合、ハイブリッドは、 $\text{NH}_2 - \text{X}_1 - \text{L}_1 - \text{X}_2 - \text{L}_2 - \text{COOH}$ 、 $\text{NH}_2 - \text{X}_1 - \text{X}_2 - \text{COOH}$ 、 $\text{NH}_2 - \text{X}_1 - \text{L}_1 - \text{X}_2 - \text{COOH}$ 、 $\text{NH}_2 - \text{X}_1 - \text{X}_2 - \text{L}_2 - \text{COOH}$ 等であり得る。リンカーアミノ酸配列(複数可)-L-は、通常は短い(例えば、20以下のアミノ酸、すなわち、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、1)。具体例として、クローニングを促進する短いペプチド配列、ポリグリシンリンカー(すなわち、 Gly_n (式中、n=2、3、4、5、6、7、8、9、10以上である)を含む)およびヒスチンタグ(すなわち、 His_n (式中、n=3、4、5、6、7、8、9、10以上である))が挙げられる。他の適切なリンカーアミノ酸配列は、当業者であれば明らかとなるであろう。有用なリンカーは、GSGGGG(配列番号47)またはGSGSGGGG(配列番号48)であり、これは、 Gly-Ser ジペプチドがBamHI制限部位から形成されるためにクローニングおよび操作を補助する。 $(\text{Gly})_4$ テトラペプチドが通常のポリグリシンリンカーである。他の適切なリンカー、特に最後の L_n としての使用に適切なリンカーは、ASGGGS(配列番号49、例えば、配列番号50にコードされる)またはLeu-Gluジペプチドである。

40

【0185】

50

- A - は、任意選択的なN末端アミノ酸配列である。これは通常は短い（例えば、40以下のアミノ酸、すなわち、40、39、38、37、36、35、34、33、32、31、30、29、28、27、26、25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、1）。具体例として、タンパク質輸送を導くリーダー配列、またはクローニングまたは精製を促進する短いペプチド配列（例えば、ヒスチジンタグ、すなわちHis_n（式中、n = 3、4、5、6、7、8、9、10以上である））が挙げられる。他の適切なN末端アミノ酸配列は、当業者であれば明らかとなるであろう。X₁がそれ自身のN末端メチオニンを欠く場合、- A - は、好ましくはN末端メチオニン、例えばMet - Ala - Serまたは単一のMet残基を提供するオリゴペプチド（例えば、1、2、3、4、5、6、7または8アミノ酸を有する）である。

10

【0186】

- B - は、任意選択的なC末端アミノ酸配列である。これは通常は短い（例えば、40以下のアミノ酸、すなわち39、38、37、36、35、34、33、32、31、30、29、28、27、26、25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、1）。具体例として、タンパク質輸送を導く配列、クローニングまたは精製を促進する短いペプチド配列（例えば、ヒスチジンタグ、すなわち配列番号51等、His_n（式中、n = 3、4、5、6、7、8、9、10以上である）を含む）、またはタンパク質の安定性を増強する配列が挙げられる。他の適切なC末端アミノ酸配列は、当業者であれば明らかとなるであろう。

20

【0187】

本発明のハイブリッドポリペプチドの一型は、EsxA抗原およびEsxB抗原の両方を包含することができる。これらは、NからC末端に向けていずれの順序であってもよい。配列番号52（「EsxAB」；配列番号53にコードされる）および54（「EsxBA」）は、両者ともにヘキサペプチドリンカーASGGGS（配列番号49）を有するこのようなハイブリッドの具体例である。

【0188】

一般

本発明の実施は、他に断りがなければ、当業者の技能範囲内である従来化学、生化学、分子生物学、免疫学および薬理学的方法を利用する。このような技法は、文献において十分に説明されている。例えば、参考文献252～259等を参照されたい。

30

【0189】

「GI」ナンバリングが上に用いられている。GIナンバーまたは「GenIdentifier」は、配列がそのデータベースに加えられ際に、NCBIによって処理された各配列記録に連続的に割り当てられる一連の数字である。GIナンバーは、配列記録のアクセッション番号との類似点を生じない。配列がアップデートされると（例えば、訂正またはさらなるアノテーションもしくは情報を加えるため）、配列は新規のGIナンバーを付与される。よって、所定のGIナンバーに関連する配列は決して変化しない。

40

【0190】

2種のアミノ酸配列の間のパーセンテージ配列同一性の言及は、整列されると、該アミノ酸パーセンテージが2配列の比較において同一であることを意味する。このアライメントおよびパーセント相同性または配列同一性は、本技術分野において公知のソフトウェアプログラム、例えば、参考文献260の第7.7.18節に記載されているプログラムを用いて決定することができる。好ましいアライメントは、ギャップ開始（open）ペナルティー12およびギャップ伸長（extension）ペナルティー2、BLOSUMマトリックス62によるアフィンギャップ検索を用いたスミス-ウォーターマン（Smith-Waterman）相同性検索アルゴリズムによって決定される。スミス-ウォーターマン相同性検索アルゴリズムは、参考文献261に開示されている。

50

【0191】

本発明が「エピトープ」に関係する場合、このエピトープは、B細胞エピトープおよび/またはT細胞エピトープであり得る。このようなエピトープは、経験的に(例えば、PEPSCAN[262、263]または同様の方法を用いて)同定することができるか、あるいはこれらは予測することができる(例えば、Jameson-Wolf抗原指数[264]、マトリックスに基づくアプローチ[265]、MAPI TOPE[266]、TEPI TOPE[267、268]、ニューラルネットワーク[269]、OptiMer & EpiMer[270、271]、ADEPT[272]、Tsites[273]、親水性[274]、抗原指数[275]または参考文献276~280に開示されている方法等を用いて)。エピトープは、抗体またはT細胞受容体の抗原結合部位により認識されて結合される抗原の一部であり、「抗原決定基」と言うこともできる。

10

【0192】

抗原の「ドメイン」が省略される場合、これは、シグナルペプチド、細胞質ドメイン、膜貫通ドメイン、細胞外ドメイン等の省略に関与し得る。

【0193】

用語「を含む(comprising)」は、「を包含する(including)」と共に「からなる(consisting)」を含み、例えば、X「を含む(comprising)」組成物は、Xから排他的になることも、あるいは追加的なものを包含することもできる(例えば、X+Y)。

20

【0194】

数値xに関する用語「約」は、例えば、 $x \pm 10\%$ を意味する。

【0195】

単語「実質的に」は、「完全に」を除外せず、例えば、Yを「実質的に含有しない」組成物は、Yを完全に含有しなくてよい。必要であれば、単語「実質的に」は、本発明の定義から省略することができる。

【0196】

本発明が、複数の逐次的な工程を含むプロセスを提供する場合、本発明は、その合計数より少ない工程を含むプロセスを提供することもできる。例えば、本発明は、(a) S. aureus 5型または8型莢膜多糖を解重合して、多糖断片を得る工程と、(b) 該断片における少なくとも1個の糖残基にアルデヒド基を導入するために該断片を酸化して、酸化された糖残基を得る工程とを含むプロセスを提供する。工程(a)および(b)の産物は結合体調製における中間体としての有用性があり、分離および後の使用のために使用、保存、搬出等することができるため、さらなる工程(c)は、本発明の範囲内とするために実行する必要はない。このような後の使用は、工程(c)の実行に関与し得る。あるいは、工程(a)および(b)の産物は、異なる方法で、例えば、酸化された糖残基において保持されているヒドロキシルまたはカルボキシル基を介してキャリア分子とカップリングすることができる。

30

【0197】

同様に、出発多糖材料が既に部分的に加工されている場合、本発明は、ある方法における後期の工程のみを含むプロセスを包含する。例えば、本発明は、5型または8型莢膜多糖における酸化された糖残基を、アルデヒド基を介してキャリア分子へとカップリングする工程を含むプロセスを包含し、ここで、このプロセスの出発材料は予め解重合されて多糖断片を生じ、次に酸化されて糖残基にアルデヒド基が導入された5型または8型莢膜多糖である。

40

【0198】

これらの様々な工程は、非常に様々な期間に、様々な人間により、様々な場所で(例えば、様々な国々で)実行することができる。

【0199】

糖環が開環または閉環型で存在し得ること、また、本明細書における構造式では閉環型が示されているが、開環型も本発明に包含されることが理解されるであろう。同様に、糖

50

がピラノースおよびフラノース型で存在し得ること、また、本明細書における構造式ではピラノース型が示されているが、フラノース型も包含されていることが理解されるであろう。糖の様々なアノマー型も包含されている。

【0200】

一級アミンは、式、 NH_2R によって表すことができる。R基は通常、電子供与性であり、 C_{1-8} ヒドロカルビル、特に C_{1-8} アルキル、特別にはメチルを包含する。Rは、多くの場合、 $-\text{CH}_3$ 、 $-\text{C}_2\text{H}_5$ または $-\text{C}_3\text{H}_7$ である。ヒドロカルビルは、ハロゲン（例えば、Cl、Br、F、I）、トリハロメチル、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{N}^+(\text{C}_{1-6}$ アルキル) $_2\text{O}^-$ 、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 、 $-\text{SOC}_{1-6}$ アルキル、 $-\text{SO}_2\text{C}_{1-6}$ アルキル、 $-\text{SO}_3\text{C}_{1-6}$ アルキル、 $-\text{OC}(=\text{O})\text{OC}_{1-6}$ アルキル、 $-\text{C}(=\text{O})\text{H}$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{C}_{1-6}$ アルキル、 $-\text{OC}(=\text{O})\text{C}_{1-6}$ アルキル、 $-\text{N}(\text{C}_{1-6}$ アルキル) $_2$ 、 C_{1-6} アルキル、 $-\text{N}(\text{C}_{1-6}$ アルキル) $_2$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{N}(\text{C}_{1-6}$ アルキル) $_2$ 、 $-\text{N}(\text{C}_{1-6}$ アルキル) $\text{C}(=\text{O})\text{O}(\text{C}_{1-6}$ アルキル)、 $-\text{N}(\text{C}_{1-6}$ アルキル) $\text{C}(=\text{O})\text{N}(\text{C}_{1-6}$ アルキル) $_2$ 、 $-\text{CO}_2\text{H}$ 、 $-\text{OC}(=\text{O})\text{N}(\text{C}_{1-6}$ アルキル) $_2$ 、 $-\text{N}(\text{C}_{1-6}$ アルキル) $\text{C}(=\text{O})\text{C}_{1-6}$ アルキル、 $-\text{N}(\text{C}_{1-6}$ アルキル) $\text{C}(=\text{S})\text{C}_{1-6}$ アルキル、 $-\text{N}(\text{C}_{1-6}$ アルキル) $\text{SO}_2\text{N}(\text{C}_{1-6}$ アルキル) $_2$ 、 $-\text{CO}_2\text{C}_{1-6}$ アルキル、 $-\text{SO}_2\text{N}(\text{C}_{1-6}$ アルキル) $_2$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{NH}_2$ 、 $-\text{C}(=\text{S})\text{N}(\text{C}_{1-6}$ アルキル) $_2$ 、 $-\text{N}(\text{C}_{1-6}$ アルキル) $\text{SO}_2\text{C}_{1-6}$ アルキル、 $-\text{N}(\text{C}_{1-6}$ アルキル) $\text{C}(=\text{S})\text{N}(\text{C}_{1-6}$ アルキル) $_2$ 、 $-\text{NH}-\text{C}_{1-6}$ アルキル、 $-\text{S}-\text{C}_{1-6}$ アルキルまたは $-\text{O}-\text{C}_{1-6}$ アルキル等、1または複数の基により置換されてよい。用語「ヒドロカルビル」は、炭素および水素からなる直鎖、分岐または環状一価基を包含する。よって、ヒドロカルビル基は、アルキル、アルケニルおよびアルキニル基、シクロアルキル（ポリシクロアルキルを包含する）、シクロアルケニルおよびアリール基ならびにそれらの組合せ、例えば、アルキルシクロアルキル、アルキルポリシクロアルキル、アルキルアリール、アルケニルアリール、シクロアルキルアリール、シクロアルケニルアリール、シクロアルキルアルキル、ポリシクロアルキルアルキル、アリールアルキル、アリールアルケニル、アリールシクロアルキルおよびアリールシクロアルケニル基を包含する。通常のヒドロカルビルは、 C_{1-14} ヒドロカルビル、より具体的には C_{1-8} ヒドロカルビルである。

10

20

30

【図面の簡単な説明】

【0201】

【図1】図1は、アジピン酸ジヒドラジンリンカーおよびカルボジイミド化学を用いてS . aureus 5型莢膜多糖 - CRM197結合体を作製するための模式図を示す。

【図2】図2aは、アジピン酸ジヒドラジンリンカーおよびカルボジイミド化学を用いて作製したS . aureus 5型莢膜多糖 - CRM197結合体のSDS - PAGE分析を示す。図2bは、アジピン酸ジヒドラジンリンカーおよびカルボジイミド化学を用いて作製したS . aureus 5型莢膜多糖 - CRM197結合体のS300 SephacrylTMクロマトグラムを示す。

【図3】図3は、解重合された5型莢膜多糖のS300 SephacrylTMクロマトグラムを示す。

40

【図4A】図4Aは、解重合された5型莢膜多糖と天然の5型莢膜多糖の¹Hアノマー領域における1D ¹Hシグナルを比較する。数個の顕著な差異がマークされている。

【図4B】図4Bおよび図4Cは、これら多糖についての2D (¹H, ¹H)スカラーカップリングスペクトルのアノマー領域およびメチル - フコース領域をそれぞれ比較する。数個の顕著な差異がマークされている。

【図4C】図4Bおよび図4Cは、これら多糖についての2D (¹H, ¹H)スカラーカップリングスペクトルのアノマー領域およびメチル - フコース領域をそれぞれ比較する。数個の顕著な差異がマークされている。

【図5】図5aは、本発明の方法を用いて作製されたS . aureus 5型莢膜多糖 - CRM197結合体のSDS - PAGE分析を示す。図5bは、本発明の方法を用いて作製

50

された *S. aureus* 5 型莢膜多糖 - CRM197 結合体の S300 SephacrylTM クロマトグラムを示す。

【図6】図6は、様々な条件下で解重合された *S. aureus* 5 型莢膜多糖の S300 SephacrylTM クロマトグラムを示す。

【図7】図7は、本発明の方法を用いて作製された *S. aureus* 5 型莢膜多糖 - CRM197 結合体の SDS - PAGE 分析を示す。

【図8】図8は、*S. aureus* 感染のマウス腎臓膿瘍モデルにおける様々な抗原に対する IgG 応答を示す。

【図9】図9は、マウス腎臓膿瘍モデルにおける様々な抗原に対する IgG および IgM 応答を比較する。

【図10】図10は、マウス腎臓膿瘍モデルにおける様々な抗原に対する防御反応を示す。

【図11】図11は、マウス腎臓膿瘍モデルにおける異なる結合体に対する IgG 応答を比較する。

【図12】図12は、マウス腎臓膿瘍モデルにおける異なる結合体に対する防御反応を比較する。

【図13A】図13A および図13Bは、マウス腎臓膿瘍モデルにおけるさらに別の結合体に対する防御反応を比較する。

【図13B】図13A および図13Bは、マウス腎臓膿瘍モデルにおけるさらに別の結合体に対する防御反応を比較する。

【図14】図14は、マウス腎臓膿瘍モデルにおけるさらに別の結合体に対する IgG 応答および IgM 応答を比較する。

【図15】図15は、マウス腎臓膿瘍モデルにおいて異なる作用物質をアジュバントとした場合の、さらに別の結合体に対する防御反応を比較する。

【図16】図16は、*S. aureus* 感染のマウス致死モデルにおける様々な抗原に対する応答を比較する。

【図17】図17は、2M塩酸により解重合された *S. aureus* 8 型莢膜多糖の SEC - HPLC クロマトグラムを示す。

【図18】図18は、2M塩酸により解重合された *S. aureus* 8 型莢膜多糖の NMR スペクトルを示す。

【発明を実施するための形態】

【0202】

結合体産生および特徴づけ

参考文献2（下を参照）において用いられている方法と同様にカルボジイミド化学およびアジピン酸ジヒドラジンリンカーを用いて、精製 *S. aureus* 5 型莢膜多糖を CRM197 と結合体化した。この方法において、莢膜多糖は、EDC を用いて誘導体化 CRM197 と結合体化される（図1）。反応は、莢膜多糖のカルボキシル基に關与する。カルボジイミド（EDC）は、カルボキシル基を活性化して誘導体化キャリアタンパク質（CRMadh）由来の -NH₂ 基と結合させ、アミド結合を形成する。誘導体化 CRMadh は、同じカルボジイミド化学を用いて調製される。

【0203】

CRMadh 調製：

CRM197 の溶液に、終濃度 10 ~ 12 mg/ml となるよう 100 mM MES pH6.0 バッファーを添加した。次に、3.5 mg/ml の ADH（アジピン酸ジヒドラジド）および 0.15（EDC / CRM, w/w）を添加し、穏やかな攪拌下、1時間 RT にて反応を維持した。次に、6 ~ 8 kDa メンブレン（SpectraPor）を用いて、先ず 200 mM NaCl、10 mM MES pH7.3 バッファーに対し、次に 5 mM MES pH7.0 バッファーに対して混合物を透析した。MicroBCA、SDS - Page（3 ~ 8%）、HPLC および MS によって産物を特徴付けた。CRMadh は、ADH の 6 ~ 8 リンカーにより誘導体化されることが判明した。

10

20

30

40

50

【0204】

結合体化反応：

50 mM MESバッファー pH 6.04中、2 mg/mLの莢膜多糖濃度で結合体化反応を行った。莢膜多糖の溶液に終濃度4.0 mg/mLとなるよう誘導体化キャリアタンパク質、CRMadhを添加した。溶液をRTにて3時間維持した。反応混合液中の多糖：タンパク質比は1：2（重量/重量）であり、多糖：EDC比は1：6.66（当量/当量）であり、多糖：スルホNHS比は1：0.53（当量/当量）であった。

【0205】

3時間後、NuPAGE（登録商標）3～8%Tris-酢酸ゲル（Invitrogen）を用いたSDS-PAGEにより結合体の形成を立証した（図2a）。結合体化後、ゲル濾過クロマトグラフィー（10 mM NaPi、10 mM NaCl、pH 7.2移動相バッファーによるS300 SephacrylTMレジン（G&E Healthcare）を用いたAktatTMシステム（G&E Healthcare）において行う）により結合体を精製した。215 nm、254 nmおよび280 nmにて結合体を検出した（図2b）。さらなる使用まで結合体溶液を-20℃で保存した。HPAEC-PAD分析により結合体における全糖を決定し、参考文献281に記載されている通りMicroBCAアッセイによりタンパク質含量を決定した（表1）。

【0206】

【表1】

結合体（ロット）	タンパク質（μg/ml）	糖（μg/ml）	糖/タンパク質（w/w）
1	26.00	12.10	0.47
2	33.90	11.00	0.32
3	62.21	29.40	0.47
4	45.21	9.30	0.21

表 1

精製S. aureus 5型および8型莢膜多糖を別個に、本発明の方法を用いてCRM197と結合体化した（下を参照）。

【0207】

解重合

精製莢膜多糖を2 mg/mLとなるよう蒸留水に溶解した。終濃度2%（v/v）となるよう酢酸を添加し、反応を90℃、3時間（またはロットBの場合は一晚）維持した。次に、溶液を1 M NaOHで中和し、解重合した多糖をゲル濾過カラムにおいて（10 mM NaPi、10 mM NaCl、pH 7.2移動相バッファーによるS300 SephacrylTMレジン（G&E Healthcare）を用いたAktatTMシステム（G&E Healthcare）において行う）精製した。215 nmにて糖を検出した（図3）。1 kDaメンブレン（SpectraPor）を用いて、プールした画分を蒸留水に対して透析し、凍結乾燥した。

【0208】

¹H NMRを用いて、切断の部位が5型多糖中の（1-3）グリコシド結合であることを立証した。簡単に言うと、天然および解重合した5型莢膜多糖の試料を凍結乾燥し、プロトン化水溶媒を取り除き、重水（99.9%重水素、Sigma-Aldrich）に溶解した。5 mm広帯域プローブならびにデータ取得および加工のためのTopSpin 2.1ソフトウェアパッケージ（Bruker）を用いてBruker Avance I II 400 MHz分光計において全NMRスペクトルを50℃で記録（record）した。1D ¹Hスペクトルを、4,000 Hzのスペクトル幅にわたり、32 kデータポイントを収集する標準ワンパルス（one-pulse）実験を用いて収集した

。トランスミッタを残留H₂O周波数(4.79 ppm)に設定した。全リサイクル時間を用いた定量的な様式でスペクトルを得て、各シグナルの完全なリカバリーを確実にした(5×Longitudinal Relaxation Time T₁)。0.2 Hzラインブロードニング関数(line broadening function)を適用した後、スペクトルをフーリエ変換した。DQF-COSYパルスシーケンスにより2D(¹H, ¹H)スカラー相関スペクトルを記録した。F2ドメインにおいて4096個のデータポイントを収集し、F1ドメインにおいて256個を収集した。

【0209】

天然の多糖の1D ¹Hシグナルを公表された値と比較したところ、合致していることが判明した(表2)。

10

【0210】

【表2-1】

シグナル	測定した δ (ppm)*	公表された δ (ppm)**	公表された δ (ppm)***
H ₃ L-FucNAc-OAc	4.958	5.005	5.005
H ₁ L-FucNAc-OAc	4.929	4.981	4.975
H ₃ L-FucNAc-deOAc	4.864	4.935	4.911
H ₁ ManNAc-deOAc	4.801	4.860	4.847
H ₁ ManNAc-OAc	4.638	4.698	4.683
H ₂ ManNAc-deOAc	4.625	4.680	4.670
H ₂ ManNAc-deOAc	4.584	4.645	4.629
H ₁ D-FucNAc-OAc/deOAc	4.405	4.461	4.452
H ₄ L-FucNAc-OAc	4.320	4.382	4.367
H ₂ L-FucNAc-OAc	4.292	4.368	4.338
H ₅ L-FucNAc-OAc	4.121	4.175	4.168
H ₅ L-FucNAc-deOAc	4.080	4.142	4.126
H ₂ L-FucNAc-deOAc	4.033	4.105	4.077
H ₄ L-FucNAc-deOAc	4.005	4.060	4.051
NAc ^D -FucNAc-OAc	2.083	2.149	2.131
NAc ^D -FucNAc-deOAc	2.067	2.126	2.115
OAc ^L -FucNAc-OAc	2.004	2.070	2.051

20

30

40

【0211】

【表 2 - 2】

NAc ^L -FucNAc-deOAc	1.995	2.057	2.002
NAc ^L -FucNAc-OAc	1.955	2.023	2.043
NAc ^{Man} NAc-deOAc	1.948	2.018	1.996
NAc ^{Man} NAc-OAc	1.943	2.011	1.992
H ₆ ^D -FucNAc-OAc	1.238	1.300	1.287
H ₆ ^D -FucNAc-deOAc		1.298	
H ₆ ^L -FucNAc-OAc/deOAc	1.183	1.242	1.231

* 4.484ppmにおけるHDOシグナル

** Jones C. Carbohydr. Res. 2005, 340(6), 1097-1106 - 4.484ppmにおけるHDOシグナル

*** Jones C. Carbohydr. Res. 2005, 340(6), 1097-1106 - H1L-FucNAc = 5.005 ppm, したがって4.484ppmではなく4.532ppmにおけるHDOシグナル

表2

10

20

図4Aは、解重合型および天然型の多糖の¹Hアノマー領域における1D¹Hシグナルを比較する。図4Bおよび4Cは、これら多糖についての2D(¹H,¹H)スカラーカップリングスペクトルのアノマー領域およびメチル-フコース領域をそれぞれ比較する。データは、酢酸処理が、5型莢膜多糖における-L-FucNAc(3OAc)残基と-D-FucNAc残基との間の(1-3)グリコシド結合の切断をもたらすことを示す。

【0212】

酸化

解重合された莢膜多糖を2mg/mLとなるよう蒸留水に溶解した。多糖:NaIO₄比が1:1(重量/重量)となるようNaIO₄を添加し、室温で1~2時間、暗所にて反応を維持した。次に、1kDaメンブレン(SpectraPor)を用いて溶液を蒸留水に対して透析し、再度凍結乾燥した。

30

【0213】

結合体化

酸化された莢膜多糖を10mg/mL濃度となるよう200mM NaPi、1M NaCl、pH7.2バッファーに溶解した。溶液に多糖:タンパク質比が4:1(重量/重量)となるようCRM197を添加し、糖:NaBCNH₃比が2:1(重量/重量)となるようNaBH₃CN(Alldrich)を添加した。溶液を37°Cで2日間維持した。SDS-PAGEを用いて結合体の形成を確認した(5型結合体に関して図5aを参照)。結合体化の後、ゲル濾過クロマトグラフィー(10mM NaPi、10mM NaCl、pH7.2移動相バッファーにより、S300 SephacrylTMレジン(G&E Healthcare)を用いたAktatTMシステム(G&E Healthcare)において行う)により結合体を精製した。215nm、254nmおよび280nmにて結合体を検出した(5型結合体に関して図5bを参照)。さらなる使用まで結合体溶液を-20°Cで保存した。HPAEC-PAD分析により結合体における全糖を決定し、MicroBCAアッセイによりタンパク質含量を決定した(5型結合体に関して表3a、8型結合体に関して表3bを参照)。

40

【0214】

【表 3 a】

結合体 (ロット)	タンパク質 (μg/ml)	糖 (μg/ml)	糖/タンパク質 (w/w)
A	51.52	1.72	0.03
B	161.80	17.10	0.11
C	34.42	4.22	0.12
D	40.56	12.70	0.31
E	196.00	55.17	0.28

表 3a

【 0 2 1 5 】

【表 3 b】

結合体 (ロット)	タンパク質 (μg/ml)	糖 (μg/ml)	糖/タンパク質 (w/w)
α	518.00	82.30	0.16
β	11.00	7.94	0.72
γ	23.22	5.57	0.24
δ	22.87	5.08	0.22

表 3b

本発明の別の方法を用いて、精製 *S. aureus* 5 型を CRM 197 に結合体化した。この方法において、解重合、酸化および結合体化工程は、CRM 197 の代わりに上述の誘導体化キャリアタンパク質 (CRM adh) を用いて結合体化工程を行ったこと以外は上述の通りに行った。HPAEC-PAD 分析により結合体における全糖を決定し、MicroBCA アッセイによりタンパク質含量を決定した (表 4)。

【 0 2 1 6 】

【表 4】

結合体 (ロット)	タンパク質 (μg/ml)	糖 (μg/ml)	糖/タンパク質 (w/w)
A'	58.25	2.49	0.043

表 4

代替的解重合方法

他の研究において、精製荚膜多糖の解重合に対して異なる条件を試験した。多糖を 2 mg/mL となるよう蒸留水に溶解した。終濃度 2% または 5% (v/v) となるよう酢酸を添加し、反応を 90 °C で 30 分間、3 時間、5 時間または 6 時間維持した。次に溶液を中和し、上述のゲル濾過カラムにおいて精製した。215 nm にて糖を検出し、プールした (図 6)。

【 0 2 1 7 】

次に、プールした画分を酸化し、上述の通り水に対して透析した。画分を上述の通り C

10

20

30

40

50

R M 1 9 7 または C R M a d h と結合体化し、その結果得られた結合体を同様に上述の通りにゲル濾過クロマトグラフィーにより精製した（図 7）。

【 0 2 1 8 】

別の研究において、8 型莢膜多糖に対して酢酸の代わりに 0 . 5 M の塩酸を用い、反応液を 3 0 分毎にサンプリングしつつ、9 0 で 2 . 5 時間維持した。N M R および S E C - H P L C により試料を分析した。解重合は観察されず、O - アセチル化のレベルは殆ど変化しなかった。対照的に、2 M の塩酸を用いて反応を 1 0 0 で維持した場合、解重合は僅か 3 0 分後に観察された。O - アセチル化のレベルは 2 . 5 時間かけて徐々に低減した（図 1 7 および 1 8 （アセチルピークを丸で囲む））。

【 0 2 1 9 】

免疫化研究 - 膿瘍モデル（1）

全般的なアッセイのプロトコール：後述される計画に従ってマウスを免疫化し、S . a u r e u s の細菌懸濁物の静脈内注射によってチャレンジした。S . a u r e u s の培養物を遠心分離し、2 回洗浄し、チャレンジ前に P B S に希釈した。所望の接種にはさらなる希釈が必要とされ、これは寒天プレーティングおよびコロニー形成によって実験的に立証された。器官採取のためマウスを安楽死させ、その腎臓を取り出して 1 % T r i t o n X - 1 0 0 中でホモジナイズした。次に、アリコートに希釈し、寒天培地上にプレーティングし、3 連で C F U を決定した。組織学のため、腎臓組織を室温、1 0 % ホルマリン中で 2 4 時間インキュベートした。組織をパラフィンに包埋し、薄切片を作製し、ヘマトキシリン / エオシン染色して顕微鏡で検査した。

【 0 2 2 0 】

3 週齢の C D 1 マウスを、注射容積 2 0 0 μ l 中の 5 μ g 用量の抗原を用いた腹腔内注射により 0 および 1 1 日目に免疫化した。0 および 2 0 日目にマウスから採血し、2 1 日目に S . a u r e u s でチャレンジした。2 5 日目に器官を採取した。次のスキームに従い 8 匹のマウス群において免疫化を行った。

【 0 2 2 1 】

群 1 - アラム (a l u m) 単独

群 2 - 5 型莢膜多糖単独

群 3 - 5 型莢膜多糖とアラム

群 4 - 5 型莢膜多糖 - C R M a d h 結合体（ロット 1）

群 5 - 5 型莢膜多糖 - C R M a d h 結合体（ロット 1）とアラム。

【 0 2 2 2 】

結合体は、5 型多糖に対し特異的な I g G 応答を誘導した。アラム処方物は応答を改善した（図 8）。結合体は、5 型多糖に対し特異的な I g M 応答も誘導した（図 9）。アラム結合体処方物はまた、腎感染症からの最良の防御をもたらした（図 1 0）。

【 0 2 2 3 】

免疫化研究 - 膿瘍モデル（2）

3 週齢の C D 1 マウスを、注射容積 2 0 0 μ l 中の 5 μ g 用量の抗原を用いた腹腔内注射により 1、1 4 および 2 8 日目に免疫化した。マウスから 0、2 7 および 3 7 日目に採血し、3 8 日目に S . a u r e u s でチャレンジした。4 2 日目に器官を採取した。次のスキームに従い 8 匹のマウス群において免疫化を行った。

【 0 2 2 4 】

群 1 - アラム単独

群 2 - 5 型莢膜多糖とアラム

群 3 - 5 型莢膜多糖 - C R M a d h 結合体（ロット 2）とアラム

群 4 - 5 型莢膜多糖 - C R M a d h 結合体（ロット A'）とアラム。

【 0 2 2 5 】

結合体は、5 型多糖に対する特異的な I g G 応答を誘導した。本発明の結合体（ロット A' で表す）は、特に高い力価を生じた（図 1 1）。本発明の結合体は、腎感染症からの最良の防御をもたらした（図 1 2）。

10

20

30

40

50

【0226】

免疫化研究 - 膿瘍モデル (3)

3週齢のCD1マウスを、注射容積200 μ l中の5 μ g用量(またはロットAの場合は0.5 μ g用量)の抗原を用いた腹腔内注射により1、14および28日目に免疫化した。0、27および37日目にマウスから採血し、38日目に*S. aureus*(液体または固体培地において増殖)でチャレンジした。42日目に器官を採取した。次のスキームに従い8匹のマウス群において免疫化を行った。

【0227】

群1 - アラム単独

群2 - 5型莢膜多糖とアラム

群3 - 5型莢膜多糖 - CRMadh結合体(ロット2)とアラム

群4 - 5型莢膜多糖 - CRMadh結合体(ロット3)とアラム

群5 - 5型莢膜多糖 - CRMadh結合体(ロットA')とアラム

群6 - 5型莢膜多糖 - CRM結合体(ロットA)とアラム

群7 - 5型莢膜多糖 - CRM結合体(ロットB)とアラム。

10

【0228】

本発明の結合体(ロットA'、AおよびBで表す)は、腎感染症からの防御をもたらした(図13Aおよび13B)。本発明の結合体は、IgM抗体の低い力価をもたらしつつ特異的なIgG抗体の高い力価をもたらした(図14)。

20

【0229】

免疫化研究 - 膿瘍モデル (4)

3週齢のCD1マウスを、注射容積200 μ l中の1 μ g用量の抗原を用いた腹腔内注射により1および14日目に免疫化した。0、13および27日目にマウスから採血し、28日目に*S. aureus*でチャレンジした。32日目に器官を採取した。次のスキームに従い8または9匹のマウス群において免疫化を行った。

【0230】

群1 - 8型莢膜多糖 - CRM結合体(ロット)とアラム

群2 - 8型莢膜多糖 - CRM結合体(ロット)とMF59

群3 - アラム単独

群4 - MF59単独。

30

【0231】

本発明の結合体は、腎感染症からの防御をもたらした(図15)。アラム処方物は、MF59処方物よりも良好な防御をもたらした。

【0232】

免疫化研究 - 致死モデル (1)

全般的なアッセイのプロトコール: 後述される計画に従ってマウスを免疫化し、*S. aureus*の細菌懸濁物の腹腔内注射によりチャレンジした。*S. aureus*の培養物を遠心分離し、2回洗浄し、チャレンジ前にPBSに希釈した。所望の接種にはさらなる希釈が必要とされ、これは寒天プレーティングおよびコロニー形成によって実験的に立証された。動物を14日間モニターし、致死性の疾患を記録した。

40

【0233】

CD1マウスを、注射容積200 μ l中の5 μ g用量の抗原を用いた腹腔内注射により免疫化した。5 \times 10⁸CFUの5型*S. aureus*によるチャレンジ前に、次のスキームに従い12匹のマウス群において免疫化を行った。

【0234】

群1 - PBSとアラム

群2 - 5型莢膜多糖 - CRM結合体(ロットC)とアラム

群3 - 5型莢膜多糖 - CRMadh結合体(ロット3)とアラム。

【0235】

本発明の結合体(ロットCで表す)は、より高い生存率をもたらした(図16)。

50

【0236】

免疫化研究 - 致死モデル (2)

CD1マウスを、注射容積200μl中の2μg(糖)および10μ(タンパク質、必要に応じて存在)用量の抗原を用いた腹腔内注射により免疫化した。5×10⁸CFUの5型S.aureusによるチャレンジ前に、次のスキームに従い12匹のマウス群において免疫化を行った。

【0237】

群1 - PBSとアラム

群2 - 5型莢膜多糖 - CRM結合体(ロットD)とアラム

群3 - 5型莢膜多糖 - CRMadh結合体(ロット4)とアラム

群4 - 5型莢膜多糖 - CRM結合体(ロットD)とEsxAB、Sta006およびSta011タンパク質ならびにアラム

群5 - 5型莢膜多糖 - CRM結合体(ロットD)とHlaH35L、Sta006およびSta011タンパク質ならびにアラム。

【0238】

生存率データを表5に提示する。

【0239】

【表5】

群	時間(日)													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1	100	25	17	17	17	17	17	17	17	17	8	0	0	0
2	100	50	50	50	50	50	50	50	50	42	42	42	42	42
3	100	50	42	42	42	42	42	42	42	33	33	33	33	33
4	100	67	67	67	67	67	67	67	67	67	67	67	67	67
5	100	100	100	100	100	100	83	83	75	75	75	75	75	75

表 5

本発明の結合体(ロットDで表す)は、より高い生存率をもたらした。生存率は、S.aureusタンパク質抗原の付加によって増強された。

【0240】

免疫化研究 - 致死モデル (3)

CD1マウスを、注射容積200μl中の2μg(5型多糖)、1μg(8型多糖、必要に応じて存在)および10μ(タンパク質、必要に応じて存在)用量の抗原を用いた腹腔内注射により免疫化した。5×10⁸CFUの5型S.aureusによるチャレンジ前に、次のスキームに従い12匹のマウス群において免疫化を行った。

【0241】

群1 - PBSとアラム

群2 - 5型莢膜多糖 - CRM結合体(ロットE)とEsxAB、Sta006およびSta011タンパク質ならびにアラム

群3 - 5型莢膜多糖 - CRM結合体(ロットE)および8型莢膜多糖 - CRM結合体(ロット)とEsxAB、Sta006およびSta011タンパク質ならびにアラム

群4 - 5型莢膜多糖 - CRM結合体(ロットE)および8型莢膜多糖 - CRM結合体(ロット)とEsxAB、Sta011およびSta073タンパク質ならびにアラム。

【0242】

生存率データを表7に提示する。

【0243】

【表 7】

群	時間(日)													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1	100	50	42	42	42	42	42	42	42	42	33	33	33	33
2	100	42	42	42	42	42	42	42	42	42	33	33	33	33
3	100	75	75	75	75	75	75	75	75	75	58	50	50	50
4	100	92	92	83	83	83	83	83	83	83	75	75	75	75

表 7

免疫化研究 - 致死モデル (4)

C D 1 マウスを、注射容積 200 μ l 中の 2 μ g (5 型莢膜多糖)、1 μ g (8 型莢膜多糖、必要に応じて存在) および 10 μ (タンパク質、必要に応じて存在) 用量の抗原を用いた腹腔内注射により免疫化した。5 \times 10⁸ C F U の 5 型 *S. aureus* によるチャレンジ前に、次のスキームに従い 12 匹のマウス群において免疫化を行った。

【0244】

群 1 - P B S とアラム

群 2 - 5 型莢膜多糖 - C R M 結合体 (ロット E) および 8 型莢膜多糖 - C R M 結合体 (ロット 第一の用量、ロット 第二の用量) と E s x A B、S t a 0 0 6 および S t a 0 1 1 タンパク質ならびにアラム

群 3 - 5 型莢膜多糖 - C R M 結合体 (ロット E) および 8 型莢膜多糖 - C R M 結合体 (ロット 第一の用量、ロット 第二の用量) とアラム

群 4 - 5 型莢膜多糖 - C R M 結合体 (ロット E) および 8 型莢膜多糖 - C R M 結合体 (ロット 第一の用量、ロット 第二の用量) と E s x A B タンパク質およびアラム

群 5 - 5 型莢膜多糖 - C R M 結合体 (ロット E) および 8 型莢膜多糖 - C R M 結合体 (ロット 第一の用量、ロット 第二の用量) と S t a 0 0 6 タンパク質およびアラム

群 6 - 5 型莢膜多糖 - C R M 結合体 (ロット E) および 8 型莢膜多糖 - C R M 結合体 (ロット 第一の用量、ロット 第二の用量) と S t a 0 1 1 タンパク質およびアラム

群 7 - 5 型莢膜多糖 - C R M 結合体 (ロット E) および 8 型莢膜多糖 - C R M 結合体 (ロット 第一の用量、ロット 第二の用量) と S t a 0 0 6 および S t a 0 1 1 タンパク質ならびにアラム

群 8 - 5 型莢膜多糖 - C R M 結合体 (ロット E) と H l a H 3 5 L、S t a 0 0 6 および S t a 0 1 1 タンパク質ならびにアラム

群 9 - 5 型莢膜多糖 - C R M 結合体 (ロット E) と H l a H 3 5 L タンパク質およびアラム。

【0245】

生存率データを表 8 に提示する。

【0246】

10

20

30

40

【表 8】

群	時間(日)													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1	100	100	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13
2	100	88	75	75	63	63	63	50	50	50	50	50	50	50
3	100	100	63	63	38	38	38	38	38	38	38	38	38	38
4	100	100	75	75	75	75	75	75	63	50	50	25	25	25
5	100	100	50	50	50	50	50	38	38	38	38	38	38	38
6	100	100	25	25	25	25	25	25	25	25	25	13	13	13
7	100	88	63	63	63	63	63	50	50	50	50	50	50	50
8	100	100	100	100	88	88	88	88	88	75	75	75	75	75
9	100	88	88	63	38	38	38	38	38	13	13	13	13	13

表 8

10

20

本発明は単なる具体例として記載されており、本発明の範囲および精神から逸脱することなく改変できることが理解されるであろう。

【 0 2 4 7 】

【 数 1 】

参考文献

- [1] Fattom *et al.* (1990) *Infect Immun.* 58(7):2367-74.
- [2] Fattom *et al.* (1992) *Infect Immun.* 60(2):584-9.
- [3] Fattom *et al.* (1993) *Infect Immun.* 61(3):1023-32.
- [4] Fattom *et al.* (1996) *Infect Immun.* 64(5):1659-65.
- [5] Welch *et al.* (1996) *J Am Soc Nephrol.* 7(2):247-53.
- [6] Fattom *et al.* (1998) *Infect Immun.* 66(10):4588-92.
- [7] Fattom *et al.* (1993) *Vaccine* 17(2):126-33.
- [8] Fattom *et al.* (2002) *N Engl J Med.* 346(7):491-6. 10
- [9] Robbins *et al.* (2005) *Ann N Y Acad Sci.* 754:68-82.
- [10] Reynaud-Rondier *et al.* (1991) *FEMS Microbiology Immunology* 76:193-200.
- [11] Tollersrud *et al.* (2001) *Vaccine.* 19(28-29):3896-903.
- [12] WO03/061558.
- [13] Gilbert *et al.* (1994) *Vaccine.* 12(4):369-74.
- [14] Moreau *et al.* (1990) *Carbohydrate Res.* 339(5):285-91
- [15] Fournier *et al.* (1984) *Infect. Immun.* 45(1):87-93.
- [16] Jones (2005) *Carbohydrate Res.* 340(6):1097-106.
- [17] Lemercinier and Jones (1996) *Carbohydrate Res.* 296:83-96.
- [18] Jones and Lemercinier (2002) *J Pharm Biomed Anal.* 30(4):1233-47. 20
- [19] WO05/033148
- [20] WO 00/56357
- [21] Hestrin (1949) *J. Biol. Chem.* 180:249-261.
- [22] Konadu *et al.* (1994) *Infect. Immun.* 62:5048-5054.
- [23] Gilbert *et al.* (1994) *J. Microb. Meth.* 20:39-46.
- [24] US patent application 61/256, 905 'PURIFICATION OF *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* TYPE 5 AND TYPE 8 CAPSULAR SACCHARIDES' (NOVARTIS AG). Assignee reference no. 53615-US-PSP.
- [25] Ramsay *et al.* (2001) *Lancet* 357(9251):195-196.
- [26] Lindberg (1999) *Vaccine* 17 Suppl 2:S28-36.
- [27] Buttery & Moxon (2000) *J R Coll Physicians Lond* 34:163-168. 30
- [28] Ahmad & Chapnick (1999) *Infect Dis Clin North Am* 13:113-33, vii.
- [29] Goldblatt (1998) *J. Med. Microbiol.* 47:563-567.
- [30] European patent 0477508.
- [31] US patent 5,306,492.
- [32] WO98/42721.
- [33] Dick *et al.* in *Conjugate Vaccines* (eds. Cruse *et al.*) Karger, Basel, 1989, 10:48-114.
- [34] Hermanson *Bioconjugate Techniques*, Academic Press, San Diego (1996) ISBN: 0123423368.
- [35] *Research Disclosure*, 453077 (Jan 2002)
- [36] Herbelin *et al.* (1997) *J Dairy Sci.* 80(9):2025-34.
- [37] EP-A-0372501.
- [38] EP-A-0378881. 40
- [39] EP-A-0427347.
- [40] WO93/17712
- [41] WO94/03208.
- [42] WO98/58668.
- [43] EP-A-0471177.

【 0 2 4 8 】

【 数 2 】

- [44] WO91/01146
 [45] Falugi *et al.* (2001) *Eur J Immunol* 31:3816-3824.
 [46] Baraldo *et al.* (2004) *Infect Immun* 72(8):4884-7.
 [47] EP-A-0594610.
 [48] Ruan *et al.* (1990) *J Immunol* 145:3379-3384.
 [49] WO00/56360.
 [50] WO02/091998.
 [51] Kuo *et al.* (1995) *Infect Immun* 63:2706-13.
 [52] Michon *et al.* (1998) *Vaccine*. 16:1732-41. 10
 [53] WO01/72337
 [54] WO00/61761.
 [55] WO2004/041157.
 [56] WO02/34771.
 [57] WO99/42130.
 [58] WO2004/011027.
 [59] WO2007/113222
 [60] US patent 6,045,805
 [61] US patents 6,027,733 & 6,274,144.
 [62] www.polymer.de
 [63] US patents 4,356,170 and 4,663,160 20
 [64] US patent 4711779.
 [65] WO00/10599.
 [66] US patent 4,057,685.
 [67] WO96/40242.
 [68] Lei *et al.* (2000) *Dev Biol (Basel)* 103:259-264.
 [69] WO00/38711; US patent 6,146,902.
 [70] WO2004/080490.
 [71] WO2006/032475.
 [72] WO2006/032500.
 [73] WO2006/065553. 30
 [74] WO2007/118979.
 [75] WO99/24578.
 [76] WO99/36544.
 [77] WO99/57280.
 [78] WO00/22430.
 [79] Tettelin *et al.* (2000) *Science* 287:1809-1815.
 [80] WO96/29412.
 [81] Pizza *et al.* (2000) *Science* 287:1816-1820.
 [82] WO01/52885.
 [83] Bjune *et al.* (1991) *Lancet* 338(8775):1093-1096.
 [84] Fukasawa *et al.* (1999) *Vaccine* 17:2951-2958. 40
 [85] Rosenqvist *et al.* (1998) *Dev. Biol. Stand.* 92:323-333.
 [86] Costantino *et al.* (1992) *Vaccine* 10:691-698.
 [87] WO03/007985.
 [88] Watson (2000) *Pediatr Infect Dis J* 19:331-332.
 [89] Rubin (2000) *Pediatr Clin North Am* 47:269-285, v.

【 0 2 4 9 】

【 数 3 】

- [90] Jedrzejak (2001) *Microbiol Mol Biol Rev* 65:187-207.
- [91] Bell (2000) *Pediatr Infect Dis J* 19:1187-1188.
- [92] Iwarson (1995) *APMIS* 103:321-326.
- [93] Gerlich *et al.* (1990) *Vaccine* 8 Suppl:S63-68 & 79-80.
- [94] Hsu *et al.* (1999) *Clin Liver Dis* 3:901-915.
- [95] Gustafsson *et al.* (1996) *N. Engl. J. Med.* 334:349-355.
- [96] Rappuoli *et al.* (1991) *TIBTECH* 9:232-238.
- [97] *Vaccines* (2004) eds. Plotkin & Orenstein. ISBN 0-7216-9688-0.
- [98] WO02/02606. 10
- [99] Kalman *et al.* (1999) *Nature Genetics* 21:385-389.
- [100] Read *et al.* (2000) *Nucleic Acids Res* 28:1397-406.
- [101] Shirai *et al.* (2000) *J. Infect. Dis.* 181(Suppl 3):S524-S527.
- [102] WO99/27105.
- [103] WO00/27994.
- [104] WO00/37494.
- [105] WO99/28475.
- [106] Ross *et al.* (2001) *Vaccine* 19:4135-4142.
- [107] Sutter *et al.* (2000) *Pediatr Clin North Am* 47:287-308.
- [108] Zimmerman & Spann (1999) *Am Fam Physician* 59:113-118, 125-126.
- [109] Dreesen (1997) *Vaccine* 15 Suppl:S2-6. 20
- [110] *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1998 Jan 16;47(1):12, 19.
- [111] McMichael (2000) *Vaccine* 19 Suppl 1:S101-107.
- [112] WO02/34771.
- [113] Dale (1999) *Infect Dis Clin North Am* 13:227-43, viii.
- [114] Ferretti *et al.* (2001) *PNAS USA* 98: 4658-4663.
- [115] WO03/093306.
- [116] WO2004/018646.
- [117] WO2004/041157.
- [118] Ichiman and Yoshida (1981) *J. Appl. Bacteriol.* 51:229.
- [119] US4197290 30
- [120] Ichiman *et al.* (1991) *J. Appl. Bacteriol.* 71:176.
- [121] Robinson & Torres (1997) *Seminars in Immunology* 9:271-283.
- [122] Donnelly *et al.* (1997) *Annu Rev Immunol* 15:617-648.
- [123] Scott-Taylor & Dalgleish (2000) *Expert Opin Investig Drugs* 9:471-480.
- [124] Apostolopoulos & Plebanski (2000) *Curr Opin Mol Ther* 2:441-447.
- [125] Ilan (1999) *Curr Opin Mol Ther* 1:116-120.
- [126] Dubensky *et al.* (2000) *Mol Med* 6:723-732.
- [127] Robinson & Pertmer (2000) *Adv Virus Res* 55:1-74.
- [128] Donnelly *et al.* (2000) *Am J Respir Crit Care Med* 162(4 Pt 2):S190-193.
- [129] Davis (1999) *Mt. Sinai J. Med.* 66:84-90.
- [130] Paoletti *et al.* (2001) *Vaccine* 19:2118-2126. 40
- [131] WO00/56365.
- [132] Gennaro (2000) *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*. 20th edition, ISBN: 0683306472.
- [133] WO03/009869.
- [134] Almeida & Alpar (1996) *J. Drug Targeting* 3:455-467.
- [135] Agarwal & Mishra (1999) *Indian J Exp Biol* 37:6-16.

【 0 2 5 0 】

【 数 4 】

- [136] WO00/53221.
- [137] Jakobsen *et al.* (2002) *Infect Immun* 70:1443-1452.
- [138] Bergquist *et al.* (1998) *APMIS* 106:800-806.
- [139] Baudner *et al.* (2002) *Infect Immun* 70:4785-4790.
- [140] Ugozzoli *et al.* (2002) *J Infect Dis* 186:1358-1361.
- [141] *Vaccine Design...* (1995) eds. Powell & Newman. ISBN: 030644867X. Plenum.
- [142] WO00/23105.
- [143] WO90/14837.
- [144] Podda (2001) *Vaccine* 19:2673-80. 10
- [145] Frey *et al.* (2003) *Vaccine* 21:4234-7.
- [146] US Patent 6,299,884.
- [147] US Patent 6,451,325.
- [148] US patent 5,057,540.
- [149] WO96/33739.
- [150] EP-A-0109942.
- [151] WO96/11711.
- [152] WO00/07621.
- [153] Barr *et al.* (1998) *Advanced Drug Delivery Reviews* 32:247-271.
- [154] Sjolanderet *et al.* (1998) *Advanced Drug Delivery Reviews* 32:321-338.
- [155] Niikura *et al.* (2002) *Virology* 293:273-280. 20
- [156] Lenz *et al.* (2001) *J Immunol* 166:5346-5355.
- [157] Pinto *et al.* (2003) *J Infect Dis* 188:327-338.
- [158] Gerber *et al.* (2001) *Virology* 75:4752-4760.
- [159] WO03/024480
- [160] WO03/024481
- [161] Gluck *et al.* (2002) *Vaccine* 20:B10-B16.
- [162] EP-A-0689454.
- [163] Johnson *et al.* (1999) *Bioorg Med Chem Lett* 9:2273-2278.
- [164] Evans *et al.* (2003) *Expert Rev Vaccines* 2:219-229.
- [165] Meraldi *et al.* (2003) *Vaccine* 21:2485-2491. 30
- [166] Pajak *et al.* (2003) *Vaccine* 21:836-842.
- [167] Kandimalla *et al.* (2003) *Nucleic Acids Research* 31:2393-2400.
- [168] WO02/26757.
- [169] WO99/62923.
- [170] Krieg (2003) *Nature Medicine* 9:831-835.
- [171] McCluskie *et al.* (2002) *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 32:179-185.
- [172] WO98/40100.
- [173] US patent 6,207,646.
- [174] US patent 6,239,116.
- [175] US patent 6,429,199.
- [176] Kandimalla *et al.* (2003) *Biochemical Society Transactions* 31 (part 3):654-658. 40
- [177] Blackwell *et al.* (2003) *J Immunol* 170:4061-4068.
- [178] Krieg (2002) *Trends Immunol* 23:64-65.
- [179] WO01/95935.
- [180] Kandimalla *et al.* (2003) *BBRC* 306:948-953.
- [181] Bhagat *et al.* (2003) *BBRC* 300:853-861.

【 0 2 5 1 】

【 数 5 】

- [182] WO03/035836.
- [183] WO95/17211.
- [184] WO98/42375.
- [185] Beignon *et al.* (2002) *Infect Immun* 70:3012-3019.
- [186] Pizza *et al.* (2001) *Vaccine* 19:2534-2541.
- [187] Pizza *et al.* (2000) *Int J Med Microbiol* 290:455-461.
- [188] Schariton-Kersten *et al.* (2000) *Infect Immun* 68:5306-5313.
- [189] Ryan *et al.* (1999) *Infect Immun* 67:6270-6280.
- [190] Partidos *et al.* (1999) *Immunol Lett* 67:209-216. 10
- [191] Peppoloni *et al.* (2003) *Expert Rev Vaccines* 2:285-293.
- [192] Pine *et al.* (2002) *J Control Release* 85:263-270.
- [193] Domenighini *et al.* (1995) *Mol Microbiol* 15:1165-1167.
- [194] WO99/40936.
- [195] WO99/44636.
- [196] Singh *et al.* (2001) *J Cont Release* 70:267-276.
- [197] WO99/27960.
- [198] US patent 6,090,406
- [199] US patent 5,916,588
- [200] EP-A-0626169.
- [201] WO99/52549. 20
- [202] WO01/21207.
- [203] WO01/21152.
- [204] Andrianov *et al.* (1998) *Biomaterials* 19:109-115.
- [205] Payne *et al.* (1998) *Adv Drug Delivery Review* 31:185-196.
- [206] Stanley (2002) *Clin Exp Dermatol* 27:571-577.
- [207] Jones (2003) *Curr Opin Investig Drugs* 4:214-218.
- [208] WO04/60308
- [209] WO04/64759.
- [210] WO99/11241.
- [211] WO94/00153. 30
- [212] WO98/57659.
- [213] European patent applications 0835318, 0735898 and 0761231.
- [214] Joyce *et al.* (2003) *Carbohydrate Research* 338 :903.
- [215] Maira-Litran *et al.* (2002) *Infect. Immun.* 70:4433.
- [216] WO2004/043407.
- [217] WO2007/113224.
- [218] WO2004/043405
- [219] WO98/10788.
- [220] WO2007/053176.
- [221] WO2007/113222.
- [222] WO2005/009379. 40
- [223] WO2009/029132.
- [224] WO2008/079315.
- [225] WO2005/086663.
- [226] WO2005/115113.
- [227] WO2006/033918.

【 0 2 5 2 】

【 数 6 】

- [228] WO2006/078680.
- [229] Kuroda *et al.* (2001) *Lancet* 357(9264):1225-1240; see also pages 1218-1219.
- [230] Sjudahl (1977) *J. Biochem.* 73:343-351.
- [231] Uhlen *et al.* (1984) *J. Biol. Chem.* 259:1695-1702 & 13628 (Corr.).
- [232] Schneewind *et al.* (1992) *Cell* 70:267-281.
- [233] DeDent *et al.* (2008) *EMBO J.* 27:2656-2668.
- [234] Sjoquist *et al.* (1972) *Eur. J. Biochem.* 30:190-194.
- [235] DeDent *et al.* (2007) *J. Bacteriol.* 189:4473-4484.
- [236] Deisenhofer *et al.*, (1978) *Hoppe-Seyh Zeitsch. Physiol. Chem.* 359:975-985. 10
- [237] Deisenhofer (1981) *Biochemistry* 20:2361-2370.
- [238] Graille *et al.* (2000) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 97:5399-5404.
- [239] O'Seaghdha *et al.* (2006) *FEBS J.* 273:4831-41.
- [240] Gomez *et al.* (2006) *J. Biol. Chem.* 281:20190-20196.
- [241] WO2007/071692.
- [242] Sebulsky & Heinrichs (2001) *J Bacteriol* 183:4994-5000.
- [243] Sebulsky *et al.* (2003) *J Biol Chem* 278:49890-900.
- [244] WO2005/009378.
- [245] Rable & Wardenburg (2009) *Infect Immun* 77:2712-8.
- [246] WO2007/145689.
- [247] WO2009/029831. 20
- [248] WO2005/079315.
- [249] WO2008/152447.
- [250] Kuklin *et al.* (2006) *Infect Immun.* 74(4):2215-23.
- [251] WO2005/009379.
- [252] Gennaro (2000) *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*. 20th edition, ISBN: 0683306472.
- [253] *Methods In Enzymology* (S. Colowick and N. Kaplan, eds., Academic Press, Inc.)
- [254] *Handbook of Experimental Immunology*, Vols. I-IV (D.M. Weir and C.C. Blackwell, eds, 1986, Blackwell Scientific Publications)
- [255] Sambrook *et al.* (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd edition (Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- [256] *Handbook of Surface and Colloidal Chemistry* (Birdi, K.S. ed., CRC Press, 1997) 30
- [257] Ausubel *et al.* (eds) (2002) *Short protocols in molecular biology*, 5th edition (Current Protocols).
- [258] *Molecular Biology Techniques: An Intensive Laboratory Course*, (Ream *et al.*, eds., 1998, Academic Press)
- [259] *PCR (Introduction to Biotechniques Series)*, 2nd ed. (Newton & Graham eds., 1997, Springer Verlag)
- [260] *Current Protocols in Molecular Biology* (F.M. Ausubel *et al.*, eds., 1987) Supplement 30
- [261] Smith & Waterman (1981) *Adv. Appl. Math.* 2: 482-489.
- [262] Geysen *et al.* (1984) *PNAS USA* 81:3998-4002.
- [263] Carter (1994) *Methods Mol Biol* 36:207-23.
- [264] Jameson, BA *et al.* 1988, *CABIOS* 4(1):181-186. 40
- [265] Raddizzani & Hammer (2000) *Brief Bioinform* 1(2):179-89.
- [266] Bublil *et al.* (2007) *Proteins* 68(1):294-304.
- [267] De Lalla *et al.* (1999) *J. Immunol.* 163:1725-29.
- [268] Kwok *et al.* (2001) *Trends Immunol* 22:583-88.
- [269] Brusci *et al.* (1998) *Bioinformatics* 14(2):121-30

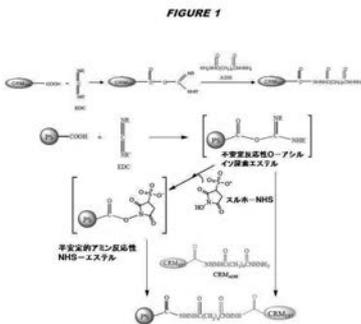
【 0 2 5 3 】

【数 7】

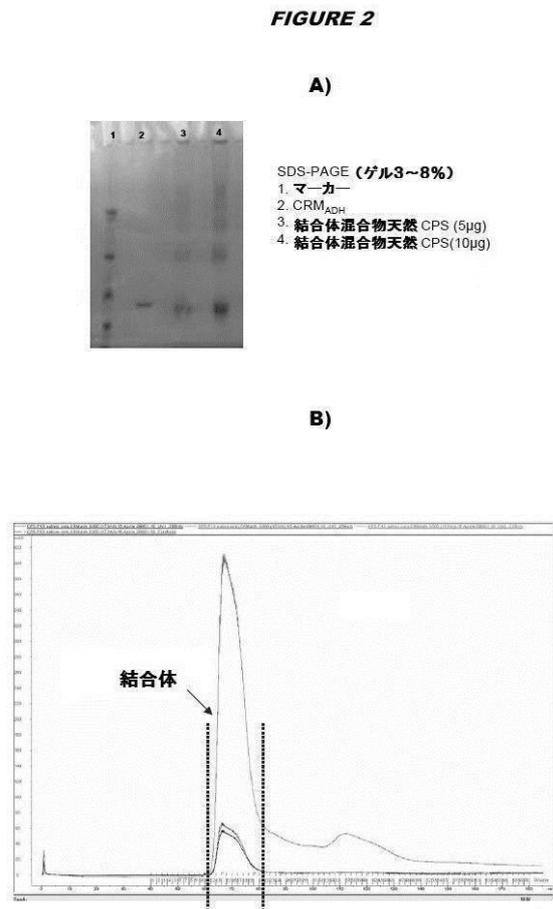
[270] Meister *et al.* (1995) *Vaccine* 13(6):581-91.
 [271] Roberts *et al.* (1996) *AIDS Res Hum Retroviruses* 12(7):593-610.
 [272] Maksyutov & Zagrebelnaya (1993) *Comput Appl Biosci* 9(3):291-7.
 [273] Feller & de la Cruz (1991) *Nature* 349(6311):720-1.
 [274] Hopp (1993) *Peptide Research* 6:183-190.
 [275] Welling *et al.* (1985) *FEBS Lett.* 188:215-218.
 [276] Davenport *et al.* (1995) *Immunogenetics* 42:392-297.
 [277] Tsurui & Takahashi (2007) *J Pharmacol Sci.* 105(4):299-316.
 [278] Tong *et al.* (2007) *Brief Bioinform.* 8(2):96-108.
 [279] Schirle *et al.* (2001) *J Immunol Methods.* 257(1-2):1-16.
 [280] Chen *et al.* (2007) *Amino Acids* 33(3):423-8.
 [281] Bardotti *et al.* (2008) *Vaccine.* 26(18):2284-96.

10

【図 1】

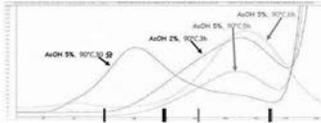


【図 2】



【 図 6 】

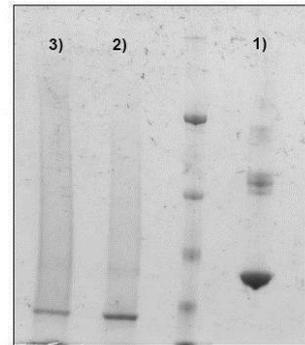
FIGURE 6



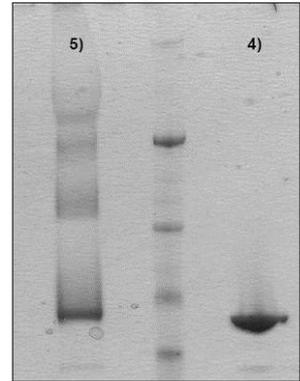
【 図 7 】

FIGURE 7

- 1) CRMadh (5 µg)
- 2) 加水分解 30'-CRMadh 結合体 (2.5 µg)
- 3) 加水分解 3h-CRMadh 結合体 (2.5 µg)

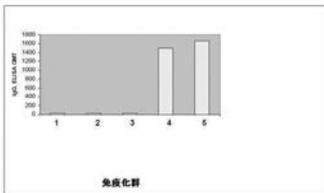


- 4) CRM (5 µg)
- 5) 加水分解 5h-CRM 結合体 (2.5 µg)



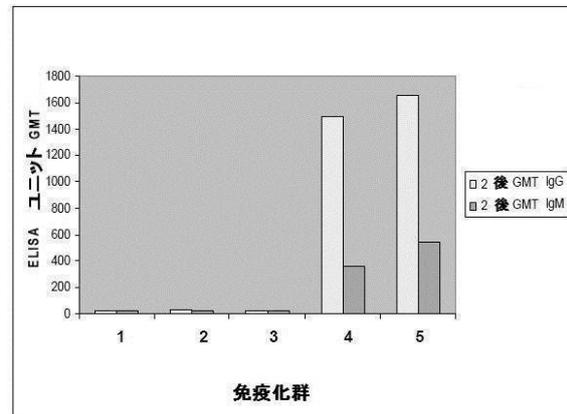
【 図 8 】

FIGURE 8



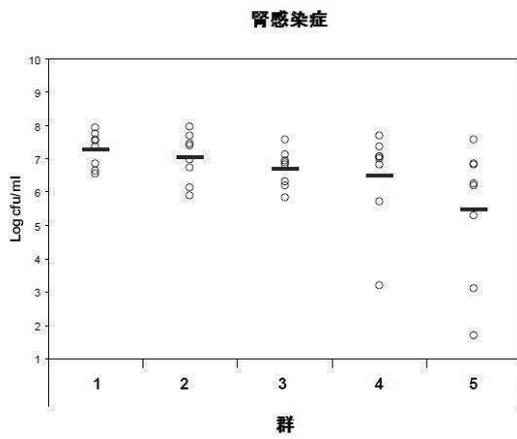
【 図 9 】

FIGURE 9



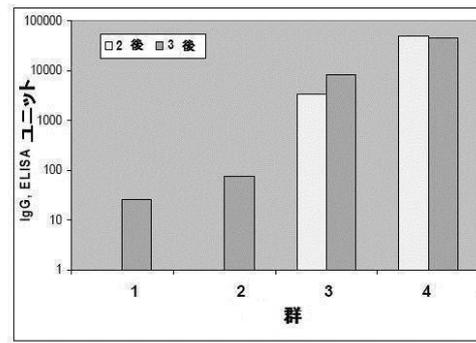
【 図 1 0 】

FIGURE 10



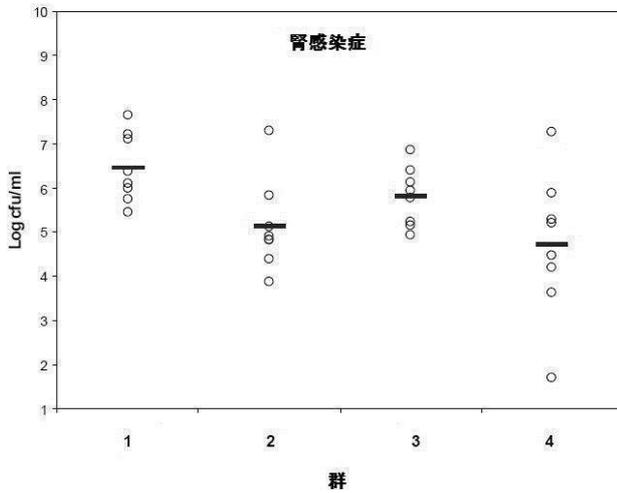
【 図 1 1 】

FIGURE 11



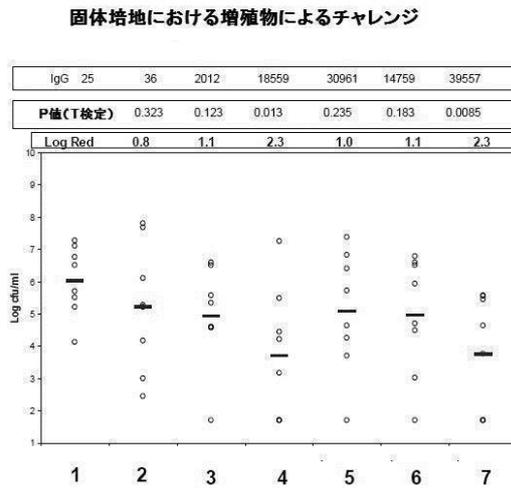
【 図 1 2 】

FIGURE 12



【 図 1 3 A 】

FIGURE 13A

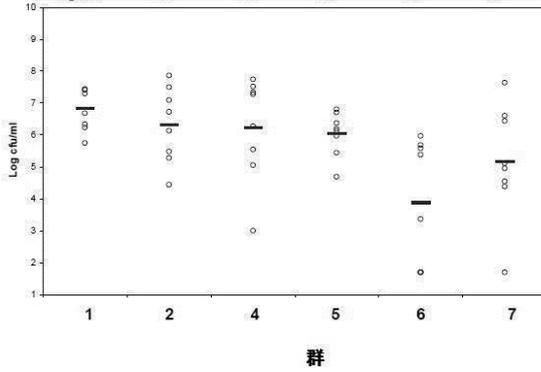


【 図 1 3 B 】

FIGURE 13B

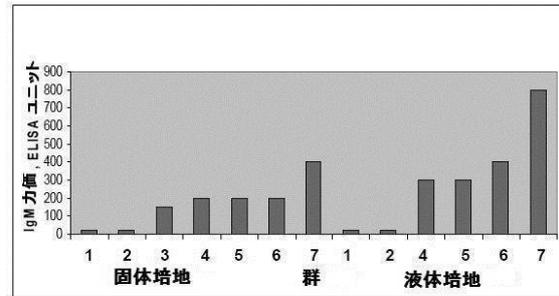
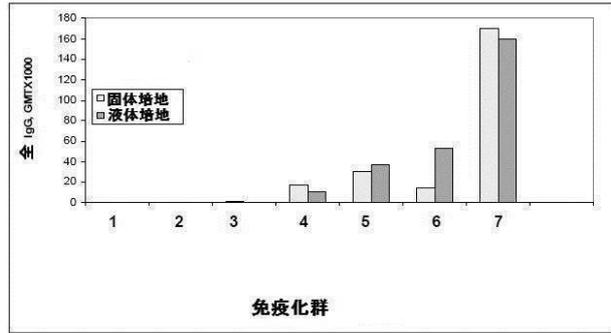
液体培地における増殖物によるチャレンジ

IgG	25	25	8731		
P値(T検定)	0.306	0.347	0.037	0.00133	0.029
Log Red	0.5	0.6	0.8	2.9	1.7



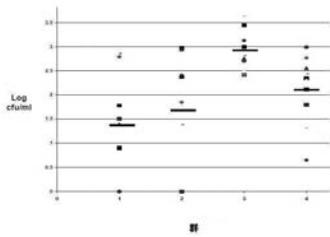
【 図 1 4 】

FIGURE 14



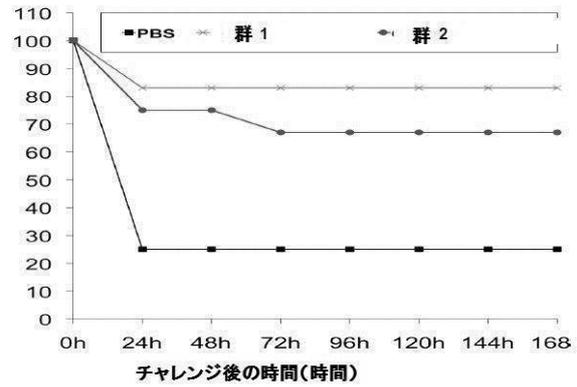
【 図 1 5 】

FIGURE 15



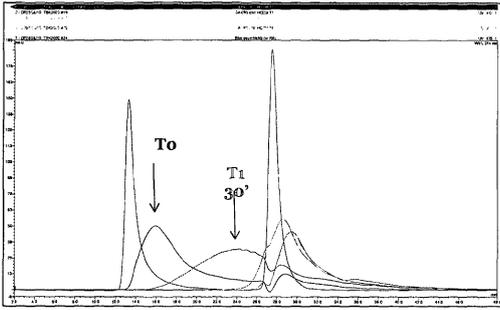
【 図 1 6 】

FIGURE 16



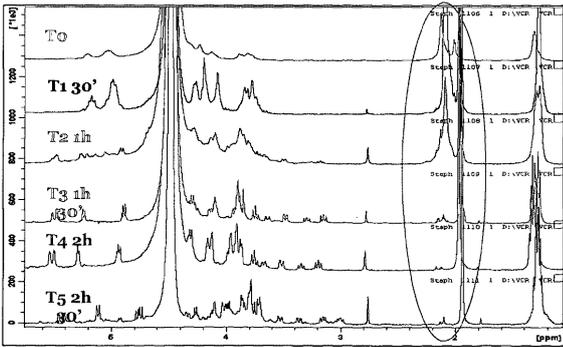
【 図 17 】

FIGURE 17



【 図 18 】

FIGURE 18



【 配列表 】

2017214601000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
A 6 1 P 43/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 0 5
		A 6 1 P	43/00	Z N A

(72)発明者 パオロ コスタンティーノ
 イタリア国 イ - 5 3 1 0 0 シエナ, ヴィア フィオレンティーナ, 1, ノバルティス
 ヴァクシンズ

(72)発明者 マリア ロザリア ロマーノ
 イタリア国 イ - 5 3 1 0 0 シエナ, ヴィア フィオレンティーナ, 1, ノバルティス
 ヴァクシンズ

Fターム(参考) 4C076 AA95 CC06 CC41 EE30 EE59
 4C085 AA03 BA01 EE01
 4C090 AA02 AA05 AA09 BA94 BB65 BB99 BD31 BD36 BD41 CA31
 CA34 CA35 CA39 CA46 DA09 DA22 DA23

【外国語明細書】

2017214601000001.pdf